

(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
2013年8月29日(29.08.2013)



(10) 国際公開番号
WO 2013/125667 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 39/395 (2006.01) C12P 21/02 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/054461
- (22) 国際出願日: 2013年2月22日(22.02.2013)
- (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:
PCT/JP2012/054624 2012年2月24日(24.02.2012) JP
特願 2012-185866 2012年8月24日(24.08.2012) JP
PCT/JP2012/075092 2012年9月28日(28.09.2012) JP
- (71) 出願人: 中外製薬株式会社(CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 井川 智之(IGAWA, Tomoyuki); 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 前田 敦彦(MAEDA, Atsuhiko); 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 岩柳 有起(IWAYANAGI, Yuki); 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 原谷 健太(HARAYA, Kenta); 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 堅田 仁(KATADA, Hitoshi); 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 門野 正次郎(KADONO, Shojiro); 〒2478530 神奈川県鎌倉市梶原200番地 中外製薬株式会社内 Kanagawa (JP). 味元 風太(MIMOTO, Futa); 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).
- (74) 代理人: 清水 初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒3000847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, 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, 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, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則 4.17 に規定する申立て:

— 出願し及び特許を与えられる出願人の資格に関する申立て (規則 4.17(ii))

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 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))

(54) Title: ANTIGEN-BINDING MOLECULE FOR PROMOTING DISAPPEARANCE OF ANTIGEN VIA FcγRIIB

(54) 発明の名称: FcγRIIB を介して抗原の消失を促進する抗原結合分子

(57) Abstract: The invention provides: an antigen-binding molecule containing (i) an antigen-binding domain for changing the binding activity in relation to an antigen depending on the conditions of ion concentration, (ii) an Fcγ-binding domain having FcγRIIB selective binding activity, and (iii) an FcRn-binding domain having binding activity in relation to FcRn under the conditions of a pH acidic region; and a method for lowering the concentration of an antigen in the plasma in comparison with before administration of the molecule, the method comprising administering the molecule.

(57) 要約: 本発明は、(i) イオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン、(ii) FcγRIIB 選択的な結合活性を有する Fcγ 結合ドメイン、ならびに(iii) pH 酸性域の条件下で FcRn に対する結合活性を有する FcRn 結合ドメインを含む抗原結合分子、および当該分子を投与することを含む当該分子の投与前と比較して当該抗原の血漿中濃度を低下させる方法を提供する。



WO 2013/125667 A1

明 細 書

発明の名称：

Fc γ RIIBを介して抗原の消失を促進する抗原結合分子

技術分野

[0001] 本発明は、血漿中から抗原を消失させるための抗原結合分子の使用、抗原結合分子を投与することを含む血漿中から抗原を消失させる方法、血漿中から抗原を消失させることが可能な抗原結合分子を含む医薬組成物、および血漿中から抗原を消失させるための抗原結合分子の製造方法を提供する。

背景技術

[0002] 抗体は血漿中での安定性が高く、副作用も少ないことから医薬品として注目されている。中でもIgG型の抗体医薬は多数上市されており、現在も数多くの抗体医薬が開発されている（非特許文献1および非特許文献2）。一方、第二世代の抗体医薬に適用可能な技術として様々な技術が開発されており、エフェクター機能、抗原結合能、薬物動態、安定性を向上させる、あるいは、免疫原性リスクを低減させる技術等が報告されている（非特許文献3）。抗体医薬は一般に投与量が非常に高いため、皮下投与製剤の作製が困難であること、製造コストが高いこと等が課題として考えられる。抗体医薬の投与量を低減させる方法として、抗体の薬物動態を改善する方法と、抗体と抗原の親和性（アフィニティー）を向上させる方法が考えられる。

[0003] 抗体の薬物動態を改善する方法として、定常領域の人工的なアミノ酸置換が報告されている（非特許文献4および5）。抗体の抗原に対する結合活性、および/または中和活性を増強させる技術として、アフィニティーマチュレーション技術（非特許文献6）が報告されており、可変領域のCDR領域などのアミノ酸に変異を導入することで抗原に対する結合活性を増強することが可能である。抗原結合能の増強によりin vitroの生物活性を向上させる、あるいは投与量を低減することが可能であり、さらにin vivo（生体内）での薬効を向上させることも可能である（非特許文献7）。

[0004] 一方、中和活性を有する抗体一分子あたりが中和できる抗原量はアフィニティーに依存するため、少ない抗体量で抗原を中和することを目的として、様々な方法で抗体のアフィニティーが増強されている（非特許文献6）。さらに抗原に共有結合的に結合し、抗原に対するアフィニティーが無窮大である抗体であれば、一分子の抗体で一分子の抗原（二価の場合は二抗原）を中和することが可能である。しかし、こうした方法では一分子の抗体で一分子の抗原（二価の場合は二抗原）の化学量論的な中和反応が限界であり、抗原量以下の抗体量で抗原を完全に中和することは不可能であった。つまり、アフィニティーを強くすることによって抗原を中和する効果には限界が存在していた（非特許文献8）。中和抗体の場合、その中和効果を一定期間持続させるためには、その期間に生体内で産生される抗原量以上の抗体量が投与される必要があり、上述の抗体の薬物動態改善、あるいは、アフィニティーマチュレーション技術だけでは、必要抗体投与量の低減には限界が存在していた。そのため、抗原量以下の抗体量で抗原の中和効果を目的期間持続するためには、一つの抗体で複数の抗原を中和する必要がある。これを達成する新しい方法として、最近、pHおよび/または金属イオン濃度に依存的に抗原に結合する抗原結合分子が報告された（特許文献1および2）。抗原に対して血漿中のpH中性および/または高カルシウムイオン濃度の条件下においては強く結合し、エンドソーム内のpH酸性および/または低カルシウムイオン濃度の条件下において抗原から解離するイオン濃度依存的抗原結合分子はエンドソーム内で抗原から解離することが可能である。イオン濃度依存的抗原結合分子は、抗原を解離した後に当該分子がFcRnによって血漿中にリサイクルされると再び抗原に結合することが可能である。そのため、一つのイオン濃度依存的抗原結合分子は複数の抗原に繰り返し結合することが可能となる。

[0005] 一方、FcRnに結合してリサイクルされる抗体と比較して、抗原の血漿中滞留性は非常に短い。しかしながら、抗原自体の血漿中滞留性が短くても、このような血漿中滞留性が長い通常の抗体が当該抗原に結合すると、抗体抗原複合体の血漿中滞留性は抗体と同様に長くなる。そのため、通常、抗体を投

与すると、当該抗体が結合した抗原は抗体抗原複合体の形で存在することから、むしろ血漿中滞留性が長くなり（血漿中から消失されにくくなり）、血漿中の抗原濃度は上昇する。一方、イオン濃度依存的抗原結合分子はエンドソーム内で抗原から解離することによって、血漿中抗原濃度の上昇を抑制することができる。しかしながら、上記の血漿中における抗原濃度の上昇の抑制は、当該抗原の生体内における産生量とのバランスに影響される。よって、このようなイオン濃度依存的抗原結合分子の投与によって、当該分子の投与前と比較して、血漿中抗原濃度が上昇してしまう場合がある可能性も考えられた（特許文献3）。

[0006] 最近、中性条件下においてFcRnへの結合を有する抗原結合分子が作製された。イオン濃度依存的に抗原に結合し、中性条件下においてFcRnへの結合を有する抗原結合分子を投与することによって、当該分子の投与前と比較して血漿中抗原濃度を低下できることが見出された（特許文献3）。通常の抗体は、抗体の投与により血漿中の抗原濃度を上昇させるのに対して、pH中性条件下においてFcRnへの結合活性を有する抗原結合分子、およびイオン濃度依存的に抗原に結合し、pH中性条件下においてFcRnへの結合活性を有する抗原結合分子は、当該分子の投与により血漿中の抗原濃度を低下させることが可能である。このような抗原結合分子は、FcRnに対する結合の結果起こるエンドサイトーシスを介して血漿中から積極的に抗原を除去することが可能であることから、医薬品として極めて有用である。

[0007] 一方、IgGのレセプターとしては、FcRnだけでなく、複数のFc γ レセプター（Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa）が存在する（非特許文献9）。抗体の活性型Fc γ レセプターに対する結合活性は、抗体の細胞傷害活性に重要な役割を果たしていることから、これまでに、活性型Fc γ レセプターに対する結合活性を増強することにより細胞傷害活性が増強された膜型抗原を標的とした抗体が開発されている（非特許文献10、11）。同様に、抑制型Fc γ レセプター（Fc γ RIIb）に対する結合活性が免疫抑制活性（非特許文献12、13、14）、アゴニスト活性（非特許文献15、16）等に重要な役

割を果たしていることから、抑制型Fc γ レセプターに対する結合活性が増強された膜型抗原を標的とした抗体の研究が進められている（非特許文献17、18）。

[0008] 可溶性抗原に結合する抗体のFc γ Rに対する結合の影響は、主にその副作用の観点で検討されている。例えば、VEGFに対する抗体であるbevacizumabが投与された患者群では血栓塞栓症のリスクが上昇することが知られている（非特許文献19）。また、CD40リガンドに対する抗体の臨床開発試験においても同様に血栓塞栓症が観察され、臨床試験が中止された（非特許文献20）。血小板の細胞上には抑制型Fc γ レセプターであるFc γ RIIbではなく活性型Fc γ レセプターであるFc γ RIIaが発現している（非特許文献21）が、動物モデルなどを使ったその後の研究により、投与されたいずれの抗体も血小板上のFc γ RIIaに対する結合を介して血小板が凝集し、その結果血栓を形成することが示唆されている（非特許文献22、非特許文献23）。自己免疫疾患の一つである全身性エリテマトーデスの患者においてはFc γ RIIa依存的な機構によって血小板が活性化し、血小板の活性化が重症度と相関すると報告されている（非特許文献24）。また、Fc γ RIIbに対する結合を増強した抗体を医薬品として用いる場合、抗抗体の産生のリスクの低減が期待できること（非特許文献25）、膜型抗原に結合する抗体のFc γ RIIaに対する結合を増強させた抗体は、樹状細胞やマクロファージを介した抗体依存的貪食活性（ADCP）が増強すること（非特許文献26）が報告されている。しかしながら、可溶性抗原を標的とした抗体の活性型および/または抑制型Fc γ レセプターに対する結合活性によって、当該抗体が投与された生体における当該抗体または当該抗体が結合する抗原の血漿中動態に対する効果は知られていなかった。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：W02009/125825

特許文献2：W02012/073992

特許文献3 : W02011/122011

非特許文献

[0010] 非特許文献1 : Janice M Reichert, Clark J Rosensweig, Laura B Faden & Matthew C Dewitz, Monoclonal antibody successes in the clinic., *Nat. Biotechnol.* (2005) 23, 1073-1078

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

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

非特許文献4 : Hinton PR, Xiong JM, Johlfs MG, Tang MT, Keller S, Tsurushita N., An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life., *J. Immunol.* (2006) 176 (1), 346-356

非特許文献5 : Ghetie V, Popov S, Borvak J, Radu C, Matesoi D, Medesan C, Ober RJ, Ward ES., Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis., *Nat. Biotechnol.* (1997) 15 (7), 637-640

非特許文献6 : Rajpal A, Beyaz N, Haber L, Cappuccilli G, Yee H, Bhatt RR, Takeuchi T, Lerner RA, Crea R., A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2005) 102 (24), 8466-8471

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

非特許文献8 : Hanson CV, Nishiyama Y, Paul S., Catalytic antibodies and their applications., *Curr. Opin. Biotechnol.* (2005) 16 (6), 631-636

非特許文献9 : Jefferis R, Lund J., Interaction sites on human IgG-Fc f

or Fcγ₂R: current models., *Immunol. Lett.* (2002) 82, 57–65

非特許文献10 : Clynes, R., Yoshizumi, T., Moroi, Y., Houghton, A.N., and Ravetch, J.V., Fc Receptors are required for passive and active immunity to melanoma., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1998) 95, 652–656

非特許文献11 : Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV., Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets., *Nat. Med.* (2000) 6, 443–446

非特許文献12 : Wernersson S, Karlsson MC, Dahlstrom J, Mattsson R, Verbeek JS, Heyman B., IgG-mediated enhancement of antibody responses is low in Fc receptor gamma chain-deficient mice and increased in Fc gamma RII-deficient mice., *J. Immunol.* (1999) 163 (2), 618–622

非特許文献13 : Yuasa T, Kubo S, Yoshino T, Ujike A, Matsumura K, Ono M, Ravetch JV, Takai T., Deletion of fcgamma receptor IIB renders H-2(b) mice susceptible to collagen-induced arthritis., *J. Exp. Med.* (1999) 189 (1), 187–194

非特許文献14 : Nakamura A, Yuasa T, Ujike A, Ono M, Nukiwa T, Ravetch JV, Takai T., Fcgamma receptor IIB-deficient mice develop Goodpasture's syndrome upon immunization with type IV collagen: a novel murine model for autoimmune glomerular basement membrane disease., *J. Exp. Med.* (2000) 191 (5), 899–906

非特許文献15 : Li F, Ravetch JV., Inhibitory Fcγ receptor engagement drives adjuvant and anti-tumor activities of agonistic CD40 antibodies., *Science* (2011) 333 (6045), 1030–1034

非特許文献16 : Wilson NS, Yang B, Yang A, Loeser S, Marsters S, Lawrence D, Li Y, Pitti R, Totpal K, Yee S, Ross S, Vernes JM, Lu Y, Adams C, Offringa R, Kelley B, Hymowitz S, Daniel D, Meng G, Ashkenazi A., An Fcγ receptor-dependent mechanism drives antibody-mediated target-

receptor signaling in cancer cells., *Cancer Cell* (2011) 19 (1), 101-113

非特許文献17 : Moore GL, Chen H, Karki S, Lazar GA., Engineered Fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions., *Mol. Immunol.* (2008) 45, 3926-3933

非特許文献18 : Li F, Ravetch JV., Apoptotic and antitumor activity of death receptor antibodies require inhibitory Fc γ receptor engagement., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* (2012) 109 (27), 10966-10971

非特許文献19 : Scappaticci FA, Skillings JR, Holden SN, Gerber HP, Miller K, Kabbinavar F, Bergsland E, Ngai J, Holmgren E, Wang J, Hurwitz H., Arterial thromboembolic events in patients with metastatic carcinoma treated with chemotherapy and bevacizumab., *J. Natl. Cancer Inst.* (2007) 99 (16), 1232-1239

非特許文献20 : Boumpas DT, Furie R, Manzi S, Illei GG, Wallace DJ, Balow JE, Vaishnav A, A short course of BG9588 (anti-CD40 ligand antibody) improves serologic activity and decreases hematuria in patients with proliferative lupus glomerulonephritis., *Arthritis. Rheum.* (2003) 48 (3), 719-727.

非特許文献21 : Mackay M, Stanevsky A, Wang T, Aranow C, Li M, Koenig S, Ravetch JV, Diamond B., Selective dysregulation of the Fc γ IIb receptor on memory B cells in SLE., *J. Exp. Med.* (2006) 203 (9), 2157-2164

非特許文献22 : Meyer T, Robles-Carrillo L, Robson T, Langer F, Desai H, Davila M, Amaya M, Francis JL, Amirkhosravi A., Bevacizumab immune complexes activate platelets and induce thrombosis in FCGR2A transgenic mice., *J. Thromb. Haemost.* (2009) 7 (1), 171-181

非特許文献23 : Robles-Carrillo L, Meyer T, Hatfield M, Desai H, Davila M, Langer F, Amaya M, Garber E, Francis JL, Hsu YM, Amirkhosravi A.,

Anti-CD40L immune complexes potently activate platelets in vitro and cause thrombosis in FCGR2A transgenic mice., J. Immunol. (2010) 185 (3), 1577-1583

非特許文献24 : Duffau P, Seneschal J, Nicco C, Richez C, Lazaro E, Douchet I, Bordes C, Viallard JF, Goulvestre C, Pellegrin JL, Weil B, Moreau JF, Batteux F, Blanco P., Platelet CD154 potentiates interferon-alpha secretion by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus., Sci. Transl. Med. (2010) 2 (47), 47-63

非特許文献25 : Desai DD, Harbers SO, Flores M, Colonna L, Downie MP, Bergtold A, Jung S, Clynes R., Fc gamma receptor IIB on dendritic cells enforces peripheral tolerance by inhibiting effector T cell responses., J. Immunol. (2007) 178 (10), 6217-6226

非特許文献26 : Richards JO, Karki S, Lazar GA, Chen H, Dang W, Desjarlais JR., Optimization of antibody binding to Fc gamma RIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells., Mol. Cancer Ther. (2008) 7 (8) 2517-2527

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明はこのような状況に鑑みて為されたものである。前述したように、可溶性抗原を標的とした抗体の活性型および/または抑制型Fcγレセプターに対する結合活性によって、当該抗体が投与された生体における当該抗体または当該抗体が結合する抗原の血漿中動態に対する効果は知られていなかった。すなわち本発明は、血漿中に可溶性で存在し病因となる抗原に対する結合活性を有し、活性型および/または抑制型Fcγレセプターに対して所望の結合活性を有する抗原結合分子の投与によって、当該分子が結合する抗原の血漿中濃度の上昇を抑制することを課題とする。さらに本発明は血漿中に可溶性で存在し病因となる抗原に対する抗原結合分子の活性型および/または抑制型Fcγレセプターに対する結合活性を最適化することによって、当該分子が結

合する抗原の血漿中濃度の上昇の抑制を最適化することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0012] すなわち、本発明は、(i) イオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン、(ii) Fc γ RIIb選択的な結合活性を有するFc γ 結合ドメイン、ならびに(iii) pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメインを含む抗原結合分子、および当該分子を投与することを含む当該分子の投与前と比較して当該抗原の血漿中濃度を低下させる方法を提供する。また、本発明は、(i) イオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン、(ii) Fc γ RIIb選択的な結合活性を有するFc γ 結合ドメイン、ならびに(iii) pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメインを含む抗原結合分子を含む、当該抗原の血漿中濃度の低下剤を提供する。さらに、本発明は、(i) イオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン、(ii) Fc γ RIIb選択的な結合活性を有するFc γ 結合ドメイン、ならびに(iii) pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメインを含む抗原結合分子を含む医薬組成物を提供する。また、本発明は、(i) イオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン、(ii) Fc γ RIIb選択的な結合活性を有するFc γ 結合ドメイン、ならびに(iii) pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメインを含む、当該抗原の血漿中濃度を低下させるための当該分子の使用を提供する。上記に加えて、本発明は当該分子の製造方法および/またはスクリーニング方法を提供する。特に以下に限定されることが意図されるものではないが、非限定な一態様として、具体的には以下を提供するものである。

〔1〕 抗原に対する結合活性がイオン濃度の条件によって変化する抗原結合ドメイン、およびEUナンバリングで表される238位のアミノ酸がAsp、ならびに271位のアミノ酸がGlyであるFc領域を含む抗原結合分子の当該抗原を血漿中から消失させるための使用、

〔2〕 前記Fc領域が、さらにEUナンバリングで表される、233位、234位、237

位、264位、265位、266位、267位、268位、269位、272位、274位、296位、326位、327位、330位、331位、332位、333位、355位、356位、358位、396位、409位、および419位の群から選択される少なくとも一つ以上のアミノ酸が置換されているFc領域である〔1〕に記載の使用、

〔3〕前記Fc領域のEUナンバリングで表される；

233位のアミノ酸がAsp、

234位のアミノ酸がTyr、

237位のアミノ酸がAsp、

264位のアミノ酸がIle、

265位のアミノ酸がGlu、

266位のアミノ酸がPhe、Met、またはLeuのいずれか、

267位のアミノ酸がAla、Glu、Gly、またはGlnのいずれか、

268位のアミノ酸がAsp、Glu、またはGlnのいずれか、

269位のアミノ酸がAsp、

272位のアミノ酸がAsp、Phe、Ile、Met、Asn、Pro、またはGlnのいずれか、

274位のアミノ酸がGln、

296位のアミノ酸がAsp、またはPheのいずれか、

326位のアミノ酸がAla、またはAspのいずれか、

327位のアミノ酸がGly、

330位のアミノ酸がLys、またはArgのいずれか、

331位のアミノ酸がSer、

332位のアミノ酸がThr、

333位のアミノ酸がThr、Lys、またはArgのいずれか、

355位のアミノ酸がGln、

356位のアミノ酸がGlu、

358位のアミノ酸がMet、

396位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Ile、Lys、Leu、Met、Gln、Arg、またはTyrのいずれか、

409位のアミノ酸がArg、

419位のアミノ酸がGlu、

のいずれかひとつ以上であるFc領域である〔2〕に記載の使用、

〔4〕前記抗原結合ドメインが、前記抗原に対する結合活性がカルシウムイオン濃度の条件によって変化する抗原結合ドメインである、〔1〕から〔3〕のいずれかに記載の使用、

〔5〕前記抗原結合ドメインが、前記抗原に対する低カルシウムイオン濃度の条件下での結合活性が、前記抗原に対する高カルシウムイオン濃度の条件下での結合活性よりも低いように結合活性が変化する抗原結合ドメインである、〔4〕に記載の使用、

〔6〕前記抗原結合ドメインが、前記抗原に対する結合活性がpHの条件によって変化する抗原結合ドメインである、〔1〕から〔3〕のいずれかに記載の使用、

〔7〕前記抗原結合ドメインが、前記抗原に対するpH酸性域の条件下での結合活性がpH中性域の条件下での結合活性よりも低いように結合活性が変化する抗原結合ドメインである、〔6〕に記載の使用、

〔8〕前記抗原結合ドメインが抗体の可変領域である、〔1〕から〔7〕のいずれかに記載の使用、

〔9〕前記Fc領域が配列番号：14、15、16または17のいずれかに含まれるFc領域においてEUナンバリングで表される238位のアミノ酸がAsp、ならびに271位のアミノ酸がGlyであるFc領域である〔1〕から〔8〕のいずれかに記載の使用、

〔10〕前記Fc領域のpH酸性域の条件下でのFcRnに対する結合活性が、配列番号：14、15、16または17のいずれかに含まれるFc領域のFcRnに対する結合活性より増強されているFc領域である、〔1〕から〔8〕のいずれかに記載の使用、

〔11〕前記の増強されているFc領域が、配列番号：14、15、16、または17のいずれかに含まれるFc領域のアミノ酸配列のうち、EUナンバリン

グで表される244位、245位、249位、250位、251位、252位、253位、254位、255位、256位、257位、258位、260位、262位、265位、270位、272位、279位、283位、285位、286位、288位、293位、303位、305位、307位、308位、309位、311位、312位、314位、316位、317位、318位、332位、339位、340位、341位、343位、356位、360位、362位、375位、376位、377位、378位、380位、382位、385位、386位、387位、388位、389位、400位、413位、415位、423位、424位、427位、428位、430位、431位、433位、434位、435位、436位、438位、439位、440位、442位または447位の群から選択される少なくとも一つ以上のアミノ酸が置換されているFc領域である〔10〕に記載の使用、

〔12〕前記の増強されているFc領域が、配列番号：14、15、16、または17に含まれるFc領域のアミノ酸配列のうち、EUナンバリングで表される；

244位のアミノ酸がLeu、

245位のアミノ酸がArg、

249位のアミノ酸がPro、

250位のアミノ酸がGlnまたはGluのいずれか、もしくは

251位のアミノ酸がArg、Asp、Glu、またはLeuのいずれか、

252位のアミノ酸がPhe、Ser、Thr、またはTyrのいずれか、

254位のアミノ酸がSerまたはThrのいずれか、

255位のアミノ酸がArg、Gly、Ile、またはLeuのいずれか、

256位のアミノ酸がAla、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Pro、またはThrのいずれか、

257位のアミノ酸がAla、Ile、Met、Asn、Ser、またはValのいずれか、

258位のアミノ酸がAsp、

260位のアミノ酸がSer、

262位のアミノ酸がLeu、

270位のアミノ酸がLys、

272位のアミノ酸がLeu、またはArgのいずれか、

279位のアミノ酸がAla、 Asp、 Gly、 His、 Met、 Asn、 Gln、 Arg、 Ser、 Thr、 Trp、 またはTyrのいずれか、

283位のアミノ酸がAla、 Asp、 Phe、 Gly、 His、 Ile、 Lys、 Leu、 Asn、 Pro、 Gln、 Arg、 Ser、 Thr、 Trp、 またはTyrのいずれか、

