

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6685272号  
(P6685272)

(45) 発行日 令和2年4月22日 (2020.4.22)

(24) 登録日 令和2年4月2日 (2020.4.2)

|                                 |                     |
|---------------------------------|---------------------|
| (51) Int.Cl.                    | F I                 |
| <b>C O 7 K</b> 16/28 (2006.01)  | C O 7 K 16/28 Z N A |
| <b>C 1 2 P</b> 21/08 (2006.01)  | C 1 2 P 21/08       |
| <b>C 1 2 N</b> 15/13 (2006.01)  | C 1 2 N 15/13       |
| <b>C 1 2 N</b> 5/0781 (2010.01) | C 1 2 N 5/0781      |
| <b>G O 1 N</b> 33/50 (2006.01)  | G O 1 N 33/50 Z     |
| 請求項の数 28 (全 228 頁) 最終頁に続く       |                     |

|                    |                                     |           |                        |
|--------------------|-------------------------------------|-----------|------------------------|
| (21) 出願番号          | 特願2017-250582 (P2017-250582)        | (73) 特許権者 | 000003311              |
| (22) 出願日           | 平成29年12月27日 (2017.12.27)            |           | 中外製薬株式会社               |
| (62) 分割の表示         | 特願2013-536425 (P2013-536425)<br>の分割 |           | 東京都北区浮間5丁目5番1号         |
| 原出願日               | 平成24年9月28日 (2012.9.28)              | (74) 代理人  | 100102978<br>弁理士 清水 初志 |
| (65) 公開番号          | 特開2018-115148 (P2018-115148A)       | (74) 代理人  | 100102118<br>弁理士 春名 雅夫 |
| (43) 公開日           | 平成30年7月26日 (2018.7.26)              | (74) 代理人  | 100160923<br>弁理士 山口 裕孝 |
| 審査請求日              | 平成30年1月25日 (2018.1.25)              | (74) 代理人  | 100119507<br>弁理士 刑部 俊  |
| (31) 優先権主張番号       | 特願2011-217043 (P2011-217043)        | (74) 代理人  | 100142929<br>弁理士 井上 隆一 |
| (32) 優先日           | 平成23年9月30日 (2011.9.30)              | (74) 代理人  | 100148699<br>弁理士 佐藤 利光 |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 | 日本国 (JP)                            |           |                        |
|                    |                                     | 最終頁に続く    |                        |

(54) 【発明の名称】 複数の生理活性を有する抗原の消失を促進する抗原結合分子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

血漿中の抗原濃度を低下させる抗原結合分子であって、以下の(1)～(6)に示す特徴を有する抗原結合分子；

(1) 抗原結合分子が、抗原結合ドメインおよび少なくとも1つのレセプター結合ドメインを含み、

(2) pH 5.8の条件下において、レセプター結合ドメインがヒトFcRn (Neonatal Fc Receptor) に結合する活性を有し、

(3) レセプター結合ドメインが以下の (a) に示されたレセプター結合ドメインであり、かつ、pH 7.0の条件下において、ヒトFcレセプターに結合する活性が、天然型ヒトIgG がヒトFcレセプターに結合する活性よりも高く、

(a) ヒトFcレセプターが、ヒトFcRnであり、前記レセプター結合ドメインが、IgGのFc領域のアミノ酸が改変されたFc領域を含み、該アミノ酸の改変が、EUナンバリングにおいてM428LおよびN434Sのアミノ酸置換を含むアミノ酸の改変であるレセプター結合ドメイン、

(4) 抗原結合ドメインが以下の (c) 又は (d) に示された抗原結合ドメインであり、かつ、抗原結合ドメインが抗原に結合する活性が、イオン濃度の条件によって変化し、

(c) イオン濃度が水素イオン濃度 (pH) であり、pH 5.8の条件下とpH 7.4の条件下における抗原に結合する活性の比が、KD(pH 5.8)/KD(pH 7.4)の値で2以上である抗原結合ドメイン、

10

20

(d) イオン濃度がカルシウムイオン濃度であり、カルシウムイオン濃度 $3\mu\text{M}$ とカルシウムイオン濃度 $1.2\text{ mM}$ における抗原に結合する活性の比が、 $\text{KD}(\text{カルシウムイオン濃度 } 3\mu\text{M}) / \text{KD}(\text{カルシウムイオン濃度 } 1.2\text{ mM})$ の値で2以上である抗原結合ドメイン、

(5) 抗原が2種類以上の生理活性を有し、

(6) 抗原結合分子が結合することで、抗原が有する生理活性のうち1種類以上が阻害される一方で、少なくとも1種類の生理活性が維持される。

【請求項2】

抗原に結合することで、抗原が有する標的分子との結合活性のうち1種類以上を阻害する一方で、少なくとも1種類の標的分子との結合活性を維持することを特徴とする、請求項1に記載の抗原結合分子。

10

【請求項3】

血漿中の抗原濃度の低下が、抗原の細胞内への取込みの促進によることを特徴とする、請求項1または2に記載の抗原結合分子。

【請求項4】

血漿中の抗原濃度が低下することによって、生体における抗原の生理活性が低減することを特徴とする、請求項1から3のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項5】

抗原がHMGB1 (High Mobility Group Box 1) である、請求項1から4のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項6】

HMGB1とRAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts) の結合を阻害する、請求項5に記載の抗原結合分子。

20

【請求項7】

HMGB1とTLR4 (Toll-Like Receptor 4) の結合を阻害する、請求項5または6に記載の抗原結合分子。

【請求項8】

抗原がCTGF (Connective Tissue Growth Factor) である、請求項1から4のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項9】

抗原が補体C5または補体C5aである、請求項1から4のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

30

【請求項10】

IgGのFc領域が非ヒト動物由来のIgGのFc領域である、請求項1から9のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項11】

IgGのFc領域がヒト由来のIgGのFc領域である、請求項1から9のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項12】

IgGのFc領域において、さらにEUナンバリング233, 234, 237, 244, 245, 249, 250, 251, 252, 254, 255, 256, 257, 258, 260, 262, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 272, 279, 283, 285, 286, 288, 293, 296, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 316, 317, 318, 326, 327, 330, 331, 332, 333, 339, 341, 343, 375, 376, 377, 378, 380, 382, 385, 386, 387, 389, 396, 423, 427, 430, 431, 433, 436, 438, 440および442番目から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸が改変された、請求項1から11のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

40

【請求項13】

IgGのFc領域におけるアミノ酸の改変が、EUナンバリング；  
233番目のアミノ酸がAsp、  
234番目のアミノ酸がTyr、  
237番目のアミノ酸がAsp、

50

264番目のアミノ酸がIle、  
 265番目のアミノ酸がGlu、  
 266番目のアミノ酸がPhe、MetまたはLeu、  
 267番目のアミノ酸がAla、Glu、GlyまたはGln、  
 268番目のアミノ酸がAspまたはGlu、  
 269番目のアミノ酸がAsp、  
 272番目のアミノ酸が、Asp、Phe、Ile、Met、AsnまたはGln、  
 296番目のアミノ酸がAsp、  
 326番目のアミノ酸がAlaまたはAsp、  
 327番目のアミノ酸がGly、  
 330番目のアミノ酸がLysまたはArg、  
 331番目のアミノ酸がSer、  
 332番目のアミノ酸がThr、  
 333番目のアミノ酸がThr、LysまたはArg、  
 396番目のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Ile、Lys、Leu、Met、Gln、ArgまたはTyr、  
 から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸の改変である、請求項12に記載の抗原結合分子。

10

【請求項14】

IgGのFc領域において、さらにEUナンバリング244、245、249、250、251、252、254、255、256、257、258、260、262、270、272、279、283、285、286、288、293、307、308、309、311、312、314、316、317、318、332、339、341、343、375、376、377、378、380、382、385、386、387、389、423、427、430、431、433、436、438、440および442番目から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸が改変された、請求項1から13のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

20

【請求項15】

IgGのFc領域におけるアミノ酸の改変が、EUナンバリング；  
 244番目のアミノ酸がLeu、  
 245番目のアミノ酸がArg、  
 249番目のアミノ酸がPro、  
 250番目のアミノ酸がGlnまたはGlu、  
 251番目のアミノ酸がArg、Asp、GluまたはLeu、  
 252番目のアミノ酸がPhe、Ser、ThrまたはTyr、  
 254番目のアミノ酸がSerまたはThr、  
 255番目のアミノ酸がArg、Gly、IleまたはLeu、  
 256番目のアミノ酸がAla、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、ProまたはThr、  
 257番目のアミノ酸がAla、Ile、Met、Asn、SerまたはVal、  
 258番目のアミノ酸がAsp、  
 260番目のアミノ酸がSer、  
 262番目のアミノ酸がLeu、  
 270番目のアミノ酸がLys、  
 272番目のアミノ酸がLeuまたはArg、  
 279番目のアミノ酸がAla、Asp、Gly、His、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、TrpまたはTyr、  
 283番目のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、TrpまたはTyr、  
 285番目のアミノ酸がAsn、  
 286番目のアミノ酸がPhe、  
 288番目のアミノ酸がAsnまたはPro、  
 293番目のアミノ酸がVal、  
 307番目のアミノ酸がAla、Glu、GlnまたはMet、

30

40

50

308番目のアミノ酸がIle、ProまたはThr、  
 309番目のアミノ酸がPro、  
 311番目のアミノ酸がAla、Glu、Ile、Lys、Leu、Met、Ser、ValまたはTrp、  
 312番目のアミノ酸がAla、AspまたはPro、  
 314番目のアミノ酸がAlaまたはLeu、  
 316番目のアミノ酸がLys、  
 317番目のアミノ酸がPro、  
 318番目のアミノ酸がAsnまたはThr、  
 332番目のアミノ酸がPhe、His、Lys、Leu、Met、Arg、SerまたはTrp、  
 339番目のアミノ酸がAsn、ThrまたはTrp、  
 341番目のアミノ酸がPro、  
 343番目のアミノ酸がGlu、His、Lys、Gln、Arg、ThrまたはTyr、  
 375番目のアミノ酸がArg、  
 376番目のアミノ酸がGly、Ile、Met、Pro、ThrまたはVal、  
 377番目のアミノ酸がLys、  
 378番目のアミノ酸がAsp、AsnまたはVal、  
 380番目のアミノ酸がAla、Asn、SerまたはThr、  
 382番目のアミノ酸がPhe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TyrまたはTrp、  
 385番目のアミノ酸がAla、Arg、Asp、Gly、His、Lys、SerまたはThr、  
 386番目のアミノ酸がArg、Asp、Ile、Lys、Met、Pro、SerまたはThr、  
 387番目のアミノ酸がAla、Arg、His、Pro、SerまたはThr、  
 389番目のアミノ酸がAsn、ProまたはSer、  
 423番目のアミノ酸がAsn、  
 427番目のアミノ酸がAsn、  
 430番目のアミノ酸がAla、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、ValまたはTyr、  
 431番目のアミノ酸がHisまたはAsn、  
 433番目のアミノ酸がArg、Gln、His、Ile、Lys、ProまたはSer、  
 436番目のアミノ酸がArg、Asn、His、Ile、Leu、Lys、MetまたはThr、  
 438番目のアミノ酸がLys、Leu、ThrまたはTrp、  
 440番目のアミノ酸がLys、および  
 442番目のアミノ酸がLys、  
 から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸の改変である、請求項14に記載の抗原結合分子。

10

20

30

【請求項16】

IgGのFc領域が非ヒト動物由来のIgGのFc領域である、請求項1から15のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項17】

IgGのFc領域がヒト由来のIgGのFc領域である、請求項1から15のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

40

【請求項18】

抗原結合ドメインにおいて、少なくとも1つのアミノ酸がヒスチジンに置換されている、および／または少なくとも1つのヒスチジンが挿入されている、請求項1から17のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項19】

さらに、抗原に結合する活性が高カルシウムイオン濃度条件下に比べて低カルシウムイオン濃度条件下において低い、請求項1から18のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項20】

抗原結合ドメインがライブラリーから取得される、請求項1から19のいずれか一項に

50

記載の抗原結合分子。

【請求項 2 1】

抗原結合分子が抗体である、請求項 1 から 2 0 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 2 2】

抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体のいずれかである、請求項 2 1 に記載の抗原結合分子。

【請求項 2 3】

水素イオン濃度 (pH) の条件によって抗原に結合する活性が変化する、前記抗原結合ドメインが、以下から選択されるアミノ酸において少なくとも 1 つのアミノ酸がヒスチジンであることを含む、請求項 1 から 2 2 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

重鎖：H27、H31、H32、H33、H35、H50、H58、H59、H61、H62、H63、H64、H65、H99、H100 b、および H102 (Kabat ナンバリング)、

軽鎖：L24、L27、L28、L32、L53、L54、L56、L90、L92、および L94 (Kabat ナンバリング)

【請求項 2 4】

カルシウム濃度の条件によって抗原に結合する活性が変化する、前記抗原結合ドメインが、以下から選択されるアミノ酸において少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されていることを含む、請求項 1 から 2 2 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

重鎖：95位、96位、100a位および101位 (Kabat ナンバリング)、

軽鎖：30位、31位、32位、50位および92位 (Kabat ナンバリング)

【請求項 2 5】

請求項 1 から 2 4 のいずれか一項に記載の抗原結合分子を有効成分として含む医薬組成物。

【請求項 2 6】

当該抗原が原因の 1 つと考えられる疾患を治療するための、請求項 2 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 7】

抗原が HMGB1 である、請求項 2 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 8】

抗原が補体 C5 または補体 C5a である、請求項 2 6 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、複数種類の生理活性を有しているため、in vitro ではそれらの生理活性を阻害することが困難な抗原に対して、血中 (血清中または血漿中) からの消失を促進することで、in vivo での生理活性を低減させることが可能な抗原結合分子、およびそのような抗原結合分子を有効成分として含む医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

健常時に比べて、血漿中に存在する生理活性物質 (例えばサイトカインなど) の量が過度に増加することによって、健常時は保たれている生理活性のバランスが崩れ、それが発症の原因となるような疾患の例は数多く知られている。そのような疾患を治療する有効な手段の一つとして、過剰となっている生理活性物質の生理活性を阻害する方法が考えられる。例えば、生理活性を有する抗原に結合することによって、その生理活性を中和する抗体は有効な治療薬になり得る。

【0003】

しかし、抗原が2種類以上の生理活性を有している場合、1種類の中和抗体で阻害できるのは、通常1種類の生理活性のみであり、そのような抗体で当該生理活性物質が原因となっている疾患を治療することは困難であると予想される。

【0004】

10

20

30

40

50

2種類以上の生理活性を有する生理活性物質の例として、HMGB1 (High Mobility Group Box 1) が挙げられる。HMGB1は、DNAに結合することによって、DNAの高次構造の安定性に寄与する核内タンパク質であるHMGファミリーの1種として同定された。HMGB1は215アミノ酸からなり、構造的には大きく分けてHMG Aボックス、HMG Bボックス、酸性カルボキシル末端の3つのドメインから構成されている。通常はDNA結合タンパク質として細胞内に存在しているが、炎症細胞や壊死した細胞などから能動的あるいは受動的な機構を介して細胞外に放出される。放出されたHMGB1は、DNAやLPS (Lipopolysaccharide)、IL (Interleukin) -1 $\beta$ などの多種類の物質との結合を介して、RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts) やTLR4 (Toll-Like Receptor 4)、IL-1受容体などの多種類の細胞表面受容体を活性化しシグナルを細胞内に伝えることで、多様な炎症反応を惹起することが知られている (非特許文献1)。そして、LPSを投与された敗血症モデルマウスにおいて、HMGB1の血中濃度の上昇が見られ、HMGB1に対するポリクローナル抗体を投与することによってマウスの致死率が減少したことから (非特許文献2)、HMGB1が敗血症の発症において重要な役割を果たしていると考えられている。特許文献1には、HMGB1に対する高親和性のモノクローナル抗体を複数作製し、それらがHMGB1とRAGEあるいはTLR4の結合を阻害すること、敗血症モデルマウスに対して致死率を低下させたことが開示されている。しかし一方で、HMGB1のRAGEおよびTLR4への作用を両方阻害する抗体を取得したとの記載はなく、HMGB1が有する複数種類の活性を1種類の抗体で阻害することは困難であると予想される。

10

#### 【0005】

抗体 (IgG) は、FcRn (Neonatal Fc Receptor) 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) において結合はほとんど認められない。通常、IgGはエンドサイトーシスを介して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に戻り、血漿中の中性条件下においてFcRnから解離する。FcRnに結合しなかったIgGはライソソームに進み、そこで分解される。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、IgGの血漿中滞留性は著しく損なわれる。IgGの血漿中滞留性を改善する方法として、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へのリサイクル効率が上昇し、その結果、血漿中滞留性が改善する。逆に、中性条件下におけるFcRnへの結合が上昇すると、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に戻っても、中性条件下の血漿中においてIgGがFcRnから解離しないため、血漿中滞留性に変化が認められなかったり、むしろ悪化したりすることが報告されている (非特許文献3-5)。

20

30

#### 【0006】

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2)。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本抗体は、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。抗原の血漿中滞留性は、FcRnを介したリサイクル機構を有する抗体と比較して非常に短いため、通常、抗原は抗体と結合することにより、血漿中滞留性が長くなり、血漿中抗原濃度は上昇する。一方、上述のpH依存的に抗原に結合する抗体は、FcRnを介したリサイクルの過程において、エンドソーム内で抗原と解離するため、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報告されている (特許文献2)。しかしながら、このような抗原の血漿中からの消失を促進する効果をさらに向上させる抗体工学の手法は知られていない。

40

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

#### 【0007】

【特許文献1】 W01995/002187

50

【特許文献 2】W02009/125825

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献 1】Sims GPら、Annu. Rev. Immunol. (2010) 28, 367-388.

【非特許文献 2】Wang Hら、Science (1999) 285, 248-251.

【非特許文献 3】Yeung YAら、J. Immunol. (2009) 182, 7663-71.

【非特許文献 4】Datta-Mannan Aら、J. Biol. Chem. (2007) 282, 1709-17.

【非特許文献 5】Dall'Acqua WFら、J. Immunol. (2002) 169, 5171-80.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0009】

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、2種類以上の生理活性を有しているためin vitroにおいては1種類の抗原結合分子でそれらの生理活性を阻害することが困難な抗原に対して、血中（血清中または血漿中）からの消失を促進することで、in vivoにおいては1種類の抗原結合分子で生理活性を低減させることが可能な抗原結合分子を提供することにある。また、当該抗原結合分子を製造する方法、当該抗原結合分子を有効成分として含む医薬組成物を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、鋭意研究を行った結果、2種類以上の生理活性を有している抗原に対して、in vitroでは一部の種類の生理活性を阻害するが残りの種類の生理活性を阻害しないような抗原結合分子であっても、当該抗原結合分子に対して、

20

(i) pH酸性域の条件下においてヒトFcRn (Neonatal Fc Receptor) に結合し、

(i i) pH中性域の条件下において天然型ヒトIgGよりも強くヒトFcRnおよび／またはヒトFcγレセプターに結合し、かつ

(i i i) 抗原に結合する活性がイオン濃度の条件によって変化する性質を付与することによって、抗原の血中（血清中または血漿中）からの消失を促進して、結果的にin vivoでは生理活性を低減できることを新たに見出した。

【0011】

本発明は、このような知見に基づくものであり、具体的には以下の発明に関する。

30

〔1〕 血漿中の抗原濃度を低下させる抗原結合分子であって、以下の(1)～(6)に示す特徴を有する抗原結合分子；

(1) 抗原結合分子が、抗原結合ドメインおよび少なくとも1つのレセプター結合ドメインを含み、

(2) pH酸性域の条件下において、レセプター結合ドメインがヒトFcRn (Neonatal Fc Receptor) に結合する活性を有し、

(3) pH中性域の条件下において、レセプター結合ドメインがヒトFcレセプターに結合する活性が、天然型ヒトIgGがヒトFcレセプターに結合する活性よりも高く、

(4) 抗原結合ドメインが抗原に結合する活性が、イオン濃度の条件によって変化し、

(5) 抗原が2種類以上の生理活性を有し、

40

(6) 抗原結合分子が結合することで、抗原が有する生理活性のうち1種類以上が阻害される一方で、少なくとも1種類の生理活性が維持される。

〔2〕 抗原に結合することで、抗原が有する標的分子との結合活性のうち1種類以上を阻害する一方で、少なくとも1種類の標的分子との結合活性を維持することを特徴とする、〔1〕に記載の抗原結合分子。

〔3〕 血漿中の抗原濃度の低下が、抗原の細胞内への取込みの促進によることを特徴とする、〔1〕または〔2〕に記載の抗原結合分子。

〔4〕 血漿中の抗原濃度が低下することによって、生体における抗原の生理活性が低減することを特徴とする、〔1〕から〔3〕のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

〔5〕 抗原がHMGB1 (High Mobility Group Box 1) である、〔1〕から〔4〕のいずれ

50

か一項に記載の抗原結合分子。

〔 6 〕 HMGB1とRAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts) の結合を阻害する、〔 5 〕に記載の抗原結合分子。

〔 7 〕 HMGB1とTLR4 (Toll-Like Receptor 4) の結合を阻害する、〔 5 〕または〔 6 〕に記載の抗原結合分子。

〔 8 〕 抗原がCTGF (Connective Tissue Growth Factor) である、〔 1 〕から〔 4 〕のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

〔 9 〕 ヒトFcレセプターが、ヒトFcRnである、〔 1 〕から〔 8 〕のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

〔 1 0 〕 レセプター結合ドメインが、IgGのFc領域の少なくとも1つのアミノ酸が改変されたFc領域を含む、〔 9 〕に記載の抗原結合分子。 10

〔 1 1 〕 IgGのFc領域におけるアミノ酸の改変が、EUナンバリング234, 235, 236, 237, 238, 239, 244, 245, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 260, 262, 265, 267, 270, 272, 274, 279, 280, 282, 283, 284, 285, 286, 288, 289, 293, 295, 297, 298, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 332, 334, 338, 339, 340, 341, 343, 345, 360, 361, 362, 375, 376, 377, 378, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 390, 391, 413, 422, 423, 424, 427, 428, 430, 431, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 440および442番目から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸の改変である、〔 1 0 〕に記載の抗原結合分子。

〔 1 2 〕 IgGのFc領域におけるアミノ酸の改変が、EUナンバリング； 20

234番目のアミノ酸がArg、

235番目のアミノ酸がGly、LysまたはArg、

236番目のアミノ酸がAla、Asp、LysまたはArg、

237番目のアミノ酸がLys、MetまたはArg、

238番目のアミノ酸がAla、Asp、Lys、LeuまたはArg、

239番目のアミノ酸がAspまたはLys、

244番目のアミノ酸がLeu、

245番目のアミノ酸がArg、

248番目のアミノ酸がIleまたはTyr、

249番目のアミノ酸がPro、

250番目のアミノ酸がAla、Glu、Phe、Ile、Met、Gln、Ser、Val、Trp、Gly、His、Leu、AsnまたはTyr、

251番目のアミノ酸がArg、Asp、GluまたはLeu、

252番目のアミノ酸がPhe、Ser、Thr、TrpまたはTyr、

253番目のアミノ酸がVal、

254番目のアミノ酸がAla、Gly、His、Ile、Gln、Ser、ValまたはThr、

255番目のアミノ酸がAla、Asp、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Gly、Ser、Trp、TyrまたはGlu、

256番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Arg、Asn、Pro、Thr、SerまたはGln、

257番目のアミノ酸がAla、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、ThrまたはVal、 40

258番目のアミノ酸がAspまたはHis、

260番目のアミノ酸がSer、

262番目のアミノ酸がLeu、

265番目のアミノ酸がAla、

267番目のアミノ酸がMetまたはLeu、

270番目のアミノ酸がLysまたはPhe、

272番目のアミノ酸がAla、LeuまたはArg、

274番目のアミノ酸がAla、

279番目のアミノ酸がLeu、Ala、Asp、Gly、His、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Trp、またはTyr、 50

280番目のアミノ酸がAla、Gly、His、Lys、Asn、Gln、Arg、Ser、ThrまたはGlu、  
 282番目のアミノ酸がAlaまたはAsp、  
 283番目のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、TrpまたはTyr、  
 284番目のアミノ酸がLys、  
 285番目のアミノ酸がAsn、  
 286番目のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、TyrまたはGlu、  
 288番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Val、Trp、TyrまたはSer、  
 289番目のアミノ酸がHis、  
 293番目のアミノ酸がVal、  
 295番目のアミノ酸がMet、  
 297番目のアミノ酸がAla、  
 298番目のアミノ酸がGly、  
 303番目のアミノ酸がAla、  
 305番目のアミノ酸がAlaまたはThr、  
 307番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、TrpまたはTyr、  
 308番目のアミノ酸がAla、Phe、Ile、Leu、Met、Pro、GlnまたはThr、  
 309番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Pro、HisまたはArg、  
 311番目のアミノ酸がAla、His、Glu、Lys、Leu、Met、Ser、Val、TrpまたはIle、  
 312番目のアミノ酸がAla、Asp、ProまたはHis、  
 313番目のアミノ酸がTyrまたはPhe、  
 314番目のアミノ酸がAla、Leu、LysまたはArg、  
 315番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、Ile、Lys、Leu、Met、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、TyrまたはHis、  
 316番目のアミノ酸がAla、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはAsp、  
 317番目のアミノ酸がAlaまたはPro、  
 318番目のアミノ酸がAsnまたはThr、  
 325番目のアミノ酸がAla、Gly、Met、Leu、IleまたはSer、  
 326番目のアミノ酸がAsp、  
 327番目のアミノ酸がGly、  
 328番目のアミノ酸がArg、Asp、GluまたはTyr、  
 329番目のアミノ酸がLysまたはArg、  
 330番目のアミノ酸がLeu、  
 332番目のアミノ酸がGlu、Phe、His、Lys、Leu、Met、Arg、Ser、TrpまたはVal、  
 334番目のアミノ酸がLeu、  
 338番目のアミノ酸がAla、  
 339番目のアミノ酸がAsn、ThrまたはTrp、  
 340番目のアミノ酸がAla、  
 341番目のアミノ酸がPro、  
 343番目のアミノ酸がGlu、His、Lys、Gln、Arg、ThrまたはTyr、  
 345番目のアミノ酸がAla、  
 360番目のアミノ酸がHis、  
 361番目のアミノ酸がAla、  
 362番目のアミノ酸がAla、  
 375番目のアミノ酸がAlaまたはArg、  
 376番目のアミノ酸がAla、Gly、Ile、Met、Pro、ThrまたはVal、

377番目のアミノ酸がLys、  
 378番目のアミノ酸がAsp、AsnまたはVal、  
 380番目のアミノ酸がAla、Asn、ThrまたはSer、  
 382番目のアミノ酸がAla、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Trp、TyrまたはVal、  
 384番目のアミノ酸がAla、  
 385番目のアミノ酸がAla、Gly、Lys、Ser、Thr、Asp、HisまたはArg、  
 386番目のアミノ酸がArg、Asp、Ile、Met、Ser、Thr、LysまたはPro、  
 387番目のアミノ酸がAla、Arg、His、Pro、Ser、ThrまたはGlu、  
 389番目のアミノ酸がAla、Asn、ProまたはSer、  
 390番目のアミノ酸がAla、  
 391番目のアミノ酸がAla、  
 413番目のアミノ酸がAla、  
 423番目のアミノ酸がAsn、  
 424番目のアミノ酸がAlaまたはGlu、  
 427番目のアミノ酸がAsn、  
 428番目のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、  
 430番目のアミノ酸がAla、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、ValまたはTyr、  
 431番目のアミノ酸がHisまたはAsn、  
 433番目のアミノ酸がArg、Gln、His、Ile、Pro、SerまたはLys、  
 434番目のアミノ酸がAla、Phe、Gly、Met、His、Ser、TrpまたはTyr、  
 435番目のアミノ酸がLys、ArgまたはAsn、  
 436番目のアミノ酸がAla、His、Ile、Leu、Glu、Phe、Gly、Lys、Met、Asn、Arg、Ser、Thr、TrpまたはVal、  
 437番目のアミノ酸がArg、  
 438番目のアミノ酸がLys、Leu、ThrまたはTrp、  
 440番目のアミノ酸がLys、および  
 442番目のアミノ酸がLys、

10

20

30

から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸の改変である、〔11〕に記載の抗原結合分子。

〔13〕 IgGのFc領域が非ヒト動物由来のIgGのFc領域である、〔10〕から〔12〕のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

〔14〕 IgGのFc領域がヒト由来のIgGのFc領域である、〔10〕から〔12〕のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

〔15〕 ヒトFcレセプターが、ヒトFcγレセプターである、〔1〕から〔8〕のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

〔16〕 レセプター結合ドメインが、IgGのFc領域の少なくとも1つのアミノ酸が改変されたFc領域を含む、〔15〕に記載の抗原結合分子。

〔17〕 IgGのFc領域におけるアミノ酸の改変が、EUナンバリング221, 222, 223, 224, 225, 227, 228, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 246, 247, 249, 250, 251, 252, 254, 255, 256, 257, 258, 260, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 288, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 320, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 339, 341, 343, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 382, 385, 386, 387, 389, 392, 396, 421, 423, 427, 428, 429, 430, 431, 433, 434, 436, 438, 440および442番目から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸の改変である、〔16〕に記載の抗原結合分子。

40

50

〔18〕 IgGのFc領域におけるアミノ酸の改変が、EUナンバリング；

221番目のアミノ酸がLysまたはTyr、

222番目のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはTyr、

223番目のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはLys、

224番目のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはTyr、

225番目のアミノ酸がGlu、LysまたはTrp、

227番目のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyr、

228番目のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyr、

230番目のアミノ酸がAla、Glu、GlyまたはTyr、

231番目のアミノ酸がGlu、Gly、Lys、ProまたはTyr、 10

232番目のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyr、

233番目のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、

234番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、

235番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、

236番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、

237番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、 20

238番目のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、

239番目のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyr、

240番目のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThr、

241番目のアミノ酸がAsp、Glu、Leu、Arg、TrpまたはTyr、

243番目のアミノ酸がLeu、Glu、Leu、Gln、Arg、TrpまたはTyr、

244番目のアミノ酸がHis、

245番目のアミノ酸がAla、 30

246番目のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyr、

247番目のアミノ酸がAla、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Thr、ValまたはTyr、

249番目のアミノ酸がGlu、His、GlnまたはTyr、

250番目のアミノ酸がGluまたはGln、

251番目のアミノ酸がPhe、

254番目のアミノ酸がPhe、MetまたはTyr、

255番目のアミノ酸がGlu、LeuまたはTyr、

256番目のアミノ酸がAla、MetまたはPro、

258番目のアミノ酸がAsp、Glu、His、SerまたはTyr、

260番目のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyr、 40

262番目のアミノ酸がAla、Glu、Phe、IleまたはThr、

263番目のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThr、

264番目のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、TrpまたはTyr、

265番目のアミノ酸がAla、Glu、Leu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、

266番目のアミノ酸がAla、Phe、Ile、Leu、MetまたはThr、

267番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyr、

268番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、A 50

rg、Thr、ValまたはTrp、  
 269番目のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、  
 270番目のアミノ酸がGlu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、TrpまたはTyr、  
 271番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、  
 272番目のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、  
 273番目のアミノ酸がPheまたはIle、  
 274番目のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、  
 275番目のアミノ酸がLeuまたはTrp、  
 276番目のアミノ酸が、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、  
 278番目のアミノ酸がAsp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、ValまたはTrp、  
 279番目のアミノ酸がAla、  
 280番目のアミノ酸がAla、Gly、His、Lys、Leu、Pro、Gln、TrpまたはTyr、  
 281番目のアミノ酸がAsp、Lys、ProまたはTyr、  
 282番目のアミノ酸がGlu、Gly、Lys、ProまたはTyr、  
 283番目のアミノ酸がAla、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、ArgまたはTyr、  
 284番目のアミノ酸がAsp、Glu、Leu、Asn、ThrまたはTyr、  
 285番目のアミノ酸がAsp、Glu、Lys、Gln、TrpまたはTyr、  
 286番目のアミノ酸がGlu、Gly、ProまたはTyr、  
 288番目のアミノ酸がAsn、Asp、GluまたはTyr、  
 290番目のアミノ酸がAsp、Gly、His、Leu、Asn、Ser、Thr、TrpまたはTyr、  
 291番目のアミノ酸がAsp、Glu、Gly、His、Ile、GlnまたはThr、  
 292番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Pro、ThrまたはTyr、  
 293番目のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、  
 294番目のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、  
 295番目のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、  
 296番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、ThrまたはVal、  
 297番目のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、  
 298番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyr、  
 299番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、TrpまたはTyr、  
 300番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、ValまたはTrp、  
 301番目のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyr、  
 302番目のアミノ酸がIle、  
 303番目のアミノ酸がAsp、GlyまたはTyr、  
 304番目のアミノ酸がAsp、His、Leu、AsnまたはThr、  
 305番目のアミノ酸がGlu、Ile、ThrまたはTyr、

|                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 311番目のアミノ酸がAla、Asp、Asn、Thr、ValまたはTyr、                                                 |    |
| 313番目のアミノ酸がPhe、                                                                       |    |
| 315番目のアミノ酸がLeu、                                                                       |    |
| 317番目のアミノ酸がGluまたはGln、                                                                 |    |
| 318番目のアミノ酸がHis、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、ValまたはTyr、                                     |    |
| 320番目のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Asn、Pro、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、                     |    |
| 322番目のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Pro、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、                         |    |
| 323番目のアミノ酸がIle、LeuまたはMet、                                                             | 10 |
| 324番目のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyr、                     |    |
| 325番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、 |    |
| 326番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、     |    |
| 327番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyr、     |    |
| 328番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、 | 20 |
| 329番目のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、     |    |
| 330番目のアミノ酸がCys、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、     |    |
| 331番目のアミノ酸がAsp、Phe、His、Ile、Leu、Met、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、                     |    |
| 332番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、 |    |
| 333番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、ValまたはTyr、         | 30 |
| 334番目のアミノ酸がAla、Glu、Phe、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、         |    |
| 335番目のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Val、TrpまたはTyr、                 |    |
| 336番目のアミノ酸がGlu、LysまたはTyr、                                                             |    |
| 337番目のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはAsn、                                                         |    |
| 339番目のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、SerまたはThr、                             |    |
| 376番目のアミノ酸がAlaまたはVal、                                                                 |    |
| 377番目のアミノ酸がGlyまたはLys、                                                                 |    |
| 378番目のアミノ酸がAsp、                                                                       | 40 |
| 379番目のアミノ酸がAsn、                                                                       |    |
| 380番目のアミノ酸がAla、AsnまたはSer、                                                             |    |
| 382番目のアミノ酸がAlaまたはIle、                                                                 |    |
| 385番目のアミノ酸がGlu、                                                                       |    |
| 392番目のアミノ酸がThr、                                                                       |    |
| 396番目のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Ile、Lys、Leu、Met、Gln、ArgまたはTyr、                                 |    |
| 421番目のアミノ酸がLys、                                                                       |    |
| 427番目のアミノ酸がAsn、                                                                       |    |
| 428番目のアミノ酸がPheまたはLeu、                                                                 |    |
| 429番目のアミノ酸がMet、                                                                       | 50 |

434番目のアミノ酸がTrp、

436番目のアミノ酸がIle、および

440番目のアミノ酸がGly、His、Ile、LeuまたはTyr、

から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸の改変である、〔17〕に記載の抗原結合分子。

〔19〕 ヒトFcγレセプターが、FcγRIa、FcγRIIa、FcγRIIb、またはFcγRIIIaである、〔16〕から〔18〕のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

〔20〕 IgGのFc領域におけるアミノ酸の改変が、EUナンバリング238番目のアミノ酸がAsp、および271番目のアミノ酸がGlyである、〔17〕に記載の抗原結合分子。

〔21〕 IgGのFc領域において、さらにEUナンバリング233, 234, 237, 244, 245, 249, 250, 251, 252, 254, 255, 256, 257, 258, 260, 262, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 272, 279, 283, 285, 286, 288, 293, 296, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 316, 317, 318, 326, 327, 330, 331, 332, 333, 339, 341, 343, 375, 376, 377, 378, 380, 382, 385, 386, 387, 389, 396, 423, 427, 428, 430, 431, 433, 434, 436, 438, 440 および442番目から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸が改変された、〔20〕に記載の抗原結合分子。

10

〔22〕 IgGのFc領域におけるアミノ酸の改変が、EUナンバリング；

233番目のアミノ酸がAsp、

234番目のアミノ酸がTyr、

237番目のアミノ酸がAsp、

264番目のアミノ酸がIle、

265番目のアミノ酸がGlu、

266番目のアミノ酸がPhe、MetまたはLeu、

267番目のアミノ酸がAla、Glu、GlyまたはGln、

268番目のアミノ酸がAspまたはGlu、

269番目のアミノ酸がAsp、

272番目のアミノ酸が、Asp、Phe、Ile、Met、AsnまたはGln、

296番目のアミノ酸がAsp、

326番目のアミノ酸がAlaまたはAsp、

327番目のアミノ酸がGly、

330番目のアミノ酸がLysまたはArg、

331番目のアミノ酸がSer、

332番目のアミノ酸がThr、

333番目のアミノ酸がThr、LysまたはArg、

396番目のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Ile、Lys、Leu、Met、Gln、ArgまたはTyr、

から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸の改変である、〔21〕に記載の抗原結合分子。

〔23〕 IgGのFc領域において、さらにEUナンバリング244, 245, 249, 250, 251, 252, 254, 255, 256, 257, 258, 260, 262, 270, 272, 279, 283, 285, 286, 288, 293, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 316, 317, 318, 332, 339, 341, 343, 375, 376, 377, 378, 380, 382, 385, 386, 387, 389, 423, 427, 428, 430, 431, 433, 434, 436, 438, 440

および442番目から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸が改変された、〔20〕から〔22〕のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

30

40

〔24〕 IgGのFc領域におけるアミノ酸の改変が、EUナンバリング；

244番目のアミノ酸がLeu、

245番目のアミノ酸がArg、

249番目のアミノ酸がPro、

250番目のアミノ酸がGlnまたはGlu、

251番目のアミノ酸がArg、Asp、GluまたはLeu、

252番目のアミノ酸がPhe、Ser、ThrまたはTyr、

254番目のアミノ酸がSerまたはThr、

255番目のアミノ酸がArg、Gly、IleまたはLeu、

50

256番目のアミノ酸がAla、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、ProまたはThr、  
 257番目のアミノ酸がAla、Ile、Met、Asn、SerまたはVal、  
 258番目のアミノ酸がAsp、  
 260番目のアミノ酸がSer、  
 262番目のアミノ酸がLeu、  
 270番目のアミノ酸がLys、  
 272番目のアミノ酸がLeuまたはArg、  
 279番目のアミノ酸がAla、Asp、Gly、His、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、TrpまたはTy  
 r、  
 283番目のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、S 10  
 er、Thr、TrpまたはTyr、  
 285番目のアミノ酸がAsn、  
 286番目のアミノ酸がPhe、  
 288番目のアミノ酸がAsnまたはPro、  
 293番目のアミノ酸がVal、  
 307番目のアミノ酸がAla、Glu、GlnまたはMet、  
 308番目のアミノ酸がIle、ProまたはThr、  
 309番目のアミノ酸がPro、  
 311番目のアミノ酸がAla、Glu、Ile、Lys、Leu、Met、Ser、ValまたはTrp、  
 312番目のアミノ酸がAla、AspまたはPro、 20  
 314番目のアミノ酸がAlaまたはLeu、  
 316番目のアミノ酸がLys、  
 317番目のアミノ酸がPro、  
 318番目のアミノ酸がAsnまたはThr、  
 332番目のアミノ酸がPhe、His、Lys、Leu、Met、Arg、SerまたはTrp、  
 339番目のアミノ酸がAsn、ThrまたはTrp、  
 341番目のアミノ酸がPro、  
 343番目のアミノ酸がGlu、His、Lys、Gln、Arg、ThrまたはTyr、  
 375番目のアミノ酸がArg、  
 376番目のアミノ酸がGly、Ile、Met、Pro、ThrまたはVal、 30  
 377番目のアミノ酸がLys、  
 378番目のアミノ酸がAsp、AsnまたはVal、  
 380番目のアミノ酸がAla、Asn、SerまたはThr、  
 382番目のアミノ酸がPhe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、T  
 rpまたはTyr、  
 385番目のアミノ酸がAla、Arg、Asp、Gly、His、Lys、SerまたはThr、  
 386番目のアミノ酸がArg、Asp、Ile、Lys、Met、Pro、SerまたはThr、  
 387番目のアミノ酸がAla、Arg、His、Pro、SerまたはThr、  
 389番目のアミノ酸がAsn、ProまたはSer、  
 423番目のアミノ酸がAsn、 40  
 427番目のアミノ酸がAsn、  
 428番目のアミノ酸がLeu、Met、Phe、SerまたはThr、  
 430番目のアミノ酸がAla、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、T  
 hr、ValまたはTyr、  
 431番目のアミノ酸がHisまたはAsn、  
 433番目のアミノ酸がArg、Gln、His、Ile、Lys、ProまたはSer、  
 434番目のアミノ酸がAla、Gly、His、Phe、Ser、TrpまたはTyr、  
 436番目のアミノ酸がArg、Asn、His、Ile、Leu、Lys、MetまたはThr、  
 438番目のアミノ酸がLys、Leu、ThrまたはTrp、  
 440番目のアミノ酸がLys、および 50

442番目のアミノ酸がLys、

から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸の改変である、〔23〕に記載の抗原結合分子。

〔25〕 IgGのFc領域が非ヒト動物由来のIgGのFc領域である、〔16〕から〔24〕のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

〔26〕 IgGのFc領域がヒト由来のIgGのFc領域である、〔16〕から〔24〕のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

〔27〕 イオン濃度が水素イオン濃度(pH)であり、抗原に結合する活性がpH中性域の条件下に比べてpH酸性域の条件下において低い、〔1〕から〔26〕のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

〔28〕 pH酸性がエンドソーム内のpHである、〔27〕に記載の抗原結合分子。

10

〔29〕 pH中性が血漿中のpHである、〔27〕または〔28〕に記載の抗原結合分子。

〔30〕 pH酸性がpH5.5~6.5であり、pH中性がpH7.0~8.0である、〔27〕から〔29〕のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

〔31〕 pH酸性域の条件下とpH中性域の条件下における抗原に結合する活性の比が、KD(pH酸性)/KD(pH中性)の値で2以上である、〔27〕から〔30〕のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

〔32〕 抗原結合ドメインにおいて、少なくとも1つのアミノ酸がヒスチジンに置換されている、および/または少なくとも1つのヒスチジンが挿入されている、〔27〕から〔31〕のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

〔33〕 さらに、抗原に結合する活性が高カルシウムイオン濃度条件下に比べて低カルシウムイオン濃度条件下において低い、〔27〕から〔32〕のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

20

〔34〕 イオン濃度がカルシウムイオン濃度であり、抗原に結合する活性が高カルシウムイオン濃度条件下に比べて低カルシウムイオン濃度条件下において低い、〔1〕から〔26〕のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

〔35〕 低カルシウムイオン濃度がエンドソーム内のカルシウムイオン濃度である、〔33〕または〔34〕に記載の抗原結合分子。

〔36〕 高カルシウムイオン濃度が血漿中のカルシウムイオン濃度である、〔33〕から〔35〕のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

〔37〕 低カルシウムイオン濃度がカルシウムイオン濃度0.1 μM~30 μMであり、高カルシウムイオン濃度がカルシウムイオン濃度100 μM~10 mMである、〔33〕から〔36〕のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

30

〔38〕 低カルシウムイオン濃度条件下と高カルシウムイオン濃度条件下における抗原に結合する活性の比が、KD(低カルシウムイオン濃度)/KD(高カルシウムイオン濃度)の値が2以上である、〔33〕から〔37〕のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

〔39〕 抗原結合ドメインがライブラリーから取得される、〔1〕から〔38〕のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

〔40〕 抗原結合分子が抗体である、〔1〕から〔39〕のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

〔41〕 抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体のいずれかである、〔40〕に記載の抗原結合分子。

40

〔42〕 〔1〕から〔41〕のいずれか一項に記載の抗原結合分子を有効成分として含む医薬組成物。

〔43〕 当該抗原が原因の1つと考えられる疾患を治療するための、〔42〕に記載の医薬組成物。

〔44〕 抗原がHMGB1である、〔43〕に記載の医薬組成物。

〔45〕 疾患が敗血症である、〔43〕または〔44〕に記載の医薬組成物。

〔46〕 抗原がCTGFである、〔43〕に記載の医薬組成物。

〔47〕 疾患が線維症である、〔43〕または〔46〕に記載の医薬組成物。

〔48〕 以下の工程を含む、〔1〕に記載の抗原結合分子を製造する方法；

50

(a) 2種類以上の生理活性を有する抗原を選択する工程、  
(b) 抗原結合ドメインを取得する工程、  
(c) 少なくとも1つのレセプター結合ドメインを取得する工程、  
(d) 工程(b)で取得された抗原結合ドメインの中から、抗原に結合する活性がイオン濃度の条件によって変化するドメインを選択する工程、  
(e) 工程(c)で取得されたレセプター結合ドメインの中から、pH酸性域の条件下においてヒトFcRnに結合する活性を有し、かつpH中性域の条件下において、ヒトFcレセプターに結合する活性が、天然型ヒトIgGがヒトFcレセプターに結合する活性よりも高いドメインを選択する工程、

(f) 工程(d)で選択された抗原結合ドメインおよび工程(e)で選択されたレセプター結合ドメインが連結された抗原結合分子を作製する工程、  
ならびに

(g) 工程(f)で作製された抗原結合分子の中から、抗原に結合することで、抗原が有する生理活性のうち1種類以上が阻害される一方で、少なくとも1種類の生理活性が維持される抗原結合分子を選択する工程。

〔49〕 工程(b)が、抗原に結合するドメインを取得し、さらに当該ドメインにおける少なくとも1つのアミノ酸を改変する工程である、〔48〕に記載の方法。

〔50〕 工程(c)が、ヒトFcRnに結合するドメインを取得し、さらに当該ドメインにおける少なくとも1つのアミノ酸を改変する工程である、〔48〕または〔49〕に記載の方法。

〔51〕 工程(f)が

(f) 工程(d)で選択された抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドおよび工程(e)で選択されたレセプター結合ドメインをコードするポリヌクレオチドが連結されたポリヌクレオチドを作製し、当該連結されたポリヌクレオチドを用いて、工程(d)で選択された抗原結合ドメインおよび工程(e)で選択されたレセプター結合ドメインが連結された抗原結合分子を作製する工程、  
である、〔48〕から〔50〕のいずれか一項に記載の方法。

〔52〕 工程(g)が

(g) 工程(f)で作製された抗原結合分子の中から、抗原に結合することで、抗原が有する標的分子との結合活性のうち1種類以上が阻害される一方で、少なくとも1種類の標的分子との結合活性が維持される抗原結合分子を選択する工程、  
である、〔48〕から〔51〕のいずれか一項に記載の方法。

〔53〕 ヒトFcレセプターが、ヒトFcRnまたはヒトFcγレセプターである、〔48〕から〔52〕のいずれか一項に記載の方法。

#### 【0012】

さらに本発明は以下に関する。

〔54〕 〔1〕から〔41〕のいずれか一項に記載の抗原結合分子または〔48〕から〔53〕のいずれか一項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、血漿中の抗原濃度を低下させる方法。

〔55〕 〔1〕から〔41〕のいずれか一項に記載の抗原結合分子または〔48〕から〔53〕のいずれか一項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、抗原の細胞内への取込みを促進する方法。

〔56〕 〔1〕から〔41〕のいずれか一項に記載の抗原結合分子または〔48〕から〔53〕のいずれか一項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、生体における抗原の生理活性を低減する方法。

〔57〕 抗原結合分子が抗体である、〔54〕から〔56〕のいずれか一項に記載の方法。

〔58〕 抗体がキメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体のいずれかである、〔57〕に記載の方法。

〔59〕 〔1〕から〔41〕のいずれか一項に記載の抗原結合分子または〔48〕から

10

20

30

40

50

〔53〕のいずれか一項に記載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、疾患治療剤。

〔60〕 抗原がHMGB1である、〔59〕に記載の治療剤。

〔61〕 疾患が敗血症である、〔59〕または〔60〕に記載の治療剤。

〔62〕 抗原がCTGFである、〔59〕に記載の治療剤。

〔63〕 疾患が線維症である、〔59〕または〔62〕に記載の治療剤。

〔64〕 〔1〕から〔41〕のいずれか一項に記載の抗原結合分子または〔48〕から〔53〕のいずれか一項に記載の製造方法により製造された抗原結合分子を含む、〔54〕から〔58〕のいずれか一項に記載の方法に用いるためのキット。

#### 【0013】

さらに本発明は以下に関する。

〔101〕 条件に応じて抗原結合活性が変化する抗体をスクリーニングする方法であって、以下の工程を含む方法；

（a）抗体を産生する細胞を調製する工程、

（b）第1の条件下で（a）の細胞に抗原を接触させる工程、

（c）工程（b）の細胞の中から、一定量以上の抗原と結合した細胞を選別する工程、

（d）工程（c）の細胞を第2の条件下に置く工程、および

（e）工程（d）の細胞の中から、工程（c）と比較して抗原の結合量が低下した細胞を選別する工程。

〔102〕 〔101〕に記載の方法であって、以下の工程を含む方法；

（a）抗体を産生する細胞を調製する工程、

（b）第1の条件下で（a）の細胞に抗原を接触させる工程、

（c）工程（b）の細胞に、抗IgG抗体を接触させる工程、

（d）工程（c）の細胞の中から、一定量以上の抗原と結合し、かつ一定量以上の抗IgG抗体と結合した細胞を選別する工程、

（e）工程（d）の細胞を第2の条件下に置く工程、および

（f）工程（e）の細胞の中から、工程（d）と比較して抗原の結合量が低下した細胞を選別する工程。

〔103〕 〔102〕に記載の方法であって、以下の工程を含む方法；

（a）抗体を産生する細胞を調製する工程、

（b）第1の条件下で（a）の細胞に抗原を接触させる工程、

（c）工程（b）の細胞の中から、抗原と結合した細胞を濃縮する工程、

（d）工程（c）の細胞に、抗IgG抗体を接触させる工程、

（e）工程（d）の細胞の中から、一定量以上の抗原と結合し、かつ一定量以上の抗IgG抗体と結合した細胞を選別する工程、

（f）工程（e）の細胞を第2の条件下に置く工程、および

（g）工程（f）の細胞の中から、工程（e）と比較して抗原の結合量が低下した細胞を選別する工程。

〔104〕 第1の条件および第2の条件がイオン濃度の条件である、〔101〕から〔103〕のいずれか一項に記載の方法。

〔105〕 第1の条件がpH中性であり、第2の条件がpH酸性である、〔104〕に記載の方法。

〔106〕 第1の条件が高カルシウムイオン濃度であり、第2の条件が低カルシウムイオン濃度である、〔104〕に記載の方法。

〔107〕 第1の条件がpH中性かつ高カルシウムイオン濃度であり、第2の条件がpH酸性かつ低カルシウムイオン濃度である、〔104〕に記載の方法。

〔108〕 pH中性がpH7.0～8.0であり、pH酸性がpH5.5～6.5である、〔105〕または〔107〕に記載の方法。

〔109〕 高カルシウムイオン濃度がカルシウムイオン濃度100  $\mu$ M～10 mMであり、低カルシウムイオン濃度がそれ以下のカルシウムイオン濃度である、〔106〕から〔10

10

20

30

40

50

8〕のいずれか一項に記載の方法。

〔110〕 抗体を産生する細胞が、血液、脾臓および／またはリンパ節から回収された細胞である、〔101〕から〔109〕のいずれか一項に記載の方法。

〔111〕 抗体を産生する細胞が、B細胞である、〔101〕から〔110〕のいずれか一項に記載の方法。

〔112〕 抗体を産生する細胞が、ウサギのB細胞である、〔111〕に記載の方法。

〔113〕 抗原および／または抗IgG抗体が蛍光標識されている、〔101〕から〔112〕のいずれか一項に記載の方法。

〔114〕 細胞を選別する工程がFACSを用いて行なわれる、〔101〕から〔113〕のいずれか一項に記載の方法。

〔115〕 細胞を濃縮する工程がMACSを用いて行なわれる、〔101〕から〔114〕のいずれか一項に記載の方法。

#### 【0014】

さらに、本発明は以下の発明に関する。

〔a〕 本発明の抗原結合分子を投与する工程を含む、生理活性を有する抗原が原因の1つと考えられる疾患を治療する方法、血漿中の抗原濃度を低下させる方法、抗原の細胞内への取込みを促進する方法、または生体における抗原の生理活性を低減する方法。

〔b〕 本発明の抗原結合分子を有効成分として含む、生理活性を有する抗原が原因の1つと考えられる疾患の治療剤、血漿中の抗原濃度低下剤、抗原の細胞内への取込み促進剤、または生体における抗原の生理活性低減剤。

〔c〕 生理活性を有する抗原が原因の1つと考えられる疾患を治療する方法、血漿中の抗原濃度を低下させる方法、抗原の細胞内への取込みを促進する方法、または生体における抗原の生理活性を低減する方法において使用するための、本発明の抗原結合分子。

〔d〕 生理活性を有する抗原が原因の1つと考えられる疾患の治療剤、血漿中の抗原濃度低下剤、抗原の細胞内への取込み促進剤、または生体における抗原の生理活性低減剤の製造における、本発明の抗原結合分子の使用。

〔e〕 本発明の抗原結合分子を使用する段階を含む、生理活性を有する抗原が原因の1つと考えられる疾患の治療剤、血漿中の抗原濃度低下剤、抗原の細胞内への取込み促進剤、または生体における抗原の生理活性低減剤を製造するためのプロセス。

疾患としては、例えばHMGB1が病因の一つと考えられる疾患、CTGFが病因の一つと考えられる疾患、またはIgEが病因の一つと考えられる疾患が挙げられる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0015】

【図1】 抗HMGB1抗体を産生するB細胞のFACSソーティングの結果を示す図である。(A)はpH中性、高カルシウムイオン濃度条件での1回目のソーティングの結果を、(B)はpH酸性、低カルシウムイオン濃度条件での2回目のソーティングの結果を示す。図中の番号(1, 2, 3)はゲートの番号を示す。

【図2】 抗HMGB1抗体のHMGB1結合活性をプロットしたグラフである。FACSソーティングにおける(A)ゲート1、(B)ゲート2、(C)ゲート3由来のB細胞が産生する抗体についてそれぞれプロットした結果を表わす。

【図3】 ゲート1、2、3由来のB細胞が産生する抗体のうち、抗原結合能がpHおよび／またはカルシウムイオン濃度に依存しない抗体(灰色部分)、pHおよび／またはカルシウムイオン濃度に依存する抗体(黒色部分)の個数をそれぞれ表わすグラフである。

【図4-1】 Biacoreにおける抗HMGB1抗体(HMG233-IgG1及びHMG236-IgG1)とヒトHMGB1とのセンサーグラムを表わす図である。

【図4-2】 図4-1の続きの図である。抗HMGB1抗体(HMG481-IgG1およびHMG487-IgG1)とヒトHMGB1とのセンサーグラムを表す図である。

【図5】 抗HMGB1抗体(HMG233, HMG236, HMG481, HMG487, HMG446)のRAGE ELISAの結果を示すグラフである。抗体非添加条件のコントロールの吸光度を100とし、これに対する各抗体の相対値を示した。

10

20

30

40

50

【図 6】抗HMGB1抗体（HMG233, HMG236, HMG481, HMG487, HMG446）のTLR4/MD-2 ELISAの結果を示すグラフである。抗体非添加条件のコントロールの吸光度を100とし、これに対する各抗体の相対値を示した。

【図 7】ノーマルマウスにおける血清中ヒトHMGB1濃度推移を表した図である。

【図 8】ノーマルマウスにおける血清中抗ヒトHMGB1抗体濃度推移を表した図である。

【図 9】pH依存的に標的抗原に結合し、中性pH域におけるFcRn結合活性を有する抗体を用いることで血漿中から抗原を除去できることを示す図である。

【図 10】pH7.4, pH6.0における6RKE02-IgG1のhsIL-6Rに対するセンサーグラムを示す図である。

【図 11】ヒトgp130発現BaF3細胞（BaF/gp130）による生物活性評価結果を示す図である。 10

【図 12】ノーマルマウスを用いたinfusion試験における抗体投与後の血漿中hsIL-6R濃度推移を示す図である。

【図 13】ノーマルマウスを用いたin vivo薬効試験（試験1）のプロトコールおよび抗体投与によるSAA抑制効果（mean±SE）を示す図である。

【図 14】ノーマルマウスを用いたin vivo薬効試験（試験2）のプロトコールおよび抗体投与によるSAA抑制効果（mean±SE）を示す図である。

【図 15】既存の中和抗体に比べて中性pHにおけるFcγレセプターに対する結合を増強したイオン濃度依存的に抗原に対して結合する抗体の投与により、血漿中から可溶性抗原が消失する非限定的作用メカニズムを表す図である。 20

【図 16】H54/L28-IgG1またはヒトIL-6レセプターに対してpH依存的に結合するFv4-IgG1が、ヒトFcRnトランスジェニックマウスに投与されたときの当該マウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度推移を示す図である。

【図 17】ヒトIL-6レセプターに対してpH依存的に結合するFv4-IgG1、マウスFcγRに対する結合が欠損したFv4-IgG1の改変体であるFv4-IgG1-F760、マウスFcγRに対する結合が増強されたFv4-IgG1の改変体であるFv4-IgG1-F1022、またはFv4-IgG1の低フコース型抗体であるFv4-IgG1-Fucが、ヒトFcRnトランスジェニックマウスに投与されたときの当該マウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度推移を示す図である。

【図 18】Fv4-IgG1、VH3-IgG1-F1022、およびVH3-IgG1-F1022の改変体であってpH酸性域におけるFcRnに対する結合が向上したVH3-IgG1-F1093を重鎖として含む抗原結合分子が、ヒトFcRnトランスジェニックマウスに投与されたときの当該マウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度推移を示す図である。 30

【図 19】Fv4-IgG1、VH3-IgG1-F1022、およびVH3-IgG1-F1022の改変体であってpH酸性域におけるFcRnに対する結合が向上したVH3-IgG1-F1093を重鎖として含む抗原結合分子が、ヒトFcRnトランスジェニックマウスに投与されたときの当該マウスの血漿中における投与された抗原結合分子の濃度推移を示す図である。

【図 20】Fv4-IgG1、マウスFcγRに対する結合が増強された（特にマウスFcγRIIb、マウスFcγRIIIに対する結合が増強された）Fv4-IgG1の改変体であるFv4-IgG1-F1087、およびマウスFcγRに対する結合が増強された（特にマウスFcγRI、マウスFcγRIVに対する結合が増強された）Fv4-IgG1の改変体であるFv4-IgG1-F1182が、ヒトFcRnトランスジェニックマウスに投与されたときの当該マウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度推移を示す図である。 40

【図 21】Fv4-IgG1、Fv4-IgG1-F1087、およびpH酸性域におけるFcRnに対する結合が向上したFv4-IgG1-F1087の改変体であるFv4-IgG1-F1180、Fv4-IgG1-F1412が、ヒトFcRnトランスジェニックマウスに投与されたときの当該マウスの血漿中における投与された抗原結合分子の濃度推移を示す図である。

【図 22】Fv4-IgG1、Fv4-IgG1-F1182、およびpH酸性域におけるFcRnに対する結合が向上したFv4-IgG1-F1182の改変体であるFv4-IgG1-F1181が、ヒトFcRnトランスジェニックマウスに投与されたときの当該マウスの血漿中における投与された抗原結合分子の濃度推移を示す図である。 50

【図 2 3】 Fv4-IgG1、Fv4-IgG1-F1087、およびpH酸性域におけるFcRnに対する結合が向上したFv4-IgG1-F1087の改変体であるFv4-IgG1-F1180、Fv4-IgG1-F1412が、ヒトFcRnトランスジェニックマウスに投与されたときの当該マウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度推移を示す図である。

【図 2 4】 Fv4-IgG1、Fv4-IgG1-F1182、およびpH酸性域におけるFcRnに対する結合が向上したFv4-IgG1-F1182の改変体であるFv4-IgG1-F1181が、ヒトFcRnトランスジェニックマウスに投与されたときの当該マウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度推移を示す図である。

【図 2 5】 Fv4-mIgG1、マウスFc $\gamma$ RIIb、マウスFc $\gamma$ RIIIに対する結合が増強されたFv4-mIgG1の改変体であるFv4-mIgG1-mF44、および更にマウスFc $\gamma$ RIIb、マウスFc $\gamma$ RIIIに対する結合が増強されたFv4-mIgG1の改変体であるFv4-mIgG1-mF46が、ノーマルマウスに投与されたときの当該マウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度推移を示す図である。

10

【図 2 6】 Fv4-mIgG1、マウスFc $\gamma$ RIIb、マウスFc $\gamma$ RIIIに対する結合が増強されたFv4-mIgG1の改変体であるFv4-mIgG1-mF44、および更にマウスFc $\gamma$ RIIb、マウスFc $\gamma$ RIIIに対する結合が増強されたFv4-mIgG1の改変体であるFv4-mIgG1-mF46が、Fc $\gamma$ RIII欠損マウスに投与されたときの当該マウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度推移を示す図である。

【図 2 7】 Fv4-mIgG1、マウスFc $\gamma$ RIIb、マウスFc $\gamma$ RIIIに対する結合が増強されたFv4-mIgG1の改変体であるFv4-mIgG1-mF44、および更にマウスFc $\gamma$ RIIb、マウスFc $\gamma$ RIIIに対する結合が増強されたFv4-mIgG1の改変体であるFv4-mIgG1-mF46が、Fc受容体 $\gamma$ 鎖欠損マウスに投与されたときの当該マウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度推移を示す図である。

20

【図 2 8】 Fv4-mIgG1、マウスFc $\gamma$ RIIb、マウスFc $\gamma$ RIIIに対する結合が増強されたFv4-mIgG1の改変体であるFv4-mIgG1-mF44、および更にマウスFc $\gamma$ RIIb、マウスFc $\gamma$ RIIIに対する結合が増強されたFv4-mIgG1の改変体であるFv4-mIgG1-mF46が、Fc $\gamma$ RIIb欠損マウスに投与されたときの当該マウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度推移を示す図である。

【図 2 9】 Fc $\gamma$ RIIaの多型 (R/H) を有するドナー由来の血小板を用いた血小板凝集アッセイにおけるomalizumab-G1d-v3/IgE免疫複合体による血小板凝集能の評価結果を示した図である。

【図 3 0】 Fc $\gamma$ RIIaの多型 (H/H) を有するドナー由来の血小板を用いた血小板凝集アッセイにおけるomalizumab-G1d-v3/IgE免疫複合体による血小板凝集能の評価結果を示した図である。

30

【図 3 1】 洗浄血小板の膜表面のCD62p発現を評価した結果を表した図である。黒色で塗りつぶされたグラフはPBSと反応させた後ADPを加え刺激した場合の結果を示し、グラフの中が塗りつぶされていないものは免疫複合体と反応させた後ADPで刺激した場合の結果を示した図である。

【図 3 2】 洗浄血小板の膜表面の活性型インテグリン発現を評価した結果を表した図である。黒色で塗りつぶされたグラフはPBSと反応させた後ADPを加え刺激した場合の結果を示し、グラフの中が塗りつぶされていないものは免疫複合体と反応させた後ADPで刺激した場合の結果を示した図である。

【図 3 3】 横軸は各PD variantのFc $\gamma$ RIIbに対する相対的な結合活性の値、縦軸は各PD variantのFc $\gamma$ RIIa R型に対する相対的な結合活性の値を表す。各PD variantの各Fc $\gamma$ Rに対する結合量の値を、コントロールとした改変導入前の抗体であるIL6R-F652 (配列番号：162) /IL6R-L (IL6R-F652はEUナンバリングで表される238位のProをAspに置換した改変Fcを含む抗体重鎖) の各Fc $\gamma$ Rに対する結合量の値で割り、さらに100倍した値を各PD variantの各Fc $\gamma$ Rに対する相対的な結合活性の値とした。図中のF652というプロットはIL6R-F652/IL6R-Lの値を示す。

40

【図 3 4】 縦軸はP238D改変を有さないGpH7-B3 (配列番号：168) /GpL16-k0 (配列番号：169) に各改変を導入した改変体のFc $\gamma$ RIIbに対する相対的な結合活性の値、横軸はP238D改変を有するIL6R-F652 (配列番号：162) /IL6R-Lに各改変を導入した改変体のFc $\gamma$ RIIbに対する相対的な結合活性の値を示す。なお、各改変体のFc $\gamma$ RIIbに対する結

50

含量の値を、改変導入前の抗体のFc $\gamma$ RIIbに対する結合量の値で割り、さらに100倍した値を相対的な結合活性の値とした。ここで、P238Dを有さないGpH7-B3/GpL16-k0に導入した場合、P238Dを有するIL6R-F652/IL6R-Lに導入した場合共にFc $\gamma$ RIIbに対する結合増強効果を発揮した改変は領域Aに含まれ、P238Dを有さないGpH7-B3/GpL16-k0に導入した場合にはFc $\gamma$ RIIbに対する結合増強効果を発揮するが、P238Dを有するIL6R-F652/IL6R-Lに導入した場合にはFc $\gamma$ RIIbに対する結合増強効果を発揮しない改変は領域Bに含まれる。

【図35】Fc (P238D) / Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体の結晶構造を表す。

【図36】Fc (P238D) / Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体の結晶構造とFc (WT) / Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体のモデル構造とを、Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域ならびにFc CH2ドメインAに対しC $\alpha$ 原子間距離をもとにした最小二乗法により重ね合わせた図を表す。

10

【図37】Fc (P238D) / Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体の結晶構造とFc (WT) / Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体のモデル構造について、Fc CH2ドメインAならびにFc CH2ドメインB単独同士でC $\alpha$ 原子間距離をもとにした最小二乗法により重ね合わせをおこない、P238D付近の詳細構造を比較した図を表す。

【図38】Fc (P238D) / Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体の結晶構造において、Fc CH2ドメインAのEUナンバリングで表される237位のGlyの主鎖とFc $\gamma$ RIIbの160位のTyrとの間に水素結合が認められることを示す図である。

【図39】Fc (P238D) / Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体の結晶構造において、Fc CH2ドメインBのEUナンバリングで表される270位のAspとFc $\gamma$ RIIbの131番目のArgとの間に静電的な相互作用が認められることを示す図である。

20

【図40】横軸は各2B variantのFc $\gamma$ RIIbに対する相対的な結合活性の値、縦軸は各2B variantのFc $\gamma$ RIIa R型に対する相対的な結合活性の値をそれぞれ示す。各2B variantの各Fc $\gamma$ Rに対する結合量の値を、コントロールとした改変導入前の抗体（EUナンバリングで表される238位のProをAspに置換した改変Fc）の各Fc $\gamma$ Rに対する結合量の値で割り、さらに100倍した値を各2B variantの各Fc $\gamma$ Rに対する相対的な結合活性の値とした。

【図41】Fc (P238D) / Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体の結晶構造においてFc Chain AのEUナンバリングで表される233位のGluとFc $\gamma$ RIIb細胞外領域におけるその周辺残基を表す図である。

【図42】Fc (P238D) / Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体の結晶構造においてFc Chain AのEUナンバリングで表される330位のAlaとFc $\gamma$ RIIb細胞外領域におけるその周辺残基を表す図である。

30

【図43】Fc (P238D) / Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体およびFc (WT) / Fc $\gamma$ RIIIa細胞外領域複合体の結晶構造を、Fc Chain Bに対しC $\alpha$ 原子間距離をもとにした最小二乗法により重ね合わせ、Fc Chain BのEUナンバリングで表される271位のProの構造を示した図である。

【図44】X線結晶構造解析によって決定されたFc (P208)/Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体の図である。Fc部分CH2ドメイン、CH3ドメインのそれぞれについて、向かって左側をドメインA、右側をドメインBとした。

【図45】X線結晶構造解析によって決定されたFc (P208)/Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体の構造とFc (WT)/Fc $\gamma$ RIIa細胞外領域複合体の構造（PDB code:3RY6）を、Fc部分CH2ドメインAにおいてC $\alpha$ 原子間距離をもとにした最小二乗法により重ね合わせをおこない、比較したものである。図中太線で描画されたものがFc (P208) / Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体であり、細線で描画されたものがFc (WT) / Fc $\gamma$ RIIa細胞外領域複合体の構造である。なお、Fc (WT)/Fc $\gamma$ RIIa細胞外領域複合体の構造においては、Fc部分CH2ドメインAのみを描画してある。

40

【図46】Fc (P208)/Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造において、Fc $\gamma$ RIIbの160番目のTyrと主鎖部分において水素結合を形成するFc部分CH2ドメインAのEUナンバリングで表わされる237位のAsp付近の構造の詳細を示したものである。

【図47】Fc (P208)/Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造において、Fc $\gamma$ RIIbの160番目のTyrと主鎖部分において水素結合を形成するFc部分CH2ドメインAのEUナンバリング

50

で表わされる237位のAsp側鎖周囲のアミノ酸残基の構造を示した図である。

【図48】参考実施例15において示されたFc (P238D)/Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造とFc (P208)/Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造を、Fc部分CH2ドメインBにおいてC $\alpha$ 原子間距離をもとにした最小二乗法により重ね合わせをおこない、EUナンバリングで表わされる266位から271位のループ周辺で比較した図である。本ループ中、Fc (P208)はFc (P238D)と比較し、EUナンバリングで表わされる268位にH268Dの改変を、EUナンバリングで表わされる271位にP271Gの改変を持つ。

【図49】Fc (P208)/Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造において、Fc部分CH2ドメインBのSer239周辺の構造を、X線結晶構造解析によって得られた2Fo-Fcを係数とする電子密度とともに示した図である。

10

【図50】X線結晶構造解析によって決定されたFc (P208)/Fc $\gamma$ RIIaR細胞外領域複合体の立体構造とFc (P208)/Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体の立体構造を、C $\alpha$ 原子間距離をもとにした最小二乗法により重ね合わせをおこない、比較した図である。

【図51】Fc (P208)/Fc $\gamma$ RIIaR細胞外領域複合体のX線結晶構造とFc (P208)/Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造を、Fc部分CH2ドメインAのEUナンバリングで表わされる237位のAsp付近において、X線結晶構造解析によって得られた2Fo-Fcを係数とする電子密度とともに比較した図である。

【図52】Fc (P208)/Fc $\gamma$ RIIaR細胞外領域複合体のX線結晶構造とFc (P208)/Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造を、Fc部分CH2ドメインBのEUナンバリングで表わされる237位のAsp付近において、X線結晶構造解析によって得られた2Fo-Fcを係数とする電子密度とともに比較した図である。

20

【図53】G1dとG4dの定常領域の配列を比較した図である。図中、太枠で囲んだアミノ酸は、G1dとG4dで異なるアミノ酸残基となっている部位を示す。

【図54】X線結晶構造解析で決定された6RL#9抗体のFabフラグメントの重鎖CDR3の構造を表す図である。(i)カルシウムイオンが存在する結晶化条件で得られた結晶構造の重鎖CDR3を示す。(ii)カルシウムイオンが存在しない結晶化条件で得られた結晶構造の重鎖CDR3を示す。

【図55】H54/L28-IgG1抗体、FH4-IgG1抗体、および、6RL#9-IgG1抗体が投与されたノーマルマウスの血漿中の各抗体濃度の推移を示す図である。

【図56】H54/L28-IgG1抗体、FH4-IgG1抗体、および、6RL#9-IgG1抗体が投与されたノーマルマウスの血漿中の可溶性ヒトIL-6レセプター (hsIL-6R) の濃度推移を示す図である。

30

【図57】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を示す図である。実線はヒトVk5-2配列を含む抗体 (重鎖: CIM\_H (配列番号: 67)、軽鎖: hVk5-2 (配列番号: 57)) のクロマトグラム、破線はhVk5-2\_L65配列を含む抗体 (重鎖: CIM\_H (配列番号: 67)、軽鎖: hVk5-2\_L65 (配列番号: 70)) のクロマトグラムを表す。

【図58A】LfVk1\_Ca配列を含む抗体 (重鎖: GC\_H (配列番号: 55)、軽鎖: LfVk1\_Ca (配列番号: 83)) と、LfVk1\_Ca配列中のAsp (D) 残基がAla (A) 残基に改変された配列を含む抗体の5℃保存後 (実線) または50℃保存後 (点線) のイオン交換クロマトグラムである。それぞれ5℃保存後のイオン交換クロマトグラムのもっとも高いピークをメインピークとして、メインピークでy軸をノーマライズした図である。軽鎖としてLfVk1\_Ca (配列番号: 83) を含む抗体のクロマトグラムを示す図である。

40

【図58B】軽鎖としてLfVk1\_Ca1 (配列番号: 85) を含む抗体のクロマトグラムを示す図である。

【図58C】軽鎖としてLfVk1\_Ca2 (配列番号: 86) を含む抗体のクロマトグラムを示す図である。

【図58D】軽鎖としてLfVk1\_Ca3 (配列番号: 87) を含む抗体のクロマトグラムを示す図である。

【図59A】LfVk1\_Ca配列を含む抗体 (重鎖: GC\_H (配列番号: 55)、軽鎖: LfVk1\_Ca

50

(配列番号：83))と、LfVkl\_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LfVkl\_Ca6配列(重鎖：GC\_H(配列番号：55)、軽鎖：LfVkl\_Ca6(配列番号：88))を含む抗体の5℃保存後(実線)または50℃保存後(点線)のイオン交換クロマトグラムである。それぞれ5℃保存後のイオン交換クロマトグラムのもっとも高いピークをメインピークとして、メインピークでy軸をノーマライズした図である。軽鎖としてLfVkl\_Ca(配列番号：83)を含む抗体のクロマトグラムを示す図である。

【図59B】軽鎖としてLfVkl\_Ca6(配列番号：88)を含む抗体のクロマトグラムを示す図である。

【図60】Ca依存的に抗原に結合する抗体遺伝子ライブラリが導入された大腸菌から単離された290クローンの配列情報のアミノ酸分布(Libraryと表示される)と設計されたアミノ酸分布(Designと表示される)との関係を示す図である。横軸はKabatナンバリングで表されるアミノ酸の部位が表される。縦軸はアミノ酸分布の比率が表される。

【図61】高カルシウムイオン濃度の条件(1.2 mM)下における抗IL-6R抗体(トシリズマブ)、6RC1IgG\_010抗体、6RC1IgG\_012抗体および6RC1IgG\_019抗体のセンサーグラムを表す図である。横軸は時間、縦軸はRU値を示す。

【図62】低カルシウムイオン濃度の条件(3 μM)下における抗IL-6R抗体(トシリズマブ)、6RC1IgG\_010抗体、6RC1IgG\_012抗体および6RC1IgG\_019抗体のセンサーグラムを表す図である。横軸は時間、縦軸はRU値を示す。

【図63】pH依存的に抗原に結合する抗体遺伝子ライブラリが導入された大腸菌から単離された132クローンの配列情報のアミノ酸分布(Libraryと表示される)と設計されたアミノ酸分布(Designと表示される)との関係を示す図である。横軸はKabatナンバリングで表されるアミノ酸の部位が表される。縦軸はアミノ酸分布の比率が表される。

【図64】抗IL-6R抗体(トシリズマブ)、6RpH#01抗体、6RpH#02抗体および6RpH#03抗体のpH7.4におけるセンサーグラムを表す図である。横軸は時間、縦軸はRU値を示す。

【図65】抗IL-6R抗体(トシリズマブ)、6RpH#01抗体、6RpH#02抗体および6RpH#03抗体のpH6.0におけるセンサーグラムを表す図である。横軸は時間、縦軸はRU値を示す。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明は、血漿中の抗原濃度を低下させる抗原結合分子であって、以下の(1)～(6)に示す特徴を有する抗原結合分子を提供する；

- (1) 抗原結合分子が、抗原結合ドメインおよびレセプター結合ドメインを含み、
- (2) pH酸性域の条件下において、レセプター結合ドメインがヒトFcRn(Neonatal Fc Receptor)に結合する活性を有し、
- (3) pH中性域の条件下において、レセプター結合ドメインがヒトFcレセプターに結合する活性が、天然型ヒトIgGがヒトFcレセプターに結合する活性よりも高く、
- (4) 抗原結合ドメインが抗原に結合する活性が、イオン濃度の条件によって変化し、
- (5) (結合対象の)抗原が2種類以上の生理活性を有し、
- (6) 抗原結合分子が結合することで、(結合対象の)抗原が有する生理活性のうち1種類以上が阻害される一方で、少なくとも1種類の生理活性が維持される。

【0017】

本発明において生理活性とは、生体、組織、細胞、タンパク質、DNA、RNA等に量的及び／又は質的な変化、影響をもたらす活性の総称であり、例えば代謝、成長、生殖、恒常性維持、精神活動、生体防御などの生体機能を調節する活性である。より具体的には、細胞の増殖および成熟、内分泌系を介した代謝、神経系における情報伝達、血液の循環、創傷治癒、免疫応答、細胞遊走などを調節する活性が挙げられる。生理活性は生物活性と言い換えることもできる。生理活性物質とはそのような生理活性を有する物質である。生理活性物質は特定の生体構成分子(標的分子)に作用し何らかの変化、影響を与えることによってその生理活性を発揮する。本発明においては、生理活性物質は生理活性を有する抗原とも表現される。本発明における生理活性物質としては、生理活性を有する物質であれば

どのような物質であってもよいが、好ましくは、生理活性を有するポリペプチドおよびその修飾物（生理活性ペプチド）である。生理活性物質が生理活性を発揮するための標的分子としては、細胞表面あるいは細胞内に存在する受容体が好ましく、生理活性物質が特定の受容体に結合することによって細胞にシグナルを伝え生理活性を発揮する。生理活性物質が、生理活性を有さない前駆体から生理活性を有する成熟型へと変換される場合、そのような変換を行なう酵素も本発明の生理活性物質に含まれる。その場合の標的分子は当該酵素の基質（前駆体）である。生理活性物質は、生物（ヒトあるいはヒト以外の生物）が作り出す物質であってもよいし、人工的に合成された物質であってもよい。本発明においては、生物（好ましくはヒト）に対して疾患を引き起こす原因の1つと考えられている生理活性物質が好ましい。

10

**【0018】**

生理活性ペプチドの例としては、線維芽細胞増殖因子(FGF)類、トランスフォーミング成長因子(TGF)類、骨形成因子(BMP)類、上皮成長因子(EGF)類、血小板由来増殖因子(PDGF)、インシュリン様成長因子(IGF)、神経成長因子(NGF)、血管内皮増殖因子(VEGF)、肝細胞増殖因子(HGF)、骨形成因子(BMP)等を含む細胞成長因子類、およびインターフェロン(IFN)類、インターロイキン(IL)類、コロニー刺激因子(CSF)類、エリスロポエチン、腫瘍壊死因子(TNF)等を含むサイトカイン類、もしくはインシュリン、パラチロイドホルモン(PTH)等の各種ホルモン類、またはマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)類等のプロテアーゼ等を含む酵素類、並びにTIMP(Tissue Inhibitor of Metalloprotease)等の酵素阻害因子などを挙げることができる。

20

**【0019】**

本発明における生理活性物質として、好ましくは哺乳動物に由来する生理活性物質であり、特に好ましくはヒトに由来する生理活性物質である。

**【0020】**

生理活性物質は、例えば生体内から精製することによって取得することができる。また、化学合成によって作製することもできる。生理活性物質が生理活性ペプチドの場合は、遺伝子工学的な手法を用いて組換えペプチドを作製することも可能である。すなわち、生理活性ペプチドのアミノ酸配列あるいはそれをコードする核酸配列から、当業者に公知の遺伝子クローニング法や核酸合成法などにより、当該生理活性ペプチドをコードする核酸を合成することができる。当該核酸を公知の発現ベクターに挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または培養上清中から目的の生理活性ペプチドを公知の方法で精製することができる。精製は通常のイオンクロマトグラフィーやアフィニティクロマトグラフィーなどの複数のクロマトグラフィーを単数回又は複数回組み合わせる又は単独で使用するにより精製することができる。また、本来の生理活性を有していれば、生理活性ペプチドの一部を含む部分ペプチドとして作製することや、ペプチドタグやFc断片などの異なるポリペプチドと融合した融合ペプチドとして作製することも可能である。融合ペプチド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をインフレームで融合させ、当該融合遺伝子を前記の様に発現ベクターに挿入することにより作製することができる(Sambrook Jら、Molecular Cloning 2<sup>nd</sup> ed. (1989) 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. Press)。生理活性物質に結合する標的分子についても、同様の方法により取得することができる。

30

40

**【0021】**

生理活性物質の生理活性を測定する方法としては、in vitroにおける生理活性であれば、当該生理活性物質およびその標的分子を調製し、それらの結合を検出することができる方法、例えばELISAやFACS、Biacoreなどの方法を用いて測定することができる。あるいは、受容体を発現している細胞に当該生理活性物質を反応させることによって、細胞に生じる変化（例えば細胞の増殖や形態の変化、遺伝子またはタンパク質の発現の変化など）を検出することによっても測定することができる。また、in vivoにおける生理活性であれば、当該生理活性物質を動物に投与することによって、動物に生じる変化（例えば代謝や成長、恒常性維持などの生体機能に関わる変化）を観察することによって測定することが

50

できる。

#### 【0022】

本発明において、「2種類以上の生理活性を有する」とは、ある生理活性物質が2種類以上の異なる標的分子に結合する性質を有することを意味する。生理活性物質が標的分子に直接結合してもよいし、生理活性物質が標的分子以外の物質であって、標的分子との結合を促進する物質に結合した後に、当該標的分子に間接的に結合してもよい。生理活性物質上には標的分子に結合するためのドメインが存在するが、2種類以上の異なる標的分子に対応して、生理活性物質上に異なる結合ドメインが複数箇所存在することが好ましい。特に本発明の抗原結合分子が結合しても、生理活性物質と全ての標的分子との結合が同時には阻害されない程度に、上記の結合ドメインが立体構造上離れた位置に存在することが好ましい。

10

#### 【0023】

本発明において、「活性を有する」とは、その活性を測定することができる系において、測定値がその系におけるバックグラウンド値（あるいは陰性対照を測定したときの値）よりも高くなることを意味する。例えば、結合活性を有するとは、ELISAやFACS、Biacoreなどの結合活性を測定することができる系において、測定値がバックグラウンド値よりも高くなることを意味する。本発明においてバックグラウンド値に対する測定値の高さは、好ましくは2倍以上、より好ましくは3倍以上、さらに好ましくは5倍以上、特に好ましくは10倍以上である。

#### 【0024】

20

本発明において、「活性を阻害する」とは、その活性を測定することができる系において、ある物質を添加した後の測定値が、ある物質を添加する前の測定値（あるいは陰性対照を添加したときの値）よりも低くなることを意味する。例えば、結合活性を阻害するとは、ELISAやFACS、Biacoreなどの結合活性を測定することができる系において、ある物質を添加した後の測定値が、ある物質を添加する前の測定値よりも低くなることを意味する。本発明においてある物質を添加する前（あるいは陰性対象を添加したとき）の測定値に対する、ある物質を添加した後の測定値の低さは、好ましくは80%以下、より好ましくは50%以下、さらに好ましくは30%以下、特に好ましくは10%以下である。

#### 【0025】

本発明において、「活性を維持する」とは、その活性を測定することができる系において、ある物質を添加した後の測定値が、ある物質を添加する前の測定値（あるいは陰性対照を添加したときの値）の80%以上であることを意味する。例えば、結合活性を維持するとは、ELISAやFACS、Biacoreなどの結合活性を測定することができる系において、ある物質を添加した後の測定値が、ある物質を添加する前の測定値の80%以上であることを意味する。本発明においてある物質を添加する前（あるいは陰性対象を添加したとき）の測定値に対する、ある物質を添加した後の測定値は、好ましくは85%以上であり、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上である。

30

#### 【0026】

本発明において、「血漿中の抗原濃度を低下させる」とは、本発明の抗原結合分子を対象に投与した場合と、陰性対照を対象に投与した場合とを比較した場合、後者よりも前者において血漿中に存在する抗原の濃度が低下することを意味する。低下させる割合は特に限定されないが、好ましくは80%以下、より好ましくは50%以下、さらに好ましくは30%以下、最も好ましくは10%以下である。また、本発明において、「血漿中の抗原濃度を低下させる」とは「抗原の血漿中からの消失（クリアランス）を促進する」、「抗原の血漿中の滞留時間を減少させる」、「抗原の血漿中半減期を短縮する」などと言い換えることもできる。また血漿中とは血清中のことであってもよい。本発明が提供する抗原結合分子の対象（生体）への投与は、例えば皮内注射、静脈内注射、硝子体内注射、皮下注射、腹腔内注射、非経口注射、筋肉内注射などにより行なうことができる。本発明の抗原結合分子を投与する対象は、好ましくは動物であり、さらに好ましくは哺乳動物であり、さらに好ましくはヒトである。

40

50

## 【0027】

抗原の濃度の低下は、抗原の細胞内への取込みの促進によって達成されてもよい。また、抗原の濃度の低下によって、生体における抗原の生理活性が低減されることが好ましく、抗原が有する全ての種類の生理活性が低減されることが特に好ましい。

## 【0028】

抗原の濃度は、当業者に公知の方法を適宜用いることにより測定することができる。抗原が生理活性ペプチドの場合は、濃度既知の標準品およびそれを定量的に測定可能な系（例えばELISAやBiacoreなど）を用意し、各濃度と測定値の関係を表わす標準曲線を作成することで、サンプル中に含まれる濃度未知の生理活性ペプチドの濃度を測定することができる。サンプルとしては、生体の血漿や細胞の培養液あるいは細胞抽出液などが挙げられる。

10

## 【0029】

本発明において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。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、細胞の培養液に抗原を添加した後、培養液中の抗原の濃度が対照に比べて減少したかどうか、あるいは、細胞内の抗原の濃度が対照に比べて増加したかどうかを測定することにより判定することができる。抗原の細胞内への取込みが促進されることはすなわち、生体内において抗原の血漿中からの消失が促進されることを意味する。したがって、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、生体に抗原を投与した後、血漿中の抗原の濃度が対照に比べて減少したかどうかを測定することによっても判定することができる。

20

## 【0030】

本発明が提供する抗原結合分子は、上記（1）～（6）に示す特徴を有していれば特に限定されるものではないが、好ましくは抗原、ヒトFcRnおよびヒトFcレセプターに特異的に結合する性質を有するポリペプチドであり、さらに好ましくは抗体であり、特に好ましくはIgGである。抗体はキメラ抗体やヒト化抗体、ヒト抗体などであってもよい。また、二重特異性抗体や、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。本発明が提供する抗原結合分子は、抗原結合ドメインおよびレセプター結合ドメインを含む。ここでのドメインとは、その部分を分割して単離できる構成単位を意味するが、その大きさは特に限定されない。各ドメインはポリペプチドを含む。本発明における抗原結合ドメインは、抗原に特異的に結合する性質を有していれば特に限定されるものではないが、好ましい例としては、抗体やその断片（可変領域、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、CDRなど）、scaffoldと呼ばれる抗体様分子（DARPin（WO2002/020565）、Affibody（WO1995/001937）、Avimer（WO2004/044011, WO2005/040229）、Adnectin（WO2002/032925）など）、あるいは生理活性物質に結合する標的分子（受容体）やその断片（可溶性受容体）などが挙げられる。特に好ましい例は抗体の可変領域である。また、本発明におけるレセプター結合ドメインは、ヒトFcRnおよび／またはヒトFcレセプターに特異的に結合する性質を有していれば特に限定されるものではないが、好ましい例としては、抗体（IgG）やその断片（定常領域、Fcなど）、アルブミンやその断片（ドメイン3）、抗FcRn抗体やその断片（可変領域、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、CDRなど）、抗FcRn抗体様分子（DARPin（WO2002/020565）、Affibody（WO1995/001937）、Avimer（WO2004/044011, WO2005/040229）、Adnectin（WO2002/032925）など）、抗FcRnペプチドなどが挙げられる。より好ましい例はIgGのFc領域である。本発明におけるヒトFcレセプターは、ヒトIgG、特にヒトIgGのFc領域が結合するレセプターであれば、特に限定されないが、好ましくはヒトFcRnまたはヒトFcγレセプターである。IgGは非ヒト動物由来であってもよいし、ヒト由来であってもよいが、好ましくはヒトIgGであり、特に好ましくはヒトIgG1である。IgGのFc領域は後述のようにアミノ酸が改変されていることが好ましい。

30

40

## 【0031】

本発明の抗原結合分子には、少なくとも1つのレセプター結合ドメインが含まれていればよく、例えば1つの抗原結合分子が、1つの抗原結合ドメインおよび1つのレセプター

50

結合ドメインを含んでいてもよいし、あるいは1つの抗原結合ドメインおよび複数のレセプター結合ドメインを含んでいてもよい。1つの抗原結合分子に複数のレセプター結合ドメインが含まれる場合においては、それらのレセプター結合ドメインがいずれも同じ種類のヒトFcレセプターに結合してもよいし、それぞれが異なる種類のヒトFcレセプターに結合してもよい。一方で、ヒトFcRnに結合する活性を有することが、本発明の抗原結合分子が満たす要件の1つとなっているので、本発明の抗原結合分子に含まれる少なくとも1つのレセプター結合ドメインはヒトFcRnに結合するドメインであることが好ましい。特に限定されないが、1つの抗原結合分子に2つのレセプター結合ドメインが含まれる場合の態様として、2つがともにヒトFcRnに結合するドメインである抗原結合分子、1つがヒトFcRnに結合するドメインであり、もう1つがヒトFcγレセプターに結合するドメインである抗原結合分子などが挙げられる。また、1つの抗原結合分子に1つのレセプター結合ドメインが含まれる場合においては、そのレセプター結合ドメインが少なくともヒトFcRnに結合するドメインであればよく、1つのレセプター結合ドメインが同時の他の種類のヒトFcレセプターに結合する性質を有していてもよい。そのようなレセプター結合ドメインの例として、IgGのFc領域を上げることができる。IgGのFc領域は、ヒトFcRnおよびヒトFcγレセプターに結合する性質を有している。

#### 【0032】

本明細書において、天然型ヒトIgGとは、天然に存在するヒトIgGを指し、Fc領域のEUナンバリング297位にフコース含有糖鎖が結合していることが望ましい。天然型ヒトIgGとしては、天然に存在するヒトIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4が用いられ得るが、好ましくは天然に存在するヒトIgG1である。結合した糖鎖がフコース含有糖鎖であるか否かは、例えば下記のような方法によって判定することが可能である。被験ヒトIgGにN-Glycosidase F (Roche diagnostics) を反応させることによって糖鎖が遊離される (Weitzhandlerら、J. Pharma. Sciences (1994) 83(12) 1670-1675)。次に、エタノールを反応させてタンパク質が除かれた反応液 (Schenkら、J. Clin. Investigation (2001) 108 (11) 1687-1695) の濃縮乾固物が、2-アミノピリジンによって蛍光標識される (Biggeら、Anal. Biochem. (1995) 230 (2) 229-238)。セルロースカートリッジを用いた固相抽出により脱試薬された、蛍光標識された2-AB化糖鎖が、順相クロマトグラフィーによって解析される。検出されるクロマトグラムのピークを観察することによって、被験ヒトIgGのFc領域に結合した糖鎖がフコース含有糖鎖であるか否かを判定することが可能である。

#### 【0033】

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。

#### 【0034】

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、CDRを移植するため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 12 5023号公報、WO 96/02576 号公報参照)。

#### 【0035】

二重特異性抗体とは、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2つ有する抗体をいう。二重特異性抗体は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。

#### 【0036】

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.)、ドメイン抗体 (dAb) (WO2004/058821、WO2003/02609)、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であれば、当該Fc領域をレセプター結合ドメインとして用いることができる。Fc領域とは、抗体分子におけるパライン切断部位のヒンジ領域のN末端から、当該ヒンジ、CH2およびCH3ドメインを含める重鎖定常領域の部分のことである。IgGのFc領域は、EU ナンバリングで、例えば226番目のシステインからC末端、あるいは230番目のプロリンからC末端までを意味するが、これに限定されない。特に限定されないが、IgGのFc領域としては、ヒトIgG1（配列番号：49）、IgG2（配列番号：50）、IgG3（配列番号：51）、またはIgG4（配列番号：52）のFc領域が例示される。好ましくはヒトIgG1のFc領域である。

#### 【0037】

抗体様分子（足場分子、スキャフォールド分子）とは、ある共通の骨格構造を有し、かつ任意の抗原に特異的に結合することができる性質をもった分子の総称であり（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）、アフィボディ（Affibody）（WO1995/001937）、アビマー（Avimer）（WO2004/044011, WO2005/040229）、アドネクチン（Adnectin）（WO2002/032925）等が挙げられる。

#### 【0038】

抗体は、修飾された糖鎖を含んでいてもよく、糖鎖が修飾された抗体としては、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。

#### 【0039】

本発明の抗原結合分子と抗原との結合や、あるいは生理活性を有する抗原と標的分子との結合は、ELISAやFACS、Biacoreなど当業者に公知の方法を用いて測定することができる。測定の条件を細胞外条件や細胞内条件に設定することにより、これらの条件における結合活性の差を調べることもできる。また、上述の生理活性物質の生理活性を測定する方法と組み合わせることで、本発明の抗原結合分子が生理活性を有する抗原に結合することによって、抗原が有する生理活性が阻害されるかどうか、あるいは生理活性が維持されるかどうかを確かめることができる。

#### 【0040】

本発明は、抗原に結合することで、抗原が有する標的分子との結合活性のうち1種類以上を阻害する一方で、少なくとも1種類の標的分子との結合活性を維持することの特徴とする抗原結合分子を提供する。即ち本発明の抗原結合分子が2種類以上の生理活性を有する抗原に結合することによって、抗原が有する生理活性のうち、1種類以上の生理活性が阻害されることが好ましい。1種類以上の生理活性を阻害する（あるいは生理活性が阻害される）とは、抗原が有する複数種類の標的分子との結合活性のうち、1種類以上の標的分子との結合活性を阻害する（あるいは結合活性が阻害される）ことを意味する。また、本発明の抗原結合分子が2種類以上の生理活性を有する抗原に結合しても、抗原が有する生理活性のうち、少なくとも1種類の生理活性を維持する（あるいは生理活性が維持される）ことが好ましい。少なくとも1種類の生理活性を維持する（あるいは生理活性が維持される）とは、抗原が有する複数種類の標的分子との結合活性のうち、少なくとも1種類の標的分子との結合活性を維持する（あるいは結合活性が維持される）ことを意味する。

#### 【0041】

生理活性を有する抗原が生体内に過剰に存在することが、ある種の疾患の原因となっている場合、例えば中和抗体のように、当該抗原に結合することでその生理活性を阻害する分子は、当該疾患を治療する上で有用と考えられる。しかし、抗原が2種類以上の生理活性を有する場合、中和抗体では1種類の生理活性しか阻害することはできない。一方、本発明の抗原結合分子であれば、少なくとも1種類の生理活性が維持されたとしても、抗原の血中（血清中または血漿中）からの消失を促進することによって、結果的にはin vivoにおける生理活性を低減させることが可能であるので、一般的な中和抗体に比べて非常に

有用である。

#### 【0042】

本発明において、ヒトFcレセプターがヒトFcRnの場合、抗原結合分子のレセプター結合ドメインはIgGのFc領域であることが好ましく、IgGのFc領域における少なくとも1つのアミノ酸が改変されたFc領域改変体であることがさらに好ましい。IgGは非ヒト動物由来であってもよいし、ヒト由来であってもよいが、好ましくはヒトIgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) であり、特に好ましくはヒトIgG1である。アミノ酸の改変の例としては、アミノ酸の置換、挿入、欠失等が含まれるが、好ましくはアミノ酸の置換である。改変されるアミノ酸の数は特に限定されず、1箇所のみアミノ酸が改変されてもよいし、2箇所以上のアミノ酸が改変されてもよい。アミノ酸の改変は、改変された後のFc領域改変体がpH酸性域およびpH中性域の条件下においてヒトFcRnに結合する活性を有し、かつpH中性域の条件下においてヒトFcRnに結合する活性がヒトIgGよりも強くなる限り、いかなる位置のアミノ酸がいかなるアミノ酸に改変されてもよい。一般に、生体内において、細胞外（例えば血漿中）のpHは中性であり、細胞内（例えばエンドソーム内）のpHは酸性であることが知られている。また、IgGとFcRnの結合はpH酸性（細胞内）条件下においてのみ認められ、pH中性（細胞外）条件下においてはほとんど認められないことが知られている。本発明の抗原結合分子は、pH酸性がエンドソーム内のpHであり、pH中性が血漿中のpHであることが好ましい。

10

#### 【0043】

細胞内および細胞外のpH条件下でヒトFcRnに結合する活性を有し、かつ細胞外のpH条件下でヒトFcRnに結合する活性がヒトIgGよりも強くなるような性質を、本発明が提供する抗原結合分子のレセプター結合ドメインに付与することができれば、細胞外で抗原に結合した本発明の抗原結合分子がさらに細胞表面のFcRnに結合することによって細胞内に移行し、結果として、抗原の細胞外から細胞内への取込みが促進されることになる。そのような抗原結合分子を生体に投与することによって、血漿中に存在する抗原の濃度を低下させ、抗原が有する生理活性をin vivoにおいて低減させることが可能となるので、本発明が提供する抗原結合分子は有用である。

20

#### 【0044】

ヒトFcRnは、構造的には主要組織適合性複合体 (MHC) クラス I のポリペプチドに構造的に類似し、クラス I のMHC分子と22から29%の配列同一性を有する (Ghetieら、Immunol Today (1997) 18 (12), 592-598)。FcRnは、可溶性β鎖（または軽鎖）であるβ2マイクログロブリンと、膜貫通α鎖（または重鎖）よりなるヘテロダイマーとして発現される。FcRnのα鎖は3つの細胞外ドメイン（α1、α2、α3）よりなり、α1およびα2ドメインが抗体のFc領域におけるFcRn結合ドメインと相互作用する (Raghavanら、Immunity (1994) 1, 303-315)。

30

#### 【0045】

ヒトFcRnの遺伝子配列およびアミノ酸配列は、GenBankアクセッション番号NM\_001136019（配列番号：16）およびNP\_001129491（配列番号：17）としてそれぞれ登録されている。ヒト以外では、マウスFcRnの遺伝子配列およびアミノ酸配列がGenBankアクセッション番号NM\_010189（配列番号：18）およびNP\_034319（配列番号：19）として、ラットFcRnの遺伝子配列およびアミノ酸配列がGenBankアクセッション番号NM\_033351（配列番号：20）およびNP\_203502（配列番号：21）としてそれぞれ登録されている。

40

#### 【0046】

ヒトFcRn（配列番号：17）は生体内でヒトβ2-マイクログロブリン（配列番号：38）との複合体を形成する。可溶型ヒトFcRnとβ2-マイクログロブリンとの複合体は通常の組換え発現方法を用いて製造することができる。このような可溶型ヒトFcRn／β2-マイクログロブリン複合体を用いて、本発明のレセプター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は本発明のレセプター結合ドメインに結合し得る形態であるものを指し、例としてヒトFcRnとヒトβ2-マイクログロブリンとの複合体が挙げられる。

50

## 【0047】

pH中性域の条件下において天然型ヒトIgGよりも強くFcRnに結合するレセプター結合ドメインは、ヒトIgGのFc領域のアミノ酸を改変することによって作製することができる。改変の例としては、一以上のアミノ酸の置換、挿入、欠失等が含まれる。また、FcRnに結合することを特徴とする抗原結合ドメインを、レセプター結合ドメインとすることもできる。レセプター結合ドメインのFcRnに対する結合活性が、天然型ヒトIgGのFc領域のFcRnに対する結合活性より高いか否かは、上述の方法を用いて適宜実施され得る。

## 【0048】

本発明において、pH酸性域の条件下におけるヒト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pH5.0～pH6.5でのヒトFcRn結合活性を意味し、さらに好ましくはpH5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5のいずれかでのヒト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、本発明において、pH中性域の条件下におけるヒト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～pH9.0でのヒトFcRn結合活性を意味し、さらに好ましくはpH7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0のいずれかでのヒト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。

## 【0049】

レセプター結合ドメインとヒトFcRnとの結合アフィニティーがpH7.4では非常に低いために、そのアフィニティーを正確に測定することが難しい場合には、pH7.4の代わりにpH7.0を用いることができる。測定条件に使用される温度として、レセプター結合ドメインとヒトFcRnとの結合アフィニティーを、10℃～50℃の任意の温度で測定してもよい。好ましくは、レセプター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、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、および35℃のいずれかの温度を使用する。特に限定されないが、25℃という温度は好ましい態様の一つである。

## 【0050】

ヒトFcRnに結合するレセプター結合ドメインとして、IgGのFc領域を改変する場合の好ましい改変の位置は、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～260番目、262番目～272番目、274番目、276番目、278番目～289番目、291番目～320番目、324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、384番目～387番目、389番目～391番目、396番目、413番目、414番目、416番目、422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である。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のFc領域のpH中性域の条件下におけるヒトFcRnへの結合を強くすることができる。

