明　細　書

発明の名称 ： 抗原の消失を促進する抗原結合分子

技術分野

[0001] 本発明は、結合する抗原の細胞内への取込が促進された抗原結合分子、一分子当りの結合できる抗原の数が増加した抗原結合分子、薬物動態が改善された抗原結合分子、細胞外で結合した抗原を細胞内で解離することが促進された抗原結合分子、抗原と結合していない状態での細胞外への放出が促進された抗原結合分子、血漿中の総抗原濃度または遊離抗原濃度を減少させる機能を有する抗原結合分子、当該抗原結合分子を含む医薬組成物、およびそれらの製造方法を提供する。

背景技術

[0002] 抗体は血漿中での安定性が高く、副作用も少ないことから医薬品として注目されている。中でもIgG型の抗体医薬は多数上市されており、現在も数多くの抗体医薬が開発されている（非特許文献１および非特許文献２）。一方、第二世代の抗体医薬に適用可能な技術として様々な技術が開発されており、エフェクター機能、抗原結合能、薬物動態、安定性を向上させる、あるいは、免疫原性リスクを低減させる技術等が報告されている（非特許文献３）。抗体医薬は一般に投与量が非常に高いため、皮下投与製剤の作製が困難であること、製造コストが高いこと等が課題として考えられる。抗体医薬の投与量を低減させる方法として、抗体の薬物動態を改善する方法と、抗体と抗原の親和性（アフィニティー）を向上させる方法が考えられる。

[0003] 抗体の薬物動態を改善する方法として、定常領域の人工的なアミノ酸置換が報告されている（非特許文献４および５）。抗原結合能、抗原中和能を増強させる技術として、アフィニティーマチュレーション技術（非特許文献６）が報告されており、可変領域のCDR領域などのアミノ酸に変異を導入することで抗原に対する結合活性を増強することが可能である。抗原結合能の増強によりin vitroの生物活性を向上させる、あるいは投与量を低減することが

可能であり、さらにin vivo（生体内）での薬効を向上させることも可能である（非特許文献７）。

[0004] 一方、抗体一分子あたりが中和できる抗原量はアフィニティーに依存し、アフィニティーを強くすることで少ない抗体量で抗原を中和することが可能であり、様々な方法で抗体のアフィニティーを強くすることが可能である（非特許文献６）。さらに抗原に共有結合的に結合し、アフィニティーを無限大にすることができれば一分子の抗体で一分子の抗原（二価の場合は二抗原）を中和することが可能である。しかし、これまでの方法では一分子の抗体で一分子の抗原（二価の場合は二抗原）の化学量論的な中和反応が限界であり、抗原量以下の抗体量で抗原を完全に中和することは不可能であった。つまり、アフィニティーを強くする効果には限界が存在していた（非特許文献９）。中和抗体の場合、その中和効果を一定期間持続させるためには、その期間に生体内で産生される抗原量以上の抗体量が投与される必要があり、上述の抗体の薬物動態改善、あるいは、アフィニティーマチュレーション技術だけでは、必要抗体投与量の低減には限界が存在していた。そのため、抗原量以下の抗体量で抗原の中和効果を目的期間持続するためには、一つの抗体で複数の抗原を中和する必要がある。これを達成する新しい方法として、最近、抗原に対してpH依存的に結合する抗体が報告された（特許文献１）。抗原に対して血漿中の中性条件下においては強く結合し、エンドソーム内の酸性条件下において抗原から解離するpH依存的抗原結合抗体はエンドソーム内で抗原から解離することが可能である。pH依存的抗原結合抗体は、抗原を解離した後に抗体がFcRnによって血漿中にリサイクルされると再び抗原に結合することが可能であるため、一つのpH依存的抗原結合抗体で複数の抗原に繰り返し結合することが可能となる。

[0005] また、抗原の血漿中滞留性は、FcRnに結合してリサイクルされる抗体と比較して非常に短い。このような血漿中滞留性が長い抗体がその抗原に結合すると、抗体抗原複合体の血漿中滞留性は抗体と同様に長くなる。そのため、抗原は抗体と結合することにより、むしろ血漿中滞留性が長くなり、血漿中

抗原濃度は上昇する。

[0006] このようにpH依存的抗原結合抗体は一つの抗体で複数の抗原に結合し、通常の抗体と比較して抗原の血漿中からの消失を促進することができるため、通常の抗体では成し得なかった作用を有する。しかしながら、これまでにこのpH依存的抗原結合抗体の抗原に繰り返し結合できる効果、および、抗原の血漿中からの消失を促進する効果をさらに向上させる抗体工学の手法は報告されていない。

[0007] IgG抗体はFcRnに結合することで長い血漿中滞留性を有する。IgGとFcRnの結合は酸性条件下（pH6.0）においてのみ認められ、中性条件下（pH7.4）においてはほとんど結合は認められない。IgG抗体は非特異的に細胞に取り込まれるが、エンドソーム内の酸性条件下においてエンドソーム内のFcRnに結合することで細胞表面上に戻り、血漿中の中性条件下においてFcRnから解離する。IgGのFc領域に変異を導入し、pH酸性域の条件下におけるFcRnに対する結合を失わせると、エンドソーム内から血漿中にリサイクルされなくなるため、抗体の血漿中滞留性は著しく損なわれる。IgG抗体の血漿中滞留性を改善する方法として、pH酸性域の条件下におけるFcRnに対する結合を向上させる方法が報告されている。IgG抗体のFc領域にアミノ酸置換を導入し、pH酸性域の条件下におけるFcRnに対する結合を向上させることで、エンドソーム内から血漿中へのリサイクル効率が上昇し、その結果、血漿中滞留性が改善する。

[0008] IgGクラスの抗体のエフェクター機能である抗体依存性細胞傷害活性（以下、ADCCと表記する）、補体依存性細胞傷害活性（以下、CDCと表記する）の研究は、これまでに多数行われ、ヒトIgGクラスの中では、IgG1サブクラスの抗体が最も高いADCC活性、CDC活性を有することが報告されている（非特許文献１３）。また、IgGクラスの抗体を介した標的細胞のファゴサイトーシスである抗体依存性細胞介在性ファゴサイトーシス（ADCP）も抗体のエフェクター機能の一つとして示唆されている（非特許文献１４、非特許文献１５）。IgG1サブクラスの抗体は、これらのエフェクター機能を腫瘍に対して発揮させることが可能であるため、癌抗原に対するほとんどの抗体医薬としてIgG1サブ

クラスの抗体が用いられている。

[0009] IgG抗体がADCC、ADCP活性を媒介するためには、IgG抗体のFc領域と、キラー細胞、ナチュラルキラー細胞、活性化されたマクロファージ等のエフェクター細胞表面上に存在する抗体レセプター（以下、Fcγレセプターまたは Fcγ Rと表記する）との結合が必要である。ヒトでは、Fcγレセプターのタンパク質ファミリーとして、FcγRIa、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa、FcγRIIIbのアイソフォームが報告されており、それぞれのアロタイプも報告されている（非特許文献１６）。

[0010] ADCCとADCPなどの細胞傷害性のエフェクター機能の増強は、抗癌抗体の抗腫瘍効果を増強するための有望な手段として注目されている。抗体の抗腫瘍効果を目的とするFcγレセプターを介したエフェクター機能の重要性は、マウスモデルを使って報告されている（非特許文献１７、非特許文献１８）。また、ヒトにおける臨床効果と、FcγRIIIaの高親和性多型（V158）と低親和性多型（F158）との間には相関が観察された（非特許文献１９）。これらの報告から、特定のFcγレセプターに対する結合が最適化されたFc領域を有する抗体は、より強力なエフェクター機能を媒介し、それにより効果的な抗腫瘍効果を発揮することが示唆される。FcγRIa、FcγRIIa、FcγRIIIa、FcγRIIIbを含む活性化受容体、FcγRIIbを含む阻害性受容体のそれぞれに対する抗体の親和性のバランスは、抗体のエフェクター機能を最適化する上で重要な要素である。活性化受容体に対する親和性を増強することによって、より強力なエフェクター機能を媒介する性質を抗体に付与する可能性があることから（非特許文献２０）、癌抗原に対する抗体医薬の抗腫瘍活性を増強あるいは向上させる抗体エンジニアリングの手法としてこれまで様々な報告がされている。

[0011] Fc領域とFcγレセプターの結合については、抗体のヒンジ領域及びCH2ドメイン内のいくつかのアミノ酸残基およびCH2ドメインに結合しているEUナンバリング297番目のAsnに付加される糖鎖が重要であることが示されている（非特許文献１３、非特許文献２１、非特許文献２２）。この結合箇所を中心に

、これまでに様々なFcγレセプター結合特性を持つFc領域の変異体が研究され、より高い活性化Fcγレセプターに対する親和性を有するFc領域変異体が得られている（特許文献２、特許文献３）。例えば、Lazarらは、ヒトIgG1のEUナンバリングで表される239位のSer、330位のAla、332位のIleをそれぞれAsp、Leu、Gluに置換することによって、ヒトFcγRIIIa（V158）に対するヒトIgG1の結合を約370倍まで増加させることに成功している（非特許文献２３、特許文献３）。この改変体は天然型と比べて、FcγRIIIaとFcγRIIbに対する結合の比（A/I比）が約9倍になっている。また、ShinkawaらはEUナンバリングで表される297位のAsnに付加される糖鎖のフコースを欠損させることによって、FcγRIIIaに対する結合を約100倍まで増加させることに成功している（非特許文献２４）。これらの方法によって、天然型ヒトIgG1と比較してヒトIgG1のADCC活性を大幅に向上させることが可能である。

[0012] このように、膜型抗原を標的とした抗体においては、Fcγレセプターに対する結合活性は細胞傷害活性に重要な役割を果たしていることから、細胞傷害活性が必要な場合、FcγRに対する結合活性が高いヒトIgG1のアイソタイプが用いられ、さらにFcγレセプターに対する結合活性を増強することにより細胞傷害活性を増強させられることは広く用いられている技術である。一方、可溶型抗原を標的とした抗体においては、Fcγレセプターに対する結合活性の果たす役割は知られておらず、Fcγレセプターに対する結合活性が高いヒトIgG1とFcγRに対する結合活性が低いヒトIgG2やヒトIgG4で効果の違いは無いと考えられてきた。そのため、これまでに可溶型抗原を標的とした抗体においてFcγレセプターに対する結合活性を増強することは試みられたことはなく、また、その効果について報告されたことは無い。

先行技術文献

特許文献

[0013] 特許文献1：WO2009/125825

特許文献2：WO2000/042072

特許文献3：WO2006/019447

非特許文献

[0014] 非特許文献1：Janice M Reichert, Clark J Rosensweig, Laura B Faden & Matthew C Dewitz, Monoclonal antibody successes in the clinic., Nat. Biotechnol. (2005) 23, 1073-1078

非特許文献2：Pavlou AK, Belsey MJ., The therapeutic antibodies market to 2008., Eur J Pharm Biopharm. (2005) 59 (3), 389-396

非特許文献3：Kim SJ, Park Y, Hong HJ., Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies., Mol Cells. (2005) 20 (1), 17-29

非特許文献4：Hinton PR, Xiong JM, Johlfs MG, Tang MT, Keller S, Tsurushita N., An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life., J. Immunol. (2006) 176 (1), 346-356

非特許文献5：Ghetie V, Popov S, Borvak J, Radu C, Matesoi D, Medesan C, Ober RJ, Ward ES., Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis., Nat. Biotechnol. (1997) 15 (7), 637-640

非特許文献6：Rajpal A, Beyaz N, Haber L, Cappuccilli G, Yee H, Bhatt RR, Takeuchi T, Lerner RA, Crea R., A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (2005) 102 (24), 8466-8471

非特許文献7：Wu H, Pfarr DS, Johnson S, Brewah YA, Woods RM, Patel NK, White WI, Young JF, Kiener PA., Development of Motavizumab, an Ultra-potent Antibody for the Prevention of Respiratory Syncytial Virus Infection in the Upper and Lower Respiratory Tract., J. Mol. Biol. (2007) 368, 652-665

非特許文献8：Hanson CV, Nishiyama Y, Paul S., Catalytic antibodies and their applications., Curr Opin Biotechnol. (2005) 16 (6), 631-636

非特許文献9：Rathanaswami P, Roalstad S, Roskos L, Su QJ, Lackie S, Babcook J., Demonstration of an in vivo generated sub-picomolar affini

ty fully human monoclonal antibody to interleukin-8., Biochem. Biophys. Res. Commun. (2005) 334 (4), 1004-1013

非特許文献10：Dall'Acqua WF, Woods RM, Ward ES, Palaszynski SR, Patel NK, Brewah YA, Wu H, Kiener PA, Langermann S., Increasing the affinity of a human IgG1 for the neonatal Fc receptor: biological consequences., J. Immunol. (2002) 169 (9), 5171-5180

非特許文献11：Yeung YA, Leabman MK, Marvin JS, Qiu J, Adams CW, Lien S, Starovasnik MA, Lowman HB., Engineering human IgG1 affinity to human neonatal Fc receptor: impact of affinity improvement on pharmacokinetics in primates., J. Immunol. (2009) 182 (12), 7663-7671

非特許文献12：Datta-Mannan A, Witcher DR, Tang Y, Watkins J, Wroblewski VJ., Monoclonal antibody clearance. Impact of modulating the interaction of IgG with the neonatal Fc receptor., J. Biol. Chem. (2007) 282 (3), 1709-1717

非特許文献13：Clark, M., Antibody Engineering IgG Effector Mechanisms., Chemical Immunology (1997) 65, 88-110

非特許文献14：Horton HM, Bernett MJ, Pong E, Peipp M, Karki S, Chu SY, Richards JO, Vostiar I, Joyce PF, Repp R, Desjarlais JR, Zhukovsky EA., Potent in vitro and in vivo activity of an Fc-engineered anti-CD19 monoclonal antibody against lymphoma and leukemia., Cancer Res. (2008) 68, 8049-8057

非特許文献15：Zalevsky J, Leung IW, Karki S, Chu SY, Zhukovsky EA, Desjarlais JR, Carmichael DF, Lawrence CE., The impact of Fc engineering on an anti-CD19 antibody: increased Fcγ receptor affinity enhances B-cell clearing in nonhuman primates., Blood (2009) 113, 3735-3743

非特許文献16：Jefferis R, Lund J., Interaction sites on human IgG-Fc for FcgammaR: current models., Immunol. Lett. (2002) 82, 57-65

非特許文献17：Clynes, R., Yoshizumi, T., Moroi, Y., Houghton, A.N., a

nd Ravetch, J.V., Fc Receptors are required for passive and active immunity to melanoma., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1998) 95, 652-656

非特許文献18：Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV., Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytoxicity against tumor targets., Nat. Med. (2000) 6, 443-446

非特許文献19：Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, Watier H., Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcgammaRIIIa gene., Blood (2002) 99, 754-758

非特許文献20：Nimmerjahn F, Ravetch JV., Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding., Science (2005) 310, 1510-1512

非特許文献21：Greenwood J, Clark M, Waldmann H., Structural motifs involved in human IgG antibody effector functions., Eur. J. Immunol. (1993) 23, 1098-1104

非特許文献22：Morgan A, Jones ND, Nesbitt AM, Chaplin L, Bodmer MW, Emtage JS., The N-terminal end of the CH2 domain of chimeric human IgG1 anti-HLA-DR is necessary for C1q, Fc gamma RI and Fc gamma RIII binding., Immunology (1995) 86, 319-324

非特許文献23：Lazar GA, Dang W, Karki S, Vafa O, Peng JS, Hyun L, Chan C, Chung HS, Eivazi A, Yoder SC, Vielmetter J, Carmichael DF, Hayes RJ, Dahiyat BI., Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. (2006) 103, 4005-4010

非特許文献24：Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosaka E, Kanda Y, Sakurada M, Uchida K, Anazawa H, Satoh M, Yamasaki M, Hanai N, Shitara K., The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosacchar

ides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity., J. Biol. Chem. (2003) 278, 3466-3473

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0015] 本発明はこのような状況に鑑みて為されたものであり、その目的は、結合する抗原の細胞内への取込が促進された抗原結合分子、一分子当りの結合できる抗原の数が増加した抗原結合分子、薬物動態が改善された抗原結合分子、細胞外で結合した抗原を細胞内で解離することが促進された抗原結合分子、抗原と結合していない状態での細胞外への放出が促進された抗原結合分子、血漿中の総抗原濃度または遊離抗原濃度を減少させる機能を有する抗原結合分子、当該抗原結合分子を含む医薬組成物、およびそれらの製造方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0016] 本発明者らは、上記の目的を達成するために鋭意研究を進めたところ、pH酸性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性を有し、イオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性が変化する抗原結合ドメイン、およびpH中性域の条件下で、EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgGのFc領域のFcγレセプターに対する結合ドメインよりもFcγレセプターに対する結合活性が高いFcγレセプター結合ドメインを含む抗原結合分子を創作した。また、本発明者らは、前記の抗原結合分子を、Fcγレセプターを発現する細胞に生体内または生体外で細胞に接触させる工程を含む、その結合する抗原の細胞内への取込を促進する方法、一分子の抗原結合分子が結合できる抗原の数を増加させる方法、抗原結合分子の薬物動態を改善する方法、細胞外で抗原結合分子に結合した抗原の細胞内での抗原結合分子からの解離を促進する方法、抗原と結合していない状態での細胞外への放出を促進する方法、および、血漿中の総抗原濃度または遊離抗原濃度を減少させる方法を見出した。また、本発明者らは上記の性質を有する抗原結合分子の製造方法を見出すとともに、そのように抗原結合分子あるい

は本発明に係る製造方法によって製造された抗原結合分子を有効成分として含有する医薬組成物の有用性を見出して本発明を完成した。

[0017] すなわち、本発明は、より具体的には以下の〔１〕～〔４６〕を提供するものである。

〔１〕pH酸性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性を有し、イオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン、およびpH中性域の条件下でFcγレセプターに対する結合活性が、EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgGのFc領域のFcγレセプターに対する結合活性よりも高いFcγレセプター結合ドメインを含む抗原結合分子を含む医薬組成物。

〔２〕前記抗原が、可溶型抗原である〔１〕に記載の医薬組成物。

〔３〕前記イオン濃度が、カルシウムイオン濃度である〔１〕または〔２〕に記載の医薬組成物。

〔４〕前記抗原結合ドメインが、低カルシウムイオン濃度の条件下での当該抗原に対する結合活性よりも高カルシウムイオン濃度の条件下での抗原に対する結合活性が高い抗原結合ドメインである〔３〕に記載の医薬組成物。

〔５〕前記イオン濃度の条件が、pHの条件である〔１〕または〔２〕に記載の医薬組成物。

〔６〕前記抗原結合ドメインが、pH酸性域の条件下での当該抗原に対する結合活性よりもpH中性域の条件下での抗原に対する結合活性が高い抗原結合ドメインである〔５〕に記載の医薬組成物。

〔７〕前記抗原結合分子が、前記抗原に対する中和活性を有する抗原結合分子である〔１〕から〔６〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔８〕前記Fcγレセプター結合ドメインが、抗体のFc領域を含む〔１〕から〔７〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔９〕前記Fc領域が、Fc領域のEUナンバリングで表される部位のうち、221位、222位、223位、224位、225位、227位、228位、230位、231位、232位、233位、234位、235位、236位、237位、238位、239位、240位、241位、243位、24

4位、245位、246位、247位、249位、250位、251位、254位、255位、256位、258位、260位、262位、263位、264位、265位、266位、267位、268位、269位、270位、271位、272位、273位、274位、275位、276位、278位、279位、280位、281位、282位、283位、284位、285位、286位、288位、290位、291位、292位、293位、294位、295位、296位、297位、298位、299位、300位、301位、302位、303位、304位、305位、311位、313位、315位、317位、318位、320位、322位、323位、324位、325位、326位、327位、328位、329位、330位、331位、332位、333位、334位、335位、336位、337位、339位、376位、377位、378位、379位、380位、382位、385位、392位、396位、421位、427位、428位、429位、434位、436位および440位の群から選択される少なくともひとつ以上のアミノ酸が、天然型Fc領域の対応する部位のアミノ酸と異なるFc領域である〔８〕に記載の医薬組成物。

〔１０〕前記Fc領域が、Fc領域のEUナンバリングで表される部位のうち；

221位のアミノ酸がLysまたはTyrのいずれか、

222位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはTyrのいずれか、

223位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはLysのいずれか、

224位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはTyrのいずれか、

225位のアミノ酸がGlu、LysまたはTrpのいずれか、

227位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

228位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

230位のアミノ酸がAla、Glu、GlyまたはTyrのいずれか、

231位のアミノ酸がGlu、Gly、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

232位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

233位のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

234位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

235位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pr

o、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

236位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

237位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

238位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

239位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

240位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

241位のアミノ酸がAsp、Glu、Leu、Arg、TrpまたはTyrのいずれか、

243位のアミノ酸がLeu、Glu、Leu、Gln、Arg、TrpまたはTyrのいずれか、

244位のアミノ酸がHis、

245位のアミノ酸がAla、

246位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、

247位のアミノ酸がAla、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

249位のアミノ酸がGlu、His、GlnまたはTyrのいずれか、

250位のアミノ酸がGluまたはGlnのいずれか、

251位のアミノ酸がPhe、

254位のアミノ酸がPhe、MetまたはTyrのいずれか、

255位のアミノ酸がGlu、LeuまたはTyrのいずれか、

256位のアミノ酸がAla、MetまたはProのいずれか、

258位のアミノ酸がAsp、Glu、His、SerまたはTyrのいずれか、

260位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、

262位のアミノ酸がAla、Glu、Phe、IleまたはThrのいずれか、

263位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

264位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro

o、Gln、Arg、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、

265位のアミノ酸がAla、Leu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

266位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

267位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

268位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Thr、ValまたはTrpのいずれか、

269位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

270位のアミノ酸がGlu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、

271位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

272位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

273位のアミノ酸がPheまたはIleのいずれか、

274位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

275位のアミノ酸がLeuまたはTrpのいずれか、

276位のアミノ酸が、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

278位のアミノ酸がAsp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、ValまたはTrpのいずれか、

279位のアミノ酸がAla、

280位のアミノ酸がAla、Gly、His、Lys、Leu、Pro、Gln、TrpまたはTyrのいずれか、

281位のアミノ酸がAsp、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

282位のアミノ酸がGlu、Gly、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

283位のアミノ酸がAla、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、ArgまたはTyrのいずれか、

284位のアミノ酸がAsp、Glu、Leu、Asn、ThrまたはTyrのいずれか、

285位のアミノ酸がAsp、Glu、Lys、Gln、TrpまたはTyrのいずれか、

286位のアミノ酸がGlu、Gly、ProまたはTyrのいずれか、

288位のアミノ酸がAsn、Asp、GluまたはTyrのいずれか、

290位のアミノ酸がAsp、Gly、His、Leu、Asn、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、291位のアミノ酸がAsp、Glu、Gly、His、Ile、GlnまたはThrのいずれか、

292位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Pro、ThrまたはTyrのいずれか、

293位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

294位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

295位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

296位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、ThrまたはValのいずれか、

297位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

298位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

299位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

300位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、ValまたはTrpのいずれか、

301位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、

302位のアミノ酸がIle、

303位のアミノ酸がAsp、GlyまたはTyrのいずれか、

304位のアミノ酸がAsp、His、Leu、AsnまたはThrのいずれか、

305位のアミノ酸がGlu、Ile、ThrまたはTyrのいずれか、

311位のアミノ酸がAla、Asp、Asn、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

313位のアミノ酸がPhe、

315位のアミノ酸がLeu、

317位のアミノ酸がGluまたはGln、

318位のアミノ酸がHis、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

320位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Asn、Pro、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

322位のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Pro、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

323位のアミノ酸がIle、

324位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

325位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

326位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

327位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

328位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

329位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

330位のアミノ酸がCys、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pr

o、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

331位のアミノ酸がAsp、Phe、His、Ile、Leu、Met、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

332位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

333位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Ser、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

334位のアミノ酸がAla、Glu、Phe、Ile、Leu、ProまたはThrのいずれか、

335位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

336位のアミノ酸がGlu、LysまたはTyrのいずれか、

337位のアミノ酸がGlu、HisまたはAsnのいずれか、

339位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、SerまたはThrのいずれか、

376位のアミノ酸がAlaまたはValのいずれか、

377位のアミノ酸がGlyまたはLysのいずれか、

378位のアミノ酸がAsp、

379位のアミノ酸がAsn、

380位のアミノ酸がAla、AsnまたはSerのいずれか、

382位のアミノ酸がAlaまたはIleのいずれか、

385位のアミノ酸がGlu、

392位のアミノ酸がThr、

396位のアミノ酸がLeu、

421位のアミノ酸がLys、

427位のアミノ酸がAsn、

428位のアミノ酸がPheまたはLeuのいずれか、

429位のアミノ酸がMet、

434位のアミノ酸がTrp、

436位のアミノ酸がIle、および
440位のアミノ酸がGly、His、Ile、LeuまたはTyrのいずれか、
の群から選択される少なくともひとつ以上のアミノ酸を含むFc領域である〔９〕に記載の医薬組成物。

〔１１〕前記EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgGのFc領域が、EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgG1、天然型ヒトIgG2、天然型ヒトIgG3または天然型ヒトIgG4のいずれかのFc領域である〔１〕から〔１０〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔１２〕前記ヒトFcγレセプターが、FcγRIa、FcγRIIa(R)、FcγRIIa(H)、FcγRIIb、FcγRIIIa(V)、またはFcγRIIIa(F)である〔１〕から〔１１〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔１３〕前記ヒトFcγレセプターが、FcγRIIbである〔１〕から〔１１〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔１４〕前記Fc領域が、Fc領域のEUナンバリングで表される部位のうち；
238位のアミノ酸がAsp、または
328位のアミノ酸がGlu、
の少なくとも一つ以上のアミノ酸を含むFc領域である〔８〕から〔１３〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔１５〕pH酸性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性を有し、イオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン、およびpH中性域の条件下でFcγレセプターに対する結合活性が、EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgGのFc領域のFcγレセプターに対する結合活性よりも高いFcγレセプター結合ドメインを含む抗原結合分子を、Fcγレセプターを発現する細胞に生体内または生体外で細胞に接触させる工程を含む、以下(i)～(vi)のいずれかの方法；
(i) 一分子の抗原結合分子が結合できる抗原の数を増加させる方法、
(ii) 血漿中抗原を消失させる方法、

（iii）抗原結合分子の薬物動態を改善する方法、

（iv）細胞外で抗原結合分子に結合した抗原の細胞内での抗原結合分子からの解離を促進する方法、

（v）抗原と結合していない状態での抗原結合分子の細胞外への放出を促進する方法、または

（vi）血漿中の総抗原濃度または遊離抗原濃度を減少させる方法。

〔１６〕前記抗原が、可溶型抗原である〔１５〕に記載の方法。

〔１７〕前記イオン濃度が、カルシウムイオン濃度である〔１５〕または〔１６〕に記載の方法。

〔１８〕前記抗原結合ドメインが、低カルシウムイオン濃度の条件下での当該抗原に対する結合活性よりも高カルシウムイオン濃度の条件下での抗原に対する結合活性が高い抗原結合ドメインである〔１７〕に記載の方法。

〔１９〕前記イオン濃度の条件が、pHの条件である〔１５〕または〔１６〕に記載の方法。

〔２０〕前記抗原結合ドメインが、pH酸性域の条件下での当該抗原に対する結合活性よりもpH中性域の条件下での抗原に対する結合活性が高い抗原結合ドメインである〔１９〕に記載の方法。

〔２１〕前記抗原結合分子が、前記抗原に対する中和活性を有する抗原結合分子である〔１５〕から〔２０〕のいずれかに記載の方法。

〔２２〕前記Fcγレセプター結合ドメインが、抗体のFc領域を含む〔１５〕から〔２１〕のいずれかに記載の方法。

〔２３〕前記Fc領域が、Fc領域のEUナンバリングで表される部位のうち、221位、222位、223位、224位、225位、227位、228位、230位、231位、232位、233位、234位、235位、236位、237位、238位、239位、240位、241位、243位、244位、245位、246位、247位、249位、250位、251位、254位、255位、256位、258位、260位、262位、263位、264位、265位、266位、267位、268位、269位、270位、271位、272位、273位、274位、275位、276位、278位、279位、280位、281位、282位、283位、284位、285位、286位、288位、290位、291位、29

2位、293位、294位、295位、296位、297位、298位、299位、300位、301位、302位、303位、304位、305位、311位、313位、315位、317位、318位、320位、322位、323位、324位、325位、326位、327位、328位、329位、330位、331位、332位、333位、334位、335位、336位、337位、339位、376位、377位、378位、379位、380位、382位、385位、392位、396位、421位、427位、428位、429位、434位、436位および440位の群から選択される少なくともひとつ以上のアミノ酸が、天然型Fc領域の対応する部位のアミノ酸と異なるFc領域である〔２２〕に記載の方法。

〔２４〕前記Fc領域が、Fc領域のEUナンバリングで表される部位のうち；

221位のアミノ酸がLysまたはTyrのいずれか、

222位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはTyrのいずれか、

223位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはLysのいずれか、

224位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはTyrのいずれか、

225位のアミノ酸がGlu、LysまたはTrpのいずれか、

227位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

228位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

230位のアミノ酸がAla、Glu、GlyまたはTyrのいずれか、

231位のアミノ酸がGlu、Gly、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

232位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

233位のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

234位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

235位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

236位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

237位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gl

n、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

238位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

239位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

240位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

241位のアミノ酸がAsp、Glu、Leu、Arg、TrpまたはTyrのいずれか、

243位のアミノ酸がLeu、Glu、Leu、Gln、Arg、TrpまたはTyrのいずれか、

244位のアミノ酸がHis、

245位のアミノ酸がAla、

246位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、

247位のアミノ酸がAla、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

249位のアミノ酸がGlu、His、GlnまたはTyrのいずれか、

250位のアミノ酸がGluまたはGlnのいずれか、

251位のアミノ酸がPhe、

254位のアミノ酸がPhe、MetまたはTyrのいずれか、

255位のアミノ酸がGlu、LeuまたはTyrのいずれか、

256位のアミノ酸がAla、MetまたはProのいずれか、

258位のアミノ酸がAsp、Glu、His、SerまたはTyrのいずれか、

260位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、

262位のアミノ酸がAla、Glu、Phe、IleまたはThrのいずれか、

263位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

264位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、

265位のアミノ酸がAla、Leu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

266位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

267位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

268位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Thr、ValまたはTrpのいずれか、

269位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

270位のアミノ酸がGlu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、

271位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

272位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

273位のアミノ酸がPheまたはIleのいずれか、

274位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

275位のアミノ酸がLeuまたはTrpのいずれか、

276位のアミノ酸が、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

278位のアミノ酸がAsp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、ValまたはTrpのいずれか、

279位のアミノ酸がAla、

280位のアミノ酸がAla、Gly、His、Lys、Leu、Pro、Gln、TrpまたはTyrのいずれか、

281位のアミノ酸がAsp、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

282位のアミノ酸がGlu、Gly、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

283位のアミノ酸がAla、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、ArgまたはTyrのいずれか、

284位のアミノ酸がAsp、Glu、Leu、Asn、ThrまたはTyrのいずれか、

285位のアミノ酸がAsp、Glu、Lys、Gln、TrpまたはTyrのいずれか、

286位のアミノ酸がGlu、Gly、ProまたはTyrのいずれか、

288位のアミノ酸がAsn、Asp、GluまたはTyrのいずれか、

290位のアミノ酸がAsp、Gly、His、Leu、Asn、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、291位のアミノ酸がAsp、Glu、Gly、His、Ile、GlnまたはThrのいずれか、

292位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Pro、ThrまたはTyrのいずれか、

293位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

294位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

295位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

296位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、ThrまたはValのいずれか、

297位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

298位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

299位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

300位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、ValまたはTrpのいずれか、

301位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、

302位のアミノ酸がIle、

303位のアミノ酸がAsp、GlyまたはTyrのいずれか、

304位のアミノ酸がAsp、His、Leu、AsnまたはThrのいずれか、

305位のアミノ酸がGlu、Ile、ThrまたはTyrのいずれか、

311位のアミノ酸がAla、Asp、Asn、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

313位のアミノ酸がPhe、

315位のアミノ酸がLeu、

317位のアミノ酸がGluまたはGln、

318位のアミノ酸がHis、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

320位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Asn、Pro、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

322位のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Pro、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

323位のアミノ酸がIle、

324位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

325位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

326位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

327位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

328位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

329位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

330位のアミノ酸がCys、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

331位のアミノ酸がAsp、Phe、His、Ile、Leu、Met、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

332位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Lys、Leu、Met、Asn、Pr

o、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

333位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Ser、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

334位のアミノ酸がAla、Glu、Phe、Ile、Leu、ProまたはThrのいずれか、

335位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

336位のアミノ酸がGlu、LysまたはTyrのいずれか、

337位のアミノ酸がGlu、HisまたはAsnのいずれか、

339位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、SerまたはThrのいずれか、

376位のアミノ酸がAlaまたはValのいずれか、

377位のアミノ酸がGlyまたはLysのいずれか、

378位のアミノ酸がAsp、

379位のアミノ酸がAsn、

380位のアミノ酸がAla、AsnまたはSerのいずれか、

382位のアミノ酸がAlaまたはIleのいずれか、

385位のアミノ酸がGlu、

392位のアミノ酸がThr、

396位のアミノ酸がLeu、

421位のアミノ酸がLys、

427位のアミノ酸がAsn、

428位のアミノ酸がPheまたはLeuのいずれか、

429位のアミノ酸がMet、

434位のアミノ酸がTrp、

436位のアミノ酸がIle、および

440位のアミノ酸がGly、His、Ile、LeuまたはTyrのいずれか、

の群から選択される少なくともひとつ以上のアミノ酸を含むFc領域である〔２３〕に記載の方法。

〔２５〕前記EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgGのFc領域が、EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgG1、天然型ヒトIgG2、天然型ヒトIgG3または天然型ヒトIgG4のいずれかのFc領域である〔１５〕から〔２４〕のいずれかに記載の方法。

〔２６〕前記ヒトFcγレセプターが、FcγRIa、FcγRIIa(R)、FcγRIIa(H)、FcγRIIb、FcγRIIIa(V)、またはFcγRIIIa(F)である〔１５〕から〔２５〕のいずれかに記載の方法。

〔２７〕前記ヒトFcγレセプターが、FcγRIIbである〔１５〕から〔２５〕のいずれかに記載の方法。

〔２８〕前記Fc領域が、Fc領域のEUナンバリングで表される部位のうち；

238位のアミノ酸がAsp、または

328位のアミノ酸がGlu、

の少なくとも一つ以上のアミノ酸を含むFc領域である〔２２〕から〔２７〕のいずれかに記載の方法。

〔２９〕pH酸性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性を有し、イオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン、およびFcγレセプター結合ドメインを含む抗原結合分子におけるFcγレセプター結合ドメインのpH中性域の条件下でのFcγレセプターに対する結合活性を、EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgGのFc領域のpH中性域の条件下でのFcγレセプターに対する結合活性よりも増強する工程を含む、以下(i)～(vii)のいずれかに記載の方法；

(i) 結合する抗原の細胞内への取込が促進された抗原結合分子の改変方法、

(ii) 一分子の抗原結合分子が結合できる抗原の数を増加させる方法、

(iii) 抗原結合分子の血漿中抗原消失能を増大させる方法、

(iv) 抗原結合分子の薬物動態を改善する方法、

(v) 細胞外で抗原結合分子に結合した抗原の細胞内での抗原結合分子からの解離を促進する方法、

(vi) 抗原と結合した状態で細胞内に取り込まれた抗原結合分子の、抗原と結合していない状態での細胞外への放出を促進する方法、または

(vii) 血漿中の総抗原濃度または遊離抗原濃度を減少することができる抗原結合分子の改変方法。

〔３０〕前記抗原が、可溶型抗原である〔２９〕に記載の方法。

〔３１〕前記イオン濃度が、カルシウムイオン濃度である〔２９〕または〔３０〕に記載の方法。

〔３２〕前記抗原結合ドメインが、低カルシウムイオン濃度の条件下での当該抗原に対する結合活性よりも高カルシウムイオン濃度の条件下での抗原に対する結合活性が高い抗原結合ドメインである〔３１〕に記載の方法。

〔３３〕前記イオン濃度の条件が、pHの条件である〔２９〕または〔３０〕に記載の方法。

〔３４〕前記抗原結合ドメインが、pH酸性域の条件下での当該抗原に対する結合活性よりもpH中性域の条件下での抗原に対する結合活性が高い抗原結合ドメインである〔３３〕に記載の方法。

〔３５〕前記抗原結合分子が、前記抗原に対する中和活性を有する抗原結合分子である〔２９〕から〔３４〕のいずれかに記載の方法。

〔３６〕前記Fcγレセプター結合ドメインが、抗体のFc領域を含む〔２９〕から〔３５〕のいずれかに記載の方法。

〔３７〕前記Fc領域が、Fc領域のEUナンバリングで表される部位のうち、221位、222位、223位、224位、225位、227位、228位、230位、231位、232位、233位、234位、235位、236位、237位、238位、239位、240位、241位、243位、244位、245位、246位、247位、249位、250位、251位、254位、255位、256位、258位、260位、262位、263位、264位、265位、266位、267位、268位、269位、270位、271位、272位、273位、274位、275位、276位、278位、279位、280位、281位、282位、283位、284位、285位、286位、288位、290位、291位、292位、293位、294位、295位、296位、297位、298位、299位、300位、301位、302位、303位、304位、305位、311位、313位、315位、317位、318位、320位、

322位、323位、324位、325位、326位、327位、328位、329位、330位、331位、332位、333位、334位、335位、336位、337位、339位、376位、377位、378位、379位、380位、382位、385位、392位、396位、421位、427位、428位、429位、434位、436位および440位の群いずれかひとつ以上のアミノ酸が、天然型Fc領域の対応する部位のアミノ酸と異なるFc領域である〔３６〕に記載の方法。

〔３８〕前記Fc領域が、Fc領域のEUナンバリングで表される部位のうち；

221位のアミノ酸がLysまたはTyrのいずれか、

222位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはTyrのいずれか、

223位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはLysのいずれか、

224位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはTyrのいずれか、

225位のアミノ酸がGlu、LysまたはTrpのいずれか、

227位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

228位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

230位のアミノ酸がAla、Glu、GlyまたはTyrのいずれか、

231位のアミノ酸がGlu、Gly、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

232位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

233位のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

234位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

235位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

236位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

237位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

238位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gl

n、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

239位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

240位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

241位のアミノ酸がAsp、Glu、Leu、Arg、TrpまたはTyrのいずれか、

243位のアミノ酸がLeu、Glu、Leu、Gln、Arg、TrpまたはTyrのいずれか、

244位のアミノ酸がHis、

245位のアミノ酸がAla、

246位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、

247位のアミノ酸がAla、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

249位のアミノ酸がGlu、His、GlnまたはTyrのいずれか、

250位のアミノ酸がGluまたはGlnのいずれか、

251位のアミノ酸がPhe、

254位のアミノ酸がPhe、MetまたはTyrのいずれか、

255位のアミノ酸がGlu、LeuまたはTyrのいずれか、

256位のアミノ酸がAla、MetまたはProのいずれか、

258位のアミノ酸がAsp、Glu、His、SerまたはTyrのいずれか、

260位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、

262位のアミノ酸がAla、Glu、Phe、IleまたはThrのいずれか、

263位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

264位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、

265位のアミノ酸がAla、Leu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

266位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

267位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

268位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Thr、ValまたはTrpのいずれか、

269位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

270位のアミノ酸がGlu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、

271位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

272位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

273位のアミノ酸がPheまたはIleのいずれか、

274位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

275位のアミノ酸がLeuまたはTrpのいずれか、

276位のアミノ酸が、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

278位のアミノ酸がAsp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、ValまたはTrpのいずれか、

279位のアミノ酸がAla、

280位のアミノ酸がAla、Gly、His、Lys、Leu、Pro、Gln、TrpまたはTyrのいずれか、

281位のアミノ酸がAsp、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

282位のアミノ酸がGlu、Gly、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

283位のアミノ酸がAla、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、ArgまたはTyrのいずれか、

284位のアミノ酸がAsp、Glu、Leu、Asn、ThrまたはTyrのいずれか、

285位のアミノ酸がAsp、Glu、Lys、Gln、TrpまたはTyrのいずれか、

286位のアミノ酸がGlu、Gly、ProまたはTyrのいずれか、

288位のアミノ酸がAsn、Asp、GluまたはTyrのいずれか、

290位のアミノ酸がAsp、Gly、His、Leu、Asn、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、291位のアミノ酸がAsp、Glu、Gly、His、Ile、GlnまたはThrのいずれか、

292位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Pro、ThrまたはTyrのいずれか、

293位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

294位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

295位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

296位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、ThrまたはValのいずれか、

297位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

298位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

299位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

300位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、ValまたはTrpのいずれか、

301位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、

302位のアミノ酸がIle、

303位のアミノ酸がAsp、GlyまたはTyrのいずれか、

304位のアミノ酸がAsp、His、Leu、AsnまたはThrのいずれか、

305位のアミノ酸がGlu、Ile、ThrまたはTyrのいずれか、

311位のアミノ酸がAla、Asp、Asn、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

313位のアミノ酸がPhe、

315位のアミノ酸がLeu、

317位のアミノ酸がGluまたはGln、

318位のアミノ酸がHis、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

320位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Asn、Pro、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

322位のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Pro、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

323位のアミノ酸がIle、

324位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

325位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

326位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

327位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

328位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

329位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

330位のアミノ酸がCys、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

331位のアミノ酸がAsp、Phe、His、Ile、Leu、Met、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

332位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

333位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Se

r、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

334位のアミノ酸がAla、Glu、Phe、Ile、Leu、ProまたはThrのいずれか、

335位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

336位のアミノ酸がGlu、LysまたはTyrのいずれか、

337位のアミノ酸がGlu、HisまたはAsnのいずれか、

339位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、SerまたはThrのいずれか、

376位のアミノ酸がAlaまたはValのいずれか、

377位のアミノ酸がGlyまたはLysのいずれか、

378位のアミノ酸がAsp、

379位のアミノ酸がAsn、

380位のアミノ酸がAla、AsnまたはSerのいずれか、

382位のアミノ酸がAlaまたはIleのいずれか、

385位のアミノ酸がGlu、

392位のアミノ酸がThr、

396位のアミノ酸がLeu、

421位のアミノ酸がLys、

427位のアミノ酸がAsn、

428位のアミノ酸がPheまたはLeuのいずれか、

429位のアミノ酸がMet、

434位のアミノ酸がTrp、

436位のアミノ酸がIle、および

440位のアミノ酸がGly、His、Ile、LeuまたはTyrのいずれか、

の群から選択される少なくともひとつ以上のアミノ酸を含むFc領域である〔３３〕に記載の方法。

〔３９〕前記EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgGのFc領域が、EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース

含有糖鎖である天然型ヒトIgG1、天然型ヒトIgG2、天然型ヒトIgG3または天然型ヒトIgG4のいずれかのFc領域である〔２９〕から〔３８〕のいずれかに記載の方法。

〔４０〕前記ヒトFcγレセプターが、FcγRIa、FcγRIIa(R)、FcγRIIa(H)、FcγRIIb、FcγRIIIa(V)、またはFcγRIIIa(F)である〔２９〕から〔３９〕のいずれかに記載の方法。

〔４１〕前記ヒトFcγレセプターが、FcγRIIbである〔２９〕から〔３９〕のいずれかに記載の方法。

〔４２〕前記Fc領域が、Fc領域のEUナンバリングで表される部位のうち；

238位のアミノ酸がAsp、または

328位のアミノ酸がGlu、

の少なくとも一つ以上のアミノ酸を含むFc領域である〔３６〕から〔４１〕のいずれかに記載の方法。

〔４３〕以下(a)～(f)の工程、

(a) 高カルシウムイオン濃度の条件における抗原結合ドメインの抗原に対する結合活性を得る工程、

(b) 低カルシウムイオン濃度の条件における抗原結合ドメインの抗原に対する結合活性を得る工程、

(c) (a)で得られた抗原結合活性が(b)で得られた抗原結合活性より高い抗原結合ドメインを選択する工程、

(d) (c)で選択された抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドを、pH酸性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性を有し、pH中性域の条件下でFcγレセプターに対する結合活性が、EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgGのFc領域のFcγレセプターに対する結合活性よりも高いFcγレセプター結合ドメインをコードするポリヌクレオチドに連結させる工程、

(e) (d)で得られたポリヌクレオチドが作用可能に連結されたベクターが導入された細胞を培養する工程、および

(f) (e)で培養された細胞の培養液から抗原結合分子を回収する工程、

を含む抗原結合分子の製造方法。

〔４４〕以下(a)～(f)の工程、

(a) 高カルシウムイオン濃度の条件における抗体の抗原に対する結合活性を得る工程、

(b) 低カルシウムイオン濃度の条件における抗体の抗原に対する結合活性を得る工程、

(c) (a)で得られた抗原結合活性が(b)で得られた抗原結合活性より高い抗体を選択する工程、

(d) (c)で選択された抗体の抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドを、pH酸性域においてヒトFcRnに対する結合活性を有し、pH中性域の条件下でFcγレセプターに対する結合活性が、EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgGのFc領域のFcγレセプターに対する結合活性よりも高いFcγレセプター結合ドメインをコードするポリヌクレオチドに連結させる工程、

(e) (d)で得られたポリヌクレオチドが作用可能に連結されたベクターが導入された細胞を培養する工程、および

(f) (e)で培養された細胞の培養液から抗原結合分子を回収する工程、

を含む抗原結合分子の製造方法。

〔４５〕以下(a)～(f)の工程、

(a) pH中性域の条件における抗原結合ドメインの抗原に対する結合活性を得る工程、

(b) pH酸性域の条件における抗原結合ドメインの抗原に対する結合活性を得る工程、

(c) (a)で得られた抗原結合活性が(b)で得られた抗原結合活性より高い抗原結合ドメインを選択する工程、

(d) (c)で選択された抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドを、pH酸性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性を有し、pH中性域の条件下でFc

γレセプターに対する結合活性が、EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgGのFc領域のFcγレセプターに対する結合活性よりも高いFcγレセプター結合ドメインをコードするポリヌクレオチドに連結させる工程、

(e) (d)で得られたポリヌクレオチドが作用可能に連結されたベクターが導入された細胞を培養する工程、および

(f) (e)で培養された細胞の培養液から抗原結合分子を回収する工程、

を含む抗原結合分子の製造方法。

〔４６〕以下(a)～(f)の工程、

(a) pH中性域の条件における抗体の抗原に対する結合活性を得る工程、

(b) pH酸性域の条件における抗体の抗原に対する抗原結合活性を得る工程、

(c) (a)で得られた抗原結合活性が(b)で得られた抗原結合活性より高い抗体を選択する工程、

(d) (c)で選択された抗体の抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドを、pH酸性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性を有し、pH中性域の条件下でFcγレセプターに対する結合活性が、EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgGのFc領域のFcγレセプターに対する結合活性よりも高いFcγレセプター結合ドメインをコードするポリヌクレオチドに連結させる工程、

(e) (d)で得られたポリヌクレオチドが作用可能に連結されたベクターが導入された細胞を培養する工程、および

(f) (e)で培養された細胞の培養液から抗原結合分子を回収する工程、

を含む抗原結合分子の製造方法。

〔４７〕前記抗原が、可溶型抗原である〔４３〕から〔４６〕のいずれかに記載の製造方法。

〔４８〕前記Fcγレセプター結合ドメインが、抗体のFc領域を含む〔４３〕から〔４７〕のいずれかに記載の製造方法。

〔４９〕前記Fc領域が、Fc領域のEUナンバリングで表される部位のうち、221

位、222位、223位、224位、225位、227位、228位、230位、231位、232位、233位、234位、235位、236位、237位、238位、239位、240位、241位、243位、244位、245位、246位、247位、249位、250位、251位、254位、255位、256位、258位、260位、262位、263位、264位、265位、266位、267位、268位、269位、270位、271位、272位、273位、274位、275位、276位、278位、279位、280位、281位、282位、283位、284位、285位、286位、288位、290位、291位、292位、293位、294位、295位、296位、297位、298位、299位、300位、301位、302位、303位、304位、305位、311位、313位、315位、317位、318位、320位、322位、323位、324位、325位、326位、327位、328位、329位、330位、331位、332位、333位、334位、335位、336位、337位、339位、376位、377位、378位、379位、380位、382位、385位、392位、396位、421位、427位、428位、429位、434位、436位および440位の群から選択される少なくともひとつ以上のアミノ酸が、天然型Fc領域の対応する部位のアミノ酸と異なるFc領域である〔４８〕に記載の製造方法。

〔５０〕前記Fc領域が、Fc領域のEUナンバリングで表される部位のうち；

221位のアミノ酸がLysまたはTyrのいずれか、

222位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはTyrのいずれか、

223位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはLysのいずれか、

224位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはTyrのいずれか、

225位のアミノ酸がGlu、LysまたはTrpのいずれか、

227位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

228位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

230位のアミノ酸がAla、Glu、GlyまたはTyrのいずれか、

231位のアミノ酸がGlu、Gly、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

232位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

233位のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

234位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pr

o、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

235位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

236位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

237位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

238位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

239位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

240位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

241位のアミノ酸がAsp、Glu、Leu、Arg、TrpまたはTyrのいずれか、

243位のアミノ酸がLeu、Glu、Leu、Gln、Arg、TrpまたはTyrのいずれか、

244位のアミノ酸がHis、

245位のアミノ酸がAla、

246位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、

247位のアミノ酸がAla、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

249位のアミノ酸がGlu、His、GlnまたはTyrのいずれか、

250位のアミノ酸がGluまたはGlnのいずれか、

251位のアミノ酸がPhe、

254位のアミノ酸がPhe、MetまたはTyrのいずれか、

255位のアミノ酸がGlu、LeuまたはTyrのいずれか、

256位のアミノ酸がAla、MetまたはProのいずれか、

258位のアミノ酸がAsp、Glu、His、SerまたはTyrのいずれか、

260位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、

262位のアミノ酸がAla、Glu、Phe、IleまたはThrのいずれか、

263位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

264位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、

265位のアミノ酸がAla、Leu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

266位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

267位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

268位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Thr、ValまたはTrpのいずれか、

269位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

270位のアミノ酸がGlu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、

271位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

272位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

273位のアミノ酸がPheまたはIleのいずれか、

274位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

275位のアミノ酸がLeuまたはTrpのいずれか、

276位のアミノ酸が、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

278位のアミノ酸がAsp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、ValまたはTrpのいずれか、

279位のアミノ酸がAla、

280位のアミノ酸がAla、Gly、His、Lys、Leu、Pro、Gln、TrpまたはTyrのい

ずれか、

281位のアミノ酸がAsp、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

282位のアミノ酸がGlu、Gly、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

283位のアミノ酸がAla、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、ArgまたはTyrのいずれか、

284位のアミノ酸がAsp、Glu、Leu、Asn、ThrまたはTyrのいずれか、

285位のアミノ酸がAsp、Glu、Lys、Gln、TrpまたはTyrのいずれか、

286位のアミノ酸がGlu、Gly、ProまたはTyrのいずれか、

288位のアミノ酸がAsn、Asp、GluまたはTyrのいずれか、

290位のアミノ酸がAsp、Gly、His、Leu、Asn、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、291位のアミノ酸がAsp、Glu、Gly、His、Ile、GlnまたはThrのいずれか、

292位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Pro、ThrまたはTyrのいずれか、

293位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

294位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

295位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

296位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、ThrまたはValのいずれか、

297位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

298位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

299位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

300位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pr

o、Gln、Arg、Ser、Thr、ValまたはTrpのいずれか、

301位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、

302位のアミノ酸がIle、

303位のアミノ酸がAsp、GlyまたはTyrのいずれか、

304位のアミノ酸がAsp、His、Leu、AsnまたはThrのいずれか、

305位のアミノ酸がGlu、Ile、ThrまたはTyrのいずれか、

311位のアミノ酸がAla、Asp、Asn、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

313位のアミノ酸がPhe、

315位のアミノ酸がLeu、

317位のアミノ酸がGluまたはGln、

318位のアミノ酸がHis、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

320位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Asn、Pro、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

322位のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Pro、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

323位のアミノ酸がIle、

324位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

325位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

326位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

327位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

328位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

329位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gl

n、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

330位のアミノ酸がCys、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

331位のアミノ酸がAsp、Phe、His、Ile、Leu、Met、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

332位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

333位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Ser、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

334位のアミノ酸がAla、Glu、Phe、Ile、Leu、ProまたはThrのいずれか、

335位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

336位のアミノ酸がGlu、LysまたはTyrのいずれか、

337位のアミノ酸がGlu、HisまたはAsnのいずれか、

339位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、SerまたはThrのいずれか、

376位のアミノ酸がAlaまたはValのいずれか、

377位のアミノ酸がGlyまたはLysのいずれか、

378位のアミノ酸がAsp、

379位のアミノ酸がAsn、

380位のアミノ酸がAla、AsnまたはSerのいずれか、

382位のアミノ酸がAlaまたはIleのいずれか、

385位のアミノ酸がGlu、

392位のアミノ酸がThr、

396位のアミノ酸がLeu、

421位のアミノ酸がLys、

427位のアミノ酸がAsn、

428位のアミノ酸がPheまたはLeuのいずれか、

429位のアミノ酸がMet、

434位のアミノ酸がTrp、

436位のアミノ酸がIle、および

440位のアミノ酸がGly、His、Ile、LeuまたはTyrのいずれか、

の群から選択される少なくともひとつ以上のアミノ酸を含むFc領域である〔４９〕に記載の製造方法。

〔５１〕前記Fcγレセプター結合ドメインが、EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgG1、天然型ヒトIgG2、天然型ヒトIgG3または天然型ヒトIgG4のいずれかのFc領域である〔４３〕から〔５０〕のいずれかに記載の製造方法。

〔５２〕前記ヒトFcγレセプターが、FcγRIa、FcγRIIa(R)、FcγRIIa(H)、FcγRIIb、FcγRIIIa(V)、またはFcγRIIIa(F)である〔４３〕から〔５１〕のいずれかに記載の製造方法。

〔５３〕前記ヒトFcγレセプターが、FcγRIIbである〔４３〕から〔５１〕のいずれかに記載の製造方法。

〔５４〕前記Fc領域が、Fc領域のEUナンバリングで表される部位のうち；

238位のアミノ酸がAsp、または

328位のアミノ酸がGlu、

の少なくとも一つ以上のアミノ酸を含むFc領域である〔４８〕から〔５３〕のいずれかに記載の製造方法。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]既存の中和抗体に比べて中性pHにおけるFcγレセプターに対する結合を増強したイオン濃度依存的に抗原に対して結合する抗体の投与により、血漿中から可溶型抗原が消失する非限定の作用メカニズムを表す図である。

[図2]H54/L28-IgG1またはヒトIL-6レセプターに対してpH依存的に結合するFv4-IgG1が、ヒトFcRnトランスジェニックマウスに投与されたときの当該マウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度推移を示す図である。

[図3]ヒトIL-6レセプターに対してpH依存的に結合するFv4-IgG1、マウスFcγ

Rに対する結合が欠損したFv4-IgG1の改変体であるFv4-IgG1-F760、マウスFcγRに対する結合が増強されたFv4-IgG1の改変体であるFv4-IgG1-F1022、またはFv4-IgG1の低フコース型抗体であるFv4-IgG1-Fucが、ヒトFcRnトランスジェニックマウスに投与されたときの当該マウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度推移を示す図である。

[図4]Fv4-IgG1、Fv4-IgG1-F1022、およびFv4-IgG1-F1022の改変体であってpH酸性域におけるFcRnに対する結合が向上したFv4-IgG1-F1093を重鎖として含む抗原結合分子が、ヒトFcRnトランスジェニックマウスに投与されたときの当該マウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度推移を示す図である。

[図5]Fv4-IgG1、Fv4-IgG1-F1022、およびFv4-IgG1-F1022の改変体であってpH酸性域におけるFcRnに対する結合が向上したFv4-IgG1-F1093を重鎖として含む抗原結合分子が、ヒトFcRnトランスジェニックマウスに投与されたときの当該マウスの血漿中における投与された抗原結合分子の濃度推移を示す図である。

[図6]Fv4-IgG1、マウスFcγRに対する結合が増強された（特にマウスFcγRIIb、マウスFcγRIIIに対する結合が増強された）Fv4-IgG1の改変体であるFv4-IgG1-F1087、およびマウスFcγRに対する結合が増強された（特にマウスFcγRI、マウスFcγRIVに対する結合が増強された）Fv4-IgG1の改変体であるFv4-IgG1-F1182が、ヒトFcRnトランスジェニックマウスに投与されたときの当該マウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度推移を示す図である。

[図7]Fv4-IgG1、Fv4-IgG1-F1087、およびpH酸性域におけるFcRnに対する結合が向上したFv4-IgG1-F1087の改変体であるFv4-IgG1-F1180、Fv4-IgG1-F1412が、ヒトFcRnトランスジェニックマウスに投与されたときの当該マウスの血漿中における投与された抗原結合分子の濃度推移を示す図である。

[図8]Fv4-IgG1、Fv4-IgG1-F1182、およびpH酸性域におけるFcRnに対する結合が向上したFv4-IgG1-F1182の改変体であるFv4-IgG1-F1181が、ヒトFcRnトランスジェニックマウスに投与されたときの当該マウスの血漿中における投与された抗原結合分子の濃度推移を示す図である。

[図9]Fv4-IgG1、Fv4-IgG1-F1087、およびpH酸性域におけるFcRnに対する結合が向上したFv4-IgG1-F1087の改変体であるFv4-IgG1-F1180、Fv4-IgG1-F1412が、ヒトFcRnトランスジェニックマウスに投与されたときの当該マウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度推移を示す図である。

[図10]Fv4-IgG1、Fv4-IgG1-F1182、およびpH酸性域におけるFcRnに対する結合が向上したFv4-IgG1-F1182の改変体であるFv4-IgG1-F1181が、ヒトFcRnトランスジェニックマウスに投与されたときの当該マウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度推移を示す図である。

[図11]Fv4-IgG1、Fv4-IgG1-F1782またはFv4-IgG1-F1087がヒトFcRnトランスジェニックマウスに投与されたときの当該マウスの血漿中におけるFv4-IgG1、Fv4-IgG1-F1782またはFv4-IgG1-F1087の濃度推移の結果を示す図である。

[図12]Fv4-IgG1、Fv4-IgG1-F1782またはFv4-IgG1-F1087がヒトFcRnトランスジェニックマウスに投与されたときの当該マウスの血漿中における可溶型ヒトIL-6レセプター濃度推移の結果を示す図である。

[図13]Fv4-mIgG1、マウスFcγRIIb、マウスFcγRIIIに対する結合が増強されたFv4-mIgG1の改変体であるFv4-mIgG1-mF44、および更にマウスFcγRIIb、マウスFcγRIIIに対する結合が増強されたFv4-mIgG1の改変体であるFv4-mIgG1-mF46が、ノーマルマウスに投与されたときの当該マウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度推移を示す図である。

[図14]Fv4-mIgG1、マウスFcγRIIb、マウスFcγRIIIに対する結合が増強されたFv4-mIgG1の改変体であるFv4-mIgG1-mF44、および更にマウスFcγRIIb、マウスFcγRIIIに対する結合が増強されたFv4-mIgG1の改変体であるFv4-mIgG1-mF46が、FcγRIII欠損マウスに投与されたときの当該マウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度推移を示す図である。

[図15]Fv4-mIgG1、マウスFcγRIIb、マウスFcγRIIIに対する結合が増強されたFv4-mIgG1の改変体であるFv4-mIgG1-mF44、および更にマウスFcγRIIb、マウスFcγRIIIに対する結合が増強されたFv4-mIgG1の改変体であるFv4-mIgG1-mF46が、Fc受容体γ鎖欠損マウスに投与されたときの当該マウスの血漿中の

ヒトIL-6レセプター濃度推移を示す図である。

[図16]Fv4-mIgG1、マウスFcγRIIb、マウスFcγRIIIに対する結合が増強されたFv4-mIgG1の改変体であるFv4-mIgG1-mF44、および更にマウスFcγRIIb、マウスFcγRIIIに対する結合が増強されたFv4-mIgG1の改変体であるFv4-mIgG1-mF46が、FcγRIIb欠損マウスに投与されたときの当該マウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度推移を示す図である。

[図17]FcγRIIaの多型（R/H）を有するドナー由来の血小板を用いた血小板凝集アッセイにおけるomalizumab-G1d-v3/IgE免疫複合体による血小板凝集能の評価結果を示した図である。

[図18]FcγRIIaの多型（H/H）を有するドナー由来の血小板を用いた血小板凝集アッセイにおけるomalizumab-G1d-v3/IgE免疫複合体による血小板凝集能の評価結果を示した図である。

[図19]洗浄血小板の膜表面のCD62p発現を評価した結果を表した図である。黒色で塗りつぶされたグラフはPBSと反応させた後ADPを加え刺激した場合の結果を示し、グラフの中が塗りつぶされていないものは免疫複合体と反応させた後ADPで刺激した場合の結果を示した図である。

[図20]洗浄血小板の膜表面の活性型インテグリン発現を評価した結果を表した図である。黒色で塗りつぶされたグラフはPBSと反応させた後ADPを加え刺激した場合の結果を示し、グラフの中が塗りつぶされていないものは免疫複合体と反応させた後ADPで刺激した場合の結果を示した図である。

[図21]FcγRIIaの多型(R/H) を有するドナー由来の血小板を用いた血小板凝集アッセイにおけるomalizumab-G1d-v3/IgE免疫複合体およびomalizumab-BP230/IgE免疫複合体による血小板凝集能の評価結果を示す図である。

[図22]洗浄血小板膜表面のCD62p発現を評価した結果を表した図である。灰色で塗りつぶされたグラフはPBSと反応させた後ADPを加え刺激した場合の結果を示し、実線はomalizumab-G1d-v3/IgE免疫複合体、点線はomalizumab-BP230/IgE免疫複合体と反応させた後ADPで刺激した場合の結果を示す。

[図23]洗浄血小板膜表面の活性型インテグリン発現を評価した結果を表した

図である。灰色で塗りつぶされたグラフはPBSと反応させた後ADPを加え刺激した場合の結果を示し、実線はomalizumab-G1d-v3/IgE免疫複合体、点線はomalizumab-BP230/IgE免疫複合体と反応させた後ADPで刺激した場合の結果を示す。

[図24]横軸は各PD variantのFcγRIIbに対する相対的な結合活性の値、縦軸は各PD variantのFcγRIIa R型に対する相対的な結合活性の値を表す。各PD variantの各FcγRに対する結合量の値を、コントロールとした改変導入前の抗体であるIL6R-F652/IL6R-L（IL6R-F652は配列番号：１４２で規定された、EUナンバリングで表される238位のProをAspに置換した改変Fcを含む抗体重鎖）の各FcγRに対する結合量の値で割り、さらに100倍した値を各PD variantの各FcγRに対する相対的な結合活性の値とした。図中のF652というプロットはIL6R-F652/IL6R-Lの値を示す。

[図25]縦軸はP238D改変を有さないGpH7-B3（配列番号：１５９）/GpL16-k0（配列番号：１６０）に各改変を導入した改変体のFcγRIIbに対する相対的な結合活性の値、横軸はP238D改変を有するIL6R-F652（配列番号：１４２）/IL6R-Lに各改変を導入した改変体のFcγRIIbに対する相対的な結合活性の値を示す。なお、各改変体のFcγRIIbに対する結合量の値を、改変導入前の抗体のFcγRIIbに対する結合量の値で割り、さらに100倍した値を相対的な結合活性の値とした。ここで、P238Dを有さないGpH7-B3/GpL16-k0に導入した場合、P238Dを有するIL6R-F652/IL6R-Lに導入した場合共にFcγRIIbに対する結合増強効果を発揮した改変は領域Aに含まれ、P238Dを有さないGpH7-B3/GpL16-k0に導入した場合にはFcγRIIbに対する結合増強効果を発揮するが、P238Dを有するIL6R-F652/IL6R-Lに導入した場合にはFcγRIIbに対する結合増強効果を発揮しない改変は領域Bに含まれる。

[図26]Fc（P238D）/ FcγRIIb細胞外領域複合体の結晶構造を表す。

[図27]Fc（P238D）/ FcγRIIb細胞外領域複合体の結晶構造とFc（WT）/ FcγRIIb細胞外領域複合体のモデル構造とを、FcγRIIb細胞外領域ならびにFc CH2ドメインAに対しCα原子間距離をもとにした最小二乗法により重ね合わせた

図を表す。

[図28]Fc（P238D）/ FcγRIIb細胞外領域複合体の結晶構造とFc（WT）/ FcγRIIb細胞外領域複合体のモデル構造について、Fc CH2ドメインAならびにFc CH2ドメインB単独同士でCα原子間距離をもとにした最小二乗法により重ね合わせをおこない、P238D付近の詳細構造を比較した図を表す。

[図29]Fc（P238D）/ FcγRIIb細胞外領域複合体の結晶構造において、Fc CH2ドメインAのEUナンバリングで表される237位のGlyの主鎖とFcγRIIbの160位のTyrとの間に水素結合が認められることを示す図である。

[図30]Fc（P238D）/ FcγRIIb細胞外領域複合体の結晶構造において、Fc CH2ドメインBのEUナンバリングで表される270位のAspとFcγRIIbの131番目のArgとの間に静電的な相互作用が認められることを示す図である。

[図31]横軸は各2B variantのFcγRIIbに対する相対的な結合活性の値、縦軸は各2B variantのFcγRIIa R型に対する相対的な結合活性の値をそれぞれ示す。各2B variantの各FcγRに対する結合量の値を、コントロールとした改変導入前の抗体（EUナンバリングで表される238位のProをAspに置換した改変Fc）の各FcγRに対する結合量の値で割り、さらに100倍した値を各2B variantの各FcγRに対する相対的な結合活性の値とした。

[図32]Fc（P238D）/ FcγRIIb細胞外領域複合体の結晶構造においてFc Chain AのEUナンバリングで表される233位のGluとFcγRIIb細胞外領域におけるその周辺残基を表す図である。

[図33]Fc（P238D）/ FcγRIIb細胞外領域複合体の結晶構造においてFc Chain AのEUナンバリングで表される330位のAlaとFcγRIIb細胞外領域におけるその周辺残基を表す図である。

[図34]Fc（P238D）/ FcγRIIb細胞外領域複合体および、Fc（WT）/ FcγRIIIa細胞外領域複合体の結晶構造を、Fc Chain Bに対しCα原子間距離をもとにした最小二乗法により重ね合わせ、Fc Chain BのEUナンバリングで表される271位のProの構造を示した図である。

[図35]X線結晶構造解析によって決定されたFc（P208)/FcγRIIb細胞外領域複

合体の図である。Fc部分CH2ドメイン、CH3ドメインのそれぞれについて、向かって左側をドメインA、右側をドメインBとした。

[図36]X線結晶構造解析によって決定されたFc（P208)/FcγRIIb細胞外領域複合体の構造とFc（WT)/FcγRIIa細胞外領域複合体の構造（PDB code:3RY6）を、Fc部分CH2ドメインAにおいてCα原子間距離をもとにした最小二乗法により重ね合わせをおこない、比較したものである。図中太線で描画されたものがFc（P208）/ FcγRIIb細胞外領域複合体であり、細線で描画されたものがFc（WT）/ FcγRIIa細胞外領域複合体の構造である。なお、Fc（WT)/FcγRIIa細胞外領域複合体の構造においては、Fc部分CH2ドメインAのみを描画してある。

[図37]Fc（P208)/FcγRIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造において、FcγRIIbの160番目Tyrと主鎖部分において水素結合を形成するFc部分CH2ドメインAのEUナンバリングで表わされる237位のAsp付近の構造の詳細を示したものである。

[図38]Fc（P208)/FcγRIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造において、FcγRIIbの160番目のTyrと主鎖部分で水素結合を形成するFc部分CH2ドメインAのEUナンバリングで表わされる237位のAsp側鎖周囲のアミノ酸残基の構造を示した図である。

[図39]実施例１０において示されたFc（P238D)/FcγRIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造とFc（P208)/FcγRIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造を、Fc部分CH2ドメインBにおいてCα原子間距離をもとにした最小二乗法により重ね合わせをおこない、EUナンバリングで表わされる266位から271位のループ周辺で比較した図である。本ループ中、Fc（P208)はFc（P238D)と比較し、EUナンバリングで表わされる268位にH268Dの改変を、EUナンバリングで表わされる271位にP271Gの改変を持つ。

[図40]Fc（P208)/FcγRIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造において、Fc部分CH2ドメインBのSer239周辺の構造を、X線結晶構造解析によって得られた2Fo-Fc係数とする電子密度とともに示した図である。

[図41]X線結晶構造解析によって決定されたFc (P208)/FcγRIIaR細胞外領域複合体の立体構造とFc (P208)/FcγRIIb細胞外領域複合体の立体構造を、Cα原子間距離をもとにした最小二乗法により重ね合わせをおこない、比較した図である。

[図42]Fc (P208)/FcγRIIaR細胞外領域複合体のX線結晶構造とFc (P208)/FcγRIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造を、Fc部分CH2ドメインAのEUナンバリングで表わされる237位のAsp付近において、X線結晶構造解析によって得られた2Fo-Fc係数とする電子密度とともに比較した図である。

[図43]Fc (P208)/FcγRIIaR細胞外領域複合体のX線結晶構造とFc (P208)/FcγRIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造を、Fc部分CH2ドメインBのEUナンバリングで表わされる237位のAsp付近において、X線結晶構造解析によって得られた2Fo-Fc係数とする電子密度とともに比較した図である。

[図44]G1dとG4dの定常領域の配列を比較した図である。図中、太枠で囲んだアミノ酸は、G1dとG4dで異なるアミノ酸残基となっている部位を示す。

[図45]ノーマルマウスにおけるGA2-IgG1およびGA2-F1087の血漿中抗体濃度推移を示した図である。

[図46]GA2-IgG1およびGA2-F1087が投与されたノーマルマウスにおける血漿中hIgA濃度推移を示した図である。

[図47]C57BL/6Jマウスにおける278-IgG1および278-F1087の血漿中抗体濃度推移を示した図である。

[図48]278-IgG1および278-F1087が投与されたC57BL/6Jマウスにおける血漿中hIgE (Asp6) 濃度推移を示した図である。

[図49]X線結晶構造解析で決定された6RL#9抗体のFabフラグメントの重鎖CDR3の構造を表す図である。(i)カルシウムイオンが存在する結晶化条件で得られた結晶構造の重鎖CDR３を示す。(ii)カルシウムイオンが存在しない結晶化条件で得られた結晶構造の重鎖CDR3を示す。

[図50]H54/L28-IgG1抗体、FH4-IgG1抗体、および、6RL#9-IgG1抗体が投与されたノーマルマウスの血漿中の各抗体濃度の推移を示す図である。

[図51]H54/L28-IgG1抗体、FH4-IgG1抗体、および、6RL#9-IgG1抗体が投与されたノーマルマウスの血漿中の可溶型ヒトIL-6レセプター（hsIL-6R）の濃度推移を示す図である。

[図52]ヒトVk5-2配列を含む抗体と、ヒトVk5-2配列中の糖鎖付加配列が改変されたh Vk5-2_L65配列を含む抗体のイオン交換クロマトグラムを示す図である。実線はヒトVk5-2配列を含む抗体（重鎖：CIM_H、配列番号：６７および軽鎖：hVk5-2、配列番号：４）のクロマトグラム、破線はhVk5-2_L65配列をもつ抗体（重鎖：CIM_H（配列番号：６７）、軽鎖：hVk5-2_L65（配列番号：７０））のクロマトグラムを表す。

[図53A]LfVk1_Ca配列を含む抗体（重鎖：GC_H、配列番号：５１および軽鎖：LfVk1_Ca、配列番号：８３）と、LfVk1_Ca配列中のAsp（D）残基がAla（A）残基に改変された配列を含む抗体の5℃保存後（実線）または50℃保存後（点線）のイオン交換クロマトグラムである。それぞれ5℃保存後のイオン交換クロマトグラムのもっとも高いピークをメインピークとして、メインピークでy軸ノーマライズした図である。軽鎖としてLfVk1_Ca（配列番号：８３）を含む抗体のクロマトグラムを示す図である。

[図53B]軽鎖としてLfVk1_Ca1（配列番号：８５）を含む抗体のクロマトグラムを示す図である。

[図53C]軽鎖としてLfVk1_Ca2（配列番号：８６）を含む抗体のクロマトグラムを示す図である。

[図53D]軽鎖としてLfVk1_Ca3（配列番号：８７）を含む抗体のクロマトグラムを示す図である。

[図54A]LfVk1_Ca配列を含む抗体（重鎖：GC_H、配列番号：５１および軽鎖：LfVk1_Ca、配列番号：８３）と、LfVk1_Ca配列中の30位（Kabatナンバリング）のAsp（D）残基がSer（S）残基に改変されたLfVk1_Ca6配列（重鎖：GC_H、配列番号：５１および軽鎖：LfVk1_Ca6、配列番号：８８）を含む抗体の5℃保存後（実線）または50℃保存後（点線）のイオン交換クロマトグラムである。それぞれ5℃保存後のイオン交換クロマトグラムのもっとも高いピークを

メインピークとして、メインピークでy軸ノーマライズした図である。軽鎖としてLfVk1_Ca（配列番号：８３）を含む抗体のクロマトグラムを示す図である。

[図54B]軽鎖としてLfVk1_Ca6（配列番号：８８）を含む抗体のクロマトグラムを示す図である。

[図55]Ca依存的に抗原に結合する抗体遺伝子ライブラリが導入された大腸菌から単離された290クローンの配列情報のアミノ酸の分布（Libraryと表示される）と設計されたアミノ酸分布（Designと表示される）との関係を示す図である。横軸はKabatナンバリングで表されるアミノ酸の部位が表される。縦軸はアミノ酸の分布の比率が表される。

[図56]高カルシウムイオン濃度の条件（1.2 mM）下における抗IL-6R抗体（トシリズマブ）、6RC1IgG_010抗体、6RC1IgG_012抗体および6RC1IgG_019抗体のセンサーグラムを表す図である。横軸は時間、縦軸はRU値を示す。

[図57]低カルシウムイオン濃度の条件（3μM）下における抗IL-6R抗体（トシリズマブ）、6RC1IgG_010抗体、6RC1IgG_012抗体および6RC1IgG_019抗体のセンサーグラムを表す図である。横軸は時間、縦軸はRU値を示す。

[図58]pH依存的に抗原に結合する抗体遺伝子ライブラリが導入された大腸菌から単離された132クローンの配列情報のアミノ酸の分布（Libraryと表示される）と設計されたアミノ酸分布（Designと表示される）との関係を示す図である。横軸はKabatナンバリングで表されるアミノ酸の部位が表される。縦軸はアミノ酸の分布の比率が表される。

[図59]抗IL-6R抗体（トシリズマブ）、6RpH#01抗体、6RpH#02抗体および6RpH#03抗体のpH7.4におけるセンサーグラムを表す図である。横軸は時間、縦軸はRU値を示す。

[図60]抗IL-6R抗体（トシリズマブ）、6RpH#01抗体、6RpH#02抗体および6RpH#03抗体のpH6.0におけるセンサーグラムを表す図である。横軸は時間、縦軸はRU値を示す。

[図61A]天然型Fcおよび改変Fcに対する、15または30の独立したリウマチ患者

から単離された血清のECL反応のグラフ表示を表す図である。グラフ表示は、それぞれ、天然型Fc（図６１Ａ）Fv4-YTE（図６１Ｂ）、Fv4-F1166（=YTE + Q438R/S440E）（図６１Ｃ）、Fv4-F1167（=YTE+S424N）（図６１Ｄ）、Fv4-LS（図６１Ｅ）、Fv4-F1170（=LS + Q438R/S440E）（図６１Ｆ），Fv4-F1171（=LS + S424N）（図６１Ｇ）、Fv4-N434H（図６１Ｈ）、Fv4-F1172（=N434H + Q438R /S440E）（図６１Ｉ）、Fv4-F1173（=N434H + S424N）（図６１Ｊ）に対するECL反応のグラフ表示を表す。

[図61B]図６１Ａの続きを示す図である。

[図61C]図６１Ｂの続きを示す図である。

[図61D]図６１Ｃの続きを示す図である。

[図61E]図６１Ｄの続きを示す図である。

[図61F]図６１Ｅの続きを示す図である。

[図61G]図６１Ｆの続きを示す図である。

[図61H]図６１Ｇの続きを示す図である。

[図61I]図６１Ｈの続きを示す図である。

[図61J]図６１Ｉの続きを示す図である。

[図62A]改変Fcに対する、30の独立したリウマチ患者から単離された血清のECL反応のグラフ表示を表す図である。グラフ表示は、それぞれ、Fv4-LS（図６２Ａ）、Fv4-F1380（図６２Ｂ）、Fv4-F1384（図６２Ｃ）、Fv4-F1385（図６２Ｄ）、Fv4-F1386（図６２Ｅ）、Fv4-F1388（図６２Ｆ）および Fv4-F1389（図６２Ｇ）に対するECL反応のグラフ表示を表す。

[図62B]図６２Ａの続きを示す図である。

[図62C]図６２Ｂの続きを示す図である。

[図62D]図６２Ｃの続きを示す図である。

[図62E]図６２Ｄの続きを示す図である。

[図62F]図６２Ｅの続きを示す図である。

[図62G]図６２Ｆの続きを示す図である。

発明を実施するための形態

[0019] 以下の定義および詳細な説明は、本明細書において説明する本発明の理解を容易にするために提供される。

[0020] アミノ酸

本明細書においては、たとえば、Ala/A、Leu/L、Arg/R、Lys/K、Asn/N、Met/M、Asp/D、Phe/F、Cys/C、Pro/P、Gln/Q、Ser/S、Glu/E、Thr/T、Gly/G、Trp/W、His/H、Tyr/Y、Ile/I、Val/Vと表されるように、アミノ酸を1文字コードまたは3文字コード、またはその両方で表記する。

[0021] アミノ酸の改変

抗原結合分子のアミノ酸配列中のアミノ酸の改変のためには、部位特異的変異誘発法（Kunkelら（Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82, 488-492））やOverlap extension PCR等の公知の方法が適宜採用され得る。これらの公知の方法によってアミノ酸の付加、欠失、および/または置換が適宜加えられる。アミノ酸残基を置換するとは、別のアミノ酸残基に置換することで、例えば次の(a)～(c)のような点について改変する事を目的とする。

(a) シート構造、若しくは、らせん構造の領域におけるポリペプチドの背骨構造；

(b) 標的部位における電荷若しくは疎水性、または

(c) 側鎖の大きさ。

[0022] アミノ酸残基はその構造に含まれる側鎖の特性に基づいて以下のグループに分類される：

(1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

(2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

(3) 酸性：Asp、Glu；

(4) 塩基性：His、Lys、Arg；

(5) 鎖の配向に影響する残基：Gly、Pro；及び

(6) 芳香族性：Trp、Tyr、Phe。

[0023] これらの各グループ内でのアミノ酸残基の置換は保存的置換と呼ばれ、一方、他グループ間同士でのアミノ酸残基の置換は非保存的置換と呼ばれる。

本発明における置換は、保存的置換であってもよく、非保存的置換であってもよく、また保存的置換と非保存的置換の組合せであってもよい。また、天然のアミノ酸以外のアミノ酸に置換するアミノ酸の改変方法として、複数の公知の方法もまた採用され得る（Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. (2006) 35, 225-249、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003) 100 (11), 6353-6357）。例えば、終止コドンの１つであるUAGコドン（アンバーコドン）の相補的アンバーサプレッサーtRNAに非天然アミノ酸が結合されたtRNAが含まれる無細胞翻訳系システム（Clover Direct (Protein Express)）等も好適に用いられる。

[0024] また、アミノ酸の改変を表す表現として、特定の位置を表す数字の前後に改変前と改変後のアミノ酸の1文字コードを用いた表現が適宜使用され得る。例えば、抗体定常領域に含まれるFc領域にアミノ酸の置換を加える際に用いられるP238Dという改変は、EUナンバリングで表される238位のProのAspへの置換を表す。すなわち、数字はEUナンバリングで表されるアミノ酸の位置を表し、その前に記載されるアミノ酸の一文字コードは置換前のアミノ酸、そのあとに記載されるアミノ酸の1文字コードは置換後のアミノ酸を表す。

[0025] 及び/または

本明細書において、「および/または」の用語の意義は、成句「および/または」の前後の用語の組合せであって、「および」と「または」が適宜組み合わされたあらゆる組合せを含む。具体的には、例えば「326位、328位、および/または428位のアミノ酸が置換されている」とは以下のアミノ酸の改変のバリエーションが含まれる；

(a) 326位、(b) 328位、(c) 428位、(d)326位および328位、(e) 326位および428位、(f) 328位および428位、(g) 326位および328位および428位。

[0026] 抗原

本明細書において「抗原」は抗原結合ドメインが結合するエピトープを含む限りその構造は特定の構造に限定されない。別の意味では、抗原は無機物でもあり得るし有機物でもあり得るが、本発明の抗原結合分子が結合し得る

態様で生体の体液中に存在する可溶型抗原が好ましい。抗原としては下記のような分子；17-IA、4-1BB、4Dc、6-ケト-PGF1a、8-イソ-PGF2a、8-オキソ-dG、A1 アデノシン受容体、A33、ACE、ACE-2、アクチビン、アクチビンA、アクチビンAB、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンRIA、アクチビンRIA ALK-2、アクチビンRIB ALK-4、アクチビンRIIA、アクチビンRIIB、ADAM、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADAM8、ADAM9、ADAMTS、ADAMTS4、ADAMTS5、アドレシン、aFGF、ALCAM、ALK、ALK-1、ALK-7、アルファ-1-アンチトリプシン、アルファーV/ベータ-1アンタゴニスト、ANG、Ang、APAF-1、APE、APJ、APP、APRIL、AR、ARC、ART、アルテミン、抗Id、ASPARTIC、心房性ナトリウム利尿因子、av/b3インテグリン、Axl、b2M、B7-1、B7-2、B7-H、B-リンパ球刺激因子（BlyS）、BACE、BACE-1、Bad、BAFF、BAFF-R、Bag-1、BAK、Bax、BCA-1、BCAM、Bcl、BCMA、BDNF、b-ECGF、bFGF、BID、Bik、BIM、BLC、BL-CAM、BLK、BMP、BMP-2 BMP-2a、BMP-3 オステオゲニン（Osteogenin）、BMP-4 BMP-2b、BMP-5、BMP-6 Vgr-1、BMP-7（OP-1）、BMP-8（BMP-8a、OP-2）、BMPR、BMPR-IA（ALK-3）、BMPR-IB（ALK-6）、BRK-2、RPK-1、BMPR-II（BRK-3）、BMP、b-NGF、BOK、ボンベシン、骨由来神経栄養因子、BPDE、BPDE-DNA、BTC、補体因子3（C3）、C3a、C4、C5、C5a、C10、CA125、CAD-8、カルシトニン、cAMP、癌胎児性抗原（CEA）、癌関連抗原、カテプシンA、カテプシンB、カテプシンC/DPPI、カテプシンD、カテプシンE、カテプシンH、カテプシンL、カテプシンO、カテプシンS、カテプシンV、カテプシンX/Z/P、CBL、CCI、CCK2、CCL、CCL1、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL2、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、CCL4、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9/10、CCR、CCR1、CCR10、CCR10、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CD1、CD2、CD3、CD3E、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD13、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD27L、CD28、CD29、CD30、CD30L、CD32、CD33（p67タンパク質）、CD34、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD49a、CD52、CD54、CD55、CD56、CD61、CD64

、CD66e、CD74、CD80（B7-1）、CD89、CD95、CD123、CD137、CD138、CD140a、CD146、CD147、CD148、CD152、CD164、CEACAM5、CFTR、cGMP、CINC、ボツリヌス菌毒素、ウェルシュ菌毒素、CKb8-1、CLC、CMV、CMV UL、CNTF、CNTN-1、COX、C-Ret、CRG-2、CT-1、CTACK、CTGF、CTLA-4、CX3CL1、CX3CR1、CXCL、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCR、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、サイトケラチン腫瘍関連抗原、DAN、DCC、DcR3、DC-SIGN、補体制御因子（Decay accelerating factor）、des（1-3）-IGF-I（脳IGF-1）、Dhh、ジゴキシン、DNAM-1、Dnase、Dpp、DPPIV/CD26、Dtk、ECAD、EDA、EDA-A1、EDA-A2、EDAR、EGF、EGFR（ErbB-1）、EMA、EMMPRIN、ENA、エンドセリン受容体、エンケファリナーゼ、eNOS、Eot、エオタキシン1、EpCAM、エフリンB2/EphB4、EPO、ERCC、E-セレクチン、ET-1、ファクターIIa、ファクターVII、ファクターVIIIc、ファクターIX、線維芽細胞活性化タンパク質（FAP）、Fas、FcR1、FEN-1、フェリチン、FGF、FGF-19、FGF-2、FGF3、FGF-8、FGFR、FGFR-3、フィブリン、FL、FLIP、Flt-3、Flt-4、卵胞刺激ホルモン、フラクタルカイン、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、FZD10、G250、Gas6、GCP-2、GCSF、GD2、GD3、GDF、GDF-1、GDF-3（Vgr-2）、GDF-5（BMP-14、CDMP-1）、GDF-6（BMP-13、CDMP-2）、GDF-7（BMP-12、CDMP-3）、GDF-8（ミオスタチン）、GDF-9、GDF-15（MIC-1）、GDNF、GDNF、GFAP、GFRa-1、GFR-アルファ1、GFR-アルファ2、GFR-アルファ3、GITR、グルカゴン、Glut4、糖タンパク質IIb/IIIa（GPIIb/IIIa）、GM-CSF、gp130、gp72、GRO、成長ホルモン放出因子、ハプテン（NP-capまたはNIP-cap）、HB-EGF、HCC、HCMV gBエンベロープ糖タンパク質、HCMV gHエンベロープ糖タンパク質、HCMV UL、造血成長因子（HGF）、Hep B gp120、ヘパラナーゼ、Her2、Her2/neu（ErbB-2）、Her3（ErbB-3）、Her4（ErbB-4）、単純ヘルペスウイルス（HSV） gB糖タンパク質、HSV gD糖タンパク質、HGFA、高分子量黒色腫関連抗原（HMW-MAA）、HIV gp120、HIV IIIB gp 120 V3ループ、HLA、HLA-DR、HM1.24、HMFG PEM、HRG、Hrk、ヒト心臓ミオシン、ヒトサイト

メガロウイルス（HCMV）、ヒト成長ホルモン（HGH）、HVEM、I-309、IAP、ICAM、ICAM-1、ICAM-3、ICE、ICOS、IFNg、Ig、IgA受容体、IgE、IGF、IGF結合タンパク質、IGF-1R、IGFBP、IGF-I、IGF-II、IL、IL-1、IL-1R、IL-2、IL-2R、IL-4、IL-4R、IL-5、IL-5R、IL-6、IL-6R、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-18R、IL-23、インターフェロン（INF）-アルファ、INF-ベータ、INF-ガンマ、インヒビン、iNOS、インスリンA鎖、インスリンB鎖、インスリン様増殖因子1、インテグリンアルファ2、インテグリンアルファ3、インテグリンアルファ4、インテグリンアルファ4/ベータ1、インテグリンアルファ4/ベータ7、インテグリンアルファ5（アルファV）、インテグリンアルファ5/ベータ1、インテグリンアルファ5/ベータ3、インテグリンアルファ6、インテグリンベータ1、インテグリンベータ2、インターフェロンガンマ、IP-10、I-TAC、JE、カリクレイン2、カリクレイン5、カリクレイン6、カリクレイン11、カリクレイン12、カリクレイン14、カリクレイン15、カリクレインL1、カリクレインL2、カリクレインL3、カリクレインL4、KC、KDR、ケラチノサイト増殖因子（KGF）、ラミニン5、LAMP、LAP、LAP（TGF-1）、潜在的TGF-1、潜在的TGF-1 bp1、LBP、LDGF、LECT2、レフティ、ルイスーY抗原、ルイスーY関連抗原、LFA-1、LFA-3、Lfo、LIF、LIGHT、リポタンパク質、LIX、LKN、Lptn、L-セレクチン、LT-a、LT-b、LTB4、LTBP-1、肺表面、黄体形成ホルモン、リンホトキシンベータ受容体、Mac-1、MAdCAM、MAG、MAP2、MARC、MCAM、MCAM、MCK-2、MCP、M-CSF、MDC、Mer、METALLOPROTEASES、MGDF受容体、MGMT、MHC（HLA-DR）、MIF、MIG、MIP、MIP-1-アルファ、MK、MMAC1、MMP、MMP-1、MMP-10、MMP-11、MMP-12、MMP-13、MMP-14、MMP-15、MMP-2、MMP-24、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MPIF、Mpo、MSK、MSP、ムチン（Muc1）、MUC18、ミュラー管抑制物質、Mug、MuSK、NAIP、NAP、NCAD、N-Cアドヘリン、NCA 90、NCAM、NCAM、ネプリライシン、ニューロトロフィン-3、-4、または-6、ニュールツリン、神経成長因子（NGF）、NGFR、NGFーベータ、nNOS、NO、NOS、Npn、NRG-3、NT、NTN、OB、OGG1、OPG、OPN、OSM、OX40L、OX40R、p150、p95、PADPr、副甲状腺ホルモン、PARC、PARP、PBR、PBSF、PCAD、P-カドヘ

リン、PCNA、PDGF、PDGF、PDK-1、PECAM、PEM、PF4、PGE、PGF、PGI2、PGJ2、PIN、PLA2、胎盤性アルカリホスファターゼ（PLAP）、PlGF、PLP、PP14、プロインスリン、プロレラキシン、プロテインC、PS、PSA、PSCA、前立腺特異的膜抗原（PSMA）、PTEN、PTHrp、Ptk、PTN、R51、RANK、RANKL、RANTES、RANTES、レラキシンA鎖、レラキシンB鎖、レニン、呼吸器多核体ウイルス（RSV）F、RSV Fgp、Ret、リウマイド因子、RLIP76、RPA2、RSK、S100、SCF/KL、SDF-1、SERINE、血清アルブミン、sFRP-3、Shh、SIGIRR、SK-1、SLAM、SLPI、SMAC、SMDF、SMOH、SOD、SPARC、Stat、STEAP、STEAP-II、TACE、TACI、TAG-72（腫瘍関連糖タンパク質－72）、TARC、TCA-3、T細胞受容体（例えば、T細胞受容体アルファ/ベータ）、TdT、TECK、TEM1、TEM5、TEM7、TEM8、TERT、睾丸PLAP様アルカリホスファターゼ、TfR、TGF、TGF-アルファ、TGF-ベータ、TGF-ベータ Pan Specific、TGF-ベータRI（ALK-5）、TGF-ベータRII、TGF-ベータRIIb、TGF-ベータRIII、TGF-ベータ1、TGF-ベータ2、TGF-ベータ3、TGF-ベータ4、TGF-ベータ5、トロンビン、胸腺Ck-1、甲状腺刺激ホルモン、Tie、TIMP、TIQ、組織因子、TMEFF2、Tmpo、TMPRSS2、TNF、TNF-アルファ、TNF-アルファベータ、TNF-ベータ2、TNFc、TNF-RI、TNF-RII、TNFRSF10A（TRAIL R1 Apo-2、DR4）、TNFRSF10B（TRAIL R2 DR5、KILLER、TRICK-2A、TRICK-B）、TNFRSF10C（TRAIL R3 DcR1、LIT、TRID）、TNFRSF10D（TRAIL R4 DcR2、TRUNDD）、TNFRSF11A（RANK ODF R、TRANCE R）、TNFRSF11B（OPG OCIF、TR1）、TNFRSF12（TWEAK R FN14）、TNFRSF13B（TACI）、TNFRSF13C（BAFF R）、TNFRSF14（HVEM ATAR、HveA、LIGHT R、TR2）、TNFRSF16（NGFR p75NTR）、TNFRSF17（BCMA）、TNFRSF18（GITR AITR）、TNFRSF19（TROY TAJ、TRADE）、TNFRSF19L（RELT）、TNFRSF1A（TNF RI CD120a、p55-60）、TNFRSF1B（TNF RII CD120b、p75-80）、TNFRSF26（TNFRH3）、TNFRSF3（LTbR TNF RIII、TNFC R）、TNFRSF4（OX40 ACT35、TXGP1 R）、TNFRSF5（CD40 p50）、TNFRSF6（Fas Apo-1、APT1、CD95）、TNFRSF6B（DcR3 M68、TR6）、TNFRSF7（CD27）、TNFRSF8（CD30）、TNFRSF9（4-1BB CD137、ILA）、TNFRSF21（DR6）、TNFRSF22（DcTRAIL R2 TNFRH2）、TNFRST23（DcTRAIL R1 TNFRH1）、TNFRSF25

（DR3 Apo-3、LARD、TR-3、TRAMP、WSL-1）、TNFSF10（TRAIL Apo-2リガンド、TL2）、TNFSF11（TRANCE/RANKリガンド ODF、OPGリガンド）、TNFSF12（TWEAK Apo-3リガンド、DR3リガンド）、TNFSF13（APRIL TALL2）、TNFSF13B（BAFF BLYS、TALL1、THANK、TNFSF20）、TNFSF14（LIGHT HVEMリガンド、LTg）、TNFSF15（TL1A/VEGI）、TNFSF18（GITRリガンド AITRリガンド、TL6）、TNFSF1A（TNF-a コネクチン（Conectin）、DIF、TNFSF2）、TNFSF1B（TNF-b LTa、TNFSF1）、TNFSF3（LTb TNFC、p33）、TNFSF4（OX40リガンド gp34、TXGP1）、TNFSF5（CD40リガンド CD154、gp39、HIGM1、IMD3、TRAP）、TNFSF6（Fasリガンド Apo-1リガンド、APT1リガンド）、TNFSF7（CD27リガンド CD70）、TNFSF8（CD30リガンド CD153）、TNFSF9（4-1BBリガンド CD137リガンド）、TP-1、t-PA、Tpo、TRAIL、TRAIL R、TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRANCE、トランスフェリン受容体、TRF、Trk、TROP-2、TSG、TSLP、腫瘍関連抗原CA125、腫瘍関連抗原発現ルイスY関連炭水化物、TWEAK、TXB2、Ung、uPAR、uPAR-1、ウロキナーゼ、VCAM、VCAM-1、VECAD、VE-Cadherin、VE-cadherin-2、VEFGR-1（flt-1）、VEGF、VEGFR、VEGFR-3（flt-4）、VEGI、VIM、ウイルス抗原、VLA、VLA-1、VLA-4、VNRインテグリン、フォン・ヴィレブランド因子、WIF-1、WNT1、WNT2、WNT2B／13、WNT3、WNT3A、WNT4、WNT5A、WNT5B、WNT6、WNT7A、WNT7B、WNT8A、WNT8B、WNT9A、WNT9A、WNT9B、WNT10A、WNT10B、WNT11、WNT16、XCL1、XCL2、XCR1、XCR1、XEDAR、XIAP、XPD、HMGB1、IgA、Aβ、CD81, CD97, CD98, DDR1, DKK1, EREG、Hsp90, IL-17/IL-17R、IL-20/IL-20R、酸化LDL, PCSK9, prekallikrein , RON, TMEM16F、SOD1, Chromogranin A, Chromogranin B、tau, VAP1、高分子キニノーゲン、IL-31、IL-31R、Nav1.1、Nav1.2、Nav1.3、Nav1.4、Nav1.5、Nav1.6、Nav1.7、Nav1.8、Nav1.9、EPCR、C1, C1q, C1r, C1s, C2, C2a, C2b, C3, C3a, C3b, C4, C4a, C4b, C5, C5a, C5b, C6, C7, C8, C9, factor B, factor D, factor H, properdin、sclerostin、fibrinogen, fibrin, prothrombin, thrombin, 組織因子, factor V, factor Va, factor VII, factor VIIa, factor VIII, factor VIIIa, factor IX, factor IXa, factor X, factor Xa, factor XI, factor XIa, factor XII,

factor XIIa, factor XIII, factor XIIIa, TFPI, antithrombin III, EPCR, トロンボモデュリン、TAPI, tPA, plasminogen, plasmin, PAI-1, PAI-2、GPC3、Syndecan-1、Syndecan-2、Syndecan-3、Syndecan-4、LPA、S1P、Acetyl choline receptor、AdipoR1、AdipoR2、ADP ribosyl cyclase-1、alpha-4/beta-7 integrin、alpha-5/beta-1 integrin、alpha-v/beta-6 integrin、alphavbeta1 integrin、Angiopoietin ligand-2、Angptl2、Anthrax、Cadherin、Carbonic anhydrase-IX、CD105、CD155、CD158a、CD37、CD49b、CD51、CD70、CD72、Claudin 18、Clostridium difficile toxin、CS1、Delta-like protein ligand 4、DHICA oxidase、Dickkopf-1 ligand、Dipeptidyl peptidase IV、EPOR、F protein of RSV、Factor Ia、FasL、Folate receptor alpha、Glucagon receptor、Glucagon-like peptide 1 receptor、Glutamate carboxypeptidase II、GMCSFR、Hepatitis C virus E2 glycoprotein、Hepcidin、IL-17 receptor、IL-22 receptor、IL-23 receptor、IL-3 receptor、Kit tyrosine kinase、Leucine Rich Alpha-2-Glycoprotein 1 (LRG1)、Lysosphingolipid receptor、Membrane glycoprotein OX2、Mesothelin、MET、MICA、MUC-16、Myelin associated glycoprotein、Neuropilin-1、Neuropilin-2、Nogo receptor、PLXNA1、PLXNA2、PLXNA3、PLXNA4A、PLXNA4B 、PLXNB1、PLXNB2、PLXNB3 、PLXNC1 、PLXND1 、Programmed cell death ligand 1、Pro protein convertase PC9、P-selectin glycoprotein ligand-1、RAGE、Reticulon 4、RF、RON-8、SEMA3A、SEMA3B、SEMA3C、SEMA3D、SEMA3E、SEMA3F、SEMA3G、SEMA4A、SEMA4B、SEMA4C、SEMA4D、SEMA4F、SEMA4G、SEMA5A、SEMA5B、SEMA6A、SEMA6B、SEMA6C、SEMA6D、SEMA7A、Shiga like toxin II、Sphingosine-1-phosphate receptor-1、ST2、Staphylococcal lipoteichoic acid、Tenascin、TG2、Thymic stromal lymphoprotein receptor、TNF superfamily receptor 12A、Transmembrane glycoprotein NMB、TREM-1、TREM-2、Trophoblast glycoprotein、TSH receptor、TTR、Tubulin、ULBP2ならびにホルモンおよび成長因子のための受容体のうち生体の体液中で細胞に係留されずに可溶型で存在する分子が例示され得る。受容体の中には、例えば、細胞表面に

発現された受容体等がプロテアーゼによる消化等を含む何らかのメカニズムによって生体の体液中に存在する可溶型抗原も本発明における可溶型抗原として好適に挙げられる。そのような分子の例として本明細書に記載されている可溶型IL-6R分子（J. Immunol. (1994) 152, 4958-4968）やCD20、CD52（Br. J. Haematol. (2003) 123 (5), 850-857）等が例示され得る。また、生体内で固有に発現する分子のみならず、ウイルス等の感染性生物により又はこれらの生物上に提示される抗原や、プリオン等の感染性分子であって生体の体液中に存在する可溶型抗原も、本発明の可溶型抗原として例示され得る。体液としては、血液、血漿、血清、尿、リンパ液、だ液、涙液等の体液等が好適に挙げられる。

[0027] エピトープ

抗原中に存在する抗原決定基を意味するエピトープは、本明細書において開示される抗原結合分子中の抗原結合ドメインが結合する抗原上の部位を意味する。よって、例えば、エピトープは、その構造によって定義され得る。また、当該エピトープを認識する抗原結合分子中の抗原に対する結合活性によっても当該エピトープが定義され得る。抗原がペプチド又はポリペプチドである場合には、エピトープを構成するアミノ酸残基によってエピトープを特定することも可能である。また、エピトープが糖鎖である場合には、特定の糖鎖構造によってエピトープを特定することも可能である。

[0028] 直線状エピトープは、アミノ酸一次配列が認識されたエピトープを含むエピトープである。直線状エピトープは、典型的には、少なくとも3つ、および最も普通には少なくとも5つ、例えば約8ないし約10個、6ないし20個のアミノ酸が固有の配列において含まれる。

[0029] 立体構造エピトープは、直線状エピトープとは対照的に、エピトープを含むアミノ酸の一次配列が、認識されたエピトープの単一の規定成分ではないエピトープ（例えば、アミノ酸の一次配列が、必ずしもエピトープを規定する抗体により認識されないエピトープ）である。立体構造エピトープは、直線状エピトープに対して増大した数のアミノ酸を包含するかもしれない。立

体構造エピトープの認識に関して、抗体は、ペプチドまたはタンパク質の三次元構造を認識する。例えば、タンパク質分子が折り畳まれて三次元構造を形成する場合には、立体構造エピトープを形成するあるアミノ酸および/またはポリペプチド主鎖は、並列となり、抗体がエピトープを認識するのを可能にする。エピトープの立体構造を決定する方法には、例えばX線結晶学、二次元核磁気共鳴分光学並びに部位特異的なスピン標識および電磁常磁性共鳴分光学が含まれるが、これらには限定されない。例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology (1996)、第66巻、Morris (編) を参照。

[0030] 結合活性

下記にIL-6Rに対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子によるエピトープに対する結合の確認方法が例示されるが、IL-6R以外の抗原に対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子によるエピトープに対する結合の確認方法も下記の例示に準じて適宜実施され得る。

[0031] 例えば、IL-6Rに対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子が、IL-6R分子中に存在する線状エピトープを認識することは、たとえば次のようにして確認することができる。上記の目的のためにIL-6Rの細胞外ドメインを構成するアミノ酸配列からなる線状のペプチドが合成される。当該ペプチドは、化学的に合成され得る。あるいは、IL-6RのcDNA中の、細胞外ドメインに相当するアミノ酸配列をコードする領域を利用して、遺伝子工学的手法により得られる。次に、細胞外ドメインを構成するアミノ酸配列からなる線状ペプチドと、IL-6Rに対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子との結合活性が評価される。たとえば、固定化された線状ペプチドを抗原とするELISAによって、当該ペプチドに対する当該抗原結合分子の結合活性が評価され得る。あるいは、IL-6R発現細胞に対する当該抗原結合分子の結合における、線状ペプチドによる阻害のレベルに基づいて、線状ペプチドに対する結合活性が明らかにされ得る。これらの試験によって、線状ペプチドに対する当該抗原結合分子の結合活性が明らかにされ得る。

[0032] また、IL-6Rに対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子が立体構造エピトープを認識することは、次のようにして確認され得る。上記の目的のために、IL-6Rを発現する細胞が調製される。IL-6Rに対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子がIL-6R発現細胞に接触した際に当該細胞に強く結合する一方で、当該抗原結合分子が固定化されたIL-6Rの細胞外ドメインを構成するアミノ酸配列からなる線状ペプチドに対して実質的に結合しないとき等が挙げられる。ここで、実質的に結合しないとは、ヒトIL-6R発現細胞に対する結合活性の80%以下、通常50%以下、好ましくは30%以下、特に好ましくは15%以下の結合活性をいう。

[0033] IL-6Rに対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子のIL-6R発現細胞に対する結合活性を測定する方法としては、例えば、Antibodies A Laboratory Manual記載の方法 (Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) 359-420) が挙げられる。即ちIL-6R発現細胞を抗原とするELISAやFACS (fluorescence activated cell sorting) の原理によって評価され得る。

[0034] ELISAフォーマットにおいて、IL-6Rに対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子のIL-6R発現細胞に対する結合活性は、酵素反応によって生成するシグナルレベルを比較することによって定量的に評価される。すなわち、IL-6R発現細胞を固定化したELISAプレートに被験抗原結合分子を加え、細胞に結合した被験抗原結合分子が、被験抗原結合分子を認識する酵素標識抗体を利用して検出される。あるいはFACSにおいては、被験抗原結合分子の希釈系列を作成し、IL-6R発現細胞に対する抗体結合力価 (titer) を決定することにより、IL-6R発現細胞に対する被験抗原結合分子の結合活性が比較され得る。

[0035] 緩衝液等に懸濁した細胞表面上に発現している抗原に対する被験抗原結合分子の結合は、フローサイトメーターによって検出することができる。フローサイトメーターとしては、例えば、次のような装置が知られている。

FACSCantoTM II

FACSAriaTM

FACSArrayTM

FACSVantageTM SE

FACSCaliburTM （いずれもBD Biosciences社の商品名）

EPICS ALTRA HyPerSort

Cytomics FC 500

EPICS XL-MCL ADC EPICS XL ADC

Cell Lab Quanta / Cell Lab Quanta SC（いずれもBeckman Coulter社の商品名）

[0036] 例えば、IL-6Rに対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子の抗原に対する結合活性の好適な測定方法の一例として、次の方法が挙げられる。まず、IL-6Rを発現する細胞と反応させた被験抗原結合分子を認識するFITC標識した二次抗体で染色する。被験抗原結合分子を適宜好適な緩衝液によって希釈することによって、当該抗原結合分子が所望の濃度に調製して用いられる。例えば、10μg/mlから10 ng/mlまでの間のいずれかの濃度で使用され得る。次に、FACSCalibur（BD社）により蛍光強度と細胞数が測定される。当該細胞に対する抗体の結合量は、CELL QUEST Software（BD社）を用いて解析することにより得られた蛍光強度、すなわちGeometric Meanの値に反映される。すなわち、当該Geometric Meanの値を得ることにより、被験抗原結合分子の結合量によって表される被験抗原結合分子の結合活性が測定され得る。

[0037] IL-6Rに対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子が、ある抗原結合分子とエピトープを共有することは、両者の同じエピトープに対する競合によって確認され得る。抗原結合分子間の競合は、交叉ブロッキングアッセイなどによって検出される。例えば競合ELISAアッセイは、好ましい交叉ブロッキングアッセイである。

[0038] 具体的には、交叉ブロッキングアッセイにおいては、マイクロタイタープレートのウェル上にコートしたIL-6Rタンパク質が、候補となる競合抗原結合分子の存在下、または非存在下でプレインキュベートされた後に、被験抗原

結合分子が添加される。ウェル中のIL-6Rタンパク質に結合した被験抗原結合分子の量は、同じエピトープに対する結合に対して競合する候補となる競合抗原結合分子の結合能に間接的に相関している。すなわち同一エピトープに対する競合抗原結合分子の親和性が大きくなればなる程、被験抗原結合分子のIL-6Rタンパク質をコートしたウェルへの結合活性は低下する。

[0039] IL-6Rタンパク質を介してウェルに結合した被験抗原結合分子の量は、予め抗原結合分子を標識しておくことによって、容易に測定され得る。たとえば、ビオチン標識された抗原結合分子は、アビジンペルオキシダーゼコンジュゲートと適切な基質を使用することにより測定される。ペルオキシダーゼなどの酵素標識を利用した交叉ブロッキングアッセイは、特に競合ELISAアッセイといわれる。抗原結合分子は、検出あるいは測定が可能な他の標識物質で標識され得る。具体的には、放射標識あるいは蛍光標識などが公知である。

[0040] 候補の競合抗原結合分子の非存在下で実施されるコントロール試験において得られる結合活性と比較して、競合抗原結合分子が、IL-6Rに対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子の結合を少なくとも20%、好ましくは少なくとも20-50%、さらに好ましくは少なくとも50%ブロックできるならば、当該被験抗原結合分子は競合抗原結合分子と実質的に同じエピトープに結合するか、又は同じエピトープに対する結合に対して競合する抗原結合分子である。

[0041] IL-6Rに対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子が結合するエピトープの構造が同定されている場合には、被験抗原結合分子と対照抗原結合分子とがエピトープを共有することは、当該エピトープを構成するペプチドにアミノ酸変異を導入したペプチドに対する両者の抗原結合分子の結合活性を比較することによって評価され得る。

[0042] こうした結合活性を測定する方法としては、例えば、前記のELISAフォーマットにおいて変異を導入した線状のペプチドに対する被験抗原結合分子及び対照抗原結合分子の結合活性を比較することによって測定され得る。ELISA以外の方法としては、カラムに結合した当該変異ペプチドに対する結合活性を

、当該カラムに被検抗原結合分子と対照抗原結合分子を流下させた後に溶出液中に溶出される抗原結合分子を定量することによっても測定され得る。変異ペプチドを例えばGSTとの融合ペプチドとしてカラムに吸着させる方法は公知である。

