



(21)申請案號：109142631 (22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 12 月 03 日

(51)Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01) A61K39/395 (2006.01)

(30)優先權：	2020/01/24	日本	2020-010411
	2020/01/24	日本	2020-010413
	2020/01/24	日本	2020-010414
	2020/01/24	日本	2020-010416
	2020/01/24	日本	2020-010417
	2020/01/24	日本	2020-010418
	2020/01/24	日本	2020-010419
	2020/01/24	日本	2020-010420
	2020/05/28	日本	2020-093384
	2020/05/28	日本	2020-093389
	2020/05/28	日本	2020-093392
	2020/05/28	日本	2020-093399
	2020/05/28	日本	2020-093405
	2020/05/28	日本	2020-093411
	2020/05/28	日本	2020-093421
	2020/05/28	日本	2020-093424

(71)申請人：日商西斯美股份有限公司 (日本) SYSMEX CORPORATION (JP)
日本

(72)發明人：前田真吾 MAETA, SHINGO (JP)；福永淳 FUKUNAGA, ATSUSHI (JP)；巴札 瑞瑪 BAJAJ, REEMA (IN)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

(56)參考文獻：

JP 2018-108072A

期刊 Fukunaga et. al., "Improvement of antibody affinity by introduction of basic amino acid residues into the framework region" Biochemistry and Biophysics Reports, vol.15, Elsevier, 2018, p.81-85

期刊 Fukunaga et. al., "Improving the affinity of an antibody for its antigen via long-range electrostatic interactions" Protein Engineering, Design & Selection, vol.26, no. 12, Oxford University Press, 2013, p.773-780

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：27 項 圖式數：9 共 91 頁

(54)名稱

提升抗體對抗原之親和性的方法及其用途

(57)摘要

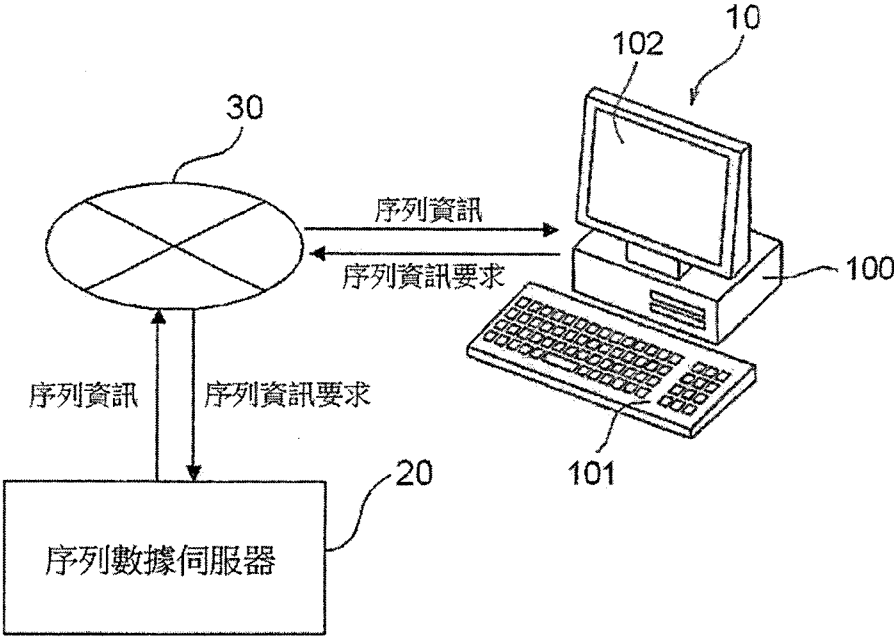
本發明之課題係提供一種提升抗體對抗原之親和性的新穎方法，係不改變互補性決定區域的胺基酸序列，但改變框架區域的胺基酸序列，藉此提升抗體對抗原之親和性；以及一種對抗原之親和性經提升的抗體。

本發明係於抗體之輕鏈框架區域的胺基酸序列中，在精胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、纈胺酸、天冬胺酸及麩胺酸之胺基酸頻率的合計值成為 35% 以上的位置且溶劑暴露表面積比率顯示為 20% 以上之胺基酸殘基之中，至少 3 個被設為帶電荷胺基酸殘基，藉此，解決上述課題。

The purpose of the present invention is to provide a novel method for enhancing affinity of antibody for antigen and an antibody having enhanced affinity for antigen by changing amino acid sequences in a framework region without changing amino acid sequences in a complimentary determining region.

The above purpose is solved by setting at least three amino acid residues as charged amino acid residues, among amino acid residues at a position where the total value of amino acid frequencies of arginine, serine, threonine, valine, aspartic acid and glutamic acid becomes 35% or more and the solvent exposure surface area ratio indicates 20% or more, in the amino acid sequences of light chain framework of an antibody.

指定代表圖：



- 符號簡單說明：
- 10:胺基酸序列的解析裝置
 - 20:序列數據伺服器
 - 30:網絡
 - 100:調控部(電腦本體)
 - 101:輸入部
 - 102:輸出部

【圖1】

I841810

【發明摘要】

【中文發明名稱】 提升抗體對抗原之親和性的方法及其用途

【英文發明名稱】 METHOD FOR IMPROVING AFFINITY OF
ANTIBODY FOR ANTIGEN AND USE THEREOF

【中文】

本發明之課題係提供一種提升抗體對抗原之親和性的新穎方法，係不改變互補性決定區域的胺基酸序列，但改變框架區域的胺基酸序列，藉此提升抗體對抗原之親和性；以及一種對抗原之親和性經提升的抗體。

本發明係於抗體之輕鏈框架區域的胺基酸序列中，在精胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、纈胺酸、天冬胺酸及麩胺酸之胺基酸頻率的合計值成為 35% 以上的位置且溶劑暴露表面積比率顯示為 20% 以上之胺基酸殘基之中，至少 3 個被設為帶電荷胺基酸殘基，藉此，解決上述課題。

【英文】

The purpose of the present invention is to provide a novel method for enhancing affinity of antibody for antigen and an antibody having enhanced affinity for antigen by changing amino acid sequences in a framework region without changing amino acid sequences in a complimentary determining region.

The above purpose is solved by setting at least three amino acid residues as charged amino acid residues, among amino acid residues at a

position where the total value of amino acid frequencies of arginine, serine, threonine, valine, aspartic acid and glutamic acid becomes 35% or more and the solvent exposure surface area ratio indicates 20% or more, in the amino acid sequences of light chain framework of an antibody.

【指定代表圖】 圖1

【代表圖之符號簡單說明】

10:胺基酸序列的解析裝置

20:序列數據伺服器

30: 網絡

100:調控部(電腦本體)

101:輸入部

102:輸出部

【特徵化學式】 無。

【發明說明書】

【中文發明名稱】 提升抗體對抗原之親和性的方法及其用途

【英文發明名稱】 METHOD FOR IMPROVING AFFINITY OF
ANTIBODY FOR ANTIGEN AND USE THEREOF

【技術領域】

【0001】 本發明係關於提升抗體對抗原之親和性的方法。本發明係關於與未修改抗體相比，對抗原的親和性已提升的修改抗體。本發明係關於與未修改抗體相比，對抗原的親和性已提升的抗體的製造方法。本發明係關於抗體的胺基酸序列的解析方法。本發明係關於抗體的候補修改位點的具體辨識方法。

【先前技術】

【0002】 先前，已知藉由修改抗體的胺基酸序列，使該抗體對抗原之親和性變化的技術。例如，專利文獻 1 中，藉由將抗體的框架區域 3 的至少 3 個胺基酸殘基設為帶電荷胺基酸殘基，而控制對抗原的親和性的方法。此方法中，維持互補性決定區域(CDR)的胺基酸序列原樣，提升抗體對抗原之親和性。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0003】

[專利文獻 1] 美國專利申請公開案第 2018/0179298 號說明書

【發明內容】**[發明欲解決的課題]**

【0004】 本發明的目的係提供不修改 CDR 的胺基酸序列，但修改框架區域(FR)的胺基酸殘基而提升抗體對抗原之親和性的新穎方法，以及對抗原之親和性經提升的新穎抗體。

[解決課題用之手段]

【0005】 本發明者們發現抗體之輕鏈 FR 的胺基酸序列中各位置的預定胺基酸殘基的胺基酸頻率的合計值、以及該 FR 中各胺基酸殘基的溶劑暴露表面積比率，係參與抗體對抗原的親和性，進而完成本發明。

【0006】 本發明係提供一種提升抗體對抗原的親和性的方法，該方法係於抗體之輕鏈 FR 的胺基酸序列中，在精胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、纈胺酸、天冬胺酸以及麩胺酸的胺基酸頻率的合計值成為 35% 以上的位置且溶劑暴露表面積比率顯示為 20% 以上的胺基酸殘基之中，至少 3 個被設為帶電荷胺基酸殘基，藉此，與未修改抗體相比，提升抗體對抗原的親和性。

【0007】 本發明提供一種與未修改抗體相比，對抗原之親和性經提升的修改抗體。此修改抗體中，未修改抗體之輕鏈 FR 的胺基酸序列中，在精胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、纈胺酸、天冬胺酸以及麩胺酸的胺基酸頻率的合計值成為 35% 以上的位置且溶劑暴露表面積比率顯示為 20% 以上的胺基酸殘基之中，至少 3 個被設為帶電荷胺基酸殘基。

【0008】 本發明提供一種與未修改抗體相比，對抗原之親和性經提升的抗體的製造方法，係包含下列步驟：於抗體之輕鏈 FR 的胺基酸序列中，

在精胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、纈胺酸、天冬胺酸以及麩胺酸的胺基酸頻率的合計值成為 35% 以上的位置且溶劑暴露表面積比率顯示為 20% 以上的胺基酸殘基之中，至少 3 個被設為帶電荷胺基酸殘基的步驟，以及回收該步驟所獲得的抗體的步驟。

【0009】 本發明提供一種抗體的胺基酸序列的解析方法，係包含下列步驟：取得抗體之輕鏈 FR 的胺基酸序列中各位置的精胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、纈胺酸、天冬胺酸以及麩胺酸的胺基酸頻率的合計值的步驟，取得抗體之輕鏈框架區域中各胺基酸殘基的溶劑暴露表面積比率的步驟，以及輸出所取得的各位置的胺基酸頻率的合計值以及各胺基酸殘基的溶劑暴露表面積比率的步驟。

【0010】 本發明提供一種具體辨識出抗體的候補修改位點的方法，係包含下列步驟：取得抗體之輕鏈 FR 的胺基酸序列中各位置的精胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、纈胺酸、天冬胺酸以及麩胺酸的胺基酸頻率的合計值的步驟，取得抗體之輕鏈框架區域中各胺基酸殘基的溶劑暴露表面積比率的步驟，以及，將在胺基酸頻率的合計值成為 35% 以上的位置且溶劑暴露表面積比率顯示為 20% 以上的胺基酸殘基具體辨識為胺基酸殘基的候補的步驟，該胺基酸殘基的候補係為了提升抗體對抗原之親和性而被修改者。

【0011】 本發明提供一種與未修改抗體相比，對抗原之親和性經提升的修改抗體。此修改抗體中，經修改的胺基酸殘基的位置，係藉由上述抗體的候補修改位點的具體辨識方法所具體辨識出之胺基酸殘基的候補中之至少 3 個胺基酸殘基的位置，修改係成為帶電荷胺基酸殘基的修改。

【0012】 本發明提供一種與未修改抗體相比，對抗原的親和性經提升的抗體的製造方法，係包含下列步驟：藉由上述之抗體的候補修改位點的具體辨識方法所具體辨識出之胺基酸殘基的候補中，將至少 3 個修改成帶電荷胺基酸殘基的步驟，以及回收該步驟所獲得的抗體的步驟。

【0013】 本發明提供一種提升抗體對抗原之親和性的方法，係包含：於未修改抗體中，藉由將選自以 Kabat 法所定義的輕鏈的第 3、5、9、17、18、20、22、60、63、65、67、70、72、74、76、77、79 以及 81 號的胺基酸殘基所組成群組中之至少 3 個胺基酸殘基設為帶電荷胺基酸殘基，與未修改抗體相比，使對抗原之親和性提升，其中，該 3 個胺基酸殘基係包含選自由輕鏈的第 3、5、9、17、18、20、22、60、74、76、77、79 以及 81 號的胺基酸殘基所組成群組中之至少一者。

【0014】 本發明提供一種與未修改抗體相比，對抗原之親和性經提升的修改抗體。此修改抗體中，選自由未修改抗體中以 Kabat 法所定義之輕鏈的第 3、5、9、17、18、20、22、60、63、65、67、70、72、74、76、77、79 以及 81 號的胺基酸殘基所組成群組中之至少 3 個胺基酸殘基被設為帶電荷胺基酸殘基，其中，該 3 個胺基酸殘基係包含選自由輕鏈的第 3、5、9、17、18、20、22、60、74、76、77、79 以及 81 號的胺基酸殘基所組成群組中之至少一者。

【0015】 本發明係提供一種與未修改抗體相比，對抗原之親和性經提升的抗體的製造方法，係包含下列步驟：於未修改抗體中，將選自由以 Kabat 法所定義之輕鏈的第 3、5、9、17、18、20、22、60、63、65、67、70、72、74、76、77、79 以及 81 號的胺基酸殘基所組成群組中之至少 3

個胺基酸殘基設為帶電荷胺基酸殘基的步驟，以及回收此步驟所得之抗體的步驟，其中，該 3 個胺基酸殘基係包含選自由輕鏈的第 3、5、9、17、18、20、22、60、74、76、77、79 以及 81 號的胺基酸殘基所組成群組中之至少一者。

[發明的功效]

【0016】 根據本發明，可提供對抗原之親和性經提升的抗體。

【圖式簡單說明】

【0017】

圖 1 係胺基酸序列的解析系統的概略圖。

圖 2 係顯示胺基酸序列的解析系統的硬體構成圖。

圖 3 係顯示由胺基酸序列的解析裝置所進行之未修改抗體的胺基酸序列的解析處理的流程圖。

圖 4 係顯示解析結果的顯示畫面的一例之圖。

圖 5 係顯示由胺基酸序列的解析裝置所進行之用以具體辨識出抗體的候補修改位點之胺基酸序列的解析處理的流程圖。

圖 6 係顯示解析結果的顯示畫面的一例之圖。

圖 7 係顯示由胺基酸序列的解析裝置所進行之胺基酸序列的解析處理的流程圖，該解析處理係用以作成將抗體的修改位點的候補設成帶電荷胺基酸殘基時的序列。

圖 8 係顯示由胺基酸序列的解析裝置所進行之胺基酸序列的解析處理的流程圖，該解析處理係作成當 CDR 的電特性為中性時將抗體的候補修改位點設成帶電荷胺基酸殘基時的序列。

圖 9 係將抗體的溶出液以 SDS-PAGE 分離且以考馬西藍(CBB)染色之凝膠的照片。

【實施方式】

【0018】 [1. 提升抗體對抗原之親和性的方法]

本實施態樣之使抗體對抗原之親和性提升的方法(以下，亦稱為「親和性的提升方法」)，係於抗體之輕鏈 FR 胺基酸序列中滿足預定條件的胺基酸殘基之中，將至少 3 個胺基酸殘基設為帶電荷胺基酸殘基。藉此，與未修改的抗體相比，提升抗體對抗原的親和性。在此，成為藉由根據上述本發明所提供的方法而提升對抗原的親和性之原本的抗體稱為「未修改抗體」。本說明書中之「未修改抗體」意指具有適用「親和性的提升方法」前的胺基酸序列之抗體。「未修改抗體」，不僅為具有天然胺基酸序列的抗體(野生型抗體)，亦包含胺基酸序列基於「親和性的提升方法」以外的方法經人為變更而得的抗體。

【0019】 本實施態樣中，未修改抗體沒有特別限定。本實施態樣之親和性的提升方法不需要變更 CDR 的胺基酸序列，因此可為任一種辨識抗原的抗體。較佳實施態樣中，未修改抗體係編碼輕鏈可變區域的基因的鹼基序列為公知或可確認該鹼基序列的抗體。具體而言，抗體基因的鹼基序列已揭示於公知數據庫的抗體，或可取得產生該抗體之融合瘤的抗體。此等

之數據庫可列舉例如：GeneBank、abYsis、IMGT 等。抗體的類型可為 IgG、IgA、IgM、IgD 以及 IgE 之任一者，較佳為 IgG。未修改抗體在具有包含 FR 的可變區域的限制下，亦可為抗體片段的形態。此等之抗體片段可列舉例如：Fab 片段、F(ab')₂ 片段、Fab' 片段、Fd 片段、Fv 片段、dAb 片段、單鏈抗體(scFv)、還原型 IgG(rIgG)等。此等之中，特佳為 Fab 片段。

【0020】 未修改抗體之一例於表 1 顯示人源化抗 HER2 抗體(曲妥珠單抗)的輕鏈以及重鏈的胺基酸序列，以及 Fab 片段的重鏈胺基酸序列。表 1 中，附加底線部分表示可變區域，以灰色標記部分表示 CDR。

【0021】 [表 1]

• 野生型的人源化抗 HER2 抗體的輕鏈

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAWAYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSQSR
SGTDFLTITISLQPEDFATYYCDQHYYTPPTFGGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV
CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC (序列編號 35)

• 野生型的人源化抗 HER2 抗體的重鏈

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVK
GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGQDGFYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TQCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (序列編號 36)

• 野生型的人源化抗 HER2 抗體的 Fab 片段的重鏈

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVK
GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGQDGFYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (序列編號 37)

【0022】 野生型的人源化抗 HER2 抗體的輕鏈之各 CDR 以及可變區域的胺基酸序列係如下述。

• 輕鏈 CDR1：RASQDVNTAVA (序列編號 38)