## 【0051】

【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 |

## 【0052】

また、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRnへの結合を天然型ヒトIgGと比較して強くす

ることができる改変の例を表2に示す。これらの改変のうち、pH中性域の条件下においてもヒト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。IgGのFc領域を改変する場合の特に好ましい改変の位置としては、例えばEUナンバリング234番目、235番目、236番目、237番目、238番目、239番目、244番目、245番目、248番目、249番目、250番目、251番目、252番目、253番目、254番目、255番目、256番目、257番目、258番目、260番目、262番目、265番目、267番目、270番目、272番目、274番目、279番目、280番目、282番目、283番目、284番目、285番目、286番目、288番目、289番目、293番目、295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、313番目、314番目、315番目、316番目、317番目、318番目、325番目、326番目、327番目、328番目、329番目、330番目、332番目、334番目、338番目、339番目、340番目、341番目、343番目、345番目、360番目、361番目、362番目、375番目、376番目、377番目、378番目、380番目、382番目、384番目、385番目、386番目、387番目、389番目、390番目、391番目、413番目、422番目、423番目、424番目、427番目、428番目、430番目、431番目、433番目、434番目、435番目、436番目、437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。また、上記以外の好ましい位置として、W01997/034631に記載されているようなEUナンバリング252番目、254番目、256番目、309番目、311番目、315番目、433番目および/または434番目、ならびにこれらのアミノ酸に組み合わせる253番目、310番目、435番目および/または426番目のアミノ酸、W02000/042072に記載されているようなEUナンバリング238番目、252番目、253番目、254番目、255番目、256番目、265番目、272番目、286番目、288番目、303番目、305番目、307番目、309番目、311番目、312番目、317番目、340番目、356番目、360番目、362番目、376番目、378番目、380番目、382番目、386番目、388番目、400番目、413番目、415番目、424番目、433番目、434番目、435番目、436番目、439番目および/または447番目のアミノ酸、W02002/060919に記載されているようなEUナンバリング251番目、252番目、254番目、255番目、256番目、308番目、309番目、311番目、312番目、385番目、386番目、387番目、389番目、428番目、433番目、434番目および/または436番目のアミノ酸、W02004/092219に記載されているようなEUナンバリング250番目、314番目および428番目のアミノ酸、W02006/020114に記載されているようなEUナンバリング238番目、244番目、245番目、249番目、252番目、256番目、257番目、258番目、260番目、262番目、270番目、272番目、279番目、283番目、285番目、286番目、288番目、293番目、307番目、311番目、312番目、316番目、317番目、318番目、332番目、339番目、341番目、343番目、375番目、376番目、377番目、378番目、380番目、382番目、423番目、427番目、430番目、431番目、434番目、436番目、438番目、440番目および/または442番目のアミノ酸、W02010/045193に記載されているようなEUナンバリング251番目、252番目、307番目、308番目、378番目、428番目、430番目、434番目および/または436番目のアミノ酸が挙げられる。これらのアミノ酸から選択される少なくとも1つのアミノ酸を改変することにより、pH中性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性を高めることができる。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。

【0053】

【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                                        |     |                                             |

【 0 0 5 4 】

また、あらかじめpH酸性域およびpH中性域の条件下においてヒトFcRn結合活性を有しているレセプター結合ドメインとしては、例えば、IgGのFc領域であって、EUナンバリング

；

234番目のアミノ酸がArg、

235番目のアミノ酸がGly、LysまたはArg、

10

20

30

40

50

|                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 236番目のアミノ酸がAla、Asp、LysまたはArg、                                                         |    |
| 237番目のアミノ酸がLys、MetまたはArg、                                                             |    |
| 238番目のアミノ酸がAla、Asp、Lys、LeuまたはArg、                                                     |    |
| 239番目のアミノ酸がAspまたはLys、                                                                 |    |
| 244番目のアミノ酸がLeu、                                                                       |    |
| 245番目のアミノ酸がArg、                                                                       |    |
| 248番目のアミノ酸がIleまたはTyr、                                                                 |    |
| 249番目のアミノ酸がPro、                                                                       |    |
| 250番目のアミノ酸がAla、Glu、Phe、Ile、Met、Gln、Ser、Val、Trp、Gly、His、Leu、AsnまたはTyr、                 | 10 |
| 251番目のアミノ酸がArg、Asp、GluまたはLeu、                                                         |    |
| 252番目のアミノ酸がPhe、Ser、Thr、TrpまたはTyr、                                                     |    |
| 253番目のアミノ酸がVal、                                                                       |    |
| 254番目のアミノ酸がAla、Gly、His、Ile、Gln、Ser、ValまたはThr、                                         |    |
| 255番目のアミノ酸がAla、Asp、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Gly、Ser、Trp、TyrまたはGlu、         |    |
| 256番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Arg、Asn、Pro、Thr、SerまたはGln、                                     |    |
| 257番目のアミノ酸がAla、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、ThrまたはVal、                                     |    |
| 258番目のアミノ酸がAspまたはHis、                                                                 |    |
| 260番目のアミノ酸がSer、                                                                       | 20 |
| 262番目のアミノ酸がLeu、                                                                       |    |
| 265番目のアミノ酸がAla、                                                                       |    |
| 267番目のアミノ酸がMetまたはLeu、                                                                 |    |
| 270番目のアミノ酸がLysまたはPhe、                                                                 |    |
| 272番目のアミノ酸がAla、LeuまたはArg、                                                             |    |
| 274番目のアミノ酸がAla、                                                                       |    |
| 279番目のアミノ酸がLeu、Ala、Asp、Gly、His、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Trp、またはTyr、                    |    |
| 280番目のアミノ酸がAla、Gly、His、Lys、Asn、Gln、Arg、Ser、ThrまたはGlu、                                 |    |
| 282番目のアミノ酸がAlaまたはAsp、                                                                 | 30 |
| 283番目のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、TrpまたはTyr、         |    |
| 284番目のアミノ酸がLys、                                                                       |    |
| 285番目のアミノ酸がAsn、                                                                       |    |
| 286番目のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、TyrまたはGlu、 |    |
| 288番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Val、Trp、TyrまたはSer、     |    |
| 289番目のアミノ酸がHis、                                                                       |    |
| 293番目のアミノ酸がVal、                                                                       | 40 |
| 295番目のアミノ酸がMet、                                                                       |    |
| 297番目のアミノ酸がAla、                                                                       |    |
| 298番目のアミノ酸がGly、                                                                       |    |
| 303番目のアミノ酸がAla、                                                                       |    |
| 305番目のアミノ酸がAlaまたはThr、                                                                 |    |
| 307番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、TrpまたはTyr、 |    |
| 308番目のアミノ酸がAla、Phe、Ile、Leu、Met、Pro、GlnまたはThr、                                         |    |
| 309番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Pro、HisまたはArg、                                                 |    |
| 311番目のアミノ酸がAla、His、Glu、Lys、Leu、Met、Ser、Val、TrpまたはIle、                                 | 50 |

312番目のアミノ酸がAla、Asp、ProまたはHis、  
313番目のアミノ酸がTyrまたはPhe、  
314番目のアミノ酸がAla、Leu、LysまたはArg、  
315番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、Ile、Lys、Leu、Met、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、TyrまたはHis、  
316番目のアミノ酸がAla、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはAsp、  
317番目のアミノ酸がAlaまたはPro、  
318番目のアミノ酸がAsnまたはThr、  
325番目のアミノ酸がAla、Gly、Met、Leu、IleまたはSer、  
326番目のアミノ酸がAsp、  
327番目のアミノ酸がGly、  
328番目のアミノ酸がArg、Asp、GluまたはTyr、  
329番目のアミノ酸がLysまたはArg、  
330番目のアミノ酸がLeu、  
332番目のアミノ酸がGlu、Phe、His、Lys、Leu、Met、Arg、Ser、TrpまたはVal、  
334番目のアミノ酸がLeu、  
338番目のアミノ酸がAla、  
339番目のアミノ酸がAsn、ThrまたはTrp、  
340番目のアミノ酸がAla、  
341番目のアミノ酸がPro、  
343番目のアミノ酸がGlu、His、Lys、Gln、Arg、ThrまたはTyr、  
345番目のアミノ酸がAla、  
360番目のアミノ酸がHis、  
361番目のアミノ酸がAla、  
362番目のアミノ酸がAla、  
375番目のアミノ酸がAlaまたはArg、  
376番目のアミノ酸がAla、Gly、Ile、Met、Pro、ThrまたはVal、  
377番目のアミノ酸がLys、  
378番目のアミノ酸がAsp、AsnまたはVal、  
380番目のアミノ酸がAla、Asn、ThrまたはSer、  
382番目のアミノ酸がAla、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Trp、TyrまたはVal、  
384番目のアミノ酸がAla、  
385番目のアミノ酸がAla、Gly、Lys、Ser、Thr、Asp、HisまたはArg、  
386番目のアミノ酸がArg、Asp、Ile、Met、Ser、Thr、LysまたはPro、  
387番目のアミノ酸がAla、Arg、His、Pro、Ser、ThrまたはGlu、  
389番目のアミノ酸がAla、Asn、ProまたはSer、  
390番目のアミノ酸がAla、  
391番目のアミノ酸がAla、  
413番目のアミノ酸がAla、  
423番目のアミノ酸がAsn、  
424番目のアミノ酸がAlaまたはGlu、  
427番目のアミノ酸がAsn、  
428番目のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、  
430番目のアミノ酸がAla、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、ValまたはTyr、  
431番目のアミノ酸がHisまたはAsn、  
433番目のアミノ酸がArg、Gln、His、Ile、Pro、SerまたはLys、

434番目のアミノ酸がAla、Phe、Gly、Met、His、Ser、TrpまたはTyr、  
435番目のアミノ酸がLys、ArgまたはAsn、  
436番目のアミノ酸がAla、His、Ile、Leu、Glu、Phe、Gly、Lys、Met、Asn、Arg、Ser、Thr、TrpまたはVal、  
437番目のアミノ酸がArg、  
438番目のアミノ酸がLys、Leu、ThrまたはTrp、  
440番目のアミノ酸がLys、および、  
442番目のアミノ酸がLys、  
の中からアミノ酸が選択されるFc領域が挙げられる。選択されるアミノ酸の位置は1箇所のみであってもよいし、2箇所以上であってもよい。2箇所以上のアミノ酸の組合せとしては、例えば表3、表4-1から4-5、表13-1から13-14に記載のアミノ酸の組合せが挙げられる。

10

【0055】

【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                         | 20 |
| T256E/N434A                         |    |
| T256S/N434A                         |    |
| P257I/Q311I                         |    |
| T307A/N434A                         |    |
| T307E/N434A                         |    |
| T307Q/N434A                         |    |
| V308P/N434A                         |    |
| L309G/N434A                         |    |
| Q311H/N434A                         | 30 |
| Q311R/N434A                         |    |
| N315D/N434A                         |    |
| A378V/N434A                         |    |
| E380S/N434A                         |    |
| E382V/N434A                         |    |
| S424E/N434A                         |    |
| M428L/N434A                         |    |
| N434A/Y436I                         | 40 |
| T437Q/N434A                         |    |
| T437R/N434A                         |    |

【 0 0 5 6 】

【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                         |  |
| 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                   |  |
| 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                               |  |
| 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                   |  |
| M252F/T256D                               |  |
| M252Y/T256Q                               |  |
| M252Y/P257L                               |  |
| M252Y/P257N                               |  |
| M252Y/V259I                               |  |
| M252Y/V279Q                               |  |
| M252Y/V308P/N434Y                         |  |
| M252Q/V308F                               |  |
| M252Y/V308F                               |  |

10

20

30

40

【 0 0 5 7 】

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/I332E/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             |
| P257I/Q311I/N434H       |
| P257L/Q311V             |
| P257L/G385N             |
| P257L/M428L             |
| P257I/E430Q             |
| P257I/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 0 5 8】

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 0 5 9 】

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             |
| H429N/N434S             |
| E430D/N434S             |
| E430T/N434S             |
| E430S/N434S             |
| E430A/N434S             |
| E430F/N434S             |
| E430Q/N434S             |
| E430L/N434S             |
| E430I/N434S             |
| A431T/N434S             |

10

20

30

40

【 0 0 6 0】

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

## 【0061】

40

本明細書において、ヒトFcRnに結合する活性が天然型ヒトIgGよりも高いとは、例えば、ヒトFcRnに結合する活性が天然型ヒトIgGの105%以上、好ましくは110%以上、115%以上、120%以上、125%以上、特に好ましくは130%以上、135%以上、140%以上、145%以上、150%以上、155%以上、160%以上、165%以上、170%以上、175%以上、180%以上、185%以上、190%以上、195%以上、2倍以上、2.5倍以上、3倍以上、3.5倍以上、4倍以上、4.5倍以上、5倍以上、7.5倍以上、10倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、100倍以上であることをいう。

## 【0062】

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):17

50

59-69、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、W02000/042072、W02002/060919、W02006/020114、W02006/031370、W02010/033279、W02006/053301、W02009/086320においてヒトIgG1のFc領域の改変が行われている。

#### 【0063】

Yeungら (The Journal of Immunology, 2009 182: 7663-7671) によれば、pH酸性域(pH6.0)の条件下におけるヒトIgG1のヒトFcRn結合活性はKD 1.7  $\mu$ Mであり、pH中性域の条件下におけるヒトIgG1のヒトFcRn結合活性はほとんど検出されない。よって、本発明が提供する抗原結合分子の好ましい態様として、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性がKD 20  $\mu$ Mまたはそれより強く、pH中性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性がヒトIgGと同じかそれより強い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酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性がKD 2.0  $\mu$ Mまたはそれより強く、pH中性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性がKD 40  $\mu$ Mまたはそれより強い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酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性がKD 0.5  $\mu$ Mまたはそれより強く、pH中性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性がKD 15  $\mu$ Mまたはそれより強い抗原結合分子を挙げることができる。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）で測定された時の値である。

#### 【0064】

本発明が提供する抗原結合分子の好ましい態様として、pH7.0および25°Cで、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°CでのヒトFcRn結合活性は、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°CでのヒトFcRn結合活性は、ヒトIgGより38倍高いか、またはKD 2.3  $\mu$ Mより強い。

#### 【0065】

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IgGのヒトFcRn結合活性はpH中性域(pH7.4)の条件下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IgGよりも高いかどうかを判断する方法として、同じ濃度でアナライトを流した時のBiacoreにおける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IgGを固定化したチップにヒトFcRnを流した時のレスポンスよりも、本発明が提供する抗原結合分子を固定化したチップにヒトFcRnを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ヒトFcRn結合活性はヒトIgGよりも高いと判断できる。

#### 【0066】

Fc  $\gamma$  レセプター (Fc  $\gamma$  R) とは、IgG（例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4など）のFc領域に結合し得るレセプターをいい、実質的にFc  $\gamma$  レセプターファミリーのいかなるメンバーをも意味する。ヒトでは、このファミリーには、アイソフォームFc  $\gamma$  RIa、Fc  $\gamma$  RIbおよびFc  $\gamma$  RIcを含むFc  $\gamma$  RI (CD64) ; アイソフォームFc  $\gamma$  RIIa (アロタイプH131およびR131を含む)、Fc  $\gamma$  RIIb (Fc  $\gamma$  RIIb-1およびFc  $\gamma$  RIIb-2を含む) およびFc  $\gamma$  RIcを含むFc  $\gamma$  RII (CD32) ; アイソフォームFc  $\gamma$  RIIIa (アロタイプV158およびF158を含む) およびFc  $\gamma$  RIIb (アロタイプFc  $\gamma$  RIIb-NA1およびFc  $\gamma$  RIIb-NA2を含む) を含むFc  $\gamma$  RIII (CD16)、並びにいかなる未発見のヒトFc  $\gamma$  Rアイソフォームまたはアロタイプも含まれるが、これらに限定されるものではない。Fc  $\gamma$  Rが由来する生物は、ヒト、マウス、ラット、ウサギおよびサルを含むがこれらに限定されるものではなく、いかなる生物由来でもよい。マウスFc  $\gamma$  R類には、Fc  $\gamma$  RI (CD64)、Fc  $\gamma$  RII (CD32)、Fc  $\gamma$  RIII (CD16) およびFc  $\gamma$  RIII-2 (Fc  $\gamma$  RIV、CD16-2)、並びにいかなる未発見のマウスFc  $\gamma$  Rアイソフォームまたはアロタイプも含まれるが、これらに限定されない。こうしたFc  $\gamma$  レセプターの好適な例としてはヒト

Fc $\gamma$ RI (CD64)、Fc $\gamma$ RIIa (CD32)、Fc $\gamma$ RIIb (CD32)、Fc $\gamma$ RIIIa (CD16) 及び／又はFc $\gamma$ RIIIb (CD16) が挙げられる。ヒトFc $\gamma$ RIのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列はそれぞれ配列番号：39 (NM\_000566.3) 及び40 (NP\_000557.1) に、ヒトFc $\gamma$ RIIa (アロタイプH131) のポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列はそれぞれ配列番号：41 (BC020823.1) 及び42 (AAH20823.1) に (アロタイプR131は配列番号：42の166番目のアミノ酸がArgに置換されている配列である)、Fc $\gamma$ RIIbのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列はそれぞれ配列番号：43 (BC146678.1) 及び44 (AAI46679.1) に、Fc $\gamma$ RIIIaのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列はそれぞれ配列番号：45 (BC033678.1) 及び46 (AAH33678.1) に、及びFc $\gamma$ RIIIbのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、それぞれ配列番号：47 (BC128562.1) 及び48 (AAI28563.1) に記載されている (カッコ内はRefSeq登録番号を示す)。Fc $\gamma$ レセプターが、IgGのFc領域に対して結合活性を有するか否かは、FACSやELISAのほか、ALPHAスクリーン (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay) や表面プラズモン共鳴 (SPR) 現象を利用したBIACORE等によって確認することができる (Proc.Natl.Acad.Sci.USA (2006) 103 (11), 4005-4010)。

#### 【0067】

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

#### 【0068】

Fc $\gamma$ RIa、Fc $\gamma$ RIbおよびFc $\gamma$ RIcを含むFc $\gamma$ RI (CD64) ならびにアイソフォームFc $\gamma$ RIIa (アロタイプV158およびF158を含む) およびFc $\gamma$ RIIIb (アロタイプFc $\gamma$ RIIIb-NA1およびFc $\gamma$ RIIIb-NA2を含む) を含むFc $\gamma$ RIII (CD16) は、IgGのFc領域と結合する $\alpha$ 鎖と、細胞内に活性化シグナルを伝達するITAMを有する共通 $\gamma$ 鎖の2種類のサブユニットから構成される。一方、アイソフォームFc $\gamma$ RIIa (アロタイプH131およびR131を含む) およびFc $\gamma$ RIIcを含むFc $\gamma$ RII (CD32) の細胞内ドメインにはITAMが含まれている。これらのレセプターは、マクロファージやマスト細胞、抗原提示細胞等の多くの免疫細胞に発現している。これらのレセプターがIgGのFc領域に結合することによって伝達される活性化シグナルによって、マクロファージの貪食能や炎症性サイトカインの産生、マスト細胞の脱顆粒、抗原提示細胞の活性化が促進される。上記のように活性化シグナルを伝達する能力を有するFc $\gamma$ レセプターは、本発明において活性型Fc $\gamma$ レセプターと呼ばれる。

#### 【0069】

一方、Fc $\gamma$ RIIb (Fc $\gamma$ RIIb-1およびFc $\gamma$ RIIb-2を含む) の細胞質内ドメインには抑制化シグナルを伝達するITIMが含まれている。B細胞ではFc $\gamma$ RIIbとB細胞レセプター (BCR) が架橋されることによって、BCRからの活性化シグナルが抑制される結果、B細胞の抗体産生が抑制される。マクロファージではFc $\gamma$ RIIIとFc $\gamma$ RIIbが架橋されることによって、貪食能や炎症性サイトカインの産生が抑制される。上記のように抑制化シグナルを伝達する能力を有するFc $\gamma$ レセプターは、本発明において抑制型Fc $\gamma$ レセプターと呼ばれる。

#### 【0070】

pH中性域の条件下において天然型ヒトIgGよりも強くFc $\gamma$ レセプターに結合するレセプター結合ドメインは、ヒトIgGのFc領域のアミノ酸を改変することによって作製することができる。改変の例としては、一以上のアミノ酸の置換、挿入、欠失等が含まれる。また、Fc $\gamma$ レセプターに結合することを特徴とする抗原結合ドメインを、レセプター結合ドメインとすることもできる。そのようなレセプター結合ドメインとしては、Protein Eng Des Sel. 2009 Mar;22(3):175-88、Protein Eng Des Sel. 2008 Jan;21(1):1-10.およびJ

10

20

30

40

50

Immunol. 2002 Jul 1;169(1):137-44に記載のFc $\gamma$ RIIIaに結合するFab断片、ラクダ由来単ドメイン抗体およびsingle chain Fv、ならびにFASEB J. 2009 Feb;23(2):575-85.に記載のFc $\gamma$ RI結合環状ペプチド等が挙げられる。レセプター結合ドメインのFc $\gamma$ レセプターに対する結合活性が、天然型ヒトIgGのFc領域のFc $\gamma$ レセプターに対する結合活性より高いか否かは、上述の方法を用いて適宜実施され得る。

#### 【0071】

本発明において、pH酸性域の条件下におけるヒトFc $\gamma$ レセプターに対する結合活性とは、pH4.0～pH6.5でのヒトFc $\gamma$ レセプター結合活性を意味する。好ましくはpH5.0～pH6.5でのヒトFc $\gamma$ レセプター結合活性を意味し、さらに好ましくはpH5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5のいずれかでのヒトFc $\gamma$ レセプター結合活性を意味し、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Fc $\gamma$ レセプター結合活性を意味する。また、本発明において、pH中性域の条件下におけるヒトFc $\gamma$ レセプターに対する結合活性とは、pH6.7～pH10.0でのヒトFc $\gamma$ レセプター結合活性を意味する。好ましくは、pH7.0～pH9.0でのヒトFc $\gamma$ レセプター結合活性を意味し、さらに好ましくはpH7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0のいずれかでのヒトFc $\gamma$ レセプター結合活性を意味し、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Fc $\gamma$ レセプター結合活性を意味する。

#### 【0072】

測定条件に使用される温度として、レセプター結合ドメインとヒトFc $\gamma$ レセプターとの結合アフィニティーを、10℃～50℃の任意の温度で測定してもよい。好ましくは、レセプター結合ドメインとヒトFc $\gamma$ レセプターとの結合アフィニティーを決定するために、15℃～40℃の温度を使用する。より好ましくは、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、および35℃のいずれかの温度を使用する。特に限定されないが、25℃という温度は好ましい態様の一つである。

#### 【0073】

本発明におけるレセプター結合ドメインの例としては、ヒトIgGのFc領域が好適に挙げられる。Fc領域の起源は限定されないが、任意の非ヒト動物またはヒトから取得され得る。非ヒト動物として好ましくは、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等が好適に挙げられる。別の態様において、レセプター結合ドメインは、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。Fc領域は、好ましくはヒトIgG1のFc領域から取得されるが、IgGの特定のクラスに限定されない。すなわち、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4のFc領域をレセプター結合ドメインとして適宜用いることができる。天然に存在する、または人工的に改変されたIgGのバリエーションの例は、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, W02009/08 6320, W02008/092117, W02007/041635およびW02006/105338) に記載されるが、それらに限定されない。

#### 【0074】

レセプター結合ドメインがpH中性域の条件下において天然型ヒトIgGよりも強くFc $\gamma$ レセプターに結合する限り、いかなる位置のアミノ酸も改変され得る。レセプター結合ドメインがヒトIgG1のFc領域を改変することによって作製される場合、pH中性域の条件下でのFc $\gamma$ レセプターに対する結合活性を増強するためのアミノ酸改変としては、例えばW02007/024249、W02007/021841、W02006/031370、W02000/042072、W02004/029207、W02004/099249、W02006/105338、W02007/041635、W02008/092117、W02005/070963、W02006/020114、W02006/116260およびW02006/023403などに記載のアミノ酸改変が挙げられる。

#### 【0075】

ヒトFc $\gamma$ レセプターに結合するレセプター結合ドメインとして、IgGのFc領域を改変する場合の好ましいアミノ酸は、例えば、EUナンバリングで表される221番目、222番目、223番目、224番目、225番目、227番目、228番目、230番目、231番目、232番目、233番目、2

34番目, 235番目, 236番目, 237番目, 238番目, 239番目, 240番目, 241番目, 243番目, 244番目, 245番目, 246番目, 247番目, 249番目, 250番目, 251番目, 252番目, 254番目, 255番目, 256番目, 257番目, 258番目, 260番目, 262番目, 263番目, 264番目, 265番目, 266番目, 267番目, 268番目, 269番目, 270番目, 271番目, 272番目, 273番目, 274番目, 275番目, 276番目, 278番目, 279番目, 280番目, 281番目, 282番目, 283番目, 284番目, 285番目, 286番目, 288番目, 290番目, 291番目, 292番目, 293番目, 294番目, 295番目, 296番目, 297番目, 298番目, 299番目, 300番目, 301番目, 302番目, 303番目, 304番目, 305番目, 307番目, 308番目, 309番目, 311番目, 312番目, 313番目, 314番目, 315番目, 316番目, 317番目, 318番目, 320番目, 322番目, 323番目, 324番目, 325番目, 326番目, 327番目, 328番目, 329番目, 330番目, 331番目, 332番目, 333番目, 334番目, 335番目, 336番目, 337番目, 339番目, 341番目, 343番目, 375番目, 376番目, 377番目, 378番目, 379番目, 380番目, 382番目, 385番目, 386番目, 387番目, 389番目, 392番目, 396番目, 421番目, 423番目, 427番目, 428番目, 429番目, 430番目, 431番目, 433番目, 434番目, 436番目, 438番目, 440番目および442番目の群から選択される少なくともひとつ以上のアミノ酸である。これらのアミノ酸の改変によって、IgGのFc領域のpH中性域の条件下でFc $\gamma$ レセプターに対する結合活性が増強される。

【0076】

pH中性域の条件下におけるFc $\gamma$ レセプターへの結合を増強するための特に好ましい改変として、例えば、Fc領域のEUナンバリングで表される；

221番目のアミノ酸がLysまたはTyr、

222番目のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはTyr、

223番目のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはLys、

224番目のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはTyr、

225番目のアミノ酸がGlu、LysまたはTrp、

227番目のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyr、

228番目のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyr、

230番目のアミノ酸がAla、Glu、GlyまたはTyr、

231番目のアミノ酸がGlu、Gly、Lys、ProまたはTyr、

232番目のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyr、

233番目のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、

234番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、

235番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、

236番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、

237番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、

238番目のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、

239番目のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyr、

240番目のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThr、

241番目のアミノ酸がAsp、Glu、Leu、Arg、TrpまたはTyr、

243番目のアミノ酸がLeu、Glu、Leu、Gln、Arg、TrpまたはTyr、

244番目のアミノ酸がHis、

245番目のアミノ酸がAla、

246番目のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyr、

247番目のアミノ酸がAla、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Thr、ValまたはTyr、

249番目のアミノ酸がGlu、His、GlnまたはTyr、  
 250番目のアミノ酸がGluまたはGln、  
 251番目のアミノ酸がPhe、  
 254番目のアミノ酸がPhe、MetまたはTyr、  
 255番目のアミノ酸がGlu、LeuまたはTyr、  
 256番目のアミノ酸がAla、MetまたはPro、  
 258番目のアミノ酸がAsp、Glu、His、SerまたはTyr、  
 260番目のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyr、  
 262番目のアミノ酸がAla、Glu、Phe、IleまたはThr、  
 263番目のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThr、  
 264番目のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、A  
 rg、Ser、Thr、TrpまたはTyr、  
 265番目のアミノ酸がAla、Glu、Leu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、G  
 ln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、  
 266番目のアミノ酸がAla、Phe、Ile、Leu、MetまたはThr、  
 267番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、G  
 ln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyr、  
 268番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、A  
 rg、Thr、ValまたはTrp、  
 269番目のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、T  
 hr、Val、TrpまたはTyr、  
 270番目のアミノ酸がGlu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、T  
 rpまたはTyr、  
 271番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、A  
 rg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、  
 272番目のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、S  
 er、Thr、Val、TrpまたはTyr、  
 273番目のアミノ酸がPheまたはIle、  
 274番目のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、T  
 hr、Val、TrpまたはTyr、  
 275番目のアミノ酸がLeuまたはTrp、  
 276番目のアミノ酸が、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr  
 、Val、TrpまたはTyr、  
 278番目のアミノ酸がAsp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、S  
 er、Thr、ValまたはTrp、  
 279番目のアミノ酸がAla、  
 280番目のアミノ酸がAla、Gly、His、Lys、Leu、Pro、Gln、TrpまたはTyr、  
 281番目のアミノ酸がAsp、Lys、ProまたはTyr、  
 282番目のアミノ酸がGlu、Gly、Lys、ProまたはTyr、  
 283番目のアミノ酸がAla、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、ArgまたはTyr、  
 284番目のアミノ酸がAsp、Glu、Leu、Asn、ThrまたはTyr、  
 285番目のアミノ酸がAsp、Glu、Lys、Gln、TrpまたはTyr、  
 286番目のアミノ酸がGlu、Gly、ProまたはTyr、  
 288番目のアミノ酸がAsn、Asp、GluまたはTyr、  
 290番目のアミノ酸がAsp、Gly、His、Leu、Asn、Ser、Thr、TrpまたはTyr、  
 291番目のアミノ酸がAsp、Glu、Gly、His、Ile、GlnまたはThr、  
 292番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Pro、ThrまたはTyr、  
 293番目のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、T  
 rpまたはTyr、  
 294番目のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、V

10

20

30

40

50

al、TrpまたはTyr、  
 295番目のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、  
 296番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、ThrまたはVal、  
 297番目のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、  
 298番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyr、  
 299番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、TrpまたはTyr、  
 300番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、ValまたはTrp、  
 301番目のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyr、  
 302番目のアミノ酸がIle、  
 303番目のアミノ酸がAsp、GlyまたはTyr、  
 304番目のアミノ酸がAsp、His、Leu、AsnまたはThr、  
 305番目のアミノ酸がGlu、Ile、ThrまたはTyr、  
 311番目のアミノ酸がAla、Asp、Asn、Thr、ValまたはTyr、  
 313番目のアミノ酸がPhe、  
 315番目のアミノ酸がLeu、  
 317番目のアミノ酸がGluまたはGln、  
 318番目のアミノ酸がHis、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、ValまたはTyr、  
 320番目のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Asn、Pro、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、  
 322番目のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Pro、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、  
 323番目のアミノ酸がIle、LeuまたはMet、  
 324番目のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyr、  
 325番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、  
 326番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、  
 327番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyr、  
 328番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、  
 329番目のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、  
 330番目のアミノ酸がCys、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、  
 331番目のアミノ酸がAsp、Phe、His、Ile、Leu、Met、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、  
 332番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、  
 333番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、ValまたはTyr、  
 334番目のアミノ酸がAla、Glu、Phe、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、

335番目のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Val、TrpまたはTyr、

336番目のアミノ酸がGlu、LysまたはTyr、

337番目のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはAsn、

339番目のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、SerまたはThr、

376番目のアミノ酸がAlaまたはVal、

377番目のアミノ酸がGlyまたはLys、

378番目のアミノ酸がAsp、

379番目のアミノ酸がAsn、

380番目のアミノ酸がAla、AsnまたはSer、

10

382番目のアミノ酸がAlaまたはIle、

385番目のアミノ酸がGlu、

392番目のアミノ酸がThr、

396番目のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Ile、Lys、Leu、Met、Gln、ArgまたはTyr、

421番目のアミノ酸がLys、

427番目のアミノ酸がAsn、

428番目のアミノ酸がPheまたはLeu、

429番目のアミノ酸がMet、

434番目のアミノ酸がTrp、

436番目のアミノ酸がIle、および

20

440番目のアミノ酸がGly、His、Ile、LeuまたはTyr、

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

【0077】

【表 5 - 1】

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

【 0 0 7 8 】

表 5 - 2 は表 5 - 1 の続きの表である。

10

20

30

40

【表 5 - 2】

|             |                         |    |
|-------------|-------------------------|----|
| F243L/V264I | S239D/N297D/I332E       |    |
| H268D/A330Y | S239D/S298A/I332E       |    |
| H268E/A330Y | S239D/V264I/I332E       |    |
| K246H/I332E | S239E/N297D/I332E       |    |
| L234D/I332E | S239E/V264I/I332E       |    |
| L234E/I332E | S239N/A330L/I332E       |    |
| L234G/I332E | S239N/A330Y/I332E       | 10 |
| L234I/I332E | S239N/S298A/I332E       |    |
| L234I/L235D | S239Q/V264I/I332E       |    |
| L234Y/I332E | V264E/N297D/I332E       |    |
| L235D/I332E | V264I/A330L/I332E       |    |
| L235E/I332E | V264I/A330Y/I332E       |    |
| L235I/I332E | V264I/S298A/I332E       |    |
| L235S/I332E | Y296D/N297D/I332E       |    |
| L328A/I332D | Y296E/N297D/I332E       | 20 |
| L328D/I332D | Y296H/N297D/I332E       |    |
| L328D/I332E | Y296N/N297D/I332E       |    |
| L328E/I332D | Y296Q/N297D/I332E       |    |
| L328E/I332E | Y296T/N297D/I332E       |    |
| L328F/I332D | D265Y/N297D/T299L/I332E |    |
| L328F/I332E | F241E/F243Q/V262T/V264E |    |
| L328H/I332E | F241E/F243R/V262E/V264R |    |
| L328I/I332D | F241E/F243Y/V262T/V264R | 30 |
| L328I/I332E | F241L/F243L/V262I/V264I |    |
| L328M/I332D | F241R/F243Q/V262T/V264R |    |
| L328M/I332E | F241S/F243H/V262T/V264T |    |
| L328N/I332D | F241W/F243W/V262A/V264A |    |
| L328N/I332E | F241Y/F243Y/V262T/V264T |    |
| L328Q/I332D | I332E/A330Y/H268E/A327A |    |
| L328Q/I332E | N297D/I332E/S239D/A330L |    |
| L328T/I332D | N297D/S298A/A330Y/I332E | 40 |
| L328T/I332E | S239D/A330Y/I332E/K326E |    |
| L328V/I332D | S239D/A330Y/I332E/K326T |    |
| L328V/I332E | S239D/A330Y/I332E/L234I |    |
| L328Y/I332D | S239D/A330Y/I332E/L235D |    |

【 0 0 7 9】

表 5 - 3 は表 5 - 2 の続きの表である。

【表 5 - 3】

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

10

20

30

## 【0080】

本明細書において、ヒトFcγレセプターに結合する活性が天然型ヒトIgGよりも高いとは、FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa及び／又はFcγRIIIbのヒトFcγレセプターに結合する活性が天然型ヒトIgGよりも高いことをいう。例えば、ヒトFcγレセプターに結合する活性が天然型ヒトIgGの105%以上、好ましくは110%以上、115%以上、120%以上、125%以上、特に好ましくは130%以上、135%以上、140%以上、145%以上、150%以上、155%以上、160%以上、165%以上、170%以上、175%以上、180%以上、185%以上、190%以上、195%以上、2倍以上、2.5倍以上、3倍以上、3.5倍以上、4倍以上、4.5倍以上、5倍以上、7.5倍以上、10倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、100倍以上であることをいう。

40

## 【0081】

本発明におけるレセプター結合ドメインは、特定のFcγレセプターに対する結合活性がそれ以外のFcγレセプターに対する結合活性よりも高い（特定のFcγレセプターに選択的に結合する）性質を有していてもよい。そのような例として、抑制型Fcγレセプターに対する結合活性が活性型Fcγレセプターに対する結合活性よりも高いレセプター結合ドメインが挙げられる。好適には、抑制型FcγレセプターであるFcγRIIb（FcγRIIb-1およびFc

50

γRIIb-2を含む) に対する結合活性が、アイソフォームFcγRIa、FcγRIbおよびFcγRIcを含むFcγRI (CD64)、アイソフォームFcγRIIIa (アロタイプV158およびF158を含む) およびFcγRIIIb (アロタイプFcγRIIIb-NA1ならびにFcγRIIIb-NA2を含む) を含むFcγRIII (CD16)、ならびにアイソフォームFcγRIIa (アロタイプH131およびR131を含む) およびFcγRIIcを含むFcγRII (CD32) のいずれかから選択される活性型Fcγレセプターに対する結合活性よりも高いレセプター結合ドメインが挙げられる。特に好適には、FcγRIb-1および/またはFcγRIIb-2に対する結合活性が、FcγRIIa (アロタイプH131) に対する結合活性よりも高いレセプター結合ドメインが挙げられる。

#### 【0082】

レセプター結合ドメインが、特定のFcγレセプターに選択的に結合する性質を有しているかどうかは、レセプター結合ドメインの各Fcγレセプターに対するKD値を測定し比較することによって判断することが可能である。例えば、レセプター結合ドメインの活性型Fcγレセプターに対するKD値を、抑制型Fcγレセプターに対するKD値で除した値が、1.2以上、1.3以上、1.4以上、1.5以上、1.6以上、1.7以上、1.8以上、1.9以上、2以上、3以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、15以上、20以上、25以上、30以上、35以上、40以上、45以上、50以上、55以上、60以上、65以上、70以上、75以上、80以上、85以上、90以上、95以上、100以上、110以上、120以上、130以上、140以上、150以上、160以上、170以上、180以上、190以上、200以上、210以上、220以上、230以上、240以上、250以上、260以上、270以上、280以上、290以上、300以上、310以上、320以上、330以上、340以上、350以上、360以上、370以上、380以上、390以上、400以上、410以上、420以上、430以上、440以上、450以上、460以上、470以上、480以上、490以上、500以上、520以上、540以上、560以上、580以上、600以上、620以上、640以上、660以上、680以上、700以上、720以上、740以上、760以上、780以上、800以上、820以上、840以上、860以上、880以上、900以上、920以上、940以上、960以上、980以上、1000以上、1500以上、2000以上、2500以上、3000以上、3500以上、4000以上、4500以上、5000以上、5500以上、6000以上、6500以上、7000以上、7500以上、8000以上、8500以上、9000以上、9500以上、10000以上、100000以上である場合、当該レセプター結合ドメインは、活性型Fcγレセプターよりも抑制型Fcγレセプターに選択的に結合すると判断され得る。

#### 【0083】

特に限定されないが、抑制型Fcγレセプターに対する結合活性が活性型Fcγレセプターに対する結合活性よりも高い (抑制型Fcγレセプターに対する選択的に結合する) レセプター結合ドメインの例として、IgGのFc領域のうちEUナンバリングで表される238番目および/または328番目のアミノ酸が異なるアミノ酸に改変されているFc領域、さらに好ましくは238番目のアミノ酸がAspに改変され、かつ/または328番目のアミノ酸がGluに改変されているFc領域など、WO2012/115241に記載のIgGのFc領域改変体が好適に挙げられる。また、US2009/0136485に記載されているIgGのFc領域改変体も適宜選択することができる。

#### 【0084】

上記のIgGのFc領域の改変に、さらに別の少なくとも一つの改変を加えてもよく、その結果、FcγRIIbに対する結合活性が増強され、かつFcγRIIa (アロタイプH131) およびFcγRIIa (アロタイプR131) に対する結合活性が維持あるいは低減されることが好ましい。そのような改変を加えることにより、FcγRIIaよりもFcγRIIbに対する結合選択性が向上する。FcγRIIa (アロタイプR131) よりもFcγRIIbに対する結合選択性が向上する改変が好ましく、FcγRIIa (アロタイプR131) およびFcγRIIa (アロタイプH131) よりもFcγRIIbに対する結合選択性が向上する改変がさらに好ましい。特に限定されないが、このような改変の例として、EUナンバリング；

233番目のアミノ酸がAsp、

234番目のアミノ酸がTrpまたはTyr、

235番目のアミノ酸がPhe、TrpまたはTyr、

236番目のアミノ酸がAsp、

237番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Leu、Met、TrpまたはTyr、

238番目のアミノ酸がPheまたはLeu、  
 239番目のアミノ酸がAsp、Glu、Gly、LeuまたはAsn、  
 266番目のアミノ酸がIle、LeuまたはMet、  
 267番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Ile、Met、GlnまたはVal、  
 268番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、AsnまたはGln、  
 271番目のアミノ酸がGlyまたはLeu、  
 295番目のアミノ酸がLeu、  
 296番目のアミノ酸がAsp、  
 300番目のアミノ酸がAsp、GluまたはGln、  
 323番目のアミノ酸がIle、LeuまたはMet、  
 324番目のアミノ酸がIleまたはVal、  
 325番目のアミノ酸がMetまたはSer、  
 326番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、  
 327番目のアミノ酸がAsp、Glu、GlyまたはAsn、  
 328番目のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Ile、Met、Gln、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyr、  
 330番目のアミノ酸がLys、MetまたはArg、  
 331番目のアミノ酸がPhe、TrpまたはTyr、  
 332番目のアミノ酸がPhe、  
 333番目のアミノ酸がPro、  
 334番目のアミノ酸がAla、Trp、Glu、Phe、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、ValまたはTyr、  
 335番目のアミノ酸がAsp、および  
 337番目のアミノ酸がAsp、  
 の群から選択される少なくともひとつ以上のアミノ酸の改変が挙げられる。

10

20

## 【0085】

更に、これらの中でも好ましい改変の例として、EUナンバリング；

233番目のアミノ酸がAsp、  
 234番目のアミノ酸がTrpまたはTyr、  
 237番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Leu、Met、TrpまたはTyr、  
 239番目のアミノ酸がAsp、  
 267番目のアミノ酸がAla、GlnまたはVal、  
 268番目のアミノ酸がAsp、GluまたはAsn  
 271番目のアミノ酸がGly  
 296番目のアミノ酸がAsp、  
 323番目のアミノ酸がIle、LeuまたはMet、  
 326番目のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Leu、Met、Asn、Gln、SerまたはThr、  
 330番目のアミノ酸がLys、MetまたはArg、  
 の群から選択される少なくともひとつ以上のアミノ酸の改変が挙げられる。

30

## 【0086】

上記の改変は一箇所であってもよいし、二箇所以上の組み合わせであってもよい。そのような改変で好ましい例としては、表24～25、表27～34、表36～37に記載の改変が挙げられる。

40

## 【0087】

本発明の抗原結合分子に含まれるレセプター結合ドメインの一態様として、特に限定されないが、ヒトIgG1（配列番号：49）、IgG2（配列番号：50）、IgG3（配列番号：51）、またはIgG4（配列番号：52）の改変されたFc領域が例示される。そのような改変Fc領域の例として、ヒトIgG（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）のEUナンバリングで表される238番目のアミノ酸がAsp、および271番目のアミノ酸がGlyであるFc領域が例示される。ヒトIgG（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）のEUナンバリングで表される238番目のアミノ酸がAsp、お

50

よび271番目のアミノ酸がGlyであるFc領域および当該Fc領域を含む抗原結合分子は、活性型Fcγレセプターよりも抑制型Fcγレセプターに対する結合活性が高い。

#### 【0088】

本発明は、EUナンバリングで表される238番目のアミノ酸がAsp、および271番目のアミノ酸がGlyであるFc領域に対して、さらに別の少なくとも一つの改変を加えてもよく、その結果、FcγRIIb-1および／またはFcγRIIb-2に対する結合活性が増強され、かつFcγRIa（アロタイプH131）およびFcγRIIa（アロタイプR131）に対する結合活性が維持あるいは低減されることが好ましい。また、抑制型Fcγレセプター（FcγRIIb-1および／またはFcγRIIb-2）に対する結合活性の増強の程度が、活性型Fcγレセプター（FcγRIa、FcγRIb、FcγRIc、FcγRIIIa（アロタイプV158）、FcγRIIIa（アロタイプF158）、FcγRIIIb（アロタイプFcγRIIIb-NA1）、FcγRIIIb（アロタイプFcγRIIIb-NA2）、FcγRIIa（アロタイプH131）、FcγRIIa（アロタイプR131））に対する結合活性の増強の程度よりも高いことが好ましい。そのような改変を加えることにより、FcγRIIaよりもFcγRIIbに対する結合選択性が向上する。

#### 【0089】

選択的レセプター結合ドメインの例として、特に限定されないが、ヒトIgG（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）のFc領域のEUナンバリングで表される238番目のアミノ酸がAsp、および271番目のアミノ酸がGlyに改変され、かつEUナンバリングで表される233番目、234番目、237番目、244番目、245番目、249番目、250番目、251番目、252番目、254番目、255番目、256番目、257番目、258番目、260番目、262番目、264番目、265番目、266番目、267番目、268番目、269番目、270番目、272番目、279番目、283番目、285番目、286番目、288番目、293番目、296番目、307番目、308番目、309番目、311番目、312番目、314番目、316番目、317番目、318番目、326番目、327番目、330番目、331番目、332番目、333番目、339番目、341番目、343番目、375番目、376番目、377番目、378番目、380番目、382番目、385番目、386番目、387番目、389番目、396番目、423番目、427番目、428番目、430番目、431番目、433番目、434番目、436番目、438番目、440番目および442番目のいずれかひとつ以上のアミノ酸が改変されたFc領域が挙げられる。

#### 【0090】

また、選択的レセプター結合ドメインの例として、特に限定されないが、ヒトIgG（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）のFc領域のEUナンバリングで表される238番目のアミノ酸がAsp、および271番目のアミノ酸がGlyに改変され、かつEUナンバリング；

233番目のアミノ酸がAsp、

234番目のアミノ酸がTyr、

237番目のアミノ酸がAsp、

264番目のアミノ酸がIle、

265番目のアミノ酸がGlu、

266番目のアミノ酸がPhe、MetまたはLeu、

267番目のアミノ酸がAla、Glu、GlyまたはGln、

268番目のアミノ酸がAspまたはGlu、

269番目のアミノ酸がAsp、

272番目のアミノ酸が、Asp、Phe、Ile、Met、AsnまたはGln、

296番目のアミノ酸がAsp、

326番目のアミノ酸がAlaまたはAsp、

327番目のアミノ酸がGly、

330番目のアミノ酸がLysまたはArg、

331番目のアミノ酸がSer、

332番目のアミノ酸がThr、

333番目のアミノ酸がThr、LysまたはArg、

396番目のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Ile、Lys、Leu、Met、Gln、ArgまたはTyr、

の群から選択されるいずれかひとつ以上のアミノ酸が改変されたFc領域が挙げられる。

## 【 0 0 9 1 】

特に限定されないが、前記のFc領域の一態様として、表 6－1～表 6－6 に記載された Fc 領域が例示される。

## 【 0 0 9 2 】

## 【表 6－1】

| 改変 Fc 領域 | 改変アミノ酸 (EU ナンバリング)                                          |
|----------|-------------------------------------------------------------|
| BP208    | E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/A330R                         |
| BP209    | G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330R                         |
| BP210    | G237D/P238D/H268D/P271G/A330R                               |
| BP211    | E233D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330R                         |
| BP212    | E233D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R                         |
| BP213    | E233D/P238D/H268D/P271G/A330R                               |
| BP214    | E233D/L234Y/G237D/P238D/Y296D/K326D/A330K                   |
| BP215    | G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K                         |
| BP216    | G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/A330K                         |
| BP217    | G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/A330K                   |
| BP218    | G237D/P238D/H268D/P271G/K326D/A330K                         |
| BP219    | L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/A330K                         |
| BP220    | E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K                   |
| BP221    | L234Y/G237D/P238D/Y296D/K326A/A330R                         |
| BP222    | L234Y/G237D/P238D/P271G/K326A/A330R                         |
| BP223    | L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330R                   |
| BP224    | L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/K326A/A330R             |
| BP225    | L234Y/G237D/P238D/K326D/A330R                               |
| BP226    | L234Y/G237D/P238D/P271G/K326D/A330R                         |
| BP227    | L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/K326D/A330R                   |
| BP228    | L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/K326D/A330R             |
| BP229    | E233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/K326A/A330R                   |
| BP230    | E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R                   |
| BP231    | G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R                         |
| BP232    | L234Y/G237D/P238D/P271G/K326A/A330K                         |
| BP233    | L234Y/G237D/P238D/P271G/A330K                               |
| BP234    | E233D/L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330K |
| BP235    | E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330R       |
| BP236    | E233D/L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330R |
| BP237    | E233D/L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330K |

10

20

30

40

## 【 0 0 9 3 】

表 6－2 は表 6－1 の続きの表である。

【表 6－2】

| 改変Fc領域 | 改変アミノ酸 (EU ナンバリング)                                          |
|--------|-------------------------------------------------------------|
| BP238  | E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330R       |
| BP239  | E233D/L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330R |
| BP240  | E233D/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/A330R                   |
| BP241  | E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/K326D/A330R                   |
| BP242  | E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330R                   |
| BP243  | E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/A330R                   |
| BP244  | E233D/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/A330R             |
| BP245  | E233D/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330R       |
| BP246  | E233D/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330R       |
| BP247  | E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330R             |
| BP248  | E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330R             |
| BP249  | E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R             |
| BP262  | G237D/P238D/H268E/P271G                                     |
| BP264  | E233D/G237D/P238D/H268E/P271G/Y296D/A330R                   |
| BP265  | G237D/P238D/H268E/P271G/Y296D/A330R                         |
| BP266  | E233D/G237D/P238D/H268E/P271G/A330R                         |
| BP267  | E233D/G237D/P238D/H268E/P271G                               |
| BP268  | E233D/G237D/P238D/H268E/P271G/Y296D                         |
| BP269  | G237D/P238D/H268E/P271G/Y296D                               |
| BP300  | E233D/G237D/P238D/V264I/H268E/P271G                         |
| BP313  | E233D/G237D/P238D/D265E/H268E/P271G                         |
| BP333  | E233D/G237D/P238D/V266F/H268E/P271G                         |
| BP338  | E233D/G237D/P238D/V266L/H268E/P271G                         |
| BP339  | E233D/G237D/P238D/V266M/H268E/P271G                         |
| BP348  | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G                         |
| BP350  | E233D/G237D/P238D/S267E/H268E/P271G                         |
| BP352  | E233D/G237D/P238D/S267G/H268E/P271G                         |
| BP367  | E233D/G237D/P238D/H268E/E269D/P271G                         |
| BP384  | E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/K334R             |
| BP390  | E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/I332S             |
| BP391  | E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/I332T             |

10

20

30

40

【 0 0 9 4 】

表 6－3 は表 6－2 の続きの表である。

【表 6－3】

| 改変 Fc 領域 | 改変アミノ酸 (EU ナンバリング)                                    |
|----------|-------------------------------------------------------|
| BP392    | E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/I332K       |
| BP393    | E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/I332R       |
| BP423    | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R             |
| BP425    | E233D/G237D/P238D/V266L/S267A/H268E/P271G/A330R       |
| BP426    | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/E269D/P271G/A330R       |
| BP427    | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/E269Y/P271G/A330R       |
| BP428    | E233D/G237D/P238D/S267G/H268E/P271G/A330R             |
| BP429    | E233D/G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/A330R       |
| BP430    | E233D/G237D/P238D/V266L/S267G/H268E/P271G/A330R       |
| BP431    | E233D/G237D/P238D/S267G/H268E/E269D/P271G/A330R       |
| BP432    | E233D/G237D/P238D/S267G/H268E/E269Y/P271G/A330R       |
| BP433    | E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K/I332T       |
| BP434    | E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330R/I332T |
| BP435    | E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330R/I332T |
| BP436    | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/I332T |
| BP437    | G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/I332T       |
| BP438    | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/I332T       |
| BP439    | E233D/G237D/P238D/V264I/V266L/S267A/H268E/P271G/A330R |
| BP440    | E233D/G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/A330R             |
| BP441    | E233D/G237D/P238D/V266L/H268E/P271G/A330R             |
| BP442    | E233D/G237D/P238D/H268E/E269D/P271G/A330R             |
| BP443    | E233D/G237D/P238D/V266L/H268E/E269D/P271G/A330R       |
| BP444    | E233D/G237D/P238D/H268E/E269N/P271G/A330R             |
| BP445    | E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R       |
| BP446    | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/E269N/P271G/A330R       |
| BP447    | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396A       |
| BP448    | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396D       |
| BP449    | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396E       |
| BP450    | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396F       |
| BP451    | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396G       |
| BP452    | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396H       |

【 0 0 9 5 】

表 6－4 は表 6－3 の続きの表である。

【表 6－4】

| 改変Fc領域 | 改変アミノ酸 (EU ナンバリング)                                                                                                                              |    |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| BP453  | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396I                                                                                                 |    |
| BP454  | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396K                                                                                                 |    |
| BP455  | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396L                                                                                                 |    |
| BP456  | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396M                                                                                                 |    |
| BP457  | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396N                                                                                                 |    |
| BP458  | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396Q                                                                                                 | 10 |
| BP459  | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396R                                                                                                 |    |
| BP460  | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396S                                                                                                 |    |
| BP461  | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396T                                                                                                 |    |
| BP462  | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396V                                                                                                 |    |
| BP463  | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396W                                                                                                 |    |
| BP464  | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396Y                                                                                                 |    |
| BP465  | E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/E333K                                                                                                 |    |
| BP466  | E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/E333R                                                                                                 | 20 |
| BP467  | E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/E334S                                                                                                 |    |
| BP468  | E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/E334T                                                                                                 |    |
| BP469  | E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/E333S                                                                                                 |    |
| BP470  | E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/E333T                                                                                                 |    |
| BP471  | E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/P331S                                                                                                 |    |
| BP472  | E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330S                                                                                                       |    |
| BP473  | E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A327G/A330R                                                                                                 |    |
| BP474  | E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/P331S                                                                                                 | 30 |
| BP475  | E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A327G/A330S                                                                                                 |    |
| BP476  | E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A327G/A330S/P331S                                                                                           |    |
| BP477  | E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A327G/A330R/P331S                                                                                           |    |
| BP478  | E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R<br>+<br>S131C/K133R/G137E/G138S/Q196K/I199T/N203D/K214R/P217S + 219-221<br>欠失+K222Y/T223G/H224P/T225P |    |
| BP479  | E233D/G237D/P238D/V264I/V266L/S267A/H268E/P271G                                                                                                 |    |
| BP480  | E233D/G237D/P238D/V266L/H268E/E269D/P271G                                                                                                       | 40 |
| BP481  | E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G                                                                                                       |    |

【0096】

表 6－5 は表 6－4 の続きの表である。

【表 6－5】

| 改変 Fc<br>領域 | 改変アミノ酸 (EU ナンバリング)                                                |
|-------------|-------------------------------------------------------------------|
| BP482       | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/E269N/P271G                         |
| BP483       | E233D/G237D/P238D/V266L/S267A/H268E/P271G                         |
| BP484       | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/E269D/P271G                         |
| BP485       | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/E269Y/P271G                         |
| BP487       | E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R/P396M             |
| BP488       | E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R             |
| BP489       | E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396M       |
| BP490       | G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R                         |
| BP491       | G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R                   |
| BP492       | P238D/V264I/S267A/H268E/P271G                                     |
| BP493       | P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D                               |
| BP494       | G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R                         |
| BP495       | G237D/P238D/S267G/H268E/P271G/Y296D/A330R                         |
| BP496       | E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D                   |
| BP497       | E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A327G/A330R             |
| BP498       | E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R/P396L             |
| BP499       | E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396L       |
| BP500       | G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D                         |
| BP501       | G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G                               |
| BP502       | E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A327G/A330R       |
| BP503       | E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A327G/A330R/P396M |
| BP504       | E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P                   |
| BP505       | E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D                   |
| BP506       | E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P/Y296D/A330R       |
| BP507       | E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P/A330R             |
| BP508       | E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P/Y296D             |
| BP509       | E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/Y296D             |
| BP510       | G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P/A330R                   |
| BP511       | G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P/Y296D/A330R             |
| BP513       | E233D/G237D/P238D/H268E/E272D/P271G                               |

10

20

30

40

【 0 0 9 7 】

表 6－6 は表 6－5 の続きの表である。

【表 6 - 6】

| 改変 Fc<br>領域 | 改変アミノ酸 (EU ナンバリング)                  |
|-------------|-------------------------------------|
| BP514       | E233D/G237D/P238D/H268E/E272F/P271G |
| BP517       | E233D/G237D/P238D/H268E/E272I/P271G |
| BP520       | E233D/G237D/P238D/H268E/E272M/P271G |
| BP521       | E233D/G237D/P238D/H268E/E272N/P271G |
| BP523       | E233D/G237D/P238D/H268E/E272Q/P271G |

10

## 【 0 0 9 8 】

上記のヒトFcγレセプターに結合するレセプター結合ドメインに対して、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合を増強するアミノ酸の改変がさらに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、W01997/034631に記載されているようなEUナンバリング252番目、254番目、256番目、309番目、311番目、315番目、433番目および/または434番目、ならびにこれらのアミノ酸に組み合わせる253番目、310番目、435番目および/または426番目のアミノ酸、W02000/042072に記載されているようなEUナンバリング238番目、252番目、253番目、254番目、255番目、256番目、265番目、272番目、286番目、288番目、303番目、305番目、307番目、309番目、311番目、312番目、317番目、340番目、356番目、360番目、362番目、376番目、378番目、380番目、382番目、386番目、388番目、400番目、413番目、415番目、424番目、433番目、434番目、435番目、436番目、439番目および/または447番目のアミノ酸、W02002/060919に記載されているようなEUナンバリング251番目、252番目、254番目、255番目、256番目、308番目、309番目、311番目、312番目、385番目、386番目、387番目、389番目、428番目、433番目、434番目および/または436番目のアミノ酸、W02004/092219に記載されているようなEUナンバリング250番目、314番目および428番目のアミノ酸、W02006/020114に記載されているようなEUナンバリング238番目、244番目、245番目、249番目、252番目、256番目、257番目、258番目、260番目、262番目、270番目、272番目、279番目、283番目、285番目、286番目、288番目、293番目、307番目、311番目、312番目、316番目、317番目、318番目、332番目、339番目、341番目、343番目、375番目、376番目、377番目、378番目、380番目、382番目、423番目、427番目、430番目、431番目、434番目、436番目、438番目、440番目および/または442番目のアミノ酸、W02010/045193に記載されているようなEUナンバリング251番目、252番目、307番目、308番目、378番目、428番目、430番目、434番目および/または436番目のアミノ酸が挙げられる。これらのアミノ酸の改変によって、IgGのFc領域のpH酸性域の条件下におけるFcRnに対する結合が増強される。

20

30

## 【 0 0 9 9 】

より具体的には、このような改変の例として、EUナンバリング；  
 244番目のアミノ酸がLeu、  
 245番目のアミノ酸がArg、  
 249番目のアミノ酸がPro、  
 250番目のアミノ酸がGlnまたはGlu、  
 251番目のアミノ酸がArg、Asp、GluまたはLeu、  
 252番目のアミノ酸がPhe、Ser、ThrまたはTyr、  
 254番目のアミノ酸がSerまたはThr、  
 255番目のアミノ酸がArg、Gly、IleまたはLeu、  
 256番目のアミノ酸がAla、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、ProまたはThr、  
 257番目のアミノ酸がAla、Ile、Met、Asn、SerまたはVal、  
 258番目のアミノ酸がAsp、  
 260番目のアミノ酸がSer、  
 262番目のアミノ酸がLeu、

40

50

270番目のアミノ酸がLys、  
 272番目のアミノ酸がLeuまたはArg、  
 279番目のアミノ酸がAla、Asp、Gly、His、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、TrpまたはTy  
 r、  
 283番目のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、S  
 er、Thr、TrpまたはTyr、  
 285番目のアミノ酸がAsn、  
 286番目のアミノ酸がPhe、  
 288番目のアミノ酸がAsnまたはPro、  
 293番目のアミノ酸がVal、  
 307番目のアミノ酸がAla、Glu、GlnまたはMet、  
 308番目のアミノ酸がIle、ProまたはThr、  
 309番目のアミノ酸がPro、  
 311番目のアミノ酸がAla、Glu、Ile、Lys、Leu、Met、Ser、ValまたはTrp、  
 312番目のアミノ酸がAla、AspまたはPro、  
 314番目のアミノ酸がAlaまたはLeu、  
 316番目のアミノ酸がLys、  
 317番目のアミノ酸がPro、  
 318番目のアミノ酸がAsnまたはThr、  
 332番目のアミノ酸がPhe、His、Lys、Leu、Met、Arg、SerまたはTrp、  
 339番目のアミノ酸がAsn、ThrまたはTrp、  
 341番目のアミノ酸がPro、  
 343番目のアミノ酸がGlu、His、Lys、Gln、Arg、ThrまたはTyr、  
 375番目のアミノ酸がArg、  
 376番目のアミノ酸がGly、Ile、Met、Pro、ThrまたはVal、  
 377番目のアミノ酸がLys、  
 378番目のアミノ酸がAsp、AsnまたはVal、  
 380番目のアミノ酸がAla、Asn、SerまたはThr、  
 382番目のアミノ酸がPhe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、T  
 rpまたはTyr、  
 385番目のアミノ酸がAla、Arg、Asp、Gly、His、Lys、SerまたはThr、  
 386番目のアミノ酸がArg、Asp、Ile、Lys、Met、Pro、SerまたはThr、  
 387番目のアミノ酸がAla、Arg、His、Pro、SerまたはThr、  
 389番目のアミノ酸がAsn、ProまたはSer、  
 423番目のアミノ酸がAsn、  
 427番目のアミノ酸がAsn、  
 428番目のアミノ酸がLeu、Met、Phe、SerまたはThr、  
 430番目のアミノ酸がAla、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、T  
 hr、ValまたはTyr、  
 431番目のアミノ酸がHisまたはAsn、  
 433番目のアミノ酸がArg、Gln、His、Ile、Lys、ProまたはSer、  
 434番目のアミノ酸がAla、Gly、His、Phe、Ser、TrpまたはTyr、  
 436番目のアミノ酸がArg、Asn、His、Ile、Leu、Lys、MetまたはThr、  
 438番目のアミノ酸がLys、Leu、ThrまたはTrp、  
 440番目のアミノ酸がLys、および  
 442番目のアミノ酸がLys、  
 の群から選択される少なくともひとつ以上のアミノ酸の改変が挙げられる。

# 【0100】

pH酸性域の条件下におけるヒトFcRnへの結合をヒトIgGと比較して増強することができる改変の例として、EUナンバリング；

308番目のアミノ酸がIle、309番目のアミノ酸がPro、および／または311番目のアミノ酸がGluを含む改変、  
308番目のアミノ酸がThr、309番目のアミノ酸がPro、311番目のアミノ酸がLeu、312番目のアミノ酸がAla、および／または314番目のアミノ酸がAlaを含む改変、  
308番目のアミノ酸がIleまたはThr、309番目のアミノ酸がPro、311番目のアミノ酸がGlu、LeuまたはSer、312番目のアミノ酸がAla、および／または314番目のアミノ酸がAlaまたはLeuを含む改変、および  
308番目のアミノ酸がThr、309番目のアミノ酸がPro、311番目のアミノ酸がSer、312番目のアミノ酸がAsp、および／または314番目のアミノ酸がLeuを含む改変、  
の群から選択される少なくとも一つ以上の改変が挙げられる。

10

**【0101】**

上記以外に、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRnへの結合をヒトIgGと比較して増強することができる改変の例として、EUナンバリング；  
251番目のアミノ酸がLeu、252番目のアミノ酸がTyr、254番目のアミノ酸がSerまたはThr、255番目のアミノ酸がArg、および／または256番目のアミノ酸がGluを含む改変、  
が挙げられる。

**【0102】**

上記以外に、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRnへの結合をヒトIgGと比較して増強することができる改変の例として、EUナンバリング；  
428番目のアミノ酸がLeu、Met、Phe、SerまたはThr、433番目のアミノ酸がArg、Gln、His、Ile、Lys、ProまたはSer、434番目のアミノ酸がHis、PheまたはTyr、および／または436番目のアミノ酸がArg、Asn、His、Lys、MetまたはThrを含む改変、および  
428番目のアミノ酸がHisまたはMet、および／または434番目のアミノ酸がHisまたはMetを含む改変、  
の群から選択される少なくとも一つ以上の改変が挙げられる。

20

**【0103】**

上記以外に、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRnへの結合をヒトIgGと比較して増強することができる改変の例として、EUナンバリング；  
385番目のアミノ酸がArg、386番目のアミノ酸がThr、387番目のアミノ酸がArg、および／または389番目のアミノ酸がProを含む改変、および  
385番目のアミノ酸がAsp、386番目のアミノ酸がPro、および／または389番目のアミノ酸がSerを含む改変、  
の群から選択される少なくとも一つ以上の改変が挙げられる。

30

**【0104】**

上記以外に、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRnへの結合をヒトIgGと比較して増強することができる改変の例として、EUナンバリング；  
250番目のアミノ酸がGlnまたはGluを含む改変、および  
428番目のアミノ酸がLeuまたはPheを含む改変、  
の群から選択される少なくとも一つ以上の改変が挙げられる。

40

**【0105】**

上記以外に、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRnへの結合をヒトIgGと比較して増強することができる改変の例として、EUナンバリング；  
250番目のアミノ酸がGln、および／または428番目のアミノ酸がLeuまたはPheを含む改変、および  
250番目のアミノ酸がGlu、および／または428番目のアミノ酸がLeuまたはPheを含む改変、  
の群から選択される少なくとも一つ以上の改変が挙げられる。

**【0106】**

上記以外に、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRnへの結合をヒトIgGと比較して増強することができる改変の例として、EUナンバリング；

50

307番目のアミノ酸がGln、および434番目のアミノ酸がAlaまたはSerを含む改変、  
308番目のアミノ酸がPro、および434番目のアミノ酸がAlaを含む改変、  
252番目のアミノ酸がTyr、および434番目のアミノ酸がAlaを含む改変、  
378番目のアミノ酸がVal、および434番目のアミノ酸がAlaを含む改変、  
428番目のアミノ酸がLeu、および434番目のアミノ酸がAlaを含む改変、  
434番目のアミノ酸がAla、および436番目のアミノ酸がIleを含む改変、  
308番目のアミノ酸がPro、および434番目のアミノ酸がTyrを含む改変、および  
307番目のアミノ酸がGln、および436番目のアミノ酸がIleを含む改変、  
の群から選択される少なくとも一つ以上の改変が挙げられる。

**【0107】**

10

上記以外に、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRnへの結合をヒトIgGと比較して増強することができる改変の例として、EUナンバリング；

307番目のアミノ酸がGln、380番目のアミノ酸がAla、および434番目のアミノ酸がSerを含む改変、

307番目のアミノ酸がGln、380番目のアミノ酸がAla、および434番目のアミノ酸がAlaを含む改変、

252番目のアミノ酸がTyr、308番目のアミノ酸がPro、および434番目のアミノ酸がTyrを含む改変、および

251番目のアミノ酸がAsp、307番目のアミノ酸がGln、および434番目のアミノ酸がHisを含む改変、

20

の群から選択される少なくとも一つ以上の改変が挙げられる。

**【0108】**

上記以外に、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRnへの結合をヒトIgGと比較して増強することができる改変の例として、EUナンバリング；

257番目のアミノ酸がIle、および311番目のアミノ酸がIleを含む改変、

257番目のアミノ酸がIle、および434番目のアミノ酸がHisを含む改変、および

376番目のアミノ酸がVal、および434番目のアミノ酸がHisを含む改変、

の群から選択される少なくとも一つ以上の改変が挙げられる。

**【0109】**

本発明の抗原結合分子がヒトIgGのFc領域を用いて作製されている場合、それと同じサブクラスのIgGのFc領域を含む抗原結合分子を対照として用いることによって、本発明の抗原結合分子の効果を検証することができる。対照となるヒトIgGのFc領域としては、ヒトIgG1（配列番号：49、RefSeq登録番号AAC82527.1のN末にAを付加したもの）、ヒトIgG2（配列番号：50、RefSeq登録番号AAB59393.1のN末にAを付加したもの）、ヒトIgG3（配列番号：51、RefSeq登録番号CAA27268.1）、およびヒトIgG4（配列番号：52、RefSeq登録番号AAB59394.1のN末にAを付加したもの）のFc領域が適宜使用され得る。

30

**【0110】**

マウスにおいては、FcγRI（CD64）、FcγRIIb（CD32）、FcγRIII（CD16）、FcγRIV（CD16-2、またはFcγRIII-2）の、4種類のFcγレセプターがこれまでに見出されている。ヒトと同様に、FcγRIIbが唯一の抑制型Fcγレセプターと考えられている。FcγRIIbのスプライシングバリエーションとしてFcγRIIb1とFcγRIIb2とが報告されている。ヒトおよびマウスのいずれにおいてもFcγRIIb1はFcγRIIb2に比べて長い細胞内ドメインを有しており、FcγRIIb1はB細胞で発現することが確認され、FcγRIIb2はマクロファージ、肥満細胞、樹状細胞、好塩基球、好中球、好酸球で発現することが確認されている（J. Clin. Immunol. (2005) 25 (1), 1-18）。

40

**【0111】**

これまでに、ヒトにおいてFcγRIIbの機能不全、発現低下は自己免疫疾患の発症と関連があることが報告されている。例えば、SLE患者の中にはFcγRIIbの発現プロモーター領域にある遺伝子多型の影響によって転写活性化因子の結合が弱まり、FcγRIIbの発現が低下している例が報告されている（Hum. Genet. (2005) 117, 220-227、J. Immunol. (2004

50

) 172, 7192-7199, J. Immunol. (2004) 172, 7186-7191)。また、SLE患者の中にはFc $\gamma$ RIIbの233番目のアミノ酸がIleまたはThrという二種類の遺伝子多型が報告されている。この部位はFc $\gamma$ RIIbの細胞膜貫通領域に存在し、233番目のアミノ酸がThrの場合、Ileの場合と比べて、Fc $\gamma$ RIIbがリピッドラフトに存在しにくくなり、結果としてFc $\gamma$ RIIbのシグナル伝達機能が低下することが報告されている (Nat. Med. (2005) 11, 1056-1058, Hum. Mol. Genet., (2005) 14, 2881-2892)。マウスにおいても、C57BL/6マウスのFc $\gamma$ RIIb遺伝子が破壊されたノックアウトマウスは、自己抗体の産生や糸球体腎炎等のSLE様の症状を呈することが報告されている (Immunity 13 (2000) 277-285, J. Exp. Med. (2002) 195, 1167-1174)。また、これまでにSLEの自然発症モデルと考えられてきているマウスにおいてもFc $\gamma$ RIIbの発現量の低下などが報告されている (Immunogenetics (2000) 51, 429-435, Int. Immunol. (1999) 11, 1685-1691, Curr. Biol. (2000) 10, 227-230, J. Immunol. (2002) 169, 4340-4346)。これらのことから、マウスにおいても、ヒト同様にFc $\gamma$ RIIbは液性免疫を制御していると考えられる。

#### 【0112】

本発明のFc領域を有する抗体がFc $\gamma$ RIIbを介して抗原を消失させる際には、Fc $\gamma$ RIIbの機能のうち、Fc $\gamma$ RIIbのエンドサイトーシスの機能が最も重要な寄与をしていると考えられる。上述のようにFc $\gamma$ RIIbのスプライシングバリエーションとしてFc $\gamma$ RIIb1とFc $\gamma$ RIIb2が存在するが、抗体と抗原の免疫複合体のエンドサイトーシスには後者が主に関与していることが報告されている (J. Immunol. (1994), 152 574-585, Science (1992) 256, 1808-1812, Cell (1989) 58, 317-327)。これまでに、マウスのFc $\gamma$ RIIb2はクラスリン被覆ピットに取り込まれて、エンドサイトーシスを起こすことが報告されている (Cell (1989) 58, 317-327)。また、Fc $\gamma$ RIIb2を介したエンドサイトーシスにはdileucine motifが必要と報告されているが、ヒトおよびマウスのいずれにおいてもdileucine motifは保存されている (EMBO J. (1994) 13 (13), 2963-2969)。このことから、ヒトにおいてもマウス同様にFc $\gamma$ RIIb2はエンドサイトーシス能を有すると考えられる。

#### 【0113】

その一方で、Fc $\gamma$ RIIb1はFc $\gamma$ RIIb2と異なり、エンドサイトーシスを起こさないことが報告されている。Fc $\gamma$ RIIb1にはFc $\gamma$ RIIb2に見られない、細胞内ドメイン中の挿入配列が存在する。この配列がFc $\gamma$ RIIb1のクラスリン被覆ピットへの取り込みを阻害し、その結果としてエンドサイトーシスが阻害されると考えられている (J. Cell. Biol. (1992) 116, 875-888, J. Cell. Biol. (1989) 109, 3291-3302)。ヒトにおいても、マウス同様にFc $\gamma$ RIIb1には挿入配列が存在するため、類似のメカニズムでFc $\gamma$ RIIb1とFc $\gamma$ RIIb2のエンドサイトーシス能に違いが生じていると予想される。また、ヒトにおいても、マウスにおいても20分間に細胞表面上の約40%の免疫複合体が細胞内へ取り込まれることが報告されている (Mol. Immunol. (2011) 49, 329-337, Science (1992) 256, 1808-1812)。このことから、ヒトにおいてもFc $\gamma$ RIIb2はマウス同様の速度で免疫複合体を細胞内に取り込んでいると予想される。

#### 【0114】

Fc $\gamma$ レセプターファミリーのうちFc $\gamma$ RIIbはヒトでもマウスでも唯一細胞内にITIMを有し、発現細胞の分布も同一であることから、免疫の制御における機能も同様であると推測できる。またヒトでもマウスでも同様の速度で免疫複合体が細胞内へ取り込まれるという事実を考慮すると、マウスを用いることで、ヒトにおけるFc $\gamma$ RIIbを介した抗体による抗原の消失効果が予測可能であると考えられる。実際に、後述の実施例においても、mIgG1と比較してマウスFc $\gamma$ RIIbおよびFc $\gamma$ RIIIに対するアフィニティーが増強された改変分子 (mF44およびmF46) がノーマルマウスに投与された場合、mIgG1が投与された場合と比べて抗原のクリアランスが増加することが示された。

#### 【0115】

また、後述の実施例において、Fc受容体 $\gamma$ 鎖欠損マウスを使って同様の実験が実施された。マウスの場合、Fc $\gamma$ RIIb以外のFc $\gamma$ Rは $\gamma$ 鎖の共存在下でしか発現しないことが報告されているため、Fc受容体 $\gamma$ 鎖欠損マウスではFc $\gamma$ RIIbしか発現していない。Fc受容体 $\gamma$

【 0 1 1 6 】

10

## 20

【 0 1 1 8 】

30

## 40

50

本発明における抗原結合ドメインは、細胞内条件と細胞外条件で抗原に結合する活性が異なることを特徴とする。細胞内条件、細胞外条件とは、生体内において細胞内と細胞外とで異なる条件のことであり、条件のカテゴリの一例としてはイオン濃度が、より具体的には水素イオン濃度 (pH) やカルシウムイオン濃度などが挙げられる。細胞内条件は好ましくはエンドソーム内部の環境に特徴的な環境のことであり、細胞外条件は好ましくは血漿中の環境に特徴的な環境のことである。

イオン濃度の条件によって抗原に結合する活性が変化するような性質を有する抗原結合

ドメインは、多数の抗原結合ドメインの中からそのような性質を有するドメインをスクリーニングすることによって取得することができる。例えば、本発明の抗原結合分子が抗体の場合、ハイブリドーマ法や抗体ライブラリー法によって互いに配列の異なる多数の抗体を作製し、それらについて異なるイオン濃度の条件下で抗原結合活性を測定することで、上記のような性質を有する抗体を取得することができる。本明細書の実施例1等に例示されるB細胞クローニング法は、そのような抗体をスクリーニングするための方法として特に好適である。また、後述するように、イオン濃度によって抗原結合活性が変化する性質を抗原結合ドメインに付与することのできる少なくとも一つの特徴的なアミノ酸残基を特定し、そのような特徴的なアミノ酸残基を共通の構造として有しつつ互いに配列の異なる多数の抗原結合ドメインをライブラリーとして作製することで、そうしたライブラリー中から上記のような性質を有する抗原結合ドメインを効率的にスクリーニングすることができる。

10

#### 【0122】

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

20

本発明においては、イオン濃度の条件としてpHの条件が用いられる場合には、pH中性域(すなわち低水素イオン濃度または高pH)の条件下における抗原に対する結合活性よりも、pH酸性域(すなわち高水素イオン濃度または低pH)の条件下における抗原に対する結合活性の方が低いことが望ましい。

#### 【0123】

細胞内では細胞外に比べてpHが酸性であり、逆に、細胞外では細胞内に比べてpHが中性である。本発明は、細胞外条件下がpH中性域の条件下であり、細胞内条件下がpH酸性域の条件下である抗原結合分子を提供する。本発明において好ましいpH酸性域は $pH4.0 \sim pH6.5$ であり、より好ましくは $pH5.0 \sim pH6.5$ であり、さらに好ましくは $pH5.5$ 、 $5.6$ 、 $5.7$ 、 $5.8$ 、 $5.9$ 、 $6.0$ 、 $6.1$ 、 $6.2$ 、 $6.3$ 、 $6.4$ 、 $6.5$ のいずれかであり、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 $pH5.8 \sim pH6.0$ である。また、本発明において好ましいpH中性域は $pH6.7 \sim pH10.0$ であり、より好ましくは $pH7.0 \sim pH9.0$ であり、さらに好ましくは $pH7.0$ 、 $7.1$ 、 $7.2$ 、 $7.3$ 、 $7.4$ 、 $7.5$ 、 $7.6$ 、 $7.7$ 、 $7.8$ 、 $7.9$ 、 $8.0$ のいずれかであり、特に好ましくは血漿中(血中)のpHに近い $pH7.4$ である。

30

#### 【0124】

本発明が提供する抗原結合ドメインが抗原に結合する活性の強さを、pH酸性域の条件下とpH中性域の条件下で比較した場合、pH中性域の条件下の方がpH酸性域の条件下よりも強く結合することが好ましい。結合する活性の強さをKD(Dissociation constant: 解離定数)で表わした場合、 $KD(pH酸性)/KD(pH中性)$ の値が好ましくは2以上であり、より好ましくは10以上であり、さらに好ましくは40以上である。 $KD(pH酸性)/KD(pH中性)$ 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、100、400、1000、10000等、いかなる値でもよい。KDの代りにkd(Dissociation rate constant: 解離速度定数)を用いることも可能である。KD値を算出することが困難な場合は、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評価してもよい。本発明が提供する抗原結合分子を固定化したチップに抗原を流した場合、pH酸性域の条件下での結合レスポンスがpH中性域の条件下での結合レスポンスの好ましくは $1/2$ 以下であり、より好ましくは $1/3$ 以下であり、さらに好ましくは $1/5$ 以下であり、特に好ましくは $1/10$ 以下である。

40

#### 【0125】

一般に、生体内において、細胞外(例えば血漿中)のpHは中性であり、細胞内(例えばエンドソーム内)のpHは酸性であることが知られている。細胞外のpH条件下に比べて細胞

50

内のpH条件下では抗原に結合する活性が弱くなるような性質を本発明が提供する抗原結合分子の抗原結合ドメインに付与することができれば、細胞外で本発明の抗原結合分子に結合した抗原は細胞内において本発明の抗原結合分子から解離し、結果として、抗原の細胞外から細胞内への取込みが促進されることになる。そのような抗原結合分子を生体に投与することによって、血漿中に存在する抗原の濃度を低下させ、抗原の生理活性をin vivoにおいて低減させることが可能となるので、本発明が提供する抗原結合分子は有用である。

#### 【0126】

pH中性域の条件下に比べてpH酸性域の条件下では抗原に弱く結合するような性質を本発明が提供する抗原結合ドメインに付与する方法は特に限定されず、いかなる方法により行われてもよい。具体的には、W02009/125825に記載の通りであるが、例えば抗原結合ドメインにおいて、少なくとも1つのアミノ酸残基をヒスチジンに置換する、および／または少なくとも1つのヒスチジンを挿入する方法を挙げることができる。本発明が提供する抗原結合分子であって、抗原結合ドメインにおいて少なくとも1つのアミノ酸残基がヒスチジンに置換されている、および／または少なくとも1つのヒスチジンが挿入されている抗原結合分子は、本発明が提供する抗原結合分子の好ましい態様の1つである。抗体中のアミノ酸残基をヒスチジンで置換することによりpH依存的な抗原結合活性を付与できることは既に知られている（Ito W ら、FEBS Lett. (1992) 309, 85-88.）。ヒスチジンの置換および／または挿入が行われる位置は特に限定されず、抗原に結合する活性がpH中性域よりもpH酸性域の条件下において弱くなる限り、いかなる位置のアミノ酸残基をヒスチジンに置換してもよく、また、いかなる位置にヒスチジンを挿入してもよい。ヒスチジンの置換および／または挿入が行われる位置の好ましい例として、抗原に直接結合する部位もしくはそのような部位の立体構造の保持に寄与する部位を挙げることができる。例えば、抗原結合ドメインが抗体の可変領域の場合は、CDR領域やその立体構造の保持に寄与する領域などを挙げることができる。具体的には重鎖：H27、H31、H32、H33、H35、H50、H58、H59、H61、H62、H63、H64、H65、H99、H100b、およびH102、軽鎖：L24、L27、L28、L32、L53、L54、L56、L90、L92、およびL94などの箇所を挙げることができ、これらのうち、H32、H61、L53、L90、およびL94は普遍性の高い箇所と考えられる（アミノ酸残基の位置はKabatナンバリング（Kabat EA et al. 1991. Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH）で示されている）。複数の箇所をヒスチジンに置換する場合の好ましい組み合わせとしては、例えば、H27、H31、およびH35の組み合わせ、H27、H31、H32、H35、H58、H62、およびH102の組み合わせ、L32およびL53の組み合わせ、L28、L32、およびL53の組み合わせ等を挙げることができる。さらに、重鎖と軽鎖の置換箇所の好ましい組み合わせの例としては、H27、H31、L32、およびL53の組み合わせを挙げることができる。

#### 【0127】

当業者に公知のアラニンscanningの方法において、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、本発明が提供する抗原結合分子の抗原結合ドメインにランダムにヒスチジンの置換および／または挿入を行ない、それらの中から、pH中性域の条件下に比べてpH酸性域の条件下で抗原に弱く結合する抗原結合ドメインを選択することができる。

#### 【0128】

置換および／または挿入が行われるヒスチジンの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、1箇所のみヒスチジンを挿入してもよい。また、2箇所以上をヒスチジンで置換してもよいし、2箇所以上にヒスチジンを挿入してもよい。さらに、2箇所以上にヒスチジンの置換と挿入を組み合わせを行なってもよい。

#### 【0129】

抗原結合ドメインは、ヒスチジンの置換および／または挿入が行われる前と後で同等の抗原結合活性を有することが好ましい。ここでの同等の活性とは、元の活性の10%以上、好ましくは30%以上、さらに好ましくは50%以上、より好ましくは80%以上、特に好まし

くは90%以上であることを言う。

#### 【0130】

本発明が提供する抗原結合分子が、抗体定常領域を含む場合、pH中性域の条件下に比べてpH酸性域の条件下では抗原に弱く結合するような性質を本発明が提供する抗原結合に付与する方法として、抗体定常領域を改変する方法が挙げられる。抗体定常領域を改変する方法としては、例えば、定常領域のアイソタイプ(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)を比較して、pH酸性域の条件下における抗原への結合活性が低くなる(pH酸性域の条件下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。また、アイソタイプ(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)のアミノ酸配列にアミノ酸改変を導入することで、pH酸性域の条件下における抗原への結合活性を低下させる(pH酸性域の条件下における解離速度を速くする)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への結合活性に大きく影響を与えるため、結合する抗原の種類によって適切なアイソタイプを選択することでpH酸性域の条件下における抗原への結合活性を低下させることが可能である。また、アイソタイプのアミノ酸配列にアミノ酸改変を導入する場合、アミノ酸改変が導入される箇所としては、ヒンジ領域が望ましいと考えられる。

10

#### 【0131】

前記のような水素イオン濃度の条件によって抗原結合活性を変化させるアミノ酸残基を共通の構造として有しつつ互いに配列の異なる多数の抗原結合ドメインをライブラリーとして作製し、そうしたライブラリーの中からスクリーニングを行なうことによって、所望の抗原に結合する活性を有し、なおかつ水素イオン濃度の条件によって抗原結合活性が変化する抗原結合ドメインを効率的に取得することができる。

20

#### 【0132】

例えば、水素イオン濃度の条件によって抗原結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基をフレームワーク配列に含む軽鎖可変領域と、ランダムな配列を有する重鎖可変領域とを組み合わせることによって、水素イオン濃度の条件によって抗原結合活性を変化させるアミノ酸残基を共通の構造として有しつつ互いに配列の異なる複数の抗原結合ドメインを含むライブラリーが作製され得る。そのようなアミノ酸残基が軽鎖可変領域に導入される場合の好ましい態様としては、それらのアミノ酸残基が軽鎖可変領域のCDR1に含まれていてもよく、さらに好ましくは、軽鎖可変領域のCDR1のKabatナンバリングで表される24位、27位、28位、31位、32位および/または34位に含まれていてもよい。また別の好ましい態様として、それらのアミノ酸残基が軽鎖可変領域のCDR2に含まれていてもよく、さらに好ましくは軽鎖可変領域のCDR2のKabatナンバリングで表される50位、51位、52位、53位、54位、55位および/または56位に含まれていてもよい。また別の好ましい態様として、それらのアミノ酸残基が軽鎖可変領域のCDR3に含まれていてもよく、さらに好ましくは軽鎖可変領域のCDR3のKabatナンバリングで表される89位、90位、91位、92位、93位、94位および/または95A位に含まれていてもよい。水素イオン濃度の条件によって抗原結合活性を変化させる限り、そのようなアミノ酸残基が単独で含まれていてもよいし、二つ以上組み合わされて含まれていてもよい。

30

#### 【0133】

水素イオン濃度の条件によって抗原結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基を含む軽鎖可変領域と、ランダムな配列を有する重鎖可変領域とを組み合わせる抗原結合ドメインを作製する場合において、さらにフレキシブル残基が軽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。本発明の抗原結合ドメインの抗原結合活性が、水素イオン濃度の条件によって変化する限り、フレキシブル残基の数および位置は特に限定されない。すなわち、軽鎖のCDR配列および/またはFR配列に一つまたはそれ以上のフレキシブル残基が含まれ得る。特に限定されないが、軽鎖可変領域配列に導入されるフレキシブル残基の好適な例として、表7または表8に記載のアミノ酸残基が挙げられる。また、水素イオン濃度の条件によって抗原結合活性を変化させるアミノ酸残基やフレキシブル残基以外の軽鎖可変領域の配列としては、特に限定されないが、Vk1(配列番号:58)、Vk2(

40

50

配列番号：５９）、Vk3（配列番号：６０）、Vk4（配列番号：６１）等の生殖細胞系列の配列が好適に使用され得る。

【０１３４】

【表７】

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

（位置はKabatナンバリングを表す）

【０１３５】

10

20

30

40

【表 8】

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

(位置はKabatナンバリングを表す)

## 【0136】

水素イオン濃度の条件によって抗原結合活性を変化させるアミノ酸残基としては、いずれのアミノ酸残基も好適に使用され得るが、そのようなアミノ酸残基としては、具体的に側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸残基が挙げられる。こうした電子供与性を有するアミノ酸としては、ヒスチジンまたはグルタミン酸等の天然のアミノ酸のほか、ヒスチジナナログ (US20090035836) もしくはm-NO<sub>2</sub>-Tyr (pKa 7.45)、3,5-Br<sub>2</sub>-Tyr (pKa 7.21) または3,5-I<sub>2</sub>-Tyr (pKa 7.38) 等の非天然のアミノ酸 (Bioorg. Med. Chem. (2003) 11 (17), 3761-2768) が好適に例示される。また、当該アミノ酸残基の特に好適な例としては、側鎖のpKaが6.0-7.0であるアミノ酸残基が挙げられる。こうした電子供与性を有するアミノ酸としては、ヒスチジンが好適に例示される。

## 【0137】

また、本発明の一つの態様では、イオン濃度とは金属イオン濃度のことをいう。「金属イオン」とは、水素を除くアルカリ金属および銅族等の第I族、アルカリ土類金属および亜鉛族等の第II族、ホウ素を除く第III族、炭素とケイ素を除く第IV族、鉄族および白金族等の第VIII族、V、VIおよびVII族の各A亜族に属する元素と、アンチモン、ビスマス、ポロニウム等の金属元素のイオンをいう。金属原子は原子価電子を放出して陽イオンになる性質を有しており、これをイオン化傾向という。イオン化傾向の大きい金属は、化学的に活性に富むとされる。

本発明で好適な金属イオンの例としてカルシウムイオンが挙げられる。カルシウムイオンは多くの生命現象の調節に関与しており、骨格筋、平滑筋および心筋等の筋肉の収縮、白血球の運動および貪食等の活性化、血小板の変形および分泌等の活性化、リンパ球の活性化、ヒスタミンの分泌等の肥満細胞の活性化、カテコールアミン $\alpha$ 受容体やアセチルコリン受容体を介する細胞の応答、エキソサイトシス、ニューロン終末からの伝達物質の放出、ニューロンの軸索流等にカルシウムイオンが関与している。細胞内のカルシウムイオン受容体として、複数のカルシウムイオン結合部位を有し、分子進化上共通の起源から由来したと考えられるトロポニンC、カルモジュリン、パルブアルブミン、ミオシン軽鎖鎖等が知られており、その結合モチーフも数多く知られている。例えば、カドヘリンドメイン、カルモジュリンに含まれるEFハンド、Protein kinase Cに含まれるC2ドメイン、血液凝固タンパク質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様ドメインがよく知られている。

10

本発明においては、金属イオンがカルシウムイオンの場合には、高カルシウムイオン濃度の条件下における抗原に対する結合活性よりも低カルシウムイオン濃度の条件下における抗原に対する結合活性の方が低いことが望ましい。

#### 【0138】

また、細胞内では細胞外に比べてカルシウムイオン濃度が低く、逆に、細胞外では細胞内に比べてカルシウムイオン濃度が高い。本発明において好ましい低カルシウムイオン濃度の条件は $0.1\mu\text{M}\sim 30\mu\text{M}$ であり、より好ましくは $0.5\mu\text{M}\sim 10\mu\text{M}$ であり、特に好ましくは生体内の早期エンドソーム内のカルシウムイオン濃度に近い $1\mu\text{M}\sim 5\mu\text{M}$ である。また本発明において好ましい高カルシウムイオン濃度の条件は $100\mu\text{M}\sim 10\text{mM}$ であり、より好ましくは $200\mu\text{M}\sim 5\text{mM}$ であり、特に好ましくは血漿中（血中）のカルシウムイオン濃度に近い $0.5\text{mM}\sim 2.5\text{mM}$ である。本発明では、低カルシウムイオン濃度がエンドソーム内のカルシウムイオン濃度であり、高カルシウムイオン濃度が血漿中のカルシウムイオン濃度であることが好ましい。

20

#### 【0139】

本発明が提供する抗原結合ドメインが抗原に結合する活性の強さを、低カルシウムイオン濃度条件下と高カルシウムイオン濃度条件下で比較した場合、高カルシウムイオン濃度条件下の方が低カルシウムイオン濃度条件下よりも強く結合することが好ましい。すなわち本発明の抗原結合ドメインは、抗原に結合する活性が高カルシウムイオン濃度条件下に比べて低カルシウムイオン濃度条件下において低いことが好ましい。

30

#### 【0140】

結合する活性の強さをKD (Dissociation constant: 解離定数) で表わした場合、KD (低カルシウムイオン濃度) / KD (高カルシウムイオン濃度) の値が1より大きく、好ましくは2以上であり、より好ましくは10以上であり、さらに好ましくは40以上である。KD (低カルシウムイオン濃度) / KD (高カルシウムイオン濃度) 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、100、400、1000、10000等、いかなる値でもよい。KDの代わりにkd (Dissociation rate constant: 解離速度定数) を用いることも可能である。KD値を算出することが困難な場合は、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評価してもよい。本発明が提供する抗原結合分子を固定化したチップに抗原を流した場合、低カルシウム濃度条件下での結合レスポンスが高カルシウム濃度条件下での結合レスポンスの好ましくは1/2以下であり、より好ましくは1/3以下であり、さらに好ましくは1/5以下であり、特に好ましくは1/10以下である。

40

#### 【0141】

一般に、生体内において、細胞外（例えば血漿中）のカルシウムイオン濃度は高く、細胞内（例えばエンドソーム内）のカルシウムイオン濃度は低いことが知られている。そのため本発明では、細胞外条件下が高カルシウムイオン濃度条件下であり、細胞内条件下が低カルシウムイオン濃度条件下であることが好ましい。

50

## 【0142】

細胞外のカルシウムイオン濃度条件下に比べて細胞内のカルシウムイオン濃度条件下では抗原に結合する活性が弱くなるような性質を本発明が提供する抗原結合分子の抗原結合ドメインに付与することができれば、細胞外で本発明の抗原結合分子に結合した抗原は細胞内において本発明の抗原結合分子から解離し、結果として、抗原の細胞外から細胞内への取込みが促進されることになる。そのような抗原結合分子を生体に投与することによって、血漿中に存在する抗原の濃度を低下させ、抗原の生理活性をin vivoにおいて低減させることが可能となるので、本発明が提供する抗原結合分子は有用である。

## 【0143】

高カルシウムイオン濃度の条件下に比べて低カルシウムイオン濃度の条件下での抗原に結合する活性が低い抗原結合ドメインまたは抗原結合分子のスクリーニング方法として、WO2012/073992等（例えば段落0200-0213）に記載の方法が例示される。

## 【0144】

高カルシウムイオン濃度の条件下に比べて低カルシウムイオン濃度の条件下では抗原に弱く結合するような性質を本発明が提供する抗原結合ドメインに付与する方法は特に限定されず、いかなる方法により行われてもよい。具体的には、特願2011-218006に記載の通りであるが、例えば抗原結合ドメインにおいて、少なくとも1つのアミノ酸残基を、金属キレート作用を有するアミノ酸残基に置換する、および／または金属キレート作用を有するアミノ酸残基を少なくとも1つ挿入する方法を挙げることができる。本発明が提供する抗原結合分子であって、抗原結合ドメインにおいて少なくとも1つのアミノ酸残基が金属キレート作用を有するアミノ酸残基に置換されている、および／または金属キレート作用を有するアミノ酸残基が少なくとも1つ挿入されている抗原結合分子は、本発明が提供する抗原結合分子の好ましい態様の1つである。金属キレート作用を有するアミノ酸残基としては、例えばセリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸またはグルタミン酸が好適に挙げられる。

## 【0145】

また、カルシウムイオン濃度の条件によって抗原結合ドメインの抗原結合活性を変化させるアミノ酸残基の例として、カルシウム結合モチーフを形成するアミノ酸残基を好適に挙げることができる。カルシウム結合モチーフは、当業者に周知であり、詳細に記載されている（例えばSpringerら（Cell（2000）102，275-277）、KawasakiおよびKretsinger（Protein Prof.（1995）2，305-490）、Moncriefら（J. Mol. Evol.（1990）30，522-562）、Chauvauxら（Biochem. J.（1990）265，261-265）、BairochおよびCox（FEBS Lett.（1990）269，454-456）、Davis（New Biol.（1990）2，410-419）、Schaeferら（Genomics（1995）25，638～643）、Economouら（EMBO J.（1990）9，349-354）、Wurzburgら（Structure.（2006）14，6，1049-1058））。例えば、トロポニンC、カルモジュリン、パルブアルブミン、ミオシン軽鎖に含まれる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、ASGPR、CD23、DC-SIGN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、アネキシンドメイン、カドヘリンドメイン、トロネン、トロンボスポンジン3型ドメインおよびEGF様ドメインなどがカルシウム結合モチーフとして好適に使用され得る。上記の他に、配列番号：57に記載される抗原結合ドメインに含まれるカルシウム結合モチーフも好適に用いられる。

## 【0146】

本発明の抗原結合ドメインには、前記の金属キレート作用を有するアミノ酸残基やカルシウム結合モチーフを形成するアミノ酸残基などのカルシウムイオン濃度の条件によって抗原結合活性を変化させるアミノ酸残基が含まれ得る。そのようなアミノ酸残基が含まれる抗原結合ドメインの位置は特に限定されず、カルシウムイオン濃度の条件によって抗原結合活性を変化させる限り、どのような位置であってもよい。また、カルシウムイオン濃度の条件によって抗原結合活性を変化させる限り、そのようなアミノ酸残基が単独で含まれていてもよいし、二つ以上組み合わされて含まれていてもよい。そのようなアミノ酸残

基としては、セリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸またはグルタミン酸が好適に例示される。抗原結合ドメインが抗体の可変領域の場合、重鎖可変領域および／または軽鎖可変領域にそれらのアミノ酸残基を含むことができる。好ましい態様として、それらのアミノ酸残基が重鎖可変領域のCDR3に含まれていてもよく、さらに好ましくは重鎖可変領域のCDR3のKabatナンバリングで表される95位、96位、100a位および／または101位に含まれていてもよい。

#### 【0147】

別の好ましい態様として、それらのアミノ酸残基が軽鎖可変領域のCDR1に含まれていてもよく、さらに好ましくは軽鎖可変領域のCDR1のKabatナンバリングで表される30位、31位および／または32位に含まれていてもよい。また別の好ましい態様として、それらのアミノ酸残基が軽鎖可変領域のCDR2に含まれていてもよく、さらに好ましくは軽鎖可変領域のCDR2のKabatナンバリングで表される50位に含まれていてもよい。また別の好ましい態様として、それらのアミノ酸残基が軽鎖可変領域のCDR3に含まれていてもよく、さらに好ましくは軽鎖可変領域のCDR3のKabatナンバリングで表される92位に含まれていてもよい。

10

#### 【0148】

また、前記の態様は組み合わせられてもよく、例えば軽鎖可変領域のCDR1、CDR2およびCDR3から選択される2つまたは3つのCDRに当該アミノ酸残基が含まれていてもよく、さらに好ましくは、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位のいずれか1つ以上に含まれていてもよい。

20

#### 【0149】

前記のようなカルシウムイオン濃度の条件によって抗原結合活性を変化させるアミノ酸残基を共通の構造として有しつつ互いに配列の異なる多数の抗原結合ドメインをライブラリーとして作製し、そうしたライブラリーの中からスクリーニングを行なうことによって、所望の抗原に結合する活性を有し、なおかつカルシウムイオン濃度の条件によって抗原結合活性が変化する抗原結合ドメインを効率的に取得することができる。

#### 【0150】

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

30

#### 【0151】

本発明は特定の理論に拘束されるものではないが、生殖細胞系列の配列の使用がほとんどの個人において有害な免疫反応を排除すると期待されている一つの理由は、以下の通りであると考えられている。通常の免疫反応中に生じる親和性成熟ステップの結果、免疫グロブリンの可変領域に体細胞の突然変異が頻繁に生じる。これらの突然変異は主にその配列が超可変的であるCDRの周辺に生じるが、フレームワーク領域の残基にも影響を及ぼす。これらのフレームワーク領域の突然変異は生殖細胞系列の配列には存在しないため、患者において免疫原性を示す可能性がある。一方、通常のヒトの集団は生殖細胞系列の遺伝子によって発現されるフレームワーク配列の大多数にさらされており、免疫寛容の結果、これらの生殖細胞系列の配列は患者において免疫原性が低いあるいは非免疫原性であると予想される。免疫寛容の可能性を最大にするため、可変領域をコードする遺伝子は機能的な（通常に発現する）生殖細胞系列の遺伝子の集合から選択され得る。

40

#### 【0152】

50

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

#### 【0153】

完全にヒト型のVH配列は、下記のみ限定されるものではないが、例えばVH1サブグループ (例えば、VH1-2、VH1-3、VH1-8、VH1-18、VH1-24、VH1-45、VH1-46、VH1-58、VH1-69)、VH2サブグループ (例えば、VH2-5、VH2-26、VH2-70)、VH3サブグループ (VH3-7、VH3-9、VH3-11、VH3-13、VH3-15、VH3-16、VH3-20、VH3-21、VH3-23、VH3-30、VH3-33、VH3-35、VH3-38、VH3-43、VH3-48、VH3-49、VH3-53、VH3-64、VH3-66、VH3-72、VH3-73、VH3-74)、VH4サブグループ (VH4-4、VH4-28、VH4-31、VH4-34、VH4-39、VH4-59、VH4-61)、VH5サブグループ (VH5-51)、VH6サブグループ (VH6-1)、VH7サブグループ (VH7-4、VH7-81) のVH配列等が好適に挙げられる。これらは公知文献 (Matsudaら (J. Exp. Med. (1998) 188, 1973-1975)) 等にも記載されており、当業者はこれらの配列情報をもとに本発明の抗原結合ドメインを適宜設計することが可能である。これら以外の完全にヒト型のフレームワーク領域またはフレームワーク準領域も好適に使用され得る。

#### 【0154】

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

#### 【0155】

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

#### 【0156】

通常これらのフレームワーク配列は一またはそれ以上のアミノ酸残基の相違により互いに異なっている。これらのフレームワーク配列は、前記のイオン濃度の条件によって抗原結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基と共に使用され得る。フレームワークの例としては、これだけに限定されるわけではないが、ほかにもKOL、NEWM、REI、EU、TUR、TEI、LAY、POM等が挙げられる (例えば、前記のKabatら (1991)およびWuら (J. Exp. Med. (1970) 132, 211-250))。

#### 【0157】

例えば、カルシウムイオン濃度の条件によって抗原結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基をフレームワーク配列に含む軽鎖可変領域と、ランダムな配列を有する重鎖可変領域とを組み合わせることによって、カルシウムイオン濃度の条件によって抗原

10

20

30

40

50

結合活性を変化させるアミノ酸残基を共通の構造として有しつつ互いに配列の異なる複数の抗原結合ドメインを含むライブラリーが作製され得る。特に限定されないが、配列番号：57 (Vk5-2) に代表されるVk5-2ファミリーに属する軽鎖可変領域と、ランダムな配列を有する重鎖可変領域とを組み合わせた抗原結合ドメインのライブラリーが好適な例として挙げられる。あるいは、配列番号：58 (Vk1)、配列番号：59 (Vk2)、配列番号：60 (Vk3)、配列番号：61 (Vk4) 等の生殖細胞系列の配列における特定のアミノ酸残基が、カルシウムイオン濃度の条件によって抗原結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基に置換された軽鎖可変領域配列と、ランダムな配列を有する重鎖可変領域とを組み合わせた抗原結合ドメインのライブラリーも好適な例として挙げられる。

#### 【0158】

また、カルシウムイオン濃度の条件によって抗原結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基をフレームワーク配列に含む軽鎖可変領域に、フレキシブル残基が含まれるように設計することも可能である。本発明の抗原結合ドメインの抗原結合活性がイオン濃度の条件によって変化する限り、フレキシブル残基の数および位置は特に限定されない。すなわち、重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域のCDR配列および/またはFR配列に一つまたはそれ以上のフレキシブル残基が含まれ得る。特に限定されないが、配列番号：57 (Vk5-2) に記載の軽鎖可変領域に導入されるフレキシブル残基の例として、表9または表10に記載のアミノ酸残基が挙げられる。

#### 【0159】

#### 【表9】

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

【0160】

【表10】

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

【0161】

本明細書において、フレキシブル残基とは、いくつかの公知かつ/または天然抗体または抗原結合ドメインのアミノ酸配列を比較した場合に、軽鎖可変領域および重鎖可変領域においてアミノ酸の種類が非常に多様である位置に存在するアミノ酸残基をいう。非常に多様である位置は一般的にCDR領域に存在する。公知かつ/または天然抗体における非常に多様な位置を決定する際には、例えばKabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health Bethesda Md.) (1987年および1991年)が提供するデータが有効である。また、インターネット上の複数のデータベース (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>、<http://www.bioinf.org.uk/abs/index.html>) では収集された多数のヒト軽鎖および重鎖の配列が提供されており、これらの配列情報は本発明における非常に多様な位置の決定に有用である。本発明によると、ある位置において、好ましくは約2から約20、好ましくは約3から約19、好ましくは約4から約18、好ましくは5から17、好ましくは6から16、好ましくは7から15、好ましくは8から14、好ましくは9から13、好ましくは10から12種類の異なるアミノ酸が存在する場合、その位置は非常に多様といえる。また、ある位置は、好ましくは少なくとも約2、好ましくは少なくとも約4、好ましくは少なくとも約6、好ましくは少なくとも約8、好ましくは少なくとも約10、好ましくは少なくとも約12種類のアミノ酸の多様性を有し得る。

【0162】

カルシウムイオン濃度の条件によって抗原結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基を含む軽鎖可変領域と、ランダムな配列を有する重鎖可変領域とを組み合わせる抗原結合ドメインを作製する場合において、さらにフレキシブル残基が軽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。カルシウムイオン濃度の条件によって抗原結合活性が変化する限り、フレキシブル残基の数および位置は特に限定されない。すなわち、軽鎖のCDR配列および/またはFR配列に一つまたはそれ以上のフレキシブル残基が含まれ得る。特に限定されないが、軽鎖可変領域に導入されるフレキシブル残基の好適な例として、表9または表10に記載のアミノ酸残基が挙げられる。

#### 【0163】

本発明において、ランダムな配列を有する重鎖および/または軽鎖可変領域は、ランダム化可変領域ライブラリーとして、公知の方法を適宜組み合わせることにより作製することができる。一態様として、特定の抗原で免疫された動物、ワクチン接種して血中抗体価が上昇したヒト、感染症患者、癌患者、自己免疫疾患患者等のリンパ球由来の抗体遺伝子をもとに構築された免疫ライブラリーが、ランダム化可変領域ライブラリーとして好適に使用される。

#### 【0164】

また、別の一態様として、ゲノムDNAにおけるV遺伝子や再構築された機能的なV遺伝子における任意のCDR配列が、適当な長さのコドンセットをコードする合成オリゴヌクレオチドセットで置換された合成ライブラリーが、ランダム化可変領域ライブラリーとして好適に使用される。この場合、重鎖可変領域のCDR3配列に多様性が観察されることから、CDR3配列のみを置換することも可能である。抗原結合分子のアミノ酸配列を多様化させる場合、抗原結合分子の表面に露出した位置のアミノ酸残基に多様性を持たせることが好ましい。表面に露出した位置とは、抗原結合分子の構造、構造アンサンブル、および/またはモデル化された構造にもとづいて、表面露出が可能かつ/または抗原との接触が可能と判断される位置のことをいうが、可変領域においては一般的にCDRである。表面に露出した位置は、InsightIIプログラム (Accelrys) のようなコンピュータプログラムを用いて、抗原結合分子の3次元モデルの座標から決定され得る。また、表面に露出した位置は、当該技術分野において公知のアルゴリズム (例えば、LeeおよびRichards (J.Mol.Biol. (1971) 55, 379-400)、Connolly (J.Appl.Cryst. (1983) 16, 548-558)) を使用して決定され得る。さらに、表面に露出した位置は、タンパク質モデリングに適したソフトウェアおよび抗体から得られる三次元構造情報を使って決定され得る。このような目的のために利用できるソフトウェアとして、SYBYL生体高分子モジュールソフトウェア (Tripos Associates) が好適に挙げられる。アルゴリズムがユーザーの入力サイズパラメータを必要とする場合、計算において使われるプローブの「サイズ」は一般的に半径約1.4オングストローム以下に設定される。さらに、パーソナルコンピュータ用のソフトウェアを使用した表面に露出した領域およびエリアの決定法が、Pacios (Comput.Chem. (1994) 18 (4), 377-386およびJ.Mol.Model. (1995) 1, 46-53) に記載されている。

#### 【0165】

さらに、別の一態様として、健常人のリンパ球由来の抗体遺伝子をもとに構築されたナイーブライブラリーもまた、ランダム化可変領域ライブラリーとして特に好適に使用される (Gejimaら (Human Antibodies (2002) 11,121-129)、およびCardosoら (Scand. J. Immunol. (2000) 51, 337-344))。健常人のリンパ球に由来する抗体配列のレパートリーにはバイアスが含まれていないため、高い多様性が期待される。本発明におけるナイーブ配列を含むアミノ酸配列とは、このようなナイーブライブラリーから取得されるアミノ酸配列をいう。

#### 【0166】

本発明の一つの態様として、カルシウムイオン濃度の条件によって抗原結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基を含む重鎖可変領域と、ランダムな配列を有する軽鎖可変領域とを組み合わせる作製した互いに配列の異なる複数の抗原結合ドメインを含むライブラリーから、本発明の抗原結合ドメインが取得され得る。特に限定されないが、配

列番号：117（6RL#9-IgG1）または配列番号：119（6KC4-1#85-IgG1）に記載の重鎖可変領域とランダムな配列を有する軽鎖可変領域とを組み合わせた抗原結合ドメインのライブラリーが好適な例として挙げられる。また、ランダムな配列を有する軽鎖可変領域の代わりに、生殖細胞系列の配列を有する軽鎖可変領域を適宜選択して用いても良い。特に限定されないが、配列番号：117（6RL#9-IgG1）または配列番号：119（6KC4-1#85-IgG1）に記載の重鎖可変領域と生殖細胞系列の配列を有する軽鎖可変領域とを組み合わせた抗原結合ドメインのライブラリーが好適な例として挙げられる。

#### 【0167】

また、前記のカルシウムイオン濃度の条件によって抗原結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基を含む重鎖可変領域に、さらにフレキシブル残基が含まれるように設計することも可能である。本発明の抗原結合ドメインの抗原結合活性が、カルシウムイオン濃度の条件によって変化する限り、当該フレキシブル残基の数および位置は特に限定されない。すなわち、重鎖および/または軽鎖のCDR配列および/またはFR配列に一つまたはそれ以上のフレキシブル残基が含まれ得る。特に限定されないが、配列番号：117（6RL#9-IgG1）に記載の重鎖可変領域に導入されるフレキシブル残基の例として、重鎖CDR1および重鎖CDR2の全てのアミノ酸残基のほか、重鎖CDR3の95位、96位および/または100a位以外のアミノ酸残基が挙げられる。また、配列番号：119（6KC4-1#85-IgG1）に記載の重鎖可変領域に導入されるフレキシブル残基の例として、重鎖CDR1および重鎖CDR2の全てのアミノ酸残基のほか、重鎖CDR3の95位および/または101位以外のアミノ酸残基が挙げられる。

#### 【0168】

また、前記のカルシウムイオン濃度の条件によって抗原結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基が導入された重鎖可変領域とランダムな配列を有する軽鎖可変領域または生殖細胞系列の配列を有する軽鎖可変領域とを組み合わせることによっても、互いに配列の異なる複数の抗原結合ドメインを含むライブラリーが作製され得る。例として、重鎖可変領域の特定のアミノ酸残基が、カルシウムイオン濃度の条件によって抗原結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基に置換された重鎖可変領域とランダムな配列を有する軽鎖可変領域または生殖細胞系列の配列を有する軽鎖可変領域とを組み合わせた抗原結合ドメインのライブラリーが好適に挙げられる。特に限定されないが、当該アミノ酸残基の例として、重鎖CDR1に含まれるアミノ酸残基、重鎖CDR2に含まれるアミノ酸残基、重鎖CDR3の95位、96位、100a位および/または101位のアミノ酸が挙げられる。これらのアミノ酸残基が、カルシウム結合モチーフを形成し、および/または、カルシウムイオン濃度の条件によって抗原結合活性が変化する限り、これらのアミノ酸残基が単独で含まれていてもよいし、これらのアミノ酸が二つ以上組み合わせられて含まれていてもよい。

#### 【0169】

前記のカルシウムイオン濃度の条件によって抗原結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基が導入された重鎖可変領域とランダムな配列を有する軽鎖可変領域または生殖細胞系列の配列を有する軽鎖可変領域とを組み合わせる場合でも、さらにフレキシブル残基が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。本発明の抗原結合ドメインの抗原結合活性が、カルシウムイオン濃度の条件によって変化する限り、フレキシブル残基の数および位置は特に限定されない。すなわち、重鎖のCDR配列および/またはFR配列に一つまたはそれ以上のフレキシブル残基が含まれ得る。また、カルシウムイオン濃度の条件によって抗原結合活性を変化させるアミノ酸残基以外の重鎖可変領域のCDR1、CDR2および/またはCDR3のアミノ酸配列が、上記の合成ライブラリーのようにランダム化された配列であってもよい。軽鎖可変領域として生殖細胞系列の配列が用いられる場合には、特に限定されないが、配列番号：58（Vk1）、配列番号：59（Vk2）、配列番号：60（Vk3）、配列番号：61（Vk4）等の生殖細胞系列の配列が好適な例として挙げられる。

#### 【0170】

本発明におけるアミノ酸の改変のためには、部位特異的変異誘発法（Kunkelら（Proc.