[0043] また、同定されたエピトープが立体エピトープの場合には、被験抗原結合分子と対照抗原結合分子とがエピトープを共有することは、次の方法で評価され得る。まず、IL-6Rを発現する細胞とエピトープに変異が導入されたIL-6Rを発現する細胞が調製される。これらの細胞がPBS等の適切な緩衝液に懸濁された細胞懸濁液に対して被験抗原結合分子と対照抗原結合分子が添加される。次いで、適宜緩衝液で洗浄された細胞懸濁液に対して、被験抗原結合分子と対照抗原結合分子を認識することができるFITC標識された抗体が添加される。標識抗体によって染色された細胞の蛍光強度と細胞数がFACSCalibur（BD社）によって測定される。被験抗原結合分子と対照抗原結合分子の濃度は好適な緩衝液によって適宜希釈することによって所望の濃度に調製して用いられる。例えば、10μg/mlから10 ng/mlまでの間のいずれかの濃度で使用される。当該細胞に対する標識抗体の結合量は、CELL QUEST Software (BD社)を用いて解析することにより得られた蛍光強度、すなわちGeometric Meanの値に反映される。すなわち、当該Geometric Meanの値を得ることにより、標識抗体の結合量によって表される被験抗原結合分子と対照抗原結合分子の結合活性を測定することができる。

[0044] 本方法において、例えば「変異IL-6R発現細胞に実質的に結合しない」ことは、以下の方法によって判断することができる。まず、変異IL-6Rを発現する細胞に対して結合した被験抗原結合分子と対照抗原結合分子が、標識抗体で染色される。次いで細胞の蛍光強度が検出される。蛍光検出にフローサイトメトリーとしてFACSCaliburを用いた場合、得られた蛍光強度はCELL QUEST Softwareを用いて解析され得る。抗原結合分子の存在下および非存在下でのGeometric Meanの値から、この比較値（ΔGeo-Mean）を下記の計算式に基づいて算出することにより、抗原結合分子の結合による蛍光強度の増加割合を求

めることができる。

ΔGeo-Mean＝Geo-Mean（抗原結合分子存在下）／Geo-Mean（抗原結合分子非存在下）

[0045] 解析によって得られる被験抗原結合分子の変異IL-6R発現細胞に対する結合量が反映されたGeometric Mean比較値（変異IL-6R分子ΔGeo-Mean値）を、被験抗原結合分子のIL-6R発現細胞に対する結合量が反映されたΔGeo-Mean比較値と比較する。この場合において、変異IL-6R発現細胞及びIL-6R発現細胞に対するΔGeo-Mean比較値を求める際に使用する被験抗原結合分子の濃度は互いに同一又は実質的に同一の濃度で調製されることが特に好ましい。予めIL-6R中のエピトープを認識していることが確認された抗原結合分子が、対照抗原結合分子として利用される。

[0046] 被験抗原結合分子の変異IL-6R発現細胞に対するΔGeo-Mean比較値が、被験抗原結合分子のIL-6R発現細胞に対するΔGeo-Mean比較値の、少なくとも80%、好ましくは50%、更に好ましくは30%、特に好ましくは15%より小さければ、「変異IL-6R発現細胞に実質的に結合しない」ものとする。Geo-Mean値（Geometric Mean）を求める計算式は、CELL QUEST Software User's Guide（BD biosciences社）に記載されている。比較値を比較することによってそれが実質的に同視し得る程度であれば、被験抗原結合分子と対照抗原結合分子のエピトープは同一であると評価され得る。

[0047] 抗原結合ドメイン

本明細書において、「抗原結合ドメイン」は目的とする抗原に結合するかぎりどのような構造のドメインも使用され得る。そのようなドメインの例として、例えば、抗体の重鎖および軽鎖の可変領域、生体内に存在する細胞膜タンパクであるAvimerに含まれる35アミノ酸程度のAドメインと呼ばれるモジュール（WO2004/044011、WO2005/040229）、細胞膜に発現する糖たんぱく質であるfibronectin中のタンパク質に結合するドメインである10Fn3ドメインを含むAdnectin（WO2002/032925）、ProteinAの58アミノ酸からなる3つのヘリックスの束（bundle）を構成するIgG結合ドメインをscaffoldとするAffibo

dy（WO1995/001937）、33アミノ酸残基を含むターンと2つの逆並行ヘリックスおよびループのサブユニットが繰り返し積み重なった構造を有するアンキリン反復（ankyrin repeat：AR）の分子表面に露出する領域であるDARPins（Designed Ankyrin Repeat proteins）（WO2002/020565）、好中球ゲラチナーゼ結合リポカリン（neutrophil gelatinase-associated lipocalin（NGAL））等のリポカリン分子において高度に保存された8つの逆並行ストランドが中央方向にねじれたバレル構造の片側を支える4つのループ領域であるAnticalin等（WO2003/029462）、ヤツメウナギ、ヌタウナギなど無顎類の獲得免疫システムとしてイムノグロブリンの構造を有さない可変性リンパ球受容体（variable lymphocyte receptor（VLR））のロイシン残基に富んだリピート（leucine-rich-repeat（LRR））モジュールが繰り返し積み重なった馬てい形の構造の内部の並行型シート構造のくぼんだ領域（WO2008/016854）が好適に挙げられる。本発明の抗原結合ドメインの好適な例として、抗体の重鎖および軽鎖の可変領域を含む抗原結合ドメインが挙げられる。こうした抗原結合ドメインの例としては、「scFv（single chain Fv）」、「単鎖抗体（single chain antibody）」、「Fv」、「scFv2（single chain Fv 2）」、「Fab」または「F(ab')2」等が好適に挙げられる。

[0048] 本発明の抗原結合分子における抗原結合ドメインは、同一のエピトープに結合することができる。ここで同一のエピトープは、例えば、配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質中に存在することができる。また、配列番号：1に記載のアミノ酸配列の20番目から365番目のアミノ酸からなるタンパク質中に存在することができる。あるいは、本発明の抗原結合分子における抗原結合ドメインは、互いに異なるエピトープに結合することができる。ここで異なるエピトープは、例えば、配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質中に存在することができる。また、配列番号：1に記載のアミノ酸配列の20番目から365番目のアミノ酸からなるタンパク質中に存在することができる。

[0049] 特異的

特異的とは、特異的に結合する分子の一方の分子がその一または複数の結合する相手方の分子以外の分子に対しては何ら有意な結合を示さない状態をいう。また、抗原結合ドメインが、ある抗原中に含まれる複数のエピトープのうち特定のエピトープに対して特異的である場合にも用いられる。また、抗原結合ドメインが結合するエピトープが複数の異なる抗原に含まれる場合には、当該抗原結合ドメインを有する抗原結合分子は当該エピトープを含む様々な抗原と結合することができる。

[0050] 抗体

本明細書において、抗体とは、天然のものであるかまたは部分的もしくは完全合成により製造された免疫グロブリンをいう。抗体はそれが天然に存在する血漿や血清等の天然資源や抗体を産生するハイブリドーマ細胞の培養上清から単離され得るし、または遺伝子組換え等の手法を用いることによって部分的にもしくは完全に合成され得る。抗体の例としては免疫グロブリンのアイソタイプおよびそれらのアイソタイプのサブクラスが好適に挙げられる。ヒトの免疫グロブリンとして、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgMの9種類のクラス（アイソタイプ）が知られている。本発明の抗体には、これらのアイソタイプのうちIgG1、IgG2、IgG3、IgG4が含まれ得る。IgGの定常領域にはそれから自然に生じる変異体等も含まれる。ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG3、ヒトIgG4抗体の定常領域としては、遺伝子多型による複数のアロタイプ配列がSequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No.91-3242に記載されているが、本発明においてはそのいずれであっても良い。特にヒトIgG1の配列としては、EUナンバリング３５６－３５８番目のアミノ酸配列がDELであってもEEMであってもよい。

[0051] 所望の結合活性を有する抗体を作製する方法は当業者において公知である。以下に、IL-6Rに結合する抗体（抗IL-6R抗体）を作製する方法が例示される。IL-6R以外の抗原に結合する抗体も下記の例示に準じて適宜作製され得る。

[0052] 抗IL-6R抗体は、公知の手段を用いてポリクローナルまたはモノクローナル

抗体として取得され得る。抗IL-6R抗体としては、哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好適に作製され得る。哺乳動物由来のモノクローナル抗体には、ハイブリドーマにより産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主細胞によって産生されるもの等が含まれる。なお本願発明のモノクローナル抗体には、「ヒト化抗体」や「キメラ抗体」が含まれる。

[0053] モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、公知技術を使用することによって、例えば以下のように作製され得る。すなわち、IL-6Rタンパク質を感作抗原として使用して、通常の免疫方法にしたがって哺乳動物が免疫される。得られる免疫細胞が通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合される。次に、通常のスクリーニング法によって、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって抗IL-6R抗体を産生するハイブリドーマが選択され得る。

[0054] 具体的には、モノクローナル抗体の作製は例えば以下に示すように行われる。まず、配列番号：２にそのヌクレオチド配列が開示されたIL-6R遺伝子を発現することによって、抗体取得の感作抗原として使用される配列番号：１で表されるIL-6Rタンパク質が取得され得る。すなわち、IL-6Rをコードする遺伝子配列を公知の発現ベクターに挿入することによって適当な宿主細胞が形質転換される。当該宿主細胞中または培養上清中から所望のヒトIL-6Rタンパク質が公知の方法で精製される。培養上清中から可溶型のIL-6Rを取得するためには、例えば、Mullbergら（J. Immunol. (1994) 152 (10), 4958-4968）によって記載されているような可溶型IL-6Rである、配列番号：１で表されるIL-6Rポリペプチド配列のうち、1から357番目のアミノ酸からなるタンパク質が、配列番号：１で表されるIL-6Rタンパク質の代わりに発現される。また、精製した天然のIL-6Rタンパク質もまた同様に感作抗原として使用され得る。

[0055] 哺乳動物に対する免疫に使用する感作抗原として当該精製IL-6Rタンパク質が使用できる。IL-6Rの部分ペプチドもまた感作抗原として使用できる。この

際、当該部分ペプチドはヒトIL-6Rのアミノ酸配列より化学合成によっても取得され得る。また、IL-6R遺伝子の一部を発現ベクターに組込んで発現させることによっても取得され得る。さらにはタンパク質分解酵素を用いてIL-6Rタンパク質を分解することによっても取得され得るが、部分ペプチドとして用いるIL-6Rペプチドの領域および大きさは特に特別の態様に限定されない。好ましい領域は配列番号：１のアミノ酸配列において20-357番目のアミノ酸に相当するアミノ酸配列から任意の配列が選択され得る。感作抗原とするペプチドを構成するアミノ酸の数は少なくとも5以上、例えば6以上、或いは7以上であることが好ましい。より具体的には8～50、好ましくは10～30残基のペプチドが感作抗原として使用され得る。

[0056] また、IL-6Rタンパク質の所望の部分ポリペプチドやペプチドを異なるポリペプチドと融合した融合タンパク質が感作抗原として利用され得る。感作抗原として使用される融合タンパク質を製造するために、例えば、抗体のFc断片やペプチドタグなどが好適に利用され得る。融合タンパク質を発現するベクターは、所望の二種類又はそれ以上のポリペプチド断片をコードする遺伝子がインフレームで融合され、当該融合遺伝子が前記のように発現ベクターに挿入されることにより作製され得る。融合タンパク質の作製方法はMolecular Cloning 2nd ed. (Sambrook,J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58 (1989) Cold Spring Harbor Lab. press) に記載されている。感作抗原として用いられるIL-6Rの取得方法及びそれを用いた免疫方法は、WO2003/000883、WO2004/022754、WO2006/006693等にも具体的に記載されている。

[0057] 当該感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特定の動物に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましい。一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター、あるいはウサギ、サル等が好適に使用される。

[0058] 公知の方法にしたがって上記の動物が感作抗原により免疫される。例えば、一般的な方法として、感作抗原が哺乳動物の腹腔内または皮下注射によって投与されることにより免疫が実施される。具体的には、PBS (Phosphate-Bu

ffered Saline）や生理食塩水等で適当な希釈倍率で希釈された感作抗原が、所望により通常のアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントと混合され、乳化された後に、該感作抗原が哺乳動物に4から21日毎に数回投与される。また、感作抗原の免疫時には適当な担体が使用され得る。特に分子量の小さい部分ペプチドが感作抗原として用いられる場合には、アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン等の担体タンパク質と結合した該感作抗原ペプチドを免疫することが望ましい場合もある。

[0059] また、所望の抗体を産生するハイブリドーマは、DNA免疫を使用し、以下のようにしても作製され得る。DNA免疫とは、免疫動物中で抗原タンパク質をコードする遺伝子が発現され得るような態様で構築されたベクターDNAが投与された当該免疫動物中で、感作抗原が当該免疫動物の生体内で発現されることによって、免疫刺激が与えられる免疫方法である。蛋白質抗原が免疫動物に投与される一般的な免疫方法と比べて、DNA免疫には、次のような優位性が期待される。

－IL-6Rのような膜蛋白質の構造を維持して免疫刺激が与えられ得る

－免疫抗原を精製する必要が無い

[0060] DNA免疫によって本発明のモノクローナル抗体を得るために、まず、IL-6Rタンパク質を発現するDNAが免疫動物に投与される。IL-6Rをコードする DNAは、PCRなどの公知の方法によって合成され得る。得られたDNAが適当な発現ベクターに挿入され、免疫動物に投与される。発現ベクターとしては、たとえばpcDNA3.1などの市販の発現ベクターが好適に利用され得る。ベクターを生体に投与する方法として、一般的に用いられている方法が利用され得る。たとえば、発現ベクターが吸着した金粒子が、gene gunで免疫動物個体の細胞内に導入されることによってDNA免疫が行われる。さらに、IL-6Rを認識する抗体の作製は国際公開WO2003/104453に記載された方法を用いても作製され得る。

[0061] このように哺乳動物が免疫され、血清中におけるIL-6Rに結合する抗体力価の上昇が確認された後に、哺乳動物から免疫細胞が採取され、細胞融合に供

される。好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が使用され得る。

[0062] 前記免疫細胞と融合される細胞として、哺乳動物のミエローマ細胞が用いられる。ミエローマ細胞は、スクリーニングのための適当な選択マーカーを備えていることが好ましい。選択マーカーとは、特定の培養条件の下で生存できる（あるいはできない）形質を指す。選択マーカーには、ヒポキサンチンーグアニンーホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損（以下HGPRT欠損と省略する）、あるいはチミジンキナーゼ欠損（以下TK欠損と省略する）などが公知である。HGPRTやTKの欠損を有する細胞は、ヒポキサンチンーアミノプテリンーチミジン感受性（以下HAT感受性と省略する）を有する。HAT感受性の細胞はHAT選択培地中でDNA合成を行うことができず死滅するが、正常な細胞と融合すると正常細胞のサルベージ回路を利用してDNAの合成を継続することができるためHAT選択培地中でも増殖するようになる。

[0063] HGPRT欠損やTK欠損の細胞は、それぞれ6チオグアニン、8アザグアニン（以下8AGと省略する）、あるいは5'ブロモデオキシウリジンを含む培地で選択され得る。これらのピリミジンアナログをDNA中に取り込む正常な細胞は死滅する。他方、これらのピリミジンアナログを取り込めないこれらの酵素を欠損した細胞は、選択培地の中で生存することができる。この他G418耐性と呼ばれる選択マーカーは、ネオマイシン耐性遺伝子によって2-デオキシストレプタミン系抗生物質（ゲンタマイシン類似体）に対する耐性を与える。細胞融合に好適な種々のミエローマ細胞が公知である。

[0064] このようなミエローマ細胞として、例えば、P3 (P3x63Ag8.653) (J. Immunol. (1979) 123 (4), 1548-1550)、P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7)、NS-1 (C. Eur. J. Immunol. (1976) 6 (7), 511-519)、MPC-11 (Cell (1976) 8 (3), 405-415)、SP2/0 (Nature (1978) 276 (5685), 269-270)、FO (J. Immunol. Methods (1980) 35 (1-2), 1-21)、S194/5.XX0.BU.1 (J. Exp. Med. (1978) 148 (1), 313-323)、R210 (Nature (1979) 277 (5692), 131-133) 等が好適に使用され得る。

[0065] 基本的には公知の方法、たとえば、ケーラーとミルステインらの方法（Methods Enzymol.（1981）73, 3-46）等に準じて、前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合が行われる。

[0066] より具体的には、例えば細胞融合促進剤の存在下で通常の栄養培養液中で、前記細胞融合が実施され得る。融合促進剤としては、例えばポリエチレングリコール（PEG）、センダイウイルス（HVJ）等が使用され、更に融合効率を高めるために所望によりジメチルスルホキシド等の補助剤が添加されて使用される。

[0067] 免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は任意に設定され得る。例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1から10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用され、さらに、牛胎児血清（FCS）等の血清補液が好適に添加され得る。

[0068] 細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め37℃程度に加温されたPEG溶液（例えば平均分子量1000から6000程度）が通常30から60％（w/v）の濃度で添加される。混合液が緩やかに混合されることによって所望の融合細胞（ハイブリドーマ）が形成される。次いで、上記に挙げた適当な培養液が逐次添加され、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等が除去され得る。

[0069] このようにして得られたハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えばHAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択され得る。所望のハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間（通常、係る十分な時間は数日から数週間である）上記HAT培養液を用いた培養が継続され得る。次いで、通常の限界希釈法によって、所望の抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単一クローニングが実施される。

[0070] このようにして得られたハイブリドーマは、細胞融合に用いられたミエローマが有する選択マーカーに応じた選択培養液を利用することによって選択され得る。例えばHGPRTやTKの欠損を有する細胞は、HAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択され得る。すなわち、HAT感受性のミエローマ細胞を細胞融合に用いた場合、HAT培養液中で、正常細胞との細胞融合に成功した細胞が選択的に増殖し得る。所望のハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、上記HAT培養液を用いた培養が継続される。具体的には、一般に、数日から数週間の培養によって、所望のハイブリドーマが選択され得る。次いで、通常の限界希釈法によって、所望の抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単一クローニングが実施され得る。

[0071] 所望の抗体のスクリーニングおよび単一クローニングが、公知の抗原抗体反応に基づくスクリーニング方法によって好適に実施され得る。例えば、IL-6Rに結合するモノクローナル抗体は、細胞表面に発現したIL-6Rに結合することができる。このようなモノクローナル抗体は、たとえば、FACS (fluorescence activated cell sorting) によってスクリーニングされ得る。FACSは、蛍光抗体と接触させた細胞をレーザー光で解析し、個々の細胞が発する蛍光を測定することによって細胞表面に対する抗体の結合を測定することを可能にするシステムである。

[0072] FACSによって本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングするためには、まずIL-6Rを発現する細胞を調製する。スクリーニングのための好ましい細胞は、IL-6Rを強制発現させた哺乳動物細胞である。宿主細胞として使用した形質転換されていない哺乳動物細胞を対照として用いることによって、細胞表面のIL-6Rに対する抗体の結合活性が選択的に検出され得る。すなわち、宿主細胞に結合せず、IL-6R強制発現細胞に結合する抗体を産生するハイブリドーマを選択することによって、IL-6Rモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが取得され得る。

[0073] あるいは固定化したIL-6R発現細胞に対する抗体の結合活性がELISAの原理

に基づいて評価され得る。たとえば、ELISAプレートのウェルにIL-6R発現細胞が固定化される。ハイブリドーマの培養上清をウェル内の固定化細胞に接触させ、固定化細胞に結合する抗体が検出される。モノクローナル抗体がマウス由来の場合、細胞に結合した抗体は、抗マウスイムノグロブリン抗体によって検出され得る。これらのスクリーニングによって選択された、抗原に対する結合能を有する所望の抗体を産生するハイブリドーマは、限界希釈法等によりクローニングされ得る。

[0074] このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは通常の培養液中で継代培養され得る。また、該ハイブリドーマは液体窒素中で長期にわたって保存され得る。

[0075] 当該ハイブリドーマを通常の方法に従い培養し、その培養上清から所望のモノクローナル抗体が取得され得る。あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖せしめ、その腹水からモノクローナル抗体が取得され得る。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに好適なものである。

[0076] 当該ハイブリドーマ等の抗体産生細胞からクローニングされる抗体遺伝子によってコードされる抗体も好適に利用され得る。クローニングした抗体遺伝子を適当なベクターに組み込んで宿主に導入することによって、当該遺伝子によってコードされる抗体が発現する。抗体遺伝子の単離と、ベクターへの導入、そして宿主細胞の形質転換のための方法は例えば、Vandammeらによって既に確立されている（Eur.J. Biochem. (1990) 192 (3), 767-775）。下記に述べるように組換え抗体の製造方法もまた公知である。

[0077] たとえば、抗IL-6R抗体を産生するハイブリドーマ細胞から、抗IL-6R抗体の可変領域（V領域）をコードするcDNAが取得される。そのために、通常、まずハイブリドーマから全RNAが抽出される。細胞からmRNAを抽出するための方法として、たとえば次のような方法を利用することができる。

－グアニジン超遠心法（Biochemistry (1979) 18 (24), 5294-5299）

－AGPC法（Anal. Biochem. (1987) 162 (1), 156-159）

[0078] 抽出されたmRNAは、mRNA Purification Kit （GEヘルスケアバイオサイエンス製）等を使用して精製され得る。あるいは、QuickPrep mRNA Purification Kit （GEヘルスケアバイオサイエンス製）などのように、細胞から直接全mRNAを抽出するためのキットも市販されている。このようなキットを用いて、ハイブリドーマからmRNAが取得され得る。得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域をコードするcDNAが合成され得る。cDNAは、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit（生化学工業社製）等によって合成され得る。また、cDNAの合成および増幅のために、SMART RACE cDNA 増幅キット（Clontech製）およびPCRを用いた5'-RACE法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85 (23), 8998-9002、Nucleic Acids Res. (1989) 17 (8), 2919-2932）が適宜利用され得る。更にこうしたcDNAの合成の過程においてcDNAの両末端に後述する適切な制限酵素サイトが導入され得る。

[0079] 得られたPCR産物から目的とするcDNA断片が精製され、次いでベクターDNAと連結される。このように組換えベクターが作製され、大腸菌等に導入されコロニーが選択された後に、該コロニーを形成した大腸菌から所望の組換えベクターが調製され得る。そして、該組換えベクターが目的とするcDNAの塩基配列を有しているか否かについて、公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法等により確認される。

[0080] 可変領域をコードする遺伝子を取得するためには、可変領域遺伝子増幅用のプライマーを使った5'-RACE法を利用するのが簡便である。まずハイブリドーマ細胞より抽出されたRNAを鋳型としてcDNAが合成され、5'-RACE cDNAライブラリが得られる。5'-RACE cDNAライブラリの合成にはSMART RACE cDNA 増幅キットなど市販のキットが適宜用いられる。

[0081] 得られた5'-RACE cDNAライブラリを鋳型として、PCR法によって抗体遺伝子が増幅される。公知の抗体遺伝子配列をもとにマウス抗体遺伝子増幅用のプライマーがデザインされ得る。これらのプライマーは、イムノグロブリンのサブクラスごとに異なる塩基配列である。したがって、サブクラスは予めIso Stripマウスモノクローナル抗体アイソタイピングキット（ロシュ・ダイア

グノスティックス）などの市販キットを用いて決定しておくことが望ましい。

[0082] 具体的には、たとえばマウスIgGをコードする遺伝子の取得を目的とするときには、重鎖としてγ１、γ2a、γ2b、γ3、軽鎖としてκ鎖とλ鎖をコードする遺伝子の増幅が可能なプライマーが利用され得る。IgGの可変領域遺伝子を増幅するためには、一般に3'側のプライマーには可変領域に近い定常領域に相当する部分にアニールするプライマーが利用される。一方5'側のプライマーには、5' RACE cDNAライブラリ作製キットに付属するプライマーが利用される。

[0083] こうして増幅されたPCR産物を利用して、重鎖と軽鎖の組み合せからなるイムノグロブリンが再構成され得る。再構成されたイムノグロブリンの、IL-6Rに対する結合活性を指標として、所望の抗体がスクリーニングされ得る。たとえばIL-6Rに対する抗体の取得を目的とするとき、抗体のIL-6Rに対する結合は、特異的であることがさらに好ましい。IL-6Rに結合する抗体は、たとえば次のようにしてスクリーニングされ得る；

（１）ハイブリドーマから得られたcDNAによってコードされるV領域を含む抗体をIL-6R発現細胞に接触させる工程、

（２）IL-6R発現細胞と抗体との結合を検出する工程、および

（３）IL-6R発現細胞に結合する抗体を選択する工程。

[0084] 抗体とIL-6R発現細胞との結合を検出する方法は公知である。具体的には、先に述べたFACSなどの手法によって、抗体とIL-6R発現細胞との結合が検出され得る。抗体の結合活性を評価するためにIL-6R発現細胞の固定標本が適宜利用され得る。

[0085] 結合活性を指標とする抗体のスクリーニング方法として、ファージベクターを利用したパニング法も好適に用いられる。ポリクローナルな抗体発現細胞群より抗体遺伝子を重鎖と軽鎖のサブクラスのライブラリとして取得した場合には、ファージベクターを利用したスクリーニング方法が有利である。重鎖と軽鎖の可変領域をコードする遺伝子は、適当なリンカー配列で連結す

ることによってシングルチェインFv（scFv）を形成することができる。scFvをコードする遺伝子をファージベクターに挿入することにより、scFvを表面に発現するファージが取得され得る。このファージと所望の抗原との接触の後に、抗原に結合したファージを回収することによって、目的の結合活性を有するscFvをコードするDNAが回収され得る。この操作を必要に応じて繰り返すことにより、所望の結合活性を有するscFvが濃縮され得る。

[0086] 目的とする抗IL-6R抗体のV領域をコードするcDNAが得られた後に、当該cDNAの両末端に挿入した制限酵素サイトを認識する制限酵素によって該cDNAが消化される。好ましい制限酵素は、抗体遺伝子を構成する塩基配列に出現する頻度が低い塩基配列を認識して消化する。更に１コピーの消化断片をベクターに正しい方向で挿入するためには、付着末端を与える制限酵素の挿入が好ましい。上記のように消化された抗IL-6R抗体のV領域をコードするcDNAを適当な発現ベクターに挿入することによって、抗体発現ベクターが取得され得る。このとき、抗体定常領域（C領域）をコードする遺伝子と、前記V領域をコードする遺伝子とがインフレームで融合されれば、キメラ抗体が取得される。ここで、キメラ抗体とは、定常領域と可変領域の由来が異なることをいう。したがって、マウスーヒトなどの異種キメラ抗体に加え、ヒトーヒト同種キメラ抗体も、本発明におけるキメラ抗体に含まれる。予め定常領域を有する発現ベクターに、前記V領域遺伝子を挿入することによって、キメラ抗体発現ベクターが構築され得る。具体的には、たとえば、所望の抗体定常領域（C領域）をコードするDNAを保持した発現ベクターの5'側に、前記V領域遺伝子を消化する制限酵素の制限酵素認識配列が適宜配置され得る。同じ組み合わせの制限酵素で消化された両者がインフレームで融合されることによって、キメラ抗体発現ベクターが構築される。

[0087] 抗IL-6Rモノクローナル抗体を製造するために、抗体遺伝子が発現制御領域による制御の下で発現するように発現ベクターに組み込まれる。抗体を発現するための発現制御領域とは、例えば、エンハンサーやプロモーターを含む。また、発現した抗体が細胞外に分泌されるように、適切なシグナル配列が

アミノ末端に付加され得る。後に記載される実施例ではシグナル配列として、アミノ酸配列MGWSCIILFLVATATGVHS（配列番号：３）を有するペプチドが使用されているが、これ以外にも適したシグナル配列が付加される。発現されたポリペプチドは上記配列のカルボキシル末端部分で切断され、切断されたポリペプチドが成熟ポリペプチドとして細胞外に分泌され得る。次いで、この発現ベクターによって適当な宿主細胞が形質転換されることによって、抗IL-6R抗体をコードするDNAを発現する組換え細胞が取得され得る。

[0088] 抗体遺伝子の発現のために、抗体重鎖（H鎖）および軽鎖（L鎖）をコードするDNAは、それぞれ別の発現ベクターに組み込まれる。H鎖とL鎖が組み込まれたベクターによって、同じ宿主細胞に同時に形質転換（co-transfect）されることによって、H鎖とL鎖を備えた抗体分子が発現され得る。あるいはH鎖およびL鎖をコードするDNAが単一の発現ベクターに組み込まれることによって宿主細胞が形質転換され得る（国際公開WO 1994/011523を参照のこと）。

[0089] 単離された抗体遺伝子を適当な宿主に導入することによって抗体を作製するための宿主細胞と発現ベクターの多くの組み合わせが公知である。これらの発現系は、いずれも本発明の抗原結合ドメインを単離するのに応用され得る。真核細胞が宿主細胞として使用される場合、動物細胞、植物細胞、あるいは真菌細胞が適宜使用され得る。具体的には、動物細胞としては、次のような細胞が例示され得る。

（１）哺乳類細胞、：CHO、COS、ミエローマ、BHK（baby hamster kidney）、Hela、Vero、HEK（human embryonic kidney）293、Freestyle™293 など

（２）両生類細胞：アフリカツメガエル卵母細胞など

（３）昆虫細胞：sf9、sf21、Tn5など

[0090] あるいは植物細胞としては、ニコティアナ・タバカム（Nicotiana tabacum）などのニコティアナ（Nicotiana）属由来の細胞による抗体遺伝子の発現系が公知である。植物細胞の形質転換には、カルス培養した細胞が適宜利用され得る。

[0091] 更に真菌細胞としては、次のような細胞を利用することができる。

ー酵母：サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces serevisiae）などのサッカロミセス（Saccharomyces ）属、メタノール資化酵母（Pichia pastoris）などのPichia属

ー糸状菌：アスペスギルス・ニガー（Aspergillus niger）などのアスペルギルス（Aspergillus ）属

[0092] また、原核細胞を利用した抗体遺伝子の発現系も公知である。たとえば、細菌細胞を用いる場合、大腸菌（E. coli ）、枯草菌などの細菌細胞が適宜利用され得る。これらの細胞中に、目的とする抗体遺伝子を含む発現ベクターが形質転換によって導入される。形質転換された細胞をin vitroで培養することにより、当該形質転換細胞の培養物から所望の抗体が取得され得る。

[0093] 組換え抗体の産生には、上記宿主細胞に加えて、トランスジェニック動物も利用され得る。すなわち所望の抗体をコードする遺伝子が導入された動物から、当該抗体を得ることができる。例えば、抗体遺伝子は、乳汁中に固有に産生されるタンパク質をコードする遺伝子の内部にインフレームで挿入することによって融合遺伝子として構築され得る。乳汁中に分泌されるタンパク質として、たとえば、ヤギβカゼインなどを利用され得る。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA断片はヤギの胚へ注入され、当該注入された胚が雌のヤギへ導入される。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ（またはその子孫）が産生する乳汁からは、所望の抗体が乳汁タンパク質との融合タンパク質として取得され得る。また、トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、ホルモンがトランスジェニックヤギに対して投与され得る（Bio/Technology (1994), 12 (7), 699-702）。

[0094] 本明細書において記載される抗原結合分子がヒトに投与される場合、当該分子における抗原結合ドメインとして、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体由来の抗原結合ドメインが適宜採用され得る。遺伝子組換え型抗体には、例えば、ヒト化（Humanized）抗体等が含まれる。これらの改変抗体は、公知の方法を用いて適

宜製造される。

[0095] 本明細書において記載される抗原結合分子における抗原結合ドメインを作製するために用いられる抗体の可変領域は、通常、４つのフレームワーク領域（FR）にはさまれた３つの相補性決定領域（complementarity-determining region ; CDR）で構成されている。CDRは、実質的に、抗体の結合特異性を決定している領域である。CDRのアミノ酸配列は多様性に富む。一方FRを構成するアミノ酸配列は、異なる結合特異性を有する抗体の間でも、高い同一性を示すことが多い。そのため、一般に、CDRの移植によって、ある抗体の結合特異性を、他の抗体に移植することができるとされている。

[0096] ヒト化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称される。具体的には、ヒト以外の動物、たとえばマウス抗体のCDRをヒト抗体に移植したヒト化抗体などが公知である。ヒト化抗体を得るための一般的な遺伝子組換え手法も知られている。具体的には、マウスの抗体のCDRをヒトのFRに移植するための方法として、たとえばOverlap Extension PCRが公知である。Overlap Extension PCRにおいては、ヒト抗体のFRを合成するためのプライマーに、移植すべきマウス抗体のCDRをコードする塩基配列が付加される。プライマーは４つのFRのそれぞれについて用意される。一般に、マウスCDRのヒトFRへの移植においては、マウスのFRと同一性の高いヒトFRを選択するのが、CDRの機能の維持において有利であるとされている。すなわち、一般に、移植すべきマウスCDRに隣接しているFRのアミノ酸配列と同一性の高いアミノ酸配列からなるヒトFRを利用するのが好ましい。

[0097] また連結される塩基配列は、互いにインフレームで接続されるようにデザインされる。それぞれのプライマーによってヒトFRが個別に合成される。その結果、各FRにマウスCDRをコードするDNAが付加された産物が得られる。各産物のマウスCDRをコードする塩基配列は、互いにオーバーラップするようにデザインされている。続いて、ヒト抗体遺伝子を鋳型として合成された産物のオーバーラップしたCDR部分を互いにアニールさせて相補鎖合成反応が行われる。この反応によって、ヒトFRがマウスCDRの配列を介して連結される。

[0098] 最終的に３つのCDRと４つのFRが連結されたV領域遺伝子は、その5'末端と3'末端にアニールし適当な制限酵素認識配列を付加されたプライマーによってその全長が増幅される。上記のように得られたDNAとヒト抗体C領域をコードするDNAとをインフレームで融合するように発現ベクター中に挿入することによって、ヒト型抗体発現用ベクターが作成できる。当該組込みベクターを宿主に導入して組換え細胞を樹立した後に、当該組換え細胞を培養し、当該ヒト化抗体をコードするDNAを発現させることによって、当該ヒト化抗体が当該培養細胞の培養物中に産生される（欧州特許公開EP239400、国際公開WO1996/002576参照）。

[0099] 上記のように作製されたヒト化抗体の抗原に対する結合活性を定性的又は定量的に測定し、評価することによって、CDRを介して連結されたときに該CDRが良好な抗原結合部位を形成するようなヒト抗体のFRが好適に選択できる。必要に応じ、再構成ヒト抗体のCDRが適切な抗原結合部位を形成するようにFRのアミノ酸残基を置換することもできる。たとえば、マウスCDRのヒトFRへの移植に用いたPCR法を応用して、FRにアミノ酸配列の変異を導入することができる。具体的には、FRにアニーリングするプライマーに部分的な塩基配列の変異を導入することができる。このようなプライマーによって合成されたFRには、塩基配列の変異が導入される。アミノ酸を置換した変異型抗体の抗原に対する結合活性を上記の方法で測定し評価することによって所望の性質を有する変異FR配列が選択され得る（Cancer Res., (1993) 53, 851-856）。

[0100] また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物（国際公開WO1993/012227、WO1992/003918、WO1994/002602、WO1994/025585、WO1996/034096、WO1996/033735参照）を免疫動物とし、DNA免疫により所望のヒト抗体が取得され得る。

[0101] さらに、ヒト抗体ライブラリを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体のV領域が一本鎖抗体（scFv）としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現される。抗原に結合するscFvを発現するファージが選択され得る。選択されたファージの遺伝

子を解析することにより、抗原に結合するヒト抗体のV領域をコードするDNA配列が決定できる。抗原に結合するscFvのDNA配列を決定した後、当該V領域配列を所望のヒト抗体C領域の配列とインフレームで融合させた後に適当な発現ベクターに挿入することによって発現ベクターが作製され得る。当該発現ベクターを上記に挙げたような好適な発現細胞中に導入し、該ヒト抗体をコードする遺伝子を発現させることにより当該ヒト抗体が取得される。これらの方法は既に公知である（国際公開WO1992/001047、WO1992/020791、WO1993/006213、WO1993/011236、WO1993/019172、WO1995/001438、WO1995/015388参照）。

[0102] また、抗体遺伝子を取得する方法としてBernasconiら（Science (2002) 298, 2199-2202）またはWO2008/081008に記載のようなB細胞クローニング（それぞれの抗体のコード配列の同定およびクローニング、その単離、およびそれぞれの抗体（特に、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4）の作製のための発現ベクター構築のための使用等）の手法が、上記のほか適宜使用され得る。

[0103] EUナンバリングおよびKabatナンバリング

本発明で使用されている方法によると、抗体のCDRとFRに割り当てられるアミノ酸位置はKabatにしたがって規定される（Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health, Bethesda, Md., 1987年および1991年）。本明細書において、抗原結合分子が抗体または抗原結合断片である場合、可変領域のアミノ酸はKabatナンバリングにしたがい、定常領域のアミノ酸はKabatのアミノ酸位置に準じたEUナンバリングにしたがって表される。

[0104] イオン濃度の条件

金属イオン濃度の条件

本発明の一つの態様では、イオン濃度とは金属イオン濃度のことをいう。「金属イオン」とは、水素を除くアルカリ金属および銅族等の第I族、アルカリ土類金属および亜鉛族等の第II族、ホウ素を除く第III族、炭素とケイ素を除く第IV族、鉄族および白金族等の第VIII族、V、VIおよびVII族の各A亜族に

属する元素と、アンチモン、ビスマス、ポロニウム等の金属元素のイオンをいう。金属原子は原子価電子を放出して陽イオンになる性質を有しており、これをイオン化傾向という。イオン化傾向の大きい金属は、化学的に活性に富むとされる。

[0105] 本発明で好適な金属イオンの例としてカルシウムイオンが挙げられる。カルシウムイオンは多くの生命現象の調節に関与しており、骨格筋、平滑筋および心筋等の筋肉の収縮、白血球の運動および貪食等の活性化、血小板の変形および分泌等の活性化、リンパ球の活性化、ヒスタミンの分泌等の肥満細胞の活性化、カテコールアミンα受容体やアセチルコリン受容体を介する細胞の応答、エキソサイトーシス、ニューロン終末からの伝達物質の放出、ニューロンの軸策流等にカルシウムイオンが関与している。細胞内のカルシウムイオン受容体として、複数個のカルシウムイオン結合部位を有し、分子進化上共通の起源から由来したと考えられるトロポニンC、カルモジュリン、パルブアルブミン、ミオシン軽鎖等が知られており、その結合モチーフも数多く知られている。例えば 、カドヘリンドメイン、カルモジュリンに含まれるEFハンド、Protein kinase Cに含まれるC2ドメイン、血液凝固タンパク質FactorIXに含まれるGlaドメイン、アシアログライコプロテインレセプターやマンノース結合レセプターに含まれるC型レクチン、LDL受容体に含まれるAドメイン、アネキシン、トロンボスポンジン3型ドメインおよびEGF様ドメインがよく知られている。

[0106] 本発明においては、金属イオンがカルシウムイオンの場合には、カルシウムイオン濃度の条件として低カルシウムイオン濃度の条件と高カルシウムイオン濃度の条件が挙げられる。カルシウムイオン濃度の条件によって結合活性が変化するとは、低カルシウムイオン濃度と高カルシウムイオン濃度の条件の違いによって抗原に対する抗原結合分子の結合活性が変化することをいう。例えば、低カルシウムイオン濃度の条件下における抗原に対する抗原結合分子の結合活性よりも高カルシウムイオン濃度の条件下における抗原に対する抗原結合分子の結合活性の方が高い場合が挙げられる。また、高カルシ

ウムイオン濃度の条件下における抗原に対する抗原結合分子の結合活性よりも低カルシウムイオン濃度の条件下における抗原に対する抗原結合分子の結合活性の方が高い場合もまた挙げられる。

[0107] 本明細書において、高カルシウムイオン濃度とはとくに一義的な数値に限定されるわけではないが、好適には100μMから10 mMの間から選択される濃度であり得る。また、別の態様では、200μMから5 mMの間から選択される濃度でもあり得る。また、異なる態様では500μMから2.5 mMの間から選択される濃度でもあり得るし、ほかの態様では200μMから2 mMの間から選択される濃度でもあり得る。さらに400μMから1.5 mMの間から選択される濃度でもあり得る。特に生体内の血漿中（血中）でのカルシウムイオン濃度に近い500μMから2.5 mMの間から選択される濃度が好適に挙げられる。

[0108] 本明細書において、低カルシウムイオン濃度とはとくに一義的な数値に限定されるわけではないが、好適には0.1μMから30μMの間から選択される濃度であり得る。また、別の態様では、0.2μMから20μMの間から選択される濃度でもあり得る。また、異なる態様では0.5μMから10μMの間から選択される濃度でもあり得るし、ほかの態様では1μMから5μMの間から選択される濃度でもあり得る。さらに2μMから4μMの間から選択される濃度でもあり得る。特に生体内の早期エンドソーム内でのイオン化カルシウム濃度に近い1μMから5μMの間から選択される濃度が好適に挙げられる。

[0109] 本発明において、低カルシウムイオン濃度の条件における抗原に対する結合活性が高カルシウムイオン濃度の条件における抗原に対する結合活性より低いとは、抗原結合分子の0.1μMから30μMの間から選択されるカルシウムイオン濃度での抗原に対する結合活性が、100μMから10 mMの間から選択されるカルシウムイオン濃度での抗原に対する結合活性より弱いことを意味する。好ましくは、抗原結合分子の0.5μMから10μMの間から選択されるカルシウムイオン濃度での抗原に対する結合活性が、200μMから5 mMの間から選択されるカルシウムイオン濃度での抗原に対する結合活性より弱いことを意味し、特に好ましくは、生体内の早期エンドソーム内のカルシウムイオン濃度にお

ける抗原結合活性が、生体内の血漿中のカルシウムイオン濃度における抗原結合活性より弱いことを意味し、具体的には、抗原結合分子の1μMから5μMの間から選択されるカルシウムイオン濃度での抗原に対する結合活性が、500μMから2.5 mMの間から選択されるカルシウムイオン濃度での抗原に対する結合活性より弱いことを意味する。

[0110] 金属イオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性が変化しているか否かは、例えば前記の結合活性の項で記載されたような公知の測定方法を使用することによって決定され得る。例えば、低カルシウムイオン濃度の条件下における抗原に対する抗原結合分子の結合活性よりも高カルシウムイオン濃度の条件下における抗原に対する抗原結合分子の結合活性の方が高く変化することを確認するためには、低カルシウムイオン濃度および高カルシウムイオン濃度の条件下における抗原に対する抗原結合分子の結合活性が比較される。

[0111] さらに本発明において、「低カルシウムイオン濃度の条件における抗原に対する結合活性が高カルシウムイオン濃度の条件における抗原に対する結合活性より低い」という表現は、抗原結合分子の高カルシウムイオン濃度条件下における抗原に対する結合活性が低カルシウムイオン濃度条件下における抗原に対する結合活性よりも高いと表現することもできる。なお本発明においては、「低カルシウムイオン濃度の条件における抗原に対する結合活性が高カルシウムイオン濃度の条件における抗原に対する結合活性より低い」を「低カルシウムイオン濃度条件下における抗原結合能が高カルシウムイオン濃度条件下における抗原に対する結合能よりも弱い」と記載する場合もあり、また、「低カルシウムイオン濃度の条件における抗原結合活性を高カルシウムイオン濃度の条件における抗原に対する結合活性より低下させる」を「低カルシウムイオン濃度条件下における抗原結合能を高カルシウムイオン濃度条件下における抗原に対する結合能よりも弱くする」と記載する場合もある。

[0112] 抗原に対する結合活性を測定する際のカルシウムイオン濃度以外の条件は

、当業者が適宜選択することが可能であり、特に限定されない。例えば、HEPESバッファー、37℃の条件において測定することが可能である。例えば、Biacore（GE Healthcare）などを用いて測定することが可能である。抗原結合分子と抗原との結合活性の測定は、抗原が可溶型抗原である場合は、抗原結合分子を固定化したチップへ、抗原をアナライトとして流すことで可溶型抗原に対する結合活性を評価することが可能であり、抗原が膜型抗原である場合は、抗原を固定化したチップへ、抗原結合分子をアナライトとして流すことで膜型抗原に対する結合活性を評価することが可能である。

[0113] 本発明の抗原結合分子において、低カルシウムイオン濃度の条件における抗原に対する結合活性が高カルシウムイオン濃度の条件における抗原に対する結合活性よりも弱い限り、低カルシウムイオン濃度条件下における抗原に対する結合活性と高カルシウムイオン濃度条件下における抗原に対する結合活性の比は特に限定されないが、好ましくは抗原に対する低カルシウムイオン濃度の条件におけるKD（Dissociation constant：解離定数）と高カルシウムイオン濃度の条件におけるKDの比であるKD（Ca 3μM)/KD（Ca 2 mM)の値が２以上であり、さらに好ましくはKD（Ca 3μM)/KD（Ca 2 mM)の値が10以上であり、さらに好ましくはKD（Ca 3μM)/KD（Ca 2 mM)の値が40以上である。KD（Ca 3μM)/KD（Ca 2 mM)の値の上限は特に限定されず、当業者の技術において作製可能な限り、400、1000、10000等、いかなる値でもよい。また、KD（Ca3μM)/KD（Ca 1.2 mM)の値でも特定され得る。すなわち、KD（Ca 3μM)/KD（Ca 1.2 mM)の値が２以上であり、さらに好ましくはKD（Ca 3μM)/KD（Ca 1.2 mM)の値が10以上であり、さらに好ましくはKD（Ca 3μM)/KD（Ca 1.2 mM)の値が40以上である。KD（Ca 3μM)/KD（Ca 1.2 mM)の値の上限は特に限定されず、当業者の技術において作製可能な限り、400、1000、10000等、いかなる値でもよい。

[0114] 抗原に対する結合活性の値として、抗原が可溶型抗原の場合はKD（解離定数）を用いることが可能であるが、抗原が膜型抗原の場合は見かけのKD（Apparent dissociation constant：見かけの解離定数）を用いることが可能であ

る。KD（解離定数）、および、見かけのKD（見かけの解離定数）は、当業者公知の方法で測定することが可能であり、例えばBiacore（GE healthcare）、スキャッチャードプロット、フローサイトメーター等を用いることが可能である。

[0115] また、本発明の抗原結合分子の低カルシウム濃度の条件における抗原に対する結合活性と高カルシウム濃度の条件における抗原に対する結合活性の比を示す他の指標として、例えば、解離速度定数であるkd（Dissociation rate constant：解離速度定数）もまた好適に用いられ得る。結合活性の比を示す指標としてKD（解離定数）の代わりにkd（解離速度定数）を用いる場合、抗原に対する低カルシウム濃度の条件におけるkd（解離速度定数）と高カルシウム濃度の条件におけるkd（解離速度定数）の比であるkd（低カルシウム濃度の条件）/kd（高カルシウム濃度の条件）の値は、好ましくは2以上であり、さらに好ましくは5以上であり、さらに好ましくは10以上であり、より好ましくは30以上である。Kd（低カルシウム濃度の条件）/kd（高カルシウム濃度の条件）の値の上限は特に限定されず、当業者の技術常識において作製可能な限り、50、100、200等、いかなる値でもよい。

[0116] 抗原結合活性の値として、抗原が可溶型抗原の場合はkd（解離速度定数）を用いることが可能であり、抗原が膜型抗原の場合は見かけのkd（Apparent dissociation rate constant：見かけの解離速度定数）を用いることが可能である。kd（解離速度定数）、および、見かけのkd（見かけの解離速度定数）は、当業者公知の方法で測定することが可能であり、例えばBiacore（GE healthcare）、フローサイトメーター等を用いることが可能である。なお本発明において、異なるカルシウムイオン濃度における抗原結合分子の抗原に対する結合活性を測定する際は、カルシウム濃度以外の条件は同一とすることが好ましい。

[0117] 例えば、本発明が提供する一つの態様である低カルシウムイオン濃度の条件における抗原に対する結合活性が、高カルシウムイオン濃度の条件における抗原に対する結合活性より低い抗原結合ドメインまたは抗体は、以下の工

程(a)～(c)を含む抗原結合ドメインまたは抗体のスクリーニングによって取得され得る。

(a) 低カルシウム濃度の条件における抗原結合ドメインまたは抗体の抗原結合活性を得る工程、

(b) 高カルシウム濃度の条件における抗原結合ドメインまたは抗体の抗原結合活性を得る工程、および

(c) 低カルシウム濃度の条件における抗原結合活性が、高カルシウム濃度の条件における抗原結合活性より低い抗原結合ドメインまたは抗体を選択する工程。

[0118] さらに、本発明が提供する一つの態様である低カルシウムイオン濃度の条件における抗原に対する結合活性が、高カルシウムイオン濃度の条件における抗原に対する結合活性より低い抗原結合ドメインまたは抗体は、以下の工程(a)～(c)を含む抗原結合ドメインまたは抗体もしくはそれらのライブラリのスクリーニングによって取得され得る。

(a) 高カルシウム濃度の条件における抗原結合ドメインまたは抗体もしくはそれらのライブラリを抗原に接触させる工程、

(b) 前記工程(a)で抗原に結合した抗原結合ドメインまたは抗体を低カルシウム濃度条件下に置く工程、および

(c) 前記工程(b)で解離した抗原結合ドメインまたは抗体を単離する工程。

[0119] また、本発明が提供する一つの態様である低カルシウムイオン濃度の条件における抗原に対する結合活性が、高カルシウムイオン濃度の条件における抗原に対する結合活性より低い抗原結合ドメインまたは抗体は、以下の工程(a)～(d)を含む抗原結合ドメインまたは抗体若しくはそれらのライブラリのスクリーニングによって取得され得る。

(a) 低カルシウム濃度条件下で抗原結合ドメイン又は抗体のライブラリを抗原に接触させる工程、

(b) 前記工程(a)で抗原に結合しない抗原結合ドメイン又は抗体を選択する工程、

(c) 前記工程(b)で選択された抗原結合ドメイン又は抗体を高カルシウム濃度条件下で抗原に結合させる工程、および

(d) 前記工程(c)で抗原に結合した抗原結合ドメイン又は抗体を単離する工程。

[0120] さらに、本発明が提供する一つの態様である低カルシウムイオン濃度の条件における抗原に対する結合活性が、高カルシウムイオン濃度の条件における抗原に対する結合活性より低い抗原結合ドメインまたは抗体は、以下の工程(a)～(c)を含むスクリーニング方法によって取得され得る。

(a) 抗原を固定したカラムに高カルシウム濃度条件下で抗原結合ドメイン又は抗体のライブラリを接触させる工程、

(b) 前記工程(a)でカラムに結合した抗原結合ドメイン又は抗体を低カルシウム濃度条件下でカラムから溶出する工程、および

(c) 前記工程(b)で溶出された抗原結合ドメイン又は抗体を単離する工程。

[0121] さらに、本発明が提供する一つの態様である低カルシウムイオン濃度の条件における抗原に対する結合活性が、高カルシウムイオン濃度の条件における抗原に対する結合活性より低い抗原結合ドメインまたは抗体は、以下の工程(a)～(d)を含むスクリーニング方法によって取得され得る。

(a) 抗原を固定したカラムに低カルシウム濃度条件下で抗原結合ドメイン又は抗体のライブラリを通過させる工程、

(b) 前記工程(a)でカラムに結合せずに溶出した抗原結合ドメイン又は抗体を回収する工程、

(c) 前記工程(b)で回収された抗原結合ドメイン又は抗体を高カルシウム濃度条件下で抗原に結合させる工程、および

(d) 前記工程(c)で抗原に結合した抗原結合ドメイン又は抗体を単離する工程。

[0122] さらに、本発明が提供する一つの態様である低カルシウムイオン濃度の条件における抗原に対する結合活性が、高カルシウムイオン濃度の条件における抗原に対する結合活性より低い抗原結合ドメインまたは抗体は、以下の工

程(a)～(d)を含むスクリーニング方法によって取得され得る。

(a) 高カルシウム濃度条件下で抗原結合ドメイン又は抗体のライブラリを抗原に接触させる工程、

(b) 前記工程(a)で抗原に結合した抗原結合ドメイン又は抗体を取得する工程、

(c) 前記工程(b)で取得した抗原結合ドメイン又は抗体を低カルシウム濃度条件下に置く工程、および

(d) 前記工程(c)で抗原結合活性が、前記工程(b)で選択した基準より弱い抗原結合ドメイン又は抗体を単離する工程。

[0123] なお、前記の工程は2回以上繰り返されてもよい。従って、本発明によって、上述のスクリーニング方法において、(a)～(c)あるいは(a)～(d)の工程を2回以上繰り返す工程をさらに含むスクリーニング方法によって取得された低カルシウムイオン濃度の条件における抗原に対する結合活性が高カルシウムイオン濃度の条件における抗原に対する結合活性より低い抗原結合ドメインまたは抗体が提供される。(a)～(c)あるいは(a)～(d)の工程が繰り返される回数は特に限定されないが、通常10回以内である。

[0124] 本発明のスクリーニング方法において、低カルシウム濃度条件下における抗原結合ドメイン又は抗体の抗原結合活性は、イオン化カルシウム濃度が0.1μM～30μMの間の抗原結合活性であれば特に限定されないが、好ましいイオン化カルシウム濃度として、0.5μM～10μMの間の抗原結合活性を挙げることができる。より好ましいイオン化カルシウム濃度として、生体内の早期エンドソーム内のイオン化カルシウム濃度が挙げられ、具体的には1μM～5μMにおける抗原結合活性を挙げることができる。また、高カルシウム濃度条件下における抗原結合ドメイン又は抗体の抗原結合活性は、イオン化カルシウム濃度が100μM～10 mMの間の抗原結合活性であれば特に限定されないが、好ましいイオン化カルシウム濃度として200μM～5 mMの間の抗原結合活性を挙げることができる。より好ましいイオン化カルシウム濃度として、生体内の血漿中でのイオン化カルシウム濃度を挙げることができ、具体的には0.5 mM～2

.5 mMにおける抗原結合活性を挙げることができる。

[0125] 抗原結合ドメイン又は抗体の抗原結合活性は当業者に公知の方法により測定することが可能であり、イオン化カルシウム濃度以外の条件については当業者が適宜決定することが可能である。抗原結合ドメイン又は抗体の抗原結合活性は、KD（Dissociation constant：解離定数）、見かけのKD（Apparent dissociation constant：見かけの解離定数）、解離速度であるkd（Dissociation rate：解離速度定数）、又は見かけのkd（Apparent dissociation：見かけの解離速度定数）等として評価することが可能である。これらは当業者公知の方法で測定することが可能であり、例えばBiacore（GE healthcare）、スキャッチャードプロット、FACS等を用いることが可能である。

[0126] 本発明において、高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より高い抗原結合ドメイン又は抗体を選択する工程は、低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低い抗原結合ドメイン又は抗体を選択する工程と同じ意味である。

[0127] 高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より高い限り、高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性と低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性の差は特に限定されないが、好ましくは高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性の2倍以上であり、さらに好ましくは10倍以上であり、より好ましくは40倍以上である。

[0128] 前記のスクリーニング方法によりスクリーニングされる本発明の抗原結合ドメイン又は抗体はいかなる抗原結合ドメイン又は抗体でもよく、例えば上述の抗原結合ドメイン又は抗体をスクリーニングすることが可能である。例えば、天然の配列を有する抗原結合ドメイン又は抗体をスクリーニングしてもよいし、アミノ酸配列が置換された抗原結合ドメイン又は抗体をスクリーニングしてもよい。

[0129] ライブラリ

ある一態様によれば、本発明の抗原結合ドメイン又は抗体は、イオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基が抗原結合ドメインに含まれている互いに配列の異なる複数の抗原結合分子から主としてなるライブラリから取得され得る。イオン濃度の例としては金属イオン濃度や水素イオン濃度が好適に挙げられる。

[0130] 本明細書において「ライブラリ」とは複数の抗原結合分子または抗原結合分子を含む複数の融合ポリペプチド、もしくはこれらの配列をコードする核酸、ポリヌクレオチドをいう。ライブラリ中に含まれる複数の抗原結合分子または抗原結合分子を含む複数の融合ポリペプチドの配列は単一の配列ではなく、互いに配列の異なる抗原結合分子または抗原結合分子を含む融合ポリペプチドである。

[0131] 本明細書においては、互いに配列の異なる複数の抗原結合分子という記載における「互いに配列の異なる」との用語は、ライブラリ中の個々の抗原結合分子の配列が相互に異なることを意味する。すなわち、ライブラリ中における互いに異なる配列の数は、ライブラリ中の配列の異なる独立クローンの数が反映され、「ライブラリサイズ」と指称される場合もある。通常のファージディスプレイライブラリでは10^{6}から10^{12}であり、リボゾームディスプレイ法等の公知の技術を適用することによってライブラリサイズを10^{14}まで拡大することが可能である。しかしながら、ファージライブラリのパンニング選択時に使用されるファージ粒子の実際の数は、通常、ライブラリサイズよりも10ないし10,000倍大きい。この過剰倍数は、「ライブラリ当量数」とも呼ばれるが、同じアミノ酸配列を有する個々のクローンが10ないし10,000存在し得ることを表す。よって本発明における「互いに配列の異なる」との用語はライブラリ当量数が除外されたライブラリ中の個々の抗原結合分子の配列が相互に異なること、より具体的には互いに配列の異なる抗原結合分子が10^{6}から10^{14}分子、好ましくは10^{7}から10^{12}分子、さらに好ましくは10^{8}から10^{11}分子、特に好ましくは10^{8}から10^{12}存在することを意味する。

[0132] また、本発明の、複数の抗原結合分子から主としてなるライブラリという

記載における「複数の」との用語は、例えば本発明の抗原結合分子、融合ポリペプチド、ポリヌクレオチド分子、ベクターまたはウイルスは、通常、その物質の2つ以上の種類の集合を指す。例えば、ある2つ以上の物質が特定の形質に関して互いに異なるならば、その物質には2種類以上が存在することを表す。例としては、アミノ酸配列中の特定のアミノ酸位置で観察される変異体アミノ酸が挙げられ得る。例えば、フレキシブル残基以外、または表面に露出した非常に多様なアミノ酸位置の特定の変異体アミノ酸以外は実質的に同じ、好ましくは同一の配列である本発明の2つ以上の抗原結合分子がある場合、本発明の抗原結合分子は複数個存在する。他の実施例では、フレキシブル残基をコードする塩基以外、または表面に露出した非常に多様なアミノ酸位置の特定の変異体アミノ酸をコードする塩基以外は実質的に同じ、好ましくは同一の配列である本発明の2つ以上のポリヌクレオチド分子があるならば、本発明のポリヌクレオチド分子は複数個存在する。

[0133] さらに、本発明の、複数の抗原結合分子から主としてなるライブラリという記載における「から主としてなる」との用語は、ライブラリ中の配列の異なる独立クローンの数のうち、イオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性 が 異なっている抗原結合分子の数が反映される。具体的には、そのような結合活性を示す抗原結合分子がライブラリ中に少なくとも10^4分子存在することが好ましい。また、より好ましくは、本発明の抗原結合ドメインはそのような結合活性を示す抗原結合分子が少なくとも10^5分子存在するライブラリから取得され得る。さらに好ましくは、本発明の抗原結合ドメインはそのような結合活性を示す抗原結合分子が少なくとも10^6分子存在するライブラリから取得され得る。特に好ましくは、本発明の抗原結合ドメインはそのような結合活性を示す抗原結合分子が少なくとも10^7分子存在するライブラリから取得され得る。また、好ましくは、本発明の抗原結合ドメインはそのような結合活性を示す抗原結合分子が少なくとも10^8分子存在するライブラリから取得され得る。別の表現では、ライブラリ中の配列の異なる独立クローンの数のうち、イオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分

子の結合活性が異なっている抗原結合分子の割合としても好適に表現され得る。具体的には、本発明の抗原結合ドメインは、そのような結合活性を示す抗原結合分子がライブラリ中の配列の異なる独立クローンの数の0.1%から80%、好ましくは0.5%から60%、より好ましくは1%から40%、さらに好ましくは2%から20%、特に好ましくは4%から10% 含まれる ライブラリから取得され得る。融合ポリペプチド、ポリヌクレオチド分子またはベクターの場合も、上記と同様、分子の数や分子全体における割合で表現され得る。また、ウイルスの場合も、上記と同様、ウイルス個体の数や個体全体における割合で表現され得る。

[0134] カルシウムイオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合ドメインの結合活性が変化するアミノ酸

[0135] 前記のスクリーニング方法によってスクリーニングされる本発明の抗原結合ドメイン又は抗体はどのように調製されてもよく、例えば、金属イオンがカルシウムイオン濃度である場合には、あらかじめ存在している抗体、あらかじめ存在しているライブラリ（ファージライブラリ等）、動物への免疫から得られたハイブリドーマや免疫動物からのB細胞から作製された抗体又はライブラリ、これらの抗体やライブラリにカルシウムをキレート可能なアミノ酸（例えばアスパラギン酸やグルタミン酸）や非天然アミノ酸変異を導入した抗体又はライブラリ（カルシウムをキレート可能なアミノ酸（例えばアスパラギン酸やグルタミン酸）又は非天然アミノ酸の含有率を高くしたライブラリや特定箇所にカルシウムをキレート可能なアミノ酸（例えばアスパラギン酸やグルタミン酸）又は非天然アミノ酸変異を導入したライブラリ等）などを用いることが可能である 。

[0136] 前記のようにイオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させるアミノ酸の例として、例えば、金属イオンがカルシウムイオンである場合には、カルシウム結合モチーフを形成するアミノ酸であれば、その種類は問わない。カルシウム結合モチーフは、当業者に周知であり、詳細に記載されている（例えばSpringerら（Cell (2000) 102, 275-277）、K

awasakiおよびKretsinger (Protein Prof. (1995) 2, 305-490) 、Moncrief ら (J. Mol. Evol. (1990) 30, 522-562) 、Chauvauxら (Biochem. J. (1990) 265, 261-265) 、BairochおよびCox (FEBS Lett. (1990) 269, 454-456) 、Davis (New Biol. (1990) 2, 410-419) 、Schaeferら (Genomics (1995) 2 5, 638～643) 、Economouら (EMBO J. (1990) 9, 349-354) 、Wurzburgら (S tructure. (2006) 14, 6, 1049-1058)) 。すなわち、ASGPR, CD23、MBR、DC -SIGN等のC型レクチン等の任意の公知のカルシウム結合モチーフが、本発明の抗原結合分子に含まれ得る。このようなカルシウム結合モチーフの好適な例として、上記のほかには配列番号：６２に記載される抗原結合ドメインに含まれるカルシウム結合モチーフも挙げられ得る。

[0137] また、カルシウムイオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性が変化するアミノ酸の例として、金属キレート作用を有するアミノ酸も好適に用いられる得る。金属キレート作用を有するアミノ酸の例として、例えばセリン (Ser (S)) 、スレオニン (Thr (T)) 、アスパラギン (Asn (N)) 、グルタミン (Gln (Q)) 、アスパラギン酸 (Asp (D)) およびグルタミン酸 (Glu (E)) 等が好適に挙げられる。

[0138] 前記のアミノ酸が含まれる抗原結合ドメインの位置は特定の位置に限定されず、カルシウムイオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させる限り、抗原結合ドメインを形成する重鎖可変領域または軽鎖可変領域中のいずれの位置でもあり得る。すなわち、本発明の抗原結合ドメインは、カルシウムイオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させるアミノ酸が重鎖の抗原結合ドメインに含まれている互いに配列の異なる抗原結合分子から主としてなるライブラリから取得され得る。また、別の非限定の態様では、本発明の抗原結合ドメインは、当該アミノ酸が重鎖のCDR3に含まれている互いに配列の異なる抗原結合分子から主としてなるライブラリから取得され得る。そのほかの非限定の態様では、本発明の抗原結合ドメインは、当該アミノ酸が重鎖のCDR3のKabatナンバリングで表される95位、96位、100a位および/または101位に含まれている互いに

配列の異なる抗原結合分子から主としてなるライブラリから取得され得る。

[0139] また、本発明の非限定の一態様では、本発明の抗原結合ドメインは、カルシウムイオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させるアミノ酸が軽鎖の抗原結合ドメインに含まれている互いに配列の異なる抗原結合分子から主としてなるライブラリから取得され得る。また、別の態様では、本発明の抗原結合ドメインは、当該アミノ酸が軽鎖のCDR1に含まれている互いに配列の異なる抗原結合分子から主としてなるライブラリから取得され得る。そのほかの態様では、本発明の抗原結合ドメインは、当該アミノ酸が軽鎖のCDR1のKabatナンバリングで表される30位、31位および/または32位に含まれている互いに配列の異なる抗原結合分子から主としてなるライブラリから取得され得る。

[0140] また、別の非限定の態様では、本発明の抗原結合ドメインは、当該アミノ酸残基が軽鎖のCDR2に含まれている互いに配列の異なる抗原結合分子から主としてなるライブラリから取得され得る。そのほかの態様では、当該アミノ酸残基が軽鎖のCDR2のKabatナンバリングで表される50位に含まれている互いに配列の異なる抗原結合分子から主としてなるライブラリが提供される。

[0141] さらに別の非限定の態様では、本発明の抗原結合ドメインは、当該アミノ酸残基が軽鎖のCDR3に含まれている互いに配列の異なる抗原結合分子から主としてなるライブラリから取得され得る。そのほかの態様では、本発明の抗原結合ドメインは、当該アミノ酸残基が軽鎖のCDR3のKabatナンバリングで表される92位に含まれている互いに配列の異なる抗原結合分子から主としてなるライブラリから取得され得る。

[0142] また、本発明の抗原結合ドメインは、当該アミノ酸残基が、前記に記載された軽鎖のCDR1、CDR2およびCDR3から選択される2つまたは3つのCDRに含まれている互いに配列の異なる抗原結合分子から主としてなるライブラリから本発明の異なる態様として取得され得る。さらに、本発明の抗原結合ドメインは、当該アミノ酸残基が軽鎖のKabatナンバリングで表される30位、31位、32位、50位および/または92位のいずれかひとつ以上に含まれている互いに配列

の異なる抗原結合分子から主としてなるライブラリから取得され得る。

[0143] 特に好適な実施形態では、抗原結合分子の軽鎖および/または重鎖可変領域のフレームワーク配列は、ヒトの生殖細胞系フレームワーク配列を有していることが望ましい。したがって、本発明の一態様においてフレームワーク配列が完全にヒトの配列であるならば、ヒトに投与（例えば疾病の治療）された場合、本発明の抗原結合分子は免疫原性反応を殆どあるいは全く引き起こさないと考えられる。上記の意味から、本発明の「生殖細胞系列の配列を含む 」とは、本発明のフレームワーク配列の一部が、いずれかのヒトの生殖細胞系フレームワーク配列の一部と同一であることを意味する。例えば、本発明の抗原結合分子の重鎖FR2の配列が複数の異なるヒトの生殖細胞系フレームワーク配列の重鎖FR2配列が組み合わされた配列である場合も、本発明の「生殖細胞系列の配列を含む 」抗原結合分子である。

[0144] フレームワークの例としては、例えばV-Base（http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/）等のウェブサイトに含まれている、現在知られている完全にヒト型のフレームワーク領域の配列が好適に挙げられる。 これらのフレームワーク領域の配列が本発明の抗原結合分子に含まれる生殖細胞系列の配列として適宜使用され得る。生殖細胞系列の配列はその類似性にもとづいて分類され得る（Tomlinsonら（J. Mol. Biol. (1992) 227, 776-798) WilliamsおよびWinter (Eur. J. Immunol. (1993) 23, 1456-1461) およびCoxら（Nat. Genetics (1994) 7, 162-168)) 。 7つのサブグループに分類されるVκ、10のサブグループに分類されるVλ、7つのサブグループに分類されるVHから好適な生殖細胞系列の配列が適宜選択され得る。

[0145] 完全にヒト型のVH配列は、下記のみに限定されるものではないが、例えばVH1サブグループ（例えば、VH1-2、VH1-3、VH1-8、VH1-18、VH1-24、VH1-45、VH1-46、VH1-58、VH1-69）、VH2サブグループ（例えば、VH2-5、VH2-26、VH2-70）、VH3サブグループ（VH3-7、VH3-9、VH3-11、VH3-13、VH3-15、VH3-16、VH3-20、VH3-21、VH3-23、VH3-30、VH3-33、VH3-35、VH3-38、VH3-43、VH3-48、VH3-49、VH3-53、VH3-64、VH3-66、VH3-72、VH3-73、VH3-74）、VH4サ

ブグループ（VH4-4、VH4-28、VH4-31、VH4-34、VH4-39、VH4-59、VH4-61）、VH5サブグループ（VH5-51）、VH6サブグループ（VH6-1）、VH7サブグループ（VH7-4、VH7-81）のVH配列等が好適に挙げられる。これらは公知文献（Matsudaら（J. Exp. Med.（1998）188, 1973-1975））等にも記載されており、当業者はこれらの配列情報をもとに本発明の抗原結合分子を適宜設計することが可能である。これら以外の完全にヒト型のフレームワークまたはフレームワークの準領域も好適に使用され得る。

[0146] 完全にヒト型のVK配列は、下記のみに限定されるものではないが、例えばVk1サブグループに分類されるA20、A30、L1、L4、L5、L8、L9、L11、L12、L14、L15、L18、L19、L22、L23、L24、O2、O4、O8、O12、O14、O18、Vk2サブグループに分類されるA1、A2、A3、A5、A7、A17、A18、A19、A23、O1、O11、Vk3サブグループに分類されるA11、A27、L2、L6、L10、L16、L20、L25、Vk4サブグループに分類されるB3、Vk5サブグループに分類されるB2（本明細書においてはVk5-2とも指称される））、VK6サブグループに分類されるA10、A14、A26等（Kawasakiら（Eur. J. Immunol.（2001）31, 1017-1028）、SchableおよびZachau（Biol. Chem. Hoppe Seyler（1993）374, 1001-1022）およびBrensing-Kuppersら（Gene（1997）191, 173-181））が好適に挙げられる。

[0147] 完全にヒト型のVL配列は、下記のみに限定されるものではないが、例えばVL1サブグループに分類されるV1-2、V1-3、V1-4、V1-5、V1-7、V1-9、V1-11、V1-13、V1-16、V1-17、V1-18、V1-19、V1-20、V1-22、VL1サブグループに分類されるV2-1、V2-6、V2-7、V2-8、V2-11、V2-13、V2-14、V2-15、V2-17、V2-19、VL3サブグループに分類されるV3-2、V3-3、V3-4、VL4サブグループに分類されるV4-1、V4-2、V4-3、V4-4、V4-6、VL5サブグループに分類されるV5-1、V5-2、V5-4、V5-6等（Kawasakiら（Genome Res.（1997）7, 250-261））が好適に挙げられる。

[0148] 通常これらのフレームワーク配列は一またはそれ以上のアミノ酸残基の相違により互いに異なっている。これらのフレームワーク配列は本発明の「イオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させる

少なくとも一つのアミノ酸残基」と共に使用され得る。本発明の「イオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基」と共に使用される完全にヒト型のフレームワークの例としては、これだけに限定されるわけではないが、ほかにもKOL、NEWM、REI、EU、TUR、TEI、LAY、POM等が挙げられる（例えば、前記のKabatら（1991)およびWuら（J. Exp. Med.（1970）132, 211-250））。

[0149] 本発明は特定の理論に拘束されるものではないが、生殖細胞系の配列の使用がほとんどの個人において有害な免疫反応を排除すると期待されている一つの理由は、以下の通りであると考えられている。通常の免疫反応中に生じる親和性成熟ステップの結果、免疫グロブリンの可変領域に体細胞の突然変異が頻繁に生じる。これらの突然変異は主にその配列が超可変的であるCDRの周辺に生じるが、フレームワーク領域の残基にも影響を及ぼす。これらのフレームワークの突然変異は生殖細胞系の遺伝子には存在しないが、患者の免疫原性になる可能性は少ない。それは、通常のヒトの集団は生殖細胞系の遺伝子によって発現されるフレームワーク配列の大多数にさらされており、免疫寛容の結果、これらの生殖細胞系のフレームワークは患者において免疫原性が低いあるいは非免疫原性であると予想されるためである。免疫寛容の可能性を最大にするため、可変領域をコード化する遺伝子が普通に存在する機能的な生殖細胞系遺伝子の集合から選択され得る。

[0150] 本発明の、カルシウムイオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させるアミノ酸が前記のフレームワーク配列に含まれる抗原結合分子を作製するために部位特異的変異誘発法（Kunkelら（Proc. Natl. Acad. Sci. USA（1985）82, 488-492））やOverlap extension PCR等の公知の方法が適宜採用され得る。

[0151] 例えば、カルシウムイオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基が予め含まれているフレームワーク配列として選択された軽鎖可変領域と、ランダム化可変領域配列ライブラリとして作製された重鎖可変領域とを組み合わせることによっ

て本発明の複数の互いに配列の異なる抗原結合分子を含むライブラリが作製され得る。このような非限定的な例として、イオン濃度がカルシウムイオン濃度である場合には、例えば、配列番号：６２（Vk5-2）に記載された軽鎖可変領域配列に代表されるVk5-2ファミリーに属する軽鎖可変領域配列とランダム化可変領域配列ライブラリとして作製された重鎖可変領域とを組み合わせたライブラリが好適に挙げられる。

[0152] また、前記のカルシウムイオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基が予め含まれているフレームワーク配列として選択された軽鎖可変領域の配列に、当該アミノ酸残基以外の残基として多様なアミノ酸が含まれるように設計することも可能である。本発明においてそのような残基は、フレキシブル残基と指称される。本発明の抗原結合分子の抗原に対する結合活性が、イオン濃度の条件によって変化する限り、当該フレキシブル残基の数および位置は特定の態様に限定されることはない。すなわち、重鎖および/または軽鎖のCDR配列および/またはFR配列に一つまたはそれ以上のフレキシブル残基が含まれ得る。例えば、イオン濃度がカルシウムイオン濃度である場合には、配列番号：６２（Vk5-2）に記載された軽鎖可変領域配列に導入されるフレキシブル残基の非限定的な例として、表１または表２に記載されたアミノ酸残基が挙げられる。

[0153]

[表1]

CDR	Kabat ナンバリング	全体の 70%のアミノ酸				
CDR1	28	S:100%				
	29	I:100%				
	30	E:72%	N:14%	S:14%		
	31	D:100%				
	32	D:100%				
	33	L:100%				
	34	A:70%	N:30%			
CDR2	50	E:100%				
	51	A:100%				
	52	S:100%				
	53	H:5%	N:25%	S:45%	T:25%	
	54	L:100%				
	55	Q:100%				
	56	S:100%				
CDR3	90	Q:100%				
	91	H:25%	S:15%	R:15%	Y:45%	
	92	D:80%	N:10%	S:10%		
	93	D:5%	G:10%	N:25%	S:50%	R:10%
	94	S:50%	Y:50%			
	95	P:100%				
	96	L:50%	Y:50%			

[0154]

[表2]

CDR	Kabat ナンバリング	全体の 30%のアミノ酸				
CDR1	28	S:100%				
	29	I:100%				
	30	E:83%	S:17%			
	31	D:100%				
	32	D:100%				
	33	L:100%				
	34	A:70%	N:30%			
CDR2	50	H:100%				
	51	A:100%				
	52	S:100%				
	53	H:5%	N:25%	S:45%	T:25%	
	54	L:100%				
	55	Q:100%				
	56	S:100%				
CDR3	90	Q:100%				
	91	H:25%	S:15%	R:15%	Y:45%	
	92	D:80%	N:10%	S:10%		
	93	D:5%	G:10%	N:25%	S:50%	R:10%
	94	S:50%	Y:50%			
	95	P:100%				
	96	L:50%	Y:50%			

[0155] 本明細書においては、フレキシブル残基とは、公知のかつ/または天然抗体または抗原結合ドメインのアミノ酸配列を比較した場合に、その位置で提示されるいくつかの異なるアミノ酸を持つ軽鎖および重鎖可変領域上のアミノ酸が非常に多様である位置に存在するアミノ酸残基のバリエーションをいう。非常に多様である位置は一般的にCDR領域に存在する。一態様では、公知のかつ/または天然抗体の非常に多様な位置を決定する際には、Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health Bethesda Md.) (1987年および1991年) が提供するデータが有効である。また、インターネット上の複数のデータベース (http://vbase.mrc-cpe.cam.

ac.uk/、http://www.bioinf.org.uk/abs/index.html）では収集された多数のヒト軽鎖および重鎖の配列とその配置が提供されており、これらの配列とその配置の情報は本発明における非常に多様な位置の決定に有用である。本発明によると、アミノ酸がある位置で好ましくは約2から約20、好ましくは約3から約19、好ましくは約4から約18、好ましくは5から17、好ましくは6から16、好ましくは7から15、好ましくは8から14、好ましくは9から13、好ましくは10から12個の可能な異なるアミノ酸残基の多様性を有する場合は、その位置は非常に多様といえる。いくつかの実施形態では、あるアミノ酸位置は、好ましくは少なくとも約2、好ましくは少なくとも約4、好ましくは少なくとも約6、好ましくは少なくとも約8、好ましくは約10、好ましくは約12の可能な異なるアミノ酸残基の多様性を有し得る。

[0156] また、前記のイオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基が導入された軽鎖可変領域とランダム化可変領域配列ライブラリとして作製された重鎖可変領域とを組み合わせることによっても、本発明の複数の互いに配列の異なる抗原結合分子を含むライブラリが作製され得る。このような非限定的な例として、イオン濃度がカルシウムイオン濃度である場合には、例えば、配列番号：５（Vk1）、配列番号：６（Vk2）、配列番号：７（Vk3）、配列番号：８（Vk4）等の生殖細胞系列の特定の残基が、カルシウムイオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基に置換された軽鎖可変領域配列とランダム化可変領域配列ライブラリとして作製された重鎖可変領域とを組み合わせたライブラリが好適に挙げられる。当該アミノ酸残基の非限定な例として軽鎖のCDR1に含まれるアミノ酸残基が例示される。ほかにも、当該アミノ酸残基の非限定な例として軽鎖のCDR2に含まれるアミノ酸残基が例示される。また、当該アミノ酸残基の非限定な別の例として軽鎖のCDR3に含まれるアミノ酸残基もまた例示される。

[0157] 前記のように、当該アミノ酸残基が軽鎖のCDR1に含まれるアミノ酸残基の非限定な例として、軽鎖可変領域のCDR1中のKabatナンバリングで表される30

位、31位、および/または32位のアミノ酸残基が挙げられる。また、当該アミノ酸残基が軽鎖のCDR2に含まれるアミノ酸残基の非限定な例として、軽鎖可変領域のCDR2中のKabatナンバリングで表される50位のアミノ酸残基が挙げられる。さらに、当該アミノ酸残基が軽鎖のCDR3に含まれアミノ酸残基の非限定な例として、軽鎖可変領域のCDR3中のKabatナンバリングで表される92位のアミノ酸残基が挙げられる。また、これらのアミノ酸残基が、カルシウム結合モチーフを形成し、および/または、カルシウムイオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性が変化する限り、これらのアミノ酸残基が単独で含まれ得るし、これらのアミノ酸が二つ以上組み合わされて含まれ得る。また、複数個のカルシウムイオン結合部位を有し、分子進化上共通の起源から由来したと考えられるトロポニンC、カルモジュリン、パルブアルブミン、ミオシン軽鎖等が知られており、その結合モチーフが含まれるように軽鎖CDR1、CDR2および/またはCDR3を設計することも可能である。例えば、上記の目的でカドヘリンドメイン、カルモジュリンに含まれるEFハンド、Protein kinase Cに含まれるC2ドメイン、血液凝固タンパク質FactorIXに含まれるGlaドメイン、アシアログライコプロテインレセプターやマンノース結合レセプターに含まれるC型レクチン、LDL受容体に含まれるAドメイン、アネキシン、トロンボスポンジン3型ドメインおよびEGF様ドメインが適宜使用され得る。

[0158] 前記のイオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基が導入された軽鎖可変領域とランダム化可変領域配列ライブラリとして作製された重鎖可変領域とを組み合わせる場合でも、前記と同様に、フレキシブル残基が当該軽鎖可変領域の配列に含まれるように設計することも可能である。本発明の抗原結合分子の抗原に対する結合活性が、イオン濃度の条件によって変化する限り、当該フレキシブル残基の数および位置は特定の態様に限定されることはない。すなわち、重鎖および/または軽鎖のCDR配列および/またはFR配列に一つまたはそれ以上のフレキシブル残基が含まれ得る。例えば、イオン濃度がカルシウムイオ

ン濃度である場合には、軽鎖可変領域配列に導入されるフレキシブル残基の非限定的な例として、表１または表２に記載されたアミノ酸残基が挙げられる。

[0159] 組み合わされる重鎖可変領域の例として、ランダム化可変領域ライブラリが好適に挙げられる。ランダム化可変領域ライブラリの作製方法は公知の方法が適宜組み合わされる。本発明の非限定な一態様では、特定の抗原で免疫された動物、感染症患者やワクチン接種して血中抗体価が上昇したヒト、癌患者、自己免疫疾患のリンパ球由来の抗体遺伝子をもとに構築された免疫ライブラリが、ランダム化可変領域ライブラリとして好適に使用され得る。

[0160] また、本発明の非限定の一態様では、ゲノムDNA におけるV 遺伝子や再構築され機能的なV遺伝子のCDR配列が、適当な長さのコドンセットをコードする配列を含む合成オリゴヌクレオチドセットで置換された合成ライブラリもまた、ランダム化可変領域ライブラリとして好適に使用され得る。この場合、重鎖のCDR3の遺伝子配列の多様性が観察されることから、CDR3の配列のみを置換することもまた可能である。抗原結合分子の可変領域においてアミノ酸の多様性を生み出す基準は、抗原結合分子の表面に露出した位置のアミノ酸残基に多様性を持たせることである。表面に露出した位置とは、抗原結合分子の構造、構造アンサンブル、および/またはモデル化された構造にもとづいて、表面露出が可能、かつ/または抗原との接触が可能と判断される位置のことをいうが、一般的にはそのCDRである。好ましくは、表面に露出した位置は、InsightIIプログラム（Accelrys）のようなコンピュータプログラムを用いて、抗原結合分子の3次元モデルからの座標を使って決定される。表面に露出した位置は、当技術分野で公知のアルゴリズム（例えば、LeeおよびRichards（J.Mol.Biol.（1971）55, 379-400）、Connolly（J.Appl.Cryst.（1983）16, 548-558））を使用して決定され得る。表面に露出した位置の決定は、タンパク質モデリングに適したソフトウェアおよび抗体から得られる三次元構造情報を使って行われ得る。このような目的のために利用できるソフトウェアとして、SYBYL生体高分子モジュールソフトウェア（Tripos Associates）

が好適に挙げられる。一般的に、また好ましくは、アルゴリズムがユーザーの入力サイズパラメータを必要とする場合は、計算において使われるプローブの「サイズ」は半径約1.4オングストローム以下に設定される。さらに、パーソナルコンピュータ用のソフトウェアを使用した表面に露出した領域およびエリアの決定法が、Pacios (Comput.Chem. (1994) 18 (4), 377-386およびJ.Mol.Model. (1995) 1, 46-53) に記載されている。

[0161] さらに、本発明の非限定の一態様では、健常人のリンパ球由来の抗体遺伝子から構築され、そのレパートリーにバイアスを含まない抗体配列であるナイーブ配列からなるナイーブライブラリもまた、ランダム化可変領域ライブラリとして特に好適に使用され得る (Gejimaら (Human Antibodies (2002) 11,121-129) およびCardosoら (Scand. J. Immunol. (2000) 51, 337-344))。本発明で記載されるナイーブ配列を含むアミノ酸配列とは、このようなナイーブライブラリから取得されるアミノ酸配列をいう。

[0162] 本発明の一つの態様では、「イオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基」が予め含まれているフレームワーク配列として選択された重鎖可変領域と、ランダム化可変領域配列ライブラリとして作製された軽鎖可変領域とを組み合わせることによって本発明の複数の互いに配列の異なる抗原結合分子を含むライブラリから、本発明の抗原結合ドメインが取得され得る。このような非限定的な例として、イオン濃度がカルシウムイオン濃度である場合には、例えば、配列番号：９ (6RL#9-IgG1) または配列番号：１０ (6KC4-1#85-IgG1) に記載された重鎖可変領域配列とランダム化可変領域配列ライブラリとして作製された軽鎖可変領域とを組み合わせたライブラリが好適に挙げられる。また、ランダム化可変領域配列ライブラリとして作製された軽鎖可変領域の代わりに、生殖細胞系列の配列を有する軽鎖可変領域の中から適宜選択することによって作製され得る。例えば、配列番号：９ (6RL#9-IgG1) または配列番号：１０ (6KC4-1#85-IgG1) に記載された重鎖可変領域配列と生殖細胞系列の配列を有する軽鎖可変領域とを組み合わせたライブラリが好適に挙げられ

る。

[0163] また、前記の「イオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基」が予め含まれているフレームワーク配列として選択された重鎖可変領域の配列に、フレキシブル残基が含まれるように設計することも可能である。本発明の抗原結合分子の抗原に対する結合活性が、イオン濃度の条件によって変化する限り、当該フレキシブル残基の数および位置は特定の態様に限定されることはない。すなわち、重鎖および/または軽鎖のCDR配列および/またはFR配列に一つまたはそれ以上のフレキシブル残基が含まれ得る。例えば、イオン濃度がカルシウムイオン濃度である場合には、配列番号：９（6RL#9-IgG1）に記載された重鎖可変領域配列に導入されるフレキシブル残基の非限定的な例として、重鎖CDR1およびCDR2の全てのアミノ酸残基のほか重鎖CDR3の95位、96位および/または100a位以外のCDR3のアミノ酸残基が挙げられる。または配列番号：１０（6KC4-1#85-IgG1）に記載された重鎖可変領域配列に導入されるフレキシブル残基の非限定的な例として、重鎖CDR1およびCDR2の全てのアミノ酸残基のほか重鎖CDR3の95位および/または101位以外 のCDR3のアミノ酸残基もまた挙げられる。

[0164] また、前記の「イオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基」が導入された重鎖可変領域とランダム化可変領域配列ライブラリとして作製された軽鎖可変領域または生殖細胞系列の配列を有する軽鎖可変領域とを組み合わせることによっても、複数の互いに配列の異なる抗原結合分子を含むライブラリが作製され得る。このような非限定的な例として、イオン濃度がカルシウムイオン濃度である場合には、例えば、重鎖可変領域の特定の残基が、カルシウムイオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基に置換された重鎖可変領域配列とランダム化可変領域配列ライブラリとして作製された軽鎖可変領域または生殖細胞系列の配列を有する軽鎖可変領域とを組み合わせたライブラリが好適に挙げられる。

当該アミノ酸残基の非限定な例として重鎖のCDR1に含まれるアミノ酸残基が例示される。ほかにも、当該アミノ酸残基の非限定な例として重鎖のCDR2に含まれるアミノ酸残基が例示される。また、当該アミノ酸残基の非限定な別の例として重鎖のCDR3に含まれるアミノ酸残基もまた例示される。当該アミノ酸残基が重鎖のCDR3に含まれアミノ酸残基の非限定な例として、重鎖可変領域のCDR3中のKabatナンバリングで表される95位、96位、100a位および/または101位のアミノ酸が挙げられる。また、これらのアミノ酸残基が、カルシウム結合モチーフを形成し、および/または、カルシウムイオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性が変化する限り、これらのアミノ酸残基が単独で含まれ得るし、これらのアミノ酸が二つ以上組み合わされて含まれ得る。

[0165] 前記の、イオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基が導入された重鎖可変領域とランダム化可変領域配列ライブラリとして作製された軽鎖可変領域または生殖細胞系列の配列を有する軽鎖可変領域とを組み合わせる場合でも、前記と同様に、フレキシブル残基が当該重鎖可変領域の配列に含まれるように設計することも可能である。本発明の抗原結合分子の抗原に対する結合活性が、イオン濃度の条件によって変化する限り、当該フレキシブル残基の数および位置は特定の態様に限定されることはない。すなわち、重鎖のCDR配列および/またはFR配列に一つまたはそれ以上のフレキシブル残基が含まれ得る。また、イオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させるアミノ酸残基以外の重鎖可変領域のCDR1、CDR2および/またはCDR3のアミノ酸配列としてランダム化可変領域ライブラリも好適に使用され得る。軽鎖可変領域として生殖細胞系列の配列が用いられる場合には、例えば、配列番号：５（Vk1）、配列番号：６（Vk2）、配列番号：７（Vk3）、配列番号：８（Vk4）等の生殖細胞系列の配列が非限定な例として挙げられ得る。

[0166] 前記の、カルシウムイオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させるアミノ酸としては、カルシウム結合モチーフを形成

する限り、いずれのアミノ酸も好適に使用され得るが、そのようなアミノ酸としては具体的に電子供与性を有するアミノ酸が挙げられる。こうした電子供与性を有するアミノ酸としては、セリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸またはグルタミン酸が好適に例示される。

[0167] 水素イオン濃度の条件

また、本発明の一つの態様では、イオン濃度の条件とは水素イオン濃度の条件またはpHの条件をいう。本発明で、プロトンすなわち水素原子の原子核の濃度の条件は、水素指数（pH）の条件とも同義に取り扱われる。水溶液中の水素イオンの活動量をaH+で表すと、pHは-log10aH+と定義される。水溶液中のイオン強度が（例えば10^{-3}より）低ければ、aH+は水素イオン強度にほぼ等しい。例えば25℃、1気圧における水のイオン積はKw=aH+aOH=10-14であるため、純水ではaH+=aOH=10-7である。この場合のpH=7が中性であり、pHが7より小さい水溶液は酸性、pHが7より大きい水溶液はアルカリ性である。

[0168] 本発明においては、イオン濃度の条件としてpHの条件が用いられる場合には、pHの条件として高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件と低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件が挙げられる。pHの条件によって結合活性が変化するとは、高水素イオン濃度または低pH（pH酸性域）と低水素イオン濃度または高pH（pH中性域）の条件の違いによって抗原に対する抗原結合分子の結合活性が変化することをいう。例えば、pH酸性域の条件における抗原に対する抗原結合分子の結合活性よりもpH中性域の条件における抗原に対する抗原結合分子の結合活性の方が高い場合が挙げられる。また、pH中性域の条件における抗原に対する抗原結合分子の結合活性よりもpH酸性域の条件における抗原に対する抗原結合分子の結合活性の方が高い場合もまた挙げられる。

[0169] 本明細書において、pH中性域とはとくに一義的な数値に限定されるわけではないが、好適にはpH6.7からpH10.0の間から選択され得る。また、別の態様では、pH6.7からpH9.5の間から選択され得る。また、異なる態様ではpH7.0からpH9.0の間から選択され得るし、ほかの態様ではpH7.0からpH8.0の間から選

択され得る。特に生体内の血漿中（血中）でのpHに近いpH7.4が好適に挙げられる。

[0170] 本明細書において、pH酸性域とはとくに一義的な数値に限定されるわけではないが、好適にはpH4.0からpH6.5の間から選択され得る。また、別の態様では、pH4.5からpH6.5の間から選択され得る。また、異なる態様ではpH5.0からpH6.5の間から選択され得るし、ほかの態様ではpH5.5からpH6.5の間から選択され得る。特に生体内の早期エンドソーム内でのイオン化カルシウム濃度に近いpH5.8が好適に挙げられる。

[0171] 本発明において、抗原結合分子の高水素イオン濃度または低pH（pH酸性域）の条件における抗原に対する結合活性が低水素イオン濃度または高pH（pH中性域）の条件における抗原に対する結合活性より低いとは、抗原結合分子のpH4.0からpH6.5の間から選択されるpHでの抗原に対する結合活性が、pH6.7からpH10.0の間から選択されるpHでの抗原に対する結合活性より弱いことを意味する。好ましくは、抗原結合分子のpH4.5からpH6.5の間から選択されるpHでの抗原に対する結合活性が、pH6.7からpH9.5の間から選択されるpHでの抗原に対する結合活性より弱いことを意味し、より好ましくは、抗原結合分子のpH5.0からpH6.5の間から選択されるpHでの抗原に対する結合活性が、pH7.0からpH9.0の間から選択されるpHでの抗原に対する結合活性より弱いことを意味する。また、好ましくは抗原結合分子のpH5.5からpH6.5の間から選択されるpHでの抗原に対する結合活性が、pH7.0からpH8.0の間から選択されるpHでの抗原に対する結合活性より弱いことを意味する。特に好ましくは、生体内の早期エンドソーム内のpHにおける抗原結合活性が、生体内の血漿中のpHにおける抗原結合活性より弱いことを意味し、具体的には、抗原結合分子のpH5.8での抗原に対する結合活性が、pH7.4での抗原に対する結合活性より弱いことを意味する。

[0172] pHの条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性が変化しているか否かは、例えば前記の結合活性の項で記載されたような公知の測定方法を使用することによって決定され得る。すなわち、当該測定方法に際して異なるp

Hの条件下での結合活性が測定される。例えば、pH酸性域の条件下における抗原に対する抗原結合分子の結合活性よりもpH中性域の条件下における抗原に対する抗原結合分子の結合活性の方が高く変化することを確認するためには、pH酸性域およびpH中性域の条件下における抗原に対する抗原結合分子の結合活性が比較される。

[0173] さらに本発明において、「高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件における抗原に対する結合活性が低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件における抗原に対する結合活性より低い」という表現は、抗原結合分子の低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件における抗原に対する結合活性が高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件における抗原に対する結合活性よりも高いと表現することもできる。なお本発明においては、「高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件における抗原に対する結合活性が低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件における抗原に対する結合活性より低い」を「高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件における抗原に対する結合活性が低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件における抗原に対する結合能よりも弱い」と記載する場合もあり、また、「高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件における抗原に対する結合活性が低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件における抗原に対する結合活性より低下させる」を「高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件における抗原に対する結合活性が低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件における抗原に対する結合能よりも弱くする」と記載する場合もある。

[0174] 抗原に対する結合活性を測定する際の水素イオン濃度またはpH以外の条件は、当業者が適宜選択することが可能であり、特に限定されない。例えば、HEPESバッファー、37℃の条件において測定することが可能である。例えば、Biacore (GE Healthcare) などを用いて測定することが可能である。抗原結合分子と抗原との結合活性の測定は、抗原が可溶型抗原である場合は、抗原結合分子を固定化したチップへ、抗原をアナライトとして流すことで可溶型抗

原に対する結合活性を評価することが可能であり、抗原が膜型抗原である場合は、抗原を固定化したチップへ、抗原結合分子をアナライトとして流すことで膜型抗原に対する結合活性を評価することが可能である。

[0175] 本発明の抗原結合分子において、高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件における抗原に対する結合活性が低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件における抗原に対する結合活性よりも弱い限り、高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件下における抗原に対する結合活性と低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件下における抗原に対する結合活性の比は特に限定されないが、好ましくは抗原に対する高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件におけるKD（Dissociation constant：解離定数）と低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件におけるKDの比であるKD（pH5.8)/KD（pH7.4)の値が２以上であり、さらに好ましくはKD（pH5.8)/KD（pH7.4)の値が10以上であり、さらに好ましくはKD（pH5.8)/KD（pH7.4)の値が40以上である。KD（pH5.8)/KD（pH7.4)の値の上限は特に限定されず、当業者の技術において作製可能な限り、400、1000、10000等、いかなる値でもよい。

[0176] 抗原に対する結合活性の値として、抗原が可溶型抗原の場合はKD（解離定数）を用いることが可能であるが、抗原が膜型抗原の場合は見かけのKD（Apparent dissociation constant：見かけの解離定数）を用いることが可能である。KD（解離定数）、および、見かけのKD（見かけの解離定数）は、当業者公知の方法で測定することが可能であり、例えばBiacore（GE healthcare）、スキャッチャードプロット、フローサイトメーター等を用いることが可能である。

[0177] また、本発明の抗原結合分子の高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件における抗原に対する結合活性と低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件における抗原に対する結合活性の比を示す他の指標として、例えば、解離速度定数であるkd（Dissociation rate constant：解離速度定数）もまた好適に用いられ得る。結合活性の比を示す指標としてKD（

解離定数）の代わりにkd（解離速度定数）を用いる場合、抗原に対する高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件におけるkd（解離速度定数）と低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件におけるkd（解離速度定数）の比であるkd（pH酸性域の条件における）/kd（pH中性域の条件における）の値は、好ましくは2以上であり、さらに好ましくは5以上であり、さらに好ましくは10以上であり、より好ましくは30以上である。Kd（pH酸性域の条件における）/kd（pH中性域の条件における）の値の上限は特に限定されず、当業者の技術常識において作製可能な限り、50、100、200等、いかなる値でもよい。

[0178] 抗原結合活性の値として、抗原が可溶型抗原の場合はkd（解離速度定数）を用いることが可能であり、抗原が膜型抗原の場合は見かけのkd（Apparent dissociation rate constant：見かけの解離速度定数）を用いることが可能である。kd（解離速度定数）、および、見かけのkd（見かけの解離速度定数）は、当業者公知の方法で測定することが可能であり、例えばBiacore（GE healthcare）、フローサイトメーター等を用いることが可能である。なお本発明において、異なる水素イオン濃度すなわちpHにおける抗原結合分子の抗原に対する結合活性を測定する際は、水素イオン濃度すなわちpH以外の条件は同一とすることが好ましい。

[0179] 例えば、本発明が提供する一つの態様である高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件における抗原に対する結合活性が、低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件における抗原に対する結合活性より低い抗原結合ドメインまたは抗体は、以下の工程(a)～(c)を含む抗原結合ドメインまたは抗体のスクリーニングによって取得され得る。

(a) pH酸性域の条件における抗原結合ドメインまたは抗体の抗原結合活性を得る工程、

(b) pH中性域の条件における抗原結合ドメインまたは抗体の抗原結合活性を得る工程、および

(c) pH酸性域の条件における抗原結合活性が、pH中性域の条件における抗

原結合活性より低い抗原結合ドメインまたは抗体を選択する工程。

[0180] さらに、本発明が提供する一つの態様である高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件における抗原に対する結合活性が、低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件における抗原に対する結合活性より低い抗原結合ドメインまたは抗体は、以下の工程(a)～(c)を含む抗原結合ドメインまたは抗体もしくはそれらのライブラリのスクリーニングによって取得され得る。

(a) pH中性域の条件における抗原結合ドメインまたは抗体もしくはそれらのライブラリを抗原に接触させる工程、

(b) 前記工程(a)で抗原に結合した抗原結合ドメインまたは抗体をpH酸性域の条件に置く工程、および

(c) 前記工程(b)で解離した抗原結合ドメインまたは抗体を単離する工程。

[0181] また、本発明が提供する一つの態様である高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件における抗原に対する結合活性が、低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件における抗原に対する結合活性より低い抗原結合ドメインまたは抗体は、以下の工程(a)～(d)を含む抗原結合ドメインまたは抗体若しくはそれらのライブラリのスクリーニングによって取得され得る。

(a) pH酸性域の条件で抗原結合ドメイン又は抗体のライブラリを抗原に接触させる工程、

(b) 前記工程(a)で抗原に結合しない抗原結合ドメイン又は抗体を選択する工程、

(c) 前記工程(b)で選択された抗原結合ドメイン又は抗体をpH中性域の条件で抗原に結合させる工程、および

(d) 前記工程(c)で抗原に結合した抗原結合ドメイン又は抗体を単離する工程。

[0182] さらに、本発明が提供する一つの態様である高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件における抗原に対する結合活性が、低水素イオン濃

度または高pHすなわちpH中性域の条件における抗原に対する結合活性より低い抗原結合ドメインまたは抗体は、以下の工程(a)～(c)を含むスクリーニング方法によって取得され得る。

(a) 抗原を固定したカラムにpH中性域の条件で抗原結合ドメイン又は抗体のライブラリを接触させる工程、

(b) 前記工程(a)でカラムに結合した抗原結合ドメイン又は抗体をpH酸性域の条件でカラムから溶出する工程、および

(c) 前記工程(b)で溶出された抗原結合ドメイン又は抗体を単離する工程。

[0183] さらに、本発明が提供する一つの態様である高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件における抗原に対する結合活性が、低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件における抗原に対する結合活性より低い抗原結合ドメインまたは抗体は、以下の工程(a)～(d)を含むスクリーニング方法によって取得され得る。

(a) 抗原を固定したカラムにpH酸性域の条件で抗原結合ドメイン又は抗体のライブラリを通過させる工程、

(b) 前記工程(a)でカラムに結合せずに溶出した抗原結合ドメイン又は抗体を回収する工程、

(c) 前記工程(b)で回収された抗原結合ドメイン又は抗体をpH中性域の条件で抗原に結合させる工程、および

(d) 前記工程(c)で抗原に結合した抗原結合ドメイン又は抗体を単離する工程。

[0184] さらに、本発明が提供する一つの態様である高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件における抗原に対する結合活性が、低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件における抗原に対する結合活性より低い抗原結合ドメインまたは抗体は、以下の工程(a)～(d)を含むスクリーニング方法によって取得され得る。

(a) pH中性域の条件で抗原結合ドメイン又は抗体のライブラリを抗原に接触させる工程、

(b) 前記工程(a)で抗原に結合した抗原結合ドメイン又は抗体を取得する工程、

(c) 前記工程(b)で取得した抗原結合ドメイン又は抗体をpH酸性域の条件に置く工程、および

(d) 前記工程(c)で抗原結合活性が、前記工程(b)で選択した基準より弱い抗原結合ドメイン又は抗体を単離する工程。

[0185] なお、前記の工程は2回以上繰り返されてもよい。従って、本発明によって、上述のスクリーニング方法において、(a)～(c)あるいは(a)～(d)の工程を2回以上繰り返す工程をさらに含むスクリーニング方法によって取得されたpH酸性域の条件における抗原に対する結合活性がpH中性域の条件における抗原に対する結合活性より低い抗原結合ドメインまたは抗体が提供される。(a)～(c)あるいは(a)～(d)の工程が繰り返される回数は特に限定されないが、通常10回以内である。

[0186] 本発明のスクリーニング方法において、高水素イオン濃度条件または低pHすなわちpH酸性域における抗原結合ドメイン又は抗体の抗原結合活性は、pHが4.0～6.5の間の抗原結合活性であれば特に限定されないが、好ましいpHとして、pHが4.5～6.6の間の抗原結合活性を挙げることができる。別の好ましいpHとして、pHが5.0～6.5の間の抗原結合活性、さらにpHが5.5～6.5の間の抗原結合活性を挙げることができる。より好ましいpHとして、生体内の早期エンドソーム内のpHが挙げられ、具体的にはpH5.8における抗原結合活性を挙げることができる。また、低水素イオン濃度条件または高pHすなわちpH中性域における抗原結合ドメイン又は抗体の抗原結合活性は、pHが6.7～10の間の抗原結合活性であれば特に限定されないが、好ましいpHとしてpHが6.7～9.5の間の抗原結合活性を挙げることができる。別の好ましいpHとして、pHが7.0～9.5の間の抗原結合活性、さらにpHが7.0～8.0の間の抗原結合活性を挙げることができる。より好ましいpHとして、生体内の血漿中でのpHを挙げることができ、具体的にはpHが7.4における抗原結合活性を挙げることができる。

[0187] 抗原結合ドメイン又は抗体の抗原結合活性は当業者に公知の方法により測

定することが可能であり、イオン化カルシウム濃度以外の条件については当業者が適宜決定することが可能である。抗原結合ドメイン又は抗体の抗原結合活性は、KD（Dissociation constant：解離定数）、見かけのKD（Apparent dissociation constant：見かけの解離定数）、解離速度であるkd（Dissociation rate：解離速度定数）、又は見かけのkd(Apparent dissociation：見かけの解離速度定数)等として評価することが可能である。これらは当業者公知の方法で測定することが可能であり、例えばBiacore（GE healthcare)、スキャッチャードプロット、FACS等を用いることが可能である。

[0188] 本発明において、低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件における抗原結合活性が高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件における抗原結合活性より高い抗原結合ドメイン又は抗体を選択する工程は、高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件における抗原結合活性が低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件における抗原結合活性より低い抗原結合ドメイン又は抗体を選択する工程と同じ意味である。

[0189] 低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件における抗原結合活性が高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件における抗原結合活性より高い限り、低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件における抗原結合活性と高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件における抗原結合活性の差は特に限定されないが、好ましくは低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件における抗原結合活性が高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件における抗原結合活性の2倍以上であり、さらに好ましくは10倍以上であり、より好ましくは40倍以上である。

[0190] 前記のスクリーニング方法によりスクリーニングされる本発明の抗原結合ドメイン又は抗体はいかなる抗原結合ドメイン又は抗体でもよく、例えば上述の抗原結合ドメイン又は抗体をスクリーニングすることが可能である。例えば、天然の配列を有する抗原結合ドメイン又は抗体をスクリーニングしてもよいし、アミノ酸配列が置換された抗原結合ドメイン又は抗体をスクリーニングしてもよい。

[0191] 前記のスクリーニング方法によってスクリーニングされる本発明の抗原結合ドメイン又は抗体はどのように調製されてもよく、例えば、あらかじめ存在している抗体、あらかじめ存在しているライブラリ（ファージライブラリ等）、動物への免疫から得られたハイブリドーマや免疫動物からのB細胞から作製された抗体又はライブラリ、これらの抗体やライブラリに側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸変異を導入した抗体又はライブラリ（側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）又は非天然アミノ酸の含有率を高くしたライブラリや特定箇所に側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）又は非天然アミノ酸変異を導入したライブラリ等）などを用いることが可能である。

[0192] 動物への免疫から得られたハイブリドーマや免疫動物からのB細胞から作製された抗原結合ドメインまたは抗体から、低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件における抗原結合活性が高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件における抗原結合活性より高い抗原結合ドメイン又は抗体を取得する方法として、例えば、WO2009/125825で記載されるような抗原結合ドメインまたは抗体中のアミノ酸の少なくとも一つが、側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸変異に置換されているもしくは抗原結合ドメインまたは抗体中に、側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸が挿入されている抗原結合分子または抗体が好適に挙げられる。

[0193] 側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸の変異が導入される位置は特に限定されず、置換または挿入前と比較してpH酸性域における抗原結合活性がpH中性域における抗原結合活性より弱くなる（KD(pH酸性域)／KD(pH中性域)の値が大きくなる、又はkd(pH酸性域)／kd(pH中性域)の値が大きくなる）限り、如何なる部位でもよい。例えば、抗原結合分子が抗体の場合には、抗体の可変領域やCDRなどが好適に挙げられる。側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグル

タミン酸）や非天然アミノ酸に置換されるアミノ酸の数、又は挿入されるアミノ酸の数は当業者が適宜決定することができ、側鎖のpKaが4.0-8.0である１つのアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸によって置換され得るし、側鎖のpKaが4.0-8.0である１つのアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸が挿入され得るし、側鎖のpKaが4.0-8.0である2つ以上の複数のアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸によって置換され得るし、側鎖のpKaが4.0-8.0である2つ以上のアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸が挿入され得る。又、側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸への置換又は側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸の挿入以外に、他のアミノ酸の欠失、付加、挿入および／または置換などが同時に行われ得る。側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸への置換又は側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸の挿入は、当業者の公知のアラニンscanningのアラニンをヒスチジン等に置き換えたヒスチジン等scanning等の方法によってランダムに行われ得るし、側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸の置換または挿入の変異がランダムに導入された抗原結合ドメインまたは抗体の中から、変異前と比較してKD(pH酸性域)／KD(pH中性域)又はkd(pH酸性域)／kd(pH中性域)の値が大きくなった抗原結合分子が選択され得る。

[0194] 前記のようにその側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸への変異が行われ、かつpH酸性域での抗原結合活性がpH中性域での抗原結合活性よりも低い抗原結合分子の好ましい例として、例えば、その側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸への変異後のpH中性域での抗原結合活性が、その側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸への変異前のpH中性域での抗原結合活性と同等

である抗原結合分子が好適に挙げられる。本発明において、その側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸の変異後の抗原結合分子が、その側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸の変異前の抗原結合分子と同等の抗原結合活性を有するとは、その側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸の変異前の抗原結合分子の抗原結合活性を100％とした場合に、その側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸の変異後の抗原結合分子の抗原結合活性が少なくとも10％以上、好ましくは50％以上、さらに好ましくは80％以上、より好ましくは90%以上であることをいう。その側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸の変異後のpH7.4での抗原結合活性が、その側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸の変異前のpH7.4での抗原結合活性より高くなってもよい。その側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸への置換または挿入により抗原結合分子の抗原結合活性が低くなった場合には、抗原結合分子中の１又は複数のアミノ酸の置換、欠失、付加及び／又は挿入などによって、抗原結合活性が、その側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸の置換又は挿入前の抗原結合活性と同等にされ得る。本発明においては、そのような側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸の置換又は挿入後に１又は複数のアミノ酸の置換、欠失、付加及び／又は挿入を行うことによって結合活性が同等となった抗原結合分子も含まれる。

[0195] さらに、抗原結合分子が抗体定常領域を含む物質である場合、pH酸性域での抗原結合活性がpH中性域での抗原結合活性よりも低い抗原結合分子の好ましい他の態様として、抗原結合分子に含まれる抗体定常領域が改変された方法を挙げることができる。改変後の抗体定常領域の具体例としては、例えば

配列番号：１１、１２、１３、または１４に記載の定常領域が好適に挙げられる。

[0196] 水素イオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合ドメインの結合活性を変化させるアミノ酸