285位のアミノ酸がAsn、

286位のアミノ酸がPhe、

288位のアミノ酸がAsn、 またはProのいずれか、

293位のアミノ酸がVal、

307位のアミノ酸がAla、 Glu、 Gln、 またはMetのいずれか、

308位のアミノ酸がIle、 Pro、 またはThrのいずれか、

309位のアミノ酸がPro、

311位のアミノ酸がAla、 Glu、 Ile、 Lys、 Leu、 Met、 Ser、 Val、 またはTrpのいずれか、

312位のアミノ酸がAla、 Asp、 またはProのいずれか、

314位のアミノ酸がAlaまたはLeuのいずれか、

316位のアミノ酸がLys、

317位のアミノ酸がPro、

318位のアミノ酸がAsn、 またはThrのいずれか、

332位のアミノ酸がPhe、 His、 Lys、 Leu、 Met、 Arg、 Ser、 またはTrpのいずれか、

339位のアミノ酸がAsn、 Thr、 またはTrpのいずれか、

341位のアミノ酸がPro、

343位のアミノ酸がGlu、 His、 Lys、 Gln、 Arg、 Thr、 またはTyrのいずれか、

375位のアミノ酸がArg、

376位のアミノ酸がGly、 Ile、 Met、 Pro、 Thr、 またはValのいずれか、

377位のアミノ酸がLys、

378位のアミノ酸がAsp、 Asn、 またはValのいずれか、

380位のアミノ酸がAla、 Asn、 Ser、 またはThrのいずれか、

382位のアミノ酸がPhe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

385位のアミノ酸がAla、Arg、Asp、Gly、His、Lys、Ser、またはThrのいずれか、

386位のアミノ酸がArg、Asp、Ile、Lys、Met、Pro、Ser、またはThrのいずれか、

387位のアミノ酸がAla、Arg、His、Pro、Ser、またはThrのいずれか、

389位のアミノ酸がAsn、Pro、またはSerのいずれか、

423位のアミノ酸がAsn、

427位のアミノ酸がAsn、

428位のアミノ酸がLeu、Met、Phe、Ser、またはThrのいずれか、

430位のアミノ酸がAla、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、またはTyrのいずれか、

431位のアミノ酸がHis、またはAsnのいずれか、

433位のアミノ酸がArg、Gln、His、Ile、Lys、Pro、またはSerのいずれか、

434位のアミノ酸がAla、Gly、His、Phe、Ser、Trp、またはTyrのいずれか、

436位のアミノ酸がArg、Asn、His、Ile、Leu、Lys、Met、またはThrのいずれか、

438位のアミノ酸がLys、Leu、Thr、またはTrpのいずれか、

440位のアミノ酸がLys、もしくは、

442位のアミノ酸がLys、

の群から選択される少なくとも一つ以上のアミノ酸である、〔11〕に記載の使用、

〔13〕前記抗原結合分子が抗体である、〔1〕から〔12〕のいずれかに記載の使用、

〔14〕抗原に対する結合活性がイオン濃度の条件によって変化する抗原結合ドメイン、およびEUナンバリングで表される238位のアミノ酸がAsp、ならびに271位のアミノ酸がGlyであるFc領域を含む抗原結合分子を含む医薬組成

物、

〔15〕前記Fc領域が、さらにEUナンバリングで表される、233位、234位、237位、264位、265位、266位、267位、268位、269位、272位、274位、296位、326位、327位、330位、331位、332位、333位、355位、356位、358位、396位、409位、および419位の群から選択される少なくとも一つ以上のアミノ酸が置換されているFc領域である〔14〕に記載の医薬組成物、

〔16〕前記Fc領域のEUナンバリングで表される；

233位のアミノ酸がAsp、

234位のアミノ酸がTyr、

237位のアミノ酸がAsp、

264位のアミノ酸がIle、

265位のアミノ酸がGlu、

266位のアミノ酸がPhe、Met、またはLeuのいずれか、

267位のアミノ酸がAla、Glu、Gly、またはGlnのいずれか、

268位のアミノ酸がAsp、Glu、またはGlnのいずれか、

269位のアミノ酸がAsp、

272位のアミノ酸がAsp、Phe、Ile、Met、Asn、Pro、またはGlnのいずれか、

274位のアミノ酸がGln、

296位のアミノ酸がAsp、またはPheのいずれか、

326位のアミノ酸がAla、またはAspのいずれか、

327位のアミノ酸がGly、

330位のアミノ酸がLys、またはArgのいずれか、

331位のアミノ酸がSer、

332位のアミノ酸がThr、

333位のアミノ酸がThr、Lys、またはArgのいずれか、

355位のアミノ酸がGln、

356位のアミノ酸がGlu、

358位のアミノ酸がMet、

396位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Ile、Lys、Leu、Met、Gln、Arg、またはTyrのいずれか、

409位のアミノ酸がArg、

419位のアミノ酸がGlu、

のいずれかひとつ以上であるFc領域である〔15〕に記載の医薬組成物、

〔17〕以下の(a)から(e)の工程；

(a) 抗原に対する結合活性がイオン濃度の条件によって変化する抗原結合ドメインを得る工程、

(b) 前記工程(a)で選択された抗原結合ドメインをコードする遺伝子を得る工程、

(c) 前記工程(b)で得られた遺伝子を、EUナンバリングで表される238位のアミノ酸がAsp、ならびに271位のアミノ酸がGlyであるFc領域をコードする遺伝子と作動可能に連結する工程、

(d) 前記工程(c)で作動可能に連結された遺伝子を含む宿主細胞を培養する工程、

(e) 前記工程(d)で得られた培養液から抗原結合分子を単離する工程、を含む抗原結合分子の製造方法、

〔18〕前記Fc領域が、さらにEUナンバリングで表される、233位、234位、237位、264位、265位、266位、267位、268位、269位、272位、274位、296位、326位、327位、330位、331位、332位、333位、355位、356位、358位、396位、409位、および419位の群から選択される少なくとも一つ以上のアミノ酸が置換されているFc領域である〔17〕に記載の製造方法、

〔19〕前記Fc領域のEUナンバリングで表される；

233位のアミノ酸がAsp、

234位のアミノ酸がTyr、

237位のアミノ酸がAsp、

264位のアミノ酸がIle、

265位のアミノ酸がGlu、

266位のアミノ酸がPhe、Met、またはLeuのいずれか、
267位のアミノ酸がAla、Glu、Gly、またはGlnのいずれか、
268位のアミノ酸がAsp、Glu、またはGlnのいずれか、
269位のアミノ酸がAsp、
272位のアミノ酸がAsp、Phe、Ile、Met、Asn、Pro、またはGlnのいずれか、
274位のアミノ酸がGln、
296位のアミノ酸がAsp、またはPheのいずれか、
326位のアミノ酸がAla、またはAspのいずれか、
327位のアミノ酸がGly、
330位のアミノ酸がLys、またはArgのいずれか、
331位のアミノ酸がSer、
332位のアミノ酸がThr、
333位のアミノ酸がThr、Lys、またはArgのいずれか、
355位のアミノ酸がGln、
356位のアミノ酸がMet、
358位のアミノ酸がMet、
396位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Ile、Lys、Leu、Met、Gln、Arg、またはTyrのいずれか、
409位のアミノ酸がArg、
419位のアミノ酸がGlu、
のいずれかひとつ以上であるFc領域である〔18〕に記載の製造方法、
〔20〕以下の(a)から(e)の工程；
(a) 抗原に対する結合活性がイオン濃度の条件によって変化する抗原結合ドメインを得る工程、
(b) 前記工程(a)で選択された抗原結合ドメインをコードする遺伝子を得る工程、
(c) 前記工程(b)で得られた遺伝子を、EUナンバリングで表される238位のアミノ酸がAsp、ならびに271位のアミノ酸がGlyであるFc領域をコードする遺伝

子と作動可能に連結する工程、

(d) 前記工程(c)で作動可能に連結された遺伝子を含む宿主細胞を培養する工程、

(e) 前記工程(d)で得られた培養液から抗原結合分子を単離する工程、を含む当該抗原結合分子を含む医薬組成物の製造方法、

〔21〕前記Fc領域が、さらにEUナンバリングで表される、233位、234位、237位、264位、265位、266位、267位、268位、269位、272位、274位、296位、326位、327位、330位、331位、332位、333位、355位、356位、358位、396位、409位、および419位の群から選択される少なくとも一つ以上のアミノ酸が置換されているFc領域である〔20〕に記載の製造方法、

〔22〕前記Fc領域のEUナンバリングで表される；

233位のアミノ酸がAsp、

234位のアミノ酸がTyr、

237位のアミノ酸がAsp、

264位のアミノ酸がIle、

265位のアミノ酸がGlu、

266位のアミノ酸がPhe、Met、またはLeuのいずれか、

267位のアミノ酸がAla、Glu、Gly、またはGlnのいずれか、

268位のアミノ酸がAsp、Glu、またはGlnのいずれか、

269位のアミノ酸がAsp、

272位のアミノ酸がAsp、Phe、Ile、Met、Asn、Pro、またはGlnのいずれか、

274位のアミノ酸がGln、

296位のアミノ酸がAsp、またはPheのいずれか、

326位のアミノ酸がAla、またはAspのいずれか、

327位のアミノ酸がGly、

330位のアミノ酸がLys、またはArgのいずれか、

331位のアミノ酸がSer、

332位のアミノ酸がThr、

333位のアミノ酸がThr、Lys、またはArgのいずれか、
355位のアミノ酸がGln、
356位のアミノ酸がGlu、
358位のアミノ酸がMet、
396位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Ile、Lys、Leu、Met、Gln、Arg、またはTyrのいずれか、

409位のアミノ酸がArg、

419位のアミノ酸がGlu、

のいずれかひとつ以上であるFc領域である〔21〕に記載の製造方法、

〔23〕抗原に対する結合活性がイオン濃度の条件によって変化する抗原結合ドメイン、およびEUナンバリングで表される238位のアミノ酸がAsp、ならびに271位のアミノ酸がGlyであるFc領域を含む抗原結合分子の有効量を投与する工程を含む、当該抗原を血漿中から消失させる方法、

〔24〕前記Fc領域が、さらにEUナンバリングで表される、233位、234位、237位、264位、265位、266位、267位、268位、269位、272位、274位、296位、326位、327位、330位、331位、332位、333位、355位、356位、358位、396位、409位、および419位の群から選択される少なくとも一つ以上のアミノ酸が置換されているFc領域である〔23〕に記載の方法、

〔25〕前記Fc領域のEUナンバリングで表される；

233位のアミノ酸がAsp、

234位のアミノ酸がTyr、

237位のアミノ酸がAsp、

264位のアミノ酸がIle、

265位のアミノ酸がGlu、

266位のアミノ酸がPhe、Met、またはLeuのいずれか、

267位のアミノ酸がAla、Glu、Gly、またはGlnのいずれか、

268位のアミノ酸がAsp、Glu、またはGlnのいずれか、

269位のアミノ酸がAsp、

272位のアミノ酸がAsp、Phe、Ile、Met、Asn、Pro、またはGlnのいずれか、
274位のアミノ酸がGln、
296位のアミノ酸がAsp、またはPheのいずれか、
326位のアミノ酸がAla、またはAspのいずれか、
327位のアミノ酸がGly、
330位のアミノ酸がLys、またはArgのいずれか、
331位のアミノ酸がSer、
332位のアミノ酸がThr、
333位のアミノ酸がThr、Lys、またはArgのいずれか、
355位のアミノ酸がGln、
356位のアミノ酸がGlu、
358位のアミノ酸がMet、
396位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Ile、Lys、Leu、Met、Gln、Arg、またはTyrのいずれか、
409位のアミノ酸がArg、
419位のアミノ酸がGlu、

のいずれかひとつ以上であるFc領域である〔24〕に記載の方法、

〔26〕前記抗原結合ドメインが、前記抗原に対する結合活性がカルシウムイオン濃度の条件によって変化する抗原結合ドメインである、〔23〕から〔25〕のいずれかに記載の方法、

〔27〕前記抗原結合ドメインが、前記抗原に対する低カルシウムイオン濃度の条件下での結合活性が、前記抗原に対する高カルシウムイオン濃度の条件下での結合活性よりも低いように結合活性が変化する抗原結合ドメインである、〔26〕に記載の方法、

〔28〕前記抗原結合ドメインが、前記抗原に対する結合活性がpHの条件によって変化する抗原結合ドメインである、〔23〕から〔25〕のいずれかに記載の方法、

〔29〕前記抗原結合ドメインが、前記抗原に対するpH酸性域の条件下での

結合活性がpH中性域の条件下での結合活性よりも低いように結合活性が変化する抗原結合ドメインである、〔28〕に記載の方法、

〔30〕前記抗原結合ドメインが抗体の可変領域である、〔23〕から〔29〕のいずれかに記載の方法、

〔31〕前記Fc領域が配列番号：14、15、16または17のいずれかに含まれるFc領域においてEUナンバリングで表される238位のアミノ酸がAsp、ならびに271位のアミノ酸がGlyであるFc領域である〔23〕から〔30〕のいずれかに記載の方法、

〔32〕前記Fc領域のpH酸性域の条件下でのFcRnに対する結合活性が、配列番号：14、15、16または17のいずれかに含まれるFc領域のFcRnに対する結合活性より増強されているFc領域である、〔23〕から〔30〕のいずれかに記載の方法、

〔33〕前記の増強されているFc領域が、配列番号：14、15、16、または17のいずれかに含まれるFc領域のアミノ酸配列のうち、EUナンバリングで表される244位、245位、249位、250位、251位、252位、253位、254位、255位、256位、257位、258位、260位、262位、265位、270位、272位、279位、283位、285位、286位、288位、293位、303位、305位、307位、308位、309位、311位、312位、314位、316位、317位、318位、332位、339位、340位、341位、343位、356位、360位、362位、375位、376位、377位、378位、380位、382位、385位、386位、387位、388位、389位、400位、413位、415位、423位、424位、427位、428位、430位、431位、433位、434位、435位、436位、438位、439位、440位、442位または447位の群から選択される少なくとも一つ以上のアミノ酸が置換されているFc領域である〔32〕に記載の方法、

〔34〕前記の増強されているFc領域が、配列番号：14、15、16、または17に含まれるFc領域のアミノ酸配列のうち、EUナンバリングで表される；

244位のアミノ酸がLeu、

245位のアミノ酸がArg、

249位のアミノ酸がPro、
250位のアミノ酸がGlnまたはGluのいずれか、もしくは
251位のアミノ酸がArg、Asp、Glu、またはLeuのいずれか、
252位のアミノ酸がPhe、Ser、Thr、またはTyrのいずれか、
254位のアミノ酸がSerまたはThrのいずれか、
255位のアミノ酸がArg、Gly、Ile、またはLeuのいずれか、
256位のアミノ酸がAla、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Pro、またはThrのいずれか、
257位のアミノ酸がAla、Ile、Met、Asn、Ser、またはValのいずれか、
258位のアミノ酸がAsp、
260位のアミノ酸がSer、
262位のアミノ酸がLeu、
270位のアミノ酸がLys、
272位のアミノ酸がLeu、またはArgのいずれか、
279位のアミノ酸がAla、Asp、Gly、His、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Trp、またはTyrのいずれか、
283位のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Trp、またはTyrのいずれか、
285位のアミノ酸がAsn、
286位のアミノ酸がPhe、
288位のアミノ酸がAsn、またはProのいずれか、
293位のアミノ酸がVal、
307位のアミノ酸がAla、Glu、Gln、またはMetのいずれか、
308位のアミノ酸がIle、Pro、またはThrのいずれか、
309位のアミノ酸がPro、
311位のアミノ酸がAla、Glu、Ile、Lys、Leu、Met、Ser、Val、またはTrpのいずれか、
312位のアミノ酸がAla、Asp、またはProのいずれか、

314位のアミノ酸がAlaまたはLeuのいずれか、
316位のアミノ酸がLys、
317位のアミノ酸がPro、
318位のアミノ酸がAsn、またはThrのいずれか、
332位のアミノ酸がPhe、 His、 Lys、 Leu、 Met、 Arg、 Ser、 またはTrpのいずれか、
339位のアミノ酸がAsn、 Thr、 またはTrpのいずれか、
341位のアミノ酸がPro、
343位のアミノ酸がGlu、 His、 Lys、 Gln、 Arg、 Thr、 またはTyrのいずれか、
375位のアミノ酸がArg、
376位のアミノ酸がGly、 Ile、 Met、 Pro、 Thr、 またはValのいずれか、
377位のアミノ酸がLys、
378位のアミノ酸がAsp、 Asn、 またはValのいずれか、
380位のアミノ酸がAla、 Asn、 Ser、 またはThrのいずれか、
382位のアミノ酸がPhe、 His、 Ile、 Lys、 Leu、 Met、 Asn、 Gln、 Arg、 Ser、 Thr、 Val、 Trp、 またはTyrのいずれか、
385位のアミノ酸がAla、 Arg、 Asp、 Gly、 His、 Lys、 Ser、 またはThrのいずれか、
386位のアミノ酸がArg、 Asp、 Ile、 Lys、 Met、 Pro、 Ser、 またはThrのいずれか、
387位のアミノ酸がAla、 Arg、 His、 Pro、 Ser、 またはThrのいずれか、
389位のアミノ酸がAsn、 Pro、 またはSerのいずれか、
423位のアミノ酸がAsn、
427位のアミノ酸がAsn、
428位のアミノ酸がLeu、 Met、 Phe、 Ser、 またはThrのいずれか、
430位のアミノ酸がAla、 Phe、 Gly、 His、 Ile、 Lys、 Leu、 Met、 Asn、 Gln、 Arg、 Ser、 Thr、 Val、 またはTyrのいずれか、
431位のアミノ酸がHis、 またはAsnのいずれか、

433位のアミノ酸がArg、Gln、His、Ile、Lys、Pro、またはSerのいずれか、
434位のアミノ酸がAla、Gly、His、Phe、Ser、Trp、またはTyrのいずれか、
436位のアミノ酸がArg、Asn、His、Ile、Leu、Lys、Met、またはThrのいずれか、

438位のアミノ酸がLys、Leu、Thr、またはTrpのいずれか、

440位のアミノ酸がLys、もしくは、

442位のアミノ酸がLys、

の群から選択される少なくとも一つ以上のアミノ酸である、〔33〕に記載の方法、

〔35〕前記抗原結合分子が抗体である、〔23〕から〔34〕のいずれかに記載の方法。

- [0013] 本発明において、「抗原に対する結合活性がイオン濃度の条件によって変化する抗原結合ドメイン、およびEUナンバリングで表される238位のアミノ酸がAsp、ならびに271位のアミノ酸がGlyであるFc領域を含む抗原結合分子の当該抗原を血漿中から消失させるための使用」と、「抗原に対する結合活性がイオン濃度の条件によって変化する抗原結合ドメイン、およびEUナンバリングで表される238位のアミノ酸がAsp、ならびに271位のアミノ酸がGlyであるFc領域を含む抗原結合分子を投与することを含む当該抗原に起因する疾患を治療する方法」、および「抗原に対する結合活性がイオン濃度の条件によって変化する抗原結合ドメイン、およびEUナンバリングで表される238位のアミノ酸がAsp、ならびに271位のアミノ酸がGlyであるFc領域を含む抗原結合分子を含む医薬組成物」、「抗原に対する結合活性がイオン濃度の条件によって変化する抗原結合ドメイン、およびEUナンバリングで表される238位のアミノ酸がAsp、ならびに271位のアミノ酸がGlyであるFc領域を含む抗原結合分子の、医薬組成物の製造における使用」、および「抗原に対する結合活性がイオン濃度の条件によって変化する抗原結合ドメイン、およびEUナンバリングで表される238位のアミノ酸がAsp、ならびに271位のアミノ酸がGlyであるFc領域を含む抗原結合分子を使用する工程を含む、医薬組成物を製造するためのプ

ロセス」とは互いに同義に用いられる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]既存の中和抗体に比べて中性pHにおけるFc γ レセプターに対する結合を増強したイオン濃度依存的に抗原に対して結合する抗体の投与により、血漿中から可溶性抗原が消失する非限定の作用メカニズムを表す図である。

[図2]H54/L28-IgG1またはヒトIL-6レセプターに対してpH依存的に結合するFv4-IgG1が、ヒトFcRnトランスジェニックマウスに投与されたときの当該マウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度推移を示す図である。

[図3]ヒトIL-6レセプターに対してpH依存的に結合するFv4-IgG1、マウスFc γ Rに対する結合が欠損したFv4-IgG1の改変体であるFv4-IgG1-F760、マウスFc γ Rに対する結合が増強されたFv4-IgG1の改変体であるFv4-IgG1-F1022、またはFv4-IgG1の低フコース型抗体であるFv4-IgG1-Fucが、ヒトFcRnトランスジェニックマウスに投与されたときの当該マウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度推移を示す図である。

[図4]Fv4-IgG1、Fv4-IgG1-F1022、およびFv4-IgG1-F1022の改変体であってpH酸性域におけるFcRnに対する結合が向上したFv4-IgG1-F1093を重鎖として含む抗原結合分子が、ヒトFcRnトランスジェニックマウスに投与されたときの当該マウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度推移を示す図である。

[図5]Fv4-IgG1、Fv4-IgG1-F1022、およびFv4-IgG1-F1022の改変体であってpH酸性域におけるFcRnに対する結合が向上したFv4-IgG1-F1093を重鎖として含む抗原結合分子が、ヒトFcRnトランスジェニックマウスに投与されたときの当該マウスの血漿中における投与された抗原結合分子の濃度推移を示す図である。

[図6]Fv4-IgG1、マウスFc γ Rに対する結合が増強された（特にマウスFc γ RIIb、マウスFc γ RIIIに対する結合が増強された）Fv4-IgG1の改変体であるFv4-IgG1-F1087、およびマウスFc γ Rに対する結合が増強された（特にマウスFc γ RI、マウスFc γ RIVに対する結合が増強された）Fv4-IgG1の改変体であるFv4-IgG1-F1182が、ヒトFcRnトランスジェニックマウスに投与されたときの当該

マウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度推移を示す図である。

[図7]Fv4-IgG1、Fv4-IgG1-F1087、およびpH酸性域におけるFcRnに対する結合が向上したFv4-IgG1-F1087の改変体であるFv4-IgG1-F1180、Fv4-IgG1-F1412が、ヒトFcRnトランスジェニックマウスに投与されたときの当該マウスの血漿中における投与された抗原結合分子の濃度推移を示す図である。

[図8]Fv4-IgG1、Fv4-IgG1-F1182、およびpH酸性域におけるFcRnに対する結合が向上したFv4-IgG1-F1182の改変体であるFv4-IgG1-F1181が、ヒトFcRnトランスジェニックマウスに投与されたときの当該マウスの血漿中における投与された抗原結合分子の濃度推移を示す図である。

[図9]Fv4-IgG1、Fv4-IgG1-F1087、およびpH酸性域におけるFcRnに対する結合が向上したFv4-IgG1-F1087の改変体であるFv4-IgG1-F1180、Fv4-IgG1-F1412が、ヒトFcRnトランスジェニックマウスに投与されたときの当該マウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度推移を示す図である。

[図10]Fv4-IgG1、Fv4-IgG1-F1182、およびpH酸性域におけるFcRnに対する結合が向上したFv4-IgG1-F1182の改変体であるFv4-IgG1-F1181が、ヒトFcRnトランスジェニックマウスに投与されたときの当該マウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度推移を示す図である。

[図11]Fv4-mIgG1、マウスFc γ RIIb、マウスFc γ RIIIに対する結合が増強されたFv4-mIgG1の改変体であるFv4-mIgG1-mF44、および更にマウスFc γ RIIb、マウスFc γ RIIIに対する結合が増強されたFv4-mIgG1の改変体であるFv4-mIgG1-mF46が、ノーマルマウスに投与されたときの当該マウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度推移を示す図である。

[図12]Fv4-mIgG1、マウスFc γ RIIb、マウスFc γ RIIIに対する結合が増強されたFv4-mIgG1の改変体であるFv4-mIgG1-mF44、および更にマウスFc γ RIIb、マウスFc γ RIIIに対する結合が増強されたFv4-mIgG1の改変体であるFv4-mIgG1-mF46が、Fc γ RIII欠損マウスに投与されたときの当該マウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度推移を示す図である。

[図13]Fv4-mIgG1、マウスFc γ RIIb、マウスFc γ RIIIに対する結合が増強され

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

[図14]Fv4-mIgG1、マウスFc γ RIIb、マウスFc γ RIIIに対する結合が増強されたFv4-mIgG1の改変体であるFv4-mIgG1-mF44、および更にマウスFc γ RIIb、マウスFc γ RIIIに対する結合が増強されたFv4-mIgG1の改変体であるFv4-mIgG1-mF46が、Fc γ RIIb欠損マウスに投与されたときの当該マウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度推移を示す図である。

[図15]Fc γ RIIaの多型 (R/H) を有するドナー由来の血小板を用いた血小板凝集アッセイにおけるomalizumab-G1d-v3/IgE免疫複合体による血小板凝集能の評価結果を示した図である。

[図16]Fc γ RIIaの多型 (H/H) を有するドナー由来の血小板を用いた血小板凝集アッセイにおけるomalizumab-G1d-v3/IgE免疫複合体による血小板凝集能の評価結果を示した図である。

