

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2017年5月18日(18.05.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/082213 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12N 15/09 (2006.01) C12P 21/08 (2006.01)  
C07K 1/22 (2006.01) C12Q 1/70 (2006.01)  
C07K 16/42 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/082986
- (22) 国際出願日: 2016年11月7日(07.11.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2015-219765 2015年11月9日(09.11.2015) JP  
特願 2016-024016 2016年2月10日(10.02.2016) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人京都工芸繊維大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KYOTO INSTITUTE OF TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒6068585 京都府京都市左京区松ヶ崎橋上町1番地 Kyoto (JP). 株式会社ダイセル(DAICEL CORPORATION) [JP/JP]; 〒5300011 大阪府大阪市北区大深町3番1号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 熊田 陽一(KUMADA, Yoichi); 〒6068585 京都府京都市左京区松ヶ崎橋上町1番地 国立大学法人京都工芸繊維大学内 Kyoto (JP). 長谷川 祐也(HASEGAWA, Yuya); 〒6068585 京都府京都市左京区松ヶ崎橋上町1番地 国立大学法人京都

工芸繊維大学内 Kyoto (JP). 内村 誠一(UCHIMURA, Seichi); 〒6711283 兵庫県姫路市網干区新在家1239 株式会社ダイセル内 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 川口 嘉之, 外(KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋三丁目4番10号 アクロポリス21ビル8階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

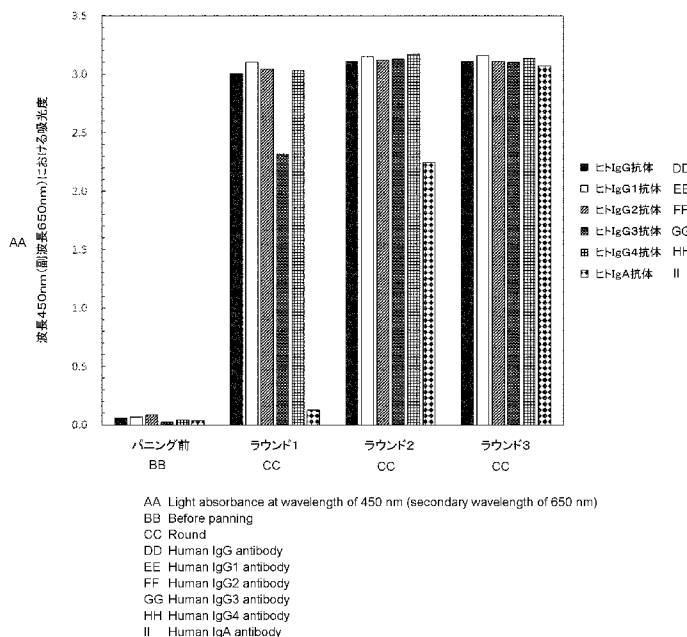
(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,

[続葉有]

(54) Title: SEPARATING AGENT FOR HUMAN SERUM-DERIVED IgG POLYCLONAL ANTIBODIES, AND METHOD FOR SEPARATING HUMAN SERUM-DERIVED IgG POLYCLONAL ANTIBODIES USING SAME

(54) 発明の名称: ヒト血清由来 IgG ポリクローナル抗体の分離剤、及び、それを用いたヒト血清由来 IgG ポリクローナル抗体を分離する方法

[図4]



(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a separating agent for human serum-derived IgG polyclonal antibodies. This problem is solved by a separating agent for human serum-derived IgG polyclonal antibodies that includes a carrier and single-chain antibodies having a dissociation constant of not more than  $3.0 \times 10^{-8}$  M with respect to human serum-derived IgG polyclonal antibodies, said single-chain antibodies binding to the surface of the carrier by means of chemical bonds.

(57) 要約: 本発明の課題は、ヒト血清由来 IgG ポリクローナル抗体の分離剤の提供である。該課題を、担体と、担体の表面に化学結合によって結合する、ヒト血清由来 IgG ポリクローナル抗体に対して  $3.0 \times 10^{-8}$  M 以下の解離定数を有する単鎖抗体とを含む、ヒト血清由来 IgG ポリクローナル抗体の分離剤により解決する。



MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,  
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト  
(規則 5.2(a))

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

## 明 細 書

発明の名称：

ヒト血清由来 I g G ポリクローナル抗体の分離剤、及び、それを用いたヒト血清由来 I g G ポリクローナル抗体を分離する方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、単鎖抗体のスクリーニング方法及び単鎖抗体に関する。

### 背景技術

[0002] 分子標的薬の形態として、抗体医薬品、低分子医薬品をはじめとし、ペプチド医薬品、サイトカインなどの生体内タンパク製剤のほか、s i R N A、アプタマーなど、様々なものが研究・開発されている（例えば、特許文献 1）。治療薬としての抗体の使用は、その特異性から、疾患細胞が特異的抗原を発現する病態の治療に有用である。抗体は、細胞表面に発現するタンパク質を抗原として結合し、結合した細胞に有効に作用する。抗体は、血中半減期が長く、抗原への特異性が高いという特徴を持ち、抗腫瘍剤としても非常に有用である。

[0003] このような抗体の取得方法として、抗体ライブラリを用いたパニング（「砂の中から砂金を洗い出すこと」になぞらえて「パニング」と称している。）を行うことにより抗体を取得する技術が知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を単鎖抗体（s c F v）としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択する方法が知られている。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードする D N A 配列を決定することができる。抗原に結合する s c F v の D N A 配列が明らかになれば、当該配列を適当な発現ベクターに組み込み、ヒト抗体を容易に製造できるようになる（例えば、特許文献 2、3）。

[0004] このように、抗体ライブラリを用いたパニングによる抗体医薬の候補となる抗体を取得する方法等が知られている。しかし、当該技術分野においては

、抗原とファージとを結合する際には、抗原をポリスチレン製のチューブやプレートに固定することが通常であり、ブロッキングの操作が必要であることや、チューブ等に吸着したタンパク質が変性してしまうことがあった。その結果、ファージライブラリの中には、ブロッキングに用いたタンパク質や変性したタンパク質と結合するものが生じ、目的とする抗原以外の抗原に結合するファージが取得されてしまうという問題があった。

[0005] 一方で、上記した抗体の取得方法とは逆に、多重膜リポソームを用いてペプチドライブラリから特定の抗体に結合するペプチドを取得する方法が開発されている（非特許文献1）。この文献では、モデルとして、多重膜リポソームに固定した抗オクタペプチド（FVNQHLCCK、配列番号35）抗体に対して、ファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させたペプチドのライブラリを適用したところ、オクタペプチド（FVNQHLCCK、配列番号35）が選択的に取得されることが確認されている。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0006] 特許文献1：特開2015-145366号公報

特許文献2：特開2015-097496号公報

特許文献3：特表平9-506508号公報

### 非特許文献

[0007] 非特許文献1：Journal of Chromatography A, 1080 (2005) 22-28

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、分離効率に優れ、抗原との結合能が極めて大きい単鎖抗体のスクリーニング方法の提供、及び、該スクリーニング法により取得された単鎖抗体の提供を課題とする。

### 課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、ファージディスプレイ法により調製した抗体ライブラリを

用いてパニングにより目的の抗体を取得する際に、従来のように、抗原をチューブ等に固定する方法を用いた場合に生じる、目的とする抗原以外の抗原に結合するファージが取得されやすいとの問題を、抗原を多重膜リポソームに結合させるという方法で解決できることを見出した。本発明は以下に示すとおりである。

[0010] [1]

多重膜リポソームに結合した抗原を準備する工程、  
単鎖抗体を提示するファージライブラリを準備する工程、及び  
前記ファージライブラリから、前記多重膜リポソームに結合した抗原に結合する単鎖抗体を提示するファージを選択する工程  
を含む、抗原に結合する単鎖抗体のスクリーニング方法。

[2]

前記単鎖抗体がウサギ由来である、[1]に記載の方法。

[3]

前記抗原がタンパク質である、[1]又は[2]に記載の方法。

[4]

前記タンパク質が抗体である、[3]に記載の方法。

[5]

前記抗体がヒト血清由来IgGポリクローナル抗体又はヒト血清由来IgAポリクローナル抗体である、[4]に記載の方法。

[6]

前記単鎖抗体がヒト由来抗体のL鎖に結合する単鎖抗体である、[4]又は[5]に記載の方法。

[7]

[1]～[6]のいずれかに記載のスクリーニング方法によりスクリーニングする工程、

スクリーニングされた単鎖抗体のアミノ酸配列を決定する工程、

決定されたアミノ酸配列の可変領域の配列に基づき、抗体をコードするD

N A配列を作成する工程、及び

作成されたD N A配列を宿主細胞で発現させる工程を含む、抗体の製造方法。

〔 8 〕

抗体をコードするD N A配列がヒト化抗体をコードする〔 7 〕に記載の製造方法。

〔 9 〕

ヒト血清由来 I g Gポリクローナル抗体に対して  $3.0 \times 10^{-8} \text{M}$  以下の解離定数を有する単鎖抗体。

〔 1 0 〕

さらに、ヒト血清由来 I g Aポリクローナル抗体に結合する、〔 9 〕に記載の単鎖抗体。

〔 1 1 〕

ヒト血清由来 I g Aポリクローナル抗体に対して  $1.0 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$  以下の解離速度定数を有する単鎖抗体。

〔 1 2 〕

ヒト由来抗体のL鎖に対して  $1.0 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$  以下の解離速度定数を有する単鎖抗体。

## 発明の効果

[0011] 本発明によれば、分離効率に優れ、抗原との結合能が極めて大きい単鎖抗体のスクリーニング方法の提供、及び、該スクリーニング法により取得された単鎖抗体の提供ができる。

多重膜リポソームは分散性が良好であるため、従来の方法に比べて、多重膜リポソームに結合した抗原と抗体との接触を効率よく行うことができ、遠心分離により簡便に回収することもできる。また、多重膜リポソームを用いれば、担体に非特異的に吸着するファージが極めて少なくなる。さらに、抗原は多重膜リポソームの膜上を側方拡散できるため、ファージライブラリとの結合性が大きく、分離効率に優れ、抗原との結合能が極めて大きい単鎖抗

体を取得することができる。

### 図面の簡単な説明

[0012] [図1]実施例1-1、実施例1-2、比較例1-1、比較例1-2において取得されたクローン数に対するポジティブクローン数の割合を示したグラフである。

[図2]実施例2及び比較例2におけるパニング前、ラウンド1終了時、ラウンド2終了時、ラウンド3終了時におけるファージ数を示したグラフである。

[図3]実施例2及び比較例2におけるラウンド1終了時、ラウンド2終了時、ラウンド3終了時における各ファージ数を、それぞれパニング前のファージ数で除した回収率(%)を示したグラフである。

[図4]実施例2におけるパニング前、ラウンド1終了時、ラウンド2終了時、ラウンド3終了時で得られたファージミド含有大腸菌ペレット単位で抗原結合活性評価した際の波長450nm(副波長650nm)における吸光度を示すグラフである。

[図5]実施例3-2における、ラウンド1終了時に得られた48コロニーから得られたウサギ由来単鎖抗体について行った抗原結合活性評価の結果を示すグラフである。

[図6]実施例3-2における、ラウンド2終了時に得られた48コロニーから得られたウサギ由来単鎖抗体について行った抗原結合活性評価の結果を示すグラフである。

[図7-1]実施例3-2における、ラウンド3終了時に得られた96コロニーから得られたウサギ由来単鎖抗体について行った抗原結合活性評価の結果を示すグラフである。

[図7-2]実施例3-2における、ラウンド3終了時に得られた96コロニーから得られたウサギ由来単鎖抗体について行った抗原結合活性評価の結果を示すグラフである。

[図7-3]実施例3-2における、ラウンド3終了時に得られた96コロニーから得られたウサギ由来単鎖抗体について行った抗原結合活性評価の結果を示

すグラフである。

[図7-4]実施例3-2における、ラウンド3終了時に得られた96コロニーから得られたウサギ由来単鎖抗体について行った抗原結合活性評価の結果を示すグラフである。

[図7-5]実施例3-2における、ラウンド3終了時に得られた96コロニーから得られたウサギ由来単鎖抗体について行った抗原結合活性評価の結果を示すグラフである。

[図7-6]実施例3-2における、ラウンド3終了時に得られた96コロニーから得られたウサギ由来単鎖抗体について行った抗原結合活性評価の結果を示すグラフである。

[図7-7]実施例3-2における、ラウンド3終了時に得られた96コロニーから得られたウサギ由来単鎖抗体について行った抗原結合活性評価の結果を示すグラフである。

[図7-8]実施例3-2における、ラウンド3終了時に得られた96コロニーから得られたウサギ由来単鎖抗体について行った抗原結合活性評価の結果を示すグラフである。

[図8-1]実施例5において決定したウサギ由来単鎖抗体遺伝子のアミノ酸配列を示す。

[図8-2]実施例5において決定したウサギ由来単鎖抗体遺伝子のアミノ酸配列を示す。

[図9-1]実施例6及び比較例6-1の抗原結合活性評価の結果を示すグラフである。

[図9-2]実施例6及び比較例6-2の抗原結合活性評価の結果を示すグラフである。

[図10]実施例8における、破過曲線である。

[図11]実施例9-1及び比較例9-1におけるパニング前、ラウンド1終了時、ラウンド2終了時、ラウンド3終了時におけるファージ数を示したグラフである。

[図12]実施例9-1及び比較例9-1におけるラウンド1終了時、ラウンド2終了時、ラウンド3終了時における各ファージ数を、それぞれパニング前のファージ数で除した回収率(%)を示したグラフである。

[図13]実施例9-2におけるパニング前、ラウンド1終了時、ラウンド2終了時、ラウンド3終了時で得られたファージミド含有大腸菌ペレット単位で抗原結合活性評価した際の波長450nm(副波長650nm)における吸光度を示すグラフである。

[図14]実施例9-3における、ラウンド1終了時に得られた32コロニーから得られたウサギ由来単鎖抗体について行った抗原結合活性評価の結果を示すグラフである。

[図15]実施例9-3における、ラウンド2終了時に得られた32コロニーから得られたウサギ由来単鎖抗体について行った抗原結合活性評価の結果を示すグラフである。

[図16]実施例9-3における、ラウンド3終了時に得られた32コロニーから得られたウサギ由来単鎖抗体について行った抗原結合活性評価の結果を示すグラフである。

[図17-1]実施例10における、ラウンド1終了時に得られた32コロニーについてV<sub>H</sub>ドメインの遺伝子配列から決定したアミノ酸配列を示す。

[図17-2]実施例10における、ラウンド1終了時に得られた32コロニーについてV<sub>H</sub>ドメインの遺伝子配列から決定したアミノ酸配列の分析結果を示す。

[図17-3]実施例10における、ラウンド2終了時に得られた32コロニーについてV<sub>H</sub>ドメインの遺伝子配列から決定したアミノ酸配列を示す。

[図17-4]実施例10における、ラウンド2終了時に得られた32コロニーについてV<sub>H</sub>ドメインの遺伝子配列から決定したアミノ酸配列の分析結果を示す。

[図17-5]実施例10における、ラウンド3終了時に得られた32コロニーについてV<sub>H</sub>ドメインの遺伝子配列から決定したアミノ酸配列を示す。

[図17-6]実施例10における、ラウンド3終了時に得られた32コロニーについてV<sub>H</sub>ドメインの遺伝子配列から決定したアミノ酸配列の分析結果を示す。

[図17-7]実施例10において参考として示したウサギ由来単鎖抗体遺伝子のアミノ酸配列である。

[図17-8]実施例10における、ラウンド1終了時に得られた共通クローンの数を示す表である。

[図17-9]実施例10における、ラウンド2終了時に得られた共通クローンの数を示す表である。

[図17-10]実施例10における、ラウンド3終了時に得られた共通クローンの数を示す表である。

[図18]実施例11及び比較例11の抗原結合活性評価の結果を示すグラフである。

### 発明を実施するための形態

[0013] 本発明は、単鎖抗体のスクリーニング方法に係る第一の発明、及び、単鎖抗体に係る第二の発明を含む。本明細書では、多重膜リポソームのことをMLVsと称することがある。また、単鎖抗体をscFv (single chain Fv) と称することがある。本発明における単鎖抗体 (scFv) は、当該技術分野では、低分子抗体の一つとして一本鎖Fv (single chain Fv) などと称されていることがある。

[0014] 以下においては、本発明における単鎖抗体としてウサギ由来単鎖抗体を用いた場合の記載もあるが、これは単鎖抗体がウサギ由来である場合の一例に過ぎず、本発明の単鎖抗体がウサギ由来の単鎖抗体に限定されるものではない。

[0015] <1. 第一の発明>

本発明の第一の発明は、次の第一の実施態様および第二の実施態様を含む。

第一の実施態様：多重膜リポソームに結合した抗原を準備する工程、単鎖

抗体を提示するファージライブラリを準備する工程、及び前記ファージライブラリから、前記多重膜リボソームに結合した抗原に結合する単鎖抗体を提示するファージを選択する工程を含む、抗原に結合する単鎖抗体のスクリーニング方法。

第二の実施態様：第一の実施態様に記載のスクリーニング方法によりスクリーニングする工程、スクリーニングされた単鎖抗体のアミノ酸配列を決定する工程、決定されたアミノ酸配列の可変領域の配列に基づき、抗体をコードするDNA配列を作成する工程、及び作成されたDNA配列を宿主細胞で発現させる工程を含む、抗体の製造方法。

[0016] <1-1. 第一の発明における第一の実施態様>

本発明の第一の発明における第一の実施態様は、多重膜リボソームに結合した抗原を準備する工程、単鎖抗体を提示するファージライブラリを準備する工程、及び前記ファージライブラリから、前記多重膜リボソームに結合した抗原に結合する単鎖抗体を提示するファージを選択する工程を含む、抗原に結合する単鎖抗体のスクリーニング方法である。

[0017] 本スクリーニング方法は、前記抗原に結合する単鎖抗体の候補をスクリーニングする方法であってもよい。

[0018] <(1) 多重膜リボソームに結合した抗原を準備する工程>

[多重膜リボソーム (MLVs)]

多重膜リボソームとしては、抗原を結合できるのであれば特に制限はない。例えば、Journal of Biotechnology 131 (2007) 144-149に記載されるような公知の方法に従って作

製することができる。具体的には、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、リン酸ジセチル (DCP)、及びN-(4-(p-マレイミドフェニル)ブチリル)ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (MPB-DPPE)を適量水和するなどして作製できる。

[0019] このとき、水和しただけでは多重膜リボソームと単膜リボソームが混合した状態であることが多いため、遠心分離により多重膜リボソームを分離して

用いることが好ましい。遠心分離の条件としては、多重膜リポソームを分離できるのであれば特に制限はない。例えば、25℃で2分、20,000gで遠心分離することが挙げられる。

[0020] [抗原]

抗原としては、本実施態様に係るスクリーニング方法によりスクリーニングされる単鎖抗体が結合する物質であれば特に制限されない。例えば、細胞、タンパク質、脂質、糖鎖などが挙げられ、これらの中ではタンパク質が好ましく、タンパク質の中では抗体が好ましい。抗原は、得られる単鎖抗体の用途に従って適宜選択できる。

[0021] 抗原として用いる抗体の生物種は特に制限されず、得られる単鎖抗体の用途に従って適宜選択できる。例えば、ヒト、ラット、マウス、ウサギ、ニワトリ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、サルなどが挙げられ、好ましくはヒト、ラット、マウス、ウサギ、ニワトリ、ヤギである。また、抗原として用いる抗体は、モノクローナル抗体であっても、ポリクローナル抗体であってもよく、得られる単鎖抗体の用途に従って適宜選択できる。

[0022] さらに、抗原として用いる抗体は、IgG抗体、IgM抗体、IgA抗体、IgD抗体、及びIgE抗体を含むいずれの抗体でもよく、いずれか1種のみでもよいし、2種以上でもよい。さらに、それぞれは、それぞれのサブクラスであってもよく、それぞれのサブクラスのいずれか1種のみでもよいし、2種以上でもよい。

[0023] 例えば、抗原として用いる抗体がヒトIgG抗体であれば、そのサブクラスは、ヒトIgG1抗体、ヒトIgG2抗体、ヒトIgG3抗体、及びヒトIgG4抗体が挙げられる。これらのいずれか1種でもよいし、2種以上でもよく、3種以上でもよく、4種全てでもよい。

[0024] また、例えば、抗原として用いる抗体がヒト血清由来IgGポリクローナル抗体であれば、そのサブクラスは、ヒト血清由来IgG1ポリクローナル抗体、ヒト血清由来IgG2ポリクローナル抗体、ヒト血清由来IgG3ポリクローナル抗体、及びヒト血清由来IgG4ポリクローナル抗体が挙げら

れる。これらのいずれか1種でもよいし、2種以上でもよく、3種以上でもよく、4種全てでもよい。

[0025] また、本スクリーニング方法により選択される単鎖抗体は、前記多重膜リポソームに固定した抗原に結合し、他の抗原に結合しないのであれば、特異性の高い単鎖抗体として利用できる。一方、本スクリーニング方法により選択される単鎖抗体は、前記多重膜リポソームに固定した抗原に結合し、かつ、他の抗原にも結合する可能性を含んでいる。このような単鎖抗体は、二以上の異なる抗原の共通部位に結合する単鎖抗体や、単鎖抗体のアミノ酸配列としては同一だが二以上の異なる部位に結合する単鎖抗体として利用できる。いずれも用途に従って選択し、利用することができるものであり、いずれも好ましい態様である。

ここで、二以上の異なる抗原の共通部位に結合する単鎖抗体については、例えば、二以上の異なる抗原それぞれに対して行うスクリーニングで選択された単鎖抗体のアミノ酸配列を比較すれば決定できる。このことは、当業者であれば容易に理解することができる。

また、単鎖抗体のアミノ酸配列としては同一だが二以上の異なる部位に結合する単鎖抗体については、例えば、ある抗原を用いたスクリーニングで選択された単鎖抗体の、他の抗原への結合性を確認すればよい。このことは、当業者であれば容易に理解することができる。

[0026] このうち、二以上の異なる抗体の共通部位に結合する単鎖抗体としては、例えば、二以上の異なる抗体の軽鎖（L鎖）、具体的には $\lambda$ 鎖又は $\kappa$ 鎖に含まれる共通の部位に結合する単鎖抗体が挙げられる。特に、 $\lambda$ 鎖又は $\kappa$ 鎖のアミノ酸配列はアイソタイプとは無関係であることから、 $\lambda$ 鎖又は $\kappa$ 鎖に含まれるアミノ酸配列に結合する単鎖抗体が選択されれば、その単鎖抗体が、異なるアイソタイプであってもそのアミノ酸配列を認識して結合することは、当業者であれば容易に理解することができる。

[0027] ここで、選択される単鎖抗体が、抗体の軽鎖（L鎖）に含まれるアミノ酸配列に結合することや、具体的に $\lambda$ 鎖又は $\kappa$ 鎖に含まれるアミノ酸配列に結

合することは、当業者であれば、例えば、ウェスタンブロット法などの公知の方法で確認することができる。

アイソタイプとは無関係に軽鎖（L鎖）に含まれるアミノ酸配列に結合する単鎖抗体を選択するための、抗原としての抗体は、特に制限されないが、好ましくはIgA抗体であり、例えば、ヒト血清由来IgAポリクローナル抗体などが挙げられる。

というのは、例えばIgG抗体やIgM抗体は補体活性を有する一方で、IgA抗体が補体活性を有しないことを考えると、IgG抗体を基準に考えた場合、機能および構造がIgG抗体からかけ離れているのはIgM抗体よりもIgA抗体であると考えられることから、例えばIgM抗体を用いるよりもIgA抗体を用いた方が、軽鎖（L鎖）に含まれるアミノ酸配列に結合する単鎖抗体が選択されやすいからである。

また、例えば5量体を形成するIgM抗体に比べ、単量体又は二量体を形成するIgA抗体の方が分子量が小さく、多重膜リポソーム上の分散性も高いため、IgM抗体よりもIgA抗体を用いた方が、スクリーニングの効率がよいからである。

さらには、IgA抗体は、粘膜において治療効果の高い抗体医薬として利用することができる。

#### [0028] [多重膜リポソームに抗原を結合する工程]

多重膜リポソームに抗原を結合する方法としては、多重膜リポソームから抗原が遊離しなければ特に制限されない。例えば、非特許文献1に記載されるような公知の方法に従って結合することができる。具体的には、抗原と多重膜リポソームとの混合液に、モル比として過剰量の2-イミノチオラン塩酸塩を加えて攪拌しながら反応させることなどが挙げられる。例えば、抗原と多重膜リポソームとの混合液に、モル比として抗原の10倍量の2-イミノチオラン塩酸塩を加えて、25℃で3時間以上攪拌しながら反応させることなどが挙げられる。

#### [0029] <（2）単鎖抗体を提示するファージライブラリを準備する工程>

[単鎖抗体を提示するファージライブラリ]

ファージライブラリとしては、単鎖抗体を提示しているファージライブラリであれば特に制限されず、公知のライブラリや市販のライブラリを用いてもよい。単鎖抗体が由来する動物に特に制限はないが、抗原への結合能が大きいものが好ましく、ヒト、ラット、マウス、ウサギ、ニワトリ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、サルなどが挙げられ、より好ましくはヒト、ラット、マウス、ウサギ、ニワトリ、ヤギが挙げられ、さらに好ましくはマウス、ウサギである、特に好ましくはウサギである。

[0030] ファージライブラリを構築する方法としては、例えば、特願2013-233096号公報に記載されるような公知の方法が挙げられる。

免疫動物を用いる場合には、例えば次のようにして行うことができる。免疫動物に特定の抗原を投与し、該免疫動物の脾臓から全RNAを取得し、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)でcDNAライブラリを構築する。次に、所定のプライマーを用いて、重鎖(H鎖)の可変領域( $V_H$ ドメイン)の遺伝子、及び、軽鎖(L鎖)の可変領域( $V_L$ ドメイン)の遺伝子をPCRで増幅する。

免疫動物としてウサギを用いる場合のプライマーとしては、目的の遺伝子をPCRで特異的に増幅できれば特に制限はないが、重鎖(H鎖)の可変領域( $V_H$ ドメイン)の遺伝子を増幅するセンスプライマーとしては、例えば、  
5'-AAAAAGGCCATGGCCCAGTCGGTGGAGGAGTCCRGG-3' (配列番号1、本明細書においてNco-VH1 Sと称することがある。)、

5'-AAAAAGGCCATGGCCCAGTCGGTGAAGGAGTCCGAG-3' (配列番号2、本明細書においてNco-VH2 Sと称することがある。)、

5'-AAAAAGGCCATGGCCCAGTCGYTGGAGGAGTCCGGG-3' (配列番号3、本明細書においてNco-VH3 Sと称することがある。)、

5' - AAAAAGGCCATGGCCCAGSAGCAGCTGRWGG  
AGTCCGG - 3' (配列番号4、本明細書においてNco-VH4 Sと称すること  
がある。)などが挙げられ、

アンチセンスプライマーとしては、例えば、

5' - TCCACCACTAGTGACGGTGAC SAGGGT - 3' (配  
列番号5、本明細書においてVH-Spe ASと称することがある。)などが挙げ  
られる。

[0031] 軽鎖(L鎖)の可変領域(V<sub>L</sub>ドメイン)の遺伝子を増幅するセンスプライ  
マーとしては、例えば、

5' - AATTAAGGATCCGAGCTCGTGMTGACCCAGA  
CTSCA - 3' (配列番号6、本明細書においてBam-V $\kappa$ 1 Sと称すること  
がある。)、

5' - AATTAAGGATCCGAGCTCGATMTGACCCAGA  
CTSCA - 3' (配列番号7、本明細書においてBam-V $\kappa$ 2 Sと称すること  
がある。)、

5' - AATTAAGGATCCGAGCTCGTGATGACCCAGA  
CTGCA - 3' (配列番号8、本明細書においてBam-V $\kappa$ 3 Sと称すること  
がある。)、

5' - AATTAAGGATCCGAGCTCGTGCTGACTCAGT  
CGYCCTC - 3' (配列番号9、本明細書においてBam-V $\lambda$ 4 Sと称する  
ことがある。)などが挙げられ、

アンチセンスプライマーとしては、例えば、

5' - TATATATGCGGCCGCGAACSTKTGAYSWCC  
AC - 3' (配列番号10、本明細書においてV $\kappa$ -Not ASと称すること  
がある。)、

5' - TTTAAATTTGCGGCCGCGAACCTGTGACGG  
TCAG - 3' (配列番号11、本明細書においてV $\lambda$ -Not ASと称すること  
がある。)などが挙げられる。

[0032] なお、塩基の IUPAC 命名法に基づき、W は A 又は T、R は A 又は G、M は A 又は C、K は T 又は G、Y は T 又は C、S は G 又は C、H は A、C 又は T、B は G、C 又は T、V は A、G 又は C、D は A、G 又は T、N は A、G、C 又は T を表す。

[0033] 次に、これら PCR 産物をファージミドベクターに挿入するための所定の制限酵素による処理等を行う。また、ファージミドベクターにおいても所定の制限酵素による処理等を行う。そして、制限酵素処理をした各遺伝子を、制限酵素処理したファージミドベクターへ挿入する。

[0034] このようにして、重鎖（H 鎖）の可変領域（V<sub>H</sub> ドメイン）の遺伝子、及び、軽鎖（L 鎖）の可変領域（V<sub>L</sub> ドメイン）の遺伝子が挿入された組換えファージミドベクターを宿主細胞、例えば大腸菌に導入し、さらにヘルパーファージを感染させて培養することで、培養上清中にウサギ由来単鎖抗体を提示したファージのライブラリを産生させることができる。ここで用いるヘルパーファージの種類は特に制限されないが、例えば、VCSM13 などが挙げられる。

[0035] <（３）ファージライブラリから、多重膜リポソームに結合した抗原に結合する単鎖抗体を提示するファージを選択する工程（選択工程）>

本工程（選択工程）は、抗原とファージライブラリ中のファージ表面に発現した単鎖抗体とを結合する工程（結合工程）、多重膜リポソームに結合した抗原に結合しなかった単鎖抗体を提示するファージを洗浄により除去する工程（洗浄工程）、及び、多重膜リポソームに結合した抗原に結合した単鎖抗体を提示するファージを、該抗原から解離（溶出）させる工程（溶出工程）を含む。

[0036] <（３－１）結合工程>

本工程は、抗原とファージライブラリ中のファージ表面に発現した単鎖抗体とを結合する工程である。その方法は、両者が十分に結合できれば特に制限はない。例えば、以下のような条件下で行うことができる。

[0037] （抗原とファージライブラリとの量比）

抗原とファージライブラリとの比は、両者が十分に結合できれば特に制限はない。ライブラリ中の総ファージ数：抗原分子数として、通常 1 : 5 以上、好ましくは 1 : 100 以上、より好ましくは 1 : 1000 以上である。当該範囲内にあることで、ファージ表面に発現した単鎖抗体に対して抗原分子数が十分となり、両者間で十分な結合が期待できる。

[0038] (溶媒)

抗原とファージライブラリ中のファージ表面に発現した単鎖抗体とを結合する場合の溶媒の種類は、両者が十分に結合できれば特に制限はない。例えば、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) などの当該技術分野で用いられている通常の溶媒を用いることができる。

[0039] (温度)

抗原とファージライブラリ中のファージ表面に発現した単鎖抗体とを結合する場合の温度は、両者が十分に結合できれば特に制限はないが、分解や変性等を回避するために、例えば、室温、例えば 25℃ が好ましく、低温、例えば 4℃ がより好ましい。

[0040] (時間)

抗原とファージライブラリ中のファージ表面に発現した単鎖抗体とを結合する場合の結合時間は、両者が十分に結合できれば特に制限はないが、例えば、30分以上、好ましくは1時間以上、より好ましくはオーバーナイトである。

[0041] (その他)

抗原とファージライブラリ中のファージ表面に発現した単鎖抗体とは、反応中に十分に攪拌されるように、例えば、ローテートしながら結合させることが好ましい。また、両者を結合する際に用いるチューブ等の反応容器は、予め、ブロッキングしておくことが好ましい。ブロッキング剤としては公知のものが挙げられ、例えば、ウシ血清アルブミン (BSA) を添加したものなどが挙げられる。また、このようなブロッキング剤を、結合に用いる溶媒に予め添加しておくことなどもできる。

[0042] < (3-2) 洗浄工程 >

本工程は、多重膜リポソームに結合した抗原に結合しなかった単鎖抗体を提示するファージを洗浄により除去する工程である。その方法は、抗原に結合しなかった単鎖抗体を提示するファージを洗浄により除去できれば特に制限はない。例えば、以下のような条件下で行うことができる。

[0043] (遠心分離及び溶媒交換)

抗原とファージライブラリ中のファージ表面に発現した単鎖抗体との結合反応後、遠心分離により、多重膜リポソームに結合した抗原に結合したファージは沈殿し、結合しなかったファージは上清に含まれる。そのため、上清を除去した後、ペレットに溶媒を加えて懸濁することで、多重膜リポソームに結合した抗原に結合したファージを選択的に取得することができる。

[0044] このとき用いる溶媒に制限はないが、上記「(3-1) 結合工程」で用いた溶媒と同一であることが好ましく、PBSなどを用いることができる。また、BSAなどのブロッキング剤を添加しておくことなどができる。さらに、ペレットにこのような溶媒を加えて得られた懸濁液を新たなチューブなどの容器に移す場合には、該容器も同様に、予めブロッキングしておくことが好ましい。また、このようなブロッキング剤を、結合に用いる溶媒に予め添加しておくことなどもできる。

[0045] 遠心分離の条件としては、多重膜リポソームに結合した抗原に結合したファージと結合しなかったファージとを分離できるのであれば特に制限はない。例えば、4℃で2分、20,000gで遠心分離することが挙げられる。この遠心分離及び溶媒交換は、単回でも複数回繰り返してもよいが、通常2回以上であり、3回以上繰り返すことが好ましい。

[0046] < (3-3) 溶出工程 >

本工程は、多重膜リポソームに結合した抗原に結合した単鎖抗体を提示するファージを、該抗原から解離（溶出）させる工程である。その方法は特に制限されないが、例えば、非特許文献1に記載されるような公知の方法に従うことができる。

ファージを溶出するための溶液としては、例えば、グリシンー塩酸緩衝液等を用いることができる。さらに、ファージを溶出した後にその溶液を中和してもよく、その中和には、例えばトリス塩酸緩衝液等を用いることができる。

[0047] < (3-4) 任意の工程 >

当該選択工程は、上記3工程（結合工程、洗浄工程、溶出工程）のほかにも、適宜、任意の工程を含んでよい。例えば、選択されたファージを増幅する工程（増幅工程）、上記選択工程を反復する工程（反復工程）、選択されたファージの遺伝子配列を決定する工程（遺伝子配列決定工程）、遺伝子配列決定工程により決定された配列に基づいてクローンを選択する工程（クローン選択工程）、選択されたファージが提示する単鎖抗体の抗原に対する結合活性を評価する工程（抗原結合活性の評価工程）などが挙げられる。

[0048] [増幅工程]

本工程は、選択工程で選択されたファージを増幅する工程である。その方法は特に制限されないが、例えば、以下のような条件下で行うことができる。

[0049] （宿主細胞へのファージの感染、及びファージが感染した宿主細胞の培養）

選択工程で選択されたファージを宿主細胞へ感染させて増幅することができる。その方法は特に制限されず、非特許文献1に記載されるような公知の方法に従うことができる。宿主細胞としては、ファージを増殖できれば特に制限されず、例えば大腸菌を用いることができ、菌株としては、例えば、TG1株やXL-1 Blue株などが挙げられる。また、宿主細胞を予め培養し、指数増殖中期のものを用いることが好ましい。宿主細胞へファージを感染させた後のその宿主細胞の培養条件も特に制限されず、例えば、37℃で200rpmの振とう培養が挙げられる。

[0050] （宿主細胞へのヘルパーファージの感染、及び培養上清中へのファージの産生）

ファージが感染した宿主細胞に対してヘルパーファージを感染させ、培養

することによって、培養上清中に単鎖抗体を提示するファージ及び単鎖抗体を分泌させることができる。その方法は特に制限されず、非特許文献1に記載されるような公知の方法に従うことができる。このとき、ヘルパーファージは特に限定されないが、例えば、VCSM13などが挙げられる。また、培養条件も特に制限されず、例えば、37℃で200rpmの振とう培養が挙げられる。

[0051] [反復工程]

上記選択工程で選択されたファージのライブラリ、または、さらに上記増幅工程で増幅されたファージのライブラリを用いて、上記選択工程を反復してもよい。

上記選択工程を1単位とするラウンドを反復することで、抗原との結合能が極めて大きいファージをさらに選択することができる。そのラウンド数は特に制限されない。ラウンド数が多ければ、抗原との結合能が極めて大きいファージが取得されるが、ラウンド数が少なければ、迅速で効率的なスクリーニング法として有用である。本方法は、従来技術と比べて少ないラウンド数で、抗原との結合能が極めて大きいファージを取得できる点で有用である。

反復工程を行う回数は、通常3回以下、好ましくは2回以下、より好ましくは1回以下、さらに好ましくは0回である。反復工程を行う回数が0回ということは、選択工程を1回のみ行うことを意味する。

[0052] [遺伝子配列決定工程]

本工程は、上記選択工程で選択されたファージのライブラリを用いて各ファージの重鎖（H鎖）の可変領域（V<sub>H</sub>ドメイン）の遺伝子配列、及び、軽鎖（L鎖）の可変領域（V<sub>L</sub>ドメイン）の遺伝子配列を決定する工程である。本工程は、最終ラウンド及び／又はラウンド間に行ってもよい。

[0053] その方法は特に制限されず、非特許文献1に記載されるような公知の方法に従って決定することができる。例えば、次のような方法で決定できる。

上記増幅工程における「宿主細胞へのファージの感染、及びファージが感

染した宿主細胞の培養」欄の方法によりファージを感染させた大腸菌をシングルコロニー化して、それぞれをサブクロニング後、コロニーごとに、重鎖（H鎖）の可変領域（ $V_H$ ドメイン）の遺伝子、及び、軽鎖（L鎖）の可変領域（ $V_L$ ドメイン）の遺伝子の配列を解析して決定することができる。遺伝子配列の解析は公知の技術を用いることができる。また、遺伝子配列が決定できれば、その遺伝子配列がコードしているアミノ酸配列も決定される。このように遺伝子配列が決定できれば、スクリーニングの効率をモニタリングすることもできる。

[0054] [クローン選択工程]

本工程は、遺伝子配列決定工程により決定された配列に基づいてクローンを選択する工程である。所望の重鎖（H鎖）の可変領域（ $V_H$ ドメイン）の遺伝子配列、及び、軽鎖（L鎖）の可変領域（ $V_L$ ドメイン）の遺伝子配列を含むファージが感染した宿主細胞のクローンを選択する工程である。重複するクローンを排除するのにも有効である。

本工程は、最終ラウンド及び／又はラウンド間に行ってもよい。このようなクローンが選択できれば、抗原に対して、結合能の大きいファージが感染した宿主細胞を選択でき、スクリーニングをより効率よく行うことができる。

[0055] [抗原結合活性の評価工程]

