明　細　書

発明の名称 ：

化合物の濃度に応じて抗原結合能の変化する抗原結合分子及びそのライブラリ

技術分野

[0001] 本発明は、低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインまたは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子のライブラリに関する。本発明はまた、非天然化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインまたは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子、当該抗原結合分子の製造方法及びスクリーニング方法、ならびに当該抗原結合分子を含む医薬組成物に関する。

背景技術

[0002] 抗体は血漿中での安定性が高く、副作用も少ないことから医薬品として注目されている。中でもIgG型の抗体医薬は多数上市されており、現在も数多くの抗体医薬が開発されている（非特許文献１、および非特許文献２）。

[0003] 抗体医薬を用いた癌治療薬として、これまでのCD20抗原に対するリツキサン、EGFR抗原に対するセツキシマブ、HER2抗原に対するハーセプチン等が承認されている（非特許文献３）。これらの抗体分子は、癌細胞に発現している抗原に対して結合し、ADCC等によって癌細胞に対する傷害活性を発揮する。こうしたADCC等による細胞傷害活性は、治療用抗体の標的細胞に発現する抗原の数に依存することが知られている（非特許文献４）ため、標的となる抗原の発現量が高いことが治療用抗体の効果の観点からは好ましい。しかし、抗原の発現量が高くても、正常組織に抗原が発現していると、正常細胞に対してADCC等の傷害活性を発揮してしまうため、副作用が大きな問題となる。そのため、癌治療薬として治療用抗体が標的とする抗原は、癌細胞に特異的に発現していることが好ましい。例えば、癌抗原として知られているEpCAM抗原に対する抗体分子は、癌治療薬として有望と考えられていたが、EpCAM抗

原は膵臓にも発現していることが知られており、実際、臨床試験において、抗EpCAM抗体を投与することによって、膵臓に対する細胞傷害活性により膵炎の副作用がみられることが報告されている（非特許文献５）。

[0004] ADCC活性による細胞傷害活性を発揮する抗体医薬の成功を受けて、天然型ヒトIgG1のFc領域のN型糖鎖のフコースを除去することによるADCC活性の増強（非特許文献６）、天然型ヒトIgG1のFc領域のアミノ酸置換によりFcγRIIIaへの結合を増強することによるADCC活性の増強（非特許文献７）等によって強力な細胞傷害活性を発揮する第二世代の改良抗体分子が報告されている。上述のNK細胞が介在するADCC活性以外のメカニズムで癌細胞に傷害活性を発揮する抗体医薬として、強力な細胞傷害活性のある薬物を抗体とコンジュゲートしたAntibody Drug Conjugate（ADC）（非特許文献８）、および、T細胞を癌細胞にリクルートすることによって癌細胞に対する傷害活性を発揮する低分子抗体（非特許文献９）等のより強力な細胞傷害活性を発揮する改良抗体分子も報告されている。

[0005] こうしたより強力な細胞傷害活性を発揮する抗体分子は、抗原の発現が多くはない癌細胞に対しても細胞傷害活性を発揮することが出来る一方で、抗原の発現が少ない正常組織に対しても同様に細胞傷害活性を発揮してしまう。実際、EGFR抗原に対する天然型ヒトIgG1であるセツキシマブと比較して、CD3とEGFRに対する二重特異性抗体であるEGFR-BiTEはT細胞を癌細胞にリクルートすることによって癌細胞に対して強力な細胞傷害活性を発揮し抗腫瘍効果を発揮することができる。その一方で、EGFRは正常組織においても発現しているため、EGFR-BiTEをカニクイザルに投与した際に深刻な副作用が現れることも認められている（非特許文献１０）。また、癌細胞で高発現しているCD44v6に対する抗体にmertansineを結合させたADCであるbivatuzumab mertansineは、CD44v6が正常組織においても発現していることから、臨床において重篤な皮膚毒性＆肝毒性が認められている（非特許文献１１）。

[0006] このように抗原の発現が少ないような癌細胞に対しても強力な細胞傷害活性を発揮することが出来る抗体を用いた場合、標的抗原が極めて癌特異的に

発現している必要があるが、ハーセプチンの標的抗原であるHER2やセツキシマブの標的抗原であるEGFRは正常組織にも発現しているように、極度に癌特異的に発現している癌抗原の数は限られていると考えられる。そのため、癌に対する細胞傷害活性を強化することはできるものの、正常組織に対する細胞傷害作用による副作用が問題となり得る。

[0007] また、最近、癌における免疫抑制に寄与しているCTLA4を阻害することによって腫瘍免疫を増強するイプリムマブが転移性メラノーマに対してOverall survivalを延長させることが示された（非特許文献１２）。しかしながら、イプリムマブはCTLA4を全身的に阻害するため、腫瘍免疫が増強される一方で、全身的に免疫が活性化されることによる自己免疫疾患様の重篤な副作用を示すことが問題となっている（非特許文献１３）。

[0008] 一方、癌以外の疾患に対する抗体医薬として、炎症性・自己免疫疾患において炎症サイトカインを阻害することで治療効果を発揮する抗体医薬が知られている（非特許文献１４）。例えばTNFを標的とするレミケードやヒュミラ、および、IL-6Rを標的とするアクテムラは、関節リウマチに対して高い治療効果を発揮するが、一方、これらのサイトカインを全身的に中和することにより感染症の副作用が見られることも知られている（非特許文献１５）。

[0009] 第二世代の抗体医薬に適用可能な技術として様々な技術が開発されており、エフェクター機能、抗原結合能、薬物動態、安定性を向上させる、あるいは、免疫原性リスクを低減させる技術等が報告されているが（非特許文献１６）、上記のような副作用を解決するための、抗体医薬を標的組織に特異的に作用可能とする技術はほとんど報告されていない。例えば、癌組織や炎症性組織のような病変部位については、これらの標的組織におけるpHが酸性条件であることを利用したpH依存性抗体が報告されている（特許文献１、および２）。しかしながら、癌組織や炎症性組織における正常組織と比較したpHの低下（すなわち水素イオン濃度の上昇）は僅かであり、分子量が極めて小さい水素イオン濃度の僅かな上昇を検知して作用する抗体を作製することは困難であると同時に、破骨細胞骨吸収窩領域等正常組織や対象とする病変以

外の組織でもpHが酸性条件である場合もあり、pHの条件が病変部位に特異的な環境因子として利用するにはなお多くの課題があると考えられた。一方、癌組織や炎症性組織のような病変部位で発現するプロテアーゼで切断されることによって、初めて抗原結合活性を発揮する抗体を作製する方法が報告されている（特許文献３）。しかし、プロテアーゼによる抗体の切断は不可逆的であるため、当該病変部位で切断された抗体が、正常組織に血流に乗って戻ることで正常組織でも抗原に結合できてしまうことが課題であると考えられた。また、そのようなプロテアーゼの癌特異性にも課題があると考えられた。そのため、副作用を回避しつつ薬効を発揮するために、正常組織や血液中において全身的に作用せず、病変部位である癌や炎症部位において可逆的に作用するような技術は知られていない。また、抗体の活性や薬理作用を外来性の化合物の非侵しゅう投与によってコントロールする方法も知られていない。

先行技術文献

特許文献

[0010] 特許文献1：国際公開第WO2003/105757号

特許文献2：国際公開第WO2012/033953号

特許文献3：国際公開第WO2010/081173号

非特許文献

[0011] 非特許文献1：Monoclonal antibody successes in the clinic. Janice M Reichert, Clark J Rosensweig, Laura B Faden & Matthew C Dewitz, Nat. Biotechnol. (2005) 23, 1073 - 1078

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

非特許文献3：Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. Weiner LM, Surana R, Wang S., Nat. Rev. Immunol. (2010) 10 (5), 317-327

非特許文献4：Differential responses of human tumor cell lines to anti

-p185HER2 monoclonal antibodies. Lewis GD, Figari I, Fendly B, Wong W L, Carter P, Gorman C, Shepard HM, Cancer Immunol. Immunotherapy (1993) 37, 255-263

非特許文献5：ING-1, a monoclonal antibody targeting Ep-CAM in patients with advanced adenocarcinomas. de Bono JS, Tolcher AW, Forero A, Vanhove GF, Takimoto C, Bauer RJ, Hammond LA, Patnaik A, White ML, Shen S, Khazaeli MB, Rowinsky EK, LoBuglio AF, Clin. Cancer Res. (2004) 10 (22), 7555-7565

非特許文献6：Non-fucosylated therapeutic antibodies as next-generation therapeutic antibodies. Satoh M, Iida S, Shitara K., Expert Opin. Biol. Ther. (2006) 6 (11), 1161-1173

非特許文献7：Optimizing engagement of the immune system by anti-tumor antibodies: an engineer's perspective. Desjarlais JR, Lazar GA, Zhukovsky EA, Chu SY., Drug Discov. Today (2007) 12 (21-22), 898-910

非特許文献8：Antibody-drug conjugates: targeted drug delivery for cancer. Alley SC, Okeley NM, Senter PD., Curr. Opin. Chem. Biol. (2010) 14 (4), 529-537

非特許文献9：BiTE: Teaching antibodies to engage T-cells for cancer therapy. Baeuerle PA, Kufer P, Bargou R., Curr. Opin. Mol. Ther. (2009) 11 (1), 22-30

非特許文献10：T cell-engaging BiTE antibodies specific for EGFR potently eliminate KRAS- and BRAF-mutated colorectal cancer cells. Lutterbuese R, Raum T, Kischel R, Hoffmann P, Mangold S, Rattel B, Friedrich M, Thomas O, Lorenczewski G, Rau D, Schaller E, Herrmann I, Wolf A, Urbig T, Baeuerle PA, Kufer P., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2010) 107 (28), 12605-12610

非特許文献11：Phase I trial with the CD44v6-targeting immunoconjugate bivatuzumab mertansine in head and neck squamous cell carcinoma. Rie

chelmann H, Sauter A, Golze W, Hanft G, Schroen C, Hoermann K, Erhard t T, Gronau S., Oral Oncol. (2008) 44 (9), 823-829

非特許文献12：Ipilimumab in the treatment of melanoma. Trinh VA, Hwu WJ., Expert Opin. Biol. Ther., (2012) Apr 14 (doi:10.1517/14712598.2012.675325)

非特許文献13：IPILIMUMAB - A NOVEL IMMUNOMODULATING THERAPY CAUSING AUTOIMMUNE HYPOPHYSITIS: A CASE REPORT AND REVIEW. Juszczak A, Gupta A, Karavitaki N, Middleton MR, Grossman A., Eur. J. Endocrinol. (2012) Apr 10 (doi: 10.1530/EJE-12-0167)

非特許文献14：The Japanese experience with biologic therapies for rheumatoid arthritis. Takeuchi T, Kameda H., Nat. Rev. Rheumatol. (2010) 6 (11), 644-652

非特許文献15：Current evidence for the management of rheumatoid arthritis with biological disease-modifying antirheumatic drugs: a systematic literature review informing the EULAR recommendations for the management of RA. Nam JL, Winthrop KL, van Vollenhoven RF, Pavelka K, Valesini G, Hensor EM, Worthy G, Landewe R, Smolen JS, Emery P, Buch MH., Ann. Rheum. Dis. (2010) 69 (6), 976-986

非特許文献16：Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies. Kim SJ, Park Y, Hong HJ., Mol. Cells. (2005) 20 (1), 17-29

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0012] 上述した背景を鑑みると、標的組織において特異的に存在または産生される低分子の濃度に応じて標的抗原への結合が制御される抗体（以下、本願明細書においては、「低分子スイッチ抗体」（Small molecule switch antibody）と称する場合もある）が取得できれば、斯かる抗体は腫瘍部位や炎症部位等の病変部位において可逆的に作用し、副作用を回避できることから極めて

有用である。また、非天然化合物の濃度に応じて抗原への結合が制御される抗体が取得できれば、斯かる抗体は抗体の活性や薬理作用を病変部位で活性化する外来性化合物や、あるいは、非侵しゅう投与可能な外来性化合物の投与によってコントロールすることができるため極めて有用である。

しかしながら、斯かる抗体が、従来の方法である、非ヒト動物を抗原で免疫する方法や、ヒトおよび非ヒト動物由来の抗体ライブラリを利用する方法で取得されたという報告は何らなされていない。

従って、標的組織において特異的に存在または産生される低分子、もしくは非天然化合物の濃度に応じて任意の標的抗原への結合が制御される抗体（低分子スイッチ抗体）を提供し、さらには斯かる抗体を短期間に効率的に取得する方法の提供が強く望まれている。

課題を解決するための手段

[0013] 本発明者らは、上記の目的を達成するために鋭意研究を進めたところ、標的組織特異的な化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子を創作した。また、本発明者らは、当該抗原結合分子または当該抗原結合分子を含む医薬組成物が、標的組織に起因する疾患の治療に有用であることを見出すとともに、当該抗原結合分子を投与することを含む標的組織に起因する疾患の治療に有用であること、および標的組織に起因する疾患の治療のための医薬の製造において当該抗原結合分子が有用であることを見出した。

[0014] 本発明者らはさらに、生体内の環境要素の相違に応じて、あるいは、非天然化合物の投与に応じて、抗原結合分子の、抗原に対する結合活性を変化させ得る低分子との結合に関与するアミノ酸残基が、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の作製に成功するとともに、当該ライブラリを用いて、当該抗原結合分子をスクリーニングおよび製造する方法を創作して本発明を完成させた。

[0015] 本発明はこのような知見に基づくものであり、具体的には以下に例示的に記載する態様を包含するものである。

〔態様1〕

（i）互いに配列の異なる複数の抗原結合ドメイン若しくは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子；又は

（ii）当該互いに配列の異なる複数の抗原結合ドメイン若しくは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子をコードする核酸、

から主としてなるライブラリであって、前記抗原結合分子ドメインまたは抗原結合分子は、低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインまたは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子であることを特徴とする、ライブラリ。

〔態様2〕

以下の(a)および(b)の工程：

(a) 低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン又は低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合ドメインにおいて、以下の(i)乃至(iii)のいずれか一つ以上を満たすアミノ酸部位を特定する工程；

（i） 当該低分子化合物に対する結合に関与していない１または複数のアミノ酸部位；

（ii）親抗原結合ドメインが属する動物種の抗体のレパートリーとしてアミノ酸出現頻度の多様性のある１または複数のアミノ酸部位；

（iii）Canonical structureの形成に重要でない１または複数のアミノ酸部位；および

(b) 前記抗原結合ドメインにおいて、未改変体をコードする核酸及び工程(a)で特定された１または複数のアミノ酸部位に改変を有する、互いに配列が異なる、前記抗原結合ドメインまたは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子の複数の改変体それぞれをコードする核酸を含むライブラリを設計する工程、

を含む方法によって製造される、態様〔1〕に記載のライブラリ。

〔態様3〕

以下の(a)乃至(d)の工程：

(a) 低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン又は低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合ドメインにおいて、以下の(i)乃至(iii)のいずれか一つ以上を満たすアミノ酸部位を特定する工程；

(i) 当該低分子化合物に対する結合に関与していない１または複数のアミノ酸部位；

(ii) 親抗原結合ドメインが属する動物種の抗体のレパートリーとしてアミノ酸出現頻度の多様性のある１または複数のアミノ酸部位；

(iii) Canonical structureの形成に重要でない１または複数のアミノ酸部位、

(b) 工程(a)で特定された１または複数のアミノ酸部位に改変を有する、互いに配列が異なる、前記抗原結合ドメインまたは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子の複数の改変体を作製する工程、

(c) 前記それぞれの改変体の当該低分子化合物に対する結合活性に実質的に変化をもたらさない１または複数のアミノ酸の改変を特定する工程；および

(d) 未改変体をコードする核酸及び工程(c)で特定された１または複数のアミノ酸に改変を有する、互いに配列が異なる、前記抗原結合ドメインまたは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子の複数の改変体をコードする核酸を含むライブラリを製造する工程、

を含む方法によって製造される、態様〔2〕に記載のライブラリ。

〔態様4〕

以下の１）および２）の工程：

１）低分子化合物に対する結合活性を有する抗原結合分子を複数含むライブラリと低分子化合物とを接触させる工程、および

２）該ライブラリから低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合分子の複数の改変体をコードする核酸を濃縮する工程、

を含む方法によって製造される、態様〔1〕に記載のライブラリ。

〔態様5〕

前記抗原結合分子が抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗原結合分子であって、以下の１）乃至３）のいずれか１つの工程を含む方法によって製造される、態様〔4〕記載のライブラリ；

１）態様〔4〕記載のライブラリが、重鎖可変領域に位置するアミノ酸が改変された１又は複数の改変体をコードする核酸を含むライブラリであって、該ライブラリから低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合分子の複数の改変体をコードする核酸を濃縮し、ライブラリを設計する工程；

２）態様〔4〕記載のライブラリが、軽鎖可変領域に位置するアミノ酸が改変された１又は複数の改変体をコードする核酸を含むライブラリであって、該ライブラリから低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合分子の複数の改変体をコードする核酸を濃縮し、ライブラリを設計する工程；

３）工程１）及び工程２）のそれぞれの可変領域ライブラリから濃縮された抗原結合分子をコードする核酸を組み合わせることによって、ライブラリを設計する工程。

〔態様6〕

前記抗原結合分子が、抗原結合ドメインとウイルスコートタンパク質の少なくとも一部との融合ポリペプチドであることを特徴とする、態様〔1〕乃至〔5〕のいずれか一項に記載のライブラリ。

〔態様7〕

前記抗原結合分子が、抗体の重鎖及び軽鎖を含む抗原結合分子であり、前記重鎖および/または軽鎖の合成ライブラリを設計する工程をさらに含む、態様〔1〕乃至〔5〕のいずれか一項に記載のライブラリ。

〔態様8〕

前記抗体の重鎖及び／又は軽鎖が、生殖細胞系列由来のフレームワーク配列を含むことを特徴とする、態様〔7〕に記載のライブラリ。

〔態様9〕

前記低分子化合物が、標的組織特異的な化合物又は非天然化合物である、態様〔1〕乃至〔8〕のいずれか一項に記載のライブラリ。

〔態様10〕

前記標的組織が、癌組織又は炎症性組織である、態様〔1〕乃至〔9〕のいずれか一項に記載のライブラリ。

〔態様11〕

前記癌組織特異的化合物が、プリン環構造を有するヌクレオシド、アミノ酸およびその代謝産物、脂質およびその代謝産物、糖代謝の一次代謝産物、ならびにニコチンアミドおよびその代謝産物からなる群から選択される少なくとも一つの化合物である、態様〔10〕に記載のライブラリ。

〔態様12〕

前記低分子化合物が、キヌレニン、アデノシン、アデノシン１リン酸、アデノシン２リン酸、又はアデノシン３リン酸である、態様〔1〕乃至〔11〕のいずれか一項に記載のライブラリ。

〔態様13〕

前記低分子化合物との結合に関与していないアミノ酸部位が、以下から選択されるいずれか一つ以上のアミノ酸以外である、態様〔1〕乃至〔12〕のいずれか一項に記載のライブラリ：

H鎖：97、100c、 101、 94、 95、 100d、 100e、 33、 50、 52、 56、 57、 58、 99、 100、 100a、54、 55（Kabatナンバリング）；

L鎖：49、55、95c、 96、95a、 95b（Kabatナンバリング）。

〔態様14〕

以下の(a)乃至(g)の工程：

(a) 低分子化合物の非存在下で態様〔1〕乃至〔13〕のいずれか一項に記載のライブラリを抗原に接触させる工程、

(b) 前記工程(a)で抗原に結合しない抗原結合ドメインを選択する工程；

(c) 前記工程(b)で選択された抗原結合ドメインを低分子化合物の存在下で抗原に接触させる工程；

(d) 前記工程(c)で抗原に結合した抗原結合ドメインを選択する工程；

(e) 前記工程(d)で選択された抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドを、Fc領域を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに連結させる工程；、

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

(g) 前記工程(f)で培養された細胞の培養液から抗原結合分子を回収する工程、

を含む低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子の製造方法。

〔態様15〕

以下の(a)乃至(e)の工程：

(a) 態様〔1〕乃至〔13〕のいずれか一項に記載のライブラリを低分子化合物の存在下で抗原に接触させる工程；

(b) 前記工程(a)より低濃度の低分子化合物で抗原結合ドメインを解離させ回収する工程；

(c) 前記工程(b)で回収された抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドを、Fc領域を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに連結させる工程；

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

(e) 前記工程(d)で培養された細胞の培養液から抗原結合分子を回収する工程、

を含む低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子の製造方法。

〔態様16〕

以下の(a)乃至(b)の工程：

(a) 態様〔1〕乃至〔13〕のいずれか一項に記載のライブラリを低分子化

合物に接触させる工程；および

(b) 前記工程(a)で回収された抗原結合ドメインを選択する工程；

をさらに含む、態様〔14〕又は〔15〕に記載の低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子の製造方法。

〔態様17〕

前記低分子化合物がキヌレニン、アデノシン、アデノシン１リン酸、アデノシン２リン酸、又はアデノシン３リン酸である態様〔14〕乃至〔16〕のいずれか1項に記載の抗原結合分子の製造方法。

〔態様18〕

非天然化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子。

〔態様19〕

態様〔18〕記載の抗原結合分子を含む医薬組成物。

上記に記載の１又は複数の態様を任意に組み合わせたものも、当業者の技術常識に基づいて技術的に矛盾しない限り、本発明に含まれることが当業者には当然に理解される。

発明の効果

[0016] 本発明の低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインまたは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子、ならびにこれを含む医薬組成物は、正常組織や血液中において全身的に作用せず、標的組織における病変部位である癌や炎症部位において可逆的に作用することにより、副作用を回避しつつ薬効を発揮し、当該標的組織に起因する疾患を治療することができる。

さらに、本発明の、互いに配列の異なる複数の、低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインまたは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子を含むライブラリを用いれば、上述したとおりの、組織特異的な疾患の治療に有用な様々な抗原結合分子を、短時間で効率良く

取得することが可能である。

斯かる本発明のライブラリの一態様においては、低分子化合物に対する結合に関与していない抗原結合分子ドメインのアミノ酸部位を特定し、当該部位のアミノ酸が1～数種類のアミノ酸となるように、互いに配列が異なる抗原結合ドメインをコードする核酸が含まれるライブラリを設計することを特徴とし、これにより、非ヒト哺乳動物の免疫による方法やヒトまたは非ヒト動物由来抗体ライブラリを利用するよりも、化合物存在下で抗原への結合能が変化する抗原結合分子を効率的に取得可能なライブラリが提供される。

図面の簡単な説明

[0017] [図1]低分子が存在しない正常の環境においては低分子スイッチ抗体（Small molecule switch antibody）が抗原に結合せず、低分子が高濃度で存在する標的組織では抗原に結合することを示す図である。

[図2]低分子抗体と抗原の複合体に挟まれることによって、低分子がスイッチ機能を果たすことを示す図である。低分子が存在しなければ抗体と抗原の相互作用が不十分となり抗体は抗原に結合することができないが、低分子が存在すれば抗体と抗原の間に挟まることによって、抗体は抗原に結合することが可能となる。

[図3]ウサギへの免疫に使用したアデノシンアナログである2'-Adenosine-PEG- peptideの構造を示す図である。

[図4]ウサギへの免疫に使用したアデノシンアナログである5'-Adenosine-PEG- peptideの構造を示す図である。

[図5]ウサギへの免疫に使用したアデノシンアナログのペプチド部分をビオチンに置換した2'-Adenosine-PEG-biotinの構造を示す図である。

[図6]ウサギへの免疫に使用したアデノシンアナログのペプチド部分をビオチンに置換した5'-Adenosine-PEG-biotinの構造を示す図である。

[図7]ウサギB細胞クローニングから得られた各抗体の2'-Adenosine-PEG-Biotinに対する結合活性の比較結果を示す図である。各抗体を2'-Adenosine-PEG-Biotinと相互作用させた際の結合量を各抗体のキャプチャー量（RU）で割っ

た値（N_binding_100）を縦軸に、2'-Adenosine-PEG-Biotinの相互作用後に各抗体から2'-Adenosine-PEG-Biotinが解離した60秒後の値を各抗体のキャプチャー量（RU）で割った値（N_stability_100）を横軸に表す。

[図8A]クローンSMB0002がアデノシンに結合すること（相互作用）を示す表面プラズモン共鳴分析のセンサーグラムである。センサーグラムは上から順に100（Duplicate）50、25、12.5、6.25、3.13 nMのアデノシンとSMB0002との相互作用を表している。

[図8B]クローンSMB0002がATPに結合すること（相互作用）を示す表面プラズモン共鳴分析のセンサーグラムである。センサーグラムは上から順に5000,1250, 313 78.1 nMのATPとSMB0002との相互作用を表している。

[図9]クローンSMB0002がアデノシンおよびATPに結合することを示す競合ELISAの結果を示す図である。

[図10A]クローンSMB0002がAMPに結合すること（相互作用）を示す表面プラズモン共鳴分析のセンサーグラムである。センサーグラムは上から順に500、250（Duplicate）、125、62.5、31.3、15.6、7.81 μMのAMPとSMB0002との相互作用を表している。

[図10B]クローンSMB0002がADPに結合すること（相互作用）を示す表面プラズモン共鳴分析のセンサーグラムである。センサーグラムは上から順に図2000、1000(Duplicate)、500、250、125、62.5、31.3 μMのADPとSMB0002との相互作用を表している。

[図11A]SMB0002抗体とアデノシンのアデニン環部分との結合の様式を示す図である。図中、当該抗体のH鎖を太線で、L鎖を細線で、アデノシンを球棒モデルで示す。アデニン環から3.8Å以内のアミノ酸残基をスティックモデルで示した。破線は、当該抗体とアデニン環部分の間において3.2Å以内の距離にある水素結合を示している。

[図11B]SMB0002抗体とアデノシンのリボース部分への結合の様式を示す図である。図中、当該抗体のH鎖を太線で、L鎖を細線で、アデノシンを球棒モデルで示す。リボース部分から3.8Å以内のアミノ酸残基をスティックモデルで

示した。破線は、当該抗体とリボース部分の間において3.2Å以内の距離にある水素結合を示している。点線領域内はAMP結合時に予想される燐酸基の存在領域を示す。

[図12]ヒト化SMB0002がアデノシンに結合すること（相互作用）を示す表面プラズモン共鳴分析のセンサーグラムである。センサーグラムは上から順に200、100、50(duplicate)、25、12.5、6.25、3.125 nMのアデノシンとヒト化SMB0002との相互作用を表している。

[図13]ヒト化SMB0002がAMPに結合すること（相互作用）を示す表面プラズモン共鳴分析のセンサーグラムである。センサーグラムは上から順に500、250、125(duplicate)、62.5、31.3、15.6、7.8 μMのAMPとヒト化SMB0002との相互作用を表している。

[図14]ヒト化SMB0002がADPに結合すること（相互作用）を示す表面プラズモン共鳴分析のセンサーグラムである。センサーグラムは上から順に1000(duplicate)、500、250、125、62.5 μMのADPとヒト化SMB0002との相互作用を表している。

[図15]ヒト化SMB0002がATPに結合すること（相互作用）を示す表面プラズモン共鳴分析のセンサーグラムである。センサーグラムは上から順に1000(duplicate)、500、250、125、62.5 μMのATPとヒト化SMB0002との相互作用を表している。

[図16]クローン6RNMSC1-2_F02のヒトIL-6Rに対する結合ELISAの結果を示す図である。縦軸は各低分子の有無により抗体のヒトIL-6Rへの結合活性を評価した吸光度の値である。

[図17]クローン6RNMSC1-3_G02のヒトIL-6Rに対する結合ELISAの結果を示す図である。縦軸は各低分子の有無により抗体のヒトIL-6Rへの結合活性を評価した吸光度の値である。

[図18]抗体のヒトIL-6Rに対する結合ELISAの結果を示す図である。縦軸は各アミノ酸もしくはアミノ酸代謝物の有無により抗体のヒトIL-6Rへの結合活性を評価した吸光度の値である。

[図19]100μmol/L kynurenine存在下、10 mmol/L ATP存在下、kynurenine、ATP非存在下における6RNMSC1-2_F02と1μmol/L IL-6Rとの相互作用のセンサーグラムである。実線はkynurenine存在下の相互作用、点線はATP存在下の相互作用、および破線はこれらの非存在下の相互作用を示す。

[図20]センサーチップCM5に固定化したIL-6Rに対して、100μmol/L kynurenine存在下で6RNMSC1-2_F02を相互作用させ、その後100μmol/L kynurenineを含むバッファーまたはkynurenineを含まないバッファー条件下における6RNMSC1-2_F02のIL-6Rからの解離を観察したグラフである。図の縦軸は100 μmol/L kynurenine存在下での6RNMSC1-2_F02の結合量を100としてnormalizeした値を、横軸は相互作用開始後からの経過時間（秒）を表す。実線はkynurenine存在下における6RNMSC1-2_F02のIL-6Rからの解離、点線はkynurenine非存在下における6RNMSC1-2_F02のIL-6Rからの解離を表す。

[図21]5μg/Lの6RNMSC1-2_F02をアナライトとして180秒間相互作用させ、センサーチップCM5上に固定化したIL-6Rに対するレスポンスを評価したグラフである。縦軸は6RNMSC1-2_F02を相互作用させた前後でのレスポンスの変化（RU）、横軸は溶液中に含まれるkynurenine濃度（μmol/L）を表す。

[図22]クローン6RNMSC1-2_F02がキヌレニンに結合すること（相互作用）を示す表面プラズモン共鳴分析のセンサーグラムである。センサーグラムは上から順に1.25、0.625、0.313、0.156、0.078、0.039mMのキヌレニンと6RNMSC1-2_F02との相互作用をあらわしている。また、カイネティクスパラメーターは、ka=709 (1/s), kd=0.17 (1/s), KD=0.239 (mmol/L)である。

[図23]クローン6RNMSC1-2_F02が３－ヒドロキシ-DL-キヌレニンに結合すること（相互作用）を示す表面プラズモン共鳴分析のセンサーグラムである。センサーグラムは上から順に0.625、0.313、0.156、0.078、0.039mMの３－ヒドロキシ-DL-キヌレニンと6RNMSC1-2_F02との相互作用をあらわしている。

[図24]クローン6RNMSC1-2_F02が化合物RO0635389-000-001に結合すること（相互作用）を示す表面プラズモン共鳴分析のセンサーグラムである。センサーグラムは上から順に0.625、0.313、0.156mMの化合物RO0635389-000-001と6

RNMSC1-2_F02との相互作用をあらわしている。

[図25]クローン6RNMSC1-2_F02が化合物RO0635390-000-001に結合すること（相互作用）を示す表面プラズモン共鳴分析のセンサーグラムである。センサーグラムは上から順に0.625、0.313、0.156mMの化合物RO0635390-000-001と6RNMSC1-2_F02との相互作用をあらわしている。

[図26]クローン6RNMSC1-2_F02がキヌレニンの存在下（実線）非存在下（破線）によってIL6Rへの結合（相互作用）が変化することを示すOctetのセンサーグラムである。縦軸はIL6Rに対するレスポンスを示す。

[図27]クローン6RNMSC1-2_F02が３－ヒドロキシ-DL-キヌレニンの存在下（実線）非存在下（破線）によってIL6Rへの結合（相互作用）が変化することを示すOctetのセンサーグラムである。縦軸はIL6Rに対するレスポンスを示す。

[図28]クローン6RNMSC1-2_F02が化合物RO0635389-000-001の存在下（実線）非存在下（破線）によってIL6Rへの結合（相互作用）が変化することを示すOctetのセンサーグラムである。縦軸はIL6Rに対するレスポンスを示す。

[図29]クローン6RNMSC1-2_F02が化合物RO0635390-000-001の存在下（実線）非存在下（破線）によってIL6Rへの結合（相互作用）が変化することを示すOctetのセンサーグラムである。縦軸はIL6Rに対するレスポンスを示す。

[図30]6RNMSC1-2_F02 Fabフラグメントとkynurenineの結合の様式を示す図である。図中、当該抗体のH鎖を太線で、L鎖を細線で、kynurenineを球棒モデルで示す。kynurenineから3.8Å以内のアミノ酸残基をスティックモデルで示した。破線は、当該抗体とkynurenineの間において3.3Å以内の距離にある水素結合または静電相互作用を示している。

[図31]クローン6RNMSC1-2_F02のH49Y改変体がキヌレニンに結合すること（相互作用）を示す表面プラズモン共鳴分析のセンサーグラムである。センサーグラムは上から順に1.25、0.625、0.313、0.156、0.078、0.039mMのキヌレニンと6RNMSC1-2_F02H49Yとの相互作用をあらわしている。また、カイネティクスパラメーターは、ka=2543 (1/s), kd=0.24 (1/s), KD=0.095 (mmol/L)である。

[図32]6RNMSC1-2_F02のフレームワーク配列に対してジャームライン配列に戻すための変異が導入されたクローンF02h011/F02l003が、キヌレニンに結合すること（相互作用）を示す表面プラズモン共鳴分析のセンサーグラムである。センサーグラムは上から順に1000、500、250、125、62.5 μMのキヌレニンとF02h011/F02l003との相互作用を表している。

[図33]F02h011/F02l003に対してキヌレニンへの結合を増強させる改変が導入されたクローンF02h011/F02l098が、キヌレニンに結合すること（相互作用）を示す表面プラズモン共鳴分析のセンサーグラムである。センサーグラムは上から順に500、250、125、62.5、31.3 15.6 μMのキヌレニンとF02h011/F02l098との相互作用を表している。

[図34]6RNMSC1-2_F02 Fabフラグメントとキヌレニンの結合の様式を示す図である。図中、当該抗体の重鎖を黒色太線で、軽鎖を灰色細線で、キヌレニンを球棒モデルで示す。キヌレニンから4.2Å以内のアミノ酸残基をスティックモデルで示した。

[図35]6RNMSC1-2_F02 Fabフラグメントとキヌレニンの結合の様式を示す図である。図中、当該抗体の重鎖を黒色太線で、軽鎖を灰色細線で、キヌレニンを球棒モデルで示す。軽鎖Ser56(kabatナンバリング)をスティックモデルで示した。破線と破線上の数字は軽鎖Ser56とキヌレニンの間の非水素原子間の最短距離を示している。

[図36]6RNMSC1-2_F02 Fabフラグメントとキヌレニンの結合の様式を示す図である。図中、当該抗体の重鎖を黒色太線で、軽鎖を灰色細線で、キヌレニンを球棒モデルで示す。重鎖Gly50及び、軽鎖Asp28(kabatナンバリング)をスティックモデルで示した。

[図37]センサーチップCM5上に固定化したIL-6Rに対する、各低分子1 mM存在下・非存在下で各クローン1 μMを120秒間相互作用させた時の結合量(Binding response(RU))を示すグラフである。

[図38]Octetセンサー上に固定化したIL-6Rに対する、各低分子1 mM存在下・非存在下で各クローン10μg/mLを120秒間相互作用させた時の結合量(Binding

response(RU))を示すグラフである。

[図39]キヌレニンライブラリVer.Aから取得されたクローン6RFHm12-4_040、6RFHm12-4_078、6RFHm14-4_087、6RFHm14-4_093、6RFHm17-4_006、6RFHm17-4_010のhIL-6Rに対する各条件下でのELISAの結果を示す図である。Positive controlとして6RNMSC1-2_F02を使用した。縦軸は抗体のhIL-6Rへの結合活性を評価した吸光度の値である。各条件の詳細は表３８に示した。

[図40]キヌレニンライブラリVer.Aから取得されたクローンhIAFHm12-4_018、hIAFHm12-4_061、hIAFHm14-4_001、hIAFHm14-4_041、hIAFHm17-4_026、hIAFHm17-4_072のhIgA-Fcに対する各条件下でのELISAの結果を示す図である。縦軸は抗体のhIgA-Fcへの結合活性を評価した吸光度の値である。各条件の詳細は表４１に示した。

[図41]キヌレニンライブラリVer.Aから取得されたクローンI6FHm12-4_068、I6FHm12-4_094、I6FHm14-4_007、I6FHm14-4_030、I6FHm17-4_016、I6FHm17-4_036のhIL-6に対する各条件下でのELISAの結果を示す図である。縦軸は抗体のhIL-6への結合活性を評価した吸光度の値である。各条件の詳細は表４４に示した。

[図42]ATNLSA1-4_D12のビオチン標識抗原（5'-Adenosine-PEG-biotin, ATP-PEG-biotinの混合）結合に対するATPによる阻害能を評価した図である。

[図43]スイッチとなる低分子が抗体と抗原の間に挟まり、抗原と接する抗体可変領域部分をライブラリ化することで、任意の抗原に対して低分子スイッチ抗体を取得できるラショナルデザイン抗体ライブラリのコンセプトを示す図である。

[図44]ATP/Adenosineに結合する抗体を鋳型としたラショナルデザイン抗体ライブラリより得られたクローンI6RLSA1-6_011のヒトIL-6に対するATP及びAdenosine 10mMの存在/非存在下におけるELISAの結果を示す図である。縦軸は抗体のヒトIL-6への結合活性を評価した吸光度の値である。Positive Controlにはラショナルデザイン抗体ライブラリより得られた、低分子の存在/非存在に関わらずヒトIL-6に結合活性を示すクローンを使用した。Negative Contro

lには、M13KO7 Helper Phageを使用した。

[図45]ATP/Adenosineに結合する抗体を鋳型としたラショナルデザイン抗体ライブラリより得られたクローン6RRLSA1-6_037、6RRLSA1-6_045のヒトIL-6 Receptorに対するATP及びAdenosine 10mMの存在/非存在下におけるELISAの結果を示す図である。縦軸は抗体のヒトIL-6 Receptorへの結合活性を評価した吸光度の値である。Negative Control(図中negaと記載)には、M13KO7 Helper Phageを使用した。

[図46]ATP/Adenosineに結合する抗体を鋳型としたラショナルデザイン抗体ライブラリより得られたクローンHSADSA1-6_020のHSAに対するATP及びAdenosine 10mMの存在/非存在下におけるELISAの結果を示す図である。縦軸は抗体のHSAへの結合活性を評価した吸光度の値である。Positive Controlにはラショナルデザイン抗体ライブラリより得られた、低分子の存在/非存在に関わらずHSAに結合活性を示すクローンを使用した。Negative Controlには、M13KO7 Helper Phageを使用した。

発明を実施するための形態

[0018] 以下の定義および詳細な説明は、本明細書において説明する本発明の理解を容易にするために提供される。

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。

[0019] 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。

[0020] 本明細書において、アミノ酸の改変部位を表す際に用いられる「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。

[0021] 本明細書において、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文字コードまたは3文字コードを併記した表現が適宜使用され得る。例えば、抗体可変領域に含まれるアミノ酸の置換を加える際に用いられるN100bLまたはAsn100bLeuという改変は、Kabatナンバリングで表される100b位のAsnのLeuへの置換を表す。すなわち、数字はKabat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1文字コード又は3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文字コードまたは3文字コードは置換後のアミノ酸を表す。同様に、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またはPro238Asp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1文字コードまたは3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文字コードまたは3文字コードは置換後のアミノ酸を表す。

[0022] 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－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、CD

45、CD46、CD49a、CD52、CD54、CD55、CD56、CD61、CD64、CD66e、CD74、CD80（B7-1）、CD89、CD95、CD123、CD137、CD138、CD140a、CD146、CD147、CD148、CD152、CD164、CEACAM5、CFTR、cGMP、CINC、ボツリヌス菌毒素、ウェルシュ菌毒素、CKb8-1、CLC、CMV、CMV UL、CNTF、CNTN-1、COX、C-Ret、CRG-2、CT-1、CTACK、CTGF、CTLA-4、PD1、PDL1、LAG3、TIM3、galectin-9、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（GP IIb/IIIa）、GM-CSF、gp130、gp72、GRO、成長ホルモン放出因子、ハプテン（NP-capまたはNIP-cap）、HB-EGF、HCC、HCMV gBエンベロープ糖タンパク質、HCMV gHエンベロープ糖タンパク質、HCMV UL、造血成長因子（HGF）、Hep B gp120、ヘパラナーゼ、Her2、Her2/neu（ErbB-2）、Her3（ErbB-3）、Her4（ErbB-4）、単純ヘルペスウイルス（HSV） gB糖タンパク質、HSV gD糖タンパク質、HGFA、高分子量黒色腫関連抗原（HMW-MAA）、HIV gp120、HIV IIIB

gp 120 V3ループ、HLA、HLA-DR、HM1.24、HMFG PEM、HRG、Hrk、ヒト心臓ミオシン、ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）、ヒト成長ホルモン（HGH）、HVEM、I-309、IAP、ICAM、ICAM-1、ICAM-3、ICE、ICOS、IFNg、Ig、IgA受容体、IgE、IGF、IGF結合タンパク質、IGF-1R、IGFBP、IGF-I、IGF-II、IL、IL-1、IL-1R、IL-2、IL-2R、IL-4、IL-4R、IL-5、IL-5R、IL-6、IL-6R、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-18R、IL-21、IL-23、IL-27、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－Y抗原、ルイス－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－ベータ、nNOS、NO、NOS、Npn、NRG-3、NT、NTN、OB、OGG1

、OPG、OPN、OSM、OX40L、OX40R、p150、p95、PADPr、副甲状腺ホルモン、PARC、PARP、PBR、PBSF、PCAD、P-カドヘリン、PCNA、PDGF、PDGF、PDK-1、PECAM、PEM、PF4、PGE、PGF、PGI2、PGJ2、PIN、PLA2、胎盤性アルカリホスファターゼ（PLAP）、PlGF、PLP、PP14、プロインスリン、プロレラキシン、プロテインC、PS、PSA、PSCA、前立腺特異的膜抗原（PSMA）、PTEN、PTHrp、Ptk、PTN、R51、RANK、RANKL、RANTES、RANTES、レラキシンA鎖、レラキシンB鎖、レニン、呼吸器多核体ウイルス（RSV）F、RSV Fgp、Ret、リウマイド因子、RLIP76、RPA2、RSK、S100、SCF/KL、SDF-1、SERINE、血清アルブミン、sFRP-3、Shh、SIGIRR、SK-1、SLAM、SLPI、SMAC、SMDF、SMOH、SOD、SPARC、Stat、STEAP、STEAP-II、TACE、TACI、TAG-72（腫瘍関連糖タンパク質－72）、TARC、TCA-3、T細胞受容体（例えば、T細胞受容体アルファ/ベータ）、TdT、TECK、TEM1、TEM5、TEM7、TEM8、TERT、睾丸PLAP様アルカリホスファターゼ、TfR、TGF、TGF-アルファ、TGF-ベータ、TGF-ベータ Pan Specific、TGF-ベータRI（ALK-5）、TGF-ベータRII、TGF-ベータRIIb、TGF-ベータRIII、TGF-ベータ1、TGF-ベータ2、TGF-ベータ3、TGF-ベータ4、TGF-ベータ5、トロンビン、胸腺Ck-1、甲状腺刺激ホルモン、Tie、TIMP、TIQ、組織因子、TMEFF2、Tmpo、TMPRSS2、TNF、TNF-アルファ、TNF-アルファベータ、TNF-ベータ2、TNFc、TNF-RI、TNF-RII、TNFRSF10A（TRAIL R1 Apo-2、DR4）、TNFRSF10B（TRAIL R2 DR5、KILLER、TRICK-2A、TRICK-B）、TNFRSF10C（TRAIL R3 DcR1、LIT、TRID）、TNFRSF10D（TRAIL R4 DcR2、TRUNDD）、TNFRSF11A（RANK ODF R、TRANCE R）、TNFRSF11B（OPG OCIF、TR1）、TNFRSF12（TWEAK R FN14）、TNFRSF13B（TACI）、TNFRSF13C（BAFF R）、TNFRSF14（HVEM ATAR、HveA、LIGHT R、TR2）、TNFRSF16（NGFR p75NTR）、TNFRSF17（BCMA）、TNFRSF18（GITR AITR）、TNFRSF19（TROY TAJ、TRADE）、TNFRSF19L（RELT）、TNFRSF1A（TNF RI CD120a、p55-60）、TNFRSF1B（TNF RII CD120b、p75-80）、TNFRSF26（TNFRH3）、TNFRSF3（LTbR TNF RIII、TNFC R）、TNFRSF4（OX40 ACT35、TXGP1 R）、TNFRSF5（CD40 p50）、TNFRSF6（Fas Apo-1、APT1、CD95）、TNFRSF6B（DcR3 M68、TR6）、TNFRSF7（CD27）、TNFRSF8（CD30）、TNFRSF9（4-1BB CD1

37、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、TLR(Toll-like receptor)1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、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, prothro

mbin, thrombin, 組織因子, factor V, factor Va, factor VII, factor VIIa, factor VIII, factor VIIIa, factor IX, factor IXa, factor X, factor Xa, factor XI, factor XIa, factor XII, factor XIIa, factor XIII, factor XIIIa, TFPI, antithrombin III, EPCR, トロンボモデュリン、TAPI, tPA, plasminogen, plasmin, PAI-1, PAI-2、GPC3、Syndecan-1、Syndecan-2、Syndecan-3、Syndecan-4、LPA、S1P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。抗原としては癌組織または炎症性組織における癌細胞・免疫細胞・ストローマ細胞等に発現する抗原が好ましい。

[0023] 上記の抗原の例示には受容体も記載されるが、これらの受容体が生体液中に可溶型で存在する場合にも、本発明の低分子化合物（例えば、標的組織特異的な化合物）の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子が結合する抗原として使用され得る。そのような可溶型受容体の非限定な一態様として、例えば、Mullbergら（J. Immunol.（1994）152（10），4958-4968）によって記載されているような可溶型IL-6Rである、配列番号：１で表されるIL-6Rポリペプチド配列のうち、1から357番目のアミノ酸からなるタンパク質が例示され得る。

[0024] 上記の抗原の例示には、細胞膜に発現する膜型分子、および細胞から細胞外に分泌される可溶型分子が含まれる。本発明の標的組織特異的な化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子が、細胞から分泌された可溶型分子に結合する場合、当該抗原結合分子としては、後述されるように中和活性を有していることが好適である。

[0025] 可溶型分子が存在する溶液に限定はなく生体液、すなわち生体内の脈管又は組織・細胞の間を満たす全ての液体に本可溶型分子は存在し得る。非限定な一態様では、本発明の抗原結合分子が結合する可溶型分子は、細胞外液に存在することができる。細胞外液とは、脊椎動物では血漿、組織間液、リンパ液、密な結合組織、脳脊髄液、髄液、穿刺液、または関節液等の骨および軟骨中の成分、肺胞液（気管支肺胞洗浄液）、腹水、胸水、心嚢水、嚢胞液、または眼房水（房水）等の細胞透過液（細胞の能動輸送・分泌活動の結果

生じた各種腺腔内の液、および消化管腔その他の体腔内液）の総称をいう。

[0026] 本発明の低分子化合物（例えば、標的組織特異的な化合物）の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子が、細胞膜に発現する膜型分子に結合する場合、当該抗原結合分子の好適な例として、後述されるように細胞傷害活性を有している、もしくは細胞傷害性物質を結合するまたは結合する能力を有している抗原結合分子が好適に挙げられる。また、細胞傷害活性を有している、もしくは細胞傷害性物質を結合するまたは結合する能力を有しているという性質に代えて、または当該性質に加えて、中和活性を有している抗原結合分子もまた非限定な一態様として好適に挙げられる。

[0027] エピトープ

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

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

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

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

[0030] エピトープに結合する抗原結合ドメインの構造はパラトープと呼ばれる。エピトープとパラトープの間に作用する、水素結合、静電気力、ファンデルワールス力、疎水結合等によりエピトープとパラトープは安定して結合する。このエピトープとパラトープの間の結合力はアフィニティー (affinity) と呼ばれる。複数の抗原と複数の抗原結合分子が結合するときの結合力の総和はアビディティ (avidity) と呼ばれる。複数の抗原結合ドメインを含む (すなわち多価の) 抗体等が複数のエピトープに結合する際には、結合力 (affinity) が相乗的に働くため、アビディティはアフィニティーよりも高くなる。

[0031] 結合活性

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

[0032] 例えば、IL-6Rに対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子が、IL-6R分子中に存在する線状エピトープを認識することは、たとえば次のようにして確認することができる。上記の目的のためにIL-6Rの細胞外ドメインを構成するアミノ酸配列からなる線状のペプチドが合成される。当該ペプチドは、化学的に合成され得る。あるいは、IL-6RのcDNA中の、細胞外ドメインに相当

するアミノ酸配列をコードする領域を利用して、遺伝子工学的手法により得られる。次に、細胞外ドメインを構成するアミノ酸配列からなる線状ペプチドと、IL-6Rに対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子との結合活性が評価される。たとえば、固定化された線状ペプチドを抗原とするELISAによって、当該ペプチドに対する当該抗原結合分子の結合活性が評価され得る。あるいは、IL-6R発現細胞に対する当該抗原結合分子の結合における、線状ペプチドによる阻害のレベルに基づいて、線状ペプチドに対する結合活性が明らかにされ得る。これらの試験によって、線状ペプチドに対する当該抗原結合分子の結合活性が明らかにされ得る。

[0033] また、IL-6Rに対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子が立体構造エピトープを認識することは、次のようにして確認され得る。上記の目的のために、IL-6Rを発現する細胞が調製される。IL-6Rに対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子がIL-6R発現細胞に接触した際に当該細胞に強く結合する一方で、当該抗原結合分子が固定化されたIL-6Rの細胞外ドメインを構成するアミノ酸配列からなる線状ペプチドに対して実質的に結合しないとき等が挙げられる。ここで、実質的に結合しないとは、ヒトIL-6R発現細胞に対する結合活性の80%以下、通常50%以下、好ましくは30%以下、特に好ましくは15%以下の結合活性をいう。

[0034] IL-6Rに対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子のIL-6R発現細胞に対する結合活性を測定する方法としては、例えば、Antibodies A Laboratory Manual記載の方法 (Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) 359-420) が挙げられる。即ちIL-6R発現細胞を抗原とするELISAやFACS (fluorescence activated cell sorting) の原理によって評価され得る。

[0035] ELISAフォーマットにおいて、IL-6Rに対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子のIL-6R発現細胞に対する結合活性は、酵素反応によって生成するシグナルレベルを比較することによって定量的に評価される。すなわち、IL-6R発現細胞を固定化したELISAプレートに被験ポリペプチド会合体を加え、

細胞に結合した被験抗原結合分子が、被験抗原結合分子を認識する酵素標識抗体を利用して検出される。あるいはFACSにおいては、被験抗原結合分子の希釈系列を作成し、IL-6R発現細胞に対する抗体結合力価（titer）を決定することにより、IL-6R発現細胞に対する被験抗原結合分子の結合活性が比較され得る。

[0036] 緩衝液等に懸濁した細胞表面上に発現している抗原に対する被験抗原結合分子の結合は、フローサイトメーターによって検出することができる。フローサイトメーターとしては、例えば、次のような装置が知られている。

FACSCanto™ II

FACSAria™

FACSArray™

FACSVantage™ SE

FACSCalibur™ （いずれもBD Biosciences社の商品名）

EPICS ALTRA HyPerSort

Cytomics FC 500

EPICS XL-MCL ADC EPICS XL ADC

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

[0037] 例えば、IL-6Rに対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子の抗原に対する結合活性の好適な測定方法の一例として、次の方法が挙げられる。まず、IL-6Rを発現する細胞と反応させた被験抗原結合分子を認識するFITC標識した二次抗体で染色する。被験抗原結合分子を適宜好適な緩衝液によって希釈することによって、当該抗原結合分子が所望の濃度に調製して用いられる。例えば、10μg/mlから10 ng/mlまでの間のいずれかの濃度で使用され得る。次に、FACSCalibur（BD社）により蛍光強度と細胞数が測定される。当該細胞に対する抗体の結合量は、CELL QUEST Software（BD社）を用いて解析することにより得られた蛍光強度、すなわちGeometric Meanの値に反映される。すなわち、当該Geometric Meanの値を得ることにより、被験抗原結合分子の

結合量によって表される被験抗原結合分子の結合活性が測定され得る。

[0038] IL-6Rに対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子が、ある抗原結合分子とエピトープを共有することは、両者の同じエピトープに対する競合によって確認され得る。抗原結合分子間の競合は、交叉ブロッキングアッセイなどによって検出される。例えば競合ELISAアッセイは、好ましい交叉ブロッキングアッセイである。

[0039] 具体的には、交叉ブロッキングアッセイにおいては、マイクロタイタープレートのウェル上にコートしたIL-6Rタンパク質が、候補となる競合抗原結合分子の存在下、または非存在下でプレインキュベートされた後に、被験抗原結合分子が添加される。ウェル中のIL-6Rタンパク質に結合した被験抗原結合分子の量は、同じエピトープへの結合に対して競合する候補となる競合抗原結合分子の結合能に間接的に相関している。すなわち同一エピトープに対する競合抗原結合分子の親和性が大きくなればなる程、被験抗原結合分子のIL-6Rタンパク質をコートしたウェルへの結合活性は低下する。

[0040] IL-6Rタンパク質を介してウェルに結合した被験抗原結合分子の量は、予め抗原結合分子を標識しておくことによって、容易に測定され得る。たとえば、ビオチン標識された抗原結合分子は、アビジンペルオキシダーゼコンジュゲートと適切な基質を使用することにより測定される。ペルオキシダーゼなどの酵素標識を利用した交叉ブロッキングアッセイは、特に競合ELISAアッセイといわれる。抗原結合分子は、検出あるいは測定が可能な他の標識物質で標識され得る。具体的には、放射標識あるいは蛍光標識などが公知である。

[0041] 候補の競合抗原結合分子会合体の非存在下で実施されるコントロール試験において得られる結合活性と比較して、競合抗原結合分子が、IL-6Rに対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子の結合を少なくとも20%、好ましくは少なくとも20-50%、さらに好ましくは少なくとも50%ブロックできるならば、当該被験抗原結合分子は競合抗原結合分子と実質的に同じエピトープに結合するか、又は同じエピトープへの結合に対して競合する抗原結合分子である。

[0042] IL-6Rに対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子が結合するエピトープの構造が同定されている場合には、被験抗原結合分子と対照抗原結合分子とがエピトープを共有することは、当該エピトープを構成するペプチドにアミノ酸変異を導入したペプチドに対する両者の抗原結合分子の結合活性を比較することによって評価され得る。

[0043] こうした結合活性を測定する方法としては、例えば、前記のELISAフォーマットにおいて変異を導入した線状のペプチドに対する被験抗原結合分子及び対照抗原結合分子の結合活性を比較することによって測定され得る。ELISA以外の方法としては、カラムに結合した当該変異ペプチドに対する結合活性を、当該カラムに被検抗原結合分子と対照抗原結合分子を流下させた後に溶出液中に溶出される抗原結合分子を定量することによっても測定され得る。変異ペプチドを例えばGSTとの融合ペプチドとしてカラムに吸着させる方法は公知である。

[0044] また、同定されたエピトープが立体エピトープの場合には、被験抗原結合分子と対照抗原結合分子とがエピトープを共有することは、次の方法で評価され得る。まず、IL-6Rを発現する細胞とエピトープに変異が導入されたIL-6Rを発現する細胞が調製される。これらの細胞がPBS等の適切な緩衝液に懸濁された細胞懸濁液に対して被験抗原結合分子と対照抗原結合分子が添加される。次いで、適宜緩衝液で洗浄された細胞懸濁液に対して、被験抗原結合分子と対照抗原結合分子を認識することができるFITC標識された抗体が添加される。標識抗体によって染色された細胞の蛍光強度と細胞数がFACSCalibur（BD社）によって測定される。被験抗原結合分子と対照抗原結合分子の濃度は好適な緩衝液によって適宜希釈することによって所望の濃度に調製して用いられる。例えば、10μg/mlから10 ng/mlまでの間のいずれかの濃度で使用される。当該細胞に対する標識抗体の結合量は、CELL QUEST Software (BD社)を用いて解析することにより得られた蛍光強度、すなわちGeometric Meanの値に反映される。すなわち、当該Geometric Meanの値を得ることにより、標識抗体の結合量によって表される被験抗原結合分子と対照抗原結合分子の結

合活性を測定することができる。

[0045] 本方法において、例えば「変異IL-6R発現細胞に実質的に結合しない」ことは、以下の方法によって判断することができる。まず、変異IL-6Rを発現する細胞に対して結合した被験抗原結合分子と対照抗原結合分子が、標識抗体で染色される。次いで細胞の蛍光強度が検出される。蛍光検出にフローサイトメトリーとしてFACSCaliburを用いた場合、得られた蛍光強度はCELL QUEST Softwareを用いて解析され得る。ポリペプチド会合体存在下および非存在下でのGeometric Meanの値から、この比較値（ΔGeo-Mean）を下記の式１に基づいて算出することにより、抗原結合分子の結合による蛍光強度の増加割合を求めることができる。

[0046] （式１）

ΔGeo-Mean＝Geo-Mean（ポリペプチド会合体存在下）／Geo-Mean（ポリペプチド会合体非存在下）

[0047] 解析によって得られる被験抗原結合分子の変異IL-6R発現細胞に対する結合量が反映されたGeometric Mean比較値（変異IL-6R分子ΔGeo-Mean値）を、被験抗原結合分子のIL-6R発現細胞に対する結合量が反映されたΔGeo-Mean比較値と比較する。この場合において、変異IL-6R発現細胞及びIL-6R発現細胞に対するΔGeo-Mean比較値を求める際に使用する被験抗原結合分子の濃度は互いに同一又は実質的に同一の濃度で調製されることが特に好ましい。予めIL-6R中のエピトープを認識していることが確認された抗原結合分子が、対照抗原結合分子として利用される。

[0048] 被験抗原結合分子の変異IL-6R発現細胞に対するΔGeo-Mean比較値が、被験抗原結合分子のIL-6R発現細胞に対するΔGeo-Mean比較値の、少なくとも80%、好ましくは50%、更に好ましくは30%、特に好ましくは15%より小さければ、「変異IL-6R発現細胞に実質的に結合しない」ものとする。Geo-Mean値（Geometric Mean）を求める計算式は、CELL QUEST Software User's Guide（BD biosciences社）に記載されている。比較値を比較することによってそれが実質的に同視し得る程度であれば、被験抗原結合分子と対照抗原結合分子の

エピトープは同一であると評価され得る。

[0049] 標的組織

本明細書中で用いられる、用語「標的組織」とは、本発明の抗原結合分子が低分子化合物濃度に応じて結合する抗原が存在する細胞を含む組織であって、当該抗原結合分子の当該細胞に発現している膜型分子に対する結合、あるいは、当該組織に存在する可溶型分子に対する結合が当該組織を含む生体にとって正の薬理作用をもたらす組織をいう。この場合において、「正の薬理作用」とは、標的組織を含む病的部位が当該組織を含む生体に対してもたらす症状の軽減、緩和、寛解、または治癒をもたらす作用をいう。そうした薬理作用をもたらす非限定なメカニズムの一態様として、例えば、癌等の悪性腫瘍がもたらす症状の場合には、癌細胞に対する細胞傷害活性および増殖抑制および癌組織における免疫活性化等が例示される。こうした非限定なメカニズムの一態様として、例えば、炎症性疾患の場合には炎症組織における炎症性サイトカインの作用の遮断活性や免疫抑制等が例示される。

[0050] 癌組織特異的化合物

本明細書中で用いられる、用語「癌組織特異的な化合物（癌組織特異的化合物）」とは、非癌組織と比較して癌組織中に差示的に存在する化合物をいう。本明細書において、「癌」という用語は、一般に、悪性新生物を表すために用いられ、それは、転移性または非転移性であってよい。例えば、消化管や皮膚等の上皮組織から発生した癌腫の非限定な例として、脳腫瘍、皮膚癌、頸頭部癌、食道癌、肺癌、胃癌、十二指腸癌、乳癌、前立腺癌、子宮頸癌、子宮体癌、膵臓癌、肝臓癌、大腸癌、結腸癌、膀胱癌、および卵巣癌等が例示される。また、筋肉等の非上皮性組織（間質）から発生した肉腫の非限定な例として、骨肉腫、軟骨肉腫、横紋筋肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、および血管肉腫等が例示される。さらに、造血器由来の血液がんの非限定な例として、ホジキンリンパ腫（Hodgkin's lymphoma）および非ホジキンリンパ腫（non Hodgkin's lymphoma）を含む悪性リンパ腫、急性（acute myelocytic leukemia）または慢性骨髄性白血病（chronic myelocytic leukemia）、

および急性（acute lymphatic leukemia）または慢性リンパ性白血病（chronic lymphatic leukemia）を含む白血病、ならびに多発性骨髄腫（multiple myeloma）が例示される。本明細書で広く用いられる「新生物」という用語は、新たに生じたいかなる病的組織腫瘍をも意味する。本発明においては、新生物は腫瘍の形成を生じ、それは部分的に血管形成を特徴とする。新生物は、例えば、血管腫、神経膠腫、奇形腫等の良性、あるいは、例えば、癌腫、肉腫、膠細胞腫、星状膠細胞腫、神経芽細胞腫、網膜芽腫等の悪性でありうる。

[0051] 用語「癌組織」とは、少なくとも一つの癌細胞を含む組織を意味する。したがって、例えば癌組織が癌細胞と血管を含んでいるように、癌細胞および内皮細胞を含む腫瘤（tumor mass）の形成に寄与するすべての細胞型をいう。本明細書において、腫瘤とは腫瘍組織巣（a foci of tumor tissue）をいう。「腫瘍」という用語は、一般に、良性新生物または悪性新生物を意味するために用いられる。

[0052] 例えば、いくつかの実施形態では、癌組織特異的化合物は、癌組織に存在するが非癌組織には存在しない、または癌組織には存在しないが非癌組織には存在している等の定性的な癌組織特異性で規定される化合物であり得る。別の実施形態では、癌組織特的化合物は、非癌組織と比較して異なる濃度（例えば、高濃度または低濃度）で癌組織に存在している等の定量的な癌組織特異性で規定される化合物であり得る。例えば、癌組織特異的化合物は任意の濃度で差示的に存在する。しかし、一般に癌組織特異的化合物は、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも100%、少なくとも110%、少なくとも120%、少なくとも130%、少なくとも140%、少なくとも150%、少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、

少なくとも10^3倍、少なくとも10^4倍、少なくとも10^5倍、少なくとも10^6倍、またはそれ以上であって、無限大（すなわち非癌組織に不存在である場合）までの増加する濃度で、存在することが可能であり、あるいは一般に、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも100%（すなわち、不存在を表す）まで減少する濃度で、存在することが可能である。癌組織特異的化合物は、統計的に有意である濃度（すなわち、ウェルチのt検定またはウィルコクソンの順位和検定のいずれかを用いて決定されるように、p値は0.05未満および/またはq値は0.10未満）で、好ましくは差示的に存在する。癌組織特異的化合物の非限定な一態様としては、以下のような癌組織に含まれる癌細胞、免疫細胞、ストローマ細胞に特有の代謝活性によって産生された癌組織特異的な代謝産物（癌組織特異的代謝産物；癌細胞特異的代謝産物、癌組織に浸潤している免疫細胞特異的な代謝産物、癌ストローマ細胞特異的代謝産物）である化合物が例示され得る。

[0053] 本明細書中で用いられる用語「非天然化合物」とは、非天然由来の化学物質及びその代謝物をいう。発明の一態様としては、生体外から生体内に投与された後に、標的組織に集積する性質をもつ非天然由来の化学物質及びその代謝物である。非天然化合物としては、（１）カペシタビン（Capecitabine (Xeloda)）とその代謝物である5-FU（fluorouracil）、並びに（２）TH-302とブロモイソホスファミドマスタード（Br-IPM）等が例示される。5-FUはカペシタビン（Capecitabine (Xeloda)）の代謝物であり、癌組織特異的な代謝酵素であるcytidine deaminaseと thymidine phosphorylaseによって代謝されることが知られている（Desmoulin F. et al. Drug Metab Dispos. 2002）。またTH-302は癌組織周辺のように、低酸素の条件下で還元されることでBr-IPMに変換されることが知られている(Duan JX, et al. J Med Chem. 2008)。

例えば、カペシタビン（capecitabine（xeloda））を投与すると、癌特異的な代謝酵素等によって5-FUに代謝されるため、癌局所における5-FUの濃度が高くなる（Desmoulin F. et al. Drug Metab Dispos. 2002）ため、5-FUをスイッチとする抗体によって、癌局所でのみ選択的に標的抗原に結合することが可能となると考えられる。また、代謝酵素以外でも、癌に特異的な低酸素環境や酸性環境下によって生成される分子をスイッチとして用いることも可能であると考えられる。例えば、TH-302（Duan JX, et al. J Med Chem. 2008）は低酸素条件下においてBr-IPMに代謝されるため、Br-IPMをスイッチとする抗体によって、癌局所でのみ選択的に標的抗原に結合することが可能となると考えられる。例えば、非天然化合物を生体に投与する方法としては、経口投与、点眼投与、経皮投与、経鼻投与、経静脈投与、経肺投与など公知の投与方法が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0054] 本明細書中で用いられる用語「非天然化合物」の別の一態様としては、標的組織に集積する性質をもつ化学物質及びその代謝物以外でも、スイッチとなる非天然化合物を例えば経口投与することによって、抗体の作用を経口剤の服用をすることによってコントロールすることができる化学物質等も含む。すなわち、ある経口等の非侵しゅう投与可能な非天然化合物をスイッチとして、ある抗原に対して結合を示すスイッチ抗体を静脈内あるいは皮下投与等の侵しゅう投与しておき、スイッチとなる外来性化合物を経口等の非侵しゅう投与によって、その抗体の作用をコントロールすることができる化学物質等である。そのような化合物質として，例えばATPγSやキヌレニン代謝物等を挙げることが出来るが、これに限定されることはない。

抗体医薬は半減期が長いことから、副作用が生じた場合はその作用が持続してしまうことが欠点であるが、このように抗体の作用を非天然化合物を経口等の非侵しゅう投与によってコントロールできれば、副作用が生じた際にスイッチ分子の投与をやめることによって薬の作用を止めることが可能である。また、あらかじめスイッチ抗体を投与しておくことにより、疾患により症状が生じたときのみスイッチ分子を投与すること、必要な時にのみ経口等の

非侵しゅう投与によって薬理作用を発揮することが可能である。

[0055] 本発明における「非天然化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子」は、生体に投与されたときに正の薬理作用をもたらし得る。

[0056] 癌組織特異的代謝産物

用語「代謝」は、生物の組織内で生ずる化学変化のことをいい、「同化」および「異化」が含まれる。同化とは、分子の生合成または蓄積のことをいい、異化は分子の分解のことをいう。「代謝産物」は、物質代謝に起因する中間体または生成物である。「一次代謝産物」とは、細胞または生物の成長もしくは繁殖の過程に直接関わる代謝産物を指し、「二次代謝産物」とはそれらの成長もしくは繁殖の過程には直接関わらず、細胞または生物に共通の生命現象に直接関与しない物質を生合成する代謝の結果生じる抗生物質や色素等の生産物をいう。代謝産物は、「生体高分子」の代謝産物でもあり得るし、「低分子」の代謝産物でもあり得る。「生体高分子」は、一種類以上の反復単位からなる高分子である。生体高分子は、一般に生物系で見出され、生物を組織する細胞およびそれに付着する細胞間マトリックス、組織間マトリックス等の構造物を形成する分子量がおよそ5000以上の分子、特に多糖類（炭水化物等）およびペプチド（この用語はポリペプチドおよびタンパク質を含むようにして用いられる）およびポリヌクレオチド、同様にそれらの類似体、例えばアミノ酸類似体もしくは非アミノ酸基から構成もしくは含むそれらの化合物が挙げられる。

[0057] 本明細書中で用いられる用語「低分子」は、生体に存在する「生体高分子」以外の天然由来の化学物質又は非天然由来の化学物質をいう。好ましくは、標的組織特異的な化合物又は非天然化合物であるが、これに限定されるものではない。本明細書に記載される非限定な一態様の癌組織特異的代謝産物として、癌細胞特異的な低分子代謝産物が好適に挙げられる（Eva Gottfried, Katrin Peter and Marina P. Kreutz, From Molecular to Modular Tumor Therapy (2010) 3 (2), 111-132）。さらには、癌組織に浸潤する免疫細胞が

高く産生する代謝産物や癌細胞の生存および/または成長をサポートするストローマ細胞（癌ストローマ細胞または癌間質線維芽細胞（CAF））が高く産生する代謝産物も含まれる。浸潤する免疫細胞としては、樹状細胞、抑制性樹状細胞、抑制性T細胞、疲弊T細胞（exhausted T cell）、骨髄系由来抑制細胞（myeloma derived suppressor cell、MDSC）等が例示される。また、本発明における代謝産物には、癌組織に存在する細胞（癌細胞、免疫細胞、ストローマ細胞）が、アポトーシスやネクローシス等によって細胞死した際に、細胞内から細胞外に放出される化合物も含まれる。

[0058] 癌細胞特異的代謝産物を同定するため、トランスクリプトーム・レベルでの解析、（例えば、Dhanasekaranら（Nature（2001）412, 822-826）、Lapointeら（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.（2004）101, 811-816またはPerouら（Nature（2000）406, 747-752等が例示される）もしくはプロテオーム・レベルでの解析（例えば、Ahramら（Mol. Carcinog.（2002）33, 9-15、Hoodら（Mol. Cell. Proteomics（2005）4, 1741-1753）のほか、代謝学的プロファイリングを中心とする代謝学（メタボロミックス）解析が、適宜使用される。すなわち、被験試料中の代謝産物を同定するために高圧液体クロトグラフィ（HPLC）、核磁気共鳴（NMR）（Brindleら（J. Mol. Recognit.（1997）10, 182-187）、質量分析法（GatesおよびSweeley（Clin. Chem.（1978）24, 1663-1673）（GC/MSおよび LC/MS））およびELISA等を単独でおよび/または組み合わせて用いる代謝学的プロファイリングが適宜使用され得る。

[0059] これらの研究によって、癌細胞が低い酸素圧条件下で成育することを可能にする代謝産物（例えばブドウ糖または酸素）および生長因子の濃度勾配を変えることによって構成された腫瘍内の異質性が明らかにされた（DangおよびSemenza（Trends Biochem. Sci.（1999）24, 68-72））。これらの研究においては、腫瘍の悪性度の異なる程度によるエネルギー利用経路の変化を理解するために細胞株モデルも使用されている（Vizanら（Cancer Res.（2005）65, 5512-5515）。代謝学プラットフォームの技術的構成要素の非限定な一態様として、Lawtonら（Pharmacogenomics（2008）9, 383）に記載された、

試料抽出、分離、検出、分光分析、データ正規化、クラス特異的代謝産物の描写、経路マッピング、確認、および候補代謝産物の機能的特徴付けが例示される。これらの方法によって所望の癌組織における癌細胞特異的代謝産物を同定することが可能である。

[0060] 本発明で使用される癌組織特異的化合物、または癌組織特異的代謝産物の非限定な一態様として以下の化合物から選択される少なくとも一つの化合物が好適に挙げられる。少なくとも一つの化合物とは、後述する同一の抗原結合ドメインによる抗原に対する結合活性が、一種の癌組織特異的化合物、または癌組織特異的代謝産物に依存的であるほか、複数の種類の癌組織特異的化合物、または癌組織特異的代謝産物に依存的である場合を含むことを意味する。

[0061] （１）乳酸、コハク酸、クエン酸等の解糖系、またはクレブス回路の一次代謝産物

本発明で使用される癌組織特異的化合物、とくに癌細胞特異的代謝産物の非限定な一態様として、乳酸、コハク酸、クエン酸等の周囲に存在する非癌部組織よりも癌組織において高濃度に存在するグルコース代謝の結果生成される一次代謝産物が好適に挙げられる。ピルビン酸キナーゼ、ヘキソキナーゼ、および乳酸脱水素酵素（LDH）等の解糖系（Embden-Myerhof経路）酵素の上方調節（アップレギュレーション）として特徴付けられる解糖系表現型は、Warburg効果として固形腫瘍の特徴であることが従来から知られている。

[0062] すなわち、腫瘍細胞ではM1アイソ型ではなく嫌気条件下での解糖（erobic glycolysis）に必要なM2アイソ型のピルビン酸キナーゼが高発現していることが、生体内における腫瘍細胞の生育に有利に働いていると考えられている（Christofkら（Nature（2008）452, 230-233）。ピルビン酸キナーゼによって生成されたピルビン酸は、嫌気条件下における乳酸脱水素酵素（LDH）による平衡反応の結果生成される、乳酸によってフィードバック阻害を受ける。当該フィードバック阻害によってミトコンドリアにおける呼吸（クレブス回路）の促進、および細胞増殖抑制が生じるため、LDH、ヘキソキナーゼ、およ

びグルコーストランスポーター（GLUT）の上方調節が腫瘍細胞の増殖に重要な役割を果たすといわれている（Fantinら（Cancer Cell（2006）9，425-434））。グルコースは解糖系で代謝され、その最終代謝産物である乳酸が腫瘍の周囲にプロトンとともに共輸送される結果、腫瘍の周辺組織のpHは酸性条件に変化するといわれている。解糖系の最終産物である乳酸、ミトコンドリアにおける呼吸の促進によって生成されるコハク酸およびクエン酸が、癌組織において蓄積していることが知られている（Teresaら（Mol. Cancer（2009）8，41-59））。本発明で使用される癌組織特異的化合物、とくに癌細胞特異的代謝産物の非限定な一態様として、こうした解糖系の代謝によって生成される一次代謝産物である、乳酸、コハク酸、クエン酸等が好適に挙げられる。また、細胞死により細胞内に高濃度で存在するコハク酸が細胞外に漏出することが知られている（Nature Immunology，（2008）9，1261-1269）。そのため、細胞死が頻繁に起こっている癌組織においてコハク酸の濃度が上昇していると考えられる。

[0063] （２）アラニン、グルタミン酸、アスパラギン酸等のアミノ酸

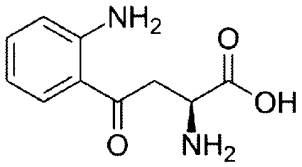
上述されたグルコース代謝以外にも、嫌気条件下における生体高分子の生合成に必要な必須アミノ酸および非必須アミノ酸の連続供給が必要な腫瘍細胞ではアミノ酸代謝も変化していることが知られている。グルタミンはその側鎖に二つの窒素を含む窒素運搬体として作用する、生体においてもっとも広範に分布するアミノ酸である。グルタミンの細胞内への取込み速度が上昇している腫瘍細胞はグルタミントラップ（glutamine trap）として機能しているといわれている。こうしたグルタミンの取込みとグルタミン酸および乳酸へ変換される活性の上昇は「グルタミン分解（glutaminolysis）」と呼ばれ、形質転換された（腫瘍）細胞の特徴であると思われている（MazurekおよびEigenbrodt（Anticancer Res.（2003）23，1149-1154、ならびにMazurekら（J. Cell. Physiol.（1999）181，136-146））。その結果、癌患者は血漿中のグルタミンのレベルの減少の一方でグルタミン酸濃度の増大を示す（Drogeら（Immunobiology（1987）174，473-479）。そして、肺癌組織の^{13}C放射標識

されたグルコースの代謝研究によって^{13}C標識コハク酸、 ^{13}C 標識アラニン、^{13}C 標識グルタミン酸、および^{13}C 標識クエン酸の濃度間で相関が観察された。本発明で使用される癌組織特異的化合物の非限定な一態様として、こうしたグルタミン分解等によって癌組織において高濃度に蓄積する、アラニン、グルタミン酸、アスパラギン酸等が好適に挙げられる。

[0064] （３）キヌレニン（kynurenine）等のアミノ酸の代謝産物

インドールアミン2, 3-ジオキシゲナーゼ（IDO）はメラノーマ、結腸癌、および腎臓癌等の多くの癌で高発現しているトリプトファン代謝酵素であり（Uyttenhoveら（Nat. Med.（2003）9, 1269-127）、二つのアイソフォームが存在することが知られている（Lobら（CancerImmunol. Immunother.（2009）58, 153-157））。IDOはトリプトファンのキヌレニン（化１で表される）への変換を触媒しニコチンアミドヌクレオチド（NAD）の新生経路の最初の酵素である。また、IDOを発現しないグリオーマでは肝臓のトリプトファン2, 3-ジオキシゲナーゼ（TDO）によって、トリプトファンからキヌレニンが生成する（Opitzら（Nature（2011）478, 7368, 197-203））。またIDOは癌組織に浸潤している樹状細胞にも発現しており、樹状細胞もキヌレニンを産生する（J. Immunol.（2008）181, 5396-5404）。またIDOは癌組織の 骨髄系由来抑制細胞（MDSC）にも発現しており、MDSCもキヌレニンを産生する（Yuら（J. Immunol.（2013）190, 3783-3797））。

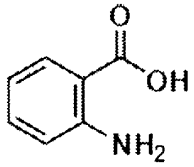
[0065] [化1]



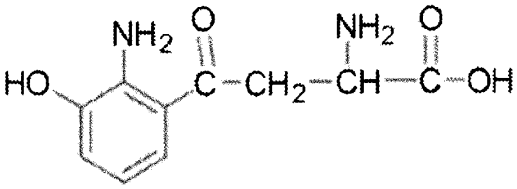
[0066] キヌレニンは同種T細胞応答を抑制することが知られており（Frumentoら（J. Exp. Med.（2002）196, 459-468）、こうした抑制を通じて腫瘍細胞が抗腫瘍免疫応答を潜り抜けるとともに、グリオーマに発現するアリル炭化水素受容体の内因性リガンドとしてキヌレニンが作用するオートクライン増殖機構を通じて、グリオーマ細胞の増殖が促進されるメカニズムが提唱されてい

る（Opitzら（上掲））。キヌレニンはキヌレニダーゼによってアントラニル酸（［化２］で表される）に、およびキヌレニン3-ヒドロキシラーゼによって3-ヒドロキシキヌレニン（［化３］で表される）に変換される。アントラニル酸、および3-ヒドロキシキヌレニンはともにNADの前駆体となる3-ヒドロキシアントラニル酸に変換される。

[0067] [化2]

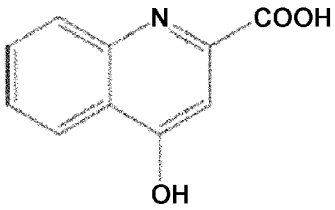


[0068] [化3]



[0069] キヌレニンはキヌレニンアミノトランスフェラーゼによってキヌレン酸（［化４］で表される）に変換される。本発明で使用される癌組織特異的化合物、とくに癌細胞特異的代謝産物の非限定な一態様として、こうしたキヌレニン、およびその代謝産物である、アントラニル酸、3-ヒドロキシキヌレニン、およびキヌレン酸等のアミノ酸の代謝産物が好適に挙げられる。

[0070] [化4]

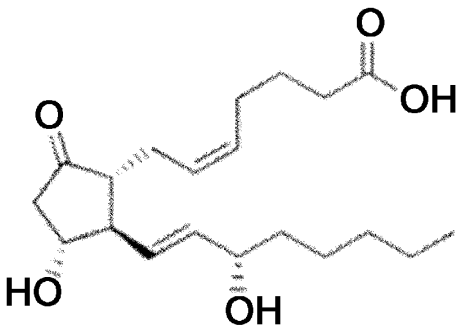


[0071] （４）プロスタグランジンE2（Prostaglandin E2）等のアラキドン酸の代謝産物

プロスタグランジンE2（PGE2）（［化５］）は、シクロオキシゲナーゼ（COX）-1/2によって合成されるプロスタグランジンおよびトロンボキサンを含

むプラストノイドと呼ばれるアラキドン酸の代謝物である（WarnerおよびMitchell（FASEB J.（2004）18，790-804））。PGE2結腸癌細胞の増殖を促進し、そのアポトーシスを抑制する（Shengら（Cancer Res.（1998）58，362-366））。 多くの癌細胞ではシクロオキシゲナーゼの発現が変化していることが知られている。すなわち、COX-1はほぼすべての組織において構成的に発現しているのに対して、COX-2は腫瘍においてある種の炎症性サイトカインおよび癌遺伝子によって誘導されることが主に見出されている（WarnerおよびMitchell（前掲））。COX-2の過剰発現は乳癌の予後の悪さ（Denkertら（Clin. Breast Cancer（2004）4，428-433）、および卵巣癌の急速な疾患の進行（Denkerら（Mod. Pathol.（2006）19，1261-1269）と関連性があることも報告されている。また癌組織に浸潤している抑制性T細胞もプロスタグランジンE2を産生している（Curr. Med. Chem.（2011）18，5217-5223）。アラキドン酸の代謝物のプロスタグランジン、ロイコトリエン等の低分子が癌のオートクライン、および/またはパラクラインな増殖を制御する刺激因子として作用していることが知られている（Nat. Rev. Cancer（2012）12（11）782-792）。本発明で使用される癌組織特異的化合物、とくに癌細胞特異的代謝産物や癌組織に浸潤している免疫細胞特異的代謝物の非限定な一態様として、こうしたプロスタグランジンE2等のアラキドン酸の代謝産物が好適に挙げられる。プロスタグランジンE2以外にも、トロンボキサンA2（TXA2)が大腸癌等の癌組織で産生が亢進しており（J. Lab. Clin. Med.（1993）122，518-523）、本発明のアラキドン酸の代謝産物の非限定な一態様として好適に挙げられる。

[0072] [化5]