前記のスクリーニング方法によってスクリーニングされる本発明の抗原結合ドメイン又は抗体はどのように調製されてもよく、例えば、イオン濃度の条件が水素イオン濃度の条件もしくはpHの条件である場合には、あらかじめ存在している抗体、あらかじめ存在しているライブラリ（ファージライブラリ等）、動物への免疫から得られたハイブリドーマや免疫動物からのB細胞から作製された抗体又はライブラリ、これらの抗体やライブラリに側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸の変異を導入した抗体又はライブラリ（側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸の含有率を高くしたライブラリや特定箇所に側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸の変異を導入したライブラリ等）などを用いることが可能である 。

[0197] 本発明の非限定の一つの態様として、「水素イオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基」が導入された軽鎖可変領域とランダム化可変領域配列ライブラリとして作製された重鎖可変領域とを組み合わせることによっても、本発明の複数の互いに配列の異なる抗原結合分子を含むライブラリが作製され得る。

[0198] 当該アミノ酸残基の非限定な例として軽鎖のCDR1に含まれるアミノ酸残基が例示される。ほかにも、当該アミノ酸残基の非限定な例として軽鎖のCDR2に含まれるアミノ酸残基が例示される。また、当該アミノ酸残基の非限定な別の例として軽鎖のCDR3に含まれるアミノ酸残基もまた例示される。

[0199] 前記のように、当該アミノ酸残基が軽鎖のCDR1に含まれるアミノ酸残基の非限定な例として、軽鎖可変領域のCDR1中のKabatナンバリングで表される24位、27位、28位、31位、32位および/または34位のアミノ酸残基が挙げられる

。また、当該アミノ酸残基が軽鎖のCDR2に含まれるアミノ酸残基の非限定な例として、軽鎖可変領域のCDR2中のKabatナンバリングで表される50位、51位、52位、53位、54位、55位および/または56位のアミノ酸残基が挙げられる。さらに、当該アミノ酸残基が軽鎖のCDR3に含まれアミノ酸残基の非限定な例として、軽鎖可変領域のCDR3中のKabatナンバリングで表される89位、90位、91位、92位、93位、94位および/または95A位のアミノ酸残基が挙げられる。また、これらのアミノ酸残基が、水素イオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性が変化する限り、これらのアミノ酸残基が単独で含まれ得るし、これらのアミノ酸が二つ以上組み合わされて含まれ得る。

[0200] 前記の「水素イオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基」が導入された軽鎖可変領域とランダム化可変領域配列ライブラリとして作製された重鎖可変領域とを組み合わせる場合でも、前記と同様に、フレキシブル残基が当該軽鎖可変領域の配列に含まれるように設計することも可能である。本発明の抗原結合分子の抗原に対する結合活性が、水素イオン濃度の条件によって変化する限り、当該フレキシブル残基の数および位置は特定の態様に限定されることはない。すなわち、重鎖および/または軽鎖のCDR配列および/またはFR配列に一つまたはそれ以上のフレキシブル残基が含まれ得る。例えば、軽鎖可変領域配列に導入されるフレキシブル残基の非限定的な例として、表３または表４に記載されたアミノ酸残基が挙げられる。また、水素イオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させるアミノ酸残基やフレキシブル残基以外の軽鎖可変領域のアミノ酸配列としては、非限定な例としてVk1（配列番号：５）、Vk2（配列番号：６）、Vk3（配列番号：７）、Vk4（配列番号：８）等の生殖細胞系列の配列が好適に使用され得る。

[0201]

[表3]

位置	アミノ酸								
CDR1									
28	S:100%								
29	I:100%								
30	N:25%	S:25%	R:25%	H:25%					
31	S:100%								
32	H:100%								
33	L:100%								
34	A:50%	N:50%							
CDR2									
50	H:100%				または	A:25%	D:25%	G:25%	K:25%
51	A:100%					A:100%			
52	S:100%					S:100%			
53	K:33.3%	N:33.3%	S:33.3%			H:100%			
54	L:100%					L:100%			
55	Q:100%					Q:100%			
56	S:100%					S:100%			
CDR3									
90	Q:100%				または	Q:100%			
91	H:100%					S:33.3%	R:33.3%	Y:33.3%	
92	G:25%	N:25%	S:25%	Y:25%		H:100%			
93	H:33.3%	N:33.3%	S:33.3%			H:33.3%	N:33.3%	S:33.3%	
94	S:50%	Y:50%				S:50%	Y:50%		
95	P:100%					P:100%			
96	L:50%	Y:50%				L:50%	Y:50%		

（位置はKabatナンバリングを表す）

[0202]

[表4]

CDR	位置	アミノ酸				
CDR1	28	S:100%				
	29	I:100%				
	30	H:30%	N:10%	S:50%	R:10%	
	31	N:35%	S:65%			
	32	H:40%	N:20%	Y:40%		
	33	L:100%				
	34	A:70%	N:30%			
CDR2	50	A:25%	D:15%	G:25%	H:30%	K:5%
	51	A:100%				
	52	S:100%				
	53	H:30%	K:10%	N:15%	S：45%	
	54	L:100%				
	55	Q:100%				
	56	S:100%				
CDR3	90	Q:100%				
	91	H:30%	S:15%	R:10%	Y:45%	
	92	G:20%	H:30%	N:20%	S:15%	Y:15%
	93	H:30%	N:25%	S:45%		
	94	S:50%	Y:50%			
	95	P:100%				
	96	L:50%	Y:50%			

（位置はKabatナンバリングを表す）

[0203] 前記の、水素イオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させるアミノ酸残基としては、いずれのアミノ酸残基も好適に使用され得るが、そのようなアミノ酸残基としては、具体的に側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸が挙げられる。こうした電子供与性を有するアミノ酸としては、ヒスチジンまたはグルタミン酸等の天然のアミノ酸のほか、ヒスチジンアナログ（US20090035836）もしくはm-NO2-Tyr（pKa 7.45）、3,5-Br2-Tyr（pKa 7.21）または3,5-I2-Tyr（pKa 7.38）等の非天然のアミノ酸（Bioorg. Med. Chem. (2003) 11 (17), 3761-2768が好適に例示される。また、当該アミノ酸残基の特に好適な例としては、側鎖のpKaが6.0-7.0であるアミノ酸が

挙げられる。こうした電子供与性を有するアミノ酸としては、ヒスチジンが好適に例示される。

[0204] 抗原結合ドメインのアミノ酸の改変のためには、部位特異的変異誘発法（Kunkelら（Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82, 488-492））やOverlap extension PCR等の公知の方法が適宜採用され得る。また、天然のアミノ酸以外のアミノ酸に置換するアミノ酸の改変方法として、複数の公知の方法もまた採用され得る（Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. (2006) 35, 225-249、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003) 100 (11), 6353-6357）。例えば、終止コドンの１つであるUAGコドン（アンバーコドン）の相補的アンバーサプレッサーtRNAに非天然アミノ酸が結合されたtRNAが含まれる無細胞翻訳系システム（Clover Direct (Protein Express)）等も好適に用いられる。

[0205] 組み合わされる重鎖可変領域の例として、ランダム化可変領域ライブラリが好適に挙げられる。ランダム化可変領域ライブラリの作製方法は公知の方法が適宜組み合わされる。本発明の非限定な一態様では、特定の抗原で免疫された動物、感染症患者やワクチン接種して血中抗体価が上昇したヒト、癌患者、自己免疫疾患のリンパ球由来の抗体遺伝子をもとに構築された免疫ライブラリが、ランダム化可変領域ライブラリとして好適に使用され得る。

[0206] また、本発明の非限定の一態様では、前記と同様に、ゲノムDNA におけるV遺伝子や再構築され機能的なV遺伝子のCDR配列が、適当な長さのコドンセットをコードする配列を含む合成オリゴヌクレオチドセットで置換された合成ライブラリもまた、ランダム化可変領域ライブラリとして好適に使用され得る。この場合、重鎖のCDR3の遺伝子配列の多様性が観察されることから、CDR3の配列のみを置換することもまた可能である。抗原結合分子の可変領域においてアミノ酸の多様性を生み出す基準は、抗原結合分子の表面に露出した位置のアミノ酸残基に多様性を持たせることである。表面に露出した位置とは、抗原結合分子の構造、構造アンサンブル、および/またはモデル化された構造にもとづいて、表面に露出が可能、かつ/または抗原との接触が可能と判断される位置のことをいうが、一般的にはそのCDRである。好ましくは、表面に

露出した位置は、InsightIIプログラム（Accelrys）のようなコンピュータプログラムを用いて、抗原結合分子の3次元モデルからの座標を使って決定される。表面に露出した位置は、当技術分野で公知のアルゴリズム（例えば、LeeおよびRichards（J. Mol. Biol.（1971）55, 379-400）、Connolly（J. Appl. Cryst.（1983）16, 548-558））を使用して決定され得る。表面に露出した位置の決定は、タンパク質モデリングに適したソフトウェアおよび抗体から得られる三次元構造情報を使って行われ得る。このような目的のために利用できるソフトウェアとして、SYBYL生体高分子モジュールソフトウェア（Tripos Associates）が好適に挙げられる。一般的に、また好ましくは、アルゴリズムがユーザーの入力サイズパラメータを必要とする場合は、計算において使われるプローブの「サイズ」は半径約1.4オングストローム以下に設定される。さらに、パーソナルコンピュータ用のソフトウェアを使用した表面に露出した領域およびエリアの決定法が、Pacios（Comput. Chem.（1994）18（4）, 377-386およびJ. Mol. Model.（1995）1, 46-53）に記載されている。

[0207] さらに、本発明の非限定の一態様では、健常人のリンパ球由来の抗体遺伝子から構築され、そのレパートリーにバイアスを含まない抗体配列であるナイーブ配列からなるナイーブライブラリもまた、ランダム化可変領域ライブラリとして特に好適に使用され得る（Gejimaら（Human Antibodies（2002）11,121-129）およびCardosoら（Scand. J. Immunol.（2000）51, 337-344））。

[0208] 中和活性

本発明の非限定の一態様では、pH酸性域においてヒトFcRnに対する結合活性を有し、イオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン、およびpH中性域の条件下でFcγレセプターに対する結合活性がEUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgGのFc領域のFcγレセプターに対する結合活性よりも高いFcγレセプター結合ドメインを含み、抗原に対する中和活性を有する抗原結合分子および当該抗原結合分子を含む医薬組成物が提供される。一般的に、中和活性とは、ウ

イルスや毒素など、細胞に対して生物学的活性を有するリガンドの当該生物学的活性を阻害する活性をいう。即ち、中和活性を有する物質とは、当該リガンド又は当該リガンドが結合するレセプターに結合し、当該リガンドとレセプターの結合を阻害する物質をさす。中和活性によりリガンドとの結合を阻止されたレセプターは、当該レセプターを通じた生物学的活性を発揮することができなくなる。抗原結合分子が抗体である場合、このような中和活性を有する抗体は一般に中和抗体と呼ばれる。ある被検物質の中和活性は、リガンドの存在下における生物学的活性をその被検物質の存在又は非存在下の条件の間で比較することにより測定され得る。

[0209] 例えば、IL-6Rの主要なリガンドとして考えられているものは配列番号：１５で表されるIL-6が好適に挙げられる。そのアミノ末端が細胞外ドメインを形成するI型膜タンパク質であるIL-6Rは、IL-6によって二量体化が誘導されたgp130レセプターとともにヘテロ四量体を形成する（HEINRICHら（Biochem. J.（1998）334, 297-314））。当該ヘテロ四量体の形成によって、gp130レセプターに会合しているJakが活性化される。Jakは自己リン酸化とレセプターのリン酸化を行う。受容体及びJakのリン酸化部位は、Stat3のようなSH2を持つStatファミリーに属する分子や、MAPキナーゼ、PI3/Akt、そのほかのSH2を持つタンパク質やアダプターに対して、結合部位の役割を果たす。次に、gp130レセプターに結合したStatが、Jakによってリン酸化。リン酸化されたStatは二量体を形成して核内に移行し、標的遺伝子の転写を調節する。JakまたはStatは他のクラスのレセプターを介してシグナルカスケードに関与することもできる。脱制御されたIL-6のシグナルカスケードは、自己免疫疾患の病態や炎症、多発性骨髄腫や前立腺癌などの癌で観察される。癌遺伝子として作用し得るStat3は、多くの癌において恒常的に活性化している。前立腺癌と多発性骨髄腫では、IL-6Rからのシグナルカスケードと、上皮成長因子受容体（EGFR）ファミリーメンバーからのシグナルカスケードとの間にクロストークがある（Ishikawaら（J. Clin. Exp. Hematopathol.（2006）46（2), 55-66））。

[0210] こうした細胞内のシグナルカスケードは細胞種毎に異なるため、目的とする標的細胞毎に適宜標的分子を設定することができ、上記の因子に限定されるものではない。生体内シグナルの活性化を測定することにより、中和活性を評価することができる。また、生体内シグナルカスケードの下流に存在する標的遺伝子に対する転写誘導作用を指標として、生体内シグナルの活性化を検出することもできる。標的遺伝子の転写活性の変化は、レポーターアッセイの原理によって検出することができる。具体的には、標的遺伝子の転写因子又はプロモーター領域の下流にGFP (Green Fluorescence Protein) やルシフェラーゼなどのレポーター遺伝子を配し、そのレポーター活性を測定することにより、転写活性の変化をレポーター活性として測定することができる。生体内シグナルの活性化の測定キットは市販のものを適宜使用することができる (例えば、Mercury Pathway Profiling Luciferase System (Clontech) 等)。

[0211] 更に、通常は細胞増殖を促進する方向に働くシグナルカスケードに作用するEGFレセプターファミリー等のレセプターリガンドの中和活性を測定する方法として、標的とする細胞の増殖活性を測定することによって、中和抗体の中和活性を評価することができる。例えば、例えばHB-EGF等その増殖がEGFファミリーの成長因子によって促進される細胞の増殖に対する、抗HB-EGF抗体の中和活性に基づく抑制効果を評価又は測定する方法として、以下の方法が好適に使用される。試験管内において該細胞増殖抑制活性を評価又は測定する方法としては、培地中に添加した[3H]ラベルしたチミジンの生細胞による取り込みをDNA複製能力の指標として測定する方法が用いられる。より簡便な方法としてトリパンブルー等の色素を細胞外に排除する能力を顕微鏡下で計測する色素排除法や、MTT法が用いられる。後者は、生細胞がテトラゾリウム塩であるMTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide)を青色のホルマザン産物へ転換する能力を有することを利用している。より具体的には、被検細胞の培養液にリガンドと共に被検抗体を添加して一定時間を経過した後に、MTT溶液を培養液に加えて一定時間静置することに

よりMTTを細胞に取り込ませる。その結果、黄色の化合物であるMTTが細胞内のミトコンドリア内のコハク酸脱水素酵素により青色の化合物に変換される。この青色生成物を溶解し呈色させた後にその吸光度を測定することにより生細胞数の指標とするものである。MTT以外に、MTS、XTT、WST－1、WST－8等の試薬も市販されており（nacalai tesqueなど）好適に使用することができる。活性の測定に際しては、対照抗体として抗HB-EGF抗体と同一のアイソタイプを有する抗体で該細胞増殖抑制活性を有しない結合抗体を、抗HB-EGF抗体と同様に使用して、抗HB-EGF抗体が対照抗体よりも強い細胞増殖抑制活性を示すことにより活性を判定することができる。

[0212] 活性を評価するための細胞として、例えば、その増殖がHB-EGFによって促進される細胞である、卵巣癌細胞であるRMG-1細胞株や、ヒトEGFRの細胞外ドメインとマウスGCSF受容体の細胞内ドメインをインフレームで融合した融合タンパク質であるhEGFR/mG-CSFRをコードする遺伝子を発現する様に結合したベクターによって形質転換されたマウスBa/F3細胞等も好適に使用され得る。このように、当業者は、活性を評価するための細胞を適宜選択することによって前記の細胞増殖活性の測定に使用することが可能である。

[0213] 本発明が提供する抗原結合分子は、抗原を血漿中から消失させることができるため、抗原結合分子自体が中和活性を有することは必ずしも必要ではない。しかしながら、Fcγレセプターを介したエンドサイトーシスにより抗原が抗原結合分子とともにFcっγレセプターを発現する細胞内に取り込まれるまでの間、抗原に対する中和活性を発揮することによって、血漿中に存在する抗原の機能を遮断することがさらに好ましい。

[0214] また、本発明が提供する抗原結合分子は、細胞外で抗原結合分子に結合した抗原の細胞内での抗原結合分子からの解離を促進することができるため、細胞内で抗原結合分子から解離した抗原はライソソームにおいて分解される。よって、抗原結合分子自体が中和活性を有することは必ずしも必要ではない。しかしながら、Fcγレセプターを介したエンドサイトーシスにより抗原が抗原結合分子とともにFcっγレセプターを発現する細胞内に取り込まれる

までの間、抗原に対する中和活性を発揮することによって、血漿中に存在する抗原の機能を遮断することがさらに好ましい。

[0215] さらに、本発明が提供する抗原結合分子は、血漿中の総抗原濃度または遊離抗原濃度を減少させることができるため、抗原結合分子自体が中和活性を有することは必ずしも必要ではない。しかしながら、Fcγレセプターを介したエンドサイトーシスにより抗原が抗原結合分子とともにFcっγレセプターを発現する細胞内に取り込まれるまでの間、抗原に対する中和活性を発揮することによって、血漿中に存在する抗原の機能を遮断することがさらに好ましい。

[0216] Fcγレセプター

Fcγレセプター（FcγR）とは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4モノクローナル抗体のFc領域に結合し得るレセプターをいい、実質的にFcγレセプター遺伝子にコードされるタンパク質のファミリーのいかなるメンバーをも意味する。ヒトでは、このファミリーには、アイソフォームFcγRIa、FcγRIbおよびFcγRIcを含むFcγRI（CD64）；アイソフォームFcγRIIa（アロタイプH131およびR131を含む）、FcγRIIb（FcγRIIb-1およびFcγRIIb-2を含む）およびFcγRIIcを含むFcγRII（CD32）；およびアイソフォームFcγRIIIa（アロタイプV158およびF158を含む）およびFcγRIIIb（アロタイプFcγRIIIb-NA1およびFcγRIIIb-NA2を含む）を含むFcγRIII（CD16）、並びにいかなる未発見のヒトFcγR類またはFcγRアイソフォームまたはアロタイプも含まれるが、これらに限定されるものではない。FcγRは、ヒト、マウス、ラット、ウサギおよびサル由来のものを含むが、これらに限定されるものではない、いかなる生物由来でもよい。マウスFcγR類には、FcγRI（CD64）、FcγRII（CD32）、FcγRIII（CD16）およびFcγRIII-2（FcγRIV、CD16-2）、並びにいかなる未発見のマウスFcγR類またはFcγRアイソフォームまたはアロタイプも含まれるが、これらに限定されない。こうしたFcγレセプターの好適な例としてはヒトFcγRI（CD64）、FcγRIIa（CD32）、FcγRIIb（CD32）、FcγRIIIa（CD16）及び／又はFcγRIIIb（CD16）が挙げられる。ヒトFcγRIのポリヌクレ

オチド配列及びアミノ酸配列はそれぞれ配列番号：１６（NM_000566.3）及び１７（NP_000557.1）に、ヒトFcγRIIa（アロタイプH131）のポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列はそれぞれ配列番号：１８（BC020823.1）及び１９（AAH20823.1）に（アロタイプR131は配列番号：１９の166番目のアミノ酸がArgに置換されている配列である）、FcγRIIbのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列はそれぞれ配列番号：２０（BC146678.1）及び２１（AAI46679.1）に、FcγRIIIaのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列はそれぞれ配列番号：２２（BC033678.1）及び２３（AAH33678.1）に、及びFcγRIIIbのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、それぞれ配列番号：２４（BC128562.1）及び２５（AAI28563.1）に記載されている（カッコ内はRefSeq登録番号を示す）。Fcγレセプターが、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4モノクローナル抗体のFc領域に結合活性を有するか否かは、上記に記載されるFACSやELISAフォーマットのほか、ALPHAスクリーン（Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay）や表面プラズモン共鳴（SPR）現象を利用したBIACORE法等によって確認され得る（Proc.Natl.Acad.Sci.USA (2006) 103 (11), 4005-4010）。

[0217] また、「Fcリガンド」または「エフェクターリガンド」は、抗体のFc領域に結合してFc／Fcリガンド複合体を形成する、任意の生物に由来する分子、好ましくはポリペプチドを意味する。FcリガンドのFcへの結合は、好ましくは、１つまたはそれ以上のエフェクター機能を誘起する。Fcリガンドには、Fc受容体、FcγR、FcαR、FcεR、FcRn、C1q、C3、マンナン結合レクチン、マンノース受容体、スタフィロコッカスのプロテインＡ、スタフィロコッカスのタンパク質Ｇおよびウイルスの FcγRが含まれるが、これらに限定されない。Fcリガンドには、FcγRに相同なFc受容体のファミリーであるFc受容体相同体（FcRH）（Davis et al., (2002) Immunological Reviews 190, 123-136）やFCRL（Annu Rev Immunol, 2007; 25: 525-60）も含まれる。Fcリガンドには、Fcに結合する未発見の分子も含まれ得る。

[0218] FcγRIa、FcγRIbおよびFcγRIcを含むFcγRI（CD64）ならびにアイソフォームFcγRIIIa（アロタイプV158およびF158を含む）およびFcγRIIIb（アロ

タイプFcγRIIIb-NA1およびFcγRIIIb-NA2を含む）を含むFcγRIII（CD16）は、IgGのFc部分と結合するα鎖と細胞内に活性化シグナルを伝達するITAMを有する共通γ鎖が会合する。一方、アイソフォームFcγRIIa（アロタイプH131およびR131を含む）およびFcγRIIcを含むFcγRII（CD32）の自身の細胞質ドメインにはITAMが含まれている。これらのレセプターは、マクロファージやマスト細胞、抗原提示細胞等の多くの免疫細胞に発現している。これらのレセプターがIgGのFc部分に結合することによって伝達される活性化シグナルによって、マクロファージの貪食能や炎症性サイトカインの産生、マスト細胞の脱顆粒、抗原提示細胞の機能亢進が促進される。上記のように活性化シグナルを伝達する能力を有するFcγレセプターは、本発明においても活性型Fcγレセプターと呼ばれる。

[0219] 一方、FcγRIIb（FcγRIIb-1およびFcγRIIb-2を含む）の自身の細胞質内ドメインには抑制型シグナルを伝達するITIMが含まれている。B細胞ではFcγRIIbとB細胞レセプター（BCR）との架橋によってBCRからの活性化シグナルが抑制される結果BCRの抗体産生が抑制される。マクロファージでは、FcγRIIIとFcγRIIbとの架橋によって貪食能や炎症性サイトカインの産生能が抑制される。上記のように抑制化シグナルを伝達する能力を有するFcγレセプターは、本発明においても抑制型Fcγレセプターと呼ばれる。

[0220] Fcγレセプターに対する結合活性

本発明の抗原結合分子に含まれるFcγR結合ドメインのFcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa及び/又はFcγRIIIbのいずれかのヒトFcγレセプターに対する結合活性は、上記に記載されるFACSやELISAフォーマットのほか、ALPHAスクリーン（Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay）や表面プラズモン共鳴（SPR）現象を利用したBIACORE法等によって確認することができる（Proc.Natl.Acad.Sci.USA (2006) 103 (11), 4005-4010）。これらのアッセイにはヒトFcγレセプターの細胞外ドメインが可溶性抗原として用いられ得る。

[0221] ALPHAスクリーンは、ドナーとアクセプターの2つのビーズを使用するALPHA

テクノロジーによって下記の原理に基づいて実施される。ドナービーズに結合した分子が、アクセプタービーズに結合した分子と生物学的に相互作用し、2つのビーズが近接した状態の時にのみ、発光シグナルを検出される。レーザーによって励起されたドナービーズ内のフォトセンシタイザーは、周辺の酸素を励起状態の一重項酸素に変換する。一重項酸素はドナービーズ周辺に拡散し、近接しているアクセプタービーズに到達するとビーズ内の化学発光反応を引き起こし、最終的に光が放出される。ドナービーズに結合した分子とアクセプタービーズに結合した分子が相互作用しないときは、ドナービーズの産生する一重項酸素がアクセプタービーズに到達しないため、化学発光反応は起きない。

[0222] 例えば、ドナービーズにビオチン標識されたFc領域を含む抗原結合分子が結合され、アクセプタービーズにはグルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）でタグ化されたFcγレセプターが結合される。競合するFc領域改変体を含む抗原結合分子の非存在下では、天然型Fc領域を有する抗原結合分子とFcγレセプターは相互作用し520-620 nmのシグナルを生ずる。タグ化されていないFc領域改変体を含む抗原結合分子は、天然型Fc領域を有する抗原結合分子とFcγレセプター間の相互作用と競合する。競合の結果表れる蛍光の減少を定量することによって相対的な結合親和性が決定され得る。抗体等の抗原結合分子をSulfo-NHS-ビオチン等を用いてビオチン化することは公知である。Fcγレセプターを GSTでタグ化する方法としては、Fcγレセプターをコードするポリヌクレオチドと GSTをコードするポリヌクレオチドをインフレームで融合した融合遺伝子が作用可能に連結されたベクターに保持した細胞等において発現し、グルタチオンカラムを用いて精製する方法等が適宜採用され得る。得られたシグナルは例えばGRAPHPAD PRISM（GraphPad社、San Diego）等のソフトウェアを用いて非線形回帰解析を利用する一部位競合（one-site competition）モデルに適合させることにより好適に解析される。

[0223] 相互作用を観察する物質の一方（リガンド）をセンサーチップの金薄膜上に固定し、センサーチップの裏側から金薄膜とガラスの境界面で全反射する

ように光を当てると、反射光の一部に反射強度が低下した部分（SPRシグナル）が形成される。相互作用を観察する物質の他方（アナライト）をセンサーチップの表面に流しリガンドとアナライトが結合すると、固定化されているリガンド分子の質量が増加し、センサーチップ表面の溶媒の屈折率が変化する。この屈折率の変化により、SPRシグナルの位置がシフトする（逆に結合が解離するとシグナルの位置は戻る）。Biacoreシステムは上記のシフトする量、すなわちセンサーチップ表面での質量変化を縦軸にとり、質量の時間変化を測定データとして表示する（センサーグラム）。センサーグラムのカーブからカイネティクス：結合速度定数（ka）と解離速度定数(kd）が、当該定数の比からアフィニティー（KD）が求められる。BIACORE法では阻害測定法も好適に用いられる。阻害測定法の例はProc.Natl.Acad.Sci.USA (2006) 103 (11), 4005-4010において記載されている。

[0224] Fcγレセプター結合ドメイン

EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgGのFc領域のFcγレセプターに対する結合活性よりもFcγレセプターに対する結合活性が高いFcγレセプター結合ドメインは、天然型ヒトIgGのFc領域のアミノ酸を改変することによって作製され得る。また、Fcγレセプター結合ドメインは、Fcγレセプターに結合することを特徴とする先に記載された抗原結合ドメインのいかなる構造のドメインも使用され得る。その場合には、アミノ酸改変の導入を必要とせずに作製され得るし、またさらに改変を導入することでFcγレセプターへの親和性を高めてもよい。そのようなFcγレセプター結合ドメインとしては、Protein Eng Des Sel. 2009 Mar;22(3):175-88 、Protein Eng Des Sel. 2008 Jan;21(1):1-10.およびJ Immunol. 2002 Jul 1;169(1):137-44に記載されたFcγRIIIaに結合するFab断片抗体、ラクダ由来単ドメイン抗体およびsingle chain Fv抗体、および、FASEB J. 2009 Feb;23(2):575-85.に記載されたFcγRI結合環状ペプチド等が挙げられる。Fcγレセプター結合ドメインのFcγRに対する結合活性が、EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgGのFc領域のFcγRに対

する結合活性より高いか否かは、前記の結合活性の項で記載された方法を用いて適宜実施され得る。

[0225] 本発明において、出発Fcγレセプター結合ドメインの例としては、ヒトIgGのFc領域が好適に挙げられる。本発明において、Fc領域の「アミノ酸の改変」または「アミノ酸改変」とは、出発Fc領域のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列に改変することを含む。出発Fc領域の修飾改変体がpH中性域においてヒトFcγレセプターに結合することができる限り、いずれのFc領域も出発Fc領域として使用され得る。また、既に改変が加えられたFc領域を出発Fc領域としてさらなる改変が加えられたFc領域も本発明のFc領域として好適に使用され得る。出発Fc領域とは、ポリペプチドそのもの、出発Fc領域を含む組成物、または出発Fc領域をコードするアミノ酸配列を意味し得る。出発Fc領域には、抗体の項で概説された組換えによって産生された公知のFc領域が含まれ得る。出発Fc領域の起源は、限定されないが非ヒト動物の任意の生物またはヒトから取得され得る。好ましくは、任意の生物としては、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、アレチネズミ、ネコ、ウサギ、イヌ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ラクダ、および非ヒト霊長類から選択される生物が好適に挙げられる。別の態様において、出発Fcγレセプター結合ドメインはまた、カニクイザル、マーモセット、アカゲザル、チンパンジー、またはヒトから取得され得る。好ましくは、出発Fc領域は、ヒトIgG1から取得され得るが、IgGの特定のクラスに限定されるものでもない。このことは、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4のFc領域を出発Fcγレセプター結合ドメインとして適宜用いることができることを意味する。同様に、本明細書において、前記の任意の生物からのIgGの任意のクラスまたはサブクラスのFc領域を、好ましくは出発Fc領域として用いることができることを意味する。天然に存在するIgGのバリアントまたは操作された型の例は、公知の文献（Curr. Opin. Biotechnol. (2009) 20 (6), 685-91、Curr. Opin. Immunol. (2008) 20 (4), 460-470、Protein Eng. Des. Sel. (2010) 23 (4), 195-202、WO2009/086320、WO2008/092117、WO2007/041635、およびWO2006/105338）に記載されるがそれ

らに限定されない。

[0226] 改変の例としては一以上の変異、例えば、出発Fc領域のアミノ酸とは異なるアミノ酸残基に置換された変異、あるいは出発Fc領域のアミノ酸に対して一以上のアミノ酸残基の挿入または出発Fc領域のアミノ酸から一以上のアミノ酸の欠失等が含まれる。好ましくは、改変後のFc領域のアミノ酸配列には、天然に生じないFc領域の少なくとも部分を含むアミノ酸配列を含む。そのような変種は必然的に出発Fc領域と100%未満の配列同一性または類似性を有する。好ましい実施形態において、変種は出発Fc領域のアミノ酸配列と約75%～100%未満のアミノ酸配列同一性または類似性、より好ましくは約80%～100%未満、より好ましくは約85%～100%未満の、より好ましくは約90%～100%未満、最も好ましくは約95%～100%未満の同一性または類似性のアミノ酸配列を有する。本発明の非限定の一態様において、出発Fc領域および本発明の改変されたFc領域の間には少なくとも１つのアミノ酸の差がある。出発Fc領域と改変Fc領域のアミノ酸の違いは、特に前述のEUナンバリングで特定されるアミノ酸残基の位置の特定されたアミノ酸の違いによっても好適に特定可能である。

[0227] Fc領域のアミノ酸の改変のためには、部位特異的変異誘発法（Kunkelら（Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82, 488-492））やOverlap extension PCR等の公知の方法が適宜採用され得る。また、天然のアミノ酸以外のアミノ酸に置換するアミノ酸の改変方法として、複数の公知の方法も採用され得る（Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. (2006) 35, 225-249、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003) 100 (11), 6353-6357）。例えば、終止コドンの１つであるUAGコドン（アンバーコドン）の相補的アンバーサプレッサーtRNAに非天然アミノ酸が結合されたtRNAが含まれる無細胞翻訳系システム（Clover Direct (Protein Express)）等も好適に用いられる。

[0228] 本発明の抗原結合分子に含まれるpH中性域におけるFcγレセプターに対する結合活性を有するFc領域はいかなる方法によっても取得され得るが、具体的には、出発Fc領域として用いられるヒトIgG型免疫グロブリンのアミノ酸の

改変によってpH中性域におけるFcγレセプターに対する結合活性を有するFc領域が取得され得る。改変のための好ましいIgG型免疫グロブリンのFc領域としては、例えばヒトIgG（IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4、およびそれらの改変体）のFc領域が挙げられる。IgGのＦｃ領域にはそれから自然に生じる変異体等も含まれる。ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG3、ヒトIgG4抗体のＦｃ領域としては、遺伝子多型による複数のアロタイプ配列がSequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No.91-3242に記載されているが、本発明においてはそのいずれであっても良い。特にヒトIgG1の配列としては、EUナンバリング３５６－３５８番目のアミノ酸配列がDELであってもEEMであってもよい。

[0229] 他のアミノ酸への改変は、pH中性域におけるFcγレセプターに対する結合活性を有する、もしくは中性域におけるFcγレセプター結合に対する結合活性を高められるかぎり、いかなる位置のアミノ酸も改変され得る。抗原結合分子が、ヒトFc領域としてヒトIgG1のFc領域を含んでいる場合、pH中性域におけるFcγレセプターに対する結合が、ヒトIgG1の出発Fc領域の結合活性より増強する効果をもたらす改変が含まれていることが好ましい。pH中性域の条件下でのFcγレセプターに対する結合活性を増強するためのアミノ酸改変としては、例えばWO2007/024249、WO2007/021841、WO2006/031370、WO2000/042072、WO2004/029207、WO2004/099249、WO2006/105338、WO2007/041635、WO2008/092117、WO2005/070963、WO2006/020114、WO2006/116260およびWO2006/023403などにおいて報告されている。

[0230] そのような改変が可能なアミノ酸として、例えば、EUナンバリングで表される221位、222位、223位、224位、225位、227位、228位、230位、231位、232位、233位、234位、235位、236位、237位、238位、239位、240位、241位、243位、244位、245位、246位、247位、249位、250位、251位、254位、255位、256位、258位、260位、262位、263位、264位、265位、266位、267位、268位、269位、270位、271位、272位、273位、274位、275位、276位、278位、279位、280位、281位、282位、283位、284位、285位、286位、288位、290位、29

1位、292位、293位、294位、295位、296位、297位、298位、299位、300位、301位、302位、303位、304位、305位、311位、313位、315位、317位、318位、320位、322位、323位、324位、325位、326位、327位、328位、329位、330位、331位、332位、333位、334位、335位、336位、337位、339位、376位、377位、378位、379位、380位、382位、385位、392位、396位、421位、427位、428位、429位、434位、436位および440位の群から選択される少なくともひとつ以上のアミノ酸が挙げられる。これらのアミノ酸の改変によって、IgG型免疫グロブリンのFc領域のpH中性域の条件下でFcγレセプターに対する結合が増強される。

[0231] 本発明に使用するために、特に好ましい改変としては、例えば、Fc領域のEUナンバリングで表される；

221位のアミノ酸がLysまたはTyrのいずれか、

222位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはTyrのいずれか、

223位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはLysのいずれか、

224位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはTyrのいずれか、

225位のアミノ酸がGlu、LysまたはTrpのいずれか、

227位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

228位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

230位のアミノ酸がAla、Glu、GlyまたはTyrのいずれか、

231位のアミノ酸がGlu、Gly、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

232位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

233位のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

234位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

235位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

236位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pr

o、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

237位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

238位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

239位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

240位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

241位のアミノ酸がAsp、Glu、Leu、Arg、TrpまたはTyrのいずれか、

243位のアミノ酸がLeu、Glu、Leu、Gln、Arg、TrpまたはTyrのいずれか、

244位のアミノ酸がHis、

245位のアミノ酸がAla、

246位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、

247位のアミノ酸がAla、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

249位のアミノ酸がGlu、His、GlnまたはTyrのいずれか、

250位のアミノ酸がGluまたはGlnのいずれか、

251位のアミノ酸がPhe、

254位のアミノ酸がPhe、MetまたはTyrのいずれか、

255位のアミノ酸がGlu、LeuまたはTyrのいずれか、

256位のアミノ酸がAla、MetまたはProのいずれか、

258位のアミノ酸がAsp、Glu、His、SerまたはTyrのいずれか、

260位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、

262位のアミノ酸がAla、Glu、Phe、IleまたはThrのいずれか、

263位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

264位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、

265位のアミノ酸がAla、Leu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pr

o、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

266位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

267位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

268位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Thr、ValまたはTrpのいずれか、

269位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

270位のアミノ酸がGlu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、

271位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

272位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

273位のアミノ酸がPheまたはIleのいずれか、

274位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

275位のアミノ酸がLeuまたはTrpのいずれか、

276位のアミノ酸が、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

278位のアミノ酸がAsp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、ValまたはTrpのいずれか、

279位のアミノ酸がAla、

280位のアミノ酸がAla、Gly、His、Lys、Leu、Pro、Gln、TrpまたはTyrのいずれか、

281位のアミノ酸がAsp、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

282位のアミノ酸がGlu、Gly、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

283位のアミノ酸がAla、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、ArgまたはTyr

のいずれか、

284位のアミノ酸がAsp、Glu、Leu、Asn、ThrまたはTyrのいずれか、

285位のアミノ酸がAsp、Glu、Lys、Gln、TrpまたはTyrのいずれか、

286位のアミノ酸がGlu、Gly、ProまたはTyrのいずれか、

288位のアミノ酸がAsn、Asp、GluまたはTyrのいずれか、

290位のアミノ酸がAsp、Gly、His、Leu、Asn、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、291位のアミノ酸がAsp、Glu、Gly、His、Ile、GlnまたはThrのいずれか、

292位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Pro、ThrまたはTyrのいずれか、

293位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

294位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

295位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

296位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、ThrまたはValのいずれか、

297位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

298位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

299位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

300位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、ValまたはTrpのいずれか、

301位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、

302位のアミノ酸がIle、

303位のアミノ酸がAsp、GlyまたはTyrのいずれか、

304位のアミノ酸がAsp、His、Leu、AsnまたはThrのいずれか、

305位のアミノ酸がGlu、Ile、ThrまたはTyrのいずれか、

311位のアミノ酸がAla、Asp、Asn、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

313位のアミノ酸がPhe、

315位のアミノ酸がLeu、

317位のアミノ酸がGluまたはGln、

318位のアミノ酸がHis、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

320位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Asn、Pro、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

322位のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Pro、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

323位のアミノ酸がIle、

324位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

325位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

326位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

327位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

328位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

329位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

330位のアミノ酸がCys、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

331位のアミノ酸がAsp、Phe、His、Ile、Leu、Met、Gln、Arg、Thr、Val、Tr

pまたはTyrのいずれか、

332位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

333位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Ser、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

334位のアミノ酸がAla、Glu、Phe、Ile、Leu、ProまたはThrのいずれか、

335位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

336位のアミノ酸がGlu、LysまたはTyrのいずれか、

337位のアミノ酸がGlu、HisまたはAsnのいずれか、

339位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、SerまたはThrのいずれか、

376位のアミノ酸がAlaまたはValのいずれか、

377位のアミノ酸がGlyまたはLysのいずれか、

378位のアミノ酸がAsp、

379位のアミノ酸がAsn、

380位のアミノ酸がAla、AsnまたはSerのいずれか、

382位のアミノ酸がAlaまたはIleのいずれか、

385位のアミノ酸がGlu、

392位のアミノ酸がThr、

396位のアミノ酸がLeu、

421位のアミノ酸がLys、

427位のアミノ酸がAsn、

428位のアミノ酸がPheまたはLeuのいずれか、

429位のアミノ酸がMet、

434位のアミノ酸がTrp、

436位のアミノ酸がIle、または

440位のアミノ酸がGly、His、Ile、LeuまたはTyrのいずれか、

の群から選択される少なくともひとつ以上のアミノ酸の改変が挙げられる。また、改変されるアミノ酸の数は特に限定されず、一箇所のみのアミノ酸が改変され得るし、二箇所以上のアミノ酸が改変され得る。二箇所以上のアミノ酸の改変の組合せとしては、例えば表５（表５－１～表５－３）に記載されるような組合せが挙げられる。

[0232]

[表5-1]

アミノ酸の組合せ	アミノ酸の組合せ
K370E/P396L/D270E	S239Q/I332Q
Q419H/P396L/D270E	S267D/I332E
V240A/P396L/D270E	S267E/I332E
R255L/P396L/D270E	S267L/A327S
R255L/P396L/D270E	S267Q/A327S
R255L/P396L/D270E/R292G	S298A/I332E
R255L/P396L/D270E	S304T/I332E
R255L/P396L/D270E/Y300L	S324G/I332D
F243L/D270E/K392N/P396L	S324G/I332E
F243L/R255L/D270E/P396L	S324I/I332D
F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L	S324I/I332E
F243L/R292P/Y300L/P396L	T260H/I332E
F243L/R292P/Y300L	T335D/I332E
F243L/R292P/P396L	V240I/V266I
F243L/R292P/V305I	V264I/I332E
F243L/R292P	D265F/N297E/I332E
S298A/E333A/K334A	D265Y/N297D/I332E
E380A/T307A	F243L/V262I/V264W
K326M/E333S	N297D/A330Y/I332E
K326A/E333A	N297D/T299E/I332E
S317A/K353A	N297D/T299F/I332E
A327D/I332E	N297D/T299H/I332E
A330L/I332E	N297D/T299I/I332E
A330Y/I332E	N297D/T299L/I332E
E258H/I332E	N297D/T299V/I332E
E272H/I332E	P230A/E233D/I332E
E272I/N276D	P244H/P245A/P247V
E272R/I332E	S239D/A330L/I332E
E283H/I332E	S239D/A330Y/I332E
E293R/I332E	S239D/H268E/A330Y
F241L/V262I	S239D/I332E/A327A
F241W/F243W	S239D/I332E/A330I

[0233]

[表5-2]

F243L/V264I	S239D/N297D/I332E
H268D/A330Y	S239D/S298A/I332E
H268E/A330Y	S239D/V264I/I332E
K246H/I332E	S239E/N297D/I332E
L234D/I332E	S239E/V264I/I332E
L234E/I332E	S239N/A330L/I332E
L234G/I332E	S239N/A330Y/I332E
L234I/I332E	S239N/S298A/I332E
L234I/L235D	S239Q/V264I/I332E
L234Y/I332E	V264E/N297D/I332E
L235D/I332E	V264I/A330L/I332E
L235E/I332E	V264I/A330Y/I332E
L235I/I332E	V264I/S298A/I332E
L235S/I332E	Y296D/N297D/I332E
L328A/I332D	Y296E/N297D/I332E
L328D/I332D	Y296H/N297D/I332E
L328D/I332E	Y296N/N297D/I332E
L328E/I332D	Y296Q/N297D/I332E
L328E/I332E	Y296T/N297D/I332E
L328F/I332D	D265Y/N297D/T299L/I332E
L328F/I332E	F241E/F243Q/V262T/V264E
L328H/I332E	F241E/F243R/V262E/V264R
L328I/I332D	F241E/F243Y/V262T/V264R
L328I/I332E	F241L/F243L/V262I/V264I
L328M/I332D	F241R/F243Q/V262T/V264R
L328M/I332E	F241S/F243H/V262T/V264T
L328N/I332D	F241W/F243W/V262A/V264A
L328N/I332E	F241Y/F243Y/V262T/V264T
L328Q/I332D	I332E/A330Y/H268E/A327A
L328Q/I332E	N297D/I332E/S239D/A330L
L328T/I332D	N297D/S298A/A330Y/I332E
L328T/I332E	S239D/A330Y/I332E/K326E
L328V/I332D	S239D/A330Y/I332E/K326T
L328V/I332E	S239D/A330Y/I332E/L234I
L328Y/I332D	S239D/A330Y/I332E/L235D

[0234]

[表5-3]

L328Y/I332E	S239D/A330Y/I332E/V240I
N297D/I332E	S239D/A330Y/I332E/V264T
N297E/I332E	S239D/A330Y/I332E/V266I
N297S/I332E	S239D/D265F/N297D/I332E
P227G/I332E	S239D/D265H/N297D/I332E
P230A/E233D	S239D/D265I/N297D/I332E
Q295E/I332E	S239D/D265L/N297D/I332E
R255Y/I332E	S239D/D265T/N297D/I332E
S239D/I332D	S239D/D265V/N297D/I332E
S239D/I332E	S239D/D265Y/N297D/I332E
S239D/I332N	S239D/I332E/A330Y/A327A
S239D/I332Q	S239D/I332E/H268E/A327A
S239E/D265G	S239D/I332E/H268E/A330Y
S239E/D265N	S239D/N297D/I332E/A330Y
S239E/D265Q	S239D/N297D/I332E/K326E
S239E/I332D	S239D/N297D/I332E/L235D
S239E/I332E	S239D/V264I/A330L/I332E
S239E/I332N	S239D/V264I/S298A/I332E
S239E/I332Q	S239E/V264I/A330Y/I332E
S239N/I332D	F241E/F243Q/V262T/V264E/I332E
S239N/I332E	F241E/F243R/V262E/V264R/I332E
S239N/I332N	F241E/F243Y/V262T/V264R/I332E
S239N/I332Q	F241R/F243Q/V262T/V264R/I332E
S239Q/I332D	S239D/I332E/H268E/A330Y/A327A
S239Q/I332E	S239E/V264I/S298A/A330Y/I332E
S239Q/I332N	F241Y/F243Y/V262T/V264T/N297D/I332E
S267E/L328F	G236D/S267E
S239D/S267E	

[0235] 本発明の抗原結合分子に含まれるFcγレセプター結合ドメインとFcγレセプターとの結合活性を測定するpHの条件はpH酸性域またはpH中性域の条件が適宜使用され得る。本発明の抗原結合分子に含まれるFcγレセプター結合ドメインとFcγレセプターとの結合活性を測定する条件としてのpH中性域とは、通常pH6.7～pH10.0を意味する。好ましくはpH7.0～pH8.0の任意のpH値によって示される範囲であり、好ましくはpH7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、および8.0から選択され、特に好ましくは生体内の血漿中

（血中）のpHに近いpH7.4である。本発明において、本発明の抗原結合分子に含まれるFcγレセプター結合ドメインとFcγレセプターとの結合活性を有する条件としてのpH酸性域とは、通常pH4.0～pH6.5を意味する。好ましくはpH5.5～pH6.5を意味し、特に好ましくは、生体内の早期エンドソーム内のpHに近いpH5.8～pH6.0を意味する。測定条件に使用される温度として、Fcγレセプター結合ドメインとヒトFcγレセプターとの結合アフィニティーは、10℃～50℃の任意の温度で評価され得る。好ましくは、ヒトFcγレセプター結合ドメインとFcγレセプターとの結合アフィニティーを決定するために、15℃～40℃の温度が使用される。より好ましくは、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、および35℃のいずれか1つのような20℃から35℃までの任意の温度も同様に、Fcγレセプター結合ドメインとFcγレセプターとの結合アフィニティーを決定するために使用される。25℃という温度は本発明の態様の非限定な一例である。

[0236] 本明細書において、Fcγレセプター結合ドメインのFcγレセプターに対する結合活性が天然型Fc領域のFcγレセプターに対する結合活性よりも高いとは、Fcγレセプター結合ドメインのFcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa及び／又はFcγRIIIbのいずれかのヒトFcγレセプターに対する結合活性が、これらのヒトFcγレセプターに対する天然型Fcγレセプター結合ドメインの結合活性よりも高いことをいう。例えば、上記の解析方法にもとづいて、対照とする天然型ヒトIgGのFc領域を含む抗原結合分子の結合活性に比較してFcγレセプター結合ドメインを含む抗原結合分子の結合活性が、105%以上、好ましくは110%以上、115%以上、120%以上、125%以上、特に好ましくは130%以上、135%以上、140%以上、145%以上、150%以上、155%以上、160%以上、165%以上、170%以上、175%以上、180%以上、185%以上、190%以上、195%以上、2倍以上、2.5倍以上、3倍以上、3.5倍以上、4倍以上、4.5倍以上、5倍以上、7.5倍以上、10倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、100倍以上の結合活性を示すことをいう。天然型Fcγレセプター結合ドメインとしては、出発Fcγレ

セプター結合ドメインも使用され得るし、同じサブクラスの天然型抗体のFcγレセプター結合ドメインも使用され得る。

[0237] 本発明では、特に対照とする天然型ヒトIgGのFc領域として、EUナンバリングで表される297位のアミノ酸に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgGのFc領域が好適に用いられる。EUナンバリングで表される297位のアミノ酸に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖であるか否かは、非特許文献２４に記載された手法が用いられ得る。例えば、下記のような方法によって、天然型ヒトIgGのFc領域に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖であるか否かを判定することが可能である。被験天然型ヒトIgGにN-Glycosidase F (Roche diagnostics) を反応させることによって、被験天然型ヒトIgGから糖鎖が遊離される (Weitzhandlerら (J. Pharma. Sciences (1994) 83, 12, 1670-1675)。次に、エタノールを反応させてタンパク質が除かれた反応液 (Schenkら (J. Clin. Investigation (2001) 108 (11) 1687-1695) の濃縮乾固物が、2-アミノピリジンによって蛍光標識される (Biggeら (Anal. Biochem. (1995) 230 (2) 229-238)。セルロースカートリッジを用いた固相抽出により脱試薬された、蛍光標識された2-AB化糖鎖が、順相クロマトグラフィによって解析される。検出されるクロマトグラムのピークを観察することによって、天然型ヒトIgGのFc領域に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖であるか否かを判定することが可能である。こうしたEUナンバリングで表される297位のアミノ酸に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgGのFc領域の非限定の例として、天然型ヒトIgGのFc領域を含む抗体をコードする遺伝子をCHO-K1 (American Type Culture Collection, ATCC No. CRL-61) 、DXB11 (American Type Culture Collection, ATCC No. CRL-11397) 等のCHO細胞で発現して得られた抗体に含まれるFc領域が挙げられる。これらの抗体に含まれるFc領域のFcγレセプターに対する結合活性を対照として、本発明のFc領域のFcγレセプターに対する結合活性を比較することによって、本発明のFcγレセプター結合ドメインのFcγレセプターに対する結合活性が、EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgGのFc領域のFcγレセプタ

ーに対する結合活性よりも高いか否かを確認することが可能である。また、これらの抗体に含まれるFc領域に結合した糖鎖のフコース含有量と本発明のFc領域に結合した糖鎖のフコース含有量を上記等の手法を用いて測定することによって、比較されるFc領域に含まれる糖鎖に結合したフコース含有量を比較することも可能である。

[0238] 対照とする同じサブクラスの天然型抗体のFc領域を含む抗原結合分子としては、IgGモノクローナル抗体のFc領域を有する抗原結合分子が適宜使用され得る。当該Fc領域の構造を、配列番号：１１（RefSeq登録番号AAC82527.1のN末にA付加）、１２（RefSeq登録番号AAB59393.1のN末にA付加）、１３（RefSeq登録番号CAA27268.1）、および１４（RefSeq登録番号AAB59394.1のN末にA付加）に記載する。また、ある特定のアイソタイプの抗体のFc領域を含む抗原結合分子を被検物質として使用する場合には、当該特定のアイソタイプのIgGモノクローナル抗体のFc領域を有する抗原結合分子を対照として用いることによって、被験Fc領域を含む抗原結合分子によるFcγレセプターに対する結合活性の効果が検証される。上記のようにして、Fcγレセプターに対する結合活性が高いことが検証されたFc領域を含む抗原結合分子が適宜選択される。

[0239] また、本発明において好適に用いられる、Fcγレセプター結合ドメインの例として、特定のFcγレセプターに対する結合活性がそのほかのFcγレセプターに対する結合活性よりも高い性質を有するFcγレセプター結合ドメイン（選択的なFcγレセプターに対する結合活性を有するFcγレセプター結合ドメイン）もまた好適に挙げられる。抗原結合分子として抗体が（Fcγレセプター結合ドメインとしてFc領域が）用いられる場合には、一分子の抗体は一分子のFcγレセプターとしか結合できないため、一分子の抗原結合分子は抑制型Fcγレセプターに結合した状態で他の活性型FcγRに結合することはできないし、活性型Fcγレセプターに結合した状態で他の活性型Fcγレセプターや抑制型Fcγレセプターに結合することはできない。

[0240] 前記したように、活性型Fcγレセプターとしては、FcγRIa、FcγRIbおよ

びFcγRIcを含むFcγRI（CD64）ならびにアイソフォームFcγRIIIa（アロタイプV158およびF158を含む）およびFcγRIIIb（アロタイプFcγRIIIb-NA1およびFcγRIIIb-NA2を含む）を含むFcγRIII（CD16）が好適に挙げられる。また、FcγRIIb（FcγRIIb-1およびFcγRIIb-2を含む）が抑制型Fcγレセプターの好適な例として挙げられる。

[0241] Fcγレセプターに対する選択的な結合活性を有するFcγR結合ドメイン

本発明のFcγR結合ドメインが選択的な結合活性を有するか否かは、前記のFcγレセプターに対する結合活性の項で記載された方法によって決定された各Fcγレセプターに対する結合活性を比較することによって確認される。本発明によって提供される抗原結合分子に含まれる選択的FcγR結合ドメインとして、活性型Fcγレセプターよりも抑制型Fcγレセプターに対する結合活性が高いFcγR結合ドメインが使用され得る。非限定な一態様では、本発明によって提供される抗原結合分子に含まれる選択的FcγR結合ドメインとして、FcγRIa、FcγRIbならびにFcγRIcを含むFcγRI（CD64）、（アロタイプV158およびF158を含む）アイソフォームFcγRIIIaならびに（アロタイプFcγRIIIb-NA1ならびにFcγRIIIb-NA2を含む）FcγRIIIbを含むFcγRIII（CD16）、および（アロタイプH131およびR131を含む）アイソフォームFcγRIIaおよびFcγRIIcを含むFcγRII（CD32）のいずれかから選択される活性型Fcγレセプターよりも（FcγRIIb-1およびFcγRIIb-2を含む）FcγRIIbに対する結合活性が高いFcγR結合ドメインが使用され得る。さらに本発明の非限定な一態様では、本発明によって提供される抗原結合分子に含まれる選択的FcγR結合ドメインとして、FcγRIa、FcγRIb、FcγRIc、アロタイプV158を含むFcγRIIIa、アロタイプF158を含むFcγRIIIa、アロタイプFcγRIIIb-NA1を含むFcγRIIIb、アロタイプFcγRIIIb-NA2を含むFcγRIIIb、アロタイプH131を含むFcγRIIa、アロタイプR131を含むFcγRIIa、および/またはFcγRIIcよりも、FcγRIIb-1および/またはFcγRIIb-2に対する結合活性が高いFcγR結合ドメインが使用され得る。被験対象のFcγR結合ドメインが、Fcγレセプターに対する選択的な結合活性を有するFcγR結合ドメインかどうかは、たとえば、前記のFcγ

レセプターに対する結合活性の項で記載された方法によって決定されたFcγR結合ドメインの、FcγRIa、FcγRIb、FcγRIc、アロタイプV158を含むFcγRIIIa、アロタイプF158を含むFcγRIIIa、アロタイプFcγRIIIb-NA1を含むFcγRIIIb、アロタイプFcγRIIIb-NA2を含むFcγRIIIb、アロタイプH131を含むFcγRIIa、アロタイプR131を含むFcγRIIa、および/またはFcγRIIcに対するKD値を、FcγRIIb-1および/またはFcγRIIb-2に対するKD値で除した値（比）、すなわち式１で表されるFcγR選択性指数を比較することによって判断することが可能である。

[0242] 〔式１〕

FcγR選択性指数＝活性型FcγRに対するKD値/抑制型FcγRに対するKD値

[0243] 上記式１において活性型FcγRとは、FcγRIa、FcγRIb、FcγRIc、アロタイプV158を含むFcγRIIIa、アロタイプF158を含むFcγRIIIa、アロタイプFcγRIIIb-NA1を含むFcγRIIIb、アロタイプFcγRIIIb-NA2を含むFcγRIIIb、アロタイプH131を含むFcγRIIa、アロタイプR131を含むFcγRIIa、および/またはFcγRIIcをいい、抑制型FcγRとはFcγRIIb-1および/またはFcγRIIb-2をいい、KD値の測定に用いられる活性型FcγRおよび抑制型FcγRはいずれの組合せから選択され得るが、非限定な一態様としてアロタイプH131を含むFcγRIIaに対するKD値を、FcγRIIb-1および/またはFcγRIIb-2に対するKD値で除した値（比）が使用され得る。

[0244] FcγR選択性指数としては、例えば、1.2以上、1.3以上、1.4以上、1.5以上、1.6以上、1.7以上、1.8以上、1.9以上、2以上、3以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、15以上、20以上、25以上、30以上、35以上、40以上、45以上、50以上、55以上、60以上、65以上、70以上、75以上、80以上、85以上、90以上、95以上、100以上、110以上、120以上、130以上、140以上、150以上、160以上、170以上、180以上、190以上、200以上、210以上、220以上、230以上、240以上、250以上、260以上、270以上、280以上、290以上、300以上、310以上、320以上、330以上、340以上、350以上、360以上、370以上、380以上、390以上、400以上、410以上、420以上、430以上、440以上、45

0以上、460以上、470以上、480以上、490以上、500以上、520以上、540以上、560以上、580以上、600以上、620以上、640以上、660以上、680以上、700以上、720以上、740以上、760以上、780以上、800以上、820以上、840以上、860以上、880以上、900以上、920以上、940以上、960以上、980以上、1000以上、1500以上、2000以上、2500以上、3000以上、3500以上、4000以上、4500以上、5000以上、5500以上、6000以上、6500以上、7000以上、7500以上、8000以上、8500以上、9000以上、9500以上、10000以上、100000以上が挙げられる。

[0245] 本発明の抗原結合分子に含まれる選択的FcγR結合ドメインの非限定な一態様として、ヒトIgG1（配列番号：１４）、IgG2（配列番号：１５）、IgG3（配列番号：１６）、またはIgG4（配列番号：１７）で表される定常領域の一部を構成するFc領域（IgGクラスのFc領域は、EU ナンバリングで、例えば226番目のシステインからC末端、あるいは230番目のプロリンからC末端までを意味するが、これに限定されない。）に含まれるFcγR結合ドメインが改変されたFc領域が例示される。当該改変Fc領域の作製方法として、前記のアミノ酸の改変の項で記載された方法が例示される。そのような改変Fc領域の例として、ヒトIgG（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）のEUナンバリングで表される238位のアミノ酸がAspであるFc領域、またはEUナンバリングで表される328位のアミノ酸がGluであるFc領域が例示される。ヒトIgG（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）のEUナンバリングで表される238位のアミノ酸がAspであるFc領域、またはEUナンバリングで表される328位のアミノ酸がGluであるFc領域および当該Fc領域を含む抗原結合分子は、FcγRIa、FcγRIb、FcγRIc、アロタイプV158を含むFcγRIIIa、アロタイプF158を含むFcγRIIIa、アロタイプFcγRIIIb-NA1を含むFcγRIIIb、アロタイプFcγRIIIb-NA2を含むFcγRIIIb、アロタイプH131を含むFcγRIIa、アロタイプR131を含むFcγRIIa、および/またはFcγRIIcよりも、FcγRIIb-1および/またはFcγRIIb-2に対する結合活性が高い。

[0246] 本発明の抗原結合分子に含まれる選択的FcγR結合ドメインを含む定常領域および当該定常領域を含む抗原結合分子は、ヒトIgG1（配列番号：１４）、I

gG2（配列番号：１５）、IgG3（配列番号：１６）、またはIgG4（配列番号：１７）の一部を構成するFc領域（IgGクラスのFc領域は、EU ナンバリングで、例えば226番目のシステインからC末端、あるいは230番目のプロリンからC末端までを意味するが、これに限定されない。）（以下、野生型Fc領域と総称される）および当該野生型Fc領域を含む抗原結合分子と比較して、活性型FcγR（FcγRIa、FcγRIb、FcγRIc、アロタイプV158を含むFcγRIIIa、アロタイプF158を含むFcγRIIIa、アロタイプFcγRIIIb-NA1を含むFcγRIIIb、アロタイプFcγRIIIb-NA2を含むFcγRIIIb、アロタイプH131を含むFcγRIIa、アロタイプR131を含むFcγRIIa、および/またはFcγRIIc）に対しても結合活性が維持あるいは減少しているFc領域および当該Fc領域を含む抗原結合分子でもあり得る。

[0247] 野生型Fc領域および野生型Fc領域を含む抗原結合分子と比較して、本発明の抗原結合分子に含まれる選択的FcγR結合ドメインを含むFc領域および当該Fc領域を含む抗原結合分子が前記活性型FcγRに対する結合活性が減少している程度としては、例えば、99%以下、98%以下、97%以下、96%以下、95%以下、94%以下、93%以下、92%以下、91%以下、90%以下、88%以下、86%以下、84%以下、82%以下、80%以下、78%以下、76%以下、74%以下、72%以下、70%以下、68%以下、66%以下、64%以下、62%以下、60%以下、58%以下、56%以下、54%以下、52%以下、50%以下、45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、5%以下、4%以下、3%以下、2%以下、1%以下、0.5%以下、0.4%以下、0.3%以下、0.2%以下、0.1%以下、0.05%以下、0.01%以下、0.005%以下が挙げられる。

[0248] 本発明の抗原結合分子に含まれる選択的FcγR結合ドメインを含むFc領域および当該Fc領域を含む定常領域、および当該定常領域を含む抗原結合分子は、ヒトIgG1（配列番号：１４）、IgG2（配列番号：１５）、IgG3（配列番号：１６）、またはIgG4（配列番号：１７）で表される定常領域の一部を構成するFc領域（IgGクラスのFc領域は、EU ナンバリングで、例えば226番目のシ

ステインからC末端、あるいは230番目のプロリンからC末端までを意味するが、これに限定されない。）（以下、野生型Fc領域と総称される）および当該野生型Fc領域を含む抗原結合分子と比較して、抑制型FcγR（FcγRIIb-1および/またはFcγRIIb-2）に対しても結合活性が増強しているFc領域および当該Fc領域を含む抗原結合分子でもあり得る。

[0249] 野生型Fc領域および野生型Fc領域を含む抗原結合分子と比較して、本発明の抗原結合分子に含まれる選択的FcγR結合ドメインを含むFc領域および当該Fc領域を含む抗原結合分子が前記抑制型FcγRに対する結合活性が増強している程度としては、例えば、101%以上、102%以上、103%以上、104%以上、105%以上、106%以上、107%以上、108%以上、109%以上、110%以上、112%以上、114%以上、116%以上、118%以上、120%以上、122%以上、124%以上、126%以上、128%以上、130%以上、132%以上、134%以上、136%以上、138%以上、140%以上、142%以上、144%以上、146%以上、148%以上、150%以上、155%以上、160%以上、165%以上、170%以上、175%以上、180%以上、185%以上、190%以上、195%以上、2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、100倍以上、200倍以上、300倍以上、400倍以上、500倍以上、600倍以上、700倍以上、800倍以上、900倍以上、1000倍以上、10000倍以上、100000倍以上が挙げられる。

[0250] また、本発明の抗原結合分子に含まれる選択的FcγR結合ドメインを含むFc領域および当該Fc領域を含む抗原結合分子は、ヒトIgG1（配列番号：１４）、IgG2（配列番号：１５）、IgG3（配列番号：１６）、またはIgG4（配列番号：１７）で表される定常領域の一部を構成するFc領域（IgGクラスのFc領域は、EU ナンバリングで、例えば226番目のシステインからC末端、あるいは230番目のプロリンからC末端までを意味するが、これに限定されない。）（以下、野生型Fc領域と総称される）および当該野生型Fc領域を含む抗原結合分子と比較して、活性型FcγR（FcγRIa、FcγRIb、FcγRIc、アロタイプV158

を含むFcγRIIIa、アロタイプF158を含むFcγRIIIa、アロタイプFcγRIIIb-NA1を含むFcγRIIIb、アロタイプFcγRIIIb-NA2を含むFcγRIIIb、アロタイプH131を含むFcγRIIa、アロタイプR131を含むFcγRIIa、および/またはFcγRIIc）に対して結合活性が維持あるいは減少し、ヒトIgG1（配列番号：１４）、IgG2（配列番号：１５）、IgG3（配列番号：１６）、またはIgG4（配列番号：１７）で表される定常領域の一部を構成するFc領域（IgGクラスのFc領域は、EU ナンバリングで、例えば226番目のシステインからC末端、あるいは230番目のプロリンからC末端までを意味するが、これに限定されない。）（以下、野生型Fc領域と総称される）および当該野生型Fc領域を含む抗原結合分子と比較して、抑制型FcγR（FcγRIIb-1および/またはFcγRIIb-2）に対して結合活性が増強しているFc領域および当該Fc領域を含む抗原結合分子でもあり得る。

[0251] また、本発明の抗原結合分子に含まれる選択的FcγR結合ドメインを含むFc領域および当該Fc領域を含む抗原結合分子は、ヒトIgG1（配列番号：１４）、IgG2（配列番号：１５）、IgG3（配列番号：１６）、またはIgG4（配列番号：１７）で表される定常領域の一部を構成するFc領域（IgGクラスのFc領域は、EU ナンバリングで、例えば226番目のシステインからC末端、あるいは230番目のプロリンからC末端までを意味するが、これに限定されない。）（以下、野生型Fc領域と総称される）および当該野生型Fc領域を含む抗原結合分子と比較して、抑制型FcγレセプターIIb（FcγRIIb-1および/またはFcγRIIb-2）に対する結合活性の増強の程度が、活性型FcγレセプターIIa（FcγRIa、FcγRIb、FcγRIc、アロタイプV158を含むFcγRIIIa、アロタイプF158を含むFcγRIIIa、アロタイプFcγRIIIb-NA1を含むFcγRIIIb、アロタイプFcγRIIIb-NA2を含むFcγRIIIb、アロタイプH131を含むFcγRIIa、アロタイプR131を含むFcγRIIa）に対する結合活性の増強の程度よりも高いFc領域および当該Fc領域を含む抗原結合分子でもあり得る。

[0252] 本発明は、EUナンバリングで表される238位のアミノ酸がAspであるFc領域またはEUナンバリングで表される328位のアミノ酸がGluであるFc領域に対し

て、前記アミノ酸の改変の項で説明された態様等により、さらに別の少なくとも一つのFc領域に対する改変を加えることが可能である。また、これらの改変に加え、更に付加的な改変を含むことができる。付加的な改変は、たとえば、アミノ酸の置換、欠損、あるいは修飾のいずれか、あるいはそれらの組み合わせから選択することができる。例えば、FcγRIIbに対する結合活性を増強し、かつFcγRIIa（H型）およびFcγRIIa（R型）に対する結合活性を維持あるいは低減する改変を加えることが可能である。そのような改変を加えることにより、FcγRIIaよりもFcγRIIbに対する結合選択性が向上する。

[0253] これらの中でも、FcγRIIa（R型）よりもFcγRIIbに対する結合選択性が向上する改変が好ましく、さらにFcγRIIa（H型）よりもFcγRIIbに対する結合選択性が向上する改変が好ましい。このような改変として好ましいアミノ酸置換は、例えばEUナンバリング237位で表されるGlyをTrpに置換した改変、EUナンバリング237位で表されるGlyをPheに置換した改変、EUナンバリング238位で表されるProをPheに置換した改変、EUナンバリング325位で表されるAsnをMetに置換した改変、EUナンバリング267位で表されるSerをIleに置換した改変、EUナンバリング328位で表されるLeuをAspに置換した改変、EUナンバリング267位で表されるSerをValに置換した改変、EUナンバリング328位で表されるLeuをTrpに置換した改変、EUナンバリング267位で表されるSerをGlnに置換した改変、EUナンバリング267位で表されるSerをMetに置換した改変、EUナンバリング236位で表されるGlyをAspに置換した改変、EUナンバリング327位で表されるAlaをAsnに置換した改変、EUナンバリング325位で表されるAsnをSerに置換した改変、EUナンバリング235位で表されるLeuをTyrに置換した改変、EUナンバリング266位で表されるValをMetに置換した改変、EUナンバリング328位で表されるLeuをTyrに置換した改変、EUナンバリング235位で表されるLeuをTrpに置換した改変、EUナンバリング235位で表されるLeuをPheに置換した改変、EUナンバリング239位で表されるSerをGlyに置換した改変、EUナンバリング327位で表されるAlaをGluに置換した改変、EUナンバリング327位で表されるAlaをGlyに置換した改変、EUナンバリング238位で表されるProをLeuに

置換した改変、EUナンバリング239位で表されるSerをLeuに置換した改変、EUナンバリング328位で表されるLeuをThrに置換した改変、EUナンバリング328位で表されるLeuをSerに置換した改変、EUナンバリング328位で表されるLeuをMetに置換した改変、EUナンバリング331位で表されるProをTrpに置換した改変、EUナンバリング331位で表されるProをTyrに置換した改変、EUナンバリング331位で表されるProをPheに置換した改変、EUナンバリング327位で表されるAlaをAspに置換した改変、EUナンバリング328位で表されるLeuをPheに置換した改変、EUナンバリング271位で表されるProをLeuに置換した改変、EUナンバリング267位で表されるSerをGluに置換した改変、EUナンバリング328位で表されるLeuをAlaに置換した改変、EUナンバリング328位で表されるLeuをIleに置換した改変、EUナンバリング328位で表されるLeuをGlnに置換した改変、EUナンバリング328位で表されるLeuをValに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをTrpに置換した改変、EUナンバリング334位で表されるLysをArgに置換した改変、EUナンバリング268位で表されるHisをGlyに置換した改変、EUナンバリング268位で表されるHisをAsnに置換した改変、EUナンバリング324位で表されるSerをValに置換した改変、EUナンバリング266位で表されるValをLeuに置換した改変、EUナンバリング271位で表されるProをGlyに置換した改変、EUナンバリング332位で表されるIleをPheに置換した改変、EUナンバリング324位で表されるSerをIleに置換した改変、EUナンバリング333位で表されるGluをProに置換した改変、EUナンバリング300位で表されるTyrをAspに置換した改変、EUナンバリング337位で表されるSerをAspに置換した改変、EUナンバリング300位で表されるTyrをGlnに置換した改変、EUナンバリング335位で表されるThrをAspに置換した改変、EUナンバリング239位で表されるSerをAsnに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをLeuに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをIleに置換した改変、EUナンバリング239位で表されるSerをGluに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをPheに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをValに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをTyrに置換した改変

、EUナンバリング267位で表されるSerをAspに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをProに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをHisに置換した改変、EUナンバリング334位で表されるLysをAlaに置換した改変、EUナンバリング334位で表されるLysをTrpに置換した改変、EUナンバリング268位で表されるHisをGlnに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをGlnに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをGluに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをMetに置換した改変、EUナンバリング266位で表されるValをIleに置換した改変、EUナンバリング334位で表されるLysをGluに置換した改変、EUナンバリング300位で表されるTyrをGluに置換した改変、EUナンバリング334位で表されるLysをMetに置換した改変、EUナンバリング334位で表されるLysをValに置換した改変、EUナンバリング334位で表されるLysをThrに置換した改変、EUナンバリング334位で表されるLysをSerに置換した改変、EUナンバリング334位で表されるLysをHisに置換した改変、EUナンバリング334位で表されるLysをPheに置換した改変、EUナンバリング334位で表されるLysをGlnに置換した改変、EUナンバリング334位で表されるLysをProに置換した改変、EUナンバリング334位で表されるLysをTyrに置換した改変、EUナンバリング334位で表されるLysをIleに置換した改変、EUナンバリング295位で表されるGlnをLeuに置換した改変、EUナンバリング334位で表されるLysをLeuに置換した改変、EUナンバリング334位で表されるLysをAsnに置換した改変、EUナンバリング268位で表されるHisをAlaに置換した改変、EUナンバリング239位で表されるSerをAspに置換した改変、EUナンバリング267位で表されるSerをAlaに置換した改変、EUナンバリング234位で表されるLeuをTrpに置換した改変、EUナンバリング234位で表されるLeuをTyrに置換した改変、EUナンバリング237位で表されるGlyをAlaに置換した改変、EUナンバリング237位で表されるGlyをAspに置換した改変、EUナンバリング237位で表されるGlyをGluに置換した改変、EUナンバリング237位で表されるGlyをLeuに置換した改変、EUナンバリング237位で表されるGlyをMetに置換した改変、EUナンバリング237位で表されるGlyをTyrに置換した改変、EUナンバリ

ング330位で表されるAlaをLysに置換した改変、EUナンバリング330位で表されるAlaをArgに置換した改変、EUナンバリング233位で表されるGluをAspに置換した改変、EUナンバリング268位で表されるHisをAspに置換した改変、EUナンバリング268位で表されるHisをGluに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをAspに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをSerに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをThrに置換した改変、EUナンバリング323位で表されるValをIleに置換した改変、EUナンバリング323位で表されるValをLeuに置換した改変、EUナンバリング323位で表されるValをMetに置換した改変、EUナンバリング296位で表されるTyrをAspに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをAlaに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをAsnに置換した改変、EUナンバリング330位で表されるAlaをMetに置換した改変、が挙げられる。

[0254] 更に、これらの改変の中でも好ましいアミノ酸置換は、例えばEUナンバリング237位で表されるGlyをTrpに置換した改変、EUナンバリング237位で表されるGlyをPheに置換した改変、EUナンバリング267位で表されるSerをValに置換した改変、EUナンバリング267位で表されるSerをGlnに置換した改変、EUナンバリング268位で表されるHisをAsnに置換した改変、EUナンバリング271位で表されるProをGlyに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをLeuに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをGlnに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをGluに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをMetに置換した改変、EUナンバリング239位で表されるSerをAspに置換した改変、EUナンバリング267位で表されるSerをAlaに置換した改変、EUナンバリング234位で表されるLeuをTrpに置換した改変、EUナンバリング234位で表されるLeuをTyrに置換した改変、EUナンバリング237位で表されるGlyをAlaに置換した改変、EUナンバリング237位で表されるGlyをAspに置換した改変、EUナンバリング237位で表されるGlyをGluに置換した改変、EUナンバリング237位で表されるGlyをLeuに置換した改変、EUナンバリング237位で表されるGlyをMetに置換した改変、EUナンバリング237位で表されるGly

をTyrに置換した改変、EUナンバリング330位で表されるAlaをLysに置換した改変、EUナンバリング330位で表されるAlaをArgに置換した改変、EUナンバリング233位で表されるGluをAspに置換した改変、EUナンバリング268位で表されるHisをAspに置換した改変、EUナンバリング268位で表されるHisをGluに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをAspに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをSerに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをThrに置換した改変、EUナンバリング323位で表されるValをIleに置換した改変、EUナンバリング323位で表されるValをLeuに置換した改変、EUナンバリング323位で表されるValをMetに置換した改変、EUナンバリング296位で表されるTyrをAspに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをAlaに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをAsnに置換した改変、EUナンバリング330位で表されるAlaをMetに置換した改変、が挙げられる。

[0255] 上記の改変は一箇所であってもよいし、二箇所以上の組み合わせであってもよい。そのような改変で好ましい例としては、表１４～１５、表１７～２４、表２６～２８に記載の改変が挙げられる。

[0256] 本発明の抗原結合分子に含まれる選択的FcγR結合ドメインの別の非限定な一態様として、ヒトIgG1（配列番号：１４）、IgG2（配列番号：１５）、IgG3（配列番号：１６）、またはIgG4（配列番号：１７）で表されるFc領域に含まれるFcγR結合ドメインが改変されたFc領域が例示される。当該改変Fc領域の作製方法として、前記のアミノ酸改変の項で記載された方法が例示される。そのような改変Fc領域の例として、ヒトIgG（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）のEUナンバリングで表される238位のアミノ酸がAsp、およびEUナンバリングで表される271位のアミノ酸がGlyであるFc領域が例示される。ヒトIgG（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）のEUナンバリングで表される238位のアミノ酸がAsp、およびEUナンバリングで表される271位のアミノ酸がGlyであるFc領域および当該Fc領域を含む抗原結合分子は、FcγRIa、FcγRIb、FcγRIc、アロタイプV158を含むFcγRIIIa、アロタイプF158を含むFcγRIIIa、アロタイプFcγRIIIb

-NA1を含むFcγRIIIb、アロタイプFcγRIIIb-NA2を含むFcγRIIIb、アロタイプH131を含むFcγRIIa、アロタイプR131を含むFcγRIIa、および/またはFcγRIIcよりも、FcγRIIb-1および/またはFcγRIIb-2に対する結合活性が高い。

[0257] 本発明は、EUナンバリングで表される238位のアミノ酸がAspおよびEUナンバリングで表される271位のアミノ酸がGlyであるFc領域に対して、前記アミノ酸の改変の項で説明された態様等により、さらに別の少なくとも一つのFc領域に対する改変を加えることが可能である。また、これらの改変に加え、更に付加的な改変を含むことができる。付加的な改変は、たとえば、アミノ酸の置換、欠損、あるいは修飾のいずれか、あるいはそれらの組み合わせから選択することができる。例えば、活性型Fcγレセプター（FcγRIa、FcγRIb、FcγRIc、アロタイプV158を含むFcγRIIIa、アロタイプF158を含むFcγRIIIa、アロタイプFcγRIIIb-NA1を含むFcγRIIIb、アロタイプFcγRIIIb-NA2を含むFcγRIIIb、アロタイプH131を含むFcγRIIa、アロタイプR131を含むFcγRIIa）に対する結合活性を維持あるいは低減する改変を加えることが可能である。抑制型Fcγレセプター（FcγRIIb-1および/またはFcγRIIb-2）に対する結合活性を増強し、かつFcγRIIa（H型）およびFcγRIIa（R型）に対する結合活性を維持あるいは低減する改変を加えることが可能である。また、抑制型Fcγレセプター（FcγRIIb-1および/またはFcγRIIb-2）に対する結合活性の増強の程度が、活性型Fcγレセプター（FcγRIa、FcγRIb、FcγRIc、アロタイプV158を含むFcγRIIIa、アロタイプF158を含むFcγRIIIa、アロタイプFcγRIIIb-NA1を含むFcγRIIIb、アロタイプFcγRIIIb-NA2を含むFcγRIIIb、アロタイプH131を含むFcγRIIa、アロタイプR131を含むFcγRIIa）に対する結合活性の増強の程度よりも高い改変も加えることが可能である。そのような改変を加えることにより、FcγRIIaよりもFcγRIIbに対する結合選択性が向上する。

[0258] 選択的FcγR結合ドメインを含む改変Fc領域の例として、ヒトIgG（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）のEUナンバリングで表される238位のアミノ酸がAspおよびEUナンバリングで表される271位のアミノ酸がGlyであるFc領域の、EUナンバ

リングで表される233位、234位、237位、264位、265位、266位、267位、268位、269位、272位、296位、326位、327位、330位、331位、332位、333位、396位のいずれかひとつ以上が置換された改変Fc領域が非限定な一態様として例示される。

[0259] また選択的FcγR結合ドメインを含む改変Fc領域の非限定な一態様として、ヒトIgG（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）の238位のアミノ酸がAspおよびEUナンバリングで表される271位のアミノ酸がGlyであるFc領域の、EUナンバリングで表される、

233位のアミノ酸がAsp、

234位のアミノ酸がTyr、

237位のアミノ酸がAsp、

264位のアミノ酸がIle、

265位のアミノ酸がGlu、

266位のアミノ酸がPhe、Met、またはLeuのいずれか、

267位のアミノ酸がAla、Glu、Gly、またはGlnのいずれか、

268位のアミノ酸がAsp、またはGluのいずれか、

269位のアミノ酸がAsp、

272位のアミノ酸が、Asp、Phe、Ile、Met、Asn、またはGlnのいずれか、

296位のアミノ酸がAsp、

326位のアミノ酸がAla、またはAspのいずれか、

327位のアミノ酸がGly、

330位のアミノ酸がLys、またはArgのいずれか、

331位のアミノ酸がSer、

332位のアミノ酸がThr、

333位のアミノ酸がThr、Lys、またはArgのいずれか、

396位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Ile、Lys、Leu、Met、Gln、Arg、またはTyrのいずれか、

のいずれかひとつ以上である改変Fc領域が例示される。

[0260] 前記の、さらに別の少なくとも一つのFc領域に対する改変、更に付加的な改変を含むFc領域の非限定な一態様として、表６－１～表６－７に記載されたFc領域が例示され得る。

[0261] [表6-1]

改変 Fc 領域	改変アミノ酸（EU ナンバリング）
BP208	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/A330R
BP209	G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330R
BP210	G237D/P238D/H268D/P271G/A330R
BP211	E233D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330R
BP212	E233D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R
BP213	E233D/P238D/H268D/P271G/A330R
BP214	E233D/L234Y/G237D/P238D/Y296D/K326D/A330K
BP215	G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K
BP216	G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/A330K
BP217	G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/A330K
BP218	G237D/P238D/H268D/P271G/K326D/A330K
BP219	L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/A330K
BP220	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K
BP221	L234Y/G237D/P238D/Y296D/K326A/A330R
BP222	L234Y/G237D/P238D/P271G/K326A/A330R
BP223	L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330R
BP224	L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/K326A/A330R
BP225	L234Y/G237D/P238D/K326D/A330R
BP226	L234Y/G237D/P238D/P271G/K326D/A330R
BP227	L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/K326D/A330R
BP228	L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/K326D/A330R
BP229	E233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/K326A/A330R
BP230	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R
BP231	G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R
BP232	L234Y/G237D/P238D/P271G/K326A/A330K
BP233	L234Y/G237D/P238D/P271G/A330K
BP234	E233D/L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330K
BP235	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330R
BP236	E233D/L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330R
BP237	E233D/L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330K

[0262] （表６－２は表６－１の続きの表である。）

[表6-2]

改変 Fc 領域	改変アミノ酸（EU ナンバリング）
BP238	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330R
BP239	E233D/L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330R
BP240	E233D/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/A330R
BP241	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/K326D/A330R
BP242	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330R
BP243	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/A330R
BP244	E233D/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/A330R
BP245	E233D/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330R
BP246	E233D/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330R
BP247	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330R
BP248	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330R
BP249	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R
BP262	G237D/P238D/H268E/P271G
BP264	E233D/G237D/P238D/H268E/P271G/Y296D/A330R
BP265	G237D/P238D/H268E/P271G/Y296D/A330R
BP266	E233D/G237D/P238D/H268E/P271G/A330R
BP267	E233D/G237D/P238D/H268E/P271G
BP268	E233D/G237D/P238D/H268E/P271G/Y296D
BP269	G237D/P238D/H268E/P271G/Y296D
BP300	E233D/G237D/P238D/V264I/H268E/P271G
BP313	E233D/G237D/P238D/D265E/H268E/P271G
BP333	E233D/G237D/P238D/V266F/H268E/P271G
BP338	E233D/G237D/P238D/V266L/H268E/P271G
BP339	E233D/G237D/P238D/V266M/H268E/P271G
BP348	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G
BP350	E233D/G237D/P238D/S267E/H268E/P271G
BP352	E233D/G237D/P238D/S267G/H268E/P271G
BP367	E233D/G237D/P238D/H268E/E269D/P271G
BP384	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/K334R
BP390	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/I332S
BP391	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/I332T

[0263] （表６－３は表６－２の続きの表である。）

[表6-3]

改変 Fc 領域	改変アミノ酸（EU ナンバリング）
BP392	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/I332K
BP393	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/I332R
BP423	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R
BP425	E233D/G237D/P238D/V266L/S267A/H268E/P271G/A330R
BP426	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/E269D/P271G/A330R
BP427	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/E269Y/P271G/A330R
BP428	E233D/G237D/P238D/S267G/H268E/P271G/A330R
BP429	E233D/G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/A330R
BP430	E233D/G237D/P238D/V266L/S267G/H268E/P271G/A330R
BP431	E233D/G237D/P238D/S267G/H268E/E269D/P271G/A330R
BP432	E233D/G237D/P238D/S267G/H268E/E269Y/P271G/A330R
BP433	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K/I332T
BP434	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330R/I332T
BP435	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330R/I332T
BP436	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/I332T
BP437	G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/I332T
BP438	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/I332T
BP439	E233D/G237D/P238D/V264I/V266L/S267A/H268E/P271G/A330R
BP440	E233D/G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/A330R
BP441	E233D/G237D/P238D/V266L/H268E/P271G/A330R
BP442	E233D/G237D/P238D/H268E/E269D/P271G/A330R
BP443	E233D/G237D/P238D/V266L/H268E/E269D/P271G/A330R
BP444	E233D/G237D/P238D/H268E/E269N/P271G/A330R
BP445	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R
BP446	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/E269N/P271G/A330R
BP447	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396A
BP448	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396D
BP449	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396E
BP450	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396F
BP451	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396G
BP452	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396H

[0264] （表６－４は表６－３の続きの表である。）

[表6-4]

改変 Fc 領域	改変アミノ酸（EU ナンバリング）
BP453	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396I
BP454	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396K
BP455	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396L
BP456	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396M
BP457	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396N
BP458	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396Q
BP459	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396R
BP460	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396S
BP461	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396T
BP462	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396V
BP463	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396W
BP464	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396Y
BP465	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/E333K
BP466	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/E333R
BP467	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/E334S
BP468	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/E334T
BP469	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/E333S
BP470	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/E333T
BP471	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/P331S
BP472	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330S
BP473	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A327G/A330R
BP474	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/P331S
BP475	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A327G/A330S
BP476	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A327G/A330S/P331S
BP477	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A327G/A330R/P331S
BP478	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R ＋ S131C/K133R/G137E/G138S/Q196K/I199T/N203D/K214R/P217S ＋ 219-221 欠失＋K222Y/T223G/H224P/T225P
BP479	E233D/G237D/P238D/V264I/V266L/S267A/H268E/P271G
BP480	E233D/G237D/P238D/V266L/H268E/E269D/P271G
BP481	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G

[0265] （表６－５は表６－４の続きの表である。）

[表6-5]

改変 Fc 領域	改変アミノ酸（EU ナンバリング）
BP482	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/E269N/P271G
BP483	E233D/G237D/P238D/V266L/S267A/H268E/P271G
BP484	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/E269D/P271G
BP485	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/E269Y/P271G
BP487	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R/P396M
BP488	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R
BP489	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396M
BP490	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R
BP491	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R
BP492	P238D/V264I/S267A/H268E/P271G
BP493	P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D
BP494	G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R
BP495	G237D/P238D/S267G/H268E/P271G/Y296D/A330R
BP496	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D
BP497	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A327G/A330R
BP498	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R/P396L
BP499	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396L
BP500	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D
BP501	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G
BP502	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A327G/A330R
BP503	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A327G/A330R/P396M
BP504	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P
BP505	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D
BP506	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P/Y296D/A330R
BP507	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P/A330R
BP508	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P/Y296D
BP509	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/Y296D
BP510	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P/A330R
BP511	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P/Y296D/A330R
BP513	E233D/G237D/P238D/H268E/E272D/P271G

[0266] （表６－６は表６－５の続きの表である。）

[表6-6]

改変 Fc 領域	改変アミノ酸（EU ナンバリング）
BP514	E233D/G237D/P238D/H268E/E272F/P271G
BP517	E233D/G237D/P238D/H268E/E272I/P271G
BP521	E233D/G237D/P238D/H268E/E272N/P271G
BP521	E233D/G237D/P238D/H268E/E272Q/P271G
BP531	E233D/G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396M
BP532	E233D/G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396M
BP533	E233D/G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396L
BP534	E233D/G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396L
BP535	E233D/G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/Y296D/A327G/A330R/P396M
BP536	E233D/G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/Y296D/A327G/A330R/P396M
BP537	G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/A330R
BP538	G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/A330R
BP539	G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/E272P/Y296D/A330R
BP540	G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/E272P/Y296D/A330R
BP541	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/K274Q/Y296D/A330R
BP542	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296F/A330R
BP543	E233D/G237D/P238D/H268Q/P271G/Y296D/A330R
BP544	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/R355Q
BP545	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/D356E
BP546	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/L358M
BP547	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/K409R
BP548	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/Q419E
BP549	G237D/P238D/S267G/H268E/P271G/A330R
BP550	G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R
BP551	G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R
BP552	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R
BP553	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/A330R
BP554	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/A330R
BP555	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R
BP556	G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/Y296D/A330R
改変 Fc 領域	改変アミノ酸（EU ナンバリング）
BP514	E233D/G237D/P238D/H268E/E272F/P271G
BP517	E233D/G237D/P238D/H268E/E272I/P271G
BP521	E233D/G237D/P238D/H268E/E272N/P271G
BP521	E233D/G237D/P238D/H268E/E272Q/P271G
BP531	E233D/G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396M
BP532	E233D/G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396M
BP533	E233D/G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396L
BP534	E233D/G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396L
BP535	E233D/G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/Y296D/A327G/A330R/P396M
BP536	E233D/G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/Y296D/A327G/A330R/P396M
BP537	G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/A330R
BP538	G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/A330R
BP539	G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/E272P/Y296D/A330R
BP540	G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/E272P/Y296D/A330R
BP541	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/K274Q/Y296D/A330R
BP542	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296F/A330R
BP543	E233D/G237D/P238D/H268Q/P271G/Y296D/A330R
BP544	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/R355Q
BP545	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/D356E
BP546	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/L358M
BP547	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/K409R
BP548	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/Q419E
BP549	G237D/P238D/S267G/H268E/P271G/A330R
BP550	G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R
BP551	G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R
BP552	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R
BP553	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/A330R
BP554	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/A330R
BP555	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R
BP556	G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/Y296D/A330R

[0267] （表６－７は表６－６の続きの表である。）

[表6-7]

改変 Fc 領域	改変アミノ酸（EU ナンバリング）
BP558	G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/E272D/A330R
BP559	P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/Y296D
BP560	P238D/S267G/H268E/P271G/Y296D/A330R
BP561	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/E272D/Y296D/A330R
BP562	G237D/P238D/H268D/P271G/E272D/Y296D/A330R
BP563	E233D/G237D/P238D/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R
BP564	G237D/P238D/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R
BP565	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R

[0268] マウスにおいて、FcγRI、FcγRIIb、FcγRIII、FcγRIVの、4種類のFcγRがこれまでに見出されている。ヒトにおいてもそれらに対応するFcγRとして、FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa、FcγRIIIa、FcγRIIIbが見出されている。これらのFcγRの中で唯一抑制型と考えられているFcγRIIbはヒト、マウスのいずれにおいても保存されている。他のFcγRはFcγRIIIbを除いてImmunoreceptor tyriosine-based activating motif （ITAM）を介して活性化シグナルを伝達するが、FcγRIIbは細胞内に有するimunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif（ITIM）を介して抑制シグナルを伝達している（Nat. Rev. Immunol. (2008) 8, 34-47）。

[0269] FcγRIIbのスプライシングバリアントとしてFcγRIIb1とFcγRIIb2とが報告されている。ヒトおよびマウスのいずれにおいてもFcγRIIb1はFcγRIIb2に比べて長い細胞内ドメインを有しており、FcγRIIb1はB細胞で発現することが確認され、FcγRIIb2はマクロファージ、肥満細胞、樹状細胞、好塩基球、好中球、好酸球で発現することが確認されている（J. Clin. Immunol. (2005) 25 (1), 1-18）。

[0270] これまでに、ヒトにおいてFcγRIIbの機能不全、発現低下は自己免疫疾患の発症と相関があることが報告されている。例えば、SLE患者の中にはFcγRIIbの発現プロモーター領域にある遺伝子多型の影響によって転写活性化因子の結合が弱まり、FcγRIIbの発現が低下している例が報告されている（Hum. Genet. (2005) 117, 220-227、J. Immunol. (2004) 172, 7192-7199、J. Immunol. (2004) 172, 7186-7191）。また、SLE患者の中にはFcγRIIbの233番目

のアミノ酸がIleまたはThrという二種類の遺伝子多型が報告されている。この部位はFcγRIIbの細胞膜貫通領域に存在し、233番目のアミノ酸がThrの場合、Ileの場合と比べて、FcγRIIbがリピッドラフトに存在しにくくなり、結果としてFcγRIIbのシグナル伝達機能が低下することが報告されている（Nat. Med. (2005) 11, 1056-1058、Hum. Mol. Genet., (2005) 14, 2881-2892）。マウスにおいても、C57BL/6マウスのFcγRIIb遺伝子が破壊されたノックアウトマウスは、自己抗体の産生や糸球体腎炎等のSLE様の症状を呈することが報告されている（Immunity 13 (2000) 277-285、J. Exp. Med. (2002) 195, 1167-1174）。また、これまでにSLEの自然発症モデルと考えられてきているマウスにおいてもFcγRIIbの発現量の低下などが報告されている（Immunogenetics (2000) 51, 429-435、Int. Immunol. (1999) 11, 1685-1691、Curr. Biol. (2000) 10, 227-230、J. Immunol. (2002) 169, 4340-4346）。これらのことから、マウスにおいても、ヒト同様にFcγRIIbは液性免疫を制御していると考えられる。

[0271] 本発明のFcを有する抗体がFcγRIIbを介して抗原を消失させる際には、FcγRIIbの機能のうち、FcγRIIbのエンドサイトーシスの機能が最も重要な寄与をしていると考えられる。上述したようにFcγRIIbのスプライシングバリアントとしてFcγRIIb1とFcγRIIb2が存在するが、抗体と抗原の免疫複合体のエンドサイトーシスには後者が主に関与していることが報告されている（J. Immunol. (1994), 152 574-585、Science (1992) 256, 1808-1812、Cell (1989) 58, 317-327）。これまでにマウスのFcγRIIb2はクラスリン被覆ピットに取り込まれて、エンドサイトーシスを起こすことが報告されている（Cell (1989) 58, 317-327）。また、FcγRIIb2を介したエンドサイトーシスにはdileucine motifが必要と報告されているが、ヒトおよびマウスのいずれにおいてもdileucine motifは保存されている（EMBO J. (1994) 13 (13), 2963-2969）。このことからも、ヒトにおいてもマウス同様にFcγRIIb2はエンドサイトーシス能を有すると考えられる。

[0272] その一方で、FcγRIIb1はFcγRIIb2と異なり、エンドサイトーシスを起こ

さないことが報告されている。FcγRIIb1はFcγRIIb2にはみられない、細胞内ドメイン中の挿入配列が存在する。この配列がFcγRIIb1のクラスリン被覆ピットへの取り込みを阻害し、その結果としてエンドサイトーシスが阻害されると考えられている（J. Cell. Biol. (1992) 116, 875-888、J. Cell. Biol. (1989) 109, 3291-3302）。ヒトにおいても、マウス同様にFcγRIIb1にはFcγRIIb2の同様の部分に挿入配列が存在するため、類似のメカニズムでFcγRIIb1とFcγRIIb2のエンドサイトーシス能の違いが生じていると予想される。また、ヒトにおいても、マウスにおいても20分間に細胞表面上の約40%の免疫複合体が細胞内へ取り込まれることが報告されている（Mol. Immunol. (2011) 49, 329-337、Science (1992) 256, 1808-1812）。このことから、ヒトにおいてもFcγRIIb2はマウス同様の速度で免疫複合体を細胞内に取り込んでいると予想される。

[0273] FcγR familyのうちFcγRIIbはヒトでもマウスでも唯一細胞内にITIMを有し、発現細胞の分布も同一であることから、免疫の制御における機能も同様であると推測できる。またヒトでもマウスでも同様の速度で免疫複合体が細胞内へ取り込まれるという事実を考慮すると、マウスを用いることで、ヒトにおけるFcγRIIbを介した抗体による抗原の消失効果が予測可能であると考えられる。実際に、実施例５において、pH依存的に可溶性抗原に結合する性質を有する抗原結合分子であるmIgG1と比較して、pH依存的に可溶性抗原に結合する性質を有しマウスFcγRIIbおよびFcγRIIIに対するaffiityが増強した抗原結合分子であるmF44およびmF46がノーマルマウスに投与されたときに、mIgG1が投与された場合と比べて抗原のクリアランスを増加することが示された。

[0274] また、後述される実施例６においてFc受容体γ鎖欠損マウスを使って同様の実験が実施された。マウスの場合、FcγRIIb以外のFcγRはgamma chainの共存在下でしか発現しないことが報告されているため、Fc受容体γ鎖欠損マウスではFcγRIIbしか発現していない。Fc受容体γ鎖欠損マウスにpH依存的に可溶性抗原に結合する性質を有する抗原結合分子であるmF44、mF46を投与

することで、FcγRIIb選択的に結合を増強した際の、抗原消失を加速する効果を考察することが可能である。実施例６の結果から、Fc受容体γ鎖欠損マウスに投与されたpH依存的に可溶性抗原に結合する性質を有する抗原結合分子であるmF44およびmF46は、同マウスに投与されたpH依存的に可溶性抗原に結合する性質を有する抗原結合分子であるmIgG1と比べて、抗原のクリアランスを増加することが示された。また、実施例６の結果から、mF44およびmF46はFc受容体γ鎖欠損マウスに投与された場合でもノーマルマウスに投与された場合とほぼ同程度に抗原を消失させることが明らかとなった。

[0275] 実施例６においてFcγRIII欠損マウスを使って同様の実験が実施された。mIgG1およびmF44、mF46はmFcγRのうちFcγRIIbおよびFcγRIIIにのみ結合することから、FcγRIII欠損マウスにこれらの抗体を投与することで、FcγRIIb選択的に結合を増強した際の、抗原消失を加速する効果を考察することが可能である。実施例６の結果から、FcγRIII欠損マウスに投与されたmF44およびmF46は同マウスに投与されたmIgG1と比べて、抗原のクリアランスを増加することが示された。また、実施例６の結果から、mF44およびmF46はFcγRIII欠損マウスに投与された場合でもノーマルマウスに投与された場合、およびFc受容体γ鎖欠損マウスに投与された場合とほぼ同程度に抗原を消失させることが明らかとなった。

[0276] これらの結果から、活性型FcγRに対する結合は増強せず、FcγRIIbにだけ選択的に結合を増強することでで、抗原消失を加速することが可能であることが明らかとなった。

[0277] 先に考察したこれまでの文献報告に加えて、上記のマウスを使った検証結果から、ヒトの生体中においても、マウスと同様にFcγRIIbを介した免疫複合体の細胞内への取り込みが生じ、その結果ヒトFcγRIIbに対して選択的に結合を増強したFcを有する抗体はその抗原の消失を速めることが可能であると考えられる。また、先に考察したように、マウスとヒトとではFcγRIIbを介した免疫複合体の細胞内への取り込みが同程度の速度で生じると考えられることから、マウスFcγRIIbに対するaffinityを増強したFcを有する抗体の

抗原消失を速める効果と同程度の効果が、ヒトFcγRIIbに対するaffinityを同程度に増強したFcを用いることでヒトの生体内においても達成することが可能であると考えられた。

[0278] WO2009/125825に記載されているように、ヒト化抗IL-6レセプター抗体であるH54/L28-IgG1の抗原に対する結合活性がpHの条件によって変化する、すなわちpH7.4において抗原に結合し、pH5.8において抗原を解離する改変が可変領域に付与されたFv4-IgG1が抗原である可溶型ヒトIL-6レセプターと共に投与されたマウスにおける可溶型ヒトIL-6レセプターの消失は、H54/L28-IgG1と当該抗原が共に投与されたマウスにおける可溶型ヒトIL-6レセプターの消失よりも大幅に加速されることが示された。なお、本明細書においては、H54/L28-IgG1に含まれる重鎖H54-IgG1および軽鎖L28-CKは、それぞれ配列番号：３６および配列番号：３７で表され、Fv4-IgG1に含まれる重鎖VH3-IgG1および軽鎖VL3-CKは、それぞれ配列番号：３８および配列番号：３９で表されている。

[0279] 可溶型ヒトIL-6レセプターに結合する抗体であるH54/L28-IgG1に結合した可溶型ヒトIL-6レセプターは、抗体とともにFcRnによって血漿中にリサイクルされるのに対して、pH依存的に可溶型ヒトIL-6レセプターに結合する抗体であるFv4-IgG1は、エンドソーム内の酸性条件下において抗体に結合した可溶型ヒトIL-6レセプターを解離する。解離した可溶型ヒトIL-6レセプターはライソソームによって分解されるため、可溶型ヒトIL-6レセプターの消失を大幅に加速することが可能となり、さらにpH依存的に可溶型ヒトIL-6レセプターに結合する抗体であるFv4-IgG1はエンドソーム内でFcRnに結合した後に血漿中にリサイクルされる。リサイクルされた当該抗体は再び可溶型ヒトIL-6レセプターに結合することができるため、抗原（可溶型ヒトIL-6レセプター）に対する結合とFcRnによる血漿中でのリサイクルが繰り返される。その結果、ひとつの抗体分子が複数回繰り返し可溶型ヒトIL-6レセプターに結合することが可能となると考えられる（WO2009/125825）。

[0280] 一方、本発明で開示されるように、pH等のイオン濃度の条件によって抗原

に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメイン、およびFcγレセプター結合ドメインを含む抗原結合分子に含まれるFcγレセプター結合ドメインの、FcγRに対する結合活性が増強された抗原結合分子の投与によって、可溶型抗原の血漿中濃度を大幅に低下させることが可能であることが見出された。

[0281] 特定の理論に拘束されるものではないが、FcγRへの結合が増強されたpH等のイオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメインを含む抗原結合分子の投与によって観察された予想外の血漿中可溶型抗原濃度の低下は、以下のように説明することも可能である。

[0282] 前記のように、Fv4-IgG1等のイオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子は、複数回繰り返し抗原に結合することが可能になると考えられるが、エンドソーム内において可溶型抗原を解離し、その血漿中からの消失を早める効果は、抗原と抗原結合分子の複合体がエンドソーム内へと取り込まれる速度に依存すると考えられる。各種のFcγRへの結合活性が増強された、イオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子は、細胞膜上に発現する各種FcγRに結合することにより、細胞内へと積極的に取り込まれ、当該分子中に含まれるpH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメインとFcRnの結合を介したリサイクルによって再度血漿中に循環することが可能である。すなわち、血漿中において可溶型抗原と複合体を形成した前記抗原結合分子は、細胞膜上に発現したFcγRを介して細胞内へ積極的に取り込まれるために、血漿中の可溶型抗原の消失を早める効果が、各種のFcγRへの結合活性が増強されていない抗原結合分子より顕著に表れると考えられる。

[0283] 膜型抗原に結合する抗体のFcγRに対する結合活性は当該抗体の細胞傷害活性に重要な役割を果たしている。そのため、医薬として用いられる抗体に細胞傷害活性が必要な場合、FcγRに対する結合活性が高いヒトIgG1のアイソタ

イプが用いられ、さらに当該抗体のFcγRに対する結合活性を増強することにより当該抗体の細胞傷害活性が増強される技術は広く用いられている。一方、医薬として用いられ、可溶型抗原に結合する抗体のFcγRに対する結合活性の果たす役割はこれまで知られておらず、FcγRに対する結合活性が高いヒトIgG1とFcγRに対する結合活性が低いヒトIgG2やヒトIgG4のFcγRに対する結合活性の相違が、当該抗体が投与された生体に与える生理的な効果の違いはこれまでに十分に検討されていなかった。実際、本実施例で後述されるように、FcγRに対する結合活性を欠損させた抗体が投与された個体の血漿中での、可溶型抗原の濃度推移に影響が無いことが確認された。一方、本発明において、FcγRに対する結合活性が増強され、イオン濃度の条件によって可溶型抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子が投与された個体の血漿中における可溶型抗原の濃度が大幅に低下したことが見出された。すなわち、可溶型抗原を標的とした抗原結合分子に含まれる、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメインとイオン濃度の条件によって可溶型抗原に対する結合が変化する抗原結合ドメインが組み合わされることによって、FcγRに対する結合を増強させる利点が初めて見出されたといえる。

[0284] 抗原結合分子

本発明において、抗原結合分子はpH酸性域においてヒトFcRnに対する結合活性を有し、抗原結合ドメインおよびFcγレセプター結合ドメインを含む分子を表す最も広義な意味として使用されており、具体的には、それらが抗原に対する結合活性を示す限り、様々な分子型が含まれる。例えば、抗原結合ドメインがFc領域と結合した分子の例として、抗体が挙げられる。抗体には、単一のモノクローナル抗体（アゴニストおよびアンタゴニスト抗体を含む）、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体等が含まれ得る。また抗体の断片として使用される場合としては、抗原結合ドメインおよび抗原結合断片（例えば、Fab、F(ab')2、scFvおよびFv）が好適に挙げられ得る。既存の安定なα/βバレルタンパク質構造等の立体構造が scaffold（土台）として用いられ、

その一部分の構造のみが抗原結合ドメインの構築のためにライブラリ化されたスキャフォールド分子も、本発明の抗原結合分子に含まれ得る 。

[0285] 本発明の抗原結合分子は、FcRnに対する結合およびFcγレセプターに対する結合を媒介するFc領域の少なくとも部分を含むことができる。例えば、非限定の一態様において、抗原結合分子は抗体またはFc融合タンパク質であり得る。融合タンパク質とは、天然ではそれが自然に連結しない第二のアミノ酸配列を有するポリペプチドに連結された第一のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むキメラポリペプチドをいう。例えば、融合タンパク質は、Fc領域の少なくとも部分（例えば、FcRnに対する結合を付与するFc領域の部分やFcγレセプターに対する結合を付与するFc領域の部分）をコードするアミノ酸配列、および、例えばレセプターのリガンド結合ドメインまたはリガンドのレセプター結合ドメインをコードするアミノ酸配列を含む非免疫グロブリンポリペプチド、を含むことができる。アミノ酸配列は、一緒に融合タンパク質に運ばれる別々のタンパク質に存在できるか、あるいはそれらは通常は同一タンパク質に存在できるが、融合ポリペプチド中の新しい再編成に入れられる。融合タンパク質は、例えば、化学合成によって、またはペプチド領域が所望の関係でコードされたポリヌクレオチドを作成し、それを発現する遺伝子組換えの手法によって作製され得る。

[0286] 本発明の各ドメインはポリペプチド結合によって直接連結され得るし、リンカーを介して連結され得る。リンカーとしては、遺伝子工学により導入し得る任意のペプチドリンカー、又は合成化合物リンカー（例えば、Protein Engineering (1996) 9 (3), 299-305）に開示されるリンカー等が使用され得るが、本発明においてはペプチドリンカーが好ましい。ペプチドリンカーの長さは特に限定されず、目的に応じて当業者が適宜選択することが可能であるが、好ましい長さは5アミノ酸以上（上限は特に限定されないが、通常、30アミノ酸以下、好ましくは20アミノ酸以下）であり、特に好ましくは15アミノ酸である。

[0287] 例えば、ペプチドリンカーの場合：

Ser

Gly・Ser

Gly・Gly・Ser

Ser・Gly・Gly

Gly・Gly・Gly・Ser（配列番号：２６）

Ser・Gly・Gly・Gly（配列番号：２７）

Gly・Gly・Gly・Gly・Ser（配列番号：２８）

Ser・Gly・Gly・Gly・Gly（配列番号：２９）

Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Ser（配列番号：３０）

Ser・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly（配列番号：３１）

Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Ser（配列番号：３２）

Ser・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly（配列番号：３３）

（Gly・Gly・Gly・Gly・Ser（配列番号：２８））n

（Ser・Gly・Gly・Gly・Gly（配列番号：２９））n

［nは１以上の整数である］等が好適に挙げられる。但し、ペプチドリンカーの長さや配列は目的に応じて当業者が適宜選択することができる。

[0288] 合成化学物リンカー（化学架橋剤）は、ペプチドの架橋に通常用いられている架橋剤、例えばN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）、ジスクシンイミジルスベレート（DSS）、ビス（スルホスクシンイミジル）スベレート（BS3）、ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）（DSP）、ジチオビス（スルホスクシンイミジルプロピオネート）（DTSSP）、エチレングリコールビス（スクシンイミジルスクシネート）（EGS）、エチレングリコールビス（スルホスクシンイミジルスクシネート）（スルホーEGS）、ジスクシンイミジル酒石酸塩（DST）、ジスルホスクシンイミジル酒石酸塩（スルホーDST）、ビス［2-（スクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル］スルホン（BSOCOES）、ビス［2-（スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル］スルホン（スルホ-BSOCOES）などであり、これらの架橋剤は市販されている。

[0289] 各ドメインを連結するリンカーが複数用いられる場合には、全て同種のリ

ンカーが用いられ得るし、異種のリンカーも用いられ得る。

[0290] また、上記記載で例示されるリンカーのほか、例えばHisタグ、HAタグ、mycタグ、FLAGタグ等のペプチドタグを有するリンカーも適宜使用され得る。また、水素結合、ジスルフィド結合、共有結合、イオン性相互作用またはこれらの結合の組合せにより互いに結合する性質もまた好適に利用され得る。例えば、抗体のCH1とCL間の親和性が利用されたり、ヘテロFc領域の会合に際して前述の二重特異性抗体を起源とするFc領域が用いられたりする。さらに、ドメイン間に形成されるジスルフィド結合もまた好適に利用され得る。

[0291] 各ドメインをペプチド結合で連結するために、当該ドメインをコードするポリヌクレオチドがインフレームで連結される。ポリヌクレオチドをインフレームで連結する方法としては、制限断片のライゲーションやフュージョンPCR、オーバーラップPCR等の手法が公知であり、本発明の抗原結合分子の作製にも適宜これらの方法が単独または組合せで使用され得る。本発明では、用語「連結され」、「融合され」、「連結」または「融合」は相互交換的に用いられる。これらの用語は、上記の化学結合手段または組換え手法を含めた全ての手段によって、二以上のポリペプチド等のエレメントまたは成分を一つの構造を形成するように連結することをいう。インフレームで融合するとは、二以上のエレメントまたは成分がポリペプチドである場合に、当該ポリペプチドのの正しい読み取り枠を維持するように連続したより長い読み取り枠を形成するための二以上の読取り枠の単位の連結をいう。二分子のFabが抗原結合ドメインとして用いられた場合、当該抗原結合ドメインとFc領域がリンカーを介することなくペプチド結合によってインフレームで連結された本発明の抗原結合分子である抗体は、本願の好適な抗原結合分子として使用され得る。