本工程は、選択されたファージが提示する抗体と抗原との結合活性を評価する工程である。選択されたファージが提示する抗体と抗原との結合活性が評価できれば、その方法に制限はない。

[0056] 例えば、実施例3-2に記載するような方法が挙げられる。すなわち、ファージミドを含有する宿主細胞をシングルコロニー化し、抗原を固相化したプレートに溶菌後の上清を適用して、マイクロプレートリーダーを用いて吸光度を測定する方法が挙げられる。

本工程は、最終ラウンド及び／又はラウンド間に行ってもよい。抗原に対する結合能が大きい抗体の遺伝子を含むクローンが選択できれば、そのクロー

ーンを用いてスクリーニングをより効率よく行うことができる。

その他、実施例4や実施例6に記載するように、*Biacore*を用いるなどして、解離速度定数  $k_{off}$  や解離定数  $K_D$  を測定し、それを指標にすることもできる。

[0057] 解離速度定数  $k_{off}$ 、解離定数  $K_D$  を測定する際のサンプルの調製方法は特に制限されないが、例えば、実施例に示されるように、ファージミド含有宿主細胞のコロニーを培養後に溶菌し、遠心分離後の上清を用いることができる。

[0058] また、ファージ及び単鎖抗体が宿主細胞から分泌されたかどうか、又はペリプラズム内に存在していたかどうかについては、次のようにして確認することができる。例えば、実施例に示されるように、ファージミドベクターを用いて単鎖抗体遺伝子を含むDNA断片を増幅し、これをpET22ベクター（メルク社）などの適当なベクターに挿入すれば、N末端側にペリプラズム移行シグナル配列（*pelB leader signal*）、C末端側にヒスチジンタグ（6×His-tag）が融合された形で単鎖抗体が発現される。当該組換えベクターを含む宿主細胞を培養し、適当な方法により、培養上清および菌体から菌体内可溶性画分を回収できる。この培養上清および菌体内可溶性画分を、それぞれヒスチジンタグをトラップできるカラム等に適用して得られる溶離液を用いて解離定数  $K_D$  を測定することができる。

[0059] 以下に、解離速度定数  $k_{off}$  と解離定数  $K_D$  について説明する。

[解離速度定数  $k_{off}$ ]

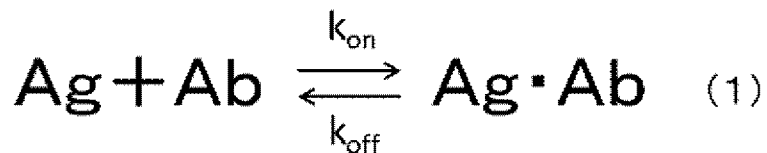
(定義)

本明細書では、抗原と単鎖抗体との結合における解離速度定数  $k_{off}$  を次のように定義する。解離速度定数  $k_{off}$  は、通常  $3.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  以下、好ましくは  $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  以下、より好ましくは  $4.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  以下、さらに好ましくは  $2.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  以下、よりさらに好ましくは  $5.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  以下、特に好ましくは  $4.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  以下、より特に好ましくは  $3.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  以下である。解離速度定数  $k_{off}$  が小さいほど抗

原との結合能が大きく、抗体として有用である。

[0060] 抗原を  $A_g$ 、抗原濃度を  $[A_g]$ 、抗体を  $A_b$ 、抗体濃度を  $[A_b]$ 、抗原－抗体複合体を  $A_g \cdot A_b$ 、抗原－抗体複合体濃度を  $[A_g \cdot A_b]$ 、結合速度定数を  $k_{on}$ 、解離速度定数を  $k_{off}$  とした場合、抗原と単鎖抗体との結合反応は下記式（１）、（２）のように表される。

[0061] [数1]



[0062] [数2]

$$\frac{d[A_g \cdot A_b]}{dt} = k_{on}[A_g][A_b] - k_{off}[A_g \cdot A_b] \quad (2)$$

[0063] これを変形すると、下記式（３）のように表される。

[0064] [数3]

$$-\frac{d[A_g \cdot A_b]}{dt} = k_{off}[A_g \cdot A_b] - k_{on}[A_g][A_b] \quad (3)$$

[0065] Biacoreなどの送液系では、センサーチップ洗浄時、 $[A_b] = 0$  であるため、上記式（３）は、下記式（４）のように表される。

[0066] [数4]

$$-\frac{d[A_g \cdot A_b]}{dt} = k_{off}[A_g \cdot A_b] \quad (4)$$

[0067] さらに、時間  $t = 0$  における  $[A_g \cdot A_b]$  を  $[A_g \cdot A_b]_0$  とすると、下記式（５）のように表される。

[0068]

[数5]

$$\ln \frac{[Ag \cdot Ab]}{[Ag \cdot Ab]_0} = -k_{off} t \quad (5)$$

[0069] Biacoreなどの送液系を用いて、抗原と単鎖抗体との結合における解離速度定数を算出する場合には、横軸に時間  $t$ 、縦軸に

[0070] [数6]

$$\ln \frac{[Ag \cdot Ab]}{[Ag \cdot Ab]_0}$$

[0071] とした測定グラフが描ければ、その傾きから解離速度定数を算出することができる。

[0072] (解離速度定数  $k_{off}$  の測定方法)

解離速度定数の測定方法は特に制限されず、例えば、測定装置として Biacore X-100 (GEヘルスケア社) などの公知の装置を用いて、上述したように測定グラフが描ければ、その傾きから解離速度定数を算出することができる。

[0073] [解離定数  $K_D$ ]

解離定数  $K_D$  は、通常  $3.0 \times 10^{-8} M$  以下、好ましくは  $1.0 \times 10^{-8} M$  以下、より好ましくは  $6.0 \times 10^{-9} M$  以下、さらに好ましくは  $1.0 \times 10^{-9} M$  以下、よりさらに好ましくは  $6.0 \times 10^{-10} M$  以下、特に好ましくは  $1.0 \times 10^{-10} M$  以下である。解離定数が小さいほど抗原との結合能が大きく、抗体として有用である。尚、一般的な抗体の  $K_D$  は  $10 nM$  程度であるのに対し、本実施態様における単鎖抗体の  $K_D$  の範囲は上記の通りであり、一般的な抗体に比べて格段に結合能が大きいことが分かる。

[0074] (解離定数  $K_D$  の測定方法)

解離定数 $K_D$ の測定方法は特に制限されず、公知の方法を用いることができる。例えば、測定装置としては、*Biacore X-100*（GEヘルスケア社）を用いることができる。

[0075] [単鎖抗体の $V_H$ 鎖の相補性決定領域（CDR）]

単鎖抗体の $V_H$ 鎖の相補性決定領域（CDR）は、CDR 1、CDR 2、及びCDR 3を含む。周知の通り、これらの中で、抗原への結合性に最も寄与しているのはCDR 3のアミノ酸配列である。

[0076] 本実施態様における単鎖抗体の $V_H$ 鎖のCDRのアミノ酸配列は、抗体を構成したときにその抗体が抗原に結合する限り特に限定されない。このうち、CDR 3のアミノ酸配列については、抗原としてヒト血清由来IgGポリクローナル抗体やヒト血清由来IgAポリクローナル抗体を、単鎖抗体としてウサギ由来単鎖抗体を用いて本方法を実施した場合には、本明細書の実施例に記載する $V_H$ 鎖のCDR 3のアミノ酸配列が好ましい。これらは、抗体を構成したときにその抗体の抗原への結合性が大きいからである。また、これらの中でも、抗体を構成したときにその抗体の抗原への結合性がより大きいものがより好ましい。

[0077] また、CDR 1のアミノ酸配列、CDR 2のアミノ酸配列も同様であり、抗原としてヒト血清由来IgGポリクローナル抗体やヒト血清由来IgAポリクローナル抗体を、単鎖抗体としてウサギ由来単鎖抗体を用いて本方法を実施した場合には、本明細書の実施例に記載する $V_H$ 鎖のCDR 1、CDR 2のアミノ酸配列が好ましい。これらは、抗体を構成したときにその抗体の抗原への結合性が大きいからである。また、これらの中でも、抗体を構成したときにその抗体の抗原への結合性がより大きいものがより好ましい。

[0078] [ $V_H$ 鎖のCDRのアミノ酸配列と実質的な相同性を有するアミノ酸配列]

本実施態様における $V_H$ 鎖のCDR 1、CDR 2、CDR 3のアミノ酸配列はいずれも、抗体を構成したときにその抗体が抗原に結合する限り特に限定されない。抗原としてヒト血清由来IgGポリクローナル抗体やヒト血清由来IgAポリクローナル抗体を、単鎖抗体としてウサギ由来単鎖抗体を用い

て本方法を実施した場合には、本明細書の実施例に記載するV<sub>H</sub>鎖のCDR 1、CDR 2、CDR 3のアミノ酸配列と、それぞれ80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の同一性を有するアミノ酸配列であってもよい。

[0079] また、抗原としてヒト血清由来IgGポリクローナル抗体やヒト血清由来IgAポリクローナル抗体を、単鎖抗体としてウサギ由来単鎖抗体を用いて本方法を実施した場合には、本明細書の実施例に記載するV<sub>H</sub>鎖のCDR 1、CDR 2、CDR 3のアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が、置換、欠失、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列であってもよい。ここで、1～数個とは、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個である。

[0080] また、上記置換は保存的置換が好ましく、保存的変異とは、置換部位が芳香族アミノ酸である場合には、Phe、Trp、Tyr間で、置換部位が疎水性アミノ酸である場合には、Leu、Ile、Val間で、極性アミノ酸である場合には、Gln、Asn間で、塩基性アミノ酸である場合には、Lys、Arg、His間で、酸性アミノ酸である場合には、Asp、Glu間で、ヒドロキシル基を持つアミノ酸である場合には、Ser、Thr間でお互いに置換する変異である。

[0081] 保存的置換としては、AlaからSer又はThrへの置換、ArgからGln、His又はLysへの置換、AsnからGlu、Gln、Lys、His又はAspへの置換、AspからAsn、Glu又はGlnへの置換、CysからSer又はAlaへの置換、GlnからAsn、Glu、Lys、His、Asp又はArgへの置換、GluからGly、Asn、Gln、Lys又はAspへの置換、GlyからProへの置換、HisからAsn、Lys、Gln、Arg又はTyrへの置換、IleからLeu、Met、Val又はPheへの置換、LeuからIle、Met、Val又はPheへの置換、LysからAsn、Glu、Gln、His又はArgへの置換、MetからIle、Leu、Val又はPheへの置換、PheからTrp、Tyr、Met、Ile又はLeuへの置換、SerからThr又はAlaへの置換、ThrからSer又はAlaへの置換、TrpからPhe又はTyrへの置換、TyrからHis、Phe又はTrpへの置換、及び、ValからMet、Ile又はLeuへの置換が挙げられる。

[0082] また、抗体を構成したときにその抗体が抗原に結合する限り、当該アミノ

酸配列は修飾されていてもよい。該修飾としては、アミド化、脂質鎖の付加（脂肪族アシル化（パルミトイル化、ミリストイル化等）、プレニル化（ファルネシル化、ゲラニルゲラニル化等）等）、リン酸化（セリン残基、スレオニン残基、チロシン残基等におけるリン酸化）、アセチル化、糖鎖の付加（N-グリコシル化、O-グリコシル化）等を挙げることができる。

[0083] [単鎖抗体の $V_L$ 鎖の相補性決定領域（CDR）]

単鎖抗体の $V_L$ 鎖の相補性決定領域（CDR）は、CDR 1、CDR 2、及びCDR 3を含む。周知の通り、これら $V_L$ 鎖のCDRのアミノ酸配列も、抗原への結合性に寄与している。

[0084] 本実施態様における単鎖抗体の $V_L$ 鎖のCDRのアミノ酸配列は、抗体を構成したときにその抗体が抗原に結合する限り特に限定されない。CDR 1、CDR 2、CDR 3のアミノ酸配列については、それぞれ、抗原としてヒト血清由来IgGポリクローナル抗体やヒト血清由来IgAポリクローナル抗体を、単鎖抗体としてウサギ由来単鎖抗体を用いて本方法を実施した場合には、本明細書の実施例に記載する $V_L$ 鎖のCDR 1、CDR 2、CDR 3のアミノ酸配列が好ましい。これらは、抗体を構成したときにその抗体の抗原への結合性が大きいからである。また、これらの中でも、抗体を構成したときにその抗体の抗原への結合性がより大きいものがより好ましい。

[0085] [ $V_L$ 鎖のCDRのアミノ酸配列と実質的な相同性を有するアミノ酸配列]

上述した「 $V_H$ 鎖のCDRのアミノ酸配列と実質的な相同性を有するアミノ酸配列」に記載した内容と同様である。

[0086] [単鎖抗体の $V_H$ 鎖のフレームワーク領域（FR）]

単鎖抗体の $V_H$ 鎖のフレームワーク領域（FR）は、FR 1、FR 2、FR 3、及びFR 4を含む。周知の通り、これら $V_H$ 鎖のFRのアミノ酸配列も、抗原への結合性に寄与している。

[0087] 本実施態様における単鎖抗体の $V_H$ 鎖のFRのアミノ酸配列は、抗体を構成したときにその抗体が抗原に結合する限り特に限定されない。FR 1、FR 2、FR 3、FR 4のアミノ酸配列については、それぞれ、抗原としてヒト

血清由来 I g G ポリクローナル抗体やヒト血清由来 I g A ポリクローナル抗体を、単鎖抗体としてウサギ由来単鎖抗体を用いて本方法を実施した場合には、本明細書の実施例に記載する V<sub>H</sub> 鎖の F R 1、F R 2、F R 3、F R 4 のアミノ酸配列が好ましい。これらは、抗体を構成したときにその抗体の抗原への結合性が大きいからである。また、これらの中でも、抗体を構成したときにその抗体の抗原への結合性がより大きいものがより好ましい。

[0088] [V<sub>H</sub> 鎖の F R のアミノ酸配列と実質的な相同性を有するアミノ酸配列]

上述した「V<sub>H</sub> 鎖の C D R のアミノ酸配列と実質的な相同性を有するアミノ酸配列」に記載した内容と同様である。

[0089] [単鎖抗体の V<sub>L</sub> 鎖のフレームワーク領域 (F R)]

単鎖抗体の V<sub>L</sub> 鎖のフレームワーク領域 (F R) は、F R 1、F R 2、F R 3、及び F R 4 を含む。周知の通り、これら V<sub>L</sub> 鎖の F R のアミノ酸配列も、抗原への結合性に寄与している。

[0090] 本実施態様における単鎖抗体の V<sub>L</sub> 鎖の F R のアミノ酸配列は、抗体を構成したときにその抗体が抗原に結合する限り特に限定されない。F R 1、F R 2、F R 3、F R 4 のアミノ酸配列については、それぞれ、抗原としてヒト血清由来 I g G ポリクローナル抗体やヒト血清由来 I g A ポリクローナル抗体を、単鎖抗体としてウサギ由来単鎖抗体を用いて本方法を実施した場合には、本明細書の実施例に記載する V<sub>L</sub> 鎖の F R 1、F R 2、F R 3、F R 4 のアミノ酸配列が好ましい、これらは、抗体を構成したときにその抗体の抗原への結合性が大きいからである。また、これらの中でも、抗体を構成したときにその抗体の抗原への結合性がより大きいものがより好ましい。

[0091] [V<sub>L</sub> 鎖の F R のアミノ酸配列と実質的な相同性を有するアミノ酸配列]

上述した「V<sub>H</sub> 鎖の C D R のアミノ酸配列と実質的な相同性を有するアミノ酸配列」に記載した内容と同様である。

[0092] <1-2. 第一の発明における第二の実施態様>

本発明の第一の発明における第二の実施態様は、第一の実施態様に記載のスクリーニング方法によりスクリーニングする工程、スクリーニングされた

単鎖抗体のアミノ酸配列を決定する工程、決定されたアミノ酸配列の可変領域の配列に基づき、抗体をコードするDNA配列を作成する工程、及び作成されたDNA配列を宿主細胞で発現させる工程を含む、抗体の製造方法である。

[0093] <（１）第一の実施態様に記載のスクリーニング方法によりスクリーニングする工程>

本工程は、第一の実施態様に記載のスクリーニング方法によりスクリーニングする工程であり、その説明には、既出の第一の実施態様の説明が適用される。

[0094] <（２）スクリーニングされた単鎖抗体のアミノ酸配列を決定する工程>

本工程は、スクリーニングされた単鎖抗体のアミノ酸配列を決定する工程である。スクリーニングされた単鎖抗体のアミノ酸配列が決定できれば、その方法に制限はない。

例えば、既出の「遺伝子配列決定工程」により決定された遺伝子配列に基づいて、アミノ酸配列を決定することができる。

[0095] <（３）決定されたアミノ酸配列の可変領域の配列に基づき、抗体をコードするDNA配列を作成する工程>

本工程において、決定されたアミノ酸配列の可変領域の配列に基づき、抗体をコードするDNA配列が作成できれば、その方法に制限はない。また、各アミノ酸をコードするコドンが公知であるため、特定のアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列は容易に特定することができる。

[0096] 抗体をコードするDNA配列を作成する公知の方法は多数あるが、例えば、アミノ酸配列を決定する工程で決定されたアミノ酸配列の可変領域（Vドメイン）をコードするDNA配列を、所望の定常領域（Cドメイン）をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターへ組み込む、又は、抗体の可変領域（Vドメイン）をコードするDNAを、定常領域のDNAを含む発現ベクターへ組み込むことができる。このとき、例えば、発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに

組み込み、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を産生させることができる。

[0097] このとき定常領域（Cドメイン）のアミノ酸配列が由来する動物は制限されない。可変領域（Vドメイン）のアミノ酸が由来する動物と異なる動物であってもよく、そのような場合に組み合わせて作製される抗体はキメラ抗体となる。例えば、ヒト、ラット、マウス、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、サルなどが挙げられ、好ましくはヒトである。可変領域（Vドメイン）のアミノ酸が由来する動物がヒトでなく、定常領域（Cドメイン）のアミノ酸配列が由来する動物がヒトの場合、組み合わせて作製される抗体はヒト化抗体となる。

[0098] また、DNA配列がコードする抗体は、免疫グロブリンである必要はなく、例えば、scFv、Fv、Fab、Fab'、又はF(ab')<sub>2</sub>などであってもよい。

[0099] （ヒト化抗体をコードDNA配列）

以下では、ヒト化抗体をコードするDNA配列を例に挙げて説明するが、上記の通り、定常領域（Cドメイン）のアミノ酸配列が由来する動物は制限されない。

ヒト化抗体とは、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称される改変抗体である。本実施態様では、ヒト化抗体は、第一の実施態様に記載のスクリーニング方法によりスクリーニングされた単鎖抗体のCDRを、ヒト抗体の相補性決定領域へ移植することによって構築することができる。その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。例えば、国際公開2013/125654号パンフレット、欧州特許出願公開第EP239400号公報、国際公開96/02576号パンフレットなどに記載されている。

[0100] 本実施態様では、例えば、第一の実施態様に記載のスクリーニング方法によりスクリーニングされた単鎖抗体のCDRとヒト抗体のFRを連結するように設計したDNA配列を、末端部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からPCR法により合成する。得られ

たDNAを、ヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得ることができる。

[0101] CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、ヒト化抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域におけるフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい。その方法は、例えば、Sato K. et al., Cancer Research 1993, 53: 851-856などに記載されている。また、FRは、異なるクラス又はサブクラスのヒト抗体由来のフレームワーク領域と置換されてもよい。その方法は、例えば、国際公開99/51743号パンフレットに記載されている。

[0102] また、ヒト化抗体を作製する際に、可変領域（例えば、FR）や定常領域中のアミノ酸を他のアミノ酸で置換等してもよい。例えば、日本血栓止血学会誌 4 (3): 193-200, 1993に記載される方法を用いてもよい。当該文献に記載されているように、決定された可変領域のアミノ酸配列とデータベースにあるヒト抗体の可変領域のアミノ酸とを比較し、両者の骨格（FR）が最も似ているヒト抗体遺伝子を選択後、コンピュータ・グラフィクスによりその高次構造を解析して、最適な可変領域のアミノ酸配列を決定してもよい。さらに、発現ベクターに組み込み、宿主細胞に導入して抗体を産生させる際に、効率的に産生させるために必要なアミノ酸の置換等をしてよい。

[0103] アミノ酸の置換は、例えば、15未満、10未満、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、又は2以下のアミノ酸、好ましくは1～5アミノ酸、より好ましくは1又は2アミノ酸の置換であり、置換抗体は、未置換抗体と機能的に同等であるべきである。置換は、保存的アミノ酸置換が望ましく、これは、電荷、側鎖、極性、芳香族性等の性質の類似するアミノ酸間の置換である。性質の類似したアミノ酸は、例えば、塩基性アミノ酸（アルギニン、リジン、ヒスチジン）、酸性アミノ酸（アスパラギン酸、グルタミン酸）、無電荷極性アミノ酸（グリシン、アスパラギン、グルタミン、セ

リン、トレオニン、システイン、チロシン)、無極性アミノ酸(ロイシン、イソロイシン、アラニン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニン)、分枝鎖アミノ酸(ロイシン、バリン、イソロイシン)、芳香族アミノ酸(フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、ヒスチジン)等に分類しうる。

[0104] <(4) 作成されたDNA配列を宿主細胞で発現させる工程>

本工程では、抗体をコードするDNA配列を作成する工程で作成されたDNA配列が宿主細胞で発現させられれば、その方法に制限はない。

例えば、抗体を生産するための宿主は哺乳動物起源のものが多いが、当業者であれば、発現したい遺伝子産物に最も適する特定の宿主細胞を適宜選択することができる。一般的な宿主細胞系としては、CHO由来細胞株(チャイニーズハムスター卵巣細胞系)、CV1(サル腎臓系)、COS(SV40T抗原をするCV1の誘導体)、SP2/O(マウスミエローマ)、P3×63-Ag3.653(マウスミエローマ)、293(ヒト腎臓)、及び293T(SV40T抗原をする293の誘導体)などが挙げられるが、これらに限定されない。宿主細胞系は、各種メーカー、ATCCなどの機関、または文献に記載の論文発表機関から入手することができる。

[0105] <(5) 任意の工程>

宿主細胞で発現させる工程の後に、その抗体を分離・精製する工程を設けてもよい。その方法は特に制限されないが、公知の分離・精製法を適切に組み合わせて抗体を分離・精製することができる。

例えば、イオン交換クロマトグラフィー等の荷電の差を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法等の主として分子量の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィー等の特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィー等の疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法等の等電点の差を利用する方法等が挙げられる。

[0106] <2. 第二の発明>

本発明の第二の発明は、次の第一の実施態様ないし第六の実施態様を含む。

第一の実施態様：ヒト血清由来 IgG ポリクローナル抗体に対して  $3.0 \times 10^{-8} \text{M}$  以下の解離定数を有する単鎖抗体。

第二の実施態様：担体と担体の表面に化学結合によって結合する第一の実施態様に記載の単鎖抗体とを含む、ヒト血清由来 IgG ポリクローナル抗体の分離剤。

第三の実施態様：ヒト血清由来 IgA ポリクローナル抗体に対して  $1.0 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$  以下の解離速度定数を有する単鎖抗体。

第四の実施態様：担体と担体の表面に化学結合によって結合する第三の実施態様に記載の単鎖抗体とを含む、ヒト血清由来 IgA ポリクローナル抗体の分離剤。

第五の実施態様：ヒト由来抗体の L 鎖に対して  $1.0 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$  以下の解離速度定数を有する単鎖抗体。

第六の実施態様：担体と担体の表面に化学結合によって結合する第五の実施態様に記載の単鎖抗体とを含む、ヒト由来抗体の分離剤。

[0107] < 2-1. 第二の発明における第一の実施態様 >

本発明の第二の発明における第一の実施態様は、ヒト血清由来 IgG ポリクローナル抗体に対して  $3.0 \times 10^{-8} \text{M}$  以下の解離定数を有する単鎖抗体である。

該単鎖抗体は、好ましくは、さらに、ヒト血清由来 IgA ポリクローナル抗体に対する抗体であり、より好ましくは、ヒト血清由来 IgA ポリクローナル抗体に対して  $1.0 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$  以下の解離速度定数を有する。また、該単鎖抗体は、これらの抗体の L 鎖に結合することが好ましく、 $\kappa$  鎖に結合することがより好ましい。

本実施態様におけるその他についての説明には、既出の第一の発明の説明が適用される。

[0108] < 2-2. 第二の発明における第二の実施態様 >

本発明の第二の発明における第二の実施態様は、担体と担体の表面に化学結合によって結合する、第二の発明における第一の実施態様に記載の単鎖抗体とを含む、ヒト血清由来 IgG ポリクローナル抗体の分離剤である。

[0109] [ヒト血清由来 IgG ポリクローナル抗体の分離剤]

第一の実施態様の単鎖抗体は、その抗体結合性を利用して、ヒト血清由来 IgG ポリクローナル抗体の分離剤として利用することができる。該分離剤は、抗体の精製や除去、抗体を利用した診断、治療、検査等に用いることができる。

本実施態様の分離剤は、第一の実施態様の単鎖抗体が水不溶性の固相支持体に固定化された形態を有する。

[0110] [水不溶性担体]

用いる水不溶性担体としては、ガラスビーズ、シリカゲルなどの無機担体、架橋ポリビニルアルコール、架橋ポリアクリレート、架橋ポリアクリルアミド、架橋ポリスチレンなどの合成高分子や結晶性セルロース、架橋セルロース、架橋アガロース、架橋デキストランなどの多糖類からなる有機担体、さらにはこれらの組み合わせによって得られる有機-有機、有機-無機などの複合担体などが挙げられるが、中でも親水性担体は非特異吸着が比較的少なく、第一の実施態様の単鎖抗体の選択性が良好であるため好ましい。ここでいう親水性担体とは、担体を構成する化合物を平板状にしたときの水との接触角が60度以下の担体を示す。このような担体としてはセルロース、キトサン、デキストラン等の多糖類、ポリビニルアルコール、エチレン-酢酸ビニル共重合体けん化物、ポリアクリルアミド、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリメタクリル酸メチル、ポリアクリル酸グラフト化ポリエチレン、ポリアクリルアミドグラフト化ポリエチレン、ガラスなどからなる担体が代表例として挙げられる。

[0111] 市販品としては多孔質セルロースゲルであるGCL2000、GC700、アリルデキストランとメチレンビスアクリルアミドを共有結合で架橋したSephacryl S-1000、アクリレート系の担体であるToyopearl、アガロース系の架橋担体であ

るSepharoseCL4B、エポキシ基で活性化されたポリメタクリルアミドであるオイパーギットC250L等を例示することができる。ただし、本実施態様においてはこれらの担体、活性化担体のみに限定されるものではない。上述の担体はそれぞれ単独で用いてもよいし、任意の2種類以上を混合してもよい。又、本実施態様に用いる水不溶性担体としては、本分離剤の使用目的および方法からみて、表面積が大きいことが望ましく、適当な大きさの細孔を多数有する、すなわち、多孔質であることが好ましい。

[0112] 担体の形態としては、ビーズ状、線維状、膜状（中空糸も含む）など何れも可能であり、任意の形態を選ぶことができる。特定の排除限界分子量を持つ担体作製の容易さからビーズ状が特に好ましく用いられる。ビーズ状の平均粒径は10～2500 $\mu\text{m}$ のものが使いやすく、とりわけ、単鎖抗体固定化反応のしやすさの点から25 $\mu\text{m}$ から800 $\mu\text{m}$ の範囲が好ましい。

さらに担体表面には、単鎖抗体の固定化反応に用いる官能基が存在していると単鎖抗体の固定化に好都合である。これらの官能基の代表例としては、水酸基、アミノ基、アルデヒド基、カルボキシル基、チオール基、シラノール基、アミド基、エポキシ基、サクシニルイミド基、酸無水物基、ヨードアセチル基などが挙げられる。

[0113] 上記担体への単鎖抗体の固定化においては、単鎖抗体の立体障害を小さくすることにより分離効率を向上させ、さらに非特異的な結合を抑えるために、親水性スペーサーを介して固定化することが、より好ましい。親水性スペーサーとしては、例えば、両末端をカルボキシル基、アミノ基、アルデヒド基、エポキシ基などで置換したポリアルキレンオキサイドの誘導体を用いるのが好ましい。

[0114] 上記の担体へ導入される単鎖抗体およびスペーサーとして用いられる有機化合物の固定化方法及び条件は特に限定されるものではないが、一般にタンパク質やペプチドを担体に固定化する場合に採用される方法を例示する。担体を臭化シアン、エピクロロヒドリン、ジグリシジルエーテル、トシルクロライド、トレシルクロライド、ヒドラジンなどと反応させて担体を活性化し

(担体が元々持っている官能基より単鎖抗体が反応しやすい官能基に変え)、単鎖抗体と反応、固定化する方法、また、担体と単鎖抗体が存在する系にカルボジイミドのような縮合試薬、または、グルタルアルデヒドのように分子中に複数の官能基を持つ試薬を加えて縮合、架橋することによる固定化方法が挙げられるが、分離剤の滅菌時または利用時に単鎖抗体が担体より容易に脱離しない固定化方法を適用することがより好ましい。

[0115] [具体例]

ヒト血清由来 IgG ポリクローナル抗体の分離剤およびその製造方法の具体例として、例えば、実施例 8 に記載するような HiTrap NHS-activated HP Columns (GEヘルスケア) およびそれを用いた第一の実施態様に係る単鎖抗体の固定化方法が挙げられる。簡潔に言えば、セファロース (ビーズ状のアガロース担体) のカルボキシル基を NHS でエステル化し、精製した第一の実施態様に係る単鎖抗体のアミノ基とアミド結合を形成させて固定化する。未反応の NHS エステルはエタノールアミンを加えてブロックすることができる。

[0116] [その他について]

本実施態様におけるその他についての説明には、既出の第一の発明、および第二の発明における第一の実施態様の説明が適用される。

[0117] < 2 - 3. 第二の発明における第三の実施態様 >

本発明の第二の発明における第三の実施態様は、ヒト血清由来 IgA ポリクローナル抗体に対して  $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  以下の解離速度定数を有する単鎖抗体である。

該単鎖抗体は、好ましくは、さらに、ヒト血清由来 IgG ポリクローナル抗体に対する抗体であり、より好ましくは、ヒト血清由来 IgG ポリクローナル抗体に対して  $3.0 \times 10^{-8} \text{ M}$  以下の解離定数を有する。また、該単鎖抗体は、これらの抗体の L 鎖に結合することが好ましく、 $\kappa$  鎖に結合することがより好ましい。

本実施態様におけるその他についての説明には、既出の第一の発明の説明が適用される。

[0118] <2-4. 第二の発明における第四の実施態様>

本発明の第二の発明における第四の実施態様は、担体と担体の表面に化学結合によって結合する、第二の発明における第三の実施態様に記載の単鎖抗体とを含む、ヒト血清由来 IgA ポリクローナル抗体の分離剤である。

本実施態様におけるその他についての説明には、既出の第一の発明、第二の発明における第二の実施態様、第二の発明における第三の実施態様の説明が適用される。

[0119] <2-5. 第二の発明における第五の実施態様>

本発明の第二の発明における第五の実施態様は、ヒト由来抗体の L 鎖に対して  $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  以下の解離速度定数を有する単鎖抗体である。

該単鎖抗体は、好ましくは、ヒト血清由来 IgG ポリクローナル抗体及び／又はヒト血清由来 IgA ポリクローナル抗体に対する抗体であり、より好ましくは、ヒト血清由来 IgG ポリクローナル抗体に対して  $3.0 \times 10^{-8} \text{ M}$  以下の解離定数を有し、及び／又は、ヒト血清由来 IgA ポリクローナル抗体に対して  $1.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  以下の解離速度定数を有する。また、該単鎖抗体は、κ 鎖に結合することが好ましい。

本実施態様におけるその他についての説明には、既出の第一の発明の説明が適用される。

[0120] <2-6. 第二の発明における第六の実施態様>

本発明の第二の発明における第六の実施態様は、担体と担体の表面に化学結合によって結合する、第二の発明における第五の実施態様に記載の単鎖抗体とを含む、ヒト由来抗体の分離剤である。

本実施態様におけるその他についての説明には、既出の第一の発明、第二の発明における第二の実施態様、第二の発明における第五の実施態様の説明が適用される。

## 実施例

[0121] 以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はその要旨を逸脱しない限り、下記の実施例に限定されるものではない。また、便宜

のため、実施例番号、比較例番号が連続していない場合もある。

[0122] <1. モデル実験>

以下では、本発明の第一の発明に係るスクリーニング法の実施例の前に、ヒト血清由来 IgG ポリクローナル抗体に結合するマウス由来単鎖抗体（以下、「抗-ヒト血清由来 IgG ポリクローナル抗体-マウス由来単鎖抗体」と称することがある。）を、ファージライブラリの中からスクリーニングする方法を記載する。このとき、比較実験として、マウス由来単鎖抗体を提示していないファージライブラリを用いた場合についても記載する。さらに、いずれの場合においても、多重膜リポソームを用いた場合とイムノチューブを用いた実験について記載する。

[0123] <1-1. 多重膜リポソームとヒト血清由来 IgG ポリクローナル抗体との結合>

10  $\mu$ mol のジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、1  $\mu$ mol のリン酸ジセチル (DCP)、0.5  $\mu$ mol の N-(4-(p-メレイミドフェニル)ブチリル)ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (MPB-DPPE) を、クロロホルム 5 ml 中に溶解し、100 ml ナスフラスコ中で減圧下、クロロホルムを留去した。

[0124] 次に、フラスコ内壁に形成させたリン脂質薄膜を 50℃ 下、3 ml の PBS で水和し、多重膜リポソーム (MLVs) を形成させた。25℃、20,000 g で 2 分間の遠心分離を行い、上清を除去した。この操作をさらに 2 回繰り返した。

[0125] 3 ml の PBS で懸濁し、4℃ で保存した（これを「反応性 MLVs」と称することがある。）。1 ml の反応性 MLVs を 25℃、20,000 g で 2 分間の遠心分離した。ヒト血清由来 IgG ポリクローナル抗体 (Sigma、#14506) を 1 mg/ml となるように PBS に溶解し、この溶液に、上記遠心分離後の反応性 MLVs のペレットを分散した。

[0126] モル比にしてヒト血清由来 IgG ポリクローナル抗体の 10 倍量の 2-イミノチオラン塩酸塩 (Sigma) を加え、25℃ で 3 時間以上攪拌しながら

らインキュベートした。その後、25℃、20,000gで2分間の遠心分離を行い、上清を除去し、1mlのPBSで懸濁した。この遠心分離と上清の除去、及び1mlのPBSへの懸濁を1単位としてさらに3回繰り返した。

[0127] 得られた懸濁液をヒト血清由来IgGポリクローナル抗体固定化MLVsとして4℃で保存した。MLVsに固定化されたヒト血清由来IgGポリクローナル抗体量はDC Protein Assayで定量した。

[0128] <1-2. チューブへのヒト血清由来IgGポリクローナル抗体の固定>

イムノチューブ (Immunotube ; Nunc社、Maxisorp (登録商標)) に、PBSで濃度10µg/mlに調製したヒト血清由来IgGポリクローナル抗体 (Sigma、#14506) 溶液を1ml加えて4℃で一晩インキュベートした。その後、PBSで5回洗浄し、2%BSA-PBSを1ml加えて1時間インキュベートした。

この後、ファージライブラリと混合する際には、PBSでさらに5回洗浄してからファージライブラリ溶液を添加して用いた。

[0129] なお、ウサギ血清由来IgGポリクローナル抗体を用いた場合ではあるが、チューブへ抗体を固定した場合におけるチューブに非特異的に結合する抗体の割合が、多重膜リポソームへ抗体を固定した場合における多重膜リポソームに非特異的に結合する抗体の割合に比べて非常に大きいことが非特許文献1で示されている。当業者であれば、ヒト血清由来IgGポリクローナル抗体を用いた場合でも同様であることは容易に理解することができる。

[0130] <1-3. 抗ヒト血清由来IgGポリクローナル抗体-マウス由来単鎖抗体を提示するファージのライブラリの調製>

pelB leaderの遺伝子配列、NcoIサイト、SpeIサイト、フレキシブルリンカー (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>の遺伝子配列、BamHIサイト、NotIサイト、FLAG-tagの遺伝子配列、c-myc-tagの遺伝子配列、Amber ストップコドン (TAG)、及びgllipコートタンパク質の遺伝子 (N末端側250アミノ酸残基を欠損) を含むDN

Aを委託合成し、pT7 Blue（メルク社）のXba I/BamHIサイトに挿入した。このpT7 Blue組換えファージミドベクターをpPLFMAΔ250gllpとし、一連のファージディスプレイの実験に用いた。

- [0131] マウスハイブリドーマCRL-1786株（ATCC）より決定した抗ヒト血清由来IgGポリクローナル抗体-マウス由来単鎖抗体の遺伝子をPCRで増幅し、組換えファージミドベクターpPLFMAΔ250gllpのNco I/Not Iサイト中に導入した。

この組換えファージミドベクターで大腸菌TG1を形質転換し、2×YT培地（1%グルコース、50mg/Lアンピシリン含有）10ml中に植菌した。200ml三角フラスコ中で37℃、200rpmにおいて一晩培養した（前培養）。

- [0132] 前培養液を、OD600=0.1となるように、50mlの2×YT培地（1%グルコース、50mg/Lアンピシリン含有）中に植菌し、30℃、200rpmで振とう培養した。OD=1.0付近まで培養後、ヘルパーファージVCSM13を感染多重度（MOI）=20となるように培養液に加え、37℃で30分インキュベートした。37℃で3000g、10分間遠心分離し、上清を除去し、2×YT培地（50mg/Lアンピシリン、35mg/Lカナマイシン含有）50ml中に穏やかに懸濁した。30℃、200rpmで12時間以上振とうし、培養上清中に、抗ヒト血清由来IgGポリクローナル抗体-マウス由来単鎖抗体を提示するファージを生産した。

上清を遠心分離によって回収し、PEG沈殿によって濃縮するとともに、1mlのPBS中に再懸濁して、抗ヒト血清由来IgGポリクローナル抗体-マウス由来単鎖抗体を提示するファージのライブラリを取得した。

- [0133] <1-4. 非提示ファージのライブラリの調製>

抗ヒト血清由来IgGポリクローナル抗体-マウス由来単鎖抗体の遺伝子を挿入していない組換えファージミドベクターpPLFMAΔ250gllpで大腸菌TG1を形質転換したこと以外は、上記1-3と同様にして

、非提示ファージを取得した。

[0134] <1-5. パニング>

(疑似ファージライブラリの調製)

上記1-3及び1-4で取得した抗-ヒト血清由来IgGポリクローナル抗体-マウス由来単鎖抗体を提示するファージのライブラリと非提示ファージのライブラリを表1に示す比で混合し、疑似ファージライブラリを調製した。

[0135] [表1]

