

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-19773

(P2017-19773A)

(43) 公開日 平成29年1月26日(2017.1.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 16/00 (2006.01)</b>	C07K 16/00	ZNA
<b>C07K 16/28 (2006.01)</b>	C07K 16/28	
<b>C07K 16/24 (2006.01)</b>	C07K 16/24	
<b>C07K 16/42 (2006.01)</b>	C07K 16/42	
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00	A

審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 159 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-127142 (P2016-127142)	(71) 出願人	000003311 中外製薬株式会社
(22) 出願日	平成28年6月28日 (2016. 6. 28)		東京都北区浮間5丁目5番1号
(62) 分割の表示	特願2012-546907 (P2012-546907) の分割	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
原出願日	平成23年11月30日 (2011. 11. 30)		
(31) 優先権主張番号	特願2010-266121 (P2010-266121)	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(32) 優先日	平成22年11月30日 (2010. 11. 30)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(31) 優先権主張番号	特願2011-217886 (P2011-217886)	(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(32) 優先日	平成23年9月30日 (2011. 9. 30)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100142929 弁理士 井上 隆一
		(74) 代理人	100148699 弁理士 佐藤 利光

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 複数分子の抗原に繰り返し結合する抗原結合分子

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 抗原の細胞内への取込みが促進された抗原結合分子、抗原への結合回数が増加した抗原結合分子、投与により血漿中の抗原濃度の減少を促進させることができる抗原結合分子、血漿中滞留性が改善された抗原結合分子を提供する。

【解決手段】 抗原結合ドメインとヒトFcRn結合ドメインを含む抗原結合分子であって、2つの異なるカルシウム濃度条件下における抗原結合活性が異なり、抗原結合分子の低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が、高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低く、中性pH条件下においてヒトFcRnに対する結合活性を有する抗原結合分子。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

本明細書に記載の発明。

## 【発明の詳細な説明】

## 【背景技術】

## 【0001】

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

10

## 【0002】

抗体の薬物動態を向上させる方法として、定常領域の人工的なアミノ酸置換が報告されている（非特許文献4、5）。抗原結合能、抗原中和能を増強させる技術として、アフィニティーマチュレーション技術（非特許文献6）が報告されており、可変領域のCDR領域などのアミノ酸に変異を導入することで抗原への結合活性を増強することが可能である。抗原結合能の増強によりin vitroの生物活性を向上させる、あるいは投与量を低減することが可能であり、さらにin vivoでの薬効を向上させることも可能である（非特許文献7）。

20

## 【0003】

一方、抗体1分子あたりが中和できる抗原量はアフィニティーに依存し、アフィニティーを強くすることで少ない抗体量で抗原を中和することが可能であり、様々な方法で抗体のアフィニティーを強くすることが可能である（非特許文献6）。さらに抗原に共有結合的に結合し、アフィニティーを無限大にすることができれば1分子の抗体で1分子の抗原（2価の場合は2抗原）を中和することが可能である。しかし、これまでの方法では1分子の抗体で1分子の抗原（2価の場合は2抗原）の化学量論的な中和反応が限界であり、抗原量以下の抗体量で抗原を完全に中和することは不可能であった。つまり、アフィニティーを強くする効果には限界が存在していた（非特許文献9）。中和抗体の場合、その中和効果を一定期間持続させるためには、その期間に生体内で産生される抗原量以上の抗体量が投与される必要があり、上述の抗体の薬物動態向上、あるいは、アフィニティーマチュレーション技術だけでは、必要抗体投与量の低減には限界が存在していた。そのため、抗原量以下の抗体量で抗原の中和効果を目的期間持続するためには、1つの抗体で複数の抗原を中和する必要がある。

30

## 【0004】

これを達成する新しい方法として、最近、抗原に対してpH依存的に結合する抗体が報告された（特許文献1）。抗原に対して血漿中の中性条件下においては強く結合し、エンドソーム内の酸性条件下において抗原から解離するpH依存的抗原結合抗体はエンドソーム内で抗原から解離することが可能である。pH依存的抗原結合抗体は、抗原を解離した後に抗体がFcRnによって血漿中にリサイクルされると再び抗原に結合することが可能であるため、1つの抗体で複数の抗原に繰り返し結合することが可能となる。

40

## 【0005】

また、抗原の血漿中滞留性は、FcRnに結合してリサイクルされる抗体と比較して非常に短い。血漿中滞留性が長い抗体がこのような血漿中滞留性が短い抗原に結合すると、抗体抗原複合体の血漿中滞留性は抗体と同様に長くなる。そのため、抗原は抗体と結合することにより、むしろ血漿中滞留性が長くなり、血漿中抗原濃度は上昇する。このような場合、抗体の抗原に対するアフィニティーを向上させても抗原の血漿中からの消失を促進する

50

ことはできない。上述のpH依存的抗原結合抗体は、通常の抗体と比較して抗原の血漿中からの消失を促進する方法としても有効であることが報告されている（特許文献1）。

【0006】

このようにpH依存的抗原結合抗体は1つの抗体で複数の抗原に結合し、通常の抗体と比較して抗原の血漿中からの消失を促進することができるため、通常の抗体では成し得なかった作用を有する。しかしながら、これまでにこのpH依存的抗原結合抗体の抗原に繰り返し結合できる効果、および、抗原の血漿中からの消失を促進する効果を達成するためには、血漿中とエンドソーム内のpHの違いを利用して抗原抗体反応にpH依存性を付与する方法しか知られていなかった。

【0007】

なお、本発明の先行技術文献を以下に示す。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】WO 2009/125825, ANTIGEN-BINDING MOLECULE CAPABLE OF BINDING TO TWO OR MORE ANTIGEN MOLECULES REPEATEDLY

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Monoclonal antibody successes in the clinic, Janice M Reichert, Clark J Rosensweig, Laura B Faden & Matthew C Dewitz, Nature Biotechnology 23, 1073 - 1078 (2005)

【非特許文献2】Pavlou AK, Belsey MJ., The therapeutic antibodies market to 2008 ., Eur J Pharm Biopharm. 2005 Apr;59(3):389-96.

【非特許文献3】Kim SJ, Park Y, Hong HJ., Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies., Mol Cells. 2005 Aug 31;20(1):17-29. Review.

【非特許文献4】Hinton PR, Xiong JM, Johlfs MG, Tang MT, Keller S, Tsurushita N., An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life., J Immunol. 2006 Jan 1;176(1):346-56

【非特許文献5】Ghetie V, Popov S, Borvak J, Radu C, Matesoi D, Medesan C, Ober RJ, Ward ES., Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis., Nat Biotechnol. 1997 Jul;15(7):637-40

【非特許文献6】Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jun 14;102(24):8466-71. Epub 2005 Jun 6. A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries. Rajpal A, Beyaz N, Haber L, Cappuccilli G, Yee H, Bhatt RR, Takeuchi T, Lerner RA, Crea R.

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

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

【非特許文献9】Rathanaswami P, Roalstad S, Roskos L, Su QJ, Lackie S, Babcook J. Demonstration of an in vivo generated sub-picomolar affinity fully human monoclonal antibody to interleukin-8. Biochem Biophys Res Commun. 2005 Sep 9;334(4):1004-13.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明はこのような状況に鑑みて為されたものであり、その目的は、抗原結合分子により抗原の細胞内への取込みを促進させる方法、1分子の抗原結合分子により抗原への結合

10

20

30

40

50

回数を増加させる方法、抗原結合分子の投与により血漿中の抗原濃度の減少を促進させる方法、抗原結合分子の血漿中滞留性を改善する方法、抗原の細胞内への取込みが促進された抗原結合分子、抗原への結合回数が増加した抗原結合分子、投与により血漿中の抗原濃度の減少を促進させることができる抗原結合分子、血漿中滞留性が改善された抗原結合分子、当該抗原結合分子を含む医薬組成物、およびそれらの製造方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、抗原結合分子（抗原結合能を有するポリペプチドなどの分子）による抗原の細胞内への取込みを促進させる方法、1分子の抗原結合分子による抗原への結合回数を増加させる方法、抗原結合分子の投与により血漿中の抗原濃度の減少を促進させる方法、抗原結合分子の血漿中滞留性を改善する方法について鋭意研究を行った。その結果、本発明者らは、血漿中と早期エンドソーム内におけるカルシウム濃度の差異に着目し、カルシウム依存性を示す抗原抗体反応を有する抗原結合分子を用いることで、抗原結合分子による抗原の細胞内への取込みを促進させること、抗原結合分子が抗原に複数回結合することにより、1分子の抗原結合分子による抗原への結合回数を増加させること、抗原結合分子の投与により血漿中の抗原濃度の減少を促進させること、抗原結合分子の血漿中滞留性を改善しうることを見出した。

10

【0012】

すなわち本発明は、カルシウム依存性を示す抗原抗体反応を有する抗原結合分子により、抗原の細胞内への取込みを促進させる方法、1分子の抗原結合分子により抗原への結合回数を増加させる方法、抗原結合分子の投与により血漿中の抗原濃度の減少を促進させる方法、抗原結合分子の血漿中滞留性を改善させる方法、抗原の細胞内への取込みが促進された抗原結合分子、抗原への結合回数が増加した抗原結合分子、その投与により血漿中の抗原濃度の減少を促進させることができる抗原結合分子、血漿中滞留性が改善された抗原結合分子、当該抗原結合分子を含む医薬組成物、およびそれらの製造方法などに関し、より具体的には、以下に関する。

20

〔1〕 抗原結合ドメインとヒトFcRn結合ドメインを含む抗原結合分子であって、2つの異なるカルシウム濃度条件下における抗原結合活性が異なり、抗原結合分子の低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が、高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低く、中性pH条件下においてヒトFcRnに対する結合活性を有する抗原結合分子。

30

〔2〕 低カルシウム濃度がイオン化カルシウム濃度0.1 μM ~ 30 μMである、〔1〕に記載の抗原結合分子。

〔3〕 高カルシウム濃度がイオン化カルシウム濃度100 μM ~ 10 mMである、〔1〕に記載の抗原結合分子。

〔4〕 低カルシウム濃度がエンドソーム内のイオン化カルシウム濃度である、〔1〕または〔2〕に記載の抗原結合分子。

〔5〕 高カルシウム濃度が血漿中のイオン化カルシウム濃度である、〔1〕または〔3〕に記載の抗原結合分子。

〔6〕 前記FcRn結合ドメインがFc領域である、〔1〕 ~ 〔5〕のいずれかに記載の抗原結合分子。

40

〔7〕 更に、酸性pH条件下における抗原結合活性が、中性pH条件下における抗原結合活性よりも低い、〔1〕 ~ 〔6〕のいずれかに記載の抗原結合分子。

〔8〕 少なくとも1つのアミノ酸がヒスチジンで置換され、又は、少なくとも1つのヒスチジンが挿入されていることを特徴とする、〔7〕に記載の抗原結合分子。

〔9〕 膜抗原又は可溶性抗原に結合することを特徴とする、〔1〕 ~ 〔8〕のいずれかに記載の抗原結合分子。

〔10〕 抗原がIL-6R、IL-6、IgA、ヒトグリピカン3、およびIgEからなる群から選択される抗原であることを特徴とする、〔1〕 ~ 〔9〕のいずれかに記載の抗原結合分子。

〔11〕 抗原結合ドメインとヒトFcRn結合ドメインを含む抗原結合分子であって、2つ

50

の異なるカルシウム濃度条件下における抗原結合活性が異なり、抗原結合分子の低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が、高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低く、抗原結合ドメインに含まれる軽鎖または重鎖にヒト抗体由来のカルシウム結合モチーフが含まれる抗原結合分子。

〔12〕 カルシウム結合モチーフが抗原結合ドメインの軽鎖CDR1、CDR2および/またはCDR3に含まれる、〔11〕に記載の抗原結合分子。

〔13〕 カルシウム結合モチーフが軽鎖CDR1のKabatナンバリングで表される30位、31位および/または32位に含まれる、〔12〕に記載の抗原結合分子。

〔14〕 カルシウム結合モチーフが軽鎖CDR2のKabatナンバリングで表される50位に含まれる、〔12〕または〔13〕に記載の抗原結合分子。

〔15〕 カルシウム結合モチーフが軽鎖CDR3のKabatナンバリングで表される92位に含まれる、〔12〕～〔14〕のいずれかに記載の抗原結合分子。

〔16〕 抗原結合分子が結合する抗原がIgA、またはグリピカン3のいずれかである、〔12〕～〔15〕のいずれかに記載の抗原結合分子。

〔17〕 カルシウム結合モチーフが抗原結合ドメインの重鎖CDR1、CDR2および/またはCDR3に含まれる、〔11〕に記載の抗原結合分子。

〔18〕 カルシウム結合モチーフが重鎖CDR3のKabatナンバリングで表される95位、96位、100a位、および/または101位に含まれる、〔16〕に記載の抗原結合分子。

〔19〕 抗原結合分子が結合する抗原がIL-6R、またはIL-6のいずれかである、〔17〕または〔18〕に記載の抗原結合分子。

〔20〕 pH中性域の条件下でのFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメインを含む、〔11〕～〔19〕のいずれかに記載の抗原結合分子。

〔21〕 前記FcRn結合ドメインがFc領域である、〔20〕に記載の抗原結合分子。

〔22〕 前記Fc領域のアミノ酸配列のうち、EUナンバリングで表される248、250、252、254、255、256、257、258、265、286、289、297、303、305、307、308、309、311、312、314、315、317、332、334、360、376、380、382、384、385、386、387、389、424、428、433、434、および436のいずれかひとつ以上のアミノ酸が天然型Fc領域のアミノ酸と異なるFc領域である、〔1〕～〔10〕、〔20〕または〔21〕のいずれかに記載の抗原結合分子。

〔23〕 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；

237位のアミノ酸がMet、

248位のアミノ酸がIle、

250位のアミノ酸がAla、Phe、Ile、Met、Gln、Ser、Val、Trp、またはTyr、

252位のアミノ酸がPhe、Trp、またはTyr、

254位のアミノ酸がThr、

255位のアミノ酸がGlu、

256位のアミノ酸がAsp、Glu、またはGln、

257位のアミノ酸がAla、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr、またはVal、

258位のアミノ酸がHis、

265位のアミノ酸がAla、

286位のアミノ酸がAlaまたはGlu、

289位のアミノ酸がHis、

297位のアミノ酸がAla、

303位のアミノ酸がAla、

305位のアミノ酸がAla、

307位のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、Trp、またはTyr、

308位のアミノ酸がAla、Phe、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、またはThr、

309位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Pro、またはArg、

311位のアミノ酸がAla、His、またはIle、

10

20

30

40

50

- 312位のアミノ酸がAlaまたはHis、  
 314位のアミノ酸がLysまたはArg、  
 315位のアミノ酸がAla、AspまたはHis、  
 317位のアミノ酸がAla、  
 332位のアミノ酸がVal、  
 334位のアミノ酸がLeu、  
 360位のアミノ酸がHis、  
 376位のアミノ酸がAla、  
 380位のアミノ酸がAla、  
 382位のアミノ酸がAla、  
 384位のアミノ酸がAla、  
 385位のアミノ酸がAspまたはHis、  
 386位のアミノ酸がPro、  
 387位のアミノ酸がGlu、  
 389位のアミノ酸がAlaまたはSer、  
 424位のアミノ酸がAla、  
 428位のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyr、  
 433位のアミノ酸がLys、  
 434位のアミノ酸がAla、Phe、His、Ser、Trp、またはTyr、もしくは  
 436位のアミノ酸がHis、Ile、Leu、Val、  
 のいずれかひとつ以上の組合せである、〔22〕に記載の抗原結合分子。
- 〔24〕 抗原結合分子が抗体であることを特徴とする、〔1〕～〔23〕のいずれかに記載の抗原結合分子。
- 〔25〕 以下の工程(a)～(e)を含む、(i) 抗原の細胞内への取込みを促進させる機能、(ii) 抗原に2回以上結合する機能、(iii) 血漿中の抗原濃度の減少を促進させる機能、及び(iv) 優れた血漿中滞留性機能、から選ばれる少なくとも1つの機能を有する抗原結合分子の製造方法；
- (a) 低カルシウム濃度条件下における抗原結合分子の抗原結合活性を得る工程、  
 (b) 高カルシウム濃度条件下における抗原結合分子の抗原結合活性を得る工程、  
 (c) 低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が、高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低い抗原結合分子を選択する工程、  
 (d) 前記工程(c)で選択された抗原結合分子をコードする遺伝子を得る工程、  
 (e) 前記工程(d)で得られた遺伝子を用いて抗原結合分子を製造する工程。
- 〔26〕 以下の工程(a)～(e)を含む、(i) 抗原の細胞内への取込みを促進させる機能、(ii) 抗原に2回以上結合する機能、(iii) 血漿中の抗原濃度の減少を促進させる機能、及び(iv) 優れた血漿中滞留性機能、から選ばれる少なくとも1つの機能を有する抗原結合分子の製造方法；
- (a) 高カルシウム濃度条件下で抗原結合分子又は抗原結合分子ライブラリー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分子を低カルシウム濃度条件下に置く工程、  
 (c) 前記工程(b)で解離した抗原結合分子を取得する工程、  
 (d) 前記工程(c)で取得された抗原結合分子をコードする遺伝子を得る工程、  
 (e) 前記工程(d)で得られた遺伝子を用いて抗原結合分子を製造する工程。
- 〔27〕 以下の工程(a)～(f)を含む、(i) 抗原の細胞内への取込みを促進させる機能、(ii) 抗原に2回以上結合する機能、(iii) 血漿中の抗原濃度の減少を促進させる機能、及び(iv) 優れた血漿中滞留性機能、から選ばれる少なくとも1つの機能を有する抗原結合分子の製造方法；
- (a) 低カルシウム濃度条件下で抗原結合分子又は抗原結合分子ライブラリーを抗原に接

10

20

30

40

50

- (b) 前記工程(a)で抗原に結合しない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分子を高カルシウム濃度条件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分子を取得する工程、  
 (e) 前記工程(d)で取得された抗原結合分子をコードする遺伝子を得る工程、  
 (f) 前記工程(e)で得られた遺伝子を用いて抗原結合分子を産生する工程。

〔28〕 さらに、抗原結合分子中のアミノ酸を改変し、中性pH条件下におけるヒトFcRnに対する結合活性を付与する或いは高める工程を含む、〔25〕～〔27〕のいずれかに記載の製造方法。

〔29〕 さらに、抗原結合分子中のアミノ酸を改変し、酸性pH条件下における抗原結合活性を中性pH条件下における抗原結合活性よりも低下させる工程を含む、〔25〕～〔27〕のいずれかに記載の製造方法。 10

〔30〕 低カルシウム濃度がイオン化カルシウム濃度 $0.1\ \mu\text{M}$ ～ $30\ \mu\text{M}$ である、〔25〕～〔27〕のいずれかに記載の製造方法。

〔31〕 高カルシウム濃度がイオン化カルシウム濃度 $100\ \mu\text{M}$ ～ $10\text{mM}$ である、〔25〕～〔27〕のいずれかに記載の製造方法。

〔32〕 低カルシウム濃度がエンドソーム内のイオン化カルシウム濃度である、〔25〕～〔27〕のいずれかに記載の製造方法。

〔33〕 高カルシウム濃度が血漿中のイオン化カルシウム濃度である、〔25〕～〔27〕のいずれかに記載の製造方法。 20

〔34〕 抗原結合分子中のアミノ酸の改変が、抗原結合分子中の少なくとも1つ以上のアミノ酸をヒスチジンで置換する又は少なくとも1つのヒスチジンを挿入する改変である、〔29〕に記載の製造方法。

〔35〕 前記抗原結合分子が結合する抗原がIL-6R、IL-6、IgA、ヒトグリピカン3、およびIgEからなる群から選択される抗原であることを特徴とする、〔25〕～〔34〕のいずれかに記載の製造方法。

〔36〕 前記抗原結合分子が抗体であることを特徴とする、〔25〕～〔35〕のいずれかに記載の製造方法。

〔37〕 〔1〕～〔24〕のいずれかに記載の抗原結合分子または〔25〕～〔36〕のいずれかに記載の製造方法により製造された抗原結合分子、および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。 30

〔38〕 抗原の細胞内への取込みを促進させるために用いられる医薬組成物である、〔37〕に記載の医薬組成物。

〔39〕 血漿中の抗原濃度の減少を促進させるために用いられる医薬組成物である、〔37〕に記載の医薬組成物。

〔40〕 抗原結合ドメインとヒトFcRn結合ドメインを含む抗原結合分子であって、2つの異なるカルシウム濃度条件下における抗原結合活性が異なり、抗原結合分子の低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が、高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低い抗原結合分子を含む、抗原の細胞内への取込み、または血漿中の抗原濃度の減少を促進させるために用いられる医薬組成物。 40

〔41〕 低カルシウム濃度がイオン化カルシウム濃度 $0.1\ \mu\text{M}$ ～ $30\ \mu\text{M}$ である、〔40〕に記載の医薬組成物。

〔42〕 高カルシウム濃度がイオン化カルシウム濃度 $100\ \mu\text{M}$ ～ $10\ \text{mM}$ である、〔40〕に記載の医薬組成物。

〔43〕 低カルシウム濃度がエンドソーム内のイオン化カルシウム濃度である、〔40〕または〔41〕に記載の医薬組成物。

〔44〕 高カルシウム濃度が血漿中のイオン化カルシウム濃度である、〔40〕または〔42〕に記載の医薬組成物。

〔45〕 前記抗原結合分子に含まれるFcRn結合ドメインがFc領域である〔40〕～〔44〕のいずれかに記載の医薬組成物。 50

〔46〕 更に、前記抗原結合分子の酸性pH条件下における抗原結合活性が、中性pH条件下における抗原結合活性よりも低い、〔40〕～〔45〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔47〕 前記抗原結合分子の少なくとも1つのアミノ酸がヒスチジンで置換され、又は、少なくとも1つのヒスチジンが挿入されていることを特徴とする、〔46〕に記載の医薬組成物。

〔48〕 前記抗原結合分子が結合する抗原がIL-6R、IL-6、IgA、ヒトグリピカン3、およびIgEからなる群から選択される抗原であることを特徴とする、〔40〕～〔47〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔49〕 以下の工程(a)～(c)を含む、(i) 抗原の細胞内への取込みを促進させる機能、(ii) 抗原に2回以上結合する機能、(iii) 血漿中の抗原濃度の減少を促進させる機能、及び(iv) 優れた血漿中滞留性機能、から選ばれる少なくとも1つの機能を有する抗原結合分子のスクリーニング方法；

(a) 低カルシウム濃度条件下における抗原結合分子の抗原結合活性を得る工程、  
 (b) 高カルシウム濃度条件下における抗原結合分子の抗原結合活性を得る工程、  
 (c) 低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が、高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低い抗原結合分子を選択する工程。

〔50〕 以下の工程(a)～(c)を含む、(i) 抗原の細胞内への取込みを促進させる機能、(ii) 抗原に2回以上結合する機能、(iii) 血漿中の抗原濃度の減少を促進させる機能、及び(iv) 優れた血漿中滞留性機能、から選ばれる少なくとも1つの機能を有する抗原結合分子のスクリーニング方法；

(a) 高カルシウム濃度条件下で抗原結合分子又は抗原結合分子ライブラリー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分子を低カルシウム濃度条件下に置く工程、  
 (c) 前記工程(b)で解離した抗原結合分子を取得する工程。

〔51〕 以下の工程(a)～(d)を含む、(i) 抗原の細胞内への取込みを促進させる機能、(ii) 抗原に2回以上結合する機能、(iii) 血漿中の抗原濃度の減少を促進させる機能、及び(iv) 優れた血漿中滞留性機能、から選ばれる少なくとも1つの機能を有する抗原結合分子のスクリーニング方法；

(a) 低カルシウム濃度条件下で抗原結合分子又は抗原結合分子ライブラリー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分子を高カルシウム濃度条件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分子を取得する工程。

〔52〕 低カルシウム濃度がイオン化カルシウム濃度 $0.1\ \mu\text{M}$ ～ $30\ \mu\text{M}$ である、〔49〕～〔51〕のいずれかに記載のスクリーニング方法。

〔53〕 高カルシウム濃度がイオン化カルシウム濃度 $100\ \mu\text{M}$ ～ $10\text{mM}$ である、〔49〕～〔51〕のいずれかに記載のスクリーニング方法。

〔54〕 低カルシウム濃度がエンドソーム内のイオン化カルシウム濃度である、〔49〕～〔52〕のいずれかに記載のスクリーニング方法。

〔55〕 高カルシウム濃度が血漿中のイオン化カルシウム濃度である、〔49〕～〔51〕または〔53〕のいずれかに記載のスクリーニング方法。

〔56〕 前記抗原結合分子が結合する抗原がIL-6R、IL-6、IgA、ヒトグリピカン3、およびIgEからなる群から選択される抗原であることを特徴とする、〔49〕～〔55〕のいずれかに記載のスクリーニング方法。

〔57〕 抗原結合分子が抗体であることを特徴とする、〔49〕～〔56〕のいずれかに記載のスクリーニング方法。

〔58〕 〔1〕～〔24〕のいずれかに記載の抗原結合分子または〔25〕～〔36〕のいずれかに記載の製造方法により製造された抗原結合分子を投与することにより、抗原

10

20

30

40

50

結合分子による抗原の細胞内への取込みを促進させる方法。

〔 5 9 〕 〔 1 〕 ~ 〔 2 4 〕 のいずれかに記載の抗原結合分子または〔 2 5 〕 ~ 〔 3 6 〕 のいずれかに記載の製造方法により製造された抗原結合分子を投与することにより、血漿中の抗原濃度の減少を促進させる方法。

〔 6 0 〕 〔 1 〕 ~ 〔 2 4 〕 のいずれかに記載の抗原結合分子または〔 2 5 〕 ~ 〔 3 6 〕 のいずれかに記載の製造方法により製造された抗原結合分子を用いることにより、1分子の抗原結合分子による抗原への結合回数を増加させる方法。

〔 6 1 〕 〔 1 〕 ~ 〔 2 4 〕 のいずれかに記載の抗原結合分子または〔 2 5 〕 ~ 〔 3 6 〕 のいずれかに記載の製造方法により製造された抗原結合分子を用いることにより、抗原結合分子の血漿中滞留性を改善する方法。

〔 6 2 〕 抗原結合ドメインとヒトFcRn結合ドメインを含む抗原結合分子であって、2つの異なるカルシウム濃度条件下における抗原結合活性が異なり、抗原結合分子の低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が、高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低い抗原結合分子を投与することにより、抗原結合分子による抗原の細胞内への取込みを促進させる方法。

〔 6 3 〕 抗原結合ドメインとヒトFcRn結合ドメインを含む抗原結合分子であって、2つの異なるカルシウム濃度条件下における抗原結合活性が異なり、抗原結合分子の低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が、高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低い抗原結合分子を投与することにより、血漿中の抗原濃度の減少を促進させる方法。

〔 6 4 〕 抗原結合ドメインとヒトFcRn結合ドメインを含む抗原結合分子であって、2つの異なるカルシウム濃度条件下における抗原結合活性が異なり、抗原結合分子の低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が、高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低い抗原結合分子を用いることにより、1分子の抗原結合分子による抗原への結合回数を増加させる方法。

〔 6 5 〕 抗原結合ドメインとヒトFcRn結合ドメインを含む抗原結合分子であって、2つの異なるカルシウム濃度条件下における抗原結合活性が異なり、抗原結合分子の低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が、高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低い抗原結合分子を用いることにより、抗原結合分子の血漿中滞留性を改善する方法。

〔 6 6 〕 前記低カルシウム濃度がイオン化カルシウム濃度 $0.1\ \mu\text{M}$  ~  $30\ \mu\text{M}$ である、〔 6 2 〕 ~ 〔 6 5 〕 のいずれかに記載の方法。

〔 6 7 〕 高カルシウム濃度がイオン化カルシウム濃度 $100\ \mu\text{M}$  ~  $10\ \text{mM}$ である、〔 6 2 〕 ~ 〔 6 6 〕 のいずれかに記載の方法。

〔 6 8 〕 低カルシウム濃度がエンドソーム内のイオン化カルシウム濃度である、〔 6 2 〕 ~ 〔 6 7 〕 のいずれかに記載の方法。

〔 6 9 〕 高カルシウム濃度が血漿中のイオン化カルシウム濃度である、〔 6 2 〕 ~ 〔 6 8 〕 のいずれかに記載の方法。

〔 7 0 〕 前記抗原結合分子に含まれるFcRn結合ドメインがFc領域である〔 6 2 〕 ~ 〔 6 9 〕 のいずれかに記載の方法。

〔 7 1 〕 更に、前記抗原結合分子の酸性pH条件下における抗原結合活性が、中性pH条件下における抗原結合活性よりも低い、〔 6 2 〕 ~ 〔 7 0 〕 のいずれかに記載の方法。

〔 7 2 〕 前記抗原結合分子の少なくとも1つのアミノ酸がヒスチジンで置換され、又は、少なくとも1つのヒスチジンが挿入されていることを特徴とする、〔 7 1 〕 に記載の方法。

〔 7 3 〕 前記抗原結合分子が結合する抗原がIL-6R、IL-6、IgA、ヒトグリピカン3、およびIgEからなる群から選択される抗原であることを特徴とする、〔 6 2 〕 ~ 〔 7 2 〕 のいずれかに記載の方法。

〔 7 4 〕 前記抗原結合分子が抗体である、〔 6 2 〕 ~ 〔 7 3 〕 のいずれかに記載の方法。

。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 3 】

また本発明は、本発明の抗原結合分子または本発明の製造方法により製造された抗原結合分子を含む、本発明の方法に用いるためのキットに関する。また本発明は、本発明の抗原結合分子もしくは本発明の製造方法により製造された抗原結合分子を有効成分として含有する、抗原結合分子による抗原の細胞内への取込み促進剤、血漿中の抗原濃度の減少促進剤、1分子の抗原結合分子による抗原への結合回数増加剤、または抗原結合分子の血漿中滞留性改善剤に関する。また本発明は、本発明の抗原結合分子もしくは本発明の製造方法により製造された抗原結合分子の、抗原結合分子による抗原の細胞内への取込み促進剤、血漿中の抗原濃度の減少促進剤、1分子の抗原結合分子による抗原への結合回数増加剤、または抗原結合分子の血漿中滞留性改善剤の製造における使用に関する。また本発明は、本発明の方法に使用するための、本発明の抗原結合分子または本発明の製造方法により製造された抗原結合分子に関する。

10

## 【発明の効果】

## 【 0 0 1 4 】

本発明によって、抗原結合分子による抗原の細胞内への取込みを促進させる方法、1分子の抗原結合分子により抗原への結合回数を増加させる方法、抗原結合分子の投与により血漿中の抗原濃度の減少を促進させる方法、抗原結合分子の血漿中滞留性を改善する方法が提供された。抗原結合分子による抗原の細胞内への取込みが促進されることで、抗原結合分子の投与により抗原の血漿中の抗原濃度の減少を促進させることが可能となるとともに、抗原結合分子の血漿中滞留性を改善させることが可能となり、1分子の抗原結合分子により抗原への結合回数を増加させることが可能となり、in vivoにおいて通常の抗原結合分子よりも優れた効果を発揮させることができる。

20

## 【図面の簡単な説明】

## 【 0 0 1 5 】

【図1】pH依存的結合抗体が繰り返し可溶性抗原に結合することを示す図である。(i) 抗体が可溶性抗原と結合する、(ii) 非特異的に、ピノサイトーシスにより細胞内へ取り込まれる、(iii) エンドソーム内で抗体はFcRnと結合し、可溶性抗原は抗体から解離する、(iv) 可溶性抗原はライソソームに移行し分解される、(v) 可溶性抗原が解離した抗体はFcRnにより血漿中にリサイクルされる、(vi) リサイクルされた抗体は、再び可溶性抗原へ結合することが可能となる。

30

【図2】pH依存的結合抗体が繰り返し膜型抗原に結合することを示す図である。(i) 抗体が膜型抗原と結合する、(ii) 抗体と膜型抗原の複合体の状態では細胞内にインターナライズされる、(iii) エンドソーム内で膜型抗原から解離する、(iv) 膜型抗原はライソソームに移行し分解される、(v) 膜型抗原から解離した抗体は血漿中にリサイクルされる、(vi) リサイクルされた抗体は、再び膜型抗原へ結合することが可能となる。

【図3】pH依存的結合抗体の血漿中(pH7.4)とエンドソーム内(pH6.0)の抗原への相互作用の様式を示す図である。

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

【図5】pHおよびカルシウム依存的結合抗体の血漿中(pH7.4、 $\text{Ca}^{2+}$  2 mM)とエンドソーム内(pH6.0、 $\text{Ca}^{2+}$  3  $\mu\text{M}$ )の抗原への相互作用の様式を示す図である。

40

【図6】Biacoreを用いた抗ヒトIL-6レセプター抗体の $\text{Ca}^{2+}$  2 mM および $\text{Ca}^{2+}$  3  $\mu\text{M}$  における可溶性ヒトIL-6レセプターへの相互作用を示すセンサーグラムを示す図である。

【図7】H54/L28-IgG1の $\text{Ca}^{2+}$  2 mM および $\text{Ca}^{2+}$  3  $\mu\text{M}$  における可溶性ヒトIL-6レセプターへの相互作用を示すBiacoreセンサーグラムを示す図である。

【図8】FH4-IgG1の $\text{Ca}^{2+}$  2 mM および $\text{Ca}^{2+}$  3  $\mu\text{M}$  における可溶性ヒトIL-6レセプターへの相互作用を示すBiacoreセンサーグラムを示す図である。

【図9】6RL#9-IgG1の $\text{Ca}^{2+}$  2 mM および $\text{Ca}^{2+}$  3  $\mu\text{M}$  における可溶性ヒトIL-6レセプターへの相互作用を示すBiacoreセンサーグラムを示す図である。

【図10】H54/L28-IgG1、FH4-IgG1、および、6RL#9-IgG1のノーマルマウス血漿中抗体濃

50

度推移を示す図である。

【図1 1】H54/L28-IgG1、FH4-IgG1、および、6RL#9-IgG1のノーマルマウス血漿中可溶性ヒトIL-6レセプター（hsIL-6R）濃度推移を示す図である。

【図1 2】H54/L28-N434W、FH4-N434W、および、6RL#9-N434Wのノーマルマウス血漿中抗体濃度推移を示す図である。

【図1 3】H54/L28-N434W、FH4-N434W、および、6RL#9-N434Wのノーマルマウス血漿中可溶性ヒトIL-6レセプター（hsIL-6R）濃度推移を示す図である。

【図1 4】X線結晶構造解析で決定された6RL#9抗体のFabフラグメントの重鎖CDR3の構造を示す図である。

【図1 5】Biacoreを用いた抗ヒトIL-6抗体のCa<sup>2+</sup>1.2 mM およびCa<sup>2+</sup> 3 μM におけるヒトIL-6への相互作用を示すセンサーグラムを示す図である。

【図1 6】ヒトVk5-2配列を含む抗体と、ヒトVk5-2配列中の糖鎖付加配列が改変されたhVk5-2\_L65配列を含む抗体のイオン交換クロマトグラムである。実線はヒトVk5-2配列を含む抗体（重鎖：CIM\_H、配列番号：4 8 および軽鎖：hVk5-2、配列番号：4 1 と配列番号：2 8 の融合分子）のクロマトグラム、破線はhVk5-2\_L65配列をもつ抗体（重鎖：CIM\_H（配列番号：4 8）、軽鎖：hVk5-2\_L65（配列番号4 7））のクロマトグラムを表す。

【図1 7】LfVk1\_Ca配列を含む抗体（重鎖：GC\_H、配列番号：1 0 2 および軽鎖：LfVk1\_Ca、配列番号：6 1）と、LfVk1\_Ca配列中のAsp（D）残基がAla（A）残基に改変された配列を含む抗体の5 保存後（実線）または50 保存後（点線）のイオン交換クロマトグラムである。それぞれ5 保存後のイオン交換クロマトグラムのもっとも高いピークをメインピークとして、メインピークでy軸ノーマライズした図である。

【図1 8】LfVk1\_Ca配列を含む抗体（重鎖：GC\_H、配列番号：1 0 2 および軽鎖：LfVk1\_Ca、配列番号：6 1）と、LfVk1\_Ca配列中の30位（Kabatナンバリング）のAsp（D）残基がSer（S）残基に改変されたLfVk1\_Ca6配列（重鎖：GC\_H、配列番号：1 0 2 および軽鎖：LfVk1\_Ca6、配列番号：7 5）を含む抗体の5 保存後（実線）または50 保存後（点線）のイオン交換クロマトグラムである。それぞれ5 保存後のイオン交換クロマトグラムのもっとも高いピークをメインピークとして、メインピークでy軸ノーマライズした図である。

【図1 9】Biacoreを用いた抗ヒトCD4抗体のCa<sup>2+</sup> 1.2 mM およびCa<sup>2+</sup> 3 μM における可溶性ヒトCD4への相互作用を示すセンサーグラムを示す図である。

【図2 0】抗ヒトCD4抗体のノーマルマウス血漿中抗体濃度推移を示す図である。

【図2 1】可溶性ヒトCD4単独投与群、TNX355-IgG1抗体投与群、Q425抗体投与群およびQ425L9抗体投与群のノーマルマウス血漿中可溶性ヒトCD4の濃度推移を示す図である。

【図2 2】Biacoreを用いた抗ヒトIgA抗体のCa<sup>2+</sup>1.2 mM およびCa<sup>2+</sup> 3 μM におけるヒトIgAへの相互作用を示すセンサーグラムを示す図である。

【図2 3】GA1-IgG1抗体投与群、GA2-IgG1抗体投与群、GA3-IgG1およびGA2-N434W抗体投与群のノーマルマウス血漿中抗体濃度推移を示す図である。

【図2 4】ヒトIgA単独投与群、GA1-IgG1抗体投与群、GA2-IgG1抗体投与群、GA3-IgG1抗体投与群およびGA2-N434W抗体投与群のノーマルマウス血漿中ヒトIgAの濃度推移を示す図である。

【図2 5】GA1-IgG1抗体投与群、GA2-IgG1抗体投与群、GA3-IgG1抗体投与群およびGA2-N434W抗体投与群のノーマルマウス血漿中の非結合型ヒトIgAの濃度推移を示す図である。

【図2 6】多量体抗原に対して大きな免疫複合体を形成する通常抗体の、抗体1分子あたりの抗原を消失させる効率を例示する図である。

【図2 7】多量体抗原に対して大きな免疫複合体を形成する天然IgG1の定常領域を含むpH/Ca依存性抗体の、抗体1分子あたりの抗原を消失させる効率を例示する図である。

【図2 8】単量体抗原に存在する2つ以上のエピトープを認識し大きな免疫複合体を形成するのに適切なmultispecific pH/Ca依存性抗体の、抗体1分子あたりの抗原を消失させる効率を例示する図である。

【図2 9】ELISA法を用いた抗ヒトグリピカン3抗体のCa<sup>2+</sup>1.2 mM およびCa<sup>2+</sup> 3 μM にお

10

20

30

40

50

ける組み換えヒトグリピカン3への相互作用を示す図である。

【図30】ELISA法を用いた抗ヒトIgE抗体のCa<sup>2+</sup>2 mM およびCa<sup>2+</sup> 3 μM における組み換えヒトIgEへの相互作用を示す図である。

【図31】ヒトFcRnトランスジェニックマウスにおける抗体の血漿中濃度推移を示す図である。

【図32】ヒトFcRnトランスジェニックマウスにおける可溶性ヒトIL-6受容体の血漿中濃度推移を示す図である。

【図33】正常マウスにおける抗体の血漿中濃度推移を示す図である。

【図34】正常マウスにおける可溶性ヒトIL-6受容体の血漿中濃度推移を示す図である。

【図35】正常マウスにおける非結合型(unbound)可溶性ヒトIL-6受容体の血漿中濃度推移を示す図である。

【図36】ヒトFcRnトランスジェニックマウスにおける血漿中可溶性ヒトIL-6受容体濃度推移を示す図である。

【図37】Fv4-IgG1-F14を、低用量(0.01 mg/kg)または1 mg/kgで投与した後の、血漿中可溶性ヒトIL-6受容体濃度推移を示す図である。

【図38】Fv4-IgG1-F14を、低用量(0.01 mg/kg)または1 mg/kgで投与した後の、血漿中抗体濃度推移を示す図である。

【図39】血漿中可溶性ヒトIL-6受容体濃度が定常状態を維持している正常マウスに対して抗ヒトIL-6受容体抗体を投与した後の血漿中可溶性ヒトIL-6受容体濃度推移を示す図である。

【図40】ヒトFcRnトランスジェニックマウス(系統276)に対してhsIL-6Rおよび抗ヒトIL-6受容体抗体を同時投与した後の血漿中抗体濃度推移を示す図である。

【図41】ヒトFcRnトランスジェニックマウス(系統276)に対してhsIL-6Rおよび抗ヒトIL-6受容体抗体を同時投与した後の血漿中可溶性ヒトIL-6受容体濃度推移を示す図である。

【図42】pH7.0におけるヒトFcRnに対するFc変異体の結合アフィニティーと、ヒトFcRnトランスジェニックマウス(系統276)に対してhsIL-6Rおよび抗ヒトIL-6受容体抗体を同時投与した1日後の血漿中hsIL-6R濃度との関係を示す図である。

【図43】pH7.0におけるヒトFcRnに対するFc変異体の結合アフィニティーと、ヒトFcRnトランスジェニックマウス(系統276)に対してhsIL-6Rおよび抗ヒトIL-6受容体抗体を同時投与した1日後の血漿中抗体濃度との関係を示す図である。

【図44】ヒトFcRnトランスジェニックマウス(系統276)に対してhsIL-6Rおよび抗ヒトIL-6受容体抗体を同時投与した後の抗原/抗体モル比(C値)の推移を示す図である。

【図45】pH7.0におけるヒトFcRnに対するFc変異体の結合アフィニティーと、ヒトFcRnトランスジェニックマウス(系統276)に対してhsIL-6Rおよび抗ヒトIL-6受容体抗体を同時投与した1日後の抗原/抗体モル比(C値)との関係を示す図である。

【図46】血漿中hsIL-6R濃度が定常状態を維持しているヒトFcRnトランスジェニックマウス(系統276)(定常状態注入モデル)に対してFv4-IgG1-F14を低用量(0.01または0.2 mg/kg)または1 mg/kgで投与した後の、血漿中hsIL-6R濃度推移を示す図である。

【図47】ヒトFcRnトランスジェニックマウス(系統276および32)に対してhsIL-6Rおよび抗ヒトIL-6受容体抗体を同時投与した後のヒトFcRnトランスジェニックマウス系統276および系統32における血漿中hsIL-6R濃度推移を示す図である。

【図48】ヒトFcRnトランスジェニックマウス(系統276および系統32)に対してhsIL-6Rおよび抗ヒトIL-6受容体抗体を同時投与した後のヒトFcRnトランスジェニックマウス系統276および系統32における血漿中抗体濃度推移を示す図である。

【図49】血漿中hsIL-6R濃度が定常状態を維持しているヒトFcRnトランスジェニックマウス(系統32)(定常状態注入モデル)に対して抗ヒトIL-6受容体抗体を投与した後の血漿中hsIL-6R濃度推移を示す図である。

【図50】血漿中hsIL-6R濃度が定常状態を維持しているヒトFcRnトランスジェニックマウス(系統32)(定常状態注入モデル)に対して抗ヒトIL-6受容体抗体を投与した後の血

10

20

30

40

50

漿中抗体濃度推移を示す図である。

【図5 1】血漿中hsIL-6R濃度が定常状態を維持しているヒトFcRnトランスジェニックマウス（系統32）（定常状態注入モデル）に対して抗ヒトIL-6受容体抗体を投与した後の抗原／抗体モル比（C値）の推移を示す図である。

【図5 2】pH7.0におけるヒトFcRnに対するFc変異体の結合アフィニティーと、血漿中hsIL-6R濃度が定常状態を維持しているヒトFcRnトランスジェニックマウス（系統32）（定常状態注入モデル）に対して抗ヒトIL-6受容体抗体を投与した1日後の抗原／抗体モル比（C値）との関係を示す図である。

【図5 3】血漿中hsIL-6R濃度が定常状態を維持しているヒトFcRnトランスジェニックマウス（系統32）（定常状態注入モデル）に対して、F11、F39、F48、およびF264のFc変異体を有する抗ヒトIL-6受容体抗体を投与した後の、血漿中抗体濃度推移を示す図である。

10

【図5 4】血漿中hsIL-6R濃度が定常状態を維持しているヒトFcRnトランスジェニックマウス（系統32）（定常状態注入モデル）に対して、F11、F39、F48、およびF264のFc変異体を有する抗ヒトIL-6受容体抗体を投与した後の、血漿中hsIL-6R濃度推移を示す図である。

【図5 5】血漿中hsIL-6R濃度が定常状態を維持しているヒトFcRnトランスジェニックマウス（系統32）（定常状態注入モデル）に対して、F157、F196、およびF262のFcバリエーションを有する抗ヒトIL-6受容体抗体を投与した後の、血漿中抗体濃度推移を示す図である。

【図5 6】血漿中hsIL-6R濃度が定常状態を維持しているヒトFcRnトランスジェニックマウス（系統32）（定常状態注入モデル）に対して、F157、F196、およびF262のFcバリエーションを有する抗ヒトIL-6受容体抗体を投与した後の、血漿中hsIL-6R濃度推移を示す図である。

20

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明は、抗原結合分子による抗原の細胞内への取込みを促進させる方法、1分子の抗原結合分子による抗原への結合回数を増加させる方法、抗原結合分子の投与による血漿中の抗原濃度の減少を促進させる方法、及び抗原結合分子の血漿中滞留性を改善する方法を提供する。具体的には、抗原結合分子の低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性（本発明では「結合能」と記載する場合もある）が高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低い抗原結合分子を用いることにより、抗原結合分子による抗原の細胞内への取込みを促進させる方法、1分子の抗原結合分子による抗原への結合回数を増加させる方法、抗原結合分子の投与による血漿中の抗原濃度の減少を促進させる方法、及び抗原結合分子の血漿中滞留性を改善する方法を提供する。

30

【0017】

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。

【0018】

40

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し、本発明が投与される生体にとって外来性の、または内在性のものでもあり得る。本発明の方法により薬物動態が改善された抗原結合分子が含む抗原結合ドメインが結合する抗原の例としては、例えば、受容体タンパク質（膜結合型受容体、可溶性受容体）や細胞表面マーカーなどの膜抗原、サイトカインなどの可溶性抗原、外来性生物にのみ存在するエピトープを含む抗原等が好適に挙げられる。抗原としては下記のような分子；17-1A、4-1 BB、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

50

、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 (Addressins)、アディポネクチン、ADPリボシルシクラーゼ-1、aFGF、AGE、ALCAM、ALK、ALK-1、ALK-7、アレルゲン、1-アンチキモトリプシン、1-アンチトリプシン、-シヌクレイン、-V/ -1アンタゴニスト、アミニン (aminin)、アミリン、アミロイド、アミロイド免疫グロブリン重鎖可変領域、アミロイド免疫グロブリン軽鎖可変領域、アンドロゲン、ANG、アンジオテンシノーゲン、アンジオポエチンリガンド-2、抗Id、アンチトロンピンIII、炭疽、APAF-1、APE、APJ、アポA1、アポ血清アミロイドA、アポ-SAA、APP、APRIL、AR、ARC、ART、アルテミン (Artemin)、ASPARTIC、心房性ナトリウム利尿因子、心房性ナトリウム利尿ペプチド、心房性ナトリウム利尿ペプチドA、心房性ナトリウム利尿ペプチドB、心房性ナトリウム利尿ペプチドC、av/b3インテグリン、Ax1、B7-1、B7-2、B7-H、BACE、BACE-1、バチルス・アントラシス (Bacillus anthracis) 防御抗原、Bad、BAFF、BAFF-R、Bag-1、BAK、Bax、BCA-1、BCAM、Bcl、BCMA、BDNF、b-ECGF、-2-ミクログロブリン、ラクタマーゼ、bFGF、BID、Bik、BIM、BLC、BL-CAM、BLK、Bリンパ球刺激因子 (BlyS)、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)、BMPR、BMPR-1A (ALK-3)、BMPR-1B (ALK-6)、BMPR-II (BRK-3)、BMP、BOK、ボンベシン、骨由来神経栄養因子 (Bone-derived neurotrophic factor)、ウシ成長ホルモン、BPDE、BPDE-DNA、BRK-2、BTC、Bリンパ球細胞接着分子、C10、C1阻害因子、C1q、C3、C3a、C4、C5、C5a (補体5a)、CA125、CAD-8、カドヘリン-3、カルシトニン、cAMP、炭酸脱水酵素-IX、癌胎児抗原 (CEA)、癌関連抗原 (carcinoma-associated antigen)、カルジオトロフィン-1、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/I-309、CCL11/エオタキシン、CCL12/MCP-5、CCL13/MCP-4、CCL14/HCC-1、CCL15/HCC-2、CCL16/HCC-4、CCL17/TARC、CCL18/PARC、CCL19/ELC、CCL2/MCP-1、CCL20/MIP-3、CCL21/SLC、CCL22/MDC、CCL23/MPIF-1、CCL24/エオタキシン-2、CCL25/TECK、CCL26/エオタキシン-3、CCL27/CTACK、CCL28/MEC、CCL3/MIP-1、CCL3L1/LD-78、CCL4/MIP-1、CCL5/RANTES、CCL6/C10、CCL7/MCP-3、CCL8/MCP-2、CCL9/10/MTP-1、CCR、CCR1、CCR10、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CD1、CD10、CD105、CD11a、CD11b、CD11c、CD123、CD13、CD137、CD138、CD14、CD140a、CD146、CD147、CD148、CD15、CD152、CD16、CD164、CD18、CD19、CD2、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD26、CD27L、CD28、CD29、CD3、CD30、CD30L、CD32、CD33 (p67タンパク質)、CD34、CD37、CD38、CD3E、CD4、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD49a、CD49b、CD5、CD51、CD52、CD54、CD55、CD56、CD6、CD61、CD64、CD66e、CD7、CD70、CD74、CD8、CD80 (B7-1)、CD89、CD95、CD105、CD158a、CEA、CEACAM5、CFTR、cGMP、CGRP受容体、CINC、CKb8-1、クローディン18、CLC、クロストリジウム・ボツリヌム (Clostridium botulinum) 毒素、クロストリジウム・ディフィシレ (Clostridium difficile) 毒素、クロストリジウム・パーフリンジェンス (Clostridium perfringens) 毒素、c-Met、CMV、CMV UL、CNTF、CNTN-1、補体因子3 (C3)、補体因子D、コルチコステロイド結合グロブリン、コロニー刺激因子-1受容体、COX、C-Ret、CRG-2、CRTH2、CT-1、CTACK、CTGF、CTLA-4、CX3CL1/フラクタルカイン、CX3CR1、CXCL、CXCL1/Gro、CXCL10、CXCL11/I-TAC、CXCL12/SDF-1、CXCL13/BCA-1、CXCL14/BRAK、CXCL15/ラングカイン (Lungkine)、CXCL16、CXCL16、CXCL2/Gro、CXCL3/Gro、CXCL3、CXCL4/PF4、CXCL5/ENA-78、CXCL6/GCP-2、CXCL7/NAP-2、CXCL8/IL-8、CXCL9/Mig、CXCL10/IP-10、CXCR、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、シスタチンC、サイトケラチン腫瘍関連抗原、DAN、DCC、DcR3、DC-SIGN、崩壊促進因子、デルタ様タンパク質 (Delta-like protein) リガンド4、des(1-3)-IGF-1 (脳IGF-1)、Dhh、DHICAオキシダーゼ、Dickkopf-1、ジゴキシン、ジペプチジルペプチダーゼIV、DK1、DNAM-1、Dnase、Dpp、DPPIV/CD26、Dtk、ECAD、EDA、EDA-A1、EDA-A2、EDAR、EGF、EGFR (ErbB-1)、EGF様ドメイン含有タンパク質7 (EGF like domain containing protein 7)、エラスターゼ、エラスチン、EMA、EMMPRIN、ENA、ENA-78、エンドシ

10

20

30

40

50

アリン (Endosialin)、エンドセリン受容体、エンドトキシン、エンケファリナーゼ、eNOS、Eot、エオタキシン、エオタキシン-2、エオタキシニ (eotaxini)、EpCAM、エフリン B2/EphB4、Epha2チロシンキナーゼ受容体、上皮増殖因子受容体 (EGFR)、ErbB2受容体、ErbB3チロシンキナーゼ受容体、ERCC、エリスロポエチン (EPO)、エリスロポエチン受容体、E-セレクトイン、ET-1、エクソダス (Exodus) -2、RSVのFタンパク質、F10、F11、F12、F13、F5、F9、第Ia因子、第IX因子、第Xa因子、第VII因子、第VIII因子、第VIIIc因子、Fas、FcR、FcイブシロンRI、FcIIb、FcRI、FcRIIa、FcRIIIa、FcRIIIb、FcRn、FEN-1、フェリチン、FGF、FGF-19、FGF-2、FGF-2受容体、FGF-3、FGF-8、酸性FGF (FGF-acidic)、塩基性FGF (FGF-basic)、FGFR、FGFR-3、フィブリン、線維芽細胞活性化タンパク質 (FAP)、線維芽細胞増殖因子、線維芽細胞増殖因子-10、フィブロネクチン、FL、FLIP、Flt-3、FLT3リガンド、葉酸受容体、卵胞刺激ホルモン (FSH)、フラクタルカイン (CX3C)、遊離型重鎖、遊離型軽鎖、FZD1、FZD10、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、G250、Gas6、GCP-2、GCSF、G-CSF、G-CSF受容体、GD2、GD3、GDF、GDF-1、GDF-15 (MIC-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、GDNF、ゲルゾリン、GFAP、GF-CSF、GFR-1、GFR-2、GFR-3、GF-1、gH外被糖タンパク質、GITR、グルカゴン、グルカゴン受容体、グルカゴン様ペプチド1受容体、Glut4、グルタミン酸カルボキシペプチダーゼII、糖タンパク質ホルモン受容体、糖タンパク質IIb/IIIa (GP IIb/IIIa)、グリピカン-3、GM-CSF、GM-CSF受容体、gp130、gp140、gp72、顆粒球-CSF (G-CSF)、GRO/MGSA、成長ホルモン放出因子、GRO- $\alpha$ 、GRO- $\beta$ 、ピロリ菌 (*H. pylori*)、ハプテン (NP-capまたは NIP-cap)、HB-EGF、HCC、HCC1、HCMV gB外被糖タンパク質、HCMV UL、造血増殖因子 (Hemopoietic growth factor) (HGF)、Hep B gp120、ヘパラナーゼ、ヘパリン補因子II、肝細胞増殖因子 (hepatic growth factor)、パチルス・アントラシス防御抗原、C型肝炎ウイルスE2糖タンパク質、E型肝炎、ヘブシジン、Her1、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、HGF、HGFA、高分子量メラノーマ関連抗原 (High molecular weight melanoma-associated antigen) (HMW-MAA)、GP120等のHIV外被タンパク質、HIV MIB gp120 V3ループ、HLA、HLA-DR、HM1.24、HMF、GPEM、HMGB-1、HRG、Hrk、HSP47、Hsp90、HSV gD糖タンパク質、ヒト心筋ミオシン、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV)、ヒト成長ホルモン (hGH)、ヒト血清アルブミン、ヒト組織型プラスミノゲン活性化因子 (t-PA)、ハンチンチン、HVEM、IAP、ICAM、ICAM-1、ICAM-3、ICE、ICOS、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IgA、IgA受容体、IgE、IGF、IGF結合タンパク質、IGF-1、IGF-1R、IGF-2、IGFBP、IGFR、IL、IL-1、IL-10、IL-10受容体、IL-11、IL-11受容体、IL-12、IL-12受容体、IL-13、IL-13受容体、IL-15、IL-15受容体、IL-16、IL-16受容体、IL-17、IL-17受容体、IL-18 (IGIF)、IL-18受容体、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-1受容体、IL-2、IL-2受容体、IL-20、IL-20受容体、IL-21、IL-21受容体、IL-23、IL-23受容体、IL-2受容体、IL-3、IL-3受容体、IL-31、IL-31受容体、IL-3受容体、IL-4、IL-4受容体、IL-5、IL-5受容体、IL-6、IL-6受容体、IL-7、IL-7受容体、IL-8、IL-8受容体、IL-9、IL-9受容体、免疫グロブリン免疫複合体、免疫グロブリン、INF- $\alpha$ 、INF- $\beta$ 受容体、INF- $\gamma$ 、INF- $\gamma$ 受容体、INF- $\delta$ 、INF- $\delta$ 受容体、I型IFN、I型IFN受容体、インフルエンザ、インヒピン、インヒピン $\alpha$ 、インヒピン $\beta$ 、iNOS、インスリン、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、インスリン様増殖因子2、インスリン様増殖因子結合タンパク質、インテグリン、インテグリン $\alpha$ 2、インテグリン $\alpha$ 3、インテグリン $\alpha$ 4、インテグリン $\alpha$ 4/1、インテグリン $\alpha$ v/1-3、インテグリン $\alpha$ v/1-6、インテグリン $\alpha$ 4/7、インテグリン $\alpha$ 5/1、インテグリン $\alpha$ 5/3、インテグリン $\alpha$ 5/6、インテグリン $\alpha$ 5 (V)、インテグリン $\alpha$ 6、インテグリン $\alpha$ 1、インテグリン $\alpha$ 2、インテグリン $\alpha$ 3 (GPIIb-IIIa)、IP-10、I-TAC、JE、カリクレイン、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2、カリクレイン5、カリクレイン6、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、カリストアチン、KCR、KDR、ケラチノサイト増殖因子 (KGF)、ケラチノサイト増殖因子-2 (KGF-2)、KGF、キラー免疫グロブリン様受容体、kitリガンド (KL)、Kitチロシンキナーゼ、ラミニン5、LAMP

10

20

30

40

50

、LAPP (アミリン、豚島アミロイドポリペプチド)、LAP (TGF-1)、潜伏期関連ペプチド、潜在型TGF-1、潜在型TGF-1 bp1、LBP、LDGF、LDL、LDL受容体、LECT2、レフティー、レプチン、黄体形成ホルモン (leutinizing hormone) (LH)、Lewis-Y抗原、Lewis-Y関連抗原、LFA-1、LFA-3、LFA-3受容体、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、肺サーファクタント、黄体形成ホルモン、リンホタクチン、リンホトキシン 受容体、リゾスフィンゴ脂質受容体、Mac-1、マクロファージ-CSF (M-CSF)、MAdCAM、MAG、MAP2、MARC、マスピン、MCAM、MCK-2、MCP、MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-I (MCAF)、M-CSF、MDC、MDC (67 a.a.)、MDC (69 a.a.)、メグシン (megsin)、Mer、METチロシンキナーゼ受容体ファミリー、メタロプロテアーゼ、膜糖タンパク質OX2、メソテリン、MGDF受容体、MGMT、MHC (HLA-DR)、微生物タンパク質 (microbial protein)、MIF、MIG、MIP、MIP-1、MIP-1、MIP-3、MIP-3、MIP-4、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、単球誘引タンパク質 (monocyte attractant protein)、単球コロニー阻害因子 (monocyte colony inhibitory factor)、マウスゴナドトロピン関連 (gonadotropin-associated) ペプチド、MPIF、Mpo、MSK、MSP、MUC-16、MUC18、ムチン (Mud)、ミュー管抑制因子、Mug、MuSK、ミエリン関連糖タンパク質、骨髄前駆細胞阻害因子-1 (MPIF-1)、NAIP、ナノボディ (Nanobody)、NAP、NAP-2、NCA 90、NCA D、N-カドヘリン、NCAM、ネプリライシン、神経細胞接着分子、ニューロセルピン (neros erpin)、神経成長因子 (NGF)、ニューロトロフィン-3、ニューロトロフィン-4、ニューロトロフィン-6、ニューロピリン1、

ニールツリン、NGF-、NGFR、NKG20、N-メチオニルヒト成長ホルモン、nNOS、NO、Nogo-A、Nogo受容体、C型肝炎ウイルス由来の非構造タンパク質3型 (NS3)、NOS、Npn、NRG-3、NT、NT-3、NT-4、NTN、OB、OGG1、オンコスタチンM、OP-2、OPG、OPN、OSM、OSM受容体、骨誘導因子 (osteoinductive factor)、オステオポンチン、OX40L、OX40R、酸化型LDL、p150、p95、PADPr、副甲状腺ホルモン、PARC、PARP、PBR、PBSF、PCAD、P-カドヘリン、PCNA、PCSK9、PDGF、PDGF受容体、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PDGF-D、PDK-1、PECAM、PEDF、PEM、PF-4、PGE、PGF、PGI2、PGJ2、PIGF、PIN、PLA2、胎盤増殖因子、胎盤アルカリホスファターゼ (PLAP)、胎盤ラクトゲン、プラスミノゲン活性化因子阻害因子-1、血小板増殖因子 (platelet-growth factor)、plgR、PLP、異なるサイズのポリグリコール鎖 (poly glycol chain) (例えば、PEG-20、PEG-30、PEG40)、PP14、プレカリクレイン、プリオンタンパク質、プロカルシトニン、プログラム細胞死タンパク質1、プロインスリン、プロラクチン、プロタンパク質転換酵素PC9、プロリラキシン (prorelaxin)、前立腺特異的膜抗原 (PSMA)、プロテインA、プロテインC、プロテインD、プロテインS、プロテインZ、PS、PSA、PSCA、PsmAr、PTEN、PTHrp、Ptk、PTN、P-セレクチン糖タンパク質リガンド-1、R51、RAGE、RANK、RANKL、RANTES、リラキシン、リラキシンA鎖、リラキシンB鎖、レニン、呼吸器多核体ウイルス (RSV) F、Ret、レチキュロン (reticulon) 4、リウマチ因子、RLI P76、RPA2、RPK-1、RSK、RSV Fgp、S100、RON-8、SCF/KL、SCGF、スクレロスチン (Sclerostin)、SDF-1、SDF1、SDF1、セリン (SERINE)、血清アミロイドP、血清アルブミン、sFRP-3、Shh、志賀様毒素II、SIGIRR、SK-1、SLAM、SLPI、SMAC、SMDF、SMOH、SOD、SPARC、スフィンゴシンーリン酸受容体1、ブドウ球菌のリポテイコ酸、Stat、STEAP、STEAP-II、幹細胞因子 (SCF)、ストレプトキナーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、シンデカン-1、TACE、TAC1、TAG-72 (腫瘍関連糖タンパク質-72)、TARC、TB、TCA-3、T細胞受容体、TdT、TECK、TEM1、TEM5、TEM7、TEM8、テネイシン、TERT、精巣PLAP様アルカリホスファターゼ、TfR、TGF、TGF-、TGF-、TGF- 汎特異的 (TGF- Pan Specific)、TGF- RII、TGF- RIIb、TGF- RIII、TGF- RI (ALK-5)、TGF- 1、TGF- 2、TGF- 3、TGF- 4、TGF- 5、TGF-I、トロンピン、トロンボポエチン (TPO)、胸腺間質性リンホプロテイン (Thymic stromal lymphoprotein) 受容体、胸腺Ck-1、甲状腺刺激ホルモン (TSH)、チロキシン、チロキシン結合グロブリン、Tie、TIMP、TIQ、組織因子、組織因子プロテアーゼインヒビター、組織因子タンパク質、TMEFF2、Tmop、TMPRSS2、TNF受容体I、TNF受容体II、TNF-、TNF-、TNF- 2、TNFc、TNF-RI、TNF-RII

10

20

30

40

50

、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)、TNFRSF12A、TNFRSF13B (TAC1)、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)、TNFRSF21 (DR6)、TNFRSF22 (DcTRAIL R2 TNFRH2)、TNFRSF25 (DR3 Apo-3/LARD/TR-3/TRAMP/WSL-1)、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 (4-1 BB CD137/ILA)、TNFRST23 (DcTRAIL R1 TNFRH1)、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/VEG1)、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 (4-1 BBリガンド CD137リガンド)、TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、TNIL-1、毒性代謝産物 (toxic metabolite)、TP-1、t-PA、Tpo、TRAIL、TRAIL R、TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRANCE、トランスフェリン受容体、TGF- $\beta$  およびTGF- $\beta$  等のトランスフォーミング増殖因子(TGF)、膜貫通型糖タンパク質NMB、トランスサイレチン、TRF、Trk、TROP-2、トロホプラスト糖タンパク質、TSG、TSLP、腫瘍壊死因子(TNF)、腫瘍関連抗原CA 125、Lewis Y関連糖を示す腫瘍関連抗原、TWEAK、TXB2、Ung、uPAR、uPAR-1、ウロキナーゼ、VAP-1、血管内皮増殖因子(VEGF)、バスピン (vaspin)、VCAM、VCAM-1、VECAD、VE-カドヘリン、VE-カドヘリン-2、VEGFR-1 (flt-1)、VEGFR-2、VEGF受容体 (VEGFR)、VEGFR-3 (flt-4)、VEG1、VIM、ウイルス抗原、ビタミンB12受容体、ピトロネクチン受容体、VLA、VLA-1、VLA-4、VNRインテグリン、フォン・ウィルブラント因子(vWF)、WIF-1、WNT1、WNT10A、WNT10B、WNT11、WNT16、WNT2、WNT2B/13、WNT3、WNT3A、WNT4、WNT5A、WNT5B、WNT6、WNT7A、WNT7B、WNT8A、WNT8B、WNT9A、WNT9B、XCL1、XCL2/SCM-1- $\alpha$ 、XCL1/リンホタクチン、XCR1、XEDAR、XIAP、XPD、HMGB1、IgA、A $\alpha$ 、CD81、CD97、CD98、DDR1、DKK1、EREG、Hsp90、IL-17/IL-17R、IL-20/IL-20R、酸化LDL、PCSK9、prekallikrein、RON、TMEM16F、SOD1、Chromogranin A、Chromogranin B、tau、VAP1、高分子キニノーゲン、IL-31、IL-31R、Nav1.1、Nav1.2、Nav1.3、Nav1.4、Nav1.5、Nav1.6、Nav1.7、Nav1.8、Nav1.9、EPCR、C1、C1q、C1r、C1s、C2、C2a、C2b、C3、C3a、C3b、C4、C4a、C4b、C5、C5a、C5b、C6、C7、C8、C9、factor B、factor D、factor H、properdin、sclerostin、fibrinogen、fibrin、prothrombin、thrombin、組織因子、factor V、factor Va、factor VII、factor VIIa、factor VIII、factor VIIIa、factor IX、factor IXa、factor X、factor Xa、factor XI、factor XIa、factor XII、factor XIIa、factor XIII、factor XIIIa、TFPI、antithrombin III、EPCR、トロンボモデュリン、TAPI、tPA、plasminogen、plasmin、PAI-1、PAI-2、GPC3、Syndecan-1、Syndecan-2、Syndecan-3、Syndecan-4、LPA、S1Pならびにホルモンおよび成長因子のための受容体のうち生体の体液中で細胞に係留されずに可溶型で存在する分子が例示され得る。

#### 【 0 0 1 9 】

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。

10

20

30

40

50

## 【0020】

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。

## 【0021】

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。

10

## 【0022】

結合活性

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

20

## 【0023】

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。

30

## 【0024】

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。

40

## 【0025】

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

50

)の原理によって評価され得る。

【0026】

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。

【0027】

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)

【0028】

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、10 µg/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。

【0029】

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。

【0030】

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

【0031】

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

10

20

30

40

50

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。

#### 【0032】

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に対する結合に対して競合する抗原結合分子である。

10

#### 【0033】

IL-6Rに対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子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。

#### 【0034】

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。

20

#### 【0035】

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、10 µg/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。

30

#### 【0036】

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 (Geo-Mean) を下記の計算式に基づいて算出することにより、抗原結合分子の結合による蛍光強度の増加割合を求めることができる。

40

#### 【0037】

Geo-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)

50

## 【0038】

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 Geo-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 Geo-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 Geo-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。

## 【0039】

被験抗原結合分子の変異IL-6R発現細胞に対する Geo-Mean比較値が、被験抗原結合分子のIL-6R発現細胞に対する Geo-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。