- 輕鏈 CDR2 : SASFLYS (序列編號 39)
- 輕鏈 CDR3 : QQHYTTPPT (序列編號 40)
- 可變區域 : DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWY
QQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFAT
YYCQQHYTTPPTFGQGKVEIKRTV (序列編號 41)

【0023】 野生型的人源化抗 HER2 抗體的重鏈之各 CDR 以及可變區域的胺基酸序列係如下述。

- 重鏈 CDR1 : DTYIH (序列編號 42)
- 重鏈 CDR2 : RIYPTNGYTRYADSVKG (序列編號 43)
- 重鏈 CDR3 : WGGDGFYAMDY (序列編號 44)
- 可變區域 : EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW
VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQM
NSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS (序列編號 45)

【0024】 框架區域(FR)係存在於抗體的輕鏈以及重鏈之各別的可變區域，為 CDR 以外的區域。FR 係擔任連結 3 個 CDR 的支架的角色，賦予 CDR 的結構穩定性。因此，FR 的胺基酸序列係於同種(species)抗體間被高度地保存。輕鏈以及重鏈之各別的可變區域中，有 CDR1、CDR2 以及 CDR3 之 3 個 CDR，以及 FR1、FR2、FR3 以及 FR4 之 4 個 FR。該等係從可變區域的 N 末端側以 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 以及 FR4 的順序排列。以下，述及抗體的 FR 時，除非特別限定，「框架區域」以及「FR」之用語意指輕鏈 FR。

【0025】本實施態樣之親和性的提升方法，係在未修改抗體的輕鏈 FR 胺基酸序列中滿足預定條件的胺基酸殘基中，至少 3 個被設為帶電荷胺基酸殘基。滿足預定條件的胺基酸殘基，係滿足下述(1)及(2)條件二者的胺基酸殘基。

(1) 未修改抗體之輕鏈 FR 的胺基酸序列中，精胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、纈胺酸、天冬胺酸以及麩胺酸的胺基酸頻率的合計值成為 35% 以上的位置。

(2) 未修改抗體之輕鏈 FR 的胺基酸序列中，溶劑暴露表面積比率顯示為 20% 以上。

【0026】本說明書中，未修改抗體中，將滿足上述(1)以及(2)條件之胺基酸殘基作成帶電荷胺基酸殘基之行為，亦稱為「進行修改」或「修改」。以下，將未修改抗體藉由本實施態樣之親和性的提升方法修改而得之抗體亦稱為「修改抗體」。

【0027】由於 CDR 參與抗體的特異性，因此本實施態樣之親和性的提升方法中，較佳為不變更 CDR 的胺基酸序列。亦即，修改抗體之 CDR 的胺基酸序列，較佳為與未修改抗體之 CDR 的胺基酸序列相同。

【0028】本實施態樣中，修改抗體對抗原之親和性，可藉由抗原抗體反應中之動力學參數評估，亦可藉由 ELISA 法等免疫學測定法評估。動力學的參數係可列舉例如：解離常數(K_d)、結合速度常數(k_{on})以及解離速度常數(k_{off})。其等之中較佳為 K_d 。抗原抗體反應中之動力學參數，可藉由表面電漿子共振(SPR)技術等而取得。與未修改抗體相比較，修改抗體之抗原抗體反應中之 K_d 值例如為約 1/2、約 1/5、約 1/10、約 1/20、約 1/50、約 1/100 或約 1/1000。

【0029】 本說明書中之「位置」意指某胺基酸序列中胺基酸殘基的位置。本實施態樣中，FR 的胺基酸序列中之位置，係藉由對 CDR 的胺基酸殘基附加編號的方法(以下，亦稱為「編號法」)所定義之 FR 的胺基酸序列中之位置。編號法係用以定義 CDR 的界限以及長度之方法，已知於所屬技術領域。藉由編號法對 CDR 的胺基酸序列附加編號時，亦對 FR 的胺基酸序列附加編號。本實施態樣中，FR 的胺基酸序列中之位置，係以編號法所附加的編號顯示。本說明書中，「Ln」(n 為正整數)係表示輕鏈胺基酸序列中第 n 號的位置。例如，L1 意指輕鏈胺基酸序列之第 1 號位置，L2 意指輕鏈胺基酸序列之第 2 號位置。

【0030】 編號法可列舉例如：Kabat 法(Kabat EA.等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest., NIH publication No.91-3242)、Chothia 法(Chothia C.以及 Lesk AM., Canonical Structures for the Hypervariable Regions of Immunoglobulins., J Mol Biol., vol.196, p.901-917, 1987)、IMGT 法(Lefranc MP. 等人, Developmental and Comparative Immunology 29 (2005) 185-203)、Honergger 法(Honegger A. 等人, Yet Another Numbering Scheme for Immunoglobulin Variable Domains: An Automatic Modeling and Analysis Tool., J Mol Biol., vol.309, p.657-670, 2001)、ABM 法、Contact 法等。本實施態樣中，抗體的 FR 可以任一編號法定義，較佳係藉由 Kabat 法定義。未修改抗體中，以 Kabat 法定義，輕鏈 FR1 係定義為包含輕鏈的第 1 至 23 號的胺基酸殘基的區域，輕鏈 FR2 係定義為包含輕鏈的第 35 至 49 號的胺基酸殘基的區域，輕鏈 FR3 係定義

為包含輕鏈的第 57 至 88 號的胺基酸殘基的區域，輕鏈 FR4 係定義為包含輕鏈的第 98 至 109 號的胺基酸殘基的區域。

【0031】 胺基酸頻率，亦稱為胺基酸出現頻率，意指將複數個胺基酸序列的整列(alignment)，於該等胺基酸序列之各位置中，顯示預定的胺基酸以何種程度出現的比例。胺基酸頻率本身為已知的指標。胺基酸序列的整列，意指將複數個胺基酸序列整列為可比較的狀態。胺基酸序列的整列，例如可藉由 ClustalW、TREBMAL 等習知多重整列程式等進行。再者，胺基酸頻率的算出方法本身係習知，可藉由上述多重整列程式等算出。胺基酸序列的整列以及胺基酸頻率的算出可藉由 abYsis 進行。abYsis 不僅可利用為提供抗體序列的數據庫，亦可利用為抗體之序列、結構以及功能之解析及預測用之軟體。例如，於經整列的複數個胺基酸序列之預定位置中，某胺基酸在該複數個胺基酸序列全部出現時，此位置之該胺基酸的胺基酸頻率成為 100%。於經整列的複數個胺基酸序列之預定位置中，某胺基酸於該複數個胺基酸序列中出現半數時，此位置之該胺基酸的胺基酸頻率成為 50%。於經整列的複數個胺基酸序列之預定位置中，某胺基酸一次都沒有出現時，此位置之該胺基酸的胺基酸頻率成為 0%。

【0032】 本實施態樣中，未修改抗體之 FR 中，為了具體辨識出滿足上述(1)條件的胺基酸殘基，取得複數個參考抗體之輕鏈胺基酸序列。藉由整列所取得之複數個參考抗體之輕鏈胺基酸序列，可取得參考抗體之輕鏈 FR 的胺基酸序列中之各位置的胺基酸頻率。從複數個參考抗體所取得之各位置的胺基酸頻率，可利用為未修改抗體之輕鏈胺基酸序列中之對應位置的胺基酸頻率。參考抗體係在與未修改抗體為胺基酸序列不同的抗體之限

制下，沒有特別限定。抗體之 FR 的胺基酸序列，由於在同種抗體間高度地保存，參考抗體較佳為與未修改抗體為同種的抗體。參考抗體之輕鏈胺基酸序列，可由 GeneBank、abYsis、IMGT 等習知的數據庫取得。參考抗體之輕鏈胺基酸序列的數目沒有特別限定，例如為 1000 以上，較佳為 10000 以上。取得之複數個參考抗體之輕鏈胺基酸序列，可為輕鏈全體的胺基酸序列，亦可為輕鏈之一部分胺基酸序列。輕鏈之一部分胺基酸序列，較佳為包含 FR1 及/或 FR3 的胺基酸序列。

【0033】 將所取得之複數個參考抗體之輕鏈胺基酸序列整列，取得參考抗體之 FR 的胺基酸序列之各位置中精胺酸(R)、絲胺酸(S)、蘇胺酸(T)、纈胺酸(V)、天冬胺酸(D)以及麩胺酸(E)之各別的胺基酸頻率。此處，「將複數個參考抗體之輕鏈胺基酸序列整列」意指於複數個參考抗體之輕鏈胺基酸序列之間，以使藉由預定的編號法所附加之 FR 中的胺基酸殘基編號成一致的方式，排列該複數個參考抗體之輕鏈胺基酸序列。本實施態樣中，較佳為使藉由 Kabat 法所附加之 FR 中之胺基酸殘基的編號成一致的方式，排列複數個參考抗體之輕鏈胺基酸序列。針對各位置，將 R、S、T、V、D 以及 E 的胺基酸頻率之值合計並算出合計值。例如，於經整列之複數個參考抗體之輕鏈胺基酸序列中，某 1 個位置的胺基酸頻率的合計值 X(%), 係可從出現在該位置的 R、S、T、V、D 以及 E 的數目，以及所取得之參考抗體之輕鏈胺基酸序列的數目，藉由下述式(I)算出。針對包含經整列之複數個參考抗體之輕鏈 FR1 及/或輕鏈 FR3 的胺基酸序列之各位置進行該計算。算出所使用之參考抗體之輕鏈胺基酸序列的數目，於每個位置亦可不

同。例如，L1 之 X 值係可基於 10000 個參考抗體之輕鏈胺基酸序列算出，L2 之 X 值係可基於 15000 個參考抗體之輕鏈胺基酸序列算出。

【0034】

$$X = \frac{(\text{R 的數目}) + (\text{S 的數目}) + (\text{T 的數目}) + (\text{V 的數目}) + (\text{D 的數目}) + (\text{E 的數目})}{(\text{參考抗體之輕鏈胺基酸序列的數目})} \times 100 \quad \cdots(I)$$

【0035】 於經整列的複數個參考抗體之輕鏈胺基酸序列中，具體辨識出所取得之胺基酸頻率的合計值成為 35% 以上，較佳成為 37% 以上的位置。然後，滿足上述(1)條件的胺基酸殘基，係具體辨識為於未修改抗體之輕鏈 FR 中，位於與從複數個參考抗體所具體辨識出的位置對應之位置的胺基酸殘基。此等胺基酸殘基，例如，亦可藉由將未修改抗體之輕鏈胺基酸序列、及複數個參考抗體之輕鏈胺基酸序列整列而具體辨識。複數個參考抗體之輕鏈胺基酸序列例如基於藉由 Kabat 法所定義之 FR 進行整列時，未修改抗體之 FR 中，藉由 Kabat 法所附加之胺基酸殘基的編號，係具體辨識為與上述胺基酸頻率的合計值成為 35% 以上之參考抗體的序列中的位置相同的胺基酸殘基。

【0036】 本實施態樣中，滿足上述(2)條件的胺基酸殘基，係基於未修改抗體之輕鏈胺基酸序列而被具體辨識。具體而言，首先，使用未修改抗體之輕鏈胺基酸序列，取得該未修改抗體之輕鏈的三維結構數據。三維結構數據係包含構成蛋白質之各胺基酸殘基的座標數據，較佳為藉由 RasMol、Jmol 等習知的分子圖案程式可將蛋白質的立體結構視覺化的數據。三維結構數據亦可針對未修改抗體之輕鏈進行 X 射線結晶結構解析、NMR 解析等習知的立體結構解析而取得。較佳實施態樣中，三維結構數據，

可從 PDB(Protein Data Bank)、BMRB(Biological Magnetic Resonance Bank)等習知的蛋白質立體結構數據庫，藉由檢索未修改抗體之輕鏈胺基酸序列而獲得。數據庫中，存在具有與未修改抗體之輕鏈胺基酸序列一致序列的蛋白質時，下載該蛋白質的三維結構數據。

【0037】 蛋白質立體結構數據庫中，沒有未修改抗體之輕鏈的三維結構數據時，亦可取得作成該三維結構數據所必須的資訊，基於此資訊作成三維結構數據。例如，亦可基於未修改抗體之輕鏈胺基酸序列，藉由同源建模法等作成三維結構數據。同源建模法中，三維結構數據的作成所必須的資訊，係使用與未修改抗體之輕鏈胺基酸序列具有至少 20%同一性且立體結構為已知的抗體之輕鏈胺基酸序列(以下，亦稱為「參考序列」)。所屬技術領域中，已知胺基酸序列的同一性高的蛋白質之間為立體結構互相類似。參考序列可由例如 GeneBank、abYsis、IMGT 等習知的數據庫取得。同源建模法中，將未修改抗體之輕鏈胺基酸序列與參考序列整列，基於整列的結果，從參考序列之已知結構構築未修改抗體之輕鏈的三維結構。藉由同源建模法進行之三維結構數據作成本身為習知，例如可藉由 MODELLER 等習知的立體結構預測程式進行。

【0038】 其次，基於所取得之三維結構數據，取得未修改抗體之 FR 的各胺基酸殘基的溶劑暴露表面積比率。所屬技術領域中，溶劑暴露表面積係以接近蛋白質分子表面(凡得瓦爾表面)的方式，定義為假設水分子的探針球 (1.4Å)轉動時之該探針球的中心的軌跡面。溶劑暴露表面積本身為習知的指標。蛋白質的溶劑暴露表面積可從該蛋白質的三維結構數據藉由 SURFace、GETAREA、Discovery Studio 等習知程式或軟體取得。再者，

亦可取得蛋白質中各胺基酸殘基的溶劑暴露表面積。蛋白質中胺基酸殘基的溶劑暴露表面積，係根據該胺基酸的側鏈大小而不同。此處，將蛋白質中胺基酸殘基的溶劑暴露表面積作為該胺基酸的側鏈大小經規格化之指標，使用溶劑暴露表面積比率。溶劑暴露表面積比率本身為習知的指標。例如，蛋白質 A 中胺基酸 X 的溶劑暴露表面積比率 Y(%)，係藉由下述式 (II) 算出。式中，「Ala-X-Ala」係由胺基酸 X 以 2 個丙胺酸夾持之序列構成的三肽。

【0039】

$$Y = \frac{(\text{蛋白質 A 中的胺基酸 X 的溶劑暴露表面積})}{(\text{Ala-X-Ala 中的胺基酸 X 的溶劑暴露表面積})} \times 100 \quad \cdots \text{(II)}$$

【0040】 然後，於未修改抗體之 FR 的胺基酸序列中，具體辨識出所取得之溶劑暴露表面積比率為 20% 以上，較佳為 25% 以上之胺基酸殘基。藉此，於未修改抗體之 FR 的胺基酸序列中，可具體辨識存在於 R、S、T、V、D 以及 E 的胺基酸頻率的合計值成為 35% 以上的位置且溶劑暴露表面積比率顯示為 20% 以上之胺基酸殘基。

【0041】 滿足上述(1)及(2)條件的胺基酸殘基之中，帶電荷胺基酸殘基胺基酸殘基的數目例如為 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17 或 18。帶電荷胺基酸殘基可為鹼性胺基酸殘基，亦可為酸性胺基酸殘基。較佳地，帶電荷胺基酸殘基為相同電荷的胺基酸殘基。帶電荷胺基酸殘基可為相同殘基，亦可為不同殘基。鹼性胺基酸殘基意指離胺酸殘基、精胺酸殘基以及組胺酸殘基。酸性胺基酸殘基意指天冬胺酸殘基以

及麩胺酸殘基。本實施態樣中，帶電荷胺基酸殘基較佳為鹼性胺基酸殘基，特佳為離胺酸殘基以及精胺酸殘基。

【0042】 滿足上述(1)及(2)條件的胺基酸殘基之中，成為帶電荷胺基酸殘基之胺基酸殘基較佳為中性胺基酸殘基。所謂中性胺基酸殘基：丙胺酸殘基、天冬醯胺殘基、異白胺酸殘基、甘胺酸殘基、麩醯胺殘基、半胱胺酸殘基、蘇胺酸殘基、絲胺酸殘基、酪胺酸殘基、苯丙胺酸殘基、脯胺酸殘基、纈胺酸殘基、甲硫胺酸殘基、白胺酸殘基以及色胺酸殘基。

【0043】 滿足上述(1)及(2)條件的胺基酸殘基為帶電荷胺基酸殘基時，該胺基酸殘基亦可維持原樣。或者是，滿足上述(1)及(2)條件的胺基酸殘基為酸性胺基酸殘基時，該胺基酸殘基亦可作成鹼性胺基酸殘基。再者，滿足上述(1)及(2)條件的胺基酸殘基為鹼性胺基酸殘基時，該胺基酸殘基亦可作成酸性胺基酸殘基。

【0044】 本實施態樣中，基於未修改抗體之 CDR 的胺基酸序列之 CDR 的電特性為中性時，滿足上述(1)及(2)條件的胺基酸殘基亦可設為帶電荷胺基酸殘基。帶電荷胺基酸殘基較佳為鹼性胺基酸殘基。此處，所謂 CDR 的電特性係本發明者們所獨自定義的指標，CDR 的胺基酸序列中之帶電荷胺基酸殘基的數目而決定。具體而言，CDR 的電特性係藉由下述式(III)決定。

【0045】

$$Z = [\text{CDR 的胺基酸序列中的鹼性胺基酸殘基的數目}] - [\text{CDR 的胺基酸序列中的酸性胺基酸殘基的數目}] \cdots (III)$$

(式中，Z 為-1、0 或 1 時，CDR 的電特性為中性，

Z 為 2 以上時，CDR 的電特性為正電荷，

Z 為 -2 以下時，CDR 的電特性為負電荷)

