明　細　書

発明の名称 ： イオン濃度依存性結合分子ライブラリ

技術分野

[0001] 関連する出願

本出願は、日本特許出願2011-218006（2011年9月30日出願）および2012-123479（2012年5月30日出願）に基づく優先権を主張しており、これらの内容は本明細書に参照として取り込まれる。

[0002] 発明の分野

本発明は、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分子のライブラリおよびその製造方法、そのような抗原結合分子の選択方法および製造方法、ならびにそのような抗原結合分子を含む医薬組成物に関する。

背景技術

[0003] 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、非特許文献2）。一方、第2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、抗体の薬物動態を向上する方法と、抗体と抗原の親和性（アフィニティー）を向上する方法が考えられる。

[0004] 抗体の薬物動態を向上させる方法として、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、5）。抗原結合能、抗原中和能を増強させる技術として、アフィニティー成熟化技術（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への結合

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での薬効を向上させることも可能である（非特許文献7）。

[0005] 一方、抗体1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1分子の抗体で1分子の抗原（2価の場合は2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1分子の抗体で1分子の抗原（2価の場合は2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向上、あるいは、アフィニティー成熟化技術だけでは、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、1つの抗体で複数の抗原を中和する必要がある。

[0006] 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）。この文献は、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。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、1つの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。

[0007] 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。血漿中滞留性が長い抗体がこのような血漿中滞留性が短い抗原に結合すると、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。このような場合、抗体の抗原に対するアフィニティーを向上させても抗原の血漿中からの消失を促進することはできない。上述のpH依存的抗原結合抗体は、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方法としても有効であることが報告されている（特許文献1）。

[0008] このようにpH依存的抗原結合抗体は1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。既存の抗体配列を置換することによって抗原に対するpH依存的な結合活性を付与することができる。一方、こうした抗体を新たに取得するためには、免疫動物から抗体を取得する方法またはヒト抗体ライブラリから抗体を取得する方法において下記のような制限が考えられる。

[0009] 非ヒト動物を免疫する方法では、pH依存的結合抗体を得られる可能性はあるものの、多種類の抗原に対するpH依存的抗原結合抗体を短期間に得ること、あるいは特定のエピトープに特異的に結合する抗体を選択的に得ること、が困難な場合がある。また、ヒト抗体ライブラリの中からpH依存的な抗原に対する結合能を指標に抗体を濃縮することが可能である。しかし、一般的に（Kabatデータベースに登録された）ヒト抗体の抗体可変領域部分におけるヒスチジン残基の出現頻度は、重鎖CDR1では5.9%、重鎖CDR2では1.4%、重鎖CDR3では1.6%、軽鎖CDR1では1.5%、軽鎖CDR2では0.5%、軽鎖CDR3では2.2%と高くないことが知られており、ヒト抗体ライブラリ中にpH依存的抗原結合能を持ち得る配列は非常に少ないと考えられる。よって、抗原との結合部位におけるヒスチジン出現頻度を高めたpH依存的な抗原に対する結合能を持ち得る配列を多く含む抗体ライブラリの提供が望まれている。

[0010] 一方、抗原の血漿中からの消失を促進する等の効果は、pH以外の血漿中と

早期エンドソーム内の環境間において異なる要素に対する抗原に対する結合能の依存性を付与することができれば達成できると考えられる。

[0011] なお、本発明の先行技術文献を以下に示す。

先行技術文献

特許文献

[0012] 特許文献1：WO2009125825

非特許文献

[0013] 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), 631-6

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 affinity fully human monoclonal antibody to interleukin-8, Biochem. Biophys. Res. Commun. (2005) 334 (4), 1004-13.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0014] 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、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、前記抗原結合分子をコードする複数のポリヌクレオチド分子を含む組成物、前記ポリヌクレオチド分子を含む複数のベクターを含む組成物、前記抗原結合分子の選択方法、前記ポリヌクレオチド分子の単離方法、前記抗原結合分子の製造方法、前記抗原結合分子を含む医薬組成物を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0015] 本発明者らは、生体内の環境要素の相違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を含むライブラリについて鋭意研究を行った。その結果、本発明者らは、血漿中と早期エンドソ

ーム内におけるイオン濃度、特にカルシウムイオン濃度の差異やpHに着目し、カルシウム依存的またはpH依存的な抗原に対する結合活性を有する抗原結合分子を用いることで、抗原結合分子による抗原の細胞内への取込みの促進、血漿中の抗原濃度の減少をもたらす抗原結合分子から主としてなるライブラリが作製可能であることを見出した。

[0016] すなわち本発明は、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、前記抗原結合分子をコードする複数のポリヌクレオチド分子を含む組成物、前記ポリヌクレオチド分子を含む複数のベクターを含む組成物、前記抗原結合分子の選択方法、前記ポリヌクレオチド分子の単離方法、前記抗原結合分子の製造方法、前記抗原結合分子を含む医薬組成物等に関する。より具体的には、以下に関する。

〔１〕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であって、前記抗原結合分子中の抗原結合ドメインは、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を含むことを特徴とするライブラリ、

〔２〕イオン濃度が、カルシウムイオン濃度である〔１〕に記載のライブラリ、

〔３〕前記アミノ酸残基が前記抗原結合分子の重鎖の抗原結合ドメインに含まれている〔２〕に記載のライブラリ、

〔４〕重鎖の抗原結合ドメインが重鎖可変領域である〔３〕に記載のライブラリ、

〔５〕前記アミノ酸残基が重鎖可変領域のCDR3に含まれている〔４〕に記載のライブラリ、

〔６〕前記アミノ酸残基が重鎖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〔２〕から〔５〕のいずれかに記載のライブラリ、

〔７〕前記アミノ酸残基以外のアミノ酸配列がナイーブ配列のアミノ酸配列を含む〔２〕から〔６〕のいずれかに記載のライブラリ、

〔８〕前記抗原結合分子の軽鎖可変領域がナイーブ配列のアミノ酸配列を含む〔３〕から〔７〕のいずれかに記載のライブラリ、

〔９〕前記アミノ酸残基が前記抗原結合分子の軽鎖の抗原結合ドメインに含まれている〔２〕に記載のライブラリ、

〔１０〕軽鎖の抗原結合ドメインが軽鎖可変領域である〔９〕に記載のライブラリ、

〔１１〕前記アミノ酸残基が軽鎖可変領域のCDR1に含まれている〔１０〕に記載のライブラリ、

〔１２〕前記アミノ酸残基が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〔１１〕に記載のライブラリ、

〔１３〕前記アミノ酸残基が軽鎖可変領域のCDR2に含まれている〔１０〕から〔１２〕のいずれかに記載のライブラリ、

〔１４〕前記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〔１３〕に記載のライブラリ、

〔１５〕前記アミノ酸残基が軽鎖のCDR3である〔１０〕から〔１４〕のいずれかに記載のライブラリ、

〔１６〕前記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〔１５〕に記載のライブラリ、

〔１７〕前記抗原結合分子の軽鎖のフレームワークが生殖細胞系列のフレームワーク配列を含む〔２〕または〔９〕から〔１６〕のいずれかに記載のライブラリ、

〔１８〕前記抗原結合分子の重鎖可変領域がナイーブ配列のアミノ酸配列を含む請求項〔２〕または〔９〕から〔１７〕のいずれかに記載のライブラリ、

〔１９〕前記アミノ酸残基が、カルシウム結合モチーフを形成する〔１〕から〔１８〕のいずれかに記載のライブラリ、

〔２０〕カルシウム結合モチーフが、カドヘリンドメイン、EFハンド、C2ドメイン、Glaドメイン、C型レクチン、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、Vk5の部分、配列番号１０、配列番号１１のいずれかのカルシウム結合モチーフである〔１９〕に記載のライブラリ、

〔２１〕前記アミノ酸残基が、金属キレート作用を有するアミノ酸である〔２〕から〔２０〕のいずれかに記載のライブラリ、

〔２２〕金属キレート作用を有するアミノ酸が、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のいずれかひとつ以上のアミノ酸である〔２１〕に記載のライブラリ、

〔２３〕イオン濃度の条件がpHである〔１〕に記載のライブラリ、

〔２４〕前記アミノ酸残基が前記抗原結合分子の重鎖の抗原結合ドメインに含まれている〔２３〕に記載のライブラリ、

〔２５〕重鎖の抗原結合ドメインが重鎖可変領域である〔２４〕に記載のライブラリ、

〔２６〕前記アミノ酸残基が重鎖可変領域のKabatナンバリングで表される27位、31位、32位、33位、35位、50位、52位、53位、55位、57位、58位、59位、61位、62位、95位、96位、97位、98位、99位、100a位、100b位、100d位、100f位、100h位、102位または107位のいずれか一つ以上に含まれている〔２５〕に記載のライブラリ、

〔２７〕重鎖可変領域のKabatナンバリングで表される27位、31位、32位、33位、35位、50位、52位、53位、55位、57位、58位、59位、61位、62位、95位、96位、97位、98位、99位、100a位、100b位、100d位、100f位、100h位、102位または107位のいずれかのアミノ酸残基以外のアミノ酸配列がナイーブ配列のアミノ酸配列を含む〔２６〕に記載のライブラリ、

〔２８〕前記抗原結合分子の軽鎖可変領域が生殖細胞系列の配列を含む〔２３〕から〔２７〕のいずれかに記載のライブラリ、

〔２９〕前記アミノ酸残基が前記抗原結合分子の軽鎖の抗原結合ドメインに

含まれている〔２３〕に記載のライブラリ、

〔３０〕軽鎖の抗原結合ドメインが軽鎖可変領域である〔２９〕に記載のライブラリ、

〔３１〕前記アミノ酸残基が軽鎖可変領域のKabatナンバリングで表される24位、27位、28位、30位、31位、32位、34位、50位、51位、52位、53位、54位、55位、56位、89位、90位、91位、92位、93位、94位または95a位のいずれか一つ以上に含まれている〔３０〕に記載のライブラリ、

〔３２〕前記アミノ酸残基が軽鎖可変領域のCDR1に含まれている〔３０〕または〔３１〕に記載のライブラリ、

〔３３〕前記アミノ酸残基が軽鎖のCDR1のKabatナンバリングで表される24位、27位、28位、30位、31位、32位または34位のいずれか一つ以上に含まれている〔３２〕に記載のライブラリ、

〔３４〕前記アミノ酸残基が軽鎖のCDR2に含まれている〔３０〕から〔３３〕のいずれかに記載のライブラリ、

〔３５〕前記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、51位、52位、53位、54位、55位または56位のいずれか一つ以上に含まれている〔３４〕に記載のライブラリ、

〔３６〕前記アミノ酸残基が軽鎖のCDR3に含まれている〔３０〕から〔３５〕のいずれかに記載のライブラリ、

〔３７〕前記アミノ酸残基が軽鎖のCDR3のKabatナンバリングで表される89位、90位、91位、92位、93、94位または95a位のいずれか一つ以上に含まれている〔３６〕に記載のライブラリ、

〔３８〕軽鎖のフレームワークが生殖細胞系列のフレームワーク配列を含む〔２９〕から〔３７〕のいずれかに記載のライブラリ、

〔３９〕重鎖可変領域がナイーブ配列である〔２９〕から〔３８〕のいずれかに記載のライブラリ、

〔４０〕前記アミノ酸残基が、側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸である〔２３〕から〔３９〕のいずれかに記載のライブラリ、

〔４１〕前記アミノ酸残基が、グルタミン酸である〔２３〕から〔４０〕のいずれかに記載のライブラリ、

〔４２〕前記アミノ酸残基が、側鎖のpKaが5.5-7.0であるアミノ酸である〔２３〕から〔３９〕に記載のライブラリ、

〔４３〕前記アミノ酸残基が、ヒスチジンである〔２３〕から〔４０〕または〔４２〕のいずれかに記載のライブラリ、

〔４４〕〔１〕から〔４３〕のいずれかに記載の抗原結合分子を含む複数の融合ポリペプチドから主としてなるライブラリであって、前記融合ポリペプチドは抗原結合分子の重鎖可変領域とウイルスコートタンパク質の少なくとも一部とが融合したものであることを特徴とするライブラリ、

〔４５〕前記ウイルスコートタンパク質がタンパク質pIII、主コートタンパク質pVIII、pVII、pIX、Soc、Hoc、gpD、pv1およびその変異体からなる群から選択される、〔４４〕に記載されるライブラリ、

〔４６〕〔１〕から〔４３〕に記載される互いに配列の異なる抗原結合分子もしくは請求項〔４４〕または〔４５〕に記載される互いに配列の異なる融合ポリペプチドを各々コードする複数のポリヌクレオチド分子を含む組成物、

〔４７〕〔４６〕に記載される複数のポリヌクレオチド分子を作用可能なように連結されている状態で各々含む複数のベクターを含む組成物、

〔４８〕ベクターが複製可能な発現ベクターである、〔４７〕に記載の組成物、〔４９〕複製可能な発現ベクターが、lac Zプロモーター系、アルカリフォスファターゼpho Aプロモーター（Ap）、バクテリオファージλPLプロモーター（温度感受性プロモーター）、tacプロモーター、トリプトファンプロモーター、pBADプロモーターおよびバクテリオファージT7プロモーターからなる群から選択されるプロモーター領域が発現ベクターにおいて前記ポリヌクレオチドが作用可能なように連結されている〔４８〕に記載の組成物、

〔５０〕複製可能な発現ベクターが、M13、f1、fd、Pf3ファージもしくはその誘導体、またはラムダ型ファージもしくはその誘導体である、〔４８〕ま

たは〔４９〕に記載の組成物、

〔５１〕〔４７〕から〔５０〕のいずれかに記載されるベクターを各々含む複数のウイルスを含む組成物、

〔５２〕〔１〕から〔４３〕に記載される互いに配列の異なる抗原結合分子もしくは請求項〔４４〕または〔４５〕に記載される互いに配列の異なる融合ポリペプチドが各々その表面に提示されている複数のウイルスを含む組成物、

〔５３〕〔１〕から〔４３〕に記載される互いに配列の異なる抗原結合分子もしくは請求項〔４４〕または〔４５〕に記載される互いに配列の異なる融合ポリペプチドを含むライブラリであって、1×10^{6}ないし1×10^{14}の互いに異なる可変領域配列を有するライブラリ、

〔５４〕1×10^{8}以上の互いに異なる可変領域配列を有する〔５３〕に記載のライブラリ、

〔５５〕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の作製方法であって、前記抗原結合分子中の抗原結合ドメインが、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を含むよう設計された複数の抗原結合分子中を製造することを含む方法、

〔５６〕前記抗原結合分子が〔２〕から〔４３〕のいずれかに記載の抗原結合分子である〔５５〕に記載の作製方法、

〔５７〕前記抗原結合分子の重鎖可変領域がウイルスコートタンパク質の少なくとも一部と融合している、〔５５〕または〔５６〕の作製方法、

〔５８〕前記ウイルスコートタンパク質がタンパク質pIII、主コートタンパク質pVIII、pVII、pIX、Soc、Hoc、gpD、pv1およびその変異体からなる群から選択される、〔５５〕から〔５７〕のいずれかに記載の作製方法、

〔５９〕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分子を選択する方法であって、

a)〔１〕から〔４３〕のいずれかに記載される互いに配列の異なる抗原結合

分子もしくは〔４４〕または〔４５〕のいずれかに記載される互いに配列の異なる融合ポリペプチドから主としてなるライブラリを作製するステップ、

b）前記ライブラリをイオン濃度の異なる二以上の条件下において抗原に接触させるステップ、

c）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分子の集団を前記ライブラリから分画するステップ、

d）c）において分画された集団から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分子を単離するステップ、

とを含む方法、

〔６０〕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分子をコードするポリヌクレオチドを単離する方法であって、

a）〔１〕から〔４３〕のいずれかに記載される互いに配列の異なる抗原結合分子もしくは〔４４〕または〔４５〕のいずれかに記載される互いに配列の異なる融合ポリペプチドを各々コードする複数のポリヌクレオチドを作用可能なように連結されている状態で各々含む複数の複製可能な発現ベクターを含むライブラリを作製するステップ、

b）前記ライブラリに含まれる各々の発現ベクターが導入された複数のウイルスの表面に、前記ポリヌクレオチドによりコードされる前記互いに配列の異なる抗原結合分子または融合ポリペプチドを発現するステップ、

c）前記複数のウイルスをイオン濃度の異なる二以上の条件下において抗原に接触させるステップ、

d）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ウイルスの集団を前記ライブラリから分画するステップ、

e）d）において分画されたウイルスの集団から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ウイルスを単離するステップ、

f）単離されたウイルスからポリヌクレオチドを単離するステップ、

とを含む方法、

〔６１〕追加的に前記c）からd）のステップを少なくとも1回反復する〔６０

〕に記載の方法、

〔６２〕イオン濃度がカルシウムイオン濃度である〔５９〕から〔６１〕のいずれかに記載の方法、

〔６３〕低カルシウム濃度の条件での抗原に対する結合活性が高カルシウム濃度の条件での結合活性よりも低下する抗原結合分子を選択する〔６２〕に記載の方法、

〔６４〕低カルシウム濃度の条件が0.1μMから30μMである〔６３〕に記載の方法、

〔６５〕高カルシウム濃度の条件が100μMから10　mMである〔６３〕または〔６４〕に記載の方法、

〔６６〕イオン濃度の条件がpHである〔５９〕から〔６１〕のいずれかに記載の方法、

〔６７〕pH酸性域条件での抗原に対する結合活性がpH中性域条件での結合活性よりも低下する抗原結合分子を選択する〔６６〕に記載の方法、

〔６８〕pH酸性域条件がpH4.0から6.5である〔６６〕に記載の方法、

〔６９〕pH中性域条件がpH6.7から10.0である〔６７〕または〔６８〕に記載の方法、

〔７０〕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分子の製造方法であって、

a）〔１〕から〔４３〕のいずれかに記載される互いに配列の異なる抗原結合分子もしくは〔４４〕または〔４５〕のいずれかに記載される互いに配列の異なる融合ポリペプチドを各々コードする複数のポリヌクレオチドを作用可能なように連結されている状態で各々含む複数の複製可能な発現ベクターを含むライブラリを作製するステップ、

b）前記ライブラリに含まれる各々の発現ベクターが導入された複数のウイルスの表面に、前記ポリヌクレオチドによりコードされる前記互いに配列の異なる抗原結合分子または融合ポリペプチドを発現するステップ、

c）前記複数のウイルスをイオン濃度の異なる二以上の条件下において抗原に

接触させるステップ、

d）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ウイルスの集団を前記ライブラリから分画するステップ、

e）d）において分画されたウイルスの集団から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ウイルスを単離するステップ、

f）単離されたウイルスからポリヌクレオチドを単離するステップ、

g）単離されたポリヌクレオチドが作用可能なように連結されている状態で挿入されたベクターが導入された宿主細胞を培養するステップ、

h）g）で培養された培養液から抗原結合分子を回収するステップ、

とを含む製造方法、

〔７１〕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分子の製造方法であって、

a）〔１〕から〔４３〕のいずれかに記載される互いに配列の異なる抗原結合分子もしくは〔４４〕または〔４５〕のいずれかに記載される互いに配列の異なる融合ポリペプチドを各々コードする複数のポリヌクレオチドを作用可能なように連結されている状態で各々含む複数の複製可能な発現ベクターを含むライブラリを作製するステップ、

b）前記ライブラリに含まれる各々の発現ベクターが導入された複数のウイルスの表面に、前記ポリヌクレオチドによりコードされる前記互いに配列の異なる抗原結合分子または融合ポリペプチドを発現するステップ、

c）前記複数のウイルスをイオン濃度の異なる二以上の条件下において抗原に接触させるステップ、

d）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ウイルスの集団を前記ライブラリから分画するステップ、

e）d）において分画されたウイルスの集団から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ウイルスを単離するステップ、

f）単離されたウイルスからポリヌクレオチドを単離するステップ、

g）単離されたポリヌクレオチドをインフレームで抗体定常領域をコードする

ポリヌクレオチドと連結するステップ、

h）g）において連結されたポリヌクレオチドが作用可能なように連結されている状態で挿入されたベクターが導入された宿主細胞を培養するステップ、

i）h）で培養された培養液から抗原結合分子を回収するステップ、

とを含む製造方法、

〔７２〕追加的に前記c）からd）のステップを少なくとも1回反復する〔７０〕または〔７１〕に記載の製造方法、

〔７３〕イオン濃度がカルシウムイオン濃度である〔７０〕から〔７２〕のいずれかに記載の製造方法、

〔７４〕低カルシウム濃度の条件での抗原に対する結合活性が高カルシウム濃度の条件での結合活性よりも低下する抗原結合分子を選択する〔７３〕に記載の製造方法、

〔７５〕低カルシウム濃度の条件が0.1μMから30μMである〔７４〕に記載の製造方法、

〔７６〕高カルシウム濃度の条件が100μMから10　mMである〔７４〕または〔７５〕に記載の製造方法、

〔７７〕イオン濃度の条件がpHの条件である〔７０〕から〔７２〕のいずれかに記載の製造方法、

〔７８〕pH酸性域条件での抗原に対する結合活性がpH中性域条件での結合活性よりも低下する抗原結合分子を選択する〔７７〕に記載の製造方法、

〔７９〕pH酸性域条件がpH4.0から6.5である〔７８〕に記載の製造方法、

〔８０〕pH中性域条件がpH6.7から10.0である〔７８〕または〔７９〕に記載の製造方法、

〔８１〕〔７０〕から〔８０〕のいずれかに記載の製造方法によって製造された抗原結合分子、

〔８２〕〔８１〕に記載の抗原結合分子またはその改変体を含む医薬組成物を提供するものである。

図面の簡単な説明

[0017] [図1]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）との関係を示すグラフである。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2]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。横軸は時間、縦軸はRU値を示す。

[図3]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。横軸は時間、縦軸はRU値を示す。

[図4A]pH依存的結合抗体の血漿中（pH7.4）とエンドソーム内（pH6.0）の抗原への相互作用の様式を示す図である。

[図4B]カルシウム依存的結合抗体の血漿中（Ca^{2+} 2mM）とエンドソーム内（Ca^{2+} 3μM）の抗原への相互作用の様式を示す図である。

[図4C]pHおよびカルシウム依存的結合抗体の血漿中（Ca^{2+} 2mM）とエンドソーム内（Ca^{2+} 3μM）の抗原への相互作用の様式を示す図である。

[図5]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：４および軽鎖：hVk5-2、配列番号：１に配列番号：２６が融合されたもの）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：４）、軽鎖：hVk5-2__L65（配列番号：５））のクロマトグラムを表す。

[図6]LfVk1__Ca配列を含む抗体（重鎖：GC__H、配列番号：４８および軽鎖：LfVk1__Ca、配列番号：４３）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。

[図7]LfVk1_Ca配列を含む抗体（重鎖：GC_H、配列番号：４８および軽鎖：LfVk1_Ca、配列番号：４３）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：４８および軽鎖：LfVk1_Ca6、配列番号：４９）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。

[図8]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）との関係を示すグラフである。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9]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。横軸は時間、縦軸はRU値を示す。

[図10]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。横軸は時間、縦軸はRU値を示す。

[図11]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。(i)は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、(ii)は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を示す図である。

[図12]Biacoreを用いた抗ヒトIgA抗体のCa^{2+}1.2 mM およびCa^{2+} 3μM におけるヒトIgAへの相互作用を示すセンサーグラムを示す図である。

[図13]ELISA法を用いた抗ヒトグリピカン3抗体のCa^{2+}1.2 mM およびCa^{2+} 3μM における組み換えヒトグリピカン3への相互作用を示す図である。

[図14]Biacoreを用いた抗マウスIgA抗体のpH7.4 およびpH5.8 におけるマ

ウスIgAへの相互作用を示すセンサーグラムを示す図である。実線はpH7.4、破線はpH5.8の条件を表す。

[図15]Biacoreを用いた抗ヒトHMGB1抗体のpH7.4 およびpH5.8 におけるヒトHMGB1への相互作用を示すセンサーグラムを示す図である。実線はpH7.4、破線はpH5.8の条件を表す。

[図16]H54/L28-IgG1抗体、FH4-IgG1抗体、および、6RL#9-IgG1抗体のノーマルマウスの血漿中の抗体濃度の推移を示す図である。

[図17]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18]H54/L28-N434W抗体、FH4-N434W抗体、および、6RL#9-N434W抗体のノーマルマウスの血漿中の抗体濃度の推移を示す図である。

[図19]H54/L28-N434W抗体、FH4-N434W抗体、および、6RL#9-N434W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。

発明を実施するための形態

[0018] 本発明の開示によって、イオン濃度等の条件によって抗原に対する結合活性が変化す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が提供される。また、本発明の開示によって、金属イオン濃度および/または水素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の新規で体系的な製造方法が提供される。そのようなライブラリは、例えば、金属イオン濃度および/または水素イオン濃度の条件に応じた望ましい活性、例えば結合親和性およびアビディティーのある合成の抗原結合分子のクローンを選択および/またはスクリーニングするために役立つ、組合せライブラリとして使用され得る。

[0019] これらのライブラリは、多種多様な対象抗原のいずれかと相互作用することのできる抗原結合分子のポリペプチドの配列を同定するために有用である

。例えば、ファージディスプレイとして発現する本発明の多様化された抗原結合分子のポリペプチドを含んでいるライブラリは、目的とする抗原結合分子の選択および/またはスクリーニングに特に有用であり、またそのための高スループットの、効率的で自動化可能な系が本発明によって提供される。本発明の方法にしたがえば、対象抗原に対して条件依存的に結合する抗原結合分子を提供し得る。さらに本発明によって当該抗原結合分子を有効成分として含む医薬組成物が提供される。

[0020] 定義

アミノ酸

本明細書において、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、アミノ酸は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されている。

[0021] 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。

[0022] 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。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。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。

[0023] および/または

本明細書において、「および/または」の用語の意義は、「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「33位、55位、および/または96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) 33位、(b) 55位、(c) 96位、(d) 33位および55位、(e) 33位および96位、(f) 55位および96位、(g) 33位および55位および96位。

[0024] 抗原結合分子

本明細書において、用語「抗原結合分子」は抗原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FcRn結合ドメイン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スキャフォールド（scaffo

ld；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。

[0025] 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（WO2004044011、WO2005040229）、細胞膜に発現する糖タンパク質であるフィブロネクチン（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（WO2002032925）、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結合ドメインをスキャフォールドとするAffibody（WO1995001937）、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）（WO2002020565）、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（WO2003029462）、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（WO2008016854）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。

[0026] 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。ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG3、ヒトIgG4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ナンバリングで表される356-358位のアミノ酸配列がDELであってもEEMであってもよい。ヒトIgK(Kappa)定常領域とヒトIgL7 (Lambda)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。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。

[0027] 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。モノクローナル抗体としては、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。

[0028] 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作製され得る。すなわち、感作抗原によっ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当該感作抗原に

対する抗体を産生するハイブリドーマが選択され得る。

[0029] 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。

[0030] 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に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-Buffered 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。

[0031] また、所望のポリペプチドに対する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。タンパク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。

－抗原が膜タンパク質の場合、そ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

[0032] 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。

[0033] 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。

[0034] 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。

[0035] 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。

[0036] 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。

[0037] 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。

[0038] 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。

[0039] 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。

[0040] 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。

[0041] 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。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への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。

[0042] あるいは固定化した抗原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プレートのウエルに抗原が固定化される。ハイブリドーマの培養上清をウエル内の抗原に接触させ、抗原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、抗原に結合した抗体は、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。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。

[0043] 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。

[0044] 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。

[0045] たとえば、目的の抗体を産生するハイブリドーマ細胞から、当該抗体の可変領域（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）

[0046] 抽出されたmRNAは、mRNA Purification Kit (GEヘルスケアバイオサイエンス）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）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）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）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。

[0047] 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。

[0048] 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。

[0049] 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。

[0050] 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。

[0051] こうして増幅されたPCR産物を利用して、重鎖と軽鎖の組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、抗原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。たとえば抗原に対する抗体の取得を目的とするとき、抗体の抗原への結合は、特異的であることがさらに好ましい。抗原に結合する抗体は、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領域を含む抗体を抗原に接触させる工程、

（２）抗原と抗体との結合を検出する工程、および

（３）抗原に結合する抗体を選択する工程。

[0052] 抗体と抗原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やELISAなどの手法によって、抗体と抗原との結合が検出され得る。

[0053] 目的とする抗体の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。

[0054] 所望の抗体を製造するために、抗体遺伝子が制御配列と作用可能に連結されて発現ベクターに組み込まれる。抗体を発現するための制御配列とは、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。例え

ばシグナル配列として、アミノ酸配列MGWSCIILFLVATATGVHS（配列番号：１３）を有するペプチドが使用されるが、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、所望の抗体をコードするDNAを発現する組換え細胞が取得され得る。

[0055] 抗体遺伝子の発現のために、抗体の重鎖（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。重鎖と軽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、重鎖と軽鎖を備えた抗体分子が発現され得る。あるいは重鎖および軽鎖をコードする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（WO19994011523を参照のこと）。

[0056] 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分子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 (Chinese hamster ovary cell line)、COS (Monkey kidney cell line)、ミエローマ (Sp2/0、NS0等)、BHK (baby hamster kidney cell line)、HEK293 (human embryonic kidney cell line with sheared adenovirus (Ad)5 DNA)、PER.C6 cell (human embryonic retinal cell line transformed with the Adenovirus Type 5 (Ad5) E1A and E1B genes)、Hela、Vero、など (Current Protocols in Protein Science (May, 2001, Unit 5.9, Table 5.9.1))

（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

[0057] 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。

[0058] 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

[0059] 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。

[0060] 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)。

[0061] 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。

[0062] 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。

[0063] 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、たとえばオーバーラップ・伸長(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。

[0064] 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。

[0065] 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（EP239400、WO1996002576）。

[0066] 上記のように作製されたヒト化抗体の抗原への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当該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への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（Satoら（Cancer Res (1993) 53, 851-856）。

[0067] 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（WO1993012227、WO1992003918、WO1994002602、WO1994025585、WO19960

34096、WO1996033735参照）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。

[0068] 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、当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（WO1992001047、WO1992020791、WO1993006213、WO1993011236、WO1993019172、WO1995001438、WO1995015388参照）。

[0069] 本明細書において「抗原結合ドメイン」とは、抗原の一部または全部に特異的に結合し且つ相補的である領域をいう。抗原結合ドメインの例として抗体の抗原結合ドメインを有しているドメインを挙げることができる。抗体の抗原結合ドメインの例として、CDRや可変領域が挙げられ得る。抗体の抗原結合ドメインがCDRである場合、抗体に含まれる6つのCDR全てが含まれ得るし、1つ若しくは2つ以上のCDRも含まれ得る。抗体の結合領域としてCDRが含まれる場合、抗原に対する結合活性を有する限り、含まれるCDRにはアミノ酸の欠失、置換、付加及び/又は挿入などが行われ得るし、又、CDRの一部分も使用され得る。抗原の分子量が大きい場合、抗体は抗原の特定部分にのみ結合することができる。当該特定部分はエピトープと呼ばれる。抗原結合ドメインは一または複数の抗体の可変ドメインより提供され得る。好ましくは、抗原結合ドメインは抗体軽鎖可変領域（VL）と抗体重鎖可変領域（VH）とを含む。こうした抗原結合ドメインの例としては、「scFv（single chainFv）」、「単鎖抗体（single chain antibody）」、「Fv」、「scFv2（single cha

in Fv2)」、「Fab」、「ダイアボディ」、「線状抗体」または「F(ab')2」等が好適に挙げられる。

[0070] 本明細書で使われるように、「抗体可変領域」とは、相補性決定領域（CDR；すなわち、CDR1、CDR2およびCDR3）ならびにフレームワーク領域（FR）のアミノ酸配列を含む、抗体分子の軽鎖および重鎖の部分をいう。VHは重鎖の可変領域（Heavy chain variable region）をいう。VLは軽鎖の可変領域（Light chain variable region）をいう。本発明で使用されている方法によると、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、抗体または抗原結合断片のアミノ酸のナンバリングも、Kabatのアミノ酸位置に準じたKabatナンバリングで表される。

[0071] 本明細書で使われるように、用語「相補性決定領域（CDR；すなわち、CDR1、CDR2およびCDR3）」とは、抗原結合のために存在している必要がある抗体可変領域のアミノ酸残基をいう。各可変領域は、一般的にCDR1、CDR2およびCDR3と表される3つのCDR領域を含む。各相補性決定領域は、Kabatが記載しているような「相補性決定領域」からのアミノ酸残基（すなわち、軽鎖可変領域の残基約24～34（CDR1）、50～56（CDR2）、および89～97（CDR3）ならびに重鎖可変領域の31～35（CDR1）、50～65（CDR2）および95～102（CDR3）；Kabat他、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、Public Health Service、National Institute of Health、Bethesda、MD.（1991））、および/または「超可変ループ」からの残基（すなわち、軽鎖可変領域の残基約26～32（CDR1）、50～52（CDR2）および91～96（CDR3）ならびに重鎖可変領域の26～32（CDR1），53～55（CDR2）および96～101（CDR3）；ChothiaおよびLesk、J.Mol.Biol.（1987）196, 901-917）を含み得る。ある場合には、相補性決定領域はKabatの記載によって定義されているCDR領域および超可変ループの両方からのアミノ酸を含み得る。

[0072] 用語「Fab」断片は、軽鎖の可変および定常領域と重鎖の可変領域および第

1の定常領域（CH1）を含む。F(ab')2抗体断片は一対のFab断片を含み、通常これらはその間にあるヒンジ領域中のシステインによってそのカルボキシ末端の近くで共有結合により連結される。抗体断片の他の化学的結合も本発明が属する技術分野で公知である。

[0073] 用語「単鎖Fv」または「scFv」抗体断片は抗体のVHおよびVL領域を含み、これらの領域は単一のポリペプチド鎖を形成する。通常、Fvポリペプチドは VHおよびVL領域の間にポリペプチドリンカーをさらに含み、このリンカーはsc Fvが抗原結合にとって望ましい構造を形成することを可能にする。scFvの総説は、例えば、Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies (1994) Vol.113, 269-315 (Rosenburg and Moore編、Springer-Verlag, New York)等に記載されている。

[0074] 用語「ダイアボディ（diabody）」とは、抗原結合部位を2つ備える小さな抗体断片をいい、この抗体断片は同じポリペプチド鎖（VHおよびVL）内に軽鎖可変領域（VL）に連結された重鎖可変領域（VH）が含まれる。同じ鎖の上の2つの領域の間で対合させるにはあまりに短いリンカーを用いて、この領域を他の鎖の相補性領域と強制的に対合させ、2つの抗原結合部位が形成される。ダイアボディは、例えば欧州特許第404097号、WO1993011161等の特許文献やHolligerら（Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1993) 90, 6444-6448）等の非特許文献において詳細に記載されている。

[0075] 用語「線状抗体」はZapata et al., Protein Eng. (1995) 8 (10), 1057-1062に記載されている抗体をいう。つまり、これらの抗体は相補性の軽鎖ポリペプチドと共に一対の抗原結合ドメインを形成する、一対のタンデムFdセグメント（VH-CH1-VH-CH1）を含む。線状抗体は二重特異性または単一特異性であり得る。

[0076] 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。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、CD

147、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-30

9、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、P

GI2、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、TRANCER）、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 R I 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 IX

a, 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、Acetylcholine 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、Proprotein 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、Tubu

lin、ULBP2ならびにホルモンおよび成長因子のための受容体が例示され得る。そのほか、前記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も例示され得る。

[0077] 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。

[0078] 直線状エピトープは、アミノ酸一次配列が認識される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。

[0079] 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、認識される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。