[0073] （５）アデノシン、アデノシン3リン酸（ATP）、アデノシン2リン酸（ADP）、アデノシン1リン酸（AMP）等のプリン環構造を有するヌクレオシド

癌細胞が細胞死すると細胞内の大量のATPが細胞外に漏出することが知られている。そのため、癌組織におけるATP濃度は正常組織と比較して著しく高い（PLoS One. (2008) 3, e2599）。複数の型の細胞がATP、ADPおよびAMPの型のアデニンヌクレオチドを遊離する。細胞外-5'-ヌクレオチダーゼ（eco-5'-nucleotidase）（CD73）のような細胞表面の細胞外酵素によって代謝される（RestaおよびThompson（Immunol. Rev. (1998) 161, 95-109）ならびにSadejら（Melanoma Res. (2006) 16, 213-222）。アデノシンは低濃度で細胞外環境に構成的に存在するプリンヌクレオシドであるが、固形癌で見出される低酸素組織では細胞外アデノシン濃度の顕著な増加が報告されている（BlayおよびHoskin（Cancer Res. (1997) 57, 2602-2605）。CD73は腫瘍および免疫細胞の表面に発現しており（Kobieら（J. Immunol. (2006) 177, 6780-6786）、乳癌（Canbolatら（Breast Cancer Res. Treat. (1996) 37, 189-193）、胃癌（Durakら（Cancer Lett. (1994) 84, 199-202）、膵臓癌（FlockeおよびMannherz（Biochim. Biophys. Acta (1991) 1076, 273-281）およびグリオブラストーマ（Bardotら（Br. J. Cancer (1994) 70, 212-218））において活性の上昇が見出されている。癌組織におけるアデノシンの蓄積は、細胞質の5'-ヌクレオチダーゼによるAMPの脱リン酸によって細胞内アデノシン生成が増加することに起因している可能性が提唱されている（HeadrickおよびWillis（Biochem. J. (1989) 261, 541-550）。さらに癌組織に浸潤している抑制性T細胞等もATP分解酵素を発現しており、アデノシンを産生している（Proc. Natl. Acad. Sci. (2006) 103 (35), 13132-13137、Curr. Med. Chem. (2011) 18, 5217-5223）。産生されたアデノシンは、A2Aレセプター等のアデノシンレセプターを介して癌組織を免疫抑制的な環境にしていると考えられている（Curr. Med. Chem. (2011),18,5217-23）。本発明で使用される癌組織特異的化合物の非限定な一態様として、こうしたATP等のプリンヌクレオチドの代謝によって癌組織において高濃度に蓄積する、ATP、ADP、AMP、または

アデノシン等が好適に挙げられる。さらにアデノシンは、adenosine deaminaseによってイノシンに分解されるため、イノシンが高濃度に蓄積する。

[0074] （６）尿酸

尿酸は生体内におけるプリンヌクレオシドの代謝経路の産物であり、血液または間質腔等の細胞外に遊離される。また、近年では、癌組織等の病変部位に存在する死細胞から遊離されることが明らかとなっている（Nat. Med.（2007）13, 851-856）。本発明で使用される癌組織特異的化合物の非限定な一態様として、こうしたATP等のプリンヌクレオチドの代謝によって癌組織において高濃度に蓄積する尿酸も好適に挙げられる。

[0075] （７）1-メチルニコチンアミド

複数のヒト癌組織において酵素ニコチンアミドN-メチルトランスフェラーゼが高発現していることが知られている。本酵素がニコチンアミドから安定的な代謝物である1-メチルニコチンアミドを産生する際、メチル供与体となるS-アデノシルメチオニン（SAM）のメチル基を消費するために、癌細胞におけるSAM濃度の減少に伴ったDNAのメチル化能を損ねる機構を通じて、ニコチンアミドN-メチルトランスフェラーゼの高発現が腫瘍化（tumorigenesis）に寄与していることが提唱されている（Ulanovskayaら（Nat. Chem. Biol.（2013）9（5）300-306））。本酵素の安定的な代謝産物である1-メチルニコチンアミドは、癌細胞の細胞外に分泌することが知られており（Yamadaら（J. Nutr. Sci. Vitaminol.（2010）56, 83-86））、本発明で使用される癌組織特異的化合物の非限定な一態様として、こうしたニコチンアミドの代謝によって癌組織において高濃度に蓄積する1-メチルニコチンアミド等も好適に挙げられる。

[0076] 炎症組織特異的化合物

本明細書中で用いられる、用語「炎症組織特異的な化合物（炎症組織特異的化合物）」とは、非炎症組織と比較して炎症組織中に差示的に存在する化合物をいう。本明細書において、「炎症組織」とは、例えば、以下が例示的に挙げられる。

・関節リウマチや変形性関節症における関節

・気管支喘息やCOPDにおける肺（肺胞）

・炎症性腸疾患やクローン病や潰瘍性大腸炎における消化器官

・肝臓、腎臓、肺における線維化症における線維化組織

・臓器移植における拒絶反応が起こっている組織

・動脈硬化や心不全における血管、心臓（心筋）

・メタボリック症候群における内臓脂肪

・アトピー性皮膚炎その他皮膚炎における皮膚組織

・椎間板ヘルニアや慢性腰痛における脊髄神経

[0077] 炎症組織特異的代謝産物

炎症組織特異的代謝産物とは、炎症性組織に浸潤にしている免疫細胞が高く産生する代謝産物、および、炎症組織において傷害を受けている正常細胞特異的が高く産生する代謝産物である。浸潤する免疫細胞としては、エフェクターT細胞、成熟樹状細胞、好中球、顆粒細胞（肥満細胞）、好塩基球等が例示される。また、本発明における代謝産物には、炎症組織に存在する細胞（免疫細胞、正常細胞）が、アポトーシスやネクローシス等によって細胞死した際に、細胞内から細胞外に放出される化合物も含まれる。

[0078] 本発明で使用される炎症組織特異的化合物、または炎症組織特異的代謝産物の非限定な一態様として以下の化合物から選択される少なくとも一つの化合物が好適に挙げられる。少なくとも一つの化合物とは、後述する同一の抗原結合ドメインによる抗原に対する結合活性が、一種の炎症組織特異的化合物、または炎症組織特異的代謝産物に依存的であるほか、複数の種類の炎症組織特異的化合物、または炎症組織特異的代謝産物に依存的である場合を含むことを意味する。

[0079] （１）プロスタグランジンE2（Prostaglandin E2）等のアラキドン酸の代謝産物

関節リウマチや変形性関節症においてPGE2濃度が高いことが知られている（Eur. J. Clin. Pharmacol. (1994) 46, 3-7.、Clin. Exp. Rheumatol. (19

99) 17, 151-160、Am. J. Vet. Res. (2004) 65, 1269-1275.)。本発明で使用される炎症組織特異的化合物、とくに炎症細胞特異的代謝産物や炎症組織に浸潤する免疫細胞特異的代謝物の非限定な一態様として、こうしたプロスタグランジンE2等のアラキドン酸の代謝産物が好適に挙げられる。

[0080] （２）アデノシン、アデノシン3リン酸（ATP）、アデノシン2リン酸（ADP）、アデノシン1リン酸（AMP）等のプリン環構造を有するヌクレオシド

気管支喘息に起因する炎症が起こっている肺胞においてATP濃度が高いことが知られている（Nat. Med. (2007) 13, 913-919）。また、COPDに起因する炎症が起こっている肺胞においてATP濃度が高いこともまた知られている（Am. J. Respir. Crit. Care Med. (2010) 181, 928-934）。また、関節リウマチ患者の関節液中でアデノシン濃度が高いことが観察されている（Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (2004) 36 877-882）。さらにGVHDにより拒絶反応が起こっている組織においてATP濃度が高いことが知られている（Nat. Med. (2010) 16, 1434-1438）。また、肺、肝臓、腎臓における線維化組織においてアデノシン濃度が亢進していることも知られている（FASEB J. (2008) 22, 2263-2272、J. Immunol. (2006) 176, 4449-4458、J. Am. Soc. Nephrol. (2011) 22 (5), 890-901、PLoS ONE J. (2010) 5 (2), e9242）。また肺線維症患者の線維化組織においてATP濃度が上昇していることが観察されている（Am. J. Respir. Crit. Care Med. (2010) 182, 774-783）。本発明で使用される炎症性組織特異的化合物の非限定な一態様として、こうしたATP等のプリンヌクレオチドの代謝によって炎症組織において高濃度に蓄積する、ATP、ADP、AMP、またはアデノシン等が好適に挙げられる。さらにアデノシンは、adenosine deaminaseによってイノシンに分解されるため、イノシンが高濃度に蓄積する。

[0081] （３）尿酸

尿酸は生体内におけるプリンヌクレオシドの代謝経路の産物であり、血液または間質腔等の細胞外に遊離される。また、近年では、壊死（necrosis）を進行する細胞から遊離される尿酸が炎症性応答を促進することが明らかと

なっている（J. Clin. Invest.（2010）120（6），1939-1949）。本発明で使用される炎症組織特異的化合物の非限定な一態様として、こうしたATP等のプリンヌクレオチドの代謝によって炎症性組織において高濃度に蓄積する尿酸も好適に挙げられる。

[0082] 抗原結合ドメイン

本明細書において、「抗原結合ドメイン」は目的とする抗原に結合するかぎりどのような構造のドメインも使用され得る。そのようなドメインの例として、例えば、抗体の重鎖および軽鎖の可変領域、生体内に存在する細胞膜タンパクであるAvimerに含まれる35アミノ酸程度のAドメインと呼ばれるモジュール（国際公開WO2004/044011、WO2005/040229）、細胞膜に発現する糖たんぱく質であるfibronectin中のタンパク質に結合するドメインである10Fn3ドメインを含むAdnectin（国際公開WO2002/032925）、ProteinAの58アミノ酸からなる3つのヘリックスの束（bundle）を構成するIgG結合ドメインをscaffoldとするAffibody（国際公開WO1995/001937）、33アミノ酸残基を含むターンと2つの逆並行ヘリックスおよびループのサブユニットが繰り返し積み重なった構造を有するアンキリン反復（ankyrin repeat：AR）の分子表面に露出する領域であるDARPins（Designed Ankyrin Repeat proteins）（国際公開WO2002/020565）、好中球ゲラチナーゼ結合リポカリン（neutrophil gelatinase-associated lipocalin（NGAL））等のリポカリン分子において高度に保存された8つの逆並行ストランドが中央方向にねじれたバレル構造の片側を支える4つのループ領域であるAnticalin等（国際公開WO2003/029462）、ヤツメウナギ、ヌタウナギなど無顎類の獲得免疫システムとしてイムノグロブリンの構造を有さない可変性リンパ球受容体（variable lymphocyte receptor（VLR））のロイシン残基に富んだリピート（leucine-rich-repeat（LRR））モジュールが繰り返し積み重なった馬てい形の構造の内部の並行型シート構造のくぼんだ領域（国際公開WO2008/016854）が好適に挙げられる。

本発明の抗原結合ドメインの好適な例として、抗体の重鎖および軽鎖の可変領域を含む抗原結合ドメインが挙げられる。こうした抗原結合ドメインの

例としては、「scFv (single chain Fv)」、「単鎖抗体 (single chain antibody)」、「Fv」、「scFv2 (single chain Fv 2)」、「Fab」または「F(ab')2」等が好適に挙げられる。

[0083] 本発明の抗原結合分子における抗原結合ドメインは、同一のエピトープに結合することができる。ここで同一のエピトープは、例えば、配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質中に存在することができる。あるいは、本発明の抗原結合分子における抗原結合ドメインは、互いに異なるエピトープに結合することができる。ここで異なるエピトープは、例えば、配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質中に存在することができる。

[0084] 特異的

特異的とは、特異的に結合する分子の一方の分子がその一または複数の結合する相手方の分子以外の分子に対しては実質的に結合しない状態をいう。また、抗原結合ドメインが、ある抗原中に含まれる複数のエピトープのうち特定のエピトープに対して特異的である場合にも用いられる。また、抗原結合ドメインが結合するエピトープが複数の異なる抗原に含まれる場合には、当該抗原結合ドメインを有する抗原結合分子は当該エピトープを含む様々な抗原と結合することができる。ここで、実質的に結合しないとは上記結合活性の項で記載される方法に準じて決定され、前記相手方以外の分子に対する特異的結合分子の結合活性が、前記相手方の分子に対するの結合活性の80%以下、通常50%以下、好ましくは30%以下、特に好ましくは15%以下の結合活性を示すことをいう。

[0085] 細胞傷害活性

本発明の非限定な一態様では、低分子化合物（例えば、癌組織特異的化合物、炎症組織特異的化合物、またはそれらの代謝物）の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインを含み、膜型分子をその細胞膜に発現する細胞に対する細胞傷害活性を有する抗原結合分子、および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。本発明において

細胞傷害活性とは、例えば抗体依存性細胞介在性細胞傷害（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity：ADCC）活性、補体依存性細胞傷害（complement-dependent cytotoxicity：CDC）活性およびT細胞による細胞傷害活性等が挙げられる。本発明において、CDC活性とは補体系による細胞傷害活性を意味する。一方ADCC活性とは、標的細胞の細胞膜に発現された膜型分子に結合する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子のFc領域に、免疫細胞等が当該免疫細胞に発現したFcγレセプターを介して結合し、当該免疫細胞が標的細胞に傷害を与える活性を意味する。目的の抗原結合分子がADCC活性を有するか否か、又はCDC活性を有するか否かは公知の方法により測定され得る（例えば、Current protocols in Immunology, Chapter7. Immunologic studies in humans、Coliganら編(1993)等）。

[0086] 具体的には、まず、エフェクター細胞、補体溶液、標的細胞の調製が実施される。

（１）エフェクター細胞の調製

CBA/Nマウスなどから摘出された脾臓から、RPMI1640培地（Invitrogen）中で脾臓細胞が分離される。10%ウシ胎児血清（FBS、HyClone）を含む同培地で洗浄された当該脾臓細胞の濃度を5×10^{6}/mLに調製することによって、エフェクター細胞が調製され得る。

（２）補体溶液の調製

10% FBS含有培地（Invitrogen）によってBaby Rabbit Complement（CEDARLANE）を10倍に希釈することによって、補体溶液が調製され得る。

（３）標的細胞の調製

[0087] 抗原を発現する細胞を0.2 mCiの^{51}Cr-クロム酸ナトリウム（GEヘルスケアバイオサイエンス）とともに、10% FBS含有DMEM培地中で37℃にて１時間培養することにより該標的細胞が放射性標識され得る。放射性標識後、10% FBS含有RPMI1640培地にて３回洗浄された細胞の濃度を2×10^{5}/mLに調製することによって、当該標的細胞が調製され得る。

[0088] ADCC活性、又はCDC活性は下記に述べる方法により測定され得る。ADCC活性

の測定の場合は、96ウェルU底プレート（Becton Dickinson）に加えられた各50μlずつの標的細胞と抗原結合分子が室温にて15分間反応させられる。その後、エフェクター細胞100μlが加えられた当該プレートが、炭酸ガスインキュベーター内で4時間静置される。抗原結合分子の終濃度は例えば0または10μg/ml等の濃度が設定され得る。静置後、各ウェルから回収された100μlの上清の放射活性が、ガンマカウンター（COBRAII AUTO-GAMMA、MODEL D5005、Packard Instrument Company）を用いて測定される。測定値を用いて細胞傷害活性（%）が(A-C)／(B-C) x 100の計算式に基づいて計算され得る。Aは各試料における放射活性（cpm）、Bは1% NP-40 (nacalai tesque)を加えた試料における放射活性（cpm）、Cは標的細胞のみを含む試料の放射活性（cpm）を表す。

[0089] 一方、CDC活性の測定の場合は、96ウェル平底プレート（Becton Dickinson）に加えられた各50μlずつの標的細胞と抗原結合分子が氷上にて15分間反応させられる。その後、補体溶液100μlが加えられた当該プレートが、炭酸ガスインキュベーター内で４時間静置される。抗原結合分子の終濃度は例えば0または3μg/mL等の濃度が設定され得る。静置後、各ウェルから回収された100μlの上清の放射活性が、ガンマカウンターを用いて測定される。細胞傷害活性はADCC活性の測定と同様に計算され得る。

[0090] また、後述される、化学療法剤、毒性ペプチド或いは放射性化学物質などの細胞傷害性物質が結合された修飾抗原結合分子修飾物も本発明の細胞傷害活性を有する抗原結合分子として好適に使用され得る。このような修飾抗原結合分子（以下、抗原結合分子薬物コンジュゲートと称する。）は、得られた抗原結合分子を化学的に修飾することによって取得され得る。なお、抗原結合分子の修飾方法として、抗体薬物コンジュゲート等の分野においてすでに確立されている方法が適宜使用され得る。また、毒性ペプチドが結合された修飾抗原結合分子は、当該毒性ペプチドをコードする遺伝子と本発明の抗原結合分子をコードする遺伝子がインフレームで連結された融合遺伝子を、適切な宿主細胞中で発現させた後に、当該細胞の培養液から単離することに

よって、取得され得る。

[0091] 中和活性

本発明の非限定な一態様では、低分子化合物（例えば、癌組織特異的化合物、炎症組織特異的化合物、それらの代謝物、等）の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインを含み、当該膜型分子に対する中和活性を有する抗原結合分子を有効成分として含む免疫応答を誘導する医薬組成物が提供される。本発明の非限定な別の一態様では、低分子化合物（例えば、癌組織特異的化合物、炎症組織特異的化合物、それらの代謝物、等）の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインを含み、膜型分子をその細胞膜に発現する細胞に対する細胞傷害活性に加えて、当該膜型分子に対する中和活性を有する抗原結合分子を有効成分として含む免疫応答を誘導する医薬組成物が提供される。一般的に、中和活性とは、ウイルスや毒素など、細胞に対して生物学的活性を有するリガンドの当該生物学的活性を阻害する活性をいう。即ち、中和活性を有する物質とは、当該リガンド又は当該リガンドが結合するレセプターに結合し、当該リガンドとレセプターの結合を阻害する物質をさす。中和活性によりリガンドとの結合を阻止されたレセプターは、当該レセプターを通じた生物学的活性を発揮することができなくなる。抗原結合分子が抗体である場合、このような中和活性を有する抗体は一般に中和抗体と呼ばれる。ある被検物質の中和活性は、リガンドの存在下における生物学的活性をその被検物質の存在又は非存在下の条件の間で比較することにより測定され得る。

[0092] 例えば、IL-6レセプターの主要なリガンドとして考えられているものは配列番号：２７で表されるIL-6が好適に挙げられる。そのアミノ末端が細胞外ドメインを形成するI型膜タンパク質であるIL-6レセプターは、IL-6によって二量体化が誘導されたgp130レセプターとともにヘテロ四量体を形成する（Heinrichら（Biochem. J. (1998) 334, 297-314））。当該ヘテロ四量体の形成によって、gp130レセプターに会合しているJakが活性化される。Jakは自己リン酸化とレセプターのリン酸化を行う。受容体及びJakのリン酸化部位は、St

at3のようなSH2を持つStatファミリーに属する分子や、MAPキナーゼ、PI3/Akt、そのほかのSH2を持つタンパク質やアダプターに対して、結合部位の役割を果たす。次に、gp130レセプターに結合したStatが、Jakによってリン酸化される。リン酸化されたStatは二量体を形成して核内に移行し、標的遺伝子の転写を調節する。JakまたはStatは他のクラスのレセプターを介してシグナルカスケードに関与することもできる。脱制御されたIL-6のシグナルカスケードは、自己免疫疾患の病態や炎症、多発性骨髄腫や前立腺癌などの癌で観察される。癌遺伝子として作用し得るStat3は、多くの癌において恒常的に活性化している。前立腺癌と多発性骨髄腫では、IL-6レセプターからのシグナルカスケードと、上皮成長因子受容体（EGFR）ファミリーメンバーからのシグナルカスケードとの間にクロストークがある（Ishikawaら（J. Clin. Exp. Hematopathol. (2006) 46 (2), 55-66））。

[0093] こうした細胞内のシグナルカスケードは細胞種毎に異なるため、目的とする標的細胞毎に適宜標的分子を設定することができ、上記の因子に限定されるものではない。生体内シグナルの活性化を測定することにより、中和活性を評価することができる。また、生体内シグナルカスケードの下流に存在する標的遺伝子に対する転写誘導作用を指標として、生体内シグナルの活性化を検出することもできる。標的遺伝子の転写活性の変化は、レポーターアッセイの原理によって検出することができる。具体的には、標的遺伝子の転写因子又はプロモーター領域の下流にGFP（Green Fluorescence Protein）やルシフェラーゼなどのレポーター遺伝子を配し、そのレポーター活性を測定することにより、転写活性の変化をレポーター活性として測定することができる。生体内シグナルの活性化の測定キットは市販のものを適宜使用することができる（例えば、Mercury Pathway Profiling Luciferase System (Clontech) 等）。

[0094] 更に、通常は細胞増殖を促進する方向に働くシグナルカスケードに作用するEGFレセプターファミリー等のレセプターリガンドの中和活性を測定する方法として、標的とする細胞の増殖活性を測定することによって、抗原結合分

子の中和活性を評価することができる。例えば、HB-EGF等その増殖がEGFファミリーの成長因子によって促進される細胞の増殖に対する、抗HB-EGF抗体の中和活性に基づく抑制効果を評価又は測定する方法として、以下の方法が好適に使用される。試験管内において当該細胞増殖抑制活性を評価又は測定する方法としては、培地中に添加した[^{3}H]ラベルしたチミジンの生細胞による取り込みをDNA複製能力の指標として測定する方法が用いられる。より簡便な方法としてトリパンブルー等の色素を細胞外に排除する能力を顕微鏡下で計測する色素排除法や、MTT法が用いられる。後者は、生細胞がテトラゾリウム塩であるMTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide)を青色のホルマザン産物へ転換する能力を有することを利用している。より具体的には、被検細胞の培養液にリガンドと共に被検抗体を添加して一定時間を経過した後に、MTT溶液を培養液に加えて一定時間静置することによりMTTを細胞に取り込ませる。その結果、黄色の化合物であるMTTが細胞内のミトコンドリア内のコハク酸脱水素酵素により青色の化合物に変換される。この青色生成物を溶解し呈色させた後にその吸光度を測定することにより生細胞数の指標とするものである。MTT以外に、MTS、XTT、WST-1、WST-8等の試薬も市販されており（nacalai tesqueなど）好適に使用することができる。活性の測定に際しては、対照抗体として抗HB-EGF抗体と同一のアイソタイプを有する抗体で当該細胞増殖抑制活性を有しない結合抗体を、抗HB-EGF抗体と同様に使用して、抗HB-EGF抗体が対照抗体よりも強い細胞増殖抑制活性を示すことにより活性を判定することができる。

[0095] 活性を評価するための細胞として、例えば、その増殖がHB-EGFによって促進される細胞である、卵巣癌細胞であるRMG-1細胞株や、ヒトEGFRの細胞外ドメインとマウスG-CSF受容体の細胞内ドメインをインフレームで融合した融合タンパク質であるhEGFR/mG-CSFRをコードする遺伝子を発現する様に結合したベクターによって形質転換されたマウスBa/F3細胞等も好適に使用され得る。このように、当業者は、活性を評価するための細胞を適宜選択することによって前記の細胞増殖活性の測定に使用することが可能である。

[0096] 抗体

本明細書において、抗体とは、天然のものであるかまたは部分的もしくは完全合成により製造された免疫グロブリンをいう。抗体はそれが天然に存在する血漿や血清等の天然資源や抗体を産生するハイブリドーマ細胞の培養上清から単離され得るし、または遺伝子組換え等の手法を用いることによって部分的にもしくは完全に合成され得る。抗体の例としては免疫グロブリンのアイソタイプおよびそれらのアイソタイプのサブクラスが好適に挙げられる。ヒトの免疫グロブリンとして、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgMの9種類のクラス（アイソタイプ）が知られている。本発明の抗体には、これらのアイソタイプのうちIgG1、IgG2、IgG3、IgG4が含まれ得る。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。また、ヒトIgκ(Kappa)定常領域とヒトIgλ (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。

[0097] 所望の結合活性を有する抗体を作製する方法は当業者において公知である。以下に、IL-6Rに結合する抗体（抗IL-6R抗体）を作製する方法が例示される。IL-6R以外の抗原に結合する抗体も下記の例示に準じて適宜作製され得る。

[0098] 抗IL-6R抗体は、公知の手段を用いてポリクローナルまたはモノクローナル抗体として取得され得る。抗IL-6R抗体としては、哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好適に作製され得る。哺乳動物由来のモノクローナル抗体には、ハイブリドーマにより産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主細胞によって産生されるもの

等が含まれる。なお本願発明のモノクローナル抗体には、「ヒト化抗体」や「キメラ抗体」が含まれる。

[0099] モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、公知技術を使用することによって、例えば以下のように作製され得る。すなわち、IL-6Rタンパク質を感作抗原として使用して、通常の免疫方法にしたがって哺乳動物が免疫される。得られる免疫細胞が通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合される。次に、通常のスクリーニング法によって、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって抗IL-6R抗体を産生するハイブリドーマが選択され得る。

[0100] 具体的には、モノクローナル抗体の作製は例えば以下に示すように行われる。まず、配列番号：２にそのヌクレオチド配列が開示されたIL-6R遺伝子を発現することによって、抗体取得の感作抗原として使用される配列番号：１で表されるIL-6Rタンパク質が取得され得る。すなわち、IL-6Rをコードする遺伝子配列を公知の発現ベクターに挿入することによって適当な宿主細胞が形質転換される。当該宿主細胞中または培養上清中から所望のヒトIL-6Rタンパク質が公知の方法で精製される。培養上清中から可溶型のIL-6Rを取得するためには、例えば、Mullbergら（J. Immunol. (1994) 152 (10), 4958-4968）によって記載されているような可溶型IL-6Rである、配列番号：１で表されるIL-6Rポリペプチド配列のうち、1から357番目のアミノ酸からなるタンパク質が、配列番号：１で表されるIL-6Rタンパク質の代わりに発現される。また、精製した天然のIL-6Rタンパク質もまた同様に感作抗原として使用され得る。

[0101] 哺乳動物に対する免疫に使用する感作抗原として当該精製IL-6Rタンパク質が使用できる。IL-6Rの部分ペプチドもまた感作抗原として使用できる。この際、当該部分ペプチドはヒトIL-6Rのアミノ酸配列より化学合成によっても取得され得る。また、IL-6R遺伝子の一部を発現ベクターに組込んで発現させることによっても取得され得る。さらにはタンパク質分解酵素を用いてIL-6Rタンパク質を分解することによっても取得され得るが、部分ペプチドとして用

いるIL-6Rペプチドの領域および大きさは特に特別の態様に限定されない。好ましい領域は配列番号：１のアミノ酸配列において20-357番目のアミノ酸に相当するアミノ酸配列から任意の配列が選択され得る。感作抗原とするペプチドを構成するアミノ酸の数は少なくとも5以上、例えば6以上、或いは7以上であることが好ましい。より具体的には8～50、好ましくは10～30残基のペプチドが感作抗原として使用され得る。

[0102] また、IL-6Rタンパク質の所望の部分ポリペプチドやペプチドを異なるポリペプチドと融合した融合タンパク質が感作抗原として利用され得る。感作抗原として使用される融合タンパク質を製造するために、例えば、抗体のFc断片やペプチドタグなどが好適に利用され得る。融合タンパク質を発現するベクターは、所望の二種類又はそれ以上のポリペプチド断片をコードする遺伝子がインフレームで融合され、当該融合遺伝子が前記のように発現ベクターに挿入されることにより作製され得る。融合タンパク質の作製方法はMolecular Cloning 2nd ed. (Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58 (1989) Cold Spring Harbor Lab. press) に記載されている。感作抗原として用いられるIL-6Rの取得方法及びそれを用いた免疫方法は、国際公開WO2003/000883、WO2004/022754、WO2006/006693等にも具体的に記載されている。

[0103] 当該感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特定の動物に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましい。一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター、あるいはウサギ、サル等が好適に使用される。

[0104] 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。

[0105] また、所望の抗体を産生するハイブリドーマは、DNA免疫を使用し、以下のようにしても作製され得る。DNA免疫とは、免疫動物中で抗原タンパク質をコードする遺伝子が発現され得るような態様で構築されたベクターDNAが投与された当該免疫動物中で、感作抗原が当該免疫動物の生体内で発現されることによって、免疫刺激が与えられる免疫方法である。蛋白質抗原が免疫動物に投与される一般的な免疫方法と比べて、DNA免疫には、次のような優位性が期待される。

－IL-6Rのような膜蛋白質の構造を維持して免疫刺激が与えられ得る

－免疫抗原を精製する必要が無い

[0106] DNA免疫によって本発明のモノクローナル抗体を得るために、まず、IL-6Rタンパク質を発現するDNAが免疫動物に投与される。IL-6Rをコードする DNAは、PCRなどの公知の方法によって合成され得る。得られたDNAが適当な発現ベクターに挿入され、免疫動物に投与される。発現ベクターとしては、たとえばpcDNA3.1などの市販の発現ベクターが好適に利用され得る。ベクターを生体に投与する方法として、一般的に用いられている方法が利用され得る。たとえば、発現ベクターが吸着した金粒子が、gene gunで免疫動物個体の細胞内に導入されることによってDNA免疫が行われる。さらに、IL-6Rを認識する抗体の作製は国際公開WO2003/104453に記載された方法を用いても作製され得る。

[0107] このように哺乳動物が免疫され、血清中におけるIL-6Rに結合する抗体力価の上昇が確認された後に、哺乳動物から免疫細胞が採取され、細胞融合に供される。好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が使用され得る。

[0108] 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－グアニン－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－アミノプテリン－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。

[0109] 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。

[0110] 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。

[0111] 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。

[0112] 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。

[0113] 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。

[0114] 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。

[0115] 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。

[0116] 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。

[0117] 所望の抗体のスクリーニングおよび単一クローニングが、公知の抗原抗体反応に基づくスクリーニング方法によって好適に実施され得る。例えば、IL-6Rに結合するモノクローナル抗体は、細胞表面に発現したIL-6Rに結合することができる。このようなモノクローナル抗体は、たとえば、FACS（fluorescence activated cell sorting）によってスクリーニングされ得る。FACSは、蛍光抗体と接触させた細胞をレーザー光で解析し、個々の細胞が発する蛍光を測定することによって細胞表面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。

[0118] FACSによって本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングするためには、まずIL-6Rを発現する細胞を調製する。スクリーニングのための好ましい細胞は、IL-6Rを強制発現させた哺乳動物細胞である。宿主細胞として使用した形質転換されていない哺乳動物細胞を対照として用いることによって、細胞表面のIL-6Rに対する抗体の結合活性が選択的に検出され得る。すなわち、宿主細胞に結合せず、IL-6R強制発現細胞に結合する抗体を産生するハイブリドーマを選択することによって、IL-6Rモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが取得され得る。

[0119] あるいは固定化したIL-6R発現細胞に対する抗体の結合活性がELISAの原理にもとづいて評価され得る。たとえば、ELISAプレートのウェルにIL-6R発現細胞が固定化される。ハイブリドーマの培養上清をウェル内の固定化細胞に接触させ、固定化細胞に結合する抗体が検出される。モノクローナル抗体が

マウス由来の場合、細胞に結合した抗体は、抗マウスイムノグロブリン抗体によって検出され得る。これらのスクリーニングによって選択された、抗原に対する結合能を有する所望の抗体を産生するハイブリドーマは、限界希釈法等によりクローニングされ得る。

[0120] 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、当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。

[0121] 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。

[0122] 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。

[0123] たとえば、抗IL-6R抗体を産生するハイブリドーマ細胞から、抗IL-6R抗体の可変領域（V領域）をコードするcDNAが取得される。そのために、通常、まずハイブリドーマから全RNAが抽出される。細胞からmRNAを抽出するための方法として、たとえば次のような方法を利用することができる。

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

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

[0124] 抽出されたmRNAは、mRNA Purification Kit （GEヘルスケアバイオサイエンス製）等を使用して精製され得る。あるいは、QuickPrep mRNA Purification Kit （GEヘルスケアバイオサイエンス製）などのように、細胞から直接全

mRNAを抽出するためのキットも市販されている。このようなキットを用いて、ハイブリドーマからmRNAが取得され得る。得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域をコードするcDNAが合成され得る。cDNAは、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit（生化学工業社製）等によって合成され得る。また、cDNAの合成および増幅のために、SMART RACE cDNA増幅キット（Clontech製）およびPCRを用いた5'-RACE法（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (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。

[0125] 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、当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。

[0126] 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。

[0127] 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。

[0128] 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。

[0129] こうして増幅されたPCR産物を利用して、重鎖と軽鎖の組み合せからなるイムノグロブリンが再構成され得る。再構成されたイムノグロブリンの、IL-6Rに対する結合活性を指標として、所望の抗体がスクリーニングされ得る。たとえばIL-6Rに対する抗体の取得を目的とするとき、抗体のIL-6Rへの結合は、特異的であることがさらに好ましい。IL-6Rに結合する抗体は、たとえば次のようにしてスクリーニングされ得る；

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

（２）IL-6R発現細胞と抗体との結合を検出する工程、および

（３）IL-6R発現細胞に結合する抗体を選択する工程。

[0130] 抗体とIL-6R発現細胞との結合を検出する方法は公知である。具体的には、先に述べたFACSなどの手法によって、抗体とIL-6R発現細胞との結合が検出され得る。抗体の結合活性を評価するためにIL-6R発現細胞の固定標本が適宜利用され得る。

[0131] 結合活性を指標とする抗体のスクリーニング方法として、ファージベクターを利用したパニング法も好適に用いられる。ポリクローナルな抗体発現細胞群より抗体遺伝子を重鎖と軽鎖のサブクラスのライブラリとして取得した場合には、ファージベクターを利用したスクリーニング方法が有利である。重鎖と軽鎖の可変領域をコードする遺伝子は、適当なリンカー配列で連結することによってシングルチェインFv（scFv）を形成することができる。scFvをコードする遺伝子をファージベクターに挿入することにより、scFvを表面に発現するファージが取得され得る。このファージと所望の抗原との接触の

後に、抗原に結合したファージを回収することによって、目的の結合活性を有するscFvをコードするDNAが回収され得る。この操作を必要に応じて繰り返すことにより、所望の結合活性を有するscFvが濃縮され得る。

[0132] 目的とする抗IL-6R抗体のV領域をコードするcDNAが得られた後に、当該cDNAの両末端に挿入した制限酵素サイトを認識する制限酵素によって該cDNAが消化される。好ましい制限酵素は、抗体遺伝子を構成する塩基配列に出現する頻度が低い塩基配列を認識して消化する。更に１コピーの消化断片をベクターに正しい方向で挿入するためには、付着末端を与える制限酵素の挿入が好ましい。上記のように消化された抗IL-6R抗体のV領域をコードするcDNAを適当な発現ベクターに挿入することによって、抗体発現ベクターが取得され得る。このとき、抗体定常領域（C領域）をコードする遺伝子と、前記V領域をコードする遺伝子とがインフレームで融合されれば、キメラ抗体が取得される。ここで、キメラ抗体とは、定常領域と可変領域の由来が異なることをいう。したがって、マウス－ヒトなどの異種キメラ抗体に加え、ヒト－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。

[0133] 抗IL-6Rモノクローナル抗体を製造するために、抗体遺伝子が発現制御領域による制御の下で発現するように発現ベクターに組み込まれる。抗体を発現するための発現制御領域とは、例えば、エンハンサーやプロモーターを含む。また、発現した抗体が細胞外に分泌されるように、適切なシグナル配列がアミノ末端に付加され得る。後に記載される実施例ではシグナル配列として、アミノ酸配列MGWSCIILFLVATATGVHS（配列番号：３）を有するペプチドが使用されているが、これ以外にも適したシグナル配列が付加される。発現され

たポリペプチドは上記配列のカルボキシル末端部分で切断され、切断されたポリペプチドが成熟ポリペプチドとして細胞外に分泌され得る。次いで、この発現ベクターによって適当な宿主細胞が形質転換されることによって、抗IL-6R抗体をコードするDNAを発現する組換え細胞が取得され得る。

[0134] 抗体遺伝子の発現のために、抗体重鎖（H鎖）および軽鎖（L鎖）をコードするDNAは、それぞれ別の発現ベクターに組み込まれる。H鎖とL鎖が組み込まれたベクターによって、同じ宿主細胞に同時に形質転換（co-transfect）されることによって、H鎖とL鎖を備えた抗体分子が発現され得る。あるいはH鎖およびL鎖をコードするDNAが単一の発現ベクターに組み込まれることによって宿主細胞が形質転換され得る（国際公開WO 1994/011523を参照のこと）。

[0135] 単離された抗体遺伝子を適当な宿主に導入することによって抗体を作製するための宿主細胞と発現ベクターの多くの組み合わせが公知である。これらの発現系は、いずれも本発明の抗原結合ドメインを単離するのに応用され得る。真核細胞が宿主細胞として使用される場合、動物細胞、植物細胞、あるいは真菌細胞が適宜使用され得る。具体的には、動物細胞としては、次のような細胞が例示され得る。

（１）哺乳類細胞、：CHO (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)、Hela、Vero、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)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

[0136] 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。

[0137] 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

[0138] 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。

[0139] 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）。

[0140] 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、当該抗原結合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。

[0141] 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。

[0142] 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。

[0143] 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。

[0144] 最終的に３つのCDRと４つのFRが連結されたV領域遺伝子は、その5'末端と3'末端にアニールし適当な制限酵素認識配列を付加されたプライマーによってその全長が増幅される。上記のように得られたDNAとヒト抗体C領域をコードするDNAとをインフレームで融合するように発現ベクター中に挿入することによって、ヒト型抗体発現用ベクターが作成できる。当該組込みベクターを宿主に導入して組換え細胞を樹立した後に、当該組換え細胞を培養し、当該ヒト化抗体をコードするDNAを発現させることによって、当該ヒト化抗体が当該培養細胞の培養物中に産生される（欧州特許公開EP239400、国際公開WO1996/002576参照）。

[0145] 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（Cancer Res., (1993) 53, 851-856）。

[0146] また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物（国際公開WO1993/012227、WO1992/003918、WO1994/002602、WO1994/025585、WO1996/034096、WO1996/033735参照）を免疫動物とし、DNA免疫により所望のヒト抗体が取得され得る。

[0147] さらに、ヒト抗体ライブラリを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体のV領域が一本鎖抗体（scFv）と

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

[0148] ファージディスプレイ法以外にも、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として、無細胞翻訳系を使用する技術、細胞またはウイルス表面に抗原結合分子を提示する技術、エマルジョンを使用する技術等が知られている。例えば、無細胞翻訳系を使用する技術としては、終止コドンの除去等によりリボゾームを介してmRNAと翻訳されたタンパク質の複合体を形成させるリボゾームディスプレイ法、ピューロマイシン等の化合物を用いて遺伝子配列と翻訳されたタンパク質を共有結合させるcDNAディスプレイ法、mRNAディスプレイ法や、核酸に対する結合タンパク質を用いて遺伝子と翻訳されたタンパク質の複合体を形成させるCISディスプレイ法等が使用され得る。また、細胞またはウイルス表面に抗原結合分子を提示する技術としては、ファージディスプレイ法以外にも、E. coliディスプレイ法、グラム陽性菌ディスプレイ法、酵母ディスプレイ法、哺乳類細胞ディスプレイ法、ウイルスディスプレイ法等が使用され得る。エマルジョンを使用する技術としては、エマルジョン中に遺伝子及び翻訳関連分子を内包させることによる、インビトロウイルスディスプレイ法等が使用され得る。これらの方法は既に公知である (Nat Biotechnol. 2000 Dec;18(12):1287-92、Nucleic Acids Res. 2006;34(19):e127、Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Mar 2;1

01(9):2806-10、Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jun 22;101(25):9193-8、Protein Eng Des Sel. 2008 Apr;21(4):247-55、Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Sep 26;97(20):10701-5、MAbs. 2010 Sep-Oct;2(5):508-18、Methods Mol Biol. 2012;911:183-98）。

[0149] また、抗体遺伝子を取得する方法としてBernasconiら（Science (2002) 298, 2199-2202）または国際公開WO2008/081008に記載のようなB細胞クローニング（それぞれの抗体のコード配列の同定およびクローニング、その単離、およびそれぞれの抗体（特に、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4）の作製のための発現ベクター構築のための使用等）の手法が、上記のほか適宜使用され得る。

[0150] また、本発明における抗体の非限定の一態様としては、Ｔ細胞受容体に代えて抗原を認識する抗体またはそのフラグメントと、Ｔ細胞のシグナルドメインの融合体がＴ細胞に組み込まれたキメラ型抗原受容体（Chimeric antigen receptor）ならびに該キメラ型抗原受容体が組み込まれたＴ細胞も挙げることができるが，これに限定されることはない。

[0151] 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。

[0152] 低分子化合物濃度に応じて結合活性の変化する抗原結合ドメイン

低分子化合物として、例えば、標的組織特異的な化合物又は非天然化合物が挙げられる。以下に、標的組織特異的な化合物に依存的な抗原結合ドメインの選択方法等が例示されるが、標的組織特異的な化合物以外の低分子化合物に依存的な抗原結合ドメインの選択方法等も、下記の例に準じて適宜実施

され得る。標的組織特異的な化合物の濃度に応じて、抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン（または当該ドメインを含む抗原結合分子）を取得するために、上記の結合活性の項で示された手法等が適宜適用され得る。非限定な一態様として、以下にその具体例がいくつか例示される。例えば、標的組織特異的な化合物の非存在下における抗原に対する抗原結合ドメイン（または当該ドメインを含む抗原結合分子）の結合活性よりも当該化合物の存在下における抗原に対する抗原結合ドメイン（または当該ドメインを含む抗原結合分子）の結合活性の方が高く変化することを確認するためには、標的組織特異的な化合物の非存在下および存在下における、または低濃度存在下および高濃度存在下における抗原に対する抗原結合ドメイン（または当該ドメインを含む抗原結合分子）の結合活性が比較される。異なる非限定な一態様では、例えば、標的組織特異的な化合物の低濃度存在下における抗原に対する抗原結合ドメイン（または当該ドメインを含む抗原結合分子）の結合活性よりも当該化合物の高濃度存在下における抗原に対する抗原結合ドメイン（または当該ドメインを含む抗原結合分子）の結合活性の方が高く変化することを確認するためには、標的組織特異的な化合物の低濃度存在下および高濃度存在下における抗原に対する抗原結合ドメイン（または当該ドメインを含む抗原結合分子）の結合活性が比較される。

[0153] さらに本発明において、「標的組織特異的な化合物の存在下における抗原に対する結合活性が、当該化合物の非存在下における抗原に対する結合活性よりも高い」という表現は、「抗原結合ドメイン（または当該ドメインを含む抗原結合分子）の標的組織特異的な化合物の非存在下における抗原に対する結合活性が当該化合物の存在下における抗原に対する結合活性よりも低い」と表現することもできる。なお本発明においては、「抗原結合ドメイン（または当該ドメインを含む抗原結合分子）の標的組織特異的な化合物の非存在下における抗原に対する結合活性が当該化合物の存在下における抗原に対する結合活性よりも低い」を「抗原結合ドメイン（または当該ドメインを含む抗原結合分子）の標的組織特異的な化合物の非存在下における抗原に対す

る結合活性が当該化合物の存在下における抗原に対する結合活性よりも弱い」と記載する場合もある。

[0154] さらに本発明において、「標的組織特異的な化合物の高濃度存在下における抗原に対する結合活性が、当該化合物の低濃度存在下における抗原に対する結合活性よりも高い」という表現は、「抗原結合ドメイン（または当該ドメインを含む抗原結合分子）の標的組織特異的な化合物の低濃度存在下における抗原に対する結合活性が当該化合物の高濃度存在下における抗原に対する結合活性よりも低い」と表現することもできる。なお本発明においては、「抗原結合ドメイン（または当該ドメインを含む抗原結合分子）の標的組織特異的な化合物の低濃度存在下における抗原に対する結合活性が当該化合物の高濃度存在下における抗原に対する結合活性よりも低い」を「抗原結合ドメイン（または当該ドメインを含む抗原結合分子）の標的組織特異的な化合物の低濃度存在下における抗原に対する結合活性が当該化合物の高濃度存在下における抗原に対する結合活性よりも弱い」と記載する場合もある。

[0155] 抗原に対する結合活性を測定する際の標的組織特異的な化合物の濃度以外の条件は、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。抗原結合ドメイン（または当該ドメインを含む抗原結合分子）と抗原との結合活性の測定は、抗原が可溶型分子である場合は、抗原結合ドメイン（または当該ドメインを含む抗原結合分子）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分子に対する結合活性を評価することが可能であり、抗原が膜型分子である場合は、抗原を固定化したチップへ、抗原結合ドメインを（または当該ドメインを含む抗原結合分子）アナライトとして流すことで膜型分子に対する結合活性を評価することが可能である。

[0156] 本発明の抗原結合分子に含まれる抗原結合ドメイン（または当該ドメインを含む抗原結合分子）の、標的組織特異的な化合物の非存在下における抗原に対する結合活性が、標的組織特異的な化合物の存在下における抗原に対す

る結合活性よりも弱い限り、当該化合物の非存在下における抗原に対する結合活性と当該化合物の存在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標的組織特異的な化合物の非存在下におけるKD（Dissociation constant：解離定数）と存在下におけるKDの比であるKD（化合物非存在下）/KD（化合物存在下）の値が２以上であり、さらに好ましくはKD（化合物非存在下）/KD（化合物存在下）の値が10以上であり、さらに好ましくはKD（化合物非存在下）/KD（化合物存在下）の値が40以上である。KD（化合物非存在下）/KD（化合物存在下）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。標的組織特異的な化合物の非存在下において、抗原に対する結合活性が観察されない場合には、この上限は無限大の数値となる。

[0157] 本発明の抗原結合分子に含まれる抗原結合ドメイン（または当該ドメインを含む抗原結合分子）の、標的組織特異的な化合物の低濃度存在下における抗原に対する結合活性が、標的組織特異的な化合物の高濃度存在下における抗原に対する結合活性よりも弱い限り、当該化合物の低濃度存在下における抗原に対する結合活性と当該化合物の高濃度存在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標的組織特異的な化合物の低濃度存在下におけるKD（Dissociation constant：解離定数）と高濃度存在下におけるKDの比であるKD（化合物低濃度存在下）/KD（化合物高濃度存在下）の値が２以上であり、さらに好ましくはKD（化合物低濃度存在下）/KD（化合物高濃度存在下）の値が10以上であり、さらに好ましくはKD（化合物低濃度存在下）/KD（化合物高濃度存在下）の値が40以上である。KD（化合物低濃度存在下）/KD（化合物高濃度存在下）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。標的組織特異的な化合物の低濃度存在下において、抗原に対する結合活性が観察されない場合には、この上限は無限大の数値となる。

[0158] 抗原に対する結合活性の値として、抗原が可溶型分子の場合はKD（解離定数）を用いることが可能であるが、抗原が膜型分子の場合は見かけのKD（App

arent 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。

[0159] また、本発明の抗原結合ドメイン（または当該ドメインを含む抗原結合分子）の標的組織特異的な化合物の非存在下における抗原に対する結合活性と存在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、標的組織特異的な化合物の非存在下における抗原に対するkd（解離速度定数）と当該化合物の存在下におけるkd（解離速度定数）の比である、kd（化合物非存在下）/kd（化合物存在下）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（化合物非存在下）/kd（化合物存在下）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。標的組織特異的な化合物の非存在下において、抗原に対する結合活性が観察されない場合には解離も生じないため、この上限は無限大の数値となる。

[0160] また、本発明の抗原結合ドメイン（または当該ドメインを含む抗原結合分子）の標的組織特異的な化合物の低濃度存在下における抗原に対する結合活性と高濃度存在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、標的組織特異的な化合物の低濃度存在下における抗原に対するkd（解離速度定数）と当該化合物の高濃度存在下におけるkd（解離速度定数）の比である、kd（化合物低濃度存在下）/kd（化合物高濃度存在下）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（化合物低濃度存在下）/kd（化合物高濃度存在下）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。標的組織特異的な化合物の低濃度存在下において、抗原に対する結合活性が観察されない場合には解離も生じないため、この上限は無限大の数値となる。

[0161] 抗原結合活性の値として、抗原が可溶型分子の場合はkd（解離速度定数）を用いることが可能であり、抗原が膜型分子の場合は見かけの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、標的組織特異的な化合物のある濃度における抗原結合ドメイン（または当該ドメインを含む抗原結合分子）の抗原に対する結合活性を測定する際は、当該化合物の濃度以外の条件は同一とすることが好ましい。

[0162] 例えば、本発明が提供する一つの態様である、標的組織特異的な化合物の非存在下における抗原に対する結合活性が当該化合物の存在下における抗原に対する結合活性よりも低い抗原結合ドメイン（または当該ドメインを含む抗原結合分子）は、以下の工程(a)～(c)を含む抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）のスクリーニングによって取得され得る。

(a) 標的組織特異的な化合物の非存在下における抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）の抗原結合活性を得る工程、

(b) 標的組織特異的な化合物の存在下における抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）の抗原結合活性を得る工程、

(c) 標的組織特異的な化合物の非存在下における抗原結合活性が、当該化合物の存在下における抗原結合活性より低い抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）を選択する工程。

[0163] 例えば、本発明が提供する一つの態様である、標的組織特異的な化合物の

低濃度存在下における抗原に対する結合活性が当該化合物の高濃度存在下における抗原に対する結合活性よりも低い抗原結合ドメイン（または当該ドメインを含む抗原結合分子）は、以下の工程(a)～(c)を含む抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）のスクリーニングによって取得され得る。

(a) 標的組織特異的な化合物の低濃度存在下における抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）の抗原結合活性を得る工程、

(b) 標的組織特異的な化合物の高濃度存在下における抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）の抗原結合活性を得る工程、

(c) 標的組織特異的な化合物の低濃度存在下における抗原結合活性が、当該化合物の高濃度存在下における抗原結合活性より低い抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）を選択する工程。

[0164] さらに、本発明が提供する一つの態様である、標的組織特異的な化合物の非存在下における抗原に対する結合活性が当該化合物の存在下における抗原に対する結合活性よりも低い抗原結合ドメイン（または当該ドメインを含む抗原結合分子）は、以下の工程(a)～(c)を含む抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）もしくはそれらのライブラリのスクリーニングによって取得され得る。

(a) 標的組織特異的な化合物の存在下における抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）もしくはそれらのライブラリを抗原に接触させる工程、

(b) 前記工程(a)で抗原に結合した抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）を当該化合物の非存在下に置く工程、

(c) 前記工程(b)で解離した抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）を単離する工程。

[0165] さらに、本発明が提供する一つの態様である、標的組織特異的な化合物の低濃度存在下における抗原に対する結合活性が当該化合物の高濃度存在下における抗原に対する結合活性よりも低い抗原結合ドメイン（または当該ドメインを含む抗原結合分子）は、以下の工程(a)～(c)を含む抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）もしくはそれらのライブラリのスクリーニングによ

って取得され得る。

(a) 標的組織特異的な化合物の高濃度存在下における抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）もしくはそれらのライブラリを抗原に接触させる工程、

(b) 前記工程(a)で抗原に結合した抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）を当該化合物の低濃度存在下に置く工程、

(c) 前記工程(b)で解離した抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）を単離する工程。

[0166] また、本発明が提供する一つの態様である、標的組織特異的な化合物の非存在下における抗原に対する結合活性が当該化合物の存在下における抗原に対する結合活性よりも低い抗原結合ドメイン（または当該ドメインを含む抗原結合分子）は、以下の工程(a)～(d)を含む抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）若しくはそれらのライブラリのスクリーニングによって取得され得る。

(a) 標的組織特異的な化合物の非存在下で抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）のライブラリを抗原に接触させる工程、

(b) 前記工程(a)で抗原に結合しない抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）を選択する工程、

(c) 前記工程(b)で選択された抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）を当該化合物の存在下で抗原に結合させる工程、

(d) 前記工程(c)で抗原に結合した抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）を単離する工程。

[0167] また、本発明が提供する一つの態様である、標的組織特異的な化合物の低濃度存在下における抗原に対する結合活性が当該化合物の高濃度存在下における抗原に対する結合活性よりも低い抗原結合ドメイン（または当該ドメインを含む抗原結合分子）は、以下の工程(a)～(d)を含む抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）若しくはそれらのライブラリのスクリーニングによって取得され得る。

(a) 標的組織特異的な化合物の低濃度存在下で抗原結合ドメイン（または抗

原結合分子）のライブラリを抗原に接触させる工程、

(b) 前記工程(a)で抗原に結合しない抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）を選択する工程、

(c) 前記工程(b)で選択された抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）を当該化合物の高濃度存在下で抗原に結合させる工程、

(d) 前記工程(c)で抗原に結合した抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）を単離する工程。

[0168] さらに、本発明が提供する一つの態様である、標的組織特異的な化合物の非存在下における抗原に対する結合活性が当該化合物の存在下における抗原に対する結合活性よりも低い抗原結合ドメイン（または当該ドメインを含む抗原結合分子）は、以下の工程(a)～(c)を含むスクリーニング方法によって取得され得る。

(a) 抗原を固定したカラムに標的組織特異的な化合物の存在下で抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）のライブラリを接触させる工程、

(b) 前記工程(a)でカラムに結合した抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）を当該化合物の非存在下でカラムから溶出する工程、

(c) 前記工程(b)で溶出された抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）を単離する工程。

[0169] さらに、本発明が提供する一つの態様である、標的組織特異的な化合物の低濃度存在下における抗原に対する結合活性が当該化合物の高濃度存在下における抗原に対する結合活性よりも低い抗原結合ドメイン（または当該ドメインを含む抗原結合分子）は、以下の工程(a)～(c)を含むスクリーニング方法によって取得され得る。

(a) 抗原を固定したカラムに標的組織特異的な化合物の高濃度存在下で抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）のライブラリを接触させる工程、

(b) 前記工程(a)でカラムに結合した抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）を当該化合物の低濃度存在下でカラムから溶出する工程、

(c) 前記工程(b)で溶出された抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）を

単離する工程。

[0170] さらに、本発明が提供する一つの態様である、標的組織特異的な化合物の非存在下における抗原に対する結合活性が当該化合物の存在下における抗原に対する結合活性よりも低い抗原結合ドメイン（または当該ドメインを含む抗原結合分子）は、以下の工程(a)～(d)を含むスクリーニング方法によって取得され得る。

(a) 抗原を固定したカラムに標的組織特異的な化合物の非存在下で抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）のライブラリを通過させる工程、

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

(c) 前記工程(b)で回収された抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）を当該化合物の存在下で抗原に結合させる工程、

(d) 前記工程(c)で抗原に結合した抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）を単離する工程。

[0171] さらに、本発明が提供する一つの態様である、標的組織特異的な化合物の低濃度存在下における抗原に対する結合活性が当該化合物の高濃度存在下における抗原に対する結合活性よりも低い抗原結合ドメイン（または当該ドメインを含む抗原結合分子）は、以下の工程(a)～(d)を含むスクリーニング方法によって取得され得る。

(a) 抗原を固定したカラムに標的組織特異的な化合物の低濃度存在下で抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）のライブラリを通過させる工程、

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

(c) 前記工程(b)で回収された抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）を当該化合物の高濃度存在下で抗原に結合させる工程、

(d) 前記工程(c)で抗原に結合した抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）を単離する工程。

[0172] さらに、本発明が提供する一つの態様である、標的組織特異的な化合物の

非存在下における抗原に対する結合活性が当該化合物の存在下における抗原に対する結合活性よりも低い抗原結合ドメイン（または当該ドメインを含む抗原結合分子）は、以下の工程(a)～(d)を含むスクリーニング方法によって取得され得る。

(a) 標的組織特異的な化合物の存在下で抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）のライブラリを抗原に接触させる工程、

(b) 前記工程(a)で抗原に結合した抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）を取得する工程、

(c) 前記工程(b)で取得した抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）を化合物の非存在下に置く工程、

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

[0173] さらに、本発明が提供する一つの態様である、標的組織特異的な化合物の低濃度存在下における抗原に対する結合活性が当該化合物の高濃度存在下における抗原に対する結合活性よりも低い抗原結合ドメイン（または当該ドメインを含む抗原結合分子）は、以下の工程(a)～(d)を含むスクリーニング方法によって取得され得る。

(a) 標的組織特異的な化合物の高濃度存在下で抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）のライブラリを抗原に接触させる工程、

(b) 前記工程(a)で抗原に結合した抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）を取得する工程、

(c) 前記工程(b)で取得した抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）を化合物の低濃度存在下に置く工程、

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

[0174] なお、前記の工程は2回以上繰り返されてもよい。従って、本発明によって、上述のスクリーニング方法において、(a)～(c)あるいは(a)～(d)の工程を2回以上繰り返す工程をさらに含むスクリーニング方法によって取得された、

標的組織特異的な化合物の非存在下における抗原に対する結合活性が当該化合物の存在下における抗原に対する結合活性よりも低い抗原結合ドメイン（または当該ドメインを含む抗原結合分子）または標的組織特異的な化合物の低濃度存在下における抗原に対する結合活性が当該化合物の高濃度存在下における抗原に対する結合活性よりも低い抗原結合ドメイン（または当該ドメインを含む抗原結合分子）が提供される。(a)～(c)あるいは(a)～(d)の工程が繰り返される回数は特に限定されないが、通常10回以内である。

[0175] 本発明のスクリーニング方法において、標的組織特的化合物は、非標的組織と比較して異なる濃度（例えば、高濃度または低濃度）で標的組織に存在している等の定量的な標的組織特異性で規定される化合物であり得る。例えば、標的組織特異的化合物は任意の濃度で差示的に存在する。しかし、一般に標的組織特異的化合物は、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも100%、少なくとも110%、少なくとも120%、少なくとも130%、少なくとも140%、少なくとも150%、少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも10^3倍、少なくとも10^4倍、少なくとも10^5倍、少なくとも10^6倍、またはそれ以上であって、無限大（すなわち非標的組織に不存在である場合）までの増加する濃度で、存在することが可能である。

[0176] 低濃度および高濃度を区別する閾値は化合物に応じて適宜設定することが可能である。例えば、ATPまたはアデノシンの閾値の非限定な一態様では、閾値として、低濃度条件は10 nM、1 nM、100 pM、10 pM、1 pMまたは0 Mの値から適宜設定され得る。設定された閾値に応じて、高濃度条件は各閾値の少なくとも110%、少なくとも120%、少なくとも130%、少なくとも140%、少なくとも150%、少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも

50倍、少なくとも100倍、少なくとも10^3倍、少なくとも10^4倍、少なくとも10^5倍、少なくとも10^6倍の値から適宜設定され得る。また、PGE2の非限定な一態様では、閾値として、低濃度条件は10 pM、1 pM、100 fM、10 fM、1 fMまたは0 Mの値から適宜設定され得る。設定された閾値に応じて、高濃度条件は各閾値の少なくとも110%、少なくとも120%、少なくとも130%、少なくとも140%、少なくとも150%、少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも10^3倍、少なくとも10^4倍、少なくとも10^5倍、少なくとも10^6倍の値から適宜設定され得る。さらに、Kynurenineの非限定な一態様では、閾値として、低濃度条件は10μM、1μM、100 nM、10 nM、1 nMまたは0 Mの値から適宜設定され得る。設定された閾値に応じて、高濃度条件は各閾値の少なくとも110%、少なくとも120%、少なくとも130%、少なくとも140%、少なくとも150%、少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも10^3倍、少なくとも10^4倍、少なくとも10^5倍、少なくとも10^6倍の値から適宜設定され得る。

[0177] 抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）の抗原結合活性は当業者に公知の方法により測定することが可能であり、標的組織特異的な化合物の濃度以外の条件については当業者が適宜決定することが可能である。抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）の抗原結合活性は、KD（Dissociation constant：解離定数）、見かけのKD（Apparent dissociation constant：見かけの解離定数）、解離速度であるkd（Dissociation rate：解離速度定数）、又は見かけのkd（Apparent dissociation：見かけの解離速度定数）等として評価することが可能である。これらは当業者公知の方法で測定することが可能であり、例えばBiacore（GE healthcare）、スキャッチャードプロット、FACS等を用いることが可能である。

[0178] 本発明において、標的組織特異的な化合物の存在下における抗原結合活性が当該化合物の非存在下における抗原結合活性より高い抗原結合ドメイン又は抗体を選択する工程は、標的組織特異的な化合物の非存在下における抗原

結合活性が当該化合物の存在下における抗原結合活性より低い抗原結合ドメイン又は抗体を選択する工程と同じ意味である。

[0179] また、本発明において、標的組織特異的な化合物の高濃度存在下における抗原結合活性が当該化合物の低濃度存在下における抗原結合活性より高い抗原結合ドメイン又は抗体を選択する工程は、標的組織特異的な化合物の非存在下における抗原結合活性が当該化合物の存在下における抗原結合活性より低い抗原結合ドメイン又は抗体を選択する工程と同じ意味である。

[0180] 標的組織特異的な化合物の非存在下における抗原に対する結合活性が当該化合物の存在下における抗原に対する結合活性よりも低い限り、当該化合物の存在下における抗原結合活性と非存在下における抗原結合活性の差は特に限定されないが、好ましくは当該化合物の存在下における抗原結合活性が非存在下における抗原結合活性の2倍以上であり、さらに好ましくは10倍以上であり、より好ましくは40倍以上である。当該抗原結合活性の差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倍、1000倍、10000倍等、いかなる値でもよい。標的組織特異的な化合物の非存在下において、抗原に対する結合活性が観察されない場合には、この上限は無限大の数値となる。

[0181] 前記のスクリーニング方法によりスクリーニングされる本発明の抗原結合ドメイン（または当該ドメインを含む抗原結合分子）はいかなる抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）でもよく、例えば上述の抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）をスクリーニングすることが可能である。例えば、天然の配列を有する抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）をスクリーニングしてもよいし、アミノ酸配列が置換された抗原結合ドメイン（または抗原結合分子）をスクリーニングしてもよい。

[0182] ライブラリ

ある一態様によれば、本発明の抗原結合ドメイン（または当該ドメインを含む抗原結合分子）は、低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基が抗原結合ドメ

インに含まれている互いに配列の異なる複数の抗原結合分子から主としてなるライブラリから取得され得る。低分子化合物の非限定の一態様として、標的組織特異的な化合物又は非天然化合物が挙げられる。標的組織特異的な化合物の例としては（１）乳酸、コハク酸、クエン酸等の解糖系、またはクレブス回路の一次代謝産物、（２）アラニン、グルタミン酸、またはアスパラギン酸等のアミノ酸、（３）キヌレニン、およびその代謝産物である、アントラニル酸、3-ヒドロキシキヌレニン、およびキヌレン酸等のアミノ酸の代謝産物、（４）プロスタグランジンE2等のアラキドン酸の代謝産物、ならびに（５）アデノシン、アデノシン3リン酸（ATP）、アデノシン2リン酸（ADP）、アデノシン1リン酸（AMP）等のプリン環構造を有するヌクレオシド等が例示される。以下では、そのような標的組織特異的化合物としてのアデノシン、および/またはATPに応じ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について例示されるが、アデノシン、および/またはATP以外の低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性を変化させる抗原結合分子のライブラリにも下記の例に準じて適宜適用され得る。

[0183] 本明細書において「ライブラリ」とはそれぞれ異なる配列を有する複数の抗原結合分子若しくは抗原結合分子を含む複数の融合ポリペプチド、またはこれらの分子若しくはポリペプチドをコードする核酸若しくはポリヌクレオチドのセットをいう。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。

[0184] 本明細書における「ライブラリ」の態様として、低分子存在下で標的抗原に結合し、低分子非存在下では標的抗原に結合しない抗原結合分子を効率的に取得できるライブラリ（低分子依存性）を提供するだけではなく、低分子非存在化で標的抗原に結合し、低分子存在化では標的抗原に結合しない抗体を

効率的に取得できるライブラリ（低分子逆依存性）も提供することができる。

[0185] 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ポリペプチドが作製され得る。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。

[0186] 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ポリペプチドであって互いに配列の異なる複数の融合ポリペプチド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ポリペプチドであって互いに配列の異なる複数の融合ポリペプチド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ポリペプチド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ポリペプチド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。

[0187] 本明細書においては、互いに配列の異なる複数の抗原結合分子という記載における「互いに配列の異なる」との用語は、ライブラリ中の個々の抗原結合分子の配列が相互に異なることを意味する。すなわち、ライブラリ中における互いに異なる配列の数は、ライブラリ中の配列の異なる独立クローンの数が反映され、「ライブラリサイズ」と指称される場合もある。通常のファージディスプレイライブラリでは10^6から10^{12}であり、リボゾームディスプレイ法等の公知の技術を適用することによってライブラリサイズを10^{14}まで拡大することが可能である。しかしながら、ファージライブラリのパンニング選択時に使用されるファージ粒子の実際の数は、通常、ライブラリサイズよりも10ないし10,000倍大きい。この過剰倍数は、「ライブラリ当量数」とも呼ばれるが、同じアミノ酸配列を有する個々のクローンが10ないし10,000存在し得ることを表す。よって本発明における「互いに配列の異なる」との用語はライブラリ当量数が除外されたライブラリ中の個々の抗原結合分子の配列が相互に異なること、より具体的には互いに配列の異なる抗原結合分子が10^6から10^{14}分子、好ましくは10^7から10^{12}分子、さらに好ましくは10^8から10^{11}、特に好ましくは10^8から10^{10}存在することを意味する。

[0188] また、本発明の、複数の抗原結合ドメインまたは抗原結合ドメインを含む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。

[0189] 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、低分子化合物（例えば、標的組織特異的化合物）の濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性が異なっている抗原結合分子の数が反映される。具体的には、そのような結合活性を示す抗原結合分子がライブラリ中に少なくとも10^4分子存在することが好ましい。また、より好ましくは、本発明の抗原結合ドメインはそのような結合活性を示す抗原結合分子が少なくとも10^5分子存在するライブラリから取得され得る。さらに好ましくは、本発明の抗原結合ドメインはそのような結合活性を示す抗原結合分子が少なくとも10^6分子存在するライブラリから取得され得る。特に好ましくは、本発明の抗原結合ドメインはそのような結合活性を示す抗原結合分子が少なくとも10^7分子存在するライブラリから取得され得る。また、好ましくは、本発明の抗原結合ドメインはそのような結合活性を示す抗原結合分子が少なくとも10^8分子存在するライブラリから取得され得る。別の表現では、ライブラリ中の配列の異なる独立クローンの数のうち、アデノシン、および/またはATPの存在または非存在によって抗原に対する抗原結合ドメインの結合活性が異なっている抗原結合分子の割合としても好適に表現され得る。具体的には、本発明の抗原結合ドメインは、そのような結合活性を示す抗原結合分子がライブラリ中の配列の異なる独立クローンの数の10^{-6}%から80%、好ましくは10^{-5}%から60%、より好ましくは10^{-4}%から40%含まれるライブラリから取得され得る。融合ポリペプチド、ポリヌクレオチド分子またはベクターの場合も、上記と同様、分子の数や分子全体における割合で表現され得る。また、ウイルスの場合も、上記と同様、ウイルス個体の数や

個体全体における割合で表現され得る。本発明の非限定の一態様として、複数の抗原結合分子が結合する抗原が1種類の場合、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分子，100分子，1000分子，10^4分子，10^5分子，10^6分子，10^7分子又は10^8分子存在することが好ましい。また、より好ましくは、本発明の抗原結合ドメインはそのような結合活性を示す抗原結合分子が少なくとも10分子存在するライブラリから取得され得る。さらに好ましくは、本発明の抗原結合ドメインはそのような結合活性を示す抗原結合分子が少なくとも100分子存在するライブラリから取得され得る。特に好ましくは、本発明の抗原結合ドメインはそのような結合活性を示す抗原結合分子が少なくとも1000分子存在するライブラリから取得され得る。

[0190] 本発明の一態様として、 以下の(a)および(b)の工程：

(a) 低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン又は低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合ドメインにおいて、以下の(i)乃至(iii)のいずれか一つ以上を満たすアミノ酸部位を特定する工程；

(i) 当該低分子化合物に対する結合に関与していない１または複数のアミノ酸部位；

(ii) 親抗原結合ドメインが属する動物種の抗体のレパートリーとしてアミノ酸出現頻度の多様性のある１または複数のアミノ酸部位；

(iii) Canonical structureの形成に重要でない１または複数のアミノ酸部位；および

(b) 前記抗原結合ドメインにおいて、未改変体をコードする核酸及び工程(a)で特定された１または複数のアミノ酸部位に改変を有する、互いに配列が異なる、前記抗原結合ドメインまたは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子の複数の改変体それぞれをコードする核酸を含むライブラリを設計する工程、

を含む方法によって製造されるライブラリが提供される。

[0191] 本発明における「低分子化合物に対する結合に関与していない１または複数

のアミノ酸部位」は、低分子化合物と抗体の複合体の結晶構造解析、NMRを用いた立体構造解析、又はアミノ酸の変異導入等の手法によって同定することができる。本発明の非限定の一態様として、低分子と抗体の複合体の結晶構造解析から、低分子との結合に関与していない抗体の残基を同定することができる。ここで、「低分子との結合に関与」とは、抗体のH鎖又はL鎖を形成するアミノ酸における側鎖又は主鎖の原子と低分子化合物の原子が、結合活性に効果を及ぼしうる距離で分子間相互作用を形成している状態、又は、あるアミノ酸残基がCDRループ等の立体構造を低分子化合物が結合する際のコンフォメーションに安定化させる等の間接的な影響を含む、低分子化合物の結合に寄与している状態、ならびにその双方を満たす状態のことをいう。

本明細書における「分子間相互作用を形成している状態」については，例えば低分子と抗体の複合体の結晶構造解析から、抗体のH鎖又はL鎖を形成するアミノ酸の側鎖又は主鎖を構成する非水素原子と低分子化合物を構成する非水素原子との原子間距離をもとに判定できる。たとえば，上記原子間距離は3.0Å、3.2Å、3.4Å、3.6Å、3.8Å、4.0Å、4.2Å、4.4Å、4.6Å、4.8Å又は5.0Å以内が好ましいがこれに限定されることはない。更に好ましい上記原子間距離は3.6Å、3.8Å、4.0Å又は4.2Å以内である。

より詳しくは、立体構造上での原子間距離と形成される分子間相互作用の種類ならびに原子の種類の情報をもとに直接的に相互作用している可能性が判定できる。さらに正確にはAlaやGlyへの改変といったアミノ酸残基の変異導入が低分子化合物の活性に与える影響から判断することができるが、これに限定されるわけではない。

本明細書における「間接的に影響している状態」についても，例えば、低分子と抗体の複合体の立体構造から各アミノ酸残基のコンフォメーションや周囲の残基との分子間相互作用の状況を詳細に解析することで、低分子の結合に間接的に影響しているかどうかを推定できるが、より正確にはAlaやGlyへの改変といったアミノ酸残基の変異導入が低分子化合物の活性に与える影響から判断することができる。

本発明の一態様として、低分子の結合に関与していないと同定された残基を他のアミノ酸に置換しても、化合物への結合を適切な程度に維持できるアミノ酸を選択することができる。これにより、選択された残基において選択されたアミノ酸が出現するライブラリを設計することができる。この場合において、低分子化合物の結合に関与していないと同定された残基が互いに異なるアミノ酸に置換された抗原結合分子の集合となるように、複数の抗原結合分子から主としてなるライブラリを設計することが可能である。

別の一態様では、低分子化合物に対する結合に関与していないアミノ酸部位の判定は、低分子化合物との結合に関与しているアミノ酸部位のうちから選択される、いずれか一つ以上のアミノ酸部位以外のアミノ酸部位であるとも考えることができる。

[0192] 本発明における非限定の一態様として、「低分子化合物に対する結合に関与していない１または複数のアミノ酸部位」は、アミノ酸の変異導入の方法によって同定することができる。例えば、可変領域のアミノ酸を網羅的に改変して、個々の改変体の低分子への結合が、Biacore等を用いた公知の方法で測定され、個々の改変体の低分子に対する結合活性（アフィニティ）がKD値として算出される。当該KD値が親配列である未改変体のKD値と比較され、一定の基準を上回る結合を示す改変箇所が、低分子化合物に対する結合に関与していないアミノ酸部位と判定される。例えば、Biacore等の公知の方法を用いた測定の結果、個々の改変体の低分子に対する結合活性（アフィニティ）がKD値として算出され、重鎖の部位としては改変によって低分子結合能が未改変体の1/100、1/50、1/10、1/9、1/8、1/7、1/6、1/5、1/4、1/3又は1/2の結合能を下回らないもの、および軽鎖の部位としては改変によって低分子結合能が未改変体の1/100、1/50、1/10、1/9、1/8、1/7、1/6、1/5、1/4、1/3又は1/2の結合能を下回らないものが低分子化合物に対する結合に関与していないアミノ酸部位と判定されるが、上記基準に限定されるものではない。あるいは、親配列である未改変体のKD値との比較ではなく、個々の改変体の低分子に対する結合活性（アフィニティ）がKD値として算出され、重鎖の部位

としては10mM、1mM、100uM、10uM、1uM、100nM、10nM、1nM、100pM、10pM、又は1pMの結合能を下回らないもの、および軽鎖の部位としては10mM、1mM、100uM、10uM、1uM、100nM、10nM、1nM、100pM、10pM、又は1pMの結合能を下回らないものが低分子化合物に対する結合に関与していないアミノ酸部位と判定されるが、上記基準に限定されるものではない。

未改変及び改変体の低分子に対する結合活性の測定は、当業者公知の方法（Biacore、ELISA、ECL等）から適宜選択して実施することができる。

別の一態様では、低分子化合物に対する結合に関与していないアミノ酸部位の判定は、低分子化合物との結合に関与しているアミノ酸部位のうちから選択される、いずれか一つ以上のアミノ酸部位以外のアミノ酸部位であるとも考えることができる。

[0193] 本発明における「互いに配列が異なる、前記抗原結合ドメインまたは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子の複数の改変体それぞれをコードする核酸を含むライブラリを設計する」とは、例えばNNKやTRIM Library等（Gonzalez-Munoz A et al. MAbs 2012, Lee CV et al. J Mol Biol. 2004, Knappik A. et al. J Mol Biol. 2000, Tiller T et al. MAbs 2013）の公知のライブラリ技術を利用して、特定部位のアミノ酸を所望のアミノ酸に改変されている抗原結合ドメインまたは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子の複数の改変体を含むライブラリを設計することが包含されるが、特にこの態様に限定されるものではない。

[0194] 本発明における「１または複数のアミノ酸」とは、特にアミノ酸の数を限定されることはなく、２種類以上のアミノ酸、５種類以上のアミノ酸、１０種類以上のアミノ酸、１５種類以上のアミノ酸又は２０種類のアミノ酸であってもよい。

[0195] 本発明における「アミノ酸出現頻度の多様性のあるアミノ酸部位」とは、親抗体（親抗原結合ドメイン）が属する動物種の抗体のレパートリーとして、1%以上の出現頻度で存在が認められるアミノ酸の種類として2種以上が認められるアミノ酸部位のことをいう。

[0196] 本発明における「親抗原結合ドメイン」とは、ライブラリ作成の鋳型となる、低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン、もしくは低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合ドメインのことをいう。

[0197] 本発明における「親抗原結合ドメインが属する動物種の抗体のレパートリー」とは、該当する親抗原結合ドメインが由来する動物種において遺伝子上で認められる抗体遺伝子配列のレパートリーのことを言う。一例として、これに限定されるわけではないが、該当する親抗原結合ドメインがヒト由来の場合、親抗原結合ドメインが属する動物種の抗体のレパートリーとは、ヒトの遺伝子上において認められる抗体遺伝子配列のレパートリーのことを指し、該当する親抗原結合ドメインがウサギ由来の場合は、親抗原結合ドメインが属する動物種の抗体のレパートリーとは、ウサギの遺伝子上において認められる抗体遺伝子配列のレパートリーのことを指す。ただし、遺伝子上に存在したとしても、終始コドンの存在やフレームシフトによって実際に抗体して発現されることのない配列は含まれない。

[0198] 該当する親抗原結合ドメインが非ヒト動物由来である場合、常法に従いこれをヒト化することが可能であり、この手法については当業者に広く公知である（欧州特許公開EP239400、国際公開WO1996/002576、WO1993/012227、WO1992/003918、WO1994/002602、WO1994/025585、WO1996/034096、WO1996/033735、WO1992/001047、WO1992/020791、WO1993/006213、WO1993/011236、WO1993/019172、WO1995/001438、WO1995/015388、Cancer Res., (1993) 53, 851-856、BBRC., (2013) 436(3):543-50等）。該当する親抗原結合ドメインを常法に従ってヒト化した後にライブラリ化を実施する場合、本発明における「親抗原結合ドメインが属する動物種の抗体のレパートリー」においては、ヒト化を実施する前の抗原結合ドメインと、ヒト化した後の抗原結合ドメインの双方を親抗原結合ドメインとして扱うことができ、それに伴い同一動物種としてヒト化を実施する前の抗原結合ドメインが由来する動物種と、ヒトの双方のレパートリーを適用することができる。一例として、これに限定される

わけではないが、ヒト化を実施する前の抗原結合ドメインがウサギに由来する場合、親抗原結合ドメインが属する動物種の抗体のレパートリーとは、ヒトおよび/またはウサギの遺伝子上において認められる抗体遺伝子配列のレパートリーのことを指す。ただし、遺伝子上に存在したとしても、終始コドンの存在やフレームシフトによって実際に抗体して発現されることのない配列は含まれない。

[0199] 親抗原結合ドメインの属する動物種の抗体のレパートリーは、一例として、これに限定されるわけではないが、既知のデータベースを参照することによって調査が可能である。アミノ酸出現頻度の多様性のある部位は一般的にCDR領域に存在する。一態様では、公知のおよび/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。

[0200] また、別の一態様としては、親抗原結合ドメインの属する動物種の抗体のレパートリーは、該当する生物種から取得した抗体遺伝子をクローニングし、配列を解析することによっても調査が可能である。一例として、これに限定されるわけではないが、ヒトの抗体レパートリーについては、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の配列を解析することによって調査され得る (Gejimaら (Human Antibodies (2002) 11,121-129) およびCardosoら (Scand. J. Immunol. (2000) 51, 337-344))。レパートリーの調査の際には、少なくとも100種類、好ましくは200種類、さらに好ましくは400種類以上の配列について解析が行われることが望ましい。

[0201] 本発明における親抗原結合ドメインの属する動物種の抗体のレパートリー

は、より好ましくは、これに限定されるわけではないが、親抗原結合ドメインの属するジャームラインのサブグループについて調査が実施されることが望ましい。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基づいてサブグループに分類され得る（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）。一例として、ヒトの抗体においては重鎖可変領域については7つのサブグループ、Vκについては7つのサブグループ、Vλについては10種類のサブグループが報告されており、各アミノ酸部位について、親抗原結合ドメインが属しているサブグループ内におけるアミノ酸のレパートリーを解析することによって調査され得るが、特にこの態様に限定されるものではない。

[0202] 本発明における「Canonical structureの形成に重要でないアミノ酸部位」において、抗体のcanonical structureとは、抗体重鎖及び軽鎖の主にCDR1、２の立体構造のクラスタリングを示しており、構造は抗体のサブグループや、CDRの長さや配列によって分類されることができる。各canonical structureにおいて、構造の維持に重要な残基は既に公知であり、Chothiaら(J. Mol. Biol.（1992）227, 799-817)、Ａl-Lazikaniら(J. Mol. Biol.（1997）273, 927-948)、Tomlinsonら(J. Mol. Biol.(1992) 227, 776-798)等の報告を参照することにより、該当する親抗原結合分子が分類されるcanonical structure、及びその構造に重要な残基を特定することが可能である。

また、抗体以外の抗原結合ドメインにおいても、構造の維持に重要な残基が存在していることは公知であり、これに限定されるわけではないが、作製した変異体の構造解析等により、個々の抗原結合ドメインにおいてcanonical structureの形成に重要でないアミノ酸部位を同定することが可能である。

[0203] 本発明のライブラリの他の一つの態様としては以下のライブラリが挙げら

れる。

以下の(a)乃至(d)の工程：

(a) 低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン又は低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合ドメインにおいて、以下の(i)乃至(iii)のいずれか一つ以上を満たすアミノ酸部位を特定する工程；

(i) 当該低分子化合物に対する結合に関与していない１または複数のアミノ酸部位；

(ii) 親抗原結合ドメインが属する動物種の抗体のレパートリーとしてアミノ酸出現頻度の多様性のある１または複数のアミノ酸部位；

(iii) Canonical structureの形成に重要でない１または複数のアミノ酸部位、

(b) 工程(a)で特定された１または複数のアミノ酸部位に改変を有する、互いに配列が異なる、前記抗原結合ドメインまたは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子の複数の改変体を作製する工程、

(c) 前記それぞれの改変体の当該低分子化合物に対する結合活性に実質的に変化をもたらさない１または複数のアミノ酸の改変を特定する工程；および

(d) 未改変体をコードする核酸及び工程(c)で特定された１または複数のアミノ酸に改変を有する、互いに配列が異なる、前記抗原結合ドメインまたは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子の複数の改変体をコードする核酸を含むライブラリを製造する工程、

を含む方法によって製造されるライブラリ。

[0204] 本発明における「互いに配列が異なる、前記抗原結合ドメインまたは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子の複数の改変体を作製する工程」において、工程(a)で特定されたアミノ酸部位のうち、CDR1及びCDR2の部位に関しては生殖細胞系列での出現頻度が10%以上、9%以上、8%以上、7%以上、6%以上、5%以上、4%以上、3%以上、2%以上又は1%以上のアミノ酸に置換することができ

、CDR3の部位に関しては生殖細胞系列での出現頻度が10%以上、9%以上、8%以上、7%以上、6%以上、5%以上、4%以上、3%以上、2%以上又は1%以上のアミノ酸に置換して、個々の改変体を作製することもできるが、これに限定されるものではない。

[0205] 本発明における「複数の改変体」とは、親配列である抗原結合ドメインの未改変体に対して、少なくとも１又はそれ以上のアミノ酸が置換されている抗原結合ドメインの各々異なる改変体をいう。

[0206] 本発明における「それぞれの改変体の当該低分子化合物に対する結合活性に実質的に変化をもたらさない１または複数のアミノ酸の改変を特定する工程」とは、以下の如くの意味を有する。例えば、個々の改変体の低分子への結合が、Biacore等を用いた公知の方法で測定され、個々の改変体の低分子に対する結合活性（アフィニティ）がKD値として算出される。当該KD値が親配列である未改変体のKD値と比較され、一定の基準を上回る結合を示す改変箇所が、改変可能部位と判定され、当該部位に置いて置換されたアミノ酸はライブラリ化が可能なアミノ酸（ライブラリにおいて出現させるフレキシブル残基）と判定することができるが、これに限定されるものではない。あるいは、親配列である未改変体のKD値との比較ではなく、個々の改変体のKD値が一定の基準を上回る結合を示す改変箇所が、改変可能部位と判定され、当該部位に置いて置換されたアミノ酸はライブラリ化が可能なアミノ酸（ライブラリにおいて出現させるフレキシブル残基）と判定することができるが、これに限定されるものではない。