## 【0040】

抗原結合ドメイン

本明細書において、「抗原結合ドメイン」は目的とする抗原に結合するかぎりどのような構造のドメインも使用され得る。そのようなドメインの例として、例えば、抗体の重鎖および軽鎖の可変領域、生体内に存在する細胞膜タンパクであるAvimerに含まれる35アミノ酸程度のAドメインと呼ばれるモジュール(WO2004/044011、WO2005/040229)、細胞膜に発現する糖タンパク質であるfibronectin中のタンパク質に結合するドメインである10Fn3ドメインを含むAdnectin(WO2002/032925)、ProteinAの58アミノ酸からなる3つのヘリックスの束(bundle)を構成するIgG結合ドメインをscaffoldとするAffibody(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DARPs(Designed Ankyrin Repeat proteins)(WO2002/020565)、好中球ゲラチナーゼ結合リポカリン(neutrophil gelatinase-associated lipocalin(NGAL))等のリポカリン分子において高度に保存された8つの逆並行ストランドが中央方向にねじれたパレル構造の片側を支える4つのループ領域であるAnticalin等(WO2003/029462)、ヤツメウナギ、ヌタウナギなど無顎類の獲得免疫システムとしてイムノグロブリンの構造を有さない可変性リンパ球受容体(variable lymphocyte receptor(VLR))のロイシン残基に富んだリピート(leucine-rich-repeat(LRR))モジュールが繰り返し積み重なった馬てい形の構造の内部の並行型シート構造のくぼんだ領域(WO2008/016854)が好適に挙げられる。本発明の抗原結合ドメインの好適な例として、抗体の重鎖および軽鎖の可変領域を含む抗原結合ドメインが挙げられる。こうした抗原結合ドメインの例としては、「scFv(single chain Fv)」、「単鎖抗体(single chain antibody)」、「Fv」、「scFv2(single chain Fv 2)」、「Fab」または「F(ab')<sub>2</sub>」等が好適に挙げられる。

## 【0041】

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:15に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質中に存在することができる。また、配列番号:15に記載のアミノ酸配列の20番目から365番目のアミノ酸からなるタンパク質中に存在することができる。あるいは、本発明の抗原結合分子における抗原結合ドメインは、互いに異なるエピトープに結合することができる。ここで異なるエピトープは、例えば、配列番号:15に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質中に存在することができる。また、配列番号:15に記載のアミノ酸配列の20番目から365番目のアミノ酸からなるタンパク質中に存在することができる。

10

20

30

40

50

## 【0042】

カルシウム結合モチーフ

本発明の抗原結合分子における抗原結合ドメインは、カルシウム結合モチーフを含む。カルシウム結合モチーフは、低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が、高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低い限り、抗原結合ドメインのいずれの位置にも含まれ得る。抗原結合ドメインが抗体の可変領域である場合は、カルシウム結合モチーフは可変領域の重鎖にも含まれ得るし、可変領域の軽鎖にも含まれ得る。また、カルシウム結合モチーフは、重鎖および軽鎖の両方にも含まれ得る。非限定な別の一態様では、カルシウム結合モチーフは、可変領域のフレームワーク配列にも含まれ得るし、可変領域のCDR配列にも含まれ得る。また、カルシウム結合モチーフは、フレームワーク配列とCDR配列の両方にも含まれ得る。

10

## 【0043】

本発明の非限定な一態様として、カルシウム結合モチーフは、カルシウムイオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させるアミノ酸残基を含む。当該アミノ酸残基の例として、金属キレート作用を有するアミノ酸が好適に用いられる得る。金属キレート作用を有するアミノ酸の例として、例えばセリン (Ser (S))、スレオニン (Thr (T))、アスパラギン (Asn (N))、グルタミン (Gln (Q))、アスパラギン酸 (Asp (D))、グルタミン酸 (Glu (E))、ヒスチジン (His (H)) およびチロシン (Tyr (Y)) 等が好適に挙げられる。低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が、高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低い性質を有する既存の抗原結合ドメインに存在するカルシウム結合モチーフが、本発明のカルシウム結合モチーフとして適宜使用され得る。そのような既存の抗原結合ドメインの非限定な一例として、低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が、高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低い抗体の可変領域に含まれるカルシウム結合モチーフが好適に使用され得る。そのような抗体の非限定な例として配列番号：1および配列番号：2を含むIL-6レセプター抗体および配列番号：25および配列番号：26を含むIL-6抗体が挙げられる。また、複数個のカルシウムイオン結合部位を有し、分子進化上共通の起源から由来したと考えられるトロポニンC、カルモジュリン、パルプアルブミン、ミオシン軽鎖等が知られており、その結合モチーフも本発明のカルシウム結合モチーフとして使用され得る。

20

## 【0044】

本発明の抗原結合ドメインが抗体の可変領域である場合は、カルシウム結合モチーフは可変領域の重鎖にも含まれ得るし、可変領域の軽鎖にも含まれ得る。また、カルシウム結合モチーフは、重鎖および軽鎖の両方にも含まれ得る。非限定な別の一態様では、カルシウム結合モチーフは、可変領域のフレームワーク配列にも含まれ得るし、可変領域のCDR配列にも含まれ得る。また、カルシウム結合モチーフは、フレームワーク配列とCDR配列の両方にも含まれ得る。これらのカルシウム結合モチーフが含まれるように重鎖または軽鎖のCDR1、CDR2および/またはCDR3を設計することも可能である。例えば、本発明の非限定な一態様では、配列番号：41、配列番号：63、配列番号：64で表されるヒト抗体の軽鎖可変領域に含まれるカルシウム結合モチーフを、本発明の抗原結合分子の軽鎖可変領域に含まれるように設計することが可能である。そのようなカルシウム結合モチーフとしては、Kabatナンバリングで表される30位、31位、32位、50位および/または92位のいずれかひとつ以上のアミノ酸が、金属キレート作用を有するアミノ酸を含むカルシウム結合モチーフが挙げられる。そのようなカルシウム結合モチーフの非限定な一態様として、配列番号：41、配列番号：63、配列番号：64で表されるヒト抗体の軽鎖可変領域のKabatナンバリングで表される30位、31位、32位、50位および/または92位の5つのアミノ酸から選択される1~4のアミノ酸と同一のアミノ酸が、対応するKabatナンバリングのアミノ酸部位に含まれるカルシウム結合モチーフが好適に挙げられる。この場合において、軽鎖可変領域のKabatナンバリングで表される30位、31位、32位、50位および/または92位の5つのアミノ酸部位のうち、配列番号：41、配列番号：63、配列番号：64で表されるヒト抗体の軽鎖可変領域中の対応するアミノ酸部位に含まれるアミノ酸と非同一のアミ

30

40

50

ノ酸であるアミノ酸部位には、金属キレート作用を有するアミノ酸が含まれることが好ましい。また、例えば、本発明の非限定な別の一態様では、配列番号：1で表される重鎖可変領域に含まれるカルシウム結合モチーフを、本発明の抗原結合分子の重鎖可変領域に含まれるように設計することも可能である。そのようなカルシウム結合モチーフとしては、Kabatナンバリングで表される95位、96位および/または100a位のアミノ酸が、金属キレート作用を有するアミノ酸を含むカルシウム結合モチーフが挙げられる。また、例えば、本発明の非限定な別の一態様では、配列番号：25で表される重鎖可変領域に含まれるカルシウム結合モチーフを、本発明の抗原結合分子の重鎖可変領域に含まれるように設計することも可能である。そのようなカルシウム結合モチーフとしては、Kabatナンバリングで表される95位および/または101位のアミノ酸が、金属キレート作用を有するアミノ酸を含むカルシウム結合モチーフが挙げられる。これらの金属キレート作用を有するアミノ酸として、例えばセリン(Ser(S))、スレオニン(Thr(T))、アスパラギン(Asn(N))、グルタミン(Gln(Q))、アスパラギン酸(Asp(D))、グルタミン酸(Glu(E))、ヒスチジン(His(H))およびチロシン(Tyr(Y))等が挙げられる。またカルシウムイオンの結合のためにこれらの位置のアミノ酸の主鎖のカルボニル基が関わっていてもよい。後述する実施例に記載されているように、カルシウム結合モチーフに含まれるアミノ酸を所望の抗原結合ドメインに移植することによって、驚くべきことに当該抗原結合ドメインにカルシウムイオン結合活性を付与することが可能であった。また、カドヘリンドメイン、カルモジュリンに含まれるEFハンド、Protein kinase Cに含まれるC2ドメイン、血液凝固タンパク質Factor IXに含まれるGlaドメイン、アシアログライコプロテインレセプターやマンノース結合レセプターに含まれるC型レクチン、LDL受容体に含まれるAドメイン、アネキシン、トロンボスポンジン3型ドメインおよびEGF様ドメインもまた適宜使用され得る。

10

20

30

40

50

#### 【0045】

##### 特異的

特異的とは、一方の分子がその結合相手である一または複数の分子以外の分子に対しては何ら有意な結合を示さない状態をいう。また、抗原結合ドメインが、ある抗原中に含まれる複数のエピトープのうち特定のエピトープに対して特異的である場合にも用いられる。また、抗原結合ドメインが結合するエピトープが複数の異なる抗原に含まれる場合には、当該抗原結合ドメインを有する抗原結合分子は当該エピトープを含む様々な抗原と結合することができる。

#### 【0046】

##### 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。

#### 【0047】

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。

#### 【0048】

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。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。

【0049】

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。

【0050】

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：16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：15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性の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性IL-6Rである、配列番号：15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：15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。

【0051】

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：15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。

【0052】

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

【0053】

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。

【0054】

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

10

20

30

40

50

法として、感作抗原が哺乳動物の腹腔内または皮下に投与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を使用され得る。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。

【0055】

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

【0056】

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WO 2003/104453に記載された方法を用いても作製され得る。

【0057】

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。

【0058】

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。

【0059】

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'プ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。

【0060】

10

20

30

40

50

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。

#### 【0061】

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。

10

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。

#### 【0062】

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。

20

#### 【0063】

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。

#### 【0064】

このようにして得られたハイブリドーマは、通常の見込培養液、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、通常の見込希釈法によって、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。

30

#### 【0065】

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見込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、通常の見込希釈法によって、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。

40

#### 【0066】

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

50

ナル抗体は、たとえば、FACS (fluorescence activated cell sorting) によってスクリーニングされ得る。FACSは、蛍光抗体と接触させた細胞をレーザー光で解析し、個々の細胞が発する蛍光を測定することによって細胞表面に対する抗体の結合を測定することを可能にするシステムである。

【0067】

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。

10

【0068】

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

20

【0069】

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

【0070】

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。

【0071】

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。

30

【0072】

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。

40

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

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

【0073】

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

50

て合成され得る。また、cDNAの合成および増幅のために、SMART RACE cDNA 増幅キット (Clontech製) およびPCRを用いた5'-RACE法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85 (23), 8998-9002、Nucleic Acids Res. (1989) 17 (8), 2919-2932) が適宜利用され得る。更にこうしたcDNAの合成の過程においてcDNAの両末端に後述する適切な制限酵素サイトが導入され得る。

#### 【0074】

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

10

#### 【0075】

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。

#### 【0076】

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プングキット (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。

20

#### 【0077】

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 1、2a、2b、3、軽鎖として 鎖と 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。

30

#### 【0078】

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

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

(2) IL-6R発現細胞と抗体との結合を検出する工程、および

(3) IL-6R発現細胞に結合する抗体を選択する工程。

40

#### 【0079】

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。

#### 【0080】

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ーンFv (scFv) を形成することができ

50

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。

#### 【0081】

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イムで融合されれば、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(C領域)をコードするDNAを保持した発現ベクターの5'側に、前記V領域遺伝子を消化する制限酵素の制限酵素認識配列が適宜配置され得る。同じ組み合わせの制限酵素で消化された両者がインフレイ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。

10

20

#### 【0082】

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。例えば、シグナル配列として、アミノ酸配列MGWSCIIILFLVATATGVHS(配列番号:113)を有するペプチドが使用され得るが、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。

30

#### 【0083】

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 1994011523を参照のこと)。

40

#### 【0084】

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

(1) 哺乳類細胞、: CHO、COS、ミエローム、BHK (baby hamster kidney)、Hela、Veroなど

(2) 両生類細胞: アフリカツメガエル卵母細胞など

(3) 昆虫細胞: sf9、sf21、Tn5など

50

## 【 0 0 8 5 】

あるいは植物細胞としては、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) などのニコチアナ (*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。

## 【 0 0 8 6 】

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・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 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：アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) などのアスペルギルス (*Aspergillus*) 属

10

## 【 0 0 8 7 】

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。

## 【 0 0 8 8 】

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 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)。

20

## 【 0 0 8 9 】

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、当該会合体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。

30

## 【 0 0 9 0 】

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。

40

## 【 0 0 9 1 】

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、

50

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。

【0092】

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。

10

【0093】

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）。

【0094】

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

20

30

【0095】

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。

【0096】

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）。

40

【0097】

また、抗体遺伝子を取得する方法としてBernasconiら（Science (2002) 298, 2199-2202）またはWO2008/081008に記載のようなB細胞クローニング（それぞれの抗体のコード配列の同定およびクローニング、その単離、およびそれぞれの抗体（特に、IgG1、IgG2、Ig

50

G3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。

【0098】

#### EU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。

10

【0099】

#### 抗原の細胞内への取込みまたは細胞内への取込みの促進

本発明において抗原結合分子による「抗原の細胞内への取込み」とは、抗原がエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれることを意味する。また本発明において「細胞内への取込みを促進する」とは、血漿中において抗原と結合した抗原結合分子が細胞内に取り込まれる速度が促進されること、および/または、取り込まれた抗原が血漿中にリサイクルされる量が減少することを意味する。本発明における細胞内への取り込み速度の促進の程度は、抗原結合分子の低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性を高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低下させる前の抗原結合分子と比較して、細胞内への取込み速度が促進されていればよい。したがって、本発明において、抗原結合分子により抗原の細胞内への取り込みが促進されたかどうかは、抗原の細胞内への取り込み速度が増大したかどうかで判断することが可能である。抗原の細胞内への取り込み速度は、例えば、ヒトFcRn発現細胞を含む培養液に抗原結合分子と抗原を添加し、抗原の培養液中濃度の減少を経時的に測定すること、あるいは、ヒトFcRn発現細胞内に取り込まれた抗原の量を経時的に測定すること、により算出することができる。

20

【0100】

本発明の抗原結合分子の抗原の細胞内への取込み速度を促進させる方法を利用することによって、例えば抗原結合分子を投与することによって、血漿中の抗原の消失速度を促進させることができる。したがって、抗原結合分子による抗原の細胞内への取込みが促進されたかどうかは、例えば、血漿中に存在する抗原の消失速度が加速されているかどうか、あるいは、抗原結合分子の投与によって血漿中の抗原濃度が低減されているかどうか、を測定することによっても確認することができる。即ち本発明の抗原結合分子の投与によって、血漿中の抗原濃度の減少を促進させることも可能である。

30

【0101】

#### 1分子の抗原結合分子による抗原への結合回数

また、本発明における「1分子の抗原結合分子による抗原への結合回数」とは、1分子の抗原結合分子が分解されて消失するまでの間に抗原へ結合することができる回数のことを意味する。本発明における「1分子の抗原結合分子による抗原への結合回数を増加させる」とは、血漿中で抗原が抗原結合分子に結合し、抗原が結合した抗原結合分子が細胞内に取り込まれエンドソーム内で抗原を解離した後に、抗原結合分子が血漿中に戻ることを1サイクルとした時に、1分子の抗原結合分子が分解されて消失するまでの間に回すことができたこのサイクルの数を増加させることである。本発明においては、抗原結合分子の低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低い抗原結合分子、あるいは、低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性を高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低下させる前の抗原結合分子と比較して、サイクル数が増えていればよい。したがって、サイクル数が増えたかどうかは、前述の「細胞内への取込みを促進した」か否か、あるいは、後述の「血漿中滞留性の改善した」か否かによって、判断することが可能である。

40

【0102】

#### 血漿中滞留性の改善

50

本発明において「血漿中滞留性の改善」は、「薬物動態の向上」、「薬物動態の改善」、「優れた薬物動態」、「血漿中滞留性の向上」、「優れた血漿中滞留性」または「血漿中滞留性を長くする」と言い換えることが可能であり、これらの語句は同じ意味で使用される。

#### 【0103】

本発明において「血漿中滞留性を改善する」とは、抗原結合分子がヒト、マウス、ラット、サル、ウサギ、イヌなどの動物に投与されてから、血漿中から消失するまで（例えば、細胞内で分解される等して抗原結合分子が血漿中に戻ることが不可能な状態になるまで）の時間が長くなることのみならず、抗原結合分子が投与されてから分解されて消失するまでの間に抗原に結合可能な状態（例えば、抗原結合分子が抗原に結合していない状態）で血漿中に滞留する時間が長くなることも含む。すなわち抗原に結合していない抗原結合分子（抗原非結合型抗原結合分子）が分解されて消失するまでの時間が長くなることを含む。

10

#### 【0104】

抗原結合分子が血漿中に存在していても、その抗原結合分子にすでに抗原が結合している場合は、その抗原結合分子は新たな抗原に結合できない。そのため抗原結合分子が抗原に結合していない時間が長くなれば、新たな抗原に結合できる時間が長くなり（新たな抗原に結合できる機会が多くなり）、生体内で抗原が抗原結合分子に結合していない時間を減少させることができ、抗原が抗原結合分子に結合している時間を長くすることができる。抗原結合分子の投与により血漿中からの抗原の消失を加速することができれば、抗原非結合型抗原結合分子の血漿中濃度は増加し、また、抗原が抗原結合分子に結合している時間が長くなる。つまり、本発明における「抗原結合分子の血漿中滞留性の改善」とは、低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低い抗原非結合型抗原結合分子、あるいは、低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性を高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低下させる前の抗原非結合型抗原結合分子と比較して、本発明の抗原非結合型抗原結合分子のいずれかの薬物動態パラメーターが改善（血漿中半減期の増加、平均血漿中滞留時間の増加、血漿中クリアランスの低下のいずれか）される、あるいは、抗原結合分子投与後に抗原が抗原結合分子に結合している時間が延長される、あるいは、抗原結合分子による血漿中からの抗原の消失が加速されること、を含む。

20

30

#### 【0105】

薬物動態パラメーターが改善されたか否かは、抗原結合分子あるいは抗原非結合型抗原結合分子の血漿中半減期、平均血漿中滞留時間、血漿中クリアランス等のいずれかのパラメーター（ファーマコキネティクス 演習による理解（南山堂））を測定することにより判断することが可能である。例えば、抗原結合分子をマウス、ラット、サル、ウサギ、イヌ、ヒトなどに投与した場合、抗原結合分子あるいは抗原非結合型抗原結合分子の血漿中濃度を測定し、各パラメーターを算出し、血漿中半減期が長くなった又は平均血漿中滞留時間が長くなった場合等には、抗原結合分子の血漿中滞留性が改善したと言える。これらのパラメーターは当業者に公知の方法により測定することが可能であり、例えば、薬物動態解析ソフトWinNonlin（Pharsight）を用いて、付属の手順書に従いNoncompartmental解析をすることによって適宜評価することができる。抗原非結合型抗原結合分子の血漿中濃度の測定は当業者公知の方法で実施することが可能であり、例えば、Clin Pharmacol. 2008 Apr;48(4):406-17において測定されている方法を用いることができる。

40

#### 【0106】

本発明において「血漿中滞留性を改善する」とは、抗原結合分子投与後に抗原が抗原結合分子に結合している時間が延長されたことも含む。抗原結合分子投与後に抗原が抗原結合分子に結合している時間が延長されたか否かは、抗原結合分子非結合型抗原（遊離型抗原）の血漿中濃度、あるいは総抗原濃度に対する抗原結合分子非結合型抗原濃度（遊離型抗原濃度）を測定し、当該濃度の割合が上昇してくるまでの時間により判断することが可能である。

50

## 【0107】

本発明において「血漿中の抗原濃度」の測定は、抗原結合分子非結合型抗原の血漿中濃度、あるいは総抗原濃度に対する抗原結合分子非結合型抗原濃度の割合を当業者公知の方法を用いて実施することが可能であり、例えば、Pharm Res. 2006 Jan;23(1):95-103において測定されている方法を用いることができる。

## 【0108】

また、抗原が何らかの機能を生体内で示す場合、抗原が抗原の機能を中和する抗原結合分子（アンタゴニスト分子）と結合しているかどうかは、その抗原の機能が中和されているかどうかで評価することも可能である。抗原の機能が中和されているかどうかは、抗原の機能を反映する何らかの生体内のマーカーを測定することで評価することが可能である。抗原が抗原の機能を活性化する抗原結合分子（アゴニスト分子）と結合しているかどうかは、抗原の機能を反映する何らかの生体内のマーカーを測定することで評価することが可能である。

10

## 【0109】

抗原結合分子非結合型抗原の血漿中濃度の測定、総抗原濃度に対する抗原結合分子非結合型の抗原濃度の割合の測定、生体内マーカーの測定などの測定は特に限定されないが、抗原結合分子が投与されてから一定時間が経過した後に行われることが好ましい。本発明において「抗原結合分子が投与されてから一定時間が経過した後」とは、特に限定されず、投与された抗原結合分子の性質等により当業者が適時決定することが可能であり、例えば抗原結合分子を投与してから1日経過後、抗原結合分子を投与してから3日経過後、抗原結合分子を投与してから7日経過後、抗原結合分子を投与してから14日経過後、抗原結合分子を投与してから28日経過後などを挙げることができる。

20

## 【0110】

本発明においては、ヒトにおける血漿中滞留性が改善することが好ましい。ヒトでの血漿中滞留性を測定することが困難である場合には、マウス（例えば、正常マウス、ヒト抗原発現トランスジェニックマウス、ヒトFcRn発現トランスジェニックマウス、等）やサル（例えば、カニクイザルなど）での血漿中滞留性をもとに、ヒトでの血漿中滞留性を予測することができる。

## 【0111】

細胞外で抗原結合分子に結合した抗原の細胞内での抗原結合分子からの解離

30

また、本発明は、細胞外で抗原結合分子に結合した抗原の細胞内での抗原結合分子からの解離を促進させる方法として利用することも可能である。本発明において抗原が抗原結合分子から解離する箇所は細胞内であればいかなる箇所でもよいが、好ましくは早期エンドソーム内である。本発明において、「細胞外で抗原結合分子に結合した抗原の細胞内での抗原結合分子からの解離」とは、細胞外で抗原結合分子に結合して細胞内に取り込まれた抗原全てが細胞内で抗原結合分子から解離する必要はなく、細胞内で抗原結合分子から解離する抗原の割合が、抗原結合分子の低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低くない抗原結合分子、あるいは、低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性を高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低下させる前の抗原結合分子と比較して、細胞内で抗原結合分子から解離する抗原の割合がより高くなっていけばよい。また、細胞外で抗原結合分子に結合した抗原の細胞内での抗原結合分子からの解離を促進させる方法は、抗原と結合した抗原結合分子の細胞内への取込みを促進させ、細胞内での抗原結合分子からの抗原の解離が促進されやすくなる性質を抗原結合分子に付与する方法ともいえる。

40

## 【0112】

抗原と結合した状態で細胞内に取り込まれた抗原結合分子の、抗原と結合していない状態での細胞外への放出

また、本発明は、抗原と結合した状態で細胞内に取り込まれた抗原結合分子の、抗原と結合していない状態での細胞外への放出を促進させる方法として利用することも可能である。本発明において、「抗原と結合した状態で細胞内に取り込まれた抗原結合分子の、抗

50

原と結合していない状態での細胞外への放出」とは、抗原と結合した状態で細胞内に取り込まれた抗原結合分子全てが抗原と結合していない状態で細胞外に放出される必要はなく、抗原と結合していない状態で細胞外に放出される抗原結合分子の割合が、抗原結合分子の低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低くない抗原結合分子、あるいは、低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性を高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低下させる前と比較して、細胞外に放出される抗原結合分子の割合が高くなっていればよい。細胞外に放出された抗原結合分子は、抗原結合活性を維持していることが好ましい。また、抗原と結合した状態で細胞内に取り込まれた抗原結合分子の抗原と結合していない状態での細胞外への放出を促進させる方法は、抗原と結合した抗原結合分子の細胞内への取り込みを促進させ、抗原結合分子の抗原と結合していない状態での細胞外への放出が促進されやすくなる性質を抗原結合分子に付与する方法ともいえる。

10

#### 【0113】

##### カルシウム濃度の条件

本発明において、低カルシウム濃度条件下とは、通常、イオン化カルシウム濃度が $0.1 \mu\text{M} \sim 30 \mu\text{M}$ であることを意味する。好ましくは $0.5 \mu\text{M} \sim 10 \mu\text{M}$ であり、特に生体内の早期エンドソーム内でのイオン化カルシウム濃度に近い $1 \mu\text{M} \sim 5 \mu\text{M}$ であることが好ましい。また、本発明において、高カルシウム濃度条件下とは、通常、イオン化カルシウム濃度が、 $100 \mu\text{M} \sim 10 \text{mM}$ を意味し、好ましくは $200 \mu\text{M} \sim 5 \text{mM}$ 、特に生体内の血漿中（血中）でのイオン化カルシウム濃度に近い $0.5 \text{mM} \sim 2.5 \text{mM}$ が好ましい。

20

#### 【0114】

従って、本発明において、「抗原結合分子の低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低い」とは、抗原結合分子のイオン化カルシウム濃度 $0.1 \mu\text{M} \sim 30 \mu\text{M}$ での抗原結合活性が、イオン化カルシウム濃度 $100 \mu\text{M} \sim 10 \text{mM}$ での抗原結合活性より弱いことを意味する。好ましくは、抗原結合分子のイオン化カルシウム濃度 $0.5 \mu\text{M} \sim 10 \mu\text{M}$ での抗原結合活性が、イオン化カルシウム濃度 $200 \mu\text{M} \sim 5 \text{mM}$ での抗原結合活性より弱いことを意味し、特に好ましくは、生体内の早期エンドソーム内のイオン化カルシウム濃度における抗原結合活性が、生体内の血漿中のイオン化カルシウム濃度における抗原結合活性より弱いことを意味し、具体的には、抗原結合分子のイオン化カルシウム濃度 $1 \mu\text{M} \sim 5 \mu\text{M}$ での抗原結合活性が、イオン化カルシウム濃度 $0.5 \text{mM} \sim 2.5 \text{mM}$ での抗原結合活性より弱いことを意味する。

30

#### 【0115】

さらに本発明において、「抗原結合分子の低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低い」という表現は、抗原結合分子の高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性よりも高いと表現することもできる。また「抗原結合分子の低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低い」という表現には、抗原結合分子中のアミノ酸配列を改変等することにより、抗原結合分子の低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性を高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低下させる、あるいは、抗原結合分子の高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性を低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性よりも高くする場合も含まれる。つまり、本発明においては、抗原結合分子の低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性と高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性の比を大きくすればよい。例えば、後述のように、 $\text{KD}(\text{Ca } 3 \mu\text{M}) / \text{KD}(\text{Ca } 2 \text{mM})$ の値を大きくするという態様が挙げられる。抗原結合分子の低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性と高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性の比を大きくするためには、例えば、低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が低いものを選択する、あるいは、抗原結合分子中のアミノ酸配列を改変等することで低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性を低くしてもよいし、高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が高いものを選択する、あるいは、抗原結合分子中のアミノ酸配列を改変等することで高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性を

40

50

高くしてもよいし、又は、その両方でもよい。

【0116】

なお本発明においては、「低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低い」を「低カルシウム濃度条件下における抗原結合能が高カルシウム濃度条件下における抗原結合能よりも弱い」と記載する場合もあり、また、「低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性を高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低下させる」を「低カルシウム濃度条件下における抗原結合能を高カルシウム濃度条件下における抗原結合能よりも弱くする」と記載する場合もある。

【0117】

#### FcRn

免疫グロブリンスーパーファミリーに属するFc レセプターと異なり、FcRn、特にヒトFcRnは構造的には主要組織不適合性複合体(MHC)クラスIのポリペプチドに構造的に類似しクラスIのMHC分子と22から29%の配列同一性を有する(Ghetieら, Immunol. Today (1997) 18 (12), 592-598)。FcRnは、可溶性 または軽鎖(2マイクログロブリン)と複合体化された膜貫通 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の鎖は3つの細胞外ドメイン(1、2、3)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繫留する。1および2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)。

【0118】

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の移動に参与する。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参与する。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。

【0119】

配列番号：17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：18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2-マイクログロブリンとの複合体を形成する。2-マイクログロブリンと複合体を形成している可溶性ヒトFcRnが通常の間換発現手法を用いることによって製造される。このような2-マイクログロブリンと複合体を形成している可溶性ヒトFcRnに対する本発明のFcRn結合ドメインの結合活性が評価され得る。本発明において、特に記載のない場合は、ヒトFcRnは本発明のFcRn結合ドメインに結合し得る形態であるものを指し、例としてヒトFcRnとヒト2-マイクログロブリンとの複合体が挙げられる。

【0120】

#### FcRn結合ドメイン

本発明の抗原結合分子は、抗原結合ドメインとヒトFcRn結合ドメインを有する。ヒトFcRn結合ドメインは、抗原結合分子が酸性pHおよび/または中性pHにおいてヒトFcRn結合活性を有していれば特に限定されず、また、直接または間接的にヒトFcRnに対して結合活性を有するドメインであってもよい。そのようなドメインとしては、例えば、直接的にヒトFcRnに対する結合活性を有するIgG型免疫グロブリンのFc領域、アルブミン、アルブミンdomain3、抗ヒトFcRn抗体、抗ヒトFcRnペプチド、抗ヒトFcRn Scaffold分子等、あるいは間接的にヒトFcRnに対する結合活性を有するIgGやアルブミンに結合する分子等を挙げることができる。本発明においては、pH酸性域およびpH中性域においてヒトFcRn結合活性を有するドメインが好ましい。当該ドメインは、あらかじめpH酸性域およびpH中性域においてヒトFcRn結合活性を有しているドメインであればそのまま用いてもよい。当該ドメインがpH酸性域および/またはpH中性域においてヒトFcRn結合活性がない若しくは弱い場合には、抗原結合分子中のアミノ酸を改変してヒトFcRn結合活性を得てもよいが、ヒトFcRn結

10

20

30

40

50

合ドメイン中のアミノ酸を改変してpH酸性域および/またはpH中性域におけるヒトFcRn結合活性を得るのが好ましい。また、あらかじめpH酸性域および/またはpH中性域においてヒトFcRn結合活性を有しているドメイン中のアミノ酸を改変して、ヒトFcRn結合活性を高めてもよい。ヒトFcRn結合ドメインのアミノ酸改変は、アミノ酸改変前と改変後のpH酸性域および/またはpH中性域におけるヒトFcRn結合活性を比較することによって目的の改変を見出すことができる。

#### 【0121】

ヒトFcRn結合ドメインは、直接ヒトFcRnと結合する領域であることが好ましい。ヒトFcRn結合領域の好ましい例として、抗体のFc領域を挙げることができる。しかしながら、アルブミンやIgGなどのヒトFcRnとの結合活性を有するポリペプチドに結合可能な領域は、アルブミンやIgGなどを介して間接的にヒトFcRnと結合することが可能である。そのため、本発明におけるヒトFcRn結合領域は、アルブミンやIgGとの結合活性を有するポリペプチドに結合する領域であってもよい。特に、ヒトFcRn結合ドメインは、中性pHにおけるヒトFcRn結合活性が高いほうが好ましく、予め中性pHにおけるヒトFcRn結合活性が高いヒトFcRn結合ドメインを選択しても良いし、抗原結合分子中のアミノ酸を改変して中性pHにおけるヒトFcRn結合活性を付与しても良いし、あるいは中性pHにおけるヒトFcRn結合活性を高めても良い。

10

#### 【0122】

ヒトFcRnへの結合活性を測定する際のpH以外の条件は当業者が適宜選択することが可能であり、特に限定されない。例えば、WO2009/125825に記載のようにMES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。また、抗原結合分子のヒトFcRn結合活性の測定は当業者に公知の方法により行うことが可能であり、例えば、Biacore (GE Healthcare) などを用いて測定することが可能である。抗原結合分子とヒトFcRnの結合活性の測定は、抗原結合分子あるいはヒトFcRnを固定化したチップへ、それぞれヒトFcRnあるいは抗原結合分子をアナライトとして流すことで評価することが可能である。

20

#### 【0123】

ここで、酸性pHにおけるヒトFcRnに対する結合活性とは、pH4.0~pH6.5でのヒトFcRn結合活性を意味する。好ましくはpH5.5~pH6.5でのヒトFcRn結合活性を意味し、特に好ましくは、生体内の早期エンドソーム内のpHに近いpH5.8~pH6.0でのヒトFcRn結合活性を意味する。また、中性pHにおけるヒトFcRnに対する結合活性とは、pH6.7~pH10.0でのヒトFcRn結合活性を意味する。好ましくは、pH7.0~pH8.0でのヒトFcRn結合活性を意味し、特に好ましくは、生体内の血漿中のpHに近いpH7.4でのヒトFcRn結合活性を意味する。

30

#### 【0124】

抗原結合分子中のアミノ酸を改変して中性pHにおけるヒトFcRn結合活性を付与する、あるいは中性pHにおけるヒトFcRn結合活性を高める場合、例えばヒトFcRn結合ドメインとしてIgG型免疫グロブリンのFc領域を用いる場合、ヒトFcRn結合ドメインのアミノ酸を改変することにより、抗原結合分子に対し中性pHにおけるヒトFcRn結合活性を付与する、あるいは中性pHにおけるヒトFcRn結合活性を高めることが可能である。改変のための好ましいIgG型免疫グロブリンのFc領域としては、例えばヒト天然型IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) のFc領域が挙げられる。他のアミノ酸への改変は、中性pHにおけるヒトFcRn結合活性が付与される若しくはヒトFcRn結合活性が高められるかぎり、いかなる位置のアミノ酸が改変されていてもよい。抗原結合分子が、ヒトFcRn結合ドメインとしてヒトIgG1のFc領域を含んでいる場合、中性pHにおけるヒトFcRnへの結合がヒト天然型IgG1より強くなる改変が含まれていることが好ましい。そのような改変が可能なアミノ酸として、例えば、EUナンバリング221番目~225番目、227番目、228番目、230番目、232番目、233番目~241番目、243番目~252番目、254番目~260番目、262番目~272番目、274番目、276番目、278番目~289番目、291番目~312番目、315番目~320番目、324番目、325番目、327番目~339番目、341番目、343番目、345番目、360番目、362番目、370番目、375番目~378番目、380番目、382番目、385番目~387番目、389番目、396番目、414番目、416番目、423番目、424番目、426番目~438番目、440番目および442番目の位置のアミノ酸を挙げることができる。

40

50

より具体的には、例えば表 1 に記載のようなアミノ酸の改変が挙げられる。これらの改変を使用することで、IgG型免疫グロブリンのFc領域の中性pHにおけるヒトFcRnへの結合活性を付与する、あるいは高める（強くする）ことができる。また、pH酸性域におけるヒトFcRnへの結合活性をヒト天然型IgG1と比較して強くすることができる改変の例を表 2 に示した。これらの改変のうち、中性pHにおいてもヒトFcRnへの結合を強くすることが出来る改変を適宜選択し、本発明に使用することが可能である。

#### 【 0 1 2 5 】

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

#### 【 0 1 2 6 】

改変の例としては一以上の変異、例えば、親FcRn結合ドメインのアミノ酸とは異なるアミノ酸残基に置換された変異、あるいは親FcRn結合ドメイン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親FcRn結合ドメイン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FcRn結合ドメインのアミノ酸配列には、天然に生じないFcRn結合ドメイン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親FcRn結合ドメインと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、変種は親FcRn結合ドメイン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、親FcRn結合ドメインおよび本発明の改変されたFcRn結合ドメインの間には少なくとも1つのアミノ酸の差がある。親FcRn結合ドメインと改変FcRn結合ドメイン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。

#### 【 0 1 2 7 】

また、pH酸性域におけるヒトFcRnへの結合を親ヒトIgGと比較して強くすることができる改変の例を表 2 に示した。これらの改変のうち、pH中性域においてもヒトFcRnへの結合を強くすることが出来る改変を適宜選択し、本発明に使用することが可能である。また、Fv4-IgG1に対して酸性条件下でヒトFcRnへの結合を強くすることができる改変の組み合わせ

せを表6-1および6-2に示した。特に好ましい親ヒトIgGのFc領域の改変アミノ酸として、例えばEUナンバリング237番目、238番目、239番目、248番目、250番目、252番目、254番目、255番目、256番目、257番目、258番目、265番目、270番目、286番目、289番目、297番目、298番目、303番目、305番目、307番目、308番目、309番目、311番目、312番目、314番目、315番目、317番目、325番目、332番目、334番目、360番目、376番目、380番目、382番目、384番目、385番目、386番目、387番目、389番目、424番目、428番目、433番目、434番目および436番目の位置のアミノ酸を挙げることができる。

【0128】

特に好ましい改変としては、例えば、親IgGのFc領域のEUナンバリング

237番目のGlyをMetに置換するアミノ酸置換、 10

238番目のProをAlaに置換するアミノ酸置換、

239番目のSerをLysに置換するアミノ酸置換、

248番目のLysをIleに置換するアミノ酸置換、

250番目のThrをAla、Phe、Ile、Met、Gln、Ser、Val、Trp、またはTyrに置換するアミノ酸置換、

252番目のMetをPhe、Trp、またはTyrに置換するアミノ酸置換、

254番目のSerをThrに置換するアミノ酸置換、

255番目のArgをGluに置換するアミノ酸置換、

256番目のThrをAsp、Glu、またはGlnに置換するアミノ酸置換、

257番目のProをAla、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr、またはValに置換するアミノ酸置換、 20

258番目のGluをHisに置換するアミノ酸置換、

265番目のAspをAlaに置換するアミノ酸置換、

270番目のAspをPheに置換するアミノ酸置換、

286番目のAsnをAlaまたはGluに置換するアミノ酸置換、

289番目のThrをHisに置換するアミノ酸置換、

297番目のAsnをAlaに置換するアミノ酸置換、

298番目のSerをGlyに置換するアミノ酸置換、

303番目のValをAlaに置換するアミノ酸置換、

305番目のValをAlaに置換するアミノ酸置換、 30

307番目のThrをAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、Trp、またはTyrに置換するアミノ酸置換、

308番目のValをAla、Phe、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、またはThrに置換するアミノ酸置換、

309番目のLeuまたはValをAla、Asp、Glu、Pro、またはArgに置換するアミノ酸置換、

311番目のGlnをAla、His、またはIleに置換するアミノ酸置換、

312番目のAspをAlaまたはHisに置換するアミノ酸置換、

314番目のLeuをLysまたはArgに置換するアミノ酸置換、

315番目のAsnをAlaまたはHisに置換するアミノ酸置換、

317番目のLysをAlaに置換するアミノ酸置換、 40

325番目のAsnをGlyに置換するアミノ酸置換、

332番目のIleをValに置換するアミノ酸置換、

334番目のLysをLeuに置換するアミノ酸置換、

360番目のLysをHisに置換するアミノ酸置換、

376番目のAspをAlaに置換するアミノ酸置換、

380番目のGluをAlaに置換するアミノ酸置換、

382番目のGluをAlaに置換するアミノ酸置換、

384番目のAsnまたはSerをAlaに置換するアミノ酸置換、

385番目のGlyをAspまたはHisに置換するアミノ酸置換、

386番目のGlnをProに置換するアミノ酸置換、 50

387番目のProをGluに置換するアミノ酸置換、  
 389番目のAsnをAlaまたはSerに置換するアミノ酸置換、  
 424番目のSerをAlaに置換するアミノ酸置換、  
 428番目のMetをAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrに置換するアミノ酸置換、  
 433番目のHisをLysに置換するアミノ酸置換、  
 434番目のAsnをAla、Phe、His、Ser、Trp、またはTyrに置換するアミノ酸置換、および  
 436番目のTyrまたはPheをHisに置換するアミノ酸置換、  
 を挙げることができる。

【0129】

10

改変されるアミノ酸の数は特に限定されず、1箇所のみのアミノ酸を改変してもよいし、2箇所以上のアミノ酸を改変してもよい。2箇所以上のアミノ酸の改変の組合せとしては、例えば表3に記載のような組合せが挙げられる。また、pH酸性域におけるヒトFcRnへの結合を親ヒトIgGと比較して強くすることができる改変の組合せを表4-1~4-5に示した。これらの改変のうち、pH中性域においてもヒトFcRnへの結合を強くすることが出来る改変の組合せを適宜選択し、本発明に使用することが可能である。さらに、Fv4-IgG1に対して中性条件下でヒトFcRnへの結合を強くすることができる改変の組み合わせを表5-1および5-2に示した。

【0130】

20

これらのアミノ酸から選択される少なくとも1つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換することにより、抗原結合分子のpH中性域におけるヒトFcRn結合活性を高めることができる。

【0131】

【表1】

位置	アミノ酸改変
256	P
280	K
339	T
385	H
428	L
434	W, Y, F, A, H

30

【0132】

【表 2】

位置	アミノ酸改変	位置	アミノ酸改変
221	Y, K	299	W, F, H, Y
222	Y	300	K, A, G, V, M, Q, N, E
223	E, K	301	E
224	Y, E	302	I
225	E, K, W	303	Y, E, A
227	K, E, G	304	N, T
228	Y, K, G	305	A, H
230	E, G	306	Y
232	K	307	A, E, M, G, Q, H
233	R, S, M, T, W, Y, G	308	A, R, F, C, Y, W, N, H
234	H, R, E, I, V, F, D, Y, G	311	A, I, K, L, M, V, W, T, H
235	Y, V, N, S, T, Q, D	312	A, P, H
236	I, V, K, P, E, Q, H, W, Y, D, T, M, A, F, S, N, R	315	T, H
237	I, W, S, T, E, R, N, Q, K, H, D, P, L, M	316	K
238	A, L, D, S, T, H, W, V, I, G, M, F, E, K	317	A, P, H
239	M, R, T, G, V, E, D, L, A	318	N, T, R, L, Y
240	I, M, T	319	L, I, W, H, M, V, A
241	E, W, L	320	L, W, H, N
243	E, W	324	T, D
244	L	325	F, M, D
245	R	326	A
246	Y, H	327	D, K, M, Y, H, L
247	D	328	G, A, W, R, F
248	Y	329	K, R, W
249	P, Q, Y, H	330	G, W, V, P, H, F
250	I, E, Q	331	L, F, Y
251	T, D	332	F, H, K, L, M, R, S, W, T, Q, E, Y, D, N, V
252	Y, W, Q	333	L, F, M, A
254	H	334	A
255	E, Y, H	335	H, F, N, V, M, W, I, S, P, L
256	A	336	E, K
257	A, I, M, N, S, V, T, L, Y, C	337	A
258	D, Y, H, A	338	A
259	I, F, N	339	N, W
260	S, D, E, H, Y	341	P
262	L, E	343	E, H, K, Q, R, T, Y
263	I	360	H, A
264	F, A, I, T, N, S, D	362	A
265	R, P, G, A	375	R
266	I	376	A, G, I, M, P, T, V
267	K, E, A	377	K
268	E, M	378	Q, D, N, W
269	M, W, K, P, I, S, G, V, F, Y, A	380	A, N, S, T, Q, R, H
270	K, S, I, A	382	A, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y
271	A, V, S, Y, I, T	385	N, E
272	A, L, R, I, D, H, V, W, Y, P, T	386	H
274	M, F, G, E, I, T, N	387	H, Q
276	D, F, H, R, L, V, W, A	414	A
278	R, S, V, M, N, I, L, D	423	N
279	A, D, G, H, M, N, Q, R, S, T, W, Y, C, I	424	A
281	D, Y	426	H, L, V, R
282	G, K, E, Y	427	N
283	A, D, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, W, Y	428	F
284	T, L, Q, E	429	Q
285	N, Y, W, Q, K, E, D, Y	430	A, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, Y
286	F, L, Y, E, P, D, K, A	431	H, K
287	S, H	432	H
288	N, P, Y, H, D, I, V, C, E, G, L, Q, R	433	P
289	H	434	G, T, M, S,
291	Q, H	435	K
292	Y, E, D	436	I, L, T
293	V	437	H
294	I, K, G	438	K, L, T, W
295	V, T	440	K
296	E, I, L	442	K
298	F, E, T, H		

10

20

30

40

50

【表 3】

アミノ酸改変の組合わせ	
M252Y/S254T/T256E	
M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F/Y436H	
H433K/N434F/Y436H	
T307A/E380A	
T307A/E380A/N434H	
T307A/E380A/N434A	
N434H/N315H	10
N434H/T289H	
N434H/T370A/E380A	
T250Q/M428L	
T250Q/N434A	
M252W/N434A	
M252Y/N434A	
T256A/N434A	
T256D/N434A	
T256E/N434A	20
T256S/N434A	
P257I/Q311I	
T307A/N434A	
T307E/N434A	
T307Q/N434A	
V308P/N434A	
L309G/N434A	
Q311H/N434A	
Q311R/N434A	30
N315D/N434A	
A378V/N434A	
E380S/N434A	
E382V/N434A	
S424E/N434A	
M428L/N434A	
N434A/Y436I	
T437Q/N434A	
T437R/N434A	40

【 0 1 3 4 】

【表 4 - 1】

アミノ酸改変の組合わせ	
L234I/L235D	
G236A/V308F/I332E	
G236R/L328R	
G236A/I332E/N434S	
S239E/V264I/A330Y/I332E	
S239E/V264I/I332E	
S239E/V264I/S298A/A330Y/I332E	
S239D/D265H/N297D/I332E	
S239D/E272Y/I332E	
S239D/E272S/I332E	10
S239D/E272I/I332E	
S239D/N297D/I332E	
S239D/K326T/I332E	
S239Q/I332Q	
S239Q/I332N	
S239D/I332D	
S239D/I332E	
S239Q/I332E	
S239E/I332E	
F241W/F243W	
F241Y/F243Y/V262T/V264T	
F241W/F243W/V262A/V264A	20
F241L/V262I	
F243L/V262I/V264W	
F243L/K288D/R292P/Y300L/V305I/P396L/H435K	
F243L/K288D/R292P/Y300L/H435K	
F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L/H435K	
P245G/V308F	
T250I/V259I/V308F	
T250I/V308F	
T250I/V308F/N434S	
T250Q/V308F/M428L	
T250Q/M428L	
L251I/N434S	
L251N/N434S	30
L251F/N434S	
L251V/N434S	
L251M/N434S	
T252L/T254S/T256F	
M252Y/S254T/T256E/N434M	
M252Y/S254T/T256E/M428L/N434S	
M252Y/S254T/T256E	
M252Y/S254T/T256E/V308F	
M252Y/S254T/T256E/N434S	
M252Y/S254T/T256E/N434A	
M252Y/S254T/T256E/M428L	
M252Y/S254T/T256E/T307Q	40
M252F/T256D	
M252Y/T256Q	
M252Y/P257L	
M252Y/P257N	
M252Y/V259I	
M252Y/V279Q	
M252Y/V308P/N434Y	
M252Q/V308F	
M252Y/V308F	

【 0 1 3 5 】

表 4 - 2 は表 4 - 1 の続きの表である。

【表 4 - 2】

M252Q/V308F/N434S
M252Y/V308F/M428L
M252Y/V308F/N434M
M252Y/V308F/N434S
M252Y/Y319I
M252Q/M428L/N434S
M252Y/M428L
M252Y/N434M
M252Y/N434S
M252Y/N434A
M252Y/N434Y
S254T/V308F
R255H/N434A
R255Q/N434S
R255H/N434S
T256V/V308F
T256P/Q311I
T256P/I332E
T256P/I332F/S440Y
T256P/E430Q
T256P/N434H
T256E/N434Y
T256P/S440Y
P257Y/V279Q
P257L/V279E
P257N/V279Q
P257N/V279E
P257N/V279Y
P257L/V279Q
P257N/281S
P257L/281S
P257N/V284E
P257N/L306Y
P257L/V308Y
P257L/V308F
P257N/V308Y
P257L/Q311I/N434H
P257L/Q311V
P257L/G385N
P257L/M428L
P257L/E430Q
P257L/N434H
P257L/N434Y
E258H/N434A
E258H/N434H
V259I/T307Q/V308F
V259I/V308F
V259I/V308F/Y319L
V259I/V308F/Y319I
V259A/V308F
V259I/V308F/N434M
V259I/V308F/N434S
V259I/V308F/M428L/N434S
V259I/V308F/M428L
V259I/Y319I
V259I/Y319I/N434S
V259I/M428L
V259I/M428L/N434S
V259I/N434S

10

20

30

40

【 0 1 3 6 】

表 4 - 3 は表 4 - 2 の続きの表である。

【表 4 - 3】

V259I/N434Y
V264I/A330L/I332E
V264I/I332E
D265F/N297E/I332E
S267L/A327S
E272R/V279L
V279E/V284E
V279Q/L306Y
V279Y/V308F
V279Q/V308F
V279Q/G385H
^281S/V308Y
^281S/V308F
^281S/N434Y
E283F/V284E
V284E/V308F
V284E/G385H
K288A/N434A
K288D/H435K
K288V/H435D
T289H/N434A
T289H/N434H
L306I/V308F
T307P/V308F
T307Q/V308F/N434S
T307Q/V308F/Y319L
T307S/V308F
T307Q/V308F
T307A/E310A/N434A
T307Q/E380A/N434A
T307Q/M428L
T307Q/N434M
T307I/N434S
T307V/N434S
T307Q/N434S
T307Q/N434Y
V308T/L309P/Q311S
V308F/L309Y
V308F/Q311V
V308F/Y319F
V308F/Y319I/N434M
V308F/Y319I
V308F/Y319L
V308F/Y319I/M428L
V308F/Y319I/M428L/N434S
V308F/Y319L/N434S
V308F/I332E
V308F/G385H
V308F/M428L/N434M
V308F/M428L
V308F/M428L/N434S
V308P/N434Y
V308F/N434M
V308F/N434S
V308F/N434Y
Q311G/N434S
Q311D/N434S
Q311E/N434S
Q311N/N434S

10

20

30

40

【 0 1 3 7 】

表 4 - 4 は表 4 - 3 の続きの表である。

【表 4 - 4】

Q311Y/N434S
Q311F/N434S
Q311W/N434S
Q311A/N434S
Q311K/N434S
Q311T/N434S
Q311R/N434S
Q311L/N434S
Q311M/N434S
Q311V/N434S
Q311I/N434S
Q311A/N434Y
D312H/N434A
D312H/N434H
L314Q/N434S
L314V/N434S
L314M/N434S
L314F/N434S
L314I/N434S
N315H/N434A
N315H/N434H
Y319I/V308F
Y319I/M428L
Y319I/M428L/N434S
Y319I/N434M
Y319I/N434S
L328H/I332E
L328N/I332E
L328E/I332E
L328I/I332E
L328Q/I332E
L328D/I332E
L328R/M428L/N434S
A330L/I332E
A330Y/I332E
I332E/D376V
I332E/N434S
P343R/E345D
D376V/E430Q
D376V/E430R
D376V/N434H
E380A/N434A
G385R/Q386T/P387R/N389P
G385D/Q386P/N389S
N414F/Y416H
M428L/N434M
M428L/N434S
M428L/N434A
M428L/N434Y
I1429N/N434S
E430D/N434S
E430T/N434S
E430S/N434S
E430A/N434S
E430F/N434S
E430Q/N434S
E430L/N434S
E430I/N434S
A431T/N434S

10

20

30

40

【 0 1 3 8 】

表 4 - 5 は表 4 - 4 の続きの表である。

【表 4 - 5】

A431S/N434S
A431G/N434S
A431V/N434S
A431N/N434S
A431F/N434S
A431H/N434S
L432F/N434S
L432N/N434S
L432Q/N434S
L432H/N434S
L432G/N434S
L432I/N434S
L432V/N434S
L432A/N434S
H433K/N434F
H433L/N434S
H433M/N434S
H433A/N434S
H433V/N434S
H433K/N434S
H433S/N434S
H433P/N434S
N434S/M428L
N434S/Y436D
N434S/Y436Q
N434S/Y436M
N434S/Y436G
N434S/Y436E
N434S/Y436F
N434S/Y436T
N434S/Y436R
N434S/Y436S
N434S/Y436H
N434S/Y436K
N434S/Y436L
N434S/Y436V
N434S/Y436W
N434S/Y436I
N434S/T437I

10

20

30

【 0 1 3 9 】

【表 5 - 1】

改変体名	KD (M)	アミノ酸改変
IgG1	ND	なし
IgG1-v1	3.2E-06	M252Y/S254T/T256E
IgG1-v2	8.1E-07	N434W
IgG1-F3	2.5E-06	N434Y
IgG1-F4	5.8E-06	N434S
IgG1-F5	6.8E-06	N434A
IgG1-F7	5.6E-06	M252Y
IgG1-F8	4.2E-06	M252W
IgG1-F9	1.4E-07	M252Y/S254T/T256E/N434Y
IgG1-F10	6.9E-08	M252Y/S254T/T256E/N434W
IgG1-F11	3.1E-07	M252Y/N434Y
IgG1-F12	1.7E-07	M252Y/N434W
IgG1-F13	3.2E-07	M252W/N434Y
IgG1-F14	1.8E-07	M252W/N434W
IgG1-F19	4.6E-07	P257L/N434Y
IgG1-F20	4.6E-07	V308F/N434Y
IgG1-F21	3.0E-08	M252Y/V308P/N434Y
IgG1-F22	2.0E-06	M428L/N434S
IgG1-F25	9.2E-09	M252Y/S254T/T256E/V308P/N434W
IgG1-F26	1.0E-06	I332V
IgG1-F27	7.4E-06	G237M
IgG1-F29	1.4E-06	I332V/N434Y
IgG1-F31	2.8E-06	G237M/V308F
IgG1-F32	8.0E-07	S254T/N434W
IgG1-F33	2.3E-06	S254T/N434Y
IgG1-F34	2.8E-07	T256E/N434W
IgG1-F35	8.4E-07	T256E/N434Y
IgG1-F36	3.6E-07	S254T/T256E/N434W
IgG1-F37	1.1E-06	S254T/T256E/N434Y
IgG1-F38	1.0E-07	M252Y/S254T/N434W
IgG1-F39	3.0E-07	M252Y/S254T/N434Y
IgG1-F40	8.2E-08	M252Y/T256E/N434W
IgG1-F41	1.5E-07	M252Y/T256E/N434Y
IgG1-F42	1.0E-06	M252Y/S254T/T256E/N434A
IgG1-F43	1.7E-06	M252Y/N434A
IgG1-F44	1.1E-06	M252W/N434A
IgG1-F47	2.4E-07	M252Y/T256Q/N434W
IgG1-F48	3.2E-07	M252Y/T256Q/N434Y
IgG1-F49	5.1E-07	M252F/T256D/N434W
IgG1-F50	1.2E-06	M252F/T256D/N434Y
IgG1-F51	8.1E-06	N434F/Y436H
IgG1-F52	3.1E-06	H433K/N434F/Y436H
IgG1-F53	1.0E-06	I332V/N434W
IgG1-F54	8.4E-08	V308P/N434W
IgG1-F56	9.4E-07	I332V/M428L/N434Y

10

20

30

40

表 5 - 2 は表 5 - 1 の続きの表である。

【表 5 - 2】

IgG1-F57	1.1E-05	G385D/Q386P/N389S
IgG1-F58	7.7E-07	G385D/Q386P/N389S/N434W
IgG1-F59	2.4E-06	G385D/Q386P/N389S/N434Y
IgG1-F60	1.1E-05	G385H
IgG1-F61	9.7E-07	G385H/N434W
IgG1-F62	1.9E-06	G385H/N434Y
IgG1-F63	2.5E-06	N434F
IgG1-F64	5.3E-06	N434H
IgG1-F65	2.9E-07	M252Y/S254T/T256E/N434F
IgG1-F66	4.3E-07	M252Y/S254T/T256E/N434H
IgG1-F67	6.3E-07	M252Y/N434F
IgG1-F68	9.3E-07	M252Y/N434H
IgG1-F69	5.1E-07	M428L/N434W
IgG1-F70	1.5E-06	M428L/N434Y
IgG1-F71	8.3E-08	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434W
IgG1-F72	2.0E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434Y
IgG1-F73	1.7E-07	M252Y/M428L/N434W
IgG1-F74	4.6E-07	M252Y/M428L/N434Y
IgG1-F75	1.4E-06	M252Y/M428L/N434A
IgG1-F76	1.0E-06	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434A
IgG1-F77	9.9E-07	T256E/M428L/N434Y
IgG1-F78	7.8E-07	S254T/M428L/N434W
IgG1-F79	5.9E-06	S254T/T256E/N434A
IgG1-F80	2.7E-06	M252Y/T256Q/N434A
IgG1-F81	1.6E-06	M252Y/T256E/N434A
IgG1-F82	1.1E-06	T256Q/N434W
IgG1-F83	2.6E-06	T256Q/N434Y
IgG1-F84	2.8E-07	M252W/T256Q/N434W
IgG1-F85	5.5E-07	M252W/T256Q/N434Y
IgG1-F86	1.5E-06	S254T/T256Q/N434W
IgG1-F87	4.3E-06	S254T/T256Q/N434Y
IgG1-F88	1.9E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434W
IgG1-F89	3.6E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434Y
IgG1-F90	1.9E-08	M252Y/T256E/V308P/N434W
IgG1-F91	4.8E-08	M252Y/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F92	1.1E-08	M252Y/S254T/T256E/V308P/M428L/N434W
IgG1-F93	7.4E-07	M252W/M428L/N434W
IgG1-F94	3.7E-07	P257L/M428L/N434Y
IgG1-F95	2.6E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434F
IgG1-F99	6.2E-07	M252Y/T256E/N434H

10

20

30

40

【 0 1 4 1 】

【表 6 - 1】

変異体名	KD (M)	アミノ酸改変
IgG1	ND	なし
IgG1-v1	3.2E-06	M252Y/S254T/T256E
IgG1-v2	8.1E-07	N434W
IgG1-F3	2.5E-06	N434Y
IgG1-F4	5.8E-06	N434S
IgG1-F5	6.8E-06	N434A
IgG1-F7	5.6E-06	M252Y
IgG1-F8	4.2E-06	M252W
IgG1-F9	1.4E-07	M252Y/S254T/T256E/N434Y
IgG1-F10	6.9E-08	M252Y/S254T/T256E/N434W
IgG1-F11	3.1E-07	M252Y/N434Y
IgG1-F12	1.7E-07	M252Y/N434W
IgG1-F13	3.2E-07	M252W/N434Y
IgG1-F14	1.8E-07	M252W/N434W
IgG1-F19	4.6E-07	P257L/N434Y
IgG1-F20	4.6E-07	V308F/N434Y
IgG1-F21	3.0E-08	M252Y/V308P/N434Y
IgG1-F22	2.0E-06	M428L/N434S
IgG1-F25	9.2E-09	M252Y/S254T/T256E/V308P/N434W
IgG1-F26	1.0E-06	I332V
IgG1-F27	7.4E-06	G237M
IgG1-F29	1.4E-06	I332V/N434Y
IgG1-F31	2.8E-06	G237M/V308F
IgG1-F32	8.0E-07	S254T/N434W
IgG1-F33	2.3E-06	S254T/N434Y
IgG1-F34	2.8E-07	T256E/N434W
IgG1-F35	8.4E-07	T256E/N434Y
IgG1-F36	3.6E-07	S254T/T256E/N434W
IgG1-F37	1.1E-06	S254T/T256E/N434Y
IgG1-F38	1.0E-07	M252Y/S254T/N434W
IgG1-F39	3.0E-07	M252Y/S254T/N434Y
IgG1-F40	8.2E-08	M252Y/T256E/N434W
IgG1-F41	1.5E-07	M252Y/T256E/N434Y
IgG1-F42	1.0E-06	M252Y/S254T/T256E/N434A
IgG1-F43	1.7E-06	M252Y/N434A
IgG1-F44	1.1E-06	M252W/N434A
IgG1-F47	2.4E-07	M252Y/T256Q/N434W
IgG1-F48	3.2E-07	M252Y/T256Q/N434Y
IgG1-F49	5.1E-07	M252F/T256D/N434W
IgG1-F50	1.2E-06	M252F/T256D/N434Y
IgG1-F51	8.1E-06	N434F/Y436H
IgG1-F52	3.1E-06	H433K/N434F/Y436H
IgG1-F53	1.0E-06	I332V/N434W
IgG1-F54	8.4E-08	V308P/N434W
IgG1-F56	9.4E-07	I332V/M428L/N434Y
IgG1-F57	1.1E-05	G385D/Q386P/N389S
IgG1-F58	7.7E-07	G385D/Q386P/N389S/N434W
IgG1-F59	2.4E-06	G385D/Q386P/N389S/N434Y
IgG1-F60	1.1E-05	G385H
IgG1-F61	9.7E-07	G385H/N434W
IgG1-F62	1.9E-06	G385H/N434Y
IgG1-F63	2.5E-06	N434F
IgG1-F64	5.3E-06	N434H

10

20

30

40

【 0 1 4 2 】

表 6 - 2 は表 6 - 1 の続きの表である。

【表 6 - 2】

IgG1-F65	2.9E-07	M252Y/S254T/T256E/N434F
IgG1-F66	4.3E-07	M252Y/S254T/T256E/N434H
IgG1-F67	6.3E-07	M252Y/N434F
IgG1-F68	9.3E-07	M252Y/N434H
IgG1-F69	5.1E-07	M428L/N434W
IgG1-F70	1.5E-06	M428L/N434Y
IgG1-F71	8.3E-08	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434W
IgG1-F72	2.0E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434Y
IgG1-F73	1.7E-07	M252Y/M428L/N434W
IgG1-F74	4.6E-07	M252Y/M428L/N434Y
IgG1-F75	1.4E-06	M252Y/M428L/N434A
IgG1-F76	1.0E-06	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434A
IgG1-F77	9.9E-07	T256E/M428L/N434Y
IgG1-F78	7.8E-07	S254T/M428L/N434W
IgG1-F79	5.9E-06	S254T/T256E/N434A
IgG1-F80	2.7E-06	M252Y/T256Q/N434A
IgG1-F81	1.6E-06	M252Y/T256E/N434A
IgG1-F82	1.1E-06	T256Q/N434W
IgG1-F83	2.6E-06	T256Q/N434Y
IgG1-F84	2.8E-07	M252W/T256Q/N434W
IgG1-F85	5.5E-07	M252W/T256Q/N434Y
IgG1-F86	1.5E-06	S254T/T256Q/N434W
IgG1-F87	4.3E-06	S254T/T256Q/N434Y
IgG1-F88	1.9E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434W
IgG1-F89	3.6E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434Y
IgG1-F90	1.9E-08	M252Y/T256E/V308P/N434W
IgG1-F91	4.8E-08	M252Y/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F92	1.1E-08	M252Y/S254T/T256E/V308P/M428L/N434W
IgG1-F93	7.4E-07	M252W/M428L/N434W
IgG1-F94	3.7E-07	P257L/M428L/N434Y
IgG1-F95	2.6E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434F
IgG1-F99	6.2E-07	M252Y/T256E/N434H

10

20

30

40

50

## 【 0 1 4 3 】

これらのアミノ酸改変については、公知の技術を用いて適宜実施することが可能であり、例えばDrug Metab Dispos. 2007 Jan;35(1):86-94、Int Immunol. 2006 Dec;18(12):1759-69、J Biol Chem. 2001 Mar 2;276(9):6591-604、J Biol Chem. 2007;282(3):1709-17、J Immunol. 2002;169(9):5171-80、J Immunol. 2009;182(12):7663-71、Molecular Cell, Vol. 7, 867-877, April, 2001、Nat Biotechnol. 1997 Jul;15(7):637-40、Nat Biotechnol. 2005 Oct;23(10):1283-8、Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Dec 5;103(49):18709-14、EP2154157、US20070141052、WO2000/042072、WO2002/060919、WO2006/020114、WO2006/031370、WO2010/033279、WO2006/053301、WO2009/086320においてヒト天然型IgG1のFc領域の改変が行われている。

## 【 0 1 4 4 】

The Journal of Immunology, 2009 182: 7663-7671によれば、pH酸性域(pH6.0)におけるヒト天然型IgG1のヒトFcRn結合活性はKD 1.7  $\mu$ Mであり、pH中性域におけるヒト天然型IgG1はヒトFcRn結合活性をほとんど検出できていない。よって、本発明の方法に用いられる抗原結合分子の好ましい態様として、pH酸性域におけるヒトFcRn結合活性がKD 20  $\mu$ M以下で、pH中性域におけるヒトFcRn結合活性がヒト天然型IgG1以上である抗原結合分子を挙げ

ることができる。より好ましい態様としては、pH酸性域におけるヒトFcRn結合活性がKD 2.0  $\mu$ M以下で、pH中性域におけるヒトFcRn結合活性がKD 40  $\mu$ M以下である抗原結合分子を挙げることができる。さらに好ましい態様としては、pH酸性域におけるヒトFcRn結合活性がKD 0.5  $\mu$ M以下で、pH中性域におけるヒトFcRn結合活性がKD 15  $\mu$ M以下である抗原結合分子を挙げることができる。即ち、抗原結合分子の酸性pH条件下における抗原結合活性を、中性pH条件下における抗原結合活性よりも低下させることが好ましい。なお、ここで示すKD値は、The Journal of Immunology, 2009 182: 7663-7671に記載された方法（抗原結合分子をチップに固定し、アナライトとしてヒトFcRnを流す）で測定した時の値である。

【0145】

ヒトFcRn結合活性の値として、KD（解離定数）を用いることが可能であるが、ヒト天然型IgG1のヒトFcRn結合活性はpH中性域（pH7.4）ではほとんど認められないため、KDとして算出することは困難である。pH7.4でのヒトFcRn結合活性がヒト天然型IgG1よりも高いかどうかを判断する方法として、Biacoreにおいて同じ濃度でアナライトを流した時の結合レスポンスの大小で判断する方法があげられる。すなわち、ヒト天然型IgG1を固定化したチップにヒトFcRnをpH7.4で流した時のレスポンスよりも、抗原結合分子を固定化したチップにヒトFcRnをpH7.4で流した時のレスポンスのほうが大きければ、その抗原結合分子のpH7.4でのヒトFcRn結合活性はヒト天然型IgG1よりも高いと判断することができる。

【0146】

pH7.0もまた、pH中性域として用いることができる。中性pHとしてpH7.0を用いることにより、ヒトFcRnとFcRn結合ドメインとの弱い相互作用を促進することができる。測定条件において使用される温度として、結合アフィニティーを、10 ~ 50 の任意の温度で評価してもよい。好ましくは、ヒトFcRn結合ドメインとヒトFcRnとの結合アフィニティーを決定するために、15 ~ 40 の温度を使用する。より好ましくは、ヒトFcRn結合ドメインとヒトFcRnとの結合アフィニティーを決定するために、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 までの任意の温度を同様に使用する。実施例5に記載の25 という温度は、本発明の態様に関する一例である。好ましい態様において、ヒトFcRnとFcRn結合ドメインとの相互作用は、実施例5に記載の通りにpH7.0および25 で測定されうる。ヒトFcRnに対する抗原結合分子の結合アフィニティーは、実施例3に記載の通りにBiacoreによって測定されうる。

【0147】

より好ましい態様において、本発明の抗原結合分子は、pH7.0および25 で、天然型ヒトIgGより高いヒトFcRn結合活性を有する。より好ましい態様において、pH7.0および25 でのヒトFcRn結合活性は、天然型ヒトIgGより28倍高いか、またはKD 3.2  $\mu$ Mより強い。より好ましい態様において、pH7.0および25 でのヒトFcRn結合活性は、天然型ヒトIgGより38倍高いか、またはKD 2.3  $\mu$ Mより強い。

【0148】

天然型ヒトIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4は、好ましくはヒトFcRn結合活性または生体内における結合活性に関して抗原結合分子と比較する参照天然型ヒトIgG用途のための、天然型ヒトIgGとして用いられる。好ましくは、目的の抗原結合分子と同一の抗原結合ドメインおよびヒトFcRn結合ドメインとして天然型ヒトIgG Fc領域を含む参照抗原結合分子を適宜用いることができる。より好ましくは、天然型ヒトIgG1は、ヒトFcRn結合活性または生体内における結合活性に関して抗原結合分子と比較する参照天然型ヒトIgG用途に用いられる。