【0046】 CDR 的電特性可基於輕鏈及/或重鏈之 CDR 的胺基酸序列決定。決定輕鏈之 CDR 的電特性時，式(III)中之 CDR 的胺基酸序列意指輕鏈之 CDR1、CDR2 以及 CDR3 之全部的胺基酸序列。再者，決定重鏈之 CDR 的電特性時，式(III)中之 CDR 的胺基酸序列意指重鏈之 CDR1、CDR2 以及 CDR3 之全部的胺基酸序列。較佳地，基於輕鏈以及重鏈二者之 CDR 胺基酸序列決定。此時，上述式(III)中之 CDR 的胺基酸序列意指輕鏈之 CDR1、CDR2 以及 CDR3、以及重鏈之 CDR1、CDR2 以及 CDR3 之全部的胺基酸序列。本實施態樣中，基於輕鏈以及重鏈二者之 CDR 的胺基酸序列所決定之電特性為中性之未修改抗體中，可將滿足上述(1)及(2)條件的胺基酸殘基之至少 3 個設為帶電荷胺基酸殘基，較佳是設為鹼性胺基酸殘基。

【0047】 CDR 的胺基酸序列可從揭示抗體基因序列之公共數據庫獲得。或者是，有產生未修改抗體之融合瘤時，CDR 的胺基酸序列係可藉由習知的方法，從該融合瘤取得編碼重鏈以及輕鏈的核酸，藉由定序該核酸的鹼基序列而獲得。

【0048】 CDR 的電特性根據抗體而不同。例如，於 Kabat 法中，後述實施例中所使用之野生型(亦即未修改)之抗溶菌酶抗體之輕鏈的 CDR 中，鹼性胺基酸殘基(精胺酸)為 1 個，無酸性胺基酸殘基。再者，重鏈的 CDR 中，鹼性胺基酸殘基(離胺酸)為 1 個，酸性胺基酸殘基(天冬胺酸)為

3 個。據此，野生型之抗溶菌酶抗體之 CDR 的電特性係定義為中性($Z = -1$)。又，基於 Chothia 法之該抗溶菌酶抗體之 CDR 的電特性成為負電荷。

【0049】 滿足上述(1)及(2)條件的胺基酸殘基，較佳為存在於 FR1 及/或 FR3 之胺基酸殘基。輕鏈 FR1 以及 FR3 中，滿足上述(1)及(2)條件的胺基酸殘基可列舉例如：以 Kabat 法所定義之輕鏈第 1、3、5、7、9、10、12、14、17、18、20、22、60、63、65、67、69、70、72、74、76、77、79 以及 81 號的胺基酸殘基。此等之中，第 1、3、5、7、9、10、12、14、17、18、20 以及 22 號的胺基酸殘基係存在於以 Kabat 法所定義之輕鏈 FR1，第 60、63、65、67、69、70、72、74、76、77、79 以及 81 號的胺基酸殘基係存在於以 Kabat 法所定義之輕鏈 FR3。

【0050】 較佳實施態樣中，滿足上述(1)及(2)條件的胺基酸殘基係以 Kabat 法所定義之輕鏈的第 3、5、9、17、18、20、22、60、63、65、67、70、72、74、76、77、79 以及 81 號的胺基酸殘基。該等胺基酸殘基之中，設為帶電荷胺基酸殘基之至少 3 個胺基酸殘基，較佳係包含選自以 Kabat 法所定義之輕鏈的第 3、5、9、17、18、20、22、60、74、76、77、79 以及 81 號的胺基酸殘基中之至少 1 者。設為帶電荷胺基酸殘基之至少 3 個胺基酸殘基，更佳係包含選自以 Kabat 法所定義之輕鏈的第 3、5、9、17、18、20、22、60、74、76、77、79 以及 81 號的胺基酸殘基中之至少 3 個。

【0051】 修改未修改抗體之輕鏈 FR1 的胺基酸殘基時，設為帶電荷胺基酸殘基之至少 3 個胺基酸殘基，較佳係選自以 Kabat 法所定義之輕鏈的第 3、5、9、17、18、20 以及 22 號的胺基酸殘基。如此之 3 個胺基酸殘基可舉出例如下列 1)至 4)之任一組合。

【0052】

- 1) 以 Kabat 法所定義之輕鏈的第 3、5 以及 9 號的胺基酸殘基；
- 2) 以 Kabat 法所定義之輕鏈的第 17、18 以及 20 號的胺基酸殘基；
- 3) 以 Kabat 法所定義之輕鏈的第 18、20 以及 22 號的胺基酸殘基；以及
- 4) 以 Kabat 法所定義之輕鏈的第 5、9 以及 22 號的胺基酸殘基。

【0053】 修改未修改抗體之輕鏈 FR3 的胺基酸殘基時，設為帶電荷胺基酸殘基之至少 3 個胺基酸殘基，較佳係選自以 Kabat 法所定義之輕鏈的第 60、63、65、67、70、72、74、76、77、79 以及 81 號的胺基酸殘基。該等胺基酸殘基之中，設為帶電荷胺基酸殘基之至少 3 個胺基酸殘基較佳係包含選自以 Kabat 法所定義之輕鏈的第 60、74、76、77、79 以及 81 號的胺基酸殘基中之至少 1 者。設為帶電荷胺基酸殘基之至少 3 個胺基酸殘基，更佳係包含選自以 Kabat 法所定義之輕鏈的 60、74、76、77、79 以及 81 號的胺基酸殘基中之至少 3 個。如此之 3 個胺基酸殘基可舉出例如下列 5)至 8)之任一組合。

【0054】

- 5) 以 Kabat 法所定義之輕鏈的第 60、76 以及 77 號的胺基酸殘基；
- 6) 以 Kabat 法所定義之輕鏈的第 74、76 以及 77 號的胺基酸殘基；
- 7) 以 Kabat 法所定義之輕鏈的第 77、79 以及 81 號的胺基酸殘基；以及
- 8) 以 Kabat 法所定義之輕鏈的第 76、77 以及 81 號的胺基酸殘基。

【0055】 滿足上述(1)及(2)條件的胺基酸殘基作成帶電荷胺基酸殘基的方法，可列舉胺基酸殘基的置換、插入等。以胺基酸殘基的插入所致之修改中，在滿足上述(1)及(2)條件的胺基酸殘基、及與該胺基酸殘基之 N 末端側鄰接的胺基酸殘基之間，插入帶電荷胺基酸殘基。例如，藉由在未修改抗體之 L2 的胺基酸殘基與 L3 的胺基酸殘基之間插入帶電荷胺基酸殘基，可將 L3 的胺基酸殘基作成帶電荷胺基酸。較佳實施態樣中，將滿足上述(1)及(2)條件的胺基酸殘基置換成帶電荷胺基酸殘基。

【0056】 本實施態樣中，可藉由 DNA 重組技術以及其他的分子生物學的技術等習知的方法，將未修改抗體之 FR 的胺基酸殘基作成帶電荷胺基酸殘基。例如，有產生未修改抗體之融合瘤時，使用自該融合瘤抽取的 RNA，藉由反轉錄反應以及 RACE (Rapid Amplification of cDNA ends) 法，合成編碼輕鏈的多核苷酸。將此多核苷酸使用用以修改 FR 之至少 3 個胺基酸殘基的引子藉由 PCR 法擴增，藉此，取得編碼經修改 FR 的輕鏈的多核苷酸。將所得之多核苷酸組入該技術中習知的表現用載體，取得包含編碼該修改抗體之多核苷酸的表現載體。表現載體的種類並無特別限定，可為哺乳動物細胞用表現載體，亦可為大腸桿菌用表現載體。將所得之表現載體藉由轉形(Transformation)或轉染至適當的宿主細胞(例如，哺乳動物細胞或大腸桿菌)，可獲得親和性提升的抗體。

【0057】 取得單鏈抗體(scFv)之修改抗體時，例如 WO2013/ 084371 所示般，可使用自上述融合瘤抽取的 RNA 藉由反轉錄反應以及 PCR 法合成編碼輕鏈可變區域的多核苷酸。此多核苷酸藉由重疊延伸 PCR 法等連結，取得編碼未修改之 scFv 的多核苷酸。將所得之多核苷酸使用用以修改

FR 之至少 3 個胺基酸殘基的引子並藉由 PCR 法擴增，取得編碼 FR 經修改之 scFv 的多核苷酸。將所得之多核苷酸組入該技術中習知的表現載體，取得包含編碼以 scFv 形態存在之修改抗體的多核苷酸的表現載體。將所得之表現載體藉由轉形或轉染至適當的宿主細胞，可獲得以 scFv 形態存在之修改抗體。

【0058】 沒有產生未修改抗體之融合瘤時，可例如藉由 Kohler 以及 Milstein, Nature, vol.256, p.495-497, 1975 所記載之方法等習知的方法製作抗體產生融合瘤。或者是，亦可使用從經感興趣對象的抗原免疫的小鼠等動物的脾臟取得的 RNA。使用自脾臟取得的 RNA 時，可例如 Fukunaga A 以及 Tsumoto K, Protein Eng. Des. Sel. 2013, vol.26, pp.773-780 所示般，自所得之編碼未修改的 scFv 之多核苷酸之中，藉由噬菌體展示法等選擇具有所期望之親和性的編碼未修改的 scFv 之多核苷酸。

【0059】 [2. 親和性提升的抗體及其製造方法]

本實施態樣之與未修改抗體相比，對抗原之親和性經提升的抗體(以下，亦稱為「親和性提升抗體」)之特徵為，於未修改抗體之輕鏈 FR 的胺基酸序列中，在存在於 R、S、T、V、D 以及 E 的胺基酸頻率的合計值成為 35% 以上的位置且溶劑暴露表面積比率顯示為 20% 以上的胺基酸殘基之中，至少 3 個被設為帶電荷胺基酸殘基。此親和性提升抗體，與本實施態樣之親和性的提升方法的說中所記載的「修改抗體」相同。

【0060】 本實施態樣之親和性提升抗體，較佳係未修改抗體之輕鏈 FR1 及/或 FR3 的胺基酸殘基設為帶電荷胺基酸殘基的抗體。如此之抗體可列舉例如：未修改抗體中以 Kabat 法所定義之輕鏈的第 1、3、5、7、9、

10、12、14、17、18、20、22、60、63、65、67、69、70、72、74、76、77、79 以及 81 號的胺基酸殘基之中，至少 3 個被設為帶電荷胺基酸殘基的抗體。較佳實施態樣中，親和性提升抗體係於未修改抗體中選自以 Kabat 法所定義之輕鏈的第 3、5、9、17、18、20、22、60、63、65、67、70、72、74、76、77、79 以及 81 號的胺基酸殘基中之至少 3 個的胺基酸殘基設為帶電荷胺基酸殘基的抗體。此抗體中，上述 3 個胺基酸殘基，更佳係包含選自以 Kabat 法所定義之輕鏈的第 3、5、9、17、18、20、22、60、74、76、77、79 以及 81 號的胺基酸殘基中之至少 1 者。帶電荷胺基酸殘基較佳為鹼性胺基酸殘基。

【0061】 本實施態樣之親和性提升抗體，係未修改抗體之輕鏈 FR1 的胺基酸殘基經修改的抗體時，較佳為未修改抗體中以 Kabat 法所定義之輕鏈的第 3、5、9、17、18、20 以及 22 號的胺基酸殘基之中，至少 3 個被設為帶電荷胺基酸殘基的抗體。如此之至少 3 個胺基酸殘基可舉出例如上述 1)至 4)之任一組合。

【0062】 本實施態樣之親和性提升抗體，係未修改抗體之輕鏈 FR1 的胺基酸殘基經修改的抗體時，較佳為未修改抗體中以 Kabat 法所定義之輕鏈的第 60、63、65、67、70、72、74、76、77、79 以及 81 號的胺基酸殘基之中，至少 3 個被設為帶電荷胺基酸殘基的抗體。特佳是選自以 Kabat 法所定義之輕鏈的第 60、74、76、77、79 以及 81 號的胺基酸殘基中之至少 3 個被設為帶電荷胺基酸殘基的抗體。如此之至少 3 個的胺基酸殘基可舉出例如上述 5)至 8)之任一組合。

【0063】 本實施態樣之親和性提升抗體，可藉由本實施態樣之與未修改抗體相比，對抗原之親和性經提升的抗體的製造方法(以下，亦稱為「製造方法」)獲得。本實施態樣之製造方法中，首先，於抗體(未修改抗體)之輕鏈 FR 的胺基酸序列中，在存在於 R、S、T、V、D 以及 E 的胺基酸頻率的合計值成為 35% 以上的位置且溶劑暴露表面積比率顯示為 20% 以上的胺基酸殘基之中，至少 3 個被設為帶電荷胺基酸殘基。修改此未修改抗體中之胺基酸殘基的步驟，係與本實施態樣之親和性的提升方法所述者相同。

【0064】 其次，回收藉由上述修改所得之抗體。例如，將表現親和性提升抗體的宿主細胞溶解於包含適當的可溶化劑的溶液中，使抗體於該溶液中游離。上述宿主細胞將抗體分泌至培養基時，回收培養上清液。遊離的抗體係可藉由親和層析等該技術領域中習知的方法回收。例如，製造的抗體為 IgG 時，可藉由使用蛋白質 A 或 G 的親和層析回收。因應所需，回收的抗體亦可藉由凝膠過濾等該技術領域中習知的方法進行精製。

【0065】 [3. 抗體之胺基酸序列的解析方法]

本發明的範圍中，亦包含抗體之胺基酸序列的解析方法(以下，亦稱為「解析方法」)。本實施態樣的解析方法中，取得抗體之輕鏈 FR 的胺基酸序列中之各位置的 R、S、T、V、D 以及 E 的胺基酸頻率的合計值，及該胺基酸序列中之各胺基酸殘基的溶劑暴露表面積比率，輸出所取得之各位置的胺基酸頻率的合計值以及各胺基酸殘基的溶劑暴露表面積比率。所輸出的資訊例如在要修改經解析的抗體時，對應修改的胺基酸殘基的候補做檢討時為有用者。關於胺基酸頻率的合計值以及溶劑暴露表面積比率之詳

細內容，係與本實施態樣之親和性的提升方法所述者相同。本實施態樣的解析方法，亦可使用例如圖 1 所示之胺基酸序列的解析系統實施。

【0066】 (胺基酸序列之解析系統的概要)

以下，參照圖式說明胺基酸序列之解析系統的一例。然而，本實施態樣不限定於此例所示之態樣。參照圖 1，胺基酸序列之解析系統係具備胺基酸序列的解析裝置 10 及序列數據伺服器 20。解析裝置 10 與序列數據伺服器 20 係經由內部網路、網際網路等網絡 30 連接。圖 1 中，解析裝置 10 顯示為具備控制部 100(電腦本體)、輸入部 101、顯示部 102 之汎用電腦系統，但不限定為此態樣。

【0067】 經由網絡 30，從解析裝置 10 對序列數據伺服器 20，要求複數個參考抗體之輕鏈胺基酸序列、抗體之輕鏈的三維結構數據等序列資訊時，該等序列資訊係從序列數據伺服器 20 下載至解析裝置 10。序列數據伺服器 20 係具備儲存複數個參考抗體之輕鏈胺基酸序列的資訊、抗體之輕鏈的三維結構數據等胺基酸序列相關資訊之數據庫(以下，亦稱為「胺基酸序列數據庫」)。序列數據伺服器 20 亦可為與利用解析裝置 10 的使用者不同的第三者管理的外部數據伺服器。可從外部數據伺服器的數據庫(以下，亦稱為「外部數據庫」)可列舉例如：GeneBank、abYsis、IMGT、PDB、BMRB 等。

【0068】 圖 1 中顯示 1 個序列數據伺服器，但解析裝置 10 亦可連接複數個序列數據伺服器。複數個序列數據伺服器亦可具備各個不同種類的胺基酸序列數據庫。例如，某序列數據伺服器可具備包含複數個參考抗體之輕鏈胺基酸序列之與蛋白質的胺基酸序列資訊相關的數據庫，另外的序

列數據伺服器可具備包含抗體之輕鏈之與蛋白質的三維結構數據相關的數據庫。

【0069】解析裝置 10 係從使用者所輸入或後述之記憶媒體 40 取得未修改抗體之輕鏈胺基酸序列。再者，解析裝置 10 係經由網絡 30，向序列數據伺服器 20 要求複數個參考抗體之輕鏈胺基酸序列以及抗體之輕鏈的三維結構數據。序列數據伺服器 20 係經由網絡 30，向解析裝置 10 提供所要求的數據。然後，解析裝置 10 係使用所取得之序列，解析未修改抗體的胺基酸序列。

【0070】(胺基酸序列之解析系統的硬體構成)

參照圖 2，解析裝置 10 的控制部 100 係具備 CPU(中央處理單元(Central Processing Unit))110、記憶體 111、記憶裝置 112、介面 113、讀取裝置 114 以及可數據通信地連接該等的匯流排 115。控制部 100 係經由介面 113 可通信地連接輸入部 101 以及輸出部 102 等外部機器、以及網絡 30。記憶媒體 40 係以 CD-ROM、USB 記憶體等電腦可讀取之非暫時性的有形記憶媒體。序列數據伺服器 20 係具備控制部 210、輸入部 211、輸出部 212、記憶部 213 以及通信部 214。記憶部 213 中儲存胺基酸序列數據庫 215。序列數據伺服器 20 係經由通信部 214 可通信地連接網絡 30。輸入部 101 以及 211 例如為滑鼠、鍵盤等輸入裝置。輸出部 102 以及 212 例如為液晶顯示器等顯示裝置。

【0071】CPU 110 係實行記憶體 111 或記憶裝置 112 所記憶之本實施態樣的電腦程式，進行後述的處理。記憶體 111 係包含 ROM(唯讀記憶體(Read Only Memory))以及 RAM(隨機存取記憶體(Random Access