[0292] FcRn

免疫グロブリンスーパーファミリーに属するFcγレセプターと異なり、FcRn特にヒトFcRnは構造的には主要組織不適合性複合体（MHC）クラスＩのポリペプチドに構造的に類似しクラスＩのMHC分子と22から29％の配列同一性を有

する（Ghetieら，Immunol. Today（1997）18（12），592-598）。FcRnは、可溶性βまたは軽鎖（β2マイクログロブリン）と複合体化された膜貫通αまたは重鎖よりなるヘテロダイマーとして発現される。MHCのように、FcRnのα鎖は３つの細胞外ドメイン（α１、α２、α３）よりなり、短い細胞質ドメインはタンパク質を細胞表面に繋留する。α１およびα２ドメインが抗体のFc領域中のFcRn結合ドメインと相互作用する（Raghavanら（Immunity（1994）1，303-315）。

[0293] FcRnは、哺乳動物の母性胎盤または卵黄嚢で発現され、それは母親から胎児へのIgGの移動に関与する。加えてFcRnが発現するげっ歯類新生児の小腸では、FcRnが摂取された初乳または乳から母性IgGの刷子縁上皮を横切る移動に関与する。FcRnは多数の種にわたって多数の他の組織、並びに種々の内皮細胞系において発現している。それはヒト成人血管内皮、筋肉血管系、および肝臓洞様毛細血管でも発現される。FcRnは、IgGに結合し、それを血清にリサイクルすることによって、IgGの血漿中濃度を維持する役割を演じていると考えられている。FcRnのIgG分子への結合は、通常、厳格にpHに依存的であり、最適結合は7.0未満のpH酸性域において認められる。

[0294] 配列番号：３４で表されたシグナル配列を含むポリペプチドを前駆体とするヒトFcRnは、生体内で（配列番号：３５にシグナル配列を含むそのポリペプチドが記載されている）ヒトβ2-ミクログロブリンとの複合体を形成する。後に参考実施例で示されるように、β2-ミクログロブリンと複合体を形成している可溶型ヒトFcRnが通常の組換え発現手法を用いることによって製造される。このようなβ2-ミクログロブリンと複合体を形成している可溶型ヒトFcRnに対する本発明のFcRn結合ドメインの結合活性が評価され得る。本発明において、特に記載のない場合は、ヒトFcRnは本発明のFcRn結合ドメインに結合し得る形態であるものを指し、例としてヒトFcRnとヒトβ2-ミクログロブリンとの複合体が挙げられる。

[0295] 本発明の抗原結合分子は、FcRn結合ドメインを有する。FcRn結合ドメインは、抗原結合分子がpH酸性域においてFcRnに対する結合活性を有していれば

特に限定されず、また、直接または間接的にFcRnに対して結合活性を有するドメインであってもよい。そのようなドメインとしては、例えば、直接的にFcRnに対する結合活性を有するIgG型免疫グロブリンのFc領域、アルブミン、アルブミンドメイン3、抗FcRn抗体、抗FcRnペプチド、抗FcRn足場（Scaffold）分子等、あるいは間接的にFcRnに対する結合活性を有するIgGやアルブミンに結合する分子等が好適に挙げられる。本発明においては、pH酸性域およびpH中性域においてFcRnに対する結合活性を有するドメインが好ましい。当該ドメインは、あらかじめpH酸性域においてFcRnに対する結合活性を有しているドメインであればそのまま好適に使用され得る。当該ドメインがpH酸性域においてFcRnに対する結合活性がない若しくは弱い場合には、抗原結合分子中のアミノ酸を改変してFcRnに対する結合活性を付与することが可能である。また、あらかじめpH酸性域においてFcRnに対する結合活性を有しているドメイン中のアミノ酸を改変して、FcRn結合活性を高めてもよい。FcRn結合ドメインのアミノ酸の改変は、アミノ酸改変前と改変後のpH酸性域におけるFcRnに対する結合活性を比較することによって目的の改変を見出すことができる。

[0296] FcRn結合ドメインは、直接FcRnと結合する領域であることが好ましい。FcRn結合ドメインの好ましい例として、抗体のFc領域を挙げることができる。しかしながら、アルブミンやIgGなどのFcRnとの結合活性を有するポリペプチドに結合可能な領域は、アルブミンやIgGなどを介して間接的にFcRnと結合することが可能である。そのため、本発明におけるFcRn結合領域としては、FcRnとの結合活性を有するポリペプチドに結合する領域が好適に使用され得る。Fc領域は、抗体重鎖の定常領域に由来するアミノ酸配列を含む。Fc領域は、EUナンバリングで表されるおよそ216のアミノ酸における、パパイン切断部位のヒンジ領域のN末端から、当該ヒンジ、CH2およびCH3ドメインを含める抗体の重鎖定常領域の部分である。

[0297] FcRn、特にヒトFcRnに対するFcRn結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子の結合活性

本発明におけるFcRn結合ドメインのFcRn特にヒトFcRnに対する結合活性は、前記結合活性の項で述べられているように、当業者に公知の方法により測定することが可能であり、pH以外の条件については当業者が適宜決定することが可能である。抗原結合分子の抗原結合活性とヒトFcRn結合活性は、KD (Dissociation constant：解離定数)、見かけのKD (Apparent dissociation constant：見かけの解離定数)、解離速度であるkd (Dissociation rate：解離速度)、又は見かけのkd(Apparent dissociation：見かけの解離速度)等として評価され得る。これらは当業者公知の方法で測定され得る。例えばBiacore (GE healthcare)、スキャッチャードプロット、フローサイトメーター等を使用され得る。

[0298] FcRn結合ドメインのFcRnに対する結合活性を測定する際のpH以外の条件は当業者が適宜選択することが可能であり、特に限定されない。例えば、WO2009/125825に記載されているようにMESバッファー、37℃の条件において測定され得る。また、本発明のFcRn結合ドメインのFcRnに対する結合活性の測定は当業者公知の方法により行うことが可能であり、例えば、Biacore (GE Healthcare) などを用いて測定され得る。FcRn結合ドメインとFcRnの結合活性の測定は、FcRn結合ドメインまたはFcRn結合ドメインを含む本発明の抗原結合分子あるいはFcRnを固定化したチップへ、それぞれFcRnあるいはFcRn結合ドメインまたはFcRn結合ドメインを含む本発明の抗原結合分子をアナライトとして流すことによって評価され得る。

[0299] 本発明の抗原結合分子に含まれるFcRn結合ドメインとFcRnとの結合活性を有する条件としてのpH酸性域とは、通常pH4.0～pH6.5を意味する。好ましくはpH5.5～pH6.5を意味し、特に好ましくは、生体内の早期エンドソーム内のpHに近いpH5.8～pH6.0を意味する。本発明の抗原結合分子または当該分子に含まれるFcRn結合ドメインとFcRnとの結合活性を有する条件としてのpH中性域とは、通常pH6.7～pH10.0を意味する。pH中性域とは、好ましくはpH7.0～pH8.0の任意のpH値によって示される範囲であり、好ましくはpH7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、および8.0から選択され、特に好まし

くは生体内の血漿中（血中）のpHに近いpH7.4である。pH7.4でのヒトFcRn結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子とヒトFcRnとの結合アフィニティーが低いためにその結合アフィニティーを評価することが難しい場合には、pH7.4の代わりにpH7.0を用いることができる。測定条件に使用される温度として、FcRn結合ドメインとFcRnとの結合アフィニティーは、10℃～50℃の任意の温度で評価してもよい。好ましくは、FcRn結合ドメインとヒトFcRnとの結合アフィニティーを決定するために、15℃～40℃の温度が使用される。より好ましくは、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、および35℃のいずれか1つのような20℃から35℃までの任意の温度も同様に、FcRn結合ドメインとFcRnとの結合アフィニティーを決定するために使用される。25℃という温度は本発明の態様の非限定な一例である。

[0300] Yeungら（J. Immunol.（2009）182, 7663-7671）によれば、天然型ヒトIgG1のヒトFcRnに対する結合活性はpH酸性域（pH6.0）でKD 1.7μMであるが、pH中性域では活性をほとんど検出できていない。よって、好ましい態様においては、pH酸性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性がKD 20μMまたはそれより強く、pH中性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性が天然型ヒトIgGと同等な抗原結合分子を含む、pH酸性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性を有する本発明の抗原結合分子が使用され得る。より好ましい態様においては、pH酸性域の条件下でヒトFcRn結合活性がKD 2.0μMまたはそれより強い抗原結合分子を含む本発明の抗原結合分子が使用され得る。さらにより好ましい態様においては、pH酸性域の条件下でヒトFcRn結合活性がKD 0.5μMまたはそれより強い抗原結合分子が使用され得る。上記のKD値は、The Journal of Immunology（2009）182: 7663-7671に記載された方法（抗原結合分子をチップに固定し、アナライトとしてヒトFcRnを流す）によって決定される。

[0301] 本発明においては、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFc領域が好ましい。当該ドメインは、あらかじめpH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有しているFc領域であればそのまま用いられ得る。当該ドメインがpH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性がない若しくは弱い場合に

は、抗原結合分子中のアミノ酸を改変することによって所望のFcRnに対する結合活性を有するFc領域が取得され得るが、Fc領域中のアミノ酸を改変することによってpH酸性域の条件下で所望のFcRnに対する結合活性を有する、または増強されたFc領域も好適に取得され得る。そのような所望の結合活性をもたらすFc領域のアミノ酸改変は、アミノ酸改変前と改変後のpH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を比較することによって見出され得る。前記のFcγレセプターに対する結合活性を改変するために用いられる手法と同様の公知の手法を用いて当業者は適宜アミノ酸の改変を実施することができる。

[0302] 本発明の抗原結合分子に含まれるpH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFc領域はいかなる方法によっても取得され得るが、具体的には、出発Fc領域として用いられるヒトIgG型免疫グロブリンのアミノ酸の改変によってpH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有する、または増強されたFcRn結合ドメインが取得され得る。改変のための好ましいIgG型免疫グロブリンのFc領域としては、例えばヒトIgG（IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4、およびそれらの改変体）のFc領域が挙げられる。他のアミノ酸への改変は、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有する、もしくは酸性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性を高められるかぎり、いかなる位置のアミノ酸も改変され得る。抗原結合分子が、Fc領域としてヒトIgG1のFc領域を含んでいる場合、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合が、ヒトIgG1の出発Fc領域の結合活性より増強する効果をもたらす改変が含まれていることが好ましい。そのような改変が可能なアミノ酸として、例えば、WO2000/042072に記載されるように、EUナンバリングで表される238位、252位、253位、254位、255位、256位、265位、272位、286位、288位、303位、305位、307位、309位、311位、312位、317位、340位、356位、360位、362位、376位、378位、380位、382位、386位、388位、400位、413位、415位、424位、433位、434位、435位、436位、439位および/または447位のアミノ酸が好適に挙げられる。同様に、そのような改変が可能なアミノ酸として、例えばWO2002/060919に記載されているように、EUナンバリングで表される251位、252位、254位、255位、256位、

308位、309位、311位、312位、385位、386位、387位、389位、428位、433位、434位および/または436位のアミノ酸も好適に挙げられる。さらに、そのような改変が可能なアミノ酸として、WO2004/092219に記載されているように、EUナンバリングで表される250位、314位および428位のアミノ酸も挙げられる。また、そのような改変が可能なアミノ酸として、例えばWO2010/045193に記載されているように、EUナンバリングで表される251位、252位、307位、308位、378位、428位、430位、434位および/または436位のアミノ酸も好適に挙げられる。これらのアミノ酸の改変によって、IgG型免疫グロブリンのFc領域のpH酸性域の条件下でFcRnに対する結合が増強される。

[0303] 本発明においては、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFc領域が好ましい。当該ドメインは、あらかじめpH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有しているFc領域であればそのまま用いられ得る。当該ドメインがpH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性がない若しくは弱い場合には、抗原結合分子中のアミノ酸を改変することによって所望のFcRnに対する結合活性を有するFc領域が取得され得るが、Fc領域中のアミノ酸を改変することによってpH酸性域の条件下で所望のFcRnに対する結合活性を有する、または増強されたFc領域も好適に取得され得る。そのような所望の結合活性をもたらすFc領域のアミノ酸改変は、アミノ酸改変前と改変後のpH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を比較することによって見出され得る。前記のFcγレセプターに対する結合活性を改変するために用いられる手法と同様の公知の手法を用いて当業者は適宜アミノ酸の改変を実施することができる。

[0304] 本発明の抗原結合分子に含まれるpH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFc領域はいかなる方法によっても取得され得るが、具体的には、出発Fc領域として用いられるヒトIgG型免疫グロブリンのアミノ酸の改変によってpH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有する、または増強されたFcRn結合ドメインが取得され得る。改変のための好ましいIgG型免疫グロブリンのFc領域としては、例えばヒトIgG（IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4、およびそれらの改変体）のFc領域が挙げられる。他のアミノ酸への改変は、pH酸

性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有する、もしくは酸性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性を高められるかぎり、いかなる位置のアミノ酸も改変され得る。抗原結合分子が、Fc領域としてヒトIgG1のFc領域を含んでいる場合、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合が、ヒトIgG1の出発Fc領域の結合活性より増強する効果をもたらす改変が含まれていることが好ましい。そのような改変が可能なアミノ酸として、例えば、国際公開WO1997/034631に記載されているように、EUナンバリングで表される252位、254位、256位、309位、311位、315位、433位、および/または434位ならびにこれらのアミノ酸に組み合わせる253位、310位、435位、および/または426位のアミノ酸が挙げられる。国際公開WO2000/042072に記載されるように、EUナンバリングで表される238位、252位、253位、254位、255位、256位、265位、272位、286位、288位、303位、305位、307位、309位、311位、312位、317位、340位、356位、360位、362位、376位、378位、380位、382位、386位、388位、400位、413位、415位、424位、433位、434位、435位、436位、439位および/または447位のアミノ酸が好適に挙げられる。同様に、そのような改変が可能なアミノ酸として、例えば国際公開WO2002/060919に記載されているように、EUナンバリングで表される251位、252位、254位、255位、256位、308位、309位、311位、312位、385位、386位、387位、389位、428位、433位、434位および/または436位のアミノ酸も好適に挙げられる。さらに、そのような改変が可能なアミノ酸として、国際公開WO2004/092219に記載されているように、EUナンバリングで表される250位、314位および428位のアミノ酸も挙げられる。加えて、そのような改変が可能なアミノ酸として、例えば国際公開WO2006/020114に記載されているように、238位、244位、245位、249位、252位、256位、257位、258位、260位、262位、270位、272位、279位、283位、285位、286位、288位、293位、307位、311位、312位、316位、317位、318位、332位、339位、341位、343位、375位、376位、377位、378位、380位、382位、423位、427位、430位、431位、434位、436位、438位、440位、および/または442位のアミノ酸も好適に挙げられる。また、そのような改変が可能なアミノ酸として、例えば国際

公開WO2010/045193に記載されているように、EUナンバリングで表される251位、252位、307位、308位、378位、428位、430位、434位および/または436位のアミノ酸も好適に挙げられる。これらのアミノ酸の改変によって、IgG型免疫グロブリンのFc領域のpH酸性域の条件下でFcRnに対する結合が増強される。

[0305] Fc領域としてヒトIgG1のFc領域を含んでいる場合、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合が、ヒトIgG1の出発Fc領域の結合活性より増強する効果をもたらす改変の非限定な一態様では、EUナンバリングで表される、

251位のアミノ酸がArgまたはLeuのいずれか、

252位のアミノ酸がPhe、Ser、Thr、またはTyrのいずれか、

254位のアミノ酸がSerまたはThrのいずれか、

255位のアミノ酸がArg、Gly、Ile、またはLeuのいずれか、

256位のアミノ酸がAla、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、またはThrのいずれか、

308位のアミノ酸がIleまたはThrのいずれか、

309位のアミノ酸がPro、

311位のアミノ酸がGlu、Leu、またはSerのいずれか、

312位のアミノ酸がAlaまたはAspのいずれか、

314位のアミノ酸がAlaまたはLeuのいずれか、

385位のアミノ酸がAla、Arg、Asp、Gly、His、Lys、Ser、またはThrのいずれか、

386位のアミノ酸がArg、Asp、Ile、Lys、Met、Pro、Ser、またはThrのいずれか、

387位のアミノ酸がAla、Arg、His、Pro、Ser、またはThrのいずれか、

389位のアミノ酸がAsn、Pro、またはSerのいずれか、

428位のアミノ酸がLeu、Met、Phe、Ser、またはThrのいずれか

433位のアミノ酸がArg、Gln、His、Ile、Lys、Pro、またはSerのいずれか、

434位のアミノ酸がHis、Phe、またはTyrのいずれか、もしくは

436位のアミノ酸がArg、Asn、His、Lys、Met、またはThrのいずれか、

の群から選択される少なくともひとつ以上のアミノ酸の改変が挙げられる。また、改変されるアミノ酸の数は特に限定されず、一箇所のみのアミノ酸が改変され得るし、二箇所以上のアミノ酸が改変され得る。

[0306] Fc領域としてヒトIgG1のFc領域を含んでいる場合、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合が、ヒトIgG1の出発Fc領域の結合活性より増強する効果をもたらす改変の非限定な一態様は、EUナンバリングで表される、308位のアミノ酸がIle、309位のアミノ酸がPro、および/または311位のアミノ酸がGluを含む改変であり得る。また、当該改変の別の非限定な一態様は、308位のアミノ酸がThr、309位のアミノ酸がPro、311位のアミノ酸がLeu、312位のアミノ酸がAla、および/または314位のアミノ酸がAlaを含む改変であり得る。また、当該改変のさらに別の非限定な一態様は、308位のアミノ酸がIleまたはThr、309位のアミノ酸がPro、311位のアミノ酸がGlu、Leu、またはSer、312位のアミノ酸がAla、および/または314位のアミノ酸がAlaまたはLeuを含む改変であり得る。当該改変の異なる非限定な一態様は、308位のアミノ酸がThr、309位のアミノ酸がPro、311位のアミノ酸がSer、312位のアミノ酸がAsp、および/または314位のアミノ酸がLeuを含む改変であり得る。

[0307] Fc領域としてヒトIgG1のFc領域を含んでいる場合、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合が、ヒトIgG1の出発Fc領域の結合活性より増強する効果をもたらす改変の非限定な一態様は、EUナンバリングで表される、251位のアミノ酸がLeu、252位のアミノ酸がTyr、254位のアミノ酸がSer、またはThr、255位のアミノ酸がArg、および/または256位のアミノ酸がGluを含む改変であり得る。

[0308] Fc領域としてヒトIgG1のFc領域を含んでいる場合、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合が、ヒトIgG1の出発Fc領域の結合活性より増強する効果をもたらす改変の非限定な一態様は、EUナンバリングで表される、428位のアミノ酸がLeu、Met、Phe、Ser、またはThrのいずれか、433位のアミノ酸がArg、Gln、His、Ile、Lys、Pro、またはSerのいずれか、434位のアミノ酸がHis、Phe、またはTyrのいずれか、および/または436位のアミノ酸がArg、Asn、His、L

ys、Met、またはThrのいずれかを含む改変であり得る。また、当該改変の別の非限定な一態様は、428位のアミノ酸がHisまたはMet、および/または434位のアミノ酸がHisまたはMetを含む改変であり得る。

[0309] Fc領域としてヒトIgG1のFc領域を含んでいる場合、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合が、ヒトIgG1の出発Fc領域の結合活性より増強する効果をもたらす改変の非限定な一態様は、EUナンバリングで表される、385位のアミノ酸がArg、386位のアミノ酸がThr、387位のアミノ酸がArg、および/または389位のアミノ酸がProを含む改変であり得る。また、当該改変の別の非限定な一態様は、385位のアミノ酸がAsp、386位のアミノ酸がProおよび/または389位のアミノ酸がSerを含む改変であり得る。

[0310] さらに、Fc領域としてヒトIgG1のFc領域を含んでいる場合、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合が、ヒトIgG1の出発Fc領域の結合活性より増強する効果をもたらす改変の非限定な一態様では、EUナンバリングで表される、
250位のアミノ酸がGlnまたはGluのいずれか、もしくは
428位のアミノ酸がLeuまたはPheのいずれか、
の群から選択される少なくともひとつ以上のアミノ酸の改変が挙げられる。また、改変されるアミノ酸の数は特に限定されず、一箇所のみのアミノ酸が改変され得るし、二箇所のアミノ酸が改変され得る。

[0311] Fc領域としてヒトIgG1のFc領域を含んでいる場合、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合が、ヒトIgG1の出発Fc領域の結合活性より増強する効果をもたらす改変の非限定な一態様は、EUナンバリングで表される、250位のアミノ酸がGln、および/または428位のアミノ酸がLeuまたはPheのいずれかを含む改変であり得る。また、当該改変の別の非限定な一態様は、250位のアミノ酸がGlu、および/または428位のアミノ酸がLeuまたはPheのいずれかを含む改変であり得る。

[0312] Fc領域としてヒトIgG1のFc領域を含んでいる場合、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合が、ヒトIgG1の出発Fc領域の結合活性より増強する効果をもたらす改変の非限定な一態様では、EUナンバリングで表される、

251位のアミノ酸がAspまたはGluのいずれか、

252位のアミノ酸がTyr、

307位のアミノ酸がGln、

308位のアミノ酸がPro、

378位のアミノ酸がVal、

380位のアミノ酸がAla、

428位のアミノ酸がLeu、

430位のアミノ酸がAla、またはLysのいずれか、

434位のアミノ酸がAla、His、Ser、またはTyrのいずれか、もしくは

436位のアミノ酸がIle、

の群から選択される少なくとも二つ以上のアミノ酸の改変が挙げられる。また、改変されるアミノ酸の数は特に限定されず、二箇所のみのアミノ酸が改変され得るし、三箇所以上のアミノ酸が改変され得る。

[0313] Fc領域としてヒトIgG1のFc領域を含んでいる場合、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合が、ヒトIgG1の出発Fc領域の結合活性より増強する効果をもたらす改変の非限定な一態様は、EUナンバリングで表される、307位のアミノ酸がGln、および434位のアミノ酸がAlaまたはSerのいずれかを含む改変であり得る。また、当該改変の別の非限定な一態様は、308位のアミノ酸がPro、および434位のアミノ酸がAlaを含む改変であり得る。また、当該改変のさらに別の非限定な一態様は、252位のアミノ酸がTyr、および434位のアミノ酸がAlaを含む改変であり得る。当該改変の異なる非限定な一態様は、378位のアミノ酸がVal、および434位のアミノ酸がAlaを含む改変であり得る。当該改変の別の異なる非限定な一態様は、428位のアミノ酸がLeu、および434位のアミノ酸がAlaを含む改変であり得る。また、当該改変のさらに別の異なる非限定な一態様は、434位のアミノ酸がAla、および436位のアミノ酸がIleを含む改変であり得る。さらに、当該改変のもう一つの非限定な一態様は、308位のアミノ酸がPro、および434位のアミノ酸がTyrを含む改変であり得る。さらに、当該改変の別のもう一つの非限定な一態様は、307位のアミノ酸がGln、および4

36位のアミノ酸がIleを含む改変であり得る。

[0314] Fc領域としてヒトIgG1のFc領域を含んでいる場合、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合が、ヒトIgG1の出発Fc領域の結合活性より増強する効果をもたらす改変の非限定な一態様は、EUナンバリングで表される、307位のアミノ酸がGln、380位のアミノ酸がAla、および434位のアミノ酸がSerのいずれかを含む改変であり得る。また、当該改変の別の非限定な一態様は、307位のアミノ酸がGln、380位のアミノ酸がAla、および434位のアミノ酸がAlaを含む改変であり得る。また、当該改変のさらに別の非限定な一態様は、252位のアミノ酸がTyr、308位のアミノ酸がPro、および434位のアミノ酸がTyrを含む改変であり得る。当該改変の異なる非限定な一態様は、251位のアミノ酸がAsp、307位のアミノ酸がGln、および434位のアミノ酸がHisを含む改変であり得る。

[0315] Fc領域としてヒトIgG1のFc領域を含んでいる場合、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合が、ヒトIgG1の出発Fc領域の結合活性より増強する効果をもたらす改変の非限定な一態様では、EUナンバリングで表される、

238位のアミノ酸がLeu、

244位のアミノ酸がLeu、

245位のアミノ酸がArg、

249位のアミノ酸がPro、

252位のアミノ酸がTyr、

256位のアミノ酸がPro、

257位のアミノ酸がAla、Ile、Met、Asn、Ser、またはValのいずれか、

258位のアミノ酸がAsp、

260位のアミノ酸がSer、

262位のアミノ酸がLeu、

270位のアミノ酸がLys、

272位のアミノ酸がLeu、またはArgのいずれか、

279位のアミノ酸がAla、Asp、Gly、His、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Trp、またはTyrのいずれか、

283位のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Trp、またはTyrのいずれか、

285位のアミノ酸がAsn、

286位のアミノ酸がPhe、

288位のアミノ酸がAsn、またはProのいずれか、

293位のアミノ酸がVal、

307位のアミノ酸がAla、Glu、またはMetのいずれか、

311位のアミノ酸がAla、Ile、Lys、Leu、Met、Val、またはTrpのいずれか、

312位のアミノ酸がPro、

316位のアミノ酸がLys、

317位のアミノ酸がPro、

318位のアミノ酸がAsn、またはThrのいずれか、

332位のアミノ酸がPhe、His、Lys、Leu、Met、Arg、Ser、またはTrpのいずれか、

339位のアミノ酸がAsn、Thr、またはTrpのいずれか、

341位のアミノ酸がPro、

343位のアミノ酸がGlu、His、Lys、Gln、Arg、Thr、またはTyrのいずれか、

375位のアミノ酸がArg、

376位のアミノ酸がGly、Ile、Met、Pro、Thr、またはValのいずれか、

377位のアミノ酸がLys、

378位のアミノ酸がAsp、またはAsnのいずれか、

380位のアミノ酸がAsn、Ser、またはThrのいずれか、

382位のアミノ酸がPhe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

423位のアミノ酸がAsn、

427位のアミノ酸がAsn、

430位のアミノ酸がAla、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、またはTyrのいずれか、

431位のアミノ酸がHis、またはAsnのいずれか、

434位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Trp、またはTyrのいずれか、

436位のアミノ酸がIle、Leu、またはThrのいずれか、

438位のアミノ酸がLys、Leu、Thr、またはTrpのいずれか、

440位のアミノ酸がLys、もしくは、

442位のアミノ酸がLys、

の群から選択される少なくとも二つ以上のアミノ酸の改変が挙げられる。また、改変されるアミノ酸の数は特に限定されず、二箇所のみのアミノ酸が改変され得るし、三箇所以上のアミノ酸が改変され得る。

[0316] Fc領域としてヒトIgG1のFc領域を含んでいる場合、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合が、ヒトIgG1の出発Fc領域の結合活性より増強する効果をもたらす改変の非限定な一態様は、EUナンバリングで表される、257位のアミノ酸がIle、および311位のアミノ酸がIleを含む改変であり得る。また、当該改変の別の非限定な一態様は、257位のアミノ酸がIle、および434位のアミノ酸がHisを含む改変であり得る。また、当該改変のさらに別の非限定な一態様は、376位のアミノ酸がVal、および434位のアミノ酸がHisを含む改変であり得る。

[0317] また、後述するように、本発明の抗原結合分子に含まれるFcRn結合ドメインとしては、pH中性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFc領域も好適に使用され得る。前記のpH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFc領域が取得される方法に準じて、そのようなFc領域はいかなる方法によっても取得され得るが、具体的には、出発Fc領域として用いられるヒトIgG型免疫グロブリンのアミノ酸の改変によってpH中性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有する、または増強されたFcRn結合ドメインが取得され得る。改変のための好ましいIgG型免疫グロブリンのFc領域としては、例えばヒトIgG（IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4、およびそれらの改変体）のFc領域が挙げられる。他のアミノ酸への改変は、pH中性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有する、もしくは酸性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性を高めら

れるかぎり、いかなる位置のアミノ酸も改変され得る。抗原結合分子が、Fc領域としてヒトIgG1のFc領域を含んでいる場合、pH中性域の条件下でFcRnに対する結合が、ヒトIgG1の出発Fc領域の結合活性より増強する効果をもたらす改変が含まれていることが好ましい。そのような改変がされたFc領域として、例えば、ヒトFcRn結合ドメインが、出発Fc領域のEUナンバリングで表される部位のうち、237位、238位、239位、248位、250位、252位、254位、255位、256位、257位、258位、265位、270位、286位、289位、297位、298位、303位、305位、307位、308位、309位、311位、312位、314位、315位、317位、325位、332位、334位、360位、376位、380位、382位、384位、385位、386位、387位、389位、424位、428位、433位、434位、および436位の群から選択される少なくともひとつ以上のアミノ酸が、天然型Fc領域の対応するアミノ酸と異なるFc領域が好適に挙げられ得る。

[0318] また、そのような改変がされたFc領域として、例えば、Fc領域のEUナンバリングで表される；

237位のアミノ酸がMet、

238位のアミノ酸がAla、

239位のアミノ酸がLys、

248位のアミノ酸がIle、

250位のアミノ酸がAla、Phe、Ile、Met、Gln、Ser、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

252位のアミノ酸がPhe、Trp、またはTyrのいずれか、

254位のアミノ酸がThr、

255位のアミノ酸がGlu、

256位のアミノ酸がAsp、Glu、またはGlnのいずれか、

257位のアミノ酸がAla、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr、またはValのいずれか、

258位のアミノ酸がHis、

265位のアミノ酸がAla、

270位のアミノ酸がPhe、

286位のアミノ酸がAlaまたはGluのいずれか、

289位のアミノ酸がHis、

297位のアミノ酸がAla、

298位のアミノ酸がGly、

303位のアミノ酸がAla、

305位のアミノ酸がAla、

307位のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

308位のアミノ酸がAla、Phe、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、またはThrのいずれか、

309位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Pro、またはArgのいずれか、

311位のアミノ酸がAla、His、またはIleのいずれか、

312位のアミノ酸がAlaまたはHisのいずれか、

314位のアミノ酸がLysまたはArgのいずれか、

315位のアミノ酸がAlaまたはHisのいずれか、

317位のアミノ酸がAla、

325位のアミノ酸がGly、

332位のアミノ酸がVal、

334位のアミノ酸がLeu、

360位のアミノ酸がHis、

376位のアミノ酸がAla、

380位のアミノ酸がAla、

382位のアミノ酸がAla、

384位のアミノ酸がAla、

385位のアミノ酸がAspまたはHisのいずれか、

386位のアミノ酸がPro、

387位のアミノ酸がGlu、

389位のアミノ酸がAlaまたはSerのいずれか、

424位のアミノ酸がAla、

428位のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

433位のアミノ酸がLys、

434位のアミノ酸がAla、Phe、His、Ser、Trp、またはTyrのいずれか、および

436位のアミノ酸がHis、

の群から選択される少なくとも1つの以上アミノ酸を含むFc領域が好適に挙げられる。

[0319] 例えばこれらのアミノ酸の改変を単独、あるいは複数を組み合わせて用いることによって、IgGのFc領域のpH酸性域および/または中性域におけるFcRnに対する結合を増強することが可能であるが、導入されるアミノ酸改変は特に限定されず、血漿中滞留性を改善する効果がもたらされる限りにおいて、どのようなアミノ酸改変が導入されても良い。

[0320] 医薬組成物

可溶型抗原に対する既存の中和抗体を投与すると、抗原が抗体に結合することで血漿中での持続性が高まることが予想される。抗体は一般的に長い半減期（1週間～3週間）を有するが、一方で抗原は一般的に短い半減期（1日以下）を有する。そのため、血漿中で抗体に結合した抗原は、抗原単独で存在する場合に比べて顕著に長い半減期を有するようになる。その結果として、既存の中和抗体を投与することにより、血漿中の抗原濃度の上昇が起こる。このような事例は様々な可溶型抗原を標的とした中和抗体において報告されており、一例を挙げるとIL-6（J. Immunotoxicol. (2005) 3, 131-139）、amyloid beta (mAbs (2010) 2 (5), 1-13)、MCP-1 (ARTHRITIS & RHEUMATISM (2006) 54,2387-2392)、hepcidin (AAPS J. (2010) 4, 646-657)、sIL-6 receptor (Blood (2008) 112 (10), 3959-64) などがある。既存の中和抗体の投与により、ベースラインからおよそ10倍～1000倍程度（上昇の程度は、抗

原によって異なる）の血漿中総抗原濃度の上昇が報告されている。ここで、血漿中総抗原濃度とは、血漿中に存在する抗原の総量としての濃度を意味しており、すなわち抗体結合型と抗体非結合型の抗原濃度の和として表される。このような可溶型抗原を標的とした抗体医薬にとっては、血漿中総抗原濃度の上昇が起こることは好ましくない。なぜなら、可溶型抗原を中和するためには、少なくとも血漿中総抗原濃度を上回る血漿中抗体濃度が必要なためである。つまり、血漿中総抗原濃度が10倍～1000倍上昇するということは、それを中和するための血漿中抗体濃度（すなわち抗体投与量）としても、血漿中総抗原濃度の上昇が起こらない場合に比べて10倍～1000倍が必要になることを意味する。一方で、既存の中和抗体に比較して血漿中総抗原濃度を10倍～1000倍低下することができれば、抗体の投与量を同じだけ減らすことが可能である。このように、血漿中から可溶型抗原を消失させて、血漿中総抗原濃度を低下させることができる抗体は、既存の中和抗体に比較して顕著に有用性が高い。

[0321] 本発明は特定の理論により拘束されるものではないが、例えば、pH酸性域の条件下で抗原に対する結合活性がpH中性域の条件における抗原に対する結合活性よりも低いように、イオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインおよびpH中性域の条件下でヒトFcγレセプターに対する結合活性を有する抗体定常領域等のFcRn結合ドメインを含む抗原結合分子が生体に投与されたときに生体中の細胞への取込みが促進されることによって、一分子の抗原結合分子が結合可能な抗原の数が増加する理由、および、血漿中抗原濃度の消失が促進される理由はたとえば以下のように説明することが可能である。

[0322] 例えば、膜抗原に結合する抗体が生体内に投与された場合、当該抗体は抗原に結合した後、抗原に結合したまま抗原と一緒にインターナライゼーションによって細胞内のエンドソームに取り込まれる。その後、抗原に結合したままライソソームへ移行した抗体は、抗原とともにライソソームによって分解される。インターナライゼーションを介した血漿中からの消失は抗原依存

的な消失と呼ばれており、多くの抗体分子で報告されている（Drug Discov Today (2006) 11(1-2), 81-88）。一分子のIgG抗体が二価で抗原に結合した場合、一分子の抗体が二分子の抗原に結合した状態でインターナライズされ、そのままライソソームで分解される。従って、通常の抗体の場合、一分子のIgG抗体が三分子以上の抗原に結合することは出来ない。例えば、中和活性を有する一分子のIgG抗体の場合、三分子以上の抗原を中和することはできない。

[0323] IgG分子の血漿中滞留性が比較的長い（消失が遅い）のは、IgG分子のサルベージ受容体として知られているFcRnが機能しているためである。ピノサイトーシスによってエンドソームに取り込まれたIgG分子は、エンドソーム内の酸性条件下においてエンドソーム内に発現しているFcRnに結合する。FcRnに結合できなかったIgG分子はその後移行するライソソーム内で分解される。一方、FcRnに結合したIgG分子は細胞表面へ移行する。血漿中の中性条件下においてIgG分子はFcRnから解離するため、当該IgG分子は再び血漿中にリサイクルされる。

[0324] また抗原結合分子が可溶型抗原に結合する抗体の場合、生体内に投与された抗体は抗原に結合し、その後、抗体は抗原に結合したまま細胞内に取り込まれる。細胞内に取り込まれた抗体の多くはエンドソーム内でFcRnに結合した後に細胞表面に移行する。血漿中の中性条件下において抗体はFcRnから解離するため、細胞外に放出される。しかし、pH等のイオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化しない通常の抗原結合ドメインを含む抗体は抗原と結合したまま細胞外に放出される為、再度、抗原に結合することはできない。従って、膜抗原に結合する抗体と同様、pH等のイオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化しない通常の一分子のIgG抗体は三分子以上の抗原に結合することはできない。

[0325] 抗原に対して血漿中のpH中性域の条件下においては強く結合し、エンドソーム内のpH酸性域の条件下において抗原から解離するpH依存的に抗原に対して結合する抗体（抗原に対してpH中性域の条件下で結合し、pH酸性域の条件

下で解離する抗体）や抗原に対して血漿中の高カルシウムイオン濃度の条件下においては強く結合し、エンドソーム内の低カルシウムイオン濃度の条件下において抗原から解離するカルシウムイオン濃度依存的に抗原に対して結合する抗体（抗原に対して高カルシウムイオン濃度の条件下で結合し、低カルシウムイオン濃度の条件下で解離する抗体）はエンドソーム内で抗原から解離することが可能である。pH依存的に抗原に対して結合する抗体やカルシウムイオン濃度依存的に抗原に対して結合する抗体は、抗原を解離した後にFcRnによって血漿中にリサイクルされると、再び抗原に結合することが可能である。そのため一分子の抗体が複数の抗原分子に繰り返し結合することが可能となる。また、抗原結合分子に結合した抗原はエンドソーム内で抗体から解離することによって血漿中にリサイクルされずライソソーム内で分解される。こうした抗原結合分子を生体に投与することによって、抗原の細胞内への取込みが促進され、血漿中の抗原濃度を低下させることが可能となる。

[0326] 抗原に対して血漿中のpH中性域の条件下においては強く結合し、エンドソーム内のpH酸性域の条件下において抗原から解離するpH依存的に抗原に対して結合する抗体（抗原に対してpH中性域の条件下で結合し、pH酸性域の条件下で解離する抗体）や抗原に対して血漿中の高カルシウムイオン濃度の条件下においては強く結合し、エンドソーム内の低カルシウムイオン濃度の条件下において抗原から解離するカルシウムイオン濃度依存的に抗原に対して結合する抗体（抗原に対して高カルシウムイオン濃度の条件下で結合し、低カルシウムイオン濃度の条件下で解離する抗体）に、pH中性域の条件下（pH7.4）におけるFcγレセプターに対する結合能を付与するまたは増強することで、抗原結合分子が結合する抗原の細胞内への取込みがさらに促進される。すなわち、こうした抗原結合分子の生体への投与によって抗原の消失が促進され、血漿中の抗原濃度を低下させることが可能となる。pH依存的な抗原に対する結合能、またはカルシウムイオン濃度依存的な抗原に対する結合能を有しない通常の抗体およびその抗体－抗原複合体は、非特異的なエンドサイトーシスによって細胞に取り込まれ、エンドソーム内の酸性条件下でFcRnに結

合することで細胞表面に輸送され、細胞表面の中性条件下でFcRnから解離することによって血漿中にリサイクルされる。そのため、十分にpH依存的に抗原に対して結合する（pH中性域の条件下で結合し、pH酸性域の条件下で解離する）、または十分にカルシウムイオン濃度依存的に抗原に対して結合する（高カルシウムイオン濃度の条件下で結合し、低カルシウムイオン濃度の条件下で解離する）抗体が血漿中で抗原に結合し、エンドソーム内において結合している抗原を解離する場合、抗原の消失速度は非特異的なエンドサイトーシスによる抗体およびその抗体－抗原複合体の細胞への取込み速度と等しくなると考えられる。抗体と抗原間の結合のpH依存性またはカルシウムイオン濃度依存性が不十分な場合は、エンドソーム内において抗体から解離しない抗原も抗体とともに血漿中にリサイクルされてしまうが、pH依存性が十分な場合は、抗原の消失速度は非特異的なエンドサイトーシスによる細胞への取込み速度が律速となる。また、FcRnは抗体をエンドソーム内から細胞表面に輸送するため、FcRnの一部は細胞表面にも存在していると考えられる。

[0327] 本発明者らは、pH中性域の条件下でFcγレセプターに対する結合活性を有する、または当該結合活性が増強されたIgG型免疫グロブリンは、細胞表面に存在するFcγレセプターに結合することが可能であり、細胞表面に存在するFcγレセプターに結合することによって当該IgG型免疫グロブリンがFcγレセプター依存的に細胞に取り込まれると考えた。Fcγレセプターを介した細胞への取り込み速度は、非特異的なエンドサイトーシスによる細胞への取り込み速度よりも早い。そのため、pH中性域の条件下でFcγレセプターに対する結合能を増強することによって、抗原結合分子による抗原の消失速度をさらに速めることが可能であると考えられる。すなわち、pH中性域の条件下でFcγレセプターに対する結合能を有する抗原結合分子は、通常の（天然型ヒト）IgG型免疫グロブリンよりも速やかに抗原を細胞内に送り込み、エンドソーム内でFcRnに結合し抗原を解離した後に、再び血漿中にリサイクルされ、そこで再び抗原に結合し、またFcγレセプターを介して細胞内に取り込まれる。pH中性域の条件下でFcγレセプターに対する結合能を高くすることによっ

て、このサイクルの回転速度を速くすることが可能となるため、血漿中から抗原を消失させる速度が速くなる。更に抗原結合分子のpH酸性域の条件下で抗原に対する結合活性をpH中性域の条件下で抗原に対する結合活性より低下させることによって、更に血漿中から抗原を消失させる速度を高めることが可能である。またこのサイクルの回転速度を早くする結果生じるそのサイクルの数の増大によって、1分子の抗原結合分子が結合可能な抗原の分子数も多くなると考えられる。本発明の抗原結合分子は、抗原結合ドメインとFcγレセプター結合ドメインからなり、Fcγレセプター結合ドメインは抗原に対する結合に影響を与えることはないため、また、上述のメカニズムから考えても、抗原の種類に依存することがなく、抗原結合分子のpH酸性域または低カルシウムイオン濃度の条件等のイオン濃度の条件における抗原に対する結合活性（結合能）をpH中性域または高カルシウムイオン濃度の条件等のイオン濃度の条件における抗原に対する結合活性（結合能）より低下させ、および/または、血漿中でのpHにおけるFcγレセプターに対する結合活性を増大させることによって、抗原結合分子による抗原の細胞内への取込みを促進させ、抗原の消失速度を速くすることが可能であると考えられる。よって本発明の抗原結合分子は、抗原がもたらす副作用の低減、抗体の投与量の上昇、抗体の生体内の動態の改善、といった点で従来の治療用抗体よりも優れた効果を発揮すると考えられる。

[0328] 図１は、既存の中和抗体に比べて中性pHにおけるFcγレセプターに対する結合を増強したイオン濃度依存性抗原結合抗体の投与により、血漿中から可溶型抗原が消失するメカニズムの一様態を表している。以下、イオン濃度依存性抗原結合抗体の一例として水素イオン濃度（すなわちpH）依存性抗原結合抗体を例に挙げて説明するが、当該メカニズムは水素イオン濃度に限定されるものでは無い。pH依存的抗原結合能をもたない既存の中和抗体は、血漿中で可溶型抗原に結合した後、主に細胞との非特異的な相互作用により緩やかに取りこまれると考えられる。細胞内へと取り込まれた中和抗体と可溶型抗原の複合体は、酸性のエンドソームへと移行し、FcRnによって血漿中へと

リサイクルされる。一方、中性条件下におけるFcγレセプターに対する結合を増強したpH依存的抗原結合抗体は、血漿中で可溶型抗原に結合した後、非特異的な相互作用に加えて、Fcγレセプターとの相互作用を介して細胞膜上にFcγレセプターを発現している細胞の中へと速やかに取り込まれると考えられる。ここで、pH依存的抗原結合抗体に結合した可溶型抗原は、酸性のエンドソームの中で、pH依存的結合能により抗体から解離する。抗体から解離した可溶型抗原は、その後ライソソームへと移行し、タンパク質分解活性による分解を受ける。一方、可溶型抗原を解離した抗体は、酸性のエンドソームの中で、FcRnに結合した後に、FcRnによって細胞膜上へとリサイクルされ、再び血漿中に放出される。このようにリサイクルされてフリーとなった抗体は、他の可溶型抗原へと再度結合することができる。このようなFcγレセプターを介した細胞内への取り込み、可溶型抗原の解離と分解、抗体のリサイクル、といったサイクルを繰り返すことによって、このような中性条件下でのFcγレセプターに対する結合を増強したpH依存的抗原結合抗体は、大量の可溶型抗原をライソソームへと移行させて血漿中総抗原濃度を低下させることができる。

[0329] またすなわち、本発明は、本発明の抗原結合分子、本発明の改変方法により作製された抗原結合分子、または本発明の製造方法により製造された抗原結合分子を含む医薬組成物に関する。本発明の抗原結合分子または本発明の製造方法により製造された抗原結合分子はその投与により通常の抗原結合分子と比較して血漿中の抗原濃度を低下させる作用が高い上に、投与された生体による免疫応答や当該生体中の薬物動態等が改変されていることから医薬組成物として有用である。本発明の医薬組成物には医薬的に許容される担体が含まれ得る。

[0330] 本発明において医薬組成物とは、通常、疾患の治療もしくは予防、あるいは検査・診断のための薬剤をいう。

[0331] 本発明の医薬組成物は、当業者に公知の方法を用いて製剤化され得る。例えば、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸

濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用され得る。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤等と適宜組み合わせて、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化され得る。これら製剤における有効成分量は、指示された範囲の適当な容量が得られるように設定される。

[0332] 注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施にしたがって処方され得る。注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬（例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウム）を含む等張液が挙げられる。適切な溶解補助剤、例えばアルコール（エタノール等）、ポリアルコール（プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等）、非イオン性界面活性剤（ポリソルベート80（TM）、HCO-50等）が併用され得る。

[0333] 油性液としてはゴマ油、大豆油が挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル及び/またはベンジルアルコールも併用され得る。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液及び酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩酸プロカイン）、安定剤（例えば、ベンジルアルコール及びフェノール）、酸化防止剤と配合され得る。調製された注射液は通常、適切なアンプルに充填される。

[0334] 本発明の医薬組成物は、好ましくは非経口投与により投与される。例えば、注射剤型、経鼻投与剤型、経肺投与剤型、経皮投与型の組成物が投与される。例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などにより全身または局部的に投与され得る。

[0335] 投与方法は、患者の年齢、症状により適宜選択され得る。抗原結合分子を含有する医薬組成物の投与量は、例えば、一回につき体重1 kgあたり0.0001 mgから1000 mgの範囲に設定され得る。または、例えば、患者あたり0.001～100000 mgの投与量が設定され得るが、本発明はこれらの数値に必ずしも制限されるものではない。投与量及び投与方法は、患者の体重、年齢、症状など

により変動するが、当業者であればそれらの条件を考慮し適当な投与量及び投与方法を設定することが可能である。

[0336] なお、本発明に記載するアミノ酸配列に含まれるアミノ酸は翻訳後に修飾（例えば、N末端のグルタミンのピログルタミル化によるピログルタミン酸への修飾は当業者によく知られた修飾である）を受ける場合もあるが、そのようにアミノ酸が翻訳後修飾された場合であっても当然のことながら本発明に記載するアミノ酸配列に含まれる。

[0337] 本発明の抗原結合分子を用いる方法

また、本発明は、pH酸性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性を有し、イオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン、およびpH中性域の条件下でFcγレセプターに対する結合活性がEUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型Fcγレセプター結合ドメインのFcγレセプターに対する結合活性よりも高いFcγレセプター結合ドメインを含む抗原結合分子を、Fcγレセプターを発現する細胞に生体内または生体外で細胞に接触させることを含む、以下のいずれかの方法；

(i) 一分子の抗原結合分子が結合できる抗原の数を増加させる方法、

(ii) 血漿中抗原を消失させる方法、

(iii) 抗原結合分子の薬物動態を改善する方法、

(iv) 細胞外で抗原結合分子に結合した抗原の細胞内での抗原結合分子からの解離を促進する方法、

(v) 抗原と結合していない状態での抗原結合分子の細胞外への放出を促進する方法、または

(vi) 血漿中の総抗原濃度または遊離抗原濃度を減少させる方法

を提供する。

[0338] さらに本発明は、pH酸性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性を有し、イオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインおよびFcγレセプター結合ドメインを含む抗原結合分子におけるFcγレセプター結合ドメインのpH中性域の条件下でのFcγレセプターに対する結合活

性を、EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型Fcγレセプター結合ドメインのpH中性域の条件下でのFcγレセプターに対する結合活性よりも増強することを含む、以下のいずれかに記載の方法；

[0339] (i) 結合する抗原の細胞内への取込が促進された抗原結合分子の改変方法、
(ii) 一分子の抗原結合分子が結合できる抗原の数を増加させる方法、
(iii) 抗原結合分子の血漿中抗原消失能を増大させる方法、
(iv) 抗原結合分子の薬物動態を改善する方法、
(v) 細胞外で抗原結合分子に結合した抗原の細胞内での抗原結合分子からの解離を促進する方法、
(vi) 抗原と結合した状態で細胞内に取り込まれた抗原結合分子の、抗原と結合していない状態での細胞外への放出を促進する方法、または
(vii) 血漿中の総抗原濃度または遊離抗原濃度を減少することができる抗原結合分子の改変方法
を提供する。

[0340] 抗原結合分子を、Fcγレセプターを発現する細胞に生体内または生体外で細胞に接触させる方法としては、例えば、（１）抗原結合分子および抗原結合分子に結合する抗原を含む血漿を生体外にいったん取り出した後に、Fcγレセプターを発現する細胞と接触させ一定期間を経過して細胞外にリサイクル（再分泌または再循環ともいう）された、抗原を結合しない抗原結合分子を含む血漿を生体内に戻すいわゆるex vivoの方法、または、（２）抗原結合分子を生体内に投与する方法が挙げられる。また（１）の方法では、抗原結合分子に結合する抗原を含む血漿を生体外にいったん取り出した後に、抗原結合分子およびFcγレセプターを発現する細胞と接触させ一定期間を経過した血漿を生体内に戻す方法も利用され得る。

[0341] 本発明において、Fcγレセプターを発現する細胞は、所望のFcγレセプターが発現する細胞であればどのような細胞も使用され、特定の細胞に制限されない。所望のFcγレセプターを発現する細胞を特定するために、Human Protein Atlas (http://www.proteinatlas.org/) 等の公知のデータベースが用

いられる得る。また、所望のFcγレセプターをコードする遺伝子の発現を確認する手法により、また、所望のFcγレセプターに結合する抗体を用いる免疫学的手法により、本発明の抗原結合分子と接触するために用いられる細胞が当受容体を発現しているか否かが確認され得る。こうした手法もまた公知である。Fcγレセプターを発現する細胞と、抗原結合分子および当該抗原結合分子に結合する抗原との接触は、生体内でも行われるため、本発明において、Fcγレセプターを発現する細胞に抗原結合分子を接触させるとは、抗原結合分子を生体に投与することを含む。接触させる時間は、例えば、１分から数週間、３０分から１週間、１時間から３日、２時間から１日の間で適切な時間、すなわち抗原結合分子または当該抗原結合分子に結合する抗原がFcγレセプターを介したエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれるために必要な時間が適宜採用される。たとえば、Fcγレセプターを発現する細胞としては、各種の免疫細胞が使用され得る。

[0342] Fcγレセプター結合ドメインのpH中性域の条件下でのFcγレセプターに対する結合活性を、EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型Fcγレセプター結合ドメインのpH中性域の条件下でのFcγレセプターに対する結合活性よりも増強する方法は、後述する本発明の抗原結合分子の製造方法の項に記載されている。

[0343] 抗原結合分子が結合する抗原の細胞内への取込が促進された抗原結合分子の改変方法

本発明は、pH酸性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性を有し、イオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインおよびFcγレセプター結合ドメインを含む抗原結合分子におけるFcγレセプター結合ドメインのpH中性域の条件下でのFcγレセプターに対する結合活性を、EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型Fcγレセプター結合ドメインのpH中性域の条件下でのFcγレセプターに対する結合活性よりも増強することを含む、抗原結合分子が結合する抗原の細胞内への取込が促進された抗原結合分子の改変方法を提供する。

[0344] 本発明において、抗原結合分子による「抗原の細胞内への取込」とは、抗原がFcγレセプターを介したエンドサイトーシス、インターナライゼーションによって細胞内に取り込まれることを意味する。また本発明において「細胞内への取込を促進する」とは、血漿中において抗原と結合した抗原結合分子が細胞内に取り込まれる速度が促進され、および/または、取り込まれた抗原が血漿中にリサイクルされる量が減少することを意味し、抗原結合分子のpH中性域におけるFcγレセプターに対する結合活性の増大に加えて抗原結合分子のpH酸性域または低カルシウムイオン濃度等のイオン濃度の条件における抗原結合活性（結合能）をpH中性域または高カルシウムイオン濃度等のイオン濃度の条件における抗原結合活性より低下させる前の抗原結合分子と比較して、細胞内への取込速度が促進されていればよく、EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型のヒトIgGより促進されていることが好ましく、特に天然型のヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4のいずれかよりも促進されていることが好ましい。したがって、本発明において、抗原結合分子による抗原の細胞内への取り込みが促進されたかどうかは、抗原の細胞内への取り込み速度が増大したかどうかで判断することが可能である。抗原の細胞内への取り込み速度は、例えば、Fcγレセプター発現細胞を含む培養液に抗原結合分子と抗原を添加し、抗原の培養液中濃度の減少を経時的に測定すること、あるいは、Fcγレセプター発現細胞内に取り込まれた抗原の量を経時的に測定すること、により算出することができる。本発明の抗原結合分子の抗原の細胞内への取込速度を促進させる方法を利用することによって、例えば抗原結合分子を投与することによって、血漿中の抗原の消失速度を促進させることができる。したがって、抗原結合分子による抗原の細胞内への取込が促進されたかどうかは、例えば、血漿中に存在する抗原の消失速度が加速されているかどうか、あるいは、抗原結合分子の投与によって血漿中の総抗原濃度が低減されているかどうか、を測定することによっても確認することができる。

[0345] 本発明において、「血漿中総抗原濃度」とは、抗原結合分子結合抗原と非

結合抗原とを合計した濃度、または抗原結合分子非結合抗原濃度である「血漿中遊離抗原濃度」を意味する。「血漿中総抗原濃度」または「血漿中遊離抗原濃度」を測定するための様々な方法が、本明細書において以下に記載するように当技術分野において周知である。

[0346] 本発明において、「天然型のヒトIgG」とは、非修飾ヒトIgGを意味し、IgGの特定のクラスに限定されない。また、「天然型のヒトIgG」は、EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖であることが望ましい。これは、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4が、pH酸性域においてヒトFcRnに結合することができる限り、「天然型のヒトIgG」として用いられうることを意味する。好ましくは、「天然型のヒトIgG」はヒトIgG1でありうる。

[0347] 一分子の抗原結合分子が結合できる抗原の数を増加させる方法

本発明は、pH酸性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性を有し、イオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン、およびpH中性域の条件下でFcγレセプターに対する結合活性がEUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型Fcγレセプター結合ドメインのFcγレセプターに対する結合活性よりも高いFcγレセプター結合ドメインを含む抗原結合分子を、Fcγレセプターを発現する細胞に生体内または生体外で細胞に接触させることを含む、一分子の抗原結合分子が結合できる抗原の数を増加させる方法を提供する。

[0348] また、本発明は、pH酸性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性を有し、イオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインおよびFcγレセプター結合ドメインを含む抗原結合分子におけるFcγレセプター結合ドメインのpH中性域の条件下でのFcγレセプターに対する結合活性を、EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型Fcγレセプター結合ドメインのpH中性域の条件下でのFcγレセプターに対する結合活性よりも増強することを含む、一分子の抗原結合分子が結合できる抗原の数を増加させる方法を提供する。

[0349] 本発明における「一分子の抗原結合分子が結合できる抗原の数」とは、抗

原結合分子が分解されて消失するまでの間に結合することができる抗原の数のことを意味する。本発明における「一分子の抗原結合分子が結合できる抗原の数を増加させる」とは、抗原結合分子に結合した抗原分子が解離して再度抗原分子に結合する回数を増加させることをいう。抗原結合分子に結合する抗原分子は、両分子が存在する反応系において存在する同一の抗原分子でもあり得るし、異なる分子でもあり得る。すなわち、いい換えれば、当該反応系において抗原結合分子が抗原に結合する延べ回数を表す。別の表現では、抗原に結合した抗原結合分子が、抗原が結合した抗原結合分子が細胞内に取り込まれエンドソーム内で抗原を解離した後に、抗原結合分子が細胞外に戻ることを１サイクルと仮定したときに、抗原結合分子が分解されて消失するまでの間に回すことができるこのサイクルの数が増加することである。pH中性域におけるFcγレセプターに対する結合活性を有する本発明の抗原結合分子はFcγレセプターに結合した後に、エンドサイトーシスによって当該Fcγレセプターを発現する細胞の細胞内に取り込まれる。pH酸性域または低カルシウムイオン濃度等のイオン濃度の条件においてFcγレセプターから遊離した本発明の抗原結合分子はpH酸性域の条件においてFcRnに結合することによって、細胞外に再度リサイクルされる。pH酸性域または低カルシウムイオン濃度等のイオン濃度の条件において抗原結合分子から抗原が解離した上で、細胞外にリサイクルされる本発明の抗原結合分子は、抗原に再度結合することが可能となる。したがって、サイクル数が増えたかどうかは、前述の「細胞内への取込が促進」されているか否か、あるいは、後述の「薬物動態が向上」するか否かによって、判断され得る。

[0350] 血漿中抗原を消失させる方法または抗原結合分子の血漿中抗原の消失能を増大させる方法

本発明は、pH酸性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性を有し、イオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン、およびpH中性域の条件下でFcγレセプターに対する結合活性がEUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型Fcγレセプター結合ド

メインのFcγレセプターに対する結合活性よりも高いFcγレセプター結合ドメインを含む抗原結合分子を、Fcγレセプターを発現する細胞に生体内または生体外で細胞に接触させることを含む、血漿中抗原を消失させる方法を提供する。

[0351] また、本発明は、pH酸性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性を有し、イオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインおよびFcγレセプター結合ドメインを含む抗原結合分子におけるFcγレセプター結合ドメインのpH中性域の条件下でのFcγレセプターに対する結合活性を、EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型Fcγレセプター結合ドメインのpH中性域の条件下でのFcγレセプターに対する結合活性よりも増強することを含む抗原結合分子の血漿中抗原の消失能を増大させる方法を提供する。

[0352] 本発明において、「血漿中抗原消失能を増加させる方法」とは「抗原を血漿中から消失させる抗原結合分子の能力を増加させる方法」と同義である。

[0353] 本発明において、「血漿中抗原消失能」とは、抗原結合分子が生体内に投与された、あるいは、抗原結合分子が生体内で分泌された際に、血漿中に存在する抗原を血漿中から消失させる能力のことをいう。従って、本発明において、「抗原結合分子の血漿中抗原消失能が増加する」とは、抗原結合分子を投与した際に、抗原結合分子のpH中性域におけるFcγレセプターに対する結合活性の増大に加えてpH酸性域または低カルシウムイオン濃度等のイオン濃度の条件における抗原結合活性をpH中性域または高カルシウムイオン濃度における抗原結合活性より低下させる前と比較して、血漿中から抗原が消失する速さが速くなっていればよい。抗原結合分子の血漿中抗原消失能が増加したか否かは、例えば、可溶型抗原と抗原結合分子とを生体内に投与し、投与後の可溶型抗原の血漿中濃度を測定することにより判断することが可能である。抗原結合分子のpH中性域の条件下でFcγレセプターに対する結合活性を増大させる、あるいは、当該Fcγレセプターに対する結合活性の増大に加えてpH酸性域または低カルシウムイオン濃度等のイオン濃度の条件における

抗原結合活性をpH中性域または高カルシウムイオン濃度等のイオン濃度の条件における抗原結合活性より低下させることにより、可溶型抗原および抗原結合分子投与後の血漿中の可溶型抗原の濃度が低下している場合には、抗原結合分子の血漿中抗原消失能が増加したと判断することができる。可溶型抗原は、現に抗原結合分子が結合している抗原（抗原－抗原結合分子複合体の状態に置かれている抗原）であっても、または抗原結合分子が結合していない抗原であってもよく、その濃度はそれぞれ「血漿中抗原結合分子結合抗原濃度」および「血漿中抗原結合分子非結合抗原濃度」として決定することができる（後者は「血漿中遊離抗原濃度」と同義である）。「血漿中総抗原濃度」とは、抗原結合分子結合抗原と抗原結合分子非結合抗原とを合計した濃度、または抗原結合分子非結合抗原濃度である「血漿中遊離抗原濃度」を意味することから、可溶型抗原濃度は「血漿中総抗原濃度」として決定することができる。「血漿中総抗原濃度」または「血漿中遊離抗原濃度」を測定する様々な方法が、本明細書において以下に記載するように当技術分野において周知である。

[0354] 抗原結合分子の薬物動態を改善する方法

本発明は、pH酸性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性を有し、イオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン、およびpH中性域の条件下でFcγレセプターに対する結合活性がEUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型Fcγレセプター結合ドメインのFcγレセプターに対する結合活性よりも高いFcγレセプター結合ドメインを含む抗原結合分子を、Fcγレセプターを発現する細胞に生体内または生体外で細胞に接触させることを含む抗原結合分子の薬物動態を改善する方法を提供する。

[0355] また、本発明は、pH酸性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性を有し、イオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインおよびFcγレセプター結合ドメインを含む抗原結合分子におけるFcγレセプター結合ドメインのpH中性域の条件下でのFcγレセプターに対する結合活

性を、EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型Fcγレセプター結合ドメインのpH中性域の条件下でのFcγレセプターに対する結合活性よりも増強することを含む、抗原結合分子の薬物動態を改善する方法を提供する。

[0356] 本発明において、「薬物動態の向上」、「薬物動態の改善」、および「優れた薬物動態」は、「血漿中（血中）滞留性の向上」、「血漿中（血中）滞留性の改善」、「優れた血漿中（血中）滞留性」、「血漿中（血中）滞留性を長くする」と言い換えることが可能であり、これらの語句は同じ意味で使用される。

[0357] 本発明において「薬物動態が改善する」とは、抗原結合分子がヒト、またはマウス、ラット、サル、ウサギ、イヌなどの非ヒト動物に投与されてから、血漿中から消失するまで（例えば、細胞内で分解される等して抗原結合分子が血漿中に戻ることが不可能な状態になるまで）の時間が長くなることのみならず、抗原結合分子が投与されてから分解されて消失するまでの間に抗原に結合可能な状態（例えば、抗原結合分子が抗原に結合していない状態）で血漿中に滞留する時間が長くなることも含む。天然型IgGは、非ヒト動物由来のFcRnに結合することができる。例えば、天然型ヒトIgGはヒトFcRnよりマウスFcRnに強く結合することができることから（Int. Immunol. (2001) 13 (12), 1551-1559）、本発明の抗原結合分子の特性を確認する目的で、好ましくはマウスを用いて投与を行うことができる。別の例として、マウス本来のFcRn遺伝子が欠損されており、ヒトFcRn遺伝子に関するトランスジーンを有して発現するマウス（Methods Mol. Biol. (2010) 602, 93-104）もまた、以下に記載する本発明の抗原結合分子の特性を確認する目的で、投与を行う対象として用いることができる。具体的には、「薬物動態が改善する」とはまた、抗原に結合していない抗原結合分子（抗原非結合型抗原結合分子）が分解されて消失するまでの時間が長くなることを含む。抗原結合分子が血漿中に存在していても、その抗原結合分子にすでに抗原が結合している場合は、その抗原結合分子は新たな抗原に結合できない。そのため抗原結合分子が抗原

に結合していない時間が長くなれば、新たな抗原に結合できる時間が長くなり（新たな抗原に結合できる機会が多くなり）、生体内で抗原が抗原結合分子に結合していない時間を減少させることができ、抗原が抗原結合分子に結合している時間を長くすることができる。抗原結合分子の投与により血漿中からの抗原の消失を加速することができれば、抗原非結合型抗原結合分子の血漿中濃度は増加し、また、抗原が抗原結合分子に結合している時間が長くなる。つまり、本発明における「抗原結合分子の薬物動態の改善」とは、抗原非結合型抗原結合分子のいずれかの薬物動態パラメーターの改善（血漿中半減期の増加、平均血漿中滞留時間の増加、血漿中クリアランスの低下のいずれか）、あるいは、抗原結合分子投与後に抗原が抗原結合分子に結合している時間の延長、あるいは、抗原結合分子による血漿中からの抗原の消失が加速されること、を含む。抗原結合分子あるいは抗原非結合型抗原結合分子の血漿中半減期、平均血漿中滞留時間、血漿中クリアランス等のいずれかのパラメーター（ファーマコキネティクス　演習による理解（南山堂））を測定することにより判断することが可能である。例えば、抗原結合分子をマウス、ラット、サル、ウサギ、イヌ、ヒトなどに投与した場合、抗原結合分子あるいは抗原非結合型抗原結合分子の血漿中濃度を測定し、各パラメーターを算出し、血漿中半減期が長くなった又は平均血漿中滞留時間が長くなった場合等には、抗原結合分子の薬物動態が改善したと言える。これらのパラメーターは当業者に公知の方法により測定することが可能であり、例えば、薬物動態解析ソフトWinNonlin（Pharsight）を用いて、付属の手順書に従いノンコンパートメント（Noncompartmental）解析することによって適宜評価することができる。抗原に結合していない抗原結合分子の血漿中濃度の測定は当業者公知の方法で実施することが可能であり、例えば、公知の方法（Clin. Pharmacol. (2008) 48 (4), 406-417）において測定されている方法を用いることができる。

[0358] 本発明において「薬物動態が改善する」とは、抗原結合分子投与後に抗原が抗原結合分子に結合している時間が延長されたことも含む。抗原結合分子

投与後に抗原が抗原結合分子に結合している時間が延長されたか否かは、遊離抗原の血漿中濃度を測定し、遊離抗原の血漿中濃度、あるいは、総抗原濃度に対する遊離抗原濃度の割合が上昇してくるまでの時間により判断することが可能である。

[0359] 抗原結合分子に結合していない遊離抗原の血漿中濃度、あるいは、総抗原濃度に対する遊離抗原濃度の割合は当業者公知の方法で実施することが可能であり、例えば、Pharm. Res. (2006) 23 (1), 95-103において測定されている方法を用いることができる。また、抗原が何らかの機能を生体内で示す場合、抗原が抗原の機能を中和する抗原結合分子（アンタゴニスト分子）と結合しているかどうかは、その抗原の機能が中和されているかどうかを評価することによって判断することも可能である。抗原の機能が中和されているかどうかは、抗原の機能を反映する何らかの生体内マーカーを測定することによって評価することが可能である。抗原が抗原の機能を活性化する抗原結合分子（アゴニスト分子）と結合しているかどうかは、抗原の機能を反映する何らかの生体内マーカーを測定することによって評価することが可能である。

[0360] 遊離抗原の血漿中濃度の測定、血漿中の総抗原量に対する血漿中の遊離抗原量の割合の測定、生体内マーカーの測定などの測定は特に限定されないが、抗原結合分子が投与されてから一定時間が経過した後に行われることが好ましい。本発明において抗原結合分子が投与されてから一定時間が経過した後とは、特に限定されず、投与された抗原結合分子の性質等により当業者が適時決定することが可能であり、例えば抗原結合分子を投与してから1日経過後、抗原結合分子を投与してから3日経過後、抗原結合分子を投与してから7日経過後、抗原結合分子を投与してから14日経過後、抗原結合分子を投与してから28日経過後などを挙げることができる。本発明において、「血漿中抗原濃度」とは、抗原結合分子結合抗原と抗原結合分子非結合抗原とを合計した濃度である「血漿中総抗原濃度」、または抗原結合分子非結合抗原濃度である「血漿中遊離抗原濃度」のいずれかを意味する。

[0361] 血漿中総抗原濃度は、Fcγレセプター結合ドメインとしてEUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgG Fc領域を含む参照抗原結合分子を投与した場合と比較して、または本発明の抗原結合ドメインを含む抗原結合分子を投与しない場合と比較して、本発明の抗原結合分子の投与により、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、200倍、500倍、1000倍またはそれ以上低減しうる。

[0362] 抗原／抗原結合分子モル比は、以下に示す通りに算出することができる：

A値＝各時点での抗原のモル濃度

B値＝各時点での抗原結合分子のモル濃度

C値＝各時点での抗原結合分子のモル濃度あたりの抗原のモル濃度（抗原／抗原結合分子モル比）

C＝A/B。

[0363] C値がより小さいことは、抗原結合分子あたりの抗原消失効率がより高いことを示し、C値がより大きいことは、抗原結合分子あたりの抗原消失効率がより低いことを示す。

[0364] 抗原／抗原結合分子モル比は、上記のように算出することができる。

[0365] 抗原／抗原結合分子モル比は、ヒトFcγレセプター結合ドメインとして天然型ヒトIgG Fc領域を含む参照抗原結合分子を投与した場合と比較して、本発明の抗原結合分子の投与により2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、200倍、500倍、1000倍またはそれ以上低減しうる。

[0366] 本発明において、天然型ヒトIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4は、好ましくはFcγレセプター結合活性または生体内の活性に関して抗原結合分子と比較する参照天然型ヒトIgGの用途のための、天然型ヒトIgGとして用いられる。好ましくは、目的の抗原結合分子と同一の抗原結合ドメインおよびFcγレセプター結合ドメインとして天然型ヒトIgG Fc領域を含む参照抗原結合分子が適宜用いられ得る。より好ましくは、天然型ヒトIgG1は、Fcγレセプター結合活性または生体内の活性に関して抗原結合分子と比較する参照天然型ヒトIgG用途に用いられる。また、本発明において、本発明の抗原結合分子と比較

する参照抗原結合分子として、抗原に対する結合活性がイオン濃度によって変化しない抗原結合ドメインを含む抗原結合分子、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性が増強されていないFcRn結合ドメインを含む抗原結合分子、またはFcγレセプターに対する選択的な結合活性を有しないFcγレセプター結合ドメインを含む抗原結合分子、等もその目的に応じて適宜用いられる。

[0367] 血漿中総抗原濃度または抗原／抗体モル比の減少は、実施例6、8および13に記載の通りに評価することができる。より具体的には、抗原結合分子がマウスカウンターパート抗原と交差反応しない場合は、ヒトFcRnトランスジェニックマウス系統32または系統276（Jackson Laboratories, Methods Mol Biol. 2010; 602: 93-104）を用い、抗原抗体同時投与モデルまたは定常状態抗原注入モデルのいずれかによって評価することができる。抗原結合分子がマウスカウンターパートと交差反応する場合は、ヒトFcRnトランスジェニックマウス系統32または系統276（Jackson Laboratories）に抗原結合分子を単に投与することによって評価することができる。同時投与モデルでは、抗原結合分子と抗原の混合物をマウスに投与する。定常状態抗原注入モデルでは、一定の血漿中抗原濃度を達成するためにマウスに抗原溶液を充填した注入ポンプを埋め込んで、次に抗原結合分子をマウスに投与する。試験抗原結合分子を同じ用量で投与する。血漿中総抗原濃度、血漿中遊離抗原濃度、および血漿中抗原結合分子濃度を、当業者公知の方法を用いて適切な時点で測定する。

[0368] Fcγレセプターに対する選択的な結合活性を有するFcγレセプター結合ドメインの影響を評価する場合において、血漿中総抗原濃度または抗原/抗体モル比の減少は、抗原結合分子がマウスカウンターパート抗原と交差反応しない場合は、通常用いられるC57BL/6Jマウス（Charles River Japan）を用い、抗原抗体同時注射モデルまたは定常状態抗原注入モデルのいずれかによって評価することもできる。抗原結合分子がマウスカウンターパートと交差反応する場合は、通常用いられるC57BL/6Jマウス（Charles River Japan）に抗原

結合分子を単に注射することによって評価することもできる。

[0369] 投与2日後、4日後、7日後、14日後、28日後、56日後、または84日後に血漿中の総抗原濃度または遊離抗原濃度および抗原／抗原結合分子モル比を測定して、本発明の長期効果を評価することができる。言い換えれば、本発明の抗原結合分子の特性を評価する目的で、長期間の血漿中抗原濃度が、抗原結合分子の投与2日後、4日後、7日後、14日後、28日後、56日後、または84日後に血漿中の総抗原濃度または遊離抗原濃度および抗原／抗原結合分子モル比を測定することによって決定される。本発明に記載の抗原結合分子によって血漿中抗原濃度または抗原／抗原結合分子モル比の減少が達成されるか否かは、先に記載した任意の1つまたは複数の時点でその減少を評価することにより決定されうる。

[0370] 投与15分後、1時間後、2時間後、4時間後、8時間後、12時間後、または24時間後に、血漿中の総抗原濃度または遊離抗原濃度および抗原／抗原結合分子モル比を測定して、本発明の短期効果を評価することができる。言い換えれば、本発明の抗原結合分子の特性を評価する目的で、短期間の血漿中抗原濃度が、抗原結合分子の投与15分後、1時間後、2時間後、4時間後、8時間後、12時間後、または24時間後に血漿中の総抗原濃度または遊離抗原濃度および抗原／抗原結合分子モル比を測定することによって決定される。

[0371] 本発明の抗原結合分子の投与経路は、皮内注射、静脈内注射、硝子体内注射、皮下注射、腹腔内注射、非経口注射、および筋肉内注射から選択することができる。

[0372] 本発明においては、ヒトにおける薬物動態が改善することが好ましい。ヒトでの血漿中滞留性を測定することが困難である場合には、マウス（例えば、正常マウス、ヒト抗原発現トランスジェニックマウス、ヒトFcRn発現トランスジェニックマウス、等）またはサル（例えば、カニクイザルなど）での血漿中滞留性をもとに、ヒトでの血漿中滞留性を予測することができる。

[0373] 細胞外で抗原結合分子に結合した抗原の細胞内での抗原結合分子からの解離を促進する方法

本発明は、pH酸性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性を有し、イオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン、およびpH中性域の条件下でFcγレセプターに対する結合活性がEUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型Fcγレセプター結合ドメインのFcγレセプターに対する結合活性よりも高いFcγレセプター結合ドメインを含む抗原結合分子を、Fcγレセプターを発現する細胞に生体内または生体外で細胞に接触させることを含む、細胞外で抗原結合分子に結合した抗原の細胞内での抗原結合分子からの解離を促進する方法を提供する。

[0374] 本発明は、pH酸性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性を有し、イオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインおよびFcγレセプター結合ドメインを含む抗原結合分子におけるFcγレセプター結合ドメインのpH中性域の条件下でのFcγレセプターに対する結合活性を、EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型Fcγレセプター結合ドメインのpH中性域の条件下でのFcγレセプターに対する結合活性よりも増強することを含む、細胞外で抗原結合分子に結合した抗原の細胞内での抗原結合分子からの解離を促進する方法を提供する。

[0375] 本発明において抗原が抗原結合分子から解離する箇所は細胞内であればいかなる箇所でもよいが、好ましくは早期エンドソーム内である。本発明において、「細胞外で抗原結合分子に結合した抗原の細胞内での抗原結合分子からの解離」とは、抗原結合分子に結合して細胞内に取り込まれた抗原全てが細胞内で抗原結合分子から解離する必要はなく、抗原結合分子のpH酸性域または低カルシウムイオン濃度等のイオン濃度の条件における抗原結合活性をpH中性域または高カルシウムイオン濃度等のイオン濃度の条件における抗原結合活性よりも低くし、かつ、pH中性域におけるFcγレセプターに対する結合活性を高める前と比較して、細胞内で抗原結合分子から解離する抗原の割合が高くなっていればよい。また、細胞外で抗原結合分子に結合した抗原の細胞内での抗原結合分子からの解離を促進させる方法は、抗原と結合した抗原結合分子の細胞内への取込を促進させ、細胞内での抗原結合分子からの抗原

の解離が促進されやすくなる性質を抗原結合分子に付与する方法ともいえる。

[0376] 抗原と結合していない状態での抗原結合分子の細胞外への放出を促進する方法

本発明は、pH酸性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性を有し、イオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン、およびpH中性域の条件下でFcγレセプターに対する結合活性がEUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型Fcγレセプター結合ドメインのFcγレセプターに対する結合活性よりも高いFcγレセプター結合ドメインを含む抗原結合分子を、Fcγレセプターを発現する細胞に生体内または生体外で細胞に接触させることを含む、抗原と結合していない状態での抗原結合分子の細胞外への放出を促進する方法を提供する。

[0377] また、本発明は、pH酸性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性を有し、イオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインおよびFcγレセプター結合ドメインを含む抗原結合分子におけるFcγレセプター結合ドメインのpH中性域の条件下でのFcγレセプターに対する結合活性を、EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型Fcγレセプター結合ドメインのpH中性域の条件下でのFcγレセプターに対する結合活性よりも増強することを含む、抗原と結合した状態で細胞内に取り込まれた抗原結合分子の、抗原と結合していない状態での細胞外への放出を促進する方法を提供する。

[0378] 本発明において、「抗原と結合した状態で細胞内に取り込まれた抗原結合分子の、抗原と結合していない状態での細胞外への放出」とは、抗原と結合した状態で細胞内に取り込まれた抗原結合分子全てが抗原と結合していない状態で細胞外に放出される必要はなく、抗原結合分子のpH酸性域または低カルシウムイオン濃度等のイオン濃度の条件における抗原結合活性をpH中性域または高カルシウムイオン濃度等のイオン濃度の条件における抗原結合活性より低くし、pH中性域におけるFcγレセプターに対する結合活性を高くする

前と比較して、抗原と結合していない状態で細胞外に放出される抗原結合分子の割合が高くなっていればよい。細胞外に放出された抗原結合分子は、抗原結合活性を維持していることが好ましい。また、抗原と結合した状態で細胞内に取り込まれた抗原結合分子の抗原と結合していない状態での細胞外への放出を促進させる方法は、抗原と結合した抗原結合分子の細胞内への取り込みを促進させ、抗原結合分子の抗原と結合していない状態での細胞外への放出が促進されやすくなる性質を抗原結合分子に付与する方法ともいえる。

[0379] 血漿中の総抗原濃度または遊離抗原濃度を減少させる方法または血漿中の総抗原濃度または遊離抗原濃度を減少することができる抗原結合分子の改変方法

本発明は、pH酸性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性を有し、イオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン、およびpH中性域の条件下でFcγレセプターに対する結合活性がEUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型Fcγレセプター結合ドメインのFcγレセプターに対する結合活性よりも高いFcγレセプター結合ドメインを含む抗原結合分子を、Fcγレセプターを発現する細胞に生体内または生体外で細胞に接触させることを含む、血漿中の総抗原濃度または遊離抗原濃度を減少させる方法を提供する。

[0380] また、本発明は、pH酸性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性を有し、イオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインおよびFcγレセプター結合ドメインを含む抗原結合分子におけるFcγレセプター結合ドメインのpH中性域の条件下でのFcγレセプターに対する結合活性を、EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型Fcγレセプター結合ドメインのpH中性域の条件下でのFcγレセプターに対する結合活性よりも増強することを含む、血漿中の総抗原濃度または遊離抗原濃度を減少することができる抗原結合分子の改変方法を提供する。

[0381] 血漿中の総抗原濃度または遊離抗原濃度の減少を評価する方法は、前記の抗原結合分子の薬物動態を改善する方法の項において記載されている。

[0382] 血漿中から当該抗原を消失させるためのex vivoの方法

本発明によって提供される、血漿中から当該抗原を消失させるための方法における抗原結合分子の使用の非限定な一態様として、対象から単離された血漿を本発明の抗原結合分子と接触せしめ形成させた免疫複合体を、FcRnおよびFcγレセプターを発現する細胞に接触させることを含む、血漿中から当該抗原を消失させるための、いわゆるex vivoの方法における当該抗原結合分子の使用も例示される。抗原結合分子を生体内に投与する方法に代えて/と組み合わせて、抗原結合分子および抗原結合分子に結合する抗原を含む血漿を生体外にいったん取り出した後に、FcRnおよびFcγレセプターを発現する細胞と接触させ一定期間を経過して細胞外にリサイクル（再分泌または再循環ともいう）された、抗原を結合しない抗原結合分子を含む血漿を生体内に戻すいわゆるex vivoの方法によっても、血漿中の抗原の消失速度を促進させることができる。

[0383] また、本発明によって提供される、血漿中から当該抗原を消失させるための方法における抗原結合分子の使用の非限定な一態様として、本発明の抗原結合分子が投与された対象から単離された血漿中に存在する免疫複合体を、FcRnおよびFcγレセプターを発現する細胞に接触させることを含む、血漿中から当該抗原を消失させるための、いわゆるex vivoの方法における当該抗原結合分子の使用も例示される。

[0384] 当該抗原が血漿から消失しているか否かは、前述の血漿中の抗原の消失速度が、本発明の抗原結合分子の代わりに、抗原に対する結合活性がイオン濃度によって変化しない抗原結合ドメインを含む抗原結合分子、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性が増強されていないFcRn結合ドメインを含む抗原結合分子、またはFcγレセプターに対する選択的な結合活性を有しないFcγレセプター結合ドメインを含む抗原結合分子、を対照として比較したときに促進されているか否かを評価すること等によって確認され得る。

[0385] 抗原結合分子の製造方法

また本発明は、pH酸性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性を有し、イ

オン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン、およびpH中性域の条件下でFcγレセプターに対する結合活性がEUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型Fcγレセプター結合ドメインのFcγレセプターに対する結合活性よりも高いFcγレセプター結合ドメインを含む抗原結合分子の製造方法を提供する。

[0386] すなわち本発明は以下(a)～(f)の工程、

(a) 高カルシウムイオン濃度の条件における抗原結合ドメインの抗原に対する結合活性を得る工程、

(b) 低カルシウムイオン濃度の条件における抗原結合ドメインの抗原に対する結合活性を得る工程、

(c) (a)で得られた抗原結合活性が(b)で得られた抗原結合活性より高い抗原結合ドメインを選択する工程、

(d) (c)で選択された抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドを、pH酸性域においてヒトFcRnに対する結合活性を有し、pH中性域の条件下でFcγレセプターに対する結合活性がEUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型Fcγレセプター結合ドメインのFcγレセプターに対する結合活性よりも高いFcγレセプター結合ドメインをコードするポリヌクレオチドに連結させる工程、

(e) (d)で得られたポリヌクレオチドが作用可能に連結されたベクターが導入された細胞を培養する工程、および

(f) (e)で培養された細胞の培養液から抗原結合分子を回収する工程、

を含む抗原結合分子の製造方法を提供する。

[0387] また本発明は以下(a)～(f)の工程、

(a) 高カルシウムイオン濃度の条件における抗体の抗原に対する結合活性を得る工程、

(b) 低カルシウムイオン濃度の条件における抗体の抗原に対する結合活性を得る工程、

(c) (a)で得られた抗原結合活性が(b)で得られた抗原結合活性より高い抗体

を選択する工程、

(d) (c)で選択された抗体の抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドを、pH酸性域においてヒトFcRnに対する結合活性を有し、pH中性域の条件下でFcγレセプターに対する結合活性がEUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型Fcγレセプター結合ドメインのFcγレセプターに対する結合活性よりも高いFcγレセプター結合ドメインをコードするポリヌクレオチドに連結させる工程、

(e) (d)で得られたポリヌクレオチドが作用可能に連結されたベクターが導入された細胞を培養する工程、および

(f) (e)で培養された細胞の培養液から抗原結合分子を回収する工程、

を含む抗原結合分子の製造方法を提供するものである。

[0388] さらに本発明は以下(a)～(f)の工程、

(a) pH中性域の条件における抗原結合ドメインの抗原に対する結合活性を得る工程、

(b) pH酸性域の条件における抗原結合ドメインの抗原に対する結合活性を得る工程、

(c) (a)で得られた抗原結合活性が(b)で得られた抗原結合活性より高い抗原結合ドメインを選択する工程、

(d) (c)で選択された抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドを、pH酸性域においてヒトFcRnに対する結合活性を有し、pH中性域の条件下でFcγレセプターに対する結合活性がEUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型Fcγレセプター結合ドメインのFcγレセプターに対する結合活性よりも高いFcγレセプター結合ドメインをコードするポリヌクレオチドに連結させる工程、

(e) (d)で得られたポリヌクレオチドが作用可能に連結されたベクターが導入された細胞を培養する工程、および

(f) (e)で培養された細胞の培養液から抗原結合分子を回収する工程、

を含む抗原結合分子の製造方法を提供するものである。

[0389] 加えて本発明は以下(a)～(f)の工程、

(a) pH中性域の条件における抗体の抗原に対する結合活性を得る工程、

(b) pH酸性域の条件における抗体の抗原に対する抗原結合活性を得る工程、

(c) (a)で得られた抗原結合活性が(b)で得られた抗原結合活性より高い抗体を選択する工程、

(d) (c)で選択された抗体の抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドを、pH酸性域においてヒトFcRnに対する結合活性を有し、pH中性域の条件下でFcγレセプターに対する結合活性がEUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型Fcγレセプター結合ドメインのFcγレセプターに対する結合活性よりも高いFcγレセプター結合ドメインをコードするポリヌクレオチドに連結させる工程、

(e) (d)で得られたポリヌクレオチドが作用可能に連結されたベクターが導入された細胞を培養する工程、および

(f) (e)で培養された細胞の培養液から抗原結合分子を回収する工程、

を含む抗原結合分子の製造方法を提供するものである。

[0390] 「細胞」、「細胞系」および「細胞培養」は本明細書では同義で使われ、そのような呼称には細胞または細胞系のすべての子孫が含まれ得る。このように、例えば、「形質転換体」および「形質転換細胞」のような用語には、継代数に関係なくそれらに由来する一次対象細胞および培養物が含まれる。また、故意または偶発的な突然変異によって、すべての子孫においてDNAの内容が正確に同一であるというわけではないこともまた理解される。当初の形質転換細胞でスクリーニングされたような、実質的に同じ機能または生物学的活性を有する変異体の子孫も含まれ得る。異なった呼称を意図する記載である場合は、当該記載の前後関係からそのような意図は明白となるであろう。

[0391] コード配列の発現に言及する場合の制御配列とは、特定の宿主生物で作用可能に連結したコード配列の発現のために必要なDNA塩基配列をいう。例えば原核生物に好適な制御配列には、プロモーター、場合によってはオペレータ

一配列、リボソーム結合部位、およびおそらくはまだよく理解されていない他の配列が含まれる。真核細胞ではコード配列の発現のために、プロモーター、ポリアデニル化シグナルおよびエンハンサーを利用することが公知である。

[0392] 核酸に関して「作用可能に連結した」は、その核酸が他の核酸配列と機能的な関係にあることを意味する。例えば、プレシーケンス（presequence）または分泌リーダーのDNAは、あるポリペプチドの分泌に関わっている前駆体タンパク質として発現する場合は、そのポリペプチドのDNAと作動可能的に結合している。プロモーターまたはエンハンサーは、それがあるコード配列の転写に影響する場合はその配列と作用可能に連結している。または、リボソーム結合部は、それが翻訳を容易にする位置にある場合は作用可能にコード配列と連結している。通常、「作用可能に連結した」は、結合したDNA配列が連続しており、分泌リーダーの場合は連続して読取り枠内にあることを意味する。しかし、エンハンサーは連続する必要はない。連結は適切な制限部位でライゲーションによって達成される。このような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーが、従来の慣行に従って使用される。また前記のOverlap Extension PCRの手法によっても連結された核酸が作製され得る。

[0393] 「ライゲーション」は、2つの核酸断片の間でリン酸ジエステル結合を形成する方法である。2つの断片のライゲーションのために、断片の末端は互いに適合していなければならない。場合によっては、この末端はエンドヌクレアーゼ消化の後に直ちに適合性を有する。しかし、ライゲーションに適合させるために、まずエンドヌクレアーゼ消化の後に一般的に形成される付着末端は平滑末端に変えられる必要がある。平滑末端にするためには、DNAが適切な緩衝液中で15℃にて少なくとも15分間、4つのデオキシリボヌクレオチド三リン酸の存在下でDNAポリメラーゼＩまたはT4DNAポリメラーゼのクレノー断片の約10単位で処理される。次にDNAがフェノールクロロホルム抽出とエタノール沈殿、またはシリカ精製によって精製される。連結すべきDNA断片が溶液に

等モル量加えられる。この溶液には、ATP、リガーゼ緩衝に加え、T4DNAリガーゼのようなリガーゼがDNA0.5 μgにつき約10単位含まれる。DNAをベクターに連結する場合は、ベクターは適当な制限エンドヌクレアーゼによる消化作用によってまず線状にされる。線状にされた断片を次に細菌のアルカリホスファターゼまたは仔ウシ腸管のホスファターゼで処理することによって、ライゲーションのステップの間の当該断片のセルフライゲーションが予防される。

[0394] 本発明の製造方法においては、上記の「イオン濃度の条件」の項で説明される方法によって選択された、高カルシウムイオン濃度の条件における抗原に対する結合活性よりも、低カルシウムイオン濃度の条件における抗原に対する結合活性よりも高い抗原結合ドメインまたは抗体が単離される。また、上記の「イオン濃度の条件」の項で説明される方法によって選択された、pH酸性域の条件における抗原に対する結合活性よりも、pH中性域の条件における抗原に対する結合活性よりも高い抗原結合ドメインまたは抗体が単離される。たとえば、このように単離された抗原結合ドメインがライブラリから選択された場合には、後述する実施例に記載されているように、当該抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドはファージ等のウイルスから通常の遺伝子増幅によって単離される。また、このように単離された抗原結合ドメインまたは抗体がハイブリドーマ等の細胞の培養液から選択された場合には、前記の抗体の項で示したように当該細胞から抗体遺伝子等が通常の遺伝子増幅によって単離される。

[0395] 次に、上記に記載したように単離された、抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドが、pH酸性域においてヒトFcRnに対する結合活性を有し、pH中性域の条件下でFcγレセプターに対する結合活性がEUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型Fcγレセプター結合ドメインのFcγレセプターに対する結合活性よりも高いFcγレセプター結合ドメインをコードするポリヌクレオチドにインフレームで連結される。前記のFcγレセプター結合ドメインの項で記載したように、Fcγレセプター結合ドメイ

ンの好適な例としては抗体のFc領域が挙げられる。また、Fcγレセプターとしてはγ RIa、γ RIIa(R)、γ RIIa(H)、γ RIIbまたはγ RIIIa(V)、γ RIIIa(F)のいずれかが挙げられる。

[0396] 抗体のFc領域としては、Fc領域のEUナンバリングで表される部位のうち、221位、222位、223位、224位、225位、227位、228位、230位、231位、232位、233位、234位、235位、236位、237位、238位、239位、240位、241位、243位、244位、245位、246位、247位、249位、250位、251位、254位、255位、256位、258位、260位、262位、263位、264位、265位、266位、267位、268位、269位、270位、271位、272位、273位、274位、275位、276位、278位、279位、280位、281位、282位、283位、284位、285位、286位、288位、290位、291位、292位、293位、294位、295位、296位、297位、298位、299位、300位、301位、302位、303位、304位、305位、311位、313位、315位、317位、318位、320位、322位、323位、324位、325位、326位、327位、328位、329位、330位、331位、332位、333位、334位、335位、336位、337位、339位、376位、377位、378位、379位、380位、382位、385位、392位、396位、421位、427位、428位、429位、434位、436位および440位の群から選択される少なくともひとつ以上のアミノ酸が、天然型Fc領域の対応する部位のアミノ酸と異なるFc領域が好適に挙げられる。天然型Fc領域としてはIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4のいずれかのFc領域が好適に挙げられる。

[0397] また、非限定の一態様では、抗体のFc領域としては、Fc領域のEUナンバリングで表される；

221位のアミノ酸がLysまたはTyrのいずれか、

222位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはTyrのいずれか、

223位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはLysのいずれか、

224位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはTyrのいずれか、

225位のアミノ酸がGlu、LysまたはTrpのいずれか、

227位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

228位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

230位のアミノ酸がAla、Glu、GlyまたはTyrのいずれか、

231位のアミノ酸がGlu、Gly、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

232位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

233位のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

234位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

235位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

236位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

237位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

238位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

239位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

240位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

241位のアミノ酸がAsp、Glu、Leu、Arg、TrpまたはTyrのいずれか、

243位のアミノ酸がLeu、Glu、Leu、Gln、Arg、TrpまたはTyrのいずれか、

244位のアミノ酸がHis、

245位のアミノ酸がAla、

246位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、

247位のアミノ酸がAla、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

249位のアミノ酸がGlu、His、GlnまたはTyrのいずれか、

250位のアミノ酸がGluまたはGlnのいずれか、

251位のアミノ酸がPhe、

254位のアミノ酸がPhe、MetまたはTyrのいずれか、

255位のアミノ酸がGlu、LeuまたはTyrのいずれか、

256位のアミノ酸がAla、MetまたはProのいずれか、

258位のアミノ酸がAsp、Glu、His、SerまたはTyrのいずれか、

260位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、

262位のアミノ酸がAla、Glu、Phe、IleまたはThrのいずれか、

263位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

264位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、

265位のアミノ酸がAla、Leu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

266位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

267位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

268位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Thr、ValまたはTrpのいずれか、

269位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

270位のアミノ酸がGlu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、

271位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

272位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

273位のアミノ酸がPheまたはIleのいずれか、

274位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

275位のアミノ酸がLeuまたはTrpのいずれか、

276位のアミノ酸が、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

278位のアミノ酸がAsp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、ValまたはTrpのいずれか、

279位のアミノ酸がAla、

280位のアミノ酸がAla、Gly、His、Lys、Leu、Pro、Gln、TrpまたはTyrのいずれか、

281位のアミノ酸がAsp、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

282位のアミノ酸がGlu、Gly、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

283位のアミノ酸がAla、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、ArgまたはTyrのいずれか、

284位のアミノ酸がAsp、Glu、Leu、Asn、ThrまたはTyrのいずれか、

285位のアミノ酸がAsp、Glu、Lys、Gln、TrpまたはTyrのいずれか、

286位のアミノ酸がGlu、Gly、ProまたはTyrのいずれか、

288位のアミノ酸がAsn、Asp、GluまたはTyrのいずれか、

290位のアミノ酸がAsp、Gly、His、Leu、Asn、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、291位のアミノ酸がAsp、Glu、Gly、His、Ile、GlnまたはThrのいずれか、

292位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Pro、ThrまたはTyrのいずれか、

293位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

294位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

295位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

296位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、ThrまたはValのいずれか、

297位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gl

n、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

298位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

299位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

300位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、ValまたはTrpのいずれか、

301位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、

302位のアミノ酸がIle、

303位のアミノ酸がAsp、GlyまたはTyrのいずれか、

304位のアミノ酸がAsp、His、Leu、AsnまたはThrのいずれか、

305位のアミノ酸がGlu、Ile、ThrまたはTyrのいずれか、

311位のアミノ酸がAla、Asp、Asn、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

313位のアミノ酸がPhe、

315位のアミノ酸がLeu、

317位のアミノ酸がGluまたはGln、

318位のアミノ酸がHis、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

320位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Asn、Pro、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

322位のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Pro、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

323位のアミノ酸がIle、

324位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

325位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

326位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Se

r、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

327位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

328位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

329位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

330位のアミノ酸がCys、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

331位のアミノ酸がAsp、Phe、His、Ile、Leu、Met、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

332位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

333位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Ser、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

334位のアミノ酸がAla、Glu、Phe、Ile、Leu、ProまたはThrのいずれか、

335位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

336位のアミノ酸がGlu、LysまたはTyrのいずれか、

337位のアミノ酸がGlu、HisまたはAsnのいずれか、

339位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、SerまたはThrのいずれか、

376位のアミノ酸がAlaまたはValのいずれか、

377位のアミノ酸がGlyまたはLysのいずれか、

378位のアミノ酸がAsp、

379位のアミノ酸がAsn、

380位のアミノ酸がAla、AsnまたはSerのいずれか、

382位のアミノ酸がAlaまたはIleのいずれか、

385位のアミノ酸がGlu、

392位のアミノ酸がThr、

396位のアミノ酸がLeu、

421位のアミノ酸がLys、

427位のアミノ酸がAsn、

428位のアミノ酸がPheまたはLeuのいずれか、

429位のアミノ酸がMet、

434位のアミノ酸がTrp、

436位のアミノ酸がIle、および

440位のアミノ酸がGly、His、Ile、LeuまたはTyrのいずれか、

の群から選択される少なくともひとつ以上のアミノ酸を含むFc領域が好適に挙げられる。

[0398] また、さらに本発明のFc領域は、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有する、または増強されたFc領域が好適に使用され得る。こうしたFc領域としては、IgG型免疫グロブリンのFc領域、例えばヒトIgG（IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4、およびそれらの改変体）のFc領域が挙げられる。他のアミノ酸への改変体は、pH酸性域におけるFcRnに対する結合活性を有する、もしくはpH酸性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性を高められるかぎり、いかなる位置のアミノ酸が改変されたFc領域が使用され得るが、抗原結合分子が、Fc領域としてヒトIgG1のFc領域を含んでいる場合、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合が、ヒトIgG1の出発Fc領域の結合活性より増強する効果をもたらす改変が含まれていることが好ましい。そのような改変が可能なアミノ酸として、例えば、WO2000/042072に記載されるように、EUナンバリングで表される238位、252位、253位、254位、255位、256位、265位、272位、286位、288位、303位、305位、307位、309位、311位、312位、317位、340位、356位、360位、362位、376位、378位、380位、382位、386位、388位、400位、413位、415位、424位、433位、434位、435位、436位、439位および/または447位のアミノ酸が好適に挙げられる。同様に、そのような改変が可能なアミノ酸

として、例えばWO2002/060919に記載されているように、EUナンバリングで表される251位、252位、254位、255位、256位、308位、309位、311位、312位、385位、386位、387位、389位、428位、433位、434位および/または436位のアミノ酸も好適に挙げられる。さらに、そのような改変が可能なアミノ酸として、WO2004/092219に記載されているように、EUナンバリングで表される250位、314位および428位のアミノ酸も挙げられる。また、そのような改変が可能なアミノ酸として、例えばWO2010/045193に記載されているように、EUナンバリングで表される251位、252位、307位、308位、378位、428位、430位、434位および/または436位のアミノ酸も好適に挙げられる。これらのアミノ酸の改変によって、IgG型免疫グロブリンのFc領域のpH酸性域におけるFcRnに対する結合が増強されたFc領域が本発明の製造方法に使用され得る。

[0399] また、後述するように、本発明の抗原結合分子に含まれるFc領域としては、pH中性域におけるFcRnに対する結合活性を有するFc領域も好適に使用され得る。前記のpH酸性域におけるFcRnに対する結合活性を有するFc領域が取得される方法に準じて、そのようなFc領域はいかなる方法によっても取得され得るが、具体的には、出発Fc領域として用いられるヒトIgG型免疫グロブリンのFc領域のアミノ酸の改変によってpH中性域におけるFcRnに対する結合活性を有する、または増強されたFcRn結合ドメインを含むFc領域が取得され得る。改変のための好ましいIgG型免疫グロブリンのFc領域としては、例えばヒトIgG（IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4、およびそれらの改変体）のFc領域が挙げられる。他のアミノ酸への改変は、pH中性域におけるFcRnに対する結合活性を有する、もしくは中性域におけるヒトFcRnに対する結合活性を高められるかぎり、いかなる位置のアミノ酸が改変されたFc領域も使用され得る。抗原結合分子が、Fc領域としてヒトIgG1のFc領域を含んでいる場合、pH中性域におけるFcRnに対する結合が、ヒトIgG1の出発Fc領域の結合活性より増強する効果をもたらす改変が含まれていることが好ましい。そのような改変がされたFc領域として、例えば、ヒトFc領域が、出発Fc領域のEUナンバリングで表される部位のうち、237位、238位、239位、248位、250位、252位、254位、

255位、256位、257位、258位、265位、270位、286位、289位、297位、298位、303位、305位、307位、308位、309位、311位、312位、314位、315位、317位、325位、332位、334位、360位、376位、380位、382位、384位、385位、386位、387位、389位、424位、428位、433位、434位、および436位の群から選択される少なくともひとつ以上のアミノ酸が、天然型Fc領域の対応するアミノ酸と異なるFc領域が好適に挙げられ得る。

[0400] また、そのような改変がされたFc領域として、例えば、Fc領域のEUナンバリングで表される；

237位のアミノ酸がMet、

238位のアミノ酸がAla、

239位のアミノ酸がLys、

248位のアミノ酸がIle、

250位のアミノ酸がAla、Phe、Ile、Met、Gln、Ser、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

252位のアミノ酸がPhe、Trp、またはTyrのいずれか、

254位のアミノ酸がThr、

255位のアミノ酸がGlu、

256位のアミノ酸がAsp、Glu、またはGlnのいずれか、

257位のアミノ酸がAla、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr、またはValのいずれか、

258位のアミノ酸がHis、

265位のアミノ酸がAla、

270位のアミノ酸がPhe、

286位のアミノ酸がAlaまたはGluのいずれか、

289位のアミノ酸がHis、

297位のアミノ酸がAla、

298位のアミノ酸がGly、

303位のアミノ酸がAla、

305位のアミノ酸がAla、

307位のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

308位のアミノ酸がAla、Phe、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、またはThrのいずれか、

309位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Pro、またはArgのいずれか、

311位のアミノ酸がAla、His、またはIleのいずれか、

312位のアミノ酸がAlaまたはHisのいずれか、

314位のアミノ酸がLysまたはArgのいずれか、

315位のアミノ酸がAlaまたはHisのいずれか、

317位のアミノ酸がAla、

325位のアミノ酸がGly、

332位のアミノ酸がVal、

334位のアミノ酸がLeu、

360位のアミノ酸がHis、

376位のアミノ酸がAla、

380位のアミノ酸がAla、

382位のアミノ酸がAla、

384位のアミノ酸がAla、

385位のアミノ酸がAspまたはHisのいずれか、

386位のアミノ酸がPro、

387位のアミノ酸がGlu、

389位のアミノ酸がAlaまたはSerのいずれか、

424位のアミノ酸がAla、

428位のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

433位のアミノ酸がLys、

434位のアミノ酸がAla、Phe、His、Ser、Trp、またはTyrのいずれか

436位のアミノ酸がHis、

の群から選択される少なくとも1つのアミノ酸を含むFc領域が好適に挙げられる。

[0401] 例えばこれらのアミノ酸の改変を単独、あるいは複数を組み合わせて用いることによって、IgGのFc領域のpH酸性域および/または中性域におけるFcRnに対する結合を増強することが可能であるが、導入されるアミノ酸改変は特に限定されず、血漿中滞留性を改善する効果がもたらされる限りにおいて、どのようなアミノ酸改変が導入されても良い。

[0402] 上記に記載したように連結された、抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドおよび、pH酸性域においてヒトFcRnに対する結合活性を有し、pH中性域の条件下でFcγレセプターに対する結合活性がEUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型Fcγレセプター結合ドメインのFcγレセプターに対する結合活性よりも高いFcγレセプター結合ドメインをコードするポリヌクレオチドが、作用可能に連結された所望の発現ベクターによって形質転換された細胞の培養液から、本発明の抗原結合分子が単離される。上記の抗体の項で記載された抗体の製造方法に準じた方法を用いて、本発明の抗原結合分子が製造される。

[0403] なお本明細書において引用されたすべての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

[0404] 以下本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

実施例

[0405] （実施例１）pH中性域の条件下でのマウスFcγRに対する結合活性が天然型ヒトIgGのFc領域の結合活性より高い抗原結合分子の作製

（１－１）pH依存的ヒトIL-6レセプター結合抗体について

WO2009/125825に記載されているH54-IgG1（配列番号：３６）とL28-CK（配列番号：３７）からなるH54/L28-IgG1はヒト化抗IL-6レセプター抗体であり、VH3-IgG1（配列番号：３８）とVL3-CK（配列番号：３９）からなるFv4-IgG

1は、H54/L28-IgG1に対して可溶型ヒトIL-6レセプターへpH依存的に結合する特性（pH7.4において結合し、pH5.8において解離する）を付与したヒト化抗IL-6レセプター抗体である。WO2009/125825に記載されているマウスのin vivo試験において、H54/L28-IgG1と抗原である可溶型ヒトIL-6レセプターの混合物を投与した群と比較して、Fv4-IgG1と抗原である可溶型ヒトIL-6レセプターの混合物を投与した群において、可溶型ヒトIL-6レセプターが血漿中からの消失が大幅に加速されることが示された。

[0406] 可溶型ヒトIL-6レセプターに結合する抗体であるH54/L28-IgG1に結合した可溶型ヒトIL-6レセプターは、抗体とともにFcRnによって血漿中にリサイクルされるのに対して、pH依存的に可溶型ヒトIL-6レセプターに結合する抗体であるFv4-IgG1は、エンドソーム内の酸性条件下において抗体に結合した可溶型ヒトIL-6レセプターを解離する。解離した可溶型ヒトIL-6レセプターはライソソームによって分解されるため、可溶型ヒトIL-6レセプターの消失を大幅に加速することが可能となり、さらにpH依存的に可溶型ヒトIL-6レセプターに結合する抗体であるFv4-IgG1はエンドゾーム内でFcRnに結合した後に血漿中にリサイクルされる。リサイクルされた当該抗体は再び可溶型ヒトIL-6レセプターに結合することができるため、抗原（可溶型ヒトIL-6レセプター）に対する結合とFcRnによる血漿中でのリサイクルが繰り返される。その結果、ひとつの抗体分子が複数回繰り返し可溶型ヒトIL-6レセプターに結合することが可能となると考えられる（WO2009/125825）。

[0407] <u>（１－２）マウスFcγRに対する結合が増強されている抗ヒトIL-6レセプター抗体およびマウスFcγRに対する結合を有しない抗ヒトIL-6レセプター抗体の作製</u>

[0408] マウスFcγRへの結合が増強された抗原結合分子として、VH3-IgG1のEUナンバリングで表される326位のLysがAspに置換され、EUナンバリングで表される328位のLeuがTyrに置換されたVH3-IgG1-F1022（配列番号：４０）が作製された。参考実施例２の方法を用いて、VH3-IgG1-F1022を重鎖として含み、VL3-CKを軽鎖として含む、Fv4-IgG1-F1022が作製された。

[0409] 一方、マウスFcγRに対する結合を有しない抗原結合分子として、VH3-IgG1のEUナンバリングで表される235位のLeuがArgに置換され、239位のSerがLysに置換されたVH3-IgG1-F760（配列番号：４１）が作製された。参考実施例２の方法を用いて、VH3-IgG1-F760を重鎖として含み、VL3-CKを軽鎖として含む、Fv4-IgG1-F760が作製された。

[0410] （１－３）マウスFcγRに対する結合活性の確認

VH3-IgG1、VH3-IgG1-F1022およびVH3-IgG1-F760を重鎖として含み、L(WT)-CK（配列番号：４２）を軽鎖として含むVH3/L(WT)-IgG1、VH3/L(WT)-IgG1-F1022およびVH3/L(WT)-IgG1-F760が参考実施例２の方法で作製された。以下のように、これらの抗体のマウスFcγRに対する結合が速度論的に解析された。

[0411] （１－４）マウスFcγRに対する結合の速度論的解析

Biacore T100 又はT200 (GE Healthcare) を用いて、マウスFcγRI、FcγRIIb、FcγRIII、FcγRIV（参考実施例26で調製）（以下、マウスFcγRs）と抗体との結合が速度論的に解析された。アミンカップリング法によってSensor chip CM4 (GE Healthcare) 上に適切な量が固定化されたprotein L (ACTIGEN) に、目的の抗体をキャプチャーさせた。次に、マウスFcγRsの希釈液とブランクであるランニングバッファーをインジェクトすることによって、センサーチップ上にキャプチャーさせた抗体にマウスFcγRsを相互作用させた。ランニングバッファーとしては20 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05% (w/v) Tween20、pH7.4が用いられ、マウスFcγRsの希釈に際してもこのバッファーが使用された。センサーチップの再生には10 mmol/L Glycine-HCl, pH 1.5が用いられた。測定は全て25℃で実施された。測定で得られたセンサーグラムから、カイネティクスパラメーターである結合速度定数 ka (1/Ms) 、および解離速度定数 kd (1/s) が算出された。これらの値をもとに各抗体のヒトFcγRに対する K_D (M) が算出された。各パラメーターの算出にはBiacore T100 又はT200 Evaluation Software (GE Healthcare) が用いられた。

[0412] その結果、表７に示される測定結果が得られた。VH3/L(WT)-IgG1-F1022は、VH3/L(WT)-IgG1に比較してmFcγR I、mFcγRIIbおよびmFcγRIIIに対する

結合活性が増強されていることが示された。一方、VH3/L(WT)-IgG1-F760は各種マウスFcγRに対する結合が検出されなかったことから、VH3/L(WT)-IgG1-F760は各種マウスFcγRに対する結合活性が欠損していることが示された。