【0149】

より具体的には、本発明に記載の血漿中の抗原消失活性に対して長期効果を有する抗原結合分子は、pH7.0および25 で、天然型ヒトIgG1より28倍~440倍高い範囲のFcRn結合活性を有するか、またはKDが3.0  $\mu$ Mから0.2  $\mu$ Mの範囲のFcRn結合活性を有する。血漿中での抗原消失活性に対する本発明の抗原結合分子の長期効果を評価する目的で、長期間の血漿中抗原濃度が、抗原結合分子の投与2日後、4日後、7日後、14日後、28日後、56日後、または84日後に血漿中の総抗原濃度または遊離抗原濃度および抗原/抗原結合分子モル比を

10

20

30

40

50

測定することによって決定される。血漿中抗原濃度または抗原 / 抗原結合分子モル比の減少が本発明に記載の抗原結合分子によって達成されるか否かは、先に記載した1つまたは複数の任意の時点で減少を評価することによって決定されうる。

【0150】

さらにより具体的には、本発明に記載の血漿中の抗原消失活性に対して短期効果を有する抗原結合分子は、pH7.0および25℃で、天然型ヒトIgGより440倍高いヒトFcRn結合活性を有するか、またはKDが0.2 μMより強いFcRn結合活性を有する。血漿中の抗原消失活性に対する本発明の抗原結合分子の短期効果を評価する目的で、短期間の血漿中抗原濃度が、抗原結合分子の投与15分後、1時間後、2時間後、4時間後、8時間後、12時間後、または24時間後に血漿中の総抗原濃度または遊離抗原濃度および抗原 / 抗原結合分子モル比を測定

10

【0151】

本発明の方法は、標的抗原の種類によらない任意の抗原結合分子に適応可能である。

【0152】

例えば、抗原結合分子が膜抗原に結合する抗体の場合、生体内に投与した抗体は抗原に結合して、その後、抗体は抗原に結合したまま抗原と一緒にインターナライゼーションによって細胞内のエンドソームに取り込まれる。その後、抗体は抗原に結合したままライソソームへ移行し、抗体は抗原と一緒にライソソームにより分解される。インターナライゼーションを介した血漿中からの消失は抗原依存的な消失と呼ばれており、多くの抗体分子で報告されている (Drug Discov Today, 2006 Jan;11(1-2):81-8)。1分子のIgG抗体が2価で抗原に結合した場合、1分子の抗体が2分子の抗原に結合した状態でインターナライズされ、そのままライソソームで分解される。従って、通常の抗体の場合、1分子のIgG抗体が3分子以上の抗原に結合することは出来ない。例えば、中和活性を有する1分子のIgG抗体の場合、3分子以上の抗原を中和することはできない。

20

【0153】

IgG分子の血漿中滞留性が比較的長い(消失が遅い)のは、IgG分子のサルベージレセプターとして知られているヒトFcRnが機能しているためである。ピノサイトーシスによってエンドソームに取り込まれたIgG分子は、エンドソーム内の酸性条件下においてエンドソーム内に発現しているヒトFcRnに結合する。ヒトFcRnに結合できなかったIgG分子はライソソームへと進み、そこで分解されるが、ヒトFcRnへ結合したIgG分子は細胞表面へ移行し血漿中の中性条件下においてヒトFcRnから解離することで再び血漿中に戻る。

30

【0154】

また抗原結合分子が可溶性抗原に結合する抗体の場合、生体内に投与した抗体は抗原に結合し、その後、抗体は抗原に結合したまま細胞内に取り込まれる。細胞内に取り込まれた抗体の多くはFcRnにより細胞外に放出されるが、このとき抗原に結合したまま細胞外に放出される為、再度、抗原に結合することはできない。従って、膜抗原に結合する抗体と同様、通常の抗体の場合、1分子のIgG抗体が3分子以上の抗原に結合することはできない。

【0155】

抗原に対して血漿中の高カルシウム濃度条件下においては強く結合し、エンドソーム内の低カルシウム濃度条件下において抗原から解離するカルシウム濃度依存的抗原結合抗体は、エンドソーム内で抗原から解離することが可能である。カルシウム濃度依存的抗原結合抗体は、抗原を解離した後に抗体がFcRnによって血漿中にリサイクルされると再び抗原に結合することが可能であるため、1つの抗体で複数の抗原に繰り返し結合することが可能となる。また、抗原結合分子に結合した抗原がエンドソーム内で解離することで血漿中にリサイクルされないため、抗原結合分子による抗原の細胞内への取り込みを促進し、抗原結合分子の投与により抗原の消失を促進し、血漿中の抗原濃度を低下させることが可能となる。

40

【0156】

抗原結合分子

50

本発明は、抗原結合ドメインとヒトFcRn結合ドメインを有する抗原結合分子であって、2つの異なるカルシウム濃度条件下における抗原結合活性が異なり、抗原結合分子の低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が、高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低い抗原結合分子を提供する。

【0157】

本発明における抗原結合分子は、対象とする抗原への特異的な結合活性を有する抗原結合ドメインを有していれば特に限定されない。抗原結合ドメインの好ましい例として、抗体の抗原結合領域を有しているドメインを挙げることができる。抗体の抗原結合領域の例として、CDRや可変領域を挙げることができる。抗体の抗原結合領域がCDRである場合、全長抗体に含まれる6つのCDR全てを含んでいてもよいし、1つ若しくは2つ以上のCDRを含んでいてもよい。抗体の結合領域としてCDRを含む場合、含まれるCDRはアミノ酸の欠失、置換、付加及び/又は挿入などが行われていてもよく、又、CDRの一部であってもよい。

10

【0158】

また本発明の方法が対象とする抗原結合分子としては、アンタゴニスト活性を有する抗原結合分子（アンタゴニスト抗原結合分子）、アゴニスト活性を有する抗原結合分子（アゴニスト抗原結合分子）、細胞傷害活性を有する分子などを挙げることができるが、好ましい態様として、アンタゴニスト抗原結合分子、特に受容体やサイトカインなどの抗原を認識するアンタゴニスト抗原結合分子を挙げることができる。

【0159】

本発明において対象となる抗原結合分子は特に限定されず、いかなる抗原結合分子でもよい。本発明で用いられる抗原結合分子は好ましくは、抗原結合活性（抗原結合ドメイン）とヒトFcRn結合ドメインを有する。本発明においては、特にヒトFcRnとの結合ドメインを含む抗原結合分子であることが好ましい。

20

【0160】

抗原結合ドメインとヒトFcRn結合ドメインを有する抗原結合分子の例として、抗体を挙げることができる。本発明の抗体の好ましい例として、IgG抗体を挙げることができる。抗体としてIgG抗体を用いる場合、その種類は限定されず、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4などのアイソタイプ（サブクラス）のIgGを用いることが可能である。また、本発明の抗原結合分子には抗体の定常領域が含まれていてもよく、定常領域部分にアミノ酸変異を導入しても良い。導入するアミノ酸変異は、例えば、Fcレセプターへの結合を増大あるいは低減させたもの（Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Mar 14;103(11):4005-10.）等を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。また、IgG2などの適切な定常領域を選択することによって、pH依存的な結合を変化させることも可能である。

30

【0161】

本発明が対象とする抗原結合分子が抗体の場合、抗体はマウス抗体、ヒト抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ヤギ抗体、ラクダ抗体など、どのような動物由来の抗体でもよい。さらに、例えばキメラ抗体、中でもヒト化抗体などのアミノ酸配列を置換した改変抗体でもよい。また、二種特異性抗体、各種分子を結合させた抗体修飾物、抗体断片を含むポリペプチドなどであってもよい。

40

【0162】

「キメラ抗体」とは、異なる動物由来の配列を組み合わせて作製される抗体である。キメラ抗体の具体的な例としては、例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変（V）領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常（C）領域からなる抗体を挙げることができる。

【0163】

「ヒト化抗体」とは、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称される、ヒト以外の哺乳動物由来の抗体、例えばマウス抗体の相補性決定領域（CDR; complementarity determining region）をヒト抗体のCDRへ移植したものである。CDRを同定するための方法は公知である（Kabat et al., Sequence of Proteins of Immunological Interest (1987), National Institute of Health, Bethesda, Md.; Chothia et al., Nature (1989) 342: 877）。また

50

、その一般的な遺伝子組換え手法も公知である（欧州特許出願公開番号EP 125023号公報、WO 96/02576号公報参照）。

【0164】

二重特異性抗体は、異なるエピトープを認識する可変領域を同一の抗体分子内に有する抗体をいう。二種特異性抗体は2つ以上の異なる抗原を認識する抗体であってもよいし、同一抗原上の異なる2つ以上のエピトープを認識する抗体であってもよい。

【0165】

又、抗体断片を含むポリペプチドとしては、例えば、Fab断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、scFv (Nat Biotechnol. 2005 Sep;23(9):1126-36.) domain antibody(dAb) (WO2004/058821, WO2003/002609)、scFv-Fc (WO2005/037989)、dAb-Fc、Fc融合タンパク質等が挙げられる。Fc領域を含んでいる分子はFc領域をヒトFcRn結合ドメインとして用いることができる。また、これらの分子にヒトFcRn結合ドメインを融合させてもよい。

10

【0166】

さらに、本発明が適用できる抗原結合分子は、抗体様分子であってもよい。抗体様分子(scaffold分子、ペプチド分子)とは、ターゲット分子に結合することで機能を発揮するような分子であり(Current Opinion in Biotechnology 2006, 17:653-658、Current Opinion in Biotechnology 2007, 18:1-10、Current Opinion in Structural Biology 1997, 7:463-469、Protein Science 2006, 15:14-27)、例えば、DARPin (WO2002/020565)、Affibody (WO1995/001937)、Avimer (WO2004/044011, WO2005/040229)、Adnectin (WO2002/032925)等が挙げられる。これら抗体様分子であっても、標的分子に対してカルシウム濃度依存的に結合し、抗原結合分子による抗原の細胞内への取込みを促進させ、抗原結合分子の投与により血漿中の抗原濃度の減少を促進させ、抗原結合分子の血漿中滞留性を改善させ、1つの抗原結合分子による抗原への結合回数を増加させることが可能である。

20

【0167】

また抗原結合分子は、標的に結合するレセプタータンパク質にヒトFcRn結合ドメインが融合されたタンパク質であっても良く、例えば、TNFR-Fc融合タンパク、IL1R-Fc融合タンパク、VEGFR-Fc融合タンパク、CTLA4-Fc融合タンパク等(Nat Med. 2003 Jan;9(1):47-52、BioDrugs. 2006;20(3):151-60.)が挙げられる。これらレセプターヒトFcRn結合ドメイン融合タンパク質であっても標的分子に対してカルシウム濃度依存的に結合し、抗原結合分子による抗原の細胞内への取込みを促進させ、抗原結合分子の投与により血漿中の抗原濃度の減少を促進させ、抗原結合分子の血漿中滞留性を改善させ、1つの抗原結合分子による抗原への結合回数を増加させることが可能である。

30

【0168】

また抗原結合分子は、標的に結合するが中和効果を有する人工リガンドタンパク質とヒトFcRn結合ドメインの融合タンパク質であっても良く、例えば、人工リガンドタンパク質としては、変異IL-6 (EMBO J. 1994 Dec 15;13(24):5863-70.)等が挙げられる。これら人工リガンド融合タンパク質であっても標的分子に対してカルシウム濃度依存的に結合し、抗原結合分子による抗原の細胞内への取込みを促進させ、抗原結合分子の投与により血漿中の抗原濃度の減少を促進させ、抗原結合分子の血漿中滞留性を改善させ、1つの抗原結合分子による抗原への結合回数を増加させることが可能である。

40

【0169】

さらに、本発明の抗体は糖鎖が改変されていてもよい。糖鎖が改変された抗体の例としては、例えば、グリコシル化が修飾された抗体(WO99/54342など)、糖鎖に付加するフコースが欠損した抗体(WO00/61739、WO02/31140、WO2006/067847、WO2006/067913など)、バイセクティングGlcNAcを有する糖鎖を有する抗体(WO02/79255など)などを挙げることができる。

【0170】

抗原への結合活性を測定する際のイオン化カルシウム濃度以外の条件は、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

50

定することが可能である。抗原結合分子と抗原との結合活性の測定は、抗原が可溶性抗原である場合は、抗原結合分子を固定化したチップへ、抗原をアナライトとして流すことで可溶性抗原への結合活性を評価することが可能であり、抗原が膜型抗原である場合は、抗原を固定化したチップへ、抗原結合分子をアナライトとして流すことで膜型抗原への結合活性を評価することが可能である。

#### 【0171】

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

10

#### 【0172】

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

20

#### 【0173】

また本発明の抗原結合分子において、低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性と高カルシウム濃度条件下における抗原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 $k_d$  (Dissociation rate constant: 解離速度定数) を用いることも可能である。結合活性の比を示す指標としてKD (解離定数) の代わりに $k_d$  (解離速度定数) を用いる場合、抗原に対する低カルシウム濃度条件下における $k_d$  (解離速度定数) と高カルシウム濃度条件下における $k_d$  (解離速度定数) の比である $k_d(\text{低カルシウム濃度条件下}) / k_d(\text{高カルシウム濃度条件下における})$ の値は、好ましくは2以上であり、さらに好ましくは5以上であり、さらに好ましくは10以上であり、より好ましくは30以上である。 $k_d(\text{低カルシウム濃度条件下}) / k_d(\text{高カルシウム濃度条件下における})$ の値の上限は特に限定されず、当業者の技術常識において作製可能な限り、50、100、200等、いかなる値でもよい。

30

#### 【0174】

抗原結合活性の値として、抗原が可溶性抗原の場合は $k_d$  (解離速度定数) を用いることが可能であり、抗原が膜型抗原の場合は見かけの $k_d$  (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。 $k_d$  (解離速度定数)、および、見かけの $k_d$  (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。

40

#### 【0175】

なお本発明において、異なるカルシウム濃度における抗原結合分子の抗原結合活性を測定する際は、カルシウム濃度以外の条件は同一とすることが好ましい。

#### 【0176】

低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が、高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低い抗原結合分子を得るために、抗原結合分子の低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性を高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低下させる (弱くする) 方法 (カルシウム濃度依存的な抗原結合活性を付与する方法) は特に限定されない。低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が高カルシウム濃度条件下における

50

抗原結合活性より低下した（弱い）抗原結合分子（カルシウム濃度依存的結合を示す抗原結合分子）は、例えば、*in vitro*で提示した抗体ライブラリーから上述のような抗原へのカルシウム濃度依存的結合を指標にスクリーニングを行うことによって、直接取得することができる。

【0177】

それ以外の方法として、このような性質を有する抗原結合分子を直接取得する方法が挙げられる。例えば、動物（マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ヒト免疫グロブリントランスジェニックマウス、ヒト免疫グロブリントランスジェニックラット、ヒト免疫グロブリントランスジェニックウサギ、ラマ、ラクダ等）へ抗原を免疫して得られた抗体を抗原へのカルシウム濃度依存的結合を指標にスクリーニングを行い、目的の性質を有する抗体を直接取得してもよい。また、抗原結合分子中のアミノ酸配列にランダムな変異を導入し、上述の方法に従って、異なるカルシウム濃度条件下における抗原結合分子の抗原結合活性を測定し、変更前の抗原結合分子と比較して、低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より、より低いものを選択してもよい。

10

【0178】

上述の方法等により抗原結合分子の低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性を高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低下させる（弱くする）（ $KD(\text{低カルシウム濃度条件下}) / KD(\text{高カルシウム濃度条件下})$ の値を大きくする）場合、特に限定されないが、 $KD(\text{低カルシウム濃度条件下}) / KD(\text{高カルシウム濃度条件下})$ の値がもとの抗体と比較して通常、2倍以上、好ましくは5倍以上、さらに好ましくは10倍以上となっていることが好ましい。

20

【0179】

更に、本発明のカルシウム濃度依存的な抗原結合活性を付与する方法は、中性pHにおけるヒトFcRn結合活性を有する抗原結合分子に用いる、あるいは、中性pHにおけるヒトFcRn結合活性を付与する或いは高める方法と組み合わせることで、抗原の細胞内への取込みを促進させる機能、1分子の抗原結合分子による抗原への結合回数を増加させる機能、抗原結合分子の投与による血漿中の抗原濃度の減少を促進させる機能、あるいは抗原結合分子の血漿中滞留性を改善する機能を増強することが可能である。中性pHにおけるヒトFcRn結合活性を付与する或いは高める方法としては、例えば、上述のヒトFcRn結合ドメインのアミノ酸を改変する方法を挙げることができる。ここで、「中性pHにおけるヒトFcRn結合活性」とは、pH6.7～pH10.0におけるヒトFcRnに対する結合活性を意味し、好ましいヒトFcRn結合活性として、pH7.0～pH8.0の間のヒトFcRn結合活性を挙げることができ、より好ましいヒトFcRn結合活性としてpH7.4におけるヒトFcRn結合活性を挙げることができる。

30

【0180】

また、更に、本発明のカルシウム濃度依存的な抗原結合活性を付与する方法は、pH依存的な抗原結合活性を有する抗原結合分子に用いる、或いは、pH依存的な抗原結合活性を付与する方法と組み合わせることで、抗原の細胞内への取込みを促進させる機能、1分子の抗原結合分子による抗原への結合回数を増加させる機能、抗原結合分子の投与による血漿中の抗原濃度の減少を促進させる機能、あるいは抗原結合分子の血漿中滞留性を改善する機能を増強することが可能である。pH依存的な抗原結合活性を付与する方法としては、例えば、WO2009/125825に記載の方法を挙げることができる。

40

【0181】

具体的には、例えば、本発明のカルシウム濃度依存的な抗原結合分子に、抗原結合分子の酸性pHにおける抗原結合活性を中性pHにおける抗原結合活性よりも低下させる（弱くする）方法を組合わせて用いることができる。ここで、「酸性pHにおける抗原結合活性を中性pHにおける抗原結合活性よりも低下させる（弱くする）」とは、抗原結合分子のpH4.0～pH6.5での抗原結合活性をpH6.7～pH10.0での抗原結合活性より弱くすることを意味する。好ましくは、抗原結合分子のpH5.5～pH6.5での抗原結合活性をpH7.0～pH8.0での抗原結合活性より弱くすることを意味し、特に好ましくは、抗原結合分子のpH5.8での抗原結合活

50

性をpH7.4での抗原結合活性より弱くすることを意味する。本発明において酸性pHとは通常、pH4.0～pH6.5であり、好ましくはpH5.5～pH6.5であり、特に好ましくはpH5.8である。又、本発明において中性pHとは通常、pH6.7～pH10.0であり、好ましくは、pH7.0～pH8.0であり、特に好ましくはpH7.4である。

#### 【0182】

また、抗原結合分子の「酸性pHにおける抗原結合活性を中性pHにおける抗原結合活性よりも低下させる」とは、抗原結合分子の中性での抗原結合活性を酸性でのpHにおける抗原結合活性よりも高くすると表現することもできる。つまり、本発明においては、抗原結合分子の酸性pHにおける抗原結合活性と中性pHにおける抗原結合活性の差を大きくすればよい（例えば、後述のように $KD(pH5.8) / KD(pH7.4)$ の値を大きくすればよい）。抗原結合分子の酸性pHにおける抗原結合活性と中性pHにおける抗原結合活性の差を大きくするためには、例えば、酸性pHにおける抗原結合活性を低くしてもよいし、中性pHにおける抗原結合活性を高くしてもよいし、又は、その両方でもよい。

10

#### 【0183】

本発明において、酸性pHにおける抗原結合活性が中性pHにおける抗原結合活性よりも弱い限り、酸性pHにおける抗原結合活性と中性pHにおける抗原結合活性の差は特に限定されないが、好ましくは抗原に対するpH5.8でのKDとpH7.4でのKD（Dissociation constant：解離定数）の比である $KD(pH5.8) / KD(pH7.4)$ の値が2以上であり、さらに好ましくは $KD(pH5.8) / KD(pH7.4)$ の値が10以上であり、さらに好ましくは $KD(pH5.8) / KD(pH7.4)$ の値が40以上である。 $KD(pH5.8) / KD(pH7.4)$ の値の上限は特に限定されず、当業者の技術において作製可能な限り、400、1000、10000等、いかなる値でもよい。

20

#### 【0184】

また、酸性pHにおける抗原結合活性と中性pHにおける抗原結合活性の差を示す他の指標として、例えば、解離速度定数である $k_d$ （Dissociation rate constant：解離速度定数）を用いることも可能である。結合活性の差を示す指標としてKD（解離定数）の代わりに $k_d$ （解離速度定数）を用いる場合、抗原に対するpH5.8での $k_d$ （解離速度定数）とpH7.4での $k_d$ （解離速度定数）の比である $k_d(pH5.8) / k_d(pH7.4)$ 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。 $k_d(pH5.8) / k_d(pH7.4)$ 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、如何なる値でもよい。

30

#### 【0185】

pH依存的な抗原結合活性を付与する方法は特に限定されず、例えば抗原結合分子中の少なくとも1つのアミノ酸をヒスチジンに置換する、又は抗原結合分子中に少なくとも1つのヒスチジンを挿入することによりpH5.8における抗原結合活性をpH7.4における抗原結合活性より弱くする方法を挙げることができる。抗体中のアミノ酸をヒスチジンで置換することによりpH依存性の抗原結合活性を抗体に付与できることは既に知られている（FEBS Letter, 309(1), 85-88, (1992)）。本発明では、抗原結合分子に対して、ヒスチジン変異（置換）又は挿入が導入される（行われる）位置は特に限定されず、変異又は挿入前と比較してpH5.8における抗原結合活性がpH7.4における抗原結合活性より弱くなる（ $KD(pH5.8) / KD(pH7.4)$ の値が大きくなる）限り、いかなる部位でもよい。例えば、抗原結合分子が抗体の場合には、抗体の可変領域などを挙げることができる。ヒスチジン変異又は挿入が導入される（行われる）数は当業者が適宜決定することができ、1箇所のみをヒスチジンで置換してもよいし、又は1箇所のみをヒスチジンを挿入してもよいし、2箇所以上の複数箇所をヒスチジンで置換してもよいし、又は2箇所以上の複数箇所にヒスチジンを挿入してもよい。又、ヒスチジン変異以外の変異（ヒスチジン以外のアミノ酸への変異）を同時に導入してもよい。さらに、ヒスチジン変異とヒスチジン挿入を同時に行ってもよい。ヒスチジンへの置換又はヒスチジンの挿入は当業者に公知のアラニンscanningのアラニンをヒスチジンに置き換えたヒスチジンscanningなどの方法によりランダムに行ってもよく、ヒスチジン変異又は挿入がランダムに導入された抗原結合分子ライブラリーの中から、変異前と比較して $KD(pH5.8) / KD(pH7.4)$ の値が大きくなった抗原結合分子を選択してもよ

40

50

い。

【0186】

抗原結合分子に対し、少なくとも1つのアミノ酸をヒスチジンに置換する、又は抗原結合分子アミノ酸に少なくとも1つのヒスチジンを挿入する場合、特に限定されないが、ヒスチジン置換又は挿入後の抗原結合分子のpH7.4における抗原結合活性が、ヒスチジン置換又は挿入前の抗原結合分子のpH7.4における抗原結合活性と同等であることが好ましい。ここで、ヒスチジン置換又は挿入後の抗原結合分子のpH7.4における抗原結合活性が、ヒスチジン置換又は挿入前の抗原結合分子のpH7.4における抗原結合活性と同等であるとは、ヒスチジン置換又は挿入後の抗原結合分子が、ヒスチジン置換又は挿入前の抗原結合分子が有する抗原結合活性の10%以上、好ましくは50%以上、さらに好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上を維持していることを言う。ヒスチジン置換又は挿入により抗原結合分子の抗原結合活性が低くなった場合には、抗原結合分子中の1又は複数のアミノ酸の置換、欠失、付加及び/又は挿入などにより抗原結合活性をヒスチジン置換又は挿入前の抗原結合活性と同等にしてもよい。本発明においては、そのようなヒスチジン置換又は挿入後に1又は複数のアミノ酸の置換、欠失、付加及び/又は挿入を行うことにより結合活性が同等となった抗原結合分子も含まれる。

10

【0187】

また、抗原結合分子のpH5.8における抗原結合活性をpH7.4における抗原結合活性より弱くする他の方法として、抗原結合分子中のアミノ酸を非天然型アミノ酸に置換する方法、又は抗原結合分子中のアミノ酸に非天然型アミノ酸を挿入する方法を挙げることができる。非天然アミノ酸は人為的にpKaをコントロールすることができることが知られている(Angew. Chem. Int. Ed. 2005, 44, 34, Chem Soc Rev. 2004 Sep 10;33(7):422-30., Amino Acids. 1999;16(3-4):345-79.)。従って、本発明においては上述のヒスチジンの代わりに非天然型アミノ酸を用いることも可能である。又、上述のヒスチジン置換及び/又は挿入と、非天然型アミノ酸の置換及び/又は挿入は、同時に行ってもよい。本発明で用いられる非天然型アミノ酸はいかなる非天然型アミノ酸でもよく、当業者に公知の非天然型アミノ酸等を用いることが可能である。

20

【0188】

さらに、抗原結合分子が抗体定常領域を含む物質である場合、抗原結合分子のpH5.8における抗原結合活性をpH7.4における抗原結合活性より弱くする他の方法として、抗原結合分子に含まれる抗体定常領域を改変する方法を挙げることができる。このような抗体定常領域の改変の具体例としては、例えばWO2009/125825に記載の定常領域を置換する方法を挙げることが出来る。

30

【0189】

また、抗体定常領域の改変方法としては、例えば、定常領域のアイソタイプ(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)を複数検討し、pH5.8における抗原結合活性が低下する(pH5.8における解離速度が速くなる)アイソタイプを選択する方法が挙げられる。さらに野生型アイソタイプのアミノ酸配列(野生型IgG1、IgG2、IgG3、IgG4アミノ酸配列)にアミノ酸置換を導入することで、pH5.8における抗原結合活性を低下させる(pH5.8における解離速度が速くなる)方法が挙げられる。アイソタイプ(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)によって抗体定常領域のヒンジ領域の配列が大きく異なり、ヒンジ領域のアミノ酸配列の違いは抗原結合活性に大きく影響を与えるため、抗原やエピトープの種類によって適切なアイソタイプを選択することでpH5.8における抗原結合活性が低下する(pH5.8における解離速度が速くなる)アイソタイプを選択することが可能である。また、ヒンジ領域のアミノ酸配列の違いは抗原結合活性に大きく影響を与えることから、野生型アイソタイプのアミノ酸配列のアミノ酸置換箇所としては、ヒンジ領域が望ましいと考えられる。

40

【0190】

上述の方法等により、抗原結合物質のpH5.8における抗原結合活性をpH7.4における抗原結合活性より弱くする(KD(pH5.8)/KD(pH7.4)の値を大きくする)場合、特に限定されないが、KD(pH5.8)/KD(pH7.4)の値が、もとの抗体と比較して通常、2倍以上、好ましくは

50

5倍以上、さらに好ましくは10倍以上となっていることが好ましい。

【0191】

#### 抗原結合分子

さらに、本発明は2つの異なるカルシウム濃度条件下における抗原結合活性が異なり、低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低い抗原結合分子を提供する。本発明は好ましくはイオン化カルシウム濃度0.1  $\mu\text{M}$  ~ 30  $\mu\text{M}$ の低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が、イオン化カルシウム濃度100  $\mu\text{M}$  ~ 10 mMの高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性よりも低い抗原結合分子を提供する。より具体的には、生体内の早期エンドソーム内のイオン化カルシウム濃度(低カルシウム濃度、例えば1  $\mu\text{M}$  ~ 5  $\mu\text{M}$ )における抗原結合活性が、生体内の血漿中のイオン化カルシウム濃度(高カルシウム濃度、例えば0.5 mM ~ 2.5 mM)における抗原結合活性よりも低い抗原結合分子を挙げることができる。

10

【0192】

本発明の低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低い抗原結合分子は、低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が高カルシウム濃度条件下での抗原結合活性より低い限り、その結合活性の差は限定されず、低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性がわずかでも低ければよい。

【0193】

本発明の低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性よりも低い抗原結合分子の好ましい態様として、低カルシウム濃度条件下におけるKDと高カルシウム濃度条件下におけるKDの比であるKD(低Ca) / KD(高Ca)の値が2以上であり、さらに好ましくはKD(低Ca) / KD(高Ca)の値が10以上であり、さらに好ましくはKD(低Ca) / KD(高Ca)の値が40以上である。KD(低Ca) / KD(高Ca)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。

20

【0194】

さらに本発明の低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性よりも低い抗原結合分子の他の好ましい態様として、抗原に対する低カルシウム濃度条件下での $k_d$ とpH7.4での $k_d$ の比である $k_d$ (低Ca) /  $k_d$ (高Ca)の値が2以上であり、さらに好ましくは $k_d$ (低Ca) /  $k_d$ (高Ca)の値が5以上であり、さらに好ましくは $k_d$ (低Ca) /  $k_d$ (高Ca)の値が10以上であり、さらに好ましくは $k_d$ (低Ca) /  $k_d$ (高Ca)の値が30以上である。 $k_d$ (低Ca) /  $k_d$ (高Ca)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、50、100、200等、いかなる値でもよい。

30

【0195】

本発明の抗原結合分子は、さらに、上述の中性pH条件下におけるヒトFcRn結合活性を有していても良い。当該中性pH条件下におけるヒトFcRn結合活性と、カルシウム濃度依存的な抗原結合活性とを組み合わせることで、抗原の細胞内への取込みを促進させる機能、1分子の抗原結合分子による抗原への結合回数を増加させる機能、抗原結合分子の投与による血漿中の抗原濃度の減少を促進させる機能、または抗原結合分子の血漿中滞留性を改善する機能を増強することが可能である。

40

【0196】

また、本発明の抗原結合分子は、さらに、上述のpH依存的な抗原結合活性、すなわち酸性pH条件下における抗原結合活性が中性pH条件下における抗原結合活性よりも低いという抗原結合活性を有していても良い。当該pH依存的な抗原結合活性と、カルシウム濃度依存的な抗原結合活性とを組み合わせることで、抗原の細胞内への取込みを促進させる機能、1分子の抗原結合分子による抗原への結合回数を増加させる機能、抗原結合分子の投与による血漿中の抗原濃度の減少を促進させる機能、または抗原結合分子の血漿中滞留性を改善する機能を増強することが可能である。

【0197】

また、本発明の抗原結合分子は低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が高カル

50

シウム濃度条件下における抗原結合活性よりも低い限り、他にどのような性質を有していてもよく、例えばアゴニスト抗原結合分子やアンタゴニスト抗原結合分子などであってもよい。本発明の好ましい抗原結合分子の例としてアンタゴニスト抗原結合分子を挙げることができる。アンタゴニスト抗原結合分子は通常、リガンド（アゴニスト）と受容体の結合を阻害し、受容体を介した細胞内へのシグナル伝達を阻害する抗原結合分子である。

【0198】

またpH依存的な抗原結合活性が付与された抗原結合分子は、少なくとも1つのアミノ酸がヒスチジンで置換され、又は少なくとも1つのヒスチジンが挿入されていてもよい。

【0199】

また、本発明の抗原結合分子が結合する抗原は特に限定されず、いかなる抗原に結合してもよい。例えば、受容体蛋白質（膜結合型受容体、可溶性受容体）や細胞表面マーカーなどの膜抗原、サイトカインなどの可溶性抗原などを挙げることができる。その他の抗原の具体的な例としては、上述の通りである。

10

【0200】

#### スクリーニング方法

本発明は、抗原結合分子の低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性よりも低い抗原結合分子をスクリーニングする方法を提供する。また、

- (i) 抗原の細胞内への取込みを促進させる機能、
- (ii) 抗原に2回以上結合する機能、
- (iii) 血漿中の抗原濃度の減少を促進させる機能、および
- (iv) 優れた血漿中滞留性機能、

20

から選ばれる少なくとも1つの機能を有する抗原結合分子のスクリーニング方法を提供する。

【0201】

具体的には、本発明は以下の工程(a)~(c)を含む抗原結合分子のスクリーニング方法を提供する；

- (a) 低カルシウム濃度条件下における抗原結合分子の抗原結合活性を得る工程、
- (b) 高カルシウム濃度条件下における抗原結合分子の抗原結合活性を得る工程、
- (c) 低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が、高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低い抗原結合分子を選択する工程。

30

【0202】

さらに本発明は以下の工程(a)~(c)を含む抗原結合分子のスクリーニング方法を提供する；

- (a) 高カルシウム濃度条件下で抗原結合分子又は抗原結合分子ライブラリー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分子を低カルシウム濃度条件下に置く工程、
- (c) 前記工程(b)で解離した抗原結合分子を取得する工程。

【0203】

さらに本発明は以下の工程(a)~(d)を含む抗原結合分子のスクリーニング方法を提供する；

40

- (a) 低カルシウム濃度条件下で抗原結合分子又は抗原結合分子ライブラリー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分子を高カルシウム濃度条件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分子を取得する工程。

【0204】

さらに本発明は以下の工程(a)~(c)を含む抗原結合分子のスクリーニング方法を提供する；

50

- (a) 抗原を固定したカラムに高カルシウム濃度条件下で抗原結合分子又は抗原結合分子ライブラリーを接触させる工程、
- (b) 前記工程(a)でカラムに結合した抗原結合分子を低カルシウム濃度条件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分子を取得する工程。

## 【0205】

さらに本発明は以下の工程(a)~(d)を含む抗原結合分子のスクリーニング方法を提供する；

- (a) 抗原を固定したカラムに低カルシウム濃度条件下で抗原結合分子又は抗原結合分子ライブラリーを通過させる工程、
- (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分子を高カルシウム濃度条件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分子を取得する工程。

## 【0206】

さらに本発明は以下の工程(a)~(d)を含む抗原結合分子のスクリーニング方法を提供する；

- (a) 高カルシウム濃度条件下で抗原結合分子又は抗原結合分子ライブラリー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分子を取得する工程、
- (c) 前記工程(b)で取得した抗原結合分子を低カルシウム濃度条件下に置く工程、
- (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分子を取得する工程。

## 【0207】

なお、これらの工程は2回以上繰り返されてもよい。従って、本発明は、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を提供する。(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。

## 【0208】

本発明のスクリーニング方法において、低カルシウム濃度条件下における抗原結合分子の抗原結合活性は、イオン化カルシウム濃度が $0.1\ \mu\text{M}$ ~ $30\ \mu\text{M}$ の間の抗原結合活性であれば特に限定されないが、好ましいイオン化カルシウム濃度として、 $0.5\ \mu\text{M}$ ~ $10\ \mu\text{M}$ の間の抗原結合活性を挙げることができる。より好ましいイオン化カルシウム濃度として、生体内の早期エンドソーム内のイオン化カルシウム濃度が挙げられ、具体的には $1\ \mu\text{M}$ ~ $5\ \mu\text{M}$ における抗原結合活性を挙げることができる。また、高カルシウム濃度条件下における抗原結合分子の抗原結合活性は、イオン化カルシウム濃度が $100\ \mu\text{M}$ ~ $10\ \text{mM}$ の間の抗原結合活性であれば特に限定されないが、好ましいイオン化カルシウム濃度として $200\ \mu\text{M}$ ~ $5\ \text{mM}$ の間の抗原結合活性を挙げることができる。より好ましいイオン化カルシウム濃度として、生体内の血漿中でのイオン化カルシウム濃度を挙げることができ、具体的には $0.5\ \text{mM}$ ~ $2.5\ \text{mM}$ における抗原結合活性を挙げることができる。

## 【0209】

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、イオン化カルシウム濃度以外の条件については当業者が適宜決定することが可能である。抗原結合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 $k_d$  (Dissociation rate: 解離速度定数)、又は見かけの $k_d$  (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。

## 【0210】

10

20

30

40

50

本発明において、高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より高い抗原結合分子を選択する工程は、低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低い抗原結合分子を選択する工程と同じ意味である。

【0211】

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

10

【0212】

本発明のスクリーニング方法によりスクリーニングされる抗原結合分子はいかなる抗原結合分子でもよく、例えば上述の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分子をスクリーニングしてもよい。

【0213】

本発明のスクリーニング方法でスクリーニングされる抗原結合分子はどのように調製されてもよく、例えば、あらかじめ存在している抗体、あらかじめ存在しているライブラリー（ファージライブラリー等）、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ー、これらの抗体やライブラリーにカルシウムをキレート可能なアミノ酸（例えばアスパラギン酸やグルタミン酸）や非天然アミノ酸変異を導入した抗体又はライブラリー（カルシウムをキレート可能なアミノ酸（例えばアスパラギン酸やグルタミン酸）又は非天然アミノ酸の含有率を高くしたライブラリーや特定箇所にカルシウムをキレート可能なアミノ酸（例えばアスパラギン酸やグルタミン酸）又は非天然アミノ酸変異を導入したライブラリー等）などを用いることが可能である。

20

【0214】

本発明のスクリーニング方法により、ヒト、マウス、サルなどの動物に投与した際に、  
(i) 抗原の細胞内への取込みを促進させる機能、  
(ii) 抗原に2回以上結合する機能、  
(iii) 血漿中の抗原濃度の減少を促進させる機能、及び  
(iv) 優れた血漿中滞留性機能、  
から選ばれる少なくとも1つの機能を有する抗原結合分子を得ることが可能である。従って、本発明のスクリーニング方法は、これらの機能のうち少なくとも1つの機能を有する抗原結合分子を得る為のスクリーニング方法として利用することができる。

30

【0215】

また、本発明のスクリーニング方法により得られるこれらの抗原結合分子は、患者への投与量や投与頻度を減らすことが可能であり、結果として総投与量を減らすことが可能となる為、医薬品として特に優れていると考えられる。従って、本発明のスクリーニング方法は、医薬組成物として用いる為の抗原結合分子のスクリーニング方法として利用することが可能である。

40

【0216】

抗原結合分子の製造方法

本発明は、抗原結合分子の低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性よりも低い抗原結合分子の製造方法を提供する。また、  
(i) 抗原の細胞内への取込みを促進させる機能、  
(ii) 抗原に2回以上結合する機能、  
(iii) 血漿中の抗原濃度の減少を促進させる機能、および、  
(iv) 優れた血漿中滞留性機能、  
から選ばれる少なくとも1つの機能を有する抗原結合分子の製造方法を提供する。

【0217】

50

具体的には、本発明は以下の工程(a)～(e)を含む抗原結合分子の製造方法を提供する；

- (a) 低カルシウム濃度条件下における抗原結合分子の抗原結合活性を得る工程、
- (b) 高カルシウム濃度条件下における抗原結合分子の抗原結合活性を得る工程、
- (c) 低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が、高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低い抗原結合分子を選択する工程、
- (d) 前記工程(c)で選択された抗原結合分子をコードする遺伝子を得る工程、
- (e) 前記工程(d)で得られた遺伝子を用いて抗原結合分子を産生する工程。

【0218】

さらに本発明は以下の工程(a)～(e)を含む抗原結合分子の製造方法を提供する；

- (a) 高カルシウム濃度条件下で抗原結合分子又は抗原結合分子ライブラリー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分子を低カルシウム濃度条件下に置く工程、
- (c) 前記工程(b)で解離した抗原結合分子を取得する工程、
- (d) 前記工程(c)で取得された抗原結合分子をコードする遺伝子を得る工程、
- (e) 前記工程(d)で得られた遺伝子を用いて抗原結合分子を産生する工程。

10

なお、(a)～(d)の工程は2回以上繰り返されてもよい。従って、本発明は上述の方法において、(a)～(d)の工程を2回以上繰り返す工程をさらに含む方法を提供する。(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。

【0219】

さらに本発明は以下の工程(a)～(f)を含む抗原結合分子の製造方法を提供する；

- (a) 低カルシウム濃度条件下で抗原結合分子又は抗原結合分子ライブラリー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分子を高カルシウム濃度条件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分子を取得する工程、
- (e) 前記工程(d)で取得された抗原結合分子をコードする遺伝子を得る工程、
- (f) 前記工程(e)で得られた遺伝子を用いて抗原結合分子を産生する工程。

20

なお、(a)～(e)の工程は2回以上繰り返されてもよい。従って、本発明は上述の方法において、(a)～(e)の工程を2回以上繰り返す工程をさらに含む方法を提供する。(a)～(e)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。

30

【0220】

さらに、本発明は以下の工程(a)～(e)を含む抗原結合分子の製造方法を提供する；

- (a) 抗原を固定したカラムに高カルシウム濃度条件下で抗原結合分子又は抗原結合分子ライブラリーを接触させる工程、
- (b) 前記工程(a)でカラムに結合した抗原結合分子を、低カルシウム濃度条件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分子を取得する工程、
- (d) 前記工程(c)で取得された抗原結合分子をコードする遺伝子を得る工程、
- (e) 前記工程(d)で得られた遺伝子を用いて抗原結合分子を産生する工程。

40

なお、(a)～(d)の工程は2回以上繰り返されてもよい。従って、本発明は上述の方法において、(a)～(d)の工程を2回以上繰り返す工程をさらに含む方法を提供する。(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。

【0221】

さらに本発明は以下の工程(a)～(f)を含む抗原結合分子の製造方法を提供する；

- (a) 抗原を固定したカラムに低カルシウム濃度条件下で抗原結合分子又は抗原結合分子ライブラリーを通過させる工程、
- (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分子を高カルシウム濃度条件下で抗原に結合させる工程、

50

- (d) 前記工程(c)で抗原に結合した抗原結合分子を取得する工程、
- (e) 前記工程(d)で取得された抗原結合分子をコードする遺伝子を得る工程、
- (f) 前記工程(e)で得られた遺伝子を用いて抗原結合分子を産生する工程。

なお、(a)～(e)の工程は2回以上繰り返されてもよい。従って、本発明は上述の方法において、(a)～(e)の工程を2回以上繰り返す工程をさらに含む方法を提供する。(a)～(e)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。

#### 【0222】

さらに本発明は以下の工程(a)～(f)を含む抗原結合分子の製造方法を提供する；

- (a) 高カルシウム濃度条件下で抗原結合分子又は抗原結合分子ライブラリー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分子を取得する工程、
- (c) 前記工程(b)で取得した抗原結合分子を低カルシウム濃度条件下に置く工程、
- (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分子を取得する工程、
- (e) 前記工程(d)で取得された抗原結合分子をコードする遺伝子を得る工程、
- (f) 前記工程(e)で得られた遺伝子を用いて抗原結合分子を産生する工程。

なお、(a)～(e)の工程は2回以上繰り返されてもよい。従って、本発明は、上述の方法において、(a)～(e)の工程を2回以上繰り返す工程をさらに含む方法を提供する。(a)～(e)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。

#### 【0223】

本発明の製造方法で用いられる抗原結合分子はどのように調製されてもよく、例えば、あらかじめ存在している抗体、あらかじめ存在しているライブラリー（ファージライブラリー等）、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ー、ライブラリーにカルシウムをキレート可能なアミノ酸（例えばアスパラギン酸やグルタミン酸）や非天然アミノ酸変異を導入した抗体又はライブラリー（カルシウムをキレート可能なアミノ酸（例えばアスパラギン酸やグルタミン酸）又は非天然アミノ酸の含有率を高くしたライブラリーや特定箇所にカルシウムをキレート可能なアミノ酸（例えばアスパラギン酸やグルタミン酸）又は非天然アミノ酸変異を導入したライブラリー等）などを用いることが可能である。

#### 【0224】

上述の製造方法において、低カルシウム濃度条件下における抗原結合分子の抗原結合活性は、イオン化カルシウム濃度が $0.1 \mu\text{M}$ ～ $30 \mu\text{M}$ の間の抗原結合活性であれば特に限定されないが、好ましいイオン化カルシウム濃度として、 $0.5 \mu\text{M}$ ～ $10 \mu\text{M}$ の間の抗原結合活性を挙げることができる。より好ましいイオン化カルシウム濃度として、生体内の早期エンドソーム内のイオン化カルシウム濃度が挙げられ、具体的には $1 \mu\text{M}$ ～ $5 \mu\text{M}$ における抗原結合活性を挙げることができる。また、高カルシウム濃度条件下における抗原結合分子の抗原結合活性は、イオン化カルシウム濃度が $100 \mu\text{M}$ ～ $10 \text{mM}$ の間の抗原結合活性であれば特に限定されないが、好ましいイオン化カルシウム濃度として $200 \mu\text{M}$ ～ $5 \text{mM}$ の間の抗原結合活性を挙げることができる。より好ましいイオン化カルシウム濃度として、生体内の血漿中でのイオン化カルシウム濃度を挙げることができ、具体的には $0.5 \text{mM}$ ～ $2.5 \text{mM}$ における抗原結合活性を挙げることができる。

#### 【0225】

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、イオン化カルシウム濃度以外の条件については当業者が適宜決定することが可能である。

#### 【0226】

高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より高い抗原結合分子を選択する工程は、低カルシウム濃度条件下における抗原結合活性が高カルシウム濃度条件下における抗原結合活性より低い抗原結合分子を選択する工程と同じ意味である。

#### 【0227】

10

20

30

40

50

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

【0228】

上述の製造方法において抗原と抗原結合分子の結合はいかなる状態で行われてもよく、特に限定されない。例えば、固定化された抗原結合分子に抗原を接触させることにより抗原結合分子と抗原を結合させてもよいし、固定化された抗原に抗原結合分子を接触させることにより抗原結合分子と抗原を結合させてもよい。又、溶液中で抗原結合分子と抗原を接触させることにより抗原結合分子と抗原を結合させてもよい。

10

【0229】

さらに本発明の製造方法は、上述の中性pHにおけるヒトFcRn結合活性を有する抗原結合分子に用いることもできるし、中性pHにおけるヒトFcRn結合活性を付与する或いは高める方法と組み合わせることもできる。本発明の製造方法に中性pHにおけるヒトFcRn結合活性を付与する或いは高める方法を組み合わせる場合には、抗原結合分子中のアミノ酸を改変し、中性pH条件下におけるヒトFcRn結合活性を付与する或いは高める工程を更に含んでもよい。また、中性pHにおけるヒトFcRn結合活性を有する抗原結合分子のヒトFcRn結合ドメインとしては、上述の中性pHにおけるヒトFcRn結合活性を有するヒトFcRn結合ドメインを好ましい例として挙げることができる。従って、本発明の製造方法においては、予め中性pHにおけるヒトFcRn結合活性が高いヒトFcRn結合ドメインを有する抗原結合分子を選択する、および/または、抗原結合分子中のアミノ酸を改変し、中性pHにおけるヒトFcRn結合活性を付与する若しくは高める工程を更に含んでもよい。

20

【0230】

さらに本発明の製造方法は、上述のpH依存的な抗原結合活性を有する抗原結合分子に用いることもできるし、pH依存的な抗原結合活性を付与する方法(WO 2009/125825)と組み合わせることもできる。本発明の製造方法にpH依存的な抗原結合活性を付与する方法を組み合わせる場合には、予め酸性pH条件下における抗原結合活性が中性pH条件下における抗原結合活性よりも低い抗原結合分子を選択する、および/または、抗原結合分子中のアミノ酸を改変し、酸性pH条件下における抗原結合活性を中性pH条件下における抗原結合活性よりも低下させる工程を更に含んでもよい。

30

【0231】

また、pH依存的な抗原結合活性を有する抗原結合分子としては、抗原結合分子の少なくとも1つのアミノ酸がヒスチジンで置換された又は少なくとも1つのヒスチジンが挿入された抗原結合分子を好ましい例として挙げることができる。従って、本発明の製造方法においては、抗原結合分子として少なくとも1つのアミノ酸がヒスチジンで置換された又は少なくとも1つのヒスチジンが挿入された抗原結合分子を用いる、或いは、抗原結合分子の少なくとも1つのアミノ酸をヒスチジンに置換又は少なくとも1つのヒスチジンを挿入する工程を更に含んでもよい。

【0232】

なお、本発明の製造方法においてはヒスチジンの代わりに非天然アミノ酸を用いてもよい。従って、上述のヒスチジンを非天然アミノ酸と置き換えて本発明を理解することも可能である。

40

【0233】

本発明の製造方法により、ヒト、マウス、サルなどの動物に投与した際に、

- (i) 抗原の細胞内への取込みを促進させる機能、
- (ii) 抗原に2回以上結合する機能、
- (iii) 血漿中の抗原濃度の減少を促進させる機能、及び
- (iv) 優れた血漿中滞留性機能、

から選ばれる少なくとも1つの機能を有する抗原結合分子を製造することが可能である。

50

従って、本発明の製造方法は、これらの機能のうち少なくとも1つの機能を有する抗原結合分子を得る為の製造方法として利用することができる。

【0234】

また、これらの抗原結合分子は、患者への投与量や投与頻度を減らすことが可能であり、結果として総投与量を減らすことが可能となる為、医薬品として特に優れていると考えられる。従って、本発明の製造方法は、医薬組成物として用いる為の抗原結合分子の製造方法として利用することが可能である。

【0235】

本発明の製造方法において得られた遺伝子は、通常、適当なベクターへ担持（挿入）され、宿主細胞へ導入される。該ベクターとしては、挿入した核酸を安定に保持するものであれば特に制限されず、例えば宿主に大腸菌を用いるのであれば、クローニング用ベクターとしてはpBluescriptベクター（Stratagene社製）などが好ましいが、市販の種々のベクターを利用することができる。本発明の抗原結合分子を生産する目的においてベクターを用いる場合には、特に発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、試験管内、大腸菌内、培養細胞内、生物個体内で抗原結合分子を発現するベクターであれば特に制限されないが、例えば、試験管内発現であればpBESTベクター（プロメガ社製）、大腸菌であればpETベクター（Invitrogen社製）、培養細胞であればpME18S-FL3ベクター（GenBank Accession No. AB009864）、生物個体であればpME18Sベクター（Mol Cell Biol. 8:466-472(1988)）などが好ましい。ベクターへの本発明のDNAの挿入は、常法により、例えば、制限酵素サイトを用いたりガーゼ反応により行うことができる（Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4-11.11）。

10

20

【0236】

上記宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられる。抗原結合分子を発現させるための細胞としては、例えば、細菌細胞（例：ストレプトコッカス、スタフィロコッカス、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌）、真菌細胞（例：酵母、アスペルギルス）、昆虫細胞（例：ドロソフィラス2、スポドプテラSF9）、動物細胞（例：CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293、Bowesメラノーマ細胞）および植物細胞を例示することができる。宿主細胞へのベクター導入は、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法（Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9.9）、リポフェクション法、マイクロインジェクション法などの公知の方法で行うことが可能である。

30

【0237】

宿主細胞の培養は、公知の方法に従って行うことができる。例えば、動物細胞を宿主とした場合、培養液として、例えば、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができる。その際、FBS、牛胎児血清（FCS）等の血清補液を併用しても、無血清培養により細胞を培養してもよい。培養時のpHは、約6~8とするのが好ましい。培養は、通常、約30~40で約15~200時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加える。

【0238】

宿主細胞において発現した抗原結合分子を小胞体の内腔に、細胞周辺腔に、または細胞外の環境に分泌させるために、適当な分泌シグナルを目的のポリペプチドに組み込むことができる。これらのシグナルは目的の抗原結合分子に対して内因性であっても、異種シグナルであってもよい。

40

【0239】

一方、in vivoでポリペプチドを産生させる系としては、例えば、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。これらの動物又は植物に目的とするポリヌクレオチドを導入し、動物又は植物の体内でポリペプチドを産生させ、回収する。本発明における「宿主」とは、これらの動物、植物を包含する。

【0240】

動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。哺乳類動物としては、

50

ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシ等を用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications (1993))。また、哺乳類動物を用いる場合、トランスジェニック動物を用いることができる。

#### 【0241】

例えば、本発明の抗原結合分子をコードするポリヌクレオチドを、ヤギ カゼインのような乳汁中に固有に産生されるポリペプチドをコードする遺伝子との融合遺伝子として調製する。次いで、この融合遺伝子を含むポリヌクレオチド断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ移植する。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又はその子孫が産生する乳汁から、目的の抗原結合分子を得ることができる。トランスジェニックヤギから産生される抗原結合分子を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに投与してもよい (Ebert et al., Bio/Technology (1994) 12: 699-702)。

10

#### 【0242】

また、本発明の抗原結合分子を産生させる昆虫としては、例えばカイコを用いることができる。カイコを用いる場合、目的の抗原結合分子をコードするポリヌクレオチドを挿入したバキュロウィルスをカイコに感染させることにより、このカイコの体液から目的の抗原結合分子を得ることができる。

#### 【0243】

さらに、植物を本発明の抗原結合分子産生に使用する場合、例えばタバコを用いることができる。タバコを用いる場合、目的とする抗原結合分子をコードするポリヌクレオチドを植物発現用ベクター、例えばpMON 530に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えば、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) に感染させ、本タバコの葉より所望の抗原結合分子を得ることができる (Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24: 131-8)。また、同様のバクテリアをウキクサ (*Lemna minor*) に感染させ、クローン化した後にウキクサの細胞より所望の抗原結合分子を得ることができる (Cox KM et al. Nat. Biotechnol. 2006 Dec;24(12):1591-1597)。

20

#### 【0244】

このようにして得られた抗原結合分子は、宿主細胞内または細胞外 (培地、乳汁など) から単離し、実質的に純粋で均一な抗原結合分子として精製することができる。抗原結合分子の分離、精製は、通常のポリペプチドの精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせる抗原結合分子を分離、精製することができる。

30

#### 【0245】

クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al.(1996) Cold Spring Harbor Laboratory Press)。これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えばHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。例えば、プロテインAを用いたカラムとして、Hyper D, POROS, Sepharose F. F. (Pharmacia製)等が挙げられる。

40

#### 【0246】

必要に応じ、抗原結合分子の精製前又は精製後に適当なタンパク質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、部分的にペプチドを除去することもできる。タンパク質修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、リシルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼなどが用いられる。

50

## 【0247】

## 医薬組成物

また本発明は、本発明の抗原結合分子、本発明のスクリーニング方法により単離された抗原結合分子、または本発明の製造方法により製造された抗原結合分子を含む医薬組成物に関する。本発明の抗原結合分子、本発明のスクリーニング方法により単離された抗原結合分子、または本発明の製造方法により製造された抗原結合分子は、

- (i) 抗原の細胞内への取込みを促進させる機能、
- (ii) 抗原に2回以上結合する機能、
- (iii) 血漿中の抗原濃度の減少を促進させる機能、及び
- (iv) 優れた血漿中滞留性機能、

から選ばれる少なくとも1つの機能を有する抗原結合分子であって、抗原結合分子の投与頻度を減らせることが期待されるので医薬組成物として有用である。また、本発明の医薬組成物は薬学的に許容される担体を含むことができる。

## 【0248】

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言う。

## 【0249】

本発明の医薬組成物は、当業者に公知の方法で製剤化することが可能である。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できる。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、結合剤などと適宜組み合わせ、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することが考えられる。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する。

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従って処方することができる。

## 【0250】

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。適当な溶解補助剤、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）を併用してもよい。

## 【0251】

油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、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を併用してもよい。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）、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填する。

## 【0252】

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とすることができる。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することができる。

## 【0253】

投与方法は、患者の年齢、症状により適宜選択することができる。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の範囲に設定することが可能である。または、例えば、患者あたり0.001~100000 mgの投与量とすることもできるが、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。

10

20

30

40

50

## 【0254】

また本発明の医薬組成物は、抗原の細胞内への取込みを促進させるため、または血漿中の抗原濃度の減少を促進させるために用いられる医薬組成物であることができる。

## 【0255】

また本発明は、本発明の抗原結合分子、または本発明の製造方法により製造された抗原結合分子を投与することにより、抗原結合分子による抗原の細胞内への取込みを促進させる方法、または血漿中の抗原濃度の減少を促進させる方法に関する。投与は、in vivoあるいはin vitroのどちらで行われてもよい。投与対象としては、例えば非ヒト動物（マウス、サルなど）、あるいはヒトなどを挙げることができる。

## 【0256】

また本発明は、本発明の抗原結合分子、または本発明の製造方法により製造された抗原結合分子を用いることにより、1分子の抗原結合分子による抗原への結合回数を増加させる方法、または抗原結合分子の血漿中滞留性を改善する方法に関する。

## 【0257】

なお、本発明で記載されているアミノ酸配列に含まれるアミノ酸は翻訳後に修飾（例えば、N末端のグルタミンのピログルタミル化によるピログルタミン酸への修飾は当業者によく知られた修飾である）を受ける場合もあるが、そのようにアミノ酸が翻訳後修飾された場合であっても当然のことながら本発明で記載されているアミノ酸配列に含まれる。

## 【0258】

また本発明は、少なくとも本発明の抗原結合分子を含む、本発明の方法に用いるためのキットを提供する。該キットには、その他、薬学的に許容される担体、媒体、使用方法を記載した指示書等をパッケージしておくこともできる。

## 【0259】

また本発明は、本発明の抗原結合分子もしくは本発明の製造方法により製造された抗原結合分子を有効成分として含有する、抗原結合分子による抗原の細胞内への取込み促進剤、血漿中の抗原濃度の減少促進剤、1分子の抗原結合分子による抗原への結合回数増加剤、または抗原結合分子の血漿中滞留性改善剤に関する。

## 【0260】

また本発明は、本発明の抗原結合分子もしくは本発明の製造方法により製造された抗原結合分子の、抗原結合分子による抗原の細胞内への取込み促進剤、血漿中の抗原濃度の減少促進剤、1分子の抗原結合分子による抗原への結合回数増加剤、または抗原結合分子の血漿中滞留性改善剤の製造における使用に関する。

## 【0261】

また本発明は、抗原結合分子による抗原の細胞内への取込みを促進させる方法、血漿中の抗原濃度の減少を促進させる方法、1分子の抗原結合分子による抗原への結合回数を増加させる方法、または抗原結合分子の血漿中滞留性を改善する方法に使用するための、本発明の抗原結合分子もしくは本発明の製造方法により製造された抗原結合分子に関する。

## 【0262】

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。

## 【実施例】

## 【0263】

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1〕カルシウム依存的抗原結合抗体の抗原消失加速効果のコンセプト

（1-1）pH依存的結合抗体の抗原結合抗体による抗原消失加速効果

WO 2009/125825に記載されているH54/L28-IgG1はヒト化抗IL-6レセプター抗体であり、Fv4-IgG1は、H54/L28-IgG1に対して可溶性ヒトIL-6レセプターへpH依存的に結合する特性（中性条件下において結合し、酸性条件下において解離する）を付与したヒト化抗IL-6レセプター抗体である。WO 2009/125825に記載されているマウスのin vivo試験において、H

10

20

30

40

50

54/L28-IgG1と抗原である可溶性ヒトIL-6レセプターの混合物を投与した群と比較して、Fv4-IgG1と抗原である可溶性ヒトIL-6レセプターの混合物を投与した群において、可溶性ヒトIL-6レセプターの消失を大幅に加速できることが示された。

【0264】

通常可溶性ヒトIL-6レセプターに結合する抗体に結合した可溶性ヒトIL-6レセプターは、抗体とともにFcRnによって血漿中にリサイクルされるのに対して、pH依存的に可溶性ヒトIL-6レセプターに結合する抗体は、エンドソーム内の酸性条件下において抗体に結合した可溶性ヒトIL-6レセプターを解離する。解離した可溶性ヒトIL-6レセプターはライソソームによって分解されるため、可溶性ヒトIL-6レセプターの消失を大幅に加速することが可能となり、さらにpH依存的に可溶性ヒトIL-6レセプターに結合する抗体はFcRnによって血漿中にリサイクルされ、リサイクルされた抗体は再び可溶性ヒトIL-6レセプターに結合することができ、これが繰り返されることによってひとつの抗体分子が複数回繰り返し可溶性ヒトIL-6レセプターに結合することが可能となる(図1)。

10

【0265】

また、WO 2009/125825に記載されているとおり、通常ヒト化抗IL-6レセプター抗体は、膜型ヒトIL-6レセプターに結合後、ヒト化抗IL-6レセプター抗体と膜型ヒトIL-6レセプターの複合体の状態ではインターナライズされ、その後ライソソームにて分解される。それに対して、pH依存的に結合するヒト化抗IL-6レセプター抗体は、膜型ヒトIL-6レセプターに結合しインターナライズされた後、エンドソーム内の酸性条件下において膜型ヒトIL-6レセプターから解離することで血漿中にリサイクルされる。このようにリサイクルされた抗体は再び膜型ヒトIL-6レセプターに結合することができ、これが繰り返されることによってひとつの抗体分子が複数回繰り返し膜型ヒトIL-6レセプターに結合することが可能となる(図2)。

20

【0266】

(1-2) 血漿中およびエンドソーム中におけるpHおよびカルシウム濃度

図1および図2に示したpH依存的結合抗体による作用においては、血漿中とエンドソーム内の環境の違い、すなわちpHの違い(血漿中:pH7.4、エンドソーム内:pH6.0)を利用して、血漿中では抗原に強く結合させ、エンドソーム内では抗原から解離させることが重要である。血漿中とエンドソーム内でpH依存的結合抗体の抗原への結合能にこのような差異を作り出すためには、血漿中とエンドソーム内の環境の違いの大きさが重要である。pHの違いはすなわち水素イオン濃度の違いである。つまり、pH7.4の血漿中の水素イオン濃度は約40 nMであり、pH6.0のエンドソーム内の水素イオン濃度は約1000 nMであり、血漿中とエンドソーム内で因子(水素イオン)の濃度に約25倍の違いがある。

30

【0267】

図1および図2に示した作用をより容易に達成するため、あるいは、その作用を増強するためには、血漿中とエンドソーム内の水素イオン濃度の違いより、濃度の違いが大きい因子に依存する抗体を使用すれば良いと考えられた。血漿中とエンドソーム内で濃度の違いが大きい因子を探索した結果、カルシウムが見出された。血漿中のイオン化カルシウム濃度は1.1-1.3 mM程度であり、エンドソーム内のイオン化カルシウム濃度は3 μM程度であり、血漿中とエンドソーム内で因子(カルシウム)の濃度に約400倍の違いがあり、その差は水素イオン濃度差(25倍)よりも大きいことが見出された。すなわち、高カルシウム濃度条件下(1.1-1.3 mM)において抗原に結合し、低カルシウム濃度条件下(3 μM)において抗原から解離するようなイオン化カルシウム濃度依存的結合抗体を用いることで、図1および図2に示した作用をより容易に達成できる、あるいは、その作用を増強することができると考えられた。

40

【0268】

また、WO 2009/125825において、ヒスチジンを導入することにより、pH7.4とpH6.0で性質が変化するpH依存的結合抗体を作製している。ヒスチジンは血漿中の中性条件下では中性電荷であるが、エンドソーム内の酸性条件下では正電荷を有する。このヒスチジンの電荷の変化を利用して、抗体と抗原の相互作用にpH依存性を付与することが可能である。一

50

方で、図3に示すように、ヒスチジンをを用いる場合、血漿中で抗原に結合し、エンドソーム内で抗原から解離するためには、抗体のヒスチジン残基は、抗原の正電荷のアミノ酸あるいは水素結合のドナーとなりうるアミノ酸と相互作用している必要があるため、目的的作用を発揮するためのpH依存的結合抗体が結合する抗原側のエピトープは正電荷のアミノ酸あるいは水素結合のドナーとなりうるアミノ酸を有する必要がある。

#### 【0269】

一方、図4に示すように、カルシウム依存的結合抗体は、カルシウムイオンを介して抗原に結合すると考えられるため、抗原側のエピトープはカルシウムイオンをキレート可能な負電荷のアミノ酸あるいは水素結合アクセプターとなりうるアミノ酸であるため、ヒスチジンを導入して作製されたpH依存的結合体ではターゲットすることができないエピトープをターゲットすることが可能である。さらに、図5に示すように、カルシウム依存性とpH依存性を併せ持つ抗体を用いることで、幅広い性質を有するエピトープをターゲットすることが可能となると考えられる。

10

#### 【0270】

〔実施例2〕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ーからのCa依存的結合抗体の取得

##### (2-1) naiveヒト抗体ファージディスプレイライブラリーの作製

ヒトPBMCから作成したpolyA RNAや、市販ヒトpolyA RNAなどをtemplateとして、(Methods Mol Biol. 2002;178:87-100.)に習い、ヒト抗体配列からなるFabドメインを提示する複数のヒト抗体ファージディスプレイライブラリーを構築した。

20

#### 【0271】

##### (2-2) ビーズパンニングによるライブラリーからのCa依存的結合抗体断片の取得

構築したヒト抗体ファージディスプレイライブラリーからの最初の選抜は、抗原への結合能をもつ抗体断片のみを濃縮、もしくはCa依存的結合能を指標に濃縮させた。Ca依存的結合能をもつ抗体断片を濃縮させる場合には、Caイオン存在下で抗原と結合させた後、EDTAによりCaイオンをキレートすることによりファージの溶出を行った。抗原として、ビオチン標識したヒトIL-6レセプターを用いた。

#### 【0272】

上記のように構築したファージディスプレイ用phagemidを保持した大腸菌からファージ産生を行い、得られた培養液を2.5 M NaCl/10%PEGにより沈殿させた後TBSにて希釈しファージライブラリー液とした。ファージライブラリー液にBSA, CaCl<sub>2</sub>を添加し、終濃度4% BSA, イオン化カルシウム濃度1.2 mMとなるよう調製した。パンニングは、一般的な方法である磁気ビーズに固定化した抗原を用いたパンニング方法を参考とした(J Immunol Methods. 2008 Mar 20;332(1-2):2-9.、J Immunol Methods. 2001 Jan 1;247(1-2):191-203.、Biotechnol Prog. 2002 Mar-Apr;18(2):212-20.、Mol Cell Proteomics. 2003 Feb;2(2):61-9.)。磁気ビーズにはNeutrAvidin coated beads(Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated)もしくはStreptavidin coated beads(Dynabeads M-280 Streptavidin)を用いた。

30

#### 【0273】

具体的には、調製したファージライブラリー液に250 pmolのビオチン標識抗原を加え、室温で60分間抗原と接触させた。BSAでブロッキングした磁気ビーズを加え、室温で15分間結合させた。ビーズを1 mLの1.2 mM CaCl<sub>2</sub>/TBS(1.2 mM CaCl<sub>2</sub>を含むTBS)にて1回洗浄した。その後、結合能を持つ抗体断片を濃縮する場合には、一般的な方法で溶出を行い、Ca依存的結合能を持つ抗体断片を濃縮する場合には、2 mM EDTA/TBS(2%EDTAを含むTBS)にビーズを懸濁し、ファージを回収した。回収したファージ溶液に、対数増殖期(OD600 0.4-0.5)となった大腸菌株TG1 10 mLを添加し、37 °C、1 hr、緩やかに攪拌培養を行うことにより感染させた。感染させた大腸菌を、225 mm x 225 mmのプレートへプレーティングした。再度この大腸菌から培養を開始し、ファージの培養を行った。

40

#### 【0274】

2回目以降のパンニングでは、Ca依存的結合能を指標に濃縮を行った。具体的には、調

50

製したファージライブラリー液に40 pmolのビオチン標識抗原を加え、室温で60分間抗原と接触させた。BSAでブロッキングした磁気ビーズを加え、室温で15分間結合させた。ビーズを1 mLの1.2 mM CaCl<sub>2</sub>/TBST(1.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1% Tween-20を含むTBS)と1.2 mM CaCl<sub>2</sub>/TBSにて1回ずつ洗浄した。その後0.1 mLの2 mM EDTA/TBS(2%EDTAを含むTBS)を加えビーズを室温で懸濁し、即座にMagnet Standを用いビーズを分離し、ファージ溶液を回収した。回収したファージ溶液を、対数増殖期(OD600 0.4-0.5)となった大腸菌株TG1 10 mLに添加、37 °C、1 hr, 緩やかに攪拌培養を行うことにより感染させた。感染させた大腸菌を225 mm x 225 mmのプレートへプレATINGした。再度この大腸菌から培養を開始し、上記と同様にファージの培養を行い、パンニングを2回繰り返した。

【0275】

### (2-3) ファージELISAによる評価

上記の方法により得られた大腸菌シングルコロニーから、(Methods Mol Biol. 2002;178:133-145.) に習い、ファージ含有培養上清を回収した。