Memory))。ROM 係藉由例如遮罩 ROM、PROM、EPROM、EEPROM 等所構成。ROM 中係紀錄藉由 CPU110 所實行之電腦程式以及該電腦程式之實行所使用之數據。RAM 係藉由例如 SRAM、DRAM 等所構成。RAM 係使用於 ROM 以及記憶裝置 112 所紀錄的程式的讀取。再者，RAM 係實行該等程式時，作為 CPU 110 的作業區域利用。

【0072】 記憶裝置 112 例如藉由硬碟所構成。記憶裝置 112 中，儲存有用以實行 CPU 110 的作業系統、應用程式等程式以及該程式實行所使用的數據。應用程式可列舉例如本實施態樣之電腦程式、用以實行胺基酸序列的整列的程式、用以實行胺基酸頻率的算出的程式、用以實行溶劑暴露表面積比率的算出的程式等。再者，記憶裝置 112 中亦可紀錄胺基酸頻率以及溶劑暴露表面積比率之各別的閾值。

【0073】 讀取裝置 114 係藉由 CD-ROM 驅動機、DVD-ROM 驅動機、USB 埠、SD 讀卡機、CF 讀卡機、隨身碟(Memory stick reader)、固態硬碟(Solid state drive)、軟性磁碟驅動機等所構成。讀取裝置 114 係可讀取記憶媒體 40 所紀錄的數據(例如，未修改抗體及/或複數個參考抗體之輕鏈胺基酸序列及/或編碼其等之核酸序列的資訊等)、以及電腦程式。

【0074】 (胺基酸序列的解析裝置的處理順序)

參照圖 3，說明藉由於解析裝置 10 所實行之抗體的胺基酸序列的解析處理。此處，以使用由外部數據庫下載之複數個參考抗體之輕鏈胺基酸序列以及未修改抗體之輕鏈的三維結構數據，輸出各位置的胺基酸頻率的合計值以及各胺基酸殘基的溶劑暴露表面積比率的情況為例進行說明。然而，

本實施態樣不限定為此例。以下的說明中如無特別敘明，控制部 100 進行之處理意指 CPU110 進行之處理。

【0075】步驟 S10 中，控制部 100 係經由網絡 30，從序列數據伺服器 20 的胺基酸序列數據庫 215 下載複數個參考抗體之輕鏈胺基酸序列的數據，記憶於記憶裝置 112。下載的胺基酸序列可為輕鏈全部序列，亦可為包含 FR1 及/或 FR3 的胺基酸序列之輕鏈一部分序列。使用者已經有複數個參考抗體之輕鏈胺基酸序列的數據時，控制部 100 係可取得由使用者輸入的該胺基酸序列的數據取代下載。輸入可藉由輸入部 101 進行，亦可藉由將記憶媒體 40 所保存之該胺基酸序列的數據轉送至記憶裝置 112 而進行。

【0076】步驟 S11 中，控制部 100 係將取得之複數個參考抗體之輕鏈胺基酸序列整列。具體而言，控制部 100 係以使由 Kabat 法所賦予之 FR 中的胺基酸殘基編號為一致的方式，將複數個參考抗體之胺基酸序列整列。整列亦可基於 Kabat 法以外的編號法進行。步驟 S12 中，控制部 100 算出複數個參考抗體之 FR 的胺基酸序列之各位置中 R、S、T、V、D 以及 E 的胺基酸頻率的合計值。此算出係與本實施態樣之親和性的提升方法中所述者相同。

【0077】步驟 S13 中，控制部 100 係取得未修改抗體之輕鏈胺基酸序列。取得之未修改抗體之輕鏈胺基酸序列可為輕鏈全體的胺基酸序列，亦可為輕鏈的一部分胺基酸序列。輕鏈的一部分胺基酸序列，較佳包含 FR1 及/或 FR3 的胺基酸序列，更佳是進一步包含 CDR 的胺基酸序列。較佳實施態樣中，控制部 100 取得未修改抗體的輕鏈全體的胺基酸序列。此胺基

酸序列可由使用者輸入，亦可保存於記憶媒體 40 或記憶裝置 112。未修改抗體之輕鏈胺基酸序列存在於胺基酸序列數據庫 215 內時，控制部 100 亦可下載該胺基酸序列的數據。步驟 S14 中，控制部 100 係於未修改抗體的 FR 中，具體辨識出存在於位置的胺基酸殘基，該位置係對應於由複數個參考抗體所具體辨識的位置。控制部 100 亦可將未修改抗體之輕鏈胺基酸序列與複數個參考抗體之輕鏈胺基酸序列整列並具體辨識。藉此，控制部 100 係將算出的胺基酸頻率的合計值作為未修改抗體之 FR 的胺基酸序列之各位置中之胺基酸頻率的合計值而取得，並記憶於記憶裝置 112。

【0078】 步驟 S15 中，控制部 100 係基於未修改抗體之輕鏈胺基酸序列，從胺基酸序列數據庫 215 下載未修改抗體之輕鏈的三維結構數據。控制部 100 係從胺基酸序列數據庫 215 檢索未修改抗體之輕鏈胺基酸序列，於數據庫中，存在具有與未修改抗體之輕鏈胺基酸序列一致序列之蛋白質時，下載該蛋白質的三維結構數據作為未修改抗體之輕鏈的三維結構數據並記憶於記憶裝置 112。

【0079】 步驟 S16 中，控制部 100 係基於所取得之三維結構數據，算出未修改抗體之 FR 的各胺基酸殘基的溶劑暴露表面積比率，並記憶於記憶裝置 112。此算出係與本實施態樣之親和性的提升方法中所述者相同。使用者具有未修改抗體之輕鏈的三維結構數據時，控制部 100 係可取得由使用者輸入之三維結構數據取代下載。輸入可藉由輸入部 101 進行，亦可將記憶媒體 40 所保存之三維結構數據轉送至記憶裝置 112 而進行。於胺基酸序列數據庫 215 中沒有未修改抗體之輕鏈的三維結構數據時，控制部 100 可自數據庫取得作成該三維結構數據所必須的資訊，基於此資訊作成三維

結構數據。具體而言，控制部 100 係從胺基酸序列數據庫 215 檢索參考序列，並下載該胺基酸序列。其次，控制部 100 係將參考序列與未修改抗體的胺基酸序列整列。然後，控制部 100 基於整列結果，從參考序列之已知結構作成未修改抗體之輕鏈的三維結構數據。三維結構數據的作成係與本實施態樣之親和性的提升方法中所述者相同。

【0080】步驟 S17 中，控制部 100 係將於步驟 S14 所具體辨識之未修改抗體之 FR 的胺基酸序列之各位置中的胺基酸頻率的合計值、以及於步驟 S16 所算出之未修改抗體之 FR 的各胺基酸殘基的溶劑暴露表面積比率傳送至輸出部 102。圖 4 中，顯示輸出部 102 所顯示之解析結果的畫面之一例。此畫面中，顯示未修改抗體之 FR1 的胺基酸序列之各位置(L1 至 L23)中的胺基酸頻率的合計值與溶劑暴露表面積比率。然而，畫面的顯示不限定為此例。

【0081】圖 3 所示之處理中，步驟 S13 亦可於步驟 S10、S11 或 S12 之前進行。步驟 S15 以及 S16 只要於未修改抗體的胺基酸序列的取得步驟(步驟 S13)之後即可，亦可於步驟 S10、S11 或 S12 之前進行。步驟 S10 以及 S15 只要於未修改抗體的胺基酸序列的取得步驟(步驟 S13)之後即可，亦可同時進行。

【0082】[4. 抗體的候補修改位點的具體辨識方法]

本發明的範圍，亦包含抗體的候補修改位點的具體辨識方法(以下，亦稱為「具體辨識方法」)。本實施態樣之具體辨識方法中，取得抗體之輕鏈 FR 的胺基酸序列中之各位置的 R、S、T、V、D 以及 E 的胺基酸頻率的合計值、以及該胺基酸序列中之各胺基酸殘基的溶劑暴露表面積比率，將存

在於胺基酸頻率的合計值成為 35% 以上的位置且溶劑暴露表面積比率顯示為 20% 以上的胺基酸殘基，具體辨識為親和性的提升用之候補應修改位點。胺基酸頻率的合計值以及溶劑暴露表面積比率的詳細內容，係與本實施態樣之親和性的提升方法所述者相同。

【0083】 抗體之輕鏈胺基酸序列中，藉由本實施態樣之具體辨識方法所具體辨識之胺基酸殘基之中，至少 3 個被設為帶電荷胺基酸殘基，藉此，與未修改抗體相比可提升抗體對抗原之親和性。然後，藉由回收胺基酸殘基經修改的抗體，可獲得抗體對抗原之親和性經提升的修改抗體。關於胺基酸殘基的修改以及抗體的回收，係與本實施態樣之親和性的提升方法以及本實施態樣之製造方法所述者相同。

【0084】 本實施態樣之具體辨識方法，係與本實施態樣之解析方法同樣地，可藉由如圖 1 所示之胺基酸序列的解析系統實施。用以實施本實施態樣之具體辨識方法的胺基酸序列解析系統的概略以及硬體構成，係與本實施態樣之解析方法所述者相同。

【0085】 (胺基酸序列的解析裝置的處理順序)

參照圖 5，說明藉由解析裝置 10 所實行，用以具體辨識抗體的候補修改位點之胺基酸序列的解析處理。此處，使用從外部數據庫下載之複數個參考抗體之輕鏈胺基酸序列以及未修改抗體之輕鏈的三維結構數據，算出各位置的胺基酸頻率的合計值以及各胺基酸殘基的溶劑暴露表面積比率的情況為例進行說明。然而，本實施態樣不限定為此例。以下的說明中如無特別敘明，控制部 100 進行之處理，意指 CPU110 進行之處理。步驟 S20 至 S26 係與步驟 S10 至 S16 所述者相同。

【0086】步驟 S27 中，控制部 100 係於步驟 S24 所具體辨識之未修改抗體之 FR 的胺基酸序列的位置之中，具體辨識出存在於 R、S、T、V、D 以及 E 的胺基酸頻率的合計值成為 35% 以上的位置，且於步驟 S26 所算出之溶劑暴露表面積比率顯示為 20% 以上的胺基酸殘基。然後，步驟 S28 中，控制部 100 係將步驟 S27 所具體辨識之胺基酸殘基傳送至輸出部 102。圖 6 中，顯示輸出部 102 所顯示之解析結果的畫面之一例。此畫面中，顯示未修改抗體之輕鏈 FR1 的胺基酸序列之各位置(L1 至 L23)中之胺基酸頻率的合計值與溶劑暴露表面積比率。此畫面中，步驟 S27 所具體辨識之胺基酸殘基的位置與各值係以粗體字及標記強調並顯示。然而，畫面的顯示不限定為此例。具體辨識之胺基酸殘基係作為未修改抗體中之候補修改位點提示給使用者。

【0087】參照圖 7，說明用以作成藉由解析裝置 10 所實行之將抗體的候補修改位點作成帶電荷胺基酸殘基時之序列的胺基酸序解析處理。此處，使用從外部數據庫所下載之複數個參考抗體之輕鏈胺基酸序列以及未修改抗體之輕鏈的三維結構數據，算出各位置的胺基酸頻率的合計值以及各胺基酸殘基的溶劑暴露表面積比率的情況為例進行說明。然而，本實施態樣不限定為此例。以下的說明中如無特別敘明，控制部 100 進行之處理，意指 CPU110 進行之處理。步驟 S30 至 S36 係與步驟 S10 至 S16 所述者相同，步驟 S37 係與步驟 S27 相同。

【0088】步驟 S38 中，控制部 100 係作成將步驟 S37 所具體辨識之胺基酸殘基之至少 3 個設為帶電荷胺基酸殘基時之胺基酸序列、及/或編碼其序列之鹼基序列。作成胺基酸序列時，控制部 100 係將步驟 S33 所取得

之未修改抗體之輕鏈胺基酸序列中，步驟 S37 所具體辨識之胺基酸殘基之至少 3 個作成 R、K、D 或 E 之胺基酸序列(修改抗體之輕鏈胺基酸序列)，並記憶於記憶裝置 112。哪個任意胺基酸殘基要作成帶電荷胺基酸殘基可預先設定，亦可由使用者決定。選擇 R、K、D 以及 E 中之任一者作為帶電荷胺基酸殘基，係可預先設定，亦可由使用者決定。

【0089】 作成編碼修改抗體之輕鏈胺基酸序列之鹼基序列時，控制部 100 係於步驟 S33 所取得之胺基酸序列中，作成將步驟 S37 所具體辨識之胺基酸殘基之至少 3 個設為 R、K、D 或 E 之胺基酸序列，將其轉換為鹼基序列，並記憶於記憶裝置 112。1 個胺基酸具有複數種密碼子時，選擇何種密碼子，可預先設定，亦可由使用者決定。作成鹼基序列時，控制部 100 亦可於步驟 S33 中，取得編碼未修改抗體之輕鏈的鹼基序列。取得該鹼基序列時，控制部 100 亦可將對應步驟 S37 所具體辨識之胺基酸殘基之密碼子，設成對應帶電荷胺基酸殘基的密碼子，藉此作成編碼修改抗體之輕鏈胺基酸序列的鹼基序列。然後，步驟 S39 中，控制部 100 係將步驟 S37 所具體辨識之胺基酸殘基、以及步驟 S38 所作成之修改抗體之輕鏈胺基酸序列及/或編碼其之鹼基序列傳送至輸出部 102。

【0090】 本實施態樣之具體辨識方法中，亦可基於未修改抗體之 CDR 的胺基酸序列算出 CDR 的電特性並輸出。CDR 的電特性係與本實施態樣之親和性的提升方法所述者相同。再者，所算出之 CDR 的電特性為中性時，作為候補修改位點之具體辨識胺基酸殘基之中，可作成將至少 3 個設為帶電荷胺基酸殘基(較佳為鹼性胺基酸殘基)時之修改胺基酸序列並輸出。

【0091】 參照圖 8，說明藉由解析裝置 10 所實行之胺基酸序列的解析處理，該解析處理係用以作成當 CDR 的電特性為中性時將抗體的候補修改位點的設為鹼性胺基酸殘基時之序列。此處，使用從外部數據庫下載之複數個參考抗體之輕鏈胺基酸序列以及未修改抗體之輕鏈的三維結構數據，算出各位置的胺基酸頻率的合計值以及各胺基酸殘基的溶劑暴露表面積比率的情況為例進行說明。然而，本實施態樣不限定為此例。以下的說明中如無特別敘明，控制部 100 進行之處理，意指 CPU110 進行之處理。步驟 S40 至 S46 係與步驟 S10 至 S16 所述者相同，步驟 S47 係與步驟 S27 相同。

【0092】 步驟 S48 中，控制部 100 係基於步驟 S43 所取得之未修改抗體之輕鏈胺基酸序列，算出未修改抗體之 CDR 的電特性。CDR 的電特性係藉由上述式(III)算出。步驟 S49 中，判定所算出之 CDR 的電特性是否為中性。藉由上述式(III)所算出之值為-1、0 或 1 時，CDR 的電特性判定為中性，處理係進入步驟 S50。步驟 S50 中，控制部 100 係作成將步驟 S47 所具體辨識之胺基酸殘基之至少 3 個作成鹼性胺基酸殘基時之胺基酸序列及/或編碼期之序列的鹼基序列。然後，步驟 S51 中，控制部 100 係將步驟 S47 所具體辨識之胺基酸殘基、步驟 S48 所算出之 CDR 的電特性以及步驟 S50 所作成之修改抗體之輕鏈胺基酸序列及/或編碼其之鹼基序列傳送至輸出部 102。步驟 S49 中，藉由上述式(III)所算出之值為-2 以下或 2 以上時，CDR 的電特性判定為非中性，處理係進入步驟 S52。步驟 S52 中，控制部 100 係將步驟 S47 所具體辨識之胺基酸殘基與步驟 S48 所算出之 CDR 的電特性傳送至輸出部 102。

【0093】 以下，藉由實施例更詳細地說明本發明，但本發明不限定為該等實施例者。

[實施例]

【0094】 實施例 1 輕鏈 FR1 或 FR3 的胺基酸殘基經修改的抗體之製作

將抗溶菌酶抗體之 FR1 或 FR3 的 3 個胺基酸殘基置換成帶電荷胺基酸殘基，並製作各抗體的變異體。

【0095】 (1) 野生型抗溶菌酶抗體的基因取得

委託 GenScript 股份有限公司合成抗溶菌酶抗體的基因，取得包含野生型抗溶菌酶抗體基因之質體 DNA。

【0096】 (2) 抗溶菌酶抗體變異體的製作

[試劑]

QIAprep Spin Miniprep 套組(QIAGEN 公司)

PrimeSTAR(註冊商標) Max DNA Polymerase (TakaraBio 股份有限公司)

Ligation high ver.2 (東洋紡股份有限公司)

T4 Polynucleotide Kinase (東洋紡股份有限公司)

Dpn I (東洋紡股份有限公司)

Competent high DH5 α (東洋紡股份有限公司)

【0097】 (2.1) 引子的設計以及 PCR

為了將野生型抗溶菌酶抗體之輕鏈 FR1 或 FR3 之預定的 3 個胺基酸殘基置換為精胺酸殘基，使用上述(1)所得之質體以及下述鹼基序列所示之

引子實施 PCR。又，各引子的名稱所記載之 3 個編號，表示以 Kabat 法所定義之輕鏈 FR 中經置換為精胺酸殘基之胺基酸殘基的位置。使用序列編號 1 至 11 的引子作為前置引子，使用序列編號 12 至 22 的引子作為反置引子。

【0098】 [變異體製作用引子]

2, 4, 6 變異體 FOR : 5' AGAACCAGAAGCCCGGCGACCCTCTCGGTCA
CCCCCGGC 3' (序列編號 1)