[0413] [表7]

変異体名	KD（M）			
	mFcγR I	mFcγR IIb	mFcγR III	mFcγR IV
IgG1	6.0E-08	5.0E-07	2.2E-07	2.4E-08
F1022	9.1E-09	8.5E-09	8.1E-09	3.8E-08
F760	検出せず	検出せず	検出せず	検出せず

[0414] （１－５）低フコース型抗体の作製

抗体のFcγRに対する結合活性を増強させる方法としては、抗体のFc領域にアミノ酸改変を導入する方法以外に、抗体に連結された糖鎖を低フコース型糖鎖とする方法が知られている（J. Biol. Chem. (2003) 278, 3466-3473）。参考実施例４の方法に従い、フコーストランスポーター遺伝子を欠損させたCHO細胞（WO2006067913）を宿主細胞として用いてFv4-IgG1を発現することにより、低フコース型Fv4-IgG1（以降、Fv4-IgG1-Fucと表記される）が作製された。mFcγR（マウスFcγレセプター）のうちFcγRIVに対する、低フコース型抗体の結合活性は選択的に向上していることが報告されている（Science (2005) 310 (5753) 1510-1512）。

[0415] （実施例２）FcγRに対する結合活性が天然型ヒトIgGのFc領域の結合活性より高い抗原結合分子の血漿中からの抗原消失効果

（２－１）H54/L28-IgG1およびFv4-IgG1の血漿中からの抗原消失効果

抗ヒトIL-6レセプター抗体であるH54/L28-IgG1と、pH依存的にヒトIL-6レセプターに結合する性質を有するFv4-IgG1が、参考実施例１の方法で作製された。作製されたH54/L28-IgG1およびFv4-IgG1を用いたin vivo infusion試験が下記の方法で実施された。

[0416] （２－１－１）ヒトFcRnトランスジェニックマウスを用いたin vivo infusion試験

ヒトFcRnトランスジェニックマウス（B6.mFcRn-/-.hFcRn Tg line 32 +/+

mouse、Jackson Laboratories、Methods Mol Biol. (2010) 602, 93-104) の背部皮下に可溶型ヒトIL-6レセプターが充填されたinfusion pump (MINI-OSMOTIC PUMP MODEL2004、alzet) を埋め込むことで、血漿中可溶型ヒトIL-6レセプター濃度が定常状態に維持される動物モデルが作製された。その動物モデルに対して投与された抗ヒトIL-6レセプター抗体の投与後の体内動態が評価された。可溶型ヒトIL-6レセプターに対する中和抗体の産生を抑制するため、（公知の方法で取得された）monoclonal anti-mouse CD4 antibodyが尾静脈に20mg/kgで単回投与された。その後、92.8μg/mLの可溶型ヒトIL-6レセプターが充填されたinfusion pumpがマウス背部皮下へ埋め込まれた。Infusion pumpが埋め込まれた3日後に、抗ヒトIL-6レセプター抗体が1 mg/kgで尾静脈に単回投与された。抗ヒトIL-6レセプター抗体投与後15分、7時間、1日、2日、4日、7日が経過した後に当該マウスから採血された。採取された血液を直ちに4℃、15,000 rpmで15分間遠心分離することによって、血漿が得られた。分離された血漿は、測定を実施するまで-20℃以下に設定された冷凍庫に保存された。

[0417] （２－１－２）電気化学発光法による血漿中ヒトIL-6レセプター（hsIL-6R）濃度測定

マウスの血漿中ヒトIL-6レセプター濃度は電気化学発光法にて測定された。2000、1000、500、250、125、62.5、31.25 pg/mLに調製されたhsIL-6R検量線試料および50倍以上希釈されたマウス血漿測定試料を、SULFO-TAG NHS Ester (Meso Scale Discovery) でルテニウム化したMonoclonal Anti-human IL-6R Antibody (R&D) およびBiotinylated Anti-human IL-6 R Antibody (R&D) およびTocilizumabと混合することによって37℃で1晩反応させた。Tocilizumabの終濃度は333μg/mLとなるように調製された。その後、反応液がMA400 PR Streptavidin Plate (Meso Scale Discovery) に分注された。さらに室温で1時間反応させた反応液を洗浄後、Read Buffer T (×4) (Meso Scale Discovery) が分注された。その後ただちにSECTOR PR 400 reader (Meso Scale Discovery) で測定が行われた。ヒトIL-6レセプター濃度は検量線のレスポン

スから解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて算出された。

[0418] 測定されたヒトIL-6レセプター濃度推移を図２に示した。H54/L28-IgG1と比較して、ヒトIL-6レセプターに対してpH依存的に結合するFv4-IgG1はヒトIL-6レセプター濃度を低下することができたが、ヒトIL-6レセプター濃度を抗体非投与時のベースラインより低下することができなかった。すなわち、抗原に対してpH依存的に結合する抗体は、抗体投与によって血漿中の抗原濃度を抗体投与前よりも低下させることはできなかった。

[0419] （２－２）FcγRに対する結合活性を増強あるいは低下させた抗体の血漿中からの抗原消失効果

pH依存的ヒトIL-6レセプター結合抗体であるFv4-IgG1に対して、FcγRに対する結合活性を増強あるいは低下させることにより、ヒトIL-6レセプター濃度推移に与える影響が、下記の方法で評価された。実施例１において作製されたFv4-IgG1、Fv4-IgG1-F760、Fv4-IgG1-F1022、Fv4-IgG1-Fucを用いたin vivo infusion試験が下記の方法で実施された。

[0420] （２－２－１）ヒトFcRnトランスジェニックマウスを用いたin vivo infusion試験

ヒトFcRnトランスジェニックマウス (B6.mFcRn-/-.hFcRn Tg line 32 +/+ mouse、Jackson Laboratories、Methods Mol Biol. (2010), 602, 93-104) の背部皮下に可溶型ヒトIL-6レセプターを充填したinfusion pump (MINI-OSMOTIC PUMP MODEL2004、alzet) を埋め込むことで、血漿中可溶型ヒトIL-6レセプター濃度が定常状態に維持される動物モデルが作製された。その動物モデルに対してヒト免疫グロブリン製剤サングロポール (CSLベーリング株式会社) と同時に投与された抗ヒトIL-6レセプター抗体の投与後の可溶型ヒトIL-6レセプターの体内動態が評価された。可溶型ヒトIL-6レセプターに対する中和抗体の産生を抑制するため、(公知の方法で取得された) monoclonal anti-mouse CD4 antibodyが尾静脈に20mg/kgで単回投与された。その後、92.8μg/mLの可溶型ヒトIL-6レセプターが充填されたinfusion pumpがマウス背部皮

下へ埋め込まれた。Infusion pumpが埋め込まれた3日後に、抗ヒトIL-6レセプター抗体が1 mg/kgで、サングロポールが1000 mg/kgで尾静脈に単回投与された。抗ヒトIL-6レセプター抗体投与後15分、7時間、1日、2日、4日、7日が経過した後に当該マウスから採血された。抗ヒトIL-6レセプター抗体投与後15分、7時間、1日、2日、3日、7日が経過した後に当該マウスから採血された。採取された血液を直ちに4℃、15,000 rpmで15分間遠心分離することによって、血漿が得られた。分離された血漿は、測定を実施するまで-20℃以下に設定された冷凍庫に保存された。

[0421] （２－２－２）電気化学発光法による血漿中可溶型ヒトIL-6レセプター（hsIL-6R）濃度測定

（２－１－２）に記載された方法と同様に、マウスの血漿中hsIL-6R濃度は電気化学発光法にて測定された。

[0422] その結果を図３に示した。Fv4-IgG1のマウスFcγRへの結合を欠損させたFv4-IgG1-F760が投与されたマウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度推移はFv4-IgG1が投与されたマウスのそれと同等であることが確認された。膜型抗原に対する細胞傷害活性はFcγRに対する結合に依存していることから、FcγRに対する結合を欠損させると細胞傷害活性は無くなることが知られている。一方、可溶型抗原であるヒトIL-6レセプターに対する抗体のマウスFcγRに対する結合を欠損させた抗体を投与しても投与されたマウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度の推移に影響が無かったことから、可溶型抗原に対する抗体が投与されたマウスの血漿中の抗原濃度の推移に対しては抗体のFcγRに対する結合の寄与が無いとも考えられた。

[0423] しかし、驚くべきことに、マウスFcγRに対する結合が増強されているFv4-IgG1-F1022が投与されたマウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度は、Fv4-IgG1が投与されたマウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度と比較して大幅に低下しており、その低下の程度は、抗体非投与時のヒトIL-6レセプター濃度であるベースラインよりも低下していることが確認された。特に、Fv4-IgG1-F1022が投与されてから3日後の、投与されたマウスの血漿中ヒトIL-6レセプ

ター濃度は、Fv4-IgG1が投与された場合のそれと比較して、約100分の1にまで低下した。このことから、pH依存的にヒトIL-6レセプターに結合し、更にFcγRに対する結合が増強されている抗体を投与することにより、投与されたマウスの血漿中ヒトIL-6レセプター濃度が大幅に低下し、その低下の程度は血漿中の抗原濃度を抗体投与前よりも低下させることが可能であることが示された。

[0424] また、低フコース型の糖鎖を有しマウスFcγR IVに対する結合活性が増強されているFv4-IgG1-Fucが投与されたマウスの血漿中ヒトIL-6レセプター濃度も、Fv4-IgG1が投与されたマウスのそれと比較して低下させることが示された。特に、Fv4-IgG1-Fucが投与されてから7日後の、投与されたマウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度は、Fv4-IgG1が投与された場合のそれと比較して、約2分の1にまで低下した。このことから、pH依存的にヒトIL-6レセプターに結合し、更にFcγRに対する結合が増強されたpH依存的抗原結合分子を投与することにより、投与されたマウスの血漿中の可溶型抗原の濃度を低下させることが可能であるが、その際にFcγRに対する結合を増強するための方法としては、アミノ酸改変を導入することには特に限定されず、例えばEUナンバリング297位に結合した糖鎖が低フコース型糖鎖であるヒトIgGのFc領域を用いることによっても、達成可能であることが示された。しかしながら、抗原濃度を低下させる効果としては、Fv4-F1022と比べてFv4-IgG1-Fucは小さいことが明らかとなった。この結果からは、複数存在するFcγR（マウスにおいては、FcγRI, II, III, IV）のうち、Fv4-IgG1-Fucにおいて結合が増強されるmFcγIVは、FcγRとして抗原濃度を低下させる寄与が大きくないとも考えられた。

[0425] このように、pH依存的に可溶型抗原に結合する抗体の、FcγRに対する結合を増強させた抗体を投与することにより、投与された個体中に存在する可溶型抗原の血漿中濃度を大幅に低下させることが可能であることが見出された。

[0426] 特定の理論に拘束されるものではないが、FcγRへの結合が増強されたpH等

のイオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメインを含む抗原結合分子の投与によって観察された予想外の血漿中可溶型抗原濃度の低下は、以下のように説明することも可能である。

[0427] 非特異的に細胞内へと取り込まれたIgG抗体は、エンドソーム内の酸性条件下においてエンドソーム内のFcRnに結合することで細胞表面上に戻り、血漿中の中性条件下においてFcRnから解離する。ここで、血漿中において可溶型抗原が一定濃度に維持されたマウスに、可溶型抗原に結合することでその機能を中和する抗体が投与された場合、血漿中の可溶型抗原は投与された抗体との複合体を形成する。当該複合体を形成した状態で細胞内へと取り込まれた可溶型抗原は、抗体のFc領域がエンドソーム内の酸性条件下においてエンドソーム内のFcRnに結合するため、抗体に結合した状態で抗体と共に血漿中へとリサイクルされると考えられる。

[0428] 一方、可溶型抗原に対する抗体がpH依存的に抗原に結合する抗体（すなわち、エンドソーム内の酸性条件において可溶型抗原を解離する抗体）である場合には、抗体と複合体を形成した状態で非特異的に細胞内へと取り込まれた可溶型抗原は、エンドソーム内において抗体から解離し、細胞内ライソソーム内で分解され血漿中へはリサイクルされない。つまり、可溶型抗原と複合体を形成した状態で細胞内へと取り込まれたFv4-IgG1は、エンドソーム内において可溶型抗原を解離し、その消失を速めることが可能であると考えられる。

[0429] 前記のように、Fv4-IgG1等のイオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子は、複数回繰り返し抗原に結合することが可能になると考えられるが、エンドソーム内において可溶型抗原を解離し、その血漿中からの消失を早める効果は、抗原と抗原結合分子の複合体がエンドソーム内へと取り込まれる速度に依存すると考えられる。各種のFcγRへの結合活性が増強された、イオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子は、細胞

膜上に発現する各種FcγRに結合することにより、細胞内へと積極的に取り込まれ、当該分子中に含まれるpH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメインとFcRnの結合を介したリサイクルによって再度血漿中に循環することが可能である。すなわち、血漿中において可溶型抗原と複合体を形成した前記抗原結合分子は、細胞膜上に発現したFcγRを介して細胞内へ積極的に取り込まれるために、血漿中の可溶型抗原の消失を早める効果が、各種のFcγRへの結合活性が増強されていない抗原結合分子より顕著に表れると考えられる。

[0430] 生体内において、各種FcγRは免疫細胞の細胞膜上に発現し、その多様な機能を担っているが、抗体を細胞内へ取り込ませるために用いられる場合、いずれのFcγRが用いられても良いと考えられる。つまり、ヒトにおいては活性型FcγRであるFcγRI、FcγRIIa、FcγRIIIaあるいは抑制型FcγRIIbなどの存在が知られているが、それらのいずれを介して取り込まれても良い。これらのうちどれか一つのFcγRを介して取り込まれても良いし、全てのFcγRを介して取り込まれても良い。更には、各種の活性型FcγRのみを介して取り込まれるといった様態であっても良いし、あるいは抑制型FcγRIIbのみを介して取り込まれるといった様態であっても良い。

[0431] 更に、それらを実現するためには、抗原結合分子のFcγR結合ドメインに対してFcγRへの結合活性を増強させるためのいかなる方法が用いられても良い。例えば、実施例１で示されたように、抗原結合分子のFcγR結合ドメインに対してFcγRに対する結合活性を増強させるためのアミノ酸変異が導入されても良いし、あるいは低フコース型抗体が用いられても良い。また、これらの方法により得られるFcγRに対する結合活性が増強される効果は、いずれのFcγRに対する結合が増強される効果であっても良い。つまり、どれか一つのFcγRに対する結合活性が増強されていても良いし、いくつかのFcγRに対する結合活性が増強されていても良いし、全てのFcγRに対する結合活性が増強されていても良い。更には、各種の活性型FcγRのみに対する結合活性が増強されていても良いし、あるいは抑制型FcγRIIbのみに対する結合活性が増強さ

れていても良い。

[0432] 膜型抗原に結合する抗体のFcγRに対する結合活性は当該抗体の細胞傷害活性に重要な役割を果たしている。そのため医薬として用いられる抗体に細胞傷害活性が必要な場合、FcγRに対する結合活性が高いヒトIgG1のアイソタイプが用いられ、さらに当該抗体のFcγRに対する結合活性を増強することにより当該抗体の細胞傷害活性が増強される技術は広く用いられている。

[0433] 一方、医薬として用いられ、可溶型抗原に結合する抗体のFcγRに対する結合活性の果たす役割はこれまで知られておらず、FcγRに対する結合活性が高いヒトIgG1とFcγRに対する結合活性が低いヒトIgG2やヒトIgG4のFcγRに対する結合活性の相違が、当該抗体が投与された生体に与える効果の違いはこれまでに十分に検討されていなかった。実際、本実施例においても、FcγRに対する結合活性を欠損させた抗体が投与された個体の血漿中において可溶型抗原の濃度推移に影響を及ぼさないことが確認された。一方、本発明において、FcγRに対する結合活性が増強され、イオン濃度の条件によって可溶型抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子が投与された個体の血漿中における可溶型抗原の濃度が大幅に低下したことが見出された。すなわち、可溶型抗原を標的とした抗原結合分子に含まれるpH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメインとイオン濃度の条件によって可溶型抗原に対する結合が変化する抗原結合ドメインが組み合わされることによって、FcγRに対する結合を増強させる利点が初めて見出されたといえる。

[0434] （実施例３） FcγRに対する結合活性が天然型ヒトIgGのFc領域の結合活性より高く、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性が増強された抗原結合分子の血漿中からの抗原消失効果

（３－１）FcγRに対する結合活性が天然型ヒトIgGのFc領域の結合活性より高く、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性が増強された抗原結合分子の作製

IgG抗体の血漿中滞留性を改善する方法として、pH酸性域の条件下における

FcRnに対する結合を向上させる方法が報告されている。IgG抗体のFc領域にアミノ酸置換を導入し、pH酸性域の条件下におけるFcRnに対する結合を向上させることで、エンドソーム内から血漿中へのリサイクル効率が上昇し、その結果、当該IgG抗体の血漿中滞留性が改善すると考えられている。

[0435] pH酸性域の条件下におけるヒトFcRnに対する結合活性を向上させることで血漿中滞留性を改善するためのアミノ酸改変の一例として、IgG抗体のEUナンバリングで表される428位のMetをLeuに置換し、434位のAsnをSerに置換する方法（Nat. Biotechnol,, (2010) 28:, 157-159.）、434位のAsnをAlaに置換する方法（Drug. Metab. Dispos. (2010) 38 (4), 600-605）、252位のMetをTyrに置換し、254位のSerをThrに置換し、256位のThrをGluに置換する方法（J. Biol. Chem. (2006) 281, 23514-23524）、250位のThrをGlnに置換し、428位のMetをLeuに置換する方法（J. Immunol. (2006) 176 (1) 346-356）、434位のAsnをHisに置換する方法(Clin. Pharm. & Ther. (2011) 89 (2) 283-290.)、ならびにWO2010/106180、WO2010/045193、WO2009/086320、WO2009/058492、 WO2008/022152、WO2006/050166、WO2006/053301、WO2006/031370、WO2005/123780、WO2005/047327、WO2005/037867、WO2004/035752、WO2002/060919など数多くが報告されている。

[0436] 実施例２において、その投与によって可溶型抗原の血漿中濃度を顕著に低下させる効果が示されたFv4-IgG1-F1022の薬物動態を向上させる目的で、VH3-IgG1-F1022のEUナンバリングで表される428位のMetがLeuに置換され、434位のAsnがSerに置換されたVH3-IgG1-F1093（配列番号：４３）が作製された。参考実施例２の方法を用いて、VH3-IgG1-F1093を重鎖として含み、VL3-CKを軽鎖として含む、Fv4-IgG1-F1093が作製された。

[0437] （３－２）FcγRに対する結合活性が天然型ヒトIgGのFc領域の結合活性より高く、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性が増強された抗原結合分子の血漿中からの抗原消失効果

血漿中可溶型ヒトIL-6レセプター濃度が定常状態に維持されたヒトFcRnトランスジェニックマウスを用いて、実施例（２－１－１）の方法と同様に、F

v4-IgG1-F1093のin vivo infusion試験が行われた。当該マウスの血漿中の可溶型ヒトIL-6レセプター濃度は、実施例（２－１－２）の方法で測定された。その結果を図４に示した。

[0438] （３－２－１）ELISA法による血漿中抗ヒトIL-6レセプター抗体濃度の測定

マウス血漿中の抗ヒトIL-6レセプター抗体濃度はELISA法にて測定された。まず、抗Fv4イディオタイプ抗体をNunc-Immuno Plate, MaxiSoup (Nalge nunc International) に分注し、4℃で１晩静置することによって抗Fv4イディオタイプ抗体固相化プレートが作成された。同イディオタイプ抗体はFv4-M73 (WO2009/125825) をウサギに免疫した血清をイオン交換樹脂で精製後、Fv4-M73が固定化されたカラムでアフィニティ精製し、その後ヒト固定化カラムで吸収させて得られた。血漿中濃度として0.8、0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125μg/mLの抗ヒトIL-6レセプター抗体を含む検量線試料と100倍以上希釈されたマウス血漿測定試料が調製された。これらの検量線試料および血漿測定試料100μLに20 ng/mLの可溶型ヒトIL-6レセプターが200μL加えられた混合液を、室温で1時間静置させた。その後当該混合液が各ウェルに分注された抗Fv4イディオタイプ抗体固相化プレートをさらに室温で1時間静置させた。その後Biotinylated Anti-human IL-6 R Antibody (R&D) と室温で1時間反応させ、さらにStreptavidin-PolyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies) を室温で1時間反応させた反応液の発色反応が、TMB One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories) を基質として用いて行われた。1N-Sulfuric acid (Showa Chemical) を添加することによって反応が停止された各ウェルの反応液の450 nmの吸光度が、マイクロプレートリーダーにて測定された。マウス血漿中の抗体濃度は検量線の吸光度から解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて算出された。

[0439] その結果を図５に示した。

[0440] （３－３）pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性を増強することによる薬物動態の改善

図５に示されたとおり、Fv4-IgG1 のpH中性域の条件下におけるFcγRへの

結合活性が増強されたFv4-IgG1-F1022が投与された群では、Fv4-IgG1が投与された群に比べて、投与された抗体の血漿中滞留性が低下することが確認された。一方、Fv4-IgG1-F1022のpH酸性域の条件下におけるヒトFcRnへの結合活性が増強されたFv4-IgG1-F1093が投与された群では、Fv4-IgG1-F1022が投与された群に比べて投与された抗体の血漿中滞留性が大幅に改善されたことが確認された。

[0441] 更に、図４に示すとおり、血漿中の可溶型ヒトIL-6レセプター濃度は、Fv4-IgG1-F1022の投与群とFv4-IgG1-F1093の投与群ではいずれも抗体投与後3日目までは同等の推移を示した。投与後3日目においては、Fv4-IgG1の投与群と比較して、Fv4-IgG1-F1022およびFv4-IgG1-F1093のいずれの投与群でも血漿中の可溶型ヒトIL-6レセプター濃度の約100倍もの顕著な濃度低下が見られた。しかし、抗体投与後7日目においてはFv4-IgG1-F1022投与群における血漿中の可溶型ヒトIL-6レセプター濃度は投与後3日目に比べて上昇する様子が観察されたが、一方でFv4-IgG1-F1093投与群においては血漿中の可溶型ヒトIL-6レセプター濃度上昇が観察されず、本投与群では可溶型ヒトIL-6レセプター濃度を低下させる効果が持続していることが示された。

[0442] すなわち、Fv4-IgG1-F1093の投与は、投与された個体の血漿中の可溶型ヒトIL-6レセプター濃度をFv4-IgG1に比べて約100分の1にまで低下させ、更にその状態を長期間維持することが出来る、非常に優れた抗原結合分子であることが示された。特定の理論に拘束されるものではないが、ここでみられた現象は、以下のように説明することも可能である。Fv4-IgG1のpH中性域の条件下におけるFcγRに対する結合活性が増強されたFv4-IgG1-F1022は、主に細胞膜上にFcγRを発現している免疫細胞に多くの量が取り込まれると考えられる。取り込まれてエンドソームへと移行した抗体は、エンドソーム内でFcRnに結合することにより血漿中へとリサイクルされる。エンドソーム内の酸性pHの条件下において、抗体のFcRnに対する結合活性が十分ではない場合には、エンドソームに取り込まれた抗体は十分にリサイクルされることが出来ないと考えられる。すなわち、Fv4-IgG1-F1022がFv4-IgG1に比べて血漿中滞留性

が低下した理由として、エンドソーム内に取り込まれた抗体がFcRnへの結合を介して十分に血漿中にリサイクルされるほどにはpH酸性域の条件下におけるFcRnに対する結合活性が十分でないために、リサイクルされなかった抗体がライソソームにおいて分解を受けたためだとも考えられる。

[0443] 一方、Fv4-IgG1-F1022のpH酸性域の条件下におけるヒトFcRnに対する結合活性が増強されたFv4-IgG1-F1093は、Fv4-IgG1-F1022と同様に、主に細胞膜上にFcγRを発現している免疫細胞に多くの量が取り込まれると考えられる。取り込まれてエンドソームへと移行した抗体は、エンドソーム内でFcRnに結合することにより血漿中へとリサイクルされるが、Fv4-IgG1-F1093はpH酸性域の条件下におけるヒトFcRnに対する結合活性が増強されているために、エンドソーム内でのFcRnに対する十分な結合活性を有すると考えられる。そのため、Fv4-IgG1-F1093は細胞内に取り込まれた後も、その多くが血漿中へとリサイクルされる。そのためFv4-IgG1-F1022に比べてFv4-IgG1-F1093は投与された個体の血漿中での滞留性が向上したとも考えられる。

[0444] 一方、pH酸性域の条件下において、FcRnに対する結合活性を向上させることで通常の抗体の血漿中滞留性が向上することはこれまでも知られていた。しかしながら、抗体の血漿中滞留性が向上すると、抗体に結合した抗原の血漿中滞留性も向上するため、その分、抗原の血漿中濃度も高くなると考えられた。実際、WO2010/088444に記載されているように、IL-6に対するヒトIgG1抗体であるAntibody 18に対して、pH酸性域の条件下においてFcRnに対する結合活性を向上させるYTE改変を導入したAntibody 18Eは、カニクイザルにおいて、抗体の血漿中滞留性が向上したが、同時に抗原であるIL-6の血漿中濃度も高くなっている。

[0445] しかしながら、驚くべきことに、抗原に対してpH依存的に結合し、且つ、FcγRに対する結合活性を増強したFv4-F1022に対して、YTE改変と同様のpH酸性域の条件下においてFcRnに対する結合活性を向上させる改変が導入されたFv4-IgG1-F1093が投与された場合は、投与された個体において大幅に抗体の血漿中滞留性が向上したにもかかわらず、当該個体において抗原である可溶型

ヒトIL-6レセプター濃度を高くなることはなく、むしろ、抗体投与7日目においては、Fv4-IgG1-F1093が投与された個体のほうがFv4-F1022が投与された個体よりも可溶型ヒトIL-6レセプター濃度が低く維持されていた。

[0446] 特定の理論に拘束されるものではないが、ここでみられた現象は、以下のように説明することも可能である。抗原に対してpH依存的な結合を示さない抗体が生体に投与された後、当該抗体は非特異的に細胞内に取り込まれ、当該抗体に結合したままの抗原は、抗体と同じ程度血漿中にリサイクルされる。一方、pH酸性域の条件下においてFcRnに対する結合活性が増強された抗体は、投与された生体の血漿中にリサイクルされる程度がFcRnに対する結合活性が増強されていない抗体よりも上がるため、当該抗原に結合したままの抗原の当該生体の血漿中にリサイクルされる程度も上がることになる。そのため、投与された抗体の、投与された生体の血漿中滞留性が向上することで当該抗体が結合する抗原の当該生体の血漿中濃度も上昇してしまうと考えられる。

[0447] 一方、抗原に対してpH依存的に結合し、FcγRに対する結合活性が増強した抗体が生体に投与されたときは、当該抗体は主に細胞膜上にFcγRを発現している免疫細胞に取り込まれることによってその血漿中滞留性が低下する。一方、当該抗体に結合した抗原も当該細胞に取り込まれた後に、エンドソーム内で当該抗体から解離した後にライソソームにおいて分解されることによって、当該生体の血漿中の抗原濃度も低下する。pH酸性域の条件下においてFcRnに対する結合活性を向上させた場合、FcγRに対する結合活性を増強させることで悪化した抗体の血漿滞中留性は、FcRnによるリサイクル率が上がることで改善する。ここで、抗原に対してpH依存的に結合する抗体に結合した抗原はエンドソーム内で当該抗体から解離し、そのままライソソームで分解されるため、抗原の血漿中濃度が上昇することはないと考えられる。さらに生体に投与された抗体の血漿中滞留性が向上することにより、当該抗体の抗原消失効果が持続し、より長く、抗原濃度を低濃度で維持することが可能であると考えられる。

[0448] 以上のことから、FcγRに対する結合活性が天然型ヒトIgGのFc領域の結合活性より高い抗原結合分子の、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性が増強した抗体が投与された生体では、投与された抗体の血漿中滞留性が向上していることが示された。また、この場合において抗体の血漿中滞留性が向上しても、抗原消失効果は減弱しないことが示された。

[0449] 〔実施例４〕FcγRに対する結合活性が天然型ヒトIgGのFc領域の結合活性より高く、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性が増強された抗原結合分子の血漿中からの抗原消失効果の更なる検証

（４－１）FcγRに対する結合活性が天然型ヒトIgGのFc領域の結合活性より高く、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性が増強された抗体が投与された生体中の抗原の消失効果

実施例２において、マウスFcγR に対する結合が増強されたFv4-IgG1-F1022が投与された群では、血漿中の抗原濃度が大幅に低下したことが示された。また、実施例３において、Fv4-IgG1-F1022の投与群での血漿中滞留性の低下は、Fv4-IgG1-F1022のpH酸性域の条件下におけるヒトFcRnへの結合活性を増強することにより、大幅に改善されることが示された。次に、マウスFcγRに対する結合を増強することによる血漿中可溶型抗原の消失効果と、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRnへの結合活性を増強することによる抗体が投与された生体中における当該抗体の血漿中滞留性の向上効果が、更に以下のように検証された。

[0450] （４－２）マウスFcγRに対する結合が増強されている抗ヒトIL-6レセプター抗体の作製

マウスFcγRへの結合が増強された抗原結合分子として、VH3-IgG1のEUナンバリングで表される326位のLysがAspに置換されたVH3-IgG1-F1087（配列番号：１２３）およびVH3-IgG1のEUナンバリングで表される239位のSerがAspに置換され、332位のIleがGluに置換されたVH3-IgG1-F1182（配列番号：１２４）が作製された。参考実施例２の方法を用いて、VH3-IgG1-F1087を重鎖として含み、VL3-CKを軽鎖として含むFv4-IgG1-F1087および、VH3-IgG1-F1182を重

鎖として含み、VL3-CKを軽鎖として含む、Fv4-IgG1-F1182が作製された。

[0451] （４－３）マウスFcγRに対する結合活性の確認

VH3-IgG1-F1087およびVH3-IgG1-F1182を重鎖として含み、L（WT)-CK（配列番号：４２）を軽鎖として含むVH3/L（WT)-IgG1-F1087およびVH3/L（WT)-IgG1-F1182が参考実施例２の方法で作製された。これらの抗体およびVH3/L（WT)-IgG1-F1022のマウスFcγRに対する結合活性が、参考実施例２の方法で評価された。その結果を表８に示した。また、それぞれの改変体のマウスFcγRに対する結合活性が、改変を加える前のIgG1に比較して何倍増強しているかを表９に示した。

[0452] [表8]

改変体名	KD (M)			
	mFcγRI	mFcγRIIb	mFcγRIII	mFcγRIV
IgG1	5.3E-08	9.8E-07	2.4E-06	8.6E-08
F1022	7.6E-09	1.0E-08	5.5E-09	1.4E-07
F1087	2.9E-08	5.6E-08	5.2E-08	3.3E-07
F1182	2.4E-09	1.1E-07	4.8E-07	5.3E-10

[0453] [表9]

改変体名	IgG1に対する結合比			
	mFcγRI	mFcγRIIb	mFcγRIII	mFcγRIV
IgG1	1.0	1.0	1.0	1.0
F1022	7.0	93.6	440.5	0.6
F1087	1.8	17.5	46.2	0.3
F1182	22.1	9.1	5.0	162.3

[0454] 表９に示すように、F1087およびF1022は、マウスFcγRI、マウスFcγRIIbおよびマウスFcγRIIIに対する結合活性がIgG1に比べて増強しているが、マウスFcγRIVに対する結合活性は増強していないことが示された。また、F1087のマウスFcγRI、マウスFcγRIIb、マウスFcγRIIIおよびマウスFcγRIVに対する結合活性は、F1022のそれに比較すると、その増強の程度が弱いことが示された。一方、F1182のマウスFcγRIおよびマウスFcγRIVに対する結合活性が大幅に増強している一方で、そのFcγRIIbおよびFcγRIIIに対する結合

活性はF1022およびF1087のぞれに比較すると、その増強の程度は弱いことが示された。このように、これら3種類の改変体は、いずれかのマウスFcγRに対する結合増強効果を示したが、どのFcγRに対して選択的に結合活性が増強するのか、およびその増強の程度は、改変体によって異なっていることが示された。

[0455] （４－４）Fv4-IgG1-F1087およびFv4-IgG1-F1182が投与された生体の血漿中からの抗原消失効果

ヒトFcRnトランスジェニックマウスを用いたin vivo infusion試験が実施例２の方法と同様に実施され、当該マウスの血漿中の可溶型IL-6レセプターの濃度が測定された。その結果を図６に示した。

[0456] マウスFcγR に対する結合活性がFv4-IgG1に比べて増強しているFv4-IgG1-F1087およびFv4-IgG1-F1182が生体内に投与された群では、いずれも、Fv4-IgG1が投与された群に比べて生体中の血漿中可溶型ヒトIL-6レセプターの濃度が低下した。前記の血漿中可溶型ヒトIL-6レセプターの濃度が低下する効果は、特にマウスFcγRIIおよびマウスFcγRIIIに対する結合が増強しているFv4-IgG1-F1087を投与した群において大きかった。一方で、マウスFcγRIおよびマウスFcγRIVに対する結合活性が大幅に向上している（マウスFcγRIIおよびマウスFcγRIIIに対する結合も数倍増強されている）F1182が生体内に投与された群では、F1182の投与による血漿中可溶型ヒトIL-6レセプターの濃度が低下する効果が小さかった。これらの結果から、pH依存的抗原結合抗体の投与されたマウスの血漿中の抗原濃度を効率的に低下させる効果により寄与するマウスFcγRは、マウスFcγRIIおよび/またはマウスFcγRIIIであると考えられた。すなわち、マウスFcγRIIおよび/またはマウスFcγRIIIへの結合が増強したpH依存的抗原結合抗体を生体内に投与することによって、より効率的に生体内の抗原の血漿中濃度を下げることが可能であると考えられた。

[0457] （４－５）FcγRに対する結合活性が天然型ヒトIgGのFc領域の結合活性より高く、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性が増強された抗原結合分子の作製

実施例３において、マウスFcγR に対する結合活性が増強しているFv4-IgG1-F1022のpH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性が増強されたFv4-IgG1-F1093が投与されたヒトFcRnトランスジェニックマウスにおいて、Fv4-IgG1-F1022が投与されたヒトFcRnトランスジェニックマウスと比較して、投与された抗体の血漿中滞留性が大幅に向上することが示された。この効果が、Fv4-IgG1-F1087およびFv4-IgG1-F1182が投与されたヒトFcRnトランスジェニックマウスにおいても示されるかどうか、更には実施例３で検証された改変とは異なる改変が加えられpH酸性域の条件下におけるヒトFcRnに対する結合活性が増強された改変体が投与されたマウスにおいても同様の効果が示されるかどうかが、以下のように検証された。

[0458] Fv4-IgG1-F1087およびFv4-IgG1-F1182のpH酸性域の条件下におけるヒトFcRnに対する結合活性を増強するために、それぞれの重鎖であるVH3-IgG1-F1087およびVH3-IgG1-F1182のEUナンバリングで表される428位のMetがLeuに置換され、434位のAsnがSerに置換されたVH3-IgG1-F1180（配列番号：１２５）およびVH3-IgG1-F1181（配列番号：１２６）が作製された。また、Fv4-IgG1-F1087のpH酸性域の条件下におけるヒトFcRnに対する結合活性を増強するために、重鎖であるVH3-IgG1-F1087のEUナンバリングで表される434位のAsnがAlaに置換されたVH3-IgG1-F1412（配列番号：１２７）が作製された。参考実施例２の方法を用いて、これらを重鎖として含み、VL3-CKを軽鎖として含む、Fv4-IgG1-F1180、Fv4-IgG1-F1181およびFv4-IgG1-F1412が作製された。

[0459] （４－６）pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性が増強された抗体の薬物動態の改善

ヒトFcRnトランスジェニックマウスにそれぞれFv4-IgG1-F1180、Fv4-IgG1-F1181およびFv4-IgG1-F1412を投与するin vivo infusion試験が実施例２の方法と同様に、実施され、当該マウス群の血漿中可溶型IL-6レセプターの濃度が測定された。Fv4-IgG1-F1087、Fv4-IgG1-F1180、Fv4-IgG1-F1412、Fv4-IgG1が投与されたマウス群の血漿中抗体濃度の結果を図７に、Fv4-IgG1-F1182、Fv4-IgG1-F1181、Fv4-IgG1が投与されたマウスの血漿中抗体濃度の結果を図

８に示した。また、当該マウス群における血漿中抗体濃度が実施例３の方法で測定された。当該マウス群におけるFv4-IgG1-F1087、Fv4-IgG1-F1180、Fv4-IgG1-F1412、Fv4-IgG1の血漿中可溶型IL-6レセプター濃度の結果を図９に、Fv4-IgG1-F1182、Fv4-IgG1-F1181、Fv4-IgG1の血漿中可溶型IL-6レセプター濃度の結果を図１０に示した。

[0460] Fv4-IgG1-F1182のpH酸性域におけるヒトFcRnへの結合活性が増強されたFv4-IgG1-F1181が投与されたマウス群において、Fv4-IgG1-F1182が投与されたマウス群に比べて投与された抗体の血漿中滞留性の向上が確認された。一方で、Fv4-IgG1-F1181が投与されたマウス群の血漿中可溶型IL-6レセプター濃度はFv4-IgG1-F1182が投与されたマウス群のそれと同等であり、Fv4-IgG1が投与されたマウス群に比べて血漿中可溶型IL-6レセプター濃度がいずれも低下していた。

[0461] 一方、Fv4-IgG1-F1087のpH酸性域におけるヒトFcRnへの結合活性が増強されたFv4-IgG1-F1180およびFv4-IgG1-F1412が投与されたマウス群においてはいずれも、Fv4-IgG1-F1087が投与されたマウス群に比較して投与された抗体の血漿中滞留性が向上しており、驚くべきことにFv4-IgG1が投与されたマウス群の血漿中滞留性と同程度にまで改善していた。また、抗体の血漿中滞留性の改善に伴い、投与されたマウス群の血漿中可溶型IL-6レセプターの濃度の低減効果の持続性も改善されていた。すなわち、Fv4-IgG1-F1180およびFv4-IgG1-F1412の投与から14日後および21日後における、当該投与を受けたマウス群の血漿中可溶型IL-6レセプターの濃度は、Fv4-IgG1-F1087の投与から14日後および21日後のそれと比較して、有意に低下していた。

[0462] 以上のことから、FcγRに対する結合活性が天然型ヒトIgGのFc領域の結合活性より高い抗原結合分子のpH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性が増強された抗体の投与により、当該投与を受けた生体の血漿中滞留性の向上が可能であることが、Fv4-IgG1-F1093、Fv4-IgG1-F1181、Fv4-IgG1-F1180およびFv4-IgG1-F1412の4例の抗体が投与されたマウス群において示された。さらに、抗原結合分子が投与された生体の血漿中滞留性が向上しても、当該生

体における抗原消失効果は減弱することはなく、むしろ抗原消失効果を持続させることが可能であることが示された。

[0463] （４－７）pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性を増強し、リウマチ因子への結合を抑制した抗原結合分子の作製

ヒト化抗CD4抗体のpH酸性域の条件下においてヒトFcRnに対する結合活性を増強し、血漿中滞留性を向上させるために、EUナンバリングで表される434位のAsnがHisに置換された抗体分子が、リウマチ因子（Rheumatiod factor、RF）に対して結合することが、近年報告された（Clin. Pharmacol. Ther.（2011）89（2），283-290）。この抗体はヒトIgG1のFc領域を有し、FcRnに対する結合部位に位置するEUナンバリングで表される434位のAsnがHisに置換されているが、その置換された箇所を認識するリウマチ因子が結合することが示されている。

[0464] 実施例（４－６）で示されたように、マウスFcγR に対する結合活性が増強しているFv4-IgG1-F1087のpH酸性域の条件下におけるヒトFcRnに対する結合活性を増強させたFv4-IgG1-F1180が、ヒトFcRnトランスジェニックマウスに投与された場合において、Fv4-IgG1-F1087が投与された場合に比較して血漿中滞留性が向上していることが示された。pH酸性域の条件下においてヒトFcRnに対する結合活性を増強するための改変として、様々なものが報告されているが、それらの改変のうち重鎖のEUナンバリングで表される428位のMetがLeuに置換され、434位のAsnがSerに置換された改変体はリウマチ因子への結合が増強されることが報告されている。

[0465] しかしながら、これらのEUナンバリングで表される428位および434位の置換に加えて、EUナンバリングで表される436位のTyrがThrに置換された改変体は、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRnに対する結合活性は増強されたまま、リウマチ因子への結合が顕著に低下する

[0466] すなわち、pH酸性域の条件下においてFcRnに対する結合活性を低下させることなく、リウマチ因子に対する結合活性のみを低下させる改変を、Fc領域の当該部位に導入することにより、リウマチ因子に対する結合性を持たずにp

H酸性域の条件下におけるヒトFcRnに対する結合活性が増強している抗原結合分子を作製することが可能である。

[0467] そのような、リウマチ因子に対する結合活性を低下させる改変として、EUナンバリングで表される248-257、305-314、342-352、380-386、388、414-421、423、425-437、439、441-444位の改変が用いられる。好ましくは、EUナンバリングで表される387、422、424、426、433、436、438、440位の改変が好ましく用いられる。特に好ましくは、EUナンバリングで表される422位のValをGluまたはSerに置換する改変、424位のSerをArgに置換する改変、433位のHisをAspに置換する改変、436位のTyrをThrへ置換する改変、438位のGlnをArgまたはLysに置換する改変、440位のSerをGluまたはAspに置換する改変が用いられる。これらの改変は、単独で用いられても良いし、複数箇所を組み合わせて用いても良い。

[0468] あるいは、リウマチ因子に対する結合活性を低下させるために、N型糖鎖の付加配列を導入しても良い。具体的には、N型糖鎖付加配列としてAsn-Xxx-Ser/Thr（XxxはProを除く任意のアミノ酸）が知られているが、この配列をFc領域に導入することによりN型糖鎖を付加させ、N型糖鎖の立体障害によってRFとの結合を阻害することが可能である。N型糖鎖を付加するための改変として、好ましくは、EUナンバリングで表される248位のLysをAsnに置換する改変、424位のSerをAsnに置換する改変、436位のTyrをAsnに置換し438位のGlnをThrに置換する改変、438位のQlnをAsnに置換する改変が用いられる。特に好ましくは、EUナンバリングで表される424位のSerをAsnに置換する改変が用いられる。

[0469] （４－８）pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性が増強され、リウマチ因子への結合が低下した抗原結合分子の薬物動態の改善効果の検証

上記のリウマチ因子に対する結合活性を低下させる改変を含む抗体の効果を検証するため、Fv4-IgG1-F1087の重鎖に対して、EUナンバリングで表される428位のMetがLeuに置換され、434位のAsnがSerに置換され、更に436位のTyrがThrに置換されたFv4-IgG1-F1782が、参考実施例２の方法を用いて作製さ

れた。実施例（４－７）に記載されたように、Fv4-IgG1-F1782は、天然型ヒトIgG1と比較して、マウスFcγR に対する結合活性が増強され、酸性pH条件下におけるヒトFcRnに対する結合活性が増強されているが、一方でリウマチ因子に対する結合性は増強していない抗体である。Fv4-IgG1-F1782が、Fv4-IgG1-F1087と比較して血漿中滞留性が向上しているかどうかを検証するために、これらの抗体が投与されたヒトFcRnトランスジェニックマウスの血漿中における当該抗体の薬物動態が、実施例２の方法と同様に評価された。血漿中可溶型ヒトIL-6レセプターの濃度は、実施例（２－１－２）に記載の方法で測定され、血漿中抗体濃度は実施例（３－２－１）に記載の方法で測定された。

[0470] 血漿中抗体濃度推移の結果を図１１に、血漿中可溶型ヒトIL-6レセプター濃度推移の結果を図１２に示した。Fv4-IgG1-F1782は、Fv4-IgG1-F1087と比較して、抗体の血漿中滞留性が向上していることが示された。一方で、上記の抗体が投与された群の血漿中可溶型ヒトIL-6レセプター濃度は、Fv4-IgG1を投与された群のそれと比較して、顕著に低下していた。

[0471] 特定の理論に拘束されるものではないが、これらの結果について、以下のように解釈することも可能である。実施例３および４の結果から、FcγRに対する結合活性が天然型ヒトIgGのFc領域の結合活性より高い抗原結合分子のpH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性が増強している抗体の投与により、当該投与を受けた生体の血漿中滞留性の向上が可能であることが示された。さらに、抗原結合分子が投与された生体の血漿中滞留性が向上しても、当該生体における抗原消失効果は減弱することはなく、むしろ抗原消失効果を持続させることが可能であることが示された。

[0472] しかしながら、これらのpH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性を増強させるための改変が導入された抗原結合分子は、リウマチ因子に対する結合性が増強することが懸念される。そこで、当該結合分子に、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性は維持したままでリウマチ因子に対する結合性を低下させる変異を導入することにより、リウマチ因子に対する結合性を

増加させることなく、血漿中滞留性を向上させることが可能である。

[0473] 言いかえれば、pH依存的に抗原に結合する性質を有し、FcγRに対する結合活性が天然型ヒトIgGのFc領域の結合活性より高く、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性が増強されており、更にリウマチ因子に対する結合性が低下した抗原結合分子が生体内に投与された場合に、当該生体内の可溶型抗原の濃度を効果的に低下させ、当該抗原結合分子のリウマチ因子に対する結合性を増加させることなく血漿中滞留性が向上されるという、優れた性質を当該抗原結合分子が有することが明らかとなった。

[0474] 〔実施例５〕FcγRに対する結合活性が天然型マウスIgGのFc領域の結合活性より高い抗原結合分子が投与された生体の血漿中からの抗原消失効果

（５－１）FcγRに対する結合活性を増強したマウス抗体が投与された生体の血漿中からの抗原消失効果

実施例１から４において、ヒト抗体のFc領域を有し、pH依存的にヒトIL-6レセプターに結合する性質を有する抗原結合分子のマウスFcγRに対する結合活性を増強させた抗原結合分子が投与されたヒトFcRnトランスジェニックマウス群において、当該マウスの血漿中可溶型ヒトIL-6レセプターの消失が早められていることが確認された。この効果が、マウスFcRnを有するノーマルマウスにおいて、マウス抗体のFc領域を有し、pH依存的にヒトIL-6レセプターに結合する性質を有する抗原結合分子が投与されたマウスFcRnを有するノーマルマウスにおいても示されるかどうかが、以下に示すように検証された。

[0475] （５－２）FcγRに対する結合活性が増強されたマウス抗体の作製

pH依存的にヒトIL-6レセプターに結合する性質を有するマウスIgG1抗体の重鎖としてVH3-mIgG1（配列番号：１２８）、軽鎖としてVL3-mk1（配列番号：１２９）が参考実施例２の方法を用いて作製された。また、VH3-mIgG1のマウスFcγRに対する結合活性を増強するために、EUナンバリングで表される327位のAlaがAspに置換されたVH3-mIgG1-mF44（配列番号：１３０）が作製された。同様に、VH3-mIgG1のEUナンバリングで表される239位のSerがAspに置換

され、327位のAlaがAspに置換されたVH3-mIgG1-mF46（配列番号：１３１）が作製された。VH3-mIgG1、VH3-mIgG1-mF44あるいはVH3-mIgG1-mF46を重鎖として含み、VL3-mk1を軽鎖として含む、Fv4-mIgG1、Fv4-mIgG1-mF44あるいはFv4-mIgG1-mF46が、参考実施例２の方法を用いて作製された。

[0476] （５－３）FcγRに対する結合活性が増強されたマウス抗体のマウスFcγRに対する結合活性の確認

VH3-mIgG1、VH3-mIgG1-mF44あるいはVH3-mIgG1-mF46を重鎖として含み、L(WT)-CK（配列番号：４２）を軽鎖として含むVH3/L（WT)-mIgG1、VH3/L（WT)-mIgG1-mF44あるいはVH3/L（WT)-mIgG1-mF46が参考実施例２の方法で作製された。これらの抗体のマウスFcγRに対する結合活性が、参考実施例２５の方法で評価された。その結果を表１０に示した。また、それぞれの改変体のマウスFcγRに対する結合活性が、改変を加える前のmIgG1に比較して何倍増強しているかを表１１に示した。

[0477] [表10]

改変体名	KD (M)			
	mFcγRI	mFcγRIIb	mFcγRIII	mFcγRIV
mIgG1	検出せず	1.1E-07	2.1E-07	検出せず
mF44	検出せず	8.9E-09	6.7E-09	検出せず
mF46	検出せず	1.2E-09	3.6E-09	検出せず

[0478] [表11]

改変体名	mIgG1に対する結合比			
	mFcγRI	mFcγRIIb	mFcγRIII	mFcγRIV
mIgG1	検出せず	1.0	1.0	検出せず
mF44	検出せず	11.9	31.0	検出せず
mF46	検出せず	91.4	57.5	検出せず

[0479] 天然型マウスIgG1抗体のFc領域を有するVH3/L（WT)-mIgG1は、マウスFcγRIおよびマウスFcγRIVに対しては結合を示さず、マウスFcγRIIb およびマウスFcγRIIIに対してのみ結合を示した実施例４の検討結果から、抗原濃度を低下させるのに重要なマウスFcγRはマウスFcγRIIおよび、あるいはマウスFcγRIIIであることが示唆されている。また、VH3/L（WT)-mIgG1のFcγRに

対する結合活性を増強すると考えられる改変が導入されたVH3/L (WT)-mIgG-mF44およびVH3/L (WT)-mIgG1-mF46のマウスFcγRIIbおよびマウスFcγRIIIに対する結合活性はいずれも増強していることが示された。

[0480] （５－４）ノーマルマウスにおける血漿中可溶型IL-6レセプター濃度の低減効果の確認

抗ヒトIL-6レセプター抗体としてFv4-mIgG1、Fv4-mIgG1-mF44あるいはFv4-mIgG1mF46が投与されたノーマルマウスの血漿中可溶型IL-6レセプターの消失効果が以下のように検証された。

[0481] ノーマルマウス（C57BL/6J mouse、Charles River Japan）の背部皮下に可溶型ヒトIL-6レセプターが充填されたinfusion pump（MINI-OSMOTIC PUMP MODEL2004、alzet）を埋め込むことで、血漿中可溶型ヒトIL-6レセプター濃度が定常状態に維持される動物モデルが作製された。その動物モデルに抗ヒトIL-6レセプター抗体を投与した後の可溶型ヒトIL-6レセプターの体内動態が評価された。可溶型ヒトIL-6レセプターに対する抗体の産生を抑制するため、モノクローナル抗マウスCD4抗体が尾静脈に20 mg/kgで単回投与された。その後、92.8μg/mLの可溶型ヒトIL-6レセプターが充填されたinfusion pumpがマウス背部皮下へ埋め込まれた。Infusion pumpが埋め込まれた3日後に、抗ヒトIL-6レセプター抗体が1 mg/kgで尾静脈に単回投与された。抗ヒトIL-6レセプター抗体投与後15分、7時間、1日、2日、4日、7日、14日（あるいは15日）、21日（あるいは22日）が経過した後に当該マウスから採血された。採取された血液を直ちに4℃、15,000 rpmで15分間遠心分離することによって、血漿が得られた。分離された血漿は、測定を実施するまで-20℃以下に設定された冷凍庫に保存された。

[0482] 血漿中の可溶型ヒトIL-6レセプター濃度は、実施例（２－１－２）の方法で測定された。その結果を図１３に示した。

[0483] 驚くべきことに、mIgG1（天然型マウスIgG1）のマウスFcγRIIbおよびマウスFcγRIIIに対する結合活性を増強する改変が導入されたmF44およびmF46が投与されたマウスでは、mIgG1が投与されたマウスに比較して血漿中IL-6レセ

プター濃度の顕著な低下がいずれも確認された。特に、mF44の投与後21日目においても、mF44投与群の血漿中IL-6レセプター濃度は抗体非投与群の血漿中IL-6レセプター濃度に比べて約6倍、mIgG1投与群に比較すると約10倍低下していた。一方、mF46の投与後７日目において、mF46投与群の血漿中IL-6レセプター濃度は抗体非投与群の血漿中IL-6レセプター濃度に比べて約30倍、mIgG1投与群に比較すると約50倍と、顕著に低下していた。

[0484] 以上のことから、ヒトIgG1抗体のFc領域を有する抗原結合分子のマウスFcγRに対する結合活性が増強している抗体と同様に、マウスIgG1抗体のFc領域を有する抗原結合分子のマウスFcγRに対する結合活性が増強している抗体が投与されたマウスにおいても、血漿中可溶型IL-6レセプターの消失が加速していることが示された。特定の理論に拘束されるものではないが、ここでみられた現象は以下のように説明することも可能である。

[0485] pH依存的に可溶型抗原に結合し、かつFcγRに対する結合活性を増強している抗体がマウスに投与されると、主に細胞膜上にFcγRを発現している細胞に積極的に取り込まれる。取り込まれた抗体はエンドソーム内の酸性pHの条件下において可溶型抗原を解離した後にFcRnを介して血漿中にリサイクルされる。そのため、このような抗体による血漿中の可溶型抗原を消失させる効果をもたらす要素の一つとしては、当該抗体のFcγRに対する結合活性の強さが挙げられる。すなわち、FcγRに対する結合活性が強いほど、より積極的にFcγR発現細胞へと取り込まれ、血漿中の可溶型抗原を速く消失させることが可能であると考えられる。また、そのような効果は、抗体に含まれるFc領域の由来がヒトIgG1であってもマウスIgG1であっても、FcγRに対する結合活性が増強している限りは、同様に検証できると考えられる。つまり、ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG3、ヒトIgG4、マウスIgG1、マウスIgG2a、マウスIgG2b、マウスIgG3、ラットIgG、サルIgG、ウサギIgGなど、いかなる動物種のFc領域であっても、投与される動物種のFcγRに対する結合活性が増強している限りは、いずれを用いても検証することが可能であると考えられる。

[0486] 〔実施例６〕FcγRIIb選択的に結合を増強した抗体による抗原消失効果

（６－１）FcγRIIbに対する結合活性が選択的に増強された抗体の抗原消失効果

FcγRIII欠損マウス（B6.129P2-FcgrFcγR3tm1Sjv/J mouse, Jackson Laboratories）は、マウスFcγRI、マウスFcγRIIb、マウスFcγRIVを発現しているが、マウスFcγRIIIを発現しないマウスである。一方、Fc受容体γ鎖欠損マウス（Fcer1g mouse, Taconic, Cell (1994) 76, 519-529）は、マウスFcγRIIbのみを発現し、マウスFcγRI、マウスFcγRIII、マウスFcγRIVを発現しないマウスである。

[0487] 実施例５において、天然型マウスIgG1に対してFcγRへの結合活性を増強させたmF44およびmF46は、マウスFcγRIIbおよびマウスFcγRIIIに対して選択的に結合が増強されていることが示された。この選択的に増強された抗体の結合活性を利用し、マウスFcγRIIIを発現しない、マウスFcγRIII欠損マウスまたはFc受容体γ鎖欠損マウスにmF44およびmF46を投与することにより、マウスFcγRIIbに対する結合が選択的に増強された抗体を投与する状況を模倣することが可能であると考えられた。

[0488] （６－２）FcγRIII欠損マウスを用いたマウスFcγRIIbに対する結合が選択的に増強された抗体が投与された生体における抗原消失効果の検証

抗ヒトIL-6レセプター抗体としてFv4-mIgG1、Fv4-mIgG1-mF44あるいはFv4-mIgG1-mF46が投与されたFcγRIII欠損マウスの血漿中可溶型IL-6レセプターの消失効果が、実施例５の方法と同様に検証された。当該マウスの血漿中の可溶型ヒトIL-6レセプター濃度は、実施例（２－１－２）の方法で測定された。その結果を図１４に示した。

[0489] 驚くべきことに、mIgG1（天然型マウスIgG1）のマウスFcγRIIbに対する結合活性が選択的に増強された状況が模倣されたmF44およびmF46が投与されたFcγRIII欠損マウスの血漿中IL-6レセプター濃度は、いずれも、mIgG1が投与されたマウスの血漿中IL-6レセプター濃度に比較していずれも顕著に低下したことが確認された。特に、mF44の投与群の血漿中IL-6レセプター濃度は、mIgG1投与群のそれに比較して約３倍程度に低下させ、抗体投与によって起こ

る抗原濃度の蓄積が抑制されていた。一方、mF46の投与群の血漿中IL-6レセプター濃度は、投与後３日目において、抗体非投与群の血漿中IL-6レセプター濃度に比べて約6倍、mIgG1投与群の血漿中IL-6レセプター濃度に比較すると約25倍と、顕著に低下した。この結果から、pH依存的に抗原に結合する抗ヒトIL-6レセプター抗体のマウスFcγRIIbに対する結合活性が高いほど、それが投与されたときにマウスの血漿中IL-6レセプター濃度をより低下させることが可能であることが示された。

[0490] （６－３）Fc受容体γ鎖欠損マウスを用いたマウスFcγRIIbに対する結合が選択的に増強された抗体が投与された生体の血漿中の抗原消失効果の検証

抗ヒトIL-6レセプター抗体としてFv4-mIgG1、Fv4-mIgG1-mF44またはFv4-mIgG1mF46が投与されたFc受容体γ鎖欠損マウスの血漿中可溶型IL-6レセプターの消失効果が、実施例５の方法と同様に検証された。当該マウスの血漿中の可溶型ヒトIL-6レセプター濃度は、実施例（２－１－２）の方法で測定された。その結果を図１５に示した。

[0491] FcγRIII欠損マウスにmF44およびmF46が投与されたときと同様に、mIgG1（天然型マウスIgG1）に対してマウスFcγRIIbに対する結合活性のみが選択的に増強された状況が模倣されたmF44およびmF46が投与されたFc受容体γ鎖欠損マウスの血漿中IL-6レセプター濃度は、いずれも、mIgG1が投与されたFc受容体γ鎖欠損マウスの血漿中IL-6レセプター濃度に比較して顕著に低下したことが確認された。特に、mF44の投与群の血漿中IL-6レセプター濃度は、mIgG1投与群の血漿中IL-6レセプター濃度に比較して約３倍程度に低下し、抗体投与によって起こる抗原濃度の蓄積が抑制されていた。一方、mF46の投与群の血漿中IL-6レセプター濃度は投与後３日目において、抗体非投与群の血漿中IL-6レセプター濃度に比べて約５倍、mIgG1投与群の血漿中IL-6レセプター濃度に比較すると約15倍と、顕著に低下した。

[0492] 実施例（６－２）および（６－３）の結果から、pH依存的に可溶型抗原に結合し、マウスFcγRIIbに対する結合活性が選択的に増強された抗体が投与された群の血漿中の可溶型抗原濃度は大幅に低下する可能性が示された。

[0493] 〔実施例７〕FcγRIIIに対する結合が選択的に増強された抗体による抗原消失効果

（７－１）FcγRIIIに対する結合活性が選択的に増強された抗体が投与された生体の血漿中の抗原消失効果

FcγRIIb欠損マウス（FcgrFcγR2b(FcγRII) mouse, Taconic）（Nature (1996) 379 (6563), 346-349）は、マウスFcγRI、マウスFcγRIII、マウスFcγRIVは発現するが、マウスFcγRIIbを発現しないマウスである。実施例５において、天然型マウスIgG1のFcγRへの結合活性を増強させたmF44およびmF46は、マウスFcγRIIbおよびマウスFcγRIIIに対して選択的に結合が増強していることが示された。この選択的に増強された抗体の結合活性を利用し、マウスFcγRIIbを発現しないマウスFcγRIIb欠損マウスにmF44およびmF46を投与することにより、マウスFcγRIIIに対する結合が選択的に増強された抗体を投与する状況を模倣することが可能であると考えられた。

[0494] 実施例６において、マウスFcγRIIbに対する結合活性が選択的に増強された抗体が投与された状況が模倣されたFcγRIII欠損マウスの血漿中の可溶型抗原濃度が低下することが示された。一方で、マウスFcγRIIIに対する結合活性が選択的に増強した抗体が投与された状況が模倣されたFcγRIIb欠損マウスの血漿中の可溶型抗原濃度が低下するかどうかが以下の試験によって確認された。

[0495] （７－２）FcγRIIb欠損マウスを用いたマウスFcγRIII選択的結合増強による抗原消失効果の検証

FcγRIIb欠損マウスに抗ヒトIL-6レセプター抗体としてFv4-mIgG1、Fv4-mIgG1-mF44あるいはFv4-mIgG1mF46が投与されたFcγRIIb欠損マウスの血漿中可溶型IL-6レセプターの消失効果が、実施例５の方法と同様に検証された。血漿中の可溶型ヒトIL-6レセプター濃度は、実施例（２－１－２）の方法で測定された。その結果を図１６に示した。

[0496] 驚くべきことに、mIgG1（天然型マウスIgG1）のマウスFcγRIIIに対する結合活性が選択的に増強したことが模倣されたmF44およびmF46の投与群では、

血漿中IL-6レセプター濃度は低下したが実施例６で示されたほどの低下は確認されなかった。

[0497] 特定の理論に拘束されるものではないが、実施例５、６および７の結果から、以下のように考察することも可能である。mIgG1（天然型マウスIgG1）のマウスFcγRIIbおよびマウスFcγRIIIに対する結合活性が選択的に増強されたmF44およびmF46が投与されたマウスFcγRIIbおよびマウスFcγRIIIの両方を発現するノーマルマウスの血漿中可溶型IL-6レセプターの消失は顕著に加速することが確認された。また、マウスFcγRIIbは発現するものの、マウスFcγRIIIを発現していないマウス（FcγRIII欠損マウス、および、Fc受容体γ鎖欠損マウス）に、mF44およびmF46が投与された場合でも当該マウスの血漿中可溶型IL-6レセプターの消失は顕著に加速することが確認された。一方で、マウスFcγRIIIは発現するものの、マウスFcγRIIbを発現していないマウス（FcγRII欠損マウス）に、mF44およびmF46が投与された場合には、当該マウスの血漿中可溶型IL-6レセプターの消失は、FcγRIII欠損マウス、および、Fc受容体γ鎖欠損マウスに投与された程度には加速されなかった。

[0498] 以上のことから、mIgG1（天然型マウスIgG1）のマウスFcγRIIbおよびマウスFcγRIIIに対する結合活性が選択的に増強された抗体であるmF44およびmF46は、主にマウスFcγRIIbを介してFcγRを発現する細胞に取り込まれることによって、当該抗体に結合する血漿中の可溶型抗原が消失していると考えられる。一方で、FcγRIIIを介した抗体抗原複合体のFcγR発現細胞への取込みは、血漿中の可溶型抗原の消失に対して大きく寄与していないと考えられる。

[0499] また、実施例４において示されたように、特にマウスFcγRIIbおよびマウスFcγRIIIに対する結合活性が向上しているFv4-IgG1-F1087が投与されたマウスの血漿中可溶型IL-6レセプター濃度は顕著に低下した一方で、特にマウスFcγRIおよびマウスFcγRIVに対する結合活性が向上しているFv4-IgG1-F1182が投与されたマウスの血漿中可溶型IL-6レセプターの消失効果は、Fv4-IgG1-F1087のそれと比較すると小さかった。

[0500] さらに、実施例２において低フコース型糖鎖を有するためにマウスFcγRIVに対する結合活性が大幅に増強されている（Science (2005) 310 (5753) 1510-1512）Fv4-IgG1-Fucが投与されたマウスの血漿中可溶型IL-6レセプター濃度は、Fv4-IgG1が投与されたマウスの血漿中可溶型IL-6レセプター濃度と比較すると低下したものの、その低下の効果は2倍程度と小さかった。そのため、マウスFcγRIVを介した抗体のFcγR発現細胞への取り込みは、血漿中の可溶型抗原の消失に対して大きく寄与していないと考えられる。

[0501] これらのことから、マウスにおいて抗体のFcγR発現細胞への取込みには、複数あるマウスFcγRの中で、マウスFcγRIIbおよびマウスFcγIII、特にマウスFcγRIIbが主な役割を発揮していることが見出された。そのため、特に限定されるものではないが、マウスFcγR結合ドメインに導入される変異としては、マウスFcγRIIbおよびマウスFcγIIIに対する結合を増強、特にマウスFcγRIIbに対する結合を増強する変異が好ましいとも考えられ得る。

[0502] 本検討によって、pH依存的に可溶型抗原に結合し、FcγRに対する結合活性が増強された抗原結合分子を投与することによって、投与された生体の血漿中の可溶型抗原の消失を早めるためには、投与される抗体のマウスFcγRIIbおよびマウスFcγIIIに対する結合活性、特にFcγRIIbに対する結合活性を増強することがより好ましいことがマウスにおいて示された。つまり、pH依存的に可溶型抗原に結合し、マウスFcγRIIbおよびマウスFcγIIIに対する結合活性、特にFcγRIIbに対する結合活性を増強させた抗原結合分子は、生体内に投与された場合に、血漿中の可溶型抗原の消失を早めて、血漿中の可溶型抗原濃度を効果的に低下させることが可能であり、極めて有効な作用を示すことが明らかとなった。

[0503] 〔実施例８〕FcγRIIbに対する結合を増強する既存の改変が加えられたFc領域を含む抗体の血小板凝集能の評価

（８－１）FcγRIIbに対する結合を増強する既存の改変が加えられたFc領域を含む抗体の作製

実施例７に記したように、FcγRIIbに対する選択的に結合活性が増強され

た抗体を生体に投与することで、当該生体の血漿中から抗原を効率的に消失させることが可能である。また、FcγRIIbに対する結合活性が選択的に増強されたFc領域を含む抗体を投与することは、抗体が投与される生体にとって安全性、副作用の観点でも好ましいと考えられた。

[0504] しかしながら、mF44やmF46は、マウスFcγRIIbとマウスFcγRIIIの両方に対して結合が増強しており、マウスFcγRIIbに対する選択的な結合は増強していない。これはマウスFcγRIIbとマウスFcγRIIIのホモロジーが高いことから、両者を識別しつつマウスFcγRIIbに対する選択的な結合を増強する改変を見出すことは困難であるためとも考えられる。また、これまでにマウスFcγRIIbに対する選択的な結合が増強されたFc領域は報告されていない。同様に、ヒトFcγRIIbとヒトFcγRIIa（131Argおよび131Hisの両アロタイプ）とのホモロジーも高いことが知られている。また、両者を識別しつつ、ヒトFcγRIIbに対する選択的な結合が増強された改変を含むFc領域もこれまで報告されていない（Seungら（Mol. Immunol. (2008) 45, 3926-3933）、Greenwoodら（Eur. J. Immunol. (1993) 23 (5), 1098-1104））。また、FcγRIIaに対する結合が抗体による血小板の凝集活性に重要な役割を果たしていることがこれまでに報告されている（Meyerら（J. Thromb. Haemost. (2009), 7 (1), 171-181）、Robles-Carrilloら（J. Immunol. (2010), 185 (3), 1577-1583））。これらの報告からFcγRIIaに対する結合が増強された抗体がが投与された生体が血栓症を発症するリスクを高める可能性がある。そこで、抗体のFcγRIIaに対する結合が増強された抗体の血小板凝集活性が増強しているか否かが下記のように検証された。

[0505] （８－２）FcγRIIbに対する結合を増強する既存の改変が加えられたFc領域を含む抗体のヒトFcγRに対する結合活性の評価

ヒトFcγRIIbに対する結合を増強する既存の改変が加えられたFc領域を含む抗体の、ヒトFcγRIa、FcγRIIaのR型およびH型、FcγRIIb、FcγRIIIaに対するアフィニティーが下記のように解析された。抗体H鎖可変領域としてWO 2009/125825に開示されているヒトインターロイキン6レセプターに対する抗

体の可変領域であるIL6R-H（配列番号：１３２）を、抗体H鎖定常領域としてヒトIgG1のC末端のGlyおよびLysを除去したG1dを有するIL6R-G1d（配列番号：１３３）を含むH鎖が作製された。次に、IL6R-G1dのFc領域がSeungら（Mol. Immunol. (2008) 45, 3926-3933）に記載されている改変であるEUナンバリング267位で表されるSerのGluへの置換、EUナンバリング328位で表されるLeuのPheへの置換によって改変されたIL6R-G1d-v3（配列番号：１３８）が作製された。抗体L鎖としてヒトインターロイキン6レセプターに対する抗体のL鎖であるIL6R-L（配列番号：１３５）を共通に用い、それぞれのH鎖と共に参考実施例１の方法に従い発現させた抗体が精製された。IL6R-G1d、IL6R-G1d-v3を重鎖として含む抗体は、それぞれIgG1、IgG1-v3と以下で呼ばれる。

[0506] 次に、これらの抗体とFcγRとの相互作用が、Biacore T100（GE Healthcare）を用いて速度論的に解析された。ランニングバッファーとしてHBS-EP+（GE Healthcare）を用い、当該相互作用が25℃の温度で測定された。アミンカップリング法によりProtein AがSeries S Sencor Chip CM5（GE Healthcare）に固定化されたチップが用いられた。このチップへキャプチャーさせた目的の抗体と、ランニングバッファーで希釈した各FcγRを相互作用させ、抗体に対する各FcγRの結合が測定された。測定後は10 mM glycine-HCl、pH1.5をチップに反応させることで、チップにキャプチャーされた抗体が洗浄されることによって、再生されたチップが繰り返し用いられた。測定結果として得られたセンサーグラムをBiacore Evaluation Softwareにより1:1 Langmuir binding modelで解析することで算出された結合速度定数ka（L/mol/s）、解離速度定数kd（1/s）の値から解離定数KD（mol/L）が算出された。IgG1、IgG1-v3の各FcγRに対するKD値を表１２（各抗体の各FcγRに対するKD値）に、またIgG1の各FcγRに対するKD値をIgG1-v3の各FcγRに対するKD値で除したIgG1-v3の相対的なKD値を表１３に示した。

[0507]

[表12]

抗体	KD (M)				
	Fcγ RIa	Fcγ RIIaR	Fcγ RIIaH	Fcγ RIIb	Fcγ RIIIa
IgG1	3.4E-10	1.2E-06	7.7E-07	5.3E-06	3.1E-06
IgG1-v3	1.9E-10	2.3E-09	1.5E-06	1.3E-08	8.8E-06

[0508] [表13]

	Fcγ RIa	Fcγ RIIaR	Fcγ RIIaH	Fcγ RIIb	Fcγ RIIIa
KD 値比	1.8	522	0.51	408	0.35

[0509] （８－３）血小板凝集能の評価

次に、IgG1のFc領域におけるEUナンバリングで表される267位のSerがGluに、328位のLeuがPheに置換されたFc 領域を含む抗体のFcγRIIaに対するアフィニティーの強弱によって血小板凝集能が変化するかがFcγRIIaのH型、R型のドナー由来の血小板を用いて検証された。IgEに結合するhIgG1抗体（ヒトIgG1定常領域）の重鎖可変領域およびG1d重鎖定常領域を含む重鎖omalizumab_VH-G1d（配列番号：１３６）、軽鎖としてomalizumab_VL-CK（配列番号：１３７）を含む抗体が参考実施例２の方法を用いて作製された。また、omalizumab_VH-G1dのEUナンバリングで表される267位のSerがGluに、328位のLeuがPheに置換されたomalizumab_VH-G1d-v3（配列番号：１３８）が作製された。参考実施例２の方法を用いて、omalizumab_VH-G1d-v3を重鎖として含み、omalizumab_VL-CKを軽鎖として含む、omalizumab-G1d-v3が作製された。この抗体の血小板凝集能が評価された。

[0510] 血小板凝集は、血小板凝集能測定装置ヘマトレーサー712（株式会社エル・エム・エス）を用いて測定された。まず、0.5 mLの3.8%クエン酸ナトリウムを含む4.5 mL真空採血管に一定分量ずつ採取された約50 mLの全血を200 gで15分間、遠心分離することによって回収された上清がPlatelet Rich Plasma（PRP）として使用された。緩衝液Ａ（137 mM NaCl、2.7 mM KCl、12 mM $NaHCO_3$、0.42 mM NaH_2PO_4、2 mM $MgCl_2$、5 mM HEPES、5.55 mM dextrose、1.5 U/mL apyrase、0.35 % BSA）を用いて洗浄されたPRPは、さらに緩衝液Ｂ（137 mM NaCl、2.7 mM KCl、12 mM $NaHCO_3$、0.42 mM NaH_2PO_4、2 mM $MgCl_2$、5 mM HEPES

、5.55 mM dextrose、2 mM $CaCl_2$、0.35 % BSA）に置換された。その結果、約300,000/μLの密度の洗浄血小板が調製された。血小板凝集能測定装置に設置された、攪拌棒を含む測定用キュベットに156 μLの洗浄血小板が分注された。当該装置内で37.0℃に維持されたキュベット内で、血小板は攪拌棒により1000 rpmで攪拌された。そこに最終濃度がそれぞれ600 μg/mL及び686 μg/mLとなるように調製されたモル比1:1のomalizumab-G1d-v3とIgEの免疫複合体を44 μL加え、血小板と当該免疫複合体を5分間反応させた。さらに、二次凝集を起こさない濃度のアデノシン2リン酸（ADP、SIGMA）が反応液に加えられ、凝集が増強されるかが確認された。

[0511] このアッセイで得られた、FcγRIIaの遺伝子多型（R/HまたはH/H）のドナーごとの血小板凝集の結果をそれぞれ図１７および１８に示した。図１７の結果から、FcγRIIaの多型（R/H）を有するドナーの血小板に、免疫複合体を添加した場合に血小板凝集が観察された。一方、図１８に示した通り、FcγRIIa多型（H/H）を有するドナーの血小板に、免疫複合体を添加した場合には血小板凝集が観察されなかった。

[0512] 次に活性化マーカーを使って血小板の活性化が評価された。血小板の活性化は、CD62p（p-selectin）もしくは活性型インテグリンといった活性化マーカーの血小板膜表面における発現増加によって測定することができる。先述の方法により調製された洗浄血小板7.7μLの洗浄血小板に免疫複合体を2.3μL添加し室温で5分間反応させた後、さらに最終濃度が30μMになるようにADPを添加して活性化が惹起され、免疫複合体によってADPによる活性化が増強されるかが確認された。陰性対照には免疫複合体の代わりにリン酸緩衝液（pH7.4）（Gibco）を添加したサンプルが用いられた。反応後の各サンプルにPE標識抗CD62抗体（BECTON DICKINSON）、PerCP標識抗CD61抗体、FITC標識PAC-1抗体（BD bioscience）を加えることによって染色された。各染色の蛍光強度がフローサイトメーター（FACS CantoII、 BD bioscience）を用いて測定された。

[0513] このアッセイ法で得られたCD62p発現の結果を図１９に、活性化インテグリ

ン発現の結果を図２０に示した。洗浄血小板としてFcγRIIaの多型がR/Hである一名の健常人から得た洗浄血小板が使用された。ADP刺激により血小板膜表面に発現誘導されるCD62p及び活性型インテグリンの発現量は、免疫複合体存在下においていずれも増加された。

[0514] これらの結果から、IgG1のFc領域のEUナンバリングで表される267位のSerがGluに、328位のLeuがPheに置換されたヒトFcγRIIbに対する結合を増強する既存の改変が加えられたFc領域を含む抗体は、FcγRIIaの遺伝子多型のうち131番目のアミノ酸がHであるFcγRIIaを発現している血小板と比べて、131番目のアミノ酸がRであるFcγRIIaを発現している血小板の凝集を促進することが明らかとなった。すなわち、既存のヒトFcγRIIbに対する結合を増強する既存の改変が加えられたFc領域を含む抗体がFcγRIIa R型を少なくとも一方のアレルに有するヒトに投与された場合には、血小板凝集による血栓症発症のリスクを高める危険性が示唆された。FcγRIIbに対してより選択的な結合を増強する本発明のFc領域を含む抗原結合分子は、抗原の血漿中滞留性の改善のみならず、上記の問題点を克服する可能性が示され、本発明の抗原結合分子の有用性が明白である。

[0515] （８－４）FcγRIIbに対する結合が選択的に増強されたFc（BP230）と既存のFcγRIIbに対する結合が選択的に増強されたFcを含む抗体の血小板凝集能の比較

（８－４－１）FcγRIIbに対する結合が選択的に増強された抗体の作製

実施例（８－３）に述べたように、FcγRIIaに対する結合が増強された抗体は、その血小板凝集能および血小板活性化能が増強され、ヒトに投与された際血栓症の発症リスクを高める可能性があることが示された。一方で、血小板に発現するFcγRがFcγRIIaのみであることを考慮すると、FcγRIIbに対する結合が選択的に増強された抗体は、その血小板凝集能および活性化能は増強されず、ヒトに投与されても血栓症の発症リスクを高めることはないと考えられる。これを確認するために、実際にFcγRIIbに対する結合が選択的に増強された抗体の血小板凝集能、血小板活性化能が検証された。

[0516] 具体的には、IgEに結合するhIgG1抗体（ヒトIgG1定常領域）の重鎖としてomalizumab_VH-G1d（配列番号：１３６）、軽鎖としてomalizumab_VL-CK（配列番号：１３７）が参考実施例２の方法を用いて作製された。次に、omalizumab_VH-G1dに対して、ヒトFcγRIIbに対する結合活性を選択的に増強するために、EUナンバリングで表される233位のGluがAspに、237位のGlyがAspに、238位のProがAspに、268位のHisがAspに、271位のProがGlyに、296位のTyrがAspに、330位のAlaがArgに、439位のLysがGluに置換されたomalizumab_VH-BP230（配列番号：１４０）が作製された。同様にして、omalizumab_VH-G1dのヒトFcγRIIbおよびFcγRIIa Rに対する結合活性を増強するために、EUナンバリングで表される267位のSerがGluに、328位のLeuがPheに置換されたomalizumab_VH-G1d-v3（配列番号：１３８）が作製された。

[0517] 参考実施例２の方法を用いて、omalizumab_VH-BP230（配列番号：１４０）を重鎖として含み、omalizumab_VL-CK（配列番号：１３７）を軽鎖として含む、omalizumab-BP230が作製され、omalizumab_VH-G1d-v3（配列番号：１３８）を重鎖として含み、omalizumab_VL-CK（配列番号：１３７）を軽鎖として含む、omalizumab-G1d-v3が作製された。これらの抗体の血小板凝集能および血小板活性化能が評価された。

[0518] （８－４－２）omalizumab-BP230およびomalizumab-G1d-v3のヒトFcγRに対する結合活性の評価

既存抗体であるomalizumabのヒトFcγRIIbに対する結合が増強されたomalizumab-G1d-v3のFc領域と各ヒトFcγRに対するaffinity解析の結果は実施例（８－２）に示されている。omalizumab-BP230のFc領域と各ヒトFcγRに対するaffinityも同様に解析され、その結果を表２２に示した。

[0519] （８－４－３）血小板凝集能の評価

次に、実施例（８－４－１）で作製されたomalizumab-BP230およびomalizumab-G1d-v3の結合を、FcγRIIaの遺伝子多型がR/H型のドナー由来の血小板を用いることで測定し、その測定結果からFcγRIIaに対するアフィニティの強弱によって血小板凝集能が変化するかが検証された。

[0520] 血小板凝集は、血小板凝集能測定装置ヘマトレーサー712（株式会社エル・エム・エス）を用いて測定された。まず、0.5 mLの3.8%クエン酸ナトリウムを含む4.5 mL真空採血管に一定分量ずつ採取された約50 mLの全血を200 gで15分間、遠心分離することによって回収された上清がPlatelet Rich Plasma（PRP）として使用された。緩衝液A（137 mM NaCl、2.7 mM KCl、12 mM $NaHCO_3$、0.42 mM NaH_2PO_4、2 mM $MgCl_2$、5 mM HEPES、5.55 mM dextrose、1.5 U/mL apyrase、0.35 % BSA）を用いて洗浄されたＰＲＰは、さらに緩衝液Ｂ（137 mM NaCl、2.7 mM KCl、12 mM $NaHCO_3$、0.42 mM NaH_2PO_4、2 mM $MgCl_2$、5 mM HEPES、5.55 mM dextrose、2 mM $CaCl_2$、0.35 % BSA）に置換された。その結果、1 μL当たり約300、000/μLの密度の洗浄血小板が調製された。血小板凝集能測定装置に設置された、攪拌棒を含む測定用キュベットに150.2 μLの洗浄血小板が分注された。当該装置内で37.0℃に維持されたキュベット内で、血小板は攪拌棒により1000 rpmで攪拌された。そこに最終濃度がそれぞれ600 μｇ/mLになるよう調製された24.3 μLの omalizumab-G1d-v3またはomalizumab-BP230を添加し、1分間反応させた後、抗体とのモル比が1:1になるよう調製されたIgEを25.4 μL加え、混合液を5分間反応させた。さらに、二次凝集を起こさない濃度のアデノシン2リン酸（ADP、SIGMA）が反応液に加えられ、凝集が増強されるかが確認された。洗浄血小板としてFcγRIIaの多型がR/Hである1名の健常人から得た洗浄血小板が使用された。

[0521] 上記のアッセイ法で得られた結果を図２１に示した。図２１に示された結果から、omalizumab-G1d-v3を含む免疫複合体を加えた場合には、強い血小板凝集が観察されたが、一方で、omalizumab-BP230を含む免疫複合を加えた場合には、PBSを加えた場合と比較して差のある血小板凝集は観察されなかった。

[0522] 次に、omalizumab-G1d-v3 およびomalizumab-BP230による血小板の活性化が測定された。血小板の活性化は、CD62p（p-selectin）または活性型インテグリンといった活性化マーカーの血小板膜表面における発現増加によって測定することができる。先述の方法により調製された洗浄血小板7.51 μLに最

終濃度が600 μｇ/mLになるよう調製されたomalizumab-G1d-v3またはomalizumab-BP230を1.22 μL添加し、室温で5分間反応させた。その後、抗体とのモル比が1:1になるよう調製されたIgEを1.27 μL加えてさらに室温で5分間反応させた後、血小板の活性化が誘導されるかが確認された。陰性対照としては免疫複合体の代わりにリン酸緩衝液（pH7.4、Gibco）が添加されたサンプルが用いられた。反応後の各サンプルはPE標識抗CD62抗体（BECTON DICKINSON）、PerCP標識抗CD61抗体、FITC標識PAC-1抗体（BD bioscience）を用いて蛍光染色された各蛍光強度が、フローサイトメーター（FACS CantoII、 BD bioscience）を用いて測定された。洗浄血小板としてFcγRIIaの多型がR/Hである1名の健常人から得た洗浄血小板が使用された。

[0523] 上記のアッセイ法で得られた結果を図２２および図２３に示した。血小板膜表面のCD62p及び活性型インテグリンの発現はいずれも、omalizumab-G1d-v3を含む免疫複合体の添加により増加した。一方、omalizumab-BP230の免疫複合体が添加された血小板膜表面のこれらの分子の発現は、リン酸緩衝液が添加され血小板膜表面における発現と同程度であった。

[0524] これらの結果から、IgG1のFc領域のEUナンバリングで表される267位のSerがGluに、328位のLeuがPheに置換された既存の改変Fc領域 を含み、ヒトFcγRIIbに対する結合が増強し、ヒトFcγRIIa Rに対する結合もまた増強した抗体は、EUナンバリングで表される233位のGluがAspに、237位のGlyがAspに、238位のProがAspに、268位のHisがAspに、271位のProがGlyに、296位のTyrがAspに、330位のAlaがArgに、439位のLysがGluに置換しされたFc領域を含み、ヒトFcγRIIbに対する結合が選択的に増強された抗体と比べて、FcγRIIaの遺伝子多型のうち少なくとも一方のアレルの131番目のアミノ酸がArgである血小板の、凝集および活性化を促進することが明らかとなった。すなわち、既存のヒトFcγRIIbに対する結合を増強したFc領域改変体を含む抗体はFcγRIIa Rのアレルを有するヒトにおいては血小板凝集による血栓症発症のリスクを高める可能性の問題点が示唆され、FcγRIIbに対する結合が選択的に増強されたFc領域改変体ではこの問題点を克服していることが明らかとなった。

[0525] 〔実施例９〕P238D 改変に加えてヒンジ部分の改変を導入した改変体のFcγRIIbに対する結合の網羅的解析

ヒト天然型IgG1に対してEUナンバリングで表される238位のProがAspに置換されたFcに対し、さらにFcγRIIbへの結合を上げると天然型抗体の解析から予測される他の改変を組み合わせても、期待される組合せ効果は得られなかった。そこで、EUナンバリングで表される238位のProがAspに置換された改変Fcに対して網羅的改変を導入することによって、さらにFcγRIIbへの結合を増強する改変体を見出すことが試みられた。抗体H鎖として用いられたIL6R-G1d（配列番号：１３３）のEUナンバリングで表される252位のMetをTyrに置換する改変、EUナンバリングで表される434位のAsnをTyrに置換する改変が導入されたIL6R-F11（配列番号：１４１）が作製された。さらに、IL6R-F11に対してEUナンバリングで表される238位のProをAspに置換する改変が導入されたIL6R-F652（配列番号：１４２）が作製された。L6R-F652に対し、EUナンバリングで表される238位の残基の近傍の領域（EUナンバリングで表される234位から237位、239位）が元のアミノ酸とシステインを除く18種類のアミノ酸にそれぞれ置換された抗体H鎖配列を含む発現プラスミドがそれぞれ調製された。抗体L鎖としてはIL6R-L（配列番号：１３５）が用いられた。これらの改変体が参考実施例２と同様の方法により発現、精製された。これらのFc変異体はPD variantと呼ばれる。参考実施例２５と同様の方法により各PD variantのFcγRIIa R型およびFcγRIIbに対する相互作用が網羅的に評価された。

[0526] 以下の方法に従って、それぞれのFcγRとの相互作用解析結果を表す図が作成された。各PD variantの各FcγRに対する結合量の値を、コントロールとした改変導入前の抗体（EUナンバリングで表される238位のProがAspに置換された改変であるIL6R-F652/IL6R-L）の各FcγRに対する結合量の値で除し、さらに100倍した値が各PD variantの各FcγRに対する相対的な結合活性の値として表された。横軸に各PD variantのFcγRIIbに対する相対的な結合活性の値、縦軸に各PD variantのFcγRIIa R型に対する相対的な結合活性の値をそれぞれ表示した（図２４）。

[0527] その結果、11種類の改変体のFcγRIIbに対する結合が、当該各改変導入前の抗体と比較して増強し、FcγRIIa R型に対する結合を維持または増強する効果があることが見出された。これらの11種類の改変体のFcγRIIbおよびFcγRIIa Rに対する結合活性をまとめた結果を表１４に示した。なお、表中の配列番号は評価した改変体のH鎖の配列番号を、また、改変とはIL6R-F11（配列番号：１４１）に対して導入した改変を表す。

[0528] [表14]

改変体名	改変	FcγRIIbに対する相対的結合活性	FcγRIIaRに対する相対的結合活性
IL6R-F652/IL6R-L	P238D	100	100
IL6R-PD042/IL6R-L	P238D/L234W	106	240
IL6R-PD043/IL6R-L	P238D/L234Y	112	175
IL6R-PD079/IL6R-L	P238D/G237A	101	138
IL6R-PD080/IL6R-L	P238D/G237D	127	222
IL6R-PD081/IL6R-L	P238D/G237E	101	117
IL6R-PD082/IL6R-L	P238D/G237F	108	380
IL6R-PD086/IL6R-L	P238D/G237L	112	268
IL6R-PD087/IL6R-L	P238D/G237M	109	196
IL6R-PD094/IL6R-L	P238D/G237W	122	593
IL6R-PD095/IL6R-L	P238D/G237Y	124	543
IL6R-PD097/IL6R-L	P238D/S239D	139	844

[0529] P238Dが導入された改変体に対して前記の11種類の改変が、さらに組み合わされて導入された改変体の相対的なFcγRIIbに対する結合活性の値、およびP238Dを含まないFcに当該改変が導入された改変体の相対的なFcγRIIbに対する結合活性の値を図２５に示した。これら11種類の改変は、P238D改変に更に導入すると、導入前に比べてFcγRIIbに対する結合量が増強していた。一方、G237F、G237W、およびS239Dを除く８種類の改変がP238Dを含まない改変体に導入された場合、FcγRIIbに対する結合を低減する効果を示していた（データ示さず）。

[0530] この結果から、天然型IgG1に対して導入した改変の効果にもとづいてP238D改変が含まれる改変体に対して同改変を組み合わせて導入したときの効果を予測するのは困難であることが明らかとなった。また、いいかえれば今回見出された８種類の改変は、P238D改変が含まれる改変体に対して同改変を組み合わせて導入する本検討を行わなければ見出すことが不可能な改変である。

[0531] 表１４に示した改変体のFcγRIa、FcγRIIaR、FcγRIIaH、FcγRIIb、FcγRIIIaVに対するKD値を参考実施例２５と同様の方法で測定した結果を表１５に示した。なお、表中の改変とはIL6R-F11（配列番号：１４１）に対して導入された改変を表す。ただし、IL6R-F11を作製する際の鋳型としたIL6R-G1d/IL6R-Lについては、*として示した。また、表中のKD（IIaR)/KD（IIb)およびKD（IIaH)/KD（IIb)はそれぞれ、各改変体のFcγRIIaRに対するKD値を各改変体のFcγRIIbに対するKD値で除した値、各改変体のFcγRIIaHに対するKD値を各改変体のFcγRIIbに対するKD値で除した値を示す。親ポリペプチドのKD（IIb)/改変体のKD（IIb)は、親ポリペプチドのFcγRIIbに対するKD値を各改変体のFcγRIIbに対するKD値で除した値を指す。

[0532] これらに加えて、各改変体のFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値/親ポリペプチドのFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値を表１５に示した。ここで親ポリペプチドとは、IL6R-F11（配列番号：１４１）をH鎖に持つ改変体のことを指す。なお、表１５のうち灰色で塗りつぶされたセルは、FcγRのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解析できないと判断されたため、参考実施例２５に記載された

〔式２〕

$$KD= C\bullet R_{max}/(R_{eq}-RI)-C$$

の式を利用して算出した値である。

[0533] 表１５に示されたように、いずれの改変体もIL6R-F11と比較してFcγRIIbに対する親和性が向上し、その向上の幅は1.9倍から5.0倍であった。各改変体のFcγRIIaRに対するKD値/各改変体のFcγRIIbに対するKD値の比、および各改変体のFcγRIIaHに対するKD値/各改変体のFcγRIIbに対するKD値の比は、FcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性に対する相対的なFcγRIIbに対する結合活性を表す。つまり、この値は各改変体のFcγRIIbへの結合選択性の高さを示した値であり、この値が大きければ大きいほどFcγRIIbに対し

て結合選択性が高い。親ポリペプチドであるIL6R-F11/IL6R-LのFcγRIIaRに対するKD値/FcγRIIbに対するKD値の比、およびFcγRIIaHに対するKD値/FcγRIIbに対するKD値の比はいずれも0.7であるため、表１５のいずれの改変体も親ポリペプチドよりもFcγRIIbへの結合選択性が向上していた。改変体のFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値/親ポリペプチドのFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値が1以上であるとは、その改変体のFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方の結合が親ポリペプチドのFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方の結合と同等であるか、より低減していることを意味する。今回得られた改変体ではこの値が0.7から5.0であったため、今回得られた改変体のFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方の結合は親ポリペプチドのそれと比較してほぼ同等か、それよりも低減していたといえる。これらの結果から、今回得られた改変体では親ポリペプチドと比べて、FcγRIIa R型およびH型への結合活性を維持または低減しつつ、FcγRIIbへの結合活性を増強しており、FcγRIIbへの選択性が向上していることが明らかとなった。また、FcγRIaおよびFcγRIIIaVに対しては、いずれの改変体もIL6R-F11と比較して親和性が低下していた。

[0534]

[表15]

改変	KD [mol/L]						KD[IIaR]/KD[IIb]	KD[IIaH]/KD[IIb]	親ポリペプチドのKD(IIb)/改変ポリペプチドのKD(IIb)	改変体のFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値/親ポリペプチドのFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値
	FcγRIa	FcγRIIaR	FcγRIIaH	FcγRIIb	FcγRIIIaV					
*	3.2E-10	1.0E-06	6.7E-07	2.6E-06	3.5E-07		0.4	0.3	2.6	0.1
	9.0E-10	5.0E-06	5.0E-06	6.8E-06	1.5E-06		0.7	0.7	1.0	1.0
L234W/P238D	6.3E-08	1.6E-05	1.9E-05	2.0E-06	3.7E-05		8.1	9.5	3.4	3.2
L234Y/P238D	7.5E-08	2.6E-05	2.3E-05	1.6E-06	4.5E-05		15.9	14.4	4.2	4.6
G237A/P238D	1.4E-07	3.2E-05	2.1E-05	3.0E-06	3.7E-05		10.5	7.0	2.3	4.2
G237D/P238D	1.4E-07	2.1E-05	2.5E-05	2.0E-06	4.3E-05		10.7	12.8	3.5	4.2
G237E/P238D	3.4E-07	3.8E-05	2.5E-05	3.6E-06	4.1E-05		10.6	7.0	1.9	5.0
G237F/P238D	5.2E-08	1.4E-05	1.6E-05	3.4E-06	4.3E-05		4.1	4.7	2.0	2.8
G237L/P238D	1.2E-07	1.8E-05	1.8E-05	2.6E-06	4.1E-05		6.9	7.1	2.7	3.5
G237M/P238D	5.2E-08	2.2E-05	2.0E-05	2.9E-06	3.7E-05		7.7	7.0	2.4	4.0
G237W/P238D	3.6E-08	7.2E-06	1.2E-05	2.3E-06	3.8E-05		3.1	5.2	2.9	1.4
G237Y/P238D	9.3E-08	7.9E-06	1.5E-05	2.3E-06	4.2E-05		3.4	6.4	2.9	1.6
P238D/S239D	4.9E-09	3.5E-06	1.9E-05	1.4E-06	1.7E-05		2.6	14.0	5.0	0.7

[0535] 〔実施例１０〕P238Dを含むFcとFcγRIIb細胞外領域との複合体のX線結晶構造解析

先の実施例９に示した通り、P238Dを含むFcに対して、FcγRIIbとの結合活性を向上する、あるいはFcγRIIbへの選択性を向上させると天然型IgG1抗体の解析から予測された改変を導入しても、FcγRIIbに対する結合活性が減弱することが明らかとなり、この原因としてFcとFcγRIIbとの相互作用界面の構造がP238Dを導入することで変化していることが考えられた。そこで、この現象の原因を追及するためP238Dの変異をもつIgG1のFc（以下、Fc（P238D）と呼ぶ）とFcγRIIb細胞外領域との複合体の立体構造をX線結晶構造解析により明らかにし、天然型 IgG1のFc（以下、Fc（WT)と呼ぶ）とFcγRIIb細胞外領域との複合体との立体構造を対比することによって、これらの結合様式が比較された。なお、FcとFcγR細胞外領域との複合体の立体構造に関する複数の報告がすでにあり、Fc（WT）/ FcγRIIIb細胞外領域複合体（Nature（2000）400, 267-273、J. Biol. Chem.（2011）276, 16469-16477）、Fc（WT）/ FcγRIIIa細胞外領域複合体（Proc. Natl. Acad. Sci. USA（2011）108, 12669-126674）、およびFc（WT）/ FcγRIIa細胞外領域複合体（J. Immunol.（2011）187, 3208-3217）の立体構造が解析されている。これまでにFc（WT）/ FcγRIIb細胞外領域複合体の立体構造は解析されていないが、Fc(WT)との複合体の立体構造が既知であるFcγRIIaとFcγRIIbでは細胞外領域においてアミノ酸配列の93%が一致し、非常に高い相同性を有していることから、Fc（WT）/ FcγRIIb細胞外領域複合体の立体構造はFc（WT）/ FcγRIIa細胞外領域複合体の結晶構造からモデリングにより推定された。

[0536] Fc（P238D）/ FcγRIIb細胞外領域複合体についてはX線結晶構造解析により分解能2.6Åで立体構造を決定した。その解析結果の構造を図２６に示した。2つのFc CH2ドメインの間にFcγRIIb細胞外領域が挟まれるように結合しており、これまで解析されたFc（WT)とFcγRIIIa、FcγRIIIb、FcγRIIaの各細胞外領域との複合体の立体構造と類似していた。次に詳細な比較のため、Fc(P238D）/ FcγRIIb細胞外領域複合体の結晶構造とFc（WT）/ FcγRIIb細胞

外領域複合体のモデル構造とを、FcγRIIb細胞外領域ならびにFc CH2ドメインAに対しCα原子間距離をもとにした最小二乗法により重ね合わせた（図２７）。その際、Fc　CH2ドメインB同士の重なりの程度は良好でなく、この部分に立体構造的な違いがあることが明らかとなった。さらにFc（P238D）/ FcγRIIb細胞外領域複合体の結晶構造ならびにFc（WT）/ FcγRIIb細胞外領域複合体のモデル構造を使い、抽出されたFcγRIIb細胞外領域とFc CH2ドメインBとの間でその距離が3.7Å以下の原子ペアを比較することによって、FcγRIIbとFc（WT）CH2ドメインBとの間の原子間相互作用とFcγRIIbとFc（P238D）CH2ドメインBとの間の原子間相互作用が比較された。表１６に示すとおり、Fc（P238D)とFc（WT)では、Fc CH2ドメインBとFcγRIIbとの間の原子間相互作用は一致していなかった。

[0537]

[表16]

FcγRIIb 原子			Fc(P238D) CH2 ドメイン B 相互作用相手（原子間距離, Å）			Fc(WT) CH2 ドメイン B 相互作用相手（原子間距離, Å）		
Val	116	CG2				Asp	265	OD2 (3.47)
						Gly	237	O (3.65)
Ser	126	OG	Ser	298	N (3.31)			
			Ser	298	CB (3.32)			
			Tyr	296	O (3.05)			
Lys	128	CA	Ser	298	OG (3.50)			
Phe	129	CB	Ser	298	O (3.36)			
Phe	129	CD2				Asn	297	CB (3.50)
						Asn	297	CG (3.43)
Lys	128	C	Ser	298	OG (3.47)			
Phe	129	N	Ser	298	OG (3.30)			
Phe	129	O	Ser	267	OG (3.54)			
Arg	131	CB				Val	266	O (3.02)
Arg	131	CG				Val	266	O (3.22)
Arg	131	CD				Val	266	CG1 (3.45)
						Val	266	C (3.55)
						Val	266	O (3.10)
Arg	131	NE	Ala	327	O (3.60)	Val	266	C (3.66)
						Val	266	O (3.01)
						Val	266	N (3.49)
Arg	131	CZ	Asp	270	CG (3.64)	Val	266	N (3.13)
			Asp	270	OD2 (3.22)			
			Asp	270	OD1 (3.27)			
			Ala	327	CB (3.63)			
Arg	131	NH1	Asp	270	CG (3.19)	Val	266	CG1 (3.47)
			Asp	270	OD2 (2.83)	Val	266	N (3.43)
			Asp	270	OD1 (2.99)	Thr	299	OG1 (3.66)
			Ser	267	CB (3.56)	Ser	298	O (3.11)
Arg	131	NH2	Asp	270	CG (3.20)			
			Asp	270	OD2 (2.80)	Asp	265	CA (3.16)
			Asp	270	OD1 (2.87)	Val	266	N (3.37)
			Ala	327	CB (3.66)			
Tyr	157	CE1				Leu	234	CG (3.64)
						Leu	234	CD1 (3.61)
Tyr	157	OH				Gly	236	O (3.62)
						Leu	234	CA (3.48)
						Leu	234	CG (3.45)

[0538] さらにFc CH2ドメインAならびにFc CH2ドメインB単独同士でCα原子間距離をもとにした最小二乗法によって、Fc（P238D）/ FcγRIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造とFc（WT）/ FcγRIIb細胞外領域複合体のモデル構造の重合せをおこなうことによって、P238D付近の詳細構造が比較された。Fc（P238D）の変異導入位置であるEUナンバリングで表される238位のアミノ酸残基の位置がFc（WT）とは変化することにともない、ヒンジ領域から続く238位のアミノ酸残基の近辺のループ構造がFc（P238D）とFc（WT）では変化していることがわかる（図２８）。もともとFc（WT）においてはEUナンバリングで表される238

位のProはFcの内側にあり、238位の周囲の残基と疎水性コアを形成している。ところが、EUナンバリングで表される238位のProが、電荷をもち非常に親水的なAspに変化した場合、変化したAsp残基がそのまま疎水性コアに存在することは脱溶媒和の点でエネルギー的に不利となる。そこでFc (P238D)ではこのエネルギー的な不利を解消するため、EUナンバリングで表される238位のアミノ酸残基が溶媒側に配向する形に変化し、238位のアミノ酸残基付近のループ構造の変化をもたらしたと考えられる。さらに、このループはS-S結合で架橋されたヒンジ領域から距離的に遠くないことから、その構造変化が局所的な変化にとどまらず、Fc CH2ドメインAとドメインBの相対的な配置にも影響し、その結果、FcγRIIbとFc CH2ドメインBとの間の原子間相互作用に違いをもたらしたと推察される。このためP238D改変を既に有するFcに、天然型IgGにおいてFcγRIIbに対する選択性、結合活性を向上させる改変を組み合わせても予測される効果が得られなかったと考えられる。

[0539] また、P238Dの導入による構造変化の結果、Fc CH2ドメインAにおいては、変異が導入されたP238Dに隣接するEUナンバリングで表される237位のGlyの主鎖とFcγRIIbの160位のTyrとの間に水素結合が認められる（図２９）。このTyr160に相当する残基はFcγRIIaではPheであり、FcγRIIaとの結合の場合ではこの水素結合は形成されない。160位のアミノ酸は、Fcとの相互作用界面におけるFcγRIIaとFcγRIIbの間の数少ない違いの一つであることを併せて考慮すると、FcγRIIbに特有となるこの水素結合の有無が、Fc (P238D)のFcγRIIbに対する結合活性の向上と、FcγRIIaに対する結合活性の低減を招き、選択性向上の原因になったと推測される。また、Fc CH2ドメインBについてはEUナンバリングで表される270位のAspとFcγRIIbの131位のArgとの間に静電的な相互作用が認められる（図３０）。FcγRIIaのアロタイプの一つであるFcγRIIa H型では、FcγRIIbの131位のArgに対応する残基がHisであり、この静電相互作用は形成できない。このことからFcγRIIa R型と比較してFcγRIIa H型ではFc (P238D)に対する結合活性が低減している理由が説明可能である。このようなX線結晶構造解析の結果に基づく考察から、P238Dの導入によるそ

の付近のループ構造の変化とそれに伴うドメイン配置の相対的な変化が天然型IgGとFcγRとの結合ではみられない新たな相互作用が形成され、P238D改変体のFcγRIIbに対する選択的な結合プロファイルにつながっている可能性があることが明らかとなった。

[0540] [Fc (P238D)の発現精製]

P238D改変を含むFcの調製は以下のように行われた。まず、hIL6R-IgG1-v1（配列番号：１４３）のEUナンバリングで表される220位のCysをSerに置換し、EUナンバリングで表される236位のGluからそのC末端をPCRによってクローニングした遺伝子配列Fc (P238D)を参考実施例１および２に記載された方法と同様な方法で発現ベクターの作製、発現、精製が行われた。なお、EUナンバリングで表される220位のCysは通常のIgG1においては、L鎖のCysとdisulfide bondを形成しているが、Fcのみを調製する場合にはL鎖を共発現させないことから、不要なdisulfide bond形成を回避するために当該Cys残基はSerに置換された。

[0541] [FcγRIIb細胞外領域の発現精製]

FcγRIIb細胞外領域は、参考実施例２５の方法にしたがって調製された。

[0542] [Fc (P238D) / FcγRIIb細胞外領域複合体の精製]

結晶化に使用するため得られたFcγRIIb細胞外領域サンプル 2 mgに対し、glutathione S-transferaseとの融合蛋白として大腸菌により発現精製したEndo F1 (Protein Science (1996) 5, 2617-2622) 0.29 mgを加え、0.1M Bis-Tris pH6.5のBuffer条件で、室温にて３日間静置することにより、FcγRIIb細胞外領域のAsnに直接結合したN-acetylglucosamine以外のN型糖鎖が切断された。次に5000MWCOの限外ろ過膜により濃縮された糖鎖切断処理が施されたFcγRIIb細胞外領域サンプルは、20mM HEPS pH7.5, 0.05M NaClで平衡化したゲルろ過カラムクロマトグラフィー (Superdex200 10/300) により精製された。さらに得られた糖鎖切断FcγRIIb細胞外領域画分にFc (P238D)をモル比でFcγRIIb細胞外領域のほうが若干過剰となるよう混合された。10000MWCOの限外ろ過膜により濃縮された前記混合液を20 mM HEPS pH7.5、0.05M NaClで平

衡化したゲルろ過カラムクロマトグラフィー（Superdex200 10/300）を用いて精製することによって、Fc（P238D）/ FcγRIIb細胞外領域複合体のサンプルが得られた。

[0543] ［Fc（P238D）/ FcγRIIb細胞外領域複合体の結晶化］

10000MWCOの限外ろ過膜 により約10 mg/mlまで濃縮された前記のFc（P238D）/ FcγRIIb細胞外領域複合体の試料を用いて、シッティングドロップ蒸気拡散法により当該複合体が結晶化された。結晶化にはHydra II Plus One (MATRIX)を用い、100 mM Bis-Tris pH6.5、17% PEG3350、0.2 M Ammonium acetate、および2.7%(w/v) D-Galactoseのリザーバー溶液に対し、リザーバー溶液：結晶化サンプルを0.2μl：0.2μlで混合して結晶化ドロップを作成した。シールされた当該結晶化ドロップを20℃に静置することによって、薄い板状の結晶が得られた。

[0544] ［Fc（P238D）/ FcγRIIb細胞外領域複合体結晶からのＸ線回折データの測定］

得られたFc（P238D）/ FcγRIIb細胞外領域複合体の単結晶一つは100 mM Bis-Tris pH6.5、20% PEG3350、Ammonium acetate、2.7% (w/v) D-Galactose、Ethylene glycol 22.5%(v/v) の溶液に浸漬された後、微小なナイロンループ付きのピンを用いて溶液ごとすくいとられ、液体窒素中で凍結された。その後、高エネルギー加速器研究機構の放射光施設フォトンファクトリーBL-1Aにて当該結晶からのX線回折データが測定された。なお、測定中は常に-178℃の窒素気流中に置くことによって凍結状態を維持し、ビームラインに備え付けられたCCDディテクタQuantum 270（ADSC）によって、結晶を0.8°ずつ回転させながらトータル225枚のX線回折画像が収集された。得られた回折画像からの格子定数の決定、回折斑点の指数付け、ならびに回折データの処理には、プログラムXia2（CCP4 Software Suite）、XDS Package（Walfgang Kabsch）ならびにScala（CCP4 Software Suite）を用い、最終的に分解能2.46Åまでの当該結晶の回折強度データが得られた。本結晶は、空間群Ｐ21に属し、格子定数ａ＝48.85Å、ｂ＝76.01Å、ｃ＝115.09Å、α＝90°、β＝100.70

°、γ＝90°であった。

[0545] [Fc（P238D）/ FcγRIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造解析]

Fc（P238D）/ FcγRIIb細胞外領域複合体の結晶構造決定は、プログラムPhaser（CCP4 Software Suite）を用いた分子置換法によりおこなわれた。得られた結晶格子の大きさとFc（P238D）/ FcγRIIb細胞外領域複合体の分子量から非対称単位中の複合体の数は一個と予想された。Fc（WT）/ FcγRIIIa細胞外領域複合体の結晶構造であるPDB code:3SGJの構造座標から、A鎖239-340番ならびにB鎖239-340番のアミノ酸残基部分を別座標として取り出し、それぞれFc CH2ドメインの探索用モデルと設定した。同じくPDB code:3SGJの構造座標から、A鎖341-444番とB鎖341-443番のアミノ酸残基部分を一つの座標として取り出し、Fc CH3ドメインの探索用モデルと設定した。最後にFcγRIIb細胞外領域の結晶構造であるPDB code:2FCBの構造座標からA鎖6-178番のアミノ酸残基部分を取り出しFcγRIIb細胞外領域の探索用モデルと設定した。Fc CH3ドメイン、FcγRIIb細胞外領域、Fc CH2ドメインの順番に各探索用モデルの結晶格子内での向きと位置を、回転関数および並進関数から決定し、Fc（P238D）/ FcγRIIb細胞外領域複合体結晶構造の初期モデルが得られた。得られた初期モデルに対し2つのFc CH2ドメイン、2つのFc CH3ドメインならびにFcγRIIb細胞外領域を動かす剛体精密化をおこなったところ、この時点で25-3.0Åの回折強度データに対し、結晶学的信頼度因子R値は40.4%、Free R値は41.9%となった。さらにプログラムRefmac5（CCP4 Software Suite）を用いた構造精密化と、実験的に決定された構造因子Foとモデルから計算された構造因子Fcならびにモデルから計算された位相をもとに算出された2Fo-Fc、Fo-Fcを係数とする電子密度マップを見ながらのモデル修正をプログラムCoot（Paul Emsley）でおこなった。これらの作業を繰り返すことによってモデルの精密化がおこなわれた。最後に2Fo-Fc、Fo-Fcを係数とする電子密度マップをもとに水分子をモデルに組み込み、精密化をおこなうことによって、最終的に分解能25-2.6Åの24291個の回折強度データを用い、4846個の非水素原子を含むモデルに対し、結晶学的信頼度因子R値は23.7%、Free R値は27.6%となっ