[0207] 本発明におけるライブラリ化が可能なアミノ酸を判定する際の「一定の基準を上回る結合を示す改変箇所」とは、以下の如くの意味を有する。例えば、Biacore等の公知の方法を用いた測定の結果、個々の改変体の低分子に対する結合活性（アフィニティ）がKD値として算出され、重鎖の部位としては改変によって低分子結合能が未改変体の1/100、1/50、1/10、1/9、1/8、1/7、1/6、1/5、1/4、1/3又は1/2の結合能を下回らないもの、および軽鎖の部位としては改変によって低分子結合能が未改変体の1/100、1/50、1/10、1/9、1/8

、1/7、1/6、1/5、1/4、1/3又は1/2の結合能を下回らないものが改変可能部位と判定され、当該部位において置換されたアミノ酸はライブラリ化が可能なアミノ酸箇所と判定することが可能であるが、上記基準に限定されるものではない。あるいは、親配列である未改変体のKD値との比較ではなく、個々の改変体の低分子に対する結合活性（アフィニティ）がKD値として算出され、重鎖の部位としては10mM、1mM、100uM、10uM、1uM、100nM、10nM、1nM、100pM、10pM、又は1pMの結合能を下回らないもの、および軽鎖の部位としては10mM、1mM、100uM、10uM、1uM、100nM、10nM、1nM、100pM、10pM、又は1pMの結合能を下回らないものが改変可能部位と判定され、当該部位において置換されたアミノ酸はライブラリ化が可能なアミノ酸箇所と判定することが可能であるが、上記基準に限定されるものではない。

未改変及び改変体の低分子に対する結合活性の測定は、当業者公知の方法（Biacore、ELISA、ECL等）から適宜選択して実施することができる。

別の一態様では、低分子化合物に対する結合に関与していないアミノ酸部位の判定は、低分子化合物との結合に関与しているアミノ酸部位のうちから選択される、いずれか一つ以上のアミノ酸部位以外のアミノ酸部位であるとも考えることができる。

[0208] 本発明における「未改変体をコードする核酸及び工程(d)で特定された１または複数のアミノ酸に改変を有する、互いに配列が異なる、前記抗原結合ドメインまたは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子の複数の改変体を含むライブラリを製造する工程」とは、工程(d)で特定された各アミノ酸の特定部位におけるアミノ酸出現頻度が等しくなるように（たとえばアミノ酸レパートリーが10種類の場合は各アミノ酸は10%出現するように）ライブラリを構築する態様を包含するが、これに限定されるものではない。

[0209] 本発明のライブラリの他の一つの態様としては以下のライブラリが挙げられる。

以下の１）および２）の工程：

１）低分子化合物に対する結合活性を有する抗原結合分子を複数含むライブ

ラリと低分子化合物とを接触させる工程、および

２）該ライブラリから低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合分子の複数の改変体をコードする核酸を濃縮する工程、

を含む方法によって製造される、ライブラリ。

さらに他の態様として、該ライブラリは、抗原結合分子が抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗原結合分子であるライブラリであって、以下の１）乃至３）のいずれか１つの工程を含む方法によって製造されることができる。

１）該ライブラリが、重鎖可変領域に位置するアミノ酸が改変された１又は複数の改変体をコードする核酸を含むライブラリであって、該ライブラリから低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合分子の複数の改変体をコードする核酸を濃縮し、ライブラリを設計する工程；

２）該ライブラリが、軽鎖可変領域に位置するアミノ酸が改変された１又は複数の改変体をコードする核酸を含むライブラリであって、該ライブラリから低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合分子の複数の改変体をコードする核酸を濃縮し、ライブラリを設計する工程；

３）工程１）及び工程２）のそれぞれの可変領域ライブラリから濃縮された抗原結合分子をコードする核酸を組み合わせることによって、ライブラリを設計する工程。

[0210] 本発明における「濃縮する」とは、濃縮作業実施前のライブラリとの比較において、目的の活性を有する改変体をコードする核酸の存在比率を上昇させることを言う。一例として、これに限定されるわけではないが、低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合分子の改変体をコードする核酸を濃縮するとは、パンニングにより低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合分子の改変体をコードする核酸の存在比率を上昇させることによって達成可能である。より具体的には、一例として、複数の抗原結合分子を含むライブラリがファージディスプレイ法により表面に提示されたファージを該低分子化合物と接触させ、洗浄作業により結合活性を有していない分子を提示

しているファージ及び分子を提示していないファージを除去したのち、結合を維持している抗原結合分子を提示しているファージのみを回収することによって、パンニングにより低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合分子の改変体をコードする核酸の存在比率を上昇させることが可能であるが、これに限定されることはない。より具体的には、目的の活性を有する改変体をコードする核酸の存在比率が、濃縮作業実施前のライブラリとの比較において、1.1倍以上上昇することが好ましい。より好ましくは、目的の活性を有する改変体をコードする核酸の存在比率を、1.2倍以上、1.5倍以上、2倍以上、4倍以上、10倍以上、25倍以上、100倍以上上昇させることにより、本発明に記載のライブラリを製造することが可能である。

[0211] ライブラリの製造方法

本願発明はまた、上記に説明した本願発明に包含される様々な態様の「ライブラリ」を製造する方法に関する。

本願発明に係る「ライブラリの製造方法」は、以下に例示するようないずれかの特定の方法に限定されるものではなく、上述した本願発明の「ライブラリ」を製造し得る方法であればいずれの方法も包含される。

本願発明に係る「ライブラリの製造方法」としては、例えば、以下に例示するような方法を挙げることができる。

なお、以下に例示する「ライブラリの製造方法」における各特定事項は、上記で本願発明の「ライブラリ」について詳述したとおりの技術的意義を有する。

[0212] （例１）

以下の(a)および(b)の工程を含む、

（i）互いに配列の異なる複数の抗原結合ドメイン若しくは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子；又は

（ii）当該互いに配列の異なる複数の抗原結合ドメイン若しくは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子をコードする核酸、

から主としてなるライブラリであって、前記抗原結合分子ドメインまたは抗

原結合分子は、低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインまたは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子であることを特徴とする、ライブラリ、

を製造する方法：

(a) 低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン又は低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合ドメインにおいて、以下の(i)乃至(iii)のいずれか一つ以上を満たすアミノ酸部位を特定する工程；

(i) 当該低分子化合物に対する結合に関与していない１または複数のアミノ酸部位；

(ii) 親抗原結合ドメインが属する動物種の抗体のレパートリーとしてアミノ酸出現頻度の多様性のある１または複数のアミノ酸部位；

(iii) Canonical structureの形成に重要でない１または複数のアミノ酸部位；および

(b) 前記抗原結合ドメインにおいて、未改変体をコードする核酸及び工程(a)で特定された１または複数のアミノ酸部位に改変を有する、互いに配列が異なる、前記抗原結合ドメインまたは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子の複数の改変体それぞれをコードする核酸を含むライブラリを設計する工程

。

[0213] （例２）

以下の(a)乃至(d)の工程を含む、

(i) 互いに配列の異なる複数の抗原結合ドメイン若しくは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子；又は

(ii) 当該互いに配列の異なる複数の抗原結合ドメイン若しくは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子をコードする核酸、

から主としてなるライブラリであって、前記抗原結合分子ドメインまたは抗原結合分子は、低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインまたは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子であること

を特徴とする、ライブラリ、

を製造する方法：

(a) 低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン又は低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合ドメインにおいて、以下の(i)乃至(iii)のいずれか一つ以上を満たすアミノ酸部位を特定する工程；

(i) 当該低分子化合物に対する結合に関与していない１または複数のアミノ酸部位；

(ii) 親抗原結合ドメインが属する動物種の抗体のレパートリーとしてアミノ酸出現頻度の多様性のある１または複数のアミノ酸部位；

(iii) Canonical structureの形成に重要でない１または複数のアミノ酸部位、

(b) 工程(a)で特定された１または複数のアミノ酸部位に改変を有する、互いに配列が異なる、前記抗原結合ドメインまたは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子の複数の改変体を作製する工程、

(c) 前記それぞれの改変体の当該低分子化合物に対する結合活性に実質的に変化をもたらさない１または複数のアミノ酸の改変を特定する工程；および

(d) 未改変体をコードする核酸及び工程(c)で特定された１または複数のアミノ酸に改変を有する、互いに配列が異なる、前記抗原結合ドメインまたは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子の複数の改変体をコードする核酸を含むライブラリを製造する工程。

[0214] （例３）

以下の１）および２）の工程を含む、

(i) 互いに配列の異なる複数の抗原結合ドメイン若しくは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子；又は

(ii) 当該互いに配列の異なる複数の抗原結合ドメイン若しくは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子をコードする核酸、

から主としてなるライブラリであって、前記抗原結合分子ドメインまたは抗原結合分子は、低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインまたは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子であることを特徴とする、ライブラリ、

を製造する方法：

１）低分子化合物に対する結合活性を有する抗原結合分子を複数含むライブラリと低分子化合物とを接触させる工程、および

２）該ライブラリから低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合分子の複数の改変体をコードする核酸を濃縮する工程。

[0215] （例４）

以下の１）乃至３）のいずれか１つの工程を含む、

（ｉ）互いに配列の異なる複数の抗原結合ドメイン若しくは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子；又は

（ｉｉ）当該互いに配列の異なる複数の抗原結合ドメイン若しくは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子をコードする核酸、

から主としてなるライブラリであって、前記抗原結合分子ドメインまたは抗原結合分子は、低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインまたは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子であることを特徴とする、ライブラリ、

を製造する方法：

１）前記（例３）記載のライブラリが、重鎖可変領域に位置するアミノ酸が改変された１又は複数の改変体をコードする核酸を含むライブラリであって、該ライブラリから低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合分子の複数の改変体をコードする核酸を濃縮し、ライブラリを設計する工程；

２）前記（例３）記載のライブラリが、軽鎖可変領域に位置するアミノ酸が改変された１又は複数の改変体をコードする核酸を含むライブラリであって、該ライブラリから低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合分子の複数の改変体をコードする核酸を濃縮し、ライブラリを設計する工程；

３）工程１）及び工程２）のそれぞれの可変領域ライブラリから濃縮された抗原結合分子をコードする核酸を組み合わせることによって、ライブラリを設計する工程。

[0216]（例５）

前記（例１）乃至（例４）のいずれかに記載のライブラリの製造方法であって、抗原結合分子が、抗原結合ドメインとウイルスコートタンパク質の少なくとも一部との融合ポリペプチドであることを特徴とする、ライブラリの製造方法。

[0217]（例６）

前記（例１）乃至（例４）のいずれかに記載のライブラリの製造方法であって、前記抗原結合分子が、抗体の重鎖及び軽鎖を含む抗原結合分子であり、前記重鎖および/または軽鎖の合成ライブラリを設計する工程をさらに含む、ライブラリの製造方法。

[0218]（例７）

前記抗体の重鎖及び／又は軽鎖が、生殖細胞系列由来のフレームワーク配列を含むことを特徴とする、前記（例６）のライブラリの製造方法。

[0219]（例８）

前記低分子化合物が、標的組織特異的な化合物又は非天然化合物である、前記（例１）乃至（例７）のいずれかに記載のライブラリの製造方法。

[0220]（例９）

前記標的組織が、癌組織又は炎症性組織である、前記（例１）乃至（例８）のいずれかに記載のライブラリの製造方法。

[0221]（例１０）

前記癌組織特異的化合物が、プリン環構造を有するヌクレオシド、アミノ酸およびその代謝産物、脂質およびその代謝産物、糖代謝の一次代謝産物、ならびにニコチンアミドおよびその代謝産物からなる群から選択される少なくとも一つの化合物である、前記（例９）に記載のライブラリの製造方法。

[0222]（例１１）

前記低分子化合物が、キヌレニン、アデノシン、アデノシン１リン酸、アデノシン２リン酸、又はアデノシン３リン酸である、前記（例１）乃至（例１０）のいずれかに記載のライブラリの製造方法。

[0223]（例１２）

前記低分子化合物との結合に関与していないアミノ酸部位が、以下から選択されるいずれか一つ以上のアミノ酸以外である、前記（例１）乃至（例１１）のいずれかに記載のライブラリの製造方法ライブラリの製造方法：

H鎖：97、100c、 101、 94、 95、 100d、 100e、 33、 50、 52、 56、 57、 58、 99、 100、 100a、54、 55（Kabatナンバリング）；

L鎖：49、55、95c、 96、95a、 95b（Kabatナンバリング）。

[0224] ライブラリ（その他の態様）

本発明における低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインを取得することができるライブラリの一つの態様としては以下のライブラリが挙げられる。

（i）互いに配列の異なる複数の抗原結合ドメイン若しくは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子；又は

（ii）当該互いに配列の異なる複数の抗原結合ドメイン若しくは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子をコードする核酸、

から主としてなるライブラリであって、前記抗原結合分子ドメインまたは抗原結合分子は、低分子化合物に対する結合活性を有する抗原結合ドメインまたは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子であることを特徴とする、ライブラリ。

本態様のライブラリとしては、1.2×10^{8}以上の多様性を有することが好ましい。

本態様における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、低分子化合物（例えば、標的組織特異的化合物）に結合活性を有す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。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、低分子の存在または非存在によって抗原に対する抗原結合ドメインの結合活性が異なっている抗原結合分子の割合としても好適に表現され得る。具体的には、本発明の抗原結合ドメインは、そのような結合活性を示す抗原結合分子がライブラリ中の配列の異なる独立クローンの数の10^{-6}%%から80%、又は10^{-5}%から60%、好ましくは10^{-4}%から40%、より好ましくは10^{-3}%から40%、さらに好ましくは10^{-2}%から40%含まれるライブラリから取得され得る。融合ポリペプチド、ポリヌクレオチド分子またはベクターの場合も、上記と同様、分子の数や分子全体における割合で表現され得る。また、ウイルスの場合も、上記と同様、ウイルス個体の数や個体全体における割合で表現され得る。

[0225] 本発明における低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインを取得することができるライブラリの一つの態様としては以下のライブラリが挙げられる。

（i）互いに配列の異なる複数の抗体分子；又は

（ii）当該互いに配列の異なる複数の抗体分子をコードする核酸、

から主としてなるライブラリであって、前記抗体分子は、低分子化合物に対する結合活性を有する抗体分子であり、以下の(i)乃至(vi)のいずれか一つ以上を満たす多様性；

(i) 重鎖CDR1の多様性が13以上

(ii) 重鎖CDR2の多様性が129以上

(iii) 重鎖CDR3の多様性が5以上

(iv) 軽鎖CDR1の多様性が193以上

(v) 軽鎖CDR2の多様性が7以上

(vi) 軽鎖CDR3の多様性が17以上

を有することを特徴とする、ライブラリ。

本態様における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、低分子化合物（例えば、標的組織特異的化合物）に結合活性を有す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。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、低分子の存在または非存在によって抗原に対する抗原結合ドメインの結合活性が異なっている抗原結合分子の割合としても好適に表現され得る。具体的には、本発明の抗原結合ドメインは、そのような結合活性を示す抗原結合分子がライブラリ中の配列の異なる独立クローンの数の10^{-6}%%から80%、又は10^{-5}%から60%、好ましくは10^{-4}%から40%、より好ましくは10^{-3}%から40%、さらに好ましくは10^{-2}%から40%含まれるライブラリから取得され得る。融合ポリペプチド、ポリヌクレオチド分子またはベクターの場合も、上記と同様、分子の数や分子全体における割合で表現され得る。また、ウイルスの場合も、上記と同様、ウイルス個体の数や個体全体における割合で表現され得る。

[0226] 本発明における低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインを取得することができるライブラリの一つの態様としては以下のライブラリが挙げられる。

（i）互いに配列の異なる複数の抗原結合ドメイン若しくは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子；又は

（ii）当該互いに配列の異なる複数の抗原結合ドメイン若しくは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子をコードする核酸、

から主としてなるライブラリであって、前記抗原結合分子ドメインまたは抗原結合分子は、低分子化合物に対する結合活性を有する抗原結合ドメインまたは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子であり、低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインまたは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子を取得するためのライブラリ。

本態様における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、低分子化合物（例えば、標的組織特異的化合物）に結合活性を有す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。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、低分子の存在または非存在によって抗原に対する抗原結合ドメインの結合活性が異なっている抗原結合分子の割合としても好適に表現され得る。具体的には、本発明の抗原結合ドメインは、そのような結合活性を示す抗原結合分子がライブラリ中の配列の異なる独立クローンの数の10^{-6}%%から80%、又は10^{-5}%から60%、好ましくは10^{-4}%から40%、より好ましくは10^{-3}%から40%、さらに好ましくは10^{-2}%から40%含まれるライブラリから取得され得る。融合ポリペプチド、ポリヌクレオチド分子またはベクターの場合も、上記と同様、分子の数や分子全体における割合で表現され得る。また、ウイルスの場合も、上記と同様、ウイルス個体の数や個体全体における割合で表現され得る。

[0227] 低分子の存在もしくは非存在によって抗原に対する抗原結合ドメインの結合活性を変化させるアミノ酸

本発明においてライブラリを製造する際に用いられる鋳型テンプレート（低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン又は低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合ドメイン）の取得方法（スクリーニング方法）に関し、これらの抗原結合ドメイン等はどのように調製されてもよく、あらかじめ存在している抗原結合ドメイン又は抗体、あらかじめ存在しているライブラリ（ファージライブラリ等）、動物への免疫から得られたハイブリドーマや免疫動物からのB細胞から作製された抗体又はライブラリ、例えばこれに限定されるものではないが、低分子化合物の一態様としてのアデノシンまたはATPと適切に連結された免疫原性が高いT細胞エピトープペプチドのようなアジュバント作用剤との連結剤（conjugate）によって免疫された動物のB細胞等の免疫細胞から作製された抗体またはライ

ブラリ等を用いることが可能である 。当該T細胞エピトープペプチドの非限定な一例として、Tetanus toxin由来のp30ヘルパーペプチド（配列番号：４で表され、Fragment C（FrC）とも指称される）等が好適に挙げられる。

[0228] 前記のスクリーニング方法によって取得される本発明の抗原結合ドメイン又は抗体の調製法の非限定の1態様として、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、細胞膜に発現する糖たんぱく質であるfibronectin中のタンパク質に結合するドメインである10Fn3ドメインを含むAdnectin、ProteinAの58アミノ酸からなる3つのヘリックスの束（bundle）を構成するIgG結合ドメインをscaffoldとするAffibody、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）、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、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等よりなるライブラリを用いることが可能である。

本発明の抗原結合ドメインの好適な例として、抗体の重鎖および軽鎖の可変領域を含む抗原結合ドメインが挙げられる。こうした抗原結合ドメインの例としては、「scFv（single chain Fv）」、「単鎖抗体（single chain antibody）」、「Fv」、「scFv2（single chain Fv 2）」、「Fab」または「F(ab')2」またはIgG等が好適に挙げられ、これらより成るライブラリを用いることも可能である。

[0229] さらに、前記のスクリーニング方法によって取得される本発明の抗原結合

ドメイン又は抗体の調製法の非限定の1態様として、前記のライブラリを用いて、パンニングにより低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合ドメイン又は抗体を調製する手法を用いることが可能である。ライブラリとしては、これに限定されないが、ファージディスプレイライブラリ、リボゾームディスプレイライブラリ、mRNAディスプレイライブラリ、cDNAディスプレイライブラリ、CISディスプレイライブラリ、E. coliディスプレイライブラリ、グラム陽性菌ディスプレイライブラリ、酵母ディスプレイライブラリ、哺乳類細胞ディスプレイライブラリ、ウイルスディスプレイライブラリ、インビトロウイルスディスプレイライブラリ等を用いることが可能である。

[0230] 前記パンニングにより低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合ドメイン又は抗体を調製する手法の1態様として、ビーズ等の担体に固相化された低分子化合物を使用することが可能である。固相化された低分子化合物は、化学的にリンカーを介してビオチンと接続された状態で合成された低分子化合物を、ストレプトアビジンやニュートラアビジンが固相化されたビーズもしくはプレートと接触させる手法や、ウシ血清アルブミン（BSA）等のアジュバントと共有結合により接続された低分子化合物を、疎水相互作用によりビーズもしくはプレートに接着させる手法等により作製することが可能だがこれに限定されない。これらの方法は既に公知である（J Immunol Methods. 2003 Sep;280(1-2):139-55、BMC Biotechnol. 2009 Jan 29;9:6. doi: 10.1186/1472-6750-9-6）。これらの、固相化された低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合ドメイン又は抗体を回収することにより、低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合ドメイン又は抗体を調製することが可能となる。

[0231] または、前記パンニングにより低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合ドメイン又は抗体を調製する手法の別の1態様として、蛍光標識された低分子化合物や、ビオチン標識された低分子化合物と蛍光標識されたストレプトアビジン（もしくはニュートラアビジンまたはアビジン）を使用することが可能である。細胞等の表面に提示されたライブラリに対して当該蛍光標

識された低分子化合物、もしくはビオチン標識された低分子化合物と蛍光標識されたストレプトアビジン（もしくはニュートラアビジンまたはアビジン）を接触させたのちに、fluorescence activated cell sorting(FACS)法を使用することによって、当該低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合ドメイン又は抗体を調製することが可能となる。これらの方法は既に公知である（Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Sep 26;97(20):10701-5.）。

また、前記のスクリーニング方法によって取得される本発明の抗原結合ドメイン又は抗体の調製法の非限定の1態様として、あらかじめ存在している低分子化合物に結合活性を有する抗原結合ドメインを用いることが可能である。例えば、これに限定されるわけではないが、アデノシン及び／ATPを例にした場合、ATPに結合活性を有するキナーゼファミリーに属する分子を抗原結合ドメインとして用いることができ、またアデノシンに結合活性を有するアデノシンデアミナーゼファミリーに属する分子を抗原結合ドメインとして用いることができる。これらのATPないしはアデノシンの結合に関与しない部分をライブラリ化することによって、ATPないしはアデノシン濃度依存的に抗原に結合する抗原結合分子を取得することが可能である。

[0232] 非抗体様タンパク質を使用した抗原結合ドメインの取得法として、これに限定されるわけではないが、該非抗体様タンパク質のループ形成部位や、αヘリックスの表面残基等を使用したライブラリを用いることが可能である。このようなライブラリの構築法は既に公知である（Nat Biotechnol. 2004 May;22(5):575-82、J Mol Biol. 1998 Dec 11;284(4):1141-51.、Nat Biotechnol. 1997 Aug;15(8):772-7）。さらに、上記のように構築されたライブラリを用いて、パンニングにより低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合ドメインを取得する技術も公知である。一例として、構築されたライブラリが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。ウシ血清アルブミンやビオチン等と接続された低分子化合物に結合する結合ドメインを発現するファージが、ビーズやイムノチューブ、プレート等を用いて選択され得る。このような低分子化合物に結合活性を有する非抗体様抗原結合ド

メインの取得法は既に公知である（Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Mar 2;96(5):1898-903）。さらに、これらの低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合ドメインに対して、これに限定されないが結晶構造を解析することや、変異体を作製し結合活性を評価することによって、低分子化合物への結合に関与していないアミノ酸部位や、canonical structureの形成に重要でないアミノ酸部位を特定することが可能である（J Mol Biol. 2003 Jul 4;330(2):385-96、Proteins. 2003 Oct 1;53(1):121-9）。このようにして特定されたアミノ酸部位に対して多様性を導入することで、本発明に記載のライブラリを構築することが可能である。さらに、本発明における別の一態様として、アミノ酸部位を限定したライブラリを使用することも可能である。一例として、これに限定されるわけではないが、非抗体様抗原結合ドメインとして報告されている、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においては、低分子化合物に対する結合に使用されるアミノ酸部位と、タンパク質に対する結合に使用されるアミノ酸部位が異なることが知られており、それぞれに対する結合に関与できるアミノ酸部位を改変した互いに異なるライブラリが使用可能であることが公知である（FEBS Lett. 2014 Jan 21;588(2):213-8）。そのため、低分子化合物に対する結合ドメインを取得可能なライブラリから該低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合ドメインを取得した後、取得した該低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合ドメインに対して、タンパク質に対して結合活性を有する抗原結合ドメインを取得するために使用されているアミノ酸部位に多様性を導入することにより本発明のライブラリを構築することが可能である。より具体的には、ヒトリポカリン２（Human lipocalin2, Lcn2）においては、V33、L36、I41、Y52、T54、S68、L70、W79、R81、K134、T136、Y138各アミノ酸部位が低分子化合物結合ドメイン取得用ライブラリの多様性導入部位として使用することが可能であり（J Am Chem Soc. 2009 Mar 18;

131(10):3565-76）、また同様にA40、L42、E44、K46、D47、Q49、K50、L70、R72、K73、D77、W79、P101、G102、L103、K125、S127、Q128、R130、Y132各アミノ酸部位がタンパク質結合ドメイン取得用ライブラリの多様性導入部位として使用することが可能であることが公知である（Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 May 19;106(20):8198-203）。そのため、まずV33、L36、I41、Y52、T54、S68、L70、W79、R81、K134、T136、Y138各アミノ酸部位に多様性を持たせた抗原結合ドメインを含むライブラリを用いて、該低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合ドメインを取得したのち、取得した該低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合ドメインに対して、A40、L42、E44、K46、D47、Q49、K50、R72、K73、D77、P101、G102、L103、K125、S127、Q128、R130、Y132各アミノ酸部位に多様性を導入することによって、本発明に記載のライブラリを構築することが可能であるがこれに限定されることはない。リポカリン分子以外の非抗体様抗原結合ドメイン及び抗体に関しても、上述したライブラリの構築方法を適宜参照することにより、当業者が本発明におけるライブラリを製造することが可能である。また、別の一態様としては、低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合ドメインを利用することが可能である。一例として、ATP、ADP、AMP及びアデノシンに対して結合活性を有することが公知である、リポカリンファミリーに属するRhodnius prolixus aggregation inhibitor1(RPAI-1)を利用することが可能である（J Biol Chem. 2000 Apr 28;275(17):12639-50、Biochemistry. 2002 Mar 19;41(11):3810-8）。これに限定されないが該抗原結合ドメインの結晶構造を解析することや、変異体を作製し結合活性を評価することによって、低分子化合物への結合に関与していないアミノ酸部位や、canonical structureの形成に重要でないアミノ酸部位を特定することが可能である。このようにして特定されたアミノ酸部位に多様性を導入することにより、本発明に記載のライブラリを構築することが可能である。ATP、ADP、AMP及びアデノシンの他にも、ヒスタミンや、セロトニン、アドレナリン、ノルアドレナリン等様々な低分子化合物に対して結合活性を有するリポカリンファミリーに属する抗原結合ドメイ

ンの存在が公知であり（J Biol Chem. 2003 Feb 14;278(7):4611-7、Expert Rev Clin Immunol. 2007 Jul;3(4):491-501）、これらを利用することで各種低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合ドメインを用いた、本発明に記載のライブラリを構築することが可能であるがこれに限定されることはない。

その他の非抗体様抗原結合ドメイン及び抗体に関しても、上述したライブラリの構築方法を適宜参照することにより、当業者が本発明におけるライブラリを製造することが可能である。

[0233] 本発明の非限定の1態様として、アデノシン及び／またはATPを例にして、以下詳細に説明するが、アデノシン及び／またはATP以外の低分子に関しても、下記の例に準じて適宜適用される。前記のようにアデノシンおよび/またはATPの存在もしくは非存在によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させるアミノ酸としては、アデノシンおよび/またはATP結合モチーフを形成するアミノ酸が例示され得る。前記のアミノ酸が含まれる抗原結合ドメイン中のアミノ酸の位置は特定の位置に限定されず、アデノシンおよび/またはATPの存在もしくは非存在によって抗原に対する抗原結合ドメインの結合活性を変化させる限り、抗原結合ドメインを形成する重鎖可変領域または軽鎖可変領域中のいずれの位置でもあり得る。すなわち、本発明の抗原結合ドメインは、アデノシンおよび/またはATPの存在もしくは非存在によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させるアミノ酸が重鎖の抗原結合ドメインに含まれている互いに配列の異なる抗原結合分子から主としてなるライブラリから取得され得る。非限定な一態様では、本発明の抗原結合ドメインは、アデノシンおよび/またはATPの存在もしくは非存在によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させるアミノ酸が重鎖のCDR1、CDR2、および/またはCDR3に含まれている互いに配列の異なる抗原結合分子から主としてなるライブラリから取得され得る。非限定な別の一態様では、本発明の抗原結合ドメインは、アデノシンおよび/またはATPの存在もしくは非存在によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させるアミノ酸が重鎖のFR1、FR

2、FR3および/またはFR4に含まれている互いに配列の異なる抗原結合分子から主としてなるライブラリから取得され得る。

[0234] また、本発明の一態様では、本発明の抗原結合ドメインは、アデノシンおよび/またはATPの存在もしくは非存在によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させるアミノ酸が重鎖および/または軽鎖の抗原結合ドメインに含まれている互いに配列の異なる抗原結合分子から主としてなるライブラリから取得され得る。非限定な一態様では、本発明の抗原結合ドメインは、アデノシンおよび/またはATPの存在もしくは非存在によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させるアミノ酸が重鎖および/または軽鎖のCDR1、CDR2、および/またはCDR3に含まれている互いに配列の異なる抗原結合分子から主としてなるライブラリから取得され得る。非限定な別の一態様では、本発明の抗原結合ドメインは、アデノシンおよび/またはATPの存在もしくは非存在によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させるアミノ酸が重鎖および/または軽鎖のFR1、FR2、FR3および/またはFR4に含まれている互いに配列の異なる抗原結合分子から主としてなるライブラリから取得され得る。

[0235] そうしたアミノ酸の非限定の一態様として、重鎖可変領域に含まれる52位、52a位、53位、96位、100a位、または100c位のアミノ酸のうちいずれかひとつ以上のアミノ酸等が例示され得る。またこのようなアミノ酸の非限定の一態様として、重鎖可変領域に含まれる52位のSer、52a位のSer、53位のArg、96位のGly、100a位のLeu、100c位のTrp等のアミノ酸のうちいずれかひとつ以上のアミノ酸が例示され得る。

[0236] 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アデノシンおよび/またはATPの存在もしくは非存在によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させるアミノ酸が重鎖および/または軽鎖の抗原結合ドメインに含まれている限り、どのようなフレームワーク配列も使用され得る。フレームワーク配列の起源は、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。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。具体的には、本発明のフレームワーク配列は、生殖細胞系列の配列と少なくとも50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、又は100%以上の相同性を有することが好ましい。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。また、本発明の抗原結合分子のフレームワーク配列が、置換されている配列である場合も、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。そのような置換されている配列の例として、とくに、ヒトの生殖細胞系フレームワーク配列の一部のアミノ酸が、アデノシンおよび/またはATPの存在もしくは非存在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に置換されている配列が挙げられる。

[0237] 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. Genetic

s（1994）7，162-168））。 7つのサブグループに分類されるVκ、10のサブグループに分類されるVλ、7つのサブグループに分類されるVHから好適な生殖細胞系列の配列が適宜選択され得る。

[0238] 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。

[0239] 完全にヒト型のVκ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。

[0240] 完全にヒト型のVλ配列は、下記のみに限定されるものではないが、例えばVL1サブグループに分類されるV1-2、V1-3、V1-4、V1-5、V1-7、V1-9、V1-11

、V1-13、V1-16、V1-17、V1-18、V1-19、V1-20、V1-22、VL1サブグループに分類されるV2-1、V2-6、V2-7、V2-8、V2-11、V2-13、V2-14、V2-15、V2-17、V2-19、VL3サブグループに分類されるV3-2、V3-3、V3-4、VL4サブグループに分類されるV4-1、V4-2、V4-3、V4-4、V4-6、VL5サブグループに分類されるV5-1、V5-2、V5-4、V5-6等（Kawasakiら（Genome Res.（1997）7，250-261））が好適に挙げられる。

[0241] 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「アデノシンおよび/またはATPの存在もしくは非存在によって抗原に対する抗原結合ドメインの結合活性を変化させる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「アデノシンおよび/またはATPの存在もしくは非存在によって抗原に対する抗原結合ドメインの結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基」と共に使用される完全にヒト型のフレームワークの例としては、これだけに限定されるわけではないが、ほかにもKOL、NEWM、REI、EU、TUR、TEI、LAY、POM等が挙げられる（例えば、前記のKabatら（1991)およびWuら（J. Exp. Med.（1970）132，211-250））。

[0242] 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い。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。

[0243] 本発明の、アデノシンおよび/またはATPの存在もしくは非存在によって抗原に対する抗原結合ドメインの結合活性を変化させるアミノ酸が前記の可変領域配列の配列、重鎖可変領域または軽鎖可変領域の配列、もしくはCDR配列または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. U.S.A. (1985) 82, 488-492））やOverlap extension PCR等の公知の方法が適宜採用され得る。

[0244] 例えばアデノシンおよび/またはATPの存在もしくは非存在によって抗原に対する抗原結合ドメインの結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基が予め含まれているCDR配列および/または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。

[0245] また、前記のアデノシンまたはATPの存在もしくは非存在によって抗原に対する抗原結合ドメインの結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基が予め含まれているCDR配列および/またはフレームワーク配列として選択された重鎖および/または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、組織特異的化合物の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。フレキシブル残基およびその残基を他のどのアミノ酸に置換してライブラリ化することができるかは、アデノシンおよび/またはATPと抗体の複合体の結晶構造解析や変異導入によって同定することができる。例えば、アデノシンおよび/またはATPと抗体の複合体の結晶構造解析から、アデノシンおよび/またはATPの結合に関与していない抗体の残基を同定することができる。アデノシンお

よび/またはATPの結合に関与していないと同定された残基を他のアミノ酸を置換しても、化合物への結合を適切な程度に維持できるアミノ酸を選択することができる。これにより、選択された残基において選択されたアミノ酸が出現するライブラリを設計することができる。この場合において、アデノシンおよび/またはATPの結合に関与していないと同定された残基が互いに異なるアミノ酸に置換された抗原結合分子の集合となるように、複数の抗原結合分子から主としてなるライブラリを設計することが可能である。すなわち、互いに異なるアミノ酸に置換された個々のフレキシブル残基を組み合わせることにより、当該フレキシブル残基が含まれる抗原結合分子の配列の多様性がもたらされる。

[0246] また、アデノシンおよび/またはATPの結合に関与すると同定された残基の少なくとも一つは、当該残基および当該残基と異なる残基から選択される任意の残基になるように、これらの残基を含む抗原結合分子がデザインされ得る。アデノシンおよび/またはATPの結合に関与すると同定されるアミノ酸の非限定の一態様として、重鎖可変領域に含まれる52位、52a位、53位、96位、100a位、または100c位のアミノ酸のうちいずれかひとつ以上のアミノ酸等が例示され得る。またこのようなアミノ酸の非限定の一態様として、重鎖可変領域に含まれる52位のSer、52a位のSer、53位のArg、96位のGly、100a位のLeu、100c位のTrp等のアミノ酸のうちいずれかひとつ以上のアミノ酸が例示され得る。例えば、前記の100a位のLeuがアデノシンおよび/またはATPの結合に関与すると同定される場合、ライブラリに含まれる抗原結合分子の100a位のアミノ酸残基は、Leuに加え、His、Met、Leu、Arg、Trp、またはTyrのいずれかのフレキシブル残基から選択されるアミノ酸残基であり得る。

[0247] 前記のフレキシブル残基の非限定の一態様として、重鎖可変領域に含まれる31位、32位、33位、35位、50位、55位、56位、57位、58位、59位、95位、96位、97位、98位、99位、100位、100a位、および100b位のアミノ酸が例示され得る。そうしたアミノ酸の別の非限定の一態様として、軽鎖可変領域に含まれる26位、27位、27a位、27b位、27c位、28位、29位、31位、32位、50位、

51位、52位、53位、54位、55位、89位、90位、91位、92位、93位、94位、95a位、96位、および97位のアミノ酸が例示され得る。

[0248] 前記のフレキシブル残基の非限定の一態様として、重鎖可変領域に含まれるアミノ酸であって；

31位のアミノ酸がAsp、Gly、Asn、Ser、Arg、またはThrのいずれか、

32位のアミノ酸がAla、Phe、His、Asn、Ser、またはTyrのいずれか、

33位のアミノ酸がAla、Glu、Asp、Gly、Phe、Ile、His、Lys、Met、Leu、Asn、Gln、Pro、Ser、Arg、Trp、Val、Tyr、またはThrのいずれか、

35位のアミノ酸がHis、Ser、Thr、Tyr、またはAsnのいずれか、

50位のアミノ酸がAla、Glu、Asp、Gly、Phe、Ile、His、Lys、Met、Leu、Asn、Gln、Pro、Arg、Thr、Trp、Val、Tyr、またはSerのいずれか、

55位のアミノ酸がAla、Glu、Asp、Gly、Leu、Thr、Ser、Arg、またはAsnのいずれか、

56位のアミノ酸がAla、Glu、Asp、Gly、Phe、Ile、His、Lys、Met、Leu、Gln、Pro、Ser、Thr、Trp、Val、またはTyrのいずれか、

57位のアミノ酸がAla、Lys、Arg、Thr、またはIleのいずれか、

58位のアミノ酸がAsp、Gly、Phe、His、Ser、Thr、Tyr、またはAsnのいずれか、

59位のアミノ酸がLeu、またはTyrのいずれか、

95位のアミノ酸がAla、Ile、Lys、Met、Leu、Arg、Trp、Val、Tyr、またはPheのいずれか、

96位のアミノ酸がAla、Asp、Asn、またはSerのいずれか、

97位のアミノ酸がAla、Asp、Gly、Ile、His、Lys、Met、Leu、Asn、Ser、Val、Tyr、またはArgのいずれか、

98位のアミノ酸がAla、Glu、Asp、Gly、Phe、Ile、His、Met、Leu、Asn、Gln、Pro、Ser、Arg、Thr、Trp、Val、Tyr、またはLysのいずれか、

99位のアミノ酸がAla、Glu、Asp、Phe、His、Lys、Asn、Gln、Ser、Arg、Trp、Val、Tyr、またはGlyのいずれか、

100位のアミノ酸がAla、Glu、Gly、Phe、Ile、His、Lys、Met、Leu、Asn、Gln、Pro、Ser、Arg、Thr、Trp、Val、Tyr、またはAspのいずれか、

100a位のアミノ酸がAla、Phe、Ile、His、Lys、Met、Arg、Trp、Val、またはTyrのいずれか、もしくは

100b位のアミノ酸がAla、Glu、Asp、Gly、Phe、Ile、His、Lys、Met、Leu、Gln、Pro、Ser、Arg、Thr、Trp、Val、Tyr、またはAsnのいずれか、

のアミノ酸が例示され得る。

[0249] 前記のフレキシブル残基の非限定の一態様として、軽鎖可変領域に含まれるアミノ酸であって；

26位のアミノ酸がAla、Ser、またはThrのいずれか、

27位のアミノ酸がThr、またはSerのいずれか、

27a位のアミノ酸がGly、Asn、Thr、またはSerのいずれか、

27b位のアミノ酸がAsn、またはAspのいずれか、

27c位のアミノ酸がIle、またはValのいずれか、

28位のアミノ酸がAsp、またはGlyのいずれか、

29位のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Ser、Arg、Thr、Tyr、またはGlyのいずれか、

31位のアミノ酸がGlu、Asp、Lys、またはAsnのいずれか、

32位のアミノ酸がAla、Asp、Ser、Thr、またはTyrのいずれか、

50位のアミノ酸がAsp、Gly、Lys、Asn、Gln、Ser、Arg、Tyr、またはGluのいずれか、

51位のアミノ酸がAsp、Gly、Lys、Asn、Thr、またはValのいずれか、

52位のアミノ酸がAla、Asp、Asn、Thr、またはSerのいずれか、

53位のアミノ酸がGlu、Asp、His、Asn、Gln、Ser、Tyr、またはLysのいずれか、

54位のアミノ酸がLys、またはArgのいずれか、

55位のアミノ酸がLeu、またはProのいずれか、

89位のアミノ酸がAla、Gly、Phe、Leu、Asn、Gln、Thr、Val、Tyr、またはSe

rのいずれか、

90位のアミノ酸がAla、Leu、Thr、Val、またはSerのいずれか、

91位のアミノ酸がAla、Asp、Phe、His、Lys、Asn、Ser、Arg、Thr、Trp、Val、またはTyrのいずれか、

92位のアミノ酸がGlu、Asp、Ser、Arg、Thr、Val、Tyr、またはAlaのいずれか、

93位のアミノ酸がAla、Asp、Ile、Asn、Ser、Arg、Thr、Val、Tyr、またはGlyのいずれか、

94位のアミノ酸がAla、Asp、Gly、Ile、Asn、Arg、Thr、またはSerのいずれか、

95位のアミノ酸がAla、Glu、Asp、Gly、Phe、Ile、His、Lys、Met、Leu、Gln、Pro、Ser、Arg、Thr、Trp、Val、Tyr、またはAsnのいずれか、

95a位のアミノ酸がAla、Glu、Asp、Gly、Ile、His、Lys、Leu、Gln、Pro、Ser、Arg、Thr、Tyr、またはAsnのいずれか、

96位のアミノ酸がAla、Asp、Gly、Phe、His、Lys、Leu、Asn、Gln、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、またはValのいずれか、もしくは

97位のアミノ酸がAla、Gly、Ile、Met、Leu、Ser、またはValのいずれか

のアミノ酸が例示され得る。

[0250] 本発明の一態様として、低分子化合物がキヌレニンの場合、フレキシブル残基およびその残基を他のどのアミノ酸に置換してライブラリ化することができるかは、キヌレニンと抗体の複合体の結晶構造解析や変異導入によって同定することができる。例えば、キヌレニンと抗体の複合体の結晶構造解析から、キヌレニンの結合に関与していない抗体の残基を同定することができる。キヌレニンの結合に関与していないと同定された残基を他のアミノ酸と置換しても、化合物への結合を適切な程度に維持できるアミノ酸を選択することができる。これにより、選択された残基において選択されたアミノ酸が出現するライブラリを設計することができる。この場合において、キヌレニンの結合に関与していないと同定された残基が互いに異なるアミノ酸に置換

された抗原結合分子の集合となるように、複数の抗原結合分子から主としてなるライブラリを設計することが可能である。すなわち、互いに異なるアミノ酸に置換された個々のフレキシブル残基を組み合わせることにより、当該フレキシブル残基が含まれる抗原結合分子の配列の多様性がもたらされる。

[0251] また、キヌレニンの結合に関与すると同定された残基の少なくとも一つは、当該残基および当該残基と異なる残基から選択される任意の残基になるように、これらの残基を含む抗原結合分子がデザインされ得る。キヌレニンの結合に関与すると同定されるアミノ酸の非限定の一態様として、キヌレニンとの結合にその側鎖が関与しているアミノ酸残基として、H鎖： P97、 R100c、 D101（Kabatナンバリング）、L鎖：H49、 F55（Kabatナンバリング）のアミノ酸のうちいずれかひとつ以上のアミノ酸が例示され得る。また、主鎖部分でkynurenineとの結合に大きく関与しているアミノ酸残基として、H鎖：R94、D95、R100c、G100d、A100eのアミノ酸のうちいずれかひとつ以上のアミノ酸が例示され得る。さらに、X線結晶構造から、H鎖CDR3の構造をkynurenineとの結合コンフォメーションに維持するうえで重要な残基として、H鎖： P97、 P100b、G100dのアミノ酸のうちいずれかひとつ以上のアミノ酸が例示され得る。

[0252] 本発明における、低分子がキヌレニンである場合のフレキシブル残基の非限定の一態様として、重鎖可変領域に含まれる24位、26位、27位、28位、29位、30位、31位、32位、33位、50位、51位、52位、52a位、53位、54位、55位、56位、58位、73位、95位、96位、97位、98位、99位、100位、100a位、100b位、100c位、100d位、100e位、100f位、および102位のアミノ酸が例示され得る。そうしたアミノ酸の別の非限定の一態様として、軽鎖可変領域に含まれる27d位、27e位、28位、29位、32位、46位、49位、50位、51位、52位、53位、54位、55位、92位、93位、および94位のアミノ酸が例示され得る。

[0253] 前記のフレキシブル残基の非限定の一態様として、重鎖可変領域に含まれるアミノ酸であって；

24位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn

、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

26位のアミノ酸がGly、Ala、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

27位のアミノ酸がGly、Ala、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

28位のアミノ酸がThr、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

29位のアミノ酸がPhe、Ile、Leu、Trp、またはTyrのいずれか、

30位のアミノ酸がSer、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

31位のアミノ酸がSer、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Gln、Arg、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

32位のアミノ酸がTyr 、Phe、またはHisのいずれか、

33位のアミノ酸がAla、Gly、Ile、Lys、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、またはTrpのいずれか、

50位のアミノ酸がGly、Ala、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

51位のアミノ酸がIle、Ala、Gly、Lys、Leu、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

52位のアミノ酸がIle、Ala、Glu、Phe、His、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

52a位のアミノ酸がPro、Ala、Gly、Ser、Thr、またはTrpのいずれか、

53位のアミノ酸がIle、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

54位のアミノ酸がPhe、Ala、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

55位のアミノ酸がGly、Ala、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

56位のアミノ酸がThr、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

58位のアミノ酸がAsn、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Lys、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

73位のアミノ酸がGlu、Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、またはTyrのいずれか、

95位のアミノ酸がAsp、またはGlyのいずれか、

96位のアミノ酸がAla、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

97位のアミノ酸がPro、Ala、Asn、またはSerのいずれか、

98位のアミノ酸がVal、Leu、またはThr、のいずれか、

99位のアミノ酸がVal、Ala、Asp、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、またはTyrのいずれか、

100位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

100a位のアミノ酸がArg、Ala、Asp、Glu、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Ser、ThrまたはValのいずれか、

100b位のアミノ酸がPro、Ala、Lys、Asn、Gln、ArgまたはSerのいずれか、

100c位のアミノ酸がArg、His、Lys、またはGlnのいずれか、

100d位のアミノ酸がGly、またはAsnのいずれか、

100e位のアミノ酸がAla、GlyまたはSerのいずれか、

100f位のアミノ酸がPhe、またはLeuのいずれか、もしくは

102位のアミノ酸がIle、Ala、Asp、Glu、Phe、His、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれかのアミノ酸が例示され得る。

[0254] 前記のフレキシブル残基の非限定の一態様として、軽鎖可変領域に含まれるアミノ酸であって；

27d位のアミノ酸がHis、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

27e位のアミノ酸がSer、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

28位のアミノ酸がAsp、Ala、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

29位のアミノ酸がGly、Ala、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

32位のアミノ酸がTyr、Ala、Phe、Gly、His、Lys、Leu、Pro、Gln、Arg、Val、またはTrpのいずれか、

46位のアミノ酸がLeu、Ile、Met、Asn、またはValのいずれか、

49位のアミノ酸がTyr 、Phe、His、またはTrpのいずれか、

50位のアミノ酸がGlu、Ala、Phe、Gly、Ile、Lys、Leu、Met、Gln、Ser、Thr、Val、またはTyrのいずれか、

51位のアミノ酸がIle、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、Lys、Leu、Met、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

52位のアミノ酸がSer、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Gln、Arg、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

53位のアミノ酸がAsn、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

54位のアミノ酸が、Arg、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

55位のアミノ酸がPhe、Leu、Met、Arg、またはTyrのいずれか、

92位のアミノ酸がThr、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Gln、Arg、Ser、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

93位のアミノ酸がGln、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、Ile、Lys、Leu、Asn、Arg、Ser、Thr、Val、またはTyrのいずれか、もしくは

94位のアミノ酸がPhe、His、Ile、Lys、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれかのアミノ酸が例示され得る。

[0255] 本発明における、低分子がキヌレニンである場合のフレキシブル残基の非

限定の別の一態様として、重鎖可変領域に含まれる28位、31位、33位、50位、51位、52位、54位、55位、56位、58位、96位、97位、99位、100位、100a位、100b位、および100c位のアミノ酸が例示され得る。そうしたアミノ酸の別の非限定の一態様として、軽鎖可変領域に含まれる27d位、27e位、28位、29位、32位、52位、53位、54位、56位、92位、および93位のアミノ酸が例示され得る。

[0256] 本発明の一態様として、低分子化合物がアデノシンの場合、フレキシブル残基およびその残基を他のどのアミノ酸に置換してライブラリ化することができるかは、アデノシンと抗体の複合体の結晶構造解析や変異導入によって同定することができる。例えば、アデノシンと抗体の複合体の結晶構造解析から、アデノシンの結合に関与していない抗体の残基を同定することができる。アデノシンの結合に関与していないと同定された残基を他のアミノ酸を置換しても、化合物への結合を適切な程度に維持できるアミノ酸を選択することができる。これにより、選択された残基において選択されたアミノ酸が出現するライブラリを設計することができる。この場合において、アデノシンの結合に関与していないと同定された残基が互いに異なるアミノ酸に置換された抗原結合分子の集合となるように、複数の抗原結合分子から主としてなるライブラリを設計することが可能である。すなわち、互いに異なるアミノ酸に置換された個々のフレキシブル残基を組み合わせることにより、当該フレキシブル残基が含まれる抗原結合分子の配列の多様性がもたらされる。

[0257] また、アデノシンの結合に関与すると同定された残基の少なくとも一つは、当該残基および当該残基と異なる残基から選択される任意の残基になるように、これらの残基を含む抗原結合分子がデザインされ得る。アデノシンの結合に関与すると同定されるアミノ酸の非限定の一態様として、H鎖：A33、I50、 G52、 S56、 T57、 W58、 G99、 Y100、 T100a（Kabatナンバリング）、L鎖：Y95c、 N96（Kabatナンバリング）のアミノ酸のうちいずれかひとつ以上のアミノ酸が例示され得る。

[0258] 本発明における、低分子がアデノシンである場合のフレキシブル残基の非

限定の一態様として、重鎖可変領域に含まれる31位、32位、53位、54位、55位、56位、57位、59位、61位、62位、65位、96位、97位、98位、100位、100a位、101位、および102位のアミノ酸が例示され得る。そうしたアミノ酸の別の非限定の一態様として、軽鎖可変領域に含まれる28位、29位、32位、93位、94位、95位、95a位、95b位、および95c位のアミノ酸が例示され得る。

[0259] 前記のフレキシブル残基の非限定の一態様として、重鎖可変領域に含まれるアミノ酸であって；

31位のアミノ酸がAsn、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

32位のアミノ酸がTyr、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、またはTrpのいずれか、

53位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、Ile、Lys、Leu、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、またはTyrのいずれか、

54位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Gln、Ser、Thr、Val、またはTyrのいずれか、

55位のアミノ酸がSer、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Gln、Arg、Thr、Val、またはTyrのいずれか、

56位のアミノ酸がSer、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Gln、Arg、Thr、またはValのいずれか、

57位のアミノ酸がThr、Ala、Ile、Lys、Leu、Asn、Gln、Arg、SerまたはValのいずれか、

59位のアミノ酸がTyr、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、またはTrpのいずれか、

61位のアミノ酸がSer、Ala、Phe、His、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

62位のアミノ酸がTrp、Ala、Asp、Glu、Phe、またはGlyのいずれか、

65位のアミノ酸がGly、Ala、Asp、Glu、Phe、Ile、Lys、Leu、Asn、Gln、Arg、Thr、Val、またはTrpのいずれか、

96位のアミノ酸がArg、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Lys、Leu、Asn、Gln、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

97位のアミノ酸がPhe、Ala、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

98位のアミノ酸がVal、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、またはThrのいずれか、

100位のアミノ酸がTyrまたはPheのいずれか、

100a位のアミノ酸がThr、SerまたはValのいずれか、

101位のアミノ酸がAsp、Ala、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、もしくは

102位のアミノ酸がPro、Asp、またはAsnのいずれかのアミノ酸が例示され得る。

[0260] 前記のフレキシブル残基の非限定の一態様として、軽鎖可変領域に含まれるアミノ酸であって；

28位のアミノ酸がTrp、Ala、Phe、His、Lys、Asn、Ser、Thr、Val、またはTyrのいずれか

29位のアミノ酸がAsn、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

32位のアミノ酸がTyr、Ala、Asp、Phe、Gly、またはHisのいずれか、

93位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Leu、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、またはTyrのいずれか、

94位のアミノ酸がAsn、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

95位のアミノ酸がSer、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

95a位のアミノ酸がGly、Ala、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

95b位のアミノ酸がTrp、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、As

n、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、またはTyrのいずれか、もしくは95c位のアミノ酸がTyr、Phe、His、Lys、Leu、AsnまたはValのいずれかのアミノ酸が例示され得る。

[0261] 本発明の一態様として、低分子化合物がアデノシン１リン酸の場合、フレキシブル残基およびその残基を他のどのアミノ酸に置換してライブラリ化することができるかは、アデノシン１リン酸と抗体の複合体の結晶構造解析ならびに類似化合物であるアデノシンと抗体の複合体の結晶構造からのモデリングや変異導入によって同定することができる。例えば、アデノシンと抗体の複合体の結晶構造解析を用いたモデリングから、アデノシン１リン酸の結合に関与していない抗体の残基を同定することができる。アデノシン１リン酸の結合に関与していないと同定された残基を他のアミノ酸を置換しても、化合物への結合を適切な程度に維持できるアミノ酸を選択することができる。これにより、選択された残基において選択されたアミノ酸が出現するライブラリを設計することができる。この場合において、アデノシン１リン酸の結合に関与していないと同定された残基が互いに異なるアミノ酸に置換された抗原結合分子の集合となるように、複数の抗原結合分子から主としてなるライブラリを設計することが可能である。すなわち、互いに異なるアミノ酸に置換された個々のフレキシブル残基を組み合わせることにより、当該フレキシブル残基が含まれる抗原結合分子の配列の多様性がもたらされる。

[0262] また、アデノシン１リン酸の結合に関与すると同定された残基の少なくとも一つは、当該残基および当該残基と異なる残基から選択される任意の残基になるように、これらの残基を含む抗原結合分子がデザインされ得る。アデノシン1リン酸のアデニン環部分ならびにリボース部分との結合に関与すると同定されるアミノ酸は、アデノシンと同様であり、非限定の一態様として、H鎖：A33、 I50、 G52、 S56、 T57、 W58、 G99、 Y100、 T100a（Kabatナンバリング）、L鎖：Y95c、 N96（Kabatナンバリング）のアミノ酸のうちいずれかひとつ以上のアミノ酸が例示され得る。また、アデノシン１リン酸のリン酸基部分との結合に関与すると同定されるアミノ酸の非限定の一態様とし

て、H鎖CDR2のD54、S55、S56、T57、W58ならびに、L鎖CDR3のG95a、W95b、Y95c（Kabatナンバリング）のアミノ酸のうちいずれかひとつ以上のアミノ酸が例示され得る。

[0263] 前記のフレキシブル残基の非限定の一態様として、重鎖可変領域に含まれるアミノ酸であって；

31位のアミノ酸がAsn、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

32位のアミノ酸がTyr、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、またはTrpのいずれか、

53位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、Ile、Lys、Leu、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、またはTyrのいずれか、

54位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Gln、Ser、Thr、Val、またはTyrのいずれか、

55位のアミノ酸がSer、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Gln、Arg、Thr、Val、またはTyrのいずれか、

56位のアミノ酸がSer、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Gln、Arg、Thr、またはValのいずれか、

57位のアミノ酸がThr、Ala、Ile、Lys、Leu、Asn、Gln、Arg、SerまたはValのいずれか、

59位のアミノ酸がTyr、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、またはTrpのいずれか、

61位のアミノ酸がSer、Ala、Phe、His、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

62位のアミノ酸がTrp、Ala、Asp、Glu、Phe、またはGlyのいずれか、

65位のアミノ酸がGly、Ala、Asp、Glu、Phe、Ile、Lys、Leu、Asn、Gln、Arg、Thr、Val、またはTrpのいずれか、

96位のアミノ酸がArg、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Lys、Leu、Asn、Gln、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

97位のアミノ酸がPhe、Ala、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

98位のアミノ酸がVal、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、またはThrのいずれか、

100位のアミノ酸がTyrまたはPheのいずれか、

100a位のアミノ酸がThr、SerまたはValのいずれか、

101位のアミノ酸がAsp、Ala、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、もしくは

102位のアミノ酸がPro、Asp、またはAsnのいずれかのアミノ酸が例示され得る。

[0264] 前記のフレキシブル残基の非限定の一態様として、軽鎖可変領域に含まれるアミノ酸であって；

28位のアミノ酸がTrp、Ala、Phe、His、Lys、Asn、Ser、Thr、Val、またはTyrのいずれか

29位のアミノ酸がAsn、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

32位のアミノ酸がTyr、Ala、Asp、Phe、Gly、またはHisのいずれか、

93位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Leu、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、またはTyrのいずれか、

94位のアミノ酸がAsn、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

95位のアミノ酸がSer、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

95a位のアミノ酸がGly、Ala、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

95b位のアミノ酸がTrp、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、またはTyrのいずれか、もしくは

95c位のアミノ酸がTyr、Phe、His、Lys、Leu、AsnまたはValのいずれかのア

ミノ酸が例示され得る。

[0265] 本発明の一態様として、低分子化合物がアデノシン２リン酸、又はアデノシン３リン酸の場合、フレキシブル残基およびその残基を他のどのアミノ酸に置換してライブラリ化することができるかは、アデノシン２リン酸、又はアデノシン３リン酸と抗体の複合体の結晶構造解析ならびに類似化合物であるアデノシンと抗体の複合体の結晶構造からのモデリングや変異導入によって同定することができる。例えば、アデノシン２リン酸、又はアデノシン３リン酸と抗体の複合体の結晶構造解析を用いたモデリングからアデノシン２リン酸、又はアデノシン３リン酸の結合に関与していない抗体の残基を同定することができる。アデノシン２リン酸、又はアデノシン３リン酸の結合に関与していないと同定された残基を他のアミノ酸を置換しても、化合物への結合を適切な程度に維持できるアミノ酸を選択することができる。これにより、選択された残基において選択されたアミノ酸が出現するライブラリを設計することができる。この場合において、アデノシン２リン酸、又はアデノシン３リン酸の結合に関与していないと同定された残基が互いに異なるアミノ酸に置換された抗原結合分子の集合となるように、複数の抗原結合分子から主としてなるライブラリを設計することが可能である。すなわち、互いに異なるアミノ酸に置換された個々のフレキシブル残基を組み合わせることにより、当該フレキシブル残基が含まれる抗原結合分子の配列の多様性がもたらされる。

[0266] また、アデノシン２リン酸、又はアデノシン３リン酸の結合に関与すると同定された残基の少なくとも一つは、当該残基および当該残基と異なる残基から選択される任意の残基になるように、これらの残基を含む抗原結合分子がデザインされ得る。アデノシン２リン酸、又はアデノシン３リン酸のアデニン環部分ならびにリボース部分との結合に関与すると同定されるアミノ酸は、アデノシンと同様であり、非限定の一態様として、H鎖：A33、 I50、 G52、 S56、 T57、 W58、 G99、 Y100、 T100a（Kabatナンバリング）、L鎖：Y95c、 N96（Kabatナンバリング）のアミノ酸のうちいずれかひとつ以上のア

ミノ酸が例示され得る。アデノシン２リン酸、又はアデノシン３リン酸のリン酸基部分との結合に関与すると同定されるアミノ酸は、結晶構造をもとに上記と同様の考察を行うことにより、アデノシン２リン酸、又はアデノシン３リン酸への結合を増強できる改変も予測できる。

[0267] 本明細書においては、フレキシブル残基とは、公知のおよび/または天然抗体または抗原結合ドメインのアミノ酸配列を比較した場合に、その位置で提示されるいくつかの異なるアミノ酸を持つ軽鎖および重鎖可変領域上のアミノ酸が非常に多様である位置に存在するアミノ酸残基のバリエーションをいう。非常に多様である位置は一般的にCDR領域に存在する。一態様では、公知のおよび/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。

[0268] また、前記の低分子の存在もしくは非存在によって抗原に対する抗原結合ドメインの結合活性を変化させる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、本発明における、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。同様に、前記の低分子の存在もしくは非存在によって抗原に対する抗原結合ドメインの結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基が導入され、それ以外のアミノ酸残基をフレキシブル残基として設計された重鎖可変領域とを組み合わせることによっても、本発明における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。

[0269] 前記の低分子化合物の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、アデノシンおよび/またはATPの存在もしくは非存在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。

[0270] 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。

[0271] 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、および/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。

[0272] また、本発明の非限定な一態様では、抗体の安定性を向上させるために、CDR領域および/またはフレームワーク領域を含む可変領域のアミノ酸を適宜改変することも可能である。そのようなアミノ酸の非限定の一態様として、1位、5位、10位、30位、48位、58位のアミノ酸が例示され得る。より具体的には1位のGln、5位のGln、10位のAsp、30位のAsn、48位のLeu、58位のAsnが例示され得る。抗体の安定性を向上させるために、これらのアミノ酸を生殖細胞系列の配列に含まれている対応するアミノ酸に置換することが可能である。そのような生殖細胞系列の非限定な一態様の配列としてVH3-21の配列が例示され得る。この場合において、1位のGlnがGluに、5位のGlnがValに、10位のA

spがGlyに、30位のAsnがSerに、48位のLeuがValに、58位のAsnがTyrに置換され得る。

[0273] 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。

[0274] Fc領域

Fc領域は、抗体重鎖の定常領域に由来するアミノ酸配列を含む。Fc領域は、EUナンバリングで表されるおよそ216位のアミノ酸における、パパイン切断部位のヒンジ領域のN末端から、当該ヒンジ、CH2およびCH3ドメインを含める抗体の重鎖定常領域の部分である。Fc領域は、ヒトIgG1から取得され得るが、IgGの特定のサブクラスに限定されるものでもない。当該Fc領域の好適な例として、後述されるようにpH酸性域におけるFcRnに対する結合活性を有するFc領域が挙げられる。また当該Fc領域の好適な例として、後述されるようにFcγレセプターに対する結合活性を有するFc領域が挙げられる。そのようなFc領域の非限定な一態様として、ヒトIgG1（配列番号：５）、IgG2（配列番号：６）、IgG3（配列番号：７）、またはIgG4（配列番号：８）で表されるFc領域が例示される。

[0275] Fcγレセプター（FcγR）

Fcγレセプター（FcγRとも記載される）とは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4モノクローナル抗体のFc領域に結合し得るレセプターをいい、実質的にFcγレセプター遺伝子にコードされるタンパク質のファミリーのいかなるメンバーをも意味する。ヒトでは、このファミリーには、アイソフォームFcγRIa、FcγRIbおよびFcγRIcを含むFcγRI（CD64）；アイソフォームFcγRIIa（アロタイプH131およびR131を含む。即ち、FcγRIIa (H)およびFcγRIIa (R)）、F

cγRIIb（FcγRIIb-1およびFcγRIIb-2を含む）およびFcγRIIcを含むFcγRII（CD32）；およびアイソフォームFcγRIIIa（アロタイプV158およびF158を含む。即ち、FcγRIIIa（V)およびFcγRIIIa（F））およびFcγRIIIb（アロタイプFcγRIIIb-NA1およびFcγRIIIb-NA2を含む）を含むFcγRIII（CD16）、並びにいかなる未発見のヒトFcγR類またはFcγRアイソフォームまたはアロタイプも含まれるが、これらに限定されるものではない。FcγRは、ヒト、マウス、ラット、ウサギおよびサルを含むが、これらに限定されるものではない、いかなる生物由来でもよい。マウスFcγR類には、FcγRI（CD64）、FcγRII（CD32）、FcγRIII（CD16）およびFcγRIII-2（FcγRIV、CD16-2）、並びにいかなる未発見のマウスFcγR類またはFcγRアイソフォームまたはアロタイプも含まれるが、これらに限定されない。こうしたFcγレセプターの好適な例としてはヒトFcγRI（CD64）、FcγRIIa（CD32）、FcγRIIb（CD32）、FcγRIIIa（CD16）及び/又はFcγRIIIb（CD16）が挙げられる。ヒトFcγRIのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列はそれぞれ配列番号：９（NM_000566.3）及び１０（NP_000557.1）に、ヒトFcγRIIa（アロタイプH131）のポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列はそれぞれ配列番号：１１（BC020823.1）及び１２（AAH20823.1）に（アロタイプR131は配列番号：１２の166番目のアミノ酸がArgに置換されている配列である）、FcγRIIbのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列はそれぞれ配列番号：１３（BC146678.1）及び１４（AAI46679.1）に、FcγRIIIaのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列はそれぞれ配列番号：１５（BC033678.1）及び１６（AAH33678.1）に、及びFcγRIIIbのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、それぞれ配列番号：１７（BC128562.1）及び１８（AAI28563.1）に記載されている（カッコ内はRefSeq等のデータベース登録番号を示す）。Fcγレセプターが、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4モノクローナル抗体のFc領域に結合活性を有するか否かは、上記に記載されるFACSやELISAフォーマットのほか、ALPHAスクリーン（Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay）や表面プラズモン共鳴（SPR）現象を利用したBIACORE法等によって確認され得る（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.

(2006) 103 (11), 4005-4010)。

[0276] FcγRIa、FcγRIbおよびFcγRIcを含むFcγRI (CD64) ならびにアイソフォームFcγRIIIa (アロタイプV158およびF158を含む) およびFcγRIIIb (アロタイプFcγRIIIb-NA1およびFcγRIIIb-NA2を含む) を含むFcγRIII (CD16) は、IgGのFc領域と結合するα鎖と細胞内に活性化シグナルを伝達するITAMを有する共通γ鎖が会合する。一方、アイソフォームFcγRIIa (アロタイプH131およびR131を含む) およびFcγRIIcを含むFcγRII (CD32) の自身の細胞質ドメインにはITAMが含まれている。これらのレセプターは、マクロファージやマスト細胞、抗原提示細胞等の多くの免疫細胞に発現している。これらのレセプターがIgGのFc領域に結合することによって伝達される活性化シグナルによって、マクロファージの貪食能や炎症性サイトカインの産生、マスト細胞の脱顆粒、抗原提示細胞の機能亢進が促進される。上記のように活性化シグナルを伝達する能力を有するFcγレセプターは、本明細書において活性型Fcγレセプターと呼ばれる。

[0277] 一方、FcγRIIb (FcγRIIb-1およびFcγRIIb-2を含む) の自身の細胞質内ドメインには抑制型シグナルを伝達するITIMが含まれている。B細胞ではFcγRIIbとB細胞レセプター (BCR) との架橋によってBCRからの活性化シグナルが抑制される結果BCRの抗体産生が抑制される。マクロファージでは、FcγRIIIとFcγRIIbとの架橋によって貪食能や炎症性サイトカインの産生能が抑制される。上記のように抑制化シグナルを伝達する能力を有するFcγレセプターは、本明細書において抑制型Fcγレセプターと呼ばれる。

[0278] FcγRに対するFc領域の結合活性

前述されるように、本発明の抗原結合分子に含まれるFc領域として、Fcγレセプターに対する結合活性を有するFc領域が挙げられる。そのようなFc領域の非限定な一態様として、ヒトIgG1 (配列番号：５)、IgG2 (配列番号：６)、IgG3 (配列番号：７)、またはIgG4 (配列番号：８) で表されるFc領域が例示される。Fcγレセプターが、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4モノクローナル抗体のFc領域に結合活性を有するか否かは、上記に記載されるFACSやELISA

フォーマットのほか、ALPHAスクリーン（Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay）や表面プラズモン共鳴（SPR）現象を利用したBIACORE法等によって確認され得る（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2006) 103 (11), 4005-4010）。

[0279] ALPHAスクリーンは、ドナーとアクセプターの2つのビーズを使用するALPHAテクノロジーによって下記の原理に基づいて実施される。ドナービーズに結合した分子が、アクセプタービーズに結合した分子と生物学的に相互作用し、2つのビーズが近接した状態の時にのみ、発光シグナルを検出される。レーザーによって励起されたドナービーズ内のフォトセンシタイザーは、周辺の酸素を励起状態の一重項酸素に変換する。一重項酸素はドナービーズ周辺に拡散し、近接しているアクセプタービーズに到達するとビーズ内の化学発光反応を引き起こし、最終的に光が放出される。ドナービーズに結合した分子とアクセプタービーズに結合した分子が相互作用しないときは、ドナービーズの産生する一重項酸素がアクセプタービーズに到達しないため、化学発光反応は起きない。

[0280] 例えば、ドナービーズにビオチン標識されたFc領域を含む抗原結合分子が結合され、アクセプタービーズにはグルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）でタグ化されたFcγレセプターが結合される。競合するFc領域改変体を含む抗原結合分子の非存在下では、天然型Fc領域を有する抗原結合分子とFcγレセプターは相互作用し520-620 nmのシグナルを生ずる。タグ化されていないFc領域改変体を含む抗原結合分子は、天然型Fc領域を有する抗原結合分子とFcγレセプター間の相互作用と競合する。競合の結果表れる蛍光の減少を定量することによって相対的な結合親和性が決定され得る。抗体等の抗原結合分子をSulfo-NHS-ビオチン等を用いてビオチン化することは公知である。Fcγレセプターを GSTでタグ化する方法としては、Fcγレセプターをコードするポリヌクレオチドと GSTをコードするポリヌクレオチドをインフレームで融合した融合遺伝子が作動可能に連結されたベクターに保持した細胞等において発現し、グルタチオンカラムを用いて精製する方法等が適宜採用され得る

。得られたシグナルは例えばGRAPHPAD PRISM（GraphPad社、San Diego）等のソフトウェアを用いて非線形回帰解析を利用する一部位競合（one-site competition）モデルに適合させることにより好適に解析される。

[0281] 相互作用を観察する物質の一方（リガンド）をセンサーチップの金薄膜上に固定し、センサーチップの裏側から金薄膜とガラスの境界面で全反射するように光を当てると、反射光の一部に反射強度が低下した部分（SPRシグナル）が形成される。相互作用を観察する物質の他方（アナライト）をセンサーチップの表面に流しリガンドとアナライトが結合すると、固定化されているリガンド分子の質量が増加し、センサーチップ表面の溶媒の屈折率が変化する。この屈折率の変化により、SPRシグナルの位置がシフトする（逆に結合が解離するとシグナルの位置は戻る）。Biacoreシステムは上記のシフトする量、すなわちセンサーチップ表面での質量変化を縦軸にとり、質量の時間変化を測定データとして表示する（センサーグラム）。センサーグラムのカーブからカイネティクス：結合速度定数（ka）と解離速度定数(kd）が、当該定数の比からアフィニティー（KD）が求められる。BIACORE法では阻害測定法も好適に用いられる。阻害測定法の例はProc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2006) 103 (11), 4005-4010において記載されている。

[0282] Fcγレセプター（FcγR）結合改変Fc領域

本発明が含むFc領域として、ヒトIgG1（配列番号：５）、IgG2（配列番号：６）、IgG3（配列番号：７）、またはIgG4（配列番号：８）で表されるFc領域のほかに、天然型ヒトIgGのFc領域のFcγレセプターに対する結合活性よりもFcγレセプターに対する結合活性が高いFcγR結合改変Fc領域も適宜使用され得る。本明細書において、「天然型ヒトIgGのFc領域」とは、配列番号：５、６、７または８で例示されるヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4のFc領域のEUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖であるFc領域を意味する。そのようなFcγR結合改変Fc領域は、天然型ヒトIgGのFc領域のアミノ酸を改変することによって作製され得る。FcγR結合改変Fc領域のFcγRに対する結合活性が、天然型ヒトIgGのFc領域のFcγRに対する結合活性より高

いか否かは、前記の結合活性の項で記載された方法を用いて適宜実施され得る。

[0283] 本発明において、Fc領域の「アミノ酸の改変」または「アミノ酸改変」とは、出発Fc領域のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列に改変することを含む。出発Fc領域の修飾改変体がpH中性域においてヒトFcγレセプターに結合することができる限り、いずれのFc領域も出発Fc領域として使用され得る。また、既に改変が加えられたFc領域を出発Fc領域としてさらなる改変が加えられたFc領域も本発明のFc領域として好適に使用され得る。出発Fc領域とは、ポリペプチドそのもの、出発Fc領域を含む組成物、または出発Fc領域をコードするアミノ酸配列を意味し得る。出発Fc領域には、抗体の項で概説された組換えによって産生された公知のFc領域が含まれ得る。出発Fc領域の起源は、限定されないが非ヒト動物の任意の生物またはヒトから取得され得る。好ましくは、任意の生物としては、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、アレチネズミ、ネコ、ウサギ、イヌ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ラクダ、および非ヒト霊長類から選択される生物が好適に挙げられる。別の態様において、出発Fc領域はまた、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。同様に、本明細書において、前記の任意の生物からのIgGの任意のクラスまたはサブクラスのFc領域を、好ましくは出発Fc領域として用いることができることを意味する。天然に存在するIgGのバリアントまたは操作された型の例は、公知の文献（Curr. Opin. Biotechnol. (2009) 20 (6), 685-91、Curr. Opin. Immunol. (2008) 20 (4), 460-470、Protein Eng. Des. Sel. (2010) 23 (4), 195-202、国際公開WO2009/086320、WO2008/092117、WO2007/041635、およびWO2006/105338）に記載されるがそれらに限定されない。

[0284] 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FcγR結合改変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領域と本発明のFcγR結合改変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。そのような変種の作製方法は「アミノ酸の改変」の項に例示されている。

[0285] 本発明の抗原結合分子に含まれる、天然型ヒトIgGのFc領域のFcγレセプターに対する結合活性よりもFcγレセプターに対する結合活性が高いFcγR結合改変Fc領域（FcγR結合改変Fc領域）はいかなる方法によっても取得され得るが、具体的には、出発Fc領域として用いられるヒトIgG型免疫グロブリンのアミノ酸の改変によって当該FcγR結合改変Fc領域が取得され得る。改変のための好ましいIgG型免疫グロブリンのFc領域としては、例えば、配列番号：５、６、７または８で例示されるヒトIgG（IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4、およびそれらの改変体）のFc領域が挙げられる。

[0286] 他のアミノ酸への改変は、天然型ヒトIgGのFc領域のFcγレセプターに対する結合活性よりもFcγレセプターに対する結合活性が高いかぎり、いかなる位置のアミノ酸も改変され得る。抗原結合分子が、ヒトFc領域としてヒトIgG1のFc領域を含んでいる場合、EUナンバリング297位に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgGのFc領域のFcγレセプターに対する結合活性

よりもFcγレセプターに対する結合活性が高い効果をもたらす改変が含まれていることが好ましい。こうしたアミノ酸の改変としては、例えば国際公開WO2007/024249、WO2007/021841、WO2006/031370、WO2000/042072、WO2004/029207、WO2004/099249、WO2006/105338、WO2007/041635、WO2008/092117、WO2005/070963、WO2006/020114、WO2006/116260およびWO2006/023403などにおいて報告されている。

[0287] 本発明の抗原結合分子に含まれるFcγレセプター結合ドメインとFcγレセプターとの結合活性を測定するpHの条件はpH酸性域乃至pH中性域の条件が適宜使用され得る。本発明の抗原結合分子に含まれるFcγレセプター結合ドメインとFcγレセプターとの結合活性を測定する条件としてのpH酸性域乃至pH中性域とは、通常pH5.8～pH8.0を意味する。好ましくはpH6.0 ～pH7.4の任意のpH値によって示される範囲であり、好ましくはpH6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、および7.4から選択され、特に好ましくは癌組織のpHに近いpH6.15～7.4である（Vaupelら（Cancer Res.（1989）49, 6449-6665））。測定条件に使用される温度として、Fcγレセプター結合ドメインとヒトFcγレセプターとの結合アフィニティーは、10℃～50℃の任意の温度で評価され得る。好ましくは、ヒトFcγレセプター結合ドメインとFcγレセプターとの結合アフィニティーを決定するために、15℃～40℃の温度が使用される。より好ましくは、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、および35℃のいずれか1つのような20℃から35℃までの任意の温度も同様に、Fcγレセプター結合ドメインとFcγレセプターとの結合アフィニティーを決定するために使用される。25℃という温度は本発明の態様の非限定な一例である。

[0288] 本明細書において、FcγR結合改変Fc領域のFcγレセプターに対する結合活性が天然型Fc領域のFcγレセプターに対する結合活性よりも高いとは、FcγR結合改変Fc領域のFcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa及び/又はFcγRIIIbのいずれかのヒトFcγレセプターに対する結合活性が、これらのヒトFcγレセプターに対する天然型Fc領域の結合活性よりも高いことをいう。例えば

、上記の解析方法にもとづいて、対照とするヒトIgGの天然型Fc領域を含む抗原結合分子の結合活性に比較してFcγR結合改変Fc領域を含む抗原結合分子の結合活性が、105%以上、好ましくは110%以上、115%以上、120%以上、125%以上、特に好ましくは130%以上、135%以上、140%以上、145%以上、150%以上、155%以上、160%以上、165%以上、170%以上、175%以上、180%以上、185%以上、190%以上、195%以上、2倍以上、2.5倍以上、3倍以上、3.5倍以上、4倍以上、4.5倍以上、5倍以上、7.5倍以上、10倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、100倍以上の結合活性を示すことをいう。天然型Fc領域としては、出発Fc領域も使用され得るし、同じサブクラスの抗体の天然型Fc領域も使用され得る。

[0289] 本発明では、対照とするヒトIgGの天然型Fc領域として、EUナンバリングで表される297位のアミノ酸に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖である天然型ヒトIgGのFc領域が好適に用いられる。EUナンバリングで表される297位のアミノ酸に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖であるか否かは、既知の手法が用いられ得る（Non-fucosylated therapeutic antibodies as next-generation therapeutic antibodies. Satoh M, Iida S, Shitara K., Expert Opin. Biol. Ther. (2006) 6 (11), 1161-1173）。例えば、下記のような方法によって、天然型ヒトIgGのFc領域に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖であるか否かを判定することが可能である。被験天然型ヒトIgGにN-Glycosidase F (Roche diagnostics) を反応させることによって、被験天然型ヒトIgGから糖鎖が遊離される（Weitzhandlerら（J. Pharma. Sciences (1994) 83, 12, 1670-1675）。次に、エタノールを反応させてタンパク質が除かれた反応液（Schenkら（J. Clin. Investigation (2001) 108 (11) 1687-1695）の濃縮乾固物が、2-アミノピリジンによって蛍光標識される（Biggeら（Anal. Biochem. (1995) 230 (2) 229-238)。セルロースカートリッジを用いた固相抽出により脱試薬された、蛍光標識された2-AB化糖鎖が、順相クロマトグラフィによって解析される。検出されるクロマトグラムのピークを観察することによって、ヒトI

gGの天然型Fc領域に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖であるか否かを判定することが可能である。

[0290] 対照とする同じサブクラスの抗体の天然型Fc領域を含む抗原結合分子としては、IgGモノクローナル抗体のFc領域を有する抗原結合分子が適宜使用され得る。当該Fc領域の構造は、配列番号：５（データベース登録番号AAC82527.1のN末にA付加）、６（データベース登録番号AAB59393.1のN末にA付加）、７（データベース登録番号CAA27268.1）、および８（データベース登録番号AAB59394.1のN末にA付加）に記載する。また、ある特定のアイソタイプの抗体のFc領域を含む抗原結合分子を被検物質として使用する場合には、当該特定のアイソタイプのIgGモノクローナル抗体のFc領域を有する抗原結合分子を対照として用いることによって、被験Fc領域を含む抗原結合分子によるFcγレセプターに対する結合活性の効果が検証される。上記のようにして、Fcγレセプターに対する結合活性が高いことが検証されたFc領域を含む抗原結合分子が適宜選択される。

[0291] 選択的なFcγレセプターに対する結合活性を有するFc領域

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

[0292] 活性型Fcγレセプターに対する結合活性が抑制型Fcγレセプターに対する結合活性よりも高いFc領域

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

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

[0293] 本明細書において、特定のFcγレセプターに対する結合活性がそれ以外のFcγレセプターに対する結合活性よりも高い例として、例えば、活性型Fcγレセプターに対する結合活性が抑制型Fcγレセプターに対する結合活性よりも高い場合が挙げられる。この場合、Fc領域のFcγRIa、FcγRIIa、FcγRIIIa及び/又はFcγRIIIbのいずれかのヒトFcγレセプターに対する結合活性が、FcγRIIbに対する結合活性よりも高いことをいう。例えば、上記の解析方法にもとづいて、Fc領域を含む抗原結合分子のFcγRIa、FcγRIIa、FcγRIIIa及び/又はFcγRIIIbのいずれかのヒトFcγレセプターに対する結合活性が、FcγRIIbに対する結合活性の、105%以上、好ましくは110%以上、120%以上、130%以上、140%以上、特に好ましくは150%以上、160%以上、170%以上、180%以上、190%以上、200%%以上、250%以上、300%以上、350%以上、400%以上、450%以上、500%以上、750%以上、10倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍以上の結合活性を示すことをいう。活性型Fcγレセプターに対する結合活性が抑制型Fcγレセプターに対する結合活性よりも高いFc領域は、抗原結合ドメインが膜型分子に結合する本発明の抗原結合分子に好適に含まれ得る。こうしたFc領域を含むIgG1抗体は、後述するADCC活性が増強されていることが知られていることから、当該Fc領域を含む抗原結合分子は、本発明の医薬組成物に含まれる抗原結合分子としても有用である。

[0294] 本発明の非限定な一態様では、活性型Fcγレセプターに対する結合活性が抑制型Fcγレセプターに対する結合活性よりも高い（抑制型Fcγレセプターに対する選択的な結合活性を有する）Fc領域の例として、前述されたEUナンバリングで表される221位、222位、223位、224位、225位、227位、228位、23

0位、231位、232位、233位、234位、235位、236位、237位、238位、239位、240位、241位、243位、244位、245位、246位、247位、249位、250位、251位、254位、255位、256位、258位、260位、262位、263位、264位、265位、266位、267位、268位、269位、270位、271位、272位、273位、274位、275位、276位、278位、279位、280位、281位、282位、283位、284位、285位、286位、288位、290位、291位、292位、293位、294位、295位、296位、297位、298位、299位、300位、301位、302位、303位、304位、305位、311位、313位、315位、317位、318位、320位、322位、323位、324位、325位、326位、327位、328位、329位、330位、331位、332位、333位、334位、335位、336位、337位、339位、376位、377位、378位、379位、380位、382位、385位、392位、396位、421位、427位、428位、429位、434位、436位および440位の群から選択される少なくとも一つ以上のアミノ酸が天然型Fc領域と異なるアミノ酸に改変されているFc領域が好適に挙げられる。