10

20

30

40

50

Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82, 488-492) ) やOverlap extension PCR等の公知の方法が適宜採用され得る。また、天然のアミノ酸以外のアミノ酸に改変する方法として、複数の公知の方法も採用され得る (Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. (2006) 35, 225-249、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003) 100 (11), 6353-6357) 。例えば、終止コドンの1つであるUAGコドン (アンバーコドン) の相補的アンバーサプレッサーtRNAに、非天然アミノ酸が結合したtRNAが含まれる無細胞翻訳システム (Clover Direct (Protein Express)) ) 等が好適に用いられる。

#### 【0171】

本発明が提供する抗原結合ドメインのKD値の測定は、例えばBiacore (GE healthcare) やスキャッチャードプロット、フローサイトメーター等など当業者に公知の方法を用いて行うことができる。Biacoreの場合、具体的には、本発明が提供する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子をチップ上に固定化し、そこに抗原をアナライトとして流すことでKD値を測定することができる。測定をpH酸性域の条件下とpH中性域の条件下で行うことにより、KD(pH酸性)/KD(pH中性)の値を算出することが可能であり、また、測定を低カルシウムイオン濃度条件下と高カルシウムイオン濃度条件下で行うことにより、KD(低カルシウムイオン濃度)/KD(高カルシウムイオン濃度)の値を算出することが可能である。

#### 【0172】

本発明が提供する抗原結合ドメインにおいて、抗原に結合する活性がイオン濃度の条件によって変化するという性質が、複数の条件について同時に成立してもよい。例えば、本発明が提供する抗原結合ドメインは、抗原に結合する活性がpH中性域の条件下に比べてpH酸性域の条件下において低く、なおかつ抗原に結合する活性が高カルシウムイオン濃度条件下に比べて低カルシウムイオン濃度条件下において低いという性質を有していてもよい。

#### 【0173】

本発明における2種類以上の生理活性を有する抗原の具体的な例としては、アクチビン、アクチビンA、アクチビンAB、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンRIA、アクチビンRIA ALK-2、アクチビンRIB ALK-4、アクチビンRIIA、アクチビンRIIB、アディポネクチン、aFGF、AGE、アレルゲン、アミロイドβ、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、抗Id、アンチトロンビンIII、炭疽、アポA1、アポ血清アミロイドA、アポ-SAA、β-2-ミクログロブリン、bFGF、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)、C10、C1阻害因子、C1q、C3、C3a、C4、C5、C5a (補体5a)、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、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-α、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-α、CCL3L1/LD-78-β、CCL4/MIP-1-β、CCL5/RANTES、CCL6/C10、CCL7/MCP-3、CCL8/MCP-2、CCL9/10/MTP-1-γ、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、CTGF (Connective Tissue Growth Factor)、CTLA-4、CX3CL1/フラクタルカイン、CXCL、CXCL1/Gro-α、CXCL10、CXCL11/I-TAC、CXCL12/SDF-1-α/β、CXCL13/BCA-1、CXCL14/BRAK、CXCL15/ラングカイン (Lungkine)、CXCL16、CXCL16、CXCL2/Gro-β、CXCL3/Gro-γ、CXCL3、CXCL4/PF4、CXCL5/ENA-78、CXCL6/GCP-2、CXCL7/NAP-2、CXCL8/IL-8、CXCL9/Mig、CXCL10/IP-10、DC-SIGN、ジゴキシン、EGF様ドメイン含有タンパク質7 (EGF like domain containing protein 7)、エンドトキシン、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、FGF、FGF-19、FGF-2、FGF-2受容体、FGF-3、FGF-8、フィブロネクチン、GRO/MGSA、GRO-β、GRO-γ、ピロリ菌 (H. pylori)、ハプテン (NP-cap

10

20

30

40

50

またはNIP-cap)、HB-EGF、HCMV gB外被糖タンパク質、Hep B gp120、バチルス・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、ヘプシジン、単純ヘルペスウイルス(HSV) gB糖タンパク質、GP120等のHIV外被タンパク質、HIV MIB gp 120 V3ループ、HLA、HLA-DR、HMGB1 (High Mobility Group Box 1)、HSP47、Hsp90、HSV gD糖タンパク質、ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)、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)、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IgE、IGF、免疫グロブリン免疫複合体、免疫グロブリン、インフルエンザ、インヒビン、インヒビン $\alpha$ 、インヒビン $\beta$ 、ラミニン5、潜伏期関連ペプチド、潜在型TGF-1、潜在型TGF-1 bp1、LBP、LDL、レプチン、Lewis-Y抗原、Lewis-Y関連抗原、LFA-1、LFA-3、リポタンパク質、L-セレクトリン、C型肝炎ウイルス由来の非構造タンパク質3型(NS3)、オンコスタチンM、オステオポンチン、酸化型LDL、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)、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)、呼吸器多核体ウイルス(RSV) F、リウマチ因子、RSV Fgp、スクレロスチン(Sclerostin)、血清アミロイドP、血清アルブミン、志賀様毒素II、シンデカン-1、テネイシン、TGF、TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、TGF- $\beta$  汎特異的(TGF- $\beta$  Pan Specific)、TGF- $\beta$  1、TGF- $\beta$  2、TGF- $\beta$  3、TGF- $\beta$  4、TGF- $\beta$  5、TGF-I、トロンビン、トロンボポエチン(TPO)、チロキシン結合グロブリン、TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、TNIL-I、毒性代謝産物(toxic metabolite)、TGF- $\alpha$ およびTGF- $\beta$ 等のトランスフォーミング増殖因子(TGF)、VEGF、ウイルス抗原、フォン・ヴィルブランド因子(vWF)などを挙げることができる。特に好ましい例としては、HMGB1、CTGF、IgEなどを挙げることができる。これらの抗原は、哺乳動物に由来するものが好ましく、ヒトに由来するものが特に好ましい。

#### 【0174】

ヒトHMGB1の遺伝子配列およびアミノ酸配列は、GenBankアクセッション番号NM\_002128(配列番号：22)およびNP\_002119(配列番号：23)としてそれぞれ登録されている。ヒト以外では、マウスHMGB1の遺伝子配列およびアミノ酸配列がGenBankアクセッション番号NM\_010439(配列番号：24)およびNP\_034569(配列番号：25)として、ラットHMGB1の遺伝子配列およびアミノ酸配列がGenBankアクセッション番号NM\_012963(配列番号：26)およびNP\_037095(配列番号：27)としてそれぞれ登録されている。

#### 【0175】

ヒトCTGFの遺伝子配列およびアミノ酸配列は、GenBankアクセッション番号NM\_001901(配列番号：28)およびNP\_001892(配列番号：29)としてそれぞれ登録されている。ヒト以外では、マウスCTGFの遺伝子配列およびアミノ酸配列がGenBankアクセッション番号NM\_010217(配列番号：30)およびNP\_034347(配列番号：31)として、ラットCTGFの遺伝子配列およびアミノ酸配列がGenBankアクセッション番号NM\_022266(配列番号：32)およびNP\_071602(配列番号：33)としてそれぞれ登録されている。

#### 【0176】

ヒトIgE定常領域の遺伝子配列は、GenBankアクセッション番号L00022(配列番号：34)、マウスIgE定常領域の遺伝子配列は、GenBankアクセッション番号X01857(配列番号：35)にそれぞれ登録されている。

#### 【0177】

HMGB1が結合する標的分子としては、RAGE(Receptor for Advanced Glycation Endproducts)やTLR4(Toll-Like Receptor 4)、IL-1受容体、TLR2(Toll-Like Receptor 2)、Thrombospondin、TREM-1(Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1)、CD24などが挙げられる。また、HMGB1とこれらの標的分子との結合を促進する物質としては、DNAやRNA、LPS(Lipopolysaccharide)、IL-1 $\beta$ (Interleukin-1 $\beta$ )、CXCL12(chemokine(C-X-C motif) Ligand 12)、Nucleosomesなどが報告されている。本発明における好ましい標的分子の例としては、RAGEやTLR4などを挙げることができる。

#### 【0178】

CTGFが結合する標的分子としては、IGF-1(Insulin-like Growth Factor-1)、IGF-2(

Insulin-like Growth Factor-2)、integrin  $\alpha v \beta 3$ 、TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ )、BMP-4 (Bone Morphogenetic Protein-4)、LRP-1 (LDL receptor-Related Protein-1)、VEGF (vascular endothelial growth factor)、Wnt、HSPG (Heparan Sulfate Proteoglycans)、Integrins、LRP-5 (LDL receptor-Related Protein-5)、LRP-6 (LDL receptor-Related Protein-6) などが報告されている。

#### 【0179】

IgEが結合する標的分子としては、Fc $\epsilon$ RI、Fc $\epsilon$ RIIなどが報告されている。これらは、本発明における標的分子の例としても好ましい。

#### 【0180】

本発明は、本発明が提供する抗原結合分子をコードするポリヌクレオチドを提供する。ポリヌクレオチドは主にDNA、RNA、その他核酸類似体などから構成される。

10

#### 【0181】

本発明は、本発明が提供するポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。用いることのできるベクターとしては、挿入した核酸を安定に保持するものであれば種類に特に制限はなく、市販の種々のベクターを利用することができる。遺伝子クローニング用のベクターとしては例えばM13系ベクター、pUC系ベクターなどが挙げられる。本発明が提供する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、生物個体内でポリペプチドを発現するベクターであれば特に制限されない。例えば、試験管内発現用のベクターとしては例えばpBESTベクター (プロメガ社製) などが、大腸菌発現用のベクターとしては例えばpGEX、pET、pBluescriptベクター (Stratagene社製) などが、培養細胞発現用のベクターとしては例えばpME18S-FL3ベクター (GenBank Accession No. AB009864) などが、動物細胞発現用のベクターとしてはpcDNA、生物個体内発現用のベクターとしては例えばpME18Sベクター (Mol Cell Biol. 8:466-472(1988)) などが挙げられる。ベクターへの本発明のポリヌクレオチドの挿入は、例えば、In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit (クロンテック社製)を用いて行うことができる。

20

#### 【0182】

本発明は、本発明が提供するベクターを保持する宿主細胞を提供する。用いることのできる宿主細胞は特に制限されず、例えば、大腸菌や種々の動物細胞などを好適に用いることができる。宿主細胞は、例えば、本発明の抗原結合分子の製造や発現のための産生系として使用することができる。産生系には、インビトロおよびインビボの産生系が含まれる。インビトロの産生系としては、真核細胞を使用する産生系及び原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

30

#### 【0183】

宿主細胞として使用できる真核細胞として、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞が挙げられる。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、CHO (J. Exp. Med. (1995) 108: 94.0)、COS、HEK293、3T3、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero等、両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞 (Valle et al., Nature (1981) 291: 338-340)、及び昆虫細胞、例えば、Sf9、Sf21、Tn5が例示される。好ましくはCHO-DG44、CHO-DX11B、COS7、HEK293、BHKが用いられる。大量発現を目的とする場合には特にCHOが好ましい。宿主細胞へのベクターの導入には、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、カチオンリポソームDOTAP (Boehringer Mannheim製)を用いた方法、エレクトロポレーション法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法など当業者に公知の手法を用いることができる。また、Free Style 293 Expression System (Invitrogen社製)を用いて、遺伝子導入からポリペプチドの発現までを行うこともできる。

40

#### 【0184】

植物細胞としては、例えば、ニコチアナ・タバカム (Nicotiana tabacum) 由来の細胞およびウキクサ (Lemna minor) がタンパク質生産系として知られており、この細胞をカルス培養する方法により本発明が提供する抗原結合分子を生産することができる。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (Saccharomyces) 属の細胞 (サッカロミセ

50

ス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、サッカロミセス・ポンベ (*Saccharomyces pombe*) 等)、及び糸状菌、例えば、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属の細胞 (アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 等) を用いたタンパク質発現系が公知である。

【0185】

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、例えば、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、枯草菌などがタンパク質産生系として知られている。

【0186】

一方、インビボ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。

10

【0187】

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、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。例えば、本発明が提供する抗原結合分子をコードするポリヌクレオチドを、ヤギβ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)。

20

【0188】

また、本発明が提供する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。

【0189】

さらに、植物を本発明が提供する抗原結合分子の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)。

30

【0190】

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分子として精製することができる。本発明が提供す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、カラムクロマトグラフィー、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、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせて分離、精製することができる。

40

【0191】

クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティ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、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロ

50

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。

#### 【0192】

必要に応じて、本発明が提供する抗原結合分子に適当なタンパク質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えることや、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。

10

#### 【0193】

また本発明は、本発明の抗原結合分子を有効成分として含む医薬組成物を提供する。医薬組成物は疾患を治療するために使用することができるが、本発明が提供する医薬組成物は、生理活性を有する抗原が原因の1つと考えられる疾患を治療するために使用することが好ましい。抗原は、2種類以上の生理活性を有する抗原であって、本発明が提供する抗原結合分子によって生理活性がin vivoで低減させられる抗原であることが好ましい。本明細書において「治療」とは、薬理的なおよび／または生理学的な効果を得ることを意味する。効果とは、疾患の症状を完全にあるいは部分的に妨げる点で予防的であることができ、疾患の症状を完全にあるいは部分的に治療する点で治療的であることもできる。本明細書における「治療」とは、哺乳類、特にヒトにおける疾患の治療すべてを含む。そしてさらに、未だ疾患を発症していると診断されていない被検者の発症の予防、疾患の症状の進行を抑制あるいは軽減することなども「治療」に含まれる。

20

#### 【0194】

本発明が提供する医薬組成物は、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、Remington's Pharmaceutical Science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton, USA)。必要に応じて本発明が提供する抗原結合分子をその他の医薬成分と組み合わせて製剤化することもできる。例えば医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。また本発明が提供する医薬組成物は、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。経口投与及び非経口投与のための剤形及びその製造方法は当業者に周知であり、本発明が提供する医薬組成物に対し薬学的に許容される担体等を混合等することにより、常法に従って製造することができる。本発明においては、例えば滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、界面活性剤、賦形剤、ベヒクル、着色料、着香料、保存料、防腐剤、安定剤、緩衝剤、懸濁剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、香味剤、矯味剤等が挙げられるが、これらに制限されず、その他常用の担体が適宜使用できる。具体的には、軽質無水ケイ酸、乳糖、結晶セルロース、マンニトール、デンプン、カルメロースカルシウム、カルメロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアセタールジエチルアミノアセテート、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、中鎖脂肪酸トリグリセライド、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、白糖、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩類等を挙げることができる。これらを適宜組み合わせ、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、本発明が提供する医薬組成物を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用量が得られるように設定する。

30

40

#### 【0195】

本発明が提供する医薬組成物は、経口投与または非経口投与のいずれでも投与可能であるが、好ましくは非経口投与であり、具体的には注射投与、経鼻投与、経肺投与、経皮投与などが挙げられる。注射投与の例としては、例えば、静脈内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、皮下投与などである。投与量は患者の体重1kgあたり0.0001mgから1000mgの範囲あ

50

るいは患者1人あたり0.001mgから10000mgの範囲で適宜選択することができるがこれに限定されるものではない。投与される対象は哺乳動物であり、好ましくはヒトである。

#### 【0196】

また本発明は、本発明が提供する抗原結合分子または医薬組成物を含有するキット、および本発明が提供する各種方法に使用するためのキットを提供する。本発明が提供するキットには、さらに適宜、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。また、本発明のキットは、(i) 血漿中の抗原濃度を低下させる方法、(ii) 抗原の細胞内への取込みを促進する方法、または(iii) 生体における抗原の生理活性を低減する方法などのために好適に用いることができる。

#### 【0197】

本発明における抗原の好ましい例として、HMGB1を挙げることができる。HMGB1が病因の1つと考えられる疾患としては、敗血症、外傷、急性呼吸窮迫症候群(ARDS)、脳・心臓・肝臓・腎臓などにおける虚血再灌流障害、肺炎、腎炎、肝炎、大腸炎、髄膜炎、眼内炎、ミオパシー、関節リウマチ(RA)、全身性エリテマトーデス(SLE)、糖尿病、多発性硬化症(MS)、大腸癌、骨肉腫、子宮頸癌、肝癌、リンパ腫、鼻咽腔癌、前立腺癌、皮膚癌、尿路上皮癌、肺癌、自閉症、発作、睡眠時無呼吸症候群、HIV感染症、肺線維症、火傷などを挙げることができる。他の好ましい抗原の例としては、CTGFを挙げることができる。CTGFが病因の1つと考えられる疾患としては、肺線維症や肝線維症などの線維症を挙げることができる。他の好ましい抗原の例としては、IgEを挙げることができる。IgEが病因の1つと考えられる疾患としては、気管支喘息やアトピー性皮膚炎、花粉症などのアレルギー性疾患を挙げることができる。

#### 【0198】

また本発明は、以下の工程を含む、本発明の抗原結合分子を製造する方法を提供する；  
(a) 2種類以上の生理活性を有する抗原を選択する工程、  
(b) 抗原結合ドメインを取得する工程、  
(c) 少なくとも1つのレセプター結合ドメインを取得する工程、  
(d) 工程(b)で取得された抗原結合ドメインの中から、抗原に結合する活性がイオン濃度の条件によって変化するドメインを選択する工程、  
(e) 工程(c)で取得されたレセプター結合ドメインの中から、pH酸性域の条件下においてヒトFcRnに結合する活性を有し、かつpH中性域の条件下において、ヒトFcレセプターに結合する活性が、天然型ヒトIgGがヒトFcレセプターに結合する活性よりも高いドメインを選択する工程、  
(f) 工程(d)で選択された抗原結合ドメインおよび工程(e)で選択されたレセプター結合ドメインが連結された抗原結合分子を作製する工程、  
ならびに  
(g) 工程(f)で作製された抗原結合分子の中から、抗原に結合することで、抗原が有する生理活性のうち1種類以上が阻害される一方で、少なくとも1種類の生理活性が維持される抗原結合分子を選択する工程。

#### 【0199】

本発明における抗原結合ドメインはいかなる方法により得られてもよい。例えば、抗原結合ドメインが抗体やその断片(可変領域、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、CDRなど)である場合、それらは抗体ライブラリー法やハイブリドーマ法、B細胞クローニング法(Bernasconiら, Science (2002) 298, 2199-2202またはW02008/081008)などにより取得することができる。また、そのようにして取得された抗体やその断片は、少なくとも1つのアミノ酸を改変してもよい。

#### 【0200】

抗体ライブラリーについては、すでに多くの作製方法が知られている。例えば、ファージディスプレイライブラリーについては、当業者であれば、Clackson et al., Nature 1991, 352: 624-8、Marks et al., J. Mol. Biol. 1991, 222: 581-97、Waterhouses et al., Nucleic Acids Res. 1993, 21: 2265-6、Griffiths et al., EMBO J. 1994, 13: 324.

0-60、Vaughan et al., Nature Biotechnology 1996, 14: 309-14、Kang ASら、Proc Natl Acad Sci USA (1991) 88, 4363-4366及び特表平10-504970号公報等の文献を参照して作製することができる。抗体の可変領域を一本鎖抗体 (scFv) としてファージの表面に発現させたファージディスプレイライブラリーであれば、そこからパンニングにより抗原に結合するファージを選択し、選択されたファージの遺伝子を解析することによって、当該抗原に結合する抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。抗体の可変領域のDNA配列が明らかになれば、これを所望の定常領域をコードするDNAと連結して適当な発現ベクターに挿入し、それを宿主細胞に導入して発現させることで、組換えタンパク質として抗体を作製することができる。これらの方法は既に周知であり、W092/01047、W092/20791、W093/06213、W093/11236、W093/19172、W095/01438、W095/ 15388などの文献を参考にすることができる。ファージディスプレイライブラリー以外にも、リボソームディスプレイライブラリー (Schaffitzel Cら、J. Immunol. Methods (1999) 231, 119-135.)、細胞ディスプレイライブラリー (Fuchs Pら、Biotechnology (1991) 9, 1369-1372、Boder ET & Wittrup KD, Nat Biotechnol (1997) 15, 553-557、W095/15393)、ヌクレオチドディスプレイライブラリー (Cull MG ら、Proc Natl Acad Sci USA (1992) 89, 1865-1869、Roberts RD & Szostak JW, Proc Natl Acad Sci USA (1997) 94, 12297-12302)、真核生物ウィルスディスプレイライブラリー (Grabherr R & Ernst W, Comb Chem High Throughput Screen (1991) 4, 185-192) などの公知の抗体ライブラリーを用いることが可能である。

10

**【0201】**

20

ハイブリドーマ法により抗体を取得する方法としては、基本的には公知技術を使用し、所望の抗原または所望の抗原を発現する細胞を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞 (ハイブリドーマ) をスクリーニングすることにより得ることができる。さらに、得られたハイブリドーマのmRNAから逆転写酵素を用いて抗体の可変領域をコードするcDNAを取得することができる。これを所望の定常領域をコードするDNAと連結して適当な発現ベクターに挿入し、それを宿主細胞に導入して発現させることで、組換えタンパク質として抗体を作製することができる。

**【0202】**

30

より具体的には、特に以下の例示に限定されないが、例えば感作抗原は、免疫原性を有する完全抗原と、免疫原性を示さないハプテン等を含む不完全抗原の両方を含むことができる。例えば、目的タンパク質の全長タンパク質、又は部分ペプチドなどを用いることができる。その他、多糖類、核酸、脂質等から構成される物質が抗原となり得ることが知られており、特に限定されない。抗原の調製は、当業者に公知の方法により行うことができる。例えば、バキュロウィルスを用いた方法 (例えば、W098/46777など) などに準じて行うことができる。ハイブリドーマの作製は、たとえば、ミルスティンらの方法 (G. Kohler and C. Milstein, Methods Enzymol. 1981, 73: 3-46) 等に準じて行うことができる。抗原の免疫原性が低い場合には、アルブミン等の免疫原性を有する巨大分子と結合させ、免疫を行えばよい。また、必要に応じ抗原を他の分子と結合させることもできる。

40

**【0203】**

ハイブリドーマは、上述の適当な感作抗原を用いて動物を免疫化することにより得ることができる。または、抗体を産生し得るリンパ球をin vitroで不死化して抗体産生細胞とすることもできる。免疫化する動物としては、各種哺乳動物を使用できるが、ゲッ歯目、ウサギ目、霊長目の動物が一般的に用いられる。マウス、ラット、ハムスター等のゲッ歯目、ウサギ等のウサギ目、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー等のサル等の霊長目の動物を例示することができる。その他、ヒト抗体遺伝子のレパトリーを有するトランスジェニック動物も知られており、このような動物を所望の抗原で免疫することによりヒト抗体を得ることもできる (W093/12227、W092/03918、W094/02602、W096/34096、W096/33735; Mendez et al., Nat. Genet. 1997, 15: 146-56参照)。このような

50

トランスジェニック動物の使用に代えて、例えば、ヒトリンパ球をin vitroで所望の抗原で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させることにより、抗原への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平1-59878号公報参照）。

#### 【0204】

動物の免疫化は、例えば、感作抗原をPhosphate-Buffered Saline (PBS) または生理食塩水等で適宜希釈、懸濁し、必要に応じてアジュバントを混合して乳化した後、動物の腹腔内または皮下に注射することにより行われる。その後、好ましくは、フロイント不完全アジュバントに混合した感作抗原を4~21日毎に数回投与する。抗体の産生の確認は、動物の血清中の目的とする抗体価を慣用の方法により測定することにより行われ得る。

10

#### 【0205】

ハイブリドーマは、所望の抗原で免疫化した動物より得られたリンパ球などの抗体産生細胞を、慣用の融合剤（例えば、ポリエチレングリコール）を使用してミエローマ細胞と融合して作成することができる（Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986, 59-103）。必要に応じハイブリドーマを培養・増殖し、免疫沈降、放射免疫分析（RIA）、酵素結合免疫吸着分析（ELISA）等の公知の分析法により該ハイブリドーマより産生される抗体の結合特異性を測定する。その後、必要に応じ、目的とする特異性、親和性または活性が測定された抗体を産生するハイブリドーマを限界希釈法等の手法によりサブクロニングすることもできる。

20

#### 【0206】

続いて、ハイブリドーマまたは抗体産生細胞（感作リンパ球等）から、抗体遺伝子に特異的に結合し得るプローブ（例えば、抗体定常領域をコードする配列に相補的なオリゴヌクレオチド等）を用いて、抗体をコードする遺伝子をクローニングすることができる。また、mRNAからRT-PCRによりクローニングすることも可能である。免疫グロブリンは、IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMの5つの異なるクラスに分類される。さらに、これらのクラスは幾つかのサブクラス（アイソタイプ）（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4等）に分けられる。

#### 【0207】

本発明におけるレセプター結合ドメインはいかなる方法により得られてもよい。例えば、レセプター結合ドメインが抗FcRn抗体やその断片（可変領域、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、CDRなど）である場合、それらは上述の抗体ライブラリー法やハイブリドーマ法などにより取得することができる。レセプター結合ドメインの他の例としては、抗体（IgG）のFc領域およびそれを含む領域（抗体の定常領域や全長抗体）が挙げられる。レセプター結合ドメインがIgGのFc領域の場合、少なくとも1つのアミノ酸を改変してもよい。

30

#### 【0208】

ポリペプチドに対して、任意のアミノ酸を付加、欠失および／または置換するための方法は、例えば部位特異的変異誘発法（Hashimoto-Gotoh T. ら、Gene (1995) 152, 271-275; Zoller M. J. & Smith M., Methods Enzymol (1983) 100, 468-500; Kramer W. ら、Nucleic Acids Res (1987) 12, 9441-9456; Kramer W. & Fritz H. J., Methods Enzymol (1987) 154, 350-367; Kunkel T. A., Proc Natl Acad Sci USA (1985) 82, 488-492) など当業者に公知の手法により行うことができる。

40

#### 【0209】

キメラ抗体の作製は公知であり、例えば、ヒトマウスキメラ抗体の場合、マウス抗体可変領域をコードするDNAとヒト抗体定常領域をコードするDNAを連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることによりキメラ抗体を得ることができる。

#### 【0210】

ヒト化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称され、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

50

of Health, Bethesda, Md.; Chothia et al., Nature (1989) 342: 877)。また、CDRを移植するため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 12502 3号公報、WO 96/02576 号公報参照）。ヒト化抗体は公知の方法により、例えば、マウス抗体のCDRを決定し、該CDRとヒト抗体のフレームワーク領域（framework region；FR）とが連結された抗体をコードするDNAを取得し、ヒト化抗体を通常の発現ベクターを用いた系により産生することができる。このようなDNAは、CDR及びFR両方の末端領域にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてアセンブルPCR法により合成することができる（WO98/13388号公報に記載の方法を参照）。CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、CDRが良好な抗原結合部位を形成するように選択される。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、抗体の変換領域におけるFRのアミノ酸を改変してもよい（Sato et al., Cancer Res. (1993) 53: 10.01-6）。改変できるFR中のアミノ酸残基には、抗原に直接、非共有結合により結合する部分（Amit et al., Science (1986) 233: 747-53）、CDR構造に影響または作用する部分（Chothia et al., J. Mol. Biol. (1987) 196: 901-17）及びVH-VL相互作用に関連する部分（EP239400号特許公報）が含まれる。

#### 【0211】

上述のヒト化以外に、例えば、抗原との結合性等の抗体の生物学的特性を改善するために改変を行うことも考えられる。本発明における改変は、部位特異的突然変異（例えば、Kunkel (1910.0) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488参照）、PCR変異、カセット変異等の方法により行うことができる。一般に、生物学的特性の改善された抗体変異体は70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上（例えば、95%以上、96%、97%、98%、99%等）のアミノ酸配列相同性及び／または類似性を、元となった抗体の変換領域のアミノ酸配列に対して有する。本明細書において、配列の相同性及び／または類似性は、配列相同性が最大の値を取るように必要に応じ配列を整列化、及びギャップ導入した後、元となった配列のアミノ酸残基と相同（同じ残基）及び／または類似（一般的なアミノ酸の側鎖の特性に基づき同じグループに分類される残基）のアミノ酸残基の割合として定義される。通常、天然のアミノ酸残基は、その側鎖の性質に基づいて

- (1)疎水性：アラニン、イソロイシン、バリン、メチオニン及びロイシン；
  - (2)中性親水性：アスパラギン、グルタミン、システイン、スレオニン及びセリン；
  - (3)酸性：アスパラギン酸及びグルタミン酸；
  - (4)塩基性：アルギニン、ヒスチジン及びリジン；
  - (5)鎖の配向に影響する残基：グリシンおよびプロリン；ならびに
  - (6)芳香族性：チロシン、トリプトファン及びフェニルアラニン
- のグループに分類される。

#### 【0212】

本発明が提供する抗原結合分子の製造方法において、抗原結合ドメインを複数取得し、それらの中から抗原に結合する活性がイオン濃度の条件によって変化するドメインを選択してもよいし、あるいは任意の抗原結合ドメインに対して、少なくとも1つのアミノ酸を付加、欠失および／または置換するなどの改変を行なったドメインを複数作製し、それらの中から抗原に結合する活性がイオン濃度の条件によって変化するドメインを選択してもよい。また適宜、複数の抗原結合ドメインの中から、抗原に結合することで、抗原が有する生理活性のうち1種類以上を阻害するが、少なくとも1種類の生理活性を維持する抗原結合ドメインを選択してもよい。

#### 【0213】

本発明が提供する抗原結合分子の製造方法において、当該抗原結合分子あるいはその抗原結合ドメインが抗原に結合することで、抗原が有する生理活性のうち1種類以上を阻害するかどうか、あるいは少なくとも1種類の生理活性を維持するかどうかは、抗原が有する標的分子と結合する活性のうち、1種類以上を阻害するかどうか、あるいは少なくとも1種類の標的分子と結合する活性を維持す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。

## 【0214】

本発明が提供する抗原結合分子の製造方法において、レセプター結合ドメインを複数取得し、それらの中からpH酸性域の条件下においてヒトFcRnに結合する活性を有し、かつpH中性域の条件下においてヒトFcレセプターに結合する活性が天然型ヒトIgGよりも高いドメインを選択してもよいし、あるいは任意のレセプター結合ドメインに対して、少なくとも1つのアミノ酸を付加、欠失および／または置換するなどの改変を行なったドメインを複数作製し、それらの中からpH酸性域の条件下においてヒトFcRnに結合する活性を有し、かつpH中性域の条件下においてヒトFcレセプターに結合する活性が天然型ヒトIgGよりも高いドメインを選択してもよい。

## 【0215】

本発明が提供する抗原結合分子の製造方法において、抗原結合ドメインとレセプター結合ドメインが連結された抗原結合分子を作製するには、抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドおよびレセプター結合ドメインをコードするポリヌクレオチドをそれぞれ作製し、それらをインフレームで連結して発現ベクターに導入し、これを宿主細胞で発現させることによって作製することができる。抗原結合ドメインとレセプター結合ドメインは直接連結されてもよいし、遺伝子工学により導入し得る任意のペプチドリンカー、または合成化合物リンカー（例えば、Protein Engineering (1996) 9, 299-305に開示されるリンカー）等を用いて間接的に連結されてもよい。ペプチドリンカーの長さやアミノ酸配列は特に限定されないが、通常は100アミノ酸以下、好ましくは50アミノ酸以下、更に好ましくは30アミノ酸以下、特に好ましくは10アミノ酸以下のペプチドが用いられる。

## 【0216】

また本発明は、条件に応じて抗原結合活性が変化する抗体をスクリーニングする方法であって、以下の工程を含む方法を提供する；

- (a) 抗体を産生する細胞を調製する工程、
- (b) 第1の条件下で (a) の細胞に抗原を接触させる工程、
- (c) 工程 (b) の細胞の中から、一定量以上の抗原と結合した細胞を選別する工程、
- (d) 工程 (c) の細胞を第2の条件下に置く工程、および
- (e) 工程 (d) の細胞の中から、工程 (c) と比較して抗原の結合量が低下した細胞を選別する工程。

## 【0217】

上記方法のより好ましい態様として、以下の工程を含む方法が挙げられる；

- (a) 抗体を産生する細胞を調製する工程、
- (b) 第1の条件下で (a) の細胞に抗原を接触させる工程、
- (c) 工程 (b) の細胞に、抗IgG抗体を接触させる工程、
- (d) 工程 (c) の細胞の中から、一定量以上の抗原と結合し、かつ一定量以上の抗IgG抗体と結合した細胞を選別する工程、
- (e) 工程 (d) の細胞を第2の条件下に置く工程、および
- (f) 工程 (e) の細胞の中から、工程 (d) と比較して抗原の結合量が低下した細胞を選別する工程。

## 【0218】

上記方法のさらに好ましい態様として、以下の工程を含む方法が挙げられる；

- (a) 抗体を産生する細胞を調製する工程、
- (b) 第1の条件下で (a) の細胞に抗原を接触させる工程、
- (c) 工程 (b) の細胞の中から、抗原と結合した細胞を濃縮する工程、
- (d) 工程 (c) の細胞に、抗IgG抗体を接触させる工程、
- (e) 工程 (d) の細胞の中から、一定量以上の抗原と結合し、かつ一定量以上の抗IgG抗体と結合した細胞を選別する工程、
- (f) 工程 (e) の細胞を第2の条件下に置く工程、および
- (g) 工程 (f) の細胞の中から、工程 (e) と比較して抗原の結合量が低下した細胞を選別する工程。

## 【0219】

本発明において、「抗体を産生する細胞」とは、抗体遺伝子を含み、抗体タンパク質を発現する細胞であれば特に限定されないが、好ましくは動物体内に天然に存在して抗体を産生する細胞であり、より好ましくはリンパ球であり、さらに好ましくはB細胞である。動物としては、各種哺乳動物（マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、カンクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー、ヒトなど）の中から適宜選択することができるが、本発明においては特にウサギが好ましい。また、所望の抗原で免疫された動物を用いることが好ましい。抗体産生細胞としては、天然に存在する細胞以外に、ハイブリドーマや遺伝子組換え細胞など、人工的に作製された細胞であってもよい。本発明で用いられる抗体産生細胞は、細胞外に抗体を分泌する性質（分泌型抗体）および／または細胞膜上に抗体を提示する性質（膜型抗体）を有していることが好ましい。動物体内に天然に存在する抗体産生細胞は、例えば脾臓、リンパ節、血液（末梢血単核球）等から好適に回収することが可能であり、そのような方法は当業者に公知であり、また後述の実施例にも記載されている。

10

## 【0220】

本発明において、「第1の条件」「第2の条件」とは、異なる2種類の条件であって、それらの条件下において抗原結合活性が異なる抗体を取得することを所望するものであれば任意の条件を設定することができる。本発明における好ましい例は、細胞外条件および細胞内条件である。条件のカテゴリーとしては、抗体産生細胞が曝露される条件であれば特に限定されないが、例としては温度やpH、培地中に含まれる組成物やその濃度などを挙げることができる。好ましくはイオン濃度であり、特に好ましくは水素イオン濃度（pH）やカルシウムイオン濃度などが挙げられる。細胞内条件は好ましくはエンドソーム内部の環境に特徴的な条件のことであり、細胞外条件は好ましくは血漿中の環境に特徴的な条件のことである。

20

## 【0221】

細胞外では細胞内に比べてpHが中性であり、逆に、細胞内では細胞外に比べてpHが酸性である。本発明において好ましいpH中性域はpH6.7～pH10.0であり、より好ましくはpH7.0～pH9.0であり、さらに好ましくはpH7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0のいずれかであり、特に好ましくは血漿中（血中）のpHに近いpH7.4である。また、本発明において好ましいpH酸性域はpH4.0～pH6.5であり、より好ましくはpH5.0～pH6.5であり、さらに好ましくはpH5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5のいずれかであり、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である。

30

## 【0222】

また、細胞外では細胞内に比べてカルシウムイオン濃度が高く、逆に、細胞内では細胞外に比べてカルシウムイオン濃度が低い。本発明において好ましい高カルシウムイオン濃度条件は100  $\mu$ M～10 mMであり、より好ましくは200  $\mu$ M～5 mMであり、特に好ましくは血漿中（血中）のカルシウムイオン濃度に近い0.5 mM～2.5 mMである。また、本発明において好ましい低カルシウムイオン濃度条件は0.1  $\mu$ M～30  $\mu$ Mであり、より好ましくは0.5  $\mu$ M～10  $\mu$ Mであり、特に好ましくは生体内の早期エンドソーム内のカルシウムイオン濃度に近い1  $\mu$ M～5  $\mu$ Mである。低カルシウムイオン濃度条件は、添加するカルシウムの量を低くする代わりに、EDTAなどのキレート剤を添加することによっても達成することができる。

40

## 【0223】

「第1の条件」と「第2の条件」には複数の条件が同時に含まれていてもよく、例えば「第1の条件」がpH中性条件かつ高カルシウムイオン濃度条件であり、「第2の条件」がpH酸性条件かつ低カルシウムイオン濃度条件であってもよい。

## 【0224】

抗原は、それに対する抗体が作製できればどのような物質であってもよく、種類は特に限定されないが、ポリペプチドを含む抗原であることが好ましい。また、本発明が提供する上記の抗体をスクリーニングする方法においては、抗原は、高感度で検出することが可

50

能な何らかの物質で標識されていることが好ましい。標識するための物質は、抗原に直接連結されてもよいし、抗原-抗体反応やビオチン-アビジン反応などを利用して間接的に抗原に連結されてもよい。標識するための物質の例としては、放射性同位体、化学発光化合物、蛍光化合物、リン光化合物、磁性粒子、酵素などが挙げられるが、特に好ましくは蛍光化合物である。蛍光化合物の例としては、フルオレセインイソチオシアネート (FITC)、フィコエリスリン (Phycoerythrin: PE)、PE-Cy5 (PE-Cyanin5)、PE-Cy5.5 (PE-Cyanin5.5)、PE-Cy7 (PE-Cyanin7)、ローダミンイソチオシアネート、テキサスレッド (Texas Red)、ECD (PE-Texas Red-x)、アロフィコサニン (APC)、APC-Cy7 (APC-Cyanin7、PharRed)、Per-CP (Peridinin Chlorophyll Protein)、PerCP-Cy5.5 (Per-CP-Cyanin5.5)などを挙げるができる。

10

#### 【0225】

また、本発明が提供する上記の抗体をスクリーニングする方法においては、抗IgG抗体も同様に、高感度で検出することが可能な何らかの物質で標識されていることが好ましい。抗体産生細胞の中から、抗IgG抗体が結合した細胞を選抜することによって、サブクラスとしてIgGが発現している細胞の比率を高めることができる。B細胞においてIgGが発現していることはすなわち、IgGへのクラススイッチが起きていることを意味し、そのような成熟した抗体を産生する細胞を濃縮することは、結合活性の高い抗体をスクリーニングする点において有利であると考えられる。標識するための物質は、抗原に直接連結されてもよいし、抗原-抗体反応やビオチン-アビジン反応などを利用して間接的に抗原に連結されてもよい。標識するための物質の例としては、上述の通りである。抗原と抗IgG抗体をともに用いる場合は、それぞれに標識される物質が互いに異なる物質であって、かつ検出方法が異なる（両者を個別に検出できる）ことが望ましい。抗原と抗IgG抗体を標識する方法は、当業者に公知の方法（例えばUS5057313、US5156840など）を参照して行なうことができる。

20

#### 【0226】

本発明が提供する上記の抗体をスクリーニングする方法の中で、一定量以上の抗原および／または抗IgG抗体と結合した細胞を選別する工程は、上記の標識物質を検出することにより行なわれることが好ましい。例えば、抗原および／または抗IgG抗体がそれぞれ異なる種類の蛍光化合物で標識されている場合、細胞に一定量以上の抗原および／または抗IgG抗体が結合しているかどうかは、それぞれの蛍光化合物が発する蛍光が一定量以上の強度で検出されるかどうかで評価することができる。一定量は当業者が目的に応じて任意に設定することができる。本発明において、当該選別する工程はFACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) を用いて行なわれることが好ましい。

30

#### 【0227】

本発明が提供する上記の抗体をスクリーニングする方法の中で、抗原と結合した細胞を濃縮する工程は、上記の標識物質を検出することにより行なわれることが好ましい。例えば、抗原が磁性粒子で標識されている場合、抗原に結合している細胞と結合していない細胞は磁石装置を用いて分離することができ、抗原に結合していない細胞を除去することで、抗原に結合している細胞を濃縮することができる。本発明において、当該濃縮する工程はMACS (Magnetic Activated Cell Sorting、登録商標) を用いて行なわれることが好ましい。

40

#### 【0228】

本発明が提供する上記の抗体をスクリーニングする方法を用いることによって、多数の抗体産生細胞の中から、条件に応じて抗原結合活性が変化する抗体を簡便かつ効率的にスクリーニングすることが可能となる。従来の方法に比べてスクリーニング可能な細胞の数を大幅に増やすことができるため、これまでは見出すことができなかった稀少な抗体を見出すことのできる確率が大幅に高くなり、本発明が提供する上記の抗体をスクリーニングする方法は有用である。

#### 【0229】

また本発明は、本発明の抗原結合分子を投与することにより、血漿中の抗原濃度を低下

50

させる方法、抗原の細胞内への取込みを促進する方法、または生体における抗原の生理活性を低減する方法を提供する。

#### 【0230】

また本発明は、本発明の抗原結合分子を有効成分として含有する、疾患治療剤を提供する。疾患としては、例えば上述のHMGB1が病因の一つと考えられる疾患、CTGFが病因の一つと考えられる疾患、またはIgEが病因の一つと考えられる疾患が挙げられる。

また本発明は、本発明の抗原結合分子を含む、血漿中の抗原濃度を低下させる方法、抗原の細胞内への取込みを促進する方法、または生体における抗原の生理活性を低減する方法に用いるためのキットを提供する。

10

さらに本発明は、本発明の抗原結合分子を投与する工程を含む、生理活性を有する抗原が原因の1つと考えられる疾患を治療する方法、血漿中の抗原濃度を低下させる方法、抗原の細胞内への取込みを促進する方法、または生体における抗原の生理活性を低減する方法を提供する。

また本発明は、本発明の抗原結合分子を有効成分として含む、生理活性を有する抗原が原因の1つと考えられる疾患の治療剤、血漿中の抗原濃度低下剤、抗原の細胞内への取込み促進剤、または生体における抗原の生理活性低減剤を提供する。

また本発明は、生理活性を有する抗原が原因の1つと考えられる疾患を治療する方法、血漿中の抗原濃度を低下させる方法、抗原の細胞内への取込みを促進する方法、または生体における抗原の生理活性を低減する方法において使用するための、本発明の抗原結合分子を提供する。

20

また本発明は、生理活性を有する抗原が原因の1つと考えられる疾患の治療剤、血漿中の抗原濃度低下剤、抗原の細胞内への取込み促進剤、または生体における抗原の生理活性低減剤の製造における、本発明の抗原結合分子の使用を提供する。

また本発明は、本発明の抗原結合分子を使用する段階を含む、生理活性を有する抗原が原因の1つと考えられる疾患の治療剤、血漿中の抗原濃度低下剤、抗原の細胞内への取込み促進剤、または生体における抗原の生理活性低減剤を製造するためのプロセスを提供する。疾患としては、例えばHMGB1が病因の一つと考えられる疾患、CTGFが病因の一つと考えられる疾患、またはIgEが病因の一つと考えられる疾患が挙げられる。

#### 【0231】

30

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。

#### 【0232】

なお本明細書において引用された全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】

#### 【0233】

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。

40

#### 【0234】

〔実施例1〕 ウサギB cellクローニング法による抗HMGB1抗体の作製

#### HMGB1の調製

抗原であるHMGB1は以下のように調製された。ヒトHMGB1（GenBankアクセッション番号P002119、配列番号：7）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全長のヒトHMGB1蛋白質を発現させた。得られた培養上清から陽イオン交換カラムクロマトグラフィー、陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーを用いてHMGB1タンパク質を精製した。

50

## 【0235】

抗原による動物の免疫化

ウサギをHMGB1で免疫化した。免疫化は、初回、完全フロイントアジュバント（CFA）に含ませたHMGB1タンパク質を皮内に100  $\mu$ g注射した。その後、HMGB1タンパク質を各回50  $\mu$ gずつ1週間以上の間隔を空けて、不完全フロイントアジュバント（IFA）に含ませて2回以上の追加免疫を行った。抗体力価を測定し、動物個体内で抗体が産生されていることを確認した。

## 【0236】

免疫化動物からの組織採取および単一細胞懸濁液の調製

抗体産生が確認された個体を安楽死処置し、脾臓、リンパ節、血液を取得した。血液からは末梢血単核球（PBMCs）を調製した。50 mLの遠沈管に入ったHistopaque-1077（Sigma）の上に、Histopaque-1077と等量の血液を注意深く載せ、25℃で30分間400×gで遠心分離した。遠心分離した後、ガラス製パストールピペットを用いてPBMC層を注意深く回収し、無菌50 mLチューブに注いだ。回収した細胞懸濁液の約10倍程度の量の2% FBS を含むRPMI-1640を加え、1000×gで5分間遠心分離して上清を除くことにより細胞を洗浄した。再度、同様の洗浄操作を行い、PBMCsを調製した。PBMCsはトリパンブルー染色を行い、血球計算板で細胞密度を決定した。

## 【0237】

脾臓およびリンパ節は採取後、5 mLシリンジのプランジャーを用いて70  $\mu$ mのセルストレーナー（BD Falcon）を通して処理することで、単一細胞懸濁液を作製した。2% FBSを含むRPMI培地で細胞を無菌50 mLチューブに回収した。1000×gで5分間 遠心分離して上清を除くことにより細胞を洗浄した。再度、2% FBS を含むRPMI-1640を50mL加えて洗浄操作を行った。最後の洗浄後、トリパンブルー染色を行い、血球計算板で細胞密度を決定した。

## 【0238】

抗原結合性B細胞の回収

前述の方法で調製した血液、脾臓、リンパ節の単一細胞懸濁液は、1000×gで5分間 遠心分離することによりHBSS（20 mM HEPES, 5.3 mM KCl, 0.4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4.2 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 0.3 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.1% BSA, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM Glucose, 138 mM NaCl, pH7.4）で細胞を2回洗浄した。HBSSでビオチン化ヒトHMGB1を500 nMに希釈した溶液を準備し、1E08細胞/100  $\mu$ L以下の密度になるように細胞に添加し、細胞を懸濁した。ビオチン化HMGB1はHMGB1タンパク質をEZ-Link NHS-PEG4-Biotin and Biotinylation Kit（Thermo Scientific）を用いて添付のプロトコールに従ってラベルした後、微量透析器（TOMY）を使ってTBS 300mM NaCl（10mM Tris-HCl, 300mM NaCl）で透析することで作製した。細胞懸濁液は、氷上で30分間インキュベートした。その後、50 mLのHBSSで洗浄して、細胞に結合していないビオチン化HMGB1を除去した。MACS（登録商標）ストレプトアビジンビーズ（Miltenyi Biot ech）をHBSSで10倍希釈した溶液を準備し、1E08細胞/500  $\mu$ L以下の密度になるように細胞に加え、懸濁した。細胞懸濁液は氷上で30分間インキュベートした。50 mLのHBSSで洗浄した後、1E08細胞/500  $\mu$ L以下の密度になるようにHBSSを細胞に加え、懸濁した。細胞懸濁液はautoMACS Pro Separatorを用いてMACSストレプトアビジンビーズが結合している陽性細胞画分を回収した。

## 【0239】

回収した細胞は、再度ビオチン化HMGB1をHBSSで希釈した溶液を準備し、1E08細胞/100  $\mu$ L以下の密度になるように細胞に添加し、細胞を懸濁した。細胞懸濁液は、氷上で30分間インキュベートした。その後、50 mLのHBSSで洗浄した。このビオチン化ヒトHMGB1との再度のインキュベーションは行わない場合もある。Streptavidin-FITC（BD）とMouse anti-rabbit IgG-PE（Southern Biotech）をHBSSで希釈した溶液を準備し、1E08細胞/100  $\mu$ L以下の密度になるように細胞に添加し、細胞を懸濁した。細胞懸濁液は、氷上で30分間インキュベートした。その後、50 mLのHBSSで洗浄した。その後、1E07細胞/100  $\mu$ L以下の密度になるようにHBSSを細胞に加え、懸濁した。細胞懸濁液はFACS Aria（BD）を用いて、FIT

CとPEの蛍光値がどちらも高い画分の細胞を回収した。

#### 【0240】

pHもしくは $\text{Ca}^{2+}$ イオン濃度の変化により解離能が変化する抗原結合性抗体発現B細胞の回収

pHもしくは $\text{Ca}^{2+}$ イオン濃度の変化により解離能が変化する抗体を発現するB細胞を濃縮して回収する方法を以下のように実施した。調製後の血液、脾臓、リンパ節の単一細胞懸濁液は、 $1000\times g$ で5分間遠心分離することによりHBSS (20 mM HEPES, 5.3 mM KCl, 0.4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4.2 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 0.3 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.1% BSA, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM Glucose, 138 mM NaCl, pH7.4)で細胞を2回洗浄した。HBSSでビオチン化HMGB1を500 nMに希釈した溶液を準備し、 $1\text{E}08$ 細胞/ $100\ \mu\text{L}$ 以下の密度になるように細胞に添加し、細胞を懸濁した。細胞懸濁液は、氷上で30分間インキュベートした。その後、50mLのHBSSで洗浄して、細胞に結合していないビオチン化HMGB1を除去した。MACSストレプトアビジンビーズ (Miltenyi Biotec) をHBSSで10倍希釈した溶液を準備し、 $1\text{E}08$ 細胞/ $500\ \mu\text{L}$ 以下の密度になるように細胞に加え、懸濁した。細胞懸濁液は氷上で30分間インキュベートした。50mLのHBSSで洗浄した後、 $1\text{E}08$ 細胞/ $500\ \mu\text{L}$ 以下の密度になるようにHBSSを細胞に加え、懸濁した。細胞懸濁液はautoMACS Pro Separatorを用いてMACSストレプトアビジンビーズが結合している陽性細胞画分を回収した。

10

#### 【0241】

回収した細胞は、再度HBSSでビオチン化HMGB1を500 nMに希釈した溶液を準備し、 $1\text{E}08$ 細胞/ $100\ \mu\text{L}$ 以下の密度になるように細胞に添加し、細胞を懸濁した。細胞懸濁液は、氷上で30分間インキュベートした。その後、50 mLのHBSSで洗浄した。Streptavidin-FITC (BD) とMouse anti-rabbit IgG-PE (Southern Biotech)をHBSSで希釈した溶液を準備し、 $1\text{E}08$ 細胞/ $100\ \mu\text{L}$ 以下の密度になるように細胞に添加し、細胞を懸濁した。細胞懸濁液は、氷上で30分間インキュベートした。その後、50 mLのHBSSで洗浄した。その後、 $1\text{E}07$ 細胞/ $100\ \mu\text{L}$ 以下の密度になるようにHBSSを細胞に加え、懸濁した。細胞懸濁液はFACS Aria (BD)を用いて、FITCとPEの蛍光値がどちらも高い画分にゲートをかけ、細胞を回収した。回収の際、回収用チューブにMBSS(20mM MES, 5.3mM KCl, 0.4mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4.2mM  $\text{NaHCO}_3$ , 0.3mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.1% BSA, 2mM EDTA, 5mM Glucose, 138mM NaCl, pH5.8)を入れておいた。その後、MBSSの溶液で30分間放置した。pH低下もしくは $\text{Ca}^{2+}$ イオン濃度低下により抗原が解離しやすい抗体の場合、MBSSの低pHおよびEDTA存在下で放置することにより、抗原が解離し、FITCの蛍光値が低下する。30分間放置した後、再度、FACS Ariaを用いて、PEの蛍光値は1回目のSortingと同じであるが、FITCの蛍光値は1回目の蛍光値より低くなった細胞集団にゲートをかけ細胞を回収した。結果を図1に示す。(A)は1回目のSortingのdot plotsの結果を示す。1で示すゲートの細胞を回収した。(B)は2回目のSortingを行った際のdot plotsの結果を示す。2回目のSortingではゲート1, 2, 3に分けて回収した。

20

30

#### 【0242】

この細胞回収法を実施することで、その後のpHもしくは $\text{Ca}^{2+}$ イオン濃度の変化により解離能が変化する抗体のスクリーニングの規模を拡大する必要がなく、pHもしくは $\text{Ca}^{2+}$ イオン濃度の変化により解離能が変化する抗体を効率よく取得できる。

#### 【0243】

B細胞の培養

回収した細胞をウェル当たり1細胞以下になるように96ウェルマイクロタイタープレートに播種した。最終濃度で5%となるように活性化ウサギT細胞馴化培地と、EL4細胞(European Collection of Cell Cultures)をウェル当たり約25000細胞となるように添加した。活性化ウサギT細胞馴化培地は、ウサギから採取した胸腺を5mLシリンジのプランジャーを用いて70  $\mu\text{m}$ のセルストレーナー (BD Falcon)を通して処理して得られた細胞を、PHA (Roche)、phorbol 12-myristate 13-acetate (Sigma)と2% FBSを含むRPMI-1640で培養し、培養上清を-70℃以下で凍結しておいたものである。EL4細胞はフィーダー細胞として使うために、細胞増殖を止める目的でMytomycin C (Sigma)を10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように加え、37℃、 $\text{CO}_2$  5%で2時間以上培養しておいたものを用いる。これらの培養物を37℃、 $\text{CO}_2$  5

40

50

%の条件で5～7日間放置した後に、分泌抗体を含有する上清を一部収集した。収集した上清を用いて、下記の方法で抗体のHMGB1結合性を評価した。細胞は、抗体のHMGB1結合性を評価するまで37℃ CO<sub>2</sub> 5%の条件で放置した。

#### 【0244】

所望の特異性を有するモノクローナル抗体についての培養上清でのスクリーニング

抗体の抗原認識についてELISA法でスクリーニングした。ストレプトアビジンでコーティングした384wellプレートを準備し、ビオチン化HMGB1を捕捉した。そのプレートに分泌抗体を含有する上清をアプライした。室温で1時間放置した後、2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.05% Tween-20を含むTBS (TAKARA) 80 μLで3回洗浄後、2 mM CaCl<sub>2</sub>を含むTBS でGoat anti-rabbit IgG Fc HRP conjugate (BETHYL) を40,000倍希釈した希釈液を分注し、室温で1時間放置した。2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.05% Tween-20を含むTBS (pH7.4) 80 μLで3回洗浄し、発色基質(ABTS peroxidase substrate(KPL))を40 μL/wellで加えた。1時間インキュベート後にMolecular Device社製SpectraMaxにて405 nmの吸光度を測定した。405 nmの吸光度の測定結果を解析し、分泌抗体がHMGB1タンパク質を認識していると考えられるウェルを判定した。

#### 【0245】

pHもしくはCa<sup>2+</sup>イオン濃度の変化により解離能が変化する抗体のスクリーニング

培養上清を使って、pH/Ca依存性の解離があるかどうかを評価するためのELISAを実施した。384wellのMAXISorp (Nunc)に1 μg/mLになるようにPBS(-)で希釈したGoat anti-rabbit IgG-Fc (BETHYL)を加え、室温で1時間以上放置した。その後、プレート中のPBS(-)で希釈したGoat anti-rabbit IgG-Fcを除き、1% BSA, 2 mM CaCl<sub>2</sub>を含むTBS (pH7.4)を加えて1時間以上放置した。1% BSA, 2 mM CaCl<sub>2</sub>を含むTBS (pH7.4)をプレートから除き、培養上清を加えた。その際、pHもしくはCa<sup>2+</sup>イオン濃度変化により解離能が変化する抗体の評価では、B細胞の培養上清1種類につき、ELISAプレートには2ウェル分の培養上清を加えた。培養上清を加えて室温で1時間以上、もしくは4℃で一晩放置することで、培養上清中の抗体をGoat anti-rabbit IgG-Fcでトラップした。その後、2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.05% Tween-20を含むTBS(pH7.4) 80 μLで3回洗浄し、ビオチン化HMGB1を加えて室温で1時間以上放置した。それによりGoat anti-rabbit IgG-Fcにトラップされたウサギ抗体とビオチン化HMGB1が結合した。2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.05% Tween-20を含むTBS (pH7.4) 80 μLで3回洗浄し、ウサギ抗体と結合しなかったビオチン化HMGB1を洗い流した。その後、前述の同一培養上清を加えた2ウェルのうちの1ウェルには20 mM MES, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH7.4(Buffer A)を加え、残りの1ウェルには20 mM MES, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH5.8 (Buffer B)を加え、37℃以下で1時間以上放置した。Buffer AおよびBuffer Bを加えている間は、ビオチン化ヒトHMGB1がウサギ抗体から解離していくが、抗体の特性によりpHが低いと抗原が解離しやすい場合、もしくは抗原と抗体の結合の維持にCa<sup>2+</sup>イオンが必要な場合に、Buffer Aを加えたウェルよりBuffer Bを加えたウェルの方が、抗原が抗体からはがれやすくなった。2mM CaCl<sub>2</sub>, 0.05% Tween-20を含むTBS (pH7.4) 80 μLで3回洗浄後、2 mM CaCl<sub>2</sub>を含むTBS で調製した25 ng/mLのStreptavidine-HRP (Genscript)を加え、室温で1時間放置した。Streptavidine-HRPは抗体から解離せずに残っていたビオチン化HMGB1に結合した。2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.05% Tween-20を含むTBS (pH7.4) 80 μLで3回洗浄し、発色基質(ABTS peroxidase substrate)を加えた。1時間インキュベート後にMolecular Device社製SpectraMaxにて405 nmの吸光度を測定した。405 nmの吸光度の測定結果を解析し、Buffer Aを加えたウェルがBuffer Bを加えたウェルより強く発色している培養上清中にある抗体が、pHもしくはCa<sup>2+</sup>イオン濃度の変化により解離能が変化する抗体と考えられた。

#### 【0246】

このELISA系には2つの特徴がある。一つはB細胞の培養上清1種類につき、ELISAプレートには2ウェル分の培養上清を準備し、抗原と抗体を結合させた後、一方をpH7.0前後かそれ以上の高いpHでかつCa<sup>2+</sup>イオン1 mM程度かそれ以上存在する条件にし、もう一方をpH6.0前後かそれ以下の低いpHでかつCa<sup>2+</sup>イオン濃度を低くする条件で抗原と抗体の解離のインキュベーションを行う点である。このインキュベーションのステップを入れることで効率よくpHもしくはCa<sup>2+</sup>イオン濃度の変化により解離能が変化する抗体をスクリーニングで

きる。もう一つの特徴は、培養上清中のウサギ抗体をGoat anti-rabbit IgG-Fcでトラップし、そこに抗原を結合させることである。抗原をプレートに結合させた後にウサギ抗体を反応させる場合、抗体の2本の腕でそれぞれプレートに固相化した抗原に結合するため強い結合反応が起こり、pH/Ca依存性の解離を示す抗体であっても抗体が解離しにくくなり、強い依存性を示すものしか取得できない。しかしながら、培養上清中のウサギ抗体をGoat anti-rabbit IgG-Fcでトラップし、そこに抗原を結合させることによって、抗原と抗体の結合が1価で起こりやすくなる。そのため、pHもしくは $\text{Ca}^{2+}$ イオン濃度の変化による解離能の変化が弱い場合においてもpH/Ca依存性があるかどうかの判定が可能になる。

#### 【0247】

結果を図2および図3に示す。図2はpHもしくは $\text{Ca}^{2+}$ イオン濃度変化により解離能が変化する抗体のスクリーニングの結果のドットプロットである。Y軸は20mM MES, 150mM NaCl, 2mM  $\text{CaCl}_2$ , pH7.4でのインキュベーションを行った条件でのOD (405nm)の値である。X軸は20mM MES, 150mM NaCl, 2mM EDTA, pH5.8でのインキュベーションを行った条件でのOD (405nm)の値である。(A)は図1(B)のゲート1由来のB細胞を培養し、pH変化もしくは $\text{Ca}^{2+}$ イオン濃度変化により解離能が変化する抗体のスクリーニングを行った結果である。(B)は図1(B)のゲート2由来のB細胞を培養し、pH変化もしくは $\text{Ca}^{2+}$ イオン濃度変化により解離能が変化する抗体のスクリーニングを行った結果である。(C)は図1(B)のゲート3由来のB細胞を培養し、pH変化もしくは $\text{Ca}^{2+}$ イオン濃度変化により解離能が変化する抗体のスクリーニングを行った結果である。pH5.8、2mM EDTA存在下でのインキュベーションにおいて、pH7.4、2mM  $\text{Ca}^{2+}$ 存在下でのインキュベーションに比べて抗体と抗原が解離しやすい抗体を○で示す。pH 5.8、2mM EDTAを含む条件とpH7.4、2mM  $\text{Ca}^{2+}$ を含む条件で値に大きな変化がなかったものを□で示す。図3は図2(A)(B)(C)におけるクローン数をグラフ化したものである。灰色部分はpH変化もしくは $\text{Ca}^{2+}$ イオン濃度変化があっても抗体と抗原の解離に変化が認められないクローン((A)(B)(C)において□で示したもの)の数を、黒色部分はpHが低下した場合もしくは $\text{Ca}^{2+}$ イオン濃度が下がった場合に抗体と抗原の解離が起こりやすくなるクローン((A)(B)(C)において○で示したもの)の数を表わす。抗原結合性B細胞の回収においては、(A)の結果と同様に、抗原結合性抗体に占めるpHもしくは $\text{Ca}^{2+}$ イオン濃度変化により解離能が変化する抗原結合性抗体の割合は多くても数%程度である。一方、pHもしくは $\text{Ca}^{2+}$ イオン濃度変化により解離能が変化する抗体を発現するB細胞を濃縮して回収することにより(C)の結果のように、抗原結合性抗体に占めるpHもしくは $\text{Ca}^{2+}$ イオン濃度変化により解離能が変化する抗原結合性抗体の割合を数十%まで上げることが可能である。この回収法を用いることにより、pHもしくは $\text{Ca}^{2+}$ イオン濃度変化により解離能が変化してかつ生理活性を有するような非常にまれな抗体を効率よく取得することができる。

#### 【0248】

##### B細胞可変領域L鎖およびH鎖配列の同定ならびに組換え抗体の発現

37℃、 $\text{CO}_2$  5%の条件でインキュベーションしておいた細胞培養プレートから、所望の特異性を有するモノクローナル抗体のスクリーニング結果、またはpHもしくは $\text{Ca}^{2+}$ イオン濃度の変化により解離能が変化する抗体のスクリーニング結果を指標に、細胞および培養上清をMS2000 (J-Tek)により新しい96ウェルプレートに回収した。回収した細胞および培養上清が入っているプレートから、培養上清のみを別の96ウェルプレートに移した。一方、MS2000で回収した細胞が残っているプレートは-70℃以下で凍結保存した。-70℃に保存しておいた細胞から抗体のcDNAを取得し、抗体発現ベクターを作製した。cDNAを取得する際のPCR反応のプライマーは、ウサギ免疫グロブリン配列の保存された領域(H領域およびL領域)にアニールするように設計した。2段階方式のネステッドPCR法による回収工程を用いて抗体のcDNAを獲得した。RNA精製はMagMax 96 RNA purification kit for microarray (Ambion)で行った。精製されたRNAを用いて、OneStep RT-PCR kit (TAKARA)により逆転写、およびfirst PCRを行なった。用いたプライマー配列を表11に示す。その後First PCR産物に対しPrimeSTAR HS (TAKARA)によるネステッドPCRを行った。PCRに用いたプライマー配列を表11に示す。表におけるRはAとGの混合塩基、VはA、C、Gの混合塩基、W

はAと Tの混合塩基、 YはCとTの混合塩基を表す。

【0249】

【表11】

|               |    |         |       |                                    |
|---------------|----|---------|-------|------------------------------------|
| first<br>PCR  | H鎖 | Forward | AS215 | AGRACCCAGCATGGACAYVA (配列番号：8)      |
|               |    | Reverse | AS217 | GGAYRGWATTTATTYGCCACRCACA (配列番号：9) |
|               | L鎖 | Forward | AS219 | AGACRCTCACCATGGAGACT (配列番号：10)     |
|               |    | Reverse | AS221 | ACTGGCTCCGGGAGGTA (配列番号：11)        |
| nested<br>PCR | H鎖 | Forward | AS365 | CACCATGGAGACTGGGC (配列番号：12)        |
|               |    | Reverse | AS368 | GGAGGAGACGGTGAC (配列番号：13)          |
|               | L鎖 | Forward | AS359 | ATGGACACGAGGGCCC (配列番号：14)         |
|               |    | Reverse | AS362 | TTTGACCACCACCTCGGTC (配列番号：15)      |

【0250】

動物細胞発現ベクターに抗体定常領域の配列を導入したカセットベクターを作製し、抗体発現ベクターの作製はそのカセットベクターを用いて行なった。カセットベクターとしてはウサギ抗体H鎖定常領域配列をもつベクター、ウサギ抗体L鎖定常領域配列をもつベクターの2種類を作製した。H鎖定常領域配列をもつベクターにはアンピシリン耐性遺伝子が挿入されている。また、L鎖定常領域配列をもつベクターにはカナマイシン耐性遺伝子が挿入されている。この2種類のベクターはネステッド PCRのプライマー配列と一部重複した配列を保持しており、In-Fusion PCR cloning kit (Clontech) を用いることにより、ネステッドPCR産物が抗体定常領域の配列を導入したカセットベクターに組み込まれ、全長のウサギ抗体遺伝子を有する発現ベクターが作製される。ネステッドPCR産物はClontech社製In-Fusion PCR cloning kitを用いてベクターに挿入した。その後、プラスミドの伝播および産生のために細菌の中に形質転換した。形質転換された細菌はアンピシリンもしくはカナマイシンを含むLB培地で培養し、増殖した細菌から96well EndoFree ezFilter Plasmid Miniprep Kit (Biomiga)でプラスミドを精製したのち、参考実施例1に従って抗体を取得した。

【0251】

〔実施例2〕 抗HMGB1抗体のアフィニティーおよびpH/Ca依存性の測定

MedG4-IgG1抗体の作製

W02007/084253 に記載されているG4抗体のVH領域 (W02007/084253配列番号：19) およびVL領域 (W02007/084253配列番号：17) に、それぞれヒトIgG1定常領域およびヒトIgκ定常領域を連結することによりMedG4H-IgG1 (配列番号：36) およびMedG4L-CK (配列番号：37) をデザインした。これらをコードするDNAを遺伝子工学的手法を用いて作製し、当業者に公知の方法により動物細胞において発現させることにより、抗HMGB1抗体であるMedG4-IgG1を作製した。

【0252】

取得された抗体のヒトHMGB1に対するpH及びpH/Ca依存的結合能の評価

取得された抗体について、pH及びpH/Ca依存的結合能があるかどうかを判断するため、BiacoreT100及びT200 (GE Healthcare)を用いて評価した。血漿中条件として、pH7.4、カルシウムイオン濃度1.2 mMを設定した。エンドソーム内条件としては、pH5.8、カルシウムイオン濃度1.2 mMおよびpH5.8、カルシウムイオン濃度3 μMの2条件を設定した。Sensor chip CM4 (GE Healthcare)上にアミンカップリング法でprotein A (Invitrogen) を適量固定化し、そこへ目的の抗体をキャプチャーさせた。抗原は、ヒトHMGB1を用いた。3種類のランニングバッファー (1; 20 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05%(w/v) Tween20、2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>、pH7.4、2; 20 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05%(w/v) Tween20、2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>、pH5.8、3; 20 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05%(w/v) Tween20、3 μmol/L CaCl<sub>2</sub>、pH5.8) を用いて測定した。ヒトHMGB1の希釈にはそれぞれのランニングバッファーを使用した。

10

20

30

40

50

## 【0253】

HMG233-IgG1、HMG236-IgG1、HMG481-IgG1、HMG487-IgG1

ランニングバッファーで希釈した抗体を流速10  $\mu\text{L}/\text{min}$ で1分間インジェクトし、センサーチップにキャプチャーさせた。その後、ヒトHMGB1希釈液（500 nM）とランニングバッファー（参照溶液として）を流速10  $\mu\text{L}/\text{min}$ で1分間インジェクトして、キャプチャーさせた抗体に相互作用させ、さらに流速10  $\mu\text{L}/\text{min}$ で1分間ランニングバッファーを流してヒトHMGB1の解離を観察した。最後に、10 mmol/L Glycine-HCl, pH1.5を流速30  $\mu\text{L}/\text{min}$ で30秒間インジェクトし、センサーチップを再生した。

## 【0254】

測定で得られたセンサーグラムを図4-1から4-2に示した。各抗体のキャプチャー量を100 RUに換算してある。いずれの抗体も、すぐに平衡状態に達する箱型のセンサーグラムであるため、ヒトHMGB1をインジェクトしている間の平衡値（＝結合量）が解離定数KD(M)を反映している。HMG233-IgG1及びHMG236-IgG1は、pH7.4, 1.2 mM Ca、pH5.8, 1.2 mM Ca条件時と比べて、pH5.8, 3  $\mu\text{M}$  Ca条件時のヒトHMGB1の各抗体に対する結合量が著しく低下した。HMG481-IgG1及びHMG487-IgG1では、pH7.4, 1.2mM Ca条件時と比べて、pH5.8, 1.2mM Ca、pH5.8, 3  $\mu\text{M}$  Ca条件時のヒトHMGB1の各抗体に対する結合量が著しく低下した。

10

## 【0255】

HMG446-IgG1, MedG4-IgG1

HMG446-IgG1, MedG4-IgG1に関しては、ランニングバッファーで希釈した抗体を流速10  $\mu\text{L}/\text{min}$ で1分間インジェクトし、センサーチップにキャプチャーさせた後、ヒトHMGB1希釈液とランニングバッファー（参照溶液として）を流速10  $\mu\text{L}/\text{min}$ で1分間インジェクトして、キャプチャーさせた抗体に相互作用させた。その後、流速10  $\mu\text{L}/\text{min}$ で2分間ランニングバッファーを流してヒトHMGB1の解離を観察した。最後に、10 mmol/L Glycine-HCl, pH 1.5を流速30  $\mu\text{L}/\text{min}$ で30秒間インジェクトし、センサーチップを再生した。

20

## 【0256】

MedG4-IgG1については、測定で得られたセンサーグラムをカーブフィッティングにより解析した。反応モデル式は1:1 binding modelを採用した。カインेटイ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HMGB1に対する解離定数KD (M) を算出した。HMG446-IgG1については、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KD (M) を算出した。各パラメーターの算出には Biacore T200 Evaluation Software (GE Healthcare)を用いた。また、pH5.8, 1.2 mM CaのKD (M)をpH7.4, 1.2 mM CaのKD (M)で割ることでpH依存性を、pH5.8, 3  $\mu\text{M}$  CaのKD (M)をpH7.4, 1.2 mMのKD (M)で割ることでpH/Ca依存性を求めた。

30

## 【0257】

解析の結果を表12にまとめた。HMG446-IgG1は、pH7.4, 1.2 mM CaにおけるKD(M)は220 nMと算出された。pH7.4, 1.2 mM CaからpH5.8, 1.2 mM CaにすることでヒトHMGB1に対するKD(M)が50倍上昇（50倍アフィニティーが低減）し、pH5.8, 3  $\mu\text{M}$  Caにすることで82倍上昇（82倍アフィニティーが低減）し、血清中条件下よりもエンドソーム内条件下において、ヒトHMGB1に対するアフィニティーが低下することが示された。一方、MedG4-IgG1では、pH7.4, 1.2 mM CaにおけるKD(M)は96 nM、pH5.8, 1.2 mM Ca及び3  $\mu\text{M}$  Caでは15 nMと算出された。血清中条件下よりもエンドソーム内条件下においてヒトHMGB1に対するアフィニティーが増加することが示され、MedG4-IgG1がエンドソーム内においてHMGB1を解離しにくいことが示唆された。

40

## 【0258】

【表 1 2】

| 抗体名    | 条件               | K <sub>D</sub> (M) | 依存性   |            |
|--------|------------------|--------------------|-------|------------|
| MedG4  | pH7.4, 1.2 mM Ca | 96 nM              |       |            |
|        | pH5.8, 1.2 mM Ca | 15 nM              | 0.15倍 | (pH依存性)    |
|        | pH5.8, 3 μM Ca   | 15 nM              | 0.15倍 | (pH/Ca依存性) |
| HMG446 | pH7.4, 1.2 mM Ca | 220 nM             |       |            |
|        | pH5.8, 1.2 mM Ca | 1.1 μM             | 50倍   | (pH依存性)    |
|        | pH5.8, 3 μM Ca   | 1.8 μM             | 82倍   | (pH/Ca依存性) |

## 【 0 2 5 9 】

〔実施例 3〕 HMGB1と細胞表面受容体との結合評価

10

#### ELISAによるHMGB1のRAGE-Fcへの結合

組換えヒトRAGE-Fc融合タンパク質 (R&D SYSTEMS) の5 μg/ml PBS溶液を、20 μl/ウェルでELISAプレートの各ウェルに加え、4℃で一晩インキュベートした。次いでプレートを、5%スキムミルク100 μlで、37℃で1時間ブロックし、PBS/Tweenで4回洗浄した。別のプレートで4 μg/mLのHMGB1と、100 μg/mLの抗HMGB1抗体またはバッファーとともに室温、2.5%スキムミルク存在下で1時間プレインキュベートし、次いでブロッキング処理したRAGEでコーティングしたプレートに移した。次いで、プレートを4℃で一晩インキュベートし、PBS/Tweenで4回洗浄した。固定化したRAGE-Fcに結合しているHMGB1を検出するために、ペルオキシダーゼ標識マウス抗HMGB1モノクローナル抗体を各ウェルに加え、プレートを室温で2時間インキュベートした。次いで、プレートを5回洗浄し、TMB発色剤20 μlを加え、プレートの450 nmにおける吸光度を測定した。

20

## 【 0 2 6 0 】

抗HMGB1抗体が、検出に用いたペルオキシダーゼ標識マウス抗HMGB1モノクローナル抗体とHMGB1との結合を阻害しないことを、HMGB1を固相化したプレートにおいて抗HMGB1抗体とペルオキシダーゼ標識マウス抗HMGB1モノクローナル抗体を競合させることで確認した。

## 【 0 2 6 1 】

#### ELISAによるHMGB1のTLR4/MD-2への結合

組換えヒトTLR4/MD-2タンパク質 (R&D SYSTEMS) の5 μg/ml PBS溶液を、20 μl/ウェルでELISAプレートの各ウェルに加え、4℃で一晩インキュベートした。次いでプレートを5%スキムミルク100 μlで、37℃で1時間ブロックし、PBS/Tweenで4回洗浄した。別のプレートで10 μg/mLのHMGB1と、100 μg/mLの抗HMGB1抗体またはバッファーとともに室温、2.5%スキムミルク存在下で1時間プレインキュベートし、次いでブロッキング処理したTLR4/MD-2でコーティングしたプレートに移した。次いで、プレートを室温で2時間インキュベートし、PBS/Tweenで4回洗浄した。固定化したTLR4/MD-2に結合しているHMGB1を検出するために、各1 μg/mlのペルオキシダーゼ標識マウス抗HMGB1モノクローナル抗体を各ウェルに加え、プレートを室温で2時間インキュベートした。次いで、プレートをPBS/Tweenで5回洗浄し、TMB発色剤20 μlを加え、プレートの450 nmにおける吸光度を測定した。

30

## 【 0 2 6 2 】

抗HMGB1抗体が、検出に用いたペルオキシダーゼ標識マウス抗HMGB1モノクローナル抗体とHMGB1との結合を阻害しないことを、HMGB1を固相化したプレートにおいて抗HMGB1抗体とペルオキシダーゼ標識マウス抗HMGB1モノクローナル抗体を競合させることで確認した。

40

## 【 0 2 6 3 】

#### 結果

RAGEおよびTLR4の両方が、HMGB1に対する推定上の受容体として同定されている。いくつかの抗HMGB1抗体がRAGE-Fc融合物あるいはTLR4/MD-2融合物とHMGB1との結合を阻害する能力についてELISAアッセイで評価した。

RAGE、TLR4それぞれについて抗HMGB1抗体非添加条件の測定値を100として、各抗HMGB1抗体添加条件の測定値を相対値として求め図 5 および図 6 に示し、100より低い値を示す

50

抗HMGB1抗体は各受容体への結合を阻害する能力を有すると判断した。RAGE ELISAに供した抗体のうちHMG233-IgG1、HMG236-IgG1はHMGB1のRAGEへの結合を阻害した。阻害率はHMG233-IgG1で53.1%、HMG236-IgG1で64.1%であった。TLR4/MD-2 ELISAに供した抗体のうちHMG481-IgG1、HMG487-IgG1、HMG446-IgG1はHMGB1のTLR4/MD-2への結合を阻害した。阻害率はHMG481-IgG1で93.5%、HMG487-IgG1で75.7%、HMG446-IgG1で81.3%であった。HMG233-IgG1とHMG236-IgG1はHMGB1とTLR4/MD-2との結合を阻害しなかった。また、HMG481-IgG1、HMG487-IgG1、HMG446-IgG1はHMGB1とRAGEとの結合を阻害しなかった。

#### 【0264】

抗HMGB1抗体のうち、ある抗体はHMGB1とRAGEとの結合を阻害するがTLR4との結合を阻害しないことを実証した。ある抗体はHMGB1とTLR4/MD-2との結合を阻害するがRAGEとの結合を阻害しないことを実証した。

#### 【0265】

〔実施例4〕 pH依存的抗ヒトHMGB1抗体のヒトHMGB1消失加速効果の向上検討

#### 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HMGB1および抗ヒトHMGB1抗体を同時投与した後のヒトHMGB1および抗ヒトHMGB1抗体の体内動態を評価した。ヒトHMGB1(0.1mg/mL)および抗ヒトHMGB1抗体 (MedG4-IgG1 1mg/mL、HMG446 2.05 mg/mL) の混合溶液を尾静脈に10mL/kgで単回投与した。この混合溶液中の抗体濃度は、混合溶液に含まれるヒトHMGB1の99.0%以上が抗体と結合する濃度として設定した。投与後5分、10分、15分、1時間、4時間、2日間、7日後の時点で採血を行った。採取した血液は2時間静置後4℃、12,000 rpmで5分間遠心分離し、血清を得た。分離した血清は、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。なお、本明細書において、MedG4-IgG1はmedG4と表記されることもある。また、HMG446-IgG1はHMG446-G1と表記されることもある。

#### 【0266】

#### ELISA法による血清中抗ヒトHMGB1抗体濃度測定

マウス血清中の抗ヒトHMGB1抗体濃度はELISA法にて測定した。まずAnti-Human IgG(γ-chain specific) F(ab')<sub>2</sub> Fragment of Antibody (SIGMA) をNunc-Immuno Plate, MaxiSorp (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。血清中濃度として3.2、1.6、0.8、0.4、0.2、0.1、0.05 μg/mLの検量線試料と100倍以上希釈したマウス血清測定試料を調製し、これら検量線試料および血清測定試料150 μLに2000ng/mLのヒトHMGB1を150 μL加え、室温で1時間静置した。その後Anti-Human 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Goat Anti-Human IgG (γ chain specific) Biotin (BIOT) Conjugate (Southern Biotech Association) 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450nmの吸光度を測定した。マウス血清中の抗ヒトHMGB1抗体濃度は検量線の吸光度から解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて算出した。この方法で測定した静脈内投与後のマウスにおける血清中抗ヒトHMGB1抗体濃度推移を図8に示す。

#### 【0267】

#### ELISA法による血清中ヒトHMGB1濃度測定

マウス血清中のヒトHMGB1濃度はHMGB1 ELISA kit II(shino-test)を用いて測定した。血清中濃度として12800、6400、3200、1600、800、400、200 μg/mLの検量線試料と100倍以上希釈したマウス血清測定試料を調製し、40 μg/mLのHMG446溶液(HMG446-IgG1もしくはHMG446-F1存在下)もしくは20 μg/mLのMedG4-IgG1溶液(MedG4-IgG1存在下)と等量混合後、室温で1時間インキュベートした。その後付属の固相化プレートに分注し37℃で20-24時間インキュベートした。その後付属の標識抗体液を25℃で2時間反応させ、さらに発色試薬で30分反応後、反応停止液を入れて反応を停止した。その後マイクロプレートリーダーにて450nmの吸光度を測定した。マウス血清中のヒトHMGB1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マウスにおける血清中ヒトHMGB1濃度推移を図7に示す。

#### 【0268】

##### ヒトHMGB1に対するpH/Ca依存的結合の効果

pH酸性または低カルシウムイオン濃度条件下でヒトHMGB1に対する結合活性が低下するHMG446-IgG1およびpH酸性または低カルシウムイオン濃度条件下でヒトHMGB1に対する結合活性が低下しないMedG4-IgG1をin vivoで試験し、それらの結果を比較した。図8に示すように、両抗体の薬物動態には線形性が認められた。一方、図7に示すように、ヒトHMGB1にpH依存的に結合するHMG446-IgG1と同時に投与したHMGB1は、MedG4-IgG1と同時に投与したHMGB1と比較してHMGB1の消失を加速させることが見出された。このように、pH依存的ヒトHMGB1結合能を付与することにより、投与1日後で血清中HMGB1濃度を、約4.0倍低下させることができることが示された。

10

#### 【0269】

##### 中性条件下 (pH7.4) におけるFcRn結合の効果

HMG446-IgG1の他に、HMG446-IgG1のIgG Fc領域にアミノ酸置換を導入することにより生じるHMG446-F1についてマウスを用いてin vivoで試験し、試験結果をHMG446-IgG1の結果と比較した。図8に示すように、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HMG446-F1での血清中抗体濃度は、投与15分後でHMG446-IgG1より約1.2倍低かった。

図7に示すように、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HMG446-F1と同時に投与したHMGB1は、HMG446-IgG1と同時に投与したHMGB1と比較して、HMGB1がより速やかに消失することが示された。HMG446-F1は、15分後でHMG446-IgG1と比較して血清中HMGB1濃度を約2.4倍低減させた。このように、中性条件下 (pH7.4) におけるマウスFcRn結合能を付与することにより、血清中ヒトHMGB1濃度を減少させることができることが判明した。先に記載したように、中性条件下 (pH7.4) におけるマウスFcRn結合能を付与することにより、血清中抗体濃度は減少した。しかしながら、抗体濃度の低下を上回る、血清中HMGB1濃度を低下させる効果が得られた。

20

#### 【0270】

以上の結果は、pH酸性または低カルシウムイオン濃度条件下でヒトHMGB1に対する結合活性が低下する抗体を投与することによって、pH酸性または低カルシウムイオン濃度条件下でヒトHMGB1に対する結合活性が低下しない抗体を投与した場合に比べ、ヒトHMGB1の消失を加速することができること、およびこの効果は中性条件下 (pH7.4) におけるマウスFcRn結合能によって増強されることを意味する。

30

#### 【0271】

〔実施例5〕 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バリエーションの作製

##### Fcバリエーションの作製

WO2009/125825に配列番号：6および配列番号：7として記載されているVH3-IgG1およびVL3-CKをそれぞれH鎖およびL鎖として含む抗体Fv4-IgG1に対して、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目的で様々な置換を導入した。具体的には、表13-1から13-14に示されるアミノ酸置換をFv4-IgG1の重鎖定常領域に導入してFcバリエーションを作製した（変異部位のアミノ酸番号は、EUナンバリングによる）。アミノ酸置換の導入は参考実施例1に記載の当業者公知の方法に従って実施した。

40

作製された重鎖およびWO2009/125825に配列番号：5として記載の軽鎖L(WT)を含むバリエーションを参考実施例1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。

#### 【0272】

##### ヒトFcRn結合の評価

中性条件下 (pH7.0) における抗体とヒトFcRnとの結合について、Biacoreによる解析を行なった。結果を表13-1から表13-14に示す。

#### 【0273】

50

【表 1 3 - 1】

| 変異体名 | KD (M)   | アミノ酸置換                        |
|------|----------|-------------------------------|
| F1   | 8.10E-07 | N434W                         |
| F2   | 3.20E-06 | M252Y/S254T/T256E             |
| F3   | 2.50E-06 | N434Y                         |
| F4   | 5.80E-06 | N434S                         |
| F5   | 6.80E-06 | N434A                         |
| F7   | 5.60E-06 | M252Y                         |
| F8   | 4.20E-06 | M252W                         |
| F9   | 1.40E-07 | M252Y/S254T/T256E/N434Y       |
| F10  | 6.90E-08 | M252Y/S254T/T256E/N434W       |
| F11  | 3.10E-07 | M252Y/N434Y                   |
| F12  | 1.70E-07 | M252Y/N434W                   |
| F13  | 3.20E-07 | M252W/N434Y                   |
| F14  | 1.80E-07 | M252W/N434W                   |
| F19  | 4.60E-07 | P257L/N434Y                   |
| F20  | 4.60E-07 | V308F/N434Y                   |
| F21  | 3.00E-08 | M252Y/V308P/N434Y             |
| F22  | 2.00E-06 | M428L/N434S                   |
| F25  | 9.20E-09 | M252Y/S254T/T256E/V308P/N434W |
| F26  | 1.00E-06 | I332V                         |
| F27  | 7.40E-06 | G237M                         |
| F29  | 1.40E-06 | I332V/N434Y                   |
| F31  | 2.80E-06 | G237M/V308F                   |
| F32  | 8.00E-07 | S254T/N434W                   |
| F33  | 2.30E-06 | S254T/N434Y                   |
| F34  | 2.80E-07 | T256E/N434W                   |
| F35  | 8.40E-07 | T256E/N434Y                   |
| F36  | 3.60E-07 | S254T/T256E/N434W             |
| F37  | 1.10E-06 | S254T/T256E/N434Y             |
| F38  | 1.00E-07 | M252Y/S254T/N434W             |
| F39  | 3.00E-07 | M252Y/S254T/N434Y             |
| F40  | 8.20E-08 | M252Y/T256E/N434W             |
| F41  | 1.50E-07 | M252Y/T256E/N434Y             |
| F42  | 1.00E-06 | M252Y/S254T/T256E/N434A       |
| F43  | 1.70E-06 | M252Y/N434A                   |
| F44  | 1.10E-06 | M252W/N434A                   |
| F47  | 2.40E-07 | M252Y/T256Q/N434W             |
| F48  | 3.20E-07 | M252Y/T256Q/N434Y             |
| F49  | 5.10E-07 | M252F/T256D/N434W             |
| F50  | 1.20E-06 | M252F/T256D/N434Y             |
| F51  | 8.10E-06 | N434F/Y436H                   |
| F52  | 3.10E-06 | H433K/N434F/Y436H             |
| F53  | 1.00E-06 | I332V/N434W                   |
| F54  | 8.40E-08 | V308P/N434W                   |
| F56  | 9.40E-07 | I332V/M428L/N434Y             |
| F57  | 1.10E-05 | G385D/Q386P/N389S             |
| F58  | 7.70E-07 | G385D/Q386P/N389S/N434W       |
| F59  | 2.40E-06 | G385D/Q386P/N389S/N434Y       |
| F60  | 1.10E-05 | G385H                         |
| F61  | 9.70E-07 | G385H/N434W                   |
| F62  | 1.90E-06 | G385H/N434Y                   |
| F63  | 2.50E-06 | N434F                         |
| F64  | 5.30E-06 | N434H                         |
| F65  | 2.90E-07 | M252Y/S254T/T256E/N434F       |
| F66  | 4.30E-07 | M252Y/S254T/T256E/N434H       |
| F67  | 6.30E-07 | M252Y/N434F                   |
| F68  | 9.30E-07 | M252Y/N434H                   |
| F69  | 5.10E-07 | M428L/N434W                   |
| F70  | 1.50E-06 | M428L/N434Y                   |
| F71  | 8.30E-08 | M252Y/S254T/T256E/M428L/N434W |
| F72  | 2.00E-07 | M252Y/S254T/T256E/M428L/N434Y |

【 0 2 7 4 】

表 1 3 - 2 は表 1 3 - 1 の続きの表である。

【表 1 3 - 2】

|      |          |                                     |
|------|----------|-------------------------------------|
| F73  | 1.70E-07 | M252Y/M428L/N434W                   |
| F74  | 4.60E-07 | M252Y/M428L/N434Y                   |
| F75  | 1.40E-06 | M252Y/M428L/N434A                   |
| F76  | 1.00E-06 | M252Y/S254T/T256E/M428L/N434A       |
| F77  | 9.90E-07 | T256E/M428L/N434Y                   |
| F78  | 7.80E-07 | S254T/M428L/N434W                   |
| F79  | 5.90E-06 | S254T/T256E/N434A                   |
| F80  | 2.70E-06 | M252Y/T256Q/N434A                   |
| F81  | 1.60E-06 | M252Y/T256E/N434A                   |
| F82  | 1.10E-06 | T256Q/N434W                         |
| F83  | 2.60E-06 | T256Q/N434Y                         |
| F84  | 2.80E-07 | M252W/T256Q/N434W                   |
| F85  | 5.50E-07 | M252W/T256Q/N434Y                   |
| F86  | 1.50E-06 | S254T/T256Q/N434W                   |
| F87  | 4.30E-06 | S254T/T256Q/N434Y                   |
| F88  | 1.90E-07 | M252Y/S254T/T256Q/N434W             |
| F89  | 3.60E-07 | M252Y/S254T/T256Q/N434Y             |
| F90  | 1.90E-08 | M252Y/T256E/V308P/N434W             |
| F91  | 4.80E-08 | M252Y/V308P/M428L/N434Y             |
| F92  | 1.10E-08 | M252Y/S254T/T256E/V308P/M428L/N434W |
| F93  | 7.40E-07 | M252W/M428L/N434W                   |
| F94  | 3.70E-07 | P257L/M428L/N434Y                   |
| F95  | 2.60E-07 | M252Y/S254T/T256E/M428L/N434F       |
| F99  | 6.20E-07 | M252Y/T256E/N434H                   |
| F101 | 1.10E-07 | M252W/T256Q/P257L/N434Y             |
| F103 | 4.40E-08 | P238A/M252Y/V308P/N434Y             |
| F104 | 3.70E-08 | M252Y/D265A/V308P/N434Y             |
| F105 | 7.50E-08 | M252Y/T307A/V308P/N434Y             |
| F106 | 3.70E-08 | M252Y/V303A/V308P/N434Y             |
| F107 | 3.40E-08 | M252Y/V308P/D376A/N434Y             |
| F108 | 4.10E-08 | M252Y/V305A/V308P/N434Y             |
| F109 | 3.20E-08 | M252Y/V308P/Q311A/N434Y             |
| F111 | 3.20E-08 | M252Y/V308P/K317A/N434Y             |
| F112 | 6.40E-08 | M252Y/V308P/E380A/N434Y             |
| F113 | 3.20E-08 | M252Y/V308P/E382A/N434Y             |
| 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 | P257L/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                   |