[0080] 遺伝子組換え手法

用語「コドンセット」とは、所望のアミノ酸をコードするために用いられる、一組の異なるヌクレオチドトリプレット配列をいう。一組のオリゴヌクレオチドは、コドンセットによって提供されるヌクレオチドトリプレットの可能な組合せのすべてを表す配列であって所望のアミノ酸群をコードする配列を含む。こうした一組のオリゴヌクレオチドは、例えば固相法によって合成され得る。標準的なコドン指定形式はIUBコードのそれであり、このコードは当技術分野で公知である。コドンセットは、一般的に3つの大文字、例えばNNK、NNS、DVK、DVDなどで表される。

IUBコード

G　グアニン

A　アデニン

T　チミン

C　シトシン

R（AまたはG）

Y（CまたはT）

M（AまたはC）

K（GまたはT）

S（CまたはG）

W（AまたはT）

H（AまたはCまたはT）

B（CまたはGまたはT）

V（AまたはCまたはG）

D（AまたはGまたはT）

N（AまたはCまたはGまたはT）

[0081] 例えば、コドンセットDVKでは、Dはヌクレオチドアデニン（A）またはグアニン（G）またはチミン（T）であり、VはAまたはGまたはCであり、KはGまたはTである。このコドンセットは18個の

異なるコドンを表し、アミノ酸Ala、Trp、Tyr、Lys、Thr、Asn、Lys、Ser、Arg、Asp、Glu、GlyおよびCysがコードされ得る。

[0082] 特定の位置に「縮重」ヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドの設計方法は本発明の属する技術分野で公知である。（例えば、Garrard and Henner, Gene (1993) 128, 103-109等）。そのようなある種のコドンセットを有しているオリゴヌクレオチドのセットは、市販の核酸シンセサイザー（Applied Biosystems, Foster City, CAなどから入手可能）を使って合成することができ、または市販品を入手することができる（例えば、Life Technologies, Rockville, MD）。したがって、特定のコドンセットを有する合成オリゴヌクレオチドセットは、一般的に異なる配列の複数のオリゴヌクレオチドが含まれる。また、本発明の非限定な態様として、例えばクローニングに役立つ制限酵素部位も含まれ得る。

[0083] 「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。

[0084] コード配列の発現に言及する場合の用語「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ー配列、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。

[0085] 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。

[0086] 「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。

[0087] 用語「コートタンパク質」はタンパク質のうち、少なくともその一部がウイルス粒子の表面に存在するものをいう。機能上の観点からは、コートタンパク質は宿主細胞でのウイルスの構築過程でウイルス粒子と結合する任意のタンパク質であり、ウイルスが他の宿主細胞に感染するまでそれと結合したままである。コートタンパク質は、主要なコートタンパク質であり得るし、マイナーなコートタンパク質でもあり得る。マイナーなコートタンパク質は、通常ウイルスの外殻に存在するコートタンパク質であり、好ましくは1ビリオンにつき少なくとも約5個、より好ましくは少なくとも約7個、より好ましくは少なくとも約10個かそれ以上のタンパク質のコピーが存在する。主要なコートタンパク質は、1ビリオンにつき数十、数百または数千のコピーが存在し得る。主要なコートタンパク質の例としては、繊維状ファージのp8タンパク質が挙げられる。

[0088] 特定の検定における、ある化学的な無機体、有機体、生物等の物体の「検出限界」とは、その検定でバックグラウンドレベルより高く検出されるその物体の最小限の濃度をいう。例えば、ファージELISAでは、特定の抗原結合断片を提示している特定のファージの「検出限界」とは、その抗原結合断片を提示していない対照ファージによって生じたものよりも多くのELISAシグナルを特定のファージが生産するファージ濃度をいう。

[0089] 「ファージディスプレイ」は、変異体ポリペプチドをファージ、例えば繊維状ファージの粒子表面でコートタンパク質の少なくとも一部と融合したタンパク質として提示する手法である。ファージディスプレイの有用さは、ランダム化タンパク質変異体の大きなライブラリから対象抗原と高親和性で結合する配列を迅速に、効率的に選別できることにある。ファージ上のペプチドおよびタンパク質ライブラリの提示は、何百万ものポリペプチドを特異的

結合特性に関してスクリーニングするために利用されてきた。多価ファージディスプレイ方法は、繊維状ファージの遺伝子IIIまたは遺伝子VIIIとの融合を通して小さなランダムペプチドおよび小タンパク質を提示するために利用されてきた（WellsおよびLowman（Curr.Opin.Struct.Biol. （1992） 3, 355-362）とその中の引用文献）。一価のファージディスプレイでは、タンパク質またはペプチドのライブラリが遺伝子IIIまたはその一部に融合され、ファージ粒子が融合タンパク質の1個または0個のコピーを提示するように野生型遺伝子IIIタンパク質の存在下で、低レベルで発現される。アビディティー効果は多価のファージと比較して低下しているので、選別は内在性のリガンド親和性に基づいておりファージミドベクターが使われるが、このベクターはDNA操作を単純化する（LowmanおよびWells、Methods：A Companion to Methods in Enzymology （1991） 3, 205-216）。

[0090] 「ファージミド」は、細菌の複製起点、例えばCo1E1およびバクテリオファージの遺伝子間領域のコピーを有するプラスミドベクターである。ファージミドはいかなる公知のバクテリオファージ、例えば繊維状バクテリオファージおよびラムダ型バクテリオファージも適宜使用され得る。プラスミドは、通常、抗生物質耐性の選択マーカーも含む。これらのベクターにクローニングされたDNA断片は、プラスミドとして増殖することができる。これらのベクターが導入された細胞がファージ粒子の生産のために必要なすべての遺伝子を備えているとき、プラスミドの複製様式はローリングサークル複製に変化し、プラスミドDNAの１つの鎖のコピーとパッケージファージ粒子を生成する。ファージミドは感染性または非感染性ファージ粒子を形成することができる。この用語は、異種ポリペプチドがファージ粒子の表面で提示されるように遺伝子融合としてこの異種ポリペプチドの遺伝子と結合したファージコートタンパク質遺伝子、またはその断片を含むファージミドを含む。

[0091] 用語「ファージベクター」は、異種遺伝子を含んでいて複製ができるバクテリオファージの二本鎖複製型を意味する。ファージベクターは、ファージ複製およびファージ粒子形成を可能にするファージ複製起点を有する。ファ

ージは好ましくは繊維状バクテリオファージ、例えばM13、f1、fd、Pf3ファージもしくはその誘導体、またはラムダ型ファージ、例えばラムダ、21、phi80、phi81、82、424、434、その他もしくはその誘導体である。

[0092] 「オリゴヌクレオチド」は、公知の方法（例えば、固相手法、例えばEP266032に記載されている手法を利用したリン酸トリエステル、亜リン酸塩、またはホスホラミダイト化学、またはFroeshlerら（Nucl.Acids.Res. (1986) 14, 5399-5407）に記載されているデオキシヌクレオチドH-ホスホン酸塩中間体を通した方法）によって化学的に合成される短い、一本鎖または二本鎖のポリデオキシヌクレオチドである。他の方法には、以下に記載のポリメラーゼ連鎖反応および他のオートプライマー法、および固体担体上のオリゴヌクレオチド合成が含まれる。これらの方法のすべては、Engelsら（Agnew.Chem.Int.Ed.Engl. (1989) 28, 716-734）に記載されている。遺伝子のすべての核酸配列が公知ならば、またはコード鎖と相補的な核酸の配列が利用できるならばこれらの方法が使われる。あるいは、対象アミノ酸配列が公知ならば、各アミノ酸残基の公知で好ましいコード残基を使って可能な核酸配列が適宜推測され得る。オリゴヌクレオチドは、ポリアクリルアミドゲルもしくは分子サイジングカラムで、または沈殿法によって精製することができる。

[0093] 用語「融合タンパク質」および「融合ポリペプチド」とは、共有結合で互いに結合された2つの部分を持つポリペプチドをいい、各部分は異なる特性を有するポリペプチドである。この特性は、例えばin vitroまたはin vivo活性などの生物学的性質であり得る。また、この特性は、単一の化学的または物理的性質、例えば対象抗原との結合、反応の触媒などでもあり得る。この2つの部分は、単一のペプチド結合によって直接、または1つまたは複数のアミノ酸残基を含んでいるペプチドリンカーを介して結合され得る。通常、この2つの部分とリンカーは同じ読取り枠中に存在する。好ましくは、ポリペプチドの2つの部分は異種または異なるポリペプチドから得られる。

[0094] 用語「異種DNA」とは、宿主細胞に導入される任意のDNAをいう。DNAは、ゲノムDNA、cDNA、合成DNAおよびこれらの融合または組合せを含む様々な起源

に由来し得る。DNAは、宿主または受容細胞と同じ細胞または細胞型からのDNA、あるいは異なる細胞型、例えば哺乳類または植物からのDNAを含み得る。DNAは任意選択にマーカーまたは選択遺伝子、例えば抗生物質耐性遺伝子、耐熱性遺伝子、その他を含み得る。

[0095] 本明細書で使われるように、用語「非常に多様な位置」とは、公知のかつ/または天然抗体または抗原結合断片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の位置をいう。非常に多様な位置は一般的に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。本明細書においては、こうしたアミノ酸残基はフレキシブル残基とも呼ばれる。用語「非ランダムコドンセット」とは、本明細書で記載されているアミノ酸選択のための基準を部分的に、好ましくは完全に満たす選択されたアミノ酸をコードするコドンセットをいう。また、本明細書で使われるように、用語「ランダムコドンセット」とは、20個のアミノ酸 (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）のうち任意のアミノ酸をコードするコドンが組み合わされたコドンセットをいう。

[0096] ライブラリ

ある一態様によれば、本発明は、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を提供する。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。

[0097] 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。

[0098] 本明細書において「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。

[0099] 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。

[0100] 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。

[0101] 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500μ

M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。

[0102] 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。

[0103] 本発明において、抗原結合分子の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活性より低いとは、抗原結合分子の0.1 μM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。

[0104] 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。

[0105] さらに本発明において、「抗原結合分子の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条件下における抗原結合活性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条件下における抗原結合活性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。

[0106] 抗原への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への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への結合活性を評価することが可能である。

[0107] 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条件下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条件下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条件下におけるKD（Dissociation constant：解離定数）と高カルシウムイオン濃度条件下における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 (Ca 3μM)/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。

[0108] 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。

[0109] また、本発明の抗原結合分子の低カルシウム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濃度条件下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条件下におけるkd（解離速度定数）と高カルシウム濃度条件下におけるkd（解離速度定数）の比であるkd（低カルシウム

濃度条件下）/kd（高カルシウム濃度条件下における）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（低カルシウム濃度条件下）/kd（高カルシウム濃度条件下における）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。

[0110] 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。

[0111] 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a_H+で表すと、pHは$-\log 10 a_H+$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、a_H+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$Kw=a_H+a_{OH}=10^{-14}$であるため、純水では$a_H+=a_{OH}=10^{-7}$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。

[0112] 本発明においては、水素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pH酸性域の条件と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、pH酸性域と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い場合が挙げられる。また、pH中性域の条件下における抗原に対する抗原結合分

子の結合活性よりも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の方が高い場合もまた挙げられる。

[0113] 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。

[0114] 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pHに近いpH5.8が好適に挙げられる。

[0115] 本発明において、抗原結合分子のpH酸性域条件下における抗原に対する結合活性がpH中性域条件下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。

[0116] 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、例えば前記の異なるpHの条件下での結合活性の測定方法に準じて実施される。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。

[0117] さらに本発明において、「抗原結合分子のpH酸性域の条件下における抗原に対する結合活性がpH中性域の条件下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pH中性域の条件下における抗原に対する結合活性がpH酸性域の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、「pH酸性域の条件下における抗原結合活性がpH中性域の条件下における抗原に対する結合活性より低い」を「pH酸性域の条件下における抗原結合能がpH中性域の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、「pH酸性域の条件下における抗原結合活性をpH中性域の条件下における抗原に対する結合活性より低下させる」を「pH酸性域の条件下における抗原結合能をpH中性域の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。

[0118] 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残基の例として、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）、Kawasaki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. (19

90) 269, 454-456)、Davis (New Biol. (1990) 2, 410-419)、Schaeferら (Genomics (1995) 25, 638～643)、Economouら (EMBO J. (1990) 9, 349-354)、Wurzburgら (Structure. (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。上記のほか、このようなカルシウム結合モチーフの好適な例として、後述されるように、Vk5-2等の生殖細胞系列の配列を有する抗体の軽鎖可変領域に存在するVk5の部分に含まれるカルシウム結合モチーフも挙げられ得る。

[0119] 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を変化させるアミノ酸残基の例として、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。

[0120] 前記のアミノ酸残基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、本発明の一態様では、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残基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が提供される。また、別の態様では、当該アミノ酸残基が重鎖の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が提供される。そのほかの態様では、当該アミノ酸残基が重鎖の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が提供される。

[0121] また、本発明の一態様では、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残基が軽鎖の抗原結合

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が提供される。また、別の態様では、当該アミノ酸残基が軽鎖の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が提供される。そのほかの態様では、当該アミノ酸残基が軽鎖の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が提供される。

[0122] また、別の態様では、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が提供される。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。

[0123] さらに別の態様では、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が提供される。そのほかの態様では、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が提供される。

[0124] また、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もまた本発明の異なる態様として提供される。さらに、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もまた提供される。

[0125] 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。

[0126] 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Vκ１Ｏ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。

[0127] 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。

[0128] 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。

[0129] 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、VL2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。

[0130] 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、Kabatら (1991)お

よびWuら（J. Exp. Med. (1970) 132, 211-250））。

[0131] 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せず、また患者の免疫原性になる可能性は少なくないとも考えられる。一方、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。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。

[0132] 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」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。

[0133] 例えば、「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：1（Vk5-2）に記載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。上記のVk5-2等の生殖細胞系列

の配列を有する抗体の軽鎖可変領域に存在するVk5のドメインを含む軽鎖可変領域配列の好適な例として、配列番号：１（Vk5-2）に記載された軽鎖可変領域配列のほかに、後述される配列番号：２で表されるVk5-2バリアント１または配列番号：３で表されるVk5-2バリアント２等も適宜使用される。これらの分子に含まれる「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」を含むVk5-2の部分が、本発明のカルシウム結合モチーフを含むドメインとして使用され得る。本発明の非限定の一態様では、カルシウム結合モチーフを形成する少なくとも一つのアミノ酸が本発明の「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」として使用され得る。

[0134] 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：１（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13、表14、表17または表18に記載されたアミノ酸残基が挙げられる。

[0135] 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：６（Vk1）、配列番号：７（Vk2）、配列番号：８（Vk3）、配列番号：９（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。

[0136] 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。

[0137] 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13、表14、表17または表18に記載されたアミノ酸残基が挙げられる。

[0138] 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。

[0139] また、本発明の非限定な一態様では、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。

[0140] さらに、本発明の非限定な一態様では、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。

[0141] 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：１０（6RL#9H-IgG1）または配列番号：１１（6KC4-1#85H-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：１０（6RL#9H-IgG1）または配列番号：１１（6KC4-1#85H-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。

[0142] 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：１０（6RL#9H-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：１１（6KC4-1#85H-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。

[0143] 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、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、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。

[0144] 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：６（Vk1）、配列番号：７（Vk2）、配列番号：８（Vk3）、配列番号：９（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。

[0145] 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残基としては、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。

[0146] 本発明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。

[0147] 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。

[0148] 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、30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。

[0149] 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4または表5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：６）、Vk2（配列番号：７）、Vk3（配列番号：８）、Vk4（配列番号：９）等の生殖細胞系列の配列が好適に使用され得る。

[0150] 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。

[0151] また、本発明の非限定な一態様では、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。

[0152] さらに、本発明の非限定な一態様では、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））。

[0153] 本発明の別の態様として、「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、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、例えば、重鎖可変領域の特定の残基が「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。

[0154] 当該アミノ酸残基が重鎖のCDR1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CDR1中のKabatナンバリングで表される27位、31位、32位、33位および/または35位のアミノ酸が挙げられる。重鎖のCDR2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CDR2中のKabatナンバリングで表される50位、52位、53位、55位、57位、58位、59位、61位および/または62位のアミノ酸が挙げられる。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、97位、98位、99位、100a位、100b位、100d位、100f位、100h位、102位および/または107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、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。

[0155] 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、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、「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」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。また、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：６（Vk1）、配列番号：７（Vk2）、配列番号：

８（Vk3）、配列番号：９（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。

[0156] 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5.5-7.0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。

[0157] 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。

[0158] 組み合わされる軽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。

[0159] また、本発明の非限定な一態様では、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。

[0160] さらに、本発明の非限定な一態様では、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））。

[0161] 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アミノ酸としては、本発明の抗原結合分子が抗原に結合する限り任意のアミノ酸が使用され得るが、好適な例としてJ. D. Marksら（J. Mol. Biol. (1991) 222, 581-597）等の公知の抗体ファージディスプレイライブラリ技術が適宜適用され得る。すなわち、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を変化させるアミノ酸残基以外のアミノ酸配列として、上記の抗体ファージライブラリで採用される。

[0162] 本発明の、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}特に好ましくは10^{8}か

ら10^{10}存在することを意味する。

[0163] 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。

[0164] 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を提供する。さらに好ましくは、本発明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を提供する。特に好ましくは、本発明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を提供する。また、好ましくは、本発明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を提供する。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を提供する。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。

[0165] 抗原結合分子を含む融合ポリペプチド

本発明における一つの実施形態では、本発明の抗原結合分子と異種ポリペプチドとの融合分子が作製され得る。ある実施形態では、融合ポリペプチドはウイルスコートタンパク質、例えばpIII、pVIII、pVII、pIX、Soc、Hoc、gpD、pVIおよびその変異体からなる群から選択されるウイルスコートタンパク質の少なくとも一部と融合され得る。

[0166] ある実施形態では、本発明の抗原結合分子は、ScFv、Fab断片、F(ab)2またはF(ab')2であり得るため、別の一つの実施形態では、これらの抗原結合分子と異種ポリペプチドとの融合分子であって互いに配列の異なる複数の融合分子から主としてなるライブラリが提供される。具体的には、これらの抗原結合分子とウイルスコートタンパク質、例えばpIII、pVIII、pVII、pIX、Soc、Hoc、gpD、pVIおよびその変異体からなる群から選択されるウイルスコートタンパク質の少なくとも一部と融合された融合タンパク質であって互いに配列の異なる複数の融合分子から主としてなるライブラリが提供される。本発明の抗原結合分子はさらに二量体化ドメインを含み得る。ある実施形態では、前記二量体化ドメインは抗体の重鎖または軽鎖の可変領域とウイルスコートタンパク質の少なくとも一部との間に存在し得る。この二量体化ドメインには、二量体化配列の少なくとも1つ、および/または1つまたは複数のシステイン残基を含む配列が含まれ得る。この二量体化ドメインは、好ましくは重

鎖可変領域または定常領域のC末端と連結され得る。二量体化ドメインは、前記抗体可変領域がウイルスのコートタンパク質成分との融合タンパク質成分として作製されている（二量体化ドメインの後ろにアンバー終止コドンを有さない）かどうかによって、または、前記抗体可変領域が主にウイルスコートタンパク質成分を含まずに作製されている（例えば、二量体化ドメインの後にアンバー終止コドンを有する）かどうかによって、様々な構造をとることが可能である。前記抗体可変領域が主にウイルスのコートタンパク質成分との融合タンパク質として作製されるときは、1つまたは複数のジスルフィド結合および/または単一の二量体化配列によって二価提示がもたらされる。本発明の抗原結合分子が、主にウイルスのコートタンパク質成分と融合されずに作製される抗体可変領域である（例えば、アンバー終止コドンを有する）場合、システイン残基と二量体化配列の両方を含んでいる二量体化ドメインを持つことが好ましい。ある実施形態では、F(ab)2の重鎖は、ヒンジ領域を含まない二量体化ドメインによって二量体化される。この二量体化ドメインには、例えば公知であるGCN4配列：GRMKQLEDKVEELLSKNYHLENEVARLKKLVGERG（配列番号：１２）等のロイシンジッパー配列が含まれ得る。

[0167] 抗原結合分子をコードするポリヌクレオチド

抗原結合分子をコードするポリヌクレオチドを作製するために用いられるオリゴヌクレオチドまたはプライマーのセットは、標準の方法を使って合成され得る。例えば、コドンセットによって提供されるヌクレオチドトリプレットの可能な組合せのすべてを含み、所望のアミノ酸群をコードする配列を含む一組のオリゴヌクレオチドが固相法によって合成され得る。したがって、特定のコドンセットを有する合成オリゴヌクレオチドセットは、一般的に異なる配列の複数のオリゴヌクレオチドを含み、この相違は配列全体の中のコドンセットによるものである。ある位置での選択された「縮重」ヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドの合成は、当技術分野で公知である。そのようなある種のコドンセットを有しているヌクレオチドのセットは、市販の核酸シンセサイザー（Applied Biosystems）を使って合成され得るし、また

はその市販品が入手され得る（例えば、Life Technologies）。本発明で使用されるように、オリゴヌクレオチドは可変ドメイン核酸鋳型へのハイブリダイゼーションを可能にする配列を有し、また、クローニングに役立つ制限酵素部位を含み得る。

[0168] ライブラリは上流および下流のオリゴヌクレオチドセットを用いることによって生成され得る。各オリゴヌクレオチドセットは、オリゴヌクレオチドの配列内で提供されたコドンセットによって確立された異なる配列を有する複数のオリゴヌクレオチドを有する。上流および下流のオリゴヌクレオチドセットは、可変ドメイン鋳型核酸配列と共に、PCR産物の「ライブラリ」を作製するために使用され得る。PCR産物は確立された分子生物学的手法を使って、他の関連した、または無関係な核酸配列、例えばウイルスのコートタンパク質構成成分および二量体化ドメインをコードする核酸配列と融合され得るため、こうしたオリゴヌクレオチドセットは「核酸カセット」と呼ばれることもある。

[0169] PCRプライマー配列は、抗原結合分子の表面に露出し非常に多様なフレキシブル残基のために設計されたコドンセットの１つまたは複数を含む。前記のように、コドンセットは所望の変異体アミノ酸をコードするのに用いられる、一組の異なるヌクレオチドトリプレット配列である。また、オリゴヌクレオチドセットの配列の長さは鋳型核酸にハイブリダイズするために十分な長さであり、また、必須ではないが制限部位が含まれ得る。DNA鋳型はバクテリオファージM13ベクターに由来するベクター、またはViera他（Meth.Enzymol. (1987) 153, 3）に記載されている一本鎖ファージの複製起点を含むベクターによって生成される。このように、突然変異させるべきDNAは、一本鎖鋳型を生成するためにこれらのベクターの1つに挿入される。一本鎖鋳型の生産は、Sambrook等の教科書に記載されている。

[0170] また、本発明の非限定な一実施態様で記載される、選択されたアミノ酸を抗原結合分子に導入する方法は当技術分野で確立されており、その幾つかは本明細書で記載されている。例えば、Kunkelら（Methods Enzymol. (1987)

154, 367-382）によるキュンケル方法を使用し、少なくとも１つの抗原結合分子の表面に露出しかつ/または「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」や非常に多様なフレキシブル残基を導入することによってライブラリが作製され得る。例えば、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」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の組合せによって、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る場合に、こうした方法が適宜採用され得るであろう。このような非限定的な例として、金属イオンがカルシウムイオンである場合に、例えば、配列番号：６（Vk1）、配列番号：７（Vk2）、配列番号：８（Vk3）、配列番号：９（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が作製されることが挙げられているが、こうした軽鎖可変領域の作製に、こうした方法が採用され得る。

[0171] この場合、核酸カセットを作製するための鋳型として可変領域の核酸鋳型（テンプレート）配列が使用されるPCR反応のプライマーとしてオリゴヌクレオチドセットが使用され得る。可変領域のテンプレート配列は、対象核酸配列（すなわち、置換の対象となるアミノ酸をコードしている核酸配列）を含む免疫グロブリンの軽鎖または重鎖のいかなる部分も好適に用いられる。前記の例でいえば、配列番号：６（Vk1）、配列番号：７（Vk2）、配列番号：８（Vk3）、配列番号：９（Vk4）等の生殖細胞系列の可変領域が、テンプレート配列として使用され得る。可変領域のテンプレート配列は、少なくとも可変領域の一部を含み、また少なくとも1つのCDRを含む。場合によっては、可変領域のテンプレート配列は複数のCDRを含む。可変領域のテンプレート配列の上流部および下流部は、上流域のオリゴヌクレオチドセットおよび下流域のオリゴヌクレオチドセットの構成メンバーによるハイブリダイゼーショ

ンの対象とされ得る。上流のプライマーセットの第1のオリゴヌクレオチドは第1の核酸鎖にハイブリダイズすることができ、下流のプライマーセットの第2のオリゴヌクレオチドは第2の核酸鎖にハイブリダイズすることができる。オリゴヌクレオチドプライマーは１つまたは複数のコドンセットを含み、可変領域のテンプレート配列の一部にハイブリダイズするように設計され得る。これらのオリゴヌクレオチドの使用によって、PCR後に2つ以上のコドンセットがPCR産物（すなわち核酸カセット）に導入され得る。抗体可変領域をコードする核酸配列の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプライマーは、アミノ酸置換の対象となるCDR残基をコードする部分が含まれ得る。

[0172] また、本発明の非限定な一実施態様で記載される、選択されたアミノ酸を抗原結合分子に導入する方法として本明細書で記載されているように、Overlap Extension PCR法も適宜採用され得る（WO1993003151）。少なくとも１つの抗原結合分子の表面に露出しかつ/または「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」または非常に多様なフレキシブル残基を導入することによってライブラリが作製され得る。Overlap Extension PCR法に使用される上流域および下流域のオリゴヌクレオチドセットには「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」または非常に多様なフレキシブル残基とともに、可変領域のテンプレート配列にハイブリダイズするために十分な長さのフレームワークの配列が含まれ得る。

[0173] 例えば、本発明の非限定な一実施態様として記載される、「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をコードするポリヌクレオチド分子を作製するために、当該アミノ酸残基のコドンセットおよび付加的にフレキシブル残基のコドンセットをコードするオリゴヌクレオチドセットが作製される。当該オリゴヌクレオチドセットには可変領域のテンプレート配列にハイブリダイズするために十分な長さのフレームワークの配列がその

上流または下流にインフレームで連結される。

[0174] 例えば、軽鎖可変領域のCDR2およびCDR3に当該アミノ酸残基または付加的なフレキシブル残基を導入する場合、オリゴヌクレオチドセットの5’末端にCDR2に隣接する十分な長さのFR2のアミノ酸配列をコードするオリゴヌクレオチドが連結され、3’末端にCDR2に隣接するFR3のアミノ酸配列をコードするオリゴヌクレオチドが連結されたプライマーが作製される。さらにオリゴヌクレオチドセットと相補的なオリゴヌクレオチドセットの5’末端にCDR3に隣接する十分な長さのFR4のアミノ酸配列をコードするオリゴヌクレオチドが連結され、3’末端にCDR3に隣接するFR3のアミノ酸配列をコードするオリゴヌクレオチドが連結された相補プライマーもまた作製される。当該プライマーのFR3のアミノ酸をコードするオリゴヌクレオチドと当該相補プライマーのFR3のアミノ酸をコードするオリゴヌクレオチドとが互いにハイブリダイズすることが可能な程度の長さのオーバーラップする配列を含んでいる場合、テンプレート配列が存在しない条件下でのPCR反応によって、CDR2およびCDR3に当該アミノ酸残基または付加的なフレキシブル残基が導入された軽鎖可変領域が作製され得る。そのようなオーバーラップする配列を含んでいない場合は、例えば、配列番号：６（Vk1）、配列番号：７（Vk2）、配列番号：８（Vk3）、配列番号：９（Vk4）等の生殖細胞系列の可変領域を、テンプレート配列としたPCR反応によって、同様にCDR2およびCDR3に当該アミノ酸残基または付加的なフレキシブル残基が導入された軽鎖可変領域が作製され得る。

[0175] 例えば、軽鎖可変領域のCDR3に当該アミノ酸残基または付加的なフレキシブル残基を導入し、CDR1およびCDR2がランダム化された可変領域を含むライブラリを作製する場合、オリゴヌクレオチドセットと相補的なオリゴヌクレオチドセットの5’末端にCDR3に隣接する十分な長さのFR4のアミノ酸配列をコードするオリゴヌクレオチドが連結され、3’末端にCDR3に隣接するFR3のアミノ酸配列をコードするオリゴヌクレオチドが連結されたプライマーと、FR1をコードするヌクレオチド配列を有するプライマーを用いたナイーブ配列等のランダム化された可変領域を含むライブラリをテンプレート配列とするP

CRによって、同様にCDR2に当該アミノ酸残基および付加的なフレキシブル残基が導入され、CDR1およびCDR2がランダム化された軽鎖可変領域をコードするのポリヌクレオチドのライブラリが作製され得る。上記の軽鎖に「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少なくとも一つのアミノ酸残基」および/またはフレキシブル残基が導入されたポリヌクレオチドライブラリの作製方法は、重鎖に当該アミノ酸残基および付加的なフレキシブル残基が導入されたポリヌクレオチドライブラリを作製するためにも適宜採用される。

[0176] また、オリゴヌクレオチド配列内に制限部位を含むように上流域および下流域のオリゴヌクレオチドセットが合成され得る。これらの制限部位は、さらなる抗体配列を有している発現ベクターへの核酸カセット（すなわちPCR反応生成物）の挿入を容易にする。好ましくは、制限部位は外来の核酸配列を導入することなく、または元のCDRまたはフレームワーク核酸配列を取り除くことなく核酸カセットのクローニングを容易にするように設計されている。

[0177] 作製された本発明の抗原結合分子を構成する軽鎖または重鎖の配列の一部またはすべての発現のために、核酸カセットが適切なベクターにクローニングされ得る。本発明で詳述される方法によると、核酸カセットはウイルスコートタンパク質のすべてまたは一部と融合した軽鎖または重鎖配列の一部またはすべて（すなわち、融合タンパク質を形成）の生産を可能とするベクターにクローニングされる。後述されるように、こうしたベクターは、前記の融合タンパク質が粒子または細胞の表面で提示されるように設計された発現ベクターであり得る。こうした目的のために数種類のベクターが入手され、それらは本発明の実施に用いられるが、ファージミドベクターが本明細書での使用には好ましいベクターである。当業者に公知であるように、ファージミドベクターには、通常、プロモーター、シグナル配列等の制御配列、表現型選択遺伝子、複製起点部位および他の必要な構成成分を含む様々な構成成分が含まれ得る。

[0178] 特定の変異体アミノ酸の組合せが発現される非限定な実施形態では、核酸

カセットには、重鎖または軽鎖の可変領域のすべてまたは一部がコードされ得る。例えば、本発明の非限定な一態様である、「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」および/またはフレキシブル残基が重鎖のCDR3に含まれるように設計する場合、重鎖CDR3の配列多様性を有する核酸カセットが作製された後に、ナイーブ配列等のランダム化された可変領域をコードする核酸カセットに連結され得る。ライブラリの場合のようにこれらの変異体アミノ酸または変異体アミノ酸の組合せを含んでいる抗原結合分子の作製のために、核酸カセットは、さらなる抗体配列、例えば軽鎖および重鎖可変領域の可変または定常領域のすべてまたは一部を含んでいる発現ベクターに挿入され得る。これらのさらなる抗原結合分子の配列は他の核酸配列、例えばウイルスコートタンパク質構成成分をコードしている配列と融合され、その結果、融合タンパク質の生産が可能となる。

[0179] ベクター

本発明の非限定な一態様では、遺伝子融合をコードしている核酸配列を含んでいる複製可能な発現ベクターを含み、前記遺伝子融合は、ウイルスコートタンパク質のすべてまたは一部と融合し、1つの抗原結合分子の可変領域、または1つの抗原結合分子の可変領域と1つの定常領域を含む融合タンパク質をコードする。前記のように、多様な配列で生成された互いに配列の異なる複数の抗原結合分子の可変領域を含む複数の異なる融合タンパク質をコードする複数の遺伝子融合を含む、多様で複製可能な発現ベクターのライブラリも含まれる。ベクターは様々な構成成分を含むことが可能で、好ましくは異なるベクターの間で抗原結合分子の可変領域が移動できるように、かつ/または異なるフォーマットで融合タンパク質が提示されるように構築される。

[0180] ベクターの例として、ファージベクターが好適に挙げられる。ファージベクターは、ファージ複製およびファージ粒子形成を可能にするファージ複製起点を有する。ファージは好ましくは、M13、f1、fd、Pf3ファージもしくはその誘導体が含まれる繊維状バクテリオファージ、またはラムダ、21、phi80

、phi81、82、424、434、その他、もしくはその誘導体が含まれるラムダ型ファージが好適な例として挙げられ得る。

[0181] ウイルスコートタンパク質の例には、感染性タンパク質PIII、主コートタンパク質PVIII、pVII、pIX、Soc（T4）、Hoc（T4）、gpD（バクテリオファージλ）、マイナーバクテリオファージコートタンパク質6（pVI）（繊維状ファージ（J. Immunol. Methods. (1999) 231 (1-2), 39-51）、M13バクテリオファージ主コートタンパク質変異体（P8）（Protein Sci. (2000) 9 (4), 647-654））が含まれる。融合タンパク質はファージの表面で提示されるが、適切なファージ系にはM13KO7ヘルパーファージ、M13R408、M13-VCSおよびPhi X 174、pJuFoファージ系（J. Virol. (2001) 75 (15), 7107-7113）、ハイパーファージ（Nat. Biotechnol. (2001) 19 (1), 75-78）、KM13（Fold Des. (1998) 3 (5), 321-328）が含まれる。好ましいヘルパーファージはM13KO7であり、好ましいコートタンパク質はM13ファージ遺伝子IIIコートタンパク質である。好ましい宿主は大腸菌、および大腸菌のプロテアーゼ欠損株である。例えばfth1ベクター（Nucleic Acids Res. (2001) 29 (10) e50）等のベクターは、融合タンパク質の発現に有用であり得る。

[0182] 発現ベクターは、抗原結合分子の重鎖可変領域または軽鎖可変領域もしくはその断片をコードしているDNAと融合した分泌シグナル配列も含み得る。この配列は典型的には融合タンパク質をコードしている遺伝子の隣接する5’側に位置し、したがって融合タンパク質のアミノ末端で転写される。しかし、ある場合には、シグナル配列は分泌されるべきタンパク質をコードしている遺伝子の5’以外の位置にあることが証明された。この配列は、それが細菌細胞の内膜を横切って結合するタンパク質を対象とする。シグナル配列をコードしているDNAは、シグナル配列を持つタンパク質をコードしている遺伝子のいずれかから、制限エンドヌクレアーゼ断片として得られる。原核生物の適当なシグナル配列は、例えば、LamBまたはOmpF（Wongら（Gene (1983), 68 (2), 193-203）、MalE、PhoAをコードしている遺伝子および他の遺伝子も

使用され得る。本発明の実施のための好ましい原核生物シグナル配列は、Changら（Gene （1987） 55 （2-3), 189-196）に記載されている大腸菌耐熱性エンテロトキシンII（STII）シグナル配列、pelBおよびmalEである。

[0183] ベクターには、一般的に、融合タンパク質の発現を促進する制御配列としてプロモーターが含まれる。原核生物ベクターで一般的に使われるプロモーターには、lac Zプロモーター系、アルカリホスファターゼpho Aプロモーター（Ap）、バクテリオファージλPLプロモーター（温度感受性プロモーター）、tacプロモーター（lacリプレッサーによって制御されるハイブリッドtrp-lacプロモーター）、トリプトファンプロモーター、pBADプロモーターおよびバクテリオファージT7プロモーターが含まれる。プロモーターの総説に関しては、前記のSambrook他の教示書に記載されている。これらが最も一般的に使用されるプロモーターであるが、他の適切な微生物プロモーターも同様に使用され得る。