2, 4, 8 變異體 FOR : 5' AGAGCAGAGCGACCCTCTCGGTACACCCCGGC
3' (序列編號 2)

3, 5, 9 變異體 FOR : 5' GCCCGCGCACCCCTCTCGGTACACCCCGGC 3' (序
列編號 3)

4, 8, 13 變異體 FOR : 5' CCCTCTCGAGAACCCCGGCAACTCGGTGT
CGC 3' (序列編號 4)

5, 9, 22 變異體 FOR : 5' GGCAACTCGGTGTCGCTCCGCTGCCGCGCCTC
GCAGTCG 3' (序列編號 5)

13, 16, 19 變異體 FOR : 5' AACTCGCGATCGCTCTCGTGCCGCGCCTCGC
AGTCG 3' (序列編號 6)

16, 21, 23 變異體 FOR : 5' GTGTCGCGATCGCGACGCGCCTCGCAGTCG
ATCGGC 3' (序列編號 7)

17, 18, 20 變異體 FOR : 5' CTCTCGTGCCGCGCCTCGCAG 3' (序列編號 8)

18, 20, 22 變異體 FOR : 5' CGCTGCCGCGCCTCGCAGTCGATCGGC 3' (序
列編號 9)

19, 21, 23 變異體 FOR : 5' AGATCGAGACGCGCCTCGCAGTCGATCGGC
3' (序列編號 10)

63, 65, 67 變異體 FOR : 5' GGCACCGACTTCACCCTGTCG 3' (序列編號
11)

【0099】

2, 4, 6 變異體 REV : 5' GACTCTATCTCCTCTGGACATTATGACTGAGGC
3' (序列編號 12)

2, 4, 8 變異體 REV : 5' GGGTTCTGACTCTATCTCCTCTGGACATTATGAC
TGAGGC 3' (序列編號 13)

3, 5, 9 變異體 REV : 5' TCTGGCGCAGGCGGATATCTCCTCTGGACATTAT
G 3' (序列編號 14)

4, 8, 13 變異體 REV : 5' TCGCTCTGCTCTGGGTTCTGACGATATCTCCTC
TGGACATTATG 3' (序列編號 15)

5, 9, 22 變異體 REV : 5' GGGGGTGACCGAGAGGGTGCGCGGGCTCTGG
CGCAGGACGATATCTCCTCTGG 3' (序列編號 16)

13, 16, 19 變異體 REV : 5' TCGGGGGGTTCGCGAGAGGGTCGCCGGGC
TCTGGG 3' (序列編號 17)

16, 21, 23 變異體 REV : 5' CGAGTTTCGGGGGGTGACCGAGAGGGTCGC
3' (序列編號 18)

17, 18, 20 變異體 REV : 5' GCGCACGCGGCGGCCGGGGGTGACCGAGA
GGG 3' (序列編號 19)

18, 20, 22 變異體 REV : 5' GAGGCGCACGCGGTTGCCGGGGGTGACCGA
GAGGG 3' (序列編號 20)

19, 21, 23 變異體 REV : 5' CGATCTCGAGTTGCCGGGGGTGACCGAGA
GGG 3' (序列編號 21)

63, 65, 67 變異體 REV : 5' TCTGCCTCTGCCTCTGAAGCGCGACGGGAT
CCCCG 3' (序列編號 22)

【0100】 使用上述(1)所得之質體作為模板，調製下列組成的 PCR 反應液。

[PCR 反應液]

PrimeSTAR(註冊商標) Max DNA Polymerase	12.5μL
前置引子(10μM)	1μL
反置引子(10μM)	1μL
模板質體(3ng/μL)	1μL
精製水	9.5μL
合計	25μL

【0101】 所調製的 PCR 反應液以下述反應條件進行 PCR 反應。

[反應條件]

98℃、10 秒，
98℃、10 秒，54℃、10 秒，以及 72℃、45 秒進行 30 循環，以及
72℃、3 分鐘。

【0102】 於所得之 PCR 產物(25μL)中添加 1μL 的 DpnI(10 U/μL)，將 PCR 產物進行片段化。使用 DpnI 處理完成的 PCR 產物，調製下列組成的接合反應液。該反應液於 16℃ 培育 1 小時，進行接合反應。

[接合反應液]

DpnI 處理過的 PCR 產物	2μL
Ligation high ver.2	5μL
T4 多核苷酸激酶	1μL
精製水	7μL
合計	15μL

【0103】 (2.2) 轉形、質體萃取以及序列確認

於接合反應後的溶液(3μL)添加 DH5α(30μL)，於冰上靜置 30 分鐘後，混合物於 42℃ 加熱 45 秒進行熱休克。再次於冰上靜置 2 分鐘，全量塗布於含有安比西林(ampicillin)的 LB 培養盤。將該培養盤於 37℃ 培育 16 小時，藉此獲得大腸桿菌的轉形體。將培養盤上的單一菌落取置於含有安比西林的 LB 液體培養基中，於 37℃ 振盪培養 (250 rpm)16 小時。從所得之大腸桿菌使用 QIAprep Spin Miniprep 套組萃取質體。所得之各質體的鹼基序列使用 pCDNA3.4 載體引子進行確認。以下，使用此等質體作為哺乳動物細胞表現用質體。

【0104】 (3) 於哺乳動物細胞的表現

[試劑]

Expi293(商標)細胞(Invitrogen 公司)

Expi293(商標) Expression 培養基(Invitrogen 公司)

ExpiFectamine(商標)293 轉染套組(Invitrogen 公司)

【0105】 (3.1) 轉染

Expi293 細胞係於 5%CO₂ 環境下，以 37℃ 振盪培養(150 rpm)使其增殖。準備數量對應樣品數目的 30 mL 的細胞培養物(3.0×10⁶ cells/mL)。使用編碼各變異體的質體以及編碼野生型抗體的質體，調製下列組成的 DNA 溶液，靜置 5 分鐘。

[DNA 溶液]

輕鏈質體溶液	相當於 15μg 的量(μL)
重鏈質體溶液	相當於 15μg 的量(μL)
Opti-MEM(商標)	適量(mL)
合計	1.5 mL

【0106】 調製下列組成的轉染試劑，並靜置 5 分鐘。

ExpiFectamine 試劑	80μL
輕鏈質體溶液	1420μL
合計	1.5 mL

【0107】 混合所調製之 DNA 溶液以及轉染試劑，並靜置 20 分鐘。

將所得之混合液(3mL)添加至細胞培養物(30 mL)，於 5%CO₂ 環境下，以 37℃ 振盪培養(150 rpm) 20 小時。20 小時後，於各培養物分別添加 150μL

之 ExpiFectamine(商標)轉染增強劑 1 及 1.5 mL 之轉染增強劑 2, 於 5%CO₂ 環境下, 以 37°C 振盪培養(150 rpm)6 日。

【0108】 (3.2) 抗體的回收以及精製

將各細胞培養物以 3000 rpm 進行 5 分鐘離心處理, 回收培養上清液。培養上清液包含從經轉染的 Expi293(商標)細胞所分泌之各抗體。將所得之培養上清再度以 15000×G 進行 10 分鐘離心處理, 回收上清液。對所得之上清液(30 mL)添加 100μL 的抗體精製用載體 Ni Sepharose High Performance(GE Healthcare), 於室溫使其反應 2 小時。回收載體且去除上清液, 添加 TBS(1mL)洗淨載體。於載體添加包含 100 mM 咪唑的 TBS 1000μL, 溶出載體所捕捉的抗體。此溶出操作合計進行 3 次, 取得抗體溶液。

【0109】 (4) 親和性的測定

將所製作之變異體的親和性使用 Biacore(註冊商標) T200(GE Healthcare 公司)進行測定。使用源自雞蛋白的溶菌酶(Sigma-Aldrich 公司)作為抗溶菌酶抗體的抗原。將抗原固定化(固定化: 50RU)於 Biacore(註冊商標)用感測晶片 Series S Sensor Chip CM5(GE Healthcare 公司)。稀釋抗體溶液, 調製出 30 nM、15 nM、7.5 nM、3.75 nM 以及 1875 nM 的抗體溶液。將各濃度的抗體溶液送液至 Biacore(註冊商標) T200 (GE Healthcare 公司)(結合時間(association time)120 秒以及解離時間(dissociation time)1800 秒)。使用 Biacore(註冊商標) Evaluation 軟體解析測定數據, 取得各抗體的親和性相關數據。各抗體的 K_d 值示於表 2。

【0110】 [表 2]

抗溶菌酶抗體	K_d (M)
野生型	1.31E-10
63, 65, 67 變異體	9.20E-11
18, 20, 22 變異體	6.52E-11
3, 5, 9 變異體	7.23E-11
17, 18, 20 變異體	1.05E-10
5, 9, 22 變異體	6.90E-11

【0111】 (5) 結果

如表 2 所示，輕鏈 FR3 已修改的 63, 65, 67 變異體、輕鏈 FR1 已修改的 18, 20, 22 變異體、3, 5, 9 變異體、17, 18, 20 變異體、18, 20, 22 變異體以及 5, 9, 22 變異體的 K_d 值，係成為比野生型抗溶菌酶抗體的 K_d 值更低。據此，與野生型相比，表 2 所示之變異體，係藉由將 FR3 或 FR1 之 3 個胺基酸殘基設為鹼性胺基酸殘基而提升對抗原之親和性。

【0112】 另一方面，未示於表 2 的變異體係起始無法確認抗體的表現。表現係將上述(3.2)所得之溶出液藉由 SDS-PAGE 以及 CBB 染色進行分析而確認。結果示於圖 9。由圖 9 可知，於電泳道 1 及 2 觀察到抗體的重鏈以及輕鏈的條帶。據此，確認野生型抗體以及 63, 65, 67 變異體的表現。然而，由於電泳道 3 至 8 未觀察到抗體條帶，無法確認 2, 4, 6 變異體、2, 4, 8 變異體、4, 8, 13 變異體、19, 21, 23 變異體、13, 16, 19 變異體以及 16, 21, 23 變異體的表現。

【0113】 實施例 2 對抗原之親和性經提升的抗體的特徵

為了發現對抗原之親和性經提升之實施例 1 的變異體的共通特徵，本發明者們算出輕鏈 FR1 以及 FR3 之各位置的胺基酸頻率。再者，本發明者們考量胺基酸殘基的側鏈面對抗體分子表面之情事，係參與抗原之親和性的提升，算出輕鏈 FR1 以及 FR3 之各胺基酸殘基的溶劑暴露表面積比率。

【0114】 (1) 胺基酸頻率

從提供抗體的胺基酸序列之公共數據庫的 abYsis，下載作為參考抗體之約 30,000 個小鼠抗體之輕鏈胺基酸序列。以使由 Kabat 法所附加之輕鏈 FR 中的胺基酸殘基的編號為一致的方式，將取得之參考抗體之輕鏈胺基酸序列整列。於取得之參考抗體之輕鏈 FR1 以及 FR3 的各位置中取得胺基酸頻率。序列的整列以及胺基酸頻率係藉由 abYsis 取得。可理解對應於對抗原之親和性經提升的實施例 1 的變異體之經修改胺基酸殘基的位置中，R、S、T、V、D 以及 E 的出現頻率為高傾向。此處，輕鏈 FR1 以及 FR3 的各位置中，算出該等胺基酸頻率的合計值。胺基酸頻率的合計值，係藉由上述式(I)算出。此處，於取得之參考抗體之輕鏈 FR 之由 Kabat 法所附加的編號，係與野生型抗溶菌酶抗體之輕鏈 FR 相同。據此，由參考抗體之輕鏈胺基酸序列所得之胺基酸頻率的合計值，係作為野生型抗溶菌酶抗體之輕鏈胺基酸序列的值使用。

【0115】 (2) 溶劑暴露表面積比率

從提供蛋白質的三維結構數據之公共數據庫的 PDB，檢索野生型抗溶菌酶抗體之輕鏈胺基酸序列，下載該抗體輕鏈的三維結構數據。使用所取得之三維結構數據，藉由 Discovery Studio Client v17.2.0.16349，取得野生型抗溶菌酶抗體之輕鏈 FR1 以及 FR3 之各胺基酸殘基的溶劑暴露表面

積比率。又，Discovery Studio Client v17.2.0.16349 中，溶劑暴露表面積比率係藉由上述式(II)算出。

【0116】 (3) 結果

表 3、表 4A 以及表 4B 顯示野生型抗溶菌酶抗體之輕鏈 FR1 以及 FR3 的各位置中之 R、S、T、V、D 以及 E 的各別胺基酸頻率以及其等之合計值、以及各胺基酸殘基的溶劑暴露表面積比率。

【0117】 [表 3]

輕鏈 FR1 的位置	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12
R	0.2	0.1	0.6	0.0	0.1	0.1	0.1	1.0	0.1	0.0	0.1	0.1
S	7.3	16.6	1.8	0.1	4.6	3.1	49.9	6.0	55.9	58.6	0.4	79.1
T	0.2	1.6	2.4	0.4	88.5	1.4	11.7	1.7	1.1	23.5	0.7	3.4
V	0.2	9.1	53.4	7.5	0.1	0.0	0.2	0.2	2.1	1.3	29.0	0.3
D	37.4	0.3	1.0	0.0	0.3	0.2	1.5	0.1	3.4	0.0	0.0	0.0
E	17.7	0.1	8.6	0.1	0.1	0.1	2.8	0.2	0.6	0.0	0.2	0.3
胺基酸頻率的合計值 (%)	62.9	27.7	67.8	8.2	93.8	4.9	66.2	9.1	63.2	83.5	30.3	83.1
溶劑暴露表面積比率 (%)	69.0	7.1	88.1	0.0	84.8	0.0	100.0	54.8	111.5	74.0	26.8	57.7

輕鏈 FR1 的位置	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	L21	L22	L23
R	0.2	0.1	0.1	0.7	0.3	44.7	0.0	5.7	0.0	0.5	0.1
S	1.1	69.3	0.5	0.2	0.9	10.7	0.1	16.0	0.0	47.5	0.1
T	3.5	11.8	0.6	0.0	0.4	24.3	0.1	70.6	0.1	42.9	0.0
V	31.2	0.3	21.9	0.1	0.0	0.1	61.1	0.2	1.4	0.0	0.0
D	0.0	0.1	0.0	0.1	25.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0
E	1.5	0.0	0.1	0.3	31.0	0.2	0.0	1.0	0.0	0.2	0.0
胺基酸頻率的合計值 (%)	37.5	81.6	23.2	1.4	58.1	80.0	61.4	93.5	1.5	91.1	0.2
溶劑暴露表面積比率 (%)	10.9	67.7	30.6	81.7	85.1	79.9	4.6	81.5	1.5	25.7	0.0

【0118】 [表 4A]

輕鏈 FR3 的位置	L57	L58	L59	L60	L61	L62	L63	L64	L65	L66	L67	L68
R	0.22	0.00	0.04	0.04	98.50	0.00	0.95	0.03	1.01	3.68	0.05	0.99
S	0.10	0.07	6.72	27.74	0.13	0.12	88.20	0.73	95.85	3.85	93.33	2.23
T	0.03	2.07	0.33	0.64	0.17	0.01	5.67	0.02	0.92	1.13	0.25	0.18
V	0.06	66.28	0.00	1.06	0.00	0.25	0.77	0.23	0.03	0.87	0.03	0.16
D	2.09	0.07	0.00	43.09	0.00	0.02	0.01	0.19	0.06	0.05	0.12	0.87
E	0.41	0.03	0.01	7.11	0.00	0.00	0.02	0.02	0.04	0.35	0.04	0.80
胺基酸頻率的合計值 (%)	2.89	68.52	7.10	79.67	98.81	0.39	95.62	1.20	97.91	9.93	93.82	5.22
溶劑暴露表面積比率(%)	123.56	6.65	25.77	132.72	13.71	0.34	84.95	2.09	93.83	54.45	85.39	46.07

輕鏈 FR3 的位置	L69	L70	L71	L72	L73	L74	L75	L76	L77	L78	L79	L80
R	0.69	0.22	1.33	0.05	0.01	0.96	0.01	0.78	17.70	0.09	2.96	1.01
S	5.49	16.37	0.58	26.20	0.09	2.58	0.06	73.92	35.17	0.06	0.07	12.11
T	68.95	18.75	0.14	65.26	0.15	74.45	0.17	14.80	1.31	2.22	0.04	8.53
V	0.05	0.44	1.34	0.39	0.06	0.35	1.72	0.03	0.04	28.04	0.25	1.55
D	2.22	44.95	0.17	0.03	0.00	0.26	0.00	0.59	1.39	0.01	0.47	0.13
E	0.10	8.77	0.01	0.00	0.01	0.19	0.00	0.29	0.26	0.01	33.22	1.73
胺基酸頻率的合計值 (%)	77.50	89.49	3.57	91.94	0.32	78.79	1.96	90.41	55.86	30.44	37.00	25.05
溶劑暴露表面積比率(%)	69.13	63.96	0.00	53.09	0.00	58.10	0.00	93.56	82.29	0.00	61.80	44.13

【0119】 [表 4B]

輕鏈 FR3 的位置	L81	L82	L83	L84	L85	L86	L87	L88
R	0.03	0.01	0.00	0.01	0.05	0.00	0.01	0.09
S	0.04	0.00	1.00	0.65	1.41	0.02	0.62	0.05
T	0.17	0.01	0.75	0.44	27.76	0.00	0.01	0.00
V	0.25	0.06	11.70	0.66	27.58	0.01	0.05	0.02
D	8.60	99.26	0.74	0.04	32.55	0.00	0.00	0.00
E	81.18	0.19	34.30	0.01	1.68	0.00	0.00	0.00
胺基酸頻率的合計值(%)	90.27	99.53	48.49	1.81	91.03	0.03	0.69	0.16
溶劑暴露表面積比率(%)	77.62	1.49	7.43	8.38	15.55	0.00	1.01	0.00