[図17]洗浄血小板の膜表面のCD62p発現を評価した結果を表した図である。黒色で塗りつぶされたグラフはPBSと反応させた後ADPを加え刺激した場合の結果を示し、グラフの中が塗りつぶされていないものは免疫複合体と反応させた後ADPで刺激した場合の結果を示した図である。

[図18]洗浄血小板の膜表面の活性型インテグリン発現を評価した結果を表した図である。黒色で塗りつぶされたグラフはPBSと反応させた後ADPを加え刺激した場合の結果を示し、グラフの中が塗りつぶされていないものは免疫複合体と反応させた後ADPで刺激した場合の結果を示した図である。

[図19]横軸は各PD variantのFc γ RIIbに対する相対的な結合活性の値、縦軸は各PD variantのFc γ RIIa R型に対する相対的な結合活性の値を表す。各PD variantの各Fc γ Rに対する結合量の値を、コントロールとした改変導入前の抗体であるIL6R-F652/IL6R-L (IL6R-F652は配列番号：61で規定された、EUN numberingで表される238位のProをAspに置換した改変Fcを含む抗体重鎖)

の各Fc γ Rに対する結合量の値で割り、さらに100倍した値を各PD variantの各Fc γ Rに対する相対的な結合活性の値とした。図中のF652というプロットはIL6R-F652/IL6R-Lの値を示す。

[図20]縦軸はP238D改変を有さないGpH7-B3（配列番号：63）/GpL16-k0に各改変を導入した改変体のFc γ RIIbに対する相対的な結合活性の値、横軸はP238D改変を有するIL6R-F652（配列番号：61）/IL6R-Lに各改変を導入した改変体のFc γ RIIbに対する相対的な結合活性の値を示す。なお、各改変体のFc γ RIIbに対する結合量の値を、改変導入前の抗体のFc γ RIIbに対する結合量の値で割り、さらに100倍した値を相対的な結合活性の値とした。ここで、P238Dを有さないGpH7-B3/GpL16-k0に導入した場合、P238Dを有するIL6R-F652/IL6R-Lに導入した場合共にFc γ RIIbに対する結合増強効果を発揮した改変は領域Aに含まれ、P238Dを有さないGpH7-B3/GpL16-k0に導入した場合にはFc γ RIIbに対する結合増強効果を発揮するが、P238Dを有するIL6R-F652/IL6R-Lに導入した場合にはFc γ RIIbに対する結合増強効果を発揮しない改変は領域Bに含まれる。

[図21]Fc（P238D）/Fc γ RIIb細胞外領域複合体の結晶構造を表す。

[図22]Fc（P238D）/Fc γ RIIb細胞外領域複合体の結晶構造とFc（WT）/Fc γ RIIb細胞外領域複合体のモデル構造とを、Fc γ RIIb細胞外領域ならびにFc CH2ドメインAに対しC α 原子間距離をもとにした最小二乗法により重ね合わせた図を表す。

[図23]Fc（P238D）/Fc γ RIIb細胞外領域複合体の結晶構造とFc（WT）/Fc γ RIIb細胞外領域複合体のモデル構造について、Fc CH2ドメインAならびにFc CH2ドメインB単独同士でC α 原子間距離をもとにした最小二乗法により重ね合わせをおこない、P238D付近の詳細構造を比較した図を表す。

[図24]Fc（P238D）/Fc γ RIIb細胞外領域複合体の結晶構造において、Fc CH2ドメインAのEUナンバリングで表される237位のGlyの主鎖とFc γ RIIbの160位のTyrとの間に水素結合が認められることを示す図である。

[図25]Fc（P238D）/Fc γ RIIb細胞外領域複合体の結晶構造において、Fc CH2

ドメインBのEUナンバリングで表される270位のAspとFc γ RIIbの131番目のArgとの間に静電的な相互作用が認められることを示す図である。

[図26]横軸は各2B variantのFc γ RIIbに対する相対的な結合活性の値、縦軸は各2B variantのFc γ RIIa R型に対する相対的な結合活性の値をそれぞれ示す。各2B variantの各Fc γ Rに対する結合量の値を、コントロールとした改変導入前の抗体（EUナンバリングで表される238位のProをAspに置換した改変Fc）の各Fc γ Rに対する結合量の値で割り、さらに100倍した値を各2B variantの各Fc γ Rに対する相対的な結合活性の値とした。

[図27]Fc (P238D) / Fc γ RIIb細胞外領域複合体の結晶構造においてFc Chain AのEUナンバリングで表される233位のGluとFc γ RIIb細胞外領域におけるその周辺残基を表す図である。

[図28]Fc (P238D) / Fc γ RIIb細胞外領域複合体の結晶構造においてFc Chain AのEUナンバリングで表される330位のAlaとFc γ RIIb細胞外領域におけるその周辺残基を表す図である。

[図29]Fc (P238D) / Fc γ RIIb細胞外領域複合体および、Fc (WT) / Fc γ RIIIa細胞外領域複合体の結晶構造を、Fc Chain Bに対しC α 原子間距離をもとにした最小二乗法により重ね合わせ、Fc Chain BのEUナンバリングで表される271位のProの構造を示した図である。

[図30]X線結晶構造解析によって決定されたFc (P208)/Fc γ RIIb細胞外領域複合体の図である。Fc部分CH2ドメイン、CH3ドメインのそれぞれについて、向かって左側をドメインA、右側をドメインBとした。

[図31]X線結晶構造解析によって決定されたFc (P208)/Fc γ RIIb細胞外領域複合体の構造とFc (WT)/Fc γ RIIa細胞外領域複合体の構造 (PDB code:3RY6) を、Fc部分CH2ドメインAにおいてC α 原子間距離をもとにした最小二乗法により重ね合わせをおこない、比較したものである。図中太線で描画されたものがFc (P208) / Fc γ RIIb細胞外領域複合体であり、細線で描画されたものがFc (WT) / Fc γ RIIa細胞外領域複合体の構造である。なお、Fc (WT)/Fc γ RIIa細胞外領域複合体の構造においては、Fc部分CH2ドメインAのみを描画してある

。

[図32]Fc (P208)/Fc γ RIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造において、Fc γ RIIbの160番目Tyrと主鎖部分において水素結合を形成するFc部分CH2ドメインAのEUナンバリングで表わされる237位のAsp付近の構造の詳細を示したものである。

[図33]Fc (P208)/Fc γ RIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造において、Fc γ RIIbの160番目のTyrと主鎖部分で水素結合を形成するFc部分CH2ドメインAのEUナンバリングで表わされる237位のAsp側鎖周囲のアミノ酸残基の構造を示した図である。

[図34]実施例10において示されたFc (P238D)/Fc γ RIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造とFc (P208)/Fc γ RIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造を、Fc部分CH2ドメインBにおいてC α 原子間距離をもとにした最小二乗法により重ね合わせをおこない、EUナンバリングで表わされる266位から271位のループ周辺で比較した図である。本ループ中、Fc (P208)はFc (P238D)と比較し、EUナンバリングで表わされる268位にH268Dの改変を、EUナンバリングで表わされる271位にP271Gの改変を持つ。

[図35]Fc (P208)/Fc γ RIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造において、Fc部分CH2ドメインBのSer239周辺の構造を、X線結晶構造解析によって得られた2Fo-Fc係数とする電子密度とともに示した図である。

[図36]X線結晶構造解析によって決定されたFc (P208)/Fc γ RIIaR細胞外領域複合体の立体構造とFc (P208)/Fc γ RIIb細胞外領域複合体の立体構造を、C α 原子間距離をもとにした最小二乗法により重ね合わせをおこない、比較した図である。

[図37]Fc (P208)/Fc γ RIIaR細胞外領域複合体のX線結晶構造とFc (P208)/Fc γ RIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造を、Fc部分CH2ドメインAのEUナンバリングで表わされる237位のAsp付近において、X線結晶構造解析によって得られた2Fo-Fc係数とする電子密度とともに比較した図である。

[図38]Fc (P208)/Fc γ RIIaR細胞外領域複合体のX線結晶構造とFc (P208)/Fc

γ R1Ib細胞外領域複合体のX線結晶構造を、Fc部分CH2ドメインBのEUナンバリングで表わされる237位のAsp付近において、X線結晶構造解析によって得られた2Fo-Fc係数とする電子密度とともに比較した図である。

[図39]G1dとG4dの定常領域の配列を比較した図である。図中、太枠で囲んだアミノ酸は、G1dとG4dで異なるアミノ酸残基となっている部位を示す。

[図40]ノーマルマウスにおけるGA2-IgG1およびGA2-F1087の血漿中抗体濃度推移を示した図である。

[図41]GA2-IgG1およびGA2-F1087が投与されたノーマルマウスにおける血漿中hIgA濃度推移を示した図である。

[図42]ノーマルマウスにおける278-IgG1および278-F1087の血漿中抗体濃度推移を示した図である。

[図43]278-IgG1および278-F1087が投与されたC57BL/6Jマウスにおける血漿中hIgE (Asp6) 濃度推移を示した図である。

[図44]Fv4-mIgG1およびマウスFc γ R1Ibに対する結合が増強されたFv4-mIgG1の改変体であるFv4-mIgG1-MB367が、ノーマルマウスに投与されたときの当該マウスの血漿中の抗ヒトIL-6レセプターマウス抗体濃度推移を示す図である。

[図45]Fv4-mIgG1およびマウスFc γ R1Ibに対する結合が増強されたFv4-mIgG1の改変体であるFv4-mIgG1-MB367が、ノーマルマウスに投与されたときの当該マウスの血漿中の可溶性ヒトIL-6レセプター濃度推移を示す図である。

発明を実施するための形態

[0015] 以下の定義および詳細な説明は、本明細書において説明される本発明の理解を容易にするために提供される。

[0016] アミノ酸

本明細書において、たとえば、Ala/A、Leu/L、Arg/R、Lys/K、Asn/N、Met/M、Asp/D、Phe/F、Cys/C、Pro/P、Gln/Q、Ser/S、Glu/E、Thr/T、Gly/G、Trp/W、His/H、Tyr/Y、Ile/I、Val/Vと表されるように、アミノ酸は1文字コードまたは3文字コード、またはその両方で表記されている。

[0017] アミノ酸の改変

抗原結合分子のアミノ酸配列中のアミノ酸の改変のためには、部位特異的変異誘発法 (Kunkelら (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82, 488-492)) やOverlap extension PCR等の公知の方法が適宜採用され得る。これらの公知の方法によってアミノ酸の付加、欠失、および/または置換が適宜加えられる。アミノ酸残基を置換するとは、別のアミノ酸残基に置換することで、例えば次の(a)~(c)のような点について改変する事を目的とする。

(a) シート構造、若しくは、らせん構造の領域におけるポリペプチドの背骨構造；

(b) 標的部位における電荷若しくは疎水性、または

(c) 側鎖の大きさ。

[0018] アミノ酸残基はその構造に含まれる側鎖の特性に基づいて以下のグループに分類される：

(1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

(2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

(3) 酸性：Asp、Glu；

(4) 塩基性：His、Lys、Arg；

(5) 鎖の配向に影響する残基：Gly、Pro；及び

(6) 芳香族性：Trp、Tyr、Phe。

[0019] これらの各グループ内でのアミノ酸残基の置換は保存的置換と呼ばれ、一方、他グループ間同士でのアミノ酸残基の置換は非保存的置換と呼ばれる。本発明における置換は、保存的置換であってもよく、非保存的置換であってもよく、また保存的置換と非保存的置換の組合せであってもよい。また、天然のアミノ酸以外のアミノ酸に置換するアミノ酸の改変方法として、複数の公知の方法もまた採用され得る (Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. (2006) 35, 225-249、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003) 100 (11), 6353-6357)。例えば、終止コドンの1つであるUAGコドン (アンバーコドン) の相補的アンバーサプレッサー-tRNAに非天然アミノ酸が結合されたtRNAが含まれ

る無細胞翻訳系システム（Clover Direct (Protein Express)）等も好適に用いられる。

[0020] また、アミノ酸の改変を表す表現として、特定の位置を表す数字の前後に改変前と改変後のアミノ酸の1文字コードを用いた表現が適宜使用され得る。例えば、抗体定常領域に含まれるFc領域にアミノ酸の置換を加える際に用いられるP238Dという改変は、EUナンバリングで表される238位のProのAspへの置換を表す。すなわち、数字はEUナンバリングで表されるアミノ酸の位置を表し、その前に記載されるアミノ酸の1文字コードは置換前のアミノ酸、そのあとに記載されるアミノ酸の1文字コードは置換後のアミノ酸を表す。

[0021] および/または

本明細書において、「および/または」の用語の意義は、成句「および/または」の前後の用語の組合せであって、「および」と「または」が適宜組み合わせられたあらゆる組合せを含む。具体的には、例えば「326位、328位、および/または428位のアミノ酸が置換されている」とは以下のアミノ酸の改変のバリエーションが含まれる；

(a) 326位、(b) 328位、(c) 428位、(d) 326位および328位、(e) 326位および428位、(f) 328位および428位、(g) 326位および328位および428位。

[0022] 抗原

本明細書において「抗原」は抗原結合ドメインが結合するエピトープを含む限りその構造は特定の構造に限定されない。別の意味では、抗原は無機物でもあり得るし有機物でもあり得る。抗原としては下記のような分子；17-IA、4-1BB、4Dc、6-ケト-PGF1a、8-イソ-PGF2a、8-オキソ-dG、A1 アデノシン受容体、A33、ACE、ACE-2、アクチビン、アクチビンA、アクチビンAB、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンRIA、アクチビンRIA ALK-2、アクチビンRIB ALK-4、アクチビンRIIA、アクチビンRIIB、ADAM、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADAM8、ADAM9、ADAMTS、ADAMTS4、ADAMTS5、アドレシン、aFGF、ALCAM、ALK、ALK-1、ALK-7、アルファ-1-アンチトリプシン、アルファ-V/ベータ-1アンタゴニスト、ANG、Ang、APAF-1、APE、APJ、APP、APRIL、A

R、ARC、ART、アルテミン、抗Id、ASPARTIC、心房性ナトリウム利尿因子、av
/b3インテグリン、Axl、b2M、B7-1、B7-2、B7-H、B-リンパ球刺激因子 (BlyS
)、BACE、BACE-1、Bad、BAFF、BAFF-R、Bag-1、BAK、Bax、BCA-1、BCAM、Bc
l、BCMA、BDNF、b-ECGF、bFGF、BID、Bik、BIM、BLC、BL-CAM、BLK、BMP、BM
P-2 BMP-2a、BMP-3 オステオゲニン (Osteogenin)、BMP-4 BMP-2b、BMP-5、
BMP-6 Vgr-1、BMP-7 (OP-1)、BMP-8 (BMP-8a、OP-2)、BMPR、BMPR-IA (ALK
-3)、BMPR-IB (ALK-6)、BRK-2、RPK-1、BMPR-II (BRK-3)、BMP、b-NGF、B
OK、ボンベシン、骨由来神経栄養因子、BPDE、BPDE-DNA、BTC、補体因子3 (C
3)、C3a、C4、C5、C5a、C10、CA125、CAD-8、カルシトニン、cAMP、癌胎児
性抗原 (CEA)、癌関連抗原、カテプシンA、カテプシンB、カテプシンC/DPPI
、カテプシンD、カテプシンE、カテプシンH、カテプシンL、カテプシンO、カ
テプシンS、カテプシンV、カテプシンX/Z/P、CBL、CCI、CCK2、CCL、CCL1、C
CL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL2、C
CL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、C
CL4、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9/10、CCR、CCR1、CCR10、CCR10、CCR2、
CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CD1、CD2、CD3、CD3E、CD4、C
D5、CD6、CD7、CD8、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD13、CD14、CD15、CD16
、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD27L、CD28、CD29、CD30、
CD30L、CD32、CD33 (p67タンパク質)、CD34、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD
45、CD46、CD49a、CD52、CD54、CD55、CD56、CD61、CD64、CD66e、CD74、CD8
0 (B7-1)、CD89、CD95、CD123、CD137、CD138、CD140a、CD146、CD147、CD1
48、CD152、CD164、CEACAM5、CFTR、cGMP、CINC、ボツリヌス菌毒素、ウェル
シュ菌毒素、CKb8-1、CLC、CMV、CMV UL、CNTF、CNTN-1、COX、C-Ret、CRG-2
、CT-1、CTACK、CTGF、CTLA-4、CX3CL1、CX3CR1、CXCL、CXCL1、CXCL2、CXCL
3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、
CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCR、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXC
R5、CXCR6、サイトケラチン腫瘍関連抗原、DAN、DCC、DcR3、DC-SIGN、補体
制御因子 (Decay accelerating factor)、des (1-3) -IGF-I (脳IGF-1)、D

hh、ジゴキシン、DNAM-1、Dnase、Dpp、DPPIV/CD26、Dtk、ECAD、EDA、EDA-A1、EDA-A2、EDAR、EGF、EGFR (ErbB-1)、EMA、EMMPRIN、ENA、エンドセリン受容体、エンケファリナーゼ、eNOS、Eot、エオタキシン1、EpCAM、エフリンB2/EphB4、EPO、ERCC、E-セレクトリン、ET-1、ファクターIIa、ファクターVII、ファクターVIIIc、ファクターIX、線維芽細胞活性化タンパク質 (FAP)、Fas、FcR1、FEN-1、フェリチン、FGF、FGF-19、FGF-2、FGF3、FGF-8、FGFR、FGFR-3、フィブリン、FL、FLIP、Flt-3、Flt-4、卵胞刺激ホルモン、フラクタルカイン、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、FZD10、G250、Gas6、GCP-2、GCSF、GD2、GD3、GDF、GDF-1、GDF-3 (Vgr-2)、GDF-5 (BMP-14、CDMP-1)、GDF-6 (BMP-13、CDMP-2)、GDF-7 (BMP-12、CDMP-3)、GDF-8 (ミオスタチン)、GDF-9、GDF-15 (MIC-1)、GDNF、GDNF、GFAP、GFRa-1、GFR-アルファ1、GFR-アルファ2、GFR-アルファ3、GITR、グルカゴン、Glut4、糖タンパク質IIb/IIIa (GPIIb/IIIa)、GM-CSF、gp130、gp72、GRO、成長ホルモン放出因子、ハプテン (NP-capまたはNIP-cap)、HB-EGF、HCC、HCMV gBエンベロープ糖タンパク質、HCMV gHエンベロープ糖タンパク質、HCMV UL、造血成長因子 (HGF)、Hep B gp120、ヘパラーゼ、Her2、Her2/neu (ErbB-2)、Her3 (ErbB-3)、Her4 (ErbB-4)、単純ヘルペスウイルス (HSV) gB糖タンパク質、HSV gD糖タンパク質、HGFA、高分子量黒色腫関連抗原 (HMW-MAA)、HIV gp120、HIV III B gp 120 V3ループ、HLA、HLA-DR、HM1.24、HMF、HRG、Hrk、ヒト心臓ミオシン、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV)、ヒト成長ホルモン (HGH)、HVEM、I-309、IAP、ICAM、ICAM-1、ICAM-3、ICE、ICOS、IFNg、Ig、IgA受容体、IgE、IGF、IGF結合タンパク質、IGF-1R、IGFBP、IGF-I、IGF-II、IL、IL-1、IL-1R、IL-2、IL-2R、IL-4、IL-4R、IL-5、IL-5R、IL-6、IL-6R、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-18R、IL-23、インターフェロン (INF) -アルファ、INF-ベータ、INF-ガンマ、インヒビン、iNOS、インスリンA鎖、インスリンB鎖、インスリン様増殖因子1、インテグリンアルファ2、インテグリンアルファ3、インテグリンアルファ4、インテグリンアルファ4/ベータ1、インテグリンアルファ4/ベータ7、イ

ンテグリンアルファ5（アルファV）、インテグリンアルファ5/ベータ1、インテグリンアルファ5/ベータ3、インテグリンアルファ6、インテグリンベータ1、インテグリンベータ2、インターフェロンガンマ、IP-10、I-TAC、JE、カリクレイン2、カリクレイン5、カリクレイン6、カリクレイン11、カリクレイン12、カリクレイン14、カリクレイン15、カリクレインL1、カリクレインL2、カリクレインL3、カリクレインL4、KC、KDR、ケラチノサイト増殖因子（KGF）、ラミニン5、LAMP、LAP、LAP（TGF-1）、潜在的TGF-1、潜在的TGF-1 bp1、LBP、LDGF、LECT2、レフティ、ルイス-Y抗原、ルイス-Y関連抗原、LFA-1、LFA-3、Lfo、LIF、LIGHT、リポタンパク質、LIX、LKN、Lptn、L-セレクチン、LT-a、LT-b、LTB4、LTBP-1、肺表面、黄体形成ホルモン、リンホトキシンベータ受容体、Mac-1、MAdCAM、MAG、MAP2、MARC、MCAM、MCAM、MCK-2、MCP、M-CSF、MDC、Mer、METALLOPROTEASES、MGDF受容体、MGMT、MHC（HLA-DR）、MIF、MIG、MIP、MIP-1-アルファ、MK、MMAC1、MMP、MMP-1、MMP-10、MMP-11、MMP-12、MMP-13、MMP-14、MMP-15、MMP-2、MMP-24、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MPIF、Mpo、MSK、MSP、ムチン（Muc1）、MUC18、ミユラー管抑制物質、Mug、MuSK、NAIP、NAP、NCAD、N-Cアドヘリン、NCA 90、NCAM、NCAM、ネプリライシン、ニューロトロフィン-3、-4、または-6、ニュールツリン、神経成長因子（NGF）、NGFR、NGF-ベータ、nNOS、NO、NOS、Npn、NRG-3、NT、NTN、OB、OGG1、OPG、OPN、OSM、OX40L、OX40R、p150、p95、PADPr、副甲状腺ホルモン、PARC、PARP、PBR、PBSF、PCAD、P-カドヘリン、PCNA、PDGF、PDGF、PDK-1、PECAM、PEM、PF4、PGE、PGF、PGI2、PGJ2、PIN、PLA2、胎盤性アルカリホスファターゼ（PLAP）、PLGF、PLP、PP14、プロインスリン、プロレラキシン、プロテインC、PS、PSA、PSCA、前立腺特異的膜抗原（PSMA）、PTEN、PTHrp、Ptk、PTN、R51、RANK、RANKL、RANTES、RANTES、レラキシンA鎖、レラキシンB鎖、レニン、呼吸器多核体ウイルス（RSV）F、RSV Fgp、Ret、リウマイド因子、RLIP76、RPA2、RSK、S100、SCF/KL、SDF-1、SERINE、血清アルブミン、sFRP-3、Shh、SIGIRR、SK-1、SLAM、SLPI、SMAC、SMDF、SMOH、SOD、SPARC、Stat、STEAP、STEAP-II、TACE、TACI、TAG-72（腫瘍関連糖タンパ

ク質-72)、TARC、TCA-3、T細胞受容体(例えば、T細胞受容体アルファ/ベータ)、TdT、TECK、TEM1、TEM5、TEM7、TEM8、TERT、辜丸PLAP様アルカリホスファターゼ、TfR、TGF、TGF-アルファ、TGF-ベータ、TGF-ベータ Pan Specific、TGF-ベータRI(ALK-5)、TGF-ベータRII、TGF-ベータRIIb、TGF-ベータRIII、TGF-ベータ1、TGF-ベータ2、TGF-ベータ3、TGF-ベータ4、TGF-ベータ5、トロンビン、胸腺Ck-1、甲状腺刺激ホルモン、Tie、TIMP、TIQ、組織因子、TMEFF2、Tmop、TMPRSS2、TNF、TNF-アルファ、TNF-アルファベータ、TNF-ベータ2、TNFc、TNF-RI、TNF-RII、TNFRSF10A(TRAIL R1 Apo-2、DR4)、TNFRSF10B(TRAIL R2 DR5、KILLER、TRICK-2A、TRICK-B)、TNFRSF10C(TRAIL R3 DcR1、LIT、TRID)、TNFRSF10D(TRAIL R4 DcR2、TRUNDD)、TNFRSF11A(RANK ODF R、TRANCE R)、TNFRSF11B(OPG OCIF、TR1)、TNFRSF12(TWEAK R FN14)、TNFRSF13B(TACI)、TNFRSF13C(BAFF R)、TNFRSF14(HVEM ATAR、HveA、LIGHT R、TR2)、TNFRSF16(NGFR p75NTR)、TNFRSF17(BCMA)、TNFRSF18(GITR AITR)、TNFRSF19(TROY TAJ、TRADE)、TNFRSF19L(RELT)、TNFRSF1A(TNF RI CD120a、p55-60)、TNFRSF1B(TNF RII CD120b、p75-80)、TNFRSF26(TNFRH3)、TNFRSF3(LTbR TNF RIII、TNFC R)、TNFRSF4(OX40 ACT35、TXGP1 R)、TNFRSF5(CD40 p50)、TNFRSF6(Fas Apo-1、APT1、CD95)、TNFRSF6B(DcR3 M68、TR6)、TNFRSF7(CD27)、TNFRSF8(CD30)、TNFRSF9(4-1BB CD137、ILA)、TNFRSF21(DR6)、TNFRSF22(DcTRAIL R2 TNFRH2)、TNFRSF23(DcTRAIL R1 TNFRH1)、TNFRSF25(DR3 Apo-3、LARD、TR-3、TRAMP、WSL-1)、TNFSF10(TRAIL Apo-2リガンド、TL2)、TNFSF11(TRANCE/RANKリガンド ODF、OPGリガンド)、TNFSF12(TWEAK Apo-3リガンド、DR3リガンド)、TNFSF13(APRIL TALL2)、TNFSF13B(BAFF BLYS、TALL1、THANK、TNFSF20)、TNFSF14(LIGHT HVEMリガンド、LTg)、TNFSF15(TL1A/VEGI)、TNFSF18(GITRリガンド AITRリガンド、TL6)、TNFSF1A(TNF-a コネクチン(Conectin)、DIF、TNFSF2)、TNFSF1B(TNF-b LTa、TNFSF1)、TNFSF3(LTb TNFC、p33)、TNFSF4(OX40リガンド gp34、TXGP1)、TNFSF5(CD40リガンド CD154、gp39、HIGM1、IMD3、TRAP)、TNFSF6(Fasリガンド Apo-1リガ