[0184] ベクターには、また、他の核酸配列、例えば、gDタグ、c-Mycエピトープ、ポリーヒスチジンタグ、蛍光タンパク質（例えば、GFP）またはファージまたは細胞の表面で発現する融合タンパク質の検出または精製に役立つβ－ガラクトシダーゼタンパク質をコードしている配列が含まれ得る。例えば、gDタグをコードしている核酸配列によって、融合タンパク質を発現する細胞またはウイルスの正または負の選択が可能となる。いくつかの実施形態では、gDタグは好ましくはウイルスコートタンパク質の構成成分に融合していない抗原結合分子の可変領域と融合する。例えば、ポリヒスチジン標識をコードしている核酸配列は、免疫組織化学手法を使って特異的抗原と結合する抗原結合分子の可変領域を含む融合タンパク質を同定するために有益である。抗原結合の検出に役立つタグは、ウイルスコートタンパク質構成成分に融合していない抗原結合分子の可変領域、またはウイルスコートタンパク質構成成分に融合した抗原結合分子の可変領域に融合され得る。

[0185] 本発明を実践するのに用いられるベクターの他の有用構成成分として、表現型選択遺伝子が好適に挙げられる。典型的表現型選択遺伝子は、宿主細胞

に抗生物質耐性を与えるタンパク質をコードしている遺伝子である。そのような例として、アンピシリン耐性遺伝子（ampr）およびテトラサイクリン耐性遺伝子（tetr）等が好適に使用され得る。

[0186] ベクターには、独特の制限部位および抑制性終止コドンを含んでいる核酸配列も含まれ得る。独特の制限部位は異なるベクターおよび発現系の間で抗原結合分子の可変領域を移動させるために有用である。特に細胞培養による完全長の抗原結合分子または抗原結合断片の生産に有用である。抑制性終止コドンは融合タンパク質の発現レベルを調節するのに有用であり、可溶型の抗原結合分子の断片の精製を容易にする。例えば、アンバー終止コドンはファージディスプレイを可能にするsupE宿主ではGlnに翻訳され得るが、非supE宿主ではそれはファージコートタンパク質と融合していない可溶型の抗原結合分子の断片を産生する終止コドンと解釈される。これらの合成配列は、ベクター内の1つまたは複数の抗原結合分子の可変領域と融合され得る。

[0187] 目的とする抗原結合分子の配列をコードする核酸がベクターから容易に取り出されて他のベクターに入れられるようにするベクターが好適に使用され得る。例えば、本発明の抗原結合分子またはその可変領域をコードしている核酸配列の取り出しを容易にするために、適当な制限部位がベクターに組み込まれ得る。制限配列は、通常、効率的な切出しおよび新しいベクターへのライゲーションを容易にするために、ベクター内でユニークなものが選択される。抗原結合分子またはその可変領域は、その後外来の融合された配列、例えばウイルスコートタンパク質または他の配列タグを含まない構造を有する分子としてベクターから発現され得る。

[0188] 抗原結合分子の可変領域または定常領域をコードしている核酸（遺伝子1）とウイルスのコートタンパク質構成成分（遺伝子2）との間に、終結または終止コドンをコードしているDNAが挿入され得る。そのような終結コドンにはUAG（アンバー）、UAA（オーカー）およびUGA（オペル）が含まれる。（Davisら（Microbiology (1980), 237, 245-247, 374 Harper & Row, New York））。野生型宿主細胞で発現する終結または終止コドンは、遺伝子2

タンパク質が結合しない遺伝子1タンパク質産物の合成をもたらす。しかし、抑制宿主細胞での増殖によって検出可能な量の融合タンパク質が合成される。そのような抑制宿主細胞は公知であり、大腸菌抑制遺伝子株（Bullockら（BioTechniques （1987） 5, 376-379））等が記載されている。そのような終結コドンが、融合ポリペプチドをコードするmRNAに挿入され得る。

[0189] 抑制性コドンは、抗原結合分子の可変または定常領域をコードする第1の遺伝子とファージコートタンパク質の少なくとも一部をコードする第2の遺伝子との間に挿入され得る。あるいは、抑制性終結コドンは、抗原結合分子の可変領域の最後のアミノ酸トリプレットまたはファージコートタンパク質の最初のアミノ酸を置換することによって融合部位に隣接して挿入され得る。抑制性終結コドンは、二量体化ドメインのC末端またはその後に挿入され得る。抑制性コドンを含んでいるプラスミドがサプレッサー宿主細胞中で複製した場合、検出可能な量のポリペプチドおよびコートタンパク質を含んでいる融合ポリペプチドが生産される。プラスミドが非サプレッサー宿主細胞中で複製した場合、挿入された抑制性トリプレットUAG、UAAまたはUGAにおける翻訳の終結のために、実質的にファージコートタンパク質と融合せずに抗原結合分子の可変領域が合成される。よって、非サプレッサー細胞中で発現した抗原結合分子の可変領域は、宿主メンブランに固定する融合ファージコートタンパク質を含まないために、合成された後に宿主細胞から分泌される。

[0190] 抗原結合分子の軽鎖および/または重鎖の可変領域または定常領域は、ウイルス粒子または細胞の表面での1つまたは複数の融合ポリペプチドの相互作用を可能にするペプチド配列にさらに融合され得る。これらのペプチド配列は、本明細書では「二量体化ドメイン」と指称される。二量体化ドメインは、少なくとも１つまたは複数の二量体化配列、またはシステイン残基を含んでいる配列を少なくとも1つ、あるいはこの両方ともに含むことができる。適当な二量体化配列には、疎水残基が一定の間隔をあけて存在し、各タンパク質の疎水残基の相互作用による二量体の形成を可能にする両親媒性のαヘリックスを有するタンパク質のそれらが含まれる。そのようなタンパク質および

タンパク質部分には、例えばロイシンジッパー領域が含まれる。二量体化ドメインは、また、1つまたは複数のシステイン残基を含むことができる（例えば、二量体化ドメイン内に抗体ヒンジ配列を含むことにより提供される）。システイン残基は、1つまたは複数のジスルフィド結合の形成による二量体化を可能にする。終止コドンが二量体化ドメインの後方に存在する一実施形態では、二量体化ドメインは少なくとも1つのシステイン残基を含む。二量体化ドメインは、好ましくは抗体可変または定常ドメインとウイルスコートタンパク質構成成分との間に位置する。

[0191] 場合によっては、ベクターは、例えばコートタンパク質に融合した重鎖および軽鎖の可変領域を含んでいる単鎖形態の単一の抗原結合分子のファージポリペプチドをコードする。これらのケースでは、ベクターは、ある種のプロモーターの制御下で1つの転写産物を発現する「一シストロン性」と考えられる。重鎖可変領域および軽鎖可変領域の間にリンカーペプチドを有し、VLおよびVHドメインをコードしている一シストロン性配列の発現を促進するためにアルカリホスファターゼ（AP）またはTacプロモーターを利用するベクターが例示される。このようなシストロン配列は、5’末端で大腸菌のmalEまたは耐熱性エンテロトキシンII（STII）シグナル配列に連結され、3’末端で（例えば、pIIIタンパク質等の）ウイルスコートタンパク質のすべてまたは一部に連結される。いくつかの実施形態では、ベクターは第2の可変領域配列とウイルスコートタンパク質配列との間のその3’末端に、（例えばロイシンジッパー等の）二量体化ドメインをコードしている配列番号：１２で示されるような配列をさらに含むことができる。

[0192] その他の場合、重鎖および軽鎖の可変領域は別々のポリペプチドとして発現され、このようなベクターは「二シストロン性」であり、別々の転写産物の発現を可能にする。これらのベクターでは、適切なプロモーター、例えばtacまたはPhoAプロモーターは二シストロン性mRNAの発現を促すために利用され得る。例えば、軽鎖可変領域および定常領域をコードしている第1のシストロンが、5’末端で大腸菌のmalE、pelBまたは耐熱性エンテロトキシンII（ST

II）シグナル配列に連結され、3’末端でgDタグをコードしている核酸配列に連結される。例えば、重鎖可変領域および定常領域CH1をコードしている第2のシストロンは、5’末端で大腸菌のmalEまたは耐熱性エンテロトキシンII（STII）シグナル配列に連結され、3’末端でウイルスコートタンパク質のすべてまたは一部に連結されている。

[0193] 二シストロン性mRNAを生成し、F(ab’)2-pIIIを提示するベクターでは、例えば、適切なプロモーター、例えばtacまたはPhoA（AP）プロモーターは、5’末端で大腸菌malEまたは耐熱性エンテロトキシンII（STII）シグナル配列と作用可能に連結され、3’末端でgDタグをコードしている核酸配列と連結された軽鎖可変領域および定常領域をコードしている第1のシストロンの発現を促進する。第2のシストロンは、例えば5’末端で大腸菌のmalEまたは耐熱性エンテロトキシンII（STII）シグナル配列と作用可能に連結された重鎖可変領域および定常領域をコードし、3’末端にはIgGヒンジ配列およびロイシンジッパー配列、さらにその後方に少なくとも一部のウイルスコートタンパク質を含む二量体化ドメインを含む。

[0194] 融合ポリペプチドの提示

抗原結合分子の可変領域の融合ポリペプチドは、細胞、ウイルスまたはファージミド粒子の表面で様々な態様で提示され得る。これらの態様には、単鎖Fv断片（scFv）、F(ab)断片およびこれらの断片の多価の形態が含まれる。多価の形態は、好ましくはScFv、FabまたはF(ab’)の二量体であり、これらは本明細書では(ScFv)2、F(ab)2およびF(ab’)2とそれぞれ指称される。多価の形態の提示が好まれる理由の一つは、多価の形態の提示によって、通常低親和性クローンの同定が可能となる点、または、選択過程で稀なクローンのより効率的な選択を可能にする複数の抗原結合部位を有する点であると考えられる。

[0195] バクテリオファージの表面で抗体断片を含んでいる融合ポリペプチドを提示する方法は当技術分野で公知であり、例えばWO1992001047および本明細書で記載されている。他にもWO1992020791、WO1993006213、WO1993011236およ

び1993019172では関連した方法が記載されており、当業者はこれらの方法を適宜使用することが可能である。他の公知文献（H.R.Hoogenboom & G.Winter (1992) J. Mol. Biol. 227, 381-388、WO1993006213およびWO1993011236）では、ファージ表面で提示された様々な抗原に対する、人工的に再配置された可変領域遺伝子レパートリーによる抗体の同定が示されている。

[0196] scFvの態様での提示のためにベクターが構築される場合、抗原結合分子の軽鎖可変領域および重鎖可変領域をコードしている核酸配列がこのベクターに含まれる。一般的には、抗原結合分子の重鎖可変領域をコードする核酸配列は、ウイルスコートタンパク質構成成分に融合する。抗原結合分子の軽鎖可変領域をコードしている核酸配列は、ペプチドリンカーをコードしている核酸配列によって抗原結合分子の重鎖可変領域に連結される。ペプチドリンカーは、一般的に約5から15個のアミノ酸を含む。任意に、例えば精製または検出に役立つ標識をコードしている他の配列が、抗原結合分子の軽鎖可変領域もしくは抗原結合分子の重鎖可変領域のいずれかまたは両方をコードしている核酸配列の3’末端に融合され得る。

[0197] F(ab)の態様での提示のためにベクターが構築される場合、抗原結合分子の可変領域および抗原結合分子の定常領域をコードする核酸配列がこのベクターに含まれる。軽鎖可変領域をコードする核酸は、軽鎖定常領域をコードする核酸配列に融合される。抗原結合分子の重鎖可変領域をコードする核酸配列は、重鎖定常CH1領域をコードする核酸配列に融合される。一般的には、重鎖可変領域および定常領域をコードしている核酸配列は、ウイルスコートタンパク質のすべてまたは一部をコードしている核酸配列に融合される。重鎖可変領域および定常領域は好ましくはウイルスコートタンパク質の少なくとも一部との融合体として発現され、軽鎖可変領域および定常領域は、重鎖ウイルスコート融合タンパク質とは別々に発現される。重鎖および軽鎖は互いと結合するが、その結合は共有結合でも非共有結合でもあり得る。任意に、例えば精製または検出に役立つポリペプチド標識をコードしている他の配列が、抗原結合分子の軽鎖定常領域もしくは抗原結合分子の重鎖定常領域のい

ずれかまたは両方をコードしている核酸配列の3’末端に融合され得る。

[0198] 宿主細胞へのベクターの導入

前記のように構築されたベクターは、増幅および/または発現のために宿主細胞に導入される。ベクターは、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿などを含む公知の形質転換法によって、宿主細胞に導入され得る。ベクターがウイルスのような感染性の粒子である場合、ベクター自体が宿主細胞に侵入する。融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドが挿入されている複製可能な発現ベクターによる宿主細胞のトランスフェクションおよび公知の手法によるファージ粒子の生産によって、融合タンパク質がファージ粒子の表面に提示される。

[0199] 複製可能な発現ベクターは、様々な方法を使用して宿主細胞に導入され得る。非限定な一実施態様では、ベクターはWO2000106717に記載されているようにエレクトロポレーション法を使って細胞に導入され得る。細胞は標準の培養液中で任意に約6ないし48時間（または600 nmにおけるODが0.6ないし0.8になるまで）、37℃で培養し、次に培養液を遠心分離することによって（例えばデカンテーションにより）培養上清が取り出される。精製の初期段階では、好ましくは緩衝液（例えば1.0 mMのHEPES（pH7.4））中に細胞ペレットが再懸濁される。次に再度の遠心分離によって懸濁液から上清が取り出される。得られた細胞ペレットは例えば5-20%V/Vに希釈されたグリセリンに再懸濁される。再度遠心分離によって懸濁液から上清を取り除くことによって細胞ペレットが得られる。当該細胞ペレットを水または希釈されたグリセリンの中に再懸濁することによって得られる菌体濃度の測定値をもとづいて、最終的な菌体濃度が水または希釈されたグリセリンを用いて所望の濃度に調製される。

[0200] 例えば、好ましい受容細胞として、エレクトロポレーション応答能のある大腸菌株SS320（Sidhuら（Methods Enzymol. (2000) 328, 333-363））が挙げられる。大腸菌株SS320は、稔性エピソーム（F’プラスミド）またはXL1-BLUEをMC1061細胞に移転するのに十分な条件の下で、MC1061細胞をXL1-BL

UE細胞と交接させて調製された。ATCC（10801 University Boulevard, Manassas, Virginia）に寄託された大腸菌株SS320に対して寄託番号98795が与えられている。この菌株でのファージ複製を可能にするいかなるF'エピソームでも、本発明で用いられ得る。適切なエピソームはATCCに寄託されている株から入手可能であるし、または市販品も入手可能である（TG1, CJ236、CSH18、DHF'、ER2738、JM101、JM103、JM105、JM107、JM109、JM110、KS1000、XL1-BLUE、71-18等）。

[0201] エレクトロポレーションでより高いDNA濃度（約10倍）を使用すると、形質転換率が向上し、宿主細胞に形質転換されるDNAの量が増加する。高い菌体濃度の使用も効率を高める（約10倍）。移転されたDNA量の増加により、より大きな多様性を有し、配列の異なる独立クローンの数が大きなライブラリが作製され得る。形質転換細胞は、通常、抗生物質を含む培地上の増殖の可否によって選択される。

[0202] 条件によって結合活性が変化する抗原結合分子の選択方法および当該分子をコードするポリヌクレオチドの単離方法

抗原に対して所望の結合活性を示す抗原結合分子を同定するためのファージディスプレイの使用方法は、様々な改変が加えられた方法も含め、当技術分野で確立されている。非限定の一態様では、融合ポリペプチドをコードしている遺伝子融合体と作用可能に連結した転写調節要素を含むように構築された複製可能なベクターのライブラリが、適切な宿主細胞に形質転換される。形質転換された細胞を培養して前記融合ポリペプチドをファージ粒子表面で提示するファージ粒子が形成される。その後、選択の過程で抗原に結合しない粒子と比較して結合する粒子の集団を増加させる目的で、少なくとも粒子集団の一部が抗原と結合するように組換え体ファージ粒子を対象抗原と接触させることによる選択、分画を伴う「結合分子を選択する」ステップが実施される。異なるまたは同じ反応条件で同じ集団をさらに1回スクリーニングするために、分画された集団を、例えば新鮮なXL1-Blue細胞等の宿主細胞に感染させることによって当該集団が増幅される。つぎに、得られた抗原結合

分子の増幅された集団と、イオン濃度の異なる条件下において抗原に接触させるステップが実施され、所望の条件で抗原に結合する抗原結合分子がスクリーニングされる。また、イオン濃度の異なる条件下において抗原に接触させるステップを前記の選択方法の最初のステップとして実施することも可能であるし、「結合分子を選択する」ステップとイオン濃度の異なる条件下で結合活性が変化している結合分子を選択するステップの組合せは適宜変更され得る。また、前記の選択および分画のステップは何回でも実施され得る。これらのイオン濃度の異なる条件下において抗原に結合する抗原結合分子は、生体に投与されたときに病因となる抗原を生体から速やかに除去する能力を有する治療薬として有用である。

[0203] 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アミノ酸および/またはフレキシブル残基を含んでいる可変領域またはその一部の融合ポリペプチドは、ファージ、ファージミド粒子または細胞の表面に発現される。次にイオン濃度の異なる条件下における、融合ポリペプチドの集団中の構成メンバーの抗原に結合する能力について選択および/または分画がされ得る。融合ポリペプチドに対する選択、分画およびスクリーニングの方法は、protein Lまたはファージ上で提示される抗原結合分子もしくはその断片と結合する標識抗体のような抗原結合分子の可変領域と親和性を有する一般的なタンパク質上での選択、分画およびスクリーニングの方法も含まれる。こうした方法は正しくフォールドされた抗原結合分子（を含む融合ポリペプチド）の断片を提示するライブラリサイズまたはライブラリ当量数を豊富にするために使用され得る。

[0204] 前記の選択、分画およびスクリーニングのために2つの主な方策が使用され得る。第1の方策は固体担体方法またはプレートスクリーニングまたは固定化抗原スクリーニングであり、第2の方策は、溶液結合方法である。

[0205] 「固体担体方法」では、抗原は当技術分野で公知の適切な固体または半固体マトリックス、例えばアガロースビーズ、アクリルアミドビーズ、ガラスビーズ、セルロース、様々なアクリルコポリマー、メタクリル酸ヒドロキシ

アルキルゲル、ポリアクリルおよびポリメタクリルコポリマー、ナイロン、中性およびイオン性担体などに結合され得る。マトリックスに対する抗原の結合は、Methods in Enzymology (1976) 44に記載されている方法、または当技術分野で公知の他の手段によって達成され得る。

[0206] マトリックスへの抗原の結合の後、ファージ粒子集団の少なくとも1サブセットと固定化抗原との結合に適した条件下で、固定化された抗原と融合ポリペプチドを発現しているライブラリとを接触させる。通常、pH、イオン強度、温度等を含む条件は、生理学的条件を模倣する条件が選択される。前記の固定化抗原と結合する粒子(「結合体」)は、水洗により対象と結合しない粒子から分離される。洗浄条件は、高親和性の結合体以外のすべてが取り除かれるように調節され得る。結合体は様々な方法によって固定化された対象から解離させることができる。これらの方法には例えば過剰な抗原等の野生型リガンドを用いる競合的解離、pHおよび/またはイオン強度の変更、ならびに当技術分野で公知の方法が含まれる。結合体は、一般的に0.1 MのHClなどの酸またはリガンドのような、適当な溶出材料によってアフィニティーマトリックスから溶出され得る。リガンドの濃度を上昇させて溶出することによって、提示されたより親和性の高い結合分子を溶出させることも可能である。

[0207] 単離された結合体であるウイルス粒子(および、例えばウイルス粒子がファージミド粒子である場合は必要に応じてヘルパーファージ)を細胞に感染させることによって、結合体が適切な宿主細胞で再増幅され得る。こうして得られた宿主細胞は所望の融合ポリペプチドを提示する粒子の増幅に適した条件下で培養される。次にファージ粒子を採取し、抗原の結合体が相当の割合を占めるまで選択工程が1回または複数回繰り返される。選択またはスクリーニングは何回も行われ得る。選択またはスクリーニング方法の1つとして、protein Lまたは提示されるポリペプチドに存在するポリペプチドタグに対する抗体、例えばgDタンパク質またはポリヒスチジンタグに対する抗体のような一般の親和性タンパク質と結合する結合体を単離することも含まれ得る

。

[0208] 本発明の1つの態様として、「溶液結合方法」と呼ばれる溶相スクリーニング法が適宜使用され得る。ランダムなライブラリから、あるいは所望の結合クローンまたはクローン群の結合活性を改善することを目的としたライブラリから改善された結合体を見つけるために溶液結合方法が使用され得る。複数のポリペプチド、例えばファージまたはファージミド粒子（ライブラリー）上で提示されるポリペプチドと、タグ分子で標識されたまたはタグ分子と融合された抗原との接触が、この方法には含まれる。タグはビオチンまたは他の特異的結合体が利用可能である。第1の溶液結合相で濃度を段階的に低くした標識されたまたは融合された抗原を用いて、溶相のストリンジェンシーが変化され得る。さらにストリンジェンシーを高めるために、第1の溶相での最初のタグ分子で標識されたまたは標識タグ分子と融合された抗原との結合の後に、追加的にタグ分子で標識されていないまたは標識タグ分子と融合されていない高濃度の抗原を有する第2の溶相と接触させることも適宜実施され得る。その場合には、通常、標識対象の100から1000倍の量のタグ分子で標識されていないまたは標識タグ分子と融合されていない抗原が第2相で使われる。第1の溶相のインキュベーション時間は、平衡に達するまで2、3分から1、2時間またはそれ以上の範囲である。結合速度の速い結合体はこの第1相における結合時間が短い性質を有する傾向があるため、結合時間を短くする接触の条件が採用されうる。第2相のインキュベーションの時間および温度は、ストリンジェンシーを高めるために変化させ得る。こうしたインキュベーションの条件の変化によって、対象から離れる速度（解離速度）が遅い結合体に対する選択の偏りが生じる。ファージ/ファージミド粒子上で提示された複数のポリペプチドと抗原とを接触させた後に、タグ分子で標識されたまたは標識タグ分子と融合された抗原と結合したファージまたはファージミド粒子が、結合しないファージまたはファージミド粒子から分離される。タグ分子で標識されたまたは標識タグ分子と融合された抗原との結合が可能になるような範囲で短い時間（例えば2～5分間）、ファージまたはファージミド粒子と抗

原とを接触させることによって、溶相からファージまたはファージミド粒子と抗原との混合物が単離される。タグ分子で標識されたまたは標識タグ分子と融合された抗原の初期濃度の範囲は、約0.1 nMから約1000 nMまでである。当該混合物から溶出された粒子は、次のスクリーニングのために増殖させることができる。各回のスクリーニングにおいて、タグ分子で標識されたまたは標識タグ分子と融合された低濃度の抗原を用いてスクリーニングを複数回繰り返すのが好ましい。後述する実施例に記載されるように、標識タグ分子としてビオチンが使用される場合には、ストレプトアビジンがコートされた磁気ビーズ等が溶液結合方法において適宜使用され得る。

[0209] 固体担体方法と溶液結合方法の組合せは、所望の特性を有している結合体を単離するために適宜単独でまたは組み合わせて実施され得る。抗原に対して2回、3回もしくは4回選択およびスクリーニングを繰り返した後、所望の性質/特性を有する特異的結合体を同定するために選択された集団から個々のクローンのスクリーニングが通常実行される。好ましくは、スクリーニングのプロセスは、ライブラリに対する高スループットスクリーニングを可能にする自動化システムによって実行され得る。

[0210] 結合体が抗原に対する結合により同定された後、当該結合体から核酸が抽出され得る。抽出されたDNAは次に大腸菌宿主細胞を形質転換するのに直接用いられる。あるいは、そのコード配列が、例えばPCRによって適切なプライマーを使って増幅されたのちに、典型的シークエンシング方法によってその配列が決定され得る。次にそのコードする抗原結合分子の発現のために、結合体の可変領域をコードするDNAが、制限酵素を用いて消化されたベクターに挿入され得る。

[0211] 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が変化した抗原結合分子またはその融合ポリペプチドを発現するファージ粒子を選択し、スクリーニングするために、固定化された抗原と抗原結合分子または融合ポリペプチドを発現しているファージ粒子を含むライブラリとを接触させる条件を変化させることによって、抗原に対する結合活性をが変

化するファージ粒子の集団が分画される。

[0212] 例えば、金属イオンの好適な例としてカルシウムイオンが着目される場合には、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。

[0213] 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200 μMから2mM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。

[0214] 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。

[0215] 本発明において、抗原結合分子の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。

[0216] 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抗原結合分子またはその融合ポリペプチドを発現するファージ粒子を選択し、スクリーニングするために、最初に高カルシウム濃度の条件下で固定化された抗原に結合するファージ粒子の集団が分画された後に、その分画された集団と抗原とを低カルシウム濃度の条件下で固定化された抗原と抗原結合分子または融合ポリペプチドを発現しているファージ粒子を含むライブラリとを接触させる。低カルシウム濃度の条件下で固定化された抗原に結合しないファージ粒子が上清またはその後の洗浄液に分画される。高カルシウム濃度および低カルシウム濃度の条件は、上記に記載された範囲内で適宜採用され得る。非限定な一態様では、0.1 μM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と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の活性の相違にもとづいて分画され得る。また、別の非限定の態様で

は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と、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の活性の相違にもとづいて分画され得る。さらに別の非限定の態様では、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に対する結合と、生体内の血漿中のカルシウムイオン濃度における抗原に対する結合の活性の相違、具体的には、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と、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の活性の相違にもとづいて分画され得る。

[0217] 例えば、イオン濃度の好適な例として水素イオン濃度が着目される場合には、水素イオン濃度の条件としてpH酸性域の条件と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、pH酸性域とpH中性域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。

[0218] 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。

[0219] 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。

[0220] 本発明において、抗原結合分子のpH酸性域条件下における抗原に対する結合活性がpH中性域条件下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。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。

[0221] 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、例えば前記の異なるpHの条件下での結合活性の測定方法に準じて実施される。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。

[0222] 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い抗原結合分子またはその融合ポリペプチドを発現するファージ粒子を選択し、スクリーニングするために、最初にpH中性域の条件下で固定化され

た抗原に結合するファージ粒子の集団が分画された後に、その分画された集団と抗原とをpH酸性域の条件下で固定化された抗原と抗原結合分子または融合ポリペプチドを発現しているファージ粒子を含むライブラリとを接触させる。pH酸性域の条件下で固定化された抗原に結合しないファージ粒子が上清またはその後の洗浄液に分画される。pH中性域およびpH酸性域の条件は、上記に記載された範囲内で適宜採用され得る。非限定な一態様では、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と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の活性の相違にもとづいて分画され得る。また、別の非限定の態様では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と、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の活性の相違にもとづいて分画され得る。さらに、別の非限定の態様では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と、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の活性の相違にもとづいて分画され得る。そのほか、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と、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の活性の相違にもとづいて分画され得る。さらに別の非限定の態様では、生体内の早期エンドソーム内のpHにおける抗原に対する結合と、生体内の血漿中のpHにおける抗原に対する結合の活性の相違、具体的には、pH5.8での抗原に対する結合と、pH7.4での抗原に対する結合の活性の相違にもとづいて分画され得る。

[0223] 条件によって結合活性が変化する抗原結合分子の製造方法

本発明の非限定の一態様では、前記のように選択された条件によって結合活性が変化する抗原結合分子分子をコードするポリヌクレオチドが単離された後に、当該ポリヌクレオチドが適切な発現ベクターに挿入される。すなわち、目的とする抗原結合分子の可変領域をコードするcDNAが得られた後に、当該cDNAの両末端に挿入され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、抗原結合分子の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原結合分子の可変領域をコードするcDNAを適当な発現ベクターに挿入することによって、本発明の抗原結合分子の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、前記可変領域をコードする遺伝子とがインフレームで融合され得る。

[0224] 所望の抗原結合分子を製造するために、抗原結合分子をコードするポリヌクレオチドが制御配列に作用可能に連結された態様で発現ベクターに組み込まれる。制御配列とは、例えば、エンハンサーやプロモーターを含む。また、発現した抗原結合分子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連結され得る。例えばシグナル配列として、アミノ酸配列MGWSCIILFLVATATGVHS（配列番号：１３）を有するペプチドが使用されるが、これ以外にも適したシグナル配列が連結され得る。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、所望の抗原結合分子をコードするポリヌクレオチドを発現する組換え細胞が取得され得る。

[0225] 抗原結合分子をコードするポリヌクレオチドの発現のために、抗原結合分子の重鎖および軽鎖をコードするポリヌクレオチドは、それぞれ別の発現ベクターに組み込まれる。重鎖と軽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、重鎖と軽鎖を備えた抗原結合分子が発現され得る。あるいは重鎖および軽鎖をコードするポリヌクレオチド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（WO19994011523を参照のこと）。

[0226] 単離された抗原結合分子をコードするポリヌクレオチドを適当な宿主に導入することによって抗原結合分子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分子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 (Chinese hamster ovary cell line)、COS (Monkey kidney cell line)、ミエローマ (Sp2/0、NS0等)、BHK (baby hamster kidney cell line)、HEK293 (human embryonic kidney cell line with sheared adenovirus (Ad)5 DNA)、PER.C6 cell (human embryonic retinal cell line transformed with the Adenovirus Type 5 (Ad5) E1A and E1B genes)、Hela、Vero、など (Current Protocols in Protein Science (May, 2001, Unit 5.9, Table 5.9.1))

（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

[0227] 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。

[0228] 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。

－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

－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

[0229] また、原核細胞を利用した抗原結合分子をコードするポリヌクレオチド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、目的とする抗原結合分子をコードするポリヌクレオチド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原結合分子が取得され得る。

[0230] 組換え抗原結合分子の産生には、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。すなわち所望の抗原結合分子をコードするポリヌクレオチドが導入された動物から、当該抗原結合分子を得ることができる。例えば、抗原結合分子をコードするポリヌクレオチドは、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カゼインなどが利用され得る。抗原結合分子をコードするポリヌクレオチド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、所望の抗原結合分子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原結合分子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）。

[0231] 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）された抗体等が含まれる。これらの改変抗原結合分子は、公知の方法を用いて適宜製造される。

[0232] 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原結合分子の可変領域は、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、抗原結合分子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原結合分子の間でも、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、ある抗原結合分子の結合特異性を、他の抗原結合分子の移植する

ことができる。

[0233] 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。

[0234] 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。

[0235] 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。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、該組換え細胞を培養し、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、該ヒト化抗体が該培養細胞の培養物中に産生される（EP 239400、WO1996002576）。

[0236] 上記のように作製されたヒト化抗体の抗原への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への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（Satoら（Cancer Res, (1993) 53, 851-856））。

[0237] 本発明の非限定な一態様において、前記のように選択された条件によって結合活性が変化する抗原結合分子分子をコードするポリヌクレオチドが単離された後に、当該ポリヌクレオチドの改変体が適切な発現ベクターに挿入される。このような改変体の一つとして、ランダム化可変領域ライブラリとして、合成ライブラリや非ヒト動物を起源として作製された免疫ライブラリを用いることによってスクリーニングされた本発明の抗原結合分子をコードするポリヌクレオチド配列がヒト化された改変体が好適に挙げられる。ヒト化された抗原結合分子の改変体の作製方法は、前記のヒト化抗体の作製方法と同様の方法が採用され得る。

[0238] また、改変体のその他の態様として、ランダム化可変領域ライブラリとして合成ライブラリやナイーブライブラリを用いることによってスクリーニングされた本発明の抗原結合分子の抗原に対する結合親和性の増強（アフィニティ成熟化）をもたらすような改変が、単離されたポリヌクレオチド配列に施された改変体が好適に挙げられる。そのような改変体はCDRの変異誘導（Yangら（J. Mol. Biol. (1995) 254, 392-403））、鎖シャッフリング（Marksら（Bio/Technology (1992) 10, 779-783））、E.coliの変異誘発株

の使用（Lowら（J. Mol. Biol. (1996) 250, 359-368））、DNAシャッフリング（Pattenら（Curr. Opin. Biotechnol. (1997) 8, 724-733））、ファージディスプレイ（Thompsonら（J. Mol. Biol. (1996) 256, 77-88））および有性PCR（sexual PCR）（Clameriら（Nature (1998) 391, 288-291））を含む種々のアフィニティー成熟化の公知の手順によって取得され得る。

[0239] 前記のように、本発明の製造方法によって作製される抗原結合分子として、FcRn（特にヒトFcRn）結合ドメインを含む抗原結合分子が挙げられるが、FcRn（特にヒトFcRn）結合ドメインとして様々な改変体が使用され得る。このようなFcRn（特にヒトFcRn）結合ドメインの改変体をコードするポリヌクレオチドと、前記のように選択された条件によって結合活性が変化する抗原結合分子分子をコードするポリヌクレオチドとがインフレームで連結された重鎖を有する抗原結合分子をコードするポリヌクレオチドも、本発明の改変体の一態様として好適に挙げられる。

[0240] 本発明の非限定な一態様では、FcRn（特にヒトFcRn）結合ドメインとして、例えば、配列番号：１４で表されるIgG1（N末端にAla が付加されたAAC82527.1）、配列番号：１５で表されるIgG2（N末端にAlaが 付加されたAAB59393.1）、配列番号：１６で表されるIgG3（CAA27268.1）、配列番号：１７で表されるIgG4（N末端にAlaが付加されたAAB59394.1）等の抗体の定常領域が好適に挙げられる。IgG分子の血漿中滞留性が比較的長い（血漿中からの消失が遅い）のは、IgG分子のサルベージレセプター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分子はライソソームへと進み、そこで分解されるが、FcRnへ結合したIgG分子は細胞表面へ移行し血漿中の中性条件下においてFcRnから解離することで再び血漿中に戻る。

[0241] 抗原に対して血漿中の高カルシウム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濃度の条件下において抗原から解離する本発

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結合活性が変化する抗原結合分子」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。抗原に対して血漿中の高カルシウム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濃度の条件下において抗原から解離する本発明の「カルシウムイオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合分子」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。すなわち、1分子の当該抗原結合分子が複数の抗原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がエンドソーム内で解離することで血漿中にリサイクルされないため、抗原結合分子による抗原の細胞内への取り込みを促進し、抗原結合分子の投与により抗原の消失を促進し、血漿中の抗原濃度を低下させることが可能となる。

[0242] また、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、エンドソーム内の酸性条件下において抗原から解離する本発明の「pH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分子」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。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、エンドソーム内の酸性条件下において抗原から解離する本発明の「pH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分子」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。すなわち、1分子の当該抗原結合分子が複数の抗原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がエンドソーム内で解離することで血漿中にリサイクルされないため、抗原結合分子による抗原の細胞内への取り込みを促進し、抗原結合分子の投与により抗原の消失を促進し、血漿中の抗原濃度を低下させることが可能となる。

[0243] 抗原に対して血漿中の高カルシウム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濃度の条件下において抗原から解離する本発明の「カルシウムイオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化す

る抗原結合分子」に、血漿中の高カルシウム濃度の条件下におけるFcRnに対する結合を付与することによって、当該抗原結合分子と抗原との複合体の細胞内への取り込みが促進される。すなわち、当該抗原結合分子の投与によって血漿中からの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。

[0244] また、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酸性条件下において抗原から解離する本発明の「pH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分子」に、血漿中のpH中性域の条件下におけるFcRnに対する結合を付与することによって、当該抗原結合分子と抗原との複合体の細胞内への取り込みが促進される。すなわち、当該抗原結合分子の投与によって血漿中からの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。

[0245] 通常のFc領域を含む抗体は血漿中のpH中性域の条件下においてFcRnに対する結合活性を有しないため、通常の抗体および抗体－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pH酸性域の条件下でFcRnに結合することで細胞表面に輸送される。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が、細胞表面のpH中性域の条件下では抗体はFcRnから解離するため、抗体は血漿中にリサイクルされる。