10

20

30

40

【0 2 7 5】

表 1 3 - 3 は表 1 3 - 2 の続きの表である。

【表 1 3 - 3】

|      |          |                         |
|------|----------|-------------------------|
| F147 | 2.40E-07 | M252Y/V308I/N434Y       |
| F149 | 1.90E-07 | M252Y/V308L/N434Y       |
| F150 | 2.00E-07 | M252Y/V308M/N434Y       |
| F152 | 2.70E-07 | M252Y/V308Q/N434Y       |
| F154 | 1.80E-07 | M252Y/V308T/N434Y       |
| F157 | 1.50E-07 | P257A/V308P/M428L/N434Y |
| F158 | 5.90E-08 | P257T/V308P/M428L/N434Y |
| F159 | 4.40E-08 | P257V/V308P/M428L/N434Y |
| F160 | 8.50E-07 | M252W/M428L/N434Y       |
| F162 | 1.60E-07 | M252W/M428Y/N434Y       |
| F163 | 4.20E-07 | M252W/M428F/N434Y       |
| F164 | 3.70E-07 | P238A/M252W/N434Y       |
| F165 | 2.90E-07 | M252W/D265A/N434Y       |
| F166 | 1.50E-07 | M252W/T307Q/N434Y       |
| F167 | 2.90E-07 | M252W/V303A/N434Y       |
| F168 | 3.20E-07 | M252W/D376A/N434Y       |
| F169 | 2.90E-07 | M252W/V305A/N434Y       |
| F170 | 1.70E-07 | M252W/Q311A/N434Y       |
| F171 | 1.90E-07 | M252W/D312A/N434Y       |
| F172 | 2.20E-07 | M252W/K317A/N434Y       |
| F173 | 7.70E-07 | M252W/E380A/N434Y       |
| F174 | 3.40E-07 | M252W/E382A/N434Y       |
| F175 | 2.70E-07 | M252W/S424A/N434Y       |
| F176 | 2.90E-07 | S239K/M252W/N434Y       |
| F177 | 2.80E-07 | M252W/S298G/N434Y       |
| F178 | 2.70E-07 | M252W/D270F/N434Y       |
| F179 | 3.10E-07 | M252W/N325G/N434Y       |
| F182 | 6.60E-08 | P257A/M428L/N434W       |
| F183 | 2.20E-07 | P257T/M428L/N434W       |
| F184 | 2.70E-07 | P257V/M428L/N434W       |
| F185 | 2.60E-07 | M252W/I332V/N434Y       |
| F188 | 3.00E-06 | P257I/Q311I             |
| F189 | 1.90E-07 | M252Y/T307A/N434Y       |
| F190 | 1.10E-07 | M252Y/T307Q/N434Y       |
| F191 | 1.60E-07 | P257L/T307A/M428L/N434Y |
| F192 | 1.10E-07 | P257A/T307A/M428L/N434Y |
| F193 | 8.50E-08 | P257T/T307A/M428L/N434Y |
| F194 | 1.20E-07 | P257V/T307A/M428L/N434Y |
| F195 | 5.60E-08 | P257L/T307Q/M428L/N434Y |
| F196 | 3.50E-08 | P257A/T307Q/M428L/N434Y |
| F197 | 3.30E-08 | P257T/T307Q/M428L/N434Y |
| F198 | 4.80E-08 | P257V/T307Q/M428L/N434Y |
| F201 | 2.10E-07 | M252Y/T307D/N434Y       |
| F203 | 2.40E-07 | M252Y/T307F/N434Y       |
| F204 | 2.10E-07 | M252Y/T307G/N434Y       |
| F205 | 2.00E-07 | M252Y/T307H/N434Y       |
| F206 | 2.30E-07 | M252Y/T307I/N434Y       |
| F207 | 9.40E-07 | M252Y/T307K/N434Y       |
| F208 | 3.90E-07 | M252Y/T307L/N434Y       |
| F209 | 1.30E-07 | M252Y/T307M/N434Y       |
| F210 | 2.90E-07 | M252Y/T307N/N434Y       |
| F211 | 2.40E-07 | M252Y/T307P/N434Y       |
| F212 | 6.80E-07 | M252Y/T307R/N434Y       |
| F213 | 2.30E-07 | M252Y/T307S/N434Y       |
| F214 | 1.70E-07 | M252Y/T307V/N434Y       |
| F215 | 9.60E-08 | M252Y/T307W/N434Y       |
| F216 | 2.30E-07 | M252Y/T307Y/N434Y       |
| F217 | 2.30E-07 | M252Y/K334L/N434Y       |
| F218 | 2.60E-07 | M252Y/G385H/N434Y       |
| F219 | 2.50E-07 | M252Y/T289H/N434Y       |
| F220 | 2.50E-07 | M252Y/Q311H/N434Y       |

10

20

30

40

【0 2 7 6】

表 1 3 - 4 は表 1 3 - 3 の続きの表である。

【表 1 3 - 4】

|      |          |                                     |
|------|----------|-------------------------------------|
| F221 | 3.10E-07 | M252Y/D312H/N434Y                   |
| F222 | 3.40E-07 | M252Y/N315H/N434Y                   |
| F223 | 2.70E-07 | M252Y/K360H/N434Y                   |
| F225 | 1.50E-06 | M252Y/L314R/N434Y                   |
| F226 | 5.40E-07 | M252Y/L314K/N434Y                   |
| F227 | 1.20E-07 | M252Y/N286E/N434Y                   |
| F228 | 2.30E-07 | M252Y/L309E/N434Y                   |
| F229 | 5.10E-07 | M252Y/R255E/N434Y                   |
| F230 | 2.50E-07 | M252Y/P387E/N434Y                   |
| F236 | 8.90E-07 | K248I/M428L/N434Y                   |
| F237 | 2.30E-07 | M252Y/M428A/N434Y                   |
| F238 | 7.40E-07 | M252Y/M428D/N434Y                   |
| F240 | 7.20E-07 | M252Y/M428F/N434Y                   |
| F241 | 1.50E-06 | M252Y/M428G/N434Y                   |
| F242 | 8.50E-07 | M252Y/M428H/N434Y                   |
| F243 | 1.80E-07 | M252Y/M428I/N434Y                   |
| F244 | 1.30E-06 | M252Y/M428K/N434Y                   |
| F245 | 4.70E-07 | M252Y/M428N/N434Y                   |
| F246 | 1.10E-06 | M252Y/M428P/N434Y                   |
| F247 | 4.40E-07 | M252Y/M428Q/N434Y                   |
| F249 | 6.40E-07 | M252Y/M428S/N434Y                   |
| F250 | 2.90E-07 | M252Y/M428T/N434Y                   |
| F251 | 1.90E-07 | M252Y/M428V/N434Y                   |
| F252 | 1.00E-06 | M252Y/M428W/N434Y                   |
| F253 | 7.10E-07 | M252Y/M428Y/N434Y                   |
| F254 | 7.50E-08 | M252W/T307Q/M428Y/N434Y             |
| F255 | 1.10E-07 | M252W/Q311A/M428Y/N434Y             |
| F256 | 5.40E-08 | M252W/T307Q/Q311A/M428Y/N434Y       |
| F257 | 5.00E-07 | M252Y/T307A/M428Y/N434Y             |
| F258 | 3.20E-07 | M252Y/T307Q/M428Y/N434Y             |
| F259 | 2.80E-07 | M252Y/D270F/N434Y                   |
| F260 | 1.30E-07 | M252Y/T307A/Q311A/N434Y             |
| F261 | 8.40E-08 | M252Y/T307Q/Q311A/N434Y             |
| F262 | 1.90E-07 | M252Y/T307A/Q311H/N434Y             |
| F263 | 1.10E-07 | M252Y/T307Q/Q311H/N434Y             |
| F264 | 2.80E-07 | M252Y/E382A/N434Y                   |
| F265 | 6.80E-07 | M252Y/E382A/M428Y/N434Y             |
| F266 | 4.70E-07 | M252Y/T307A/E382A/M428Y/N434Y       |
| F267 | 3.20E-07 | M252Y/T307Q/E382A/M428Y/N434Y       |
| F268 | 6.30E-07 | P238A/M252Y/M428F/N434Y             |
| F269 | 5.20E-07 | M252Y/V305A/M428F/N434Y             |
| F270 | 6.60E-07 | M252Y/N325G/M428F/N434Y             |
| F271 | 6.90E-07 | M252Y/D376A/M428F/N434Y             |
| F272 | 6.80E-07 | M252Y/E380A/M428F/N434Y             |
| F273 | 6.50E-07 | M252Y/E382A/M428F/N434Y             |
| F274 | 7.60E-07 | M252Y/E380A/E382A/M428F/N434Y       |
| F275 | 4.20E-08 | S239K/M252Y/V308P/E382A/N434Y       |
| F276 | 4.10E-08 | M252Y/D270F/V308P/E382A/N434Y       |
| F277 | 1.30E-07 | S239K/M252Y/V308P/M428Y/N434Y       |
| F278 | 3.00E-08 | M252Y/T307Q/V308P/E382A/N434Y       |
| F279 | 6.10E-08 | M252Y/V308P/Q311H/E382A/N434Y       |
| F280 | 4.10E-08 | S239K/M252Y/D270F/V308P/N434Y       |
| F281 | 9.20E-08 | M252Y/V308P/E382A/M428F/N434Y       |
| F282 | 2.90E-08 | M252Y/V308P/E382A/M428L/N434Y       |
| F283 | 1.00E-07 | M252Y/V308P/E382A/M428Y/N434Y       |
| F284 | 1.00E-07 | M252Y/V308P/M428Y/N434Y             |
| F285 | 9.90E-08 | M252Y/V308P/M428F/N434Y             |
| 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             |

10

20

30

40

【0 2 7 7】

表 1 3 - 5 は表 1 3 - 4 の続きの表である。

【表 1 3 - 5】

|      |          |                                                 |
|------|----------|-------------------------------------------------|
| F290 | 4.60E-07 | M252Y/T256E/E382A/M428Y/N434Y                   |
| F292 | 2.30E-08 | S239K/M252Y/V308P/E382A/M428I/N434Y             |
| F293 | 5.30E-08 | M252Y/V308P/E380A/E382A/M428I/N434Y             |
| F294 | 1.10E-07 | S239K/M252Y/V308P/M428F/N434Y                   |
| F295 | 6.80E-07 | S239K/M252Y/E380A/E382A/M428F/N434Y             |
| F296 | 4.90E-07 | M252Y/Q311A/M428Y/N434Y                         |
| F297 | 5.10E-07 | M252Y/D312A/M428Y/N434Y                         |
| F298 | 4.80E-07 | M252Y/Q311A/D312A/M428Y/N434Y                   |
| F299 | 9.40E-08 | S239K/M252Y/V308P/Q311A/M428Y/N434Y             |
| F300 | 8.30E-08 | S239K/M252Y/V308P/D312A/M428Y/N434Y             |
| F301 | 7.20E-08 | S239K/M252Y/V308P/Q311A/D312A/M428Y/N434Y       |
| F302 | 1.90E-07 | M252Y/T256E/T307P/N434Y                         |
| F303 | 6.70E-07 | M252Y/T307P/M428Y/N434Y                         |
| F304 | 1.60E-08 | M252W/V308P/M428Y/N434Y                         |
| F305 | 2.70E-08 | M252Y/T256E/V308P/E382A/N434Y                   |
| F306 | 3.60E-08 | M252W/V308P/E382A/N434Y                         |
| F307 | 3.60E-08 | S239K/M252W/V308P/E382A/N434Y                   |
| F308 | 1.90E-08 | S239K/M252W/V308P/E382A/M428Y/N434Y             |
| F310 | 9.40E-08 | S239K/M252W/V308P/E382A/M428I/N434Y             |
| F311 | 2.80E-08 | S239K/M252W/V308P/M428F/N434Y                   |
| F312 | 4.50E-07 | S239K/M252W/E380A/E382A/M428F/N434Y             |
| F313 | 6.50E-07 | S239K/M252Y/T307P/M428Y/N434Y                   |
| F314 | 3.20E-07 | M252Y/T256E/Q311A/D312A/M428Y/N434Y             |
| F315 | 6.80E-07 | S239K/M252Y/M428Y/N434Y                         |
| F316 | 7.00E-07 | S239K/M252Y/D270F/M428Y/N434Y                   |
| F317 | 1.10E-07 | S239K/M252Y/D270F/V308P/M428Y/N434Y             |
| F318 | 1.80E-08 | S239K/M252Y/V308P/M428I/N434Y                   |
| F320 | 2.00E-08 | S239K/M252Y/V308P/N325G/E382A/M428I/N434Y       |
| F321 | 3.20E-08 | S239K/M252Y/D270F/V308P/N325G/N434Y             |
| F322 | 9.20E-08 | S239K/M252Y/D270F/T307P/V308P/N434Y             |
| F323 | 2.70E-08 | S239K/M252Y/T256E/D270F/V308P/N434Y             |
| F324 | 2.80E-08 | S239K/M252Y/D270F/T307Q/V308P/N434Y             |
| F325 | 2.10E-08 | S239K/M252Y/D270F/T307Q/V308P/Q311A/N434Y       |
| F326 | 7.50E-08 | S239K/M252Y/D270F/T307Q/Q311A/N434Y             |
| F327 | 6.50E-08 | S239K/M252Y/T256E/D270F/T307Q/Q311A/N434Y       |
| F328 | 1.90E-08 | S239K/M252Y/D270F/V308P/M428I/N434Y             |
| F329 | 1.20E-08 | S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/N434Y             |
| F330 | 3.60E-08 | S239K/M252Y/D270F/V308P/L309E/N434Y             |
| F331 | 3.00E-08 | S239K/M252Y/D270F/V308P/P387E/N434Y             |
| F333 | 7.40E-08 | S239K/M252Y/D270F/T307Q/L309E/Q311A/N434Y       |
| F334 | 1.90E-08 | S239K/M252Y/D270F/V308P/N325G/M428I/N434Y       |
| F335 | 1.50E-08 | S239K/M252Y/T256E/D270F/V308P/M428I/N434Y       |
| F336 | 1.40E-08 | S239K/M252Y/D270F/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y |
| F337 | 5.60E-08 | S239K/M252Y/D270F/T307Q/Q311A/M428I/N434Y       |
| F338 | 7.70E-09 | S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/M428I/N434Y       |
| F339 | 1.90E-08 | S239K/M252Y/D270F/V308P/L309E/M428I/N434Y       |
| F343 | 3.20E-08 | S239K/M252Y/D270F/V308P/M428L/N434Y             |
| F344 | 3.00E-08 | S239K/M252Y/V308P/M428L/N434Y                   |
| F349 | 1.50E-07 | S239K/M252Y/V308P/L309P/M428L/N434Y             |
| F350 | 1.70E-07 | S239K/M252Y/V308P/L309R/M428L/N434Y             |
| F352 | 6.00E-07 | S239K/M252Y/L309P/M428L/N434Y                   |
| F353 | 1.10E-06 | S239K/M252Y/L309R/M428L/N434Y                   |
| F354 | 2.80E-08 | S239K/M252Y/T307Q/V308P/M428L/N434Y             |
| F356 | 3.40E-08 | S239K/M252Y/D270F/V308P/L309E/P387E/N434Y       |
| F357 | 1.60E-08 | S239K/M252Y/T256E/D270F/V308P/N325G/M428I/N434Y |
| F358 | 1.00E-07 | S239K/M252Y/T307Q/N434Y                         |
| F359 | 4.20E-07 | P257V/T307Q/M428I/N434Y                         |
| F360 | 1.30E-06 | P257V/T307Q/M428V/N434Y                         |
| F362 | 5.40E-08 | P257V/T307Q/N325G/M428L/N434Y                   |
| F363 | 4.10E-08 | P257V/T307Q/Q311A/M428L/N434Y                   |
| F364 | 3.50E-08 | P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428L/N434Y             |

10

20

30

40

【0 2 7 8】

表 1 3 - 6 は表 1 3 - 5 の続きの表である。

【表 1 3 - 6】

|      |          |                                                       |
|------|----------|-------------------------------------------------------|
| F365 | 5.10E-08 | P257V/V305A/T307Q/M428L/N434Y                         |
| F367 | 1.50E-08 | S239K/M252Y/E258H/D270F/T307Q/V308P/Q311A/N434Y       |
| F368 | 2.00E-08 | S239K/M252Y/D270F/V308P/N325G/E382A/M428I/N434Y       |
| F369 | 7.50E-08 | M252Y/P257V/T307Q/M428I/N434Y                         |
| F372 | 1.30E-08 | S239K/M252W/V308P/M428Y/N434Y                         |
| F373 | 1.10E-08 | S239K/M252W/V308P/Q311A/M428Y/N434Y                   |
| F374 | 1.20E-08 | S239K/M252W/T256E/V308P/M428Y/N434Y                   |
| F375 | 5.50E-09 | S239K/M252W/N286E/V308P/M428Y/N434Y                   |
| F376 | 9.60E-09 | S239K/M252Y/T256E/D270F/N286E/V308P/N434Y             |
| F377 | 1.30E-07 | S239K/M252W/T307P/M428Y/N434Y                         |
| F379 | 9.00E-09 | S239K/M252W/T256E/V308P/Q311A/M428Y/N434Y             |
| F380 | 5.60E-09 | S239K/M252W/T256E/N286E/V308P/M428Y/N434Y             |
| F381 | 1.10E-07 | P257V/T307A/Q311A/M428L/N434Y                         |
| F382 | 8.70E-08 | P257V/V305A/T307A/M428L/N434Y                         |
| F386 | 3.20E-08 | M252Y/V308P/L309E/N434Y                               |
| F387 | 1.50E-07 | M252Y/V308P/L309D/N434Y                               |
| F388 | 7.00E-08 | M252Y/V308P/L309A/N434Y                               |
| F389 | 1.70E-08 | M252W/V308P/L309E/M428Y/N434Y                         |
| F390 | 6.80E-08 | M252W/V308P/L309D/M428Y/N434Y                         |
| F391 | 3.60E-08 | M252W/V308P/L309A/M428Y/N434Y                         |
| F392 | 6.90E-09 | S239K/M252Y/N286E/V308P/M428I/N434Y                   |
| F393 | 1.20E-08 | S239K/M252Y/N286E/V308P/N434Y                         |
| F394 | 5.30E-08 | S239K/M252Y/T307Q/Q311A/M428I/N434Y                   |
| F395 | 2.40E-08 | S239K/M252Y/T256E/V308P/N434Y                         |
| F396 | 2.00E-08 | S239K/M252Y/D270F/N286E/T307Q/Q311A/M428I/N434Y       |
| F397 | 4.50E-08 | S239K/M252Y/D270F/T307Q/Q311A/P387E/M428I/N434Y       |
| F398 | 4.40E-09 | S239K/M252Y/D270F/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y |
| F399 | 6.50E-09 | S239K/M252Y/D270F/N286E/T307Q/V308P/M428I/N434Y       |
| F400 | 6.10E-09 | S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/Q311A/M428I/N434Y       |
| F401 | 6.90E-09 | S239K/M252Y/D270F/N286E/V308P/P387E/M428I/N434Y       |
| F402 | 2.30E-08 | P257V/T307Q/M428L/N434W                               |
| 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                   |

10

20

30

40

【0 2 7 9】

表 1 3 - 7 は表 1 3 - 6 の続きの表である。

【表 1 3 - 7】

|      |          |                                           |
|------|----------|-------------------------------------------|
| F433 | 6.00E-08 | P257V/T307Q/Q311A/N325G/N434Y             |
| F434 | 2.00E-08 | P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428Y/N434Y       |
| F435 | 2.50E-08 | P257V/T307Q/Q311A/N325G/M428F/N434Y       |
| F436 | 2.50E-07 | P257A/T307Q/M428V/N434Y                   |
| F437 | 5.70E-08 | P257A/T307Q/N434Y                         |
| F438 | 3.60E-08 | P257A/T307Q/M428Y/N434Y                   |
| F439 | 4.00E-08 | P257A/T307Q/M428F/N434Y                   |
| F440 | 1.50E-08 | P257V/N286E/T307Q/Q311A/N325G/M428L/N434Y |
| F441 | 1.80E-07 | P257A/Q311A/M428L/N434Y                   |
| F442 | 2.00E-07 | P257A/Q311H/M428L/N434Y                   |
| F443 | 5.50E-08 | P257A/T307Q/Q311A/M428L/N434Y             |
| F444 | 1.40E-07 | P257A/T307A/Q311A/M428L/N434Y             |
| F445 | 6.20E-08 | P257A/T307Q/Q311H/M428L/N434Y             |
| F446 | 1.10E-07 | P257A/T307A/Q311H/M428L/N434Y             |
| F447 | 1.40E-08 | P257A/N286E/T307Q/M428L/N434Y             |
| F448 | 5.30E-08 | P257A/N286E/T307A/M428L/N434Y             |
| F449 | 5.70E-07 | S239K/M252Y/D270F/T307P/N325G/M428Y/N434Y |
| F450 | 5.20E-07 | S239K/M252Y/T307P/L309E/N325G/M428Y/N434Y |
| F451 | 1.00E-07 | P257S/T307A/M428L/N434Y                   |
| F452 | 1.40E-07 | P257M/T307A/M428L/N434Y                   |
| F453 | 7.80E-08 | P257N/T307A/M428L/N434Y                   |
| F454 | 9.60E-08 | P257I/T307A/M428L/N434Y                   |
| F455 | 2.70E-08 | P257V/T307Q/M428Y/N434Y                   |
| F456 | 3.40E-08 | P257V/T307Q/M428F/N434Y                   |
| F457 | 4.00E-08 | S239K/P257V/V308P/M428L/N434Y             |
| F458 | 1.50E-08 | P257V/T307Q/V308P/N325G/M428L/N434Y       |
| F459 | 1.30E-08 | P257V/T307Q/V308P/Q311A/N325G/M428L/N434Y |
| F460 | 4.70E-08 | P257V/T307A/V308P/N325G/M428L/N434Y       |
| F462 | 8.50E-08 | P257A/V308P/N325G/M428L/N434Y             |
| F463 | 1.30E-07 | P257A/T307A/V308P/M428L/N434Y             |
| F464 | 5.50E-08 | P257A/T307Q/V308P/M428L/N434Y             |
| F465 | 2.10E-08 | P257V/N286E/T307Q/N325G/M428L/N434Y       |
| F466 | 3.50E-07 | T256E/P257V/N434Y                         |
| F467 | 5.70E-07 | T256E/P257T/N434Y                         |
| F468 | 5.70E-08 | S239K/P257T/V308P/M428L/N434Y             |
| F469 | 5.60E-08 | P257T/V308P/N325G/M428L/N434Y             |
| F470 | 5.40E-08 | T256E/P257T/V308P/N325G/M428L/N434Y       |
| F471 | 6.60E-08 | P257T/V308P/N325G/E382A/M428L/N434Y       |
| F472 | 5.40E-08 | P257T/V308P/N325G/P387E/M428L/N434Y       |
| F473 | 4.50E-07 | P257T/V308P/L309P/N325G/M428L/N434Y       |
| F474 | 3.50E-07 | P257T/V308P/L309R/N325G/M428L/N434Y       |
| F475 | 4.30E-08 | T256E/P257V/T307Q/M428L/N434Y             |
| F476 | 5.50E-08 | P257V/T307Q/E382A/M428L/N434Y             |
| F477 | 4.30E-08 | P257V/T307Q/P387E/M428L/N434Y             |
| F480 | 3.90E-08 | P257L/V308P/N434Y                         |
| F481 | 5.60E-08 | P257T/T307Q/N434Y                         |
| F482 | 7.00E-08 | P257V/T307Q/N325G/N434Y                   |
| F483 | 5.70E-08 | P257V/T307Q/Q311A/N434Y                   |
| F484 | 6.20E-08 | P257V/V305A/T307Q/N434Y                   |
| F485 | 9.70E-08 | P257V/N286E/T307A/N434Y                   |
| F486 | 3.40E-07 | P257V/T307Q/L309R/Q311H/M428L/N434Y       |
| F488 | 3.50E-08 | P257V/V308P/N325G/M428L/N434Y             |
| F490 | 7.50E-08 | S239K/P257V/V308P/Q311H/M428L/N434Y       |
| F492 | 9.80E-08 | P257V/V305A/T307A/N325G/M428L/N434Y       |
| F493 | 4.90E-07 | S239K/D270F/T307P/N325G/M428Y/N434Y       |
| F497 | 3.10E-06 | P257T/T307A/M428V/N434Y                   |
| F498 | 1.30E-06 | P257A/M428V/N434Y                         |
| F499 | 5.20E-07 | P257A/T307A/M428V/N434Y                   |
| F500 | 4.30E-08 | P257S/T307Q/M428L/N434Y                   |
| F506 | 1.90E-07 | P257V/N297A/T307Q/M428L/N434Y             |

10

20

30

40

【0 2 8 0】

表 1 3 - 8 は表 1 3 - 7 の続きの表である。

【表 1 3 - 8】

|      |          |                                     |
|------|----------|-------------------------------------|
| 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       |
| 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             |

10

20

30

40

【0 2 8 1】

表 1 3 - 9 は表 1 3 - 8 の続きの表である。

【表 1 3 - 9】

|      |          |                                           |
|------|----------|-------------------------------------------|
| F600 | 2.80E-07 | M252Y/T256Q/E382A/N434Y                   |
| F601 | 9.60E-09 | M252Y/N286E/V308P/N434Y                   |
| F608 |          | G236A/S239D/I332E                         |
| F611 | 2.80E-07 | M252Y/V305T/T307P/V308I/L309A/N434Y       |
| F612 | 3.60E-07 | M252Y/T307P/V308I/L309A/N434Y             |
| F613 |          | S239D/A330L/I332E                         |
| F616 |          | S239D/K326D/L328Y                         |
| F617 | 7.40E-07 | S239K/N434W                               |
| F618 | 6.40E-07 | S239K/V308F/N434Y                         |
| F619 | 3.10E-07 | S239K/M252Y/N434Y                         |
| F620 | 2.10E-07 | S239K/M252Y/S254T/N434Y                   |
| F621 | 1.50E-07 | S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y             |
| F622 | 3.50E-07 | S239K/M252Y/T256Q/N434Y                   |
| F623 | 1.80E-07 | S239K/M252W/N434W                         |
| F624 | 1.40E-08 | S239K/P257A/N286E/T307Q/M428L/N434Y       |
| F625 | 7.60E-08 | S239K/P257A/T307Q/M428L/N434Y             |
| F626 | 1.30E-06 | V308P                                     |
| F629 | 3.90E-08 | M252Y/V279L/V308P/N434Y                   |
| F630 | 3.70E-08 | S239K/M252Y/V279L/V308P/N434Y             |
| F633 | 2.40E-08 | M252Y/V282D/V308P/N434Y                   |
| F634 | 3.20E-08 | S239K/M252Y/V282D/V308P/N434Y             |
| F635 | 4.50E-08 | M252Y/V284K/V308P/N434Y                   |
| F636 | 4.80E-08 | S239K/M252Y/V284K/V308P/N434Y             |
| F637 | 1.50E-07 | M252Y/K288S/V308P/N434Y                   |
| F638 | 1.40E-07 | S239K/M252Y/K288S/V308P/N434Y             |
| F639 | 2.70E-08 | M252Y/V308P/G385R/N434Y                   |
| F640 | 3.60E-08 | S239K/M252Y/V308P/G385R/N434Y             |
| F641 | 3.00E-08 | M252Y/V308P/Q386K/N434Y                   |
| F642 | 3.00E-08 | S239K/M252Y/V308P/Q386K/N434Y             |
| F643 | 3.20E-08 | L235G/G236R/S239K/M252Y/V308P/N434Y       |
| F644 | 3.00E-08 | G236R/S239K/M252Y/V308P/N434Y             |
| F645 | 3.30E-08 | S239K/M252Y/V308P/L328R/N434Y             |
| F646 | 3.80E-08 | S239K/M252Y/N297A/V308P/N434Y             |
| F647 | 2.90E-08 | P238D/M252Y/V308P/N434Y                   |
| F648 |          | P238D                                     |
| F649 | 1.20E-07 | S239K/M252Y/N286E/N434Y                   |
| F650 | 1.70E-07 | S239K/M252Y/T256E/N434Y                   |
| F651 | 1.80E-07 | S239K/M252Y/Q311A/N434Y                   |
| F652 | 2.40E-07 | P238D/M252Y/N434Y                         |
| F654 | 3.20E-08 | L235K/S239K/M252Y/V308P/N434Y             |
| F655 | 3.40E-08 | L235R/S239K/M252Y/V308P/N434Y             |
| F656 | 3.30E-08 | G237K/S239K/M252Y/V308P/N434Y             |
| F657 | 3.20E-08 | G237R/S239K/M252Y/V308P/N434Y             |
| F658 | 3.20E-08 | P238K/S239K/M252Y/V308P/N434Y             |
| F659 | 3.00E-08 | P238R/S239K/M252Y/V308P/N434Y             |
| F660 | 3.10E-08 | S239K/M252Y/V308P/P329K/N434Y             |
| F661 | 3.40E-08 | S239K/M252Y/V308P/P329R/N434Y             |
| F663 | 6.40E-09 | S239K/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y |
| F664 | 3.90E-08 | M252Y/N286A/V308P/N434Y                   |
| F665 | 2.00E-08 | M252Y/N286D/V308P/N434Y                   |
| F666 | 2.10E-08 | M252Y/N286F/V308P/N434Y                   |
| F667 | 3.00E-08 | M252Y/N286G/V308P/N434Y                   |
| F668 | 4.00E-08 | M252Y/N286H/V308P/N434Y                   |
| F669 | 3.50E-08 | M252Y/N286I/V308P/N434Y                   |
| F670 | 2.10E-07 | M252Y/N286K/V308P/N434Y                   |
| F671 | 2.20E-08 | M252Y/N286L/V308P/N434Y                   |
| F672 | 2.40E-08 | M252Y/N286M/V308P/N434Y                   |
| F673 | 2.30E-08 | M252Y/N286P/V308P/N434Y                   |
| F674 | 3.20E-08 | M252Y/N286Q/V308P/N434Y                   |
| F675 | 5.10E-08 | M252Y/N286R/V308P/N434Y                   |

10

20

30

40

【0 2 8 2】

表 1 3 - 1 0 は表 1 3 - 9 の続きの表である。

【表 1 3 - 1 0】

|      |          |                                           |
|------|----------|-------------------------------------------|
| F676 | 3.20E-08 | M252Y/N286S/V308P/N434Y                   |
| F677 | 4.70E-08 | M252Y/N286T/V308P/N434Y                   |
| F678 | 3.30E-08 | M252Y/N286V/V308P/N434Y                   |
| F679 | 1.70E-08 | M252Y/N286W/V308P/N434Y                   |
| F680 | 1.50E-08 | M252Y/N286Y/V308P/N434Y                   |
| F681 | 4.90E-08 | M252Y/K288A/V308P/N434Y                   |
| F682 | 8.20E-08 | M252Y/K288D/V308P/N434Y                   |
| F683 | 5.00E-08 | M252Y/K288E/V308P/N434Y                   |
| F684 | 5.10E-08 | M252Y/K288F/V308P/N434Y                   |
| F685 | 5.30E-08 | M252Y/K288G/V308P/N434Y                   |
| F686 | 4.60E-08 | M252Y/K288H/V308P/N434Y                   |
| F687 | 4.90E-08 | M252Y/K288I/V308P/N434Y                   |
| F688 | 2.80E-08 | M252Y/K288L/V308P/N434Y                   |
| F689 | 4.10E-08 | M252Y/K288M/V308P/N434Y                   |
| F690 | 1.00E-07 | M252Y/K288N/V308P/N434Y                   |
| F691 | 3.20E-07 | M252Y/K288P/V308P/N434Y                   |
| F692 | 3.90E-08 | M252Y/K288Q/V308P/N434Y                   |
| F693 | 3.60E-08 | M252Y/K288R/V308P/N434Y                   |
| F694 | 4.70E-08 | M252Y/K288V/V308P/N434Y                   |
| F695 | 4.00E-08 | M252Y/K288W/V308P/N434Y                   |
| F696 | 4.40E-08 | M252Y/K288Y/V308P/N434Y                   |
| F697 | 3.10E-08 | S239K/M252Y/V308P/N325G/N434Y             |
| F698 | 2.20E-08 | M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y             |
| F699 | 2.30E-08 | S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y       |
| F700 | 5.20E-08 | M252Y/V308P/L328E/N434Y                   |
| F705 | 7.10E-09 | M252Y/N286E/V308P/M428I/N434Y             |
| F706 | 1.80E-08 | M252Y/N286E/T307Q/Q311A/M428I/N434Y       |
| F707 | 5.90E-09 | M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y       |
| F708 | 4.10E-09 | M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y |
| F709 | 2.00E-08 | S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/M428I/N434Y |
| F710 | 1.50E-08 | P238D/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/M428I/N434Y |
| F711 | 6.50E-08 | S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y             |
| F712 | 6.00E-08 | P238D/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y             |
| F713 | 2.00E-08 | P238D/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y       |
| F714 | 2.30E-07 | P238D/M252Y/N325S/N434Y                   |
| F715 | 2.30E-07 | P238D/M252Y/N325M/N434Y                   |
| F716 | 2.70E-07 | P238D/M252Y/N325L/N434Y                   |
| F717 | 2.60E-07 | P238D/M252Y/N325I/N434Y                   |
| F718 | 2.80E-07 | P238D/M252Y/Q295M/N434Y                   |
| F719 | 7.40E-08 | P238D/M252Y/N325G/N434Y                   |
| F720 | 2.40E-08 | M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y             |
| F721 | 1.50E-08 | M252Y/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y       |
| F722 | 2.70E-07 | P238D/M252Y/A327G/N434Y                   |
| F723 | 2.80E-07 | P238D/M252Y/L328D/N434Y                   |
| F724 | 2.50E-07 | P238D/M252Y/L328E/N434Y                   |
| F725 | 4.20E-08 | L235K/G237R/S239K/M252Y/V308P/N434Y       |
| F726 | 3.70E-08 | L235K/P238K/S239K/M252Y/V308P/N434Y       |
| F729 | 9.20E-07 | T307A/Q311A/N434Y                         |
| F730 | 6.00E-07 | T307Q/Q311A/N434Y                         |
| F731 | 8.50E-07 | T307A/Q311H/N434Y                         |
| F732 | 6.80E-07 | T307Q/Q311H/N434Y                         |
| F733 | 3.20E-07 | M252Y/L328E/N434Y                         |
| F734 | 3.10E-07 | G236D/M252Y/L328E/N434Y                   |
| F736 | 3.10E-07 | M252Y/S267M/L328E/N434Y                   |
| F737 | 3.10E-07 | M252Y/S267L/L328E/N434Y                   |
| F738 | 3.50E-07 | P238D/M252Y/T307P/N434Y                   |
| F739 | 2.20E-07 | M252Y/T307P/Q311A/N434Y                   |
| F740 | 2.90E-07 | M252Y/T307P/Q311H/N434Y                   |
| F741 | 3.10E-07 | P238D/T250A/M252Y/N434Y                   |
| F744 | 9.90E-07 | P238D/T250F/M252Y/N434Y                   |

10

20

30

40

【0 2 8 3】

表 1 3 - 1 1 は表 1 3 - 1 0 の続きの表である。

【表 1 3 - 1 1】

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

10

20

30

40

【0 2 8 4】

表 1 3 - 1 2 は表 1 3 - 1 1 の続きの表である。

【表 1 3 - 1 2】

|      |          |                                           |
|------|----------|-------------------------------------------|
| F810 | 2.20E-07 | M252Y/A378V/N434Y                         |
| F811 | 4.90E-07 | M252Y/E380S/N434Y                         |
| F812 | 2.70E-07 | M252Y/E382V/N434Y                         |
| F813 | 2.80E-07 | M252Y/S424E/N434Y                         |
| F814 | 1.20E-07 | M252Y/N434Y/Y436I                         |
| F815 | 5.50E-07 | M252Y/N434Y/T437R                         |
| F816 | 3.60E-07 | P238D/T250V/M252Y/T307P/N434Y             |
| F817 | 9.80E-08 | P238D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y       |
| F819 | 1.40E-07 | P238D/M252Y/N286E/N434Y                   |
| F820 | 3.40E-07 | L235K/S239K/M252Y/N434Y                   |
| F821 | 3.10E-07 | L235R/S239K/M252Y/N434Y                   |
| F822 | 1.10E-06 | P238D/T250Y/M252Y/W313Y/N434Y             |
| F823 | 1.10E-06 | P238D/T250Y/M252Y/W313F/N434Y             |
| F828 | 2.50E-06 | P238D/T250V/M252Y/I253V/N434Y             |
| F831 | 1.60E-06 | P238D/T250V/M252Y/R255A/N434Y             |
| F832 | 2.60E-06 | P238D/T250V/M252Y/R255D/N434Y             |
| F833 | 8.00E-07 | P238D/T250V/M252Y/R255E/N434Y             |
| F834 | 8.10E-07 | P238D/T250V/M252Y/R255F/N434Y             |
| F836 | 5.00E-07 | P238D/T250V/M252Y/R255H/N434Y             |
| F837 | 5.60E-07 | P238D/T250V/M252Y/R255I/N434Y             |
| F838 | 4.30E-07 | P238D/T250V/M252Y/R255K/N434Y             |
| F839 | 3.40E-07 | P238D/T250V/M252Y/R255L/N434Y             |
| F840 | 4.20E-07 | P238D/T250V/M252Y/R255M/N434Y             |
| F841 | 1.10E-06 | P238D/T250V/M252Y/R255N/N434Y             |
| F843 | 6.60E-07 | P238D/T250V/M252Y/R255Q/N434Y             |
| F844 | 1.30E-06 | P238D/T250V/M252Y/R255S/N434Y             |
| F847 | 3.40E-07 | P238D/T250V/M252Y/R255W/N434Y             |
| F848 | 8.30E-07 | P238D/T250V/M252Y/R255Y/N434Y             |
| F849 | 3.30E-07 | M252Y/D280A/N434Y                         |
| F850 | 2.90E-07 | M252Y/D280E/N434Y                         |
| F852 | 3.30E-07 | M252Y/D280G/N434Y                         |
| F853 | 3.20E-07 | M252Y/D280H/N434Y                         |
| F855 | 3.20E-07 | M252Y/D280K/N434Y                         |
| F858 | 3.20E-07 | M252Y/D280N/N434Y                         |
| F860 | 3.30E-07 | M252Y/D280Q/N434Y                         |
| F861 | 3.20E-07 | M252Y/D280R/N434Y                         |
| F862 | 3.00E-07 | M252Y/D280S/N434Y                         |
| F863 | 2.70E-07 | M252Y/D280T/N434Y                         |
| F867 | 2.80E-07 | M252Y/N384A/N389A/N434Y                   |
| F868 | 2.00E-08 | G236A/S239D/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y |
| F869 |          | G236A/S239D                               |
| F870 | 7.30E-08 | L235K/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y       |
| F871 | 7.10E-08 | L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y       |
| F872 | 1.30E-07 | L235K/S239K/M252Y/N286E/N434Y             |
| F873 | 1.20E-07 | L235R/S239K/M252Y/N286E/N434Y             |
| F875 | 4.80E-07 | M252Y/N434Y/Y436A                         |
| F877 | 8.30E-07 | M252Y/N434Y/Y436E                         |
| F878 | 1.90E-07 | M252Y/N434Y/Y436F                         |
| F879 | 9.20E-07 | M252Y/N434Y/Y436G                         |
| F880 | 3.90E-07 | M252Y/N434Y/Y436H                         |
| F881 | 3.10E-07 | M252Y/N434Y/Y436K                         |
| F882 | 1.30E-07 | M252Y/N434Y/Y436L                         |
| F883 | 2.10E-07 | M252Y/N434Y/Y436M                         |
| F884 | 4.00E-07 | M252Y/N434Y/Y436N                         |
| F888 | 4.80E-07 | M252Y/N434Y/Y436S                         |
| F889 | 2.20E-07 | M252Y/N434Y/Y436T                         |
| F890 | 1.10E-07 | M252Y/N434Y/Y436V                         |
| F891 | 1.70E-07 | M252Y/N434Y/Y436W                         |
| F892 | 7.10E-08 | M252Y/S254T/N434Y/Y436I                   |
| F893 | 9.80E-08 | L235K/S239K/M252Y/N434Y/Y436I             |

10

20

30

40

【0 2 8 5】

表 1 3 - 1 3 は表 1 3 - 1 2 の続きの表である。

【表 1 3 - 1 3】

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

10

20

30

40

【0 2 8 6】

表 1 3 - 1 4 は表 1 3 - 1 3 の続きの表である。

【表 1 3 - 1 4】

|       |          |                                                                   |
|-------|----------|-------------------------------------------------------------------|
| F978  | 1.30E-06 | M252Y/S254Q/N434Y                                                 |
| F980  | 1.80E-07 | M252Y/S254V/N434Y                                                 |
| F987  | 4.00E-08 | P238D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V                         |
| F988  | 6.90E-08 | P238D/T250V/M252Y/N286E/N434Y/Y436V                               |
| F989  | 1.40E-08 | L235R/S239K/M252Y/V308P/N434Y/Y436V                               |
| F990  | 9.40E-09 | L235R/S239K/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V                   |
| F991  | 1.30E-08 | L235R/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V                   |
| F992  | 5.10E-08 | L235R/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/M428I/N434Y/Y436V                   |
| F993  | 3.80E-08 | M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V                                     |
| F994  | 2.80E-07 | M252Y/N325G/N434Y                                                 |
| F995  | 2.90E-07 | L235R/P238D/S239K/M252Y/N434Y                                     |
| F996  | 1.30E-07 | L235R/P238D/S239K/M252Y/N434Y/Y436V                               |
| F997  | 3.80E-07 | K248I/T250V/M252Y/N434Y/Y436V                                     |
| F998  | 8.50E-07 | K248Y/T250V/M252Y/N434Y/Y436V                                     |
| F999  | 2.10E-07 | T250V/M252Y/E258H/N434Y/Y436V                                     |
| F1005 |          | N325G                                                             |
| F1008 | 1.70E-07 | L235R/S239K/T250V/M252Y/N434Y/Y436V                               |
| F1009 | 1.20E-08 | L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V             |
| F1010 | 1.90E-07 | L235R/S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y                               |
| F1011 | 4.50E-08 | T250V/M252Y/V308P/N434Y                                           |
| F1012 | 4.70E-08 | L235R/S239K/T250V/M252Y/V308P/N434Y                               |
| F1013 | 3.00E-08 | T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y                               |
| F1014 | 3.20E-08 | L235R/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y                   |
| F1015 | 2.20E-08 | L235R/S239K/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y                         |
| F1016 | 3.80E-09 | T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V                   |
| F1017 | 4.20E-09 | L235R/S239K/T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V       |
| F1018 | 3.20E-09 | L235R/S239K/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V             |
| F1019 | 3.40E-07 | P238D/T250V/M252Y/N325G/N434Y                                     |
| F1020 | 8.50E-08 | P238D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N325G/N434Y                         |
| F1021 | 3.30E-07 | P238D/T250V/M252Y/N325A/N434Y                                     |
| F1022 |          | K326D/L328Y                                                       |
| F1023 | 4.40E-08 | S239D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V                         |
| F1024 | 4.00E-08 | T250V/M252Y/T307Q/Q311A/K326D/L328Y/N434Y/Y436V                   |
| F1025 | 3.60E-08 | S239D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/K326D/L328Y/N434Y/Y436V             |
| F1026 | 8.40E-08 | M252Y/T307A/Q311H/N434Y/Y436V                                     |
| F1027 | 8.60E-08 | L235R/S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y/Y436V                         |
| F1028 | 4.60E-08 | G236A/S239D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V                   |
| F1029 | 5.10E-08 | T250V/M252Y/T307Q/Q311A/I332E/N434Y/Y436V                         |
| F1030 |          | I332E                                                             |
| F1031 | 5.30E-08 | G236A/S239D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/I332E/N434Y/Y436V             |
| F1032 | 4.30E-08 | P238D/T250V/M252Y/T307Q/Q311A/N325G/N434Y/Y436V                   |
| F1033 | 1.00E-06 | P238D/N434W                                                       |
| F1034 | 1.50E-08 | L235K/S239K/M252Y/V308P/N434Y/Y436V                               |
| F1035 | 1.00E-08 | L235K/S239K/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V                   |
| F1036 | 1.40E-08 | L235K/S239K/M252Y/N286E/T307Q/Q311A/N434Y/Y436V                   |
| F1037 | 6.10E-08 | L235K/S239K/M252Y/T307Q/Q311A/M428I/N434Y/Y436V                   |
| F1038 | 2.80E-07 | L235K/P238D/S239K/M252Y/N434Y                                     |
| F1039 | 1.30E-07 | L235K/P238D/S239K/M252Y/N434Y/Y436V                               |
| F1040 | 2.00E-07 | L235K/S239K/T250V/M252Y/N434Y/Y436V                               |
| F1041 | 1.40E-08 | L235K/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V             |
| F1042 | 2.00E-07 | L235K/S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y                               |
| F1043 | 5.20E-08 | L235K/S239K/T250V/M252Y/V308P/N434Y                               |
| F1044 | 3.50E-08 | L235K/S239K/T250V/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y                   |
| F1045 | 2.50E-08 | L235K/S239K/M252Y/T307Q/V308P/Q311A/N434Y                         |
| F1046 | 4.50E-09 | L235K/S239K/T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V       |
| F1047 | 3.40E-09 | L235K/S239K/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/N434Y/Y436V             |
| F1048 | 9.90E-08 | L235K/S239K/M252Y/T307A/Q311H/N434Y/Y436V                         |
| F1050 | 3.50E-09 | T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y/Y436V             |
| F1051 | 3.90E-09 | L235R/S239K/T250V/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y/Y436V |
| F1052 | 3.20E-09 | L235R/S239K/M252Y/N286E/T307Q/V308P/Q311A/M428I/N434Y/Y436V       |

## 【0 2 8 7】

〔参考実施例 1〕 抗体の発現ベクターの作製および抗体の発現と精製

抗体の変領域のH鎖およびL鎖の塩基配列をコードする全長の遺伝子の合成は、Assembly PCR等を用いて、当業者公知の方法で作製した。アミノ酸置換の導入はPCR等を用いて当業者公知の方法で行った。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、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。作製したプラスミドをヒト胎児腎癌細胞由来HEK293H株 (I

10

20

30

40

50

nvitrogen社)、またはFreeStyle293細胞(Invitrogen社)に、一過性に導入し、抗体の発現を行った。得られた培養上清を回収した後、0.22 μmフィルターMILLEX(R)-GV(Millipore)、または0.45 μmフィルターMILLEX(R)-GV(Millipore)を通して培養上清を得た。得られた培養上清から、rProtein A Sepharose Fast Flow(GEヘルスケア)またはProtein G Sepharose 4 Fast Flow(GEヘルスケア)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、得られた値からPACE等の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(Protein Science(1995); 4, 2411-2423)。

#### 【0288】

〔参考実施例2〕 FcγRの調製方法および改変抗体とFcγRとの相互作用解析方法

FcγRの細胞外ドメインを以下の方法で調製した。まずFcγRの細胞外ドメインの遺伝子の合成を当業者公知の方法で実施した。その際、各FcγRの配列はNCBIに登録されている情報に基づき作製した。具体的には、FcγRIについてはNCBIのアクセッション番号NM\_000566(バージョン番号NM\_000566.3)の配列、FcγRIIaについてはNCBIのアクセッション番号NM\_001136219(バージョン番号NM\_001136219.1)の配列、FcγRIIbについてはNCBIのアクセッション番号NM\_004001(バージョン番号NM\_004001.3)の配列、FcγRIIIaについてはNCBIのアクセッション番号NM\_001127593(バージョン番号NM\_001127593.1)の配列、FcγRIIIbについてはNCBIのアクセッション番号NM\_000570(バージョン番号NM\_000570.3)の配列に基づいて作製し、C末端にHisタグを付加した。またFcγRIIa、FcγRIIIa、FcγRIIIbは多型が存在することが知られているが、FcγRIIaの多型部位はWarmerdamら(J. Exp. Med. (1990) 172, 19-25)、FcγRIIIaの多型部位はWuら(J. Clin. Invest. (1997) 100 (5), 1059-1070)、FcγRIIIbの多型部位はOryら(J. Clin. Invest. (1989) 84, 1688-1691)を参考にして作製した。

#### 【0289】

得られた遺伝子断片を動物細胞発現ベクターに挿入し、発現ベクターを作製した。作製した発現ベクターをヒト胎児腎癌細胞由来FreeStyle293細胞(Invitrogen社)に、一過性に導入し、目的タンパク質を発現させた。なお、結晶構造解析用に用いたFcγRIIbについては、終濃度10 μg/mLのKifunesine存在下で目的タンパク質を発現させ、FcγRIIbに付加される糖鎖が高マンノース型になるようにした。培養し、得られた培養上清を回収した後、0.22 μmフィルターを通して培養上清を得た。得られた培養上清は原則として次の4ステップで精製した。第1ステップは陽イオン交換カラムクロマトグラフィー(SP Sepharose FF)、第2ステップはHisタグに対するアフィニティカラムクロマトグラフィー(HisTrap HP)、第3ステップはゲルろ過カラムクロマトグラフィー(Superdex200)、第4ステップは無菌ろ過、を実施した。ただし、FcγRIについては、第1ステップにQ sepharose FFを用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを実施した。精製したタンパク質については分光光度計を用いて280 nmでの吸光度を測定し、得られた値からPACE等の方法により算出された吸光係数を用いて精製タンパク質の濃度を算出した(Protein Science (1995) 4, 2411-2423)。

#### 【0290】

Biacore T100(GEヘルスケア)、Biacore T200(GEヘルスケア)、Biacore A100、Biacore 4000を用いて、各改変抗体と上記で調製したFcγレセプターとの相互作用解析を行った。ランニングバッファーにはHBS-EP+(GEヘルスケア)を用い、測定温度は25℃とした。Series S Sensor Chip CM5(GEヘルスケア)またはSeries S sensor Chip CM4(GEヘルスケア)に、アミンカップリング法により抗原ペプチド、ProteinA(Thermo Scientific)、Protein A/G(Thermo Scientific)、Protein L(ACTIGENまたはBioVision)を固定化したチップ、あるいはSeries S Sensor Chip SA(certified)(GEヘルスケア)に対して予めビオチン化しておいた抗原ペプチドを相互作用させ、固定化したチップを用いた。

#### 【0291】

これらのセンサーチップに目的の抗体をキャプチャーさせ、ランニングバッファーで希釈したFcγレセプターを相互作用させ、抗体に対する結合量を測定し、抗体間で比較した

10

20

30

40

50

。ただし、Fcγレセプターの結合量はキャプチャーした抗体の量に依存するため、各抗体のキャプチャー量でFcγレセプターの結合量を除した補正值で比較した。また、10 mM glycine-HCl、pH1.5を反応させることで、センサーチップにキャプチャーした抗体を洗浄し、センサーチップを再生して繰り返し用いた。

#### 【0292】

また、各改変抗体のFcγRに対するKD値を算出するため速度論的な解析は以下の方法にしたがって実施した。まず、上記のセンサーチップに目的の抗体をキャプチャーさせ、ランニングバッファーで希釈したFcγレセプターを相互作用させ、得られたセンサーグラムに対してBiacore Evaluation Softwareにより測定結果を1:1 Langmuir binding modelでglobal fittingさせることで結合速度定数ka (L/mol/s)、解離速度定数kd(1/s)を算出し、その値から解離定数KD (mol/L) を算出した。

10

#### 【0293】

また、各改変抗体とFcγRとの相互作用が微弱で、上記の速度論的な解析では正しく解析できないと判断された場合、その相互作用についてはBiacore T100 Software Handbook BR1006-48 Edition AEに記載の以下の1:1結合モデル式を利用してKDを算出した。

#### 【0294】

1:1 binding modelで相互作用する分子のBiacore上での挙動は以下の式1によって表わすことができる。

〔式1〕

$$R_{eq} = C \bullet R_{max} / (KD + C) + RI$$

20

Req: a plot of steady state binding levels against analyte concentration

C: concentration

RI: bulk refractive index contribution in the sample

Rmax: analyte binding capacity of the surface

#### 【0295】

この式を変形すると、KDは以下の式2のように表わすことができる。

〔式2〕

$$KD = C \bullet R_{max} / (R_{eq} - RI) - C$$

30

#### 【0296】

この式にRmax、RI、Cの値を代入することで、KDを算出することが可能である。RI、Cについては測定結果のセンサーグラム、測定条件から値を求めることができる。Rmaxの算出については、以下の方法にしたがった。その測定回に同時に評価した比較対象となる相互作用が十分強い抗体について、上記の1:1 Langmuir binding modelでglobal fittingさせた際に得られたRmaxの値を、比較対象となる抗体のセンサーチップへのキャプチャー量で除し、評価したい改変抗体のキャプチャー量で乗じて得られた値をRmaxとした。

#### 【0297】

〔参考実施例3〕 可溶型ヒトIL-6レセプター (hsIL-6R) の調製

抗原であるヒトIL-6レセプターの組み換えヒトIL-6レセプターは以下のように調製された。J. Immunol. (1994) 152, 4958-4968で報告されているN末端側1番目から357番目のアミノ酸配列からなる可溶型ヒトIL-6レセプター（以下、hsIL-6R）を定常的に発現するCHO株が当業者公知の方法で構築された。当該CHO株を培養することによって、hsIL-6Rを発現させた。得られた当該CHO株の培養上清から、Blue Sepharose 6 FFカラムクロマトグラフィー、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーの二工程によってhsIL-6Rが精製された。最終工程においてメインピークとして溶出された画分が最終精製品として用いられた。

40

#### 【0298】

〔参考実施例4〕 pH中性域の条件下におけるヒトFcRnに対する結合活性を有するpH依存的結合抗体による標的抗原の血漿中からの除去

可溶型抗原に対する既存の中和抗体を投与すると、抗原が抗体に結合することで血漿中

50

での持続性が高まることが予想される。抗体は一般的に長い半減期（1週間～3週間）を有するが、一方で抗原は一般的に短い半減期（1日以下）を有する。そのため、血漿中で抗体に結合した抗原は、抗原単独で存在する場合に比べて顕著に長い半減期を有するようになる。その結果として、既存の中和抗体を投与することにより、血漿中の抗原濃度の上昇が起こる。このような事例は様々な可溶型抗原を標的とした中和抗体において報告されており、一例を挙げるとIL-6 (J Immunotoxicol. 2005, 3, 131-9.)、amyloid beta (mAbs, 2010, 2:5, 1-13)、MCP-1 (ARTHRITIS & RHEUMATISM 2006, 54,2387-92)、hepcidin (AA PS J. 2010, 4, 646-57.)、sIL-6 receptor (Blood. 2008 Nov 15;112(10):3959-64.)などがある。既存の中和抗体の投与により、ベースラインからおよそ10倍～1000倍程度（上昇の程度は、抗原によって異なる）の血漿中総抗原濃度の上昇が報告されている。ここで、血漿中総抗原濃度とは、血漿中に存在する抗原の総量としての濃度を意味しており、すなわち抗体結合型と抗体非結合型の抗原濃度の和として表される。このような可溶型抗原を標的とした抗体医薬にとっては、血漿中総抗原濃度の上昇が起こることは好ましくない。なぜなら、可溶型抗原を中和するためには、少なくとも血漿中総抗原濃度を上回る血漿中抗体濃度が必要なためである。つまり、血漿中総抗原濃度が10倍～1000倍上昇すること、それを中和するための血漿中抗体濃度（すなわち抗体投与量）としても、血漿中総抗原濃度の上昇が起こらない場合に比べて10倍～1000倍が必要になることを意味する。一方で、既存の中和抗体に比較して血漿中総抗原濃度を10倍～1000倍低下することができれば、抗体の投与量を同じだけ減らすことが可能である。このように、血漿中から可溶型抗原を消失させて、血漿中総抗原濃度を低下させることができる抗体は、既存の中和抗体に比較して顕著に有用性が高い。

#### 【0299】

PCT/JP2011/001888で示した試験は、pH7.4でのFcRnへの結合を増強した抗原結合分子（IL-6レセプター結合抗体）は、可溶型抗原を消失させて、血漿中総抗原濃度を低下させることが可能であること、さらに可溶型抗原を消失させる効果はpH依存的に抗原に結合する（血漿中のpH7.4の条件下では抗原に結合し、エンドソーム内のpH6.0の条件下では抗原を解離する）性質を付与することによって向上することを示している。抗原結合分子の投与によって血漿中総抗原濃度を低下させるためには、抗原結合分子が抗原結合ドメインとヒトFcRn結合ドメインからなり、ヒトFcRn結合ドメインは酸性条件下および中性条件下でヒトFcRnへの結合活性を有し、さらに中性条件下でのヒトFcRnへの結合活性が3200 nM以上であることが望ましい。この場合の比較対象の抗原結合分子は、同一の抗原結合ドメインを有し、ヒトFcRn結合ドメインとして天然型のヒトIgG Fcドメインからなる抗原結合分子である。

#### 【0300】

図9は、既存の中和抗体に比べて中性pHにおけるFcRnへの結合を増強したpH依存的抗原結合抗体の投与により、血漿中から可溶型抗原が消失するメカニズムを表している。pH依存的抗原結合能をもたない既存の中和抗体は、血漿中で可溶型抗原に結合した後、細胞との非特異的な相互作用により緩やかに取り込まれる。細胞内へと取り込まれた中和抗体と可溶型抗原の複合体は、酸性のエンドソームへと移行し、FcRnによって血漿中へとリサイクルされる。一方、中性条件下におけるFcRnへの結合を増強したpH依存的抗原結合抗体は、血漿中で可溶型抗原に結合した後、細胞膜上にFcRnを発現している細胞の中へと速やかに取り込まれる。ここで、pH依存的抗原結合抗体に結合した可溶型抗原は、酸性のエンドソームの中で、pH依存的結合能により抗体から解離する。抗体から解離した可溶型抗原は、その後リソソームへと移行し、タンパク質分解活性による分解を受ける。一方、可溶型抗原を解離した抗体は、FcRnによって細胞膜上へとリサイクルされ、再び血漿中に放出される。このようにリサイクルされてフリーとなった抗体は、他の可溶型抗原へと再度結合することができる。このようなFcRnを介した細胞内への取り込み、可溶型抗原の解離と分解、抗体のリサイクル、といったサイクルを繰り返すことによって、このような中性条件下でのFcRn結合を増強したpH依存的抗原結合抗体は、大量の可溶型抗原をリソソームへと移行させて血漿中総抗原濃度を低下させることができる。

## 【0301】

〔参考実施例5〕 In vitroにおいて中和活性の無い抗体が標的抗原を血漿中から除去することによるin vivo薬効を発揮することの証明

これまでは抗原結合分子がin vivoで標的抗原の中和による薬効を発揮するためには、in vitroにおいて標的抗原の中和活性を有していることが必然であった。通常の抗原結合分子において、in vitroで中和活性が無い通常の抗原結合分子がin vivoで標的抗原の中和による薬効を発揮することが不可能であるためである。

一方、参考実施例4において、pH中性域の条件下におけるヒトFcRnに対する結合活性を有するpH依存的結合抗体は、抗体をin vivoに投与することにより、標的抗原を血漿中から除去できることが示されている。抗体を投与することにより標的抗原を血漿中から除去することができれば、その抗体に抗原に対する中和活性が無かったとしても、標的抗原の作用を実質的に遮断することが可能であると考えた。

10

## 【0302】

ヒトナイブライブラリーからヒトIL-6レセプターに対するpH依存性抗体6RKE02-IgG1の取得

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。

構築されたナイ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ヒトIL-6レセプターが用いられた。

20

## 【0303】

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

30

## 【0304】

具体的には、調製されたファージライブラリー液に250pmol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1mLの1.2mM CaCl<sub>2</sub>/TBS (1.2mM CaCl<sub>2</sub>を含むTBS) にて1回洗浄された。その後、一般的な方法に従い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10mLの大腸菌株TG1に添加された。37℃で1時間緩やかに上記大腸菌の攪拌培養を行うことによって、ファージを大腸菌に感染させた。感染させた大腸菌は、225mm x 225mm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。

40

## 【0305】

2回目以降のパンニングでは、pH依存的結合能を指標にファージの濃縮が行われた。具体的には、調製したファージライブラリー液に40pmol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1mLの1.2mM CaCl<sub>2</sub>/TBS (1.2mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1% Tween 20を含むTBS) と1.

50

2mM  $\text{CaCl}_2$ /TBSにて洗浄された。その後0.1mLの50mM MES/1.2mM  $\text{CaCl}_2$ /150mM NaCl (pH5.5) が加えられたビーズは室温で懸濁された後、即座に磁気スタンドを用いてビーズが分離され、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10mLの大腸菌株TG1に添加された。37℃で1時間緩やかに上記大腸菌の攪拌培養を行うことによって、ファージを大腸菌に感染させた。感染させた大腸菌は225mm x 22.5mm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。pH依存的結合能を指標とするパンニングが複数回繰り返された。

#### 【0306】

パンニングを2回、3回、4回繰り返した後、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1.2mMカルシウムイオン濃度となるようにBSAおよび $\text{CaCl}_2$ が加えられたファージを含有する培養上清が以下の手順でELISAに供された。StreptaWell 96マイクロタイタープレート (Roche) がビオチン標識抗原を含む100  $\mu\text{L}$ 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  $\mu\text{L}$ 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上記で調製された培養上清が加えられ、当該プレートを37℃で1時間静置することによって、ファージを提示する抗体を各ウェルに存在する抗原に結合させた。1.2mM  $\text{CaCl}_2$ /TBSTにて洗浄された各ウェルに、1.2mM  $\text{CaCl}_2$ /TBS (pH7.6) もしくは1.2mM  $\text{CaCl}_2$ /TBS (pH5.5) が加えられ、当該プレートは37℃で30分間静置しインキュベートされた。1.2mM  $\text{CaCl}_2$ /TBST (pH7.6) にて洗浄された後に、終濃度4%のBSAおよび1.2mM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後、当該プレートを1時間インキュベートさせた。1.2mM  $\text{CaCl}_2$ /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を硫酸の添加により停止させた後、450 nmの吸光度によって当該発色が測定された。

#### 【0307】

また、ファージELISAを実施したクローンを鋳型として、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。

上記のファージELISA、および配列解析の結果から、pH依存的な抗原に対する結合能があると判断される抗体断片の種類を多く含むライブラリープールの選択を行った。

#### 【0308】

##### 抗体の発現

ファージELISAの結果、pH依存的な抗原に対する結合能があると判断されたクローンが多く含まれているライブラリープールについて、抗体遺伝子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、 $2.63 \times 10^5$  細胞/mLの細胞密度で96ウェルプレートの各ウェルへ190  $\mu\text{L}$ 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℃、8% CO<sub>2</sub>) 中で4日間培養が行われた。

#### 【0309】

##### Biacore A100を用いた相互作用解析評価

上記の方法により取得された抗体に対し、Biacore A100 (GE Healthcare) を用いて、目的の抗体とIL-6Rとの相互作用解析を行った。ランニングバッファーには10mM ACES, 150mM NaCl, 1.2mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.05% Tween20, pH7.4もしくは10mM ACES, 150mM NaCl, 1.2mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.05% Tween20, pH6.0を用い、測定温度は25℃とした。Series S Sencor Chip CM 5 (GE Healthcare) に、アミンカップリング法によりProtein A/G (Thermo Scientific) を固定化したチップを用いた。チップへ目的の抗体をキャプチャーさせ、ランニングバッファーで希釈したIL-6Rを相互作用させた。10mM glycine-HCl, pH1.5を反応させることで、チップにキャプチャーした抗体を洗浄し、チップを再生して繰り返し用いた。

各抗体のIL-6Rに対する結合活性は主にIL-6Rの抗体に対する結合量を指標として評価した。IL-6Rの抗体に対する結合量には、キャプチャーさせた抗体に対してIL-6Rを相互作用させた際のセンサーグラムの変化量 (RU) を、抗体をチップにキャプチャーさせた際の変化量 (RU) で除した値を用いた。

#### 【0310】

##### 抗体の発現と精製

BiacoreA100でのスクリーニング結果、pH依存的な抗原に対する結合能があると判断されたクローンについて再度抗体発現を行い、評価を実施した。参考実施例1の方法を用いて抗体を作成した。

#### 【0311】

##### 6RKE02-IgG1のヒト可溶型IL-6受容体に対するpH依存的結合評価

上記の方法により、6RKE02H-IgG1 (配列番号: 1) を重鎖として有し、6RKE02L-k0 (配列番号: 2) を軽鎖として有する、6RKE02-IgG1が見出された。Biacore T100 (GE Healthcare) を用いて、6RKE02-IgG1に対し、IL-6Rとの相互作用解析を行い、解離定数 (KD) を算出した。

ランニングバッファーには10mM ACES, 150mM NaCl, 0.05% Tween20, pH7.4を用い、測定温度は37℃とした。Series S Sencor Chip CM4(GE Healthcare) に、アミンカップリング法によりProtein A/G (Thermo Scientific) を固定化したチップを用いた。チップへ目的の抗体をキャプチャーさせ、そこへランニングバッファーで800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5nMに希釈したIL-6Rおよびランニングバッファーを流速 2  $\mu$ L/分で15分間相互作用させた。10mM glycine-HCl, pH1.5を反応させることで、チップにキャプチャーした抗体を洗浄し、チップを再生して繰り返し用いた。

6RKE02-IgG1のIL-6Rに対する解離定数KD (mol/L)は、Biacoreの測定結果として得られたセンサーグラムに対してBiacore Evaluation Softwareを用いてsteady state affinity解析を行うことで算出した。この方法により算出されたpH7.4における6RKE02-IgG1とIL-6Rとの解離定数 (KD) は1.4E-7 (M)であった。

#### 【0312】

次に、6RKE02-IgG1のhIL-6Rに対する結合のpH依存性をBiacore T100を用いて評価した。ランニングバッファーには10mM ACES, 150mM NaCl, 0.05% Tween20, pH7.4および10mM ACES, 150mM NaCl, 0.05% Tween20, pH6.0を用い、測定温度は37℃とした。Series S Sencor Chip CM4(GE Healthcare) に、アミンカップリング法によりProtein A/G (Thermo Scientific) を固定化したチップを用いた。チップへ目的の抗体をキャプチャーさせ、そこへ1000, 250, 62.5nMにランニングバッファーで希釈したhIL-6Rおよびランニングバッファーを相互作用させた。

この方法で測定して得られたpH7.4およびpH6.0におけるセンサーグラムをそれぞれ図10に示した。抗体のキャプチャー量を100 RUにnormalizeした際の6RKE02-IgG1のhIL-6Rに対する結合相および解離相を示す。図10の結果を比較すると、pH6.0ではpH7.4の場合と比較して、6RKE02-IgG1のhIL-6Rに対する結合が減少することが明らかとなった。

#### 【0313】

##### ヒトgp130発現BaF3細胞 (BaF/gp130) による生物活性評価

ヒトIL-6/可溶型ヒトIL-6レセプター依存性増殖を示すBaF3/gp130を用いて、6RKE02-IgG1およびTocilizumabのIL-6レセプター中和活性を評価した。BaF3/gp130を10% FBSを含むRPMI1640培地で3回洗浄した後に、10% FBSを含むRPMI1640培地に懸濁し、human interleukin-6 (R&D Systems) 及び可溶型ヒトIL-6レセプターの終濃度がともに15ng/mLとなるように、また細胞が1.5 x 10<sup>5</sup> cells/mLとなるように調製し、96 well-plate (CORNING) の各wellに50  $\mu$ Lずつ分注した。次に、精製した抗体をPBSで段階希釈したのち、10% FBSを含むRPMI1640培地に20倍希釈して、各wellに50  $\mu$ Lずつ混合した。37℃、5% CO2条件下で、3日間培養し、PBSで2倍に希釈したWST-8試薬 (Cell Counting Kit-8、株式会社同仁化学研究所) を20  $\mu$ L/wellで加え、4時間培養した後に、xMarkマイクロプレートリーダー (バイオ・ラッドラボラトリーズ) により450 nmの吸光度 (参照波長620 nm) を測定し、IL

10

20

30

40

50

-6レセプター中和活性を評価した。結果を図 11 に示す。6RKE02-IgG1は、BaF3/gp130のヒトIL-6/可溶型ヒトIL-6レセプター依存性増殖を阻害しないことから、中和活性がない事が示された。

### 【0314】

#### 中性域pHにおけるFcRn結合活性を増強した6RKE02-IgG1の調製

6RKE02-IgG1に対してpH中性域の条件下におけるマウスFcRnに対する結合活性を付与するために、6RKE02-IgG1の重鎖定常領域である6RKE02H-IgG1に対してアミノ酸変異が導入された。具体的には、参考実施例1の方法を用いて、6RKE02H-IgG1に対してEUナンバリング332番目のIleがValに置換されたアミノ酸置換、及びEUナンバリング434番目のAsnがTyrに置換されたアミノ酸置換が導入され、6RKE02H-F29（配列番号：3）が作製された。参考実施例1の方法を用いて、6RKE02H-F29を重鎖として含み、6RKE02L-k0を軽鎖として含む、6RKE02-F29が作製された。

10

### 【0315】

#### マウスFcRnに対する結合の速度論的解析

6RKE02-F29のマウスFcRnに対する結合活性を評価するために、VH3-IgG1（配列番号：4）およびL(WT)-CK（配列番号：5）からなるVH3/L(WT)-IgG1、およびVH3-F29（配列番号：6）およびL(WT)-CK（配列番号：5）からなるVH3/L(WT)-F29が作製された。

VH3/L(WT)-IgG1、およびVH3/L(WT)-F29を用いて、マウスFcRnに対する結合活性の評価が以下のように実施された。

### 【0316】

20

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。Sensor chip CM4 (GE Healthcare) 上にアミンカップリング法でprotein L (ACTIGEN) 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。次に、マウスFcRnの希釈液とブランクであるランニングバッファーをインジェクトし、センサーチップ上にキャプチャー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50mmol/L sodium phosphate、150mmol/L NaCl、0.05% (w/v) Tween20、pH7.0を用い、マウスFcRnの希釈にもそれぞれのバッファーを使用した。再生には10mmol/L Glycine-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 又はT200 Evaluation Software (GE Healthcare)を用いた。

30

結果を以下の表14（ヒトIgG1とF29のマウスFcRnに対するKD）に示した。F29は、pH中性域の条件下（pH7.0）においてマウスFcRnに対する結合活性が増強されていることが示された。

### 【0317】

#### 【表14】

| 抗体      | mFcRn KD (M) | アミノ酸置換      |
|---------|--------------|-------------|
| ヒト IgG1 | ND           |             |
| F29     | 8.5E-08      | I332V/N434Y |

40

### 【0318】

#### ノーマルマウスを用いたin vivo infusion試験

ノーマルマウス（C57BL/6J mouse、Charles River Japan）の背部皮下に可溶型ヒトIL-6レセプターを充填したinfusion pump(MINI-OSMOTIC PUMP MODEL2004、alzet)を埋め込むことで、血漿中可溶型ヒトIL-6レセプター濃度が定常状態に維持される動物モデルを作製した。その動物モデルに対して、抗ヒトIL-6レセプター抗体を投与し、投与後の可溶型ヒトIL-6レセプターの体内動態を評価した。可溶型ヒトIL-6レセプターに対する中和抗体の産生を抑制するため、monoclonal anti-mouse CD4 antibody(in-house調製品)を尾静脈に20mg/kgで単回投与した。その後、92.8 µg/mLの可溶型ヒトIL-6レセプターを充填したinf

50

usion pumpのマウス背部皮下への埋め込みを実施した。Infusion pump埋め込み3日後に6RKE02-IgG1および6RKE02-F29をノーマルマウスの背部皮下に、1mg/kgで単回投与した。抗ヒトIL-6レセプター抗体の投与後、適切なポイントで採血が行われた。採取された血液を直ちに4℃、15,000 rpmで15分間遠心分離することによって、血漿が得られた。分離された血漿は、測定を実施するまで-20℃以下に設定された冷凍庫に保存された。

### 【0319】

マウスの血漿中hsIL-6R濃度は電気化学発光法にて測定された。2000、1000、500、250、125、62.5、31.25pg/mLに調製されたhsIL-6R検量線試料および50倍以上希釈されたマウス血漿測定試料を、SULFO-TAG NHS Ester (Meso Scale Discovery) でルテニウム化したMonoclonal Anti-human IL-6R Antibody (R&D)、Biotinylated Anti-human IL-6 R Antibody (R&D) およびTocilizumabと混合することによって37℃で1晩反応させた。Tocilizumabの終濃度は333 µg/mLとなるように調製された。その後、反応液がMA400 PR Streptavidin Plate (Meso Scale Discovery) に分注された。さらに室温で1時間反応させた後、反応液を洗浄し、Read Buffer T(×4) (Meso Scale Discovery) が分注された。その後ただちにSECTOR PR 400 reader (Meso Scale Discovery) で測定が行われた。hsIL-6R濃度は検量線のレスポンスから解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて算出された。

### 【0320】

測定されたヒトIL-6レセプター濃度推移が図12に示されている。抗体非投与群および6RKE02-IgG1投与群においては、血漿中hsIL-6R濃度を低下させることが出来なかったのに対して、pH依存的にIL-6レセプターに結合し、且つ、中性領域においてマウスFcRnに対して結合活性を有する6RKE02-F29を投与した群においては、顕著な血漿中hsIL-6R濃度の低下が認められた。

### 【0321】

ノーマルマウスを用いたin vivo薬効試験 (試験1)

In vitroにおいて中和活性の無い6RKE02-F29がhsIL-6Rを血漿中から除去することによりin vivoで薬効を発揮できるかどうかをノーマルマウスモデル (C57BL/6J Jclマウス) で検証した。hIL-6およびhsIL-6Rの混合液をマウスに投与すると、hIL-6/hsIL-6Rの複合体がマウスgp130に結合することによるtrans-signaling、および、hIL-6がマウス膜型IL-6Rに結合しさらにマウスgp130に結合することによるclassical-signalingの両方のシグナルが入り、SAA(血清アミロイドA)の産生が誘導され、血漿中SAA濃度が上昇することが知られている。

C57BL/6J Jclマウス (雌) に0, 1, 10及び30mg/kgの6RKE02-F29を静脈内投与し、投与1時間後に、4 µg/kgのhIL-6と7 µg/kgのhsIL-6Rの混合液を静脈内投与した。2回目の静脈内投与後6時間目に採血して、血漿SAA濃度をELISAにて測定した。内在性のマウスIL-6による血漿SAA濃度への影響を除外する目的で、全個体に20mg/kgのMR16-1 (ラット抗マウスIL-6R抗体) を被験物質投与時に同時に静脈内投与した。これにより、hIL-6/hsIL-6Rを投与することでtrans-signalingのみが起こることになり、hsIL-6Rを血漿中から除去することでin vivoで薬効を発揮することが出来るか評価することができる。なお、20mg/kgのMR16-1を静脈内投与した溶媒投与群に4 µg/kgのhIL-6を静脈内投与して、内在性のマウスIL-6Rの影響が除外されていることを確認した。

### 【0322】

血漿SAA濃度はSAA Mouse ELISA Kit (カタログ番号KMA0021, Life Technologies Corporation) を用いて、キット添付の方法に従って測定した。抗体投与6時間後の血漿中SAA濃度を図13に示した。また、抗体投与6時間後の血漿中hsIL-6R濃度を表15に示した。

### 【0323】

【表 1 5】

| samples                  | ng/mL |
|--------------------------|-------|
| 6RKE02-F29 (F29) 30mg/kg | N.D.  |
| 6RKE02-F29 (F29) 10mg/kg | 0.38  |
| 6RKE02-F29 (F29) 1mg/kg  | 3.22  |
| IL6/IL6R                 | 17.35 |
| IL6                      | N.D.  |

【0 3 2 4】

6RKE02-F29は用量依存的に血漿中hsIL-6R濃度を低下させ、それにより血漿中SAA濃度を下げる効果があることが確認された。

【0 3 2 5】

ノーマルマウスを用いたin vivo薬効試験（試験2）

C57BL/6J Jclマウス（雌）に0, 10及び30mg/kgの6RKE02-F29を静脈内投与し、試験2においては投与24時間後に、4 µg/kgのhIL-6と7 µg/kgのhsIL-6Rの混合液を静脈内投与した。2回目の静脈内投与後6時間目に採血して、血漿SAA濃度をELISAにて測定した。内在性のマウスIL-6Rによる血漿SAA濃度への影響を除外する目的で、全個体に20mg/kgのMR16-1（ラット抗マウスIL-6R抗体）を被験物質投与時に同時に静脈内投与した。なお、20mg/kgのMR16-1を静脈内投与した溶媒投与群に4 µg/kgのhIL-6を静脈内投与して、内在性のマウスIL-6Rの影響が除外されていることを確認した。

抗体投与6時間後の血漿中SAA濃度を図14に示した。また、抗体投与6時間後の血漿中hsIL-6R濃度を表16に示した。

【0 3 2 6】

【表 1 6】

| samples                  | ng/mL |
|--------------------------|-------|
| 6RKE02-F29 (F29) 30mg/kg | 0.22  |
| 6RKE02-F29 (F29) 10mg/kg | 0.82  |
| IL6/IL6R                 | 27.50 |
| IL6                      | N.D.  |

【0 3 2 7】

6RKE02-F29は用量依存的に血漿中hsIL-6R濃度を低下させ、それにより血漿中SAA濃度を下げる効果があることが確認された。

【0 3 2 8】

試験1および試験2より、6RKE02-F29は、in vitroにおいてはhsIL-6Rを介したtrans-signalingに対する阻害活性を有していないにもかかわらず、in vivoでhsIL-6Rを血漿中から除去することでtrans-signalingに対する阻害効果を発揮できることが見出された。

【0 3 2 9】

これにより、pH依存的に標的抗原に結合し、中性pH域におけるFcRn結合活性を有する抗体を用いることで、in vitroにおいては特定のエピトープに対する中和活性を有してなくても、標的抗原を血漿中から除去してしまうことによって、in vivoにおいて薬効（阻害効果）を発揮することが可能であると言える。モノクローナル抗体をはじめとする通常の抗原結合分子は、単一エピトープにしか結合することができない。一方で、抗原によっては中和すべき抗原が複数存在することもあり、このような抗原に対しては、通常のモノクローナル抗体は一つのエピトープの作用を中和しても、他のエピトープの作用を中和することができない。このような場合でも、本実施例で見出されたようにpH依存的に標的抗原に結合し、中性pH域におけるFcRn結合活性を有するモノクローナル抗体を用いることにより、血漿中から抗原を除去することで実質的に標的抗原の全てのエピトープの作用を

10

20

30

40

50

阻害することが可能となる。

### 【0330】

〔参考実施例6〕 pH中性域の条件下でのマウスFc $\gamma$ Rに対する結合活性が天然型ヒトIgGのFc領域の結合活性より高い抗原結合分子の作製

#### （6-1）pH依存的ヒトIL-6レセプター結合抗体について

W02009/125825に記載されているH54-IgG1（配列番号：113）とL28-CK（配列番号：114）からなるH54/L28-IgG1はヒト化抗IL-6レセプター抗体であり、VH3-IgG1（配列番号：4）とVL3-CK（配列番号：122）からなるFv4-IgG1は、H54/L28-IgG1に対して可溶型ヒトIL-6レセプターへpH依存的に結合する特性（pH7.4において結合し、pH5.8において解離する）を付与したヒト化抗IL-6レセプター抗体である。W02009/125825に記載されて

10

### 【0331】

H54/L28-IgG1に結合した可溶型ヒトIL-6レセプターは、抗体とともにFcRnによって血漿中にリサイクルされるのに対して、Fv4-IgG1は、エンドソーム内の酸性条件下において抗体に結合した可溶型ヒトIL-6レセプターを解離し、解離した可溶型ヒトIL-6レセプターはライソソームによって分解されるため、可溶型ヒトIL-6レセプターの消失を大幅に加速することが可能となる。Fv4-IgG1はエンドソーム内でFcRnに結合した後に血漿中にリサイク

20

### 【0332】

（6-2）マウスFc $\gamma$ Rに対する結合が増強されている抗ヒトIL-6レセプター抗体およびマウスFc $\gamma$ Rに対する結合を有しない抗ヒトIL-6レセプター抗体の作製

マウスFc $\gamma$ Rへの結合が増強された抗原結合分子として、VH3-IgG1のEUナンバリングで表される326位のLysがAspに置換され、EUナンバリングで表される328位のLeuがTyrに置換されたVH3-IgG1-F1022（配列番号：124）が作製された。参考実施例1の方法を用いて

30

### 【0333】

一方、マウスFc $\gamma$ Rに対する結合を有しない抗原結合分子として、VH3-IgG1のEUナンバリングで表される235位のLeuがArgに置換され、239位のSerがLysに置換されたVH3-IgG1-F760（配列番号：123）が作製された。参考実施例1の方法を用いて、VH3-IgG1-F760を重鎖として含み、VL3-CKを軽鎖として含む、Fv4-IgG1-F760が作製された。

### 【0334】

#### （6-3）マウスFc $\gamma$ Rに対する結合活性の確認

VH3-IgG1、VH3-IgG1-F1022およびVH3-IgG1-F760を重鎖として含み、L(WT)-CK（配列番号：5）を軽鎖として含むVH3/L(WT)-IgG1、VH3/L(WT)-IgG1-F1022およびVH3/L(WT)-IgG1-F760が参考実施例1の方法で作製された。以下のように、これらの抗体のマウスFc $\gamma$ Rに対する結合が速度論的に解析された。

40

### 【0335】

#### （6-4）マウスFc $\gamma$ Rに対する結合の速度論的解析

Biacore T100 又はT200（GE Healthcare）を用いて、マウスFc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIIb、Fc $\gamma$ RII、Fc $\gamma$ RIV（R&D systems、Sino Biological、または参考実施例2に記載の方法により調製）（以下、マウスFc $\gamma$ Rs）と抗体との結合が速度論的に解析された。アミンカップリング法によってSensor chip CM4（GE Healthcare）上に適切な量が固定化されたprotein L（ACTIGENまたはBioVision）に、目的の抗体をキャプチャーさせた。次に、マウスFc $\gamma$ Rs

50

の希釈液とブランクであるランニングバッファーをインジェクトすることによって、センサーチップ上にキャプチャーさせた抗体にマウスFc $\gamma$ Rsを相互作用させた。ランニングバッファーとしては20 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05% (w/v) Tween20、pH7.4が用いられ、マウスFc $\gamma$ Rsの希釈に際してもこのバッファーが使用された。センサーチップの再生には10 mmol/L Glycine-HCl, pH1.5が用いられた。測定は全て25℃で実施された。測定で得られたセンサーグラムから、カイネティクスパラメーターである結合速度定数  $k_a$  (1/Ms)、および解離速度定数  $k_d$  (1/s) が算出された。これらの値をもとに各抗体のヒトFc $\gamma$ Rに対するKD (M) が算出された。各パラメーターの算出にはBiacore T100 又はT200 Evaluation Software (GE Healthcare) が用いられた。

### 【0336】

その結果、表17に示される測定結果が得られた。VH3/L (WT)-IgG1-F1022は、VH3/L (WT)-IgG1に比較してmFc $\gamma$ RI、mFc $\gamma$ RIIbおよびmFc $\gamma$ RIIIに対する結合活性が増強されていることが示された。一方、VH3/L (WT)-IgG1-F760は各種マウスFc $\gamma$ Rに対する結合が検出されなかったことから、VH3/L (WT)-IgG1-F760は各種マウスFc $\gamma$ Rに対する結合活性が欠損していることが示された。なお、表中では、VH3/L (WT)-IgG1はIgG1、VH3/L (WT)-IgG1-F1022はF1022、VH3/L (WT)-IgG1-F760はF760と表記した。

### 【0337】

#### 【表17】

| 改変体名  | KD (M)          |                  |                   |                  |
|-------|-----------------|------------------|-------------------|------------------|
|       | mFc $\gamma$ RI | mFc $\gamma$ RII | mFc $\gamma$ RIII | mFc $\gamma$ RIV |
| IgG1  | 5.3E-08         | 9.8E-07          | 2.4E-06           | 8.6E-08          |
| F1022 | 7.6E-09         | 1.0E-08          | 5.5E-09           | 1.4E-07          |
| F760  | 検出せず            | 検出せず             | 検出せず              | 検出せず             |

### (6-5) 低フコース型抗体の作製

抗体のFc $\gamma$ Rに対する結合活性を増強させる方法としては、抗体のFc領域にアミノ酸改変を導入する方法以外に、抗体に連結された糖鎖を低フコース型糖鎖とする方法が知られている (J. Biol. Chem. (2003) 278, 3466-3473)。参考実施例1の方法に従い、フコーストランスポーター遺伝子を欠損させたCHO細胞 (W02006/067913) を宿主細胞としてFv4-IgG1を発現することにより、低フコース型Fv4-IgG1 (以降、Fv4-IgG1-Fucと表記される) が作製された。mFc $\gamma$ R (マウスFc $\gamma$ レセプター) のうちFc $\gamma$ RIVに対する低フコース型抗体の結合活性は選択的に向上していることが報告されている (Science, 2005, 310 (5753) 1510-1512)。

### 【0338】

〔参考実施例7〕 Fc $\gamma$ Rに対する結合活性が天然型ヒトIgGのFc領域の結合活性より高い抗原結合分子の血漿中からの抗原消失効果

#### (7-1) H54/L28-IgG1およびFv4-IgG1の血漿中からの抗原消失効果

抗ヒトIL-6レセプター抗体であるH54/L28-IgG1と、pH依存的にヒトIL-6レセプターに結合する性質を有するFv4-IgG1が、参考実施例1の方法で作製された。作製されたH54/L28-IgG1およびFv4-IgG1を用いたin vivo infusion試験が下記の方法で実施された。

### 【0339】

#### (7-1-1) ヒトFcRnトランスジェニックマウスを用いたin vivo infusion試験

ヒトFcRnトランスジェニックマウス (B6.mFcRn-/-hFcRn Tg line 32 +/+ mouse, Jackson Laboratories, Methods Mol Biol. (2010) 602, 93-104) の背部皮下に可溶型ヒトIL-6レセプターが充填されたinfusion pump (MINI-OSMOTIC PUMP MODEL2004, alzet) を埋め込むことで、血漿中可溶型ヒトIL-6レセプター濃度が定常状態に維持される動物モデルが作製された。その動物モデルに対して投与された抗ヒトIL-6レセプター抗体の投与後の体内動態が評価された。可溶型ヒトIL-6レセプターに対する中和抗体の産生を抑制するため、(公知の方法で取得された) monoclonal anti-mouse CD4 antibodyが尾静脈に20mg/k

gで単回投与された。その後、92.8 µg/mLの可溶型ヒトIL-6レセプターが充填されたinfusion pumpがマウス背部皮下へ埋め込まれた。Infusion pumpが埋め込まれた3日後に、抗ヒトIL-6レセプター抗体が1 mg/kgで尾静脈に単回投与された。抗ヒトIL-6レセプター抗体投与後15分、7時間、1日、2日、4日、7日が経過した後に当該マウスから採血された。採取された血液を直ちに4°C、15,000 rpmで15分間遠心分離することによって、血漿が得られた。分離された血漿は、測定を実施するまで-20°C以下に設定された冷凍庫に保存された。

#### 【0340】

##### (7-1-2) 電気化学発光法による血漿中可溶型ヒトIL-6レセプター (hsIL-6R) 濃度測定

マウスの血漿中hsIL-6R濃度は電気化学発光法にて測定された。2000、1000、500、250、125、62.5、31.25 pg/mLに調製されたhsIL-6R検量線試料および50倍以上希釈されたマウス血漿測定試料を、SULFO-TAG NHS Ester (Meso Scale Discovery) でルテニウム化したMonoclonal Anti-human IL-6R Antibody (R&D) およびBiotinylated Anti-human IL-6R Antibody (R&D) およびTocilizumabと混合することによって37°Cで1晩反応させた。Tocilizumabの終濃度は333 µg/mLとなるように調製された。その後、反応液がMA400 PR Streptavidin Plate (Meso Scale Discovery) に分注された。さらに室温で1時間反応させた反応液を洗浄後、Read Buffer T (×4) (Meso Scale Discovery) が分注された。その後ただちにSECTOR PR 400 reader (Meso Scale Discovery) で測定が行われた。hsIL-6R濃度は検量線のレスポンスから解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて算出された。

#### 【0341】

測定されたヒトIL-6レセプター濃度推移を図16に示した。H54/L28-IgG1と比較して、ヒトIL-6レセプターに対してpH依存的に結合するFv4-IgG1はヒトIL-6レセプター濃度を低下させることができたが、ヒトIL-6レセプター濃度を抗体非投与時のベースラインより低下させることができなかった。すなわち、抗原に対してpH依存的に結合する抗体は、抗体投与によって血漿中の抗原濃度を抗体投与前よりも低下させることはできなかった。

#### 【0342】

##### (7-2) FcγRに対する結合活性を増強あるいは低下させた抗体の血漿中からの抗原消失効果

pH依存的ヒトIL-6レセプター結合抗体であるFv4-IgG1に対して、FcγRに対する結合活性を増強あるいは低下させることにより、ヒトIL-6レセプター濃度推移に与える影響が、下記の方法で評価された。参考実施例6において作製されたFv4-IgG1、Fv4-IgG1-F760、Fv4-IgG1-F1022、Fv4-IgG1-Fucを用いたin vivo infusion試験が下記の方法で実施された。

#### 【0343】

##### (7-2-1) ヒトFcRnトランスジェニックマウスを用いたin vivo infusion試験

ヒトFcRnトランスジェニックマウス (B6.mFcRn-/- .hFcRn Tg line 32 +/- mouse、Jackson Laboratories、Methods Mol Biol. (2010), 602, 93-104) の背部皮下に可溶型ヒトIL-6レセプターを充填したinfusion pump (MINI-OSMOTIC PUMP MODEL2004、alzet) を埋め込むことで、血漿中可溶型ヒトIL-6レセプター濃度が定常状態に維持される動物モデルが作製された。その動物モデルに対してヒト免疫グロブリン製剤サングロポール (CSLベリング株式会社) と同時に投与された抗ヒトIL-6レセプター抗体の投与後の可溶型ヒトIL-6レセプターの体内動態が評価された。可溶型ヒトIL-6レセプターに対する中和抗体の産生を抑制するため、(公知の方法で取得された) monoclonal anti-mouse CD4 antibodyが尾静脈に20mg/kgで単回投与された。その後、92.8 µg/mLの可溶型ヒトIL-6レセプターが充填されたinfusion pumpがマウス背部皮下へ埋め込まれた。Infusion pumpが埋め込まれた3日後に、抗ヒトIL-6レセプター抗体が1 mg/kgで、サングロポールが1000 mg/kgで尾静脈に単回投与された。抗ヒトIL-6レセプター抗体投与後15分、7時間、1日、2日、4日、7日、14日、21日が経過した後に当該マウスから採血された。抗ヒトIL-6レセプター抗体投

与後15分、7時間、1日、2日、3日、7日、14日、21日が経過した後に当該マウスから採血された。採取された血液を直ちに4℃、15,000 rpmで15分間遠心分離することによって、血漿が得られた。分離された血漿は、測定を実施するまで-20℃以下に設定された冷凍庫に保存された。

#### 【0344】

(7-2-2) 電気化学発光法による血漿中可溶性ヒトIL-6レセプター (hsIL-6R) 濃度測定

(7-1-2) に記載された方法と同様に、マウスの血漿中hsIL-6R濃度は電気化学発光法にて測定された。

#### 【0345】

その結果を図17に示した。Fv4-IgG1のマウスFcγRへの結合を欠損させたFv4-IgG1-F760が投与されたマウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度推移はFv4-IgG1が投与されたマウスのそれと同等であることが確認された。膜型抗原に対する細胞傷害活性はFcγRに対する結合に依存していることから、FcγRに対する結合を欠損させると細胞傷害活性はなくなることが知られている。一方、可溶性抗原であるヒトIL-6レセプターに対する抗体のマウスFcγRに対する結合を欠損させた抗体を投与しても投与されたマウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度の推移に影響が無かったことから、可溶性抗原に対する抗体が投与されたマウスの血漿中の抗原濃度の推移に対しては抗体のFcγRに対する結合の寄与が無いとも考えられた。

#### 【0346】

しかし、驚くべきことに、マウスFcγRに対する結合が増強されているFv4-IgG1-F1022が投与されたマウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度は、Fv4-IgG1が投与されたマウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度と比較して大幅に低下しており、その低下の程度は、抗体非投与時のヒトIL-6レセプター濃度であるベースラインよりも低下していることが確認された。特に、Fv4-IgG1-F1022が投与されてから3日後の、投与されたマウスの血漿中ヒトIL-6レセプター濃度は、Fv4-IgG1が投与された場合のそれと比較して、約100分の1にまで低下した。このことから、pH依存的にヒトIL-6レセプターに結合し、更にFcγRに対する結合が増強されている抗体を投与することにより、投与されたマウスの血漿中ヒトIL-6レセプター濃度が大幅に低下し、その低下の程度は血漿中の抗原濃度を抗体投与前よりも低下させることが可能であることが示された。

#### 【0347】

また、低フコース型の糖鎖を有しマウスFcγR IVに対する結合活性が増強されているFv4-IgG1-Fucが投与されたマウスの血漿中ヒトIL-6レセプター濃度も、Fv4-IgG1が投与されたマウスのそれと比較して低下させることが示された。特に、Fv4-IgG1-Fucが投与されてから7日後の、投与されたマウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度は、Fv4-IgG1が投与された場合のそれと比較して、約2分の1にまで低下した。このことから、pH依存的にヒトIL-6レセプターに結合し、更にFcγRに対する結合が増強されたpH依存的抗原結合分子を投与することにより、投与されたマウスの血漿中の可溶性抗原の濃度を低下させることが可能であるが、FcγRに対する結合を増強するための方法としては、アミノ酸改変を導入することには特に限定されず、例えばEUナンバリング297位に結合した糖鎖が低フコース型糖鎖であるヒトIgGのFc領域を用いることによって、達成可能であることが示された。しかしながら、抗原濃度を低下させる効果としては、Fv4-F1022と比べてFv4-IgG1-Fucは小さいことが明らかとなった。このことは、複数存在するFcγR (マウスにおいては、FcγRI, II, III, IV) のうち、Fv4-IgG1-Fucにおいて結合が増強されるmFcγIVは、FcγRとして抗原濃度を低下させる寄与が大きくないとも考えられた。

#### 【0348】

このように、pH依存的に可溶性抗原に結合する抗体の、FcγRに対する結合を増強させた抗体を投与することにより、投与された個体中に存在する可溶性抗原の血漿中濃度を大幅に低下させることが可能であることが見出された。

#### 【0349】

特定の理論に拘束されるものではないが、Fc $\gamma$ Rへの結合が増強されたpH等のイオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメインを含む抗原結合分子の投与によって観察された予想外の血漿中可溶性抗原濃度の低下は、以下のように説明することも可能である。

#### 【0350】

非特異的に細胞内へと取り込まれたIgG抗体は、エンドソーム内の酸性条件下においてエンドソーム内のFcRnに結合することで細胞表面上に戻り、血漿中の中性条件下においてFcRnから解離する。ここで、血漿中において可溶性抗原が一定濃度に維持されたマウスに、可溶性抗原に結合することでその機能を中和する抗体が投与された場合、血漿中の可溶性抗原は抗体との複合体を形成する。当該複合体を形成した状態で細胞内へと取り込まれた可溶性抗原は、抗体のFc領域がエンドソーム内の酸性条件下においてエンドソーム内のFcRnに結合するため、抗体に結合した状態で抗体と共に血漿中へとリサイクルされると考えられる。

10

#### 【0351】

一方、可溶性抗原に対する抗体がpH依存的に抗原に結合する抗体（すなわち、エンドソーム内の酸性条件下において可溶性抗原を解離する抗体）である場合には、抗体と複合体を形成した状態で非特異的に細胞内へと取り込まれた可溶性抗原は、エンドソーム内において抗体から解離し、細胞内リソゾーム内で分解され血漿中へはリサイクルされない。つまり、可溶性抗原と複合体を形成した状態で細胞内へと取り込まれたFv4-IgG1は、エンドソーム内において可溶性抗原を解離し、その消失を速めることが可能であると考えられる。

20

#### 【0352】

前記のように、Fv4-IgG1等のイオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子は、複数回繰り返し抗原に結合することが可能になると考えられるが、エンドソーム内において可溶性抗原を解離し、その血漿中からの消失を早める効果は、抗原と抗原結合分子の複合体がエンドソーム内へと取り込まれる速度に依存すると考えられる。各種のFc $\gamma$ Rへの結合活性が増強された、イオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子は、細胞膜上に発現する各種Fc $\gamma$ Rに結合することにより、細胞内へと積極的に取り込まれ、当該分子中に含まれるpH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメインとFcRnの結合を介したリサイクルによって再度血漿中に循環することが可能である。すなわち、血漿中において可溶性抗原と複合体を形成した前記抗原結合分子は、細胞膜上に発現したFc $\gamma$ Rを介して細胞内へ積極的に取り込まれるために、血漿中の可溶性抗原の消失を早める効果が、各種のFc $\gamma$ Rへの結合活性が増強されていない抗原結合分子より顕著に表れると考えられる。

30

#### 【0353】

膜型抗原に結合する抗体のFc $\gamma$ Rに対する結合活性は当該抗体の細胞傷害活性に重要な役割を果たしている。そのため、医薬として用いられる抗体に細胞傷害活性が必要な場合、Fc $\gamma$ Rに対する結合活性が高いヒトIgG1のアイソタイプが用いられ、さらに当該抗体のFc $\gamma$ Rに対する結合活性を増強することにより当該抗体の細胞傷害活性が増強される技術は広く用いられている。

40

#### 【0354】

一方、医薬として用いられ、可溶性抗原に結合する抗体のFc $\gamma$ Rに対する結合活性の果たす役割はこれまで知られておらず、Fc $\gamma$ Rに対する結合活性が高いヒトIgG1とFc $\gamma$ Rに対する結合活性が低いヒトIgG2やヒトIgG4のFc $\gamma$ Rに対する結合活性の相違が、当該抗体が投与された生体に与える効果の違いはこれまでに十分に検討されてきていなかった。実際、本実施例においても、Fc $\gamma$ Rに対する結合活性を欠損させた抗体が投与された個体の血漿中での、可溶性抗原の濃度推移に影響が無いことが確認された。一方、本発明において、Fc $\gamma$ Rに対する結合活性が増強され、イオン濃度の条件によって可溶性抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子が投与された個体の血漿中にお

50

る可溶性抗原の濃度が大幅に低下したことが見出された。すなわち、可溶性抗原を標的とした抗原結合分子に含まれる、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメインとイオン濃度の条件によって可溶性抗原に対する結合が変化する抗原結合ドメインが組み合わされることによって、FcγRに対する結合を増強させる利点が初めて見出されたといえる。

#### 【0355】

〔参考実施例8〕 FcγRに対する結合活性が天然型ヒトIgGのFc領域の結合活性より高く、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性が増強された抗原結合分子の血漿中からの抗原消失効果

（8-1）FcγRに対する結合活性が天然型ヒトIgGのFc領域の結合活性より高く、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性が増強された抗原結合分子の作製

IgG抗体の血漿中滞留性を改善する方法として、pH酸性域の条件下におけるFcRnに対する結合を向上させる方法が報告されている。IgG抗体のFc領域にアミノ酸置換を導入し、pH酸性域の条件下におけるFcRnに対する結合を向上させることで、エンドソーム内から血漿中へのリサイクル効率が上昇し、その結果、当該IgG抗体の血漿中滞留性が改善すると考えられている。