ド、APT1リガンド)、TNFSF7 (CD27リガンド CD70)、TNFSF8 (CD30リガンド CD153)、TNFSF9 (4-1BBリガンド CD137リガンド)、TP-1、t-PA、Tpo、TRAIL、TRAIL R、TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRANCE、トランスフェリン受容体、TRF、Trk、TROP-2、TSG、TSLP、腫瘍関連抗原CA125、腫瘍関連抗原発現ルイスY関連炭水化物、TWEAK、TXB2、Ung、uPAR、uPAR-1、ウロキナーゼ、VCAM、VCA M-1、VECAD、VE-Cadherin、VE-cadherin-2、VEGFR-1 (flt-1)、VEGF、VEGFR、VEGFR-3 (flt-4)、VEGI、VIM、ウイルス抗原、VLA、VLA-1、VLA-4、VNRインテグリン、フォン・ヴィレブランド因子、WIF-1、WNT1、WNT2、WNT2B/13、WNT3、WNT3A、WNT4、WNT5A、WNT5B、WNT6、WNT7A、WNT7B、WNT8A、WNT8B、WNT9A、WNT9A、WNT9B、WNT10A、WNT10B、WNT11、WNT16、XCL1、XCL2、XCR1、XCR1、XEDAR、XIAP、XPD、HMGB1、IgA、 $A\beta$ 、CD81、CD97、CD98、DDR1、DKK1、EREG、Hsp90、IL-17/IL-17R、IL-20/IL-20R、酸化LDL、PCSK9、prekallikrein、RON、TMEM16F、SOD1、Chromogranin A、Chromogranin B、tau、VAP1、高分子キニノーゲン、IL-31、IL-31R、Nav1.1、Nav1.2、Nav1.3、Nav1.4、Nav1.5、Nav1.6、Nav1.7、Nav1.8、Nav1.9、EPCR、C1、C1q、C1r、C1s、C2、C2a、C2b、C3、C3a、C3b、C4、C4a、C4b、C5、C5a、C5b、C6、C7、C8、C9、factor B、factor D、factor H、properdin、sclerostin、fibrinogen、fibrin、prothrombin、thrombin、組織因子、factor V、factor Va、factor VII、factor VIIa、factor VIII、factor VIIa、factor IX、factor IXa、factor X、factor Xa、factor XI、factor XIa、factor XII、factor XIIa、factor XIII、factor XIIIa、TFPI、antithrombin III、EPCR、トロンボモデュリン、TAPI、tPA、plasminogen、plasmin、PAI-1、PAI-2、GPC3、Syndecan-1、Syndecan-2、Syndecan-3、Syndecan-4、LPA、S1Pならびにホルモンおよび成長因子のための受容体が例示され得る。

[0023] 上記の抗原の例示には受容体も記載されるが、これらの受容体が血漿中等の生体液中に可溶型で存在する場合、本発明の抗原結合分子と複合体を形成することが可能であるため、上記に挙げた受容体が可溶型で血漿中等の生体液中に存在する限り、本発明の抗原結合分子が結合して本発明の複合体を形

成し得る抗原として使用され得る。そのような可溶性受容体の非限定な一態様として、例えば、Mullbergら (J. Immunol. (1994) 152 (10), 4958-4968) によって記載されているような可溶性IL-6Rである、配列番号：1で表されるIL-6Rポリペプチド配列のうち、1から357番目のアミノ酸からなるタンパク質が例示され得る。

[0024] 上記の抗原の例示には可溶性抗原も記載されるが、当該抗原が存在する溶液に限定はなく生体液、すなわち生体内の脈管又は組織・細胞の間を満たす全ての液体に本可溶性抗原は存在し得る。非限定な一態様では、本発明の抗原結合分子が結合する抗原は、細胞外液に存在することができる。細胞外液とは、脊椎動物では血漿、組織間液、リンパ液、密な結合組織、脳脊髄液、髄液、穿刺液、または関節液等の骨および軟骨中の成分、肺胞液（気管支肺胞洗浄液）、腹水、胸水、心嚢水、嚢胞液、または眼房水（房水）等の細胞透過液（細胞の能動輸送・分泌活動の結果生じた各種腺腔内の液、および消化管腔その他の体腔内液）の総称をいう。

[0025] エピトープ

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

[0026] 直線状エピトープは、アミノ酸一次配列が認識されたエピトープを含むエピトープである。直線状エピトープは、典型的には、少なくとも3つ、および最も普通には少なくとも5つ、例えば約8ないし約10個、6ないし20個のアミノ酸が固有の配列において含まれる。

[0027] 立体構造エピトープは、直線状エピトープとは対照的に、エピトープを含

むアミノ酸の一次配列が、認識されたエピトープの単一の規定成分ではないエピトープ（例えば、アミノ酸の一次配列が、必ずしもエピトープを規定する抗体により認識されないエピトープ）である。立体構造エピトープは、直線状エピトープに対して増大した数のアミノ酸を包含するかもしれない。立体構造エピトープの認識に関して、抗体は、ペプチドまたはタンパク質の三次元構造を認識する。例えば、タンパク質分子が折り畳まれて三次元構造を形成する場合には、立体構造エピトープを形成するあるアミノ酸および/またはポリペプチド主鎖は、並列となり、抗体がエピトープを認識するのを可能にする。エピトープの立体構造を決定する方法には、例えばX線結晶学、二次元核磁気共鳴分光学並びに部位特異的なスピン標識および電磁常磁性共鳴分光学が含まれるが、これらには限定されない。例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology (1996)、第66巻、Morris (編) を参照。

[0028] 結合活性

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

[0029] 例えば、IL-6Rに対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子が、IL-6R分子中に存在する線状エピトープを認識することは、たとえば次のようにして確認することができる。上記の目的のためにIL-6Rの細胞外ドメインを構成するアミノ酸配列からなる線状のペプチドが合成される。当該ペプチドは、化学的に合成され得る。あるいは、配列番号：2で表されるIL-6RのcDNA中の、細胞外ドメインに相当するアミノ酸配列をコードする領域を利用して、遺伝子工学的手法により得られる。次に、細胞外ドメインを構成するアミノ酸配列からなる線状ペプチドと、IL-6Rに対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子との結合活性が評価される。たとえば、固定化された線状ペプチドを抗原とするELISAによって、当該ペプチドに対する当該抗原結合分子の結

合活性が評価され得る。あるいは、IL-6R発現細胞に対する当該抗原結合分子の結合における、線状ペプチドによる阻害のレベルに基づいて、線状ペプチドに対する結合活性が明らかにされ得る。これらの試験によって、線状ペプチドに対する当該抗原結合分子の結合活性が明らかにされ得る。

[0030] また、IL-6Rに対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子が立体構造エピトープを認識することは、次のようにして確認され得る。上記の目的のために、IL-6Rを発現する細胞が調製される。IL-6Rに対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子がIL-6R発現細胞に接触した際に当該細胞に強く結合する一方で、当該抗原結合分子が固定化されたIL-6Rの細胞外ドメインを構成するアミノ酸配列からなる線状ペプチドに対して実質的に結合しないとき等が挙げられる。ここで、実質的に結合しないとは、ヒトIL-6R発現細胞に対する結合活性の80%以下、通常50%以下、好ましくは30%以下、特に好ましくは15%以下の結合活性をいう。

[0031] IL-6Rに対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子のIL-6R発現細胞に対する結合活性を測定する方法としては、例えば、Antibodies A Laboratory Manual記載の方法 (Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) 359-420) が挙げられる。即ちIL-6R発現細胞を抗原とするELISAやFACS (fluorescence activated cell sorting) の原理によって評価され得る。

[0032] ELISAフォーマットにおいて、IL-6Rに対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子のIL-6R発現細胞に対する結合活性は、酵素反応によって生成するシグナルレベルを比較することによって定量的に評価される。すなわち、IL-6R発現細胞を固定化したELISAプレートに被験ポリペプチド会合体を加え、細胞に結合した被験抗原結合分子が、被験抗原結合分子を認識する酵素標識抗体を利用して検出される。あるいはFACSにおいては、被験抗原結合分子の希釈系列を作成し、IL-6R発現細胞に対する抗体結合力価 (titer) を決定することにより、IL-6R発現細胞に対する被験抗原結合分子の結合活性が比較され得る。

[0033] 緩衝液等に懸濁した細胞表面上に発現している抗原に対する被験抗原結合分子の結合は、フローサイトメーターによって検出することができる。フローサイトメーターとしては、例えば、次のような装置が知られている。

FACSCanto™ II

FACSAria™

FACSArray™

FACSVantage™ SE

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

EPICS ALTRA HyPerSort

Cytomics FC 500

EPICS XL-MCL ADC EPICS XL ADC

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

[0034] 例えば、IL-6Rに対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子の抗原に対する結合活性の好適な測定方法の一例として、次の方法が挙げられる。まず、IL-6Rを発現する細胞と反応させた被験抗原結合分子を認識するFITC標識した二次抗体で染色する。被験抗原結合分子を適宜好適な緩衝液によって希釈することによって、当該抗原結合分子が所望の濃度に調製して用いられる。例えば、10 µg/mlから10 ng/mlまでの間のいずれかの濃度で使用され得る。次に、FACSCalibur (BD社) により蛍光強度と細胞数が測定される。当該細胞に対する抗体の結合量は、CELL QUEST Software (BD社) を用いて解析することにより得られた蛍光強度、すなわちGeometric Meanの値に反映される。すなわち、当該Geometric Meanの値を得ることにより、被験抗原結合分子の結合量によって表される被験抗原結合分子の結合活性が測定され得る。

[0035] IL-6Rに対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子が、ある抗原結合分子とエピトープを共有することは、両者の同じエピトープに対する競合によって確認され得る。抗原結合分子間の競合は、交叉ブロッキングアッセイなどによって検出される。例えば競合ELISAアッセイは、好ましい交叉ブロッ

キングアッセイである。

- [0036] 具体的には、交叉ブロッキングアッセイにおいては、マイクロタイタープレートウェル上にコートしたIL-6Rタンパク質が、候補となる競合抗原結合分子の存在下、または非存在下でプレインキュベートされた後に、被験抗原結合分子が添加される。ウェル中のIL-6Rタンパク質に結合した被験抗原結合分子の量は、同じエピトープへの結合に対して競合する候補となる競合抗原結合分子の結合能に間接的に相関している。すなわち同一エピトープに対する競合抗原結合分子の親和性が大きくなればなる程、被験抗原結合分子のIL-6Rタンパク質をコートしたウェルへの結合活性は低下する。
- [0037] IL-6Rタンパク質を介してウェルに結合した被験抗原結合分子の量は、予め抗原結合分子を標識しておくことによって、容易に測定され得る。たとえば、ビオチン標識された抗原結合分子は、アビジンペルオキシダーゼコンジュゲートと適切な基質を使用することにより測定される。ペルオキシダーゼなどの酵素標識を利用した交叉ブロッキングアッセイは、特に競合ELISAアッセイといわれる。抗原結合分子は、検出あるいは測定が可能な他の標識物質で標識され得る。具体的には、放射標識あるいは蛍光標識などが公知である。
- [0038] 候補の競合抗原結合分子会合体の非存在下で実施されるコントロール試験において得られる結合活性と比較して、競合抗原結合分子が、IL-6Rに対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子の結合を少なくとも20%、好ましくは少なくとも20-50%、さらに好ましくは少なくとも50%ブロックできるならば、当該被験抗原結合分子は競合抗原結合分子と実質的に同じエピトープに結合するか、又は同じエピトープへの結合に対して競合する抗原結合分子である。
- [0039] IL-6Rに対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子が結合するエピトープの構造が同定されている場合には、被験抗原結合分子と対照抗原結合分子とがエピトープを共有することは、当該エピトープを構成するペプチドにアミノ酸変異を導入したペプチドに対する両者の抗原結合分子の結合活性を比較することによって評価され得る。

[0040] こうした結合活性を測定する方法としては、例えば、前記のELISAフォーマットにおいて変異を導入した線状のペプチドに対する被験抗原結合分子及び対照抗原結合分子の結合活性を比較することによって測定され得る。ELISA以外の方法としては、カラムに結合した当該変異ペプチドに対する結合活性を、当該カラムに被検抗原結合分子と対照抗原結合分子を流下させた後に溶出液中に溶出される抗原結合分子を定量することによっても測定され得る。変異ペプチドを例えばGSTとの融合ペプチドとしてカラムに吸着させる方法は公知である。

[0041] また、同定されたエピトープが立体エピトープの場合には、被験抗原結合分子と対照抗原結合分子とがエピトープを共有することは、次の方法で評価され得る。まず、IL-6Rを発現する細胞とエピトープに変異が導入されたIL-6Rを発現する細胞が調製される。これらの細胞がPBS等の適切な緩衝液に懸濁された細胞懸濁液に対して被験抗原結合分子と対照抗原結合分子が添加される。次いで、適宜緩衝液で洗浄された細胞懸濁液に対して、被験抗原結合分子と対照抗原結合分子を認識することができるFITC標識された抗体が添加される。標識抗体によって染色された細胞の蛍光強度と細胞数がFACSCalibur (BD社) によって測定される。被験抗原結合分子と対照抗原結合分子の濃度は好適な緩衝液によって適宜希釈することによって所望の濃度に調製して用いられる。例えば、10 μ g/mlから10 ng/mlまでの間のいずれかの濃度で使用される。当該細胞に対する標識抗体の結合量は、CELL QUEST Software (BD社) を用いて解析することにより得られた蛍光強度、すなわちGeometric Meanの値に反映される。すなわち、当該Geometric Meanの値を得ることにより、標識抗体の結合量によって表される被験抗原結合分子と対照抗原結合分子の結合活性を測定することができる。

[0042] 本方法において、例えば「変異IL-6R発現細胞に実質的に結合しない」ことは、以下の方法によって判断することができる。まず、変異IL-6Rを発現する細胞に対して結合した被験抗原結合分子と対照抗原結合分子が、標識抗体で染色される。次いで細胞の蛍光強度が検出される。蛍光検出にフローサイト

メトリーとしてFACSCaliburを用いた場合、得られた蛍光強度はCELL QUEST S softwareを用いて解析され得る。ポリペプチド会合体存在下および非存在下でのGeometric Meanの値から、この比較値 (Δ Geo-Mean) を下記の計算式に基づいて算出することにより、抗原結合分子の結合による蛍光強度の増加割合を求めることができる。

[0043] Δ Geo-Mean=Geo-Mean (ポリペプチド会合体存在下) / Geo-Mean (ポリペプチド会合体非存在下)

[0044] 解析によって得られる被験抗原結合分子の変異IL-6R発現細胞に対する結合量が反映されたGeometric Mean比較値 (変異IL-6R分子 Δ Geo-Mean値) を、被験抗原結合分子のIL-6R発現細胞に対する結合量が反映された Δ Geo-Mean比較値と比較する。この場合において、変異IL-6R発現細胞及びIL-6R発現細胞に対する Δ Geo-Mean比較値を求める際に使用する被験抗原結合分子の濃度は互いに同一又は実質的に同一の濃度で調製されることが特に好ましい。予めIL-6R中のエピトープを認識していることが確認された抗原結合分子が、対照抗原結合分子として利用される。

[0045] 被験抗原結合分子の変異IL-6R発現細胞に対する Δ Geo-Mean比較値が、被験抗原結合分子のIL-6R発現細胞に対する Δ Geo-Mean比較値の、少なくとも80%、好ましくは50%、更に好ましくは30%、特に好ましくは15%より小さければ、「変異IL-6R発現細胞に実質的に結合しない」ものとする。Geo-Mean値 (Geometric Mean) を求める計算式は、CELL QUEST Software User's Guide (BD biosciences社) に記載されている。比較値を比較することによってそれが実質的に同視し得る程度であれば、被験抗原結合分子と対照抗原結合分子のエピトープは同一であると評価され得る。

[0046] 抗原結合ドメイン

本明細書において、「抗原結合ドメイン」は目的とする抗原に結合するかぎりどのような構造のドメインも使用され得る。そのようなドメインの例として、例えば、抗体の重鎖および軽鎖の可変領域、生体内に存在する細胞膜タンパクであるAvimerに含まれる35アミノ酸程度のAドメインと呼ばれるモジ

ジュール（国際公開W02004/044011、W02005/040229）、細胞膜に発現する糖たんぱく質であるfibronectin中のタンパク質に結合するドメインである10Fn3ドメインを含むAdnectin（国際公開W02002/032925）、ProteinAの58アミノ酸からなる3つのヘリックスの束（bundle）を構成するIgG結合ドメインをscaffoldとするAffibody（国際公開W01995/001937）、33アミノ酸残基を含むターンと2つの逆並行ヘリックスおよびループのサブユニットが繰り返し積み重なった構造を有するアンキリン反復（ankyrin repeat：AR）の分子表面に露出する領域であるDARPin（Designed Ankyrin Repeat proteins）（国際公開W02002/020565）、好中球ゲラチナーゼ結合リポカリン（neutrophil gelatinase-associated lipocalin（NGAL））等のリポカリン分子において高度に保存された8つの逆並行ストランドが中央方向にねじれたバレル構造の片側を支える4つのループ領域であるAnticalin等（国際公開W02003/029462）、ヤツメウナギ、ヌタウナギなど無顎類の獲得免疫システムとしてイムノグロブリンの構造を有さない可変性リンパ球受容体（variable lymphocyte receptor（VLR））のロイシン残基に富んだりピート（leucine-rich-repeat（LRR））モジュールが繰り返し積み重なった馬てい形の構造の内部の並行型シート構造のくぼんだ領域（国際公開W02008/016854）が好適に挙げられる。本発明の抗原結合ドメインの好適な例として、抗体の重鎖および軽鎖の可変領域を含む抗原結合ドメインが挙げられる。こうした抗原結合ドメインの例としては、「scFv（single chain Fv）」、「単鎖抗体（single chain antibody）」、「Fv」、「scFv2（single chain Fv 2）」、「Fab」または「F(ab')₂」等が好適に挙げられる。

[0047] 本発明の抗原結合分子における抗原結合ドメインは、同一のエピトープに結合することができる。ここで同一のエピトープは、例えば、配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質中に存在することができる。あるいは、本発明の抗原結合分子における抗原結合ドメインは、互いに異なるエピトープに結合することができる。ここで異なるエピトープは、例えば、配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質中に存在することがで

きる。

[0048] 特異的

本発明によって提供される抗原結合分子の抗原に対する結合に関して「特異的」とは、特異的に結合する分子の一方の分子がその一または複数の結合する相手方の分子以外の分子に対しては実質的に結合しない状態をいう。ここで、実質的に結合しないとは、前記の結合活性の項で記載されるように、当該相手方の分子に対する結合活性の80%以下、通常50%以下、好ましくは30%以下、特に好ましくは15%以下の結合活性を当該相手方の分子以外の分子に対して示すことをいう。また、抗原結合ドメインが、ある抗原中に含まれる複数のエピトープのうち特定のエピトープに対して特異的である場合にも用いられる。また、抗原結合ドメインが結合するエピトープが複数の異なる抗原に含まれる場合には、当該抗原結合ドメインを有する抗原結合分子は当該エピトープを含む様々な抗原と結合することができる。

[0049] 中和活性

本発明の非限定な一態様では、(i) イオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン、(ii) Fc γ RIIb選択的な結合活性を有するFc γ 結合ドメイン、ならびに(iii) pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメインを含み、当該抗原に対する中和活性を有する抗原結合分子を有効成分として含む医薬組成物が提供される。一般的に、中和活性とは、ウイルスや毒素など、細胞に対して生物学的活性を有するリガンドの当該生物学的活性を阻害する活性をいう。即ち、中和活性を有する物質とは、当該リガンド又は当該リガンドが結合するレセプターに結合し、当該リガンドとレセプターの結合を阻害する物質をさす。中和活性によりリガンドとの結合を阻止されたレセプターは、当該レセプターを通じた生物学的活性を発揮することができなくなる。抗原結合分子が抗体である場合、このような中和活性を有する抗体は一般に中和抗体と呼ばれる。ある被検物質の中和活性は、リガンドの存在下における生物学的活性をその被検物質の存在又は非存在下の条件の間で比較することにより測定され得る。

[0050] 例えば、IL-6レセプターの主要なリガンドとして考えられているものは配列番号：3で表されるIL-6が好適に挙げられる。そのアミノ末端が細胞外ドメインを形成するI型膜タンパク質であるIL-6レセプターは、IL-6によって二量体化が誘導されたgp130レセプターとともにヘテロ四量体を形成する（Heinrichら（*Biochem. J.*（1998）334，297-314））。当該ヘテロ四量体の形成によって、gp130レセプターに会合しているJakが活性化される。Jakは自己リン酸化とレセプターのリン酸化を行う。受容体及びJakのリン酸化部位は、Stat3のようなSH2を持つStatファミリーに属する分子や、MAPキナーゼ、PI3/Akt、そのほかのSH2を持つタンパク質やアダプターに対して、結合部位の役割を果たす。次に、gp130レセプターに結合したStatが、Jakによってリン酸化される。リン酸化されたStatは二量体を形成して核内に移行し、標的遺伝子の転写を調節する。JakまたはStatは他のクラスのレセプターを介してシグナルカスケードに関与することもできる。脱制御されたIL-6のシグナルカスケードは、自己免疫疾患の病態や炎症、多発性骨髄腫や前立腺癌などの癌で観察される。癌遺伝子として作用し得るStat3は、多くの癌において恒常的に活性化している。前立腺癌と多発性骨髄腫では、IL-6レセプターからのシグナルカスケードと、上皮成長因子受容体（EGFR）ファミリーメンバーからのシグナルカスケードとの間にクロストークがある（Ishikawaら（*J. Clin. Exp. Hematopathol.*（2006）46（2），55-66））。

[0051] こうした細胞内のシグナルカスケードは細胞種毎に異なるため、目的とする標的細胞毎に適宜標的分子を設定することができ、上記の因子に限定されるものではない。生体内シグナルの活性化を測定することにより、中和活性を評価することができる。また、生体内シグナルカスケードの下流に存在する標的遺伝子に対する転写誘導作用を指標として、生体内シグナルの活性化を検出することもできる。標的遺伝子の転写活性の変化は、レポーターアッセイの原理によって検出することができる。具体的には、標的遺伝子の転写因子又はプロモーター領域の下流にGFP（Green Fluorescence Protein）やルシフェラーゼなどのレポーター遺伝子を配し、そのレポーター活性を測定す

ることにより、転写活性の変化をレポーター活性として測定することができる。生体内シグナルの活性化の測定キットは市販のものを適宜使用することができる（例えば、Mercury Pathway Profiling Luciferase System (Clontech) 等）。

[0052] 更に、通常は細胞増殖を促進する方向に働くシグナルカスケードに作用するEGFレセプターファミリー等のレセプターリガンドの中和活性を測定する方法として、標的とする細胞の増殖活性を測定することによって、抗原結合分子の中和活性を評価することができる。例えば、例えばHB-EGF等その増殖がEGFファミリーの成長因子によって促進される細胞の増殖に対する、抗HB-EGF抗体の中和活性に基づく抑制効果を評価又は測定する方法として、以下の方法が好適に使用される。試験管内において当該細胞増殖抑制活性を評価又は測定する方法としては、培地中に添加した $[^3\text{H}]$ ラベルしたチミジンの生細胞による取り込みをDNA複製能力の指標として測定する方法が用いられる。より簡便な方法としてトリパンブルー等の色素を細胞外に排除する能力を顕微鏡下で計測する色素排除法や、MTT法が用いられる。後者は、生細胞がテトラゾリウム塩であるMTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide)を青色のホルマザン産物へ転換する能力を有することを利用して、より具体的には、被検細胞の培養液にリガンドと共に被検抗体を添加して一定時間を経過した後に、MTT溶液を培養液に加えて一定時間静置することによりMTTを細胞に取り込ませる。その結果、黄色の化合物であるMTTが細胞内のミトコンドリア内のコハク酸脱水素酵素により青色の化合物に変換される。この青色生成物を溶解し呈色させた後にその吸光度を測定することにより生細胞数の指標とするものである。MTT以外に、MTS、XTT、WST-1、WST-8等の試薬も市販されており (nacalai tesqueなど) 好適に使用することができる。活性の測定に際しては、対照抗体として抗HB-EGF抗体と同一のアイソタイプを有する抗体で当該細胞増殖抑制活性を有しない結合抗体を、抗HB-EGF抗体と同様に使用して、抗HB-EGF抗体が対照抗体よりも強い細胞増殖抑制活性を示すことにより活性を判定することができる。