[0246] 前記の、FcRn結合ドメインであるFc領域を含む抗体の生体内での動態を考慮すると、抗原に対して血漿中の高カルシウム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濃度の条件下において抗原から解離する本発明の「カルシウムイオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合分子」は、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ため、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り込み速度と等しくなると考えられる。抗原結合分子の抗原に対する結合の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解離しない抗原が血漿中にリサイクルされてし

まうが、抗原結合分子の抗原に対する結合のカルシウムイオン濃度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り込みが律速となる。

[0247] また、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酸性条件下において抗原から解離する本発明の「pH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分子」は、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ため、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り込み速度と等しくなると考えられる。抗原結合分子の抗原に対する結合のpH依存性が不十分な場合は、エンドソーム内において解離しない抗原が血漿中にリサイクルされてしまうが、抗原結合分子の抗原に対する結合の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り込みが律速となる。

[0248] よって、FcRn結合ドメインを含む抗原結合分子にpH中性域におけるFcRnへの結合能を付与することによって、細胞表面に存在するFcRnに結合した当該抗原結合分子が、FcRn依存的に細胞に取り込まれる。FcRnを介した細胞への取込み速度は、非特異的なエンドサイトーシスによる細胞への取込み速度よりも早いため、pH中性域におけるFcRnへの結合能を付与することによって、抗原の血漿中からの消失速度をさらに速めることが可能である。すなわち、pH中性域においてFcRnに対する結合能を有する抗原結合分子は、通常の（血漿中のpH中性域の条件下においてFcRnに対する結合活性を有しない）Fc領域を含む抗原結合分子よりも速やかに抗原を細胞内に送り込み、エンドソーム内で抗原を解離し、再び細胞表面ないしは血漿中にリサイクルされ、そこで再び抗原に結合し、またFcRnを介して細胞内に取り込まれる。pH中性域においてFcRnに対する結合能を高くすることで、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。さらに、抗原結合分子のpH酸性域における抗原結合活性をpH中性域における抗原結合活性より低下させることによって、更にその効率を高めることが可能

である。また1分子の抗原結合分子によるこの回転数が多くなることによって、1分子の抗原結合分子によって結合できる抗原の数も多くなると考えられる。

[0249] 本発明の抗原結合分子は、抗原結合ドメインとFcRn（特にヒトFcRn）結合ドメインからなり、FcRn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、抗原結合分子の低カルシウムイオン濃度の条件下における抗原結合活性（結合能）を高カルシウムイオン濃度の条件下における抗原結合活性より低下させ、および/または、血漿中でのpH中性域におけるFcRnへの結合活性を増大させることにより、抗原結合分子による抗原の細胞内への取込を促進させ、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。

[0250] また、本発明の抗原結合分子は、抗原結合ドメインとFcRn結合ドメインからなり、FcRn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酸性域の条件下における抗原結合活性（結合能）をpH中性域の条件下における抗原結合活性より低下させ、および/または、血漿中でのpH中性域におけるFcRnへの結合活性を増大させることにより、抗原結合分子による抗原の細胞内への取込を促進させ、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。

[0251] 抗体定常領域等のFcRn結合ドメインの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。

[0252] 抗体定常領域等のFcRn結合ドメインのヒト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、WO2009125825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、抗体定常領域等のFcRn結合ドメインのヒト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。抗体定常領域等のFcRn結合ドメインとヒト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ヒトFcRnを固定化したチップへ、それぞれヒト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。

[0253] 抗体定常領域等のFcRn結合ドメインまたはFcRn結合ドメインを含む抗原結合分子と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、特に好ましくはインビボの血漿中（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。本発明において、ヒトFcRn結合ドメインまたはヒトFcRn結合ドメインを含む抗原結合分子と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、インビボ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、ヒトFcRn結合ドメインまたはヒトFcRn結合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は、10℃～50℃の任意の温度で評価してもよい。好ましくは、ヒトFcRn結合ドメインまたはヒトFcRn結合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、ヒトFcRn結合ドメインまたはヒトFcRn結合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。

[0254] The Journal of Immunology (2009) 182: 7663-7671によれば、天然型ヒトIgG1のヒトFcRn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酸性域におけるヒトFcRn結合活性がKD 20μMまたはそれより強く、pH中性域におけるヒトFcRn結合活性が天然型ヒトIgGと同等かそれより強い抗原結合分子を含む、pH酸性域およびpH中性域においてヒトFcRn結合活性を有する本発明の抗原結合分子がスクリーニングされ得る。より好ましい態様においては、pH酸性域におけるヒトFcRn結合活性がKD 2.0μMまたはそれより強く、pH中性域におけるヒトFcRn結合活性がKD 40μMまたはそれより強い抗原結合分子がスクリーニングされ得る。さらにより好ましい態様においては、pH酸性域におけるヒトFcRn結合活性がKD 0.5μMまたはそれより強く、pH中性域におけるヒトFcRn結合活性がKD 15μMまたはそれより強い抗原結合分子がスクリーニングされ得る。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。

[0255] 本発明においては、pH酸性域およびpH中性域においてヒトFcRn結合活性を有するFcRn結合ドメインが好ましい。当該ドメインは、あらかじめpH酸性域およびpH中性域においてヒトFcRn結合活性を有しているFcRn結合ドメインであればそのまま用いられ得る。当該ドメインがpH酸性域および/またはpH中性域においてヒトFcRn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ヒトFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメインが取得され得るが、ヒトFcRn結合ドメイン中のアミノ酸

を改変することによってpH酸性域および/またはpH中性域における所望のヒトFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメインも好適に取得され得る。また、あらかじめpH酸性域および/またはpH中性域においてヒトFcRn結合活性を有しているFcRn結合ドメイン中のアミノ酸の改変によって、所望のヒトFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメインも取得され得る。そのような所望の結合活性をもたらすヒトFcRn結合ドメインのアミノ酸改変は、アミノ酸改変前と改変後のpH酸性域および/またはpH中性域におけるヒトFcRn結合活性を比較することによって見出され得る。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。

[0256] 本発明において、FcRn結合ドメインの「アミノ酸の改変」または「アミノ酸改変」とは、出発FcRn結合ドメイン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FcRn結合ドメインの修飾改変体がpH酸性域および/または中性域においてヒトFcRnに結合することができる限り（ゆえに、出発FcRn結合ドメインはpH酸性域および/または中性域の条件下におけるヒトFcRnに対する結合活性を必ずしも必要とするわけではない）いずれのFcRn結合ドメインも出発ドメインとして使用され得る。出発FcRn結合ドメインの例としては、IgG抗体の定常領域、すなわち配列番号：１４から１７のいずれかで表される天然型の定常領域が好適に挙げられる。また、既に改変が加えられたFcRn結合ドメインを出発FcRn結合ドメインとしてさらなる改変が加えられた改変FcRn結合ドメインも本発明の改変FcRn結合ドメインとして好適に使用され得る。出発FcRn結合ドメインとは、ポリペプチドそのもの、出発FcRn結合ドメインを含む組成物、または出発FcRn結合ドメインをコードするアミノ酸配列を意味し得る。出発FcRn結合ドメインには、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IgG抗体のFcRn結合ドメインが含まれ得る。出発FcRn結合ドメインの起源は、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FcRn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Fc領域として適宜用いることができることを意味する。ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG3、ヒトIgG4 Fc領域としては、遺伝子多形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。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FcRn結合ドメインを、好ましくは出発FcRn結合ドメイン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、WO2009086320、WO2008092117、WO2007041635、およびWO2006105338）に記載されるがそれらに限定されない。

[0257] FcRn（特にヒトFcRn）結合ドメインを含む抗原結合分子にpH中性域におけるFcRn（特にヒトFcRn）への結合能を付与するために、FcRnとの結合に関与するFcRn結合ドメイン中のアミノ酸に適宜変異が加えられる。FcRn結合ドメインとして抗体IgG分子の定常領域が用いられる場合には、例えば、EUナンバリングで表される221位～225位、227位、228位、230位、232位、233～241位、243～252位、254～260位、262～272位、274位、276位、278～289位、291～312位、315～320位、324位、325位、327～339位、341位、343位、345位、360位、362位、370位、375～378位、380位、382位、385～387位、389位、396位、414位、416位、423位、424位、426～438位、440位および442位の位置のアミノ酸が天然型IgGの定常領域の相当するアミノ酸とは異なる改変された定常

領域が挙げられる。より具体的には、例えばEUナンバリングで表される256位のアミノ酸がPro、280位のアミノ酸がLys、339位のアミノ酸がThr、385位のアミノ酸がHis、428位のアミノ酸がLeu、および/または434位のアミノ酸がTrp、Tyr、Phe、AlaもしくはHisのいずれかである定常領域の改変体が挙げられる。これらの改変体を使用することで、IgG型免疫グロブリンのFc領域のpH中性域におけるヒトFcRnに対する結合活性を強くすることが可能である。

[0258] また、pH酸性域におけるヒトFcRnに対する結合を天然型IgGの定常領域と比較して強くすることができる改変体も適宜使用され得る。これらの改変体のうち、pH中性域においてもヒトFcRnに対する結合を強くすることが出来る改変体が適宜選択され、本発明に使用することが可能である。そのような例として、定常領域におけるEUナンバリングで表されるアミノ酸が天然型IgGの定常領域の相当するアミノ酸とは異なる改変された定常領域が挙げられる。そのようなアミノ酸の改変例として表1に挙げられるアミノ酸を含む定常領域の改変体が好適に使用され得る。

[0259]

[表1]

位置	アミノ酸改変
221	Y, K
222	Y
223	E, K
224	Y, E
225	E, K, W
227	K, E, G
228	Y, K, G
230	E, G
232	K
233	R, S, M, T, W, Y, G
234	H, R, E, I, V, F, D, Y, G
235	Y, V, N, S, T, Q, D
236	I, V, K, P, E, Q, H, W, Y, D, T, M, A, F, S, N, R
237	I, W, S, T, E, R, N, Q, K, H, D, P, L, M
238	A, L, D, S, T, H, W, V, I, G, M, F, E, K
239	M, R, T, G, V, E, D, L, A
240	I, M, T
241	E, W, L
243	E, W
244	L
245	R
246	Y, H
247	D
248	Y
249	P, Q, Y, H
250	I, E, Q
251	T, D
252	Y, W, Q
254	H
255	E, Y, H
256	A
257	A, I, M, N, S, V, T, L, Y, C
258	D, Y, H, A
259	I, F, N
260	S, D, E, H, Y
262	L, E
263	I
264	F, A, I, T, N, S, D
265	R, P, G, A
266	I
267	K, E, A
268	E, M
269	M, W, K, P, I, S, G, V, F, Y, A
270	K, S, I, A
271	A, V, S, Y, I, T
272	A, L, R, I, D, H, V, W, Y, P, T
274	M, F, G, E, I, T, N
276	D, F, H, R, L, V, W, A
278	R, S, V, M, N, I, L, D
279	A, D, G, H, M, N, Q, R, S, T, W, Y, C, I
281	D, Y
282	G, K, E, Y
283	A, D, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, W, Y
284	T, L, Q, E
285	N, Y, W, Q, K, E, D, Y
286	F, L, Y, E, P, D, K, A
287	S, H
288	N, P, Y, H, D, I, V, C, E, G, L, Q, R
289	H
291	Q, H
292	Y, E, D
293	V
294	I, K, G
295	V, T
296	E, I, L
298	F, E, T, H

位置	アミノ酸改変
299	W, F, H, Y
300	K, A, G, V, M, Q, N, E
301	E
302	I
303	Y, E, A
304	N, T
305	A, H
306	Y
307	A, E, M, G, Q, H
308	A, R, F, C, Y, W, N, H
311	A, I, K, L, M, V, W, T, H
312	A, P, H
315	T, H
316	K
317	A, P, H
318	N, T, R, L, Y
319	L, I, W, H, M, V, A
320	L, W, H, N
324	T, D
325	F, M, D
326	A
327	D, K, M, Y, H, L
328	G, A, W, R, F
329	K, R, W
330	G, W, V, P, H, F
331	L, F, Y
332	F, H, K, L, M, R, S, W, T, Q, E, Y, D, N, V
333	L, F, M, A
334	A
335	H, F, N, V, M, W, I, S, P, L
336	E, K
337	A
338	A
339	N, W
341	P
343	E, H, K, Q, R, T, Y
360	H, A
362	A
375	R
376	A, G, I, M, P, T, V
377	K
378	Q, D, N, W
380	A, N, S, T, Q, R, H
382	A, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y
385	N, E
386	H
387	H, Q
414	A
423	N
424	A
426	H, L, V, R
427	N
428	F
429	Q
430	A, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, Y
431	H, K
432	H
433	P
434	G, T, M, S,
435	K
436	I, L, T
437	H
438	K, L, T, W
440	K
442	K

[0260] 特に好ましいアミノ酸の改変として、例えばEUナンバリング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位で表されるアミノ酸を天然型IgGの定常領域の相当するアミノ酸と異なるアミノ酸へ置換する改変が挙げられる。これらのアミノ酸から選択される少なくとも１つのアミノ酸を他のアミノ酸に改変することによって、FcRn結合ドメインのpH中性域におけるヒトFcRnに対する結合活性を高めることができる。

[0261] 特に好ましい改変としては、例えば、天然型IgGの定常領域の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

である改変が好適に挙げられる。また、改変されるアミノ酸の数は特に限定されず、1箇所のみのアミノ酸を改変してもよいし、2箇所以上のアミノ酸を改変してもよい。2箇所以上のアミノ酸の改変の組合せとしては、例えば表2に記載されるような組合せが挙げられる。

[0262]

[表2-1]

変異体	KD (M)	アミノ酸改変部位
F1	8.10E-07	N434W
F2	3.20E-06	M252Y/S254T/T256E
F3	2.50E-06	N434Y
F4	5.80E-06	N434S
F5	6.80E-06	N434A
F7	5.60E-06	M252Y
F8	4.20E-06	M252W
F9	1.40E-07	M252Y/S254T/T256E/N434Y
F10	6.90E-08	M252Y/S254T/T256E/N434W
F11	3.10E-07	M252Y/N434Y
F12	1.70E-07	M252Y/N434W
F13	3.20E-07	M252W/N434Y
F14	1.80E-07	M252W/N434W
F19	4.60E-07	P257L/N434Y
F20	4.60E-07	V308F/N434Y
F21	3.00E-08	M252Y/V308P/N434Y
F22	2.00E-06	M428L/N434S
F25	9.20E-09	M252Y/S254T/T256E/V308P/N434W
F26	1.00E-06	I332V
F27	7.40E-06	G237M
F29	1.40E-06	I332V/N434Y
F31	2.80E-06	G237M/V308F
F32	8.00E-07	S254T/N434W
F33	2.30E-06	S254T/N434Y
F34	2.80E-07	T256E/N434W
F35	8.40E-07	T256E/N434Y
F36	3.60E-07	S254T/T256E/N434W
F37	1.10E-06	S254T/T256E/N434Y
F38	1.00E-07	M252Y/S254T/N434W
F39	3.00E-07	M252Y/S254T/N434Y
F40	8.20E-08	M252Y/T256E/N434W
F41	1.50E-07	M252Y/T256E/N434Y
F42	1.00E-06	M252Y/S254T/T256E/N434A
F43	1.70E-06	M252Y/N434A
F44	1.10E-06	M252W/N434A
F47	2.40E-07	M252Y/T256Q/N434W
F48	3.20E-07	M252Y/T256Q/N434Y
F49	5.10E-07	M252F/T256D/N434W
F50	1.20E-06	M252F/T256D/N434Y
F51	8.10E-06	N434F/Y436H
F52	3.10E-06	H433K/N434F/Y436H
F53	1.00E-06	I332V/N434W
F54	8.40E-08	V308P/N434W
F56	9.40E-07	I332V/M428L/N434Y
F57	1.10E-05	G385D/Q386P/N389S
F58	7.70E-07	G385D/Q386P/N389S/N434W
F59	2.40E-06	G385D/Q386P/N389S/N434Y

[0263]

[表2-2]

F60	1.10E-05	G385H
F61	9.70E-07	G385H/N434W
F62	1.90E-06	G385H/N434Y
F63	2.50E-06	N434F
F64	5.30E-06	N434H
F65	2.90E-07	M252Y/S254T/T256E/N434F
F66	4.30E-07	M252Y/S254T/T256E/N434H
F67	6.30E-07	M252Y/N434F
F68	9.30E-07	M252Y/N434H
F69	5.10E-07	M428L/N434W
F70	1.50E-06	M428L/N434Y
F71	8.30E-08	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434W
F72	2.00E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434Y
F73	1.70E-07	M252Y/M428L/N434W
F74	4.60E-07	M252Y/M428L/N434Y
F75	1.40E-06	M252Y/M428L/N434A
F76	1.00E-06	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434A
F77	9.90E-07	T256E/M428L/N434Y
F78	7.80E-07	S254T/M428L/N434W
F79	5.90E-06	S254T/T256E/N434A
F80	2.70E-06	M252Y/T256Q/N434A
F81	1.60E-06	M252Y/T256E/N434A
F82	1.10E-06	T256Q/N434W
F83	2.60E-06	T256Q/N434Y
F84	2.80E-07	M252W/T256Q/N434W
F85	5.50E-07	M252W/T256Q/N434Y
F86	1.50E-06	S254T/T256Q/N434W
F87	4.30E-06	S254T/T256Q/N434Y
F88	1.90E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434W
F89	3.60E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434Y
F90	1.90E-08	M252Y/T256E/V308P/N434W
F91	4.80E-08	M252Y/V308P/M428L/N434Y
F92	1.10E-08	M252Y/S254T/T256E/V308P/M428L/N434W
F93	7.40E-07	M252W/M428L/N434W
F94	3.70E-07	P257L/M428L/N434Y
F95	2.60E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434F
F99	6.20E-07	M252Y/T256E/N434H
F101	1.10E-07	M252W/T256Q/P257L/N434Y
F103	4.40E-08	P238A/M252Y/V308P/N434Y
F104	3.70E-08	M252Y/D265A/V308P/N434Y
F105	7.50E-08	M252Y/T307A/V308P/N434Y
F106	3.70E-08	M252Y/V303A/V308P/N434Y
F107	3.40E-08	M252Y/V308P/D376A/N434Y
F108	4.10E-08	M252Y/V305A/V308P/N434Y
F109	3.20E-08	M252Y/V308P/Q311A/N434Y
F111	3.20E-08	M252Y/V308P/K317A/N434Y
F112	6.40E-08	M252Y/V308P/E380A/N434Y
F113	3.20E-08	M252Y/V308P/E382A/N434Y

[0264]

[表2-3]

F114	3.80E-08	M252Y/V308P/S424A/N434Y
F115	6.60E-06	T307A/N434A
F116	8.70E-06	E380A/N434A
F118	1.40E-05	M428L
F119	5.40E-06	T250Q/M428L
F120	6.30E-08	P257L/V308P/M428L/N434Y
F121	1.50E-08	M252Y/T256E/V308P/M428L/N434W
F122	1.20E-07	M252Y/T256E/M428L/N434W
F123	3.00E-08	M252Y/T256E/V308P/N434Y
F124	2.90E-07	M252Y/T256E/M428L/N434Y
F125	2.40E-08	M252Y/S254T/T256E/V308P/M428L/N434Y
F128	1.70E-07	P257L/M428L/N434W
F129	2.20E-07	P257A/M428L/N434Y
F131	3.00E-06	P257G/M428L/N434Y
F132	2.10E-07	P257I/M428L/N434Y
F133	4.10E-07	P257M/M428L/N434Y
F134	2.70E-07	P257N/M428L/N434Y
F135	7.50E-07	P257S/M428L/N434Y
F136	3.80E-07	P257T/M428L/N434Y
F137	4.60E-07	P257V/M428L/N434Y
F139	1.50E-08	M252W/V308P/N434W
F140	3.60E-08	S239K/M252Y/V308P/N434Y
F141	3.50E-08	M252Y/S298G/V308P/N434Y
F142	3.70E-08	M252Y/D270F/V308P/N434Y
F143	2.00E-07	M252Y/V308A/N434Y
F145	5.30E-08	M252Y/V308F/N434Y
F147	2.40E-07	M252Y/V308I/N434Y
F149	1.90E-07	M252Y/V308L/N434Y
F150	2.00E-07	M252Y/V308M/N434Y
F152	2.70E-07	M252Y/V308Q/N434Y
F154	1.80E-07	M252Y/V308T/N434Y
F157	1.50E-07	P257A/V308P/M428L/N434Y
F158	5.90E-08	P257T/V308P/M428L/N434Y
F159	4.40E-08	P257V/V308P/M428L/N434Y
F160	8.50E-07	M252W/M428I/N434Y
F162	1.60E-07	M252W/M428Y/N434Y
F163	4.20E-07	M252W/M428F/N434Y
F164	3.70E-07	P238A/M252W/N434Y
F165	2.90E-07	M252W/D265A/N434Y
F166	1.50E-07	M252W/T307Q/N434Y
F167	2.90E-07	M252W/V303A/N434Y
F168	3.20E-07	M252W/D376A/N434Y
F169	2.90E-07	M252W/V305A/N434Y
F170	1.70E-07	M252W/Q311A/N434Y
F171	1.90E-07	M252W/D312A/N434Y
F172	2.20E-07	M252W/K317A/N434Y
F173	7.70E-07	M252W/E380A/N434Y
F174	3.40E-07	M252W/E382A/N434Y

[0265]

[表2-4]

F175	2.70E-07	M252W/S424A/N434Y
F176	2.90E-07	S239K/M252W/N434Y
F177	2.80E-07	M252W/S298G/N434Y
F178	2.70E-07	M252W/D270F/N434Y
F179	3.10E-07	M252W/N325G/N434Y
F182	6.60E-08	P257A/M428L/N434W
F183	2.20E-07	P257T/M428L/N434W
F184	2.70E-07	P257V/M428L/N434W
F185	2.60E-07	M252W/I332V/N434Y
F188	3.00E-06	P257I/Q311I
F189	1.90E-07	M252Y/T307A/N434Y
F190	1.10E-07	M252Y/T307Q/N434Y
F191	1.60E-07	P257L/T307A/M428L/N434Y
F192	1.10E-07	P257A/T307A/M428L/N434Y
F193	8.50E-08	P257T/T307A/M428L/N434Y
F194	1.20E-07	P257V/T307A/M428L/N434Y
F195	5.60E-08	P257L/T307Q/M428L/N434Y
F196	3.50E-08	P257A/T307Q/M428L/N434Y
F197	3.30E-08	P257T/T307Q/M428L/N434Y
F198	4.80E-08	P257V/T307Q/M428L/N434Y
F201	2.10E-07	M252Y/T307D/N434Y
F203	2.40E-07	M252Y/T307F/N434Y
F204	2.10E-07	M252Y/T307G/N434Y
F205	2.00E-07	M252Y/T307H/N434Y
F206	2.30E-07	M252Y/T307I/N434Y
F207	9.40E-07	M252Y/T307K/N434Y
F208	3.90E-07	M252Y/T307L/N434Y
F209	1.30E-07	M252Y/T307M/N434Y
F210	2.90E-07	M252Y/T307N/N434Y
F211	2.40E-07	M252Y/T307P/N434Y
F212	6.80E-07	M252Y/T307R/N434Y
F213	2.30E-07	M252Y/T307S/N434Y
F214	1.70E-07	M252Y/T307V/N434Y
F215	9.60E-08	M252Y/T307W/N434Y
F216	2.30E-07	M252Y/T307Y/N434Y
F217	2.30E-07	M252Y/K334L/N434Y
F218	2.60E-07	M252Y/G385H/N434Y
F219	2.50E-07	M252Y/T289H/N434Y
F220	2.50E-07	M252Y/Q311H/N434Y
F221	3.10E-07	M252Y/D312H/N434Y
F222	3.40E-07	M252Y/N315H/N434Y
F223	2.70E-07	M252Y/K360H/N434Y
F225	1.50E-06	M252Y/L314R/N434Y
F226	5.40E-07	M252Y/L314K/N434Y
F227	1.20E-07	M252Y/N286E/N434Y
F228	2.30E-07	M252Y/L309E/N434Y
F229	5.10E-07	M252Y/R255E/N434Y
F230	2.50E-07	M252Y/P387E/N434Y

[0266]

[表2-5]

F236	8.90E-07	K248I/M428L/N434Y
F237	2.30E-07	M252Y/M428A/N434Y
F238	7.40E-07	M252Y/M428D/N434Y
F240	7.20E-07	M252Y/M428F/N434Y
F241	1.50E-06	M252Y/M428G/N434Y
F242	8.50E-07	M252Y/M428H/N434Y
F243	1.80E-07	M252Y/M428I/N434Y
F244	1.30E-06	M252Y/M428K/N434Y
F245	4.70E-07	M252Y/M428N/N434Y
F246	1.10E-06	M252Y/M428P/N434Y
F247	4.40E-07	M252Y/M428Q/N434Y
F249	6.40E-07	M252Y/M428S/N434Y
F250	2.90E-07	M252Y/M428T/N434Y
F251	1.90E-07	M252Y/M428V/N434Y
F252	1.00E-06	M252Y/M428W/N434Y
F253	7.10E-07	M252Y/M428Y/N434Y
F254	7.50E-08	M252W/T307Q/M428Y/N434Y
F255	1.10E-07	M252W/Q311A/M428Y/N434Y
F256	5.40E-08	M252W/T307Q/Q311A/M428Y/N434Y
F257	5.00E-07	M252Y/T307A/M428Y/N434Y
F258	3.20E-07	M252Y/T307Q/M428Y/N434Y
F259	2.80E-07	M252Y/D270F/N434Y
F260	1.30E-07	M252Y/T307A/Q311A/N434Y
F261	8.40E-08	M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F262	1.90E-07	M252Y/T307A/Q311H/N434Y
F263	1.10E-07	M252Y/T307Q/Q311H/N434Y
F264	2.80E-07	M252Y/E382A/N434Y
F265	6.80E-07	M252Y/E382A/M428Y/N434Y
F266	4.70E-07	M252Y/T307A/E382A/M428Y/N434Y
F267	3.20E-07	M252Y/T307Q/E382A/M428Y/N434Y
F268	6.30E-07	P238A/M252Y/M428F/N434Y
F269	5.20E-07	M252Y/V305A/M428F/N434Y
F270	6.60E-07	M252Y/N325G/M428F/N434Y
F271	6.90E-07	M252Y/D376A/M428F/N434Y
F272	6.80E-07	M252Y/E380A/M428F/N434Y
F273	6.50E-07	M252Y/E382A/M428F/N434Y
F274	7.60E-07	M252Y/E380A/E382A/M428F/N434Y
F275	4.20E-08	S239K/M252Y/V308P/E382A/N434Y
F276	4.10E-08	M252Y/D270F/V308P/E382A/N434Y
F277	1.30E-07	S239K/M252Y/V308P/M428Y/N434Y
F278	3.00E-08	M252Y/T307Q/V308P/E382A/N434Y
F279	6.10E-08	M252Y/V308P/Q311H/E382A/N434Y
F280	4.10E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/N434Y
F281	9.20E-08	M252Y/V308P/E382A/M428F/N434Y
F282	2.90E-08	M252Y/V308P/E382A/M428L/N434Y
F283	1.00E-07	M252Y/V308P/E382A/M428Y/N434Y
F284	1.00E-07	M252Y/V308P/M428Y/N434Y
F285	9.90E-08	M252Y/V308P/M428F/N434Y

[0267]

[表2-6]

F286	1.20E-07	S239K/M252Y/V308P/E382A/M428Y/N434Y
F287	1.00E-07	M252Y/V308P/E380A/E382A/M428F/N434Y
F288	1.90E-07	M252Y/T256E/E382A/N434Y
F289	4.80E-07	M252Y/T256E/M428Y/N434Y
F290	4.60E-07	M252Y/T256E/E382A/M428Y/N434Y
F292	2.30E-08	S239K/M252Y/V308P/E382A/M428I/N434Y
F293	5.30E-08	M252Y/V308P/E380A/E382A/M428I/N434Y
F294	1.10E-07	S239K/M252Y/V308P/M428F/N434Y
F295	6.80E-07	S239K/M252Y/E380A/E382A/M428F/N434Y
F296	4.90E-07	M252Y/Q311A/M428Y/N434Y
F297	5.10E-07	M252Y/D312A/M428Y/N434Y
F298	4.80E-07	M252Y/Q311A/D312A/M428Y/N434Y
F299	9.40E-08	S239K/M252Y/V308P/Q311A/M428Y/N434Y
F300	8.30E-08	S239K/M252Y/V308P/D312A/M428Y/N434Y
F301	7.20E-08	S239K/M252Y/V308P/Q311A/D312A/M428Y/N434Y
F302	1.90E-07	M252Y/T256E/T307P/N434Y
F303	6.70E-07	M252Y/T307P/M428Y/N434Y
F304	1.60E-08	M252W/V308P/M428Y/N434Y
F305	2.70E-08	M252Y/T256E/V308P/E382A/N434Y
F306	3.60E-08	M252W/V308P/E382A/N434Y
F307	3.60E-08	S239K/M252W/V308P/E382A/N434Y
F308	1.90E-08	S239K/M252W/V308P/E382A/M428Y/N434Y
F310	9.40E-08	S239K/M252W/V308P/E382A/M428I/N434Y
F311	2.80E-08	S239K/M252W/V308P/M428F/N434Y
F312	4.50E-07	S239K/M252W/E380A/E382A/M428F/N434Y
F313	6.50E-07	S239K/M252Y/T307P/M428Y/N434Y
F314	3.20E-07	M252Y/T256E/Q311A/D312A/M428Y/N434Y
F315	6.80E-07	S239K/M252Y/M428Y/N434Y
F316	7.00E-07	S239K/M252Y/D270F/M428Y/N434Y
F317	1.10E-07	S239K/M252Y/D270F/V308P/M428Y/N434Y
F318	1.80E-08	S239K/M252Y/V308P/M428I/N434Y
F320	2.00E-08	S239K/M252Y/V308P/N325G/E382A/M428I/N434Y
F321	3.20E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/N325G/N434Y
F322	9.20E-08	S239K/M252Y/D270F/T307P/V308P/N434Y
F323	2.70E-08	S239K/M252Y/T256E/D270F/V308P/N434Y
F324	2.80E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/V308P/N434Y
F325	2.10E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F326	7.50E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/Q311A/N434Y
F327	6.50E-08	S239K/M252Y/T256E/D270F/T307Q/Q311A/N434Y
F328	1.90E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/M428I/N434Y
F329	1.20E-08	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/N434Y
F330	3.60E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/L309E/N434Y
F331	3.00E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/P387E/N434Y
F333	7.40E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/L309E/Q311A/N434Y
F334	1.90E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/N325G/M428I/N434Y
F335	1.50E-08	S239K/M252Y/T256E/D270F/V308P/M428I/N434Y
F336	1.40E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y
F337	5.60E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/Q311A/M428I/N434Y

[0268]

[表2-7]

F338	7.70E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/M428I/N434Y
F339	1.90E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/L309E/M428I/N434Y
F343	3.20E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/M428L/N434Y
F344	3.00E-08	S239K/M252Y/V308P/M428L/N434Y
F349	1.50E-07	S239K/M252Y/V308P/L309P/M428L/N434Y
F350	1.70E-07	S239K/M252Y/V308P/L309R/M428L/N434Y
F352	6.00E-07	S239K/M252Y/L309P/M428L/N434Y
F353	1.10E-06	S239K/M252Y/L309R/M428L/N434Y
F354	2.80E-08	S239K/M252Y/T307Q/V308P/M428L/N434Y
F356	3.40E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/L309E/P387E/N434Y
F357	1.60E-08	S239K/M252Y/T256E/D270F/V308P/N325G/M428I/N434Y
F358	1.00E-07	S239K/M252Y/T307Q/N434Y
F359	4.20E-07	P257V/T307Q/M428I/N434Y
F360	1.30E-06	P257V/T307Q/M428V/N434Y
F362	5.40E-08	P257V/T307Q/N325G/M428L/N434Y
F363	4.10E-08	P257V/T307Q/Q311A/M428L/N434Y
F364	3.50E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428L/N434Y
F365	5.10E-08	P257V/V305A/T307Q/M428L/N434Y
F367	1.50E-08	S239K/M252Y/E258H/D270F/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F368	2.00E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/N325G/E382A/M428I/N434Y
F369	7.50E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428I/N434Y
F372	1.30E-08	S239K/M252W/V308P/M428Y/N434Y
F373	1.10E-08	S239K/M252W/V308P/Q311A/M428Y/N434Y
F374	1.20E-08	S239K/M252W/T256E/V308P/M428Y/N434Y
F375	5.50E-09	S239K/M252W/N286E/V308P/M428Y/N434Y
F376	9.60E-09	S239K/M252Y/T256E/D270F/N286E/V308P/N434Y
F377	1.30E-07	S239K/M252W/T307P/M428Y/N434Y
F379	9.00E-09	S239K/M252W/T256E/V308P/Q311A/M428Y/N434Y
F380	5.60E-09	S239K/M252W/T256E/N286E/V308P/M428Y/N434Y
F381	1.10E-07	P257V/T307A/Q311A/M428L/N434Y
F382	8.70E-08	P257V/V305A/T307A/M428L/N434Y
F386	3.20E-08	M252Y/V308P/L309E/N434Y
F387	1.50E-07	M252Y/V308P/L309D/N434Y
F388	7.00E-08	M252Y/V308P/L309A/N434Y
F389	1.70E-08	M252W/V308P/L309E/M428Y/N434Y
F390	6.80E-08	M252W/V308P/L309D/M428Y/N434Y
F391	3.60E-08	M252W/V308P/L309A/M428Y/N434Y
F392	6.90E-09	S239K/M252Y/N286E/V308P/M428I/N434Y
F393	1.20E-08	S239K/M252Y/N286E/V308P/N434Y
F394	5.30E-08	S239K/M252Y/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
F395	2.40E-08	S239K/M252Y/T256E/V308P/N434Y
F396	2.00E-08	S239K/M252Y/D270F/N286E/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
F397	4.50E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/Q311A/P387E/M428I/N434Y
F398	4.40E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y
F399	6.50E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/T307Q/V308P/M428I/N434Y
F400	6.10E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/Q311A/M428I/N434Y
F401	6.90E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/P387E/M428I/N434Y
F402	2.30E-08	P257V/T307Q/M428L/N434W

[0269]

[表2-8]

F403	5.10E-08	P257V/T307A/M428L/N434W
F404	9.40E-08	P257A/T307Q/L309P/M428L/N434Y
F405	1.70E-07	P257V/T307Q/L309P/M428L/N434Y
F406	1.50E-07	P257A/T307Q/L309R/M428L/N434Y
F407	1.60E-07	P257V/T307Q/L309R/M428L/N434Y
F408	2.50E-07	P257V/N286E/M428L/N434Y
F409	2.00E-07	P257V/P387E/M428L/N434Y
F410	2.20E-07	P257V/T307H/M428L/N434Y
F411	1.30E-07	P257V/T307N/M428L/N434Y
F412	8.80E-08	P257V/T307G/M428L/N434Y
F413	1.20E-07	P257V/T307P/M428L/N434Y
F414	1.10E-07	P257V/T307S/M428L/N434Y
F415	5.60E-08	P257V/N286E/T307A/M428L/N434Y
F416	9.40E-08	P257V/T307A/P387E/M428L/N434Y
F418	6.20E-07	S239K/M252Y/T307P/N325G/M428Y/N434Y
F419	1.60E-07	M252Y/T307A/Q311H/K360H/N434Y
F420	1.50E-07	M252Y/T307A/Q311H/P387E/N434Y
F421	1.30E-07	M252Y/T307A/Q311H/M428A/N434Y
F422	1.80E-07	M252Y/T307A/Q311H/E382A/N434Y
F423	8.40E-08	M252Y/T307W/Q311H/N434Y
F424	9.40E-08	S239K/P257A/V308P/M428L/N434Y
F425	8.00E-08	P257A/V308P/L309E/M428L/N434Y
F426	8.40E-08	P257V/T307Q/N434Y
F427	1.10E-07	M252Y/P257V/T307Q/M428V/N434Y
F428	8.00E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F429	3.70E-08	M252Y/P257V/T307Q/N434Y
F430	8.10E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428Y/N434Y
F431	6.50E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428F/N434Y
F432	9.20E-07	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428V/N434Y
F433	6.00E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/N434Y
F434	2.00E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428Y/N434Y
F435	2.50E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428F/N434Y
F436	2.50E-07	P257A/T307Q/M428V/N434Y
F437	5.70E-08	P257A/T307Q/N434Y
F438	3.60E-08	P257A/T307Q/M428Y/N434Y
F439	4.00E-08	P257A/T307Q/M428F/N434Y
F440	1.50E-08	P257V/N286E/T307Q/Q311A/N325G/M428L/N434Y
F441	1.80E-07	P257A/Q311A/M428L/N434Y
F442	2.00E-07	P257A/Q311H/M428L/N434Y
F443	5.50E-08	P257A/T307Q/Q311A/M428L/N434Y
F444	1.40E-07	P257A/T307A/Q311A/M428L/N434Y
F445	6.20E-08	P257A/T307Q/Q311H/M428L/N434Y
F446	1.10E-07	P257A/T307A/Q311H/M428L/N434Y
F447	1.40E-08	P257A/N286E/T307Q/M428L/N434Y
F448	5.30E-08	P257A/N286E/T307A/M428L/N434Y
F449	5.70E-07	S239K/M252Y/D270F/T307P/N325G/M428Y/N434Y
F450	5.20E-07	S239K/M252Y/T307P/L309E/N325G/M428Y/N434Y
F451	1.00E-07	P257S/T307A/M428L/N434Y