ファージ含有培養上清に終濃度4%BSA, カルシウムイオン濃度1.2 mMとなるようBSA、CaCl<sub>2</sub>を加え、ELISAに供した。StreptaWell 96マイクロタイタープレート(Roche)をビオチン標識抗原を含むPBS 100 μLにて一晚コートした。PBST(0.1%Tween20を含むPBS)にて洗浄し、抗原を除いた後、4% BSA-TBS 250 μLにて1時間以上ブロッキングした。4% BSA-TBSを除き、ここに調製した培養上清を加え37 °Cで1時間静置しファージ提示抗体を結合させた。1.2 mM CaCl<sub>2</sub>/TBST (1.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1% Tween20を含むTBS)にて洗浄後、1.2 mM CaCl<sub>2</sub>/TBSもしくは1 mM EDTA/TBSを加え37 °Cで30分間静置しインキュベートした。1.2 mM CaCl<sub>2</sub>/TBSTにて洗浄後、4% BSA, イオン化カルシウム濃度1.2 mMとしたTBSにて希釈したHRP結合抗M13抗体(Amersham Pharmacia Biotech)を1時間インキュベートさせた。1.2 mM CaCl<sub>2</sub>/TBSTにて洗浄後、TMB single solution(ZYMED)で検出し、硫酸の添加により反応を停止した後、450 nmの吸光度を測定した。Ca依存結合能があると判断した抗体断片に対し、特異的なプライマーを用いて塩基配列解析を行った。

【0276】

### (2-4) 抗体の発現と精製

ファージELISAにより、Ca依存結合能があると判断されたクローンについて、動物細胞発現用プラスミドへの導入を行った。抗体の発現は以下の方法を用いて行った。ヒト胎児腎細胞由来FreeStyle 293-F株(Invitrogen)をFreeStyle 293 Expression Medium培地(Invitrogen)へ懸濁し、1.33 × 10<sup>6</sup>個/mLの細胞密度で6well plateの各ウェルへ3 mLずつ蒔きこみ、リポフェクション法により調製したプラスミドを細胞へ導入した。CO<sub>2</sub>インキュベーター(37度、8%CO<sub>2</sub>, 90 rpm)で4日間培養を行い、得られた培養上清から、rProtein A Sepharose™ Fast Flow(Amersham Biosciences)を用いて当業者公知の方法で抗体を精製した。精製抗体濃度は、分光光度計を用いて280 nmでの吸光度を測定した。得られた値からPACE法により算出された吸光係数を用いて抗体濃度を算出した(Protein Science 1995; 4: 2411-2423)。

【0277】

〔実施例3〕取得された抗体のヒトIL-6レセプターに対するCa依存結合能の評価

実施例2で取得された抗体6RL#9-IgG1(重鎖配列番号: 1、軽鎖配列番号: 2)、6RK#12-IgG1(重鎖配列番号: 66、軽鎖配列番号: 67)及び、FH4-IgG1(重鎖配列番号: 3、軽鎖配列番号: 4)を、Biacore T100(GE Healthcare)を用いてpH7.4でヒトインターロイキン6レセプター(hIL6R)結合活性が評価された。ランニングバッファーとして3 μMもしくは2 mM CaCl<sub>2</sub>を含有する0.05% Surfactant P20, 10 mmol/l ACES 150 mmol/l NaCl(pH7.4もしくはpH6.0)を用いて測定を行った。

【0278】

Sensor chip CM4(GE Healthcare)上にアミノカップリング法で組換え型プロテインA(Thermo Scientific)を適当量固定化した後、抗体を結合させた。アナライトとして適切な濃度のhIL-6Rをインジェクトし、センサーチップ上の抗体と相互作用させた。その後、10 mmol/L Glycine-HCl(pH1.5)をインジェクトし、センサーチップを再生した。測定は37

10

20

30

40

50

で行った。測定した結果、得られたセンサーグラムを図6に示した。これらの結果から、6RL#9-IgG1、6RK#12-IgG1およびFH4-IgG1抗体はいずれも、Ca<sup>2+</sup>濃度が3 μMの条件下では、Ca<sup>2+</sup>濃度が2 mMの条件下の場合と比べて、hIL6Rに対する結合が弱いことが明らかに示された。

【0279】

これらの抗体の中から、Ca依存性を有する抗体として6RL#9-IgG1（重鎖配列番号：1、軽鎖配列番号：2）、及び、FH4-IgG1（重鎖配列番号：3、軽鎖配列番号：4）をさらに反応速度論解析を行った。Ca依存性を有さない抗体として、WO 2009/125825に記載されているH54/L28-IgG1（重鎖配列番号：5、軽鎖配列番号：6）を用いた。高カルシウムイオン濃度として、2 mMを使用し、低カルシウムイオン濃度の条件として3 μMを使用した。抗原はヒトIL-6レセプター（IL-6R）を用いた。Sensor chip CM4（GE Healthcare）上にアミンカップリング法でprotein A（Invitrogen）を適当量固定化し、そこへ目的の抗体をキャプチャーさせた。ランニングバッファーには10 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05%（w/v）Tween20、2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>、pH7.4もしくは10 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05%（w/v）Tween20、3 μmol/L CaCl<sub>2</sub>、pH7.4の2種類を用いた。測定は全て37 °Cで実施し、IL-6Rの希釈にもそれぞれのバッファーを使用した。

10

【0280】

H54L28-IgG1に関しては、IL-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20 μL/minで3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IL-6Rを相互作用させた。その後流速20 μL/minで10分間ランニングバッファーを流しIL-6Rの解離を観察した後、10 mmol/L Glycine-HCl、pH1.5を流速30 μL/minで30秒間インジェクトし、センサーチップを再生した。測定で得られたセンサーグラムから、カインेटクスパラメーターである結合速度定数  $k_a$  (1/Ms)、および解離速度定数  $k_d$  (1/s) を算出し、その値をもとに各抗体のヒトIL-6レセプターに対する解離定数  $K_D$  (M) を算出した。各パラメーターの算出にはBiacore T100 Evaluation Software（GE Healthcare）を用いた。

20

【0281】

FH4-IgG1、6RL#9-IgG1に関しては、IL-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5 μL/minで15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IL-6Rを相互作用させた。その後、10 mmol/L Glycine-HCl、pH1.5を流速30 μL/minで30秒間インジェクトし、センサーチップを再生した。測定で得られたセンサーグラムに対してsteady state affinity modelを使って解離定数  $K_D$  (M) を算出した。各パラメーターの算出にはBiacore T100 Evaluation Software（GE Healthcare）を用いた。

30

【0282】

この方法により求めた2 mM CaCl<sub>2</sub>存在下における各抗体とIL-6Rとの解離定数  $K_D$ を表7に示す。H54/L28-IgG1ではCa濃度の違いによるIL-6Rに対する結合の違いは観察されなかったが、FH4-IgG1、6RL#9-IgG1では低濃度のCa条件下では結合の著しい減弱が観察された（図7、8、9）。

【0283】

【表7】

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

40

【0284】

H54/L28-IgG1については2 mM Ca濃度存在下と同様の方法で、Ca濃度が3 μMの条件下での  $K_D$  を算出することができる。FH4-IgG1、6RL#9-IgG1についてはCa濃度が3 μMの場合は、ほぼIL-6Rに対する結合が観察されなかったため、上記の方法による  $K_D$  の算出は困難であるが、下記の式1を用いることで  $K_D$  を予測することが可能である（Biacore T100 Software Handbook, BR-1006-48, AE 01/2007）。

【0285】

【式1】

50

$$R_{eq} = C \cdot R_{max} / (K_D + C) + RI$$

【 0 2 8 6 】

上記式 1 中の各項目の意味を示す；

$R_{eq}$  (RU): 定常状態結合レベル (Steady state binding levels)

$R_{max}$  (RU): アナライトの表面結合能 (Analyte binding capacity of the surface)

RI (RU): 試料中の容積屈折率寄与 (Bulk refractive index contribution in the sample)

C (M): アナライト濃度 (Analyte concentration)

$K_D$  (M): 平衡解離定数 (Equilibrium dissociation constant)

【 0 2 8 7 】

この式 1 を用いて、Ca濃度が3  $\mu\text{mol/L}$  の場合の予測される各抗体とIL-6Rとの解離定数  $K_D$  を概算した結果を表 8 に示す。

【 0 2 8 8 】

【 表 8 】

	H54L28-IgG1	FH4-IgG1	6RL#9-IgG1
$R_{eq}$ (RU)		5	10
$R_{max}$ (RU)		39	72
RI (RU)		0	0
C (M)		5E-06	5E-06
$K_D$ (M)	2.2E-9	3.4E-05	3.1E-05

10

20

【 0 2 8 9 】

上記表 8 中、 $R_{eq}$ 、 $R_{max}$ 、RI、Cは測定結果を基に仮定された値である。

【 0 2 9 0 】

この結果から、FH4-IgG1、6RL#9-IgG1は、2 mM  $\text{CaCl}_2$  から3  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  にすることで、IL-6Rに対する $K_D$ がそれぞれ約60倍、約120倍上昇(60倍、120倍以上アフィニティーが低減)すると予測された。表 9 にH54/L28-IgG1、FH4-IgG1、6RL#9-IgG1の3種類の抗体の2 mM  $\text{CaCl}_2$  存在下および3  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  存在下における $K_D$ 値、および、 $K_D$ 値のCa依存性についてまとめた。

【 0 2 9 1 】

【 表 9 】

	H54/L28-IgG1	FH4-IgG1	6RL#9-IgG1
$K_D$ (M) (2mM $\text{CaCl}_2$ )	1.9E-9	5.9E-7	2.6E-7
$K_D$ (M) (3 $\mu\text{M}$ $\text{CaCl}_2$ )	2.2E-9	3.4E-5 以上	3.1E-5 以上
Ca 依存性	約 1 倍	約 60 倍以上	約 120 倍以上

30

【 0 2 9 2 】

〔実施例 4〕取得された抗体へのカルシウムイオン結合評価

次に、抗体へのカルシウムイオンの結合の評価を行うために、示差走査型熱量測定(DSC)による熱変性中間温度( $T_m$ 値)の評価を行った(MicroCal VP-Capillary DSC、MicroCal製)。熱変性中間温度( $T_m$ 値)は安定性の指標であり、カルシウムイオンが結合してタンパク質が安定化すると、熱変性中間温度( $T_m$ 値)はカルシウムイオンが結合していない場合に比べて高くなる(J Bio Chem. 2008 Sep 12 ; Vol.283 ; No. 37:pp 25140 - 25149)ことを利用して、抗体へのカルシウムイオンの結合の評価を行った。精製した抗体を20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH7.4、または20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 3  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ , pH7.4の溶液に対して透析(EasySEP, TOMY)を行った。タンパク質溶液を透析に用いた溶液で0.1 mg/mLに調製し、20 から115 まで240 /hrの昇温速度でDSC測定を行った。得られたDSCの変性曲線を元に各抗体のFabドメインの熱変性中間温度( $T_m$ 値)を算出し表 10 に示した。

40

【 0 2 9 3 】

50

【表 1 0】

可変領域配列	カルシウムイオン濃度		$\Delta T_m [^{\circ}C]$
	3 $\mu$ M	2mM	
H54/L28	92.87	92.87	0.00
FH4	74.71	78.97	4.26
6RL#9	77.77	78.98	1.21

## 【 0 2 9 4】

表 1 0 の結果からカルシウム依存的結合能を示すFH4および6RL#9はカルシウムイオンの濃度によりFabのTm値が変動し、カルシウム依存的結合能を示さないH54/L28はTm値が変動しないことが示された。FH4および6RL#9で示されたFabのTm値の変動は、これらの抗体にカルシウムイオンが結合し、Fab部分が安定化したことを示している。これにより、FH4および6RL#9はカルシウムイオンが結合し、一方でH54/L28はカルシウムイオンが結合していないことが示された。

## 【 0 2 9 5】

〔実施例 5〕 ノーマルマウスを用いたCa依存性結合抗体の抗原の血漿中滞留性への影響評価

( 5 - 1 ) ノーマルマウスを用いた *in vivo* 試験

ノーマルマウス (C57BL/6J mouse、Charles River Japan) にhsIL-6R (可溶型ヒトIL-6レセプター：参考例 1 にて作製) を単独投与もしくはhsIL-6Rおよび抗ヒトIL-6レセプター抗体を同時投与した後のhsIL-6Rおよび抗ヒトIL-6レセプター抗体の体内動態を評価した。hsIL-6R溶液 (5  $\mu$ g/mL)、もしくは、hsIL-6Rと抗ヒトIL-6レセプター抗体の混合溶液を尾静脈に10 mL/kgで単回投与した。抗ヒトIL-6レセプター抗体としては、上述のH54/L28-IgG1、6RL#9-IgG1、FH4-IgG1を使用した。

## 【 0 2 9 6】

混合溶液中のhsIL-6R濃度は全て5  $\mu$ g/mLであるが、抗ヒトIL-6レセプター抗体濃度は抗体毎に異なり、H54/L28-IgG1は0.1 mg/mL、6RL#9-IgG1およびFH4-IgG1は10 mg/mL、このとき、hsIL-6Rに対して抗ヒトIL-6レセプター抗体は十分量過剰に存在することから、hsIL-6Rは大部分が抗体に結合していると考えられる。投与後15分間、7時間、1日間、2日間、4日間、7日間、14日間、21日間、28日間で採血を行った。採取した血液は直ちに4、12,000 rpmで15分間遠心分離し、血漿を得た。分離した血漿は、測定を実施するまで-20以下に設定された冷凍庫に保存した。

## 【 0 2 9 7】

## ( 5 - 2 ) ELISA法によるノーマルマウス血漿中の抗ヒトIL-6レセプター抗体濃度測定

マウス血漿中の抗ヒトIL-6レセプター抗体濃度はELISA法にて測定した。まずAnti-Human IgG ( -chain specific) F(ab')<sub>2</sub> Fragment of Antibody (SIGMA) をNunc-Immuno Plate, MaxiSoup (Nalge nunc International) に分注し、4 で1晩静置しAnti-Human IgG固相化プレートを作成した。血漿中濃度として0.64、0.32、0.16、0.08、0.04、0.02、0.01  $\mu$ g/mLの検量線試料と100倍以上希釈したマウス血漿測定試料を調製し、Anti-Human IgG固相化プレートに分注して25 で1時間インキュベーションした。その後Biotinylated Anti-human IL-6 R Antibody (R&D) を25 で1時間反応させ、さらにStreptavidin-PolyHRP 80 (Stereospecific Detection Technologies) を25 で0.5時間反応させ、TMB One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories) を基質として用い発色反応を行い、1N-Sulfuric acid (Showa Chemical) で反応停止後、マイクロプレートリーダーにて450 nmの吸光度を測定した。マウス血漿中濃度は検量線の吸光度から解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて算出した。この方法で測定した静脈内投与後のノーマルマウスにおけるH54/L28-IgG1、6RL#9-IgG1、FH4-IgG1の血漿中抗体濃度推移を図 1 0 に示した。

## 【 0 2 9 8】

### ( 5 - 3 ) 電気化学発光法による血漿中hsIL-6R濃度測定

マウスの血漿中hsIL-6R濃度は電気化学発光法にて測定した。2000、1000、500、250、125、62.5、31.25 pg/mLに調整したhsIL-6R検量線試料および50倍以上希釈したマウス血漿測定試料を調製し、SULFO-TAG NHS Ester (Meso Scale Discovery) でルテニウム化したMonoclonal Anti-human IL-6R Antibody (R&D) およびBiotinylated Anti-human IL-6 R Antibody (R&D) およびトシリズマブ (重鎖配列番号: 13、軽鎖配列番号: 14) 溶液を混合し4 で1晩反応させた。その際のAssay bufferには10 mM EDTAが含まれており、サンプル中のFree Ca濃度を低下させ、サンプル中のほぼ全てのhsIL-6Rが6RL#9-IgG1もしくはFH4-IgG1から解離し、添加したトシリズマブと結合した状態とすることを目的とした。その後、MA400 PR Streptavidin Plate (Meso Scale Discovery) に分注した。さらに25 で1時間反応させ洗浄後、Read Buffer T(x4) (Meso Scale Discovery) を分注し、ただちにSECTOR PR 400 reader (Meso Scale Discovery) で測定を行った。hsIL-6R濃度は検量線のレスポンスから解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて算出した。この方法で測定した静脈内投与後のノーマルマウスにおける血漿中hsIL-6R濃度推移を図11に示した。

10

#### 【 0 2 9 9 】

結果、hsIL-6R単独は非常に早い消失を示したのに対して、hsIL-6RとCa依存的な結合が無い通常の抗体であるH54/L28-IgG1を同時に投与した場合は、hsIL-6Rの消失を大幅に遅くした。それに対して、hsIL-6Rと100倍以上のCa依存的な結合を有する6RL#9-IgG1あるいはFH4-IgG1を同時に投与した場合は、hsIL-6Rの消失を大幅に加速した。H54/L28-IgG1を同時に投与した場合と比較して、6RL#9-IgG1およびFH4-IgG1を同時に投与した場合は、Day1における血漿中のhsIL-6R濃度をそれぞれ3.9倍および2倍低減することが出来た。これよりカルシウム依存的結合抗体が血漿中からの抗原の消失を加速可能であることが確認された。

20

#### 【 0 3 0 0 】

〔実施例6〕Ca依存的抗原結合抗体の抗原消失加速効果の向上検討 (抗体作製)

### ( 6 - 1 ) IgG抗体のFcRnへの結合に関して

IgG抗体はFcRnに結合することで長い血漿中滞留性を有する。IgGとFcRnの結合は酸性条件下 (pH6.0) においてのみ認められ、中性条件下 (pH7.4) においてはほとんど結合は認められない。IgG抗体は非特異的に細胞に取り込まれるが、エンドソーム内の酸性条件下においてエンドソーム内のFcRnに結合することで細胞表面上に戻り、血漿中の中性条件下においてFcRnから解離する。IgGのFc領域に変異を導入し、酸性条件下におけるFcRnへの結合を失わせると、エンドソーム内から血漿中にリサイクルされなくなるため、抗体の血漿中滞留性は著しく損なわれる。

30

#### 【 0 3 0 1 】

IgG抗体の血漿中滞留性を改善させる方法として、酸性条件下におけるFcRnへの結合を向上させる方法が報告されている。IgG抗体のFc領域にアミノ酸置換を導入し、酸性条件下のFcRnへの結合を向上させることで、エンドソーム内から血漿中にリサイクル効率が上昇し、その結果、血漿中滞留性が改善する。アミノ酸置換を導入する際に重要なのは、中性条件下におけるFcRnへの結合を高めないことである。中性条件下においてFcRnに結合してしまうと、エンドソーム内の酸性条件下においてFcRnに結合することで細胞表面上に戻っても、中性条件下の血漿中においてIgG抗体がFcRnから解離しないとIgG抗体が血漿中にリサイクルされないため、逆に血漿中滞留性は損なわれることになる。

40

#### 【 0 3 0 2 】

例えば、J Immunol. 2002;169(9):5171-80.に記載されているように、IgG1に対してアミノ酸置換を導入することによって中性条件下 (pH7.4) においてマウスFcRnに対する結合が認められるようになった抗体をマウスに投与した場合、抗体の血漿中滞留性が悪化することが報告されている。また、J Immunol. 2009;182(12):7663-71.やJ Biol Chem. 2007 Jan 19;282(3):1709-17.やJ Immunol. 2002 Nov 1;169(9):5171-80.に記載されているように、IgG1に対してアミノ酸置換を導入することによって酸性条件下 (pH6.0) にお

50

るヒトFcRnの結合が向上するが、同時に中性条件下 (pH7.4) におけるヒトFcRnに対する結合が認められるようになった抗体をカニクイザルに投与した場合、抗体の血漿中滞留性は改善することは無く、血漿中滞留性に変化が認められなかったことが報告されている。そのため、抗体の機能を向上させる抗体工学技術においては、中性条件下 (pH7.4) におけるヒトFcRnに対する結合を増加させることなく酸性条件下におけるヒトFcRnへの結合を増加させることで抗体の血漿中滞留性を改善させることにのみ注力されており、これまでにIgG抗体のFc領域にアミノ酸置換を導入し、中性条件下 (pH7.4) におけるヒトFcRnに対する結合を増加させることの利点は報告されていない。

#### 【0303】

Ca依存的に抗原に結合する抗体は、可溶性の抗原の消失を加速させ、ひとつの抗体分子が複数回繰り返し可溶性の抗原に結合する効果を有することから、極めて有用である。この抗原消失加速効果をさらに向上させる方法として、FcRnへの中性条件下 (pH7.4) における結合を増強する方法を検証した。

#### 【0304】

#### (6-2) 中性条件下におけるFcRnへの結合を有するCa依存的ヒトIL-6レセプター結合抗体の調製

カルシウム依存的抗原結合能を有するFH4-IgG1と6RL#9-IgG1、および、コントロールとしてカルシウム依存的抗原結合能を有さないH54/L28-IgG1に対して、中性条件下 (pH7.4) におけるFcRnに対する結合を増加させるアミノ酸変異を導入した。アミノ酸変異の導入はPCRを用いた当業者公知の方法を用いて行った。具体的にはIgG1の重鎖定常領域に対して、IgG1の重鎖定常領域に対して、EUナンバリングにおける434番目をAsnからTrpに置換したFH4-N434W (重鎖配列番号: 7、軽鎖配列番号: 8) と6RL#9-N434W (重鎖配列番号: 9、軽鎖配列番号: 10) とH54/L28-N434W (重鎖配列番号: 11、軽鎖配列番号: 12) を作製した。アミノ酸置換の導入方法としては、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を用いて、添付説明書記載の方法で変異体を作製し、得られたプラスミド断片を動物細胞発現ベクターに挿入し、目的の発現ベクターを作成した。抗体の発現、精製、濃度測定は実施例2に記載の方法で実施した。

#### 【0305】

〔実施例7〕 ノーマルマウスを用いたCa依存性結合抗体の消失加速効果の評価

#### (7-1) ノーマルマウスを用いたin vivo試験

ノーマルマウス (C57BL/6J mouse, Charles River Japan) にhsIL-6R (可溶性ヒトIL-6レセプター: 参考例1にて作製) を単独投与もしくはhsIL-6Rおよび抗ヒトIL-6レセプター抗体を同時投与した後のhsIL-6Rおよび抗ヒトIL-6レセプター抗体の体内動態を評価した。hsIL-6R溶液 (5 µg/mL)、もしくは、hsIL-6Rと抗ヒトIL-6レセプター抗体の混合溶液を尾静脈に10 mL/kgで単回投与した。抗ヒトIL-6レセプター抗体としては、上述のH54/L28-N434W、6RL#9-N434W、FH4-N434Wを使用した。

#### 【0306】

混合溶液中のhsIL-6R濃度は全て5 µg/mLであるが、抗ヒトIL-6レセプター抗体濃度は抗体毎に異なり、H54/L28-N434Wは0.042 mg/mL、6RL#9-N434Wは0.55 mg/mL、FH4-N434Wは1 mg/mLとした。このとき、hsIL-6Rに対して抗ヒトIL-6レセプター抗体は十分量過剰に存在することから、hsIL-6Rは大部分が抗体に結合していると考えられる。投与後15分間、7時間、1日間、2日間、4日間、7日間、14日間、21日間、28日間で採血を行った。採取した血液は直ちに4, 12,000 rpmで15分間遠心分離し、血漿を得た。分離した血漿は、測定を実施するまで-20 以下に設定された冷凍庫に保存した。

#### 【0307】

#### (7-2) ELISA法によるノーマルマウス血漿中の抗ヒトIL-6レセプター抗体濃度測定

マウス血漿中の抗ヒトIL-6レセプター抗体濃度は実施例6と同様のELISA法にて測定した。この方法で測定した静脈内投与後のノーマルマウスにおけるH54/L28-N434W、6RL#9-N434W、FH4-N434Wの血漿中抗体濃度推移を図12に示した。

#### 【0308】

10

20

30

40

50

( 7 - 3 ) 電気化学発光法による血漿中hsIL-6R濃度測定

マウスの血漿中hsIL-6R濃度は電気化学発光法にて測定した。2000、1000、500、250、125、62.5、31.25 pg/mLに調整したhsIL-6R検量線試料および50倍以上希釈したマウス血漿測定試料を調製し、SULFO-TAG NHS Ester (Meso Scale Discovery) でルテニウム化したMonoclonal Anti-human IL-6R Antibody (R&D) およびBiotinylated Anti-human IL-6 R Antibody (R&D) を混合し4 で1晩反応させた。その際のAssay bufferには10 mM EDTAが含まれており、サンプル中のFree Ca濃度を低下させ、サンプル中のほぼ全てのhsIL-6Rが6RL#9-N434WもしくはFH4-N434Wから解離し、free体として存在する状態とすることを目的とした。その後、MA400 PR Streptavidin Plate (Meso Scale Discovery) に分注した。さらに25 で1時間反応させ洗浄後、Read Buffer T(x4) (Meso Scale Discovery) を分注し、ただちにSECTOR PR 400 reader (Meso Scale Discovery) で測定を行った。hsIL-6R濃度は検量線のレスポンスから解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて算出した。この方法で測定した静脈内投与後のノーマルマウスにおける血漿中hsIL-6R濃度推移を図13に示した。

10

## 【 0 3 0 9 】

結果、pH7.4におけるFcRnへの結合を増強したが、hsIL-6RとCa依存的な結合が無い通常の抗体であるH54/L28-N434Wを同時に投与した場合は、hsIL-6R単独で投与した場合と比較して、hsIL-6Rの消失を大幅に遅くした。それに対して、hsIL-6Rと100倍以上のCa依存的な結合を有し、且つ、pH7.4におけるFcRnへの結合を増強した抗体である6RL#9-N434WあるいはFH4-N434Wを同時に投与した場合は、hsIL-6R単独で投与した場合よりもhsIL-6Rの消失を加速した。hsIL-6Rを単独で投与した場合と比較して、6RL#9-N434WおよびFH4-N434Wを同時に投与した場合は、Day1における血漿中のhsIL-6R濃度をそれぞれ3倍および8倍低減することが出来た。これより、カルシウム依存的結合抗体に対して、pH7.4におけるFcRnへの結合能を増強することにより、血漿中からの抗原の消失をさらに加速可能であることが確認された。

20

## 【 0 3 1 0 】

hsIL-6RとCa依存的な結合が無い通常の抗体であるH54/L28-IgG1と比較して、hsIL-6Rと100倍以上のCa依存的な結合を有する抗体である6RL#9-IgG1あるいはFH4-IgG1は、hsIL-6Rの消失を増大させる効果が確認され、hsIL-6Rと100倍以上のCa依存的な結合を有し、且つ、pH7.4におけるFcRnへの結合を増強した抗体である6RL#9-N434WあるいはFH4-N434Wは、hsIL-6Rの消失をhsIL-6R単独よりも加速できることが確認された。これらのデータは、図1に示したようにpH依存的に抗原に結合する抗体と同様に、Ca依存的に抗原に結合する抗体がエンドソーム内で抗原を解離することを示唆している。実施例1に記したように、pH依存的に抗原に結合する抗体では標的とできるエピトープが限られてしまうが(図3)、本検討で見出されたCa依存的に抗原に結合する抗体を用いることで(図4、5)、エンドソーム依存的に抗原を解離することができる抗体が標的とできるエピトープをより幅広くすることができると考えられた。

30

## 【 0 3 1 1 】

〔実施例8〕6RL#9抗体のカルシウムイオン結合部位のX線結晶構造解析による同定

## ( 8 - 1 ) X線結晶構造解析

実施例4に示されたように、6RL#9抗体はカルシウムイオンと結合することが熱変性温度Tm値の測定から示唆された。しかし、6RL#9抗体のどの部位がカルシウムイオンと結合しているか予想できなかったため、X線結晶構造解析の手法を用いることによって、カルシウムイオンが相互作用する6RL#9抗体の配列中の残基が特定された。

40

## 【 0 3 1 2 】

( 8 - 2 ) 6RL#9抗体の発現および精製

X線結晶構造解析に用いるために発現させた6RL#9抗体が精製された。具体的には、6RL#9抗体の重鎖(配列番号:1)と軽鎖(配列番号:2)をそれぞれ発現させることが出来るように調製された動物発現用プラスミドが動物細胞に一過的に導入された。最終細胞密度 $1 \times 10^6$ 細胞/mLとなるようにFreeStyle 293 Expression Medium培地 (Invitrogen) へ

50

懸濁された800 mLのヒト胎児腎細胞由来FreeStyle 293-F株 (Invitrogen) に、リポフェクション法により調製されたプラスミドが導入された。プラスミドが導入された細胞はCO<sub>2</sub> インキュベーター (37 °C、8%CO<sub>2</sub>、90 rpm) 中で5日間培養された。rProtein A Sepharos e™ Fast Flow (Amersham Biosciences) を用いた当業者公知の方法にしたがって、上記のように得られた培養上清から抗体が精製された。分光光度計を用いて精製された抗体溶液の280 nmでの吸光度が測定された。PACE法により算出された吸光係数を用いて測定値から抗体濃度が算出された (Protein Science (1995) 4, 2411-2423)。

#### 【 0 3 1 3 】

##### ( 8 - 3 ) 6RL#9抗体からのFabフラグメントの精製

分子量分画サイズ10000MWCOの限外ろ過膜 を用いて6RL#9抗体が21 mg/mLまで濃縮された。L-Cystein 4 mM、EDTA 5 mM、20 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) を用いて5 mg/mLによって希釈された2.5 mLの当該抗体の試料が調製された。0.125 mgのPapain (Roche Applied Science) を加えて攪拌された当該試料が35 °Cにて2時間静置された。静置後、プロテアーゼインヒビターカクテルミニ、EDTAフリー (Roche Applied Science) 1錠を溶かした10 mLの25 mM MES 緩衝液 (pH6) をさらに当該試料に加え、氷中に静置することによって、Papainによるプロテアーゼ反応が停止された。次に、当該試料が、下流に1 mLサイズのProteinA担体カラムHiTrap MabSelect Sure (GE Healthcare) がタンデムにつながれた25 mM MES 緩衝液pH6で平衡化された1 mLサイズの陽イオン交換カラムHiTrap SP HP (GE Healthcare) に添加された。同緩衝液中NaCl濃度を300 mMまで直線的に上げて溶出をおこなうことで6RL#9抗体のFabフラグメントの精製画分が得られた。次に、得られた精製画分が5000MWCOの限外ろ過膜 により0.8 mL程度まで濃縮された。50 mM NaCl を含む100 mM HEPES緩衝液 (pH 8) で平衡化されたゲルろ過カラムSuperdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) に濃縮液が添加された。結晶化用の精製6RL#9抗体のFabフラグメントが同緩衝液を用いてカラムから溶出された。なお、上記のすべてのカラム操作は6から7.5 °Cの低温下にて実施された。

#### 【 0 3 1 4 】

##### ( 8 - 4 ) 6RL#9抗体の FabフラグメントのCa存在下での結晶化

予め一般的な条件設定で6RL#9 Fabフラグメントの種結晶が得られた。つぎに5 mM となるようにCaCl<sub>2</sub> が加えられた精製6RL#9抗体のFabフラグメントが5000MWCOの限外ろ過膜を用いて12 mg/mLに濃縮された。つぎに、ハンギングドロップ蒸気拡散法によって、前記のように濃縮された試料の結晶化が実施された。リザーバー溶液として20-29%のPEG4000を含む100 mM HEPES緩衝液 (pH7.5) が用いられた。カバーガラス上で0.8 µlのリザーバー溶液および0.8 µlの前記濃縮試料の混合液に対して、29% PEG4000および5 mM CaCl<sub>2</sub> を含む100 mM HEPES緩衝液 (pH7.5) 中で破碎された前記種結晶が100-10000倍に希釈された希釈系列の溶液0.2 µlを加えることによって結晶化ドロップが調製された。当該結晶化ドロップを20 °Cに2日から3日静置することによって得られた薄い板状の結晶のX線回折データが測定された。

#### 【 0 3 1 5 】

##### ( 8 - 5 ) 6RL#9抗体の FabフラグメントのCa非存在下での結晶化

精製6RL#9抗体のFabフラグメントが5000MWCOの限外ろ過膜 を用いて15 mg/mlに濃縮された。つぎに、ハンギングドロップ蒸気拡散法によって、前記のように濃縮された試料の結晶化が実施された。リザーバー溶液として18-25%のPEG4000を含む100 mM HEPES緩衝液 (pH7.5) が用いられた。カバーガラス上で0.8 µlのリザーバー溶液および0.8 µlの前記濃縮試料の混合液に対して、25% PEG4000を含む100 mM HEPES緩衝液 (pH7.5) 中で破碎されたCa存在下で得られた6RL#9抗体のFabフラグメントの結晶が100-10000倍に希釈された希釈系列の溶液0.2 µlを加えることによって結晶化ドロップが調製された。当該結晶化ドロップを20 °Cに2日から3日静置することによって得られた薄い板状の結晶のX線回折データが測定された。

#### 【 0 3 1 6 】

##### ( 8 - 6 ) 6RL#9抗体の FabフラグメントのCa存在下での結晶のX線回折データの測定

35% PEG4000および5 mM  $\text{CaCl}_2$ を含む100mM HEPES緩衝液 (pH7.5) の溶液に浸された6RL#9抗体のFabフラグメントのCa存在下で得られた単結晶一つを、微小なナイロンループ付きのピンを用いて外液ごとすくいとることによって、当該単結晶が液体窒素中で凍結された。高エネルギー加速器研究機構の放射光施設フォトンファクトリーのビームラインBL-17Aを用いて、前記の凍結結晶のX線回折データが測定された。なお、測定中は常に-178の窒素気流中に凍結結晶を置くことで凍結状態が維持された。ビームラインに備え付けられたCCDディテクタQuantum315r (ADSC) を用い、結晶を1°ずつ回転させながらトータル180枚の回折画像が収集された。格子定数の決定、回折斑点の指数付け、および回折データの処理がプログラムXia2 (CCP4 Software Suite)、XDS Package (Walfgang Kabsch) ならびにScala (CCP4 Software Suite) によって行われた。最終的に分解能2.2 までの回折強度データが得られた。本結晶は、空間群P212121に属し、格子定数  $a = 45.47$  、  $b = 79.86$  、  $c = 116.25$  、  $\alpha = 90^\circ$  、  $\beta = 90^\circ$  、  $\gamma = 90^\circ$  であった。

10

【 0 3 1 7 】

( 8 - 7 ) 6RL#9抗体の FabフラグメントのCa非存在下での結晶のX線回折データの測定

35% PEG4000を含む100 mM HEPES緩衝液 (pH7.5) の溶液に浸された6RL#9抗体のFabフラグメントのCa非存在下で得られた単結晶一つを、微小なナイロンループ付きのピンを用いて外液ごとすくいとることによって、当該単結晶が液体窒素中で凍結された。高エネルギー加速器研究機構の放射光施設フォトンファクトリーのビームラインBL-5Aを用いて、前記の凍結結晶のX線回折データが測定された。なお、測定中は常に-178 の窒素気流中に凍結結晶を置くことで凍結状態が維持された。ビームラインに備え付けられたCCDディテクタQuantum210r (ADSC) を用い、結晶を1°ずつ回転させながらトータル180枚の回折画像が収集された。格子定数の決定、回折斑点の指数付け、および回折データの処理がプログラムXia2 (CCP4 Software Suite)、XDS Package (Walfgang Kabsch) ならびにScala (CCP4 Software Suite) によって行われた。最終的に分解能2.3 までの回折強度データが得られた。本結晶は、空間群P212121に属し、格子定数  $a = 45.40$  、  $b = 79.63$  、  $c = 116.07$  、  $\alpha = 90^\circ$  、  $\beta = 90^\circ$  、  $\gamma = 90^\circ$  であり、Ca存在下の結晶と同型であった。

20

【 0 3 1 8 】

( 8 - 8 ) 6RL#9抗体のFabフラグメントのCa存在下での結晶の構造解析

プログラムPhaser (CCP4 Software Suite) を用いた分子置換法によって、6RL#9抗体のFabフラグメントのCa存在下での結晶の構造が決定された。得られた結晶格子の大きさと6RL#9抗体のFabフラグメントの分子量から、非対称単位中の分子数が一個であると予想された。一次配列上の相同性をもとにPDB code: 1ZA6の構造座標から取り出されたA鎖112-220番およびB鎖116-218番のアミノ酸残基部分が、CLおよびCH1領域の探索用モデル分子とされた。次にPDB code: 1ZA6の構造座標から取り出されたB鎖1-115番のアミノ酸残基部分が、VH領域の探索用モデル分子とされた。最後にPDB code 2A9Mの構造座標から取り出された軽鎖3-147番のアミノ酸残基が、VL領域の探索用モデル分子とされた。この順番にしたがい各探索用モデル分子の結晶格子内での向きと位置を回転関数および並進関数から決定することによって、6RL#9抗体のFabフラグメントの初期構造モデルが得られた。当該初期構造モデルに対してVH、VL、CH1、CLの各ドメインを動かす剛体精密化をおこなうことにより、25-3.0 の反射データに対する結晶学的信頼度因子R値は46.9%、Free R値は48.6%となった。さらにプログラムRefmac5 (CCP4 Software Suite) を用いた構造精密化と、実験的に決定された構造因子 $F_o$ とモデルから計算された構造因子 $F_c$ および位相を用い計算された $2F_o - F_c$ 、 $F_o - F_c$ を係数とする電子密度マップを参照しながらモデル修正を繰り返しプログラムCoot (Paul Emsley) 上でおこなうことによってモデルの精密化がおこなわれた。最後に $2F_o - F_c$ 、 $F_o - F_c$ を係数とする電子密度マップをもとにCaイオンおよび水分子をモデルに組み込むことによって、プログラムRefmac5 (CCP4 Software Suite) を用いて精密化がおこなわれた。分解能25-2.2 の21020個の反射データを用いることによって、最終的に3440原子のモデルに対する結晶学的信頼度因子R値は20.0%、Free R値は27.9%となった。

30

40

【 0 3 1 9 】

50

( 8 - 9 ) 6RL#9抗体のFabフラグメントのCa非存在下での結晶のX線回折データの測定

6RL#9抗体のFabフラグメントのCa非存在下での結晶の構造は、同型であるCa存在下結晶の構造を使って決定された。6RL#9抗体のFabフラグメントのCa存在下での結晶の構造座標から水分子とCaイオン分子がのぞかれ、VH、VL、CH1、CLの各ドメインを動かす剛体精密化がおこなわれた。25-3.0 の反射データに対する結晶学的信頼度因子R値は30.3%、Free R値は31.7%となった。さらにプログラムRefmac5 (CCP4 Software Suite) を用いた構造精密化と、実験的に決定された構造因子Foとモデルから計算された構造因子Fcおよび位相を用い計算された2Fo-Fc、Fo-Fcを係数とする電子密度マップを参照しながらモデル修正を繰り返しプログラムCoot (Paul Emsley) 上でおこなうことによってモデルの精密化がおこなわれた。最後に2Fo-Fc、Fo-Fcを係数とする電子密度マップをもとに水分子をモデルに組み込むことによって、プログラムRefmac5 (CCP4 Software Suite) を用いて精密化がおこなわれた。分解能25-2.3 の18357個の反射データを用いることによって、最終的に3351原子のモデルに対する結晶学的信頼度因子R値は20.9%、Free R値は27.7%となった。

10

20

30

40

50

## 【 0 3 2 0 】

( 8 - 1 0 ) 6RL#9抗体のFabフラグメントのCa存在または非存在下での結晶のX線回折データの比較

6RL#9抗体のFabフラグメントのCa存在下での結晶およびCa非存在下での結晶の構造を比較すると、重鎖CDR3に大きな変化がみられた。X線結晶構造解析で決定された6RL#9抗体のFabフラグメントの重鎖CDR3の構造を図14に示した。具体的には、Ca存在下での6RL#9抗体のFabフラグメントの結晶では、重鎖CDR3ループ部分の中心部分にカルシウムイオンが存在していた。カルシウムイオンは、重鎖CDR3の95位、96位および100a位 (Kabatナンバリング) と相互作用していると考えられた。Ca存在下では、抗原との結合に重要である重鎖CDR3ループがカルシウムと結合することによって安定化し、抗原との結合に最適な構造となっていることが考えられた。抗体の重鎖CDR3にカルシウムが結合する例はこれまでに報告されておらず、抗体の重鎖CDR3にカルシウムが結合した構造は新規な構造である。重鎖CDR3は抗原との結合に最も重要であることが知られており、重鎖CDR3の構造維持にカルシウムイオンが必要となっている本実施例で見出されたモチーフは、抗原への結合にカルシウムイオンが重要な役割を果たしていると考えられる。すなわち、本モチーフを有する抗体はカルシウムイオン依存的に抗原に対する結合を有する可能性が極めて高いと考えられ、例えば本モチーフを有する合成ライブラリーを作製することができれば、そのようなライブラリーから効率的にカルシウム依存的結合抗体を取得することが可能であると考えられた。

## 【 0 3 2 1 】

〔実施例9〕ファージディスプレイ技術を用いたヒト抗体ライブラリーからのCa依存的にIL-6に結合する抗体の取得

( 9 - 1 ) ナイーブヒト抗体ファージディスプレイライブラリーの作製

ヒトPBMCから作成したポリA RNAや、市販されているヒトポリA RNAなどを鋳型として当業者に公知な方法にしたがい、互いに異なるヒト抗体配列のFabドメインを提示する複数のファージからなるヒト抗体ファージディスプレイライブラリーが構築された。

## 【 0 3 2 2 】

( 9 - 2 ) ピーズパンニングによるライブラリーからのCa依存的に抗原に結合する抗体断片の取得

構築されたナイーブヒト抗体ファージディスプレイライブラリーからの最初の選抜は、抗原 (IL-6) への結合能をもつ抗体断片のみの濃縮によって実施された。抗原としてビオチン標識されたIL-6が用いられた。

## 【 0 3 2 3 】

構築されたファージディスプレイ用ファージミドを保持した大腸菌からファージ産生が行われた。ファージ産生が行われた大腸菌の培養液に2.5 M NaCl/10%PEGを添加することによって沈殿させたファージの集団をTBSにて希釈することによってファージライブラリー

一液が得られた。次に、ファージライブラリー液に終濃度4%BSAおよび1.2mMカルシウムイオン濃度となるようにBSAおよびCaCl<sub>2</sub>が添加された。パンニング方法として、一般的な方法である磁気ビーズに固定化した抗原を用いたパンニング方法が参照された (J. Immunol. Methods. (2008) 332 (1-2), 2-9, J. Immunol. Methods. (2001) 247 (1-2), 191-203, Biotechnol. Prog. (2002) 18 (2) 212-20, Mol. Cell Proteomics (2003) 2 (2), 61-9)。磁気ビーズとして、NeutrAvidin coated beads (Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) もしくはStreptavidin coated beads (Dynabeads M-280 Streptavidin) が用いられた。

#### 【0324】

具体的には、調製されたファージライブラリー液に250 pmolのビオチン標識抗原を加えることによって、当該ファージライブラリー液を室温にて60分間抗原と接触させた。BSAでブロッキングされた磁気ビーズが加えられ、抗原とファージとの複合体を磁気ビーズと室温にて15分間結合させた。ビーズは1.2 mM CaCl<sub>2</sub>/TBST (1.2 mM CaCl<sub>2</sub>を含むTBST) にて3回洗浄された後、1 mLの1.2 mM CaCl<sub>2</sub>/TBS (1.2 mM CaCl<sub>2</sub>を含むTBS) にてさらに2回洗浄された。その後、0.5 mLの1 mg/mLのトリプシンが加えられたビーズは室温で15分懸濁された後、即座に磁気スタンドを用いてビーズが分離され、ファージ溶液が回収された。回収されたファージ溶液が、対数増殖期 (OD600が0.4-0.5) となった10 mLの大腸菌株TG1に添加された。37 °C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ー液が調製された。

#### 【0325】

2回目以降のパンニングでは、Ca依存的結合能を指標にファージの濃縮が行われた。具体的には、調製したファージライブラリー液に40 pmolのビオチン標識抗原を加えることによって、ファージライブラリーを室温で60分間抗原と接触させた。BSAでブロッキングされた磁気ビーズが加えられ、抗原とファージとの複合体を磁気ビーズと室温で15分間結合させた。ビーズは1 mLの1.2 mM CaCl<sub>2</sub>/TBSTと1.2 mM CaCl<sub>2</sub>/TBSにて洗浄された。その後0.1 mLの2 mM EDTA/TBSが加えられたビーズは室温で懸濁された後、即座に磁気スタンドを用いてビーズが分離され、ファージ溶液が回収された。回収されたファージ溶液に100 mg/mLのトリプシン5 μLを加えることによって、Fabを提示しないファージのpIIIタンパク質 (ヘルパーファージ由来のpIIIタンパク質) が切断され、Fabを提示しないファージの大腸菌に対する感染能を失わせた。トリプシン処理されたファージ溶液から回収されたファージが、対数増殖期 (OD600が0.4-0.7) となった10 mLの大腸菌株TG1に添加された。37 °C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ー液が回収された。Ca依存的結合能を指標とするパンニングが3回繰り返された。

#### 【0326】

##### (9-3) ファージELISAによる評価

上記の方法によって得られた大腸菌のシングルコロニーから、常法 (Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145) に習い、ファージ含有培養上清が回収された。終濃度4%BSAおよび1.2 mMカルシウムイオン濃度となるようにBSAおよびCaCl<sub>2</sub>が加えられたファージを含有する培養上清が以下の手順でELISAに供された。StreptaWell 96マイクロタイタープレート (Roche) がビオチン標識抗原を含む100 μLのPBSにて一晚コートされた。当該プレートの各ウェルをPBSTにて洗浄することによって抗原が除かれた後、当該ウェルが1時間以上250 μLの4%BSA-TBSにてブロッキングされた。4%BSA-TBSが除かれた各ウェルに調製された培養上清が加えられた当該プレートを37 °Cで1時間静置することによって、ファージを提示する抗体を各ウェルに存在する抗原に結合させた。1.2 mM CaCl<sub>2</sub>/TBSTにて洗浄された各ウェルに、1.2 mM CaCl<sub>2</sub>/TBSもしくは1 mM EDTA/TBSが加えられ、当該プレートは37 °Cで30分間静置しインキュベートされた。1.2 mM CaCl<sub>2</sub>/TBSTにて洗浄された後に、終濃

度4%のBSAおよび1.2 mMのイオン化カルシウム濃度としたTBSによって希釈されたHRP結合抗M13抗体 (Amersham Pharmacia Biotech) が各ウェルに添加されたプレートを一時間インキュベートさせた。1.2 mM  $\text{CaCl}_2$ /TBSTにて洗浄後、TMB single溶液 (ZYMED) が添加された各ウェル中の溶液の発色反応が、硫酸の添加により停止された後、450 nmの吸光度によって当該発色が測定された。

#### 【0327】

単離された96クローンを用いてファージELISAを行うことによって、IL-6に対するCa依存的な結合能を有する6KC4-1#85抗体、6LC4-1#15抗体および6LC4-2#16抗体が得られた。上記のファージELISAの結果、Ca依存的な抗原に対する結合能があると判断される抗体断片を鋳型として特異的なプライマーによって増幅された遺伝子の塩基配列解析が行われた。6KC4-1#85抗体の重鎖可変領域の配列を配列番号：25に、および軽鎖可変領域の配列を配列番号：26に記載した。6KC4-1#85抗体の重鎖可変領域 (配列番号：25) をコードするポリヌクレオチドが、PCR法によってIgG1由来配列をコードするポリヌクレオチド (配列番号：65) と連結されたDNA断片が、動物細胞発現用ベクターに組み込まれ、配列番号：27で表される重鎖を発現するベクターが構築された。6KC4-1#85抗体の軽鎖可変領域 (配列番号：26) をコードするポリヌクレオチドが、PCR法によって天然型Kappa鎖の定常領域 (配列番号：28) をコードするポリヌクレオチドと連結された配列番号：29で表された配列をコードするDNA断片が、動物細胞発現用ベクターに組み込まれた。同様の方法で、6LC4-1#15抗体 (重鎖配列番号68、軽鎖配列番号69) および6LC4-2#16抗体 (重鎖配列番号70、軽鎖配列番号71) が細胞発現用ベクターに組み込まれた。作製された改変体の配列は当業者公知の方法で確認された。

10

20

#### 【0328】

##### (9-4) 抗体の発現と精製

ファージELISAの結果、Ca依存的な抗原に対する結合能があると判断されたクローンが、動物細胞発現用プラスミドへ導入された。抗体の発現は以下の方法を用いて行われた。ヒト胎児腎細胞由来FreeStyle 293-F株 (Invitrogen) がFreeStyle 293 Expression Medium培地 (Invitrogen) に懸濁され、 $1.33 \times 10^6$ 細胞/mLの細胞密度で6ウェルプレートの各ウェルへ3 mLずつ蒔きこまれた。調製されたプラスミドは、リポフェクション法によって細胞へ導入された。 $\text{CO}_2$ インキュベーター (37度、8% $\text{CO}_2$ 、90 rpm) 中で4日間培養が行われた。rProtein A Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow (Amersham Biosciences) を用いて当業者公知の方法を用いて、上記で得られた培養上清から抗体が精製された。分光光度計を用いて精製された抗体溶液の280 nmでの吸光度が測定された。PACE法により算出された吸光係数を用いることによって、得られた測定値から抗体濃度が算出された (Protein Science (1995) 4, 2411-2423)。

30

#### 【0329】

##### (9-5) カルシウム依存的抗IL6抗体の結合評価

取得された抗体を、Biacore T100 (GE Healthcare) を用いてpH7.4でヒトインターロイキン6 (hIL6) 結合活性 (解離定数 $K_D$  (M)) に関して評価した。ランニングバッファーとして3  $\mu\text{M}$ もしくは1.2mM  $\text{CaCl}_2$ を含有する0.05% Tween20, 10 mmol/l ACES, 150 mmol/l NaCl (pH7.4) を用いて測定を行った。

40

#### 【0330】

Sensor chip CM5 (GE Healthcare) 上にアミノカップリング法で組換え型プロテインA/G (Thermo Scientific) を適量固定化した後、抗体を結合させた。アナライトとして適切な濃度のhIL6 (ヒトインターロイキン6、鎌倉テクノサイエンス) をインジェクトし、センサーチップ上の抗体と相互作用させた。その後、10 mmol/L Glycine-HCl (pH1.5) をインジェクトし、センサーチップを再生した。測定は37 で行った。測定の結果、得られたセンサーグラムを図15に示した。これらの結果から、6LC4-1#15-IgG1および6LC4-2#16-IgG1、6KC4-1#85-IgG1抗体は $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が3  $\mu\text{M}$ の条件下では、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が1.2mMの条件下の場合と比べて、hIL6に対する結合が弱いことが明らかに示された。上記の結果は、カルシウム依存的な抗原結合という性質が実施例3に示されたIL-6RだけでなくIL-6でも示され

50

たことから、他の抗原に対しても適応可能であることが示している。

【0331】

〔実施例10〕6KC4-1#85抗体のカルシウムイオン結合評価

(10-1)6KC4-1#85抗体のカルシウムイオン結合評価

ヒト抗体ライブラリーから取得されたカルシウム依存的抗原結合抗体6KC4-1#85抗体がカルシウムと結合するか評価された。イオン化カルシウム濃度が異なる条件で、測定されるT<sub>m</sub>値が変動するか否かが実施例4に記載された方法で評価された。

【0332】

6KC4-1#85抗体のFabドメインのT<sub>m</sub>値を表11に示した。表11に示されているように、6KC4-1#85抗体のFabドメインのT<sub>m</sub>値はカルシウムイオンの濃度によって変動していることから、6KC4-1#85抗体がカルシウムと結合することが明らかになった。

10

【0333】

【表11】

抗体	カルシウムイオン濃度		ΔT <sub>m</sub> (°C) 2 mM-3 μM
	3 μM	2 mM	
6KC4-1#85	71.49	75.39	3.9

【0334】

20

(10-2)6KC4-1#85抗体のカルシウムイオン結合部位の同定

実施例10の(10-1)で6KC4-1#85抗体はカルシウムイオンと結合することが示されたが、6KC4-1#85は後述されるhVκ5-2配列のようなカルシウム結合モチーフを持たない。そこで、カルシウムイオンが6KC4-1#85抗体のどの残基とカルシウムイオンが結合しているか同定するために、6KC4-1#85抗体のCDRに存在するAsp(D)残基をカルシウムイオンの結合もしくはキレートに関与できないAla(A)残基に置換した改変重鎖(6\_H1-11(配列番号:30)、6\_H1-12(配列番号:31)、6\_H1-13(配列番号:32)、6\_H1-14(配列番号:33)、6\_H1-15(配列番号:34))および改変軽鎖(6\_L1-5(配列番号:35))および6\_L1-6(配列番号:36))が作製された。改変抗体遺伝子を含む発現ベクターが導入された動物細胞の培養液から、改変抗体が実施例2に記載された方法にしたがって精製された。精製された改変抗体のカルシウム結合が、実施例4に記載された方法にしたがって測定された。測定された結果を表12に示した。

30

【0335】

【表 1 2】

重鎖	軽鎖	改変残基	カルシウムイオン濃度		ΔTm (°C)
			3 μM	2 mM	
6KC4-1#85	6KC4-1#85	野生型	71.49	75.39	3.9
6H1-11	6KC4-1#85	H鎖 61 位(Kabat ナンバリング)	71.73	75.56	3.83
6H1-12	6KC4-1#85	H鎖 95 位(Kabat ナンバリング)	72.9	73.43	0.53
6H1-13	6KC4-1#85	H鎖 100a 位 (Kabat ナンバリング)	70.94	76.25	5.31
6H1-14	6KC4-1#85	H鎖 100g 位 (Kabat ナンバリング)	73.95	75.14	1.19
6H1-15	6KC4-1#85	H鎖 101 位(Kabat ナンバリング)	65.37	66.25	0.87
6KC4-1#85	6L1-5	L鎖 50 位(Kabat ナンバリング)	71.92	76.08	4.16
6KC4-1#85	6L1-6	L鎖 92 位(Kabat ナンバリング)	72.13	78.74	6.61

## 【0336】

表 1 2 に示されているように、6KC4-1#85抗体の重鎖CDR3の95位または101位（Kabatナンバリング）をAla残基に置換することによって6KC4-1#85抗体のカルシウム結合能が失われることから、この残基がカルシウムとの結合に重要であると考えられる。6KC4-1#85抗体の改変抗体のカルシウム結合性から明らかになった6KC4-1#85抗体の重鎖CDR3のループ付け根付近に存在するカルシウム結合モチーフも、本発明の抗原結合分子に含まれる抗原結合ドメインにおけるカルシウム結合モチーフとして使用され得ることが明らかとなった。本モチーフは実施例 8 で見出されたモチーフと同様に重鎖CDR3のカルシウム結合モチーフであることから、同様に例えば本モチーフを有する合成ライブラリーを作製することができれば、そのようなライブラリーから効率的にカルシウム依存的結合抗体を取得することが可能であると考えられた。

## 【0337】

〔実施例 1 1〕カルシウムイオンに結合するヒト生殖細胞系列配列の探索

（1 1 - 1）ヒト生殖細胞系列配列の取得

ヒト生殖細胞系列配列を含む抗体でカルシウムイオンが結合するものはこれまで報告されていない。そこで、ヒト生殖細胞系列配列を含む抗体がカルシウムイオンと結合するかどうかを判定するため、Human Fetal Spleen Poly RNA (Clontech) から調製されたcDNAを鋳型としてヒト生殖細胞系列配列を含む抗体の生殖細胞系列の配列がクローニングされた。クローニングされたDNA断片は動物細胞発現ベクターに挿入された。得られた発現ベクターの塩基配列が、を当業者公知の方法で決定し、その配列番号を表 1 3 に示した。配列番号：37 (Vk1)、配列番号：38 (Vk2)、配列番号：39 (Vk3)、配列番号：40 (Vk4) ならびに配列番号：41 (Vk5) をコードするポリヌクレオチドが、PCR法によ

10

20

30

40

50

て天然型Kappa鎖の定常領域（配列番号：28）をコードするポリヌクレオチドと連結されたDNA断片が、動物細胞発現用ベクターに組み込まれた。また、配列番号：42（Vk1）、配列番号：43（Vk2）、配列番号：44（Vk3）、配列番号：45（Vk4）ならびに配列番号：46（Vk5）をコードするポリヌクレオチドが、PCR法によってIgG1のC末端2アミノ酸が欠失したポリペプチド（配列番号：65）をコードするポリヌクレオチドと連結されたDNA断片が、動物細胞発現用ベクターに組み込まれた。作製された改変体の配列は当業者公知の方法で確認された。

【0338】

【表13】

10

軽鎖生殖細胞系列配列	重鎖可変領域配列番号	軽鎖可変領域配列番号
Vk1	42	37
Vk2	43	38
Vk3	44	39
Vk4	45	40
Vk5	46	41

【0339】

（11-2）抗体の発現と精製

取得された5種類のヒト生殖細胞系列配列を含むDNA断片が挿入された動物細胞発現ベクターが動物細胞へ導入された。抗体の発現は以下の方法を用いて行われた。ヒト胎児腎細胞由来FreeStyle 293-F株（Invitrogen）がFreeStyle 293 Expression Medium培地（Invitrogen）に懸濁され、 $1.33 \times 10^6$ 細胞/mLの細胞密度で6ウェルプレートの各ウェルへ3 mLずつ蒔きこまれた。調製されたプラスミドは、リポフェクション法によって細胞へ導入された。CO<sub>2</sub>インキュベーター（37度、8%CO<sub>2</sub>、90 rpm）中で4日間培養が行われた。rProtein A Sepharose™ Fast Flow（Amersham Biosciences）を用いて当業者公知の方法を用いて、上記で得られた培養上清から抗体が精製された。分光光度計を用いて精製された抗体溶液の280 nmでの吸光度が測定された。PACE法により算出された吸光係数を用いることによって、得られた測定値から抗体濃度が算出された（Protein Science（1995）4，2411-2423）。

20

【0340】

（11-3）ヒト生殖細胞系列配列を含む抗体のカルシウムイオン結合活性の評価

精製された抗体のカルシウムイオン結合活性が評価された。精製された抗体が20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、2 mM CaCl<sub>2</sub>（pH7.4）または20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、3 μM CaCl<sub>2</sub>（pH7.4）の溶液を外液とする透析（EasySEP、TOMY）処理に供された。透析に用いられた溶液を用いておよそ0.1 mg/mLに調製された抗体溶液を被験物質として、20 から15 まで240 /hrの昇温速度でDSC測定が行われた。得られたDSCの変性曲線にもとづいて算出された各抗体のFabドメインの熱変性中間温度（T<sub>m</sub>値）を表14に示した。

30

【0341】

【表 1 4】

軽鎖生殖細胞系 列配列	カルシウムイオン濃度		$\Delta T_m$ (°C) 2 mM-3 $\mu$ M
	3 $\mu$ M	2 mM	
Vk1	80.32	80.78	0.46
Vk2	80.67	80.61	-0.06
Vk3	81.64	81.36	-0.28
Vk4	70.74	70.74	0
Vk5	71.52	74.17	2.65

10

## 【0342】

その結果、hVk1、hVk2、hVk3、hVk4配列を含む抗体のFabドメインの $T_m$ 値は、当該Fabドメインを含む溶液中のカルシウムイオンの濃度によらず変動しなかった。一方で、hVk5配列を含む抗体のFabドメインの $T_m$ 値は、当該Fabドメインを含む抗体溶液中のカルシウムイオンの濃度によって変動したことから、hVk5配列がカルシウムイオンと結合することが示された。

## 【0343】

20

〔実施例 1 2〕ヒトVk5 (hVk5) 配列の評価

## (12-1) hVk5配列

Kabatデータベース中には、hVk5配列としてhVk5-2配列のみが登録されている。以下では、hVk5とhVk5-2は同義で扱われる。

## 【0344】

## (12-2) 糖鎖非付加型hVk5-2配列の構築、発現および精製

hVk5-2配列は20位 (Kabatナンバリング) のアミノ酸にN型糖鎖が付加する配列を有する。タンパク質に付加する糖鎖にはヘテロジェニティーが存在するため、物質の均一性の観点から糖鎖は付加されないほうが望ましい。そこで、20位 (Kabatナンバリング) のAsn (N) 残基がThr (T) 残基に置換された改変体hVk5-2\_L65 (配列番号: 47) が作製された。アミノ酸の置換はQuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を用いる当業者公知の方法で行われた。改変体hVk5-2\_L65をコードするDNAが動物発現用ベクターに組み込まれた。作製された改変体hVk5-2\_L65のDNAが組み込まれた動物発現用ベクターは、重鎖としてCIM\_H (配列番号: 48) が発現するように組み込まれた動物発現用のベクターと、実施例 2 で記載した方法で共に動物細胞中に導入された。導入された動物細胞中で発現したhVk5-2\_L65 およびCIM\_Hを含む抗体が、実施例 2 で記載した方法で精製された。

30

## 【0345】

## (12-3) 糖鎖非付加型hVk5-2配列を含む抗体の物性評価

取得された改変配列hVk5-2\_L65を含む抗体が、改変に供されたもとのhVk5-2配列を含む抗体よりも、そのヘテロジェニティーが減少しているか否かが、イオン交換クロマトグラフィーを用いて分析された。イオン交換クロマトグラフィーの方法を表 1 5 に示した。分析の結果、図 1 6 に示したように糖鎖付加部位が改変されたhVk5-2\_L65は、元のhVk5-2配列よりもヘテロジェニティーが減少していることが示された。

40

## 【0346】

【表 1 5】

	条件
カラム	TOSOH TSKgel DEAE-NPR
移動相	A; 10 mM Tris-HCl, 3 $\mu$ M CaCl <sub>2</sub> (pH8.0)
	B; 10 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 3 $\mu$ M CaCl <sub>2</sub> (pH8.0)
グラジエントスケジュール	%B = 0 - (5min) - 0 - 2%/1min
カラム温度	40°C
検出	280 nm
注入量	100 $\mu$ L (5 $\mu$ g)

10

## 【 0 3 4 7 】

次に、ヘテロジェニティーが減少したhVk5-2\_L65配列を含む抗体がカルシウムイオンと結合するか否かが、実施例 4 に記載された方法を用いて評価された。その結果、表 1 6 に示したように、糖鎖付加部位が改変されたhVk5-2\_L65を含む抗体のFabドメインのTm値も、抗体溶液中のカルシウムイオンの濃度の変化によって変動した。すなわち、糖鎖付加部位が改変されたhVk5-2\_L65を含む抗体のFabドメインにカルシウムイオンが結合することが示された。

20

## 【 0 3 4 8 】

【表 1 6】

糖鎖	糖鎖付加配列	カルシウムイオン濃度		$\Delta T_m$ (°C)
		3 $\mu$ M	2 mM	
hVk5-2	あり	71.52	74.17	2.65
hVk5-2_L65	なし	71.51	73.66	2.15

## 【 0 3 4 9 】

〔実施例 1 3〕 hVk5-2配列のCDR配列を含む抗体分子に対するカルシウムイオンの結合活性の評価

30

## ( 1 3 - 1 ) hVk5-2配列のCDR配列を含む改変抗体の作製、発現および精製

hVk5-2\_L65配列はヒトVk5-2配列のフレームワークに存在する糖鎖付加部位のアミノ酸が改変された配列である。実施例 1 2 で糖鎖付加部位を改変してもカルシウムイオンが結合することが示されたが、フレームワーク配列は生殖細胞系列の配列であることが免疫原性の観点から一般的には望ましい。そこで、抗体のフレームワーク配列を、当該抗体に対するカルシウムイオンの結合活性を維持しながら、糖鎖が付加されない生殖細胞系列配列のフレームワーク配列に置換することが可能であるか否かが検討された。

## 【 0 3 5 0 】

化学合成されたhVk5-2配列のフレームワーク配列がhVk1、hVk2、hVk3および hVk4配列に改変された配列（それぞれCaVk1（配列番号：49）、CaVk2（配列番号：50）、CaVk3（配列番号：51）、CaVk4（配列番号：52）をコードするポリヌクレオチドが、PCR法によって天然型Kappa鎖の定常領域（配列番号：28）をコードするポリヌクレオチドと連結されたDNA断片が、動物細胞発現用ベクターに組み込まれた。作製された改変体の配列は当業者公知の方法で確認された。上記のように作製された各プラスミドは、CIM\_H（配列番号：48）をコードするポリヌクレオチドが組み込まれたプラスミドと共に実施例 2 で記載された方法で動物細胞に導入された。上記のように導入された動物細胞の培養液から、発現した所望の抗体分子が精製された。

40

## 【 0 3 5 1 】

( 1 3 - 2 ) hVk5-2配列のCDR配列を含む改変抗体のカルシウムイオン結合活性の評価

50

hV<sub>k</sub>5-2配列以外の生殖細胞系列配列（hV<sub>k</sub>1、hV<sub>k</sub>2、hV<sub>k</sub>3、hV<sub>k</sub>4）のフレームワーク配列およびhV<sub>k</sub>5-2配列のCDR配列を含む改変抗体に、カルシウムイオンが結合するか否かが実施例4に記載された方法によって評価された。評価された結果を表17に示した。各改変抗体のFabドメインのT<sub>m</sub>値は、抗体溶液中のカルシウムイオン濃度の変化によって変動することが示された。よって、hV<sub>k</sub>5-2配列のフレームワーク配列以外のフレームワーク配列を含む抗体もカルシウムイオンと結合することが示された。すなわち、hV<sub>k</sub>5-2配列のCDR配列が有するモチーフがカルシウムイオンとの結合に重要であることが示され、フレームワーク配列は任意のフレームワークであってもよいことが確認された。

【0352】

【表17】

生殖細胞系列 (軽鎖フレーム ワーク配列)	カルシウムイオン濃度		ΔT <sub>m</sub> (°C) 2 mM-3 μM
	3 μM	2 mM	
hV <sub>k</sub> 1	77.51	79.79	2.28
hV <sub>k</sub> 2	78.46	80.37	1.91
hV <sub>k</sub> 3	77.27	79.54	2.27
hV <sub>k</sub> 4	80.35	81.38	1.03
hV <sub>k</sub> 5-2	71.52	74.17	2.65

【0353】

さらに、hV<sub>k</sub>5-2配列以外の生殖細胞系列配列（hV<sub>k</sub>1、hV<sub>k</sub>2、hV<sub>k</sub>3、hV<sub>k</sub>4）のフレームワーク配列およびhV<sub>k</sub>5-2配列のCDR配列を含むように改変された各抗体のFabドメインの熱安定性の指標である熱変性温度（T<sub>m</sub>値）は、改変に供されたもとのhV<sub>k</sub>5-2配列を含む抗体のFabドメインのT<sub>m</sub>値よりも増加することが明らかになった。この結果から、hV<sub>k</sub>1、hV<sub>k</sub>2、hV<sub>k</sub>3、hV<sub>k</sub>4のフレームワーク配列およびhV<sub>k</sub>5-2配列のCDR配列を含む抗体はカルシウムイオンと結合する性質を有する上に、熱安定性の観点でも優れた分子であることが見出された。

【0354】

〔実施例14〕ヒト生殖細胞系列hV<sub>k</sub>5-2配列に存在するカルシウムイオン結合部位の同定  
(14-1) hV<sub>k</sub>5-2配列のCDR配列中の変異部位の設計

実施例13に記載されているように、hV<sub>k</sub>5-2配列のCDR部分が他の生殖細胞系列のフレームワーク配列に導入された軽鎖を含む抗体もカルシウムイオンと結合することが示された。この結果からhV<sub>k</sub>5-2に存在するカルシウムイオン結合部位はCDRの中に存在することが示唆された。カルシウムイオンと結合する、すなわち、カルシウムイオンをキレートするアミノ酸として、負電荷のアミノ酸もしくは水素結合のアクセプターとなりうるアミノ酸が挙げられる。そこで、hV<sub>k</sub>5-2配列のCDR配列中に存在するAsp (D) 残基またはGlu (E) 残基がAla (A) 残基に置換された変異hV<sub>k</sub>5-2配列を含む抗体がカルシウムイオンと結合するか否かが評価された。

【0355】

(14-2) hV<sub>k</sub>5-2配列のAla置換体の作製ならびに抗体の発現および精製

hV<sub>k</sub>5-2配列のCDR配列中に存在するAspおよび/またはGlu残基がAla残基に改変された軽鎖を含む抗体分子が作製された。実施例12で記載されるように、糖鎖が付加されない改変体hV<sub>k</sub>5-2\_L65はカルシウムイオン結合を維持していたことから、カルシウムイオン結合性という観点ではhV<sub>k</sub>5-2配列と同等と考えられる。本実施例ではhV<sub>k</sub>5-2\_L65をプレート配列としてアミノ酸置換が行われた。作製された改変体を表18に示した。アミノ酸の置換はQuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)、PCRまたはIn fusion Advantage PCR cloning kit (TAKARA)等の当業者公知の方法によって行われ、アミノ酸