[0053] 活性を評価するための細胞として、例えば、その増殖がHB-EGFによって促進される細胞である、卵巣癌細胞であるRMG-1細胞株や、ヒトEGFRの細胞外ドメインとマウスG-CSF受容体の細胞内ドメインをインフレームで融合した融合タンパク質であるhEGFR/mG-CSFRをコードする遺伝子を発現する様に結合したベクターによって形質転換されたマウスBa/F3細胞等も好適に使用され得る。このように、当業者は、活性を評価するための細胞を適宜選択することによって前記の細胞増殖活性の測定に使用することが可能である。

[0054] 抗体

本明細書において、抗体とは、天然のものであるかまたは部分的もしくは完全合成により製造された免疫グロブリンをいう。抗体はそれが天然に存在する血漿や血清等の天然資源や抗体を産生するハイブリドーマ細胞の培養上清から単離され得るし、または遺伝子組換え等の手法を用いることによって部分的にもしくは完全に合成され得る。抗体の例としては免疫グロブリンのアイソタイプおよびそれらのアイソタイプのサブクラスが好適に挙げられる。ヒトの免疫グロブリンとして、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgMの9種類のクラス（アイソタイプ）が知られている。本発明の抗体には、これらのアイソタイプのうちIgG1、IgG2、IgG3、IgG4が含まれ得る。ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG3、ヒトIgG4定常領域としては、遺伝子多型による複数のアロタイプ配列がSequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No.91-3242 に記載されているが、本発明においてはそのいずれであっても良い。特にヒトIgG1の配列としては、EUナンバリングで表される356-358位のアミノ酸配列がDELであってもEEMであってもよい。また、ヒトIg κ (Kappa)定常領域とヒトIg λ (Lambda)定常領域としては、遺伝子多型による複数のアロタイプ配列がSequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No.91-3242に記載されているが、本発明においてはそのいずれであっても良い。

[0055] 所望の結合活性を有する抗体を作製する方法は当業者において公知である。以下に、IL-6Rに結合する抗体（抗IL-6R抗体）を作製する方法が例示され

る。IL-6R以外の抗原に結合する抗体も下記の例示に準じて適宜作製され得る。

[0056] 抗IL-6R抗体は、公知の手段を用いてポリクローナルまたはモノクローナル抗体として取得され得る。抗IL-6R抗体としては、哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好適に作製され得る。哺乳動物由来のモノクローナル抗体には、ハイブリドーマにより産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主細胞によって産生されるもの等が含まれる。なお本願発明のモノクローナル抗体には、「ヒト化抗体」や「キメラ抗体」が含まれる。

[0057] モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、公知技術を使用することによって、例えば以下のように作製され得る。すなわち、IL-6Rタンパク質を感作抗原として使用して、通常の免疫方法にしたがって哺乳動物が免疫される。得られる免疫細胞が通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合される。次に、通常のスクリーニング法によって、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって抗IL-6R抗体を産生するハイブリドーマが選択され得る。

[0058] 具体的には、モノクローナル抗体の作製は例えば以下に示すように行われる。まず、配列番号：2にそのヌクレオチド配列が開示されたIL-6R遺伝子を発現することによって、抗体取得の感作抗原として使用される配列番号：1で表されるIL-6Rタンパク質が取得され得る。すなわち、IL-6Rをコードする遺伝子配列を公知の発現ベクターに挿入することによって適当な宿主細胞が形質転換される。当該宿主細胞中または培養上清中から所望のヒトIL-6Rタンパク質が公知の方法で精製される。培養上清中から可溶性のIL-6Rを取得するためには、例えば、Mullbergら (J. Immunol. (1994) 152 (10), 4958-4968) によって記載されているような可溶性IL-6Rである、配列番号：1で表されるIL-6Rポリペプチド配列のうち、1から357番目のアミノ酸からなるタンパク質が、配列番号：1で表されるIL-6Rタンパク質の代わりに発現される。また、精製した天然のIL-6Rタンパク質もまた同様に感作抗原として使用され得る。

。

[0059] 哺乳動物に対する免疫に使用する感作抗原として当該精製IL-6Rタンパク質が使用できる。IL-6Rの部分ペプチドもまた感作抗原として使用できる。この際、当該部分ペプチドはヒトIL-6Rのアミノ酸配列より化学合成によっても取得され得る。また、IL-6R遺伝子の一部を発現ベクターに組込んで発現させることによっても取得され得る。さらにはタンパク質分解酵素を用いてIL-6Rタンパク質を分解することによっても取得され得るが、部分ペプチドとして用いるIL-6Rペプチドの領域および大きさは特に特別の態様に限定されない。好ましい領域は配列番号：1のアミノ酸配列において20-357番目のアミノ酸に相当するアミノ酸配列から任意の配列が選択され得る。感作抗原とするペプチドを構成するアミノ酸の数は少なくとも5以上、例えば6以上、或いは7以上であることが好ましい。より具体的には8~50、好ましくは10~30残基のペプチドが感作抗原として使用され得る。

[0060] また、IL-6Rタンパク質の所望の部分ポリペプチドやペプチドを異なるポリペプチドと融合した融合タンパク質が感作抗原として利用され得る。感作抗原として使用される融合タンパク質を製造するために、例えば、抗体のFc断片やペプチドタグなどが好適に利用され得る。融合タンパク質を発現するベクターは、所望の二種類又はそれ以上のポリペプチド断片をコードする遺伝子がインフレームで融合され、当該融合遺伝子が前記のように発現ベクターに挿入されることにより作製され得る。融合タンパク質の作製方法はMolecular Cloning 2nd ed. (Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58 (1989) Cold Spring Harbor Lab. press) に記載されている。感作抗原として用いられるIL-6Rの取得方法及びそれを用いた免疫方法は、国際公開W02003/000883、W02004/022754、W02006/006693等にも具体的に記載されている。

[0061] 当該感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特定の動物に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましい。一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムス

ター、あるいはウサギ、サル等が好適に使用される。

[0062] 公知の方法にしたがって上記の動物が感作抗原により免疫される。例えば、一般的な方法として、感作抗原が哺乳動物の腹腔内または皮下に注射によって投与されることにより免疫が実施される。具体的には、PBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当な希釈倍率で希釈された感作抗原が、所望により通常のアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントと混合され、乳化された後に、該感作抗原が哺乳動物に4から21日毎に数回投与される。また、感作抗原の免疫時には適当な担体を使用され得る。特に分子量の小さい部分ペプチドが感作抗原として用いられる場合には、アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン等の担体タンパク質と結合した該感作抗原ペプチドを免疫することが望ましい場合もある。

[0063] また、所望の抗体を産生するハイブリドーマは、DNA免疫を使用し、以下のようにしても作製され得る。DNA免疫とは、免疫動物中で抗原タンパク質をコードする遺伝子が発現され得るような態様で構築されたベクターDNAが投与された当該免疫動物中で、感作抗原が当該免疫動物の生体内で発現されることによって、免疫刺激が与えられる免疫方法である。蛋白質抗原が免疫動物に投与される一般的な免疫方法と比べて、DNA免疫には、次のような優位性が期待される。

- IL-6Rのような膜蛋白質の構造を維持して免疫刺激が与えられ得る
- 免疫抗原を精製する必要が無い

[0064] DNA免疫によって本発明のモノクローナル抗体を得るために、まず、IL-6Rタンパク質を発現するDNAが免疫動物に投与される。IL-6RをコードするDNAは、PCRなどの公知の方法によって合成され得る。得られたDNAが適当な発現ベクターに挿入され、免疫動物に投与される。発現ベクターとしては、たとえばpcDNA3.1などの市販の発現ベクターが好適に利用され得る。ベクターを生体に投与する方法として、一般的に用いられている方法が利用され得る。たとえば、発現ベクターが吸着した金粒子が、gene gunで免疫動物個体の細胞内に導入されることによってDNA免疫が行われる。さらに、IL-6Rを認識する

抗体の作製は国際公開W02003/104453に記載された方法を用いても作製され得る。

[0065] このように哺乳動物が免疫され、血清中におけるIL-6Rに結合する抗体力価の上昇が確認された後に、哺乳動物から免疫細胞が採取され、細胞融合に供される。好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が使用され得る。

[0066] 前記免疫細胞と融合される細胞として、哺乳動物のミエローマ細胞が用いられる。ミエローマ細胞は、スクリーニングのための適当な選択マーカーを備えていることが好ましい。選択マーカーとは、特定の培養条件の下で生存できる（あるいはできない）形質を指す。選択マーカーには、ヒポキサンチン-グアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損（以下HGPRT欠損と省略する）、あるいはチミジンキナーゼ欠損（以下TK欠損と省略する）などが公知である。HGPRTやTKの欠損を有する細胞は、ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン感受性（以下HAT感受性と省略する）を有する。HAT感受性の細胞はHAT選択培地中でDNA合成を行うことができず死滅するが、正常な細胞と融合すると正常細胞のサルベージ回路を利用してDNAの合成を継続することができるためHAT選択培地中でも増殖するようになる。

[0067] HGPRT欠損やTK欠損の細胞は、それぞれ6チオグアニン、8アザグアニン（以下8AGと省略する）、あるいは5' ブロモデオキシウリジンを含む培地で選択され得る。これらのピリミジンアナログをDNA中に取り込む正常な細胞は死滅する。他方、これらのピリミジンアナログを取り込めないこれらの酵素を欠損した細胞は、選択培地の中で生存することができる。この他G418耐性と呼ばれる選択マーカーは、ネオマイシン耐性遺伝子によって2-デオキシストレプトミン系抗生物質（ゲンタマイシン類似体）に対する耐性を与える。細胞融合に好適な種々のミエローマ細胞が公知である。

[0068] このようなミエローマ細胞として、例えば、P3 (P3x63Ag8.653) (J. Immunol. (1979) 123 (4), 1548-1550)、P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7)、NS-1 (C. Eur. J. Immunol. (1976) 6 (7), 511-519)、MPC-11 (Cell (1976) 8 (3), 405-415)、SP2/0 (

Nature (1978) 276 (5685), 269-270)、F0 (J. Immunol. Methods (1980) 35 (1-2), 1-21)、S194/5.XX0.BU.1 (J. Exp. Med. (1978) 148 (1), 313-323)、R210 (Nature (1979) 277 (5692), 131-133) 等が好適に使用され得る。

[0069] 基本的には公知の方法、たとえば、ケーラーとミルステインらの方法 (Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて、前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合が行われる。

[0070] より具体的には、例えば細胞融合促進剤の存在下で通常の栄養培養液中で、前記細胞融合が実施され得る。融合促進剤としては、例えばポリエチレングリコール (PEG)、センダイウイルス (HVJ) 等が使用され、更に融合効率を高めるために所望によりジメチルスルホキシド等の補助剤が添加されて使用される。

[0071] 免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は任意に設定され得る。例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1から10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用され、さらに、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液が好適に添加され得る。

[0072] 細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め37°C程度に加温されたPEG溶液 (例えば平均分子量1000から6000程度) が通常30から60% (w/v) の濃度で添加される。混合液が緩やかに混合されることによって所望の融合細胞 (ハイブリドーマ) が形成される。次いで、上記に挙げた適当な培養液が逐次添加され、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等が除去され得る。

[0073] このようにして得られたハイブリドーマは、通常を選択培養液、例えばHAT培養液 (ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液) で培養することにより選択され得る。所望のハイブリドーマ以外の細胞 (非融

合細胞)が死滅するのに十分な時間(通常、係る十分な時間は数日から数週間である)上記HAT培養液を用いた培養が継続され得る。次いで、通常の限界希釈法によって、所望の抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単クローニングが実施される。

[0074] このようにして得られたハイブリドーマは、細胞融合に用いられたミエローマが有する選択マーカーに応じた選択培養液を利用することによって選択され得る。例えばHGPRTやTKの欠損を有する細胞は、HAT培養液(ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液)で培養することにより選択され得る。すなわち、HAT感受性のミエローマ細胞を細胞融合に用いた場合、HAT培養液中で、正常細胞との細胞融合に成功した細胞が選択的に増殖し得る。所望のハイブリドーマ以外の細胞(非融合細胞)が死滅するのに十分な時間、上記HAT培養液を用いた培養が継続される。具体的には、一般に、数日から数週間の培養によって、所望のハイブリドーマが選択され得る。次いで、通常の限界希釈法によって、所望の抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単クローニングが実施され得る。

[0075] 所望の抗体のスクリーニングおよび単クローニングが、公知の抗原抗体反応に基づくスクリーニング方法によって好適に実施され得る。例えば、IL-6Rに結合するモノクローナル抗体は、細胞表面に発現したIL-6Rに結合することができる。このようなモノクローナル抗体は、たとえば、FACS (fluorescence activated cell sorting) によってスクリーニングされ得る。FACSは、蛍光抗体と接触させた細胞をレーザー光で解析し、個々の細胞が発する蛍光を測定することによって細胞表面への抗体の結合を測定することを可能にするシステムである。

[0076] FACSによって本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングするためには、まずIL-6Rを発現する細胞を調製する。スクリーニングのための好ましい細胞は、IL-6Rを強制発現させた哺乳動物細胞である。宿主細胞として使用した形質転換されていない哺乳動物細胞を対照として用いることによって、細胞表面のIL-6Rに対する抗体の結合活性が選択的に検

出され得る。すなわち、宿主細胞に結合せず、IL-6R強制発現細胞に結合する抗体を産生するハイブリドーマを選択することによって、IL-6Rモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが取得され得る。

[0077] あるいは固定化したIL-6R発現細胞に対する抗体の結合活性がELISAの原理にもとづいて評価され得る。たとえば、ELISAプレートのウェルにIL-6R発現細胞が固定化される。ハイブリドーマの培養上清をウェル内の固定化細胞に接触させ、固定化細胞に結合する抗体が検出される。モノクローナル抗体がマウス由来の場合、細胞に結合した抗体は、抗マウスイムノグロブリン抗体によって検出され得る。これらのスクリーニングによって選択された、抗原に対する結合能を有する所望の抗体を産生するハイブリドーマは、限界希釈法等によりクローニングされ得る。

[0078] このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは通常の培養液中で継代培養され得る。また、当該ハイブリドーマは液体窒素中で長期にわたって保存され得る。

[0079] 当該ハイブリドーマを通常の方法に従い培養し、その培養上清から所望のモノクローナル抗体が取得され得る。あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖せしめ、その腹水からモノクローナル抗体が取得され得る。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに好適なものである。

[0080] 当該ハイブリドーマ等の抗体産生細胞からクローニングされる抗体遺伝子によってコードされる抗体も好適に利用され得る。クローニングした抗体遺伝子を適当なベクターに組み込んで宿主に導入することによって、当該遺伝子によってコードされる抗体が発現する。抗体遺伝子の単離と、ベクターへの導入、そして宿主細胞の形質転換のための方法は例えば、Vandammeらによって既に確立されている (Eur. J. Biochem. (1990) 192 (3), 767-775)。下記に述べるように組換え抗体の製造方法もまた公知である。

[0081] たとえば、抗IL-6R抗体を産生するハイブリドーマ細胞から、抗IL-6R抗体の可変領域 (V領域) をコードするcDNAが取得される。そのために、通常、ま

ずハイブリドーマから全RNAが抽出される。細胞からmRNAを抽出するための方法として、たとえば次のような方法を利用することができる。

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

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

[0082] 抽出されたmRNAは、mRNA Purification Kit (GEヘルスケアバイオサイエンス製) 等を使用して精製され得る。あるいは、QuickPrep mRNA Purification Kit (GEヘルスケアバイオサイエンス製) などのように、細胞から直接全mRNAを抽出するためのキットも市販されている。このようなキットを用いて、ハイブリドーマからmRNAが取得され得る。得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域をコードするcDNAが合成され得る。cDNAは、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業社製) 等によって合成され得る。また、cDNAの合成および増幅のために、SMART RACE cDNA増幅キット (Clontech製) およびPCRを用いた5'-RACE法 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85 (23), 8998-9002、Nucleic Acids Res. (1989) 17 (8), 2919-2932) が適宜利用され得る。更にこうしたcDNAの合成の過程においてcDNAの両末端に後述する適切な制限酵素サイトが導入され得る。

[0083] 得られたPCR産物から目的とするcDNA断片が精製され、次いでベクターDNAと連結される。このように組換えベクターが作製され、大腸菌等に導入されコロニーが選択された後に、該コロニーを形成した大腸菌から所望の組換えベクターが調製され得る。そして、当該組換えベクターが目的とするcDNAの塩基配列を有しているか否かについて、公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法等により確認される。

[0084] 可変領域をコードする遺伝子を取得するためには、可変領域遺伝子増幅用のプライマーを使った5'-RACE法を利用するのが簡便である。まずハイブリドーマ細胞より抽出されたRNAを鋳型としてcDNAが合成され、5'-RACE cDNAライブラリが得られる。5'-RACE cDNAライブラリの合成にはSMART RACE cDNA増幅キットなど市販のキットが適宜用いられる。

[0085] 得られた5'-RACE cDNAライブラリを鋳型として、PCR法によって抗体遺伝子

が増幅される。公知の抗体遺伝子配列をもとにマウス抗体遺伝子増幅用のプライマーがデザインされ得る。これらのプライマーは、イムノグロブリンのサブクラスごとに異なる塩基配列である。したがって、サブクラスは予め Iso Strip マウスモノクローナル抗体アイソタイピングキット（ロシュ・ダイアグノスティックス）などの市販キットを用いて決定しておくことが望ましい。

[0086] 具体的には、たとえばマウスIgGをコードする遺伝子の取得を目的とするときには、重鎖として $\gamma 1$ 、 $\gamma 2a$ 、 $\gamma 2b$ 、 $\gamma 3$ 、軽鎖として κ 鎖と λ 鎖をコードする遺伝子の増幅が可能なプライマーが利用され得る。IgGの可変領域遺伝子を増幅するためには、一般に3'側のプライマーには可変領域に近い定常領域に相当する部分にアニールするプライマーが利用される。一方5'側のプライマーには、5' RACE cDNAライブラリ作製キットに付属するプライマーが利用される。

[0087] こうして増幅されたPCR産物を利用して、重鎖と軽鎖の組み合わせからなるイムノグロブリンが再構成され得る。再構成されたイムノグロブリンの、IL-6Rに対する結合活性を指標として、所望の抗体がスクリーニングされ得る。たとえばIL-6Rに対する抗体の取得を目的とするとき、抗体のIL-6Rへの結合は、特異的であることがさらに好ましい。IL-6Rに結合する抗体は、たとえば次のようにしてスクリーニングされ得る；

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

(2) IL-6R発現細胞と抗体との結合を検出する工程、および

(3) IL-6R発現細胞に結合する抗体を選択する工程。

[0088] 抗体とIL-6R発現細胞との結合を検出する方法は公知である。具体的には、先に述べたFACSなどの手法によって、抗体とIL-6R発現細胞との結合が検出され得る。抗体の結合活性を評価するためにIL-6R発現細胞の固定標本が適宜利用され得る。

[0089] 結合活性を指標とする抗体のスクリーニング方法として、ファージベクタ

ーを利用したパニング法も好適に用いられる。ポリクローナルな抗体発現細胞群より抗体遺伝子を重鎖と軽鎖のサブクラスのリブラリとして取得した場合には、ファージベクターを利用したスクリーニング方法が有利である。重鎖と軽鎖の可変領域をコードする遺伝子は、適当なリンカー配列で連結することによってシングルチェーンFv (scFv) を形成することができる。scFvをコードする遺伝子をファージベクターに挿入することにより、scFvを表面に発現するファージが取得され得る。このファージと所望の抗原との接触の後に、抗原に結合したファージを回収することによって、目的の結合活性を有するscFvをコードするDNAが回収され得る。この操作を必要に応じて繰り返すことにより、所望の結合活性を有するscFvが濃縮され得る。

[0090] 目的とする抗IL-6R抗体のV領域をコードするcDNAが得られた後に、当該cDNAの両末端に挿入した制限酵素サイトを認識する制限酵素によって該cDNAが消化される。好ましい制限酵素は、抗体遺伝子を構成する塩基配列に出現する頻度が低い塩基配列を認識して消化する。更に1コピーの消化断片をベクターに正しい方向で挿入するためには、付着末端を与える制限酵素の挿入が好ましい。上記のように消化された抗IL-6R抗体のV領域をコードするcDNAを適当な発現ベクターに挿入することによって、抗体発現ベクターが取得され得る。このとき、抗体定常領域(C領域)をコードする遺伝子と、前記V領域をコードする遺伝子とがインフレームで融合されれば、キメラ抗体が取得される。ここで、キメラ抗体とは、定常領域と可変領域の由来が異なることをいう。したがって、マウス-ヒトなどの異種キメラ抗体に加え、ヒト-ヒト同種キメラ抗体も、本発明におけるキメラ抗体に含まれる。予め定常領域を有する発現ベクターに、前記V領域遺伝子を挿入することによって、キメラ抗体発現ベクターが構築され得る。具体的には、たとえば、所望の抗体定常領域をコードするDNAを保持した発現ベクターの5'側に、前記V領域遺伝子を消化する制限酵素の制限酵素認識配列が適宜配置され得る。同じ組み合わせの制限酵素で消化された両者がインフレームで融合されることによって、キメラ抗体発現ベクターが構築される。

[0091] 抗IL-6Rモノクローナル抗体を製造するために、抗体遺伝子が発現制御領域による制御の下で発現するように発現ベクターに組み込まれる。抗体を発現するための発現制御領域とは、例えば、エンハンサーやプロモーターを含む。また、発現した抗体が細胞外に分泌されるように、適切なシグナル配列がアミノ末端に付加され得る。後に記載される実施例ではシグナル配列として、アミノ酸配列MGWSCIIILFLVATATGVHS（配列番号：4）を有するペプチドが使用されているが、これ以外にも適したシグナル配列が付加される。発現されたポリペプチドは上記配列のカルボキシル末端部分で切断され、切断されたポリペプチドが成熟ポリペプチドとして細胞外に分泌され得る。次いで、この発現ベクターによって適当な宿主細胞が形質転換されることによって、抗IL-6R抗体をコードするDNAを発現する組換え細胞が取得され得る。

[0092] 抗体遺伝子の発現のために、抗体重鎖（H鎖）および軽鎖（L鎖）をコードするDNAは、それぞれ別の発現ベクターに組み込まれる。H鎖とL鎖が組み込まれたベクターによって、同じ宿主細胞に同時に形質転換（co-transfect）されることによって、H鎖とL鎖を備えた抗体分子が発現され得る。あるいはH鎖およびL鎖をコードするDNAが単一の発現ベクターに組み込まれることによって宿主細胞が形質転換され得る（国際公開WO 1994/011523を参照のこと）。

[0093] 単離された抗体遺伝子を適当な宿主に導入することによって抗体を作製するための宿主細胞と発現ベクターの多くの組み合わせが公知である。これらの発現系は、いずれも本発明の抗原結合ドメインを単離するのに応用され得る。真核細胞が宿主細胞として使用される場合、動物細胞、植物細胞、あるいは真菌細胞が適宜使用され得る。具体的には、動物細胞としては、次のような細胞が例示され得る。

（1）哺乳類細胞、：CHO（Chinese hamster ovary cell line）、COS（Monkey kidney cell line）、ミエローマ（Sp2/0、NS0等）、BHK（baby hamster kidney cell line）、Hela、Vero、HEK293（human embryonic kidney cell line with sheared adenovirus (Ad)5 DNA）、Freestyle293、PER.C6 cell（human embryonic retinal cell line transformed with the Adenovirus Typ

e 5 (Ad5) E1A and E1B genes)など (Current Protocols in Protein Science (May, 2001, Unit 5.9, Table 5.9.1))

(2) 両生類細胞：アフリカツメガエル卵母細胞など

(3) 昆虫細胞：sf9、sf21、Tn5など

[0094] あるいは植物細胞としては、ニコティアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) などのニコティアナ (*Nicotiana*) 属由来の細胞による抗体遺伝子の発現系が公知である。植物細胞の形質転換には、カルス培養した細胞が適宜利用され得る。