た。

[0546] [Fc (WT) / FcγRIIb細胞外領域複合体のモデル構造作成]

Fc (WT) / FcγRIIa細胞外領域複合体の結晶構造であるPDB code:3RY6の構造座標をベースに、プログラムDisovery Studio 3.1 (Accelrys) のBuild Mutants機能を使い、FcγRIIbのアミノ酸配列と一致するように構造座標中のFcγRIIaに変異が導入された。その際、Optimization LevelをHigh、Cut Radiusを4.5とし、５つのモデルを発生させ、その中から最もエネルギースコアが良いものを採用し、Fc (WT) / FcγRIIb細胞外領域複合体のモデル構造と設定した。

[0547] 〔実施例１１〕結晶構造に基づいて改変箇所を決定したFc改変体のFcγRに対する結合の解析

実施例１０で得られたFc (P238D)とFcγRIIb細胞外領域との複合体のX線結晶構造解析の結果に基づき、EUナンバリングで表される238位のProがAspに置換された改変FcにおいてFcγRIIbとの相互作用に影響を与えることが予測される部位（EUナンバリングで表される233位、240位、241位、263位、265位、266位、267位、268位、271位、273位、295位、296位、298位、300位、323位、325位、326位、327位、328位、330位、332位、334位の残基）に対して網羅的な改変が導入された改変体を構築することによって、P238D 改変に加えてさらにFcγRIIbとの結合を増強する改変の組合せを得ることが可能であるか検討した。

[0548] IL6R-G1d（配列番号：１３４）に対し、EUナンバリングで表される439位のLysがGluに置換されたIL6R-B3（配列番号：１４４）が作製された。次に、IL6R-B3の、EUナンバリングで表される238位のProがAspに置換されたIL6R-BF648が作製された。抗体L鎖としてはIL6R-L（配列番号：１３５）が共通に用いられた。参考実施例２と同様の方法に従い発現させたこれらの抗体の改変体が精製された。参考実施例２５の方法によって各FcγR（FcγRIa、FcγRIIa H型、FcγRIIa R型、FcγRIIb、FcγRIIIa V型）に対するこれら抗体改変体の結合が網羅的に評価された。

[0549] 以下の方法に従って、それぞれのFcγRとの相互作用解析結果を表す図が作成された。各改変体の各FcγRに対する結合量の値を、コントロールとした改変導入前の抗体（EUナンバリングで表される238位のProがAspに置換された改変であるIL6R-BF648/IL6R-L）の各FcγRに対する結合量の値で割り、さらに100倍した値が各改変体の各FcγRに対する相対的な結合活性の値として表された。横軸に各改変体のFcγRIIbに対する相対的な結合活性の値、縦軸に各改変体のFcγRIIa R型に対する相対的な結合活性の値をそれぞれ表示した（図３１）。

[0550] その結果、図３１に示すように、全改変中24種類の改変体は、改変導入前の抗体と比較してFcγRIIbに対する結合が維持または増強していることが見出された。これらの改変体のそれぞれのFcγRに対する結合に関し、表１７に示した。なお、表中の改変とはIL6R-B3（配列番号：１４４）に対して導入された改変を表す。ただし、IL6R-B3を作製する際の鋳型としたIL6R-G1d/IL6R-Lについては、*として示した。

[0551]

[表17]

改変体名	改変	相対的結合				
		FcγRIa	FcγRIIaR	FcγRIIaH	FcγRIIb	FcγRIIIa
IL6R-G1d/IL6R-L	*	140	650	1670	62	3348
IL6R-B3/IL6R-L		145	625	1601	58	3264
IL6R-BF648/IL6R-L	P238D	100	100	100	100	100
IL6R-2B002/IL6R-L	P238D/E233D	118	103	147	116	147
IL6R-BP100/IL6R-L	P238D/S267A	121	197	128	110	138
IL6R-BP102/IL6R-L	P238D/S267Q	104	165	66	106	86
IL6R-BP103/IL6R-L	P238D/S267V	56	163	69	107	77
IL6R-BP106/IL6R-L	P238D/H268D	127	150	110	116	127
IL6R-BP107/IL6R-L	P238D/H268E	123	147	114	118	129
IL6R-BP110/IL6R-L	P238D/H268N	105	128	127	101	127
IL6R-BP112/IL6R-L	P238D/P271G	119	340	113	157	102
IL6R-2B128/IL6R-L	P238D/Y296D	95	87	37	103	96
IL6R-2B169/IL6R-L	P238D/V323I	73	92	83	104	94
IL6R-2B171/IL6R-L	P238D/V323L	116	117	115	113	122
IL6R-2B172/IL6R-L	P238D/V323M	140	244	179	132	144
IL6R-BP136/IL6R-L	P238D/K326A	117	159	103	119	102
IL6R-BP117/IL6R-L	P238D/K326D	124	166	96	118	105
IL6R-BP120/IL6R-L	P238D/K326E	125	175	92	114	103
IL6R-BP126/IL6R-L	P238D/K326L	113	167	132	103	146
IL6R-BP119/IL6R-L	P238D/K326M	117	181	133	110	145
IL6R-BP142/IL6R-L	P238D/K326N	98	103	97	106	102
IL6R-BP121/IL6R-L	P238D/K326Q	118	155	135	113	157
IL6R-BP118/IL6R-L	P238D/K326S	101	132	128	104	144
IL6R-BP116/IL6R-L	P238D/K326T	110	126	110	108	114
IL6R-BP911/IL6R-L	P238D/A330K	52	101	108	119	120
IL6R-BP078/IL6R-L	P238D/A330M	106	101	89	105	91
IL6R-BP912/IL6R-L	P238D/A330R	60	81	93	103	97

[0552] 表１７に示した改変体のFcγRIa, FcγRIIaR, FcγRIIaH, FcγRIIb, FcγRIIIa

RIIIa V型に対するKD値を参考実施例２５の方法で測定した結果を表１８にまとめた。表中の改変とはIL6R-B3（配列番号：１４４）に対して導入した改変を表す。ただし、IL6R-B3を作製する際の鋳型としたIL6R-G1d/IL6R-Lについては、*として示した。また、表中のKD (IIaR)/KD (IIb)およびKD (IIaH)/KD (IIb)はそれぞれ、各改変体のFcγRIIaRに対するKD値を各改変体のFcγRIIbに対するKD値で除した値、各改変体のFcγRIIaHに対するKD値を各改変体のFcγRIIbに対するKD値で除した値を示す。親ポリペプチドのKD (IIb)/改変ポリペプチドのKD (IIb)は、親ポリペプチドのFcγRIIbに対するKD値を各改変体のFcγRIIbに対するKD値で除した値を指す。これらに加えて、各改変体のFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値/親ポリペプチドのFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値を表１８に示した。ここで親ポリペプチドとは、IL6R-B3（配列番号：１４４）をH鎖に持つ改変体のことを指す。なお、表１８のうち灰色で塗りつぶしたセルは、FcγRのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解析できないと判断されたため、参考実施例２５に記載された

〔式２〕

$$KD = C \bullet R_{max} / (R_{eq} - RT) - C$$

の式を利用して算出した値である。

[0553]

[表18]

改変体名	改変	KD[mol/L]									
		FcγRIa	FcγRIIaR	FcγRIIaH	FcγRIIb	FcγRIIaV	KD[IIaR]/KD[IIb]	KD[IIaH]/KD[IIb]	親ポリペプチドのKD(IIb)/改変ポリペプチドのKD(IIb)	改変体のFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値/親ポリペプチドのFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値
IL6R-G1d/IL6R-L	・	3.2E-10	1.0E-06	6.7E-07	2.6E-06	3.5E-07	0.4	0.3	1.2	0.9
IL6R-B3/IL6R-L	／	4.2E-10	1.1E-06	7.7E-07	3.1E-06	3.3E-07	0.3	0.2	1.0	1.0
IL6R-BF648/IL6R-L	P238D	1.1E-08	1.5E-05	4.0E-05	1.2E-06	7.1E-05	13.0	33.9	2.6	19.9
IL6R-2B002/IL6R-L	P238D/E233D	6.4E-09	1.9E-05	8.6E-05	9.3E-07	5.3E-05	20.4	92.3	3.3	24.7
IL6R-BP100/IL6R-L	P238D/S267A	1.1E-09	7.8E-06	4.6E-05	1.1E-06	5.9E-05	7.3	42.6	2.9	10.2
IL6R-BP102/IL6R-L	P238D/S267Q	8.2E-09	8.4E-06	6.1E-05	9.0E-07	8.2E-05	9.4	67.6	3.4	11.0
IL6R-BP103/IL6R-L	P238D/S267V	3.5E-08	1.1E-05	8.8E-05	1.2E-06	1.1E-04	9.0	71.5	2.5	14.4
IL6R-BP106/IL6R-L	P238D/H268D	4.0E-09	1.1E-05	3.6E-05	9.3E-07	5.5E-05	11.6	38.7	3.3	14.0
IL6R-BP107/IL6R-L	P238D/H268E	1.5E-09	1.2E-05	5.2E-05	9.3E-07	6.3E-05	12.7	56.1	3.3	15.3
IL6R-BP110/IL6R-L	P238D/H268N	7.3E-09	1.7E-05	4.7E-05	1.5E-06	6.4E-05	11.7	31.5	2.1	22.8
IL6R-BP112/IL6R-L	P238D/P271G	6.5E-09	3.5E-06	3.5E-05	3.2E-07	6.9E-05	11.0	109.4	9.7	4.6
IL6R-2B128/IL6R-L	P238D/Y296D	1.3E-08	2.6E-05	3.4E-05	1.4E-06	7.2E-05	17.7	23.6	2.1	33.1
IL6R-2B169/IL6R-L	P238D/V323I	2.5E-08	1.9E-05	4.8E-05	1.2E-06	7.5E-05	15.8	40.7	2.6	24.3
IL6R-2B171/IL6R-L	P238D/V323L	9.1E-09	1.6E-05	3.4E-05	1.1E-06	5.7E-05	15.0	31.8	2.9	20.8
IL6R-2B172/IL6R-L	P238D/V323M	3.0E-09	6.1E-06	2.1E-05	7.7E-07	4.8E-05	8.0	27.3	4.0	8.0
IL6R-BP136/IL6R-L	P238D/K326A	6.6E-09	9.1E-06	3.8E-05	8.0E-07	6.9E-05	11.4	47.8	3.9	11.8
IL6R-BP117/IL6R-L	P238D/K326D	4.1E-09	9.2E-06	4.1E-05	8.0E-07	6.7E-05	11.6	51.4	3.9	12.0
IL6R-BP120/IL6R-L	P238D/K326E	6.6E-09	9.6E-06	6.5E-05	1.0E-06	7.9E-05	9.3	63.1	3.0	12.5
IL6R-BP126/IL6R-L	P238D/K326L	7.4E-09	1.1E-05	4.5E-05	1.4E-06	5.6E-05	7.8	31.7	2.2	14.4
IL6R-BP119/IL6R-L	P238D/K326M	7.0E-09	9.9E-06	4.5E-05	1.1E-06	5.6E-05	8.7	39.5	2.7	12.8
IL6R-BP142/IL6R-L	P238D/K326N	5.3E-09	1.8E-05	9.3E-05	1.2E-06	1.1E-04	15.5	79.5	2.8	23.5
IL6R-BP121/IL6R-L	P238D/K326Q	1.1E-08	1.3E-05	4.4E-05	1.1E-06	5.2E-05	11.7	40.4	2.8	16.6
IL6R-BP118/IL6R-L	P238D/K326S	1.2E-08	1.5E-05	4.6E-05	1.2E-06	5.6E-05	13.2	40.0	2.7	19.7
IL6R-BP116/IL6R-L	P238D/K326T	2.6E-09	1.5E-05	5.4E-05	1.1E-06	7.2E-05	13.3	48.2	2.8	19.4
IL6R-BP911/IL6R-L	P238D/A330K	4.9E-08	1.6E-05	3.7E-05	8.9E-07	5.8E-05	18.5	41.7	3.5	21.3
IL6R-BP078/IL6R-L	P238D/A330M	8.2E-09	1.5E-05	4.5E-05	1.1E-06	7.8E-05	13.4	41.3	2.8	19.0
IL6R-BP912/IL6R-L	P238D/A330R	3.8E-08	2.6E-05	3.8E-05	1.5E-06	7.8E-05	17.8	25.9	2.1	34.0

[0554] 表１８から、いずれの改変体もIL6R-B3と比較してFcγRIIbに対する親和性が向上し、その向上の幅は2.1倍から9.7倍であった。各改変体のFcγRIIaRに対するKD値/各改変体のFcγRIIbに対するKD値の比、および各改変体のFcγRIIaHに対するKD値/各改変体のFcγRIIbに対するKD値の比は、FcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性に対する相対的なFcγRIIbに対する結合活性を表す。つまり、この値は各改変体のFcγRIIbへの結合選択性の高さを示した値であり、この値が大きければ大きいほどFcγRIIbに対して結合選択性が高い。親ポリペプチドであるIL6R-B3/IL6R-LのFcγRIIaRに対するKD値/FcγRIIbに対するKD値の比、およびFcγRIIaHに対するKD値/FcγRIIbに対するKD値の比はそれぞれ0.3、0.2であるため、表１８のいずれの改変体も親ポリペプチドよりもFcγRIIbへの結合選択性が向上していた。改変体のFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値/親ポリペプチドのFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値が1以上であるとは、その改変体のFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方の結合が親ポリペプチドのFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方の結合と同等であるか、より低減していることを意味する。今回得られた改変体ではこの値が4.6から34.0であったため、今回得られた改変体のFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方の結合は親ポリペプチドのそれよりも低減していたといえる。これらの結果から、今回得られた改変体では親ポリペプチドと比べて、FcγRIIa R型およびH型への結合活性を維持または低減しつつ、FcγRIIbへの結合活性を増強しており、FcγRIIbへの選択性を向上させていることが明らかとなった。また、FcγRIaおよびFcγRIIaVに対しては、いずれの改変体もIL6R-B3と比較して親和性が低下していた。

[0555] 得られた組合せ改変体のうち、有望なものについて、結晶構造からその効果の要因が考察された。図３２にはFc (P238D) / FcγRIIb細胞外領域複合体の結晶構造を示した。この中で、左側に位置するH鎖をFc Chain A、右側に位置するH鎖をFc Chain Bとする。ここでFc Chain AにおけるEUナンバリングで

表される233位の部位は、FcγRIIbの113位のLysの近傍に位置することが分かる。ただし、本結晶構造においては、E233の側鎖はその電子密度がうまく観察されておらず、かなり運動性の高い状態にある。従ってEUナンバリングで表される233位のGluをAspに置換する改変は、側鎖が1炭素分短くなることによって側鎖の自由度が小さくなり、その結果、FcγRIIbの113位のLysとの相互作用形成時のエントロピーロスが低減され、結果、結合自由エネルギーの向上に寄与しているものと推測される。

[0556] 図３３には同じくFc（P238D）/ FcγRIIb細胞外領域複合体の構造のうち、EUナンバリングで表される330位の部位近傍の環境を示した。この図から、Fc（P238D）のFc Chain AのEUナンバリングで表される330位の部位周辺はFcγRIIbの85位のSer、86位のGlu、163位のLysなどから構成される親水的な環境であることが分かる。従って、EUナンバリングで表される330位のAlaをLys、あるいはArgに置換する改変は、FcγRIIbの85位のSer、ないし86位のGluとの相互作用強化に寄与しているものと推測される。

[0557] 図３４にはFc（P238D）/ FcγRIIb細胞外領域複合体および、Fc（WT）/ FcγRIIIa細胞外領域複合体の結晶構造を、Fc Chain Bに対しCα原子間距離をもとにした最小二乗法により重ね合わせ、EUナンバリングで表される271位のProの構造を示した。これら二つの構造は、良く一致するが、EUナンバリングで表される271位のProの部位においては異なる立体構造となっている。また、Fc（P238D）/ FcγRIIb細胞外領域複合体結晶構造においては、この周辺の電子密度が弱いことを考え合わせると、Fc（P238D)/FcγRIIbにおいては、EUナンバリングで表される271位がProであることで、構造上、大きな負荷がかかっており、それによってこのループ構造が最適な構造をとり得ていない可能性が示唆された。従って、EUナンバリングで表される271位のProをGlyに置換する改変は、このループ構造に柔軟性を与え、FcγRIIbと相互作用するうえで最適な構造をとらせる際のエネルギー的な障害を軽減することで、結合増強に寄与しているものと推測される。

[0558] 〔実施例１２〕P238Dと組み合わせることによりFcγRIIbへの結合を増強する

改変の組合せ効果の検証

実施例９および１１において得られた改変の中で、FcγRIIbへの結合を増強する効果もしくはFcγRIIbへの結合を維持し、他のFcγRへの結合を抑制する効果がみられた改変同士を組み合わせることによる効果が検証された。

[0559] 実施例１１の方法と同様に、表１４および１８から選択された特に優れた改変が、抗体H鎖IL6R-BF648に対して導入された。抗体L鎖としてIL6R-Lが用いられ、参考実施例１と同様の方法に従い発現した抗体が精製された。参考実施例２５と同様の方法により各FcγR（FcγRIa、 FcγRIIa H型、FcγRIIa R型、FcγRIIb、FcγRIIIa V型）に対する結合が網羅的に評価された。

[0560] 以下の方法に従って、それぞれのFcγRとの相互作用解析結果について相対的結合活性が算出された。各改変体の各FcγRに対する結合量の値を、コントロールとした改変導入前の抗体（EUナンバリングで表される238位のProがAspに置換されたIL6R-BF648/IL6R-L）の各FcγRに対する結合量の値で除し、さらに100倍した値が各改変体の各FcγRに対する相対的な結合活性の値として表された（表１９）。なお、表中の改変とはIL6R-B3（配列番号：１４４）に対して導入した改変を表す。ただし、IL6R-B3を作製する際の鋳型としたIL6R-G1d/IL6R-Lについては、*として示した。

[0561]

[表19-1]

改变体名	改变	相对的結合活性				
		FcgRIa	FcgRIIaR	FcgRIIaH	FcgRIIb	FcgRIIIaV
IL6R-G1d/IL6R-L		140	650	1670	62	3348
IL6R-B3/IL6R-L		145	625	1601	58	3364
IL6R-BF648/IL6R-L	P238D	100	100	100	100	100
IL6R-2B253/IL6R-L	E233D/P238D/Y323M	155	288	207	156	126
IL6R-2B261/IL6R-L	E233D/P238D/Y296D	100	94	91	115	87
IL6R-BP082/IL6R-L	E233D/P238D/A330K	74	126	106	136	87
IL6R-BP083/IL6R-L	P238D/Y296D/A330K	50	87	91	122	107
IL6R-BP084/IL6R-L	P238D/Y323M/A330K	109	203	162	141	106
IL6R-BP085/IL6R-L	G237D/P238D/A330K	19	279	158	152	104
IL6R-BP086/IL6R-L	P238D/K326A/A330K	72	155	116	137	123
IL6R-BP087/IL6R-L	L234Y/P238D/A330K	33	163	179	137	158
IL6R-BP088/IL6R-L	G237D/P238D/K326A/A330K	25	377	166	161	122
IL6R-BP089/IL6R-L	L234Y/P238D/K326A/A330K	43	222	186	147	136
IL6R-BP139/IL6R-L	E233D/P238D/Y296D/A330K	68	111	98	138	95
IL6R-BP130/IL6R-L	E233D/P238D/Y323M/A330K	104	272	224	160	115
IL6R-BP131/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/A330K	33	364	253	160	118
IL6R-BP132/IL6R-L	E233D/P238D/K326A/A330K	91	191	130	150	120
IL6R-BP133/IL6R-L	E233D/L234Y/P238D/A330K	41	174	151	137	114
IL6R-BP143/IL6R-L	L234Y/P238D/K326A	86	238	143	133	114
IL6R-BP144/IL6R-L	G237D/P238D/K326A	64	204	108	121	128
IL6R-BP145/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D	41	350	224	152	153
IL6R-BP146/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/K326A	50	445	203	156	180
IL6R-BP147/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/K326A/A330K	24	650	582	177	209
IL6R-BP148/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/K326A/A330K	33	603	462	176	227
IL6R-BP149/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/Y296D/K326A/A330K	29	539	401	173	186
IL6R-BP150/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/K326A/A330K	30	757	770	183	204
IL6R-BP151/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/K326A/A330K	39	705	621	180	221
IL6R-BP152/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/Y296D/K326A/A330K	34	638	548	178	146
IL6R-BP176/IL6R-L	E233D/P238D/K326D/A330K	102	201	128	147	131
IL6R-BP177/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/K326D/A330K	57	691	409	177	186
IL6R-BP178/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/P271G/A330K	51	653	259	179	110
IL6R-BP179/IL6R-L	G237D/P238D/P271G/K325A/A330K	39	570	226	177	125
IL6R-BP180/IL6R-L	G237D/P238D/P271G/A330K	29	602	203	179	100

[0562] 表１９－２は表１９－１の続きの表である。

[表19-2]

IL6R-BF181/IL6R-L	E233D/P238D/P271G/K326A/A330K	108	362	150	170	122
IL6R-BF182/IL6R-L	E233D/P238D/P271G/Y296D/A330K	95	413	139	173	120
IL6R-BF183/IL6R-L	E233D/L234Y/P238D/P271G/K326A/A330K	83	423	191	164	113
IL6R-BF184/IL6R-L	E233D/P238D/P271G/A330K	96	436	131	171	106
IL6R-BF185/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/K326A/A330K	47	670	446	179	191
IL6R-BF186/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/Y296D/K326A/A330K	43	614	368	175	143
IL6R-BF187/IL6R-L	L234Y/P238D/P271G/K326A/A330K	68	387	205	157	124
IL6R-BF188/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/A330K	74	636	234	179	121
IL6R-BF189/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	56	557	183	177	141
IL6R-BF190/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/A330K	50	615	224	181	155
IL6R-BF191/IL6R-L	E233D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	125	382	145	170	142
IL6R-BF192/IL6R-L	E233D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K	109	406	123	172	118
IL6R-BF193/IL6R-L	E233D/P238D/H268D/P271G/A330K	113	449	154	173	135
IL6R-BF194/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	69	672	395	178	249
IL6R-BF195/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330K	68	661	344	181	221
IL6R-BF196/IL6R-L	L234Y/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	89	402	195	157	137
IL6R-BF197/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330K	71	642	294	179	206
IL6R-BF198/IL6R-L	E233D/L234Y/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	104	449	188	164	157
IL6R-BF199/IL6R-L	E233D/P238D/K326D/A330K	112	172	116	144	103
IL6R-BF200/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/K326D/A330K	60	754	517	188	164
IL6R-BF201/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/F271G/A330K	57	696	359	186	131
IL6R-BF202/IL6R-L	G237D/P238D/P271G/K326A/A330K	43	615	285	185	108
IL6R-BF203/IL6R-L	G237D/P238D/P271G/A330K	35	637	255	185	86
IL6R-BF204/IL6R-L	E233D/P238D/P271G/K326A/A330K	110	301	137	165	121
IL6R-BF205/IL6R-L	E233D/P238D/P271G/Y296D/A330K	97	335	108	167	93
IL6R-BF206/IL6R-L	E233D/P238D/P271G/A330K	101	362	123	168	92
IL6R-BF207/IL6R-L	E233D/P238D/A330K	74	103	103	134	97
IL6R-BF208/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/A330K	81	690	310	188	118
IL6R-BF209/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	66	625	267	186	153
IL6R-BF210/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/A330K	57	661	279	187	135
IL6R-BF211/IL6R-L	E233D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	128	312	111	165	87
IL6R-BF212/IL6R-L	E233D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K	117	363	135	173	122
IL6R-BF213/IL6R-L	E233D/P238D/H268D/P271G/A330K	118	382	123	169	100
IL6R-BF214/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/Y296D/K326D/A330K	36	498	285	174	165

[0563] 表１９に示した改変体のFcγRIa, FcγRIIaR, FcγRIIaH, FcγRIIb, FcγRIIIa V型に対するKD値を参考実施例２５の方法で測定した結果を表２０－１および２０－２にまとめた。表中の改変とはIL6R-B3（配列番号：１４４）に対して導入した改変を示した。ただし、IL6R-B3を作製する際の鋳型としたIL6R-G1d/IL6R-Lは、*として示した。また、表中のKD (IIaR)/KD (IIb)およびKD (IIaH)/KD (IIb)はそれぞれ、各改変体のFcγRIIaRに対するKD値を当該改変体のFcγRIIbに対するKD値で除した値、各改変体のFcγRIIaHに対するKD値を当該改変体のFcγRIIbに対するKD値で除した値を示す。親ポリペプチドのKD (IIb)/改変ポリペプチドのKD (IIb)は、親ポリペプチドのFcγRIIbに対するKD値を当該改変体のFcγRIIbに対するKD値で除した値を指す。これらに加えて、各改変体のFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値/親ポリペプチドのFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値を表２０－１および２０－２に示した。ここで親ポリペプチドとは、IL6R-B3（配列番号：１４４）をH鎖に持つ改変体のことを指す。なお、表２０－１および２０－２のうち灰色で塗りつぶされたセル中の数値は、FcγRのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解析できないと判断されたため、参考実施例２５に記載された

〔式２〕

$$KD = C \bullet R_{max} / (R_{eq} - RI) - C$$

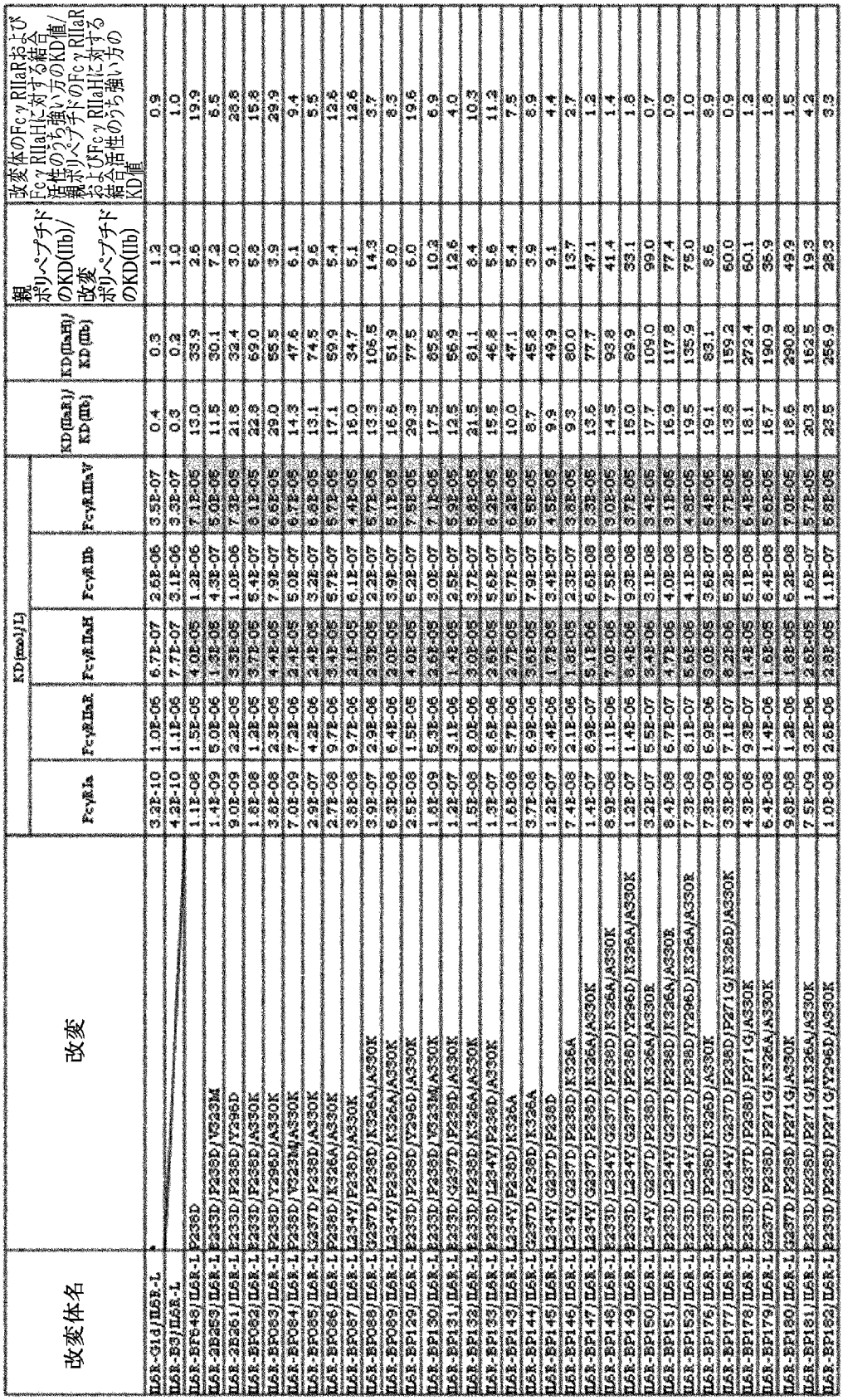
の式を利用して算出した数値である。

[0564] 表２０－１および２０－２から、いずれの改変体もIL6R-B3と比較してFcγRIIbに対する親和性が向上し、その向上の幅は3.0倍から99.0倍であった。各改変体のFcγRIIaRに対するKD値/各改変体のFcγRIIbに対するKD値の比、および各改変体のFcγRIIaHに対するKD値/各改変体のFcγRIIbに対するKD値の比は、FcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性に対する相対的なFcγRIIbに対する結合活性を表す。つまり、この値は各改変体のFcγRIIbへの結合選択性の高さを示した値であり、この値が大きければ大きいほどFcγRIIbに対

して結合選択性が高い。親ポリペプチドであるIL6R-B3/IL6R-LのFcγRIIaRに対するKD値/FcγRIIbに対するKD値の比、およびFcγRIIaHに対するKD値/FcγRIIbに対するKD値の比はそれぞれ0.3、0.2であるため、表２０－１および２０－２のいずれの改変体も親ポリペプチドよりもFcγRIIbへの結合選択性が向上していた。改変体のFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値/親ポリペプチドのFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値が1以上であるとは、その改変体のFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方の結合が親ポリペプチドのFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方の結合と同等であるか、より低減していることを意味する。今回得られた改変体ではこの値が0.7から29.9であったため、今回得られた改変体のFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方の結合は親ポリペプチドのそれと比較してほぼ同等か、それよりも低減していたといえる。これらの結果から、今回得られた改変体では親ポリペプチドと比べて、FcγRIIa R型およびH型への結合活性を維持または低減しつつ、FcγRIIbへの結合活性を増強しており、FcγRIIbへの選択性を向上させていることが明らかとなった。また、FcγRIaおよびFcγRIIIaVに対しては、いずれの改変体もIL6R-B3と比較して親和性が低下していた。

[0565]

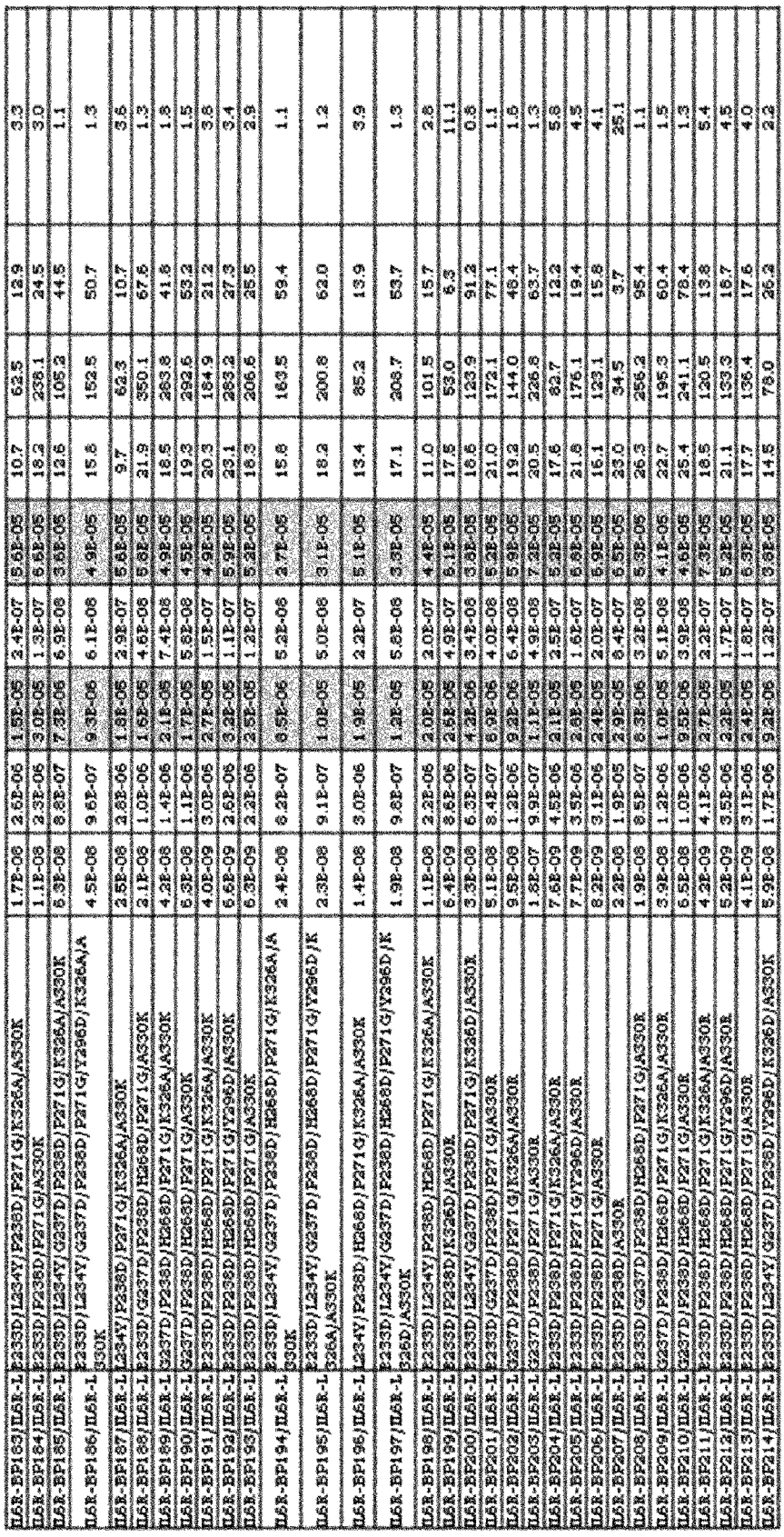
[表20-1]



改変体名	改変	KD(mol/L)					KD(IIaR)/KD(IIb)	親ポリペプチドのKD(IIb)/改変ポリペプチドのKD(IIb)	改変体のFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値/親ポリペプチドのFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値
		FcγRIa	FcγRIIaR	FcγRIIaH	FcγRIIb	FcγRIIIaV			
IL6R-G1d/IL6R-L		3.2E-10	1.0E-06	6.7E-07	2.6E-06	3.5E-07	0.4	0.3	1.2	0.9
IL6R-B3/IL6R-L		4.2E-10	1.1E-06	7.7E-07	3.1E-06	3.3E-07	0.3	0.2	1.0	1.0
IL6R-BF648/IL6R-L	E236D	1.1E-08	1.5E-05	4.0E-05	1.2E-06	7.1E-05	13.0	33.9	2.6	19.9
IL6R-2B253/IL6R-L	E233D/P238D/Y323M	1.4E-09	5.0E-06	1.3E-05	4.3E-07	5.0E-05	11.5	30.1	7.2	5.5
IL6R-2B261/IL6R-L	E233D/P238D/Y296D	9.0E-09	2.2E-05	3.3E-05	1.0E-06	7.3E-05	21.8	32.4	3.0	28.8
IL6R-BP062/IL6R-L	E233D/P238D/A330K	1.8E-08	1.2E-05	3.7E-05	5.4E-07	6.1E-05	22.3	69.0	5.8	15.8
IL6R-BP063/IL6R-L	P238D/Y296D/A330K	3.6E-08	2.3E-05	4.4E-05	7.9E-07	6.6E-05	29.0	55.5	3.9	29.9
IL6R-BP064/IL6R-L	P238D/Y323M/A330K	7.0E-09	7.2E-06	2.4E-05	5.0E-07	6.7E-05	14.3	47.6	6.1	9.4
IL6R-BP065/IL6R-L	G237D/P238D/A330K	2.9E-07	4.2E-06	2.4E-05	3.2E-07	6.6E-05	13.1	74.5	9.5	5.5
IL6R-BP066/IL6R-L	P238D/K326A/A330K	2.7E-08	9.7E-06	3.4E-05	5.7E-07	5.7E-05	17.1	59.9	5.4	12.6
IL6R-BP067/IL6R-L	L234Y/P238D/A330K	3.8E-08	9.7E-06	2.1E-05	6.1E-07	4.4E-05	16.0	34.7	5.1	12.6
IL6R-BP068/IL6R-L	G237D/P238D/K326A/A330K	3.9E-07	2.9E-06	2.3E-05	2.2E-07	5.7E-05	13.3	106.5	14.3	3.7
IL6R-BP069/IL6R-L	L234Y/P238D/K326A/A330K	6.3E-08	6.4E-06	2.0E-05	3.9E-07	5.1E-05	16.8	51.9	8.0	8.3
IL6R-BP129/IL6R-L	E233D/P238D/Y296D/A330K	2.5E-08	1.5E-05	4.0E-05	5.2E-07	7.5E-05	29.3	77.5	6.0	19.6
IL6R-BP130/IL6R-L	E233D/P238D/Y323M/A330K	1.8E-09	5.3E-06	2.6E-05	3.0E-07	7.1E-05	17.5	85.5	10.3	6.9
IL6R-BP131/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/A330K	1.2E-07	3.1E-06	1.4E-05	2.5E-07	5.9E-05	12.5	56.9	12.6	4.0
IL6R-BP132/IL6R-L	E233D/P238D/K326A/A330K	1.5E-08	8.0E-06	3.0E-05	3.7E-07	5.6E-05	21.5	81.1	8.4	10.3
IL6R-BP133/IL6R-L	E233D/L234Y/P238D/A330K	1.3E-07	8.5E-06	2.6E-05	5.6E-07	6.2E-05	15.5	46.8	5.6	11.2
IL6R-BP143/IL6R-L	L234Y/P238D/K326A	1.6E-08	5.7E-06	2.7E-05	5.7E-07	6.3E-05	10.0	47.1	5.4	7.5
IL6R-BP144/IL6R-L	G237D/P238D/K326A	3.7E-08	6.9E-06	3.6E-05	7.9E-07	5.5E-05	8.7	45.8	3.9	8.9
IL6R-BP145/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D	1.2E-07	3.4E-06	1.7E-05	3.4E-07	4.5E-05	9.9	49.9	9.1	4.4
IL6R-BP146/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/K326A	7.4E-08	2.1E-06	1.3E-05	2.3E-07	3.8E-05	9.3	80.0	13.7	2.7
IL6R-BP147/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/K326A/A330K	1.4E-07	8.9E-07	5.1E-06	6.6E-08	3.3E-05	13.5	77.7	47.1	1.2
IL6R-BP148/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/K326A/A330K	8.9E-08	1.1E-06	7.0E-06	7.5E-08	3.0E-05	14.5	93.8	41.4	1.4
IL6R-BP149/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/Y296D/K326A/A330K	1.2E-07	1.4E-06	6.4E-06	9.3E-08	3.7E-05	15.0	69.9	33.1	1.8
IL6R-BP150/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/K326A/A330K	3.2E-07	5.5E-07	3.4E-06	3.1E-08	3.4E-05	17.7	109.0	99.0	0.7
IL6R-BP151/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/K326A/A330K	8.4E-08	6.7E-07	4.7E-06	4.0E-08	3.1E-05	16.9	117.8	77.4	0.9
IL6R-BP152/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/Y296D/K326A/A330K	7.3E-09	8.1E-07	5.6E-06	4.1E-08	4.8E-05	19.5	135.9	75.0	1.0
IL6R-BP176/IL6R-L	E233D/P238D/K326D/A330K	7.3E-09	6.9E-06	3.0E-05	3.6E-07	5.4E-05	19.1	83.1	8.6	8.9
IL6R-BP177/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/K326D/A330K	3.3E-08	7.1E-07	8.2E-06	5.2E-08	3.7E-05	13.8	159.2	60.0	0.9
IL6R-BP178/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/P271G/A330K	4.3E-08	9.3E-07	1.4E-05	5.1E-08	6.4E-05	18.1	272.4	60.1	1.2
IL6R-BP179/IL6R-L	G237D/P238D/P271G/K326A/A330K	6.4E-08	1.4E-06	1.5E-05	6.4E-08	5.6E-05	16.7	190.9	36.9	1.8
IL6R-BP180/IL6R-L	G237D/P238D/P271G/A330K	9.8E-08	1.2E-06	1.8E-05	6.2E-08	7.0E-05	18.5	290.8	49.9	1.5
IL6R-BP181/IL6R-L	E233D/P238D/P271G/K326A/A330K	7.5E-09	3.2E-06	2.6E-05	1.6E-07	5.7E-05	20.3	152.5	19.3	4.2
IL6R-BP182/IL6R-L	E233D/P238D/P271G/Y296D/A330K	1.0E-08	2.6E-06	2.8E-05	1.1E-07	5.8E-05	23.5	256.9	28.3	3.3

[0566] 表２０－２は表２０－１の続きの表である。

[表20-2]



[0567] 〔実施例１３〕FcγRIIbへの結合が増強された改変体の作製

実施例８で示されたように、FcγRIIbへの結合を増強する際に、他の活性型FcγRに対する結合を可能な限り抑制したうえで、FcγRIIbへの結合を増強することが好ましい。そこで、FcγRIIbへの結合を増強する、または選択性を向上する効果がある改変同士を組み合わせ、さらにFcγRIIbへの結合が増強されまたは選択性が向上した改変体が作製された。具体的には、FcγRIIbへの結合の増強、選択性の向上において優れた効果を示すP238Dの改変を基礎とし、実施例９、実施例１１、実施例１２においてP238Dの改変と組み合わせることで効果が見られた改変同士がさらに組み合わされた。

[0568] IL6R-G1d（配列番号：１３３）、IL6R-B3（配列番号：１４４）のFc領域に、実施例９、実施例１１、実施例１２においてP238Dの改変と組み合わせて効果が認められた改変である、E233D、L234Y、G237D、S267Q、H268D、P271G、Y296D、K326D、K326A、A330R、A330Kを組み合わせた改変体が作製された。抗体L鎖としてIL6R-L（配列番号：１３５）を用いて、参考実施例１および２の方法に従い、これらの改変体を重鎖に含む抗体が発現、精製された。参考実施例２５の方法により各改変体の各FcγR（FcγRIa、FcγRIIaH、FcγRIIaR、FcγRIIb、FcγRIIIaV）に対する結合が評価された。

[0569] 各改変体の各FcγRに対するKDを表２１に示した。なお、改変とはIL6R-B3（配列番号：１４４）に対して導入した改変を示した。ただし各改変体を作製する際の鋳型としたIL6R-B3/IL6R-Lは*として示した。表中の「KD（IIaR)/KD（IIb)」とは、各改変体のFcγRIIaRに対するKDを各改変体のFcγRIIbに対するKDで除した値であり、この値が大きいほどFcγRIIbへの選択性が高いことを示す。「親ポリペプチドのKD（IIb)/改変ポリペプチドのKD（IIb)」は、IL6R-B3/IL6R-LのFcγRIIbに対するKD値を各改変体のFcγRIIbに対するKD値で除した値を指す。また、「親ポリペプチドのKD（IIaR)/改変ポリペプチドのKD（IIaR)」は、IL6R-B3/IL6R-LのFcγR IIaRに対するKD値を各改変体のFcγR IIaRに対するKD値で除した値を指す。なお、表２１中灰色で塗りつぶされたセル中の数値は、FcγRのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解

析では正しく解析できないと判断されたため、参考実施例２５に記載された

〔式２〕

$$KD= C\bullet R_{max}/(R_{eq}-RI)-C$$

の式を利用して算出された数値である。

[0570]

［表21］

改変体名	改変	FcγRIaに対するKD (mol/L)	FcγRIIaRに対するKD (mol/L)	FcγRIIaHに対するKD (mol/L)	FcγRIIbに対するKD (mol/L)	FcγRIIIaVに対するKD (mol/L)	KD (IIaR)/KD (IIb)	親ポリペプチドのKD (IIb)/改変ポリペプチドのKD (IIb)	親ポリペプチドのKD (IIaR)/改変ポリペプチドのKD (IIaR)
IL6R-G1d/IL6R-L		3.20E-10	1.00E-06	6.70E-07	2.60E-06	3.50E-07	0.4	1.2	1.1
IL6R-B3/IL6R-L	*	4.20E-10	1.10E-06	7.70E-07	3.10E-06	3.30E-07	0.3	1	1
IL6R-BF648/IL6R-L	P238D	1.10E-08	1.50E-05	4.00E-05	1.20E-06	7.10E-05	12.5	2.6	0.1
IL6R-BP215/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K	4.30E-08	1.30E-06	1.40E-05	4.10E-08	6.70E-05	31.7	75.6	0.8
IL6R-BP216/IL6R-L	G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/A330K	6.20E-07	2.90E-06	2.60E-05	1.40E-07	5.30E-05	20.7	22.1	0.4
IL6R-BP217/IL6R-L	G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/A330K	2.80E-06	3.60E-06	2.80E-05	1.50E-07	6.00E-05	24	20.7	0.3
IL6R-BP218/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/K326D/A330K	3.70E-08	1.50E-06	1.20E-05	7.60E-08	3.80E-05	19.7	40.8	0.7
IL6R-BP219/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/A330K	4.60E-08	6.10E-07	2.50E-06	3.40E-08	2.90E-05	17.9	91.2	1.8
IL6R-BP220/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K	2.00E-08	1.10E-06	1.20E-05	3.60E-08	5.30E-05	30.6	86.1	1
IL6R-BP221/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/Y296D/K326A/A330R	1.30E-07	7.10E-07	2.50E-06	2.80E-08	4.60E-05	25.4	110.7	1.5
IL6R-BP222/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/P271G/K326A/A330R	5.10E-08	7.10E-07	2.60E-06	3.40E-08	4.70E-05	20.9	91.2	1.5
IL6R-BP223/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330R	2.70E-08	6.00E-07	2.80E-06	2.50E-08	3.20E-05	24	124	1.8
IL6R-BP224/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/K326A/A330R	6.20E-09	4.50E-07	9.50E-06	3.50E-08	4.10E-05	12.9	88.6	2.4
IL6R-BP225/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/K326D/A330R	9.50E-08	6.90E-07	2.80E-06	3.50E-08	3.20E-05	19.7	88.6	1.6
IL6R-BP226/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/P271G/K326D/A330R	5.20E-08	5.70E-07	2.40E-06	3.30E-08	3.60E-05	17.3	93.9	1.9
IL6R-BP227/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/K326D/A330R	2.70E-08	6.20E-07	2.90E-06	3.20E-08	2.60E-05	19.4	96.9	1.8
IL6R-BP228/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/K326D/A330R	5.30E-09	4.20E-07	1.10E-05	4.00E-08	3.20E-05	10.5	77.5	2.6
IL6R-BP229/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/K326A/A330R	5.60E-08	8.10E-07	3.30E-06	4.20E-08	3.70E-05	19.3	73.8	1.4
IL6R-BP230/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R	1.40E-08	5.70E-07	9.60E-06	2.10E-08	6.70E-05	27.1	147.6	1.9
IL6R-BP231/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R	9.40E-09	7.40E-07	1.10E-05	2.30E-08	4.00E-05	32.2	134.8	1.5
IL6R-BP232/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/P271G/K326A/A330K	7.60E-08	8.40E-07	3.30E-06	5.60E-08	4.50E-05	15	55.4	1.3
IL6R-BP233/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/P271G/A330K	7.00E-08	6.90E-07	2.80E-06	3.70E-08	5.10E-05	18.6	83.8	1.6
IL6R-BP234/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330K	6.50E-09	1.20E-06	2.00E-05	1.20E-07	3.10E-05	10	25.8	0.9
IL6R-BP235/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330R	3.50E-09	6.80E-07	7.50E-06	4.40E-08	2.50E-05	15.5	70.5	1.6
IL6R-BP236/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330R	7.70E-09	8.40E-07	1.90E-05	6.50E-08	3.90E-05	12.9	47.7	1.3
IL6R-BP237/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330K	4.10E-09	1.10E-06	1.90E-05	1.00E-07	3.50E-05	11	31	1
IL6R-BP238/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330R	2.40E-09	6.40E-07	7.00E-06	3.60E-08	2.70E-05	17.8	86.1	1.7
IL6R-BP239/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330R	7.60E-09	8.10E-07	1.70E-05	6.00E-08	4.80E-05	13.5	51.7	1.4
IL6R-BP240/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/A330R	7.60E-09	1.50E-06	2.60E-05	9.50E-08	5.20E-05	15.8	32.6	0.7
IL6R-BP241/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/K326D/A330R	1.10E-09	6.80E-07	9.00E-06	4.50E-08	3.10E-05	15.1	68.9	1.6
IL6R-BP242/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330R	1.90E-09	7.50E-07	8.60E-06	5.10E-08	2.90E-05	14.7	60.8	1.5
IL6R-BP243/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/A330R	3.00E-09	5.40E-07	6.00E-06	3.60E-08	2.50E-05	15	86.1	2
IL6R-BP244/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/A330R	7.80E-09	1.80E-06	2.60E-05	1.10E-07	4.60E-05	16.4	28.2	0.6
IL6R-BP245/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330R	6.30E-09	1.40E-06	2.50E-05	8.30E-08	3.90E-05	16.9	37.3	0.8
IL6R-BP246/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330R	8.00E-09	1.60E-06	2.30E-05	9.20E-08	4.40E-05	17.4	33.7	0.7
IL6R-BP247/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330R	7.50E-09	8.10E-07	1.20E-05	3.70E-08	4.40E-05	21.9	83.8	1.4
IL6R-BP248/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330R	1.70E-09	8.20E-07	1.10E-05	3.50E-08	4.40E-05	23.4	88.6	1.3
IL6R-BP249/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R	7.00E-09	6.20E-07	7.20E-06	3.70E-08	2.80E-05	16.8	83.8	1.8

[0571] ヒト天然型IgG1の配列を含むIL6R-G1d/IL6R-LのH鎖にK439Eの改変が導入されたIL6R-B3/IL6R-Lの各FcγRに対する結合を1とした場合に、IL6R-G1d/IL6R-L のFcγRIaへの結合が1.3倍、FcγRIIaRへの結合が1.1倍、FcγRIIaHへの結合が1.1倍、FcγRIIbへの結合が1.2倍、FcγRIIIaVへの結合が0.9倍であり、IL6R-G1d/IL6R-LとIL6R-B3/IL6R-Lのこれら全てのFcγRに対する結合は同等であった。従って各改変体の各FcγRへの結合を当該改変導入前のIL6R-B3/IL6R-Lと比較することは、各改変体の各FcγRへの結合をヒト天然型IgG1の配列を含むIL6R-G1d/IL6R-Lの各FcγRへの結合と比較することと同等であると考えられる。そこでこれ以降の実施例においては各改変体の各FcγRへの結合活性を当該改変導入前のIL6R-B3/IL6R-Lの各FcγRへのと比較することとした。表２１から、改変導入前のIL6R-B3と比較していずれの改変体のFcγRIIbへの結合活性も向上しており、最も低かったIL6R-BF648/IL6R-Lの結合活性が2.6倍、最も高かったIL6R-BP230/IL6R-Lの結合活性は147.6倍向上していた。また、選択性を示すKD (IIaR)/KD (IIb)の数値は、最も低かったIL6R-BP234/IL6R-Lで10.0、最も高かったIL6R-BP231/IL6R-Lで32.2となり、いずれの改変体の当該数値も改変導入前のIL6R-B3/IL6R-Lの0.3と比較して選択性が向上していた。なお、いずれの改変体も、FcγRIa、FcγRIIaH、FcγRIIIaVへの結合活性は改変導入前のIL6R-B3/IL6R-Lのそれよりも低かった。

[0572] 〔実施例１４〕FcγRIIbに対する結合を増強したFc領域 とFcγRIIb細胞外領域との複合体およびFcγRIIaR細胞外領域との複合体のX線結晶構造解析

実施例１３において最もFcγRIIbへの結合が増強された改変体IL6R-BP230/IL6R-LのFcγRIIbへの結合は、改変導入前のIL6R-B3/IL6R-Lと比較して約150倍に増強され、FcγRIIaRへの結合も1.9倍程度の増強に抑えられている。従ってIL6R-BP230/IL6R-LはFcγRIIbへの結合、選択性共に優れた改変体であるが、可能な限りFcγRIIaRへの結合を抑制したうえでFcγRIIbへの結合がさらに増強されたより好ましい改変体を作製する可能性が模索された。

[0573] 実施例１０の図３０に示したように、P238Dの改変を含むFc領域では、CH2ドメインBのEUナンバリング２７０位で表されるAspとFcγRIIbの１３１番目

のArgとの間で強固な静電相互作用が形成されるが、この１３１番目のアミノ酸残基がFcγRIIIaおよびFcγRIIaHではHisであるのに対し、FcγRIIaRではFcγRIIbと同じArgである。その結果、FcγRIIaRとFcγRIIbとの間では１３１番目のアミノ酸残基とCH2ドメインBのEUナンバリング２７０位で表されるAspとの相互作用に差が生じない。これが、Fc領域のFcγRIIbへの結合と FcγRIIaRへの結合の選択性が出にくい要因となっていると考えられた。

[0574] 一方で、FcγRIIaとFcγRIIb細胞外領域のアミノ酸配列は、その93%が同一で非常に高い相同性を有している。天然型IgG1のFc領域（以下Fc（WT））とFcγRIIaRの細胞外領域複合体の結晶構造（J. Imunol.（2011）187, 3208-3217）の分析によると、両者の相互作用の界面付近においては、FcγRIIaRとFcγRIIbとの間でわずか３アミノ酸（Gln127、Leu132、Phe160）の違いしか見いだせておらず、Fc領域のFcγRIIbへの結合と FcγRIIaRへの結合の選択性の改善には相当な困難が予想された。

[0575] そのため、Fc領域のさらなるFcγRIIbに対する結合活性の増強とFc領域のFcγRIIbに対する結合とFcγRIIaRへの結合の選択性の向上を図るために、FcγRIIbに対する結合が増強されたFc領域とFcγRIIb細胞外領域との複合体の立体構造だけではなく、FcγRIIbに対する結合を増強したFc領域とFcγRIIaR細胞外領域との複合体の立体構造が併せて解析され、当該Fc領域とFcγRIIbとの相互作用と当該Fc領域とFcγRIIaRとの相互作用の微妙な差異が明らかになることが重要と考えられた。そこで、最初にIL6R-BP230/IL6R-Lの作製において基礎となった改変体であって実施例１２において作製されたIL6R-BP208/IL6R-L のFc領域からK439Eの改変が除かれたFc（P208）とFcγRIIb細胞外領域、またはFcγRIIaR細胞外領域との複合体のX線結晶構造が解析された。

[0576] （１４－１）Fc（P208）とFcγRIIb細胞外領域との複合体のX線結晶構造解析

[Fc（P208）の発現精製]

Fc（P208)は以下のように調製された。まず、IL6R-BP208の、EUナンバリングで表される439位のGluを天然型ヒトIgG1の配列であるLysにしたIL6R-P208が作製された。次にEUナンバリングで表される220位のCysがSerに置換された

改変体をコードするDNAを鋳型として、EUナンバリングで表される216位のGluからそのC末端がPCRによってクローニングされた遺伝子配列Fc (P208)がクローニングされた。参考実施例1および２に記載の方法にしたがって発現ベクターの作製、発現、精製を行った。なお、通常のIgG1のEUナンバリングで表される220位のCysは、L鎖に存在するCysとジスルフィド結合を形成しているが、Fc領域のみを調製する場合、L鎖を共発現させないため、不要なdisulfide bond形成を回避するために当該220位のCysはSerに置換された。

[0577] [FcγRIIb細胞外領域の発現精製]

FcγRIIb細胞外領域は、参考実施例２５の方法にしたがって調製された。

[0578] [Fc (P208) FcγRIIb細胞外領域複合体の精製]

glutathione S-transferaseとの融合蛋白として大腸菌内で発現されたEndo F1 (Protein Science (1996) 5, 2617-2622) の精製産物0.15 mgが加えられた、結晶化のために得られた1.5 mgのFcγRIIb細胞外領域サンプルを、0.1M Bis-Tris pH6.5のバッファー中で、室温にて３日間静置することにより、当該FcγRIIb細胞外領域サンプル中のN型糖鎖がAsnに直接結合したN-acetylglucosamineを残して切断された。次に5000MWCOの限外ろ過膜により濃縮された前記の糖鎖切断処理が施されたFcγRIIb細胞外領域サンプルは、20mM HEPES pH7.5, 0.1M NaClで平衡化されたゲルろ過カラムクロマトグラフィー (Superdex200 10/300) によって精製された。さらに、Fc (P208) がモル比でFcγRIIb細胞外領域のほうが若干過剰となるよう加えられた、前記の糖鎖切断FcγRIIb細胞外領域の精製画分は、10000MWCOの限外ろ過膜により濃縮され、その後、25mM HEPES pH7.5, 0.1M NaClで平衡化されたゲルろ過カラムクロマトグラフィー (Superdex200 10/300) により精製された。前記のように得られた精製画分が、Fc (P208) / FcγRIIb細胞外領域複合体のサンプルとして以後の検討に使用された。

[0579] [Fc (P208)/FcγRIIb複合体細胞外領域複合体の結晶化]

10000MWCOの限外ろ過膜 により約10 mg/mlまで濃縮されたFc (P208) / FcγRIIb細胞外領域複合体のサンプルは、ハンギングドロップ蒸気拡散法によ

りSeeding法が併用して結晶化された。結晶化にはVDXmプレート（Hampton Research）を用い、0.1M Bis-Tris pH6.5、19%(w/v) PEG3350、0.2 M Potassium Phosphate dibasicのリザーバー溶液に対し、リザーバー溶液：結晶化サンプル＝0.85μl：0.85μlで混合して作成された結晶化ドロップに、同様な条件で得られた同複合体の結晶をSeed Bead（Hampton Research）を用いて砕いた種結晶溶液から作成した希釈溶液0.15μlを添加し、リザーバーの入ったウェルに密閉、20℃に静置することにより、板状の結晶が得られた。

[0580] [Fc（P208)/FcγRIIb細胞外領域複合体結晶からのＸ線回折データの測定]

前記のように得られたFc（P208）/ FcγRIIb細胞外領域複合体の単結晶の一つを0.1M Bis-Tris pH6.5、24%（w/v）PEG3350、0.2 M Potassium Phosphate dibasic、20%（v/v）Ethylene glycolの溶液に浸した後、微小なナイロンループ付きのピンで溶液ごとすくいとり、液体窒素中で凍結させた当該単結晶からのX線回折データは、Spring-8のBL32XUにて測定された。なお、測定中、常に-178℃の窒素気流中に置くことで凍結状態が維持され、ビームライン備え付けのCCDディテクタMX-225HE（RAYONIX）により、当該単結晶を0.6°ずつ回転させながら計300枚の当該単結晶のX線回折画像が収集された。得られた回折画像からの格子定数の決定、回折斑点の指数付け、および回折データの処理には、プログラムXia2（J. Appl. Cryst.（2010）43, 186-190）、XDS Package（Acta Cryst.（2010）D66, 125-132）およびScala（Acta Cryst.（2006）D62, 72-82）を用い、最終的に分解能2.81Åまでの当該単結晶の回折強度データが得られた。本結晶は、空間群C2221に属し、格子定数ａ＝156.69Å、ｂ＝260.17Å、ｃ＝56.85Å、α＝90°、β＝90°、γ＝90°であった。

[0581] [Fc（P208）/ FcγRIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造解析]

Fc（P208）/ FcγRIIb細胞外領域複合体の構造は、プログラムPhaser（J. Appl. Cryst.（2007）40, 658-674）を用いた分子置換法により決定された。得られた結晶格子の大きさとFc（P208）/ FcγRIIb細胞外領域複合体の分子量から非対称単位中の複合体の数は一個と予想された。Fc（WT）/ FcγRIIIa

細胞外領域複合体の結晶構造であるPDB code:3SGJの構造座標から別座標として取り出されたA鎖239-340番ならびにB鎖239-340番のアミノ酸残基部分が、Fc領域のCH2ドメインの探索用モデルとして使用された。同じくPDB code:3SGJの構造座標から一つの座標として取り出されたA鎖341-444番とB鎖341-443番のアミノ酸残基部分がFc領域のCH3ドメインの探索用モデルとして使用された。最後にFcγRIIb細胞外領域の結晶構造であるPDB code:2FCB の構造座標から取り出されたA鎖6-178番のアミノ酸残基部分がFc（P208）の探索用モデルとして使用された。Fc領域のCH3ドメイン、FcγRIIb細胞外領域、Fc領域のCH2ドメインの各探索用モデルの結晶格子内での向きと位置を、回転関数および並進関数から決定しようとしたところ、CH2ドメインの一つの位置がうまく決定されなかった。そこで残りの三つの部分から計算された位相をもとに計算された電子密度マップから、Fc（WT）/ FcγRIIIa細胞外領域複合体の結晶構造を参考にしながら最後のCH2ドメインAの位置が決定され、Fc（P208）/ FcγRIIb細胞外領域複合体結晶構造の初期モデルが得られた。得られた初期モデルに対し二つのFc領域のCH2ドメイン、二つのFc領域のCH3ドメインおよびFcγRIIb細胞外領域を動かす剛体精密化をおこなったところ、剛体精密化が行われた時点で25-3.0Åの回折強度データを用いた構造モデルの結晶学的信頼度因子Ｒ値は42.6%、Free R値は43.7%となった。さらにプログラムREFMAC5（Acta Cryst.（2011）D67, 355-367）を用いた構造精密化と、実験的に決定された構造因子Foと構造モデルから計算された構造因子Fc領域および構造モデルから計算された位相をもとに算出された2Fo-Fc、Fo-Fcを係数とする電子密度マップをみながら、構造モデルをプログラムCoot（Acta Cryst.（2010）D66, 486-501）を用いて修正する作業を繰り返すことで構造モデルの精密化がおこなわれた。さらに2Fo-Fc、Fo-Fcを係数とする電子密度マップをもとに水分子を構造モデルに組み込み、精密化を行うことで、最終的に分解能25-2.81Åの27259個の回折強度データを用いた、4786個の非水素原子を含む構造モデルの、結晶学的信頼度因子Ｒ値は24.5%、Free R値は28.2%となった。

[0582] 構造解析の結果、Fc（P208)/FcγRIIb細胞外領域複合体の立体構造が分解

能2.81Åで決定された。その解析の結果、取得された構造を図３５に示した。2つのFc領域のCH2ドメインの間にFcγRIIbの細胞外領域が挟まれるように結合しており、これまで解析された天然型IgGのFcであるFc（WT)とFcγRIIIa（Proc.Natl.Acad.Sci.USA（2011）108, 12669-126674）、FcγRIIIb（Nature（2000）400, 267-273、J. Biol. Chem.（2011）276, 16469-16477）、およびFcγRIIa（J. Immunol.（2011）187（6), 3208-3217）の各細胞外領域との複合体の立体構造と類似していた。

[0583] 細部をみると、Fc（P208）/FcγRIIb細胞外領域の複合体では、G237Dならびに P238Dの改変の導入の影響により、Fc（WT)/FcγRIIaR細胞外領域の複合体と比較して、Fc領域のCH2ドメインAのヒンジ領域から続くEUナンバリングで表される233位から239位のループ構造が変化していた（図３６）。この結果、Fc（P208）のEUナンバリングで表される237位のAsp主鎖とFcγRIIbの160番目のTyr側鎖との間に強固な水素結合の形成が認められた（図３７）。この160番目のアミノ酸残基はFcγRIIaHおよびFcγRIIaRともにPheであり、水素結合の形成は不可能なことから、本水素結合はFc（P208)のFcγRIIbに対する結合活性の向上ならびにFcγRIIaに対する結合活性の低減というFc（P208)のFcγRIIbへの結合とFcγRIIaへの結合の選択性の獲得に重要な寄与をしているとも考えられる。

[0584] 一方で、Fc（P208)のEUナンバリングで表される237位のAspの側鎖自体はFcγRIIbとの結合に際してとくに目立った相互作用は形成しておらず、Fc領域内部のほかの残基との相互作用もみられなかった。このEUナンバリングで表される237位のAspの周囲には、Fc領域内のEUナンバリングで表される332位のIle、333位のGlu、334位のLysが近傍に位置していた（図３８）。これらの部位のアミノ酸残基を親水性残基に置換することによってFc（P208)のEUナンバリングで表される237位のAsp側鎖と相互作用を形成させ、ループ構造を安定化できれば、当該Fc領域とFcγRIIbの160番目のTyrとの水素結合形成にともなうエントロピー的なエネルギー損失を軽減することにつながり、結合自由エネルギーの増加、つまり結合活性の向上につながる可能性も考えられた。

[0585] 実施例１０において示されたP238Dの改変を含むFc（P238D)とFcγRIIb細胞外領域の複合体のX線結晶構造とFc（P208)とFcγRIIb細胞外領域の複合体のX線結晶構造を比較すると、Fc（P208)はFc（P238D)と比較し、新たに５個の変異を含んでおり、その多くは側鎖レベルの変化にとどまる。ただし、Fc領域のCH2ドメインBにおいてはEUナンバリングで表される271位のProをGlyへと改変したことで、主鎖レベルでの位置変化がみられるとともに、併せてEUナンバリングで表される266-270位のループの構造変化がおきていた（図３９）。実施例１１に示したように、Fc（P238D)のEUナンバリングで表される270位のAspがFcγRIIbの131番目のArgと強固な静電相互作用を形成する際に、このEUナンバリングで表される271位のPro部分に立体化学的なストレスがかかっている可能性が示唆された。今回EUナンバリングで表される271位のアミノ酸のGlyへの改変によりみられた構造変化は、改変前のProにたまっていた構造的なひずみが解消された結果と考えられ、その解消分がFcγRIIbとの結合自由エネルギーの改善、つまり結合活性の向上につながったと推察され得る。

[0586] さらにこのEUナンバリングで表される266-271位のループの構造変化に起因して、EUナンバリングで表される292位のArgが二状態をとりつつ構造変化をおこしていることが確認された。その際、このEUナンバリングで表される292位のArgとFc（P208)における改変残基の一つであるEUナンバリングで表される268位のAspとで形成される静電相互作用（図３９）が、本ループ構造の安定化に寄与している可能性が考えられた。本ループ中のEUナンバリングで表される270位のAspとFcγRIIbの131番目のArgとで形成される静電相互作用が、Fc（P208)とFcγRIIbの結合活性に大きく寄与していることから、当該ループ構造を結合時のコンフォメーションに安定化させることで、結合にともなうエントロピー的なエネルギー損失が軽減され、本改変が結合自由エネルギーの増加つまり結合活性の向上につながった可能性がある。

[0587] また、本構造解析結果をもとに、さらなる活性向上を目指した改変の可能性が精査され、改変導入部位の候補のひとつとしてEUナンバリングで表される239位のSerが見出された。図４０に示すとおり、FcγRIIbの117番目のLys

が構造的にみてもっとも自然な形で伸びる方向にこのCH2ドメインBのEUナンバリングで表される239位のSerが位置している。ただ、今回の解析ではFcγRIIbの117番目のLysの電子密度は観察されていないことから、一定の構造はとっておらず、現状ではFc (P208)との相互作用へのこのLys117の関与は限定的であるとも考えられる。このCH2ドメインBのEUナンバリングで表される239位のSerを、負電荷を有するAspまたはGluへと改変した場合、正電荷をもつFcγRIIbの117番目のLysとの間に静電相互作用が期待でき、その結果としてFcγRIIbへの結合活性の向上が期待された。

[0588] 一方、CH2ドメインAにおけるEUナンバリングで表される239位のSerの構造をみると、本アミノ酸側鎖は、EUナンバリングで表される236位のGlyの主鎖と水素結合を形成し、ヒンジ領域から続き、FcγRIIbの160番目のTyrの側鎖と水素結合を形成するEUナンバリングで表わされる237位のAspを含む233位から239位にかけてのループ構造を安定化させていると考えられた（図３７）。当該ループ構造を結合時のコンフォメーションに安定化させることは、結合にともなうエントロピー的なエネルギー損失を軽減し、結果として結合自由エネルギーの増加つまり結合活性の向上につながる。一方、このCH2ドメインAにおけるEUナンバリングで表される239位のSerをAspまたはGluへと改変した場合、EUナンバリングで表される236位のGlyの主鎖との水素結合が失われ、ループ構造の不安定化につながる可能性もあり得る。さらにすぐ近くに存在するEUナンバリングで表される265位のAspとの静電反発をも招く可能性があり、さらなるループ構造の不安定化が起きるとも考えられた。この不安定化された分のエネルギーは、FcγRIIbとの結合自由エネルギーの減少に働くため、結果として結合活性の低下を招くことにもなり得る。

[0589] （１４－２）Fc (P208) とFcγRIIaR細胞外領域との複合体のX線結晶構造解析

[FcγRIIaR細胞外領域の発現精製]

FcγRIIaR細胞外領域は、参考実施例2の方法にしたがって調製された。

[0590] [Fc (P208) / FcγRIIaR型細胞外領域複合体の精製]

S-transferaseとの融合蛋白として大腸菌内で発現されたEndo F1 (Protein Science (1996) 5, 2617-2622) の精製産物0.15 mg、20μlの5 U/ml 濃度のEndo F2 (QA-bio) および20μlの5 U/ml 濃度のEndo F3 (QA-bio) が加えられた、1.5 mgの精製されたFcγRIIa Rの細胞外領域サンプルを、0.1M Na Acetate pH4.5のバッファー中で、室温にて９日間静置の後、さらに、0.07 mgの前記Endo F1、7.5μl の前記Endo F2および7.5μl の前記Endo F3の追加後３日間静置することにより、当該FcγRIIa R細胞外領域サンプル中のN型糖鎖がAsnに直接結合したN-acetylglucosamineを残して切断された。次に10000MWCOの限外ろ過膜により濃縮された前記の糖鎖切断処理が施されたFcγRIIaR細胞外領域サンプルは、25 mM HEPES pH7、0.1M NaClで平衡化したゲルろ過カラムクロマトグラフィー (Superdex200 10/300) によって精製された。さらに、Fc (P208) をモル比でFcγRIIaR細胞外領域のほうが若干過剰となるよう加えられた、前記の糖鎖切断FcγRIIaR細胞外領域の精製画分は、10000MWCOの限外ろ過膜による濃縮後、25mM HEPES pH7、0.1M NaClで平衡化されたゲルろ過カラムクロマトグラフィー (Superdex200 10/300) により精製された。前記のように得られた精製画分が、Fc (P208)/FcγRIIaR型細胞外領域複合体のサンプルとして以後の検討に使用された。

[0591] [Fc (P208)/FcγRIIaR型細胞外領域複合体の結晶化]

10000MWCOの限外ろ過膜 により約10 mg/mlまで濃縮されたFc (P208)/FcγRIIa R型細胞外領域複合体のサンプルは、シッテイングドロップ蒸気拡散法にて結晶化された。0.1 M Bis-Tris pH7.5、26% (w/v) PEG3350、0.2 M Ammonium Sulfaeのリザーバー溶液に対し、リザーバー溶液：結晶化サンプル＝0.8μl：1.0μlで混合して作成された結晶化ドロップを、シールで密閉して20℃に静置することにより、板状の結晶が得られた。

[0592] [Fc (P208)/FcγRIIaR細胞外領域複合体結晶からのＸ線回折データの測定]

前記のように得られたFc (P208)/FcγRIIaR細胞外領域複合体の単結晶の一つを0.1 M Bis-Tris pH7.5、27.5% (w/v) PEG3350、0.2 M Ammonium Sulfate、20% (v/v) Glycerolの溶液に浸した後、微小なナイロンループ付きのピン

で溶液ごとすくいとり、液体窒素中で凍結させた当該単結晶中からのX線回折データは、高エネルギー加速器研究機構の放射光施設フォトンファクトリーBL-17Aにて測定された。なお、測定中、常に-178℃の窒素気流中に置くことで凍結状態が維持され、ビームライン備え付けのCCDディテクタQuantum 315r（ADSC）により、当該単結晶を0.6°ずつ回転させながら計225枚の当該単結晶のX線回折画像が収集された。得られた回折画像からの格子定数の決定、回折斑点の指数付け、および回折データの処理は、プログラムXia2（J. Appl. Cryst.（2010）43, 186-190）、XDS Package（Acta Cryst.（2010）D66, 125-132）およびScala（Acta Cryst.（2006）D62, 72-82）を用い、最終的に分解能2.87Åまでの回折強度データが得られた。本結晶は、空間群C2221に属し、格子定数ａ＝154.31Å、ｂ＝257.61Å、ｃ＝56.19Å、α＝90°、β＝90°、γ＝90°であった。

[0593] [Fc（P208)/FcγRIIaR型細胞外領域複合体のX線結晶構造解析]

Fc（P208)/FcγRIIaR型細胞外領域複合体の構造は、プログラムPhaser（J. Appl. Cryst.（2007）40, 658-674）を用いた分子置換法により決定された。得られた結晶格子の大きさとFc（P208)/FcγRIIaR細胞外領域複合体の分子量から非対称単位中の複合体の数は一個と予想された。実施例（１４－１）で得られたFc（P208)/FcγRIIb細胞外領域複合体の結晶構造を探索用モデルとして用いて、Fc（P208)/FcγRIIaR細胞外領域複合体の結晶格子内での向きと位置が、回転関数および並進関数から決定された。さらに得られた初期構造モデルに対し、二つのFc領域のCH2ドメイン、二つのFc領域のCH3ドメインおよびFcγRIIaR細胞外領域を独立に動かす剛体精密化をおこなったところ、剛体精密化が終了した時点で25-3.0Åの回折強度データを用いた構造モデルの結晶学的信頼度因子Ｒ値は38.4%、Free R値は30.0%となった。さらにプログラムREFMAC5（Acta Cryst.（2011）D67, 355-367）を用いた構造精密化と、実験的に決定された構造因子Foとモデルから計算された構造因子Fcならびにモデルから計算された位相をもとに算出された2Fo-Fc、Fo-Fcを係数とする電子密度マップをみながら当該構造モデルをプログラムCoot（Acta Cryst.（

2010) D66, 486-501）を用いて修正する作業を繰り返すことで構造モデルの精密化がおこなわれた。最後に2Fo-Fc、Fo-Fcを係数とする電子密度マップをもとに水分子をモデルに組み込み、精密化をおこなうことで、最終的に分解能25-2.87Åの24838個の回折強度データを用いた、4758個の非水素原子を含む構造モデルの、結晶学的信頼度因子Ｒ値は26.3%、Free R値は38.0%となった。

[0594] 構造解析の結果、Fc (P208)/FcγRIIaR細胞外領域複合体の立体構造が分解能2.87Åで決定された。Fc (P208)/FcγRIIaR型細胞外領域複合体の結晶構造を、実施例（１４－１）に示したFc (P208)/FcγRIIb細胞外領域複合体との結晶構造と比較したところ、両Fcγレセプター間の非常に高いアミノ酸同一性を反映し、全体構造から把握されるレベルでは、ほとんど差異は見られなかった（図４１）。

[0595] しかし、電子密度レベルで構造を詳細にみるとFc領域のFcγRIIbへの結合とFcγRIIaRへの結合の選択性の改善をもたらす可能性のある差異が見出された。FcγRIIaRの160番目のアミノ酸残基はTyrではなくPheであり、図４２に示したとおり、P238Dの改変を含むFc領域とFcγRIIbとの結合に際して存在したFc領域CH２ドメインAのEUナンバリングで表される237位のアミノ酸残基の主鎖とFcγRIIbの160番目Tyrとの間の水素結合は、P238Dの改変を含むFc領域とFcγRIIbとの結合では形成されないと考えられる。この水素結合の不形成がP238Dの改変が導入されたFc領域のFcγRIIbへの結合とFcγRIIaRへの結合の選択性改善の主要因と考えられるが、さらに電子密度レベルで比較してみると、当該Fc領域とFcγRIIbとの複合体ではEUナンバリングで表される235位のLeu、およびEUナンバリングで表される234位のLeuの側鎖の電子密度が明確に確認可能であるのに対し、当該Fc領域とFcγRIIaRとの複合体ではこれら側鎖の電儀密度が明確ではなく、EUナンバリングで表わされる237位近辺のループが、この付近でのFcγRIIaRとの相互作用の低下にともない、ゆらいでいると考えられた。一方、当該Fc領域のCH2ドメインBの同じ領域の構造を比較すると（図４３）、当該Fc領域とFcγRIIｂとの複合体構造ではEUナンバリング

で表される237位のAspまでの電子密度が確認できるのに対し、当該Fc領域とFcγRIIaRとの複合体では、EUナンバリングで表される237位のAspより手前の３残基、すなわちEUナンバリングで表される234位のLeu程度まで電子密度をが確認することが可能であり、FcγRIIbへの結合と比較し、より広い領域を使って相互作用を形成していると考えられた。以上から、当該Fc領域とFcγRIIbとの結合では、EUナンバリングで表される234位から238位の領域におけるFc領域のCH2ドメインA側の寄与が、当該Fc領域とFcγRIIaRとの結合では、EUナンバリングで表される234位から238位の領域におけるFc領域のCH2ドメインB側の寄与が大きい可能性が示唆された。

[0596] 〔実施例１５〕結晶構造に基づいて改変箇所を決定したFc改変体

実施例１４においてFcγRIIbへの結合が増強された改変体（P208）のドメインB内で、P271G改変の導入にともなう周囲の構造変化の結果として、EUナンバリングで表される268位のAspが、EUナンバリングで表される292位のArgと静電相互作用していることが示唆された（図３９）。この相互作用形成がEUナンバリングで表される266位から271位のループ構造の安定化に働き、結果としてFcγRIIbへの結合増強に寄与した可能性が考えられた。そこで、当該改変体のEUナンバリングで表される268位のAspをGluに置換することによって、前記の静電相互作用が強化され、当該改変体のループ構造をさらに安定化させることで、FcγRIIbへの結合増強が可能か否かが検討された。また図３８に示したとおり、FcγRIIbのEUナンバリングで表される160位のTyrは、P208のドメインAのEUナンバリングで表される237位のAspの主鎖と相互作用している。一方、EUナンバリングで表される237位のAspの側鎖は、分子内のEUナンバリングで表される332位のIle、333位のGlu、334位のLysの近傍に位置しているが特に目立った相互作用は形成していない。そこで、これらの部位を親水性アミノ酸残基に置換することでEUナンバリングで表される237位のAspの側鎖との相互作用を強めて、EUナンバリングで表される266位から271位のループ構造を安定化することで、FcγRIIbの160番目のTyrとの相互作用が増強されるか否かが、併せて検証された。

[0597] 実施例１３において作製されたFcγRIIbに対して優れた選択性を示したIL6R-BP230/IL6R-Lを鋳型として、構造情報から見出したH268E、I332T、I332S、I332E、I332K、E333K、E333R、E333S、E333T、K334S、K334T、K334Eの改変がそれぞれ導入された改変体が作製された。抗体L鎖としてはIL6R-L（配列番号：１３５）が用いられた。参考実施例１および２の方法に従い発現した、前記の重鎖の改変体とIL6R-Lの軽鎖を含む抗体が精製された。精製された抗体の各FcγR（FcγRIa、FcγRIIaH、FcγRIIaR、FcγRIIb、FcγRIIIaV）に対する結合が、参考実施例２５の方法によって評価された。

[0598] 各改変体の各FcγRに対するKDを表２２に示した。なお、表中の改変とはIL6R-B3（配列番号：１４４）に対して導入された改変を示した。ただしIL6R-BP230を作製する際の鋳型として用いられたIL6R-B3/IL6R-Lは*として示した。また、表中の親ポリペプチドのKD（IIb)/改変ポリペプチドのKD（IIb)は、IL6R-B3/IL6R-LのFcγRIIbに対するKD値を各改変体のFcγRIIbに対するＫＤ値で除した値を指す。また、親ポリペプチドのKD（IIaR)/改変ポリペプチドのKD（IIaR)は、IL6R-B3/IL6R-LのFcγR IIaRに対するKD値を各改変体のFcγR IIaRに対するKD値で除した値を指す。KD（IIaR)/KD（IIb)とは、各改変体のFcγRIIaRに対するKDを当該改変体のFcγRIIbに対するKDで除した値であり、この値が大きいほどFcγRIIbへの選択性が高いことを示す。なお、表２２のうち灰色で塗りつぶされたセルの数値は、FcγRのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解析できないと判断されたため、参考実施例２５に記載された

〔式２〕

$$KD = C \bullet R_{max} / (R_{eq} - RI) - C$$

の式を利用して算出された数値である。

[0599]

[表22]

改変体名	IL6R-BP230に加えた改変	FcγRIaに対するKD (mol/L)	FcγRIIaRに対するKD (mol/L)	FcγRIIaHに対するKD (mol/L)	FcγRIIbに対するKD (mol/L)	FcγRIIIaVに対するKD (mol/L)	KD (IIaR)/KD (IIb)	親ポリペプチドのKD(IIaR)/改変ポリペプチドのKD(IIaR)	親ポリペプチドのKD (IIb)/改変ポリペプチドのKD (IIb)
IL6R-G1d/IL6R-L		3.20E-10	1.00E-06	6.70E-07	2.60E-06	3.50E-07	0.4	1.1	1.2
IL6R-B3/IL6R-L	*	4.20E-10	1.10E-06	7.70E-07	3.10E-06	3.30E-07	0.3	1	1
IL6R-BP230/IL6R-L		1.40E-08	5.70E-07	9.60E-06	2.10E-08	6.70E-05	27.5	1.9	149
IL6R-BP264/IL6R-L	H268E	6.50E-09	4.80E-07	9.20E-06	1.20E-08	5.20E-05	40.6	2.3	265
IL6R-BP384/IL6R-L	K334R	3.00E-09	1.30E-06	1.80E-05	7.10E-08	4.50E-05	17.7	0.9	43.5
IL6R-BP390/IL6R-L	I332S	1.60E-09	4.90E-07	7.30E-06	2.10E-08	2.90E-05	22.9	2.2	144.9
IL6R-BP391/IL6R-L	I332T	9.60E-10	3.40E-07	4.40E-06	1.30E-08	1.90E-05	26.6	3.2	242.2
IL6R-BP392/IL6R-L	I332K	7.90E-09	7.30E-06	2.80E-05	9.90E-07	2.90E-05	7.3	0.2	3.1
IL6R-BP393/IL6R-L	I332R	1.10E-08	3.90E-06	4.60E-05	2.70E-06	4.80E-05	1.4	0.3	1.2
IL6R-BP465/IL6R-L	E333K	1.60E-08	6.10E-07	1.50E-05	2.10E-08	6.70E-05	29.8	1.8	151.2
IL6R-BP466/IL6R-L	E333R	1.50E-08	5.20E-07	1.10E-05	1.70E-08	2.90E-05	30.4	2.1	181.3
IL6R-BP467/IL6R-L	K334S	8.90E-10	1.10E-06	1.20E-05	4.10E-08	3.20E-05	25.8	1	75.4
IL6R-BP468/IL6R-L	K334T	9.70E-10	1.10E-06	9.70E-06	4.00E-08	2.70E-05	26.3	1	77.7
IL6R-BP469/IL6R-L	E333S	1.30E-08	6.00E-07	1.20E-05	2.30E-08	3.70E-05	26.4	1.8	136.6
IL6R-BP470/IL6R-L	E333T	1.50E-08	4.90E-07	1.00E-05	1.60E-08	3.70E-05	30.6	2.2	192.5

[0600] IL6R-BP230/IL6R-Lに対してH268Eの改変が導入されたIL6R-BP264/IL6R-L、E333Kの改変が導入されたIL6R-BP465/IL6R-L、E333Rの改変が導入されたIL6R-BP466/IL6R-L、E333Tの改変が導入されたIL6R-BP470のFcγRIIbへの結合活性、およびFcγRIIbの選択性は、IL6R-BP230/IL6R-Lのそれと比較して共に向上していた。またI332Tの改変が導入されたIL6R-BP391/IL6R-LのFcγRIIbの選択性は、IL6R-BP230/IL6R-Lと比較して低下するものの、FcγRIIbへの結合活性が向上していた。

[0601] 〔実施例１６〕EUナンバリングで表される271位の周辺のアミノ酸残基への改変の網羅的導入

Fc (P208)とFcγRIIbの構造とFc (P238D)/FcγRIIbの構造の比較において最も違いがみられるのは、Fc領域のCH2ドメインB のEUナンバリングで表される271位の近傍の構造である（図３９）。実施例１１に示したようにFc (P238D)ではEUナンバリングで表される270位のAspがFcγRIIbの131番目のArgと強固な静電相互作用を形成する際に、EUナンバリングで表される271位のPro部分に立体化学的なストレスがかかっている可能性が示唆された。Fc (P208)/FcγRIIbの構造においてはEUナンバリングで表される271位のProのGlyへの置換により、この構造的なひずみを解消するように主鎖レベルでの位置変化がおきており、その結果、271位の近傍の構造が大きく変化したと考えられる。この変化した271位の近傍の構造をさらに安定化させることができれば、FcγRIIbの131番目のArgとの静電相互作用を形成結合にともなうエントロピー的

なエネルギー損失をさらに軽減できる可能性も考えられた。そこで、EUナンバリングで表される271位の周辺のアミノ酸残基に対する改変を網羅的に導入することにより、Fc領域のFcγRIIbに対する結合の増強あるいは選択性の向上を示す改変が探索された。

[0602] 改変を網羅的に導入する鋳型として、IL6R-B3（配列番号：１４４）に対して、E233D、G237D、P238D、H268E、P271Gの改変が導入されたIL6R-BP267が作製された。抗体L鎖としてはIL6R-L（配列番号：１３５）が用いられた。参考実施例１および２の方法に従い発現した、前記の重鎖の改変体とIL6R-Lの軽鎖を含む抗体が精製された。精製された抗体の各FcγR（FcγRIa、FcγRIIaH、FcγRIIaR、FcγRIIb、FcγRIIIaV）に対する結合が、参考実施例２５の方法によって評価された。IL6R-BP267のEUナンバリングで表される264位、265位、266位、267位、269位、272位のアミノ酸が置換前のアミノ酸とCysを除く18種類のアミノ酸にそれぞれ置換された。抗体L鎖としてはIL6R-L（配列番号：１３５）が用いられた。参考実施例１および２の方法に従い発現した、前記の重鎖の改変体とIL6R-Lの軽鎖を含む抗体が精製された。参考実施例２５の方法により精製された抗体の各FcγR（FcγRIa、FcγRIIaH、FcγRIIaR、FcγRIIb、FcγRIIIaV））に対する結合が、参考実施例２５の方法によって評価された。得られた改変体の中から、改変を導入する前のIL6R-BP267/IL6R-LのFcγRIIbへの結合またはFcγIIbの選択性と比較してFcγRIIbへの結合が増強された改変体、あるいはFcγRIIbへの選択性が向上した改変体を表２３に示した。

[0603]

[表23]

改変体名	IL6R-BP267に加えた改変	FcγRIaに対するKD (mol/L)	FcγRIIaRに対するKD (mol/L)	FcγRIIaHに対するKD (mol/L)	FcγRIIbに対するKD (mol/L)	FcγRIIIaVに対するKD (mol/L)	KD (IIaR)/KD (IIb)	親ポリペプチドのKD (IIaR)/改変ポリペプチドのKD (IIaR)	親ポリペプチドのKD (IIb)/改変ポリペプチドのKD (IIb)
IL6R-B3/IL6R-L	*	3.20E-10	1.00E-06	6.70E-07	2.60E-06	3.50E-07	0.4	1	1
IL6R-BP267/IL6R-L		4.00E-09	1.70E-06	1.90E-05	1.30E-07	5.30E-05	13	0.6	20.5
IL6R-BP348/IL6R-L	S267A	5.50E-10	7.00E-07	2.20E-05	4.60E-08	2.70E-05	15.3	1.4	56.9
IL6R-BP300/IL6R-L	V264I	9.60E-09	6.90E-07	2.20E-05	5.80E-08	3.60E-05	11.9	1.4	44.8
IL6R-BP367/IL6R-L	E269D	3.10E-09	1.20E-06	4.60E-05	1.00E-07	5.30E-05	11.7	0.8	25.7
IL6R-BP350/IL6R-L	S267E	8.90E-10	1.50E-07	8.30E-05	1.00E-07	8.90E-05	1.5	6.5	25.2
IL6R-BP333/IL6R-L	V266F	9.10E-09	1.50E-06	3.40E-05	1.20E-07	5.90E-05	12.5	0.7	22.2
IL6R-BP352/IL6R-L	S267G	1.80E-09	1.90E-06	2.80E-05	1.20E-07	4.30E-05	15.7	0.5	21.3
IL6R-BP339/IL6R-L	V266M	4.60E-09	1.40E-06	1.80E-05	1.30E-07	2.40E-05	11.3	0.7	20.6
IL6R-BP520/IL6R-L	E272M	3.90E-09	3.00E-06	3.10E-05	1.70E-07	4.70E-05	17.5	0.3	14.9
IL6R-BP523/IL6R-L	E272Q	3.70E-09	2.70E-06	2.90E-05	1.70E-07	4.10E-05	15.9	0.4	15.5
IL6R-BP313/IL6R-L	D265E	2.60E-08	1.30E-05	4.70E-05	8.40E-07	3.80E-05	15.6	0.1	3.1
IL6R-BP513/IL6R-L	E272D	3.80E-09	1.70E-06	3.90E-05	1.10E-07	7.50E-05	15.4	0.6	23.6
IL6R-BP521/IL6R-L	E272N	3.60E-09	2.90E-06	4.40E-05	1.90E-07	9.00E-05	15.2	0.3	13.5
IL6R-BP338/IL6R-L	V266L	1.50E-08	2.20E-06	2.20E-05	1.50E-07	2.50E-05	15	0.5	17.9
IL6R-BP517/IL6R-L	E272I	3.20E-09	2.10E-06	2.20E-05	1.40E-07	3.50E-05	14.7	0.5	18.1
IL6R-BP514/IL6R-L	E272F	4.30E-09	3.00E-06	6.40E-05	2.10E-07	9.10E-05	14	0.3	12.3

[0604] 各改変体の各FcγRに対するKDを表２３に示した。なお、表中の改変とは、鋳型としたIL6R-BP267に対して導入された改変を示した。ただしIL6R-B3を作製する際の鋳型として用いられたIL6R-B3/IL6R-Lは*として示した。また、表中の親ポリペプチドのKD (IIb)/改変ポリペプチドのKD (IIb)は、IL6R-B3/IL6R-LのFcγRIIbに対するKD値を各改変体のFcγRIIbに対するKD値で除した値を指す。また、親ポリペプチドのKD (IIaR)/改変ポリペプチドのKD (IIaR)は、IL6R-B3/IL6R-LのFcγR IIaRに対するKD値を各改変体のFcγR IIaRに対するKD値で除した値を指す。KD (IIaR)/KD (IIb)とは、各改変体のFcγRIIaRに対するKDを当該改変体のFcγRIIbに対するKDで除した値であり、この値が大きいほどFcγRIIbへの選択性が高いことを示す。なお、表２３中灰色で塗りつぶされたセル中の数値は、FcγRのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解析できないと判断されたため、参考実施例２５に記載された

〔式２〕

$$KD = C \bullet R_{max} / (R_{eq} - RI) - C$$

の式を利用して算出された数値である。

[0605] 表２３に示された改変体のFcγRIa、FcγRIIaH、FcγRIIIaVへの結合活性はいずれも、IL6R-B3/IL6R-Lのそれと比較して維持または減少していた。また、IL6R-BP267/IL6R-Lに対してそれぞれS267A、V264I、E269D、S267E、V266

F、S267G、V266Mの改変が加えられた改変体のFcγRIIbへの結合活性は、改変を加える前のIL6R-BP267/IL6R-Lのそれと比較して増強されていた。また、IL6R-BP267/IL6R-Lに対してそれぞれS267A、S267G、E272M、E272Q、D265E、E272D、E272N、V266L、E272I、E272Fの改変が加えられた改変体のKD（IIaR)/KD(IIb)の値は、改変を加える前のIL6R-BP267/IL6R-Lのそれと比較して増加しており、S267A、S267G、E272M、E272Q、D265E、E272D、E272N、V266L、E272I、E272Fの改変がFcγRIIbへの選択性を向上させる効果を示すことが明らかとなった。

[0606] 〔実施例１７〕CH3領域への改変の導入によるFcγRIIbへの結合増強

EUナンバリングで表される396位のProをLeuに置換する改変はFcγRIIbへの結合を増強することが報告されている（Cancer Res.（2007）67, 8882-8890）。EUナンバリングで表される396位のアミノ酸はFcγRとの相互作用には直接関与しない部位であるが、抗体の構造を変化させることでFcγRとの相互作用に影響を与えるとも考えられる。そこで、Fc領域のEUナンバリングで表される396位のアミノ酸に改変を網羅的に導入することにより、Fc慮域のFcγRIIbへの結合あるいは選択性が向上するか否かが検証された。

[0607] 改変を網羅的に導入する鋳型として、IL6R-B3（配列番号：１４４）に対して、E233D、G237D、P238D、S267A、H268E、P271G、A330Rの改変が導入されたIL6R-BP423が作製された。IL6R-BP423のEUナンバリングで表される396位のアミノ酸が置換前のアミノ酸とシステインを除く18種類のアミノ酸に置換された改変体が作製された。抗体L鎖としてはIL6R-L（配列番号：１３５）が用いられた。参考実施例１の方法に従い、発現した前記の重鎖の改変体とIL6R-Lの軽鎖を含む抗体が精製された。精製された抗体の各FcγR（FcγRIa、FcγRIIaH、FcγRIIaR、FcγRIIb、FcγRIIIaV）に対する結合が、参考実施例２５の方法によって評価された。得られた改変体の各FcγRへの結合を表２４に示した。

[0608]

[表24]

改変体名	IL6R-BP423に加えた改変	FcγRIaに対するKD (mol/L)	FcγRIIaRに対するKD (mol/L)	FcγRIIaHに対するKD (mol/L)	FcγRIIbに対するKD (mol/L)	FcγRIIIaVに対するKD (mol/L)	KD (IIaR)/ KD (IIb)	親ポリペプチドのKD (IIaR)/改変ポリペプチドのKD (IIaR)	親ポリペプチドのKD (IIb)/改変ポリペプチドのKD (IIb)
IL6R-G1d/IL6R-L		3.20E-10	1.00E-06	6.70E-07	2.60E-06	3.50E-07	0.4	1.1	1.2
IL6R-B3/IL6R-L	*	4.20E-10	1.10E-06	7.70E-07	3.10E-06	3.30E-07	0.3	1	1
IL6R-BP423/IL6R-L		7.70E-10	1.80E-07	2.00E-06	5.10E-09	1.60E-05	34.2	6.3	604
IL6R-BP447/IL6R-L	P396A	9.00E-10	1.60E-07	2.00E-06	5.30E-09	2.50E-05	29.7	7	584
IL6R-BP448/IL6R-L	P396D	7.50E-10	1.30E-07	1.40E-06	4.10E-09	9.70E-06	31.7	8.5	759
IL6R-BP449/IL6R-L	P396E	9.10E-10	1.40E-07	1.50E-06	4.60E-09	1.20E-05	29.8	8	667
IL6R-BP450/IL6R-L	P396F	8.40E-10	1.20E-07	1.30E-06	4.10E-09	9.60E-06	29.4	9.2	763
IL6R-BP451/IL6R-L	P396G	9.80E-10	1.80E-07	2.00E-06	6.20E-09	1.20E-05	29.2	6.1	499
IL6R-BP452/IL6R-L	P396H	7.50E-10	1.30E-07	1.50E-06	5.10E-09	1.10E-05	25.9	8.3	602
IL6R-BP453/IL6R-L	P396I	7.50E-10	1.20E-07	9.30E-07	4.60E-09	7.40E-06	25.5	9.4	675
IL6R-BP454/IL6R-L	P396K	8.20E-09	1.30E-07	1.40E-06	4.80E-09	9.10E-06	27.5	8.4	649
IL6R-BP455/IL6R-L	P396L	7.50E-10	1.30E-07	1.60E-06	4.00E-09	8.50E-06	31.8	8.6	767
IL6R-BP456/IL6R-L	P396M	6.00E-10	1.20E-07	2.00E-06	3.50E-09	9.20E-06	35.3	8.9	888
IL6R-BP457/IL6R-L	P396N	9.10E-10	1.50E-07	2.60E-06	5.20E-09	1.30E-05	28.9	7.3	591
IL6R-BP458/IL6R-L	P396Q	7.80E-10	1.40E-07	1.40E-06	4.50E-09	1.10E-05	31.1	7.9	687
IL6R-BP459/IL6R-L	P396R	1.10E-09	1.50E-07	1.40E-06	5.10E-09	1.20E-05	28.9	7.5	607
IL6R-BP460/IL6R-L	P396S	8.70E-10	1.60E-07	3.20E-06	6.50E-09	1.40E-05	25.2	6.7	478
IL6R-BP461/IL6R-L	P396T	1.30E-09	1.30E-07	1.50E-06	5.10E-09	9.90E-06	24.4	8.8	602
IL6R-BP462/IL6R-L	P396V	9.70E-10	1.30E-07	1.40E-06	5.20E-09	9.00E-06	25	8.5	593
IL6R-BP463/IL6R-L	P396W	1.30E-09	1.60E-07	1.90E-06	5.60E-09	1.20E-05	28.1	7	554
IL6R-BP464/IL6R-L	P396Y	1.10E-09	1.30E-07	2.10E-06	4.00E-09	9.90E-06	31.5	8.7	773

[0609] なお、表中の「IL6R-BP423に加えた改変」とは、鋳型としたIL6R-BP423に対して導入された改変を示した。ただし、IL6R-BP423を作製する際の鋳型として用いられたIL6R-B3/IL6R-Lは*として示した。また、表中の親ポリペプチドのKD (IIb)/改変ポリペプチドのKD (IIb)は、IL6R-B3/IL6R-LのFcγRIIbに対するKD値を各改変体のFcγRIIbに対するKD値で除した値を指す。また、親ポリペプチドのKD (IIaR)/改変ポリペプチドのKD (IIaR)は、IL6R-B3/IL6R-LのFcγR IIaRに対するKD値を各改変体のFcγR IIaRに対するKD値で除した値を指す。KD (IIaR)/KD (IIb)とは、各改変体のFcγRIIaRに対するKDを当該改変体のFcγRIIbに対するKDで除した値であり、この値が大きいほどFcγRIIbへの選択性が高いことを示す。なお、表２４中灰色で塗りつぶされたセル中の数値は、FcγRのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解析できないと判断されたため、参考実施例２５に記載された

〔式２〕

$$KD = C \bullet R_{max} / (R_{eq} - RT) - C$$

の式を利用して算出された数値である。

[0610] 表２４の結果より、IL6R-BP423/IL6R-Lに対してP396Mの改変が導入されたIL6R-BP456/IL6R-L、P396Lの改変導入されたIL6R-BP455/IL6R-L、P396Yの改変が導入されたIL6R-BP464/IL6R-L、P396Fの改変が導入されたIL6R-BP450/IL6R-L、P396Dの改変が導入されたIL6R-BP448/IL6R-L、P396Qの改変が導入されたIL6R-BP458/IL6R-L、P396Iの改変が導入されたIL6R-BP453/IL6R-L、P396Eの改変が導入されたIL6R-BP449/IL6R-L、P396Kの改変が導入されたIL6R-BP454/IL6R-L、P396Rの改変が導入されたIL6R-BP459/IL6R-LのFcγRIIbへの結合活性は、いずれも改変を導入する前のIL6R-BP423/IL6R-Lのそれと比較して向上していた。また、IL6R-BP423/IL6R-Lに対してP396Mの改変が導入されたIL6R-BP456/IL6R-LのKD (IIaR)/KD (IIb)の値は、改変が導入する前のIL6R-BP423/IL6R-Lのそれと比較して大きく、FcγRIIbへの選択性が向上していた。表２４中で作製された改変体はいずれもFcγRIa、FcγRIIaH、FcγRIIIaVへの結

合活性は親ポリペプチドであるIL6R-B3/IL6R-Lのそれよりも低かった。

[0611] 〔実施例１８〕サブクラス配列の利用によるFcγRIIbへの結合が増強された改変体の作製

ヒトIgGに存在するサブクラスによって、FcγRへの結合プロファイルが異なる。IgG1とIgG4の各FcγRへの結合活性の違いを、FcγRIIbへの結合活性の増強、および/または選択性の向上に利用できるか否かが検証された。はじめに、IgG1とIgG4の各FcγRへの結合活性が解析された。抗体H鎖としては、ヒトIgG4 のEUナンバリングで表される228位のSerがProに置換され、C末端のGlyおよびLysが除去されたFc領域であるG4dを含むIL6R-G4d（配列番号：１６４）が抗体H鎖として作製された。抗体L鎖としてはIL6R-L（配列番号：１３５）が用いられた。参考実施例１および２の方法に従い発現した、IL6R-Lの軽鎖とIL6R-G1d/IL6R-LまたはIL6R-G4d/IL6R-Lを含む抗体が精製された。精製された抗体の各FcγR（FcγRIa、FcγRIIaH、FcγRIIaR、FcγRIIb、FcγRIIIaV）に対する結合が、参考実施例２５の方法によって評価された。得られた改変体の各FcγRへの結合を表２５にまとめた。

[0612] [表25]

改変体名	FcγRIaに対するKD (mol/L)	FcγRIIaRに対するKD (mol/L)	FcγRIIaHに対するKD (mol/L)	FcγRIIbに対するKD (mol/L)	FcγRIIIaVに対するKD (mol/L)
IL6R-G1d/IL6R-L	1.20E-10	9.70E-07	6.50E-07	3.90E-06	4.20E-07
IL6R-G4d/IL6R-L	6.60E-10	2.10E-06	3.40E-06	2.60E-06	3.40E-06

[0613] IL6R-G4d/IL6R-LのFcγRIIbへの結合は、IL6R-G1d/IL6R-Lのそれと比較して1.5倍強いのに対して、IL6R-G4d/IL6R-LのFcγRIIaRへの結合は、IL6R-G1d/IL6R-Lのそれと比較して2.2倍弱いことが示された。また、IL6R-G4d/IL6R-L のFcγRIa、FcγRIIaH、FcγRIIIaVへの結合活性は、IL6R-G1d/IL6R-Lのそれと比較して弱かった。以上の結果から、IL6R-G4dのFcγRIIbへの結合活性、選択性共に、IL6R-G1dと比較して好ましい性質を有していることが明らかとなった。

[0614] 図４４はG1dとG4dのCH1からC末端までの配列（EUナンバリングで表される118位から445位）の比較を示したアラインメントである。図４４中の太枠で囲

まれたアミノ酸はG1dとG4dで異なるアミノ酸残基であることを示している。これらの異なるアミノ酸の中から、FcγRとの相互作用に関与すると予想される部位をいくつか選択し、FcγRIIbへの結合活性、選択性の観点で共に好ましい性質を付与するG4dの配列中の少なくとも一つ以上のアミノ酸残基をFcγRIIbへの結合が増強された改変体に移植することで、更なるFcγRIIbへの結合のさらなる増強、および/または選択性のさらなる向上が可能であるか否かが検証された。

[0615] 具体的には、IL6R-BP230に対して、A327Gの改変が導入されたIL6R-BP473、A330Sの改変が導入されたIL6R-BP472、P331Sの改変が導入されたIL6R-BP471、A330SおよびP331Sの改変が導入されたIL6R-BP474、A327GおよびA330Sの改変が導入されたIL6R-BP475、A327G、A330S、およびP331Sの改変が導入されたIL6R-BP476、A327GおよびP331Sの改変が導入されたIL6R-BP477が作製された。またIL6R-BP230のEUナンバリングで表される118位のAlaから225位のThrまでのアミノ酸がEUナンバリングで表される118位のAlaから222位のProまでからなるG4dの配列のアミノ酸に置換されたIL6R-BP478が作製された。抗体L鎖としてはIL6R-L（配列番号：１３５）が用いられた。参考実施例１および２の方法に従い、前記の重鎖の改変体とIL6R-Lの軽鎖を含む抗体が精製された。精製された抗体の各FcγR（FcγRIa、FcγRIIaH、FcγRIIaR、FcγRIIb、FcγRIIIaV）に対する結合が参考実施例２５の方法により評価された。

[0616] 各改変体の各FcγRに対するKDを表２６に示した。なお、表中の、「親ポリペプチドのKD（IIb)/改変ポリペプチドのKD（IIb)」は、IL6R-B3/IL6R-LのFcγRIIbに対するKD値を各改変体のFcγRIIbに対するKD値で除した値を指す。表中の「IL6R-BP230に加えた改変」とはIL6R-BP230に対して導入された改変を示した。ただし、IL6R-BP230を作製する際の鋳型としたIL6R-B3/IL6R-Lは*1として示した。また、IL6R-BP230のEUナンバリングで表される118位のAlaから225位のThrまでが、EUナンバリングで表される118位のAlaから222位のProまでからなるG4dの配列に置換されたIL6R-BP478は*2として示した。「親ポリペプチドのKD（IIaR)/改変ポリペプチドのKD（IIaR)」は、IL6R-B3/IL6R-Lの

FcγR IIaRに対するKD値を当該改変体のFcγR IIaRに対するKD値で除した値を指す。KD (IIaR)/KD (IIb)とは、各改変体のFcγRIIaRに対するKDを当該改変体のFcγRIIbに対するKDで除した値であり、この値が大きいほどFcγRIIbへの選択性が高いことを示す。なお、表２６において灰色で塗りつぶされたセル中の数値は、FcγRのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解析できないと判断されたため、参考実施例２５に記載された

〔式２〕

$$KD = C \bullet R_{max} / (R_{eq} - RI) - C$$

の式を利用して算出された数値である。

[0617]

[表26]

改変体名	IL6R-BP230に加えた改変	FcγRIaに対するKD (mol/L)	FcγRIIaRに対するKD (mol/L)	FcγRIIaHに対するKD (mol/L)	FcγRIIbに対するKD (mol/L)	FcγRIIIaVに対するKD (mol/L)	KD (IIaR)/KD (IIb)	親ポリペプチドのKD (IIaR)/改変ポリペプチドのKD (IIaR)	親ポリペプチドのKD (IIb)/改変ポリペプチドのKD (IIb)
IL6R-G1d/IL6R-L		3.20E-10	1.00E-06	6.70E-07	2.60E-06	3.50E-07	0.4	1.1	1.2
IL6R-B3/IL6R-L	*1	4.20E-10	1.10E-06	7.70E-07	3.10E-06	3.30E-07	0.3	1	1
IL6R-BP230/IL6R-L		1.40E-08	5.70E-07	9.60E-06	2.10E-08	6.70E-05	27.5	1.9	149
IL6R-BP471/IL6R-L	P331S	7.30E-09	8.00E-07	1.20E-05	3.50E-08	7.10E-05	22.7	1.4	88.1
IL6R-BP472/IL6R-L	A330S	5.20E-09	3.30E-06	2.40E-05	1.50E-07	3.80E-05	21.5	0.3	20.3
IL6R-BP473/IL6R-L	A327G	6.20E-09	3.80E-07	4.80E-06	1.80E-08	3.60E-05	21.1	2.9	172.2
IL6R-BP474/IL6R-L	A330S/P331S	4.10E-09	3.00E-06	3.70E-05	1.80E-07	5.50E-05	16.6	0.4	16.9
IL6R-BP475/IL6R-L	A327G/A330S	4.90E-09	1.00E-06	1.50E-05	1.10E-07	4.60E-05	9.7	1.1	29.2
IL6R-BP476/IL6R-L	A327G/A330S/P331S	5.90E-09	1.30E-06	1.90E-05	1.30E-07	4.90E-05	9.7	0.9	23.7
IL6R-BP477/IL6R-L	A327G/P331S	9.20E-09	5.10E-07	7.60E-06	3.70E-08	5.80E-05	14	2.2	84.9
IL6R-BP478/IL6R-L	*2	7.70E-09	5.40E-07	6.70E-06	1.90E-08	3.50E-05	28	2	160.6

[0618] 表２６に記載された改変体のうち、A327Gの改変が導入されたIL6R-BP473/IL6R-LのFcγRIIbへの結合はIL6R-BP230/IL6R-Lのそれと比較して1.2倍増強されていた。また、IL6R-BP230のEUナンバリングで表される118位のAlaから225位のThrまでのアミノ酸が、EUナンバリングで表される118位のAlaから222位のProまでからなるG4dの配列のアミノ酸に置換されたIL6R-BP478/IL6R-LのFcγRIIbおよびFcγRIIaRへの結合は、IL6R-BP230/IL6R-Lのそれと比較して共に1.1倍増強していた。いずれの改変体のFcγRIa、FcγRIIaH、FcγRIIIaVへの結合活性は、親ポリペプチドであるIL6R-B3/IL6R-Lのそれよりも低かった。