【0120】 由該等表可觀察到，作為對抗原之親和性經提升的實施例 1 的變異體之共通特徵，在抗體之輕鏈 FR 的胺基酸序列中，滿足下述(a)以及(b)條件二者的胺基酸殘基中的 3 個係被設為帶電荷胺基酸殘基。再者，可理解實施例 1 中無法確認的變異體中所修改的胺基酸殘基，係未滿足下述(a)及/或(b)的條件。

【0121】

(a) 抗體之輕鏈 FR 的胺基酸序列中，存在於精胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、纈胺酸、天冬胺酸以及麩胺酸的胺基酸頻率的合計值成為 35% 以上的位置。

(b) 抗體之輕鏈 FR 的胺基酸序列中，溶劑暴露表面積比率顯示為 20% 以上。

【0122】 實施例 3 輕鏈 FR3 的胺基酸殘基經修改的抗體之製作

藉由將實施例 2 中觀察到之滿足上述(a)以及(b)條件二者的胺基酸殘基中的 3 個置換成帶電荷胺基酸殘基，藉此檢視確認是否可提升抗體對抗

原之親和性。具體而言，製作與實施例 1 所製作之變異體不同的抗溶菌酶抗體的變異體，測定該等對抗原之親和性。

【0123】 (1) 抗溶菌酶抗體的變異體之製作

從表 4A 以及 B 選擇在野生型抗溶菌酶抗體之輕鏈 FR3 中修改的 3 個胺基酸殘基。為了將所選擇之預定的 3 個胺基酸殘基置換為精胺酸殘基，使用下述鹼基序列所示之引子，與實施例 1 同樣地操作實施 PCR。使用序列編號 23 至 28 的引子作為前置引子，使用序列編號 29 至 34 的引子作為反置引子。

【0124】 [變異體製作用引子]

60, 63, 65 變異體 FOR : 5' GAGGCTCGGGCACCGACTTCACCCTGTC 3' (序列編號 23)

60, 76, 77 變異體 FOR : 5' TCGGGCACCGACTTCACCCTGTCGATCAGAAGAGTCGAGACGGAGGAC 3' (序列編號 24)

65, 67, 70 變異體 FOR : 5' CCAGATTCACCCTGTCGATCAACAGCGTCGAG 3' (序列編號 25)

67, 70, 72 變異體 FOR : 5' CCAGATTCAGACTGTCGATCAACAGCGTCGAGAC 3' (序列編號 26)

74, 76, 77 變異體 FOR : 5' AGTCGAGACGGAGGACTTCGG 3' (序列編號 27)

77, 79, 81 變異體 FOR : 5' AGAACGAGAGACTTCGGCATGTACTTCTGC 3' (序列編號 28)

60, 63, 65 變異體 REV : 5' TGCCTCTGAAGCGTCTCGGGATCCCC
GAGATC 3' (序列編號 29)

60, 76, 77 變異體 REV : 5' GCCCGAGCCGCTGAAGCGTCTCGGG
ATCCCCGAGATC 3' (序列編號 30)

65, 67, 70 變異體 REV : 5' TGCCTCTGCCTCTGCCGCTGAAGC 3'
(序列編號 31)

67, 70, 72 變異體 REV : 5' TGCCTCTGCCCGAGCCGCTGAAG 3'
(序列編號 32)

74, 76, 77 變異體 REV : 5' CTTCTGATTCTCAGGGTGAAGTCG 3'
(序列編號 33)

77, 79, 81 變異體 REV : 5' GACTCTGTTGATCGACAGGGTGAA
GTCG 3' (序列編號 34)

【0125】 使用所得之 PCR 產物，與實施例 1 同樣地施作，取得包含編碼變異體輕鏈之基因的質體、以及包含編碼野生型重鏈之基因的質體。使用此等質體，與實施例 1 同樣地施作，於 Expi293(商標)細胞表現各抗體，精製所得之培養上清，取得抗溶菌酶抗體的變異體的溶液。

【0126】 (2) 親和性的測定

將所製作之變異體的親和性使用 Biacore(註冊商標) T200(GE Healthcare 公司)，與實施例 1 同樣地施作進行測定。結果示於表 5。

【0127】 [表 5]

抗溶菌酶抗體	K_d (M)
野生型	1.3E-10
60, 63, 65 變異體	6.6E-11
67, 70, 72 變異體	1.4E-11
74, 76, 77 變異體	5.6E-11
77, 79, 81 變異體	1.0E-10
65, 67, 70 變異體	2.0E-11
60, 76, 77 變異體	9.7E-11

【0128】 如表 5 所示，任一變異體的 K_d 值皆比野生型抗溶菌酶抗體的 K_d 值低。據此，暗示藉由將實施例 2 中所觀察到之滿足上述(a)以及(b)條件二者的胺基酸殘基中的 3 個置換為精胺酸殘基，可提升抗體對抗原之親和性。

【0129】 實施例 4 輕鏈 FR1 或 FR3 的胺基酸殘基經修改的抗體之製作(2)

使用與實施例 1 之抗溶菌酶抗體不同殖株(clone)(Hy-HEL5)的小鼠抗溶菌酶抗體、小鼠抗甲狀腺刺激荷爾蒙(TSH)抗體、以及人源化抗 HER2 抗體(曲妥珠單抗)作為未修改抗體。在此等抗體之輕鏈 FR1 或 FR3 中，將滿足上述(a)以及(b)條件二者的胺基酸殘基中的 3 個置換成帶電荷胺基酸殘基，藉此檢視確認是否可提升抗體對抗原之親和性。

【0130】 (1) 變異體的製作

(1.1) 編碼抗溶菌酶抗體(Hy-HEL5)之變異體輕鏈的基因之取得

根據表 3，選擇輕鏈 FR1 的第 3、5 以及 9 號的胺基酸殘基作為滿足上述(a)以及(b)條件二者的胺基酸殘基。為了將此等的胺基酸殘基置換為組胺

酸殘基，使用下述鹼基序列所示之引子，與實施例 1 同樣地施作實施 PCR。
使用序列編號 46 的引子作為前置引子，使用序列編號 47 的引子作為反置引子。

【0131】

3, 5, 9 變異體(His) FOR : 5' CATCTGCACCAATCACCGCACATTAT
GTCCGCATCTC 3' (序列編號 46)

3, 5, 9 變異體(His) REV: 5' TATGTCCCCTCTGCTCATAATCACAGA
GGCACTG 3' (序列編號 47)

【0132】 (1.2) 編碼抗 TSH 抗體之變異體的輕鏈的基因之取得

使用表 3 所記載的胺基酸頻率的合計作為野生型抗 TSH 抗體之輕鏈 FR 的胺基酸序列之各位置中之 R、S、T、V、D 以及 E 的胺基酸頻率的合計值。抗 TSH 抗體之輕鏈 FR 的各胺基酸殘基的溶劑暴露表面積比率，與實施例 2 同樣地施作，基於從數據庫 PDB 下載之野生型抗 TSH 抗體之輕鏈的三維結構數據而取得。選擇輕鏈 FR1 的第 18、20 以及 22 號的胺基酸殘基作為滿足上述(a)以及(b)條件二者的胺基酸殘基。為了將此等胺基酸殘基置換為離胺酸殘基，使用下述鹼基序列所示之引子，與實施例 1 同樣地施作實施 PCR。使用序列編號 48 的引子作為前置引子，使用序列編號 49 的引子作為反置引子。

【0133】

18, 20, 22 變異體(Lys) FOR : 5' AAGGCCAAGATTAAGTGCAGATC
TAATCAGAGCGTTG 3' (序列編號 48)

18, 20, 22 變異體(Lys) REV : 5' ATCTCCAAGACTGACAGGCAGGG
AGAGTG 3' (序列編號 49)

【0134】 (1.3) 編碼人源化抗 HER2 抗體之變異體輕鏈的基因之取得
從數據庫 abYsis 下載作為參考抗體之約 30,000 個人類抗體之輕鏈胺
基酸序列。與實施例 2 同樣地施作，將所取得之參考抗體之輕鏈胺基酸序
列整列，算出 FR 的胺基酸序列之各位置中的 R、S、T、V、D 以及 E 的胺
基酸頻率的合計值。抗 HER2 抗體之輕鏈 FR 的各胺基酸殘基的溶劑暴露
表面積比率，係與實施例 2 同樣地施作，基於從數據庫 PDB 下載之人源化
抗 HER2 抗體之輕鏈的三維結構數據而取得。選擇輕鏈 FR3 的第 76、77
以及 81 號的胺基酸殘基。為了將此等胺基酸殘基置換為精胺酸殘基，使用
下述鹼基序列所示之引子與實施例 1 同樣地施作實施 PCR。使用序列編號
50 的引子作為前置引子，使用序列編號 51 的引子作為反置引子。

【0135】

76, 77, 81 變異體(Arg) FOR : 5' CAGCCGAGAGACTTCGCCACGTA
TTACTG 3' (序列編號 50)

76, 77, 81 變異體(Arg) REV : 5' CAGTCTTCTGATCGTCAGGGTAA
AATCGGTAC 3' (序列編號 51)

【0136】 (1.4) 各抗體之變異體的取得

使用所得之 PCR 產物，與實施例 1 同樣地施作，取得編碼各抗體之變
異體輕鏈的基因的質體、以及編碼各抗體之野生型重鏈的基因的質體。使
用該等質體，與實施例 1 同樣地施作，於 Expi293(商標)細胞表現各抗體，

精製所得之培養上清液，取得各抗體之變異體的溶液。人源化抗 HER2 抗體之 76, 77, 81 變異體(Arg)之輕鏈胺基酸序列示於序列編號 52。

【0137】 (2) 親和性的測定

將所製作之變異體的親和性使用 Biacore(註冊商標) T200(GE Healthcare 公司)，與實施例 1 同樣地施作進行測定。測定中，使用 TSH 蛋白質(R&D Systems 公司)作為抗 TSH 抗體的抗原，使用 HER2 蛋白質(R&D Systems 公司，目錄編號：1129-ER)作為抗 HER2 抗體的抗原。結果示於表 6。表中，「Ratio」係野生型的 K_d 值設為 1 時之變異型的 K_d 值的比。

【0138】 [表 6]

抗溶菌酶抗體	K_d (M)	Ratio
野生型	1.77E-10	1.00
3, 5, 9 變異體 (His)	1.21E-10	1.46

抗 TSH 抗體	K_d (M)	Ratio
野生型	1.18E-09	1.00
18, 20, 22 變異體 (Lys)	4.64E-10	2.55

抗 HER2 抗體	K_d (M)	Ratio
野生型	5.94E-11	1.00
76, 77, 81 變異體 (Arg)	2.19E-11	2.71

【0139】 如表 6 所示，任一變異體的 K_d 值皆比野生型的抗體的 K_d 值低。據此，暗示即使為與實施例 1 的抗溶菌酶抗體不同的抗體，藉由修改滿足上述(a)以及(b)條件二者的胺基酸殘基中的 3 個，可提升抗體對抗原之親和性。

【符號說明】

【0140】

10:胺基酸序列的解析裝置(解析裝置)

20:序列數據伺服器

30:網絡

40:記憶媒體

100:控制部(電腦本體)

101,211:輸入部

102,212:輸出部(顯示部)

110:CPU

111:記憶體

112:記憶裝置

113:介面

114:讀取裝置

115:匯流排

210:控制部

213:記憶部

214:通信部

215:胺基酸序列數據庫

【序列表】

- <110> 西斯美股份有限公司(SYSMEX CORPORATION)
- <120> 提升抗體對抗原之親和性的方法及其用途
(Method for improving affinity of antibody for antigen and use thereof)
- <150> JP2020-10411
<151> 2020-01-24
- <150> JP2020-93384
<151> 2020-05-28
- <150> JP2020-10413
<151> 2020-01-24
- <150> JP2020-93389
<151> 2020-05-28
- <150> JP2020-10414
<151> 2020-01-24
- <150> JP2020-93392
<151> 2020-05-28
- <150> JP2020-10416
<151> 2020-01-24
- <150> JP2020-93399
<151> 2020-05-28
- <150> JP2020-10417
<151> 2020-01-24
- <150> JP2020-93405
<151> 2020-05-28
- <150> JP2020-10418
<151> 2020-01-24
- <150> JP2020-93411
<151> 2020-05-28
- <150> JP2020-10419
<151> 2020-01-24
- <150> JP2020-93421
<151> 2020-05-28
- <150> JP2020-10420
<151> 2020-01-24
- <150> JP2020-93424
<151> 2020-05-28

<160>	52	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	引子	
<400>	1	
	agaaccagaa gcccggcgac cctctcggtc acccccggc	39
<210>	2	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	引子	
<400>	2	
	agagcagagc gaccctctcg gtcacccccg gc	32
<210>	3	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	引子	
<400>	3	
	gccccgcgac cctctcggtc acccccggc	29
<210>	4	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	引子	
<400>	4	
	ccctctcgag aacccccggc aactcggtgt cgc	33
<210>	5	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	

<220>		
<223>	引子	
<400>	5	
ggcaactcgg	tgtegtccg	ctgccgcgc tgcagtcg 39
<210>	6	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	引子	
<400>	6	
aactcgcgat	cgctctcgtg	ccgcgcctcg cagtcg 36
<210>	7	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	引子	
<400>	7	
gtgtcgcgat	cgcgacgcgc	ctcgcagtcg atcggc 36
<210>	8	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	引子	
<400>	8	
ctctcgtgcc	gcgcctcgca	g 21
<210>	9	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	引子	
<400>	9	
cgctgccgcg	cctcgcagtc	gatcggc 27
<210>	10	
<211>	30	
<212>	DNA	

<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	引子	
<400>	10	
	agatcgagac ggcctcgca gtcgacggc	30
<210>	11	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	引子	
<400>	11	
	ggcaccgact tcacctgtc g	21
<210>	12	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	引子	
<400>	12	
	gactctatct cctctggaca ttatgactga ggc	33
<210>	13	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	引子	
<400>	13	
	gggttctgac tctatctcct ctggacatta tgactgaggc	40
<210>	14	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	引子	
<400>	14	
	tctggcgag gcggatatct cctctggaca ttatg	35
<210>	15	

<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	引子	
<400>	15	
	tcgctctgct ctgggttctg acgatatctc ctctggacat tatg	44
<210>	16	
<211>	53	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	引子	
<400>	16	
	gggggtgacc gagagggtgc gcgggctctg gcgcaggacg atatctcctc tgg	53
<210>	17	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	引子	
<400>	17	
	tcgggggggtt cgcgagaggg tcgccgggct ctggg	35
<210>	18	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	引子	
<400>	18	
	cgagtttcgg ggggtgaccg agagggtcgc	30
<210>	19	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	引子	
<400>	19	

gcgcacgcgg cggccggggg tgaccgagag gg	32
<210> 20	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 引子	
<400> 20	
gaggcgcacg cggttgccgg gggtgaccga gaggg	35
<210> 21	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 引子	
<400> 21	
cgatctcgag ttgccggggg tgaccgagag gg	32
<210> 22	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 引子	
<400> 22	
tctgcctctg cctctgaagc gcgacgggat ccccg	35
<210> 23	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 引子	
<400> 23	
gaggctcggg caccgacttc accctgtc	28
<210> 24	
<211> 48	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	

<220>		
<223>	引子	
<400>	24	
	tcgggcaccg acttcaccct gtcgatcaga agagtcgaga cggaggac	48
<210>	25	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	引子	
<400>	25	
	ccagattcac cctgtcgatc aacagcgtcg ag	32
<210>	26	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	引子	
<400>	26	
	ccagattcag actgtcgatc aacagcgtcg agac	34
<210>	27	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	引子	
<400>	27	
	agtcgagacg gaggacttcg g	21
<210>	28	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	引子	
<400>	28	
	agaacgagag acttcggcat gtacttctgc	30
<210>	29	
<211>	32	
<212>	DNA	

<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	引子	
<400>	29	
	tgccctctgaa gcgtctcggg atccccgaga tc	32
<210>	30	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	引子	
<400>	30	
	gccccgagccg ctgaagcgtc tcgggatccc cgagatc	37
<210>	31	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	引子	
<400>	31	
	tgccctctgcc tctgccgctg aagc	24
<210>	32	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	引子	
<400>	32	
	tgccctctgcc cgagccgctg aag	23
<210>	33	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	引子	
<400>	33	
	cttctgattc tcagggtgaa gtcg	24

<210> 34
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 引子

<400> 34
gactctgttg atcgacaggg tgaagtcg 28

<210> 35
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人源化抗體(humanized antibody)

<400> 35

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 36
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人源化抗體(humanized antibody)

<400> 36

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 37
<211> 223
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人源化抗体(humanized antibody)

<400> 37

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

- <210> 38
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- <220>
- <223> 人源化抗體(humanized antibody)
- <400> 38

Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 39
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 人源化抗體(humanized antibody)

<400> 39

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

<210> 40
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 人源化抗體(humanized antibody)

<400> 40

Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
 1 5

<210> 41
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 人源化抗體(humanized antibody)

<400> 41

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
100 105 110

<210> 42
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人源化抗體(humanized antibody)

<400> 42

Asp Thr Tyr Ile His
1 5

<210> 43
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人源化抗體(humanized antibody)

<400> 43

Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 44
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 人源化抗體(humanized antibody)

<400> 44

Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 45
<211> 120
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人源化抗體(humanized antibody)