表1. 疑似ファージライブラリの組成

| 条件  |                                               | cfu/ml               | cfu/ml比   |
|-----|-----------------------------------------------|----------------------|-----------|
| 条件1 | 抗-ヒト血清由来IgGポリクローナル抗体-マウス由来単鎖抗体を提示するファージのライブラリ | $8.8 \times 10^8$    | 1         |
|     | 非提示ファージ                                       | $4.7 \times 10^{14}$ | 540,000   |
| 条件2 | 抗-ヒト血清由来IgGポリクローナル抗体-マウス由来単鎖抗体を提示するファージのライブラリ | $8.8 \times 10^7$    | 1         |
|     | 非提示ファージ                                       | $4.7 \times 10^{14}$ | 5,400,000 |

[0136] [実施例1-1]

(ヒト血清由来IgGポリクローナル抗体固定化MLVsを用いたパニング)

以下のようにして、上記疑似ファージライブラリとして条件1を採用し、上記1-1で調製したヒト血清由来IgGポリクローナル抗体固定化MLVsを用いて、以下のようにパニングを実施した。

[0137] (ラウンド)

まず各ラウンドにおいて行う操作を説明する。

ヒト血清由来IgGポリクローナル抗体固定化MLVsをIgG量が10  $\mu$ gとなるように加え、ボルテックスした。これを25℃、20,000g、2分間遠心分離し、上清を取り除いて、2%BSA-PBSを0.9ml加えて再懸濁した。

[0138] 一方で、疑似ファージライブラリ溶液を25℃、20,000g、2分間遠心分離し、上清を回収した。100  $\mu$ lの上清をチューブに加えてボルテックスし、25℃で1時間、ローテーターを用いて転倒混和し、ヒト血清由

来 I g G ポリクローナル抗体固定化 M L V s と疑似ファージライブラリとを結合させる反応を行った。

[0139] 上記結合反応液と 1 m l の 2 % B S A - P B S を混合し、25℃、20,000 g、2 分間遠心分離、上清を除去した（洗浄）。洗浄作業は 5 回繰り返した。

[0140] （パニングにより選択されたファージの取得）

上記チューブ内のヒト血清由来 I g G ポリクローナル抗体固定化 M L V s に 10 m M グリシン-HC l（pH 1.5）を 0.9 m l 加えて懸濁し、B S A ブロッキングしたチューブに移した。そして、さらに、室温（または 4℃）でチューブを 10 分間転倒混和して、ファージを溶出した。

[0141] 上記チューブから回収したファージ溶出液 0.9 m l と 0.1 m l の 2 M T r i s - H C l 溶液を混合し、ファージ溶出液を中和した。

[0142] 一方で、大腸菌 T G 1 の培養液を O D = 0.1 となるように新しい L B 培地 10 m l に植菌し、30℃で培養を行った。

[0143] 中和した溶離液 1 m l と培養した大腸菌 T G 1 の培養液 1 m l を混合し、37℃で 1 時間インキュベートした。インキュベート後、2×Y T 培地（1 % グルコース、50 m g / L アンピシリン含有）中に添加し、30℃、200 r p m で O D 600 = 1.0 となるまで培養した。

[0144] その培養液に、ヘルパーファージ V C S M 13 を感染多重度（M O I）= 20 となるように添加し、37℃で 30 分インキュベートした。30℃、1500 r p m で 15 分間の遠心分離後に上清を捨て、2×Y T 培地（50 m g / L アンピシリン、50 m g / L カナマイシン含有）50 m l 中に菌体を再分散させた。これを、30℃、200 r p m で 12 時間培養を行い、ファージを培養上清中に生産させた。

[0145] その後、30℃、1500 r p m で 15 分間の遠心分離後に上清を回収し、P E G 沈殿によって濃縮、精製を行った。最後に、1 m l の P B S に分散し、遠心分離によって凝集体を取り除いた。

ここまでの操作を 1 ラウンドとする。上記操作によりラウンド 1 を行った

ことになる。

その後、上記ラウンドをさらに3回実施した。すなわち、ラウンド4まで行った。各ラウンドで得られたコロニーからファージミドDNAを回収した。

[0146] [実施例1-2]

疑似ファージライブラリとして条件2を採用したこと以外は実施例1-1と同様にしたものを実施例1-2とした。

[0147] [比較例1-1]

上記疑似ファージライブラリとして条件1を採用し、ヒト血清由来IgGポリクローナル抗体固定化MLVsではなく、上記1-2で調製した、ヒト血清由来IgGポリクローナル抗体固定化チューブを用いて、以下のようにパニングを行った。

[0148] (ラウンド)

各ラウンドにおいて行う操作を説明する。

上記1-2の通り、イムノチューブ (Immunotube ; Nunc社、Maxisorp (登録商標)) に、PBSで濃度10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  に調製したヒト血清由来IgGポリクローナル抗体 (Sigma、#14506) 溶液を1ml加えて4℃で一晩インキュベートした。その後、PBSで5回洗浄し、2%BSA-PBSを1ml加えて1時間インキュベートした。

次に、PBSTで5回洗浄し、2%BSA-PBSTを900  $\mu\text{l}$  加え、さらに、疑似ファージライブラリ溶液を100  $\mu\text{l}$  加えて25℃で1時間インキュベートした。

[0149] (パニングにより選択されたファージの取得)

大腸菌TG1の培養液をOD=0.1となるように新しいLB培地10mlに植菌し、30℃で培養を行った。

[0150] 溶離液1mlと培養した大腸菌TG1の培養液1mlを混合し、37℃で1時間インキュベートした。インキュベート後、2×YT培地 (1%グルコース、50mg/Lアンピシリン含有) 中に添加し、30℃、200rpm

でOD600 = 1.0となるまで培養した。

[0151] その培養液に、ヘルパーファージVCSM13を感染多重度(MOI) = 20となるように添加し、37℃で30分インキュベートした。30℃、1500rpmで15分間の遠心分離後に上清を捨て、2×YT培地(50mg/Lアンピシリン、50mg/Lカナマイシン含有)50ml中に菌体を再分散させた。これを、30℃、200rpmで12時間培養を行い、培養上清中にファージを生産させた。

[0152] その後、30℃、1500rpmで15分間の遠心分離後に上清を回収し、PEG沈殿によって濃縮、精製を行った。最後に、1mlのPBSに分散し、遠心分離によって凝集体を取り除いた。

ここまでの操作を1ラウンドとする。上記操作によりラウンド1を行ったことになる。

その後、上記ラウンドをさらに3回実施した。すなわち、ラウンド4まで行った。各ラウンドで得られたコロニーからファージミドDNAを回収した。

[0153] [比較例1-2]

疑似ファージライブラリとして条件2を採用したこと以外は比較例1-1と同様にしたものを比較例1-2とした。

[0154] <1-6. 抗-ヒト血清由来IgGポリクローナル抗体-マウス由来単鎖抗体の遺伝子の有無の確認>

実施例1-1、実施例1-2、比較例1-1、比較例1-2で回収したファージミドDNAから、抗-ヒト血清由来IgGポリクローナル抗体-マウス由来単鎖抗体の遺伝子の有無を確認した。

[0155] 得られたファージミドDNAを、1%アガロースゲルを用いた電気泳動によって分離し、エチジウムブロマイド染色によって可視化した。抗-ヒト血清由来IgGポリクローナル抗体-マウス由来単鎖抗体の遺伝子を挿入していないファージミドベクター(pPLFMAΔ250gllp)と泳動距離を比較し、抗-ヒト血清由来IgGポリクローナル抗体-マウス由来単鎖

抗体の遺伝子の有無を目視で確認した。

[0156] <1-7. パニングの結果>

表2-1及び表2-2に、ラウンド1～4におけるパニング前後のファージ数、パニング前に対するパニング後のファージ数である回収率を示した。

また、表3に、ラウンド1～4における、取得されたポジティブクローン数（すなわち、抗-ヒト血清由来IgGポリクローナル抗体-マウス由来単鎖抗体の遺伝子を含むクローン数）と、取得された全クローン数に対するポジティブクローン数の割合を示した。さらに、この割合を図1に示した。

[0157] [表2-1]

|     |        | ラウンド1             |                   |            | ラウンド2             |                   |            |
|-----|--------|-------------------|-------------------|------------|-------------------|-------------------|------------|
|     |        | パニング前<br>(cfu/ml) | パニング後<br>(cfu/ml) | 回収率<br>(%) | パニング前<br>(cfu/ml) | パニング後<br>(cfu/ml) | 回収率<br>(%) |
| 条件1 | 実施例1-1 | 4.7E+14           | 2.8E+04           | 6.0E-09    | 4.2E+12           | 1.1E+06           | 2.6E-05    |
|     | 比較例1-1 | 4.7E+14           | 8.1E+05           | 1.7E-07    | 1.9E+12           | 1.4E+06           | 7.4E-05    |
| 条件2 | 実施例1-2 | 4.7E+14           | 7.4E+04           | 1.6E-08    | 3.1E+13           | 1.5E+05           | 4.8E-07    |
|     | 比較例1-2 | 4.7E+14           | 1.3E+05           | 2.8E-08    | 4.0E+12           | 6.0E+06           | 1.5E-04    |

[0158] [表2-2]

|     |        | ラウンド3             |                   |            | ラウンド4             |                   |            |
|-----|--------|-------------------|-------------------|------------|-------------------|-------------------|------------|
|     |        | パニング前<br>(cfu/ml) | パニング後<br>(cfu/ml) | 回収率<br>(%) | パニング前<br>(cfu/ml) | パニング後<br>(cfu/ml) | 回収率<br>(%) |
| 条件1 | 実施例1-1 | 2.8E+12           | 1.3E+07           | 4.6E-04    | 1.2E+14           | 2.4E+06           | 2.0E-06    |
|     | 比較例1-1 | 5.2E+12           | 2.0E+06           | 3.8E-05    | 2.0E+12           | 9.8E+06           | 4.9E-04    |
| 条件2 | 実施例1-2 | 6.4E+12           | 5.9E+05           | 9.2E-06    | 1.0E+14           | 8.4E+06           | 8.3E-06    |
|     | 比較例1-2 | 3.2E+12           | 1.2E+06           | 3.8E-05    | 7.3E+12           | 2.1E+06           | 2.9E-05    |

[0159] [表3]

|     |        | ラウンド1          |           | ラウンド2          |           | ラウンド3          |           | ラウンド4          |           |
|-----|--------|----------------|-----------|----------------|-----------|----------------|-----------|----------------|-----------|
|     |        | ポジティブ<br>クローン数 | 割合<br>(%) | ポジティブ<br>クローン数 | 割合<br>(%) | ポジティブ<br>クローン数 | 割合<br>(%) | ポジティブ<br>クローン数 | 割合<br>(%) |
| 条件1 | 実施例1-1 | 0              | 0         | 1              | 17        | 6              | 100       | 6              | 100       |
|     | 比較例1-1 | 0              | 0         | 0              | 0         | 0              | 0         | 0              | 0         |
| 条件2 | 実施例1-2 | 0              | 0         | 0              | 0         | 3              | 50        | 6              | 100       |
|     | 比較例1-2 | 0              | 0         | 0              | 0         | 0              | 0         | 0              | 0         |

[0160] 上記結果より、抗原であるヒト血清由来IgGポリクローナル抗体をチュ

ープに固定した方法よりも、多重膜リボソームに結合させた方法を用いた方が、効率的なパニングが可能であることが分かった。

[0161] <2. ヒト血清由来 I g G ポリクローナル抗体に結合するウサギ由来単鎖抗体のスクリーニング方法>

以下では、ヒト血清由来 I g G ポリクローナル抗体に結合するウサギ由来単鎖抗体（以下、「抗-ヒト血清由来 I g G ポリクローナル抗体-ウサギ由来単鎖抗体」と称することがある。）を、ファージライブラリの中からスクリーニングする方法を記載する。

[0162] <2-1. 多重膜リボソームとヒト血清由来 I g G ポリクローナル抗体との結合>

上記 1-1 と同様にして、ヒト血清由来 I g G ポリクローナル抗体固定化 M L V s を調製した。

[0163] <2-2. 抗-ヒト血清由来 I g G ポリクローナル抗体-ウサギ由来単鎖抗体を提示するファージのライブラリの調製>

まず、公知の方法により、ヒト血清由来 I g G ポリクローナル抗体（S i g m a、# 1 4 5 0 6）でアナウサギを免疫した。そのウサギの脾臓から全 R N A を抽出した。

[0164] 逆転写酵素として、Superscript（登録商標）IV Reverse Transcriptase（Thermo Fisher Scientific社）を用いて全 R N A から c D N A を作成した。c D N A をテンプレートにして、配列番号 1 ~ 1 1 のプライマーを用いて、重鎖（H鎖）の可変領域（V<sub>H</sub>ドメイン）の遺伝子、及び、軽鎖（L鎖）の可変領域（V<sub>L</sub>ドメイン）の遺伝子を増幅した。

[0165] 増幅した V<sub>L</sub> 遺伝子を、p P L F M A Δ g l l l p ベクターの B a m H I / N o t I サイトに導入し、これを V<sub>L</sub> ライブラリベクターとした。このときの宿主細胞は大腸菌 T G 1 である。

次に、V<sub>L</sub> ライブラリベクターを大腸菌から精製し、増幅した V<sub>H</sub> 遺伝子を、N c o I / S p e I サイトに導入し、抗-ヒト血清由来 I g G ポリクローナル抗体-ウサギ由来単鎖抗体を提示するファージライブラリベクター

( $2.0 \times 10^7$ コロニー)を取得した。このときの宿主細胞も大腸菌 T G 1 である。

[0166] 次に、 $2 \times$  Y T 培地 (1% グルコース、50 mg/L アンピシリン含有) 50 ml 中に、ファージライブラリベクターを含む大腸菌 T G 1 を植菌し、 $30^\circ\text{C}$ 、200 rpm で OD = 1 となるまで振とう培養した。その培養液に、ヘルパーファージ V C S M 1 3 を感染多重度 MOI = 20 となるように加え、 $37^\circ\text{C}$  で 1 時間インキュベートした。 $30^\circ\text{C}$ 、1500 rpm で 15 分間の遠心分離後に上清を捨て、 $2 \times$  Y T 培地 (50 mg/L アンピシリン、50 mg/L カナマイシン含有) 50 ml 中に菌体を懸濁し、 $30^\circ\text{C}$ 、200 rpm で 12 時間以上培養して、培養上清中にファージを産生させた。

[0167]  $4^\circ\text{C}$ 、10000 g で 15 分間の遠心分離を 2 回行い、上清をファージライブラリとして回収した。そして、PEG 沈殿によりファージライブラリを濃縮し、1 ml の  $1 \times$  P B S 中に分散した。

[0168] <2-3. パニング>

[実施例 2]

上記 2-2 で調製したファージライブラリと、上記 2-1 で調製したヒト血清由来 Ig G ポリクローナル抗体固定化 M L V s を用いて、以下のようにパニングを実施した。

[0169] (ラウンド)

各ラウンドにおいて行う操作を説明する。

1. 5 ml エッペンドルフチューブに 2% B S A - P B S を 1 ml 加え、室温で 1 時間以上ブロッキングした。このブロッキングは使用するチューブ全てについて行った。ヒト血清由来 Ig G ポリクローナル抗体固定化 M L V s を Ig G 量が  $10 \mu\text{g}$  となるように加え、ボルテックスした。これを  $4^\circ\text{C}$ 、20,000 g で 2 分間遠心分離し、上清を除去した。これに、2% B S A - P B S で 10 倍希釈したファージライブラリを 1 ml 加え、 $4^\circ\text{C}$  で回転倒しながら 1 晩インキュベートした。

[0170] その後、 $4^\circ\text{C}$ 、20000 g で 2 分間遠心分離し、上清を除去した。2%

B S A - P B S を 1 m l 加えて懸濁し、別のエッペンドルフチューブに移した。この遠心分離、上清除去、2 % B S A - P B S による懸濁、及び別のエッペンドルフチューブに移す操作を 1 単位として、合計 3 回繰り返した。

[0171] (パニングにより選択されたファージの取得)

続いて、4℃、20000 g で 2 分間遠心分離し、上清を除去した。10 mM グリシン-HCl (pH 1.5) を 0.9 ml 加えて懸濁し、溶液を別のエッペンドルフチューブに移した。4℃で回転転倒しながら 10 分間インキュベートし、ファージを溶出した。

4℃、20000 g で 2 分間遠心分離し、上清を別のエッペンドルフチューブに移した。さらに、2 M Tris-HCl (pH 8.0) を 0.1 ml 加えて、ファージ溶出液を中和した。

[0172] 一方で予め培養しておいた指数増殖中期の大腸菌 T G 1 の培養液 1 ml を加え、37℃で 30 分インキュベートした。

この溶液を、2×YT 培地 (1% グルコース、50 mg/L アンピシリン含有) に懸濁し、30℃、200 rpm で振とう培養した。OD = 1.0 付近まで増殖させた後、VCSM13 を感染多重度 (MOI) = 20 となるように添加し、37℃で 30 分インキュベートし、30℃、3000 g で 10 分間遠心分離した。

[0173] 30℃、1500 rpm で 15 分間の遠心分離後に上清を除去し、50 ml の 2×YT 培地 (50 mg/L アンピシリン、50 mg/L カナマイシン含有) に菌体を懸濁後、30℃、200 rpm で 12 時間培養し、ファージを培養上清中に生産させた。

[0174] その後、4℃、20000 g で 2 分間遠心分離し、上清を回収し、PEG 沈殿 (2 回) し、1 ml の PBS に分散させた。最後に、4℃、20000 g で 2 分間遠心分離し、上清をファージ溶液として回収した。

[0175] ここまでの操作を 1 ラウンドとする。上記操作によりラウンド 1 を行ったことになる。

その後、上記ラウンドをさらに 2 回実施した。すなわち、ラウンド 3 まで

行った。各ラウンドで得られたコロニーからファージミドDNAを回収した。

[0176] [比較例 2]

ヒト血清由来 IgG ポリクローナル抗体を結合しなかった多重膜リポソームを用いたこと以外は実施例 2 と同様にしたものを比較例 2 とした。

[0177] < 2-4. ファージの回収から遺伝子配列のシーケンスまで >

実施例 2、比較例 2 で回収したファージミドDNA から、抗ヒト血清由来 IgG ポリクローナル抗体ーウサギ由来単鎖抗体の遺伝子の有無を確認した。

[0178] 得られたファージミドDNA を、1%アガロースゲルを用いた電気泳動によって分離し、エチジウムブロマイド染色によって可視化した。抗ヒト血清由来 IgG ポリクローナル抗体ーウサギ由来単鎖抗体の遺伝子を挿入していないファージミドベクター (pPLFMAΔ250gllp) と泳動距離を比較し、抗ヒト血清由来 IgG ポリクローナル抗体ーウサギ由来単鎖抗体の遺伝子の有無を目視で確認した。当該遺伝子の挿入を確認できたファージミドベクターは、DNA シーケンス解析 (受託) によって配列決定を行った。

当該遺伝子内における CDR 領域の決定は、IMGT (<http://www.imgt.org/>) の Vquest サーチエンジンを利用して行った。

[0179] < 2-5. パニングの結果 >

図 2 に、実施例 2 及び比較例 2 におけるパニング前、ラウンド 1 終了時、ラウンド 2 終了時、ラウンド 3 終了時におけるファージ数を示した。

また、図 3 に、実施例 2 及び比較例 2 におけるラウンド 1 終了時、ラウンド 2 終了時、ラウンド 3 終了時における各ファージ数を、それぞれパニング前のファージ数で除した回収率 (%) を示した。

[0180] 上記結果より、実施例 2 では、ラウンド 2 において早くも回収率が大幅に増加することが分かった。なお、通常のイムノチューブを用いる方法では、

少なくともラウンド3ないし4以上でなければ、ここまでの回収率(%)が得られないことを付言しておく。すなわち、多重膜リポソームを用いることによって、従来技術に比べて顕著に効率的なパニングが可能であることが分かった。

[0181] <3-1. 抗原結合活性評価1>

[実施例3-1]

各ラウンドで回収されたファージミド含有大腸菌のペレット単位（すなわち、シングルコロニー化しておらず、ペレットに含まれる大腸菌が含むファージ全体）から得られたウサギ由来単鎖抗体について、以下のようにして抗原結合活性を評価した。

[0182] Maxisorp（登録商標）（Thermo Fisher Scientific社）プレートに、ヒトIgG1（Sigma、#15154）、ヒトIgG2（Sigma、#15404）、ヒトIgG3（Sigma、#15654）、ヒトIgG4（Sigma、#14639）、ヒトIgA（Sigma、#14036）を、それぞれが最終濃度5  $\mu$ g/mlとなるように100  $\mu$ lのPBSを添加し、4℃で一晩インキュベートした（抗原の固相化）。

次に、上記固相化したプレートをPBSで洗浄し、10%のBlocking One-PBS（ナカライテスク）を300  $\mu$ l加えて25℃で1時間インキュベート後（ブロッキング）、PBSTでプレートを洗浄した。

[0183] 一方で、実施例2におけるパニング前、ラウンド1終了時、ラウンド2終了時、ラウンド3終了時で得られたファージミド含有大腸菌ペレット25 mlのそれぞれに、2.5 mlのBugbuster（登録商標）（メルク社）、及び2.5  $\mu$ LのBenzonase Nuclease（登録商標）（メルク社）を加えて溶菌後、4℃、10,000 gで15分間遠心分離し、上清を回収した。

これを10% Blocking One-PBSTで10倍に希釈し、上記ブロッキング及びPBSTによる洗浄後のプレートに100  $\mu$ lずつ加えて25℃で1時間インキュベートした。

[0184] 続いて、PBSTでプレートを洗浄し、10% Blocking On

e-PBSTで10000倍希釈したHRP標識抗c-myc抗体を100  $\mu$ lずつ加えて25℃で1時間インキュベートした。

その後、PBSTでプレートを洗浄し、TMB溶液を100  $\mu$ lずつ加えて5分間インキュベートし、0.3M硫酸を100  $\mu$ lずつ加えて反応を停止した。

マイクロプレートリーダーを用いて450nmにおける吸光度を測定した。なお、650nmを副波長とした。

[0185] 図4にその結果を示す。図4より、ヒトIgG1抗体、ヒトIgG2抗体、ヒトIgG3抗体、ヒトIgG4抗体に対する結合活性として、わずか1ラウンドのパニング操作により、大きい吸光度を示すことが分かった。すなわち、1ラウンドのパニング操作にもかかわらず、抗原に特異的に結合するファージが濃縮されていることが分かった。

さらに、ラウンド2終了時には、ヒトIgG1抗体、ヒトIgG2抗体、ヒトIgG3抗体、ヒトIgG4抗体に加えて、ヒトIgA抗体に対しても特異的に結合するファージが濃縮されていることが分かった。

[0186] <3-2. 抗原結合活性評価2>

[実施例3-2]

各ラウンドで回収されたファージミド含有大腸菌のコロニーから得られたウサギ由来単鎖抗体について、以下のようにして抗原結合活性を評価した。

[0187] 実施例2におけるパニング前、ラウンド1終了時、ラウンド2終了時、ラウンド3終了時で得られたファージミド含有大腸菌のコロニーを、96ウェルディープウェルプレート内で、1mlのOvernight Express（登録商標、メルク）培地中に植菌し、30℃、1600rpmで24時間培養後、遠心分離で上清を除去した。これに、0.2mlのBugbuster、及び0.2  $\mu$ LのBenzonase Nucleaseを加えて溶菌後、遠心分離し、上清を回収した。それ以降は、上記3-1と同様である。

[0188] 図5、表4-1、表4-2に、ラウンド1終了時に得られた48コロニーから得られたウサギ由来単鎖抗体について行った抗原結合活性評価の結果を

示す。尚、「ライブラリ」とは、ファージミド含有大腸菌のペレット単位（すなわち、シングルコロニー化しておらず、ペレットに含まれる大腸菌が含むファージ全体）から得られたウサギ由来単鎖抗体について抗原結合活性を評価した結果である。また、OD値が0.1以上の場合をポジティブクローンと、それ未満をネガティブクローンとした。

尚、ヒト血清由来IgGポリクローナル抗体に結合するウサギ由来単鎖抗体のスクリーニング方法において取得されたクローンの名称として、例えば、「ラウンド1終了時のクローン番号1」のクローンを「R1-1」や「I-1」と略すことがある。同様に、例えば、「ラウンド2終了時のクローン番号1」のクローンを「R2-1」や「II-1」と、「ラウンド3終了時のクローン番号1」のクローンを「R3-1」や「III-1」と略すことがある。

[0189]

[表4-1]

表4-1

| クローン番号 | IgG1   | IgG3   | IgA    | クローン番号 | IgG1   | IgG3   | IgA    |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| R1-1   | 0.0330 | 0.0290 | 0.0330 | R1-25  | 3.1200 | 0.7990 | 0.0310 |
| R1-2   | 0.0200 | 0.0150 | 0.0160 | R1-26  | 3.0350 | 3.0000 | 0.0200 |
| R1-3   | 3.1470 | 2.2850 | 0.0410 | R1-27  | 3.0730 | 3.0820 | 0.0290 |
| R1-4   | 0.0300 | 0.0290 | 0.0250 | R1-28  | 0.0170 | 0.0100 | 0.0140 |
| R1-5   | 3.1910 | 3.0870 | 0.0230 | R1-29  | 3.0530 | 2.2800 | 0.0530 |
| R1-6   | 3.1740 | 2.8820 | 0.0780 | R1-30  | 0.0190 | 0.0170 | 0.0290 |
| R1-7   | 3.1240 | 0.0660 | 0.0360 | R1-31  | 0.0360 | 0.0300 | 0.0340 |
| R1-8   | 0.1010 | 0.1200 | 0.1200 | R1-32  | 0.1900 | 0.1350 | 0.1150 |
| R1-9   | 3.1220 | 2.2560 | 0.0200 | R1-33  | 0.0170 | 0.0180 | 0.0170 |
| R1-10  | 2.8020 | 1.2220 | 0.0360 | R1-34  | 3.1380 | 0.6290 | 0.0250 |
| R1-11  | 3.1100 | 2.9800 | 0.0480 | R1-35  | 3.0660 | 0.5400 | 0.0170 |
| R1-12  | 0.0350 | 0.0230 | 0.0140 | R1-36  | 3.1030 | 0.7110 | 0.0310 |
| R1-13  | 3.1020 | 2.9500 | 0.0200 | R1-37  | 0.0080 | 0.0080 | 0.0120 |
| R1-14  | 3.1160 | 3.0010 | 0.0220 | R1-38  | 3.0930 | 2.9980 | 0.0210 |
| R1-15  | 0.0170 | 0.0130 | 0.0360 | R1-39  | 2.9170 | 0.2600 | 0.0170 |
| R1-16  | 0.0310 | 0.0240 | 0.0240 | R1-40  | 0.0330 | 0.0330 | 0.0320 |
| R1-17  | 0.0220 | 0.0200 | 0.0230 | R1-41  | 3.1450 | 2.1250 | 0.3290 |
| R1-18  | 0.0160 | 0.0090 | 0.0120 | R1-42  | 3.1050 | 2.5150 | 0.0170 |
| R1-19  | 0.0110 | 0.0100 | 0.0090 | R1-43  | 3.0910 | 2.9530 | 0.0200 |
| R1-20  | 2.8940 | 1.0570 | 0.0190 | R1-44  | 0.0090 | 0.0060 | 0.0120 |
| R1-21  | 0.0270 | 0.0150 | 0.0450 | R1-45  | 3.0720 | 2.5140 | 0.0130 |
| R1-22  | 0.1530 | 0.1110 | 0.1040 | R1-46  | 0.0080 | 0.0070 | 0.0130 |
| R1-23  | 3.0390 | 0.8750 | 0.0170 | R1-47  | 3.1160 | 2.8050 | 0.0190 |
| R1-24  | 3.0480 | 0.0530 | 0.0270 | R1-48  | 3.1370 | 2.9600 | 0.0290 |
|        |        |        |        | ライブラリ  | 2.9090 | 1.6280 | 0.0710 |

[0190]

[表4-2]

表4-2

|                           | IgG1 | IgG3 | IgA |
|---------------------------|------|------|-----|
| ポジティブクローン数                | 30   | 28   | 4   |
| ネガティブクローン数                | 18   | 20   | 44  |
| 全48クローン中のポジティブクローン数の割合(%) | 62.5 | 58.3 | 8.3 |
| $OD \geq 2.5$             | 27   | 13   | 0   |
| $1 \leq OD < 2.5$         | 0    | 6    | 0   |
| $0.1 \leq OD < 1$         | 3    | 9    | 4   |

[0191] 同様に、図6、表5-1、表5-2に、ラウンド2終了時に得られた48コロニーから得られたウサギ由来単鎖抗体について行った抗原結合活性評価の結果を示す。ここでは、ヒトIgG1抗体、ヒトIgG3抗体、ヒトIgA抗体に対する結合活性の結果を示した。尚、「ライブラリ」とは、上記同様に、ファージミド含有大腸菌のペレット単位（すなわち、シングルコロニー化しておらず、ペレットに含まれる大腸菌が含むファージ全体）から得られたウサギ由来単鎖抗体について抗原結合活性を評価した結果である。また、OD値が0.1以上の場合をポジティブクローンと、それ未満をネガティブクローンとした。

[0192]

[表5-1]

表5-1

| クローン番号 | IgG1   | IgG3   | IgA    | クローン番号 | IgG1   | IgG3   | IgA    |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| R2-1   | 3.1060 | 2.9480 | 0.0250 | R2-25  | 3.1110 | 2.5610 | 0.0270 |
| R2-2   | 3.0650 | 2.9030 | 0.0370 | R2-26  | 3.0630 | 1.2730 | 0.0180 |
| R2-3   | 2.5150 | 2.5170 | 0.0100 | R2-27  | 3.0220 | 2.4760 | 0.1570 |
| R2-4   | 0.0490 | 0.0630 | 0.0160 | R2-28  | 0.8610 | 1.3530 | 0.0210 |
| R2-5   | 2.9640 | 0.1920 | 0.0130 | R2-29  | 0.6900 | 0.0170 | 0.0180 |
| R2-6   | 1.6750 | 0.2710 | 0.0120 | R2-30  | 3.0180 | 3.0400 | 0.0210 |
| R2-7   | 0.0090 | 0.0090 | 0.0140 | R2-31  | 3.1040 | 2.5360 | 0.0220 |
| R2-8   | 3.1140 | 2.0550 | 0.0190 | R2-32  | 3.0850 | 3.1180 | 0.0470 |
| R2-9   | 3.1330 | 3.0210 | 0.0200 | R2-33  | 3.1310 | 2.8100 | 0.0240 |
| R2-10  | 3.1010 | 2.8040 | 0.0210 | R2-34  | 3.1600 | 1.8090 | 0.0360 |
| R2-11  | 2.7430 | 0.0210 | 0.0180 | R2-35  | 3.0810 | 2.9710 | 0.0200 |
| R2-12  | 0.3590 | 0.0300 | 0.0150 | R2-36  | 3.0860 | 3.0690 | 0.0310 |
| R2-13  | 1.4750 | 0.0130 | 0.0170 | R2-37  | 3.0820 | 2.3490 | 0.0170 |
| R2-14  | 2.9970 | 0.5070 | 0.0220 | R2-38  | 3.0670 | 2.6320 | 0.0180 |
| R2-15  | 3.1040 | 2.9740 | 0.0200 | R2-39  | 0.0170 | 0.0110 | 0.0150 |
| R2-16  | 3.1150 | 3.0470 | 0.0260 | R2-40  | 3.1540 | 2.6190 | 0.0200 |
| R2-17  | 3.1850 | 0.4590 | 0.0350 | R2-41  | 3.1320 | 2.7460 | 0.0300 |
| R2-18  | 3.1140 | 3.0750 | 3.1080 | R2-42  | 3.1680 | 1.7200 | 0.0210 |
| R2-19  | 2.7350 | 1.8010 | 0.0210 | R2-43  | 3.1190 | 1.7940 | 0.0200 |
| R2-20  | 2.8910 | 0.0680 | 0.0190 | R2-44  | 3.1840 | 1.0250 | 0.0830 |
| R2-21  | 1.9870 | 0.2040 | 0.0160 | R2-45  | 3.1430 | 2.8320 | 0.0180 |
| R2-22  | 3.1160 | 0.0400 | 0.0250 | R2-46  | 3.1590 | 1.2460 | 0.0180 |
| R2-23  | 2.8150 | 0.5180 | 0.0220 | R2-47  | 3.1440 | 3.0400 | 0.0420 |
| R2-24  | 3.1600 | 3.1080 | 0.0380 | R2-48  | 3.1430 | 3.1320 | 0.0260 |
|        |        |        |        | ライブラリ  | 3.1130 | 3.0780 | 1.4940 |

[0193]

[表5-2]

表5-2

|                           | IgG1 | IgG3 | IgA |
|---------------------------|------|------|-----|
| ポジティブクローン数                | 45   | 39   | 2   |
| ネガティブクローン数                | 3    | 9    | 46  |
| 全48クローン中のポジティブクローン数の割合(%) | 93.8 | 81.3 | 4.2 |
| $OD \geq 2.5$             | 39   | 22   | 1   |
| $1 \leq OD < 2.5$         | 3    | 11   | 0   |
| $0.1 \leq OD < 1$         | 3    | 6    | 1   |

[0194] 同様に、図7-1～図7-8、表6-1～表6-5に、ラウンド3終了時に得られた96コロニーから得られたウサギ由来単鎖抗体について行った抗原結合活性評価の結果を示す。なお、OD値が0.1以上の場合をポジティブクローンと、それ未満をネガティブクローンとした。

[0195]

[表6-1]

表6-1

| クローン番号 | IgG    | IgG1   | IgG2   | IgG3   | IgG4   | IgA    |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| R3-1   | 0.0310 | 0.0370 | 0.0360 | 0.0180 | 0.0370 | 0.0240 |
| R3-2   | 3.0800 | 3.1090 | 3.0940 | 3.1140 | 3.1180 | 0.0590 |
| R3-3   | 2.8830 | 2.9510 | 2.8880 | 2.9560 | 2.6520 | 0.0340 |
| R3-4   | 2.5980 | 2.7860 | 2.7350 | 1.7970 | 2.4910 | 0.0260 |
| R3-5   | 2.9690 | 3.0340 | 3.0400 | 3.0120 | 2.9450 | 0.0280 |
| R3-6   | 3.0750 | 3.0610 | 3.0590 | 3.0430 | 3.1060 | 0.0380 |
| R3-7   | 3.0980 | 2.9180 | 3.0420 | 3.0640 | 3.0510 | 0.0550 |
| R3-8   | 3.0140 | 3.0280 | 3.0250 | 3.0600 | 3.0920 | 3.0630 |
| R3-9   | 3.1070 | 3.0960 | 3.0760 | 2.8800 | 3.0170 | 0.0420 |
| R3-10  | 3.0930 | 3.1050 | 3.1540 | 2.7160 | 3.1220 | 0.0310 |
| R3-11  | 3.0930 | 3.0690 | 3.0950 | 3.0400 | 3.0350 | 0.0280 |
| R3-12  | 2.2380 | 2.5210 | 2.4300 | 0.6300 | 1.9520 | 0.0200 |
| R3-13  | 2.8830 | 2.9640 | 2.9040 | 1.1880 | 2.8740 | 0.0200 |
| R3-14  | 3.0970 | 3.0880 | 3.1320 | 2.9640 | 3.1210 | 0.0280 |
| R3-15  | 1.2220 | 1.5330 | 1.5390 | 0.0480 | 1.1510 | 0.0280 |
| R3-16  | 3.0640 | 3.0810 | 3.0930 | 1.5460 | 3.1160 | 0.0610 |
| R3-17  | 3.1290 | 3.1580 | 3.0970 | 3.0340 | 3.1070 | 0.0650 |
| R3-18  | 3.0470 | 3.0680 | 3.0980 | 1.9300 | 3.1070 | 0.0400 |
| R3-19  | 3.0610 | 3.0910 | 3.1060 | 3.0340 | 3.1140 | 0.0230 |
| R3-20  | 0.0820 | 0.1120 | 0.1160 | 0.0310 | 0.0730 | 0.0180 |
| R3-21  | 3.0520 | 3.0760 | 3.0870 | 2.6270 | 3.0640 | 0.0970 |
| R3-22  | 2.9310 | 3.0260 | 3.0840 | 1.5340 | 3.0600 | 0.0240 |
| R3-23  | 3.0370 | 3.0550 | 3.0560 | 3.0220 | 3.0560 | 0.0440 |
| R3-24  | 3.0680 | 3.0780 | 3.0790 | 3.0220 | 3.0820 | 0.0680 |

[0196]

[表6-2]

表6-2

| クローン番号 | IgG    | IgG1   | IgG2   | IgG3   | IgG4   | IgA    |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| R3-25  | 3.1060 | 3.1460 | 3.0560 | 3.1750 | 3.2120 | 0.0320 |
| R3-26  | 3.0960 | 3.1000 | 3.0370 | 3.1440 | 3.1580 | 0.0370 |
| R3-27  | 3.0960 | 3.1090 | 3.0770 | 3.0890 | 3.1390 | 0.0220 |
| R3-28  | 3.1190 | 3.1290 | 3.0440 | 3.0720 | 3.1380 | 0.0220 |
| R3-29  | 2.1340 | 3.0510 | 2.9840 | 0.1170 | 2.5800 | 0.0260 |
| R3-30  | 3.0330 | 3.0940 | 3.0100 | 3.1070 | 3.0930 | 0.0300 |
| R3-31  | 3.0970 | 3.0660 | 3.0280 | 3.0780 | 3.1250 | 0.0370 |
| R3-32  | 3.0950 | 2.9880 | 2.9860 | 3.1500 | 3.0800 | 0.0380 |
| R3-33  | 3.1380 | 3.1370 | 3.1400 | 3.1270 | 3.1660 | 0.0260 |
| R3-34  | 3.0970 | 3.1190 | 3.1370 | 2.9870 | 3.1430 | 0.0200 |
| R3-35  | 3.0740 | 3.1400 | 3.1190 | 3.0850 | 3.1080 | 0.0280 |
| R3-36  | 3.0880 | 3.1110 | 3.1020 | 2.9920 | 3.1130 | 0.0180 |
| R3-37  | 3.0650 | 3.0820 | 3.1260 | 2.1810 | 3.1020 | 0.0940 |
| R3-38  | 2.7950 | 2.8820 | 2.7880 | 1.2760 | 2.7010 | 0.0180 |
| R3-39  | 3.0760 | 3.0750 | 3.1010 | 2.9760 | 3.0900 | 0.0190 |
| R3-40  | 3.0700 | 3.1080 | 3.1080 | 1.7450 | 3.1040 | 0.0400 |
| R3-41  | 3.0470 | 3.0970 | 3.1200 | 3.1280 | 3.1680 | 0.0270 |
| R3-42  | 3.1050 | 3.1300 | 3.1430 | 3.1020 | 3.1400 | 0.0200 |
| R3-43  | 3.0960 | 3.1390 | 3.1510 | 3.0700 | 3.1530 | 0.0190 |
| R3-44  | 3.0560 | 3.0620 | 3.1000 | 3.1210 | 3.1030 | 0.0220 |
| R3-45  | 3.0570 | 3.0920 | 3.1290 | 2.9400 | 3.1150 | 0.0160 |
| R3-46  | 3.0660 | 3.1220 | 3.0540 | 3.0390 | 3.1270 | 0.0170 |
| R3-47  | 0.1210 | 0.1750 | 0.1800 | 0.0630 | 0.1080 | 0.0250 |
| R3-48  | 3.0760 | 3.1180 | 3.1320 | 2.1820 | 3.1440 | 0.0200 |