[0295] 抑制型Fcγレセプターに対する結合活性が活性型Fcγレセプターに対する結合活性よりも高いFc領域

本明細書において、特定のFcγレセプターに対する結合活性がそれ以外のFcγレセプターに対する結合活性よりも高い例として、例えば、抑制型Fcγレセプターに対する結合活性が活性型Fcγレセプターに対する結合活性よりも高い場合が挙げられる。この場合、Fc領域のFcγRIIbに対する結合活性が、FcγRIa、FcγRIIa、FcγRIIIa及び/又はFcγRIIIbのいずれかのヒトFcγレセプターに対する結合活性よりも高いことをいう。例えば、上記の解析方法にもとづいて、Fc領域を含む抗原結合分子のFcγRIIbに対する結合活性が、FcγRIa、FcγRIIa、FcγRIIIa及び/又はFcγRIIIbのいずれかのヒトFcγレセプターに対する結合活性の、105%以上、好ましくは110%以上、120%以上、130%以上、140%以上、特に好ましくは150%以上、160%以上、170%以上、180%以上、190%以上、200%%以上、250%以上、300%以上、350%以上、400%以上、450%以上、500%以上、750%以上、10倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍以上の結合活性を示す

ことをいう。抑制型Fcγレセプターに対する結合活性が活性型Fcγレセプターに対する結合活性よりも高いFc領域は、抗原結合ドメインが可溶型分子に結合する本発明の抗原結合分子に好適に含まれ得る。

[0296] 本発明の非限定な一態様では、抑制型Fcγレセプターに対する結合活性が活性型Fcγレセプターに対する結合活性よりも高い（抑制型Fcγレセプターに対する選択的な結合活性を有する）Fc領域の例として、前記Fc領域のアミノ酸のうちEUナンバリングで表される238または328のアミノ酸が天然型Fc領域と異なるアミノ酸に改変されているFc領域が好適に挙げられる。

[0297] また本発明の非限定な一態様では、抑制型Fcγレセプターに対する結合活性が活性型Fcγレセプターに対する結合活性よりも高い（抑制型Fcγレセプターに対する選択的な結合活性を有する）Fc領域の例として、前記Fc領域のEUナンバリングで表されるアミノ酸であってEUナンバリングで表される238のアミノ酸がAsp、または328のアミノ酸がGluのいずれか一つ以上に改変されているFc領域が好適に挙げられる。また、抑制型Fcγレセプターに対する選択的な結合活性を有するFc領域として、US2009/0136485に記載されているFc領域あるいは改変も適宜選択することができる。

[0298] また本発明の非限定の一態様では、前記Fc領域のEUナンバリングで表されるアミノ酸であってEUナンバリングで表される238のアミノ酸がAsp、または328のアミノ酸がGluのいずれか一つ以上に改変されているFc領域が好適に挙げられる。

[0299] さらに本発明の非限定の一態様では、PCT/JP2012/054624で例示される、EUナンバリングで表される238位のProのAspへの置換、およびEUナンバリングで表される237位のアミノ酸がTrp、EUナンバリングで表される237位のアミノ酸がPhe、EUナンバリングで表される267位のアミノ酸がVal、EUナンバリングで表される267位のアミノ酸がGln、EUナンバリングで表される268位のアミノ酸がAsn、EUナンバリングで表される271位のアミノ酸がGly、EUナンバリングで表される326位のアミノ酸がLeu、EUナンバリングで表される326位のアミノ酸がGln、EUナンバリングで表される326位のアミノ酸がGlu、EUナンバリングで

表される326位のアミノ酸がMet、EUナンバリングで表される239位のアミノ酸がAsp、EUナンバリングで表される267位のアミノ酸がAla、EUナンバリングで表される234位のアミノ酸がTrp、EUナンバリングで表される234位のアミノ酸がTyr、EUナンバリングで表される237位のアミノ酸がAla、EUナンバリングで表される237位のアミノ酸がAsp、EUナンバリングで表される237位のアミノ酸がGlu、EUナンバリングで表される237位のアミノ酸がLeu、EUナンバリングで表される237位のアミノ酸がMet、EUナンバリングで表される237位のアミノ酸がTyr、EUナンバリングで表される330位のアミノ酸がLys、EUナンバリングで表される330位のアミノ酸がArg、EUナンバリングで表される233位のアミノ酸がAsp、EUナンバリングで表される268位のアミノ酸がAsp、EUナンバリングで表される268位のアミノ酸がGlu、EUナンバリングで表される326位のアミノ酸がAsp、EUナンバリングで表される326位のアミノ酸がSer、EUナンバリングで表される326位のアミノ酸がThr、EUナンバリングで表される323位のアミノ酸がIle、EUナンバリングで表される323位のアミノ酸がLeu、EUナンバリングで表される323位のアミノ酸がMet、EUナンバリングで表される296位のアミノ酸がAsp、EUナンバリングで表される326位のアミノ酸がAla、EUナンバリングで表される326位のアミノ酸がAsn、EUナンバリングで表される330位のアミノ酸がMet、のいずれか一つ以上に改変されているFc領域が好適に挙げられる。

[0300] 糖鎖が修飾されたFc領域

本発明が提供する抗原結合分子に含まれるFc領域として、Fc領域に結合した糖鎖の組成がフコース欠損糖鎖を結合したFc領域の割合が高くなるように、またはバイセクティングN-アセチルグルコサミンが付加したFc領域の割合が高くなるように修飾されたFc領域も含まれ得る。抗体Fc領域に結合するN-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN-アセチルグルコサミンからフコース残基を除去すると、FcγRIIIaに対する親和性が増強されることが知られている（非特許文献６）。こうしたFc領域を含むIgG1抗体は、後述するADCC活性が増強されていることが知られていることから、当該Fc領域を含む抗原結合分子は、本発明の医薬組成物に含まれる抗原結合分子としても有用である。

抗体Fc領域に結合するN -グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN -アセチルグルコサミンからフコース残基が除去された抗体としては、例えば、次のような抗体；

グリコシル化が修飾された抗体（国際公開WO1999/054342等）、

糖鎖に付加するフコースが欠損した抗体（国際公開WO2000/061739、WO2002/031140、WO2006/067913等）、

[0301] より具体的には、抗体Fc領域に結合するN -グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN -アセチルグルコサミンからフコース残基が除去された抗体の異なる非限定の一態様として、糖鎖に付加するフコースが欠損した抗体（国際公開WO2000/061739、WO2002/031140、WO2006/067913等）を作製するために、糖鎖修飾を受けるポリペプチドの糖鎖構造を形成する活性が改変された結果、糖鎖にフコースを付加する能力が低い宿主細胞が作製される。当該宿主細胞において所望の抗体遺伝子を発現することによって、当該宿主細胞の培養液からその糖鎖中のフコースが欠損した当該抗体が回収され得る。ポリペプチドの糖鎖構造を形成する活性として、フコシルトランスフェラーゼ（EC 2.4.1.152）、フコーストランスポーター（SLC35C1）、GMD（GDP-マンノース4,6-デヒドラターゼ）（EC 4.2.1.47）、Fx（GDP-ケト-6-デオキシマンノース3, 5-エピメラーゼ, 4-レダクターゼ）（EC 1.1.1.271）、およびGFPP（GDP-β-L-フコースピロフォスフォリラーゼ）（EC 2.7.7.30）からなる群から選択される酵素またはトランスポーターの活性が非限定の好適な例として挙げられ得る。これらの酵素またはトランスポーターは、その活性を発揮することができれば必ずしもその構造は特定されない。本明細書においては、これらの活性を発揮することが可能なタンパク質を機能性タンパク質という。これらの活性を改変する方法の非限定の一態様として、これらの活性の欠失が挙げられる。これらの活性が欠失した宿主細胞を作製するために、これらの機能性タンパク質の遺伝子を機能不能に破壊する方法等公知の方法が適宜採用され得る（国際公開WO2000/061739、WO2002/031140、WO2006/067913等）。そのような活性が欠失した宿主細胞は、CHO細胞、BHK細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、Y

0骨髄腫細胞、P3X63マウス骨髄腫細胞、PER細胞、PER.C6細胞、HEK293細胞、またはハイブリドーマ細胞等に内在性であるこれらの機能性タンパク質の遺伝子を機能不能に破壊する方法等によって作製され得る。

[0302] バイセクティングGlcNAcを有する糖鎖を有する抗体（国際公開WO2002/079255等）が公知である。非限定な一態様では、バイセクティングGlcNAcを有する糖鎖を有する抗体を作製するために、GnTIII（β-1,4-マンノシル-グリコプロテイン，4-β-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ）（EC 2.4.1.144）活性またはGalT（β-1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ）（EC 2.4.1.38）活性を有する機能性タンパク質をコードする遺伝子を発現する宿主細胞が作製される。別の非限定の好適な一態様では、前記の機能性タンパク質に加えて、ヒトManII（マンノシダーゼII）（3.2.1.114）活性を有する機能性タンパク質をコードする遺伝子、GnTI（β-1,2-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI）（EC 2.4.1.94）活性を有する機能性タンパク質をコードする遺伝子、GnTII（β-1,2-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII）（EC 2.4.1.143）活性を有する機能性タンパク質をコードする遺伝子、ManI（マンノシダーゼ）（EC 3.2.1.113）活性を有する機能性タンパク質をコードする遺伝子、およびα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ（EC 2.4.1.68）と共発現する宿主細胞が作製される（国際公開WO2004/065540）。

[0303] 前記のような糖鎖にフコースを付加する能力が低い宿主細胞、およびバイセクティングGlcNAc構造を含む糖鎖を形成する活性を有する宿主細胞に抗体遺伝子を含む発現ベクターを形質導入することによって、抗体Fc領域に結合するN -グリコシド結合複合型糖鎖還元末端のN -アセチルグルコサミンからフコース残基が除去された抗体、およびバイセクティングGlcNAcを有する糖鎖を有する抗体がそれぞれ作製され得る。これらの抗体の製造方法は本発明のFc領域に結合した糖鎖の組成がフコース欠損糖鎖を結合したFc領域の割合が高くなるように、またはバイセクティングN-アセチルグルコサミンが付加したFc領域の割合が高くなるように修飾された改変Fc領域を含む抗原結合分子の製造方法にも適用することが可能である。こうした製造方法によって作

製された本発明の抗原結合分子に含まれるFc領域に結合した糖鎖の組成は、前記の「Fcγレセプター（FcγR）結合改変Fc領域」で記載された方法によって確認され得る。

[0304] 多重特異性抗原結合分子または多重パラトピックな抗原結合分子

その少なくとも一つの抗原結合ドメインが抗原分子中の第一のエピトープに結合し、その少なくとも一つの別の抗原結合ドメインが抗原分子中の第二のエピトープに結合する特徴を有する、少なくとも二つの抗原結合ドメインを含む抗原結合分子は、その反応の特異性という観点から多重特異性抗原結合分子と呼ばれる。一分子の抗原結合分子に含まれる二種類の抗原結合ドメインによって当該抗原結合分子が、二つの異なるエピトープに結合する場合、当該抗原結合分子は二重特異性抗原結合分子と呼ばれる。また、一分子の抗原結合分子に含まれる三種類の抗原結合ドメインによって当該抗原結合分子が、三つの異なるエピトープに結合する場合、当該抗原結合分子は三重特異性抗原結合分子と呼ばれる。

[0305] 抗原分子中の第一のエピトープに結合する抗原結合ドメイン中のパラトープと、第一のエピトープと構造の異なる第二のエピトープに結合する抗原結合ドメイン中のパラトープとはその構造が互いに異なる。ゆえに、その少なくとも一つの抗原結合ドメインが抗原分子中の第一のエピトープに結合し、その少なくとも一つの別の抗原結合ドメインが抗原分子中の第二のエピトープに結合する特徴を有する、少なくとも二つの抗原結合ドメインを含む抗原結合分子は、その構造の特異性という観点から多重パラトピック抗原結合分子と呼ばれる。一分子の抗原結合分子に含まれる二種類の抗原結合ドメインによって当該抗原結合分子が、二つの異なるエピトープに結合する場合、当該抗原結合分子は二重パラトピック抗原結合分子と呼ばれる。また、一分子の抗原結合分子に含まれる三種類の抗原結合ドメインによって当該抗原結合分子が、三つの異なるエピトープに結合する場合、当該抗原結合分子は三重パラトピック抗原結合分子と呼ばれる。

[0306] 一つまたは複数の抗原結合ドメインを含む多価の多重特異性または多重パ

ラトピック抗原結合分子とその調製方法は、Conrathら（J.Biol.Chem.（2001）276（10）7346-7350）、Muyldermans（Rev. Mol. Biotech.（2001）74, 277-302）およびKontermann R.E.（2011）Bispecific Antibodies（Springer-Verlag）等の非特許文献、ならびに国際公開WO1996/034103またはWO1999/023221等の特許文献等にも記載されている。これらに記載された多重特異性または多重パラトピック抗原結合分子とその調製方法を用いることによって、本発明の抗原結合分子を作製することが可能である

[0307] 二重特異性抗体とその作製方法

前記のような多重特異性または多重パラトピック抗原結合分子とその調製方法の一態様として、二重特異性抗体とその作製方法が下記に例示される。二重特異性抗体とは、異なるエピトープに対して特異的に結合する二種類の可変領域を含む抗体である。IgG型の二重特異性抗体はIgG抗体を産生するハイブリドーマ二種を融合することによって生じるhybrid hybridoma（quadroma）によって分泌させることが可能である（Milsteinら（Nature（1983）305, 537-540））。

[0308] 二重特異性抗体を前記の抗体の項で記載されたような組換え手法を用いて製造する場合、目的の二種の可変領域を含む重鎖をコードする遺伝子を細胞に導入しそれらを共発現させる方法が採用され得る。しかしながら、こうした共発現させる方法における重鎖の組合せを考慮するだけでも、（i）第一のエピトープに結合する可変領域を含む重鎖と第二のエピトープに結合する可変領域を含む重鎖が一対となった重鎖の組合せ、（ii）第一のエピトープに結合する可変領域を含む重鎖のみが一対となった重鎖の組合せ、（iii）第二のエピトープに結合する可変領域を含む重鎖のみが一対となった重鎖の組合せが、２：１：１の分子数の割合で存在する混合物となる。これら三種類の重鎖の組合せの混合物から目的の重鎖の組合せを含む抗原結合分子を精製することは困難である。

[0309] こうした組換え手法を用いて二重特異性抗体を製造する際に、重鎖を構成するCH3ドメインに適当なアミノ酸置換の改変を加えることによってヘテロな

組合せの重鎖を含む二重特異性抗体が優先的に分泌され得る。具体的には、一方の重鎖のCH3ドメインに存在するアミノ酸側鎖をより大きい側鎖（knob（「突起」の意））に置換し、もう一方の重鎖のCH3ドメインに存在するアミノ酸側鎖をより小さい側鎖（hole（「空隙」の意））に置換することによって、突起が空隙内に配置され得るようにして異種の重鎖形成の促進および同種の重鎖形成の阻害を引き起こす方法である（国際公開WO1996027011、Ridgwayら（Protein Engineering (1996) 9, 617-621）、Merchantら（Nat. Biotech. (1998) 16, 677-681））。

[0310] また、ポリペプチドの会合、またはポリペプチドによって構成される異種多量体の会合の制御方法を、重鎖の会合に利用することによって二重特異性抗体を作製する技術も知られている。即ち、重鎖内の界面を形成するアミノ酸残基を改変することによって、同一配列を有する重鎖の会合が阻害され、配列の異なる二つの重鎖が形成されるように制御する方法が二重特異性抗体の作製に採用され得る（国際公開WO2006/106905）。このような方法も二重特異性抗体を製造する際に、採用され得る。

[0311] 本発明の非限定な一態様における抗原結合分子に含まれるFc領域としては、上記の二重特異性抗体を起源とするFc領域を形成する二つのポリペプチドが適宜使用され得る。より具体的には、Fc領域を形成する二つのポリペプチドであって、その一方のポリペプチドのアミノ酸配列のうちEUナンバリングで表される349のアミノ酸がCys、366のアミノ酸がTrpであり、他方のポリペプチドのアミノ酸配列のうちEUナンバリングで表される356のアミノ酸がCys、366のアミノ酸がSerに、368のアミノ酸がAlaに、407のアミノ酸がValであることを特徴とする二つのポリペプチドが好適に用いられる。

[0312] そのほかの本発明の非限定な一態様におけるFc領域としては、Fc領域を形成する二つのポリペプチドであって、その一方のポリペプチドのアミノ酸配列のうちEUナンバリングで表される409のアミノ酸がAspであり、他方のポリペプチドのアミノ酸配列のうちEUナンバリングで表される399のアミノ酸がLysであることを特徴とする二つのポリペプチドが好適に用いられる。上記態様

では、409のアミノ酸はAspに代えてGlu、399のアミノ酸はLysに代えてArgでもあり得る。また、399のアミノ酸のLysに加えて360のアミノ酸としてAsp又は392のアミノ酸としてAspも好適に追加され得る。

[0313] 本発明の別の非限定な一態様におけるFc領域としては、Fc領域を形成する二つのポリペプチドであって、その一方のポリペプチドのアミノ酸配列のうちEUナンバリングで表される370のアミノ酸がGluであり、他方のポリペプチドのアミノ酸配列のうちEUナンバリングで表される357のアミノ酸がLysであることを特徴とする二つのポリペプチドが好適に用いられる。

[0314] 本発明のさらに別の非限定な一態様におけるFc領域としては、Fc領域を形成する二つのポリペプチドであって、その一方のポリペプチドのアミノ酸配列のうちEUナンバリングで表される439のアミノ酸がGluであり、他方のポリペプチドのアミノ酸配列のうちEUナンバリングで表される356のアミノ酸がLysであることを特徴とする二つのポリペプチドが好適に用いられる。

[0315] 本発明の別の非限定な一態様におけるFc領域としては、これらが組み合わされた以下の態様のいずれか；

(i) Fc領域を形成する二つのポリペプチドであって、その一方のポリペプチドのアミノ酸配列のうちEUナンバリングで表される409のアミノ酸がAsp、370のアミノ酸がGluであり、他方のポリペプチドのアミノ酸配列のうちEUナンバリングで表される399のアミノ酸がLys、357のアミノ酸がLysであることを特徴とする二つのポリペプチド（本態様では、EUナンバリングで表される370のアミノ酸のGluに代えてAspであってもよく、EUナンバリングで表される370のアミノ酸のGluに代えて392のアミノ酸のAspであってもよい）、

(ii) Fc領域を形成する二つのポリペプチドであって、その一方のポリペプチドのアミノ酸配列のうちEUナンバリングで表される409のアミノ酸がAsp、439のアミノ酸がGluであり、他方のポリペプチドのアミノ酸配列のうちEUナンバリングで表される399のアミノ酸がLys、356のアミノ酸がLysであることを特徴とする二つのポリペプチド（本態様では、EUナンバリングで表される439のアミノ酸のGluに代えて360のアミノ酸のAsp、EUナンバリングで表される392

のアミノ酸のAsp又は439のアミノ酸のAspであってもよい）、

（iii）Fc領域を形成する二つのポリペプチドであって、その一方のポリペプチドのアミノ酸配列のうちEUナンバリングで表される370のアミノ酸がGlu、439のアミノ酸がGluであり、他方のポリペプチドのアミノ酸配列のうちEUナンバリングで表される357のアミノ酸がLys、356のアミノ酸がLysであることを特徴とする二つのポリペプチド、または、

Fc領域を形成する二つのポリペプチドであって、その一方のポリペプチドのアミノ酸配列のうちEUナンバリングで表される409のアミノ酸がAsp、370のアミノ酸がGlu、439のアミノ酸がGluであり、他方のポリペプチドのアミノ酸配列のうちEUナンバリングで表される399のアミノ酸がLys、357のアミノ酸がLys、356のアミノ酸がLysであることを特徴とする二つのポリペプチド（本態様では、EUナンバリングで表される370のアミノ酸をGluに置換しなくてもよく、更に、370のアミノ酸をGluに置換しない上で、439のアミノ酸のGluに代えてAsp又は439のアミノ酸のGluに代えて392のアミノ酸のAspであってもよい）、

が好適に用いられる。

[0316] さらに、本発明の別の非限定な一態様において、Fc領域を形成する二つのポリペプチドであって、その一方のポリペプチドのアミノ酸配列のうちEUナンバリングで表される356のアミノ酸がLysであり、他方のポリペプチドのアミノ酸配列のうちEUナンバリングで表される435のアミノ酸がArg、439のアミノ酸がGluであることを特徴とする二つのポリペプチドも好適に用いられる。

[0317] さらに、本発明の別の非限定な一態様において、Fc領域を形成する二つのポリペプチドであって、その一方のポリペプチドのアミノ酸配列のうちEUナンバリングで表される356のアミノ酸がLys、357のアミノ酸がLysであり、他方のポリペプチドのアミノ酸配列のうちEUナンバリングで表される370のアミノ酸がGlu、435のアミノ酸がArg、439のアミノ酸がGluであることを特徴とする二つのポリペプチドも好適に用いられる。

[0318] また、上記の異種の重鎖の会合技術のほか、第一のエピトープに結合する

可変領域を形成する軽鎖、および第二のエピトープに結合する可変領域を形成する軽鎖を、各々、第一のエピトープに結合する可変領域を形成する重鎖、および第二のエピトープに結合する可変領域を形成する重鎖に会合させる異種の軽鎖の会合技術として知られるCrossMab技術（Scaeferら（Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.（2011）108, 11187-11192））も、本発明が提供する多重特異性または多重パラトピック抗原結合分子を作製するために使用され得る。また、異なるIgG4の重鎖同士の交換が起きることを利用して、第一のエピトープに結合する可変領域を形成する重鎖、および第二のエピトープに結合する可変領域を形成する重鎖を会合させる異種の重鎖の会合技術として知られるFab-Arm Exchange(Labrijnら(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2013) 110, 5145-5150)、WO2008119353)も、本発明が提供する多重特異性または多重パラトピック抗原結合分子を作成するために使用され得る。

[0319] エフェクター細胞

本発明において、「エフェクター細胞」とは、T細胞（$CD4^+$（ヘルパーリンパ球）T細胞および/または$CD8^+$（細胞傷害性）T細胞）、多核白血球（好中球、好酸球、好塩基球、肥満細胞）、単球、マクロファージ、組織球またはナチュラルキラー細胞（NK細胞）、NK様T細胞、クッパー細胞、ランゲルハンス細胞、またはリンフォカイン活性化キラー細胞（LAK細胞）等の白血球、Bリンパ球、もしくは樹状細胞またはマクロファージ等の抗原提示細胞をふくむ最も広義な意味で使用され得るが、好適なエフェクター細胞の例としては、$CD8^+$（細胞傷害性）T細胞、NK細胞、またはマクロファージが挙げられる。エフェクター細胞の細胞膜に発現する膜型分子であれば、本発明の抗原結合分子に含まれる少なくとも1つの抗原結合ドメインが結合する抗原として使用され得るが、好適な膜型分子としては、TCRを構成するポリペプチド、CD3、CD2、CD28、CD44、CD16、CD32、CD64、またはNKG2Dもしくは NK細胞活性化リガンドが非限定な例として例示され得る。

[0320] 細胞傷害性物質

本発明の抗原結合分子が癌細胞に結合し、細胞傷害活性を発揮するために

、抗原結合分子に細胞傷害性物質が結合されていてもよい。細胞傷害性物質としては、以下に例示される化学療法剤であってもよく、またCurr Opin Chem Biol (2010) 14, 529-37や国際公開2009/140242に開示されている化合物であってもよく、これらの化合物が適切なリンカー等で抗原結合分子に結合される。本発明の抗原結合分子が医薬組成物として使用される場合、対象（被験者、患者、等）に当該抗原結合分子を投与する前にこれらの細胞傷害性物質を結合させることも可能であるし、投与の前後または同時に投与することも可能である。

[0321] また、後述される、化学療法剤、毒性ペプチド或いは放射性化学物質などの細胞傷害性物質が結合された修飾抗原結合分子修飾物も本発明の細胞傷害活性を有する抗原結合分子として好適に使用され得る。このような修飾抗原結合分子（以下、抗原結合分子薬物コンジュゲートと称する。）は、得られた抗原結合分子を化学的に修飾することによって取得され得る。なお、抗原結合分子の修飾方法として、抗体薬物コンジュゲート等の分野においてすでに確立されている方法が適宜使用され得る。また、毒性ペプチドが結合された修飾抗原結合分子は、当該毒性ペプチドをコードする遺伝子と本発明の抗原結合分子をコードする遺伝子がインフレームで連結された融合遺伝子を、適切な宿主細胞中で発現させた後に、当該細胞の培養液から単離することによって、取得され得る。

[0322] 本発明の抗原結合分子に結合される化学療法剤が例示され得る：アザリビン (azaribine)、アナストロゾール (anastrozole)、アザシチジン (azacytidine)、ブレオマイシン (bleomycin)、ボルテゾミブ (bortezomib)、ブリオスタチン-1 (bryostatin-1)、ブスルファン (busulfan)、カンプトテシン (camptothecin)、10-ヒドロキシカンプトテシン (10-hydroxycamptothecin)、カルムスチン (carmustine)、セレブレックス (celebrex)、クロラムブシル (chlorambucil)、シスプラチン (cisplatin)、イリノテカン (irinotecan)、カルボプラチン (carboplatin)、クラドリビン (cladribine)、シクロホスファミド (cyclophosphamide)、シタラビン (cytarabine)

、ダカルバジン（dacarbazine）、ドセタキセル（docetaxel）、ダクチノマイシン（dactinomycin）、ダウノマイシングルクロニド（daunomycin glucuronide）、ダウノルビシン（daunorubicin）、デキサメタゾン（dexamethasone）、ジエチルスチルベストロール（diethylstilbestrol）、ドキソルビシン（doxorubicin）、ドキソルビシンブルクロニド（doxorubicin glucuronide）、エピルビシン（epirubicin）、エチニルエストラジオール（ethinyl estradiol）、エストラムスチン（estramustine）、エトポシド（etoposide）、エトポシドグルクロニド（etoposide glucuronide）、フロキシウリジン（floxuridine）、フルダラビン（fludarabine）、フルタミド（flutamide）、フルオロウラシル（fluorouracil）、フルオキシメステロン（fluoxymesterone）、ゲムシタビン（gemcitabine）、ヒドロキシプロゲステロンカプロエート（hydroxyprogesterone caproate）、ヒドロキシウレア（hydroxyurea）、イダルビシン（idarubicin）、イフォスファミド（ifosfamide）、ロイコボリン（leucovorin）、ロムスチン（lomustine）、マイタンシノイド（maytansinoid）、メクロレタミン（mechlorethamine）、メドロキシプロゲステロンアセテート（medroxyprogesterone acetate）、メゲストロールアセテート（megestrol acetate）、メルファラン（melphalan）、メルカプトプリン（mercaptopurine）、メトトレキセート（methotrexate）、ミトキサントロン（mitoxantrone）、ミトラマイシン（mithramycin）、ミトマイシン（mitomycin）、ミトタン（mitotane）、フェニルブチレート（phenylbutyrate）、プレドニゾン（prednisone）、プロカルバジン（procarbazine）、パクリタキセル（paclitaxel）、ペントスタチン（pentostatin）、セムスチン（semustine）、ストレプトゾシン（streptozocin）、タモキシフェン（tamoxifen）、タキサン類（taxanes）、タキソール（taxol）、テストステロンプロピオネート（testosterone propionate）、サリドマイド（thalidomide）、チオグアニン（thioguanine）、チオテパ（thiotepa）、テニポシド（teniposide）、トポテカン（topotecan）、ウラシルマスタード（uracil mustard）、ビンブラスチン（vinblastine）、ビノレルビン（vinorelbine）、ビンクリスチン

（vincristine）。

[0323] 本発明において、好ましい化学療法剤は、低分子の化学療法剤である。低分子の化学療法剤は、本発明の抗原結合分子が結合した後も、抗原結合分子の機能に干渉する可能性が低い。本発明において、低分子の化学療法剤は、通常100～2000、好ましくは200～1000の分子量を有する。ここに例示した化学療法剤は、いずれも低分子の化学療法剤である。これらの本発明における化学療法剤は、生体内で活性な化学療法剤に変換されるプロドラッグを含む。プロドラッグの活性化は酵素的な変換であり得るし、非酵素的な変換でもあり得る。

[0324] また、本発明の抗原結合分子に結合される細胞傷害物質としては、Pseudomonas exotoxin A、Saporin-s6、Diphtheria toxin、Cnidarian toxin等の毒性ペプチド（トキシン）やRadioiodine、Photosensitizerも例示され得る。毒性ペプチドの例としては、例えば、次のものが好適に挙げられる。

ジフテリアトキシンＡ鎖（Diphtheria toxin A Chain）（Langoneら（Methods in Enzymology （1983）93, 307-308））；

シュードモナスエンドトキシン（Pseudomonas Exotoxin）（Nature Medicine （1996）2, 350-353）；

リシン鎖（Ricin A Chain）（Fultonら（J. Biol. Chem.（1986）261, 5314-5319）、Sivamら（Cancer Res.（1987）47, 3169-3173）、Cumberら、（J. Immunol. Methods（1990）135,15-24、Wawrzynczakら（Cancer Res.（1990）50, 7519-7562）、およびGheeite ら（J. Immunol.Methods（1991）142,223-230））；

無糖鎖リシンＡ鎖（Deglicosylated Ricin A Chain）（Thorpeら（Cancer Res.（1987）47, 5924-5931））；

アブリンＡ鎖（Abrin A Chain）（Wawrzynczakら（Br. J. Cancer（1992）66, 361-366）、Wawrzynczakら（Cancer Res.（1990）50, 7519-7562）、Sivamら（Cancer Res.（1987）47, 3169-3173）、およびThorpeら（Cancer Res.（1987）47, 5924-5931））；

ゲロニン（Gelonin）（Sivamら（Cancer Res.（1987）47, 3169-3173）、Cumberら（J. Immunol. Methods（1990）135, 15-24）、Wawrzynczakら（Cancer Res.,（1990）50, 7519-7562）、およびBolognesiら（Clin. exp. Immunol.（1992）89, 341-346））；

ポークウイード抗ウィルス蛋白（PAP-s; Pokeweed anti-viral protein from seeds）（Bolognesiら（Clin. exp. Immunol.（1992）89, 341-346））；

ブリオジン（Briodin）（Bolognesiら（Clin. exp. Immunol.（1992）89, 341-346））；

サポリン（Saporin）（Bolognesiら（Clin. exp. Immunol.（1992）89, 341-346））；

モモルジン（Momordin）（Cumberら（J. Immunol. Methods（1990）135, 15-24）；Wawrzynczakら（Cancer Res.（1990）50, 7519-7562）、およびBolognesiら（Clin. exp. Immunol.（1992）89, 341-346））；

モモルコキン（Momorcochin）（Bolognesiら（Clin. exp. Immunol.（1992）89, 341-346））；

ジアンシン３２（Dianthin 32）（Bolognesiら（Clin. exp. Immunol.（1992）89, 341-346））；

ジアンシン３０（Dianthin 30）（Stirpe F., Barbieri L.（FEBS letter（1986）195, 1-8））；

モデッシン（Modeccin）（Stirpe F., Barbieri L.（FEBS letter（1986）195, 1-8））；

ビスカミン（Viscumin）（Stirpe F., Barbieri L.（FEBS letter（1986）195, 1-8））；

ボルケシン（Volkesin）（Stirpe F., Barbieri L.（FEBS letter（1986）195, 1-8））；

ドデカンドリン（Dodecandrin）（Stirpe F., Barbieri L.（FEBS letter（1986）195, 1-8））；

トリチン（Tritin）（Stirpe F., Barbieri L.（FEBS letter（1986）195, 1

-8)）；

ルフィン（Luffin）（Stirpe F., Barbieri L.（FEBS letter（1986）195, 1-8））；および

トリコキリン（Trichokirin）（Casellasら（Eur. J. Biochem.（1988）176, 581-588）、およびBolognesiら（Clin. exp. Immunol.,（1992）89, 341-346））。

[0325] 抗原結合分子

本発明において、低分子化合物（例えば、標的組織特異的な化合物）の存在下における抗原に対する結合活性が、当該化合物の非存在下における抗原に対する結合活性よりも高い抗原結合ドメインを含む抗原結合分子は最も広義な意味として使用されており、具体的には、それらが抗原に対する結合活性を示す限り、様々な分子型が含まれる。例えば、抗原結合ドメインがFc領域と結合した分子の例として、抗体が挙げられる。抗体には、単一のモノクローナル抗体（アゴニストおよびアンタゴニスト抗体を含む）、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体等が含まれ得る。また抗体の断片として使用される場合としては、抗原結合ドメインおよび抗原結合断片（例えば、Fab、F(ab')2、scFvおよびFv）が好適に挙げられ得る。既存の安定なα/βバレルタンパク質構造等の立体構造が scaffold（土台）として用いられ、その一部分の構造のみが抗原結合ドメインの構築のためにライブラリ化されたスキャフォールド分子も、本発明の抗原結合分子に含まれ得る 。

[0326] 本発明の抗原結合分子は、Fcγレセプターに対する結合、および/またはFcRnに対する結合を媒介するFc領域の少なくとも部分を含むことができる。例えば、非限定な一態様では、抗原結合分子は抗体またはFc融合タンパク質であり得る。融合タンパク質とは、天然ではそれが自然に連結しない第二のアミノ酸配列を有するポリペプチドに連結された第一のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むキメラポリペプチドをいう。例えば、融合タンパク質は、Fc領域の少なくとも部分（例えば、Fcγレセプターに対する結合を付与するFc領域の部分および/またはFcRnに対する結合を付与するFc領域の部分）をコー

ドするアミノ酸配列を含むポリペプチド、を含むことができる。アミノ酸配列は、一緒に融合タンパク質に運ばれる別々のタンパク質に存在できるか、あるいはそれらは通常は同一タンパク質に存在できるが、融合ポリペプチド中の新しい再編成に入れられる。融合タンパク質は、例えば、化学合成によって、またはペプチド領域が所望の関係でコードされたポリヌクレオチドを作成し、それを発現する遺伝子組換えの手法によって作製され得る。

[0327] 本発明の各ドメインはポリペプチド結合によって直接連結され得るし、リンカーを介して連結され得る。リンカーとしては、遺伝子工学により導入し得る任意のペプチドリンカー、又は合成化合物リンカー（例えば、Holligerら（Protein Engineering（1996）9（3），299-305））に開示されるリンカー等が使用され得るが、本発明においてはペプチドリンカーが好ましい。ペプチドリンカーの長さは特に限定されず、目的に応じて当業者が適宜選択することが可能であるが、好ましい長さは5アミノ酸以上（上限は特に限定されないが、通常、30アミノ酸以下、好ましくは20アミノ酸以下）であり、特に好ましくは15アミノ酸である。

[0328] 例えば、ペプチドリンカーの場合：

Ser

Gly・Ser

Gly・Gly・Ser

Ser・Gly・Gly

Gly・Gly・Gly・Ser（配列番号：１９）

Ser・Gly・Gly・Gly（配列番号：２０）

Gly・Gly・Gly・Gly・Ser（配列番号：２１）

Ser・Gly・Gly・Gly・Gly（配列番号：２２）

Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Ser（配列番号：２３）

Ser・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly（配列番号：２４）

Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Ser（配列番号：２５）

Ser・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly（配列番号：２６）

（Gly・Gly・Gly・Gly・Ser（配列番号：２１））n

（Ser・Gly・Gly・Gly・Gly（配列番号：２２））n

［nは１以上の整数である］等が好適に挙げられる。但し、ペプチドリンカーの長さや配列は目的に応じて当業者が適宜選択することができる。

[0329] 合成化学物リンカー（化学架橋剤）は、ペプチドの架橋に通常用いられている架橋剤、例えばN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）、ジスクシンイミジルスベレート（DSS）、ビス（スルホスクシンイミジル）スベレート（BS3）、ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）（DSP）、ジチオビス（スルホスクシンイミジルプロピオネート）（DTSSP）、エチレングリコールビス（スクシンイミジルスクシネート）（EGS）、エチレングリコールビス（スルホスクシンイミジルスクシネート）（スルホ－EGS）、ジスクシンイミジル酒石酸塩（DST）、ジスルホスクシンイミジル酒石酸塩（スルホ－DST）、ビス［2-（スクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル］スルホン（BSOCOES）、ビス［2-（スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル］スルホン（スルホ-BSOCOES）等であり、これらの架橋剤は市販されている。

[0330] 各ドメインを連結するリンカーが複数用いられる場合には、全て同種のリンカーが用いられ得るし、異種のリンカーも用いられ得る。また、上記記載で例示されるリンカーのほか、例えばHisタグ、HAタグ、mycタグ、FLAGタグ等のペプチドタグを有するリンカーも適宜使用され得る。また、水素結合、ジスルフィド結合、共有結合、イオン性相互作用またはこれらの結合の組合せにより互いに結合する性質もまた好適に利用され得る。例えば、抗体のCH1とCL間の親和性が利用されたり、ヘテロFc領域の会合に際して前述の二重特異性抗体を起源とするFc領域が用いられたりする。さらに、ドメイン間に形成されるジスルフィド結合もまた好適に利用され得る。

[0331] 各ドメインをペプチド結合で連結するために、当該ドメインをコードするポリヌクレオチドがインフレームで連結される。ポリヌクレオチドをインフレームで連結する方法としては、制限断片のライゲーションやフュージョンPCR、オーバーラップPCR等の手法が公知であり、本発明の抗原結合分子の作製

にも適宜これらの方法が単独または組合せで使用され得る。本発明では、用語「連結され」、「融合され」、「連結」または「融合」は相互交換的に用いられる。これらの用語は、上記の化学結合手段または組換え手法を含めた全ての手段によって、二以上のポリペプチド等のエレメントまたは成分を一つの構造を形成するように連結することをいう。インフレームで融合するとは、二以上のエレメントまたは成分がポリペプチドである場合に、当該ポリペプチドのの正しい読み取り枠を維持するように連続したより長い読み取り枠を形成するための二以上の読取り枠の単位の連結をいう。二分子のFabが抗原結合ドメインとして用いられた場合、当該抗原結合ドメインとFc領域を含む定常領域がリンカーを介することなくペプチド結合によってインフレームで連結された本発明の抗原結合分子である抗体は、本発明の好適な抗原結合分子として使用され得る。

[0332] 低分子化抗体

本発明で使用される抗体は、抗体の全長分子に限られず、低分子化抗体またはその修飾物であってもよい。低分子化抗体は、全長抗体（例えば、whole IgG等のwhole antibody）の一部分が欠損している抗体断片を含み、抗原に対する結合活性を有していれば特に限定されない。本発明の低分子化抗体は、全長抗体の一部分であれば特に限定されないが、重鎖可変領域（VH）又は/及び軽鎖可変領域（VL）を含んでいることが好ましい。VHまたはVLのアミノ酸配列は、置換、欠失、付加及び/又は挿入がされていてもよい。さらに抗原に対する結合活性を有する限り、VH又は/及びVLの一部を欠損させてもよい。又、可変領域はキメラ化やヒト化されていてもよい。抗体断片の具体例としては、例えば、Fab、Fab'、F(ab')2、Fvなどを挙げることができる。また、低分子化抗体の具体例としては、例えば、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv、scFv（single chain Fv）、Diabody、sc(Fv)2（single chain (Fv)2）などを挙げることができる。これら抗体の多量体（例えば、ダイマー、トリマー、テトラマー、ポリマー）も、本発明の低分子化抗体に含まれる。

[0333] 抗体断片は、抗体を酵素、例えばパパイン、ペプシンで処理することによ

って生成され得るし、または、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現され得る（例えば、Coら（J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976）、BetterおよびHorwitz（Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496）、PlueckthunおよびSkerraら（Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496）、Lamoyi（Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663）、Rousseauxら（Methods in Enzymology (1989) 121, 663-669）およびBirdら（TIBTECH (1991) 9, 132-137）を参照）。

[0334] Diabodyは、遺伝子融合により構築された二価（bivalent）の低分子化抗体を指す（Holligerら（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 6444-6448 (1993)、欧州公開公報EP404097、およびPCT公開公報WO1993/011161等）。Diabodyは、2本のポリペプチド鎖から構成されるダイマーであり、通常、ポリペプチド鎖は各々、同じ鎖中でVL及びVHが、互いに結合できない位に短い、例えば、5残基程度のリンカーにより結合されている。同一ポリペプチド鎖上にコードされるVLとVHとは、その間のリンカーが短いため単鎖可変領域フラグメントを形成することが出来ず二量体を形成するため、Diabodyは2つの抗原結合部位を有することとなる。

[0335] scFvは、抗体のH鎖V領域とL鎖V領域とを連結することにより得られる。このscFvにおいて、H鎖V領域とL鎖V領域は、リンカー、好ましくはペプチドリンカーを介して連結される（Hustonら（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883）。scFvにおけるH鎖V領域およびL鎖V領域は、本明細書に抗体として記載されたもののいずれの抗体由来であってもよい。V領域を連結するペプチドリンカーとしては、特に制限はないが、例えば３から２５残基程度からなる任意の一本鎖ペプチド、また、後述のペプチドリンカー等を用いることができる。V領域の連結方法としては上記のようなPCR法が利用できる。前記抗体のH鎖またはH鎖Ｖ領域をコードするDNA配列、およびL鎖またはL鎖V領域をコードするDNA配列のうち、全部又は所望のアミノ酸配列をコードするDNA部分を鋳型として、及び、その両端の配列に対応する配列を有するプライマーの一対を用いたPCR法によってscFvをコードするDNAが増幅できる。

次いで、ペプチドリンカー部分をコードするDNA、およびその両端が各々H鎖、L鎖と連結されるように設計された配列を有するプライマーの一対を組み合わせてPCR反応を行うことによって、所望の配列を有するDNAが取得できる。また、一旦scFvをコードするDNAが作製されると、それらを含有する発現ベクター、および当該発現ベクターにより形質転換された組換え細胞が常法に従って取得でき、また、その結果得られる組換え細胞を培養して当該scFvをコードするDNAを発現させることにより、当該scFvが取得できる。

[0336] sc(Fv)2は、2つのVH及び2つのVLをリンカー等で結合して一本鎖にした低分子化抗体である（Hudsonら（J. Immunol. Methods（1999）231, 177-189）。sc(Fv)2は、例えば、scFvをリンカーで結ぶことによって作製できる。

[0337] また２つのVH及び２つのVLが、一本鎖ポリペプチドのN末端側を基点としてVH、VL、VH、VL（［VH］リンカー［VL］リンカー［VH］リンカー［VL］）の順に並んでいることを特徴とする抗体が好ましい。2つのVHと2つのVLの順序は特に上記配置に限定されず、どのような順序で並べられていてもよい。例えば以下のような配置も挙げることができる。

－［VL］リンカー［VH］リンカー［VH］リンカー［VL］

－［VH］リンカー［VL］リンカー［VL］リンカー［VH］

－［VH］リンカー［VH］リンカー［VL］リンカー［VL］

－［VL］リンカー［VL］リンカー［VH］リンカー［VH］

－［VL］リンカー［VH］リンカー［VL］リンカー［VH］

[0338] 抗体の可変領域を結合するリンカーとしては、前記の抗原結合分子の項で記載されたリンカーと同様のリンカーが使用され得る。例えば、本発明において特に好ましいsc(Fv)2の態様としては、例えば、以下のsc(Fv)2を挙げることができる。

－［VH］ペプチドリンカー(15アミノ酸)［VL］ペプチドリンカー(15アミノ酸)［VH］ペプチドリンカー(15アミノ酸)［VL］

[0339] 4つの抗体可変領域を結合する場合には、通常、3つのリンカーが必要となるが、全て同じリンカーを用いてもよいし、異なるリンカーを用いてもよい

。本発明において非限定な低分子化抗体の一態様として、互いに異なるパラトープであって、一方のパラトープが癌細胞や炎症組織に浸潤している細胞等の細胞膜に結合する膜型分子に存在するエピトープに結合し、もう一方のパラトープがエフェクター細胞の細胞膜に発現する膜型分子中に存在するエピトープに結合するDiabody又はsc(Fv)2が例示され得る。上記のDiabody又はsc(Fv)2では、癌細胞や炎症組織に浸潤している細胞等の細胞膜に結合する膜型分子に存在するエピトープに対する一方のパラトープの結合活性が低分子化合物（例えば、癌組織特異的化合物、炎症組織特異的化合物、非天然化合物）に依存的であり得るし、エフェクター細胞の細胞膜に結合する膜型分子に存在するエピトープに対する一方のパラトープの結合活性が低分子化合物（例えば、癌組織特異的化合物、炎症組織特異的化合物、非天然化合物）に依存的であり得るし、また、双方のパラトープの結合活性が低分子化合物（例えば、癌組織特異的化合物、炎症組織特異的化合物、非天然化合物）に依存的であり得る。

[0340] 本発明において非限定な低分子化抗体の一態様として、互いに異なるパラトープであって、一方のパラトープが癌細胞や炎症組織に浸潤している細胞等の細胞膜に結合する膜型分子に存在するエピトープに結合し、もう一方のパラトープが細胞傷害性物質に存在するエピトープに結合するDiabody又はsc(Fv)2が例示され得る。上記のDiabody又はsc(Fv)2では、癌細胞や炎症組織に浸潤している細胞の細胞膜に結合する膜型分子に存在するエピトープに対する一方のパラトープの結合活性が低分子化合物（例えば、癌組織特異的化合物、炎症組織特異的化合物、非天然化合物）に依存的であり得るし、細胞傷害性物質に存在するエピトープに対する一方のパラトープの結合活性が低分子化合物（例えば、癌組織特異的化合物、炎症組織特異的化合物、非天然化合物）に依存的であり得るし、また、双方のパラトープの結合活性が癌組織特異的化合物に依存的であり得る。

[0341] このような低分子化抗体を得るには、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンなどで処理し、抗体断片を生成させるか、もしくはこれらの抗体断片

または低分子化抗体をコードするDNAを構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させればよい（例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137参照）。

[0342] FcRn

免疫グロブリンスーパーファミリーに属するFcγレセプターと異なり、ヒトFcRnは構造的には主要組織不適合性複合体（MHC）クラスＩのポリペプチドに構造的に類似しクラスＩのMHC分子と22から29%の配列同一性を有する（Ghetieら, Immunol. Today (1997) 18 (12), 592-598）。FcRnは、可溶性βまたは軽鎖（β2マイクログロブリン）と複合体化された膜貫通αまたは重鎖よりなるヘテロダイマーとして発現される。MHCのように、FcRnのα鎖は３つの細胞外ドメイン（α１、α２、α３）よりなり、短い細胞質ドメインはタンパク質を細胞表面に繋留する。α１およびα２ドメインが抗体のFc領域中のFcRn結合ドメインと相互作用する（Raghavanら（Immunity (1994) 1, 303-315）。

[0343] FcRnは、哺乳動物の母性胎盤または卵黄嚢で発現され、それは母親から胎児へのIgGの移動に関与する。加えてFcRnが発現するげっ歯類新生児の小腸では、FcRnが摂取された初乳または乳から母性IgGの刷子縁上皮を横切る移動に関与する。FcRnは多数の種にわたって多数の他の組織、並びに種々の内皮細胞系において発現している。それはヒト成人血管内皮、筋肉血管系、および肝臓洞様毛細血管でも発現される。FcRnは、IgGに結合し、それを血清にリサイクルすることによって、IgGの血漿中濃度を維持する役割を演じていると考えられている。FcRnのIgG分子への結合は、通常、厳格にpHに依存的であり、最適結合は7.0未満のpH酸性域において認められる。

[0344] 配列番号：２８で表されたシグナル配列を含むポリペプチドを前駆体とするヒトFcRnは、生体内で（配列番号：２９にシグナル配列を含むそのポリペプチドが記載されている）ヒトβ2-ミクログロブリンとの複合体を形成する。β2-ミクログロブリンと複合体を形成している可溶型ヒトFcRnが通常の組換え発現手法を用いることによって製造される。このようなβ2-ミクログロブリンと複合体を形成している可溶型ヒトFcRnに対する本発明のFc領域の結合活性が評価され得る。本発明において、特に記載のない場合は、ヒトFcRnは本発明のFc領域に結合し得る形態であるものを指し、例としてヒトFcRnとヒトβ2-ミクログロブリンとの複合体が挙げられる。

[0345] 本発明と定常領域改変技術の組み合わせの態様として、酸性pHでのFcRn結合増強改変Fc技術（WO2002060919、WO2004035752、WO2000042072）、中性pHでのFcRn結合増強改変Fc技術(WO2011122011、WO2012133782)、抑制型Fcγ受容体選択的結合増強技術（WO2012115241、WO2013125667）、活性型Fcγ受容体選択的結合増強技術（ADCC活性増強技術）（WO2013002362）、Rheumatoid factorへの結合活性を低下させる技術(WO2013046704) 等の抗体改変技術との組み合わせが挙げられる。

[0346] 本発明と可変領域改変技術との非限定の組み合わせの態様としては、pH依存性抗体（WO2009125825）、カルシウム依存性抗体（WO2012073992）等の改変技術との組み合わせが挙げられる。

[0347] 二分子のFcRnおよび一分子の活性型Fcγレセプターの四者を含むヘテロ複合体

FcRnとIgG抗体との結晶学的研究によって、FcRn-IgG複合体は、二分子のFcRnに対して一分子のIgGから構成され、IgGのFc領域の両側に位置するCH2およびCH3ドメインの接触面付近において、二分子の結合が起こると考えられている（Burmeisterら（Nature（1994）372, 336-343）。一方、PCT/JP2012/058603の実施例３において確認されたように、抗体のFc領域が二分子のFcRnおよび一分子の活性型Fcγレセプターの四者を含む複合体を形成できることが明らかとなった（PCT/JP2012/058603）。このヘテロ複合体の形成は、pH中性域

の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFc領域を含む抗原結合分子の性質について解析を進めた結果明らかとなった現象である。

[0348] 本発明は特定の理論に拘束されるわけではないが、抗原結合分子に含まれるFc領域と二分子のFcRnおよび一分子の活性型Fcγレセプターの四者を含むヘテロ複合体の形成によって、抗原結合分子が生体内に投与されたときの抗原結合分子の当該生体内における薬物動態（血漿中滞留性）、および、投与された抗原結合分子に対する免疫応答（免疫原性）に対して以下のような影響がもたらされることも考えられる。免疫細胞上には各種活性型Fcγレセプターに加えFcRnが発現しており、抗原結合分子が免疫細胞上でこのような四者複合体を形成することは、免疫細胞に対する親和性を向上させ、さらに細胞内ドメインを会合化させることにより内在化シグナルを増強させ、免疫細胞への取り込みが促進されることが示唆される。抗原提示細胞においても同様であり、抗原提示細胞の細胞膜上で四者複合体を形成することにより、抗原結合分子が抗原提示細胞へ取り込まれやすくなる可能性が示唆される。一般的に、抗原提示細胞に取り込まれた抗原結合分子は、抗原提示細胞内のリソソームにおいて分解され、T細胞へと提示される。結果として、抗原提示細胞の細胞膜上で上記の四者複合体を形成することにより、抗原結合分子に対する抗原提示細胞への取り込みが促進されことによって抗原結合分子の血漿中滞留性が悪化する可能性もある。また、同様にして、免疫応答が誘起される（増悪する）可能性がある。

[0349] そのため、このような四者複合体を形成する能力が低下した抗原結合分子が生体に投与された場合、当該抗原結合分子の血漿中滞留性が向上し、当該生体による免疫応答の誘起が抑制されると考えられ得る。このような抗原提示細胞を含む免疫細胞上における当該複合体の形成を阻害する抗原結合分子の好ましい様態として、以下の三種類が挙げられ得る。

[0350] ヘテロ複合体の形成を阻害する抗原結合分子

（様態１） pH中性域の条件下でのFcRnに対する結合活性を有し、活性型FcγRに対する結合活性が天然型Fc領域の活性型FcγRに対する結合活性より低

いFc領域を含む抗原結合分子

[0351] 様態１の抗原結合分子は、二分子のFcRnに結合することによって三者複合体を形成するが、活性型FcγRを含めた複合体は形成しない。活性型FcγRに対する結合活性が天然型Fc領域の活性型FcγRに対する結合活性より低いFc領域は、前記のように天然型Fc領域のアミノ酸を改変することによって作製され得る。改変Fc領域の活性型FcγRに対する結合活性が、天然型Fc領域の活性型FcγRに対する結合活性より低いか否かは、前記の結合活性の項で記載された方法を用いて適宜実施され得る。

[0352] 活性型Fcγレセプターとしては、FcγRIa、FcγRIbおよびFcγRIcを含むFcγRI（CD64）、FcγRIIa（アロタイプR131およびH131を含む）ならびにアイソフォームFcγRIIIa（アロタイプV158およびF158を含む）およびFcγRIIIb（アロタイプFcγRIIIb-NA1およびFcγRIIIb-NA2を含む）を含むFcγRIII（CD16）が好適に挙げられる。

[0353] 本明細書において、Fc領域改変体の活性型Fcγレセプターに対する結合活性が天然型Fc領域の活性型Fcγレセプターに対する結合活性よりも低いとは、Fc領域改変体のFcγRI、FcγRIIa、FcγRIIIa及び/又はFcγRIIIbのいずれかのヒトFcγレセプターに対する結合活性が、これらのヒトFcγレセプターに対する天然型Fc領域の結合活性よりも低いことをいう。例えば、上記の解析方法にもとづいて、対照とする天然型Fc領域を含む抗原結合分子の結合活性に比較してFc領域改変体を含む抗原結合分子の結合活性が、95%以下、好ましくは90%以下、85%以下、80%以下、75%以下、特に好ましくは70%以下、65%以下、60%以下、55%以下、50%以下、45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、9%以下、8%以下、7%以下、6%以下、5%以下、4%以下、3%以下、2%以下、1%以下の結合活性を示すことをいう。天然型Fc領域としては、出発Fc領域も使用され得るし、野生型抗体の異なるアイソタイプのFc領域も使用され得る。

[0354] また、天然型の活性型FcγRに対する結合活性とは、ヒトIgG1のFcγレセプターに対する結合活性であることが好ましく、Fcγレセプターに対する結合

活性を低減させるには上記改変以外にも、ヒトIgG2、ヒトIgG3、ヒトIgG4にアイソタイプを変更することでも達成し得る。また、Fcγレセプターに対する結合活性を低下させるのは上記改変以外にも、Fcγレセプターに対する結合活性を有するFc領域を含む抗原結合分子を大腸菌等の糖鎖を付加しない宿主で発現させることによっても得ることができる。

[0355] 対照とするFc領域を含む抗原結合分子としては、IgGモノクローナル抗体のFc領域を有する抗原結合分子が適宜使用され得る。当該Fc領域の構造は、配列番号：５（RefSeq登録番号AAC82527.1のN末にA付加）、６（RefSeq登録番号AAB59393.1のN末にA付加）、７（RefSeq登録番号CAA27268.1）、８（RefSeq登録番号AAB59394.1のN末にA付加）に記載されている。また、ある特定のアイソタイプの抗体のFc領域を含む抗原結合分子を被検物質として使用する場合には、当該特定のアイソタイプのIgGモノクローナル抗体のFc領域を有する抗原結合分子を対照として用いることによって、当該Fc領域を含む抗原結合分子によるFcγレセプターに対する結合活性の効果が検証される。上記のようにして、Fcγレセプターに対する結合活性が高いことが検証されたFc領域を含む抗原結合分子が適宜選択される。

[0356] 本発明の非限定の一態様では、活性型FcγRに対する結合活性が天然型Fc領域の活性型FcγRに対する結合活性より低いFc領域の例として、前記Fc領域のアミノ酸のうちEUナンバリングで表される234、235、236、237、238、239、270、297、298、325、328、および329のいずれか一つ以上のアミノ酸が天然型Fc領域と異なるアミノ酸に改変されているFc領域が好適に挙げられるが、Fc領域の改変は上記改変に限定されず、例えばCur. Opin. in Biotech. (2009) 20 (6), 685-691に記載されている脱糖鎖（N297A, N297Q）、IgG1-L234A/L235A、IgG1-A325A/A330S/P331S、IgG1-C226S/C229S、IgG1-C226S/C229S/E233P/L234V/L235A、IgG1-L234F/L235E/P331S、IgG1-S267E/L328F、IgG2-V234A/G237A、IgG2-H268Q/V309L/A330S/A331S、IgG4-L235A/G237A/E318A、IgG4-L236E等の改変、および、国際公開WO2008/092117に記載されているG236R/L328R、L235G/G236R、N325A/L328R、N325L/L328R等の改変、および、EUナンバリング2

33位、234位、235位、237位におけるアミノ酸の挿入、国際公開WO2000/042072に記載されている個所の改変であってもよい。

[0357] また本発明の非限定の一態様では、前記Fc領域のEUナンバリングで表されるアミノ酸であって；

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

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

236位のアミノ酸をArg、Asn、Gln、His、Leu、Lys、Met、Phe、ProまたはTyrのいずれか、

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

238位のアミノ酸をAla、Asn、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Thr、TrpまたはArgのいずれか、

239位のアミノ酸をGln、His、Lys、Phe、Pro、Trp、TyrまたはArgのいずれか、

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

266位のアミノ酸をAla、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Gly、His、Lys、Phe、Pro、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、

267位のアミノ酸をArg、His、Lys、Phe、Pro、TrpまたはTyrのいずれか、

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

270位のアミノ酸をAla、Arg、Asn、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、TyrまたはValのいずれか、

271位のアミノ酸をArg、His、Phe、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、

295位のアミノ酸をArg、Asn、Asp、Gly、His、Phe、Ser、TrpまたはTyrのいずれか、

296位のアミノ酸をArg、Gly、LysまたはProのいずれか、

297位のアミノ酸をAla、

298位のアミノ酸をArg、Gly、Lys、Pro、TrpまたはTyrのいずれか、

300位のアミノ酸をArg、LysまたはProのいずれか、

324位のアミノ酸をLysまたはProのいずれか、

325位のアミノ酸をAla、Arg、Gly、His、Ile、Ｌｙｓ、Phe、Pro、Thr、TrpTyr、もしくはValのいずれか、

327位のアミノ酸をArg、Gln、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、TyrまたはValのいずれか、

328位のアミノ酸をArg、Asn、Gly、His、LysまたはProのいずれか、

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

330位のアミノ酸をProまたはSerのいずれか、

331位のアミノ酸をArg、GlyまたはLysのいずれか、もしくは

332位のアミノ酸をArg、LysまたはProのいずれか、

のいずれか一つ以上に改変されているFc領域が好適に挙げられる。

[0358] （様態２） pH中性域の条件下でのFcRnに対する結合活性を有し、抑制型FcγRに対する結合活性が活性型Fcγレセプターに対する結合活性よりも高いFc領域を含む抗原結合分子

[0359] 様態２の抗原結合分子は、二分子のFcRnと一分子の抑制型FcγRに結合することによってこれら四者を含む複合体を形成し得る。しかしながら、一分子の抗原結合分子は一分子のFcγRとしか結合できないため、一分子の抗原結合分子は抑制型FcγRに結合した状態で他の活性型FcγRに結合することはできない。さらに、抑制型FcγRに結合した状態で細胞内へと取り込まれた抗原結合分子は、細胞膜上へとリサイクルされ、細胞内での分解を回避することが報告されている（Immunity (2005) 23, 503-514）。すなわち、抑制型FcγRに対する選択的結合活性を有する抗原結合分子は、免疫応答の原因となる活性型FcγRおよび二分子のFcRnを含めたヘテロ複合体を形成することができな

いと考えられる。

[0360] 活性型Fcγレセプターとしては、FcγRIa、FcγRIbおよびFcγRIcを含むFcγRI（CD64）、FcγRIIa（アロタイプR131およびH131を含む）ならびにアイソフォームFcγRIIIa（アロタイプV158およびF158を含む）およびFcγRIIIb（アロタイプFcγRIIIb-NA1およびFcγRIIIb-NA2を含む）を含むFcγRIII（CD16）が好適に挙げられる。また、FcγRIIb（FcγRIIb-1およびFcγRIIb-2を含む）が抑制型Fcγレセプターの好適な例として挙げられる。

[0361] 本明細書において、抑制型FcγRに対する結合活性が活性型Fcγレセプターに対する結合活性よりも高いとは、Fc領域改変体のFcγRIIbに対する結合活性が、FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIIa及び/又はFcγRIIIbのいずれかのヒトFcγレセプターに対する結合活性よりも高いことをいう。例えば、上記の解析方法にもとづいて、Fc領域改変体を含む抗原結合分子のFcγRIIbに対する結合活性が、FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIIa及び/又はFcγRIIIbのいずれかのヒトFcγレセプターに対する結合活性の、105%以上、好ましくは110%以上、120%以上、130%以上、140%以上、特に好ましくは150%以上、160%以上、170%以上、180%以上、190%以上、200%%以上、250%以上、300%以上、350%以上、400%以上、450%以上、500%以上、750%以上、10倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上の結合活性を示すことをいう。

[0362] FcγRIIbに対する結合活性が、FcγRIa、FcγRIIa（アロタイプR131およびH131を含む）およびFcγRIIIa（アロタイプV158およびF158を含む）よりもすべて高いことがもっとも好ましい。FcγRIa は天然型IgG1に対するアフィニティーが極めて高いことから、生体内においては大量の内因性IgG1によって結合が飽和されていると考えられるため、FcγRIIbに対する結合活性はFcγRIIaおよびFcγRIIIaよりも高く、FcγRIaよりは低くても当該複合体の形成阻害は可能であると考えられる。

[0363] 対照とするFc領域を含む抗原結合分子としては、IgGモノクローナル抗体のFc領域を有する抗原結合分子が適宜使用され得る。当該Fc領域の構造は、配列番号：５（RefSeq登録番号AAC82527.1のN末にA付加）、６（RefSeq登録番

号AAB59393.1のN末にA付加）、７（RefSeq登録番号CAA27268.1）、８（RefSeq登録番号AAB59394.1のN末にA付加）に記載されている。また、ある特定のアイソタイプの抗体のFc領域を含む抗原結合分子を被検物質として使用する場合には、当該特定のアイソタイプのIgGモノクローナル抗体のFc領域を有する抗原結合分子を対照として用いることによって、当該Fc領域を含む抗原結合分子によるFcγレセプターに対する結合活性の効果が検証される。上記のようにして、Fcγレセプターに対する結合活性が高いことが検証されたFc領域を含む抗原結合分子が適宜選択される。

[0364] 本発明の非限定の一態様では、抑制型FcγRに対する選択的な結合活性を有するFc領域の例として、前記Fc領域のアミノ酸のうちEUナンバリングで表される238または328のアミノ酸が天然型Fc領域と異なるアミノ酸に改変されているFc領域が好適に挙げられる。また、抑制型Fcγレセプターに対する選択的な結合活性を有するFc領域として、US2009/0136485に記載されているFc領域あるいは改変も適宜選択することができる。

[0365] また本発明の非限定の一態様では、前記Fc領域のEUナンバリングで表されるアミノ酸であってEUナンバリングで表される238のアミノ酸がAsp、または328のアミノ酸がGluのいずれか一つ以上に改変されているFc領域が好適に挙げられる。

[0366] さらに本発明の非限定の一態様では、EUナンバリングで表される２３８位のProのAspへの置換、およびEUナンバリングで表される237位のアミノ酸がTrp、EUナンバリングで表される237位のアミノ酸がPhe、EUナンバリングで表される267位のアミノ酸がVal、EUナンバリングで表される267位のアミノ酸がGln、EUナンバリングで表される268位のアミノ酸がAsn、EUナンバリングで表される271位のアミノ酸がGly、EUナンバリングで表される326位のアミノ酸がLeu、EUナンバリングで表される326位のアミノ酸がGln、EUナンバリングで表される326位のアミノ酸がGlu、EUナンバリングで表される326位のアミノ酸がMet、EUナンバリングで表される239位のアミノ酸がAsp、EUナンバリングで表される267位のアミノ酸がAla、EUナンバリングで表される234位のアミノ酸がTr

p、EUナンバリングで表される234位のアミノ酸がTyr、EUナンバリングで表される237位のアミノ酸がAla、EUナンバリングで表される237位のアミノ酸がAsp、EUナンバリングで表される237位のアミノ酸がGlu、EUナンバリングで表される237位のアミノ酸がLeu、EUナンバリングで表される237位のアミノ酸がMet、EUナンバリングで表される237位のアミノ酸がTyr、EUナンバリングで表される330位のアミノ酸がLys、EUナンバリングで表される330位のアミノ酸がArg、EUナンバリングで表される233位のアミノ酸がAsp、EUナンバリングで表される268位のアミノ酸がAsp、EUナンバリングで表される268位のアミノ酸がGlu、EUナンバリングで表される326位のアミノ酸がAsp、EUナンバリングで表される326位のアミノ酸がSer、EUナンバリングで表される326位のアミノ酸がThr、EUナンバリングで表される323位のアミノ酸がIle、EUナンバリングで表される323位のアミノ酸がLeu、EUナンバリングで表される323位のアミノ酸がMet、EUナンバリングで表される296位のアミノ酸がAsp、EUナンバリングで表される326位のアミノ酸がAla、EUナンバリングで表される326位のアミノ酸がAsn、EUナンバリングで表される330位のアミノ酸がMet、のいずれか一つ以上に改変されているFc領域が好適に挙げられる。

[0367] （様態３） Fc領域を構成する二つのポリペプチドの一方がpH中性域の条件下でのFcRnに対する結合活性を有し、他方がpH中性域の条件下でのFcRnに対する結合能活性を有しないFc領域を含む抗原結合分子

[0368] 様態３の抗原結合分子は、一分子のFcRnと一分子のFcγRに結合することによって三者複合体を形成しうるが、二分子のFcRnと一分子のFcγRの四者を含むヘテロ複合体は形成しない。本様態３の抗原結合分子に含まれる、Fc領域を構成する二つのポリペプチドの一方がpH中性域の条件下でのFcRnに対する結合活性を有し、他方のポリペプチドがpH中性域の条件下でのFcRnに対する結合能活性を有しないFc領域として、二重特異性抗体（bispecific抗体）を起源とするFc領域も適宜使用され得る。二重特異性抗体とは、異なる抗原に対して特異性を有する二種類の抗体である。IgG型の二重特異性抗体はIgG抗体を産生するハイブリドーマ二種を融合することによって生じるhybrid hybr

idoma（quadroma）によって分泌させることが可能である（Milsteinら（Nature（1983）305，537-540））。

[0369] 上記の様態３の抗原結合分子を前記の抗体の項で記載されたような組換え手法を用いて製造する場合、目的の二種のFc領域を構成するポリペプチドをコードする遺伝子を細胞に導入しそれらを共発現させる方法が採用され得る。しかしながら、製造されるFc領域は、Fc領域を構成する二つのポリペプチドの一方がpH中性域の条件下でのFcRnに対する結合活性を有し、他方のポリペプチドがpH中性域の条件下でのFcRnに対する結合能活性を有しないFc領域と、Fc領域を構成する二つのポリペプチドの双方がpH中性域の条件下でのFcRnに対する結合活性を有するFc領域と、Fc領域を構成する二つのポリペプチドの双方がpH中性域の条件下でのFcRnに対する結合活性を有しないFc領域が、２：１：１の分子数の割合で存在する混合物となる。3種類のIgGから目的の組合せのFc領域を含む抗原結合分子を精製することは困難である。

[0370] こうした組換え手法を用いて様態３の抗原結合分子を製造する際に、Fc領域を構成するCH3ドメインに適当なアミノ酸置換の改変を加えることによってヘテロな組合せのFc領域を含む抗原結合分子が優先的に分泌され得る。具体的には、一方の重鎖のCH3ドメインに存在するアミノ酸側鎖をより大きい側鎖（knob（「突起」の意））に置換し、もう一方の重鎖のCH3ドメインに存在するアミノ酸側鎖をより小さい側鎖（hole（「空隙」の意））に置換することによって、突起が空隙内に配置され得るようにして異種H鎖形成の促進および同種H鎖形成の阻害を引き起こす方法である（国際公開WO1996027011、Ridgwayら（Protein Engineering（1996）9，617-621）、Merchantら（Nat. Biotech.（1998）16，677-681））。

[0371] また、ポリペプチドの会合、またはポリペプチドによって構成される異種多量体の会合の制御方法を、Fc領域を構成する二つのポリペプチドの会合に利用することによって二重特異性抗体を作製する技術も知られている。即ち、Fc領域を構成する二つのポリペプチド内の界面を形成するアミノ酸残基を改変することによって、同一配列を有するFc領域を構成するポリペプチドの

会合が阻害され、配列の異なる二つのFc領域を構成するポリペプチド会合体が形成されるように制御する方法が二重特異性抗体の作製に採用され得る（国際公開WO2006/106905）。具体的には前記の二重特異性抗体とその作製方法の項で記載された方法が本発明の様態３の抗原結合分子を製造する際に、非限定な一態様として採用され得る。

[0372] これら様態１～３の抗原結合分子は、四者複合体を形成しうる抗原結合分子に比較して、いずれも免疫原性を低下させ、また血漿中滞留性を向上させることが可能であると期待される。

[0373] 抗原結合ドメインの製造方法

本発明は、低分子化合物の存在下における抗原に対する結合活性が、当該化合物の非存在下における抗原に対する結合活性よりも高い抗原結合ドメインの製造方法を提供する。

[0374] すなわち、本発明は、以下の(a)～(e)の工程；

(a) 低分子化合物の非存在下における抗原結合ドメインの抗原結合活性を得る工程、

(b) 低分子化合物の存在下における抗原結合ドメインの抗原結合活性を得る工程、

(c) 低分子化合物の非存在下における抗原結合活性が、当該化合物の存在下における抗原結合活性より低い抗原結合ドメインを選択する工程、

(d) (c)で選択された抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドが作動可能に連結されたベクターが導入された細胞を培養する工程、および

(e) (d)で培養された細胞の培養液から抗原結合ドメインを回収する工程、

を含む抗原結合ドメインの製造方法を提供する。

[0375] また、本発明は、以下の(a)～(e)の工程；

(a) 低分子化合物の低濃度存在下における抗原結合ドメインの抗原結合活性を得る工程、

(b) 低分子化合物の高濃度存在下における抗原結合ドメインの抗原結合活性を得る工程、

(c) 低分子化合物の低濃度存在下における抗原結合活性が、当該化合物の高濃度存在下における抗原結合活性より低い抗原結合ドメインを選択する工程、

(d) (c)で選択された抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドが作動可能に連結されたベクターが導入された細胞を培養する工程、および

(e) (d)で培養された細胞の培養液から抗原結合ドメインを回収する工程、

を含む抗原結合ドメインの製造方法を提供する。

[0376] さらに、本発明は、以下の(a)～(e)の工程；

(a) 低分子化合物の存在下における抗原結合ドメインもしくはそれらのライブラリを抗原に接触させる工程、

(b) 前記工程(a)で抗原に結合した抗原結合ドメインを当該化合物の非存在下に置く工程、

(c) 前記工程(b)で解離した抗原結合ドメインを単離する工程、

(d) (c)で選択された抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドが作動可能に連結されたベクターが導入された細胞を培養する工程、および

(e) (d)で培養された細胞の培養液から抗原結合ドメインを回収する工程、

を含む抗原結合ドメインの製造方法を提供する。

[0377] さらに、本発明は、以下の(a)～(e)の工程；

(a) 低分子化合物の高濃度存在下における抗原結合ドメインもしくはそれらのライブラリを抗原に接触させる工程、

(b) 前記工程(a)で抗原に結合した抗原結合ドメインを当該化合物の低濃度存在下に置く工程、

(c) 前記工程(b)で解離した抗原結合ドメインを単離する工程、

(d) (c)で選択された抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドが作動可能に連結されたベクターが導入された細胞を培養する工程、および

(e) (d)で培養された細胞の培養液から抗原結合ドメインを回収する工程、

を含む抗原結合ドメインの製造方法を提供する。

[0378] また、本発明は、以下の (a)～(f)の工程；

(a) 低分子化合物の非存在下で抗原結合ドメインのライブラリを抗原に接触させる工程、

(b) 前記工程(a)で抗原に結合しない抗原結合ドメインを選択する工程、

(c) 前記工程(b)で選択された抗原結合ドメインを当該化合物の存在下で抗原に結合させる工程、

(d) 前記工程(c)で抗原に結合した抗原結合ドメインを単離する工程、

(e) (d)で選択された抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドが作動可能に連結されたベクターが導入された細胞を培養する工程、および

(f) (e)で培養された細胞の培養液から抗原結合ドメインを回収する工程、

を含む抗原結合ドメインの製造方法を提供する。

[0379] また、本発明は、以下の (a)～(f)の工程；

(a) 低分子化合物の低濃度存在下で抗原結合ドメインのライブラリを抗原に接触させる工程、

(b) 前記工程(a)で抗原に結合しない抗原結合ドメインを選択する工程、

(c) 前記工程(b)で選択された抗原結合ドメインを当該化合物の高濃度存在下で抗原に結合させる工程、

(d) 前記工程(c)で抗原に結合した抗原結合ドメインを単離する工程、

(e) (d)で選択された抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドが作動可能に連結されたベクターが導入された細胞を培養する工程、および

(f) (e)で培養された細胞の培養液から抗原結合ドメインを回収する工程、

を含む抗原結合ドメインの製造方法を提供する。

[0380] さらに、本発明は、以下の(a)～(e)の工程；

(a) 抗原を固定したカラムに低分子化合物の存在下で抗原結合ドメインのライブラリを接触させる工程、

(b) 前記工程(a)でカラムに結合した抗原結合ドメインを当該化合物の非存在下でカラムから溶出する工程、

(c) 前記工程(b)で溶出された抗原結合ドメインを単離する工程、

(d) (c)で選択された抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドが作動

可能に連結されたベクターが導入された細胞を培養する工程、および

(e) (d)で培養された細胞の培養液から抗原結合ドメインを回収する工程、

を含む抗原結合ドメインの製造方法を提供する。

[0381] さらに、本発明は、以下の(a)～(e)の工程；

(a) 抗原を固定したカラムに低分子化合物の高濃度存在下で抗原結合ドメインのライブラリを接触させる工程、

(b) 前記工程(a)でカラムに結合した抗原結合ドメインを当該化合物の低濃度存在下でカラムから溶出する工程、

(c) 前記工程(b)で溶出された抗原結合ドメインを単離する工程、

(d) (c)で選択された抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドが作動可能に連結されたベクターが導入された細胞を培養する工程、および

(e) (d)で培養された細胞の培養液から抗原結合ドメインを回収する工程、

を含む抗原結合ドメインの製造方法を提供する。

[0382] さらに、本発明は、以下の(a)～(f)の工程；

(a) 抗原を固定したカラムに低分子化合物の非存在下で抗原結合ドメインのライブラリを通過させる工程、

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

(c) 前記工程(b)で回収された抗原結合ドメインを当該化合物の存在下で抗原に結合させる工程、

(d) 前記工程(c)で抗原に結合した抗原結合ドメインを単離する工程、

(e) (d)で選択された抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドが作動可能に連結されたベクターが導入された細胞を培養する工程、および

(f) (e)で培養された細胞の培養液から抗原結合ドメインを回収する工程、

を含む抗原結合ドメインの製造方法を提供する。

[0383] さらに、本発明は、以下の(a)～(f)の工程；

(a) 抗原を固定したカラムに低分子化合物の低濃度存在下で抗原結合ドメインのライブラリを通過させる工程、

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

(c) 前記工程(b)で回収された抗原結合ドメインを当該化合物の高濃度存在下で抗原に結合させる工程、

(d) 前記工程(c)で抗原に結合した抗原結合ドメインを単離する工程、

(e) (d)で選択された抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドが作動可能に連結されたベクターが導入された細胞を培養する工程、および

(f) (e)で培養された細胞の培養液から抗原結合ドメインを回収する工程、

を含む抗原結合ドメインの製造方法を提供する。

[0384] さらに、本発明は、以下の(a)～(f)の工程；

(a) 低分子化合物の存在下で抗原結合ドメインのライブラリを抗原に接触させる工程、

(b) 前記工程(a)で抗原に結合した抗原結合ドメインを取得する工程、

(c) 前記工程(b)で取得した抗原結合ドメインを化合物の非存在下に置く工程、

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

(e) (d)で選択された抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドが作動可能に連結されたベクターが導入された細胞を培養する工程、および

(f) (e)で培養された細胞の培養液から抗原結合ドメインを回収する工程、

を含む抗原結合ドメインの製造方法を提供する。

[0385] さらに、本発明は、以下の(a)～(f)の工程；

(a) 低分子化合物の高濃度存在下で抗原結合ドメインのライブラリを抗原に接触させる工程、

(b) 前記工程(a)で抗原に結合した抗原結合ドメインを取得する工程、

(c) 前記工程(b)で取得した抗原結合ドメインを化合物の低濃度存在下に置く工程、

(d) 前記工程(c)で抗原結合活性が、前記工程(b)で選択した基準より弱い抗

原結合ドメインを単離する工程、

(e) (d)で選択された抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドが作動可能に連結されたベクターが導入された細胞を培養する工程、および

(f) (e)で培養された細胞の培養液から抗原結合ドメインを回収する工程、

を含む抗原結合ドメインの製造方法を提供する。

[0386] 「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。使用される細胞としては、前述の「抗体」の項で記載された細胞の内から適切なものが適宜選択される。

[0387] コード配列の発現に言及する場合の制御配列とは、特定の宿主生物で作動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。

[0388] 核酸に関して「作動可能に連結した」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動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動可能にコード配列と連結している。通常、「作動可能に連結した」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。

[0389] 「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DNA0.5μg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。

[0390] 本発明の製造方法においては、上記の「低分子化合物に依存的な抗原結合ドメイン」の項で説明される方法によって選択された、低分子化合物の存在

下における抗原に対する結合活性が、当該化合物の非存在下における抗原に対する結合活性よりも高い抗原結合ドメインが単離される。たとえば、このように単離された抗原結合ドメインがライブラリから選択された場合には、後述する実施例に記載されているように、当該抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドはファージ等のウイルスから通常の遺伝子増幅によって単離される。また、このように単離された抗原結合ドメインまたは抗体がハイブリドーマ等の細胞の培養液から選択された場合には、前記の抗体の項で示したように当該細胞から抗体遺伝子等が通常の遺伝子増幅によって単離される。

[0391] 抗原結合分子の製造方法

本発明は、低分子化合物の存在下における抗原に対する結合活性が、当該化合物の非存在下における抗原に対する結合活性よりも高い抗原結合分子の製造方法を提供する。

[0392] すなわち、本発明は、以下の(a)～(f)の工程；

(a) 低分子化合物の非存在下における抗原結合ドメインの抗原結合活性を得る工程、

(b) 低分子化合物の存在下における抗原結合ドメインの抗原結合活性を得る工程、

(c) 低分子化合物の非存在下における抗原結合活性が、当該化合物の存在下における抗原結合活性より低い抗原結合ドメインを選択する工程、

(d) (c)で選択された抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドを、Fc領域を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに連結させる工程、

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

(f) (e)で培養された細胞の培養液から抗原結合分子を回収する工程、

を含む抗原結合分子の製造方法を提供する。

[0393] また、本発明は、以下の(a)～(f)の工程；

(a) 低分子化合物の低濃度存在下における抗原結合ドメインの抗原結合活性

を得る工程、

(b) 低分子化合物の高濃度存在下における抗原結合ドメインの抗原結合活性を得る工程、

(c) 低分子化合物の低濃度存在下における抗原結合活性が、当該化合物の高濃度存在下における抗原結合活性より低い抗原結合ドメインを選択する工程、

(d) (c)で選択された抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドを、Fc領域を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに連結させる工程、

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

(f) (e)で培養された細胞の培養液から抗原結合分子を回収する工程、

を含む抗原結合分子の製造方法を提供する。

[0394] さらに、本発明は、以下の(a)～(f)の工程；

(a) 低分子化合物の存在下における抗原結合ドメインもしくはそれらのライブラリを抗原に接触させる工程、

(b) 前記工程(a)で抗原に結合した抗原結合ドメインを当該化合物の非存在下に置く工程、

(c) 前記工程(b)で解離した抗原結合ドメインを単離する工程、

(d) (c)で選択された抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドを、Fc領域を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに連結させる工程、

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

(f) (e)で培養された細胞の培養液から抗原結合分子を回収する工程、

を含む抗原結合分子の製造方法を提供する。

[0395] さらに、本発明は、以下の(a)～(f)の工程；

(a) 低分子化合物の高濃度存在下における抗原結合ドメインもしくはそれらのライブラリを抗原に接触させる工程、

(b) 前記工程(a)で抗原に結合した抗原結合ドメインを当該化合物の低濃度

存在下に置く工程、

(c) 前記工程(b)で解離した抗原結合ドメインを単離する工程、

(d) (c)で選択された抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドを、Fc領域を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに連結させる工程、

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

(f) (e)で培養された細胞の培養液から抗原結合分子を回収する工程、

を含む抗原結合分子の製造方法を提供する。

[0396] また、本発明は、以下の (a)～(g)の工程；

(a) 低分子化合物の非存在下で抗原結合ドメインのライブラリを抗原に接触させる工程、

(b) 前記工程(a)で抗原に結合しない抗原結合ドメインを選択する工程、

(c) 前記工程(b)で選択された抗原結合ドメインを当該化合物の存在下で抗原に結合させる工程、

(d) 前記工程(c)で抗原に結合した抗原結合ドメインを単離する工程、

(e) (d)で選択された抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドを、Fc領域を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに連結させる工程、

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

(g) (f)で培養された細胞の培養液から抗原結合分子を回収する工程、

を含む抗原結合分子の製造方法を提供する。

[0397] また、本発明は、以下の (a)～(g)の工程；

(a) 低分子化合物の低濃度存在下で抗原結合ドメインのライブラリを抗原に接触させる工程、

(b) 前記工程(a)で抗原に結合しない抗原結合ドメインを選択する工程、

(c) 前記工程(b)で選択された抗原結合ドメインを当該化合物の高濃度存在下で抗原に結合させる工程、

(d) 前記工程(c)で抗原に結合した抗原結合ドメインを単離する工程、

(e) (d)で選択された抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドを、Fc領域を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに連結させる工程、

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

(g) (f)で培養された細胞の培養液から抗原結合分子を回収する工程、

を含む抗原結合分子の製造方法を提供する。

[0398] さらに、本発明は、以下の(a)～(f)の工程；

(a) 抗原を固定したカラムに低分子化合物の存在下で抗原結合ドメインのライブラリを接触させる工程、

(b) 前記工程(a)でカラムに結合した抗原結合ドメインを当該化合物の非存在下でカラムから溶出する工程、

(c) 前記工程(b)で溶出された抗原結合ドメインを単離する工程、

(d) (c)で選択された抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドを、Fc領域を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに連結させる工程、