<400> 45

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 46

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 引子

<400> 46

catctgcacc aatcacgca cattatgtcc gcatctc 37

<210> 47

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>		
<223>	引子	
<400>	47	
tatgtcccct ctgctcataa tcacagaggc actg		34
<210>	48	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	引子	
<400>	48	
aaggccaaga ttaagtcag atctaatacag agcggtg		37
<210>	49	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	引子	
<400>	49	
atctccaaga ctgacaggca gggagagt		29
<210>	50	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	引子	
<400>	50	
cagccgagag acttcgccac gtattactg		29
<210>	51	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	引子	
<400>	51	
cagtcttctg atcgtcaggg taaaatcgg ac		32
<210>	52	
<211>	214	
<212>	PRT	

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 經修改抗體(modified antibody)

<400> 52

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Arg Arg Leu Gln Pro
65 70 75 80

Arg Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種提升抗體對抗原之親和性的方法，係於抗體之輕鏈框架區域的胺基酸序列中，在精胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、纈胺酸、天冬胺酸以及麩胺酸的胺基酸頻率的合計值成為 35% 以上的位置且溶劑暴露表面積比率顯示為 20% 以上的胺基酸殘基之中，至少 3 個被設為鹼性胺基酸殘基，藉此，與未修改抗體相比，提升抗體對抗原之親和性；

在前述胺基酸頻率的合計值成為 35% 以上的位置之胺基酸殘基，係藉由下列步驟予以具體辨識：

取得複數個參考抗體之輕鏈胺基酸序列的步驟，

將前述複數個參考抗體之輕鏈胺基酸序列進行整列，算出框架區域的胺基酸序列之各位置中的精胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、纈胺酸、天冬胺酸以及麩胺酸的胺基酸頻率的合計值的步驟，

具體辨識出所取得之胺基酸頻率的合計值成為 35% 以上的位置的步驟，以及

於前述未修改抗體之輕鏈框架區域中，具體辨識出位於特定位置之胺基酸殘基的步驟，其中該特定位置對應於由前述複數個參考抗體所具體辨識之前述位置；

前述溶劑暴露表面積比率顯示為 20% 以上的胺基酸殘基，係藉由下列步驟予以具體辨識：

使用前述未修改抗體之輕鏈胺基酸序列，取得前述未修改抗體之輕鏈的三維結構數據的步驟，

基於前述三維結構數據，取得前述框架區域的各胺基酸殘基的溶劑暴露表面積比率的步驟，以及

具體辨識出所取得之溶劑暴露表面積比率為 20% 以上的胺基酸殘基的步驟。

【請求項2】如請求項 1 所述之方法，其中，前述溶劑暴露表面積比率顯示為 20% 以上的胺基酸殘基，係基於前述未修改抗體之輕鏈胺基酸序列而被具體辨識。

【請求項3】一種改變抗體，為與未修改抗體相比，對抗原之親和性經提升者，其中，

前述未修改抗體之輕鏈框架區域的胺基酸序列中，在精胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、纈胺酸、天冬胺酸以及麩胺酸的胺基酸頻率的合計值成為 35% 以上的位置且溶劑暴露表面積比率顯示為 20% 以上的胺基酸殘基之中，至少 3 個被設為鹼性胺基酸殘基，前述至少 3 個胺基酸殘基係選自於未修改抗體中以 Kabat 法所定義之輕鏈的第 3、5、9、17、18、20 及 22 號的胺基酸殘基所組成群組；

在前述胺基酸頻率的合計值成為 35% 以上的位置之胺基酸殘基，係藉由下列步驟予以具體辨識：

取得複數個參考抗體之輕鏈胺基酸序列的步驟，

將前述複數個參考抗體之輕鏈胺基酸序列進行整列，算出框架區域的胺基酸序列之各位置中的精胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、纈胺酸、天冬胺酸以及麩胺酸的胺基酸頻率的合計值的步驟，

具體辨識出所取得之胺基酸頻率的合計值成為 35% 以上的位置的步驟，以及

於前述未修改抗體之輕鏈框架區域中，具體辨識出位於特定位置之胺基酸殘基的步驟，其中該特定位置對應於由前述複數個參考抗體所具體辨識之前述位置；

前述溶劑暴露表面積比率顯示為 20% 以上的胺基酸殘基，係藉由下列步驟予以具體辨識：

使用前述未修改抗體之輕鏈胺基酸序列，取得前述未修改抗體之輕鏈的三維結構數據的步驟，

基於前述三維結構數據，取得前述框架區域的各胺基酸殘基的溶劑暴露表面積比率的步驟，以及

具體辨識出所取得之溶劑暴露表面積比率為 20% 以上的胺基酸殘基的步驟。

【請求項4】一種製造抗體的方法，該抗體為與未修改抗體相比，對抗原之親和性經提升者，該方法係包含下列步驟：

於抗體之輕鏈框架區域的胺基酸序列中，在精胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、纈胺酸、天冬胺酸以及麩胺酸的胺基酸頻率的合計值成為 35% 以上的位置且溶劑暴露表面積比率顯示為 20% 以上的胺基酸殘基之中，至少 3 個被設為鹼性胺基酸殘基的步驟，以及

回收前述步驟所得之抗體的步驟；

在前述胺基酸頻率的合計值成為 35% 以上的位置之胺基酸殘基，係藉由下列步驟予以具體辨識：

取得複數個參考抗體之輕鏈胺基酸序列的步驟，

將前述複數個參考抗體之輕鏈胺基酸序列進行整列，算出框架區域的胺基酸序列之各位置中的精胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、纈胺酸、天冬胺酸以及麩胺酸的胺基酸頻率的合計值的步驟，

具體辨識出所取得之胺基酸頻率的合計值成為 35% 以上的位置的步驟，以及

於前述未修改抗體之輕鏈框架區域中，具體辨識出位於特定位置之胺基酸殘基的步驟，其中該特定位置對應於由前述複數個參考抗體所具體辨識之前述位置；

前述溶劑暴露表面積比率顯示為 20% 以上的胺基酸殘基，係藉由下列步驟予以具體辨識：

使用前述未修改抗體之輕鏈胺基酸序列，取得前述未修改抗體之輕鏈的三維結構數據的步驟，

基於前述三維結構數據，取得前述框架區域的各胺基酸殘基的溶劑暴露表面積比率的步驟，以及

具體辨識出所取得之溶劑暴露表面積比率為 20% 以上的胺基酸殘基的步驟。

【請求項5】 一種解析抗體的胺基酸序列之方法，係包含下列步驟：

取得抗體之輕鏈框架區域的胺基酸序列中之各位置的精胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、纈胺酸、天冬胺酸以及麩胺酸的胺基酸頻率的合計值的步驟，

取得前述抗體之輕鏈框架區域中之各胺基酸殘基的溶劑暴露表面積比率的步驟，

輸出所取得之各位置的胺基酸頻率的合計值以及各胺基酸殘基的溶劑暴露表面積比率的步驟。

【請求項6】如請求項 5 所述之方法，其中，前述抗體之前述胺基酸頻率的合計值係藉由下列步驟取得：

取得複數個參考抗體之輕鏈胺基酸序列的步驟，

將前述複數個參考抗體之輕鏈胺基酸序列進行整列，算出框架區域的胺基酸序列之各位置中的精胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、纈胺酸、天冬胺酸以及麩胺酸的胺基酸頻率的合計值的步驟，以及

取得所算出之前述胺基酸頻率的合計值，作為與前述複數個參考抗體之前述各位置對應的前述抗體的框架區域的胺基酸序列之各位置中的胺基酸頻率的合計值的步驟。

【請求項7】如請求項 6 所述之方法，其中，前述複數個參考抗體之輕鏈胺基酸序列係包含由外部數據庫下載之胺基酸序列、及/或由使用者輸入的胺基酸序列。

【請求項8】如請求項 5 至 7 中任一項所述之方法，其中，前述取得抗體的溶劑暴露表面積比率的步驟中，基於前述抗體之輕鏈框架區域的胺基酸序列，取得前述抗體的溶劑暴露表面積比率。

【請求項9】如請求項 5 至 7 中任一項所述之方法，係更包含使用前述抗體之輕鏈胺基酸序列，取得前述抗體之輕鏈的三維結構數據的步驟，其中，前述取得抗體的溶劑暴露表面積比率的步驟中，係基於前述三維結構數據，取得前述框架區域之各胺基酸殘基的溶劑暴露表面積比率。

【請求項10】 如請求項 9 所述之方法，其中，前述抗體之輕鏈的三維結構數據係包含選自下列數據之至少 1 者：

使用前述抗體之輕鏈胺基酸序列從外部數據庫進行檢索，由前述外部數據庫下載之三維結構數據；

從外部數據庫下載前述抗體之輕鏈三維結構數據的作成所必須的資訊，基於前述下載之資訊所作成之三維結構數據；以及

前述由使用者輸入之三維結構數據。

【請求項11】 一種具體辨識抗體的候補修改位點之方法，係包含下列步驟：

取得抗體之輕鏈框架區域的胺基酸序列中之各位置的精胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、纈胺酸、天冬胺酸以及麩胺酸的胺基酸頻率的合計值的步驟，

取得前述抗體之輕鏈框架區域中之各胺基酸殘基的溶劑暴露表面積比率的步驟，以及

將在前述胺基酸頻率的合計值成為 35% 以上的位置且溶劑暴露表面積比率顯示為 20% 以上的胺基酸殘基，具體辨識為胺基酸殘基的候補的步驟，該胺基酸殘基的候補係為了提升前述抗體對抗原之親和性而被修改者；

在前述胺基酸頻率的合計值成為 35% 以上的位置之胺基酸殘基，係藉由下列步驟予以具體辨識：

取得複數個參考抗體之輕鏈胺基酸序列的步驟，

將前述複數個參考抗體之輕鏈胺基酸序列進行整列，算出框架區域的胺基酸序列之各位置中的精胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、纈胺酸、天冬胺酸以及麩胺酸的胺基酸頻率的合計值的步驟，

具體辨識出所取得之胺基酸頻率的合計值成為 35% 以上的位置的步驟，以及

於前述未修改抗體之輕鏈框架區域中，具體辨識出位於特定位置之胺基酸殘基的步驟，其中該特定位置對應於由前述複數個參考抗體所具體辨識之前述位置；

前述溶劑暴露表面積比率顯示為 20% 以上的胺基酸殘基，係藉由下列步驟予以具體辨識：

使用前述未修改抗體之輕鏈胺基酸序列，取得前述未修改抗體之輕鏈的三維結構數據的步驟，

基於前述三維結構數據，取得前述框架區域的各胺基酸殘基的溶劑暴露表面積比率的步驟，以及

具體辨識出所取得之溶劑暴露表面積比率為 20% 以上的胺基酸殘基的步驟。

【請求項12】如請求項 11 所述之方法，係更包含輸出所具體辨識之前述胺基酸殘基的候補的步驟。

【請求項13】如請求項 11 所述之方法，其中，前述抗體之輕鏈框架區域的胺基酸序列，係從使用者輸入之前述抗體之輕鏈胺基酸序列取得。

【請求項14】如請求項 13 所述之方法，係更包含於前述由使用者輸入之抗體之輕鏈胺基酸序列中，作成前述胺基酸殘基的候補之中，至少 3 個設為帶電荷胺基酸時的修改胺基酸序列的步驟。

【請求項15】如請求項 14 所述之方法，係更包含輸出所作成之前述修改胺基酸序列的步驟。

【請求項16】 如請求項 11 所述之方法，其中，前述複數個參考抗體之輕鏈胺基酸序列，係包含由外部數據庫下載之胺基酸序列、及/或前述由使用者輸入之胺基酸序列。

【請求項17】 如請求項 11 所述之方法，其中，前述抗體之輕鏈的三維結構數據係包含選自下列數據之至少 1 者：

使用前述抗體之輕鏈胺基酸序列從外部數據庫進行檢索，從前述外部數據庫下載之三維結構數據；

從外部數據庫下載前述抗體之輕鏈的三維結構數據的作成所必須的資訊，基於前述下載之資訊所作成之三維結構數據；以及

前述由使用者輸入之三維結構數據。

【請求項18】 如請求項 11 至 17 中任一項所述之方法，係更包含從前述抗體之輕鏈胺基酸序列，算出互補性決定區域(CDR)的電特性的步驟，其中，

前述電特性係藉由下述式(III)決定，

$$Z = [\text{CDR 的胺基酸序列中的鹼性胺基酸殘基數}] - [\text{CDR 的胺基酸序列中的酸性胺基酸殘基數}] \cdots (III)$$

式中，Z 為-1、0 或 1 時，CDR 的電特性為中性，

Z 為 2 以上時，CDR 的電特性為正電荷，

Z 為-2 以下時，CDR 的電特性為負電荷。

【請求項19】 如請求項 18 所述之方法，係更包含輸出所算出之電特性的步驟。

【請求項20】如請求項 18 所述之方法，其中，所算出之 CDR 的電特性為中性時，作成前述胺基酸殘基的候補中，至少 3 個設為鹼性胺基酸殘基時之修改胺基酸序列。

【請求項21】一種修改抗體，係與未修改抗體相比，對抗原之親和性經提升者，其中，經修改之胺基酸殘基的位置，係藉由請求項 11 至 20 中任一項所述之方法所具體辨識出之胺基酸殘基的候補中之至少 3 個胺基酸殘基的位置；前述修改係對鹼性胺基酸殘基的修改；前述至少 3 個胺基酸殘基係選自於未修改抗體中以 Kabat 法所定義之輕鏈的第 3、5、9、17、18、20 及 22 號的胺基酸殘基所組成群組。

【請求項22】一種製造抗體的方法，該抗體係與未修改抗體相比，對抗原之親和性經提升者，該方法係包含下列步驟：

於藉由請求項 11 至 20 中任一項所述之方法所具體辨識出之胺基酸殘基的候補中，將至少 3 個設為鹼性胺基酸殘基的步驟，

回收前述步驟所得之抗體的步驟。

【請求項23】一種提升抗體對抗原之親和性的方法，係包含於未修改抗體中，將選自以 Kabat 法所定義之輕鏈的第 3、5、9、17、18、20 以及 22 號的胺基酸殘基所組成群組中之至少 3 個胺基酸殘基，設為鹼性胺基酸殘基，藉此與前述未修改抗體相比，提升對抗原之親和性。

【請求項24】一種修改抗體，係與未修改抗體相比，對抗原之親和性經提升者，

該修改抗體係包含將選自前述未修改抗體中以 Kabat 法所定義之輕鏈的第 3、5、9、17、18、20 以及 22 號的胺基酸殘基所組成群組中之至少 3 個胺基酸殘基設為鹼性胺基酸殘基。

【請求項25】一種製造抗體的方法，該抗體係與未修改抗體相比，對抗原之親和性經提升者，該方法係包含下列步驟：

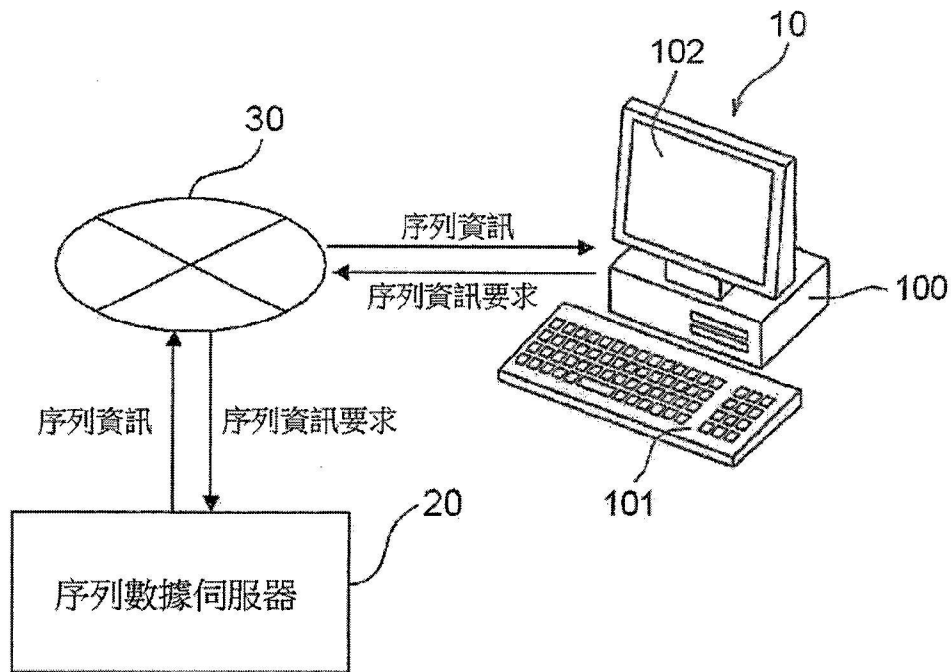
於未修改抗體中，將選自以 Kabat 法所定義之輕鏈的第 3、5、9、17、18、20 以及 22 號的胺基酸殘基所組成群組中之至少 3 個胺基酸殘基，設為鹼性胺基酸殘基的步驟，以及