[0197]

[表6-3]

表6-3

| クローン番号 | IgG    | IgG1   | IgG2   | IgG3   | IgG4   | IgA    |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| R3-49  | 3.0920 | 3.0680 | 3.0740 | 3.1260 | 3.2050 | 0.0330 |
| R3-50  | 3.0680 | 3.0770 | 3.0960 | 2.1670 | 3.1910 | 0.0200 |
| R3-51  | 3.0400 | 3.0480 | 3.0990 | 3.0520 | 3.1630 | 0.0150 |
| R3-52  | 3.0640 | 2.9840 | 3.0860 | 3.1580 | 3.1460 | 0.0220 |
| R3-53  | 3.0380 | 3.0300 | 3.0860 | 3.1260 | 3.1210 | 0.0580 |
| R3-54  | 3.0390 | 3.0520 | 3.0950 | 3.0980 | 3.1660 | 0.0280 |
| R3-55  | 3.0520 | 3.0110 | 3.1080 | 3.0960 | 3.1000 | 0.0150 |
| R3-56  | 3.0850 | 3.0440 | 3.0910 | 3.1430 | 3.1590 | 0.0540 |
| R3-57  | 3.0850 | 3.1320 | 3.0830 | 3.0730 | 3.1420 | 0.1160 |
| R3-58  | 3.0460 | 3.1360 | 3.0790 | 3.1140 | 3.1690 | 0.0300 |
| R3-59  | 3.0720 | 3.1590 | 3.0710 | 2.9270 | 3.1420 | 0.0180 |
| R3-60  | 3.0310 | 3.1390 | 3.0440 | 2.9530 | 3.1010 | 0.0350 |
| R3-61  | 3.0360 | 3.0780 | 3.0130 | 3.0230 | 3.0780 | 0.0320 |
| R3-62  | 3.0580 | 3.0910 | 3.0490 | 3.0700 | 3.1060 | 0.0320 |
| R3-63  | 3.0300 | 3.0620 | 3.0450 | 2.9870 | 3.1170 | 0.0240 |
| R3-64  | 3.0750 | 3.1320 | 3.0800 | 2.8780 | 3.1220 | 0.0220 |
| R3-65  | 3.1030 | 3.0710 | 3.0540 | 3.1120 | 3.1280 | 0.0270 |
| R3-66  | 3.0640 | 3.1340 | 3.0810 | 3.0090 | 3.1370 | 0.0230 |
| R3-67  | 3.0520 | 3.0990 | 3.0780 | 2.6830 | 3.1160 | 0.0780 |
| R3-68  | 3.0610 | 3.0780 | 3.0630 | 3.0960 | 3.0890 | 0.0760 |
| R3-69  | 3.0400 | 3.0640 | 3.0600 | 3.0720 | 3.0470 | 0.0360 |
| R3-70  | 3.0430 | 3.0990 | 3.0800 | 3.0040 | 3.0960 | 0.0300 |
| R3-71  | 3.0520 | 3.0930 | 3.0790 | 3.0600 | 3.0980 | 0.0170 |
| R3-72  | 3.0610 | 3.0880 | 3.0630 | 3.0740 | 3.1290 | 0.0340 |

[0198]

[表6-4]

表6-4

| クローン番号 | IgG    | IgG1   | IgG2   | IgG3   | IgG4   | IgA    |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| R3-73  | 3.0550 | 3.1000 | 3.0920 | 3.1200 | 3.1370 | 0.1650 |
| R3-74  | 3.0070 | 3.0470 | 3.0610 | 3.0800 | 3.1430 | 0.0250 |
| R3-75  | 3.0110 | 3.0500 | 3.0400 | 3.1240 | 3.1070 | 3.0610 |
| R3-76  | 2.9820 | 3.0840 | 3.0820 | 1.2550 | 3.1270 | 0.0490 |
| R3-77  | 3.0360 | 3.0540 | 3.0300 | 3.0740 | 3.1430 | 0.0280 |
| R3-78  | 3.0060 | 3.0580 | 3.0560 | 2.8450 | 3.0970 | 0.0300 |
| R3-79  | 3.0070 | 3.0510 | 3.0490 | 3.0620 | 3.1290 | 0.0280 |
| R3-80  | 3.0410 | 3.0570 | 3.0630 | 2.9360 | 3.1410 | 0.0230 |
| R3-81  | 3.0990 | 3.1640 | 3.1200 | 3.0440 | 3.1530 | 0.0410 |
| R3-82  | 3.0570 | 3.1510 | 3.1250 | 2.6310 | 3.1620 | 0.0270 |
| R3-83  | 3.1000 | 3.1090 | 3.1050 | 2.9730 | 3.1160 | 0.0570 |
| R3-84  | 3.0610 | 3.1290 | 3.0800 | 2.9890 | 3.1080 | 0.0930 |
| R3-85  | 3.0390 | 3.1480 | 3.0880 | 2.9480 | 3.0770 | 0.0270 |
| R3-86  | 2.8250 | 3.0800 | 3.0730 | 0.1340 | 3.0630 | 0.0540 |
| R3-87  | 3.0220 | 3.1040 | 3.0650 | 1.6500 | 3.0650 | 0.0210 |
| R3-88  | 3.0200 | 3.1380 | 3.0920 | 1.8170 | 3.0970 | 0.0430 |
| R3-89  | 2.9340 | 3.1590 | 3.1150 | 1.3950 | 3.1080 | 0.0170 |
| R3-90  | 3.0200 | 3.1280 | 3.1080 | 2.9950 | 3.1010 | 0.0240 |
| R3-91  | 3.0580 | 3.1570 | 3.0490 | 2.9740 | 3.1160 | 0.0280 |
| R3-92  | 3.0360 | 3.0980 | 3.0980 | 2.9290 | 3.0950 | 0.0280 |
| R3-93  | 3.0100 | 3.1110 | 3.0990 | 1.8240 | 3.0700 | 0.0470 |
| R3-94  | 3.0280 | 3.0970 | 3.0310 | 3.0530 | 3.0950 | 0.0400 |
| R3-95  | 3.0360 | 3.1210 | 3.1000 | 2.9770 | 3.0560 | 0.0230 |
| R3-96  | 3.0810 | 3.1460 | 3.0000 | 3.0610 | 3.1210 | 0.0250 |

[0199]

[表6-5]

表6-5

|                           | IgG  | IgG1 | IgG2 | IgG3 | IgG4 | IgA |
|---------------------------|------|------|------|------|------|-----|
| ポジティブクローン数                | 94   | 95   | 95   | 92   | 94   | 4   |
| ネガティブクローン数                | 2    | 1    | 1    | 4    | 2    | 92  |
| 全96クローン中のポジティブクローン数の割合(%) | 97.9 | 99   | 99   | 95.8 | 97.9 | 4.2 |
| OD $\geq$ 2.5             | 90   | 92   | 91   | 74   | 90   | 2   |
| 1 $\leq$ OD<2.5           | 3    | 1    | 2    | 15   | 3    | 0   |
| 0.1 $\leq$ OD<1           | 1    | 2    | 2    | 3    | 1    | 2   |

[0200] 以上の結果から以下のことが分かった。

ヒト血清由来 I g G ポリクローナル抗体固定化 M L V s を用いることで、ヒト血清由来 I g G ポリクローナル抗体に極めて特異的に結合するファージを効率的に回収することができた。ここで、1 ラウンドのパニングで、全クローン数中のポジティブクローン数の割合が 5 0 % を越える結果は、従来技術では困難であり、極めて稀なものである。また、ラウンドを重ねるごとにポジティブクローン数が顕著に増加し、結合量も顕著に増加していることから、多重膜リポソームを用いた本発明にかかるスクリーニング方法は、非常に高効率なスクリーニング技術であるといえる。

[0201] また、単離されたウサギ由来単鎖抗体の多くが、ヒト I g G 1 抗体、ヒト I g G 2 抗体、ヒト I g G 3 抗体、及びヒト I g G 4 抗体から成る群から選択される二以上に結合特異性を有していた。特に、ヒト I g G 1 抗体とヒト I g G 3 抗体の両者への結合量が同じウサギ由来単鎖抗体については、従来用いられているプロテイン A に代わるアフィニティリガンドとなる可能性が高いと考えられる。

[0202] さらに、数は少ないものの、ヒト I g G 1 抗体、ヒト I g G 2 抗体、ヒト I g G 3 抗体、及びヒト I g G 4 抗体に加え、ヒト I g A 抗体にも同程度の吸光度を示すものもあった。これは、抗体の L 鎖に特異性に結合することを示唆しているものと考えられる。

[0203] <4. 解離速度定数  $k_{off}$  の測定>

[実施例 4]

ラウンド 1 終了時に得られた 48 コロニー、ラウンド 2 終了時に得られた 48 コロニー、及びラウンド 3 終了時に得られた 96 コロニーのうち、抗原結合活性評価 2 で吸光度が 2.5 を超えたコロニーのそれぞれについて、Biacore X-100 (GEヘルスケア社)を用いて解離速度定数  $k_{off}$  の測定を行った。

[0204] (サンプルの調製)

ファージミド含有大腸菌のコロニーを、96 ウェルディープウェルプレート内で、1 ml の Overnight Express (登録商標、メルク) 培地中に植菌し、30℃、1600 rpm で 24 時間培養後、遠心分離で上清を除去した。これに、0.2 ml の Bugbuster、及び 0.2  $\mu$ L の Benzonase Nuclease を加えて溶菌後、遠心分離し、上清を回収した。回収した上清を PBST で 10 倍希釈した。

[0205] (測定方法)

以下の測定条件で測定を行った。

Sensor Chip: human IgG-coupled CM5 (15000 RU)

Running buffer: PBST

Binding time: 300 sec

Dissociation time: 180 sec

Elution: 10mM Glycine, pH 1.5

[0206] 既出の解離速度定数  $k_{off}$  の算出方法に従って、解離速度定数  $k_{off}$  を算出し、その大きい順に 1 位から 140 位までランキングしたものを表 7-1 ~ 表 7-5 に示した。

[0207]

[表7-1]

表7-1

| 順位 | クローン番号 | koff (s <sup>-1</sup> ) | IgG1   | IgG3   | IgA    |
|----|--------|-------------------------|--------|--------|--------|
| 1  | R3-75  | 2.78E-04                | 3.0500 | 3.1240 | 3.0610 |
| 2  | R3-23  | 4.08E-04                | 3.0550 | 3.0220 | 0.0440 |
| 3  | R3-26  | 5.71E-04                | 3.1000 | 3.1440 | 0.0370 |
| 4  | R3-43  | 6.41E-04                | 3.1390 | 3.0700 | 0.0190 |
| 5  | R3-58  | 7.42E-04                | 3.1360 | 3.1140 | 0.0300 |
| 6  | R2-18  | 8.00E-04                | 3.1140 | 3.0750 | 3.1080 |
| 7  | R2-16  | 8.38E-04                | 3.1150 | 3.0470 | 0.0260 |
| 8  | R1-27  | 8.59E-04                | 3.0730 | 3.0820 | 0.0290 |
| 9  | R3-42  | 8.62E-04                | 3.1300 | 3.1020 | 0.0200 |
| 10 | R3-44  | 8.74E-04                | 3.0620 | 3.1210 | 0.0220 |
| 11 | R3-8   | 8.80E-04                | 3.0280 | 3.0600 | 3.0630 |
| 12 | R3-24  | 8.80E-04                | 3.0780 | 3.0220 | 0.0680 |
| 13 | R3-2   | 8.97E-04                | 3.1090 | 3.1140 | 0.0590 |
| 14 | R3-74  | 9.32E-04                | 3.0470 | 3.0800 | 0.0250 |
| 15 | R3-25  | 9.40E-04                | 3.1460 | 3.1750 | 0.0320 |
| 16 | R3-33  | 9.42E-04                | 3.1370 | 3.1270 | 0.0260 |
| 17 | R3-31  | 9.55E-04                | 3.0660 | 3.0780 | 0.0370 |
| 18 | R3-28  | 9.60E-04                | 3.1290 | 3.0720 | 0.0220 |
| 19 | R3-41  | 9.71E-04                | 3.0970 | 3.1280 | 0.0270 |
| 20 | R3-52  | 9.73E-04                | 2.9840 | 3.1580 | 0.0220 |
| 21 | R3-54  | 1.00E-03                | 3.0520 | 3.0980 | 0.0280 |
| 22 | R3-62  | 1.05E-03                | 3.0910 | 3.0700 | 0.0320 |
| 23 | R3-78  | 1.07E-03                | 3.0580 | 2.8450 | 0.0300 |
| 24 | R3-59  | 1.08E-03                | 3.1590 | 2.9270 | 0.0180 |
| 25 | R3-5   | 1.11E-03                | 3.0340 | 3.0120 | 0.0280 |
| 26 | R3-92  | 1.11E-03                | 3.0980 | 2.9290 | 0.0280 |
| 27 | R3-56  | 1.12E-03                | 3.0440 | 3.1430 | 0.0540 |
| 28 | R3-61  | 1.13E-03                | 3.0780 | 3.0230 | 0.0320 |
| 29 | R3-77  | 1.13E-03                | 3.0540 | 3.0740 | 0.0280 |
| 30 | R3-6   | 1.21E-03                | 3.0610 | 3.0430 | 0.0380 |

[0208] [表7-2]

表7-2

| 順位 | クローン番号 | koff (s <sup>-1</sup> ) | IgG1   | IgG3   | IgA    |
|----|--------|-------------------------|--------|--------|--------|
| 31 | R3-68  | 1.22E-03                | 3.0780 | 3.0960 | 0.0760 |
| 32 | R3-64  | 1.24E-03                | 3.1320 | 2.8780 | 0.0220 |
| 33 | R2-3   | 1.25E-03                | 2.5150 | 2.5170 | 0.0100 |
| 34 | R3-3   | 1.27E-03                | 2.9510 | 2.9560 | 0.0340 |
| 35 | R3-7   | 1.32E-03                | 2.9180 | 3.0640 | 0.0550 |
| 36 | R3-85  | 1.34E-03                | 3.1480 | 2.9480 | 0.0270 |
| 37 | R3-32  | 1.34E-03                | 2.9880 | 3.1500 | 0.0380 |
| 38 | R3-39  | 1.36E-03                | 3.0750 | 2.9760 | 0.0190 |
| 39 | R3-34  | 1.39E-03                | 3.1190 | 2.9870 | 0.0200 |
| 40 | R2-32  | 1.39E-03                | 3.0850 | 3.1180 | 0.0470 |
| 41 | R3-95  | 1.40E-03                | 3.1210 | 2.9770 | 0.0230 |
| 42 | R3-21  | 1.41E-03                | 3.0760 | 2.6270 | 0.0970 |
| 43 | R2-1   | 1.42E-03                | 3.1060 | 2.9480 | 0.0250 |
| 44 | R3-73  | 1.42E-03                | 3.1000 | 3.1200 | 0.1650 |
| 45 | R3-46  | 1.48E-03                | 3.1220 | 3.0390 | 0.0170 |
| 46 | R2-24  | 1.49E-03                | 3.1600 | 3.1080 | 0.0380 |
| 47 | R3-90  | 1.51E-03                | 3.1280 | 2.9950 | 0.0240 |
| 48 | R3-91  | 1.52E-03                | 3.1570 | 2.9740 | 0.0280 |
| 49 | R3-60  | 1.52E-03                | 3.1390 | 2.9530 | 0.0350 |
| 50 | R3-80  | 1.53E-03                | 3.0570 | 2.9360 | 0.0230 |
| 51 | R3-82  | 1.54E-03                | 3.1510 | 2.6310 | 0.0270 |
| 52 | R2-25  | 1.57E-03                | 3.1110 | 2.5610 | 0.0270 |
| 53 | R3-84  | 1.57E-03                | 3.1290 | 2.9890 | 0.0930 |
| 54 | R1-43  | 1.60E-03                | 3.0910 | 2.9530 | 0.0200 |
| 55 | R3-63  | 1.62E-03                | 3.0620 | 2.9870 | 0.0240 |
| 56 | R3-51  | 1.63E-03                | 3.0480 | 3.0520 | 0.0150 |
| 57 | R2-31  | 1.64E-03                | 3.1040 | 2.5360 | 0.0220 |
| 58 | R3-27  | 1.64E-03                | 3.1090 | 3.0890 | 0.0220 |
| 59 | R3-55  | 1.65E-03                | 3.0110 | 3.0960 | 0.0150 |
| 60 | R1-5   | 1.66E-03                | 3.1910 | 3.0870 | 0.0230 |

[0209] [表7-3]

表7-3

| 順位 | クローン番号 | koff (s <sup>-1</sup> ) | IgG1   | IgG3   | IgA    |
|----|--------|-------------------------|--------|--------|--------|
| 61 | R3-49  | 1.67E-03                | 3.0680 | 3.1260 | 0.0330 |
| 62 | R3-83  | 1.68E-03                | 3.1090 | 2.9730 | 0.0570 |
| 63 | R3-45  | 1.69E-03                | 3.0920 | 2.9400 | 0.0160 |
| 64 | R3-14  | 1.71E-03                | 3.0880 | 2.9640 | 0.0280 |
| 65 | R3-65  | 1.73E-03                | 3.0710 | 3.1120 | 0.0270 |
| 66 | R3-36  | 1.73E-03                | 3.1110 | 2.9920 | 0.0180 |
| 67 | R3-94  | 1.74E-03                | 3.0970 | 3.0530 | 0.0400 |
| 68 | R1-7   | 1.75E-03                | 3.1240 | 0.0660 | 0.0360 |
| 69 | R3-9   | 1.76E-03                | 3.0960 | 2.8800 | 0.0420 |
| 70 | R2-22  | 1.86E-03                | 3.1160 | 0.0400 | 0.0250 |
| 71 | R3-67  | 1.86E-03                | 3.0990 | 2.6830 | 0.0780 |
| 72 | R3-96  | 1.86E-03                | 3.1460 | 3.0610 | 0.0250 |
| 73 | R2-33  | 1.86E-03                | 3.1310 | 2.8100 | 0.0240 |
| 74 | R1-36  | 1.87E-03                | 3.0660 | 0.5400 | 0.0170 |
| 75 | R3-70  | 1.87E-03                | 3.0990 | 3.0040 | 0.0300 |
| 76 | R3-53  | 1.88E-03                | 3.0300 | 3.1260 | 0.0580 |
| 77 | R3-81  | 1.93E-03                | 3.1640 | 3.0440 | 0.0410 |
| 78 | R3-17  | 1.94E-03                | 3.1580 | 3.0340 | 0.0650 |
| 79 | R3-71  | 1.94E-03                | 3.0930 | 3.0600 | 0.0170 |
| 80 | R3-57  | 1.95E-03                | 3.1320 | 3.0730 | 0.1160 |
| 81 | R3-30  | 1.97E-03                | 3.0940 | 3.1070 | 0.0300 |
| 82 | R2-14  | 2.04E-03                | 2.9970 | 0.5070 | 0.0220 |
| 83 | R2-26  | 2.05E-03                | 3.0630 | 1.2730 | 0.0180 |
| 84 | R3-79  | 2.06E-03                | 3.0510 | 3.0620 | 0.0280 |
| 85 | R1-29  | 2.08E-03                | 3.0530 | 2.2800 | 0.0530 |
| 86 | R2-15  | 2.09E-03                | 3.1040 | 2.9740 | 0.0200 |
| 87 | R3-19  | 2.10E-03                | 3.0910 | 3.0340 | 0.0230 |
| 88 | R2-10  | 2.11E-03                | 3.1010 | 2.8040 | 0.0210 |
| 89 | R1-42  | 2.11E-03                | 3.1050 | 2.5150 | 0.0170 |
| 90 | R3-11  | 2.18E-03                | 3.0690 | 3.0400 | 0.0280 |

[0210] [表7-4]

表7-4

| 順位  | クローン番号 | koff (s <sup>-1</sup> ) | IgG1   | IgG3   | IgA    |
|-----|--------|-------------------------|--------|--------|--------|
| 91  | R1-38  | 2.22E-03                | 3.0930 | 2.9980 | 0.0210 |
| 92  | R2-8   | 2.22E-03                | 3.1140 | 2.0550 | 0.0190 |
| 93  | R1-39  | 2.22E-03                | 2.9170 | 0.2600 | 0.0170 |
| 94  | R2-27  | 2.28E-03                | 3.0220 | 2.4760 | 0.1570 |
| 95  | R2-30  | 2.31E-03                | 3.0180 | 3.0400 | 0.0210 |
| 96  | R2-5   | 2.33E-03                | 2.9640 | 0.1920 | 0.0130 |
| 97  | R1-25  | 2.33E-03                | 3.1200 | 0.7990 | 0.0310 |
| 98  | R2-23  | 2.36E-03                | 2.8150 | 0.5180 | 0.0220 |
| 99  | R2-34  | 2.36E-03                | 3.1600 | 1.8090 | 0.0360 |
| 100 | R3-10  | 2.38E-03                | 3.1050 | 2.7160 | 0.0310 |
| 101 | R3-66  | 2.42E-03                | 3.1340 | 3.0090 | 0.0230 |
| 102 | R1-47  | 2.44E-03                | 3.1160 | 2.8050 | 0.0190 |
| 103 | R3-72  | 2.44E-03                | 3.0880 | 3.0740 | 0.0340 |
| 104 | R2-9   | 2.44E-03                | 3.1330 | 3.0210 | 0.0200 |
| 105 | R1-13  | 2.47E-03                | 3.1020 | 2.9500 | 0.0200 |
| 106 | R1-23  | 2.48E-03                | 3.0390 | 0.8750 | 0.0170 |
| 107 | R1-41  | 2.48E-03                | 3.1450 | 2.1250 | 0.3290 |
| 108 | R2-35  | 2.48E-03                | 3.0810 | 2.9710 | 0.0200 |
| 109 | R3-35  | 2.53E-03                | 3.1400 | 3.0850 | 0.0280 |
| 110 | R1-6   | 2.53E-03                | 3.1740 | 2.8820 | 0.0780 |
| 111 | R2-17  | 2.55E-03                | 3.1850 | 0.4590 | 0.0350 |
| 112 | R3-69  | 2.59E-03                | 3.0640 | 3.0720 | 0.0360 |
| 113 | R1-35  | 2.60E-03                | 3.1030 | 0.7110 | 0.0310 |
| 114 | R2-37  | 2.60E-03                | 3.0820 | 2.3490 | 0.0170 |
| 115 | R1-9   | 2.65E-03                | 3.1220 | 2.2560 | 0.0200 |
| 116 | R2-19  | 2.67E-03                | 2.7350 | 1.8010 | 0.0210 |
| 117 | R1-24  | 2.68E-03                | 3.0480 | 0.0530 | 0.0270 |
| 118 | R2-2   | 2.82E-03                | 3.0650 | 2.9030 | 0.0370 |
| 119 | R1-3   | 2.85E-03                | 3.1470 | 2.2850 | 0.0410 |
| 120 | R1-20  | 2.86E-03                | 2.8940 | 1.0570 | 0.0190 |

[0211] [表7-5]

表7-5

| 順位  | クローン番号 | koff (s <sup>-1</sup> ) | IgG1   | IgG3   | IgA    |
|-----|--------|-------------------------|--------|--------|--------|
| 121 | R2-11  | 2.96E-03                | 2.7430 | 0.0210 | 0.0180 |
| 122 | R2-45  | 3.09E-03                | 3.1430 | 2.8320 | 0.0180 |
| 123 | R2-48  | 3.14E-03                | 3.1430 | 3.1320 | 0.0260 |
| 124 | R1-34  | 3.27E-03                | 3.1380 | 0.6290 | 0.0250 |
| 125 | R1-48  | 3.45E-03                | 3.1370 | 2.9600 | 0.0290 |
| 126 | R1-45  | 3.47E-03                | 3.0720 | 2.5140 | 0.0130 |
| 127 | R1-26  | 3.63E-03                | 3.0350 | 3.0000 | 0.0200 |
| 128 | R1-14  | 3.66E-03                | 3.1160 | 3.0010 | 0.0220 |
| 129 | R2-42  | 3.87E-03                | 3.1680 | 1.7200 | 0.0210 |
| 130 | R1-10  | 4.00E-03                | 2.8020 | 1.2220 | 0.0360 |
| 131 | R2-44  | 4.06E-03                | 3.1840 | 1.0250 | 0.0830 |
| 132 | R2-47  | 4.11E-03                | 3.1440 | 3.0400 | 0.0420 |
| 133 | R1-11  | 4.38E-03                | 3.1100 | 2.9800 | 0.0480 |
| 134 | R2-40  | 4.88E-03                | 3.1540 | 2.6190 | 0.0200 |
| 135 | R2-46  | 6.78E-03                | 3.1590 | 1.2460 | 0.0180 |
| 136 | R2-41  | 6.94E-03                | 3.1320 | 2.7460 | 0.0300 |
| 137 | R2-43  | 6.95E-03                | 3.1190 | 1.7940 | 0.0200 |
| 138 | R2-38  | 9.89E-03                | 3.0670 | 2.6320 | 0.0180 |
| 139 | R2-20  | 測定不能                    | 2.8910 | 0.0680 | 0.0190 |
| 140 | R2-36  | 測定不能                    | 3.0860 | 3.0690 | 0.0310 |

[0212] <5. ヒト血清由来 IgG ポリクローナル抗体に結合するウサギ由来単鎖抗体遺伝子のアミノ酸配列の決定>

[実施例5]

解離速度定数  $k_{off}$  の測定の結果で、1位 (R3-75)、2位 (R3-23)、3位 (R3-26)、4位 (R3-43)、5位 (R3-58)、6位 (R2-18)、7位 (R2-16)、8位 (R1-27)、11位 (R3-8)、68位 (R1-7) について、ウサギ由来単鎖抗体遺伝子の遺伝

子配列からアミノ酸配列を決定した。なお、4位(R3-43)はシーケンスできなかった。

[0213] 図8-1、図8-2に、決定したアミノ酸配列を示す。以下のことが分かった。なお、図8-1に示す重鎖(H鎖)の可変領域(V<sub>H</sub>ドメイン)の遺伝子について、1位(R3-75)の配列を配列番号12と、2位(R3-23)の配列を配列番号13と、3位(R3-26)の配列を配列番号14と、5位(R3-58)の配列を配列番号15と、6位(R2-18)の配列を配列番号16と、7位(R2-16)の配列を配列番号17と、8位(R1-27)の配列を配列番号18と、11位(R3-8)の配列を配列番号19と、68位(R1-7)の配列を配列番号20とする。

[0214] また、図8-2に示す重鎖(L鎖)の可変領域(V<sub>L</sub>ドメイン)の遺伝子について、1位(R3-75)の配列を配列番号21と、2位(R3-23)の配列を配列番号22と、3位(R3-26)の配列を配列番号23と、5位(R3-58)の配列を配列番号24と、6位(R2-18)の配列を配列番号25と、7位(R2-16)の配列を配列番号26と、8位(R1-27)の配列を配列番号27と、11位(R3-8)の配列を配列番号28と、68位(R1-7)の配列を配列番号29とする。

[0215] 1位(R3-75)、6位(R2-18)、11位(R3-8)から得られたウサギ由来単鎖抗体遺伝子は、CDR3として、「ATRYDSYGYAYNYWFGTLW(配列番号30、19残基)」を有することが分かった。尚、これらのコロニーから取得されたウサギ由来単鎖抗体は、ヒトIgG1抗体、ヒトIgG2抗体、ヒトIgG3抗体、ヒトIgG4抗体、及びヒトIgA抗体に結合するものである。

[0216] 2位(R3-23)から得られたウサギ由来単鎖抗体遺伝子は、CDR3として、「GSYYDSHGYYAYVSLW(配列番号31、15残基)」を有することが分かった。尚、このコロニーから取得されたウサギ由来単鎖抗体は、ヒトIgG1抗体、ヒトIgG2抗体、ヒトIgG3抗体、及びヒトIgG4抗体に結合するものである。

[0217] 3位(R3-26)から得られたウサギ由来単鎖抗体遺伝子は、CDR3として、「ATDYGYGYAYGHLW(配列番号32、15残基)」であることが分かった。尚、このコロニーから取得されたウサギ由来単鎖抗体は、ヒトIgG1抗体、ヒトIgG2抗体、ヒトIgG3抗体、及びヒトIgG4抗体に結合するものである。

[0218] 5位(R3-58)、8位(R1-27)から得られたウサギ由来単鎖抗体遺伝子は、CDR3として、「ARYSGDNGGTNLNW(配列番号33、14残基)」を有することが分かった。尚、このコロニーから取得されたウサギ由来単鎖抗体は、ヒトIgG1抗体、ヒトIgG2抗体、ヒトIgG3抗体、及びヒトIgG4抗体に結合するものである。

[0219] 7位(R2-16)から得られたウサギ由来単鎖抗体遺伝子は、CDR3として、「ARYSGDNGGALNLNW(配列番号34、14残基)」を有することが分かった。尚、このコロニーから取得されたウサギ由来単鎖抗体は、ヒトIgG1抗体、ヒトIgG2抗体、ヒトIgG3抗体、及びヒトIgG4抗体に結合するものである。

[0220] <6. ヒトIgG1抗体との結合能の測定>

[実施例6]

解離速度定数 $k_{off}$ の測定の結果で、1位(R3-75)、2位(R3-23)、6位(R2-18)、7位(R2-16)、8位(R1-27)、68位(R1-7)となった各コロニーから取得されたウサギ由来単鎖抗体について、Biacore X-100(GEヘルスケア社)を用いて、ヒトIgG1抗体との結合性を測定した。

[0221] (サンプルの調製方法)

得られたファージミド含有大腸菌のコロニーを、500mlバッフル付フラスコ内で、50mlのOvernight Express(登録商標、メルク)培地中に植菌し、30℃、200rpmで24時間培養後、遠心分離で上清を除去した。これに、5mlのBugbuster、及び0.2μLのBenzonase Nucleaseを加えて溶菌後、遠心分離し、上清を回収した。これをPBSTで10倍希釈し、

測定に用いた。

[0222] (測定方法)

以下の測定条件で測定を行った。

Sensor Chip: human IgG1-coupled CM5 (5000 RU)

Running buffer: PBST

Binding time: 540 sec

Dissociation time: 120 sec

Elution: 10mM Glycine, pH 1.5

[0223] [比較例 6-1]

サンプルの代わりに、PBSTで最終濃度  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  に調製したプロテイン A (ナカライテスク、29435-14) を用いたこと以外は実施例 6 と同様にしたものを比較例 6-1 とした。

[0224] [比較例 6-2]

サンプルの代わりに、mouse scFv-FM (可溶性画分をPBSTで10倍希釈) を用いたこと以外は実施例 6 と同様にしたものを比較例 6-2 とした。

得られたファージミド含有大腸菌のコロニーを、500 mL バッフル付フラスコ内で、50 mL の 0vernight Express (登録商標、メルク) 培地中に植菌し、 $30^{\circ}\text{C}$ 、200 rpm で 24 時間培養後、遠心分離で上清を除去した。これに、5 mL の Bugbuster、及び 0.2  $\mu\text{L}$  の Benzonase Nuclease を加えて溶菌後、遠心分離し、上清を回収した。これを PBST で 10 倍希釈し、測定に用いた。

[0225] 図 9-1、図 9-2 に測定結果を示した。ヒト IgG1 抗体に対する結合能は、いずれのウサギ由来単鎖抗体も、比較例 6-1 のプロテイン A、比較例 6-2 の mouse scFv-FM に比べて顕著に大きいことが分かった。

[0226] <7. ヒト IgG1 抗体に対する解離定数  $K_D$  の測定>

[実施例 7]

解離速度定数  $k_{off}$  の測定の結果で、1 位 (R3-75)、2 位 (R3-23)、3 位 (R3-26)、6 位 (R2-18)、7 位 (R2-16)、8

位 (R 1 - 2 7)、6 8 位 (R 1 - 7) となったコロニーから取得されたウサギ由来単鎖抗体について、B i a c o r e X - 1 0 0 (G Eヘルスケア社) を用いて、ヒト I g G 1 抗体に対する解離定数  $K_D$  の測定を行った。

[0227] (サンプルの調製方法)

ファージミドベクターより T7 promoter primer および M13 primer を用いてウサギ由来単鎖抗体遺伝子を含む DNA 断片を PCR によって増幅した。DNA 断片を精製後、制限酵素 X b a I および N o t I で消化し、pET22ベクター (メルク) の X b a I / N o t I サイトに挿入した。構築したウサギ由来単鎖抗体発現ベクターは、N末端側にペリプラズム移行シグナル配列 (pelB leader signal)、C末端側にヒスチジントグ (6 x His-tag) を融合された形で発現される。発現後、ウサギ由来単鎖抗体はペリプラズムに移行し、pelB leader配列はシグナルペプチダーゼによって切断される。

[0228] 構築したウサギ由来単鎖抗体-H i s 発現ベクターで大腸菌 Rosetta (DE3) を形質転換し、LBアガープレート (5 0 m g / L アンピシリン、3 5 m g / L カナマイシン含有) 上で培養した。得られたシングルコロニーを LB 培地 1 0 m l (5 0 m g / L アンピシリン、3 5 m g / L カナマイシン含有) 中で一晩培養した。得られた培養液を 50ml Overnight Express TB培地 (メルク) 中に植菌し、3 7 °C、2 0 0 r p m で 2 4 時間培養した。

得られた培養液を遠心分離 (1 0 0 0 0 r p m、4 °C、1 5 分) し、培養上清を得た。また、菌体は、Bugbuster、リゾチーム、Benzonase Nuclease を含む 5 m l の溶解バッファと懸濁し、3 7 °C で 1 時間インキュベートすることで破碎した。1 0 0 0 0 r p m、4 °C、1 5 分間遠心分離し、上清を菌体内可溶性画分として回収した。

[0229] 上述の培養上清および菌体内可溶性画分をそれぞれ His-Trap HPカラム (GE Healthcare) にアプライし、0. 4 M イミダゾールを用いたグラジエント溶出によってウサギ由来単鎖抗体-H i s を回収した。また、溶離液のタンパク質濃度を DC Protein assay (Biorad) によって定量した。さらに、溶離液中のウサギ由来単鎖抗体-H i s の純度を SDS-PAGE によって確認し

た。溶離液中のウサギ由来単鎖抗体-Hisの純度が悪い場合は、溶離液をヒトIgG結合カラムでさらに精製し、定量した。回収した溶離液をPBSTで10倍以上希釈し、BiacoreX-100で解離定数 $K_D$ を測定した。

[0230] (測定方法)

以下の測定条件で測定を行った。

Sensor Chip: human IgG1-coupled CM5 (5000 RU)

Running buffer: PBST

Binding time: 180 sec

Dissociation time: 600 sec

Elution: 10mM Glycine, pH 1.5

Mode: Single cycle kinetics mode

[0231] 表8に、解離定数 $K_D$ の測定結果を含め、取得されたウサギ由来単鎖抗体の特性をまとめた。1位(R3-75)のウサギ由来単鎖抗体のヒトIgG1抗体に対する解離定数 $K_D$ は $5.5 \times 10^{-10} M$ であることが分かった。一般的なプロテインAのヒトIgG1抗体に対する解離定数 $K_D$ は5-10nM程度であることを考慮すると、1位(R3-75)のウサギ由来単鎖抗体は、ヒトIgG1抗体に対して非常に強固に結合するものと考えられる。

[0232] なお、表8のLocationにおいては、培養上清のサンプルを用いて活性が確認されたものを「上清」と、可溶性画分のサンプルを用いて活性が確認されたものを「ペリプラズム」と記載した。「上清」の場合には、大腸菌からファージまたはウサギ由来単鎖抗体が分泌されたことを示しており、「ペリプラズム」の場合には、大腸菌のペリプラズム内に存在していたことを示している。

[0233]

[表8]

表8

| 順位 | クローン番号 | $k_{on} (M^{-1}s^{-1})$ | $k_{off} (s^{-1})$   | $K_D (M)$             | $R_{max} (RU)$ | Location |
|----|--------|-------------------------|----------------------|-----------------------|----------------|----------|
| 1  | R3-75  | $6.7 \times 10^4$       | $3.7 \times 10^{-5}$ | $5.5 \times 10^{-10}$ | 342.2          | 上清       |
| 2  | R3-23  | $1.1 \times 10^4$       | $1.3 \times 10^{-4}$ | $1.1 \times 10^{-8}$  | 364.1          | ペリプラズム   |
| 3  | R3-26  | $2.1 \times 10^4$       | $4.3 \times 10^{-5}$ | $2.1 \times 10^{-9}$  | 329.4          | 上清       |
| 6  | R2-18  | $2.5 \times 10^4$       | $1.2 \times 10^{-4}$ | $4.8 \times 10^{-9}$  | 364.1          | 上清       |
| 7  | R2-16  | $1.3 \times 10^5$       | $3.2 \times 10^{-4}$ | $2.5 \times 10^{-9}$  | 241.8          | ペリプラズム   |
| 8  | R1-27  | $9.9 \times 10^3$       | $4.0 \times 10^{-4}$ | $4.0 \times 10^{-8}$  | 530.6          | ペリプラズム   |
| 68 | R1-07  | $7.1 \times 10^4$       | $1.7 \times 10^{-3}$ | $2.4 \times 10^{-8}$  | 79.9           | ペリプラズム   |

[0234] 1位(R3-75)、3位(R3-26)、および6位(R2-18)のウサギ由来単鎖抗体は、培養上清中に分泌されたことが分かった。

[0235] <8. ヒト血清由来IgGポリクローナル抗体の分離剤>

[実施例8]

(単鎖抗体の調製)

Jar Fermenterを用いた流加培養により、「R3-26」の単鎖抗体を大量生産した。さらに、培養上清中に分泌された単鎖抗体をHisTrap HPカラム(GEヘルスケア)を利用した固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー(IMAC)によって精製した。さらに、脱塩・バッファ交換用Hi Trap Desaltingカラム(GEヘルスケア)を用いて0.5M NaClを含む0.1M炭酸バッファ(pH8.3)に置換、さらには、限外ろ過を用いて濃縮した。最終的に、濃度1mg/ml、体積10mlの単鎖抗体を得た。

[0236] (担体への単鎖抗体の固定化)

HiTrap NHSカラム5ml(GEヘルスケア)の担体であるセファロース(ビーズ状のアガロース担体)のカルボキシル基をNHSでエステル化し、精製した上記単鎖抗体を供給して、そのアミノ基とアミド結合を形成させて固定化した。未反応のNHSエステルはエタノールアミンを加えてブロックした。

[0237] (ヒト血清由来IgGポリクローナル抗体の分離)

単鎖抗体を固定した上記カラム5mlをクロマトグラフィーシステムAKTA

Purifier UPC 10 (GEヘルスケア) にセットし、PBSで平衡化した。そこへ、1 mg/ml に調製したヒト血清由来 IgG ポリクローナル抗体 (Sigma、#14506) を 1 ml/min の流速で 10 ml 分供給した。その後、カラムを PBS で洗浄し、UV 280 の値がベースラインとなったのを確認後、0.5 M アルギニン (pH 1.5) を供給して、ヒト血清由来 IgG ポリクローナル抗体をカラムから溶出した。