10

20

30

40

50

が置換された改変軽鎖の発現ベクターが構築された。

【 0 3 5 6 】

【表 1 8】

軽鎖改変体名	改変部位 (Kabat ナンバリング)	配列番号
hVk5-2_L65	野生型	4 7
hVk5-2_L66	30	5 3
hVk5-2_L67	31	5 4
hVk5-2_L68	32	5 5
hVk5-2_L69	50	5 6
hVk5-2_L70	30, 32	5 7
hVk5-2_L71	30, 50	5 8
hVk5-2_L72	30, 32, 50	5 9
hVk5-2_L73	92	6 0

10

【 0 3 5 7 】

得られた発現ベクターの塩基配列は当業者公知の方法で決定された。作製された改変軽鎖の発現ベクターを重鎖CIM\_H (配列番号：48) の発現ベクターと共に、ヒト胎児腎癌細胞由来HEK293H株 (Invitrogen)、またはFreeStyle293細胞 (Invitrogen) に一過性に導入することによって、抗体を発現させた。得られた培養上清から、rProtein A Sepharose™ Fast Flow (GEヘルスケア) を用いて当業者公知の方法で、抗体が精製された。精製された抗体溶液の280 nmでの吸光度が、分光光度計を用いて測定された。PACE法により算出された吸光係数を用いることによって、得られた測定値から抗体濃度が算出された (Protein Science (1995) 4, 2411-2423)。

20

【 0 3 5 8 】

(14-3) hVk5-2配列のAla置換体を含む抗体のカルシウムイオン結合活性評価

得られた精製抗体がカルシウムイオンと結合するか否かが判定された。具体的には、精製された抗体が20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、2 mM CaCl<sub>2</sub> (pH7.5) または20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl (pH7.5) の溶液 (表19ではカルシウムイオン濃度0 μMと表記) を外液とする透析 (EasySEP、TOMY) 処理に供された。透析に用いられた溶液を用いておよそ0.1 mg/mLに調製された抗体溶液を被験物質として、20 から115 まで240 /hrの昇温速度でDSC測定が行われた。得られたDSCの変性曲線にもとづいて算出された各抗体のFabドメインの熱変性中間温度 (T<sub>m</sub>値) が表19に示されている。hVk5-2配列のCDR配列中に存在するAspまたはGlu残基をカルシウムイオンの結合もしくはキレートに関与できないAla残基に置換することによって、抗体溶液のカルシウムイオン濃度の変化によってそのFabドメインのT<sub>m</sub>値が変動しない抗体が存在した。Ala置換によってT<sub>m</sub>値が変動しない置換部位 (32位および92位 (Kabatナンバリング)) はカルシウムイオンと抗体の結合に特に重要であることが示された。

30

40

【 0 3 5 9 】

【表 19】

軽鎖改変体名	改変部位 (Kabat ナンバリング)	カルシウムイオン濃度		$\Delta T_m(^{\circ}C)$ 2 mM-0 $\mu$ M
		0 $\mu$ M	2 mM	
hVk5-2_L65	野生型	71.71	73.69	1.98
hVk5-2_L66	30	71.65	72.83	1.18
hVk5-2_L67	31	71.52	73.30	1.78
hVk5-2_L68	32	73.25	74.03	0.78
hVk5-2_L69	50	72.00	73.97	1.97
hVk5-2_L70	30, 32	73.42	73.60	0.18
hVk5-2_L71	30, 50	71.84	72.57	0.73
hVk5-2_L72	30, 32, 50	75.04	75.17	0.13
hVk5-2_L73	92	75.23	75.04	-0.19

10

## 【0360】

〔実施例 15〕カルシウムイオン結合モチーフを有するhVk1配列を含む抗体のカルシウムイオン結合活性の評価

20

(15-1)カルシウムイオン結合モチーフを有するhVk1配列の作製ならびに抗体の発現および精製

実施例 14 で記載されたAla置換体のカルシウムの結合活性の結果から、hVk5-2配列のCDR配列の中でAspやGlu残基がカルシウム結合に重要であることが示された。そこで、30位、31位、32位、50位および92位 (Kabatナンバリング) の残基のみを他の生殖細胞系列の可変領域配列に導入してもカルシウムイオンと結合できるか否かが評価された。具体的には、ヒト生殖細胞系配列であるhVk1配列の30位、31位、32位、50位および92位 (Kabatナンバリング) の残基がhVk5-2配列の30位、31位、32位、50位および92位 (Kabatナンバリング) の残基に置換された改変体LfVk1\_Ca (配列番号: 61) が作製された。すなわち、hVk5-2配列中のこれらの5残基のみが導入されたhVk1配列を含む抗体がカルシウムと結合

30

## 【0361】

(15-2)カルシウムイオン結合モチーフを有するヒトhVk1配列を含む抗体のカルシウムイオン結合活性の評価

上記のように得られた精製抗体がカルシウムイオンと結合するか否かが実施例 4 に記載された方法で判定された。その結果を表 20 に示した。hVk1配列を有するLfVk1を含む抗体のFabドメインのTm値は抗体溶液中のカルシウムの濃度の変化によっては変動しない一方で、LfVk1\_Caを含む抗体配列の、Tm値は、抗体溶液中のカルシウムの濃度の変化によって1 以上変化したことから、LfVk1\_Caを含む抗体がカルシウムと結合することが示された。上記の結果から、カルシウムイオンの結合には、hVk5-2のCDR配列がすべて必要ではなく、LfVk1\_Ca配列を構築する際に導入された残基のみでも十分であることが示された。

40

## 【0362】

【表 2 0】

軽鎖改変体	カルシウムイオン濃度		$\Delta T_m(^{\circ}C)$ 2 mM-3 $\mu$ M
	3 $\mu$ M	2 mM	
LfVk1	83.18	83.81	0.63
LfVk1_Ca	79.83	82.24	2.41

## 【 0 3 6 3】

## ( 1 5 - 3 ) 分解抑制型LfVk1\_\_Ca配列の構築、発現および精製

実施例15の(15-2)でヒト生殖細胞系配列であるhVk1配列の30位、31位、32位、50位および92位(Kabatナンバリング)の残基がhVk5-2配列の30位、31位、32位、50位および92位(Kabatナンバリング)の残基に置換された改変体LfVk1\_\_Ca(配列番号:61)が作製され、カルシウムイオンが結合することが示された。そこで、LfVk1\_\_Ca配列を含むCa依存性抗体(Ca結合抗体)が考えられるが、新規配列であるLfVk1\_\_Ca配列の医薬品としての保存安定性は不明であることから、その医薬品としての応用可能性は不明である。そこで、LfVk1\_\_Caの熱加速試験により安定性を評価した。LfVk1\_\_CaをL鎖に有する抗体を20 mM Histidine-HCl、150 mM NaCl、pH6.0の溶液に一晚4 の条件で透析された。透析された抗体は0.5 mg/mLに調製され、5 または50 で3日間保存された。保存後の各抗体を実施例12に記載された方法でイオン交換クロマトグラフィーが行われた。その結果、図17に示すように、LfVk1\_\_Caは50 で3日間保存で著しく分解することが確認された。LfVk1\_\_Ca配列は、30位、31位および32位(Kabatナンバリング)にAspが存在し、酸性条件下で分解することが報告されているAsp-Asp配列がCDR1配列中に存在する(J. Pharm. Bio med. Anal. (2008) 47(1), 23-30)ため、30位、31位および32位(Kabatナンバリング)が分解箇所である可能性が考えられた。そこで、LfVk1\_\_Caの分解を回避するため、分解する可能性がある3か所のAsp(D)残基がAla(A)残基に置換された改変体LfVk1\_Ca1(配列番号:72)、LfVk1\_Ca2(配列番号:73)およびLfVk1\_Ca3(配列番号:74)が作製された。アミノ酸の置換はQuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit(Stratagene)を用いる当業者公知の方法で行われた。改変体をコードするDNAが動物発現用ベクターに組み込まれた。作製された改変体のDNAが組み込まれた動物発現用ベクターは、重鎖としてGC H(配列番号:102)が発現するように組み込まれた動物発現用のベクターと、実施例14に記載した方法で共に動物細胞中に導入された。導入された動物細胞中で発現した抗体が、実施例14に記載した方法で精製された。

## 【 0 3 6 4】

## ( 1 5 - 4 ) 分解抑制型LfVk1\_\_Ca配列を含む抗体の安定性評価

実施例15の(15-3)で取得された抗体が、改変に供されたもとのLfVk1\_Ca配列を含む抗体よりも、pH6.0溶液中での分解が抑制されているか否かが熱加速後の各抗体のヘテロジェニティーの比較によって評価された。上述と同様に抗体は5 または50 で3日間保存された。保存後の各抗体を実施例12に記載された方法でイオン交換クロマトグラフィーが行われた。分析の結果、図17に示されるように30番目(Kabatナンバリング)部位が改変されたLfVk1\_Ca1は、元のLfVk1\_Ca配列よりもヘテロジェニティーが少なく、熱加速による分解が著しく抑制されていることが示された。すなわち、LfVk1\_Ca配列中の30位に存在するAsp(D)残基が分解することが示され、そしてAsp残基の分解はアミノ酸改変によって回避できることが示された。

## 【 0 3 6 5】

## ( 1 5 - 5 ) 軽鎖30位Asp残基分解抑制型LfVk1\_\_Ca配列の作製ならびに抗体の発現および精製

実施例15の(15-4)に記載されたAla置換体の分解抑制の結果から、LfVk1\_Ca配列のCDR配列の中で30位(Kabatナンバリング)のAsp(D)残基が酸性条件下で分解し、30位(Kabatナンバリング)を他のアミノ酸((15-4)では、Ala(A)残基に置換された)

10

20

30

40

50

に置換することで分解が抑制できることが示された。そこで、30位（Kabatナンバリング）の残基をカルシウムイオンがキレートできる残基の一つであるSer（S）残基に置換した配列（LfV<sub>k</sub>1\_Ca6とよぶ。配列番号：75）としても、カルシウム結合能を維持しつつ、分解が抑制されるか否かが評価された。変体の作製は実施例14と同様に行われた。得られた軽鎖変体LfV<sub>k</sub>1\_Ca6および軽鎖LfV<sub>k</sub>1\_Ca配列を、重鎖GC<sub>H</sub>（配列番号：102）と共に発現させた。抗体の発現および精製は実施例14と同様の方法で実施された。

#### 【0366】

##### （15-6）軽鎖30位Asp残基分解抑制型LfV<sub>k</sub>1\_Ca配列の評価

上記のように得られた精製抗体の酸性条件下における保存安定性が実施例15の（15-4）に記載された方法で判定された。その結果、図18に示すように、LfV<sub>k</sub>1\_Ca6配列を含む抗体は、元のLfV<sub>k</sub>1\_Ca配列を含む抗体よりも分解が抑制されていることが示された。

10

#### 【0367】

さらに、LfV<sub>k</sub>1\_Ca配列を含む抗体およびLfV<sub>k</sub>1\_Ca6配列を含む抗体がカルシウムイオンと結合するか否かが実施例15に記載された方法で判定された。その結果を表21に示す。LfV<sub>k</sub>1\_Ca配列を含む抗体および分解抑制型であるLfV<sub>k</sub>1\_Ca6配列を含む抗体のFabドメインのT<sub>m</sub>値は、それぞれ抗体溶液中のカルシウムの濃度の変化によって1以上変化した。

#### 【0368】

##### 【表21】

軽鎖変体	カルシウムイオン濃度		ΔT <sub>m</sub> (°C) 2 mM-3 μM
	3 μM	2 mM	
LfV <sub>k</sub> 1_Ca	78.45	80.06	1.61
LfV <sub>k</sub> 1_Ca6	78.44	79.74	1.30

20

#### 【0369】

以上の結果から、安定性を考慮に入れると、30位はAsp以外のカルシウムイオンと相互作用が可能なアミノ酸（Asn、Glu、Gln、Ser、Thr、His、Tyr等）であって、31位、32位、50位および92位（Kabatナンバリング）の配列の全てあるいは一部がhV<sub>k</sub>5-2のアミノ酸、あるいは、カルシウムと相互作用可能なアミノ酸（Asp、Asn、Glu、Gln、Ser、Thr、His、Tyr等）であることが、抗体へのカルシウムイオンの結合に重要であることが示された。

30

#### 【0370】

〔実施例16〕NMRによるカルシウムイオン結合モチーフを有するヒトhV<sub>k</sub>1配列を含む抗体のカルシウムイオン結合活性の評価

##### （16-1）抗体の発現と精製

NMR測定に用いるために発現させたLfV<sub>k</sub>1\_Caを含む抗体とLfV<sub>k</sub>1を含む抗体が精製された。具体的には、LfV<sub>k</sub>1\_Caを含む抗体は重鎖（配列番号：13）と軽鎖（配列番号：61）をそれぞれ発現させることが出来るように調製された動物発現用プラスミドが動物細胞に一過的に導入された。また、LfV<sub>k</sub>1を含む抗体は重鎖（配列番号：13）と軽鎖（配列番号：62）をそれぞれ発現させることが出来るように調製された動物発現用プラスミドが動物細胞に一過的に導入された。最終細胞密度1 × 10<sup>6</sup>細胞/mLとなるようにFreeStyle 293 Expression Medium培地（Invitrogen）へ懸濁された100 mLのヒト胎児腎細胞由来FreeStyle 293-F株（Invitrogen）の細胞懸濁液に、標識アミノ酸が加えられた。具体的には、Asp/Glu/Gln/Asn標識体についてはL-Aspartic acid-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>, <sup>15</sup>N（10 mg）、L-Glutamic acid-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>, <sup>15</sup>N（2.5 mg）、L-Glutamine-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>, <sup>15</sup>N<sub>2</sub>（60 mg）、L-Asparagine-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>, <sup>15</sup>N<sub>2</sub>・H<sub>2</sub>O（2.5 mg）、<sup>13</sup>C-chloro-L-alanine（6 mg）を10 mLの水に懸濁した溶液を0.22 μmフィルターでろ過した液を加えた。Leu標識体については、L-Leucine-<sup>15</sup>N（30 mg）、<sup>13</sup>C-chloro-L-alanine（6 mg）を10 mLの水に懸濁した溶液を0.22 μmフィルターでろ過した液を加え

40

50

た。リポフェクション法により調製されたプラスミドが細胞に導入された。プラスミドが導入された細胞はCO<sub>2</sub>インキュベーター（37℃、8%CO<sub>2</sub>、90 rpm）中で5日間培養された。r Protein A Sepharose™ Fast Flow（Amersham Biosciences）を用いた当業者公知の方法にしたがって、上記のように得られた培養上清から抗体が精製された。分光光度計を用いて精製された抗体溶液の280 nmでの吸光度が測定された。PACE法により算出された吸光係数を用いて測定値から抗体濃度が算出された（Protein Science（1995）4，2411-2423）。

### 【0371】

#### （16-2）Fabフラグメントの調製

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

### 【0372】

#### （16-3）LfVtk1\_Ca抗体およびLfVtk1抗体の FabフラグメントのNMR試料調製

抗体溶液をMWCO 5000の限外濾過器Vivaspin（Sartorius）を用いて0.5 mLまで遠心により濃縮した。次に上記限外濾過器にダイアフィルトレーションカップを設置して、NMR用緩衝液：5 mM d-BisTris，20 mM NaCl，0.001 %（w/v）NaN<sub>3</sub>，5 %（v/v）<sup>2</sup>H<sub>2</sub>O，pH 7.0（NaOH、HClを用いてpHを調製した）へ緩衝液置換（ダイアフィルトレーションカップに上記緩衝液を5 mL足して0.5 mLまで遠心濃縮することを3回繰り返した）を行い、最後に0.25 mLまで濃縮した。最後に、NMR緩衝液で限外濾過器を洗いこみ、濃縮液とあわせて抗体溶液をLfVtk1\_Ca抗体については420 μL、LfVtk1抗体については270 μLとした。この段階で再度、pHを確認し、必要に応じてNaOH、HClによりpH 7.0に調整した。UV測定器Nanodrop（Thermo Fisher Scientific）を用いて280 nmにおける吸光度を測定し、280 nmにおけるモル吸光係数を70000 M<sup>-1</sup>・cm<sup>-1</sup>としてFabフラグメントを定量した。Leu標識LfVtk1\_Ca抗体、Leu標識LfVtk1抗体は0.12 mM、Asp、Glu、Asn、Gln標識LfVtk1\_Ca抗体、Asp、Glu、Asn、Gln標識LfVtk1抗体は0.24 mMとなった。これらの試料の内、LfVtk1\_Ca抗体については、直径5 mmのNMR試料管（shigemi）に、LfVtk1抗体については直径5 mmの水溶液用対称形マイクロ試料管（shigemi）にパスツールピペットを用いて充填した。LfVtk1\_Ca抗体のCa<sup>2+</sup>滴定実験においては、抗体溶液に、抗体に対して、Ca<sup>2+</sup>が1、2、5、10、20モル等量となるよう、CaCl<sub>2</sub>溶液を順次、添加した。添加に用いたCaCl<sub>2</sub>溶液にはNMRバッファーに溶解した10、20、50、100 mM CaCl<sub>2</sub>溶液を準備した。シリンジ部分を既製品から延長した特注マイクロシリンジ（ITO）により、添加容量が3-10 μLの範囲となるように、CaCl<sub>2</sub>溶液の必要量を直接、NMR試料管に充填された抗体溶液に添加し、試料管をボルテックスミキサーにより攪拌後、手動遠心器（Shimadzu）により遠心分離した。

### 【0373】

#### （16-4）LfVtk1\_Ca抗体およびLfVtk1\_Ca抗体の Fabフラグメントのアミド基シグナルを観測するためのNMR測定

NMR測定には、TCI CryoProbeを設置したNMR分光器DRX750（Bruker Biospin）を用いた。設定温度を307K（GasFlow 535 L/h）とした。アミド基シグナルを観測するためのNMR測定には<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQCを用いた。測定法としては、<sup>15</sup>N展開期に炭素とカルボニル炭素の同

10

20

30

40

50

時<sup>13</sup>Cデカップリング、および溶媒水シグナル消去のための3-9-19パルストレインを伴う<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N FHSQCを用い、それを制御するパルスプログラムには、メーカー (Bruker Biospin) により標準として準備されているものを用いた。NMRの測定条件は以下の通りとした。スペクトル幅:12019Hz (f2), 1976 Hz (f1)、データポイント数: 2048 (f2), 128 (f1)。データ処理にはTopspin 3.0 (Bruker Biospin) を用いた。データ処理条件は以下の通りとした。f2、f1共に、ウィンドウ関数としてshifted Sine (QSINE) を乗じ、2倍のデータポイント数となるようにゼロフィリングを行った後に、フーリエ変換を行った。シグナルの化学シフトはNMR解析ソフトウェアSparky (UCSF) を用いて算出した。

【 0 3 7 4 】

( 1 6 - 5 ) 主鎖アミド基のNMRシグナルの帰属

これまでにトシリズムブ (重鎖配列番号: 13、軽鎖配列番号: 14) のFabフラグメントの主鎖アミド基のNMRシグナルの内、80%が帰属された (データ未公開)。LfV<sub>k1</sub>-Ca抗体のFabフラグメントのアミノ酸配列は、軽鎖CDR1、CDR2、CDR3の一部、および軽鎖73、83番のアミノ酸残基およびを除き、トシリズムブとFabフラグメントのアミノ酸配列と同じである。両抗体でアミノ酸配列が同じ部分については、そのNMRシグナルが同一の化学シフトを有する、あるいはそれらが近いため、トシリズムブの帰属情報を移行することが可能であった。Leu標識試料については、軽鎖11、(33)、(46)、(47)、(54)、(78)、125、135、136、154、175、179、181、201、重鎖18、46、64、71、81、83、114、144、147、165、176、181、184、195が帰属を移行することが可能であった。上記、括弧が付いていない番号はトシリズムブと同一の化学シフトであるため、帰属が移行できた残基番号、括弧が付いた番号は、トシリズムブと近い化学シフトを有しており、それ以外に近い化学シフトを有するシグナルがないため、帰属が可能であった残基番号であった。一方、Asp、Glu、Asn、Gln標識試料については、LfV<sub>k1</sub>-Ca抗体とLfV<sub>k1</sub>抗体のスペクトルを比較し、4個のシグナルがLfV<sub>k1</sub>-Caで新たに観測されていた。これは、この両抗体間でAsp、Glu、Asn、Gln残基の内、Ca<sup>2+</sup>結合モチーフとして導入した配列の異なる軽鎖Asp30、31、32、92、Glu50の5残基の内のいずれか4残基由来であると分類できた。

【 0 3 7 5 】

( 1 6 - 6 ) Ca<sup>2+</sup>のLfV<sub>k1</sub>-Ca抗体上の結合部位の同定

LfV<sub>k1</sub>-Ca抗体のFabフラグメントのCa<sup>2+</sup>未添加状態と、20モル等量添加の<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQCスペクトルを比較して、化学シフトが変化しているシグナルを抽出した。その結果、Leu標識試料からは、軽鎖Leu33が結合に関与しており、それ以外のLeu残基は結合に関与していないことが分かった。また、Asp、Glu、Asn、Gln標識試料からは、軽鎖Asp30、31、32、92、Glu50の5残基の内のいずれか4残基が結合に関与し、それ以外のAsp、Glu、Asn、Gln残基の内の1残基を除くすべてが結合に関与していないことが明らかとなった。以上のことから、Ca<sup>2+</sup>結合モチーフとして導入されたアミノ酸配列の内、少なくとも軽鎖CDR1、これに加えて軽鎖CDR2、CDR3の両方もしくはいずれかのアミノ酸がCa<sup>2+</sup>結合に関与していると同定された。このことは実施例 15において確認された30位、31位、32位、50位および92位 (Kabatナンバリング) のうち4つがhV<sub>k5</sub>-2配列のアミノ酸であることがカルシウムイオンの結合に重要であった結果と一致している。

【 0 3 7 6 】

( 1 6 - 7 ) 滴定実験におけるCa<sup>2+</sup>解離定数の算出

Ca<sup>2+</sup>濃度がLfV<sub>k1</sub>-Ca抗体のFabフラグメントに対して、0、1、2、5、10、20モル等量の時の<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQCスペクトルを利用した。結合部位として同定された軽鎖Leu33のシグナルの<sup>1</sup>Hまたは<sup>15</sup>N化学シフトを縦軸に、上記Ca<sup>2+</sup>のモル等量を横軸にプロットし、グラフ作成ソフトウェアGnuplotを用いて以下の式 2 で示される関数のフィッティングを行った。

【 0 3 7 7 】

【 式 2 】

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

【 0 3 7 8 】

10

20

30

40

50

式 2 で表される関数において、s、t はそれぞれ  $\text{Ca}^{2+}$  非結合時の化学シフト [ppm]、 $\text{Ca}^{2+}$  飽和結合時の推定化学シフト [ppm]、a は抗体 Fab フラグメント濃度 [M]、Kd は解離定数、x は抗体 Fab フラグメントに対して添加した  $\text{Ca}^{2+}$  のモル等量を示している。フィッティングの際には、s、t、Kd をフィッティングパラメータとした。その結果、 $^1\text{H}$  化学シフトからは  $Kd=7.1 \times 10^{-5}$  [M]、 $^{15}\text{N}$  化学シフトからは、 $Kd=5.9 \times 10^{-5}$  [M] として見積もられた。

【 0 3 7 9 】

〔実施例 1 7〕 hVk5-2 バリエーション配列のカルシウム結合評価

Vk5-2 (配列番号：41) のほかに Vk5-2 に分類される Vk5-2 バリエーション 1 (配列番号：63) および Vk5-2 バリエーション 2 (配列番号：64) が得られた。これらのバリエーションについてもカルシウム結合評価が行われた。Vk5-2、Vk5-2 バリエーション 1 および Vk5-2 バリエーション 2 の DNA 断片がそれぞれ動物細胞用発現ベクターに組み込まれた。得られた発現ベクターの塩基配列は当業者公知の方法で決定された。Vk5-2、Vk5-2 バリエーション 1 および Vk5-2 バリエーション 2 の DNA 断片がそれぞれ組み込まれた動物細胞用発現ベクターは、重鎖として CIM\_H (配列番号：48) が発現するように組み込まれた動物細胞発現用のベクターと、実施例 1 3 で記載された方法で共に動物細胞中に導入され、抗体が精製された。精製された抗体のカルシウムイオン結合活性が評価された。精製された抗体が 20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、2 mM  $\text{CaCl}_2$  (pH7.5) または 20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl (pH7.5) の溶液 (表 2 2 ではカルシウムイオン濃度 0mM と表記) を外液とする透析 (EasySEP、TOMY) 処理に供された。透析に用いられた溶液を用いておよそ 0.1 mg/mL に調製された抗体溶液を被験物質として、20 から 115 まで 240 /hr の昇温速度で DSC 測定が行われた。得られた DSC の変性曲線にもとづいて算出された各抗体の Fab ドメインの熱変性中間温度 ( $T_m$  値) が表 2 2 に示されている。

【 0 3 8 0 】

【表 2 2】

軽鎖	カルシウムイオン濃度		$\Delta T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )
	0 mM	2 mM	2 mM-0mM
Vk5-2	71.65	74.38	2.73
Vk5-2 バリエーション 1	65.75	72.24	6.49
Vk5-2 バリエーション 2	66.46	72.24	5.78

【 0 3 8 1 】

その結果、Vk5-2、Vk5-2 バリエーション 1 および Vk5-2 バリエーション 2 の配列を含む抗体の Fab ドメインの  $T_m$  値は、当該 Fab ドメインを含む抗体溶液中のカルシウムイオンの濃度によって変動したことから、Vk5-2 に分類される配列を持つ抗体はカルシウムイオンと結合することが示された。

【 0 3 8 2 】

〔実施例 1 8〕カルシウム依存的にヒト CD4 に結合する抗体

(18-1) 可溶性ヒト CD4 の調製

可溶性ヒト CD4 は以下のように調製された。膜貫通領域を欠損したヒト CD4 のアミノ酸配列に Myc タグを付加した配列 (配列番号：76) をコードする DNA 配列が動物細胞発現用ベクターに組み込まれた。作製された組み換えヒト CD4 の配列は当業者公知の方法で確認された。

【 0 3 8 3 】

(18-2) 可溶性ヒト CD4 に結合する抗体の発現と精製

TNX355-IgG1 (重鎖配列番号：77、軽鎖配列番号：78) および Q425 (重鎖配列番号：79、軽鎖配列番号：80) は抗ヒト CD4 抗体である。さらに Q425L9 (重鎖配列番号：81、軽鎖配列番号：82) は Q425 の L 鎖改変体である。TNX355-IgG1 (重鎖配列番号：77、軽鎖配列番号：78)、Q425 (重鎖配列番号：79、軽鎖配列番号：80) および Q425L9 (重鎖配列番号：81、軽鎖配列番号：82) のアミノ酸をコードする DNA 配列が、

動物細胞発現用プラスミドへ導入された。抗体の発現は以下の方法を用いて行われた。ヒト胎児腎細胞由来FreeStyle 293-F株 (Invitrogen) がFreeStyle 293 Expression Medium 培地 (Invitrogen) に懸濁され、 $1.33 \times 10^6$  細胞/mLの細胞密度で6ウェルプレートの各ウェルへ3 mLずつ蒔きこまれた。調製されたプラスミドは、リポフェクション法によって細胞へ導入された。CO<sub>2</sub>インキュベーター (37 °C、8%CO<sub>2</sub>、90 rpm) 中で4日間培養が行われた。rProtein A Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences) を用いて当業者公知の方法を用いて、上記で得られた培養上清から抗体が精製された。分光光度計を用いて精製された抗体溶液の280 nmでの吸光度が測定された。PACE法により算出された吸光係数を用いることによって、得られた測定値から抗体濃度が算出された (Protein Science (1995) 4, 2411-2423)。

10

#### 【0384】

##### (18-3) 取得された抗体のヒトCD4に対するカルシウム依存的結合能評価

取得された抗体の可溶性ヒトCD4に対するカルシウム依存的結合能がBiacore T100 (GE Healthcare) を用いて評価された。高カルシウムイオン濃度として、1.2 mMを使用し、低カルシウムイオン濃度の条件として3 μMを使用した。抗原は可溶性ヒトCD4 (18-1で調製した) を用いた。Sensor chip CM4 (GE Healthcare) 上にアミンカップリング法でprotein G (Invitrogen) を適当量固定化し、そこへ目的の抗体をキャプチャーさせた。ランニングバッファーには1.2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>または3 μmol/L CaCl<sub>2</sub>を含む10 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05% (w/v) Tween20、1.2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>、pH7.4またはpH6.0を用いた。測定は全て37 °Cで実施し、ヒトCD4の希釈にもそれぞれのバッファーを使用した。抗体のセンサーグラムを図19に示した。図19に示したようにTNX355-IgG1抗体はランニングバッファーの条件が変化してもセンサーグラムの形状は変化しなかったことから、TNX355-IgG1はヒトCD4に対してカルシウム依存的に結合活性を示さない通常の抗体であることが確認された。一方で、Q425抗体およびQ425L9抗体はいずれもカルシウムイオン濃度が3 μM (低カルシウムイオン濃度) のときの抗原結合量はカルシウムイオン濃度が1.2 mM (高カルシウムイオン濃度) のときの抗原結合量よりも少なく、Ca依存的結合能が示された。特にQ425L9抗体は、カルシウムイオン濃度が3 μMとなると、200 nMのアナライト (可溶性ヒトCD4) で測定した場合でも全く結合相が観測できなかった。すなわち、Q425抗体およびQ425L9抗体はヒトCD4に対してカルシウム依存的に結合活性を示すカルシウム依存的結合であることが確認された。

20

30

#### 【0385】

〔実施例19〕 ノーマルマウスを用いたCa依存性結合抗体の抗原の血漿中滞留性への影響評価

##### (19-1) ノーマルマウスを用いたin vivo試験

実施例18で調製されたQ425およびQ425L9はカルシウム依存的に可溶性ヒトCD4に結合する抗体であった。しかし、これまでにカルシウム依存的に抗原と結合する性質を有する抗体と抗原を同時に投与した場合に、カルシウム依存的に抗原と結合する性質が無い抗体と抗原を同時に投与した場合よりも抗原の消失を加速させる性質を持っていることは実施例5および実施例6で示したようにIL6Rで明らかになっているが、他の抗原でも抗原の消失を加速させる性質を持っているかは不明である。

40

#### 【0386】

そこで、ノーマルマウス (C57BL/6J mouse, Charles River Japan) に可溶性ヒトCD4 (実施例18で調製) を単独投与もしくは可溶性ヒトCD4および抗ヒトCD4抗体を同時投与した後の可溶性ヒトCD4および抗ヒトCD4抗体の体内動態を評価した。可溶性ヒトCD4溶液 (50 μg/mL)、もしくは、可溶性ヒトCD4および抗ヒトCD4抗体の混合溶液を尾静脈に10 mL/kgで単回投与した。抗ヒトCD4抗体としては、上述のTNX355-IgG1、Q425-IgG1、Q425L9-IgG1を使用した。

#### 【0387】

混合溶液中の可溶性ヒトCD4濃度は全て50 μg/mLであるが、抗ヒトCD4抗体濃度は抗体毎に異なり、TNX355-IgG1は0.264 mg/mL、Q425-IgG1は0.197 mg/mL、およびQ425L9-IgG1は2

50

.594 mg/mL、このとき、可溶性ヒトCD4に対して抗ヒトCD4抗体は十分量過剰に存在することから、可溶性ヒトCD4は大部分が抗体に結合していると考えられる。投与後可溶性ヒトCD4を単独投与した群は、2分間、5分間、15分間、30分間、1時間、2時間で採血を行った。可溶性ヒトCD4およびカルシウム依存的抗原結合能が無いTNX355-IgG1を同時投与した群は、投与後5分間、2時間、7時間、1日間、3日間、7日間、14日間、28日間で採血を行った。可溶性ヒトCD4およびカルシウム依存的抗原結合能を有するQ425-IgG1およびQ425L9-IgG1を同時投与した群は、投与後5分間、30分間、2時間、7時間、1日間、3日間、8日間、14日間、28日間で採血を行った。採取した血液は直ちに4℃、12,000 rpmで15分間遠心分離し、血漿を得た。分離した血漿は、測定を実施するまで-20℃以下に設定された冷凍庫に保存した。

10

## 【0388】

(19-2) ELISA法によるノーマルマウス血漿中の抗ヒトCD4抗体濃度測定

マウス血漿中の抗ヒトCD4抗体濃度はELISA法にて測定した。まずAnti-Human IgG( $\kappa$ -chain specific) F(ab')<sub>2</sub> Fragment of Antibody (SIGMA) をNunc-Immuno Plate, MaxiSoup (Nalge nunc International) に分注し、4℃で1晩静置しAnti-Human IgG固相化プレートを作成した。血漿中濃度として0.64、0.32、0.16、0.08、0.04、0.02、0.01  $\mu$ g/mLの検量線試料と100倍以上希釈したマウス血漿測定試料を調製し、Anti-Human IgG固相化プレートに分注して25℃で1時間incubationした。その後Biotinylated Anti-human IL-6 R Antibody (R&D) を25℃で1時間反応させ、さらにStreptavidin-PolyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies) を25℃で0.5時間反応させ、TMB One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories) を基質として用い発色反応を行い、1N-Sulfuric acid (Showa Chemical) で反応停止後、マイクロプレートリーダーにて450 nmの吸光度を測定した。マウス血漿中濃度は検量線の吸光度から解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて算出した。

20

## 【0389】

この方法で測定した静脈内投与後のノーマルマウスにおけるTNX355-IgG1、Q425-IgG1およびQ425L9-IgG1の血漿中抗体濃度推移を図20に示した。

## 【0390】

(19-3) 電気化学発光法による血漿中可溶性ヒトCD4濃度測定

マウスの血漿中可溶性ヒトCD4濃度はELISA法にて測定した。

30

## 【0391】

sCD4単独投与の群・Q425、Q425\_L9と同時投与した群については、TNXをNunc-Immuno Plate, MaxiSoup (Nalge nunc International) に分注し、4℃で1晩静置しTNX固相化プレートを作成した。血漿中濃度として10、5、2.5、1.25、0.625、0.3125、0.156  $\mu$ g/mLの検量線試料と100倍以上希釈したマウス血漿測定試料を10mM EDTA入りのBufferで調製し、TNX固相化プレートに分注して25℃で3時間incubationした。その後Anti-c-myc-HRP (Miltenyi Biotech) を25℃で1時間反応させ、TMB One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories) を基質として用い発色反応を行い、1N-Sulfuric acid (Showa Chemical) で反応停止後、マイクロプレートリーダーにて450 nmの吸光度を測定した。マウス血漿中濃度は検量線の吸光度から解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて算出した。

40

## 【0392】

TNXと同時投与した群については、Q425をNunc-Immuno Plate, MaxiSoup (Nalge nunc International) に分注し、4℃で1晩静置しQ425固相化プレートを作成した。血漿中濃度として20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.3125  $\mu$ g/mLの検量線試料と100倍以上希釈したマウス血漿測定試料を2mM Ca<sup>2+</sup>入りのBufferで調製し、TNX固相化プレートに分注して25℃で3時間incubationした。その後Anti-c-myc-HRP (Miltenyi Biotech) を25℃で1時間反応させ、TMB One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories) を基質として用い発色反応を行い、1N-Sulfuric acid (Showa Chemical) で反応停止後、マイクロプレートリーダーにて450 nmの吸光度を測定した。マウス血漿中濃度は検量線の吸光度から解

50

析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて算出した。

【0393】

この方法で測定した静脈内投与後のノーマルマウスにおける血漿中可溶性ヒトCD4濃度推移を図21に示した。

【0394】

結果、可溶性ヒトCD4単独は非常に早い消失を示したのに対して、可溶性ヒトCD4とCa依存的な結合が無い通常の抗体であるTNX355-IgG1を同時に投与した場合は、可溶性ヒトCD4の消失を大幅に遅くした。それに対して、可溶性ヒトCD4とCa依存的な結合を有するQ425-IgG1あるいはQ425L9-IgG1を同時に投与した場合は、可溶性ヒトCD4の消失を大幅に加速した。TNX355-IgG1を同時に投与した場合と比較して、Q425-IgG1あるいはQ425L9-IgG1を同時に投与した場合は、可溶性ヒトCD4の消失を促進することが出来た。これよりカルシウム依存的結合抗体が血漿中からの抗原の消失を達成できることがIL-6RのみならずヒトCD4においても確認された。

10

【0395】

〔実施例20〕カルシウム依存的にヒトIgAに結合する抗体

(20-1) ヒトIgA (hIgA) の調製

抗原であるヒトIgAの組み換えヒトIgA (以下hIgA) は以下のように調製した。H(WT)-IgA1 (配列番号: 83) とL(WT) (配列番号: 14) とを含むhIgAを発現させて、当業者公知の方法によってイオン交換クロマトグラフィーおよびゲルろ過クロマトグラフィーを用いて精製した。

20

【0396】

(20-2) ヒトIgAに結合する抗体の発現と精製

GA1-IgG1 (重鎖配列番号: 84、軽鎖配列番号: 85)、GA2-IgG1 (重鎖配列番号: 86、軽鎖配列番号: 87)、GA3-IgG1 (重鎖配列番号: 88、軽鎖配列番号: 89) およびGA4-IgG1 (重鎖配列番号: 90、軽鎖配列番号: 91) はヒトIgAに結合する抗体である。さらに、実施例6および実施例7と同様に、血漿中からの抗原 (hIgA) の消失をさらに増大させるために、GA2-IgG1に対してマウスFcRnに対するpH7.4における結合を増強するためにN434Wのアミノ酸置換を導入したGA2-N434W (重鎖配列番号: 92、軽鎖配列番号: 87) を作製した。GA1-IgG1 (重鎖配列番号: 84、軽鎖配列番号: 85)、GA2-IgG1 (重鎖配列番号: 86、軽鎖配列番号: 87)、GA3-IgG1 (重鎖配列番号: 88、軽鎖配列番号: 89)、GA4-IgG1 (重鎖配列番号: 90、軽鎖配列番号: 91) およびGA2-N434W (重鎖配列番号: 92、軽鎖配列番号: 87) をコードするDNA配列が動物発現用プラスミドに当該業者公知の方法で組み込まれた。抗体の発現は以下の方法を用いて行った。ヒト胎児腎細胞由来FreeStyle 293-F株 (Invitrogen) をFreeStyle 293 Expression Medium 培地 (Invitrogen) へ懸濁し、 $1.33 \times 10^6$  個/mLの細胞密度で6well plateの各ウェルへ3 mLずつ蒔きこみ、リポフェクション法により調製したプラスミドを細胞へ導入した。CO<sub>2</sub> インキュベーター (37 °C、8%CO<sub>2</sub>、90 rpm) で4日間培養を行い、得られた培養上清から、rProtein A Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences) を用いて当業者公知の方法で抗体を精製した。精製抗体濃度は、分光光度計を用いて280 nmでの吸光度を測定した。得られた値からPACE法により算出された吸光係数を用いて抗体濃度を算出した (Protein Science 1995 ; 4 : 2411-2423)。

30

40

【0397】

(20-3) 取得された抗体のヒトIgAに対するCa依存的結合能評価

取得された抗体を、Biacore T200 (GE Healthcare) を用いてヒトIgA結合活性 (解離定数K<sub>D</sub> (M)) に関して評価した。ランニングバッファーとして3 μMもしくは1.2 mM CaCl<sub>2</sub> を含有する0.05% tween20, 20 mmol/l ACES, 150 mmol/l NaCl (pH7.4およびpH5.8)、0.1 μMもしくは10 mM CaCl<sub>2</sub> を含有する0.05% tween20, 20 mmol/l ACES, 150 mmol/l NaCl、pH8.0を用いて測定を行った。

【0398】

Sensor chip CM5 (GE Healthcare) 上にアミノカップリング法で組換え型プロテインA/G

50

(Thermo Scientific) を適当量固定化した後、抗体を結合させた。アナライトとして適切な濃度のhIgA ( ( 2 0 - 1 ) に記載 ) をインジェクトし、センサーチップ上の抗体と相互作用させた。その後、10 mmol/L Glycine-HCl, pH1.5をインジェクトし、センサーチップを再生した。測定を37 °Cで行った。測定結果をBiacore T200 Evaluation Software (GE Healthcare) を用い、カーブフィッティングによる解析および平衡値解析により、解離定数 $K_D$  (M)を算出した。その結果を表23に示す。また、得られたセンサーグラムを図22に示した。GA2-IgG1、GA3-IgG1、GA4-IgG1は $Ca^{2+}$ 濃度が1.2 mMにおいてはヒトIgAに強く結合するが、 $Ca^{2+}$ 濃度が3  $\mu$ MにおいてはヒトIgAに弱く結合することが明らかに示された。

【 0 3 9 9 】

10

【表23】

抗体名	条件	Fit	ka	kd	KD
GA1-IgG1	pH8.0, 10 mM Ca	1:1binding model	1.10E+06	2.40E-01	2.20E-07
	pH8.0, 0.1 $\mu$ M Ca	1:1binding model	1.20E+06	1.20E-01	1.00E-07
	pH7.4, 1.2 mM Ca	1:1binding model	5.70E+05	8.40E-02	1.50E-07
	pH7.4, 3 $\mu$ M Ca	1:1binding model	6.40E+05	1.20E-01	1.90E-07
	pH5.8, 1.2 mM Ca	1:1binding model	6.80E+05	9.90E-02	1.40E-07
	pH5.8, 3 $\mu$ M Ca	1:1binding model	7.10E+05	1.10E-01	1.50E-07
GA2-IgG1	pH7.4, 1.2 mM Ca	1:1binding model	4.00E+05	1.60E-02	3.90E-08
	pH7.4, 3 $\mu$ M Ca	Steady State Affinity	-	-	6.70E-06
	pH5.8, 1.2 mM Ca	Steady State Affinity	-	-	4.00E-06
	pH5.8, 3 $\mu$ M Ca	Steady State Affinity	-	-	5.00E-06
GA3-IgG1	pH7.4, 1.2 mM Ca	1:1binding model	4.30E+05	3.30E-02	7.90E-08
	pH7.4, 3 $\mu$ M Ca	Steady State Affinity	-	-	-
	pH5.8, 1.2 mM Ca	1:1binding model	4.40E+05	3.50E-02	8.10E-08
	pH5.8, 3 $\mu$ M Ca	Steady State Affinity	-	-	1.10E-06
GA4-IgG1	pH7.4, 1.2 mM Ca	Steady State Affinity	-	-	4.20E-07
	pH7.4, 3 $\mu$ M Ca	Steady State Affinity	-	-	8.90E-07
	pH5.8, 1.2 mM Ca	Steady State Affinity	-	-	1.10E-06
	pH5.8, 3 $\mu$ M Ca	Steady State Affinity	-	-	1.50E-06

20

30

【 0 4 0 0 】

〔実施例21〕 ノーマルマウスを用いたCa依存性ヒトIgA結合抗体の抗原の血漿中滞留性への影響評価

(21-1) ノーマルマウスを用いたin vivo試験

ノーマルマウス (C57BL/6J mouse, Charles River Japan) にヒトIgA (ヒトIgA: 実施例20にて作製) を単独投与もしくはヒトIgAおよび抗ヒトIgA抗体を同時投与した後のヒトIgAおよび抗ヒトIgA抗体の体内動態を評価した。ヒトIgA溶液 (80  $\mu$ g/mL)、もしくはヒトIgAおよび抗ヒトIgA抗体の混合溶液を尾静脈に10 mL/kgで単回投与した。抗ヒトIgA抗体としては、上述のGA1-IgG1、GA2-IgG1、GA3-IgG1およびGA2-N434Wを使用した。

40

【 0 4 0 1 】

混合溶液中のヒトIgA濃度は全て80  $\mu$ g/mLであるが、抗ヒトIgA抗体濃度は各抗体のhIgAへのアフィニティーに応じて抗体毎に異なり、GA1-IgG1は100 mg/mL、GA2-IgG1は28.9 mg/mL、GA3-IgG1は53.8 mg/mL、GA2-N434Wは1 mg/mLとした。このとき、ヒトIgAに対して抗ヒトIgA抗体は十分量過剰に存在することから、ヒトIgAは大部分が抗体に結合していると考えられる。投与後5分間、7時間、1日間、2日間、3日間、7日間で採血を行った。採取した血液は直ちに4,000 rpmで15分間遠心分離し、血漿を得た。分離した血漿は、測定を実施するまで-20 °C以下に設定された冷凍庫に保存した。

50

## 【 0 4 0 2 】

## ( 2 1 - 2 ) ELISA法によるノーマルマウス血漿中の抗ヒトIgA抗体濃度測定

マウス血漿中の抗ヒトIgA抗体濃度はELISA法にて測定した。まずAnti-Human IgG(  $\gamma$ -chain specific) F(ab')<sub>2</sub> Fragment of Antibody (SIGMA) をNunc-Immuno Plate, MaxiSoup (Nalge nunc International) に分注し、4℃で1晩静置しAnti-Human IgG固相化プレートを作成した。血漿中濃度として0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125、0.01563、0.07813  $\mu$ g/mLの検量線試料と100倍以上希釈したマウス血漿測定試料を調製し、Anti-Human IgG固相化プレートに分注して25℃で1時間インキュベーションした。その後Goat Anti-Human IgG (  $\gamma$ -chain specific) Biotin (BIOT) Conjugate (Southern Biotechnology Associates Inc.) を25℃で1時間反応させ、さらにStreptavidin-PolyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies) を25℃で1時間反応させ、TMB One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories) を基質として用い発色反応を行い、1N-Sulfuric acid (Showa Chemical) で反応停止後、マイクロプレートリーダーにて450 nmの吸光度を測定した。マウス血漿中濃度は検量線の吸光度から解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて算出した。この方法で測定した静脈内投与後のノーマルマウスにおけるGA1-IgG1、GA2-IgG1、GA3-IgG1およびGA2-N434Wの血漿中抗体濃度推移を図2-3に示した。

10

## 【 0 4 0 3 】

## ( 2 1 - 3 ) ELISA法による血漿中ヒトIgA濃度測定

マウスの血漿中ヒトIgA濃度はELISA法にて測定した。まずGoat anti-Human IgA Antibody (BETHYL) をNunc-Immuno Plate, MaxiSoup (Nalge nunc International) に分注し、4℃で1晩静置しAnti-Human IgA固相化プレートを作成した。血漿中濃度として0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625  $\mu$ g/mLに調整したヒトIgA検量線試料および100倍以上希釈したマウス血漿測定試料を調製し、これら検量線試料および血漿測定試料100  $\mu$ Lに500 ng/mLのhsIL-6Rを200  $\mu$ L加え、室温で1時間静置した。その後Anti-Human IgA固相化プレートに分注しさらに室温で1時間静置した。その後Biotinylated Anti-human IL-6 R Antibody (R&D) を室温で1時間反応させ、さらにStreptavidin-PolyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies) を室温で1時間反応させ、TMB One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories) を基質として用い発色反応を行い、1N-Sulfuric acid (Showa Chemical) で反応停止後、マイクロプレートリーダーにて450 nmの吸光度を測定した。マウス血漿中濃度は検量線の吸光度から解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて算出した。この方法で測定した静脈内投与後のノーマルマウスにおける血漿中ヒトIgA濃度推移を図2-4に示した。

20

30

## 【 0 4 0 4 】

結果、ヒトIgA単独の消失に対して、ヒトIgA とCa依存的な結合が弱い(依存性の度合いが小さい)抗体であるGA1-IgG1を同時に投与した場合は、ヒトIgAの消失を遅くした。それに対して、ヒトIgA と100倍以上のCa依存的な結合を有するGA2-IgG1を同時に投与した場合は、ヒトIgA の消失を大幅に加速した。図2-3に示された血漿中抗体濃度、図2-4に示された血漿中ヒトIgA濃度および表2-3に示された各抗体のKD値から、血漿中に存在する非結合型のヒトIgA濃度を求めた。その結果を図2-5に示した。図2-5に示されたようにGA1-IgG1投与群の非結合型の抗原(ヒトIgA)の濃度と比較して、GA2-IgG1またはGA3-IgG1投与群の非結合型の抗原(ヒトIgA)の濃度は低いことから、カルシウム依存的結合抗体を抗原の消失を加速することによって、非結合型の抗原(ヒトIgA)を低下できることが示された。さらに、pH7.4におけるFcRn結合を増強したGA2-N434Wは抗原の消失をGA2-IgG1よりも早め、投与7時間後には検出限界以下となった。

40

## 【 0 4 0 5 】

以上からカルシウム依存的結合抗体が、pHまたはカルシウム依存的に結合しない通常の抗体と比較して、血漿中からの抗原の消失を加速可能であることが確認され、この現象は実施例5で示されたヒトIL6Rや実施例19で示されたヒトCD4だけでなくヒトIgAでも起こることが明らかになった。また、実施例6および実施例7のヒトIL6Rと同様に、カルシウム依存的結合抗体に対してpH7.4におけるFcRn結合を増強することによってさらに抗原の

50

消失を加速できることがヒトIgAにおいても確認された。

【0406】

参考実施例31に示すとおり、pH依存的にヒトIL-6受容体に結合するFv4-IgG1は、非pH依存的にヒトIL-6受容体に結合するH54/L28-IgG1と比較してヒトIL-6受容体の消失を加速することが出来ているものの、ヒトIL-6受容体単独より消失を加速することはできていない。ヒトIL-6受容体単独より消失を加速するためには、中性領域におけるFcRnへの結合を増強したFv4-IgG1-v1あるいはFv4-IgG1-v2を用いる必要がある。

【0407】

一方、驚くことに、Ca依存的にヒトIgAに結合するGA2-IgG1は、中性領域におけるFcRnに対する結合を増強していない天然型IgG1の定常領域を含むにも関わらず、ヒトIgAの消失をヒトIgA単独より加速することが見出された。このようなことがGA2-IgG1において起こる理由として以下のメカニズムが考えられた。

10

【0408】

ヒトIL-6受容体の単量体抗原の場合、2価の抗体に対して抗原が2つ結合し、抗原抗体3分子からなる抗原抗体複合体を形成する。一方、ヒトIgAが二量体抗原であり、抗体も2価であることから、両者の抗原抗体複合体は、抗原抗体4分子以上からなる抗原抗体複合体（免疫複合体）を形成すると考えられる。

【0409】

多量体抗原に対する天然IgG1型通常抗体が大きな免疫複合体を形成する場合、その免疫複合体はFcγR、FcRn、補体レセプター等に対して多価のFc領域を介してavidityで結合することが可能であるため、これらのレセプターを発現する細胞に取り込まれるのに対して、pH/Ca依存性を有さない単量体抗原に対する通常抗体は、天然IgG1型のレセプターに対する親和性が十分ではないため細胞に取り込まれる効率が低い。本来FcRnは細胞内に取り込まれた抗体をエンドソームから血漿中にリサイクルする役目を持っているが、このようなFcRnに対して多価で結合可能な大きな免疫複合体は、FcRnを介してエンドソームからライソソームに移行し分解されることが知られている。すなわち、図26に示すように、多量体抗原に対して大きな免疫複合体を形成する通常抗体は、その抗原の消失を加速することは可能だが、エンドソーム内でも抗原が抗体から解離することが無いことから、抗原と同時に抗体も消失してしまうため、抗体1分子あたりの抗原を消失させる効率は悪い。すなわち、pH/Ca依存性を有さない単量体抗原に対する通常抗体は抗原の消失を加速することは可能だが、その効率は悪いと考えられる。

20

30

【0410】

これに対して、多量体抗原に対する天然型IgG1の定常領域を含むpH/Ca依存性抗体が大きな免疫複合体を形成する場合は、図27に示すように、その免疫複合体はFcγR、FcRn、補体レセプター等に対して多価のFc領域を介してavidityで結合し、これらのレセプターを発現する細胞に取り込まれる。その後、エンドソーム内で抗原がpH/Ca依存性抗体から解離することで、免疫複合体の形成が解消される。抗原はFcRnに結合することができないため、ライソソームに移行し分解されるのに対して、抗体は免疫複合体を形成していないためFcRnによって血漿中にリサイクルされると考えられる。

【0411】

すなわち、多量体抗原に対する天然IgG1型の定常領域を含むpH/Ca依存性抗体が大きな免疫複合体を形成して、avidityでFcγR、FcRn、補体レセプター等に結合することが出来れば、抗原の消失のみを選択的に大幅に加速することが出来ると考えられる。そのようなことがヒトIgAに対するGA2-IgG1においても起こっていると考えられた。参考実施例31に示すような天然型IgG1に対してアミノ酸置換で中性領域におけるFcRnの結合を増強する方法を用いることなく、多量体抗原の消失を大幅に加速する方法として有用であると考えられた。

40

【0412】

このような作用を発揮するためには、抗原抗体が大きな免疫複合体を形成し、IgG1でもavidityでFcγR/FcRnに強く結合する必要があると考えられる。抗原が二量体以上の抗原で

50

あれば、大きな免疫複合体を形成し、avidityで上述のレセプターに結合するようなpH/Ca依存性抗体をスクリーニングすることが出来れば、アミノ酸置換することなく天然型IgG1の定常領域を用いることで効率的に抗原の消失を加速することが可能である。また、一般には抗原と抗体が大きな免疫複合体を形成するためには、抗原が多量体抗原（例えばIgA、IgE等のimmunoglobulinやTNF、CD154等のTNFスーパーファミリー）である必要があると考えられるが、単量体抗原であってもその単量体抗原に存在する2つ以上のエピトープを認識する適切な2種類以上のpH/Ca依存性抗体の混合物を用いることでも大きな免疫複合体を形成することが可能であると考えられる。また、単量体抗原に存在する2つ以上のエピトープを認識する適切なmultispecific pH/Ca依存性抗体（例えば、図28に示すようなエピトープAを認識する右腕とエピトープBを認識する左腕を含む天然型IgGの定常領域を含むbispecific抗体）を用いることでも大きな免疫複合体を形成することが可能であると考えられる。すなわち、単量体抗原に対しても、適切なpH/Ca依存性抗体をスクリーニングすることができれば、天然型IgG1の定常領域を含む抗体の混合物やmultispecificな天然型IgG1の定常領域を含む抗体を用いることで、そのアミノ酸が置換された変異型IgG1を用いることなく効率的に抗原の消失を加速することも可能であると考えられる

10

20

30

40

50

#### 【0413】

〔実施例22〕カルシウム依存的にヒトグリピカン3に結合する抗体

##### （22-1）ヒトグリピカン3（GPC3）の調製

抗原として用いる組み換えヒトグリピカン3（以下GPC3）を以下のように調製した。ヒトグリピカン3の膜貫通領域を含まないアミノ酸配列に6残基のヒスチジンが連結した配列（配列番号：93）を発現するプラスミドが定常的に導入されているCHO細胞を培養し、培養上清を回収した。得られた培養上清を、イオン交換クロマトグラフィー精製後、Hisタグを用いたアフィニティー精製およびゲルろ過クロマトグラフィー精製を行って、GPC3を得た。

#### 【0414】

##### （22-2）ヒトGPC3に結合する抗体の発現と精製

抗ヒトグリピカン3抗体である、CSCM-01\_005（重鎖配列：94、軽鎖配列：95）、CSM-01\_009（重鎖配列：96、軽鎖配列：97）、CSCM-01\_015（重鎖配列：98、軽鎖配列：99）、CSCM-01\_023（重鎖配列：100、軽鎖配列：101）およびGC-IgG1（重鎖配列：102、軽鎖配列：103）がそれぞれ動物発現用プラスミドへ挿入された。抗体の発現は以下の方法を用いて行った。ヒト胎児腎細胞由来FreeStyle 293-F株（Invitrogen）をFreeStyle 293 Expression Medium培地（Invitrogen）へ懸濁し、 $1.33 \times 10^6$ 個/mLの細胞密度で6well plateの各ウェルへ3 mLずつ蒔きこみ、リポフェクション法により調製したプラスミドを細胞へ導入した。CO<sub>2</sub>インキュベーター（37℃、8%CO<sub>2</sub>、90 rpm）で4日間培養を行い、得られた培養上清から、rProtein A Sepharose™ Fast Flow（Amersham Biosciences）を用いて当業者公知の方法で抗体を精製した。精製抗体濃度は、分光光度計を用いて280 nmでの吸光度を測定した。得られた値からPACE法により算出された吸光係数を用いて抗体濃度を算出した（Protein Science 1995；4：2411-2423）。なお、GC-IgG1抗体については、GC-IgG1抗体が定常的に発現するCHO細胞培養上清から同様の方法で抗体を精製し、濃度を算出した。

#### 【0415】

##### （22-3）取得された抗体のヒトGPC3に対するCa依存的結合能評価

取得された抗体が以下の手順でELISAに供された。StreptaWell 96マイクロタイタープレート（Roche）がビオチン標識抗原を含む100 μLのPBSにて一晚コートされた。該当プレートの各ウェルをACES buffer（10 mM ACES, 150 mM NaCl, 100 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.05% Tween20, pH7.4）にて洗浄することによって抗原が除かれた後、当該ウェルが2%BSAを含むACES Buffer 250 μLにて1時間以上ブロッキングされた。2%BSAを含むACES Bufferが除かれた各ウェルに、あらかじめ10 μg/mLから4倍ずつ希釈を行った精製IgG各100 μLが加えられた当該プレートを一時間静置することによって、IgGを各ウェルに存在する抗原に結合させた。ACES Bufferにて洗浄された各ウェルに、「10 mM ACES, 150 mM NaCl, 1.2 mM CaCl<sub>2</sub>, p

H7.4」、 $10\text{ mM ACES}$ 、 $150\text{ mM NaCl}$ 、 $3\text{ }\mu\text{M CaCl}_2$ 、 $\text{pH}7.4$ 」、 $10\text{ mM ACES}$ 、 $150\text{ mM NaCl}$ 、 $1.2\text{ mM CaCl}_2$ 、 $\text{pH}5.8$ 」もしくは $10\text{ mM ACES}$ 、 $150\text{ mM NaCl}$ 、 $3\text{ }\mu\text{M CaCl}_2$ 、 $\text{pH}5.8$ 」が加えられ、当該プレートは37 で30分間静置しインキュベートされた。 $\text{ACES Buffer}$ にて洗浄された後に、 $2\%$ BSAを含む $\text{ACES Buffer}$ 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を1時間インキュベートさせた。 $\text{ACES Buffer}$ 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、 $450\text{ nm}$ の吸光度によって当該発色が測定された。

#### 【0416】

測定された結果を図29に示した。GC-IgG1ではカルシウムイオンの濃度に依らず吸光度が同じであるのに対して、CSCM-01\_005、CSCM-01\_009、CSCM-01\_015およびCSCM-01\_023は $1.2\text{ mM}$ カルシウムイオン濃度（高カルシウムイオン濃度）における吸光度と比較して、 $3\text{ }\mu\text{M}$ カルシウムイオン濃度（低カルシウムイオン濃度）における吸光度は、顕著に低い結果となった。この結果から、CSCM-01\_005、CSCM-01\_009、CSCM-01\_015およびCSCM-01\_023はカルシウムイオンの濃度によって抗原との結合が変化する性質を有することが示され、ヒトグリピカン3に対してもカルシウム依存的抗体が取得できることが示された。これらのカルシウム依存的抗ヒトグリピカン3抗体は、通常の抗ヒトグリピカン3抗体と比較して、上述の実施例におけるヒトIL-6R、ヒトCD4、ヒトIgAと同様に、ヒトグリピカン3の消失を加速することが出来ると考えられた。さらにこれらのカルシウム依存的抗ヒト抗グリピカン3抗体に対して、 $\text{pH}7.4$ におけるFcRnに対する結合を増強することにより、さらにヒトグリピカン3の消失を加速することが出来ると考えられた。

#### 【0417】

〔実施例23〕カルシウム依存的にIgEに結合する抗体

##### （23-1）ビオチン化ヒトIgEの調製

抗原であるヒトIgEは以下のように調製された。IgE-H（配列番号：104、C末端にビオチン付加配列が連結されている）およびL(WT)（配列番号：14）をコードするDNA配列を挿入した動物細胞発現ベクターを作製し、当該発現ベクターおよびFreeStyle293（Invitrogen）を用いて培養上清中にビオチン付加配列がC末端に結合した全長のヒトIgE蛋白質を発現させた。得られた培養上清からイオン交換クロマトグラフィー、アビジンを用いたアフィニティー精製さらにゲルろ過クロマトグラフィー精製を行い、ビオチン化ヒトIgEを得た。

#### 【0418】

##### （23-2）ヒトIgEに結合する抗体の発現と精製

GEB0100（重鎖配列番号：105、軽鎖配列番号：106）、GEB0220（重鎖配列番号：107、軽鎖配列番号：108）、GEB0230（重鎖配列番号：109、軽鎖配列番号：110）およびXolair（重鎖配列番号：111、軽鎖配列番号：112）はヒトIgEに結合する抗体である。GEB0100（重鎖配列番号：105、軽鎖配列番号：106）、GEB0220（重鎖配列番号：107、軽鎖配列番号：108）、GEB0230（重鎖配列番号：109、軽鎖配列番号：110）およびXolair（一般名Omalizumab）（重鎖配列番号：111、軽鎖配列番号：112）がそれぞれ動物発現用プラスミドに当該業者公知の方法で組み込まれた。抗体の発現は以下の方法を用いて行った。ヒト胎児腎細胞由来FreeStyle 293-F株（Invitrogen）へリポフェクション法により調製したプラスミドを細胞へ導入した。 $\text{CO}_2$ インキュベーター（ $37$ 、 $8\%\text{CO}_2$ 、 $90\text{ rpm}$ ）で4から7日間培養を行い、得られた培養上清から、rProtein A Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow（Amersham Biosciences）を用いて当業者公知の方法で抗体を精製した。精製抗体濃度は、分光光度計を用いて $280\text{ nm}$ での吸光度を測定した。得られた値からPACE法により算出された吸光係数を用いて抗体濃度を算出した（Protein Science 1995；4：2411-2423）。

#### 【0419】

##### （23-3）取得された抗体のヒトIgEに対するCa依存的結合能の評価

取得された抗体のヒトIgEに対するCa依存的結合能の評価はELISA法を用いて行われた。具体的には、NUNCイムノ384ウェルプレートマキシソープ（Thermo fisher scientific社

製464718)に1 $\mu$ g/mLのGoat anti-rabbit IgG-Fc polyclonal antibody (Bethyl laboratory社製 A120-111A)または1 $\mu$ g/mLのGoat anti-human IgG-Fc polyclonal antibody (ICN biomedical社製 55071)を40 $\mu$ L加えた。室温で1時間インキュベートした後、溶液を取り除き、20%に希釈したBlocking One試薬(ナカライテスク社製03953-95)を50 $\mu$ L加えた。室温で1時間インキュベートした後、溶液を取り除き、1.2 mMの塩化カルシウムを含むトリス緩衝溶液で希釈した精製抗体を40 $\mu$ L加えた。4 で一晩インキュベートした後、1.2 mMの塩化カルシウムと0.05% (w/v)のTween-20を含むトリス緩衝溶液80 $\mu$ Lで3回洗浄し、1.2 mMの塩化カルシウムを含むトリス緩衝溶液で500ng/mLに希釈したビオチン化ヒトIgE ((23-1)で作製)を40 $\mu$ L加えた。室温で1時間インキュベートした後、1.2 mMの塩化カルシウムと0.05% (w/v)のTween-20を含むトリス緩衝溶液80 $\mu$ Lで3回洗浄し、2 mMの塩化カルシウムを含むACES緩衝溶液(pH7.4)または3 $\mu$ Mの塩化カルシウムを含むACES緩衝溶液(pH7.4)を80 $\mu$ L加え、ただちに溶液を取り除いた後、再び2 mMの塩化カルシウムを含むACES緩衝溶液(pH7.4)または3 $\mu$ Mの塩化カルシウムを含むACES緩衝溶液(pH7.4)を80 $\mu$ L加えた。37 で1時間インキュベートした後、1.2 mMの塩化カルシウムと0.05% (w/v)のTween-20を含むトリス緩衝溶液80 $\mu$ Lで3回洗浄し、1.2 mMの塩化カルシウムを含むトリス緩衝溶液で25 ng/mLに希釈したHRP標識ストレプトアビジン(Thermo fisher scientific社製21132)を40 $\mu$ L加えた。室温で1時間インキュベートした後、1.2 mMの塩化カルシウムと0.05% (w/v)のTween-20を含むトリス緩衝溶液80 $\mu$ Lで3回洗浄し、発色基質(KPL社製50-66-06: ABTS peroxidase substrate system 1 component)を40 $\mu$ L加える。室温で15分または30分インキュベートした後、405nmの吸光度を測定した(Molecular devices社製SpectraMax Plus384)。

#### 【0420】

測定結果を図30に示した。Xolairではカルシウムイオンの濃度に依らず吸光度が同じであるのに対して、GEB0100、GEB0220およびGEB0230は2 mMカルシウムイオン濃度(高カルシウムイオン濃度)における吸光度と比較して、3 $\mu$ Mカルシウムイオン濃度(低カルシウムイオン濃度)における吸光度は、顕著に低い結果となった。この結果から、GEB0100、GEB0220およびGEB0230はカルシウムイオンの濃度によって抗原との結合が変化する性質を有することが示された。上記の現象は、ヒトIgEに対してもカルシウム依存的抗体が取得できることを示している。これらのカルシウム依存的抗ヒトIgE抗体は、Xolairなどの通常の抗ヒトIgE抗体と比較して、上述の実施例におけるヒトIL-6R、ヒトCD4、ヒトIgAと同様に、ヒトIgEの消失を加速することが出来ると考えられた。さらにこれらのカルシウム依存的抗ヒトIgE抗体に対して、pH7.4におけるFcRnに対する結合を増強することにより、さらにヒトIgEの消失を加速することが出来ると考えられた。

#### 【0421】

〔参考例1〕可溶性ヒトIL-6レセプター(hsIL-6R)の調製

抗原であるヒトIL-6レセプターの組み換えヒトIL-6レセプターは以下のように調製した。J. Immunol. 152, 4958-4968 (1994)で報告されているN末端側1番目から357番目のアミノ酸配列からなる可溶性ヒトIL-6レセプター(以下、hsIL-6R)のCHO定常発現株を当業者公知の方法で構築し、培養し、hsIL-6Rを発現させた。得られた培養上清から、Blue Sepharose 6 FFカラムクロマトグラフィー、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーの2工程によりhsIL-6Rを精製した。最終工程においてメインピークとして溶出した画分を最終精製品とした。

#### 【0422】

〔参考例2〕ヒトFcRnの調製

FcRnは、FcRnと $\alpha$ 2-ミクログロブリンとの複合体である。公表されているヒトFcRn遺伝子配列に基づいてオリゴDNAプライマーを調製した(J Exp Med. 1994 Dec 1; 180(6): 2377-81)。遺伝子全体をコードするDNA断片は、調製したプライマーおよび鋳型としてヒトcDNA(Human Placenta Marathon-Ready cDNA, Clontech)を用いてPCRによって調製した。得られたDNA断片を鋳型として用い、シグナル領域(Met1~Leu290)を含有する細胞外ドメインをコードするDNA断片をPCRによって増幅し、哺乳動物細胞発現ベクターに挿入し

た。同様に、公表されているヒト 2-ミクログロブリン遺伝子配列 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (26): 16899-16903 (2002)) に基づいてオリゴDNAプライマーを調製した。遺伝子全体をコードするDNA断片は、調製したプライマーおよび鋳型としてヒトcDNA (Human Placenta Marathon-Ready cDNA, Clontech) を用いてPCRによって調製した。得られたDNA断片を鋳型として用い、シグナル領域 (Met1~Met119) を含有するタンパク質全体をコードするDNA断片をPCRによって増幅し、哺乳動物細胞発現ベクターに挿入した。

#### 【0423】

可溶性ヒトFcRnを以下の手順により発現させた。ヒトFcRn (配列番号: 17) および2-ミクログロブリン (配列番号: 18) を発現させるために構築したプラスミドを、PEI (Polyscience) を用いたリポフェクション法によって、ヒト胎児腎癌由来細胞株HEK293H (Invitrogen) の細胞に導入した。得られた培養上清を回収して、IgG Sepharose 6 Fast Flow (Amersham Biosciences) を用いて精製した後にHiTrap Q HP (GE Healthcare) (J Immunol. 2002 Nov 1; 169(9): 5171-80) を用いることによってFcRnをさらに精製した。