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

(f) (e)で培養された細胞の培養液から抗原結合分子を回収する工程、

を含む抗原結合分子の製造方法を提供する。

[0399] さらに、本発明は、以下の(a)～(f)の工程；

(a) 抗原を固定したカラムに低分子化合物の高濃度存在下で抗原結合ドメインのライブラリを接触させる工程、

(b) 前記工程(a)でカラムに結合した抗原結合ドメインを当該化合物の低濃度存在下でカラムから溶出する工程、

(c) 前記工程(b)で溶出された抗原結合ドメインを単離する工程、

(d) (c)で選択された抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドを、Fc領域を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに連結させる工程、

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

(f) (e)で培養された細胞の培養液から抗原結合分子を回収する工程、

を含む抗原結合分子の製造方法を提供する。

[0400] さらに、本発明は、以下の(a)～(g)の工程；

(a) 抗原を固定したカラムに低分子化合物の非存在下で抗原結合ドメインのライブラリを通過させる工程、

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

(c) 前記工程(b)で回収された抗原結合ドメインを当該化合物の存在下で抗原に結合させる工程、

(d) 前記工程(c)で抗原に結合した抗原結合ドメインを単離する工程、

(e) (d)で選択された抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドを、Fc領域を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに連結させる工程、

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

(g) (f)で培養された細胞の培養液から抗原結合分子を回収する工程、

を含む抗原結合分子の製造方法を提供する。

[0401] さらに、本発明は、以下の(a)～(g)の工程；

(a) 抗原を固定したカラムに低分子化合物の低濃度存在下で抗原結合ドメインのライブラリを通過させる工程、

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

(c) 前記工程(b)で回収された抗原結合ドメインを当該化合物の高濃度存在下で抗原に結合させる工程、

(d) 前記工程(c)で抗原に結合した抗原結合ドメインを単離する工程、

(e) (d)で選択された抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドを、Fc領域を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに連結させる工程、

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

(g) (f)で培養された細胞の培養液から抗原結合分子を回収する工程、

を含む抗原結合分子の製造方法を提供する。

[0402] さらに、本発明は、以下の(a)～(g)の工程；

(a) 低分子化合物の存在下で抗原結合ドメインのライブラリを抗原に接触させる工程、

(b) 前記工程(a)で抗原に結合した抗原結合ドメインを取得する工程、

(c) 前記工程(b)で取得した抗原結合ドメインを化合物の非存在下に置く工程、

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

(e) (d)で選択された抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドを、Fc領域を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに連結させる工程、

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

(g) (f)で培養された細胞の培養液から抗原結合分子を回収する工程、

を含む抗原結合分子の製造方法を提供する。

[0403] さらに、本発明は、以下の(a)～(g)の工程；

(a) 低分子化合物の高濃度存在下で抗原結合ドメインのライブラリを抗原に接触させる工程、

(b) 前記工程(a)で抗原に結合した抗原結合ドメインを取得する工程、

(c) 前記工程(b)で取得した抗原結合ドメインを化合物の低濃度存在下に置く工程、

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

(e) (d)で選択された抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドを、Fc領域を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに連結させる工程、

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

(g) (f)で培養された細胞の培養液から抗原結合分子を回収する工程、

を含む抗原結合分子の製造方法を提供する。

[0404] さらに、本発明は、以下の (a)～(g)の工程：

(a) 低分子化合物の非存在下で本発明のライブラリを抗原に接触させる工程、

(b) 前記工程(a)で抗原に結合しない抗原結合ドメインを選択する工程；

(c) 前記工程(b)で選択された抗原結合ドメインを低分子化合物の存在下で抗原に接触させる工程；

(d) 前記工程(c)で抗原に結合した抗原結合ドメインを選択する工程；

(e) 前記工程(d)で選択された抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドを、Fc領域を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに連結させる工程；

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

(g) 前記工程(f)で培養された細胞の培養液から抗原結合分子を回収する工程、

を含む低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子の製造方法を提供する。

さらに、上記態様にくわえて、以下の(a)～(b)の工程：

(a) 本発明のライブラリを低分子化合物に接触させる工程；および

(b) 前記工程(a)で回収された抗原結合ドメインを選択する工程；

をさらに含む、低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子の製造方法も提供される。

[0405] さらに、本発明は、以下の(a)～(e)の工程：

(a) 本発明のライブラリを低分子化合物の存在下で抗原に接触させる工程；

(b) 前記工程(a)より低濃度の低分子化合物で抗原結合ドメインを解離

させ回収する工程

(c) 前記工程(b)で回収された抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドを、Fc領域を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに連結させる工程；、

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

(e) 前記工程(d)で培養された細胞の培養液から抗原結合分子を回収する工程、

を含む低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子の製造方法を提供する。

さらに、上記態様にくわえて、以下の(a)～(b)の工程：

(a) 本発明のライブラリを低分子化合物に接触させる工程；および

(b) 前記工程(a)で回収された抗原結合ドメインを選択する工程；

をさらに含む、低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子の製造方法も提供される。

[0406] 抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドに対してそのポリヌクレオチド配列が連結されるFc領域の非限定な一態様として、ヒトIgG1（配列番号：５）、IgG2（配列番号：６）、IgG3（配列番号：７）、またはIgG4（配列番号：８）で表される抗体の定常領域に含まれるFc領域が例示される。Fc領域は、EUナンバリングで表されるおよそ216位のアミノ酸における、パパイン切断部位のヒンジ領域のN末端から、当該ヒンジ、CH2およびCH3ドメインを含める抗体の重鎖定常領域の部分である。Fc領域は、ヒトIgG1から取得され得るが、IgGの特定のサブクラスに限定されるものでもない。

[0407] 抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドに対してそのポリヌクレオチド配列が連結されるFc領域の非限定な一態様として、活性型FcγRに対する結合活性が天然型Fc領域の活性型FcγRに対する結合活性より低いFc領域が例示される。当該Fc領域の非限定な別の一態様として、EUナンバリングで表される、EUナンバリングで表される234、235、236、237、238、239、270、29

7、298、325、328、および329のいずれか一つ以上のアミノ酸が、例えば、配列番号：５、６、７、または８で表される天然型Fc領域と異なるアミノ酸に改変されているFc領域が好適に挙げられるが、Fc領域の改変は上記改変に限定されず、例えばCur. Opin. in Biotech. (2009) 20 (6), 685-691に記載されている脱糖鎖（N297A, N297Q）、IgG1-L234A/L235A、IgG1-A325A/A330S/P331S、IgG1-C226S/C229S、IgG1-C226S/C229S/E233P/L234V/L235A、IgG1-L234F/L235E/P331S、IgG1-S267E/L328F、IgG2-V234A/G237A、IgG2-H268Q/V309L/A330S/A331S、IgG4-L235A/G237A/E318A、IgG4-L236E等の改変、および、国際公開WO2008/092117に記載されているG236R/L328R、L235G/G236R、N325A/L328R、N325L/L328R等の改変、および、EUナンバリング233位、234位、235位、237位におけるアミノ酸の挿入、国際公開WO2000/042072に記載されている個所の改変であってもよい。

[0408] 本発明の抗原結合分子に含まれるFc領域が、当該Fc領域に結合した糖鎖の組成がフコース欠損糖鎖を結合したFc領域の割合が高くなるように、またはバイセクティングN-アセチルグルコサミンが付加したFc領域の割合が高くなるように修飾されたFc領域である場合、前記の形質転換された細胞として、糖鎖修飾を受けるポリペプチドの糖鎖構造を形成する活性が改変された結果、糖鎖にフコースを付加する能力が低い宿主細胞が適宜使用される（国際公開WO2000/061739、WO2002/031140、WO2006/067913等）。当該宿主細胞の非限定な一態様として、フコシルトランスフェラーゼ（EC 2.4.1.152）、フコーストランスポーター（SLC35C1）、GMD（GDP-マンノース4,6-デヒドラターゼ）（EC 4.2.1.47）、Fx（GDP-ケト-6-デオキシマンノース3, 5-エピメラーゼ, 4-レダクターゼ）（EC 1.1.1.271）、およびGFPP（GDP-β-L-フコースピロフォスフォリラーゼ）（EC 2.7.7.30）からなる群から選択される酵素またはトランスポーターの活性がが欠失した宿主細胞が適宜使用される（国際公開WO2000/061739、WO2002/031140、WO2006/067913等）。そのような活性が欠失した宿主細胞は、CHO細胞、BHK細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、YO骨髄腫細胞、P3X63マウス骨髄腫細胞、PER細胞、PER.C6細胞、HEK293細胞、またはハイブリ

ドーマ細胞等に内在性であるこれらの機能性タンパク質の遺伝子を機能不能に破壊する方法等によって作製され得る。

[0409] 本発明の抗原結合分子に含まれるFc領域が、バイセクティングGlcNAcを有する糖鎖を有するFc領域である場合、前記の形質転換された細胞として、バイセクティングGlcNAcを有する糖鎖を有する抗体を作製するために、GnTIII（β-1,4-マンノシル-グリコプロテイン，4-β-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ）（EC 2.4.1.144）活性またはGalT（β-1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ）（EC 2.4.1.38）活性を有する機能性タンパク質をコードする遺伝子を発現する宿主細胞が適宜使用される（国際公開WO2002/079255等）。別の非限定の好適な一態様では、前記の機能性タンパク質に加えて、ヒトManII（マンノシダーゼII）（3.2.1.114）活性を有する機能性タンパク質をコードする遺伝子、GnTI（β-1,2-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI）（EC 2.4.1.94）活性を有する機能性タンパク質をコードする遺伝子、GnTII（β-1,2-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII）（EC 2.4.1.143）活性を有する機能性タンパク質をコードする遺伝子、ManI（マンノシダーゼ）（EC 3.2.1.113）活性を有する機能性タンパク質をコードする遺伝子、およびα-1,6-フコシルトランスフェラーゼ（EC 2.4.1.68）と共発現する宿主細胞が適宜使用される（国際公開WO2004/065540）。

[0410] 上記の細胞の培養液から単離する等の上記の抗体の項で記載された抗体の製造方法に準じた方法を用いて、本発明の抗原結合分子が製造される。前記のFc領域を含むポリペプチドの非限定な一態様として、例えば、配列番号：５、６、７、または８で表される抗体の定常領域が例示される。また、本発明の抗原結合分子の非限定な一態様として、全長抗体分子が挙げられる。

[0411] 医薬組成物

本発明によって、副作用を回避しつつ薬効を発揮するために、正常組織や血液中において全身的に作用せず、病変部位である癌や炎症部位において作用する抗原結合分子を含む医薬組成物が提供される。本発明の医薬組成物に含まれる抗原結合分子は、標的組織において特異的に存在もしくは産生され

る標的組織特異的化合物および／または該組織に集積等する非天然化合物の濃度に応じて標的抗原への結合が制御されることから、例えば、該抗原結合分子が、癌組織や炎症組織における抗原を標的とする場合、癌組織における癌細胞・免疫細胞・ストローマ細胞等に発現する抗原、癌組織に分泌されている抗原、あるいは、炎症性組織における免疫細胞等に発現する抗原、炎症性組織に分泌されている抗原に結合し、正常組織に発現している抗原に結合することが出来ないため、正常組織に対する細胞傷害作用や中和作用等による副作用を回避しつつ、癌に対する強力な細胞傷害作用や増殖抑制作用、免疫亢進作用等、あるいは、炎症性組織における炎症性細胞に対する免疫抑制効果等を発揮する。例えば、癌組織特異的化合物に依存的にT細胞に発現するCD3に結合する抗原結合ドメインと、癌細胞に発現するEGFRに結合する抗原結合ドメインを含む二重特異性抗原結合分子または二重パラトピックな抗原結合分子は、正常組織に発現するEGFRに結合せず、癌細胞に発現しているEGFRに結合するため、副作用を回避しつつ強力な抗腫瘍効果を発揮する。すなわち、癌細胞近傍にいるT細胞に発現しているCD3には癌組織特異的化合物に依存的に結合するが、癌細胞近傍以外にいるT細胞に発現しているCD3に結合しないため、癌細胞近傍にいるT細胞を活性化し副作用を回避しつつ強力な抗腫瘍効果を発揮する。

[0412] このように標的組織において抗原に結合し、それ以外の正常組織や血液中では抗原に結合しない抗原結合分子は、副作用を回避しつつ薬効を発揮する。本発明が提供する、生体内の標的組織において高濃度で存在する低分子をスイッチとして抗原に結合する抗原結合分子、すなわち、低分子スイッチ抗原結合分子（Small molecule switch antigen binding molecule）は、当該低分子が存在しない正常の環境では抗原に結合せず、当該低分子が高濃度で存在する標的組織では抗原に結合することが可能である。

[0413] このような低分子スイッチ抗原結合分子の非限定な一態様として、まず癌組織や炎症性組織において高濃度に存在し、スイッチとして機能し得る癌組織あるいは炎症性組織特異的化合物である、アデノシン（adenosine）、アデ

ノシン3リン酸（adenosine 5'-triphosphate; ATP）、イノシン（inosine）、キヌレニン（kynurenine）、プロスタグランジンE2（prostaglandin E2; PGE2）、コハク酸（succinic acid）、乳酸（lactic acid）が、本発明の抗原結合分子（に含まれるパラトープ）と抗原（に含まれるエピトープ）に挟まれて、もしくは本発明の抗原結合分子に結合することで抗原結合分子の抗原に対するパラトープの構造に変化を起こしてスイッチ機能を果たす癌組織あるいは炎症性組織特異的な化合物依存的な抗原結合分子が例示される。当該化合物が存在しなければ本発明の抗原結合分子に含まれるパラトープと抗原に含まれるエピトープとの相互作用が不十分となり本発明の抗原結合分子は抗原に結合することができないが、当該化合物が存在すれば本発明の抗原結合分子に含まれるパラトープと抗原に含まれるエピトープとの間に挟まる、もしくはパラトープの構造を変化させることによって、当該化合物が高濃度で存在する癌組織あるいは炎症性組織等の標的組織において抗原に結合した当該抗原結合分子が、当該抗原を発現する細胞に対して薬効を発揮することができる。また、このスイッチとなる化合物の結合は可逆的であるため、これらの化合物のスイッチによる本発明の抗原結合分子の抗原に対する結合の制御は可逆的であると考えられる。このように癌組織あるいは炎症性組織等の病変部位において癌組織あるいは炎症性組織における癌細胞や免疫細胞等の病的細胞に結合し、あるいは、癌組織あるいは炎症性組織において分泌された抗原に結合し、薬効を発揮することが可能な本発明の抗原結合分子は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。

[0414] 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。また、本発明において、「低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合分子を含む医薬組成物」（ここで、低分子化合物は、標的組織特異的化合物、非天然化合物、等）との用語は、「低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合分子を治療対象に投与することを含む疾患の治療方法」と言

い換えることも可能であるし、「疾患を治療するための医薬の製造における低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合分子の使用」と言い換えることも可能である。また、「低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合分子を含む医薬組成物」との用語を、「疾患を治療するための低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合分子の使用」と言い換えることも可能である。

[0415] 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。

[0416] 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。

[0417] 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。

[0418] 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。

[0419] 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。

[0420] なお、本発明に記載するアミノ酸配列に含まれるアミノ酸は翻訳後に修飾（例えば、N末端のグルタミンのピログルタミル化によるピログルタミン酸への修飾は当業者によく知られた修飾である）を受ける場合もあるが、そのようにアミノ酸が翻訳後修飾された場合であっても当然のことながら本発明に記載するアミノ酸配列に含まれる。

[0421] 本明細書に記載の１又は複数の態様を任意に組み合わせたものも、当業者の技術常識に基づいて技術的に矛盾しない限り、本発明に含まれることが当業者には当然に理解される。

[0422] 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。

[0423] 以下本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

実施例

[0424] 〔実施例１〕標的組織において高濃度で存在する低分子をスイッチとして抗原に結合するスイッチ抗体のコンセプト及び取得戦略

（１－１）標的組織特異的化合物存在下で抗原への結合能が変化するスイッチ抗体のコンセプト

副作用を回避しつつ薬効を発揮するために、正常組織や血液中において全

身的に作用せず、病変部位である癌や炎症部位において作用するような創薬技術が求められている。投与された後に癌細胞に発現している抗原に結合し、正常組織に発現している抗原に結合することが出来ない抗体分子は、正常組織に対する細胞傷害作用による副作用を回避しつつ、癌に対する強力な細胞傷害作用を発揮することが可能である。例えば、前記EGFR-BiTE（非特許文献９）が改変された抗原結合分子であって、正常組織に発現するEGFRには結合せず、癌細胞に発現しているEGFRに結合することができる分子は、副作用を回避しつつ強力な抗腫瘍効果を発揮することが可能である。また、BiTEはCD3を介してT細胞をリクルートし活性化することによって抗腫瘍効果を発揮する（非特許文献８）ため、EGFR-BiTEに対して、癌細胞近傍にいるT細胞に発現しているCD3には結合するが、癌細胞近傍以外にいるT細胞に発現しているCD3に結合しない性質を付与することができれば、そのような性質を付与された改変EGFR-BiTEは、癌においてT細胞を活性化することが可能であり、副作用を回避しつつ強力な抗腫瘍効果を発揮することが可能となる。

[0425] 癌に対する抗体医薬に限らず、抗体分子が関節リウマチにおいて炎症が起こっている関節の滑液中でサイトカインに結合しその作用を阻害し、全身的には阻害しなければ、全身的なサイトカインの中和による感染症のリスクの増大を回避しつつ、関節リウマチ等の炎症性疾患・自己免疫疾患に対して高い治療効果を発揮することが可能であると考えられた。

[0426] このように癌組織において抗原に結合し、それ以外の正常組織や血液中では抗原に結合しない抗体は、副作用を回避しつつ薬効を発揮することが可能である。しかしながら、これまでにこのような特性を有する理想的な抗体は報告されていない。そこで、生体内の癌組織において高濃度で存在する低分子、もしくは生体に投与した後、癌組織に集積する性質をもつような化合物をスイッチとして抗原に結合する抗体分子、すなわち、低分子スイッチ抗体（Small molecule switch antibody）は、図１に示すように、低分子が存在しない環境では抗原に結合せず、低分子が高濃度で存在する標的組織では抗原に結合することが可能である。

[0427] このような低分子スイッチ抗体を創製するにあたり、まず癌組織において高濃度に存在し、スイッチとして使用できると考えられる低分子が探索された。その結果、アデノシン（adenosine）、アデノシン3リン酸（adenosine 5'-triphosphate; ATP）、イノシン（inosine）、キヌレニン（kynurenine）、プロスタグランジンE2（prostaglandin E2; PGE2）、コハク酸（succinic acid）、乳酸（lactic acid）がスイッチとして有望であった。これらの低分子はいずれも、癌細胞自体から産生される、あるいは、細胞死した癌細胞から放出される、あるいは、癌組織に浸潤している免疫細胞等から産生されることで、癌組織において高濃度で存在し、正常組織や血液中では癌組織と比較して低濃度で存在している。

[0428] 次に生体に投与された後、癌組織に集積する性質を有する分子が探索された。XelodaやTH302といったプロドラッグは生体内に投与された後、癌組織に発現している代謝酵素により代謝され、スイッチとなりうる低分子を産生する。すなわち5-FU（fluorouracil）やBr-IPMなどがスイッチとして有望であると考えられた。5-FUはCapecitabine (Xeloda)の代謝物であり、癌組織特異的な代謝酵素であるcytidine deaminaseと thymidine phosphorylaseによって代謝されることが知られている（Desmoulin F. et al. Drug Metab Dispos. 2002）。またTH-302は癌組織周辺のように、低酸素の条件下で還元されることでBr-IPMに変換されることが知られている(Duan JX, et al. J Med Chem. 2008)。これらのことからプロドラッグは生体内に投与された後、癌組織で発現している代謝酵素で代謝されることにより、高濃度に存在し、正常組織や血液中では癌組織と比較して低濃度で存在していると思われる。

[0429] これらの低分子が図２に示すように抗体と抗原の複合体に挟まれることが出来れば、当該低分子はスイッチ機能を果たすことが出来る。もしくはこれらの低分子が抗体に結合することにより、抗体の抗原結合部位の立体構造を変化させ、それにより抗原への結合能を変化させることができれば、当該低分子はスイッチ機能を果たすことが出来る。すなわち、低分子が存在しなければ抗体と抗原の相互作用が不十分となり抗体は抗原に結合することができ

ないが、低分子が存在すれば、抗体は抗原に結合することが可能となる。言い換えれば、低濃度の低分子存在下では抗体と抗原の相互作用が不十分となり抗体は抗原に結合することができないが、高濃度の低分子存在下では、抗体は抗原に結合することが可能となる。また、このスイッチとなる低分子の結合は可逆的であるため、これらの低分子スイッチによる抗原結合の制御は可逆的である。

[0430] またスイッチとなる外来性化合物を経口投与することによって、抗体の作用を経口剤の服用をすることによってコントロールすることも可能である。すなわち、ある経口等の非侵しゅう投与可能な外来性化合物をスイッチとして、ある抗原に対して結合を示すスイッチ抗体を静脈内あるいは皮下投与等の侵しゅう投与しておき、スイッチとなる外来性化合物を経口等の非侵しゅう投与することによって、その抗体の作用をコントロールすることが可能である。抗体医薬は半減期が長いことから、副作用が生じた場合はその作用が持続してしまうことが欠点であるが、このように抗体の作用を外来性化合物の経口等の非侵しゅう投与によってコントロールできれば、副作用が生じた際にスイッチ分子の投与をやめることによって薬の作用を止めることが可能である。また、あらかじめスイッチ抗体を投与しておくことにより、疾患により症状が生じたときのみスイッチ分子を投与することで、必要な時にのみ経口等の非侵しゅう投与によって薬理作用を発揮することが可能である。

[0431] （１－２）標的組織特異的化合物存在下で抗原への結合能が変化するスイッチ抗体の取得戦略

標的組織特異的化合物の存在の有無で可逆的に抗原と結合するスイッチ抗体をより効率良く創製するための方法として、ライブラリ技術を利用した方法がある。標的組織特異的化合物との結合を維持している抗体を鋳型に、化合物との結合に関与しない可変領域をライブラリ化することで、通常の抗体ライブラリよりも、高頻度で化合物と結合可能な抗体が出現するため、所望の性質を有する抗原結合分子が効率よく取得できると考えられる。そこでまずライブラリの鋳型配列となる抗体を取得するため、癌細胞で高濃度に存在

することが知られているアデノシンもしくはATPに対する結合抗体の取得が試みられた。

[0432] 〔実施例２〕ウサギB細胞クローニングによる抗アデノシン抗体の取得

（２－１）アデノシン結合ライブラリ作製のための免疫原のデザイン

ウサギに免疫する免疫原として、図３に示した2'-Adenosine-PEG-Tetanus toxin p30 helper peptide（2'-Adenosine-PEG-peptide）、および、図４に示した5'-Adenosine-PEG- Tetanus toxin p30 helper peptide（5'-Adenosine-PEG-peptide）が用いられた。Tetanus toxin p30 helper peptideはFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE（配列番号：４）のアミノ酸配列からなり、ヘルパーT細胞上に発現するT細胞受容体のエピトープとして同定されたペプチドである（Eur. J. Immunol. (1989) 19, 2237-2242）。抗体産生を活性化することが知られており（J. Immunol. (1992) 149, 717-721）、アデノシンと連結させることでアジュバンドとして作用し、アデノシンに対する抗体産生を亢進させることが期待される。産生される抗体のエピトープがアデノシンとともにTetanus toxin p30 helper peptideを含みにくいよう、アデノシンとTetanus toxin p30 helper peptideの連結にはPEGを介するようデザインされた。アデノシンはATPの代謝物であるが、ATPのリン酸基はアデノシンの5'位水酸基に付加されていることから、アデノシンの5'位水酸基をエピトープとしない抗体はアデノシンに加えATPにも結合する可能性が考えられる。つまり、5'-Adenosine-PEG- Tetanus toxin p30 helper peptideを免疫原として用いることでアデノシンとATPの両方に結合できる抗体が得られやすくなり、2'-Adenosine-PEG-Tetanus toxin p30 helper peptideを免疫原として用いることでアデノシンに結合しATPには結合しない抗体が得られやすくなると想定されることから、アデノシンの2'位または5'位に連結するTetanus toxin p30 helper peptide を含む二種類の免疫原が（２－２）に記載のように作製された。

[0433] 加えて、Tetanus toxin p30 helper peptideの代わりにビオチンをコンジュゲートさせた2'-Adenosine-PEG-biotin（図５）および5'-Adenosine-PEG-biotin（図６）が以下のように作製された。これら二種類のAdenosine-PEG-bi

otinに対する結合を検証することによって、Tetanus toxin p30 helper peptideをエピトープとして含む抗体でないことを判別することが可能となる。

[0434] （２－２）アデノシン結合ライブラリ作製のための免疫原の合成

2'-Adenosine-PEG-peptide（adenosine 2'-PEG-peptide conjugateまたは2'-(PEG-peptide)adenosine）および2'-Adenosine-PEG-biotin（adenosine 2'-PEG-biotin conjugateまたは2'-(PEG- biotin)adenosine）は以下のように合成された。なお、合成された2'-Adenosine-PEG-peptideまたは2'-Adenosine-PEG-biotinは以下の条件で分析または分取された。

[0435] ＬＣＭＳの分析条件は、下記のとおりである。

[0436] [表1]

分析条件	装置	カラム（長さ mm）	移動相	勾配（A/B）	流速（ml/分）	カラム温度（℃）	波長
SQDAA05	Acquity UPLC/SQD	Aldrich Ascentis Express C18 (2.1 x 50)	A) 10mM AcONH4, H2O B) MeOH	95/5 => 0/100（1.0分間）=> 0/100（0.4分間）	1.0	35	210-400nm PDA total
SQDAA50	Acquity UPLC/SQD	Aldrich Ascentis Express C18 (2.1 x 50)	A) 10mM AcONH4, H2O B) MeOH	50/50 => 0/100（0.7分間）=> 0/100（0.7分間）	1.0	35	210-400nm PDA total
SQDFA05	Acquity UPLC/SQD	Aldrich Ascentis Express C18 (2.1 x 50)	A) 0.1% FA, H2O B) 0.1% FA CH3CN	95/5 => 0/100（1.0分間）=> 0/100（0.4分間）	1.0	35	210-400nm PDA total
SQDFA50	Acquity UPLC/SQD	Aldrich Ascentis Express C18 (2.1 x 50)	A) 0.1% FA, H2O B) 0.1% FA CH3CN	50/50 => 0/100（0.7分間）=> 0/100（0.7分間）	1.0	35	210-400nm PDA total

[0437] ＨＰＬＣの分取条件は、下記のとおりである。

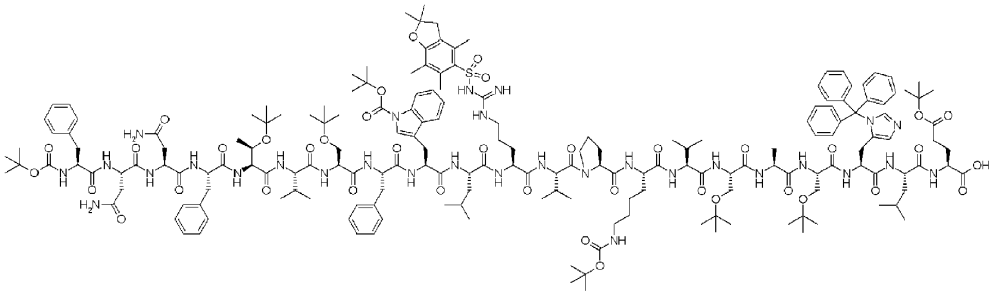
[0438] [表2]

分取条件	装置	カラム（長さ mm）	移動相	勾配（A/B）	流速（ml/分）	カラム温度（℃）	波長
A	Preparative HPLC system with injection/fractionation (Gilson, Inc.)	Aldrich Ascentis RP-Amide (21.2x150mm 5μm)	A) 0.1%FA H2O B) 0.1%FA MeCN	isocratic(A/B):15/85	20.0	40	254, 258nm
B	Preparative HPLC system with injection/fractionation (Gilson, Inc.)	YMC Actus ODS-A (20x100mm 5μm)	A) 20mM AcONH4 H2O B) 20mM AcONH4 MeOH/MeCN(1/1)	isocratic(A/B):47/53	20.0	40	254, 258nm

[0439] （２－２－１）化合物006（Boc-Phe-Asn-Asn-Phe-Thr（tBu)-Val-Ser（tBu)-Phe-Trp（Boc)-Lue-Arg（Pbf)-Val-Pro-Lys（Boc)-Val-Ser（tBu)-Ala-Ser（tBu)-His（Trt)-Leu-Glu（tBu)-OH）の合成

[0440]

[化6]



[0441] ペプチド合成機（Multipep RS; Intavis）を用いて、Fmoc法によりペプチド合成が行われた。全てのFmocアミノ酸は渡辺化学工業から購入された。なお、操作の詳細な手順は合成機に付属のマニュアルに従った。

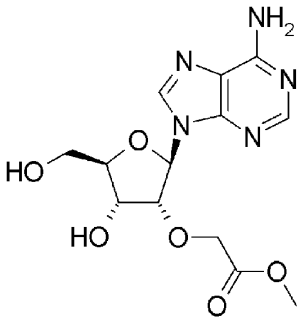
[0442] 合成機にC末端のFmoc-Glu(tBu)-OHが結合した2-クロロトリチルレジン（1カラムあたり250 mg、30カラム、11.7 mmol）と、各種Fmocアミノ酸（0.6mol/L）と1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール（0.375mol/L）のN,N-ジメチルホルムアミド溶液と、ジイソプロピルカルボジイミドのN,N-ジメチルホルムアミド溶液（10%v/v）をセットし、Fmoc脱保護溶液として、5%（wt/v）の尿素を含むピペリジンのN,N-ジメチルホルムアミド溶液（20%v/v）を用いて合成反応が行われた。レジンはN,N-ジメチルホルムアミドで洗浄した後、Fmoc脱保護に次いでFmocアミノ酸の縮合反応を1サイクルとし、このサイクルを繰り返すことでレジン表面上にペプチドを伸長させた。伸長終了後、レジンをトリフルオロエタノールで洗浄し、トリフルオロエタノール/ジクロロメタン（＝1/1）を加え、レジンからペプチドの切り出しを行い、化合物006（7.2 g）が粗生成物として得られた。

LCMS（ESI） m/z ＝1185（M+3H）3+

保持時間：1.24分（分析条件SQDAA05）

[0443] （２－２－２）化合物007の合成

[化7]



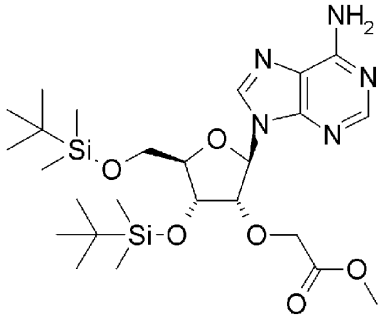
[0444] ０℃に冷却されたアデノシン（2.00 g、 7.48 mmol）のN,N-ジメチルホルムアミド （40 ml）懸濁液に、60%水素化ナトリウム（0.42 g、10.48 mol）が加えられた反応液が０℃で１時間攪拌された。ブロモ酢酸メチル（0.76 ml、8.01 mmol）が加えられた当該反応液が、室温で５時間攪拌された。酢酸（１ｍｌ）およびメタノール（３ｍｌ）が加えられた反応混合物が減圧濃縮された。得られた残渣が順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ジクロロメタン/メタノール）にて精製され、化合物007（0.93 g、37%）が得られた。

LCMS (ESI) m/z = 340 (M+H) +

保持時間：0.27分（分析条件SQDFA05）

[0445] （２－２－３）化合物008の合成

[化8]



[0446] t-ブチルジメチルシリルクロリド（999 mg、6.63 mol）およびイミダゾール（722 mg、10.61 mol）が加えられた化合物007（900 mg、2.65 mmol）のピリジン（8 ml）溶液が、室温で４時間攪拌された。反応混合物から酢酸エチ

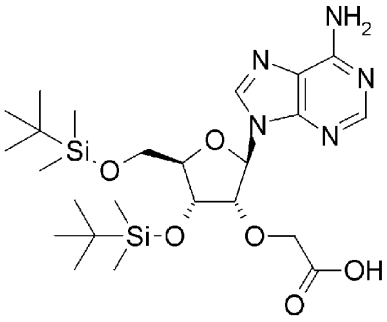
ル/水で抽出された有機層が飽和食塩水で洗浄された。無水硫酸ナトリウムで乾燥された有機層が、ろ過後、減圧濃縮された。得られた残渣が順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ジクロロメタン/メタノール）にて精製され、化合物008（1.17 g、78%）が得られた。

LCMS（ESI）m/z ＝ 568 （M+H）+

保持時間：1.10分（分析条件SQDFA05）

[0447] （２－２－４）化合物009の合成

[化9]



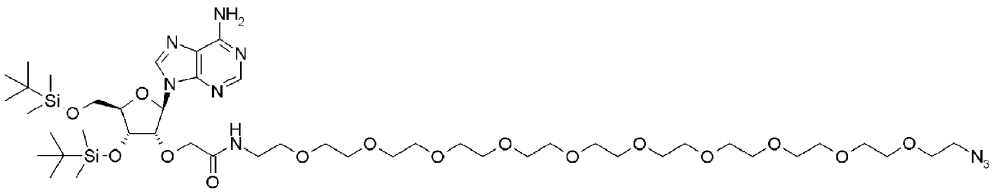
[0448] 水（0.17 ml）に溶解させた水酸化リチウム（61 mg、2.55 mol）が加えられた化合物008（290 mg、0.511 mmol）のメタノール（0.34 ml）/テトラヒドロフラン（0.34 ml）溶液が、室温で30分間攪拌された。1M塩酸で中和された反応混合物が、減圧濃縮された。濃縮残渣から酢酸エチル/水で抽出された、有機層が飽和食塩水で洗浄された。無水硫酸ナトリウムで乾燥させた有機層は、ろ過後、減圧濃縮され化合物009（319 mg、90%）が得られた。

LCMS（ESI）m/z ＝ 552（M-H）-

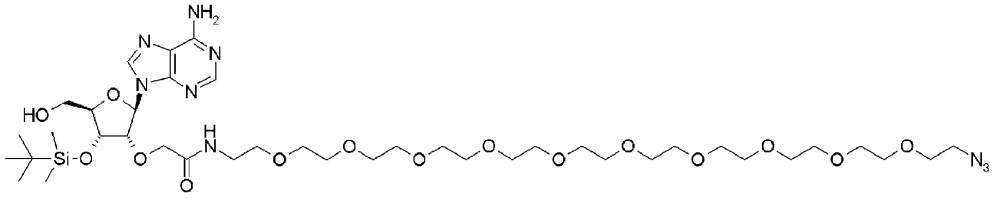
保持時間：0.97分（分析条件SQDFA05）

[0449] （２－２－５）化合物010および化合物011の合成

[化10]



[0450] [化11]



[0451] 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール（75 mg、0.553 mol）および1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（106 mg、0.553 mol）が加えられた化合物009（255mg、0.460 mmol）のN,N-ジメチルホルムアミド（1.5 ml）溶液が、室温で3分間攪拌された。O-（2-アミノエチル）-O'-2-アジドエチル）ノナエチレングリコール（291 mg、0.553 mmol）が加えられた反応液が、室温で3時間攪拌された。減圧濃縮された反応混合物の残渣が逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（10 mM酢酸アンモニウム水溶液/メタノール）にて精製され、化合物010（177 mg、42%）および011（72 mg、19%）が得られた。

[0452] 化合物010

LCMS (ESI) m/z = 1063 (M+H) +

保持時間：0.98分（分析条件SQDFA05）

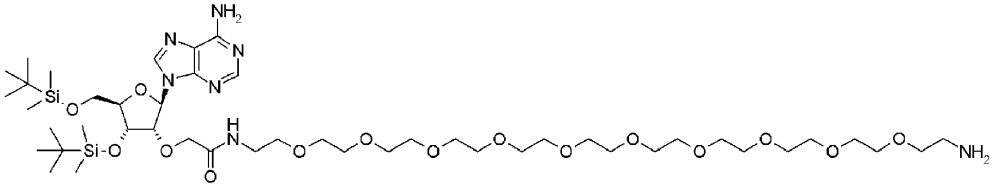
[0453] 化合物011

LCMS (ESI) m/z = 949 (M+H) +

保持時間：0.67分（分析条件SQDFA05）

[0454] （２－２－６）化合物012の合成

[化12]



[0455] 10%パラジウム炭素（34 mg）が加えられた化合物010（170 mg、0.160 mmol）のエタノール（1 ml）溶液が、水素雰囲気下２時間攪拌された。更に10%パラジウム炭素（34 mg）を加え、水素雰囲気下で２時間攪拌し、反応を完結

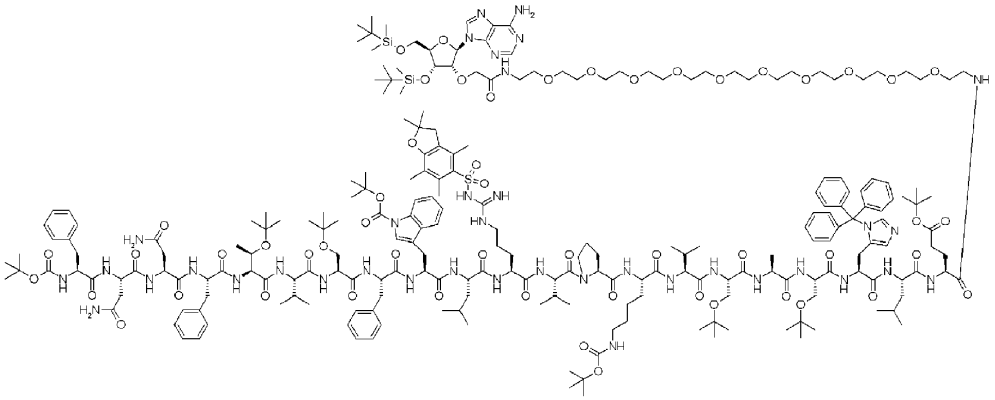
させた。反応液のろ液が減圧濃縮され、化合物012（34 mg、95%）が得られた。

LCMS (ESI) m/z = 1037 (M+H) +

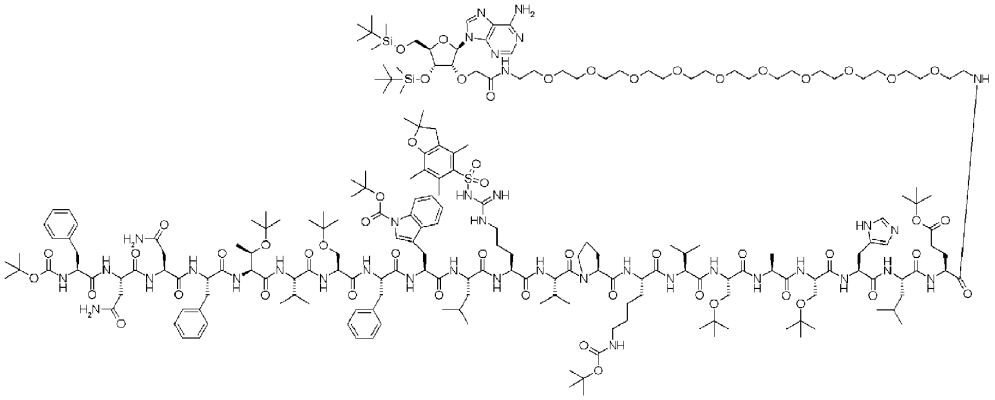
保持時間：0.70分（分析条件SQDFA05）

[0456] （２－２－７）化合物013および化合物014の合成

[化13]



[0457] [化14]



[0458] 化合物006（354 mg、0.110 mmol）、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール（13 mg、0.100 mol）および1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（19 mg、0.100 mol）が加えられた、化合物012（86 mg、0.083 mmol）のN,N-ジメチルホルムアミド（1.5 ml）溶液が室温で２時間攪拌された。反応混合物のろ液が、表２に記載される分取条件Aにて精製され、化合物013および014の混合物（72 mg）が得られた。

[0459] 化合物013

LCMS (ESI) m/z = 1525 (M+3H) 3+、1144 (M+4H) 4+

保持時間：1.13分（分析条件SQDAA50）

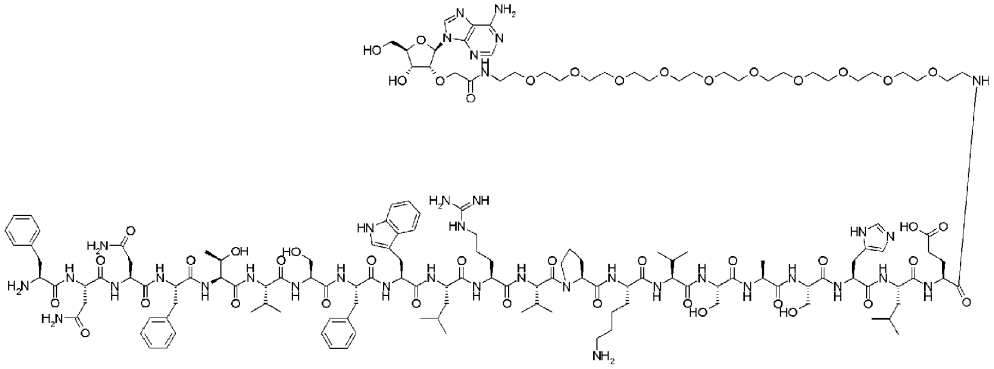
[0460] 化合物014

LCMS (ESI) m/z = 1444 (M+3H) 3+、1083 (M+4H) 4+

保持時間：1.02分（分析条件SQDAA50）

[0461] （２－２－８）2'-Adenosine-PEG-peptide (adenosine 2'-PEG-peptide conjugateまたは2'-(PEG-peptide)adenosine) (化合物015) の合成

[化15]



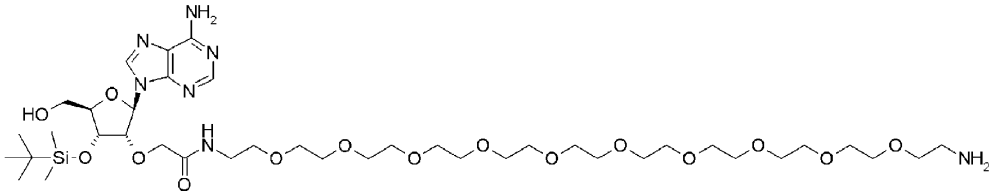
[0462] トリフルオロ酢酸 (16 ml)、ジクロロメタン (8 ml)、水 (1.3 ml)、およびテトライソプロピルシラン (1.3 ml) が加えられた化合物013および014の混合物 (42 mg) が、室温で６時間攪拌された。減圧濃縮された反応混合物の残渣が、表２に記載された分取条件Bにて精製され、化合物015 (10 mg) が得られた。

LCMS (ESI) m/z = 1090 (M+3H) 3+、818 (M+4H) 4+

保持時間：0.52分（分析条件SQDAA50）

[0463] （２－２－９）化合物016の合成

[化16]



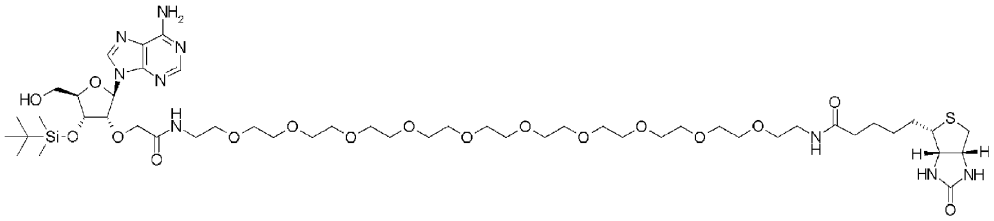
[0464] 10%パラジウム炭素（34 mg）が加えられた化合物011（70 mg、0.074 mmol）のエタノール（１ｍｌ）溶液が、水素雰囲気下5時間攪拌された。反応液のろ液が減圧濃縮され、化合物016（58 mg、85%）が得られた。

LCMS (ESI) m/z ＝ 923 (M+H) +

保持時間：0.50分（分析条件SQDFA05）

[0465] （２－２－１０）化合物017の合成

[化17]



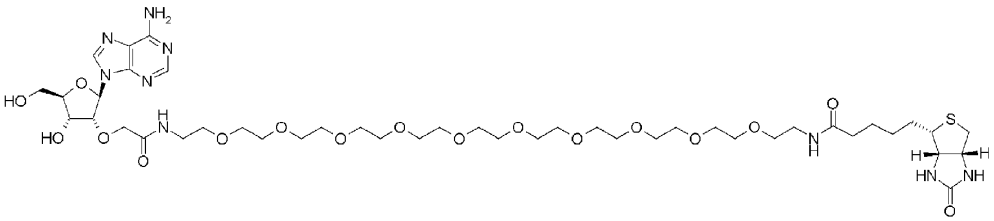
[0466] D-ビオチンN-スクシイミジル（24 mg、0.069 mmol）、およびトリエチルアミン（13μｌ、 0.094 mol）が加えられた化合物016（58 mg、0.063 mmol）のN,N-ジメチルホルムアミド （1 ml）溶液が、室温で2時間攪拌された。更にD-ビオチンN-スクシイミジル（5 mg、0.015 mmol）が加えられた後、室温で1.5時間攪拌させ反応を完結させた。反応混合物が逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（10 mM酢酸アンモニウム水溶液/メタノール）にて精製され、化合物017（50 mg、69%）が得られた。

LCMS (ESI) m/z ＝ 1149 (M+H) +

保持時間：1.04分（分析条件SQDFA05）

[0467] （２－２－１１）2'-Adenosine-PEG-biotin (adenosine 2'-PEG-biotin conjugateまたは2'-(PEG- biotin)adenosine) （化合物018）の合成

[化18]



[0468] 1Mフッ化テトラ-n-ブチルアンモニウムテトラヒドロフラン溶液（65μｌ、0

.065 mmol）が加えられた化合物017（62 mg、0.054 mmol）のテトラヒドロフラン（2 ml）溶液が、室温で１時間攪拌された。更に1Mフッ化テトラ-n-ブチルアンモニウムテトラヒドロフラン溶液（20μl、0.020 mmol）を加え、室温で1時間攪拌させ反応を完結させた。減圧濃縮された反応液の残渣が逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル）にて精製され、化合物018（12 mg、21%）が得られた。

LCMS（ESI）m/z ＝ 1035（M+H）+

保持時間：0.71分（分析条件SQDAA05）

[0469] また、5'-Adenosine-PEG-peptideおよび5'-Adenosine-PEG-biotinも同様の反応を用いて合成された。

[0470] （２－３）動物によるAdenosine結合抗体作製および抗体のスクリーニング

ウサギが通常の方法によって2'-Adenosine-PEG-peptideおよび/または5'-Adenosine-PEG-peptideで免疫された。autoMACS Pro Separator とFACSAria（BD）を用いたAdenosine-PEG-biotin結合性とウサギIgGの発現を指標に免疫されたウサギの血液から採取された細胞懸濁液から、Adenosine結合活性を有する細胞の候補が選抜された。次に、選抜された細胞の培養上清中に分泌された抗体がスクリーニングされた。スクリーニングとしてAdenosine-PEG-biotinに対する結合活性を有するか否かがELISA法によって評価された。また、AdenosineをAdenosine-PEG-biotin と一緒に1000倍以上加えるとAdenosine-PEG-biotinに対する結合が抑制されるかどうかもELISA法で評価された。Adenosine-PEG-biotinに対する結合活性を有し、Adenosine-PEG-biotinと一緒にAdenosineを加えた場合にAdenosine-PEG-biotinに対する結合が抑制されることを指標にして選抜された細胞からPCR法を用いてH鎖可変領域およびL鎖可変領域が取得された。取得された可変領域を、ヒトIgG1重鎖定常領域、およびヒト軽鎖定常領域と組み合わせて発現させた。

[0471] 〔実施例３〕ウサギB細胞クローニングから得られたクローンの評価

（３－１）ウサギB細胞クローニングから得られたクローンの2'-Adenosine-PEG-Biotinに対する結合活性の評価

ウサギB細胞クローニング法によって得られたクローンのアデノシンに対する結合活性がSPR法を用いて評価された。Biacore 4000（GE Healthcare）を用いて、上記クローンと2'-Adenosine-PEG-Biotinとの抗原抗体反応が速度論的に解析された。アミンカップリング法で適切な量のprotein A/G（Invitrogen）が固定化されたSensor chip CM5（GE Healthcare）に目的の抗体をキャプチャーさせた。次に、アナライトとして100 nmol/Lの2'-Adenosine-PEG-Biotinを60秒間相互作用させた後、アナライトの解離が60秒間追跡して測定された。ランニングバッファーにはHBS-P+（GE Healthcare）が用いられた。測定は全て25 ℃で実施され、アナライトの希釈にはランニングバッファーが使用された。

[0472] 2'-Adenosine-PEG-Biotinを相互作用させた際の結合量を各抗体のキャプチャー量（RU）で割った値（N_binding_100）と、2'-Adenosine-PEG-Biotinの相互作用後に各抗体から2'-Adenosine-PEG-Biotinが解離した60秒後の値を各抗体のキャプチャー量（RU）で割った値（N_stability_100）を指標とすることによって、各抗体の2'-Adenosine-PEG-Biotinに対する結合活性が比較された。ただし、キャプチャー量が1500 RU以下の抗体は、結合が十分に観察できなかったため検討する対象から除かれた。この結果を図７に示した。図７の結果から、B細胞クローニング法によってアデノシンに対して様々なaffinityで結合するクローンが取得されたことが明らかとなった。

[0473] （３－２）2'-Adenosine-PEG-Biotin結合クローンのアデノシンおよびATPに対する結合活性の評価およびその配列解析

2'-Adenosine-PEG-Biotinに対する結合が認められたクローンのアデノシンまたはATPに対する結合がSPR法および競合ELISA法により評価された。

[0474] （３－２－１）2'-Adenosine-PEG-Biotin結合クローンのSPR法によるアデノシンに対する結合の評価

Biacore T200（GE Healthcare）を用いて、B cell cloning法によって得られた抗体SMB0002のアデノシンとの抗原抗体反応の相互作用が解析された。Sensor chip CM5（GE Healthcare）上にアミンカップリング法で適切な量固定

化されたprotein A（Invitrogen）に、目的の抗体をキャプチャーさせ、抗原であるアデノシンを相互作用させた。ランニングバッファーには50 mmol/L TrisHCl、150 mmol/L NaCl、0.02%（w/v）Tween20、pH7.6が用いられた。測定は全て25 ℃で実施され、抗原の希釈にはランニングバッファーが使用された。

[0475] SMB0002については、抗原希釈液とブランクであるランニングバッファーを流速30 μL/minで75秒間添加し、センサーチップ上にキャプチャーさせた抗体に各抗原を相互作用させた。その後、流速30 μL/minで4分間ランニングバッファーを流し、抗原の抗体からの解離が観察された。その後、10 mmol/L Glycine-HCl, pH1.5を流速30μL/minで30秒間添加し、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。これらの定数をもとに解離定数KD（M）が算出された。各パラメーターの算出には Biacore T200 Evaluation Software（GE Healthcare）が用いられた。

[0476] その結果、SMB0002はアデノシンに対して結合することが見出された。クローンをアデノシン、100（Duplicate）、50、25、12.5、6.25、3.13 nMの濃度で結合を評価した時に観察されたセンサーグラムを図８Ａにまとめた。SMB0002のアデノシンに対するKDは1.5× 10^{-8}（mol/L)であった。

[0477] <u>（３－２－２）2'-Adenosine-PEG-Biotin結合クローンのSPR法によるATPに対する結合の評価</u>

Biacore T200（GE Healthcare）を用いてATPとの抗原抗体反応の相互作用が解析された。Sensor chip CM5（GE Healthcare）上にアミンカップリング法で適切な量固定化されたprotein A/G（Invitrogen）に、目的の抗体をキャプチャーさせ、抗原であるATPを相互作用させた。ランニングバッファーには10 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05%（w/v）Tween20、pH7.4が用いられた。測定は全て25 ℃で実施され、抗原の希釈にはランニングバッファーが使用された。

[0478] SMB0002は、抗原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2分間インジェクトし、センサーチップ上にキャプチャーさせた抗体に各抗原を相互作用させた。その後、流速20μL/minで3分間ランニングバッファーを流し、抗原の抗体からの解離が観察された。その後、10 mmol/L Glycine-HCl, pH1.5を流速30μL/minで30秒間インジェクトし、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。これらの定数をもとに解離定数KD (M) が算出された。各パラメーターの算出には Biacore T200 Evaluation Software (GE Healthcare) が用いられた。

[0479] その結果、SMB0002はATPに対しても結合することが見出された。各クローンをATP 5000、1250、313、78.1 nMの濃度で結合を評価した時に観察されたセンサーグラムを図８Ｂにまとめた。図８Ａおよび８Ｂに示すように、SMB0002はアデノシンとATPの両方に対する結合が認められた。SMB0002のアデノシンに対するKDは1.5E^{-8} (mol/L)であり、SMB0002のATPに対するKDは1.0E^{-5} (mol/L)であった。

[0480] （３－２－３）2'-Adenosine-PEG-Biotin結合クローンの競合ELISA法によるアデノシンおよびATPへの結合評価

2'-Adenosine-PEG-Biotinに対する結合が認められた抗体を1μg/mLになるようにPBSで希釈して384 wellのMAXISorp (Nunc) の各ウェルに加え、室温で1時間以上放置しプレートに結合させた。プレートの各ウェル中のPBSで希釈した抗体が除かれた後、1% BSAを含む TBSが加えられた当該プレートは1時間以上放置された。その後、1% BSAを含む TBS pH7.4 を除き、PBSで希釈した50nMの2'-Adenosine-PEG-Biotin、PBSで希釈した50 nMの2'-Adenosine-PEG-Biotinと500μMのAdenosineの混合物、PBSで希釈した50 nMの2'-Adenosine-PEG-Biotinと500μMのATPの混合物、またはPBSのみのいずれかが加えられた当該プレートが室温で1時間放置された。その後、当該プレートの各ウェルが0.05% Tween-20を含むPBS 80μLで3回洗浄された。その後、PBSで20000倍に希釈

されたStreptavidine-HRP（Thermo fisher scientific）が各ウェルに加えられたプレートは、室温で1時間以上放置された。0.05% Tween-20を含むPBS 80μLで3回洗浄された当該プレートの各ウェルに、発色基質（ABTS peroxidase substrate）が加えられた。1時間当該プレートがインキュベートされた後に、各ウェル中の溶液の発色がMolecular Device社製SpectraMaxにて405nmの吸光度が測定された。

[0481] その結果、図９に示すようにSMB0002は、アデノシンとATPを過剰量添加することによって、2'-Adenosine-PEG-Biotinに対する結合が阻害されたことから、これらのクローンは2'-Adenosine-PEG-Biotinのみならず、アデノシンとATPの両方に結合する抗体であることが確認された。

[0482] （３－２－４）アデノシンおよびATP結合クローンの配列解析

AdenosineとATPの両方に対して結合が認められたクローンSMB0002のアミノ酸配列は表３に示すとおりであった。

[0483] [表3]

クローン名	重鎖配列番号	軽鎖配列番号
SMB0002	配列番号:30	配列番号:31

[0484] 〔実施例４〕抗ATP/アデノシン抗体を利用した網羅的改変によるAMP/ADP/ATP/アデノシンスイッチ抗体取得用のライブラリの設計

癌組織および炎症性組織においては、アデノシン及びATPの濃度が高いことが知られている。後述する参考実施例２において構築した、ATPに結合する抗体を鋳型としたラショナルデザインライブラリより、ATP存在下でのみ抗原に結合能を示す抗体が多数取得されたことより、同様にアデノシンやAMP、ADP、ATPに結合能を示す抗体を鋳型としたライブラリを構築することによって、アデノシンやAMP、ADP、ATP存在下でのみ抗原に結合能を示す抗体が取得可能となると考えられた。

[0485] （４－１）SPR法によるアデノシン結合抗体SMB0002のAMPおよびADPへの結合評価

後述する参考実施例１で示された方法で、発現および精製されたSMB0002の

AMPへの結合が実施例３－２で示されたBiacoreを用いた測定方法と同様の方法で測定された。SMB0002をAMP 500、250 (Duplicate) 、125、62.5、31.25、15.625、7.8125 μMの濃度で結合を評価した時に観察されたセンサーグラムを図１０Ａに示した。図１０Ａに示すように、SMB0002のAMPに対する結合が認められた。SMB0002のAMPに対するKDは5.9 × 10^{-5} (mol/L)であった。

また、ADPへの結合が実施例３－２で示されたBiacoreを用いた測定方法と同様の方法で、NaCl濃度のみ600mMに変えて測定された。SMB0002に対してADP 2000、1000(Duplicate)、500、250、250、125、62.5、31.3 μMの濃度で結合を評価した時に観察されたセンサーグラムを図１０Ｂに示した。図１０Ｂに示すように、SMB0002のADPに対する結合が認められた。SMB0002のADPに対するKDは2.4 × 10^{-4} (mol/L)であった。

[0486] （４－２）アデノシン結合抗体SMB0002のX線結晶構造解析

実施例３において免疫されたウサギより取得されたアデノシン結合抗体SMB0002とアデノシンの複合体の立体構造がX線結晶構造解析により解明された。

[0487] （４－２－１）結晶化用SMB0002全長抗体の調製

結晶化用SMB0002全長抗体の調製及び精製は当業者公知の方法により行われた。

[0488] （４－２－２）全長抗体からのSMB0002Fabフラグメントの調製

得られたSMB0002全長抗体を分子量分画サイズ10000MWCOの限外ろ過膜により濃縮後、4mM L-Cystein、5mM EDTA、25mM MES pH 6.5にて1.5mg/mlに希釈したサンプルを調製、これに、全長抗体に対し質量比で百分の1量のPapain (Roche Applied Science) を加え、35℃に2時間静置した。その後、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20mlの25mM 酢酸ナトリウム 緩衝液 pH5.0を加えることで反応を停止した。次にこのサンプルを25mM 酢酸ナトリウム 緩衝液 pH5.0で平衡化した1mlサイズの陽イオン交換カラムHiTrap SP HP (GE Healthcare) の下流に1mlサイズのProteinA担体カラムHiTrap MabSelect Sure (GE Healthcare) をタンデムにつないだカラムに添加し、同緩衝液中NaCl濃度を直線的に上げ

て溶出をおこなうことでSMB0002抗体のFabフラグメントの精製画分を得た。次に、得られた精製画分を5000MWCOの限外ろ過膜 により濃縮、これを25mM HEPES緩衝液pH 7.0、100mM NaClで平衡化したゲルろ過カラムSuperdex 200 16/60 prep grade (GE Healthcare) に添加、同緩衝液によりカラムから溶出し、結晶化用SMB0002のFabフラグメントを得た。なお、すべてのカラム操作は低温下にて実施した。

[0489] （４－２－３）SMB0002Fabフラグメントとアデノシン複合体の結晶化

上記の方法で精製した結晶化用SMB0002_Fabサンプルを5000MWCOの限外ろ過膜 によりA280=22.3まで濃縮した。その後Adenosineを終濃度0.9mMになるように添加し、シッティングドロップ蒸気拡散法により結晶化をおこなった。結晶化にはHydra II Plus One (MATRIX)を用い、20% PEG3350, 0.2M Ammonium citrate dibasicのリザーバー溶液に対し、リザーバー溶液：結晶化サンプル＝0.2μl：0.2μlで混合して結晶化ドロップを作成、20℃に静置したところ、板状の結晶を得ることに成功した。

[0490] （４－２－４）SMB0002 Fabフラグメントとアデノシン複合体結晶からのＸ線回折データの測定

得られたSMB0002 Fabフラグメントとアデノシン複合体の単結晶一つを0.2M ammonium citrate dibasic, 0.025M HEPES pH7, 25% PEG3350, 0.1M NaCl, 1mM Adenosine, 16% Glycerolの溶液に浸した後、微小なナイロンループ付きのピンで溶液ごとすくいとり、液体窒素中で凍結させ、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BL-17AにてX線回折データの測定をおこなった。なお、測定中は常に-178℃の窒素気流中に置くことで凍結状態を維持し、ビームライン備え付けのCCDディテクタQuantum 315r (ADSC) により、結晶を0.6°ずつ回転させながらトータル300枚のX線回折画像を収集した。得られた回折画像からの格子定数の決定、回折斑点の指数付け、ならびに回折データの処理には、プログラムXia2 (J. Appl. Cryst. (2010) 43, 186-190) 、XDS Package (Acta Cryst. (2010) D66, 125-132) およびScala (Acta Cryst. (2006) D62, 72-82) を用い、最終的に分解能1.76Åまでの回

折強度データを得ることに成功した。本結晶は、空間群P1に属し、格子定数ａ＝49.960Å、ｂ＝105.730Å、ｃ＝106.166Å、α＝62.58°、β＝77.29°、γ＝77.49°であった。

[0491] （４－２－５）SMB0002 Fabフラグメントとアデノシン複合体のX線結晶構造解析

SMB0002 Fabフラグメントとアデノシン複合体結晶の構造決定のため、プログラムPhaser（J. Appl. Cryst.（2007）40, 658-674）を用いて分子置換法を実施した。得られた結晶格子の大きさとSMB0002 Fabフラグメントの分子量から非対称単位中の複合体の数は4個と予想された。Discovery Studio3.5（Accelrys）を用いて、当該抗体のホモロジーモデルを作成し、このモデルを可変領域と定常領域部分に分け、それぞれの構造座標を探索用モデルとして用いて、当該結晶の格子内での向きと位置を回転関数および並進関数から決定した。さらに得られた初期構造モデルに対し、可変領域と定常領域部分を独立に動かす剛体精密化をおこなったところ、25-3.0Åの回折強度データに対する結晶学的信頼度因子Ｒ値は46.36%、Free R値は46.10%となった。さらにプログラムREFMAC5（Acta Cryst.（2011）D67, 355-367）を用いた構造精密化と、実験的に決定された構造因子Foとモデルから計算された構造因子Fcならびにモデルから計算された位相をもとに算出された2Fo-Fc、Fo-Fcを係数とする電子密度マップをみながらの当該構造モデルの修正をプログラムCoot（Acta Cryst.（2010）D66, 486-501）を用いて実施、これらの作業を繰り返すことで構造モデルの精密化をおこなった。最終的には、分解能25-1.76Åの168160個の回折強度データを用いて、14681個の非水素原子を含む構造モデルの結晶学的信頼度因子Ｒ値は19.82%、Free R値は23.15%となった。

[0492] （４－２－６）SMB0002とアデノシンの相互作用部位の同定

最終的に、SMB0002_Fabフラグメントとアデノシンの複合体の結晶構造は、分解能1.76Åで決定された。本結晶の非対称単位中には、４つのSMB0002_Fabフラグメントが存在し、そのすべてにアデノシンが結合、その結合様式はいずれもほぼ同一であった。本結晶構造より、アデノシンは、当該抗体のFabフ

ラグメントのH鎖とL鎖の間に形成されるポケットに、アデニン環がポケット奥に向かう形で結合することがわかった。

図１１Ａに示すように、アデノシンのアデニン環部分は、当該抗体のH鎖A33、I50、W58、Y100 、L鎖Y95c、N96の各側鎖ならびに、H鎖G99、T100aの各主鎖により認識される。特にL鎖N96側鎖はアデノシン１位のNならびに６位のNH2と2本の水素結合を形成、さらに、H鎖T100a主鎖のカルボニル酸素ならびにアミドNH基と、アデニン環の6位のNH2ならびに7位のNとの間に、それぞれ水素結合が形成されることで、強固に認識されることがわかった。さらに、アデニン環は、当該抗体のH鎖A33、I50、W58、Y100及びL鎖Y95cの各側鎖によりとり囲まれ、これら残基とファンデルワールス相互作用やCH-π相互作用を形成している。H鎖G99、T100aは、いずれも主鎖部分でアデニン環と相互作用を形成しているが、G99はラマチャンドランプロット上でGlyに特有のφ-Ψ角を有することから、アデノシンと結合する際のH鎖CDR３のループ構造の維持に重要と考えられる。また、T100a側鎖もH鎖CDR3の他の残基と相互作用を形成することで、アデノシンと結合する際のH鎖CDR3ループの構造の維持に重要な役割を果たしていると考えられる。図１１Ｂに示すように、アデノシンのリボース部分はH鎖S56、W58、 L鎖Y95cの各側鎖ならびに、T57の主鎖、H鎖G52により認識されている。これらの残基との相互作用は主にファンデルワールス相互作用によるものであるが、H鎖S56は側鎖とリボースの3’位OHの間には弱いながらも水素結合の形成が見られる。H鎖G52は、そのCα原子も含めて、リボース部分と複数のファンデルワールス相互作用を形成しており、アデノシンの認識に重要な役割を果たしていると考えられる。一方で、H鎖T57は、主鎖のみでリボース部分と相互作用し、側鎖は結合には直接関与していない。

[0493] 実施例４－１で示したように、当該抗体はアデノシンだけではなく、結合活性は落ちるもののAMPにも結合する。本結晶構造ではアデノシンのリボース5’位 OHがアデニン環部分3位のNと分子内相互作用を形成しているが、AMPにおいては、本結合を形成することはできず、5’位のOは、その位置を少し変え

、結果として、AMPのリン酸基は、図１１Ｂに示した点線内の領域に存在すると推察される。本領域は、H鎖CDR2ならびにL鎖CDR3の残基と相互作用可能な位置にあり、H鎖CDR2ならびにL鎖CDR3に適切な変異を導入することでAMPへの結合増強が期待できる。

以上の結果から、当該抗体によるアデノシンの認識様式が明らかになるとともに、アデノシンとの結合に大きく関与する抗体可変領域のアミノ酸残基が同定された。アデノシンとの結合に大きく関与しているアミノ酸残基として、H鎖：A33、 I50、 G52、 S56、 T57、 W58、 G99、 Y100、 T100a（Kabatナンバリング）、L鎖：Y95c、 N96（Kabatナンバリング）が挙げられる。またAMPの5'位リン酸基の近傍に位置する可能性のある残基として、H鎖CDR2のD54、S55、S56、T57、W58ならびに、L鎖CDR3のG95a、W95b、Y95cが予測され、これら残基への改変はAMPとの結合増強につながる可能性がある。

さらに、ADP、ATPに対しても結晶構造をもとに同様の考察を行うことにより、ADP、ATPへの結合を増強できる改変も予測できる。

[0494] （４－３）ウサギ由来抗体SMB0002のヒト化

SMB0002はウサギ由来の抗体であるため、ヒト抗体ライブラリを作成するにあたり、配列のヒト化が当業者公知の方法で実施された（欧州特許公開EP239400、国際公開WO1996/002576、WO1993/012227、WO1992/003918、WO1994/002602、WO1994/025585、WO1996/034096、WO1996/033735、WO1992/001047、WO1992/020791、WO1993/006213、WO1993/011236、WO1993/019172、WO1995/001438、WO1995/015388、Cancer Res., (1993) 53, 851-856、BBRC., (2013) 436(3):543-50等）。

ヒト化SMB0002（重鎖可変領域配列：配列番号：８５、軽鎖可変領域配列：配列番号：８６は、参考実施例１－１で示された方法で発現および精製された。ヒト化SMB0002とアデノシンおよびAMPとの結合がBiacore T200（GE Healthcare）を用いた方法で測定され、解析された。Sensor chip CM5（GE Healthcare）上にアミンカップリング法で適切な量固定化されたprotein A（Invitrogen）に、目的の抗体がキャプチャーされ、抗原であるアデノシンあるいは

AMP、ADP、ATPとの相互作用が観察された。ランニングバッファーにはアデノシンあるいはAMP の場合には50 mM TrisHCl、150 mM NaCl、0.02% (w/v) Tween20、pH7.6が、ADPあるいはATPの場合には50 mM TrisHCl、150 mM NaCl、0.02% (w/v) Tween20、2 mM $MgCl_2$、pH7.6が用いられた。測定は全て25 ℃で実施され、抗原の希釈にはランニングバッファーが使用された。

[0495] センサーチップ上にキャプチャーされた抗体に対して、抗原希釈液とブランクであるランニングバッファーが流速30 μL/minで75秒間添加され、抗原と抗体の結合が観察された。その後、流速30 μL/minで5分間ランニングバッファーが流され、抗原の抗体からの解離が観察された。その後、10 mM Glycine-HCl, pH1.5が流速30μL/minで30秒間添加され、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。これらの定数をもとに解離定数KD (M) が算出された。各パラメーターの算出にはBiacore T200 Evaluation Software (GE Healthcare) が用いられた。

[0496] その結果、ヒト化SMB0002はアデノシン、AMP、ADP、ATPに対して結合することが見出された。クローンに対してアデノシン濃度200、100、50(duplicate)、25、12.5、6.25、3.125 nMの試料が相互作用した時に観察されたセンサーグラムを図１２にまとめた。ヒト化SMB0002のアデノシンに対するKDは7.5 × 10^{-9} Mであった。次に、クローンに対してAMP濃度500、250、125(duplicate)、62.5、31.3、15.6、7.8 μMの試料が相互作用した時に観察されたセンサーグラムを図１３にまとめた。ヒト化SMB0002のAMPに対するKDは3.5 × 10^{-5} Mであった。次に、クローンに対してADP濃度1000(duplicate)、500、250、125、62.5 μMの試料が相互作用した時に観察されたセンサーグラムを図１４にまとめた。ヒト化SMB0002のADPに対するKDは7.9 × 10^{-5} Mであった。最後に、クローンに対してATP濃度1000(duplicate)、500、250、125、62.5 μMの試料が相互作用した時に観察されたセンサーグラムを図１５にまとめた。ヒト化SMB0002のATPに対するKDは1.4 × 10^{-4} Mであった。ヒト化SMB0002がアデノシンおよびAMP, ADP, ATPに対して結合活性を有していたことから、この配列

がヒト抗体ライブラリ構築の鋳型配列として用いられた。

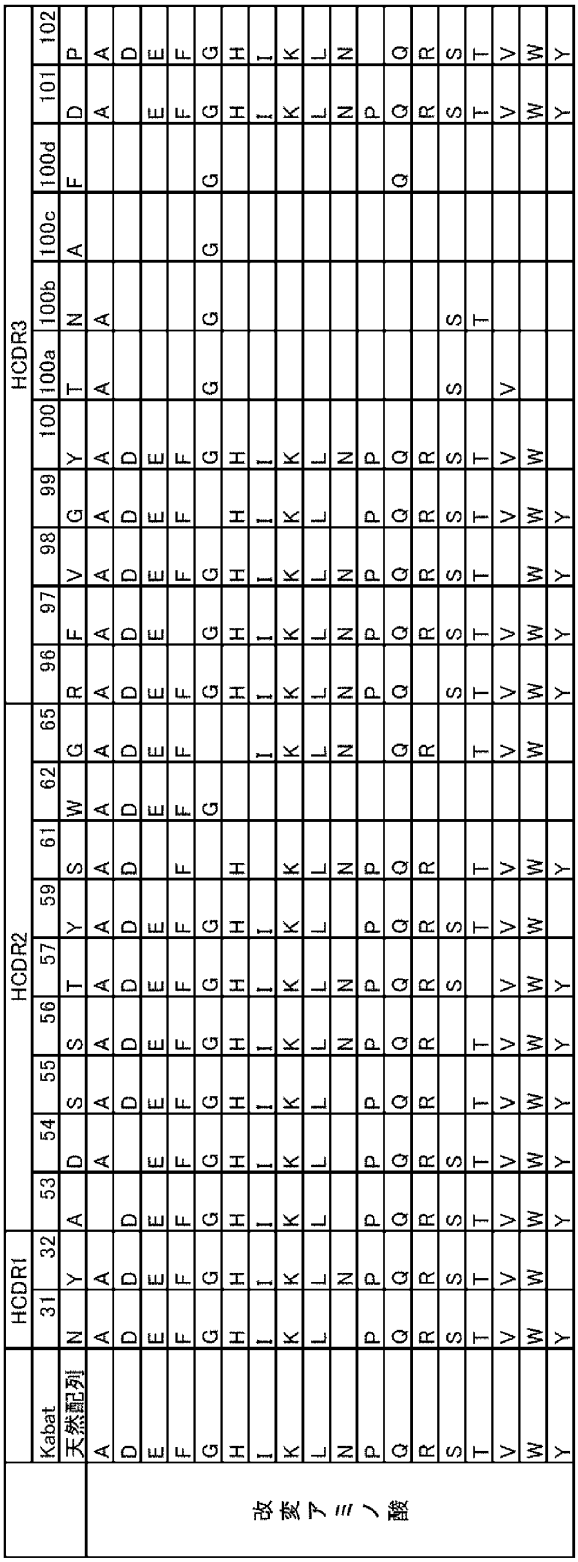
[0497] （４－４）X線結晶構造解析結果をもとにしたライブラリ設計のための網羅的改変体評価

実施例（４－２）においてアデノシン結合抗体SMB0002とアデノシンの複合体の結晶構造が解析された。結晶構造解析の結果から、当該抗体が認識するアデノシン（およびAMP）の認識様式、および、アデノシン（およびAMP）への結合に大きく関与していないと想定される抗体可変領域のアミノ酸残基が推定された。アデノシン認識部位近傍に存在する残基が各アミノ酸に置換された改変体を網羅的に評価することで、ライブラリ化可能部位およびライブラリ化可能アミノ酸の判定が可能になると考えられた。つまり、アデノシンあるいはAMP、ADP、ATPに対する結合に大きく関与していない部位、あるいは、結合に関与していてもアデノシンあるいはAMP、ADP、ATPに対する結合を大幅には低下させない（結合をゼロにしない）天然配列以外のアミノ酸が存在する部位およびアミノ酸を判定することで、ライブラリ化可能部位およびライブラリ化可能アミノ酸の判定が可能になると考えられた。実施例（４－３）で作製されたヒト化SMB0002に対して、これらの残基に改変を導入した改変体が複数作製された。

[0498] 重鎖の部位のうち改変された部位（表中、「Kabat」と記載されるKabatナンバリングで表される部位）ならびに当該部位における改変前のアミノ酸（表中、「天然配列」と記載されるアミノ酸）および改変後のアミノ酸（表中「改変アミノ酸」と記載されるアミノ酸）は表４に示した。

[0499]

[表4]



[0500] 軽鎖の部位のうち改変された部位（表中、「Kabat」と記載されるKabatナンバリングで表される部位）ならびに当該部位における改変前のアミノ酸（表中、「天然配列」と記載されるアミノ酸）および改変後のアミノ酸（表中「改変アミノ酸」と記載されるアミノ酸）は表５に示した。

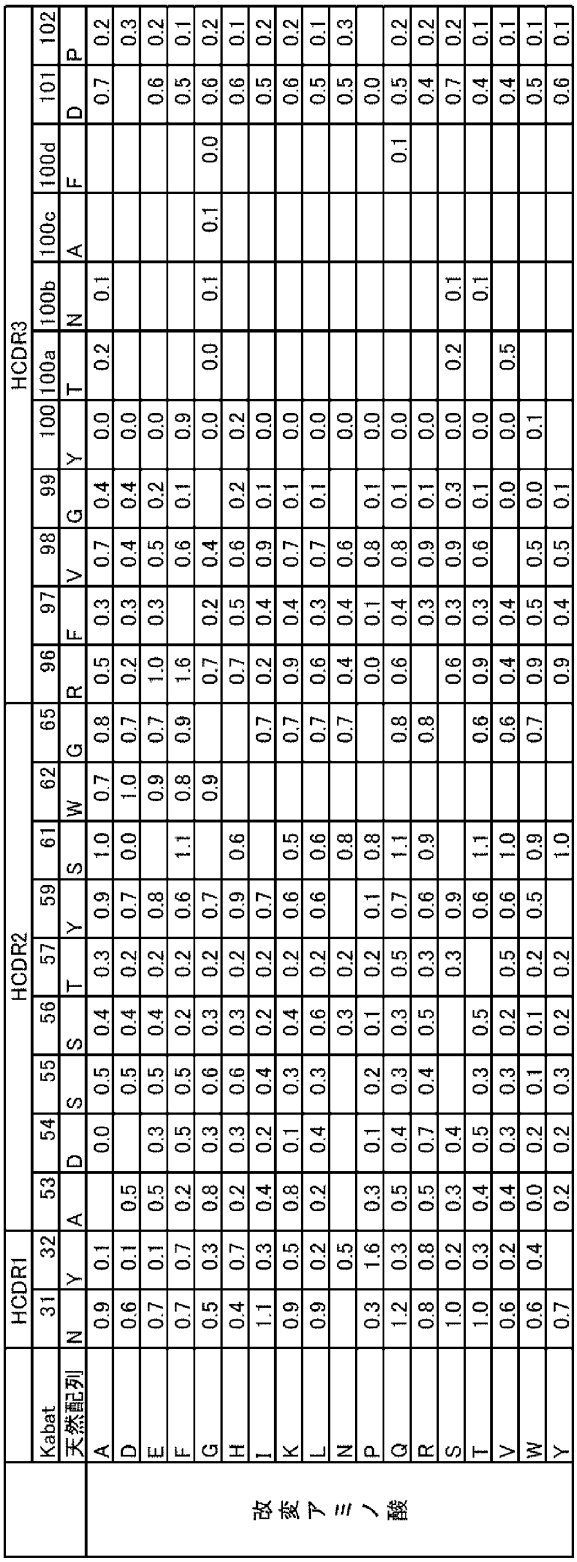
[0501] [表5]

		LCDR1			LCDR3					
	Kabat	28	29	32	93	94	95	95a	95b	95c
	天然配列	W	N	Y	A	N	S	G	W	Y
改変アミノ酸	A	A	A	A		A	A	A	A	A
	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
	G	G	G	G	G	G	G		G	G
	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
	N	N					N	N	N	N
	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	S	S	S	S	S	S			S	S
	T	T	T	T	T	T	T		T	T
	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
	W		W	W	W	W	W	W		W
	Y	Y	Y		Y	Y	Y	Y	Y	

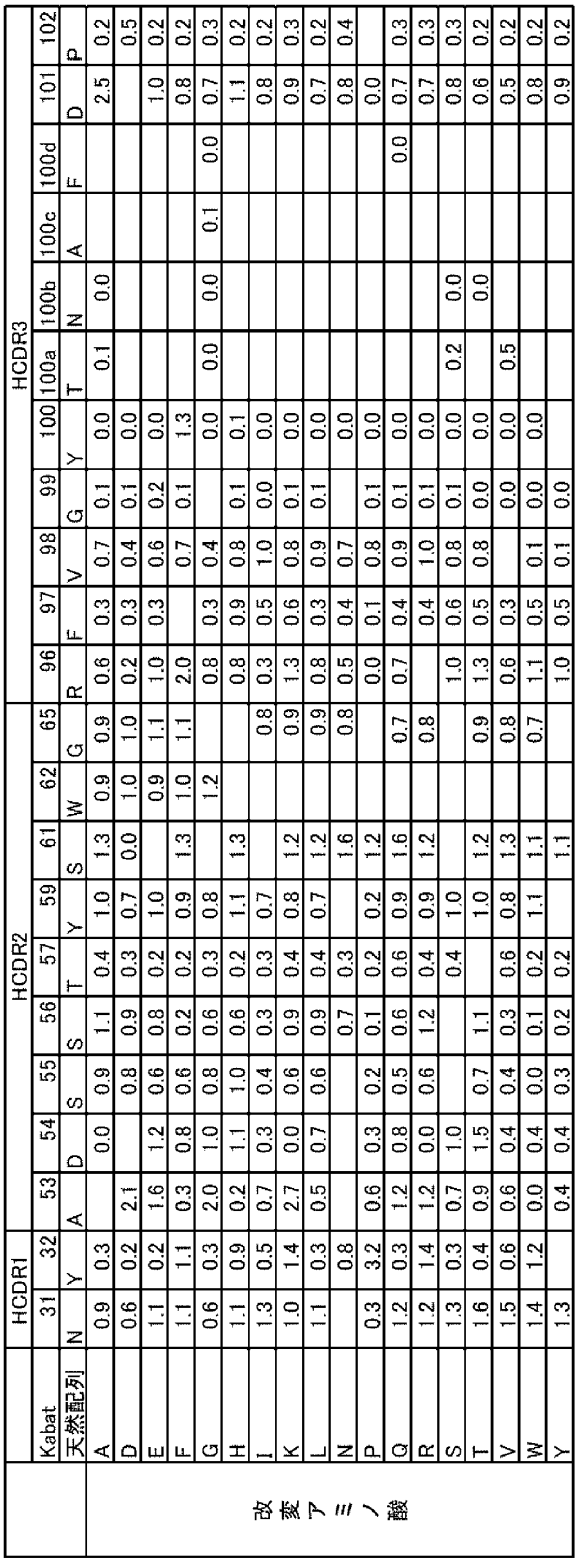
[0502] 後述する参考実施例１で示された方法で、発現および精製される各改変体のアデノシン及びAMPへの結合が、実施例４－３で示されたBiacoreを用いた方法で、$MgCl_2$濃度のみ2mMに変えて測定された。測定の結果、各改変体のアデノシンおよびAMPに対するAffinityがKD値として算出された。重鎖における各改変体と親配列であるヒト化SMB0002のアデノシンに対するKD値の比較の結果を表６、AMPに対するKD値の比較の結果を表７に示した。軽鎖における各改変体とヒト化SMB0002のアデノシンに対するKD値の比較の結果を表８に、AMPに対するKD値の比較の結果を表９に示した。

[0503]

[表6]



[0504] [表7]