[0095] 更に真菌細胞としては、次のような細胞を利用することができる。

—酵母：サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) などのサッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、メタノール資化酵母 (*Pichia pastoris*) などの*Pichia*属

—糸状菌：アスペスギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) などのアスペルギルス (*Aspergillus*) 属

[0096] また、原核細胞を利用した抗体遺伝子の発現系も公知である。たとえば、細菌細胞を用いる場合、大腸菌 (*E. coli*)、枯草菌などの細菌細胞が適宜利用され得る。これらの細胞中に、目的とする抗体遺伝子を含む発現ベクターが形質転換によって導入される。形質転換された細胞を *in vitro* で培養することにより、当該形質転換細胞の培養物から所望の抗体が取得され得る。

[0097] 組換え抗体の産生には、上記宿主細胞に加えて、トランスジェニック動物も利用され得る。すなわち所望の抗体をコードする遺伝子が導入された動物から、当該抗体を得ることができる。例えば、抗体遺伝子は、乳汁中に固有に産生されるタンパク質をコードする遺伝子の内部にインフレームで挿入することによって融合遺伝子として構築され得る。乳汁中に分泌されるタンパク質として、たとえば、ヤギβカゼインなどを利用され得る。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA断片はヤギの胚へ注入され、当該注入された胚が雌のヤギへ導入される。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ (またはその子孫) が産生する乳汁からは、所望の抗体が乳汁タン

パク質との融合タンパク質として取得され得る。また、トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、ホルモンがトランスジェニックヤギに対して投与され得る (Bio/Technology (1994), 12 (7), 699-702)。

- [0098] 本明細書において記載される抗原結合分子がヒトに投与される場合、当該抗原結合分子における抗原結合ドメインとして、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体由来の抗原結合ドメインが適宜採用され得る。遺伝子組換え型抗体には、例えば、ヒト化 (Humanized) 抗体等が含まれる。これらの改変抗体は、公知の方法を用いて適宜製造される。
- [0099] 本明細書において記載される抗原結合分子における抗原結合ドメインを複製するために用いられる抗体の可変領域は、通常、4つのフレームワーク領域 (FR) には含まれた3つの相補性決定領域 (complementarity-determining region ; CDR) で構成されている。CDRは、実質的に、抗体の結合特異性を決定している領域である。CDRのアミノ酸配列は多様性に富む。一方FRを構成するアミノ酸配列は、異なる結合特異性を有する抗体の間でも、高い同一性を示すことが多い。そのため、一般に、CDRの移植によって、ある抗体の結合特異性を、他の抗体に移植することができるとされている。
- [0100] ヒト化抗体は、再構成 (reshaped) ヒト抗体とも称される。具体的には、ヒト以外の動物、たとえばマウス抗体のCDRをヒト抗体に移植したヒト化抗体などが公知である。ヒト化抗体を得るための一般的な遺伝子組換え手法も知られている。具体的には、マウスの抗体のCDRをヒトのFRに移植するための方法として、たとえばOverlap Extension PCRが公知である。Overlap Extension PCRにおいては、ヒト抗体のFRを合成するためのプライマーに、移植すべきマウス抗体のCDRをコードする塩基配列が付加される。プライマーは4つのFRのそれぞれについて用意される。一般に、マウスCDRのヒトFRへの移植においては、マウスのFRと同一性の高いヒトFRを選択するのが、CDRの機能の維持において有利であるとされている。すなわち、一般に、移植すべきマウスCDRに

隣接しているFRのアミノ酸配列と同一性の高いアミノ酸配列からなるヒトFRを利用するのが好ましい。

[0101] また連結される塩基配列は、互いにインフレームで接続されるようにデザインされる。それぞれのプライマーによってヒトFRが個別に合成される。その結果、各FRにマウスCDRをコードするDNAが付加された産物が得られる。各産物のマウスCDRをコードする塩基配列は、互いにオーバーラップするようにデザインされている。続いて、ヒト抗体遺伝子を鋳型として合成された産物のオーバーラップしたCDR部分を互いにアニールさせて相補鎖合成反応が行われる。この反応によって、ヒトFRがマウスCDRの配列を介して連結される。

[0102] 最終的に3つのCDRと4つのFRが連結されたV領域遺伝子は、その5'末端と3'末端にアニールし適当な制限酵素認識配列を付加されたプライマーによってその全長が増幅される。上記のように得られたDNAとヒト抗体C領域をコードするDNAとをインフレームで融合するように発現ベクター中に挿入することによって、ヒト型抗体発現用ベクターが作成できる。当該組込みベクターを宿主に導入して組換え細胞を樹立した後に、当該組換え細胞を培養し、当該ヒト化抗体をコードするDNAを発現させることによって、当該ヒト化抗体が当該培養細胞の培養物中に産生される（欧州特許公開EP239400、国際公開W01996/002576参照）。

[0103] 上記のように作製されたヒト化抗体の抗原への結合活性を定性的又は定量的に測定し、評価することによって、CDRを介して連結されたときに該CDRが良好な抗原結合部位を形成するようなヒト抗体のFRが好適に選択できる。必要に応じ、再構成ヒト抗体のCDRが適切な抗原結合部位を形成するようにFRのアミノ酸残基を置換することもできる。たとえば、マウスCDRのヒトFRへの移植に用いたPCR法を応用して、FRにアミノ酸配列の変異を導入することができる。具体的には、FRにアニーリングするプライマーに部分的な塩基配列の変異を導入することができる。このようなプライマーによって合成されたFRには、塩基配列の変異が導入される。アミノ酸を置換した変異型抗体の抗原への結合活性を上記の方法で測定し評価することによって所望の性質を有する

変異FR配列が選択され得る (Cancer Res., (1993) 53, 851-856)。

[0104] また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物 (国際公開W01993/012227、W01992/003918、W01994/002602、W01994/025585、W01996/034096、W01996/033735参照) を免疫動物とし、DNA免疫により所望のヒト抗体が取得され得る。

[0105] さらに、ヒト抗体ライブラリを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体のV領域が一本鎖抗体 (scFv) としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現される。抗原に結合するscFvを発現するファージが選択され得る。選択されたファージの遺伝子を解析することにより、抗原に結合するヒト抗体のV領域をコードするDNA配列が決定できる。抗原に結合するscFvのDNA配列を決定した後、当該V領域配列を所望のヒト抗体C領域の配列とインフレームで融合させた後に適当な発現ベクターに挿入することによって発現ベクターが作製され得る。当該発現ベクターを上記に挙げたような好適な発現細胞中に導入し、当該ヒト抗体をコードする遺伝子を発現させることにより当該ヒト抗体が取得される。これらの方法は既に公知である (国際公開W01992/001047、W01992/020791、W01993/006213、W01993/011236、W01993/019172、W01995/001438、W01995/015388参照)。

[0106] また、抗体遺伝子を取得する方法としてBernasconiら (Science (2002) 298, 2199-2202) または国際公開W02008/081008に記載のようなB細胞クローニング (それぞれの抗体のコード配列の同定およびクローニング、その単離、およびそれぞれの抗体 (特に、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4) の作製のための発現ベクター構築のための使用等) の手法が、上記のほか適宜使用され得る。

[0107] EUナンバリングおよびKabatナンバリング

本発明で使用されている方法によると、抗体のCDRとFRに割り当てられるアミノ酸位置はKabatにしたがって規定される (Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health, Bethesda, Md., 198

7年および1991年)。本明細書において、抗原結合分子が抗体または抗原結合断片である場合、可変領域のアミノ酸はKabatナンバリングにしたがい、定常領域のアミノ酸はKabatのアミノ酸位置に準じたEUナンバリングにしたがって表される。

イオン濃度の条件

金属イオン濃度の条件

本発明の一つの態様では、イオン濃度とは金属イオン濃度のことをいう。

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

[0108] 本発明で好適な金属イオンの例としてカルシウムイオンが挙げられる。カルシウムイオンは多くの生命現象の調節に関与しており、骨格筋、平滑筋および心筋等の筋肉の収縮、白血球の運動および貪食等の活性化、血小板の変形および分泌等の活性化、リンパ球の活性化、ヒスタミンの分泌等の肥満細胞の活性化、カテコールアミン α 受容体やアセチルコリン受容体を介する細胞の応答、エキソサイトーシス、ニューロン終末からの伝達物質の放出、ニューロンの軸策流等にカルシウムイオンが関与している。細胞内のカルシウムイオン受容体として、複数個のカルシウムイオン結合部位を有し、分子進化上共通の起源から由来したと考えられるトロポニンC、カルモジュリン、パルブアルブミン、ミオシン軽鎖等が知られており、その結合モチーフも数多く知られている。例えば、カドヘリンドメイン、カルモジュリンに含まれるEFハンド、Protein kinase Cに含まれるC2ドメイン、血液凝固タンパク質Factor IXに含まれるGlaドメイン、アシアログライコプロテインレセプターやマンノース結合レセプターに含まれるC型レクチン、LDL受容体に含まれるAドメ

イン、アネキシン、トロンボスポンジン3型ドメインおよびEGF様ドメインがよく知られている。

[0109] 本発明においては、金属イオンがカルシウムイオンの場合には、カルシウムイオン濃度の条件として低カルシウムイオン濃度の条件と高カルシウムイオン濃度の条件が挙げられる。本発明の抗原結合分子に含まれる抗原結合ドメインの抗原に対する結合活性がカルシウムイオン濃度の条件によって変化すると、低カルシウムイオン濃度と高カルシウムイオン濃度の条件の違いによって抗原結合分子に含まれる抗原結合ドメインの抗原に対する結合活性が変化することをいう。例えば、低カルシウムイオン濃度の条件下における抗原に対する抗原結合ドメインの結合活性よりも高カルシウムイオン濃度の条件下における抗原に対する抗原結合ドメインの結合活性の方が高い場合が挙げられる。また、高カルシウムイオン濃度の条件下における抗原に対する抗原結合ドメインの結合活性よりも低カルシウムイオン濃度の条件下における抗原に対する抗原結合ドメインの結合活性の方が高い場合もまた例示される。

[0110] 本明細書において、高カルシウムイオン濃度とはとくに一義的な数値に限定されるわけではないが、好適には100 μM から10 mMの間から選択される濃度であり得る。また、別の態様では、200 μM から5 mMの間から選択される濃度でもあり得る。また、異なる態様では400 μM から3 mMの間から選択される濃度でもあり得るし、ほかの態様では200 μM から2 mMの間から選択される濃度でもあり得る。さらに400 μM から1 mMの間から選択される濃度でもあり得る。特に生体内の血漿中（血中）でのカルシウムイオン濃度に近い500 μM から2.5 mMの間から選択される濃度が好適に挙げられる。

[0111] 本明細書において、低カルシウムイオン濃度とはとくに一義的な数値に限定されるわけではないが、好適には0.1 μM から30 μM の間から選択される濃度であり得る。また、別の態様では、0.2 μM から20 μM の間から選択される濃度でもあり得る。また、異なる態様では0.5 μM から10 μM の間から選択される濃度でもあり得るし、ほかの態様では1 μM から5 μM の間から選択される濃度で

もあり得る。さらに2 μ Mから4 μ Mの間から選択される濃度でもあり得る。特に生体内の早期エンドソーム内でのイオン化カルシウム濃度に近い1 μ Mから5 μ Mの間から選択される濃度が好適に挙げられる。

[0112] 本発明において、低カルシウムイオン濃度の条件下における抗原に対する結合活性が高カルシウムイオン濃度の条件下における抗原に対する結合活性より低いとは、本発明の抗原結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子の0.1 μ Mから30 μ Mの間から選択されるカルシウムイオン濃度での抗原に対する結合活性が、100 μ Mから10 mMの間から選択されるカルシウムイオン濃度での抗原に対する結合活性より弱いことを意味する。好ましくは、本発明の抗原結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子の0.5 μ Mから10 μ Mの間から選択されるカルシウムイオン濃度での抗原に対する結合活性が、200 μ Mから5 mMの間から選択されるカルシウムイオン濃度での抗原に対する結合活性より弱いことを意味し、特に好ましくは、生体内の早期エンドソーム内のカルシウムイオン濃度における抗原結合活性が、生体内の血漿中のカルシウムイオン濃度における抗原結合活性より弱いことを意味し、具体的には、抗原結合分子の1 μ Mから5 μ Mの間から選択されるカルシウムイオン濃度での抗原に対する結合活性が、500 μ Mから2.5 mMの間から選択されるカルシウムイオン濃度での抗原に対する結合活性より弱いことを意味する。

[0113] 金属イオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子の結合活性が変化しているか否かは、例えば前記の結合活性の項で記載されたような公知の測定方法を使用することによって決定され得る。例えば、低カルシウムイオン濃度の条件下における抗原に対する抗原結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子の結合活性よりも高カルシウムイオン濃度の条件下における抗原に対する前記ドメインまたは前記分子の結合活性の方が高く変化することを確認するためには、低カルシウムイオン濃度および高カルシウムイオン濃度の条件下における抗原に対する前記ドメインまたは前記分子の結合活性が比較される。

[0114] さらに本発明において、「低カルシウムイオン濃度の条件下における抗原

に対する結合活性が高カルシウムイオン濃度の条件下における抗原に対する結合活性より低い」という表現は、抗原結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子の高カルシウムイオン濃度条件下における抗原に対する結合活性が低カルシウムイオン濃度条件下における抗原に対する結合活性よりも高いと表現することもできる。なお本発明においては、「低カルシウムイオン濃度の条件下における抗原に対する結合活性が高カルシウムイオン濃度の条件下における抗原に対する結合活性より低い」を「低カルシウムイオン濃度条件下における抗原結合活性が高カルシウムイオン濃度条件下における抗原に対する結合活性よりも弱い」と記載する場合もあり、また、「低カルシウムイオン濃度の条件下における抗原結合活性を高カルシウムイオン濃度の条件下における抗原に対する結合活性より低下させる」を「低カルシウムイオン濃度条件下における抗原結合活性を高カルシウムイオン濃度条件下における抗原に対する結合活性よりも弱くする」と記載する場合もある。

[0115] 抗原に対する結合活性を測定する際のカルシウムイオン濃度以外の条件は、当業者が適宜選択することが可能であり、特に限定されない。例えば、HEPESバッファー、37°Cの条件において測定することが可能である。例えば、Biacore (GE Healthcare) などを用いて測定することが可能である。抗原結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子と抗原との結合活性の測定は、抗原が可溶性抗原である場合は、抗原結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子を固定化したチップへ、抗原をアナライトとして流すことで可溶性抗原に対する結合活性を評価することが可能であり、抗原が膜型抗原である場合は、抗原を固定化したチップへ、抗原結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子をアナライトとして流すことで膜型抗原に対する結合活性を評価することが可能である。

[0116] 本発明の抗原結合分子において、低カルシウムイオン濃度の条件における抗原に対する結合活性が高カルシウムイオン濃度の条件における抗原に対する結合活性よりも弱い限り、低カルシウムイオン濃度条件下における抗原に対する結合活性と高カルシウムイオン濃度条件下における抗原に対する結合

活性の比は特に限定されないが、好ましくは抗原に対する低カルシウムイオン濃度の条件におけるKD (Dissociation constant : 解離定数) と高カルシウムイオン濃度の条件におけるKDの比である $KD (Ca\ 3\ \mu M) / KD (Ca\ 2\ mM)$ の値が2以上であり、さらに好ましくは $KD (Ca\ 3\ \mu M) / KD (Ca\ 2\ mM)$ の値が10以上であり、さらに好ましくは $KD (Ca\ 3\ \mu M) / KD (Ca\ 2\ mM)$ の値が40以上である。KD (Ca 3 μ M)/KD (Ca 2 mM)の値の上限は特に限定されず、当業者の技術において作製可能な限り、400、1000、10000等、いかなる値でもよい。

[0117] 抗原に対する結合活性の値として、抗原が可溶性抗原の場合はKD (解離定数) を用いることが可能であるが、抗原が膜型抗原の場合は見かけのKD (Apparent dissociation constant : 見かけの解離定数) を用いることが可能である。KD (解離定数)、および、見かけのKD (見かけの解離定数) は、当業者公知の方法で測定することが可能であり、例えばBiacore (GE healthcare)、スキャッチャードプロット、フローサイトメーター等を用いることが可能である。

[0118] また、本発明の抗原結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子の低カルシウム濃度の条件における抗原に対する結合活性と高カルシウム濃度の条件における抗原に対する結合活性の比を示す他の指標として、例えば、解離速度定数であるkd (Dissociation rate constant : 解離速度定数) もまた好適に用いられ得る。結合活性の比を示す指標としてKD (解離定数) の代わりにkd (解離速度定数) を用いる場合、抗原に対する低カルシウム濃度の条件におけるkd (解離速度定数) と高カルシウム濃度の条件におけるkd (解離速度定数) の比である $kd (低カルシウム濃度の条件) / kd (高カルシウム濃度の条件)$ の値は、好ましくは2以上であり、さらに好ましくは5以上であり、さらに好ましくは10以上であり、より好ましくは30以上である。Kd (低カルシウム濃度の条件) /kd (高カルシウム濃度の条件) の値の上限は特に限定されず、当業者の技術常識において作製可能な限り、50、100、200等、いかなる値でもよい。

[0119] 抗原結合活性の値として、抗原が可溶性抗原の場合はkd (解離速度定数)

を用いることが可能であり、抗原が膜型抗原の場合は見かけの k_d (Apparent dissociation rate constant : 見かけの解離速度定数) を用いることが可能である。 k_d (解離速度定数)、および、見かけの k_d (見かけの解離速度定数) は、当業者公知の方法で測定することが可能であり、例えばBiacore (GE healthcare)、フローサイトメーター等を用いることが可能である。なお本発明において、異なるカルシウムイオン濃度における抗原結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子の抗原に対する結合活性を測定する際は、カルシウム濃度以外の条件は同一とすることが好ましい。

[0120] 例えば、本発明が提供する一つの態様である低カルシウムイオン濃度の条件における抗原に対する結合活性が、高カルシウムイオン濃度の条件における抗原に対する結合活性より低い抗原結合ドメインまたは抗原結合分子のスクリーニング方法としてW02012/073992等 (例えば段落0200-0213) に記載された方法が例示され得る。

[0121] ライブラリ

ある一態様によれば、本発明の抗原結合ドメイン又は抗原結合分子は、イオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基が抗原結合ドメインに含まれている互いに配列の異なる複数の抗原結合分子から主としてなるライブラリから取得され得る。イオン濃度の例としては金属イオン濃度や水素イオン濃度が好適に挙げられる。

[0122] 本明細書において「ライブラリ」とは複数の抗原結合分子または抗原結合分子を含む複数の融合ポリペプチド、もしくはこれらの配列をコードする核酸、ポリヌクレオチドをいう。ライブラリ中に含まれる複数の抗原結合分子または抗原結合分子を含む複数の融合ポリペプチドの配列は単一の配列ではなく、互いに配列の異なる抗原結合分子または抗原結合分子を含む融合ポリペプチドである。

[0123] 本明細書においては、互いに配列の異なる複数の抗原結合分子という記載における「互いに配列の異なる」との用語は、ライブラリ中の個々の抗原結

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

[0124] また、本発明における、複数の抗原結合分子から主としてなるライブラリという記載における「複数の」との用語は、例えば本発明の抗原結合分子、融合ポリペプチド、ポリヌクレオチド分子、ベクターまたはウイルスは、通常、その物質の2つ以上の種類の集合を指す。例えば、ある2つ以上の物質が特定の形質に関して互いに異なるならば、その物質には2種類以上が存在することを表す。例としては、アミノ酸配列中の特定のアミノ酸位置で観察される変異体アミノ酸が挙げられ得る。例えば、フレキシブル残基以外、または表面に露出した非常に多様なアミノ酸位置の特定の变異体アミノ酸以外は実質的に同じ、好ましくは同一の配列である本発明の2つ以上の抗原結合分子がある場合、本発明の抗原結合分子は複数個存在する。他の例では、フレキシブル残基をコードする塩基以外、または表面に露出した非常に多様なアミノ酸位置の特定の变異体アミノ酸をコードする塩基以外は実質的に同じ、好ましくは同一の配列である本発明の2つ以上のポリヌクレオチド分子があるならば、本発明におけるポリヌクレオチド分子は複数個存在する。

[0125] さらに、本発明における、複数の抗原結合分子から主としてなるライブラリという記載における「から主としてなる」との用語は、ライブラリ中の配列の異なる独立クローンの数のうち、イオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性が異なっている抗原結合分子の数が反映される。具体的には、そのような結合活性を示す抗原結合分子がライブラリ中に少なくとも 10^4 分子存在することが好ましい。また、より好ましくは、本発明の抗原結合ドメインはそのような結合活性を示す抗原結合分子が少なくとも 10^5 分子存在するライブラリから取得され得る。さらに好ましくは、本発明の抗原結合ドメインはそのような結合活性を示す抗原結合分子が少なくとも 10^6 分子存在するライブラリから取得され得る。特に好ましくは、本発明の抗原結合ドメインはそのような結合活性を示す抗原結合分子が少なくとも 10^7 分子存在するライブラリから取得され得る。また、好ましくは、本発明の抗原結合ドメインはそのような結合活性を示す抗原結合分子が少なくとも 10^8 分子存在するライブラリから取得され得る。別の表現では、ライブラリ中の配列の異なる独立クローンの数のうち、イオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性が異なっている抗原結合分子の割合としても好適に表現され得る。具体的には、本発明の抗原結合ドメインは、そのような結合活性を示す抗原結合分子がライブラリ中の配列の異なる独立クローンの数の0.1%から80%、好ましくは0.5%から60%、より好ましくは1%から40%、さらに好ましくは2%から20%、特に好ましくは4%から10% 含まれるライブラリから取得され得る。融合ポリペプチド、ポリヌクレオチド分子またはベクターの場合も、上記と同様、分子の数や分子全体における割合で表現され得る。また、ウイルスの場合も、上記と同様、ウイルス個体の数や個体全体における割合で表現され得る。

[0126] カルシウムイオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合ドメインの結合活性を変化させるアミノ酸

前記のスクリーニング方法によってスクリーニングされる本発明の抗原結合ドメインまたは抗原結合分子はどのように調製されてもよく、例えば、金

属イオンがカルシウムイオン濃度である場合には、あらかじめ存在している抗原結合ドメインまたは抗原結合分子、あらかじめ存在しているライブラリ（ファージライブラリ等）、動物への免疫から得られたハイブリドーマや免疫動物からのB細胞から作製された抗体またはライブラリ、これらの抗体やライブラリにカルシウムをキレート可能なアミノ酸（例えばアスパラギン酸やグルタミン酸）や非天然アミノ酸変異を導入した抗体またはライブラリ（カルシウムをキレート可能なアミノ酸（例えばアスパラギン酸やグルタミン酸）または非天然アミノ酸の含有率を高くしたライブラリや特定箇所にカルシウムをキレート可能なアミノ酸（例えばアスパラギン酸やグルタミン酸）または非天然アミノ酸変異を導入したライブラリ等）などを用いることが可能である。

[0127] 前記のようにイオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させるアミノ酸の例として、例えば、金属イオンがカルシウムイオンである場合には、カルシウム結合モチーフを形成するアミノ酸であれば、その種類は問わない。カルシウム結合モチーフは、当業者に周知であり、詳細に記載されている（例えばSpringerら（*Cell* (2000) 102, 275-277）、KawasakiおよびKretsinger（*Protein Prof.* (1995) 2, 305-490）、Moncriefら（*J. Mol. Evol.* (1990) 30, 522-562）、Chauvauxら（*Biochem. J.* (1990) 265, 261-265）、BairochおよびCox（*FEBS Lett.* (1990) 269, 454-456）、Davis（*New Biol.* (1990) 2, 410-419）、Schaeferら（*Genomics* (1995) 25, 638-643）、Economouら（*EMBO J.* (1990) 9, 349-354）、Wurzburgら（*Structure.* (2006) 14, 6, 1049-1058））。すなわち、ASGPR、CD23、MBR、DC-SIGN等のC型レクチン等の任意の公知のカルシウム結合モチーフが、本発明の抗原結合分子に含まれ得る。このようなカルシウム結合モチーフの好適な例として、上記のほかには配列番号：5に記載される抗原結合ドメインに含まれるカルシウム結合モチーフも挙げられ得る。

[0128] また、本発明の抗原結合分子に含まれる抗原結合ドメインのカルシウムイオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性を変化させるアミノ酸の例と

して、金属キレート作用を有するアミノ酸も好適に用いられ得る。金属キレート作用を有するアミノ酸の例として、例えばセリン (Ser (S))、スレオニン (Thr (T))、アスパラギン (Asn (N))、グルタミン (Gln (Q))、アスパラギン酸 (Asp (D)) およびグルタミン酸 (Glu (E)) 等が好適に挙げられる。