#### 【0356】

pH酸性域の条件下におけるヒトFcRnに対する結合活性を向上させることで血漿中滞留性を改善するためのアミノ酸改変の一例として、IgG抗体のEUナンバリングで表される428位のMetをLeuに置換し、434位のAsnをSerに置換する方法（Nat. Biotechnol. (2010) 28, 157-159）、434位のAsnをAlaに置換する方法（Drug. Metab. Dispos. (2010) 38 (4), 600-605）、252位のMetをTyrに置換し、254位のSerをThrに置換し、256位のThrをGluに置換する方法（J. Biol. Chem. (2006) 281, 23514-23524）、250位のThrをGlnに置換し、428位のMetをLeuに置換する方法（J. Immunol. (2006) 176 (1) 346-356）、434位のAsnをHisに置換する方法（Clin. Pharm. & Ther. (2011) 89 (2) 283-290.）、ならびにWO2010/106180、WO2010/045193、WO2009/058492、WO2008/022152、WO2006/050166、WO2006/053301、WO2006/031370、WO2005/123780、WO2005/047327、WO2005/037867、WO2004/035752、WO2002/060919など数多くが報告されている。

#### 【0357】

参考実施例7において、その投与によって可溶性抗原の血漿中濃度を顕著に低下させる効果が示されたFv4-IgG1-F1022の薬物動態を向上させる目的で、VH3-IgG1-F1022のEUナンバリングで表される428位のMetがLeuに置換され、434位のAsnがSerに置換されたVH3-IgG1-F1093（配列番号：125）が作製された。参考実施例1の方法を用いて、VH3-IgG1-F1093を重鎖として含み、VL3-CKを軽鎖として含む、Fv4-IgG1-F1093が作製された。

#### 【0358】

（8-2）FcγRに対する結合活性が天然型ヒトIgGのFc領域の結合活性より高く、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性が増強された抗原結合分子の血漿中からの抗原消失効果

血漿中可溶性ヒトIL-6レセプター濃度が定常状態に維持されたヒトFcRnトランスジェニックマウスを用いて、（7-1-1）の方法と同様に、Fv4-IgG1-F1093のin vivo infusion試験が行われた。当該マウスの血漿中の可溶性ヒトIL-6レセプター濃度は、（7-1-2）の方法で測定された。その結果を図18に示した。

#### 【0359】

（8-2-1）ELISA法による血漿中抗ヒトIL-6レセプター抗体濃度の測定

マウス血漿中の抗ヒトIL-6レセプター抗体濃度はELISA法にて測定された。まず、抗Fv4イディオタイプ抗体（社内品）をNunc-Immuno Plate, MaxiSoup (Nalge nunc International) に分注し、4℃で1晩静置し抗Fv4イディオタイプ抗体固相化プレートを作成した。血漿中濃度として6.4、3.2、1.6、0.8、0.4、0.2、0.1 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及び2mg/mLのサングロポールを200 μL加え、室温で1時間静置した。その後抗

Fv4イディオタイプ抗体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。その結果を図19に示した。

#### 【0360】

(8-3) pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性を増強することによる薬物動態の改善

10

図19に示されたとおり、Fv4-IgG1のpH中性域の条件下におけるFcγRへの結合活性が増強されたFv4-IgG1-F1022が投与された群では、Fv4-IgG1が投与された群に比べて、投与された抗体の血漿中滞留性が低下することが確認された。一方、Fv4-IgG1-F1022のpH酸性域の条件下におけるヒトFcRnへの結合活性が増強されたFv4-IgG1-F1093が投与された群では、Fv4-IgG1-F1022が投与された群に比べて投与された抗体の血漿中滞留性が大幅に改善されたことが確認された。

#### 【0361】

更に、図18に示すとおり、血漿中の可溶型ヒトIL-6レセプター濃度は、Fv4-IgG1-F1022の投与群とFv4-IgG1-F1093の投与群ではいずれも抗体投与後3日目までは同等の推移を示した。投与後3日目においては、Fv4-IgG1の投与群と比較して、Fv4-IgG1-F1022およびFv4-IgG1-F1093のいずれの投与群でも血漿中の可溶型ヒトIL-6レセプター濃度の約100倍もの顕著な濃度低下が見られた。しかし、抗体投与後7日目においてはFv4-IgG1-F1022投与群における血漿中の可溶型ヒトIL-6レセプター濃度は投与後3日目に比べて上昇する様子が観察されたが、一方でFv4-IgG1-F1093投与群においては血漿中の可溶型ヒトIL-6レセプター濃度の上昇が観察されず、本投与群では可溶型ヒトIL-6レセプター濃度を低下させる効果が持続していることが示された。

20

#### 【0362】

すなわち、Fv4-IgG1-F1093の投与は、投与された個体の血漿中の可溶型ヒトIL-6レセプター濃度をFv4-IgG1に比べて約100分の1にまで低下させ、更にその状態を長期間維持することが出来る、非常に優れた抗原結合分子であることが示された。特定の理論に拘束されるものではないが、ここでみられた現象は、以下のように説明することも可能である。Fv4-IgG1のpH中性域の条件下におけるFcγRに対する結合活性が増強されたFv4-IgG1-F1022は、主に細胞膜上にFcγRを発現している細胞に多くの量を取り込まれると考えられる。取り込まれてエンドソームへと移行した抗体は、エンドソーム内でFcRnに結合することにより血漿中へとリサイクルされる。エンドソーム内の酸性pHの条件下において、抗体のFcRnに対する結合活性が十分ではない場合には、エンドソームに取り込まれた抗体は十分にリサイクルされることが出来ないと考えられる。すなわち、Fv4-IgG1-F1022がFv4-IgG1に比べて血漿中滞留性が低下した理由として、エンドソーム内に取り込まれた抗体がFcRnへの結合を介して十分に血漿中にリサイクルされるほどにはpH酸性域の条件下におけるFcRnに対する結合活性が十分でないために、リサイクルされなかった抗体がライソソームにおいて分解を受けたためだとも考えられる。

30

40

#### 【0363】

一方、Fv4-IgG1-F1022のpH酸性域の条件下におけるヒトFcRnに対する結合活性を増強したFv4-IgG1-F1093は、Fv4-IgG1-F1022と同様に、主に細胞膜上にFcγRを発現している細胞に多くの量を取り込まれると考えられる。取り込まれてエンドソームへと移行した抗体は、エンドソーム内でFcRnに結合することにより血漿中へとリサイクルされるが、Fv4-IgG1-F1093はpH酸性域の条件下におけるヒトFcRnに対する結合活性が増強されているために、エンドソーム内でのFcRnに対する十分な結合活性を有すると考えられる。そのため、Fv4-IgG1-F1093は細胞内に取り込まれた後も、その多くが血漿中へとリサイクルされる。そ

50

のためFv4-IgG1-F1022に比べてFv4-IgG1-F1093は投与された個体の血漿中での滞留性が向上したとも考えられる。

#### 【0364】

一方、pH酸性域の条件下において、FcRnに対する結合活性を向上させることで通常の抗体の血漿中滞留性が向上することはこれまでも知られていた。しかしながら、抗体の血漿中滞留性が向上すると、抗体に結合した抗原の血漿中滞留性も向上するため、その分、抗原の血漿中濃度も高くなると考えられた。実際、W02010/088444に記載されているように、IL-6に対するヒトIgG1抗体であるAntibody 18に対して、pH酸性域の条件下においてFcRnに対する結合活性を向上させるYTE改変を導入したAntibody 18Eは、カニクイザルにおいて、抗体の血漿中滞留性が向上したが、同時に抗原であるIL-6の血漿中濃度も高くなっている。

10

#### 【0365】

しかしながら、驚くべきことに、抗原に対してpH依存的に結合し、Fc $\gamma$ Rに対する結合活性を増強したFv4-IgG1-F1022に対して、YTE改変と同様のpH酸性域の条件下においてFcRnに対する結合活性を向上させる改変が導入されたFv4-IgG1-F1093が投与された場合、投与された個体において大幅に抗体の血漿中滞留性が向上したにもかかわらず、当該個体において抗原である可溶性ヒトIL-6レセプター濃度が高くなることはなく、むしろ、抗体投与7日目においては、Fv4-IgG1-F1093が投与された個体のほうがFv4-IgG1-F1022が投与された個体よりも可溶性ヒトIL-6レセプター濃度が低く維持されていた。

#### 【0366】

20

特定の理論に拘束されるものではないが、ここで見られた現象は、以下のように説明することも可能である。抗原に対してpH依存的な結合を示さない抗体が生体に投与された後、当該抗体は非特異的に細胞内に取り込まれ、当該抗体に結合したままの抗原は、抗体と同じ程度血漿中にリサイクルされる。一方、pH酸性域の条件下においてFcRnに対する結合活性が増強された抗体は、投与された生体の血漿中にリサイクルされる程度がFcRnに対する結合活性が増強されていない抗体よりも上がるため、当該抗原に結合したままの抗原の当該生体の血漿中にリサイクルされる程度も上がることになる。そのため、投与される抗体の、投与された生体の血漿中滞留性が向上することで当該抗体が結合する抗原の当該生体の血漿中濃度も上昇してしまうとも考えられる。

#### 【0367】

30

一方、抗原に対してpH依存的に結合し、Fc $\gamma$ Rに対する結合活性が増強した抗体が生体に投与されたときは、当該抗体は主に細胞膜上にFc $\gamma$ Rを発現している細胞に取り込まれることによってその血漿中滞留性が悪化する。一方、当該抗体に結合した抗原も当該細胞に取り込まれた後に、エンドソーム内で当該抗体から解離した後にライソソームにおいて分解されることによって、当該生体の血漿中の抗原濃度も低下する。pH酸性域の条件下においてFcRnに対する結合活性を向上させた場合、Fc $\gamma$ Rに対する結合活性を増強させることで悪化した抗体の血漿中滞留性は、FcRnによるリサイクル率が上がることで改善する。ここで、抗原に対してpH依存的に結合する抗体に結合した抗原はエンドソーム内で当該抗体から解離し、そのままライソソームで分解されるため、抗原の血漿中濃度が上昇することはないと考えられる。さらに生体に投与された抗体の血漿中滞留性が向上することにより、当該抗体の抗原消失効果が持続し、より長く、抗原濃度を低濃度で維持することが可能であると考えられる。

40

#### 【0368】

以上のことから、Fc $\gamma$ Rに対する結合活性が天然型ヒトIgGのFc領域の結合活性より高い抗原結合分子の、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性が増強した抗体が投与された生体では、投与された抗体の血漿中滞留性が向上していることが示された。また、この場合において抗体の血漿中滞留性が向上しても、抗原消失効果は減弱しないことが示された。

#### 【0369】

〔参考実施例9〕 Fc $\gamma$ Rに対する結合活性が天然型ヒトIgGのFc領域の結合活性より高く

50

、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性が増強された抗原結合分子の血漿中からの抗原消失効果についての更なる検証

#### 【 9 - 1 ） Fc $\gamma$ R に対する結合活性を増強した抗体の抗原消失効果

参考実施例 7 において、マウスFc  $\gamma$  R に対する結合が増強されたFv4-IgG1-F1022が投与された群では、血漿中の抗原濃度が大幅に低下したことが示された。また、参考実施例 8 において、Fv4-IgG1-F1022の投与群での血漿中滞留性の低下は、Fv4-IgG1-F1022のpH酸性域の条件下におけるヒトFcRnへの結合活性を増強することにより、大幅に改善することが示された。次に、マウスFc  $\gamma$  R に対する結合を増強することによる血漿中可溶性抗原の消失効果と、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRnへの結合活性を増強することによる抗体の血漿中滞留性の向上効果が、更に以下のように検証された。

10

#### 【 0 3 7 0 】

#### 【 9 - 2 ） マウスFc $\gamma$ R に対する結合が増強されている抗ヒトIL-6レセプター抗体の作製

マウスFc  $\gamma$  R への結合が増強された抗原結合分子として、VH3-IgG1のEUナンバリングで表される326位のLysがAspに置換されたVH3-IgG1-F1087（配列番号：1 4 5）およびVH3-IgG1のEUナンバリングで表される239位のSerがAspに置換され、332位のIleがGluに置換されたVH3-IgG1-F1182（配列番号：1 4 8）が作製された。参考実施例 1 の方法を用いて、VH3-IgG1-F1087を重鎖として含み、VL3-CKを軽鎖として含むFv4-IgG1-F1087、および、VH3-IgG1-F1182を重鎖として含み、VL3-CKを軽鎖として含むFv4-IgG1-F1182が作製された。

#### 【 0 3 7 1 】

#### 【 9 - 3 ） マウスFc $\gamma$ R に対する結合活性の確認

20

VH3-IgG1-F1087およびVH3-IgG1-F1182を重鎖として含み、L (WT)-CK（配列番号：5）を軽鎖として含むVH3/L (WT)-IgG1-F1087およびVH3/L (WT)-IgG1-F1182が参考実施例 1 の方法で作製された。これらの抗体およびVH3/L (WT)-IgG1-F1022、VH3/L (WT)-IgG1のマウスFc  $\gamma$  R に対する結合活性が、参考実施例 2 の方法で評価された。その結果を表 1 8 に示した。また、それぞれの改変体のマウスFc  $\gamma$  R に対する結合活性が、改変を加える前のIgG1と比較して何倍増強しているかを表 1 9 に示した。なお、表中では、VH3/L (WT)-IgG1はIgG1、VH3/L (WT)-IgG1-F1022はF1022、VH3/L (WT)-IgG1-F1087はF1087、VH3/L (WT)-IgG1-F1182はF1182と表記した。

#### 【 0 3 7 2 】

#### 【表 1 8】

30

| 改変体名  | KD (M)          |                    |                   |                   |
|-------|-----------------|--------------------|-------------------|-------------------|
|       | mFc $\gamma$ RI | mFc $\gamma$ RIIfb | mFc $\gamma$ RIIf | mFc $\gamma$ RIIf |
| IgG1  | 5.3E-08         | 9.8E-07            | 2.4E-06           | 8.6E-08           |
| F1022 | 7.6E-09         | 1.0E-08            | 5.5E-09           | 1.4E-07           |
| F1087 | 2.9E-08         | 5.6E-08            | 5.2E-08           | 3.3E-07           |
| F1182 | 2.4E-09         | 1.1E-07            | 4.8E-07           | 5.3E-10           |

#### 【 0 3 7 3 】

#### 【表 1 9】

40

| 改変体名  | IgG1 に対する結合比    |                    |                   |                   |
|-------|-----------------|--------------------|-------------------|-------------------|
|       | mFc $\gamma$ RI | mFc $\gamma$ RIIfb | mFc $\gamma$ RIIf | mFc $\gamma$ RIIf |
| IgG1  | 1.0             | 1.0                | 1.0               | 1.0               |
| F1022 | 7.0             | 93.6               | 440.5             | 0.6               |
| F1087 | 1.8             | 17.5               | 46.2              | 0.3               |
| F1182 | 22.1            | 9.1                | 5.0               | 162.3             |

#### 【 0 3 7 4 】

表 1 9 に示すように、F1087およびF1022は、マウスFc  $\gamma$  RI、マウスFc  $\gamma$  RIIfbおよびマウ

50

スFc $\gamma$ RIIIに対する結合活性がIgG1に比べて増強しているが、マウスFc $\gamma$ RIVに対する結合活性は増強していないことが示された。また、F1087のマウスFc $\gamma$ RI、マウスFc $\gamma$ RIIb、マウスFc $\gamma$ RIIIおよびマウスFc $\gamma$ RIVに対する結合活性は、F1022のそれに比較すると、その増強の程度が弱いことが示された。一方、F1182のマウスFc $\gamma$ RIおよびマウスFc $\gamma$ RIVに対する結合活性が大幅に増強している一方で、そのFc $\gamma$ RIIbおよびFc $\gamma$ RIIIに対する結合活性はF1022およびF1087のそれに比較すると、その増強の程度は弱いことが示された。このように、これら3種類の改変体は、いずれかのマウスFc $\gamma$ Rに対する結合増強効果を示したが、どのFc $\gamma$ Rに対して選択的に結合活性が増強するのか、およびその増強の程度は、改変体によって異なっていることが示された。

#### 【0375】

##### (9-4) Fv4-IgG1-F1087およびFv4-IgG1-F1182の血漿中からの抗原消失効果

ヒトFcRnトランスジェニックマウスを用いたin vivo infusion試験が参考実施例7の方法と同様に実施され、当該マウスの血漿中の可溶性ヒトIL-6レセプターの濃度が測定された。その結果を図20に示した。

#### 【0376】

マウスFc $\gamma$ Rに対する結合活性がFv4-IgG1に比べて増強しているFv4-IgG1-F1087およびFv4-IgG1-F1182が生体内に投与された群では、いずれも、Fv4-IgG1が投与された群に比べて生体中の血漿中可溶性ヒトIL-6レセプターの濃度を低下させることができた。血漿中可溶性ヒトIL-6レセプターの濃度を低下させる効果は、特にマウスFc $\gamma$ RIIおよびマウスFc $\gamma$ RIIIに対する結合が増強しているFv4-IgG1-F1087を投与した群において大きかった。一方で、マウスFc $\gamma$ RIおよびマウスFc $\gamma$ RIVに対する結合活性が大幅に向上している（マウスFc $\gamma$ RIIおよびマウスFc $\gamma$ RIIIに対する結合も数倍増強されている）F1182が生体内に投与された群では、F1182の投与による血漿中可溶性ヒトIL-6レセプターの濃度を低下させる効果が小さかった。これらの結果から、pH依存的抗原結合抗体の投与によりマウスの血漿中の抗原濃度を効率的に低下させるのにより寄与するマウスFc $\gamma$ Rは、マウスFc $\gamma$ RIIおよび／またはマウスFc $\gamma$ RIIIであると考えられた。すなわち、マウスFc $\gamma$ RIIおよび／またはマウスFc $\gamma$ RIIIへの結合が増強したpH依存的抗原結合抗体を生体内に投与することによって、より効率的に生体内の抗原の血漿中濃度を下げることが可能であると考えられた。

#### 【0377】

##### (9-5) Fc $\gamma$ Rに対する結合活性が天然型ヒトIgGのFc領域の結合活性より高く、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性が増強された抗原結合分子の作製

参考実施例8において、マウスFc $\gamma$ Rに対する結合活性が増強しているFv4-IgG1-F1022のpH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性を増強したFv4-IgG1-F1093が投与されたヒトFcRnトランスジェニックマウスにおいて、Fv4-IgG1-F1022が投与されたヒトFcRnトランスジェニックマウスと比較して、抗体の血漿中滞留性が大幅に向上することが示された。この効果が、Fv4-IgG1-F1087およびFv4-IgG1-F1182が投与されたヒトFcRnトランスジェニックマウスにおいても示されるかどうか、更には参考実施例8で検証された改変とは異なる改変が加えられpH酸性域の条件下におけるヒトFcRnに対する結合活性が増強している改変体が投与されたマウスにおいても同様の効果が示されるかどうか、以下のように検証された。

#### 【0378】

Fv4-IgG1-F1087およびFv4-IgG1-F1182のpH酸性域の条件下におけるヒトFcRnに対する結合活性を増強するために、それぞれの重鎖であるVH3-IgG1-F1087およびVH3-IgG1-F1182のEUナンバリングで表される428位のMetがLeuに置換され、434位のAsnがSerに置換されたVH3-IgG1-F1180（配列番号：146）およびVH3-IgG1-F1181（配列番号：147）が作製された。また、Fv4-IgG1-F1087のpH酸性域の条件下におけるヒトFcRnに対する結合活性を増強するために、重鎖であるVH3-IgG1-F1087のEUナンバリングで表される434位のAsnがAlaに置換されたVH3-IgG1-F1412（配列番号：149）が作製された。参考実施例1の方法を用いて、これらを重鎖として含み、VL3-CKを軽鎖として含む、Fv4-IgG1-F1180、Fv4-IgG1

10

20

30

40

50

-F1181およびFv4-IgG1-F1412が作製された。

【0379】

(9-6) pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性を増強することによる薬物動態の改善

ヒトFcRnトランスジェニックマウスにそれぞれFv4-IgG1-F1180、Fv4-IgG1-F1181およびFv4-IgG1-F1412を投与するin vivo infusion試験が参考実施例7の方法と同様に、実施され、当該マウス群の血漿中可溶性ヒトIL-6レセプターの濃度が測定された。Fv4-IgG1-F1087、Fv4-IgG1-F1180、Fv4-IgG1-F1412、Fv4-IgG1が投与されたマウス群の血漿中可溶性ヒトIL-6レセプター濃度の結果を図23に、Fv4-IgG1-F1182、Fv4-IgG1-F1181、Fv4-IgG1が投与されたマウスの血漿中可溶性ヒトIL-6レセプター濃度の結果を図24に示した。また、当該マウス群における血漿中抗体濃度が参考実施例8の方法で測定された。当該マウス群におけるFv4-IgG1-F1087、Fv4-IgG1-F1180、Fv4-IgG1-F1412、Fv4-IgG1の血漿中抗体濃度の結果を図21に、Fv4-IgG1-F1182、Fv4-IgG1-F1181、Fv4-IgG1の血漿中抗体濃度の結果を図22に示した。

10

【0380】

Fv4-IgG1-F1182のpH酸性域におけるヒトFcRnへの結合活性を増強したFv4-IgG1-F1181が投与されたマウス群において、Fv4-IgG1-F1182が投与されたマウス群に比べて抗体の血漿中滞留性の向上が確認された。一方で、Fv4-IgG1-F1181が投与されたマウス群の血漿中可溶性ヒトIL-6レセプター濃度はFv4-IgG1-F1182が投与されたマウス群のそれと同等であり、Fv4-IgG1が投与されたマウス群に比べて血漿中可溶性ヒトIL-6レセプター濃度がいずれも低下していた。

20

【0381】

一方、Fv4-IgG1-F1087のpH酸性域におけるヒトFcRnへの結合活性を増強したFv4-IgG1-F1180およびFv4-IgG1-F1412が投与されたマウス群においては、Fv4-IgG1-F1087が投与されたマウス群に比較して抗体の血漿中滞留性が向上しており、驚くべきことにFv4-IgG1が投与されたマウス群の血漿中滞留性と同程度にまで改善していた。また、抗体の血漿中滞留性の改善に伴い、投与されたマウス群の血漿中可溶性ヒトIL-6レセプターの濃度の低減効果の持続性も改善されていた。すなわち、Fv4-IgG1-F1180およびFv4-IgG1-F1412の投与から14日後および21日後における、当該投与を受けたマウス群の血漿中可溶性ヒトIL-6レセプターの濃度は、Fv4-IgG1-F1087の投与から14日後および21日後のそれと比較して、有意に低下していた。

30

【0382】

以上のことから、FcγRに対する結合活性が天然型ヒトIgGのFc領域の結合活性より高い抗原結合分子のpH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性が増強している抗体の投与により、当該投与を受けた生体の血漿中滞留性の向上が可能であることが、Fv4-IgG1-F1093、Fv4-IgG1-F1181、Fv4-IgG1-F1180およびFv4-IgG1-F1412の4例の抗体が投与されたマウス群において示された。さらに、抗原結合分子が投与された生体の血漿中滞留性が向上しても、当該生体における抗原消失効果は減弱することではなく、むしろ抗原消失効果を持続させることが可能であることが示された。

【0383】

40

pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性を増強させるための改変としては、EUナンバリングで表される428位のMetをLeuに置換し、434位のAsnをSerに置換する方法に加え、EUナンバリングで表される434位のAsnをAlaに置換する方法によっても達成可能であることが示された。このことから、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性を増強させるために用いられる改変としては特に限定されず、IgG抗体のEUナンバリングで表される428位のMetをLeuに置換し、434位のAsnをSerに置換する方法 (Nat. Biotechnol. (2010) 28, 157-159)、434位のAsnをAlaに置換する方法 (Drug Metab. Dispos. (2010) 38 (4) 600-605)、252位のMetをTyrに置換し、254位のSerをThrに置換し、256位のThrをGluに置換する方法 (J. Biol. Chem. (2006) 281, 23514-23524)、250位のThrをGlnに置換し、428位のMetをLeuに置換する方法 (J. Immunol. (2006) 176 (1), 346-356)、434位のAsnをH

50

isに置換する方法(Clin. Pharmacol. Ther. (2011) 89 (2) 283-290)、ならびにW02010/10 6180、W02010/045193、W02009/058492、W02008/022152、W02006/050166、W02006/053301、W02006/031370、W02005/123780、W02005/047327、W02005/037867、W02004/035752、W02 002/060919などにおいて記載されるような改変も用いられる。

#### 【0384】

(9-7) pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性を増強し、リウマチ因子への結合を抑制した抗原結合分子の作製

ヒト化抗CD4抗体のpH酸性域の条件下においてヒトFcRnに対する結合活性を増強し、血漿中滞留性を向上させるために、EUナンバリングで表される434位のAsnがHisに置換された抗体分子が、リウマチ因子(Rheumatoid factor、RF)に対して結合することが、近年報告された(Clin. Pharmacol. Ther. (2011) 89 (2), 283-290)。この抗体はヒトIgG1のFc領域を有し、FcRnに対する結合部位に位置するEUナンバリングで表される434位のAsnがHisに置換されているが、その置換された箇所を認識するリウマチ因子が結合することが示されている。

#### 【0385】

(9-6) で示されたように、pH酸性域の条件下においてヒトFcRnに対する結合活性を増強するための改変として、様々なものが報告されているが、これらの改変をFc領域の中のFcRn結合部位に導入することによって、当該部位を認識するリウマチ因子に対する結合性を増強する可能性がある。

#### 【0386】

しかしながら、pH酸性域の条件下においてFcRnに対する結合活性を低下させることなく、リウマチ因子に対する結合活性のみを低下させる改変を、Fc領域の当該部位に導入することにより、リウマチ因子に対する結合性を持たずにpH酸性域の条件下におけるヒトFcRnに対する結合活性が増強している抗原結合分子を作製することが可能である。

#### 【0387】

そのような、リウマチ因子に対する結合活性を低下させる改変として、EUナンバリングで表される248-257、305-314、342-352、380-386、388、414-421、423、425-437、439、441-444位の改変が用いられる。好ましくは、EUナンバリングで表される387、422、424、426、433、436、438、440位の改変が用いられる。特に好ましくは、EUナンバリングで表される422位のValをGluまたはSerに置換する改変、424位のSerをArgに置換する改変、433位のHisをAspに置換する改変、436位のTyrをThrに置換する改変、438位のGlnをArgまたはLysに置換する改変、440位のSerをGluまたはAspに置換する改変が用いられる。これらの改変は、単独で用いられても良いし、複数箇所を組み合わせて用いても良い。

#### 【0388】

あるいは、リウマチ因子に対する結合活性を低下させるために、N型糖鎖の付加配列を導入しても良い。具体的には、N型糖鎖付加配列としてAsn-Xxx-Ser/Thr (XxxはProを除く任意のアミノ酸) が知られているが、この配列をFc領域に導入することによりN型糖鎖を付加させ、N型糖鎖の立体障害によってRFとの結合を阻害することが可能である。N型糖鎖を付加するための改変として、好ましくは、EUナンバリングで表される248位のLysをAsnに置換する改変、424位のSerをAsnに置換する改変、436位のTyrをAsnに置換し438位のGlnをThrに置換する改変、438位のQlnをAsnに置換する改変が用いられる。特に好ましくは、EUナンバリングで表される424位のSerをAsnに置換する改変が用いられる。

#### 【0389】

〔参考実施例10〕 Fc $\gamma$ Rに対する結合活性が天然型マウスIgGのFc領域の結合活性より高い抗原結合分子の血漿中からの抗原消失効果

(10-1) Fc $\gamma$ Rに対する結合活性を増強したマウス抗体の抗原消失効果

参考実施例6から9において、ヒト抗体のFc領域を有し、pH依存的にヒトIL-6レセプターに結合する性質を有する抗原結合分子のマウスFc $\gamma$ Rに対する結合活性を増強させた抗原結合分子が投与されたヒトFcRnトランスジェニックマウス群において、当該マウスの血漿中可溶型ヒトIL-6レセプターの消失が早められていることが確認された。この効果が、

マウス抗体のFc領域を有し、pH依存的にヒトIL-6レセプターに結合する性質を有する抗原結合分子が投与されたマウスFcRnを有するノーマルマウスにおいても示されるかどうか、以下に示すように検証された。

### 【0390】

#### (10-2) Fc $\gamma$ Rに対する結合活性を増強したマウス抗体の作製

pH依存的にヒトIL-6レセプターに結合する性質を有するマウスIgG1抗体の重鎖としてVH3-mIgG1（配列番号：150）、軽鎖としてVL3-mk1（配列番号：151）が参考実施例1の方法を用いて作製された。また、VH3-mIgG1のマウスFc $\gamma$ Rに対する結合活性を増強するために、EUナンバリングで表される327位のAlaがAspに置換されたVH3-mIgG1-mF44（配列番号：152）が作製された。同様に、VH3-mIgG1のEUナンバリングで表される239位のSerがAspに置換され、327位のAlaがAspに置換されたVH3-mIgG1-mF46（配列番号：153）が作製された。VH3-mIgG1、VH3-mIgG1-mF44あるいはVH3-mIgG1-mF46を重鎖として含み、VL3-mk1を軽鎖として含む、Fv4-mIgG1、Fv4-mIgG1-mF44あるいはFv4-mIgG1-mF46が、参考実施例1の方法を用いて作製された。

### 【0391】

#### (10-3) マウスFc $\gamma$ Rに対する結合活性の確認

VH3-mIgG1、VH3-mIgG1-mF44あるいはVH3-mIgG1-mF46を重鎖として含み、L (WT)-CK（配列番号：5）を軽鎖として含むVH3/L (WT)-mIgG1、VH3/L (WT)-mIgG1-mF44あるいはVH3/L (WT)-mIgG1-mF46が参考実施例1の方法で作製された。これらの抗体のマウスFc $\gamma$ Rに対する結合活性が、参考実施例2の方法で評価された。その結果を表20に示した。また、それぞれの改変体のマウスFc $\gamma$ Rに対する結合活性が、改変を加える前のmIgG1に比較して何倍増強しているかを表21に示した。なお、表中では、VH3/L (WT)-mIgG1はmIgG1、VH3/L (WT)-mIgG1-mF44はmF44、VH3/L (WT)-mIgG1-mF46はmF46と表記した。

### 【0392】

#### 【表20】

| 改変体名  | KD (M)            |                   |                   |                   |
|-------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|       | mFc $\gamma$ RI   | mFc $\gamma$ RIIb | mFc $\gamma$ RIII | mFc $\gamma$ RIV  |
| mIgG1 | 検出せず <sup>a</sup> | 1.1E-07           | 2.1E-07           | 検出せず <sup>a</sup> |
| mF44  | 検出せず <sup>a</sup> | 8.9E-09           | 6.7E-09           | 検出せず <sup>a</sup> |
| mF46  | 検出せず <sup>a</sup> | 1.2E-09           | 3.6E-09           | 検出せず <sup>a</sup> |

### 【0393】

#### 【表21】

| 改変体名  | mIgG1に対する結合比      |                   |                   |                   |
|-------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|       | mFc $\gamma$ RI   | mFc $\gamma$ RIIb | mFc $\gamma$ RIII | mFc $\gamma$ RIV  |
| mIgG1 | 検出せず <sup>a</sup> | 1.0               | 1.0               | 検出せず <sup>a</sup> |
| mF44  | 検出せず <sup>a</sup> | 11.9              | 31.0              | 検出せず <sup>a</sup> |
| mF46  | 検出せず <sup>a</sup> | 91.4              | 57.5              | 検出せず <sup>a</sup> |

### 【0394】

天然型マウスIgG1抗体のFc領域を有するVH3/L (WT)-mIgG1は、マウスFc $\gamma$ RIおよびマウスFc $\gamma$ RIVに対しては結合を示さず、マウスFc $\gamma$ RIIb およびマウスFc $\gamma$ RIIIに対してのみ結合を示した参考実施例9の検討結果から、抗原濃度を低下させるのに重要なマウスFc $\gamma$ RはマウスFc $\gamma$ RIIおよび、あるいはマウスFc $\gamma$ RIIIであることが示唆されている。また、VH3/L (WT)-mIgG1のFc $\gamma$ Rに対する結合活性を増強すると考えられる改変が導入されたVH3/L (WT)-mIgG-mF44およびVH3/L (WT)-mIgG1-mF46のマウスFc $\gamma$ RIIbおよびマウスFc $\gamma$ RIIIに対する結合活性はいずれも増強していることが示された。

### 【0395】

(10-4) ノーマルマウスにおける血漿中可溶性ヒトIL-6レセプター濃度の低減効果の確認

抗ヒトIL-6レセプター抗体としてFv4-mIgG1、Fv4-mIgG1-mF44あるいはFv4-mIgG1mF46が投与されたノーマルマウスの血漿中可溶性ヒトIL-6レセプターの消失効果が以下のように検証された。

【0396】

ノーマルマウス (C57BL/6J mouse、Charles River Japan) の背部皮下に可溶性ヒトIL-6レセプターが充填されたinfusion pump (MINI-OSMOTIC PUMP MODEL2004、alzet) を埋め込むことで、血漿中可溶性ヒトIL-6レセプター濃度が定常状態に維持される動物モデルが作製された。その動物モデルに抗ヒトIL-6レセプター抗体を投与した後の可溶性ヒトIL-6レセプターの体内動態が評価された。可溶性ヒトIL-6レセプターに対する抗体の産生を抑制するため、モノクローナル抗マウスCD4抗体が尾静脈に20 mg/kgで単回投与された。その後、92.8 µg/mLの可溶性ヒトIL-6レセプターが充填されたinfusion pumpがマウス背部皮下へ埋め込まれた。Infusion pumpが埋め込まれた3日後に、抗ヒトIL-6レセプター抗体が1 mg/kgで尾静脈に単回投与された。抗ヒトIL-6レセプター抗体投与後15分、7時間、1日、2日、4日、7日、14日（あるいは15日）、21日（あるいは22日）が経過した後に当該マウスから採血された。採取された血液を直ちに4℃、15,000 rpmで15分間遠心分離することによって、血漿が得られた。分離された血漿は、測定を実施するまで-20℃以下に設定された冷凍庫に保存された。

【0397】

血漿中の可溶性ヒトIL-6レセプター濃度は、(7-1-2)の方法で測定された。その結果を図25に示した。

【0398】

驚くべきことに、mIgG1（天然型マウスIgG1）のマウスFcγRIIbおよびマウスFcγRIIIに対する結合活性を増強する改変が導入されたmF44およびmF46が投与されたマウスでは、mIgG1が投与されたマウスに比較して血漿中IL-6レセプター濃度の顕著な低下がいずれも確認された。特に、mF44の投与後21日目においても、mF44投与群の血漿中IL-6レセプター濃度は抗体非投与群の血漿中IL-6レセプター濃度に比べて約6倍、mIgG1投与群に比較すると約10倍低下していた。一方、mF46の投与後7日目において、mF46投与群の血漿中IL-6レセプター濃度は抗体非投与群の血漿中IL-6レセプター濃度に比べて約30倍、mIgG1投与群に比較すると約50倍と、顕著に低下していた。

【0399】

以上のことから、ヒトIgG1抗体のFc領域を有する抗原結合分子のマウスFcγRに対する結合活性が増強している抗体と同様に、マウスIgG1抗体のFc領域を有する抗原結合分子のマウスFcγRに対する結合活性が増強している抗体が投与されたマウスにおいても、血漿中可溶性ヒトIL-6レセプターの消失が加速していることが示された。特定の理論に拘束されるものではないが、ここでみられた現象は以下のように説明することも可能である。

【0400】

pH依存的に可溶性抗原に結合し、かつFcγRに対する結合活性を増強している抗体がマウスに投与されると、主に細胞膜上にFcγRを発現している細胞に積極的に取り込まれる。取り込まれた抗体はエンドソーム内の酸性pHの条件下において可溶性抗原を解離した後にFcRnを介して血漿中にリサイクルされる。そのため、このような抗体による血漿中の可溶性抗原を消失させる効果をもたらす要素の一つとしては、当該抗体のFcγRに対する結合活性の強さが挙げられる。すなわち、FcγRに対する結合活性が強いほど、より積極的にFcγR発現細胞へと取り込まれ、血漿中の可溶性抗原を速く消失させることが可能であると考えられる。また、そのような効果は、抗体に含まれるFc領域の由来がヒトIgG1であってもマウスIgG1であっても、FcγRに対する結合活性が増強している限りは、同様に検証できると考えられる。つまり、ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG3、ヒトIgG4、マウスIgG1、マウスIgG2a、マウスIgG2b、マウスIgG3、ラットIgG、サルIgG、ウサギIgGなど、いかなる動物種のFc領域であっても、投与される動物種のFcγRに対する結合活性が増強して

いる限り、いずれを用いても検証することが可能であると考えられる。

#### 【0401】

〔参考実施例11〕 Fc $\gamma$ RIIb選択的に結合を増強した抗体による抗原消失効果

##### (11-1) Fc $\gamma$ RIIbに対する結合活性を選択的に増強した抗体の抗原消失効果

Fc $\gamma$ RIII欠損マウス (B6.129P2-FcgrR3tm1Sjv/J mouse, Jackson Laboratories) は、マウスFc $\gamma$ RI、マウスFc $\gamma$ RIIb、マウスFc $\gamma$ RIVを発現しているが、マウスFc $\gamma$ RIIIを発現しないマウスである。一方、Fc受容体 $\gamma$ 鎖欠損マウス (Fcer1g mouse, Taconic, Cell (1994) 76, 519-529) は、マウスFc $\gamma$ RIIbのみを発現し、マウスFc $\gamma$ RI、マウスFc $\gamma$ RIII、マウスFc $\gamma$ RIVを発現しないマウスである。

#### 【0402】

参考実施例10において、天然型マウスIgG1に対してFc $\gamma$ Rへの結合活性を増強させたmF44およびmF46は、マウスFc $\gamma$ RIIbおよびマウスFc $\gamma$ RIIIに対して選択的に結合が増強されていることが示された。この選択的に増強された抗体の結合活性を利用し、マウスFc $\gamma$ RIIIを発現しない、マウスFc $\gamma$ RIII欠損マウスまたはFc受容体 $\gamma$ 鎖欠損マウスにmF44およびmF46を投与することにより、マウスFc $\gamma$ RIIbに対する結合が増強された抗体を投与する状況を模倣することが可能であると考えられた。

#### 【0403】

##### (11-2) Fc $\gamma$ RIII欠損マウスを用いたマウスFc $\gamma$ RIIb選択的結合増強による抗原消失効果の検証

抗ヒトIL-6レセプター抗体としてFv4-mIgG1、Fv4-mIgG1-mF44あるいはFv4-mIgG1-mF46が投与されたFc $\gamma$ RIII欠損マウスの血漿中可溶性ヒトIL-6レセプターの消失効果が、参考実施例10の方法と同様に検証された。当該マウスの血漿中の可溶性ヒトIL-6レセプター濃度は、(7-1-2)の方法で測定された。その結果を図26に示した。

#### 【0404】

驚くべきことに、mIgG1 (天然型マウスIgG1) のマウスFc $\gamma$ RIIbに対する結合活性が選択的に増強された状況が模倣されたmF44およびmF46が投与されたFc $\gamma$ RIII欠損マウスの血漿中IL-6レセプター濃度は、いずれも、mIgG1が投与されたマウスの血漿中IL-6レセプター濃度に比較していずれも顕著に低下したことが確認された。特に、mF44の投与群の血漿中IL-6レセプター濃度は、mIgG1投与群のそれに比較して約3倍程度に低下し、抗体投与によって起こる抗原濃度の蓄積が抑制されていた。一方、mF46の投与群の血漿中IL-6レセプター濃度は、投与後3日目において、抗体非投与群の血漿中IL-6レセプター濃度に比べて約6倍、mIgG1投与群の血漿中IL-6レセプター濃度に比較すると約25倍と、顕著に低下した。この結果から、pH依存的に抗原に結合する抗ヒトIL-6レセプター抗体のマウスFc $\gamma$ RIIbに対する結合活性が高いほど、それが投与されたときにマウスの血漿中IL-6レセプター濃度をより低下させることが可能であることが示された。

#### 【0405】

##### (11-3) Fc受容体 $\gamma$ 鎖欠損マウスを用いたマウスFc $\gamma$ RIIb選択的結合増強による抗原消失効果の検証

抗ヒトIL-6レセプター抗体としてFv4-mIgG1、Fv4-mIgG1-mF44またはFv4-mIgG1-mF46が投与されたFc受容体 $\gamma$ 鎖欠損マウスの血漿中可溶性ヒトIL-6レセプターの消失効果が、参考実施例10の方法と同様に検証された。当該マウスの血漿中の可溶性ヒトIL-6レセプター濃度は、(7-1-2)の方法で測定された。その結果を図27に示した。

#### 【0406】

Fc $\gamma$ RIII欠損マウスにmF44およびmF46が投与されたときと同様に、mIgG1 (天然型マウスIgG1) に対してマウスFc $\gamma$ RIIbに対する結合活性のみが選択的に増強された状況が模倣されたmF44およびmF46が投与されたFc受容体 $\gamma$ 鎖欠損マウスの血漿中IL-6レセプター濃度は、いずれも、mIgG1が投与されたFc受容体 $\gamma$ 鎖欠損マウスの血漿中IL-6レセプター濃度に比較して顕著に低下したことが確認された。特に、mF44の投与群の血漿中IL-6レセプター濃度は、mIgG1投与群の血漿中IL-6レセプター濃度に比較して約3倍程度に低下し、抗体投与によって起こる抗原濃度の蓄積が抑制されていた。一方、mF46の投与群の血漿中IL

-6レセプター濃度は投与後3日目において、抗体非投与群の血漿中IL-6レセプター濃度に比べて約5倍、mIgG1投与群の血漿中IL-6レセプター濃度に比較すると約15倍と、顕著に低下した。

#### 【0407】

(11-2) および(11-3)の結果から、pH依存的に可溶型抗原に結合し、マウスFcγRIIbに対する結合活性が選択的に増強した抗体の投与群の血漿中の可溶型抗原濃度は大幅に低下する可能性が示された。

#### 【0408】

〔参考実施例12〕 FcγRIII選択的に結合を増強した抗体による抗原消失効果

(12-1) FcγRIIIに対する結合活性を選択的に増強した抗体の抗原消失効果

FcγRIIb欠損マウス(Fcgr2b(FcγRII) mouse, Taconic) (Nature (1996) 379 (6563), 346-349) は、マウスFcγRI、マウスFcγRIII、マウスFcγRIVは発現するが、マウスFcγRIIbを発現しないマウスである。参考実施例10において、天然型マウスIgG1のFcγRへの結合活性を増強させたmF44およびmF46は、マウスFcγRIIbおよびマウスFcγRIIIに対して選択的に結合が増強していることが示された。この選択的に増強された抗体の結合活性を利用し、マウスFcγRIIbを発現しないマウスFcγRIIb欠損マウスにmF44およびmF46を投与することにより、マウスFcγRIIIに対する結合が増強された抗体を投与する状況を模倣することが可能であると考えられた。

#### 【0409】

参考実施例11において、マウスFcγRIIbに対する結合活性が増強された抗体が投与された状況が模倣されたFcγRIII欠損マウスの血漿中の可溶型抗原濃度が低下することが示された。一方で、マウスFcγRIIIに対する結合活性が増強された抗体が投与された状況が模倣されたFcγRIIb欠損マウスの血漿中の可溶型抗原濃度が低下するかどうかは以下の試験によって確認された。

#### 【0410】

(12-2) FcγRIIb欠損マウスを用いたマウスFcγRIII選択的結合増強による抗原消失効果の検証

FcγRIIb欠損マウスに抗ヒトIL-6レセプター抗体としてFv4-mIgG1、Fv4-mIgG1-mF44あるいはFv4-mIgG1mF46が投与されたFcγRIIb欠損マウスの血漿中可溶型ヒトIL-6レセプターの消失効果が、参考実施例10の方法と同様に検証された。血漿中の可溶型ヒトIL-6レセプター濃度は、(7-1-2)の方法で測定された。その結果を図28に示した。

#### 【0411】

驚くべきことに、mIgG1(天然型マウスIgG1)のマウスFcγRIIIに対する結合活性が選択的に増強したことが模倣されたmF44およびmF46の投与群では、血漿中IL-6レセプター濃度は低下したが参考実施例11で示されたほどの顕著な低下は確認されなかった。

#### 【0412】

特定の理論に拘束されるものではないが、参考実施例10、11および12の結果から、以下のように考察することも可能である。mIgG1(天然型マウスIgG1)のマウスFcγRIIbおよびマウスFcγRIIIに対する結合活性が増強されたmF44およびmF46が投与されたマウスFcγRIIbおよびマウスFcγRIIIの両方を発現するノーマルマウスの血漿中可溶型ヒトIL-6レセプターの消失は顕著に加速することが確認された。また、マウスFcγRIIbは発現するものの、マウスFcγRIIIを発現していないマウス(FcγRIII欠損マウス、および、Fc受容体γ鎖欠損マウス)に、mF44およびmF46が投与された場合でも当該マウスの血漿中可溶型ヒトIL-6レセプターの消失は顕著に加速することが確認された。一方で、マウスFcγRIIIは発現するものの、マウスFcγRIIbを発現していないマウス(FcγRII欠損マウス)に、mF44およびmF46が投与された場合には、当該マウスの血漿中可溶型ヒトIL-6レセプターの消失は顕著には加速されなかった。

#### 【0413】

以上のことから、mIgG1(天然型マウスIgG1)のマウスFcγRIIbおよびマウスFcγRIIIに対する結合活性が増強された抗体であるmF44およびmF46は、主にマウスFcγRI

10

20

30

40

50

Ibを介してFc $\gamma$ Rを発現する細胞に取り込まれることによって、当該抗体に結合する血漿中の可溶性抗原が消失していると考えられる。一方で、Fc $\gamma$ RIIIを介した抗体抗原複合体のFc $\gamma$ R発現細胞への取込みは、血漿中の可溶性抗原の消失に対して大きく寄与していないと考えられる。

#### 【0414】

また、参考実施例9において示されたように、特にマウスFc $\gamma$ RIIbおよびマウスFc $\gamma$ RIIに対する結合活性が向上しているFv4-IgG1-F1087が投与されたマウスの血漿中可溶性ヒトIL-6レセプター濃度は顕著に低下した一方で、特にマウスFc $\gamma$ RIおよびマウスFc $\gamma$ RIVに対する結合活性が向上しているFv4-IgG1-F1182が投与されたマウスの血漿中可溶性ヒトIL-6レセプターの消失効果は、Fv4-IgG1-F1087のそれと比較すると小さかった。

10

#### 【0415】

さらに、参考実施例7において低フコース型糖鎖を有するためにマウスFc $\gamma$ RIVに対する結合活性が大幅に増強されている (Science (2005) 310 (5753) 1510-1512) Fv4-IgG1-Fucが投与されたマウスの血漿中可溶性ヒトIL-6レセプター濃度は、Fv4-IgG1が投与されたマウスの血漿中可溶性ヒトIL-6レセプター濃度と比較すると低下したものの、その低下の効果は2倍程度と小さかった。そのため、マウスFc $\gamma$ RIVを介した抗体のFc $\gamma$ R発現細胞への取込みは、血漿中の可溶性抗原の消失に対して大きく寄与していないと考えられる。

#### 【0416】

これらのことから、マウスにおいて抗体のFc $\gamma$ R発現細胞への取込みには、複数あるマウスFc $\gamma$ Rの中で、マウスFc $\gamma$ RIIbが主な役割を発揮していることが見出された。そのため、特に限定されるものではないが、マウスFc $\gamma$ レセプター結合ドメインに導入される変異としては、マウスFc $\gamma$ RIIbに対する結合を増強する変異が特に好ましいとも考えられ得る。

20

#### 【0417】

本検討によって、pH依存的に可溶性抗原に結合し、Fc $\gamma$ Rに対する結合活性が増強された抗原結合分子を投与することによって、投与された生体の血漿中の可溶性抗原の消失を早めるためには、投与される抗体のFc $\gamma$ RIIbに対する結合活性を増強することがより好ましいことがマウスにおいて示された。つまり、pH依存的に可溶性抗原に結合し、Fc $\gamma$ RIIbに対する結合活性を増強させた抗原結合分子は、生体内に投与された場合に、血漿中の可溶性抗原の消失を早めて、血漿中の可溶性抗原濃度を効果的に低下させることが可能であり、極めて有効な作用を示すことが明らかとなった。

30

#### 【0418】

〔参考実施例13〕 Fc $\gamma$ RIIbに対する結合を増強する既存の改変が加えられたFc領域を含む抗体の血小板凝集能の評価

#### （13-1）Fc $\gamma$ RIIbに対する結合を増強する既存の改変が加えられたFc領域を含む抗体の作製

参考実施例12に記したように、Fc $\gamma$ RIIbに対する選択的に結合活性が増強された抗体を生体に投与することで、当該生体の血漿中から抗原を効率的に消失させることが可能である。また、Fc $\gamma$ RIIbに対する結合活性が選択的に増強されたFc領域を含む抗体を投与することは、抗体が投与される生体にとって安全性、副作用の観点でも好ましいと考えられた。

40

#### 【0419】

しかしながら、mF44やmF46は、マウスFc $\gamma$ RIIbとマウスFc $\gamma$ RIIIの両方に対して結合が増強しており、マウスFc $\gamma$ RIIbに対する選択的な結合は増強していない。これはマウスFc $\gamma$ RIIbとマウスFc $\gamma$ RIIIのホモロジーが高いことから、両者を識別しつつマウスFc $\gamma$ RIIbに対する選択的な結合を増強する改変を見出すことは困難であるためとも考えられる。また、これまでにマウスFc $\gamma$ RIIbに対する選択的な結合が増強されたFc領域は報告されていない。同様に、ヒトFc $\gamma$ RIIbとヒトFc $\gamma$ RIIa（アロタイプH131およびR131）とのホモロジーも高いことが知られている。また、Fc $\gamma$ RIIaに対する結合が増強された抗体は、血小板

50

の凝集活性が増強され、当該抗体が投与された生体が血栓症を発症するリスクを高める可能性があることが報告されている（Meyerら（J. Thromb. Haemost. (2009), 7 (1), 171-181）、Robles-Carrilloら（J. Immunol. (2010), 185 (3), 1577-1583））。そこで、抗体のFc $\gamma$ RIIaに対する結合が増強された抗体の血小板凝集活性が増強しているか否かが下記のように検証された。

#### 【0420】

（13-2）Fc $\gamma$ RIIbに対する結合を増強する既存の改変が加えられたFc領域を含む抗体のヒトFc $\gamma$ Rに対する結合活性の評価

ヒトFc $\gamma$ RIIbに対する結合を増強する既存の改変が加えられたFc領域を含む抗体の、ヒトFc $\gamma$ RIa、Fc $\gamma$ RIIaのR型およびH型、Fc $\gamma$ RIIb、Fc $\gamma$ RIIIaに対するアフィニティーが下記のように解析された。抗体H鎖可変領域としてW02009/125825に開示されているヒトIL-6レセプターに対する抗体の可変領域であるIL6R-H（配列番号：154）を、抗体H鎖定常領域としてヒトIgG1のC末端のGlyおよびLysを除去したG1dを有するIL6R-G1d（配列番号：156）を含むH鎖が作製された。次に、IL6R-G1dのFc領域がSeungら（Mol. Immunol. (2008) 45, 3926-3933）に記載されている改変であるEUナンバリング267位で表されるSerのGluへの置換、EUナンバリング328位で表されるLeuのPheへの置換によって改変されたIL6R-G1d-v3（配列番号：157）が作製された。抗体L鎖としてヒトIL-6レセプターに対する抗体のL鎖であるIL6R-L（配列番号：155）を共通に用い、それぞれのH鎖と共に参考実施例1の方法に従い発現させた抗体が精製された。IL6R-G1d、IL6R-G1d-v3を重鎖として含む抗体は、それぞれIgG1、IgG1-v3と以下で呼ばれる。

#### 【0421】

次に、これらの抗体とFc $\gamma$ Rとの相互作用が、Biacore T100（GE Healthcare）を用いて速度論的に解析された。ランニングバッファーとしてHBS-EP+（GE Healthcare）を用い、当該相互作用が25℃の温度で測定された。アミンカップリング法によりProtein AがSeries S Sencor Chip CM5（GE Healthcare）に固定化されたチップが用いられた。このチップへキャプチャーさせた目的の抗体と、ランニングバッファーで希釈した各Fc $\gamma$ Rを相互作用させ、抗体に対する各Fc $\gamma$ Rの結合が測定された。測定後は10 mM glycine-HCl、pH1.5をチップに反応させることで、チップにキャプチャーされた抗体が洗浄されることによって、再生されたチップが繰り返し用いられた。測定結果として得られたセンサーグラムをBiacore Evaluation Softwareにより1:1 Langmuir binding modelで解析することで算出された結合速度定数ka（L/mol/s）、解離速度定数kd（1/s）の値から解離定数KD（mol/L）が算出された。IgG1、IgG1-v3の各Fc $\gamma$ Rに対するKD値を表22（各抗体の各Fc $\gamma$ Rに対するKD値）に、またIgG1の各Fc $\gamma$ Rに対するKD値をIgG1-v3の各Fc $\gamma$ Rに対するKD値で除したIgG1-v3の相対的なKD値を表23に示した。

#### 【0422】

##### 【表22】

| 抗体      | KD (M)          |                   |                   |                  |                   |
|---------|-----------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|
|         | Fc $\gamma$ RIa | Fc $\gamma$ RIIaR | Fc $\gamma$ RIIaH | Fc $\gamma$ RIIb | Fc $\gamma$ RIIIa |
| IgG1    | 3.4E-10         | 1.2E-06           | 7.7E-07           | 5.3E-06          | 3.1E-06           |
| IgG1-v3 | 1.9E-10         | 2.3E-09           | 1.5E-06           | 1.3E-08          | 8.8E-06           |

#### 【0423】

##### 【表23】

|       | Fc $\gamma$ RIa | Fc $\gamma$ RIIaR | Fc $\gamma$ RIIaH | Fc $\gamma$ RIIb | Fc $\gamma$ RIIIa |
|-------|-----------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| KD 値比 | 1.8             | 522               | 0.51              | 408              | 0.35              |

#### 【0424】

この結果から、IgG1のFc領域におけるEUナンバリングで表される267位のSerがGluに、328位のLeuがPheに置換された改変Fc領域（Mol. Immunol. (2008) 45, 3926-3933）を含む

抗体はIgG1のFc領域を含む抗体と比較してFc $\gamma$ RIIbに対するアフィニティーが408倍増強し、Fc $\gamma$ RIIaのH型に対するアフィニティーは0.51倍に減弱しているが、Fc $\gamma$ RIIaのR型に対するアフィニティーが522倍増強していることが確認された。

#### 【0425】

##### (13-3) 血小板凝集能の評価

次に、IgG1のFc領域におけるEUナンバリングで表される267位のSerがGluに、328位のLeuがPheに置換されたFc領域を含む抗体のFc $\gamma$ RIIaに対するアフィニティーの強弱によって血小板凝集能が変化するかがFc $\gamma$ RIIaのH型、R型のドナー由来の血小板を用いて検証された。IgEに結合するhIgG1抗体（ヒトIgG1定常領域）の重鎖可変領域およびG1d重鎖定常領域を含む重鎖omalizumab\_VH-G1d（配列番号：158）、軽鎖としてomalizumab\_VL-CK（配列番号：159）を含む抗体が参考実施例1の方法を用いて作製された。また、omalizumab\_VH-G1dのEUナンバリングで表される267位のSerがGluに、328位のLeuがPheに置換されたomalizumab\_VH-G1d-v3（配列番号：160）が作製された。参考実施例1の方法を用いて、omalizumab\_VH-G1d-v3を重鎖として含み、omalizumab\_VL-CKを軽鎖として含む、omalizumab-G1d-v3が作製された。この抗体の血小板凝集能が評価された。

#### 【0426】

血小板凝集は、血小板凝集能測定装置ヘマトレーサー712（株式会社エル・エム・エス）を用いて測定された。まず、約50 mLの全血を、0.5 mLの3.8%クエン酸ナトリウムを含む4.5 mL真空採血管に一定分量ずつ採取された約50 mLの全血を200 gで15分間、遠心分離することによって回収された上清がPlatelet Rich Plasma (PRP) として使用された。緩衝液A（137 mM NaCl、2.7 mM KCl、12 mM NaHCO<sub>3</sub>、0.42 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、2 mM MgCl<sub>2</sub>、5 mM HEPES、5.55 mM dextrose、1.5 U/mL apyrase、0.35 % BSA）を用いて洗浄されたPRPは、さらに緩衝液B（137 mM NaCl、2.7 mM KCl、12 mM NaHCO<sub>3</sub>、0.42 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、2 mM MgCl<sub>2</sub>、5 mM HEPES、5.55 mM dextrose、2 mM CaCl<sub>2</sub>、0.35 % BSA）に置換された。その結果、約300,000/ $\mu$ Lの密度の洗浄血小板が調製された。血小板凝集能測定装置に設置された、攪拌棒を含む測定用キュベットに156  $\mu$ Lの洗浄血小板が分注された。当該装置内で37.0°Cに維持されたキュベット内で、血小板は攪拌棒により1000 rpmで攪拌された。そこに最終濃度がそれぞれ600  $\mu$ g/mL及び686  $\mu$ g/mLとなるように調製されたモル比1:1のomalizumab-G1d-v3とIgEの免疫複合体を44  $\mu$ L加え、血小板と当該免疫複合体を5分間反応させた。さらに、二次凝集を起こさない濃度のアデノシン2リン酸（ADP、SIGMA）が反応液に加えられ、凝集が増強されるかが確認された。

#### 【0427】

このアッセイで得られた、Fc $\gamma$ RIIaの遺伝子多型（H/HまたはR/H）のドナーごとの血小板凝集の結果を図29および30に示した。図29の結果から、Fc $\gamma$ RIIaの多型（R/H）を有するドナーの血小板に、免疫複合体を添加した場合に血小板凝集が増強することが示された。一方、図30に示した通り、Fc $\gamma$ RIIa多型（H/H）を有するドナーの血小板に、免疫複合体を添加した場合には血小板凝集が増強しなかった。

#### 【0428】

次に活性化マーカーを使って血小板の活性化が評価された。血小板の活性化は、CD62p（p-selectin）もしくは活性型インテグリンといった活性化マーカーの血小板膜表面における発現増加によって測定することができる。先述の方法により調製された洗浄血小板7.7  $\mu$ Lの洗浄血小板に免疫複合体を2.3  $\mu$ L添加し室温で5分間反応させた後、さらに最終濃度が30  $\mu$ MになるようにADPを添加して活性化が惹起され、免疫複合体によってADPによる活性化が増強されるかが確認された。陰性対照には免疫複合体の代わりにリン酸緩衝液（pH7.4）（Gibco）を添加したサンプルが用いられた。反応後の各サンプルにPE標識抗CD62抗体（BECTON DICKINSON）、PerCP標識抗CD61抗体、FITC標識PAC-1抗体（BD bioscience）を加えることによって染色された。各染色の蛍光強度がフローサイトメーター（FACS CantoII、BD bioscience）を用いて測定された。

#### 【0429】

このアッセイ法で得られたCD62p発現の結果を図31に、活性化インテグリン発現の結果

果を図32に示した。洗浄血小板としてFc $\gamma$ RIIaの多型がR/Hである一名の健常人から得た洗浄血小板が使用された。ADP刺激により血小板膜表面に発現誘導されるCD62p及び活性型インテグリンは、免疫複合体存在下においていずれも増強された。

#### 【0430】

これらの結果から、IgG1のFc領域のEUナンバリングで表される267位のSerがGluに、328位のLeuがPheに置換された、ヒトFc $\gamma$ RIIbに対する結合を増強する既存の改変が加えられたFc領域を含む抗体は、Fc $\gamma$ RIIaの遺伝子多型のうち131番目のアミノ酸がHである血小板と比べて、131番目のアミノ酸がRである血小板の凝集を促進することが明らかとなった。すなわち、ヒトFc $\gamma$ RIIbに対する結合を増強する既存の改変が加えられたFc領域を含む抗体がFc $\gamma$ RIIa R型を有するヒトに投与された場合には、血小板凝集による血栓症発症のリスクを高める危険性が示唆された。Fc $\gamma$ RIIbに対してより選択的な結合を増強する本発明のFc領域を含む抗原結合分子は、抗原の血漿中滞留性の改善のみならず、上記の問題点を克服する可能性が示され、本発明の抗原結合分子の有用性が明白である。

#### 【0431】

〔参考実施例14〕 P238D 改変に加えてヒンジ部分の改変を導入した改変体のFc $\gamma$ RIIbに対する結合の網羅的解析

ヒト天然型IgG1に対してEUナンバリングで表される238位のProがAspに置換されたFcに対し、さらにFc $\gamma$ RIIbへの結合を上げると天然型抗体の解析から予測される他の改変を組み合わせても、期待される組合せ効果は得られなかった。そこで、EUナンバリングで表される238位のProがAspに置換された改変Fcに対して網羅的改変を導入することによって、さらにFc $\gamma$ RIIbへの結合を増強する改変体を見出すことが試みられた。抗体H鎖として用いられたIL6R-G1d（配列番号：156）のEUナンバリングで表される252位のMetをTyrに置換する改変、EUナンバリングで表される434位のAsnをTyrに置換する改変が導入されたIL6R-F11（配列番号：161）が作製された。さらに、IL6R-F11に対してEUナンバリングで表される238位のProをAspに置換する改変が導入されたIL6R-F652（配列番号：162）が作製された。L6R-F652に対し、EUナンバリングで表される238位の残基の近傍の領域（EUナンバリングで表される234位から237位、239位）が元のアミノ酸とシステインを除く18種類のアミノ酸にそれぞれ置換された抗体H鎖配列を含む発現プラスミドがそれぞれ調製された。抗体L鎖としてはIL6R-L（配列番号：155）が用いられた。これらの改変体が参考実施例1と同様の方法により発現、精製された。これらのFc変異体はPD variantと呼ばれる。参考実施例2と同様の方法により各PD variantのFc $\gamma$ RIIa R型（アロタイプR131）およびFc $\gamma$ RIIbに対する相互作用が網羅的に評価された。

#### 【0432】

以下の方法に従って、それぞれのFc $\gamma$ Rとの相互作用解析結果を表す図が作成された。各PD variantの各Fc $\gamma$ Rに対する結合量の値を、コントロールとした改変導入前の抗体（EUナンバリングで表される238位のProがAspに置換された改変であるIL6R-F652/IL6R-L）の各Fc $\gamma$ Rに対する結合量の値で割り、さらに100倍した値が各PD variantの各Fc $\gamma$ Rに対する相対的な結合活性の値として表された。横軸に各PD variantのFc $\gamma$ RIIbに対する相対的な結合活性の値、縦軸に各PD variantのFc $\gamma$ RIIa R型に対する相対的な結合活性の値をそれぞれ表示した（図33）。

#### 【0433】

その結果、11種類の改変体のFc $\gamma$ RIIbに対する結合が、当該各改変導入前の抗体と比較して増強し、Fc $\gamma$ RIIa R型に対する結合を維持または増強する効果があることが見出された。これらの11種類の改変体のFc $\gamma$ RIIbおよびFc $\gamma$ RIIa R型に対する結合活性をまとめた結果を表24に示した。なお、表中の改変とはIL6R-F11（配列番号：161）に対して導入された改変を表す。

#### 【0434】

【表 2 4】

| 改変体名              | 改変          | Fc $\gamma$ RIIb に対する<br>相対的結合活性 | Fc $\gamma$ RIIaR に対する<br>相対的結合活性 |
|-------------------|-------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| IL6R-F652/IL6R-L  | P238D       | 100                              | 100                               |
| IL6R-PD042/IL6R-L | P238D/L234W | 106                              | 240                               |
| IL6R-PD043/IL6R-L | P238D/L234Y | 112                              | 175                               |
| IL6R-PD079/IL6R-L | P238D/G237A | 101                              | 138                               |
| IL6R-PD080/IL6R-L | P238D/G237D | 127                              | 222                               |
| IL6R-PD081/IL6R-L | P238D/G237E | 101                              | 117                               |
| IL6R-PD082/IL6R-L | P238D/G237F | 108                              | 380                               |
| IL6R-PD086/IL6R-L | P238D/G237L | 112                              | 268                               |
| IL6R-PD087/IL6R-L | P238D/G237M | 109                              | 196                               |
| IL6R-PD094/IL6R-L | P238D/G237W | 122                              | 593                               |
| IL6R-PD095/IL6R-L | P238D/G237Y | 124                              | 543                               |
| IL6R-PD097/IL6R-L | P238D/S239D | 139                              | 844                               |

10

## 【0 4 3 5】

P238Dが導入された改変体に対して前記の11種類の改変が、さらに組み合わせられて導入された改変体の相対的なFc $\gamma$ RIIbに対する結合活性の値、およびP238Dを含まないFcに当該改変が導入された改変体の相対的なFc $\gamma$ RIIbに対する結合活性の値を図34に示した。これら11種類の改変は、P238D改変に更に導入すると、導入前に比べてFc $\gamma$ RIIbに対する結合量が増強していた。一方、G237F、G237W、およびS239Dを除く8種類の改変がP238Dを含まない改変体に導入された場合、Fc $\gamma$ RIIbに対する結合を低減する効果を示していた（データ示さず）。

20

この結果から、天然型IgG1に対して導入した改変の効果にもとづいて、同じ改変をP238D改変が含まれる改変体に対して組み合わせ導入したときの効果を予測するのは困難であることが明らかとなった。また、いいかえれば今回見出された8種類の改変は、同じ改変をP238D改変が含まれる改変体に対して組み合わせ導入する本検討を行わなければ見出すことが不可能な改変である。

## 【0 4 3 6】

表24に示した改変体のFc $\gamma$ RIa、Fc $\gamma$ RIIaR（アロタイプR131）、Fc $\gamma$ RIIaH（アロタイプH131）、Fc $\gamma$ RIIb、Fc $\gamma$ RIIIaV（アロタイプV158）に対するKD値を参考実施例2と同様の方法で測定した結果を表25に示した。なお、表中の改変とはIL6R-F11（配列番号：161）に対して導入された改変を表す。ただし、IL6R-F11を作製する際の鑄型としたIL6R-G1d/IL6R-Lについては、\*として示した。また、表中のKD（IIaR）/KD（IIb）およびKD（IIaH）/KD（IIb）はそれぞれ、各改変体のFc $\gamma$ RIIaRに対するKD値を各改変体のFc $\gamma$ RIIbに対するKD値で割った値、各改変体のFc $\gamma$ RIIaHに対するKD値を各改変体のFc $\gamma$ RIIbに対するKD値で割った値を示す。親ポリペプチドのKD（IIb）/改変体のKD（IIb）は、親ポリペプチドのFc $\gamma$ RIIbに対するKD値を各改変体のFc $\gamma$ RIIbに対するKD値で割った値を示す。これらに加えて、各改変体のFc $\gamma$ RIIaRおよびFc $\gamma$ RIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値/親ポリペプチドのFc $\gamma$ RIIaRおよびFc $\gamma$ RIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値を表25に示した。ここで親ポリペプチドとは、IL6R-F11（配列番号：161）をH鎖に持つ改変体のことを指す。なお、表25のうち灰色で塗りつぶされたセルは、Fc $\gamma$ RのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解析できないと判断されたため、参考実施例2に記載された

30

40

〔式2〕

$$KD = C \bullet R_{\max} / (R_{\text{eq}} - RI) - C$$

を利用して算出した値である。

## 【0 4 3 7】

表25に示されたように、いずれの改変体もIL6R-F11と比較してFc $\gamma$ RIIbに対する親和

50

性が向上し、その向上の幅は1.9倍から5.0倍であった。各改変体のFc $\gamma$ RIIaRに対するKD値/各改変体のFc $\gamma$ RIIbに対するKD値の比、および各改変体のFc $\gamma$ RIIaHに対するKD値/各改変体のFc $\gamma$ RIIbに対するKD値の比は、Fc $\gamma$ RIIaRおよびFc $\gamma$ RIIaHに対する結合活性に対する相対的なFc $\gamma$ RIIbに対する結合活性を表す。つまり、この値は各改変体のFc $\gamma$ RIIbへの結合選択性の高さを示した値であり、この値が大きければ大きいほどFc $\gamma$ RIIbに対して結合選択性が高い。親ポリペプチドであるIL6R-F11/IL6R-LのFc $\gamma$ RIIaRに対するKD値/Fc $\gamma$ RIIbに対するKD値の比、およびFc $\gamma$ RIIaHに対するKD値/Fc $\gamma$ RIIbに対するKD値の比はいずれも0.7であるため、表25のいずれの改変体も親ポリペプチドよりもFc $\gamma$ RIIbへの結合選択性が向上していた。改変体のFc $\gamma$ RIIaRおよびFc $\gamma$ RIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値/親ポリペプチドのFc $\gamma$ RIIaRおよびFc $\gamma$ RIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値が1以上であるとは、その改変体のFc $\gamma$ RIIaRおよびFc $\gamma$ RIIaHに対する結合活性のうち強い方の結合が親ポリペプチドのFc $\gamma$ RIIaRおよびFc $\gamma$ RIIaHに対する結合活性のうち強い方の結合と同等であるか、より低減していることを意味する。今回得られた改変体ではこの値が0.7から5.0であったため、今回得られた改変体のFc $\gamma$ RIIaRおよびFc $\gamma$ RIIaHに対する結合活性のうち強い方の結合は親ポリペプチドのそれと比較してほぼ同等か、それよりも低減していたといえる。これらの結果から、今回得られた改変体では親ポリペプチドと比べて、Fc $\gamma$ RIIa R型およびH型への結合活性を維持または低減しつつ、Fc $\gamma$ RIIbへの結合活性を増強しており、Fc $\gamma$ RIIbへの選択性が向上していることが明らかとなった。また、Fc $\gamma$ RIaおよびFc $\gamma$ RIIaVに対しては、いずれの改変体もIL6R-F11と比較して親和性が低下していた。

【0438】

10

20

【表 25】

| 改変          | KD [nmol/L]     |                   |                   |                  |                    | KD[IIaR]/<br>KD[IIb] | KD[IIaH]/<br>KD[IIb] | 親ポリペプチドの<br>KD(IIb)/<br>改変ポリペプチドの<br>KD(IIb) | 改変体のFc $\gamma$ RIIaRおよびFc $\gamma$ RIIaHに<br>対する結合活性のうち強い方のKD値/<br>親ポリペプチドのFc $\gamma$ RIIaRおよびFc $\gamma$ RIIaH<br>に対する結合活性のうち強い方のKD値 |
|-------------|-----------------|-------------------|-------------------|------------------|--------------------|----------------------|----------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|             | Fc $\gamma$ RIa | Fc $\gamma$ RIIaR | Fc $\gamma$ RIIaH | Fc $\gamma$ RIIb | Fc $\gamma$ RIIIaV |                      |                      |                                              |                                                                                                                                         |
| *           | 3.2E-10         | 1.0E-06           | 6.7E-07           | 2.6E-06          | 3.5E-07            | 0.4                  | 0.3                  | 2.6                                          | 0.1                                                                                                                                     |
|             | 9.0E-10         | 5.0E-06           | 5.0E-06           | 6.8E-06          | 1.5E-06            | 0.7                  | 0.7                  | 1.0                                          | 1.0                                                                                                                                     |
| L234W/P238D | 6.3E-08         | 1.6E-05           | 1.9E-05           | 2.0E-06          | 3.7E-05            | 8.1                  | 9.5                  | 3.4                                          | 3.2                                                                                                                                     |
| L234Y/P238D | 7.5E-08         | 2.6E-05           | 2.3E-05           | 1.6E-06          | 4.5E-05            | 15.9                 | 14.4                 | 4.2                                          | 4.6                                                                                                                                     |
| G237A/P238D | 1.4E-07         | 3.2E-05           | 2.1E-05           | 3.0E-06          | 3.7E-05            | 10.5                 | 7.0                  | 2.3                                          | 4.2                                                                                                                                     |
| G237D/P238D | 1.4E-07         | 2.1E-05           | 2.5E-05           | 2.0E-06          | 4.3E-05            | 10.7                 | 12.8                 | 3.5                                          | 4.2                                                                                                                                     |
| G237E/P238D | 3.4E-07         | 3.8E-05           | 2.5E-05           | 3.6E-06          | 4.1E-05            | 10.6                 | 7.0                  | 1.9                                          | 5.0                                                                                                                                     |
| G237F/P238D | 5.2E-08         | 1.4E-05           | 1.6E-05           | 3.4E-06          | 4.3E-05            | 4.1                  | 4.7                  | 2.0                                          | 2.8                                                                                                                                     |
| G237L/P238D | 1.2E-07         | 1.8E-05           | 1.8E-05           | 2.6E-06          | 4.1E-05            | 6.9                  | 7.1                  | 2.7                                          | 3.5                                                                                                                                     |
| G237M/P238D | 5.2E-08         | 2.2E-05           | 2.0E-05           | 2.9E-06          | 3.7E-05            | 7.7                  | 7.0                  | 2.4                                          | 4.0                                                                                                                                     |
| G237W/P238D | 3.6E-08         | 7.2E-06           | 1.2E-05           | 2.3E-06          | 3.8E-05            | 3.1                  | 5.2                  | 2.9                                          | 1.4                                                                                                                                     |
| G237Y/P238D | 9.3E-08         | 7.9E-06           | 1.5E-05           | 2.3E-06          | 4.2E-05            | 3.4                  | 6.4                  | 2.9                                          | 1.6                                                                                                                                     |
| P238D/S239D | 4.9E-09         | 3.5E-06           | 1.9E-05           | 1.4E-06          | 1.7E-05            | 2.6                  | 14.0                 | 5.0                                          | 0.7                                                                                                                                     |

【0439】

〔参考実施例 15〕 P238Dを含むFcとFc $\gamma$ RIIb細胞外領域との複合体のX線結晶構造解析  
 先の参考実施例 14に示した通り、P238Dを含むFcに対して、Fc $\gamma$ RIIbとの結合活性を

10

20

30

40

50

向上する、あるいはFc $\gamma$ RIIbへの選択性を向上させると天然型IgG1抗体の解析から予測された改変を導入しても、Fc $\gamma$ RIIbに対する結合活性が減弱することが明らかとなり、この原因としてFcとFc $\gamma$ RIIbとの相互作用界面の構造がP238Dを導入することで変化していることが考えられた。そこで、この現象の原因を追及するためP238Dの変異をもつIgG1のFc（以下、Fc（P238D）と呼ぶ）とFc $\gamma$ RIIb細胞外領域との複合体の立体構造をX線結晶構造解析により明らかにし、天然型 IgG1のFc（以下、Fc（WT）と呼ぶ）とFc $\gamma$ RIIb細胞外領域との複合体の立体構造と対比することによって、これらの結合様式が比較された。なお、FcとFc $\gamma$ R細胞外領域との複合体の立体構造に関する複数の報告がすでにあり、Fc（WT） / Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体（Nature（2000）400, 267-273、J. Biol. Chem.（2011）276, 16469-16477）、Fc（WT） / Fc $\gamma$ RIIIa細胞外領域複合体（Proc. Natl. Acad. Sci. US A（2011）108, 12669-126674）、およびFc（WT） / Fc $\gamma$ RIIa細胞外領域複合体（J. Immunol.（2011）187, 3208-3217）の立体構造が解析されている。これまでにFc（WT） / Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体の立体構造は解析されていないが、Fc（WT）との複合体の立体構造が既知であるFc $\gamma$ RIIaとFc $\gamma$ RIIbでは細胞外領域においてアミノ酸配列の93%が一致し、非常に高い相同性を有していることから、Fc（WT） / Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体の立体構造はFc（WT） / Fc $\gamma$ RIIa細胞外領域複合体の結晶構造からモデリングにより推定された。

#### 【0440】

Fc（P238D） / Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体についてはX線結晶構造解析により分解能2.6 Åで立体構造を決定した。その解析結果の構造を図35に示した。2つのFc CH2ドメインの間にFc $\gamma$ RIIb細胞外領域が挟まれるように結合しており、これまで解析されたFc（WT）とFc $\gamma$ RIIIa、Fc $\gamma$ RIIb、Fc $\gamma$ RIIaの各細胞外領域との複合体の立体構造と類似していた。次に詳細な比較のため、Fc（P238D） / Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体の結晶構造とFc（WT） / Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体のモデル構造とを、Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域ならびにFc CH2ドメインAに対しC $\alpha$ 原子間距離をもとにした最小二乗法により重ね合わせた（図36）。その際、Fc CH2ドメインB同士の重なりは良好でなく、この部分に立体構造的な違いがあることが明らかとなった。さらにFc（P238D） / Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体の結晶構造ならびにFc（WT） / Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体のモデル構造を使い、抽出されたFc $\gamma$ RIIb細胞外領域とFc CH2ドメインBとの間でその距離が3.7 Å以下の原子ペアを比較することによって、Fc $\gamma$ RIIbとFc（WT）CH2ドメインBとの間の原子間相互作用とFc $\gamma$ RIIbとFc（P238D）CH2ドメインBとの間の原子間相互作用が比較された。表26に示すとおり、Fc（P238D）とFc（WT）では、Fc CH2ドメインBとFc $\gamma$ RIIbとの間の原子間相互作用は一致していなかった。

#### 【0441】

【表 2 6】

| Fc $\gamma$ RIIb 原子 | Fc(P238D) CH2 ドメイン B<br>相互作用相手 (原子間距離, Å)                                          | Fc(WT) CH2 ドメイン B<br>相互作用相手 (原子間距離, Å)                                           |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Val 116 CG2         |                                                                                    | Asp 265 OD2 (3.47)<br>Gly 237 O (3.65)                                           |
| Ser 126 OG          | Ser 298 N (3.31)<br>Ser 298 CB (3.32)<br>Tyr 296 O (3.05)                          |                                                                                  |
| Lys 128 CA          | Ser 298 OG (3.50)                                                                  |                                                                                  |
| Phe 129 CB          | Ser 298 O (3.36)                                                                   |                                                                                  |
| Phe 129 CD2         |                                                                                    | Asn 297 CB (3.50)<br>Asn 297 CG (3.43)                                           |
| Lys 128 C           | Ser 298 OG (3.47)                                                                  |                                                                                  |
| Phe 129 N           | Ser 298 OG (3.30)                                                                  |                                                                                  |
| Phe 129 O           | Ser 267 OG (3.54)                                                                  |                                                                                  |
| Arg 131 CB          |                                                                                    | Val 266 O (3.02)                                                                 |
| Arg 131 CG          |                                                                                    | Val 266 O (3.22)                                                                 |
| Arg 131 CD          |                                                                                    | Val 266 CG1 (3.45)<br>Val 266 C (3.55)<br>Val 266 O (3.10)                       |
| Arg 131 NE          | Ala 327 O (3.60)                                                                   | Val 266 C (3.66)<br>Val 266 O (3.01)<br>Val 266 N (3.49)                         |
| Arg 131 CZ          | Asp 270 CG (3.64)<br>Asp 270 OD2 (3.22)<br>Asp 270 OD1 (3.27)<br>Ala 327 CB (3.63) | Val 266 N (3.13)                                                                 |
| Arg 131 NH1         | Asp 270 CG (3.19)<br>Asp 270 OD2 (2.83)<br>Asp 270 OD1 (2.99)<br>Ser 267 CB (3.56) | Val 266 CG1 (3.47)<br>Val 266 N (3.43)<br>Thr 299 OG1 (3.66)<br>Ser 298 O (3.11) |
| Arg 131 NH2         | Asp 270 CG (3.20)<br>Asp 270 OD2 (2.80)<br>Asp 270 OD1 (2.87)<br>Ala 327 CB (3.66) | Asp 265 CA (3.16)<br>Val 266 N (3.37)                                            |
| Tyr 157 CE1         |                                                                                    | Leu 234 CG (3.64)<br>Leu 234 CD1 (3.61)                                          |
| Tyr 157 OH          |                                                                                    | Gly 236 O (3.62)<br>Leu 234 CA (3.48)<br>Leu 234 CG (3.45)                       |

## 【0 4 4 2】

さらにFc CH2ドメインAならびにFc CH2ドメインB単独同士でC $\alpha$ 原子間距離をもとにした最小二乗法によって、Fc (P238D) / Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造とFc (WT) / Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体のモデル構造の重ね合わせをおこなうことによって、P238D付近の詳細構造が比較された。Fc (P238D)の変異導入位置であるEUナンバリングで表される238位のアミノ酸残基の位置がFc (WT)とは変化することに伴い、ヒンジ領域から続く238位のアミノ酸残基の近辺のループ構造がFc (P238D)とFc (WT)では変化していることがわかる(図37)。もともとFc (WT)においてはEUナンバリングで表される238位のProはFcの内側にあり、238位の周囲の残基と疎水性コアを形成している。ところが、EUナンバリングで表される238位のProが、電荷をもち非常に親水的なAspに変化した場合、変化したAsp残基がそのまま疎水性コアに存在することは脱溶媒和の点でエネルギー的に不利となる。そこでFc (P238D)ではこのエネルギー的な不利を解消するため、EUナンバリングで表される238位のアミノ酸残基が溶媒側に配向する形に変化し、238位のアミノ酸残基付近のループ構造の変化をもたらしたと考えられる。さらに、このループはS-S結合で架橋されたヒンジ領域から距離的に遠くないことから、その構造変化が局所的な変化にとどまらず、Fc CH2ドメインAとドメインBの相対的な配置にも影響し、その結果、Fc $\gamma$ RIIbとFc CH2ドメインBとの間の原子間相互作用に違いをもたらしたと推察される。このため、P238D改変

を既に有するFcに、天然型IgGにおいてFc $\gamma$ RIIbに対する選択性、結合活性を向上させる改変を組み合わせても予測される効果が得られなかったと考えられる。

#### 【0443】

また、P238Dの導入による構造変化の結果、Fc CH2ドメインAにおいては、変異が導入されたP238Dに隣接するEUナンバリングで表される237位のGlyの主鎖とFc $\gamma$ RIIbの160位のTyrとの間に水素結合が認められる（図38）。このTyr160に相当する残基はFc $\gamma$ RIIaではPheであり、Fc $\gamma$ RIIaとの結合の場合ではこの水素結合は形成されない。160位のアミノ酸は、Fcとの相互作用界面におけるFc $\gamma$ RIIaとFc $\gamma$ RIIbの間の数少ない違いの一つであることを併せて考慮すると、Fc $\gamma$ RIIbに特有となるこの水素結合の有無が、Fc（P238D）のFc $\gamma$ RIIbに対する結合活性の向上と、Fc $\gamma$ RIIaに対する結合活性の低減を招き、選択性向上の原因になったと推測される。また、Fc CH2ドメインBについてはEUナンバリングで表される270位のAspとFc $\gamma$ RIIbの131位のArgとの間に静電的な相互作用が認められる（図39）。Fc $\gamma$ RIIaのアロタイプの一つであるFc $\gamma$ RIIa H型では、Fc $\gamma$ RIIbの131位のArgに対応する残基がHisであり、この静電相互作用は形成できない。このことからFc $\gamma$ RIIa R型と比較してFc $\gamma$ RIIa H型ではFc（P238D）に対する結合活性が低減している理由が説明可能である。このようなX線結晶構造解析の結果に基づく考察から、P238Dの導入によるその付近のループ構造の変化とそれに伴うドメイン配置の相対的な変化が、天然型IgGとFc $\gamma$ Rとの結合ではみられない新たな相互作用が形成され、P238D改変体のFc $\gamma$ RIIbに対する選択的な結合プロファイルにつながっている可能性があることが明らかとなった。

#### 【0444】

##### [Fc（P238D）の発現精製]

P238D改変を含むFcの調製は以下のように行われた。まず、hIL6R-IgG1-v1（配列番号：163）のEUナンバリングで表される220位のCysをSerに置換し、EUナンバリングで表される236位のGluからそのC末端をPCRによってクローニングした遺伝子配列Fc（P238D）を参考実施例1に記載された方法と同様な方法で発現ベクターの作製、発現、精製が行われた。なお、EUナンバリングで表される220位のCysは通常のIgG1においては、L鎖のCysとジスルフィド結合を形成しているが、Fcのみを調製する場合にはL鎖を共発現させないことから、不要なジスルフィド結合形成を回避するために当該Cys残基はSerに置換された。

#### 【0445】

##### [Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域の発現精製]

Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域は、参考実施例2の方法にしたがって調製された。

#### 【0446】

##### [Fc（P238D） / Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体の精製]

結晶化に使用するため得られたFc $\gamma$ RIIb細胞外領域サンプル 2 mgに対し、glutathione S-transferaseとの融合蛋白として大腸菌により発現精製したEndo F1（Protein Science（1996）5, 2617-2622）0.29 mgを加え、0.1M Bis-Tris pH6.5のバッファー条件で、室温にて3日間静置することにより、Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域のAsnに直接結合したN-acetylglucosamine以外のN型糖鎖が切断された。次に5000MWCOの限外ろ過膜により濃縮された糖鎖切断処理が施されたFc $\gamma$ RIIb細胞外領域サンプルは、20mM HEPS pH7.5, 0.05M NaClで平衡化したゲルろ過カラムクロマトグラフィー（Superdex200 10/300）により精製された。さらに得られた糖鎖切断Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域画分にFc（P238D）をモル比でFc $\gamma$ RIIb細胞外領域のほうが若干過剰となるよう混合された。10000MWCOの限外ろ過膜により濃縮された前記混合液を20 mM HEPS pH7.5, 0.05M NaClで平衡化したゲルろ過カラムクロマトグラフィー（Superdex200 10/300）を用いて精製することによって、Fc（P238D） / Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体のサンプルが得られた。

#### 【0447】

##### [Fc（P238D） / Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体の結晶化]

10000MWCOの限外ろ過膜により約10 mg/mlまで濃縮された前記のFc（P238D） / Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体の試料を用いて、シッティングドロップ蒸気拡散法により当該複合体が結晶化された。結晶化にはHydra II Plus One（MATRIX）を用い、100 mM Bis-Tris pH6.

5、17% PEG3350、0.2 M Ammonium acetate、および2.7%(w/v) D-Galactoseのリザーバー溶液に対し、リザーバー溶液：結晶化サンプルを0.2  $\mu$ L：0.2  $\mu$ Lで混合して結晶化ドロップを作成した。シールされた当該結晶化ドロップを20℃に静置することによって、薄い板状の結晶が得られた。

#### 【0448】

[Fc (P238D) / Fc  $\gamma$  RIIb細胞外領域複合体結晶からのX線回折データの測定]

得られたFc (P238D) / Fc  $\gamma$  RIIb細胞外領域複合体の単結晶一つは100 mM Bis-Tris pH6.5、20% PEG3350、Ammonium acetate、2.7% (w/v) D-Galactose、Ethylene glycol 22.5% (v/v) の溶液に浸漬された後、微小なナイロンループ付きのピンを用いて溶液ごとすくいとられ、液体窒素中で凍結された。その後、高エネルギー加速器研究機構の放射光施設フォトンファクトリーBL-1Aにて当該結晶からのX線回折データが測定された。なお、測定中は常に-178℃の窒素気流中に置くことによって凍結状態を維持し、ビームラインに備え付けられたCCDディテクタQuantum 270 (ADSC) によって、結晶を0.8°ずつ回転させながらトータル225枚のX線回折画像が収集された。得られた回折画像からの格子定数の決定、回折斑点の指数付け、ならびに回折データの処理には、プログラムXia2 (CCP4 Software Suite)、XDS Package (Walfgang Kabsch) ならびにScala (CCP4 Software Suite) を用い、最終的に分解能2.46 Åまでの当該結晶の回折強度データが得られた。本結晶は、空間群P 21に属し、格子定数  $a = 48.85$  Å、 $b = 76.01$  Å、 $c = 115.09$  Å、 $\alpha = 90^\circ$ 、 $\beta = 100.70^\circ$ 、 $\gamma = 90^\circ$  であった。

#### 【0449】

[Fc (P238D) / Fc  $\gamma$  RIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造解析]

Fc (P238D) / Fc  $\gamma$  RIIb細胞外領域複合体の結晶構造決定は、プログラムPhaser (CCP4 Software Suite) を用いた分子置換法によりおこなわれた。得られた結晶格子の大きさとFc (P238D) / Fc  $\gamma$  RIIb細胞外領域複合体の分子量から非対称単位中の複合体の数は一個と予想された。Fc (WT) / Fc  $\gamma$  RIIa細胞外領域複合体の結晶構造であるPDB code:3SGJの構造座標から、A鎖239-340番ならびにB鎖239-340番のアミノ酸残基部分を別座標として取り出し、それぞれFc CH2ドメインの探索用モデルと設定した。同じくPDB code:3SGJの構造座標から、A鎖341-444番とB鎖341-443番のアミノ酸残基部分を一つの座標として取り出し、Fc CH3ドメインの探索用モデルと設定した。最後にFc  $\gamma$  RIIb細胞外領域の結晶構造であるPDB code:2FCBの構造座標からA鎖6-178番のアミノ酸残基部分を取り出しFc  $\gamma$  RIIb細胞外領域の探索用モデルと設定した。Fc CH3ドメイン、Fc  $\gamma$  RIIb細胞外領域、Fc CH2ドメインの順番に各探索用モデルの結晶格子内での向きと位置を、回転関数および並進関数から決定し、Fc (P238D) / Fc  $\gamma$  RIIb細胞外領域複合体結晶構造の初期モデルが得られた。得られた初期モデルに対し2つのFc CH2ドメイン、2つのFc CH3ドメインならびにFc  $\gamma$  RIIb細胞外領域を動かす剛体精密化をおこなったところ、この時点で25-3.0 Åの回折強度データに対し、結晶学的信頼度因子R値は40.4%、Free R値は41.9%となった。さらにプログラムRefmac5 (CCP4 Software Suite) を用いた構造精密化と、実験的に決定された構造因子Foとモデルから計算された構造因子Fcならびにモデルから計算された位相をもとに算出された2Fo-Fc、Fo-Fcを係数とする電子密度マップを見ながらのモデル修正をプログラムCoot (Paul Emsley) でおこなった。これらの作業を繰り返すことによってモデルの精密化がおこなわれた。最後に2Fo-Fc、Fo-Fcを係数とする電子密度マップをもとに水分子をモデルに組み込み、精密化をおこなうことによって、最終的に分解能25-2.6 Åの24291個の回折強度データを用い、4846個の非水素原子を含むモデルに対し、結晶学的信頼度因子R値は23.7%、Free R値は27.6%となった。

#### 【0450】

[Fc (WT) / Fc  $\gamma$  RIIb細胞外領域複合体のモデル構造作成]

Fc (WT) / Fc  $\gamma$  RIIa細胞外領域複合体の結晶構造であるPDB code:3RY6の構造座標をベースに、プログラムDiscovery Studio 3.1 (Accelrys) のBuild Mutants機能を使い、Fc  $\gamma$  RIIbのアミノ酸配列と一致するように構造座標中のFc  $\gamma$  RIIaに変異が導入された。その際、Optimization LevelをHigh、Cut Radiusを4.5とし、5つのモデルを発生させ、その中

から最もエネルギースコアが良いものを採用し、Fc (WT) / Fc  $\gamma$  RIIb細胞外領域複合体のモデル構造と設定した。

【0451】

〔参考実施例16〕 結晶構造に基づいて改変箇所を決定したFc改変体のFc  $\gamma$  Rに対する結合の解析

参考実施例15で得られたFc (P238D)とFc  $\gamma$  RIIb細胞外領域との複合体のX線結晶構造解析の結果に基づき、EUナンバリングで表される238位のProがAspに置換された改変FcにおいてFc  $\gamma$  RIIbとの相互作用に影響を与えることが予測される部位（EUナンバリングで表される233位、240位、241位、263位、265位、266位、267位、268位、271位、273位、295位、296位、298位、300位、323位、325位、326位、327位、328位、330位、332位、334位の残基）に対して網羅的な改変が導入された改変体を構築することによって、P238D 改変に加えてさらにFc  $\gamma$  RIIbとの結合を増強する改変の組合せを得ることが可能であるか検討した。

10

【0452】

IL6R-G1d（配列番号：156）に対し、EUナンバリングで表される439位のLysがGluに置換されたIL6R-B3（配列番号：164）が作製された。次に、IL6R-B3の、EUナンバリングで表される238位のProがAspに置換されたIL6R-BF648が作製された。抗体L鎖としてはIL6R-L（配列番号：155）が共通に用いられた。参考実施例1と同様の方法に従い発現させたこれらの抗体の改変体が精製された。参考実施例2の方法によって各Fc  $\gamma$  R（Fc  $\gamma$  RIa、Fc  $\gamma$  RIIa H型、Fc  $\gamma$  RIIa R型、Fc  $\gamma$  RIIb、Fc  $\gamma$  RIIIa V型）に対するこれら抗体改変体の結合が網羅的に評価された。

20

【0453】

以下の方法に従って、それぞれのFc  $\gamma$  Rとの相互作用解析結果を表す図が作成された。各改変体の各Fc  $\gamma$  Rに対する結合量の値を、コントロールとした改変導入前の抗体（EUナンバリングで表される238位のProがAspに置換された改変であるIL6R-BF648/IL6R-L）の各Fc  $\gamma$  Rに対する結合量の値で割り、さらに100倍した値が各改変体の各Fc  $\gamma$  Rに対する相対的な結合活性の値として表された。横軸に各改変体のFc  $\gamma$  RIIbに対する相対的な結合活性の値、縦軸に各改変体のFc  $\gamma$  RIIa R型に対する相対的な結合活性の値をそれぞれ表示した（図40）。

【0454】

30

その結果、図40に示すように、全改変中24種類の改変体は、改変導入前の抗体と比較してFc  $\gamma$  RIIbに対する結合が維持または増強していることが見出された。これらの改変体のそれぞれのFc  $\gamma$  Rに対する結合に関し、表27に示した。なお、表中の改変とはIL6R-B3（配列番号：164）に対して導入された改変を表す。ただし、IL6R-B3を作製する際の鋳型としたIL6R-G1d/IL6R-Lについては、\*として示した。

【0455】

【表 2 7】

| 改変体名              | 改変          | 相対的結合  |          |          |         |          |
|-------------------|-------------|--------|----------|----------|---------|----------|
|                   |             | FcγRIa | FcγRIIaR | FcγRIIaH | FcγRIIb | FcγRIIIa |
| IL6R-G1d/IL6R-L   | *           | 140    | 650      | 1670     | 62      | 3348     |
| IL6R-B3/IL6R-L    |             | 145    | 625      | 1601     | 58      | 3264     |
| IL6R-BF648/IL6R-L | P238D       | 100    | 100      | 100      | 100     | 100      |
| IL6R-2B002/IL6R-L | P238D/E233D | 118    | 103      | 147      | 116     | 147      |
| IL6R-BP100/IL6R-L | P238D/S267A | 121    | 197      | 128      | 110     | 138      |
| IL6R-BP102/IL6R-L | P238D/S267Q | 104    | 165      | 66       | 106     | 86       |
| IL6R-BP103/IL6R-L | P238D/S267V | 56     | 163      | 69       | 107     | 77       |
| IL6R-BP106/IL6R-L | P238D/H268D | 127    | 150      | 110      | 116     | 127      |
| IL6R-BP107/IL6R-L | P238D/H268E | 123    | 147      | 114      | 118     | 129      |
| IL6R-BP110/IL6R-L | P238D/H268N | 105    | 128      | 127      | 101     | 127      |
| IL6R-BP112/IL6R-L | P238D/P271G | 119    | 340      | 113      | 157     | 102      |
| IL6R-2B128/IL6R-L | P238D/Y296D | 95     | 87       | 37       | 103     | 96       |
| IL6R-2B169/IL6R-L | P238D/V323I | 73     | 92       | 83       | 104     | 94       |
| IL6R-2B171/IL6R-L | P238D/V323L | 116    | 117      | 115      | 113     | 122      |
| IL6R-2B172/IL6R-L | P238D/V323M | 140    | 244      | 179      | 132     | 144      |
| IL6R-BP136/IL6R-L | P238D/K326A | 117    | 159      | 103      | 119     | 102      |
| IL6R-BP117/IL6R-L | P238D/K326D | 124    | 166      | 96       | 118     | 105      |
| IL6R-BP120/IL6R-L | P238D/K326E | 125    | 175      | 92       | 114     | 103      |
| IL6R-BP126/IL6R-L | P238D/K326L | 113    | 167      | 132      | 103     | 146      |
| IL6R-BP119/IL6R-L | P238D/K326M | 117    | 181      | 133      | 110     | 145      |
| IL6R-BP142/IL6R-L | P238D/K326N | 98     | 103      | 97       | 106     | 102      |
| IL6R-BP121/IL6R-L | P238D/K326Q | 118    | 155      | 135      | 113     | 157      |
| IL6R-BP118/IL6R-L | P238D/K326S | 101    | 132      | 128      | 104     | 144      |
| IL6R-BP116/IL6R-L | P238D/K326T | 110    | 126      | 110      | 108     | 114      |
| IL6R-BP911/IL6R-L | P238D/A330K | 52     | 101      | 108      | 119     | 120      |
| IL6R-BP078/IL6R-L | P238D/A330M | 106    | 101      | 89       | 105     | 91       |
| IL6R-BP912/IL6R-L | P238D/A330R | 60     | 81       | 93       | 103     | 97       |

【0 4 5 6】

表 2 7 に示した改変体の FcγRIa, FcγRIIaR, FcγRIIaH, FcγRIIb, FcγRIIIaV に対する KD 値を参考実施例 2 の方法で測定した結果を表 2 8 にまとめた。表中の改変とは IL6R-B3 (配列番号: 1 6 4) に対して導入した改変を表す。ただし、IL6R-B3 を作製する際の鋳型とした IL6R-G1d/IL6R-L については、\* として示した。また、表中の KD (IIaR)/KD (IIb) および KD (IIaH)/KD (IIb) はそれぞれ、各改変体の FcγRIIaR に対する KD 値を各改変体

10

20

30

40

50

のFc $\gamma$ RIIbに対するKD値で割った値、各改変体のFc $\gamma$ RIIaHに対するKD値を各改変体のFc $\gamma$ RIIbに対するKD値で割った値を示す。親ポリペプチドのKD (IIb)/改変ポリペプチドのKD (IIb)は、親ポリペプチドのFc $\gamma$ RIIbに対するKD値を各改変体のFc $\gamma$ RIIbに対するKD値で除した値を示す。これらに加えて、各改変体のFc $\gamma$ RIIaRおよびFc $\gamma$ RIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値/親ポリペプチドのFc $\gamma$ RIIaRおよびFc $\gamma$ RIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値を表28に示した。ここで親ポリペプチドとは、IL6R-B3（配列番号：164）をH鎖に持つ改変体のことを指す。なお、表28のうち灰色で塗りつぶしたセルは、Fc $\gamma$ RのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解析できないと判断されたため、参考実施例2に記載された