[0238] その結果、図 10 に示す通りの破過曲線が得られた。さらに、0.5 M アルギニン (pH 1.5) を用いてヒト血清由来 IgG ポリクローナル抗体をカラムから強制的に解離させたところ、高純度で単離できた。素通り画分と溶出画分とのピーク面積比から、供給した IgG (10 mg) の内、およそ 53% (5.3 mg) がカラムに吸着し、溶出された。

以上の結果より、本発明のスクリーニング方法によって選択された単鎖抗体の、ヒト血清由来 IgG ポリクローナル抗体の分離剤としての利用可能性が示された。

[0239] <9. ヒト抗体の L 鎖に特異的に結合するウサギ由来単鎖抗体のスクリーニング方法>

先に検討したヒト血清由来 IgG ポリクローナル抗体固定化 MLVs を用いたパニングにおいて、ラウンド 1~3 で得られた合計 192 クローンの抗原特異性ならびにアミノ酸配列の評価を行った結果、3 クローン (R2-18、R3-8、R3-75) がヒト IgG 抗体のみならず、ヒト IgA 抗体にも強く結合していることが明らかとなった。

さらに、これらの単鎖抗体の抗原特異性をウェスタンブロットで解析した結果、これらは、ヒト抗体の軽鎖 (L 鎖)、具体的には  $\kappa$  鎖を特異的に認識していることが明らかとなった。ヒト IgG 抗体とヒト IgA 抗体の定常部のアミノ酸配列を比較した場合、重鎖 (H 鎖) のアミノ酸配列は全く異なるが、軽鎖 (L 鎖) のアミノ酸配列は  $\lambda$  鎖又は  $\kappa$  鎖に大別され、配列はそれぞれで共通である。このことは、ヒト IgM 抗体、ヒト IgE 抗体、ヒト IgD 抗体等でも同様である。したがって、これら 3 クローンは、ヒト IgG 抗

体、ヒト Ig A 抗体のみならず、ヒト Ig M 抗体、ヒト Ig E 抗体、ヒト Ig D 抗体等、全てのヒト抗体に対し、特異的に結合できる非常に付加価値の高い抗体であることが示唆された。

そこで、先に調製した、抗ヒト血清由来 Ig G ポリクローナル抗体ーウサギ由来単鎖抗体を提示するファージのライブラリ中から、このような、ヒト抗体の L 鎖に特異的に結合するウサギ由来単鎖抗体を高効率に回収するために、新たに以下のパニングを行うことにした。

[0240] 以下では、ヒト抗体の L 鎖に特異的に結合するウサギ由来単鎖抗体（以下、「抗ヒト抗体 L 鎖ーウサギ由来単鎖抗体」と称することがある。）を、ファージライブラリの中からスクリーニングする方法を記載する。

尚、抗ヒト抗体 L 鎖ーウサギ由来単鎖抗体のスクリーニング方法において取得されたクローンの名称として、例えば、「ラウンド 1 終了時のクローン番号 1」のクローンを「Ig A R 1-1」や「Ig A I-1」と略することがある。同様に、例えば、「ラウンド 2 終了時のクローン番号 1」のクローンを「Ig A R 2-1」や「Ig A I I-1」と、「ラウンド 3 終了時のクローン番号 1」のクローンを「Ig A R 3-1」や「Ig A I I I-1」と略することがある。

[0241] <9-1. 多重膜リボソームとヒト血清由来 Ig A ポリクローナル抗体との結合>

上記 1-1 と同様にして、ヒト血清由来 Ig A ポリクローナル抗体固定化 MLVs を調製した。ヒト血清由来 Ig A ポリクローナル抗体には、Sigma の #14036 を用いた。

[0242] <9-2. 抗ヒト血清由来 Ig G ポリクローナル抗体ーウサギ由来単鎖抗体を提示するファージのライブラリの調製>

上記 2-2 と同様にして、抗ヒト血清由来 Ig G ポリクローナル抗体ーウサギ由来単鎖抗体を提示するファージのライブラリを調製した。

[0243] <9-3. パニング>

[実施例 9-1]

上記 9-2 で調製したファージライブラリと、上記 9-1 で調製したヒト血清由来 IgA ポリクローナル抗体固定化 MLVs を用いて、上記 2-3 と同様にパニングを実施した。

[0244] [比較例 9-1]

ヒト血清由来 IgA ポリクローナル抗体を固定化しなかった多重膜リポソームを用いたこと以外は実施例 9-1 と同様にしたものを比較例 9-1 とした。

[0245] <9-4. ファージの回収から遺伝子配列のシーケンスまで>

上記 2-2 と同様にして、実施例 9-1、比較例 9-1 で回収したファージミド DNA から、抗ヒト血清由来 IgA ポリクローナル抗体ウサギ由来単鎖抗体の遺伝子の有無を確認した。

[0246] <9-5. パニングの結果>

図 11 に、実施例 9-1 及び比較例 9-1 におけるパニング前、ラウンド 1 終了時、ラウンド 2 終了時、ラウンド 3 終了時におけるファージ数を示した。

また、図 12 に、実施例 9-1 及び比較例 9-1 におけるラウンド 1 終了時、ラウンド 2 終了時、ラウンド 3 終了時における各ファージ数を、それぞれパニング前のファージ数で除した回収率 (%) を示した。

[0247] 上記結果より、実施例 9-1 では、ラウンド 3 において回収率が大幅に増加し、比較例 9-1 に比べて 100 倍以上になった。ヒト血清由来 IgA ポリクローナル抗体固定化 MLVs を用いたパニングにおいても、効率的なパニングが実施できていることが分かった。

[0248] <9-6. 抗原結合活性評価 1>

[実施例 9-2]

上記 3-1 と同様に、各ラウンドで回収されたファージミド含有大腸菌のペレット単位（すなわち、シングルコロニー化しておらず、ペレットに含まれる大腸菌が含むファージ全体）から得られたウサギ由来単鎖抗体について、以下のようにして抗原結合活性を評価した。ただし、プレートに固相化し

た抗原としてはヒトIgA抗体（Sigma、#14036）を用いたのみであり、抗原結合活性評価もヒトIgA抗体に対してしか行わなかった。すなわち、ヒトIgG1抗体等の固相化およびヒトIgG1抗体等に対する抗原結合活性評価は行わなかった。

[0249] 図13にその結果を示す。図13より、ラウンド2においてヒトIgA抗体に対する抗原結合活性が飛躍的に増加した。さらに、ラウンド3においては、ラウンド2よりもさらにヒトIgA抗体に対する抗原結合活性が高くなった。この結果より、ヒト血清由来IgAポリクローナル抗体固定化MLVsを担体としてパニングを行った場合でも、ヒトIgA抗体に対して特異的に結合するファージが濃縮されていることが分かった。

[0250] <9-7. 抗原結合活性評価2>

[実施例9-3]

各ラウンドで回収されたファージミド含有大腸菌のコロニーから得られたウサギ由来単鎖抗体について、3-2と同様にして抗原結合活性を評価した。尚、ここでは、プレートに固相化した抗原としてはヒトIgA抗体（Sigma、#14036）を用いただけでなく、3-2と同様にヒトIgG1抗体等も使い、ヒトIgG1抗体等に対する抗原結合活性評価も行った。

[0251] 図14、表9-1、表9-2に、ラウンド1終了時に得られた32コロニーから得られたウサギ由来単鎖抗体について行った抗原結合活性評価の結果を示す。また、OD値が0.1以上の場合をポジティブクローンと、それ未満をネガティブクローンとした。

[0252]

[表9-1]

表9-1

| クローン番号    | IgG1   | IgG2   | IgG3   | IgG4   | IgA    |
|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|
| IgA R1-1  | 0.0850 | 0.1040 | 0.2120 | 0.0440 | 0.0380 |
| IgA R1-2  | 0.0600 | 0.0760 | 0.0690 | 0.0280 | 0.0240 |
| IgA R1-3  | 0.0540 | 0.0560 | 0.0790 | 0.0270 | 0.0200 |
| IgA R1-4  | 0.2200 | 0.5880 | 1.5880 | 0.5000 | 0.2600 |
| IgA R1-5  | 0.0600 | 0.1100 | 0.6720 | 0.0970 | 0.0440 |
| IgA R1-6  | 0.0500 | 0.0650 | 0.0850 | 0.0330 | 0.0270 |
| IgA R1-7  | 0.0730 | 0.1150 | 0.9080 | 0.1290 | 0.0920 |
| IgA R1-8  | 0.2330 | 0.2670 | 0.6240 | 0.3280 | 0.2690 |
| IgA R1-9  | 0.1810 | 0.0760 | 0.1100 | 0.0300 | 0.0310 |
| IgA R1-10 | 0.0270 | 0.0820 | 0.2070 | 0.0440 | 0.0320 |
| IgA R1-11 | 0.0180 | 0.0570 | 0.0770 | 0.0250 | 0.0210 |
| IgA R1-12 | 0.0220 | 0.0750 | 0.1360 | 0.0350 | 0.0270 |
| IgA R1-13 | 0.0190 | 0.0590 | 0.1230 | 0.0340 | 0.0260 |
| IgA R1-14 | 0.0450 | 0.1510 | 0.9870 | 0.1680 | 0.1210 |
| IgA R1-15 | 0.0220 | 0.0800 | 0.0950 | 0.0350 | 0.0300 |
| IgA R1-16 | 0.0520 | 0.1140 | 0.2510 | 0.0670 | 0.0430 |
| IgA R1-17 | 0.0240 | 0.0710 | 0.3950 | 0.0580 | 0.0290 |
| IgA R1-18 | 0.3240 | 0.7110 | 1.8720 | 0.6230 | 0.3630 |
| IgA R1-19 | 0.4750 | 0.2010 | 1.3900 | 2.2470 | 0.6940 |
| IgA R1-20 | 0.0390 | 0.2960 | 0.2900 | 0.1420 | 0.1120 |
| IgA R1-21 | 0.0120 | 0.0560 | 0.0820 | 0.0210 | 0.0170 |
| IgA R1-22 | 0.0830 | 0.1650 | 1.6250 | 0.2780 | 0.1050 |
| IgA R1-23 | 0.0200 | 0.0570 | 0.1450 | 0.0310 | 0.0230 |
| IgA R1-24 | 0.0460 | 0.0600 | 0.0600 | 0.0190 | 0.0210 |
| IgA R1-25 | 0.0210 | 0.0850 | 0.3760 | 0.0490 | 0.0310 |
| IgA R1-26 | 0.0330 | 0.1190 | 0.3780 | 0.0790 | 0.0500 |
| IgA R1-27 | 0.0630 | 0.0810 | 0.6180 | 0.1260 | 0.0540 |
| IgA R1-28 | 0.0490 | 0.1350 | 0.6880 | 0.1000 | 0.0640 |
| IgA R1-29 | 0.0320 | 0.1310 | 0.8010 | 0.1050 | 0.0610 |
| IgA R1-30 | 0.0130 | 0.0640 | 0.1430 | 0.0280 | 0.0220 |
| IgA R1-31 | 0.1870 | 0.6220 | 1.8370 | 0.6150 | 0.2750 |
| IgA R1-32 | 1.2300 | 2.1850 | 2.7570 | 2.0930 | 2.5720 |

[0253] [表9-2]

表9-2

|                           | IgG1 | IgG2 | IgG3 | IgG4 | IgA  |
|---------------------------|------|------|------|------|------|
| ポジティブクローン数                | 7    | 16   | 25   | 13   | 9    |
| ネガティブクローン数                | 25   | 16   | 7    | 19   | 23   |
| 全32クローン中のポジティブクローン数の割合(%) | 21.9 | 50.0 | 78.1 | 40.6 | 28.1 |
| $OD \geq 2.5$             | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    |
| $1 \leq OD < 2.5$         | 1    | 1    | 5    | 2    | 0    |
| $0.1 \leq OD < 1$         | 6    | 15   | 19   | 11   | 8    |

[0254] 同様に、図15、表10-1、表10-2に、ラウンド2終了時に得られた32コロニーから得られたウサギ由来単鎖抗体について行った抗原結合活性評価の結果を示す。また、OD値が0.1以上の場合をポジティブクローンと、それ未満をネガティブクローンとした。

[0255]

[表10-1]

表10-1

| クローン番号    | IgG1   | IgG2   | IgG3   | IgG4   | IgA    |
|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|
| IgA R2-1  | 0.0140 | 0.0560 | 0.0710 | 0.0220 | 0.0200 |
| IgA R2-2  | 3.0900 | 3.0160 | 2.9940 | 2.9860 | 2.9130 |
| IgA R2-3  | 3.1110 | 2.9990 | 2.9910 | 2.9780 | 2.9280 |
| IgA R2-4  | 2.9270 | 2.9660 | 2.9890 | 2.9540 | 2.9070 |
| IgA R2-5  | 0.0100 | 0.0540 | 0.0760 | 0.0220 | 0.0180 |
| IgA R2-6  | 3.0640 | 2.9620 | 2.9640 | 2.9300 | 2.8760 |
| IgA R2-7  | 0.0090 | 0.0450 | 0.0270 | 0.0170 | 0.0180 |
| IgA R2-8  | 3.1390 | 3.0310 | 3.0200 | 3.0030 | 2.9220 |
| IgA R2-9  | 0.0330 | 0.0980 | 0.4670 | 0.0560 | 0.0450 |
| IgA R2-10 | 3.0600 | 3.0060 | 3.0150 | 2.9410 | 2.8700 |
| IgA R2-11 | 3.0650 | 2.9860 | 2.9960 | 2.9860 | 2.8940 |
| IgA R2-12 | 0.2040 | 0.4280 | 2.2810 | 0.5590 | 0.2790 |
| IgA R2-13 | 0.0430 | 0.1360 | 1.5570 | 0.1690 | 0.0660 |
| IgA R2-14 | 0.1150 | 0.3220 | 1.3980 | 0.2480 | 0.1490 |
| IgA R2-15 | 0.0380 | 0.1140 | 0.7580 | 0.1350 | 0.0550 |
| IgA R2-16 | 0.0720 | 0.1760 | 1.6820 | 0.1760 | 0.0630 |
| IgA R2-17 | 0.0690 | 0.1650 | 1.7400 | 0.2470 | 0.1160 |
| IgA R2-18 | 0.0120 | 0.0520 | 0.0850 | 0.0220 | 0.0210 |
| IgA R2-19 | 0.0250 | 0.0950 | 0.6030 | 0.0590 | 0.0380 |
| IgA R2-20 | 3.0290 | 3.0270 | 2.9720 | 2.9640 | 2.8480 |
| IgA R2-21 | 0.0080 | 0.0460 | 0.1020 | 0.0150 | 0.0170 |
| IgA R2-22 | 2.8440 | 3.0150 | 2.9650 | 2.9660 | 2.8580 |
| IgA R2-23 | 0.0320 | 0.1070 | 1.1400 | 0.0960 | 0.0410 |
| IgA R2-24 | 0.1180 | 0.5180 | 1.9500 | 0.3020 | 0.4330 |
| IgA R2-25 | 0.0810 | 0.2390 | 1.6760 | 0.4050 | 0.1340 |
| IgA R2-26 | 3.0840 | 2.9940 | 2.9820 | 3.0180 | 2.9360 |
| IgA R2-27 | 0.1000 | 0.4810 | 1.4420 | 0.3820 | 0.2800 |
| IgA R2-28 | 3.0400 | 2.9900 | 2.9300 | 2.9910 | 2.9560 |
| IgA R2-29 | 2.1590 | 2.8960 | 2.8920 | 1.0310 | 2.7930 |
| IgA R2-30 | 0.2730 | 0.6990 | 1.7850 | 0.6590 | 0.4920 |
| IgA R2-31 | 0.1900 | 2.4280 | 1.2270 | 1.4560 | 0.0990 |
| IgA R2-32 | 0.0620 | 0.1050 | 0.4250 | 0.0760 | 0.0650 |

[0256] [表10-2]

表10-2

|                           | IgG1 | IgG2 | IgG3 | IgG4 | IgA  |
|---------------------------|------|------|------|------|------|
| ポジティブクローン数                | 18   | 25   | 28   | 23   | 19   |
| ネガティブクローン数                | 14   | 7    | 4    | 9    | 13   |
| 全32クローン中のポジティブクローン数の割合(%) | 56.3 | 78.1 | 87.5 | 71.9 | 59.4 |
| $OD \geq 2.5$             | 11   | 12   | 12   | 11   | 12   |
| $1 \leq OD < 2.5$         | 1    | 1    | 11   | 2    | 0    |
| $0.1 \leq OD < 1$         | 6    | 12   | 5    | 10   | 7    |

[0257] 同様に、図16、表11-1、表11-2に、ラウンド3終了時に得られた32コロニーから得られたウサギ由来単鎖抗体について行った抗原結合活性評価の結果を示す。また、OD値が0.1以上の場合をポジティブクローンと、それ未満をネガティブクローンとした。

[0258]

[表11-1]

表11-1

| クローン番号    | IgG1   | IgG2   | IgG3   | IgG4   | IgA    |
|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|
| IgA R3-1  | 3.0930 | 3.0670 | 3.0240 | 3.0710 | 2.9960 |
| IgA R3-2  | 3.0790 | 3.0310 | 2.9910 | 3.0140 | 2.9740 |
| IgA R3-3  | 0.2860 | 2.7640 | 2.9480 | 2.9950 | 2.8860 |
| IgA R3-4  | 3.0610 | 3.0250 | 2.9770 | 3.0420 | 2.9520 |
| IgA R3-5  | 3.1030 | 3.0350 | 2.9900 | 3.0390 | 2.9580 |
| IgA R3-6  | 3.0930 | 3.0310 | 2.9770 | 3.0500 | 2.9540 |
| IgA R3-7  | 3.0870 | 3.0090 | 2.9810 | 3.0490 | 2.9950 |
| IgA R3-8  | 3.0920 | 3.0590 | 3.0440 | 3.0210 | 2.9840 |
| IgA R3-9  | 3.0780 | 3.0910 | 3.0370 | 3.0210 | 2.9860 |
| IgA R3-10 | 3.1220 | 3.0150 | 3.0140 | 3.0280 | 2.9690 |
| IgA R3-11 | 2.9950 | 3.0290 | 2.9600 | 3.0350 | 3.0260 |
| IgA R3-12 | 3.0610 | 3.0490 | 2.9380 | 3.0060 | 3.0120 |
| IgA R3-13 | 2.8620 | 2.9970 | 2.9940 | 3.0250 | 3.0410 |
| IgA R3-14 | 3.0680 | 3.0490 | 2.9530 | 3.0210 | 3.0010 |
| IgA R3-15 | 3.0920 | 3.0420 | 2.9610 | 3.0480 | 2.9550 |
| IgA R3-16 | 3.0900 | 3.0750 | 3.0210 | 3.0380 | 2.9770 |
| IgA R3-17 | 3.1130 | 3.0810 | 2.9750 | 3.1040 | 3.0100 |
| IgA R3-18 | 3.0910 | 3.0900 | 2.9910 | 3.0790 | 3.0340 |
| IgA R3-19 | 2.9280 | 3.0170 | 2.9810 | 3.0840 | 2.9920 |
| IgA R3-20 | 3.0290 | 3.0130 | 2.9810 | 3.0490 | 2.9650 |
| IgA R3-21 | 3.0950 | 3.0490 | 2.9920 | 3.0600 | 2.9960 |
| IgA R3-22 | 3.0400 | 3.0500 | 2.9610 | 3.1010 | 3.0010 |
| IgA R3-23 | 3.0360 | 3.0310 | 2.9540 | 3.0780 | 2.9660 |
| IgA R3-24 | 3.1110 | 3.0640 | 2.9940 | 3.0400 | 2.9730 |
| IgA R3-25 | 3.0670 | 3.1040 | 2.9840 | 3.1550 | 3.0870 |
| IgA R3-26 | 2.8440 | 3.0730 | 3.0000 | 3.0990 | 3.0030 |
| IgA R3-27 | 3.0450 | 3.0810 | 3.0150 | 3.1110 | 3.0520 |
| IgA R3-28 | 3.0470 | 3.0720 | 3.0050 | 3.0910 | 3.0640 |
| IgA R3-29 | 2.7280 | 3.0550 | 2.9890 | 3.1130 | 3.0150 |
| IgA R3-30 | 3.0490 | 2.9040 | 2.9910 | 3.0780 | 3.1070 |
| IgA R3-31 | 3.0370 | 3.0520 | 2.9900 | 3.1030 | 2.9870 |
| IgA R3-32 | 2.7580 | 3.0530 | 2.9610 | 3.0670 | 3.0590 |

[0259] [表11-2]

表11-2

|                           | IgG1 | IgG2 | IgG3 | IgG4 | IgA |
|---------------------------|------|------|------|------|-----|
| ポジティブクローン数                | 32   | 32   | 32   | 32   | 32  |
| ネガティブクローン数                | 0    | 0    | 0    | 0    | 0   |
| 全32クローン中のポジティブクローン数の割合(%) | 100  | 100  | 100  | 100  | 100 |
| $OD \geq 2.5$             | 31   | 32   | 32   | 32   | 32  |
| $1 \leq OD < 2.5$         | 0    | 0    | 0    | 0    | 0   |
| $0.1 \leq OD < 1$         | 1    | 0    | 0    | 0    | 0   |

[0260] 以上の結果から以下のことが分かった。

ラウンド3で回収された単鎖抗体は、すべてヒトIgA抗体に結合するものであり、その結合活性も極めて高かった。また、ヒトIgA抗体のみならず、ヒトIgG1抗体、ヒトIgG2抗体、ヒトIgG3抗体、及びヒトIgG4抗体のすべてに結合するものであった。この結果より、パニングが極めて高効率に実施されていることがわかった。

[0261] <9-8. ヒト血清由来IgAポリクローナル抗体に結合するウサギ由来単鎖抗体遺伝子のアミノ酸配列の決定>

[実施例10]

ラウンド1終了時に得られた32コロニー、ラウンド2終了時に得られた32コロニー、および、ラウンド3終了時に得られた32コロニーについて、ウサギ由来単鎖抗体遺伝子の遺伝子配列からアミノ酸配列を決定した。

[0262] ラウンド1終了時に得られた32コロニーについて、V<sub>H</sub>ドメインの遺伝子配列から決定したアミノ酸配列を図17-1に示し、各アミノ酸配列について図中に示す通り配列番号を付した。尚、配列が空欄の部分は配列決定ができなかったものである。

また、抗原抗体反応の特異性に大きく関与するV<sub>H</sub>ドメインのCDR3領域のアミノ酸配列について、アミノ酸残基数、32クローン中の出現数、32

クローン中の出現確率を図 17-2 に示した。「ネガティブクローン」とは、 $V_H$  ドメインの CDR 3 領域のアミノ酸配列が決定できなかったクローンに関するものである。こちらにも、各アミノ酸配列について図中に示す通り配列番号を付した。

同様に、ラウンド 2 終了時に得られた 32 コロニーについては図 17-3、図 17-4 に、ラウンド 3 終了時に得られた 32 コロニーについては図 17-5、図 17-6 に示した。

さらに、参考のために、＜2. ヒト血清由来 IgG ポリクローナル抗体に結合するウサギ由来単鎖抗体のスクリーニング方法＞で得られた「R2-18」、「R3-8」、「R3-75」の  $V_H$  ドメインのアミノ酸配列を図 17-7 に示した。

[0263] また、備考欄に、例えば「共通 1」と記載されているクローンが複数ある。「共通 1」と記載されているクローン群はすべて同一のクローンであることを示している。同様に、「共通 2」と記載されているクローン群もすべて同一のクローンであることを示している。ただし、これらの付与番号は便宜的なものに過ぎない。

さらに、備考欄に、例えば「共通 3 (R3-75 と同一)」と記載されているクローンがある。これは、＜2. ヒト血清由来 IgG ポリクローナル抗体に結合するウサギ由来単鎖抗体のスクリーニング方法＞で得られた「R3-75」と同一のクローンであることを示している。

さらに、ラウンド 1～3 終了時に得られた「共通 1」～「共通 7」のクローンの数を、図 17-8、図 17-9、図 17-10 にまとめた。

[0264] 以上の結果から以下のことが分かった。

図 17-6 から分かるように、ラウンド 3 においては、＜2. ヒト血清由来 IgG ポリクローナル抗体に結合するウサギ由来単鎖抗体のスクリーニング方法＞で得られた、「R2-18」、「R3-8 (ただし、当該クローンは、R2-18 と同一クローンである。）」、「R3-75」が含む CDR 3 のアミノ酸配列である「ATRYDSYGAYNYWFGTLW (配列

番号30、19残基)」を含むV<sub>H</sub>ドメインが、全32クローン中26クローン取得され、81.3%の割合で存在した。

[0265] これらのうち、12クローンと8クローンは、それぞれ、共通1のクローン、共通2のクローンであった。また、他の2クローンは、＜2. ヒト血清由来IgGポリクローナル抗体に結合するウサギ由来単鎖抗体のスクリーニング方法＞で得られた、「R2-18（6位；ただし、当該クローンは、「R3-8」と同一クローンである。）」と同一の共通4のクローンであった。

さらに、他の2クローンは、＜2. ヒト血清由来IgGポリクローナル抗体に結合するウサギ由来単鎖抗体のスクリーニング方法＞で得られた、「R3-75（1位）」と同一の共通3のクローンであった。

[0266] さらに、「ARADYNTVAYFDLW（14残基、配列番号141）」、「ARADYNTAAYFDLW（14残基、配列番号142）」、「VRADYNTVSYFDLW（14残基、配列番号143）」のように、V<sub>H</sub>ドメインのCDR3のアミノ酸配列において互いに相同性の高いクローンも複数個取得された。

[0267] また、ウェスタンブロットの結果、ラウンド3で取得されたクローンは、V<sub>H</sub>ドメインのCDR3のアミノ酸配列の長さに拘わらず、全てがヒト抗体の軽鎖（L鎖）、具体的にはκ鎖に結合していることが明らかとなった。

[0268] 以上の結果より、ヒト血清由来IgAポリクローナル抗体を担体に用いてパニングを行うことで、ヒトIgG抗体とヒトIgA抗体との共通部分である、ヒト抗体の軽鎖（L鎖）、具体的にはκ鎖に特異的に結合する単鎖抗体を極めて高効率に回収できることが明らかとなった。

[0269] ＜9-9. 解離速度定数 $k_{off}$ の測定＞

[実施例11]

センサーチップとしてヒトIgA抗体固定化CM5を用いたこと以外は＜4. 解離速度定数 $k_{off}$ の測定＞と同様にして、ラウンド3終了時に得られた32コロニーについて解離速度定数 $k_{off}$ の測定を行った。その結果を図18、

表 1 2 に示した。また、 $R^2$  も併せて記載した。

[0270] [比較例 1 1]

「IgA R1-2」を用いた以外は実施例 1 1 と同様にしたものをネガティブコントロールとし、比較例 1 1 とした。

[0271] [表12]

表12

| クローン番号    | koff (sec <sup>-1</sup> ) | $R^2$    | 備考   |
|-----------|---------------------------|----------|------|
| IgA R3-6  | 8.69E-05                  | 9.92E-01 | 共通 1 |
| IgA R3-2  | 1.48E-04                  | 9.92E-01 | 共通 2 |
| IgA R3-1  | 9.88E-05                  | 9.81E-01 | 共通 3 |
| IgA R3-18 | 1.81E-04                  | 9.93E-01 | 共通 4 |
| IgA R3-7  | 9.56E-05                  | 9.74E-01 | 共通 5 |
| IgA R3-19 | 9.81E-04                  | 9.84E-01 | 共通 6 |
| IgA R3-13 | 1.31E-04                  | 9.95E-01 | 共通 7 |
| IgA R3-3  | 6.75E-04                  | 9.53E-01 |      |
| IgA R3-26 | 1.00E-03                  | 9.86E-01 |      |
| IgA R3-29 | 6.61E-04                  | 9.97E-01 |      |
| IgA R3-32 | 5.64E-04                  | 9.99E-01 |      |
| IgA R1-2  | —                         | —        |      |

[0272] ラウンド 3 で得られたクローン全てにおいて、ヒト IgA 抗体への結合が確認された。さらに、表 1 2 に示す通り、ラウンド 3 で取得されたクローンによる単鎖抗体の解離速度定数  $k_{off}$  のほとんどは、 $10^{-5} \sim 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$  のオーダーの範囲にあり、非常に小さかった。特に、32 クローン中 12 ク

クローンを占めていた「IgA R3-6（共通1）」による単鎖抗体の解離速度定数 $k_{off}$ は、「R3-75」と同一クローンである「IgA R3-1（共通3）」による単鎖抗体の解離速度定数 $k_{off}$ よりも小さく、より高親和性であることが示唆された。

[0273] 以上の結果より、本方法は、ライブラリ中で存在率の低いクローンについても極めて高効率で回収可能であり、高い親和性・特異性を有する単鎖抗体の回収・単離に有効であることがわかった。

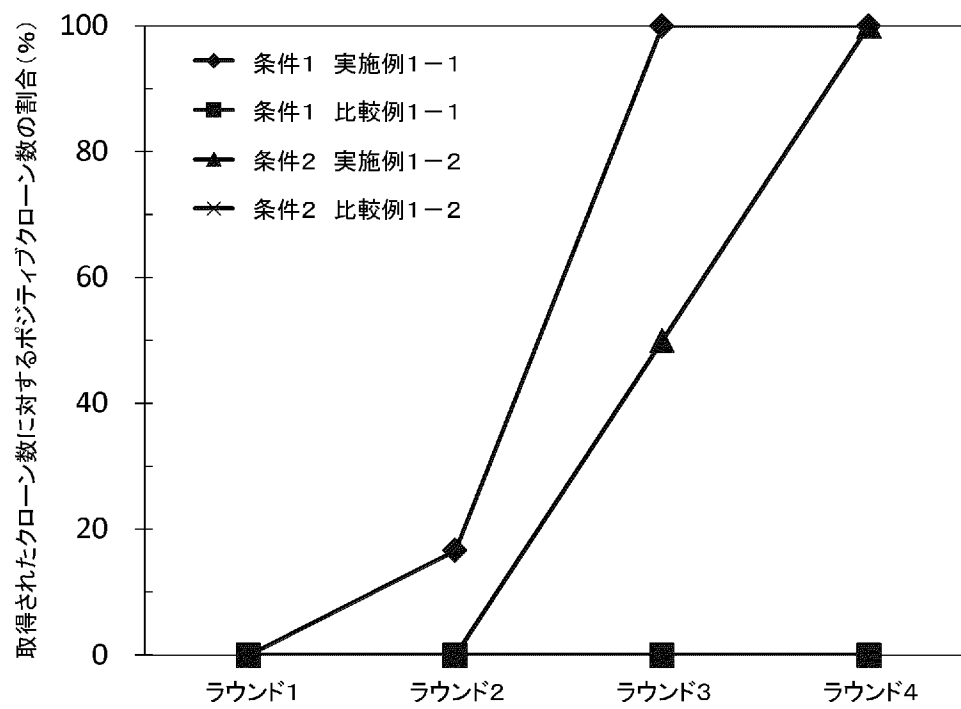
### 産業上の利用可能性

[0274] 本発明は、例えば、抗体医薬の製造方法に適用できる。

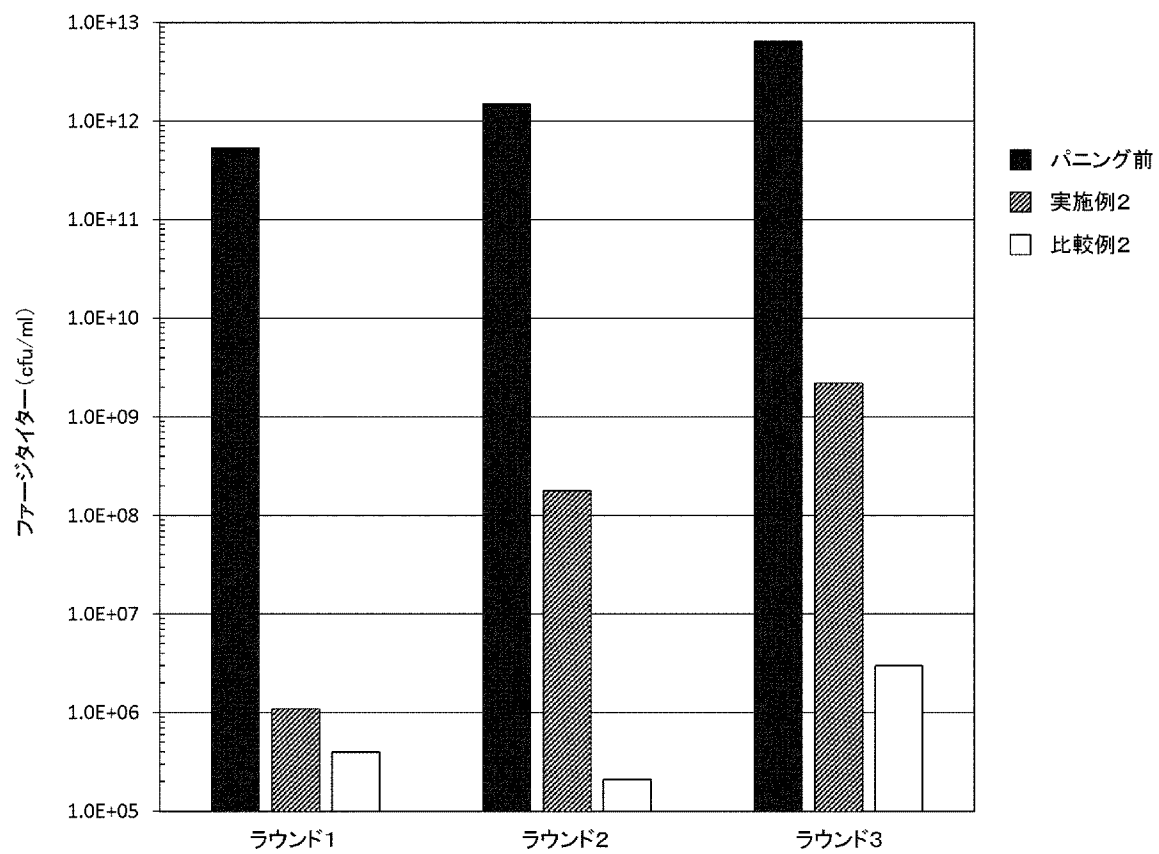
## 請求の範囲

- [請求項1] 担体と、担体の表面に化学結合によって結合する、ヒト血清由来 IgG ポリクローナル抗体に対して  $3.0 \times 10^{-8} \text{M}$  以下の解離定数を有する単鎖抗体とを含む、ヒト血清由来 IgG ポリクローナル抗体の分離剤。
- [請求項2] 前記単鎖抗体が、さらに、ヒト血清由来 IgA ポリクローナル抗体に対する抗体である、請求項1に記載の分離剤。
- [請求項3] 前記単鎖抗体が、前記ヒト血清由来 IgA ポリクローナル抗体に対して  $1.0 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$  以下の解離速度定数を有する、請求項2に記載の分離剤。
- [請求項4] 前記単鎖抗体が、L鎖に結合する抗体である、請求項1～3のいずれか1項に記載の分離剤。
- [請求項5] 前記単鎖抗体が、 $\kappa$ 鎖に結合する抗体である、請求項1～4のいずれか1項に記載の分離剤。
- [請求項6] 担体と、担体の表面に化学結合によって結合する、ヒト血清由来 IgG ポリクローナル抗体に対して  $3.0 \times 10^{-8} \text{M}$  以下の解離定数を有する単鎖抗体とを含む分離剤を用いて、二種以上の物質の混合液からヒト血清由来 IgG ポリクローナル抗体を分離する方法。
- [請求項7] 前記単鎖抗体が、さらに、ヒト血清由来 IgA ポリクローナル抗体に対する抗体であり、さらに、ヒト血清由来 IgA ポリクローナル抗体を分離する、請求項6に記載の方法。
- [請求項8] 前記単鎖抗体が、前記ヒト血清由来 IgA ポリクローナル抗体に対して  $1.0 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$  以下の解離速度定数を有する、請求項7に記載の方法。
- [請求項9] 前記単鎖抗体が、L鎖に結合する抗体である、請求項6～8のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項10] 前記単鎖抗体が、 $\kappa$ 鎖に結合する抗体である、請求項6～9のいずれか1項に記載の方法。

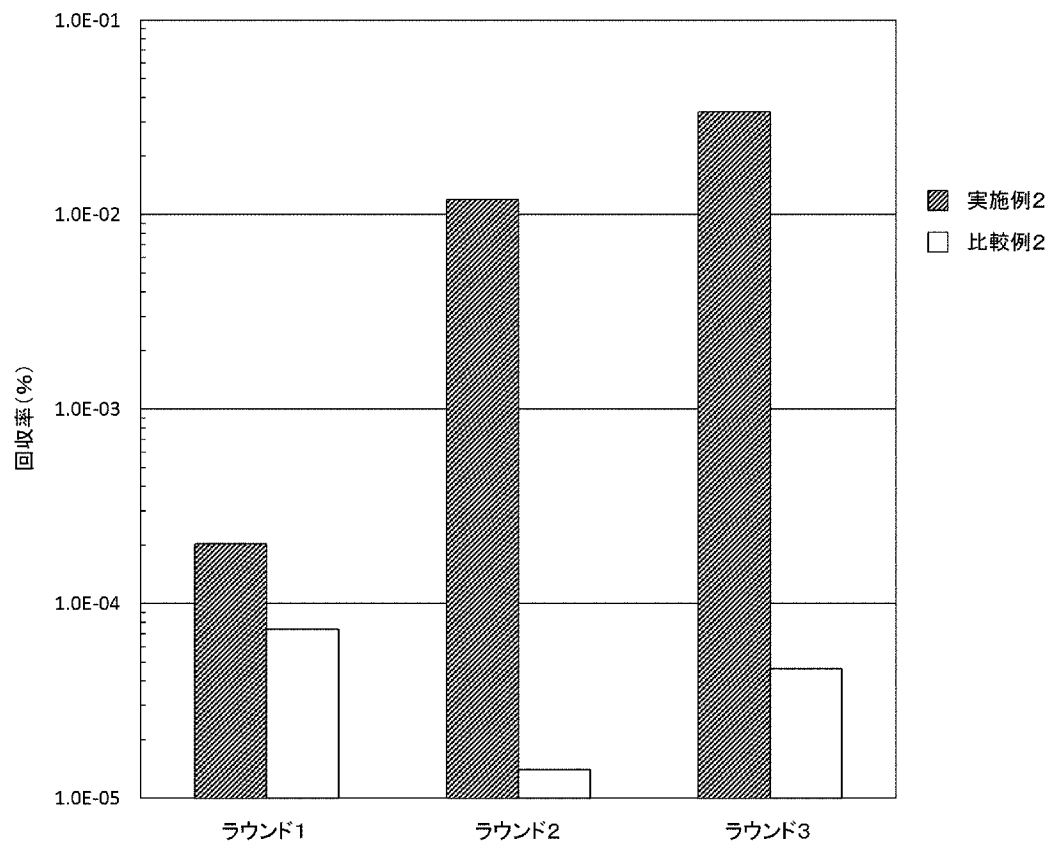
[図1]