#### 【0424】

[参考例3] pH依存的抗原結合抗体の抗原消失加速効果の向上検討 (in vivo試験)

(3-1) 中性条件下におけるFcRnへの結合を有するpH依存的ヒトIL-6受容体結合抗体の調製

VH3-IgG1 (配列番号: 19) とVL3-CK (配列番号: 20) とを含むFv4-IgG1に対して、中性条件下 (pH7.4) におけるFcRnに対する結合を増加させる変異を導入した。具体的にはIgG1の重鎖定常領域に対して、EUナンバリングにおける252番目をMetからTyrに、254番目をSerからThrに、256番目をThrからGluに置換したVH3-IgG1-v1 (配列番号: 21)、および、IgG1の重鎖定常領域に対して、EUナンバリングにおける434番目をAsnからTrpに置換したVH3-IgG1-v2 (配列番号: 22) を調製した。アミノ酸置換の導入は、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) またはIn-Fusion HD Cloning Kit (Clontech) を用いて、添付説明書記載の方法で変異体を作製し、得られたプラスミド断片を動物細胞発現ベクターに挿入し、目的のH鎖発現ベクターおよびL鎖発現ベクターを作製した。得られた発現ベクターの塩基配列は当業者公知の方法で決定した。

#### 【0425】

H54 (配列番号: 5) とL28 (配列番号: 6) とを含むH54/L28-IgG1、VH3-IgG1 (配列番号: 19) とVL3-CK (配列番号: 20) とを含むFv4-IgG1、VH3-IgG1-v1 (配列番号: 21) とVL3-CK (配列番号: 20) とを含むFv4-IgG1-v1、および、VH3-IgG1-v2 (配列番号: 22) とVL3-CK (配列番号: 20) とを含むFv4-IgG1-v2の発現及び精製は、以下の方法を用いて行われた。製造元の提供するプロトコールに記載のようにFreestyleHEK293 (Invitrogen) により、またはHEK293H 株 (Invitrogen) により抗体を発現させた。ヒト胎児腎癌細胞由来HEK293H株 (Invitrogen) を、10%ウシ胎仔血清 (Invitrogen) を含むDMEM培地 (Invitrogen) へ懸濁し、 $5 \sim 6 \times 10^5$  個/mLの細胞密度で接着細胞用ディッシュ (直径10 cm, CORNING) の各ディッシュへ10 mLずつ蒔きこみCO<sub>2</sub>インキュベーター (37 °C、5% CO<sub>2</sub>) 内で一昼夜培養した後に、培地を吸引除去し、CHO-S-SFM-II (Invitrogen) 培地6.9 mLを添加した。調製したプラスミドをlipofection法により細胞へ導入した。得られた培養上清を回収した後、遠心分離 (約2000 g、5分間、室温) して細胞を除去し、さらに0.22 μmフィルターMILLEX (登録商標) -GV (Millipore) を通して滅菌して培養上清を得た。得られた培養上清にrProtein A Sepharose (商標) Fast Flow (Amersham Biosciences) を用いて当業者公知の方法で精製した。精製抗体濃度は、分光光度計を用いて280 nmでの吸光度を測定した。得られた値からProtein Science 1995; 4: 2411-2423に記載された方法により算出された吸光係数を用いて抗体濃度を算出した。当業者公知の方法によって発現させて精製した。

#### 【0426】

(3-2) ヒトFcRnトランスジェニックマウスおよび正常マウスを用いたin vivo試験

ヒトFcRnトランスジェニックマウス (B6.mFcRn-/- .hFcRn Tg 系統276 +/+マウス、Jack

son Laboratories, Methods Mol Biol. 2010;602:93-104.) および正常マウス (C57BL/6J マウス、Charles River Japan) にhsIL-6R (可溶性ヒトIL-6受容体: 参考例1にて調製) を単独投与もしくはhsIL-6Rおよび抗ヒトIL-6受容体抗体を同時投与した後のhsIL-6Rおよび抗ヒトIL-6受容体抗体の生体内における動態を評価した。hsIL-6R溶液(5 µg/mL)もしくはhsIL-6Rおよび抗ヒトIL-6受容体抗体の混合溶液(それぞれ5 µg/mL、0.1 mg/mL)を尾静脈に10 mL/kgで単回投与した。このとき、hsIL-6Rに対して抗ヒトIL-6受容体抗体は十分量過剰に存在することから、hsIL-6Rはほぼ全て抗体に結合していると考えられる。投与15分後、7時間後、1日後、2日後、3日後、4日後、7日後、14日後、21日後、28日後に血液を採取した。採取した血液は直ちに4、15,000 rpmで15分間遠心分離し、血漿を得た。分離した血漿は、測定を実施するまで-20 以下に設定された冷凍庫に保存した。抗ヒトIL-6受容体抗体としては、ヒトFcRnトランスジェニックマウスには上述のH54/L28-IgG1、Fv4-IgG1、および、Fv4-IgG1-v2、正常マウスには上述のH54/L28-IgG1、Fv4-IgG1、Fv4-IgG1-v1、および、Fv4-IgG1-v2を使用した。

10

20

30

40

50

#### 【0427】

##### (3-3) 血漿中抗ヒトIL-6受容体抗体濃度のELISA法による測定

マウス血漿中の抗ヒトIL-6受容体抗体濃度はELISA法にて測定した。まず抗ヒトIgG(鎖特異的)F(ab')<sub>2</sub>抗体断片(Sigma)をNunc-ImmunoPlate, MaxiSorp (Nalge Nunc International)に分注し、4 で一晩静置し抗ヒトIgG固相化プレートを調製した。血漿中濃度として0.8、0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125 µg/mLの検量線試料と100倍以上希釈したマウス血漿測定試料を調製し、これら検量線試料および血漿測定試料100 µLに20 ng/mLのhsIL-6Rを200 µL加え、室温で1時間静置した。その後抗ヒトIgG固相化プレートに分注しさらに室温で1時間静置した。その後ビオチン化抗ヒトIL-6 R抗体(R&D)を室温で1時間反応させ、さらにStreptavidin-PolyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies)を室温で1時間反応させ、TMB One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories)を基質として用い発色反応を行い、1N硫酸(Showa Chemical)で反応停止後、マイクロプレートリーダーにて450 nmの吸光度を測定した。マウス血漿中濃度は検量線の吸光度から解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices)を用いて算出した。この方法で測定した静脈内投与後のヒトFcRnトランスジェニックマウスにおける血漿中抗体濃度推移を図3 1に、正常マウスにおける血漿中抗体濃度推移を図3 3に示した。

#### 【0428】

##### (3-4) 電気化学発光法による血漿中hsIL-6R濃度測定

マウスの血漿中hsIL-6R濃度は電気化学発光法にて測定した。2000、1000、500、250、125、62.5、および31.25 pg/mLの濃度に調整したhsIL-6R検量線試料ならびに50倍以上希釈したマウス血漿測定試料を調製した。試料を、SULFO-TAG NHS Ester (Meso Scale Discovery)でルテニウム化したモノクローナル抗ヒトIL-6R抗体(R&D)、ビオチン化抗ヒトIL-6 R抗体(R&D)、およびWT-IgG1溶液と混合し、37 で一晩反応させた。その際の抗ヒトIL-6受容体抗体として、H(WT)(配列番号: 13)とL(WT)(配列番号: 14)とを含むWT-IgG1の終濃度は試料に含まれる抗ヒトIL-6受容体抗体濃度より過剰の333 µg/mLであり、試料中のほぼ全てのhsIL-6RをWT-IgG1と結合した状態にすることを目的とした。その後、MA400 PR Streptavidin Plate (Meso Scale Discovery)に分注した。さらに室温で1時間反応させ洗浄後、Read Buffer T(x4) (Meso Scale Discovery)を分注し、ただちにSECTOR PR 400 reader (Meso Scale Discovery)で測定を行った。hsIL-6R濃度は検量線のレスポンスから解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices)を用いて算出した。この方法で測定した静脈内投与後のヒトFcRnトランスジェニックマウスにおける血漿中hsIL-6R濃度推移を図3 2に、正常マウスにおける血漿中hsIL-6R濃度推移を図3 4に示した。

#### 【0429】

##### (3-5) 電気化学発光法による血漿中遊離hsIL-6R濃度測定

可溶性ヒトIL-6受容体が血漿中においてどの程度中和されているかを評価するために、マウス血漿中の抗ヒトIL-6受容体抗体によって結合(中和)されていない可溶性ヒトIL-6受容体濃度(遊離hsIL-6R濃度)を電気化学発光法で測定した。10000、5000、2500、1250

、625、312.5、または156.25 pg/mLに調整したhsIL-6R検量線試料及びマウスの血漿試料12 µLを、0.22 µmのフィルターカップ (Millipore) において乾燥させた適量のrProtein A Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) 樹脂に添加することで血漿中に存在する全てのIgG型抗体 (マウスIgG、抗ヒトIL-6受容体抗体および抗ヒトIL-6受容体抗体-可溶性ヒトIL-6受容体複合体) をプロテインAに吸着させた。その後、高速遠心機でスピンドウンし、パス溶液を回収した。パス溶液にはプロテインAに結合した抗ヒトIL-6受容体抗体-可溶性ヒトIL-6受容体複合体は含まれないため、パス溶液中のhsIL-6R濃度を測定することによって、血漿中の遊離hsIL-6R濃度を測定可能である。次にパス溶液を、SULFO-TAG NHS Ester (Meso Scale Discovery) でルテニウム化したモノクローナル抗ヒトIL-6R抗体 (R&D) およびビオチン化抗ヒトIL-6 R抗体 (R&D) と混合し室温で1時間反応させた。その後、MA400 PR Streptavidin Plate (Meso Scale Discovery) に分注した。さらに室温で1時間反応させ洗浄後、Read Buffer T(x4) (Meso Scale Discovery) を分注し、ただちにSECTOR PR 400 reader (Meso Scale Discovery) で測定を行った。hsIL-6R濃度は検量線のレスポンスから解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて算出した。この方法で測定した静脈内投与後の正常マウスにおける血漿中遊離hsIL-6R濃度推移を図35に示した。

10

【0430】

#### (3-6) pH依存的ヒトIL-6受容体結合の効果

H54/L28-IgG1とpH依存的ヒトIL-6受容体結合を有するFv4-IgG1のin vivo試験の結果を比較した。図31および図33に示したとおり、両者の抗体血漿中滞留性はほぼ同等であったが、図32および図34に示すとおり、pH依存的ヒトIL-6受容体結合を有するFv4-IgG1と同時に投与したhsIL-6Rのほうが、H54/L28-IgG1と同時に投与したhsIL-6Rと比較して、hsIL-6Rの消失が早くなっていることが確認された。この傾向はヒトFcRnトランスジェニックマウスと正常マウスの両方で確認され、pH依存的ヒトIL-6受容体結合能を付与することによって4日後の血漿中hsIL-6R濃度はそれぞれ約17倍および約34倍低減できることが見出された。

20

【0431】

#### (3-7) 中性条件下 (pH7.4) におけるFcRnへの結合の効果

天然型ヒトIgG1は中性条件下 (pH7.4) においてヒトFcRnにほとんど結合しない (アフィニティーが極めて弱い) ことが報告されている。天然型ヒトIgG1に対してEUナンバリングにおける434番目をAsnからTrpに置換することによって、中性条件下 (pH7.4) におけるヒトFcRnに対する結合が増加することが報告されている (J Immunol. 2009;182(12):7663-71.)。Fv4-IgG1、および、Fv4-IgG1に対してこのアミノ酸置換を導入したFv4-IgG1-v2のヒトFcRnトランスジェニックマウスにおけるin vivo試験の結果を比較した。図31に示したとおり、両者の抗体血漿中滞留性はほぼ同等であったが、図32に示すとおり、中性条件下 (pH7.4) におけるヒトFcRnに対する結合が増加したFv4-IgG1-v2と同時に投与したhsIL-6Rのほうが、Fv4-IgG1と同時に投与したhsIL-6Rと比較して、hsIL-6Rの消失が早くなっていることが確認された。中性条件下 (pH7.4) におけるヒトFcRnに対する結合を付与することによって4日後の血漿中hsIL-6R濃度は約4倍低減できることが見出された。

30

【0432】

ヒトFcRnとマウスFcRnのホモロジーからEUナンバリングにおける434番目のAsnからTrpへの置換は、中性条件下 (pH7.4) におけるマウスFcRnへの結合も増加させると考えられる。また、EUナンバリングにおける252番目をMetからTyrに、254番目をSerからThrに、256番目をThrからGluに置換することによって、中性条件下 (pH7.4) におけるマウスFcRnに対する結合が増加することが報告されている (J Immunol. 2002;169(9):5171-80.)。Fv4-IgG1、および、Fv4-IgG1に対してこれらのアミノ酸置換をそれぞれ導入したFv4-IgG1-v1とFv4-IgG1-v2の正常マウスにおけるin vivo試験の結果を比較した。図33に示したとおり、Fv4-IgG1と比較して、中性条件下 (pH7.4) におけるマウスFcRnへの結合も増加させたFv4-IgG1-v1とFv4-IgG1-v2の血漿中滞留性は若干低下した (1日後の血漿中抗体濃度がそれぞれ約1.5倍および約1.9倍低下)。

40

50

## 【0433】

図34に示すとおり、中性条件下(pH7.4)におけるマウスFcRnに対する結合が増加したFv4-IgG1-v1あるいはFv4-IgG1-v2と同時に投与したhsIL-6Rのほうが、Fv4-IgG1と同時に投与したhsIL-6Rと比較して、hsIL-6Rの消失が著しく早くなっていることが確認された。中性条件下(pH7.4)におけるマウスFcRnに対する結合を付与することによって、Fv4-IgG1-v1とFv4-IgG1-v2は1日後の血漿中hsIL-6R濃度はそれぞれ約32倍および約80倍低減できることが見出された。中性条件下(pH7.4)におけるマウスFcRnに対する結合を付与することによって、上述のように抗体の血漿中濃度も若干低下したが、それを大幅に上回る血漿中hsIL-6R濃度低減効果を示すことが見出された。さらにhsIL-6R単独の投与群と比較しても、Fv4-IgG1-v1あるいはFv4-IgG1-v2と同時に投与したhsIL-6RのほうがhsIL-6Rの消失が早くなっていることが見出された。図34に示すとおり、hsIL-6R単独と比較して、Fv4-IgG1-v1またはFv4-IgG1-v2と同時にhsIL-6Rを投与することにより1日後の血漿中hsIL-6R濃度はそれぞれ約4倍および約11倍低減できることが見出された。これはすなわち、pH依存的に可溶性IL-6受容体に結合し、さらに中性条件下(pH7.4)におけるマウスFcRnに対する結合を付与した抗体の投与によって、可溶性IL-6受容体の消失を抗体により加速できたことを意味する。すなわち、このような抗体を生体内に投与することによって、生体内で血漿中の抗原濃度を低減することが可能となる。

10

## 【0434】

図35に示すとおり、H54/L28-IgG1は投与7日後まで遊離hsIL-6R濃度が検出されたが、Fv4-IgG1は投与後1日以降は遊離hsIL-6Rが検出されず、Fv4-IgG1-v1またはFv4-IgG1-v2は投与後7時間以降は遊離hsIL-6Rが検出されなかった。すなわち、hsIL-6Rに対してpH依存的結合を有するFv4-IgG1は、H54/L28-IgG1と比較して低い遊離hsIL-6R濃度を示したことから、hsIL-6Rに対してpH依存的結合を付与することでより高いhsIL-6Rの中和効果を発揮し、さらにFv4-IgG1に対してpH7.4においてFcRnへの結合を増加させたFv4-IgG1-v1およびFv4-IgG1-v2は、さらに低い遊離hsIL-6R濃度を示したことから、pH7.4においてFcRnへの結合を増加させることでさらに高いhsIL-6Rの中和効果を発揮することが可能であることが確認された。

20

## 【0435】

H54/L28-IgG1のような通常の中和抗体は、抗体を投与すると結合する抗原のクリアランスを低下させ、抗原はより血漿中に長く滞留する。抗体投与によってその作用を中和したい抗原の血漿中滞留性が長くなることは好ましくない。抗原に対する結合にpH依存性(中性条件下で結合し、酸性条件下で解離する)を付与することで、抗原の血漿中滞留性を短くすることが出来る。今回、さらに中性条件下(pH7.4)におけるヒトFcRnに対する結合を付与することで、抗原の血漿中滞留性をさらに短くすることができた。さらに、pH依存的に抗原に結合し中性条件下(pH7.4)におけるFcRnに対する結合を付与した抗体を投与することによって、抗原単独のクリアランスよりもクリアランスを増大させることが可能であることが示された。これまでに抗体投与により抗原単独のクリアランスよりもクリアランスを増大させる方法は知られておらず、本検討で見出された方法は、抗体投与によって血漿中から抗原を消失させる方法として極めて有用である。また、本検討により初めて中性条件下(pH7.4)におけるFcRnに対する結合を増加させることの利点が見出された。また、中性条件下(pH7.4)におけるFcRnに対する結合を増加させる異なるアミノ酸置換を有するFv4-IgG1-v1とFv4-IgG1-v2の両方において同様の効果が認められたことから、アミノ酸置換の種類によらず、中性条件下(pH7.4)におけるヒトFcRnに対する結合を増加させるアミノ酸置換であれば、抗原の消失を加速する効果があると考えられる。すなわち、J Biol Chem. 2007;282(3):1709-17に報告されているEUナンバリング257番目のProをIleに置換するアミノ酸置換、EUナンバリング311番目のGlnをIleに置換するアミノ酸置換、J Immunol. 2009;182(12):7663-71.に報告されているEUナンバリング434番目のAsnをAla、TyrもしくはTrpに置換するアミノ酸置換、EUナンバリング252番目のMetをTyrに置換するアミノ酸置換、EUナンバリング307番目のThrをGlnに置換するアミノ酸置換、EUナンバリング308番目のValをProに置換するアミノ酸置換、EUナンバリング250番目のThrをGlnに

30

40

50

置換するアミノ酸置換、EUナンバリング428番目のMetをLeuに置換するアミノ酸置換、EUナンバリング380番目のGluをAlaに置換するアミノ酸置換、EUナンバリング378番目のAlaをValに置換するアミノ酸置換、EUナンバリング436番目のTyrをIleに置換するアミノ酸置換、J Biol Chem. 2006 Aug 18;281(33):23514-24に報告されているEUナンバリング252番目のMetをTyrに置換するアミノ酸置換、EUナンバリング254番目のSerをThrに置換するアミノ酸置換、EUナンバリング256番目のThrをGluに置換するアミノ酸置換、Nat Biotechnol. 2005 Oct;23(10):1283-8.に報告されている433番目のHisをLysに置換するアミノ酸置換、434番目のAsnをPheに置換するアミノ酸置換、436番目のTyrをHisに置換するアミノ酸置換等、および、これらのアミノ酸置換の組み合わせを用いることによって、投与より血漿中から抗原を消失させる抗体分子を作製可能であると考えられる。

10

## 【0436】

〔参考例4〕ヒトFcRnへの結合活性の評価

Biacoreを用いた抗体とFcRnの相互作用を評価する測定系として、J Immunol. 2009;182(12):7663-71.に記されたセンサーチップへ抗体を固定化しヒトFcRnをアナライトとする系が報告されている。この目的のために、ヒトFcRnを参考例4に記載のように調製した。本系を用いて、Fv4-IgG1、Fv4-IgG1-v1およびFv4-IgG1-v2のpH6.0およびpH7.4におけるヒトFcRnへの結合活性(解離定数KD)の評価を行った。被験物質である抗体は、Series SセンサーチップCM5に直接固定化して試験に供した。センサーチップへの抗体の固定化は、ランニングバッファーとして50 mmol/Lリン酸ナトリウム/150 mmol/L NaCl, 0.05% (v/v%) Surfactant P20 pH6.0を用い、アミンカップリングキットを使用してメーカーのマニュアルに従って固定化量500RUを目指して実施した。

20

## 【0437】

ランニングバッファーとして、50 mmol/Lリン酸ナトリウム/150 mmol/L NaCl, 0.05% Surfactant P20 pH6.0、あるいは50 mmol/Lリン酸ナトリウム/150 mmol/L NaCl, 0.05% Surfactant P20 pH7.4を使用し、作成したセンサーチップを使用して測定を実施した。測定は全て25℃で行った。ヒトFcRn希釈液とランニングバッファー(参照溶液として)とを流速5  $\mu$ L/minで10分間インジェクトし、センサーチップ上の抗体にヒトFcRnを相互作用させた。その後流速5  $\mu$ L/minで1分間ランニングバッファーを流しFcRnを解離を観察した後、20 mmol/L Tris-HCl/150 mmol/L NaCl, pH8.1を流速30  $\mu$ L/minで15秒間インジェクトを2回繰り返してセンサーチップを再生した。

30

## 【0438】

測定結果の解析はBiacore T100 Evaluation Software (Ver. 2.0.1)で行った。少なくとも6つの異なる濃度のFcRnの測定結果より定常状態アフィニティー法(steady-state affinity method)により解析して解離定数(KD)を算出した。Fv4-IgG1、Fv4-IgG1-v1およびFv4-IgG1-v2のpH6.0およびpH7.4におけるヒトFcRnへの結合活性(解離定数KD)の結果を以下の表24に示した。

## 【0439】

## 【表24】

	KD ( $\mu$ M)	
	pH6.0	pH7.4
Fv4-IgG1	1.99	NA
Fv4-IgG1-v1	0.32	36.55
Fv4-IgG1-v2	0.11	11.03

40

## 【0440】

Fv4-IgG1のpH7.4におけるヒトFcRnへの結合は非常に弱く、KD値を算出することはでき

50

なかった (NA)。それに対して、Fv4-IgG1-v1とFv4-IgG1-v2はpH7.4におけるヒトFcRnへの結合が認められ、KD値はそれぞれ36.55  $\mu\text{M}$ と11.03  $\mu\text{M}$ と算出された。また、pH6.0におけるヒトFcRnへのKD値はそれぞれ1.99  $\mu\text{M}$ と0.32  $\mu\text{M}$ と0.11  $\mu\text{M}$ と算出された。図3 1に示したように、ヒトFcRnトランスジェニックマウスにおいて、Fv4-IgG1と比較して、Fv4-IgG1-v2にすることによってhsIL-6Rの消失が加速されたことから、ヒトIgG1を改変して最低でもpH7.4におけるヒトFcRnへの結合を11.03  $\mu\text{M}$ よりも強くすることで、抗原の消失を加速できると考えられる。また、J Immunol. 2002;169(9):5171-80.に示されているようにヒトIgG1はマウスFcRnに対してヒトFcRnよりも10倍程度強く結合することから、Fv4-IgG1-v1とFv4-IgG1-v2においてもpH7.4におけるマウスFcRnへの結合はヒトFcRnに対する結合よりも10倍程度強いと予想される。図3 4に示した正常マウスにおけるFv4-IgG1-v1とFv4-IgG1-v2のhsIL-6Rの消失加速は、図3 2に示したヒトFcRnトランスジェニックマウスにおけるFv4-IgG1-v2のhsIL-6Rの消失加速よりも大きいことから、pH7.4におけるFcRnへの結合の強さに応じて、hsIL-6Rの消失加速が大きくなると考えられる。

10

#### 【0441】

〔参考例5〕中性条件下におけるヒトFcRnへの結合を増強したpH依存的ヒトIL-6受容体結合抗体の調製

#### (5-1) Fv4-IgG1の重鎖定常領域改変体の作製

ヒトFcRnトランスジェニックマウスにおける、pH依存的ヒトIL-6受容体結合抗体の抗原消失効果を更に増大させるため、Fv4-IgG1に対して、中性条件下におけるヒトFcRnへの結合を増強するための様々な改変を導入した。具体的には、表2 5 - 1および2 5 - 2に記載のアミノ酸改変をFv4-IgG1の重鎖定常領域に導入することで、各種変異体を作製した(変異箇所のアミノ酸番号はEUナンバリングによる)。なお、アミノ酸置換の導入は参考例3に記載の当業者公知の方法に従って実施した。

20

#### 【0442】

【表 2 5 - 1】

変異体名	KD (M)	アミノ酸改変
IgG1	ND	なし
IgG1-v1	3.2E-06	M252Y/S254T/T256E
IgG1-v2	8.1E-07	N434W
IgG1-F3	2.5E-06	N434Y
IgG1-F4	5.8E-06	N434S
IgG1-F5	6.8E-06	N434A
IgG1-F7	5.6E-06	M252Y
IgG1-F8	4.2E-06	M252W
IgG1-F9	1.4E-07	M252Y/S254T/T256E/N434Y
IgG1-F10	6.9E-08	M252Y/S254T/T256E/N434W
IgG1-F11	3.1E-07	M252Y/N434Y
IgG1-F12	1.7E-07	M252Y/N434W
IgG1-F13	3.2E-07	M252W/N434Y
IgG1-F14	1.8E-07	M252W/N434W
IgG1-F19	4.6E-07	P257L/N434Y
IgG1-F20	4.6E-07	V308F/N434Y
IgG1-F21	3.0E-08	M252Y/V308P/N434Y
IgG1-F22	2.0E-06	M428L/N434S
IgG1-F25	9.2E-09	M252Y/S254T/T256E/V308P/N434W
IgG1-F26	1.0E-06	I332V
IgG1-F27	7.4E-06	G237M
IgG1-F29	1.4E-06	I332V/N434Y
IgG1-F31	2.8E-06	G237M/V308F
IgG1-F32	8.0E-07	S254T/N434W
IgG1-F33	2.3E-06	S254T/N434Y
IgG1-F34	2.8E-07	T256E/N434W
IgG1-F35	8.4E-07	T256E/N434Y
IgG1-F36	3.6E-07	S254T/T256E/N434W
IgG1-F37	1.1E-06	S254T/T256E/N434Y
IgG1-F38	1.0E-07	M252Y/S254T/N434W
IgG1-F39	3.0E-07	M252Y/S254T/N434Y
IgG1-F40	8.2E-08	M252Y/T256E/N434W
IgG1-F41	1.5E-07	M252Y/T256E/N434Y
IgG1-F42	1.0E-06	M252Y/S254T/T256E/N434A
IgG1-F43	1.7E-06	M252Y/N434A
IgG1-F44	1.1E-06	M252W/N434A
IgG1-F47	2.4E-07	M252Y/T256Q/N434W
IgG1-F48	3.2E-07	M252Y/T256Q/N434Y
IgG1-F49	5.1E-07	M252F/T256D/N434W
IgG1-F50	1.2E-06	M252F/T256D/N434Y
IgG1-F51	8.1E-06	N434F/Y436H
IgG1-F52	3.1E-06	H433K/N434F/Y436H
IgG1-F53	1.0E-06	I332V/N434W
IgG1-F54	8.4E-08	V308P/N434W
IgG1-F56	9.4E-07	I332V/M428L/N434Y
IgG1-F57	1.1E-05	G385D/Q386P/N389S
IgG1-F58	7.7E-07	G385D/Q386P/N389S/N434W
IgG1-F59	2.4E-06	G385D/Q386P/N389S/N434Y
IgG1-F60	1.1E-05	G385H
IgG1-F61	9.7E-07	G385H/N434W
IgG1-F62	1.9E-06	G385H/N434Y
IgG1-F63	2.5E-06	N434F
IgG1-F64	5.3E-06	N434H

10

20

30

40

【 0 4 4 3 】

表 2 5 - 2 は表 2 5 - 1 の続きの表である。

【表 2 5 - 2】

IgG1-F65	2.9E-07	M252Y/S254T/T256E/N434F
IgG1-F66	4.3E-07	M252Y/S254T/T256E/N434H
IgG1-F67	6.3E-07	M252Y/N434F
IgG1-F68	9.3E-07	M252Y/N434H
IgG1-F69	5.1E-07	M428L/N434W
IgG1-F70	1.5E-06	M428L/N434Y
IgG1-F71	8.3E-08	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434W
IgG1-F72	2.0E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434Y
IgG1-F73	1.7E-07	M252Y/M428L/N434W
IgG1-F74	4.6E-07	M252Y/M428L/N434Y
IgG1-F75	1.4E-06	M252Y/M428L/N434A
IgG1-F76	1.0E-06	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434A
IgG1-F77	9.9E-07	T256E/M428L/N434Y
IgG1-F78	7.8E-07	S254T/M428L/N434W
IgG1-F79	5.9E-06	S254T/T256E/N434A
IgG1-F80	2.7E-06	M252Y/T256Q/N434A
IgG1-F81	1.6E-06	M252Y/T256E/N434A
IgG1-F82	1.1E-06	T256Q/N434W
IgG1-F83	2.6E-06	T256Q/N434Y
IgG1-F84	2.8E-07	M252W/T256Q/N434W
IgG1-F85	5.5E-07	M252W/T256Q/N434Y
IgG1-F86	1.5E-06	S254T/T256Q/N434W
IgG1-F87	4.3E-06	S254T/T256Q/N434Y
IgG1-F88	1.9E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434W
IgG1-F89	3.6E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434Y
IgG1-F90	1.9E-08	M252Y/T256E/V308P/N434W
IgG1-F91	4.8E-08	M252Y/V308P/M428L/N434Y
IgG1-F92	1.1E-08	M252Y/S254T/T256E/V308P/M428L/N434W
IgG1-F93	7.4E-07	M252W/M428L/N434W
IgG1-F94	3.7E-07	P257L/M428L/N434Y
IgG1-F95	2.6E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434F
IgG1-F99	6.2E-07	M252Y/T256E/N434H

10

20

30

## 【 0 4 4 4 】

調製した重鎖とL(WT) (配列番号：14) とを含む変異体を、参考例3に記載の当業者公知の方法によって発現させて精製した。

## 【 0 4 4 5 】

## ( 5 - 2 ) ヒトFcRnに対する結合評価

Biacore T100 (GE Healthcare) を用いて、ヒトFcRnと抗体との速度論的解析を行った。この目的のために、ヒトFcRnを参考例2に記載のように調製した。センサーチップCM4 (GE Healthcare) 上にアミンカップリング法でプロテインL (ACTIGEN) を適量固定化し、そこへ目的の抗体を捕捉させた。次に、FcRn希釈液とランニングバッファー (参照溶液として) とをインジェクトし、センサーチップ上に捕捉させた抗体にヒトFcRnを相互作用させた。ランニングバッファーには50 mmol/Lリン酸ナトリウム、150 mmol/L NaCl、0.05 % (w/v) Tween20、pH7.0を用い、FcRnの希釈にもそれぞれのバッファーを使用した。チップの再生には10 mmol/Lグリシン-HCl, pH1.5を用いた。測定は全て25 °Cで実施した。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  $k_a$  (1/Ms)、および解離速度定数  $k_d$  (1/s) を算出し、その値をもとに各抗体のヒトFcRnに対する  $K_D$  (M) を算出した。各パラメーターの算出にはBiacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare)を用いた。

40

## 【 0 4 4 6 】

Biacoreによる中性条件下 (pH7.0) でのヒトFcRnへの結合評価の結果を、表 6 - 1 および 6 - 2 に記載した。ここで、天然型IgG1は結合が非常に弱く、 $K_D$ は算出不可能であった

50

ため、表 6 - 1 にNDと表記した。

【 0 4 4 7 】

〔参考例6〕中性条件下におけるヒトFcRnへの結合を増強したpH依存的ヒトIL-6受容体結合抗体のin vivo試験

参考例4で調製した中性条件下でのヒトFcRnへの結合能を付与した重鎖を用いて、中性条件下でのヒトFcRnへの結合能を有するpH依存的ヒトIL-6受容体結合抗体を作製し、生体内での抗原消失効果の検証を行った。具体的には、

VH3-IgG1とVL3-CKとを含むFv4-IgG1、  
 VH3-IgG1-v2とVL3-CKとを含むFv4-IgG1-v2、  
 VH3-IgG1-F14とVL3-CKとを含むFv4-IgG1-F14、  
 VH3-IgG1-F20とVL3-CKとを含むFv4-IgG1-F20、  
 VH3-IgG1-F21とVL3-CKとを含むFv4-IgG1-F21、  
 VH3-IgG1-F25とVL3-CKとを含むFv4-IgG1-F25、  
 VH3-IgG1-F29とVL3-CKとを含むFv4-IgG1-F29、  
 VH3-IgG1-F35とVL3-CKとを含むFv4-IgG1-F35、  
 VH3-IgG1-F48とVL3-CKとを含むFv4-IgG1-F48、  
 VH3-IgG1-F93とVL3-CKとを含むFv4-IgG1-F93、  
 VH3-IgG1-F94とVL3-CKとを含むFv4-IgG1-F94

を、参考例3に記載の当業者公知の方法によって発現させて精製した。

【 0 4 4 8 】

調製したpH依存的ヒトIL-6受容体結合抗体について、ヒトFcRnトランスジェニックマウス (B6.mFcRn-/- .hFcRn Tg 系統276 +/+マウス、Jackson Laboratories、Methods Mol Biol. 2010;602:93-104.) を用いたin vivo試験を、参考例3の方法と同様に実施した。

【 0 4 4 9 】

得られた静脈内投与後のヒトFcRnトランスジェニックマウスにおける血漿中可溶性ヒトIL-6受容体濃度推移を図36に示した。試験の結果、中性条件下におけるヒトFcRnへの結合を増強させたpH依存的ヒトIL-6受容体結合抗体はいずれも、中性条件下におけるヒトFcRnへの結合能をほとんど持たないFv4-IgG1と比較して、血漿中可溶性ヒトIL-6受容体濃度が低く推移することが示された。中でも、特に顕著な効果を示したものとして例を挙げると、Fv4-IgG1-F14と同時に投与された可溶性ヒトIL-6受容体の1日後の血漿中濃度は、Fv4-IgG1と同時に投与されたそれと比較して、約54倍低下することが示された。また、Fv4-IgG1-F21と同時に投与された可溶性ヒトIL-6受容体の7時間後の血漿中濃度は、Fv4-IgG1と同時に投与されたそれと比較して、約24倍低下することが示された。更には、Fv4-IgG1-F25と同時に投与された可溶性ヒトIL-6受容体の7時間後の血漿中濃度は、検出限界 (1.56 ng/mL) 以下であり、Fv4-IgG1と同時に投与されたそれと比較して、200倍以上もの顕著な抗原濃度の低下が可能であると考えられた。これらのことから、抗原消失効果を増強させることを目的として、pH依存的抗原結合抗体に対して中性条件下でのヒトFcRnへの結合を増強させることは非常に有効であることが示された。また、抗原消失効果を増強させるために導入される、中性条件下でのヒトFcRnへの結合を増強させるアミノ酸改変の種類は表6-1、表6-2に記載の改変を含めて特に限定されず、どのような改変を導入しても、生体内において抗原消失効果を増強することが可能であると考えられる。

【 0 4 5 0 】

更に、Fv4-IgG1-F14、Fv4-IgG1-F21、Fv4-IgG1-F25、Fv4-IgG1-F48の4種のpH依存的ヒトIL-6受容体結合抗体と同時に投与した可溶性ヒトIL-6受容体は、可溶性ヒトIL-6受容体の単独投与群と比較しても、より低い血漿中濃度推移を示した。このようなpH依存的ヒトIL-6受容体結合抗体を、血漿中の可溶性ヒトIL-6受容体濃度が一定濃度を維持している状態 (定常状態) にある生体内に投与することで、血漿中の可溶性ヒトIL-6受容体濃度を定常状態における血漿中濃度よりも、より低く維持することが可能である。すなわち、このような抗体を生体内に投与することによって、生体内で血漿中の抗原濃度を低減することが可能となる。

10

20

30

40

50

## 【0451】

〔参考例7〕低用量（0.01 mg/kg）におけるFv4-IgG1-F14の有効性の検証

参考例6で調製したFv4-IgG1-F14を用いて、低用量（0.01 mg/kg）におけるin vivo試験を参考例6の方法と同様に行い、参考例6で得られたFv4-IgG1およびFv4-IgG1-F14の1 mg/kg投与時の結果と比較した（結果を図37および38に示した）。

## 【0452】

その結果、Fv4-IgG1-F14の0.01 mg/kg投与群の血漿中抗体濃度は、1 mg/kg投与群と比較して100倍程度低いにも関わらず（図38）、血漿中可溶性ヒトIL-6受容体濃度推移はほぼ同等であることが示された（図37）。また、Fv4-IgG1-F14の0.01 mg/kg投与群の7時間後の血漿中可溶性ヒトIL-6受容体濃度は、Fv4-IgG1の1 mg/kg投与群のそれと比較して、約3倍低下させることが示された。更に、Fv4-IgG1-F14は、いずれの用量での投与群においても、可溶性ヒトIL-6受容体単独投与群と比較して、より低い血漿中可溶性ヒトIL-6受容体濃度推移を示した（図37）。

10

## 【0453】

このことから、Fv4-IgG1に対して中性条件下でのヒトFcRnへの結合を増強させたFv4-IgG1-F14は、Fv4-IgG1の100分の1の投与量であっても、血漿中可溶性ヒトIL-6受容体濃度を効果的に低下させることが示された。つまり、pH依存的抗原結合抗体に対し、中性条件下でのFcRnへの結合能を増強させることで、より低い投与量であっても効果的に抗原を消失させることが可能になると考えられる。

## 【0454】

〔参考例8〕正常マウスを用いた定常状態モデルによるin vivo試験

（8-1）中性条件下におけるマウスFcRnへの結合評価

参考例5で調製した、

VH3-IgG1（配列番号：19）とL(WT)（配列番号：14）とを含むVH3/L(WT)-IgG1、

VH3-IgG1-v2（配列番号：22）とL(WT)（配列番号：14）とを含むVH3/L(WT)-IgG1-v2

、

VH3-IgG1-F20（配列番号：23）とL(WT)（配列番号：14）とを含むVH3/L(WT)-IgG1-F20、

0、

について、以下の方法により中性条件下（pH7.4）におけるマウスFcRnへの結合評価を実施した。

30

## 【0455】

Biacore T100（GE Healthcare）を用いて、マウスFcRnと抗体との速度論的解析を行った。センサーチップCM4（GE Healthcare）上にアミンカップリング法でプロテインL（ACTIGEN）を適量固定化し、そこへ目的の抗体を捕捉させた。次に、FcRn希釈液とランニングバッファー（参照溶液として）とをインジェクトし、センサーチップ上に捕捉させた抗体にマウスFcRnを相互作用させた。ランニングバッファーには50 mmol/Lリン酸ナトリウム、150 mmol/L NaCl、0.05%（w/v）Tween20、pH7.4を用い、FcRnの希釈にもそれぞれのバッファーを使用した。チップの再生には10 mmol/Lグリシン-HCl、pH1.5を用いた。測定は全て25℃で実施した。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  $k_a$  (1/Ms)、および解離速度定数  $k_d$  (1/s) を算出し、その値をもとに各抗体のマウスFcRnに対するKD (M) を算出した。各パラメーターの算出にはBiacore T100 Evaluation Software（GE Healthcare）を用いた。

40

## 【0456】

結果を表26（pH7.4におけるマウスFcRnアフィニティー）に示した。ここで、定常領域が、天然型IgG1であるVH3/L(WT)-IgG1（表26におけるIgG1）は、マウスFcRnに対する結合が非常に弱く、KDは算出不可能であったため、表26にはNDと表記した。測定の結果、中性条件下におけるヒトFcRnへの結合を増強したこれらの改変体は、マウスFcRnに対しても同様に、中性条件下における結合が増強していることが示された。

## 【0457】

【表 2 6】

	KD (M)
IgG1	ND
IgG1-v2	1.04E-06
IgG1-F20	1.17E-07

10

## 【 0 4 5 8 】

( 8 - 2 ) 血漿中可溶性ヒトIL-6受容体濃度を定常状態とした正常マウスにおける in vivo 試験

実施例3および参考例5で調製した、H54/L28-IgG1、Fv4-IgG1、Fv4-IgG1-v2およびFv4-IgG1-F20を用いて、下記の方法でin vivo試験を行った。

## 【 0 4 5 9 】

正常マウス (C57BL/6Jマウス、Charles River Japan) の背部皮下に可溶性ヒトIL-6受容体を充填した注入ポンプ(MINI-OSMOTIC PUMP MODEL2004、alzet)を埋め込むことで、血漿中可溶性ヒトIL-6受容体濃度が定常状態に維持される動物モデルを作製した。その動物モデルに対して、抗ヒトIL-6受容体抗体を投与し、投与後の可溶性ヒトIL-6受容体の生体内における動態を評価した。可溶性ヒトIL-6受容体に対する中和抗体の産生を抑制するために、モノクローナル抗マウスCD4抗体(R&D)を尾静脈に20 mg/kgで単回投与した。その後、92.8 µg/mLの可溶性ヒトIL-6受容体を充填した注入ポンプをマウス背部皮下に埋め込んだ。注入ポンプ埋め込み3日後に、抗ヒトIL-6受容体抗体を尾静脈に1 mg/kgで単回投与した。抗ヒトIL-6受容体抗体を投与した15分後、7時間後、1日後、2日後、3日後、4日後、7日後、14日後、21日後、28日後に血液を採取した。採取した血液は直ちに4、15,000 rpmで15分間遠心分離し、血漿を得た。分離した血漿は、アッセイを実施するまで-20℃以下に設定された冷凍庫に保存した。

20

## 【 0 4 6 0 】

( 8 - 3 ) 血漿中抗ヒトIL-6受容体抗体濃度のELISA法による測定

参考例3と同様の方法で実施した。

30

## 【 0 4 6 1 】

( 8 - 4 ) 電気化学発光法による血漿中hsIL-6R濃度測定

実施例5と同様の方法で実施した。

図 3 9 に示した通り、血漿中可溶性ヒトIL-6受容体濃度が約40 ng/mLにおいて定常状態を維持している正常マウス (hsIL-6R群) に対して、可溶性ヒトIL-6受容体の中和抗体であるH54/L28-IgG1を投与すると、血漿中可溶性ヒトIL-6受容体濃度が650 ng/mL (投与前の15倍) まで上昇した。一方で、H54/L28-IgG1にpH依存的抗原結合能を付与したFv4-IgG1の投与群においては、血漿中可溶性ヒトIL-6受容体濃度が70 ng/mL程度を維持していた。このことから、通常の中和抗体であるH54/L28-IgG1の投与によって引き起こされる血漿中可溶性ヒトIL-6受容体濃度の上昇は、pH依存的結合能を付与することにより、10分の1程度にまで抑制できることが示された。

40

## 【 0 4 6 2 】

更に、pH依存的ヒトIL-6受容体結合抗体に対して、中性条件下でのFcRnへの結合を増強させる改変を導入したFv-IgG1-v2およびFv-IgG1-F20の投与により、血漿中可溶性ヒトIL-6受容体濃度を定常状態の10分の1以下にまで低下した状態を維持することが可能であることが示された。ここで、Fv-IgG1-v2は、投与から14日後における血漿中可溶性ヒトIL-6受容体濃度が約2 ng/mLであり、投与前の20分の1にまで低下させることが可能であった。また、Fv-IgG1-F20は、投与から7時間後、1日後、2日後、4日後の血漿中可溶性ヒトIL-6受容体濃度は、検出限界 (1.56 ng/mL) 以下であり、投与前の25分の1以下にまで低下させ

50

ていることが示された。

【0463】

以上のことから、血漿中の抗原濃度が定常状態を維持している動物モデルに対して、pH依存的抗原結合能と中性条件下でのFcRnへの結合能を併せ持つ抗体を投与することにより、血漿中の抗原の消失速度を増加させ、血漿中抗原濃度を顕著に低下させることが可能であることが示された。

【0464】

通常の抗体は、H54/L28-IgG1のように、標的抗原に対して結合することで、その作用を中和することしか出来ず、更に悪いことに血漿中の抗原濃度の上昇が起こってしまう。一方、pH依存的抗原結合能と中性条件下でのFcRnへの結合能を併せ持つ抗体は、標的抗原を中和するだけでなく、血漿中の標的抗原の濃度を低下させることが可能であることが見出された。抗原を血漿中から除去することによって、中和以上の高い効果を有することが期待できる。また、中和だけでは不十分な標的抗原に対しても、効果を示すことが可能となると考えられる。

【0465】

〔参考例9〕抗原消失を増強するのに必要なpH中性域におけるヒトFcRnに対する結合アフィニティーの閾値の同定、および抗原消失とpH中性域におけるヒトFcRnに対する結合アフィニティーとの関係

(9-1) *in vivo*試験のための抗体調製

pH中性域におけるFcRnに対する結合が増加したVH3-IgG1(配列番号:19)とVL3-CK(配列番号:20)とを含むFv4-IgG1のFc変異体を作製した。具体的には、VH3-M73(配列番号:24)およびVH3-IgG1-v1(配列番号:21)を調製した。アミノ酸置換の導入は参考例3に記載の当業者公知の方法に従って実施した。

【0466】

H54(配列番号:5)とL28(配列番号:6)とを含むH54/L28-IgG1、VH3-IgG1(配列番号:19)とVL3-CK(配列番号:20)とを含むFv4-IgG1、VH3-M73(配列番号:24)とVL3-CK(配列番号:20)とを含むFv4-M73、VH3-IgG1-v1(配列番号:21)とVL3-CK(配列番号:20)とを含むFv4-IgG1-v1、およびVH3-IgG1-v2(配列番号:22)とVL3-CK(配列番号:20)とを含むFv4-IgG1-v2を、参考例3に記載の当業者公知の方法によって発現させて精製した。

【0467】

(9-2) pH中性条件下におけるヒトFcRnに対する抗体の結合アフィニティーの評価

VH3-IgG1(配列番号:19)とL(WT)(配列番号:14)とを含むVH3/L(WT)-IgG1、VH3-M73(配列番号:24)とL(WT)(配列番号:14)とを含むVH3/L(WT)-M73、VH3-IgG1-v1(配列番号:21)とL(WT)(配列番号:14)とを含むVH3/L(WT)-IgG1-v1、およびVH3-IgG1-v2(配列番号:22)とL(WT)(配列番号:14)とを含むVH3/L(WT)-IgG1-v2は、その全てを参考例3に記載の通りに調製し、中性pH(pH7.0)におけるヒトFcRn結合に関して評価した。

【0468】

ヒトFcRnに対するVH3/L(WT)-IgG1-v1およびVH3/L(WT)-IgG1-v2の結合活性を、参考例5に記載の方法を用いて測定した。ヒトFcRnに対するVH3/L(WT)-IgG1およびVH3/L(WT)-M73の結合活性が低いために、実施例5に記載の方法ではヒトFcRnに対する結合活性を測定することができず、ゆえに、これらの抗体を以下に記載する方法によって評価した。抗体とヒトFcRnとの結合の動態をBiacore T100(GE Healthcare)を用いて解析した。センサーチップCM4(GE Healthcare)上にアミンカップリング法で適量のプロテインL(ACTIGEN)を固定化し、チップに目的の抗体を捕捉させた。次に、希釈したFcRn溶液とランニングバッファー(参照溶液として)とをインジェクトして、センサーチップ上に捕捉させた抗体にヒトFcRnを相互作用させた。ランニングバッファーとして、50 mmol/l リン酸ナトリウム、150 mmol/l NaCl、0.05% (w/v) Tween 20、pH7.0を用いた。FcRnを各バッファーを用いて希釈した。チップを10 mmol/l グリシン-HCl (pH1.5)を用いて再生した。測定は25

10

20

30

40

50

で行った。

【0469】

各抗体のKD (M) を、センサーグラムの結合および解離相を同時に適合させて、実行中の組における全ての曲線を一括で適合させるBiacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare) を用いてセンサーグラムデータから導いた。センサーグラムを、Biacore T100 Evaluation Softwareによって提供された1:1結合モデルである「ラングミュア結合」モデルに適合させた。結合相互作用のいくつかについては、平衡に基づくアプローチを用い、アナライト濃度の対数に対して平衡結合レスポンスであるReqをプロットし、非線形回帰分析によりKDを導いた。

中性条件下 (pH7.0) におけるヒトFcRn結合についてのBiacoreによる結果を表27に示す。

【0470】

【表27】

	KD(M)
IgG1	8.8E-05
M73	1.4E-05
IgG1-v1	3.2E-06
IgG1-v2	8.1E-07

【0471】

(9-3) ヒトFcRnトランスジェニックマウス系統276を用いた同時投与モデルにおける抗体の抗原消失効果のin vivo試験

同時投与モデルを用いた抗体のin vivo試験を参考例3に記載した通りに行った。本試験において用いた抗ヒトIL-6受容体抗体は、先に記載したH54/L28-IgG1、Fv4-IgG1、Fv4-M73、Fv4-IgG1-v1、およびFv4-IgG1-v2である。この試験において用いたマウスはヒトFcRnトランスジェニックマウス (B6.mFcRn-/- .hFcRn Tg 系統276 +/+マウス、Jackson Laboratories; Methods Mol Biol. (2010) 602: 93-104) である。

図40に示すように、H54/L28-IgG1、Fv4-IgG1、Fv4-M73、Fv4-IgG1-v1、およびFv4-IgG1-v2の薬物動態は同等であり、これらの抗体は試験のあいだ類似の血漿中濃度を維持した。

【0472】

血漿中hsIL-6濃度推移を図41に示した。Fv4-IgG1と共に投与したhsIL-6Rと比較して、Fv4-IgG1-v2と共に投与したhsIL-6Rは、クリアランスの増大を示したが、Fv4-M73およびFv4-IgG1-v1と共に投与したhsIL-6Rはクリアランスの低下を示した。M73、v1およびv2の全てのFc変異体が、ヒトFcRnに対してpH中性条件下 (pH7.0) において結合アフィニティーが増大しているが、hsIL-6Rクリアランスの増大を示したのはFv4-IgG1-v2のみであり、Fv4-M73およびFv4-IgG1-v1は増大を示さなかった。このことは、抗原のクリアランスを増大させるためには、pH7.0におけるヒトFcRnに対する結合アフィニティーがKD 3.2 μMであるかまたは天然型ヒトIgG1 (ヒトFcRnに対する結合アフィニティーはKD 88 μM) より28倍高いIgG1-v1と比べて、pH7.0におけるヒトFcRnに対する抗体の結合アフィニティーが、それより少なくとも高い必要があることを示している。

【0473】

図42は、pH7.0におけるヒトFcRnに対するFc変異体の結合アフィニティーと、hsIL-6RおよびFc変異体を同時投与した1日後の血漿中hsIL-6R濃度との関係を示す。本実施例および参考例6に記載のFc変異体 (Fv4-IgG1、Fv4-M73、Fv4-IgG1-v1、Fv4-IgG1-v2、Fv4-IgG1-F14、Fv4-IgG1-F20、Fv4-IgG1-F21、Fv4-IgG1-F25、Fv4-IgG1-F29、Fv4-IgG1-F35、Fv4-

10

20

30

40

50

IgG1-F48、Fv4-IgG1-F93、およびFv4-IgG1-F94)をプロットしている。pH7.0におけるヒトFcRnに対する抗体の結合アフィニティーを増大させると、抗原のクリアランスを反映する血漿中hsIL-6R濃度は、最初に増加した後、急激に低下した。このことは、天然型ヒトIgG1と比較して抗原クリアランスを増大させるためには、pH7.0におけるヒトFcRnに対する抗体の結合アフィニティーが、好ましくはKD 2.3  $\mu\text{M}$  (図42の曲線に当てはめて得た値)より強い必要があることを示している。ヒトFcRnに対する抗体の結合アフィニティーがKD 88  $\mu\text{M}$ ~KD 2.3  $\mu\text{M}$ である場合、むしろ抗原クリアランスは低下すると考えられる(より高いhsIL-6R濃度)。言い換えれば、pH7.0におけるヒトFcRnに対する抗体の結合アフィニティーは、抗原の消失を増強するためには、好ましくは天然型ヒトIgG1より38倍高い必要があり、そうでなければ抗原クリアランスは低下すると考えられる。

10

## 【0474】

図43は、pH7.0におけるヒトFcRnに対するFc変異体の結合アフィニティーと、hsIL-6RおよびFc変異体を同時投与した1日後の血漿中抗体濃度との関係を示す。本実施例および参考例6に記載のFc変異体(Fv4-IgG1、Fv4-M73、Fv4-IgG1-v1、Fv4-IgG1-v2、Fv4-IgG1-F14、Fv4-IgG1-F20、Fv4-IgG1-F21、Fv4-IgG1-F25、Fv4-IgG1-F29、Fv4-IgG1-F35、Fv4-IgG1-F48、Fv4-IgG1-F93、およびFv4-IgG1-F94)をプロットしている。pH7.0におけるヒトFcRnに対する抗体の結合アフィニティーを増大させると、抗体の薬物動態(クリアランス)を反映する血漿中抗体濃度は最初維持されるが、その後急激に低下する。このことは、天然型ヒトIgG1(ヒトFcRnに対する結合アフィニティーはKD 88  $\mu\text{M}$ )と類似した抗体の薬物動態を維持するためには、pH7.0におけるヒトFcRnに対する抗体のアフィニティーが、KD 0.2  $\mu\text{M}$  (図43の曲線に当てはめて得た値)より弱い必要があることを示している。ヒトFcRnに対する抗体の結合アフィニティーがKD 0.2  $\mu\text{M}$ より強い場合、抗体のクリアランスは増大した(すなわち、血漿からのより急速な抗体の消失)。言い換えれば、pH7.0におけるヒトFcRnに対する抗体の結合アフィニティーは、天然型ヒトIgG1と類似した抗体薬物動態を示すためには、天然型ヒトIgG1と比べて440倍以内の高さとする必要があり、そうでなければ血漿からの抗体の急速な消失が生じると考えられる。

20

## 【0475】

図42および43の双方を考慮すると、天然型ヒトIgG1と類似した抗体薬物動態を維持しながらIgG1と比較して抗原クリアランスを増大させる(すなわち、血漿中抗原濃度を減少させる)ためには、pH7.0におけるヒトFcRnに対する抗体の結合アフィニティーが、2.3  $\mu\text{M}$ から0.2  $\mu\text{M}$ である必要があるか、または言い換えればpH7.0におけるヒトFcRnに対する抗体の結合アフィニティーが、天然型ヒトIgG1より38倍から440倍高い範囲である必要がある。長期間の抗体消失活性を有するIgG1と類似した薬物動態であるそのような抗体は、長期間作用性により、慢性疾患などのより長い投与間隔を必要とする抗体治療にとって有益となると考えられる。

30

## 【0476】

一方、pH7.0におけるヒトFcRnに対する抗体の結合アフィニティーをKD 0.2  $\mu\text{M}$ より強く増大させることにより、または言い換えれば天然型ヒトIgG1と比較してpH7.0でのヒトFcRnに対する抗体の結合アフィニティーを440倍より高く増大させることにより、抗体は天然型ヒトIgG1より速やかに血漿から消失するものの、抗原クリアランスを短期間でかなりの程度のものに増強すると考えられる。抗原濃度の急速で大きな減少を誘導できるそのような抗体は、その即効性により、疾患関連抗原を血漿中から除去する必要がある急性疾患などの抗体治療にとって有益となると考えられる。

40

## 【0477】

抗体1分子につき血漿から消失される抗原の量は、pH7.0におけるヒトFcRnに対する結合アフィニティーが増大した抗体Fc変異体を投与することにより抗原消失効率を評価する場合に重要な要因となる。抗体1分子あたりの抗原消失効率を評価するために、本実施例および参考例6に記載のin vivo試験の各時点で以下の計算を行った。

A値：各時点での抗原のモル濃度

B値：各時点での抗体のモル濃度

50

C値：抗体モル濃度あたりの抗原モル濃度（抗原／抗体モル比）

$C = A/B$

【0478】

各抗体についてのC値（抗原／抗体モル比）の推移を図44に記載した。C値がより小さいことは、抗体1分子あたりの抗原消失効率がより高いことを示すが、C値がより大きいことは、抗体1分子あたりの抗原消失効率がより低いことを示す。IgG1と比較してC値がより小さければ、Fc変異体によってより高い抗原消失効率が得られたことを示すが、IgG1と比較してC値がより大きければ、Fc変異体が抗原消失効率に関して負の効果を有することを示す。Fv4-M73およびFv4-IgG1-v1を除く全てのFc変異体が、Fv4-IgG1と比較して抗原消失効率の増大を示した。Fv4-M73およびFv4-IgG1-v1は、抗原消失効率に対して負の影響を示し、これは図42と一致した。

10

【0479】

図45は、pH7.0におけるヒトFcRnに対するFc変異体の結合アフィニティーと、hsIL-6RおよびFc変異体を同時投与した1日後のC値（抗原／抗体モル比）との関係を示す。本実施例および参考例6に記載のFc変異体（Fv4-IgG1、Fv4-M73、Fv4-IgG1-v1、Fv4-IgG1-v2、Fv4-IgG1-F14、Fv4-IgG1-F20、Fv4-IgG1-F21、Fv4-IgG1-F25、Fv4-IgG1-F29、Fv4-IgG1-F35、Fv4-IgG1-F48、Fv4-IgG1-F93、およびFv4-IgG1-F94）をプロットしている。これは、天然型ヒトIgG1と比較してより高い抗原消失効率を達成するためには、pH7.0におけるヒトFcRnに対する抗体のアフィニティーがKD 3.0  $\mu$ M（図45の曲線に当てはめて得た値）より強い必要があることを示している。言い換えれば、pH7.0におけるヒトFcRnに対する抗体の結合アフィニティーは、天然型ヒトIgG1と比較してより高い抗原消失効率を達成するためには、天然型ヒトIgG1より少なくとも29倍高い必要がある。

20

【0480】

結論としては、FcRnに対してpH7.0でKD 3.0  $\mu$ Mから0.2  $\mu$ Mの結合アフィニティーを有する抗体変異体の群、または言い換えればFcRnに対してpH7.0で天然型ヒトIgG1より29倍から440倍高い範囲の結合アフィニティーを有する抗体変異体の群は、IgG1と類似した抗体薬物動態を有するが、増大した血漿中抗体消失能を有する。よって、そのような抗体は、IgG1と比較して増大した抗原消失効率を示す。IgG1と類似した薬物動態により、血漿から抗原を長期間消失させることが可能であり（長期間作用性の抗原消失）、ゆえに長い投与間隔が可能となり、このことは慢性疾患に関する抗体治療物質にとって好ましいと考えられる。FcRnに対してpH7.0でKD 0.2  $\mu$ Mより強い結合アフィニティーを有する抗体変異体の群、または言い換えればFcRnに対してpH7.0で天然型ヒトIgG1より440倍高い結合アフィニティーを有する抗体変異体の群は、急速な抗体クリアランス（短期間の抗体消失）を有する。それにもかかわらず、そのような抗体は抗原のさらにより急速なクリアランスを可能にすることから（即効性の抗原消失）、よって、そのような抗体はまた、IgG1と比較して増大した抗原消失効率を示す。参考例8に示すように、正常マウスにおけるFv4-IgG1-F20は、血漿からの抗原の大幅な消失を非常に短期間で誘導するが、抗原消失効果は持続しない。そのようなプロファイルは、疾患関連抗原を非常に短期間で迅速かつ大幅に血漿から枯渇させる必要がある急性疾患の場合に好ましいと考えられる。

30

【0481】

〔参考例10〕ヒトFcRnトランスジェニックマウス系統276を用いた定常状態注入モデルによるFv4-IgG1-F14のin vivo試験

ヒトFcRnトランスジェニックマウス系統276を用いた下記の定常状態注入モデルによるFv4-IgG1-F14のin vivo試験を行った。試験群は対照群（抗体なし）、1 mg/kgの用量でのFv4-IgG1、ならびに1 mg/kg、0.2 mg/kg、および0.01 mg/kgの用量でのFv4-IgG1-F14からなる。

40

【0482】

ヒトFcRnトランスジェニックマウス系統276（B6.mFcRn-/- .hFcRn Tg 系統276 +/-マウス（B6.mFcRn-/- hFCRN Tg276 B6.Cg-Fcgrt < tm1Dcr > Tg(FCGRT)276Dcr（Jackson #4919））、Jackson Laboratories; Methods Mol Biol. (2010) 602: 93-104）の背部皮下に、

50

可溶性ヒトIL-6受容体を充填した注入ポンプ (MINI-OSMOTIC PUMP MODEL 2004 ; alzet) を埋め込むことで、血漿中可溶性ヒトIL-6受容体濃度が一定に維持されるモデル動物を製作した。モデル動物に抗ヒトIL-6受容体抗体を投与し、投与後の可溶性ヒトIL-6受容体の生体内における動態を評価した。可溶性ヒトIL-6受容体に対する中和抗体の産生を抑制するために、注入ポンプを埋め込む前と、抗体を尾静脈に投与した14日後に、モノクローナル抗マウスCD4抗体 (R&D) を20 mg/kgで投与した。次に、92.8 µg/mlの可溶性ヒトIL-6受容体を充填した注入ポンプをマウスの背部皮下に埋め込んだ。注入ポンプ埋め込み3日後に、抗ヒトIL-6受容体抗体 (H54/L28-IgG1およびH54/L28-IgG1-F14) を尾静脈に1 mg/kgで単回投与した。抗ヒトIL-6受容体抗体を投与した15分後、7時間後、1日後、2日後、3日後、4日後、7日後、14日後、21日後、および28日後に血液を採取した。採取した血液は直ちに4、15,000 rpmで15分間遠心分離し、血漿を得た。分離した血漿は、測定を実施するまで-20 以下に設定された冷凍庫に保存した。

10

20

30

40

50

#### 【0483】

マウス血漿中のhsIL-6R濃度は電気化学発光にて測定した。2,000、1,000、500、250、125、62.5、および31.25 pg/mlの濃度に調整したhsIL-6R検量線試料ならびに50倍以上希釈したマウス血漿試料を調製した。試料を、SULFO-TAG NHS Ester (Meso Scale Discovery) でルテニウム化したモノクローナル抗ヒトIL-6R抗体 (R&D)、ビオチン化抗ヒトIL-6R抗体 (R&D)、およびWT-IgG1溶液と混合し、37 で一晚反応させた。抗ヒトIL-6受容体抗体として、トシリズマブ (重鎖配列番号: 13、軽鎖配列番号: 14) とを含むWT-IgG1の終濃度は、試料に含まれる抗ヒトIL-6受容体抗体濃度より過剰の333 µg/mlであり、試料中のほぼ全てのhsIL-6R分子がWT-IgG1と結合した状態にすることを目的とした。その後、試料をMA400 PR Streptavidin Plate (Meso Scale Discovery) に分注し、室温で1時間反応させて洗浄を行った。Read Buffer T (x4) (Meso Scale Discovery) を分注し、直ちにSector PR 400 Reader (Meso Scale Discovery) で測定を行った。hsIL-6R濃度は検量線のレスポンスから解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて算出した。

#### 【0484】

図46は、抗体投与後の血漿中hsIL-6R濃度の時間プロファイルを示す。抗体を投与していないベースラインのhsIL-6Rレベルと比較して、1 mg/kg Fv4-IgG1の投与により、血漿中hsIL-6R濃度が数倍増加した。他方、1 mg/kgのFv4-IgG1-F14の投与により、Fv4-IgG1群およびベースライン群と比較した場合に血漿中濃度の有意な減少が生じた。2日目に、血漿中hsIL-6R濃度は検出されず (血漿中hsIL-6R濃度の定量限界はこの測定系において1.56 ng/mLである)、これは14日目まで持続した。

#### 【0485】

H54/L28-IgG1-F14は、H54/L28-IgG1と比較して血漿中hsIL-6R濃度の減少を示したが、減少の程度は小さかった。減少の程度は、hsIL-6Rに対するpH依存的結合特性をFv4可変領域に有する場合ではかなり大きかった。このことは、pH7.0におけるヒトFcRnに対する結合アフィニティーを増大させることは血漿中抗原濃度を減少させるために有効であるが、pH依存的抗原結合とpH中性域におけるヒトFcRnに対する結合アフィニティーの増大とを組み合わせると、抗原消失が有意に増大することを示している。

#### 【0486】

より低用量のFv4-IgG1-F14を用いた試験は、1 mg/kgの1/100である0.01 mg/kgでさえも、血漿中抗原濃度をベースラインよりも減少させて、分子が血漿から抗原を枯渇させる効率が有意であることを示している。

#### 【0487】

〔参考例11〕同時投与モデルにおけるヒトFcRnトランスジェニックマウス系統276および系統32の比較

これまでのin vivo試験は、ヒトFcRnトランスジェニックマウス系統276 (Jackson Laboratories) を用いて行っていた。ヒトFcRnトランスジェニックマウス系統276と異なるトランスジェニック系統である系統32との差を比較するために、本発明者らは、ヒトFcRnト

ランスジェニックマウス系統32 (B6.mFcRn-/- .hFcRn Tg 系統32 +/+マウス (B6.mFcRn-/- hFCRN Tg32; B6.Cg-Fcgrt < tm1Dcr > Tg(FCGRT)32Dcr) (Jackson #4915)), Jackson Laboratories; Methods Mol Biol. (2010) 602: 93-104) を用いてH54/L28-IgG1、Fv4-IgG1、およびFv4-IgG1-v2の同時投与試験を行った。試験方法は、ヒトFcRnトランスジェニックマウス系統32をヒトFcRnトランスジェニックマウス系統276の代わりに用いたこと以外は、参考例3の試験方法と同じであった。

【0488】

図47は、ヒトFcRnトランスジェニックマウス系統276および系統32の双方における血漿中hsIL-6R濃度推移を示す。H54/L28-IgG1、Fv4-IgG1、およびFv4-IgG1-v2は、類似の血漿中hsIL-6R濃度-時間プロファイルを示した。いずれのマウスにおいても、pH7.0におけるヒトFcRnに対する結合アフィニティーを増大させると、血漿からの抗原消失が同程度に増強された (Fv4-IgG1とFv4-IgG1-v2とを比較)。

10

【0489】

図48は、ヒトFcRnトランスジェニックマウス系統276および系統32の双方における血漿中抗体濃度推移を示す。H54/L28-IgG1、Fv4-IgG1、およびFv4-IgG1-v2は、類似の血漿中抗体濃度-時間プロファイルを示した。

【0490】

結論としては、系統276と系統32のあいだに有意差は観察されず、pH7.0におけるヒトFcRnに対する結合アフィニティーを増大させるFc変異体は、血漿中抗原濃度の消失の増強に関して、ヒトFcRnを発現する2つの異なるトランスジェニックマウス系統において有効であった。

20

【0491】

〔参考例12〕中性pHにおけるヒトFcRnに対する結合アフィニティーが増大した様々な抗体Fc変異体の作製

(12-1) Fc変異体の作製

抗原消失プロファイルをさらに改善するために、pH中性域におけるヒトFcRnに対する結合アフィニティーを増大させることを目的として、様々な変異をFv4-IgG1に導入した。具体的には、表15に示されるアミノ酸変異をFv4-IgG1の重鎖定常領域に導入してFc変異体を作製した (変異部位のアミノ酸番号は、EUナンバリングに従って記載する)。アミノ酸置換の導入は参考例3に記載の当業者公知の方法に従って実施した。

30

【0492】

調製された重鎖とL(WT) (配列番号: 14) とを各々含むさらなる変異体 (IgG1-F100からIgG1-F1052) を、参考例3に記載の当業者公知の方法によって発現させて精製した。

【0493】

(12-2) ヒトFcRn結合の評価

抗体とヒトFcRnとの結合の動態を、IgG1-v1、IgG1-v2、およびIgG1-F2からIgG1-F1052については参考例5に記載した通りに、またはIgG1およびM73については参考例9に記載した通りに解析した。中性条件下 (pH7.0) におけるヒトFcRn結合についてのBiacoreによる結果を表28-1から28-21に示す。