〔式2〕

$$KD = C \bullet R_{\max} / (R_{\text{eq}} - RI) - C$$

を利用して算出した値である。

【0457】

【表 28】

| 改変体名              | 改変          | KD[μmol/L] |          |          |         |          | KD[IIaR]/<br>KD[IIb] | KD[IIaH]/<br>KD[IIb] | 親ポリペプチド<br>のKD(IIb)/<br>改変<br>ポリペプチド<br>のKD(IIb) | 改変体のFcγRIIaRおよび<br>FcγRIIaHに対する結合活性<br>のうち強い方のKD値/親ポリ<br>ペプチドのFcγRIIaRおよび<br>FcγRIIaHに対する結合活性<br>のうち強い方のKD値 |
|-------------------|-------------|------------|----------|----------|---------|----------|----------------------|----------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                   |             | FcγRIa     | FcγRIIaR | FcγRIIaH | FcγRIIb | FcγRIIaV |                      |                      |                                                  |                                                                                                             |
| IL6R-G13/IL6R-L   | ●           | 3.2E-10    | 1.0E-06  | 6.7E-07  | 2.6E-06 | 3.5E-07  | 0.4                  | 0.3                  | 1.2                                              | 0.9                                                                                                         |
| IL6R-B3/IL6R-L    | ●           | 4.2E-10    | 1.1E-06  | 7.7E-07  | 3.1E-06 | 3.3E-07  | 0.3                  | 0.2                  | 1.0                                              | 1.0                                                                                                         |
| IL6R-BF648/IL6R-L | P238D       | 1.1E-08    | 1.5E-05  | 4.0E-05  | 1.2E-06 | 7.1E-05  | 13.0                 | 33.9                 | 2.6                                              | 19.9                                                                                                        |
| IL6R-2B002/IL6R-L | P238D/E233D | 6.4E-09    | 1.9E-05  | 8.6E-05  | 9.3E-07 | 5.3E-05  | 20.4                 | 92.3                 | 3.3                                              | 24.7                                                                                                        |
| IL6R-BP100/IL6R-L | P238D/S267A | 1.1E-09    | 7.8E-06  | 4.6E-05  | 1.1E-06 | 5.9E-05  | 7.3                  | 42.6                 | 2.9                                              | 10.2                                                                                                        |
| IL6R-BP102/IL6R-L | P238D/S267Q | 8.2E-09    | 8.4E-06  | 6.1E-05  | 9.0E-07 | 8.2E-05  | 9.4                  | 67.6                 | 3.4                                              | 11.0                                                                                                        |
| IL6R-BP103/IL6R-L | P238D/S267V | 3.5E-08    | 1.1E-05  | 8.8E-05  | 1.2E-06 | 1.1E-04  | 9.0                  | 71.5                 | 2.5                                              | 14.4                                                                                                        |
| IL6R-BP106/IL6R-L | P238D/H268D | 4.0E-09    | 1.1E-05  | 3.6E-05  | 9.3E-07 | 5.5E-05  | 11.6                 | 38.7                 | 3.3                                              | 14.0                                                                                                        |
| IL6R-BP107/IL6R-L | P238D/H268E | 1.5E-09    | 1.2E-05  | 5.2E-05  | 9.3E-07 | 6.3E-05  | 12.7                 | 56.1                 | 3.3                                              | 15.3                                                                                                        |
| IL6R-BP110/IL6R-L | P238D/H268N | 7.3E-09    | 1.7E-05  | 4.7E-05  | 1.5E-06 | 6.4E-05  | 11.7                 | 31.5                 | 2.1                                              | 22.6                                                                                                        |
| IL6R-BP112/IL6R-L | P238D/P271G | 6.5E-09    | 3.5E-06  | 3.5E-05  | 3.2E-07 | 6.9E-05  | 11.0                 | 109.4                | 9.7                                              | 4.6                                                                                                         |
| IL6R-2B128/IL6R-L | P238D/Y296D | 1.3E-08    | 2.6E-05  | 3.4E-05  | 1.4E-06 | 7.2E-05  | 17.7                 | 23.6                 | 2.1                                              | 33.1                                                                                                        |
| IL6R-2B169/IL6R-L | P238D/V323I | 2.5E-08    | 1.9E-05  | 4.8E-05  | 1.2E-06 | 7.5E-05  | 15.8                 | 40.7                 | 2.6                                              | 24.3                                                                                                        |
| IL6R-2B171/IL6R-L | P238D/V323L | 9.1E-09    | 1.6E-05  | 3.4E-05  | 1.1E-06 | 5.7E-05  | 15.0                 | 31.8                 | 2.9                                              | 20.8                                                                                                        |
| IL6R-2B172/IL6R-L | P238D/V323M | 3.0E-09    | 6.1E-06  | 2.1E-05  | 7.7E-07 | 4.8E-05  | 8.0                  | 27.3                 | 4.0                                              | 8.0                                                                                                         |
| IL6R-BP136/IL6R-L | P238D/K326A | 6.6E-09    | 9.1E-06  | 3.8E-05  | 8.0E-07 | 6.9E-05  | 11.4                 | 47.6                 | 3.9                                              | 11.8                                                                                                        |
| IL6R-BP117/IL6R-L | P238D/K326D | 4.1E-09    | 9.2E-06  | 4.1E-05  | 8.0E-07 | 6.7E-05  | 11.6                 | 51.4                 | 3.9                                              | 12.0                                                                                                        |
| IL6R-BP120/IL6R-L | P238D/K326E | 6.6E-09    | 9.6E-06  | 6.5E-05  | 1.0E-06 | 7.9E-05  | 9.3                  | 63.1                 | 3.0                                              | 12.5                                                                                                        |
| IL6R-BP126/IL6R-L | P238D/K326L | 7.4E-09    | 1.1E-05  | 4.5E-05  | 1.4E-06 | 5.6E-05  | 7.8                  | 31.7                 | 2.2                                              | 14.4                                                                                                        |
| IL6R-BP119/IL6R-L | P238D/K326M | 7.0E-09    | 9.9E-06  | 4.5E-05  | 1.1E-06 | 5.6E-05  | 8.7                  | 39.5                 | 2.7                                              | 12.8                                                                                                        |
| IL6R-BP142/IL6R-L | P238D/K326N | 5.3E-09    | 1.8E-05  | 9.3E-05  | 1.2E-06 | 1.1E-04  | 15.5                 | 79.5                 | 2.6                                              | 23.5                                                                                                        |
| IL6R-BP121/IL6R-L | P238D/K326Q | 1.1E-08    | 1.3E-05  | 4.4E-05  | 1.1E-06 | 5.2E-05  | 11.7                 | 40.4                 | 2.8                                              | 16.6                                                                                                        |
| IL6R-BP118/IL6R-L | P238D/K326S | 1.2E-08    | 1.5E-05  | 4.6E-05  | 1.2E-06 | 5.6E-05  | 13.2                 | 40.0                 | 2.7                                              | 19.7                                                                                                        |
| IL6R-BP116/IL6R-L | P238D/K326T | 2.6E-09    | 1.5E-05  | 5.4E-05  | 1.1E-06 | 7.2E-05  | 13.3                 | 48.2                 | 2.8                                              | 19.4                                                                                                        |
| IL6R-BP911/IL6R-L | P238D/A330K | 4.9E-08    | 1.6E-05  | 3.7E-05  | 8.9E-07 | 5.8E-05  | 18.5                 | 41.7                 | 3.5                                              | 21.3                                                                                                        |
| IL6R-BP078/IL6R-L | P238D/A330M | 8.2E-09    | 1.5E-05  | 4.5E-05  | 1.1E-06 | 7.8E-05  | 13.4                 | 41.3                 | 2.8                                              | 19.0                                                                                                        |
| IL6R-BP912/IL6R-L | P238D/A330R | 3.8E-08    | 2.6E-05  | 3.8E-05  | 1.5E-06 | 7.8E-05  | 17.8                 | 25.9                 | 2.1                                              | 34.0                                                                                                        |

【0458】

表28から、いずれの改変体もIL6R-B3と比較してFcγRIIbに対する親和性が向上し、その向上の幅は2.1倍から9.7倍であった。各改変体のFcγRIIaRに対するKD値/各改変体の

10

20

30

40

50

Fc $\gamma$ RIIbに対するKD値の比、および各改変体のFc $\gamma$ RIIaHに対するKD値/各改変体のFc $\gamma$ RIIbに対するKD値の比は、Fc $\gamma$ RIIaRおよびFc $\gamma$ RIIaHに対する結合活性に対する相対的なFc $\gamma$ RIIbに対する結合活性を表す。つまり、この値は各改変体のFc $\gamma$ RIIbへの結合選択性の高さを示した値であり、この値が大きければ大きいほどFc $\gamma$ RIIbに対して結合選択性が高い。親ポリペプチドであるIL6R-B3/IL6R-LのFc $\gamma$ RIIaRに対するKD値/Fc $\gamma$ RIIbに対するKD値の比、およびFc $\gamma$ RIIaHに対するKD値/Fc $\gamma$ RIIbに対するKD値の比はそれぞれ0.3、0.2であるため、表28のいずれの改変体も親ポリペプチドよりもFc $\gamma$ RIIbへの結合選択性が向上していた。改変体のFc $\gamma$ RIIaRおよびFc $\gamma$ RIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値/親ポリペプチドのFc $\gamma$ RIIaRおよびFc $\gamma$ RIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値が1以上であるとは、その改変体のFc $\gamma$ RIIaRおよびFc $\gamma$ RIIaHに対する結合活性のうち強い方の結合が親ポリペプチドのFc $\gamma$ RIIaRおよびFc $\gamma$ RIIaHに対する結合活性のうち強い方の結合と同等であるか、より低減していることを意味する。今回得られた改変体ではこの値が4.6から34.0であったため、今回得られた改変体のFc $\gamma$ RIIaRおよびFc $\gamma$ RIIaHに対する結合活性のうち強い方の結合は親ポリペプチドのそれよりも低減していたといえる。これらの結果から、今回得られた改変体では親ポリペプチドと比べて、Fc $\gamma$ RIIa R型およびH型への結合活性を維持または低減しつつ、Fc $\gamma$ RIIbへの結合活性を増強しており、Fc $\gamma$ RIIbへの選択性を向上させていることが明らかとなった。また、Fc $\gamma$ RIaおよびFc $\gamma$ RIIIaVに対しては、いずれの改変体もIL6R-B3と比較して親和性が低下していた。

#### 【0459】

得られた組合せ改変体のうち、有望なものについて、結晶構造からその効果の要因が考察された。図41にはFc (P238D) / Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体の結晶構造を示した。この中で、左側に位置するH鎖をFc Chain A、右側に位置するH鎖をFc Chain Bとする。ここでFc Chain AにおけるEUナンバリングで表される233位の部位は、Fc $\gamma$ RIIbの113位のLysの近傍に位置することが分かる。ただし、本結晶構造においては、E233の側鎖はその電子密度がうまく観察されておらず、かなり運動性の高い状態にある。従ってEUナンバリングで表される233位のGluをAspに置換する改変は、側鎖が1炭素分短くなることによって側鎖の自由度が小さくなり、その結果、Fc $\gamma$ RIIbの113位のLysとの相互作用形成時のエントロピーロスが低減され、結果、結合自由エネルギーの向上に寄与しているものと推測される。

#### 【0460】

図42には同じくFc (P238D) / Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体の構造のうち、EUナンバリングで表される330位の部位近傍の環境を示した。この図から、Fc (P238D) のFc Chain AのEUナンバリングで表される330位の部位周辺はFc $\gamma$ RIIbの85位のSer、86位のGlu、163位のLysなどから構成される親水的な環境であることが分かる。従って、EUナンバリングで表される330位のAlaをLys、あるいはArgに置換する改変は、Fc $\gamma$ RIIbの85位のSer、ないし86位のGluとの相互作用強化に寄与しているものと推測される。

#### 【0461】

図43にはFc (P238D) / Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体および、Fc (WT) / Fc $\gamma$ RIIIa細胞外領域複合体の結晶構造を、Fc Chain Bに対しC $\alpha$ 原子間距離をもとにした最小二乗法により重ね合わせ、EUナンバリングで表される271位のProの構造を示した。これら二つの構造は、良く一致するが、EUナンバリングで表される271位のProの部位においては異なる立体構造となっている。また、Fc (P238D) / Fc $\gamma$ RIIb細胞外領域複合体結晶構造においては、この周辺の電子密度が弱いことを考え合わせると、Fc (P238D)/Fc $\gamma$ RIIbにおいては、EUナンバリングで表される271位がProであることで、構造上、大きな負荷がかかっており、それによってこのループ構造が最適な構造をとり得ていない可能性が示唆された。従って、EUナンバリングで表される271位のProをGlyに置換する改変は、このループ構造に柔軟性を与え、Fc $\gamma$ RIIbと相互作用するうえで最適な構造をとらせる際のエネルギー的な障害を軽減することで、結合増強に寄与しているものと推測される。

#### 【0462】

〔参考実施例17〕 P238Dと組み合わせることによりFc $\gamma$ RIIbへの結合を増強する改変の

## 組合せ効果の検証

参考実施例 1 4 および 1 6 において得られた改変の中で、Fc $\gamma$ RIIbへの結合を増強する効果もしくはFc $\gamma$ RIIbへの結合を維持し、他のFc $\gamma$ Rへの結合を抑制する効果がみられた改変同士を組み合わせることによる効果が検証された。

## 【0 4 6 3】

参考実施例 1 6 の方法と同様に、表 2 4 および 2 8 から選択された特に優れた改変が、抗体H鎖IL6R-BF648に対して導入された。抗体L鎖としてIL6R-Lが用いられ、参考実施例 1 と同様の方法に従い発現した抗体が精製された。参考実施例 2 と同様の方法により各Fc $\gamma$ R (Fc $\gamma$ RIa、Fc $\gamma$ RIIa H型、Fc $\gamma$ RIIa R型、Fc $\gamma$ RIIb、Fc $\gamma$ RIIIa V型) に対する結合が網羅的に評価された。

10

## 【0 4 6 4】

以下の方法に従って、それぞれのFc $\gamma$ Rとの相互作用解析結果について相対的結合活性が算出された。各改変体の各Fc $\gamma$ Rに対する結合量の値を、コントロールとした改変導入前の抗体 (EUナンバリングで表される238位のProがAspに置換されたIL6R-BF648/IL6R-L) の各Fc $\gamma$ Rに対する結合量の値で除し、さらに100倍した値が各改変体の各Fc $\gamma$ Rに対する相対的な結合活性の値として表された (表 2 9 - 1 ~ 2 9 - 2)。なお、表中の改変とはIL6R-B3 (配列番号: 1 6 4) に対して導入された改変を表す。ただし、IL6R-B3を作製する際の鋳型としたIL6R-G1d/IL6R-Lについては、\*として示した。

## 【0 4 6 5】

【表 29-1】

| 変身体名            | 変 更 | 相 対 的 結 合 活 性 |          |           |         |           |
|-----------------|-----|---------------|----------|-----------|---------|-----------|
|                 |     | FcgRIa        | FcgRIIaR | FcgRIIIaH | FcgRIIb | FcgRIIIaV |
| U6R-G1d/U6R-L   |     | 140           | 650      | 1670      | 62      | 3348      |
| U6R-B3/U6R-L    |     | 145           | 625      | 1601      | 58      | 3264      |
| U6R-BF648/U6R-L |     | 100           | 100      | 100       | 100     | 100       |
| U6R-2B253/U6R-L |     | 155           | 268      | 207       | 156     | 126       |
| U6R-2B251/U6R-L |     | 100           | 94       | 91        | 115     | 87        |
| U6R-BF082/U6R-L |     | 74            | 126      | 106       | 136     | 87        |
| U6R-BF083/U6R-L |     | 50            | 87       | 91        | 122     | 107       |
| U6R-BF084/U6R-L |     | 109           | 203      | 162       | 141     | 106       |
| U6R-BF085/U6R-L |     | 19            | 279      | 158       | 152     | 104       |
| U6R-BF086/U6R-L |     | 72            | 155      | 116       | 137     | 123       |
| U6R-BF087/U6R-L |     | 33            | 163      | 179       | 137     | 158       |
| U6R-BF088/U6R-L |     | 25            | 377      | 166       | 161     | 122       |
| U6R-BF089/U6R-L |     | 43            | 222      | 186       | 147     | 136       |
| U6R-BP129/U6R-L |     | 68            | 111      | 96        | 138     | 95        |
| U6R-BP130/U6R-L |     | 104           | 272      | 224       | 160     | 115       |
| U6R-BP131/U6R-L |     | 33            | 364      | 253       | 160     | 118       |
| U6R-BP132/U6R-L |     | 91            | 191      | 130       | 150     | 120       |
| U6R-BP133/U6R-L |     | 41            | 174      | 151       | 137     | 114       |
| U6R-BP143/U6R-L |     | 86            | 238      | 143       | 133     | 114       |
| U6R-BP144/U6R-L |     | 64            | 204      | 108       | 121     | 128       |
| U6R-BP145/U6R-L |     | 41            | 350      | 224       | 152     | 153       |
| U6R-BP146/U6R-L |     | 50            | 445      | 203       | 156     | 180       |
| U6R-BP147/U6R-L |     | 24            | 650      | 582       | 177     | 209       |
| U6R-BP148/U6R-L |     | 33            | 603      | 462       | 176     | 227       |
| U6R-BP149/U6R-L |     | 29            | 539      | 401       | 173     | 186       |
| U6R-BP150/U6R-L |     | 30            | 757      | 770       | 183     | 204       |
| U6R-BP151/U6R-L |     | 39            | 705      | 621       | 180     | 221       |
| U6R-BP152/U6R-L |     | 34            | 638      | 548       | 178     | 146       |
| U6R-BP176/U6R-L |     | 103           | 201      | 128       | 147     | 131       |
| U6R-BP177/U6R-L |     | 57            | 691      | 409       | 177     | 186       |
| U6R-BP178/U6R-L |     | 51            | 653      | 259       | 179     | 110       |
| U6R-BP179/U6R-L |     | 39            | 570      | 226       | 177     | 125       |
| U6R-BP180/U6R-L |     | 29            | 602      | 203       | 179     | 100       |

【0466】

表 29-2 は表 29-1 の続きの表である。

10

20

30

40

【表 29-2】

|                   |                                                       |     |     |     |     |     |
|-------------------|-------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| IL6R-BP181/IL6R-L | E233D/P238D/P271G/K326A/A330K                         | 108 | 362 | 150 | 170 | 122 |
| IL6R-BP182/IL6R-L | E233D/P238D/P271G/Y296D/A330K                         | 95  | 413 | 139 | 173 | 120 |
| IL6R-BP183/IL6R-L | E233D/L234Y/P238D/P271G/K326A/A330K                   | 83  | 423 | 191 | 164 | 113 |
| IL6R-BP184/IL6R-L | E233D/P238D/P271G/A330K                               | 96  | 436 | 131 | 171 | 106 |
| IL6R-BP185/IL6R-L | E233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/K326A/A330K             | 47  | 670 | 446 | 179 | 191 |
| IL6R-BP186/IL6R-L | E233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/Y296D/K326A/A330K       | 43  | 614 | 368 | 175 | 143 |
| IL6R-BP187/IL6R-L | L234Y/P238D/P271G/K326A/A330K                         | 68  | 387 | 205 | 157 | 124 |
| IL6R-BP188/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/A330K                   | 74  | 636 | 234 | 179 | 121 |
| IL6R-BP189/IL6R-L | G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K                   | 56  | 557 | 183 | 177 | 141 |
| IL6R-BP190/IL6R-L | G237D/P238D/H268D/P271G/A330K                         | 50  | 615 | 224 | 181 | 155 |
| IL6R-BP191/IL6R-L | E233D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K                   | 125 | 382 | 145 | 170 | 142 |
| IL6R-BP192/IL6R-L | E233D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K                   | 109 | 406 | 123 | 173 | 118 |
| IL6R-BP193/IL6R-L | E233D/P238D/H268D/P271G/A330K                         | 113 | 449 | 154 | 173 | 135 |
| IL6R-BP194/IL6R-L | E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K       | 69  | 672 | 395 | 178 | 249 |
| IL6R-BP195/IL6R-L | E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330K | 68  | 661 | 344 | 181 | 221 |
| IL6R-BP196/IL6R-L | L234Y/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K                   | 89  | 402 | 195 | 157 | 137 |
| IL6R-BP197/IL6R-L | E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330K | 71  | 642 | 294 | 179 | 206 |
| IL6R-BP198/IL6R-L | E233D/L234Y/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K             | 104 | 449 | 188 | 164 | 157 |
| IL6R-BP199/IL6R-L | E233D/P238D/K326D/A330K                               | 112 | 172 | 116 | 144 | 103 |
| IL6R-BP200/IL6R-L | E233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/K326D/A330K             | 60  | 754 | 517 | 188 | 164 |
| IL6R-BP201/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/P271G/A330K                         | 57  | 696 | 359 | 166 | 121 |
| IL6R-BP202/IL6R-L | G237D/P238D/P271G/K326A/A330K                         | 43  | 615 | 285 | 185 | 108 |
| IL6R-BP203/IL6R-L | G237D/P238D/P271G/A330K                               | 35  | 637 | 255 | 185 | 86  |
| IL6R-BP204/IL6R-L | E233D/P238D/P271G/K326A/A330K                         | 110 | 301 | 137 | 165 | 121 |
| IL6R-BP205/IL6R-L | E233D/P238D/P271G/Y296D/A330K                         | 97  | 335 | 108 | 167 | 93  |
| IL6R-BP206/IL6R-L | E233D/P238D/P271G/A330K                               | 101 | 362 | 123 | 168 | 92  |
| IL6R-BP207/IL6R-L | E233D/P238D/A330K                                     | 74  | 103 | 103 | 124 | 97  |
| IL6R-BP208/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/A330K                   | 81  | 690 | 310 | 188 | 118 |
| IL6R-BP209/IL6R-L | G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K                   | 68  | 625 | 267 | 166 | 153 |
| IL6R-BP210/IL6R-L | G237D/P238D/H268D/P271G/A330K                         | 57  | 661 | 279 | 167 | 135 |
| IL6R-BP211/IL6R-L | E233D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K                   | 128 | 312 | 111 | 165 | 87  |
| IL6R-BP212/IL6R-L | E233D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K                   | 117 | 363 | 135 | 173 | 122 |
| IL6R-BP213/IL6R-L | E233D/P238D/H268D/P271G/A330K                         | 118 | 382 | 123 | 169 | 100 |
| IL6R-BP214/IL6R-L | E233D/L234Y/G237D/P238D/Y296D/K326D/A330K             | 36  | 498 | 285 | 174 | 165 |

【0467】

表 29-1 および 29-2 に示した改変体の Fc $\gamma$ RIa, Fc $\gamma$ RIIaR, Fc $\gamma$ RIIaH, Fc $\gamma$ RIIb, Fc $\gamma$ RIIIaV に対する KD 値を参考実施例 2 の方法で測定した結果を表 30-1 および 30-2 にまとめた。表中の改変とは IL6R-B3 (配列番号: 164) に対して導入された改変を示す。ただし、IL6R-B3 を作製する際の鋳型とした IL6R-G1d/IL6R-L は、\* として示し

10

20

30

40

50

た。また、表中のKD (IIaR)/KD (IIb)およびKD (IIaH)/KD (IIb)はそれぞれ、各改変体のFcγRIIaRに対するKD値を当該改変体のFcγRIIbに対するKD値で除した値、各改変体のFcγRIIaHに対するKD値を当該改変体のFcγRIIbに対するKD値で除した値を示す。親ポリペプチドのKD (IIb)/改変ポリペプチドのKD (IIb)は、親ポリペプチドのFcγRIIbに対するKD値を当該改変体のFcγRIIbに対するKD値で除した値を示す。これらに加えて、各改変体のFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値/親ポリペプチドのFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値を表30-1および30-2に示した。ここで親ポリペプチドとは、IL6R-B3（配列番号：164）をH鎖に持つ改変体のことを指す。なお、表30-1および30-2のうち灰色で塗りつぶされたセル中の数値は、FcγRのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解析できないと判断されたため、参考実施例2に記載された

10

〔式2〕

$$KD = C \bullet R_{\max} / (R_{\text{eq}} - RI) - C$$

を利用して算出した数値である。

【0468】

表30-1および30-2から、いずれの改変体もIL6R-B3と比較してFcγRIIbに対する親和性が向上し、その向上の幅は3.0倍から99.0倍であった。各改変体のFcγRIIaRに対するKD値/各改変体のFcγRIIbに対するKD値の比、および各改変体のFcγRIIaHに対するKD値/各改変体のFcγRIIbに対するKD値の比は、FcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性に対する相対的なFcγRIIbに対する結合活性を表す。つまり、この値は各改変体のFcγRIIbへの結合選択性の高さを示した値であり、この値が大きければ大きいほどFcγRIIbに対して結合選択性が高い。親ポリペプチドであるIL6R-B3/IL6R-LのFcγRIIaRに対するKD値/FcγRIIbに対するKD値の比、およびFcγRIIaHに対するKD値/FcγRIIbに対するKD値の比はそれぞれ0.3、0.2であるため、表30-1および30-2のいずれの改変体も親ポリペプチドよりもFcγRIIbへの結合選択性が向上していた。改変体のFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値/親ポリペプチドのFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値が1以上であるとは、その改変体のFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方の結合が親ポリペプチドのFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方の結合と同等であるか、より低減していることを意味する。今回得られた改変体ではこの値が0.7から29.9であったため、今回得られた改変体のFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方の結合は親ポリペプチドのそれと比較してほぼ同等か、それよりも低減していたといえる。これらの結果から、今回得られた改変体では親ポリペプチドと比べて、FcγRIIa R型およびH型への結合活性を維持または低減しつつ、FcγRIIbへの結合活性を増強しており、FcγRIIbへの選択性を向上させていることが明らかとなった。また、FcγRIaおよびFcγRIIIaVに対しては、いずれの改変体もIL6R-B3と比較して親和性が低下していた。

20

30

【0469】

【表 30-1】

| 改変体名            | 改変                                        | KD (mol/L)      |                   |                   |                  | KD (mM)/<br>KD (mM) | 親ポリペプチド<br>のKD (mM)/<br>改変<br>ポリペプチド<br>のKD (mM) | 改変体のFe $\gamma$ RIIaRおよび<br>Fe $\gamma$ RIIaHに対する結合<br>活性のうち強い方のKD値/<br>親ポリペプチドのFe $\gamma$ RIIaR<br>およびFe $\gamma$ RIIaHに対する<br>結合活性のうち強い方の<br>KD値 |
|-----------------|-------------------------------------------|-----------------|-------------------|-------------------|------------------|---------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                 |                                           | Fe $\gamma$ RIa | Fe $\gamma$ RIIaE | Fe $\gamma$ RIIaH | Fe $\gamma$ RIIb | Fe $\gamma$ RIIaV   |                                                  |                                                                                                                                                     |
| U6R-G18/U6R-L   |                                           | 3.2E-10         | 1.0E-05           | 5.7E-07           | 2.5E-05          | 3.5E-07             | 0.3                                              | 0.9                                                                                                                                                 |
| U6R-G3/U6R-L    |                                           | 4.2E-10         | 1.1E-05           | 7.7E-07           | 3.1E-06          | 3.3E-07             | 0.3                                              | 1.0                                                                                                                                                 |
| U6R-E7C48/U6R-L | F238D                                     | 1.1E-08         | 1.5E-05           | 4.0E-05           | 1.2E-06          | 7.1E-05             | 33.9                                             | 19.9                                                                                                                                                |
| U6R-2E253/U6R-L | F233D/F238D/V323M                         | 1.4E-09         | 5.0E-06           | 1.3E-05           | 4.3E-07          | 5.0E-05             | 30.1                                             | 6.5                                                                                                                                                 |
| U6R-2E261/U6R-L | F233D/F238D/Y296D                         | 9.0E-09         | 2.2E-05           | 3.3E-05           | 1.0E-06          | 7.3E-05             | 32.4                                             | 28.8                                                                                                                                                |
| U6R-BP082/U6R-L | F233D/F238D/A330K                         | 1.8E-08         | 1.2E-05           | 3.7E-05           | 5.4E-07          | 6.1E-05             | 69.0                                             | 15.8                                                                                                                                                |
| U6R-BP083/U6R-L | F238D/Y296D/A330K                         | 3.6E-08         | 2.3E-05           | 4.4E-05           | 7.9E-07          | 6.6E-05             | 55.5                                             | 29.9                                                                                                                                                |
| U6R-BP084/U6R-L | F238D/V323M/A330K                         | 7.0E-09         | 7.2E-06           | 2.4E-05           | 5.0E-07          | 5.7E-05             | 47.6                                             | 9.4                                                                                                                                                 |
| U6R-BP085/U6R-L | F238D/A330K                               | 2.9E-07         | 4.2E-06           | 2.4E-05           | 3.2E-07          | 6.8E-05             | 13.1                                             | 5.5                                                                                                                                                 |
| U6R-BP086/U6R-L | F238D/K326A/A330K                         | 2.7E-08         | 9.7E-06           | 3.4E-05           | 5.7E-07          | 5.7E-05             | 17.1                                             | 5.4                                                                                                                                                 |
| U6R-BP087/U6R-L | L234Y/F238D/A330K                         | 3.8E-08         | 9.7E-06           | 2.1E-05           | 6.1E-07          | 4.4E-05             | 34.7                                             | 12.6                                                                                                                                                |
| U6R-BP088/U6R-L | F237D/F238D/K326A/A330K                   | 3.9E-07         | 2.9E-06           | 2.3E-05           | 2.2E-07          | 5.7E-05             | 13.3                                             | 3.7                                                                                                                                                 |
| U6R-BP089/U6R-L | L234Y/F238D/K326A/A330K                   | 5.3E-08         | 6.4E-06           | 2.0E-05           | 3.2E-07          | 5.1E-05             | 16.5                                             | 6.3                                                                                                                                                 |
| U6R-BP129/U6R-L | F233D/F238D/Y296D/A330K                   | 2.5E-08         | 1.5E-05           | 4.0E-05           | 5.2E-07          | 7.5E-05             | 29.3                                             | 19.6                                                                                                                                                |
| U6R-BP130/U6R-L | F233D/F238D/V323M/A330K                   | 1.8E-09         | 5.3E-06           | 2.6E-05           | 3.0E-07          | 7.1E-05             | 17.5                                             | 6.9                                                                                                                                                 |
| U6R-BP131/U6R-L | F233D/G237D/F238D/A330K                   | 1.2E-07         | 3.1E-06           | 1.4E-05           | 2.5E-07          | 5.9E-05             | 12.5                                             | 4.0                                                                                                                                                 |
| U6R-BP132/U6R-L | F233D/F238D/K326A/A330K                   | 1.5E-08         | 8.0E-06           | 3.0E-05           | 3.7E-07          | 5.8E-05             | 21.5                                             | 8.4                                                                                                                                                 |
| U6R-BP133/U6R-L | F233D/L234Y/F238D/A330K                   | 1.3E-07         | 8.6E-06           | 2.6E-05           | 5.6E-07          | 6.2E-05             | 15.5                                             | 46.8                                                                                                                                                |
| U6R-BP143/U6R-L | L234Y/F238D/K326A                         | 1.6E-08         | 5.7E-06           | 2.7E-05           | 5.7E-07          | 6.2E-05             | 10.0                                             | 47.1                                                                                                                                                |
| U6R-BP144/U6R-L | F237D/F238D/K326A                         | 3.7E-08         | 6.9E-06           | 3.6E-05           | 7.9E-07          | 5.5E-05             | 8.7                                              | 45.8                                                                                                                                                |
| U6R-BP145/U6R-L | L234Y/G237D/F238D                         | 1.2E-07         | 3.4E-06           | 1.7E-05           | 3.4E-07          | 4.5E-05             | 9.9                                              | 49.9                                                                                                                                                |
| U6R-BP146/U6R-L | L234Y/G237D/F238D/K326A                   | 7.4E-08         | 2.1E-06           | 1.8E-05           | 2.3E-07          | 3.8E-05             | 9.3                                              | 80.0                                                                                                                                                |
| U6R-BP147/U6R-L | L234Y/G237D/F238D/K326A/A330K             | 1.4E-07         | 8.9E-07           | 5.1E-06           | 6.6E-08          | 3.3E-05             | 13.6                                             | 77.7                                                                                                                                                |
| U6R-BP148/U6R-L | F233D/L234Y/G237D/F238D/K326A/A330K       | 8.9E-08         | 1.1E-06           | 7.0E-06           | 7.5E-08          | 3.0E-05             | 14.5                                             | 93.8                                                                                                                                                |
| U6R-BP149/U6R-L | F233D/L234Y/G237D/F238D/K326A/A330K       | 1.2E-07         | 1.4E-06           | 8.4E-06           | 9.3E-08          | 3.7E-05             | 15.0                                             | 89.9                                                                                                                                                |
| U6R-BP150/U6R-L | L234Y/G237D/F238D/K326A/A330K             | 3.2E-07         | 5.5E-07           | 3.4E-06           | 3.1E-08          | 3.4E-05             | 17.7                                             | 109.0                                                                                                                                               |
| U6R-BP151/U6R-L | F233D/L234Y/G237D/F238D/K326A/A330K       | 8.4E-08         | 5.7E-07           | 4.7E-06           | 4.0E-08          | 3.1E-05             | 16.9                                             | 117.8                                                                                                                                               |
| U6R-BP152/U6R-L | F233D/L234Y/G237D/F238D/Y296D/K326A/A330K | 7.3E-08         | 8.1E-07           | 5.6E-06           | 4.1E-08          | 4.8E-05             | 19.5                                             | 135.9                                                                                                                                               |
| U6R-BP176/U6R-L | F233D/F238D/K326D/A330K                   | 7.3E-09         | 6.9E-06           | 3.0E-05           | 3.5E-07          | 5.4E-05             | 19.1                                             | 83.1                                                                                                                                                |
| U6R-BP177/U6R-L | F233D/L234Y/G237D/F238D/F271G/K326D/A330K | 3.3E-08         | 7.1E-07           | 8.2E-06           | 5.2E-08          | 3.7E-05             | 13.8                                             | 159.2                                                                                                                                               |
| U6R-BP178/U6R-L | F233D/G237D/F238D/F271G/A330K             | 4.3E-08         | 9.3E-07           | 1.4E-05           | 5.1E-08          | 6.4E-05             | 18.1                                             | 272.4                                                                                                                                               |
| U6R-BP179/U6R-L | F237D/F238D/F271G/K326A/A330K             | 6.4E-08         | 1.4E-06           | 1.6E-05           | 8.4E-08          | 5.6E-05             | 16.7                                             | 190.9                                                                                                                                               |
| U6R-BP180/U6R-L | F237D/F238D/F271G/A330K                   | 9.8E-08         | 1.2E-06           | 1.3E-05           | 6.2E-08          | 7.0E-05             | 18.6                                             | 290.8                                                                                                                                               |
| U6R-BP181/U6R-L | F233D/F238D/F271G/K326A/A330K             | 7.5E-09         | 3.2E-06           | 2.8E-05           | 1.5E-07          | 5.7E-05             | 20.3                                             | 162.5                                                                                                                                               |
| U6R-BP182/U6R-L | F233D/F238D/F271G/Y296D/A330K             | 1.0E-08         | 2.6E-06           | 2.8E-05           | 1.1E-07          | 5.8E-05             | 23.5                                             | 256.9                                                                                                                                               |
|                 |                                           |                 |                   |                   |                  |                     |                                                  | 3.3                                                                                                                                                 |

【0470】

表 30-2 は表 30-1 の続きの表である。

10

20

30

40

【表 30-2】

|                  |                                                       |         |         |         |         |         |      |       |      |      |
|------------------|-------------------------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|------|-------|------|------|
| U6R-BP163/U6R-L1 | E233D/L234Y/F236D/P271G/K326A/A330K                   | 1.7E-08 | 2.6E-06 | 1.5E-05 | 2.4E-07 | 5.6E-05 | 10.7 | 62.5  | 12.9 | 3.3  |
| U6R-BP164/U6R-L1 | E233D/P236D/P271G/A330K                               | 1.1E-08 | 2.3E-06 | 3.0E-05 | 1.3E-07 | 6.6E-05 | 18.2 | 238.1 | 24.5 | 3.0  |
| U6R-BP165/U6R-L1 | E233D/L234Y/G237D/F236D/P271G/K326A/A330K             | 6.3E-08 | 8.8E-07 | 7.3E-06 | 6.9E-08 | 3.6E-05 | 12.6 | 105.2 | 44.5 | 1.1  |
| U6R-BP166/U6R-L1 | E233D/L234Y/G237D/F236D/P271G/Y296D/K326A/A330K       | 4.5E-08 | 9.6E-07 | 9.3E-06 | 6.1E-08 | 4.9E-05 | 15.8 | 152.5 | 50.7 | 1.3  |
| U6R-BP167/U6R-L1 | E233D/L234Y/F236D/P271G/K326A/A330K                   | 2.5E-08 | 2.8E-06 | 1.8E-05 | 2.9E-07 | 5.8E-05 | 9.7  | 62.3  | 10.7 | 3.6  |
| U6R-BP168/U6R-L1 | E233D/G237D/F236D/H268D/P271G/A330K                   | 2.1E-08 | 1.0E-06 | 1.6E-05 | 4.6E-06 | 5.8E-05 | 21.9 | 350.1 | 67.6 | 1.3  |
| U6R-BP169/U6R-L1 | E233D/P236D/H268D/P271G/K326A/A330K                   | 4.2E-08 | 1.4E-06 | 2.1E-05 | 7.4E-08 | 4.9E-05 | 18.5 | 283.8 | 41.8 | 1.8  |
| U6R-BP170/U6R-L1 | E233D/P236D/H268D/P271G/A330K                         | 6.3E-08 | 1.1E-06 | 1.7E-05 | 5.8E-08 | 4.5E-05 | 19.3 | 292.6 | 53.2 | 1.5  |
| U6R-BP171/U6R-L1 | E233D/P236D/H268D/P271G/K326A/A330K                   | 4.0E-09 | 3.0E-06 | 2.7E-05 | 1.5E-07 | 4.9E-05 | 20.3 | 184.9 | 21.2 | 3.8  |
| U6R-BP172/U6R-L1 | E233D/P236D/H268D/P271G/Y296D/A330K                   | 6.6E-09 | 2.6E-06 | 3.2E-05 | 1.1E-07 | 5.9E-05 | 23.1 | 283.2 | 27.3 | 3.4  |
| U6R-BP173/U6R-L1 | E233D/P236D/H268D/P271G/A330K                         | 6.3E-09 | 2.2E-06 | 2.5E-05 | 1.2E-07 | 5.2E-05 | 18.3 | 206.6 | 25.5 | 2.9  |
| U6R-BP174/U6R-L1 | E233D/L234Y/G237D/F236D/H268D/P271G/K326A/A330K       | 2.4E-08 | 6.2E-07 | 6.5E-06 | 5.2E-08 | 2.7E-05 | 15.8 | 163.5 | 59.4 | 1.1  |
| U6R-BP175/U6R-L1 | E233D/L234Y/G237D/F236D/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330K | 2.3E-08 | 9.1E-07 | 1.0E-05 | 5.0E-08 | 9.1E-05 | 18.2 | 200.8 | 62.0 | 1.2  |
| U6R-BP176/U6R-L1 | E233D/L234Y/F236D/H268D/P271G/K326A/A330K             | 1.4E-08 | 3.0E-06 | 1.9E-05 | 2.2E-07 | 5.1E-05 | 13.4 | 85.2  | 13.9 | 3.9  |
| U6R-BP177/U6R-L1 | E233D/L234Y/G237D/F236D/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330K | 1.9E-08 | 9.8E-07 | 1.2E-05 | 5.8E-08 | 3.3E-05 | 17.1 | 208.7 | 53.7 | 1.3  |
| U6R-BP178/U6R-L1 | E233D/L234Y/F236D/H268D/P271G/K326A/A330K             | 1.1E-08 | 2.2E-06 | 2.0E-05 | 2.0E-07 | 4.4E-05 | 11.0 | 101.5 | 15.7 | 2.8  |
| U6R-BP179/U6R-L1 | E233D/P236D/K326D/A330K                               | 6.4E-09 | 8.6E-06 | 2.6E-05 | 4.9E-07 | 6.1E-05 | 17.5 | 53.0  | 6.3  | 11.1 |
| U6R-BP200/U6R-L1 | E233D/L234Y/G237D/F236D/P271G/K326D/A330K             | 3.3E-08 | 6.3E-07 | 4.2E-06 | 3.4E-08 | 3.8E-05 | 18.6 | 123.9 | 91.2 | 0.8  |
| U6R-BP201/U6R-L1 | E233D/G237D/F236D/P271G/A330K                         | 5.1E-08 | 8.4E-07 | 6.9E-06 | 4.0E-08 | 5.2E-05 | 21.0 | 172.1 | 77.1 | 1.1  |
| U6R-BP202/U6R-L1 | E233D/P236D/P271G/K326A/A330K                         | 9.5E-08 | 1.2E-06 | 9.2E-06 | 6.4E-08 | 5.9E-05 | 19.3 | 144.0 | 48.4 | 1.6  |
| U6R-BP203/U6R-L1 | E233D/P236D/P271G/A330K                               | 1.8E-07 | 9.9E-07 | 1.1E-05 | 4.9E-08 | 7.2E-05 | 20.5 | 226.8 | 63.7 | 1.3  |
| U6R-BP204/U6R-L1 | E233D/P236D/P271G/K326A/A330K                         | 7.6E-09 | 4.5E-06 | 2.1E-05 | 2.5E-07 | 5.2E-05 | 17.6 | 82.7  | 12.3 | 5.8  |
| U6R-BP205/U6R-L1 | E233D/P236D/P271G/Y296D/A330K                         | 7.7E-09 | 3.5E-06 | 2.8E-05 | 1.6E-07 | 6.8E-05 | 21.8 | 176.1 | 19.4 | 4.5  |
| U6R-BP206/U6R-L1 | E233D/P236D/P271G/A330K                               | 8.2E-09 | 3.1E-06 | 2.4E-05 | 2.0E-07 | 6.9E-05 | 16.1 | 123.1 | 15.8 | 4.1  |
| U6R-BP207/U6R-L1 | E233D/P236D/A330K                                     | 2.2E-08 | 1.9E-05 | 2.9E-05 | 6.4E-07 | 6.5E-05 | 23.0 | 34.5  | 3.7  | 25.1 |
| U6R-BP208/U6R-L1 | E233D/G237D/F236D/H268D/P271G/K326A/A330K             | 1.9E-08 | 8.5E-07 | 8.3E-06 | 3.2E-08 | 5.3E-05 | 26.3 | 256.2 | 95.4 | 1.1  |
| U6R-BP209/U6R-L1 | E233D/P236D/H268D/P271G/K326A/A330K                   | 3.9E-08 | 1.2E-06 | 1.0E-05 | 5.1E-08 | 4.1E-05 | 22.7 | 196.3 | 60.4 | 1.5  |
| U6R-BP210/U6R-L1 | E233D/P236D/H268D/P271G/A330K                         | 6.5E-08 | 1.0E-06 | 9.5E-06 | 3.9E-08 | 4.6E-05 | 25.4 | 241.1 | 78.4 | 1.3  |
| U6R-BP211/U6R-L1 | E233D/P236D/H268D/P271G/K326A/A330K                   | 4.2E-09 | 4.1E-06 | 2.7E-05 | 2.2E-07 | 7.3E-05 | 18.5 | 120.5 | 13.8 | 5.4  |
| U6R-BP212/U6R-L1 | E233D/P236D/H268D/P271G/Y296D/A330K                   | 5.2E-09 | 3.5E-06 | 2.3E-05 | 1.7E-07 | 5.2E-05 | 21.1 | 133.3 | 18.7 | 4.5  |
| U6R-BP213/U6R-L1 | E233D/P236D/H268D/P271G/A330K                         | 4.1E-09 | 3.1E-06 | 2.4E-05 | 1.8E-07 | 6.3E-05 | 17.7 | 136.4 | 17.6 | 4.0  |
| U6R-BP214/U6R-L1 | E233D/L234Y/G237D/F236D/Y296D/K326D/A330K             | 5.9E-08 | 1.7E-06 | 9.2E-06 | 1.2E-07 | 3.8E-05 | 14.5 | 78.0  | 26.2 | 2.2  |

【0471】

【参考実施例 18】 FcγRIIbへの結合が増強された改変体の作製

参考実施例 13 で示されたように、FcγRIIbへの結合を増強する際に、他の活性型FcγRに対する結合を可能な限り抑制したうえで、FcγRIIbへの結合を増強することが好ましい。そこで、FcγRIIbへの結合を増強する、または選択性を向上する効果がある改変同士

10

20

30

40

50

を組み合わせ、さらにFc $\gamma$ RIIbへの結合が増強されまたは選択性が向上した改変体が作製された。具体的には、Fc $\gamma$ RIIbへの結合の増強、選択性の向上において優れた効果を示すP238Dの改変を基礎とし、参考実施例14、16、17においてP238Dの改変と組み合わせることで効果が見られた改変同士がさらに組み合わせられた。

【0472】

IL6R-G1d（配列番号：156）、IL6R-B3（配列番号：164）のFc領域に、参考実施例14、16、17においてP238Dの改変と組み合わせることで効果が認められた改変である、E233D、L234Y、G237D、S267Q、H268D、P271G、Y296D、K326D、K326A、A330R、A330Kを組み合わせた改変体を作製された。抗体鎖としてIL6R-L（配列番号：155）を用いて、参考実施例1の方法に従い、これらの改変体を重鎖に含む抗体が発現、精製された。参考実施例2の方法により各改変体の各Fc $\gamma$ R（Fc $\gamma$ RIa、Fc $\gamma$ RIIaH、Fc $\gamma$ RIIaR、Fc $\gamma$ RIIb、Fc $\gamma$ RIIIaV）に対する結合が評価された。

【0473】

各改変体の各Fc $\gamma$ Rに対するKD値を表31に示した。なお、改変とはIL6R-B3（配列番号：164）に対して導入された改変を示す。ただし各改変体を作製する際の鋳型としたIL6R-B3/IL6R-Lは\*として示した。表中のKD（IIaR）/KD（IIb）は、各改変体のFc $\gamma$ RIIaRに対するKD値を各改変体のFc $\gamma$ RIIbに対するKD値で除した値であり、この値が大きいほどFc $\gamma$ RIIbへの選択性が高いことを示す。親ポリペプチドのKD（IIb）/改変ポリペプチドのKD（IIb）は、IL6R-B3/IL6R-LのFc $\gamma$ RIIbに対するKD値を各改変体のFc $\gamma$ RIIbに対するKD値で除した値を示す。また、親ポリペプチドのKD（IIaR）/改変ポリペプチドのKD（IIaR）は、IL6R-B3/IL6R-LのFc $\gamma$ RIIaRに対するKD値を各改変体のFc $\gamma$ RIIaRに対するKD値で除した値を示す。なお、表31のうち灰色で塗りつぶされたセル中の数値は、Fc $\gamma$ RのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解析できないと判断されたため、参考実施例2に記載された

〔式2〕

$$KD = C \bullet R_{\max} / (R_{\text{eq}} - RI) - C$$

を利用して算出された数値である。

【0474】

【表 3 1】

| 変異体名              | 変異                                                    | FcγRIaIに対するKD<br>(mol/L) | FcγRIIaRIに対するKD<br>(mol/L) | FcγRIIaHに対するKD<br>(mol/L) | FcγRIIbIに対するKD<br>(mol/L) | FcγRIIaVに対するKD<br>(mol/L) | KD (IIaR)/KD<br>(IIb) | 綿ポリペプチドの<br>KD (IIb)/変異ポリ<br>ペプチドのKD (IIb) | 綿ポリペプチドの<br>KD (IIaR)/変異ポリ<br>ペプチドのKD (IIaR) |
|-------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------|
| IL6R-G1d/IL6R-L   |                                                       | 3.20E-10                 | 1.00E-06                   | 6.70E-07                  | 2.60E-06                  | 3.50E-07                  | 0.4                   | 1.2                                        | 1.1                                          |
| IL6R-B3/IL6R-L    | *                                                     | 4.20E-10                 | 1.10E-06                   | 7.70E-07                  | 3.10E-06                  | 3.30E-07                  | 0.3                   | 1                                          | 1                                            |
| IL6R-BF648/IL6R-L | P238D                                                 | 1.10E-08                 | 1.50E-05                   | 4.00E-05                  | 1.20E-06                  | 7.10E-05                  | 12.5                  | 2.6                                        | 0.1                                          |
| IL6R-BP215/IL6R-L | G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K                   | 4.30E-08                 | 1.30E-06                   | 1.40E-05                  | 4.10E-08                  | 6.70E-05                  | 31.7                  | 75.6                                       | 0.8                                          |
| IL6R-BP216/IL6R-L | G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/A330K                   | 6.20E-07                 | 2.90E-06                   | 2.60E-05                  | 1.40E-07                  | 5.30E-05                  | 20.7                  | 22.1                                       | 0.4                                          |
| IL6R-BP217/IL6R-L | G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/A330K             | 2.80E-06                 | 3.60E-06                   | 2.80E-05                  | 1.50E-07                  | 6.00E-05                  | 24                    | 20.7                                       | 0.3                                          |
| IL6R-BP218/IL6R-L | G237D/P238D/H268D/P271G/K326D/A330K                   | 3.70E-08                 | 1.50E-06                   | 1.20E-05                  | 7.60E-08                  | 3.80E-05                  | 19.7                  | 40.8                                       | 0.7                                          |
| IL6R-BP219/IL6R-L | L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/A330K                   | 4.60E-08                 | 6.10E-07                   | 2.30E-06                  | 3.40E-08                  | 2.90E-05                  | 17.9                  | 91.2                                       | 1.8                                          |
| IL6R-BP220/IL6R-L | L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K             | 2.00E-08                 | 1.10E-06                   | 1.20E-05                  | 3.60E-08                  | 5.80E-05                  | 30.6                  | 86.1                                       | 1                                            |
| IL6R-BP221/IL6R-L | L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330R             | 1.30E-07                 | 7.10E-07                   | 2.50E-06                  | 2.80E-08                  | 4.60E-05                  | 25.4                  | 110.7                                      | 1.5                                          |
| IL6R-BP222/IL6R-L | L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330R             | 5.10E-08                 | 7.10E-07                   | 2.50E-06                  | 3.40E-08                  | 4.70E-05                  | 20.9                  | 91.2                                       | 1.5                                          |
| IL6R-BP223/IL6R-L | L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330R             | 2.70E-08                 | 6.00E-07                   | 2.80E-06                  | 2.50E-08                  | 3.20E-05                  | 24                    | 124                                        | 1.8                                          |
| IL6R-BP224/IL6R-L | L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330R             | 6.20E-09                 | 4.50E-07                   | 9.50E-06                  | 4.10E-05                  | 3.50E-08                  | 12.9                  | 88.6                                       | 2.4                                          |
| IL6R-BP225/IL6R-L | L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/K326D/A330R             | 9.50E-08                 | 6.90E-07                   | 2.80E-06                  | 3.50E-08                  | 3.20E-05                  | 19.7                  | 88.6                                       | 1.6                                          |
| IL6R-BP226/IL6R-L | L234Y/G237D/P238D/P271G/K326D/A330R                   | 5.20E-08                 | 5.70E-07                   | 2.40E-06                  | 3.30E-08                  | 3.60E-05                  | 17.3                  | 93.9                                       | 1.9                                          |
| IL6R-BP227/IL6R-L | L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/K326D/A330R             | 2.70E-08                 | 6.20E-07                   | 2.90E-06                  | 3.20E-08                  | 2.60E-05                  | 19.4                  | 96.9                                       | 1.8                                          |
| IL6R-BP228/IL6R-L | L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/K326D/A330R       | 5.50E-09                 | 4.00E-07                   | 1.10E-05                  | 3.20E-08                  | 3.20E-05                  | 10.5                  | 77.5                                       | 2.6                                          |
| IL6R-BP229/IL6R-L | E233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/K326A/A330R             | 5.60E-08                 | 8.10E-07                   | 3.30E-06                  | 4.20E-08                  | 3.70E-05                  | 19.3                  | 73.8                                       | 1.4                                          |
| IL6R-BP230/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R             | 1.40E-08                 | 5.70E-07                   | 9.60E-06                  | 2.10E-08                  | 6.70E-05                  | 27.1                  | 147.6                                      | 1.9                                          |
| IL6R-BP231/IL6R-L | G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R                   | 9.40E-09                 | 7.40E-07                   | 1.10E-05                  | 2.30E-08                  | 4.00E-05                  | 32.2                  | 134.8                                      | 1.5                                          |
| IL6R-BP232/IL6R-L | L234Y/G237D/P238D/P271G/K326A/A330K                   | 7.60E-08                 | 8.40E-07                   | 3.30E-06                  | 5.60E-08                  | 4.50E-05                  | 15                    | 55.4                                       | 1.3                                          |
| IL6R-BP233/IL6R-L | L234Y/G237D/P238D/P271G/A330K                         | 7.00E-08                 | 6.90E-07                   | 2.80E-06                  | 3.70E-08                  | 5.10E-05                  | 18.6                  | 83.8                                       | 1.6                                          |
| IL6R-BP234/IL6R-L | E233D/L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/A330K | 6.50E-09                 | 1.20E-06                   | 2.00E-05                  | 1.20E-07                  | 3.10E-05                  | 10                    | 25.8                                       | 0.9                                          |
| IL6R-BP235/IL6R-L | E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R       | 3.50E-09                 | 6.80E-07                   | 7.50E-06                  | 4.40E-08                  | 2.50E-05                  | 15.5                  | 70.5                                       | 1.6                                          |
| IL6R-BP236/IL6R-L | E233D/L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/A330R | 7.70E-09                 | 8.40E-07                   | 1.90E-05                  | 6.50E-08                  | 3.90E-05                  | 12.9                  | 47.7                                       | 1.3                                          |
| IL6R-BP237/IL6R-L | E233D/L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/A330K | 4.10E-09                 | 1.10E-06                   | 1.90E-05                  | 1.00E-07                  | 3.50E-05                  | 11                    | 31                                         | 1                                            |
| IL6R-BP238/IL6R-L | E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R       | 2.40E-09                 | 6.40E-07                   | 7.00E-06                  | 3.60E-08                  | 2.70E-05                  | 17.8                  | 86.1                                       | 1.7                                          |
| IL6R-BP239/IL6R-L | E233D/L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/A330R | 7.60E-09                 | 8.10E-07                   | 1.70E-05                  | 6.00E-08                  | 4.80E-05                  | 13.5                  | 51.7                                       | 1.4                                          |
| IL6R-BP240/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/A330R             | 7.60E-09                 | 1.50E-06                   | 2.60E-05                  | 9.50E-08                  | 5.20E-05                  | 15.8                  | 32.6                                       | 0.7                                          |
| IL6R-BP241/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/K326D/A330R             | 1.10E-09                 | 6.80E-07                   | 9.90E-06                  | 4.50E-08                  | 3.10E-05                  | 15.1                  | 68.9                                       | 1.6                                          |
| IL6R-BP242/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330R             | 1.90E-09                 | 7.50E-07                   | 8.60E-06                  | 5.10E-08                  | 2.90E-05                  | 14.7                  | 60.8                                       | 1.5                                          |
| IL6R-BP243/IL6R-L | E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/A330R             | 3.00E-09                 | 5.40E-07                   | 6.00E-06                  | 3.60E-08                  | 2.50E-05                  | 15                    | 86.1                                       | 2                                            |
| IL6R-BP244/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/A330R       | 7.80E-09                 | 1.80E-06                   | 2.60E-05                  | 1.10E-07                  | 4.60E-05                  | 16.4                  | 28.2                                       | 0.6                                          |
| IL6R-BP245/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/A330R       | 6.30E-09                 | 1.40E-06                   | 2.30E-05                  | 8.30E-08                  | 3.90E-05                  | 16.9                  | 37.3                                       | 0.8                                          |
| IL6R-BP246/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/A330R       | 8.00E-09                 | 1.60E-06                   | 2.30E-05                  | 9.20E-08                  | 4.40E-05                  | 17.4                  | 33.7                                       | 0.7                                          |
| IL6R-BP247/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R             | 7.50E-09                 | 8.10E-07                   | 1.20E-05                  | 3.70E-08                  | 4.40E-05                  | 21.9                  | 83.8                                       | 1.4                                          |
| IL6R-BP248/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R             | 1.70E-09                 | 8.20E-07                   | 1.10E-05                  | 3.50E-08                  | 4.40E-05                  | 23.4                  | 88.6                                       | 1.3                                          |
| IL6R-BP249/IL6R-L | E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R       | 7.00E-09                 | 6.20E-07                   | 7.20E-06                  | 3.70E-08                  | 2.80E-05                  | 16.8                  | 83.8                                       | 1.8                                          |

【0 4 7 5】

ヒト天然型IgG1の配列を含むIL6R-G1d/IL6R-LにK439Eの変異が導入されたIL6R-B3/IL6R-Lの各FcγRに対する結合を1とした場合に、IL6R-G1d/IL6R-LのFcγRIaへの結合が1.3倍

10

20

30

40

50

、Fc $\gamma$ RIIaRへの結合が1.1倍、Fc $\gamma$ RIIaHへの結合が1.1倍、Fc $\gamma$ RIIbへの結合が1.2倍、Fc $\gamma$ RIIIaVへの結合が0.9倍であり、IL6R-G1d/IL6R-LとIL6R-B3/IL6R-Lのこれら全てのFc $\gamma$ Rに対する結合は同等であった。従って各改変体の各Fc $\gamma$ Rへの結合を当該改変導入前のIL6R-B3/IL6R-Lと比較することは、各改変体の各Fc $\gamma$ Rへの結合をヒト天然型IgG1の配列を含むIL6R-G1d/IL6R-Lの各Fc $\gamma$ Rへの結合と比較することと同等であると考えられる。そこでこれ以降の実施例においては各改変体の各Fc $\gamma$ Rへの結合活性を当該改変導入前のIL6R-B3/IL6R-Lの各Fc $\gamma$ Rへの結合と比較することとした。表31から、改変導入前のIL6R-B3と比較していずれの改変体もFc $\gamma$ RIIbへの結合活性が向上しており、最も低かったIL6R-BF648/IL6R-Lの結合活性が2.6倍、最も高かったIL6R-BP230/IL6R-Lの結合活性は147.6倍向上していた。また、選択性を示すKD (IIaR)/KD (IIb)の数値は、最も低かったIL6R-BP234/IL6R-Lで10.0、最も高かったIL6R-BP231/IL6R-Lで32.2となり、いずれの改変体の数値も改変導入前のIL6R-B3/IL6R-Lの0.3と比較して選択性が向上していた。なお、いずれの改変体も、Fc $\gamma$ RIa、Fc $\gamma$ RIIaH、Fc $\gamma$ RIIIaVへの結合活性は改変導入前のIL6R-B3/IL6R-Lより低かった。

10

#### 【0476】

〔参考実施例19〕 Fc $\gamma$ RIIbに対する結合を増強したFc領域とFc $\gamma$ RIIb細胞外領域との複合体およびFc $\gamma$ RIIaR細胞外領域との複合体のX線結晶構造解析

参考実施例18において最もFc $\gamma$ RIIbへの結合が増強された改変体IL6R-BP230/IL6R-LのFc $\gamma$ RIIbへの結合は、改変導入前のIL6R-B3/IL6R-Lと比較して約150倍に増強され、Fc $\gamma$ RIIaRへの結合も1.9倍程度の増強に抑えられている。従ってIL6R-BP230/IL6R-LはFc $\gamma$ RIIbへの結合、選択性共に優れた改変体であるが、可能な限りFc $\gamma$ RIIaRへの結合を抑制したうえでFc $\gamma$ RIIbへの結合がさらに増強されたより好ましい改変体を作製する可能性が模索された。

20

#### 【0477】

参考実施例15の図39に示したように、P238Dの改変を含むFc領域では、CH2ドメインBのEUナンバリング270位で表されるAspとFc $\gamma$ RIIbの131番目のArgとの間で強固な静電相互作用が形成されるが、この131番目のアミノ酸残基がFc $\gamma$ RIIIaおよびFc $\gamma$ RIIaHではHisであるのに対し、Fc $\gamma$ RIIaRではFc $\gamma$ RIIbと同じArgである。その結果、Fc $\gamma$ RIIaRとFc $\gamma$ RIIbとの間では131番目のアミノ酸残基とCH2ドメインBのEUナンバリング270位で表されるAspとの相互作用に差が生じない。これが、Fc領域のFc $\gamma$ RIIbへの結合とFc $\gamma$ RIIaRへの結合で選択性が出にくい要因となっていると考えられた。

30

#### 【0478】

一方で、Fc $\gamma$ RIIaとFc $\gamma$ RIIb細胞外領域のアミノ酸配列は、その93%が同一で非常に高い相同性を有している。天然型IgG1のFc領域（以下Fc (WT)）とFc $\gamma$ RIIaRの細胞外領域複合体の結晶構造（J. Immunol. (2011) 187, 3208-3217）の分析によると、両者の相互作用の界面付近においては、Fc $\gamma$ RIIaRとFc $\gamma$ RIIbとの間でわずか3アミノ酸（Gln127、Leu132、Phe160）の違いしか見いだせておらず、Fc領域のFc $\gamma$ RIIbへの結合とFc $\gamma$ RIIaRへの結合の選択性の改善には相当な困難が予想された。

#### 【0479】

そのため、Fc領域のさらなるFc $\gamma$ RIIbに対する結合活性の増強とFc $\gamma$ RIIaRへの結合の選択性の向上を図るために、Fc $\gamma$ RIIbに対する結合が増強されたFc領域とFc $\gamma$ RIIb細胞外領域との複合体の立体構造だけではなく、Fc $\gamma$ RIIbに対する結合が増強されたFc領域とFc $\gamma$ RIIaR細胞外領域との複合体の立体構造が併せて解析され、当該Fc領域とFc $\gamma$ RIIbとの相互作用と当該Fc領域とFc $\gamma$ RIIaRとの相互作用の微妙な差異が明らかになることが重要と考えられた。そこで、最初にIL6R-BP230/IL6R-Lの作製において基礎となった改変体であって参考実施例17において作製されたIL6R-BP208/IL6R-LのFc領域からK439Eの改変が除かれたFc (P208) とFc $\gamma$ RIIb細胞外領域、またはFc $\gamma$ RIIaR細胞外領域との複合体のX線結晶構造が解析された。

40

#### 【0480】

（19-1）Fc (P208) とFc $\gamma$ RIIb細胞外領域との複合体のX線結晶構造解析

50

## [Fc (P208) の発現精製]

Fc (P208)は以下のように調製された。まず、IL6R-BP208の、EUナンバリングで表される439位のGluを天然型ヒトIgG1の配列であるLysにしたIL6R-P208が作製された。次にEUナンバリングで表される220位のCysがSerに置換された改変体をコードするDNAを鋳型として、EUナンバリングで表される216位のGluからC末端までに該当する遺伝子配列Fc (P208)がPCRによってクローニングされた。参考実施例1に記載の方法にしたがって発現ベクターの作製、発現、精製を行った。なお、通常のIgG1のEUナンバリングで表される220位のCysは、L鎖に存在するCysとジスルフィド結合を形成しているが、Fc領域のみを調製する場合、L鎖を共発現させないため、不要なジスルフィド結合形成を回避するために当該220位のCysはSerに置換された。

10

## 【0481】

[Fc  $\gamma$  RIIB細胞外領域の発現精製]

Fc  $\gamma$  RIIB細胞外領域は、参考実施例2の方法にしたがって調製された。

## 【0482】

[Fc (P208) Fc  $\gamma$  RIIB細胞外領域複合体の精製]

glutathione S-transferaseとの融合蛋白として大腸菌内で発現されたEndo F1 (Protein Science (1996) 5, 2617-2622) の精製産物0.15 mgが加えられた、結晶化のために得られた1.5 mgのFc  $\gamma$  RIIB細胞外領域サンプルを、0.1M Bis-Tris pH6.5のバッファー中で、室温にて3日間静置することにより、当該Fc  $\gamma$  RIIB細胞外領域サンプル中のN型糖鎖がAsnに直接結合したN-acetylglucosamineを残して切断された。次に5000MWCOの限外ろ過膜により濃縮された前記の糖鎖切断処理が施されたFc  $\gamma$  RIIB細胞外領域サンプルは、20mM HEPES pH7.5, 0.1M NaClで平衡化されたゲルろ過カラムクロマトグラフィー (Superdex200 10/300) によって精製された。さらに、Fc (P208) がモル比でFc  $\gamma$  RIIB細胞外領域のほうが若干過剰となるよう加えられた、前記の糖鎖切断Fc  $\gamma$  RIIB細胞外領域の精製画分は、10000MWCOの限外ろ過膜により濃縮され、その後、25mM HEPES pH7.5, 0.1M NaClで平衡化されたゲルろ過カラムクロマトグラフィー (Superdex200 10/300) により精製された。前記のように得られた精製画分が、Fc (P208) / Fc  $\gamma$  RIIB細胞外領域複合体のサンプルとして以後の検討に使用された。

20

## 【0483】

[Fc (P208)/Fc  $\gamma$  RIIB複合体細胞外領域複合体の結晶化]

10000MWCOの限外ろ過膜により約10 mg/mlまで濃縮されたFc (P208) / Fc  $\gamma$  RIIB細胞外領域複合体のサンプルは、ハンギングドロップ蒸気拡散法によりSeeding法を併用して結晶化された。結晶化にはVDXmプレート (Hampton Research) を用い、0.1M Bis-Tris pH6.5、19% (w/v) PEG3350、0.2 M Potassium Phosphate dibasicのリザーバー溶液に対し、リザーバー溶液：結晶化サンプル=0.85  $\mu$ L：0.85  $\mu$ Lで混合して作成された結晶化ドロップに、同様な条件で得られた同複合体の結晶をSeed Bead (Hampton Research) を用いて砕いた種結晶溶液から作成した希釈溶液0.15  $\mu$ Lを添加し、リザーバーの入ったウェルに密閉、20°Cに静置することにより、板状の結晶が得られた。

30

## 【0484】

[Fc (P208)/Fc  $\gamma$  RIIB細胞外領域複合体結晶からのX線回折データの測定]

前記のように得られたFc (P208) / Fc  $\gamma$  RIIB細胞外領域複合体の単結晶の一つを0.1M Bis-Tris pH6.5、24% (w/v) PEG3350、0.2 M Potassium Phosphate dibasic、20% (v/v) Ethylene glycolの溶液に浸した後、微小なナイロンループ付きのピンで溶液ごとすくいとり、液体窒素中で凍結させた当該単結晶からのX線回折データは、Spring-8のBL32XUにて測定された。なお、測定中、常に-178°Cの窒素気流中に置くことで凍結状態が維持され、ビームライン備え付けのCCDディテクタMX-225HE (RAYONIX) により、当該単結晶を0.6°ずつ回転させながら計300枚の当該単結晶のX線回折画像が収集された。得られた回折画像からの格子定数の決定、回折斑点の指数付け、および回折データの処理には、プログラムXia2 (J. Appl. Cryst. (2010) 43, 186-190)、XDS Package (Acta Cryst. (2010) D66, 125-132) およびScala (Acta Cryst. (2006) D62, 72-82) を用い、最終的に分解能2.

40

50

81 Å までの当該単結晶の回折強度データが得られた。本結晶は、空間群C222<sub>1</sub>に属し、格子定数  $a = 156.69 \text{ Å}$ 、 $b = 260.17 \text{ Å}$ 、 $c = 56.85 \text{ Å}$ 、 $\alpha = 90^\circ$ 、 $\beta = 90^\circ$ 、 $\gamma = 90^\circ$ であった。

#### 【0485】

[Fc (P208) / Fc  $\gamma$  RIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造解析]

Fc (P208) / Fc  $\gamma$  RIIb細胞外領域複合体の構造は、プログラムPhaser (J. Appl. Cryst. (2007) 40, 658-674) を用いた分子置換法により決定された。得られた結晶格子の大きさとFc (P208) / Fc  $\gamma$  RIIb細胞外領域複合体の分子量から非対称単位中の複合体の数は一個と予想された。Fc (WT) / Fc  $\gamma$  RIIa細胞外領域複合体の結晶構造であるPDB code:3SGJの構造座標から別座標として取り出されたA鎖239-340番ならびにB鎖239-340番のアミノ酸残基部分が、Fc領域のCH2ドメインの探索用モデルとして使用された。同じくPDB code:3SGJの構造座標から一つの座標として取り出されたA鎖341-444番とB鎖341-443番のアミノ酸残基部分がFc領域のCH3ドメインの探索用モデルとして使用された。最後にFc  $\gamma$  RIIb細胞外領域の結晶構造であるPDB code:2FCB の構造座標から取り出されたA鎖6-178番のアミノ酸残基部分がFc (P208) の探索用モデルとして使用された。Fc領域のCH3ドメイン、Fc  $\gamma$  RIIb細胞外領域、Fc領域のCH2ドメインの各探索用モデルの結晶格子内での向きと位置を、回転関数および並進関数から決定しようとしたところ、CH2ドメインの一つの位置がうまく決定されなかった。そこで残りの三つの部分から計算された位相をもとに計算された電子密度マップから、Fc (WT) / Fc  $\gamma$  RIIa細胞外領域複合体の結晶構造を参考にしながら最後のCH2ドメインAの位置が決定され、Fc (P208) / Fc  $\gamma$  RIIb細胞外領域複合体結晶構造の初期モデルが得られた。得られた初期モデルに対し二つのFc領域のCH2ドメイン、二つのFc領域のCH3ドメインおよびFc  $\gamma$  RIIb細胞外領域を動かす剛体精密化をおこなったところ、剛体精密化が行われた時点で25-3.0 Å の回折強度データを用いた構造モデルの結晶学的信頼度因子R値は42.6%、Free R値は43.7%となった。さらにプログラムREFMAC5 (Acta Cryst. (2011) D67, 355-367) を用いた構造精密化と、実験的に決定された構造因子Foと構造モデルから計算された構造因子Fcおよび構造モデルから計算された位相をもとに算出された2Fo-Fc、Fo-Fcを係数とする電子密度マップをみながら、構造モデルをプログラムCoot (Acta Cryst. (2010) D66, 486-501) を用いて修正する作業を繰り返すことで構造モデルの精密化がおこなわれた。さらに2Fo-Fc、Fo-Fcを係数とする電子密度マップをもとに水分子を構造モデルに組み込み、精密化を行うことで、最終的に分解能25-2.81 Å の27259個の回折強度データを用いた、4786個の非水素原子を含む構造モデルの、結晶学的信頼度因子R値は24.5%、Free R値は28.2%となった。

#### 【0486】

構造解析の結果、Fc (P208)/Fc  $\gamma$  RIIb細胞外領域複合体の立体構造が分解能2.81 Å で決定された。その解析の結果、取得された構造を図44に示した。2つのFc領域のCH2ドメインの間にFc  $\gamma$  RIIbの細胞外領域が挟まれるように結合しており、これまで解析された天然型IgGのFcであるFc (WT)とFc  $\gamma$  RIIa (Proc.Natl.Acad.Sci.USA (2011) 108, 12669-126674)、Fc  $\gamma$  RIIb (Nature (2000) 400, 267-273、J. Biol. Chem. (2011) 276, 16469-16477)、およびFc  $\gamma$  RIIa (J. Immunol. (2011) 187 (6), 3208-3217) の各細胞外領域との複合体の立体構造と類似していた。

#### 【0487】

細部をみると、Fc (P208) /Fc  $\gamma$  RIIb細胞外領域の複合体では、G237DならびにP238Dの改変の導入の影響により、Fc (WT)/Fc  $\gamma$  RIIa細胞外領域の複合体と比較して、Fc領域のCH2ドメインAのヒンジ領域から続くEUナンバリングで表される233位から239位のループ構造が変化していた(図45)。この結果、Fc (P208) のEUナンバリングで表される237位のAsp主鎖とFc  $\gamma$  RIIbの160番目のTyr側鎖との間に強固な水素結合の形成が認められた(図46)。この160番目のアミノ酸残基はFc  $\gamma$  RIIaHおよびFc  $\gamma$  RIIaRともにPheであり、水素結合の形成は不可能なことから、本水素結合はFc (P208)のFc  $\gamma$  RIIbに対する結合活性の向上ならびにFc  $\gamma$  RIIaに対する結合活性の低減というFc (P208)のFc  $\gamma$  RIIbへの結合の増強とFc  $\gamma$  RIIaへの結合の選択性の獲得に重要な寄与をしているとも考えられる。

## 【0488】

一方で、Fc (P208)のEUナンバリングで表される237位のAspの側鎖自体はFc $\gamma$ RIIbとの結合に際してとくに目立った相互作用は形成しておらず、Fc領域内部のほかの残基との相互作用もみられなかった。このEUナンバリングで表される237位のAspの周囲には、Fc領域内のEUナンバリングで表される332位のIle、333位のGlu、334位のLysが近傍に位置していた(図47)。これらの部位のアミノ酸残基を親水性残基に置換することによってFc (P208)のEUナンバリングで表される237位のAsp側鎖と相互作用を形成させ、ループ構造を安定化できれば、当該Fc領域とFc $\gamma$ RIIbの160番目のTyrとの水素結合形成にともなうエントロピー的なエネルギー損失を軽減することにつながり、結合自由エネルギーの増加、つまり結合活性の向上につながる可能性も考えられた。

10

## 【0489】

参考実施例15において示されたP238Dの改変を含むFc (P238D)とFc $\gamma$ RIIb細胞外領域の複合体のX線結晶構造とFc (P208)とFc $\gamma$ RIIb細胞外領域の複合体のX線結晶構造を比較すると、Fc (P208)はFc (P238D)と比較し、新たに5個の変異を含んでおり、その多くは側鎖レベルの変化にとどまる。ただし、Fc領域のCH2ドメインBにおいてはEUナンバリングで表される271位のProをGlyへと改変したことで、主鎖レベルでの位置変化がみられるとともに、併せてEUナンバリングで表される266-270位のループの構造変化がおきていた(図48)。参考実施例16に示したように、Fc (P238D)のEUナンバリングで表される270位のAspがFc $\gamma$ RIIbの131番目のArgと強固な静電相互作用を形成する際に、このEUナンバリングで表される271位のPro部分に立体化学的なストレスがかかっている可能性が示唆された。今回EUナンバリングで表される271位のアミノ酸のGlyへの改変によりみられた構造変化は、改変前のProにたまっていた構造的なひずみが解消された結果と考えられ、その解消分がFc $\gamma$ RIIbとの結合自由エネルギーの改善、つまり結合活性の向上につながったと推察され得る。

20

## 【0490】

さらにこのEUナンバリングで表される266-271位のループの構造変化に起因して、EUナンバリングで表される292位のArgが二状態をとりつつ構造変化をおこしていることが確認された。その際、このEUナンバリングで表される292位のArgとFc (P208)における改変残基の一つであるEUナンバリングで表される268位のAspとで形成される静電相互作用(図48)が、本ループ構造の安定化に寄与している可能性が考えられた。本ループ中のEUナンバリングで表される270位のAspとFc $\gamma$ RIIbの131番目のArgとで形成される静電相互作用が、Fc (P208)とFc $\gamma$ RIIbの結合活性に大きく寄与していることから、当該ループ構造を結合時のコンフォメーションに安定化させることで、結合にともなうエントロピー的なエネルギー損失が軽減され、本改変が結合自由エネルギーの増加つまり結合活性の向上につながった可能性がある。

30

## 【0491】

また、本構造解析結果をもとに、さらなる活性向上を目指した改変の可能性が精査され、改変導入部位の候補のひとつとしてEUナンバリングで表される239位のSerが見出された。図49に示すとおり、Fc $\gamma$ RIIbの117番目のLysが構造的にみてもっとも自然な形で伸びる方向にこのCH2ドメインBのEUナンバリングで表される239位のSerが位置している。ただし、今回の解析ではFc $\gamma$ RIIbの117番目のLysの電子密度は観察されていないことから、一定の構造はとっておらず、現状ではFc (P208)との相互作用へのこのLys117の関与は限定的であるとも考えられる。このCH2ドメインBのEUナンバリングで表される239位のSerを、負電荷を有するAspまたはGluへと改変した場合、正電荷をもつFc $\gamma$ RIIbの117番目のLysとの間に静電相互作用が期待でき、その結果としてFc $\gamma$ RIIbへの結合活性の向上が期待された。

40

## 【0492】

一方、CH2ドメインAにおけるEUナンバリングで表される239位のSerの構造をみると、本アミノ酸側鎖は、EUナンバリングで表される236位のGlyの主鎖と水素結合を形成し、ヒンジ領域から続き、Fc $\gamma$ RIIbの160番目のTyrの側鎖と水素結合を形成するEUナンバリングで

50

表わされる237位のAspを含む、233位から239位にかけてのループ構造を安定化させていると考えられた(図46)。当該ループ構造を結合時のコンフォメーションに安定化させることは、結合にともなうエントロピー的なエネルギー損失を軽減し、結果として結合自由エネルギーの増加つまり結合活性の向上につながる。一方、このCH2ドメインAにおけるEUナンバリングで表される239位のSerをAspまたはGluへと改変した場合、EUナンバリングで表される236位のGlyの主鎖との水素結合が失われ、ループ構造の不安定化につながる可能性もあり得る。さらにすぐ近くに存在するEUナンバリングで表される265位のAspとの静電反発をも招く可能性があり、さらなるループ構造の不安定化が起きるとも考えられた。この不安定化された分のエネルギーは、Fc $\gamma$ RIIbとの結合自由エネルギーの減少に働くため、結果として結合活性の低下を招くことにもなり得る。

10

#### 【0493】

##### (19-2) Fc(P208)とFc $\gamma$ RIIaR細胞外領域との複合体のX線結晶構造解析

[Fc $\gamma$ RIIaR細胞外領域の発現精製]

Fc $\gamma$ RIIaR細胞外領域は、参考実施例2の方法にしたがって調製された。

#### 【0494】

[Fc(P208)/Fc $\gamma$ RIIaR細胞外領域複合体の精製]

glutathione S-transferaseとの融合蛋白として大腸菌内で発現されたEndo F1 (Protein Science (1996) 5, 2617-2622) の精製産物0.15 mg、20  $\mu$ Lの5 U/ml 濃度のEndo F2 (Q A-bio) および20  $\mu$ Lの5 U/ml 濃度のEndo F3 (QA-bio) が加えられた、1.5 mgの精製されたFc $\gamma$ RIIa Rの細胞外領域サンプルを、0.1M Na Acetate pH4.5のバッファー中で、室温にて9日間静置の後、さらに、0.07 mgの前記Endo F1、7.5  $\mu$ Lの前記Endo F2および7.5  $\mu$ Lの前記Endo F3の追加後3日間静置することにより、当該Fc $\gamma$ RIIa R細胞外領域サンプル中のN型糖鎖がAsnに直接結合したN-acetylglucosamineを残して切断された。次に10000MWC0の限外ろ過膜により濃縮された前記の糖鎖切断処理が施されたFc $\gamma$ RIIaR細胞外領域サンプルは、25 mM HEPES pH7、0.1M NaClで平衡化したゲルろ過カラムクロマトグラフィー (Superdex200 10/300) によって精製された。さらに、Fc(P208)をモル比でFc $\gamma$ RIIaR細胞外領域のほうが若干過剰となるよう加えられた、前記の糖鎖切断Fc $\gamma$ RIIaR細胞外領域の精製画分は、10000MWC0の限外ろ過膜による濃縮後、25mM HEPES pH7、0.1M NaClで平衡化されたゲルろ過カラムクロマトグラフィー (Superdex200 10/300) により精製された。前記のように得られた精製画分が、Fc(P208)/Fc $\gamma$ RIIaR細胞外領域複合体のサンプルとして以後の検討に使用された。

20

30

#### 【0495】

[Fc(P208)/Fc $\gamma$ RIIaR細胞外領域複合体の結晶化]

10000MWC0の限外ろ過膜により約10 mg/mLまで濃縮されたFc(P208)/Fc $\gamma$ RIIa R細胞外領域複合体のサンプルは、シッティングドロップ蒸気拡散法にて結晶化された。0.1 M Bis-Tris pH7.5、26% (w/v) PEG3350、0.2 M Ammonium Sulfateのリザーバー溶液に対し、リザーバー溶液：結晶化サンプル=0.8  $\mu$ L：1.0  $\mu$ Lで混合して作成された結晶化ドロップを、シールで密閉して20°Cに静置することにより、板状の結晶が得られた。

#### 【0496】

[Fc(P208)/Fc $\gamma$ RIIaR細胞外領域複合体結晶からのX線回折データの測定]

40

前記のように得られたFc(P208)/Fc $\gamma$ RIIaR細胞外領域複合体の単結晶の一つを0.1 M Bis-Tris pH7.5、27.5% (w/v) PEG3350、0.2 M Ammonium Sulfate、20% (v/v) Glycerolの溶液に浸した後、微小なナイロンループ付きのピンで溶液ごとすくいとり、液体窒素中で凍結させた当該単結晶中からのX線回折データは、高エネルギー加速器研究機構の放射光施設フォトンファクトリーBL-17Aにて測定された。なお、測定中、常に-178°Cの窒素気流中に置くことで凍結状態が維持され、ビームライン備え付けのCCDディテクタQuantum 315 r (ADSC) により、当該単結晶を0.6°ずつ回転させながら計225枚の当該単結晶のX線回折画像が収集された。得られた回折画像からの格子定数の決定、回折斑点の指数付け、および回折データの処理は、プログラムXia2 (J. Appl. Cryst. (2010) 43, 186-190)、XDS Package (Acta Cryst. (2010) D66, 125-132) およびScala (Acta Cryst. (2006) D62, 7

50

2-82) を用い、最終的に分解能2.87 Å までの回折強度データが得られた。本結晶は、空間群C222<sub>1</sub>に属し、格子定数  $a = 154.31 \text{ Å}$ 、 $b = 257.61 \text{ Å}$ 、 $c = 56.19 \text{ Å}$ 、 $\alpha = 90^\circ$ 、 $\beta = 90^\circ$ 、 $\gamma = 90^\circ$  であった。

#### 【0497】

[Fc (P208)/Fc  $\gamma$  RIIaR細胞外領域複合体のX線結晶構造解析]

Fc (P208)/Fc  $\gamma$  RIIaR細胞外領域複合体の構造は、プログラムPhaser (J. Appl. Cryst. (2007) 40, 658-674) を用いた分子置換法により決定された。得られた結晶格子の大きさとFc (P208)/Fc  $\gamma$  RIIaR細胞外領域複合体の分子量から非対称単位中の複合体の数は一個と予想された。(19-1) で得られたFc (P208)/Fc  $\gamma$  RIIb細胞外領域複合体の結晶構造を探索用モデルとして用いて、Fc (P208)/Fc  $\gamma$  RIIaR細胞外領域複合体の結晶格子内での向きと位置が、回転関数および並進関数から決定された。さらに得られた初期構造モデルに対し、二つのFc領域のCH2ドメイン、二つのFc領域のCH3ドメインおよびFc  $\gamma$  RIIaR細胞外領域を独立に動かす剛体精密化をおこなったところ、剛体精密化が終了した時点で25-3.0 Å の回折強度データを用いた構造モデルの結晶学的信頼度因子R値は38.4%、Free R値は30.0%となった。さらにプログラムREFMAC5 (Acta Cryst. (2011) D67, 355-367) を用いた構造精密化と、実験的に決定された構造因子Foとモデルから計算された構造因子Fcならびにモデルから計算された位相をもとに算出された2Fo-Fc、Fo-Fcを係数とする電子密度マップをみながら当該構造モデルをプログラムCoot (Acta Cryst. (2010) D66, 486-501) を用いて修正する作業を繰り返すことで構造モデルの精密化がおこなわれた。最後に2Fo-Fc、Fo-Fcを係数とする電子密度マップをもとに水分子をモデルに組み込み、精密化をおこなうことで、最終的に分解能25-2.87 Å の24838個の回折強度データを用いた、4758個の非水素原子を含む構造モデルの、結晶学的信頼度因子R値は26.3%、Free R値は38.0%となった。

#### 【0498】

構造解析の結果、Fc (P208)/Fc  $\gamma$  RIIaR細胞外領域複合体の立体構造が分解能2.87 Å で決定された。Fc (P208)/Fc  $\gamma$  RIIaR細胞外領域複合体の結晶構造を、(19-1) に示したFc (P208)/Fc  $\gamma$  RIIb細胞外領域複合体の結晶構造と比較したところ、両Fc  $\gamma$  レセプター間の非常に高いアミノ酸同一性を反映し、全体構造から把握されるレベルでは、ほとんど差異は見られなかった(図50)。

#### 【0499】

しかし、電子密度レベルで構造を詳細にみるとFc領域のFc  $\gamma$  RIIbへの結合とFc  $\gamma$  RIIaRへの結合の選択性の改善をもたらす可能性のある差異が見出された。Fc  $\gamma$  RIIaRの160番目のアミノ酸残基はTyrではなくPheであり、図51に示したとおり、P238Dの改変を含むFc領域とFc  $\gamma$  RIIbとの結合に際して存在したFc領域CH2ドメインAのEUナンバリングで表される237位のアミノ酸残基の主鎖とFc  $\gamma$  RIIbの160番目のTyrとの間の水素結合は、P238Dの改変を含むFc領域とFc  $\gamma$  RIIaRとの結合では形成されないと考えられる。この水素結合の不形成がP238Dの改変が導入されたFc領域のFc  $\gamma$  RIIbへの結合とFc  $\gamma$  RIIaRへの結合の選択性改善の主要因と考えられるが、さらに電子密度レベルで比較してみると、当該Fc領域とFc  $\gamma$  RIIbとの複合体ではEUナンバリングで表される235位のLeu、およびEUナンバリングで表される234位のLeuの側鎖の電子密度が明確に確認可能であるのに対し、当該Fc領域とFc  $\gamma$  RIIaRとの複合体ではこれら側鎖の電子密度が明確ではなく、EUナンバリングで表わされる237位近辺のループが、この付近でのFc  $\gamma$  RIIaRとの相互作用の低下に伴い、ゆらいでいると考えられた。一方、当該Fc領域のCH2ドメインBの同じ領域の構造を比較すると(図52)、当該Fc領域とFc  $\gamma$  RIIbとの複合体ではEUナンバリングで表される237位のAspまでの電子密度が確認できるのに対し、当該Fc領域とFc  $\gamma$  RIIaRとの複合体ではEUナンバリングで表される237位のAspより手前の3残基、すなわちEUナンバリングで表される234位のLeu程度まで電子密度を確認することが可能であり、Fc  $\gamma$  RIIbへの結合と比較し、より広い領域を使って相互作用を形成していると考えられた。以上から、当該Fc領域とFc  $\gamma$  RIIbとの結合では、EUナンバリングで表される234位から238位の領域におけるFc領域のCH2ドメインA側の寄与が、当該Fc領域とFc  $\gamma$  RIIaRとの結合では、EUナンバリングで表される234位

から238位の領域におけるFc領域のCH2ドメインB側の寄与が大きい可能性が示唆された。

#### 【0500】

〔参考実施例20〕 結晶構造に基づいて改変箇所を決定したFc改変体

参考実施例19においてFcγRIIbへの結合が増強された改変体（P208）のドメインB内で、P271G改変の導入にともなう周囲の構造変化の結果として、EUナンバリングで表される268位のAspが、EUナンバリングで表される292位のArgと静電相互作用していることが示唆された（図48）。この相互作用形成がEUナンバリングで表される266位から271位のループ構造の安定化に働き、結果としてFcγRIIbへの結合増強に寄与した可能性が考えられた。そこで、当該改変体のEUナンバリングで表される268位のAspをGluに置換することによって、前記の静電相互作用が強化され、当該改変体のループ構造をさらに安定化させることで、FcγRIIbへの結合増強が可能か否かが検討された。また図47に示したとおり、FcγRIIbの160位のTyrは、P208のドメインAのEUナンバリングで表される237位のAspの主鎖と相互作用している。一方、EUナンバリングで表される237位のAspの側鎖は、分子内のEUナンバリングで表される332位のIle、333位のGlu、334位のLysの近傍に位置しているが特に目立った相互作用は形成していない。そこで、これらの部位を親水性アミノ酸残基に置換することでEUナンバリングで表される237位のAspの側鎖との相互作用を強めて、EUナンバリングで表される266位から271位のループ構造を安定化することで、FcγRIIbの160番目のTyrとの相互作用が増強されるか否かが、併せて検証された。

10

#### 【0501】

参考実施例18において作製されたIL6R-BP230/IL6R-Lの、H268E、I332T、I332S、I332E、I332K、E333K、E333R、E333S、E333T、K334S、K334T、K334Eの改変がそれぞれ導入された改変体を作製された。抗体L鎖としてはIL6R-L（配列番号：155）が用いられた。参考実施例1の方法に従い発現した、前記の重鎖の改変体とIL6R-Lの軽鎖を含む抗体が精製された。精製された抗体の各FcγR（FcγRIa、FcγRIIaH、FcγRIIaR、FcγRIIb、FcγRIIIaV）に対する結合が、参考実施例2の方法によって評価された。

20

#### 【0502】

各改変体の各FcγRに対するKD値を表32に示した。なお、表中の改変とはIL6R-BP230に対して導入された改変を示す。ただしIL6R-BP230を作製する際の鋳型として用いられたIL6R-B3/IL6R-Lは\*として示した。また、表中の親ポリペプチドのKD（IIb）/改変ポリペプチドのKD（IIb）は、IL6R-B3/IL6R-LのFcγRIIbに対するKD値を各改変体のFcγRIIbに対するKD値で除した値を示す。また、親ポリペプチドのKD（IIaR）/改変ポリペプチドのKD（IIaR）は、IL6R-B3/IL6R-LのFcγRIIaRに対するKD値を各改変体のFcγRIIaRに対するKD値で除した値を示す。KD（IIaR）/KD（IIb）とは、各改変体のFcγRIIaRに対するKD値を当該改変体のFcγRIIbに対するKD値で除した値であり、この値が大きいほどFcγRIIbへの選択性が高いことを示す。なお、表32のうち灰色で塗りつぶされたセルの数値は、FcγRのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解析できないと判断されたため、参考実施例2に記載された

30

〔式2〕

$$KD = C \bullet R_{\max} / (R_{\text{eq}} - RI) - C$$

を利用して算出された数値である。

40

#### 【0503】

【表 3 2】

| 改変体名              | IL6R-BP230に<br>加えた改変 | Fc $\gamma$ RIaIに<br>対するKD<br>(mol/L) | Fc $\gamma$ RIaK<br>に対するKD<br>(mol/L) | Fc $\gamma$ RIaH<br>に対するKD<br>(mol/L) | Fc $\gamma$ RIIbI<br>に対するKD<br>(mol/L) | Fc $\gamma$ RIIaV<br>に対するKD<br>(mol/L) | KD (IIaR)/KD<br>(IIb) | 親ポリペプチドの<br>KD(IIaR)/改変ポリ<br>ペプチドのKD(IIaR) | 親ポリペプチドの<br>KD (IIb)/改変ポリ<br>ペプチドのKD (IIb) |
|-------------------|----------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|
| IL6R-G1d/IL6R-L   |                      | 3.20E-10                              | 1.00E-06                              | 6.70E-07                              | 2.60E-06                               | 3.50E-07                               | 0.4                   | 1.1                                        | 1.2                                        |
| IL6R-B3/IL6R-L    | *                    | 4.20E-10                              | 1.10E-06                              | 7.70E-07                              | 3.10E-06                               | 3.30E-07                               | 0.3                   | 1                                          | 1                                          |
| IL6R-BP230/IL6R-L |                      | 1.40E-08                              | 5.70E-07                              | 9.60E-06                              | 2.10E-08                               | 6.70E-05                               | 27.5                  | 1.9                                        | 149                                        |
| IL6R-BP264/IL6R-L | H268E                | 6.50E-09                              | 4.80E-07                              | 9.20E-06                              | 1.20E-08                               | 5.20E-05                               | 40.6                  | 2.3                                        | 265                                        |
| IL6R-BP384/IL6R-L | K334R                | 3.00E-09                              | 1.30E-06                              | 1.80E-05                              | 7.10E-08                               | 4.50E-05                               | 17.7                  | 0.9                                        | 43.5                                       |
| IL6R-BP390/IL6R-L | I332S                | 1.60E-09                              | 4.90E-07                              | 7.30E-06                              | 2.10E-08                               | 2.90E-05                               | 22.9                  | 2.2                                        | 144.9                                      |
| IL6R-BP391/IL6R-L | I332T                | 9.60E-10                              | 3.40E-07                              | 4.40E-06                              | 1.30E-08                               | 1.90E-05                               | 26.6                  | 3.2                                        | 242.2                                      |
| IL6R-BP392/IL6R-L | I332K                | 7.90E-09                              | 7.30E-06                              | 2.80E-05                              | 9.90E-07                               | 2.90E-05                               | 7.3                   | 0.2                                        | 3.1                                        |
| IL6R-BP393/IL6R-L | I332R                | 1.10E-08                              | 3.90E-06                              | 4.60E-05                              | 2.70E-06                               | 4.80E-05                               | 1.4                   | 0.3                                        | 1.2                                        |
| IL6R-BP465/IL6R-L | E333K                | 1.60E-08                              | 6.10E-07                              | 1.50E-05                              | 2.10E-08                               | 6.70E-05                               | 29.8                  | 1.8                                        | 151.2                                      |
| IL6R-BP466/IL6R-L | E333R                | 1.50E-08                              | 5.20E-07                              | 1.10E-05                              | 1.70E-08                               | 2.90E-05                               | 30.4                  | 2.1                                        | 181.3                                      |
| IL6R-BP467/IL6R-L | K334S                | 8.90E-10                              | 1.10E-06                              | 1.20E-05                              | 4.10E-08                               | 3.20E-05                               | 25.8                  | 1                                          | 75.4                                       |
| IL6R-BP468/IL6R-L | K334T                | 9.70E-10                              | 1.10E-06                              | 9.70E-06                              | 4.00E-08                               | 2.70E-05                               | 26.3                  | 1                                          | 77.7                                       |
| IL6R-BP469/IL6R-L | E333S                | 1.30E-08                              | 6.00E-07                              | 1.20E-05                              | 2.30E-08                               | 3.70E-05                               | 26.4                  | 1.8                                        | 136.6                                      |
| IL6R-BP470/IL6R-L | E333T                | 1.50E-08                              | 4.90E-07                              | 1.00E-05                              | 1.60E-08                               | 3.70E-05                               | 30.6                  | 2.2                                        | 192.5                                      |

【0504】

IL6R-BP230/IL6R-Lに対してH268Eの改変が導入されたIL6R-BP264/IL6R-L、E333Kの改変が導入されたIL6R-BP465/IL6R-L、E333Rの改変が導入されたIL6R-BP466/IL6R-L、E333Tの改変が導入されたIL6R-BP470のFc $\gamma$ RIIbへの結合活性、およびFc $\gamma$ RIIbの選択性は、IL6R-BP230/IL6R-Lのそれと比較して共に向上していた。またI332Tの改変が導入されたIL6R-BP391/IL6R-LのFc $\gamma$ RIIbの選択性は、IL6R-BP230/IL6R-Lと比較して低下するものの、Fc $\gamma$ RIIbへの結合活性が向上していた。

【0505】

〔参考実施例 2 1〕 EUナンバリングで表される271位の周辺のアミノ酸残基への改変の網羅的導入

Fc (P208)/Fc $\gamma$ RIIbの構造とFc (P238D)/Fc $\gamma$ RIIbの構造の比較において最も違いがみられるのは、Fc領域のCH2ドメインBのEUナンバリングで表される271位の近傍の構造である(図48)。参考実施例16に示したようにFc (P238D)/Fc $\gamma$ RIIbの構造においてはEUナンバリングで表される270位のAspがFc $\gamma$ RIIbの131番目のArgと強固な静電相互作用を形成する際に、EUナンバリングで表される271位のPro部分に立体化学的なストレスがかかっている可能性が示唆された。Fc (P208)/Fc $\gamma$ RIIbの構造においてはEUナンバリングで表される271位のProのGlyへの置換により、この構造的なひずみを解消するように主鎖レベルでの位置変化が起きており、その結果、271位の近傍の構造が大きく変化したと考えられる。この変化した271位の近傍の構造をさらに安定化させることができれば、Fc $\gamma$ RIIbの131番目のArgとの静電相互作用を形成時の結合にともなうエントロピー的なエネルギー損失をさらに軽減できる可能性も考えられた。そこで、EUナンバリングで表される271位の周辺のアミノ酸残基に対する改変を網羅的に導入することにより、Fc領域のFc $\gamma$ RIIbに対する結合の増強あるいは選択性の向上を示す改変が探索された。

【0506】

改変を網羅的に導入する鋳型として、IL6R-B3(配列番号:164)に対して、E233D、G237D、P238D、H268E、P271Gの改変が導入されたIL6R-BP267が作製された。抗体L鎖としてはIL6R-L(配列番号:155)が用いられた。参考実施例1の方法に従い発現した、前記の重鎖の改変体とIL6R-Lの軽鎖を含む抗体が精製された。精製された抗体の各Fc $\gamma$ R(Fc $\gamma$ RIa、Fc $\gamma$ RIIaH、Fc $\gamma$ RIIaR、Fc $\gamma$ RIIb、Fc $\gamma$ RIIIaV)に対する結合が、参考実施例2の方法によって評価された。IL6R-BP267のEUナンバリングで表される264位、265位、266位、267位、269位、272位のアミノ酸が置換前のアミノ酸とCysを除く18種類のアミノ酸にそれぞれ置換された。抗体L鎖としてはIL6R-L(配列番号:155)が用いられた。参考実施例1の方法に従い発現した、前記の重鎖の改変体とIL6R-Lの軽鎖を含む抗体が精製された。参考実施例2の方法により精製された抗体の各Fc $\gamma$ R(Fc $\gamma$ RIa、Fc $\gamma$ RIIaH、Fc $\gamma$ RIIaR、Fc $\gamma$ RIIb、Fc $\gamma$ RIIIaV)に対する結合が、参考実施例2の方法によって評価された。得られた改変体の中から、改変を導入する前のIL6R-BP267/IL6R-LのFc $\gamma$ RIIbへの結合またはFc $\gamma$ RIIbの選択性と比較して、Fc $\gamma$ RIIbへの結合が増強された改変体、あるいはFc $\gamma$ RIIbへの選択性が向上した改変体を表33に示した。

10

20

30

40

50

【0507】

【表33】

| 改変体名              | IL6R-BP267に加えた改変 | FcγRIaに対するKD (mol/L) | FcγRIIaRに対するKD (mol/L) | FcγRIIaHに対するKD (mol/L) | FcγRIIbに対するKD (mol/L) | FcγRIIIaVに対するKD (mol/L) | KD (IIaR)/KD (IIb) | 親ポリペプチドのKD (IIaR)/改変ポリペプチドのKD (IIaR) | 親ポリペプチドのKD (IIb)/改変ポリペプチドのKD (IIb) |
|-------------------|------------------|----------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|-------------------------|--------------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| IL6R-B3/IL6R-L    | *                | 3.20E-10             | 1.00E-06               | 6.70E-07               | 2.60E-06              | 3.50E-07                | 0.4                | 1                                    | 1                                  |
| IL6R-BP267/IL6R-L |                  | 4.00E-09             | 1.70E-06               | 1.90E-05               | 1.30E-07              | 5.30E-05                | 13                 | 0.6                                  | 20.5                               |
| IL6R-BP348/IL6R-L | S267A            | 5.50E-10             | 7.00E-07               | 2.20E-03               | 4.60E-08              | 2.70E-05                | 15.3               | 1.4                                  | 56.9                               |
| IL6R-BP300/IL6R-L | V264I            | 9.60E-09             | 6.90E-07               | 2.20E-05               | 5.80E-08              | 5.60E-05                | 11.9               | 1.4                                  | 44.8                               |
| IL6R-BP367/IL6R-L | E269D            | 3.10E-09             | 1.20E-06               | 4.60E-05               | 1.00E-07              | 5.30E-05                | 11.7               | 0.8                                  | 25.7                               |
| IL6R-BP350/IL6R-L | S267E            | 8.90E-10             | 1.50E-07               | 6.30E-03               | 1.00E-07              | 8.90E-05                | 1.5                | 6.5                                  | 25.2                               |
| IL6R-BP333/IL6R-L | V266F            | 9.10E-09             | 1.50E-06               | 3.40E-05               | 1.20E-07              | 5.90E-05                | 12.5               | 0.7                                  | 22.2                               |
| IL6R-BP352/IL6R-L | S267G            | 1.80E-09             | 1.90E-06               | 2.80E-05               | 1.20E-07              | 4.30E-05                | 15.7               | 0.5                                  | 21.3                               |
| IL6R-BP339/IL6R-L | V266M            | 4.60E-09             | 1.40E-06               | 1.80E-05               | 1.30E-07              | 2.40E-05                | 11.3               | 0.7                                  | 20.6                               |
| IL6R-BP520/IL6R-L | E272M            | 3.90E-09             | 3.00E-06               | 3.10E-05               | 1.70E-07              | 4.70E-05                | 17.5               | 0.3                                  | 14.9                               |
| IL6R-BP523/IL6R-L | E272Q            | 3.70E-09             | 2.70E-06               | 2.90E-05               | 1.70E-07              | 4.10E-05                | 15.9               | 0.4                                  | 15.5                               |
| IL6R-BP313/IL6R-L | D265E            | 2.60E-08             | 1.30E-05               | 4.70E-05               | 8.40E-07              | 3.80E-05                | 15.6               | 0.1                                  | 3.1                                |
| IL6R-BP513/IL6R-L | E272D            | 3.80E-09             | 1.70E-06               | 3.90E-05               | 1.10E-07              | 7.50E-05                | 15.4               | 0.6                                  | 23.6                               |
| IL6R-BP521/IL6R-L | E272N            | 3.60E-09             | 2.90E-06               | 4.40E-05               | 1.90E-07              | 9.90E-05                | 15.2               | 0.3                                  | 13.5                               |
| IL6R-BP338/IL6R-L | V266L            | 1.50E-08             | 2.20E-06               | 2.20E-05               | 1.50E-07              | 2.50E-05                | 15                 | 0.5                                  | 17.9                               |
| IL6R-BP517/IL6R-L | E272I            | 3.20E-09             | 2.10E-06               | 2.20E-05               | 1.40E-07              | 3.50E-05                | 14.7               | 0.5                                  | 18.1                               |
| IL6R-BP514/IL6R-L | E272F            | 4.30E-09             | 3.00E-06               | 6.40E-05               | 2.10E-07              | 9.10E-05                | 14                 | 0.3                                  | 12.3                               |

【0508】

各改変体の各FcγRに対するKD値を表33に示した。なお、表中の改変とは、鋳型としたIL6R-BP267に対して導入された改変を示す。ただしIL6R-BP267を作製する際の鋳型として用いられたIL6R-B3/IL6R-Lは\*として示した。また、表中の親ポリペプチドのKD (IIb)/改変ポリペプチドのKD (IIb)は、IL6R-B3/IL6R-LのFcγRIIbに対するKD値を各改変体のFcγRIIbに対するKD値で除した値を示す。また、親ポリペプチドのKD (IIaR)/改変ポリペプチドのKD (IIaR)は、IL6R-B3/IL6R-LのFcγRIIaRに対するKD値を各改変体のFcγRIIaRに対するKD値で除した値を示す。KD (IIaR)/KD (IIb)とは、各改変体のFcγRIIaRに対するKD値を当該改変体のFcγRIIbに対するKD値で除した値であり、この値が大きいほどFcγRIIbへの選択性が高いことを示す。なお、表33のうち灰色で塗りつぶされたセル中の数値は、FcγRのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解析できないと判断されたため、参考実施例2に記載された