[0129] 前記のアミノ酸が含まれる抗原結合ドメインの位置は特定の位置に限定されず、カルシウムイオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させる限り、抗原結合ドメインを形成する重鎖可変領域または軽鎖可変領域中のいずれの位置でもあり得る。非限定な一態様では、本発明の抗原結合ドメインは、カルシウムイオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させるアミノ酸が重鎖の抗原結合ドメインに含まれている互いに配列の異なる抗原結合分子から主としてなるライブラリから取得され得る。また、非限定な別の態様では、本発明の抗原結合ドメインは、当該アミノ酸が重鎖のCDR3に含まれている互いに配列の異なる抗原結合分子から主としてなるライブラリから取得され得る。そのほかの態様では、本発明の抗原結合ドメインは、当該アミノ酸が重鎖のCDR3のKabatナンバリングで表される95位、96位、100a位および/または101位に含まれている互いに配列の異なる抗原結合分子から主としてなるライブラリから取得され得る。

[0130] また、本発明の非限定な一態様では、本発明の抗原結合ドメインは、カルシウムイオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させるアミノ酸が軽鎖の抗原結合ドメインに含まれている互いに配列の異なる抗原結合分子から主としてなるライブラリから取得され得る。また、非限定な別の態様では、本発明の抗原結合ドメインは、当該アミノ酸が軽鎖のCDR1に含まれている互いに配列の異なる抗原結合分子から主としてなるライブラリから取得され得る。そのほかの態様では、本発明の抗原結合ドメインは、当該アミノ酸が軽鎖のCDR1のKabatナンバリングで表される30位、31位および/または32位に含まれている互いに配列の異なる抗原結合分子から主と

してなるライブラリから取得され得る。

[0131] また、別の非限定な一態様では、本発明の抗原結合ドメインは、当該アミノ酸残基が軽鎖のCDR2に含まれている互いに配列の異なる抗原結合分子から主としてなるライブラリから取得され得る。そのほかの非限定な一態様では、当該アミノ酸残基が軽鎖のCDR2のKabatナンバリングで表される50位に含まれている互いに配列の異なる抗原結合分子から主としてなるライブラリが提供される。

[0132] さらに別の態様では、本発明の抗原結合ドメインは、当該アミノ酸残基が軽鎖のCDR3に含まれている互いに配列の異なる抗原結合分子から主としてなるライブラリから取得され得る。そのほかの態様では、本発明の抗原結合ドメインは、当該アミノ酸残基が軽鎖のCDR3のKabatナンバリングで表される92位に含まれている互いに配列の異なる抗原結合分子から主としてなるライブラリから取得され得る。

[0133] また、本発明の抗原結合ドメインは、当該アミノ酸残基が、前記に記載された軽鎖のCDR1、CDR2およびCDR3から選択される2つまたは3つのCDRに含まれている互いに配列の異なる抗原結合分子から主としてなるライブラリから本発明の異なる態様として取得され得る。さらに、本発明の抗原結合ドメインは、当該アミノ酸残基が軽鎖のKabatナンバリングで表される30位、31位、32位、50位および/または92位のいずれかひとつ以上に含まれている互いに配列の異なる抗原結合分子から主としてなるライブラリから取得され得る。

[0134] 特に好適な実施形態では、抗原結合分子の軽鎖および/または重鎖可変領域のフレームワーク配列は、ヒトの生殖細胞系フレームワーク配列を有していることが望ましい。したがって、本発明の一態様においてフレームワーク配列が完全にヒトの配列であるならば、ヒトに投与（例えば疾病の治療）された場合、本発明の抗原結合分子は免疫原性反応を殆どあるいは全く引き起こさないと考えられる。上記の意味から、本発明における「生殖細胞系列の配列を含む」とは、本発明におけるフレームワーク配列の一部が、いずれかのヒトの生殖細胞系フレームワーク配列の一部と同一であることを意味する。

例えば、本発明の抗原結合分子の重鎖FR2の配列が複数の異なるヒトの生殖細胞系フレームワーク配列の重鎖FR2配列が組み合わされた配列である場合も、本発明における「生殖細胞系列の配列を含む」抗原結合分子である。

[0135] フレームワークの例としては、例えばV-Base (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) 等のウェブサイトに含まれている、現在知られている完全にヒト型のフレームワーク領域の配列が好適に挙げられる。これらのフレームワーク領域の配列が本発明の抗原結合分子に含まれる生殖細胞系列の配列として適宜使用され得る。生殖細胞系列の配列はその類似性にもとづいて分類され得る (Tomlinsonら (J. Mol. Biol. (1992) 227, 776-798) WilliamsおよびWinter (Eur. J. Immunol. (1993) 23, 1456-1461) およびCoxら (Nat. Genetics (1994) 7, 162-168))。7つのサブグループに分類されるV κ 、10のサブグループに分類されるV λ 、7つのサブグループに分類されるVHから好適な生殖細胞系列の配列が適宜選択され得る。

[0136] 完全にヒト型のVH配列は、下記のみ限定されるものではないが、例えばVH1サブグループ (例えば、VH1-2、VH1-3、VH1-8、VH1-18、VH1-24、VH1-45、VH1-46、VH1-58、VH1-69)、VH2サブグループ (例えば、VH2-5、VH2-26、VH2-70)、VH3サブグループ (VH3-7、VH3-9、VH3-11、VH3-13、VH3-15、VH3-16、VH3-20、VH3-21、VH3-23、VH3-30、VH3-33、VH3-35、VH3-38、VH3-43、VH3-48、VH3-49、VH3-53、VH3-64、VH3-66、VH3-72、VH3-73、VH3-74)、VH4サブグループ (VH4-4、VH4-28、VH4-31、VH4-34、VH4-39、VH4-59、VH4-61)、VH5サブグループ (VH5-51)、VH6サブグループ (VH6-1)、VH7サブグループ (VH7-4、VH7-81) のVH配列等が好適に挙げられる。これらは公知文献 (Matsudaら (J. Exp. Med. (1998) 188, 1973-1975)) 等にも記載されており、当業者はこれらの配列情報をもとに本発明の抗原結合分子を適宜設計することが可能である。これら以外の完全にヒト型のフレームワークまたはフレームワークの準領域も好適に使用され得る。

[0137] 完全にヒト型のV κ 配列は、下記のみ限定されるものではないが、例えばVk1サブグループに分類されるA20、A30、L1、L4、L5、L8、L9、L11、L12、L1

4、L15、L18、L19、L22、L23、L24、O2、O4、O8、O12、O14、O18、Vk2サブグループに分類されるA1、A2、A3、A5、A7、A17、A18、A19、A23、O1、O11、Vk3サブグループに分類されるA11、A27、L2、L6、L10、L16、L20、L25、Vk4サブグループに分類されるB3、Vk5サブグループに分類されるB2（本明細書においてはVk5-2とも指称される））、Vk6サブグループに分類されるA10、A14、A26等（Kawasakiら（*Eur. J. Immunol.* (2001) 31, 1017-1028）、SchableおよびZachau（*Biol. Chem. Hoppe Seyler* (1993) 374, 1001-1022）およびBrensing-Kuppersら（*Gene* (1997) 191, 173-181））が好適に挙げられる。

[0138] 完全にヒト型のV λ 配列は、下記のみ限定されるものではないが、例えばVL1サブグループに分類されるV1-2、V1-3、V1-4、V1-5、V1-7、V1-9、V1-11、V1-13、V1-16、V1-17、V1-18、V1-19、V1-20、V1-22、VL1サブグループに分類されるV2-1、V2-6、V2-7、V2-8、V2-11、V2-13、V2-14、V2-15、V2-17、V2-19、VL3サブグループに分類されるV3-2、V3-3、V3-4、VL4サブグループに分類されるV4-1、V4-2、V4-3、V4-4、V4-6、VL5サブグループに分類されるV5-1、V5-2、V5-4、V5-6等（Kawasakiら（*Genome Res.* (1997) 7, 250-261））が好適に挙げられる。

[0139] 通常これらのフレームワーク配列は一またはそれ以上のアミノ酸残基の相違により互いに異なっている。これらのフレームワーク配列は本発明における「イオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基」と共に使用され得る。本発明における「イオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基」と共に使用される完全にヒト型のフレームワークの例としては、これだけに限定されるわけではないが、ほかにもKOL、NEWM、REI、EU、TUR、TEI、LAY、POM等が挙げられる（例えば、前記のKabatら（1991）およびWuら（*J. Exp. Med.* (1970) 132, 211-250））。

[0140] 本発明は特定の理論に拘束されるものではないが、生殖細胞系の配列の使用がほとんどの個人において有害な免疫反応を排除すると期待されている一つの理由は、以下のとおりであると考えられている。通常の免疫反応中に生

じる親和性成熟ステップの結果、免疫グロブリンの可変領域に体細胞の突然変異が頻繁に生じる。これらの突然変異は主にその配列が超可変的であるCDRの周辺に生じるが、フレームワーク領域の残基にも影響を及ぼす。これらのフレームワークの突然変異は生殖細胞系の遺伝子には存在せず、また患者の免疫原性になる可能性は少ない。一方、通常のヒトの集団は生殖細胞系の遺伝子によって発現されるフレームワーク配列の大多数にさらされており、免疫寛容の結果、これらの生殖細胞系のフレームワークは患者において免疫原性が低いあるいは非免疫原性であると予想される。免疫寛容の可能性を最大にするため、可変領域をコード化する遺伝子が普通に存在する機能的な生殖細胞系遺伝子の集合から選択され得る。

[0141] 本発明の、カルシウムイオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させるアミノ酸が前記の可変領域配列の配列、重鎖可変領域または軽鎖可変領域の配列、もしくはCDR配列またはフレームワーク配列に含まれる抗原結合分子を作製するために部位特異的変異誘発法（Kunkelら（Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82, 488-492））やOverlap extension PCR等の公知の方法が適宜採用され得る。

[0142] 例えば、カルシウムイオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基が予め含まれているフレームワーク配列として選択された軽鎖可変領域と、ランダム化可変領域配列ライブラリとして作製された重鎖可変領域と組み合わせることによって本発明の複数の互いに配列の異なる抗原結合分子を含むライブラリが作製され得る。このような非限定的な例として、イオン濃度がカルシウムイオン濃度である場合には、例えば、配列番号：5（Vk5-2）に記載された軽鎖可変領域配列とランダム化可変領域配列ライブラリとして作製された重鎖可変領域とを組み合わせたライブラリが好適に挙げられる。

[0143] また、前記のカルシウムイオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合ドメインまたは抗原結合分子の結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基が予め含まれているフレームワーク配列として選択された軽鎖可変

領域の配列に、当該アミノ酸残基以外の残基として多様なアミノ酸が含まれるように設計することも可能である。本発明においてそのような残基は、フレキシブル残基と指称される。本発明の抗原結合ドメインまたは抗原結合分子の抗原に対する結合活性が、イオン濃度の条件によって変化する限り、当該フレキシブル残基の数および位置は特定の態様に限定されることはない。すなわち、重鎖および/または軽鎖のCDR配列および/またはFR配列に一つまたはそれ以上のフレキシブル残基が含まれ得る。例えば、イオン濃度がカルシウムイオン濃度である場合には、配列番号：5（Vk5-2）に記載された軽鎖可変領域配列に導入されるフレキシブル残基の非限定的な例として、表1または表2に記載されたアミノ酸残基が挙げられる。

[0144]

[表1]

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

(位置は Kabat ナンバリングを表す)

[0145]

[表2]

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

(位置は Kabat ナンバリングを表す)

- [0146] 本明細書においては、フレキシブル残基とは、公知のかつ/または天然抗体または抗原結合ドメインのアミノ酸配列を比較した場合に、その位置で提示されるいくつかの異なるアミノ酸を持つ軽鎖および重鎖可変領域上のアミノ酸が非常に多様である位置に存在するアミノ酸残基のバリエーションをいう。非常に多様である位置は一般的にCDR領域に存在する。一態様では、公知のかつ/または天然抗体の非常に多様な位置を決定する際には、Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health Bethesda Md.) (1987年および1991年) が提供するデータが有効である。

また、インターネット上の複数のデータベース (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>、<http://www.bioinf.org.uk/abs/index.html>) では収集された多数のヒト軽鎖および重鎖の配列とその配置が提供されており、これらの配列とその配置の情報は本発明における非常に多様な位置の決定に有用である。本発明によると、アミノ酸がある位置で好ましくは約2から約20、好ましくは約3から約19、好ましくは約4から約18、好ましくは5から17、好ましくは6から16、好ましくは7から15、好ましくは8から14、好ましくは9から13、好ましくは10から12個の可能な異なるアミノ酸残基の多様性を有する場合は、その位置は非常に多様といえる。いくつかの実施形態では、あるアミノ酸位置は、好ましくは少なくとも約2、好ましくは少なくとも約4、好ましくは少なくとも約6、好ましくは少なくとも約8、好ましくは約10、好ましくは約12の可能な異なるアミノ酸残基の多様性を有し得る。

[0147] また、前記のイオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基が導入された軽鎖可変領域とランダム化可変領域配列ライブラリとして作製された重鎖可変領域とを組み合わせることによっても、本発明の複数の互いに配列の異なる抗原結合分子を含むライブラリが作製され得る。このような非限定的な例として、イオン濃度がカルシウムイオン濃度である場合には、例えば、配列番号：6 (Vk1)、配列番号：7 (Vk2)、配列番号：8 (Vk3)、配列番号：9 (Vk4) 等の生殖細胞系列の特定の残基が、カルシウムイオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基に置換された軽鎖可変領域配列とランダム化可変領域配列ライブラリとして作製された重鎖可変領域とを組み合わせたライブラリが好適に挙げられる。当該アミノ酸残基の非限定な例として軽鎖のCDR1に含まれるアミノ酸残基が例示される。ほかにも、当該アミノ酸残基の非限定な例として軽鎖のCDR2に含まれるアミノ酸残基が例示される。また、当該アミノ酸残基の非限定な別の例として軽鎖のCDR3に含まれるアミノ酸残基もまた例示される。

[0148] 前記のように、当該アミノ酸残基が軽鎖のCDR1に含まれるアミノ酸残基の

非限定な例として、軽鎖可変領域のCDR1中のEUナンバリングで表される30位、31位、および/または32位のアミノ酸残基が挙げられる。また、当該アミノ酸残基が軽鎖のCDR2に含まれるアミノ酸残基の非限定な例として、軽鎖可変領域のCDR2中のKabatナンバリングで表される50位のアミノ酸残基が挙げられる。さらに、当該アミノ酸残基が軽鎖のCDR3に含まれるアミノ酸残基の非限定な例として、軽鎖可変領域のCDR3中のKabatナンバリングで表される92位のアミノ酸残基が挙げられる。また、これらのアミノ酸残基が、カルシウム結合モチーフを形成し、および/または、カルシウムイオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性が変化する限り、これらのアミノ酸残基が単独で含まれ得るし、これらのアミノ酸が二つ以上組み合わせられて含まれ得る。また、複数個のカルシウムイオン結合部位を有し、分子進化上共通の起源から由来したと考えられるトロポニンC、カルモジュリン、パルブアルブミン、ミオシン軽鎖等が知られており、その結合モチーフが含まれるように軽鎖CDR1、CDR2および/またはCDR3を設計することも可能である。例えば、上記の目的でカドヘリンドメイン、カルモジュリンに含まれるEFハンド、Protein kinase Cに含まれるC2ドメイン、血液凝固タンパク質Factor IXに含まれるGlaドメイン、アシアログライコプロテインレセプターやマンノース結合レセプターに含まれるC型レクチン、LDL受容体に含まれるAドメイン、アネキシン、トロンボスポンジン3型ドメインおよびEGF様ドメインが適宜使用され得る。

[0149] 前記のイオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基が導入された軽鎖可変領域とランダム化可変領域配列ライブラリとして作製された重鎖可変領域とを組み合わせる場合でも、前記と同様に、フレキシブル残基が当該軽鎖可変領域の配列に含まれるように設計することも可能である。本発明の抗原結合分子の抗原に対する結合活性が、イオン濃度の条件によって変化する限り、当該フレキシブル残基の数および位置は特定の態様に限定されることはない。すなわち、重鎖および/または軽鎖のCDR配列および/またはFR配列に一つまたはそれ以

上のフレキシブル残基が含まれ得る。例えば、イオン濃度がカルシウムイオン濃度である場合には、軽鎖可変領域配列に導入されるフレキシブル残基の非限定的な例として、表1または表2に記載されたアミノ酸残基が挙げられる。

[0150] 組み合わせられる重鎖可変領域の例として、ランダム化可変領域ライブラリが好適に挙げられる。ランダム化可変領域ライブラリの作製方法は公知の方法が適宜組み合わせられる。本発明の非限定な一態様では、特定の抗原で免疫された動物、感染症患者やワクチン接種して血中抗体価が上昇したヒト、癌患者、自己免疫疾患のリンパ球由来の抗体遺伝子をもとに構築された免疫ライブラリが、ランダム化可変領域ライブラリとして好適に使用され得る。

[0151] また、本発明の非限定な一態様では、ゲノムDNAにおけるV遺伝子や再構築され機能的なV遺伝子のCDR配列が、適当な長さのコドンセットをコードする配列を含む合成オリゴヌクレオチドセットで置換された合成ライブラリもまた、ランダム化可変領域ライブラリとして好適に使用され得る。この場合、重鎖のCDR3の遺伝子配列の多様性が観察されることから、CDR3の配列のみを置換することもまた可能である。抗原結合分子の可変領域においてアミノ酸の多様性を生み出す基準は、抗原結合分子の表面に露出した位置のアミノ酸残基に多様性を持たせることである。表面に露出した位置とは、抗原結合分子の構造、構造アンサンブル、および/またはモデル化された構造にもとづいて、表面露出が可能、かつ/または抗原との接触が可能と判断される位置のことをいうが、一般的にはそのCDRである。好ましくは、表面に露出した位置は、InsightIIプログラム (Accelrys) のようなコンピュータプログラムを用いて、抗原結合分子の3次元モデルからの座標を使って決定される。表面に露出した位置は、当技術分野で公知のアルゴリズム (例えば、LeeおよびRichards (J. Mol. Biol. (1971) 55, 379-400)、Connolly (J. Appl. Cryst. (1983) 16, 548-558)) を使用して決定され得る。表面に露出した位置の決定は、タンパク質モデリングに適したソフトウェアおよび抗体から得られる三次元構造情報を使って行われ得る。このような目的のために利用できるソフトウェ

アとして、SYBYL生体高分子モジュールソフトウェア (Tripos Associates) が好適に挙げられる。一般的に、また好ましくは、アルゴリズムがユーザーの入力サイズパラメータを必要とする場合は、計算において使われるプローブの「サイズ」は半径約1.4オングストローム以下に設定される。さらに、パーソナルコンピュータ用のソフトウェアを使用した表面に露出した領域およびエリアの決定法が、Pacios (Comput. Chem. (1994) 18 (4), 377-386および J. Mol. Model. (1995) 1, 46-53) に記載されている。

[0152] さらに、本発明の非限定な一態様では、健常人のリンパ球由来の抗体遺伝子から構築され、そのレパートリーにバイアスを含まない抗体配列であるナイーブ配列からなるナイーブライブラリもまた、ランダム化可変領域ライブラリとして特に好適に使用され得る (Gejimaら (Human Antibodies (2002) 11, 121-129) およびCardosoら (Scand. J. Immunol. (2000) 51, 337-344))。本発明で記載されるナイーブ配列を含むアミノ酸配列とは、このようなナイーブライブラリから取得されるアミノ酸配列をいう。

[0153] 本発明の一つの態様では、「イオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基」が予め含まれているフレームワーク配列として選択された重鎖可変領域と、ランダム化可変領域配列ライブラリとして作製された軽鎖可変領域とを組み合わせることによって本発明の複数の互いに配列の異なる抗原結合分子を含むライブラリから、本発明の抗原結合ドメインが取得され得る。このような非限定的な例として、イオン濃度がカルシウムイオン濃度である場合には、例えば、配列番号：10 (6RL#9-IgG1) または配列番号：11 (6KC4-1#85-IgG1) に記載された重鎖可変領域配列とランダム化可変領域配列ライブラリとして作製された軽鎖可変領域とを組み合わせたライブラリが好適に挙げられる。また、ランダム化可変領域配列ライブラリとして作製された軽鎖可変領域の代わりに、生殖細胞系列の配列を有する軽鎖可変領域の中から適宜選択することによって作製され得る。例えば、配列番号：10 (6RL#9-IgG1) または配列番号：11 (6KC4-1#85-IgG1) に記載された重鎖可変領域配列と生殖細胞

系列の配列を有する軽鎖可変領域とを組み合わせたライブラリが好適に挙げられる。

[0154] また、前記の「イオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基」が予め含まれているフレームワーク配列として選択された重鎖可変領域の配列に、フレキシブル残基が含まれるように設計することも可能である。本発明の抗原結合分子の抗原に対する結合活性が、イオン濃度の条件によって変化する限り、当該フレキシブル残基の数および位置は特定の態様に限定されることはない。すなわち、重鎖および/または軽鎖のCDR配列および/またはFR配列に一つまたはそれ以上のフレキシブル残基が含まれ得る。例えば、イオン濃度がカルシウムイオン濃度である場合には、配列番号：10（6RL#9-IgG1）に記載された重鎖可変領域配列に導入されるフレキシブル残基の非限定的な例として、重鎖CDR1およびCDR2の全てのアミノ酸残基のほか重鎖CDR3の95位、96位および/または100a位以外のCDR3のアミノ酸残基が挙げられる。または配列番号：11（6KC4-1#85-IgG1）に記載された重鎖可変領域配列に導入されるフレキシブル残基の非限定的な例として、重鎖CDR1およびCDR2の全てのアミノ酸残基のほか重鎖CDR3の95位および/または101位以外のCDR3のアミノ酸残基もまた挙げられる。

[0155] また、前記の「イオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基」が導入された重鎖可変領域とランダム化可変領域配列ライブラリとして作製された軽鎖可変領域または生殖細胞系列の配列を有する軽鎖可変領域とを組み合わせることによっても、複数の互いに配列の異なる抗原結合分子を含むライブラリが作製され得る。このような非限定的な例として、イオン濃度がカルシウムイオン濃度である場合には、例えば、重鎖可変領域の特定の残基が、カルシウムイオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基に置換された重鎖可変領域配列とランダム化可変領域配列ライブラリとして作製された軽鎖可変領域または生殖細胞系列の配

列を有する軽鎖可変領域とを組み合わせたライブラリが好適に挙げられる。当該アミノ酸残基の非限定な例として重鎖のCDR1に含まれるアミノ酸残基が例示される。ほかにも、当該アミノ酸残基の非限定な例として重鎖のCDR2に含まれるアミノ酸残基が例示される。また、当該アミノ酸残基の非限定な別の例として重鎖のCDR3に含まれるアミノ酸残基もまた例示される。当該アミノ酸残基が重鎖のCDR3に含まれアミノ酸残基の非限定な例として、重鎖可変領域のCDR3中のKabatナンバリングで表される95位、96位、100a位および/または101位のアミノ酸が挙げられる。また、これらのアミノ酸残基が、カルシウム結合モチーフを形成し、および/または、カルシウムイオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性が変化する限り、これらのアミノ酸残基が単独で含まれ得るし、これらのアミノ酸が二つ以上組み合わせられて含まれ得る。

[0156] 前記の、イオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基が導入された重鎖可変領域とランダム化可変領域配列ライブラリとして作製された軽鎖可変領域または生殖細胞系列の配列を有する軽鎖可変領域とを組み合わせる場合でも、前記と同様に、フレキシブル残基が当該重鎖可変領域の配列に含まれるように設計することも可能である。本発明の抗原結合分子の抗原に対する結合活性が、イオン濃度の条件によって変化する限り、当該フレキシブル残基の数および位置は特定の態様に限定されることはない。すなわち、重鎖のCDR配列および/またはFR配列に一つまたはそれ以上のフレキシブル残基が含まれ得る。また、イオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させるアミノ酸残基以外の重鎖可変領域のCDR1、CDR2および/またはCDR3のアミノ酸配列としてランダム化可変領域ライブラリも好適に使用され得る。軽鎖可変領域として生殖細胞系列の配列が用いられる場合には、例えば、配列番号：6 (Vk1)、配列番号：7 (Vk2)、配列番号：8 (Vk3)、配列番号：9 (Vk4) 等の生殖細胞系列の配列が非限定な例として挙げられ得る。

[0157] 前記の、カルシウムイオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子

の結合活性を変化させるアミノ酸としては、カルシウム結合モチーフを形成する限り、いずれのアミノ酸も好適に使用され得るが、そのようなアミノ酸としては具体的に電子供与性を有するアミノ酸が挙げられる。こうした電子供与性を有するアミノ酸としては、セリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸またはグルタミン酸が好適に例示される。