[0619] 図４４に示されたその他の部位の改変体もさらに検証された。具体的には、抗体H鎖のIL6R-BP230に対して、K274Qが導入されたIL6R-BP541、Y296Fが導入されたIL6R-BP542、H268Qが導入されたIL6R-BP543、R355Qが導入されたIL6R-BP544、D356Eが導入されたIL6R-BP545、L358Mが導入されたIL6R-BP546、K409Rが導入されたIL6R-BP547、Q419Eが導入されたIL6R-BP548が作製された。抗体L鎖としてはIL6R-Lが共通して用いられた。参考実施例１および２の方法に従い、前記の重鎖の改変体とIL6R-Lの軽鎖を含む抗体が精製された。精製された抗体の参考実施例２５の方法により各FcγR（FcγRIa、FcγRIIaH、FcγRIIaR、FcγRIIb、FcγRIIIaV）に対する結合が参考実施例２５の方法により評価された。

[0620] 各改変体の各FcγRに対するKDを表２７に示した。なお、表中の、「親ポリペプチドのKD（IIb)/改変ポリペプチドのKD（IIb)」は、IL6R-B3/IL6R-LのFcγRIIbに対するKD値を各改変体のFcγRIIbに対するKD値で除した値を指す。表中の「IL6R-BP230に加えた改変」とはIL6R-BP230に対して導入された改変を示した。ただし、IL6R-BP230を作製する際の鋳型としたIL6R-B3/IL6R-Lは*1として示した。「親ポリペプチドのKD（IIaR)/改変ポリペプチドのKD（IIaR)」は、IL6R-B3/IL6R-LのFcγR IIaRに対するKD値を当該改変体のFcγR IIaRに対するKD値で除した値を指す。KD（IIaR)/KD（IIb)とは、各改変体のFcγR IIaRに対するKDを当該改変体のFcγRIIbに対するKDで除した値であり、この

値が大きいほどFcγRIIbへの選択性が高いことを示す。なお、表２７において灰色で塗りつぶされたセル中の数値は、FcγRのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解析できないと判断されたため、参考実施例２５に記載された

〔式２〕

$$KD = C \bullet R_{max} / (R_{eq} - RI) - C$$

の式を利用して算出された数値である。

[0621] 表２７に示すように、IL6R-BP230/IL6R-Lに対してK274Qを導入したIL6R-BP541/IL6R-L、R355Qを導入したIL6R-BP544/IL6R-L、D356Eを導入したIL6R-BP545/IL6R-L、L358Mを導入したIL6R-BP546/IL6R-L は改変導入前のIL6R-BP230/IL6R-Lと比較してFcγRIIbへの結合が増強されていた。またこの中で、IL6R-BP230/IL6R-Lに対してR355Qを導入したIL6R-BP544/IL6R-L、D356Eを導入したIL6R-BP545/IL6R-L、L358Mを導入したIL6R-BP546/IL6R-Lは改変導入前のIL6R-BP230/IL6R-Lと比較してKD (IIaR)/KD (IIb)の値が増加しており、FcγRIIbへの選択性についても向上する改変であることが示された。

[0622] [表27]

改変体名	IL6R-BP230に加えた改変	Fcγ RIaに対するKD (mol/L)	Fcγ RIIaRに対するKD (mol/L)	Fcγ RIIaHに対するKD (mol/L)	Fcγ RIIbに対するKD (mol/L)	Fcγ RIIIaVに対するKD (mol/L)	KD (IIaR)/KD (IIb)	抗原ポリペプチドのKD (IIaR)/改変ポリペプチドのKD (IIaR)	抗原ポリペプチドのKD (IIb)/改変ポリペプチドのKD (IIb)
IL6R-G1d/IL6R-L		3.2E-10	1.0E-06	6.7E-07	2.6E-06	3.5E-07	0.4	1.1	1.2
IL6R-B3/IL6R-L	*1	4.2E-10	1.1E-06	7.7E-07	3.1E-06	3.3E-07	0.3	1.0	1.0
IL6R-BP230/IL6R-L		1.0E-08	4.9E-07	9.7E-06	1.8E-08	3.9E-05	28.0	2.2	175.6
IL6R-BP541/IL6R-L	K274Q	1.1E-08	4.5E-07	9.3E-06	1.6E-08	4.1E-05	27.8	2.4	189.6
IL6R-BP542/IL6R-L	Y296F	1.3E-08	4.9E-07	9.7E-06	2.0E-08	4.3E-05	24.4	2.2	153.7
IL6R-BP543/IL6R-L	H268Q	2.3E-08	5.6E-07	7.4E-06	2.0E-08	4.6E-05	27.3	1.9	151.5
IL6R-BP544/IL6R-L	R355Q	9.8E-09	4.8E-07	1.2E-05	1.7E-08	4.5E-05	28.8	2.2	183.9
IL6R-BP545/IL6R-L	D356E	9.9E-09	5.7E-07	9.1E-06	1.7E-08	4.5E-05	32.7	1.9	178.6
IL6R-BP546/IL6R-L	L358M	9.0E-09	5.0E-07	1.0E-05	1.5E-08	3.7E-05	32.8	2.2	204.6
IL6R-BP547/IL6R-L	K409R	1.2E-08	4.9E-07	7.5E-06	1.9E-08	3.5E-05	25.5	2.2	162.6
IL6R-BP548/IL6R-L	Q419E	1.2E-08	5.0E-07	9.4E-06	1.9E-08	3.4E-05	26.2	2.2	161.8

[0623] 〔実施例１９〕FcγRIIbへの結合の増強、選択性の向上をもたらす改変の組合せの検討

実施例１８までの実施例においてFcγRIIbへの結合の増強あるいは選択性

の向上の面で、効果がみられた改変のさらなる組合せが検討された。具体的には、IL6R-B3（配列番号：１４４）に対してこれまでの検討の中でFcγRIIbへの結合の増強、および/または選択性の向上をもたらした改変の組合せが導入された。また比較対照として既存のFcγRIIbへの結合を増強する改変（Seungら（Mol. Immunol. (2008) 45, 3926-3933））である、S267E、およびL328Fの改変がIL6R-B3に導入されたIL6R-BP253が作製された。抗体L鎖としてはIL6R-L（配列番号：１３５）が用いられた。参考実施例１および２の方法に従い発現した、前記の重鎖の改変体とIL6R-Lの軽鎖を含む抗体が精製された。精製された抗体の各FcγR（FcγRIa、FcγRIIaH、FcγRIIaR、FcγRIIb、FcγRIIIaV）に対する結合が、参考実施例２５の方法によって評価された。

[0624] 各改変体の各FcγRに対するKDを表２８に示した。なお、表中の改変とはIL6R-B3（配列番号：１４４）に対して導入された改変を示した。ただし各改変体を作製する際の鋳型としたIL6R-B3/IL6R-Lは*として示した。親ポリペプチドのKD（IIb)/改変ポリペプチドのKD（IIb)は、IL6R-B3/IL6R-LのFcγRIIbに対するKD値を各改変体のFcγRIIbに対するKD値で除した値を指す。また、親ポリペプチドのKD（IIaR)/改変ポリペプチドのKD（IIaR)は、IL6R-B3/IL6R-LのFcγR IIaRに対するKD値を当該改変体のFcγR IIaRに対するKDで除した値を指す。KD（IIaR)/KD（IIb)とは、各改変体のFcγRIIaRに対するKDを当該改変体のFcγRIIbに対するKDで除した値であり、この値が大きいほどFcγRIIaRと比較してFcγRIIbへの選択性が高いことを示す。またKD（IIaH)/KD（IIb)とは、各改変体のFcγRIIaHに対するKDを当該改変体のFcγRIIbに対するKDで除した値であり、この値が大きいほどFcγRIIaHと比較してFcγRIIbへの選択性が高いことを示す。なお、表２８において灰色で塗りつぶされたセル中の数値は、FcγRのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解析できないと判断されたため、参考実施例２５に記載された

〔式２〕

$$KD = C \bullet R_{max} / (R_{eq} - RI) - C$$

の式を利用して算出された数値である。

[0625] [表28-1]

改変体名 (L鎖はIL6R-L)	配列	KD (mol/L)					KD (IIaR)/KD (IIb)	KD (IIaH)/KD (IIb)	酸性リガンドのKD (IIaR) / 酸性リガンドのKD (IIb)	酸性リガンドのKD (IIb)
		FcγRIa	FcγRIIaR	FcγRIIaH	FcγRIIb	FcγRIIaV				
IL6R-G1d	G1d	3.2E-10	1.0E-06	6.7E-07	2.6E-06	3.5E-07	0.4	0.3	1.1	1.2
IL6R-B3	B3	4.2E-10	1.1E-06	7.7E-07	3.1E-06	3.3E-07	0.3	0.2	1	1
IL6R-BP253	S267E/L328F	6.7E-11	2.1E-09	1.2E-06	1.1E-08	3.6E-06	0.2	107.1	528.8	276.8
IL6R-BP262	G237D/P238D/H268E/P271G	1.0E-08	2.0E-06	4.5E-05	1.2E-07	5.6E-05	17	375	0.5	25.8
IL6R-BP264	E233D/G237D/P238D/H268E/P271G/Y296D/A330R	7.4E-09	3.5E-07	2.8E-06	1.2E-08	2.6E-05	28.3	227.6	3.2	252
IL6R-BP265	G237D/P238D/H268E/P271G/Y296D/A330R	2.3E-08	6.3E-07	1.2E-05	1.5E-08	9.6E-05	41.2	789.5	1.8	203.9
IL6R-BP266	E233D/G237D/P238D/H268E/P271G/A330R	1.4E-08	3.2E-07	1.1E-05	1.8E-08	4.0E-05	18	621.5	3.4	175.1
IL6R-BP268	E233D/G237D/P238D/H268E/P271G/Y296D	4.5E-09	1.8E-06	2.1E-05	9.2E-08	2.8E-05	19.6	228.3	0.6	33.7
IL6R-BP269	G237D/P238D/H268E/P271G/Y296D	1.4E-08	2.2E-06	7.2E-05	1.1E-07	1.4E-04	19.6	637.2	0.5	27.4
IL6R-BP423	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R	7.7E-10	1.8E-07	2.0E-06	5.1E-09	1.6E-05	34.2	390.6	6.3	605.5
IL6R-BP425	E233D/G237D/P238D/V266L/S267A/H268E/P271G/A330R	4.1E-09	2.2E-07	1.5E-05	9.1E-09	4.2E-05	23.6	1644.7	5.1	339.9
IL6R-BP426	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/E269D/P271G/A330R	1.0E-09	1.6E-07	4.9E-05	5.9E-09	4.1E-05	27.6	8361.8	6.8	529
IL6R-BP428	E233D/G237D/P238D/S267G/H268E/P271G/A330R	4.9E-09	3.9E-07	4.2E-05	1.4E-08	3.6E-05	28	3000	2.8	221.4
IL6R-BP429	E233D/G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/A330R	6.2E-09	1.7E-07	3.5E-06	5.4E-09	6.8E-05	31.5	648.1	6.5	574.1
IL6R-BP430	E233D/G237D/P238D/V266L/S267G/H268E/P271G/A330R	1.7E-08	2.2E-07	1.1E-05	1.2E-08	3.5E-05	18.5	909.1	4.9	256.2
IL6R-BP431	E233D/G237D/P238D/S267G/H268E/E269D/P271G/A330R	3.6E-09	4.1E-07	7.6E-06	1.2E-08	3.2E-05	34.6	649.6	2.7	265
IL6R-BP433	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/I332T	7.5E-10	6.8E-07	7.3E-06	3.4E-08	2.6E-05	20	216	1.6	91.7
IL6R-BP434	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330R/I332T	5.5E-10	3.4E-07	4.1E-06	1.2E-08	2.5E-05	27.2	333.3	3.3	252
IL6R-BP435	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330R/I332T	1.0E-09	4.2E-07	3.4E-06	1.6E-08	2.2E-05	27.1	217.9	2.6	198.7
IL6R-BP436	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/I332T	2.6E-10	2.2E-07	2.1E-06	5.1E-09	1.3E-05	43.8	411	4.9	606.7
IL6R-BP437	G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/I332T	7.5E-10	2.2E-07	1.4E-06	5.9E-09	1.1E-05	37.7	236.5	4.9	523.6
IL6R-BP438	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/I332T	2.1E-10	1.8E-07	1.6E-06	5.5E-09	6.8E-06	32.7	293.6	6.2	568.8
IL6R-BP439	E233D/G237D/P238D/V264I/V266L/S267A/H268E/P271G/A330R	8.7E-09	1.3E-07	2.8E-06	6.1E-09	6.6E-05	20.9	460.5	8.7	509.9
IL6R-BP440	E233D/G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/A330R	8.7E-09	1.3E-07	1.6E-06	5.2E-09	2.8E-05	24	307.1	8.8	595
IL6R-BP441	E233D/G237D/P238D/V266L/H268E/P271G/A330R	1.7E-08	3.6E-07	8.8E-06	1.5E-08	3.7E-05	24	582.8	3	205.3

[0626] 表２８－２は表２８－１の続きの表である。

[表28-2]

IL6R-BP442	E233D/G237D/P238D/H268E/E269D/P271G/A330R	4.5E-09	3.8E-07	4.7E-06	1.2E-08	2.5E-05	30.6	379	2.9	250
IL6R-BP443	E233D/G237D/P238D/V266L/H268E/E269D/P271G/A330R	1.8E-08	5.1E-07	9.5E-06	2.3E-08	2.3E-05	21.7	406	2.2	132.5
IL6R-BP445	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R	2.0E-09	8.0E-08	1.5E-06	2.6E-09	2.4E-05	31	581.4	13.8	1201.6
IL6R-BP479	E233D/G237D/P238D/V264I/V266L/S267A/H268E/P271G	5.3E-09	9.0E-07	1.5E-05	5.6E-08	4.0E-05	16.1	268.3	1.2	55.5
IL6R-BP480	E233D/G237D/P238D/V266L/H268E/E269D/P271G	1.3E-08	6.3E-06	2.1E-05	2.0E-07	4.6E-05	32.1	107.7	0.2	15.9
IL6R-BP481	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G	1.0E-09	4.0E-07	6.8E-06	1.9E-08	2.4E-05	20.5	350.5	2.8	159.8
IL6R-BP483	E233D/G237D/P238D/V266L/S267A/H268E/P271G	1.3E-09	1.3E-06	1.8E-05	7.8E-08	2.5E-05	16.8	230.8	0.8	39.7
IL6R-BP484	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/E269D/P271G	8.2E-10	7.8E-07	1.1E-05	4.6E-08	2.5E-05	17.1	240.7	1.4	67.8
IL6R-BP487	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R/P396M	1.2E-09	3.9E-08	8.4E-07	1.2E-09	1.0E-05	33.8	730.4	28.3	2695.7
IL6R-BP488	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	2.2E-09	7.4E-08	1.6E-06	1.9E-09	2.0E-05	40.1	864.9	14.8	1675.7
IL6R-BP489	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396M	1.3E-09	4.3E-08	8.7E-07	1.0E-09	1.2E-05	42.8	870	25.7	3100
IL6R-BP490	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R	4.5E-09	1.1E-07	2.4E-06	2.4E-09	2.3E-05	46.7	1000	9.8	1291.7
IL6R-BP491	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	5.3E-09	1.2E-07	2.2E-06	3.0E-09	2.1E-05	38.8	723.7	9.3	1019.7
IL6R-BP492	P238D/V264I/S267A/H268E/P271G	7.9E-10	9.2E-07	1.6E-05	2.4E-08	3.6E-05	38.8	678	1.2	131.4
IL6R-BP493	P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D	8.2E-10	1.1E-06	1.9E-05	2.1E-08	3.5E-05	52.1	900.5	1	146.9
IL6R-BP494	G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	3.9E-09	2.5E-07	5.4E-06	6.6E-09	4.0E-05	38.6	820.7	4.3	471.1
IL6R-BP495	G237D/P238D/S267G/H268E/P271G/Y296D/A330R	8.3E-09	4.9E-07	1.2E-05	9.7E-09	3.3E-05	50.9	1243.5	2.2	321.2
IL6R-BP496	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D	1.2E-09	4.7E-07	3.7E-06	1.8E-08	3.0E-05	25.5	201.1	2.3	168.5
IL6R-BP497	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A327G/A330R	2.1E-09	8.5E-08	9.6E-07	4.1E-09	2.8E-05	21	236.5	12.9	763.5
IL6R-BP498	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R/P396L	1.3E-09	5.1E-08	9.3E-07	1.7E-09	1.0E-05	30.8	563.6	21.7	1878.8
IL6R-BP499	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396L	1.2E-09	4.9E-08	1.0E-06	1.5E-09	1.2E-05	33.8	684.9	22.3	2123.3
IL6R-BP500	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D	2.3E-09	7.2E-07	2.5E-05	2.4E-08	3.9E-05	29.9	1033.1	1.5	128.1
IL6R-BP501	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G	2.1E-09	6.3E-07	1.4E-05	2.5E-08	1.9E-05	25.1	555.6	1.7	123
IL6R-BP502	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A327G/A330R	2.1E-09	1.1E-07	1.3E-06	3.7E-09	2.4E-05	29.5	352.3	10.1	840.1
IL6R-BP503	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A327G/A330R/P396M	1.2E-09	5.7E-08	8.6E-07	1.7E-09	2.1E-05	33.2	502.9	19.4	1812.9
IL6R-BP504	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P	1.4E-09	4.5E-07	1.6E-05	2.4E-08	3.4E-05	18.5	658.4	2.4	127.6
IL6R-BP505	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D	1.1E-09	4.3E-07	1.1E-05	2.1E-08	3.8E-05	20	514	2.6	144.9
IL6R-BP506	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P/Y296D/A330R	3.1E-09	1.2E-07	2.5E-06	3.4E-09	5.5E-05	35.1	731	9.2	906.4
IL6R-BP507	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P/A330R	2.6E-09	1.0E-07	1.8E-06	2.9E-09	2.6E-05	34.2	618.6	11.1	1065.3
IL6R-BP508	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P/Y296D	1.4E-09	5.4E-07	2.0E-05	2.1E-08	6.1E-05	26	961.5	2	149

[0627] 表２８－３は表２８－２の続きの表である。

[表28-3]

IL6R-BP509	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/Y296D	1.1E-09	5.2E-07	7.9E-06	1.8E-08	2.3E-05	29.2	443.8	2.1	174.2
IL6R-BP510	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P/A330R	6.0E-09	1.7E-07	4.0E-06	3.8E-09	2.5E-05	43.5	1041.7	6.6	807.3
IL6R-BP511	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P/Y296D/A330R	6.0E-09	1.8E-07	4.3E-06	3.5E-09	7.1E-05	50.6	1235.6	6.3	890.8
IL6R-BP531	E233D/G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396M	9.4E-09	1.2E-07	3.5E-06	3.8E-09	2.7E-05	33.1	933.3	8.9	826.7
IL6R-BP532	E233D/G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396M	1.2E-08	9.4E-08	1.9E-06	3.2E-09	2.6E-05	29.3	593.8	11.7	968.8
IL6R-BP533	E233D/G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396L	7.7E-09	1.2E-07	2.6E-06	4.1E-09	2.7E-05	29.3	634.1	9.2	756.1
IL6R-BP534	E233D/G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396L	9.3E-09	9.1E-08	1.8E-06	3.0E-09	2.5E-05	30.7	606.1	12.1	1043.8
IL6R-BP535	E233D/G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/Y296D/A327G/A330R/P396M	1.1E-08	9.2E-08	3.2E-06	4.0E-09	3.3E-05	23.2	806	11.9	780.9
IL6R-BP536	E233D/G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/Y296D/A327G/A330R/P396M	8.9E-09	7.9E-08	1.3E-06	3.0E-09	2.3E-05	26.6	437.7	13.9	1043.8
IL6R-BP537	G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/A330R	2.9E-08	2.7E-07	3.1E-06	6.9E-09	3.6E-05	39.1	447.3	4.1	447.3
IL6R-BP538	G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/A330R	5.5E-08	2.0E-07	3.0E-06	5.3E-09	3.3E-05	38.6	568.2	5.4	587.1
IL6R-BP539	G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/E272P/Y296D/A330R	6.4E-08	3.3E-07	5.6E-06	8.4E-09	3.4E-05	39	666.7	3.4	369
IL6R-BP540	G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/E272P/Y296D/A330R	9.6E-08	2.1E-07	4.6E-06	5.7E-09	3.9E-05	36.6	802.8	5.2	541
IL6R-BP549	G237D/P238D/S267G/H268E/P271G/A330R	1.8E-08	5.7E-07	1.1E-05	1.6E-08	2.4E-05	35.9	696.2	1.9	196.2
IL6R-BP550	G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R	2.5E-08	3.4E-07	5.0E-06	7.6E-09	4.8E-05	44.2	655.3	3.3	406.3
IL6R-BP551	G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R	3.2E-08	2.5E-07	2.8E-06	6.4E-09	4.8E-05	38.1	435.5	4.5	482.1
IL6R-BP552	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R	3.2E-09	9.7E-08	1.9E-06	2.6E-09	3.0E-05	37.3	733.6	11.4	1196.9
IL6R-BP553	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/A330R	3.4E-09	8.6E-08	1.4E-06	3.1E-09	2.0E-05	27.8	453.1	12.8	1003.2
IL6R-BP554	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/A330R	8.0E-09	1.5E-07	2.3E-06	4.4E-09	2.4E-05	32.7	518	7.6	698.2
IL6R-BP555	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R	9.4E-09	1.6E-07	3.2E-06	4.1E-09	3.0E-05	39.7	778.6	6.7	754.3
IL6R-BP556	G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/Y296D/A330R	4.3E-08	3.0E-07	5.8E-06	8.4E-09	6.0E-05	35.4	692.1	3.7	369.9
IL6R-BP557	G237D/P238D/S267G/H268D/P271G/Y296D/A330R	1.3E-08	8.5E-07	1.5E-05	2.0E-08	2.9E-05	42	746.3	1.3	154.2
IL6R-BP558	G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/E272D/A330R	1.3E-08	3.3E-07	4.9E-06	9.0E-09	3.6E-05	36.4	543.2	3.4	343.7
IL6R-BP559	P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/Y296D	1.1E-09	1.6E-06	2.0E-05	2.8E-08	4.4E-05	58.4	711.7	0.7	110.3
IL6R-BP560	P238D/S267G/H268E/P271G/Y296D/A330R	5.6E-09	4.2E-06	3.1E-05	1.8E-07	4.1E-05	22.8	168.5	0.3	16.8
IL6R-BP561	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/E272D/Y296D/A330R	9.4E-09	5.1E-07	5.3E-06	1.8E-08	3.7E-05	28	291.2	2.2	170.3
IL6R-BP562	G237D/P238D/H268D/P271G/E272D/Y296D/A330R	2.5E-08	6.8E-07	1.1E-05	2.4E-08	5.3E-05	29	466.1	1.6	131.4
IL6R-BP563	E233D/G237D/P238D/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R	1.2E-08	4.6E-07	8.3E-06	1.6E-08	3.8E-05	29.1	525.3	2.4	196.2
IL6R-BP564	G237D/P238D/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R	3.1E-08	5.8E-07	1.0E-05	2.2E-08	4.9E-05	26.2	454.5	1.9	140.9
IL6R-BP565	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	2.4E-09	2.3E-07	4.7E-06	5.5E-09	2.1E-05	41.5	856.1	4.8	564.7

[0628] 表２８に記載された改変体のうち、FcγRIIbへの結合を増強する既存の改変が加えられたIL6R-BP253/IL6R-LのFcγRIIbおよびFcγRIIaRに対する結合活性は、改変導入前のIL6R-B3/IL6R-Lのそれと比較して、それぞれ277倍、お

よび529倍増強された。また、IL6R-BP253/IL6R-LのFcγRIaへの結合活性もIL6R-B3/IL6R-Lのそれよりも増強されていた。一方、IL6R-BP253/IL6R-LのFcγRIIaHおよびFcγRIIIaVへの結合はIL6R-B3/IL6R-Lのそれと比較して減弱していた。その他の改変体のうち、IL6R-BP436/IL6R-LとIL6R-BP438/IL6R-LのFcγRIaへの結合が、改変導入前のIL6R-B3/IL6R-Lのそれと比較してわずかに増強されたが、それ以外の改変体のFcγRIaへの結合はいずれも減弱していた。また、いずれの改変体のFcγRIIaH、およびFcγRIIIaVへの結合は、IL6R-B3/IL6R-Lのそれと比較して減弱していた。

[0629] 本検討で作製された改変体と、既存のFcγRIIbへの結合増強改変体であるIL6R-BP253/IL6R-Lを比較すると、KD (IIaH)/KD (IIb)の値は最も低かったIL6R-BP480/IL6R-Lで107.7、最も高かったIL6R-BP426/IL6R-Lで8362であり、いずれの改変体もIL6R-BP253/IL6R-Lの107.1と比較して高かった。また、KD (IIaR)/KD (IIb)の値は、最も低かったIL6R-BP479/IL6R-Lで16.1、最も高かったIL6R-BP559/IL6R-Lで58.4であり、いずれの改変体もIL6R-BP253/IL6R-Lの0.2と比較して高かった。これらの結果から、表２８に示された改変体のFcγRIIbに対する選択性は、いずれも既存のFcγRIIbに対する結合を増強する改変が加えられた改変体のFcγRIIbに対する選択性と比較してFcγRIIbへの選択性が向上したことが示された。特に、IL6R-BP559/IL6R-L、IL6R-BP493/IL6R-L、IL6R-BP557/IL6R-L、IL6R-BP492/IL6R-L、およびIL6R-BP500/IL6R-Lはいずれも FcγRIIaRへの結合がIL6R-B3/IL6R-Lと比較して1.5倍以下に維持される一方、FcγRIIbへの結合活性が100倍以上増強されていることから、FcγRIIaRへの結合を増強することにより生じ得る副作用を回避しながらFcγRIIbへの結合増強による効果を示すことが期待される。

[0630] また、IL6R-BP489/IL6R-L、IL6R-BP487/IL6R-L、IL6R-BP499/IL6R-L、IL6R-BP498/IL6R-L、IL6R-BP503/IL6R-L、IL6R-BP488/IL6R-L、IL6R-BP490/IL6R-L、IL6R-BP445/IL6R-L、IL6R-BP552/IL6R-L、IL6R-BP507/IL6R-L、IL6R-BP536/IL6R-L、IL6R-BP534/IL6R-L、IL6R-491/IL6R-L、IL6R-BP553/IL6R-L、IL6R-BP532/IL6R-L、IL6R-BP506/IL6R-L、IL6R-BP511/IL6R-L、IL6R-BP502/IL6R-

L、IL6R-BP531/IL6R-L、IL6R-BP510/IL6R-L、IL6R-BP535/IL6R-L、IL6R-BP497/IL6R-L、IL6R-BP533/IL6R-L、IL6R-BP555/IL6R-L、IL6R-BP554/IL6R-L、IL6R-BP436/IL6R-L、IL6R-BP423/IL6R-L、IL6R-BP440/IL6R-L、IL6R-BP538/IL6R-L、IL6R-BP429/IL6R-L、IL6R-BP438/IL6R-L、IL6R-BP565/IL6R-L、IL6R-BP540/IL6R-L、BP426/IL6R-L、IL6R-BP437/IL6R-L、IL6R-BP439/IL6R-L、IL6R-BP551/IL6R-L、IL6R-BP494/IL6R-L、IL6R-BP537/IL6R-L、IL6R-BP550/IL6R-L、IL6R-BP556/IL6R-L、IL6R-BP539/IL6R-L、IL6R-BP558/IL6R-L、IL6R-BP425/IL6R-L、 IL6R-BP495/IL6R-LのFcγRIIbへの結合は、FcγRIIbへの結合を増強する既存の改変が加えられたIL6R-BP253/IL6R-Lのそれと比較して上回った。これらの中でFcγRIIbへの結合が最も低かったIL6R-BP495/IL6R-Lから、最も高かったIL6R-BP489/IL6R-Lまでの増強の幅は、IL6R-B3/IL6R-Lの結合を1とした場合に321倍から3100倍までであった。従ってこれらの改変体は、FcγRIIbへの結合活性増強の程度、および選択性の両面で従来技術よりも優れた改変体であるといえる。

[0631] 〔実施例２０〕カルシウム依存的にヒトIgAに結合する抗体の調製

（２０－１）ヒトIgA（hIgA）の調製

実施例２から４で、マウスFcγRに対する結合が増強されたpH依存的に抗原であるヒトIL-6レセプターに結合する分子は血漿中の抗原濃度を大幅に低下させることが可能であることが示された。次に、ヒトIL-6レセプター以外の抗原に対してpH依存的に結合し、マウスFcγR に対する結合が増強された抗体が投与された生体の血漿中の可溶型抗原を消失させる効果が同様に観察されるかについて更なる検証を行うために、ヒトIgAを抗原とする抗体を用いた試験が新たに実施された。抗原であるヒトIgA（以下hIgAとも呼ばれる）（可変領域は抗ヒトIL6R抗体）は以下のような組換え技術を用いて調製された。H（WT)-IgA1（配列番号：１４５）とL（WT)（配列番号：４２）を含む組み組換えベクターを含む宿主細胞を培養することによって発現されたhIgAが、当業者公知の方法によってイオン交換クロマトグラフィーおよびゲルろ過クロマトグラフィーを用いて精製された。

[0632] （２０－２）hIgAに結合する抗体の発現と精製

GA2-IgG1（重鎖配列番号：１４６、軽鎖配列番号：１４７）はhIgAに結合する抗体である。GA2-IgG1（重鎖配列番号：１４６、軽鎖配列番号：１４７）をコードするDNA配列が動物細胞発現用プラスミドに当業者公知の方法で組み込まれた。抗体は以下の方法を用いて発現および精製された。ヒト胎児腎細胞由来FreeStyle 293-F株（Invitrogen）をFreeStyle 293 Expression Medium培地（Invitrogen）に懸濁させた細胞懸濁液が、1.33 x 106個/mLの細胞密度で6 well plateの各ウェルへ3 mLずつ播種された。次に、リポフェクション法により調製されたプラスミドが細胞へ導入された。当該細胞はCO_2インキュベーター（37℃、8%CO_2, 90 rpm）で4日間培養され、単離されたその培養上清から、rProtein A SepharoseTM Fast Flow（Amersham Biosciences）を用いて当業者公知の方法で抗体が精製された。精製された抗体溶液の吸光度（波長：280nm）が、分光光度計を用いて測定された。得られた測定値からPACE法によって算出された吸光係数を用いて抗体濃度が算出された（Protein Science (1995) 4, 2411-2423）。

[0633] （２０－３）取得された抗体のhIgAに対するカルシウム依存的結合能の評価

Biacore T200（GE Healthcare）を用いて、実施例（２０－２）で単離された抗体のhIgA結合活性（解離定数KD（M））が評価された。ランニングバッファーとして3μMまたは1.2 mM $CaCl_2$を含有する0.05% tween20、20 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl（pH7.4またはpH5.8）を用いて当該結合活性が測定された。アミノカップリング法で適切な量の組換え型プロテインA/G（Thermo Scientific）が固定化されたSensor chip CM5（GE Healthcare）に、抗体を結合させた。次に、アナライトとして適切な濃度のhIgA（（A1－１）に記載）をインジェクトすることによって、hIgAとセンサーチップ上の抗体を相互作用させた。測定は37℃で行われた。測定後、10 mmol/L Glycine-HCl、 pH1.5をインジェクトすることによって、センサーチップが再生された。Biacore T200 Evaluation Software（GE Healthcare）を用いて、カーブフィッティングによる解析および平衡値解析により、測定結果から解離定数KD（M）が算出さ

れた。その結果を表２９に示した。GA2-IgG1はCa^{2+}濃度が1.2 mMの条件下ではhIgAに強く結合するが、Ca^{2+}濃度が3μMの条件下ではhIgAに弱く結合することが示された。また、GA2-IgG1はCa^{2+}濃度が1.2 mMの条件下で、pH7.4においてはヒトIgAに強く結合するが、pH5.8においてはヒトIgAに弱く結合することが示された。すなわち、GA2-IgG1は、ヒトIgAに対して、pH依存的、および、カルシウム依存的に結合することが明らかとなった。

[0634] [表29]

抗体名	条件	Fit	ka	kd	KD[M]
GA2-IgG1	pH7.4, 1.2mM Ca	1:1binding model	4.0E+05	1.6E-02	3.9E-08
	pH7.4, 3μM Ca	Steady State Affinity	-	-	6.7E-06
	pH5.8, 1.2mM Ca	Steady State Affinity	-	-	4.0E-06
	pH5.8, 3μM Ca	Steady State Affinity	-	-	5.0E-06

[0635] 〔実施例２１〕カルシウム依存的にhIgAに結合する抗体の改変体の調製

次に、血漿中からの抗原（hIgA）の消失をさらに増大させることを目的に、カルシウム依存的にhIgAに結合するGA2-IgG1に対してマウスFcγRに対する結合を増強するためにGA2-IgG1のEUナンバリングで表される326位のLysがAspに置換されたGA2-F1087（重鎖配列番号：１４８）が作製された。GA2-F1087（重鎖配列番号：１４８、軽鎖配列番号：１４７）をコードするDNA配列が当業者に公知の方法で組み込まれた動物発現用プラスミドを用いて、上述の方法で発現したこれらの抗体改変体の濃度が、精製後に測定された。この改変を含む抗体は実施例(４－３)に示されるように、マウスFcγRに対する結合が大幅に増強していた。

[0636] 〔実施例２２〕Ca依存性hIgA結合抗体が投与されたノーマルマウスにおける抗原の血漿中滞留性への影響の評価

（２２－１）ノーマルマウスが用いられたin vivo試験

ノーマルマウス（C57BL/6J mouse、Charles River Japan）に対してhIgA（ヒトIgA：実施例（２０－１）にて作製）が単独で投与された、またはhIgAおよび抗hIgA抗体が同時に投与された後の、hIgAおよび抗hIgA抗体の体内動態が評価された。hIgA溶液（80μg/mL）、または、hIgAと抗hIgA抗体の混合溶

液が尾静脈に10 mL/kgの用量で単回投与された。抗hIgA抗体としては、上述のGA2-IgG1およびGA2-F1087が使用された。

[0637] 混合溶液中のhIgA濃度は全て80μg/mLであり、抗hIgA抗体濃度は2.69 mg/mLであった。このとき、hIgAに対して抗hIgA抗体は十分量過剰に存在することから、hIgAは大部分が抗体に結合していると考えられた。GA-IgG1が投与された群では、投与後5分間、7時間、1日間、2日間、3日間、7日間でマウスから採血が行われた。またGA-F1087が投与された群では、投与後5分間、30分間、1時間、2時間、1日間、3日間、7日間でマウスから採血が行われた。採取された血液を直ちに4℃、12,000 rpmで15分間遠心分離することによって、血漿が得られた。分離された血漿は、測定を実施するまで-20℃以下に設定された冷凍庫に保存された。

[0638] （２２－２）ELISA法によるノーマルマウス血漿中の抗hIgA抗体濃度測定

マウス血漿中の抗hIgA抗体濃度はELISA法にて測定された。まずAnti-Human IgG(γ-chain specific) F(ab')2 Fragment of Antibody (SIGMA) がその各ウェルに分注されたNunc-Immuno Plate, MaxiSorp (Nalge nunc International) を4℃で１晩静置することによってAnti-Human IgG固相化プレートが作成された。血漿中濃度の標準液として0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125、0.01563、0.007813μg/mLに調製された抗hIgA抗体の検量線試料と100倍以上希釈されたマウス血漿測定試料が、前記のAnti-Human IgG固相化プレートに分注された後、当該プレートが25℃で1時間インキュベーションされた。その後、Goat Anti-Human IgG (γ chain specific) Biotin (BIOT) Conjugate (Southern Biotechnology Associats Inc.) が前記プレートの各ウェルに分注された後、当該プレートを25℃で1時間反応させた。さらに、Streptavidin-PolyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies) が前記プレートの各ウェルに分注された後、当該プレートを25℃で1時間反応させた。TMB One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories) を基質として用いた発色反応が1N-Sulfuric acid (Showa Chemical) を用いて停止された後、マイクロプレートリーダーを用いて各ウェルの反応液の450 nmの吸光度が測定さ

れた。マウス血漿中の抗hIgA抗体濃度は検量線の吸光度から解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて算出された。この方法で測定された静脈内投与後のノーマルマウスにおけるGA2-IgG1およびGA2-F1087の血漿中抗体濃度推移を図４５に示した。その結果、hIgAと強いpH依存的な結合活性を有するクローンGA2-IgG1はFcγRとの結合を増強したとしても、その血漿中抗体濃度が大きく低下しないことが確認された。

[0639] （２２－３）ELISA法による血漿中hIgA濃度測定

マウスの血漿中hIgA濃度はELISA法にて測定された。まずGoat anti-Human IgA Antibody (BETHYL) がその各ウェルに分注されたNunc-Immuno Plate, MaxiSoup (Nalge nunc International) を4℃で１晩静置することによってAnti-Human IgA固相化プレートが作成された。血漿中濃度の標準液として0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625μg/mLに調製されたhIgAの検量線試料が用いられた。検量線試料および100倍以上希釈されたマウス血漿測定試料の各100μLに対し、500ng/mLhsL6Rを200μL加えて混合し、室温で1時間静置した。その後、混合溶液100μLが分注された前記のAnti-Human IgA固相化プレートプレートは室温で1時間静置された。次に、Biotinylated Anti-human IL-6 R Antibody (R&D) が前記プレートの各ウェルに分注された後、当該プレートを室温で1時間反応させた。更にStreptavidin-PolyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies) が前記プレートの各ウェルに分注された後、当該プレートを室温で1時間反応させた。TMB One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories) を基質として用いた発色反応が1N-Sulfuric acid (Showa Chemical) を用いて停止された後、マイクロプレートリーダーを用いて各ウェルの反応液の450 nmの吸光度が測定された。マウス血漿中濃度は検量線の吸光度から解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて算出された。この方法で測定した静脈内投与後のノーマルマウスにおける血漿中hIgA濃度推移を図４６に示した。

[0640] その結果、hIgA単独の消失に対して、hIgA と100倍以上のCa依存的な結合活性を有するGA2-IgG1が同時に投与されたマウスでは、hIgA の消失がhIgA単

独と比較して加速された。さらに、hIgAとFcγRに対して結合が増強されたGA2-F1087が投与されたマウスの血漿中では、投与一日後に測定範囲（0.006μg/mL以上）よりhIgAの濃度が低下し、GA-IgG1が投与されたマウスの血漿中よりも大幅にhIgAの消失が加速された。以上から、実施例２から実施例７ではIL6Rと抗IL6R抗体が投与されたマウスにおいて、FcγRに対する結合が増強された抗体による抗原の除去効果の増強が示されたが、抗原がhIgAと抗hIgA抗体が投与されたマウスでも同様の効果が示されることが明らかになった。

[0641] 〔実施例２３〕pH依存的抗IgE抗体の取得

（２３－１）抗ヒトIgE抗体の取得

pH依存的抗ヒトIgE抗体を取得するために、抗原であるヒトIgE（重鎖配列番号：１４９、軽鎖配列番号：１５０）（可変領域は抗ヒトGlypican3抗体からなる）をFreeStyle293（Life Technologies）を用いて発現させた。発現したヒトIgEは当業者公知の一般的なカラムクロマトグラフィー法により精製して、調製された。取得された多数の抗体の中から、ヒトIgEにpH依存的に結合する抗体が選抜された。選抜された抗ヒトIgE抗体の重鎖および軽鎖の可変領域が、ヒトIgG1重鎖定常領域、および、ヒト軽鎖定常領域と融合された抗体遺伝子が組み込まれたベクターを用いて発現した組換え抗ヒトIgE抗体が精製された。作製された抗体はクローン278（以下278-IgG1と表記する、重鎖配列番号：１５１、軽鎖配列番号：１５２）と命名された。

[0642] （２３－２）抗ヒトIgE抗体のヒトIgEに対する結合活性およびpH依存的結合活性の評価

エンドソーム内で抗原を解離することができる抗体は、抗原に対してpH依存的に結合するだけでなく、Ca依存的に結合する抗原に結合することによっても創製することが可能である。そこで、278-IgG1およびコントロールとなるpH/Ca依存的IgE結合能を有さないヒトIgG1抗体であるXolair（omalizumab, Novartis）の、ヒトIgE（hIgE）に対するpH依存的結合能およびpH/Ca依存的結合能が評価された。すなわち、Biacore T200（GE Healthcare）を用いて、278-IgG1およびXolairのhIgEに対する結合活性（解離定数KD（M））が評価さ

れた。ランニングバッファーとして以下3種を用いて測定が行われた。

・1.2 mmol/l $CaCl_2$ /0.05% tween20, 20 mmol/l ACES, 150 mmol/l NaCl, pH 7.4

・1.2 mmol/l $CaCl_2$ /0.05% tween20, 20 mmol/l ACES, 150 mmol/l NaCl, pH 5.8

・3 μmol/l $CaCl_2$ /0.05% tween20, 20 mmol/l ACES, 150 mmol/l NaCl, pH5.8

[0643] 適切な量の化学合成されたヒトグリピカン３タンパク質由来配列（配列番号：１５３）のC末端に存在するLysにビオチンが付加されたペプチド（以下「ビオチン化GPC3ペプチド」と記載する）が、Sensor chip SA(GE Healthcare)上に添加され、ストレプトアビジンとビオチンの親和性を利用して同Sensor chip SA上に固定化された。適切な濃度のヒトIgEをインジェクトして、ビオチン化GPC3ペプチドに捕捉させることで、ヒトIgEがチップ上に固定化された。アナライトとして適切な濃度の278-IgG1をインジェクトして、センサーチップ上のヒトIgEと相互作用させた。その後、10 mmol/L Glycine-HCl, pH1.5をインジェクトして、センサーチップが再生された。相互作用は全て37℃で測定された。Biacore T200 Evaluation Software (GE Healthcare) を用いた、カーブフィッティングによる測定結果の解析により、結合速度定数ka (1/Ms)及び解離速度定数kd (1/s)が算出された。これらの定数を元に解離定数KD (M)が算出された。さらに、pH5.8, 1.2 mM Ca条件とpH7.4, 1.2 mM Ca条件の下での各抗体のKD比を算出してpH依存性結合が、pH5.8, 3μM Ca条件とpH7.4, 1.2 mM Ca条件の下での各抗体のKD比を算出してpH/Ca依存性結合が評価された。その結果を表３０に示した。

[0644] [表30]

抗体名(略名)	バッファー条件	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	pH依存性 KD(pH5.8, 1.2 mM Ca) /KD(pH7.4, 1.2 mM Ca)	pH/Ca依存性 KD(pH5.8, 3 μM Ca) /KD(pH7.4, 1.2 mM Ca)
クローン278	pH7.4, 1.2 mM Ca	1.5E+06	3.6E-03	2.4E-09	842.5	1636.5
	pH5.8, 1.2 mM Ca	1.2E+05	2.3E-01	2.0E-06		
	pH5.8, 3 μM Ca	6.2E+04	2.4E-01	3.9E-06		
Xolair	pH7.4, 1.2 mM Ca	2.5E+06	1.1E-02	4.4E-09	2.3	2.9
	pH5.8, 1.2 mM Ca	2.4E+06	2.4E-02	9.9E-09		
	pH5.8, 3 μM Ca	1.4E+06	1.7E-02	1.3E-08		

[0645] 〔実施例２４〕pH依存的にヒトIgEに結合する抗体の改変体の調製

次に、血漿中からの抗原（ヒトIgE）の消失をさらに増大させることを目的に、pH依存的にヒトIgEに結合する278-IgG1に対してマウスFcγRに対する結合を増強するために278-IgG1のEUナンバリングで表される326位のLysがAspに置換された278-F1087（重鎖配列番号：１５４、軽鎖配列番号：１５２）をコードするDNA配列が当業者に公知の方法で動物発現用プラスミドに組み込まれた。当該プラスミドが導入された動物細胞を用いて、上述の方法で発現したこれらの抗体改変体の濃度が、その精製後に測定された。

[0646] 〔実施例２５〕278-IgG1のin vivo評価

（２５－１）In vivo評価用のヒトIgE（hIgE（Asp6））の調製

重鎖（配列番号：１５５）および軽鎖（配列番号：１５０）からなるin vivo評価用のヒトIgEであるhIgE（Asp6）（可変領域は抗ヒトGlypican3抗体）は、実施例（２３－１）と同様の方法で調製された。hIgE（Asp6）は、ヒトIgEのN型糖鎖のヘテロジェニティーが抗原であるヒトIgEの血漿中濃度推移の影響を受けないようにするために、ヒトIgEの6か所のN型糖鎖結合サイトのアスパラギンがアスパラギン酸に改変された分子である。

[0647] （２５－２）クローン278が投与されたノーマルマウスの血漿中のヒトIgEの消失加速効果の検証

実施例２から４および２２で、pH依存的に抗原であるヒトIL-6レセプターおよびヒトIgAに結合しマウスFcγRに対する結合が増強された分子が投与されたマウスの血漿中の抗原濃度が大幅に低下したことが示された。マウスFcγR に対する結合を増強した場合に、ヒトIL-6レセプター、およびヒトIgA以外の抗原に対してpH依存的に結合しマウスFcγR に対する結合が増強された抗体が投与された生体の血漿中の可溶型抗原の消失効果が同様に観察されるかについて更なる検証を行うために、ヒトIgEを抗原とする抗体を用いた試験が新たに実施された。

[0648] C57BL/6Jマウス（Charles river Japan）にhIgE（Asp6）が単独投与、もしくはhIgE（Asp6）および抗hIgE抗体（278-IgG1と278-F1087）が同時投与され

た後のhIgE（Asp6）および抗ヒトIgE抗体の体内動態が評価された。hIgE（Asp6）（20μg/mL）もしくはhIgE（Asp6）および抗ヒトIgE抗体の混合溶液（濃度は表３１に記載したように、いずれの抗体も同じ濃度になるように調製された）が尾静脈から10mL/kgで単回投与された。このとき、hIgE（Asp6）に対して各抗体は十分量過剰に存在することから、hIgE（Asp6）はほぼ全て抗体に結合していると考えられた。クローン278（278-IgG1）が投与された群では、投与後5分間、2時間、7時間、1日間、2日間、4日間、5日間、7日間、14日間、21日間で当該マウスから血液が採血された。278-F1087が投与された群では、5分間、30分間、1時間、2時間、1日間、3日間、7日間、14日間、21日間で当該マウスから血液が採血された。また、採取された血液をただちに4℃、15,000 rpmで5分間遠心分離して、血漿が得られた。分離された血漿は、測定を実施するまで、-20℃以下に設定された冷凍庫に保存された。

[0649] [表31]

抗 hIgE 抗体	投与液中 hIgE (Asp6)濃度 (μg/mL)	投与液中抗 hIgE 抗体濃度 (μg/mL)
278-IgG1	20	100
278-F1087	20	100

[0650] （２５－３）ノーマルマウスの血漿中の抗ヒトIgE抗体濃度の測定

マウス血漿中の抗hIgE抗体濃度はELISA法にて測定された。血漿中濃度として0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625μg/mLの検量線試料が調製された。hIgE（Asp6）と抗hIgE抗体の免疫複合体を均一にするため、検量線およびマウス血漿測定試料には、1μg/mLとなるようにhIgE（Asp6）を添加し、278-hIgG1投与群および対応する検量線試料は室温で30分静置させた。また、278-F1087投与群および対応する検量線試料は37℃で一晩攪拌した。静置もしくは攪拌後の検量線およびマウス血漿測定試料をAnti-Human Kappa Light Chain Antibody（Bethyl Laboratories）が固相化されたイムノプレート（Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp（Nalge nunc International））に分注し、室温で2時間静置攪拌（278-F1087投与群の試料および278-F1087の検量線試料）もしくは4℃で一晩静置（278-hIgG1投与群の試料および278-hIgG1の検量線試料

）させた。その後、Rabbit anti-Human IgG (Fc) Secondary antibody, Biotin conjugate (Pierce Biotechnology) およびStreptavidin-Poly HRP80 (Stereospecific Detection Technologies) をそれぞれ1時間順次反応させた。TMB One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories) を基質として用いた発色反応を1 N-Sulfuric acid (Showa Chemical) で反応停止後、当該発色をマクロプレートリーダーにて450nmの吸光度を測定する方法によってマウス血漿中濃度が測定された。マウス血漿中濃度は検量線の吸光度から解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて算出された。この方法で測定された静脈内投与後の血漿中抗体濃度推移を図４７に示した。その結果、ヒトIgEに対して強いpH依存的な結合活性を有する278-IgG1のFcγRとの結合が増強された改変体が投与されたマウスにおいて、当該マウスの血漿中における抗体濃度は278-IgG1のそれと比較しても大きく低下しないことが確認された。

[0651] （２５－４）ノーマルマウスの血漿中のhIgE (Asp6) 濃度の測定

マウス血漿中hIgE (Asp6) 濃度はELISA法にて測定された。血漿中濃度として192、96、48、24、12、6、3 ng/mLの検量線試料が調製された。hIgE (Asp6) と抗hIgE抗体の免疫複合体を均一にするため、検量線およびマウス血漿測定試料には、278-hIgG1を投与した群では10μg/mLとなるようにXolair (Novartis) を添加し、室温で30分静置させた。278-F1087を投与した群では20μg/mLとなるように278-F1022（重鎖配列番号：１５６、軽鎖配列番号：１５２、実施例２４と同様に調製）もしくは278-F760（重鎖配列番号：１５７、軽鎖配列番号：１５２、実施例２４と同様に調製）を添加し、37℃で60時間攪拌した。マウス血漿測定試料をanti-human IgEが固相化されたイムノプレート（MABTECH）もしくは、anti-human IgE (clone 107、MABTECH) が固相化されたイムノプレート (Nunc F96 MicroWell Plate (Nalge nunc International)) に分注し、室温で2時間静置もしくは撹拌もしくは4℃で一晩静置させた。その後、human GPC3 core protein（配列番号：１５８）、NHS-PEG4-Biotin (Thermo Fisher Scientific) でbiotin化された抗GPC3抗体（社内調製）、

Sterptavidin-PolyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies) をそれぞれ1時間順次反応させた。TMB One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories) を基質として用いた発色反応を1 N-Sulfuric acid (Showa Chemical) で反応停止後、当該発色をマイクロプレートリーダーにて450nmの吸光度を測定する方法、もしくはSuperSignal(r) ELISA Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific) を基質として発光反応を行い、マイクロプレートリーダーにて発光強度を測定する方法によってマウス血漿中濃度が測定された。マウス血漿中濃度は検量線の吸光度もしくは発光強度から解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて算出された。この方法で測定された静脈内投与後の血漿中hIgE (Asp6) 濃度推移を図４８に示した。

[0652] その結果、ヒトIgE単独の消失に対して、強いpH依存的な結合活性を有する278-IgG1とヒトIgEが同時に投与されたマウスでは、ヒトIgEの消失がヒトIgE単独と比較して加速された。さらに278-IgG1に対してFcγRとの結合が増強された278-F1087とヒトIgEが投与されたマウスでは、ヒトIgEの消失が、ヒトIgE単独および278-IgG1とヒトIgEが投与されたマウスよりも大幅に加速されることが確認された。すなわち、これまでに述べられたFcγRとの結合が増強された抗IL6R抗体や抗IgA抗体のみならず、FcγRとの結合が増強された抗IgE抗体が投与されたマウスにおいても、抗原の消失が加速されることが示された。

[0653] (参考実施例１) アミノ酸が置換されたIgG抗体の発現ベクターの構築

QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を用いて、添付説明書記載の方法で作製された変異体を含むプラスミド断片を動物細胞発現ベクターに挿入することによって、目的のH鎖発現ベクターおよびL鎖発現ベクターが作製された。得られた発現ベクターの塩基配列は当業者公知の方法で決定された。

[0654] (参考実施例２) IgG抗体の発現と精製

抗体の発現は以下の方法を用いて行われた。ヒト胎児腎癌細胞由来HEK293H

株（Invitrogen）を10 % Fetal Bovine Serum（Invitrogen）を含むDMEM培地（Invitrogen）へ懸濁し、5～6 × 10^5細胞/mLの細胞密度で接着細胞用ディッシュ（直径10 cm, CORNING）の各ディッシュへ10 mLずつ蒔きこみCO_2インキュベーター（37℃、5 % CO_2）内で一昼夜培養した後に、培地を吸引除去し、CHO-S-SFM-II（Invitrogen）培地6.9 mLを添加した。調製したプラスミドをlipofection法により細胞へ導入した。得られた培養上清を回収した後、遠心分離（約2000 g、5分間、室温）して細胞を除去し、さらに0.22μmフィルターMILLEX(R)-GV（Millipore）を通して滅菌して培養上清を得た。得られた培養上清にrProtein A SepharoseTM Fast Flow（Amersham Biosciences）を用いて当業者公知の方法で精製した。精製抗体濃度は、分光光度計を用いて280 nmでの吸光度を測定した。得られた値からProtein Science（1995）4, 2411-2423に記された方法により算出された吸光係数を用いて抗体濃度を算出した。

[0655] （参考実施例３）可溶型ヒトIL-6レセプター（hsIL-6R）の調製

抗原であるヒトIL-6レセプターの組み換えヒトIL-6レセプターは以下のように調製された。J. Immunol.（1994）152, 4958-4968で報告されているN末端側１番目から357番目のアミノ酸配列からなる可溶型ヒトIL-6レセプター（以下、hsIL-6R）を定常的に発現するCHO株が当業者公知の方法で構築された。当該CHO株を培養することによって、hsIL-6Rを発現させた。得られた当該CHO株の培養上清から、Blue Sepharose 6 FFカラムクロマトグラフィー、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーの二工程によってhsIL-6Rが精製された。最終工程においてメインピークとして溶出された画分が最終精製品として用いられた。

[0656] （参考実施例４）低フコース抗体の調製

低フコース抗体の発現は以下の方法を用いて行われた。10 % Fetal Bovine Serum（CCB）を含むα-MEM培地（Invitrogen）に懸濁されたCHO細胞フコーストランスポーター欠損株（特許文献WO2006/067913）が、接着細胞用ディッシュ（直径10 cm, CORNING）に2E+6個/10mLの濃度で播種された。CO_2インキュベーター（37℃、5% CO_2）内で一昼夜培養された培地が吸引除去された後、CH

O-S-SFM-II（Invitrogen）培地7mLが添加された。別途調製したプラスミドがlipofection法により導入された細胞に、CHO-S-SFM-II（Invitrogen）培地7mLが添加された。72時間後、遠心分離（約2000 g、5分間、室温）により回収された培養上清が、さらに0.22μmフィルターMILLEX(R)-GV（Millipore）を通すことによって滅菌された。得られた培養上清よりrProtein A SepharoseTM Fast Flow（Amersham Biosciences）を用いて当業者公知の方法で抗体が精製された。精製抗体濃度は、分光光度計を用いて測定された280 nmでの吸光度からProtein Science（1995）4, 2411-2423に記された方法により算出された吸光係数を用いて算出された。

[0657] （参考実施例５）ファージディスプレイ技術を用いたヒト抗体ライブラリからのCa依存的にIL-6レセプターに結合する抗体の取得

（５－１）ナイーブヒト抗体ファージディスプレイライブラリの作製

ヒトPBMCから作成したポリA RNAや、市販されているヒトポリA RNAなどを鋳型として当業者に公知な方法にしたがい、互いに異なるヒト抗体配列のFabドメインを提示する複数のファージからなるヒト抗体ファージディスプレイライブラリが構築された。

[0658] （５－２）ビーズパンニングによるライブラリからのCa依存的に抗原に結合する抗体断片の取得

構築されたナイーブヒト抗体ファージディスプレイライブラリからの最初の選抜は、抗原（IL-6レセプター）への結合能をもつ抗体断片のみの濃縮、または、Ca濃度依存的な抗原（IL-6レセプター）への結合能を指標とした抗体断片の濃縮によって実施された。Ca濃度依存的な抗原（IL-6レセプター）への結合能を指標として抗体断片の濃縮は、Caイオンをキレートするエチレンジアミン四酢酸を用いてCaイオン存在下でIL-6レセプターと結合させたファージライブラリからファージを溶出することによって実施された。抗原としてビオチン標識されたIL-6レセプターが用いられた。

[0659] 構築したファージディスプレイ用ファージミドを保持した大腸菌からファージ産生が行われた。ファージ産生が行われた大腸菌の培養液に2.5 M NaCl/

10%PEGを添加することによって沈殿させたファージの集団をTBSにて希釈することによってファージライブラリ液が得られた。次に、ファージライブラリ液に終濃度4%BSAおよび1.2mMカルシウムイオン濃度となるようにBSAおよび$CaCl_2$が添加された。パンニング方法として、一般的な方法である磁気ビーズに固定化した抗原を用いたパンニング方法が参照された（J. Immunol. Methods. (2008) 332 (1-2), 2-9、J. Immunol. Methods. (2001) 247 (1-2), 191-203、Biotechnol. Prog. (2002) 18(2) 212-20、Mol. Cell Proteomics (2003) 2 (2), 61-9）。磁気ビーズとして、NeutrAvidin coated beads (Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) もしくはStreptavidin coated beads (Dynabeads M-280 Streptavidin) が用いられた。

[0660] 具体的には、調製されたファージライブラリ液に250 pmolのビオチン標識抗原を加えることによって、当該ファージライブラリ液を室温にて60分間抗原と接触させた。BSAでブロッキングされた磁気ビーズが加えられ、抗原とファージとの複合体を磁気ビーズと室温にて15分間結合させた。ビーズは1 mLの1.2 mM $CaCl_2$/TBS（1.2 mM $CaCl_2$を含むTBS）にて1回洗浄された。その後、IL-6レセプターへの結合能をもつ抗体断片を濃縮する場合には、一般的な方法による溶出によって、Ca濃度依存的なIL-6レセプターへの結合能を指標として抗体断片を濃縮する場合には、2 mM EDTA/TBS（2mMEDTAを含むTBS）に懸濁されたビーズからの溶出によって、ファージ溶液が回収された。回収されたファージ溶液が、対数増殖期（OD600が0.4-0.7）となった10 mLの大腸菌株TG1に添加された。37℃で1時間緩やかに上記大腸菌の攪拌培養を行うことによって、ファージを大腸菌に感染させた。感染させた大腸菌は、225 mm x 225 mmのプレートへ播種された。次に、播種された大腸菌の培養液からファージを回収することによって、ファージライブラリ液が調製された。

[0661] 2回目以降のパンニングでは、Ca依存的結合能を指標にファージの濃縮が行われた。具体的には、調製したファージライブラリ液に40 pmolのビオチン標識抗原を加えることによって、ファージライブラリを室温で60分間抗原と接触させた。BSAでブロッキングされた磁気ビーズが加えられ、抗原とファージ

との複合体を磁気ビーズと室温で15分間結合させた。ビーズは1 mLの1.2 mM $CaCl_2$/TBSTと1.2 mM $CaCl_2$/TBSにて洗浄された。その後0.1 mLの2 mM EDTA/TBSが加えられたビーズは室温で懸濁された後、即座に磁気スタンドを用いてビーズが分離され、ファージ溶液が回収された。回収されたファージ溶液が、対数増殖期（OD600が0.4-0.7）となった10 mLの大腸菌株TG1に添加された。37℃で1時間緩やかに上記大腸菌の攪拌培養を行うことによって、ファージを大腸菌に感染させた。感染させた大腸菌は225 mm x 225 mmのプレートへ播種された。次に、播種された大腸菌の培養液からファージを回収することによってファージライブラリ液が回収された。Ca依存的結合能を指標とするパンニングが複数回繰り返された。

[0662] （５－３）ファージELISAによる評価

上記の方法によって得られた大腸菌のシングルコロニーから、常法（Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145）に習い、ファージ含有培養上清が回収された。終濃度4%BSAおよび1.2 mMカルシウムイオン濃度となるようにBSAおよび$CaCl_2$が加えられたファージを含有する培養上清が以下の手順でELISAに供された。StreptaWell 96マイクロタイタープレート（Roche）がビオチン標識抗原を含む100μLのPBSにて一晩コートされた。当該プレートの各ウェルをPBSTにて洗浄することによって抗原が除かれた後、当該ウェルが1時間以上250μLの4%BSA-TBSにてブロッキングされた。4%BSA-TBSが除かれた各ウェルに調製された培養上清が加えられた当該プレートを37℃で1時間静置することによって、ファージを提示する抗体を各ウェルに存在する抗原に結合させた。1.2 mM $CaCl_2$/TBSTにて洗浄された各ウェルに、1.2 mM $CaCl_2$/TBSもしくは1 mM EDTA/TBSが加えられ、当該プレートは37℃で30分間静置しインキュベートされた。1.2 mM $CaCl_2$/TBSTにて洗浄された後に、終濃度4%のBSAおよび1.2 mMのイオン化カルシウム濃度としたTBSによって希釈されたHRP結合抗M13抗体（Amersham Pharmacia Biotech）が各ウェルに添加されたプレートを１時間インキュベートさせた。1.2 mM $CaCl_2$/TBSTにて洗浄後、TMB single溶液（ZYMED）が添加された各ウェル中の溶液の発色反応が、硫酸の添加により停止され

た後、450 nmの吸光度によって当該発色が測定された。

[0663] 上記のファージELISAの結果、Ca依存的な抗原に対する結合能があると判断される抗体断片を鋳型として特異的なプライマーによって増幅された遺伝子の塩基配列解析が行われた。

[0664] （５－４）抗体の発現と精製

ファージELISAの結果、Ca依存的な抗原に対する結合能があると判断されたクローンが、動物細胞発現用プラスミドへ導入された。抗体の発現は以下の方法を用いて行われた。ヒト胎児腎細胞由来FreeStyle 293-F株（Invitrogen）がFreeStyle 293 Expression Medium培地（Invitrogen）に懸濁され、1.33 x 10^6細胞/mLの細胞密度で6ウェルプレートの各ウェルへ3 mLずつ蒔きこまれた。調製されたプラスミドは、リポフェクション法によって細胞へ導入された。CO_2インキュベーター（37度、8%CO_2、90 rpm）中で4日間培養が行われる。rProtein A SepharoseTM Fast Flow（Amersham Biosciences）を用いて当業者公知の方法を用いて、上記で得られた培養上清から抗体が精製された。分光光度計を用いて精製された抗体溶液の280 nmでの吸光度が測定された。PACE法により算出された吸光係数を用いることによって、得られた測定値から抗体濃度が算出された（Protein Science (1995) 4, 2411-2423）。

[0665] （参考実施例６）取得された抗体のヒトIL-6レセプターに対するCa依存的結合能の評価

参考実施例５で取得された抗体6RL#9-IgG1（重鎖（配列番号：４４、配列番号：９にIgG1由来定常領域が連結された配列）、軽鎖配列番号：４５）、および、FH4-IgG1（重鎖配列番号：４６、軽鎖配列番号：４７）のヒトIL-6レセプターに対する結合活性がCa依存的であるかどうかを判断するため、これらの抗体とヒトIL-6レセプターとの抗原抗体反応の速度論的解析がBiacore T100（GE Healthcare）を用いて行われた。ヒトIL-6レセプターに対するCa依存性の結合活性を有しない対照抗体として、WO2009125825に記載されているH54/L28-IgG1（重鎖配列番号：３６、軽鎖配列番号：３７）が用いられた。高カルシウムイオン濃度および低カルシウムイオン濃度の条件として、そ

れぞれ2 mMおよび3μMのカルシウムイオン濃度の溶液中で抗原抗体反応の速度論的解析が行われた。アミンカップリング法でprotein A (Invitrogen) が適当量固定化されたSensor chip CM4 (GE Healthcare) 上に、目的の抗体がキャプチャーされた。ランニングバッファーには10 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% (w/v) Tween20、2 mM $CaCl_2$ (pH7.4) または10 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% (w/v) Tween20、3μmol/L $CaCl_2$ (pH7.4) の2種類の緩衝液が用いられた。ヒトIL-6レセプターの希釈にもそれぞれのバッファーが使用された。測定は全て37℃で実施された。

[0666] H54L28-IgG1抗体を用いた抗原抗体反応の速度論的解析に際して、IL-6レセプターの希釈液とブランクであるランニングバッファーを流速20μL/minで3分間インジェクトすることによって、センサーチップ上にキャプチャーさせたH54L28-IgG1抗体にIL-6レセプターを相互作用させた。その後、流速20μL/minで10分間ランニングバッファーを流しIL-6レセプターの解離が観察された後、10 mM Glycine-HCl (pH1.5) を流速30μL/minで30秒間インジェクトすることによって、センサーチップが再生された。測定で得られたセンサーグラムから、カイネティクスパラメーターである結合速度定数 ka (1/Ms)、および解離速度定数 kd (1/s) が算出された。これらの値を用いてH54L28-IgG1抗体のヒトIL-6レセプターに対する解離定数KD (M) が算出された。各パラメーターの算出にはBiacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare) が用いられた。

[0667] FH4-IgG1抗体および6RL#9-IgG1抗体を用いた抗原抗体反応の速度論的解析に際しては、IL-6レセプターの希釈液とブランクであるランニングバッファーを流速5μL/minで15分間インジェクトすることによって、センサーチップ上にキャプチャーさせたFH4-IgG1抗体または6RL#9-IgG1抗体にIL-6レセプターを相互作用させた。その後、10 mM Glycine-HCl (pH1.5) を流速30μL/minで30秒間インジェクトすることによって、センサーチップが再生された。測定で得られたセンサーグラムからsteady state affinity modelを使って解離定数KD (M) が算出された。各パラメーターの算出には Biacore T100 Evalua

tion Software (GE Healthcare) が用いられた。

[0668] この方法により決定された2 mM $CaCl_2$存在下における各抗体とIL-6レセプターとの解離定数KDを表３２に示す。

[0669] [表32]

抗体	H54/L28-IgG1	FH4-IgG1	6RL#9-IgG1
kD (M)	1.9E-9	5.9E-7	2.6E-7

[0670] Ca濃度が3μMの条件下でのH54/L28-IgG1抗体のKDは、2 mM Ca濃度存在下と同様の方法で算出することが可能である。Ca濃度が3μMの条件下では、FH4-IgG1抗体および6RL#9-IgG1抗体は、IL-6レセプターに対する結合はほとんど観察されなかったため、上記の方法によるKDの算出は困難である。しかし、下記の式３ (Biacore T100 Software Handbook, BR-1006-48, AE 01/2007) を用いることによって、Ca濃度が3μMの条件下でのこれらの抗体のKDを予測することが可能である。

[0671] (式３)

Req=C x Rmax/ (KD+C) +RI

[0672] 上記 (式３) 中の各項目の意味は下記；

Req (RU) : 定常状態結合レベル (Steady state binding levels)

Rmax (RU) :アナライトの表面結合能 (Analyte binding capacity of the surface)

RI (RU) : 試料中の容積屈折率寄与 (Bulk refractive index contribution in the sample)

C (M) : アナライト濃度 (Analyte concentration)

KD (M) : 平衡解離定数 (Equilibrium dissociation constant)

で表される。

[0673] 上記の (式３) を用いた、Ca濃度が3μmol/Lの場合の各抗体とIL-6レセプターとの解離定数KDの予測される概算結果を表３３に示す。表３３ 中の、Req、Rmax、RI、Cは測定結果を基に仮定された値である。

[0674]

[表33]

抗体	H54/L28-IgG1	FH4-IgG1	6RL#9-IgG1
Req（RU）		5	10
Rmax（RU）		39	72
RI（RU）		0	0
C（M）		5E-06	5E-06
KD（M）	2.2E-9	3.4E-05	3.1E-05

[0675] 上記の結果から、FH4-IgG1抗体および6RL#9-IgG1抗体は、バッファー中の$CaCl_2$の濃度を2 mMから3μMに減少することで、IL-6レセプターに対するKDがそれぞれ約60倍、約120倍上昇（60倍、120倍以上アフィニティーが低減）すると予測された。

[0676] 表３４にH54/L28-IgG1、FH4-IgG1、6RL#9-IgG1の3種類の抗体の2 mM $CaCl_2$存在下および3μM $CaCl_2$存在下におけるKD値、および、KD値のCa依存性についてまとめた。

[0677] [表34]

抗体	H54/L28-IgG1	FH4-IgG1	6RL#9-IgG1
KD（M）（2 mM $CaCl_2$）	1.9E-9	5.9E-7	2.6E-7
KD（M）（3μM $CaCl_2$）	2.2E-9	3.4E-5 以上	3.1E-5 以上
Ca 依存性	約 1 倍	約 60 倍以上	約 120 倍以上

[0678] Ca濃度の違いによるH54/L28-IgG1抗体のIL-6レセプターに対する結合の違いは観察されなかった。その一方、低濃度のCa条件下ではFH4-IgG1抗体および6RL#9-IgG1抗体のIL-6レセプターに対する結合の著しい減弱が観察された（表３４）。

[0679] （参考実施例７）取得された抗体へのカルシウムイオン結合評価

次に、抗体へのカルシウムイオンの結合の評価の指標として、示差走査型熱量測定（DSC）による熱変性中間温度（Tm値）が測定された（MicroCal VP-Capillary DSC、MicroCal）。熱変性中間温度（Tm値）は安定性の指標であり、カルシウムイオンの結合によってタンパク質が安定化すると、熱変性中間温度（Tm値）はカルシウムイオンが結合していない場合に比べて高くなる（J. Biol. Chem. (2008) 283, 37, 25140-25149）。抗体溶液中のカルシウムイ

オン濃度の変化に応じた抗体のTm値の変化を評価することによって、抗体へのカルシウムイオンの結合活性が評価された。精製された抗体が20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、2 mM $CaCl_2$（pH7.4）または20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl, 3μM $CaCl_2$（pH7.4）の溶液を外液とする透析（EasySEP、TOMY）処理に供された。透析に用いられた溶液を用いておよそ0.1 mg/mLに調製された抗体溶液を被験物質として、20℃から115℃まで240℃/hrの昇温速度でDSC測定が行われた。得られたDSCの変性曲線にもとづいて算出された各抗体のFabドメインの熱変性中間温度（Tm値）を表３５に示した。

[0680] [表35]

抗体	カルシウムイオン濃度		ΔTm（℃）
	3μM	2 mM	2 mM-3μM
H54/L28-IgG1	92.87	92.87	0.00
FH4-IgG1	74.71	78.97	4.26
6RL#9-IgG1	77.77	78.98	1.21

[0681] 表３５の結果から、カルシウム依存的結合能を示すFH4-IgG1抗体および6RL#9-IgG1抗体のFabのTm値はカルシウムイオンの濃度の変化により変動し、カルシウム依存的結合能を示さないH54/L28-IgG1抗体のFabのTm値はカルシウムイオンの濃度の変化により変動しないことが示された。FH4-IgG1抗体および6RL#9-IgG1抗体のFabのTm値の変動は、これらの抗体にカルシウムイオンが結合し、Fab部分が安定化したことを示している。上記の結果より、FH4-IgG1抗体および6RL#9-IgG1抗体にはカルシウムイオンが結合し、一方でH54/L28-IgG1抗体にはカルシウムイオンが結合していないことが示された。

[0682] （参考実施例８）6RL#9抗体のカルシウムイオン結合部位のX線結晶構造解析による同定

（８－１）X線結晶構造解析

参考実施例７に示されたように、6RL#9抗体はカルシウムイオンと結合することが熱変性温度Tm値の測定から示唆された。しかし、6RL#9抗体のどの部位がカルシウムイオンと結合しているか予想できなかったため、X線結晶構造解析の手法を用いることによって、カルシウムイオンが相互作用する6RL#9抗体

の配列中の残基が特定された。

[0683] （８－２）6RL#9抗体の発現および精製

X線結晶構造解析に用いるために発現させた6RL#9抗体が精製された。具体的には、6RL#9抗体の重鎖（配列番号：４４）と軽鎖（配列番号：４５）をそれぞれ発現させることが出来るように調製された動物発現用プラスミドが動物細胞に一過的に導入された。最終細胞密度1 x 10^6細胞/mLとなるようにFreeStyle 293 Expression Medium培地（Invitrogen）へ懸濁された800 mLのヒト胎児腎細胞由来FreeStyle 293-F株（Invitrogen）に、リポフェクション法により調製されたプラスミドが導入された。プラスミドが導入された細胞はCO_2インキュベーター（37℃、8%CO_2、90 rpm）中で5日間培養された。rProtein A SepharoseTM Fast Flow（Amersham Biosciences）を用いた当業者公知の方法にしたがって、上記のように得られた培養上清から抗体が精製された。分光光度計を用いて精製された抗体溶液の280 nmでの吸光度が測定された。PACE法により算出された吸光係数を用いて測定値から抗体濃度が算出された（Protein Science (1995) 4, 2411-2423）。

[0684] （８－３）6RL#9抗体からのFabフラグメントの精製

分子量分画サイズ10000MWCOの限外ろ過膜 を用いて6RL#9抗体が21 mg/mLまで濃縮された。L-Cystein 4 mM、EDTA 5 mM、20 mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.5）を用いて5 mg/mLによって希釈された2.5 mLの当該抗体の試料が調製された。0.125 mgのPapain（Roche Applied Science）を加えて攪拌された当該試料が35℃にて2時間静置された。静置後、プロテアーゼインヒビターカクテルミニ、EDTAフリー（Roche Applied Science）1錠を溶かした10 mLの25 mM MES 緩衝液（pH6）をさらに当該試料に加え、氷中に静置することによって、Papainによるプロテアーゼ反応が停止された。次に、当該試料が、下流に1 mLサイズのProteinA担体カラムHiTrap MabSelect Sure（GE Healthcare）がタンデムにつながれた25 mM MES 緩衝液pH6で平衡化された1 mLサイズの陽イオン交換カラムHiTrap SP HP（GE Healthcare）に添加された。同緩衝液中NaCl濃度を300 mMまで直線的に上げて溶出をおこなうことで6RL#9抗体のFa

bフラグメントの精製画分が得られた。次に、得られた精製画分が5000MWCOの限外ろ過膜 により0.8 mL程度まで濃縮された。50 mM NaCl を含む100 mM HEPES緩衝液（pH 8）で平衡化されたゲルろ過カラムSuperdex 200 10/300 GL（GE Healthcare）に濃縮液が添加された。結晶化用の精製6RL#9抗体のFabフラグメントが同緩衝液を用いてカラムから溶出された。なお、上記のすべてのカラム操作は6から7.5℃の低温下にて実施された。

[0685] （８－４）6RL#9抗体の Fabフラグメントの Ca存在下での結晶化

予め一般的な条件設定で6RL#9 Fabフラグメントの種結晶が得られた。つぎに5 mM となるように$CaCl_2$が加えられた精製6RL#9抗体のFabフラグメントが5000MWCOの限外ろ過膜を用いて12 mg/mLに濃縮された。つぎに、ハンギングドロップ蒸気拡散法によって、前記のように濃縮された試料の結晶化が実施された。リザーバー溶液として20-29%のPEG4000を含む100 mM HEPES緩衝液（pH 7.5）が用いられた。カバーグラス上で0.8μlのリザーバー溶液および0.8μlの前記濃縮試料の混合液に対して、29% PEG4000および5 mM $CaCl_2$を含む100 mM HEPES緩衝液（pH7.5）中で破砕された前記種結晶が100-10000倍に希釈された希釈系列の溶液0.2μlを加えることによって結晶化ドロップが調製された。当該結晶化ドロップを20℃に2日から3日静置することによって得られた薄い板状の結晶のX線回折データが測定された。

[0686] （８－５）6RL#9抗体の Fabフラグメントの Ca非存在下での結晶化

精製6RL#9抗体のFabフラグメントが5000MWCOの限外ろ過膜 を用いて15 mg/mlに濃縮された。つぎに、ハンギングドロップ蒸気拡散法によって、前記のように濃縮された試料の結晶化が実施された。リザーバー溶液として18-25%のPEG4000を含む100 mM HEPES緩衝液（pH7.5）が用いられた。カバーグラス上で0.8μlのリザーバー溶液および0.8μlの前記濃縮試料の混合液に対して、25% PEG4000を含む100 mM HEPES緩衝液（pH7.5）中で破砕されたCa存在下で得られた6RL#9抗体のFabフラグメントの結晶が100-10000倍に希釈された希釈系列の溶液0.2μlを加えることによって結晶化ドロップが調製された。当該結晶化ドロップを20℃に2日から3日静置することによって得られた薄い板

状の結晶のX線回折データが測定された。

[0687] （８－６）6RL#9抗体の Fabフラグメントの Ca存在下での結晶のX線回折データの測定

35% PEG4000および5 mM $CaCl_2$を含む100mM HEPES緩衝液（pH7.5）の溶液に浸された6RL#9抗体のFabフラグメントのCa存在下で得られた単結晶一つを、微小なナイロンループ付きのピンを用いて外液ごとすくいとることによって、当該単結晶が液体窒素中で凍結された。高エネルギー加速器研究機構の放射光施設フォトンファクトリーのビームラインBL-17Aを用いて、前記の凍結結晶のX線回折データが測定された。なお、測定中は常に-178℃の窒素気流中に凍結結晶を置くことで凍結状態が維持された。ビームラインに備え付けられたCCDディテクタQuantum315r（ADSC）を用い、結晶を1°ずつ回転させながらトータル180枚の回折画像が収集された。格子定数の決定、回折斑点の指数付け、および回折データの処理がプログラムXia2（CCP4 Software Suite）、XDS Package（Walfgang Kabsch）ならびにScala（CCP4 Software Suite）によって行われた。最終的に分解能2.2Åまでの回折強度データが得られた。本結晶は、空間群$P2_12_12_1$に属し、格子定数ａ＝45.47Å、ｂ＝79.86Å、ｃ＝116.25Å、α＝90°、β＝90°、γ＝90°であった。

[0688] （８－７）6RL#9抗体の Fabフラグメントの Ca非存在下での結晶のX線回折データの測定

35% PEG4000を含む100 mM HEPES緩衝液（pH7.5）の溶液に浸された6RL#9抗体のFabフラグメントのCa非存在下で得られた単結晶一つを、微小なナイロンループ付きのピンを用いて外液ごとすくいとることによって、当該単結晶が液体窒素中で凍結された。高エネルギー加速器研究機構の放射光施設フォトンファクトリーのビームラインBL-5Aを用いて、前記の凍結結晶のX線回折データが測定された。なお、測定中は常に-178℃の窒素気流中に凍結結晶を置くことで凍結状態が維持された。ビームラインに備え付けられたCCDディテクタQuantum210r（ADSC）を用い、結晶を1°ずつ回転させながらトータル180枚の回折画像が収集された。格子定数の決定、回折斑点の指数付け、および回

折データの処理がプログラムXia2（CCP4 Software Suite）、XDS Package（Walfgang Kabsch）ならびにScala（CCP4 Software Suite）によって行われた。最終的に分解能2.3Åまでの回折強度データが得られた。本結晶は、空間群$P2_12_12_1$に属し、格子定数ａ＝45.40Å、ｂ＝79.63Å、ｃ＝116.07Å、α＝90°、β＝90°、γ＝90°であり、Ca存在下の結晶と同型であった。

[0689] （８－８）6RL#9抗体のFabフラグメントのCa存在下での結晶の構造解析

プログラムPhaser（CCP4 Software Suite）を用いた分子置換法によって、6RL#9抗体のFabフラグメントのCa存在下での結晶の構造が決定された。得られた結晶格子の大きさと6RL#9抗体のFabフラグメントの分子量から、非対称単位中の分子数が一個であると予想された。一次配列上の相同性をもとにPDB code: 1ZA6の構造座標から取り出されたA鎖112-220番およびB鎖116-218番のアミノ酸残基部分が、CLおよびCH1領域の探索用モデル分子とされた。次にPDB code: 1ZA6の構造座標から取り出されたB鎖1-115番のアミノ酸残基部分が、VH領域の探索用モデル分子とされた。最後にPDB code 2A9Mの構造座標から取り出された軽鎖3-147番のアミノ酸残基が、VL領域の探索用モデル分子とされた。この順番にしたがい各探索用モデル分子の結晶格子内での向きと位置を回転関数および並進関数から決定することによって、6RL#9抗体のFabフラグメントの初期構造モデルが得られた。当該初期構造モデルに対してVH、VL、CH1、CLの各ドメインを動かす剛体精密化をおこなうことにより、25-3.0Åの反射データに対する結晶学的信頼度因子R値は46.9%、Free R値は48.6%となった。さらにプログラムRefmac5（CCP4 Software Suite）を用いた構造精密化と、実験的に決定された構造因子Foとモデルから計算された構造因子Fcおよび位相を用い計算された2Fo-Fc、Fo-Fcを係数とする電子密度マップを参照しながらモデル修正を繰り返しプログラムCoot（Paul Emsley）上でおこなうことによってモデルの精密化がおこなわれた。最後に2Fo-Fc、Fo-Fcを係数とする電子密度マップをもとにCaイオンおよび水分子をモデルに組み込むことによって、プログラムRefmac5（CCP4 Software Suite）を用いて精密化がおこなわれた。分解能25-2.2Åの21020個の反射データを用いることによって、

最終的に3440原子のモデルに対する結晶学的信頼度因子R値は20.0%、Free R値は27.9%となった。

[0690] （８－９）6RL#9抗体のFabフラグメントのCa非存在下での結晶のX線回折データの測定

6RL#9抗体のFabフラグメントのCa非存在下での結晶の構造は、同型であるCa存在下結晶の構造を使って決定された。6RL#9抗体のFabフラグメントのCa存在下での結晶の構造座標から水分子とCaイオン分子がのぞかれ、VH、VL、CH1、CLの各ドメインを動かす剛体精密化がおこなわれた。25-3.0Åの反射データに対する結晶学的信頼度因子R値は30.3%、Free R値は31.7%となった。さらにプログラムRefmac5（CCP4 Software Suite）を用いた構造精密化と、実験的に決定された構造因子Foとモデルから計算された構造因子Fcおよび位相を用い計算された2Fo-Fc、Fo-Fcを係数とする電子密度マップを参照しながらモデル修正を繰り返しプログラムCoot（Paul Emsley）上でおこなうことによってモデルの精密化がおこなわれた。最後に2Fo-Fc、Fo-Fcを係数とする電子密度マップをもとに水分子をモデルに組み込むことによって、プログラムRefmac5（CCP4 Software Suite）を用いて精密化がおこなわれた。分解能25-2.3Åの18357個の反射データを用いることによって、最終的に3351原子のモデルに対する結晶学的信頼度因子R値は20.9%、Free R値は27.7%となった。

[0691] （８－１０）6RL#9抗体のFabフラグメントのCa存在または非存在下での結晶のX線回析データの比較

6RL#9抗体のFabフラグメントのCa存在下での結晶およびCa非存在下での結晶の構造を比較すると、重鎖CDR3に大きな変化がみられた。X線結晶構造解析で決定された6RL#9抗体のFabフラグメントの重鎖CDR3の構造を図４９に示す。具体的には、Ca存在下での6RL#9抗体のFabフラグメントの結晶では、重鎖CDR3ループ部分の中心部分にカルシウムイオンが存在していた。カルシウムイオンは、重鎖CDR3の95位、96位および100a位（Kabatナンバリング）と相互作用していると考えられた。Ca存在下では、抗原との結合に重要である重鎖CDR3ループがカルシウムと結合することによって安定化し、抗原との結合に最適

な構造となっていることが考えられた。抗体の重鎖CDR3にカルシウムが結合する例は今までに報告されておらず、抗体の重鎖CDR3にカルシウムが結合した構造は新規な構造である。

[0692] 6RL#9抗体のFabフラグメントの構造から明らかになった重鎖CDR3に存在するカルシウム結合モチーフは、本発明の抗原結合分子に含まれるイオン濃度によって抗原に対する抗原結合ドメインを取得する際に使用されるCaライブラリのデザインの新たな要素となりうる。後述される参考実施例１８および１９では軽鎖可変領域にカルシウム結合モチーフが導入されたが、たとえば6RL#9抗体の重鎖CDR3を含み、軽鎖を含むそれ以外のCDRにフレキシブル残基を含むライブラリが考えられる。

[0693] （参考実施例９）ファージディスプレイ技術を用いたヒト抗体ライブラリからのCa依存的にIL-6に結合する抗体の取得

（９－１）ナイーブヒト抗体ファージディスプレイライブラリの作製

ヒトPBMCから作成したポリA RNAや、市販されているヒトポリA RNAなどを鋳型として当業者に公知な方法にしたがい、互いに異なるヒト抗体配列のFabドメインを提示する複数のファージからなるヒト抗体ファージディスプレイライブラリが構築された。

[0694] （９－２）ビーズパンニングによるライブラリからのCa依存的に抗原に結合する抗体断片の取得

構築されたナイーブヒト抗体ファージディスプレイライブラリからの最初の選抜は、抗原（IL-6）への結合能をもつ抗体断片のみの濃縮によって実施された。抗原としてビオチン標識されたIL-6が用いられた。

[0695] 構築したファージディスプレイ用ファージミドを保持した大腸菌からファージ産生が行われた。ファージ産生が行われた大腸菌の培養液に2.5 M NaCl/10%PEGを添加することによって沈殿させたファージの集団をTBSにて希釈することによってファージライブラリ液が得られた。次に、ファージライブラリ液に終濃度4%BSAおよび1.2mMカルシウムイオン濃度となるようにBSAおよび$CaCl_2$が添加された。パンニング方法として、一般的な方法である磁気ビーズに

固定化した抗原を用いたパンニング方法が参照された（J. Immunol. Methods. (2008) 332 (1-2), 2-9、J. Immunol. Methods. (2001) 247 (1-2), 191-203、Biotechnol. Prog. (2002) 18(2) 212-20、Mol. Cell Proteomics (2003) 2 (2), 61-9）。磁気ビーズとして、NeutrAvidin coated beads (Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) もしくはStreptavidin coated beads (Dynabeads M-280 Streptavidin) が用いられた。

[0696] 具体的には、調製されたファージライブラリ液に250 pmolのビオチン標識抗原を加えることによって、当該ファージライブラリ液を室温にて60分間抗原と接触させた。BSAでブロッキングされた磁気ビーズが加えられ、抗原とファージとの複合体を磁気ビーズと室温にて15分間結合させた。ビーズは1.2 mM $CaCl_2$/TBST（1.2 mM $CaCl_2$を含むTBST）にて3回洗浄された後、1 mLの1.2 mM $CaCl_2$/TBS（1.2 mM $CaCl_2$を含むTBS）にてさらに2回洗浄された。その後、0.5 mLの1 mg/mLのトリプシンが加えられたビーズは室温で15分懸濁された後、即座に磁気スタンドを用いてビーズが分離され、ファージ溶液が回収された。回収されたファージ溶液が、対数増殖期（OD600が0.4-0.7）となった10 mLの大腸菌株TG1に添加された。37℃で1時間緩やかに上記大腸菌の攪拌培養を行うことによって、ファージを大腸菌に感染させた。感染させた大腸菌は、225 mm x 225 mmのプレートへ播種された。次に、播種された大腸菌の培養液からファージを回収することによって、ファージライブラリ液が調製された。

[0697] 2回目以降のパンニングでは、Ca依存的結合能を指標にファージの濃縮が行われた。具体的には、調製したファージライブラリ液に40 pmolのビオチン標識抗原を加えることによって、ファージライブラリを室温で60分間抗原と接触させた。BSAでブロッキングされた磁気ビーズが加えられ、抗原とファージとの複合体を磁気ビーズと室温で15分間結合させた。ビーズは1 mLの1.2 mM $CaCl_2$/TBSTと1.2 mM $CaCl_2$/TBSにて洗浄された。その後0.1 mLの2 mM EDTA/TBSが加えられたビーズは室温で懸濁された後、即座に磁気スタンドを用いてビーズが分離され、ファージ溶液が回収された。回収されたファージ溶液に100

mg/mLのトリプシン5μLを加えることによって、Fabを提示しないファージのpIIIタンパク質（ヘルパーファージ由来のpIIIタンパク質）が切断され、Fabを提示しないファージの大腸菌に対する感染能を失わせた。トリプシン処理されたファージ溶液から回収されたファージが、対数増殖期（OD600が0.4-0.7）となった10 mLの大腸菌株TG1に添加された。37℃で1時間緩やかに上記大腸菌の攪拌培養を行うことによって、ファージを大腸菌に感染させた。感染させた大腸菌は225 mm x 225 mmのプレートへ播種された。次に、播種された大腸菌の培養液からファージを回収することによってファージライブラリ液が回収された。Ca依存的結合能を指標とするパンニングが3回繰り返された。

[0698] （９－３）ファージELISAによる評価

上記の方法によって得られた大腸菌のシングルコロニーから、常法（Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145）に習い、ファージ含有培養上清が回収された。

[0699] 終濃度4%BSAおよび1.2 mMカルシウムイオン濃度となるようにBSAおよび$CaCl_2$が加えられたファージを含有する培養上清が以下の手順でELISAに供された。StreptaWell 96マイクロタイタープレート（Roche）がビオチン標識抗原を含む100μLのPBSにて一晩コートされた。当該プレートの各ウェルをPBSTにて洗浄することによって抗原が除かれた後、当該ウェルが1時間以上250μLの4%BSA-TBSにてブロッキングされた。4%BSA-TBSが除かれた各ウェルに調製された培養上清が加えられた当該プレートを37℃で1時間静置することによって、ファージを提示する抗体を各ウェルに存在する抗原に結合させた。1.2 mM $CaCl_2$/TBSTにて洗浄された各ウェルに、1.2 mM $CaCl_2$/TBSもしくは1 mM EDTA/TBSが加えられ、当該プレートは37℃で30分間静置しインキュベートされた。1.2 mM $CaCl_2$/TBSTにて洗浄された後に、終濃度4%のBSAおよび1.2 mMのイオン化カルシウム濃度としたTBSによって希釈されたHRP結合抗M13抗体（Amersham Pharmacia Biotech）が各ウェルに添加されたプレートを１時間インキュベートさせた。1.2 mM $CaCl_2$/TBSTにて洗浄後、TMB single溶液（ZYMED）が添加された各ウェル中の溶液の発色反応が、硫酸の添加により停止された後、4

50 nmの吸光度によって当該発色が測定された。

[0700] 単離された96クローンを用いてファージELISA を行うことによって、IL-6に対するCa依存的な結合能を有する6KC4-1#85抗体が得られた。上記のファージELISAの結果、Ca依存的な抗原に対する結合能があると判断される抗体断片を鋳型として特異的なプライマーによって増幅された遺伝子の塩基配列解析が行われた。6KC4-1#85抗体の重鎖可変領域の配列は配列番号：１０に、および、軽鎖可変領域の配列は配列番号：４８に記載されている。6KC4-1#85抗体の重鎖可変領域（配列番号：１０）をコードするポリヌクレオチドが、PCR法によってIgG1由来配列をコードするポリヌクレオチドと連結されたDNA断片が、動物細胞発現用ベクターに組み込まれ、配列番号：４９で表される重鎖を発現するベクターが構築された。6KC4-1#85抗体の軽鎖可変領域（配列番号：４８）をコードするポリヌクレオチドが、PCR法によって天然型Kappa鎖の定常領域（配列番号：５０）をコードするポリヌクレオチドと連結されたDNA断片が、動物細胞発現用ベクターに組み込まれた。作製された改変体の配列は当業者公知の方法で確認された。作製された改変体の配列は当業者公知の方法で確認された。

[0701] （９－４）抗体の発現と精製

ファージELISAの結果、Ca依存的な抗原に対する結合能があると判断されたクローン6KC4-1#85が、動物細胞発現用プラスミドへ導入された。抗体の発現は以下の方法を用いて行われた。ヒト胎児腎細胞由来FreeStyle 293-F株（Invitrogen）がFreeStyle 293 Expression Medium培地（Invitrogen）に懸濁され、1.33 x 10^6細胞/mLの細胞密度で6ウェルプレートの各ウェルへ3 mLずつ播種された。調製されたプラスミドは、リポフェクション法によって細胞へ導入された。CO_2インキュベーター（37度、8%CO_2、90 rpm）中で4日間培養が行われる。rProtein A SepharoseTM Fast Flow (Amersham Biosciences) を用いて当業者公知の方法を用いて、上記で得られた培養上清から抗体が精製された。分光光度計を用いて精製された抗体溶液の280 nmでの吸光度が測定された。PACE法により算出された吸光係数を用いることによって、得られた測

定値から抗体濃度が算出された（Protein Science（1995）4, 2411-2423）。

[0702]（参考実施例１０）6KC4-1#85抗体のカルシウムイオン結合評価

ヒト抗体ライブラリから取得されたカルシウム依存的抗原結合抗体6KC4-1#85抗体がカルシウムと結合するか評価された。イオン化カルシウム濃度が異なる条件で、測定されるTm値が変動するか否かが参考実施例７に記載された方法に準じて評価された。

[0703] 6KC4-1#85抗体のFabドメインのTm値を表３６に示す。表３６に示すように、6KC4-1#85抗体のFabドメインのTm値はカルシウムイオンの濃度によって変動していることから、6KC4-1#85抗体がカルシウムと結合することが明らかになった。

[0704] [表36]

抗体	カルシウムイオン濃度		ΔTm（℃）
	3μM	2 mM	2 mM-3μM
6KC4-1#85	71.49	75.39	3.9

[0705]（参考実施例１１）6KC4-1#85抗体のカルシウムイオン結合部位の同定

参考実施例１０で示されるように、6KC4-1#85抗体はカルシウムイオンと結合することが示されたが、6KC4-1#85はhVk5-2配列の検討から明らかになったカルシウム結合モチーフを持たない。そこで、カルシウムイオンが6KC4-1#85抗体の重鎖に結合するのか、軽鎖に結合するのかまたは両者に結合するのかを確認するために、カルシウムイオンと結合しない抗グリピカン3抗体（重鎖配列GC_H（配列番号：５１）、軽鎖配列GC_L（配列番号：５２））の重鎖と軽鎖とそれぞれ交換した改変抗体に対するカルシウムイオンの結合が評価された。参考実施例７に示される方法に準じて測定された改変抗体のTm値を表３７に示した。その結果、6KC4-1#85抗体の重鎖をもつ改変抗体のTm値がカルシウムイオンの濃度によって変化するため、6KC4-1#85抗体の重鎖でカルシウムと結合していると考えられた。

[0706]

[表37]

重鎖	軽鎖	カルシウムイオン濃度		ΔTm（℃）2 mM-3μM
		3μM	2 mM	
6KC4-1#85	6KC4-1#85	71.46	75.18	3.72
6KC4-1#85	GC_L	78.87	80.01	1.14
GC_H	6KC4-1#85	75.69	75.94	0.25
GC_H	GC_L	79.94	80.01	0.07

[0707] そこで、さらに6KC4-1#85抗体の重鎖のどの残基とカルシウムイオンが結合しているか同定するために、6KC4-1#85抗体のCDRに存在するAsp（D）残基をカルシウムイオンの結合もしくはキレートに関与できないAla（A）残基に置換した改変重鎖（6_H1-11（配列番号：５３）、6_H1-12（配列番号：５４）、6_H1-13（配列番号：５５）、6_H1-14（配列番号：５６）、6_H1-15（配列番号：５７））、または改変軽鎖（6_L1-5（配列番号：５８）および6_L1-6（配列番号：５９））が作製された。改変抗体遺伝子を含む発現ベクターが導入された動物細胞の培養液から、改変抗体が参考実施例９に記載された方法にしたがって精製された。精製された改変抗体のカルシウム結合が、参考実施例７に記載された方法に準じて測定された。測定された結果を表３８に示した。表３８に示すように、6KC4-1#85抗体の重鎖CDR3の95位または101位（Kabatナンバリング）をAla残基に置換することによって6KC4-1#85抗体のカルシウム結合能が失われることから、この残基がカルシウムとの結合に重要であると考えられる。6KC4-1#85抗体の改変抗体のカルシウム結合性から明らかになった6KC4-1#85抗体の重鎖CDR3のループ付け根付近に存在するカルシウム結合モチーフは、本発明の抗原結合分子に含まれるイオン濃度によって抗原に対する抗原結合ドメインを取得する際に使用されるCaライブラリのデザインの新たな要素となりうる。後述される参考実施例１８および１９では軽鎖可変領域にカルシウム結合モチーフが導入されたが、たとえば6KC4-1#85抗体の重鎖CDR3を含み、軽鎖を含むそれ以外のCDRにフレキシブル残基を含むライブラリが考えられる。

[0708]

[表38]

重鎖	軽鎖	改変残基	カルシウムイオン濃度		ΔTm（℃）
			3μM	2 mM	2 mM-3μM
6KC4-1#85	6KC4-1#85	野生型	71.49	75.39	3.9
6H1-11	6KC4-1#85	H鎖61位（Kabatナンバリング）	71.73	75.56	3.83
6H1-12	6KC4-1#85	H鎖95位（Kabatナンバリング）	72.9	73.43	0.53
6H1-13	6KC4-1#85	H鎖100a位（Kabatナンバリング）	70.94	76.25	5.31
6H1-14	6KC4-1#85	H鎖100g位（Kabatナンバリング）	73.95	75.14	1.19
6H1-15	6KC4-1#85	H鎖101位(Kabatナンバリング）	65.37	66.25	0.87
6KC4-1#85	6L1-5	L鎖50位（Kabatナンバリング）	71.92	76.08	4.16
6KC4-1#85	6L1-6	L鎖92位（Kabatナンバリング）	72.13	78.74	6.61

[0709] （参考実施例１２）ノーマルマウスを用いたCa依存性結合抗体の抗原の血漿中滞留性への影響の評価

（１２－１）ノーマルマウスを用いたin vivo試験

ノーマルマウス（C57BL/6J mouse、Charles River Japan）にhsIL-6R（可溶型ヒトIL-6レセプター：参考実施例３にて作製）を単独投与もしくはhsIL-6Rおよび抗ヒトIL-6レセプター抗体を同時投与した後のhsIL-6Rおよび抗ヒトIL-6レセプター抗体の体内動態が評価された。hsIL-6R溶液（5μg/mL）、もしくは、hsIL-6Rと抗ヒトIL-6レセプター抗体の混合溶液が尾静脈に10 mL/kgで単回投与された。抗ヒトIL-6レセプター抗体としては、前記のH54/L28-IgG1、6RL#9-IgG1、FH4-IgG1が使用された。

[0710] 混合溶液中のhsIL-6R濃度は全て5μg/mLであるが、抗ヒトIL-6レセプター

抗体濃度は抗体毎に異なり、H54/L28-IgG1は0.1 mg/mL、6RL#9-IgG1およびFH4-IgG1は10 mg/mL、このとき、hsIL-6Rに対して抗ヒトIL-6レセプター抗体は十分量過剰に存在することから、hsIL-6Rは大部分が抗体に結合していると考えられる。投与後15分、7時間、1日、2日、4日、7日、14日、21日、28日の時点で採血が行われた。採取された血液を直ちに4℃、12,000 rpmで15分間遠心分離することによって、血漿が得られた。分離された血漿は、測定を実施するまで-20℃以下に設定された冷凍庫で保存された。

[0711] （１２－２）ELISA法によるノーマルマウス血漿中の抗ヒトIL-6レセプター抗体濃度の測定

マウス血漿中の抗ヒトIL-6レセプター抗体濃度はELISA法にて測定された。まずAnti-Human IgG(γ-chain specific) F(ab')2 Fragment of Antibody (SIGMA) をNunc-Immuno Plate, MaxiSoup (Nalge nunc International) に分注し、4℃で１晩静置することによってAnti-Human IgG固相化プレートが作成された。血漿中濃度として0.64、0.32、0.16、0.08、0.04、0.02、0.01μg/mLの検量線試料および100倍以上希釈されたマウス血漿測定試料のそれぞれが分注されたAnti-Human IgG固相化プレートが25℃で1時間インキュベーションされた。その後Biotinylated Anti-human IL-6 R Antibody (R&D) を25℃で1時間反応させた後にStreptavidin-PolyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies) を25℃で0.5時間反応させた。TMB One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories) を基質として用いて発色反応が行われた。1N-Sulfuric acid (Showa Chemical) によって発色反応が停止された後、マイクロプレートリーダーを用いて発色液の450 nmにおける吸光度が測定された。解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて、マウス血漿中濃度が検量線の吸光度を基準として算出された。この方法で測定された静脈内投与後のノーマルマウスにおけるH54/L28-IgG1、6RL#9-IgG1、FH4-IgG1の血漿中の抗体濃度の推移を図５０に示した。

[0712] （１２－３）電気化学発光法による血漿中のhsIL-6R濃度の測定

マウスの血漿中hsIL-6R濃度は電気化学発光法にて測定された。2000、1000

、500、250、125、62.5、31.25 pg/mLに調整されたhsIL-6R検量線試料および50倍以上希釈されたマウス血漿測定試料と、SULFO-TAG NHS Ester (Meso Scale Discovery) でルテニウム化したMonoclonal Anti-human IL-6R Antibody (R&D) およびBiotinylated Anti-human IL-6 R Antibody (R&D) およびトシリズマブ（重鎖配列番号：６０、軽鎖配列番号：６１）溶液との混合液を4℃で1晩反応させた。サンプル中のFree Ca濃度を低下させ、サンプル中のほぼ全てのhsIL-6Rが6RL#9-IgG1もしくはFH4-IgG1から解離し、添加したトシリズマブと結合した状態とするために、その際のAssay bufferには10 mM EDTAが含まれていた。その後、当該反応液がMA400 PR Streptavidin Plate (Meso Scale Discovery) に分注された。さらに25℃で1時間反応させたプレートの各ウェルが洗浄された後、各ウェルにRead Buffer T (×4) (Meso Scale Discovery) が分注された。ただちに反応液はSECTOR PR 400 reader (Meso Scale Discovery) を用いて測定された。hSIL-6R濃度は検量線のレスポンスから解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて算出された。前記の方法で測定された静脈内投与後のノーマルマウスにおける血漿中のhsIL-6Rの濃度推移を図５１に示した。

[0713] その結果、hsIL-6R単独では非常に早い消失を示したのに対して、hsIL-6RとCa依存的な結合が無い通常の抗体であるH54/L28-IgG1を同時に投与した場合は、hsIL-6Rの消失を大幅に遅くした。それに対して、hsIL-6Rと100倍以上のCa依存的な結合を有する6RL#9-IgG1あるいはFH4-IgG1を同時に投与した場合は、hsIL-6Rの消失が大幅に加速された。H54/L28-IgG1を同時に投与した場合と比較して、6RL#9-IgG1およびFH4-IgG1を同時に投与した場合は、一日後の血漿中のhsIL-6R濃度はそれぞれ39倍および2倍低減された。これよりカルシウム依存的結合抗体が血漿中からの抗原の消失を加速可能であることが確認された。

[0714] （参考実施例１３）カルシウムイオンに結合するヒト生殖細胞系列配列の探索

（１３－１）カルシウム依存的に抗原に結合する抗体

カルシウム依存的に抗原に結合する抗体（カルシウム依存的抗原結合抗体）はカルシウムの濃度によって抗原との相互作用が変化する抗体である。カルシウム依存的抗原結合抗体は、カルシウムイオンを介して抗原に結合すると考えられるため、抗原側のエピトープを形成するアミノ酸は、カルシウムイオンをキレートすることが可能な負電荷のアミノ酸あるいは水素結合アクセプターとなりうるアミノ酸である。こうしたエピトープを形成するアミノ酸の性質から、ヒスチジンを導入することにより作製されるpH依存的に抗原に結合する結合分子以外のエピトープをターゲットすることが可能となる。さらに、カルシウム依存的およびpH依存的に抗原に結合する性質を併せ持つ抗原結合分子を用いることで、幅広い性質を有する多様なエピトープを個々にターゲットすることが可能な抗原結合分子を作製することが可能となると考えられる。そこで、カルシウムが結合するモチーフを含む分子の集合（Caライブラリ）を構築し、この分子の集団から抗原結合分子を取得すれば、カルシウム依存的抗原結合抗体が効率的に得られると考えられる。

[0715] （１３－２）ヒト生殖細胞系列配列の取得

カルシウムが結合するモチーフを含む分子の集合の例として、当該分子が抗体である例が考えられる。言い換えればカルシウムが結合するモチーフを含む抗体ライブラリがCaライブラリである場合が考えられる。

[0716] ヒト生殖細胞系列配列を含む抗体でカルシウムイオンが結合するものはこれまで報告されていない。そこで、ヒト生殖細胞系列配列を含む抗体がカルシウムイオンと結合するか否かを判定するため、Human Fetal Spleen Poly RNA（Clontech）から調製されたcDNAを鋳型としてヒト生殖細胞系列配列を含む抗体の生殖細胞系列の配列がクローニングされた。クローニングされたDNA断片は動物細胞発現ベクターに挿入された。得られた発現ベクターの塩基配列が、当業者公知の方法で決定され、その配列番号を表３９に示した。配列番号：５（Vk1）、配列番号：６（Vk2）、配列番号：７（Vk3）、配列番号：８（Vk4）ならびに配列番号：６２（Vk5-2）をコードするポリヌクレオチドが、PCR法によって天然型Kappa鎖の定常領域（配列番号：５０）をコードす

るポリヌクレオチドと連結されたDNA断片が、動物細胞発現用ベクターに組み込まれた。また、配列番号：６３（Vk1）、配列番号：６４（Vk2）、配列番号：６５（Vk3）ならびに配列番号：６６（Vk4）をコードする重鎖可変領域ポリヌクレオチドが、PCR法によって（天然型配列のC末端２アミノ酸が欠失している）配列番号：１６３で表されるIgG1をコードするポリヌクレオチドと連結されたDNA断片が、動物細胞発現用ベクターに組み込まれた。作製された改変体の配列は当業者公知の方法で確認された。

[0717] [表39]

軽鎖生殖細胞系列配列	重鎖(可変領域)配列番号	軽鎖可変領域配列番号
Vk1	６３	５
Vk2	６４	６
Vk3	６５	７
Vk4	６６	８
Vk5	６７	６２

[0718] （１３－３）抗体の発現と精製

取得された5種類のヒト生殖細胞系列配列を含むDNA断片が挿入された動物細胞発現ベクターが動物細胞へ導入された。抗体の発現は以下の方法を用いて行われた。ヒト胎児腎細胞由来FreeStyle 293-F株（Invitrogen）がFreeStyle 293 Expression Medium培地（Invitrogen）に懸濁され、1.33 x 10^6細胞/mLの細胞密度で6ウェルプレートの各ウェルへ3 mLずつ播種された。調製されたプラスミドは、リポフェクション法によって細胞へ導入される。CO_2インキュベーター（37度、8%CO_2、90 rpm）中で4日間培養が行われた。rProtein A SepharoseTM Fast Flow（Amersham Biosciences）を用いて当業者公知の方法を用いて、上記で得られた培養上清から抗体が精製された。分光光度計を用いて精製された抗体溶液の280 nmでの吸光度が測定された。PACE法により算出された吸光係数を用いることによって、得られた測定値から抗体濃度が算出された（Protein Science (1995) 4, 2411-2423）。

[0719] （１３－４）ヒト生殖細胞系列配列を含む抗体のカルシウムイオン結合活性の評価

精製された抗体のカルシウムイオン結合活性が評価された。抗体へのカルシウムイオンの結合の評価の指標として、示差走査型熱量測定（DSC）による熱変性中間温度（Tm値）が測定された（MicroCal VP-Capillary DSC、MicroCal）。熱変性中間温度（Tm値）は安定性の指標であり、カルシウムイオンの結合によってタンパク質が安定化すると、熱変性中間温度（Tm値）はカルシウムイオンが結合していない場合に比べて高くなる（J. Biol. Chem. (2008) 283, 37, 25140-25149）。抗体溶液中のカルシウムイオン濃度の変化に応じた抗体のTm値の変化を評価することによって、抗体へのカルシウムイオンの結合活性が評価された。精製された抗体が20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、2 mM $CaCl_2$（pH7.4）または20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl, 3μM $CaCl_2$（pH7.4）の溶液を外液とする透析（EasySEP、TOMY）処理に供された。透析に用いられた溶液を用いておよそ0.1 mg/mLに調製された抗体溶液を被験物質として、20℃から115℃まで240℃/hrの昇温速度でDSC測定が行われた。得られたDSCの変性曲線にもとづいて算出された各抗体のFabドメインの熱変性中間温度（Tm値）を表４０に示した。

[0720] [表40]

軽鎖生殖細胞系列配列	カルシウムイオン濃度		ΔTm（℃）
	3μM	2 mM	2 mM-3μM
hVk1	80.32	80.78	0.46
hVk2	80.67	80.61	-0.06
hVk3	81.64	81.36	-0.28
hVk4	70.74	70.74	0
hVk5	71.52	74.17	2.65

[0721] その結果、hVk1、hVk2、hVk3、hVk4配列を含む抗体のFabドメインのTm値は、当該Fabドメインを含む溶液中のカルシウムイオンの濃度によらず変動しなかった。一方で、hVk5配列を含む抗体のFabドメインのTm値は、当該Fabドメインを含む抗体溶液中のカルシウムイオンの濃度によって変動したことから、hVk5配列がカルシウムイオンと結合することが示された。