		HCDR1		HCDR2													HCDR3														
	Kabat	31	32	53	54	55	56	57	59	61	62	65	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	101	102
	天然配列	N	Y	A	D	S	S	T	Y	S	W	G	R	F	V	G	Y	T	N	A	F	D	P
改変アミノ酸	A	0.9	0.3		0.0	0.9	1.1	0.4	1.0	1.3	0.9	0.9	0.6	0.3	0.7	0.1	0.0	0.1	0.0			2.5	0.2
	D	0.6	0.2	2.1		0.8	0.9	0.3	0.7	0.0	1.0	1.0	0.2	0.3	0.4	0.1	0.0						0.5
	E	1.1	0.2	1.6	1.2	0.6	0.8	0.2	1.0		0.9	1.1	1.0	0.3	0.6	0.2	0.0					1.0	0.2
	F	1.1	1.1	0.3	0.8	0.6	0.2	0.2	0.9	1.3	1.0	1.1	2.0		0.7	0.1	1.3					0.8	0.2
	G	0.6	0.3	2.0	1.0	0.8	0.6	0.3	0.8		1.2		0.8	0.3	0.4		0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.7	0.3
	H	1.1	0.9	0.2	1.1	1.0	0.6	0.2	1.1	1.3			0.8	0.9	0.8	0.1	0.1					1.1	0.2
	I	1.3	0.5	0.7	0.3	0.4	0.3	0.3	0.7			0.8	0.3	0.5	1.0	0.0	0.0					0.8	0.2
	K	1.0	1.4	2.7	0.0	0.6	0.9	0.4	0.8	1.2		0.9	1.3	0.6	0.8	0.1	0.0					0.9	0.3
	L	1.1	0.3	0.5	0.7	0.6	0.9	0.4	0.7	1.2		0.9	0.8	0.3	0.9	0.1	0.0					0.7	0.2
	N		0.8				0.7	0.3		1.6		0.8	0.5	0.4	0.7		0.0					0.8	0.4
	P	0.3	3.2	0.6	0.3	0.2	0.1	0.2	0.2	1.2			0.0	0.1	0.8	0.1	0.0					0.0	
	Q	1.2	0.3	1.2	0.8	0.5	0.6	0.6	0.9	1.6		0.7	0.7	0.4	0.9	0.1	0.0				0.0	0.7	0.3
	R	1.2	1.4	1.2	0.0	0.6	1.2	0.4	0.9	1.2		0.8		0.4	1.0	0.1	0.0					0.7	0.3
	S	1.3	0.3	0.7	1.0			0.4	1.0				1.0	0.6	0.8	0.1	0.0	0.2	0.0			0.8	0.3
	T	1.6	0.4	0.9	1.5	0.7	1.1		1.0	1.2		0.9	1.3	0.5	0.8	0.0	0.0		0.0			0.6	0.2
	V	1.5	0.6	0.6	0.4	0.4	0.3	0.6	0.8	1.3		0.8	0.6	0.3		0.0	0.0	0.5				0.5	0.2
	W	1.4	1.2	0.0	0.4	0.0	0.1	0.2	1.1	1.1		0.7	1.1	0.5	0.1	0.0	0.0					0.8	0.2
	Y	1.3		0.4	0.4	0.3	0.2	0.2		1.1			1.0	0.5	0.1	0.0						0.9	0.2

[0505] [表8]

		LCDR1			LCDR3					
	Kabat	28	29	32	93	94	95	95a	95b	95c
	天然配列	W	N	Y	A	N	S	G	W	Y
改変アミノ酸	A	0.3	0.7	0.2		0.9	0.7	0.5	0.7	0.1
	D	0.1	0.7	0.1	0.4	1.0	0.6	0.5	0.4	0.1
	E	0.1	0.7	0.2	0.4	0.7	0.7	0.5	0.6	0.1
	F	0.8	0.4	0.7	0.6	0.7	0.4	0.4	0.5	0.6
	G	0.1	0.7	0.2	0.3	1.1	0.9		0.7	0.1
	H	0.6	0.6	0.4	0.8	0.7	0.8	1.0	0.8	0.3
	I	0.1	0.4	0.0	0.1	0.6	0.8	0.5	0.7	0.2
	K	0.3	0.6	0.1	0.0	0.8	0.7	0.5	0.5	0.5
	L	0.2	0.6	0.1	0.7	0.6	0.8	0.6	0.5	1.0
	N	0.3					0.5	1.0	0.5	0.6
	P	0.1	0.3	0.1	0.1	0.3	0.6	0.3	0.4	0.1
	Q	0.1	0.8	0.1	0.8	0.6	0.6	0.7	0.8	0.0
	R	0.2	0.7	0.1	1.3	0.6	0.6	0.8	1.1	0.2
	S	0.6	0.7	0.2	0.5	0.9			0.8	0.1
	T	0.5	0.4	0.1	0.7	0.7	0.7		0.9	0.1
	V	0.6	0.4	0.0	0.5	0.4	0.7	0.6	0.7	0.2
	W		0.6	0.1	0.0	0.7	0.5	0.5		0.1
	Y	0.7	0.7		0.8	0.7	0.3	0.3	1.0	

[0506] [表9]

		LCDR1			LCDR3					
	Kabat	28	29	32	93	94	95	95a	95b	95c
	天然配列	W	N	Y	A	N	S	G	W	Y
改変アミノ酸	A	0.4	0.8	0.2		1.3	1.4	0.8	1.2	0.2
	D	0.1	1.0	0.1	0.8	1.2	1.2	0.8	1.0	0.1
	E	0.1	1.0	0.2	0.8	1.2	0.9	1.0	1.2	0.0
	F	0.9	0.6	0.9	1.0	1.3	0.3	1.1	0.9	1.1
	G	0.1	1.2	0.2	0.5	1.5	1.8		1.0	0.1
	H	0.9	0.9	0.5	1.2	1.1	1.0	0.8	1.0	0.7
	I	0.2	0.6	0.1	0.1	0.9	0.8	0.5	0.9	0.3
	K	0.4	1.0	0.1	0.0	1.1	0.7	0.6	1.5	2.2
	L	0.3	1.2	0.1	0.9	1.3	1.8	1.4	1.3	1.9
	N	0.4					1.0	0.7	1.1	1.9
	P	0.1	0.5	0.1	0.0	0.5	1.4	0.4	0.8	0.3
	Q	0.1	1.0	0.1	1.3	1.5	1.2	1.0	1.4	0.0
	R	0.2	1.0	0.1	2.5	1.0	0.9	1.0	2.2	0.4
	S	0.5	1.0	0.3	1.0	1.6			1.6	0.1
	T	0.5	0.6	0.1	1.2	1.0	1.1		1.4	0.1
	V	0.5	0.8	0.0	0.8	0.6	1.0	0.5	1.2	0.4
	W		1.0	0.2	0.0	0.8	0.7	1.0		0.1
	Y	1.0	0.9		1.3	1.4	0.5	0.4	0.9	

[0507] （４－５）網羅的改変体評価結果をもとにしたライブラリ設計

ライブラリの設計にあたり、実施例４－４で得られた情報をもとに、以下の条件のうち少なくとも一つを満たす部位がライブラリ化可能部位として選定された。

条件１）アデノシンあるいはAMP、ADP、ATPに対する結合に大きく関与していない部位、あるいは、結合に関与していてもアデノシンあるいはAMP、ADP、ATPに対する結合を大幅には低下させない（結合をゼロにしない）天然配列以外のアミノ酸が存在する部位、

条件２）抗体のレパートリーとしてある程度アミノ酸出現頻度の多様性のある部位、

条件３）Canonical structureの形成に重要でない部位。

[0508] 実施例（４－４）の評価結果より、アデノシンおよびAMPに対するKD値がともに親配列（ヒト化SMB0002）のアデノシンおよびAMPに対するKD値の20％を上回る結合を示す改変体が少なくとも一つ以上存在する箇所が、上記条件を満たす改変可能部位と判定された。当該部位において置換されたアミノ酸のうち、アデノシンおよびAMPに対するKD値がともに親配列（ヒト化SMB0002）のアデノシンおよびAMPに対するKD値の20％を上回る結合を示すアミノ酸はライブラリ化が可能なアミノ酸（ライブラリにおいて出現させることが可能なフレキシブル残基）と判定された。ヒト化SMB0002のCDR部位において、判定された改変可能部位に、前記の改変体の解析から選出されたライブラリ化可能アミノ酸（ライブラリにおいて出現させることが可能なフレキシブル残基）および未改変体のアミノ酸（すなわちヒト化SMB0002の天然配列に含まれるアミノ酸）を含むアミノ酸レパートリーに含まれるアミノ酸のうち、少なくともいずれか一つ以上のアミノ酸が出現するライブラリを設計することによって、ATP/AMP/ADP/アデノシンスイッチ抗体取得用のライブラリが構築される。重鎖におけるアミノ酸レパートリーを含む部位、ならびに当該部位におけるアミノ酸レパートリーは表１０に示した。軽鎖におけるアミノ酸レパートリーを含む部位、ならびに当該部位におけるアミノ酸レパートリーは表１１に示した。表中、「Kabat」と記載されるKabatナンバリングで表される部

位は改変可能部位を、「天然配列」と記載されるアミノ酸は当該部位における未改変体のアミノ酸を、「ライブラリ化可能アミノ酸」と記載されるアミノ酸は当該部位におけるライブラリ化可能アミノ酸を、それぞれ表す。各改変可能酸部位において、選出されたアミノ酸レパートリーに含まれるアミノ酸のうち、少なくともいずれか一つが出現するライブラリが設計された。

[0509] [表10]

		HCDR1		HCDR2									HCDR3						
	Kabat	31	32	53	54	55	56	57	59	61	62	65	96	97	98	100	100a	101	102
	天然配列	N	Y	A	D	S	S	T	Y	S	W	G	R	F	V	Y	T	D	P
ライブラリ化可能アミノ酸	A	A				A	A	A	A	A	A	A	A	A	A			A	
	D	D		D		D	D		D		D	D	D	D	D				D
	E	E		E	E	E	E		E		E	E	E	E	E			E	
	F	F	F	F	F	F	F		F	F	F	F	F		F	F		F	
	G	G	G	G	G	G	G		G		G		G	G	G			G	
	H	H	H		H	H	H		H	H			H	H	H			H	
	I	I	I	I	I	I	I	I	I			I		I	I			I	
	K	K	K	K		K	K	K	K	K		K	K	K	K			K	
	L	L		L	L	L	L	L	L	L		L	L	L	L			L	
	N		N				N	N		N		N	N	N	N			N	N
	P	P	P	P						P					P				
	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q		Q	Q	Q	Q			Q	
	R	R	R	R		R	R	R	R	R		R		R	R			R	
	S	S		S	S			S	S				S	S	S		S	S	
	T	T	T	T	T	T	T		T	T		T	T	T	T			T	
	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V		V	V	V			V	V	
	W	W	W						W	W		W	W	W				W	
	Y	Y		Y	Y	Y				Y			Y	Y				Y	

[0510] [表11]

		LCDR1			LCDR3					
	Kabat	28	29	32	93	94	95	95a	95b	95c
	天然配列	W	N	Y	A	N	S	G	W	Y
ライブラリ化可能アミノ酸	A	A	A	A		A	A	A	A	
	D		D	D	D	D	D	D	D	
	E		E		E	E	E	E	E	
	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
	G		G	G	G	G	G		G	
	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
	I		I			I	I	I	I	
	K	K	K			K	K	K	K	K
	L		L		L	L	L	L	L	L
	N	N					N	N	N	N
	P		P			P	P	P	P	
	Q		Q		Q	Q	Q	Q	Q	
	R		R		R	R	R	R	R	
	S	S	S		S	S			S	
	T	T	T		T	T	T		T	
	V	V	V		V	V	V	V	V	V
	W		W			W	W	W		
	Y	Y	Y		Y	Y	Y	Y	Y	

[0511] こうして設計されたライブラリに含まれる個々の配列を含む遺伝子が合成され、これらの個々の遺伝子の集合体（ライブラリ）を鋳型として用いてVHおよびVLをそれぞれ増幅させることが可能なプライマーによって遺伝子ライブラリが増幅される。増幅されたラショナルデザインヒト抗体重鎖可変領域の遺伝子ライブラリとヒト抗体軽鎖可変領域の遺伝子ライブラリはヒトIgG由来CH1配列およびヒトIgG由来軽鎖定常領域配列の両方を有する適切なファージミドベクターへと導入される。このファージミドベクターをエレクトロポレーションにより大腸菌へと導入することで、ヒト抗体可変領域－定常領域よりなるFabドメインを提示し、アデノシンまたはAMP、ADP、ATPをスイッチとして抗原に結合できる抗体を取得できるようなラショナルデザインライブラリが構築される。このように多様なアデノシンまたはAMP、ADP、ATP結合活性を有するH鎖およびL鎖から構成されたラショナルデザインライブラリは、図４３に示したようにアデノシンまたはAMP、ADP、ATPが抗体と抗原の間に挟まり、任意の抗原に対するAMP/ADP/ATP/アデノシンスイッチ抗体を効率よく取得できるヒト抗体が含まれるライブラリとして有用であると考えられる。また、上述のようにSMB0002はアデノシンとAMPのみならず、ADPやATPにも結合することから、AMP、ADP、ATPおよびアデノシンにその構造が類似するcAMPおよびATP-gamma-Sにも結合活性を有すると予想される。そのため、本ライブラリはATP、ADP、AMP、cAMP、アデノシン、またはATP-gamma-Sのうちいずれか一つ以上の低分子の有無によって任意の標的抗原に対する結合活性が変化するスイッチ抗体を取得するのに有用であると考えられる。

[0512] 〔実施例５〕スイッチとなる分子によるパンニングを利用したAMP/ADP/ATP/アデノシンスイッチ抗体取得用のライブラリ設計

実施例４で網羅的改変によりライブラリ化部位の設計を行い、アデノシンやAMP、ADP、ATPに結合能を示す抗体を鋳型としたライブラリを構築する方法を記載した。ライブラリ作製方法として異なるアプローチ法としてスイッチとなる分子に対するパンニングを利用した方法も有用である。

[0513] （５－１）アデノシン結合抗体SMB0002のX線結晶構造解析

実施例４－２においてアデノシン結合抗体SMB0002とアデノシンの複合体の結晶構造が解析された。結晶構造解析の結果から、当該抗体が認識するアデノシン（およびAMP）の認識様式、および、アデノシン（およびAMP）への結合に大きく関与していないと想定される抗体可変領域のアミノ酸残基が推定された。

[0514] SMB0002はウサギ由来の抗体であるため、ヒト抗体ライブラリを作成するにあたり、配列のヒト化が当業者公知の方法で実施された（前記に同じ）。

[0515] ライブラリの設計にあたり、以下の条件のうち少なくとも一つを満たす部位がライブラリ化可能部位として選定される。

条件１）アデノシンあるいはAMP、ADP、ATPに対する結合に大きく関与していない部位、あるいは、結合に関与していてもアデノシンあるいはAMP、ADP、ATPに対する結合を大幅には低下させない（結合をゼロにしない）天然配列以外のアミノ酸が存在する部位、

条件２）抗体のレパートリーとしてある程度アミノ酸出現頻度の多様性のある部位、

条件３）Canonical structureの形成に重要でない部位。

[0516] まず、重鎖において上記の条件を満たす部位であって、ヒト化SMB0002の配列に含まれる部位のうち、CDR1, CDR2, CDR3の部位に関して、アデノシンあるいはAMP、ADP、ATPに対する結合に大きく関与していない部位のアミノ酸をある一定の塩基のみに出現を限定したライブラリを設計する。たとえばNNKやTRIM Library等（Gonzalez-Munoz A et al. MAbs 2012, Lee CV et al. J Mol Biol. 2004, Knappik A. et al. J Mol Biol. 2000, Tiller T et al. MAbs 2013）が挙げられる。設計された遺伝子配列の集合体は遺伝子合成され（重鎖可変領域ライブラリ）、ヒト化SMB0002の軽鎖可変領域配列（親配列、配列番号：８６）と組み合わせられ、ヒトIgG由来CH1配列およびヒトIgG由来軽鎖定常領域配列を有する適切なファージミドベクターに導入される。このファージミドベクターをエレクトロポレーションにより大腸菌へと導入することで、アデノシン、AMP、ADP、ATPのいずれかをスイッチとして抗原に結合で

きるようなヒト抗体重鎖可変領域ファージディスプレイライブラリが構築される。

[0517] 次に、軽鎖において上記の条件を満たす部位であって、ヒト化SMB0002の配列に含まれる部位のうち、CDR1, CDR2, CDR3の部位に関して、アデノシンあるいはAMP、ADP、ATPに対する結合に大きく関与していない部位のアミノ酸をある一定の塩基のみに出現を限定したライブラリを設計する。たとえばNNKやTRIM Library等が挙げられる。設計された遺伝子配列の集合体は遺伝子合成され（軽鎖可変領域ライブラリ）、ヒト化SMB0002の重鎖可変領域配列（親配列、配列番号：８５）と組み合わせられ、ヒトIgG由来CH1配列およびヒトIgG由来軽鎖定常領域配列を有する適切なファージミドベクターに導入される。このファージミドベクターをエレクトロポレーションにより大腸菌へと導入することで、アデノシン、AMP、ADP、ATPのいずれかをスイッチとして抗原に結合できるようなヒト抗体軽鎖可変領域ファージディスプレイライブラリが構築される。

[0518] 構築された重鎖、軽鎖可変領域それぞれのファージディスプレイライブラリから、ATP、ADP、AMPもしくはアデノシンに特異的に結合する抗体集団を取得するために、ビオチン化ATP, ビオチン化ADP、ビオチン化AMPもしくはビオチン化アデノシンに対するパンニングが実施される。

[0519] ビオチン化アデノシンは実施例２－２－１１に記載の方法により調製された。ATP-PEG-ビオチンはJenaBioscience社、カタログナンバーNU-926-BI0を購入し使用できる。AMP、ADPはATPと同様に、アデノシンの5'位水酸基にリン酸基が付加されている構造のため、ビオチン化ATPと同様にリン酸基から適切なリンカー（PEGリンカー等）を結合し、その末端にビオチンを付加することが望ましい。

[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する大腸菌からファージが産生される。ファージ産生が行われる大腸菌の培養液に2.5M 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、当該ファージライブ

ラリ液に終濃度4%となるようにBSAが添加される。磁気ビーズに固定化された抗原を用いてパンニングが実施される。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。

[0521] パンニングでは、アデノシン、AMP、ADPもしくはATPに対して結合可能なファージの回収が行われる。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分間アデノシン、AMP、ADPもしくはATPと接触させる。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分間結合させる。ビーズは1 mLのTBSTとTBSにて洗浄される。その後最終濃度1mg/mLのトリプシン入りのTBSが加えられたビーズが室温で15分懸濁された後、即座に磁気スタンドを用いて分離されたビーズからファージ溶液が回収される。トリプシンの添加によって、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が失われる。トリプシン溶液で溶出されたファージが、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る。同様のパンニングが複数回実施され、アデノシン、AMP、ADPもしくはATPへ結合するファージ集団が得られる。

[0522] 重鎖、軽鎖可変領域ファージディスプレイライブラリそれぞれから取得された抗原(アデノシン、AMP、ADPもしくはATP)に対する結合ファージは、抗原への結合能を有する集団であるため、その両者の組み合わせにより作製されるFab提示ファージライブラリにはスイッチとなる低分子結合を維持しているクローンが多数含まれることが予想され、より効率良くスイッチ抗体を取得できるライブラリが作製できると思われる。

[0523] 重鎖、軽鎖それぞれのファージライブラリに感染した大腸菌は当業者公知の方法で遺伝子が抽出される。こうして取得された個々の遺伝子の集合体（ライブラリ）を鋳型として用いてVHおよびVLをそれぞれ増幅させることが可能なプライマーによって遺伝子ライブラリが増幅される。増幅されたヒト抗体重鎖可変領域の遺伝子ライブラリとヒト抗体軽鎖可変領域の遺伝子ライブラリはヒトIgG由来CH1配列およびヒトIgG由来軽鎖定常領域配列の両方を有する適切なファージミドベクターへと導入される。このファージミドベクターをエレクトロポレーションにより大腸菌へと導入することで、ヒト抗体可変領域－定常領域よりなるFabドメインを提示し、アデノシンまたはAMP、ADP、ATPをスイッチとして抗原に結合できる抗体を取得できるようなデザインライブラリが構築される。このように多様なアデノシンまたはAMP、ADP、ATP結合活性を有するH鎖およびL鎖から構成されたデザインライブラリは、図４３に示したようにアデノシンまたはAMP、ADP、ATPが抗体と抗原の間に挟まり、任意の抗原に対するAMP/ADP/ATP/アデノシンスイッチ抗体を効率よく取得できるヒト抗体が含まれるライブラリとして有用であると考えられる。また、上述のようにSMB0002はアデノシンとAMPのみならず、ADP、ATPにも結合することから、ATP、AMP、ADPおよびアデノシンにその構造が類似するcAMPおよびATP-gamma-Sにも結合活性を有すると予想される。そのため、本ライブラリはATP、ADP、AMP、cAMP、アデノシンまたはATP-gamma-Sのうちいずれか一つ以上の低分子の有無によって任意の標的抗原に対する結合活性が変化するスイッチ抗体を取得するのに有用であると考えられる。

[0524] 〔実施例６〕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低分子存在下においてヒトIL-6レセプター（hIL-6R）に結合する抗体の取得

<u>（６－１）ビーズパンニングによるナイーブヒト抗体ライブラリからの低分子存在下においてhIL-6Rに結合する抗体の取得</u>

後述の参考実施例１で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、低分子存在下でヒトIL-6レセプター(hIL-6R)に対する結合活性を示す抗体がスクリーニングされた。すなわち、ビーズにキャプチャー

されたhIL-6Rに対して低分子存在下で結合活性を示す抗体を提示しているファージが集められた。低分子非存在の条件でビーズから溶出されたファージ溶出液からファージが回収された。本取得方法では、抗原としてビオチン標識されたhIL-6Rが用いられた。

[0525] 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産生されたファージは一般的な方法により精製された。その後TBSで透析処理された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%となるようにBSAが添加された。磁気ビーズに固定化された抗原を用いたパンニングが実施された。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。

[0526] 癌組織においてスイッチの役割を果たすことができる低分子に依存的な低分子スイッチ抗体を効率的に取得するために、下記各種低分子 (アデノシン (adenosine) 、アデノシン3リン酸 (adenosine 5'-triphosphate; ATP) 、イノシン (inosine) 、キヌレニン(kynurenine)、プロスタグランジンE2 (prostaglandin E2; PGE2) 、コハク酸 (succinic acid) 、乳酸 (lactic acid)) の混合液 (以下、SC (small molecule cocktail) と表記される) の存在下で抗原に結合し、SC非存在下では抗原に結合しない抗体を濃縮するパンニングが実施された。

[0527] 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とともに、各終濃度が1 mMのアデノシン3リン酸ナトリウム塩 (ATP-Na) 、アデノシン (Adenosine) 、イノシン (Inosine) 、コハク酸 (Succinic acid) 、および乳酸 (Lactic acid) 、終濃度が1μMのプロスタグランジンE2 (PGE2) 、ならびに終濃度が100μMのキヌレニン (Kynurenine) からなりNaOHによってそのpHが7.4に調製されたSCを、当該ファージライブラリ液と室温にて60分間接触させた。次にファージライブラリ液に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SC/TBS (SCを含むTBS) にて1回洗浄された。その

後、1 mg/mLのトリプシン溶液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分離されたビーズから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。

[0528] 1回目のパンニングでは、低分子存在下で結合可能なファージの回収が行われたが、2回目以降のパンニングでは、SC存在下でのみ抗原に対して結合可能な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およびSC、NaOHを加えることによって、ファージライブラリを室温で60分間抗原及び低分子と接触させた。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SC/TBSTとSC/TBSにて洗浄された。その後0.5 mLの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分離されたビーズからファージ溶液が回収された。この作業が再度繰り返された後、2回に分けて溶出されたファージ液が混合された。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が失われた。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。SC存在下で抗原に対する結合活性を有する抗体を取得するパンニングが3回繰り返された。

[0529] （６－２）ファージELISAによる低分子存在下における結合活性の評価

（６－１）で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）に倣い、ファージ含有培養上清が回収された。参考実施例（１－３）に記載された方法で精製された精製ファージが以下の手順で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hIL-6Rを含む100μLのTBSにて一晩コートされた。当該プレートの各ウェルをTBSTにて洗浄することによってプレートへ結合していないビオチン標識hIL-6Rが除かれた後、当該ウェルが250μLの2%スキムミルク-TBSにて1時間以上ブロッキングされた。2%スキムミルク-TBSを除き、その後、各ウェルに調製された精製ファージが加えられた当該プレートを室温で1時間静置することによって、ファージを提示する抗体を各ウェルに存在するビオチン標識hIL-6RにSC非存在/存在下において結合させた。TBSTもしくはSC/TBSTにて洗浄された各ウェルに、TBSもしくはSC/TBSによって希釈されたHRP結合抗M13抗体（Amersham Pharmacia Biotech）が添加されたプレートを１時間インキュベートさせた。TBSTもしくはSC/TBSTにて洗浄後、TMB single溶液（ZYMED）が添加された各ウェル中の溶液の発色反応が硫酸の添加により停止された後、450 nmの吸光度によって当該発色が測定された。

[0530] 単離された960クローンを用いてファージELISA を行うことによって、低分子混合物存在下で抗原であるhIL-6Rに対して結合活性を有するクローン6RNMSC1-2_F02および6RNMSC1-3_G02が得られた。

[0531] （６－３）hIL-6Rに結合する抗体の発現と精製

（６－２）で記載されたファージELISAで示された、SC存在下でビオチン標識hIL-6Rに対する結合活性を有すると判断されたクローン6RNMSC1-2_F02および6RNMSC1-3_G02から特異的なプライマー（配列番号：７８及び８０）を用いて増幅された遺伝子の塩基配列が解析された（6RNMSC1-2_F02：重鎖の配列は配列番号：３２および軽鎖の配列は配列番号：３３、6RNMSC1-3_G02：重鎖の配列は配列番号：３４および軽鎖の配列は配列番号：３５で表される）。6RNMSC1-2_F02、6RNMSC1-3_G02および陰性対照である抗ヒトグリピカン3抗体GC4

13（重鎖は配列番号：３６、軽鎖は配列番号：３７）の可変領域をコードする遺伝子はヒトIgG1/Kappaの動物発現用プラスミドへ挿入された。発現した抗体は後述の参考実施例１に記載の方法で精製された。

[0532] （６－４）取得された抗体のhIL-6Rに対する結合に必要な低分子の同定

取得された6RNMSC1-2_F02および6RNMSC1-3_G02とGC413の3種類の抗体が表１２に示す9条件下でELISAに供された。また表１３に示すBufferにて各低分子が表１２に示される濃度で適宜調製された。抗原としてビオチン標識されたhIL-6Rが用いられた。

[0533] [表12]

条件	低分子（small molecule）	濃度
1	ATP-Na	1mM
2	Adenosine	1mM
3	Inosine	1mM
4	PGE2	1μM
5	Succinic acid	1mM
6	Lactic acid	1mM
7	Kynurenine	100μM
8	ATP 1mM, Adenosine 1mM, Inosine 1mM, PGE2 1μM, Succinic acid 1mM, Lactic acid 1mM, Kynurenine 100μM	
9	-	-

[0534] [表13]

Wash buffer	10 mM ACES, 150 mM NaCl,0.05% Tween20, pH7.4
Blocking Buffer	10 mM ACES, 150 mM NaCl, 2%SkimMilk, pH7.4
Sample Buffer	10 mM ACES, 150 mM NaCl, 低分子 (Small molecule), pH7.4

[0535] はじめに、StreptaWell 96マイクロタイタープレート（Roche）がビオチン標識hIL-6Rを含む100μLのPBSにて室温で1時間以上コートされた。当該プレートの各ウェルをTBSTにて洗浄することによってプレートへ結合していないビオチン標識hIL-6Rが除かれた後、当該ウェルがBlocking Buffer（2% skim

milk/TBS）250μLにて1時間以上ブロッキングされた。Blocking Bufferが除かれた各ウェルに、表１２の終濃度で低分子を含むSample Bufferにて2.5μg/mLに調製された精製IgGの各100μLが加えられた当該プレートを室温で1時間静置することによって、各IgGを各ウェルに存在するビオチン標識hIL-6Rに結合させた。表１２の終濃度で低分子を含むWash Bufferにて洗浄された後に、同低分子入りSample Bufferによって希釈されたHRP結合抗ヒトIgG抗体（BIOSOURCE）が各ウェルに添加されたプレートが1時間インキュベートされた。各低分子を含むWash Bufferにて洗浄後、TMB single溶液（ZYMED）が添加された各ウェル中の溶液の発色反応が、硫酸の添加により停止された後、450 nmの吸光度によって当該発色が測定された。なおBufferrとしては表１３記載の組成を含むBufferが使用された。

[0536] 測定された結果を図１６と図１７に示した。6RNMSC1-2_F02および6RNMSC1-3_G02が用いられた場合、条件8（全ての低分子カクテル溶液）における吸光度と比較して、条件9（低分子なし）における吸光度は、顕著に低いという結果が得られた。この結果から、6RNMSC1-2_F02および6RNMSC1-3_G02は低分子の有無によって抗原との結合が変化する性質を有することが確認された。また6RNMSC1-2_F02が用いられた場合、条件7（キヌレニン 100uM）において、条件8と同等の吸光度を示し、その他の条件下では吸光度が顕著に低い結果であったことから、6RNMSC1-2_F02はキヌレニン存在下で抗原であるhIL-6Rと結合する抗体であることが示された（図１６）。また6RNMSC1-3_G02が用いられた場合、条件1（ATP-Na 1mM）において、条件8と同等の吸光度を示し、その他の条件下では吸光度が顕著に低い結果であったことから、6RNMSC1-3_G02はATP存在下で抗原であるhIL-6Rと結合する抗体であることが示された（図１７）。このような方法を用いることで、異なる低分子の存在下で抗原への結合能が変化する抗体を一度に複数取得することが可能であることが示された。

[0537] 〔実施例７〕6RNMSC1-2_F02抗体のキャラクタライゼーション

（７－１）ELISAによるキヌレニン以外のアミノ酸およびアミノ酸代謝物存在下におけるhIL-6Rに対する結合活性の評価

実施例６で取得された低分子存在下でhIL-6Rに結合する抗体6RNMSC1-2_F02はキヌレニン存在下でhIL-6Rに結合する抗体である。一連のトリプトファン代謝物等のアミノ酸代謝物が、本発明で使用される癌組織特異的化合物、とくに癌細胞特異的代謝産物の非限定な一態様として好適か否か検証された。

[0538] 実施例６で示された、キヌレニン存在下で抗原に対する結合活性を有する抗体6RNMSC1-2_F02および陰性対照としてGC413は表１４に示す7条件下でELISAに供された。また表１３に示すBufferにて各アミノ酸およびその代謝物が表１４に示される濃度で適宜調製された。抗原としてビオチン標識されたhIL-6Rが用いられた。

[0539] [表14]

条件	低分子（Small Molecule）	濃度
1	キヌレニン（Kynurenine）	1mM
2	トリプトファン（Tryptophan）	1mM
3	フェニルアラニン（Phenylalanine）	1mM
4	アントラニル酸（Anthranilic acid）	1mM
5	3-ヒドロキシキヌレニン（3-Hydroxykynurenine）	1mM
6	キヌレン酸（Kynurenic acid）	1mM
7	-	-

[0540] はじめに、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にて室温で1時間以上コートされた。当該プレートの各ウェルをTBSTにて洗浄することによってプレートへ結合していない抗原が除かれた後、当該ウェルがBlocking Buffer（2% skim milk/TBS）250μLにて1時間以上ブロッキングされた。Blocking Bufferが除かれた各ウェルに、表１４の終濃度で低分子を含むSample Bufferにて2.5μg/mLに調製された精製IgGの各100μLが加えられた当該プレートを室温で1時間静置することによって、各IgGを各ウェルに存在する抗原に結合させた。表１４の終濃度でア

ミノ酸およびアミノ酸代謝物を含むWash Bufferにて洗浄された後に、アミノ酸およびアミノ酸代謝物を含むSample Bufferによって希釈されたHRP結合抗ヒトIgG抗体（BIOSOURCE）が各ウェルに添加されたプレートが1時間インキュベートされた。各アミノ酸およびアミノ酸代謝物を含むWash Bufferにて洗浄後、TMB single溶液（ZYMED）が添加された各ウェル中の溶液の発色反応が、硫酸の添加により停止された後、450 nmの吸光度によって当該発色が測定された。なおBufferrとしては表１３に記載された組成を含むBufferが使用された。

[0541] 測定された結果を図１８に示した。6RNMSC1-2_F02が用いられた場合、条件1（キヌレニン溶液）における吸光度と比較して、条件7（低分子なし）における吸光度は、顕著に低かった。また同様に、条件5（3-ヒドロキシキヌレニン溶液）における吸光度も条件1と同様の高い吸光度を示したことから、6RNMSC1-2_F02はキヌレニンだけでなく、キヌレニンの代謝物存在下でも抗原であるhIL-6Rに結合する抗体であることが示された。また、その他の条件では顕著に低い吸光度であったことから、6RNMSC1-2_F02はキヌレニンの前駆体であるトリプトファンが存在していても、抗原であるhIL-6Rに結合しない抗体であることが示された。癌微小環境においてはトリプトファンを代謝してキヌレニンを産生する酵素であるIDOの発現が上昇していることから、トリプトファン存在下では抗原に結合せず、キヌレニンおよびその代謝物存在下で抗原に結合する抗体であることが、癌微小環境下においてのみ抗原に結合する抗体として重要であると考えられた。また、このことから、同様の方法を用いることで、一種類のアミノ酸代謝物のみならず、構造の異なる複数の種類のアミノ酸代謝物存在下において目的の抗原に結合する抗体を取得することが可能であると考えられた。

[0542] このように癌特異的な酵素（本実施例ではIDOおよびその下流の代謝酵素）によって代謝されて癌局所で産生される分子をスイッチとする抗体は、癌局所でのみ選択的に標的抗原に結合することができると考えられる。本実施例においては、内因性の分子であるトリプトファンの癌特異的な代謝酵素によ

る代謝産物をスイッチとして用いているが、外から経口あるいは静脈内投与等によって投与される人工的な分子（非天然分子）あるいは内因性の分子の癌特異的な代謝酵素による代謝産物をスイッチとして用いることも可能であると考えられる。例えば実施例1に記載したように、capecitabine（xeloda）を投与すると、癌特異的な代謝酵素等によって5-FUに代謝されるため、癌局所における5-FUの濃度が高くなる（Desmoulin F. et al. Drug Metab Dispos. 2002）ため、5-FUをスイッチとする抗体によって、癌局所でのみ選択的に標的抗原に結合することが可能となると考えられる。また、代謝酵素以外でも、癌に特異的な低酸素環境や酸性環境下によって生成される分子をスイッチとして用いることも可能であると考えられる。例えば、TH-302（Duan JX, et al. J Med Chem. 2008）は低酸素条件下においてBr-IPMに代謝されるため、Br-IPMをスイッチとする抗体によって、癌局所でのみ選択的に標的抗原に結合することが可能となると考えられる。

[0543] （７－２）表面プラズモン共鳴によるヒトIL6レセプターに対する結合のキヌレニンの影響の評価

Biacore T200（GE Healthcare）を用いて、6RNMSC1-2_F02とヒトIL-6レセプター（hIL-6R）との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（Invitrogen）が適当量固定化されたSensor chip CM5（GE Healthcare）に目的の抗体をキャプチャーさせ、抗原であるhIL-6Rを相互作用させた。ランニングバッファーには20 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05%（w/v）Tween20、pH7.4が用いられた。抗原であるhIL-6Rとの相互作用は25 ℃で測定され、hIL-6Rの希釈にはランニングバッファー、ランニングバッファーに100 μmol/L キヌレニンを加えたバッファー、また比較対照のためにランニングバッファーに10 mmol/L ATPを加えたバッファーが使用された。

[0544] hIL-6R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1分間インジェクトして、センサーチップ上にキャプチャーさせた6RNMSC1-2_F02にhIL-6Rを相互作用させた。その後、流速10μL/minで1 分間ランニングバ

ッファーを流し、hIL-6Rの抗体からの解離が観察された後、10 mmol/L Glycine-HCl、pH1.5を流速30μL/minで30 秒間インジェクトし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算出された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）をもとに、6RNMSC1-2_F02のhIL-6Rに対する解離定数K_D（M）が算出された。各パラメーターの算出には Biacore T200 Evaluation Software（GE Healthcare）が用いられた。

[0545] この測定で取得された100μmol/L キヌレニン存在下、10 mmol/L ATP存在下、または非存在下における6RNMSC1-2_F02と1μmol/LのhIL-6Rとの相互作用のセンサーグラムを図１９に示した。図１９に示されたように、6RNMSC1-2_F02は100μmol/Lのキヌレニン存在下ではhIL-6Rに結合するが、キヌレニン非存在下ではhIL-6Rに対する結合が観察されなかった。このことから、6RNMSC1-2_F02はキヌレニンをスイッチとしてhIL-6Rに結合する性質を有することが確認された。また、100μmol/L キヌレニン存在下での6RNMSC1-2_F02の解離定数K_Dは1.5μmol/Lであった。

[0546] （７－３）抗体のhIL-6Rからの解離に対するキヌレニンスイッチの効果

Biacore T200（GE Healthcare）を用いて、キヌレニン存在下でhIL-6Rに対して結合した6RNMSC1-2_F02が、キヌレニン存在下でキヌレニン濃度依存的に解離するかが評価された。ランニングバッファーとして20 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05%（w/v）Tween20、pH7.4および20 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05%（w/v）Tween20、pH7.4、100 μmol/L キヌレニンが用いられ、25 ℃で測定された。アミンカップリングによりhIL-6Rが固定化されたセンサーチップCM5に100 μmol/Lのキヌレニンを含む20 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05%（w/v）Tween20、pH7.4で希釈された5μg/mLの6RNMSC1-2_F02をアナライトとして180 秒間相互作用させた後、各ランニングバッファー条件下におけるhIL-6Rの解離の様子が観察された。各ランニングバッファー条件下での解離の程度を比較するために、100μmol/L キヌレニン存在下でのhIL-6Rに対する6RNMSC1-2_F02の結合量を100として標準化（normalize）された

値が比較された。この標準化された後の6RNMSC1-2_F02とhIL-6Rとの相互作用の様子を示したセンサーグラムを図２０に示した。図２０の結果から、6RNMSC1-2_F02はキヌレニン存在下でhIL-6Rと結合した後、キヌレニンが存在しなくなると、hIL-6Rを速やかに解離する性質を有することが明らかとなった。すなわち、抗体のhIL-6Rに対する結合に及ぼすキヌレニンによる制御は可逆的であることが確認された。

[0547] （７－４）hIL-6R結合に対するキヌレニン濃度の及ぼす影響の評価

次に、Biacore T200 (GE Healthcare) を用いて、6RNMSC1-2_F02とhIL-6Rとの抗原抗体反応におけるキヌレニン濃度の影響が評価された。ランニングバッファーとして20 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05% (w/v) Tween20、pH7.4が用いられ、6RNMSC1-2_F02とヒトIL-6Rとの抗原抗体反応が25 ℃で測定された。センサーチップCM5上にアミンカップリングによりhIL-6Rを固定化し、種々の濃度に調製されたキヌレニンを含む20 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05% (w/v) Tween20、pH7.4で希釈された1μg/mLの6RNMSC1-2_F02をアナライトとして180 秒間相互作用させ、その結合量の変化が観察された。その結果を図２１に示した。この結果から、スイッチとなるキヌレニン濃度が高いほど、6RNMSC1-2_F02はhIL-6Rに対してより多く結合することが明らかとなった。

[0548] また、この評価系ではhIL-6Rがセンサーチップ上に固定化されているため、6RNMSC1-2_F02が二価で結合すると考えられる。このような6RNMSC1-2_F02がhIL-6Rを二価で認識するような評価系においても、キヌレニン濃度が高いほど6RNMSC1-2_F02のhIL-6Rの結合量が増加することが観察された。この結果から、二価での結合においても6RNMSC1-2_F02がIL-6Rに対してキヌレニンをスイッチとして結合する性質を有することが明らかとなった。

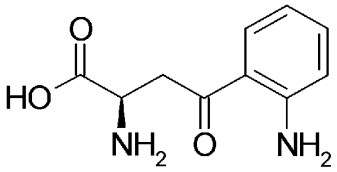
[0549] これらの結果から、6RNMSC1-2_F02は、キヌレニンをスイッチとして、キヌレニン存在下でhIL-6Rに結合し、キヌレニン非存在下ではhIL-6Rから解離する抗体であることが明らかとなった。また、6RNMSC1-2_F02はキヌレニン非存在下ではhIL-6Rに結合活性を示さない完全なON/OFF制御が可能であることが

確認され、スイッチ機能を果たしていることが確認された。

[0550] （７－５）6RNMSC1-2 F02のキヌレニンの誘導体に対する結合能評価

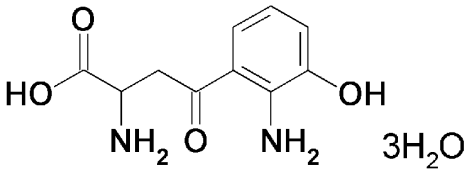
Biacore T200（GE Healthcare）を用いて、ライブラリから取得されたキヌレニン依存性抗体6RNMSC1-2_F02とキヌレニンおよびその誘導体との結合が評価された。誘導体として以下の７分子が評価された。キヌレニンの異性体D-キヌレニン、誘導体である３－ヒドロキシ-DL-キヌレニン、4-(4-METHYLPHENYL)-4-OXOBUTYRIC ACID、RO0447436-000-001、RO0635389-000-001、RO0438566-001-001、RO0635390-000-001である。それぞれの化合物の化学構造は以下に示す。

[0551] [化19]



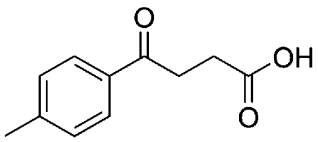
D-キヌレニン

[0552] [化20]



3－ヒドロキシ-DL-キヌレニン

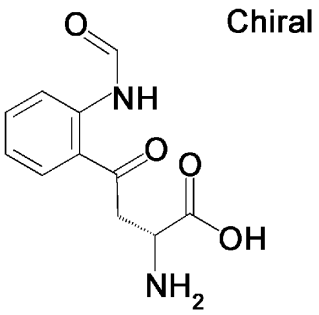
[0553] [化21]



4-(4-METHYLPHENYL)-4-OXOBUTYRIC ACID

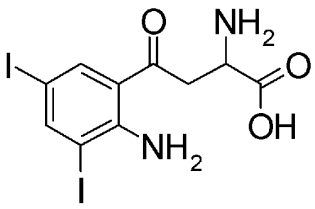
[0554]

[化22]



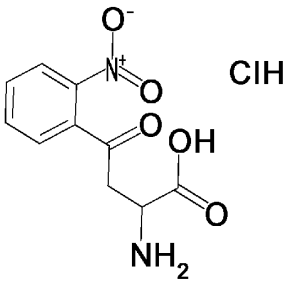
RO0447436-000-001

[0555] [化23]



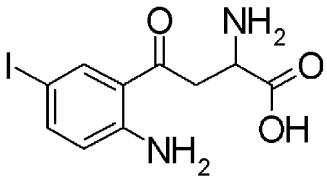
RO0635389-000-001

[0556] [化24]



RO0438566-001-001

[0557] [化25]



RO0635390-000-001

[0558] Sensor chip CM4 (GE Healthcare) 上にアミンカップリング法で適切な量

固定化されたprotein A（Invitrogen）に、目的の抗体をキャプチャーさせ、抗原であるキヌレニン及び誘導体を相互作用させた。ランニングバッファーには50 mmol/L TrisHCl、150 mmol/L NaCl、0.02%（w/v）Tween20、5% DMSO、pH7.6が用いられた。測定は全て15℃で実施され、抗原の希釈にはランニングバッファーが使用された。

[0559] 6RNMSC1-2_F02については、抗原希釈液とブランクであるランニングバッファーを流速30 μL/minで60秒間添加し、センサーチップ上にキャプチャーさせた抗体に各抗原を相互作用させた。その後、流速30 μL/minで60秒間ランニングバッファーを流し、抗原の抗体からの解離が観察された。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。これらの定数をもとに解離定数KD（M）が算出された。各パラメーターの算出には Biacore T200 Evaluation Software（GE Healthcare）が用いられた。

[0560] 評価の結果、キヌレニンと6RNMSC1-2_F02相互作用のカイネティクスパラメーターは、ka=709（1/s），kd=0.17（1/s），KD=0.239（mmol/L）と決定された。また、評価の結果得られたセンサーグラムを図２２に示した。また誘導体との結合結果を表わすセンサーグラムは図２３：3－ヒドロキシ-DL-キヌレニン、図２４：RO0635389-000-001、図２５：RO0635390-000-001に示した。センサーグラムの表示にはScrubber2（Biologic software）およびMicrosoft Office Excel 2007 が用いられた。この結果から6RNMSC1-2_F02はキヌレニンのみならず、３－ヒドロキシ-DL-キヌレニン、およびRO0635389-000-001、RO0635390-000-001といった一部のキヌレニン誘導体に対して結合可能であることが明らかとなった。

[0561] （７－６）6RNMSC1-2 F02の非天然低分子に対する応答性評価

Octet（PRIMETECH）を用いて、ライブラリから取得されたキヌレニンスイッチ抗体6RNMSC1-2_F02とhIL-6Rとの抗原抗体反応における各種低分子の影響が評価された。低分子としてキヌレニンおよび誘導体で、実施例（７－５）に示された全８分子が評価された。測定バッファーとして、TBS、pH7.4が用

いられ、30 ℃で測定された。ストレプトアビジンセンサーチップ上に、ビオチン化hIL-6Rを固定化し、抗体を相互作用させ、その結合量の変化が観察された。抗体の希釈は、測定バッファー及び測定バッファーに各低分子のいずれかがそれぞれ添加されたバッファーが使用され、各低分子の終濃度が100uM、抗体の終濃度が10μg/mLになるように調製された。

[0562] この測定で取得された100uM の各低分子存在下、または非存在下における6RNMSC1-2_F02のhIL-6Rに対する結合性を図２６：キヌレニン、図２７：3－ヒドロキシ-DL-キヌレニン、図２８：RO0635389-000-001、図２９：RO0635390-000-001に示した。に示した。図２６に示されたように、6RNMSC1-2_F02は100uMキヌレニン存在下でhIL-6Rに結合し、キヌレニン非存在下ではhIL-6Rに対する結合が観察されなかった。このことから、キヌレニンをスイッチとしてhIL-6Rに結合する性質を有することがOctetでも確認された。また図２７－２９で示されたようにキヌレニン以外の低分子である、３－ヒドロキシ-DL-キヌレニンおよびRO0635389-000-001、RO0635390-000-001といった、6RNMSC1-2_F02へ結合可能なキヌレニン誘導体に対しても、低分子存在下での結合が観察され、これら低分子非存在下ではhIL-6Rへの結合は観察されなかった。以上のことからキヌレニンとその誘導体（非天然化合物）がスイッチとして機能する、hIL-6R抗体がライブラリから取得可能であることが示された。

実施例７－３においては、内因性の分子をスイッチとして用いていることが示されたが、本実施例により、人工的な分子（非天然分子）をスイッチとして用いることが可能であることも示された。すなわち、外から経口あるいは静脈内投与等によって投与される人工的な分子（非天然分子）が癌特異的な代謝酵素によって産生する非天然の代謝産物をスイッチとして用いた抗体も作製可能であることが示された。

[0563] 〔実施例８〕キヌレニンスイッチ抗hIL-6R抗体を利用した網羅的改変によるキヌレニンスイッチ抗体取得用のライブラリの設計

癌組織においては、キヌレニンの濃度が高いことが知られている。参考実施例２において構築した、ATPに結合する抗体を鋳型としたラショナルデザイ

ンライブラリより、ATP存在下でのみ抗原に結合能を示す抗体が多数取得されたことより、同様にキヌレニンに結合能を示す抗体を鋳型としたライブラリを構築することによって、キヌレニン存在下でのみ抗原に結合能を示す抗体が取得可能となると考えられた。

[0564] （８－１）キヌレニンをスイッチとするhIL-6R結合抗体6RNMSC1-2 F02のX線結晶構造解析

実施例７においてライブラリより取得されたキヌレニンをスイッチとするhIL-6R結合抗体6RNMSC1-2_F02とキヌレニンの複合体の立体構造がX線結晶構造解析により解明された。

[0565] （８－１－１）結晶化用6RNMSC1-2 F02全長抗体の調製

結晶化用6RNMSC1-2_F02全長抗体の調製及び精製は当業者公知の方法により行われた。

[0566] （８－１－２）全長抗体からの6RNMSC1-2 F02 Fabフラグメントの調製

得られた6RNMSC1-2_F02抗体を分子量分画サイズ10000MWCOの限外ろ過膜 により濃縮後、100mM Tris緩衝液 pH 8.0にて2mg/mlに希釈したサンプルを調製、これに、全長抗体に対し質量比で四百分の1量のEndoproteinase Lys-C Sequencing Grade (Roche Applied Science) を加え、35℃に45分間静置した。その後、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20mlの25mM 酢酸ナトリウム 緩衝液 pH5.0を加えることで反応を停止した。次にこのサンプルを25mM 酢酸ナトリウム 緩衝液 pH5.0で平衡化した1mlサイズの陽イオン交換カラムHiTrap SP HP (GE Healthcare) の下流に1mlサイズのProteinA担体カラムHiTrap MabSelect Sure (GE Healthcare) をタンデムにつないだカラムに添加し、同緩衝液中NaCl濃度を直線的に上げて溶出を行うことで6RNMSC1-2_F02抗体のFabフラグメントの精製画分を得た。これを25mM HEPES緩衝液pH 7.5、100mM NaClで平衡化したゲルろ過カラムSuperdex 200 16/60 prep grade (GE Healthcare) に添加、同緩衝液によりカラムから溶出し、結晶化用6RNMSC1-2_F02のFabフラグメントを得た。なお、すべてのカラム操作は低温下にて実施した。

[0567] （８－１－３）6RNMSC1-2 F02 Fabフラグメントとキヌレニン複合体の結晶の作成

上記の方法で精製した結晶化用6RNMSC1-2_F02のFabフラグメントのサンプルを5000MWCOの限外ろ過膜 により、A280=24.1まで濃縮した。その後、100% DMSOに溶かした50mM キヌレニンを終濃度2 mMになるように添加し、シッティングドロップ蒸気拡散法により結晶化をおこなった。結晶化にはHydra II Plus One (MATRIX)を用い、0.2 M Lithium sulfate monohydrate、30.0 %w/v PEG 3350、0.1 M Tris pH 8.5のリザーバー溶液に対し、リザーバー溶液：結晶化サンプル＝0.2μｌ：0.2μｌで混合して結晶化ドロップを作成、20℃に静置したところ、細い柱状の結晶を得ることに成功した。さらに得られた結晶の1つを0.18M Lithium sulfate monohydrate、27.3% PEG3350、0.09M HEPES pH7.5、18.2% Ethylene Glycol、4.5mM キヌレニン、9% DMSOの溶液に室温で30分間浸し、6RNMSC1-2_F02 Fabフラグメントとキヌレニン複合体の結晶を得た。

[0568] （８－１－４）6RNMSC1-2 F02 Fabフラグメントとキヌレニン複合体の結晶からのＸ線回折データの測定

上記の方法で得られた6RNMSC1-2_F02 Fabフラグメントとキヌレニン複合体の結晶の単結晶一つを微小なナイロンループ付きのピンで溶液ごとすくいとり、液体窒素中で凍結させ、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BL-5AにてX線回折データの測定をおこなった。なお、測定中は常に-178℃の窒素気流中に置くことで凍結状態を維持し、ビームライン備え付けのCCDディテクタQuantum 315r (ADSC)により、結晶を0.5°ずつ回転させながらトータル360枚のX線回折画像を収集した。得られた回折画像からの格子定数の決定、回折斑点の指数付け、ならびに回折データの処理には、プログラムXia2 (J. Appl. Cryst. (2010) 43, 186-190)、XDS Package (Acta Cryst. (2010) D66, 125-132) およびScala (Acta Cryst. (2006) D62, 72-82) を用い、最終的に分解能2.33Åまでの回折強度データを得ることに成功した。本結晶は、空間群P1に属し、格子定数ａ＝55.830Å、ｂ＝56.040

Å、ｃ＝80.340Å、α＝87.81°、β＝82.88°、γ＝65.54°であった。

[0569] （８－１－５）6RNMSC1-2 F02 Fabフラグメントとキヌレニン複合体のX線結晶構造解析

6RNMSC1-2_F02 Fabフラグメントとキヌレニン複合体の構造決定のため、プログラムPhaser（J. Appl. Cryst.（2007）40, 658-674）を用いて分子置換法を実施した。得られた結晶格子の大きさと6RNMSC1-2_F02 Fabフラグメントの分子量から非対称単位中の複合体の数は2個と予想された。Discovery Studio3.5(Accelrys)を用いて、当該抗体のホモロジーモデルを作成し、このFabのモデルを可変領域と定常領域部分に分け、それぞれの構造座標を探索用モデルとして用いて、当該結晶の格子内での向きと位置を回転関数および並進関数から決定した。さらに得られた初期構造モデルに対し、可変領域と定常領域を独立に動かす剛体精密化をおこなったところ、25-3.0Åの回折強度データに対する結晶学的信頼度因子Ｒ値は40.57%、Free R値は38.91%となった。さらにプログラムREFMAC5（Acta Cryst.（2011）D67, 355-367）を用いた構造精密化と、実験的に決定された構造因子Foとモデルから計算された構造因子Fcならびにモデルから計算された位相をもとに算出された2Fo-Fc、Fo-Fcを係数とする電子密度マップをみながらの当該構造モデルの修正をプログラムCoot（Acta Cryst.（2010）D66, 486-501）を用いて実施、これらの作業を繰り返すことで構造モデルの精密化をおこなった。最終的には、分解能25-2.33Åの34135個の回折強度データを用いて、7019個の非水素原子を含む構造モデルの結晶学的信頼度因子Ｒ値は20.4%、Free R値は26.56%となった。

[0570] （８－１－６）6RNMSC1-2 F02とキヌレニンの相互作用部位の同定

最終的に、実施例７においてライブラリより取得されたキヌレニンをスイッチとするhIL-6R結合抗体6RNMSC1-2-F02の Fabフラグメントとキヌレニンの複合体の結晶構造は分解能2.33Åで決定された。

本結晶の非対称単位中には、当該抗体のFab フラグメントが2分子存在しており、その一方にのみ、キヌレニンの結合が認められた。キヌレニンは、主に当該抗体のH鎖CDR3により認識されるが、その際、通常の抗原との結合に使わ

れる部分から少しずれた位置で当該抗体と結合することがわかった。

図３０に示すようにキヌレニン分子は、当該抗体のH鎖P97、R100c、D101、L鎖H49、F55の各側鎖ならびに、H鎖R94、D95、R100c、G100d、A100eの各主鎖により認識されている。また、キヌレニンのアミノ酸骨格中のアミノ基は中性では正電荷をもち、H鎖D95、R94、A100eの各主鎖のカルボニル酸素ならびにD101側鎖のカルボキシ基との間に、複数の水素結合ならびに静電相互作用が認められる。さらに、負電荷をもつキヌレニンのカルボキシ基はH鎖G100d、R100cの各主鎖のアミドNH基と複数の水素結合を形成している。これらの強固な水素結合並びに、静電相互作用のネットワークは、当該抗体によるキヌレニンの認識に重要な役割を果たしていると考えられる。さらにH鎖R100cの側鎖は、キヌレニンのベンゼン環部分とカチオン-π相互作用を形成、加えてキヌレニンのベンゼン環部分は、L鎖H49やF55ならびに、H鎖D101によりとり囲まれており、これら残基とファンデルワールス相互作用を形成することで、キヌレニンとの結合認識に寄与している。また、L鎖H49の側鎖は、キヌレニンの芳香環上のNH2基との間に弱いながらも水素結合が形成していることが確認された。

以上の結果から、当該抗体によるキヌレニンの認識様式が明らかになるとともに、キヌレニンとの結合に大きく関与する抗体可変領域のアミノ酸残基が同定された。キヌレニンとの結合にその側鎖が大きく関与しているアミノ酸残基として、H鎖： P97、 R100c、 D101（Kabatナンバリング）、L鎖：H49、 F55（Kabatナンバリング）が挙げられる。また、主鎖部分でキヌレニンとの結合に大きく関与する残基としてH鎖R94、D95、R100c、G100d、A100eが挙げられる。さらに、P97やP100b、 G100dといった残基は、その構造的な特徴からH鎖CDR3の構造をキヌレニンとの結合に必要なコンフォメーションに維持することで間接的にキヌレニンとの結合に大きく寄与している可能性が考えられる。

[0571] （８－２）6RNMSC1-2 F02の改変体における、キヌレニンに対する結合能評価

（８－２－１）6RNMSC1-2 F02の重鎖改変体におけるキヌレニンに対する結合

能評価

上述のように、結晶構造解析より、キヌレニンとの結合に重要な働きをしている可能性がある残基として重鎖のP97、P100b、 R100c、 G100d、 D101等が見出された。そこで、これらのうちいくつかの残基について実際に改変体を作成し、キヌレニンとの結合能を評価した。作製した改変体は以下の通りである。P97A、 P97G、 P100bG、 R100cA、 G100dA、 G100dV、 D101A（表１５）。

[0572] [表15]

クローン名	重鎖配列番号	軽鎖配列番号
6RNMSC1-2_F02 P97A	配列番号:38	配列番号:33
6RNMSC1-2_F02 P97G	配列番号:39	配列番号:33
6RNMSC1-2_F02 P100bG	配列番号:40	配列番号:33
6RNMSC1-2_F02 R100cA	配列番号:41	配列番号:33
6RNMSC1-2_F02 G100dA	配列番号:42	配列番号:33
6RNMSC1-2_F02 G100dV	配列番号:43	配列番号:33
6RNMSC1-2_F02 D101A	配列番号:44	配列番号:33

[0573] 後述の参考実施例１に示された方法で発現、精製された6RNMSC1-2_F02の各種改変体は実施例（７－５）で示されたBiacoreと同様の方法で、キヌレニンへの結合が評価された。この結果、6RNMSC1-2_F02はキヌレニンへの結合が再度確認されたが、その他全ての改変体はキヌレニンへの結合能が減弱もしくは大幅に減弱した。すなわち結晶構造から導かれた、キヌレニンとの結合に重要な残基は、たしかに結合に関与していることが明らかとなり、結晶構造解析結果を裏付ける結果となった。

（８－２－２）6RNMSC1-2 F02のH49Y改変体における、キヌレニンに対する結合能評価

[0574] 結晶構造解析より、キヌレニンと重要な相互作用をしている軽鎖のアミノ酸残基はH49（Kabatナンバリング）のみであると思われた。また配列解析の結果から、6RNMSC1-2_F02のフレームワークはVLkappa-2生殖細胞系列由来であると推察された。Kabatナンバリング49番目のアミノ酸はVLkappa-2生殖細胞系列では、そのほとんどがTyrであり非常に保存性が高い。そこで、His49をTyrに置換した改変体を作成し、キヌレニンとの相互作用に対するHisの寄

与度を検証した。

[0575] 後述の参考実施例１で示された方法で発現、精製された6RNMSC1-2_F02のHis49Tyr改変体（重鎖配列番号：３２、軽鎖配列番号：４５）は実施例（７－５）で示されたBiacoreと同様の方法で、キヌレニンへの結合が評価された。この結果、H49Yはキヌレニンへの結合を維持していることが明らかとなった。また、カイネティクスパラメーターは、ka=2543 (1/s), kd=0.24 (1/s), KD=0.095 (mmol/L) と決定された。評価結果を示すセンサーグラムは図３１に示した。

[0576] （８－２－３）6RNMSC1-2 F02の生殖細胞系フレームワーク配列への改変

配列解析の結果から、6RNMSC1-2_F02のVHフレームワークはVH1-69生殖細胞系列由来であると推察された。また、6RNMSC1-2_F02のVLフレームワークはVκ2-28生殖細胞系列由来であると推察された。そこで、抗体の安定性の向上を目的として、6RNMSC1-2_F02のフレームワーク配列を生殖細胞系フレームワーク配列に戻すためにVH_Met108Leu, VL_Thr07Ser、VL_Ser11Leu、VL_Leu15Pro、VL_Gln17Glu、VL_Leu36Tyr、VL_Gln37Leu、VL_Arg39Lys、VL_Pro43Ser、VL_Arg45Gln、VL_His49Tyr、VL_Ala67Ser、VL_Asn70Asp（数字はKabatナンバリングを表す）の改変が6RNMSC1-2_F02のフレームワーク配列に導入され、F02h011/F02l003（重鎖可変領域配列：配列番号：９５、軽鎖可変領域配列：配列番号：９６）と命名された。参考実施例１－１で示された方法で発現および精製されたF02h011/F02l003のTmがDSCによって測定された。DSCによる測定は当業者公知の方法で実施された。これらの改変が加えられた6RNMSC1-2_F02の改変体のTmは82.9℃から85.2℃と向上し、その構造の安定化が認められた。また、F02h011/F02l003とキヌレニンの結合が、実施例（７－５）で示されたBiacoreを用いた方法のうち、抗原希釈液およびブランクであるランニングバッファーの添加時間が30秒間に変更された条件で測定され、キヌレニンへの結合を維持していることが確認された。キヌレニン結合のカイネティクスパラメーターは、ka=3664 (1/s), kd=0.40 (1/s), KD=0.11 (mmol/L) と決定され、評価結果を示すセンサーグラムは図３２に示された。抗体ライブラリ

として安定性が高いフレームワークを用いることも好ましい場合があることから、F02h011/F02l003が、後述の実施例（８－２－３）および実施例（９－２）のフレームワーク配列として用いられた。フレームワーク配列は表１６に示した。

[0577] [表16]

フレームワーク	配列番号	配列
重鎖フレームワーク1	87	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS
重鎖フレームワーク2	88	WVRQAPGQGLEWMG
重鎖フレームワーク3	89	RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
重鎖フレームワーク4	90	WGQGTLVTVSS
軽鎖フレームワーク1	91	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC
軽鎖フレームワーク2	92	WYLQKPGQSPQLLIY
軽鎖フレームワーク3	93	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
軽鎖フレームワーク4	94	WYLQKPGQSPQLLIY

[0578] （８－２－４）F02h011/F02l003のキヌレニンへの結合増強改変の探索

実施例（８－１）、（８－２－１）の結果から、6RNMSC1-2_F02のキヌレニンへの結合に関与していると推察される残基が予測された。さらに、これらの残基に加え、改変によりキヌレニンへの結合増強を見込める可能性のある残基の探索を行った。

[0579] 具体的には、当該抗体のFabフラグメントとキヌレニンの複合体の結晶構造から、図３４に示すようにキヌレニンから4.2Å以内に存在するアミノ酸残基を選別した。その結果、重鎖Tyr32、Arg100a、（kabatナンバリング）、軽鎖Leu46（kabatナンバリング）が新たに見出された。また、重鎖CDR3はキヌレニンの結合に最も大きく寄与するCDRループであり、このループ上の残基への改変により、間接的にキヌレニンへの結合に影響を与える可能性も考えられることから、なるべく多くの残基位置でアミノ酸残基の改変を行うこととした。しかしながら、軽鎖Arg96と強固な水素結合を形成してループの構造を規定する重鎖Asp95、軽鎖Glu50と水素結合を形成してループの構造を規定する重鎖Arg100a、側鎖がキヌレニンとは逆の方向を向き、改変を導入してもキヌレニンとは相互作用の形成を見込むことのできない重鎖Pro100bは、改変残基部位の候補から除外された。また軽鎖Ser56は、図３５に示すようにキヌレニ

ンからの距離は遠いものの、側鎖はキヌレニンの方向を向くように存在し、Serよりもより大きな長さのアミノ酸残基へと改変することでキヌレニンとの相互作用を形成する可能性があり、改変残基部位として選別した。また、後述の実施例（９－２）の結果から、重鎖Gly50及び軽鎖Asp28は、Alaに置換することでキヌレニンへの結合活性の増強が示された。これらの残基部位は、直接キヌレニンと相互作用できる位置ではないため（図３６）、キヌレニンに結合する際のFab全体のコンフォメーションを安定化し、間接的な寄与をしたと推察される。さらに、これらの残基部位については、Ala以外への改変により、さらにキヌレニンへの結合が増強される可能性も考えられるため、当該残基位置も網羅的改変部位として選別された。これらの残基が各アミノ酸に置換された改変体を網羅的に評価することで、キヌレニンへの結合能を増強させる効果が期待される改変を同定することが可能かどうか検証された。

[0580] 実施例（８－２－３）で作製されたF02h011/F02l003に対して、このように改変された部位（表中、「Kabat」と記載されるKabatナンバリングで表される部位）ならびに当該部位における改変前のアミノ酸（表中、「天然配列」と記載されるアミノ酸）および改変後のアミノ酸（表中、「改変アミノ酸」と記載されるアミノ酸）は表１７に示した。

[0581] [表17]

		HCDR1	HCDR2	HCDR3										LCDR1	LFR2		LCDR2	
	Kabat	32	50	96	97	98	99	100	100c	100d	100e	101	102	28	46	49	55	56
	天然配列	Y	G	A	P	V	V	A	R	G	A	D	I	D	L	Y	F	S
改変アミノ酸	A	A	A		A	A	A		A	A		A	A	A		A	A	A
	D	D	D	D	D			D	D	D	D		D			D		D
	E	E	E	E	E			E	E	E		E	E	E	E	E		E
	F	F	F	F	F	F		F	F	F			F	F	F	F		F
	G	G		G	G			G	G				G	G		G		G
	H	H	H	H	H			H	H	H			H	H	H	H		H
	I	I	I	I	I	I		I	I	I	I			I		I		I
	K	K	K	K	K			K	K	K			K	K		K		K
	L	L	L	L	L	L		L	L	L	L		L	L		L	L	L
	M	M	M	M	M			M	M	M			M	M		M	M	M
	N	N	N	N	N			N	N	N	N	N	N	N		N		N
	P	P	P	P				P	P	P			P	P		P		P
	Q	Q	Q	Q	Q			Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q		Q		Q
	R	R	R	R	R			R		R			R	R		R	R	R
	S	S	S	S	S		S	S	S	S	S	S	S	S		S		
	T	T	T	T	T	T		T	T	T	T		T	T		T		
	V	V	V	V	V			V	V	V	V		V	V		V		V
	W	W	W	W	W			W	W	W			W	W		W	W	W
	Y		Y	Y	Y	Y		Y	Y	Y			Y	Y	Y		Y	Y

[0582] 後述の参考実施例１で示された方法で、発現および精製された各改変体の

キヌレニンへの結合が、実施例（７－５）で示されたBiacoreを用いた方法のうち、抗原希釈液およびブランクであるランニングバッファーの添加時間が30秒間に変更された条件で測定された。また、一部改変体についてはProtein Aが固定化されるセンサーチップの種類がSensor chip Series S CM3（GE Healthcare）に変更された条件で測定された。キヌレニンの解離がはやく解離速度定数を決定できない場合には、各抗原を相互作用させている間（結合相）における結合レスポンスの大きさを元にした平衡値解析により解離定数KD（M）が算出された。この場合にも、パラメーターの算出には Biacore T200 Evaluation Software（GE Healthcare）が用いられた。測定の結果、各改変体のキヌレニンに対するAffinityがKD値として算出された。各改変体とF02h011/F02l003のキヌレニンに対するKD値の比較の結果を、表１８に示した。

[0583] [表18]

		HCDR1	HCDR2	HCDR3										LCDR1	LFR2		LCDR2	
	Kabat	32	50	96	97	98	99	100	100c	100d	100e	101	102	28	46	49	55	56
	天然配列	Y	G	A	P	V	V	A	R	G	A	D	I	D	L	Y	F	S
改変アミノ酸	A	0.0	3.1		0.5	0.1	0.5		0.1	0.1		0.0	0.4	2.5		0.0	0.1	0.9
	D	0.0	0.0	0.0	0.0			0.6	0.0	0.0	0.0		0.7			0.0		0.5
	E	0.0	0.0	0.4	0.1			0.8	0.0	0.0		0.0	0.5	1.7	0.0	0.0		0.5
	F	0.3	1.8	0.8	0.0	0.1		0.9	0.0	0.0			0.6	2.0	0.0	0.7		1.3
	G	0.0		0.0	0.0			1.3	0.0				0.1	1.5		0.0		0.9
	H	0.4	0.6	1.6	0.0			0.6	2.5	0.1			0.7	2.6	0.1	1.2		1.1
	I	0.0	2.7	0.4	0.0	0.2		1.0	0.0	0.0	0.0			2.1		0.0		1.3
	K	0.0	1.9	1.3	0.1			0.6	0.7	0.0			0.2	1.8		0.0		1.0
	L	0.0	1.0	0.1	0.0	0.2		1.2	0.0	0.0	0.0		0.3	0.0		0.0	0.3	0.8
	M	0.0	2.3	0.1	0.0			0.6	0.0	0.2			0.4	2.1		0.0	0.7	1.0
	N	0.0	1.6	0.7	0.4			0.3	0.0	0.3	0.0	0.0	0.4	1.5		0.2		0.7
	P	0.0	0.0	0.0				0.0	0.0	0.0			0.0	3.2		0.0		0.7
	Q	0.0	0.3	2.1	0.0			0.6	0.2	0.0	0.0	0.0	0.4	1.8		0.0		0.7
	R	0.0	1.0	0.3	0.0			0.5		0.0			0.2	1.2		0.0	0.2	1.2
	S	0.0	2.7	0.5	0.4		0.5	0.5	0.0	0.0	0.3	0.0	0.1	0.9		0.1		
	T	0.0	1.5	0.5	0.0	0.3		0.4	0.0	0.0	0.0		0.3	1.4		0.0		
	V	0.0	7.0	1.9	0.0			0.6	0.0	0.0	0.0		0.6	2.1		0.0		2.8
	W	0.0	1.8	6.5	0.0			1.1	0.0	0.0			0.7	2.2		0.3	0.0	1.4
	Y		3.3	0.3	0.0	0.2		0.9	0.1	0.0			0.6	3.2	0.0		1.0	1.5

[0584] キヌレニンへの結合増強が期待される改変のうち、Lch_Ser56Tyrの改変が加えられた配列がF02h011/F02l098（重鎖可変領域配列：配列番号：９５、軽鎖可変領域配列：配列番号：９７）と命名され、ライブラリの鋳型配列として用いられた。F02h011/F02l098とキヌレニンの結合が、実施例（７－５）で示されたBiacoreを用いた方法のうち、抗原希釈液およびブランクであるランニングバッファーの添加時間が30秒間に、Protein Aが固定化されるセンサーチップの種類がSensor chip Series S CM3（GE Healthcare）に、それぞれ変

更された条件で測定された。F02h011/F02l098に対するキヌレニン結合のカイネティクスパラメーターは、ka=3686（1/s），kd=0.26（1/s），KD=0.072（mmol/L）と決定された。評価結果を示すセンサーグラムは図３３に示された。

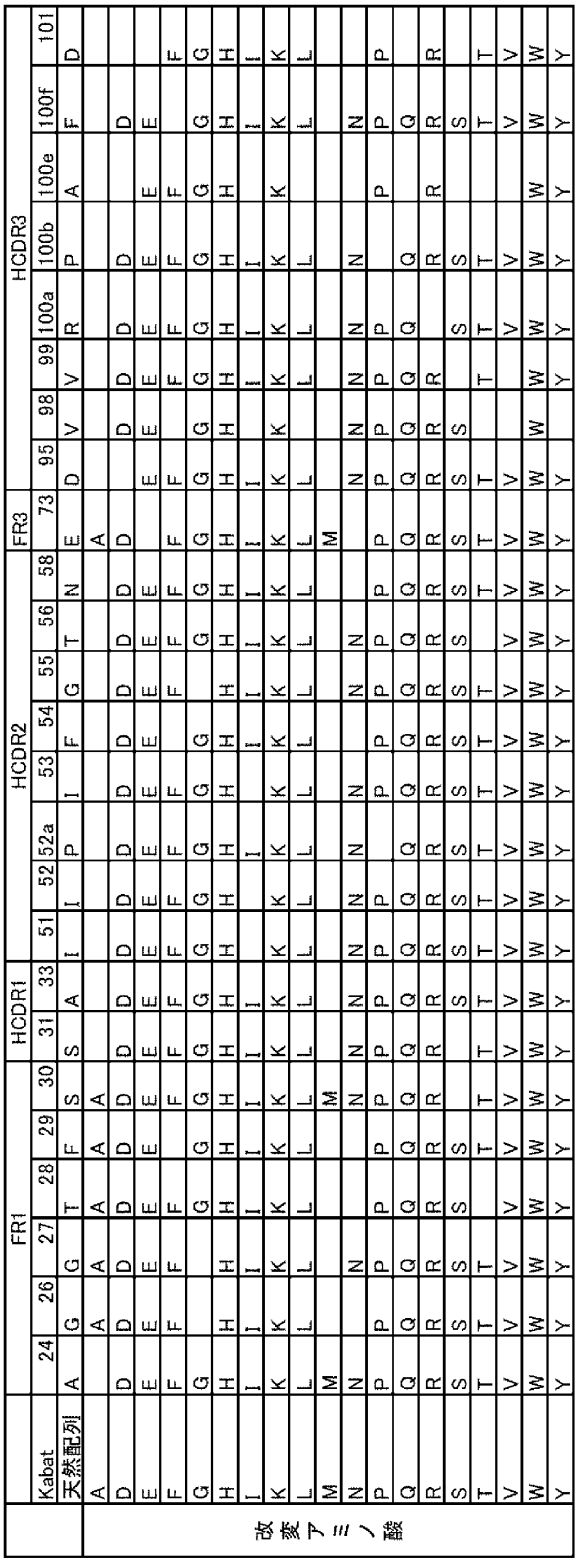
[0585] （８－３）X線結晶構造解析結果をもとにしたライブラリ設計のための網羅的改変体評価

実施例（８－１）において6RNMSC1-2_F02とキヌレニンの複合体の結晶構造が解析された。結晶構造解析の結果から、当該抗体が認識するキヌレニンの認識様式、およびキヌレニンへの結合に大きく関与していないと想定される抗体可変領域のアミノ酸残基が同定された。以下に示す残基が各アミノ酸に置換された改変体を網羅的に評価することで、ライブラリ化可能部位およびライブラリ化可能アミノ酸の判定が可能になると考えられた。つまり、キヌレニンに対する結合に大きく関与していない部位、あるいは、結合に関与していてもキヌレニンに対する結合を大幅には低下させない（結合をゼロにしない）天然配列以外のアミノ酸が存在する部位およびアミノ酸を判定することで、ライブラリ化可能部位およびライブラリ化可能アミノ酸の判定が可能になると考えられた。実施例（８－２－４）で作製されたキヌレニンに対する結合を増強する改変が加えられたF02h011/F02l098に対して、これらの残基に改変を導入した改変体が複数作製された。

[0586] 重鎖の部位のうち改変された部位（表中、「Kabat」と記載されるKabatナンバリングで表される部位）ならびに当該部位における改変前のアミノ酸（表中、「天然配列」と記載されるアミノ酸）および改変後のアミノ酸（表中「改変アミノ酸」と記載されるアミノ酸）は表１９ に示した。

[0587]

[表19]



[0588] 軽鎖の部位のうち改変された部位（表中、「Kabat」と記載されるKabatナンバリングで表される部位）ならびに当該部位における改変前のアミノ酸（表中、「天然配列」と記載されるアミノ酸）および改変後のアミノ酸（表中「改変アミノ酸」と記載されるアミノ酸）は表２０に示した。

[0589] [表20]

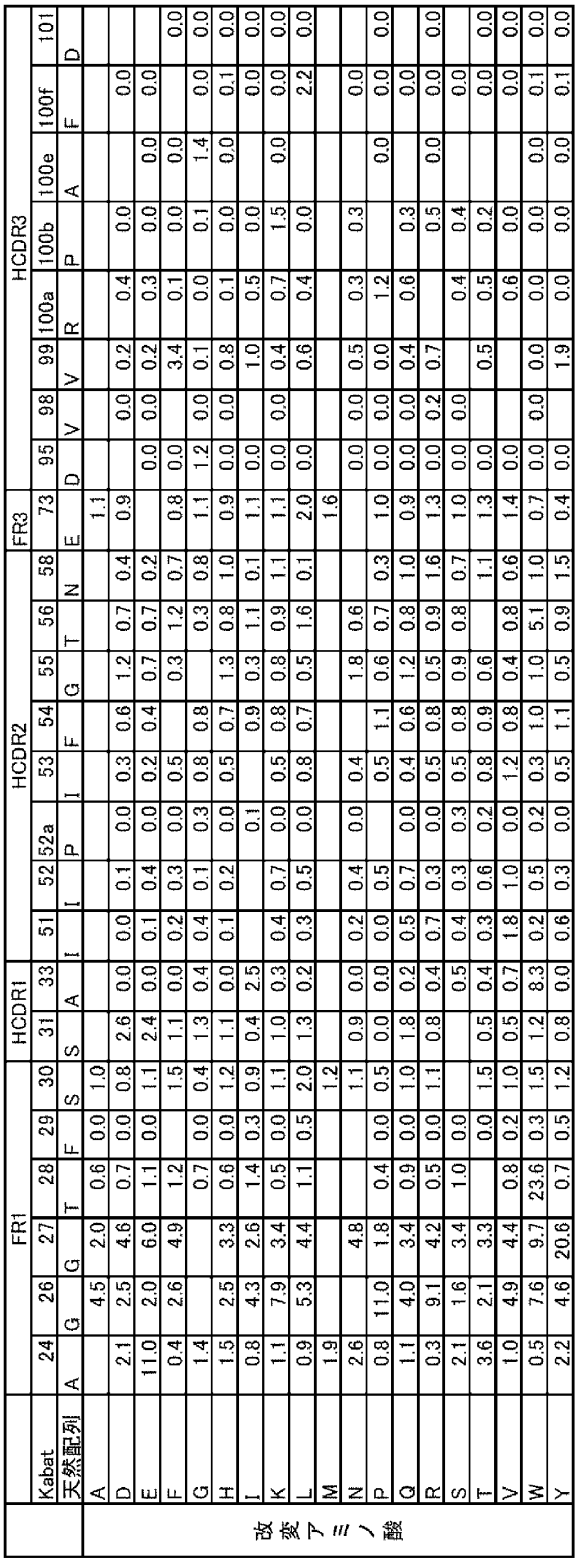
		LCDR1				FR2	LCDR2						LCDR3			
	Kabat	27d	27e	29	32	46	50	51	52	53	54	55	92	93	94	96
	天然配列	H	S	G	Y	L	E	I	S	N	R	F	T	Q	F	R
改変アミノ酸	A					A										
	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
	E	E	E	E	E			E	E	E	E	E	E	E	E	E
	F	F	F	F	F		F	F	F	F	F		F	F		F
	G	G	G		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	H		H	H	H		H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
	I	I	I	I	I	I	I		I	I	I	I	I	I	I	I
	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
	L	L	L	L	L		L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
	M					M	M	M								
	N	N	N			N		N	N		N	N	N	N	N	N
	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q		Q	Q
	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		R	R	R	R	
	S	S		S		S	S	S		S	S		S	S	S	S
	T	T	T	T		T	T	T	T	T	T			T	T	T
	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
	Y	Y	Y	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y

[0590] 後述の参考実施例１で示された方法で、発現および精製された各改変体のキヌレニンへの結合が、実施例（７－５）で示されたBiacoreを用いた方法のうち、抗原希釈液およびブランクであるランニングバッファーの添加時間が30秒間に変更された条件で測定された。また、一部改変体についてはProtein Aが固定化されるセンサーチップの種類がSensor chip Series S CM3（GE Healthcare）に変更された条件で測定された。キヌレニンの解離がはやく解離速度定数を決定できない場合には、各抗原を相互作用させている間（結合相）における結合レスポンスの大きさを元にした平衡値解析により解離定数KD（M）が算出された。この場合にも、パラメーターの算出には Biacore T200 Evaluation Software（GE Healthcare）が用いられた。測定の結果、各改変体のキヌレニンに対するAffinityがKD値として算出された。重鎖における各改変体と、親配列であるF02h011/F02l098のキヌレニンに対するKD値の比較の結果

を、表２１に示した。軽鎖における各改変体と、親配列であるF02h011/F02l098のキヌレニンに対するKD値の比較の結果を、表２２に示した。

[0591]

[表21]



[0592] [表22]

		LCDR1				FR2	LCDR2						LCDR3			
	Kabat	27d	27e	29	32	46	50	51	52	53	54	55	92	93	94	96
	天然配列	H	S	G	Y	L	E	I	S	N	R	F	T	Q	F	R
改変アミノ酸	A					0.0										
	D	1.9	0.9	1.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.8	1.1	0.8	0.0	1.2	0.9	0.0	0.0
	E	1.3	0.9	0.9	0.2			0.3	1.0	0.9	0.9	0.0	0.4	1.6	0.0	0.0
	F	0.6	0.9	1.0	2.0		0.5	0.4	1.1	1.0	0.9		0.9	0.5		0.0
	G	1.1	0.9		0.3	0.0	0.4	0.4	1.0	0.5	0.9	0.1	1.4	0.4	0.2	0.0
	H		1.0	1.0	0.8		0.0	0.2	0.9	0.9	1.2	0.1	1.0	0.1	0.4	0.0
	I	2.3	0.9	1.2	0.0	0.4	0.4		1.0	1.2	0.8	0.1	2.2	0.6	0.9	0.0
	K	1.1	1.0	1.1	0.5	0.0	0.2	0.3	1.2	1.2	0.9	0.1	1.1	0.6	0.4	0.0
	L	1.8	0.9	1.0	0.4		0.8	0.2	0.9	1.4	0.8	0.2	1.0	0.4	0.2	0.0
	M					0.4	1.9	0.4	0.9							
	N	2.3	1.0			0.3		0.2	0.8		0.7	0.1	1.8	1.1	0.2	0.0
	P	2.3	0.9	1.8	0.4	0.1	0.0	0.0	0.1	0.6	1.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0
	Q	1.4	1.0	1.0	0.3	0.0	0.8	0.4	1.2	1.0	1.0	0.1	1.4		0.2	0.0
	R	0.9	1.1	0.9	0.9	0.0	0.0	0.5	1.2	1.1		0.1	0.9	0.7	0.3	
	S	1.0		0.9		0.0	0.2	0.4		0.8	0.9		0.9	0.8	0.2	0.0
	T	2.0	1.0	0.9		0.0	0.3	0.4	1.0	0.7	0.6			1.7	0.4	0.0
	V	2.5	1.0	1.2	0.3	0.6	0.2	0.6	1.1	1.0	0.7	0.1	1.7	1.0	0.8	0.0
	W	0.6	1.0	1.1	0.3	0.0	0.0	0.3	1.0	1.0	0.9	0.0	0.8	0.0	0.8	0.0
	Y	0.6	1.2	1.0			0.2	0.3	1.1	1.1	1.2	1.3	0.9	0.5	1.1	0.0