回收前述工程所得之抗體的步驟。

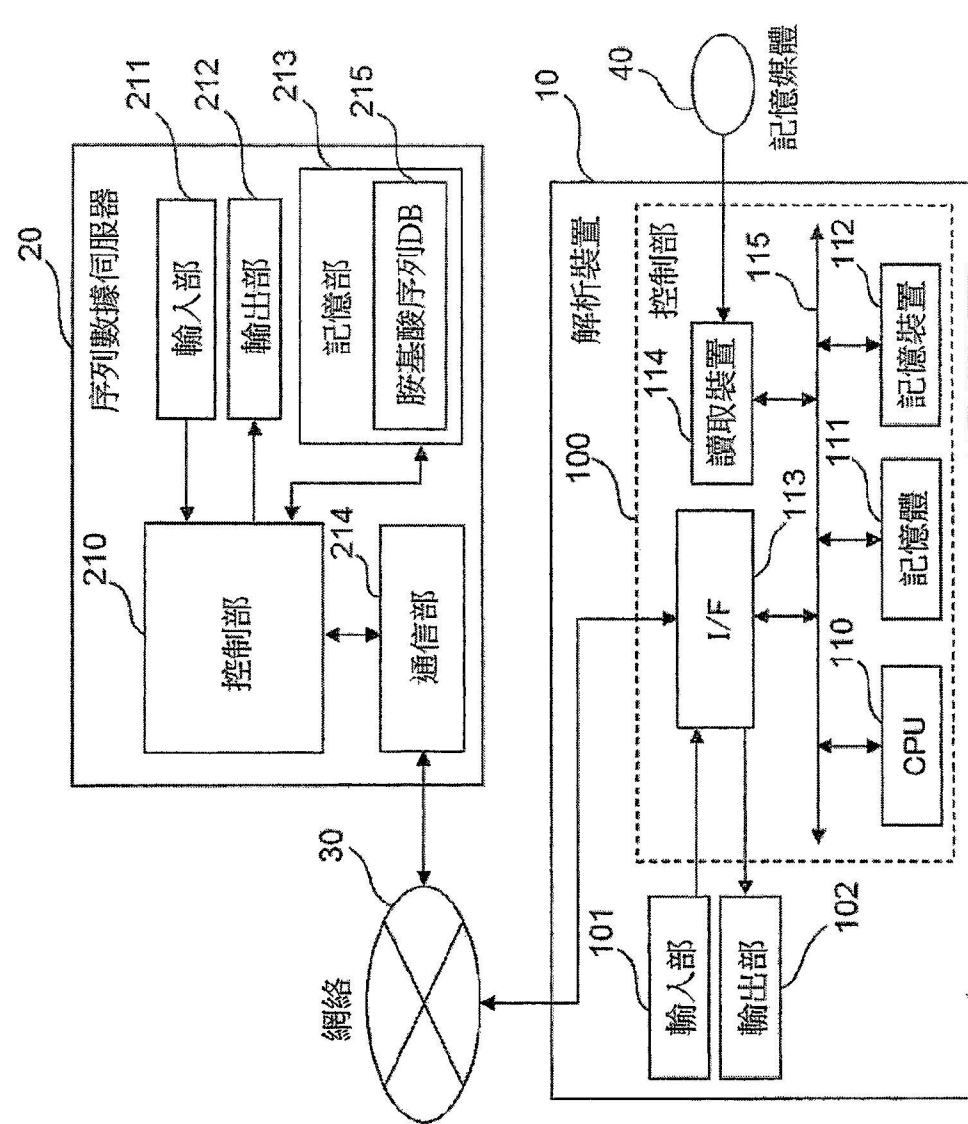
【請求項26】如請求項 1、2、4、14、20、22、23 及 25 中任一項所述之方法，其中，前述框架區域為框架區域 1 或框架區域 3。

【請求項27】如請求項 3、21 及 24 中任一項所述之抗體，其中，前述框架區域為框架區域 1 或框架區域 3。

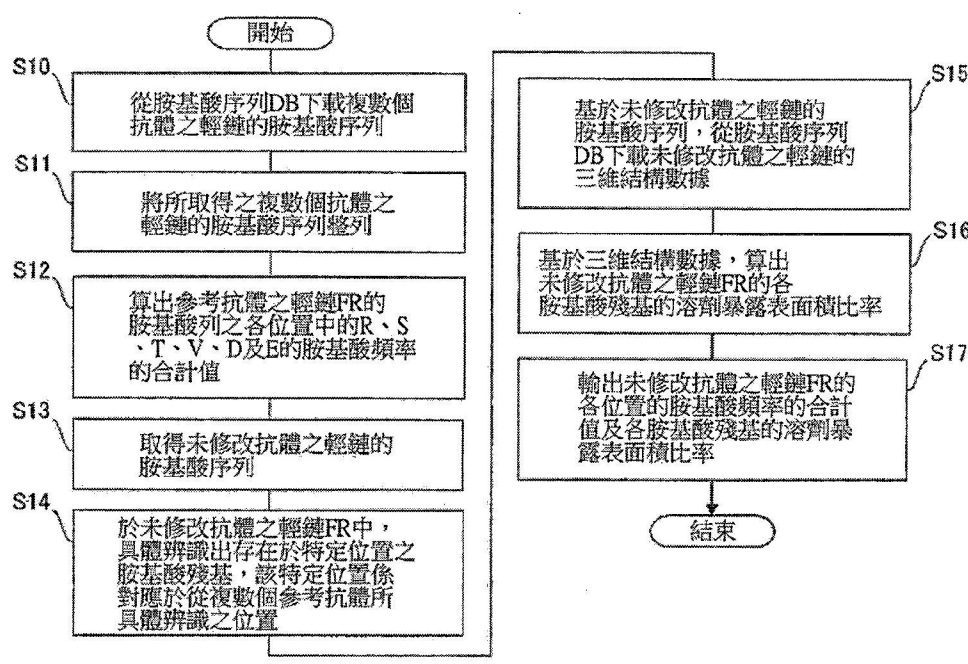
【發明圖式】



【圖1】



【圖2】



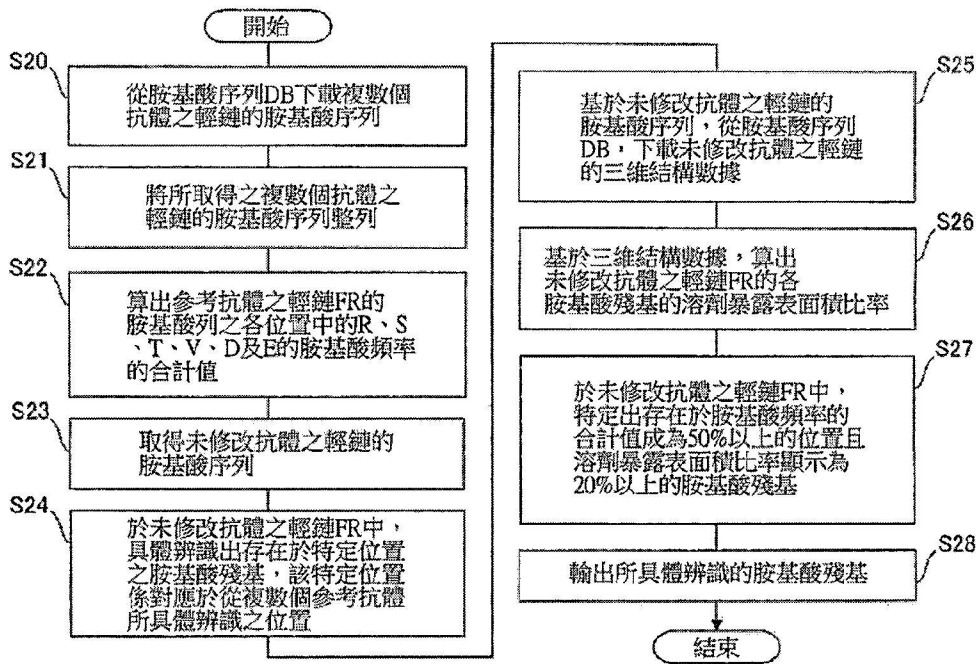
【圖3】

輕鏈FR1的位置	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10
胺基酸頻率的合計值(%)	62.9	27.7	67.8	8.2	93.8	4.9	66.2	9.1	63.2	83.5
溶劑暴露面積比率(%)	69.0	7.1	88.1	0.0	84.8	0.0	100.0	54.8	111.5	74.0

輕鏈FR1的位置	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20
胺基酸頻率的合計值(%)	30.3	83.1	37.5	81.6	23.2	1.4	58.1	80.0	61.4	93.5
溶劑暴露面積比率(%)	26.8	57.7	10.9	67.7	30.6	81.7	85.1	79.9	4.6	81.5

輕鏈FR1的位置	L21	L22	L23
胺基酸頻率的合計值(%)	1.5	91.1	0.2
溶劑暴露面積比率(%)	1.5	25.7	0.0

【圖4】



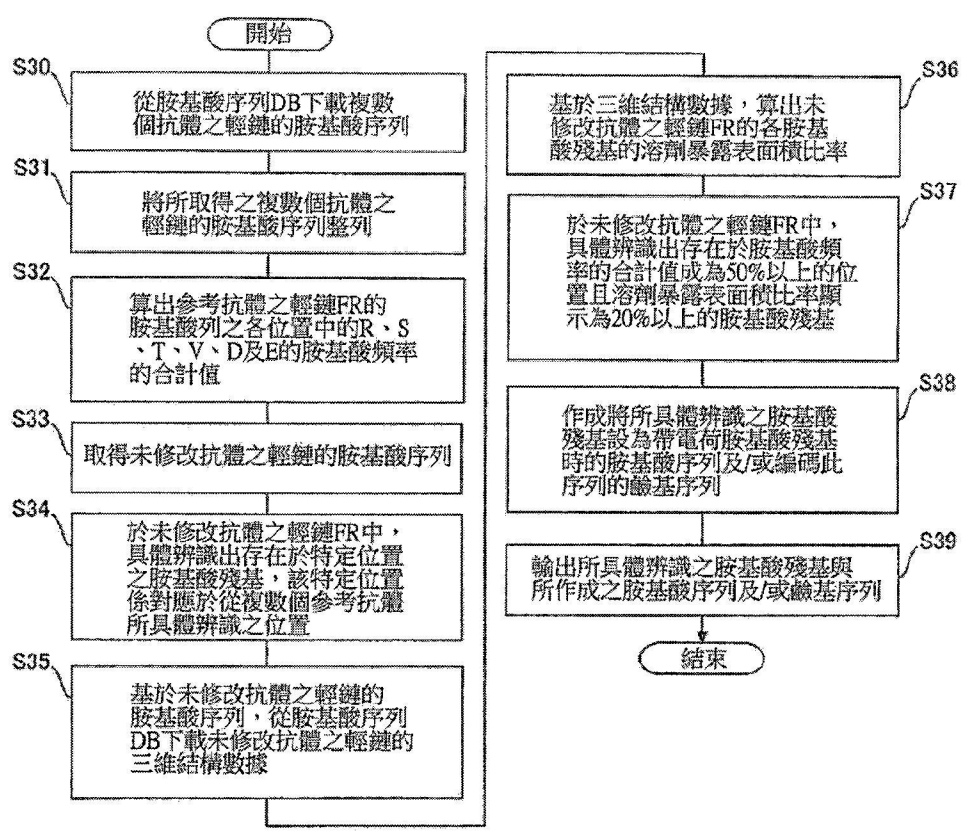
【圖5】

輕鏈FR1的位置	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10
胺基酸頻率的合計值(%)	62.9	27.7	67.8	8.2	93.8	4.9	66.2	9.1	63.2	83.5
溶劑暴露面積比率(%)	69.0	7.1	88.1	0.0	84.8	0.0	100.0	54.8	111.5	74.0

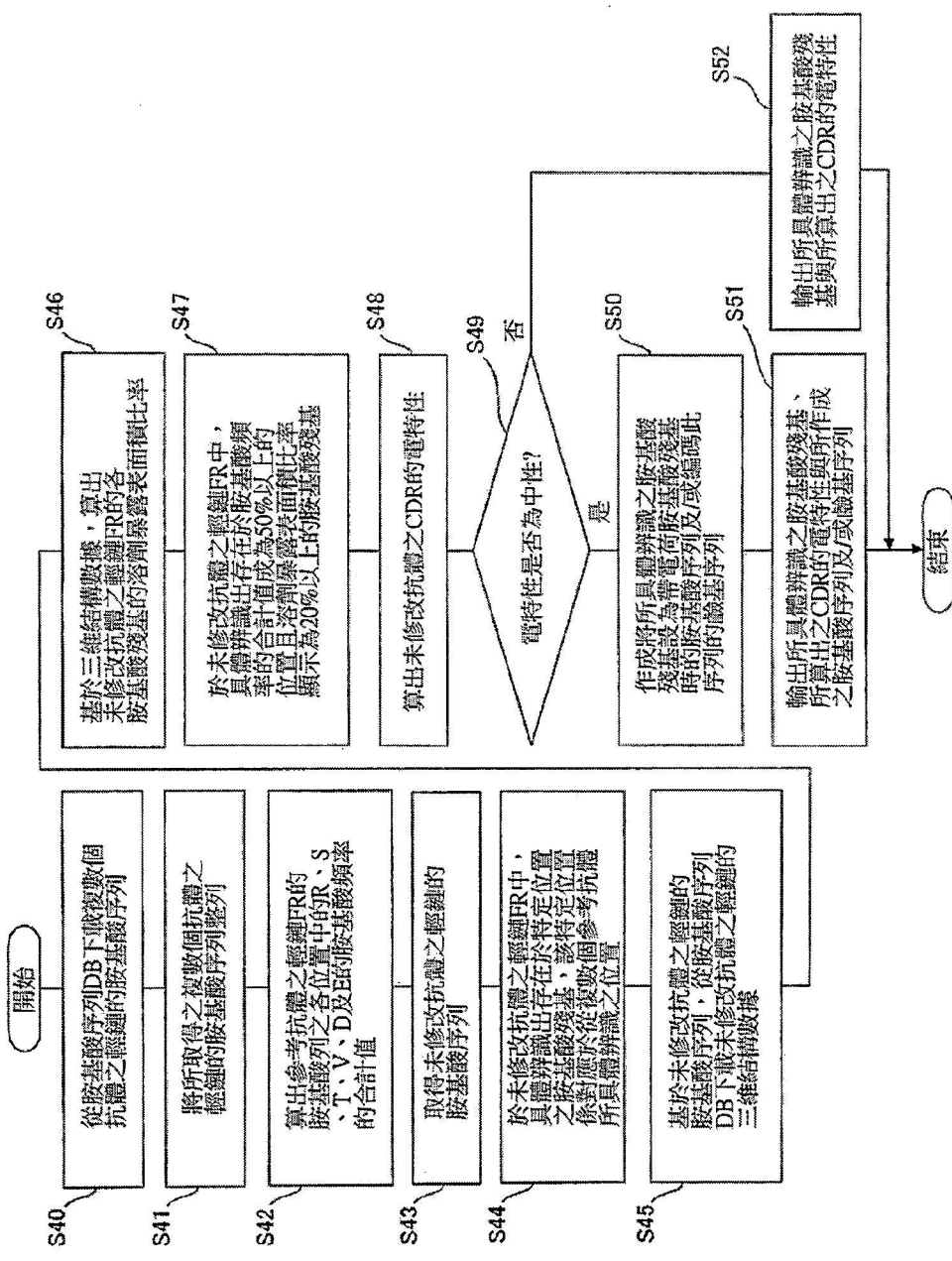
輕鏈FR1的位置	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20
胺基酸頻率的合計值(%)	30.3	83.1	37.5	81.6	23.2	1.4	58.1	80.0	61.4	93.5
溶劑暴露面積比率(%)	26.8	57.7	10.9	67.7	30.6	81.7	85.1	79.9	4.6	81.5

輕鏈FR1的位置	L21	L22	L23
胺基酸頻率的合計值(%)	1.5	91.1	0.2
溶劑暴露面積比率(%)	1.5	25.7	0.0

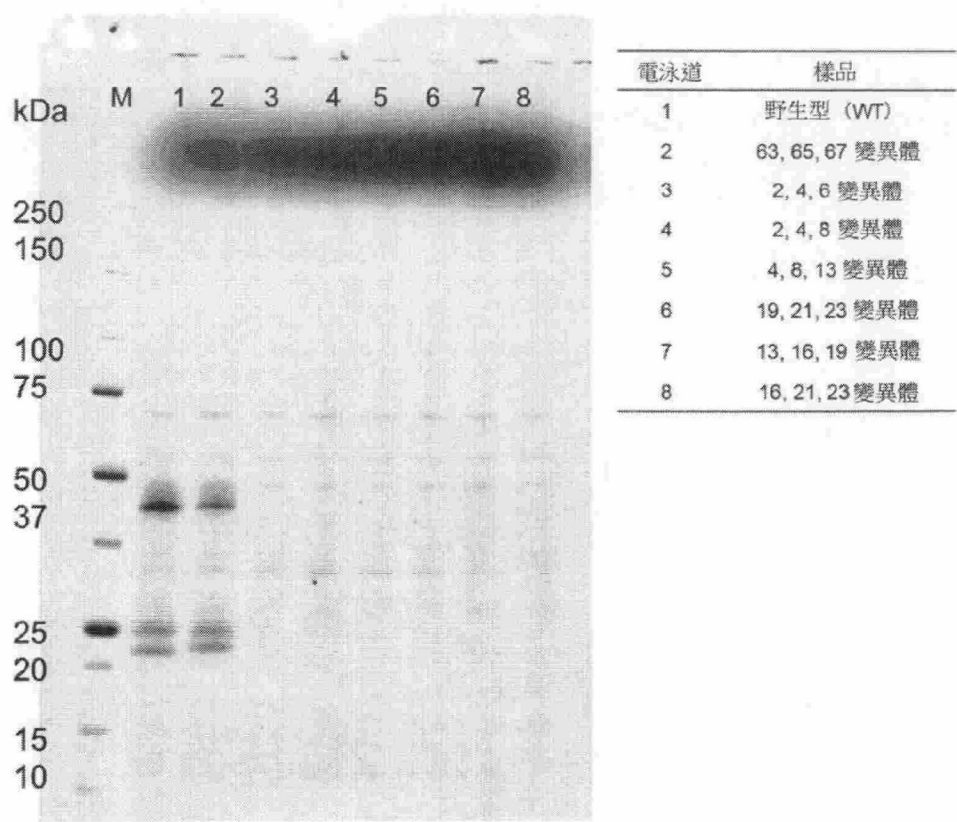
【圖6】



【圖7】



【圖8】



【圖9】