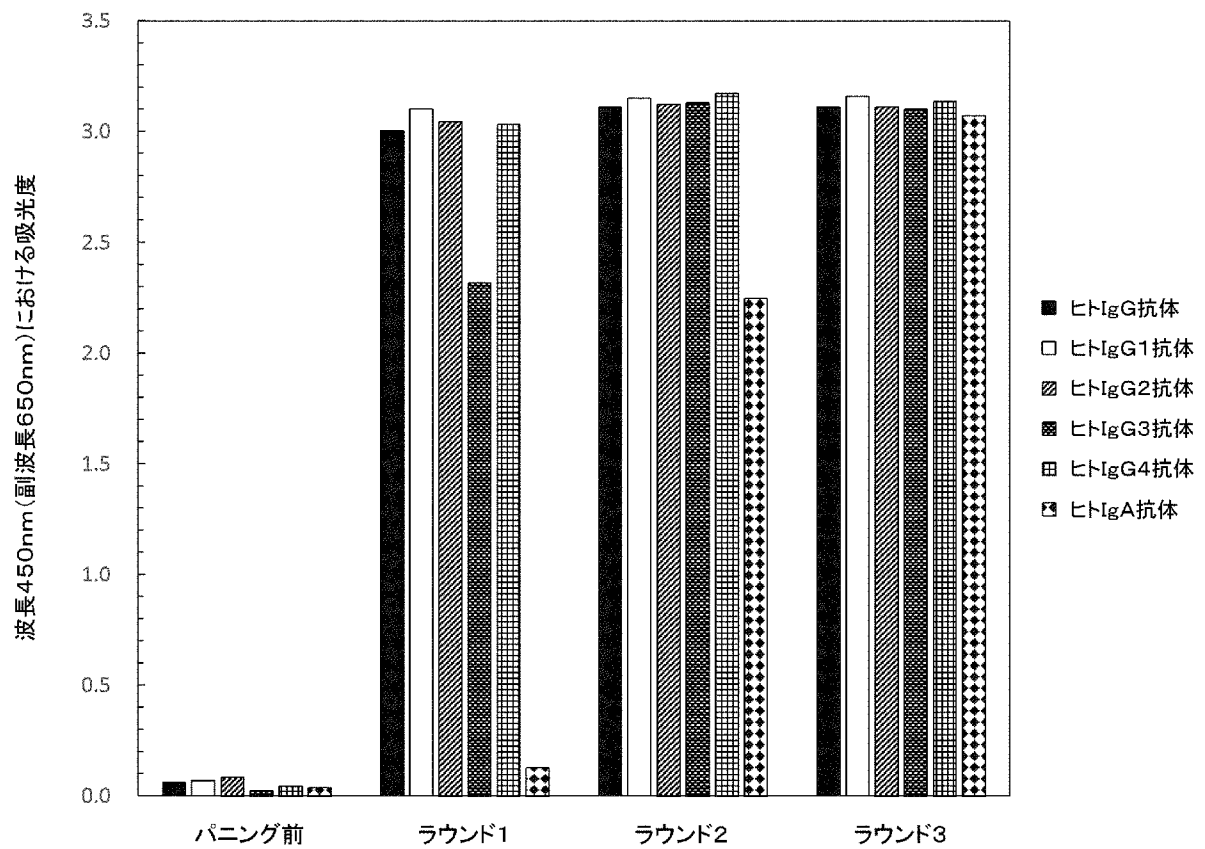
[図2]



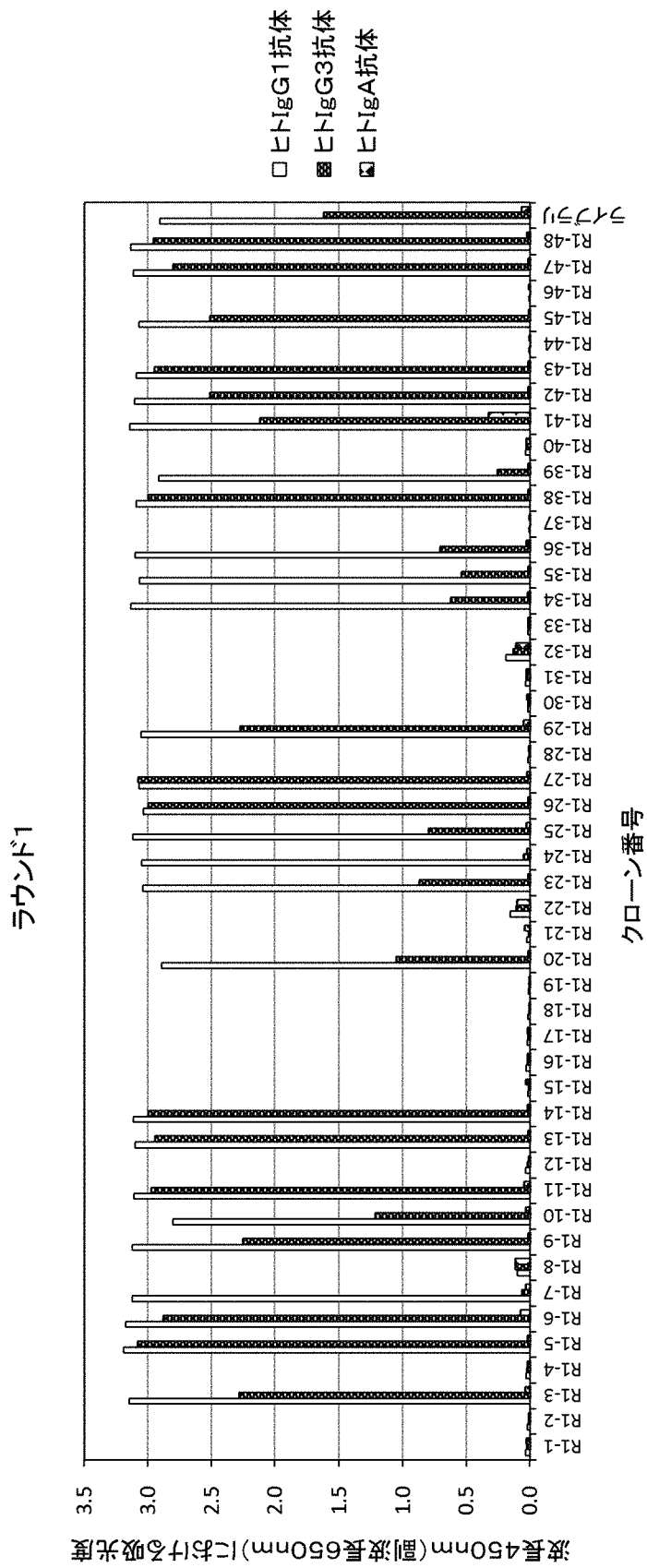
[図3]



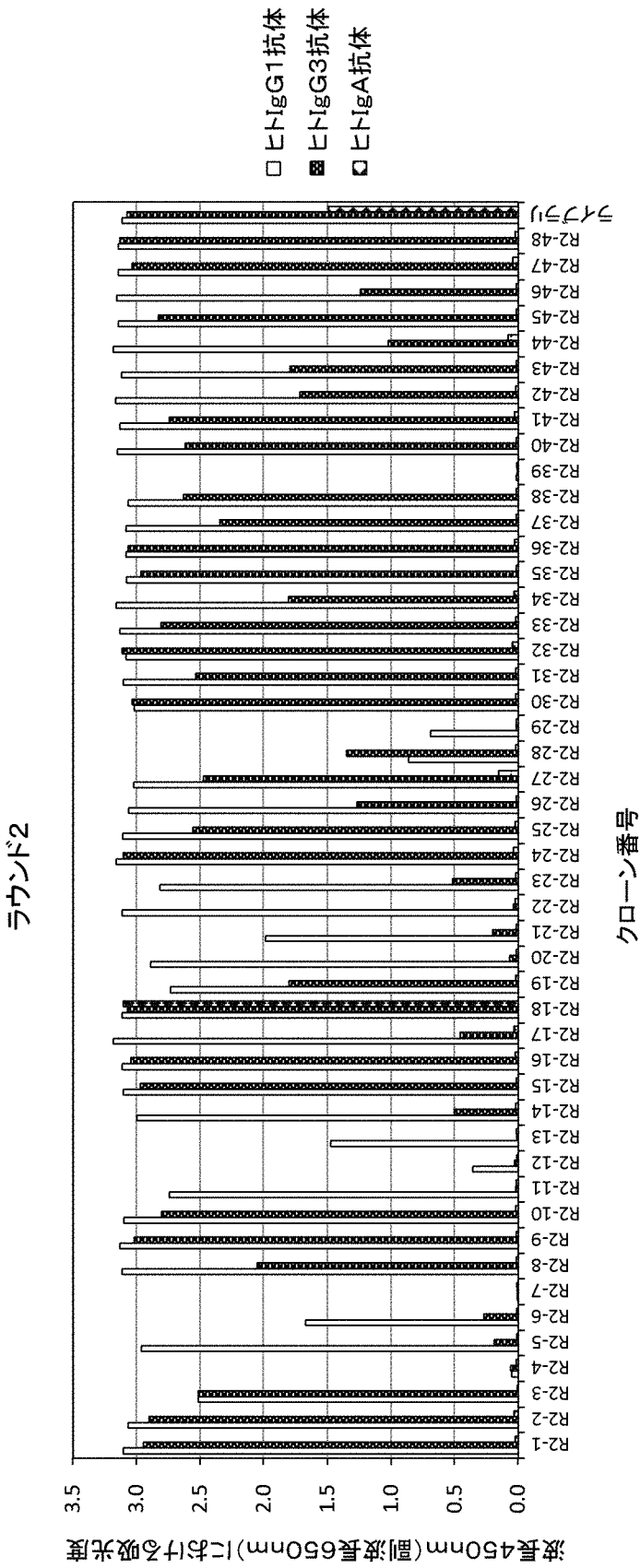
[図4]



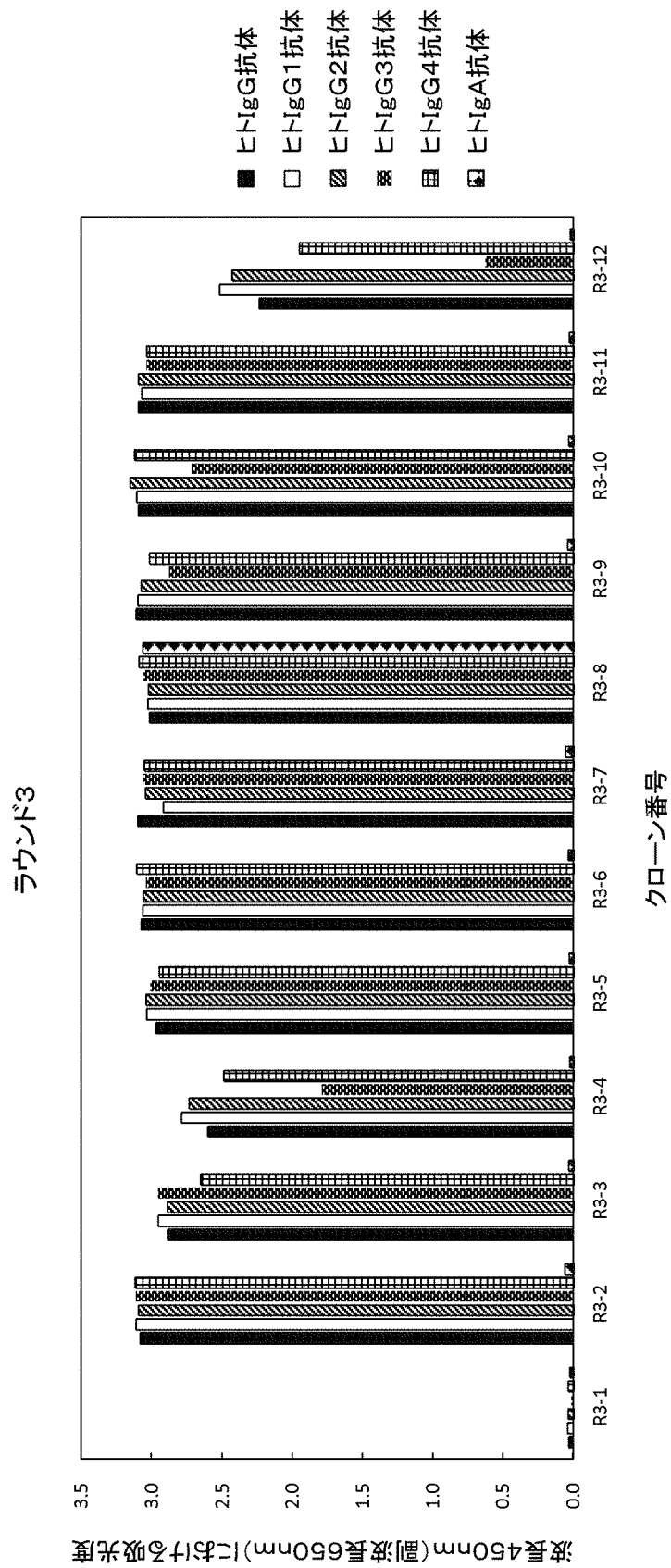
[図5]



[図6]

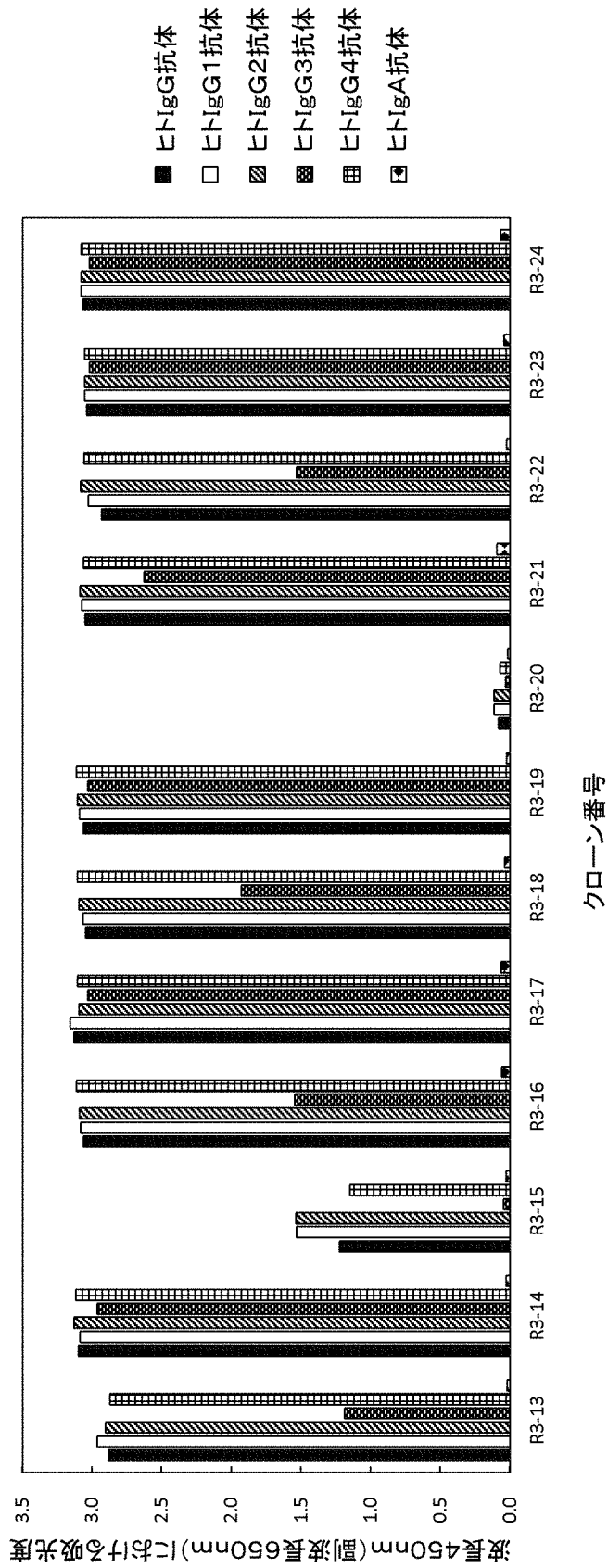


[図7-1]

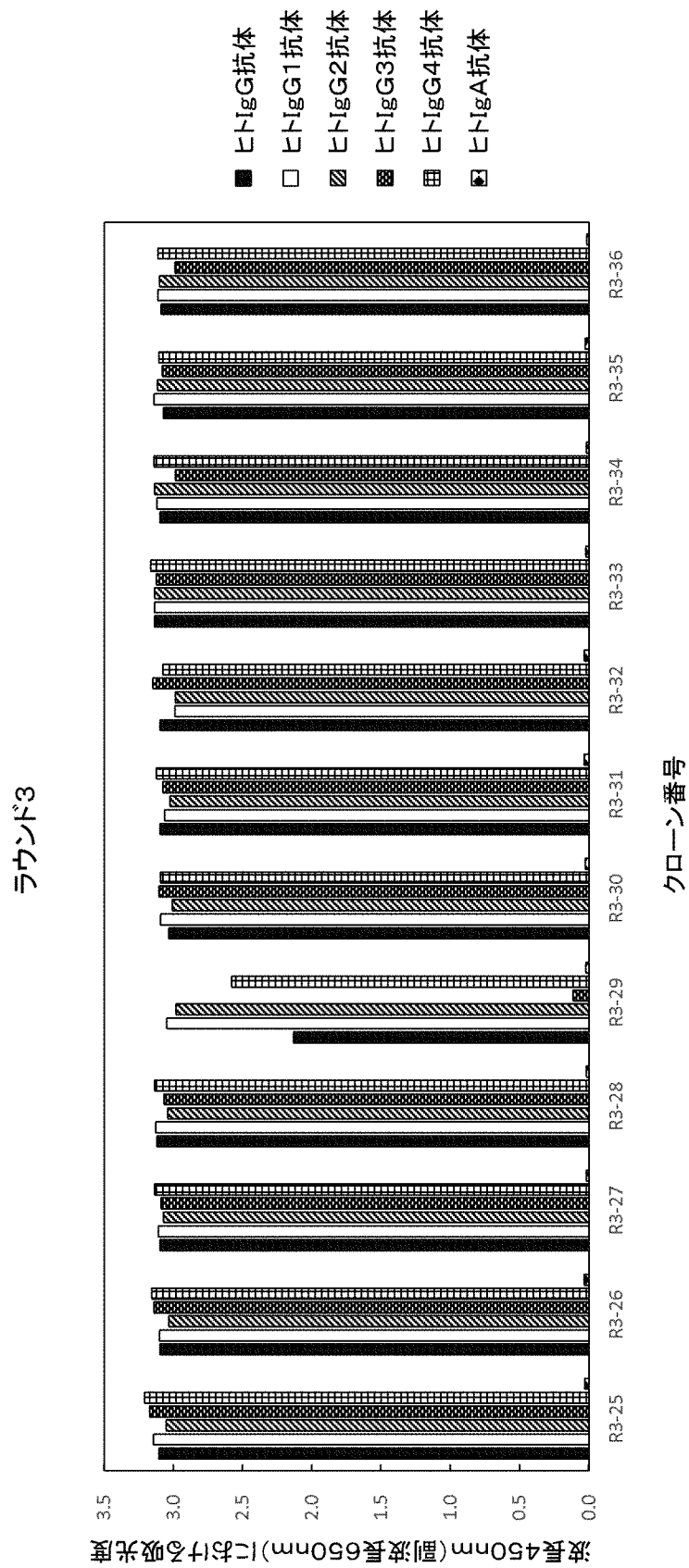


[図7-2]

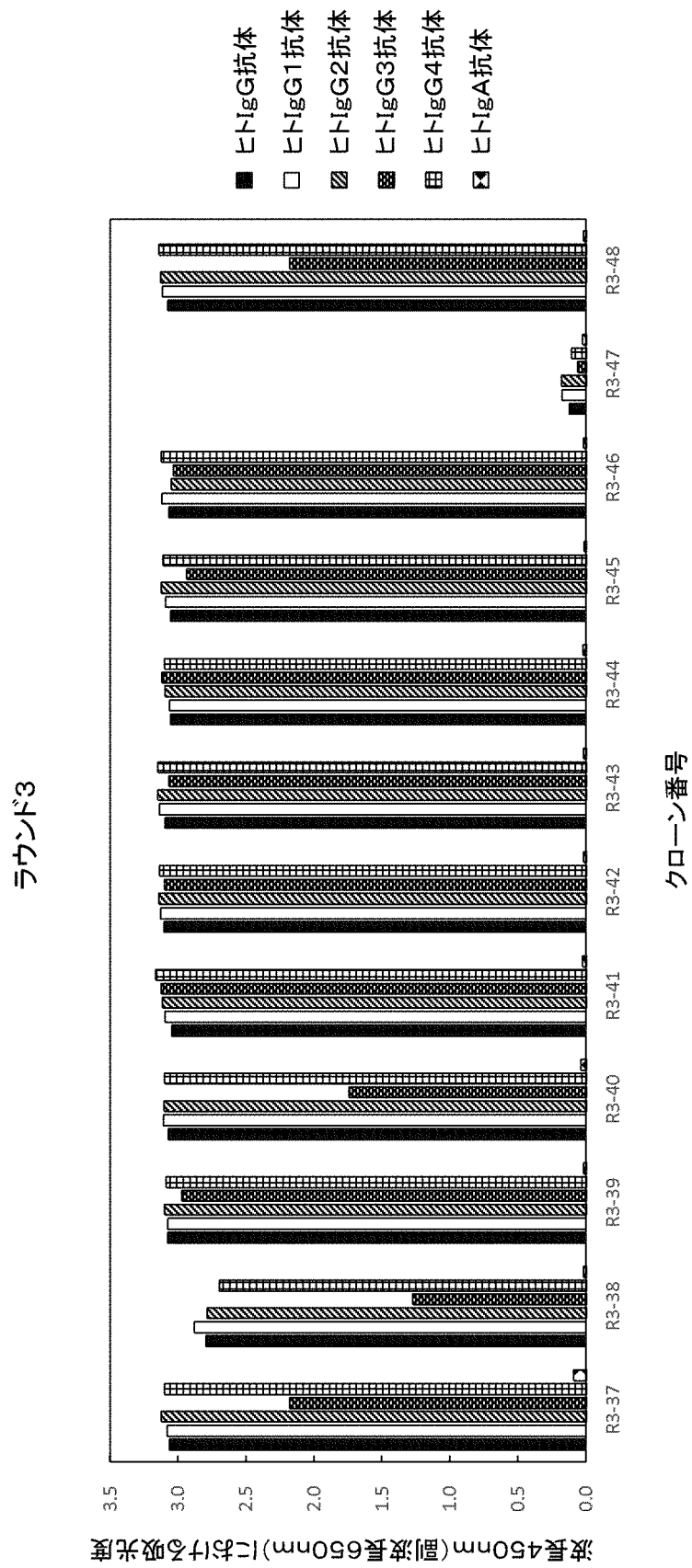
ラウンド3



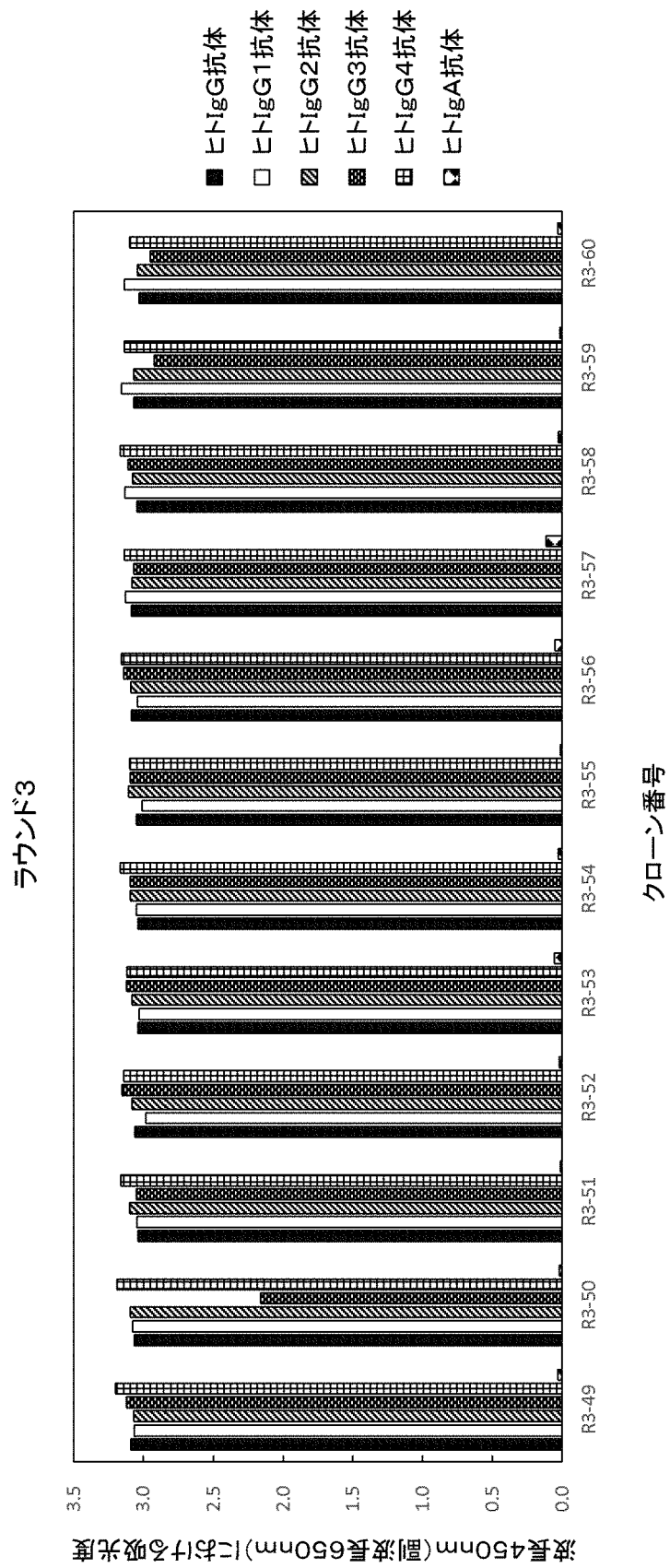
[図7-3]



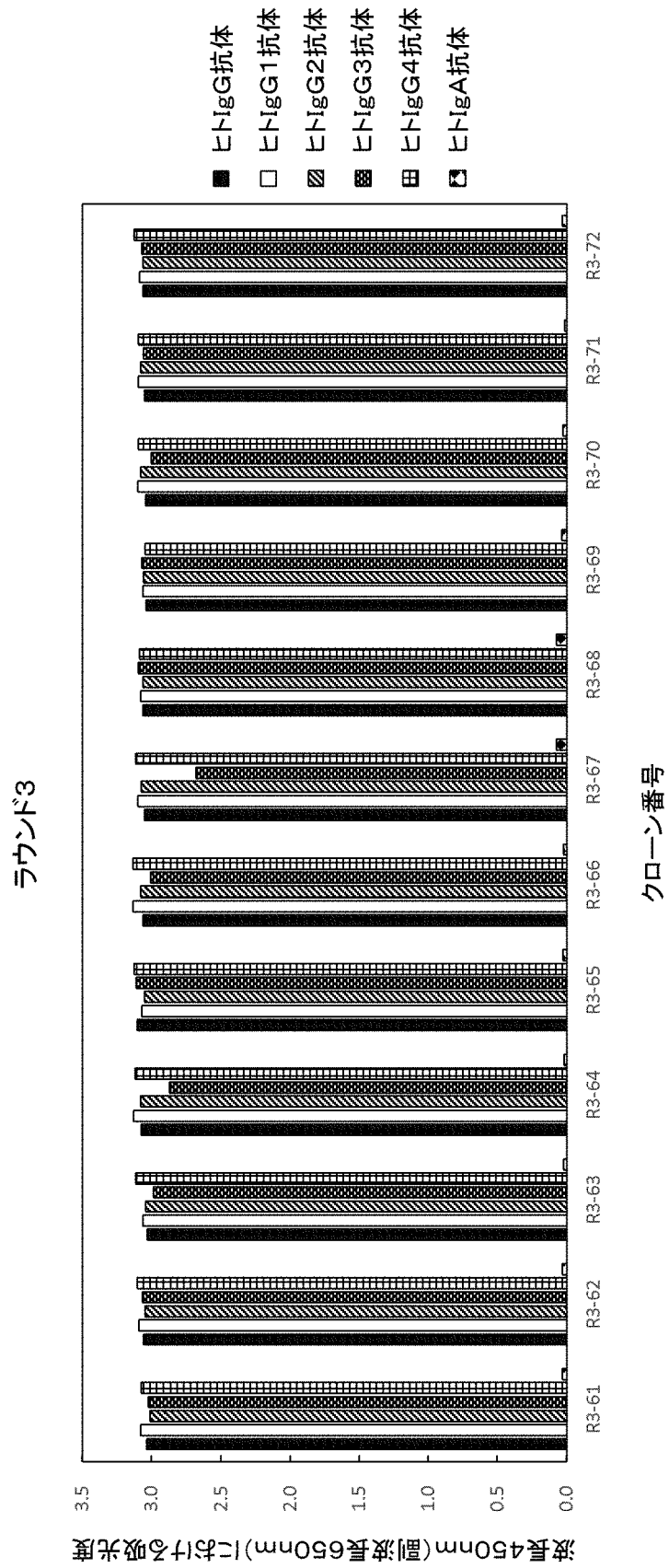
[図7-4]



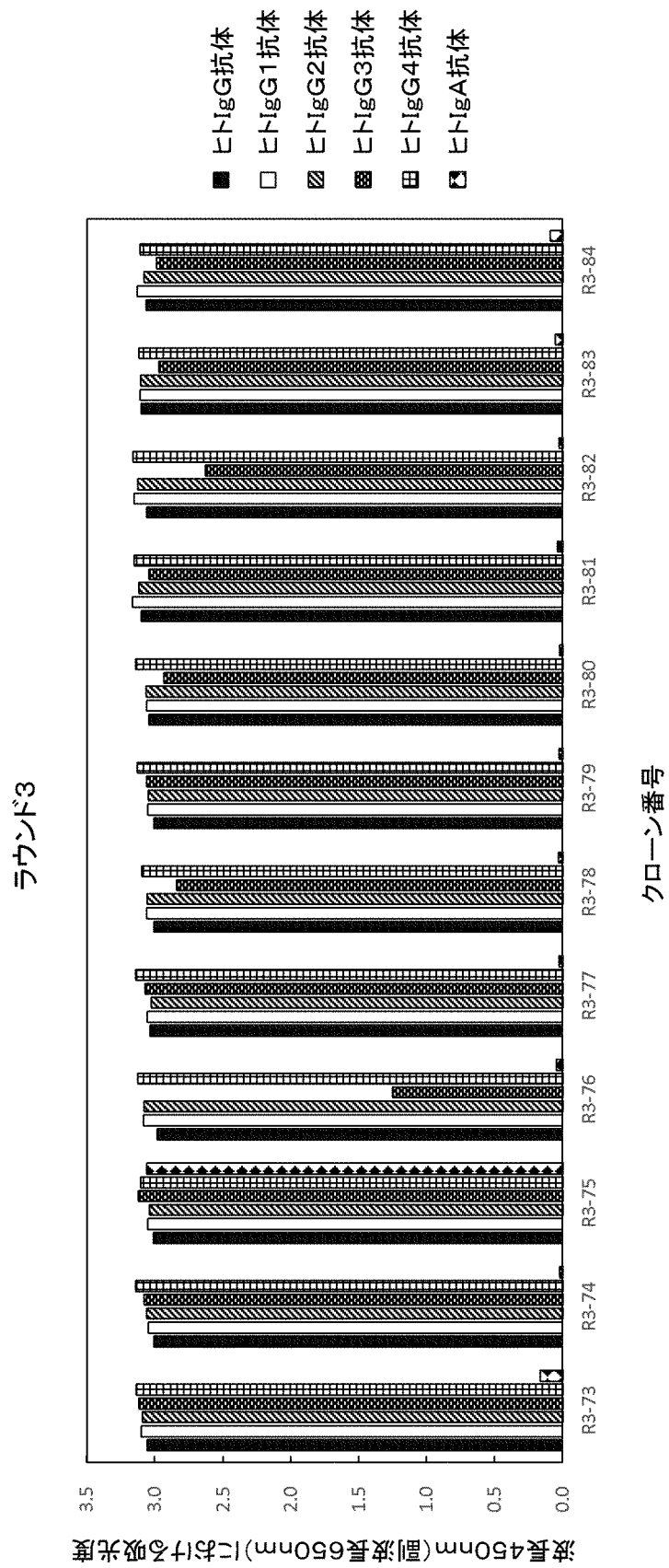
[図7-5]



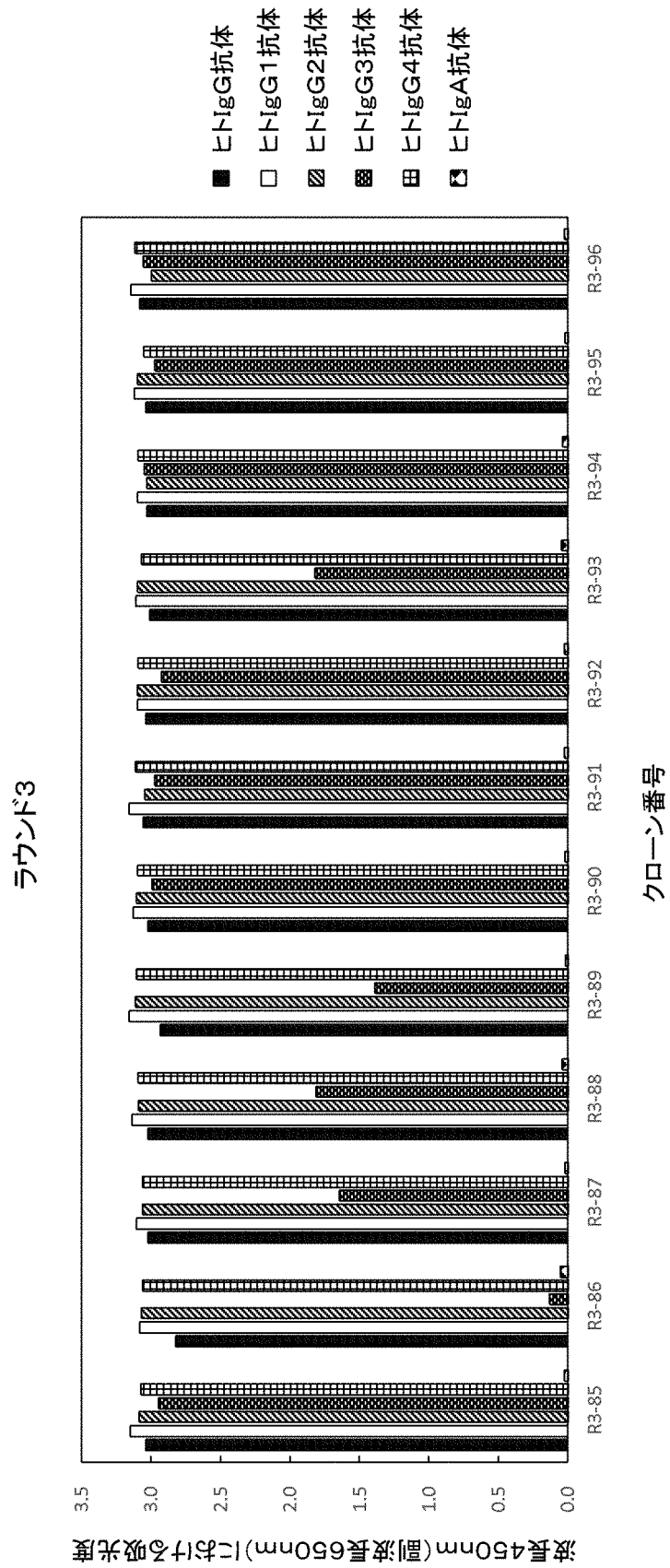
[図7-6]



[図7-7]



[図7-8]