【0494】

40

【表 2 8 - 1】

変異体	KD (M)	アミノ酸改変部位
F1	8. 10E-07	N434W
F2	3. 20E-06	M252Y/S254T/T256E
F3	2. 50E-06	N434Y
F4	5. 80E-06	N434S
F5	6. 80E-06	N434A
F7	5. 60E-06	M252Y
F8	4. 20E-06	M252W
F9	1. 40E-07	M252Y/S254T/T256E/N434Y
F10	6. 90E-08	M252Y/S254T/T256E/N434W
F11	3. 10E-07	M252Y/N434Y
F12	1. 70E-07	M252Y/N434W
F13	3. 20E-07	M252W/N434Y
F14	1. 80E-07	M252W/N434W
F19	4. 60E-07	P257L/N434Y
F20	4. 60E-07	V308F/N434Y
F21	3. 00E-08	M252Y/V308P/N434Y
F22	2. 00E-06	M428L/N434S
F25	9. 20E-09	M252Y/S254T/T256E/V308P/N434W
F26	1. 00E-06	I332V
F27	7. 40E-06	G237M
F29	1. 40E-06	I332V/N434Y
F31	2. 80E-06	G237M/V308F
F32	8. 00E-07	S254T/N434W
F33	2. 30E-06	S254T/N434Y
F34	2. 80E-07	T256E/N434W
F35	8. 40E-07	T256E/N434Y
F36	3. 60E-07	S254T/T256E/N434W
F37	1. 10E-06	S254T/T256E/N434Y
F38	1. 00E-07	M252Y/S254T/N434W
F39	3. 00E-07	M252Y/S254T/N434Y
F40	8. 20E-08	M252Y/T256E/N434W
F41	1. 50E-07	M252Y/T256E/N434Y
F42	1. 00E-06	M252Y/S254T/T256E/N434A
F43	1. 70E-06	M252Y/N434A
F44	1. 10E-06	M252W/N434A
F47	2. 40E-07	M252Y/T256Q/N434W
F48	3. 20E-07	M252Y/T256Q/N434Y
F49	5. 10E-07	M252F/T256D/N434W
F50	1. 20E-06	M252F/T256D/N434Y
F51	8. 10E-06	N434F/Y436H

10

20

30

40

【 0 4 9 5 】

表 2 8 - 2 は、表 2 8 - 1 の続きの表である。

【表 2 8 - 2】

F52	3.10E-06	H433K/N434F/Y436H	
F53	1.00E-06	I332V/N434W	
F54	8.40E-08	V308P/N434W	
F56	9.40E-07	I332V/M428L/N434Y	
F57	1.10E-05	G385D/Q386P/N389S	
F58	7.70E-07	G385D/Q386P/N389S/N434W	
F59	2.40E-06	G385D/Q386P/N389S/N434Y	
F60	1.10E-05	G385H	
F61	9.70E-07	G385H/N434W	10
F62	1.90E-06	G385H/N434Y	
F63	2.50E-06	N434F	
F64	5.30E-06	N434H	
F65	2.90E-07	M252Y/S254T/T256E/N434F	
F66	4.30E-07	M252Y/S254T/T256E/N434H	
F67	6.30E-07	M252Y/N434F	
F68	9.30E-07	M252Y/N434H	
F69	5.10E-07	M428L/N434W	
F70	1.50E-06	M428L/N434Y	
F71	8.30E-08	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434W	20
F72	2.00E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434Y	
F73	1.70E-07	M252Y/M428L/N434W	
F74	4.60E-07	M252Y/M428L/N434Y	
F75	1.40E-06	M252Y/M428L/N434A	
F76	1.00E-06	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434A	
F77	9.90E-07	T256E/M428L/N434Y	
F78	7.80E-07	S254T/M428L/N434W	
F79	5.90E-06	S254T/T256E/N434A	
F80	2.70E-06	M252Y/T256Q/N434A	
F81	1.60E-06	M252Y/T256E/N434A	30
F82	1.10E-06	T256Q/N434W	
F83	2.60E-06	T256Q/N434Y	
F84	2.80E-07	M252W/T256Q/N434W	
F85	5.50E-07	M252W/T256Q/N434Y	
F86	1.50E-06	S254T/T256Q/N434W	
F87	4.30E-06	S254T/T256Q/N434Y	
F88	1.90E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434W	
F89	3.60E-07	M252Y/S254T/T256Q/N434Y	
F90	1.90E-08	M252Y/T256E/V308P/N434W	
F91	4.80E-08	M252Y/V308P/M428L/N434Y	40
F92	1.10E-08	M252Y/S254T/T256E/V308P/M428L/N434W	
F93	7.40E-07	M252W/M428L/N434W	
F94	3.70E-07	P257L/M428L/N434Y	

【0496】

表 2 8 - 3 は、表 2 8 - 2 の続きの表である。

【表 2 8 - 3】

F95	2. 60E-07	M252Y/S254T/T256E/M428L/N434F
F99	6. 20E-07	M252Y/T256E/N434H
F101	1. 10E-07	M252W/T256Q/P257L/N434Y
F103	4. 40E-08	P238A/M252Y/V308P/N434Y
F104	3. 70E-08	M252Y/D265A/V308P/N434Y
F105	7. 50E-08	M252Y/T307A/V308P/N434Y
F106	3. 70E-08	M252Y/V303A/V308P/N434Y
F107	3. 40E-08	M252Y/V308P/D376A/N434Y
F108	4. 10E-08	M252Y/V305A/V308P/N434Y
F109	3. 20E-08	M252Y/V308P/Q311A/N434Y
F111	3. 20E-08	M252Y/V308P/K317A/N434Y
F112	6. 40E-08	M252Y/V308P/E380A/N434Y
F113	3. 20E-08	M252Y/V308P/E382A/N434Y
F114	3. 80E-08	M252Y/V308P/S424A/N434Y
F115	6. 60E-06	T307A/N434A
F116	8. 70E-06	E380A/N434A
F118	1. 40E-05	M428L
F119	5. 40E-06	T250Q/M428L
F120	6. 30E-08	P257L/V308P/M428L/N434Y
F121	1. 50E-08	M252Y/T256E/V308P/M428L/N434W
F122	1. 20E-07	M252Y/T256E/M428L/N434W
F123	3. 00E-08	M252Y/T256E/V308P/N434Y
F124	2. 90E-07	M252Y/T256E/M428L/N434Y
F125	2. 40E-08	M252Y/S254T/T256E/V308P/M428L/N434Y
F128	1. 70E-07	P257L/M428L/N434W
F129	2. 20E-07	P257A/M428L/N434Y
F131	3. 00E-06	P257G/M428L/N434Y
F132	2. 10E-07	P257I/M428L/N434Y
F133	4. 10E-07	P257M/M428L/N434Y
F134	2. 70E-07	P257N/M428L/N434Y
F135	7. 50E-07	P257S/M428L/N434Y
F136	3. 80E-07	P257T/M428L/N434Y
F137	4. 60E-07	P257V/M428L/N434Y
F139	1. 50E-08	M252W/V308P/N434W
F140	3. 60E-08	S239K/M252Y/V308P/N434Y
F141	3. 50E-08	M252Y/S298G/V308P/N434Y
F142	3. 70E-08	M252Y/D270F/V308P/N434Y
F143	2. 00E-07	M252Y/V308A/N434Y
F145	5. 30E-08	M252Y/V308F/N434Y
F147	2. 40E-07	M252Y/V308I/N434Y
F149	1. 90E-07	M252Y/V308L/N434Y
F150	2. 00E-07	M252Y/V308M/N434Y

10

20

30

40

【 0 4 9 7 】

表 2 8 - 4 は、表 2 8 - 3 の続きの表である。

【表 2 8 - 4】

F152	2. 70E-07	M252Y/V308Q/N434Y	
F154	1. 80E-07	M252Y/V308T/N434Y	
F157	1. 50E-07	P257A/V308P/M428L/N434Y	
F158	5. 90E-08	P257T/V308P/M428L/N434Y	
F159	4. 40E-08	P257V/V308P/M428L/N434Y	
F160	8. 50E-07	M252W/M428I/N434Y	
F162	1. 60E-07	M252W/M428Y/N434Y	
F163	4. 20E-07	M252W/M428F/N434Y	
F164	3. 70E-07	P238A/M252W/N434Y	10
F165	2. 90E-07	M252W/D265A/N434Y	
F166	1. 50E-07	M252W/T307Q/N434Y	
F167	2. 90E-07	M252W/V303A/N434Y	
F168	3. 20E-07	M252W/D376A/N434Y	
F169	2. 90E-07	M252W/V305A/N434Y	
F170	1. 70E-07	M252W/Q311A/N434Y	
F171	1. 90E-07	M252W/D312A/N434Y	
F172	2. 20E-07	M252W/K317A/N434Y	
F173	7. 70E-07	M252W/E380A/N434Y	
F174	3. 40E-07	M252W/E382A/N434Y	20
F175	2. 70E-07	M252W/S424A/N434Y	
F176	2. 90E-07	S239K/M252W/N434Y	
F177	2. 80E-07	M252W/S298G/N434Y	
F178	2. 70E-07	M252W/D270F/N434Y	
F179	3. 10E-07	M252W/N325G/N434Y	
F182	6. 60E-08	P257A/M428L/N434W	
F183	2. 20E-07	P257T/M428L/N434W	
F184	2. 70E-07	P257V/M428L/N434W	
F185	2. 60E-07	M252W/I332V/N434Y	
F188	3. 00E-06	P257I/Q311I	30
F189	1. 90E-07	M252Y/T307A/N434Y	
F190	1. 10E-07	M252Y/T307Q/N434Y	
F191	1. 60E-07	P257L/T307A/M428L/N434Y	
F192	1. 10E-07	P257A/T307A/M428L/N434Y	
F193	8. 50E-08	P257T/T307A/M428L/N434Y	
F194	1. 20E-07	P257V/T307A/M428L/N434Y	
F195	5. 60E-08	P257L/T307Q/M428L/N434Y	
F196	3. 50E-08	P257A/T307Q/M428L/N434Y	
F197	3. 30E-08	P257T/T307Q/M428L/N434Y	
F198	4. 80E-08	P257V/T307Q/M428L/N434Y	40
F201	2. 10E-07	M252Y/T307D/N434Y	
F203	2. 40E-07	M252Y/T307F/N434Y	
F204	2. 10E-07	M252Y/T307G/N434Y	

【 0 4 9 8 】

表 2 8 - 5 は、表 2 8 - 4 の続きの表である。

【表 2 8 - 5】

F205	2. 00E-07	M252Y/T307H/N434Y	
F206	2. 30E-07	M252Y/T307I/N434Y	
F207	9. 40E-07	M252Y/T307K/N434Y	
F208	3. 90E-07	M252Y/T307L/N434Y	
F209	1. 30E-07	M252Y/T307M/N434Y	
F210	2. 90E-07	M252Y/T307N/N434Y	
F211	2. 40E-07	M252Y/T307P/N434Y	
F212	6. 80E-07	M252Y/T307R/N434Y	
F213	2. 30E-07	M252Y/T307S/N434Y	10
F214	1. 70E-07	M252Y/T307V/N434Y	
F215	9. 60E-08	M252Y/T307W/N434Y	
F216	2. 30E-07	M252Y/T307Y/N434Y	
F217	2. 30E-07	M252Y/K334L/N434Y	
F218	2. 60E-07	M252Y/G385H/N434Y	
F219	2. 50E-07	M252Y/T289H/N434Y	
F220	2. 50E-07	M252Y/Q311H/N434Y	
F221	3. 10E-07	M252Y/D312H/N434Y	
F222	3. 40E-07	M252Y/N315H/N434Y	
F223	2. 70E-07	M252Y/K360H/N434Y	20
F225	1. 50E-06	M252Y/L314R/N434Y	
F226	5. 40E-07	M252Y/L314K/N434Y	
F227	1. 20E-07	M252Y/N286E/N434Y	
F228	2. 30E-07	M252Y/L309E/N434Y	
F229	5. 10E-07	M252Y/R255E/N434Y	
F230	2. 50E-07	M252Y/P387E/N434Y	
F236	8. 90E-07	K248I/M428L/N434Y	
F237	2. 30E-07	M252Y/M428A/N434Y	
F238	7. 40E-07	M252Y/M428D/N434Y	
F240	7. 20E-07	M252Y/M428F/N434Y	30
F241	1. 50E-06	M252Y/M428G/N434Y	
F242	8. 50E-07	M252Y/M428H/N434Y	
F243	1. 80E-07	M252Y/M428I/N434Y	
F244	1. 30E-06	M252Y/M428K/N434Y	
F245	4. 70E-07	M252Y/M428N/N434Y	
F246	1. 10E-06	M252Y/M428P/N434Y	
F247	4. 40E-07	M252Y/M428Q/N434Y	
F249	6. 40E-07	M252Y/M428S/N434Y	
F250	2. 90E-07	M252Y/M428T/N434Y	
F251	1. 90E-07	M252Y/M428V/N434Y	40
F252	1. 00E-06	M252Y/M428W/N434Y	
F253	7. 10E-07	M252Y/M428Y/N434Y	
F254	7. 50E-08	M252W/T307Q/M428Y/N434Y	

【 0 4 9 9 】

表 2 8 - 6 は、表 2 8 - 5 の続きの表である。

【表 2 8 - 6】

F255	1. 10E-07	M252W/Q311A/M428Y/N434Y
F256	5. 40E-08	M252W/T307Q/Q311A/M428Y/N434Y
F257	5. 00E-07	M252Y/T307A/M428Y/N434Y
F258	3. 20E-07	M252Y/T307Q/M428Y/N434Y
F259	2. 80E-07	M252Y/D270F/N434Y
F260	1. 30E-07	M252Y/T307A/Q311A/N434Y
F261	8. 40E-08	M252Y/T307Q/Q311A/N434Y
F262	1. 90E-07	M252Y/T307A/Q311H/N434Y
F263	1. 10E-07	M252Y/T307Q/Q311H/N434Y
F264	2. 80E-07	M252Y/E382A/N434Y
F265	6. 80E-07	M252Y/E382A/M428Y/N434Y
F266	4. 70E-07	M252Y/T307A/E382A/M428Y/N434Y
F267	3. 20E-07	M252Y/T307Q/E382A/M428Y/N434Y
F268	6. 30E-07	P238A/M252Y/M428F/N434Y
F269	5. 20E-07	M252Y/V305A/M428F/N434Y
F270	6. 60E-07	M252Y/N325G/M428F/N434Y
F271	6. 90E-07	M252Y/D376A/M428F/N434Y
F272	6. 80E-07	M252Y/E380A/M428F/N434Y
F273	6. 50E-07	M252Y/E382A/M428F/N434Y
F274	7. 60E-07	M252Y/E380A/E382A/M428F/N434Y
F275	4. 20E-08	S239K/M252Y/V308P/E382A/N434Y
F276	4. 10E-08	M252Y/D270F/V308P/E382A/N434Y
F277	1. 30E-07	S239K/M252Y/V308P/M428Y/N434Y
F278	3. 00E-08	M252Y/T307Q/V308P/E382A/N434Y
F279	6. 10E-08	M252Y/V308P/Q311H/E382A/N434Y
F280	4. 10E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/N434Y
F281	9. 20E-08	M252Y/V308P/E382A/M428F/N434Y
F282	2. 90E-08	M252Y/V308P/E382A/M428L/N434Y
F283	1. 00E-07	M252Y/V308P/E382A/M428Y/N434Y
F284	1. 00E-07	M252Y/V308P/M428Y/N434Y
F285	9. 90E-08	M252Y/V308P/M428F/N434Y
F286	1. 20E-07	S239K/M252Y/V308P/E382A/M428Y/N434Y
F287	1. 00E-07	M252Y/V308P/E380A/E382A/M428F/N434Y
F288	1. 90E-07	M252Y/T256E/E382A/N434Y
F289	4. 80E-07	M252Y/T256E/M428Y/N434Y
F290	4. 60E-07	M252Y/T256E/E382A/M428Y/N434Y
F292	2. 30E-08	S239K/M252Y/V308P/E382A/M428I/N434Y
F293	5. 30E-08	M252Y/V308P/E380A/E382A/M428I/N434Y
F294	1. 10E-07	S239K/M252Y/V308P/M428F/N434Y
F295	6. 80E-07	S239K/M252Y/E380A/E382A/M428F/N434Y
F296	4. 90E-07	M252Y/Q311A/M428Y/N434Y
F297	5. 10E-07	M252Y/D312A/M428Y/N434Y

10

20

30

40

【 0 5 0 0 】

表 2 8 - 7 は、表 2 8 - 6 の続きの表である。

【表 28 - 7】

F298	4.80E-07	M252Y/Q311A/D312A/M428Y/N434Y
F299	9.40E-08	S239K/M252Y/V308P/Q311A/M428Y/N434Y
F300	8.30E-08	S239K/M252Y/V308P/D312A/M428Y/N434Y
F301	7.20E-08	S239K/M252Y/V308P/Q311A/D312A/M428Y/N434Y
F302	1.90E-07	M252Y/T256E/T307P/N434Y
F303	6.70E-07	M252Y/T307P/M428Y/N434Y
F304	1.60E-08	M252W/V308P/M428Y/N434Y
F305	2.70E-08	M252Y/T256E/V308P/E382A/N434Y
F306	3.60E-08	M252W/V308P/E382A/N434Y
F307	3.60E-08	S239K/M252W/V308P/E382A/N434Y
F308	1.90E-08	S239K/M252W/V308P/E382A/M428Y/N434Y
F310	9.40E-08	S239K/M252W/V308P/E382A/M428I/N434Y
F311	2.80E-08	S239K/M252W/V308P/M428F/N434Y
F312	4.50E-07	S239K/M252W/E380A/E382A/M428F/N434Y
F313	6.50E-07	S239K/M252Y/T307P/M428Y/N434Y
F314	3.20E-07	M252Y/T256E/Q311A/D312A/M428Y/N434Y
F315	6.80E-07	S239K/M252Y/M428Y/N434Y
F316	7.00E-07	S239K/M252Y/D270F/M428Y/N434Y
F317	1.10E-07	S239K/M252Y/D270F/V308P/M428Y/N434Y
F318	1.80E-08	S239K/M252Y/V308P/M428I/N434Y
F320	2.00E-08	S239K/M252Y/V308P/N325G/E382A/M428I/N434Y
F321	3.20E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/N325G/N434Y
F322	9.20E-08	S239K/M252Y/D270F/T307P/V308P/N434Y
F323	2.70E-08	S239K/M252Y/T256E/D270F/V308P/N434Y
F324	2.80E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/V308P/N434Y
F325	2.10E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F326	7.50E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/Q311A/N434Y
F327	6.50E-08	S239K/M252Y/T256E/D270F/T307Q/Q311A/N434Y
F328	1.90E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/M428I/N434Y
F329	1.20E-08	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/N434Y
F330	3.60E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/L309E/N434Y
F331	3.00E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/P387E/N434Y
F333	7.40E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/L309E/Q311A/N434Y
F334	1.90E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/N325G/M428I/N434Y
F335	1.50E-08	S239K/M252Y/T256E/D270F/V308P/M428I/N434Y
F336	1.40E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y
F337	5.60E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/Q311A/M428I/N434Y
F338	7.70E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/M428I/N434Y
F339	1.90E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/L309E/M428I/N434Y
F343	3.20E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/M428L/N434Y
F344	3.00E-08	S239K/M252Y/V308P/M428L/N434Y
F349	1.50E-07	S239K/M252Y/V308P/L309P/M428L/N434Y

10

20

30

40

【0501】

表 28 - 8 は、表 28 - 7 の続きの表である。

【表 2 8 - 8】

F350	1. 70E-07	S239K/M252Y/V308P/L309R/M428L/N434Y	
F352	6. 00E-07	S239K/M252Y/L309P/M428L/N434Y	
F353	1. 10E-06	S239K/M252Y/L309R/M428L/N434Y	
F354	2. 80E-08	S239K/M252Y/T307Q/V308P/M428L/N434Y	
F356	3. 40E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/L309E/P387E/N434Y	
F357	1. 60E-08	S239K/M252Y/T256E/D270F/V308P/N325G/M428I/N434Y	
F358	1. 00E-07	S239K/M252Y/T307Q/N434Y	
F359	4. 20E-07	P257V/T307Q/M428I/N434Y	
F360	1. 30E-06	P257V/T307Q/M428V/N434Y	10
F362	5. 40E-08	P257V/T307Q/N325G/M428L/N434Y	
F363	4. 10E-08	P257V/T307Q/Q311A/M428L/N434Y	
F364	3. 50E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428L/N434Y	
F365	5. 10E-08	P257V/V305A/T307Q/M428L/N434Y	
F367	1. 50E-08	S239K/M252Y/E258H/D270F/T307Q/V308P/Q311A/N434Y	
F368	2. 00E-08	S239K/M252Y/D270F/V308P/N325G/E382A/M428I/N434Y	
F369	7. 50E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428I/N434Y	
F372	1. 30E-08	S239K/M252W/V308P/M428Y/N434Y	
F373	1. 10E-08	S239K/M252W/V308P/Q311A/M428Y/N434Y	
F374	1. 20E-08	S239K/M252W/T256E/V308P/M428Y/N434Y	20
F375	5. 50E-09	S239K/M252W/N286E/V308P/M428Y/N434Y	
F376	9. 60E-09	S239K/M252Y/T256E/D270F/N286E/V308P/N434Y	
F377	1. 30E-07	S239K/M252W/T307P/M428Y/N434Y	
F379	9. 00E-09	S239K/M252W/T256E/V308P/Q311A/M428Y/N434Y	
F380	5. 60E-09	S239K/M252W/T256E/N286E/V308P/M428Y/N434Y	
F381	1. 10E-07	P257V/T307A/Q311A/M428L/N434Y	
F382	8. 70E-08	P257V/V305A/T307A/M428L/N434Y	
F386	3. 20E-08	M252Y/V308P/L309E/N434Y	
F387	1. 50E-07	M252Y/V308P/L309D/N434Y	
F388	7. 00E-08	M252Y/V308P/L309A/N434Y	30
F389	1. 70E-08	M252W/V308P/L309E/M428Y/N434Y	
F390	6. 80E-08	M252W/V308P/L309D/M428Y/N434Y	
F391	3. 60E-08	M252W/V308P/L309A/M428Y/N434Y	
F392	6. 90E-09	S239K/M252Y/N286E/V308P/M428I/N434Y	
F393	1. 20E-08	S239K/M252Y/N286E/V308P/N434Y	
F394	5. 30E-08	S239K/M252Y/T307Q/Q311A/M428I/N434Y	
F395	2. 40E-08	S239K/M252Y/T256E/V308P/N434Y	
F396	2. 00E-08	S239K/M252Y/D270F/N286E/T307Q/Q311A/M428I/N434Y	
F397	4. 50E-08	S239K/M252Y/D270F/T307Q/Q311A/P387E/M428I/N434Y	
F398	4. 40E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y	40
F399	6. 50E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/T307Q/V308P/M428I/N434Y	
F400	6. 10E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/Q311A/M428I/N434Y	

【 0 5 0 2 】

表 2 8 - 9 は、表 2 8 - 8 の続きの表である。

【表 2 8 - 9】

F401	6. 90E-09	S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/P387E/M428I/N434Y
F402	2. 30E-08	P257V/T307Q/M428L/N434W
F403	5. 10E-08	P257V/T307A/M428L/N434W
F404	9. 40E-08	P257A/T307Q/L309P/M428L/N434Y
F405	1. 70E-07	P257V/T307Q/L309P/M428L/N434Y
F406	1. 50E-07	P257A/T307Q/L309R/M428L/N434Y
F407	1. 60E-07	P257V/T307Q/L309R/M428L/N434Y
F408	2. 50E-07	P257V/N286E/M428L/N434Y
F409	2. 00E-07	P257V/P387E/M428L/N434Y
F410	2. 20E-07	P257V/T307H/M428L/N434Y
F411	1. 30E-07	P257V/T307N/M428L/N434Y
F412	8. 80E-08	P257V/T307G/M428L/N434Y
F413	1. 20E-07	P257V/T307P/M428L/N434Y
F414	1. 10E-07	P257V/T307S/M428L/N434Y
F415	5. 60E-08	P257V/N286E/T307A/M428L/N434Y
F416	9. 40E-08	P257V/T307A/P387E/M428L/N434Y
F418	6. 20E-07	S239K/M252Y/T307P/N325G/M428Y/N434Y
F419	1. 60E-07	M252Y/T307A/Q311H/K360H/N434Y
F420	1. 50E-07	M252Y/T307A/Q311H/P387E/N434Y
F421	1. 30E-07	M252Y/T307A/Q311H/M428A/N434Y
F422	1. 80E-07	M252Y/T307A/Q311H/E382A/N434Y
F423	8. 40E-08	M252Y/T307W/Q311H/N434Y
F424	9. 40E-08	S239K/P257A/V308P/M428L/N434Y
F425	8. 00E-08	P257A/V308P/L309E/M428L/N434Y
F426	8. 40E-08	P257V/T307Q/N434Y
F427	1. 10E-07	M252Y/P257V/T307Q/M428V/N434Y
F428	8. 00E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F429	3. 70E-08	M252Y/P257V/T307Q/N434Y
F430	8. 10E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428Y/N434Y
F431	6. 50E-08	M252Y/P257V/T307Q/M428F/N434Y
F432	9. 20E-07	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428V/N434Y
F433	6. 00E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/N434Y
F434	2. 00E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428Y/N434Y
F435	2. 50E-08	P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428F/N434Y
F436	2. 50E-07	P257A/T307Q/M428V/N434Y
F437	5. 70E-08	P257A/T307Q/N434Y
F438	3. 60E-08	P257A/T307Q/M428Y/N434Y
F439	4. 00E-08	P257A/T307Q/M428F/N434Y
F440	1. 50E-08	P257V/N286E/T307Q/Q311A/N325G/M428L/N434Y
F441	1. 80E-07	P257A/Q311A/M428L/N434Y
F442	2. 00E-07	P257A/Q311H/M428L/N434Y
F443	5. 50E-08	P257A/T307Q/Q311A/M428L/N434Y

10

20

30

40

【 0 5 0 3 】

表 2 8 - 1 0 は、表 2 8 - 9 の続きの表である。

【表 2 8 - 1 0】

F444	1. 40E-07	P257A/T307A/Q311A/M428L/N434Y
F445	6. 20E-08	P257A/T307Q/Q311H/M428L/N434Y
F446	1. 10E-07	P257A/T307A/Q311H/M428L/N434Y
F447	1. 40E-08	P257A/N286E/T307Q/M428L/N434Y
F448	5. 30E-08	P257A/N286E/T307A/M428L/N434Y
F449	5. 70E-07	S239K/M252Y/D270F/T307P/N325G/M428Y/N434Y
F450	5. 20E-07	S239K/M252Y/T307P/L309E/N325G/M428Y/N434Y
F451	1. 00E-07	P257S/T307A/M428L/N434Y
F452	1. 40E-07	P257M/T307A/M428L/N434Y
F453	7. 80E-08	P257N/T307A/M428L/N434Y
F454	9. 60E-08	P257I/T307A/M428L/N434Y
F455	2. 70E-08	P257V/T307Q/M428Y/N434Y
F456	3. 40E-08	P257V/T307Q/M428F/N434Y
F457	4. 00E-08	S239K/P257V/V308P/M428L/N434Y
F458	1. 50E-08	P257V/T307Q/V308P/N325G/M428L/N434Y
F459	1. 30E-08	P257V/T307Q/V308P/Q311A/N325G/M428L/N434Y
F460	4. 70E-08	P257V/T307A/V308P/N325G/M428L/N434Y
F462	8. 50E-08	P257A/V308P/N325G/M428L/N434Y
F463	1. 30E-07	P257A/T307A/V308P/M428L/N434Y
F464	5. 50E-08	P257A/T307Q/V308P/M428L/N434Y
F465	2. 10E-08	P257V/N286E/T307Q/N325G/M428L/N434Y
F466	3. 50E-07	T256E/P257V/N434Y
F467	5. 70E-07	T256E/P257T/N434Y
F468	5. 70E-08	S239K/P257T/V308P/M428L/N434Y
F469	5. 60E-08	P257T/V308P/N325G/M428L/N434Y
F470	5. 40E-08	T256E/P257T/V308P/N325G/M428L/N434Y
F471	6. 60E-08	P257T/V308P/N325G/E382A/M428L/N434Y
F472	5. 40E-08	P257T/V308P/N325G/P387E/M428L/N434Y
F473	4. 50E-07	P257T/V308P/L309P/N325G/M428L/N434Y
F474	3. 50E-07	P257T/V308P/L309R/N325G/M428L/N434Y
F475	4. 30E-08	T256E/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F476	5. 50E-08	P257V/T307Q/E382A/M428L/N434Y
F477	4. 30E-08	P257V/T307Q/P387E/M428L/N434Y
F480	3. 90E-08	P257L/V308P/N434Y
F481	5. 60E-08	P257T/T307Q/N434Y
F482	7. 00E-08	P257V/T307Q/N325G/N434Y
F483	5. 70E-08	P257V/T307Q/Q311A/N434Y
F484	6. 20E-08	P257V/V305A/T307Q/N434Y
F485	9. 70E-08	P257V/N286E/T307A/N434Y
F486	3. 40E-07	P257V/T307Q/L309R/Q311H/M428L/N434Y
F488	3. 50E-08	P257V/V308P/N325G/M428L/N434Y
F490	7. 50E-08	S239K/P257V/V308P/Q311H/M428L/N434Y

10

20

30

40

【 0 5 0 4】

表 2 8 - 1 1 は、表 2 8 - 1 0 の続きの表である。

【表 2 8 - 1 1】

F492	9. 80E-08	P257V/V305A/T307A/N325G/M428L/N434Y
F493	4. 90E-07	S239K/D270F/T307P/N325G/M428Y/N434Y
F497	3. 10E-06	P257T/T307A/M428V/N434Y
F498	1. 30E-06	P257A/M428V/N434Y
F499	5. 20E-07	P257A/T307A/M428V/N434Y
F500	4. 30E-08	P257S/T307Q/M428L/N434Y
F506	1. 90E-07	P257V/N297A/T307Q/M428L/N434Y
F507	5. 10E-08	P257V/N286A/T307Q/M428L/N434Y
F508	1. 10E-07	P257V/T307Q/N315A/M428L/N434Y
F509	5. 80E-08	P257V/T307Q/N384A/M428L/N434Y
F510	5. 30E-08	P257V/T307Q/N389A/M428L/N434Y
F511	4. 20E-07	P257V/N434Y
F512	5. 80E-07	P257T/N434Y
F517	3. 10E-07	P257V/N286E/N434Y
F518	4. 20E-07	P257T/N286E/N434Y
F519	2. 60E-08	P257V/N286E/T307Q/N434Y
F521	1. 10E-08	P257V/N286E/T307Q/M428Y/N434Y
F523	2. 60E-08	P257V/V305A/T307Q/M428Y/N434Y
F526	1. 90E-08	P257T/T307Q/M428Y/N434Y
F527	9. 40E-09	P257V/T307Q/V308P/N325G/M428Y/N434Y
F529	2. 50E-08	P257T/T307Q/M428F/N434Y
F533	1. 20E-08	P257A/N286E/T307Q/M428F/N434Y
F534	1. 20E-08	P257A/N286E/T307Q/M428Y/N434Y
F535	3. 90E-08	T250A/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F538	9. 90E-08	T250F/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F541	6. 00E-08	T250I/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F544	3. 10E-08	T250M/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F549	5. 40E-08	T250S/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F550	5. 90E-08	T250V/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F551	1. 20E-07	T250W/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F552	1. 10E-07	T250Y/P257V/T307Q/M428L/N434Y
F553	1. 70E-07	M252Y/Q311A/N434Y
F554	2. 80E-08	S239K/M252Y/S254T/V308P/N434Y
F556	1. 50E-06	M252Y/T307Q/Q311A
F559	8. 00E-08	M252Y/S254T/N286E/N434Y
F560	2. 80E-08	M252Y/S254T/V308P/N434Y
F561	1. 40E-07	M252Y/S254T/T307A/N434Y
F562	8. 30E-08	M252Y/S254T/T307Q/N434Y
F563	1. 30E-07	M252Y/S254T/Q311A/N434Y
F564	1. 90E-07	M252Y/S254T/Q311H/N434Y
F565	9. 20E-08	M252Y/S254T/T307A/Q311A/N434Y
F566	6. 10E-08	M252Y/S254T/T307Q/Q311A/N434Y

10

20

30

40

【 0 5 0 5 】

表 2 8 - 1 2 は、表 2 8 - 1 1 の続きの表である。

【表 2 8 - 1 2】

F567	2. 20E-07	M252Y/S254T/M428I/N434Y
F568	1. 10E-07	M252Y/T256E/T307A/Q311H/N434Y
F569	2. 00E-07	M252Y/T256Q/T307A/Q311H/N434Y
F570	1. 30E-07	M252Y/S254T/T307A/Q311H/N434Y
F571	8. 10E-08	M252Y/N286E/T307A/Q311H/N434Y
F572	1. 00E-07	M252Y/T307A/Q311H/M428I/N434Y
F576	1. 60E-06	M252Y/T256E/T307Q/Q311H
F577	1. 30E-06	M252Y/N286E/T307A/Q311A
F578	5. 70E-07	M252Y/N286E/T307Q/Q311A
F580	8. 60E-07	M252Y/N286E/T307Q/Q311H
F581	7. 20E-08	M252Y/T256E/N286E/N434Y
F582	7. 50E-07	S239K/M252Y/V308P
F583	7. 80E-07	S239K/M252Y/V308P/E382A
F584	6. 30E-07	S239K/M252Y/T256E/V308P
F585	2. 90E-07	S239K/M252Y/N286E/V308P
F586	1. 40E-07	S239K/M252Y/N286E/V308P/M428I
F587	1. 90E-07	M252Y/N286E/M428L/N434Y
F592	2. 00E-07	M252Y/S254T/E382A/N434Y
F593	3. 10E-08	S239K/M252Y/S254T/V308P/M428I/N434Y
F594	1. 60E-08	S239K/M252Y/T256E/V308P/M428I/N434Y
F595	1. 80E-07	S239K/M252Y/M428I/N434Y
F596	4. 00E-07	M252Y/D312A/E382A/M428Y/N434Y
F597	2. 20E-07	M252Y/E382A/P387E/N434Y
F598	1. 40E-07	M252Y/D312A/P387E/N434Y
F599	5. 20E-07	M252Y/P387E/M428Y/N434Y
F600	2. 80E-07	M252Y/T256Q/E382A/N434Y
F601	9. 60E-09	M252Y/N286E/V308P/N434Y
F608		G236A/S239D/I332E
F611	2. 80E-07	M252Y/V305T/T307P/V308I/L309A/N434Y
F612	3. 60E-07	M252Y/T307P/V308I/L309A/N434Y
F613		S239D/A330L/I332E
F616		S239D/K326D/L328Y
F617	7. 40E-07	S239K/N434W
F618	6. 40E-07	S239K/V308F/N434Y
F619	3. 10E-07	S239K/M252Y/N434Y
F620	2. 10E-07	S239K/M252Y/S254T/N434Y
F621	1. 50E-07	S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y
F622	3. 50E-07	S239K/M252Y/T256Q/N434Y
F623	1. 80E-07	S239K/M252W/N434W
F624	1. 40E-08	S239K/P257A/N286E/T307Q/M428L/N434Y
F625	7. 60E-08	S239K/P257A/T307Q/M428L/N434Y
F626	1. 30E-06	V308P

10

20

30

40

【 0 5 0 6 】

表 2 8 - 1 3 は、表 2 8 - 1 2 の続きの表である。

【表 2 8 - 1 3】

F629	3. 90E-08	M252Y/V279L/V308P/N434Y
F630	3. 70E-08	S239K/M252Y/V279L/V308P/N434Y
F633	2. 40E-08	M252Y/V282D/V308P/N434Y
F634	3. 20E-08	S239K/M252Y/V282D/V308P/N434Y
F635	4. 50E-08	M252Y/V284K/V308P/N434Y
F636	4. 80E-08	S239K/M252Y/V284K/V308P/N434Y
F637	1. 50E-07	M252Y/K288S/V308P/N434Y
F638	1. 40E-07	S239K/M252Y/K288S/V308P/N434Y
F639	2. 70E-08	M252Y/V308P/G385R/N434Y
F640	3. 60E-08	S239K/M252Y/V308P/G385R/N434Y
F641	3. 00E-08	M252Y/V308P/Q386K/N434Y
F642	3. 00E-08	S239K/M252Y/V308P/Q386K/N434Y
F643	3. 20E-08	L235G/G236R/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F644	3. 00E-08	G236R/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F645	3. 30E-08	S239K/M252Y/V308P/L328R/N434Y
F646	3. 80E-08	S239K/M252Y/N297A/V308P/N434Y
F647	2. 90E-08	P238D/M252Y/V308P/N434Y
F648		P238D
F649	1. 20E-07	S239K/M252Y/N286E/N434Y
F650	1. 70E-07	S239K/M252Y/T256E/N434Y
F651	1. 80E-07	S239K/M252Y/Q311A/N434Y
F652	2. 40E-07	P238D/M252Y/N434Y
F654	3. 20E-08	L235K/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F655	3. 40E-08	L235R/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F656	3. 30E-08	G237K/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F657	3. 20E-08	G237R/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F658	3. 20E-08	P238K/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F659	3. 00E-08	P238R/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F660	3. 10E-08	S239K/M252Y/V308P/P329K/N434Y
F661	3. 40E-08	S239K/M252Y/V308P/P329R/N434Y
F663	6. 40E-09	S239K/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F664	3. 90E-08	M252Y/N286A/V308P/N434Y
F665	2. 00E-08	M252Y/N286D/V308P/N434Y
F666	2. 10E-08	M252Y/N286F/V308P/N434Y
F667	3. 00E-08	M252Y/N286G/V308P/N434Y
F668	4. 00E-08	M252Y/N286H/V308P/N434Y
F669	3. 50E-08	M252Y/N286I/V308P/N434Y
F670	2. 10E-07	M252Y/N286K/V308P/N434Y
F671	2. 20E-08	M252Y/N286L/V308P/N434Y
F672	2. 40E-08	M252Y/N286M/V308P/N434Y
F673	2. 30E-08	M252Y/N286P/V308P/N434Y
F674	3. 20E-08	M252Y/N286Q/V308P/N434Y

10

20

30

40

【 0 5 0 7 】

表 2 8 - 1 4 は、表 2 8 - 1 3 の続きの表である。

【表 2 8 - 1 4】

F675	5. 10E-08	M252Y/N286R/V308P/N434Y	
F676	3. 20E-08	M252Y/N286S/V308P/N434Y	
F677	4. 70E-08	M252Y/N286T/V308P/N434Y	
F678	3. 30E-08	M252Y/N286V/V308P/N434Y	
F679	1. 70E-08	M252Y/N286W/V308P/N434Y	
F680	1. 50E-08	M252Y/N286Y/V308P/N434Y	
F681	4. 90E-08	M252Y/K288A/V308P/N434Y	
F682	8. 20E-08	M252Y/K288D/V308P/N434Y	
F683	5. 00E-08	M252Y/K288E/V308P/N434Y	10
F684	5. 10E-08	M252Y/K288F/V308P/N434Y	
F685	5. 30E-08	M252Y/K288G/V308P/N434Y	
F686	4. 60E-08	M252Y/K288H/V308P/N434Y	
F687	4. 90E-08	M252Y/K288I/V308P/N434Y	
F688	2. 80E-08	M252Y/K288L/V308P/N434Y	
F689	4. 10E-08	M252Y/K288M/V308P/N434Y	
F690	1. 00E-07	M252Y/K288N/V308P/N434Y	
F691	3. 20E-07	M252Y/K288P/V308P/N434Y	
F692	3. 90E-08	M252Y/K288Q/V308P/N434Y	
F693	3. 60E-08	M252Y/K288R/V308P/N434Y	20
F694	4. 70E-08	M252Y/K288V/V308P/N434Y	
F695	4. 00E-08	M252Y/K288W/V308P/N434Y	
F696	4. 40E-08	M252Y/K288Y/V308P/N434Y	
F697	3. 10E-08	S239K/M252Y/V308P/N325G/N434Y	
F698	2. 20E-08	M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y	
F699	2. 30E-08	S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y	
F700	5. 20E-08	M252Y/V308P/L328E/N434Y	
F705	7. 10E-09	M252Y/N286E/V308P/M428I/N434Y	
F706	1. 80E-08	M252Y/N286E/T307Q/Q311A/M428I/N434Y	
F707	5. 90E-09	M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y	30
F708	4. 10E-09	M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y	
F709	2. 00E-08	S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/M428I/N434Y	
F710	1. 50E-08	P238D/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/M428I/N434Y	
F711	6. 50E-08	S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y	
F712	6. 00E-08	P238D/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y	
F713	2. 00E-08	P238D/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y	
F714	2. 30E-07	P238D/M252Y/N325S/N434Y	
F715	2. 30E-07	P238D/M252Y/N325M/N434Y	
F716	2. 70E-07	P238D/M252Y/N325L/N434Y	
F717	2. 60E-07	P238D/M252Y/N325I/N434Y	40
F718	2. 80E-07	P238D/M252Y/Q295M/N434Y	
F719	7. 40E-08	P238D/M252Y/N325G/N434Y	
F720	2. 40E-08	M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y	

【 0 5 0 8 】

表 2 8 - 1 5 は、表 2 8 - 1 4 の続きの表である。

【表 2 8 - 1 5】

F721	1. 50E-08	M252Y/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y
F722	2. 70E-07	P238D/M252Y/A327G/N434Y
F723	2. 80E-07	P238D/M252Y/L328D/N434Y
F724	2. 50E-07	P238D/M252Y/L328E/N434Y
F725	4. 20E-08	L235K/G237R/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F726	3. 70E-08	L235K/P238K/S239K/M252Y/V308P/N434Y
F729	9. 20E-07	T307A/Q311A/N434Y
F730	6. 00E-07	T307Q/Q311A/N434Y
F731	8. 50E-07	T307A/Q311H/N434Y
F732	6. 80E-07	T307Q/Q311H/N434Y
F733	3. 20E-07	M252Y/L328E/N434Y
F734	3. 10E-07	G236D/M252Y/L328E/N434Y
F736	3. 10E-07	M252Y/S267M/L328E/N434Y
F737	3. 10E-07	M252Y/S267L/L328E/N434Y
F738	3. 50E-07	P238D/M252Y/T307P/N434Y
F739	2. 20E-07	M252Y/T307P/Q311A/N434Y
F740	2. 90E-07	M252Y/T307P/Q311H/N434Y
F741	3. 10E-07	P238D/T250A/M252Y/N434Y
F744	9. 90E-07	P238D/T250F/M252Y/N434Y
F745	6. 60E-07	P238D/T250G/M252Y/N434Y
F746	6. 00E-07	P238D/T250H/M252Y/N434Y
F747	2. 80E-07	P238D/T250I/M252Y/N434Y
F749	5. 10E-07	P238D/T250L/M252Y/N434Y
F750	3. 00E-07	P238D/T250M/M252Y/N434Y
F751	5. 30E-07	P238D/T250N/M252Y/N434Y
F753	1. 80E-07	P238D/T250Q/M252Y/N434Y
F755	3. 50E-07	P238D/T250S/M252Y/N434Y
F756	3. 70E-07	P238D/T250V/M252Y/N434Y
F757	1. 20E-06	P238D/T250W/M252Y/N434Y
F758	1. 40E-06	P238D/T250Y/M252Y/N434Y
F759		L235K/S239K
F760		L235R/S239K
F761	1. 10E-06	P238D/N434Y
F762	3. 60E-08	L235K/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F763	3. 50E-08	L235R/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y
F764	6. 30E-07	P238D/T307Q/Q311A/N434Y
F765	8. 50E-08	P238D/M252Y/T307Q/L309E/Q311A/N434Y
F766	6. 00E-07	T307A/L309E/Q311A/N434Y
F767	4. 30E-07	T307Q/L309E/Q311A/N434Y
F768	6. 40E-07	T307A/L309E/Q311H/N434Y
F769	4. 60E-07	T307Q/L309E/Q311H/N434Y
F770	3. 00E-07	M252Y/T256A/N434Y

10

20

30

40

【 0 5 0 9 】

表 2 8 - 1 6 は、表 2 8 - 1 5 の続きの表である。

【表 2 8 - 1 6】

F771	4.00E-07	M252Y/E272A/N434Y	
F772	3.80E-07	M252Y/K274A/N434Y	
F773	3.90E-07	M252Y/V282A/N434Y	
F774	4.00E-07	M252Y/N286A/N434Y	
F775	6.20E-07	M252Y/K338A/N434Y	
F776	3.90E-07	M252Y/K340A/N434Y	
F777	3.90E-07	M252Y/E345A/N434Y	
F779	3.90E-07	M252Y/N361A/N434Y	
F780	3.90E-07	M252Y/Q362A/N434Y	10
F781	3.70E-07	M252Y/S375A/N434Y	
F782	3.50E-07	M252Y/Y391A/N434Y	
F783	4.00E-07	M252Y/D413A/N434Y	
F784	5.00E-07	M252Y/L309A/N434Y	
F785	7.40E-07	M252Y/L309H/N434Y	
F786	2.80E-08	M252Y/S254T/N286E/T307Q/Q311A/N434Y	
F787	8.80E-08	M252Y/S254T/T307Q/L309E/Q311A/N434Y	
F788	4.10E-07	M252Y/N315A/N434Y	
F789	1.50E-07	M252Y/N315D/N434Y	
F790	2.70E-07	M252Y/N315E/N434Y	20
F791	4.40E-07	M252Y/N315F/N434Y	
F792	4.40E-07	M252Y/N315G/N434Y	
F793	3.30E-07	M252Y/N315I/N434Y	
F794	4.10E-07	M252Y/N315K/N434Y	
F795	3.10E-07	M252Y/N315L/N434Y	
F796	3.40E-07	M252Y/N315M/N434Y	
F798	3.50E-07	M252Y/N315Q/N434Y	
F799	4.10E-07	M252Y/N315R/N434Y	
F800	3.80E-07	M252Y/N315S/N434Y	
F801	4.40E-07	M252Y/N315T/N434Y	30
F802	3.30E-07	M252Y/N315V/N434Y	
F803	3.60E-07	M252Y/N315W/N434Y	
F804	4.00E-07	M252Y/N315Y/N434Y	
F805	3.00E-07	M252Y/N325A/N434Y	
F806	3.10E-07	M252Y/N384A/N434Y	
F807	3.20E-07	M252Y/N389A/N434Y	
F808	3.20E-07	M252Y/N389A/N390A/N434Y	
F809	2.20E-07	M252Y/S254T/T256S/N434Y	
F810	2.20E-07	M252Y/A378V/N434Y	
F811	4.90E-07	M252Y/E380S/N434Y	40
F812	2.70E-07	M252Y/E382V/N434Y	
F813	2.80E-07	M252Y/S424E/N434Y	
F814	1.20E-07	M252Y/N434Y/Y436I	

【0510】

表 2 8 - 1 7 は、表 2 8 - 1 6 の続きの表である。

【表 2 8 - 1 7】

F815	5. 50E-07	M252Y/N434Y/T437R	
F816	3. 60E-07	P238D/T250V/M252Y/T307P/N434Y	
F817	9. 80E-08	P238D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y	
F819	1. 40E-07	P238D/M252Y/N286E/N434Y	
F820	3. 40E-07	L235K/S239K/M252Y/N434Y	
F821	3. 10E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y	
F822	1. 10E-06	P238D/T250Y/M252Y/W313Y/N434Y	
F823	1. 10E-06	P238D/T250Y/M252Y/W313F/N434Y	
F828	2. 50E-06	P238D/T250V/M252Y/I253V/N434Y	10
F831	1. 60E-06	P238D/T250V/M252Y/R255A/N434Y	
F832	2. 60E-06	P238D/T250V/M252Y/R255D/N434Y	
F833	8. 00E-07	P238D/T250V/M252Y/R255E/N434Y	
F834	8. 10E-07	P238D/T250V/M252Y/R255F/N434Y	
F836	5. 00E-07	P238D/T250V/M252Y/R255H/N434Y	
F837	5. 60E-07	P238D/T250V/M252Y/R255I/N434Y	
F838	4. 30E-07	P238D/T250V/M252Y/R255K/N434Y	
F839	3. 40E-07	P238D/T250V/M252Y/R255L/N434Y	
F840	4. 20E-07	P238D/T250V/M252Y/R255M/N434Y	
F841	1. 10E-06	P238D/T250V/M252Y/R255N/N434Y	20
F843	6. 60E-07	P238D/T250V/M252Y/R255Q/N434Y	
F844	1. 30E-06	P238D/T250V/M252Y/R255S/N434Y	
F847	3. 40E-07	P238D/T250V/M252Y/R255W/N434Y	
F848	8. 30E-07	P238D/T250V/M252Y/R255Y/N434Y	
F849	3. 30E-07	M252Y/D280A/N434Y	
F850	2. 90E-07	M252Y/D280E/N434Y	
F852	3. 30E-07	M252Y/D280G/N434Y	
F853	3. 20E-07	M252Y/D280H/N434Y	
F855	3. 20E-07	M252Y/D280K/N434Y	
F858	3. 20E-07	M252Y/D280N/N434Y	30
F860	3. 30E-07	M252Y/D280Q/N434Y	
F861	3. 20E-07	M252Y/D280R/N434Y	
F862	3. 00E-07	M252Y/D280S/N434Y	
F863	2. 70E-07	M252Y/D280T/N434Y	
F867	2. 80E-07	M252Y/N384A/N389A/N434Y	
F868	2. 00E-08	G236A/S239D/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y	
F869		G236A/S239D	
F870	7. 30E-08	L235K/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y	
F871	7. 10E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y	
F872	1. 30E-07	L235K/S239K/M252Y/N286E/N434Y	
F873	1. 20E-07	L235R/S239K/M252Y/N286E/N434Y	40
F875	4. 80E-07	M252Y/N434Y/Y436A	
F877	8. 30E-07	M252Y/N434Y/Y436E	

【 0 5 1 1 】

表 2 8 - 1 8 は、表 2 8 - 1 7 の続きの表である。

【表 2 8 - 1 8】

F878	1. 90E-07	M252Y/N434Y/Y436F	
F879	9. 20E-07	M252Y/N434Y/Y436G	
F880	3. 90E-07	M252Y/N434Y/Y436H	
F881	3. 10E-07	M252Y/N434Y/Y436K	
F882	1. 30E-07	M252Y/N434Y/Y436L	
F883	2. 10E-07	M252Y/N434Y/Y436M	
F884	4. 00E-07	M252Y/N434Y/Y436N	
F888	4. 80E-07	M252Y/N434Y/Y436S	
F889	2. 20E-07	M252Y/N434Y/Y436T	10
F890	1. 10E-07	M252Y/N434Y/Y436V	
F891	1. 70E-07	M252Y/N434Y/Y436W	
F892	7. 10E-08	M252Y/S254T/N434Y/Y436I	
F893	9. 80E-08	L235K/S239K/M252Y/N434Y/Y436I	
F894	9. 20E-08	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436I	
F895	2. 10E-08	L235K/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N315E/N434Y	
F896	2. 00E-08	L235R/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N315E/N434Y	
F897	9. 70E-08	M252Y/N315D/N384A/N389A/N434Y	
F898	1. 70E-07	M252Y/N315E/N384A/N389A/N434Y	
F899	1. 10E-07	M252Y/N315D/G316A/N434Y	20
F900	1. 70E-07	M252Y/N315D/G316D/N434Y	
F901	1. 30E-07	M252Y/N315D/G316E/N434Y	
F902	2. 20E-07	M252Y/N315D/G316F/N434Y	
F903	2. 30E-07	M252Y/N315D/G316H/N434Y	
F904	1. 00E-07	M252Y/N315D/G316I/N434Y	
F905	1. 30E-07	M252Y/N315D/G316K/N434Y	
F906	1. 50E-07	M252Y/N315D/G316L/N434Y	
F907	1. 30E-07	M252Y/N315D/G316M/N434Y	
F908	1. 50E-07	M252Y/N315D/G316N/N434Y	
F909	1. 30E-07	M252Y/N315D/G316P/N434Y	30
F910	1. 40E-07	M252Y/N315D/G316Q/N434Y	
F911	1. 30E-07	M252Y/N315D/G316R/N434Y	
F912	1. 20E-07	M252Y/N315D/G316S/N434Y	
F913	1. 10E-07	M252Y/N315D/G316T/N434Y	
F914	1. 50E-07	M252Y/N315D/G316V/N434Y	
F915	2. 30E-07	M252Y/N315D/G316W/N434Y	
F917	2. 50E-07	M252Y/N286S/N434Y	
F918	2. 80E-07	M252Y/D280E/N384A/N389A/N434Y	
F919	3. 30E-07	M252Y/D280G/N384A/N389A/N434Y	
F920	2. 50E-07	M252Y/N286S/N384A/N389A/N434Y	40
F921	1. 20E-07	M252Y/N286E/N384A/N389A/N434Y	
F922	5. 90E-08	L235K/S239K/M252Y/N286E/N434Y/Y436I	
F923	6. 00E-08	L235R/S239K/M252Y/N286E/N434Y/Y436I	

【 0 5 1 2】

表 2 8 - 1 9 は、表 2 8 - 1 8 の続きの表である。

【表 28 - 19】

F924	3.40E-08	L235K/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436I
F925	3.20E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436I
F926	1.10E-07	L235K/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436I
F927	1.00E-07	L235R/S239K/M252Y/S254T/N434Y/Y436I
F928	2.90E-08	M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436I
F929	2.90E-08	M252Y/S254T/T307Q/Q311A/N434Y/Y436I
F930	1.40E-07	P238D/T250V/M252Y/N286E/N434Y
F931	1.20E-07	P238D/T250V/M252Y/N434Y/Y436I
F932	3.20E-07	T250V/M252Y/N434Y
F933	3.00E-07	L234R/P238D/T250V/M252Y/N434Y
F934	3.10E-07	G236K/P238D/T250V/M252Y/N434Y
F935	3.20E-07	G237K/P238D/T250V/M252Y/N434Y
F936	3.20E-07	G237R/P238D/T250V/M252Y/N434Y
F937	3.10E-07	P238D/S239K/T250V/M252Y/N434Y
F938	1.60E-07	L235K/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F939	1.50E-07	L235R/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F940	1.50E-07	P238D/T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F941	1.20E-08	M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F942	4.20E-08	L235K/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F943	4.00E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F944	1.70E-07	T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F945	1.70E-08	T250V/M252Y/V308P/N434Y/Y436V
F946	4.30E-08	T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F947	1.10E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F954	5.30E-07	M252Y/N434Y/H435K/Y436V
F957	7.70E-07	M252Y/N434Y/H435N/Y436V
F960	8.00E-07	M252Y/N434Y/H435R/Y436V
F966	3.10E-07	M252Y/S254A/N434Y
F970	2.50E-06	M252Y/S254G/N434Y
F971	2.60E-06	M252Y/S254H/N434Y
F972	2.60E-07	M252Y/S254I/N434Y
F978	1.30E-06	M252Y/S254Q/N434Y
F980	1.80E-07	M252Y/S254V/N434Y
F987	4.00E-08	P238D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F988	6.90E-08	P238D/T250V/M252Y/N286E/N434Y/Y436V
F989	1.40E-08	L235R/S239K/M252Y/V308P/N434Y/Y436V
F990	9.40E-09	L235R/S239K/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F991	1.30E-08	L235R/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F992	5.10E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/M428I/N434Y/Y436V
F993	3.80E-08	M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F994	2.80E-07	M252Y/N325G/N434Y
F995	2.90E-07	L235R/P238D/S239K/M252Y/N434Y

10

20

30

40

【0513】

表 28 - 20 は、表 28 - 19 の続きの表である。

【表 28 - 20】

F996	1. 30E-07	L235R/P238D/S239K/M252Y/N434Y/Y436V
F997	3. 80E-07	K248I/T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F998	8. 50E-07	K248Y/T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F999	2. 10E-07	T250V/M252Y/E258H/N434Y/Y436V
F1005		N325G
F1008	1. 70E-07	L235R/S239K/T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F1009	1. 20E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1010	1. 90E-07	L235R/S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y
F1011	4. 50E-08	T250V/M252Y/V308P/N434Y
F1012	4. 70E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/V308P/N434Y
F1013	3. 00E-08	T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F1014	3. 20E-08	L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F1015	2. 20E-08	L235R/S239K/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F1016	3. 80E-09	T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1017	4. 20E-09	L235R/S239K/T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1018	3. 20E-09	L235R/S239K/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1019	3. 40E-07	P238D/T250V/M252Y/N325G/N434Y
F1020	8. 50E-08	P238D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N325G/N434Y
F1021	3. 30E-07	P238D/T250V/M252Y/N325A/N434Y
F1022		K326D/L328Y
F1023	4. 40E-08	S239D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F1024	4. 00E-08	T250V/M252Y/T307Q/Q311A/K326D/L328Y/N434Y/Y436V
F1025	3. 60E-08	S239D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/K326D/L328Y/N434Y/Y436V
F1026	8. 40E-08	M252Y/T307A/Q311H/N434Y/Y436V
F1027	8. 60E-08	L235R/S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y/Y436V
F1028	4. 60E-08	G236A/S239D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F1029	5. 10E-08	T250V/M252Y/T307Q/Q311A/I332E/N434Y/Y436V
F1030		I332E
F1031	5. 30E-08	G236A/S239D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/I332E/N434Y/Y436V
F1032	4. 30E-08	P238D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N325G/N434Y/Y436V
F1033	1. 00E-06	P238D/N434W
F1034	1. 50E-08	L235K/S239K/M252Y/V308P/N434Y/Y436V
F1035	1. 00E-08	L235K/S239K/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1036	1. 40E-08	L235K/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V
F1037	6. 10E-08	L235K/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/M428I/N434Y/Y436V
F1038	2. 80E-07	L235K/P238D/S239K/M252Y/N434Y
F1039	1. 30E-07	L235K/P238D/S239K/M252Y/N434Y/Y436V

10

20

30

40

【0514】

表 28 - 21 は、表 28 - 20 の続きの表である。

【表 2 8 - 2 1】

F1040	2. 00E-07	L235K/S239K/T250V/M252Y/N434Y/Y436V
F1041	1. 40E-08	L235K/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1042	2. 00E-07	L235K/S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y
F1043	5. 20E-08	L235K/S239K/T250V/M252Y/V308P/N434Y
F1044	3. 50E-08	L235K/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F1045	2. 50E-08	L235K/S239K/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y
F1046	4. 50E-09	L235K/S239K/T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1047	3. 40E-09	L235K/S239K/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V
F1048	9. 90E-08	L235K/S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y/Y436V
F1050	3. 50E-09	T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y/Y436V
F1051	3. 90E-09	L235R/S239K/T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y/Y436V
F1052	3. 20E-09	L235R/S239K/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y/Y436V

10

20

## 【 0 5 1 5 】

〔参考例13〕ヒトFcRnトランスジェニックマウス系統32を用いた定常状態注入モデルによる様々なFc変異体抗体のin vivo試験

参考例12において作製したFc変異体を、ヒトFcRnトランスジェニックマウス系統32を用いた定常状態注入モデルにおいて血漿中抗原消失能に関して試験した。定常状態注入モデルin vivo試験は、ヒトFcRnトランスジェニックマウス系統32を系統276の代わりに用い、モノクローナル抗マウスCD4抗体を2回（注入ポンプを埋め込む前と、抗体を投与した14日後）または3回（注入ポンプを埋め込む前と、抗体を投与した10日後および20日後）投与したこと以外は、実施例1に記載した通りに行った。

30

## 【 0 5 1 6 】

表 2 8 - 1 から 2 8 - 2 1 に記載のFc変異体から選択した、以下に記載の抗体Fc変異体を、参考例3に記載の当業者公知の方法によって発現させて精製した：

VH3-IgG1とVL3-CKとを含むFv4-IgG1；  
 VH3-IgG1-F11とVL3-CKとを含むFv4-IgG1-F11；  
 VH3-IgG1-F14とVL3-CKとを含むFv4-IgG1-F14；  
 VH3-IgG1-F39とVL3-CKとを含むFv4-IgG1-F39；  
 VH3-IgG1-F48とVL3-CKとを含むFv4-IgG1-F48；  
 VH3-IgG1-F140とVL3-CKとを含むFv4-IgG1-F140；  
 VH3-IgG1-F157とVL3-CKとを含むFv4-IgG1-F157；  
 VH3-IgG1-F194とVL3-CKとを含むFv4-IgG1-F194；  
 VH3-IgG1-F196とVL3-CKとを含むFv4-IgG1-F196；  
 VH3-IgG1-F198とVL3-CKとを含むFv4-IgG1-F198；  
 VH3-IgG1-F262とVL3-CKとを含むFv4-IgG1-F262；  
 VH3-IgG1-F264とVL3-CKとを含むFv4-IgG1-F264；  
 VH3-IgG1-F393とVL3-CKとを含むFv4-IgG1-F393；  
 VH3-IgG1-F434とVL3-CKとを含むFv4-IgG1-F424；および  
 VH3-IgG1-F447とVL3-CKとを含むFv4-IgG1-F447。

40

## 【 0 5 1 7 】

これらの抗体を、ヒトFcRnトランスジェニックマウス系統32に1 mg/kgの用量で投与し

50

た。

図49は、マウスにおける血漿中hsIL-6R濃度推移を示す。Fv4-IgG1と比較して、pH7.0におけるヒトFcRnに対する結合アフィニティーが増大したFc変異体は全て、血漿中hsIL-6R濃度の減少を示し、ゆえに血漿からの抗原の消失を増大させた。抗原濃度減少の程度および持続はFc変異体間で異なったものの、全ての変異体が一致してIgG1と比較して血漿中hsIL-6R濃度を減少させた。これは、pH7.0におけるヒトFcRnに対する結合アフィニティーが増大することにより、血漿からの抗原の消失が一般に増大することを示している。図50は、マウスにおける血漿中抗体濃度推移を示す。抗体の薬物動態はFc変異体間で異なった。

#### 【0518】

参考例9に記載したように、抗体1分子につき血漿から消失される抗原の量は、pH7.0におけるヒトFcRnに対する結合アフィニティーが増大した抗体Fc変異体を投与することにより抗原消失効率を評価する場合に重要な要因となる。ゆえに、各抗体についてのC値（抗原/抗体モル比）の推移を図51に記載した。図52は、pH7.0におけるヒトFcRnに対するFc変異体の結合アフィニティーと、抗体投与1日後のC値（抗原/抗体モル比）との関係を示す。これは、この試験において試験した全ての抗体Fc変異体がFv4-IgG1と比較して小さいC値を有することを示している。本試験において試験した全てのFc変異体が、ヒトFcRnに対してpH7.0でKD 3.0 μMより強い結合アフィニティーを有することから、それらは天然型ヒトIgG1と比較して高い抗原消失効率を達成した。これは参考例9で得られた結果と一致した（図42）。

#### 【0519】

図53は、本試験において試験したFc変異体において、F11、F39、F48、およびF264のFc変異体を有する抗体が、IgG1と類似した薬物動態を示したことを示す。この試験はヒトFcRnトランスジェニックマウスを用いて行われていることから、これらのFc変異体はヒトにおいてもIgG1と類似した長い半減期を有すると予想される。図54は、天然型ヒトIgG1と類似した薬物動態を有する抗体（F11、F39、F48、およびF264）を投与したマウスにおける血漿中hsIL-6R濃度推移を示す。これらの変異体は、IgG1と比較して血漿中hsIL-6R濃度を約10倍低減させた。その上、これらの抗体は、ベースラインhsIL-6R濃度（抗体なしの濃度）より下までhsIL-6R濃度を減少させた。したがって、これらの抗体は、血漿からの抗原の長期消失を可能にし、ゆえに、慢性疾患のための抗体治療にとって好ましい長い投与間隔を可能にすると考えられる。

#### 【0520】

図55および56はそれぞれ、IgG1、ならびにFc変異体F157、F196、およびF262についての血漿中抗体濃度および血漿中hsIL-6R濃度推移を示す。驚くべきことに、F157およびF262の抗体薬物動態は、天然型IgG1と比較して有意に速い血漿からのクリアランスを示したが、F157およびF262は血漿からの大幅かつ持続的なhsIL-6R消失を示した。具体的には、F157での血漿中hsIL-6R濃度は、1日目から28日目（14日目を除く）まで検出限界（1.56 ng/ml）より下であり、F262での血漿中hsIL-6R濃度は14日目から28日目まで検出限界（1.56 ng/ml）より下であった。一方、F157と比較して抗体のクリアランスがより遅いF196に関しては、抗原濃度は14日目で増加し始め、28日目にベースラインに戻った。本試験において試験したFc変異体の中で、F157およびF262は、血漿中hsIL-6R濃度を28日目の時点で1.56 mg/mlより下に減少させることができた唯一のFc変異体であった。

#### 【0521】

抗体は天然型ヒトIgG1と比較して非常に急速に血漿から消失したことから、F157およびF262においてそのような持続的な長期効果が得られたことは、抗体の薬物動態からは予想外のことである。特に、F157での血漿中抗体濃度は、21日目では検出されなかった。それにもかかわらず、血漿中hsIL-6R濃度は、21日目および28日目の時点で検出限界の1.56 ng/mlより低いレベルまで減少し続けた。本発明は特定の理論に拘束されるものではないが、この予想外の効果は、抗体がFcRn結合型として血管内皮細胞表面に存在するためであると考えられる。これらの抗体は血漿中で低濃度を示したが、これらの抗体はなおもFcRn結

10

20

30

40

50

合型（血漿中抗体濃度として測定することができない）として血管コンパートメントに存在している。これらのFcRn結合抗体はなおも血漿中の抗原に結合し、抗原/抗体複合体がFcRnによって取り込まれた後、抗原はエンドソーム内で遊離してライソソームによって分解されるが、抗体はFcRn結合型として細胞表面に戻されてリサイクルされる。このように、これらのFcRn結合抗体は抗原の消失に寄与する。このことにより、抗体濃度が血漿中で低くなった後でさえもこれらの抗体が抗原消失能を維持している理由が説明される。

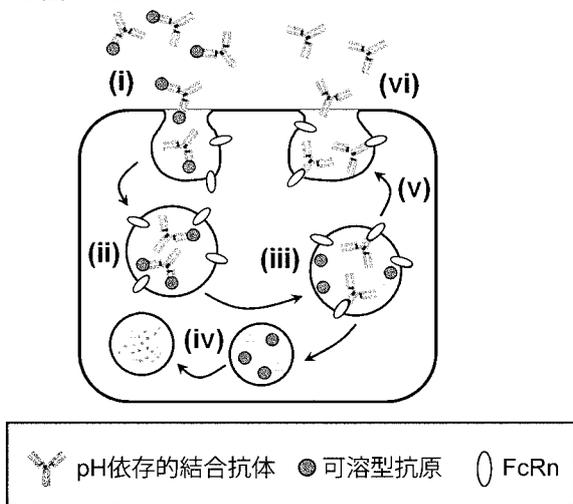
【産業上の利用可能性】

【0522】

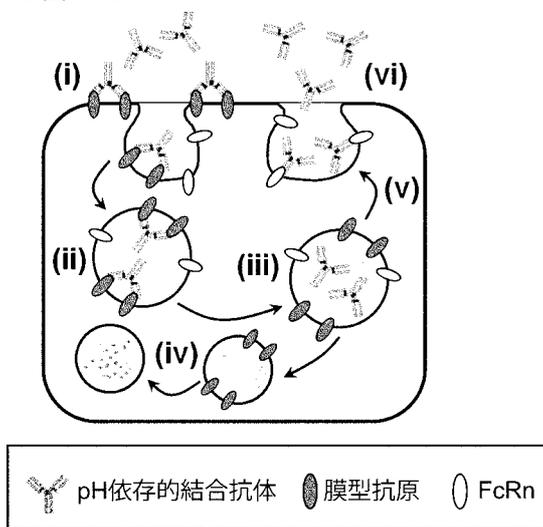
本発明によって、抗原結合分子による抗原の細胞内への取込みを促進させる方法、1分子の抗原結合分子により抗原への結合回数を増加させる方法、抗原結合分子の投与により血漿中の抗原濃度の減少を促進させる方法、抗原結合分子の血漿中滞留性を改善する方法が提供された。抗原結合分子による抗原の細胞内への取込みが促進されることで、抗原結合分子の投与により抗原の血漿中の抗原濃度の減少を促進させることが可能となるとともに、抗原結合分子の血漿中滞留性を改善させることが可能となり、1分子の抗原結合分子により抗原への結合回数を増加させることが可能となり、in vivoにおいて通常の抗原結合分子よりも優れた効果を発揮させることができる。