[0270]

[表2-9]

F452	1.40E-07	P257M/T307A/M428L/N434Y
F453	7.80E-08	P257N/T307A/M428L/N434Y
F454	9.60E-08	P257I/T307A/M428L/N434Y
F455	2.70E-08	P257V/T307Q/M428Y/N434Y
F456	3.40E-08	P257V/T307Q/M428F/N434Y
F457	4.00E-08	S239K/P257V/V308P/M428L/N434Y
F458	1.50E-08	P257V/T307Q/V308P/N325G/M428L/N434Y
F459	1.30E-08	P257V/T307Q/V308P/Q311A/N325G/M428L/N434Y
F460	4.70E-08	P257V/T307A/V308P/N325G/M428L/N434Y
F462	8.50E-08	P257A/V308P/N325G/M428L/N434Y
F463	1.30E-07	P257A/T307A/V308P/M428L/N434Y
F464	5.50E-08	P257A/T307Q/V308P/M428L/N434Y
F465	2.10E-08	P257V/N286E/T307Q/N325G/M428L/N434Y
F466	3.50E-07	T256E/P257V/N434Y
F467	5.70E-07	T256E/P257T/N434Y
F468	5.70E-08	S239K/P257T/V308P/M428L/N434Y
F469	5.60E-08	P257T/V308P/N325G/M428L/N434Y
F470	5.40E-08	T256E/P257T/V308P/N325G/M428L/N434Y
F471	6.60E-08	P257T/V308P/N325G/E382A/M428L/N434Y
F472	5.40E-08	P257T/V308P/N325G/P387E/M428L/N434Y
F473	4.50E-07	P257T/V308P/L309P/N325G/M428L/N434Y
F474	3.50E-07	P257T/V308P/L309R/N325G/M428L/N434Y
F475	4.30E-08	T256E/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F476	5.50E-08	P257V/T307Q/E382A/M428L/N434Y
F477	4.30E-08	P257V/T307Q/P387E/M428L/N434Y
F480	3.90E-08	P257L/V308P/N434Y
F481	5.60E-08	P257T/T307Q/N434Y
F482	7.00E-08	P257V/T307Q/N325G/N434Y
F483	5.70E-08	P257V/T307Q/Q311A/N434Y
F484	6.20E-08	P257V/V305A/T307Q/N434Y
F485	9.70E-08	P257V/N286E/T307A/N434Y
F486	3.40E-07	P257V/T307Q/L309R/Q311H/M428L/N434Y
F488	3.50E-08	P257V/V308P/N325G/M428L/N434Y
F490	7.50E-08	S239K/P257V/V308P/Q311H/M428L/N434Y
F492	9.80E-08	P257V/V305A/T307A/N325G/M428L/N434Y
F493	4.90E-07	S239K/D270F/T307P/N325G/M428Y/N434Y
F497	3.10E-06	P257T/T307A/M428V/N434Y
F498	1.30E-06	P257A/M428V/N434Y
F499	5.20E-07	P257A/T307A/M428V/N434Y
F500	4.30E-08	P257S/T307Q/M428L/N434Y
F506	1.90E-07	P257V/N297A/T307Q/M428L/N434Y
F507	5.10E-08	P257V/N286A/T307Q/M428L/N434Y
F508	1.10E-07	P257V/T307Q/N315A/M428L/N434Y
F509	5.80E-08	P257V/T307Q/N384A/M428L/N434Y
F510	5.30E-08	P257V/T307Q/N389A/M428L/N434Y
F511	4.20E-07	P257V/N434Y
F512	5.80E-07	P257T/N434Y
F517	3.10E-07	P257V/N286E/N434Y

[0271]

[表2-10]

F518	4.20E-07	P257T/N286E/N434Y
F519	2.60E-08	P257V/N286E/T307Q/N434Y
F521	1.10E-08	P257V/N286E/T307Q/M428Y/N434Y
F523	2.60E-08	P257V/V305A/T307Q/M428Y/N434Y
F526	1.90E-08	P257T/T307Q/M428Y/N434Y
F527	9.40E-09	P257V/T307Q/V308P/N325G/M428Y/N434Y
F529	2.50E-08	P257T/T307Q/M428F/N434Y
F533	1.20E-08	P257A/N286E/T307Q/M428F/N434Y
F534	1.20E-08	P257A/N286E/T307Q/M428Y/N434Y
F535	3.90E-08	T250A/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F538	9.90E-08	T250F/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F541	6.00E-08	T250I/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F544	3.10E-08	T250M/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F549	5.40E-08	T250S/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F550	5.90E-08	T250V/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F551	1.20E-07	T250W/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F552	1.10E-07	T250Y/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F553	1.70E-07	M252Y/Q311A/N434Y
F554	2.80E-08	S239K/M252Y/S254T/V308P/N434Y
F556	1.50E-06	M252Y/T307Q/Q311A
F559	8.00E-08	M252Y/S254T/N286E/N434Y
F560	2.80E-08	M252Y/S254T/V308P/N434Y
F561	1.40E-07	M252Y/S254T/T307A/N434Y
F562	8.30E-08	M252Y/S254T/T307Q/N434Y
F563	1.30E-07	M252Y/S254T/Q311A/N434Y
F564	1.90E-07	M252Y/S254T/Q311H/N434Y
F565	9.20E-08	M252Y/S254T/T307A/Q311A/N434Y
F566	6.10E-08	M252Y/S254T/T307Q/Q311A/N434Y
F567	2.20E-07	M252Y/S254T/M428I/N434Y
F568	1.10E-07	M252Y/T256E/T307A/Q311H/N434Y
F569	2.00E-07	M252Y/T256Q/T307A/Q311H/N434Y
F570	1.30E-07	M252Y/S254T/T307A/Q311H/N434Y
F571	8.10E-08	M252Y/N286E/T307A/Q311H/N434Y
F572	1.00E-07	M252Y/T307A/Q311H/M428I/N434Y
F576	1.60E-06	M252Y/T256E/T307Q/Q311H
F577	1.30E-06	M252Y/N286E/T307A/Q311A
F578	5.70E-07	M252Y/N286E/T307Q/Q311A
F580	8.60E-07	M252Y/N286E/T307Q/Q311H
F581	7.20E-08	M252Y/T256E/N286E/N434Y
F582	7.50E-07	S239K/M252Y/V308P
F583	7.80E-07	S239K/M252Y/V308P/E382A
F584	6.30E-07	S239K/M252Y/T256E/V308P
F585	2.90E-07	S239K/M252Y/N286E/V308P
F586	1.40E-07	S239K/M252Y/N286E/V308P/M428I
F587	1.90E-07	M252Y/N286E/M428L/N434Y
F592	2.00E-07	M252Y/S254T/E382A/N434Y
F593	3.10E-08	S239K/M252Y/S254T/V308P/M428I/N434Y
F594	1.60E-08	S239K/M252Y/T256E/V308P/M428I/N434Y

[0272]

[表2-11]

F595	1.80E-07	S239K/M252Y/M428I/N434Y
F596	4.00E-07	M252Y/D312A/E382A/M428Y/N434Y
F597	2.20E-07	M252Y/E382A/P387E/N434Y
F598	1.40E-07	M252Y/D312A/P387E/N434Y
F599	5.20E-07	M252Y/P387E/M428Y/N434Y
F600	2.80E-07	M252Y/T256Q/E382A/N434Y
F601	9.60E-09	M252Y/N286E/V308P/N434Y
F608		G236A/S239D/I332E
F611	2.80E-07	M252Y/V305T/T307P/V308I/L309A/N434Y
F612	3.60E-07	M252Y/T307P/V308I/L309A/N434Y
F613		S239D/A330L/I332E
F616		S239D/K326D/L328Y
F617	7.40E-07	S239K/N434W
F618	6.40E-07	S239K/V308F/N434Y
F619	3.10E-07	S239K/M252Y/N434Y
F620	2.10E-07	S239K/M252Y/S254T/N434Y
F621	1.50E-07	S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y
F622	3.50E-07	S239K/M252Y/T256Q/N434Y
F623	1.80E-07	S239K/M252W/N434W
F624	1.40E-08	S239K/P257A/N286E/T307Q/M428L/N434Y
F625	7.60E-08	S239K/P257A/T307Q/M428L/N434Y
F626	1.30E-06	V308P
F629	3.90E-08	M252Y/V279L/V308P/N434Y
F630	3.70E-08	S239K/M252Y/V279L/V308P/N434Y
F633	2.40E-08	M252Y/V282D/V308P/N434Y
F634	3.20E-08	S239K/M252Y/V282D/V308P/N434Y
F635	4.50E-08	M252Y/V284K/V308P/N434Y
F636	4.80E-08	S239K/M252Y/V284K/V308P/N434Y
F637	1.50E-07	M252Y/K288S/V308P/N434Y
F638	1.40E-07	S239K/M252Y/K288S/V308P/N434Y
F639	2.70E-08	M252Y/V308P/G385R/N434Y
F640	3.60E-08	S239K/M252Y/V308P/G385R/N434Y
F641	3.00E-08	M252Y/V308P/Q386K/N434Y
F642	3.00E-08	S239K/M252Y/V308P/Q386K/N434Y
F643	3.20E-08	L235G/G236R/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F644	3.00E-08	G236R/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F645	3.30E-08	S239K/M252Y/V308P/L328R/N434Y
F646	3.80E-08	S239K/M252Y/N297A/V308P/N434Y
F647	2.90E-08	P238D/M252Y/V308P/N434Y
F648		P238D
F649	1.20E-07	S239K/M252Y/N286E/N434Y
F650	1.70E-07	S239K/M252Y/T256E/N434Y
F651	1.80E-07	S239K/M252Y/Q311A/N434Y
F652	2.40E-07	P238D/M252Y/N434Y
F654	3.20E-08	L235K/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F655	3.40E-08	L235R/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F656	3.30E-08	G237K/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F657	3.20E-08	G237R/S239K/M252Y/V308P/N434Y

[0273]

[表2-12]

F658	3.20E-08	P238K/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F659	3.00E-08	P238R/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F660	3.10E-08	S239K/M252Y/V308P/P329K/N434Y
F661	3.40E-08	S239K/M252Y/V308P/P329R/N434Y
F663	6.40E-09	S239K/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F664	3.90E-08	M252Y/N286A/V308P/N434Y
F665	2.00E-08	M252Y/N286D/V308P/N434Y
F666	2.10E-08	M252Y/N286F/V308P/N434Y
F667	3.00E-08	M252Y/N286G/V308P/N434Y
F668	4.00E-08	M252Y/N286H/V308P/N434Y
F669	3.50E-08	M252Y/N286I/V308P/N434Y
F670	2.10E-07	M252Y/N286K/V308P/N434Y
F671	2.20E-08	M252Y/N286L/V308P/N434Y
F672	2.40E-08	M252Y/N286M/V308P/N434Y
F673	2.30E-08	M252Y/N286P/V308P/N434Y
F674	3.20E-08	M252Y/N286Q/V308P/N434Y
F675	5.10E-08	M252Y/N286R/V308P/N434Y
F676	3.20E-08	M252Y/N286S/V308P/N434Y
F677	4.70E-08	M252Y/N286T/V308P/N434Y
F678	3.30E-08	M252Y/N286V/V308P/N434Y
F679	1.70E-08	M252Y/N286W/V308P/N434Y
F680	1.50E-08	M252Y/N286Y/V308P/N434Y
F681	4.90E-08	M252Y/K288A/V308P/N434Y
F682	8.20E-08	M252Y/K288D/V308P/N434Y
F683	5.00E-08	M252Y/K288E/V308P/N434Y
F684	5.10E-08	M252Y/K288F/V308P/N434Y
F685	5.30E-08	M252Y/K288G/V308P/N434Y
F686	4.60E-08	M252Y/K288H/V308P/N434Y
F687	4.90E-08	M252Y/K288I/V308P/N434Y
F688	2.80E-08	M252Y/K288L/V308P/N434Y
F689	4.10E-08	M252Y/K288M/V308P/N434Y
F690	1.00E-07	M252Y/K288N/V308P/N434Y
F691	3.20E-07	M252Y/K288P/V308P/N434Y
F692	3.90E-08	M252Y/K288Q/V308P/N434Y
F693	3.60E-08	M252Y/K288R/V308P/N434Y
F694	4.70E-08	M252Y/K288V/V308P/N434Y
F695	4.00E-08	M252Y/K288W/V308P/N434Y
F696	4.40E-08	M252Y/K288Y/V308P/N434Y
F697	3.10E-08	S239K/M252Y/V308P/N325G/N434Y
F698	2.20E-08	M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F699	2.30E-08	S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F700	5.20E-08	M252Y/V308P/L328E/N434Y
F705	7.10E-09	M252Y/N286E/V308P/M428I/N434Y
F706	1.80E-08	M252Y/N286E/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
F707	5.90E-09	M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F708	4.10E-09	M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y
F709	2.00E-08	S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
F710	1.50E-08	P238D/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/M428I/N434Y

[0274]

[表2-13]

F711	6.50E-08	S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F712	6.00E-08	P238D/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F713	2.00E-08	P238D/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F714	2.30E-07	P238D/M252Y/N325S/N434Y
F715	2.30E-07	P238D/M252Y/N325M/N434Y
F716	2.70E-07	P238D/M252Y/N325L/N434Y
F717	2.60E-07	P238D/M252Y/N325I/N434Y
F718	2.80E-07	P238D/M252Y/Q295M/N434Y
F719	7.40E-08	P238D/M252Y/N325G/N434Y
F720	2.40E-08	M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F721	1.50E-08	M252Y/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y
F722	2.70E-07	P238D/M252Y/A327G/N434Y
F723	2.80E-07	P238D/M252Y/L328D/N434Y
F724	2.50E-07	P238D/M252Y/L328E/N434Y
F725	4.20E-08	L235K/G237R/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F726	3.70E-08	L235K/P238K/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F729	9.20E-07	T307A/Q311A/N434Y
F730	6.00E-07	T307Q/Q311A/N434Y
F731	8.50E-07	T307A/Q311H/N434Y
F732	6.80E-07	T307Q/Q311H/N434Y
F733	3.20E-07	M252Y/L328E/N434Y
F734	3.10E-07	G236D/M252Y/L328E/N434Y
F736	3.10E-07	M252Y/S267M/L328E/N434Y
F737	3.10E-07	M252Y/S267L/L328E/N434Y
F738	3.50E-07	P238D/M252Y/T307P/N434Y
F739	2.20E-07	M252Y/T307P/Q311A/N434Y
F740	2.90E-07	M252Y/T307P/Q311H/N434Y
F741	3.10E-07	P238D/T250A/M252Y/N434Y
F744	9.90E-07	P238D/T250F/M252Y/N434Y
F745	6.60E-07	P238D/T250G/M252Y/N434Y
F746	6.00E-07	P238D/T250H/M252Y/N434Y
F747	2.80E-07	P238D/T250I/M252Y/N434Y
F749	5.10E-07	P238D/T250L/M252Y/N434Y
F750	3.00E-07	P238D/T250M/M252Y/N434Y
F751	5.30E-07	P238D/T250N/M252Y/N434Y
F753	1.80E-07	P238D/T250Q/M252Y/N434Y
F755	3.50E-07	P238D/T250S/M252Y/N434Y
F756	3.70E-07	P238D/T250V/M252Y/N434Y
F757	1.20E-06	P238D/T250W/M252Y/N434Y
F758	1.40E-06	P238D/T250Y/M252Y/N434Y
F759		L235K/S239K
F760		L235R/S239K
F761	1.10E-06	P238D/N434Y
F762	3.60E-08	L235K/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F763	3.50E-08	L235R/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F764	6.30E-07	P238D/T307Q/Q311A/N434Y
F765	8.50E-08	P238D/M252Y/T307Q/L309E/Q311A/N434Y
F766	6.00E-07	T307A/L309E/Q311A/N434Y

[0275]

[表2-14]

F767	4.30E-07	T307Q/L309E/Q311A/N434Y
F768	6.40E-07	T307A/L309E/Q311H/N434Y
F769	4.60E-07	T307Q/L309E/Q311H/N434Y
F770	3.00E-07	M252Y/T256A/N434Y
F771	4.00E-07	M252Y/E272A/N434Y
F772	3.80E-07	M252Y/K274A/N434Y
F773	3.90E-07	M252Y/V282A/N434Y
F774	4.00E-07	M252Y/N286A/N434Y
F775	6.20E-07	M252Y/K338A/N434Y
F776	3.90E-07	M252Y/K340A/N434Y
F777	3.90E-07	M252Y/E345A/N434Y
F779	3.90E-07	M252Y/N361A/N434Y
F780	3.90E-07	M252Y/Q362A/N434Y
F781	3.70E-07	M252Y/S375A/N434Y
F782	3.50E-07	M252Y/Y391A/N434Y
F783	4.00E-07	M252Y/D413A/N434Y
F784	5.00E-07	M252Y/L309A/N434Y
F785	7.40E-07	M252Y/L309H/N434Y
F786	2.80E-08	M252Y/S254T/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F787	8.80E-08	M252Y/S254T/T307Q/L309E/Q311A/N434Y
F788	4.10E-07	M252Y/N315A/N434Y
F789	1.50E-07	M252Y/N315D/N434Y
F790	2.70E-07	M252Y/N315E/N434Y
F791	4.40E-07	M252Y/N315F/N434Y
F792	4.40E-07	M252Y/N315G/N434Y
F793	3.30E-07	M252Y/N315I/N434Y
F794	4.10E-07	M252Y/N315K/N434Y
F795	3.10E-07	M252Y/N315L/N434Y
F796	3.40E-07	M252Y/N315M/N434Y
F798	3.50E-07	M252Y/N315Q/N434Y
F799	4.10E-07	M252Y/N315R/N434Y
F800	3.80E-07	M252Y/N315S/N434Y
F801	4.40E-07	M252Y/N315T/N434Y
F802	3.30E-07	M252Y/N315V/N434Y
F803	3.60E-07	M252Y/N315W/N434Y
F804	4.00E-07	M252Y/N315Y/N434Y
F805	3.00E-07	M252Y/N325A/N434Y
F806	3.10E-07	M252Y/N384A/N434Y
F807	3.20E-07	M252Y/N389A/N434Y
F808	3.20E-07	M252Y/N389A/N390A/N434Y
F809	2.20E-07	M252Y/S254T/T256S/N434Y
F810	2.20E-07	M252Y/A378V/N434Y
F811	4.90E-07	M252Y/E380S/N434Y
F812	2.70E-07	M252Y/E382V/N434Y
F813	2.80E-07	M252Y/S424E/N434Y
F814	1.20E-07	M252Y/N434Y/Y436I
F815	5.50E-07	M252Y/N434Y/T437R
F816	3.60E-07	P238D/T250V/M252Y/T307P/N434Y

[0276]

[表2-15]

F817	9.80E-08	P238D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F819	1.40E-07	P238D/M252Y/N286E/N434Y
F820	3.40E-07	L235K/S239K/M252Y/N434Y
F821	3.10E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y
F822	1.10E-06	P238D/T250Y/M252Y/W313Y/N434Y
F823	1.10E-06	P238D/T250Y/M252Y/W313F/N434Y
F828	2.50E-06	P238D/T250V/M252Y/I253V/N434Y
F831	1.60E-06	P238D/T250V/M252Y/R255A/N434Y
F832	2.60E-06	P238D/T250V/M252Y/R255D/N434Y
F833	8.00E-07	P238D/T250V/M252Y/R255E/N434Y
F834	8.10E-07	P238D/T250V/M252Y/R255F/N434Y
F836	5.00E-07	P238D/T250V/M252Y/R255H/N434Y
F837	5.60E-07	P238D/T250V/M252Y/R255I/N434Y
F838	4.30E-07	P238D/T250V/M252Y/R255K/N434Y
F839	3.40E-07	P238D/T250V/M252Y/R255L/N434Y
F840	4.20E-07	P238D/T250V/M252Y/R255M/N434Y
F841	1.10E-06	P238D/T250V/M252Y/R255N/N434Y
F843	6.60E-07	P238D/T250V/M252Y/R255Q/N434Y
F844	1.30E-06	P238D/T250V/M252Y/R255S/N434Y
F847	3.40E-07	P238D/T250V/M252Y/R255W/N434Y
F848	8.30E-07	P238D/T250V/M252Y/R255Y/N434Y
F849	3.30E-07	M252Y/D280A/N434Y
F850	2.90E-07	M252Y/D280E/N434Y
F852	3.30E-07	M252Y/D280G/N434Y
F853	3.20E-07	M252Y/D280H/N434Y
F855	3.20E-07	M252Y/D280K/N434Y
F858	3.20E-07	M252Y/D280N/N434Y
F860	3.30E-07	M252Y/D280Q/N434Y
F861	3.20E-07	M252Y/D280R/N434Y
F862	3.00E-07	M252Y/D280S/N434Y
F863	2.70E-07	M252Y/D280T/N434Y
F867	2.80E-07	M252Y/N384A/N389A/N434Y
F868	2.00E-08	G236A/S239D/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F869		G236A/S239D
F870	7.30E-08	L235K/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F871	7.10E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F872	1.30E-07	L235K/S239K/M252Y/N286E/N434Y
F873	1.20E-07	L235R/S239K/M252Y/N286E/N434Y
F875	4.80E-07	M252Y/N434Y/Y436A
F877	8.30E-07	M252Y/N434Y/Y436E
F878	1.90E-07	M252Y/N434Y/Y436F
F879	9.20E-07	M252Y/N434Y/Y436G
F880	3.90E-07	M252Y/N434Y/Y436H
F881	3.10E-07	M252Y/N434Y/Y436K
F882	1.30E-07	M252Y/N434Y/Y436L
F883	2.10E-07	M252Y/N434Y/Y436M
F884	4.00E-07	M252Y/N434Y/Y436N
F888	4.80E-07	M252Y/N434Y/Y436S

[0277]

[表2-16]

F889	2.20E-07	M252Y/N434Y/Y436T
F890	1.10E-07	M252Y/N434Y/Y436V
F891	1.70E-07	M252Y/N434Y/Y436W
F892	7.10E-08	M252Y/S254T/N434Y/Y436I
F893	9.80E-08	L235K/S239K/M252Y/N434Y/Y436I
F894	9.20E-08	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436I
F895	2.10E-08	L235K/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N315E/N434Y
F896	2.00E-08	L235R/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N315E/N434Y
F897	9.70E-08	M252Y/N315D/N384A/N389A/N434Y
F898	1.70E-07	M252Y/N315E/N384A/N389A/N434Y
F899	1.10E-07	M252Y/N315D/G316A/N434Y
F900	1.70E-07	M252Y/N315D/G316D/N434Y
F901	1.30E-07	M252Y/N315D/G316E/N434Y
F902	2.20E-07	M252Y/N315D/G316F/N434Y
F903	2.30E-07	M252Y/N315D/G316H/N434Y
F904	1.00E-07	M252Y/N315D/G316I/N434Y
F905	1.30E-07	M252Y/N315D/G316K/N434Y
F906	1.50E-07	M252Y/N315D/G316L/N434Y
F907	1.30E-07	M252Y/N315D/G316M/N434Y
F908	1.50E-07	M252Y/N315D/G316N/N434Y
F909	1.30E-07	M252Y/N315D/G316P/N434Y
F910	1.40E-07	M252Y/N315D/G316Q/N434Y
F911	1.30E-07	M252Y/N315D/G316R/N434Y
F912	1.20E-07	M252Y/N315D/G316S/N434Y
F913	1.10E-07	M252Y/N315D/G316T/N434Y
F914	1.50E-07	M252Y/N315D/G316V/N434Y
F915	2.30E-07	M252Y/N315D/G316W/N434Y
F917	2.50E-07	M252Y/N286S/N434Y
F918	2.80E-07	M252Y/D280E/N384A/N389A/N434Y
F919	3.30E-07	M252Y/D280G/N384A/N389A/N434Y
F920	2.50E-07	M252Y/N286S/N384A/N389A/N434Y
F921	1.20E-07	M252Y/N286E/N384A/N389A/N434Y
F922	5.90E-08	L235K/S239K/M252Y/N286E/N434Y/Y436I
F923	6.00E-08	L235R/S239K/M252Y/N286E/N434Y/Y436I
F924	3.40E-08	L235K/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436I
F925	3.20E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436I
F926	1.10E-07	L235K/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436I
F927	1.00E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436I
F928	2.90E-08	M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436I
F929	2.90E-08	M252Y/S254T/T307Q/Q311A/N434Y/Y436I
F930	1.40E-07	P238D/T250V/M252Y/N286E/N434Y
F931	1.20E-07	P238D/T250V/M252Y/N434Y/Y436I
F932	3.20E-07	T250V/M252Y/N434Y
F933	3.00E-07	L234R/P238D/T250V/M252Y/N434Y
F934	3.10E-07	G236K/P238D/T250V/M252Y/N434Y
F935	3.20E-07	G237K/P238D/T250V/M252Y/N434Y
F936	3.20E-07	G237R/P238D/T250V/M252Y/N434Y
F937	3.10E-07	P238D/S239K/T250V/M252Y/N434Y

[0278]

[表2-17]

F938	1.60E-07	L235K/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F939	1.50E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F940	1.50E-07	P238D/T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F941	1.20E-08	M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F942	4.20E-08	L235K/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F943	4.00E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F944	1.70E-07	T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F945	1.70E-08	T250V/M252Y/V308P/N434Y/Y436V
F946	4.30E-08	T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F947	1.10E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F954	5.30E-07	M252Y/N434Y/H435K/Y436V
F957	7.70E-07	M252Y/N434Y/H435N/Y436V
F960	8.00E-07	M252Y/N434Y/H435R/Y436V
F966	3.10E-07	M252Y/S254A/N434Y
F970	2.50E-06	M252Y/S254G/N434Y
F971	2.60E-06	M252Y/S254H/N434Y
F972	2.60E-07	M252Y/S254I/N434Y
F978	1.30E-06	M252Y/S254Q/N434Y
F980	1.80E-07	M252Y/S254V/N434Y
F987	4.00E-08	P238D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F988	6.90E-08	P238D/T250V/M252Y/N286E/N434Y/Y436V
F989	1.40E-08	L235R/S239K/M252Y/V308P/N434Y/Y436V
F990	9.40E-09	L235R/S239K/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F991	1.30E-08	L235R/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F992	5.10E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/M428I/N434Y/Y436V
F993	3.80E-08	M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F994	2.80E-07	M252Y/N325G/N434Y
F995	2.90E-07	L235R/P238D/S239K/M252Y/N434Y
F996	1.30E-07	L235R/P238D/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F997	3.80E-07	K248I/T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F998	8.50E-07	K248Y/T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F999	2.10E-07	T250V/M252Y/E258H/N434Y/Y436V
F1005		N325G
F1008	1.70E-07	L235R/S239K/T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F1009	1.20E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1010	1.90E-07	L235R/S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y
F1011	4.50E-08	T250V/M252Y/V308P/N434Y
F1012	4.70E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/V308P/N434Y
F1013	3.00E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F1014	3.20E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F1015	2.20E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F1016	3.80E-09	T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1017	4.20E-09	L235R/S239K/T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1018	3.20E-09	L235R/S239K/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1019	3.40E-07	P238D/T250V/M252Y/N325G/N434Y
F1020	8.50E-08	P238D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N325G/N434Y
F1021	3.30E-07	P238D/T250V/M252Y/N325A/N434Y
F1022		K326D/L328Y

[0279]

[表2-18]

F1023	4.40E-08	S239D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F1024	4.00E-08	T250V/M252Y/T307Q/Q311A/K326D/L328Y/N434Y/Y436V
F1025	3.60E-08	S239D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/K326D/L328Y/N434Y/Y436V
F1026	8.40E-08	M252Y/T307A/Q311H/N434Y/Y436V
F1027	8.60E-08	L235R/S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y/Y436V
F1028	4.60E-08	G236A/S239D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F1029	5.10E-08	T250V/M252Y/T307Q/Q311A/I332E/N434Y/Y436V
F1030		I332E
F1031	5.30E-08	G236A/S239D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/I332E/N434Y/Y436V
F1032	4.30E-08	P238D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N325G/N434Y/Y436V
F1033	1.00E-06	P238D/N434W
F1034	1.50E-08	L235K/S239K/M252Y/V308P/N434Y/Y436V
F1035	1.00E-08	L235K/S239K/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1036	1.40E-08	L235K/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F1037	6.10E-08	L235K/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/M428I/N434Y/Y436V
F1038	2.80E-07	L235K/P238D/S239K/M252Y/N434Y
F1039	1.30E-07	L235K/P238D/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F1040	2.00E-07	L235K/S239K/T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F1041	1.40E-08	L235K/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1042	2.00E-07	L235K/S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y
F1043	5.20E-08	L235K/S239K/T250V/M252Y/V308P/N434Y
F1044	3.50E-08	L235K/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F1045	2.50E-08	L235K/S239K/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F1046	4.50E-09	L235K/S239K/T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1047	3.40E-09	L235K/S239K/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1048	9.90E-08	L235K/S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y/Y436V
F1050	3.50E-09	T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y/Y436V
F1051	3.90E-09	L235R/S239K/T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y/Y436V
F1052	3.20E-09	L235R/S239K/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y/Y436V
F1053	4.23E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F1058	1.31E-07	M252Y/Q386E/N434Y/Y436V
F1059	1.39E-07	M252Y/Q386R/N434Y/Y436V
F1060	1.43E-07	M252Y/Q386S/N434Y/Y436V
F1061	1.19E-07	M252Y/P387E/N434Y/Y436V
F1062	1.2E-07	M252Y/P387R/N434Y/Y436V
F1063	1.43E-07	M252Y/P387S/N434Y/Y436V
F1064	1.32E-07	M252Y/V422E/N434Y/Y436V
F1065	1.38E-07	M252Y/V422R/N434Y/Y436V
F1066	1.45E-07	M252Y/V422S/N434Y/Y436V
F1067	1.26E-07	M252Y/S424E/N434Y/Y436V
F1068	1.69E-07	M252Y/S424R/N434Y/Y436V
F1069	1.39E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438E
F1070	1.73E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R
F1071	1.24E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438S
F1072	1.35E-07	M252Y/N434Y/Y436V/S440E
F1073	1.34E-07	M252Y/N434Y/Y436V/S440R
F1074	1.32E-07	S239D/M252Y/N434Y/Y436V
F1075	1.4E-07	M252Y/K326D/L328Y/N434Y/Y436V
F1076	1.27E-07	S239D/M252Y/K326D/L328Y/N434Y/Y436V

[0280]

[表2-19]

F1077	2.03E-06	K248N/M252Y/N434Y
F1078	4.7E-07	M252Y/E380N/E382S/N434Y
F1079	3.44E-07	M252Y/E382N/N384S/N434Y
F1080	3.19E-07	M252Y/S424N/N434Y
F1081	6.2E-07	M252Y/N434Y/Y436N/Q438T
F1082	2.76E-07	M252Y/N434Y/Q438N
F1083	3.45E-07	M252Y/N434Y/S440N
F1094	2.6E-07	M252Y/N434Y/S442N
F1095	2.86E-07	M252Y/S383N/G385S/N434Y
F1096	2.72E-07	M252Y/Q386T/N434Y
F1097	2.82E-07	M252Y/G385N/P387S/N434Y
F1098	2.58E-07	S239D/M252Y/N434Y
F1099	2.57E-07	M252Y/K326D/L328Y/N434Y
F1100	2.41E-07	S239D/M252Y/K326D/L328Y/N434Y
F1101	6.59E-08	S239D/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F1102	6.46E-08	M252Y/T307Q/Q311A/K326D/L328Y/N434Y
F1103	6.11E-08	S239D/M252Y/T307Q/Q311A/K326D/L328Y/N434Y
F1104	1.77E-07	M252Y/V422E/S424R/N434Y/Y436V
F1105	1.54E-07	M252Y/V422S/S424R/N434Y/Y436V
F1106	1.42E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1107	1.23E-07	M252Y/V422D/N434Y/Y436V
F1108	1.26E-07	M252Y/V422K/N434Y/Y436V
F1109	1.27E-07	M252Y/V422T/N434Y/Y436V
F1110	1.33E-07	M252Y/V422Q/N434Y/Y436V
F1111	1.65E-07	M252Y/S424K/N434Y/Y436V
F1112	1.23E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438K
F1113	1.18E-07	M252Y/N434Y/Y436V/S440D
F1114	1.31E-07	M252Y/N434Y/Y436V/S440Q
F1115	1.35E-07	M252Y/S424N/N434Y/Y436V
F1116	7.44E-08	M252Y/T307Q/Q311A/S424N/N434Y
F1117	4.87E-08	T250V/M252Y/T307Q/Q311A/S424N/N434Y/Y436V
F1118	1.32E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/S424N/N434Y/Y436V
F1119	1.03E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/V422E/N434Y/Y436V
F1120	1.04E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/S424R/N434Y/Y436V
F1121	1.04E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/V422E/S424R/N434Y/Y436V
F1122	1.37E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R
F1123	9.55E-09	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V/S440E
F1124	1.22E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1125	5.18E-08	M252Y/T307Q/N434Y/Y436V
F1126	8.95E-08	M252Y/T307A/N434Y/Y436V
F1127	7.94E-08	M252Y/Q311A/N434Y/Y436V
F1128	1.17E-07	M252Y/Q311H/N434Y/Y436V
F1129	4.48E-08	M252Y/T307Q/Q311H/N434Y/Y436V
F1130	5.54E-08	M252Y/T307A/Q311A/N434Y/Y436V
F1131	1.29E-07	L235R/S239K/M252Y/V422E/N434Y/Y436V
F1132	1.4E-07	L235R/S239K/M252Y/V422S/N434Y/Y436V
F1133	1.58E-07	L235R/S239K/M252Y/S424R/N434Y/Y436V
F1134	1.66E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438R
F1135	1.26E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/S440E

[0281]

[表2-20]