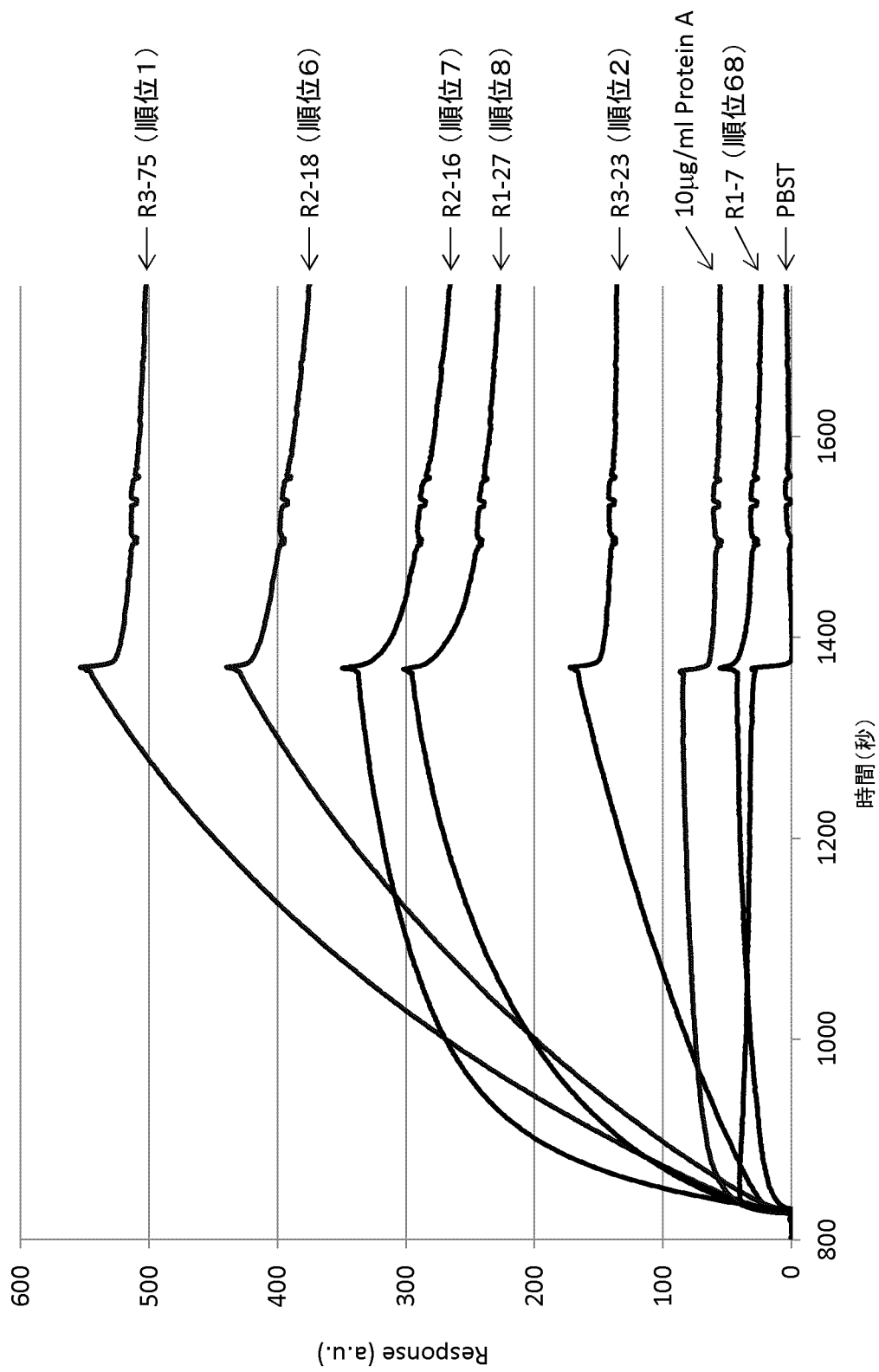
[図8-1]

| 順位 | クローン番号 | k <sub>off</sub> (s <sup>-1</sup> ) | V <sub>H</sub>          |           |                   |         |                                        |                    |           |      |  |  |
|----|--------|-------------------------------------|-------------------------|-----------|-------------------|---------|----------------------------------------|--------------------|-----------|------|--|--|
|    |        |                                     | FRI                     | CDR1      | FR2               | CDR2    | FR3                                    | CDR3               | FR4       | 配列番号 |  |  |
| 1  | II-75  | 4.08E-04                            | QS VKESGGRIVTPGTPILICTV | SGIDLSSNA | MSWRQAPGEGLEWIGI  | ISTVGKI | YFASWAKGRFTISKI STTYDLRLIISPTIEDIATYFC | ATRYDSYGAYNYWFGILW | GPGLIVITS | 12   |  |  |
| 2  | II-23  | 2.78E-04                            | QS VKESGGRIVTPGTPILICTV | SGESLSRYA | NSWRQAPGKGLIEWIGI | IGSGGSI | SVATWAKGRFTISKI STTYDLKLIISPTIEDIATYFC | GSYDSHGAY          | VSLW      | 13   |  |  |
| 3  | II-26  | 5.71E-04                            | QEQLVESGGGLVWPGGTLICTV  | SGIDLSSYA | MSWRQAPGKGLIEWIGI | IGSGGSI | AYANWAKGRFTISKI STTYDLKLIISPTIEDIATYFC | ATDYGIVGAY         | GHLW      | 14   |  |  |
| 4  | II-43  | 6.41E-04                            | -                       | -         | -                 | -       | -                                      | -                  | -         | -    |  |  |
| 5  | II-58  | 7.42E-04                            | QQQLMESGGRIVTPGGSILICTV | SGIDLNSYA | MCWRQAPGKGLIEWIGI | IRNSGNT | YFASWAKGRFTISKI STTYDLKLIISPTIEDIATYFC | ARYSGDNGGALN       | LW        | 15   |  |  |
| 6  | II-18  | 8.00E-04                            | QS LEESGGRIVTPGTPILICTV | SGIDLSSNA | MTWRQAPGEGLEWIGI  | ISTGGSF | YFASWAKGRFTISKI STTYDLKLIISPTIEDIATYFC | ATRYDSYGAYNYWFGILW | GPGLIVITS | 16   |  |  |
| 7  | II-16  | 8.38E-04                            | QS VKESGGRIVTPGTPILICTV | SGESLSRYA | MCWRQAPGKGLIEWIGI | IGSSGSI | YYASWAKGRFTISKI STTYDLKLIISPTIEDIATYFC | ARYSGDNGGALN       | LW        | 17   |  |  |
| 8  | I-27   | 8.59E-04                            | QQQLMESGGGLVTPGTPILICTV | SGIDLRVA  | MCWRQAPGKGLIEWIGI | IASGNID | YASWAKGRFTISAT STTYDLKLIISPTIEDIATYFC  | ARYSGDNGGILN       | LW        | 18   |  |  |
| 11 | II-8   | 8.80E-04                            | QS LEESGGRIVTPGTPILICTV | SGIDLSSNA | MTWRQAPGEGLEWIGI  | ISTGGSF | YFASWAKGRFTISKI STTYDLKLIISPTIEDIATYFC | ATRYDSYGAYNYWFGILW | GPGLIVITS | 19   |  |  |
| 68 | I-7    | 1.75E-03                            | QS LEESGGRIVTPGTPILICTV | SGIDLRVA  | MCWRQAPGKGLIEWIGI | IASGNID | YASWAKGRFTISAT STTYDLKLIISPTIEDIATYFC  | ARYSGDNGGILN       | LW        | 20   |  |  |

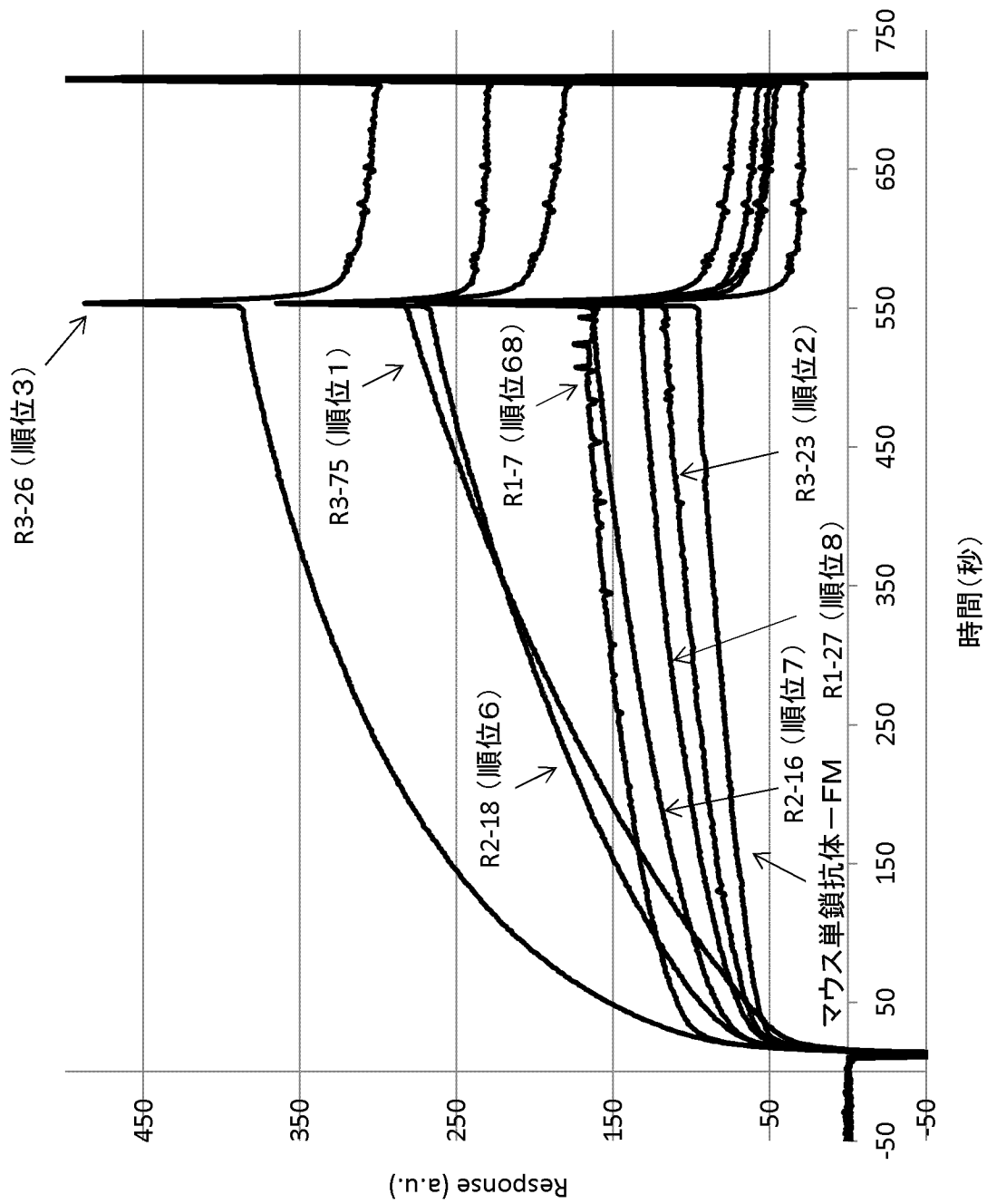
[図8-2]

| 順位 | クローン番号 | k <sub>off</sub> (s <sup>-1</sup> ) | V <sub>L</sub>             |        |                  |      |                                       |              |             |    |  |  | 配列番号 |
|----|--------|-------------------------------------|----------------------------|--------|------------------|------|---------------------------------------|--------------|-------------|----|--|--|------|
|    |        |                                     | FR1                        | CDR1   | FR2              | CDR2 | FR3                                   | CDR3         | FR4         |    |  |  |      |
| 1  | III-75 | 4.08E-04                            | ELDLTQTTPSYSGAVGGTVTIKQAS  | ENINSE | LAWYQKPGQRPKLLIY | DAS  | KLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISGMCDDAAATYYC  | QSTYYDGNYYVA | FGGTEVDVTRS | 21 |  |  |      |
| 2  | III-23 | 2.78E-04                            | ELVLIQTTPSPYSGAVGGTVIINQAS | QSISTA | LAWYQKPGQRPKLLIY | SAS  | TLASGVSSRFKSGSGTGFTLTISDLECAAAATYYC   | QSYGSSSD NA  | FGGTEWIKRS  | 22 |  |  |      |
| 3  | III-26 | 5.71E-04                            | ELVMIQTASPYSAVGGTVTIKQAS   | QSISTA | LAWYQKPGQRPKLLIY | DAS  | TLASGVSSRFKSGSGTEFTLTISDLECAAAATYYC   | QTYFGSDJD NA | FGGTEVEITGS | 23 |  |  |      |
| 4  | III-43 | 6.41E-04                            |                            |        |                  |      |                                       |              |             |    |  |  |      |
| 5  | III-58 | 7.42E-04                            | ELVMIQTAAVSYPVGGTVTIKQAS   | EFIRNY | LAWYQKPGQRPKLLIY | TTS  | NLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISDLECAAAATYYC  | QWYDTSITYGNA | FGGTEWVIKGS | 24 |  |  |      |
| 6  | II-18  | 8.00E-04                            | ELVMIQTAAVSYPVGGTVTIKQAS   | QWNNNE | LAWYQKPGQRPKLLIY | DAS  | KLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISGMCQDDAAATYYC | QSTYYDGNYYVA | FGGTEVDVKGS | 25 |  |  |      |
| 7  | II-16  | 8.38E-04                            | ELDLTQTAAVSYPVGGTVTISQSS   | QHTRSY | LAWYQKPGQRPKLLIS | AAS  | TLASGVSSRFKSGSGTEFTLTISDLECAAAATYYC   | QRYYDIRNYGNG | FGGTEVEITGS | 26 |  |  |      |
| 8  | I-27   | 8.59E-04                            | ELVMIQTAAVSYPVGGTVTIKQAS   | EBIRNY | LAWYQKPGQRPKLLIY | TTS  | NLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISDLECAAAATYYC  | QWYDTSITYGNT | FGGTEVDVKGS | 27 |  |  |      |
| 11 | III-8  | 8.80E-04                            | ELVMIQTAAVSYPVGGTVIINQAS   | QSIIDE | LAWYQKPGQRPKLLIY | DAS  | BLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISCVQDDAAATYYC  | QSAYYDGRYYVA | FGGTEVEITGS | 28 |  |  |      |
| 68 | I-7    | 1.75E-03                            | ELVMIQTAAVSYPVGGTVTIKQAS   | QSISSY | LAWYQKPGQRPKLLIY | AAS  | NLASGVSSRFKSGSGTEFTLTISDLECAAAATYYC   | QSYSLSSSYGNT | FGGTEVEITGS | 29 |  |  |      |

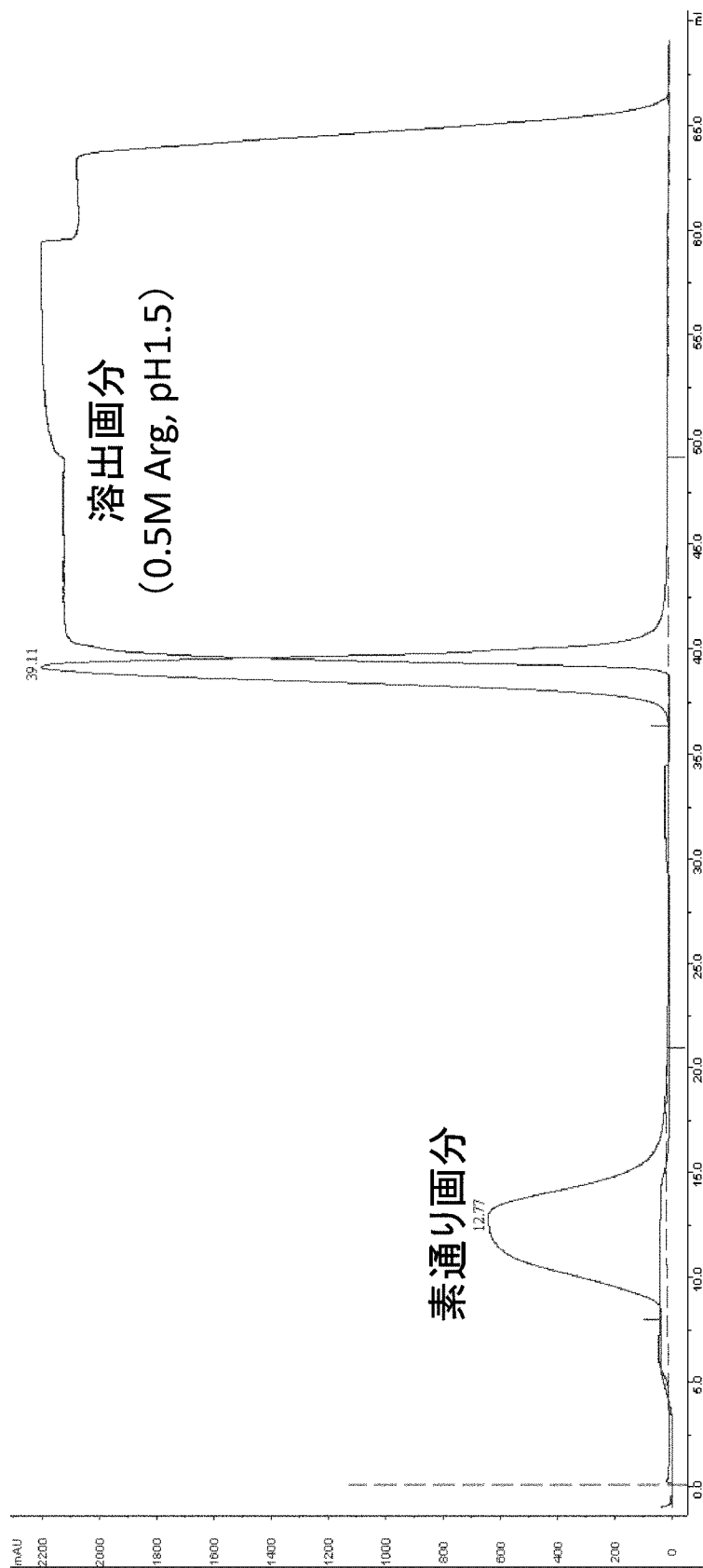
[図9-1]



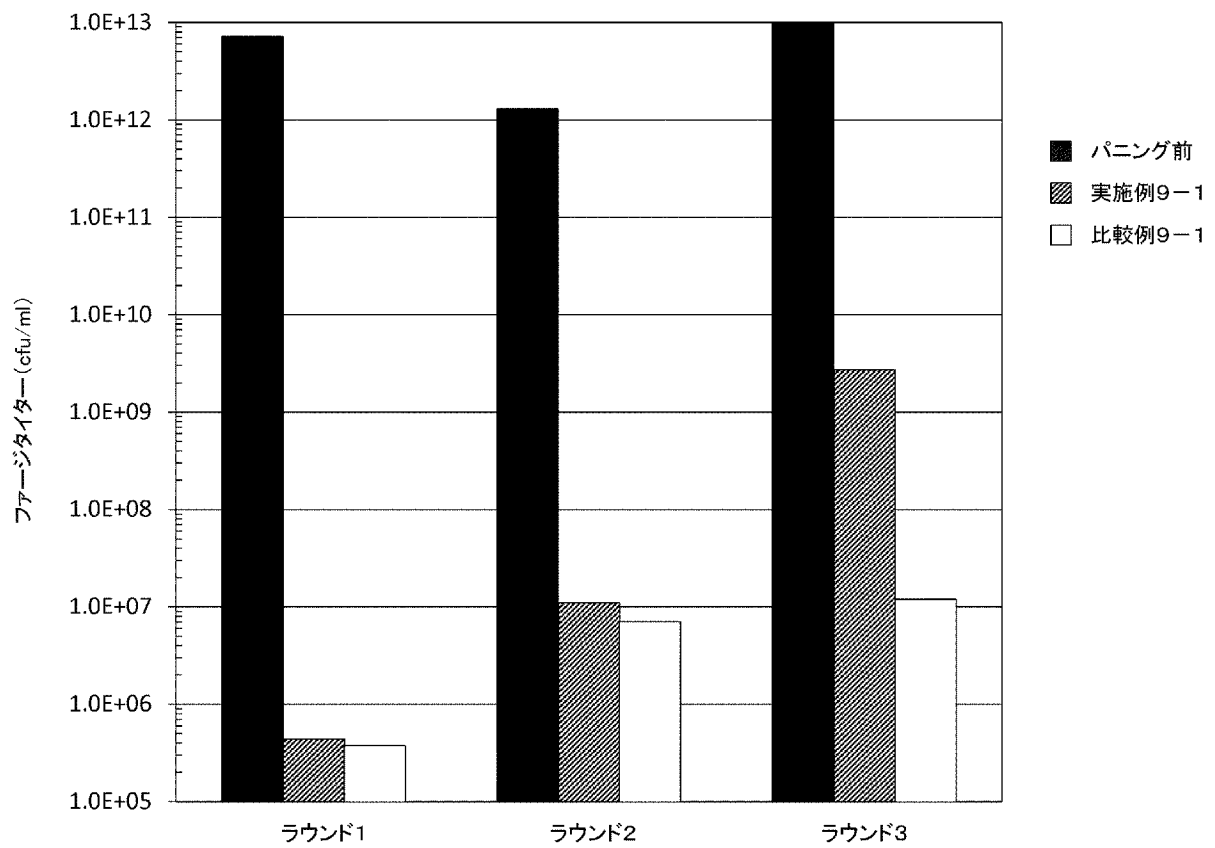
[図9-2]



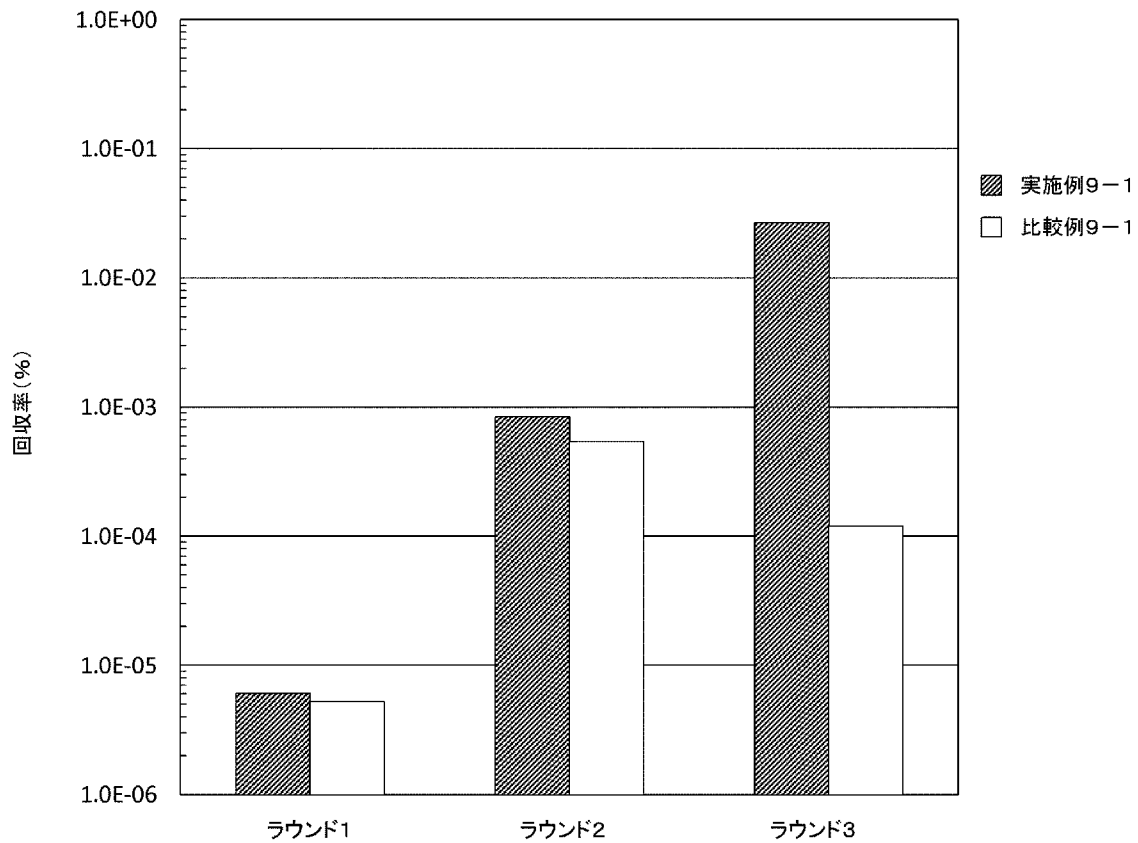
[図10]



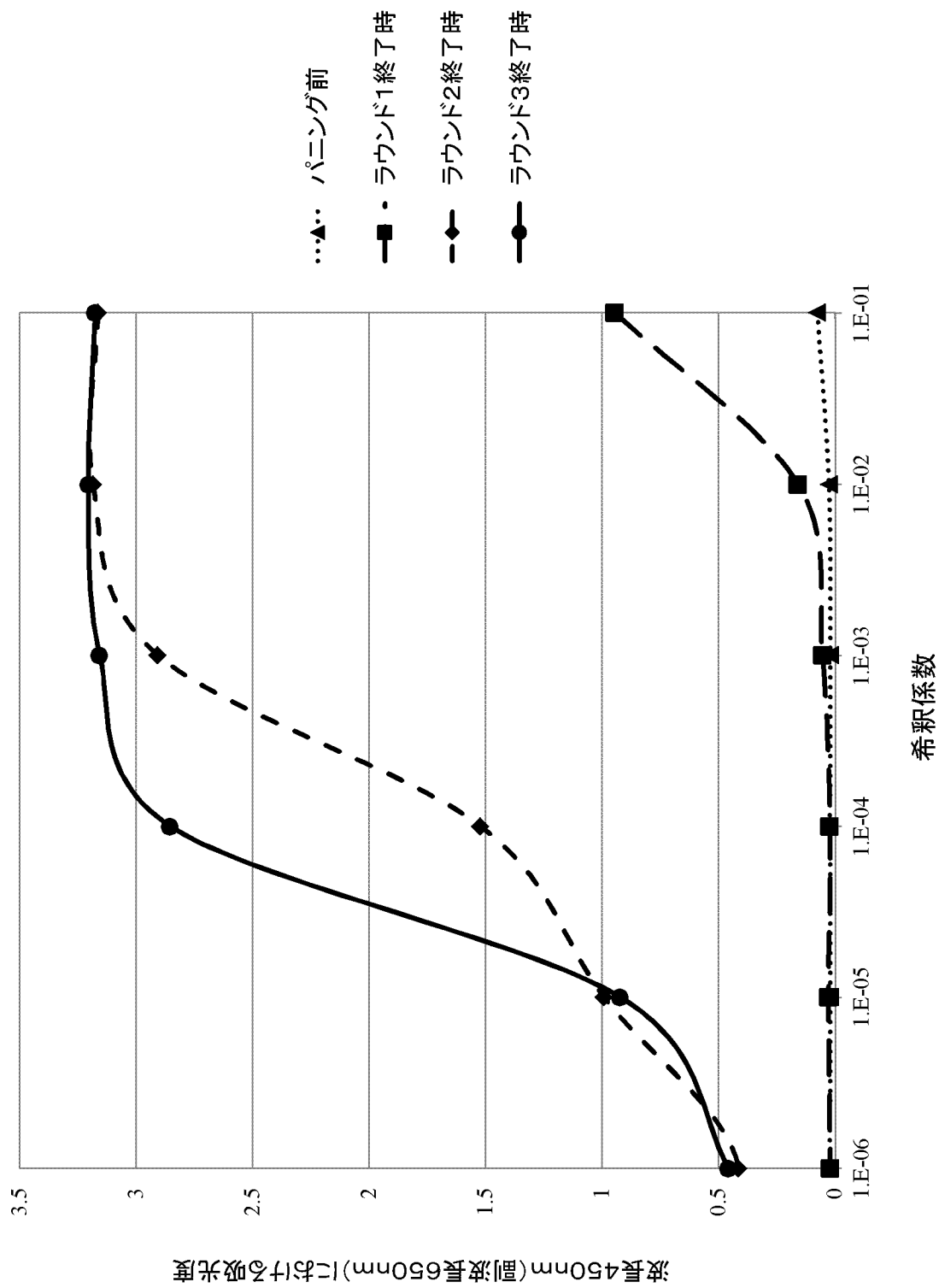
[図11]



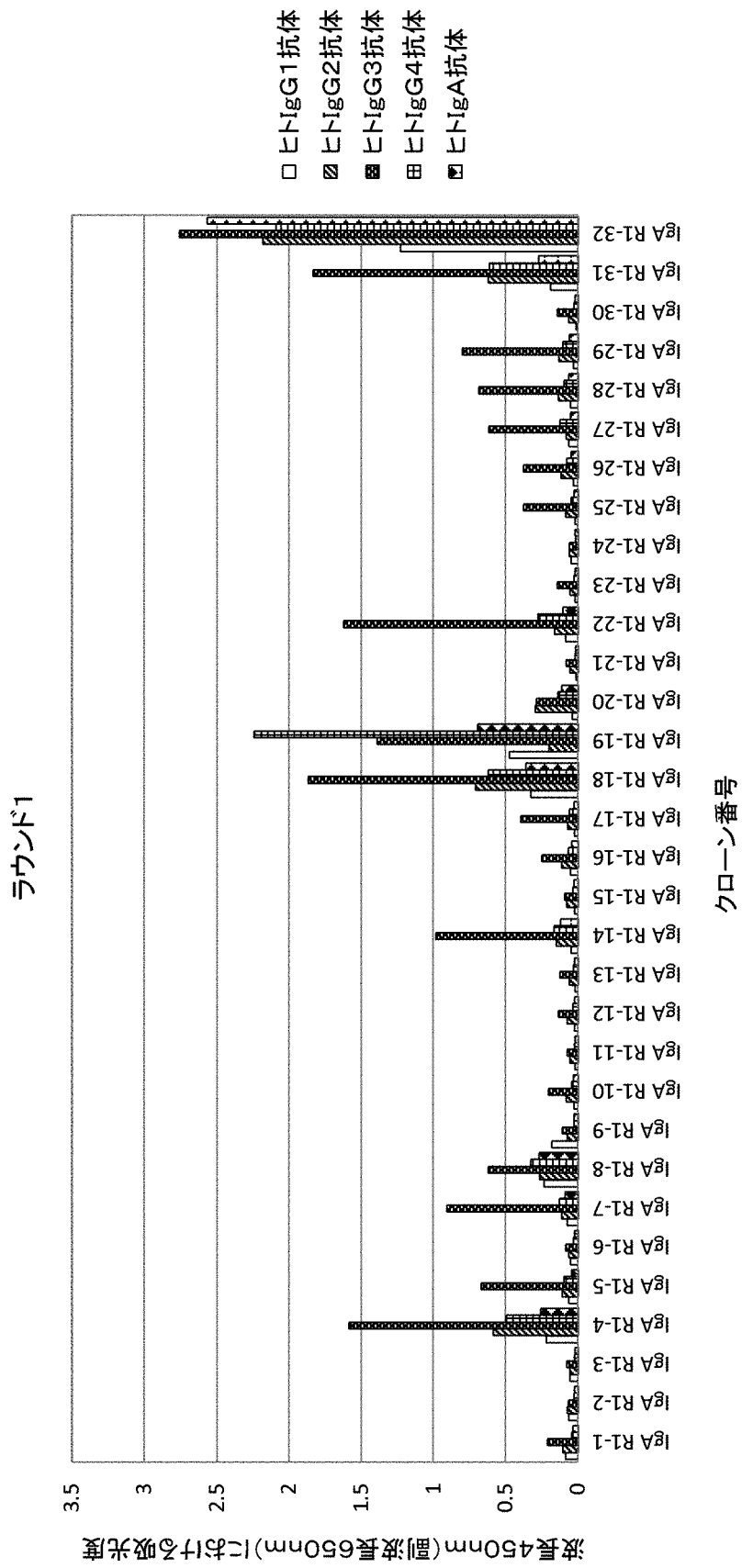
[図12]



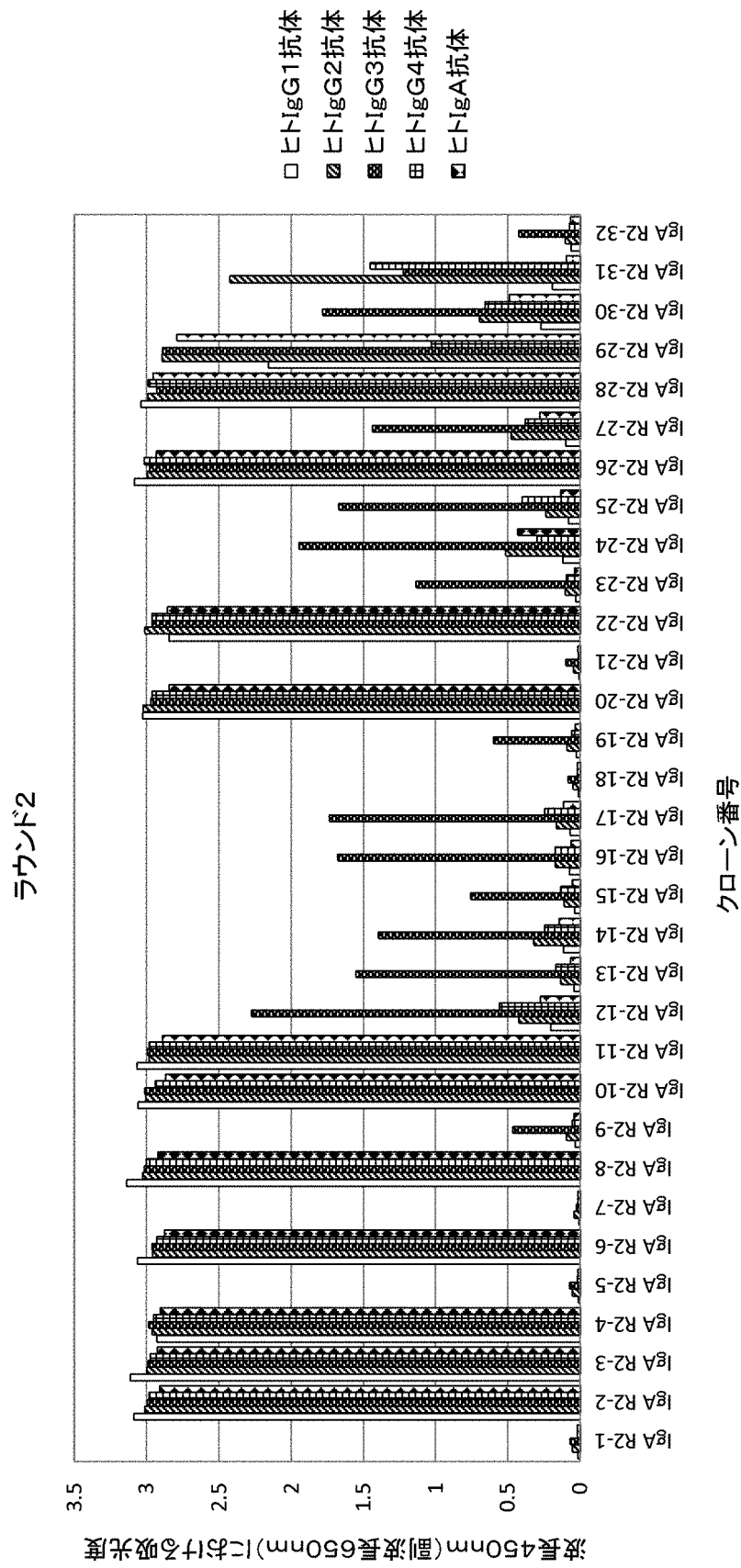
[図13]



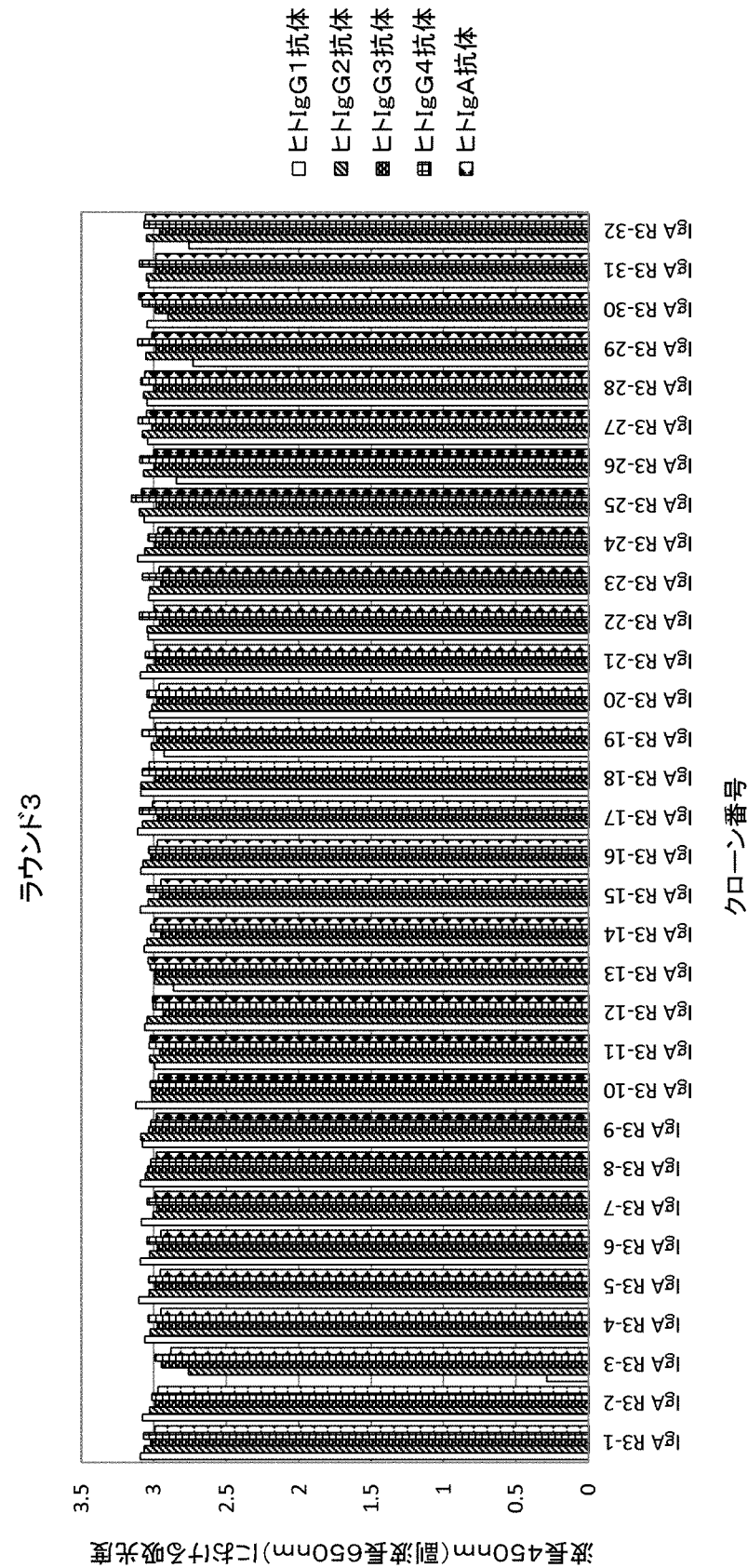
[図14]



[図15]



[図16]



[図17-1]