[0593] （８－４）網羅的改変体評価結果をもとにしたライブラリ設計

ライブラリの設計にあたり、実施例（８－２－４）、（８－３）および後述する実施例（９－２）で得られた情報をもとに、以下の条件のうち少なくとも一つを満たす部位がライブラリ化可能部位として選定された。

条件１）キヌレニンに対する結合に大きく関与していない部位、あるいは、結合に関与していてもキヌレニンに対する結合を大幅に低下させない天然配列以外のアミノ酸が存在する部位、

条件２）抗体のレパートリーとしてある程度アミノ酸出現頻度の多様性のある部位、

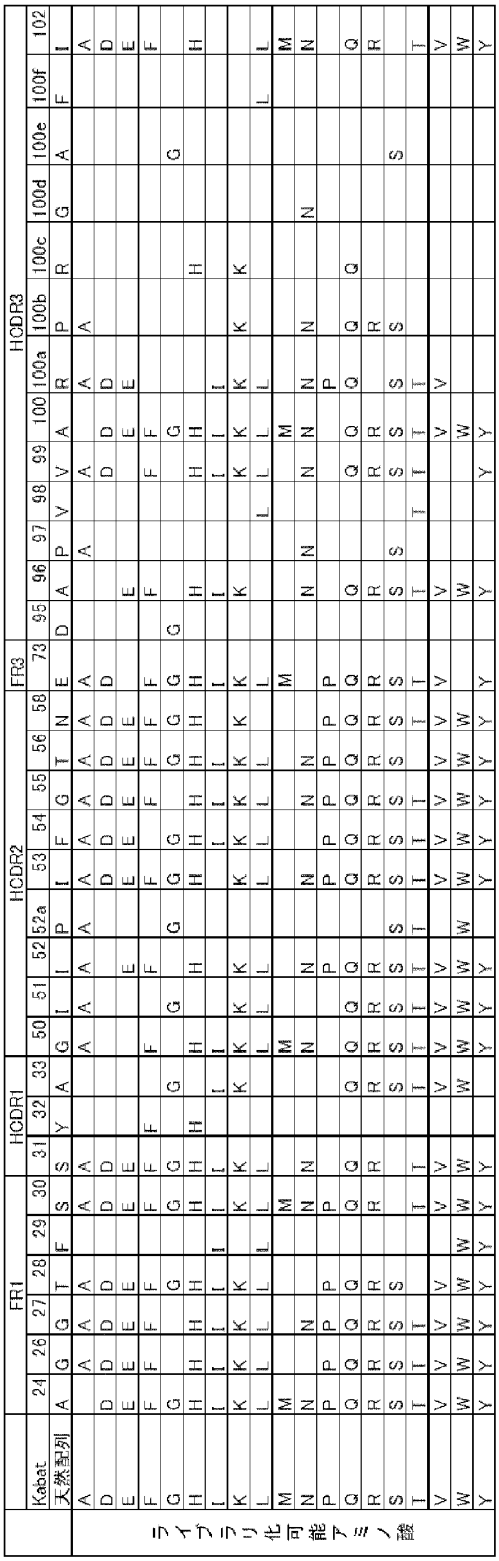
条件３）Canonical structureの形成に重要でない部位。

[0594] 実施例（８－２－４）、（８－３）および後述する実施例（９－２）にて実施された評価結果から、各評価における親配列のキヌレニンに対するKD値の20％を上回る結合を示す改変体が少なくとも1つ以上存在する箇所が、上記条件を満たす改変可能部位と判定された。当該部位において置換されたアミノ酸のうち、各評価における親配列のキヌレニンに対するKD値の20％を上回る結合を示すアミノ酸はライブラリ化が可能なアミノ酸（ライブラリにおい

て出現させることが可能なフレキシブル残基）と判定された。実施例（８－２－４）で作製されたキヌレニンに対する結合を増強する改変が加えられたF02h011/F02l098において、判定された各改変可能部位に、改変体の解析によって選出されたライブラリ化可能アミノ酸（ライブラリにおいて出現させることが可能なフレキシブル残基）および未改変体のアミノ酸（すなわちF02h011/F02l098の天然配列に含まれるアミノ酸）を含むアミノ酸レパートリーに含まれるアミノ酸のうち、少なくともいずれか一つ以上のアミノ酸が出現するライブラリを設計することによって、キヌレニンスイッチ抗体取得用のライブラリが構築される。重鎖におけるアミノ酸レパートリーを含む部位、ならびに当該部位におけるアミノ酸レパートリーは表２３示した。軽鎖におけるアミノ酸レパートリーを含む部位、ならびに当該部位におけるアミノ酸レパートリーは表２４に示した。表中、「Kabat」と記載されるKabatナンバリングで表される部位は改変可能部位を、「天然配列」と記載されるアミノ酸は当該部位における未改変体のアミノ酸を、「ライブラリ化可能アミノ酸」と記載されるアミノ酸は当該部位におけるライブラリ化可能アミノ酸を、それぞれ表す。各改変可能酸部位において、選出されたアミノ酸レパートリーに含まれるアミノ酸のうち、少なくともいずれか一つが出現するライブラリが設計された。

[0595]

[表23]



[0596] [表24]

		LCDR1					FR2		LCDR2						LCDR3		
	Kabat	27d	27e	28	29	32	46	49	50	51	52	53	54	55	92	93	94
	天然配列	H	S	D	G	Y	L	Y	E	I	S	N	R	F	T	Q	F
ライブラリ化可能アミノ酸	A	A	A	A	A	A			A	A	A	A	A		A	A	
	D	D	D		D					D	D	D	D		D	D	
	E	E	E	E	E					E	E	E	E		E	E	
	F	F	F	F	F	F		F	F	F	F	F	F		F	F	
	G	G	G	G		G			G	G	G	G	G		G	G	
	H	H	H	H	H	H		H			H	H	H		H		H
	I	I	I	I	I		I		I		I	I	I		I	I	I
	K	K	K	K	K	K			K	K	K	K	K		K	K	K
	L	L	L		L	L			L	L	L	L	L	L	L	L	
	M			M			M		M	M				M			
	N	N	N	N			N				N		N		N	N	N
	P	P	P	P	P	P						P	P				
	Q	Q	Q	Q	Q	Q			Q	Q	Q	Q	Q		Q		Q
	R	R	R	R	R	R				R	R	R		R	R	R	R
	S	S		S	S				S	S		S	S		S	S	S
	T	T	T	T	T				T	T	T	T	T			T	T
	V	V	V	V	V	V	V		V	V	V	V	V		V	V	V
	W	W	W	W	W	W		W		W	W	W	W		W		W
	Y	Y	Y	Y	Y				Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y

[0597] こうして設計されたライブラリに含まれる個々の配列を含む遺伝子が合成され、これらの個々の遺伝子の集合体（ライブラリ）を鋳型として用いてVHおよびVLをそれぞれ増幅させることが可能なプライマーによって遺伝子ライブラリが増幅される。増幅されたラショナルデザインヒト抗体重鎖可変領域の遺伝子ライブラリとヒト抗体軽鎖可変領域の遺伝子ライブラリはヒトIgG由来CH1配列およびヒトIgG由来軽鎖定常領域配列の両方を有する適切なファージミドベクターへと導入される。このファージミドベクターをエレクトロポレーションにより大腸菌へと導入することで、ヒト抗体可変領域－定常領域よりなるFabドメインを提示し、キヌレニンをスイッチとして抗原に結合できる抗体を取得できるようなラショナルデザインライブラリが構築される。このように多様なキヌレニン結合活性を有するH鎖およびL鎖から構成されたラショナルデザインライブラリは、任意の抗原に対するキヌレニンスイッチ抗体を効率よく取得できるヒト抗体が含まれるライブラリとして有用であると考えられる。また、実施例（７－６）で示されるように、6RNMSC1-2_F02はキヌレニンのみならず、キヌレニンの代謝物である３－ヒドロキシキヌレニンやRO0635389-000-001をはじめとするキヌレニン誘導体にも結合することから

、キヌレニンにその構造が類似するその他の誘導体にも結合活性を有すると予想される。そのため、本ライブラリはキヌレニンやキヌレニン代謝物、ひいては生体外分子であるキヌレニン誘導体のうちいずれか一つ以上の低分子の有無によって任意の標的抗原に対する結合活性が変化するスイッチ抗体を取得するのに有用であると考えられる。

[0598] 〔実施例９〕スイッチとなる分子によるパンニングを利用したキヌレニンスイッチ抗体取得用のライブラリ設計

実施例８で網羅的改変によりライブラリ化部位の設計を行い、キヌレニンに結合能を示す抗体を鋳型としたライブラリを構築する方法を記載した。ライブラリ作製方法として異なるアプローチ法としてスイッチとなる分子に対するパンニングを利用した方法も有用である。

[0599] （９－１）キヌレニンをスイッチとするhIL-6R結合抗体6RNMSC1-2 F02のX線結晶構造解析

実施例（８－１）において6RNMSC1-2_F02とキヌレニンの複合体の結晶構造が解析された。結晶構造解析の結果から、当該抗体が認識するキヌレニンの認識様式、およびキヌレニンへの結合に大きく関与していないと想定される抗体可変領域のアミノ酸残基が同定された。

[0600] （９－２）ライブラリ化可能部位選定評価およびライブラリ設計

実施例（８－２－２）で作製されたF02h011/F02l003（重鎖可変領域配列：配列番号：９５軽鎖可変領域配列：配列番号：９６）に対して、結晶構造解析結果をもとに選抜された各部位をAlaもしくはValに置換した改変体の評価を行うことで、ライブラリ化可能部位の選定が可能になると考えられた。

[0601] （９－２－１）重鎖可変領域のライブラリ化可能部位選定評価およびライブラリ設計

まず、重鎖において、F02h011/F02l003の重鎖配列に含まれる部位のうち、結晶構造解析結果をもとに選抜された各部位に関して、AlaもしくはValに置換した各改変体が作製された。改変された部位（表中、「Kabat」と記載されるKabatナンバリングで表される部位）ならびに当該部位における改変前のア

ミノ酸（表中、「天然配列」と記載されるアミノ酸）および改変後のアミノ酸（表中「改変アミノ酸」と記載されるアミノ酸）は表２５に示した。

[0602] [表25]

	HFR1	HCDR1				HCDR2								
Kabat	28	31	32	33	35	50	51	52	52a	53	54	55	56	58
天然配列	T	S	Y	A	S	G	I	I	P	I	F	G	T	N
改変アミノ酸	A	A	A	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

	HCDR3													
Kabat	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	100f	101	102
天然配列	D	A	P	V	V	A	R	P	R	G	A	F	D	I
改変アミノ酸	A	V	A	A	A	V	A	A	A	A	V	A	A	A

[0603] 後述の参考実施例１で示された方法で、発現および精製された各改変体のキヌレニンへの結合が、実施例（７－５）で示されたBiacoreを用いた方法のうち、抗原添加時間が30秒間に変更された条件で測定された。キヌレニンの解離がはやく解離速度定数を決定できない場合には、各抗原を相互作用させている間（結合相）における結合レスポンスの大きさを元にした平衡値解析により解離定数KD（M）が算出された。この場合にも、パラメーターの算出には Biacore T200 Evaluation Software（GE Healthcare）が用いられた。測定の結果、各改変体のキヌレニンに対するAffinityがKD値として算出された。各改変体と親抗体であるF02h011/F02l003のキヌレニンに対するKD値の比較の結果を、表２６に示した。

[0604] [表26]

	HFR1	HCDR1				HCDR2								
Kabat	28	31	32	33	35	50	51	52	52a	53	54	55	56	58
天然配列	T	S	Y	A	S	G	I	I	P	I	F	G	T	N
改変アミノ酸	A	A	A	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
F02h011/F02l003との比	0.9	1.7	0.0	0.7	0.7	6.9	0.5	0.4	0.4	0.4	0.6	0.8	0.8	0.7

	HCDR3													
Kabat	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	100f	101	102
天然配列	D	A	P	V	V	A	R	P	R	G	A	F	D	I
改変アミノ酸	A	V	A	A	A	V	A	A	A	A	V	A	A	A
F02h011/F02l003との比	0.0	1.9	0.5	0.1	0.5	0.6	0.3	0.2	0.1	0.2	0.0	0.0	0.0	0.4

[0605] ライブラリの設計にあたり、上記改変体評価および実施例（８－２－４）の評価で得られた情報をもとに、以下の条件のうち少なくとも一つを満たす部位がライブラリ化可能部位として選定された。

条件１）キヌレニンに対する結合に大きく関与していない部位、あるいは、結合に関与していてもキヌレニンに対する結合を大幅には低下させない（結

合をゼロにしない）天然配列以外のアミノ酸が存在する部位、

条件２）抗体のレパートリーとしてある程度アミノ酸出現頻度の多様性のある部位、

条件３）Canonical structureの形成に重要でない部位。

[0606] 実施例（８－２－４）で作製されたキヌレニンへの結合増強改変が導入されたF02h011/F02l098の重鎖配列（配列番号：９５）において、上記条件により選出された部位のアミノ酸をある一定の塩基のみに出現を限定したライブラリが設計された。たとえばNNKやTRIM Library等（Gonzalez-Munoz A et al. MAbs 2012, Lee CV et al. J Mol Biol. 2004, Knappik A. et al. J Mol Biol. 2000, Tiller T et al. MAbs 2013）が挙げられる。評価が実施された各部位において、親配列であるF02h011/F02l003のキヌレニンに対するKD値の20%を上回る結合を示す改変箇所が、上記条件を満たす改変可能部位として判定された。また、これに含まれる部位であっても構造上重要な残基であると判断された部位はライブラリ化部位から除外されるか、もしくは出現するアミノ酸を限定してライブラリ化された。NNKコドンを用いたライブラリ化部位（表中〇で表示）、天然配列に固定する部位（表中×で表示）、および出現するアミノ酸を限定する場合はそのアミノ酸を表２７に示した。

[0607] [表27]

	HFR1	HCDR1				HCDR2								
kabat	28	31	32	33	35	50	51	52	52a	53	54	55	56	58
天然配列	T	S	Y	A	S	G	I	I	P	I	F	G	T	N
Library	〇	〇	×	〇	×	〇	I, F, V, L	〇	×	×	〇	G, S	〇	〇

	HCDR3													
kabat	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	100f	101	102
天然配列	D	A	P	V	V	A	R	P	R	G	A	F	D	I
Library	×	〇	A, P	x	〇	〇	〇	A, P	R, H	×	×	×	×	×

[0608] 設計された遺伝子配列はライブラリ化部位にNNKコドンもしくは限定したアミノ酸が出現するコドンを用いたプライマーを用いて遺伝子合成され（重鎖可変領域ライブラリ）、F02h011/F02l098の軽鎖可変領域配列（親配列、配列番号：９７）と組み合わせられ、ヒトIgG由来CH1配列およびヒトIgG由来軽鎖定常領域配列を有する適切なファージミドベクターに導入された。このファ

ージミドベクターをエレクトロポレーションにより大腸菌へと導入することで、キヌレニンをスイッチとして抗原に結合できるようなヒト抗体重鎖可変領域ファージディスプレイライブラリが構築された。

[0609] （９－２－２）軽鎖可変領域のライブラリ化可能部位選定評価およびライブラリ設計

次に、軽鎖においてF02h011/F02l003の軽鎖配列に含まれる部位のうち、結晶構造解析結果をもとに選抜された各部位に関して、AlaもしくはValに置換した各改変体が作製された。改変された部位（表中、「Kabat」と記載されるKabatナンバリングで表される部位）ならびに当該部位における改変前のアミノ酸（表中、「天然配列」と記載されるアミノ酸）および改変後のアミノ酸（表中「改変アミノ酸」と記載されるアミノ酸）は表２８に示した。

[0610] [表28]

	LCDR1						LCDR2					LCDR3				
Kabat	27d	27e	28	29	30	32	52	53	54	55	56	91	92	93	94	96
天然配列	H	S	D	G	N	Y	S	N	R	F	S	A	T	Q	F	R
改変アミノ酸	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	V	A	A	A	A

[0611] 後述の参考実施例１で示された方法で、発現および精製された各改変体のキヌレニンへの結合が、実施例（７－５）で示されたBiacoreを用いた方法のうち、抗原添加時間が30秒間に変更された条件で測定された。キヌレニンの解離がはやく解離速度定数を決定できない場合には、各抗原を相互作用させている間（結合相）における結合レスポンスの大きさを元にした平衡値解析により解離定数KD（M）が算出された。この場合にも、パラメーターの算出には Biacore T200 Evaluation Software（GE Healthcare）が用いられた。測定の結果、各改変体のキヌレニンに対するAffinityがKD値として算出された。各改変体と親配列であるF02h011/F02l003のキヌレニンに対するKD値の比較の結果を、表２９に示した。

[0612] [表29]

	LCDR1						LCDR2					LCDR3				
Kabat	27d	27e	28	29	30	32	52	53	54	55	56	91	92	93	94	96
天然配列	H	S	D	G	N	Y	S	N	R	F	S	A	T	Q	F	R
改変アミノ酸	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	V	A	A	A	A
F02h011/F02l003との比	0.7	0.9	2.5	1.0	0.7	0.5	1.0	0.8	0.8	0.1	0.9	0.3	0.9	1.0	0.1	0.0

[0613] ライブラリの設計にあたり、上記改変体評価および実施例（８－２－４）の評価で得られた情報をもとに、以下の条件のうち少なくとも一つを満たす部位がライブラリ化可能部位として選定された。

条件１）キヌレニンに対する結合に大きく関与していない部位、あるいは、結合に関与していてもキヌレニンに対する結合を大幅には低下させない（結合をゼロにしない）天然配列以外のアミノ酸が存在する部位、

条件２）抗体のレパートリーとしてある程度アミノ酸出現頻度の多様性のある部位、

条件３）Canonical structureの形成に重要でない部位。

[0614] 実施例（８－２－４）で作製されたキヌレニンへの結合増強改変が導入されたF02h011/F02l098の軽鎖配列（配列番号：９７）において、上記条件により選出された部位のアミノ酸をある一定の塩基のみに出現を限定したライブラリが設計された。たとえばNNKやTRIM Library等が挙げられる。評価が実施された各部位において、親配列であるF02h011/F02l003のキヌレニンに対するKD値の20%を上回る結合を示す改変箇所が、上記条件を満たす改変可能部位として判定された。また、これに含まれる部位であっても構造上重要な残基であると判断された部位はライブラリ化部位から除外されるか、もしくは出現するアミノ酸を限定してライブラリ化された。NNKコドンを用いたライブラリ化部位（表中〇で表示）、天然配列に固定する部位（表中×で表示）、および出現するアミノ酸を限定する場合はそのアミノ酸を表３０に示した。

[0615] [表30]

	LCDR1						LCDR2					LCDR3				
Kabat	27d	27e	28	29	30	32	52	53	54	55	56	91	92	93	94	96
天然配列	H	S	D	G	N	Y	S	N	R	F	S	A	T	Q	F	R
Library	〇	〇	〇	〇	x	Y, F	〇	〇	〇	x	Y	x	〇	〇	x	x

[0616] 設計された遺伝子配列はライブラリ化部位にNNKコドンもしくは限定したアミノ酸が出現するコドンを用いたプライマーを用いて遺伝子合成され（軽鎖可変領域ライブラリ）、F02h011/F02l098の重鎖可変領域配列（親配列、配列番号：９５）と組み合わせられ、ヒトIgG由来CH1配列およびヒトIgG由来軽鎖定常領域配列を有する適切なファージミドベクターに導入された。このファ

ージミドベクターをエレクトロポレーションにより大腸菌へと導入することで、キヌレニンをスイッチとして抗原に結合できるようなヒト抗体軽鎖可変領域ファージディスプレイライブラリが構築された。

[0617] （９－３）キヌレニン結合ライブラリ作製のためのビオチン化キヌレニンの合成

実施例（７－６）で示されたように、6RNMSC1-2_F02においては、キヌレニンの誘導体でもスイッチとして機能する。これら誘導体はいずれもキヌレニンの3位4位5位のいずれかが置換された構造であること、また6RNMSC1-2_F02とキヌレニンの複合体の結晶構造解析結果から、キヌレニンの3位4位もしくは5位へのビオチンの導入は6RNMSC1-2_F02と抗原であるhIL-6Rの結合を邪魔しないと予測されるため、3位4位5位のいずれかから適切なリンカー（PEGリンカーなど）を結合し、その末端にビオチンを付加することが望ましい。

[0618] 以下に、本発明のビオチン化キヌレニンの実施例を示す。本発明のビオチン化キヌレニンは様々な方法によって合成することができるが、その一部を以下のスキームで説明する。スキームは例示であり、本発明は、明示された化学反応および条件だけに制限されない。本発明の代表的化合物は、適切な中間体、公知の化合物、および、試薬を用いて合成することができる。

[0619] （９－３－１）キヌレニンの4位にリンカーを取り付けたビオチン化合物の合成

以下に記載される方法により、ビオチン化キヌレニン化合物028及び029を調製することができる。なお、ビオチン化キヌレニン化合物および合成中間体は以下の条件で分析された。

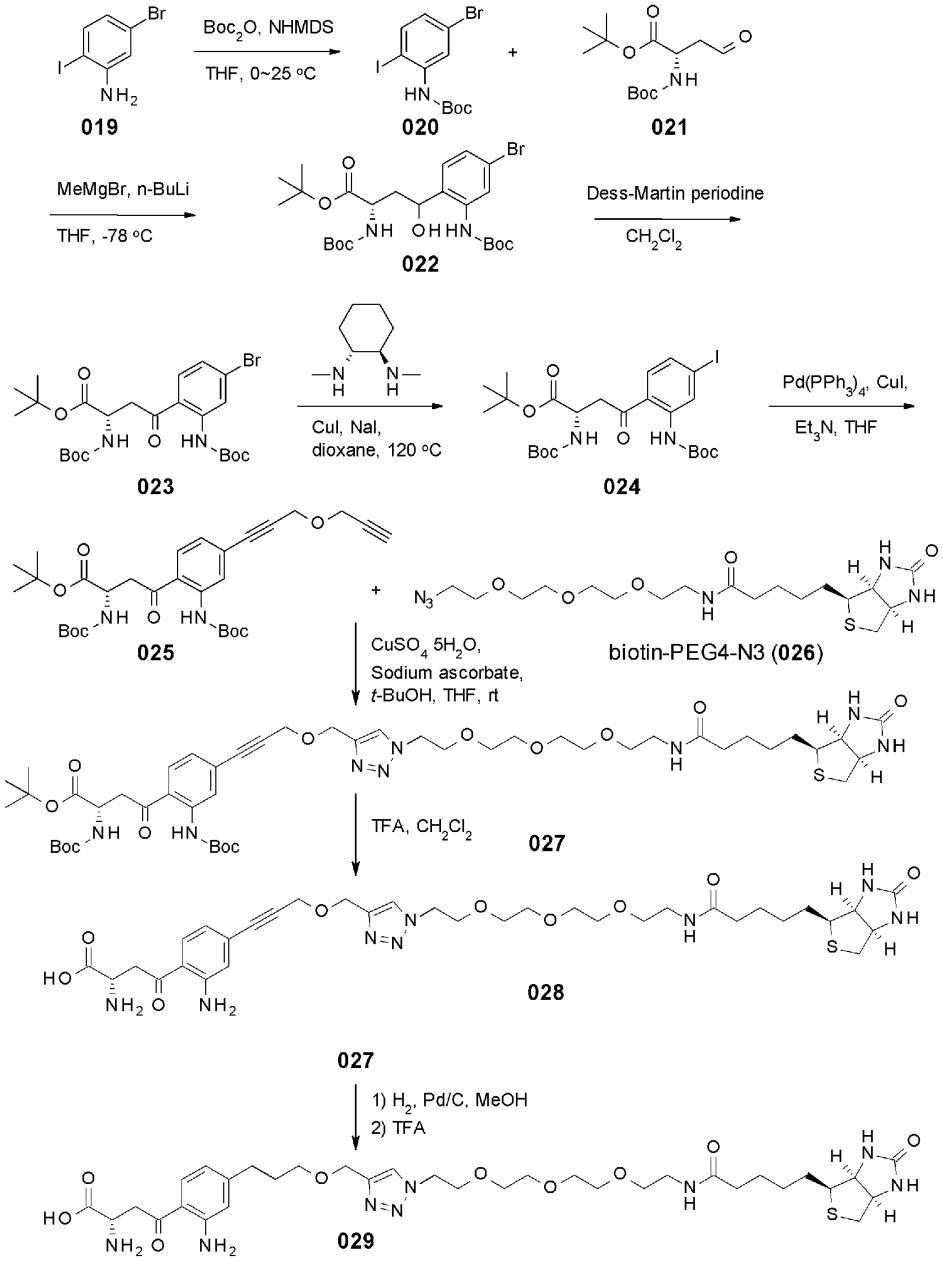
ＬＣＭＳの分析条件は、下記のとおりである。

[0620]

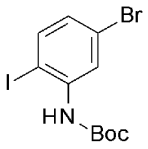
[表31]

分析条件	装置	カラム（粒子径、長さ、内径）	移動相	勾配(A/B)	流速(ml/分)	カラム温度(℃)	波長
A	Shimadzu LCMS-2020	Shim-pack XR-ODS (2.2um, 50 mm, 3.0 mm)	A:Water/0.05%TFA B:Acetonitrile/0.05%TFA	95/5 (0.01 min), 0/100 (1.20 min), 0/100 (2.20 min), 85/5 (2.30 min)	1	40	190-800 nm, PDA total
B	Shimadzu LCMS-2020	Shim-pack XR-ODS (2.2um, 50 mm, 3.0 mm)	A:Water/0.05%TFA B:Acetonitrile/0.05%TFA	95/5 (0.01 min), 0/100 (2.20 min), 0/100 (3.20 min), 85/5 (3.30 min)	1	40	190-800 nm, PDA total
C	Shimadzu LCMS-2020	ACQUITY UPLC BEH C18 (1.7um, 50 mm, 2.1 mm)	A:Water/0.05%TFA B:Acetonitrile/0.05%TFA	95/5 (0.01 min), 0/100 (1.20 min), 0/100 (1.90 min), 85/5 (2.00 min)	1	45	190-800 nm, PDA total
D	Shimadzu LCMS-2020	Shim-pack XR-ODS (2.2um, 50 mm, 3.0 mm)	A:Water/0.05%TFA B:Acetonitrile/0.05%TFA	95/5 (0.01 min), 35/65 (4.50 min), 35/65 (5.60 min), 95/5 (5.70 min)	1	40	190-800 nm, PDA total
E	Shimadzu LCMS-2020	ACQUITY UPLC BEH C18 (1.7um, 50 mm, 2.1 mm)	A:Water/0.05%TFA B:Acetonitrile/0.05%TFA	95/5 (0.01 min), 0/100 (1.00 min), 0/100 (1.80 min), 85/5 (1.90 min)	1	45	190-800 nm, PDA total
F	Shimadzu LCMS-2020	Ascentis Express C18 (2.7um, 50 mm, 3.0 mm)	A:water/0.1%FA B:Acetonitrile/0.05%FA	90/10 (0.01 min), 0/100 (1.10 min), 0/100 (1.60 min), 90/10 (1.70 min)	1.5	40	190-800 nm, PDA total
G	Shimadzu LCMS-2020	Phenomenex kinetex (2.6um, 50 mm, 3.0 mm)	A:water/0.1%FA B:Acetonitrile/0.05%FA	90/10 (0.01 min), 0/100 (2.00 min), 0/100 (2.70 min), 90/10 (2.80 min)	1.5	40	190-800 nm, PDA total
H	Aquity Ultra Performance	Ascentis Express C18 (2.7um, 50 mm, 2.1 mm)	A:water/0.1%FA B:Acetonitrile/0.05%FA	60/40 (0.01 min), 0/100 (1.40 min), 0/100 (1.40 min), 60/40 (3.0 min)	1	25	190-800 nm, PDA total

[0621] [化26]



[0622] [化27]

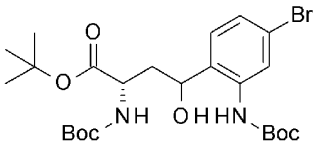


5-ブロモ-2-ヨードアニリン（化合物019、4.90 g、16.5 mmol、COMBI-BLOCKS）と二炭酸ジ-t-ブチル（7.54 g、 41.1 mmol）のテトラヒドロフラン（100 ml）溶液に窒素気流下0 ℃でナトリウムビス(トリメチルシリル)アミド（38 % テトラヒドロフラン溶液、1.9 mol/L、21.6 ml、41.1 mmol）が15分かけて加えられ、0 ℃で30分、室温で18時間攪拌された。反応液が酢酸エチル（300 ml）で希釈され、1M塩酸、飽和重曹水溶液、及び飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥され、減圧濃縮された。得られた残渣が順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル/ヘキサン）にて精製され、化合物020（6.14 g、90%）が得られた。

LCMS (ESI) m/z = 342、344 (M-Bu+H) +

保持時間：0.97分（分析条件H）

[0623] [化28]

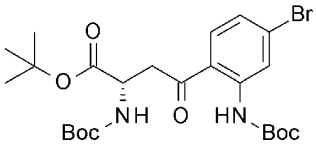


N- t-ブトキシ-(5-ブロモ-2-ヨードフェニル)カルバメート（化合物020、12.0 g、 30.2 mmol）のテトラヒドロフラン（120 ml）溶液に窒素気流下-78 ℃でメチルマグネシウムブロミド（1M、33.2 ml、33.2 mmol）が加えられ、同温度で１時間攪拌された。次いでn-ブチルリチウム（2.5 M、13.3 ml、33.3 mmol）が加えられた後、-78 ℃で2時間攪拌された。この溶液に(2S)-2-[[t-ブトキシカルボニル]アミノ]-4-オキソブタノエート（化合物021、4.20 g、15.4 mmol、Robertsら、Bioorg. Med. Chem. Letters, 13 (2), 265-267 (2003)）のテトラヒドロフラン（15 ml）溶液が-78 ℃で30分かけて加えられ、更に同温度で2時間攪拌された。反応液に１M塩酸が加えられ、酢酸エチルで3回抽出された。集めた有機層が1M塩酸、飽和重曹水溶液、及び飽和食塩水で洗浄後、減圧濃縮された。得られた残渣が順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル/石油エーテル）にて精製され、化合物022（7.50 g、89%）が得られた。

LCMS (ESI)　m/z　=　569 (M+Na) +

保持時間：1.93分（分析条件A）

[0624] [化29]

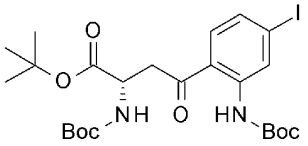


化合物022 (7.50 g、13.8 mmol) のジクロロメタン (100 ml) 溶液に25 ℃でデス-マーチンペルヨージナン (11.7 g、27.6 mmol) が加えられ、2時間攪拌された。反応混合物の酢酸エチル希釈溶液が、チオ硫酸ナトリウム水溶液、炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄され、減圧濃縮された。得られた残渣が順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル/石油エーテル）にて精製され、化合物023 (5.80 g、78%) が得られた。

LCMS (ESI)　m/z　=　565 (M+Na) +

保持時間：1.78分（分析条件A）

[0625] [化30]



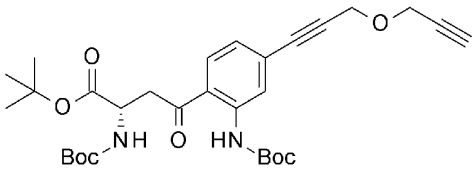
化合物023 (2.50 g、　4.58 mmol)、ヨウ化銅 (I) (438 mg、2.30 mmol)、(1R,2R)-(-)-N,N'-ジメチルシクロヘキサン-1,2-ジアミン (654 mg、4.60 mmol)、ヨウ化ナトリウム (1.40 g、9.34 mmol) のジオキサン (60 ml) 溶液が、窒素雰囲気下120 ℃で16時間攪拌された。減圧濃縮された反応混合液の残渣が順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル/石油エーテル）にて精製され、化合物024 (1.60 g、59%) が得られた。

LCMS (ESI)　m/z　=　613　(M+Na) +

保持時間：1.95分（分析条件B）

[0626]

[化31]

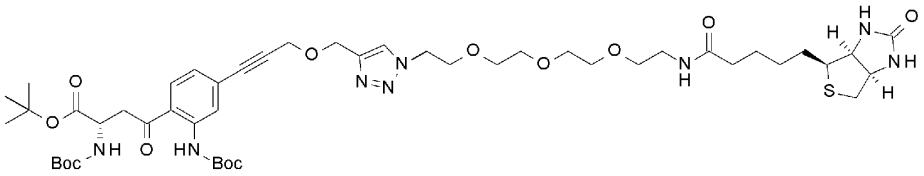


化合物024（1.60 g、2.71 mmol）、テトラキス（トリフェニルホスフィン）パラジウム（627 mg、0.54 mmol）、ヨウ化銅 （103 mg、0.54 mmol）、ビス(2-プロピニル)エーテル（893 mg、9.49 mmol)、トリアチルアミン（960 mg、9.49 mmol）のテトラヒドロフラン（20 ml）溶液が、窒素雰囲気下25 ℃で16時間攪拌された。減圧濃縮された反応混合液の残渣が順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル/石油エーテル）にて精製され、化合物025（700 mg、46%）が得られた。

LCMS (ESI)　m/z　=　579 (M+Na) +

保持時間：2.68分（分析条件B）

[0627] [化32]



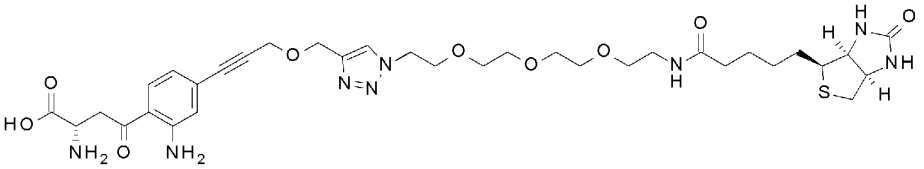
化合物025（60.0 mg、0.11 mmol）、biotin-PEG4-N3（化合物026、60.0 mg、0.13 mmol）、 硫酸銅・５水和物 （10.0 mg、0.040 mmol）、１Mアスコルビン酸ナトリウム水溶液（5滴)、のテトラヒドロフラン（2.0 ml）とt-ブタノール（2.0 ml）混合溶液が、25 ℃で16時間攪拌された。減圧濃縮された反応混合液の残渣が順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（メタノール/ジクロロメタン）にて精製され、化合物027（100 mg、91%）が得られた。

LCMS (ESI)　m/z　=　1001 (M+H) +

保持時間：1.40分（分析条件C）

[0628]

[化33]

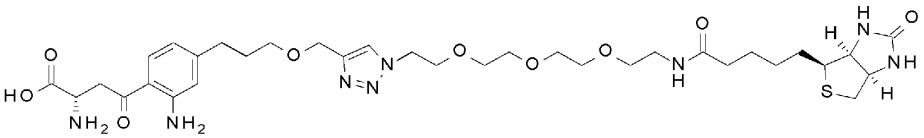


化合物027（100 mg、0.10 mmol）のジクロロメタン（10 ml）溶液にトリフルオロ酢酸（2.0 ml）が加えられ、25 ℃で2時間攪拌された。減圧濃縮された反応混合液の残渣が高速液体クロマトグラフィーにて精製され、化合物028（27.8 mg、37%）が得られた。

LCMS（ESI） m/z = 745（M+H）+

保持時間：2.14分（分析条件D）

[0629] [化34]



化合物027（100 mg、0.10 mmol）、パラジウム/炭素（20 mg）のメタノール（10 ml）溶液に水素ガスが5時間にわたり吹き込まれた。反応混合物をろ過後減圧濃縮し、残渣のジクロロメタン（10 ml）溶液にトリフルオロ酢酸（1.0 ml）が加えられ、25 ℃で1時間攪拌された。減圧濃縮された反応混合液の残渣が高速液体クロマトグラフィーにて精製され、化合物029（13.5 mg、18%）が得られた。

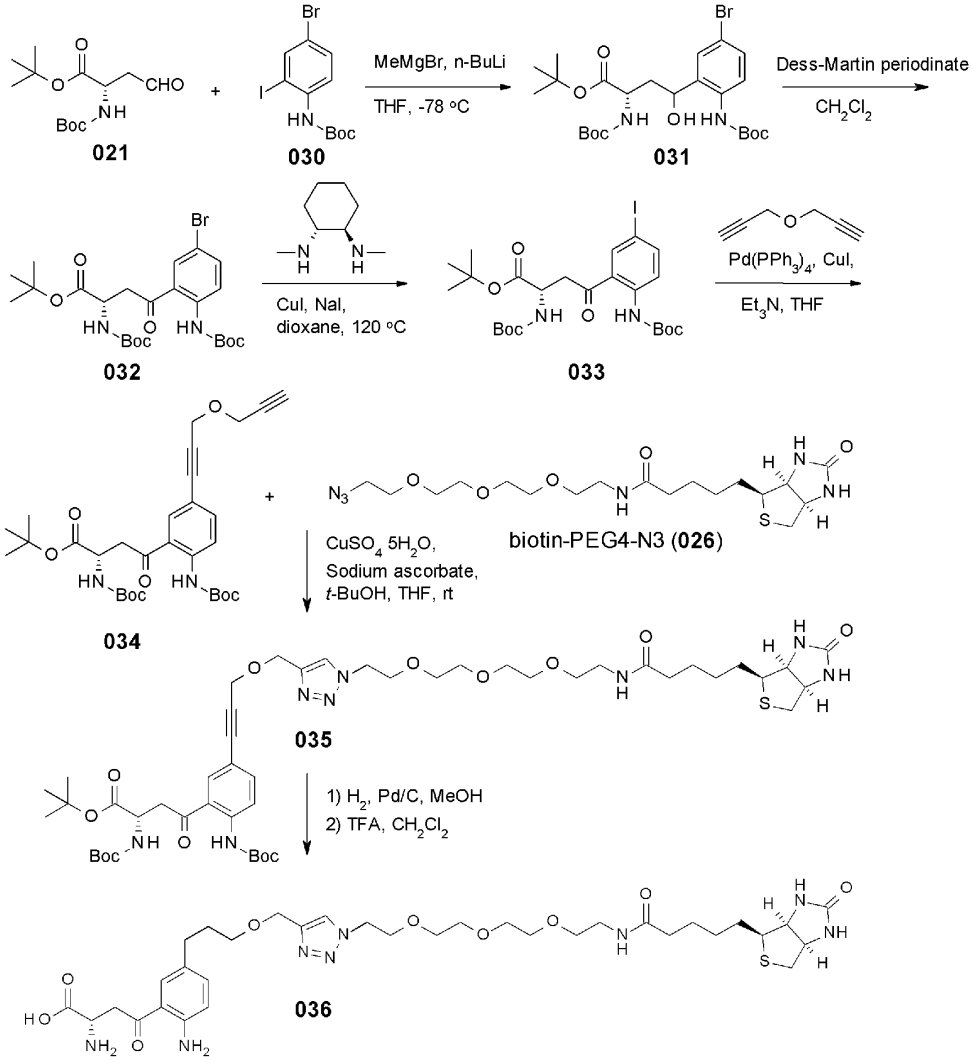
LCMS（ESI） m/z = 749（M+H）+

保持時間：1.20分（分析条件B）

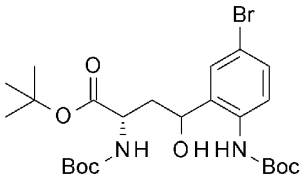
[0630] （９－３－２）キヌレニンの5位にリンカーを取り付けたビオチン化合物の合成

以下に記載される方法により、ビオチン化キヌレニン化合物036を調製することができる。

[化35]



[0631] [化36]



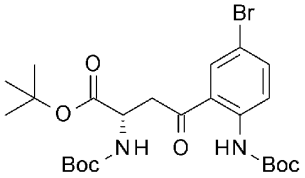
N- t-ブトキシ-（4-ブロモ-2-ヨードフェニル）カルバメート（Wensboら、Tetrahedron, 51 (37), 10323-10342 (1995)）（化合物030、7.50 g、18.8 mmol）のテトラヒドロフラン（80 ml）溶液に窒素気流下-78 ℃でメチルマグネ

シウムブロミド（1M、20 ml、20 mmol）が加えられ、同温度で20分攪拌された。次いでn-ブチルリチウム（2.5 M、10 ml、25 mmol）が加えられた後、-78 ℃で30分攪拌された。この溶液に(2S)-2-[[t-ブトキシカルボニル]アミノ]-4-オキソブタノエート（化合物021、2.57 g、9.40 mmol）のテトラヒドロフラン（20 ml）溶液が-78 ℃で30分かけて加えられ、更に同温度で1時間攪拌された。反応液に1M塩酸が加えられ、酢酸エチルで3回抽出された。集めた有機層が1M塩酸、飽和重曹水溶液、及び飽和食塩水で洗浄、硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮された。得られた残渣が順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル/石油エーテル）にて精製され、化合物031（4.56 g、89%）が得られた。

LCMS (ESI)　m/z　=　569 (M+Na) +

保持時間：1.78分（分析条件A）

[0632] [化37]



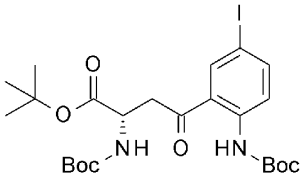
化合物031（4.56 g、8.36 mmol）のジクロロメタン（100 ml）溶液に25 ℃でデス-マーチンペルヨージナン（8.89 g、21.0 mmol）が加えられ、3時間攪拌された。反応混合物にチオ硫酸ナトリウム水溶液が加えられた後、ジクロロメタンで3度抽出された。合わせた有機層が炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄された後、硫酸ナトリウムで乾燥、減圧濃縮された。得られた残渣が順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル/石油エーテル）にて精製され、化合物032（3.60 g、79%）が得られた。

LCMS (ESI)　m/z　=　567 (M+H) +

保持時間：1.90分（分析条件E）

[0633]

[化38]

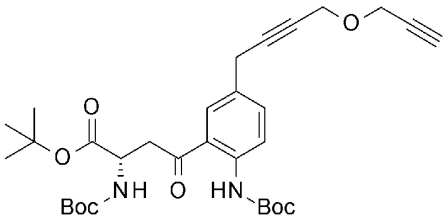


化合物032（3.60 g、6.62 mmol）、ヨウ化銅（I）（650 mg、3.41 mmol）、(1R,2R)-(-)-N,N'-ジメチルシクロヘキサン-1,2-ジアミン（940 mg、6.61 mmol）、ヨウ化ナトリウム（1.98 g、13.2 mmol）のジオキサン（60 ml）溶液が、窒素雰囲気下120℃で16時間攪拌された。減圧濃縮された反応混合液の残渣が順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル/石油エーテル）にて精製され、化合物033（3.10 g、79%）が得られた。

LCMS（ESI） m/z = 613（M+Na）+

保持時間：1.33分（分析条件E）

[0634] [化39]



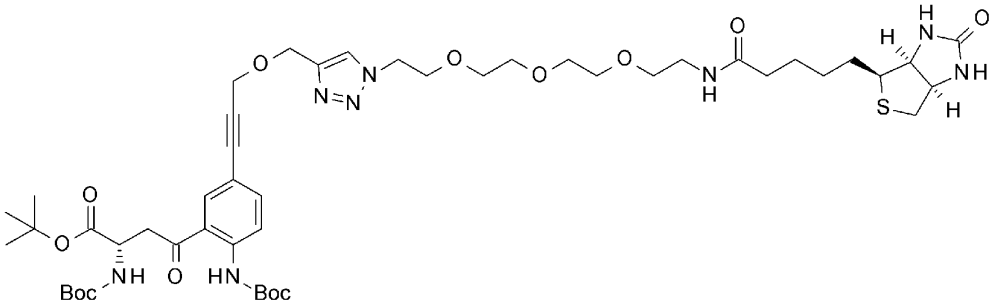
化合物033（3.10 g、5.25 mmol）、テトラキス（トリフェニルホスフィン）パラジウム（1.21 g、1.05 mmol）、 ヨウ化銅 （200 mg、1.05 mmol）、ビス(2-プロピニル)エーテル（1.73 mg、18.4 mmol)、トリアチルアミン（1.86 g、18.4 mmol）のテトラヒドロフラン（20 ml）溶液が、窒素雰囲気下25 ℃で16時間攪拌された。減圧濃縮された反応混合液の残渣が順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル/石油エーテル）にて精製され、化合物034（1.00 g、34%）が得られた。

LCMS（ESI） m/z = 579（M+Na）+

保持時間：1.28分（分析条件E）

[0635]

[化40]

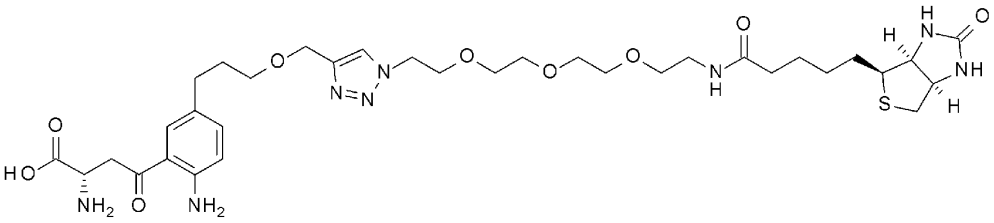


化合物034（90.0 mg、0.20 mmol）、biotin-PEG4-N3（化合物026、90.0 mg、0.16 mmol）、 硫酸銅・5水和物 （10 mg、0.040 mmol）、１Mアスコルビン酸ナトリウム水溶液（10滴)、のテトラヒドロフラン（2 ml）とt-ブタノール（2 ml）混合溶液が、25 ℃で16時間攪拌された。減圧濃縮された反応混合液の残渣が順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー（メタノール/ジクロロメタン）にて精製され、化合物035（155 mg、76%）が得られた。

LCMS (ESI)　m/z　＝　1001 (M+H) +

保持時間：1.13分（分析条件F）

[0636] [化41]



化合物035（85.0 mg、0.080 mmol）、パラジウム/炭素（10 mg）のメタノール（10 ml）溶液に水素ガスが4時間にわたり吹き込まれた。反応混合物をろ過後減圧濃縮し、残渣のジクロロメタン（5.0 ml）溶液にトリフルオロ酢酸（1.0 ml）が加えられ、25 ℃で1時間攪拌された。減圧濃縮された反応混合液の残渣が高速液体クロマトグラフィーにて精製され、化合物036（18.9 mg、31.6%）が得られた。

LCMS (ESI)　m/z　＝　749 (M+H) +

保持時間：0.70分（分析条件G）

[0637] （９－４）重鎖および軽鎖可変領域ファージディスプレイライブラリを用いたキヌレニンに結合する抗体集団の取得

実施例（９－２－１）および（９－２－２）で設計、構築された重鎖、軽鎖可変領域それぞれのファージディスプレイライブラリから、キヌレニンに特異的に結合する抗体集団を取得するために、実施例（９－３）で合成されたビオチン化キヌレニンに対するパンニングが実施された。このために、まず抗体ファージディスプレイライブラリをビオチン化キヌレニン非存在下で磁気ビーズと接触させ、ビオチン化キヌレニン非存在下でも磁気ビーズに対して結合活性を有する抗体を提示しているファージが除去された。それに続き、ビオチン化キヌレニンの存在する条件下で同様にパンニングを行うことによって、ビオチン化キヌレニンに対して特異的な結合活性を有する抗体のスクリーニングが実施された。

[0638] 構築されたファージディスプレイファージミドベクターを保持する大腸菌に対して、M13KO7ΔpIII（ハイパーファージと呼称される）（PROGEN Biotechnik）を感染させ、30℃で一晩培養した上清からファージが回収された。ファージ産生が行われた大腸菌の培養液に2.5M 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抗体多価提示ファージライブラリ液が調製された。次に、当該ファージライブラリ液に終濃度4%となるようにBSAが添加された。磁気ビーズに固定化された抗原を用いてパンニングが実施された。磁気ビーズとして、NeutrAvidin coated beads (Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) もしくはStreptavidin coated beads (Dynabeads MyOne StreptAvidin T1) が用いられた。

[0639] パンニングでは、ネガティブセレクション法を利用したキヌレニンに特異的に結合するファージの回収が行われた。実施例（９－３）で合成された３種類のビオチン化キヌレニン（化合物028、029、および036）に対して、それぞれ別々にパンニングが実施された。具体的には、BSAでブロッキングされた磁気ビーズ（Dynabeads MyOne StreptAvidin T1）に調製されたファージライブラリ液0.8 mLを加え、室温で30分間結合させた。その後、4℃で30分間結合

させた。磁気スタンドを用いてビーズを分離することによって、ビーズに結合しないファージが回収された。この作業が再度繰り返された。別途準備されたBSAでブロッキングされた磁気ビーズ（Dynabeads MyOne StreptAvidin T1）と6 nmolのビオチン化キヌレニンを室温で30分間反応させることによって、磁気ビーズに対してビオチン化キヌレニンが固相化された。TBSTで3回洗浄されたビオチン化キヌレニンが固相化された磁気ビーズに、回収されたファージを加えることによって、ファージライブラリを室温で30分間ビオチン化キヌレニンと接触させた。その後、4℃で30分間接触させた。ビーズは1 mLの氷冷されたTBSTにて2回、氷冷されたTBSにて1回洗浄された。その後最終濃度1mg/mLのトリプシン入りのTBS 0.5 mLが加えられたビーズが室温で15分懸濁された後、即座に磁気スタンドを用いて分離されたビーズからファージ溶液が回収された。トリプシン溶液で溶出されたファージが、対数増殖期（OD600が0.4-0.7）となった60 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3枚へ播種された。次に、播種された大腸菌の培養液に対してハイパーファージを感染させ、30℃で一晩培養することによって、抗体多価提示ファージライブラリ液が回収された。

[0640] 2回目のパンニングでは、1回目と同様に、ネガティブセレクション法を利用したキヌレニンに特異的に結合するファージの回収が、3種類のビオチン化キヌレニンに対して別々に実施された。具体的には、まず磁気ビーズ（Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated）が、5 mg/mLのStreptAvidin recombinant(Roche) 5 μLが添加された2%スキムミルク-TBSでブロッキングされた。TBSTで3回洗浄された磁気ビーズに、4% BSAでブロッキングされたファージライブラリ液0.8 mLを加え、室温で30分間結合させた。磁気スタンドを用いてビーズを分離することによって、ビーズに結合しないファージが回収された。この作業が再度繰り返された。別途準備された5 mg/mLのStreptAvidin recombinant(Roche) 5 μLが添加された2%スキムミルク-TBSでブロッキングされ

た磁気ビーズ（Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated）と10 nmolのビオチン化キヌレニンを室温で30分間、4℃で30分間反応させることによって、磁気ビーズに対してビオチン化キヌレニンが固相化された。TBSTで3回洗浄されたビオチン化キヌレニンが固相化された磁気ビーズに、回収されたファージを加えることによって、ファージライブラリを室温で30分間ビオチン化キヌレニンと接触させた。その後、4℃で30分間接触させた。ビーズは1 mLの氷冷されたTBSTにて3回、氷冷されたTBSにて2回洗浄された。その後最終濃度1mg/mLのトリプシン入りのTBS 0.5 mLが加えられたビーズが室温で15分懸濁された後、即座に磁気スタンドを用いて分離されたビーズからファージ溶液が回収された。トリプシン溶液で溶出されたファージ 0.5 mLのうち50 μLが、対数増殖期（OD600が0.4-0.7）となった60 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3枚へ播種された。

[0641] （９－４－２）ファージELISAによるビオチン化キヌレニンに対する結合活性の評価

実施例（９－４－１）で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）に倣い、ファージ含有培養上清が回収された。ヘルパーファージとしてハイパーファージを用いることで、抗体多価提示ファージが回収され、ELISAに供された。StreptaWell 96マイクロタイタープレート（Roche）が３種類のビオチン化キヌレニン（化合物028、029および036を等量ずつ混合）を含む80 μLのTBSにて1時間以上コートされた。当該プレートの各ウェルをTBSTにて洗浄することによってStreptAvidinに結合していないビオチン化キヌレニンが除かれた後、当該ウェルが250 μLの2%スキムミルク-TBSにて1時間以上ブロッキングされた。2%スキムミルク-TBSを除き、その後、各ウェルに調製された精製ファージが加えられた当該プレートを室温で1時間静置することによって、ファージを提示する抗体を各ウェルに存在するビオチン化キヌレニンに結合させた。TBSTにて洗浄された各ウ

エルに、TBSによって希釈されたHRP結合抗M13抗体（Amersham Pharmacia Biotech）が添加されたプレートを１時間インキュベートさせた。TBSTにて洗浄後、TMB single溶液（ZYMED）が添加された各ウェル中の溶液の発色反応が硫酸の添加により停止された後、450 nmの吸光度によって当該発色が測定された。その結果、ビオチン化キヌレニンに対して結合する抗体が複数確認された。ファージELISAの結果を表３２に示した。

[0642] [表32]

Library	重鎖ライブラリ			軽鎖ライブラリ		
パンニングプローブ	化合物028	化合物029	化合物036	化合物028	化合物029	化合物036
パンニング回数	2	2	2	2	2	2
ELISA実施クローン数	96	96	96	96	96	96
陽性クローン数（吸光度＞0.2）	23	17	33	30	17	63
陽性クローン配列数	23	17	33	30	17	63

[0643] （９－４－３）ビオチン化キヌレニン結合抗体の配列解析

実施例（９－４－２）で示されるファージELISAの結果、キヌレニンに対して特異的な結合活性があると判断されたクローンから、特異的なプライマー（配列番号：７９及び８０）を用いて増幅された遺伝子の塩基配列が解析された。解析の結果、キヌレニンに対して結合活性を有すると判断されたクローンの配列はそれぞれ独立であった。

[0644] （９－５）キヌレニンに対するパンニングを利用したキヌレニンスイッチ抗体取得用ライブラリの構築

重鎖、軽鎖可変領域ファージディスプレイライブラリそれぞれから取得された抗原(キヌレニン)に対する結合ファージは、キヌレニンへの結合能を有する集団であるため、その両者の組み合わせにより作製されるFab提示ファージライブラリにはスイッチとなるキヌレニン結合を維持しているクローンが多数含まれることが予想され、より効率良くキヌレニンスイッチ抗体を取得できるライブラリが作製できると考えられた。

[0645] 実施例（９－４）で取得された重鎖、軽鎖それぞれのファージライブラリが感染した大腸菌から当業者公知の方法で遺伝子が抽出された。重鎖においては、取得された遺伝子の集合体（重鎖可変領域ライブラリ）を鋳型として用いて重鎖可変領域をそれぞれ増幅させることが可能なプライマー（配列番

号：９８および９９）によって遺伝子ライブラリが増幅された。軽鎖においては、取得された遺伝子の集合体（軽鎖可変領域ライブラリ）からF02h011/F02l098の重鎖可変領域配列（ライブラリ鋳型配列：配列番号：９５）を制限酵素処理により抜き取り、軽鎖可変領域ライブラリ遺伝子、ヒトIgG由来軽鎖定常領域配列およびヒトIgG由来CH1配列を含むファージミドベクターが調製された。調製された軽鎖可変領域ライブラリ遺伝子を含むファージミドベクターに重鎖可変領域ライブラリ遺伝子を挿入することで、ヒト抗体重鎖/軽鎖可変領域ライブラリ遺伝子が導入されたファージミドベクターが構築された。このファージミドベクターをエレクトロポレーションにより大腸菌へと導入することで、ヒト抗体可変領域－定常領域よりなるFabドメインを提示し、キヌレニンをスイッチとして抗原に結合できる抗体を取得できるようなデザインライブラリが構築された。このように多様なキヌレニン結合活性を有するH鎖およびL鎖から構成されたデザインライブラリは、任意の抗原に対するキヌレニンスイッチ抗体を効率よく取得できるヒト抗体が含まれるライブラリとして有用であると考えられる。また、実施例（７－６）で示されるように、6RNMSC1-2_F02はキヌレニンのみならず、その代謝物である3－ヒドロキシキヌレニンや、３－ヒドロキシ-DL-キヌレニンおよびRO0635389-000-001、RO0635390-000-001といったキヌレニン誘導体にも結合することから、本ライブラリはキヌレニン、キヌレニン代謝物、キヌレニン誘導体のうちいずれか一つ以上の低分子の有無によって任意の標的抗原に対する結合活性が変化するスイッチ抗体を取得するのに有用であると考えられる。

[0646] 実施例（９－６）ファージELISAによる、ライブラリに含まれるクローンのキヌレニン結合能の評価

実施例（９－５）で構築されたライブラリはキヌレニンに対するパンニングを経て作製されているため、そのライブラリ中にはキヌレニンに対する結合能を有するクローンが多く含まれていることが予想された。構築したライブラリから得られたファージクローンのビオチン化キヌレニンに対する結合評価が、ファージELISAによって実施された。

[0647] 構築されたライブラリ遺伝子を有する大腸菌のシングルコロニーから、常法（Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145）に倣い、ファージの培養が行われた。ヘルパーファージとしてハイパーファージを用いることで、抗体多価提示ファージ含有培養上清が回収された。NucleoFast96（MACHERY-NAGEL）を用いて、回収されたファージ培養上清が限外濾過された。培養上清各200 μLがNucleoFast96の各ウェルにアプライされ、6,000 g、 45分間遠心分離を行いフロースルーが除去された。H_2O 200 μLを加え、6,000 g、30分間遠心分離による洗浄が行われた。その後、TBS 200 μLを加え、室温で5分間静置した後、上清に含まれるファージ液が回収された。

[0648] TBSが加えられた精製ファージが、実施例（９－４－１）で用いた方法と同様の方法でELISAに供された。その結果、ビオチン化キヌレニンに対して結合する抗体が複数確認された。解析したプライマリーライブラリ由来のファージクローンのうち、約49%がキヌレニン結合能を示した。ファージELISAの結果を表３３に示した。

[0649] [表33]

ELISA実施クローン数	192
陽性クローン数（吸光度＞0.2）	94
陽性クローン割合	48.96%

[0650] 〔実施例１０〕非生体由来低分子をスイッチとする抗原結合タンパク質の評価

ATP、アデノシンに対して結合する抗体ATNLSA1-4_D12より構築されたライブラリから取得された、ATPまたはアデノシン存在下においてヒトIL-6レセプター（hIL-6R）に対して結合能を示す抗体（後述の参考実施例３）について、非生体由来低分子存在下でのヒトIL-6レセプターに対する結合能について評価を行った。

[0651] （１０－１）ライブラリから取得されたATP/アデノシンスイッチ抗体の調製

後述の参考実施例３で取得された、ATPもしくはアデノシン存在下でビオチン標識hIL-6Rに対する結合活性を有すると判断されたクローン6RAD2C1-4_001、6RAD2C1-4_005、6RAD2C1-4_011、6RAD2C1-4_026、6RAD2C1-4_030、6RAD2C1

-4_042、6RAD2C1-4_076、6RDL3C1-4_085、6RDL3C5-4_011の重鎖および軽鎖の可変領域配列は、重鎖抗体定常領域（配列番号：４６）もしくは軽鎖Lambda定常領域配列（配列番号：１００）を有するヒトIgG1/Lambdaの動物発現用プラスミドへそれぞれ挿入された。以下の方法を用いて抗体が発現された。FreeStyle 293 Expression Medium培地（Invitrogen）に1.33 x 10^6細胞/mLの細胞密度で懸濁されて、6well plateの各ウェルへ3 mLずつ播種されたヒト胎児腎細胞由来FreeStyle 293-F株（Invitrogen）に対して、調製されたプラスミドがリポフェクション法により導入された。CO_2インキュベーター（37℃、8%CO_2, 90 rpm）で4日間培養された培養上清から、rProtein A SepharoseTM Fast Flow（Amersham Biosciences）を用いて当業者公知の方法で抗体が精製された。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。得られた測定値からPACE法により算出された吸光係数を用いて精製された抗体の濃度が算出された（Protein Science（1995）4, 2411-2423）。

[0652] （１０－２）表面プラズモン共鳴によるヒトIL-6レセプターに対する結合の各種低分子の影響の評価

Biacore T200（GE Healthcare）を用いて、ライブラリから取得されたATP/アデノシン依存性抗体9クローン（6RAD2C1-4_001、6RAD2C1-4_005、6RAD2C1-4_011、6RAD2C1-4_026、6RAD2C1-4_030、6RAD2C1-4_042、6RAD2C1-4_076、6RDL3C1-4_085、6RDL3C5-4_011）とhIL-6Rとの抗原抗体反応における各種低分子の影響が評価された。ランニングバッファーとして、20 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05%（w/v）Tween20、pH7.4が用いられ、25 ℃で測定された。センサーチップCM5上にアミンカップリングによりhIL-6Rを固定化し、抗体をアナライトとして120 秒間相互作用させ、その結合量の変化が観察された。抗体の希釈は、ランニングバッファー及びランニングバッファーにATP、ADP、AMP、cAMP、またはアデノシン(ADO)のいずれかがそれぞれ添加されたバッファーが使用され、各低分子の終濃度が1 mM、抗体の終濃度が1 μMになるように調製された。また、1 mM ATP条件下では、数段階の抗体の濃度系列を測定し、抗体濃度に対する平衡値のプロットから、各クローンのhIL-6Rに対す

る解離定数K_D（mol/L）が算出された。パラメーターの算出には Biacore T200 Evaluation Software（GE Healthcare）が用いられた。1 mM ATP存在下での各クローンの解離定数K_Dを表３４に示した。

[0653] [表34]

クローン名	解離定数K_D（mol/L）
6RAD2C1-4_01	3.0E-07
6RAD2C1-4_05	3.4E-07
6RAD2C1-4_11	2.3E-07
6RAD2C1-4_26	2.1E-07
6RAD2C1-4_30	3.3E-07
6RAD2C1-4_42	2.5E-07
6RAD2C1-4_76	2.5E-07
6RDL3C1-4_85	3.9E-07
6RDL3C5-4_11	1.3E-07

[0654] この測定で取得された1 mM の各低分子存在下、または非存在下における各クローンのhIL-6Rに対する結合量を図３７に示した。図３７に示されたように、各クローンは1 mM ATP存在下ではhIL-6Rに結合するが、ATP非存在下ではhIL-6Rに対する結合が観察されなかった。このことから、ATPをスイッチとしてhIL-6Rに結合する性質を有することが確認された。ATP以外の低分子においては、全クローンにおいてADP存在下で結合が観察され、一部のクローンにおいてAMP及びcAMP存在下での結合も観察された。ADO（アデノシン）存在下ではhIL-6Rへの結合は観察されなかった。

[0655] （１０－３）OctetによるヒトIL-6レセプターに対する結合の各種低分子の影響の評価

Octet（PRIMETECH）を用いて、ライブラリから取得されたATP/アデノシン依存性抗体9クローン（6RAD2C1-4_001、6RAD2C1-4_005、6RAD2C1-4_011、6RAD2C1-4_026、6RAD2C1-4_030、6RAD2C1-4_042、6RAD2C1-4_076、6RDL3C1-4_085、6RDL3C5-4_011）とhIL-6Rとの抗原抗体反応における各種低分子の影響が評価された。測定バッファーとして、TBS、pH7.4が用いられ、30 ℃で測定された。ストレプトアビジンセンサーチップ上に、ビオチン化hIL-6Rを固定化

し、抗体を相互作用させ、その結合量の変化が観察された。抗体の希釈は、測定バッファー及び測定バッファーにATP、ADP、AMP、cAMP、ADOもしくはATP-gamma-Sのいずれかがそれぞれ添加されたバッファーが使用され、各低分子の終濃度が1 mM、抗体の終濃度が10μg/mLになるように調製された。

[0656] この測定で取得された1 mM の各低分子存在下、または非存在下における各クローンのhIL-6Rに対する結合性を評価した結果、全てのクローンにおいて、1 mM ATP存在下でhIL-6Rに結合することが確認され、ATP非存在下ではhIL-6Rに対する結合が観察されなかった。このことから、ATPをスイッチとしてhIL-6Rに結合する性質を有することがOctetでも確認された。また全てのクローンにおいてATP-gamma-S存在下での結合も観察された。評価で得られたATPあるいはATP-gamma-S 1mM存在下もしくは非存在下のIL6Rへの結合量は図３８に示した。以上のことからATPと誘導体（生体外分子）がスイッチとして機能する、hIL-6R結合抗体がライブラリから取得可能であることが示された。

[0657] 〔実施例１１〕キヌレニンに対するパンニングを利用したキヌレニンスイッチ抗体取得用ライブラリ（キヌレニンライブラリVer.A）からの、キヌレニン存在下においてヒトIL-6レセプターに結合する抗体の取得

（１１－１）抗体ライブラリからのキヌレニン存在下でヒトIL-6レセプターに結合活性を示し、キヌレニン非存在下において結合を示さない抗体の取得

実施例9で構築された、キヌレニンに対するパンニングを利用したキヌレニンスイッチ抗体取得用ファージディスプレイライブラリ（キヌレニンライブラリVer.Aと呼称する）から、キヌレニン存在下でヒトIL-6レセプター(hIL-6R)に対する結合活性を示す抗体がスクリーニングされた。すなわち、ビーズにキャプチャーされたhIL-6Rに対してキヌレニン存在下で結合活性を示し、キヌレニン非存在下の条件ではビーズから溶出されるような抗体を提示しているファージが回収された。本取得方法では、抗原としてビオチン標識されたhIL-6Rが用いられた。

[0658] 構築されたファージディスプレイファージミドベクターを保持する大腸菌に対して、M13K07ΔpIII（ハイパーファージと呼称される）（PROGEN Biotec

hnik）を感染させ、30℃で一晩培養した上清からファージが回収された。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、抗体多価提示ファージライブラリ液が調製された。次に、当該ファージライブラリ液に終濃度4%となるようにBSAが添加された。磁気ビーズに固定化された抗原を用いたパンニングが実施された。磁気ビーズとして、NeutrAvidin coated beads（Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated）もしくはStreptavidin coated beads（Dynabeads MyOne Streptavidin T1）が用いられた。

[0659] 1回目のパンニングではキヌレニン存在下でのみ抗原に対して結合可能な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0.5 mLに250 pmolのビオチン標識抗原とともに終濃度500 μMのキヌレニンを加えることによって、ファージライブラリを室温で15分間抗原及びキヌレニンと接触させた。その後、4℃で45分間接触させた。BSAでブロッキングされた磁気ビーズ（Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated）が加えられ、抗原とファージとの複合体を磁気ビーズと4℃で15分間結合させた。ビーズは0.5 mLの氷冷されたキヌレニン/TBSTにて2回、氷冷されたキヌレニン/TBSにて1回洗浄された。その後0.25 mLの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分離されたビーズからファージ溶液が回収された。この作業が再度繰り返された後、2回に分けて溶出されたファージ液が混合された。回収されたファージ溶液に100 mg/mLのトリプシン5 μLを加えることによってFabが切断され、トリプシン処理されたファージの大腸菌に対する感染能が改善された。トリプシン処理されたファージが、対数増殖期（OD600が0.4-0.7）となった10 mLの大腸菌株ER2738に添加された。37℃で1時間緩やかに上記大腸菌の攪拌培養を行うことによって、ファージを大腸菌に感染させた。感染させた大腸菌は225 mm x 225 mmのプレートへ播種された。次に、播種された大腸菌の培養液に対してハイパーファージを感染させ、30℃で一晩培養した上清からファージを回収することによって、抗体多価提示ファージライブラリ液が調製された。

[0660] 2回目のパンニングでは、調製したファージライブラリ液0.4 mLに250 pmolのビオチン標識抗原とともに終濃度500 μMのキヌレニンを加えることによって、ファージライブラリを室温で60分間抗原及びキヌレニンと接触させた。BSAでブロッキングされた磁気ビーズ（Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated）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0.5 mLのキヌレニン/TBSTにて2回、キヌレニン/TBSにて1回洗浄された。その後0.25 mLの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分離されたビーズからファージ溶液が回収された。この作業が再度繰り返された後、2回に分けて溶出されたファージ液が混合された。回収されたファージ溶液に100 mg/mLのトリプシン5 μLを加えることによってFabが切断され、トリプシン処理されたファージの大腸菌に対する感染能が改善された。トリプシン処理されたファージが、対数増殖期（OD600が0.4-0.7）となった20 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に対してハイパーファージを感染させ、30℃で一晩培養した上清からファージを回収することによって、抗体多価提示ファージライブラリ液が調製された。

[0661] 3回目のパンニングでは、調製したファージライブラリ液0.2 mLに100 pmolのビオチン標識抗原とともに終濃度500 μMのキヌレニンを加えることによって、ファージライブラリを室温で60分間抗原及びキヌレニンと接触させた。BSAでブロッキングされた磁気ビーズ（Dynabeads MyOne Streptavidin T1）が加えられ、抗原とファージとの複合体を磁気ビーズと4℃で30分間結合させた。ビーズは0.4 mLのキヌレニン/TBSTにて3回、キヌレニン/TBSにて2回洗浄された。その後0.25 mLの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分離されたビーズからファージ溶液が回収された。この作業が再度繰り返された後、2回に分けて溶出されたファージ液が混合された。回収されたファージ溶液に100 mg/mLのトリプシン5 μLを加えること

によってFabが切断され、トリプシン処理されたファージの大腸菌に対する感染能が改善された。トリプシン処理されたファージが、対数増殖期（OD600が0.4-0.7）となった20 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に対してハイパーファージを感染させ、30℃で一晩培養した上清からファージを回収することによって、抗体多価提示ファージライブラリ液が調製された。

[0662] 4回目のパンニングでは、3回目のパンニングと同様の条件によるパンニングが実施された。

[0663] （１１－２）ネガティブセレクション法を利用した抗体ライブラリからのキヌレニン存在下においてhIL-6Rに結合する抗体の取得

実施例9で構築されたキヌレニンライブラリVer.Aから、抗原に対してキヌレニンが存在する条件下で抗原に対する結合活性を示す抗体のスクリーニングが行われた。スクリーニングのために、まず抗体ファージディスプレイライブラリを、キヌレニン非存在下でビオチン標識抗原－ストレプトアビジンと接触させ、キヌレニン非存在下でも抗原に対して結合活性を有する抗体を提示しているファージが除去された。それに続き、キヌレニンの存在する条件下で同様にパンニングを行うことによって、キヌレニンが存在する条件下でのみ抗原に対して結合活性を有する抗体のスクリーニングが実施された。

[0664] 構築されたファージディスプレイファージミドベクターを保持する大腸菌に対して、M13KO7ΔpIII（ハイパーファージと呼称される）（PROGEN Biotechnik）を感染させ、30℃で一晩培養した上清からファージが回収された。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、抗体多価提示ファージライブラリ液が調製された。次に、当該ファージライブラリ液に終濃度4%となるようにBSAが添加された。磁気ビーズに固定化された抗原を用いたパンニングが実施された。磁気ビーズとして、NeutrAvidin coated

beads (Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) もしくはStreptavidin coated beads (Dynabeads MyOne Streptavidin T1) が用いられた。

[0665] 1回目のパンニングでは、ネガティブセレクション法を利用したキヌレニン存在下でのみ抗原に対して結合可能なファージの濃縮が行われた。具体的には、BSAでブロッキングされたSera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coatedに500 pmolのビオチン化抗原を加え、室温で15分間結合させた。TBSで3回洗浄されたビーズに対して、BSAにてブロッキングが行われたファージライブラリ液0.5 mLを加え室温にて1時間結合させた。磁気スタンドを用いてビーズを分離することによって、抗原およびビーズに結合しないファージが回収された。回収されたファージに対して、250 pmolのビオチン標識抗原ならびに終濃度500 μMのキヌレニンを加えることによって、ファージライブラリを室温で15分間抗原ならびにキヌレニンと接触させた。その後、4℃で45分間接触させた。次に、当該標識抗原ならびにキヌレニンとファージライブラリとの混合液にBSAでブロッキングされた磁気ビーズを加え、4℃で15分間、抗原とファージとの複合体を磁気ビーズと結合させた。ビーズは0.5 mLの氷冷されたキヌレニン /TBSTにて2回、氷冷されたキヌレニン /TBSにて1回洗浄された。その後1 mg/mLのTrypsin溶液0.5 mLが当該混合液に加えられた。当該混合液は室温で15分間攪拌された後、磁気スタンドを使用して分離されたビーズからファージが回収された。回収されたファージは、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に対して、ハイパーファージを感染させ、30℃で一晩培養した上清からファージを回収することによって、抗体多価提示ファージライブラリ液が調製された。

[0666] 2回目以降のパンニングでは、キヌレニン存在下でのみ抗原に対して結合可能なファージの濃縮が行われた。具体的には、実施例（１１－１）に示された2回目以降のパンニング方法と同様の方法で、4回目のパンニングまで実施

された。

[0667] （１１－３）スイッチとなる分子に対するパンニングを利用した抗体ライブラリからのキヌレニン存在下においてhIL-6Rに結合する抗体の取得

実施例9で構築されたキヌレニンライブラリVer.Aから、抗原に対してキヌレニンが存在する条件下で抗原に対する結合活性を示す抗体のスクリーニングが行われた。スクリーニングのために、まずビオチン化キヌレニン（化合物028、029および036）に対してパンニングを行い、キヌレニンに対して結合活性を有する抗体を提示しているファージが回収された。それに続き、キヌレニン存在下でビオチン標識抗原に対するパンニングを行うことによって、キヌレニンが存在する条件下で抗原に対して結合活性を有する抗体のスクリーニングが実施された。

[0668] 構築されたファージディスプレイファージミドベクターを保持する大腸菌に対して、M13KO7ΔpIII（ハイパーファージと呼称される）（PROGEN Biotechnik）を感染させ、30℃で一晩培養した上清からファージが回収された。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、抗体多価提示ファージライブラリ液が調製された。次に、当該ファージライブラリ液に終濃度4%となるようにBSAが添加された。磁気ビーズに固定化された抗原を用いたパンニングが実施された。磁気ビーズとして、NeutrAvidin coated beads (Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) もしくはStreptavidin coated beads (Dynabeads MyOne Streptavidin T1) が用いられた。

[0669] 1回目のパンニングでは、ビオチン化キヌレニン（化合物028、029および036の混合物）に対して結合可能なファージの濃縮が行われた。具体的には、BSAでブロッキングされたビーズ (Dynabeads MyOne Streptavidin T1) に化合物028、029および036を等量ずつ混合したビオチン化キヌレニン混合物4000 pmolを加え、室温で30分間結合させた。TBSで3回洗浄されたビーズに対して、BSAにてブロッキングが行われたファージライブラリ液0.8 mLを加え、室温で30分間ビオチン化キヌレニンと接触させた。その後、4℃で30分間接触させた

。ビーズは1 mLの氷冷されたTBSTにて3回、氷冷されたTBSにて2回洗浄された。その後、1 mg/mLのトリプシン溶液0.5 mLが当該混合液に加えられた。当該混合液は室温で15分懸濁された後、即座に磁気スタンドを用いて分離されたビーズからファージ溶液が回収された。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100 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5枚へ播種された。次に、播種された大腸菌の培養液に対してハイパーファージを感染させ、30℃で一晩培養した上清からファージを回収することによって、抗体多価提示ファージライブラリ液が調製された。

[0670] 2回目以降のパンニングでは、キヌレニン存在下でのみ抗原に対して結合可能なファージの濃縮が行われた。具体的には、実施例（１１－１）に示された2回目以降のパンニング方法と同様の方法で、4回目のパンニングまで実施された。

[0671] （１１－４）ファージELISAによるキヌレニン存在下における結合活性の評価

（１１－１）、（１１－２）、（１１－３）で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）に倣い、ファージの培養が行われた。ヘルパーファージとしてハイパーファージを用いることで、抗体多価提示ファージ含有培養上清が回収された。NucleoFast96 (MACHERY-NAGEL)を用いて、回収されたファージ培養上清が限外濾過された。培養上清各200 μLがNucleoFast96の各ウェルにアプライされ、6,000 g、45分間遠心分離を行いフロースルーが除去された。H_2O 200 μLを加え、6,000 g、30分間遠心分離による洗浄が行われた。その後、TBS 200 μLを加え、室温で5分間静置した後、上清に含まれるファージ液が回収された。

[0672] TBSまたは500 μM キヌレニン/TBSが加えられた精製ファージが以下の手順で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hIL-6Rを含む100 μLのTBSにて1時間以上コートされた。当該プレートの各ウェルをTBSTにて洗浄することによってプレートへ結合していな

いビオチン標識hIL-6Rが除かれた後、当該ウェルが250 μLの2 %スキムミルク-TBSにて1時間以上ブロッキングされた。2 %スキムミルク-TBSを除き、その後、各ウェルに調製された精製ファージが加えられた当該プレートを室温で1時間静置することによって、ファージを提示する抗体を各ウェルに存在するビオチン標識hIL-6Rにキヌレニン非存在/存在下において結合させた。TBSTもしくはキヌレニン/TBSTにて洗浄された各ウェルに、TBSもしくはキヌレニン/TBSによって希釈されたHRP結合抗M13抗体（Amersham Pharmacia Biotech）が添加されたプレートを１時間インキュベートさせた。TBSTもしくはキヌレニン/TBSTにて洗浄後、TMB single溶液（ZYMED）が添加された各ウェル中の溶液の発色反応が硫酸の添加により停止された後、450 nmの吸光度によって当該発色が測定された。その結果、ヒトIL-6レセプターに対して、キヌレニン存在下で結合する抗体が複数確認された。ファージELISAの結果を表３５示した。前述の実施例６に示されるように、ヒトナイーブ抗体ライブラリからもキヌレニン存在下でヒトIL-6レセプターに結合する抗体は取得されているが、それよりも非常に高い効率でヒトIL-6レセプターに対するスイッチ抗体を取得することができた。実施例６－２で実施されたファージELISAの結果を表３６に示した。

[0673] [表35]

由来	実施例（１１－１）	実施例（１１－２）	実施例（１１－３）
パンニング回数	4	4	4
ELISA実施クローン数	96	96	96
陽性クローン数（吸光度＞0.2）	96	94	94
スイッチクローン数（キヌレニン+/-吸光度比＞2）	93	91	86
スイッチクローン配列数	87	88	77

[0674] [表36]

パンニング回数	3
ELISA実施クローン数	960
陽性クローン数（吸光度＞0.1）	939
スイッチクローン数（キヌレニン+/-吸光度比＞1.5）	10
スイッチクローン配列数	2

[0675] （１１－５）キヌレニンの有無によって抗原に対する結合活性が変化するスイッチ抗体の配列解析

実施例（１１－４）で示されるファージELISAの結果、キヌレニンが存在す

る条件下で抗原に対する結合活性があると判断されたクローンから特異的なプライマー（配列番号：７９及び８０）を用いて増幅された遺伝子の塩基配列が解析された。解析の結果、実施例（１１－１）、（１１－２）および（１１－３）のすべての条件から、キヌレニン存在下でビオチン標識hIL-6Rに対する結合活性を有すると判断されたクローンが複数取得された。取得されたクローンのうち、選抜された6クローンについて、以下の表３７に取得されたパンニング条件（表中、由来と表記）およびアミノ酸配列を示した。

[0676] [表37]

クローン名	由来	重鎖配列番号	軽鎖配列番号
6RFHm12-4_040	実施例（１１－３）	配列番号:101	配列番号:102
6RFHm12-4_078	実施例（１１－３）	配列番号:103	配列番号:104
6RFHm14-4_087	実施例（１１－２）	配列番号:105	配列番号:106
6RFHm14-4_093	実施例（１１－２）	配列番号:107	配列番号:108
6RFHm17-4_006	実施例（１１－１）	配列番号:109	配列番号:110
6RFHm17-4_010	実施例（１１－１）	配列番号:111	配列番号:112

[0677] （１１－６）hIL-6Rに結合する抗体の発現と精製

実施例（１１－５）に記載された6クローンの重鎖および軽鎖の可変領域配列は、重鎖抗体定常領域（配列番号：１１３）もしくは軽鎖kappa定常領域配列（配列番号：４７）を有する動物発現用プラスミドへとそれぞれ挿入された。後述の参考実施例１に記載の方法で抗体の発現および精製が実施された。

[0678] （１１－７）取得された抗体のhIL-6Rに対する結合活性評価

選抜された6種類の抗体と6RNMSC1-2_F02抗体が表３８示した条件でELISAに供された。

[0679] [表38]

	抗原	キヌレニン	トリプトファン
条件1	hIL6R	500uM	-
条件2	hIL6R	-	-
条件3	-	500uM	-
条件4	hIL6R	-	500uM

[0680] はじめに、StreptaWell 96マイクロタイタープレート（Roche）がビオチン標識hIL-6Rを含む100 μLのTBSにて室温で1時間以上コートされた。当該プレ

ートの各ウェルをTBSTにて洗浄することによってプレートへ結合していないビオチン標識hIL-6Rが除かれた後、当該ウェルがBlocking Buffer（2% skim milk/TBS）250μLにて1時間以上ブロッキングされた。Blocking Bufferが除かれた各ウェルに、表３８の条件でTBSにて2.5 μg/mLに調製された精製IgG各100 μLが加えられた当該プレートを室温で1時間静置することによって、各IgGを各ウェルに存在するビオチン標識hIL-6Rに結合させた。表３８に示した終濃度となるように調製されたTBSTにて洗浄された各ウェルに、同低分子入りTBSによって希釈されたHRP結合抗ヒトIgG抗体（BIOSOURCE）が添加されたプレートを１時間インキュベートさせた。表３８に示した終濃度となるように調製されたTBSTにて洗浄後、TMB single溶液（ZYMED）が添加された各ウェル中の溶液の発色反応が硫酸の添加により停止された後、450 nmの吸光度によって当該発色が測定された。測定された結果を図３９に示した。