F1136	1.63E-07	L235R/S239K/M252Y/V422E/S424R/N434Y/Y436V
F1137	1.58E-07	L235R/S239K/M252Y/V422S/S424R/N434Y/Y436V
F1138	1.65E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1139	1.52E-07	L235R/S239K/M252Y/S424N/N434Y/Y436V
F1140	1.62E-07	M252Y/V422E/S424R/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1141	1.77E-07	M252Y/V422S/S424R/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1142	1.87E-07	L235R/S239K/M252Y/V422E/S424R/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1143	1.98E-07	L235R/S239K/M252Y/V422S/S424R/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1144	1.44E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1145	5.23E-08	T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1146	6.24E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1147	7.19E-08	M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Q438R/S440E
F1148	7.63E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Q438R/S440E
F1151	2.51E-07	L235R/S239K/M252Y/S424N/N434Y
F1152	7.38E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/S424N/N434Y
F1153	4.85E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/S424N/N434Y/Y436V
F1154	1.34E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/S424N/N434Y/Y436V
F1157	2.09E-07	M252Y/N434Y/Q438R/S440E
F1158	2.44E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Q438R/S440E
F1159	4.79E-07	S424N/N434W
F1160	2.88E-07	V308F/S424N/N434Y
F1161	1.07E-06	I332V/S424N/N434Y
F1162	3.43E-07	P238D/T250Y/M252Y/N434Y/Y436V
F1163	1.54E-07	P238D/T250Y/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F1164	6.96E-08	P238D/T250Y/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F1165	1.63E-08	P238D/T250Y/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1174	4.9E-07	P257I/N434H
F1176	1.98E-06	V308F
F1178	8.72E-07	V259I/V308F/M428L
F1183	1.28E-06	E380A/M428L/N434S
F1184	1E-06	T307A/M428L/N434S
F1185	9.17E-07	T307A/E380A/M428L/N434S
F1188	1.72E-06	T307A/E380A/N434H
F1189	1.57E-07	M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1190	2.4E-07	M252Y/H433E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1191	2.11E-07	M252Y/N434Y/Y436V/T437A/Q438R/S440E
F1192	1.27E-07	M252Y/N434Y/Y436V/T437G/Q438R/S440E
F1194	1.55E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/K439D/S440E
F1195	1.76E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440E/L441A
F1196	1.51E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440E/L441E
F1197	9.46E-08	M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1198	7.83E-08	M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1199	6.25E-08	M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1200	1.26E-07	T250V/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1201	1.07E-07	T250V/M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1202	8.81E-08	T250V/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1203	1.52E-07	M252Y/T256Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1204	1.18E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1205	1.98E-07	T250V/M252Y/T256Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E

[0282]

[表2-21]

F1206	1.69E-07	T250V/M252Y/S254T/T256Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1207	1.11E-06	I332E/M428L/N434S
F1208	5.71E-07	L251A/M252Y/N434Y/Y436V
F1211	1.23E-06	L251H/M252Y/N434Y/Y436V
F1213	6.33E-07	L251N/M252Y/N434Y/Y436V
F1216	1.16E-06	L251S/M252Y/N434Y/Y436V
F1217	1.14E-06	L251T/M252Y/N434Y/Y436V
F1218	2.51E-07	L251V/M252Y/N434Y/Y436V
F1229	2.81E-06	M252Y/I253V/N434Y/Y436V
F1230	1.12E-07	M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1231	9.73E-08	M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1232	9.79E-08	M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1243	1.25E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1244	1.02E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1245	8.2E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1246	1.73E-07	L235R/S239K/T250V/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1247	1.45E-07	L235R/S239K/T250V/M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1248	1.2E-07	L235R/S239K/T250V/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1249	2.06E-07	L235R/S239K/M252Y/T256Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1250	1.66E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1251	2.77E-07	L235R/S239K/T250V/M252Y/T256Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1252	2.33E-07	L235R/S239K/T250V/M252Y/S254T/T256Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1253	1.12E-07	L235R/S239K/M252Y/T307A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1254	6.42E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1255	1.11E-07	L235R/S239K/M252Y/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1256	1.56E-07	L235R/S239K/M252Y/Q311H/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1257	7.81E-08	L235R/S239K/M252Y/T307A/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1258	1.05E-07	L235R/S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1259	4.46E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1260	6.53E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311H/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1261	1.35E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1262	1.26E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1263	1.24E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1264	1.27E-07	L235R/S239K/M252Y/T256A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1265	1.57E-07	L235R/S239K/M252Y/T256G/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1266	9.99E-08	L235R/S239K/M252Y/T256N/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1267	1.5E-07	L235R/S239K/M252Y/S254A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1268	2E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1269	1.69E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1270	1.18E-07	L235R/S239K/M252Y/S254A/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1271	2.05E-07	L235R/S239K/M252Y/S254A/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1272	1.71E-07	L235R/S239K/M252Y/S254A/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1273	1.53E-07	L235R/S239K/M252Y/T256Q/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1274	2.48E-07	L235R/S239K/M252Y/T256Q/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1275	2.09E-07	L235R/S239K/M252Y/T256Q/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1276	1.02E-07	L235R/S239K/M252Y/T256A/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1277	1.69E-07	L235R/S239K/M252Y/T256A/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1278	1.4E-07	L235R/S239K/M252Y/T256A/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1279	1.23E-07	L235R/S239K/M252Y/T256G/N434Y/Y436V/Q438K/S440D

[0283]

[表2-22]

F1280	2.09E-07	L235R/S239K/M252Y/T256G/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1281	1.74E-07	L235R/S239K/M252Y/T256G/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1282	7.69E-08	L235R/S239K/M252Y/T256N/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1283	1.34E-07	L235R/S239K/M252Y/T256N/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1284	1.12E-07	L235R/S239K/M252Y/T256N/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1285	9.36E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1286	1.57E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1287	1.5E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1288	7.95E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1289	1.33E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1290	1.11E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1291	1.51E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V
F1292	4.24E-07	L235R/S239K/H433D/N434W/Y436V/Q438R/S440E
F1293	1.61E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Q438R/S440E
F1294	2E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1295	9.84E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1296	2.27E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Q438R/S440E
F1297	2.5E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1298	1.47E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1299	1.5E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Q438K/S440D
F1300	1.63E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436T/Q438K/S440D
F1301	8.3E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436F/Q438K/S440D
F1302	2.15E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Q438K/S440D
F1303	2.1E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440D
F1304	1.24E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436F/Q438K/S440D
F1305	2.05E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1306	1.92E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1307	1.44E-07	L235R/S239K/M252Y/V422A/S424A/N434Y/Y436V
F1308	2.06E-07	L235R/S239K/M252Y/V422L/S424L/N434Y/Y436V
F1309	1.26E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438A/S440A
F1310	2.28E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438L/S440L
F1311	1.69E-07	L235R/S239K/M252Y/V422A/S424A/H433D/N434Y/Y436V
F1312	1.79E-07	L235R/S239K/M252Y/V422L/S424L/H433D/N434Y/Y436V
F1313	1.77E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438A/S440A
F1314	2.27E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438L/S440L
F1315	1.52E-07	G237K/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F1316	1.49E-07	G237R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F1317	1.38E-07	S239K/M252Y/P329K/N434Y/Y436V
F1318	1.43E-07	S239K/M252Y/P329R/N434Y/Y436V
F1319	2.67E-07	M252Y/L328Y/N434Y
F1320	1.22E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1321	1.03E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1322	1.6E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1323	1.49E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1324	1.32E-07	L234A/L235A/M252Y/N434Y/Y436V
F1325	2.13E-07	L234A/L235A/M252Y/N297A/N434Y/Y436V
F1326	1.09E-08	L234A/L235A/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1327	1.41E-08	L234A/L235A/T250V/M252Y/N297A/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1328	1.52E-07	L235R/G236R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440E

[0284]

[表2-23]

F1329	1.29E-07	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1330	1.03E-07	L235R/G236R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1331	7.75E-08	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1333	1.23E-07	L235R/G236R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F1334	1.04E-07	L235R/G236R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1335	8.78E-08	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1336	7.18E-08	L235R/G236R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1337	7.41E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1338	1.04E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1339	2.51E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1340	5.58E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1341	3.22E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1342	2.51E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1343	2.01E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1344	3.96E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1345	1.05E-07	L235R/G236R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1346	8.59E-08	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1347	7.14E-08	L235R/G236R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1348	5.52E-08	L235R/G236R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1349	3.36E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1350	1.18E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1351	1.62E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1352	3.93E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1353	4.33E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1354	2.29E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1355	2.47E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1356	1.58E-07	G236R/M252Y/L328R/N434Y/Y436V
F1357	2.81E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1358	9.07E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1359	1.28E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1360	3.12E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1361	3.52E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1362	1.41E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1363	1.9E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/H433D/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1364	7.49E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1365	3.14E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1366	1.17E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433D/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1367	1.79E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1368	5.49E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1369	7.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1370	9.14E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1371	1.09E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1372	2.28E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1373	8.67E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1374	1.2E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1375	1.03E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436V
F1376	9.09E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V
F1377	8.27E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/N434Y/Y436V
F1378	3.61E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436T

[0285]

[表2-24]

F1379	2.85E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436F
F1410	1.90E-06	V308P/I332V
F1411	1.70E-07	V308P/I332V/M428L/N434S
F1413	3.70E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/T307Q/Q311A/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1414	5.60E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/T307Q/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1415	5.90E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/Q311A/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1416	1.30E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1417	5.90E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434W/Y436V/Q438K/S440E
F1418	7.50E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434W/Y436V/Q438R/S440E
F1419	1.50E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434W/Y436V/Q438R/S440E
F1420	1.30E-07	L235R/S239K/M252Y/H433D/N434W/Y436V/Q438K/S440E
F1421	3.20E-08	V308P/M428L/N434W
F1422	1.90E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1423	1.60E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V302D/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1424	1.60E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V302E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1425	1.90E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V303D/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1426	1.80E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V303E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1428	1.50E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/S304E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1430	3.10E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V305E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1433	4.50E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/T307D/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1434	3.60E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/T307E/V308P/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1437	1.2E-07	V308P/M428L/N434F
F1438	2.2E-07	V308P/M428L/N434H
F1439	4.7E-08	V308P/M428Y/N434W
F1440	2.6E-07	V308P/M428I/N434W
F1441	2.5E-07	L235R/S239K/M252Y/T256E/M428L/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1442	2.4E-07	V308P/M428L/N434S
F1443	5.0E-07	T307A/V308P/M428L/N434S
F1444	2.6E-07	T307Q/V308P/M428L/N434S
F1445	2.1E-07	V308P/Q311A/M428L/N434S
F1446	2.1E-07	T307Q/V308P/Q311A/M428L/N434S
F1447	6.7E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1448	4.3E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1449	1.2E-07	L235R/S239K/M252W/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1450	8.6E-08	L235R/S239K/M252W/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1451	4.0E-07	L235R/S239K/D249A/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1452	6.1E-07	L235R/S239K/D249E/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1455	7.9E-07	L235R/S239K/D249H/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1460	5.8E-07	L235R/S239K/D249N/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1464	8.4E-07	L235R/S239K/D249S/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1465	8.2E-07	L235R/S239K/D249T/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1469	9.2E-08	L235R/S239K/T250A/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1472	5.3E-07	L235R/S239K/T250F/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1475	2.0E-07	L235R/S239K/T250I/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1478	2.0E-07	L235R/S239K/T250M/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1479	1.2E-06	L235R/S239K/T250N/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1481	1.1E-07	L235R/S239K/T250Q/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1483	1.8E-07	L235R/S239K/T250S/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E

[0286]

[表2-25]

F1484	1.5E-07	L235R/S239K/T250V/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1486	3.1E-07	L235R/S239K/T250Y/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1490	4.6E-07	L235R/S239K/L251F/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1495	5.4E-07	L235R/S239K/L251M/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1504	6.3E-07	L235R/S239K/L251Y/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1520	1.3E-06	L235R/S239K/M252Y/I253V/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1523	1.8E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255A/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1524	1.4E-06	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255D/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1525	4.2E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255E/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1526	1.7E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255F/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1527	1.9E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255G/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1528	1.6E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255H/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1529	1.5E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255I/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1530	1.5E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255K/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1531	6.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1532	1.1E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255M/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1533	3.2E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255N/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1535	2.7E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255Q/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1536	2.2E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255S/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1537	3.0E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1538	7.4E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255V/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1539	5.6E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255W/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1540	1.7E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255Y/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1541	1.2E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258A/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1542	5.7E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1543	1.2E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258F/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1544	8.2E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258G/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1545	9.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258H/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1546	6.2E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1547	7.9E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258K/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1548	6.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258L/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1549	7.8E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258M/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1550	1.2E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258N/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1552	8.1E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258Q/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1553	6.9E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258R/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1554	1.1E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258S/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1555	9.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258T/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1556	7.4E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258V/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1557	8.9E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258W/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1558	1.3E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/E258Y/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1559	1.4E-07	V308P/Q311A/I332V/M428L/N434S
F1560	2.4E-08	V308P/Q311A/M428L/N434W
F1561	2.5E-08	V308P/Q311A/M428Y/N434W
F1562	2.7E-07	K288D/V308P/I332V/M428L/N434S
F1563	5.0E-08	K288D/V308P/M428L/N434W
F1564	4.8E-08	K288D/V308P/M428Y/N434W
F1565	3.1E-08	V308P/I332V/M428Y/N434W
F1566	3.4E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1567	4.8E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E

[0287]

[表2-26]

F1568	1.5E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433E/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1569	2.6E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433F/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1570	2.1E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433G/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1571	1.7E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433I/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1572	4.1E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1573	1.3E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433L/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1574	9.4E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433M/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1575	8.8E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433N/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1576	4.3E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1577	6.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433Q/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1578	4.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1579	5.4E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1580	9.8E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433T/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1581	1.4E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433V/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1582	1.9E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433W/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1583	2.7E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433Y/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1586	5.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1587	6.1E-08	L235R/S239K/T250Q/M252Y/S254T/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1588	3.4E-08	L235R/G236R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/M428I/N434Y/Y436V
F1589	4.2E-08	L235R/G236R/S239K/T250V/M252Y/V308P/N434Y
F1590	4.7E-08	L235R/G236R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F1591	4.3E-08	L235R/G236R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1592	5.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1593	5.9E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258K/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1594	5.7E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258L/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1595	6.3E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258M/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1596	5.7E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258Q/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1597	5.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258R/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1598	6.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258V/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1599	7.4E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1600	8.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1601	3.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1602	3.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N286E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1603	5.9E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1604	6.0E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1605	6.1E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1606	3.2E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V302D/V308P/H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1607	2.0E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V302D/V308P/H433D/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1608	2.9E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/V302D/V308P/H433D/N434Y/Q438R/S440E
F1610	4.8E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1611	5.2E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E

[0288]

[表2-27]

F1612	4.9E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1613	5.2E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1614	5.1E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1615	6.0E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1616	8.2E-08	L235R/S239K/T250Q/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1617	9.6E-08	L235R/S239K/T250Q/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1618	8.6E-08	L235R/S239K/T250Q/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1619	8.8E-08	L235R/S239K/T250Q/M252Y/S254T/R255L/T256E/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1620	6.4E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1621	5.8E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1622	6.1E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1623	5.9E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1624	7.3E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1625	6.5E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1626	5.4E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1627	6.5E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1628	6.0E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1629	6.9E-08	L235R/S239K/M252Y/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1641	4.1E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1642	4.1E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1643	3.9E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433A/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1644	3.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1645	3.6E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1646	3.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433K/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1647	3.8E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1648	3.8E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1649	3.7E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433P/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1650	4.0E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1651	4.4E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1652	4.0E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433R/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1653	4.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1654	4.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1655	4.4E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/H433S/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1656	6.5E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1657	6.1E-08	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1659	3.0E-06	L235R/S239K/M252Y/S254T/T256E
F1670	1.1E-06	L235R/S239K/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1671	2.0E-06	L235R/S239K/N434Y/Y436V
F1672	2.3E-06	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E
F1673	1.8E-06	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D
F1674	2.0E-06	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I
F1675	9.6E-07	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436V
F1677	3.7E-06	L235R/S239K/S254T/T256E/N434H
F1680	1.3E-06	L235R/S239K/N434Y/Y436T

[0289] [表2-28]

F1681	1.3E-06	L235R/S239K/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1683	1.1E-06	L235R/S239K/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1684	1.8E-06	L235R/S239K/N434Y
F1686	4.0E-06	L235R/S239K/N434A/Y436V/Q438R/S440E
F1689	1.5E-06	L235R/S239K/N434F/Y436V/Q438R/S440E
F1703	8.5E-07	L235R/S239K/N434W/Y436V/Q438R/S440E
F1705	2.0E-06	L235R/S239K/M428L/N434S
F1706	2.1E-06	L235R/G236R/S239K/M428L/N434S
F1708	2.4E-06	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/Q438R/S440E
F1709	1.7E-06	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258D/Q438R/S440E
F1710	2.1E-06	L235R/S239K/M252Y/S254T/R255L/T256E/E258I/Q438R/S440E
F1711	1.8E-06	L235R/S239K/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1712	9.3E-07	L235R/S239K/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1713	9.6E-07	L235R/S239K/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1714	1.2E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1715	1.0E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1716	1.0E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1717	9.6E-07	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1718	2.0E-06	N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1719	1.8E-06	N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1720	9.0E-07	N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1721	9.0E-07	N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1722	1.1E-06	H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440E
F1723	9.9E-07	H433D/N434Y/Y436V/Q438R/S440D
F1724	9.6E-07	H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440E
F1725	9.1E-07	H433D/N434Y/Y436V/Q438K/S440D
F1734	1.2E-06	L235R/S239K/N434Y/Y436F/Q438R/S440D
F1735	8.1E-07	L235R/S239K/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1736	8.9E-07	L235R/S239K/N434Y/Y436F/Q438K/S440D
F1737	1.3E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1738	1.2E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436F/Q438R/S440D
F1739	9.7E-07	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1740	1.1E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436F/Q438K/S440D
F1741	1.1E-06	N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1742	1.1E-06	N434Y/Y436F/Q438R/S440D
F1743	8.2E-07	N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1744	9.2E-07	N434Y/Y436F/Q438K/S440D
F1745	1.1E-06	H433D/N434Y/Y436F/Q438R/S440E
F1746	1.2E-06	H433D/N434Y/Y436F/Q438R/S440D
F1747	9.6E-07	H433D/N434Y/Y436F/Q438K/S440E
F1748	1.0E-06	H433D/N434Y/Y436F/Q438K/S440D
F1749	1.3E-06	L235R/S239K/N434Y/Y436T/Q438R/S440D
F1750	1.1E-06	L235R/S239K/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1751	1.1E-06	L235R/S239K/N434Y/Y436T/Q438K/S440D
F1752	1.4E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1753	1.3E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440D
F1754	1.1E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1755	1.3E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440D
F1756	1.2E-06	N434Y/Y436T/Q438R/S440E

[0290]

[表2-29]

F1757	1.1E-06	N434Y/Y436T/Q438R/S440D
F1758	1.1E-06	N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1759	1.0E-06	N434Y/Y436T/Q438K/S440D
F1760	1.2E-06	H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440E
F1761	1.3E-06	H433D/N434Y/Y436T/Q438R/S440D
F1762	1.1E-06	H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440E
F1763	1.1E-06	H433D/N434Y/Y436T/Q438K/S440D
F1764	4.8E-06	L235R/S239K/N434Y/Q438R/S440D
F1765	1.7E-06	L235R/S239K/N434Y/Q438K/S440E
F1766	2.4E-06	L235R/S239K/N434Y/Q438K/S440D
F1767	1.5E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Q438R/S440E
F1768	1.5E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Q438R/S440D
F1769	1.9E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Q438K/S440E
F1770	1.4E-06	L235R/S239K/H433D/N434Y/Q438K/S440D
F1771	1.9E-06	N434Y/Q438R/S440E
F1772	3.4E-06	N434Y/Q438R/S440D
F1773	1.7E-06	N434Y/Q438K/S440E
F1774	2.7E-06	N434Y/Q438K/S440D
F1775	1.3E-06	H433D/N434Y/Q438R/S440E
F1776	1.5E-06	H433D/N434Y/Q438R/S440D
F1777	1.4E-06	H433D/N434Y/Q438K/S440E
F1778	1.3E-06	H433D/N434Y/Q438K/S440D

[0291] 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。

[0292] 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。

[0293] 前記のようなアミノ酸の変異が加えられたFcRn結合ドメインの改変体をコードするポリヌクレオチドと、前記のように選択された条件によって結合活性が変化する抗原結合分子分子をコードするポリヌクレオチドとがインフレームで連結された重鎖を有する抗原結合分子をコードするポリヌクレオチドも、本発明の改変体の一態様として作製される。

[0294] 本発明によって、FcRn結合ドメインをコードするポリヌクレオチドとインフレームで連結された本発明のウイルスから単離さ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の培養液から抗原結合分子を回収することを含む抗原結合分子の製造方法が提供される。また、ベクター中に予め作用可能に連結されたFcRn結合ドメインをコードするポリヌクレオチドとインフレームで連結された本発明のウイルスから単離さ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の培養液から抗原結合分子を回収することを含む抗原結合分子の製造方法もまた提供される。

[0295] 医薬組成物

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付加的にpH中性域の条件下でヒトFcRn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、1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。

[0296] 例えば、抗原結合分子が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）。1分子のIgG抗体が2価で抗原に結合した場合、1分子の抗体が2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、1分子のIgG抗体が3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1分子のIgG抗体の場合、3分子以上の抗原を中和することはできない。

[0297] 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ヒト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ヒトFcRnに結合する。ヒト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、ヒト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分子はヒト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。

[0298] 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ヒト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1分子のIgG抗体は3分子以上の抗原に結合することはできない。

[0299] 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。

[0300] 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）におけるヒトFcRnに対する結合能を付与することで、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。

[0301] 通常、抗原結合分子の一態様であるIgG型免疫グロブリンはpH中性域におけるFcRnに対する結合活性をほとんど有しない。本発明者らは、pH中性域においてFcRnに対する結合活性を有するIgG型免疫グロブリンは、細胞表面に存在

するFcRnに結合することが可能であり、細胞表面に存在するFcRnに結合することによって当該IgG型免疫グロブリンがFcRn依存的に細胞に取り込まれると考えた。FcRn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中性域においてFcRnに対する結合能を付与することによって、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中性域においてFcRn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、エンドソーム内で抗原を解離し、再び細胞表面ないしは血漿中にリサイクルされ、そこで再び抗原に結合し、またFcRnを介して細胞内に取り込まれる。pH中性域においてFcRn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酸性域における抗原に対する結合活性をpH中性域における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FcRn結合ドメインからなり、FcRn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FcRnへの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。

[0302] すなわち、本発明は、本発明の抗原結合分子、本発明のスクリーニング方法により単離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。

[0303] 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。

[0304] 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。

[0305] 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。

[0306] 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。

[0307] 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。

[0308] 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。

[0309] なお、本発明で記載されてい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で記載されているアミノ酸配列に含まれる。

[0310] 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。

[0311] 本明細書において用いる場合、「・・・を含む（comprising）」との表現により表される態様は、「本質的に・・・からなる（essentially consisting of）」との表現により表される態様、ならびに「・・・からなる（consisting of）」との表現により表される態様を包含する。

実施例

[0312] 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。

[0313] ［実施例１］pH依存的結合抗体ライブラリの設計

（１－１）pH依存的結合抗体の取得方法

WO2009125825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、ヒスチジンを可変領域（より好ましくは抗原結合に関与する可能性がある位置）に導入し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。

[0314] （１－２）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。WO2009125825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を作製し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（WO2009139822）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が表3に示される。表3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3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。

[0315] [表3]

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							

[0316] 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。

[0317] 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。

[0318] 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4および表5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4および5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）の場合は94位はSer（S）を除外することができる。

[0319]

[表4]

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 %		

[0320]

[表5]

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%			

[0321] [実施例2] 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1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が、図1に示されている。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。

[0322] [実施例3] pH依存的にIL-6Rに結合する抗体の取得

（３－１）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。

[0323] 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。

[0324] 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。

[0325] 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 mmx 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。

[0326] （３－２）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。

[0327] 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エルを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、当該ウエルが4% BSA-TBS 250μLにて1時間以上ブロッキングされた。4% BSA-TBSが除かれた各ウエ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エ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エルに、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）が各ウエ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）が添加された各ウエ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。

[0328] 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。

[0329] 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。

[0330] ファージELISAおよび配列解析の結果が以下の表6に示されている。

[0331] [表6]

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

[0332] 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。

[0333] 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。

[0334] （3－3）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ウエルプレートの各ウエルへ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。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）。

[0335] （３－４）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

（３－３）で取得された抗体6RpH#01（重鎖配列番号：１８、軽鎖配列番号：１９）、および、6RpH#02（重鎖配列番号：２０）、軽鎖配列番号：２１）、および、6RpH#03（重鎖配列番号：２２）、軽鎖配列番号：２３）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：２４）、軽鎖配列番号：２５）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。

[0336] 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。

[0337] 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が、図２に示されている。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が、図３に示されている。

[0338] 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。

[0339] [実施例4] 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2) 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１に記載されるように、pH依存的抗原結合能をもつ抗体の出現頻度を向上させるため、抗体可変領域の軽鎖部分のうち、抗原接触部位となる可能性の高い部位のヒスチジン残基の出現頻度を高めた抗体可変領域軽鎖部分が設計される。また、フレキシブル残基のうちヒスチジン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から特定される出現頻度の高いアミノ酸が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る。上記のように設計された抗体軽鎖可変領域の遺伝子ライブラリが、合成される。ライブラリの合成は商業的な受託会社等に委託して作製することも可能である。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、公知の方法 (Methods Mol Biol. (2002) 178, 87-100) に準じて、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る。実施例2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の配列が確認される。

[0340] ［実施例5］pH依存的にIL-6Rに結合する抗体の取得

（５－１）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2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る。

[0341] 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る。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る。次に、ファージライブラリ液にブロッキング剤としてBSAもしくはスキムミルクが添加される。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る（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) が用いられる。

[0342] 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る。ブロッキング剤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分間結合させる。ビーズは1 mLのTBSTにて3回洗浄された後、1 mLのTBSにてさらに2回洗浄される。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る。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に添加される。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る。感染させた大腸菌は、225 mm x 225 mmのプレートへ播種される。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る。

[0343] 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る。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る。BSAもしくはスキムミルク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分間結合させる。ビーズは1 mLのTBSTとTBSにて洗浄される。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る。pH依存的抗原結合能を指標に濃縮する場合は0.1 mLの50 mM MES/1.2 mM $CaCl_2$/150 mM 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、ファージ溶液が回収される。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る。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に添加される。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る。感染させた大腸菌は225 mm x 225 mmのプレートへ播種される。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複数回繰り返される。

[0344] （５－２）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る。

[0345] 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る。当該プレートの各ウエルをPBSTにて洗浄することによって抗原が除かれた後、当該ウエルが4% BSA-TBS 250μLにて1時間以上ブロッキングされる。4%BSA-TBSが除かれた各ウエ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エルに存在する抗原に結合させる。1.2 mM $CaCl_2$/TBSTにて洗浄された各ウエルに、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る。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）が各ウエルに添加されたプレートを１時間インキュベートさせる。1.2 mM $CaCl_2$/TBSTにて洗浄後、TMB single溶液（ZYMED）が添加された各ウエ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る。

[0346] 上記のファージ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る。

[0347]（５－３）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る。抗体の発現は以下の方法を用いて行われる。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ウエルプレートの各ウエルへ3 mLずつ蒔きこまれる。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る。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る。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る（Protein Science (1995) 4, 2411-2423）。

[0348] （５－４）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

実施例５で取得された抗体のヒト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解析がBiacore T100（GE Healthcare）を用いて行われる。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、トリシズマブ（重鎖配列番号：２４、軽鎖配列番号：２５）が用いられる。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解析が行われる。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る。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る。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る。測定は全て37℃で実施される。

[0349] 対照抗体であるトシリズマブ抗体、実施例５で取得される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抗体にIL-6レセプターを相互作用させる。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る。pH6.0の条件下でのセンサーグラ

ムも、同様の方法で取得する。

[0350] ［実施例6］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

（６－１）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（図４Ｂ）。こうしたエピトープを形成するアミノ酸の性質から、図４Ａに示される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、図４Ｃに示されるように、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。

[0351] （６－２）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。

[0352] 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 Spreen 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、アミノ酸配列の配列番号が表7に示されている。配列番号：６（Vk1）、配列番号：７（Vk2）、配列番号：８（Vk3）、配列番号：９（Vk4）ならびに配列番号：１（Vk5）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：２６）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：２７（Vk1）、配列番号：２８（Vk2）、配列番号：２９（Vk3）ならびに配列番号：３０（Vk4）をコードする重鎖可変領域ポリヌクレオチドが、PCR法によって配列番号：１４のC末端の２アミノ酸が欠失した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。なお、ヒトのVk1はhVk1、ヒトのVk2はhVk2、ヒトのVk3はhVk3、ヒトのVk4はhVk4と記載することがある。

[0353] [表7]

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	２７	6
Vk2	２８	7
Vk3	２９	8
Vk4	３０	9
Vk5	4	1

[0354] （６－３）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ウエルプレートの各ウエルへ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）。

[0355] （６－４）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, 3 μM $CaCl_2$（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）が表8に示されている。

[0356] [表8]

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

[0357] 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。

[0358] （６－５）hVk5-2配列のカルシウム結合評価

実施例６の（６－２）においてVk5-2（配列番号：１に配列番号：２６が融合されたもの）のほかにVk5-2に分類されるVk5-2バリアント１（配列番号：２）およびVk5-2バリアント２（配列番号：３）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：４）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、実施例6の（６－３）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9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）が表9に示されている。

[0359] [表9]

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

[0360] 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。

[0361] ［実施例7］ヒトVk5（hVk5）配列の評価

（７－１）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。以下では、hVk5とhVk5-2は同義で扱われる。WO2010136598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（WO2010105256やWO2010136598）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。

[0362] （７－２）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：５）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：４）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、実施例6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、実施例6で記載した方法で精製された。

[0363] （７－３）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は表10に示されている。分析の結果、図5に示される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。

[0364] [表10]

	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)

[0365] 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、実施例6に記載された方法を用いて評価された。その結果、表11に示されるように、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。

[0366] [表11]

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

[0367] ［実施例8］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

（８－１）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。実施例7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。

[0368] 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：３１）、CaVk2（配列番号：３２）、CaVk3（配列番号：３３）、CaVk4（配列番号：３４）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：２６）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：４）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実施例6で記載され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。

[0369] （８－２）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実施例6に記載された方法によって評価された。評価された結果が表12に示される。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。

[0370] [表12]

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

[0371] 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。

[0372] [実施例9] 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

（９－１）hVk5-2配列のCDR配列中の変異部位の設計

実施例8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。

[0373] （９－２）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。実施例7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。作製された改変体は表13に示されている。アミノ酸の置換はQuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)、PCRまたはInfusion 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。

[0374] [表13]

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	5
hVk5-2_L66	30	35
hVk5-2_L67	31	36
hVk5-2_L68	32	37
hVk5-2_L69	50	38
hVk5-2_L70	30, 32	39
hVk5-2_L71	30, 50	40
hVk5-2_L72	30, 32, 50	41
hVk5-2_L73	92	42

[0375] 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：４）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）。

[0376] （９－３）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実施例6に記載された方法によって判定された。その結果が表14に示されている。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。

[0377] [表14]

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（℃）
		0 mM	2 mM	2 mM-0 mM
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

[0378] [実施例10] 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

（１０－１）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

実施例9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：４３）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。改変体の作製は実施例9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：４４）を、重鎖CIM_H（配列番号：４）と共に発現させた。抗体の発現および精製は実施例9と同様の方法で実施された。

[0379] （１０－２）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実施例6に記載された方法で判定された。その結果を表15に示す。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。

[0380] [表15]

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

[0381] （１０－３）分解抑制型LfVk1_Ca配列の構築、発現および精製

実施例10の（１０－１）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：４３）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：４５）、LfVk1__Ca2（配列番号：４６）およびLfVk1__Ca3（配列番号：４７）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：４８）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、実施例6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、実施例6で記載した方法で精製された。

[0382] （１０－４）分解抑制型LfVk1__Ca配列を含む抗体の安定性評価

実施例10の（１０－３）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。保存後の各抗体を実施例7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6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。

[0383] （１０－５）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

実施例10の（１０－４）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（（１０－４）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：４９）としても、分解が抑制されるか否かが評価された。改変体の作製は実施例10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：４８）と共に発現させた。抗体の発現および精製は実施例10と同様の方法で実施された。

[0384] （１０－５）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実施例10の（１０－４）に記載された方法で判定された。その結果、図7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。

[0385] 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実施例6に記載された方法で判定された。その結果を表16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。

[0386] [表16]

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

[0387] [実施例11] 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。

[0388] 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配列を含む抗体は実施例10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。

[0389] 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。

[0390] 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17および18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17および18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。

[0391] [表17]

CDR	位置	全体の70%				
CDR1	28	S ; 100%				
	29	I ; 100%				
	30	E ; 72%	H; 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%			

[0392]

[表18]

CDR	位置	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%			

[0393] [実施例12] 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、実施例11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。

[0394] 実施例2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が、図8に示されている。

[0395] ［実施例13］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

（１３－１）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

実施例7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、実施例12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。

[0396] （１３－２）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ウエルプレートの各ウエルへ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）。

[0397] （１３－３）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実施例６に記載された方法で判定された。その結果を表19に示す。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。

[0398] [表19]

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	50	61	70.88	71.45	0.57
Ca_E01	51	62	84.31	84.95	0.64
Ca_H01	52	63	77.87	79.49	1.62
Ca_D02	53	64	78.94	81.1	2.16
Ca_E02	54	65	81.41	83.18	1.77
Ca_H02	55	66	72.84	75.13	2.29
Ca_D03	56	67	87.39	86.78	-0.61
Ca_C01	57	68	74.74	74.92	0.18
Ca_G01	58	69	65.21	65.87	0.66
Ca_A03	59	70	80.64	81.89	1.25
Ca_B03	60	71	93.02	93.75	0.73

[0399] [実施例14] Ca依存的にIL-6レセプターに結合する抗体の取得

（１４－１）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。

[0400] 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。

[0401] 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。

[0402] 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。

[0403] 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。

[0404] 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。

[0405] （１４－２）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。

[0406] 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エルをPBSTにて洗浄することによって抗原が除かれた後、当該ウエルが4% BSA-TBS 250μLにて1時間以上ブロッキングされた。4% BSA-TBSが除かれた各ウエ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エ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エルに、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）が各ウエ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）が添加された各ウエ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。

[0407] 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。ファージELISA、配列解析の結果を以下の表20に示した。

[0408] [表20]

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

[0409] （１４－３）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ウエルプレートの各ウエルへ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）。

[0410] （１４－４）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

実施例１４で取得された抗体6RC1IgG_010（重鎖配列番号：７２、軽鎖配列番号：７３）、および、6RC1IgG_012（重鎖配列番号：７４、軽鎖配列番号：７５）、および、6RC1IgG_019（重鎖配列番号：７６、軽鎖配列番号：７７）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：２４、軽鎖配列番号：２５）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。

[0411] 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。

[0412] 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が、図9に示されている。

[0413] 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、同様の方法で取得した。低カルシウムイオン濃度におけるセンサーグラムが、図10に示されている。

[0414] 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。

[0415] [実施例15] 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

（１５－１）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。

[0416] （１５－２）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edta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。

[0417] 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。

[0418] 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。

[0419] 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0.1mL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。

[0420] （１５－３）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。

[0421] 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エルをPBSTにて洗浄することによって抗原が除かれた後、当該ウエルが1時間以上250μLの4%BSA-TBSにてブロッキングされた。4%BSA-TBSが除かれた各ウエ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エ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エルに、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）が各ウエ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）が添加された各ウエ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。

[0422] 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。

[0423] （１５－４）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ウエルプレートの各ウエルへ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)。

[0424] [実施例16] 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

実施例15で取得された抗体6RL#9-IgG1 (重鎖 (配列番号：７８、配列番号：１０にIgG1由来定常領域が連結された配列)、軽鎖配列番号：７９)、および、FH4-IgG1 (重鎖配列番号：８０、軽鎖配列番号：８１) 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：８２、軽鎖配列番号：８３) 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。

[0425] H54/L28-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H54/L28-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H54/L28-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。