10

【図1】



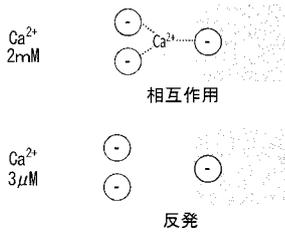
【図2】



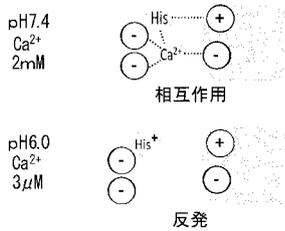
【図3】



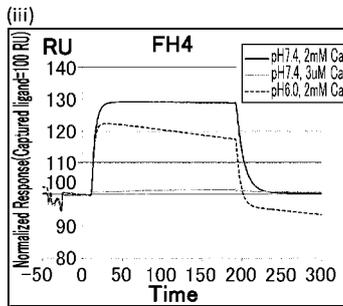
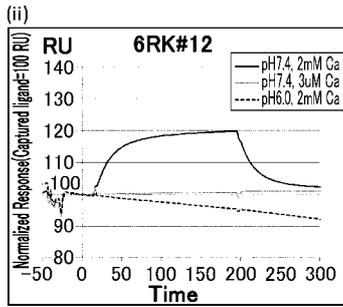
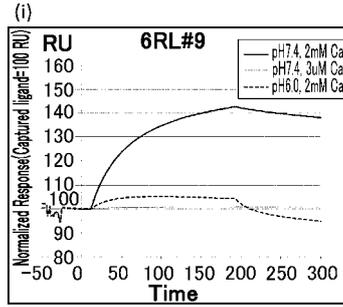
【 図 4 】



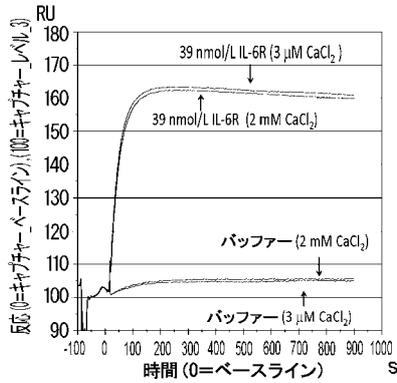
【 図 5 】



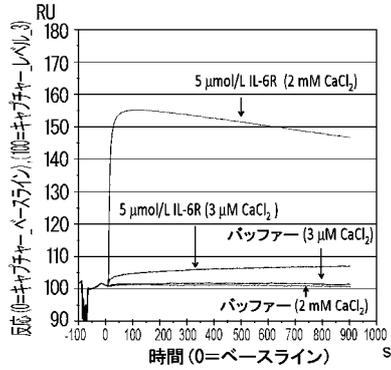
【 図 6 】



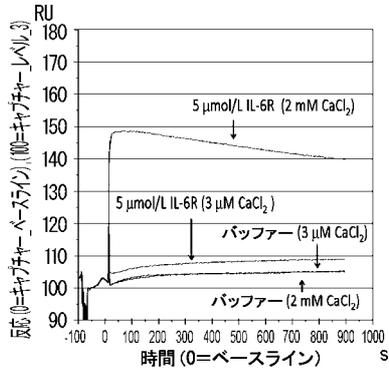
【 図 7 】



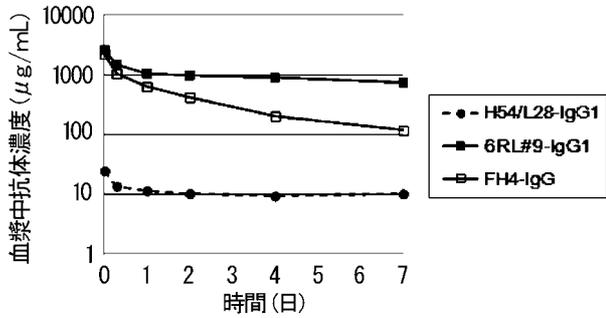
【 図 9 】

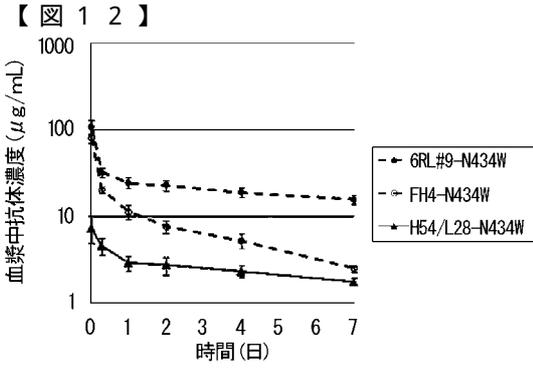
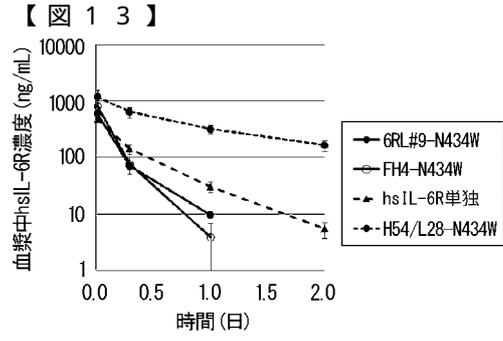
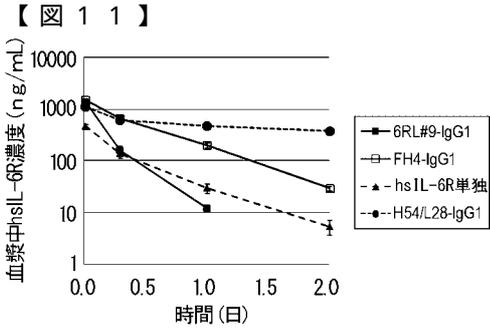


【 図 8 】

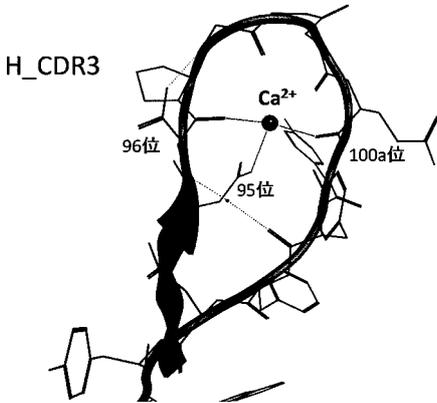


【 図 10 】

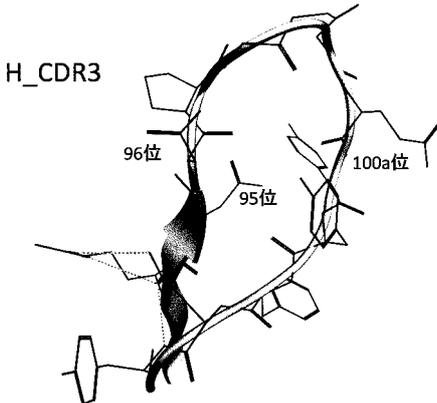




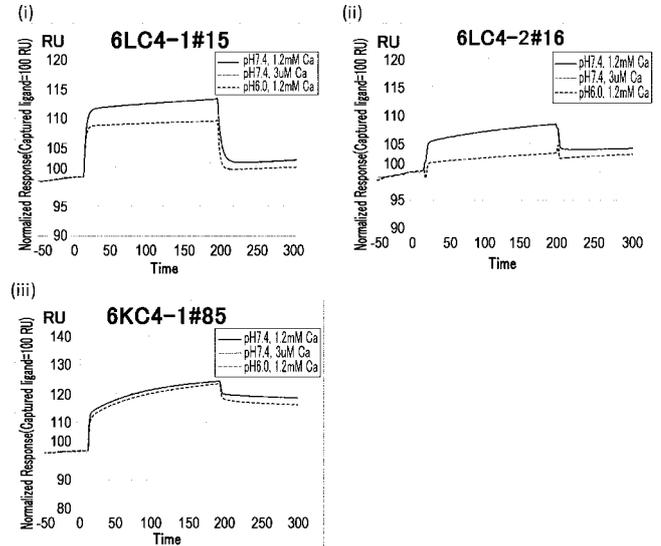
【 図 1 4 】  
(i) カルシウムイオン存在下での結晶の構造



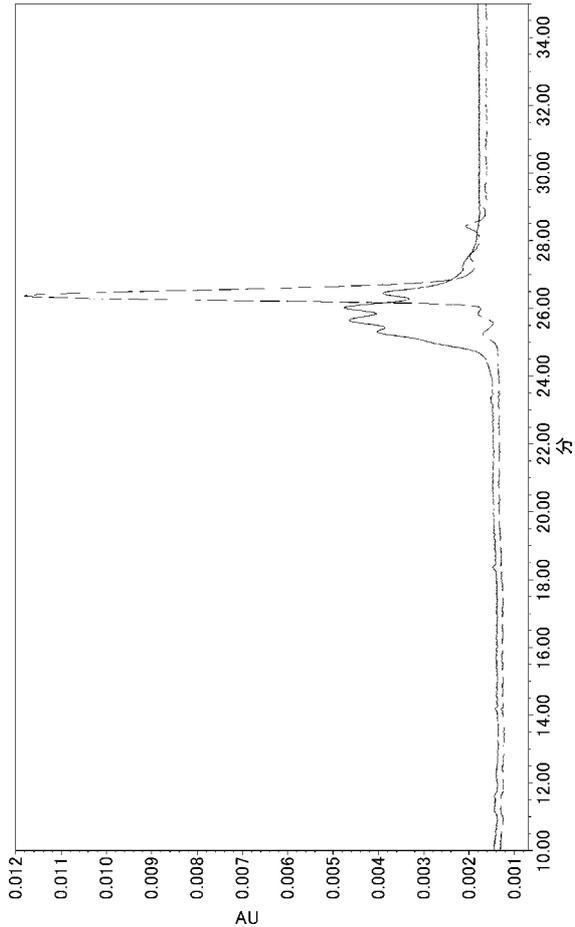
(ii) カルシウムイオン非存在下での結晶の構造



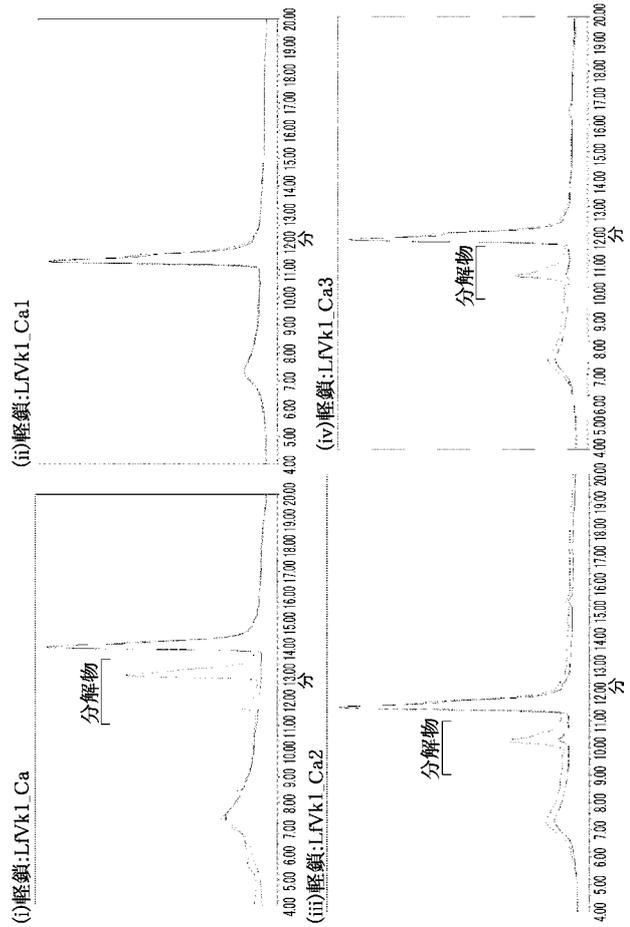
【 図 1 5 】



【 図 1 6 】

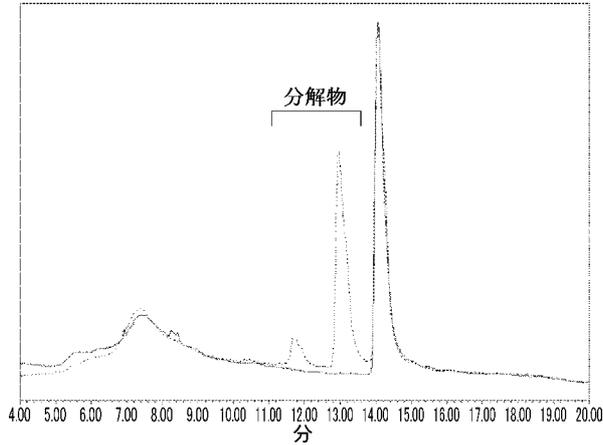


【 図 1 7 】

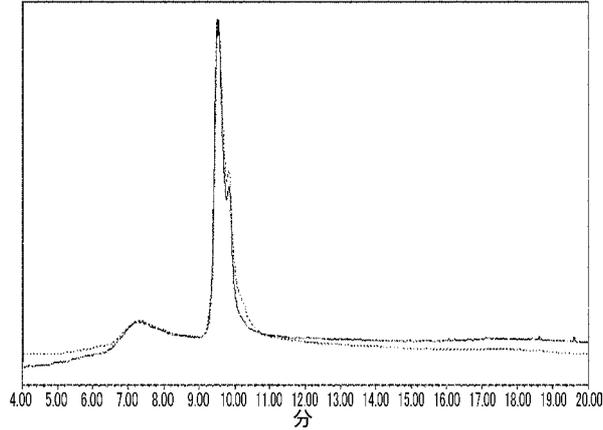


【 図 1 8 】

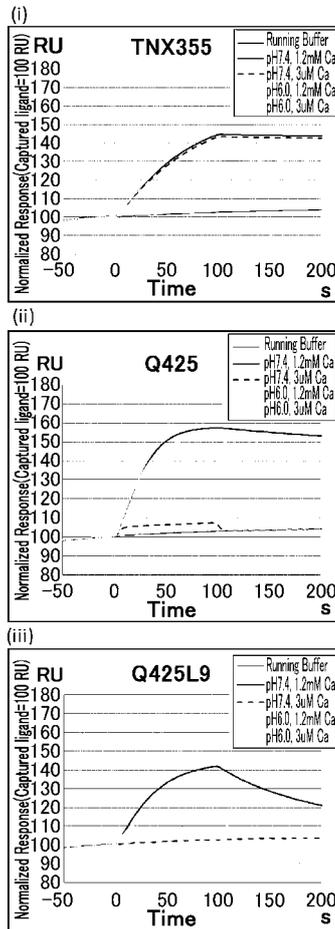
(i) 軽鎖:LfVkl\_Ca

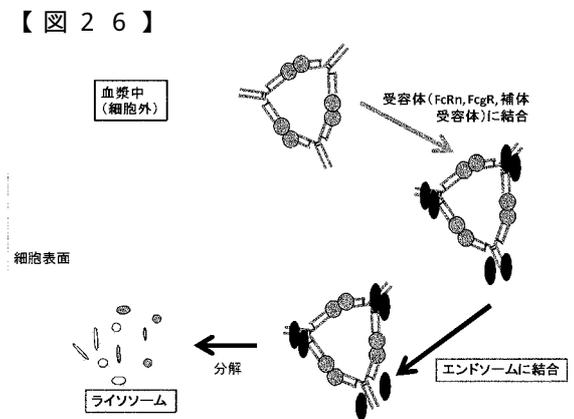
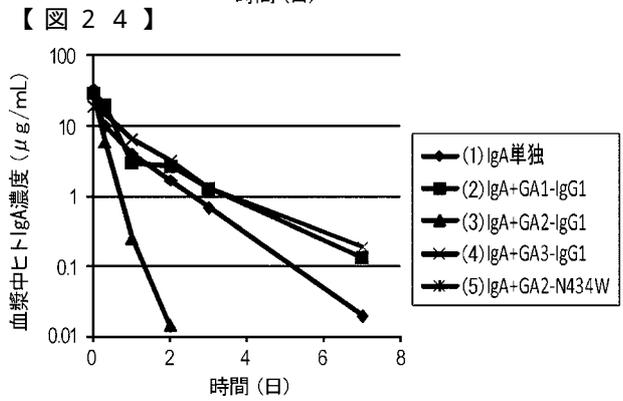
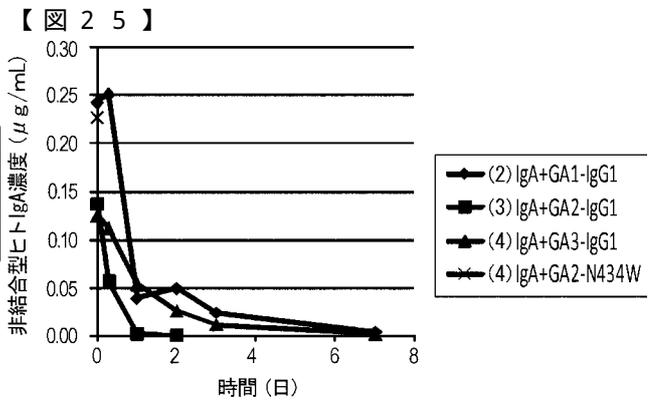
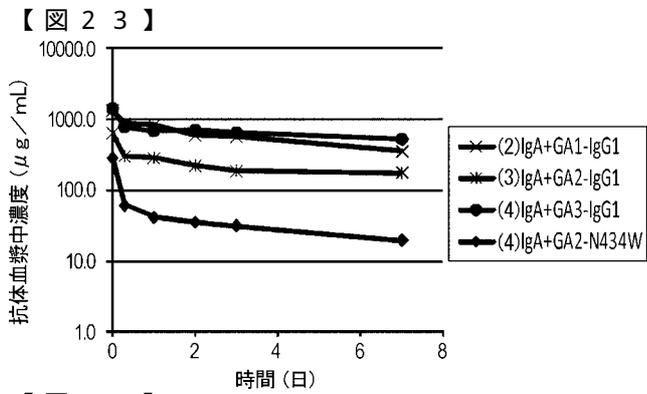
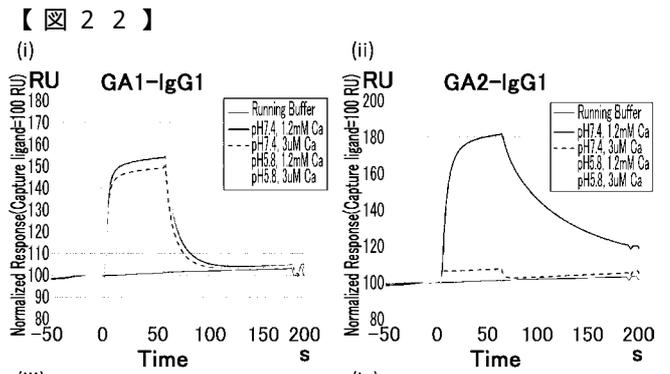
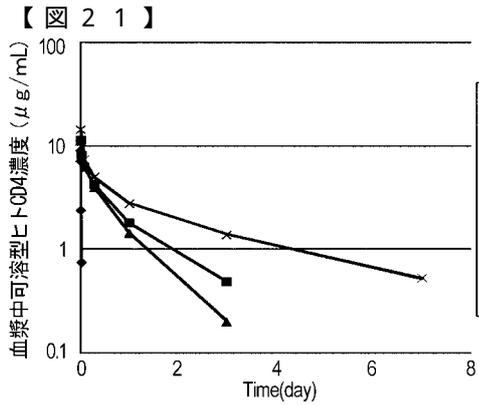
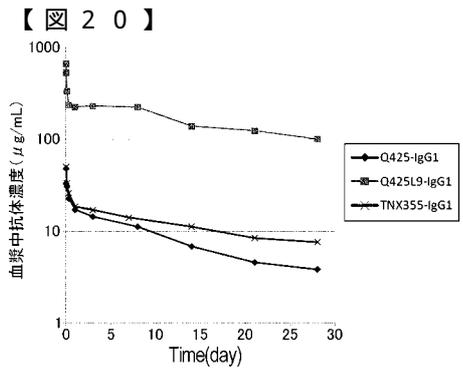


(ii) 軽鎖:LfVkl\_Ca6

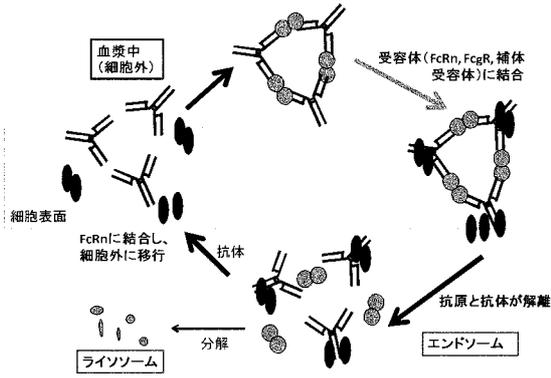


【 図 1 9 】

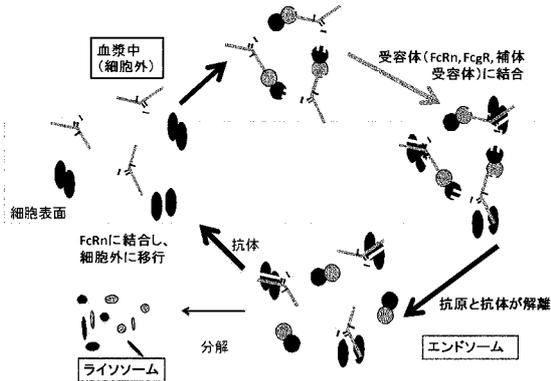




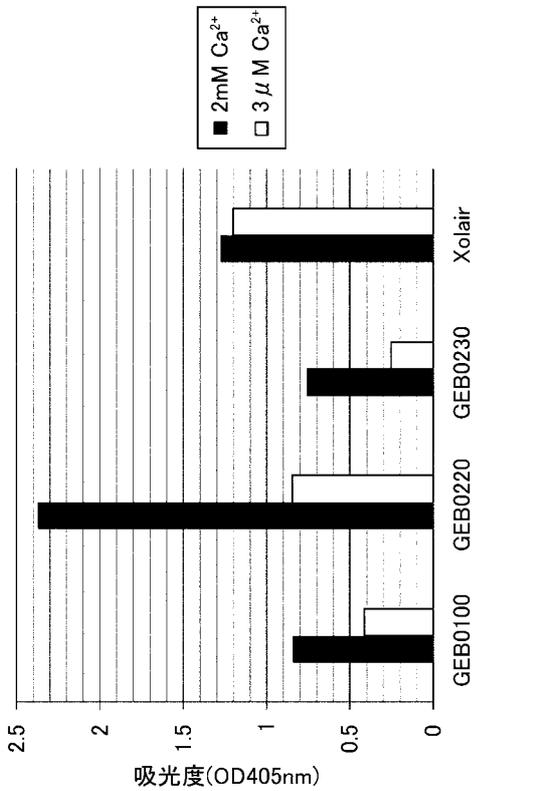
【 図 2 7 】



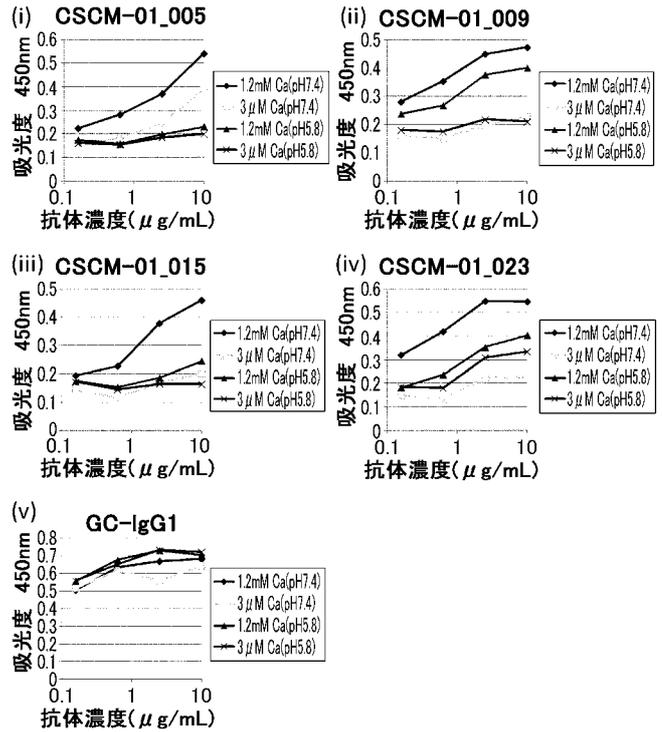
【 図 2 8 】



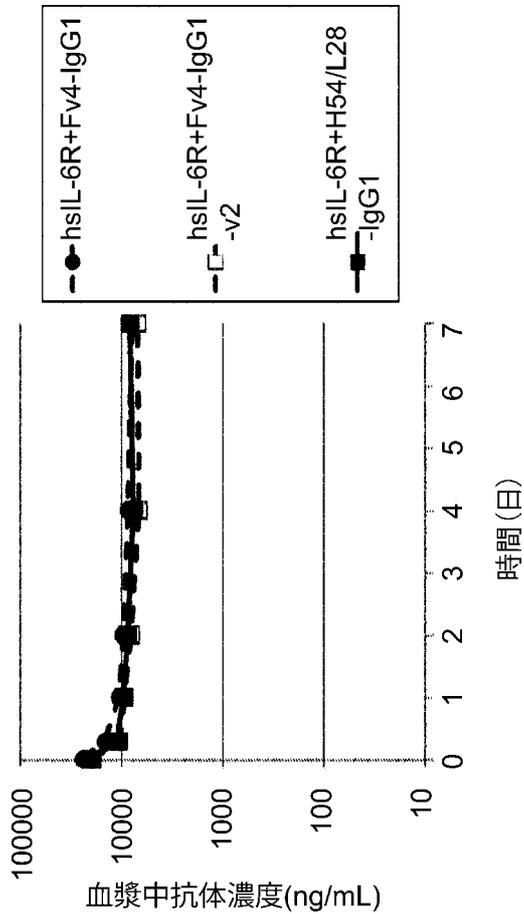
【 図 3 0 】



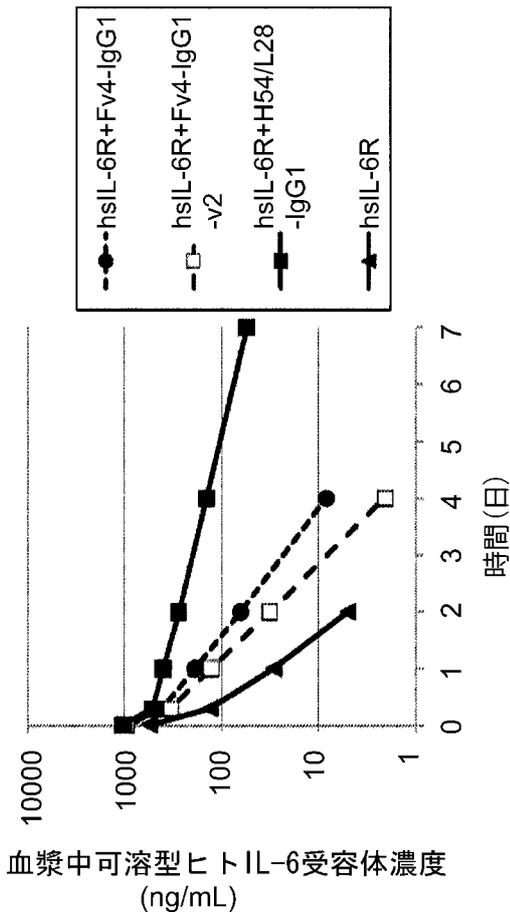
【 図 2 9 】



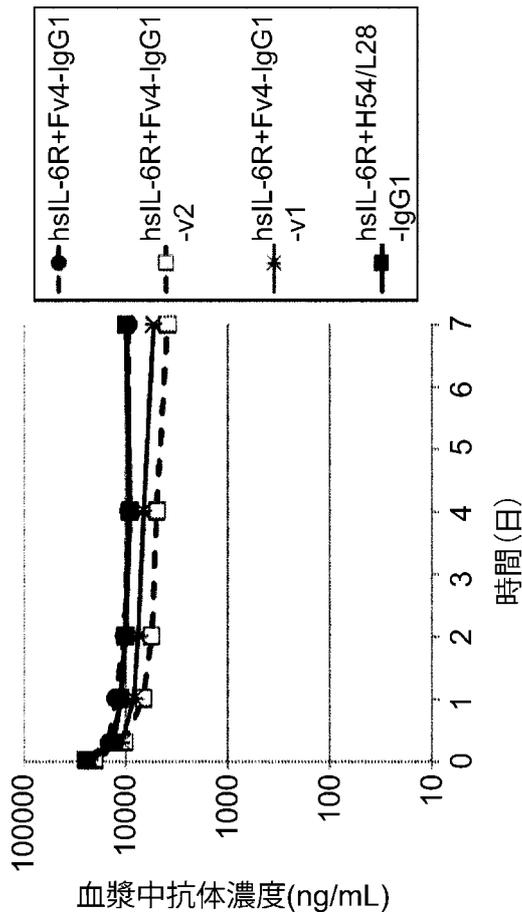
【 図 3 1 】



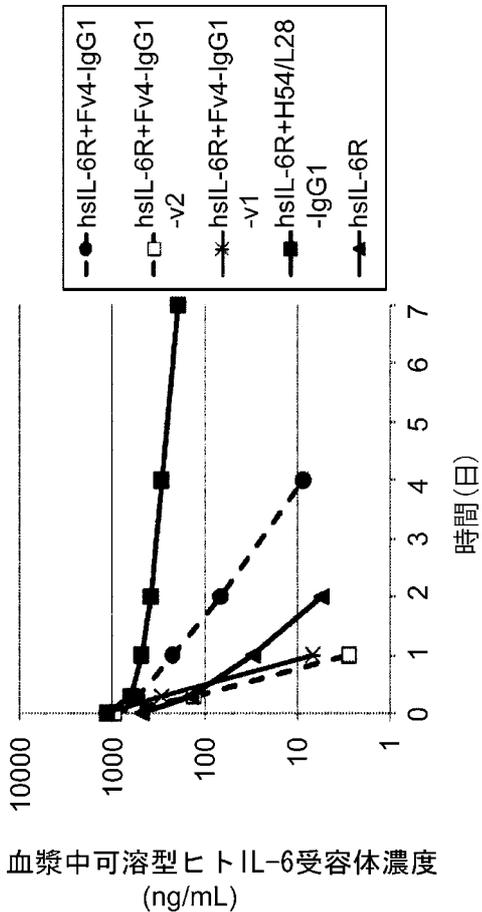
【 図 3 2 】



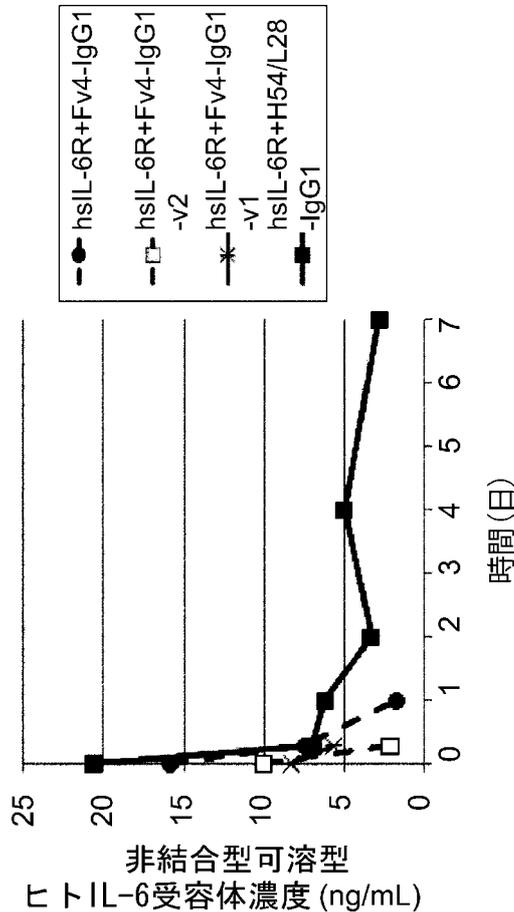
【 図 3 3 】



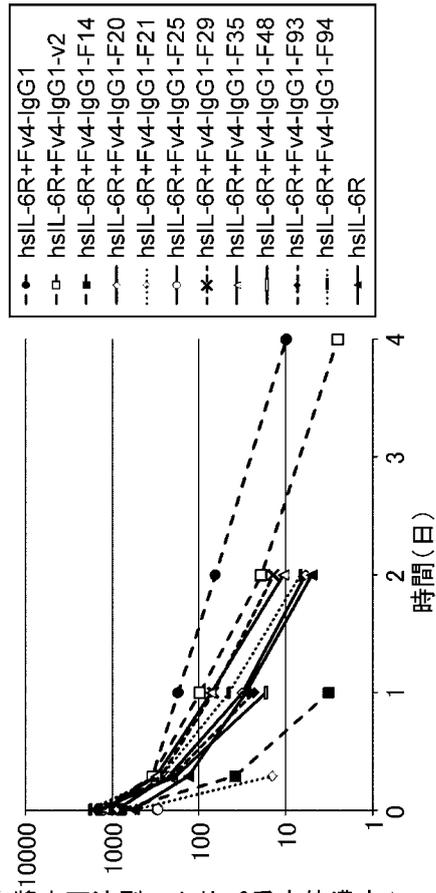
【 図 3 4 】



【 図 3 5 】

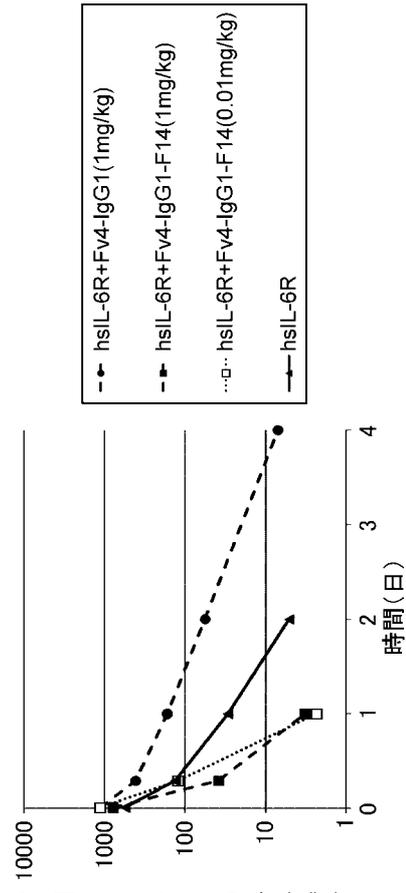


【 図 3 6 】



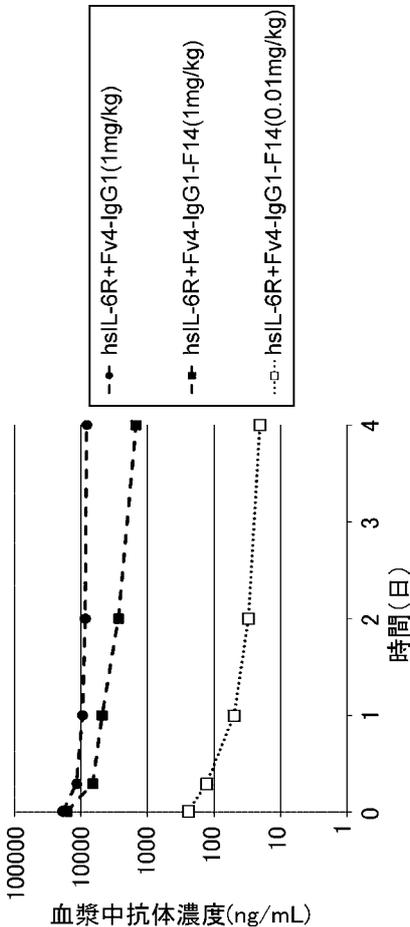
血漿中可溶性ヒトIL-6受容体濃度(ng/mL)

【 図 3 7 】



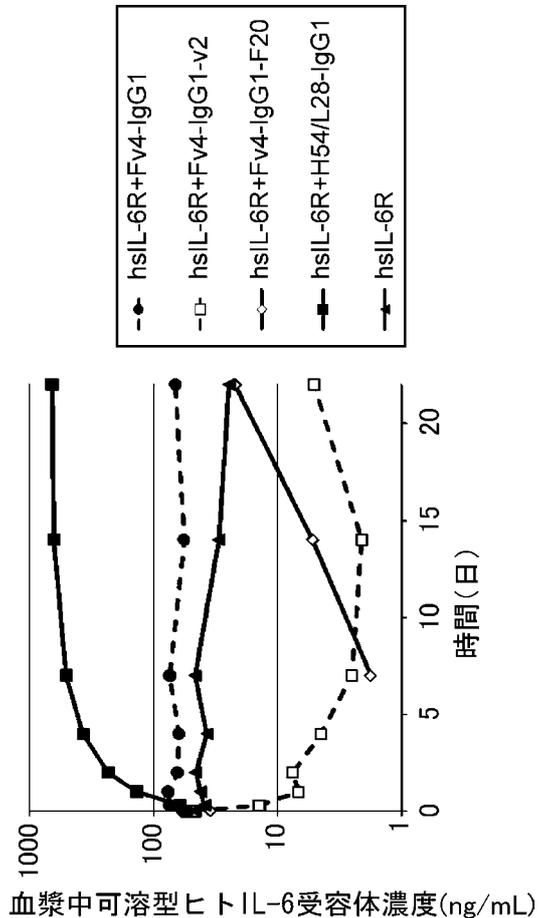
血漿中可溶性ヒトIL-6受容体濃度(ng/mL)

【 図 3 8 】



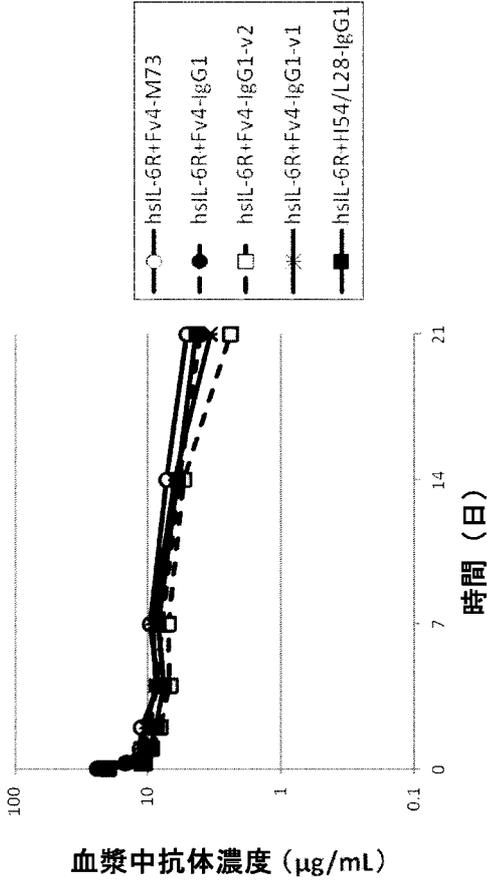
血漿中抗体濃度(ng/mL)

【 図 3 9 】

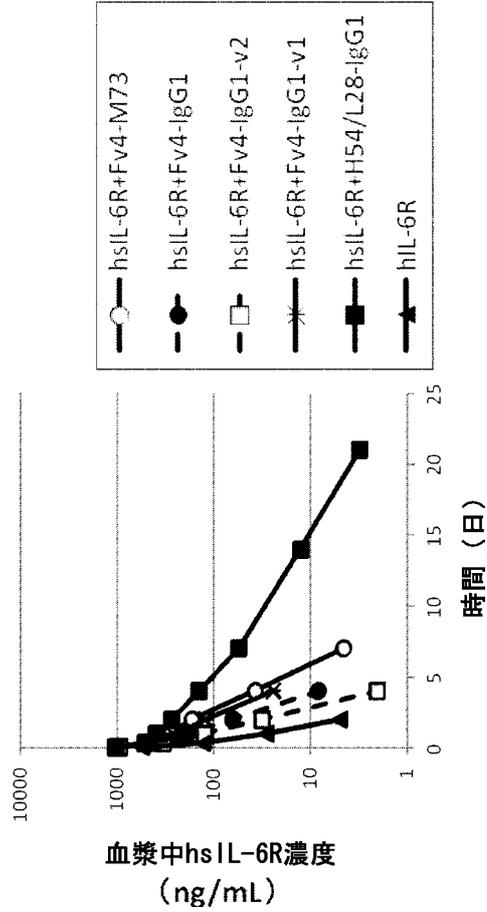


血漿中可溶性ヒトIL-6受容体濃度(ng/mL)

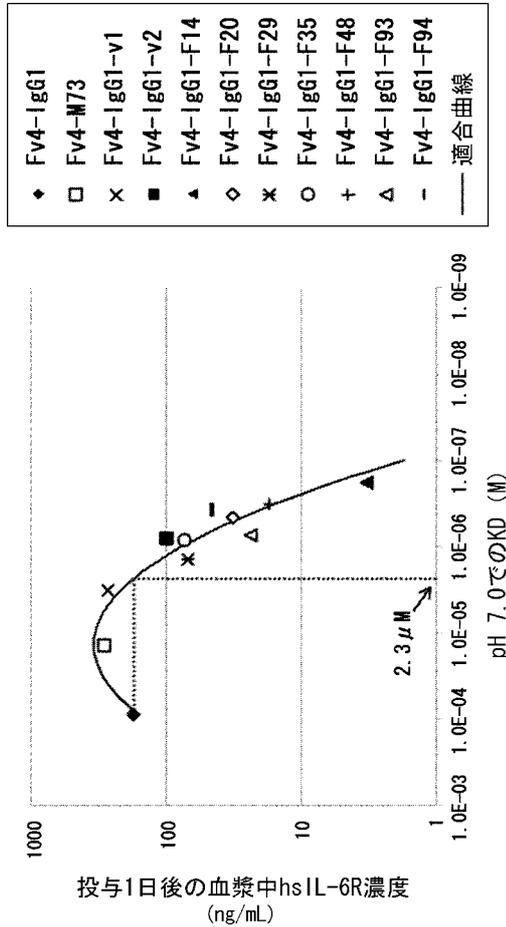
【 図 4 0 】



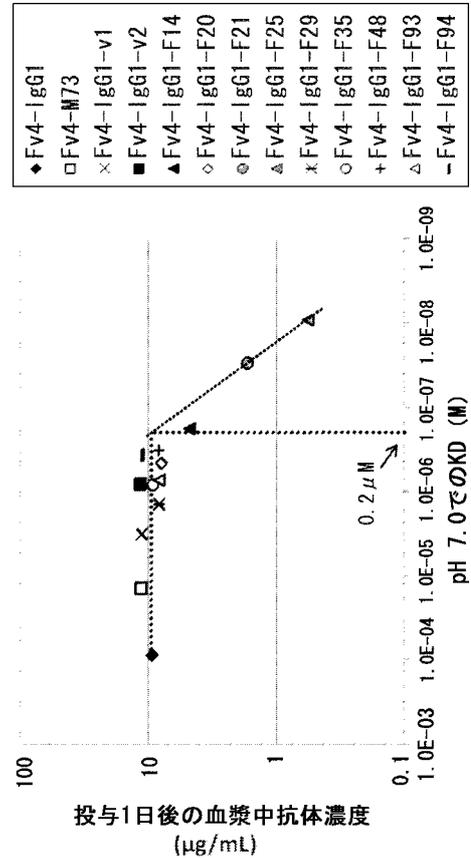
【 図 4 1 】



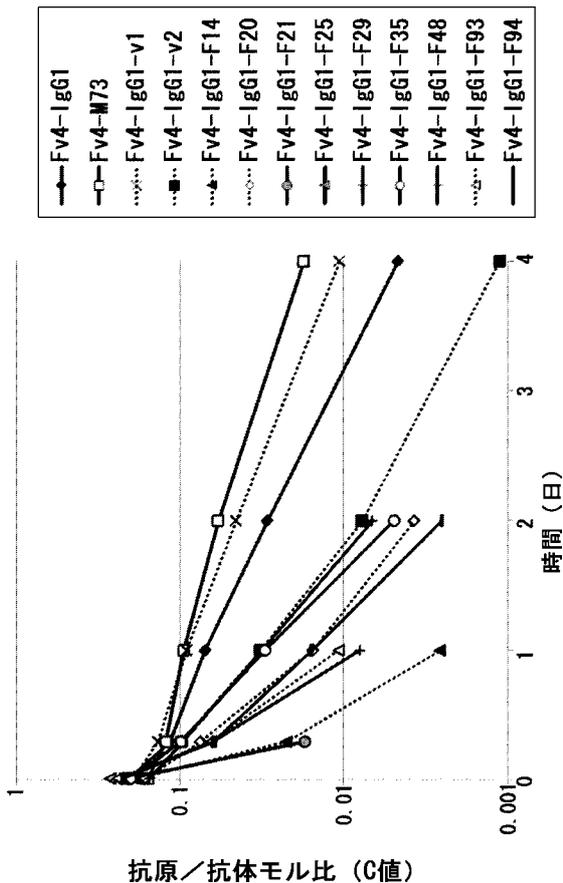
【 図 4 2 】



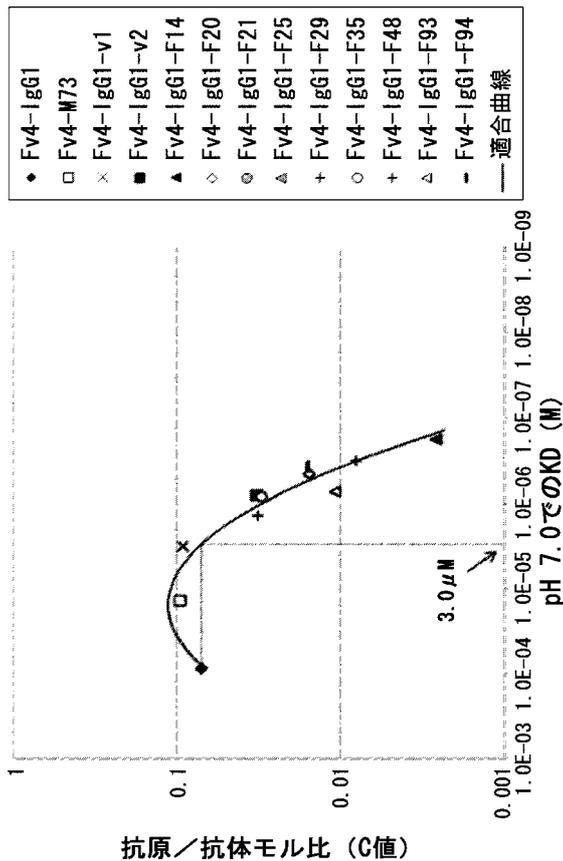
【 図 4 3 】



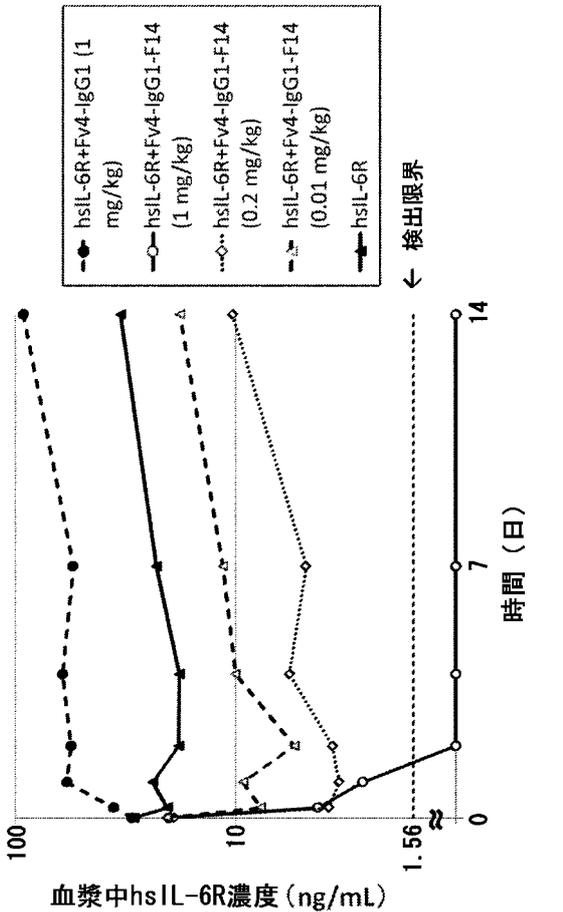
【 図 4 4 】



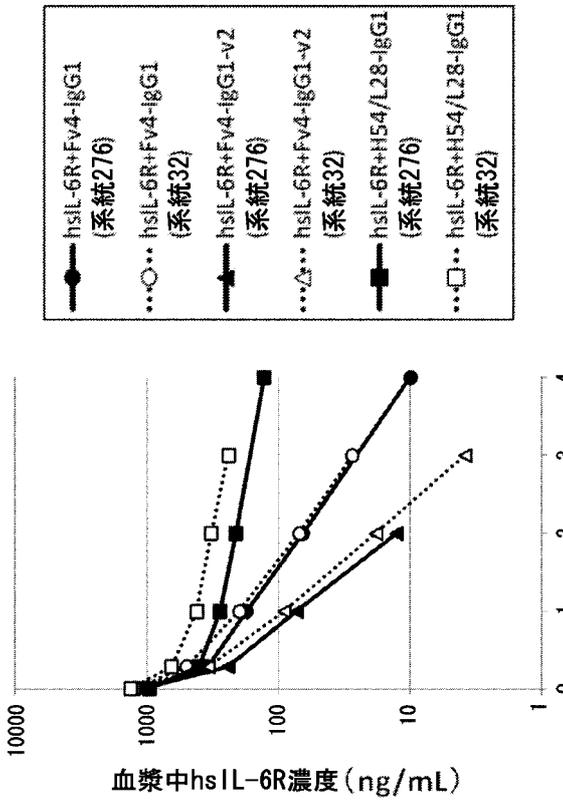
【 図 4 5 】



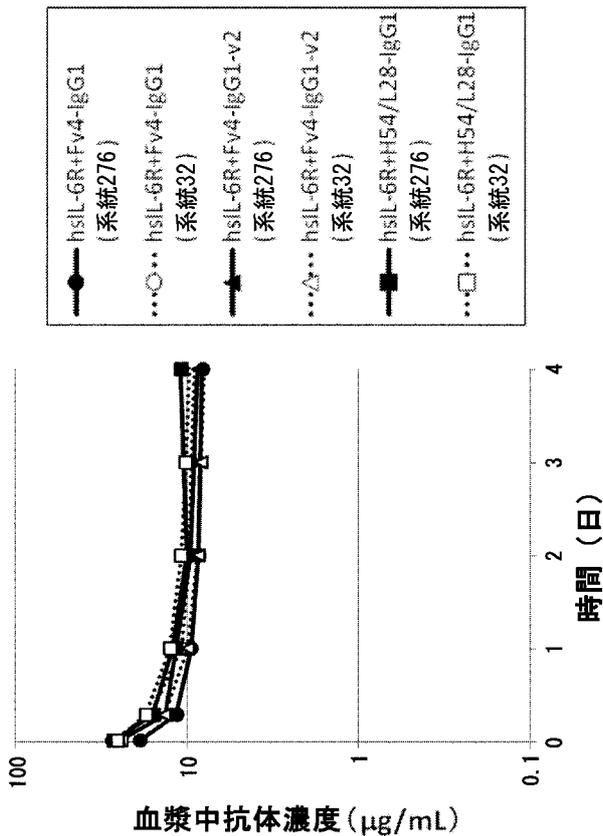
【 図 4 6 】



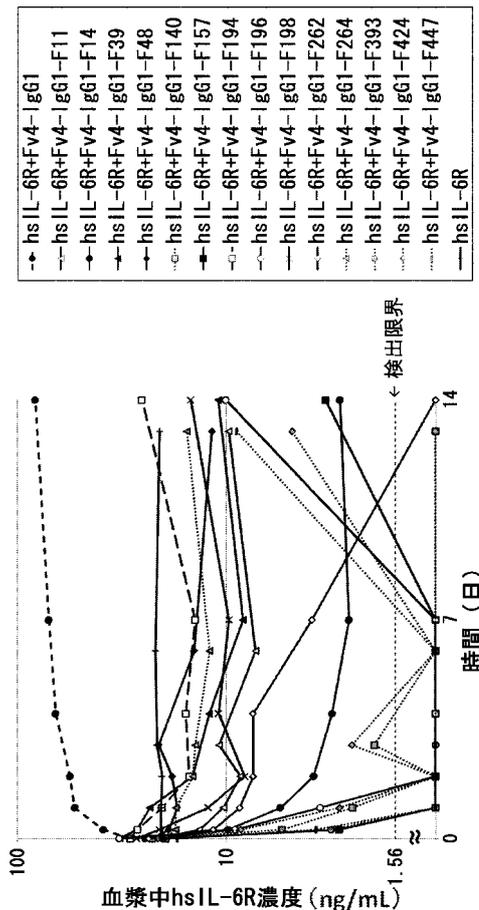
【 図 4 7 】



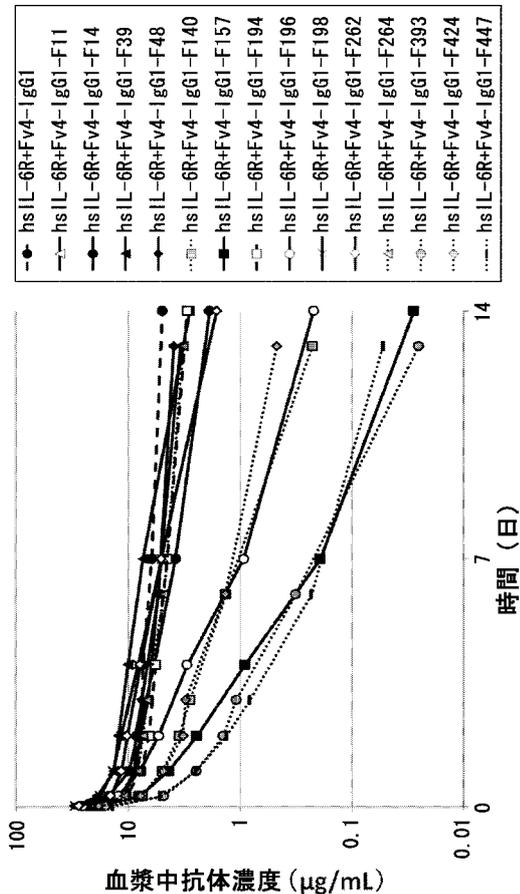
【 図 4 8 】



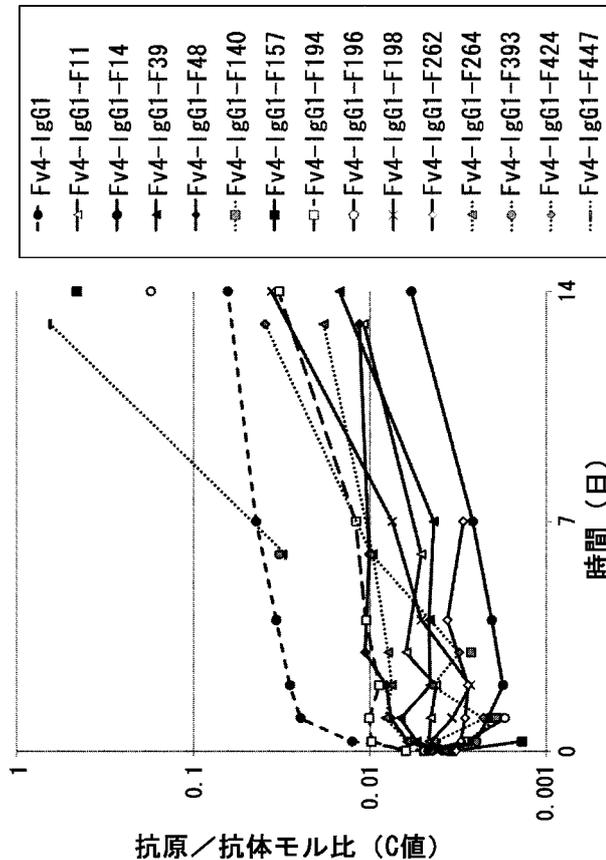
【 図 4 9 】



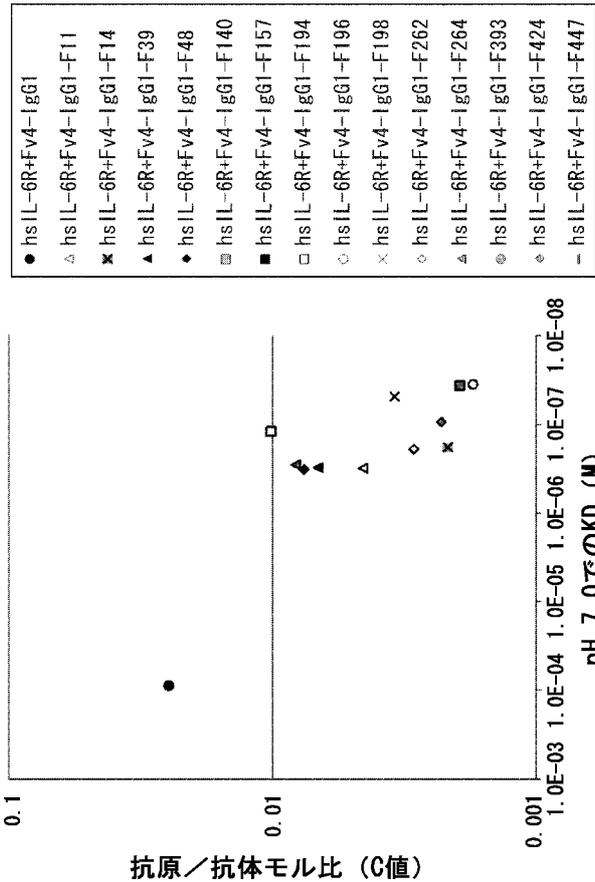
【 図 5 0 】



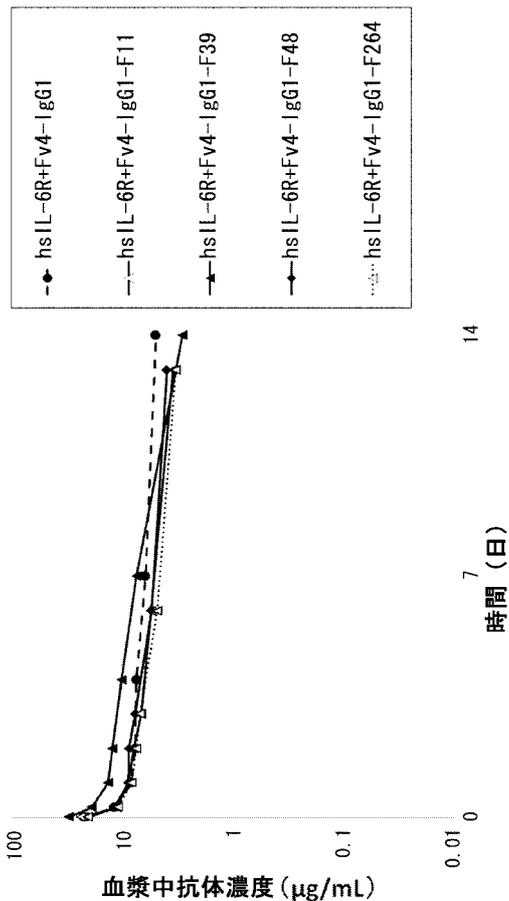
【 図 5 1 】



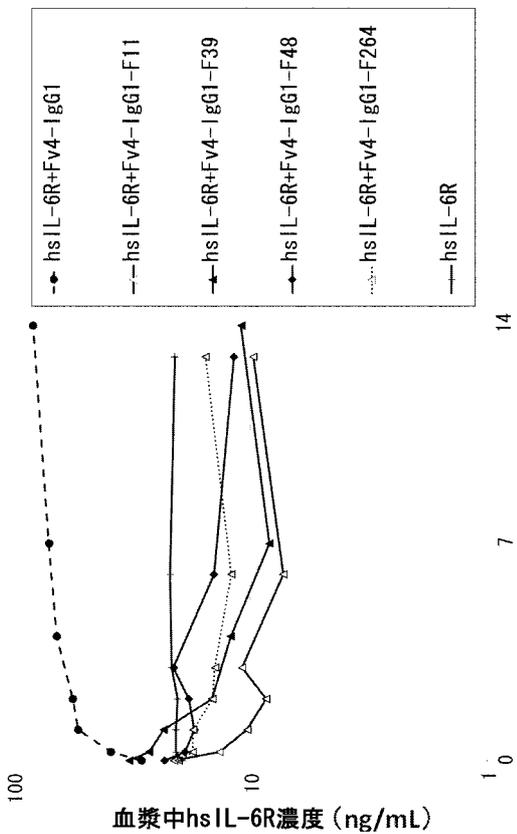
【 図 5 2 】



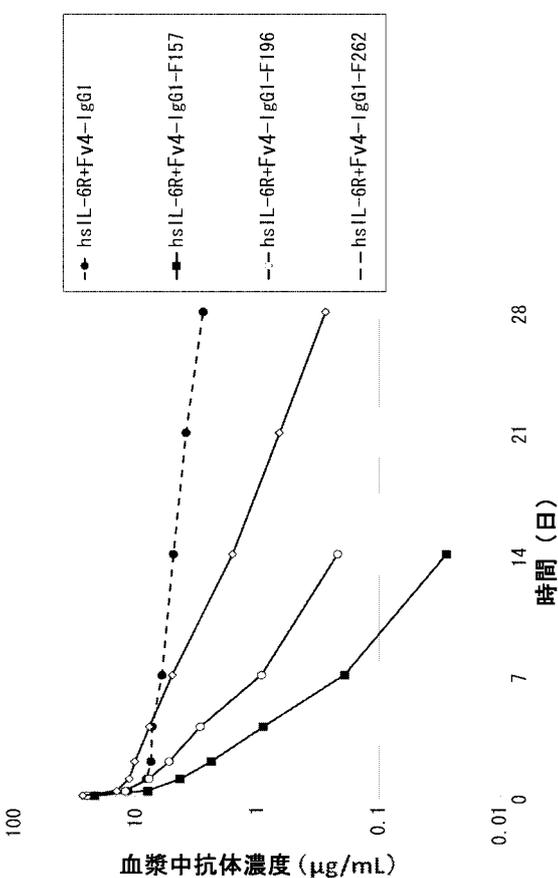
【 図 5 3 】



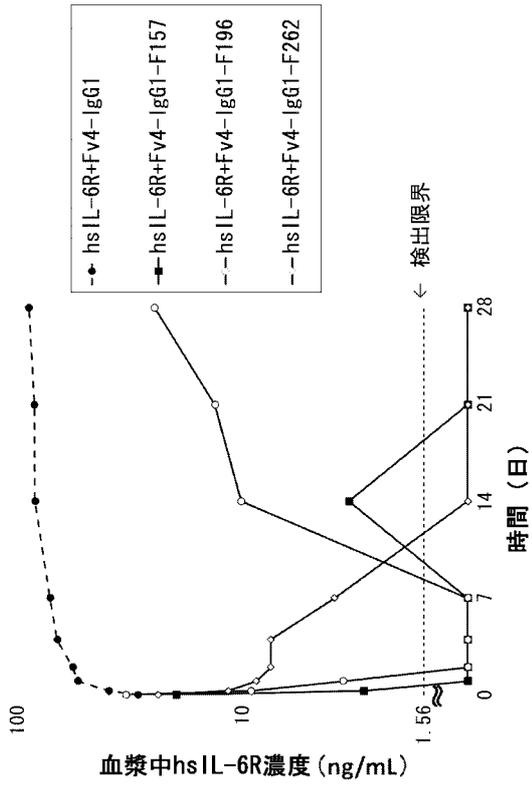
【 図 5 4 】



【 図 5 5 】



【 図 5 6 】



【 配列表 】

2017019773000001.app

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)	
<b>C 4 0 B</b>	<b>40/10</b>	<b>(2006.01)</b>	C 4 0 B	40/10	
<b>A 6 1 K</b>	<b>38/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K	37/02	
<b>G 0 1 N</b>	<b>33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N	33/53	D
<b>G 0 1 N</b>	<b>33/50</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N	33/50	Z
<b>G 0 1 N</b>	<b>33/15</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N	33/15	Z
<b>C 1 2 P</b>	<b>21/08</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 P	21/08	

- (74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889  
弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 井川 智之  
静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内
- (72)発明者 石井 慎也  
静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内
- (72)発明者 船木 美歩  
静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内
- (72)発明者 廣庭 奈緒香  
静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内
- (72)発明者 前田 敦彦  
静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内
- (72)発明者 根津 淳一  
静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内
- (72)発明者 類家 慶直  
静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内
- (72)発明者 馬場 威  
静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内
- (72)発明者 清水 駿  
静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内

专利名称(译)	抗原结合分子反复结合多分子抗原		
公开(公告)号	<a href="#">JP2017019773A</a>	公开(公告)日	2017-01-26
申请号	JP2016127142	申请日	2016-06-28
申请(专利权)人(译)	中外制药有限公司		
[标]发明人	井川智之 石井慎也 船木美步 廣庭奈緒香 前田敦彦 根津淳一 類家慶直 馬場威 清水駿		
发明人	井川 智之 石井 慎也 船木 美步 廣庭 奈緒香 前田 敦彦 根津 淳一 類家 慶直 馬場 威 清水 駿		
IPC分类号	C07K16/00 C07K16/28 C07K16/24 C07K16/42 C12N15/09 C40B40/10 A61K38/00 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15 C12P21/08		
CPC分类号	C07K16/18 C07K16/248 C07K16/2866 C07K16/4291 C07K2317/565 G01N33/53 C07K16/22 C07K16/241 C07K16/28 C07K16/2812 C07K16/2863 C07K16/3007 C07K16/40 C07K16/4208 C07K16/468 C12N15/1037 C12N15/62 C40B40/02		
FI分类号	C07K16/00.ZNA C07K16/28 C07K16/24 C07K16/42 C12N15/00.A C40B40/10 A61K37/02 G01N33/53.D G01N33/50.Z G01N33/15.Z C12P21/08 A61K38/00 C07K16/00 C12N15/13 C12P21/08.ZNA		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/AA29 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BB20 2G045/BB51 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB17 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/DB07 2G045/FA29 2G045/FA37 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/GC10 2G045/GC15 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4C084/AA02 4C084/BA44 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZC411 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	2010266121 2010-11-30 JP 2011217886 2011-09-30 JP		
其他公开文献	JP6431506B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本発明の目的は提供通过抗原结合分子促进抗原向细胞中的摄取的方法，用于增加一个抗原结合分子的抗原结合次数的方法，促进血浆中的抗原浓度降低的方法给予抗原结合分子的方法以及提高抗原结合分子的血浆中滞留性的方法，以及允许增强抗原吸收到细胞中的抗原结合分子，具有增加的抗原结合次数的抗原结合分子，抗原能够促进施用血浆中抗原浓度的降低的结合分子，具有改善的血浆滞留的抗原结合分子，包含上述抗原结合分子的药物组合物，及其制备方法。本發明人发现，通过使用显示钙依赖性抗原抗体反应的抗原结合分子，可以实现上述目的。

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-19773

(P2017-19773A)

(43) 公開日 平成29年1月26日(2017.1.26)

(51) Int. Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>C 0 7 K 1 6 / 0 0 (2006. 01)</b>	C 0 7 K 1 6 / 0 0	Z N A
<b>C 0 7 K 1 6 / 2 8 (2006. 01)</b>	C 0 7 K 1 6 / 2 8	
<b>C 0 7 K 1 6 / 2 4 (2006. 01)</b>	C 0 7 K 1 6 / 2 4	
<b>C 0 7 K 1 6 / 4 2 (2006. 01)</b>	C 0 7 K 1 6 / 4 2	
<b>C 1 2 N 1 5 / 0 9 (2006. 01)</b>	C 1 2 N 1 5 / 0 0	A
	審査請求 有	請求項の数 1 O L (全 159 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2016-127142 (P2016-127142)	(71) 出願人 000003311
(22) 出願日	平成28年6月28日(2016. 6. 28)	中外製薬株式会社
(62) 分割の表示	特願2012-546907 (P2012-546907) の分割	東京都北区浮間5丁目5番1号
原出願日	平成23年11月30日(2011. 11. 30)	100102978
(31) 優先権主張番号	特願2010-266121 (P2010-266121)	(74) 代理人 弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成22年11月30日(2010. 11. 30)	弁理士 100102118
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	弁理士 100160923
(31) 優先権主張番号	特願2011-217886 (P2011-217886)	(74) 代理人 弁理士 100160923
(32) 優先日	平成23年9月30日(2011. 9. 30)	弁理士 100119507
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	弁理士 100142929
		(74) 代理人 弁理士 100142929
		弁理士 100148699
		(74) 代理人 弁理士 100148699
		弁理士 佐藤 利光
		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 複数分子の抗原に繰り返し結合する抗原結合分子