ラウンド1終了時

| V <sub>H</sub> |                         |           |                   |         |                                         |                  |            |    |  | 配列番号 | 備考 |
|----------------|-------------------------|-----------|-------------------|---------|-----------------------------------------|------------------|------------|----|--|------|----|
| クローン番号         | FR1                     | CDR1      | FR2               | CDR2    | FR3                                     | CDR3             | FR4        |    |  |      |    |
| IgA R1-1       | QSLEESGGRVDPDEILITICTA  | SGFSLSSYA | MCWRQAQPKGLEWIGI  | IGSGDT  | YYASWAKGRFTISKI ATTVDLKITSPITIEDIATYFC  | ARAGNDRYIGDNLW   | QPGILVTVTS | 36 |  |      |    |
| IgA R1-2       | -                       | -         | -                 | -       | -                                       | -                | -          |    |  |      |    |
| IgA R1-3       | SRWRSPGGRVTPGPIITICTV   | SGIDLSSYA | MIWRQSPGEGLEYIGI  | ISSTGSA | YYASWAKGRFALAKI STTMOLKMISPTIEDIATYFC   | GRYINGGVFDLW     | QPGILVTVTS | 37 |  |      |    |
| IgA R1-4       | -                       | -         | -                 | -       | -                                       | -                | -          |    |  |      |    |
| IgA R1-5       | -                       | -         | -                 | -       | -                                       | -                | PRATLVTVTS | 38 |  |      |    |
| IgA R1-6       | -                       | -         | -                 | -       | -                                       | -                | -          |    |  |      |    |
| IgA R1-7       | QSLEESGGRVTPGGSILITCTV  | SGIDLSSYA | MCWRQAQPKGLEWIGI  | VEWGSA  | DYAAWAKGRFTISKI STTVDLKITSPITIEDIATYFC  | VRDEHGNIGSLW     | QPGILVTVTS | 39 |  |      |    |
| IgA R1-8       | -                       | -         | -                 | -       | -                                       | -                | PRATLVTVTS | 40 |  |      |    |
| IgA R1-9       | -                       | -         | -                 | -       | -                                       | -                | -          |    |  |      |    |
| IgA R1-10      | QSVEESGRVTPGPIILITCTV   | SGIDLNSWP | MSWRQAQPKGLEWIGI  | INTGSA  | YYASWAEGRFTISKI SSTTVDLKITSPITIEDIATYFC | ARQVPSYGGGAYIW   | QPGILVTVTS | 41 |  |      |    |
| IgA R1-11      | -                       | -         | -                 | -       | -                                       | -                | -          |    |  |      |    |
| IgA R1-12      | -                       | -         | -                 | -       | -                                       | -                | -          |    |  |      |    |
| IgA R1-13      | -                       | -         | -                 | -       | -                                       | -                | -          |    |  |      |    |
| IgA R1-14      | QQQLMESGGRVTPGPIILITCTV | SGIDLSSYA | MCWRQAQPKGLEWIGI  | IDATDVT | YYASWAKGRFTISKA SSTTVDLKITSPITIEDIATYFC | ARYSYNGGAFNLW    | QPGILVTVTS | 42 |  |      |    |
| IgA R1-15      | -                       | -         | -                 | -       | -                                       | -                | PRATLVTVTS | 43 |  |      |    |
| IgA R1-16      | -                       | -         | -                 | -       | -                                       | -                | -          |    |  |      |    |
| IgA R1-17      | -                       | -         | -                 | -       | -                                       | -                | -          |    |  |      |    |
| IgA R1-18      | QSLEESGGRVTPGPIILISCTV  | SGIDLSSNA | MSWRQAQPKGLEWIGA  | IYRGNT  | EPASWAKGRFTISKI STTVDLKITSLTTIEDIATYFC  | AGWDITLPPKFW     | QPGILVTVTS | 44 |  |      |    |
| IgA R1-19      | QSVEESGRVTPGPIILITCTV   | SGFSLSTYG | VSWRQAQPKGLEWIGI  | ISSSGST | YYANWAKGRFTISKI SSTTVDLKMISLTIEDIATYFC  | ARGYSNYYIGYAFDPW | QPGILVTVTS | 45 |  |      |    |
| IgA R1-20      | -                       | -         | -                 | -       | -                                       | -                | -          |    |  |      |    |
| IgA R1-21      | -                       | -         | -                 | -       | -                                       | -                | -          |    |  |      |    |
| IgA R1-22      | QSVEESGGRVSPGPIILITCTV  | SGFSLSSYY | MIWRQAQPKGLEWIGI  | IDGVGSA | YYASWAKGRFTISRA STTVDLTMTSLTADATYFC     | ARVDYGVSPDLW     | QPGILVTVTS | 46 |  |      |    |
| IgA R1-23      | -                       | -         | -                 | -       | -                                       | -                | -          |    |  |      |    |
| IgA R1-24      | -                       | -         | -                 | -       | -                                       | -                | -          |    |  |      |    |
| IgA R1-25      | QSVKESGRVTPGPIILITCTA   | SGFSLSSNA | MSWRQAQPKGLEWIGT  | INTGGIT | YYASWAKGRFTISKI STTVDLKMTGLTIEDIATYFC   | ARFWNLW          | QPGILVTVTS | 47 |  |      |    |
| IgA R1-26      | -                       | -         | -                 | -       | -                                       | -                | -          |    |  |      |    |
| IgA R1-27      | QFQLEESGGRVTPGGSILITCTV | SGIDLSSYA | MCWRQAQPKGLEWIGI  | ISSSGST | YYASWAKGRFTISKI SSTTVDLKMISLTIEDIATYFC  | ARYSDNGGTLNLW    | QPGILVTVTS | 48 |  |      |    |
| IgA R1-28      | -                       | -         | -                 | -       | -                                       | -                | -          |    |  |      |    |
| IgA R1-29      | QSLEESGGRVTPGPIILITCTV  | SGLYLSSDA | MIWRQAQPKGLEWIGI  | IYASGST | YYASWAKGRFTISKI STTVDLKITSPITIEDIATYFCA | ARVKSNGHYFDLW    | QPGILVTVTS | 49 |  |      |    |
| IgA R1-30      | -                       | -         | -                 | -       | -                                       | -                | -          |    |  |      |    |
| IgA R1-31      | QSVVEESGRVTPGPIILITCTI  | SGFSLNIYE | INWWRQAQPKGLEWIAA | IWRGHT  | DYSWAKGRFTISKS STTVELRMTSLTTIEDIATYFC   | ARYSDNGGTFNLW    | QPGILVTVTS | 50 |  |      |    |
| IgA R1-32      | QSLEESGGRVTPGPIILITCTV  | SGFTISSYA | MIWRQAQPKGLEWIGA  | ISSSGIT | YYASWAKGRFTISKI ATTVDLKMISLTIEDIATYFC   | ARADYNTAAVFDLW   | QPGILVTVTS | 51 |  |      |    |

## [図17-2]

## ラウンド1終了時

| CDR3の配列             | 残基数 | 出現数 | 出現確率(%) | 配列番号 |
|---------------------|-----|-----|---------|------|
| ARGGYSDSNYYIGYAFDPW | 19  | 1   | 3.1     | 52   |
| ARAGNDRIYIGDNLW     | 14  | 1   | 3.1     | 53   |
| ARGVPSYGGGAYIW      | 14  | 1   | 3.1     | 54   |
| ARYSGYNGGAFNLW      | 14  | 1   | 3.1     | 55   |
| ARYSGDNNGGTLNLW     | 14  | 1   | 3.1     | 56   |
| ARVRSNGHYFDLW       | 14  | 1   | 3.1     | 57   |
| ARYSGDNNGGTFNLW     | 14  | 1   | 3.1     | 58   |
| ARADYNTAAYFDLW      | 14  | 1   | 3.1     | 59   |
| GRYINGGYFDLW        | 12  | 1   | 3.1     | 60   |
| VRDEHGNIGSLW        | 12  | 1   | 3.1     | 61   |
| AGDWDTLPPKFW        | 12  | 1   | 3.1     | 62   |
| ARVDYGVSFDLW        | 12  | 1   | 3.1     | 63   |
| ARFWNLW             | 7   | 1   | 3.1     | 64   |
| ネガティブクローン           | -   | 19  | 59.4    |      |

[図17-3]

ラウンド2終了時

| V <sub>H</sub> |                          |           |                    |          |                        |                     |            |            | 備考 |
|----------------|--------------------------|-----------|--------------------|----------|------------------------|---------------------|------------|------------|----|
| クローン番号         | FR1                      | CDR1      | FR2                | CDR2     | FR3                    | CDR3                | FR4        | 配列番号       |    |
| IgA R2-1       | -                        | -         | -                  | -        | -                      | -                   | -          |            |    |
| IgA R2-2       | QEQLMESGGRVTPGIPILICTV   | SGFSLGVA  | VTVWRQAPGEGLEWIGT  | ISTVGS   | STTVDLKITSPITEDIATYFC  | ATRYDSGYAANNVWFGTLW | QPGTLVTVTS | 65         |    |
| IgA R2-3       | QQQLMESGGRVTPGIPILICTV   | SGIDLSSNA | MTWWRQAPGEGLEWIGT  | ISTGGS   | STTVDLKITSPITEDIATYFC  | ATRYDSGYAANNVWFGTLW | QPGTLVTVTS | 66<br>共通 2 |    |
| IgA R2-4       | QS VEESGGRVSPGIPILICTV   | SGFSLSSYY | MTWWRQAPGCKGLEWIGM | IDGYGGNA | ATTVDLKMISLTEDIATYFC   | VRADYNTVSVYFDLW     | QPGTLVTVTS | 67<br>共通 7 |    |
| IgA R2-5       | -                        | -         | -                  | -        | -                      | -                   | -          |            |    |
| IgA R2-6       | QS LEESGGRVTPGIPILICTV   | SGIDLSSNA | MTWWRQAPGEGLEWIGT  | ISTGGS   | STTVDLKITSPITEDIATYFC  | ATRYDSGYAANNVWFGTLW | QPGTLVTVTS | 68<br>共通 1 |    |
| IgA R2-7       | QS LEESGGRVTPGIPILICTV   | SGIDLSDVA | VTVWRQAPGCKLEWIGT  | ISTVIN   | STTVDLKITSPITEDIATYFC  | ATRYDSGYAANNVWFGTLW | QPGTLVTVTS | 69         |    |
| IgA R2-8       | QQQLMESGGRVTPGIPILICTV   | SGIDLSSNA | MTWWRQAPGEGLEWIGT  | ISTGGS   | STTVDLKITSPITEDIATYFC  | ATRYDSGYAANNVWFGTLW | QPGTLVTVTS | 70<br>共通 2 |    |
| IgA R2-9       | QS LEESGGGLVPGGSLTIACTV  | SGIDLSSNA | MCWWRQAPGCKLEWIGL  | INSGGT   | STTVDLKMISLTEDIATYFC   | ARAGDSVSTLALW       | QPGTLVTVTS | 71         |    |
| IgA R2-10      | QS VEESGGRVSPGIPILICTV   | SGFSLSTYY | MTWWRQAPGCKGLEWIGS | IDGTGDDT | ATTVDLKMISLTEDIATYFC   | ARADYNTVAVFDLW      | QPGTLVTVTS | 72<br>共通 6 |    |
| IgA R2-11      | QQQLMESGGRVTPGIPILICTV   | SGIDLSSNA | MTWWRQAPGEGLEWIGT  | ISTGGS   | STTVDLKITSPITEDIATYFC  | ATRYDSGYAANNVWFGTLW | QPGTLVTVTS | 73<br>共通 2 |    |
| IgA R2-12      | QS VEESRGRVTPGIPILICTV   | SGFSLSSYA | MCWFLAPGCKLEWIGI   | ITIGDSI  | STTVDLKITSPITADIATYFC  | ARGNIGIGWGSYYFNFW   | QPGTLVTVTS | 74         |    |
| IgA R2-13      | QS VEESGGRVTPGIPILICTV   | SGIDLSSYA | MSWWRQAPGCKLEWIGY  | ITTRDKT  | STVSLRIASPTEDIATYFC    | ATALYADDGNLW        | QPGTLVTVTS | 75         |    |
| IgA R2-14      | QS LEESGGRVTPGIPILICTV   | SGFSLSSYP | MCWWRQAPGCKLEWIGA  | INTGGS   | STTVDLKMISLTAEADIATYFC | VRHDDDLTFNLW        | QPGTLVTVTS | 76         |    |
| IgA R2-15      | -                        | -         | -                  | -        | -                      | -                   | -          |            |    |
| IgA R2-16      | QQQLVESGGRVTPGIPILICTV   | SGFSLSNYY | MCWWRQAPGCKLQWIAAY | IMQSGIA  | STTVDLKMISLTAAIDATYFC  | ARDVDGGYALW         | QPGTLVTVTS | 77         |    |
| IgA R2-17      | QS LEESGGRVTPGIPILICTV   | SGFSLSSYY | MSWWRQAPGCKLEWIGS  | IDTNSNT  | STTVDLKMISPTEDIATYFC   | VRGVIGATGDLW        | QPGTLVTVTS | 78         |    |
| IgA R2-18      | -                        | -         | -                  | -        | -                      | -                   | -          |            |    |
| IgA R2-19      | QS VEESRGRVTPGIPILICTV   | SGFSLSSYA | LSWWRQAPGCKLEWIGY  | ILAGGSA  | STTVELKVISPTEDIATYFC   | ARGGAGYNTVGNLW      | QPGTLVTVTS | 79         |    |
| IgA R2-20      | QEQLMESGGRVTPGIPILICTV   | SGFSLGVA  | VTVWRQAPGEGLEWIGT  | ISTVGS   | STTVDLKITSPITEDIATYFC  | ATRYDSGYAANNVWFGTLW | QPGTLVTVTS | 80         |    |
| IgA R2-21      | -                        | -         | -                  | -        | -                      | -                   | -          |            |    |
| IgA R2-22      | QS VEESGGRVSPGIPILICTV   | SGFSLSSYY | MTWWRQAPGCKGLEWIGM | IDGYGGNA | ATTVDLKMISLTEDIATYFC   | VRADYNTVSVYFDLW     | QPGTLVTVTS | 81<br>共通 7 |    |
| IgA R2-23      | QS VKESGRVTPGIPILICTV    | SGFSLSNYN | MCWWRQAPGCKGLEWIGA | IVSSGPT  | STTVDLKMISLTEDIATYFC   | AKNDPPETVDLW        | QPGTLVTVTS | 82         |    |
| IgA R2-24      | QS VEESRGRVTPGIPILICTV   | SGIDLMSNA | MCWWRQAPGCKLEWIGI  | ISSSGST  | STTVDLKITSPITEDAAATYFC | ARAIDNGGQYFNLW      | QPGTLVTVTS | 83         |    |
| IgA R2-25      | QEQLLEESGGGLVTPGIPILICTV | SGFSLDSYY | MTWWRQAPGEGLEWIGI  | IGGGGDT  | STTVDLKMISLTEDIATYFC   | ARDVDGGYALW         | QPGTLVTVTS | 84         |    |
| IgA R2-26      | QS LEESGGRVTPGIPILICTV   | SGIDLSSNA | MTWWRQAPGEGLEWIGT  | ISTGGS   | STTVDLKITSPITEDIATYFC  | ATRYDSGYAANNVWFGTLW | QPGTLVTVTS | 85<br>共通 1 |    |
| IgA R2-27      | QS VEESGGRVTPGIPILICTV   | SGIDLNNYA | MCWWRQAPGCKLEWIGI  | ISYGGSA  | STTVDLKITSPITEDIATYFC  | ARGDYNGGYALNFW      | QPGTLVTVTS | 86         |    |
| IgA R2-28      | -                        | -         | -                  | -        | -                      | -                   | -          |            |    |
| IgA R2-29      | QS VEESGGRVTPGIPILICTV   | SGIDLSSYP | MCWWRQAPGCKLEWIGI  | ISDSINT  | STTVDLKITSPITEDIATYFC  | ARGWLVDLW           | QPGTLVTVTS | 87         |    |
| IgA R2-30      | QS LEESGGRVTPGIPILICTV   | SGIDLNSYA | MCWWRQAPGEGLEWIGI  | ITSSSIT  | STTVDLKMISLTEDIATYFC   | ARGDYNNNDYFNLW      | QPGTLVTVTS | 88         |    |
| IgA R2-31      | QS VEESGGRVTPGIPILICTV   | SGFSLNIVE | INWWRQAPGCKLEWIAA  | IWRGHT   | STTVELKMISLTEDIATYFC   | ARYSDNGGTFNLW       | QPGTLVTVTS | 89         |    |
| IgA R2-32      | QS LEESGGRVTPGIPILICTV   | SGFSLSSYA | MANWWRQAPGCKLEWITP | ICTGGDI  | STTVDLKIASPTEDIATYFC   | ARGDTGGSLYRHFNLW    | QPGTLVTVTS | 90         |    |

## [図17-4]

## ラウンド2終了時

| CDR3の配列             | 残基数 | 出現数 | 出現確率(%) | 配列番号 |
|---------------------|-----|-----|---------|------|
| ATRYDSYGYAYNYWFGTLW | 19  | 8   | 25.0    | 91   |
| ARGNIGIGWGSYYFNFW   | 17  | 1   | 3.1     | 92   |
| ARGDYDNYGYGYAINFW   | 17  | 1   | 3.1     | 93   |
| ARGDTGGSLYRHFNLW    | 16  | 1   | 3.1     | 94   |
| ARGGAGYNTVGLNLW     | 15  | 1   | 3.1     | 95   |
| ARGDYNNNWDYFNLW     | 15  | 1   | 3.1     | 96   |
| ARADYNTVAYFDLW      | 14  | 1   | 3.1     | 97   |
| VRADYNTVSYFDLW      | 14  | 2   | 6.3     | 98   |
| ARAIGDNGGYFNLW      | 14  | 1   | 3.1     | 99   |
| ARYSGDNGGTfNLW      | 14  | 1   | 3.1     | 100  |
| ARAGDSVSTLALW       | 13  | 1   | 3.1     | 101  |
| ATALYADDGNTLW       | 13  | 1   | 3.1     | 102  |
| AKNDPPFETYDLW       | 13  | 1   | 3.1     | 103  |
| VRGVIGATGDLW        | 12  | 1   | 3.1     | 104  |
| VRHDDDLTFNLW        | 12  | 1   | 3.1     | 105  |
| ARDVDGGYALW         | 11  | 2   | 6.3     | 106  |
| ARGWLYFDLW          | 10  | 1   | 3.1     | 107  |
| ネガティブクローン           | -   | 4   | 12.5    |      |

[図17-5]

ラウンド3終了時

| V <sub>H</sub> |                        |            |                  |          |                                      |                     |           |      | 備考              |
|----------------|------------------------|------------|------------------|----------|--------------------------------------|---------------------|-----------|------|-----------------|
| クローン番号         | FR1                    | CDR1       | FR2              | CDR2     | FR3                                  | CDR3                | FR4       | 配列番号 |                 |
| IgA R3-1       | QS VKESGGRVTPGIPILICTV | SGIDLSSNA  | MSWRQAPGEGLEWIGT | ISTVCKT  | YFASWAKGRTISKI STTVDLRITSPITEDIATYFC | ATRYDSGYAANNVWFGILW | QPGILVITS | 108  | 共通 3 (R3-75と同一) |
| IgA R3-2       | QQQLMESGGRVTPGIPILICTV | SGIDLSSNA  | MTWRQAPGEGLEWIGT | ISTGGST  | YFASWAKGRTISKI STTVDLKITSPITEDIATYFC | ATRYDSGYAANNVWFGILW | QPGILVITS | 109  | 共通 2            |
| IgA R3-3       | QS LEESGGRVTPGGSLLICTA | SGFSLSSAYD | INWRQAPCKGLEWIGM | ISGSGST  | YFASWAKGRTISKI STTVDLKMSLTADIAIYFC   | ARGFDNVLNW          | QPGILVITS | 110  |                 |
| IgA R3-4       | QQQLMESGGRVTPGIPILICTV | SGIDLSSNA  | MTWRQAPGEGLEWIGT | ISTGGST  | YFASWAKGRTISKI STTVDLKITSPITEDIATYFC | ATRYDSGYAANNVWFGILW | QPGILVITS | 111  | 共通 2            |
| IgA R3-5       | QS VEESGGRVTPGIPILICTV | SGIDLSSNA  | MTWRQAPGEGLEWIGT | ISTGGST  | YFASWAKGRTISKI STTVDLKITSPITEDIATYFC | ATRYDSGYAANNVWFGILW | QPGILVITS | 112  | 共通 4 (R2-18と同一) |
| IgA R3-6       | QS LEESGGRVTPGIPILICTV | SGIDLSSNA  | MTWRQAPGEGLEWIGT | ISTGGST  | YFASWAKGRTISKI STTVDLKITSPITEDIATYFC | ATRYDSGYAANNVWFGILW | QPGILVITS | 113  | 共通 1            |
| IgA R3-7       | QS LEESGGRVTPGIPILICTV | SGIDLSSNA  | MSWRQAPGEGLEWIGT | ISTGCSA  | YFASWAKGRTISKI STTVDLKITSPITEDIATYFC | ATRYDSGYAANNVWFGILW | QPGILVITS | 114  | 共通 5            |
| IgA R3-8       | QQQLMESGGRVTPGIPILICTV | SGIDLSSNA  | MTWRQAPGEGLEWIGT | ISTGGST  | YFASWAKGRTISKI STTVDLKITSPITEDIATYFC | ATRYDSGYAANNVWFGILW | QPGILVITS | 115  | 共通 2            |
| IgA R3-9       | QS VKESGGRVTPGIPILICTV | SGIDLSSNA  | MSWRQAPGEGLEWIGT | ISTVCKT  | YFASWAKGRTISKI STTVDLRITSPITEDIATYFC | ATRYDSGYAANNVWFGILW | QPGILVITS | 116  | 共通 3 (R3-75と同一) |
| IgA R3-10      | QS LEESGGRVTPGIPILICTV | SGIDLSSNA  | MTWRQAPGEGLEWIGT | ISTGGST  | YFASWAKGRTISKI STTVDLKITSPITEDIATYFC | ATRYDSGYAANNVWFGILW | QPGILVITS | 117  | 共通 1            |
| IgA R3-11      | QS LEESGGRVTPGIPILICTV | SGIDLSSNA  | MTWRQAPGEGLEWIGT | ISTGGST  | YFASWAKGRTISKI STTVDLKITSPITEDIATYFC | ATRYDSGYAANNVWFGILW | QPGILVITS | 118  | 共通 1            |
| IgA R3-12      | QQQLMESGGRVTPGIPILICTV | SGIDLSSNA  | MTWRQAPGEGLEWIGT | ISTGGST  | YFASWAKGRTISKI STTVDLKITSPITEDIATYFC | ATRYDSGYAANNVWFGILW | QPGILVITS | 119  | 共通 2            |
| IgA R3-13      | QS VEESGGRVSPGIPILICTV | SGFSLSSYY  | MTWRQAPCKGLEWIGM | IDVGGNA  | YYANWAKGRTYSKA ATTVDLKMISLTEDIATYFC  | VRADYNTVSYFDLW      | QPGILVITS | 120  | 共通 7            |
| IgA R3-14      | QS LEESGGRVTPGIPILICTV | SGIDLSSNA  | MTWRQAPGEGLEWIGT | ISTGGST  | YFASWAKGRTISKI STTVDLKITSPITEDIATYFC | ATRYDSGYAANNVWFGILW | QPGILVITS | 121  | 共通 1            |
| IgA R3-15      | QS LEESGGRVTPGIPILICTV | SGIDLSSNA  | MTWRQAPGEGLEWIGT | ISTGGST  | YFASWAKGRTISKI STTVDLKITSPITEDIATYFC | ATRYDSGYAANNVWFGILW | QPGILVITS | 122  | 共通 1            |
| IgA R3-16      | QS LEESGGRVTPGIPILICTV | SGIDLSSNA  | MTWRQAPGEGLEWIGT | ISTGGST  | YFASWAKGRTISKI STTVDLKITSPITEDIATYFC | ATRYDSGYAANNVWFGILW | QPGILVITS | 123  | 共通 1            |
| IgA R3-17      | QQQLMESGGRVTPGIPILICTV | SGIDLSSNA  | MTWRQAPGEGLEWIGT | ISTGGST  | YFASWAKGRTISKI STTVDLKITSPITEDIATYFC | ATRYDSGYAANNVWFGILW | QPGILVITS | 124  | 共通 2            |
| IgA R3-18      | QS VEESGGRVTPGIPILICTV | SGIDLSSNA  | MTWRQAPGEGLEWIGT | ISTGGST  | YFASWAKGRTISKI STTVDLKITSPITEDIATYFC | ATRYDSGYAANNVWFGILW | QPGILVITS | 125  | 共通 4 (R2-18と同一) |
| IgA R3-19      | QS VEESGGRVSPGIPILICTA | SGFSLSTYY  | MTWRQAPCKGLEYIGS | IDVGGDT  | YYATWAKGRTVSKT ATTVDLKMISLTEDIATYFC  | ARADYNTVAFYDLW      | QPGILVITS | 126  | 共通 6            |
| IgA R3-20      | QS LEESGGRVTPGIPILICTV | SGIDLSSNA  | MTWRQAPGEGLEWIGT | ISTGGST  | YFASWAKGRTISKI STTVDLKITSPITEDIATYFC | ATRYDSGYAANNVWFGILW | QPGILVITS | 127  | 共通 1            |
| IgA R3-21      | QS LEESGGRVTPGIPILICTV | SGIDLSSNA  | MTWRQAPGEGLEWIGT | ISTGGST  | YFASWAKGRTISKI STTVDLKITSPITEDIATYFC | ATRYDSGYAANNVWFGILW | QPGILVITS | 128  | 共通 1            |
| IgA R3-22      | QQQLMESGGRVTPGIPILICTV | SGIDLSSNA  | MTWRQAPGEGLEWIGT | ISTGGST  | YFASWAKGRTISKI STTVDLKITSPITEDIATYFC | ATRYDSGYAANNVWFGILW | QPGILVITS | 129  | 共通 2            |
| IgA R3-23      | QQQLMESGGRVTPGIPILICTV | SGIDLSSNA  | MTWRQAPGEGLEWIGT | ISTGGST  | YFASWAKGRTISKI STTVDLKITSPITEDIATYFC | ATRYDSGYAANNVWFGILW | QPGILVITS | 130  | 共通 2            |
| IgA R3-24      | QS LEESGGRVTPGIPILICTV | SGIDLSSNA  | MSWRQAPGEGLEWIGT | ISTGCSA  | YFASWAKGRTISKI STTVDLKITSPITEDIATYFC | ATRYDSGYAANNVWFGILW | QPGILVITS | 131  | 共通 5            |
| IgA R3-25      | QQQLMESGGRVTPGIPILICTV | SGIDLSSNA  | MTWRQAPGEGLEWIGT | ISTGGST  | YFASWAKGRTISKI STTVDLKITSPITEDIATYFC | ATRYDSGYAANNVWFGILW | QPGILVITS | 132  | 共通 2            |
| IgA R3-26      | QS VKESGGRVSPGIPILICTV | SGFSLSSYY  | MTWRQAPCKGLEYIGS | IDVGGDT  | YYATWAKGRTVSKT ATTVDLKMISLTEDIATYFC  | ARADYNTVAFYDLW      | QPGILVITS | 133  |                 |
| IgA R3-27      | QS LEESGGRVTPGIPILICTV | SGIDLSSNA  | MTWRQAPGEGLEWIGT | ISTGGST  | YFASWAKGRTISKI STTVDLKITSPITEDIATYFC | ATRYDSGYAANNVWFGILW | QPGILVITS | 134  | 共通 1            |
| IgA R3-28      | QS LEESGGRVTPGIPILICTV | SGIDLSSNA  | MTWRQAPGEGLEWIGT | ISTIGIT  | YFASWAKGRTISKI STTVDLKITSPITEDIATYFC | ATRYDSGYAANNVWFGILW | QPGILVITS | 135  | 共通 1            |
| IgA R3-29      | QS LEESGGRVSPGIPILICTV | SGFSLSTYY  | MTWRQAPCKGLEYIGS | IDVGGNA  | YYATWAKGRTISKI ATTVDLKMISLTEDIATYFC  | ARADYNTAAFYDLW      | QPGILVITS | 136  |                 |
| IgA R3-30      | QS LEESGGRVTPGIPILICTV | SGIDLSSNA  | MTWRQAPGEGLEWIGT | ISTGGST  | YFASWAKGRTISKI STTVDLKITSPITEDIATYFC | ATRYDSGYAANNVWFGILW | QPGILVITS | 137  | 共通 1            |
| IgA R3-31      | QS LEESGGRVTPGIPILICTV | SGIDLSSNA  | MTWRQAPGEGLEWIGT | ISTGGST  | YFASWAKGRTISKI STTVDLKITSPITEDIATYFC | ATRYDSGYAANNVWFGILW | QPGILVITS | 138  | 共通 1            |
| IgA R3-32      | QS LEESGGRVTPGIPILICTV | SGFSLSSYY  | MTWRQAPCKGLEYIGS | IDVGGCSA | YYATWAKGRTVSKT ATTVDLKMISLTEDIATYFC  | ARADYNTAAFYDLW      | QPGILVITS | 139  |                 |

## [図17-6]

ラウンド3終了時

| CDR3の配列             | 残基数 | 出現数 | 出現確率(%) | 配列番号 |
|---------------------|-----|-----|---------|------|
| ATRYDSYGYAYNYWFGTLW | 19  | 26  | 81.3    | 140  |
| ARADYNTVAYFDLW      | 14  | 2   | 6.3     | 141  |
| ARADYNTAAAYFDLW     | 14  | 2   | 6.3     | 142  |
| VRADYNTVSYFDLW      | 14  | 1   | 3.1     | 143  |
| ARGFDNYNLW          | 10  | 1   | 3.1     | 144  |
| ネガティブクローン           | -   | 0   | 0       |      |

[図17-7]

| クローン番号 | V <sub>H</sub>           |                 |                   |         |                                      |                    |           | 配列番号 | 備考              |
|--------|--------------------------|-----------------|-------------------|---------|--------------------------------------|--------------------|-----------|------|-----------------|
|        | FR1                      | CDR1            | FR2               | CDR2    | FR3                                  | CDR3               | FR4       |      |                 |
|        | QS VEESGGRLVTPGPIPLILCTV | SGDILSSNA       | MTWVRQAPGEGLEWIGT | ISTGGST | VFASWAKGRFTISKSTTVVDLKITSPPTIEDATVFC | ATRYDSGYAVVWVFGTLW | GPGLVTVTS |      |                 |
|        | 145                      | 共通 4 (R2-18と同一) |                   |         |                                      |                    |           |      |                 |
| R2-18  | QS VEESGGRLVTPGPIPLILCTV | SGDILSSNA       | MTWVRQAPGEGLEWIGT | ISTGGST | VFASWAKGRFTISKSTTVVDLKITSPPTIEDATVFC | ATRYDSGYAVVWVFGTLW | GPGLVTVTS | 146  | 共通 4 (R2-18と同一) |
| R3-8   | QS VEESGGRLVTPGPIPLILCTV | SGDILSSNA       | MSWVRQAPGEGLEWIGT | ISTVGKT | VFASWAKGRFTISKSTTVVDLRITSPPTIEDATVFC | ATRYDSGYAVVWVFGTLW | GPGLVTVTS | 147  | 共通 3 (R3-75と同一) |
| R3-75  | QS VKESGGRLVTPGPIPLILCTV | SGDILSSNA       | MSWVRQAPGEGLEWIGT | ISTVGKT | VFASWAKGRFTISKSTTVVDLRITSPPTIEDATVFC | ATRYDSGYAVVWVFGTLW | GPGLVTVTS | 147  | 共通 3 (R3-75と同一) |

[図17-8]

## ラウンド1終了時

|                 | クローン数 |
|-----------------|-------|
| 共通 1            | 0     |
| 共通 2            | 0     |
| 共通 3 (R3-75と同一) | 0     |
| 共通 4 (R2-18と同一) | 0     |
| 共通 5            | 0     |
| 共通 6            | 0     |
| 共通 7            | 0     |

[図17-9]

## ラウンド2終了時

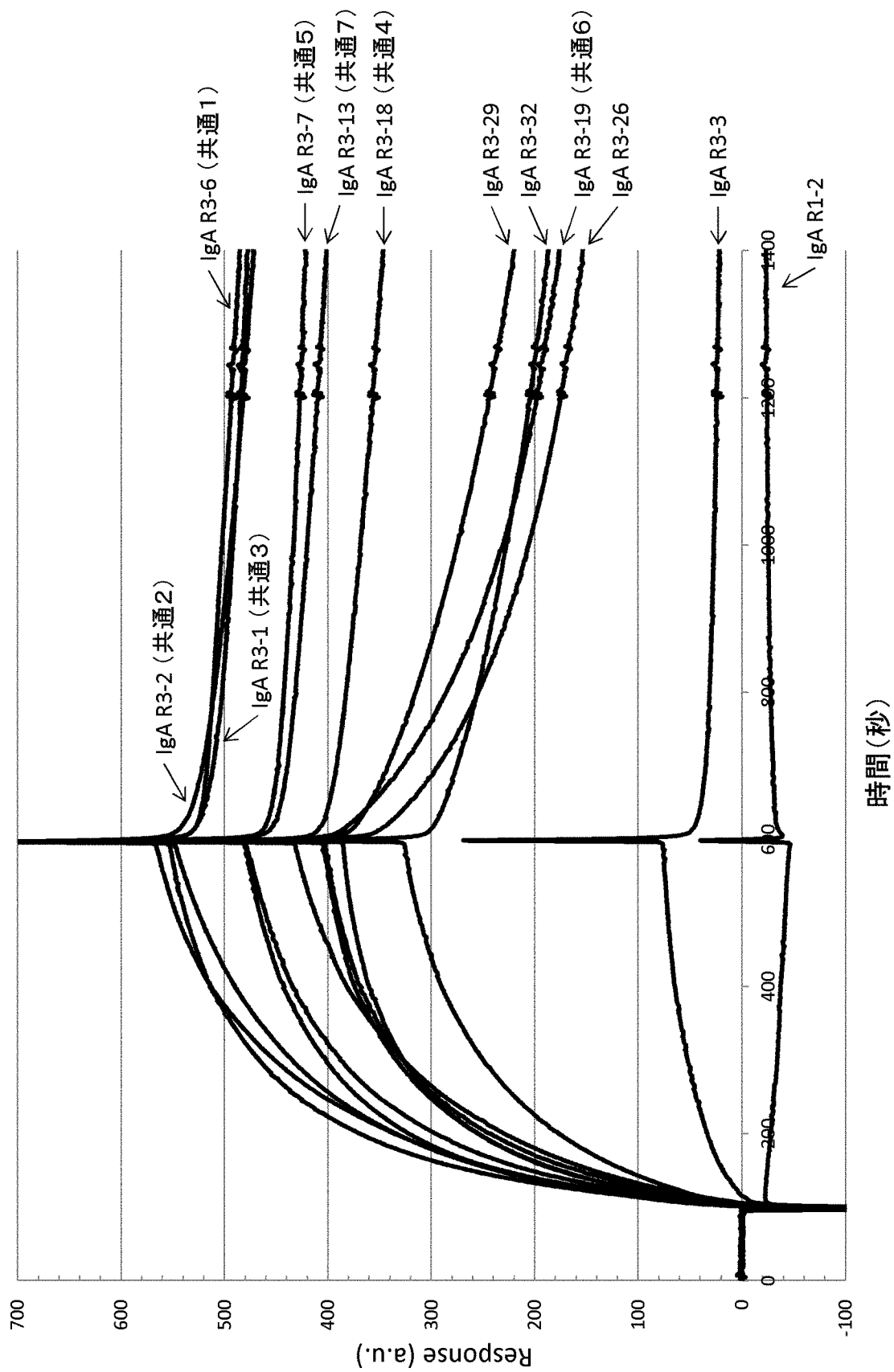
|                 | クローン数 |
|-----------------|-------|
| 共通 1            | 2     |
| 共通 2            | 3     |
| 共通 3 (R3-75と同一) | 0     |
| 共通 4 (R2-18と同一) | 0     |
| 共通 5            | 0     |
| 共通 6            | 1     |
| 共通 7            | 2     |

[図17-10]

## ラウンド3終了時

|                 | クローン数 |
|-----------------|-------|
| 共通 1            | 12    |
| 共通 2            | 8     |
| 共通 3 (R3-75と同一) | 2     |
| 共通 4 (R2-18と同一) | 2     |
| 共通 5            | 2     |
| 共通 6            | 1     |
| 共通 7            | 1     |

[図18]



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/082986

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C07K1/22(2006.01)i, C07K16/42(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i, C12Q1/70(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, C07K1/22, C07K16/42, C12P21/08, C12Q1/70

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

|                           |           |                            |           |
|---------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Jitsuyo Shinan Koho       | 1922-1996 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2017 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2017 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2017 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), DWPI(Thomson Innovation)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                     | Relevant to claim No.    |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Y<br>A    | JP 2013-508700 A (F. Hoffmann-La Roche AG.),<br>07 March 2013 (07.03.2013),<br>claims; examples; particularly, examples 4, 6<br>to 7, 11<br>& WO 2011/048043 A1<br>claims; examples<br>& US 2012/0208216 A1 & EP 2491397 A1<br>& CA 2776576 A & CN 102656460 A<br>& KR 10-2013-26409 A | 1, 4-6, 9-10<br>2-3, 7-8 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
26 January 2017 (26.01.17)

Date of mailing of the international search report  
07 February 2017 (07.02.17)

Name and mailing address of the ISA/  
Japan Patent Office  
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,  
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/082986

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                       | Relevant to claim No.    |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Y<br>A    | JP 2008-525766 A (F. Hoffmann-La Roche AG.),<br>17 July 2008 (17.07.2008),<br>paragraph [0021]; examples<br>& WO 2006/066912 A2<br>page 6, lines 13 to 21; examples<br>& US 2008/0102474 A1 & EP 1853921 A2<br>& CA 2589054 A & CN 101088014 A<br>& KR 10-2007-0086642 A | 1, 6<br>2-5, 7-10        |
| Y<br>A    | JP 2009-142269 A (Takara Bio Inc.),<br>02 July 2009 (02.07.2009),<br>claims; paragraph [0020]; example 2<br>(Family: none)                                                                                                                                               | 1, 4-6, 9-10<br>2-3, 7-8 |
| A         | JP 2009-501713 A (Coimmune Inc.),<br>22 January 2009 (22.01.2009),<br>claims<br>& WO 2007/011639 A2<br>claims<br>& US 2009/0297534 A1 & EP 1907423 A2<br>& CA 2615386 A                                                                                                  | 1-10                     |
| A         | JP 57-501147 A (The University of Birmingham),<br>01 July 1982 (01.07.1982),<br>claims<br>& WO 1982/00364 A1<br>claims<br>& US 4618589 A & EP 44219 A1<br>& GB 2107053 A                                                                                                 | 1-10                     |

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C07K1/22(2006.01)i, C07K16/42(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i,  
C12Q1/70(2006.01)i

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09, C07K1/22, C07K16/42, C12P21/08, C12Q1/70

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

|             |                     |
|-------------|---------------------|
| 日本国実用新案公報   | 1 9 2 2 - 1 9 9 6 年 |
| 日本国公開実用新案公報 | 1 9 7 1 - 2 0 1 7 年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1 9 9 6 - 2 0 1 7 年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1 9 9 4 - 2 0 1 7 年 |

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), DWPI (Thomson Innovation)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                                                                 | 関連する<br>請求項の番号           |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Y<br>A          | JP 2013-508700 A (エフ・ホフマンーラ ロシュ アーゲー)<br>2013.03.07,<br>請求の範囲, 実施例, 特に、実施例 4, 6 ~ 7, 11,<br>& WO 2011/048043 A1, claims, example,<br>& US 2012/0208216 A1 & EP 2491397 A1 & CA 2776576 A<br>& CN 102656460 A & KR 10-2013-26409 A | 1, 4-6, 9-10<br>2-3, 7-8 |

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

|                                                                |                                                                       |
|----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの                                 | 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの       |
| 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの                         | 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの                       |
| 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) | 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの |
| 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献                                      | 「&」 同一パテントファミリー文献                                                     |
| 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願                                   |                                                                       |

国際調査を完了した日

2 6 . 0 1 . 2 0 1 7

国際調査報告の発送日

0 7 . 0 2 . 2 0 1 7

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂崎 恵美子

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

4 B

9 4 5 1

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                                                                                        |                          |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                                                      | 関連する<br>請求項の番号           |
| Y<br>A                | JP 2008-525766 A (エフ. ホフマンーラ ロシュ アーゲー)<br>2008.07.17,<br>【0021】, 実施例,<br>& WO 2006/066912 A2, p.6 l.13-21, examples,<br>& US 2008/0102474 A1 & EP 1853921 A2 & CA 2589054 A<br>& CN 101088014 A & KR 10-2007-0086642 A | 1, 6<br>2-5, 7-10        |
| Y<br>A                | JP 2009-142269 A (タカラバイオ株式会社) 2009.07.02,<br>請求の範囲, 【0020】, 実施例2,<br>(ファミリーなし)                                                                                                                                         | 1, 4-6, 9-10<br>2-3, 7-8 |
| A                     | JP 2009-501713 A (コイミュン インコーポレイテッド)<br>2009.01.22,<br>請求の範囲など,<br>& WO 2007/011639 A2, claims,<br>& US 2009/0297534 A1 & EP 1907423 A2 & CA 2615386 A                                                                  | 1-10                     |
| A                     | JP 57-501147 A (ジ・ユニヴァーシティー・オブ・バーミンガム)<br>1982.07.01,<br>請求の範囲,<br>& WO 1982/00364 A1, claims,<br>& US 4618589 A & EP 44219 A1 & GB 2107053 A                                                                          | 1-10                     |