[0681] 選抜された6種類の抗体は6RNMSC1-2_F02抗体と同様に、条件１の吸光度と比較して条件２または条件３の吸光度は顕著に低かった。このことから、選抜された6種類の抗体はIgG型においてもキヌレニン存在下でビオチン標識hIL-6Rに対して特異的な結合活性を有することが確認された。また、条件4の吸光度と比較して条件2の吸光度に顕著な差が見られないことから、選抜された6種類の抗体にトリプトファン存在下でのビオチン標識hIL-6Rに対する結合活性がないことも確認された。以上のことからキヌレニンに対するパンニングを利用したキヌレニンスイッチ抗体取得用ライブラリ（キヌレニンライブラリVer.A）からキヌレニンがスイッチとして機能するhIL-6R結合抗体が複数取得可能であることが示された。また、後述の参考実施例４で示されるように、参考実施例２において構築された、ATPに結合する抗体を鋳型としたラショナルデザインライブラリより、ATP非存在下において標的抗原に結合し、ATP存在下では標的抗原に結合しない抗体が取得されたことより、同様にキヌレニンスイッチ抗体取得用ライブラリからキヌレニン非存在下において標的抗原に結合し、キヌレニン存在下では標的抗原に結合しない抗体の取得も可能であると考えられる。

[0682] 〔実施例１２〕キヌレニンに対するパンニングを利用したキヌレニンスイッチ抗体取得用ライブラリ（キヌレニンライブラリVer.A）からの、キヌレニン存在下においてヒトIgA-Fc（hIgA-Fc）に結合する抗体の取得

（１２－１）抗体ライブラリからのキヌレニン存在下でhIgA-Fcに結合活性を示し、キヌレニン非存在下において結合を示さない抗体の取得

実施例9で構築されたキヌレニンライブラリVer.Aから、キヌレニン存在下でヒトIgA-Fc（hIgA-Fc）に対する結合活性を示す抗体がスクリーニングされた。すなわち、ビーズにキャプチャーされたhIgA-Fcに対してキヌレニン存在下で結合活性を示し、キヌレニン非存在下の条件ではビーズから溶出されるような抗体を提示しているファージが回収された。本取得方法では、抗原として参考実施例５に記載される方法で調製されたビオチン標識hIgA-Fc（配列番号：１４６）が用いられた。

[0683] 構築されたファージディスプレイファージミドベクターを保持する大腸菌に対して、M13KO7ΔpIII（ハイパーファージと呼称される）（PROGEN Biotechnik）を感染させ、30℃で一晩培養した上清からファージが回収された。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、抗体多価提示ファージライブラリ液が調製された。次に、当該ファージライブラリ液に終濃度4%となるようにBSAが添加された。磁気ビーズに固定化された抗原を用いたパンニングが実施された。磁気ビーズとして、NeutrAvidin coated beads (Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) もしくはStreptavidin coated beads (Dynabeads MyOne Streptavidin T1) が用いられた。

[0684] パンニングではキヌレニン存在下でのみ抗原に対して結合可能なファージの濃縮が行われた。具体的には、実施例（１１－１）に示された方法と同様の方法で、抗原量を1回目および2回目で500 pmol、3回目および4回目で200 pmolに変更して4回目までのパンニングが実施された。

[0685] （１２－２）ネガティブセレクション法を利用した抗体ライブラリからのキヌレニン存在下においてhIgA-Fcに結合する抗体の取得

実施例9で構築されたキヌレニンライブラリVer.Aから、抗原に対してキヌレニンが存在する条件下で抗原に対する結合活性を示す抗体のスクリーニングが行われた。スクリーニングのために、まず抗体ファージディスプレイライブラリを、キヌレニン非存在下でビオチン標識抗原－ストレプトアビジンと接触させ、キヌレニン非存在下でも抗原に対して結合活性を有する抗体を提示しているファージが除去された。それに続き、キヌレニンの存在する条件下で同様にパンニングを行うことによって、キヌレニンが存在する条件下でのみ抗原に対して結合活性を有する抗体のスクリーニングが実施された。

[0686] 構築されたファージディスプレイファージミドベクターを保持する大腸菌に対して、M13KO7ΔpIII（ハイパーファージと呼称される）（PROGEN Biotechnik）を感染させ、30℃で一晩培養した上清からファージが回収された。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、抗体多価提示ファージライブラリ液が調製された。次に、当該ファージライブラリ液に終濃度4%となるようにBSAが添加された。磁気ビーズに固定化された抗原を用いたパンニングが実施された。磁気ビーズとして、NeutrAvidin coated beads (Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) もしくはStreptavidin coated beads (Dynabeads MyOne Streptavidin T1) が用いられた。

[0687] 1回目のパンニングでは、ネガティブセレクション法を利用したキヌレニン存在下でのみ抗原に対して結合可能なファージの濃縮が行われた。具体的には、BSAでブロッキングされたSera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coatedに1000 pmolビオチン化抗原を加え、室温で15分間結合させた。TBSで3回洗浄されたビーズに対して、BSAにてブロッキングが行われたファージライブラリ液0.5 mLを加え室温にて1時間結合させた。磁気スタンドを用いてビーズを分離することによって、抗原およびビーズに結合しないファージが回収された。回収されたファージに対して、500 pmolのビオチン標識抗原ならびに終濃度500 μMのキヌレニンを加えることによって、ファージライブラリを室温で15分間抗原ならびにキヌレニンと接触させた。その後、4℃で45分間接触させた。

次に、当該標識抗原ならびにキヌレニンとファージライブラリとの混合液にBSAでブロッキングされた磁気ビーズを加え、4℃で15分間、抗原とファージとの複合体を磁気ビーズと結合させた。ビーズは0.5 mLの氷冷されたキヌレニン /TBSTにて2回、氷冷されたキヌレニン /TBSにて1回洗浄された。その後1 mg/mLのTrypsin溶液0.5 mLが当該混合液に加えられた。当該混合液は室温で15分間攪拌された後、磁気スタンドを使用して分離されたビーズからファージが回収された。回収されたファージは、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に対してハイパーファージを感染させ、30℃で一晩培養した上清からファージを回収することによって、抗体多価提示ファージライブラリ液が調製された。

[0688] 2回目以降のパンニングでは、キヌレニン存在下でのみ抗原に対して結合可能なファージの濃縮が行われた。具体的には、実施例（１１－１）に示された2回目以降のパンニング方法と同様の方法で、抗原量を2回目で500 pmol、3回目および4回目で200 pmolに変更して4回目のパンニングまで実施された。

[0689] （１２－３）スイッチとなる分子に対するパンニングを利用した抗体ライブラリからのキヌレニン存在下においてhIgA-Fcに結合する抗体の取得

実施例9で構築されたキヌレニンライブラリVer.Aから、抗原に対してキヌレニンが存在する条件下で抗原に対する結合活性を示す抗体のスクリーニングが行われた。スクリーニングのために、まずビオチン化キヌレニン（化合物028、029および036）に対してパンニングを行い、キヌレニンに対して結合活性を有する抗体を提示しているファージが回収された。それに続き、キヌレニン存在下でビオチン標識抗原に対するパンニングを行うことによって、キヌレニンが存在する条件下で抗原に対して結合活性を有する抗体のスクリーニングが実施された。

[0690] 構築されたファージディスプレイファージミドベクターを保持する大腸菌

に対して、M13KO7ΔpIII（ハイパーファージと呼称される）（PROGEN Biotechnik）を感染させ、30℃で一晩培養した上清からファージが回収された。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、抗体多価提示ファージライブラリ液が調製された。次に、当該ファージライブラリ液に終濃度4%となるようにBSAが添加された。磁気ビーズに固定化された抗原を用いたパンニングが実施された。磁気ビーズとして、NeutrAvidin coated beads（Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated）もしくはStreptavidin coated beads（Dynabeads MyOne Streptavidin T1）が用いられた。

[0691] 1回目のパンニングでは、ビオチン化キヌレニン（化合物028、029および036の混合物）に対して結合可能なファージの濃縮が行われた。具体的には、BSAでブロッキングされたビーズ（Dynabeads MyOne Streptavidin T1）に化合物028、029および036を等量ずつ混合したビオチン化キヌレニン混合物4000 pmolを加え、室温で30分間結合させた。TBSで3回洗浄されたビーズに対して、BSAにてブロッキングが行われたファージライブラリ液0.8 mLを加え、室温で30分間ビオチン化キヌレニンと接触させた。その後、30分間4℃で接触させた。ビーズは1 mLの氷冷されたTBSTにて3回、氷冷されたTBSにて2回洗浄された。その後、1mg/mLのトリプシン溶液0.5 mLが当該混合液に加えられた。当該混合液は室温で15分懸濁された後、即座に磁気スタンドを用いて分離されたビーズからファージ溶液が回収された。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100 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5枚へ播種された。次に、播種された大腸菌の培養液に対して、ハイパーファージを感染させ、30℃で一晩培養した上清からファージを回収することによって、抗体多価提示ファージライブラリ液が調製された。

[0692] 2回目以降のパンニングでは、キヌレニン存在下でのみ抗原に対して結合可能なファージの濃縮が行われた。具体的には、実施例（１１－１）に示され

た2回目以降のパンニング方法と同様の方法で、抗原量を2回目で500 pmol、3回目および4回目で200 pmolに変更して4回目のパンニングまで実施された。

[0693] （１２－４）ファージELISAによるキヌレニン存在下における結合活性の評価

（１２－１）、（１２－２）、（１２－３）で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）に倣い、ファージの培養が行われた。ヘルパーファージとしてハイパーファージを用いることで、抗体多価提示ファージ含有培養上清が回収された。実施例（１１－４）に記載された方法で精製された精製ファージが以下の手順で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hIgA-Fcを含む100 μLのTBSにて1時間以上コートされた。当該プレートの各ウェルをTBSTにて洗浄することによってプレートへ結合していないビオチン標識hIgA-Fcが除かれた後、当該ウェルが250 μLの2%スキムミルク-TBSにて1時間以上ブロッキングされた。2%スキムミルク-TBSを除き、その後、各ウェルに調製された精製ファージが加えられた当該プレートを室温で1時間静置することによって、ファージを提示する抗体を各ウェルに存在するビオチン標識hIgA-Fcにキヌレニン非存在/存在下において結合させた。TBSTもしくはキヌレニン/TBSTにて洗浄された各ウェルに、TBSもしくはキヌレニン/TBSによって希釈されたHRP結合抗M13抗体（Amersham Pharmacia Biotech）が添加されたプレートを１時間インキュベートさせた。TBSTもしくはキヌレニン/TBSTにて洗浄後、TMB single溶液（ZYMED）が添加された各ウェル中の溶液の発色反応が硫酸の添加により停止された後、450 nmの吸光度によって当該発色が測定された。その結果、ヒトIgA-Fcに対して、キヌレニン存在下で結合する抗体が複数確認された。ファージELISAの結果を表３９に示した。

[0694] [表39]

由来	実施例（12－1）	実施例（12－2）	実施例（12－3）
パンニング回数	4	4	4
ELISA実施クローン数	96	96	96
陽性クローン数（吸光度＞0.2）	89	90	91
スイッチクローン数（キヌレニン+/-吸光度比＞2）	87	90	86
スイッチクローン配列数	67	69	75

[0695] （１２－５）キヌレニンの有無によって抗原に対する結合活性が変化するス

イッチ抗体の配列解析

実施例（１２－４）で示されるファージELISAの結果、キヌレニンが存在する条件下で抗原に対する結合活性があると判断されたクローンから特異的なプライマー（配列番号：７９及び８０）を用いて増幅された遺伝子の塩基配列が解析された。解析の結果、実施例（１２－１）、（１２－２）および（１２－３）のすべての条件からキヌレニン存在下でビオチン標識hIgA-Fcに対する結合活性を有すると判断されたクローンが複数取得された。取得されたクローンのうち、選抜された6クローンについて、以下の表４０に取得されたパンニング条件（表中、由来と表記）およびアミノ酸配列を示した。

[0696] [表40]

クローン名	由来	重鎖配列番号	軽鎖配列番号
hIAFHm12-4_018	実施例（12－3）	配列番号:114	配列番号:115
hIAFHm12-4_061	実施例（12－3）	配列番号:116	配列番号:117
hIAFHm14-4_001	実施例（12－2）	配列番号:118	配列番号:119
hIAFHm14-4_041	実施例（12－2）	配列番号:120	配列番号:121
hIAFHm17-4_026	実施例（12－1）	配列番号:122	配列番号:123
hIAFHm17-4_072	実施例（12－1）	配列番号:124	配列番号:125

[0697] （１２－６）hIgA-Fcに結合する抗体の発現と精製

実施例（１２－５）に記載された6クローンの重鎖および軽鎖の可変領域配列は、重鎖抗体定常領域（配列番号：１１３）もしくは軽鎖kappa定常領域配列（配列番号：４７）を有する動物発現用プラスミドへとそれぞれ挿入された。後述の参考実施例１に記載の方法で抗体の発現および精製が実施された。

[0698] （１２－７）取得された抗体のhIgA-Fcに対する結合活性の評価

取得された6種類の抗体が表４１に示された条件でELISAに供された。

[0699] [表41]

	抗原	キヌレニン	トリプトファン
条件1	hIgA-Fc	500uM	-
条件2	hIgA-Fc	-	-
条件3	-	500uM	-
条件4	hIgA-Fc	-	500uM

[0700] はじめに、StreptaWell 96マイクロタイタープレート（Roche）がビオチン

標識hIgA-Fcを含む100 μLのTBSにて室温で1時間以上コートされた。当該プレートの各ウェルをTBSTにて洗浄することによってプレートへ結合していないビオチン標識hIgA-Fcが除かれた後、当該ウェルがBlocking Buffer（2% skim milk/TBS）250 μLにて1時間以上ブロッキングされた。Blocking Bufferが除かれた各ウェルに、表４１条件でTBSにて2.5 μg/mLに調製された精製IgG各100 μLが加えられた当該プレートを室温で1時間静置することによって、各IgGを各ウェルに存在するビオチン標識hIgA-Fcに結合させた。表４１に示した終濃度となるように調製されたTBSTにて洗浄された各ウェルに、同低分子入りTBSによって希釈されたHRP結合抗ヒトIgG抗体（BIOSOURCE）が添加されたプレートを１時間インキュベートさせた。表４１に示した終濃度となるように調製されたTBSTにて洗浄後、TMB single溶液（ZYMED）が添加された各ウェル中の溶液の発色反応が硫酸の添加により停止された後、450 nmの吸光度によって当該発色が測定された。測定された結果を図４０に示した。

[0701] 選抜された6種類の抗体は、条件1の吸光度と比較して条件2または条件3の吸光度は顕著に低かった。このことから、選抜された6種類の抗体はIgG型においてもキヌレニン存在下でビオチン標識hIgA-Fcに対して特異的な結合活性を有することが確認された。また、条件4の吸光度と比較して条件2の吸光度に顕著な差が見られないことから、選抜された6種類の抗体にトリプトファン存在下でのビオチン標識hIgA-Fcに対する結合活性がないことも確認された。以上のことからキヌレニンに対するパンニングを利用したキヌレニンスイッチ抗体取得用ライブラリ（キヌレニンライブラリVer.A）からキヌレニンがスイッチとして機能するhIgA-Fc結合抗体が複数取得可能であることが示された。

[0702] 〔実施例１３〕キヌレニンに対するパンニングを利用したキヌレニンスイッチ抗体取得用ライブラリ（キヌレニンライブラリVer.A）からの、キヌレニン存在下においてヒトIL-6（hIL-6）に結合する抗体の取得

（１３－１）抗体ライブラリからのキヌレニン存在下でhIL-6に結合活性を示し、キヌレニン非存在下において結合を示さない抗体の取得

実施例9で構築されたキヌレニンライブラリVer.Aから、キヌレニン存在下でヒトIL-6(hIL-6)に対する結合活性を示す抗体がスクリーニングされた。すなわち、ビーズにキャプチャーされたhIL-6に対してキヌレニン存在下で結合活性を示し、キヌレニン非存在下の条件ではビーズから溶出されるような抗体を提示しているファージが回収された。本取得方法では、抗原としてビオチン標識されたhIL-6が用いられた。

[0703] 構築されたファージディスプレイファージミドベクターを保持する大腸菌に対して、M13KO7ΔpIII（ハイパーファージと呼称される）（PROGEN Biotechnik）を感染させ、30℃で一晩培養した上清からファージが回収された。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、抗体多価提示ファージライブラリ液が調製された。次に、当該ファージライブラリ液に終濃度4%となるようにBSAが添加された。磁気ビーズに固定化された抗原を用いたパンニングが実施された。磁気ビーズとして、NeutrAvidin coated beads (Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) もしくはStreptavidin coated beads (Dynabeads MyOne Streptavidin T1) が用いられた。

[0704] パンニングではキヌレニン存在下でのみ抗原に対して結合可能なファージの濃縮が行われた。実施例（１１－１）に示された方法と同様の方法で、4回目までのパンニングが実施された。

[0705] <u>（１３－２）ネガティブセレクション法を利用した抗体ライブラリからのキヌレニン存在下においてhIL-6に結合する抗体の取得</u>

実施例9で構築されたキヌレニンライブラリVer.Aから、抗原に対してキヌレニンが存在する条件下で抗原に対する結合活性を示す抗体のスクリーニングが行われた。スクリーニングのために、まず抗体ファージディスプレイライブラリを、キヌレニン非存在下でビオチン標識抗原－ストレプトアビジンと接触させ、キヌレニン非存在下でも抗原に対して結合活性を有する抗体を提示しているファージが除去された。それに続き、キヌレニンの存在する条件下で同様にパンニングを行うことによって、キヌレニンが存在する条件下

で抗原に対して結合活性を有する抗体のスクリーニングが実施された。

[0706] 構築されたファージディスプレイファージミドベクターを保持する大腸菌に対して、M13KO7ΔpIII（ハイパーファージと呼称される）（PROGEN Biotechnik）を感染させ、30℃で一晩培養した上清からファージが回収された。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、抗体多価提示ファージライブラリ液が調製された。次に、当該ファージライブラリ液に終濃度4%となるようにBSAが添加された。磁気ビーズに固定化された抗原を用いたパンニングが実施された。磁気ビーズとして、NeutrAvidin coated beads (Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) もしくはStreptavidin coated beads (Dynabeads MyOne Streptavidin T1) が用いられた。

[0707] 1回目のパンニングでは、ネガティブセレクション法を利用したキヌレニン存在下でのみ抗原に対して結合可能なファージの濃縮が行われた。具体的には、BSAでブロッキングされたSera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coatedに500 pmolのビオチン化抗原を加え、室温で15分間結合させた。TBSで3回洗浄されたビーズに対して、BSAにてブロッキングが行われたファージライブラリ液0.5 mLを加え室温にて1時間結合させた。磁気スタンドを用いてビーズを分離することによって、抗原およびビーズに結合しないファージが回収された。回収されたファージに対して、250 pmolのビオチン標識抗原ならびに終濃度500 μMのキヌレニンを加えることによって、ファージライブラリを室温で15分間抗原ならびにキヌレニンと接触させた。その後、4℃で45分間接触させた。次に、当該標識抗原ならびにキヌレニンとファージライブラリとの混合液にBSAでブロッキングされた磁気ビーズを加え、4℃で15分間、抗原とファージとの複合体を磁気ビーズと結合させた。ビーズは0.5 mLの氷冷されたキヌレニン /TBSTにて2回、氷冷されたキヌレニン /TBSにて1回洗浄された。その後1 mg/mLのTrypsin溶液0.5 mLが当該混合液に加えられた。当該混合液は室温で15分間攪拌された後、磁気スタンドを使用して分離されたビーズからファージが回収された。回収されたファージは、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に対してハイパーファージを感染させ、30℃で一晩培養した上清からファージを回収することによって、抗体多価提示ファージライブラリ液が調製された。

[0708] 2回目以降のパンニングでは、キヌレニン存在下でのみ抗原に対して結合可能なファージの濃縮が行われた。具体的には、実施例（１１－１）に示された2回目以降のパンニング方法と同様の方法で、4回目のパンニングまで実施された。

[0709] （１３－３）スイッチとなる分子に対するパンニングを利用した抗体ライブラリからのキヌレニン存在下においてhIL-6に結合する抗体の取得

実施例9で構築されたキヌレニンライブラリVer.Aから、抗原に対してキヌレニンが存在する条件下で抗原に対する結合活性を示す抗体のスクリーニングが行われた。スクリーニングのために、まずビオチン化キヌレニン（化合物028、029および036）に対してパンニングを行い、キヌレニンに対して結合活性を有する抗体を提示しているファージが回収された。それに続き、キヌレニン存在下でビオチン標識抗原に対するパンニングを行うことによって、キヌレニンが存在する条件下で抗原に対して結合活性を有する抗体のスクリーニングが実施された。

[0710] 構築されたファージディスプレイファージミドベクターを保持する大腸菌に対して、M13KO7ΔpIII（ハイパーファージと呼称される）（PROGEN Biotechnik）を感染させ、30℃で一晩培養した上清からファージが回収された。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、抗体多価提示ファージライブラリ液が調製された。次に、当該ファージライブラリ液に終濃度4%となるようにBSAが添加された。磁気ビーズに固定化された抗原を用いたパンニングが実施された。磁気ビーズとして、NeutrAvidin coated

beads (Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) もしくはStreptavidin coated beads (Dynabeads MyOne Streptavidin T1) が用いられた。

[0711] 1回目のパンニングでは、ビオチン化キヌレニン（化合物028、029および036の混合物）に対して結合可能なファージの濃縮が行われた。具体的には、BSAでブロッキングされたビーズ (Dynabeads MyOne Streptavidin T1) に化合物028、029および036を等量ずつ混合したビオチン化キヌレニン混合物4000 pmolを加え、室温で30分間結合させた。TBSで3回洗浄されたビーズに対して、BSAにてブロッキングが行われたファージライブラリ液0.8 mLを加え、室温で30分間ビオチン化キヌレニンと接触させた。その後、30分間4℃で接触させた。ビーズは1 mLの氷冷されたTBSTにて3回、氷冷されたTBSにて2回洗浄された。その後、1 mg/mLのトリプシン溶液0.5 mLが当該混合液に加えられた。当該混合液は室温で15分懸濁された後、即座に磁気スタンドを用いて分離されたビーズからファージ溶液が回収された。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100 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5枚へ播種された。次に、播種された大腸菌の培養液に対して、ハイパーファージを感染させ、30℃で一晩培養した上清からファージを回収することによって、抗体多価提示ファージライブラリ液が調製された。

[0712] 2回目以降のパンニングでは、キヌレニン存在下でのみ抗原に対して結合可能なファージの濃縮が行われた。具体的には、実施例（１１－１）に示された2回目以降のパンニング方法と同様の方法で、4回目のパンニングまで実施された。

[0713] （１３－４）ファージELISAによるキヌレニン存在下における結合活性の評価

（１３－１）、（１３－２）、（１３－３）で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) に倣い、ファージの培養が行われた。ヘルパーファージとしてハイパーファージを用いることで、抗体多価提示ファージ含有培養上清が回収された。参考実施例

（１１－４）に記載された方法で精製された精製ファージが以下の手順でELISAに供された。384 well Microplates Streptavidin-coated (Greiner Bio-One）がビオチン標識hIL-6を含む10 μLのTBSにて1時間以上コートされた。当該プレートの各ウェルをTBSTにて洗浄することによってプレートへ結合していないビオチン標識hIL-6が除かれた後、当該ウェルが80 μLの2%スキムミルク-TBSにて1時間以上ブロッキングされた。2%スキムミルク-TBSを除き、その後、各ウェルに調製された精製ファージが加えられた当該プレートを室温で1時間静置することによって、ファージを提示する抗体を各ウェルに存在するビオチン標識hIL-6にキヌレニン非存在/存在下において結合させた。TBSTもしくはキヌレニン/TBSTにて洗浄された各ウェルに、TBSもしくはキヌレニン/TBSによって希釈されたHRP結合抗M13抗体（Amersham Pharmacia Biotech）が添加されたプレートを１時間インキュベートさせた。TBSTもしくはキヌレニン/TBSTにて洗浄後、TMB single溶液（ZYMED）が添加された各ウェル中の溶液の発色反応が硫酸の添加により停止された後、450 nmの吸光度によって当該発色が測定された。その結果、hIL-6に対して、キヌレニン存在下で結合する抗体が複数確認された。ファージELISAの結果を表４２に示した。

[0714] [表42]

由来	実施例（13－1）	実施例（13－2）	実施例（13－3）
パンニング回数	4	4	4
ELISA実施クローン数	96	96	96
陽性クローン数（吸光度＞0.2）	65	59	54
スイッチクローン数（キヌレニン+/-吸光度比＞2）	61	58	48
スイッチクローン配列数	42	37	44

[0715] （１３－５）キヌレニンの有無によって抗原に対する結合活性が変化するスイッチ抗体の配列解析

実施例（１３－４）で示されるファージELISAの結果、キヌレニンが存在する条件下で抗原に対する結合活性があると判断されたクローンから特異的なプライマー（配列番号：７９及び８０）を用いて増幅された遺伝子の塩基配列が解析された。解析の結果、実施例（１３－１）、（１３－２）または（１３－３）のすべての条件からキヌレニン存在下でビオチン標識hIL-6に対する結合活性を有すると判断されたクローンが複数取得された。取得されたク

ローンのうち、選抜された6クローンについて、以下の表４３に取得されたパンニング条件（表中、由来と表記）およびアミノ酸配列を示した。

[0716] [表43]

クローン名	由来	重鎖配列番号	軽鎖配列番号
I6FHm12-4_068	実施例（１３－３）	配列番号:126	配列番号:127
I6FHm12-4_094	実施例（１３－３）	配列番号:128	配列番号:129
I6FHm14-4_007	実施例（１３－２）	配列番号:130	配列番号:131
I6FHm14-4_030	実施例（１３－２）	配列番号:132	配列番号:133
I6FHm17-4_016	実施例（１３－１）	配列番号:134	配列番号:135
I6FHm17-4_036	実施例（１３－１）	配列番号:136	配列番号:137

[0717] （１３－６）hIL-6に結合する抗体の発現と精製

実施例（１３－５）に記載された6クローンの重鎖および軽鎖の可変領域配列は、重鎖抗体定常領域（配列番号：１１３）もしくは軽鎖kappa定常領域配列（配列番号：４７）を有する動物発現用プラスミドへとそれぞれ挿入された。後述の参考実施例１に記載の方法で抗体の発現および精製が実施された。

[0718] （１３－７）取得された抗体のhIL-6に対する結合活性評価

取得された6種類の抗体が表４４に示された条件でELISAに供された。

[0719] [表44]

	抗原	キヌレニン	トリプトファン
条件1	hIL-6	500uM	-
条件2	hIL-6	-	-
条件3	-	500uM	-
条件4	hIL-6	-	500uM

[0720] はじめに、StreptaWell 96マイクロタイタープレート（Roche）がビオチン標識hIL-6を含む100 μLのTBSにて室温で1時間以上コートされた。当該プレートの各ウェルをTBSTにて洗浄することによってプレートへ結合していないビオチン標識hIL-6が除かれた後、当該ウェルがBlocking Buffer（2% skim milk/TBS）250 μLにて1時間以上ブロッキングされた。Blocking Bufferが除かれた各ウェルに、表４４の条件でTBSにて2.5 μg/mLに調製された精製IgG各100 μLが加えられた当該プレートを室温で1時間静置することによって、各IgGを各ウェルに存在するビオチン標識hIL-6に結合させた。表４４に示し

た終濃度となるように調製されたTBSTにて洗浄された各ウェルに、同低分子入りTBSによって希釈されたHRP結合抗ヒトIgG抗体（BIOSOURCE）が添加されたプレートを１時間インキュベートさせた。表４４に示した終濃度となるように調製されたTBSTにて洗浄後、TMB single溶液（ZYMED）が添加された各ウェル中の溶液の発色反応が硫酸の添加により停止された後、450 nmの吸光度によって当該発色が測定された。測定された結果を図４１に示した。

[0721] 選抜された6種類の抗体は、条件１の吸光度と比較して条件２または条件３の吸光度は顕著に低かった。このことから、選抜された6種類の抗体はIgG型においてもキヌレニン存在下でビオチン標識hIL-6に対して特異的な結合活性を有することが確認された。また、条件4の吸光度と比較して条件2の吸光度に顕著な差が見られないことから、選抜された6種類の抗体にトリプトファン存在下でのビオチン標識hIL-6に対する結合活性がないことも確認された。以上のことからキヌレニンに対するパンニングを利用したキヌレニンスイッチ抗体取得用ライブラリ（キヌレニンライブラリVer.A）からキヌレニンがスイッチとして機能するhIL-6結合抗体が複数取得可能であることが示された。

[0722] ［参考実施例１］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アデノシンおよび/またはATPに結合する抗体の取得

<u>（１－１）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</u>

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従い、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。

[0723] <u>（１－２）ビーズパンニングによるライブラリからのアデノシンおよび/またはATPに結合する抗体の取得</u>

参考実施例（１－１）で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、抗原に対する結合活性を示す抗体のスクリーニングが行われた。すなわち、ビーズにキャプチャーされた抗原に対して結合活性を示す抗体を提示しているファージが集められた。抗原としてATP-PEG-Biotin、2

'-Adenosine-PEG-Biotin、および5'-Adenosine-PEG-Biotinが用いられた。ATP-PEG-BiotinはJena Bioscience社、カタログナンバーNU-926-BIOを購入し使用した。2'-Adenosine-PEG-Biotin、および5'-Adenosine-PEG-Biotinは実施例（２－２－１１）において構築されたものを使用した。

[0724] 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産生されたファージは一般的な方法により精製された。その後TBSで透析処理された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%となるようにBSAが添加された。磁気ビーズに固定化された抗原を用いたパンニングが実施された。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。

[0725] その後、調製されたファージライブラリ液と250 pmolのビオチン化ATP、2'-Adenosine-PEG-Biotin、および5'-Adenosine-PEG-Biotinを加えることによって、当該ファージライブラリ液とアデノシンおよびATPとを室温にて60分間接触させた。次にファージライブラリ液にBSAでブロッキングされた磁気ビーズが加えられ、アデノシンおよび／またはATP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TBSにて1回洗浄された。その後、1 mg/mLのトリプシン溶液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分離されたビーズから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。

[0726] 2回目のパンニングにおいても、アデノシンおよび/またはATPに対して結合可能なファージの濃縮が行われた。得られたファージライブラリ液に各50 pmolのビオチン化ATP、2'-Adenosine-PEG-Biotin、および5'-Adenosine-PEG-Bi

otinを加えることによって、当該ファージライブラリ液をアデノシンおよびATPと室温にて60分間接触させた。次にファージライブラリ液にBSAでブロッキングされた磁気ビーズが加えられ、アデノシンおよび/またはATP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。TBSTにて3回、TBSにて2回ビーズは洗浄された。その後、1 mg/mLのトリプシン溶液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分離されたビーズから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。

[0727] 同様の手順でアデノシンおよび／またはATPに対して結合可能な抗体を取得するパンニングが3回繰り返された。4回目のパンニングはTBST、TBS共に5回洗浄が実施された。

[0728] （１－３）ファージELISAによるアデノシンおよびATP結合性の評価

上述の実施例で示されたPanning法により得られた大腸菌のシングルコロニーから、常法（Method Mol. Biol. (2002) 178, 133-145）に倣い、ファージ含有培養上清が回収された。NucleoFast 96 (MACHERY-NAGEL)を用いて回収された培養上清が限外濾過された。培養上清各100μLがNucleoFast 96の各ウェルにアプライされ、4,500g, 45分間遠心分離を行いフロースルーが除去された。H_2O 100μLを加え、再度4,500g, 30分間遠心分離による洗浄が行われた。その後、TBS 100μLを加え、室温で5分間静置した後、上清に含まれるファージ液が回収された。

[0729] TBSが加えられた精製ファージが以下の手順で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（2'-Adenosine-PEG-biotin、5'-Adenosine-PEG-biotin、およびATP-PEG-biotinを等量ずつ混合）を含む100μLのTBSにて室温で1時間コートされた。当該プレートの各

ウェルをTBST（0.1%Tween20を含むTBS）にて洗浄することによって抗原が除かれた後、当該ウェルが1時間以上250μLの2%SkimMilk-TBSにてブロッキングされた。2%SkimMilk-TBSを除き、その後各ウェルに調製された精製ファージが加えられた当該プレートを室温で1時間静置することによって、抗体を提示したファージを各ウェルに存在する抗原に結合させた。TBSTにて洗浄された各ウェルに、TBSによって希釈されたHRP結合抗M13抗体（Amersham Pharmacia Biotech）が添加されたプレートを１時間インキュベートさせた。TBSTにて洗浄後、TMB single溶液（ZYMED）が添加された各ウェル中の溶液の発色反応が、硫酸の添加により停止された後、450 nmの吸光度によって当該発色が測定された。

[0730] ファージELISA を実施した192クローンの中から、2'-Adenosine-PEG-biotin、5'-Adenosine-PEG-biotin、ATP-PEG-biotinのいずれか、いずれか2つ、もしくは3つ全てに結合能を有する106のクローンが得られた。

[0731] 次にこれらのクローンが2'-Adenosine-PEG-biotin, 5'-Adenosine-PEG-biotin, ATP-PEG-biotinのうち、どの抗原に対して結合能を有しているのかを確認する目的で、同精製ファージがTBSで希釈されたのちに以下の手順で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（2'-Adenosine-PEG-biotin, 5'-Adenosine-PEG-biotin, ATP-PEG-biotin）いずれかを含む100μLのTBSにて室温で1時間コートされた。当該プレートの各ウェルをTBSTにて洗浄することによって抗原が除かれた後、当該ウェルが1時間以上250μLの2% SkimMilk-TBSにてブロッキングされた。2% SkimMilk-TBSを除き、その後各ウェルに調製された精製ファージが加えられた当該プレートを室温で1時間静置することによって、抗体を提示したファージを各ウェルに存在する抗原に結合させた。TBSTにて洗浄された各ウェルに、TBSによって希釈されたHRP結合抗M13抗体（Amersham Pharmacia Biotech）が添加されたプレートを1時間インキュベートさせた。TBSTにて洗浄後、TMB single溶液（ZYMED）が添加された各ウェル中の溶液の発色反応が、硫酸の添加により停止された後、450 nmの吸光度によって当該発色が測定された。ファー

ジELISAの結果が以下の表４５に記されている。

[0732] [表45]

濃縮指標		抗原結合能(S/N 比＞1.5)
パンニング回数		4
ELISA 実施クローン数		192
ELISA 陽性クローン数	2'-Adenosine-PEG-biotin, 5'-Adenosine-PEG-biotin, ATP-PEG-biotin 混合	106
	2'-Adenosine-PEG-biotin	0
	5'-Adenosine-PEG-biotin	6
	ATP-PEG-biotin	76
	2'-Adenosine-PEG-biotin, 5'-Adenosine-PEG-biotin, ATP-PEG-biotin のうち二者以上に結合	1

[0733] ファージELISAを実施したクローンのうち、抗原二種類以上に結合が確認されたものは1クローンであり、本抗体断片を鋳型として、遺伝子の塩基配列解析が行われた。本クローンは5'-Adenosine-PEG-biotin, ATP-PEG-biotinの二者に結合能を有するクローンであり、ATNLSA1-4_D12と命名された。ATNLSA1-4_D12抗体の重鎖可変領域の配列は配列番号：４８に、および、軽鎖可変領域の配列は配列番号：４９に記載されている。

[0734] （１－４）ファージ競合ELISAによるアデノシンもしくはATP結合性の評価

ファージELISAの結果、5'-Adenosine-PEG-biotinおよびATP-biotinの両者に結合能があると判断されたクローン、ATNLSA1-4_D12（重鎖可変領域配列：配列番号：４８、軽鎖配列：配列番号：４９）は、5'-Adenosine-PEG-biotin, ATP-PEG-biotinの構造上、ビオチンタグもしくはPEG領域を認識している可能性が残っている。そこで、ビオチンタグやPEG認識抗体ではないことを示すため、ATNLSA1-4_D12および、Negative controlとして用意されたhIL-6R結合クローンPF1（重鎖配列：配列番号：５０、軽鎖配列：配列番号：５１）を用いてアデノシンもしくはATPで抗原との結合が阻害されるかどうかがファージELISAにて確認された。ATNLSA1-4_D12およびPF1はそれぞれTBSで希釈され、以下の手順でELISAに供された。

[0735] StreptaWell 96マイクロタイタープレート（Roche）がビオチン標識抗原（5'-Adenosine-PEG-biotin, ATP-PEG-biotinの混合）を含む100μLのTBSにて室温で1時間コートされた。当該プレートの各ウェルをTBSTにて洗浄すること

によって抗原が除かれた後、当該ウェルが1時間以上250μLの2% SkimMilk-TBSにてブロッキングされた。2% SkimMilk-TBSを除き、その後各ウェルに調製された精製ファージが加えられた当該プレートを室温で1時間静置することによって、ファージが提示する抗体を各ウェルに存在する抗原に結合させた。次に抗原なし、ならびに抗原と等量から10,000倍量までのATPの希釈系列を含むTBSが当該ウェルに加えられた。室温で１時間当該プレートを静置することによって、固定化されている抗原とATPが競合させられた。その後、TBSTにて洗浄された各ウェルに、TBSによって希釈されたHRP結合抗M13抗体（Amersham Pharmacia Biotech）が添加されたプレートを１時間インキュベートさせた。TBSTにて洗浄後、TMB single溶液（ZYMED）が添加された各ウェル中の溶液の発色反応が、硫酸の添加により停止された後、450 nmの吸光度によって当該発色が測定された。

[0736] 測定された結果を図４２に示した。ATNLSA1-4_D12はATP濃度が高くなるにつれ、過剰量のATP存在下で発色値が小さくなっていることが確認され、ATP濃度依存的にATNLSA1-4_D12と抗原との結合が阻害されていることが確認された。また陰性対照として比較実験が行われたPF1はATP濃度に関係なく抗原との結合は確認されていない。このことからATNLSA1-4_D12はATP結合能を有する抗体であり、ビオチンタグやPEGを認識する抗体ではないことが確認された。

[0737] （１－５）ATPおよびadenosineに結合する抗体の発現と精製

ATNLSA1-4_D12の可変領域をコードする遺伝子はヒトIgG1/Lambdaの動物発現用プラスミドへ挿入された。以下の方法を用いて抗体が発現された。FreeStyle 293 Expression Medium培地（Invitrogen）に1.33 x 10^6細胞/mLの細胞密度で懸濁されて、6well plateの各ウェルへ3 mLずつ播種されたヒト胎児腎細胞由来FreeStyle 293-F株（Invitrogen）に対して、調製されたプラスミドがリポフェクション法により導入された。CO_2インキュベーター（37℃、8%CO_2, 90 rpm）で4日間培養された培養上清から、rProtein A Sepharose™ Fast Flow（Amersham Biosciences）を用いて当業者公知の方法で抗体が精製された

。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。得られた測定値からPACE法により算出された吸光係数を用いて精製された抗体の濃度が算出された（Protein Science (1995) 4, 2411-2423）。

[0738] （１－６）表面プラズモン共鳴を用いたATP、adenosine結合抗体のATP、adenosine結合の評価

Biacore T200 (GE Healthcare) を用いて、ATPおよびAdenosine結合活性のあるクローンATNLSA1-4_D12の可変領域がIgGの定常領域に連結されたD12の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適切な量のprotein A (Life technologies) が固定化されたSensor chip CM5またはCM4 (GE Healthcare) に目的の抗体をキャプチャーさせ、抗原であるATP (Wako)、Adenosine (Wako)、ADP (adenosine diphosphate) (Wako) を相互作用させた。ランニングバッファーには50 mM Tris-HCl (Takara, T903), 500 mM NaCl, 0.01% (w/v) Tween20が用いられた。抗原は流速30μL/minで、30秒間相互作用させ、30秒間解離させた。抗原との相互作用は15℃で測定され、抗原の希釈にはランニングバッファーと同じバッファーが使用された。

[0739] 測定で得られたセンサーグラムから算出された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) をもとに、解離定数K_D (M) が算出された。あるいは、衡状態解析法 (Steady state analysis) を用いて、解離定数K_D (M) が算出された。各パラメーターの算出には Biacore T200 Evaluation Software (GE Healthcare) が用いられた。

[0740] adenosineに対するK_Dを算出するために、各濃度のadenosine存在下での結合レスポンスが20μmol/L ADP存在下および非存在下において取得され、また別途20μmol/L ADP存在下での結合レスポンスが取得された。非特異的結合成分と推定される、ADP存在下における各濃度のadenosineに対する結合レスポンスからADP単独存在下でのレスポンスを差し引いた値を、ADP非存在下におけるadenosineに対する結合レスポンスの値から差し引くことで、adenosineに対する特異的結合のレスポンス(R)が取得された。adenosine濃度がX軸に、式２により算出されるRがY軸にプロットされた曲線に対して最小二乗法をOffic

e Excel2007（Microsoft）のソルバー機能を用いて適用することによってadenosineに対するK_D値が決定された。

[0741] （式２）

$$R = Rmax \times conc / (K_D + conc)$$

[0742] 式２において、concはadenosine濃度（mol/L）を意味し、Rmaxは抗体に対してadenosineが最も結合したときに期待されるレスポンスの値を意味する。実測されたレスポンスの値の抽出には、Scrubber2（BioLogics. Inc）が用いられた。

[0743] この測定で取得されたD12のATPに対するKDは8.5μmol/L、ADPに対するKDは0.25μmol/L、Adenosineに対するKDは1100μmol/であった。このことから、D12は、ATP、ADP、Adenosineに対して結合活性を有し、またAMP（adenosine monophosphate）およびcAMP（cyclinc adenosine monophosphate）に対しても結合活性を有すると考えられた。

[0744] 〔参考実施例２〕抗ATP/アデノシン抗体を利用したATP/アデノシンスイッチ抗体取得用のライブラリの設計

癌組織および炎症性組織においては、アデノシンのみならずATPの濃度も高いことが知られている。そのため、アデノシンまたはATPのいずれかのみをスイッチとして利用する抗体だけでなく、アデノシンおよびATPの両者（本実施例においてATP/アデノシンと記載される）をスイッチとして利用できる抗体（すなわちアデノシンあるいはATPどちらかが高濃度に存在していれば抗原に結合できる抗体）も有用である。参考実施例１－４に示されたATNLSA1-4_D12はATP/アデノシンに結合する抗体であり、当該抗体は図４３に示したようにATP/アデノシンが抗体と標的抗原の間に挟まり、標的抗原と接する抗体可変領域を含むと考えられた。そこで、このように標的抗原と接し得て、ATP/アデノシンへの結合を保持し得る抗体可変領域部分をライブラリ化することで、任意の抗原に対してATP/アデノシンの有無によって任意の抗原に対する結合活性が変化するATP/アデノシンスイッチ抗体を取得できる合成抗体ライブラリが作製できると考えられた。

[0745] 参考実施例１－４においてヒト抗体ライブラリより取得されたATP/アデノシン抗体ATNLSA1-4_D12とATPの複合体の結晶構造が解析された。結晶構造解析の結果から、当該抗体が認識するアデノシン（およびATP）の認識様式、および、アデノシン（およびATP）への結合に大きく関与していないと想定される抗体可変領域のアミノ酸残基が同定された。アデノシン（ATP）への結合に主に関与しているアミノ酸残基は重鎖におけるSer52、Ser52a、Arg53、Gly96、Leu100a、Trp100c（Kabatナンバリング）であると同定された。

[0746] ライブラリの設計にあたり、以下の条件のうち少なくとも一つを満たす部位がライブラリ化可能部位として選定された。

条件１）ATPに対する結合に大きく関与していない部位、あるいは、結合に関与していてもATPに対する結合を低下させない天然配列以外のアミノ酸が存在する部位、

条件２）ヒト抗体のレパートリーとしてある程度アミノ酸出現頻度の多様性のある部位、

条件３）Canonical structureの形成に重要でない部位。

[0747] 重鎖、軽鎖共に上記の条件を満たす部位であって、ATNLSA1-4_D12の配列に含まれる部位のうち、CDR1およびCDR2の部位に関しては生殖細胞系列での出現頻度が2%以上のアミノ酸に、CDR3の部位に関しては生殖細胞系列での出現頻度が1%以上のアミノ酸に網羅的に置換されて、これらの置換が組み合わされたATNLSA1-4_D12の改変体が複数作製された。

[0748] 重鎖の部位のうち改変された部位（表中、「Kabat」と記載されるKabatナンバリングで表される部位）ならびに当該部位における改変前のアミノ酸（表中、「天然配列」と記載されるアミノ酸）および改変後のアミノ酸（表中「改変アミノ酸」と記載されるアミノ酸）は表４６に示した。

[0749]

[表46]

		HCDR1			HCDR2			HCDR3				
	Kabat	31	32	35	55	57	58	96	97	99	100	100a
	天然配列	T	Y	N	N	I	N	G	R	G	D	L
改変アミノ酸	A		A		A	A		A	A	A	A	A
	C											
	E				E							
	D	D			D		D	D	D	D		
	G	G			G		G					
	F		F				F					F
	I											I
	H		H	H			H					
	K					K				K	K	K
	M											M
	L				L							
	N	N	N					N	N	N	N	
	Q											
	P											
	S	S	S	S	S		S	S	S	S	S	
	R	R			R	R						R
	T			T	T	T	T					
	W											W
	V								V	V	V	V
	Y			Y			Y		Y	Y	Y	Y

[0750] 軽鎖の部位のうち改変された部位（表中、「Kabat」と記載されるKabatナンバリングで表される部位）ならびに当該部位における改変前のアミノ酸（表中、「天然配列」と記載されるアミノ酸）および改変後のアミノ酸（表中「改変アミノ酸」と記載されるアミノ酸）は表４７に示した。

[0751] [表47]

		LCDR1									LCDR2						LCDR3								
	Kabat	26	27	27a	27b	27c	28	29	31	32	50	51	52	53	54	55	89	90	91	92	93	94	95a	96	97
	天然配列	T	S	S	D	V	G	G	N	Y	E	V	S	K	R	P	S	S	Y	A	G	S	N	V	V
改変アミノ酸	A	A						A		A			A				A	A	A		A	A	A	A	A
	C																								
	E								E					E						E			E		
	D						D	D	D	D	D	D	D	D					D	D	D	D	D	D	
	G			G							G	G					G					G	G	G	G
	F							F									F		F					F	
	I					I															I	I	I		I
	H													H					H				H	H	
	K								K		K	K			K				K				K	K	
	M																								M
	L															L	L	L					L	L	L
	N			N	N						N	N	N	N			N		N		N	N		N	
	Q										Q			Q			Q						Q	Q	
	P																						P	P	
	S	S						S		S	S			S					S	S	S		S	S	S
	R							R			R								R	R	R	R	R		
	T		T	T				T		T		T	T				T	T	T	T	T	T	T	T	
	W																		W					W	
	V																V	V	V	V	V				
	Y							Y			Y			Y			Y			Y	Y		Y	Y	

[0752] 参考実施例１－１で示された方法で発現および精製された各改変体のATPおよびアデノシンへの結合が、参考実施例１－６で示されたBiacoreを用いた測定方法と同様の方法で測定された。測定の結果、各改変体のATPに対するAffi

nityがKD値として算出された。重鎖の部位としては改変によってATP結合能がATNLSA1-4_D12の1/5 の結合能を下回らないもの（すなわちKD値が42.5μmol/Lより小さいもの）、および軽鎖の部位としてはATNLSA1-4_D12の結合能 を上回るもの（すなわちKD値が8.5μmol/Lより小さいもの)が改変可能部位と判定され、当該部位において置換されたアミノ酸はライブラリ化が可能なアミノ酸（ライブラリにおいて出現させるフレキシブル残基）と判定された。

[0753] 各改変体のATP結合能の評価結果から、各部位をライブラリ化することにより、ATPへの結合能は低下することが予想された。そこで、ATPへの結合に関与していると推察される部位の周辺部位が置換され、これらの置換が組み合わされた各種改変体を網羅的に評価することで、ATPへの結合能を増強させる効果が期待される改変を同定することが可能かどうか検証された。このように改変された部位（表中、「Kabat」と記載されるKabatナンバリングで表される部位）ならびに当該部位における改変前のアミノ酸（表中、「天然配列」と記載されるアミノ酸）および改変後のアミノ酸（表中、「改変アミノ酸」と記載されるアミノ酸）は表４８に示した。

[0754]

[表48]

		HCDR1	HCDR2		HCDR3			LCDR3
	Kabat	33	50	56	95	98	100b	95
	天然配列	T	S	Y	F	K	N	N
改変アミノ酸	A	A	A	A	A	A	A	A
	C							
	E	E	E	E		E	E	E
	D	D	D	D		D	D	D
	G	G	G	G		G	G	G
	F	F	F	F		F	F	F
	I	I	I	I	I	I	I	I
	H	H	H	H		H	H	H
	K	K	K	K	K		K	K
	M	M	M	M	M	M	M	M
	L	L	L	L	L	L	L	L
	N	N	N			N		
	Q	Q	Q	Q		Q	Q	Q
	P	P	P	P		P	P	P
	S	S		S		S	S	S
	R	R	R		R	R	R	R
	T		T	T		T	T	T
	W	W	W	W	W	W	W	W
	V	V	V	V	V	V	V	V
	Y	Y	Y		Y	Y	Y	Y

[0755] 参考実施例１－１で示された方法で発現および精製された各改変体のATPおよびアデノシンへの結合が、参考実施例１－６で示されたBiacoreを用いた測定方法と同様の方法で測定された。測定の結果、ATPおよびアデノシンへの結合増強が期待される改変はKabatナンバリングで表される56位、100位等の部位（例えばTyr56His、Asn100bLeu等のアミノ酸の改変）であり、当該部位において置換されたアミノ酸もライブラリ化が可能なアミノ酸（ライブラリにおいて出現させるフレキシブル残基）と判定された。

[0756] ATNLSA1-4_D12のCDRの部位において、前記の改変体の解析から選出されたライブラリ化可能アミノ酸（ライブラリにおいて出現するアミノ酸させるフレキシブル残基）および当該アミノ酸に改変前のアミノ酸（すなわち、ATNLSA1-4_D12の天然配列に含まれるアミノ酸）を含むアミノ酸レパートリーと当該レパートリーを含む部位を設計することによって、ATP/アデノシンスイッ

チ抗体取得用のライブラリが構築された。アミノ酸レパートリーに含まれる各アミノ酸の出現頻度は等しくなるように（例えば、アミノ酸レパートリーが10種類の場合は、各アミノ酸はそれぞれ10％出現するように）ライブラリが構築された。

[0757] 重鎖におけるアミノ酸レパートリーを含む部位（表中、「Kabat」と記載されるKabatナンバリングで表される部位）ならびに当該部位におけるアミノ酸レパートリーは表４９に示した。軽鎖におけるアミノ酸レパートリーを含む部位（表中、「Kabat」と記載されるKabatナンバリングで表される部位）ならびに当該部位におけるアミノ酸レパートリーは表５０に示した。

[0758] [表49]

		HCDR1			HCDR2					HCDR3						
	Kabat	31	32	35	55	56	57	58	59	95	97	98	99	100	100a	100b
	天然配列	T	Y	N	N	Y	I	N	Y	F	R	K	G	D	L	N
改変アミノ酸	A				17%		25%				11%			5%		
	C															
	E												9%	5%		
	D							13%					9%	5%		
	G	33%			17%			13%			11%		9%	5%		
	F		33%					13%		50%			9%	5%		
	I						25%				11%			5%		
	H		33%	50%		50%		13%			11%		9%	5%	17%	
	K						25%				11%	33%	9%	5%		
	M										11%			5%	17%	
	L								50%		11%	33%		5%	17%	50%
	N			50%	17%			13%					9%	5%		50%
	Q												9%	5%		
	P													5%		
	S	33%			17%			13%						5%		
	R				17%		25%				11%	33%	9%	5%	17%	
	T	33%			17%			13%						5%		
	W												9%	5%	17%	
	V										11%			5%		
	Y		33%			50%		13%	50%	50%			9%	5%	17%	

[0759]

[表50]

		LCDR1		LCDR2			LCDR3								
	Kabat	27a	29	50	51	54	90	91	92	93	94	95	95a	96	97
	天然配列	S	S	E	V	R	S	Y	A	G	S	N	N	V	V
改変アミノ酸	A		17%						17%	14%	13%	6%			17%
	C														
	E			14%					17%			6%			
	D		17%	14%						14%	13%	6%	11%		
	G		17%	14%	25%					14%	13%	6%	11%		17%
	F		17%									6%			
	I									14%	13%	6%	11%		
	H											6%	11%		
	K			14%		50%		14%				6%			
	M											6%			17%
	L						25%					6%	11%	33%	17%
	N				25%			14%			13%	6%	11%		
	Q			14%								6%	11%		
	P											6%		33%	
	S	50%	17%	14%			25%		17%	14%	13%	6%	11%		17%
	R					50%		14%	17%		13%	6%			
	T	50%	17%		25%		25%	14%	17%	14%	13%	6%			
	W							14%				6%			
	V				25%		25%	14%						33%	17%
	Y			14%				14%	17%	14%		6%	11%		

[0760] 配列解析の結果から、ATNLSA1-4_D12のフレームワークはVH3-21生殖細胞系列由来であると推察された。そこで、抗体の安定性の向上を目的として、ATNLSA1-4_D12のフレームワーク配列をVH3-21ジャームライン配列に戻すためにGln01Glu、Gln05Val、Asp10Gly、Asn30Ser、Leu48Val、Asn58Tyr（数字はKabatナンバリングを表す）の改変がATNLSA1-4_D12のフレームワーク配列に導入された。参考実施例１－１で示された方法で発現および精製されたATNLSA1-4_D12の改変体のTmがDSCによって測定された。DSCによる測定は当業者公知の方法で実施された。これらの改変が加えられたATNLSA1-4_D12の改変体のTmは74.37℃から81.44℃と大幅に向上し、その構造の安定化が認められた。抗体ライブラリとして安定性が高いフレームワークを用いることも好ましい場合があることから、前記の改変が加えられたフレームワーク配列が、ライブラリのフレームワーク配列として用いられた。ライブラリに用いられたフレームワークは表５１に示した。

[0761]

[表51]

フレームワーク	配列番号	配列
重鎖フレームワーク１	５２	EVQLVESGGDLVKPGGGLRLSCAASGFTFS
重鎖フレームワーク２	５３	WVRQAPGKGLEWVS
重鎖フレームワーク３	５４	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
重鎖フレームワーク４	５５	WGQGTLVTVSS
軽鎖フレームワーク１	５６	QSALTQPPSASGSPGQTVTISC
軽鎖フレームワーク２	５７	WYQQHPGKAPKLMIY
軽鎖フレームワーク３	５８	GVPDRFSGSKSGNTASLTVSGLQAEDEADYFC
軽鎖フレームワーク４	５９	FGGGTKLTVL

[0762] こうして設計されたライブラリに含まれる個々の配列を含む遺伝子が合成され（DNA2.0）、これらの個々の遺伝子の集合体（ライブラリ）を鋳型として用いてVHおよびVLをそれぞれ増幅させることが可能なプライマーによって遺伝子ライブラリが増幅された。なお、VL増幅用プライマーの配列は配列番号：８１および８２に記載され、VH増幅用プライマーの配列は配列番号：８３および８４にそれぞれ記載されている。増幅されたラショナルデザインヒト抗体重鎖可変領域の遺伝子ライブラリとヒト抗体軽鎖可変領域の遺伝子ライブラリはヒトIgG由来CH1配列およびヒトIgG由来軽鎖定常領域配列の両方を有する適切なファージミドベクターへと導入された。このファージミドベクターをエレクトロポレーションにより大腸菌へと導入することで、ヒト抗体可変領域－定常領域よりなるFabドメインを提示し、アデノシンまたはATPをスイッチとして抗原に結合できる抗体を取得できるようなラショナルデザインライブラリが構築された。このように多様なアデノシンまたはATP結合活性を有するH鎖およびL鎖から構成されたラショナルデザインライブラリは、図４３に示したようにアデノシンまたはATPが抗体と抗原の間に挟まり、任意の抗原に対するATP/アデノシンスイッチ抗体を効率よく取得できるヒト抗体が含まれるライブラリとして有用であると考えられた。また、上述のようにATNLSA1-4_D12はアデノシンとATPのみならず、ADPにも結合することから、ATP、ADPおよびアデノシンにその構造が類似するAMPおよびcAMPにも結合活性を有すると予想された。そのため、本ライブラリはATP、ADP、AMP、cAMP、または

アデノシンのうちいずれか一つ以上の低分子の有無によって任意の標的抗原に対する結合活性が変化するスイッチ抗体を取得するのに有用であると考えられた。

[0763] 〔参考実施例３〕ファージディスプレイ技術を用いた抗体ライブラリからのアデノシン、ATP存在下において抗原に結合する抗体の取得

（３－１）アデノシンおよびATPの混合物を利用したライブラリからの低分子存在下において抗原に結合する抗体の取得

構築されたラショナルデザイン抗体ファージディスプレイライブラリから、アデノシンおよび/またはATP存在条件下で抗原に対する結合活性を示す抗体が取得された。取得のために、アデノシン、およびATP存在下でビーズにキャプチャーされた抗原に対して結合能を示す抗体を提示しているファージが回収され、その後アデノシン、およびATPの非存在条件下でビーズから溶出された溶出液中にファージが回収された。

[0764] 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する大腸菌からファージが産生された。ファージ産生が行われた大腸菌の培養液に2.5M 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、当該ファージライブラリ液に終濃度4%となるようにBSAが添加された。磁気ビーズに固定化された抗原を用いてパンニングが実施された。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。抗原として、ビオチン化されたヒトIL-6レセプターが使用された。

[0765] 調製されたファージライブラリ液に500 pmolのビオチン標識抗原、ならびに各終濃度 1 mMのATP-Naおよびアデノシン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分間抗原及びアデノシン、およびATPと接触させる。当該ファージライブラリ液に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ATPおよびアデノシンを溶解したTBSにて1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分離されたビーズから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。

[0766] 1回目のパンニングでは、アデノシンおよびATP存在下で抗原に対して結合可能なファージの回収が行われたが、2回目以降のパンニングでは、アデノシンおよびATP存在下でのみ抗原に対して結合可能なファージの濃縮が行われた。具体的には、調製されたファージライブラリ液に40 pmolのビオチン標識抗原ならびに各終濃度1 mMのアデノシンおよびATPを加えることによって、ファージライブラリを室温で60分間抗原ならびにアデノシンおよびATP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のアデノシンおよびATP を溶解したTBST（以下、（アデノシン＋ATP)/TBSTと呼ばれる）とアデノシン、アデノシンおよびATP を溶解するTBS（以下、（アデノシン＋ATP)/TBSと呼ばれる）にて洗浄された。その後0.5 mLのTBSが加えられたビーズが室温で懸濁された後、即座に磁気スタンドを用いて分離されたビーズからファージ溶液が回収された。この作業が再度繰り返された後、2回に分けて溶出されたファージ液が混合された。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が失われた。トリプシン処理されたファージ溶液から回収されるファージが、対数増殖期（OD600が0.4-0.7）となった10 mLの大腸菌株ER2738に添加された。37℃で1時間緩やかに上記大腸菌の攪拌培養を行うことによって、ファージを大腸菌に感染させた。感染させた大腸

菌は225 mm x 225 mmのプレートへ播種された。次に、播種された大腸菌の培養液からファージを回収することによってファージライブラリ液が回収された。アデノシンおよびATP存在下で抗原に対する結合活性を有する抗体を取得するパンニングが3回繰り返された。

[0767] （３－２）ネガティブセレクション法を利用した抗体ライブラリからのアデノシン、ATP存在下において抗原に結合する抗体の取得

ラショナルデザイン抗体ファージディスプレイライブラリから、抗原に対してアデノシンおよび/またはATPが存在する条件下で抗原に対する結合活性を示す抗体のスクリーニングが行われた。スクリーニングのために、まず抗体ファージディスプレイライブラリを、アデノシンおよびATP非存在下でビオチン標識抗原－ストレプトアビジンと接触させ、アデノシンおよびATP非存在下でも抗原に対して結合活性を有する抗体を提示しているファージが除去された。それに続き、アデノシンおよびATPの存在する条件下で同様にパンニングを行うことによって、アデノシンおよびATPが存在する条件下で抗原に対して結合活性を有する抗体のスクリーニングが実施された。

[0768] 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が産生された。ファージ産生が行われた大腸菌の培養液に2.5M 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%となるようにBSAが添加された。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) を用い、磁気ビーズに固定化される抗原を用いるパンニングが実施された。

[0769] 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とともに、各終濃度が 1 mMのアデノシンおよびATPの混合液を加えることによって、当該ファージライブラリ液と抗原ならびにアデノシンおよびATPとを室温にて60分間接触させた。次にファージライブラリ液に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(アデノシン＋ATP) /TBSにて1回洗浄された。その後、1 mg/mLのトリプシン溶液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分離されたビーズから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に対して、ヘルパーファージM13KO7(タカラバイオ)、もしくはM13KO7ΔpIII（ハイパーファージと呼称される）（PROGEN Biotechnik）を感染させ、30℃で一晩培養した上清からファージを回収することによって、それぞれ抗体一価提示ファージライブラリ及び抗体多価提示ファージライブラリ液が調製された。

[0770] 1回目のパンニングでは、アデノシンおよびATP存在下で結合可能なファージの回収が行われるが、2回目以降のパンニングでは、アデノシンおよびATP存在下でのみ抗原に対して結合可能なファージの濃縮が行われた。具体的には、BSAでブロッキングされたSera-Mag NeutrAvidin ビーズに250 pmolビオチン化抗原を加え、室温で15分間結合させた。TBSで3回洗浄されたビーズに対して、BSAにてブロッキングが行われたファージライブラリ液を加え室温にて1時間結合させた。磁気スタンドを用いてビーズを分離することによって、抗原およびビーズに結合しないファージが回収された。回収されたファージに対して、40 pmolのビオチン標識抗原ならびに各終濃度1 mMのアデノシンおよびATPを加えることによって、ファージライブラリを室温で60分間抗原ならびにアデノシンおよびATPと接触させた。次に、当該標識抗原ならびにアデノシンおよびATPとファージライブラリとの混合液にBSAでブロッキングされた磁気ビーズを加え、室温で15分間、抗原とファージとの複合体を磁気ビーズと結合させた。ビーズは1 mLの(アデノシン＋ATP) /TBSTと(アデノシン＋ATP) /TBSにて洗浄された。その後1 mg/mLのTrypsin溶液0.5 mLが当該混合液に加えられた。当該混合液は室温で20分間攪拌された後、磁気スタンドを使用

して分離されたビーズからファージが回収された。回収されたファージは、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。アデノシンおよびATPが存在する条件下で抗原に対する結合活性を有する抗体を取得するパンニングが3回繰り返された。

[0771] （３－３）ファージELISAによるアデノシンおよび/またはATPの存在下および非存在下における結合活性評価

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）に倣い、ファージ含有培養上清が回収された。NucleoFast 96（MACHEREY-NAGEL）を用いて、回収された培養上清が限外ろ過された。培養上清各100μLが各ウェルにアプライされたNucleoFast 96を遠心分離（4,500g、45分間）することによってフロースルーが除去された。100μlのH_2Oが各ウェルに加えられた当該NucleoFast 96が、再度遠心分離（4,500g、30分間）によって洗浄された。最後にTBS 100μLが加えられ、室温で5分間静置された当該NucleoFast 96の各ウェルの上清に含まれるファージ液が回収された。

[0772] TBS、または(アデノシン＋ATP)/TBSが加えられた精製ファージが以下の手順で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TBSにて一晩コートされた。当該プレートの各ウェルをTBSTにて洗浄することによって抗原が除かれた後、当該ウェルが250μLの2%SkimMilk-TBSにて1時間以上ブロッキングされた。2%SkimMilk-TBSを除き、その後、各ウェルに調製された精製ファージ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、抗体を提示したファージを各ウェルに存在する抗原にアデノシンおよび/またはATPの非存在下および存在下において結合させた。TBSTまたは(アデノシン＋ATP)/TBSTにて洗浄された各ウェルに、TBSまたは(アデノシン＋ATP)/TBSによって希釈されたHRP結合抗M13抗体（Amersham Pharmacia Biotech）が添加されたプレートを１時間インキ

ュベートさせた。TBSTまたは(アデノシン＋ATP)/TBSTにて洗浄後、TMB single溶液（ZYMED）が添加された各ウェル中の溶液の発色反応が硫酸の添加により停止された後、450 nmの吸光度によって当該発色が測定された。その結果、ヒトIL-6 レセプターに対して、ATPまたはアデノシン存在下で結合する抗体が複数確認された。ファージELISAの結果を表５２に示した。

[0773] [表52]

パンニング回数	3	4
ELISA実施クローン数	96	96
陽性クローン数(S/N比>10)	23	64
スイッチクローン数(SM+/-比>2)	22	64
スイッチクローン配列数	17	35

[0774] （３－４）アデノシンおよびATPの有無によって抗原に対する結合活性が変化するスイッチ抗体の配列解析

参考実施例（３－３）で示されるファージELISAの結果、アデノシンまたはATPが存在する条件下で抗原に対する結合活性があると判断されたクローンから特異的なプライマー（配列番号：７９及び８０）を用いて増幅された遺伝子の塩基配列が解析された。解析の結果、ATPもしくはアデノシン存在下でビオチン標識hIL-6Rに対する結合活性を有すると判断されたクローン6RAD2C1-4_001、6RAD2C1-4_005、6RAD2C1-4_011、6RAD2C1-4_026、6RAD2C1-4_030、6RAD2C1-4_042、6RAD2C1-4_076、6RDL3C1-4_085、6RDL3C5-4_011が取得された（表５３）。

[0775] [表53]

クローン名	重鎖配列番号	軽鎖配列番号
6RAD2C1-4_001	配列番号:60	配列番号:61
6RAD2C1-4_005	配列番号:62	配列番号:63
6RAD2C1-4_011	配列番号:64	配列番号:65
6RAD2C1-4_026	配列番号:66	配列番号:67
6RAD2C1-4_030	配列番号:68	配列番号:69
6RAD2C1-4_042	配列番号:70	配列番号:71
6RAD2C1-4_076	配列番号:72	配列番号:73
6RDL3C1-4_085	配列番号:74	配列番号:75
6RDL3C5-4_011	配列番号:76	配列番号:77

[0776] 〔参考実施例４〕ファージディスプレイ技術を用いた抗体ライブラリからのアデノシン、ATP非存在下において抗原に結合する抗体の取得

（４－１）アデノシンおよびATPの混合物を利用したライブラリからの低分子存在下において抗原への結合が阻害される抗体の取得

上述の参考実施例３において、スイッチとなる低分子の存在下で標的抗原に結合する抗体が取得された。本参考実施例においては、低分子非存在下において標的抗原に結合する抗体の取得が試みられた。

[0777] 参考実施例２で構築されたラショナルデザイン抗体ファージディスプレイライブラリから、抗原に対してアデノシン、および/またはATP非存在条件下で抗原に対する結合活性を示し、存在下で結合能が減衰する抗体が取得された。取得のために、まず抗体ファージディスプレイライブラリを、ビオチン化アデノシンおよびビオチン化ATPと接触させ、アデノシンおよび/またはATPに結合する抗体ファージディスプレイライブラリが回収された。次に、当該抗体ファージディスプレイライブラリを、アデノシンおよびATP非存在条件下でビオチン化抗原－ストレプトアビジンと接触させ、アデノシンおよびATP非存在下で抗原に結合する抗体が回収された。このようなパンニングを交互に行うことによって、アデノシンおよび/またはATPと、抗原の両者に対して結合活性を有する抗体がスクリーニングされた。このような性質を持つ抗体は、アデノシンおよびATP存在下においては、アデノシンおよび/またはATPの抗体への結合により、抗体の抗原への結合が阻害されることが期待された。

[0778] 参考実施例２で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する大腸菌からファージが産生された。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 %となるようにBSAが添加された。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) を用い、磁気ビーズに固定化された抗原を用いるパンニングが実施された。

[0779] 調製されたファージライブラリ液に500 pmolのビオチン化ATP、2'-Adenosi

ne-PEG-Biotin、および5'-Adenosine-PEG-Biotinを加えることによって、当該ファージライブラリ液とアデノシンおよびATPとを室温にて60分間接触させた。次にファージライブラリ液にBSAでブロッキングされた磁気ビーズが加えられ、アデノシンおよび/またはATP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TBSにて1回洗浄された。その後、1 mg/mLのトリプシン溶液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分離されたビーズから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。

[0780] 2回目のパンニングでは、アデノシンおよびATP非存在条件下でビオチン化抗原に対して結合可能なファージの濃縮が行われた。具体的には、調製されたファージライブラリ液に250 pmolのビオチン化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抗原と室温にて60分間接触させた。次にファージライブラリ液に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TBSTにて2回、TBSにて1回洗浄された。その後、1 mg/mLのトリプシン溶液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分離されたビーズから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。

[0781] この後、奇数回目のパンニングにおいては、1回目のパンニングと同じ条件

によるパンニングが繰り返し実施された。ただし、TBSTおよびTBSによるビーズの洗浄は、それぞれ3回、2回に増やして実施された。

[0782] この後、偶数回目のパンニングにおいては、2回目のパンニングと同じ条件によるパンニングが繰り返し実施された。ただし、4回目以降のパンニングでは、ビオチン化抗原を40pmolに減らし、TBSTおよびTBSによるビーズの洗浄はそれぞれ3回、2回に増やして実施された。

[0783] （４－２）ファージELISAによる低分子存在下における結合活性の評価

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）に倣い、ファージ含有培養上清が回収された。回収された培養上清はNucleoFast 96（MACHEREY-NAGEL）を用いて限外ろ過された。培養上清各100 μLが各ウェルにアプライされたNucleoFast 96を遠心分離（4,500 g, 45分間）することによってフロースルーが除去された。100 μL のH_2Oが各ウェルに加えられた当該NucleoFast 96が、再度遠心分離（4,500 g, 30分間遠心）によって洗浄された。最後にTBS 100 μLが加えられ、室温で5分間静置された当該NucleoFast 96の各ウェルの上清に含まれるファージ液が回収された。

[0784] TBS、もしくはATPおよびアデノシン/TBSが加えられた精製ファージが以下の手順で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100 μLのTBSにて一晩コートされた。当該プレートの各ウェルをTBSTにて洗浄することによってStreptavidinに結合していない抗原が除かれた後、当該ウェルが250 μLの2 % SkimMilk-TBSにて1時間以上ブロッキングされた。2 % SkimMilk-TBSを除き、その後、各ウェルに調製された精製ファージが加えられた当該プレートを37 ℃で1時間静置することによって、ファージを提示する抗体を各ウェルに存在する抗原にアデノシンおよびATP10 mM存在下または非存在下において結合させた。TBSTもしくは10 mM ATPおよびアデノシン/TBSTにて洗浄された各ウェルに、TBSもしくは10 mM ATPおよびアデノシン/TBSによって希釈されたHRP結合抗M13抗体（Amersham Pharmacia Biotech）が添加されたプレートを１時間インキュベートさせた

。TBSTもしくは10 mM ATPおよびアデノシン/TBSTにて洗浄後、TMB single溶液（ZYMED）が添加された各ウェル中の溶液の発色反応が硫酸の添加により停止された後、450 nmの吸光度によって当該発色が測定された。

[0785] 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、ラショナルデザイン抗体ライブラリより、ATP及びアデノシン非存在下で抗原であるヒトIL-6に対して結合活性を示すクローン「I6RLSA1-6_011」、ATP及びアデノシン非存在下で抗原であるHuman Serum Albumin(HSA)に対して結合活性を示すクローン「HSADSA1-6_020」、及び、ATP及びアデノシン非存在下でヒトIL-6 receptorに対して結合活性を示すクローン「6RRLSA1-6_037」、「6RRLSA1-6_045」が得られた（図４４、４５、４６）。

[0786] （４－３）アデノシンおよびATPをスイッチとする抗体の配列解析

（４－２）で示されたファージELISAの結果、アデノシンまたはATPの非存在条件下で抗原に対する結合活性があると判断されたクローンから特異的なプライマー（配列番号：７９及び８０）を用いて増幅された遺伝子の塩基配列が解析された。解析の結果について以下の表５４にアミノ酸配列を示した。

[0787] [表54]

クローン名	重鎖配列番号	軽鎖配列番号
I6RLSA1-6_011	138	139
HSADSA1-6_020	140	141
6RRLSA1-6_037	142	143
6RRLSA1-6_045	144	145

[0788] 〔参考実施例５〕ビオチン化ヒトIgA-Fcの調製

ヒトIgAとして天然に存在するヒトIgA配列のうちFc部分を用いた（ヒトIgA-Fc）。ヒトIgA-FcのC末端にbiotinを付加するため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、配列番号：１４７）をコードする遺伝子断片をリンカーを介して連結させた。ヒトIgA-FcとAviTag配列が連結されたタンパク質（配列番号：１４６）をコードする遺伝子断片を動物細胞発現用ベクターに組み込み、構築されたプラスミドベクターを293 Fectin (Invitrogen)を用いてFreeStyle293細胞 (Invitrogen)に導入した。

このときEBNA1（配列番号：１４８）を発現する遺伝子およびビオチンリガーゼ（BirA、配列番号：１４９）を発現する遺伝子を同時に導入し、さらにヒトIgA-Fcをビオチン標識する目的でビオチンを添加した。前述の手順に従って遺伝子が導入された細胞を37 ℃、8 % CO_2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。

目的のビオチン化ヒトIgA-Fcを含む細胞培養液を0.22 μmボトルトップフィルターでろ過し、培養上清を得た。20 mM Tris-HCl, pH7.4で平衡化されたHiTrap Q HP (GEヘルスケア)に、同溶液で希釈された培養上清をアプライし、NaClの濃度勾配により目的のビオチン化ヒトIgA-Fcを溶出させた。次に、50 mM Tris-HCl, pH8.0で平衡化されたSoftLink Avidin カラム (Promega) に、同溶液で希釈された前記HiTrap Q HP溶出液をアプライし、5 mM ビオチン, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH8.0で目的のビオチン化ヒトIgA-Fcを溶出させた。その後、Superdex200(GEヘルスケア)を用いたゲルろ過クロマトグラフィーによって、目的外の不純物である会合体を除去し、バッファーが20 mM Histidine-HCl, 150 mM NaCl, pH6.0に置換された精製ビオチン化ヒトIgA-Fcを得た。

産業上の利用可能性

[0789] 本発明の低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインまたは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子、ならびにこれを含む医薬組成物は、正常組織や血液中において全身的に作用せず、標的組織における病変部位である癌や炎症部位において可逆的に作用することにより、副作用を回避しつつ薬効を発揮し、該標的組織に起因する疾患を治療することができる。また、非天然化合物の濃度に応じて抗原への結合が制御される抗体が取得できれば、斯かる抗体は抗体の活性や薬理作用を病変部位で活性化する外来性化合物や、あるいは、非侵しゅう投与可能な外来性化合物の投与によってコントロールすることができるため極めて有用である。

さらに、本発明の、互いに配列の異なる複数の、低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインまたは抗原結合ドメ

インを含む抗原結合分子を含むライブラリを用いれば、組織特異的な疾患の治療に有用な様々な抗原結合分子を、短時間で効率良く取得することが可能である。

請求の範囲

[請求項1] （i）互いに配列の異なる複数の抗原結合ドメイン若しくは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子；又は

（ii）当該互いに配列の異なる複数の抗原結合ドメイン若しくは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子をコードする核酸、

から主としてなるライブラリであって、前記抗原結合分子ドメインまたは抗原結合分子は、低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインまたは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子であることを特徴とする、ライブラリ。

[請求項2] 以下の(a)および(b)の工程：

(a) 低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン又は低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合ドメインにおいて、以下の(i)乃至(iii)のいずれか一つ以上を満たすアミノ酸部位を特定する工程；

（i） 当該低分子化合物に対する結合に関与していない１または複数のアミノ酸部位；

（ii）親抗原結合ドメインが属する動物種の抗体のレパートリーとしてアミノ酸出現頻度の多様性のある１または複数のアミノ酸部位；

（iii）Canonical structureの形成に重要でない１または複数のアミノ酸部位；および

(b) 前記抗原結合ドメインにおいて、未改変体をコードする核酸及び工程(a)で特定された１または複数のアミノ酸部位に改変を有する、互いに配列が異なる、前記抗原結合ドメインまたは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子の複数の改変体それぞれをコードする核酸を含むライブラリを設計する工程、

を含む方法によって製造される、請求項1に記載のライブラリ。

[請求項3] 以下の(a)乃至(d)の工程：

(a) 低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン又は低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合ドメインにおいて、以下の(i)乃至(iii)のいずれか一つ以上を満たすアミノ酸部位を特定する工程；

(i) 当該低分子化合物に対する結合に関与していない１または複数のアミノ酸部位；

(ii) 親抗原結合ドメインが属する動物種の抗体のレパートリーとしてアミノ酸出現頻度の多様性のある１または複数のアミノ酸部位；

(iii) Canonical structureの形成に重要でない１または複数のアミノ酸部位、

(b) 工程(a)で特定された１または複数のアミノ酸部位に改変を有する、互いに配列が異なる、前記抗原結合ドメインまたは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子の複数の改変体を作製する工程、

(c) 前記それぞれの改変体の当該低分子化合物に対する結合活性に実質的に変化をもたらさない１または複数のアミノ酸の改変を特定する工程；および

(d) 未改変体をコードする核酸及び工程(c)で特定された１または複数のアミノ酸に改変を有する、互いに配列が異なる、前記抗原結合ドメインまたは抗原結合ドメインを含む抗原結合分子の複数の改変体をコードする核酸を含むライブラリを製造する工程、

を含む方法によって製造される、請求項2に記載のライブラリ。

[請求項4] 以下の１）および２）の工程：

１）低分子化合物に対する結合活性を有する抗原結合分子を複数含むライブラリと低分子化合物とを接触させる工程、および

２）該ライブラリから低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合分子の複数の改変体をコードする核酸を濃縮する工程、

を含む方法によって製造される、請求項1に記載のライブラリ。

[請求項5] 前記抗原結合分子が抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗原結合分子であって、以下の１）乃至３）のいずれか１つの工程を含む方法によって製造される、請求項4記載のライブラリ；

１）請求項4記載のライブラリが、重鎖可変領域に位置するアミノ酸が改変された１又は複数の改変体をコードする核酸を含むライブラリであって、該ライブラリから低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合分子の複数の改変体をコードする核酸を濃縮し、ライブラリを設計する工程；

２）請求項4記載のライブラリが、軽鎖可変領域に位置するアミノ酸が改変された１又は複数の改変体をコードする核酸を含むライブラリであって、該ライブラリから低分子化合物に対して結合活性を有する抗原結合分子の複数の改変体をコードする核酸を濃縮し、ライブラリを設計する工程；

３）工程１）及び工程２）のそれぞれの可変領域ライブラリから濃縮された抗原結合分子をコードする核酸を組み合わせることによって、ライブラリを設計する工程。

[請求項6] 前記抗原結合分子が、抗原結合ドメインとウイルスコートタンパク質の少なくとも一部との融合ポリペプチドであることを特徴とする、請求項1乃至5のいずれか一項に記載のライブラリ。

[請求項7] 前記抗原結合分子が、抗体の重鎖及び軽鎖を含む抗原結合分子であり、前記重鎖および/または軽鎖の合成ライブラリを設計する工程をさらに含む、請求項1乃至5のいずれか一項に記載のライブラリ。

[請求項8] 前記抗体の重鎖及び／又は軽鎖が、生殖細胞系列由来のフレームワーク配列を含むことを特徴とする、請求項7に記載のライブラリ。

[請求項9] 前記低分子化合物が、標的組織特異的な化合物又は非天然化合物である、請求項1乃至8のいずれか一項に記載のライブラリ。

[請求項10] 前記標的組織が、癌組織又は炎症性組織である、請求項1乃至9のいずれか一項に記載のライブラリ。

[請求項11] 前記癌組織特異的化合物が、プリン環構造を有するヌクレオシド、アミノ酸およびその代謝産物、脂質およびその代謝産物、糖代謝の一次代謝産物、ならびにニコチンアミドおよびその代謝産物からなる群から選択される少なくとも一つの化合物である、請求項10に記載のライブラリ。

[請求項12] 前記低分子化合物が、キヌレニン、アデノシン、アデノシン１リン酸、アデノシン２リン酸、又はアデノシン３リン酸である、請求項1乃至11のいずれか一項に記載のライブラリ。

[請求項13] 前記低分子化合物との結合に関与していないアミノ酸部位が、以下から選択されるいずれか一つ以上のアミノ酸以外である、請求項1乃至12のいずれか一項に記載のライブラリ：

H鎖：97、100c、 101、 94、 95、 100d、 100e、 33、 50、 52、 56、 57、 58、 99、 100、 100a、54、 55（Kabatナンバリング）；

L鎖：49、55、95c、 96、95a、 95b（Kabatナンバリング）。

[請求項14] 以下の(a)乃至(g)の工程：

(a) 低分子化合物の非存在下で請求項1乃至13のいずれか一項に記載のライブラリを抗原に接触させる工程、

(b) 前記工程(a)で抗原に結合しない抗原結合ドメインを選択する工程；

(c) 前記工程(b)で選択された抗原結合ドメインを低分子化合物の存在下で抗原に接触させる工程；

(d) 前記工程(c)で抗原に結合した抗原結合ドメインを選択する工程；

(e) 前記工程(d)で選択された抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドを、Fc領域を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに連結させる工程；、

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

(g) 前記工程(f)で培養された細胞の培養液から抗原結合分子を回収する工程、

を含む低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子の製造方法。

[請求項15] 以下の(a)乃至(e)の工程：

(a) 請求項1乃至13のいずれか一項に記載のライブラリを低分子化合物の存在下で抗原に接触させる工程；

(b) 前記工程(a)より低濃度の低分子化合物で抗原結合ドメインを解離させ回収する工程；

(c) 前記工程(b)で回収された抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドを、Fc領域を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに連結させる工程；

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

(e) 前記工程(d)で培養された細胞の培養液から抗原結合分子を回収する工程、

を含む低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子の製造方法。

[請求項16] 以下の(a)乃至(b)の工程：

(a) 請求項1乃至13のいずれか一項に記載のライブラリを低分子化合物に接触させる工程；および

(b) 前記工程(a)で回収された抗原結合ドメインを選択する工程；

をさらに含む、請求項14又は15に記載の低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子の製造方法。

[請求項17] 前記低分子化合物がキヌレニン、アデノシン、アデノシン１リン酸、アデノシン２リン酸、又はアデノシン３リン酸である請求項14乃至16のいずれか1項に記載の抗原結合分子の製造方法。

[請求項18] 非天然化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子。

[請求項19] 請求項18記載の抗原結合分子を含む医薬組成物。