[0426] 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 Evaluation Software (GE Healthcare) が用いられた。

[0427] 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が表21に示されている。

[0428] [表21]

抗体	H54/L28-IgG1	FH4-IgG1	6RL#9-IgG1
kD (M)	1.9E-9	5.9E-7	2.6E-7

[0429] 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1 (Biacore T100 Software Handbook, BR-1006-48, AE 01/2

007）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。

［式１］

Req=C x Rmax/ (KD+C) +RI

上記式１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。

[0430] 上記の式１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が表22に示されている。表22 中の、Req、Rmax、RI、Cは測定結果を基に仮定された値である。

[0431] [表22]

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

[0432] 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。

[0433] 表23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。

[0434] [表23]

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) (3 μM $CaCl_2$)	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

[0435] 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23）。

[0436] [実施例17] 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）が表24に示されている。

[0437]

[表24]

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

[0438] 表24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。

[0439] [実施例18] 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

（１８－１）X線結晶構造解析

実施例17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。

[0440] （１８－２）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：７８）と軽鎖（配列番号：７９）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)。

[0441] （１８－３）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 (RocheApplied 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Fab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。

[0442] （１８－４）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（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、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。

[0443] （１８－５）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。

[0444] （１８－６）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。

[0445] （１８－７）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。

[0446] （１８－８）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。

[0447] （１８－９）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%、FreeR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。

[0448] （１８－１０）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の構造が図11で示されている。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。

[0449] 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も、実施例11で記載されるようなCaライブラリのデザインの新たな要素となりうる。すなわち、実施例11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。

[0450] [実施例19] 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

（１９－１）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。

[0451] （１９－２）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。

[0452] 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。

[0453] 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。

[0454] 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0.1mL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。

[0455] （１９－３）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。

[0456] 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エルをPBSTにて洗浄することによって抗原が除かれた後、当該ウエルが1時間以上250μLの4%BSA-TBSにてブロッキングされた。4%BSA-TBSが除かれた各ウエ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エ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エルに、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）が各ウエ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）が添加された各ウエ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。

[0457] 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：１１に、およ

び、軽鎖可変領域の配列は配列番号：８４に記載されている。6KC4-1#85抗体の重鎖可変領域（配列番号：１１）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：８５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：８４）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：２６）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。

[0458] （１９－４）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ウエルプレートの各ウエルへ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）。

[0459] ［実施例20］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実施例６に記載された方法

で評価された。

[0460] 6KC4-1#85抗体のFabドメインのTm値が表25に示されている。表25に示されているように、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。

[0461] [表25]

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

[0462] [実施例21] 6KC4-1#85抗体のカルシウムイオン結合部位の同定

実施例20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：４８）、軽鎖配列GC__L（配列番号：８６））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。実施例6に示される方法に準じて測定された改変抗体のTm値が表26に示されている。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。

[0463] [表26]

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

[0464] 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：８７）、6__H1-12（配列番号：８８）、6__H1-13（配列番号：８９）、6__H1-14（配列番号：９０）、6__H1-15（配列番号：９１））、または改変軽鎖（6__L1-5（配列番号：９２）および6__L1-6（配列番号：９３））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、改変抗体が実施例19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、実施例6に記載された方法にしたがって測定された。測定された結果が表27に示されている。表27に示されているように、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も、実施例11で記載されるようなCaライブラリのデザインの新たな要素となりうる。すなわち、実施例11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。

[0465]

[表27]

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

[0466] ［実施例２２］Ca依存的にヒトIgAに結合する抗体の取得

（２２－１）MRA-hIgA、GC-hIgAおよびビオチンを付加したヒトIgA-Fcの調製

ヒトIgAとして、MRA-hIgA（重鎖配列番号９７、軽鎖配列番号２５）GC-hIgA（重鎖配列番号９８、軽鎖配列番号９９）およびビオチンを付加したヒトIgA-Fc（ビオチン標識hIgA-Fcともいう、hIgA_CH2-CH3-Avitag：配列番号１００）が以下のように調製された。

[0467] （２２－１－１）<u>MRA-hIgAの調製</u>

ヒトIgAの組換え体であるMRA-hIgA（以下MRA-hIgA）は以下のように調製された。発現させたH(WT)-IgA1（配列番号：９７）とL(WT)（配列番号：２５）とを含む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。

[0468] （２２－１－２）GC-hIgAの調製

ヒトIgAの組換え体であるGC-hIgAは、以下のように調製された。GC-hIgA（重鎖配列番号：９８、軽鎖配列番号：９９）をコードする遺伝子断片が、動物細胞発現用ベクターに組み込まれた。構築されたプラスミドベクターは、FreeStyle293 (Invitrogen)に293Fectin (Invitrogen)を用いて、EBNA1を発現する遺伝子と共に導入された。その後、遺伝子導入された細胞を37℃、CO_2 8%で6日間培養して、GC-hIgAタンパク質を培養上清中に分泌させた。

[0469] GC-hIgAを含む細胞培養液を、0.22μmボトルトップフィルターでろ過し培養上清が得られた。20 mM Tris-HCl, pH8.0で平衡化されたHiTrap Q HP (GE healthcare)に同溶液で希釈された培養上清を負荷し、NaClの濃度勾配によりGC-hIgAが溶出された。その後、Superdex200によるゲルろ過クロマトグラフィーにて会合体の除去と20 mM His-HCl, 150 mM NaCl, pH6.0への置換を行い、精製GC-hIgAが得られた。

[0470] （２２－１－３）ビオチン標識hIgA-Fcの調製

ビオチンを目的タンパク質（ヒトIgA-Fc）のC末端に付加するために、ヒトIgA-Fc領域をコードする遺伝子断片の下流に、ビオチンリガーゼによってビオチンが付加される特異的な配列（Avitag配列）をコードする遺伝子断片が連結された。ヒトIgAとAvitag配列が連結されたタンパク質（hIgA__CH2-CH3-Avitag（配列番号：１００））をコードする遺伝子断片が動物細胞発現用ベクターに組み込まれた。構築されたプラスミドベクターが、FreeStyle293 (Invitrogen)に293Fectin (Invitrogen)を用いて、遺伝子導入された。このときEBNA1を発現する遺伝子およびビオチンリガーゼ（BirA）を発現する遺伝子を同時に導入し、ビオチンを添加することでビオチン標識させた。前述の手順に従って遺伝子が導入された細胞を、37℃、CO2 8%で6日間培養し、目的のタンパク質を培養上清中に分泌させた。

[0471] 目的のヒトIgA-Fcを含む細胞培養液を、0.22μmボトルトップフィルターでろ過し培養上清が得られた。20 mM Tris-HCl, pH7.4で平衡化されたHiTrap Q HP (GE healthcare)に同溶液で希釈された培養上清を負荷し、NaCl

の濃度勾配により目的のヒトIgA-Fcが溶出された。50 mM Tris-HCl, pH8.0で希釈されたHiTrap Q HP溶出液を、同溶液で平衡化したSoftLink Avidin columnに負荷し、5 mM Biotin, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH8.0で溶出させた。その後、Superdex200によるゲルろ過クロマトグラフィーにて会合体の除去と20 mM His-HCl, 150 mM NaCl, pH6.0への置換を行い、精製ヒトIgA-Fcが得られた。

[0472] （２２－２）ビーズパンニングによるCa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依存的に抗原に結合する抗体ライブラリ（Caライブラリ）からの最初の選抜は、抗原（ヒトIgA-Fc）への結合能を指標として実施された。

[0473] 構築され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が産生された。ファージが産生された大腸菌の培養液に2.5 M NaCl/10%PEGを添加し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、1.2 mMカルシウムイオンまたは3%SkimMilk、1.2 mMカルシウムイオンとなるようBSAまたはSkimMilk、および$CaCl_2$が添加され、ブロッキングされたファージライブラリ液が調製された。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。

[0474] 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（ビオチン標識IgA-Fc）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またはSkimMilk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 $CaCl_2$、0.1% Tween20、を含むTBS）と1 mLの1.2 mM $CaCl_2$/TBS（1.2 mM $CaCl_2$を含むTBS）にて洗浄された。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。

[0475] ２回目、３回目のパンニングでは、Caイオン濃度依存的抗原結合能を指標にファージの濃縮が行われた。具体的には、1回目のパンニングと同様にブロッキングを行い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。

[0476] （２２－３）BiacoreによるヒトIgA結合抗体のスクリーニング

2回目のパンニング終了後に得られた大腸菌から取得されたファージミドから抽出された抗体断片遺伝子が動物細胞発現用ベクターへ挿入された。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、2.63x10^5細胞/mLの細胞密度で96ウエルプレートの各ウエルへ190uL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）中で4日間培養が行われた。

[0477] 上記方法により得られた培養上清を用い、BiacoreA100を用いてGC-hIgAへの結合能が解析された。アミンカップリング法でproteinA(invitrogen)が適当量固定化されたsensor chip CM5(GE Healthcare)に対し培養上清中の抗体を固定化させた。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）の緩衝液が用いられた。GC-hIgA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25℃で実施された。

[0478] 上記のIgG Biacoreでの結合能解析の結果、GC-hIgAに対する結合能があると判断された抗体について、発現に用いた動物細胞発現用ベクターから、特異的なプライマーを用いて増幅された抗体遺伝子の塩基配列が解析された。

[0479] （２２－４）Phage ELISAによるhIgA結合抗体のスクリーニング

（２２－２）で実施された3回目のパンニング後に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）に習いファージの培養を行い、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IgA-Fcを含む100 μLのPBSにて一晩コートされた。当該プレートの各ウエルをPBSTにて洗浄す

ることによって抗原が除かれた後、当該ウエルが1時間以上250μLの4%BSA-TBSにてブロッキングされた。4%BSA-TBSが除かれた各ウエ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エルに存在するIgA-Fcに結合させた。1.2 mM $CaCl_2$/TBSTにて洗浄された各ウエルに、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）が各ウエ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）が添加された各ウエ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。

[0480] 上記のファージELISAの結果、Caイオン濃度によりIgA-Fcへの結合能が変化すると判断されたクローンに対し、抗体断片遺伝子の塩基配列解析が行われた。

[0481] （２２－５）固層パンニング法によるCa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依存的に抗原に結合する抗体ライブラリ（Caライブラリ）からの最初の選抜は、抗原（ヒトIgA-Fc）への結合能を指標として実施された。

[0482] 構築され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が産生された。ファージが産生さ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、1.2 mMカルシウムイオンまたは3%SkimMilk、1.2 mMカルシウムイオンとなるようBSAまたはSkimMilk、および$CaCl_2$が添加され、ブロッキングされたファージライブラリ液が調製された。パンニング方法として、1回目のパンニングでは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。

[0483] 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（ビオチン標識IgA-Fc）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。SkimMilk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 $CaCl_2$、0.1% Tween20を含むTBS）と1 mLの1.2 mM $CaCl_2$/TBS（1.2 mM $CaCl_2$を含むTBS）にて洗浄された。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。

[0484] 2回目のパンニングでは、プレート上に固層化された抗原を用いてパンニングが行われた。具体的には、ストレプトアビジンがコーティングされた10ウエルのプレート(Streptawell, Roche)に各ウエルあたり 5pmolのビオチン標識抗原が加えられ、室温で60分間抗原と接触させた後、TBST（0.1% Tween 20を含むTBS）にて3回洗浄された抗原固相化プレートが作製された。ここに、1.2mM Caを含むSkimMilkでブロッキングされたファージライブラリを加え、室温で60分間抗原と接触させた。プレートは1.2 mM $CaCl_2$/TBSTにて、プレートウォッシャー(Skan WASHER, SKARON)により3回洗浄された。その後

、さらに2Lの1.2 mM $CaCl_2$/TBST に浸漬され、60分間緩やかに振とうされた。0.1 mLの2 mM EDTA/TBS（2 mMのEDTAを含むTBS）が加えられたウエルは室温で懸濁された後、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。

[0485] （２２－６）Phage ELISAによるhIgA結合抗体のスクリーニング

上記パンニング後に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）に習いファージの培養を行い、ファージ含有培養上清が回収された。（２２－４）に記載の方法で、PhageELISAを実施し、Ca依存的抗原結合能があると判断されたクローンに対し塩基配列解析が行われ、動物細胞発現用ベクターに挿入され、抗体として発現、精製された。

[0486] [実施例２３] 取得された抗体のヒトIgAに対するCa依存的結合能の評価

（２３－１）取得された抗ヒトIgA抗体の発現および精製

実施例２２においてヒトIgAに対する結合能があると判断された抗体として取得された抗体のうち、GA1-IgG1（（２２－３）で取得された、重鎖配列番号１０１、軽鎖配列番号１０２）,GA2-IgG1（（２２－４）で取得された、重鎖配列番号１０３、軽鎖配列番号１０４）、GA3-IgG1（（２２－６）で取得された、重鎖配列番号１０５、軽鎖配列番号１０６）、GA4-IgG1（（２２－３）で取得された、重鎖配列番号１０７、軽鎖配列番号１０８）を以下の方法を用いて発現して、当該抗体の精製が行われた。FreeStyle 293 Expression Medium培地（Invitrogen）に懸濁されたヒト胎児腎細胞由来FreeStyle 293-F株（Invitrogen）が1.33 x 10^6細胞/mLの細胞密度で6ウエルプレー

トの各ウエルへ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）。

[0487] （２３－２）取得された抗体のヒトIgAに対するCa依存的結合能の評価

Biacore T200（GE Healthcare）を用いて、（２３－１）で取得された抗体（GA1-IgG1, GA2-IgG1, GA3-IgG1およびGA4-IgG1）のヒトIgAに対する結合活性（解離定数K_D (M)）が評価された。ランニングバッファーとして3μMもしくは1.2 mM $CaCl_2$を含有する0.05% tween20, 20 mmol/l ACES, 150 mmol/l NaCl（pH7.4およびpH5.8）、0.1μMもしくは10 mM $CaCl_2$を含有する0.05% tween20, 20 mmol/l ACES, 150 mmol/l NaCl、pH8.0を用いて当該結合活性が測定された。

[0488] Sensor chip CM5(GE Healthcare)上にアミノカップリング法で適切な量が固定化された組換え型プロテインA/G（Thermo Scientific）に、抗体を結合させた。アナライトとして適切な濃度のMRA-hIgA（（２２－１）に記載）をインジェクトし、センサーチップ上の抗体と相互作用させた。その後、10 mmol/L Glycine-HCl, pH1.5をインジェクトし、センサーチップが再生された。測定は37℃で行われた。Biacore T200 Evaluation Software (GE Healthcare）を用いた、測定結果の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、解離定数K_D (M)が算出された。その結果を表２８に示した。また、得られたセンサーグラムを図１２に示した。GA2-IgG1、GA3-IgG1、GA4-IgG1はCa^{2+}濃度が1.2 mMにおいてはヒトIgAに強く結合するが、Caイオン濃度が3μMにおいてはヒトIgAに弱く結合することが明らかに示された。

[0489]

[表28]

抗体名	条件	Fit	ka	kd	KD[M]
GA1-IgG1	pH8.0, 10mM Ca	1:1binding model	1.2E+06	1.2E-01	1.0E-07
	pH8.0, 0.1μM Ca	1:1binding model	1.1E+06	2.4E-01	2.2E-07
	pH7.4, 1.2mM Ca	1:1binding model	5.7E+05	8.4E-02	1.5E-07
	pH7.4, 3μM Ca	1:1binding model	6.4E+05	1.2E-01	1.9E-07
	pH5.8, 1.2mM Ca	1:1binding model	6.8E+05	9.9E-02	1.4E-07
	pH5.8, 3μM Ca	1:1binding model	7.1E+05	1.1E-01	1.5E-07
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
GA3-IgG1	pH7.4, 1.2mM Ca	1:1binding model	4.3E+05	3.3E-02	7.9E-08
	pH7.4, 3μM Ca	Steady State Affinity	-	-	-
	pH5.8, 1.2mM Ca	1:1binding model	4.4E+05	3.5E-02	8.1E-08
	pH5.8, 3μM Ca	Steady State Affinity	-	-	1.1E-06
GA4-IgG1	pH7.4, 1.2mM Ca	Steady State Affinity	-	-	4.2E-07
	pH7.4, 3μM Ca	Steady State Affinity	-	-	8.9E-07
	pH5.8, 1.2mM Ca	Steady State Affinity	-	-	1.1E-06
	pH5.8, 3μM Ca	Steady State Affinity	-	-	1.5E-06

[0490] 実施例１４ではCaライブラリからIL6レセプターに対してCaイオン濃度依存的に抗原（IL6レセプター）との相互作用が変化する抗体が取得されたが、Caイオン濃度依存的に抗原に結合する抗体は、IL6レセプターだけでなくヒトIgAでも取得できることが明らかになった。

[0491] [実施例２４] Ca依存的にヒトグリピカン３(GPC3)に結合する抗体の取得

（２４－１）ヒトグリピカン３の調製

抗原として用いる組換えヒトグリピカン3（以下GPC3）が以下のように調製された。ヒトグリピカン3の膜貫通領域を含まないアミノ酸配列に6残基のヒスチジンが連結した配列（配列番号：１０９）を発現するプラスミドが定常的に導入されているCHO細胞の培養上清が回収された。得られた培養上清を、イオン交換クロマトグラフィー精製後、Hisタグを用いたアフィニティー精製およびゲルろ過クロマトグラフィー精製を行って、GPC3が得られた。EZ-Link NHS-PEG4-Biotin (Thermo SCIENTIFIC)を用いて当該GPC3に対してビオチンが標識されたビオチン標識GPC3が調製された。

[0492] （２４－２）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Ca依存的にGPC3に結合する抗体ライブラリからの最初の選抜は、抗原（GPC3）への結合能を指標に実施された。

[0493] 構築され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が産生された。ファージが産生さ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、1.2 mMカルシウムイオンまたは3%SkimMilk、1.2 mMカルシウムイオンとなるようBSAまたはSkimMilk、および$CaCl_2$が添加され、ブロッキングされたファージライブラリ液が調製された。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。

[0494] 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（ビオチン標識GPC3）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またはSkimMilk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）と1 mLの1.2 mM $CaCl_2$/TBS（1.2 mM $CaCl_2$を含むTBS）にて洗浄された。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。

[0495] 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、1回目のパンニングと同様にブロッキングを行い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またはSkimMilk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。

[0496] （２４－３）Phage ELISAによるGPC3結合抗体のスクリーニング

上記の方法で実施された２回目および３回目のパンニング後に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）に習いファージの培養を行い、ファージ含有培養上清が回収された。

[0497] 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エルを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、当該ウエルが1時間以上250μLの4%BSA-TBSにてブロッキングされた。4%BSA-TBSが除かれた各ウエ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エ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エルに、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）が各ウエ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）が添加された各ウエ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。

[0498] 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が解析された。

[0499] （２４－４）ヒトGPC3に結合する抗体の発現と精製

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４抗体、CSCM-01__005（重鎖配列：１１０、軽鎖配列：１１１）、CSCM-01__009（重鎖配列：１１２、軽鎖配列：１１３）、CSCM-01__015（重鎖配列：１１４、軽鎖配列：１１５）、およびCSCM-01__023（重鎖配列：１１６、軽鎖配列：１１７）ならびにコントロールとして抗ヒトGPC3抗体であるGC-IgG1（重鎖配列：１１８、軽鎖配列：１１９）がそれぞれ動物細胞発現用プラスミドへ挿入された。抗体を以下の方法を用いて発現させた。FreeStyle 293 Expression Medium培地（Invitrogen）に懸濁されたヒト胎児腎細胞由来FreeStyle 293-F株（Invitrogen）が1.33 x 10^6個 /mLの細胞密度で6ウエルプレートの各ウエルへ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℃、8%CO_2, 90 rpm）で4日間培養が行われた。rProtein A Sepharose™ 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）。なお、GC-IgG1抗体については、GC-IgG1抗体を定常的に発現するCHO細胞培養上清から同様の方法で抗体を精製し、濃度が算出された 。

[0500] （２４－５）取得された抗体のヒトGPC3に対するCa依存的結合能評価

取得された抗体が以下の手順で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。該当プレートの各ウエルをACES buffer（10 mM ACES, 150 mM NaCl, 100 mM $CaCl_2$,0.05% Tween20, pH7.4）にて洗浄することによって抗原が除かれた後、当該ウエルが2%BSAを含むACES Buffer 250 μLにて1時間以上ブロッキングされた。2%BSAを含むACES Bufferが除かれた各ウエルに、あらかじめ10μg/mLから4倍ずつ希釈を行った精製IgG各100μLが加えられた当該プレートを一時間静置することによって、IgGを各ウエルに存在する抗原に結合させた。ACES Bufferにて洗浄された各ウエルに、「10 mM ACES,150 mM NaCl, 1.2 mM $CaCl_2$, pH7.4」、「10 mM ACES, 150 mM NaCl, 3μM $CaCl_2$, pH7.4」、「10 mM ACES, 150 mM NaCl, 1.2 mM $CaCl_2$, pH5.8」もしくは「10 mM ACES, 150 mM NaCl, 3μM $CaCl_2$, pH5.8」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。ACES Bufferにて洗浄された後に、2%BSAを含むACES Bufferによって希釈されたHRP結合抗ヒトIgG抗体（BIOSOURCE）が各ウエ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。ACES Bufferにて洗浄後、TMB single溶液（ZYMED）が添加された各ウエ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。

[0501] 測定された結果を図１３に示した。GC-IgG1ではカルシウムイオンの濃度に依らず吸光度が同じであるのに対して、CSCM-01__005、CSCM-01__009、CSCM-01__015およびCSCM-01__023は1.2 mMカルシウムイオン濃度（高カルシウムイオン濃度）における吸光度と比較して、3μMカルシウムイオン濃度（低カルシウムイオン濃度）における吸光度は、顕著に低い結果となった。この結果から、CSCM-01__005、CSCM-01__009、CSCM-01__015およびCSCM-01__023はカルシウムイオンの濃度によって抗原との結合が変化する性質を有することが示され、ヒトグリピカン3に対してもカルシウム依存的抗体が取得できることが示された。

[0502] ［実施例２５］pH依存的にマウスIgAに結合する抗体の取得

（２５－１）GC-mIgAおよびビオチンを付加したマウスIgA-Fcの調製

マウスIgAとして、GC-mIgA（重鎖配列番号１２０、軽鎖配列番号１２１）およびビオチンを付加したマウスIgA-Fc（ビオチン標識mIgA-Fcともいう、mIgA__CH2-CH3-Avitag：配列番号１２２）が以下のように調製された。

[0503] （２５－１－１）GC-mIgAの調製

マウスIgAの組換え体であるGC-mIgAは、以下のように調製された。GC-mIgA（重鎖配列番号：１２０、軽鎖配列番号：１２１）をコードする遺伝子断片が、動物細胞発現用ベクターに組み込まれた。構築されたプラスミドベクターは、FreeStyle293 (Invitrogen)に293Fectin (Invitrogen)を用いて、EBNA1を発現する遺伝子と共に導入された。その後、遺伝子導入された細胞を37℃、CO_2 8%で4日間培養して、GC-mIgAタンパク質を培養上清中に分泌させた。

[0504] GC-mIgAを含む細胞培養液を、0.22μmボトルトップフィルターでろ過し培養上清が得られた。20 mM Tris-HCl, pH8.0で平衡化された後に同溶液で希釈された培養上清が負荷されたHiTrap Q HP (GE healthcare)から、NaClの濃度勾配によりGC-mIgAが溶出された。その後、Superdex200を用いたゲルろ過クロマトグラフィーによって会合体が除去されたGC-mIgAを含むバッファーを20 mM His-HCl, 150 mM NaCl, pH6.0へ置換して、精製GC-mIgA

が得られた。

[0505] （２５－１－２）ビオチン標識mIgA-Fcの調製

ビオチンを目的タンパク質（マウスIgA-Fc）のC末端に付加するために、マウスIgA-Fc領域をコードする遺伝子断片の下流に、ビオチンリガーゼによってビオチンが付加される特異的な配列（Avitag配列）をコードする遺伝子断片が連結された。マウスIgAとAvitag配列が連結されたタンパク質（mIgA_CH2-CH3-Avitag（配列番号：１２２））をコードする遺伝子断片が動物細胞発現用ベクターに組み込まれた。構築されたプラスミドベクターが、FreeStyle 293 (Invitrogen)に293Fectin (Invitrogen)を用いて、遺伝子導入された。このときEBNA1を発現する遺伝子およびビオチンリガーゼ（BirA）を発現する遺伝子を同時に導入し、ビオチンを添加することでビオチン標識させた。前述の手順に従って遺伝子が導入された細胞を、37℃、CO_2 8%で6日間培養し、目的のタンパク質を培養上清中に分泌させた。

[0506] 目的のマウスIgA-Fcを含む細胞培養液を、0.22μmボトルトップフィルターでろ過し培養上清が得られた。20 mM Tris-HCl, pH7.4で平衡化された後に同溶液で希釈された培養上清が負荷されたHiTrap Q HP (GE healthcare)から、NaClの濃度勾配により目的のマウスIgA-Fcを溶出させた。次に、50 mM Tris-HCl, pH8.0で平衡化された後に、同溶液で希釈された前記HiTrap Q HP溶出液が負荷されたSoftLink Avidin columnから、5 mM Biotin, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH8.0で目的のマウスIgA-Fcを溶出させた。その後、Superdex200を用いたゲルろ過クロマトグラフィーによって会合体が除去されたマウスIgA-Fcを含むバッファーを20 mM His-HCl, 150 mM NaCl, pH6.0へ置換して、精製マウスIgA-Fcが得られた。

[0507] （２５－２）ビーズパンニングによるHis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pH依存的に抗原に結合する抗体ライブラリ（Hisライブラリ１）からの最初の選抜は、抗原（マウスIgA-Fc）への結合能を指標として実施された。

[0508] 構築され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が産生された。ファージが産生された大腸菌の培養液に2.5 M NaCl/10%PEGを添加し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3%SkimMilk、となるようSkim Milkが添加され、ブロッキングされたファージライブラリ液が調製された。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。

[0509] 具体的には、調製されたファージライブラリ液にビオチン標識抗原（ビオチン標識mIgA-Fc）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。1回目のパニングでは250pmol、2回目のパニングでは40 pmol、3回目のパニングでは10pmolのビオチン標識抗原が用いられた。Skim Milk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, pH7.6) と1 mLの1.2 mM $CaCl_2$/TBS (1.2 mM $CaCl_2$を含むTBS, pH7.6) にて洗浄された。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。パンニングは、合計3回繰り返された。

[0510] （２５－３）Biacoreによるマウスの結合抗体の結合能評価

3回目のパンニング終了後に得られた大腸菌から取得されたファージミドから抽出された抗体断片遺伝子が、動物細胞発現用ベクターへ挿入された。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、2.63x10^5細胞/mLの細胞密度で96ウエルプレートの各ウエルへ190μL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℃、8%CO_2）中で4日間培養が行われた。

[0511] 上記方法により得られた培養上清を用い、BiacoreA100を用いてGC-mIgAへの結合能が解析された。アミンカップリング法で適切な量のproteinA/G(PIERCE)が固定化されたsensor chip CM5(GE Healthcare)に対し培養上清中の抗体をキャプチャーさせた。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）および20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% (w/v) Tween20、1.2 mM $CaCl_2$（pH5.8）の2種の緩衝液が用いられ、中性域pHおよび酸性域pHの条件中での抗原抗体反応の相互作用が解析された。GC-mIgAの希釈にもそれぞれのバッファーが使用され、流速10μL/minで60秒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れた抗体と相互作用させた。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。測定は全て25℃で実施された。

[0512] 上記のBiacoreでの結合評価の結果、GC-mIgAに対してpH依存的結合能を持つと判断された抗体として、mIAP1B3-3_#024（重鎖配列番号：１２３、軽鎖配列番号：１２４）、mIAP1B3-3_#130（重鎖配列番号：１２５、軽鎖配列番号：１２６）、mIAP1B3-3_#230（重鎖配列番号：１２７、軽鎖配列番号：１２８）が得られた。これらの抗体のpH7.4およびpH5.8におけるセンサーグラムを図１４に示した。バッファー中のpHをpH7.4からpH5.8にすることで、マ

ウスIgAに対する結合能が低減することが観察された。

[0513] これらの抗体について、発現に用いた動物細胞発現用ベクターから抗体遺伝子の塩基配列が解析された。

[0514] 実施例３ではHisライブラリ１からIL-6Rに対してpH依存的に抗原（IL-6R）との相互作用が変化する抗体が取得されたが、pH依存的に抗原に結合する抗体は、IL-6Rだけでなくマウスでも取得できることが明らかになった。

[0515] ［実施例２６］pH依存的にヒトHMGB1に結合する抗体の取得

（２６－１）ヒトHMGB1およびビオチンを付加したヒトHMGB1の調製

ヒトHMGB1（配列番号：１２９）、およびビオチンを付加したヒトHMGB1-Avi（ビオチン標識hHMGB1ともいう、hHMGB1-Avitag：配列番号１３０）が以下のように調製された。

[0516] （２６－１－１）ヒトHMGB1の調製

ヒトHMGB1の組換え体であるhHMGB1は、以下のように調製された。hHMGB1（配列番号：１２９）をコードする遺伝子断片が、動物細胞発現用ベクターに組み込まれた。構築されたプラスミドベクターは、FreeStyle293 (Invitrogen)に293Fectin (Invitrogen)を用いて、EBNA1を発現する遺伝子と共に導入された。その後、遺伝子導入された細胞を37℃、CO_2 8%で培養して、hHMGB1タンパク質を培養上清中に分泌させた。PBSで平衡化された後に、得られた培養上清が負荷されたHiTrap SP Sepharose HP（GE Healthcare社）をPBSで洗浄後、塩化ナトリウムの直線的濃度勾配によってカラムに吸着した蛋白質を溶出させた。20 mM Histidine-HCl, pH5.0で平衡化された後に、同緩衝液で3倍に希釈された前記のhHMGB1を含む溶出画分が負荷された。同緩衝液で洗浄されたカラムから、カラムに吸着した蛋白質を塩化ナトリウムの直線的濃度勾配によって溶出させた。限外ろ過膜で濃縮されたhHMGB1を含む画分が、300 mM NaCl, 20 mMヒスチジン, pH6.0で平衡化されたSuperdex200カラム（GE Healthcare社）に負荷された。同緩衝液で分離することでhHMGB1精製画分が得られた。

[0517] （２６－１－２）ビオチン標識ヒトHMGB1の調製

ビオチンを目的タンパク質（ヒトHMGB1）のC末端に付加するために、ヒトHMGB1領域をコードする遺伝子断片の下流に、ビオチンリガーゼによってビオチンが付加される特異的な配列（Avitag配列）をコードする遺伝子断片が連結された。ヒトHMGB1とAvitag配列が連結されたタンパク質（hHMGB1-Avitag（配列番号：１３０））をコードする遺伝子断片が動物細胞発現用ベクターに組み込まれた。構築されたプラスミドベクターが、FreeStyle293 (Invitrogen)に293Fectin (Invitrogen)を用いて、遺伝子導入された。このときEBNA1を発現する遺伝子およびビオチンリガーゼ（BirA）を発現する遺伝子を同時に導入し、ビオチンを添加することでビオチン標識させた。前述の手順に従って遺伝子が導入された細胞を、37℃、CO_2 8%で培養し、目的のタンパク質を培養上清中に分泌させた。

[0518] PBSで平衡化された後に、前記で得られた培養上清が負荷されたHiTrap SP Sepharose HP（GE Healthcare社）をPBSで洗浄後、塩化ナトリウムの直線的濃度勾配によってカラムに吸着した蛋白質を溶出させた。TBSで平衡化されたSoftLink Soft Release Avidin Resinカラム（Promega社）に100 mM Tris-HCl, pH7.4で2倍に希釈されたHMGB1-Aviを含む画分が負荷された。TBSで洗浄されたカラムから、カラムに吸着した蛋白質を5 mM Biotinを含むTBS（pH8.0）で溶出させた。限外ろ過膜で濃縮されたHMGB1-Aviを含む画分が、300 mM NaCl, 20 mMヒスチジン, pH6.0で平衡化されたSuperdex200カラム（GE Healthcare社）に負荷された。同緩衝液で分離することでBiotin化されたHMGB1-Avi精製画分が得られた。

[0519] （２６－２）ビーズパンニングによるHis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pH依存的に抗原に結合する抗体ライブラリ（Hisライブラリ１）からの最初の選抜は、抗原（ヒトHMGB1）への結合能を指標として実施された。

[0520] 構築され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が産生された。ファージが産生された大腸菌の培養液に2.5 M NaCl/

10%PEGを添加し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、1.2 mMカルシウムイオンとなるようBSA、および$CaCl_2$が添加され、ブロッキングされたファージライブラリ液が調製された。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。

[0521] 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（ビオチン標識hHMGB1）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 (50mM Tris, 300mM NaCl, 1.2 mM $CaCl_2$、0.1% Tween20, pH7.6) と1 mLの1.2 mM $CaCl_2$/TBS (50mM Tris, 300mM NaCl, 1.2 mM $CaCl_2$, pH7.6) にて洗浄された。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。

[0522] 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4

0 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0.5 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。pH依存的抗原結合能を指標に濃縮する場合は、Round2では0.4 mL, Round3以降では0.1 mLの50 mM MES/1.2 mM $CaCl_2$/150 mM NaCl (pH5.5) が加えられ、ビーズは室温で懸濁された後、磁気スタンドを用いてビーズが分離された。回収されたファージ溶液に、100 mg/mLのトリプシンをRound2では20μL、Round3以降では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 mmx 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は3回繰り返された。

[0523] （２６－３）Phage ELISAによるヒトHMGB1結合抗体のスクリーニング

（２６－２）で実施された3回目、4回目のパンニング後に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）に習いファージの培養を行い、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hHMGB1を含む100μLのPBSにて4時間以上コートされた。当該プレートの各ウエルを

PBSTにて洗浄することによって抗原が除かれた後、当該ウエルが1時間以上250μLの4%BSA-TBS(50mM Tris, 300mM NaCl, 2.5mM $CaCl_2$, 4%BSA)にてブロッキングされた。4%BSA-TBSが除かれた各ウエ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エルに存在するHMGB1に結合させた。1.2 mM $CaCl_2$/TBST(pH7.6)にて洗浄された各ウエルに、1.2 mM $CaCl_2$/TBS(pH7.6)もしくは1.2 mM $CaCl_2$/150 mM NaCl/50 mM MES(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(pH7.6)にて洗浄された後に、4%BSA-TBSによって希釈されたHRP結合抗M13抗体（Amersham Pharmacia Biotech）が各ウエ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(pH7.6)にて洗浄後、TMB single溶液（invitrogen）が添加された各ウエ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。

[0524] 上記のファージELISAの結果、pHによりヒトHMGB1への結合能が変化すると判断されたクローンに含まれる体断片遺伝子の塩基配列が解析された。

[0525] （２６－４）ヒトHMGB1に結合する抗体の発現と精製

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３抗体、HM_3_2_R_017(重鎖配列番号：１３１、軽鎖配列番号：１３２)、HM_3_2_R_054（重鎖配列番号：１３３、軽鎖配列番号：１３４）、およびHM_4_1_R_001（重鎖配列番号：１３５、軽鎖配列番号：１３６）がそれぞれ動物細胞発現用プラスミドへ挿入された。抗体を以下の方法を用いて発現させた。FreeStyle 293 Expression Medium培地（Invitrogen）に懸濁されたヒト胎児腎細胞由来FreeStyle 293-F株（Invitrogen）が1.33 x 10^6個 /mLの細胞密度で6ウエルプレートの各ウエルへ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℃、8%CO_2, 90 rpm）で4日間培養が行われた。rProtein A Sepharose™ 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）。