〔式2〕

$$KD = C \bullet R_{\max} / (R_{eq} - RI) - C$$

を利用して算出された数値である。

【0509】

表33に示された改変体のFcγRIa、FcγRIIaH、FcγRIIIaVへの結合活性はいずれも、IL6R-B3/IL6R-Lのそれと比較して維持または減少していた。また、IL6R-BP267/IL6R-Lに対してそれぞれS267A、V264I、E269D、S267E、V266F、S267G、V266Mの改変が加えられた改変体のFcγRIIbへの結合活性は、改変を加える前のIL6R-BP267/IL6R-Lのそれと比較して増強されていた。また、IL6R-BP267/IL6R-Lに対してそれぞれS267A、S267G、E272M、E272Q、D265E、E272D、E272N、V266L、E272I、E272Fの改変が加えられた改変体のKD (IIaR)/KD (IIb)の値は、改変を加える前のIL6R-BP267/IL6R-Lのそれと比較して増加しており、S267A、S267G、E272M、E272Q、D265E、E272D、E272N、V266L、E272I、E272Fの改変がFcγRIIbへの選択性を向上させる効果を示すことが明らかとなった。

【0510】

〔参考実施例22〕 CH3領域への改変の導入によるFcγRIIbへの結合増強

EUナンバリングで表される396位のProをLeuに置換する改変はFcγRIIbへの結合を増強することが報告されている (Cancer Res. (2007) 67, 8882-8890)。EUナンバリングで表される396位のアミノ酸はFcγRとの相互作用には直接関与しない部位であるが、抗体の構造を変化させることでFcγRとの相互作用に影響を与えとも考えられる。そこで、Fc領域のEUナンバリングで表される396位のアミノ酸に改変を網羅的に導入することにより、Fc領域のFcγRIIbへの結合あるいは選択性が向上するか否かが検証された。

【0511】

改変を網羅的に導する鋳型として、IL6R-B3 (配列番号: 164) に対して、E233D、G2

10

20

30

40

50

37D、P238D、S267A、H268E、P271G、A330Rの改変が導入されたIL6R-BP423が作製された。IL6R-BP423のEUナンバリングで表される396位のアミノ酸が置換前のアミノ酸とシステインを除く18種類のアミノ酸に置換された改変体を作製された。抗体L鎖としてはIL6R-L（配列番号：155）が用いられた。参考実施例1の方法に従い、発現した前記の重鎖の改変体とIL6R-Lの軽鎖を含む抗体が精製された。精製された抗体の各Fc $\gamma$ R（Fc $\gamma$ RIa、Fc $\gamma$ RIIaH、Fc $\gamma$ RIIaR、Fc $\gamma$ RIIb、Fc $\gamma$ RIIIaV）に対する結合が、参考実施例2の方法によって評価された。得られた改変体の各Fc $\gamma$ Rへの結合を表34に示した。

【0512】

【表 34】

| 変体名               | IL6R-BP423<br>に加えた改変 | FcγRIaに<br>対するKD<br>(mol/L) | FcγRIIaRに<br>対するKD<br>(mol/L) | FcγRIIaHに<br>対するKD<br>(mol/L) | FcγRIIbに<br>対するKD<br>(mol/L) | FcγRIIIaVに<br>対するKD<br>(mol/L) | KD (IIaR)/ KD<br>(IIb) | 親ポリペプチドの<br>KD (IIaR)/ 改変<br>ポリペプチドのKD<br>(IIaR) | 親ポリペプチドの<br>KD (IIb)/ 改変<br>ポリペプチドのKD<br>(IIb) |
|-------------------|----------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------|------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| IL6R-G1d/IL6R-L   |                      | 3.20E-10                    | 1.00E-06                      | 6.70E-07                      | 2.60E-06                     | 3.50E-07                       | 0.4                    | 1.1                                              | 1.2                                            |
| IL6R-B3/IL6R-L    | *                    | 4.20E-10                    | 1.10E-06                      | 7.70E-07                      | 3.10E-06                     | 3.30E-07                       | 0.3                    | 1                                                | 1                                              |
| IL6R-BP423/IL6R-L |                      | 7.70E-10                    | 1.80E-07                      | 2.00E-06                      | 5.10E-09                     | 1.60E-05                       | 34.2                   | 6.3                                              | 604                                            |
| IL6R-BP447/IL6R-L | P396A                | 9.00E-10                    | 1.60E-07                      | 2.00E-06                      | 5.30E-09                     | 2.50E-05                       | 29.7                   | 7                                                | 584                                            |
| IL6R-BP448/IL6R-L | P396D                | 7.50E-10                    | 1.30E-07                      | 1.40E-06                      | 4.10E-09                     | 9.70E-06                       | 31.7                   | 8.5                                              | 759                                            |
| IL6R-BP449/IL6R-L | P396E                | 9.10E-10                    | 1.40E-07                      | 1.50E-06                      | 4.60E-09                     | 1.20E-05                       | 29.8                   | 8                                                | 667                                            |
| IL6R-BP450/IL6R-L | P396F                | 8.40E-10                    | 1.20E-07                      | 1.30E-06                      | 4.10E-09                     | 9.60E-06                       | 29.4                   | 9.2                                              | 763                                            |
| IL6R-BP451/IL6R-L | P396G                | 9.80E-10                    | 1.80E-07                      | 2.00E-06                      | 6.20E-09                     | 1.20E-05                       | 29.2                   | 6.1                                              | 499                                            |
| IL6R-BP452/IL6R-L | P396H                | 7.50E-10                    | 1.30E-07                      | 1.50E-06                      | 5.10E-09                     | 1.10E-05                       | 25.9                   | 8.3                                              | 602                                            |
| IL6R-BP453/IL6R-L | P396I                | 7.50E-10                    | 1.20E-07                      | 9.30E-07                      | 4.60E-09                     | 7.40E-06                       | 25.5                   | 9.4                                              | 675                                            |
| IL6R-BP454/IL6R-L | P396K                | 8.20E-09                    | 1.30E-07                      | 1.40E-06                      | 4.80E-09                     | 9.10E-06                       | 27.5                   | 8.4                                              | 649                                            |
| IL6R-BP455/IL6R-L | P396L                | 7.50E-10                    | 1.30E-07                      | 1.60E-06                      | 4.00E-09                     | 8.50E-06                       | 31.8                   | 8.6                                              | 767                                            |
| IL6R-BP456/IL6R-L | P396M                | 6.00E-10                    | 1.20E-07                      | 2.00E-06                      | 3.50E-09                     | 9.20E-06                       | 35.3                   | 8.9                                              | 888                                            |
| IL6R-BP457/IL6R-L | P396N                | 9.10E-10                    | 1.50E-07                      | 2.60E-06                      | 5.20E-09                     | 1.30E-05                       | 28.9                   | 7.3                                              | 591                                            |
| IL6R-BP458/IL6R-L | P396Q                | 7.80E-10                    | 1.40E-07                      | 1.40E-06                      | 4.50E-09                     | 1.10E-05                       | 31.1                   | 7.9                                              | 687                                            |
| IL6R-BP459/IL6R-L | P396R                | 1.10E-09                    | 1.50E-07                      | 1.40E-06                      | 5.10E-09                     | 1.20E-05                       | 28.9                   | 7.5                                              | 607                                            |
| IL6R-BP460/IL6R-L | P396S                | 8.70E-10                    | 1.60E-07                      | 3.20E-06                      | 6.50E-09                     | 1.40E-05                       | 25.2                   | 6.7                                              | 478                                            |
| IL6R-BP461/IL6R-L | P396T                | 1.30E-09                    | 1.30E-07                      | 1.50E-06                      | 5.10E-09                     | 9.90E-06                       | 24.4                   | 8.8                                              | 602                                            |
| IL6R-BP462/IL6R-L | P396V                | 9.70E-10                    | 1.30E-07                      | 1.40E-06                      | 5.20E-09                     | 9.00E-06                       | 25                     | 8.5                                              | 593                                            |
| IL6R-BP463/IL6R-L | P396W                | 1.30E-09                    | 1.60E-07                      | 1.90E-06                      | 5.60E-09                     | 1.20E-05                       | 28.1                   | 7                                                | 554                                            |
| IL6R-BP464/IL6R-L | P396Y                | 1.10E-09                    | 1.30E-07                      | 2.10E-06                      | 4.00E-09                     | 9.90E-06                       | 31.5                   | 8.7                                              | 773                                            |

【0513】

なお、表中のIL6R-BP423に加えた改変とは、鋳型としたIL6R-BP423に対して導入された改変を示す。ただし、IL6R-BP423を作製する際の鋳型として用いられたIL6R-B3/IL6R-Lは

10

20

30

40

50

\*として示した。また、表中の親ポリペプチドのKD (IIb)/改変ポリペプチドのKD (IIb)は、IL6R-B3/IL6R-LのFc $\gamma$ RIIbに対するKD値を各改変体のFc $\gamma$ RIIbに対するKD値で除した値を示す。また、親ポリペプチドのKD (IIaR)/改変ポリペプチドのKD (IIaR)は、IL6R-B3/IL6R-LのFc $\gamma$ RIIaRに対するKD値を各改変体のFc $\gamma$ RIIaRに対するKD値で除した値を示す。KD (IIaR)/KD (IIb)とは、各改変体のFc $\gamma$ RIIaRに対するKD値を当該改変体のFc $\gamma$ RIIbに対するKD値で除した値であり、この値が大きいほどFc $\gamma$ RIIbへの選択性が高いことを示す。なお、表34のうち灰色で塗りつぶされたセル中の数値は、Fc $\gamma$ RのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解析できないと判断されたため、参考実施例2に記載された

〔式2〕

$$KD = C \bullet R_{\max} / (R_{\text{eq}} - RI) - C$$

を利用して算出された数値である。

【0514】

表34の結果より、IL6R-BP423/IL6R-Lに対してP396Mの改変が導入されたIL6R-BP456/IL6R-L、P396Lの改変が導入されたIL6R-BP455/IL6R-L、P396Yの改変が導入されたIL6R-BP464/IL6R-L、P396Fの改変が導入されたIL6R-BP450/IL6R-L、P396Dの改変が導入されたIL6R-BP448/IL6R-L、P396Qの改変が導入されたIL6R-BP458/IL6R-L、P396Iの改変が導入されたIL6R-BP453/IL6R-L、P396Eの改変が導入されたIL6R-BP449/IL6R-L、P396Kの改変が導入されたIL6R-BP454/IL6R-L、P396Rの改変が導入されたIL6R-BP459/IL6R-LのFc $\gamma$ RIIbへの結合活性は、いずれも改変を導入する前のIL6R-BP423/IL6R-Lのそれと比較して向上していた。また、IL6R-BP423/IL6R-Lに対してP396Mの改変が導入されたIL6R-BP456/IL6R-LのKD (IIaR)/KD (IIb)の値は、改変を導入する前のIL6R-BP423/IL6R-Lのそれと比較して大きく、Fc $\gamma$ RIIbへの選択性が向上していた。表34中で作製された改変体はいずれもFc $\gamma$ RIa、Fc $\gamma$ RIIaH、Fc $\gamma$ RIIIaVへの結合活性は親ポリペプチドであるIL6R-B3/IL6R-Lのそれよりも低かった。

【0515】

〔参考実施例23〕 サブクラス配列の利用によるFc $\gamma$ RIIbへの結合が増強された改変体の作製

ヒトIgGに存在するサブクラスによって、Fc $\gamma$ Rへの結合プロファイルが異なる。IgG1とIgG4の各Fc $\gamma$ Rへの結合活性の違いを、Fc $\gamma$ RIIbへの結合活性の増強、および/または選択性の向上に利用できるか否かが検証された。はじめに、IgG1とIgG4の各Fc $\gamma$ Rへの結合活性が解析された。抗体H鎖としては、ヒトIgG4のEUナンバリングで表される228位のSerがProに置換され、C末端のGlyおよびLysが除去されたFc領域であるG4dを含むIL6R-G4d（配列番号：165）が抗体H鎖として作製された。抗体L鎖としてはIL6R-L（配列番号：155）が用いられた。参考実施例1の方法に従い発現した、IL6R-Lの軽鎖とIL6R-G1dまたはIL6R-G4dの重鎖を含む抗体が精製された。精製された抗体の各Fc $\gamma$ R（Fc $\gamma$ RIa、Fc $\gamma$ RIIaH、Fc $\gamma$ RIIb、Fc $\gamma$ RIIIaV）に対する結合が、参考実施例2の方法によって評価された。得られた改変体の各Fc $\gamma$ Rへの結合を表35にまとめた。

【0516】

〔表35〕

| 改変体名            | Fc $\gamma$ RIaに対するKD<br>(mol/L) | Fc $\gamma$ RIIaRに対するKD<br>(mol/L) | Fc $\gamma$ RIIaHに対するKD<br>(mol/L) | Fc $\gamma$ RIIbに対するKD<br>(mol/L) | Fc $\gamma$ RIIIaVに対するKD<br>(mol/L) |
|-----------------|----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| IL6R-G1d/IL6R-L | 1.20E-10                         | 9.70E-07                           | 6.50E-07                           | 3.90E-06                          | 4.20E-07                            |
| IL6R-G4d/IL6R-L | 6.60E-10                         | 2.10E-06                           | 3.40E-06                           | 2.60E-06                          | 3.40E-06                            |

【0517】

IL6R-G4d/IL6R-LのFc $\gamma$ RIIbへの結合は、IL6R-G1d/IL6R-Lのそれと比較して1.5倍強いのにに対して、IL6R-G4d/IL6R-LのFc $\gamma$ RIIaRへの結合は、IL6R-G1d/IL6R-Lのそれと比較して2.2倍弱いことが示された。また、IL6R-G4d/IL6R-LのFc $\gamma$ RIa、Fc $\gamma$ RIIaH、Fc $\gamma$ RIIIa

10

20

30

40

50

Vへの結合活性は、IL6R-G1d/IL6R-Lのそれと比較して弱かった。以上の結果から、IL6R-G4dのFcγRIIbへの結合活性、選択性共に、IL6R-G1dと比較して好ましい性質を有していることが明らかとなった。

#### 【0518】

図53はG1dとG4dのCH1からC末端までの配列（EUナンバリングで表される118位から445位）の比較を示したアラインメントである。図53中の太枠で囲まれたアミノ酸はG1dとG4dで異なるアミノ酸残基であることを示している。これらの異なるアミノ酸の中から、FcγRとの相互作用に関与すると予想される部位をいくつか選択し、FcγRIIbへの結合活性、選択性の観点で共に好ましい性質を付与するG4dの配列中の少なくとも一つ以上のアミノ酸残基をFcγRIIbへの結合が増強された改変体に移植することで、FcγRIIbへの結合のさらなる増強、および/または選択性のさらなる向上が可能であるか否かが検証された。

#### 【0519】

具体的には、IL6R-BP230に対して、A327Gの改変が導入されたIL6R-BP473、A330Sの改変が導入されたIL6R-BP472、P331Sの改変が導入されたIL6R-BP471、A330SおよびP331Sの改変が導入されたIL6R-BP474、A327GおよびA330Sの改変が導入されたIL6R-BP475、A327G、A330S、およびP331Sの改変が導入されたIL6R-BP476、A327GおよびP331Sの改変が導入されたIL6R-BP477が作製された。またIL6R-BP230のEUナンバリングで表される118位のAlaから225位のThrまでのアミノ酸がG4dのEUナンバリングで表される118位のAlaから222位のProまでのアミノ酸に置換されたIL6R-BP478が作製された。抗体L鎖としてはIL6R-L（配列番号：155）が用いられた。参考実施例1の方法に従い、前記の重鎖の改変体とIL6R-Lの軽鎖を含む抗体が精製された。精製された抗体の各FcγR（FcγRIa、FcγRIIaH、FcγRIIaR、FcγRIIb、FcγRIIIaV）に対する結合が参考実施例2の方法により評価された。

#### 【0520】

各改変体の各FcγRに対するKD値を表36に示した。なお、表中の、親ポリペプチドのKD（IIb）/改変ポリペプチドのKD（IIb）は、IL6R-B3/IL6R-LのFcγRIIbに対するKD値を各改変体のFcγRIIbに対するKD値で除した値を示す。表中のIL6R-BP230に加えた改変とはIL6R-BP230に対して導入された改変を示す。ただし、IL6R-BP230を作製する際の鋳型としたIL6R-B3/IL6R-Lは\*1として示した。また、IL6R-BP230のEUナンバリングで表される118位のAlaから225位のThrまでが、G4dのEUナンバリングで表される118位のAlaから222位のProまでに置換されたIL6R-BP478は\*2として示した。親ポリペプチドのKD（IIaR）/改変ポリペプチドのKD（IIaR）は、IL6R-B3/IL6R-LのFcγRIIaRに対するKD値を各改変体のFcγRIIaRに対するKD値で除した値を示す。KD（IIaR）/KD（IIb）とは、各改変体のFcγRIIaRに対するKD値を当該改変体のFcγRIIbに対するKD値で除した値であり、この値が大きいほどFcγRIIbへの選択性が高いことを示す。なお、表36において灰色で塗りつぶされたセル中の数値は、FcγRのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解析できないと判断されたため、参考実施例2に記載された

〔式2〕

$$KD = C \bullet R_{\max} / (R_{\text{eq}} - RI) - C$$

を利用して算出された数値である。

#### 【0521】

10

20

30

40

【表 36】

| 改変体名              | IL6R-BP230に加えた改変  | FcγRIIaに<br>対するKD<br>(mol/L) | FcγRIIaRに<br>対するKD<br>(mol/L) | FcγRIIaHIに<br>対するKD<br>(mol/L) | FcγRIIbに<br>対するKD<br>(mol/L) | FcγRIIaVに<br>対するKD<br>(mol/L) | KD (IIaR)/KD<br>(IIb) | 親ポリペプチドのKD<br>(IIaR)/改変ポリ<br>チドのKD (IIaR) | 親ポリペプチドの<br>KD (IIb)/改変ポリ<br>ペプチドのKD (IIb) |
|-------------------|-------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------|
| IL6R-G1d/IL6R-L   |                   | 3.20E-10                     | 1.00E-06                      | 6.70E-07                       | 2.60E-06                     | 3.50E-07                      | 0.4                   | 1.1                                       | 1.2                                        |
| IL6R-B3/IL6R-L    | *1                | 4.20E-10                     | 1.10E-06                      | 7.70E-07                       | 3.10E-06                     | 3.30E-07                      | 0.3                   | 1                                         | 1                                          |
| IL6R-BP230/IL6R-L |                   | 1.40E-08                     | 5.70E-07                      | 9.60E-06                       | 2.10E-08                     | 6.70E-05                      | 27.5                  | 1.9                                       | 149                                        |
| IL6R-BP471/IL6R-L | P331S             | 7.30E-09                     | 8.00E-07                      | 1.20E-05                       | 3.50E-08                     | 7.10E-05                      | 22.7                  | 1.4                                       | 88.1                                       |
| IL6R-BP472/IL6R-L | A330S             | 5.20E-09                     | 3.30E-06                      | 2.40E-05                       | 1.50E-07                     | 3.80E-05                      | 21.5                  | 0.3                                       | 20.3                                       |
| IL6R-BP473/IL6R-L | A327G             | 6.20E-09                     | 3.80E-07                      | 4.80E-06                       | 1.80E-08                     | 3.60E-05                      | 21.1                  | 2.9                                       | 172.2                                      |
| IL6R-BP474/IL6R-L | A330S/P331S       | 4.10E-09                     | 3.00E-06                      | 3.70E-05                       | 1.80E-07                     | 5.50E-05                      | 16.6                  | 0.4                                       | 16.9                                       |
| IL6R-BP475/IL6R-L | A327G/A330S       | 4.90E-09                     | 1.00E-06                      | 1.50E-05                       | 1.10E-07                     | 4.60E-05                      | 9.7                   | 1.1                                       | 29.2                                       |
| IL6R-BP476/IL6R-L | A327G/A330S/P331S | 5.90E-09                     | 1.30E-06                      | 1.90E-05                       | 1.30E-07                     | 4.90E-05                      | 9.7                   | 0.9                                       | 23.7                                       |
| IL6R-BP477/IL6R-L | A327G/P331S       | 9.20E-09                     | 5.10E-07                      | 7.60E-06                       | 3.70E-08                     | 5.80E-05                      | 14                    | 2.2                                       | 84.9                                       |
| IL6R-BP478/IL6R-L | *2                | 7.70E-09                     | 5.40E-07                      | 6.70E-06                       | 1.90E-08                     | 3.50E-05                      | 28                    | 2                                         | 160.6                                      |

【0522】

表 36 に記載された改変体のうち、A327Gの改変が導入されたIL6R-BP473/IL6R-LのFcγRIIbへの結合はIL6R-BP230/IL6R-Lのそれと比較して1.2倍増強されていた。また、IL6R-B

10

20

30

40

50

P230のEUナンバリングで表される118位のAlaから225位のThrまでのアミノ酸が、G4dのEUナンバリングで表される118位のAlaから222位のProまでのアミノ酸に置換されたIL6R-BP478/IL6R-LのFcγRIIbへの結合は、IL6R-BP230/IL6R-Lのそれと比較して1.1倍増強し、IL6R-BP478/IL6R-LのFcγRIIaRへの結合は、IL6R-BP230/IL6R-Lのそれと比較して0.9倍低減していた。いずれの改変体のFcγRIa、FcγRIIaH、FcγRIIaVへの結合活性も、親ポリペプチドであるIL6R-B3/IL6R-Lのそれより低かった。

#### 【0523】

〔参考実施例24〕 FcγRIIbへの結合の増強、選択性の向上をもたらす改変の組合せの検討

参考実施例23までにおいてFcγRIIbへの結合の増強あるいは選択性の向上の面で、効果がみられた改変のさらなる組合せが検討された。具体的には、IL6R-B3（配列番号：164）に対してこれまでの検討の中でFcγRIIbへの結合の増強、および/または選択性の向上をもたらした改変の組合せが導入された。また比較対照として既存のFcγRIIbへの結合を増強する改変（Seungら（Mol. Immunol. (2008) 45, 3926-3933））である、S267E、およびL328Fの改変がIL6R-B3に導入されたIL6R-BP253が作製された。抗体L鎖としてはIL6R-L（配列番号：155）が用いられた。参考実施例1の方法に従い発現した、前記の重鎖の改変体とIL6R-Lの軽鎖を含む抗体が精製された。精製された抗体の各FcγR（FcγRIa、FcγRIIaH、FcγRIIaR、FcγRIIb、FcγRIIaV）に対する結合が、参考実施例2の方法によって評価された。

#### 【0524】

各改変体の各FcγRに対するKD値を表37に示した。なお、表中の改変とはIL6R-B3（配列番号：164）に対して導入された改変を示す。ただし各改変体を作製する際の鑄型としたIL6R-B3/IL6R-Lは\*として示した。親ポリペプチドのKD（IIb）/改変ポリペプチドのKD（IIb）は、IL6R-B3/IL6R-LのFcγRIIbに対するKD値を各改変体のFcγRIIbに対するKD値で除した値を示す。また、親ポリペプチドのKD（IIaR）/改変ポリペプチドのKD（IIaR）は、IL6R-B3/IL6R-LのFcγRIIaRに対するKD値を各改変体のFcγRIIaRに対するKD値で除した値を示す。KD（IIaR）/KD（IIb）とは、各改変体のFcγRIIaRに対するKD値を当該改変体のFcγRIIbに対するKD値で除した値であり、この値が大きいほどFcγRIIaRと比較してFcγRIIbへの選択性が高いことを示す。またKD（IIaH）/KD（IIb）とは、各改変体のFcγRIIaHに対するKD値を当該改変体のFcγRIIbに対するKD値で除した値であり、この値が大きいほどFcγRIIaHと比較してFcγRIIbへの選択性が高いことを示す。なお、表37において灰色で塗りつぶされたセル中の数値は、FcγRのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解析できないと判断されたため、参考実施例2に記載された

〔式2〕

$$KD = C \bullet R_{\max} / (R_{\text{eq}} - RI) - C$$

を利用して算出された数値である。

#### 【0525】

【表 3 7】

| 変異体名              | 変異                                        | Fc $\gamma$ RIaHに<br>対するKD<br>(mol/L) | Fc $\gamma$ RIaRに<br>対するKD<br>(mol/L) | Fc $\gamma$ RIaHに<br>対するKD<br>(mol/L) | Fc $\gamma$ RIIbに<br>対するKD<br>(mol/L) | Fc $\gamma$ RIIbに<br>対するKD<br>(mol/L) | Fc $\gamma$ RIIaVに<br>対するKD<br>(mol/L) | KD (fM)/KT<br>(fM) | KD (fM)/KT<br>(fM) | 親和性/ペプチドのKD<br>(fM) | 親和性/ペプチドのKD<br>(fM) |
|-------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| IL6R-B3/IL6R-L    |                                           | 3.20E-10                              | 1.00E-06                              | 6.70E-07                              | 2.60E-05                              | 3.50E-07                              | 3.50E-07                               | 0.4                | 0.3                | 1.1                 | 1.2                 |
| IL6R-B3/IL6R-L    |                                           | 4.20E-10                              | 1.10E-06                              | 7.70E-07                              | 3.10E-05                              | 3.50E-07                              | 3.50E-07                               | 0.3                | 0.2                | 1                   | 1                   |
| IL6R-BP253/IL6R-L | S267E/L328F                               | 6.70E-11                              | 2.10E-09                              | 1.20E-05                              | 1.10E-08                              | 3.60E-06                              | 3.60E-06                               | 0.2                | 107.1              | 528.8               | 276.8               |
| IL6R-BP265/IL6R-L | G237D/P238D/H268E/P271G/A330R             | 2.30E-08                              | 6.30E-07                              | 1.20E-05                              | 1.50E-08                              | 9.60E-05                              | 9.60E-05                               | 41.2               | 789.5              | 1.8                 | 203.9               |
| IL6R-BP266/IL6R-L | G237D/G237D/P238D/H268E/P271G/A330R       | 1.40E-08                              | 3.20E-07                              | 1.10E-05                              | 1.80E-08                              | 4.00E-05                              | 4.00E-05                               | 18                 | 621.5              | 3.4                 | 178.1               |
| IL6R-BP423/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 7.70E-10                              | 1.80E-07                              | 2.00E-05                              | 3.10E-09                              | 1.60E-05                              | 1.60E-05                               | 34.2               | 390.6              | 6.3                 | 605.1               |
| IL6R-BP423/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 4.10E-09                              | 2.20E-07                              | 1.50E-05                              | 9.10E-09                              | 4.20E-05                              | 4.20E-05                               | 23.6               | 1644.7             | 5.1                 | 339.9               |
| IL6R-BP425/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 1.00E-09                              | 1.60E-07                              | 4.90E-05                              | 5.90E-09                              | 4.10E-05                              | 4.10E-05                               | 27.6               | 8361.8             | 6.8                 | 529                 |
| IL6R-BP425/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 4.90E-09                              | 3.90E-07                              | 4.20E-05                              | 1.40E-08                              | 3.60E-05                              | 3.60E-05                               | 28                 | 3000               | 2.8                 | 221.4               |
| IL6R-BP429/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 6.20E-09                              | 1.70E-07                              | 3.50E-05                              | 5.40E-09                              | 6.40E-05                              | 6.40E-05                               | 31.5               | 648.1              | 6.5                 | 574.1               |
| IL6R-BP430/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 1.70E-08                              | 2.20E-07                              | 1.10E-05                              | 1.20E-08                              | 3.90E-05                              | 3.90E-05                               | 18.5               | 909.1              | 4.9                 | 256.2               |
| IL6R-BP431/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 3.60E-09                              | 4.10E-07                              | 7.60E-06                              | 1.20E-08                              | 3.20E-05                              | 3.20E-05                               | 34.6               | 649.6              | 2.7                 | 265                 |
| IL6R-BP433/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 7.50E-10                              | 6.80E-07                              | 7.30E-06                              | 3.0E-08                               | 2.60E-05                              | 2.60E-05                               | 20                 | 216                | 1.6                 | 91.7                |
| IL6R-BP435/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 5.50E-10                              | 3.40E-07                              | 4.10E-06                              | 1.20E-08                              | 2.40E-05                              | 2.40E-05                               | 27.2               | 333.3              | 3.3                 | 252                 |
| IL6R-BP435/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 1.00E-09                              | 4.20E-07                              | 3.40E-05                              | 1.60E-08                              | 2.20E-05                              | 2.20E-05                               | 27.1               | 217.9              | 2.6                 | 198.7               |
| IL6R-BP438/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 2.60E-10                              | 2.20E-07                              | 2.10E-05                              | 5.10E-09                              | 1.30E-05                              | 1.30E-05                               | 43.8               | 411                | 4.9                 | 606.7               |
| IL6R-BP437/IL6R-L | G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R       | 7.50E-10                              | 2.20E-07                              | 1.40E-05                              | 5.90E-09                              | 1.10E-05                              | 1.10E-05                               | 37.7               | 236.5              | 4.9                 | 523.6               |
| IL6R-BP438/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 2.10E-10                              | 1.80E-07                              | 1.50E-05                              | 6.80E-05                              | 6.80E-05                              | 6.80E-05                               | 32.7               | 263.6              | 6.2                 | 568.8               |
| IL6R-BP439/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 8.70E-09                              | 1.30E-07                              | 2.80E-05                              | 6.10E-09                              | 6.10E-05                              | 6.10E-05                               | 20.9               | 460.5              | 8.7                 | 589.4               |
| IL6R-BP440/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 8.70E-09                              | 1.30E-07                              | 2.80E-05                              | 6.10E-09                              | 6.10E-05                              | 6.10E-05                               | 20.9               | 460.5              | 8.7                 | 589.4               |
| IL6R-BP441/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 1.70E-08                              | 3.60E-07                              | 8.80E-06                              | 1.50E-08                              | 3.70E-05                              | 3.70E-05                               | 24                 | 582.8              | 3                   | 205.3               |
| IL6R-BP442/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 4.50E-09                              | 3.80E-07                              | 4.70E-06                              | 2.30E-08                              | 2.30E-05                              | 2.30E-05                               | 30.6               | 379                | 2.9                 | 250                 |
| IL6R-BP443/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 1.80E-08                              | 5.10E-07                              | 9.50E-05                              | 2.30E-08                              | 2.30E-05                              | 2.30E-05                               | 21.7               | 406                | 2.2                 | 132.5               |
| IL6R-BP444/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 2.00E-09                              | 8.00E-08                              | 1.50E-06                              | 2.60E-09                              | 2.60E-05                              | 2.60E-05                               | 31                 | 581.4              | 13.8                | 1201.6              |
| IL6R-BP445/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 1.00E-08                              | 2.00E-06                              | 4.50E-05                              | 1.20E-07                              | 3.60E-05                              | 3.60E-05                               | 17                 | 375                | 0.5                 | 25.8                |
| IL6R-BP446/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 7.40E-09                              | 3.50E-07                              | 2.80E-05                              | 1.20E-08                              | 2.0E-05                               | 2.0E-05                                | 28.3               | 227.6              | 3.2                 | 252                 |
| IL6R-BP447/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 4.50E-09                              | 1.80E-06                              | 2.10E-05                              | 9.20E-08                              | 3.80E-05                              | 3.80E-05                               | 19.6               | 228.3              | 0.6                 | 33.7                |
| IL6R-BP448/IL6R-L | G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R       | 1.40E-08                              | 2.20E-06                              | 1.10E-07                              | 1.10E-07                              | 1.40E-04                              | 1.40E-04                               | 19.6               | 637.2              | 0.5                 | 27.4                |
| IL6R-BP479/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 5.30E-09                              | 9.00E-07                              | 1.50E-05                              | 5.60E-08                              | 4.60E-05                              | 4.60E-05                               | 16.1               | 268.3              | 1.2                 | 55.5                |
| IL6R-BP480/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 1.30E-08                              | 6.30E-06                              | 2.10E-05                              | 2.00E-07                              | 4.0E-05                               | 4.0E-05                                | 32.1               | 107.7              | 0.2                 | 15.9                |
| IL6R-BP481/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 1.00E-09                              | 4.00E-07                              | 6.80E-06                              | 1.90E-08                              | 2.10E-05                              | 2.10E-05                               | 20.5               | 350.5              | 2.8                 | 159.4               |
| IL6R-BP483/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 1.30E-09                              | 1.30E-06                              | 1.80E-05                              | 7.80E-05                              | 7.80E-05                              | 7.80E-05                               | 16.8               | 230.8              | 0.8                 | 36.7                |
| IL6R-BP484/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 8.20E-10                              | 7.80E-07                              | 1.10E-05                              | 4.60E-08                              | 2.50E-05                              | 2.50E-05                               | 17.1               | 240.7              | 1.4                 | 67.8                |
| IL6R-BP487/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 1.20E-09                              | 3.90E-08                              | 8.40E-07                              | 1.20E-09                              | 1.00E-05                              | 1.00E-05                               | 33.8               | 730.4              | 28.3                | 2695.7              |
| IL6R-BP488/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 2.20E-09                              | 7.40E-08                              | 1.60E-06                              | 1.90E-09                              | 2.00E-05                              | 2.00E-05                               | 40.1               | 864.9              | 14.8                | 1675.7              |
| IL6R-BP489/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 1.30E-09                              | 4.30E-08                              | 8.70E-07                              | 1.00E-09                              | 1.20E-05                              | 1.20E-05                               | 42.8               | 870                | 25.7                | 3100                |
| IL6R-BP490/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 4.50E-09                              | 1.10E-07                              | 2.40E-05                              | 3.00E-09                              | 2.30E-05                              | 2.30E-05                               | 46.7               | 1000               | 9.8                 | 1291.7              |
| IL6R-BP491/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 5.30E-09                              | 1.20E-07                              | 2.20E-05                              | 2.40E-09                              | 2.10E-05                              | 2.10E-05                               | 38.8               | 723.7              | 9.3                 | 1019.7              |
| IL6R-BP492/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 7.90E-10                              | 9.20E-07                              | 1.60E-05                              | 2.40E-08                              | 3.00E-05                              | 3.00E-05                               | 38.8               | 678                | 1.2                 | 131.4               |
| IL6R-BP493/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 8.20E-10                              | 1.10E-06                              | 1.90E-05                              | 2.10E-08                              | 2.50E-05                              | 2.50E-05                               | 52.1               | 900.5              | 1                   | 146.9               |
| IL6R-BP494/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 3.90E-09                              | 2.50E-07                              | 5.40E-06                              | 6.60E-09                              | 4.0E-05                               | 4.0E-05                                | 36.6               | 820.7              | 4.3                 | 471.1               |
| IL6R-BP495/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 8.30E-09                              | 4.90E-07                              | 1.20E-05                              | 9.70E-09                              | 3.0E-05                               | 3.0E-05                                | 50.9               | 1243.5             | 2.2                 | 321.2               |
| IL6R-BP495/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 1.20E-09                              | 4.70E-07                              | 3.70E-05                              | 1.80E-08                              | 3.0E-05                               | 3.0E-05                                | 25.5               | 201.1              | 2.3                 | 168.5               |
| IL6R-BP497/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 2.10E-09                              | 8.50E-08                              | 9.60E-07                              | 4.10E-09                              | 2.80E-05                              | 2.80E-05                               | 21                 | 236.5              | 12.9                | 763.5               |
| IL6R-BP498/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 1.30E-09                              | 5.10E-08                              | 9.30E-07                              | 1.70E-09                              | 1.00E-05                              | 1.00E-05                               | 30.8               | 563.6              | 21.7                | 1878.8              |
| IL6R-BP499/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 1.20E-09                              | 4.90E-08                              | 1.00E-05                              | 1.50E-09                              | 1.20E-05                              | 1.20E-05                               | 33.8               | 684.9              | 22.3                | 2123.3              |
| IL6R-BP500/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 2.30E-09                              | 7.20E-07                              | 2.50E-05                              | 2.40E-08                              | 3.0E-05                               | 3.0E-05                                | 29.9               | 1033.1             | 1.5                 | 128.1               |
| IL6R-BP501/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 2.10E-09                              | 6.30E-07                              | 1.30E-05                              | 2.50E-08                              | 1.90E-05                              | 1.90E-05                               | 25.1               | 555.6              | 1.7                 | 123                 |
| IL6R-BP502/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 2.10E-09                              | 1.10E-07                              | 1.00E-05                              | 3.70E-09                              | 2.10E-05                              | 2.10E-05                               | 35.2               | 352.3              | 10.1                | 840.1               |
| IL6R-BP503/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 1.20E-09                              | 5.70E-08                              | 8.60E-07                              | 1.70E-09                              | 2.10E-05                              | 2.10E-05                               | 33.2               | 502.9              | 19.4                | 1812.9              |
| IL6R-BP504/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 1.40E-09                              | 4.50E-07                              | 1.60E-05                              | 2.40E-08                              | 3.0E-05                               | 3.0E-05                                | 19.5               | 638.4              | 2.4                 | 127.6               |
| IL6R-BP505/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 1.10E-09                              | 4.30E-07                              | 1.10E-05                              | 2.10E-08                              | 3.80E-05                              | 3.80E-05                               | 20                 | 514                | 2.6                 | 144.9               |
| IL6R-BP506/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 3.10E-09                              | 1.20E-07                              | 2.50E-05                              | 3.40E-09                              | 5.50E-05                              | 5.50E-05                               | 35.1               | 731                | 9.2                 | 906.4               |
| IL6R-BP507/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 2.50E-09                              | 1.00E-07                              | 1.80E-05                              | 2.90E-09                              | 2.60E-05                              | 2.60E-05                               | 34.2               | 618.6              | 11.1                | 1065.3              |
| IL6R-BP508/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 1.40E-09                              | 5.40E-07                              | 2.00E-05                              | 2.10E-08                              | 6.10E-05                              | 6.10E-05                               | 26                 | 961.5              | 2                   | 149                 |
| IL6R-BP509/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 1.10E-09                              | 5.20E-07                              | 2.90E-06                              | 1.80E-08                              | 2.30E-05                              | 2.30E-05                               | 29.2               | 443.8              | 2.1                 | 174.2               |
| IL6R-BP510/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 6.00E-09                              | 1.70E-07                              | 4.00E-05                              | 3.80E-09                              | 2.50E-05                              | 2.50E-05                               | 43.5               | 1041.7             | 6.6                 | 807.3               |
| IL6R-BP511/IL6R-L | E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R | 6.00E-09                              | 1.80E-07                              | 4.30E-05                              | 3.50E-09                              | 7.10E-05                              | 7.10E-05                               | 30.6               | 1235.6             | 6.3                 | 890.8               |

【0 5 2 6】

表 3 7 に記載された変異体のうち、Fc $\gamma$ RIIbへの結合を増強する既存の変異が加えられた IL6R-BP253/IL6R-L の Fc $\gamma$ RIIb および Fc $\gamma$ RIIaR に対する結合活性は、変異導入前の IL6R-B3/IL6R-L のそれと比較して、それぞれ 277 倍、および 529 倍増強された。また、IL6R-BP253/IL6R-L の Fc $\gamma$ RIa への結合活性も IL6R-B3/IL6R-L のそれよりも増強されていた。一方、IL6R-BP253/IL6R-L の Fc $\gamma$ RIIaH および Fc $\gamma$ RIIaV への結合は IL6R-B3/IL6R-L のそれと比較して減弱していた。その他の変異体のうち、IL6R-BP436/IL6R-L と IL6R-BP438/IL6R-L の Fc $\gamma$ RIa への結合が、変異導入前の IL6R-B3/IL6R-L のそれと比較してわずかに増強されたが、それ以外の変異体の Fc $\gamma$ RIa への結合はいずれも減弱していた。また、いずれの変異体の Fc $\gamma$ RIIaH、および Fc $\gamma$ RIIaV への結合も、IL6R-B3/IL6R-L のそれと比較して減弱して

10

20

30

40

50

いた。

#### 【0527】

IL6R-BP489/IL6R-L、IL6R-BP487/IL6R-L、IL6R-BP499/IL6R-L、IL6R-BP498/IL6R-L、IL6R-BP503/IL6R-L、IL6R-BP488/IL6R-L、IL6R-BP490/IL6R-L、IL6R-BP445/IL6R-L、IL6R-BP507/IL6R-L、IL6R-491/IL6R-L、IL6R-BP506/IL6R-L、IL6R-BP511/IL6R-L、IL6R-BP502/IL6R-L、IL6R-BP510/IL6R-L、IL6R-BP497/IL6R-L、IL6R-BP436/IL6R-L、IL6R-BP423/IL6R-L、IL6R-BP440/IL6R-L、IL6R-BP429/IL6R-L、IL6R-BP438/IL6R-L、IL6R-BP426/IL6R-L、IL6R-BP437/IL6R-L、IL6R-BP439/IL6R-L、IL6R-BP494/IL6R-L、IL6R-BP425/IL6R-L、IL6R-BP495/IL6R-LのFc $\gamma$ RIIbへの結合は、Fc $\gamma$ RIIbへの結合を増強する既存の改変が加えられたIL6R-BP253/IL6R-Lのそれと比較して上回った。これらの中でFc $\gamma$ RIIbへの結合が最も低かったIL6R-BP495/IL6R-Lから、最も高かったIL6R-BP489/IL6R-Lまでの増強の幅は、IL6R-B3/IL6R-Lの結合を1とした場合に321倍から3100倍までであった。

10

#### 【0528】

KD (IIaR)/KD (IIb)の値は、最も低かったIL6R-BP479/IL6R-Lで16.1、最も高かったIL6R-BP493/IL6R-Lで52.1であり、いずれの改変体もIL6R-BP253/IL6R-Lの0.2と比較して高かった。またKD (IIaH)/KD (IIb)の値は、最も低かったIL6R-BP480/IL6R-Lで107.7、最も高かったIL6R-BP426/IL6R-Lで8362であり、いずれの改変体もIL6R-BP253/IL6R-Lの107.1と比較して高かった。これらの結果から、表37に示された改変体のFc $\gamma$ RIIbに対する結合活性は、Fc $\gamma$ RIIbに対する結合を増強する既存の改変が加えられた改変体と比較していずれも増強されていた。さらに、表37に示された改変体のFc $\gamma$ RIIbに対する選択性は、Fc $\gamma$ R IIaRおよびFc $\gamma$ R IIaHのいずれを問わず既存の改変が加えられた改変体よりも向上していた。

20

#### 【0529】

〔参考実施例25〕 ファージディスプレイ技術を用いたヒト抗体ライブラリからのCa依存的にIL-6レセプターに結合する抗体の取得

##### (25-1) ナイーブヒト抗体ファージディスプレイライブラリの作製

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

30

#### 【0530】

(25-2) ビーズパンニングによるライブラリからのCa依存的に抗原に結合する抗体断片の取得

構築されたナイーブヒト抗体ファージディスプレイライブラリからの最初の選抜は、抗原(IL-6レセプター)への結合能をもつ抗体断片のみの濃縮、または、Ca濃度依存的な抗原(IL-6レセプター)への結合能を指標とした抗体断片の濃縮によって実施された。Ca濃度依存的な抗原(IL-6レセプター)への結合能を指標として抗体断片の濃縮は、CaイオンをキレートするEDTAを用いてCaイオン存在下でIL-6レセプターと結合させたファージライブラリからファージを溶出することによって実施された。抗原としてビオチン標識されたIL-6レセプターが用いられた。

40

#### 【0531】

構築したファージディスプレイ用ファージミドを保持した大腸菌からファージ産生が行われた。ファージ産生が行われた大腸菌の培養液に2.5 M NaCl/10%PEGを添加することによって沈殿させたファージの集団をTBSにて希釈することによってファージライブラリ液が得られた。次に、ファージライブラリ液に終濃度4%BSAおよび1.2mMカルシウムイオン濃度となるようにBSAおよびCaCl<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-coat

50

ed) もしくはStreptavidin coated beads (Dynabeads M-280 Streptavidin) が用いられた。

#### 【0532】

具体的には、調製されたファージライブラリ液に250 pmolのビオチン標識抗原を加えることによって、当該ファージライブラリ液を室温にて60分間抗原と接触させた。BSAでブロッキングされた磁気ビーズが加えられ、抗原とファージとの複合体を磁気ビーズと室温にて15分間結合させた。ビーズは1 mLの1.2 mM  $\text{CaCl}_2$ /TBS (1.2 mM  $\text{CaCl}_2$ を含むTBS) にて1回洗浄された。その後、IL-6レセプターへの結合能をもつ抗体断片を濃縮する場合には、一般的な方法を用いた溶出によって、Ca濃度依存的なIL-6レセプターへの結合能を指標として抗体断片を濃縮する場合には、2 mM EDTA/TBS (2mMEDTAを含むTBS) に懸濁されたビーズからの溶出によって、ファージ溶液が回収された。回収されたファージ溶液が、対数増殖期 (OD600が0.4-0.7) となった10 mLの大腸菌株TG1に添加された。37℃で1時間緩やかに上記大腸菌の攪拌培養を行うことによって、ファージを大腸菌に感染させた。感染させた大腸菌は、225 mm x 225 mmのプレートへ播種された。次に、播種された大腸菌の培養液からファージを回収することによって、ファージライブラリ液が調製された。

10

#### 【0533】

2回目以降のパンニングでは、Ca依存的結合能を指標にファージの濃縮が行われた。具体的には、調製したファージライブラリ液に40 pmolのビオチン標識抗原を加えることによって、ファージライブラリを室温で60分間抗原と接触させた。BSAでブロッキングされた磁気ビーズが加えられ、抗原とファージとの複合体を磁気ビーズと室温で15分間結合させた。ビーズは1 mLの1.2 mM  $\text{CaCl}_2$ /TBSTと1.2 mM  $\text{CaCl}_2$ /TBSにて洗浄された。その後0.1 mLの2 mM EDTA/TBSが加えられたビーズは室温で懸濁された後、即座に磁気スタンドを用いてビーズが分離され、ファージ溶液が回収された。回収されたファージ溶液が、対数増殖期 (OD600が0.4-0.7) となった10 mLの大腸菌株TG1に添加された。37℃で1時間緩やかに上記大腸菌の攪拌培養を行うことによって、ファージを大腸菌に感染させた。感染させた大腸菌は225 mm x 225 mmのプレートへ播種された。次に、播種された大腸菌の培養液からファージを回収することによってファージライブラリ液が回収された。Ca依存的結合能を指標とするパンニングが複数回繰り返された。

20

#### 【0534】

##### (25-3) ファージELISAによる評価

30

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。

#### 【0535】

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 $\text{CaCl}_2$ が加えられたファージを含有する培養上清が以下の手順でELISAに供された。StreptaWell 96マイクロタイタープレート (Roche) がビオチン標識抗原を含む100  $\mu\text{L}$ 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  $\mu\text{L}$ の4%BSA-TBSにてブロッキングされた。4%BSA-TBSが除かれた各ウェルに調製された培養上清が加えられた当該プレートを37℃で1時間静置することによって、ファージを提示する抗体を各ウェルに存在する抗原に結合させた。1.2 mM  $\text{CaCl}_2$ /TBSTにて洗浄された各ウェルに、1.2 mM  $\text{CaCl}_2$ /TBSもしくは1 mM EDTA/TBSが加えられ、当該プレートは37℃で30分間静置しインキュベートされた。1.2 mM  $\text{CaCl}_2$ /TBSTにて洗浄された後に、終濃度4%のBSAおよび1.2 mMのイオン化カルシウム濃度としたTBSによって希釈されたHRP結合抗M13抗体 (Amersham Pharmacia Biotech) が各ウェルに添加されたプレートを1時間インキュベートさせた。1.2 mM  $\text{CaCl}_2$ /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。

40

#### 【0536】

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

50

た。

### 【0537】

#### (25-4) 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。CO<sub>2</sub>インキュベーター (37度、8%CO<sub>2</sub>、90 rpm) 中で4日間培養が行われる。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)。

### 【0538】

〔参考実施例26〕 取得された抗体のヒトIL-6レセプターに対するCa依存の結合能の評価

参考実施例25で取得された抗体6RL#9-IgG1 (重鎖配列番号: 117、軽鎖配列番号: 118)、および、FH4-IgG1 (重鎖配列番号: 115、軽鎖配列番号: 116) のヒトIL-6レセプターに対する結合活性がCa依存性であるかどうかを判断するため、これらの抗体とヒトIL-6レセプターとの抗原抗体反応の速度論的解析がBiacore T100 (GE Healthcare) を用いて行われた。ヒトIL-6レセプターに対するCa依存性の結合活性を有しない対照抗体として、W02009/125825に記載されているH54/L28-IgG1 (重鎖配列番号: 113、軽鎖配列番号: 114) が用いられた。高カルシウムイオン濃度および低カルシウムイオン濃度の条件として、それぞれ2 mMおよび3  $\mu$ Mのカルシウムイオン濃度の溶液中で抗原抗体反応の速度論的解析が行われた。アミンカップリング法でProtein A (Invitrogen) が適量固定化されたSensor chip CM4 (GE Healthcare) 上に、目的の抗体がキャプチャーされた。ランニングバッファーには10 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% (w/v) Tween20、2 mM CaCl<sub>2</sub> (pH7.4) または10 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% (w/v) Tween20、3  $\mu$ mol/L CaCl<sub>2</sub> (pH7.4) の2種類の緩衝液が用いられた。ヒトIL-6レセプターの希釈にもそれぞれのバッファーが使用された。測定は全て37°Cで実施された。

### 【0539】

H54L28-IgG1抗体を用いた抗原抗体反応の速度論的解析に際して、IL-6レセプターの希釈液とブランクであるランニングバッファーを流速20  $\mu$ L/minで3分間インジェクトすることによって、センサーチップ上にキャプチャーさせたH54L28-IgG1抗体にIL-6レセプターを相互作用させた。その後、流速20  $\mu$ L/minで10分間ランニングバッファーを流しIL-6レセプターの解離が観察された後、10 mM Glycine-HCl (pH1.5) を流速30  $\mu$ L/minで30秒間インジェクトすることによって、センサーチップが再生された。測定で得られたセンサーグラムから、カインेटイ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) が算出された。これらの値を用いてH54L28-IgG1抗体のヒトIL-6レセプターに対する解離定数KD (M) が算出された。各パラメーターの算出にはBiacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare) が用いられた。

### 【0540】

FH4-IgG1抗体および6RL#9-IgG1抗体を用いた抗原抗体反応の速度論的解析に際しては、IL-6レセプターの希釈液とブランクであるランニングバッファーを流速5  $\mu$ L/minで15分間インジェクトすることによって、センサーチップ上にキャプチャーさせたFH4-IgG1抗体または6RL#9-IgG1抗体にIL-6レセプターを相互作用させた。その後、10 mM Glycine-HCl (pH1.5) を流速30  $\mu$ L/minで30秒間インジェクトすることによって、センサーチップが再生された。測定で得られたセンサーグラムからsteady state affinity modelを使って解離定数KD (M) が算出された。各パラメーターの算出には Biacore T100 Evaluation Softwa

re (GE Healthcare) が用いられた。

#### 【0541】

この方法により決定された2 mM  $\text{CaCl}_2$  存在下における各抗体とIL-6レセプターとの解離定数KDを表38に示す。

#### 【0542】

#### 【表38】

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

#### 【0543】

Ca濃度が3  $\mu\text{M}$ の条件下でのH54/L28-IgG1抗体のKDは、2 mM Ca濃度存在下と同様の方法で算出することが可能である。Ca濃度が3  $\mu\text{M}$ の条件下では、FH4-IgG1抗体および6RL#9-IgG1抗体は、IL-6レセプターに対する結合はほとんど観察されなかったため、上記の方法によるKDの算出は困難である。しかし、下記の式1 (Biacore T100 Software Handbook, BR-1006-48, AE 01/2007) を用いることによって、Ca濃度が3  $\mu\text{M}$ の条件下でのこれらの抗体のKDを予測することが可能である。

#### 【0544】

(式1)

$$\text{Req} = C \times \text{Rmax} / (\text{KD} + C) + \text{RI}$$

#### 【0545】

上記(式1)中の各項目の意味は下記；

Req (RU)：定常状態結合レベル (Steady state binding levels)

Rmax (RU)：アナライトの表面結合能 (Analyte binding capacity of the surface)

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

C (M)：アナライト濃度 (Analyte concentration)

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

で表される。

#### 【0546】

上記の(式1)を用いた、Ca濃度が3  $\mu\text{M}$ の場合の各抗体とIL-6レセプターとの解離定数KDの予測される概算結果を表39に示す。表39中の、Req、Rmax、RI、Cは測定結果を基に仮定された値である。

#### 【0547】

#### 【表39】

| 抗体        | H54/L28-IgG1 | FH4-IgG1 | 6RL#9-IgG1 |
|-----------|--------------|----------|------------|
| Req (RU)  |              | 5        | 10         |
| Rmax (RU) |              | 39       | 72         |
| RI (RU)   |              | 0        | 0          |
| C (M)     |              | 5E-06    | 5E-06      |
| KD (M)    | 2.2E-9       | 3.4E-05  | 3.1E-05    |

#### 【0548】

上記の結果から、FH4-IgG1抗体および6RL#9-IgG1抗体は、バッファー中の $\text{CaCl}_2$ の濃度を2 mMから3  $\mu\text{M}$ に減少することで、IL-6レセプターに対するKDがそれぞれ約60倍、約120倍上昇(60倍、120倍以上アフィニティーが低減)すると予測された。

#### 【0549】

表40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IL-6レセプターに対するKD値、および、KD値のCa依存性についてまとめた。

10

20

30

40

50

【0550】

【表40】

| 抗体                               | H54/L28-IgG1 | FH4-IgG1  | 6RL#9-IgG1 |
|----------------------------------|--------------|-----------|------------|
| KD (M) (2 mM CaCl <sub>2</sub> ) | 1.9E-9       | 5.9E-7    | 2.6E-7     |
| KD (M) (3 μM CaCl <sub>2</sub> ) | 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  |

【0551】

Ca濃度の違いによるH54/L28-IgG1抗体のIL-6レセプターに対する結合の違いは観察されなかった。その一方、低濃度のCa条件下ではFH4-IgG1抗体および6RL#9-IgG1抗体のIL-6レセプターに対する結合の著しい減弱が観察された（表40）。

10

【0552】

〔参考実施例27〕 取得された抗体へのカルシウムイオン結合評価

次に、抗体へのカルシウムイオンの結合の評価の指標として、示差走査型熱量測定（DSC）による熱変性中間温度（T<sub>m</sub>値）が測定された（MicroCal VP-Capillary DSC、MicroCal）。熱変性中間温度（T<sub>m</sub>値）は安定性の指標であり、カルシウムイオンの結合によってタンパク質が安定化すると、熱変性中間温度（T<sub>m</sub>値）はカルシウムイオンが結合していない場合に比べて高くなる（J. Biol. Chem. (2008) 283, 37, 25140-25149）。抗体溶液中のカルシウムイオン濃度の変化に応じた抗体のT<sub>m</sub>値の変化を評価することによって、抗体へのカルシウムイオンの結合活性が評価された。精製された抗体が20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、2 mM CaCl<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）を表41に示す。

20

【0553】

【表41】

| 抗体           | カルシウムイオン濃度 |       | ΔT <sub>m</sub> (°C) |
|--------------|------------|-------|----------------------|
|              | 3 μM       | 2 mM  | 2 mM-3 μM            |
| H54/L28-IgG1 | 92.87      | 92.87 | 0.00                 |
| FH4-IgG1     | 74.71      | 78.97 | 4.26                 |
| 6RL#9-IgG1   | 77.77      | 78.98 | 1.21                 |

30

【0554】

表41の結果から、カルシウム依存的結合能を示すFH4-IgG1抗体および6RL#9-IgG1抗体のFabのT<sub>m</sub>値はカルシウムイオンの濃度の変化により変動し、カルシウム依存的結合能を示さないH54/L28-IgG1抗体のFabのT<sub>m</sub>値はカルシウムイオンの濃度の変化により変動しないことが示された。FH4-IgG1抗体および6RL#9-IgG1抗体のFabのT<sub>m</sub>値の変動は、これらの抗体にカルシウムイオンが結合し、Fab部分が安定化したことを示している。上記の結果より、FH4-IgG1抗体および6RL#9-IgG1抗体にはカルシウムイオンが結合し、一方でH54/L28-IgG1抗体にはカルシウムイオンが結合していないことが示された。

40

【0555】

〔参考実施例28〕 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

（28-1）X線結晶構造解析

参考実施例27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T<sub>m</sub>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

50

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。

#### 【0556】

##### (28-2) 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：117）と軽鎖（配列番号：118）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℃、8%CO<sub>2</sub>、90 rpm）中で5日間培養された。rProtein A Sepharose™ Fast Flow（Amersham Biosciences）を用いた当業者公知の方法にしたがって、上記のように得られた培養上清から抗体が精製された。分光光度計を用いて精製された抗体溶液の280 nmでの吸光度が測定された。PACE法により算出された吸光係数を用いて測定値から抗体濃度が算出された（Protein Science（1995）4，2411-2423）。

#### 【0557】

##### (28-3) 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に希釈された2.5 mLの当該抗体の試料が調製された。0.125 mgのPapain（Roche Applied Science）を加えて攪拌された当該試料が35℃にて2時間静置された。静置後、プロテアーゼインヒビターカクテルミニ、EDTAフリー（Roche Applied Science）1錠を溶かした10 mLの25 mM MES 緩衝液（pH6）をさらに当該試料に加え、水中に静置することによって、Papainによるプロテアーゼ反応が停止された。次に、当該試料が、下流に1 mLサイズのProteinA担体カラムHiTrap MabSelect Sure（GE Healthcare）がタンデムにつながれた25 mM MES 緩衝液（pH6）で平衡化された1 mLサイズの陽イオン交換カラムHiTrap SP HP（GE Healthcare）に添加された。同緩衝液中NaCl濃度を300 mMまで直線的に上げて溶出をおこなうことで6RL#9抗体のFabフラグメントの精製画分が得られた。次に、得られた精製画分が5000MWCOの限外ろ過膜により0.8 mL程度まで濃縮された。50 mM NaCl を含む100 mM HEPES緩衝液（pH 8）で平衡化されたゲルろ過カラムSuperdex 200 10/300 GL（GE Healthcare）に濃縮液が添加された。結晶化用の精製6RL#9抗体のFabフラグメントが同緩衝液を用いてカラムから溶出された。なお、上記のすべてのカラム操作は6から7.5℃の低温下にて実施された。

#### 【0558】

##### (28-4) 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℃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。

#### 【0559】

##### (28-5) 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  $\mu$ Lのリザーバー溶液および0.8  $\mu$ L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  $\mu$ L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。

#### 【0560】

##### (28-6) 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°C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 Åまでの回折強度データが得られた。本結晶は、空間群 $P2_12_12_1$ に属し、格子定数  $a = 45.47 \text{ \AA}$ 、 $b = 79.86 \text{ \AA}$ 、 $c = 116.25 \text{ \AA}$ 、 $\alpha = 90^\circ$ 、 $\beta = 90^\circ$ 、 $\gamma = 90^\circ$  であった。

#### 【0561】

##### (28-7) 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°C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 Åまでの回折強度データが得られた。本結晶は、空間群 $P2_12_12_1$ に属し、格子定数  $a = 45.40 \text{ \AA}$ 、 $b = 79.63 \text{ \AA}$ 、 $c = 116.07 \text{ \AA}$ 、 $\alpha = 90^\circ$ 、 $\beta = 90^\circ$ 、 $\gamma = 90^\circ$  であり、Ca存在下の結晶と同型であった。

#### 【0562】

##### (28-8) 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 Å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2Fo-Fc、Fo-Fcを係数とする電子密度マップを参照しながらモデル修正を繰り返しプログラムCoot (Paul Emsley) 上でおこなうことによってモデルの精密化がおこなわれた。最後に2Fo-Fc、Fo-Fcを係数とする電子密度マップをもとにCaイオンおよび水分子をモデルに組み込むことによって、プログラムRefmac5 (CCP4 Software Suite) を用いて精密化がおこなわれた。分解能25-2.2 Å 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。

#### 【0563】

##### (28-9) 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解析

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イオン分子が除かれ、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 Å 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 Å の18357個の反射データを用いることによって、最終的に351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。

#### 【0564】

##### (28-10) 6RL#9抗体のFabフラグメントのCa存在または非存在下での結晶のX線回折データの比較

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54に示す。具体的には、Ca存在下での6RL#9抗体のFabフラグメントの結晶では、重鎖CDR3ループ部分の中心部分にカルシウムイオンが存在していた。カルシウムイオンは、重鎖CDR3の95位、96位および100a位 (Kabatナンバリング) と相互作用していると考えられた。Ca存在下では、抗原との結合に重要である重鎖CDR3ループがカルシウムと結合することによって安定化し、抗原との結合に最適な構造となっていることが考えられた。抗体の重鎖CDR3にカルシウムが結合する例は今までに報告されておらず、抗体の重鎖CDR3にカルシウムが結合した構造は新規な構造である。

#### 【0565】

6RL#9抗体のFabフラグメントの構造から明らかになった重鎖CDR3に存在するカルシウム結合モチーフは、本発明の抗原結合分子に含まれる、カルシウムイオン濃度によって抗原結合活性が変化する抗原結合ドメインを取得する際に使用されるCaライブラリのデザインの新たな要素となり得る。後述される参考実施例38および39では軽鎖可変領域にカルシウム結合モチーフが導入されたが、たとえば6RL#9抗体の重鎖CDR3を含み、軽鎖を含めたそれ以外のCDRにフレキシブル残基を含むライブラリが考えられる。

#### 【0566】

〔参考実施例29〕 ファージディスプレイ技術を用いたヒト抗体ライブラリからのCa依存的にIL-6に結合する抗体の取得

##### (29-1) ナイブヒト抗体ファージディスプレイライブラリの作製

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

#### 【0567】

##### (29-2) ビーズパンニングによるライブラリからのCa依存的に抗原に結合する抗体断片の取得

10

20

30

40

50

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

構築したファージディスプレイ用ファージミドを保持した大腸菌からファージ産生が行われた。ファージ産生が行われた大腸菌の培養液に2.5 M NaCl/10%PEGを添加することによって沈殿させたファージの集団をTBSにて希釈することによってファージライブラリ液が得られた。次に、ファージライブラリ液に終濃度4%BSAおよび1.2mMカルシウムイオン濃度となるようにBSAおよびCaCl<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、Biootechnol. 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。

#### 【0568】

具体的には、調製されたファージライブラリ液に250 pmolのビオチン標識抗原を加えることによって、当該ファージライブラリ液を室温にて60分間抗原と接触させた。BSAでブロッキングされた磁気ビーズが加えられ、抗原とファージとの複合体を磁気ビーズと室温にて15分間結合させた。ビーズは1.2 mM CaCl<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0.4-0.7）となった10 mLの大腸菌株TG1に添加された。37℃で1時間緩やかに上記大腸菌の攪拌培養を行うことによって、ファージを大腸菌に感染させた。感染させた大腸菌は、225 mm x 225 mmのプレートへ播種された。次に、播種された大腸菌の培養液からファージを回収することによって、ファージライブラリ液が調製された。

#### 【0569】

2回目以降のパンニングでは、Ca依存的結合能を指標にファージの濃縮が行われた。具体的には、調製したファージライブラリ液に40 pmolのビオチン標識抗原を加えることによって、ファージライブラリを室温で60分間抗原と接触させた。BSAでブロッキングされた磁気ビーズが加えられ、抗原とファージとの複合体を磁気ビーズと室温で15分間結合させた。ビーズは1 mLの1.2 mM CaCl<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℃で1時間緩やかに上記大腸菌の攪拌培養を行うことによって、ファージを大腸菌に感染させた。感染させた大腸菌は225 mm x 225 mmのプレートへ播種された。次に、播種された大腸菌の培養液からファージを回収することによってファージライブラリ液が回収された。Ca依存的結合能を指標とするパンニングが3回繰り返された。

#### 【0570】

##### （29-3）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  $\mu$ L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  $\text{CaCl}_2$ /TBSTにて洗浄された各ウェルに、1.2 mM  $\text{CaCl}_2$ /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  $\text{CaCl}_2$ /TBSTにて洗浄された後に、終濃度4%のBSAおよび1.2 mMのイオン化カルシウム濃度としたTBSによって希釈されたHRP結合抗M13抗体（Amersham Pharmacia Biotech）が各ウェルに添加されたプレートを1時間インキュベートさせた。1.2 mM  $\text{CaCl}_2$ /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。

10

#### 【0571】

単離された96クローンを用いてファージELISAを行うことによって、IL-6に対するCa依存的な結合能を有する6KC4-1#85抗体が得られた。上記のファージELISAの結果、Ca依存的な抗原に対する結合能があると判断される抗体断片を鋳型として特異的なプライマーによって増幅された遺伝子の塩基配列解析が行われた。6KC4-1#85抗体の重鎖可変領域の配列は配列番号：119に、および軽鎖可変領域の配列は配列番号：120に記載されている。6KC4-1#85抗体の重鎖可変領域（配列番号：119）をコードするポリヌクレオチドが、PCR法によってIgG1由来配列をコードするポリヌクレオチドと連結されたDNA断片が、動物細胞発現用ベクターに組み込まれ、配列番号：121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：120）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：54）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。

20

#### 【0572】

##### （29-4）抗体の発現と精製

ファージELISAの結果、Ca依存的な抗原に対する結合能があると判断されたクローン6KC4-1#85が、動物細胞発現用プラスミドへ導入された。抗体の発現は以下の方法を用いて行われた。ヒト胎児腎細胞由来FreeStyle 293-F株（Invitrogen）がFreeStyle 293 Expression Medium培地（Invitrogen）に懸濁され、 $1.33 \times 10^6$ 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ずつ播種された。調製されたプラスミドは、リポフェクション法によって細胞へ導入された。CO<sub>2</sub>インキュベーター（37度、8%CO<sub>2</sub>、90 rpm）中で4日間培養が行われる。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）。

30

#### 【0573】

〔参考実施例30〕 6KC4-1#85抗体のカルシウムイオン結合評価

ヒト抗体ライブラリから取得されたカルシウム依存的抗原結合抗体6KC4-1#85抗体がカルシウムと結合するか評価された。イオン化カルシウム濃度が異なる条件で、測定されるT<sub>m</sub>値が変動するか否かが参考実施例27に記載された方法に準じて評価された。

40

#### 【0574】

6KC4-1#85抗体のFabドメインのT<sub>m</sub>値を表42に示す。表42に示すように、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。

#### 【0575】

【表 4 2】

| 抗体        | カルシウムイオン濃度 |       | $\Delta T_m$ (°C) |
|-----------|------------|-------|-------------------|
|           | 3 $\mu$ M  | 2 mM  |                   |
| 6KC4-1#85 | 71.49      | 75.39 | 3.9               |

【0576】

〔参考実施例 3 1〕 6KC4-1#85抗体のカルシウムイオン結合部位の同定

参考実施例 3 0 で示されるように、6KC4-1#85抗体はカルシウムイオンと結合することが示されたが、6KC4-1#85はhVk5-2配列の検討から明らかになったカルシウム結合モチーフを持たない。そこで、カルシウムイオンが6KC4-1#85抗体の重鎖に結合するのか、軽鎖に結合するのかまたは両者に結合するのかを確認するために、カルシウムイオンと結合しない抗グリピカン3抗体（重鎖配列GC\_H（配列番号：55）、軽鎖配列GC\_L（配列番号：56））と、重鎖と軽鎖をそれぞれ交換した改変抗体に対するカルシウムイオンの結合が評価された。参考実施例 2 7 に示される方法に準じて測定された改変抗体の $T_m$ 値が表 4 3 に示されている。その結果、6KC4-1#85抗体の重鎖をもつ改変抗体の $T_m$ 値がカルシウムイオンの濃度によって変化するため、6KC4-1#85抗体の重鎖でカルシウムと結合していると考えられた。

【0577】

【表 4 3】

| 重鎖        | 軽鎖        | カルシウムイオン濃度 |       | $\Delta T_m$ (°C) 2 mM-3 $\mu$ M |
|-----------|-----------|------------|-------|----------------------------------|
|           |           | 3 $\mu$ M  | 2 mM  |                                  |
| 6KC4-1#85 | 6KC4-1#85 | 71.46      | 75.18 | 3.72                             |
| 6KC4-1#85 | GC_L      | 78.87      | 80.01 | 1.14                             |
| GC_H      | 6KC4-1#85 | 75.69      | 75.94 | 0.25                             |
| GC_H      | GC_L      | 79.94      | 80.01 | 0.07                             |

【0578】

そこで、さらに6KC4-1#85抗体の重鎖のどの残基とカルシウムイオンが結合しているか同定するために、6KC4-1#85抗体のCDRに存在するAsp (D) 残基をカルシウムイオンの結合もしくはキレートに関与できないAla (A) 残基に置換した改変重鎖（6\_H1-11（配列番号：126）、6\_H1-12（配列番号：127）、6\_H1-13（配列番号：128）、6\_H1-14（配列番号：129）、6\_H1-15（配列番号：130））、または改変軽鎖（6\_L1-5（配列番号：131）および6\_L1-6（配列番号：132））が作製された。改変抗体遺伝子を含む発現ベクターが導入された動物細胞の培養液から、改変抗体が参考実施例 2 9 に記載された方法にしたがって精製された。精製された改変抗体のカルシウム結合が、参考実施例 2 7 に記載された方法に準じて測定された。測定された結果を表 4 4 に示す。表 4 4 に示すように、6KC4-1#85抗体の重鎖CDR3の95位または101位（Kabatナンバリング）をAla残基に置換することによって6KC4-1#85抗体のカルシウム結合能が失われることから、この残基がカルシウムとの結合に重要であると考えられる。6KC4-1#85抗体の改変抗体のカルシウム結合性から明らかになった6KC4-1#85抗体の重鎖CDR3のループ付け根付近に存在するカルシウム結合モチーフは、本発明の抗原結合分子に含まれる、カルシウムイオン濃度によって抗原結合活性が変化する抗原結合ドメインを取得する際に使用されるCaライブラリのデザインの新たな要素となり得る。後述される参考実施例 3 8 および 3 9 では軽鎖可変領域にカルシウム結合モチーフが導入されたが、たとえば6KC4-1#85抗体の重鎖CDR3を含み、軽鎖を含めたそれ以外のCDRにフレキシブル残基を含むライブラリが考えられる。

【0579】

【表 4 4】

| 重鎖        | 軽鎖        | 改変残基                     | カルシウムイオン濃度 |       | $\Delta T_m$ (°C) |
|-----------|-----------|--------------------------|------------|-------|-------------------|
|           |           |                          | 3 $\mu$ M  | 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              |

## 【0580】

〔参考実施例 3 2〕 ノーマルマウスを用いたCa依存性結合抗体の抗原の血漿中滞留性への影響の評価

## (32-1) 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：参考実施例 3 にて作製) を単独投与もしくはhsIL-6Rおよび抗ヒトIL-6レセプター抗体を同時投与した後のhsIL-6Rおよび抗ヒトIL-6レセプター抗体の体内動態が評価された。hsIL-6R溶液 (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が尾静脈に10 mL/kgで単回投与された。抗ヒトIL-6レセプター抗体としては、前記のH54/L28-IgG1、6RL#9-IgG1、FH4-IgG1が使用された。

## 【0581】

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であり、このとき、hsIL-6Rに対して抗ヒトIL-6レセプター抗体は十分量過剰に存在することから、hsIL-6Rは大部分が抗体に結合していると考えられる。投与後15分、7時間、1日、2日、4日、7日、14日、21日、28日の時点で採血が行われた。採取された血液を直ちに4°C、12,000 rpmで15分間遠心分離することによって、血漿が得られた。分離された血漿は、測定を実施するまで-20°C以下に設定された冷凍庫で保存された。

## 【0582】

(32-2) ELISA法によるノーマルマウス血漿中の抗ヒトIL-6レセプター抗体濃度の測定

マウス血漿中の抗ヒトIL-6レセプター抗体濃度はELISA法にて測定された。まずAnti-Hu

10

20

30

40

50

man 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晩静置することによって Anti-Human IgG固相化プレートが作成された。血漿中濃度として0.64、0.32、0.16、0.08、0.04、0.02、0.01  $\mu\text{g/mL}$ の検量線試料および100倍以上希釈されたマウス血漿測定試料のそれぞれが分注されたAnti-Human IgG固相化プレートが25℃で1時間インキュベーションされた。その後Biotinylated Anti-human IL-6 R Antibody (R&D) を25℃で1時間反応させた後にStreptavidin-PolyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies) を25℃で0.5時間反応させた。TMB One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories) を基質として用いて発色反応が行われた。1N-Sulfuric acid (Showa Chemical) によって発色反応が停止された後、マイクロプレートリーダーを用いて発色液の450 nmにおける吸光度が測定された。解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて、マウス血漿中濃度が検量線の吸光度を基準として算出された。この方法で測定された静脈内投与後のノーマルマウスにおけるH54/L28-IgG1、6RL#9-IgG1、FH4-IgG1の血漿中の抗体濃度の推移が図55に示されている。

#### 【0583】

##### (32-3) 電気化学発光法による血漿中のhsIL-6R濃度の測定

マウスの血漿中hsIL-6R濃度は電気化学発光法にて測定された。2000、1000、500、250、125、62.5、31.25  $\text{pg/mL}$ に調整されたhsIL-6R検量線試料および50倍以上希釈されたマウス血漿測定試料と、SULFO-TAG NHS Ester (Meso Scale Discovery) でルテニウム化したMonoclonal Anti-human IL-6R Antibody (R&D)、Biotinylated Anti-human IL-6 R Antibody (R&D) およびトシリズマブ(重鎖配列番号: 111、軽鎖配列番号: 112) 溶液との混合液を4℃で1晩反応させた。サンプル中のFree Ca濃度を低下させ、サンプル中のほぼ全てのhsIL-6Rが6RL#9-IgG1もしくはFH4-IgG1から解離し、添加したトシリズマブと結合した状態とするために、その際のAssay bufferには10 mM EDTAが含まれていた。その後、当該反応液がMA400 PR Streptavidin Plate (Meso Scale Discovery) に分注された。さらに25℃で1時間反応させたプレートの各ウェルが洗浄された後、各ウェルにRead Buffer T ( $\times 4$ ) (Meso Scale Discovery) が分注された。ただちに反応液はSECTOR PR 400 reader (Meso Scale Discovery) を用いて測定された。hsIL-6R濃度は検量線のレスポンスから解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて算出された。前記の方法で測定された静脈内投与後のノーマルマウスにおける血漿中のhsIL-6Rの濃度推移を図56に示す。

#### 【0584】

その結果、hsIL-6R単独では非常に早い消失を示したのに対して、hsIL-6RとCa依存的な結合が無い通常の抗体であるH54/L28-IgG1を同時に投与した場合は、hsIL-6Rの消失を大幅に遅くした。それに対して、hsIL-6Rと100倍以上のCa依存的な結合を有する6RL#9-IgG1あるいはFH4-IgG1を同時に投与した場合は、hsIL-6Rの消失が大幅に加速された。H54/L28-IgG1を同時に投与した場合と比較して、6RL#9-IgG1およびFH4-IgG1を同時に投与した場合は、一日後の血漿中のhsIL-6R濃度はそれぞれ39倍および2倍低減された。これよりカルシウム依存的結合抗体が血漿中からの抗原の消失を加速可能であることが確認された。

#### 【0585】

〔参考実施例33〕 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

##### (33-1) カルシウム依存的に抗原に結合する抗体

カルシウム依存的に抗原に結合する抗体(カルシウム依存的抗原結合抗体)はカルシウムの濃度によって抗原との相互作用が変化する抗体である。カルシウム依存的抗原結合抗体は、カルシウムイオンを介して抗原に結合すると考えられるため、抗原側のエピトープを形成するアミノ酸は、カルシウムイオンをキレートすることが可能な負電荷のアミノ酸あるいは水素結合アクセプターとなりうるアミノ酸である。こうしたエピトープを形成するアミノ酸の性質から、ヒスチジンを導入することにより作製されるpH依存的に抗原に結合する抗原結合分子とは別のエピトープをターゲットすることが可能となる。さらに、カルシウム依存的およびpH依存的に抗原に結合する性質を併せ持つ抗原結合分子を用いるこ

とで、幅広い性質を有する多様なエピトープを個々にターゲットすることが可能な抗原結合分子を作製することが可能となると考えられる。そこで、カルシウムが結合するモチーフを含む分子の集合（Caライブラリ）を構築し、この分子の集団から抗原結合分子を取得すれば、カルシウム依存的抗原結合分子が効率的に得られると考えられる。

#### 【0586】

##### （33-2）ヒト生殖細胞系列配列の取得

カルシウムが結合するモチーフを含む分子の集合の例として、当該分子が抗体である例が考えられる。言い換えればカルシウムが結合するモチーフを含む抗体ライブラリがCaライブラリである場合が考えられる。

#### 【0587】

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可否かを判定するため、Human Fetal Spleen Poly RNA (Clontech) から調製されたcDNAを鋳型としてヒト生殖細胞系列配列を含む抗体がそれぞれクローニングされた。クローニングされたDNA断片は動物細胞発現ベクターに挿入された。得られた発現ベクターの塩基配列が、当業者公知の方法で決定され、その配列番号が表45に示されている。配列番号：58（Vk1）、配列番号：59（Vk2）、配列番号：60（Vk3）、配列番号：61（Vk4）ならびに配列番号：62（Vk5-2）をコードするポリヌクレオチドが、PCR法によって天然型Kappa鎖の定常領域（配列番号：54）をコードするポリヌクレオチドと連結されたDNA断片が、動物細胞発現用ベクターに組み込まれた。また、配列番号：63、配列番号：64、配列番号：65、配列番号：66ならびに配列番号：67をコードする重鎖可変領域ポリヌクレオチドが、PCR法によって（天然型配列のC末端2アミノ酸が欠失している）配列番号：53で表されるIgG1をコードするポリヌクレオチドと連結されたDNA断片が、動物細胞発現用ベクターに組み込まれた。作製された改変体の配列は当業者公知の方法で確認された。

#### 【0588】

##### 【表45】

| 軽鎖生殖細胞系列配列 | 重鎖(可変領域)配列番号 | 軽鎖可変領域配列番号 |
|------------|--------------|------------|
| Vk1        | 63           | 58         |
| Vk2        | 64           | 59         |
| Vk3        | 65           | 60         |
| Vk4        | 66           | 61         |
| Vk5        | 67           | 62         |

#### 【0589】

##### （33-3）抗体の発現と精製

取得された5種類のヒト生殖細胞系列配列を含むDNA断片が挿入された動物細胞発現ベクターが動物細胞へ導入された。抗体の発現は以下の方法を用いて行われた。ヒト胎児腎細胞由来FreeStyle 293-F株（Invitrogen）がFreeStyle 293 Expression Medium培地（Invitrogen）に懸濁され、 $1.33 \times 10^6$ 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ずつ播種された。調製されたプラスミドは、リポフェクション法によって細胞へ導入される。CO<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）。

#### 【0590】

##### （33-4）ヒト生殖細胞系列配列を含む抗体のカルシウムイオン結合活性の評価

精製された抗体のカルシウムイオン結合活性が評価された。抗体へのカルシウムイオンの結合の評価の指標として、示差走査型熱量測定（DSC）による熱変性中間温度（ $T_m$ 値）が測定された（MicroCal VP-Capillary DSC、MicroCal）。熱変性中間温度（ $T_m$ 値）は安定性の指標であり、カルシウムイオンの結合によってタンパク質が安定化すると、熱変性中間温度（ $T_m$ 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. Biol. Chem. (2008) 283, 37, 25140-25149）。抗体溶液中のカルシウムイオン濃度の変化に応じた抗体の $T_m$ 値の変化を評価することによって、抗体へのカルシウムイオンの結合活性が評価された。精製された抗体が20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、2 mM  $\text{CaCl}_2$  (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）を表46に示す。

【0591】

【表46】

| 軽鎖生殖細胞系<br>列配列 | カルシウムイオン濃度      |       | $\Delta T_m$ (°C)    |
|----------------|-----------------|-------|----------------------|
|                | 3 $\mu\text{M}$ | 2 mM  | 2 mM-3 $\mu\text{M}$ |
| hVk1           | 80.32           | 80.78 | 0.46                 |
| hVk2           | 80.67           | 80.61 | -0.06                |
| hVk3           | 81.64           | 81.36 | -0.28                |
| hVk4           | 70.74           | 70.74 | 0                    |
| hVk5           | 71.52           | 74.17 | 2.65                 |

【0592】

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。

【0593】

（33-5）hVk5-2配列のカルシウム結合評価

（33-2）においてVk5-2（配列番号：57）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：68）およびVk5-2バリエーション2（配列番号：69）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：67）が発現するように組み込まれた動物発現用のベクターと、（33-3）で記載した方法で共に動物細胞中に導入され、抗体が精製された。精製された抗体のカルシウムイオン結合活性が評価された。精製された抗体が20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、2 mM  $\text{CaCl}_2$  (pH7.5) または20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl (pH7.5) の溶液（表47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）を表47に示す。

【0594】

【表 4 7】

| 軽鎖            | カルシウムイオン濃度 |       | $\Delta T_m$ (°C)<br>2 mM-0mM |
|---------------|------------|-------|-------------------------------|
|               | 0 mM       | 2 mM  |                               |
| Vk5-2         | 71.65      | 74.38 | 2.73                          |
| Vk5-2 バリエント 1 | 65.75      | 72.24 | 6.49                          |
| Vk5-2 バリエント 2 | 66.46      | 72.24 | 5.78                          |

## 【0 5 9 5】

その結果、Vk5-2、Vk5-2バリエント 1 およびVk5-2バリエント 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 5 9 6】

〔参考実施例 3 4〕 ヒトVk5 (hVk5) 配列の評価

## (3 4-1) hVk5配列

Kabatデータベース中には、hVk5配列としてhVk5-2配列のみが登録されている。本明細書では、hVk5とhVk5-2は同義で扱われる。W02010/136598では、hVk5-2配列の生殖細胞系配列中の存在比は0.4%と記載されている。他の報告でもhVk5-2配列の生殖細胞系配列中の存在比は0~0.06%と述べられている (J. Mol. Biol. (2000) 296, 57-86、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2009) 106, 48, 20216-20221)。上記のように、hVk5-2配列は、生殖細胞系配列中で出現頻度が低い配列であるため、ヒト生殖細胞系配列で構成される抗体ライブラリや、ヒト抗体を発現するマウスへの免疫によって取得されたB細胞から、カルシウムと結合する抗体を取得することは非効率であると考えられた。そこで、ヒトhVk5-2配列を含むCaライブラリを設計する可能性が考えられるが、報告されている合成抗体ライブラリ (W02010/105256やW02010/136598) ではhVk5配列は含まれていなかった。さらに、hVk5-2配列の物性は報告されておらず、その可能性の実現は未知であった。

## 【0 5 9 7】

## (3 4-2) 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: 7 0) 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: 6 7) が発現するように組み込まれた動物発現用のベクターと、参考実施例 2 5で記載した方法で共に動物細胞中に導入された。導入された動物細胞中で発現したhVk5-2\_L65 およびCIM\_Hを含む抗体が、参考実施例 3 3で記載した方法で精製された。

## 【0 5 9 8】

## (3 4-3) 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、改変に供された元の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 4 8 に示す。分析の結果、図 5 7 に示すように糖鎖付加部位が改変されたhVk5-2\_L65は、元のhVk5-2配列よりもヘテロジェニティーが減少していることが示された。

## 【0 5 9 9】

10

20

30

40

【表 4 8】

|              | 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

## 【0600】

次に、ヘテロジェニティーが減少したhVk5-2\_L65配列を含む抗体がカルシウムイオンと結合するか否かが、参考実施例 3 3 に記載された方法を用いて評価された。その結果、表 4 9 に示すように、糖鎖付加部位が改変されたhVk5-2\_L65を含む抗体のFabドメインのTm値も、抗体溶液中のカルシウムイオンの濃度の変化によって変動した。すなわち、糖鎖付加部位が改変されたhVk5-2\_L65を含む抗体のFabドメインにカルシウムイオンが結合することが示された。

20

## 【0601】

【表 4 9】

| 軽鎖         | 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              |

## 【0602】

〔参考実施例 3 5〕 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

## (35-1) hVk5-2配列のCDR配列を含む改変抗体の作製、発現および精製

hVk5-2\_L65配列はヒトVk5-2配列のフレームワークに存在する糖鎖付加部位のアミノ酸が改変された配列である。参考実施例 3 4 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。

## 【0603】

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：7 1）、CaVk2（配列番号：7 2）、CaVk3（配列番号：7 3）、CaVk4（配列番号：7 4））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：5 4）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：6 7）をコードするポリヌクレオチドが組み込まれたプラスミドと共に参考実施例 3 3 に記載した方法で動物細胞に導入された。上記のように導入された動物細胞の培養液から、発現した所望の抗体分子が精製された。

40

## 【0604】

## (35-2) 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

hVk5-2配列以外の生殖細胞系列配列 (hVk1、hVk2、hVk3、hVk4) のフレームワーク配列、およびhVk5-2配列のCDR配列を含む改変抗体に、カルシウムイオンが結合するか否かが参考実施例 25 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 50 に示す。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、hVk5-2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。

【0605】

【表50】

| 生殖細胞系列<br>(軽鎖フレーム<br>ワーク配列) | カルシウムイオン濃度 |       | ΔT <sub>m</sub> (°C)<br>2 mM-3 μM |
|-----------------------------|------------|-------|-----------------------------------|
|                             | 3 μM       | 2 mM  |                                   |
| hVk1                        | 77.51      | 79.79 | 2.28                              |
| hVk2                        | 78.46      | 80.37 | 1.91                              |
| hVk3                        | 77.27      | 79.54 | 2.27                              |
| hVk4                        | 80.35      | 81.38 | 1.03                              |
| hVk5-2                      | 71.52      | 74.17 | 2.65                              |

【0606】

さらに、hVk5-2配列以外の生殖細胞系列配列 (hVk1、hVk2、hVk3、hVk4) のフレームワーク配列、およびhVk5-2配列のCDR配列を含むように改変された各抗体のFabドメインの熱安定性の指標である熱変性温度 (T<sub>m</sub>値) は、改変に供された元のhVk5-2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、hVk1、hVk2、hVk3、hVk4のフレームワーク配列およびhVk5-2配列のCDR配列を含む抗体はカルシウムイオンと結合する性質を有する上に、熱安定性の観点でも優れた分子であることが見出された。

【0607】

〔参考実施例 36〕 ヒト生殖細胞系列hVk5-2配列に存在するカルシウムイオン結合部位の同定

(36-1) hVk5-2配列のCDR配列中の変異部位の設計

参考実施例 35 に記載されているように、hVk5-2配列のCDR配列が他の生殖細胞系列のフレームワーク配列に導入された軽鎖を含む抗体もカルシウムイオンと結合することが示された。この結果からhVk5-2に存在するカルシウムイオン結合部位はCDR配列の中に存在することが示唆された。カルシウムイオンと結合する、すなわち、カルシウムイオンをキレートするアミノ酸として、負電荷のアミノ酸もしくは水素結合のアクセプターとなりうるアミノ酸が挙げられる。そこで、hVk5-2配列のCDR配列中に存在するAsp (D) 残基またはGlu (E) 残基がAla (A) 残基に置換された変異hVk5-2配列を含む抗体がカルシウムイオンと結合するか否かが評価された。

【0608】

(36-2) hVk5-2配列のAla置換体の作製ならびに抗体の発現および精製

hVk5-2配列のCDR配列中に存在するAspおよび/またはGlu残基がAla残基に改変された軽鎖を含む抗体分子が作製された。参考実施例 34 で記載されるように、糖鎖が付加されない改変体hVk5-2\_L65はカルシウムイオン結合を維持していたことから、カルシウムイオン結合性という観点ではhVk5-2配列と同等と考えられる。本実施例ではhVk5-2\_L65をテンプレート配列としてアミノ酸置換が行われた。作製された改変体を表 51 に示す。アミノ酸の置換はQuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)、PCRまたはIn fusion Advantage PCR cloning kit (TAKARA) 等の当業者公知の方法によって行われ、アミノ

酸が置換された改変軽鎖の発現ベクターが構築された。

【0609】

【表51】

| 軽鎖改変体名     | 改変部位（Kabat ナンバリング） | 配列番号 |
|------------|--------------------|------|
| hVk5-2_L65 | 野生型                | 70   |
| hVk5-2_L66 | 30                 | 75   |
| hVk5-2_L67 | 31                 | 76   |
| hVk5-2_L68 | 32                 | 77   |
| hVk5-2_L69 | 50                 | 78   |
| hVk5-2_L70 | 30, 32             | 79   |
| hVk5-2_L71 | 30, 50             | 80   |
| hVk5-2_L72 | 30, 32, 50         | 81   |
| hVk5-2_L73 | 92                 | 82   |

【0610】

得られた発現ベクターの塩基配列は当業者公知の方法で決定された。作製された改変軽鎖の発現ベクターを重鎖CIM\_H（配列番号：67）の発現ベクターと共に、ヒト胎児腎癌細胞由来HEK293H株（Invitrogen）、またはFreeStyle293細胞（Invitrogen）に一過性に導入することによって、抗体を発現させた。得られた培養上清から、rProtein A 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）。

【0611】

（36-3）hVk5-2配列のAla置換体を含む抗体のカルシウムイオン結合活性評価

得られた精製抗体がカルシウムイオンと結合するか否かが参考実施例33に記載された方法によって判定された。その結果を表52に示す。hVk5-2配列のCDR配列中に存在するAspまたはGlu残基をカルシウムイオンの結合もしくはキレートに関与できないAla残基に置換することによって、抗体溶液のカルシウムイオン濃度の変化によってそのFabドメインのTm値が変動しない抗体が存在した。Ala置換によってTm値が変動しない置換部位（32位および92位（Kabatナンバリング））はカルシウムイオンと抗体の結合に特に重要であることが示された。

【0612】

10

20

30

【表 5 2】

| 軽鎖改変体名     | 改変部位 (Kabat<br>ナンバリング) | カルシウムイオン濃度 |       | $\Delta T_m$ (°C)<br>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

## 【0 6 1 3】

〔参考実施例 3 7〕 カルシウムイオン結合モチーフを有するhVk1配列を含む抗体の評価  
 (3 7-1) 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

20

参考実施例 3 6 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、ヒト生殖細胞系列配列である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: 8 3) が作製された。すなわち、hVk5-2配列中のこれらの5残基のみが導入されたhVk1配列を含む抗体がカルシウムと結合できるか否かが判定された。改変体の作製は参考実施例 3 6 と同様に行われた。得られた軽鎖改変体LfVk1\_Caおよび軽鎖hVk1配列を含むLfVk1 (配列番号: 8 4) を、重鎖C IM\_H (配列番号: 6 7) と共に発現させた。抗体の発現および精製は参考実施例 3 6 と同様の方法で実施された。

30

## 【0 6 1 4】

(3 7-2) カルシウムイオン結合モチーフを有するヒトhVk1配列を含む抗体のカルシウムイオン結合活性の評価

上記のように得られた精製抗体がカルシウムイオンと結合するか否かが参考実施例 3 3 に記載された方法で判定された。その結果を表 5 3 に示す。hVk1配列を有するLfVk1を含む抗体のFabドメインのTm値は抗体溶液中のカルシウムの濃度の変化によっては変動しない一方で、LfVk1\_Caを含む抗体配列のTm値は、抗体溶液中のカルシウムの濃度の変化によって1°C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

## 【0 6 1 5】

【表 5 3】

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

## 【0616】

## (37-3) 分解抑制型LfVk1\_Ca配列の構築、発現および精製

(37-1) でヒト生殖細胞系列配列であるhVk1配列の30位、31位、32位、50位および92位 (Kabatナンバリング) の残基がhVk5-2配列の30位、31位、32位、50位および92位 (Kabatナンバリング) の残基に置換された改変体LfVk1\_Ca (配列番号: 83) が作製され、カルシウムイオンが結合することが示された。そこで、LfVk1\_Ca配列を含むCaライブラリを設計する可能性が考えられるが、LfVk1\_Ca配列の物性は報告されておらず、その実現可能性は未知であった。LfVk1\_Ca配列は、30位、31位および32位 (Kabatナンバリング) にAspが存在し、酸性条件下で分解することが報告されているAsp-Asp配列がCDR1配列中に存在する (J. Pharm. Biomed. Anal. (2008) 47(1), 23-30)。抗体の保存安定性の観点から、酸性条件下での分解は避けることが望ましい。そこで、分解する可能性があるAsp (D) 残基がAla (A) 残基に置換された改変体LfVk1\_Ca1 (配列番号: 85)、LfVk1\_Ca2 (配列番号: 86) およびLfVk1\_Ca3 (配列番号: 87) が作製された。アミノ酸の置換はQuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を用いる当業者公知の方法で行われた。改変体をコードするDNAが動物発現用ベクターに組み込まれた。作製された改変体のDNAが組み込まれた動物発現用ベクターは、重鎖としてGC\_H (配列番号: 55) が発現するように組み込まれた動物発現用のベクターと、参考実施例33で記載した方法で共に動物細胞中に導入された。導入された動物細胞中で発現した抗体が、参考実施例33で記載した方法で精製された。

## 【0617】

## (37-4) 分解抑制型LfVk1\_Ca配列を含む抗体の安定性評価

(37-3) で取得された抗体が、改変に供された元のLfVk1\_Ca配列を含む抗体よりも、pH6.0溶液中での分解が抑制されているか否かが熱加速後の各抗体のヘテロジェニティーの比較によって評価された。各抗体が20 mM Histidine-HCl、150 mM NaCl、pH6.0の溶液に一晚4°Cの条件で透析された。透析された抗体は0.5mg/mLに調製され、5°Cまたは50°Cで3日間保存された。保存後の各抗体を参考実施例34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58に示されるように分解部位が改変されたLfVk1\_Ca1は、元のLfVk1\_Ca配列よりもヘテロジェニティーが少なく、熱加速による分解が著しく抑制されていることが示された。すなわち、LfVk1\_Ca配列中の30位に存在するAsp (D) 残基が分解することが示され、アミノ酸改変によって回避できることが示された。

## 【0618】

## (37-5) 軽鎖30位Asp残基分解抑制型LVk1\_Ca配列の作製ならびに抗体の発現および精製

(37-4) で記載されたAla置換体の分解抑制の結果から、LfVk1\_Ca配列のCDR配列の中で30位 (Kabatナンバリング) のAsp (D) 残基が酸性条件下で分解し、30位 (Kabatナンバリング) を他のアミノ酸 ((37-4) では、Ala (A) 残基) に置換することで分解が抑制できることが示された。そこで、30位 (Kabatナンバリング) の残基をカルシウムイオンがキレートできる残基の代表であるSer (S) 残基に置換した配列 (LfVk1\_Ca6とよぶ。配列番号: 88) としても、分解が抑制されるか否かが評価された。改変体の作製は参考実施例29と同様に行われた。得られた軽鎖改変体LfVk1\_Ca6および軽鎖LfVk1\_Ca配列を、重鎖GC\_H (配列番号: 55) と共に発現させた。抗体の発現および精製は参考実施例3

10

20

30

40

50

6と同様の方法で実施された。

#### 【0619】

##### (37-6) 軽鎖30位Asp残基分解抑制型LVk1\_Ca配列の評価

上記のように得られた精製抗体の酸性条件下における保存安定性が(37-4)に記載された方法で判定された。その結果、図59に示すように、LfVkl\_Ca6配列を含む抗体は、元のLfVkl\_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。

#### 【0620】

さらに、LfVkl\_Ca配列を含む抗体およびLfVkl\_Ca6配列を含む抗体がカルシウムイオンと結合するか否かが参考実施例33に記載された方法で判定された。その結果を表54に示す。LfVkl\_Ca配列を含む抗体および分解抑制型であるLfVkl\_Ca6配列を含む抗体のFabドメインのTm値は、それぞれ抗体溶液中のカルシウムの濃度の変化によって1℃以上変化した。

#### 【0621】

##### 【表54】

| 軽鎖改変体     | カルシウムイオン濃度 |       | ΔTm (°C)  |
|-----------|------------|-------|-----------|
|           | 3 μM       | 2 mM  | 2 mM-3 μM |
| LfVkl_Ca  | 78.45      | 80.06 | 1.61      |
| LfVkl_Ca6 | 78.44      | 79.74 | 1.30      |

#### 【0622】

〔参考実施例38〕 Ca濃度依存的に抗原に結合する抗体が効率よく取得できるように、カルシウムイオン結合モチーフが可変領域に導入された抗体分子の集団(Caライブラリ)の設計

カルシウム結合モチーフとして、例えばhVkl5-2配列やそのCDR配列、さらに残基が絞られた30位、31位、32位、50位、92位(Kabatナンバリング)が好適に挙げられる。他にも、カルシウムと結合するタンパク質が有するEFハンドモチーフ(カルモジュリンなど)やCタイプレクチン(ASGPRなど)もカルシウム結合モチーフに該当する。

#### 【0623】

Caライブラリは重鎖可変領域と軽鎖可変領域から構成される。重鎖可変領域はヒト抗体配列が使用され、軽鎖可変領域にカルシウム結合モチーフが導入された。カルシウム結合モチーフが導入される軽鎖可変領域のテンプレート配列として、hVkl1配列が選択された。hVkl1配列にカルシウム結合モチーフのうちの一つであるhVkl5-2のCDR配列が導入されたLfVkl\_Ca配列を含む抗体は参考実施例36で示したように、カルシウムイオンと結合することが示された。テンプレート配列に複数のアミノ酸を出現させてライブラリを構成する抗原結合分子の多様性が広げられた。複数のアミノ酸を出現させる位置は、抗原と相互作用する可能性が高い可変領域の表面に露出する位置が選択された。具体的には、30位、31位、32位、34位、50位、53位、91位、92位、93位、94位および96位(Kabatナンバリング)が、こうしたフレキシブル残基として選択された。

#### 【0624】

次に出現させるアミノ酸残基の種類とその出現率が設定された。Kabatデータベース(Kabat, E.A. ET AL.: 'Sequences of proteins of immunological interest', vol. 91, 1991, NIH PUBLICATION)に登録されているhVkl1とhVkl3の配列中のフレキシブル残基におけるアミノ酸の出現頻度が解析された。解析結果を元に、各位置で出現頻度が高いアミノ酸からCaライブラリで出現させるアミノ酸の種類が選択された。この際、アミノ酸の性質が偏らないように解析結果では出現頻度が少ないと判定されたアミノ酸も選択された。また、選択されたアミノ酸の出現頻度は、Kabatデータベースの解析結果を参考にして設定された。

#### 【0625】

以上のように設定されたアミノ酸および出現頻度を考慮することによって、Caライブラリとして、カルシウム結合モチーフを含み、当該モチーフ以外の各残基で複数のアミノ酸を含むような配列の多様性が重視されたCaライブラリが設計された。表9および10にCaライブラリの詳細なデザインが示されている（各表中の位置はKabatナンバリングを表す）。また、表9および10においては、Kabatナンバリングで表される92位がAsn (N) の場合、94位はSer (S) ではなくLeu (L) とすることができる。

#### 【0626】

〔参考実施例39〕 Caライブラリの作製

ヒトPBMcから作成したポリA RNAや、市販されているヒトポリA RNAなどを鋳型としてPCR法により抗体重鎖可変領域の遺伝子ライブラリが増幅された。抗体軽鎖可変領域については、参考実施例38に記載されるように、カルシウム結合モチーフを維持しカルシウム濃度依存的に抗原に対して結合可能な抗体の出現頻度を高めた抗体軽鎖可変領域が設計された。また、カルシウム結合モチーフが導入された残基以外のアミノ酸残基は、天然ヒト抗体でのアミノ酸出現頻度の情報（(KABAT, E.A. ET AL.: 'Sequences of proteins of immunological interest', vol. 91, 1991, NIH PUBLICATION)）を参考にフレキシブル残基として、天然ヒト抗体の配列中で出現頻度の高いアミノ酸を均等に分布させた抗体軽鎖可変領域のライブラリが設計された。このように作製された抗体重鎖可変領域の遺伝子ライブラリと抗体軽鎖可変領域の遺伝子ライブラリとの組合せがファージミドベクターへ挿入され、ヒト抗体配列からなるFabドメインを提示するヒト抗体ファージディスプレイライブラリ (Methods Mol Biol. (2002) 178, 87-100) が構築された。

#### 【0627】

後述する参考実施例43に記載された方法に準じて、抗体遺伝子ライブラリが導入された大腸菌から単離された抗体遺伝子の配列が確認された。得られた290クロンの配列のアミノ酸分布と、設計したアミノ酸分布を、図60に示す。

#### 【0628】

〔参考実施例40〕 Caライブラリに含まれる分子のカルシウムイオン結合活性の評価  
(40-1) Caライブラリに含まれる分子のカルシウムイオン結合活性

参考実施例34に示されているように、カルシウムイオンと結合することが示されたhV k5-2配列は生殖細胞系列配列中で出現頻度が低い配列であるため、ヒト生殖細胞系列配列で構成される抗体ライブラリや、ヒト抗体を発現するマウスへの免疫によって取得されたB細胞から、カルシウムと結合する抗体を取得することは非効率であると考えられた。そこで、Caライブラリが構築された。構築されたCaライブラリにカルシウム結合を示すクロンが存在するか評価された。

#### 【0629】

(40-2) 抗体の発現と精製

Caライブラリに含まれるクロンが、動物細胞発現用プラスミドへ導入される。抗体の発現は以下の方法を用いて行われた。ヒト胎児腎細胞由来FreeStyle 293-F株 (Invitrogen) がFreeStyle 293 Expression Medium培地 (Invitrogen) に懸濁され、 $1.33 \times 10^6$  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ずつ播種された。調製されたプラスミドは、リポフェクション法によって細胞へ導入された。CO<sub>2</sub> インキュベーター (37度、8% O<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)。