[0722] （１３－５）hVk5-2配列のカルシウム結合評価

参考実施例５の（５－２）においてVk5-2（配列番号：４）のほかにVk5-2に分類されるVk5-2バリアント１（配列番号：６８）およびVk5-2バリアント２（配列番号：６９）が得られた。これらのバリアントについてもカルシウム結合評価が行われた。Vk5-2、Vk5-2バリアント１およびVk5-2バリアント２のDNA断片がそれぞれ動物細胞用発現ベクターに組み込まれた。得られた発現ベクターの塩基配列は当業者公知の方法で決定された。Vk5-2、Vk5-2バリアント１およびVk5-2バリアント２のDNA断片がそれぞれ組み込まれた動物細胞用発現ベクターは、重鎖としてCIM_H（配列番号：６７）が発現するように組み込まれた動物発現用のベクターと、参考実施例１２の（１２－３）で記載した方法で共に動物細胞中に導入され、抗体が精製された。精製された抗体のカルシウムイオン結合活性が評価された。精製された抗体が20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、2 mM $CaCl_2$（pH7.5）または20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl（pH7.5）の溶液（表４１ではカルシウムイオン濃度0mMと表記）を外液とする透析（EasySEP、TOMY）処理に供された。透析に用いられた溶液を用いておよそ0.1 mg/mLに調製された抗体溶液を被験物質として、20℃から115℃まで240℃/hrの昇温速度でDSC測定が行われた。得られたDSCの変性曲線にもとづいて算出された各抗体のFabドメインの熱変性中間温度（Tm値）を表４１に示した。

[0723] [表41]

軽鎖	カルシウムイオン濃度		ΔTm（℃）
	0 mM	2 mM	2 mM-0mM
Vk5-2	71.65	74.38	2.73
Vk5-2 バリアント１	65.75	72.24	6.49
Vk5-2 バリアント２	66.46	72.24	5.78

[0724] その結果、Vk5-2、Vk5-2バリアント１およびVk5-2バリアント２の配列を含む抗体のFabドメインのTm値は、当該Fabドメインを含む抗体溶液中のカルシウムイオンの濃度によって変動したことから、Vk5-2に分類される配列を持つ抗体はカルシウムイオンと結合することが示された。

[0725] （参考実施例１４）ヒトVk5（hVk5）配列の評価

（１４－１）hVk5配列

Kabatデータベース中には、hVk5配列としてhVk5-2配列のみが登録されている。本明細書では、hVk5とhVk5-2は同義で扱われる。WO2010/136598では、hVk5-2配列の生殖細胞系列配列中の存在比は0.4%と記載されている。他の報告でもhVk5-2配列の生殖細胞系列配列中の存在比は0～0.06%と述べられている（J. Mol. Biol. (2000) 296, 57-86、Proc. Natl. Acad. Sci. (2009) 106, 48, 20216-20221）。上記のように、hVk5-2配列は、生殖細胞系列配列中で出現頻度が低い配列であるため、ヒト生殖細胞系列配列で構成される抗体ライブラリやヒト抗体を発現するマウスへの免疫によって取得されたB細胞から、カルシウムと結合する抗体を取得することは非効率であると考えられた。そこで、ヒトhVk5-2配列を含むCaライブラリを設計する可能性が考えられるが、報告されている合成抗体ライブラリ（WO2010/105256やWO2010/136598）ではhVk5配列は含まれていなかった。さらに、hVk5-2配列の物性は報告されておらず、その実現の可能性は未知であった。

[0726] （１４－２）糖鎖非付加型hVk5-2配列の構築、発現および精製

hVk5-2配列は20位（Kabatナンバリング）のアミノ酸にN型糖鎖が付加する配列を有する。タンパク質に付加する糖鎖にはヘテロジェニティーが存在するため、物質の均一性の観点から糖鎖は付加されないほうが望ましい。そこで、20位（Kabatナンバリング）のAsn（N）残基がThr（T）残基に置換された改変体hVk5-2_L65（配列番号：７０）が作製された。アミノ酸の置換はQuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit（Stratagene）を用いる当業者公知の方法で行われた。改変体hVk5-2_L65をコードするDNAが動物発現用ベクターに組み込まれた。作製された改変体hVk5-2_L65のDNAが組み込まれた動物発現用ベクターは、重鎖としてCIM_H（配列番号：６７）が発現するように組み込まれた動物発現用のベクターと、参考実施例５で記載した方法で共に動物細胞中に導入された。導入された動物細胞中で発現したhVk5-2_L65 およびCIM_Hを含む抗体が、参考実施例１３で記載した方法で精製された。

[0727] （１４－３）糖鎖非付加型hVk5-2配列を含む抗体の物性評価

取得された改変配列hVk5-2_L65を含む抗体が、改変に供されたもとのhVk5-2配列を含む抗体よりも、そのヘテロジェニティーが減少しているか否かが、イオン交換クロマトグラフィーを用いて分析された。イオン交換クロマトグラフィーの方法を表４２に示した。分析の結果、図５２に示すように糖鎖付加部位が改変されたhVk5-2_L65は、元のhVk5-2配列よりもヘテロジェニティーが減少していることが示された。

[0728] [表42]

	条件
カラム	TOSOH TSKgel DEAE-NPR
移動相	A; 10 mM Tris-HCl, 3μM $CaCl_2$（pH8.0）
	B; 10 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 3μM $CaCl_2$（pH8.0）
グラジエントスケジュール	%B = 0 - (5min) - 0 - 2%/1min
カラム温度	40℃
検出	280 nm
注入量	100μL (5μg)

[0729] 次に、ヘテロジェニティーが減少したhVk5-2_L65配列を含む抗体がカルシウムイオンと結合するか否かが、参考実施例１３に記載された方法を用いて評価された。その結果、表４３に示すように、糖鎖付加部位が改変されたhVk5-2_L65を含む抗体のFabドメインのTm値も、抗体溶液中のカルシウムイオンの濃度の変化によって変動した。すなわち、糖鎖付加部位が改変されたhVk5-2_L65を含む抗体のFabドメインにカルシウムイオンが結合することが示された。

[0730] [表43]

軽鎖	糖鎖付加配列	カルシウムイオン濃度		ΔTm（℃）
		3μM	2 mM	2 mM-3μM
hVk5-2	あり	71.52	74.17	2.65
hVk5-2_L65	なし	71.51	73.66	2.15

[0731] （参考実施例１５）hVk5-2配列のCDR配列を含む抗体分子に対するカルシウムイオンの結合活性の評価

（１５－１）hVk5-2配列のCDR配列を含む改変抗体の作製、発現および精製

hVk5-2_L65配列はヒトVk5-2配列のフレームワークに存在する糖鎖付加部位のアミノ酸が改変された配列である。参考実施例１４で糖鎖付加部位を改変してもカルシウムイオンが結合することが示されたが、フレームワーク配列は生殖細胞系列の配列であることが免疫原性の観点から一般的には望ましい。そこで、抗体のフレームワーク配列を、当該抗体に対するカルシウムイオンの結合活性を維持しながら、糖鎖が付加されない生殖細胞系列配列のフレームワーク配列に置換することが可能であるか否かが検討された。

[0732] 化学合成されたhVk5-2配列のフレームワーク配列がhVk1、hVk2、hVk3および hVk4配列に改変された配列（それぞれCaVk1（配列番号：７１）、CaVk2（配列番号：７２）、CaVk3（配列番号：７３）、CaVk4（配列番号：７４）をコードするポリヌクレオチドが、PCR法によって天然型Kappa鎖の定常領域（配列番号：５０）をコードするポリヌクレオチドと連結されたDNA断片が、動物細胞発現用ベクターに組み込まれた。作製された改変体の配列は当業者公知の方法で確認された。上記のように作製された各プラスミドは、CIM_H（配列番号：６７）をコードするポリヌクレオチドが組み込まれたプラスミドと共に参考実施例１３に記載した方法で動物細胞に導入された。上記のように導入された動物細胞の培養液から、発現した所望の抗体分子が精製された。

[0733] （１５－２）hVk5-2配列のCDR配列を含む改変抗体のカルシウムイオン結合活性の評価

hVk5-2配列以外の生殖細胞系列配列（hVk1、hVk2、hVk3、hVk4）のフレームワーク配列およびhVK5-2配列のCDR配列を含む改変抗体に、カルシウムイオンが結合するか否かが参考実施例５に記載された方法によって評価された。評価された結果を表４４に示した。各改変抗体のFabドメインのTm値は、抗体溶液中のカルシウムイオン濃度の変化によって変動することが示された。よって、hVk5-2配列のフレームワーク配列以外のフレームワーク配列を含む抗体もカルシウムイオンと結合することが示された。

[0734]

[表44]

生殖細胞系列（軽鎖フレームワーク配列）	カルシウムイオン濃度		ΔTm（℃）
	3μM	2 mM	2 mM-3μM
hVk1	77.51	79.79	2.28
hVk2	78.46	80.37	1.91
hVk3	77.27	79.54	2.27
hVk4	80.35	81.38	1.03
hVk5-2	71.52	74.17	2.65

[0735] さらに、hVk5-2配列以外の生殖細胞系列配列（hVk1、hVk2、hVk3、hVk4）のフレームワーク配列およびhVK5-2配列のCDR配列を含むように改変された各抗体のFabドメインの熱安定性の指標である熱変性温度（Tm値）は、改変に供されたもとのhVk5-2配列を含む抗体のFabドメインのTm値よりも増加することが明らかになった。この結果から、hVk1、hVk2、hVk3、hVk4のフレームワーク配列およびhVk5-2配列のCDR配列を含む抗体はカルシウムイオンと結合する性質を有する上に、熱安定性の観点でも優れた分子であることが見出された。

[0736]（参考実施例１６）ヒト生殖細胞系列hVk5-2配列に存在するカルシウムイオン結合部位の同定

（１６－１）hVk5-2配列のCDR配列中の変異部位の設計

参考実施例１５に記載されているように、hVk5-2配列のCDR部分が他の生殖細胞系列のフレームワーク配列に導入された軽鎖を含む抗体もカルシウムイオンと結合することが示された。この結果からhVk5-2に存在するカルシウムイオン結合部位はCDRの中に存在することが示唆された。カルシウムイオンと結合する、すなわち、カルシウムイオンをキレートするアミノ酸として、負電荷のアミノ酸もしくは水素結合のアクセプターとなりうるアミノ酸が挙げられる。そこで、hVk5-2配列のCDR配列中に存在するAsp（D）残基またはGlu（E）残基がAla（A）残基に置換された変異hVk5-2配列を含む抗体がカルシウムイオンと結合するか否かが評価された。

[0737] （１６－２）hVk5-2配列のAla置換体の作製ならびに抗体の発現および精製

hVk5-2配列のCDR配列中に存在するAspおよび/またはGlu残基がAla残基に改変された軽鎖を含む抗体分子が作製された。参考実施例１４で記載されるように、糖鎖が付加されない改変体hVk5-2_L65はカルシウムイオン結合を維持していたことから、カルシウムイオン結合性という観点ではhVk5-2配列と同等と考えられる。本実施例ではhVk5-2_L65をテンプレート配列としてアミノ酸置換が行われた。作製された改変体を表４５に示した。アミノ酸の置換はQuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)、PCRまたはIn fusion Advantage PCR cloning kit (TAKARA) 等の当業者公知の方法によって行われ、アミノ酸が置換された改変軽鎖の発現ベクターが構築された。

[0738] [表45]

軽鎖改変体名	改変部位（Kabatナンバリング）	配列番号
hVk5-2_L65	野生型	７０
hVk5-2_L66	30	７５
hVk5-2_L67	31	７６
hVk5-2_L68	32	７７
hVk5-2_L69	50	７８
hVk5-2_L70	30, 32	７９
hVk5-2_L71	30, 50	８０
hVk5-2_L72	30, 32, 50	８１
hVk5-2_L73	92	８２

[0739] 得られた発現ベクターの塩基配列は当業者公知の方法で決定された。作製された改変軽鎖の発現ベクターを重鎖CIM_H（配列番号：６７）の発現ベクターと共に、ヒト胎児腎癌細胞由来HEK293H株（Invitrogen）、またはFreeStyle293細胞（Invitrogen）に一過性に導入することによって、抗体を発現させた。得られた培養上清から、rProtein A SepharoseTM Fast Flow（GEヘルスケア）を用いて当業者公知の方法で、抗体が精製された。精製された抗体溶液の280 nmでの吸光度が、分光光度計を用いて測定された。PACE法により算出された吸光係数を用いることによって、得られた測定値から抗体濃度が算

出された（Protein Science (1995) 4, 2411-2423）。

[0740] （１６－３）hVk5-2配列のAla置換体を含む抗体のカルシウムイオン結合活性評価

得られた精製抗体がカルシウムイオンと結合するか否かが参考実施例１３に記載された方法によって判定された。その結果を表４６に示した。hVk5-2配列のCDR配列中に存在するAspまたはGlu残基をカルシウムイオンの結合もしくはキレートに関与できないAla残基に置換することによって、抗体溶液のカルシウムイオン濃度の変化によってそのFabドメインのTm値が変動しない抗体が存在した。Ala置換によってTm値が変動しない置換部位（32位および92位（Kabatナンバリング））はカルシウムイオンと抗体の結合に特に重要であることが示された。

[0741] [表46]

軽鎖改変体名	改変部位（Kabatナンバリング）	カルシウムイオン濃度		ΔTm（℃）
		0μM	2 mM	2 mM-0μM
hVk5-2_L65	野生型	71.71	73.69	1.98
hVk5-2_L66	30	71.65	72.83	1.18
hVk5-2_L67	31	71.52	73.30	1.78
hVk5-2_L68	32	73.25	74.03	0.78
hVk5-2_L69	50	72.00	73.97	1.97
hVk5-2_L70	30, 32	73.42	73.60	0.18
hVk5-2_L71	30, 50	71.84	72.57	0.73
hVk5-2_L72	30, 32, 50	75.04	75.17	0.13
hVk5-2_L73	92	75.23	75.04	-0.19

[0742] （参考実施例１７）カルシウムイオン結合モチーフを有するhVk1配列を含む抗体の評価

（１７－１）カルシウムイオン結合モチーフを有するhVk1配列の作製ならびに抗体の発現および精製

参考実施例１６で記載されたAla置換体のカルシウムの結合活性の結果から、hVk5-2配列のCDR配列の中でAspやGlu残基がカルシウム結合に重要であることが示された。そこで、30位、31位、32位、50位および92位（Kabatナンバリ

ング）の残基のみを他の生殖細胞系列の可変領域配列に導入してもカルシウムイオンと結合できるか否かが評価された。具体的には、ヒト生殖細胞系配列であるhVk1配列の30位、31位、32位、50位および92位（Kabatナンバリング）の残基がhVk5-2配列の30位、31位、32位、50位および92位（Kabatナンバリング）の残基に置換された改変体LfVk1_Ca（配列番号：８３）が作製された。すなわち、hVk5-2配列中のこれらの5残基のみが導入されたhVk1配列を含む抗体がカルシウムと結合できるか否かが判定された。改変体の作製は参考実施例１６と同様に行われた。得られた軽鎖改変体LfVk1_Caおよび軽鎖hVk1配列を含むLfVk1（配列番号：８４）を、重鎖CIM_H（配列番号：６７）と共に発現させた。抗体の発現および精製は参考実施例１６と同様の方法で実施された。

[0743] （１７－２）カルシウムイオン結合モチーフを有するヒトhVk1配列を含む抗体のカルシウムイオン結合活性の評価

上記のように得られた精製抗体がカルシウムイオンと結合するか否かが参考実施例１３に記載された方法で判定された。その結果を表４７に示した。hVk1配列を有するLfVk1を含む抗体のFabドメインのTm値は抗体溶液中のカルシウムの濃度の変化によっては変動しない一方で、LfVk1_Caを含む抗体配列の、Tm値は、抗体溶液中のカルシウムの濃度の変化によって1℃以上変化したことから、LfVk1_Caを含む抗体がカルシウムと結合することが示された。上記の結果から、カルシウムイオンの結合には、hVk5-2のCDR配列がすべて必要ではなく、LfVk1_Ca配列を構築する際に導入された残基のみでも十分であることが示された。

[0744] [表47]

軽鎖改変体	カルシウムイオン濃度		ΔTm（℃）
	3μM	2 mM	2 mM-3μM
LfVk1	83.18	83.81	0.63
LfVk1_Ca	79.83	82.24	2.41

[0745] （１７－３）分解抑制型LfVk1 Ca配列の構築、発現および精製

参考実施例１７の（１７－１）でヒト生殖細胞系配列であるhVk1配列の30位、31位、32位、50位および92位（Kabatナンバリング）の残基がhVk5-2配列の30位、31位、32位、50位および92位（Kabatナンバリング）の残基に置換された改変体LfVk1_Ca（配列番号：６６）が作製され、カルシウムイオンが結合することが示された。そこで、LfVk1_Ca配列を含むCaライブラリを設計する可能性が考えられるが、LfVk1_Ca配列の物性は報告されておらず、その実現可能性は未知であった。LfVk1_Ca配列は、30位、31位および32位（Kabatナンバリング）にAspが存在し、酸性条件下で分解することが報告されているAsp-Asp配列がCDR1配列中に存在する（J. Pharm. Biomed. Anal. (2008) 47(1), 23-30）。保存安定性の観点から、酸性条件での分解は避けることが望ましい。そこで、分解する可能性があるAsp（D）残基がAla（A）残基に置換された改変体LfVk1_Ca1（配列番号：８５）、LfVk1_Ca2（配列番号：８６）およびLfVk1_Ca3（配列番号：８７）が作製された。アミノ酸の置換はQuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit（Stratagene）を用いる当業者公知の方法で行われた。改変体をコードするDNAが動物発現用ベクターに組み込まれた。作製された改変体のDNAが組み込まれた動物発現用ベクターは、重鎖としてGC_H（配列番号：５１）が発現するように組み込まれた動物発現用のベクターと、参考実施例１３で記載した方法で共に動物細胞中に導入された。導入された動物細胞中で発現した抗体が、参考実施例１３で記載した方法で精製された。

[0746] （１７－４）分解抑制型LfVk1 Ca配列を含む抗体の安定性評価

参考実施例１７の（１７－３）で取得された抗体が、改変に供されたもとのLfVk1_Ca配列を含む抗体よりも、pH6.0溶液中での分解が抑制されているか否かが熱加速後の各抗体のヘテロジェニティーの比較によって評価された。各抗体が20 mM Histidine-HCl、150 mM NaCl、pH6.0の溶液に一晩4℃の条件で透析された。透析された抗体は0.5mg/mLに調製され、5℃または50℃で3日間保存された。保存後の各抗体を参考実施例１４に記載された方法でイオン交換クロマトグラフィーが行われた。分析の結果、図５３に示されるように

分解部位が改変されたLfVk1_Ca1は、元のLfVk1_Ca配列よりもヘテロジェニティーが少なく、熱加速による分解が著しく抑制されていることが示された。すなわち、LfVk1_Ca配列中の30位に存在するAsp（D）残基が分解することが示され、アミノ酸改変によって回避できることが示された。

[0747] （１７－５）軽鎖30位Asp残基分解抑制型LVk1 Ca配列の作製ならびに抗体の発現および精製

参考実施例１７の（１７－４）で記載されたAla置換体の分解抑制の結果から、LfVk1_Ca配列のCDR配列の中で30位（Kabatナンバリング）のAsp（D）残基が酸性条件で分解し、30位（Kabatナンバリング）を他のアミノ酸（（１７－４）では、Ala（A）残基に置換された）に置換することで分解が抑制できることが示された。そこで、30位（Kabatナンバリング）の残基をカルシウムイオンがキレートできる残基の代表であるSer（S）残基に置換した配列（LfVk1_Ca6とよぶ。配列番号：８８）としても、分解が抑制されるか否かが評価された。改変体の作製は参考実施例９と同様に行われた。得られた軽鎖改変体LfVk1_Ca6および軽鎖LfVk1_Ca配列を、重鎖GC_H（配列番号：５１）と共に発現させた。抗体の発現および精製は参考実施例１６と同様の方法で実施された。

[0748] （１７－６）軽鎖30位Asp残基分解抑制型LVk1 Ca配列の評価

上記のように得られた精製抗体の酸性条件下における保存安定性が参考実施例１７の（１７－４）に記載された方法で判定された。その結果、図５４に示すように、LfVk1_Ca6配列を含む抗体は、元のLfVk1_Ca配列を含む抗体よりも分解が抑制されていることが示された。

[0749] さらに、LfVk1_Ca配列を含む抗体およびLfVk1_Ca6配列を含む抗体がカルシウムイオンと結合するか否かが参考実施例１３に記載された方法で判定された。その結果を表４８に示す。LfVk1_Ca配列を含む抗体および分解抑制型であるLfVk1_Ca6配列を含む抗体のFabドメインのTm値は、それぞれ抗体溶液中のカルシウムの濃度の変化によって1℃以上変化した。

[0750]

[表48]

軽鎖改変体	カルシウムイオン濃度		ΔTm（℃）
	3μM	2 mM	2 mM-3μM
LfVk1_Ca	78.45	80.06	1.61
LfVk1_Ca6	78.44	79.74	1.30

[0751] （参考実施例１８）Ca濃度依存的に抗原に結合する結合抗体が効率よく取得できるように、カルシウムイオン結合モチーフが可変領域に導入された抗体分子の集団（Caライブラリ）の設計

カルシウム結合モチーフとして、例えばhVk5-2配列やそのCDR配列、さらに残基が絞られた30位、31位、32位、50位、92位（Kabatナンバリング）が好適に挙げられる。他にも、カルシウムと結合するタンパク質が有するEFハンドモチーフ（カルモジュリンなど）やCタイプレクチン（ASGPRなど）もカルシウム結合モチーフに該当する。

[0752] Caライブラリは重鎖可変領域と軽鎖可変領域から構成される。重鎖可変領域はヒト抗体配列が使用され、軽鎖可変領域にカルシウム結合モチーフが導入された。カルシウム結合モチーフが導入される軽鎖可変領域のテンプレート配列として、hVk1配列が選択された。hVk1配列にカルシウム結合モチーフのうちの一つであるhVk5-2のCDR配列が導入されたLfVk1_Ca配列を含む抗体は参考実施例１６で示したように、カルシウムイオンと結合することが示された。テンプレート配列に複数のアミノ酸を出現させてライブラリを構成する抗原結合分子の多様性が拡げられた。複数のアミノ酸を出現させる位置は、抗原と相互作用する可能性が高い可変領域の表面に露出する位置が選択された。具体的には、30位、31位、32位、34位、50位、53位、91位、92位、93位、94位および96位（Kabatナンバリング）が、こうしたフレキシブル残基として選択された。

[0753] 次に出現させるアミノ酸残基の種類とその出現率が設定された。Kabatデータベース（KABAT, E.A. ET AL.: 'Sequences of proteins of immunological interest', vol. 91, 1991, NIH PUBLICATION）に登録されているhVk1とhVk

3の配列中のフレキシブル残基におけるアミノ酸の出現頻度が解析された。解析結果を元に、各位置で出現頻度が高いアミノ酸からCaライブラリで出現させるアミノ酸の種類が選択された。この際、アミノ酸の性質が偏らないように解析結果では出現頻度が少ないと判定されたアミノ酸も選択された。また、選択されたアミノ酸の出現頻度は、Kabatデータベースの解析結果を参考にして設定された。

[0754] 以上のように設定されたアミノ酸および出現頻度を考慮することによって、Caライブラリとして、カルシウム結合モチーフを含み、当該モチーフ以外の各残基で複数のアミノ酸を含むような配列の多様性が重視されたCaライブラリが設計された。表１および２にCaライブラリの詳細なデザインが示されている（各表中の位置はKabatナンバリングを表す）。また、表１および２で記載されるアミノ酸の出現頻度は、Kabatナンバリングで表される92位がAsn（N）の場合、94位はSer（S）ではなくLeu（L）とすることができる。

[0755] （参考実施例１９）Caライブラリの作製

ヒトPBMCから作成したポリA RNAや、市販されているヒトポリA RNAなどを鋳型としてPCR法により抗体重鎖可変領域の遺伝子ライブラリが増幅された。抗体軽鎖可変領域部分については、参考実施例１８に記載されるように、カルシウム結合モチーフを維持しカルシウム濃度依存的に抗原に対して結合可能な抗体の出現頻度を高めた抗体可変領域軽鎖部分が設計された。また、フレキシブル残基のうちカルシウム結合モチーフが導入された残基以外のアミノ酸残基として、天然ヒト抗体でのアミノ酸出現頻度の情報（（KABAT, E.A. ET AL.: 'Sequences of proteins of immunological interest', vol. 91, 1991, NIH PUBLICATION）が参考にされ、天然ヒト抗体の配列中で出現頻度の高いアミノ酸を均等に分布させた抗体軽鎖可変領域のライブラリが設計された。このように作製された抗体重鎖可変領域の遺伝子ライブラリと抗体軽鎖可変領域の遺伝子ライブラリとの組合せがファージミドベクターへ挿入され、ヒト抗体配列からなるFabドメインを提示するヒト抗体ファージディスプレイライブラリ（Methods Mol Biol. (2002) 178, 87-100）が構築された。

[0756] 後述する参考実施例２３に記載された方法に準じて、抗体遺伝子ライブラリが導入された大腸菌から単離された抗体遺伝子部分についての配列が確認された。得られた290種類のクローンの配列のアミノ酸分布と、設計したアミノ酸分布を、図５５に示した。

[0757] （参考実施例２０）Caライブラリに含まれる分子のカルシウムイオン結合活性の評価

（２０－１）Caライブラリに含まれる分子のカルシウムイオン結合活性

参考実施例１４に示されているように、カルシウムイオンと結合することが示されたhVk5-2配列は生殖細胞系列配列中で出現頻度が低い配列であるため、ヒト生殖細胞系列配列で構成される抗体ライブラリやヒト抗体を発現するマウスへの免疫によって取得されたB細胞から、カルシウムと結合する抗体を取得することは非効率であると考えられた。そこで、Caライブラリが構築された。構築されたCaライブラリにカルシウム結合を示すクローンが存在するか評価された。

[0758] （２０－２）抗体の発現と精製

Caライブラリに含まれるクローンが、動物細胞発現用プラスミドへ導入される。抗体の発現は以下の方法を用いて行われた。ヒト胎児腎細胞由来FreeStyle 293-F株（Invitrogen）がFreeStyle 293 Expression Medium培地（Invitrogen）に懸濁され、1.33 x 10^6細胞/mLの細胞密度で6ウェルプレートの各ウェルへ3 mLずつ播種された。調製されたプラスミドは、リポフェクション法によって細胞へ導入された。CO_2インキュベーター（37度、8%CO_2、90 rpm）中で4日間培養が行われた。rProtein A SepharoseTM Fast Flow (Amersham Biosciences）を用いて当業者公知の方法を用いて、上記で得られた培養上清から抗体が精製された。分光光度計を用いて精製された抗体溶液の280 nmでの吸光度が測定された。PACE法により算出された吸光係数を用いることによって、得られた測定値から抗体濃度が算出された（Protein Science (1995) 4, 2411-2423）。

[0759] （２０－３）取得された抗体へのカルシウムイオン結合評価

上記のように得られた精製抗体がカルシウムイオンと結合するか否かが参考実施例６に記載された方法で判定された。その結果を表４９に示した。Caライブラリに含まれる複数の抗体のFabドメインのTmはカルシウムイオン濃度によって変動し、カルシウムイオンと結合する分子が含まれることが示された。

[0760] [表49]

抗体	配列番号		カルシウムイオン濃度		ΔTm（℃）
	重鎖	軽鎖	3μM	2 mM	2 mM-3μM
Ca_B01	８９	１００	70.88	71.45	0.57
Ca_E01	９０	１０１	84.31	84.95	0.64
Ca_H01	９１	１０２	77.87	79.49	1.62
Ca_D02	９２	１０３	78.94	81.1	2.16
Ca_E02	９３	１０４	81.41	83.18	1.77
Ca_H02	９４	１０５	72.84	75.13	2.29
Ca_D03	９５	１０６	87.39	86.78	-0.61
Ca_C01	９６	１０７	74.74	74.92	0.18
Ca_G01	９７	１０８	65.21	65.87	0.66
Ca_A03	９８	１０９	80.64	81.89	1.25
Ca_B03	９９	１１０	93.02	93.75	0.73

[0761] （参考実施例２１）Ca依存的にIL-6レセプターに結合する抗体の取得

（２１－１）ビーズパンニングによるライブラリからのCa依存的に抗原に結合する抗体断片の取得

構築されたCa依存的にIL-6レセプターに結合する抗体ライブラリからの最

初の選抜は、抗原（IL-6レセプター）への結合能をもつ抗体断片のみの濃縮によって実施された。

[0762] 構築したファージディスプレイ用ファージミドを保持した大腸菌からファージ産生が行われた。ファージ産生が行われた大腸菌の培養液に2.5 M NaCl/10%PEGを添加することによって沈殿させたファージの集団をTBSにて希釈することによってファージライブラリ液が得られた。次に、ファージライブラリ液にBSA、および$CaCl_2$を添加することによって終濃度4%BSA、1.2 mMカルシウムイオンとなるよう調製された。パンニング方法として、一般的な方法である磁気ビーズに固定化した抗原を用いたパンニング方法が参照された（J. Immunol. Methods. (2008) 332 (1-2), 2-9、J. Immunol. Methods. (2001) 247 (1-2), 191-203、Biotechnol. Prog. (2002) 18(2) 212-20、Mol. Cell Proteomics (2003) 2 (2), 61-9）。磁気ビーズとして、NeutrAvidin coated beads (Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) もしくはStreptavidin coated beads (Dynabeads M-280 Streptavidin) が用いられた。

[0763] 具体的には、調製されたファージライブラリ液に250 pmolのビオチン標識抗原を加えることによって、当該ファージライブラリ液を室温にて60分間抗原と接触させた。BSAでブロッキングされた磁気ビーズが加えられ、抗原とファージとの複合体を磁気ビーズと室温にて15分間結合させた。ビーズは1mLの1.2 mM $CaCl_2$/TBST (1.2 mM $CaCl_2$を含むTBST) にて3回洗浄された後、1 mLの1.2 mM $CaCl_2$/TBS (1.2 mM $CaCl_2$を含むTBS) にてさらに2回洗浄された。その後、1mg/mLのトリプシン0.5mLが加えられたビーズは室温で15分懸濁された後、即座に磁気スタンドを用いてビーズが分離され、ファージ溶液が回収された。回収されたファージ溶液が、対数増殖期 (OD600が0.4-0.7) となった10 mLの大腸菌株ER2738に添加された。37℃で1時間緩やかに上記大腸菌の攪拌培養を行うことによって、ファージを大腸菌に感染させた。感染させた大腸菌は、225 mm x 225 mmのプレートへ播種された。次に、播種された大腸菌の培養液からファージを回収することによって、ファージライブラリ液が調製された。

[0764] 2回目のパンニングでは、抗原結合能もしくはCa依存的結合能を指標にファージの濃縮が行われた。

[0765] 具体的には、抗原結合能を指標に濃縮を行った際には、調製したファージライブラリ液に40 pmolのビオチン標識抗原を加えることによって、ファージライブラリを室温で60分間抗原と接触させた。BSAでブロッキングされた磁気ビーズが加えられ、抗原とファージとの複合体を磁気ビーズと室温で15分間結合させた。ビーズは1 mLの1.2 mM $CaCl_2$/TBSTにて3回、1.2 mM $CaCl_2$/TBSにて2回洗浄された。その後、1 mg/mLのトリプシン0.5 mLが加えられたビーズは室温で15分懸濁された後、即座に磁気スタンドを用いてビーズが分離され、ファージ溶液が回収された。回収されたファージ溶液に、100 mg/mLのトリプシン5μLを加えることによって、Fabを提示しないファージのpIIIタンパク質（ヘルパーファージ由来のpIIIタンパク質）が切断され、Fabを提示しないファージの大腸菌に対する感染能を失わせた。回収されたファージ溶液が、対数増殖期（OD600が0.4-0.7）となった10 mLの大腸菌株ER2738に添加された。37℃で1時間緩やかに上記大腸菌の攪拌培養を行うことによって、ファージを大腸菌に感染させた。感染させた大腸菌は225 mm x 225 mmのプレートへ播種された。次に、播種された大腸菌の培養液からファージを回収することによってファージライブラリ液が回収された。

[0766] Ca依存的結合能を指標に濃縮を行った際には、調製したファージライブラリ液に40 pmolのビオチン標識抗原を加えることによって、ファージライブラリを室温で60分間抗原と接触させた。BSAでブロッキングされた磁気ビーズが加えられ、抗原とファージとの複合体を磁気ビーズと室温で15分間結合させた。ビーズは1 mLの1.2 mM $CaCl_2$/TBSTと1.2 mM $CaCl_2$/TBSにて洗浄された。その後、0.1 mLの2 mM EDTA/TBS（2 mMのEDTAを含むTBS）が加えられたビーズは室温で懸濁された後、即座に磁気スタンドを用いてビーズが分離され、ファージ溶液が回収された。回収されたファージ溶液に、100 mg/mLのトリプシン5μLを加えることによって、Fabを提示しないファージのpIIIタンパク質（ヘルパーファージ由来のpIIIタンパク質）が切断され、Fabを提示しないフ

ァージの大腸菌に対する感染能を失わせた。回収されたファージ溶液が、対数増殖期（OD600が0.4-0.7）となった10 mLの大腸菌株ER2738に添加された。37℃で1時間緩やかに上記大腸菌の攪拌培養を行うことによって、ファージを大腸菌に感染させた。感染させた大腸菌は225 mm x 225 mmのプレートへ播種された。次に、播種された大腸菌の培養液からファージを回収することによってファージライブラリ液が回収された。

[0767] （２１－２）ファージELISAによる評価

上記の方法によって得られた大腸菌のシングルコロニーから、常法（Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145）に習い、ファージ含有培養上清が回収された。

[0768] BSAおよび$CaCl_2$が加えられたファージを含有する培養上清が以下の手順でELISAに供された。StreptaWell 96マイクロタイタープレート（Roche）がビオチン標識抗原を含む100μLのPBSにて一晩コートされた。当該プレートの各ウェルをPBSTにて洗浄することによって抗原が除かれた後、当該ウェルが4% BSA-TBS 250μLにて1時間以上ブロッキングされた。4% BSA-TBSが除かれた各ウェルに調製された培養上清が加えられた当該プレートを37℃で1時間静置することによって、ファージを提示する抗体を各ウェルに存在する抗原に結合させた。1.2 mM $CaCl_2$/TBSTにて洗浄された各ウェルに、1.2 mM $CaCl_2$/TBSもしくは1 mM EDTA/TBSが加えられ、当該プレートは37℃で30分間静置しインキュベートされた。1.2 mM $CaCl_2$/TBSTにて洗浄された後に、イオン化カルシウム濃度1.2 mMとしたTBSによって希釈されたHRP結合抗M13抗体（Amersham Pharmacia Biotech）が各ウェルに添加されたプレートを１時間インキュベートさせた。1.2 mM $CaCl_2$/TBSTにて洗浄後、TMB single溶液（ZYMED）が添加された各ウェル中の溶液の発色反応が、硫酸の添加により停止された後、450 nmの吸光度によって当該発色が測定された。

[0769] 上記のファージELISAを実施したクローンに対し、特異的なプライマーを用いて増幅された遺伝子の塩基配列解析が行われた。

[0770] ファージELISA、配列解析の結果を以下の表５０に示した。

[0771] [表50]

ライブラリ	Ca ライブラリ	Ca ライブラリ
濃縮指標	抗原結合能	依存的抗原結合能
パンニング回数	2	2
試験したクローン数	85	86
ELISA 陽性	77	75
ELISA 陽性クローン配列種類	74	72
Ca 依存的結合クローン配列種類	13	47

[0772] （２１－３）抗体の発現と精製

ファージELISAの結果、Ca依存的な抗原に対する結合能があると判断されたクローンが、動物細胞発現用プラスミドへ導入された。抗体の発現は以下の方法を用いて行われた。ヒト胎児腎細胞由来FreeStyle 293-F株（Invitrogen）がFreeStyle 293 Expression Medium培地（Invitrogen）に懸濁され、1.33 x 10^6細胞/mLの細胞密度で6ウェルプレートの各ウェルへ3 mLずつ播種された。調製されたプラスミドは、リポフェクション法によって細胞へ導入された。CO_2インキュベーター（37度、8%CO_2、90 rpm）中で4日間培養が行われた。rProtein A SepharoseTM Fast Flow（Amersham Biosciences）を用いて当業者公知の方法を用いて、上記で得られた培養上清から抗体が精製された。分光光度計を用いて精製された抗体溶液の280 nmでの吸光度が測定された。PACE法により算出された吸光係数を用いることによって、得られた測定値から抗体濃度が算出された（Protein Science (1995) 4, 2411-2423）。

[0773] （２１－４）取得された抗体のヒトIL-6レセプターに対するCa依存的結合能の評価

前記のように取得された抗体6RC1IgG_010（重鎖配列番号：１１１、軽鎖配列番号：１１２）、および、6RC1IgG_012（重鎖配列番号：１１３、軽鎖配列番号：１１４）、および、6RC1IgG_019（重鎖配列番号：１１５、軽鎖配列番号：１１６）のヒトIL-6レセプターに対する結合活性がCa依存的であるかどうかを判断するため、これらの抗体とヒトIL-6レセプターとの相互作用解析がBiacore T100（GE Healthcare）を用いて行われた。ヒトIL-6レセプターに

対するCa依存性の結合活性を有しない対照抗体として、トリシズマブ（重鎖配列番号：６０、軽鎖配列番号：６１）が用いられた。高カルシウムイオン濃度および低カルシウムイオン濃度の条件として、それぞれ1.2 mMおよび3μMのカルシウムイオン濃度の溶液中で相互作用解析が行われた。アミンカップリング法でprotein A/G（Invitrogen）が適当量固定化されたSensor chip CM5（GE Healthcare）上に、目的の抗体がキャプチャーされた。ランニングバッファーには20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05%（w/v）Tween20、1.2 mM $CaCl_2$（pH7.4）または20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05%（w/v）Tween20、3μM $CaCl_2$（pH7.4）の2種類の緩衝液が用いられた。ヒトIL-6レセプターの希釈にもそれぞれのバッファーが使用された。測定は全て37℃で実施された。

[0774] 対照抗体であるトシリズマブ抗体、6RC1IgG_010抗体および6RC1IgG_012抗体および6RC1IgG_019抗体を用いた抗原抗体反応の相互作用解析に際して、IL-6レセプターの希釈液とブランクであるランニングバッファーを流速5μL/minで3分間インジェクトすることによって、センサーチップ上にキャプチャーさせたトシリズマブ抗体、6RC1IgG_010抗体および6RC1IgG_012抗体および6RC1IgG_019抗体にIL-6レセプターを相互作用させた。その後、10 mM Glycine-HCl（pH1.5）を流速30μL/minで30秒間インジェクトすることによって、センサーチップが再生された。

[0775] この方法により測定された高カルシウムイオン濃度におけるセンサーグラムを、図５６に示した。

[0776] 低カルシウムイオン濃度の条件下でのトシリズマブ抗体、6RC1IgG_010抗体および6RC1IgG_012抗体および6RC1IgG_019抗体についてのセンサーグラムも、同様の方法で取得された。低カルシウムイオン濃度におけるセンサーグラムを、図５７に示した。

[0777] 上記の結果から、6RC1IgG_010抗体および6RC1IgG_012抗体および6RC1IgG_019抗体は、バッファー中のカルシウムイオン濃度を1.2mMから3μMにすることで、IL6レセプターに対する結合能が大幅に低減することが観察された。

[0778]（参考実施例２２）pH依存的結合抗体ライブラリの設計

（２２－１）pH依存的結合抗体の取得方法

WO2009/125825は抗原結合分子にヒスチジンを導入することにより、pH中性領域とpH酸性領域で性質が変化するpH依存的抗原結合抗体を開示している。開示されたpH依存的結合抗体は、所望の抗原結合分子のアミノ酸配列の一部をヒスチジンに置換する改変によって取得されている。改変する対象の抗原結合分子を予め得ることなく、pH依存的結合抗体をより効率的に取得するために、ヒスチジンが可変領域（より好ましくは抗原結合に関与する可能性がある位置）に導入された抗原結合分子の集団（Hisライブラリと呼ぶ）から所望の抗原に結合する抗原結合分子を取得する方法が考えられる。Hisライブラリから得られる抗原結合分子は通常の抗体ライブラリよりもヒスチジンが高頻度に出現するため、所望の性質を有する抗原結合分子が効率的に取得できると考えられる。

[0779] （２２－２）pH依存的に抗原に結合する結合抗体が効率よく取得できるように、ヒスチジン残基が可変領域に導入された抗体分子の集団（Hisライブラリ）の設計

まず、Hisライブラリでヒスチジンを導入する位置が選択された。WO2009/125825ではIL-6レセプター抗体、IL-6抗体およびIL-31レセプター抗体の配列中のアミノ酸残基をヒスチジンに置換することでpH依存的抗原結合抗体が作製されたことが開示されている。さらに、抗原結合分子のアミノ酸配列をヒスチジンに置換することによって、pH依存的抗原結合能を有する、抗卵白リゾチウム抗体（FEBS Letter 11483, 309, 1, 85-88）および抗ヘプシジン抗体（WO2009/139822）が作製されている。IL-6レセプター抗体、IL-6抗体、IL-31レセプター抗体、卵白リゾチウム抗体およびヘプシジン抗体でヒスチジンを導入した位置を表５１に示した。表５１に示す位置は、抗原と抗体との結合を制御できる位置の候補として挙げられ得る。さらに表５１で示された位置以外でも、抗原と接触する可能性が高い位置も、ヒスチジンを導入する位置として適切であると考えられた。

[0780]

[表51]

抗体	鎖	位置(Kabat ナンバリング)								
IL-6 レセプター抗体	H	27	31	32	35	50	58	62	100B	102
	L	28	32	53	56	92				
IL-6 抗体	H	32	59	61	99					
	L	53	54	90	94					
IL-31 レセプター抗体	H	33								
	L									
卵白リゾチウム抗体	H	33	98							
	L	54								
ヘプシジン抗体	H	52	56	95	100c					
	L	28	90							

[0781] 重鎖可変領域と軽鎖可変領域から構成されるHisライブラリのうち、重鎖可変領域はヒト抗体配列が使用され、軽鎖可変領域にヒスチジンが導入された。Hisライブラリでヒスチジンを導入する位置として、上記で挙げられた位置と、抗原結合に関与する可能性がある位置、すなわち軽鎖の30位、32位、50位、53位、91位、92位および93位（Kabatナンバリング、Kabat EA et al. 1991. Sequence of Proteins of Immunological Interest. NIH）が選択された。またヒスチジンを導入する軽鎖可変領域のテンプレート配列として、Vk1配列が選択された。テンプレート配列に複数のアミノ酸を出現させてライブラリを構成する抗原結合分子の多様性が拡げられた。複数のアミノ酸を出現させる位置は、抗原と相互作用する可能性が高い可変領域の表面に露出する位置が選択された。具体的には、軽鎖の30位、31位、32位、34位、50位、53位、91位、92位、93位、94位および96位（Kabatナンバリング、Kabat EA et al. 1991. Sequence of Proteins of Immunological Interest. NIH）が、こうしたフレキシブル残基として選択された。

[0782] 次に出現させるアミノ酸残基の種類とその出現率が設定された。Kabatデータベース（KABAT, E.A. ET AL.: 'Sequences of proteins of immunological interest', vol. 91, 1991, NIH PUBLICATION）に登録されているhVk1とhVk3の配列中のフレキシブル残基におけるアミノ酸の出現頻度が解析された。解析結果を元に、各位置で出現頻度が高いアミノ酸からHisライブラリで出現さ

せるアミノ酸の種類が選択された。この際、アミノ酸の性質が偏らないように解析結果では出現頻度が少ないと判定されたアミノ酸も選択された。また、選択されたアミノ酸の出現頻度は、Kabatデータベースの解析結果を参考にして設定された。

[0783] 以上のように設定されたアミノ酸および出現頻度を考慮することによって、Hisライブラリとして、ヒスチジンが各CDRで1つ必ず入るように固定されているHisライブラリ1とHisライブラリ1よりも配列の多様性が重視されたHisライブラリ2が設計された。Hisライブラリ1およびHisライブラリ2の詳細なデザインは表３および表４に示されている（各表中の位置はKabatナンバリングを表す）。また、表３および４で記載されるアミノ酸の出現頻度は、Kabatナンバリングで表される92位がAsn（N）の場合、94位はSer（S）を除外することができる。

[0784] （参考実施例２３）pH依存的に抗原に結合する抗体を取得するためのヒト抗体ファージディスプレイライブラリ（Hisライブラリ1）の作製

ヒトPBMCから作成したポリA RNAや、市販されているヒトポリA RNAなどを鋳型としてPCR法により抗体重鎖可変領域の遺伝子ライブラリが増幅された。実施例２２に記載のHisライブラリ１として設計された抗体軽鎖可変領域の遺伝子ライブラリが、PCR法を用いて増幅された。このように作製された抗体重鎖可変領域の遺伝子ライブラリと抗体軽鎖可変領域の遺伝子ライブラリとの組合せがファージミドベクターへ挿入され、ヒト抗体配列からなるFabドメインを提示するヒト抗体ファージディスプレイライブラリが構築された。構築方法として、（Methods Mol Biol. (2002) 178, 87-100）が参考とされた。上記ライブラリの構築に際しては、ファージミドのFabとファージpIIIタンパク質をつなぐリンカー部分、および、ヘルパーファージpIIIタンパク遺伝子のN2ドメインとCTドメインの間にトリプシン切断配列が挿入されたファージディスプレイライブラリの配列が使用された。抗体遺伝子ライブラリが導入された大腸菌から単離された抗体遺伝子部分の配列が確認され、132クローンの配列情報が得られた。設計されたアミノ酸分布と、確認された配列中のア

ミノ酸の分布を、図５８に示した。設計されたアミノ酸分布に対応する多様な配列を含むライブラリが構築された。

[0785] （参考実施例２４）pH依存的にIL-6Rに結合する抗体の取得

（２４－１）ビーズパンニングによるライブラリからのpH依存的に抗原に結合する抗体断片の取得

構築されたHisライブラリ1からの最初の選抜は、抗原（IL-6R）への結合能をもつ抗体断片のみの濃縮によって実施された。

[0786] 構築したファージディスプレイ用ファージミドを保持した大腸菌からファージ産生が行われた。ファージ産生が行われた大腸菌の培養液に2.5 M NaCl/10%PEGを添加することによって沈殿させたファージの集団をTBSにて希釈することによってファージライブラリ液が得られた。ファージライブラリ液にBSAおよび$CaCl_2$を添加することによって終濃度4% BSA、1.2mMカルシウムイオンとなるよう調製された。パンニング方法として、一般的な方法である磁気ビーズに固定化した抗原を用いたパンニング方法が参照された（J. Immunol. Methods. (2008) 332 (1-2), 2-9、J. Immunol. Methods. (2001) 247 (1-2), 191-203、Biotechnol. Prog. (2002) 18(2) 212-20、Mol. Cell Proteomics (2003) 2 (2), 61-9）。磁気ビーズとして、NeutrAvidin coated beads (Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) もしくはStreptavidin coated beads (Dynabeads M-280 Streptavidin) が用いられた。

[0787] 具体的には、調製されたファージライブラリ液に250 pmolのビオチン標識抗原を加えることによって、当該ファージライブラリ液を室温にて60分間抗原と接触させた。BSAでブロッキングされた磁気ビーズが加えられ、抗原とファージとの複合体を磁気ビーズと室温にて15分間結合させた。ビーズは1 mLの1.2 mM $CaCl_2$/TBST (1.2 mM $CaCl_2$、0.1% Tween20を含むTBS) にて3回洗浄された後、1 mLの1.2 mM $CaCl_2$/TBS (pH7.6) にてさらに2回洗浄された。その後、1mg/mLのトリプシン0.5mLが加えられたビーズは室温で15分懸濁された後、即座に磁気スタンドを用いてビーズが分離され、ファージ溶液が回収された。回収されたファージ溶液が、対数増殖期（OD600が0.4-0.7）となった10

mLの大腸菌株ER2738に添加された。37℃で1時間緩やかに上記大腸菌の攪拌培養を行うことによって、ファージを大腸菌に感染させた。感染させた大腸菌は、225 mm x 225 mmのプレートへ播種された。次に、播種された大腸菌の培養液からファージを回収することによって、ファージライブラリ液が調製された。

[0788] 2回目以降のパンニングでは、抗原結合能もしくはpH依存的結合能を指標にファージの濃縮が行われた。具体的には、調製したファージライブラリ液に40 pmolのビオチン標識抗原を加えることによって、ファージライブラリを室温で60分間抗原と接触させた。BSAでブロッキングされた磁気ビーズが加えられ、抗原とファージとの複合体を磁気ビーズと室温で15分間結合させた。ビーズは1 mLの1.2 mM $CaCl_2$/TBSTと1.2 mM $CaCl_2$/TBSにて複数回洗浄された。その後抗原結合能を指標として濃縮する場合は、1mg/mLのトリプシン0.5mLが加えられたビーズは室温で15分懸濁された後、即座に磁気スタンドを用いてビーズが分離され、ファージ溶液が回収された。pH依存的抗原結合能を指標に濃縮する場合は、0.1mLの50mM MES/1.2mM $CaCl_2$/150mM NaCl (pH5.5) が加えられたビーズは室温で懸濁された後、即座に磁気スタンドを用いてビーズが分離され、回収されたファージ溶液に、100mg/mLのトリプシン5μLを加えることによって、Fabを提示しないファージのpIIIタンパク質（ヘルパーファージ由来のpIIIタンパク質）が切断され、Fabを提示しないファージの大腸菌に対する感染能を失わせた。回収されたファージが、対数増殖期（OD600が0.4-0.7）となった10 mLの大腸菌株ER2738に添加された。37℃で1時間緩やかに上記大腸菌の攪拌培養を行うことによって、ファージを大腸菌に感染させた。感染させた大腸菌は225 mm x 225 mmのプレートへ播種された。次に、播種された大腸菌の培養液からファージを回収することによってファージライブラリ液が回収された。抗原結合能もしくはpH依存的結合能を指標とするパンニングが2回繰り返された。

[0789] （２４－２）ファージELISAによる評価

上記の方法によって得られた大腸菌のシングルコロニーから、常法（Metho

ds Mol. Biol. (2002) 178, 133-145) に習い、ファージ含有培養上清が回収された。

[0790] 終濃度4%BSAおよびカルシウムイオン濃度1.2 mMとなるようBSAおよび$CaCl_2$が加えられたファージを含有する培養上清が以下の手順でELISAに供された。StreptaWell 96マイクロタイタープレート (Roche) がビオチン標識抗原を含む100μLのPBSにて一晩コートされた。当該プレートの各ウェルをPBST (0.1% Tween20を含むPBS) にて洗浄することによって抗原が除かれた後、当該ウェルが4% BSA-TBS 250μLにて1時間以上ブロッキングされた。4% BSA-TBSが除かれた各ウェルに調製された培養上清が加えられた当該プレートを37℃で1時間静置することによって、ファージを提示する抗体を各ウェルに存在する抗原に結合させた。1.2 mM $CaCl_2$/TBSTにて洗浄された各ウェルに、1.2 mM $CaCl_2$/TBS (pH7.6) もしくは1.2 mM $CaCl_2$/TBS (pH5.5) が加えられ、当該プレートは37℃で30分間静置しインキュベートされた。1.2 mM $CaCl_2$/TBSTにて洗浄された後に4% BSAおよびイオン化カルシウム濃度1.2 mMとしたTBSによって希釈されたHRP結合抗M13抗体 (Amersham Pharmacia Biotech) が各ウェルに添加されたプレートを１時間インキュベートさせた。1.2 mM $CaCl_2$/TBSTにて洗浄後、TMB single溶液 (ZYMED) が添加された各ウェル中の溶液の発色反応が、硫酸の添加により停止された後、450 nmの吸光度によって当該発色が測定された。

[0791] 抗原結合能を指標に濃縮した場合、パンニングを2回実施したものについてファージELISAを実施したところ、抗原特異的にELISA陽性となったものは96クローン中１７クローンであったため、パンニングを3回実施したものが解析された。一方、pH依存的抗原結合能を指標に濃縮した場合、パンニングを2回実施したものについてファージELISAを実施したところ、ELISA陽性となったものは94クローン中70クローンであったため、パンニングを2回実施したものが解析された。

[0792] 上記のファージELISAを実施したクローンに対し、特異的なプライマーを用いて増幅された遺伝子の塩基配列が解析された。

[0793] ファージELISAおよび配列解析の結果を以下の表５２に示した。

[0794] [表52]

ライブラリー	His ライブラリー１	His ライブラリー１
濃縮指標	抗原結合能	pH 依存的抗原結合能
パンニング回数	3	2
試験したクローン数	80	94
ELISA 陽性	76	70
ELISA 陽性クローン配列種類	30	67
pH 依存的結合クローン配列種類	22	47

[0795] 同様の方法により、ナイーブヒト抗体ファージディスプレイライブラリから、pH依存的抗原結合能をもつ抗体取得が行われた。抗原結合能を指標に濃縮した場合、88クローン評価中13種類のpH依存的結合抗体が取得された。またpH依存的抗原結合能を指標に濃縮した場合、83クローン評価中27種類のpH依存的結合抗体が取得された。

[0796] 以上の結果より、ナイーブヒト抗体ファージディスプレイライブラリと比較し、Hisライブラリ１のほうが得られるpH依存的抗原結合能をもつクローンのバリエーションが多いことが確認された。

[0797] （２４－３）抗体の発現と精製

ファージELISAの結果、pH依存的な抗原に対する結合能があると判断されたクローンが、動物細胞発現用プラスミドへ導入された。抗体の発現は以下の方法を用いて行われた。ヒト胎児腎細胞由来FreeStyle 293-F株（Invitrogen）がFreeStyle 293 Expression Medium培地（Invitrogen）に懸濁され、1.33 x 10^6細胞/mLの細胞密度で6ウェルプレートの各ウェルへ3 mLずつ蒔きこまれた。調製されたプラスミドは、リポフェクション法によって細胞へ導入された。CO_2インキュベーター（37度、8%CO_2、90 rpm）中で4日間培養が行われた。rProtein A SepharoseTM Fast Flow (Amersham Biosciences) を用いて当業者公知の方法を用いて、上記で得られた培養上清から抗体が精製された。分光光度計を用いて精製された抗体溶液の280 nmでの吸光度が測定された。P

ACE法により算出された吸光係数を用いることによって、得られた測定値から抗体濃度が算出された（Protein Science (1995) 4, 2411-2423）。

[0798] （２４－４）取得された抗体のヒトIL-6レセプターに対するpH依存的結合能の評価

（２４－３）で取得された抗体6RpH#01（重鎖配列番号：１１７、軽鎖配列番号：１１８）、および、6RpH#02（重鎖配列番号：１１９）、軽鎖配列番号：１２０）、および、6RpH#03（重鎖配列番号：１２１）、軽鎖配列番号：１２２）のヒトIL-6レセプターに対する結合活性がpH依存的であるかどうかを判断するため、これらの抗体とヒトIL-6レセプターとの相互作用がBiacore T100（GE Healthcare）を用いて解析された。ヒトIL-6レセプターに対するpH依存性の結合活性を有しない対照抗体として、トシリズマブ（重鎖配列番号：６０）、軽鎖配列番号：６１）が用いられた。中性域pHおよび酸性域pHの条件として、それぞれpH7.4およびpH6.0の溶液中で抗原抗体反応の相互作用が解析された。アミンカップリング法でprotein A/G（Invitrogen）が適当量固定化されたSensor chip CM5（GE Healthcare）上に、目的の抗体がそれぞれ300RU程度キャプチャーされた。ランニングバッファーには20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% (w/v) Tween20、1.2 mM $CaCl_2$ (pH7.4) または20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% (w/v) Tween20、1.2mM $CaCl_2$ (pH6.0) の2種類の緩衝液が用いられた。ヒトIL-6レセプターの希釈にもそれぞれのバッファーが使用された。測定は全て37℃で実施された。

[0799] 対照抗体であるトシリズマブ抗体、6RpH#01抗体および6RpH#02抗体および6RpH#03抗体を用いた抗原抗体反応の相互作用の解析に際して、IL-6レセプターの希釈液とブランクであるランニングバッファーを流速5μL/minで3分間インジェクトすることによって、センサーチップ上にキャプチャーさせたトシリズマブ抗体、6RpH#01抗体および6RpH#02抗体および6RpH#03抗体にIL-6レセプターを相互作用させた。その後、10 mM Glycine-HCl (pH1.5) を流速30μL/minで30秒間インジェクトすることによって、センサーチップが再生された。

[0800] 前記の方法により測定されたpH7.4におけるセンサーグラムを、図５９に示した。また同様の方法で取得されたpH6.0の条件下でのセンサーグラムを、図６０に示した。

[0801] 前記の結果から、6RpH#01抗体、6RpH#02抗体および6RpH#03抗体は、バッファー中のpHをpH7.4からpH6.0にすることで、IL6レセプターに対する結合能が大幅に低減することが観察された。

[0802] （参考実施例２５）ヒトFcγRの調製方法および改変抗体とヒトFcγRとの相互作用解析方法

ヒトFcγRの細胞外ドメインは以下の方法で調製された。まずFcγRの細胞外ドメインの遺伝子が当業者公知の方法で合成された。その際、各FcγRの配列としてNCBIに登録されている情報に基づき当該遺伝子が作製された。具体的には、FcγRIはNCBIのアクセッション番号NM_000566（バージョン番号NM_000566.3）の配列、FcγRIIaはNCBIのアクセッション番号NM_001136219（バージョン番号NM_001136219.1）の配列、FcγRIIbはNCBIのアクセッション番号NM_004001（バージョン番号NM_004001.3）の配列、FcγRIIIaはNCBIのアクセッション番号NM_001127593（バージョン番号NM_001127593.1）の配列、FcγRIIIbはNCBIのアクセッション番号NM_000570（バージョン番号NM_000570.3）の配列に基づいて、そのC末端にHisタグを付加して作製された。またFcγRIIa、FcγRIIIa、FcγRIIIbは多型が存在することが知られているが、FcγRIIaの多型部位はWarmerdamら（J. Exp. Med. (1990) 172, 19-25）、FcγRIIIaの多型部位はWuら（J. Clin. Invest. (1997) 100 (5), 1059-1070）、FcγRIIIbの多型部位はOryら（J. Clin. Invest. (1989) 84, 1688-1691）を参考にして作製された。

[0803] 得られた遺伝子断片が動物細胞発現ベクターに挿入された発現ベクターが作製された。作製された発現ベクターをヒト胎児腎癌細胞由来FreeStyle293細胞（Invitrogen社）に、一過性に導入し、目的タンパク質を発現させた。なお、結晶構造解析用に用いたFcγRIIbは、終濃度10 μg/mLのKifunesine存在下で目的タンパク質を発現させることによって、FcγRIIbに付加される糖

鎖が高マンノース型にされた。上記の一過性に導入された細胞の培養液から得られた培養上清を0.22μmフィルターに通した調製液は原則として次の4ステップで精製された。第1ステップは陽イオン交換カラムクロマトグラフィー（SP Sepharose FF）、第2ステップはHisタグに対するアフィニティカラムクロマトグラフィー（HisTrap HP）、第3ステップはゲルろ過カラムクロマトグラフィー（Superdex200）、第4ステップは無菌ろ過、で精製されたた。ただし、FcγRIの精製に際しては、第1ステップにQ sepharose FFを用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィーが用いられた。精製されたタンパク質の280 nmでの吸光度が分光光度計を用いて測定され、得られた測定値からPACE等の方法により算出された吸光係数を用いて精製タンパク質の濃度が算出された（Protein Science (1995) 4, 2411-2423）。

[0804] 各改変抗体と上記で調製されたFcγレセプターとの相互作用が、Biacore T100（GEヘルスケア）、Biacore T200（GEヘルスケア）、Biacore A100、Biacore 4000を用いて解析された。ランニングバッファーにはHBS-EP+（GEヘルスケア）が用いられた測定の温度は25℃に設定された。Series S Sensor Chip CM5（GEヘルスケア）またはSeries S sensor Chip CM4（GEヘルスケア）に、アミンカップリング法により抗原ペプチド、ProteinA（Thermo Scientific）、Protein A/G（Thermo Scientific）、Protein L（ACTIGENまたはBioVision）が固定化されたチップ、あるいは予めビオチン化された抗原ペプチドをSeries S Sensor Chip SA（certified）（GEヘルスケア）に相互作用させて当該ペプチドが固定化されたチップが用いられた。

[0805] これらのセンサーチップに目的の抗体をキャプチャーさせ、ランニングバッファーで希釈したFcγレセプターを相互作用させ、抗体に対する結合量を測定し、その測定値が抗体間で比較された。ただし、Fcγレセプターの結合量はキャプチャーした抗体の量に依存するため、各抗体のキャプチャー量でFcγレセプターの結合量を除した補正値が比較された。また、10 mM glycine-HCl、pH1.5を反応させることで、センサーチップにキャプチャーした抗体を洗浄し、センサーチップが再生して繰り返し用いられた。

[0806] また、各改変抗体のFcγRに対するKD値は以下の方法にしたがって速度論的に解析された。まず、上記のセンサーチップに目的の抗体をキャプチャーさせ、ランニングバッファーで希釈したFcγレセプターを相互作用させ、得られたセンサーグラムに対してBiacore Evaluation Softwareにより測定結果を1:1 Langmuir binding modelでglobal fittingさせることで算出された、結合速度定数ka（L/mol/s）、および解離速度定数kd（1/s）の値から解離定数KD（mol/L）が算出された。

[0807] また、各改変抗体とFcγRとの相互作用が微弱で、上記の速度論的な解析では正しく解析できないと判断された場合、Biacore T100 Software Handbook BR1006-48 Edition AEに記載の以下の1:1結合モデル式を利用してKDが算出された。

1:1 binding modelで相互作用する分子のBiacore上での挙動は以下の式４によって表わすことができる。

〔式４〕

$$R_{eq} = C \bullet R_{max} / (KD+C) + RI$$

Req: a plot of steady state binding levels against analyte concentration

C: concentration

RI: bulk refractive index contribution in the sample

Rmax: analyte binding capacity of the surface

[0808] この式を変形すると、KDは以下の式２のように表わすことができる。

〔式２〕

$$KD = C \bullet R_{max} / (R_{eq} - RI) - C$$

[0809] この式にRmax、RI、Cの値を代入することで、KDを算出することが可能である。RI、およびCは測定結果のセンサーグラム、測定条件から求められる。Rmaxは、以下の方法にしたがって算出された。上記の1:1 Langmuir binding modelでglobal fittingさせた際に得られた、その測定回に同時に評価された比

較対象として用いられる相互作用が十分強い抗体のRmaxの値を、比較対象となる抗体のセンサーチップへのキャプチャー量で除し、評価したい改変抗体のキャプチャー量で乗じて得られた値がRmaxとして用いられた。

[0810] （参考実施例２６）mFcγRの調製方法

マウスのFcγRの細胞外ドメインは以下の方法で調製された。まずFcγRの細胞外ドメインの遺伝子が当業者公知の方法で合成された。その際、各FcγRの配列としてNCBIに登録されている情報に基づき当該遺伝子が作製された。具体的には、mFcγRIはNCBI Reference Sequence: NP_034316.1、mFcγRIIはNCBI Reference Sequence: NP_034317.1、mFcγRIIIはNCBI Reference Sequence: NP_034318.2、mFcγRIVはNCBI Reference Sequence: NP_653142.2の配列に基づいて作製し、そのC末端にHisタグを付加して作製された。

[0811] 上記の一過性に導入された細胞の培養液から得られた培養上清を0.22μmフィルターに通した調製液は原則として次の4ステップで精製された。第1ステップは陽イオン交換カラムクロマトグラフィー（SP Sepharose FF）、第2ステップはHisタグに対するアフィニティカラムクロマトグラフィー（HisTrap HP）、第3ステップはゲルろ過カラムクロマトグラフィー（Superdex200）、第4ステップは無菌ろ過、で精製されたた。ただし、FcγRIの精製に際しては、第1ステップにQ sepharose FFを用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィーが用いられた。精製されたタンパク質の280 nmでの吸光度が分光光度計を用いて測定され、得られた測定値からPACE等の方法により算出された吸光係数を用いて精製タンパク質の濃度が算出された（Protein Science (1995) 4, 2411-2423）。

[0812] 得られた遺伝子断片が動物細胞発現ベクターに挿入された発現ベクターが作製された。作製された発現ベクターをヒト胎児腎癌細胞由来FreeStyle293細胞（Invitrogen社）に、一過性に導入し、目的タンパク質を発現させた。上記の一過性に導入された細胞の培養液から得られた培養上清を0.22μmフィルターを通した調製液は原則として次の4ステップで精製された。第1ステップはイオン交換カラムクロマトグラフィー、第2ステップはHisタグに対する

アフィニティカラムクロマトグラフィー（HisTrap HP）、第3ステップはゲルろ過カラムクロマトグラフィー（Superdex200）、第4ステップは無菌ろ過、で精製された。ただし、第1ステップのイオン交換カラムクロマトグラフィとして、mFcγRIの精製に際してはQ Sepharose HP、mFcγRIIおよびmFcγRIVの精製に際してはSP Sepharose FF、mFcγRIIIの精製に際してはSP Sepharose HPが用いられた。また第3ステップ以降では溶媒としてはD-PBS(-)が用いられたが、mFcγRIIIの精製に際して同溶媒としては0.1M Arginineを含むD-PBS(-)が用いられた。精製されたタンパク質の280 nmでの吸光度が分光光度計を用いて測定され、得られた測定値からPACE等の方法により算出された吸光係数を用いて精製タンパク質の濃度が算出された（Protein Science (1995) 4：2411-2423）。

[0813] （参考実施例２７）リウマチ因子への結合抑制改変

（２７－１）Fv4-YTE、Fv4-N434HおよびLS改変体のリウマチ因子への結合抑制

pH酸性域でのFcRnへの結合が改善され血漿中滞留性が向上したFv4-YTE、Fv4-N434HおよびLS改変体のリウマチ因子への結合を抑制する目的で、これらの改変体に対してQ438R/S440E改変またはS424N改変が導入された。具体的には表５３で示される新規なFc改変体が作製された。まずこれらの改変体のpH6.0におけるFcRnへの結合親和性が評価された。その結果を表５３に示した。

[0814] [表53]

改変体名	KD (M)	改変
IgG1	2.4E-06	なし
YTE	2.1E-07	M252Y/S254T/T256E
F1166	2.1E-07	M252Y/S254T/T256E/Q438R/S440E
F1167	2.5E-07	M252Y/S254T/T256E/S424N
LS	1.6E-07	M428L/N434S
F1170	1.5E-07	M428L/N434S/Q438R/S440E
F1171	2.4E-07	S424N/M428L/N434S
N434H	4.3E-07	N434H
F1172	4.0E-07	N434H/Q438R/S440E
F1173	5.3E-07	S424N/N434H

[0815] 次に、これらの改変体（Fv4-F1166、F1167、F1172、F1173、F1170およびF1171）のリウマチ因子に対する結合が評価された。リウマチ因子に対する結合

アッセイはpH7.4において電気化学発光法（electrochemiluminescene、ECL）によって実施された。本アッセイには15または30のリウマチ患者の血清（Protogenex）が用いられた。50倍希釈された血清試料、ビオチン標識された被験抗体（1μg/mL）、SULFO-TAG NHSエステル標識された被験抗体（1μg/mL）の混合液が室温にて3時間インキュベートされた。次に、当該混合液が各ウェルに分注されたストレプトアビジンでコートされたMULTI-ARRAY 96ウェルプレート（Meso Scale Discovery）が室温で2時間インキュベートされた後に、その各ウェルが洗浄された。Read Buffer（x4）が各ウェルに分注された当該プレートがSECTOR imager 2400 Reader（Meso Scale Discovery）に装着された。各ウェルの化学発光が測定された。

[0816] その結果を図６１に示した。90216Sおよび90214Sドナーの血清中のリウマチ因子に対して強い結合活性を示すYTE改変体に比較して、F1166（Q438R/S440E）およびF1167（S424N）改変体はリウマチ因子に対する結合が強く抑制された。さらにS424N改変を含むF1173およびF1171改変体も、N434HおよびLS改変体によってそれぞれもたらされるリウマチ因子の結合が強く抑制されていた。しかしながら、Q438R/S440E改変によってN434HおよびLS改変体によってそれぞれもたらされるリウマチ因子の結合を完全に抑制することはできず、１または２のドナーの血清中のリウマチ因子に結合した。

[0817] （２７－２）LS改変体のリウマチ因子への結合抑制

Fv4-LSに新規な一つの改変が導入されたFc改変体が表５４に示すように作製された。このうち、pH6.0におけるFcRn結合が維持されている改変体（Fv4-F1380、F1384-F1386、F1388およびF1389）のリウマチ因子に対する結合が実施例（２７－１）に記載された方法に準じて評価された。その結果を図６２に示した。これらの改変体はドナーの血清中のリウマチ因子に対する結合が強く抑制されていた。特にY436Tを含むFv4-F1389は天然のIgG1と同程度のリウマチ因子に対する結合を示した。

[0818]

[表54]

改変体名	KD (M)	改変
F22 (LS)	7.1E-08	M428L/N434S
F1380	7.3E-08	S426D/M428L/N434S
F1381	8.6E-08	S426E/M428L/N434S
F1382	1.3E-07	S426K/M428L/N434S
F1383	1.6E-07	S426R/M428L/N434S
F1384	8.6E-08	S426A/M428L/N434S
F1385	7.7E-08	S426Q/M428L/N434S
F1386	1.6E-07	S426Y/M428L/N434S
F1387	1.5E-07	M428L/N434S/Y436M
F1388	8.0E-08	M428L/N434S/Y436F
F1389	6.8E-08	M428L/N434S/Y436T
F1390	4.0E-07	M428L/N434S/Y436H
F1391	4.2E-07	M428L/N434S/Y436N
F1392	2.7E-07	M428L/N434S/Y436K

[0819] 上記に示されるように、pH酸性域の条件下においてFcRnに対する結合活性を低下させることなく、リウマチ因子に対する結合活性のみを低下させる改変を、Fc領域の当該部位に導入することにより、リウマチ因子に対する結合性を持たずにpH酸性域の条件下におけるヒトFcRnに対する結合活性が増強している抗原結合分子を作製することが可能である。

[0820] そのような、リウマチ因子に対する結合活性を低下させる改変として、EUナンバリングで表される248-257、305-314、342-352、380-386、388、414-421、423、425-437、439、441-444位の改変が用いられる。好ましくは、EUナンバリングで表される387、422、424、426、433、436、438、440位の改変が好ましく用いられる。特に好ましくは、EUナンバリングで表される422位のValをGluまたはSerに置換する改変、424位のSerをArgに置換する改変、433位のHisをAspに置換する改変、436位のTyrをThrへ置換する改変、438位のGlnをArgまたはLysに置換する改変、440位のSerをGluまたはAspに置換する改変が用いられる。これらの改変は、単独で用いられても良いし、複数箇所を組み合わせて用いても良い。

[0821] あるいは、リウマチ因子に対する結合活性を低下させるために、N型糖鎖の付加配列を導入しても良い。具体的には、N型糖鎖付加配列としてAsn-Xxx-Ser/Thr（XxxはProを除く任意のアミノ酸）が知られているが、この配列をFc領域に導入することによりN型糖鎖を付加させ、N型糖鎖の立体障害によってRF

との結合を阻害することが可能である。N型糖鎖を付加するための改変として、好ましくは、EUナンバリングで表される248位のLysをAsnに置換する改変、424位のSerをAsnに置換する改変、436位のTyrをAsnに置換し438位のGlnをThrに置換する改変、438位のQlnをAsnに置換する改変が用いられる。特に好ましくは、EUナンバリングで表される424位のSerをAsnに置換する改変が用いられる。

産業上の利用可能性

[0822] 本発明によって、抗原結合分子による抗原の細胞内への取込を促進させる方法、1分子の抗原結合分子が結合できる抗原の数を増加させる方法、その投与により血漿中の抗原濃度の減少を促進させる方法が提供された。抗原結合分子による抗原の細胞内への取込が促進されることで、抗原結合分子の投与により抗原の血漿中の抗原濃度の減少を促進させることが可能となるとともに、抗原結合分子の薬物動態を改善することが可能となり、1分子の抗原結合分子が結合できる抗原の数を増加させることが可能となり、インビボにおいて通常の抗原結合分子よりも優れた効果を発揮させることができる。

請求の範囲

[請求項1] pH酸性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性を有し、イオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン、およびpH中性域の条件下でFcγレセプターに対する結合活性が、EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgGのFc領域のFcγレセプターに対する結合活性よりも高いFcγレセプター結合ドメインを含む抗原結合分子を含む医薬組成物。

[請求項2] 前記抗原が、可溶型抗原である請求項１に記載の医薬組成物。

[請求項3] 前記イオン濃度が、カルシウムイオン濃度である請求項１または２に記載の医薬組成物。

[請求項4] 前記抗原結合ドメインが、低カルシウムイオン濃度の条件下での当該抗原に対する結合活性よりも高カルシウムイオン濃度の条件下での抗原に対する結合活性が高い抗原結合ドメインである請求項３に記載の医薬組成物。

[請求項5] 前記イオン濃度の条件が、pHの条件である請求項１または２に記載の医薬組成物。

[請求項6] 前記抗原結合ドメインが、pH酸性域の条件下での当該抗原に対する結合活性よりもpH中性域の条件下での抗原に対する結合活性が高い抗原結合ドメインである請求項５に記載の医薬組成物。

[請求項7] 前記抗原結合分子が、前記抗原に対する中和活性を有する抗原結合分子である請求項１から６のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項8] 前記Fcγレセプター結合ドメインが、抗体のFc領域を含む請求項１から７のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項9] 前記Fc領域が、Fc領域のEUナンバリングで表される部位のうち、221位、222位、223位、224位、225位、227位、228位、230位、231位、232位、233位、234位、235位、236位、237位、238位、239位、240位、241位、243位、244位、245位、246位、247位、249位、250位、251位、254位、255位、256位、258位、260位、262位、263位、264位、265位

、266位、267位、268位、269位、270位、271位、272位、273位、274位、275位、276位、278位、279位、280位、281位、282位、283位、284位、285位、286位、288位、290位、291位、292位、293位、294位、295位、296位、297位、298位、299位、300位、301位、302位、303位、304位、305位、311位、313位、315位、317位、318位、320位、322位、323位、324位、325位、326位、327位、328位、329位、330位、331位、332位、333位、334位、335位、336位、337位、339位、376位、377位、378位、379位、380位、382位、385位、392位、396位、421位、427位、428位、429位、434位、436位および440位の群から選択される少なくともひとつ以上のアミノ酸が、天然型Fc領域の対応する部位のアミノ酸と異なるFc領域である請求項８に記載の医薬組成物。

[請求項10] 前記Fc領域が、Fc領域のEUナンバリングで表される部位のうち；

221位のアミノ酸がLysまたはTyrのいずれか、

222位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはTyrのいずれか、

223位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはLysのいずれか、

224位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはTyrのいずれか、

225位のアミノ酸がGlu、LysまたはTrpのいずれか、

227位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

228位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

230位のアミノ酸がAla、Glu、GlyまたはTyrのいずれか、

231位のアミノ酸がGlu、Gly、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

232位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

233位のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

234位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

235位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

236位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

237位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

238位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

239位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

240位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

241位のアミノ酸がAsp、Glu、Leu、Arg、TrpまたはTyrのいずれか、

243位のアミノ酸がLeu、Glu、Leu、Gln、Arg、TrpまたはTyrのいずれか、

244位のアミノ酸がHis、

245位のアミノ酸がAla、

246位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、

247位のアミノ酸がAla、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

249位のアミノ酸がGlu、His、GlnまたはTyrのいずれか、

250位のアミノ酸がGluまたはGlnのいずれか、

251位のアミノ酸がPhe、

254位のアミノ酸がPhe、MetまたはTyrのいずれか、

255位のアミノ酸がGlu、LeuまたはTyrのいずれか、

256位のアミノ酸がAla、MetまたはProのいずれか、

258位のアミノ酸がAsp、Glu、His、SerまたはTyrのいずれか、

260位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、

262位のアミノ酸がAla、Glu、Phe、IleまたはThrのいずれか、

263位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

264位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、

Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、

265位のアミノ酸がAla、Leu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

266位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

267位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

268位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Thr、ValまたはTrpのいずれか、

269位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

270位のアミノ酸がGlu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、

271位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

272位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

273位のアミノ酸がPheまたはIleのいずれか、

274位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

275位のアミノ酸がLeuまたはTrpのいずれか、

276位のアミノ酸が、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

278位のアミノ酸がAsp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、ValまたはTrpのいずれか、

279位のアミノ酸がAla、

280位のアミノ酸がAla、Gly、His、Lys、Leu、Pro、Gln、TrpまたはTyrのいずれか、

281位のアミノ酸がAsp、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

282位のアミノ酸がGlu、Gly、Lys、ProまたはTyrのいずれか、
283位のアミノ酸がAla、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、ArgまたはTyrのいずれか、
284位のアミノ酸がAsp、Glu、Leu、Asn、ThrまたはTyrのいずれか、
285位のアミノ酸がAsp、Glu、Lys、Gln、TrpまたはTyrのいずれか、
286位のアミノ酸がGlu、Gly、ProまたはTyrのいずれか、
288位のアミノ酸がAsn、Asp、GluまたはTyrのいずれか、
290位のアミノ酸がAsp、Gly、His、Leu、Asn、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、291位のアミノ酸がAsp、Glu、Gly、His、Ile、GlnまたはThrのいずれか、
292位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Pro、ThrまたはTyrのいずれか、
293位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、
294位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、
295位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、
296位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、ThrまたはValのいずれか、
297位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、
298位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、
299位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、TrpまたはTyrのいずれか、
300位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、ValまたはTrpのいずれか、
301位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、

302位のアミノ酸がIle、

303位のアミノ酸がAsp、GlyまたはTyrのいずれか、

304位のアミノ酸がAsp、His、Leu、AsnまたはThrのいずれか、

305位のアミノ酸がGlu、Ile、ThrまたはTyrのいずれか、

311位のアミノ酸がAla、Asp、Asn、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

313位のアミノ酸がPhe、

315位のアミノ酸がLeu、

317位のアミノ酸がGluまたはGln、

318位のアミノ酸がHis、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

320位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Asn、Pro、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

322位のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Pro、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

323位のアミノ酸がIle、

324位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

325位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

326位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

327位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

328位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

329位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

330位のアミノ酸がCys、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、

Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

331位のアミノ酸がAsp、Phe、His、Ile、Leu、Met、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

332位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

333位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Ser、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

334位のアミノ酸がAla、Glu、Phe、Ile、Leu、ProまたはThrのいずれか、

335位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

336位のアミノ酸がGlu、LysまたはTyrのいずれか、

337位のアミノ酸がGlu、HisまたはAsnのいずれか、

339位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、SerまたはThrのいずれか、

376位のアミノ酸がAlaまたはValのいずれか、

377位のアミノ酸がGlyまたはLysのいずれか、

378位のアミノ酸がAsp、

379位のアミノ酸がAsn、

380位のアミノ酸がAla、AsnまたはSerのいずれか、

382位のアミノ酸がAlaまたはIleのいずれか、

385位のアミノ酸がGlu、

392位のアミノ酸がThr、

396位のアミノ酸がLeu、

421位のアミノ酸がLys、

427位のアミノ酸がAsn、

428位のアミノ酸がPheまたはLeuのいずれか、

429位のアミノ酸がMet、

434位のアミノ酸がTrp、

436位のアミノ酸がIle、および

440位のアミノ酸がGly、His、Ile、LeuまたはTyrのいずれか、

の群から選択される少なくともひとつ以上のアミノ酸を含むFc領域である請求項９に記載の医薬組成物。

[請求項11] 前記EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgGのFc領域が、EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgG1、天然型ヒトIgG2、天然型ヒトIgG3または天然型ヒトIgG4のいずれかのFc領域である請求項１から１０のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項12] 前記ヒトFcγレセプターが、FcγRIa、FcγRIIa(R)、FcγRIIa(H)、FcγRIIb、FcγRIIIa(V)、またはFcγRIIIa(F)である請求項１から１１のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項13] 前記ヒトFcγレセプターが、FcγRIIbである請求項１から１１のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項14] 前記Fc領域が、Fc領域のEUナンバリングで表される部位のうち；

238位のアミノ酸がAsp、または

328位のアミノ酸がGlu、

の少なくとも一つ以上のアミノ酸を含むFc領域である請求項８から１３のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項15] pH酸性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性を有し、イオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン、およびpH中性域の条件下でFcγレセプターに対する結合活性が、EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgGのFc領域のFcγレセプターに対する結合活性よりも高いFcγレセプター結合ドメインを含む抗原結合分子を、Fcγレセプターを発現する細胞に生体内または生体外で細胞に接触させる工程を含む、以下(i)～(vi)のいずれかの方法；

（i）一分子の抗原結合分子が結合できる抗原の数を増加させる方法、
（ii）血漿中抗原を消失させる方法、
（iii）抗原結合分子の薬物動態を改善する方法、
（iv）細胞外で抗原結合分子に結合した抗原の細胞内での抗原結合分子からの解離を促進する方法、
（v）抗原と結合していない状態での抗原結合分子の細胞外への放出を促進する方法、または
（vi）血漿中の総抗原濃度または遊離抗原濃度を減少させる方法。

[請求項16] 前記抗原が、可溶型抗原である請求項１５に記載の方法。

[請求項17] 前記イオン濃度が、カルシウムイオン濃度である請求項１５または１６に記載の方法。

[請求項18] 前記抗原結合ドメインが、低カルシウムイオン濃度の条件下での当該抗原に対する結合活性よりも高カルシウムイオン濃度の条件下での抗原に対する結合活性が高い抗原結合ドメインである請求項１７に記載の方法。

[請求項19] 前記イオン濃度の条件が、pHの条件である請求項１５または１６に記載の方法。

[請求項20] 前記抗原結合ドメインが、pH酸性域の条件下での当該抗原に対する結合活性よりもpH中性域の条件下での抗原に対する結合活性が高い抗原結合ドメインである請求項１９に記載の方法。

[請求項21] 前記抗原結合分子が、前記抗原に対する中和活性を有する抗原結合分子である請求項１５から２０のいずれか一項に記載の方法。

[請求項22] 前記Fcγレセプター結合ドメインが、抗体のFc領域を含む請求項１５から２１のいずれか一項に記載の方法。

[請求項23] 前記Fc領域が、Fc領域のEUナンバリングで表される部位のうち、221位、222位、223位、224位、225位、227位、228位、230位、231位、232位、233位、234位、235位、236位、237位、238位、239位、240位、241位、243位、244位、245位、246位、247位、249位、250位、251位、

254位、255位、256位、258位、260位、262位、263位、264位、265位、266位、267位、268位、269位、270位、271位、272位、273位、274位、275位、276位、278位、279位、280位、281位、282位、283位、284位、285位、286位、288位、290位、291位、292位、293位、294位、295位、296位、297位、298位、299位、300位、301位、302位、303位、304位、305位、311位、313位、315位、317位、318位、320位、322位、323位、324位、325位、326位、327位、328位、329位、330位、331位、332位、333位、334位、335位、336位、337位、339位、376位、377位、378位、379位、380位、382位、385位、392位、396位、421位、427位、428位、429位、434位、436位および440位の群から選択される少なくともひとつ以上のアミノ酸が、天然型Fc領域の対応する部位のアミノ酸と異なるFc領域である請求項２２に記載の方法。

［請求項24］ 前記Fc領域が、Fc領域のEUナンバリングで表される部位のうち；

221位のアミノ酸がLysまたはTyrのいずれか、

222位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはTyrのいずれか、

223位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはLysのいずれか、

224位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはTyrのいずれか、

225位のアミノ酸がGlu、LysまたはTrpのいずれか、

227位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

228位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

230位のアミノ酸がAla、Glu、GlyまたはTyrのいずれか、

231位のアミノ酸がGlu、Gly、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

232位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

233位のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

234位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

235位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、

Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

236位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

237位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

238位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

239位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

240位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

241位のアミノ酸がAsp、Glu、Leu、Arg、TrpまたはTyrのいずれか、

243位のアミノ酸がLeu、Glu、Leu、Gln、Arg、TrpまたはTyrのいずれか、

244位のアミノ酸がHis、

245位のアミノ酸がAla、

246位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、

247位のアミノ酸がAla、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

249位のアミノ酸がGlu、His、GlnまたはTyrのいずれか、

250位のアミノ酸がGluまたはGlnのいずれか、

251位のアミノ酸がPhe、

254位のアミノ酸がPhe、MetまたはTyrのいずれか、

255位のアミノ酸がGlu、LeuまたはTyrのいずれか、

256位のアミノ酸がAla、MetまたはProのいずれか、

258位のアミノ酸がAsp、Glu、His、SerまたはTyrのいずれか、

260位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、

262位のアミノ酸がAla、Glu、Phe、IleまたはThrのいずれか、

263位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

264位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、

265位のアミノ酸がAla、Leu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

266位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

267位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

268位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Thr、ValまたはTrpのいずれか、

269位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

270位のアミノ酸がGlu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、

271位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

272位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

273位のアミノ酸がPheまたはIleのいずれか、

274位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

275位のアミノ酸がLeuまたはTrpのいずれか、

276位のアミノ酸が、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

278位のアミノ酸がAsp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、ValまたはTrpのいずれか、

279位のアミノ酸がAla、

280位のアミノ酸がAla、Gly、His、Lys、Leu、Pro、Gln、TrpまたはTyrのいずれか、

281位のアミノ酸がAsp、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

282位のアミノ酸がGlu、Gly、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

283位のアミノ酸がAla、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、ArgまたはTyrのいずれか、

284位のアミノ酸がAsp、Glu、Leu、Asn、ThrまたはTyrのいずれか、

285位のアミノ酸がAsp、Glu、Lys、Gln、TrpまたはTyrのいずれか、

286位のアミノ酸がGlu、Gly、ProまたはTyrのいずれか、

288位のアミノ酸がAsn、Asp、GluまたはTyrのいずれか、

290位のアミノ酸がAsp、Gly、His、Leu、Asn、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、291位のアミノ酸がAsp、Glu、Gly、His、Ile、GlnまたはThrのいずれか、

292位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Pro、ThrまたはTyrのいずれか、

293位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

294位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

295位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

296位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、ThrまたはValのいずれか、

297位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

298位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

299位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

300位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、ValまたはTrpのいずれか、

301位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、

302位のアミノ酸がIle、

303位のアミノ酸がAsp、GlyまたはTyrのいずれか、

304位のアミノ酸がAsp、His、Leu、AsnまたはThrのいずれか、

305位のアミノ酸がGlu、Ile、ThrまたはTyrのいずれか、

311位のアミノ酸がAla、Asp、Asn、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

313位のアミノ酸がPhe、

315位のアミノ酸がLeu、

317位のアミノ酸がGluまたはGln、

318位のアミノ酸がHis、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

320位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Asn、Pro、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

322位のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Pro、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

323位のアミノ酸がIle、

324位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

325位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

326位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

327位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

328位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

329位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

330位のアミノ酸がCys、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

331位のアミノ酸がAsp、Phe、His、Ile、Leu、Met、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

332位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

333位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Ser、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

334位のアミノ酸がAla、Glu、Phe、Ile、Leu、ProまたはThrのいずれか、

335位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

336位のアミノ酸がGlu、LysまたはTyrのいずれか、

337位のアミノ酸がGlu、HisまたはAsnのいずれか、

339位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、SerまたはThrのいずれか、

376位のアミノ酸がAlaまたはValのいずれか、

377位のアミノ酸がGlyまたはLysのいずれか、

378位のアミノ酸がAsp、

379位のアミノ酸がAsn、

380位のアミノ酸がAla、AsnまたはSerのいずれか、

382位のアミノ酸がAlaまたはIleのいずれか、

385位のアミノ酸がGlu、

392位のアミノ酸がThr、

396位のアミノ酸がLeu、

421位のアミノ酸がLys、

427位のアミノ酸がAsn、

428位のアミノ酸がPheまたはLeuのいずれか、

429位のアミノ酸がMet、

434位のアミノ酸がTrp、

436位のアミノ酸がIle、および

440位のアミノ酸がGly、His、Ile、LeuまたはTyrのいずれか、

の群から選択される少なくともひとつ以上のアミノ酸を含むFc領域である請求項２３に記載の方法。

[請求項25] 前記EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgGのFc領域が、EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgG1、天然型ヒトIgG2、天然型ヒトIgG3または天然型ヒトIgG4のいずれかのFc領域である請求項１５から２４のいずれか一項に記載の方法。

[請求項26] 前記ヒトFcγレセプターが、FcγRIa、FcγRIIa(R)、FcγRIIa(H)、FcγRIIb、FcγRIIIa(V)、またはFcγRIIIa(F)である請求項１５から２５のいずれか一項に記載の方法。

[請求項27] 前記ヒトFcγレセプターが、FcγRIIbである請求項１５から２５のいずれか一項に記載の方法。

[請求項28] 前記Fc領域が、Fc領域のEUナンバリングで表される部位のうち；

238位のアミノ酸がAsp、または

328位のアミノ酸がGlu、

の少なくとも一つ以上のアミノ酸を含むFc領域である請求項２２から２７のいずれか一項に記載の方法。

[請求項29] pH酸性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性を有し、イオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン、およびFcγレセプター結合ドメインを含む抗原結合分子におけるFcγレセプター結合ドメインのpH中性域の条件下でのFcγレセプターに対する結合活性を、EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgGのFc領域のpH中性域の条件下でのFcγレセプターに対する結合活性よりも増強する工程を含む、以下(i)～(vii)

のいずれかに記載の方法；

（i）結合する抗原の細胞内への取込が促進された抗原結合分子の改変方法、

（ii）一分子の抗原結合分子が結合できる抗原の数を増加させる方法、

（iii）抗原結合分子の血漿中抗原消失能を増大させる方法、

（iv）抗原結合分子の薬物動態を改善する方法、

（v）細胞外で抗原結合分子に結合した抗原の細胞内での抗原結合分子からの解離を促進する方法、

（vi）抗原と結合した状態で細胞内に取り込まれた抗原結合分子の、抗原と結合していない状態での細胞外への放出を促進する方法、または

（vii）血漿中の総抗原濃度または遊離抗原濃度を減少することができる抗原結合分子の改変方法。

［請求項30］ 前記抗原が、可溶型抗原である請求項２９に記載の方法。

［請求項31］ 前記イオン濃度が、カルシウムイオン濃度である請求項２９または３０に記載の方法。

［請求項32］ 前記抗原結合ドメインが、低カルシウムイオン濃度の条件下での当該抗原に対する結合活性よりも高カルシウムイオン濃度の条件下での抗原に対する結合活性が高い抗原結合ドメインである請求項３１に記載の方法。

［請求項33］ 前記イオン濃度の条件が、pHの条件である請求項２９または３０に記載の方法。

［請求項34］ 前記抗原結合ドメインが、pH酸性域の条件下での当該抗原に対する結合活性よりもpH中性域の条件下での抗原に対する結合活性が高い抗原結合ドメインである請求項３３に記載の方法。

［請求項35］ 前記抗原結合分子が、前記抗原に対する中和活性を有する抗原結合分子である請求項２９から３４のいずれか一項に記載の方法。

[請求項36] 前記Fcγレセプター結合ドメインが、抗体のFc領域を含む請求項２９から３５のいずれか一項に記載の方法。

[請求項37] 前記Fc領域が、Fc領域のEUナンバリングで表される部位のうち、221位、222位、223位、224位、225位、227位、228位、230位、231位、232位、233位、234位、235位、236位、237位、238位、239位、240位、241位、243位、244位、245位、246位、247位、249位、250位、251位、254位、255位、256位、258位、260位、262位、263位、264位、265位、266位、267位、268位、269位、270位、271位、272位、273位、274位、275位、276位、278位、279位、280位、281位、282位、283位、284位、285位、286位、288位、290位、291位、292位、293位、294位、295位、296位、297位、298位、299位、300位、301位、302位、303位、304位、305位、311位、313位、315位、317位、318位、320位、322位、323位、324位、325位、326位、327位、328位、329位、330位、331位、332位、333位、334位、335位、336位、337位、339位、376位、377位、378位、379位、380位、382位、385位、392位、396位、421位、427位、428位、429位、434位、436位および440位の群いずれかひとつ以上のアミノ酸が、天然型Fc領域の対応する部位のアミノ酸と異なるFc領域である請求項３６に記載の方法。

[請求項38] 前記Fc領域が、Fc領域のEUナンバリングで表される部位のうち；

221位のアミノ酸がLysまたはTyrのいずれか、

222位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはTyrのいずれか、

223位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはLysのいずれか、

224位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはTyrのいずれか、

225位のアミノ酸がGlu、LysまたはTrpのいずれか、

227位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

228位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

230位のアミノ酸がAla、Glu、GlyまたはTyrのいずれか、

231位のアミノ酸がGlu、Gly、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

232位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

233位のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

234位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

235位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

236位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

237位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

238位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

239位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

240位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

241位のアミノ酸がAsp、Glu、Leu、Arg、TrpまたはTyrのいずれか、

243位のアミノ酸がLeu、Glu、Leu、Gln、Arg、TrpまたはTyrのいずれか、

244位のアミノ酸がHis、

245位のアミノ酸がAla、

246位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、

247位のアミノ酸がAla、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

249位のアミノ酸がGlu、His、GlnまたはTyrのいずれか、

250位のアミノ酸がGluまたはGlnのいずれか、

251位のアミノ酸がPhe、

254位のアミノ酸がPhe、MetまたはTyrのいずれか、

255位のアミノ酸がGlu、LeuまたはTyrのいずれか、

256位のアミノ酸がAla、MetまたはProのいずれか、

258位のアミノ酸がAsp、Glu、His、SerまたはTyrのいずれか、

260位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、

262位のアミノ酸がAla、Glu、Phe、IleまたはThrのいずれか、

263位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

264位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、

265位のアミノ酸がAla、Leu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

266位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

267位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

268位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Thr、ValまたはTrpのいずれか、

269位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

270位のアミノ酸がGlu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、

271位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

272位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

273位のアミノ酸がPheまたはIleのいずれか、

274位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

275位のアミノ酸がLeuまたはTrpのいずれか、

276位のアミノ酸が、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro

、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

278位のアミノ酸がAsp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、ValまたはTrpのいずれか、

279位のアミノ酸がAla、

280位のアミノ酸がAla、Gly、His、Lys、Leu、Pro、Gln、TrpまたはTyrのいずれか、

281位のアミノ酸がAsp、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

282位のアミノ酸がGlu、Gly、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

283位のアミノ酸がAla、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、ArgまたはTyrのいずれか、

284位のアミノ酸がAsp、Glu、Leu、Asn、ThrまたはTyrのいずれか、

285位のアミノ酸がAsp、Glu、Lys、Gln、TrpまたはTyrのいずれか、

286位のアミノ酸がGlu、Gly、ProまたはTyrのいずれか、

288位のアミノ酸がAsn、Asp、GluまたはTyrのいずれか、

290位のアミノ酸がAsp、Gly、His、Leu、Asn、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、291位のアミノ酸がAsp、Glu、Gly、His、Ile、GlnまたはThrのいずれか、

292位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Pro、ThrまたはTyrのいずれか、

293位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

294位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

295位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

296位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、ThrまたはValのいずれか、

297位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

298位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

299位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

300位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、ValまたはTrpのいずれか、

301位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、

302位のアミノ酸がIle、

303位のアミノ酸がAsp、GlyまたはTyrのいずれか、

304位のアミノ酸がAsp、His、Leu、AsnまたはThrのいずれか、

305位のアミノ酸がGlu、Ile、ThrまたはTyrのいずれか、

311位のアミノ酸がAla、Asp、Asn、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

313位のアミノ酸がPhe、

315位のアミノ酸がLeu、

317位のアミノ酸がGluまたはGln、

318位のアミノ酸がHis、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

320位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Asn、Pro、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

322位のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Pro、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

323位のアミノ酸がIle、

324位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

325位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

326位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

327位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

328位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

329位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

330位のアミノ酸がCys、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

331位のアミノ酸がAsp、Phe、His、Ile、Leu、Met、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

332位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

333位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Ser、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

334位のアミノ酸がAla、Glu、Phe、Ile、Leu、ProまたはThrのいずれか、

335位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

336位のアミノ酸がGlu、LysまたはTyrのいずれか、

337位のアミノ酸がGlu、HisまたはAsnのいずれか、

339位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、SerまたはThrのいずれか、

376位のアミノ酸がAlaまたはValのいずれか、

377位のアミノ酸がGlyまたはLysのいずれか、

378位のアミノ酸がAsp、

379位のアミノ酸がAsn、

380位のアミノ酸がAla、AsnまたはSerのいずれか、

382位のアミノ酸がAlaまたはIleのいずれか、

385位のアミノ酸がGlu、

392位のアミノ酸がThr、

396位のアミノ酸がLeu、

421位のアミノ酸がLys、

427位のアミノ酸がAsn、

428位のアミノ酸がPheまたはLeuのいずれか、

429位のアミノ酸がMet、

434位のアミノ酸がTrp、

436位のアミノ酸がIle、および

440位のアミノ酸がGly、His、Ile、LeuまたはTyrのいずれか、

の群から選択される少なくともひとつ以上のアミノ酸を含むFc領域である請求項３７に記載の方法。

[請求項39] 前記EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgGのFc領域が、EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgG1、天然型ヒトIgG2、天然型ヒトIgG3または天然型ヒトIgG4のいずれかのFc領域である請求項２９から３８のいずれか一項に記載の方法。

[請求項40] 前記ヒトFcγレセプターが、FcγRIa、FcγRIIa(R)、FcγRIIa(H)、FcγRIIb、FcγRIIIa(V)、またはFcγRIIIa(F)である請求項２９から３９のいずれか一項に記載の方法。

[請求項41] 前記ヒトFcγレセプターが、FcγRIIbである請求項２９から３９のいずれか一項に記載の方法。

[請求項42] 前記Fc領域が、Fc領域のEUナンバリングで表される部位のうち；

238位のアミノ酸がAsp、または

328位のアミノ酸がGlu、

の少なくとも一つ以上のアミノ酸を含むFc領域である請求項３６から４１のいずれか一項に記載の方法。

[請求項43] 以下(a)～(f)の工程、

(a) 高カルシウムイオン濃度の条件における抗原結合ドメインの抗原に対する結合活性を得る工程、

(b) 低カルシウムイオン濃度の条件における抗原結合ドメインの抗原に対する結合活性を得る工程、

(c) (a)で得られた抗原結合活性が(b)で得られた抗原結合活性より高い抗原結合ドメインを選択する工程、

(d) (c)で選択された抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドを、pH酸性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性を有し、pH中性域の条件下でFcγレセプターに対する結合活性が、EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgGのFc領域のFcγレセプターに対する結合活性よりも高いFcγレセプター結合ドメインをコードするポリヌクレオチドに連結させる工程、

(e) (d)で得られたポリヌクレオチドが作用可能に連結されたベクターが導入された細胞を培養する工程、および

(f) (e)で培養された細胞の培養液から抗原結合分子を回収する工程、

を含む抗原結合分子の製造方法。

[請求項44] 以下(a)～(f)の工程、

(a) 高カルシウムイオン濃度の条件における抗体の抗原に対する結合活性を得る工程、

(b) 低カルシウムイオン濃度の条件における抗体の抗原に対する結合活性を得る工程、

(c) (a)で得られた抗原結合活性が(b)で得られた抗原結合活性より高い抗体を選択する工程、

(d) (c)で選択された抗体の抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドを、pH酸性域においてヒトFcRnに対する結合活性を有し、pH中性域の条件下でFcγレセプターに対する結合活性が、EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgGのFc

領域のFcγレセプターに対する結合活性よりも高いFcγレセプター結合ドメインをコードするポリヌクレオチドに連結させる工程、

(e) (d)で得られたポリヌクレオチドが作用可能に連結されたベクターが導入された細胞を培養する工程、および

(f) (e)で培養された細胞の培養液から抗原結合分子を回収する工程、

を含む抗原結合分子の製造方法。

[請求項45] 以下(a)～(f)の工程、

(a) pH中性域の条件における抗原結合ドメインの抗原に対する結合活性を得る工程、

(b) pH酸性域の条件における抗原結合ドメインの抗原に対する結合活性を得る工程、

(c) (a)で得られた抗原結合活性が(b)で得られた抗原結合活性より高い抗原結合ドメインを選択する工程、

(d) (c)で選択された抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドを、pH酸性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性を有し、pH中性域の条件下でFcγレセプターに対する結合活性が、EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgGのFc領域のFcγレセプターに対する結合活性よりも高いFcγレセプター結合ドメインをコードするポリヌクレオチドに連結させる工程、

(e) (d)で得られたポリヌクレオチドが作用可能に連結されたベクターが導入された細胞を培養する工程、および

(f) (e)で培養された細胞の培養液から抗原結合分子を回収する工程、

を含む抗原結合分子の製造方法。

[請求項46] 以下(a)～(f)の工程、

(a) pH中性域の条件における抗体の抗原に対する結合活性を得る工程、

(b) pH酸性域の条件における抗体の抗原に対する抗原結合活性を得る工程、

(c) (a)で得られた抗原結合活性が(b)で得られた抗原結合活性より高い抗体を選択する工程、

(d) (c)で選択された抗体の抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドを、pH酸性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性を有し、pH中性域の条件下でFcγレセプターに対する結合活性が、EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgGのFc領域のFcγレセプターに対する結合活性よりも高いFcγレセプター結合ドメインをコードするポリヌクレオチドに連結させる工程、

(e) (d)で得られたポリヌクレオチドが作用可能に連結されたベクターが導入された細胞を培養する工程、および

(f) (e)で培養された細胞の培養液から抗原結合分子を回収する工程、

を含む抗原結合分子の製造方法。

[請求項47] 前記抗原が、可溶型抗原である請求項４３から４６のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項48] 前記Fcγレセプター結合ドメインが、抗体のFc領域を含む請求項４３から４７のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項49] 前記Fc領域が、Fc領域のEUナンバリングで表される部位のうち、221位、222位、223位、224位、225位、227位、228位、230位、231位、232位、233位、234位、235位、236位、237位、238位、239位、240位、241位、243位、244位、245位、246位、247位、249位、250位、251位、254位、255位、256位、258位、260位、262位、263位、264位、265位、266位、267位、268位、269位、270位、271位、272位、273位、274位、275位、276位、278位、279位、280位、281位、282位、283位、284位、285位、286位、288位、290位、291位、292位、293位、294位、295位、296位、297位、298位、299位、300位、301位、302位、303位、

304位、305位、311位、313位、315位、317位、318位、320位、322位、323位、324位、325位、326位、327位、328位、329位、330位、331位、332位、333位、334位、335位、336位、337位、339位、376位、377位、378位、379位、380位、382位、385位、392位、396位、421位、427位、428位、429位、434位、436位および440位の群から選択される少なくともひとつ以上のアミノ酸が、天然型Fc領域の対応する部位のアミノ酸と異なるFc領域である請求項４８に記載の製造方法。

[請求項50] 前記Fc領域が、Fc領域のEUナンバリングで表される部位のうち；

221位のアミノ酸がLysまたはTyrのいずれか、

222位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはTyrのいずれか、

223位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはLysのいずれか、

224位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはTyrのいずれか、

225位のアミノ酸がGlu、LysまたはTrpのいずれか、

227位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

228位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

230位のアミノ酸がAla、Glu、GlyまたはTyrのいずれか、

231位のアミノ酸がGlu、Gly、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

232位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

233位のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

234位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

235位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

236位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

237位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

238位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

239位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

240位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

241位のアミノ酸がAsp、Glu、Leu、Arg、TrpまたはTyrのいずれか、

243位のアミノ酸がLeu、Glu、Leu、Gln、Arg、TrpまたはTyrのいずれか、

244位のアミノ酸がHis、

245位のアミノ酸がAla、

246位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、

247位のアミノ酸がAla、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

249位のアミノ酸がGlu、His、GlnまたはTyrのいずれか、

250位のアミノ酸がGluまたはGlnのいずれか、

251位のアミノ酸がPhe、

254位のアミノ酸がPhe、MetまたはTyrのいずれか、

255位のアミノ酸がGlu、LeuまたはTyrのいずれか、

256位のアミノ酸がAla、MetまたはProのいずれか、

258位のアミノ酸がAsp、Glu、His、SerまたはTyrのいずれか、

260位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、

262位のアミノ酸がAla、Glu、Phe、IleまたはThrのいずれか、

263位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

264位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、

265位のアミノ酸がAla、Leu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

266位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、

267位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

268位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Thr、ValまたはTrpのいずれか、

269位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

270位のアミノ酸がGlu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、

271位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

272位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

273位のアミノ酸がPheまたはIleのいずれか、

274位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

275位のアミノ酸がLeuまたはTrpのいずれか、

276位のアミノ酸が、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

278位のアミノ酸がAsp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、ValまたはTrpのいずれか、

279位のアミノ酸がAla、

280位のアミノ酸がAla、Gly、His、Lys、Leu、Pro、Gln、TrpまたはTyrのいずれか、

281位のアミノ酸がAsp、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

282位のアミノ酸がGlu、Gly、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

283位のアミノ酸がAla、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、ArgまたはTyrのいずれか、

284位のアミノ酸がAsp、Glu、Leu、Asn、ThrまたはTyrのいずれか、

285位のアミノ酸がAsp、Glu、Lys、Gln、TrpまたはTyrのいずれか、

286位のアミノ酸がGlu、Gly、ProまたはTyrのいずれか、

288位のアミノ酸がAsn、Asp、GluまたはTyrのいずれか、

290位のアミノ酸がAsp、Gly、His、Leu、Asn、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、291位のアミノ酸がAsp、Glu、Gly、His、Ile、GlnまたはThrのいずれか、

292位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Pro、ThrまたはTyrのいずれか、

293位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

294位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

295位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

296位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、ThrまたはValのいずれか、

297位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

298位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

299位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

300位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、ValまたはTrpのいずれか、

301位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、

302位のアミノ酸がIle、

303位のアミノ酸がAsp、GlyまたはTyrのいずれか、

304位のアミノ酸がAsp、His、Leu、AsnまたはThrのいずれか、

305位のアミノ酸がGlu、Ile、ThrまたはTyrのいずれか、

311位のアミノ酸がAla、Asp、Asn、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

313位のアミノ酸がPhe、

315位のアミノ酸がLeu、

317位のアミノ酸がGluまたはGln、

318位のアミノ酸がHis、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

320位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Asn、Pro、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

322位のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Pro、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

323位のアミノ酸がIle、

324位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

325位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

326位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

327位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

328位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

329位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

330位のアミノ酸がCys、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

331位のアミノ酸がAsp、Phe、His、Ile、Leu、Met、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

332位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Lys、Leu、Met、

Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、
333位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Ser、Thr、ValまたはTyrのいずれか、
334位のアミノ酸がAla、Glu、Phe、Ile、Leu、ProまたはThrのいずれか、
335位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Val、TrpまたはTyrのいずれか、
336位のアミノ酸がGlu、LysまたはTyrのいずれか、
337位のアミノ酸がGlu、HisまたはAsnのいずれか、
339位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、SerまたはThrのいずれか、
376位のアミノ酸がAlaまたはValのいずれか、
377位のアミノ酸がGlyまたはLysのいずれか、
378位のアミノ酸がAsp、
379位のアミノ酸がAsn、
380位のアミノ酸がAla、AsnまたはSerのいずれか、
382位のアミノ酸がAlaまたはIleのいずれか、
385位のアミノ酸がGlu、
392位のアミノ酸がThr、
396位のアミノ酸がLeu、
421位のアミノ酸がLys、
427位のアミノ酸がAsn、
428位のアミノ酸がPheまたはLeuのいずれか、
429位のアミノ酸がMet、
434位のアミノ酸がTrp、
436位のアミノ酸がIle、および
440位のアミノ酸がGly、His、Ile、LeuまたはTyrのいずれか、
の群から選択される少なくともひとつ以上のアミノ酸を含むFc領域で

ある請求項４９に記載の製造方法。

[請求項51] 前記EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgGのFc領域が、EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgG1、天然型ヒトIgG2、天然型ヒトIgG3または天然型ヒトIgG4のいずれかのFc領域である請求項４３から５０のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項52] 前記ヒトFcγレセプターが、FcγRIa、FcγRIIa(R)、FcγRIIa(H)、FcγRIIb、FcγRIIIa(V)、またはFcγRIIIa(F)である請求項４３から５１のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項53] 前記ヒトFcγレセプターが、FcγRIIbである請求項４３から５１のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項54] 前記Fc領域が、Fc領域のEUナンバリングで表される部位のうち；
238位のアミノ酸がAsp、または
328位のアミノ酸がGlu、
の少なくとも一つ以上のアミノ酸を含むFc領域である請求項４８から５３のいずれか一項に記載の製造方法。