[0526] （２６－５）取得された抗体のヒトHMGB1に対するpH依存的結合能の評価

（２６－４）で取得された抗体HM_3_2_R_017（重鎖配列番号：１３１、軽鎖配列番号：１３２）、HM_3_2_R_054（重鎖配列番号：１３３、軽鎖配列番号：１３４）、およびHM_4_1_R_001（重鎖配列番号：１３５、軽鎖配列番号：１３６）のhHMGB1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hHMGB1との相互作用がBiacore T100（GE Healthcare）を用いて解析された。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pH5.8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（PIERCE）が適当量固定化されたSensor chip CM4（GE Healthcare）上に、目的の抗体がそれぞれ200RU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 $CaCl_2$（pH5.8）の2種類の緩衝液が用いられた。hHMGB1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25℃で実施された。

[0527] HM_3_2_R_017抗体およびHM_3_2_R_054抗体およびHM_4_1_R_001抗体を用いた抗原抗体反応の相互作用の解析に際して、hHMGB1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10μL/minで60秒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。HM_3_2_R_017抗体およびHM_3_2_R_054抗体およびHM_4_1_R_001抗体にhHMGB1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。

[0528] 前記の方法により測定されたpH7.4, pH5.8におけるセンサーグラムが、図１５に示されている。

前記の結果から、HM__3__2__R__017抗体、HM__3__2__R__054抗体およびHM__4__1__R__001抗体は、バッファー中のpHをpH7.4からpH5.8にすることで、hHMGB1に対する結合能が低減することが観察され、ヒトHMGB1に対してもpH依存的結合抗体が取得できることが示された。

[0529] ［参考実施例１］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

（１－１）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４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。

[0530] 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。

[0531] （１－２）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が図１６に示されている。

[0532] （１－３）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：２４、軽鎖配列番号：２５）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エルが洗浄された後、各ウエルにRead Buffer T (×4) (Meso Scale Discovery) が分注された。ただちに反応液はSEC

TOR 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の濃度推移が図１７に示されている。

[0533] 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。

[0534] [参考実施例２] Ca依存的抗原結合抗体の抗原消失加速効果の向上検討（抗体作製）

（２－１）IgG抗体のFcRnへの結合に関して

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）においてその結合はほとんど認められない。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に結合することによって細胞表面上に戻り、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、酸性条件下におけるFcRnへの結合を失わせると、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。

[0535] IgG抗体の血漿中滞留性を改善させる方法として、酸性条件下におけるFcRnへの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、酸性条件下のFcRnへの結合を向上させることによって、エンド

ソーム内から血漿中へのIgG抗体のリサイクル効率が上昇する。その結果、IgG抗体の血漿中の滞留性が改善する。アミノ酸の置換を導入する際に重要と考えられているのは、中性条件下におけるFcRnへの結合を高めないことであった。中性条件下においてFcRnに結合するIgG抗体は、エンドソーム内の酸性条件下においてFcRnに結合することによって細胞表面上に戻ることはできても、中性条件下の血漿中においてIgG抗体がFcRnから解離せず血漿中にリサイクルされないために、逆にIgG抗体の血漿中滞留性は損なわれると考えられていた。

[0536] 例えば、Dall' Acquaら（J. Immunol. (2002) 169 (9), 5171-5180）に記載されているように、マウスに投与された、アミノ酸置換を導入することによって中性条件下（pH7.4）においてマウスFcRnに対する結合が認められるようになったIgG1抗体の血漿中滞留性が悪化することが報告されている。また、Yeungら（J. Immunol. (2009) 182 (12), 7663-7671）、Datta-Mannanら（J. Biol. Chem. (2007) 282 (3), 1709-1717）、Dall' Acquaら（J. Immunol. (2002) 169 (9), 5171-5180）に記載されているように、アミノ酸置換を導入することによって酸性条件下（pH6.0）におけるヒトFcRnの結合が向上するIgG1抗体改変体は、同時に中性条件下（pH7.4）におけるヒトFcRnに対する結合が認められるようになる。カニクイザルに投与された当該抗体の血漿中滞留性は改善されず、血漿中滞留性に変化が認められなかったことが報告されている。そのため、抗体の機能を向上させる抗体工学技術においては、中性条件下（pH7.4）におけるヒトFcRnに対する結合を増加させることなく酸性条件下におけるヒトFcRnへの結合を増加させることで抗体の血漿中滞留性を改善させることに注力されていた。すなわち、そのFc領域にアミノ酸置換を導入することによって中性条件下（pH7.4）におけるヒトFcRnに対する結合が増加したIgG1抗体の利点はこれまで報告されていない。

[0537] Ca依存的に抗原に結合する抗体は、可溶型の抗原の消失を加速させ、ひとつの抗体分子が複数回繰り返し可溶型の抗原に結合する効果を有することか

ら、極めて有用である。この抗原消失加速効果をさらに向上させる方法として、中性条件下（pH7.4）におけるFcRnに対する結合を増強する方法が検証された。

[0538] （２－２）中性条件下におけるFcRnに対する結合活性を有するCa依存的ヒトIL-6レセプター結合抗体の調製

カルシウム依存的抗原結合能を有するFH4-IgG1、6RL#9-IgG1、および対照として用いられたカルシウム依存的抗原結合能を有しないH54/L28-IgG1のFc領域にアミノ酸変異を導入することによって、中性条件下（pH7.4）におけるFcRnに対する結合を有する改変体が作製された。アミノ酸の変異の導入はPCRを用いた当業者公知の方法を用いて行われた。具体的には、IgG1の重鎖定常領域に対して、EUナンバリングで表される434位のアミノ酸であるAsnがTrpに置換されたFH4-N434W（重鎖配列番号：９４、軽鎖配列番号：８１）と6RL#9-N434W（重鎖配列番号：９５、軽鎖配列番号：７９）とH54/L28-N434W（重鎖配列番号：９６、軽鎖配列番号：８３）が作製された。QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を用いて、添付説明書記載の方法を用いてそのアミノ酸が置換された変異体をコードするポリヌクレオチドが挿入された動物細胞発現ベクターが作製された。抗体の発現、精製、濃度測定は実施例15に記載された方法に準じて実施された。

[0539] ［参考実施例３］ノーマルマウスを用いたCa依存性結合抗体の消失加速効果の評価

（３－１）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４にて作製）が単独で投与された、もしくはhsIL-6Rおよび抗ヒトIL-6レセプター抗体が同時投与された後の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、上述のH54/L28-N434W、6RL#9-N434W、FH4-N434Wが使用された。

[0540] 混合溶液中のhsIL-6R濃度は全て5μg/mLであるが、抗ヒトIL-6レセプター抗体の濃度は抗体毎に異なり、H54/L28-N434Wは0.042 mg/mL、6RL#9-N434Wは0.55 mg/mL、FH4-N434Wは1 mg/mLに調製された。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ため、hsIL-6Rの大部分は抗体に結合していると考えられた。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。

[0541] （３－２）ELISA法によるノーマルマウス血漿中の抗ヒトIL-6レセプター抗体の濃度の測定

マウス血漿中の抗ヒトIL-6レセプター抗体濃度は参考実施例１と同様のELISA法によって測定された。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-N434W、6RL#9-N434W、FH4-N434W抗体の血漿中の抗体濃度の推移が図１８に示されている。

[0542] （３－３）電気化学発光法による血漿中hsIL-6R濃度測定

マウスの血漿中hsIL-6R濃度が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) 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-N434WもしくはFH4-N434Wから解離し、free体として存在する状態とするために、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エルが洗浄された後、各ウエルに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１９に示されている。

[0543] その結果、pH7.4におけるFcRnに対する結合活性を有する一方でhsIL-6Rに対するCa依存的な結合活性を有しないH54/L28-N434W抗体が同時に投与された場合は、hsIL-6Rが単独で投与された場合と比較して、hsIL-6Rの消失が大幅に遅延した。それに対して、hsIL-6Rに対して100倍以上のCa依存的な結合を有し、pH7.4におけるFcRnに対する結合を有する6RL#9-N434W抗体またはFH4-N434W抗体が同時に投与された場合は、hsIL-6Rが単独で投与された場合よりもhsIL-6Rの消失が加速された。hsIL-6Rが単独で投与された場合と比較して、6RL#9-N434W抗体またはFH4-N434W抗体が同時に投与された場合は、投与後一日での血漿中のhsIL-6R濃度がそれぞれ3倍および8倍低減した。この結果、カルシウム依存的に抗原に対して結合する抗体に対して、pH7.4におけるFcRnに対する結合活性を付与することによって、血漿中からの抗原の消失がさらに加速し得ることが確認された。

[0544] hsIL-6Rに対するCa依存的な結合を有しないH54/L28-IgG1抗体と比較して、hsIL-6Rに対して100倍以上のCa依存的な結合活性を有する6RL#9-IgG1抗体またはFH4-IgG1抗体は、hsIL-6Rの消失を増大させる効果が確認された。hsIL-6Rに対して100倍以上のCa依存的な結合を有し、pH7.4におけるFcRnに対する結合を有する6RL#9-N434W抗体またはFH4-N434W抗体は、hsIL-6Rの消失をhsIL-6R単独の投与よりも加速することが確認された。これらのデータは、pH依存的に抗原に結合する抗体と同様、Ca依存的に抗原に結合する抗体がエンドソーム内で抗原を解離することを示唆している。

[0545] [参考実施例４] 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レセプターの組換えヒトIL-6レセプターは以下のように調製された。Mullberg ら (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）のCHO定常発現株が当業者公知の方法で構築された。当該発現株を培養することによって、hsIL-6Rが発現した。得られた培養上清から、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。

[0546] ［参考実施例５］NMRによる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

（５－１）抗体の発現と精製

NMR測定に用いるために発現させたLfVk1__Caを含む抗体とLfVk1を含む抗体が精製された。具体的には、LfVk1__Caを含む抗体（LfVk1__Ca抗体とも呼ぶ）は重鎖（配列番号：２４）と軽鎖（配列番号：４３）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。また、LfVk1を含む抗体（LfVk1抗体とも呼ぶ）は重鎖（配列番号：２４）と軽鎖（配列番号：４４）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100 mLのヒト胎児腎細胞由来FreeStyle 293-F株（Invitrogen）の細胞懸濁液に、標識アミノ酸が加えられた。具体的には、Asp/Glu/Gln/Asn標識体についてはL-Aspartic acid-$^{13}C_4$,^{15}N（10 mg）、L-Glutamic acid-$^{13}C_5$,^{15}N（2.5 mg）、L-Glutamine-$^{13}C_5$,$^{15}N_2$（60 mg）、L-Asparagine-$^{13}C_4$,$^{15}N_2$・H_2O（2.5 mg）、β-chloro-L-alanine（6 mg）を10 mLの水に懸濁した溶液を0.22μmフィルターでろ過した液を加えた。Leu標識体については、L-Leucine-^{15}N（30 mg）、β-chloro-L-alanine（6 mg）を10 mLの水に懸濁した溶液を0.22μmフィルターでろ過した液を加えた。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に導入された。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 Sepharose™ 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）。

[0547] （５－２）Fabフラグメントの調製

分子量分画サイズ30,000MWCOの限外ろ過膜 を用いて、各種抗体が8.2-11.8 mg/mLまで濃縮された。L-Cystein 1 mM、EDTA 2 mM、50 mM酢酸/125 mMトリス緩衝液（pH 6.8）を用いて8 mg/mLに希釈された当該抗体の試料が調製された。各抗体に対して1/240量のPapain（Roche Applied Science）を加えて攪拌された当該試料が37℃にて1時間静置された。静置後、それぞれ下流に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50 mM酢酸/125 mMトリス緩衝液（pH 6.8）で平衡化されたGly-Gly-Tyr-Arg（Sigma）ペプチドを結合した1 mLサイズのHiTrap NHS-activated HP（GE Healthcare）に添加された。上流のGly-Gly-Tyr-Argペプチドによって活性化Papainを除去するとともに、下流のProteinA担体カラムでFcフラグメントおよび未消化抗体を除去することでFabフラグメントの精製画分が得られた。Fab画分に含まれる不活性Papainが活性化するのを防ぐために、Fab画分にはシステインプロテアーゼ阻害剤E64（Sigma）を10μM添加した。なお、上記のすべてのカラム操作は20から25℃の室温下にて実施された。

[0548] （５－３）LfVk1 Ca抗体およびLfVk1抗体の FabフラグメントのNMR試料調製

抗体溶液をMWCO 5000の限外濾過器Vivaspin（Sartorius）を用いて0.5 mLまで遠心により濃縮した。次に上記限外濾過器にダイアフィルトレーションカップを設置して、NMR用緩衝液：5 mM d-BisTris, 20 mM NaCl, 0.001 % (w/v) NaN_3, 5 % (v/v) ^2H_2O, pH 7.0（NaOH、HClを用いてpHを調製した）へ緩衝液置換（ダイアフィルトレーションカップに上記緩衝液を5 mL足して0.5 mLまで遠心濃縮することを3回繰り返した）を行い、最後に0

.25 mLまで濃縮した。最後に、NMR緩衝液で限外濾過器を洗いこみ、濃縮液とあわせて抗体溶液をLfVk1__Ca抗体については420μL、LfVk1抗体については270μLとした。この段階で再度、pHを確認し、必要に応じてNaOH、HClによりpH 7.0に調整した。UV測定器Nanodrop (Thermo Fisher Scientific) を用いて280 nmにおける吸光度を測定し、280 nmにおけるモル吸光係数を70000 M^{-1}・cm^{-1}としてFabフラグメントを定量した。Leu標識LfVk1__Ca抗体、Leu標識LfVk1抗体は0.12 mM、Asp、Glu、Asn、Gln標識LfVk1__Ca抗体、Asp、Glu、Asn、Gln標識LfVk1抗体は0.24 mMとなった。これらの試料の内、LfVk1__Ca抗体については、直径5 mmのNMR試料管 (shigemi) に、LfVk1抗体については直径5 mmの水溶液用対称形ミクロ試料管 (shigemi) にパスツールピペットを用いて充填した。LfVk1__Ca抗体のCa^{2+}滴定実験においては、抗体溶液に、抗体に対して、Ca^{2+}が1、2、5、10、20モル等量となるよう、$CaCl_2$溶液を順次、添加した。添加に用いた$CaCl_2$溶液にはNMRバッファーに溶解した10、20、50、100 mM $CaCl_2$溶液を準備した。シリンジ部分を既製品から延長した特注マイクロシリンジ (ITO) により、添加容量が3-10μLの範囲となるように、$CaCl_2$溶液の必要量を直接、NMR試料管に充填された抗体溶液に添加し、試料管をボルテックスミキサーにより攪拌後、手動遠心器 (Shimadzu) により遠心分離した。

[0549] （５－３）LfVk1 Ca抗体およびLfVk1 Ca抗体の Fabフラグメントのアミド基シグナルを観測するためのNMR測定

NMR測定には、TCI CryoProbeを設置したNMR分光器DRX750 (Bruker Biospin) を用いた。設定温度を307K (GasFlow 535 L/h) とした。アミド基シグナルを観測するためのNMR測定には^{1}H-^{15}N HSQCを用いた。測定法としては、^{15}N展開期にα炭素とカルボニル炭素の同時^{13}Cデカップリング、および溶媒水シグナル消去のための3-9-19パルストレインを伴う^{1}H-^{15}N FHSQCを用い、それを制御するパルスプログラムには、メーカー (Bruker Biospin) により標準として準備されているものを用いた。NMRの測定条件は以下の通りとした。スペクトル幅:12019Hz (f2), 1976 Hz (f1)、データポイント数: 2048 (f2

), 128 (f1)。データ処理にはTopspin 3.0 (Bruker Biospin) を用いた。データ処理条件は以下の通りとした。f2、f1共に、ウィンドウ関数としてshifted Sine (QSINE) を乗じ、2倍のデータポイント数となるようにゼロフィリングを行った後に、フーリエ変換を行った。シグナルの化学シフトはNMR解析ソフトウェアSparky (UCSF) を用いて算出した。

[0550] （５－４）主鎖アミド基のNMRシグナルの帰属

これまでにトシリズマブ（重鎖配列番号：２４、軽鎖配列番号：２５）のFabフラグメントの主鎖アミド基のNMRシグナルの内、80%が帰属された（データ未公開）。LfVk1_Ca抗体のFabフラグメントのアミノ酸配列は、軽鎖CDR1、CDR2、CDR3の一部、および軽鎖73、83番のアミノ酸残基およびを除き、トシリズマブとFabフラグメントのアミノ酸配列と同じである。両抗体でアミノ酸配列が同じ部分については、そのNMRシグナルが同一の化学シフトを有する、あるいはそれらが近いため、トシリズマブの帰属情報を移行することが可能であった。Leu標識試料については、軽鎖11、(33)、(46)、(47)、(54)、(78)、125、135、136、154、175、179、181、201、重鎖18、46、64、71、81、83、114、144、147、165、176、181、184、195が帰属を移行することが可能であった。上記、括弧が付いていない番号はトシリズマブと同一の化学シフトであるため、帰属が移行できた残基番号、括弧が付いた番号は、トシリズマブと近い化学シフトを有しており、それ以外に近い化学シフトを有するシグナルがないため、帰属が可能であった残基番号であった。一方、Asp、Glu、Asn、Gln標識試料については、LfVk1_Ca抗体とLfVk1抗体のスペクトルを比較し、4個のシグナルがLfVk1_Caで新たに観測されていた。これは、この両抗体間でAsp、Glu、Asn、Gln残基の内、Ca^{2+}結合モチーフとして導入した配列の異なる軽鎖Asp30、31、32、92、Glu50の5残基の内のいずれか4残基由来であると分類できた。

[0551] （５－５）Ca^{2+}のLfVk1_Ca抗体上の結合部位の同定

LfVk1_Ca抗体のFabフラグメントのCa^{2+}未添加状態と、20モル等量添加の^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルを比較して、化学シフトが変化しているシグナルを抽出

した。その結果、Leu標識試料からは、軽鎖Leu33が結合に関与しており、それ以外のLeu残基は結合に関与していないことが分かった。また、Asp、Glu、Asn、Gln標識試料からは、軽鎖Asp30、31、32、92、Glu50の5残基の内のいずれか4残基が結合に関与し、それ以外のAsp、Glu、Asn、Gln残基の内の1残基を除くすべてが結合に関与していないことが明らかとなった。以上のことから、Ca^{2+}結合モチーフとして導入されたアミノ酸配列の内、少なくとも軽鎖CDR1、これに加えて軽鎖CDR2、CDR3の両方もしくはいずれかのアミノ酸がCa^{2+}結合に関与していると同定された。このことは実施例１５において確認された30位、31位、32位、50位および92位（Kabatナンバリング）のうち４つがhVk5-2配列のアミノ酸であることがカルシウムイオンの結合に重要であった結果と一致している。

[0552] （５－６）滴定実験におけるCa^{2+}解離定数の算出

Ca^{2+}濃度がLfVk1_Ca抗体のFabフラグメントに対して、0、1、2、5、10、20モル等量の時の^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルを利用した。結合部位として同定された軽鎖Leu33のシグナルの^{1}Hまたは^{15}N化学シフトを縦軸に、上記Ca^{2+}のモル等量を横軸にプロットし、グラフ作成ソフトウェアGnuplotを用いて以下の式２で示される関数のフィッティングを行った。

[0553] 〔式２〕

$$f(x)=s\times[1-0.5/a\times\{(a\times x+a+Kd)-((a\times x+a+Kd)^2-4\times x\times a^2)^{0.5}\}+t\times[0.5/a\times\{(a\times x+a+Kd)-((a\times x+a+Kd)^2-4\times x\times a^2)^{0.5}\}$$

[0554] 式２で表される関数において、s、tはそれぞれCa^{2+}非結合時の化学シフト[ppm]、Ca^{2+}飽和結合時の推定化学シフト[ppm]、aは抗体 Fabフラグメント濃度[M]、Kdは解離定数、xは抗体 Fabフラグメントに対して添加したCa^{2+}のモル等量を示している。フィッティングの際には、s, t, Kdをフィッティングパラメータとした。その結果、^{1}H化学シフトからは$Kd=7.1\times10^{-5}$[M]、^{15}N化学シフトからは、$Kd=5.9\times10^{-5}$[M]として見積もられた。

請求の範囲

[請求項1] 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であって、前記抗原結合分子中の抗原結合ドメインは、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を含むことを特徴とするライブラリ。

[請求項2] イオン濃度が、カルシウムイオン濃度である請求項1に記載のライブラリ。

[請求項3] 前記アミノ酸残基が前記抗原結合分子の重鎖の抗原結合ドメインに含まれている請求項2に記載のライブラリ。

[請求項4] 重鎖の抗原結合ドメインが重鎖可変領域である請求項3に記載のライブラリ。

[請求項5] 前記アミノ酸残基が重鎖可変領域のCDR3に含まれている請求項4に記載のライブラリ。

[請求項6] 前記アミノ酸残基が重鎖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位に含まれている請求項2から5のいずれかに記載のライブラリ。

[請求項7] 前記アミノ酸残基以外のアミノ酸配列がナイーブ配列のアミノ酸配列を含む請求項2から6のいずれかに記載のライブラリ。

[請求項8] 前記抗原結合分子の軽鎖可変領域がナイーブ配列のアミノ酸配列を含む請求項3から7のいずれかに記載のライブラリ。

[請求項9] 前記アミノ酸残基が前記抗原結合分子の軽鎖の抗原結合ドメインに含まれている請求項2に記載のライブラリ。

[請求項10] 軽鎖の抗原結合ドメインが軽鎖可変領域である請求項9に記載のライブラリ。

[請求項11] 前記アミノ酸残基が軽鎖可変領域のCDR1に含まれている請求項10に記載のライブラリ。

[請求項12] 前記アミノ酸残基が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位に含まれている請求項11に記載のライブラリ。

[請求項13] 前記アミノ酸残基が軽鎖可変領域のCDR2に含まれている請求項10から12のいずれかに記載のライブラリ。

[請求項14] 前記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位に含まれている請求項13に記載のライブラリ。

[請求項15] 前記アミノ酸残基が軽鎖のCDR3である請求項10から14のいずれかに記載のライブラリ。

[請求項16] 前記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位に含まれている請求項15に記載のライブラリ。

[請求項17] 前記抗原結合分子の軽鎖のフレームワークが生殖細胞系列のフレームワーク配列を含む請求項2または9から16のいずれかに記載のライブラリ。

[請求項18] 前記抗原結合分子の重鎖可変領域がナイーブ配列のアミノ酸配列を含む請求項2または9から17のいずれかに記載のライブラリ。

[請求項19] 前記アミノ酸残基が、カルシウム結合モチーフを形成する請求項1から18のいずれかに記載のライブラリ。

[請求項20] カルシウム結合モチーフが、カドヘリンドメイン、EFハンド、C2ドメイン、Glaドメイン、C型レクチン、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、Vk5の部分、配列番号１０、配列番号１１のいずれかのカルシウム結合モチーフである請求項19に記載のライブラリ。

[請求項21] 前記アミノ酸残基が、金属キレート作用を有するアミノ酸である請求項2から20のいずれかに記載のライブラリ。

[請求項22] 金属キレート作用を有するアミノ酸が、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のいずれかひとつ以上のアミノ酸である請求項21に記載のライブラリ。

[請求項23] イオン濃度の条件がpHである請求項1に記載のライブラリ。

[請求項24] 前記アミノ酸残基が前記抗原結合分子の重鎖の抗原結合ドメインに含まれている請求項23に記載のライブラリ。

[請求項25] 重鎖の抗原結合ドメインが重鎖可変領域である請求項24に記載のライブラリ。

[請求項26] 前記アミノ酸残基が重鎖可変領域のKabatナンバリングで表される27位、31位、32位、33位、35位、50位、52位、53位、55位、57位、58位、59位、61位、62位、95位、96位、97位、98位、99位、100a位、100b位、100d位、100f位、100h位、102位または107位のいずれか一つ以上に含まれている請求項25に記載のライブラリ。

[請求項27] 重鎖可変領域のKabatナンバリングで表される27位、31位、32位、33位、35位、50位、52位、53位、55位、57位、58位、59位、61位、62位、95位、96位、97位、98位、99位、100a位、100b位、100d位、100f位、100h位、102位または107位のいずれかのアミノ酸残基以外のアミノ酸配列がナイーブ配列のアミノ酸配列を含む請求項26に記載のライブラリ。

[請求項28] 前記抗原結合分子の軽鎖可変領域が生殖細胞系列の配列を含む請求項23から27のいずれかに記載のライブラリ。

[請求項29] 前記アミノ酸残基が前記抗原結合分子の軽鎖の抗原結合ドメインに含まれている請求項23に記載のライブラリ。

[請求項30] 軽鎖の抗原結合ドメインが軽鎖可変領域である請求項29に記載のライブラリ。

[請求項31] 前記アミノ酸残基が軽鎖可変領域のKabatナンバリングで表される24位、27位、28位、30位、31位、32位、34位、50位、51位、52位、53位、54位、55位、56位、89位、90位、91位、92位、93位、94位または95a位のいずれか一つ以上に含まれている請求項30に記載のライブラリ。

[請求項32] 前記アミノ酸残基が軽鎖可変領域のCDR1に含まれている請求項30または31に記載のライブラリ。

[請求項33] 前記アミノ酸残基が軽鎖のCDR1のKabatナンバリングで表される24位、27位、28位、30位、31位、32位または34位のいずれか一つ以上に含

まれている請求項32に記載のライブラリ。

[請求項34] 前記アミノ酸残基が軽鎖のCDR2に含まれている請求項30から33のいずれかに記載のライブラリ。

[請求項35] 前記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、51位、52位、53位、54位、55位または56位のいずれか一つ以上に含まれている請求項34に記載のライブラリ。

[請求項36] 前記アミノ酸残基が軽鎖のCDR3に含まれている請求項30から35のいずれかに記載のライブラリ。

[請求項37] 前記アミノ酸残基が軽鎖のCDR3のKabatナンバリングで表される89位、90位、91位、92位、93、94位または95a位のいずれか一つ以上に含まれている請求項36に記載のライブラリ。

[請求項38] 軽鎖のフレームワークが生殖細胞系列のフレームワーク配列を含む請求項29から37のいずれかに記載のライブラリ。

[請求項39] 重鎖可変領域がナイーブ配列である請求項29から38のいずれかに記載のライブラリ。

[請求項40] 前記アミノ酸残基が、側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸である請求項23から39のいずれかに記載のライブラリ。

[請求項41] 前記アミノ酸残基が、グルタミン酸である請求項23から40のいずれかに記載のライブラリ。

[請求項42] 前記アミノ酸残基が、側鎖のpKaが5.5-7.0であるアミノ酸である請求項23から39に記載のライブラリ。

[請求項43] 前記アミノ酸残基が、ヒスチジンである請求項23から40または42のいずれかに記載のライブラリ。

[請求項44] 請求項1から43のいずれかに記載の抗原結合分子を含む複数の融合ポリペプチドから主としてなるライブラリであって、前記融合ポリペプチドは抗原結合分子の重鎖可変領域とウイルスコートタンパク質の少なくとも一部とが融合したものであることを特徴とするライブラリ。

[請求項45] 前記ウイルスコートタンパク質がタンパク質pIII、主コートタンパク

質pVIII、pVII、pIX、Soc、Hoc、gpD、pv1およびその変異体からなる群から選択される、請求項44に記載されるライブラリ。

[請求項46] 請求項1から43に記載される互いに配列の異なる抗原結合分子もしくは請求項44または45に記載される互いに配列の異なる融合ポリペプチドを各々コードする複数のポリヌクレオチド分子を含む組成物。

[請求項47] 請求項46に記載される複数のポリヌクレオチド分子を作用可能なように連結されている状態で各々含む複数のベクターを含む組成物。

[請求項48] ベクターが複製可能な発現ベクターである、請求項47に記載の組成物。

[請求項49] 複製可能な発現ベクターが、lac Zプロモーター系、アルカリフォスファターゼpho Aプロモーター（Ap）、バクテリオファージλPLプロモーター（温度感受性プロモーター）、tacプロモーター、トリプトファンプロモーター、pBADプロモーターおよびバクテリオファージT7プロモーターからなる群から選択されるプロモーター領域が発現ベクターにおいて前記ポリヌクレオチドが作用可能なように連結されている請求項48に記載の組成物。

[請求項50] 複製可能な発現ベクターが、M13、f1、fd、Pf3ファージもしくはその誘導体、またはラムダ型ファージもしくはその誘導体である、請求項48または49に記載の組成物。

[請求項51] 請求項47から50のいずれかに記載されるベクターを各々含む複数のウイルスを含む組成物。

[請求項52] 請求項1から43に記載される互いに配列の異なる抗原結合分子もしくは請求項44または45に記載される互いに配列の異なる融合ポリペプチドが各々その表面に提示されている複数のウイルスを含む組成物。

[請求項53] 請求項1から43に記載される互いに配列の異なる抗原結合分子もしくは請求項44または45に記載される互いに配列の異なる融合ポリペプチドを含むライブラリであって、1×10^{6}ないし1×10^{14}の互いに異なる可変領域配列を有するライブラリ。

[請求項54] 1 x 10^8以上の互いに異なる可変領域配列を有する請求項53に記載のライブラリ。

[請求項55] 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の作製方法であって、前記抗原結合分子中の抗原結合ドメインが、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を含むよう設計された複数の抗原結合分子中を製造することを含む方法。

[請求項56] 前記抗原結合分子が請求項2から43のいずれかに記載の抗原結合分子である請求項55の作製方法。

[請求項57] 前記抗原結合分子の重鎖可変領域がウイルスコートタンパク質の少なくとも一部と融合している、請求項55または56の作製方法。

[請求項58] 前記ウイルスコートタンパク質がタンパク質pIII、主コートタンパク質pVIII、pVII、pIX、Soc、Hoc、gpD、pv1およびその変異体からなる群から選択される、請求項55から57のいずれかに記載の作製方法。

[請求項59] 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分子を選択する方法であって、

a) 請求項1から43のいずれかに記載される互いに配列の異なる抗原結合分子もしくは請求項44または45のいずれかに記載される互いに配列の異なる融合ポリペプチドから主としてなるライブラリを作製するステップ、

b) 前記ライブラリをイオン濃度の異なる二以上の条件下において抗原に接触させるステップ、

c) 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分子の集団を前記ライブラリから分画するステップ、

d) c) において分画された集団から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分子を単離するステップ、

とを含む方法。

[請求項60] 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

分子をコードするポリヌクレオチドを単離する方法であって、

a）請求項1から43のいずれかに記載される互いに配列の異なる抗原結合分子もしくは請求項44または45のいずれかに記載される互いに配列の異なる融合ポリペプチドを各々コードする複数のポリヌクレオチドを作用可能なように連結されている状態で各々含む複数の複製可能な発現ベクターを含むライブラリを作製するステップ、

b）前記ライブラリに含まれる各々の発現ベクターが導入された複数のウイルスの表面に、前記ポリヌクレオチドによりコードされる前記互いに配列の異なる抗原結合分子または融合ポリペプチドを発現するステップ、

c）前記複数のウイルスをイオン濃度の異なる二以上の条件下において抗原に接触させるステップ、

d）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ウイルスの集団を前記ライブラリから分画するステップ、

e）d）において分画されたウイルスの集団から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ウイルスを単離するステップ、

f）単離されたウイルスからポリヌクレオチドを単離するステップ、

とを含む方法。

[請求項61] 追加的に前記c）からd）のステップを少なくとも1回反復する請求項60に記載の方法。

[請求項62] イオン濃度がカルシウムイオン濃度である請求項59から61のいずれかに記載の方法。

[請求項63] 低カルシウム濃度の条件での抗原に対する結合活性が高カルシウム濃度の条件での結合活性よりも低下する抗原結合分子を選択する請求項62に記載の方法。

[請求項64] 低カルシウム濃度の条件が0.1μMから30μMである請求項63に記載の方法。

[請求項65] 高カルシウム濃度の条件が100μMから10 mMである請求項63または64

に記載の方法。

[請求項66] イオン濃度の条件がpHである請求項59から61のいずれかに記載の方法。

[請求項67] pH酸性域条件での抗原に対する結合活性がpH中性域条件での結合活性よりも低下する抗原結合分子を選択する請求項66に記載の方法。

[請求項68] pH酸性域条件がpH4.0から6.5である請求項66に記載の方法。

[請求項69] pH中性域条件がpH6.7から10.0である請求項67または68に記載の方法。

[請求項70] 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分子の製造方法であって、

a）請求項1から43のいずれかに記載される互いに配列の異なる抗原結合分子もしくは請求項44または45のいずれかに記載される互いに配列の異なる融合ポリペプチドを各々コードする複数のポリヌクレオチドを作用可能なように連結されている状態で各々含む複数の複製可能な発現ベクターを含むライブラリを作製するステップ、

b）前記ライブラリに含まれる各々の発現ベクターが導入された複数のウイルスの表面に、前記ポリヌクレオチドによりコードされる前記互いに配列の異なる抗原結合分子または融合ポリペプチドを発現するステップ、

c）前記複数のウイルスをイオン濃度の異なる二以上の条件下において抗原に接触させるステップ、

d）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ウイルスの集団を前記ライブラリから分画するステップ、

e）d）において分画されたウイルスの集団から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ウイルスを単離するステップ、

f）単離されたウイルスからポリヌクレオチドを単離するステップ、

g）単離されたポリヌクレオチドが作用可能なように連結されている状態で挿入されたベクターが導入された宿主細胞を培養するステップ

、

h）g）で培養された培養液から抗原結合分子を回収するステップ、

とを含む製造方法。

［請求項71］ 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分子の製造方法であって、

a）請求項1から43のいずれかに記載される互いに配列の異なる抗原結合分子もしくは請求項44または45のいずれかに記載される互いに配列の異なる融合ポリペプチドを各々コードする複数のポリヌクレオチドを作用可能なように連結されている状態で各々含む複数の複製可能な発現ベクターを含むライブラリを作製するステップ、

b）前記ライブラリに含まれる各々の発現ベクターが導入された複数のウイルスの表面に、前記ポリヌクレオチドによりコードされる前記互いに配列の異なる抗原結合分子または融合ポリペプチドを発現するステップ、

c）前記複数のウイルスをイオン濃度の異なる二以上の条件下において抗原に接触させるステップ、

d）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ウイルスの集団を前記ライブラリから分画するステップ、

e）d）において分画されたウイルスの集団から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ウイルスを単離するステップ、

f）単離されたウイルスからポリヌクレオチドを単離するステップ、

g）単離されたポリヌクレオチドをインフレームで抗体定常領域をコードするポリヌクレオチドと連結するステップ、

h）g）において連結されたポリヌクレオチドが作用可能なように連結されている状態で挿入されたベクターが導入された宿主細胞を培養するステップ、

i）h）で培養された培養液から抗原結合分子を回収するステップ、

とを含む製造方法。

[請求項72] 追加的に前記c）からd）のステップを少なくとも1回反復する請求項70または71に記載の製造方法。

[請求項73] イオン濃度がカルシウムイオン濃度である請求項70から72のいずれかに記載の製造方法。

[請求項74] 低カルシウム濃度の条件での抗原に対する結合活性が高カルシウム濃度の条件での結合活性よりも低下する抗原結合分子を選択する請求項73に記載の製造方法。

[請求項75] 低カルシウム濃度の条件が0.1μMから30μMである請求項74に記載の製造方法。

[請求項76] 高カルシウム濃度の条件が100μMから10 mMである請求項74または75に記載の製造方法。

[請求項77] イオン濃度の条件がpHの条件である請求項70から72のいずれかに記載の製造方法。

[請求項78] pH酸性域条件での抗原に対する結合活性がpH中性域条件での結合活性よりも低下する抗原結合分子を選択する請求項77に記載の製造方法。

[請求項79] pH酸性域条件がpH4.0から6.5である請求項78に記載の製造方法。

[請求項80] pH中性域条件がpH6.7から10.0である請求項78または79に記載の製造方法。

[請求項81] 請求項70から80のいずれかに記載の製造方法によって製造された抗原結合分子。

[請求項82] 請求項81に記載の抗原結合分子またはその改変体を含む医薬組成物。