#### 【0630】

(40-3) 取得された抗体のカルシウムイオン結合評価

上記のように得られた精製抗体がカルシウムイオンと結合するか否かが参考実施例26に記載された方法で判定された。その結果を表55に示す。Caライブラリに含まれる複数の抗体のFabドメインのT<sub>m</sub>はカルシウムイオン濃度によって変動し、カルシウムイオンと

結合する分子が含まれることが示された。

【0631】

【表55】

| 抗体     | 配列番号 |     | カルシウムイオン濃度 |       | $\Delta T_m$ (°C)<br>2 mM-3 $\mu$ M |
|--------|------|-----|------------|-------|-------------------------------------|
|        | 重鎖   | 軽鎖  | 3 $\mu$ M  | 2 mM  |                                     |
| Ca_B01 | 89   | 100 | 70.88      | 71.45 | 0.57                                |
| Ca_E01 | 90   | 101 | 84.31      | 84.95 | 0.64                                |
| Ca_H01 | 91   | 102 | 77.87      | 79.49 | 1.62                                |
| Ca_D02 | 92   | 103 | 78.94      | 81.1  | 2.16                                |
| Ca_E02 | 93   | 104 | 81.41      | 83.18 | 1.77                                |
| Ca_H02 | 94   | 105 | 72.84      | 75.13 | 2.29                                |
| Ca_D03 | 95   | 106 | 87.39      | 86.78 | -0.61                               |
| Ca_C01 | 96   | 107 | 74.74      | 74.92 | 0.18                                |
| Ca_G01 | 97   | 108 | 65.21      | 65.87 | 0.66                                |
| Ca_A03 | 98   | 109 | 80.64      | 81.89 | 1.25                                |
| Ca_B03 | 99   | 110 | 93.02      | 93.75 | 0.73                                |

【0632】

〔参考実施例41〕 Ca依存的にIL-6レセプターに結合する抗体の取得

(41-1) ビーズパンニングによるライブラリからのCa依存的に抗原に結合する抗体断片の取得

構築されたCa依存的に結合する抗体ライブラリからの最初の選抜は、抗原（IL-6レセプター）への結合能をもつ抗体断片のみの濃縮によって実施された。

構築したファージディスプレイ用ファージミドを保持した大腸菌からファージ産生が行われた。ファージ産生が行われた大腸菌の培養液に2.5 M NaCl/10%PEGを添加することによって沈殿させたファージの集団をTBSにて希釈することによってファージライブラリ液が得られた。次に、ファージライブラリ液にBSA、およびCaCl<sub>2</sub>を添加することによって終濃度4%BSA、1.2 mMカルシウムイオンとなるよう調製された。パンニング方法として、一般的な方法である磁気ビーズに固定化した抗原を用いたパンニング方法が参照された（J. Immunol. Methods. (2008) 332 (1-2), 2-9、J. Immunol. Methods. (2001) 247 (1-2), 191-203、Biotechnol. Prog. (2002) 18(2) 212-20、Mol. Cell Proteomics (2003) 2 (2), 61-9）。磁気ビーズとして、NeutrAvidin coated beads (Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) もしくはStreptavidin coated beads (Dynabeads M-280 Streptavidin) が用いられた。

## 【0633】

具体的には、調製されたファージライブラリ液に250 pmolのビオチン標識抗原を加えることによって、当該ファージライブラリ液を室温にて60分間抗原と接触させた。BSAでブロッキングされた磁気ビーズが加えられ、抗原とファージとの複合体を磁気ビーズと室温にて15分間結合させた。ビーズは1mLの1.2 mM  $\text{CaCl}_2$ /TBST (1.2 mM  $\text{CaCl}_2$ を含むTBST) にて3回洗浄された後、1 mLの1.2 mM  $\text{CaCl}_2$ /TBS (1.2 mM  $\text{CaCl}_2$ を含むTBS) にてさらに2回洗浄された。その後、1mg/mLのトリプシン0.5mLが加えられたビーズは室温で15分懸濁された後、即座に磁気スタンドを用いてビーズが分離され、ファージ溶液が回収された。回収されたファージ溶液が、対数増殖期 (OD600が0.4-0.7) となった10 mLの大腸菌株ER2738に添加された。37°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液が調製された。

10

## 【0634】

2回目のパンニングでは、抗原結合能もしくはCa依存的結合能を指標にファージの濃縮が行われた。

具体的には、抗原結合能を指標に濃縮を行った際には、調製したファージライブラリ液に40 pmolのビオチン標識抗原を加えることによって、ファージライブラリを室温で60分間抗原と接触させた。BSAでブロッキングされた磁気ビーズが加えられ、抗原とファージとの複合体を磁気ビーズと室温で15分間結合させた。ビーズは1 mLの1.2 mM  $\text{CaCl}_2$ /TBST にて3回、1.2 mM  $\text{CaCl}_2$ /TBSにて2回洗浄された。その後、1 mg/mLのトリプシン0.5 mLが加えられたビーズは室温で15分懸濁された後、即座に磁気スタンドを用いてビーズが分離され、ファージ溶液が回収された。回収されたファージ溶液に、100 mg/mLのトリプシン5  $\mu\text{L}$ を加えることによって、Fabを提示しないファージのpIIIタンパク質 (ヘルパーファージ由来のpIIIタンパク質) が切断され、Fabを提示しないファージの大腸菌に対する感染能を失わせた。回収されたファージ溶液が、対数増殖期 (OD600が0.4-0.7) となった10 mLの大腸菌株ER2738に添加された。37°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液が回収された。

20

30

## 【0635】

Ca依存的結合能を指標に濃縮を行った際には、調製したファージライブラリ液に40 pmolのビオチン標識抗原を加えることによって、ファージライブラリを室温で60分間抗原と接触させた。BSAでブロッキングされた磁気ビーズが加えられ、抗原とファージとの複合体を磁気ビーズと室温で15分間結合させた。ビーズは1 mLの1.2 mM  $\text{CaCl}_2$ /TBSTと1.2 mM  $\text{CaCl}_2$ /TBSにて洗浄された。その後、0.1 mLの2 mM EDTA/TBS (2 mMのEDTAを含むTBS) が加えられたビーズは室温で懸濁された後、即座に磁気スタンドを用いてビーズが分離され、ファージ溶液が回収された。回収されたファージ溶液に、100 mg/mLのトリプシン5  $\mu\text{L}$ を加えることによって、Fabを提示しないファージのpIIIタンパク質 (ヘルパーファージ由来のpIIIタンパク質) が切断され、Fabを提示しないファージの大腸菌に対する感染能を失わせた。回収されたファージ溶液が、対数増殖期 (OD600が0.4-0.7) となった10 mLの大腸菌株ER2738に添加された。37°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液が回収された。

40

## 【0636】

## (41-2) ファージELISAによる評価

上記の方法によって得られた大腸菌のシングルコロニーから、常法 (Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145) に習い、ファージ含有培養上清が回収された。

BSAおよび $\text{CaCl}_2$ が加えられたファージを含有する培養上清が以下の手順でELISAに供さ

50

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  $\mu$ LのPBSにて一晩コートされた。当該プレートの各ウェルをPBSTにて洗浄することによって抗原が除かれた後、当該ウェルが4% BSA-TBS 250  $\mu$ Lにて1時間以上ブロッキングされた。4% BSA-TBSが除かれた各ウェルに調製された培養上清が加えられた当該プレートを37°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  $\text{CaCl}_2$ /TBSTにて洗浄された各ウェルに、1.2 mM  $\text{CaCl}_2$ /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  $\text{CaCl}_2$ /TBSTにて洗浄された後に、イオン化カルシウム濃度1.2 mMとしたTBSによって希釈されたHRP結合抗M13抗体（Amersham Pharmacia Biotech）が各ウェルに添加されたプレートを1時間インキュベートさせた。1.2 mM  $\text{CaCl}_2$ /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。

#### 【0637】

上記のファージELISAを実施したクローンに対し、特異的なプライマーを用いて増幅された遺伝子の塩基配列解析が行われた。

ファージELISA、配列解析の結果を以下の表56に示した。

#### 【0638】

##### 【表56】

| ライブラリ            | Ca ライブラリ | Ca ライブラリ |
|------------------|----------|----------|
| 濃縮指標             | 抗原結合能    | 依存的抗原結合能 |
| パンニング回数          | 2        | 2        |
| 試験したクローン数        | 85       | 86       |
| ELISA 陽性         | 77       | 75       |
| ELISA 陽性クローン配列種類 | 74       | 72       |
| Ca 依存的結合クローン配列種類 | 13       | 47       |

#### 【0639】

##### （41-3）抗体の発現と精製

ファージELISAの結果、Ca依存的な抗原に対する結合能があると判断されたクローンが、動物細胞発現用プラスミドへ導入された。抗体の発現は以下の方法を用いて行われた。ヒト胎児腎細胞由来FreeStyle 293-F株（Invitrogen）がFreeStyle 293 Expression Medium培地（Invitrogen）に懸濁され、 $1.33 \times 10^6$ 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ずつ播種された。調製されたプラスミドは、リポフェクション法によって細胞へ導入された。CO<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）。

#### 【0640】

##### （41-4）取得された抗体のヒトIL-6レセプターに対するCa依存的結合能の評価

前記のように取得された抗体6RC1IgG\_010（重鎖配列番号：133、軽鎖配列番号：134）、および、6RC1IgG\_012（重鎖配列番号：135、軽鎖配列番号：136）、および、6RC1IgG\_019（重鎖配列番号：137、軽鎖配列番号：138）のヒトIL-6レセプターに対する結合活性がCa依存的であるかどうかを判断するため、これらの抗体とヒトIL-6レセプターとの相互作用解析がBiacore T100（GE Healthcare）を用いて行われた。ヒトIL-6レセプターに対してCa依存性の結合活性を有しない対照抗体として、トシリズマブ（重鎖配列番号：111、軽鎖配列番号：112）が用いられた。高カルシウムイオン濃度

および低カルシウムイオン濃度の条件として、それぞれ1.2 mMおよび3  $\mu$ Mのカルシウムイオン濃度の溶液中で相互作用解析が行われた。アミンカップリング法でProtein A/G (Invitrogen) が適当量固定化されたSensor chip CM5 (GE Healthcare) 上に、目的の抗体がキャプチャーされた。ランニングバッファーには20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% (w/v) Tween20、1.2 mM  $\text{CaCl}_2$  (pH7.4) または20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% (w/v) Tween20、3  $\mu$ M  $\text{CaCl}_2$  (pH7.4) の2種類の緩衝液が用いられた。ヒトIL-6レセプターの希釈にもそれぞれのバッファーが使用された。測定は全て37°Cで実施された。

#### 【0641】

対照抗体であるトシリズマブ抗体、6RC1IgG\_010抗体、6RC1IgG\_012抗体および6RC1IgG\_019抗体を用いた抗原抗体反応の相互作用解析に際して、IL-6レセプターの希釈液とブランクであるランニングバッファーを流速5  $\mu$ L/minで3分間インジェクトすることによって、センサーチップ上にキャプチャーさせたトシリズマブ抗体、6RC1IgG\_010抗体、6RC1IgG\_012抗体および6RC1IgG\_019抗体にIL-6レセプターを相互作用させた。その後、10 mM Glycine-HCl (pH1.5) を流速30  $\mu$ L/minで30秒間インジェクトすることによって、センサーチップが再生された。

この方法により測定された高カルシウムイオン濃度におけるセンサーグラムを、図6-1に示す。

#### 【0642】

低カルシウムイオン濃度の条件下でのトシリズマブ抗体、6RC1IgG\_010抗体、6RC1IgG\_012抗体および6RC1IgG\_019抗体についてのセンサーグラムも、同様の方法で取得された。低カルシウムイオン濃度におけるセンサーグラムを、図6-2に示す。

#### 【0643】

上記の結果から、6RC1IgG\_010抗体、6RC1IgG\_012抗体および6RC1IgG\_019抗体は、バッファー中のカルシウムイオン濃度を1.2mMから3  $\mu$ Mにすることで、IL6レセプターに対する結合能が大幅に低減することが観察された。

#### 【0644】

〔参考実施例4-2〕 pH依存的結合抗体ライブラリの設計

##### （4-2-1）pH依存的結合抗体の取得方法

W02009/125825は抗原結合分子にヒスチジンを導入することにより、pH中性領域とpH酸性領域で性質が変化するpH依存的抗原結合分子を開示している。開示されたpH依存的抗原結合分子は、所望の抗原結合分子のアミノ酸配列の一部をヒスチジンに置換する改変によって取得されている。改変する対象の抗原結合分子を予め得ることなく、pH依存的抗原結合分子をより効率的に取得するために、ヒスチジンが可変領域（より好ましくは抗原結合に関与する可能性がある位置）に導入された抗原結合分子の集団（Hisライブラリと呼ぶ）から所望の抗原に結合する抗原結合分子を取得する方法が考えられる。Hisライブラリから得られる抗原結合分子は通常の抗体ライブラリよりもヒスチジンが高頻度に出現するため、所望の性質を有する抗原結合分子が効率的に取得できると考えられる。

#### 【0645】

（4-2-2）pH依存的に抗原に結合する抗体が効率よく取得できるように、ヒスチジン残基が可変領域に導入された抗体分子の集団（Hisライブラリ）の設計

まず、Hisライブラリでヒスチジンを導入する位置が選択された。W02009/125825ではIL-6レセプター抗体、IL-6抗体およびIL-31レセプター抗体の配列中のアミノ酸残基をヒスチジンに置換することでpH依存的抗原結合分子が作製されたことが開示されている。さらに、抗原結合分子のアミノ酸配列をヒスチジンに置換することによって、pH依存的抗原結合能を有する、卵白リゾチウム抗体（FEBS Letter 11483, 309, 1, 85-88）およびヘプシジン抗体（W02009/139822）が作製されている。IL-6レセプター抗体、IL-6抗体、IL-31レセプター抗体、卵白リゾチウム抗体およびヘプシジン抗体でヒスチジンを導入した位置を表5-7に示す。表5-7に示す位置は、抗原と抗体との結合を制御できる位置の候補として挙げられ得る。さらに表5-7で示された位置以外でも、抗原と接触する可能性が高い位置も、ヒスチジンを導入する位置として適切であると考えられた。

【0646】

【表57】

| 抗体            | 鎖 | 位置 (Kabat) |    |    |     |    |    |    |      |     |
|---------------|---|------------|----|----|-----|----|----|----|------|-----|
| IL-6 レセプター抗体  | H | 27         | 31 | 32 | 35  | 50 | 58 | 62 | 100B | 102 |
|               | L | 28         | 31 | 32 | 53  | 56 | 92 |    |      |     |
| IL-6 抗体       | H | 32         | 59 | 61 | 99  |    |    |    |      |     |
|               | L | 53         | 54 | 90 | 94  |    |    |    |      |     |
| IL-31 レセプター抗体 | H | 33         |    |    |     |    |    |    |      |     |
|               | L |            |    |    |     |    |    |    |      |     |
| 卵白リゾチウム抗体     | H | 33         | 98 |    |     |    |    |    |      |     |
|               | L | 54         |    |    |     |    |    |    |      |     |
| ヘプシジン抗体       | H | 52         | 57 | 99 | 107 |    |    |    |      |     |
|               | L | 27         | 89 |    |     |    |    |    |      |     |

10

【0647】

重鎖可変領域と軽鎖可変領域から構成されるHisライブラリのうち、重鎖可変領域はヒト抗体配列が使用され、軽鎖可変領域にヒスチジンが導入された。Hisライブラリでヒスチジンを導入する位置として、上記で挙げられた位置と、抗原結合に参与する可能性がある位置、すなわち軽鎖の30位、32位、50位、53位、91位、92位および93位（Kabatナンバリング、Kabat EA et al. 1991. Sequence of Proteins of Immunological Interest. NIH）が選択された。またヒスチジンを導入する軽鎖可変領域のテンプレート配列として、hVk1配列が選択された。テンプレート配列に複数のアミノ酸を出現させてライブラリを構成する抗原結合分子の多様性が広げられた。複数のアミノ酸を出現させる位置は、抗原と相互作用する可能性が高い可変領域の表面に露出する位置が選択された。具体的には、軽鎖の30位、31位、32位、34位、50位、53位、91位、92位、93位、94位および96位（Kabatナンバリング、Kabat EA et al. 1991. Sequence of Proteins of Immunological Interest. NIH）が、こうしたフレキシブル残基として選択された。

20

【0648】

次に出現させるアミノ酸残基の種類とその出現率が設定された。Kabatデータベース（KABAT, E.A. ET AL.: 'Sequences of proteins of immunological interest', vol. 91, 1991, NIH PUBLICATION）に登録されているhVk1とhVk3の配列中のフレキシブル残基におけるアミノ酸の出現頻度が解析された。解析結果を元に、各位置で出現頻度が高いアミノ酸からHisライブラリで出現させるアミノ酸の種類が選択された。この際、アミノ酸の性質が偏らないように解析結果では出現頻度が少ないと判定されたアミノ酸も選択された。また、選択されたアミノ酸の出現頻度は、Kabatデータベースの解析結果を参考にして設定された。

30

【0649】

以上のように設定されたアミノ酸および出現頻度を考慮することによって、Hisライブラリとして、ヒスチジンが各CDRで1つ必ず入るように固定されているHisライブラリ1とHisライブラリ1よりも配列の多様性が重視されたHisライブラリ2が設計された。Hisライブラリ1およびHisライブラリ2の詳細なデザインは表7および表8に示されている（各表中の位置はKabatナンバリングを表す）。また、表7および8において、Kabatナンバリングで表される92位がAsn（N）の場合、94位はSer（S）を除外することができる。

40

【0650】

〔参考実施例43〕 pH依存的に抗原に結合する抗体を取得するためのヒト抗体ファージディスプレイライブラリ（Hisライブラリ1）の作製

ヒトPBMCから作成したポリA RNAや、市販されているヒトポリA RNAなどを鋳型としてPCR法により抗体重鎖可変領域の遺伝子ライブラリが増幅された。参考実施例42に記載のH

50

isライブラリ1として設計された抗体軽鎖可変領域の遺伝子ライブラリが、PCR法を用いて増幅された。このように作製された抗体重鎖可変領域の遺伝子ライブラリと抗体軽鎖可変領域の遺伝子ライブラリとの組合せがファージミドベクターへ挿入され、ヒト抗体配列からなるFabドメインを提示するヒト抗体ファージディスプレイライブラリが構築された。構築方法として、(Methods Mol Biol. (2002) 178, 87-100) が参考とされた。上記ライブラリの構築に際しては、ファージミドのFabとファージpIIIタンパク質をつなぐリンカー部分、およびヘルパーファージpIIIタンパク質遺伝子のN2ドメインとCTドメインの間にトリプシン切断配列が挿入されたファージディスプレイライブラリの配列が使用された。抗体遺伝子ライブラリが導入された大腸菌から単離された抗体遺伝子の配列が確認され、132クローンの配列情報が得られた。設計されたアミノ酸分布と、確認された配列中のアミノ酸分布を、図63に示す。設計されたアミノ酸分布に対応する多様な配列を含むライブラリが構築された。

10

#### 【0651】

〔参考実施例44〕 pH依存的にIL-6Rに結合する抗体の取得

#### 〔44-1〕 ビーズパンニングによるライブラリからのpH依存的に抗原に結合する抗体断片の取得

構築されたHisライブラリ1からの最初の選抜は、抗原 (IL-6R) への結合能をもつ抗体断片のみの濃縮によって実施された。

構築したファージディスプレイ用ファージミドを保持した大腸菌からファージ産生が行われた。ファージ産生が行われた大腸菌の培養液に2.5 M NaCl/10%PEGを添加することによって沈殿させたファージの集団をTBSにて希釈することによってファージライブラリ液が得られた。ファージライブラリ液にBSAおよびCaCl<sub>2</sub>を添加することによって終濃度4% BSA、1.2mMカルシウムイオンとなるよう調製された。パンニング方法として、一般的な方法である磁気ビーズに固定化した抗原を用いたパンニング方法が参照された (J. Immunol. Methods. (2008) 332 (1-2), 2-9、J. Immunol. Methods. (2001) 247 (1-2), 191-203、Biotechnol. Prog. (2002) 18(2) 212-20、Mol. Cell Proteomics (2003) 2 (2), 61-9)。磁気ビーズとして、NeutrAvidin coated beads (Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) もしくはStreptavidin coated beads (Dynabeads M-280 Streptavidin) が用いられた。

20

#### 【0652】

具体的には、調製されたファージライブラリ液に250 pmolのビオチン標識抗原を加えることによって、当該ファージライブラリ液を室温にて60分間抗原と接触させた。BSAでブロッキングされた磁気ビーズが加えられ、抗原とファージとの複合体を磁気ビーズと室温にて15分間結合させた。ビーズは1 mLの1.2 mM CaCl<sub>2</sub>/TBST (1.2 mM CaCl<sub>2</sub>、0.1% Tween20を含むTBS) にて3回洗浄された後、1 mLの1.2 mM CaCl<sub>2</sub>/TBS (pH7.6) にてさらに2回洗浄された。その後、1mg/mLのトリプシン0.5mLが加えられたビーズは室温で15分懸濁された後、即座に磁気スタンドを用いてビーズが分離され、ファージ溶液が回収された。回収されたファージ溶液が、対数増殖期 (OD600が0.4-0.7) となった10 mLの大腸菌株ER2738に添加された。37℃で1時間緩やかに上記大腸菌の攪拌培養を行うことによって、ファージを大腸菌に感染させた。感染させた大腸菌は、225 mm x 225 mmのプレートへ播種された。次に、播種された大腸菌の培養液からファージを回収することによって、ファージライブラリ液が調製された。

30

40

#### 【0653】

2回目以降のパンニングでは、抗原結合能もしくはpH依存的結合能を指標にファージの濃縮が行われた。具体的には、調製したファージライブラリ液に40 pmolのビオチン標識抗原を加えることによって、ファージライブラリを室温で60分間抗原と接触させた。BSAでブロッキングされた磁気ビーズが加えられ、抗原とファージとの複合体を磁気ビーズと室温で15分間結合させた。ビーズは1 mLの1.2 mM CaCl<sub>2</sub>/TBSTと1.2 mM CaCl<sub>2</sub>/TBSにて複数回洗浄された。その後抗原結合能を指標として濃縮する場合は、1mg/mLのトリプシン0.5mLが加えられたビーズは室温で15分懸濁された後、即座に磁気スタンドを用いてビーズ

50

が分離され、ファージ溶液が回収された。pH依存的抗原結合能を指標に濃縮する場合は、0.1mLの50mM MES/1.2mM  $\text{CaCl}_2$ /150mM NaCl (pH5.5) が加えられたビーズは室温で懸濁された後、即座に磁気スタンドを用いてビーズが分離され、回収されたファージ溶液に、100mg/mLのトリプシン5  $\mu\text{L}$ を加えることによって、Fabを提示しないファージのpIIIタンパク質（ヘルパーファージ由来のpIIIタンパク質）が切断され、Fabを提示しないファージの大腸菌に対する感染能を失わせた。回収されたファージが、対数増殖期（OD600が0.4-0.7）となった10 mLの大腸菌株ER2738に添加された。37°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液が回収された。抗原結合能もしくはpH依存的結合能を指標とするパンニングが2回繰り返された。

10

#### 【0654】

##### （44-2）ファージELISAによる評価

上記の方法によって得られた大腸菌のシングルコロニーから、常法（Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145）に習い、ファージ含有培養上清が回収された。

終濃度4%BSAおよびカルシウムイオン濃度1.2 mMとなるようBSAおよび $\text{CaCl}_2$ が加えられたファージを含有する培養上清が以下の手順でELISAに供された。StreptaWell 96マイクロタイタープレート（Roche）がビオチン標識抗原を含む100  $\mu\text{L}$ 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（0.1%Tween20を含むPBS）にて洗浄することによって抗原が除かれた後、当該ウェルが4% BSA-TBS 250  $\mu\text{L}$ にて1時間以上ブロッキングされた。4% BSA-TBSが除かれた各ウェルに調製された培養上清が加えられた当該プレートを37°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  $\text{CaCl}_2$ /TBSTにて洗浄された各ウェルに、1.2 mM  $\text{CaCl}_2$ /TBS (pH7.6) もしくは1.2 mM  $\text{CaCl}_2$ /TBS (pH5.5) 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  $\text{CaCl}_2$ /TBSTにて洗浄された後に4% BSAおよびイオン化カルシウム濃度1.2 mMとしたTBSによって希釈されたHRP結合抗M13抗体（Amersham Pharmacia Biotech）が各ウェルに添加されたプレートを1時間インキュベートさせた。1.2 mM  $\text{CaCl}_2$ /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。

20

#### 【0655】

抗原結合能を指標に濃縮した場合、パンニングを2回実施したものについてファージELISAを実施したところ、抗原特異的にELISA陽性となったものは96クローン中17クローンであったため、パンニングを3回実施したものが解析された。一方、pH依存的抗原結合能を指標に濃縮した場合、パンニングを2回実施したものについてファージELISAを実施したところ、ELISA陽性となったものは94クローン中70クローンであったため、パンニングを2回実施したものが解析された。

30

#### 【0656】

上記のファージELISAを実施したクローンに対し、特異的なプライマーを用いて増幅された遺伝子の塩基配列が解析された。ファージELISAおよび配列解析の結果を以下の表58に示す。

40

#### 【0657】

【表 5 8】

| ライブラリー           | His ライブラリー 1 | His ライブラリー 1 |
|------------------|--------------|--------------|
| 濃縮指標             | 抗原結合能        | pH 依存的抗原結合能  |
| パンニング回数          | 3            | 2            |
| 試験したクローン数        | 80           | 94           |
| ELISA 陽性         | 76           | 70           |
| ELISA 陽性クローン配列種類 | 30           | 67           |
| pH 依存的結合クローン配列種類 | 22           | 47           |

10

## 【0 6 5 8】

同様の方法により、ナイーブヒト抗体ファージディスプレイライブラリから、pH依存的抗原結合能をもつ抗体取得が行われた。抗原結合能を指標に濃縮した場合、88クローン評価中13種類のpH依存的結合抗体が取得された。またpH依存的抗原結合能を指標に濃縮した場合、83クローン評価中27種類のpH依存的結合抗体が取得された。

## 【0 6 5 9】

以上の結果より、ナイーブヒト抗体ファージディスプレイライブラリと比較し、Hisライブラリー1のほうが得られるpH依存的抗原結合能をもつクローンのバリエーションが多いことが確認された。

20

## 【0 6 6 0】

## (4 4 - 3) 抗体の発現と精製

ファージELISAの結果、pH依存的な抗原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。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)。

30

## 【0 6 6 1】

## (4 4 - 4) 取得された抗体のヒトIL-6レセプターに対するpH依存的結合能の評価

(4 4 - 3) で取得された抗体6RpH#01 (重鎖配列番号: 1 3 9、軽鎖配列番号: 1 4 0)、6RpH#02 (重鎖配列番号: 1 4 1)、軽鎖配列番号: 1 4 2)、および6RpH#03 (重鎖配列番号: 1 4 3)、軽鎖配列番号: 1 4 4) のヒトIL-6レセプターに対する結合活性がpH依存的であるかどうかを判断するため、これらの抗体とヒトIL-6レセプターとの相互作用がBiacore T100 (GE Healthcare) を用いて解析された。ヒトIL-6レセプターに対してpH依存性の結合活性を有しない対照抗体として、トシリズマブ (重鎖配列番号: 1 1 1)、軽鎖配列番号: 1 1 2) が用いられた。中性域pHおよび酸性域pHの条件として、それぞれpH7.4およびpH6.0の溶液中で抗原抗体反応の相互作用が解析された。アミンカップリング法でProtein A/G (Invitrogen) が適当量固定化されたSensor chip CM5 (GE Healthcare) 上に、目的の抗体がそれぞれ300RU程度キャプチャーされた。ランニングバッファーには20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% (w/v) Tween20、1.2 mM CaCl<sub>2</sub> (pH7.4) または20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% (w/v) Tween20、1.2mM CaCl<sub>2</sub> (pH6.0) の2種類の緩衝液が用いられた。ヒトIL-6レセプターの希釈にもそれぞれのバッファーが使用された。測定は全て37°Cで実施された。

40

50

## 【0662】

対照抗体であるトシリズマブ抗体、6RpH#01抗体、6RpH#02抗体および6RpH#03抗体を用いた抗原抗体反応の相互作用の解析に際して、IL-6レセプターの希釈液とブランクであるランニングバッファーを流速5  $\mu\text{L}/\text{min}$ で3分間インジェクトすることによって、センサーチップ上にキャプチャーさせたトシリズマブ抗体、6RpH#01抗体、6RpH#02抗体および6RpH#03抗体にIL-6レセプターを相互作用させた。その後、10 mM Glycine-HCl (pH1.5) を流速30  $\mu\text{L}/\text{min}$ で30秒間インジェクトすることによって、センサーチップが再生された。

## 【0663】

前記の方法により測定されたpH7.4におけるセンサグラムを、図64に示す。また同様の方法で取得されたpH6.0の条件下でのセンサグラムを、図65に示す。

10

## 【0664】

前記の結果から、6RpH#01抗体、6RpH#02抗体および6RpH#03抗体は、バッファー中のpHをpH7.4からpH6.0にすることで、IL-6レセプターに対する結合能が大幅に低減することが観察された。

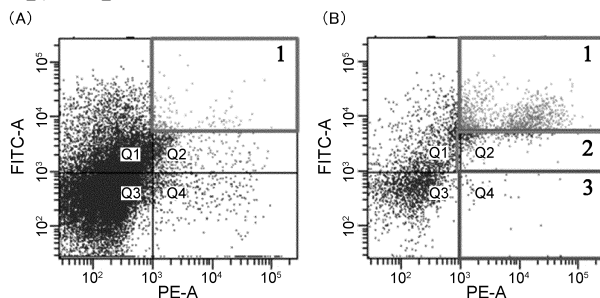
## 【産業上の利用可能性】

## 【0665】

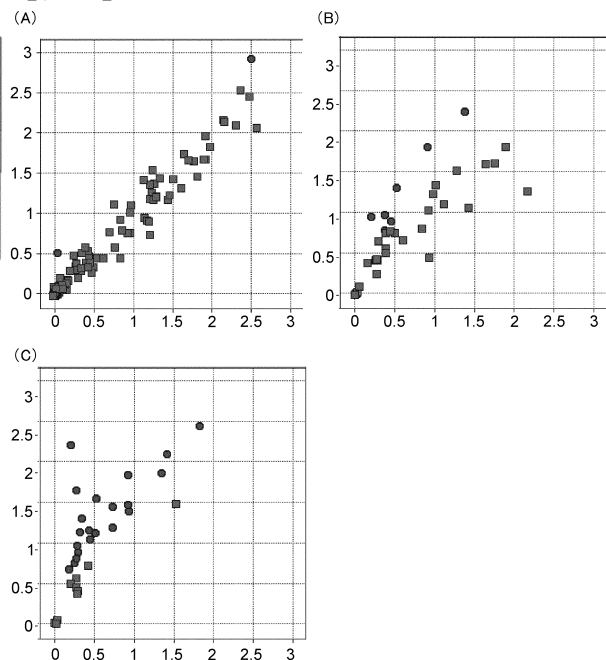
本発明によって、2種類以上の生理活性を有しているためにin vitroにおいては1種類の抗原結合分子でそれらの生理活性を阻害することが困難な抗原に対して、血中（血清中または血漿中）からの消失を促進することで、in vivoにおいては1種類の抗原結合分子で生理活性を低減させることが可能な抗原結合分子を得ることができた。複数種類の生理活性を有する抗原が病因となっているような疾患に対して、1種類の薬剤で治療を行うことは困難であったが、本発明によって、そのような疾患に対しても有効な薬剤を提供することが可能となる。

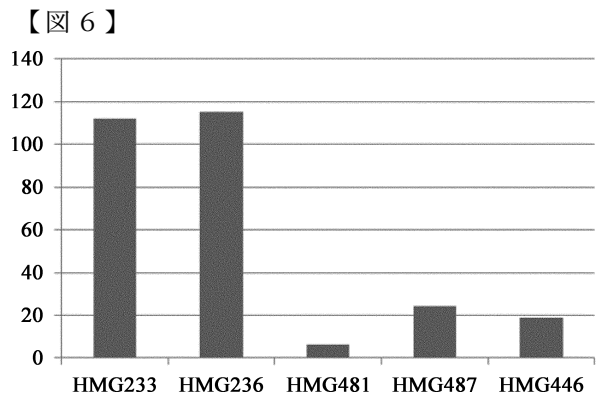
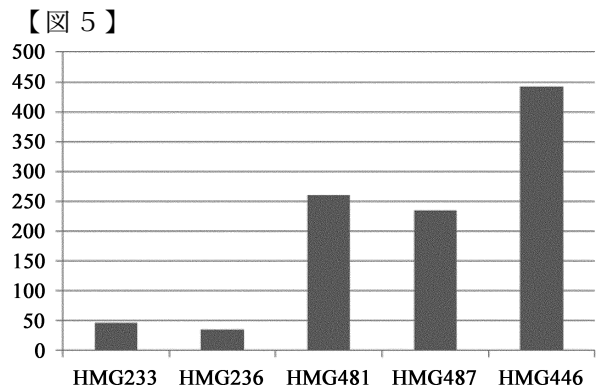
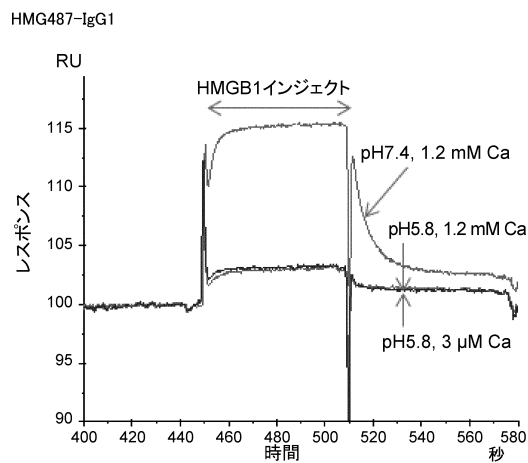
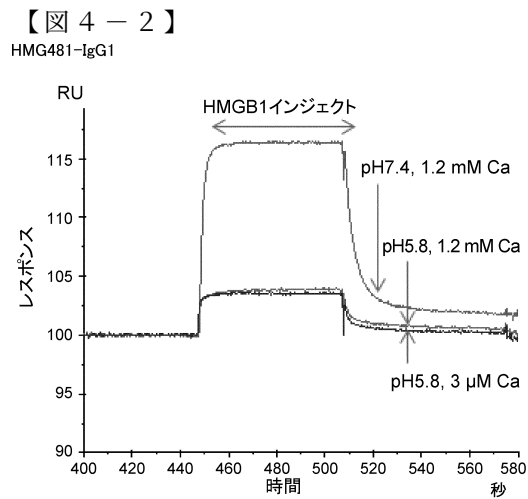
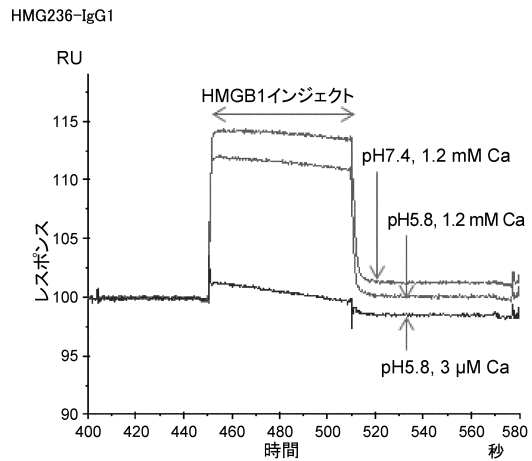
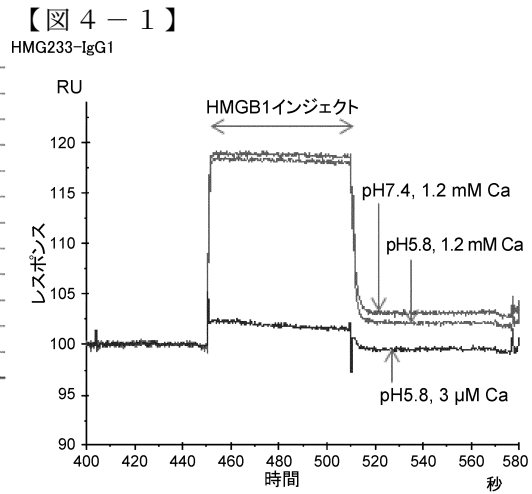
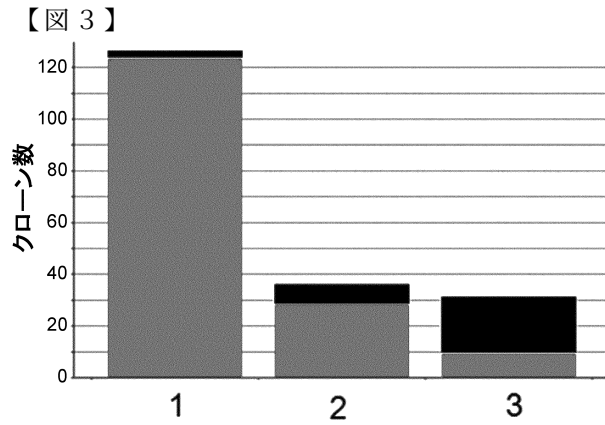
20

【図1】

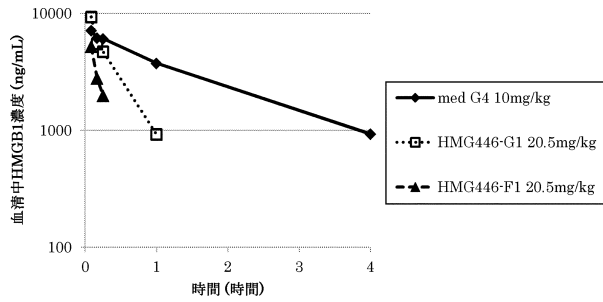


【図2】

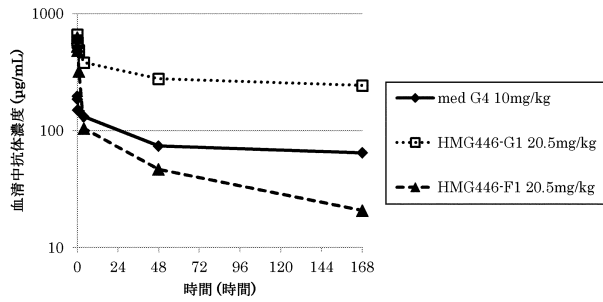




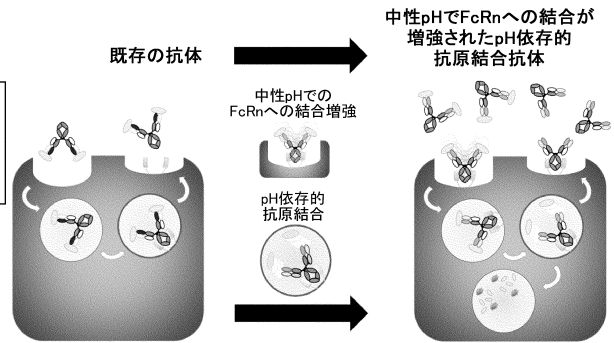
【図 7】



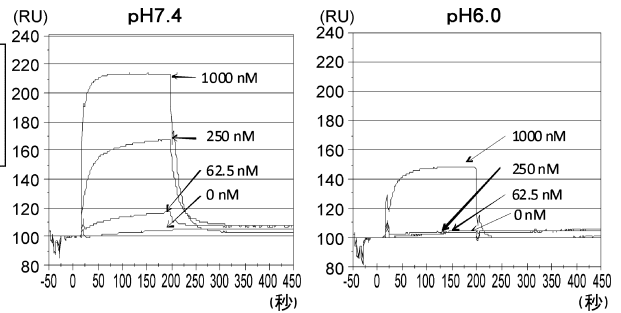
【図 8】



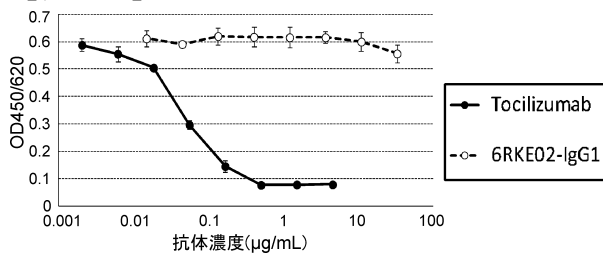
【図 9】



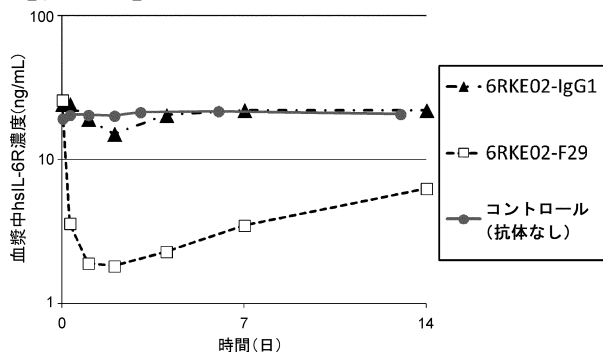
【図 10】



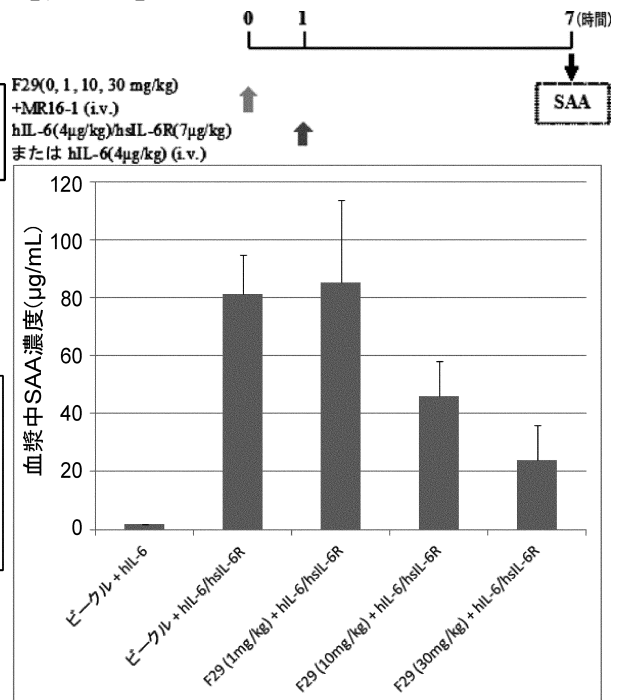
【図 11】



【図 12】

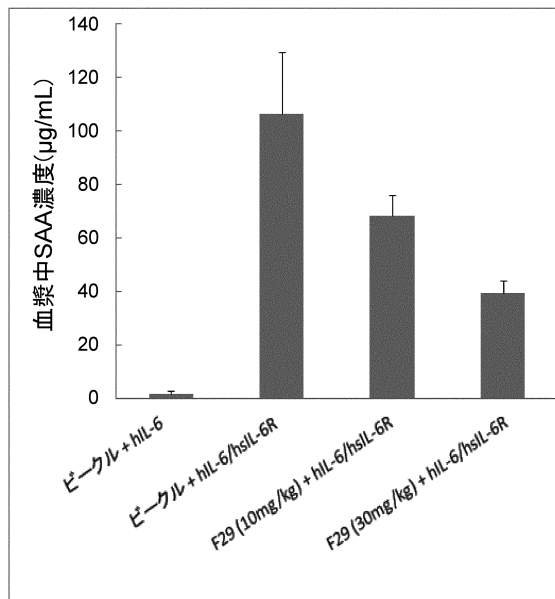


【図 13】

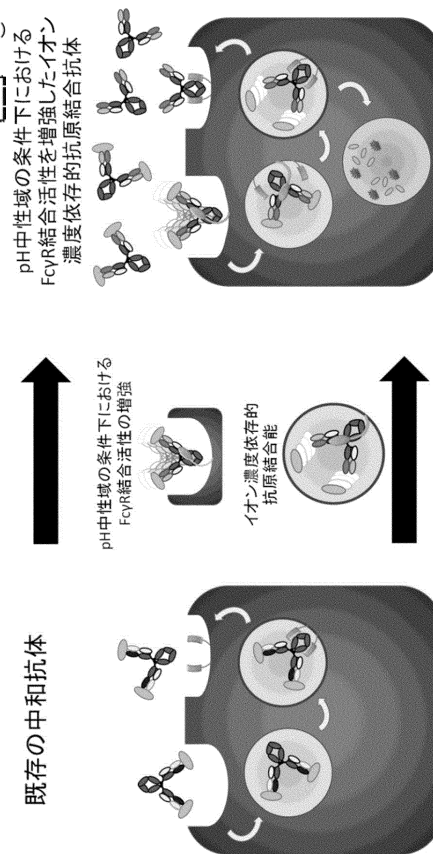


【図 14】

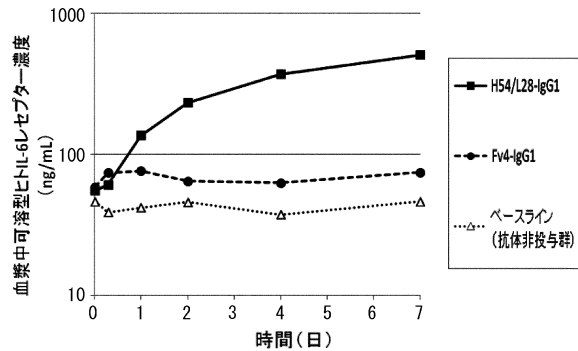
F29(0, 10, 30 mg/kg)  
+MR16-1(20 mg/kg) (i.v.)  
hIL-6(4μg/kg)/hslL-6R(7μg/kg)  
または hIL-6(4μg/kg) (i.v.)



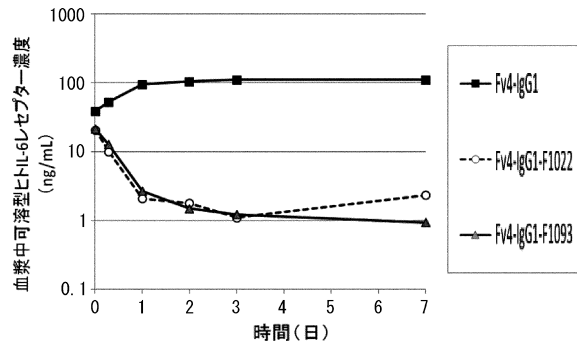
【図 15】



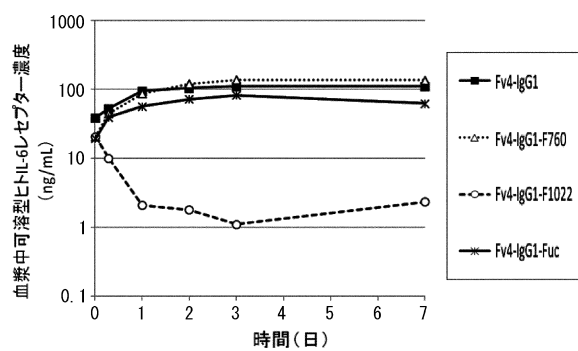
【図 16】



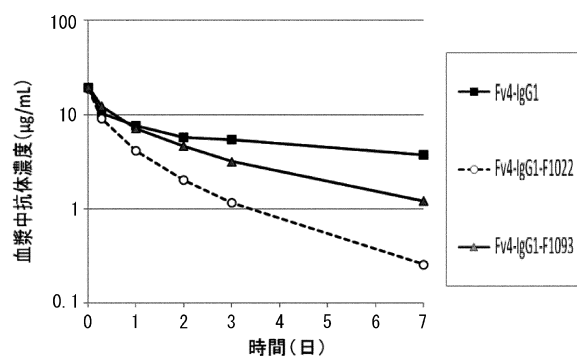
【図 18】

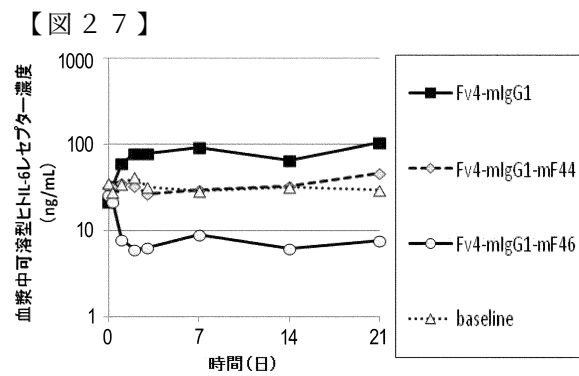
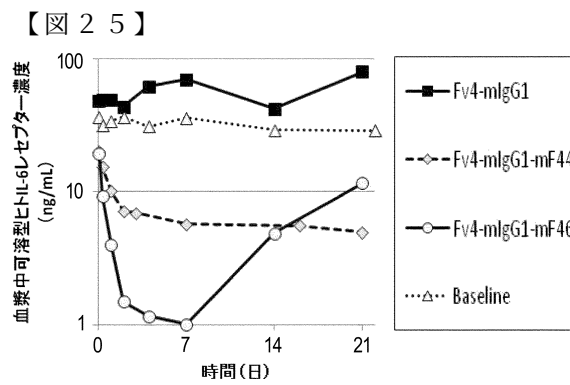
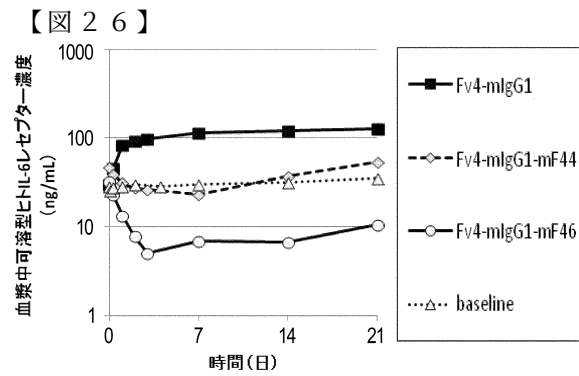
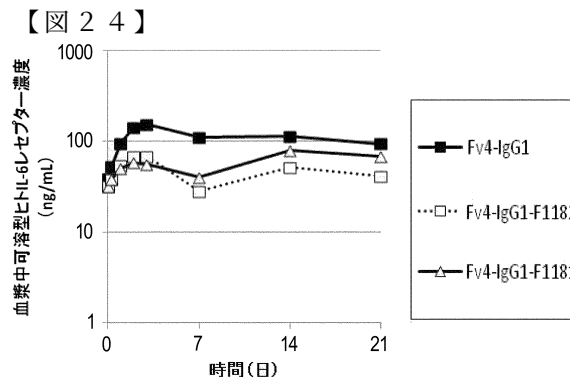
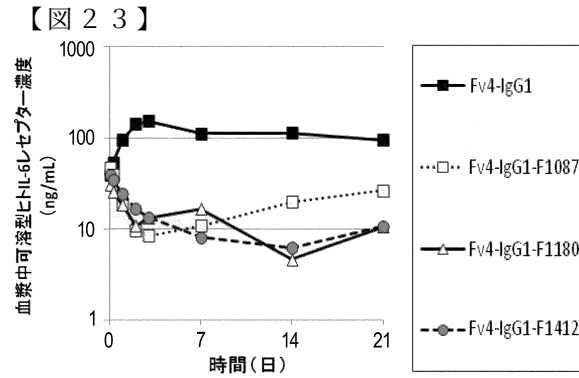
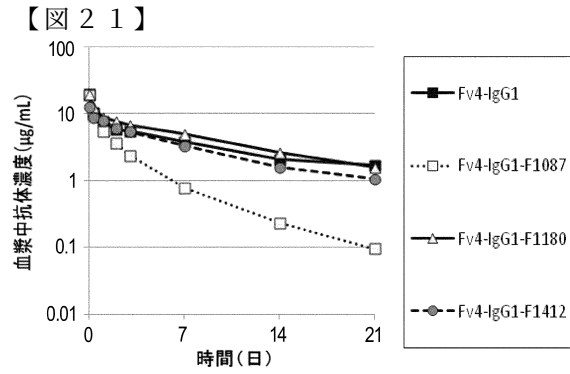
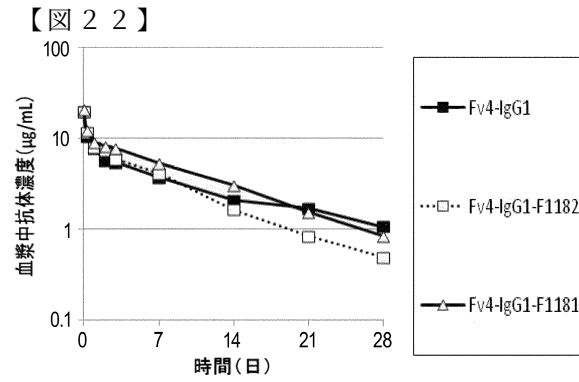
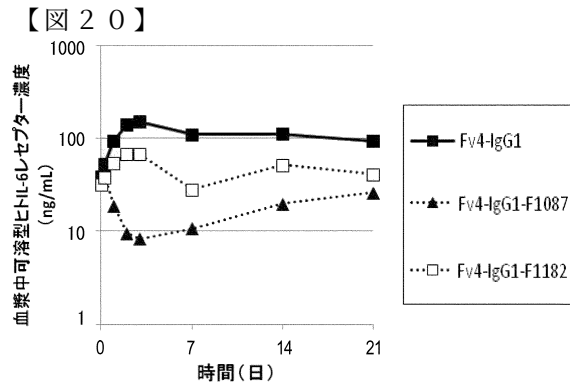


【図 17】

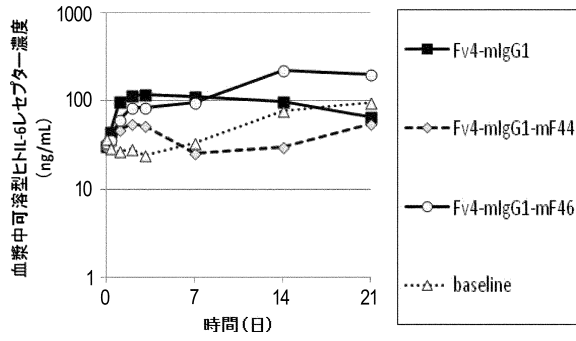


【図 19】

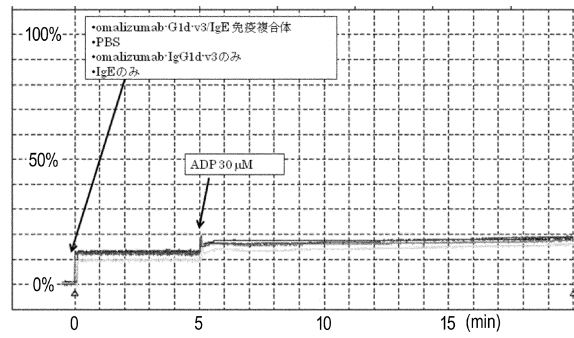




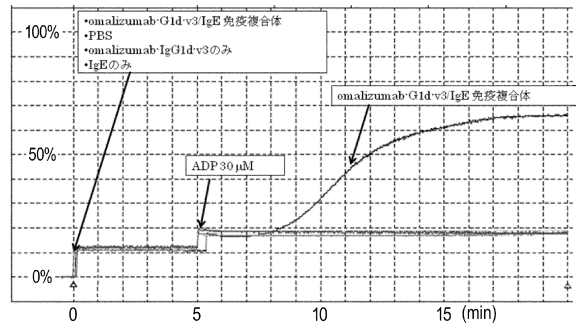
【図 28】



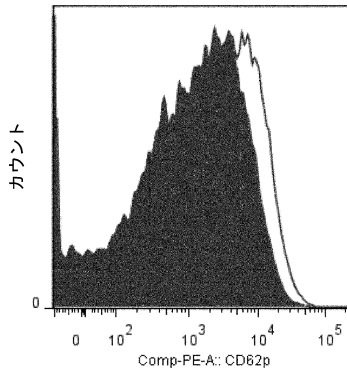
【図 30】



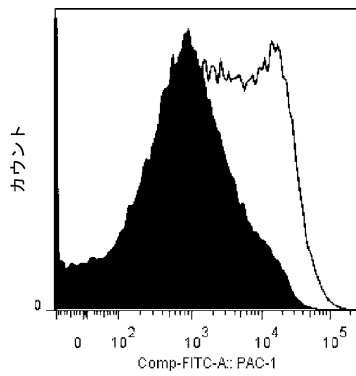
【図 29】



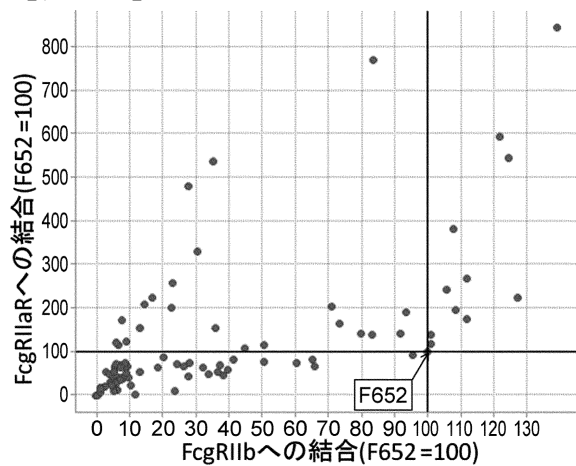
【図 31】



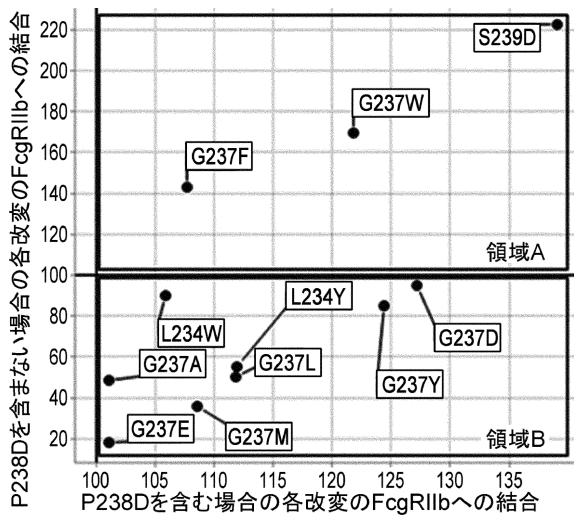
【図 32】



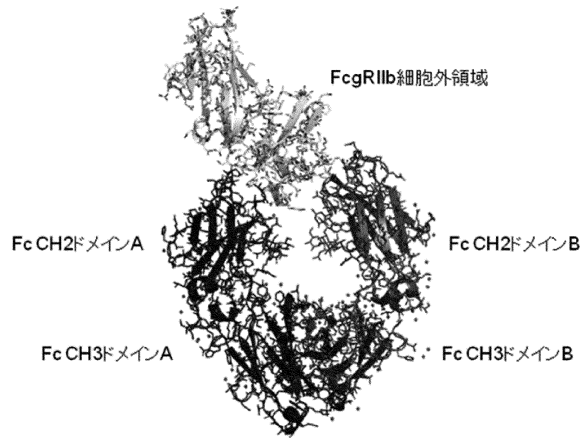
【図 33】



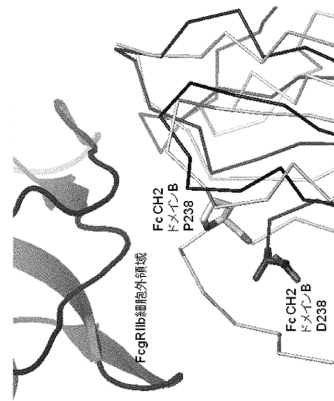
【図 34】



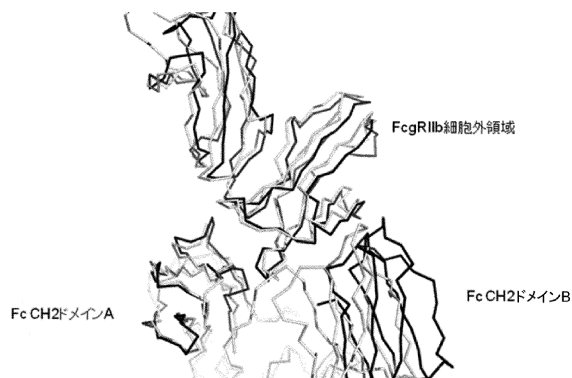
【図 35】



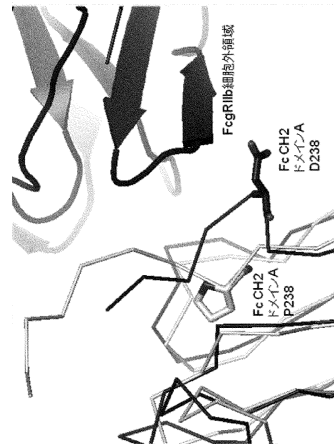
【図 37】



【図 36】

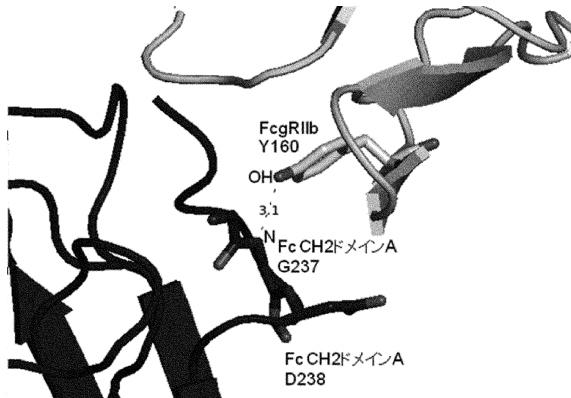


黒 Fc(P238D) / FcγRIIb細胞外領域複合体の結晶構造  
 灰色 Fc(WT) / FcγRIIb細胞外領域複合体のモデル構造

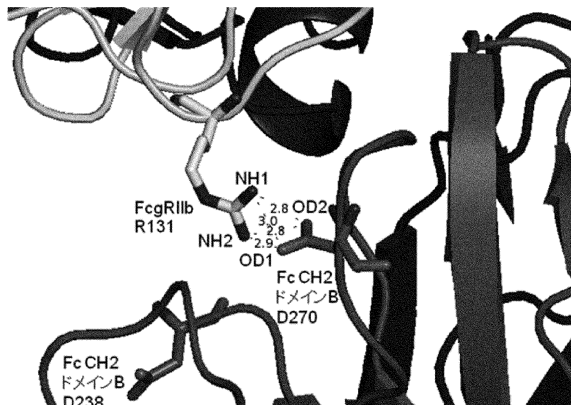


黒 Fc(P238D) / FcγRIIb細胞外領域複合体の結晶構造  
 灰色 Fc(WT) / FcγRIIb細胞外領域複合体のモデル構造

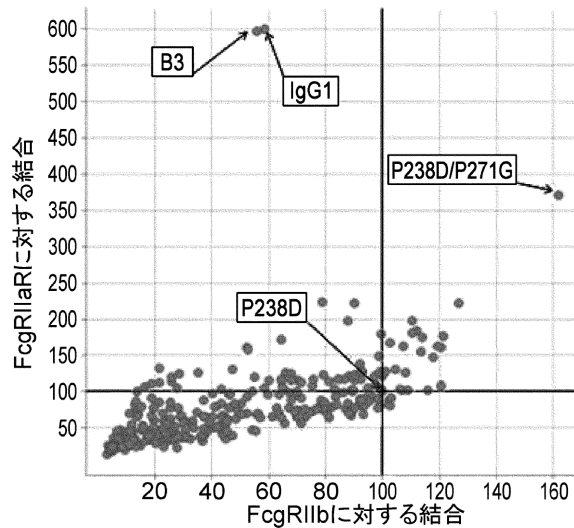
【図 38】



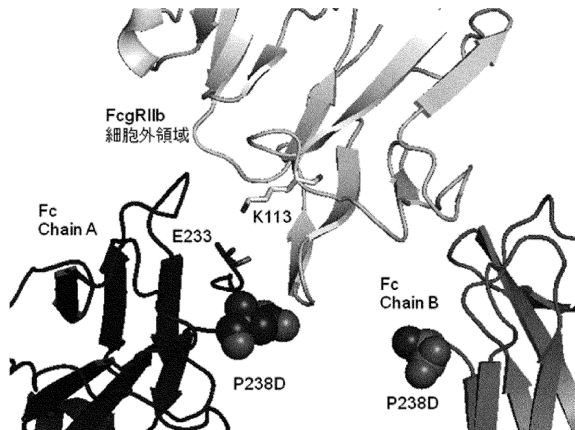
【図 39】



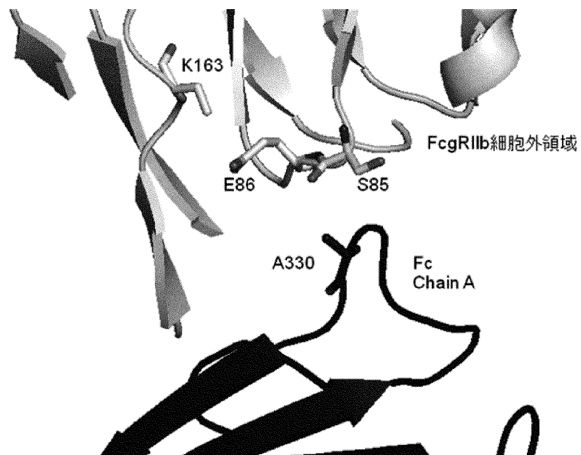
【図 40】



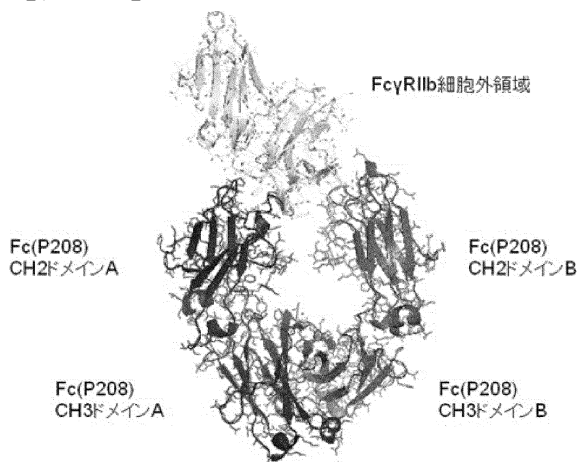
【図 4 1】



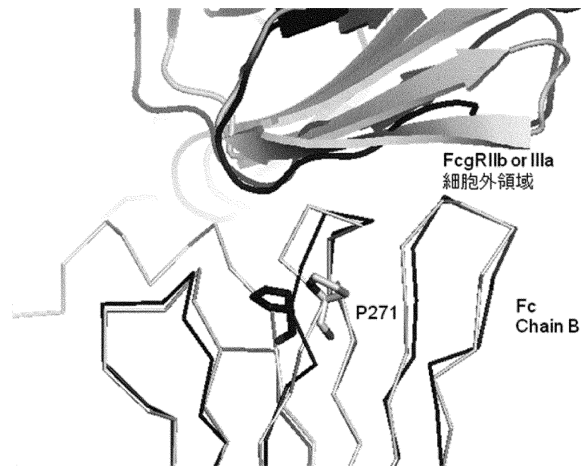
【図 4 2】



【図 4 4】

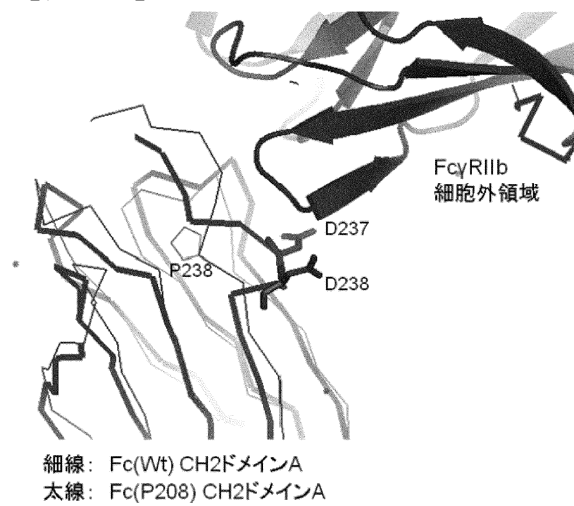


【図 4 3】

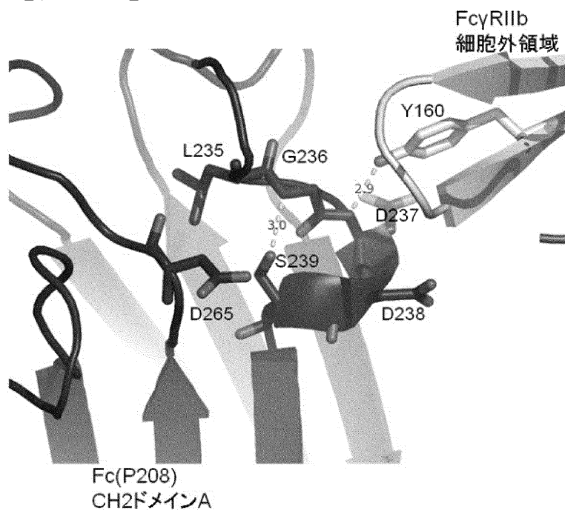


黒 Fc(P238D) / FcγRIIb 細胞外領域複合体の結晶構造  
 灰色 Fc(WT) / FcγRIIIa 細胞外領域複合体の結晶構造 (PDB code: 3SGJ)

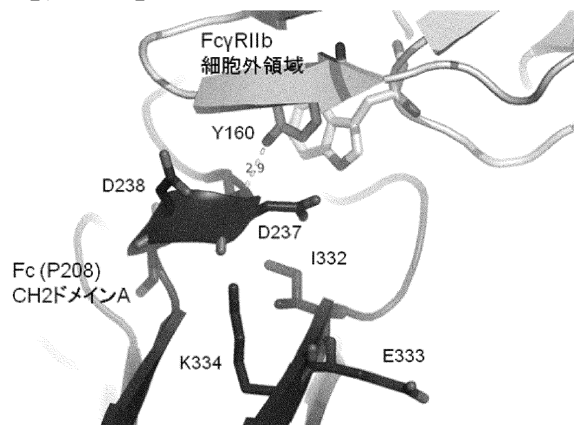
【図 4 5】



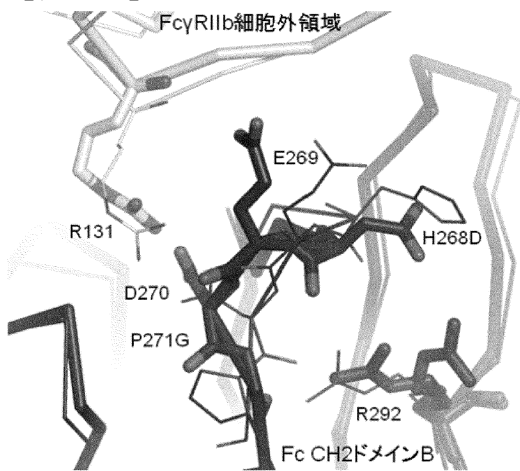
【図 4 6】



【図 4 7】

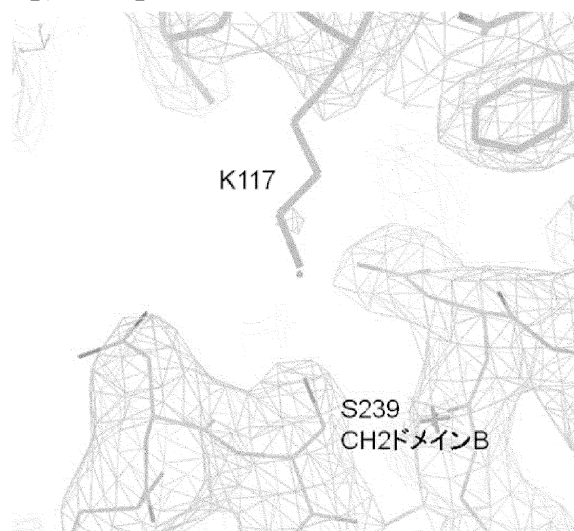


【図 4 8】



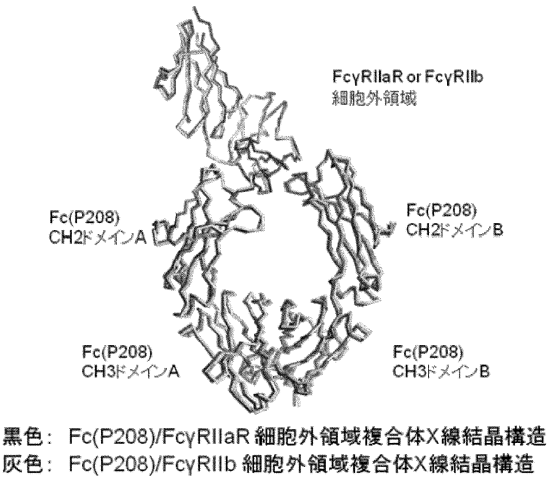
細線: Fc(P238D)/FcγRIIb 細胞外領域複合体X線結晶構造  
太線: Fc(P208)/FcγRIIb 細胞外領域複合体X線結晶構造

【図 4 9】

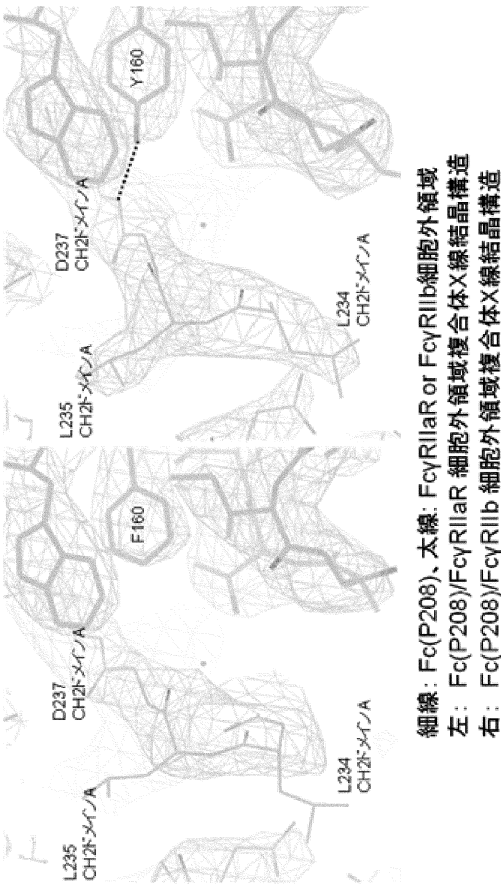


細線: Fc(P208)、太線: FcγRIIb細胞外領域

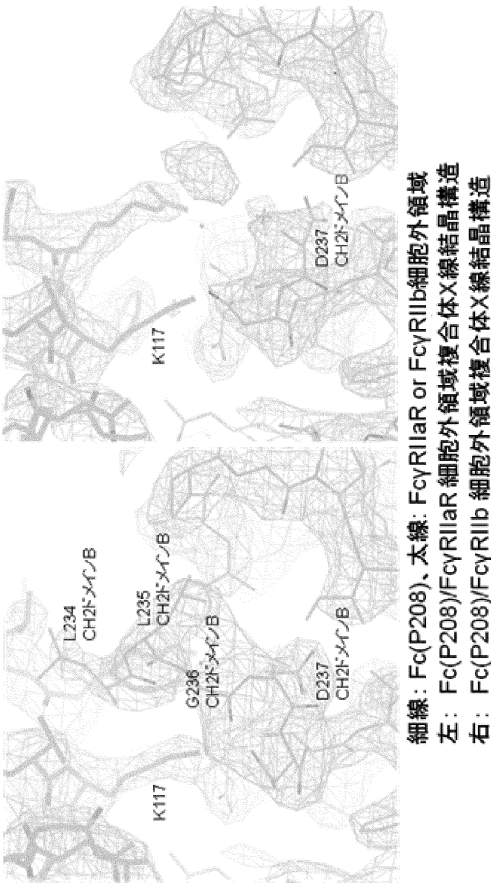
【図 5 0】



【図 5 1】



【図 5 2】

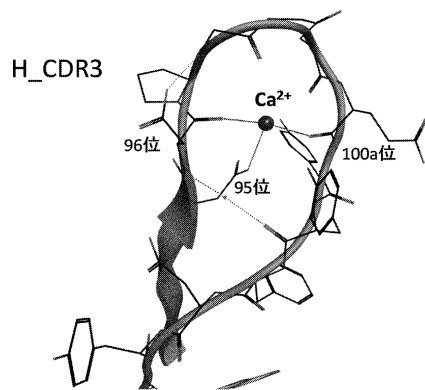


【図 5 3】

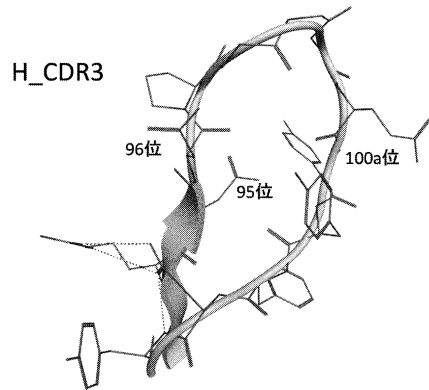
|     |     |        |        |       |       |       |       |       |        |       |       |        |        |       |       |       |       |       |
|-----|-----|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| G1d | 118 | ASTKGP | SVPLAP | ESSTG | TAALG | CLVDF | PEP   | VTVM  | NSGALT | SGVHT | PEAV  | IQSSGL | YSLSSV | TVFP  | SSSLG | DTY   | YCNV  | NHKPS |
| G4d | 118 | ASTKGP | SVPLAP | ESSTG | TAALG | CLVDF | PEP   | VTVM  | NSGALT | SGVHT | PEAV  | IQSSGL | YSLSSV | TVFP  | SSSLG | DTY   | YCNV  | NHKPS |
| G1d | 208 | NTKVD  | NTKVD  | NTKVD | NTKVD | NTKVD | NTKVD | NTKVD | NTKVD  | NTKVD | NTKVD | NTKVD  | NTKVD  | NTKVD | NTKVD | NTKVD | NTKVD | NTKVD |
| G4d | 208 | NTKVD  | NTKVD  | NTKVD | NTKVD | NTKVD | NTKVD | NTKVD | NTKVD  | NTKVD | NTKVD | NTKVD  | NTKVD  | NTKVD | NTKVD | NTKVD | NTKVD | NTKVD |
| G1d | 298 | STYRV  | SVLTV  | LHQL  | DLNG  | KEK   | CKV   | SNK   | SL     | HEKT  | ISKAK | GPREF  | QVY    | TL    | PPSE  | ET    | TKNQ  | SVLTV |
| G4d | 298 | STYRV  | SVLTV  | LHQL  | DLNG  | KEK   | CKV   | SNK   | SL     | HEKT  | ISKAK | GPREF  | QVY    | TL    | PPSE  | ET    | TKNQ  | SVLTV |
| G1d | 388 | ENNYK  | TTFP   | VLDS  | DG    | SF    | LY    | SL    | LTVD   | KSR   | WQ    | SNV    | FSC    | SVW   | HEAL  | HNHY  | TQ    | KSLS  |
| G4d | 388 | ENNYK  | TTFP   | VLDS  | DG    | SF    | LY    | SL    | LTVD   | KSR   | WQ    | SNV    | FSC    | SVW   | HEAL  | HNHY  | TQ    | KSLS  |

【図 5 4】

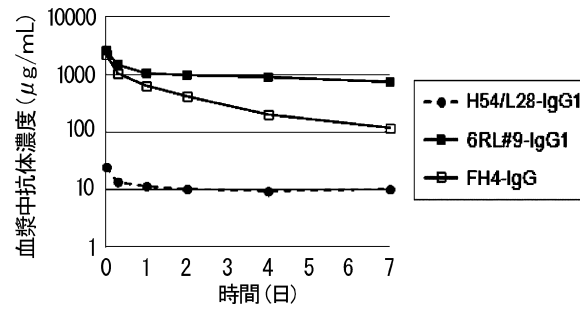
(i) カルシウムイオン存在下での結晶の構造



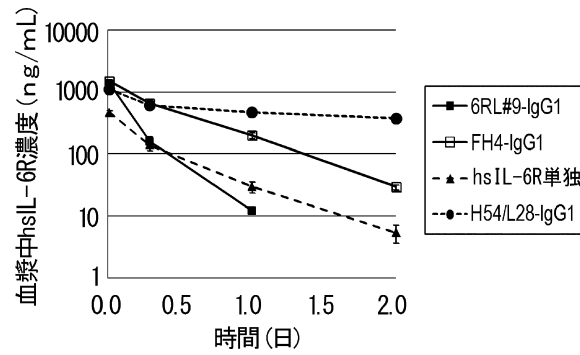
(ii) カルシウムイオン非存在下での結晶の構造



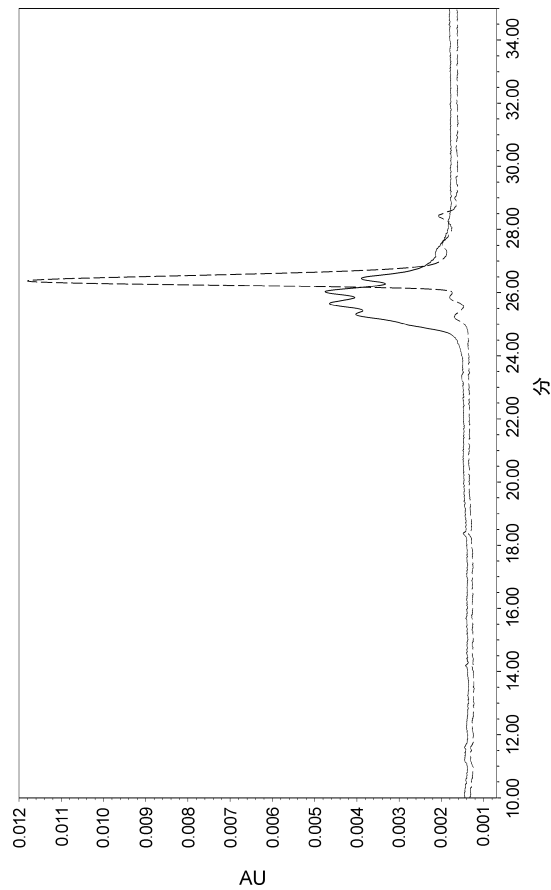
【図 5 5】



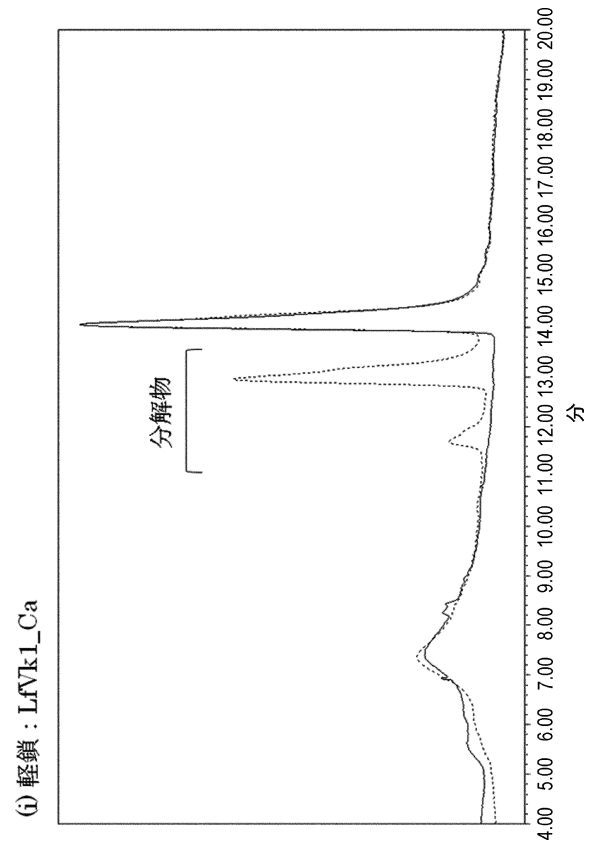
【図 5 6】



【図 5 7】

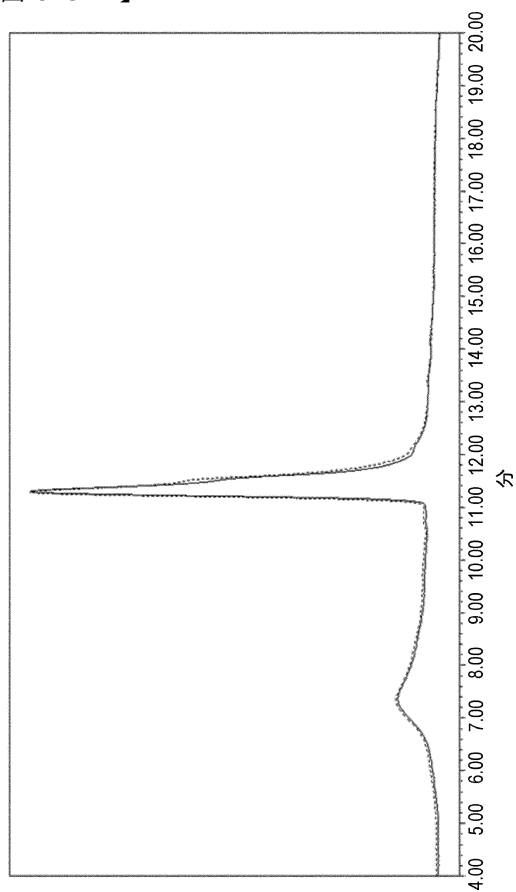


【図 5 8 A】



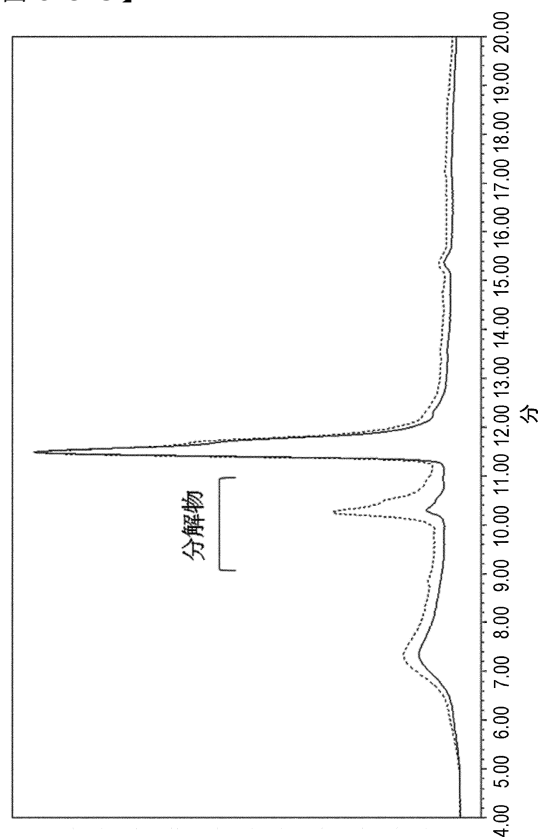
【図 5 8 B】

(ii) 軽鎖 : LFVk1\_Ca1



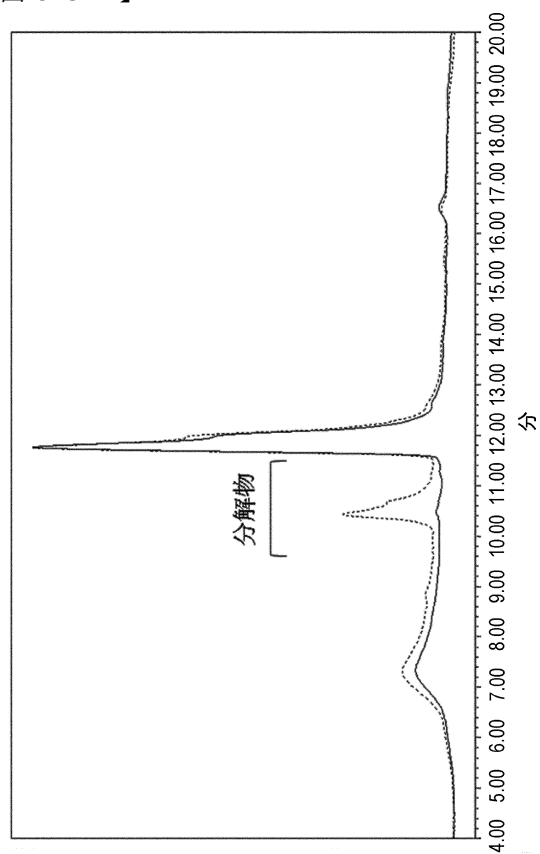
【図 5 8 C】

(iii) 軽鎖 : LFVk1\_Ca2



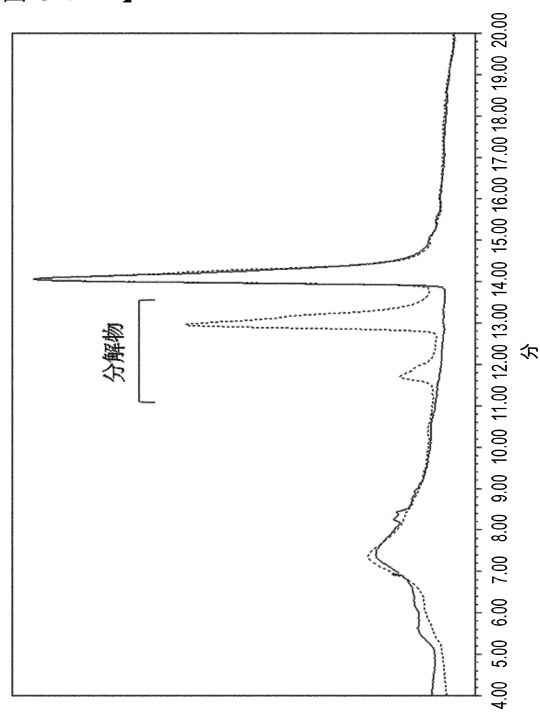
【図 5 8 D】

(iv) 軽鎖 : LFVk1\_Ca3

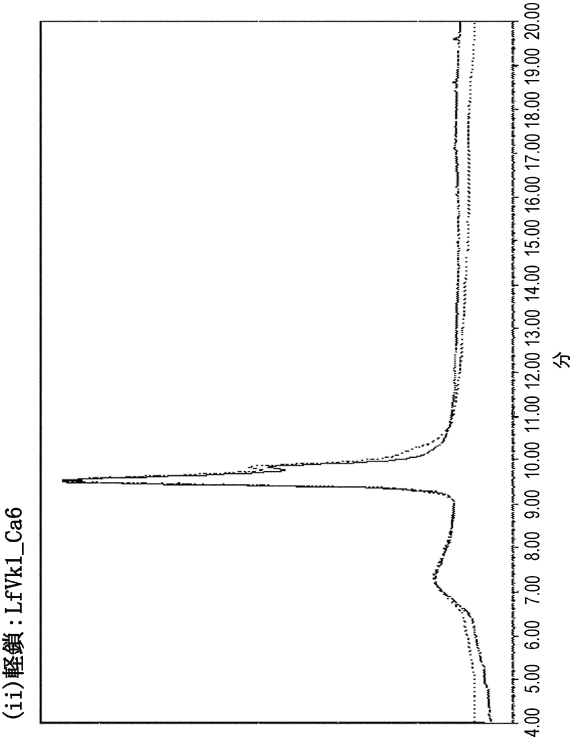


【図 5 9 A】

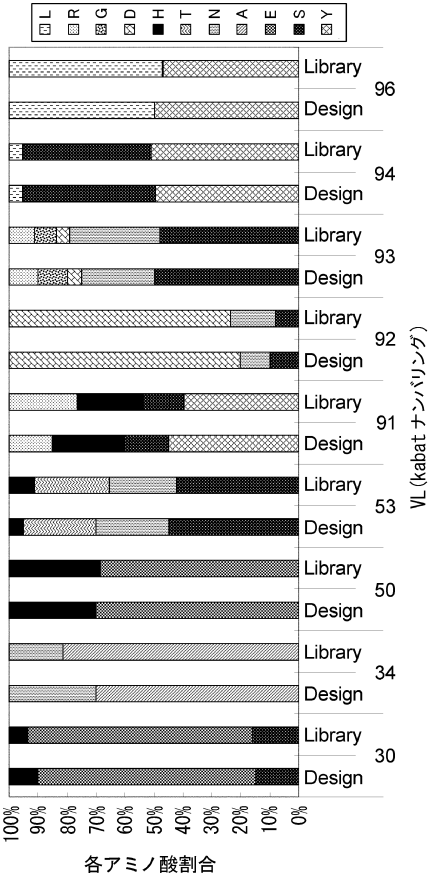
(i) 軽鎖 : LFVk1\_Ca



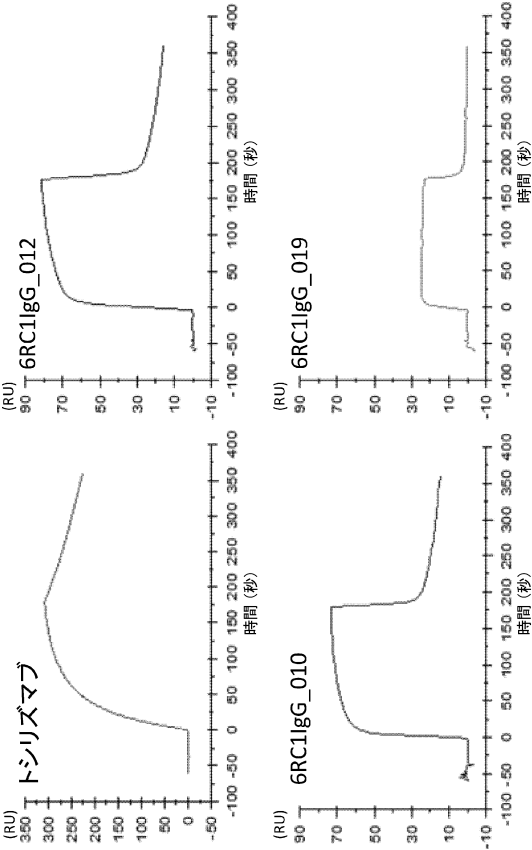
【図 59 B】



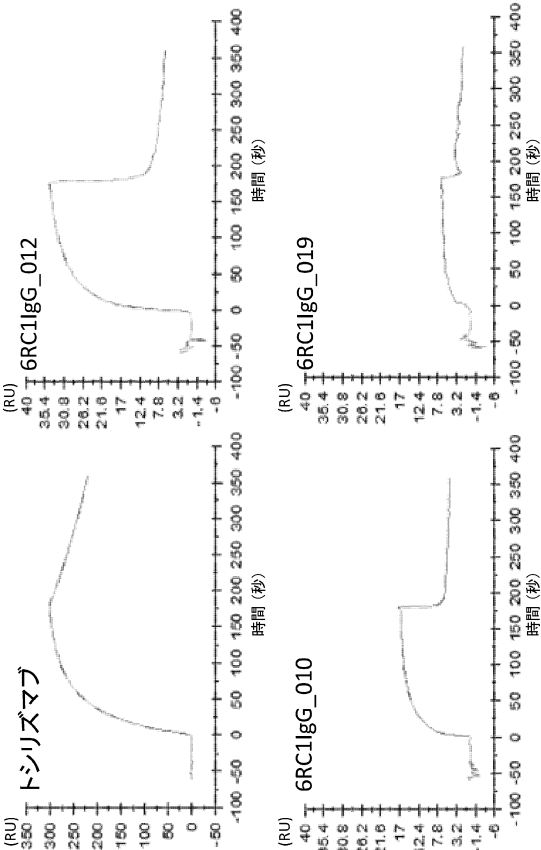
【図 60】

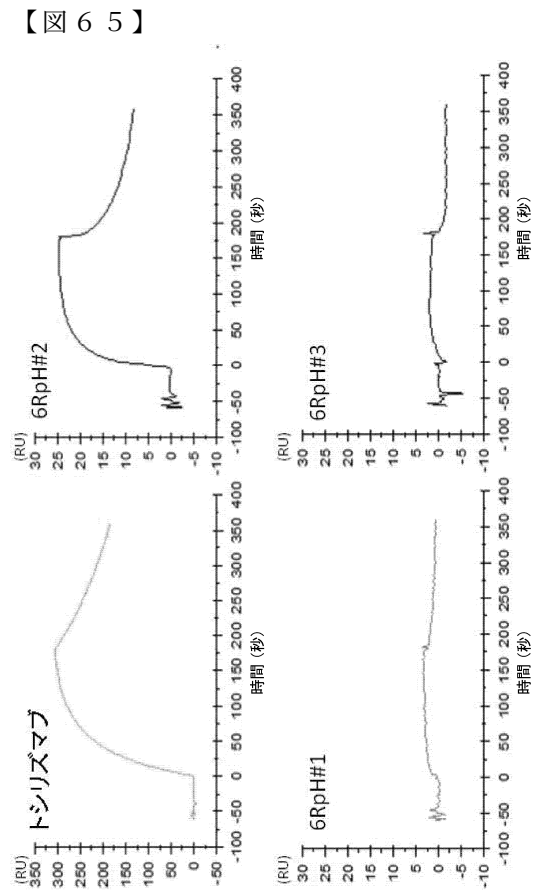
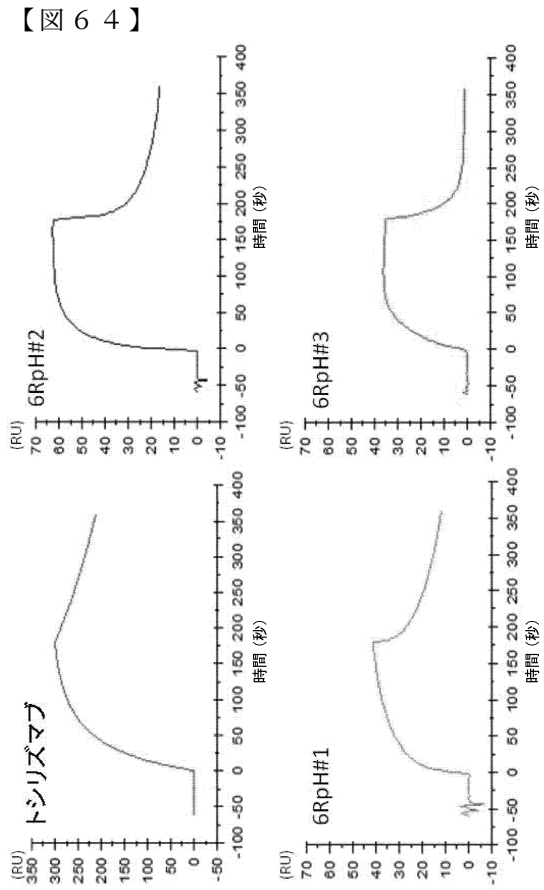
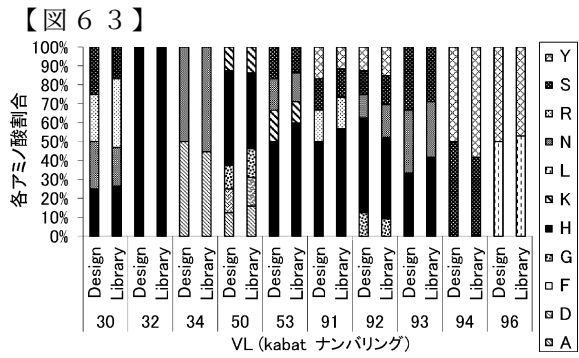


【図 61】



【図 62】





【配列表】

0006685272000001.app

## フロントページの続き

|                |               |                  |         |          |
|----------------|---------------|------------------|---------|----------|
| (51)Int.Cl.    |               | F I              |         |          |
| <b>G 0 1 N</b> | <b>33/15</b>  | <b>(2006.01)</b> | G 0 1 N | 33/15 Z  |
| <b>A 6 1 K</b> | <b>39/395</b> | <b>(2006.01)</b> | A 6 1 K | 39/395 N |
| <b>A 6 1 P</b> | <b>31/04</b>  | <b>(2006.01)</b> | A 6 1 P | 31/04    |
| <b>A 6 1 P</b> | <b>19/04</b>  | <b>(2006.01)</b> | A 6 1 P | 19/04    |

(74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707  
弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889  
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 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 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 丹波 茂郎  
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 北澤 剛久  
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 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 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

審査官 清野 千秋

(56)参考文献 国際公開第2009/125825 (WO, A1)  
特表2008-519860 (JP, A)  
国際公開第2011/122011 (WO, A1)  
国際公開第2010/106180 (WO, A1)  
Nat.Biotechnol., 2010年, Vol.28, No.11, p.1203-1207  
J.Immunol., 2009年, Vol.182, p.7663-7671  
J.Immunol., 2010年, Vol.184, p.1968-1976  
Nat.Biotechnol., 2010年, Vol.28, No.2, p.157-159  
BIO INDUSTRY, Jun., 2011年 6月, Vol.28, No.7, p.15-21

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C 0 7 K 1 6 / 2 8  
A 6 1 K 3 9 / 3 9 5

A61P 19/04  
A61P 31/04  
C12N 5/0781  
C12N 15/13  
C12P 21/08  
G01N 33/15  
G01N 33/50  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)