[0158] 水素イオン濃度の条件

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

[0159] 本発明においては、イオン濃度の条件としてpHの条件が用いられる場合には、pHの条件として高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件と低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件が挙げられる。本発明の抗原結合分子に含まれる抗原結合ドメインの抗原に対する結合活性がpHの条件によって結合活性が変化すると、高水素イオン濃度または低pH (pH酸性域) と低水素イオン濃度または高pH (pH中性域) の条件の違いによって抗原結合分子に含まれる抗原結合ドメインの抗原に対する結合活性が変化することをいう。例えば、pH酸性域の条件下における抗原に対する抗原結合分子の結合活性よりもpH中性域の条件下における抗原に対する抗原結合分子の結合活性の方が高い場合が挙げられる。また、pH中性域の条件下における抗原に対する抗原結合分子の結合活性よりもpH酸性域の条件下における抗原に対する抗原結合分子の結合活性の方が高い場合もまた挙げられる。

[0160] 本明細書において、pH中性域とはとくに一義的な数値に限定されるわけではないが、好適にはpH6.7からpH10.0の間から選択され得る。また、別の態様

では、pH6.7からpH9.5の間から選択され得る。また、異なる態様ではpH7.0からpH9.0の間から選択され得るし、ほかの態様ではpH7.0からpH8.0の間から選択され得る。特に生体内の血漿中（血中）でのpHに近いpH7.4が好適に挙げられる。

[0161] 本明細書において、pH酸性域とはとくに一義的な数値に限定されるわけではないが、好適にはpH4.0からpH6.5の間から選択され得る。また、別の態様では、pH4.5からpH6.5の間から選択され得る。また、異なる態様ではpH5.0からpH6.5の間から選択され得るし、ほかの態様ではpH5.5からpH6.5の間から選択され得る。特に生体内の早期エンドソーム内でのイオン化カルシウム濃度に近いpH5.8が好適に挙げられる。

[0162] 本発明において、高水素イオン濃度または低pH（pH酸性域）の条件下における抗原に対する結合活性が低水素イオン濃度または高pH（pH中性域）の条件下における抗原に対する結合活性より低いとは、本発明の抗原結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子のpH4.0からpH6.5の間から選択されるpHでの抗原に対する結合活性が、pH6.7からpH10.0の間から選択されるpHでの抗原に対する結合活性より弱いことを意味する。好ましくは、本発明の抗原結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子のpH4.5からpH6.5の間から選択されるpHでの抗原に対する結合活性が、pH6.7からpH9.5の間から選択されるpHでの抗原に対する結合活性より弱いことを意味し、より好ましくは、抗原結合分子のpH5.0からpH6.5の間から選択されるpHでの抗原に対する結合活性が、pH7.0からpH9.0の間から選択されるpHでの抗原に対する結合活性より弱いことを意味する。また、好ましくは抗原結合分子のpH5.5からpH6.5の間から選択されるpHでの抗原に対する結合活性が、pH7.0からpH8.0の間から選択されるpHでの抗原に対する結合活性より弱いことを意味する。特に好ましくは、生体内の早期エンドソーム内のpHにおける抗原結合活性が、生体内の血漿中のpHにおける抗原結合活性より弱いことを意味し、具体的には、抗原結合分子のpH5.8での抗原に対する結合活性が、pH7.4での抗原に対する結合活性より弱いことを意味する。

[0163] pHの条件によって抗原に対する抗原結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子の結合活性が変化しているか否かは、例えば前記の結合活性の項で記載されたような公知の測定方法を使用することによって決定され得る。例えば、当該測定方法に際して異なるpHの条件下での結合活性が測定される。例えば、pH酸性域の条件下における抗原に対する抗原結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子の結合活性よりもpH中性域の条件下における抗原に対する前記ドメインまたは前記の結合活性の方が高く変化することを確認するためには、pH酸性域およびpH中性域の条件下における抗原に対する前記ドメインまたは前記分子の結合活性が比較される。

[0164] さらに本発明において、「高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件下における抗原に対する結合活性が低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件下における抗原に対する結合活性より低い」という表現は、抗原結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子の低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件下における抗原に対する結合活性が高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件下における抗原に対する結合活性よりも高いと表現することもできる。なお本発明においては、「高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件下における抗原に対する結合活性が低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件下における抗原に対する結合活性より低い」を「高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件下における抗原に対する結合活性が低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件下における抗原に対する結合能よりも弱い」と記載する場合もあり、また、「高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件下における抗原に対する結合活性が低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件下における抗原に対する結合活性より低下させる」を「高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件下における抗原に対する結合活性が低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件下における抗原に対する結合能よりも弱くする」と記載する場合もある。

[0165] 抗原に対する結合活性を測定する際の水素イオン濃度またはpH以外の条件

は、当業者が適宜選択することが可能であり、特に限定されない。例えば、H EPESバッファー、37°Cの条件において測定することが可能である。例えば、B iacore (GE Healthcare) などを用いて測定することが可能である。抗原結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子と抗原との結合活性の測定は、抗原が可溶性抗原である場合は、抗原結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子を固定化したチップへ、抗原をアナライトとして流すことで可溶性抗原への結合活性を評価することが可能であり、抗原が膜型抗原である場合は、抗原を固定化したチップへ、抗原結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子をアナライトとして流すことで膜型抗原への結合活性を評価することが可能である。

本発明の抗原結合分子において、高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件における抗原に対する結合活性が低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件における抗原に対する結合活性よりも弱い限り、高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件下における抗原に対する結合活性と低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件下における抗原に対する結合活性の比は特に限定されないが、好ましくは抗原に対する高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件におけるKD (Dissociation constant : 解離定数) と低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件におけるKDの比である $KD(pH5.8)/KD(pH7.4)$ の値が2以上であり、さらに好ましくは $KD(pH5.8)/KD(pH7.4)$ の値が10以上であり、さらに好ましくは $KD(pH5.8)/KD(pH7.4)$ の値が40以上である。 $KD(pH5.8)/KD(pH7.4)$ の値の上限は特に限定されず、当業者の技術において作製可能な限り、400、1000、10000等、いかなる値でもよい。

[0166] また、本発明の抗原結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子の高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件における抗原に対する結合活性と低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件における抗原に対する結合活性の比を示す他の指標として、例えば、解離速度定数である k_d (Dissociation rate constant : 解離速度定数) もまた好適に用いら

れ得る。結合活性の比を示す指標としてKD（解離定数）の代わりにkd（解離速度定数）を用いる場合、抗原に対する高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件におけるkd（解離速度定数）と低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件におけるkd（解離速度定数）の比であるkd（pH酸性域の条件における）/kd（pH中性域の条件における）の値は、好ましくは2以上であり、さらに好ましくは5以上であり、さらに好ましくは10以上であり、より好ましくは30以上である。Kd（pH酸性域の条件における）/kd（pH中性域の条件における）の値の上限は特に限定されず、当業者の技術常識において作製可能な限り、50、100、200等、いかなる値でもよい。

[0167] 抗原結合活性の値として、抗原が可溶性抗原の場合はkd（解離速度定数）を用いることが可能であり、抗原が膜型抗原の場合は見かけのkd（Apparent dissociation rate constant：見かけの解離速度定数）を用いることが可能である。kd（解離速度定数）、および、見かけのkd（見かけの解離速度定数）は、当業者公知の方法で測定することが可能であり、例えばBiacore（GE healthcare）、フローサイトメーター等を用いることが可能である。なお本発明において、異なる水素イオン濃度すなわちpHにおける抗原結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子の抗原に対する結合活性を測定する際は、水素イオン濃度すなわちpH以外の条件は同一とすることが好ましい。

[0168] 例えば、本発明が提供する一つの態様である高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件における抗原に対する結合活性が、低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件における抗原に対する結合活性より低い抗原結合ドメインまたは抗原結合分子は、以下の工程(a)～(c)を含む抗原結合ドメインまたは抗原結合分子のスクリーニングによって取得され得る。

- (a) pH酸性域の条件における抗原結合ドメインまたは抗原結合分子の抗原結合活性を得る工程、
- (b) pH中性域の条件における抗原結合ドメインまたは抗原結合分子の抗原結合活性を得る工程、
- (c) pH酸性域の条件における抗原結合活性が、pH中性域の条件における抗原

結合活性より低い抗原結合ドメインまたは抗原結合分子を選択する工程。

[0169] さらに、本発明が提供する一つの態様である高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件における抗原に対する結合活性が、低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件における抗原に対する結合活性より低い抗原結合ドメインまたは抗原結合分子は、以下の工程(a)~(c)を含む抗原結合ドメインまたは抗原結合分子もしくはそれらのライブラリのスクリーニングによって取得され得る。

(a) pH中性域の条件における抗原結合ドメインまたは抗原結合分子もしくはそれらのライブラリを抗原に接触させる工程、

(b) 前記工程(a)で抗原に結合した抗原結合ドメインまたは抗原結合分子をpH酸性域の条件に置く工程、

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

[0170] また、本発明が提供する一つの態様である高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件における抗原に対する結合活性が、低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件における抗原に対する結合活性より低い抗原結合ドメインまたは抗原結合分子は、以下の工程(a)~(d)を含む抗原結合ドメインまたは抗原結合分子若しくはそれらのライブラリのスクリーニングによって取得され得る。

(a) pH酸性域の条件で抗原結合ドメイン又は抗原結合分子のライブラリを抗原に接触させる工程、

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

(c) 前記工程(b)で選択された抗原結合ドメイン又は抗原結合分子をpH中性域の条件で抗原に結合させる工程、

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

[0171] さらに、本発明が提供する一つの態様である高水素イオン濃度または低pH

すなわちpH酸性域の条件における抗原に対する結合活性が、低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件における抗原に対する結合活性より低い抗原結合ドメインまたは抗原結合分子は、以下の工程(a)~(c)を含むスクリーニング方法によって取得され得る。

(a) 抗原を固定したカラムにpH中性域の条件で抗原結合ドメイン又は抗原結合分子のライブラリを接触させる工程、

(b) 前記工程(a)でカラムに結合した抗原結合ドメイン又は抗原結合分子をpH酸性域の条件でカラムから溶出する工程、

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

[0172] さらに、本発明が提供する一つの態様である高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件における抗原に対する結合活性が、低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件における抗原に対する結合活性より低い抗原結合ドメインまたは抗原結合分子は、以下の工程(a)~(d)を含むスクリーニング方法によって取得され得る。

(a) 抗原を固定したカラムにpH酸性域の条件で抗原結合ドメイン又は抗原結合分子のライブラリを通過させる工程、

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

(c) 前記工程(b)で回収された抗原結合ドメイン又は抗原結合分子をpH中性域の条件で抗原に結合させる工程、

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

[0173] さらに、本発明が提供する一つの態様である高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件における抗原に対する結合活性が、低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件における抗原に対する結合活性より低い抗原結合ドメインまたは抗原結合分子は、以下の工程(a)~(d)を含むスクリーニング方法によって取得され得る。

- (a) pH中性域の条件で抗原結合ドメイン又は抗原結合分子のライブラリを抗原に接触させる工程、
- (b) 前記工程(a)で抗原に結合した抗原結合ドメイン又は抗原結合分子を取得する工程、
- (c) 前記工程(b)で取得した抗原結合ドメイン又は抗原結合分子をpH酸性域の条件に置く工程、
- (d) 前記工程(c)で抗原結合活性が、前記工程(b)で選択した基準より弱い抗原結合ドメイン又は抗原結合分子を単離する工程。

[0174] なお、前記の工程は2回以上繰り返されてもよい。従って、本発明によって、上述のスクリーニング方法において、(a)～(c)あるいは(a)～(d)の工程を2回以上繰り返す工程をさらに含むスクリーニング方法によって取得されたpH酸性域の条件における抗原に対する結合活性がpH中性域の条件における抗原に対する結合活性より低い抗原結合ドメインまたは抗原結合分子が提供される。(a)～(c)あるいは(a)～(d)の工程が繰り返される回数は特に限定されないが、通常10回以内である。

[0175] 本発明のスクリーニング方法において、高水素イオン濃度条件または低pHすなわちpH酸性域における抗原結合ドメイン又は抗原結合分子の抗原結合活性は、pHが4.0～6.5の間の抗原結合活性であれば特に限定されないが、好ましいpHとして、pHが4.5～6.6の間の抗原結合活性を挙げることができる。別の好ましいpHとして、pHが5.0～6.5の間の抗原結合活性、さらにpHが5.5～6.5の間の抗原結合活性を挙げることができる。より好ましいpHとして、生体内の早期エンドソーム内のpHが挙げられ、具体的にはpH5.8における抗原結合活性を挙げることができる。また、低水素イオン濃度条件または高pHすなわちpH中性域における抗原結合ドメイン又は抗原結合分子の抗原結合活性は、pHが6.7～10の間の抗原結合活性であれば特に限定されないが、好ましいpHとしてpHが6.7～9.5の間の抗原結合活性を挙げることができる。別の好ましいpHとして、pHが7.0～9.5の間の抗原結合活性、さらにpHが7.0～8.0の間の抗原結合活性を挙げることができる。より好ましいpHとして、生体内の血漿中でのp

Hを挙げることができ、具体的にはpHが7.4における抗原結合活性を挙げることができる。

[0176] 抗原結合ドメイン又は抗原結合分子の抗原結合活性は当業者に公知の方法により測定することが可能であり、イオン化カルシウム濃度以外の条件については当業者が適宜決定することが可能である。抗原結合ドメイン又は抗原結合分子の抗原結合活性は、KD (Dissociation constant: 解離定数)、見かけのKD (Apparent dissociation constant: 見かけの解離定数)、解離速度であるkd (Dissociation rate: 解離速度定数)、又は見かけのkd (Apparent dissociation: 見かけの解離速度定数) 等として評価することが可能である。これらは当業者公知の方法で測定することが可能であり、例えばBiacore (GE healthcare)、スキャッチャードプロット、FACS等を用いることが可能である。

[0177] 本発明において、低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件における抗原結合活性が高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件における抗原結合活性より高い抗原結合ドメイン又は抗原結合分子を選択する工程は、高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件における抗原結合活性が低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件における抗原結合活性より低い抗原結合ドメイン又は抗原結合分子を選択する工程と同じ意味である。

[0178] 低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件における抗原結合活性が高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件における抗原結合活性より高い限り、低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件における抗原結合活性と高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件における抗原結合活性の差は特に限定されないが、好ましくは低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件における抗原結合活性が高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件における抗原結合活性の2倍以上であり、さらに好ましくは10倍以上であり、より好ましくは40倍以上である。

[0179] 水素イオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合ドメインの結合活性を

変化させるアミノ酸

前記のスクリーニング方法によってスクリーニングされる本発明の抗原結合ドメイン又は抗原結合分子はどのように調製されてもよく、例えば、あらかじめ存在している抗原結合分子、あらかじめ存在しているライブラリ（ファージライブラリ等）、動物への免疫から得られたハイブリドーマや免疫動物からのB細胞から作製された抗体又はライブラリ、これらの抗体やライブラリに側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸変異を導入した抗体又はライブラリ（側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）又は非天然アミノ酸の含有率を高くしたライブラリや特定箇所に側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）又は非天然アミノ酸変異を導入したライブラリ等）などを用いることが可能である。

[0180] 動物への免疫から得られたハイブリドーマや免疫動物からのB細胞から作製された抗原結合ドメインまたは抗原結合分子から、低水素イオン濃度または高pHすなわちpH中性域の条件における抗原結合活性が高水素イオン濃度または低pHすなわちpH酸性域の条件における抗原結合活性より高い抗原結合ドメイン又は抗原結合分子を取得する方法として、例えば、国際公開W02009/125825で記載されるような抗原結合ドメインまたは抗原結合分子中のアミノ酸の少なくとも一つが、側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸変異に置換されているもしくは抗原結合ドメインまたは抗原結合分子中に、側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸が挿入されている抗原結合分子または抗原結合分子が好適に挙げられる。

[0181] 側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸の変異が導入される位置は特に限定されず、置換または挿入前と比較してpH酸性域における抗原結合活性がpH中性域における抗原結合活性より弱くなる（ $KD(\text{pH酸性域})/KD(\text{pH中性域})$ の値が大きくなる、又は $kd(\text{pH酸性域})/kd(\text{pH中性域})$ の値が大きくなる）限り、如何なる部位でもよい。例

例えば、抗原結合分子が抗体の場合には、抗体の可変領域やCDRなどが好適に挙げられる。側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸に置換されるアミノ酸の数、又は挿入されるアミノ酸の数は当業者が適宜決定することができ、側鎖のpKaが4.0-8.0である1つのアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸によって置換され得るし、側鎖のpKaが4.0-8.0である1つのアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸が挿入され得るし、側鎖のpKaが4.0-8.0である2つ以上の複数のアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸によって置換され得るし、側鎖のpKaが4.0-8.0である2つ以上のアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸が挿入され得る。又、側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸への置換又は側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸の挿入以外に、他のアミノ酸の欠失、付加、挿入および/または置換などが同時に行われ得る。側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸への置換又は側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸の挿入は、当業者の公知のアラニンscanningのアラニンをヒスチジン等に置き換えたヒスチジン等scanning等の方法によってランダムに行われ得るし、側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸の置換または挿入の変異がランダムに導入された抗原結合ドメインまたは抗体の中から、変異前と比較してKD（pH酸性域）/KD（pH中性域）又はkd（pH酸性域）/kd（pH中性域）の値が大きくなった抗原結合分子が選択され得る。

[0182] 前記のようにその側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸への変異が行われ、かつpH酸性域での抗原結合活性がpH中性域での抗原結合活性よりも低い抗原結合分子の好ましい例として、例えば、その側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸への変異後のpH中性域での抗原結合

活性が、その側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸への変異前のpH中性域での抗原結合活性と同等である抗原結合分子が好適に挙げられる。本発明において、その側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸の変異後の抗原結合分子が、その側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸の変異前の抗原結合分子と同等の抗原結合活性を有するとは、その側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸の変異前の抗原結合分子の抗原結合活性を100%とした場合に、その側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸の変異後の抗原結合分子の抗原結合活性が少なくとも10%以上、好ましくは50%以上、さらに好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上であることをいう。その側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸の変異後のpH7.4での抗原結合活性が、その側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸の変異前のpH7.4での抗原結合活性より高くなってもよい。その側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸への置換または挿入により抗原結合分子の抗原結合活性が低くなった場合には、抗原結合分子中の1又は複数のアミノ酸の置換、欠失、付加及び/又は挿入などによって、抗原結合活性が、その側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸の置換又は挿入前の抗原結合活性と同等にされ得る。本発明においては、そのような側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸（例えばヒスチジンやグルタミン酸）や非天然アミノ酸の置換又は挿入後に1又は複数のアミノ酸の置換、欠失、付加及び/又は挿入を行うことによって結合活性が同等となった抗原結合分子も含まれる。

[0183] 本発明の一つの態様として、「水素イオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合ドメインまたは抗原結合分子の結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基」が導入された軽鎖可変領域とランダム化可変領域配列

ライブラリとして作製された重鎖可変領域とを組み合わせることによっても、本発明の複数の互いに配列の異なる抗原結合ドメインまたは抗原結合分子を含むライブラリが作製され得る。

[0184] 当該アミノ酸残基の非限定な例として軽鎖のCDR1に含まれるアミノ酸残基が例示される。ほかにも、当該アミノ酸残基の非限定な例として軽鎖のCDR2に含まれるアミノ酸残基が例示される。また、当該アミノ酸残基の非限定な別の例として軽鎖のCDR3に含まれるアミノ酸残基もまた例示される。

[0185] 前記のように、当該アミノ酸残基が軽鎖のCDR1に含まれるアミノ酸残基の非限定な例として、軽鎖可変領域のCDR1中のKabatナンバリングで表される24位、27位、28位、31位、32位および/または34位のアミノ酸残基が挙げられる。また、当該アミノ酸残基が軽鎖のCDR2に含まれるアミノ酸残基の非限定な例として、軽鎖可変領域のCDR2中のKabatナンバリングで表される50位、51位、52位、53位、54位、55位および/または56位のアミノ酸残基が挙げられる。さらに、当該アミノ酸残基が軽鎖のCDR3に含まれアミノ酸残基の非限定な例として、軽鎖可変領域のCDR3中のKabatナンバリングで表される89位、90位、91位、92位、93位、94位および/または95A位のアミノ酸残基が挙げられる。また、これらのアミノ酸残基が、水素イオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性が変化する限り、これらのアミノ酸残基が単独で含まれ得るし、これらのアミノ酸が二つ以上組み合わせられて含まれ得る。

[0186] 前記の「水素イオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合分子の結合活性を変化させる少なくとも一つのアミノ酸残基」が導入された軽鎖可変領域とランダム化可変領域配列ライブラリとして作製された重鎖可変領域とを組み合わせる場合でも、前記と同様に、フレキシブル残基が当該軽鎖可変領域の配列に含まれるように設計することも可能である。本発明の抗原結合ドメインまたは抗原結合分子の抗原に対する結合活性が、水素イオン濃度の条件によって変化する限り、当該フレキシブル残基の数および位置は特定の態様に限定されることはない。すなわち、重鎖および/または軽鎖のCDR配列および/またはFR配列に一つまたはそれ以上のフレキシブル残基が含まれ得る。

例えば、軽鎖可変領域配列に導入されるフレキシブル残基の非限定的な例として、表3または表4に記載されたアミノ酸残基が挙げられる。また、水素イオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合ドメインまたは抗原結合分子の結合活性を変化させるアミノ酸残基やフレキシブル残基以外の軽鎖可変領域のアミノ酸配列としては、非限定な例としてVk1（配列番号：6）、Vk2（配列番号：7）、Vk3（配列番号：8）、Vk4（配列番号：9）等の生殖細胞系列の配列が好適に使用され得る。

[0187] [表3]

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

(位置は Kabat ナンバリングを表す)

[0188] [表4]

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

(位置は Kabat ナンバリングを表す)

[0189] 前記の、水素イオン濃度の条件によって抗原に対する抗原結合ドメインまたは抗原結合分子の結合活性を変化させるアミノ酸残基としては、いずれのアミノ酸残基も好適に使用され得るが、そのようなアミノ酸残基としては、具体的に側鎖のpKaが4.0-8.0であるアミノ酸が挙げられる。こうした電子供与性を有するアミノ酸としては、ヒスチジンまたはグルタミン酸等の天然のアミノ酸のほか、ヒスチジンアナログ (US2009/0035836) もしくはm-N02-Tyr (pKa 7.45)、3,5-Br2-Tyr (pKa 7.21) または3,5-I2-Tyr (pKa 7.38) 等の非天然のアミノ酸 (Bioorg. Med. Chem. (2003) 11 (17), 3761-3768) が好適

に例示される。また、当該アミノ酸残基の特に好適な例としては、側鎖のpKaが6.0-7.0であるアミノ酸が挙げられる。こうした電子供与性を有するアミノ酸としては、ヒスチジンが好適に例示される。

[0190] 組み合わされる重鎖可変領域の例として、ランダム化可変領域ライブラリが好適に挙げられる。ランダム化可変領域ライブラリの作製方法は公知の方法が適宜組み合わされる。本発明の非限定な一態様では、特定の抗原で免疫された動物、感染症患者やワクチン接種して血中抗体価が上昇したヒト、癌患者、自己免疫疾患のリンパ球由来の抗体遺伝子をもとに構築された免疫ライブラリが、ランダム化可変領域ライブラリとして好適に使用され得る。

[0191] また、本発明の非限定な一態様では、前記と同様に、ゲノムDNAにおけるV遺伝子や再構築され機能的なV遺伝子のCDR配列が、適当な長さのコドンセットをコードする配列を含む合成オリゴヌクレオチドセットで置換された合成ライブラリもまた、ランダム化可変領域ライブラリとして好適に使用され得る。この場合、重鎖のCDR3の遺伝子配列の多様性が観察されることから、CDR3の配列のみを置換することもまた可能である。抗原結合分子の可変領域においてアミノ酸の多様性を生み出す基準は、抗原結合分子の表面に露出した位置のアミノ酸残基に多様性を持たせることである。表面に露出した位置とは、抗原結合分子の構造、構造アンサンブル、および/またはモデル化された構造にもとづいて、表面に露出が可能、かつ/または抗原との接触が可能と判断される位置のことをいうが、一般的にはそのCDRである。好ましくは、表面に露出した位置は、InsightIIプログラム (Accelrys) のようなコンピュータプログラムを用いて、抗原結合分子の3次元モデルからの座標を使って決定される。表面に露出した位置は、当技術分野で公知のアルゴリズム (例えば、Lee およびRichards (J. Mol. Biol. (1971) 55, 379-400) 、Connolly (J. Appl. Cryst. (1983) 16, 548-558)) を使用して決定され得る。表面に露出した位置の決定は、タンパク質モデリングに適したソフトウェアおよび抗体から得られる三次元構造情報を使って行われ得る。このような目的のために利用できるソフトウェアとして、SYBYL生体高分子モジュールソフトウェア (Trip

os Associates) が好適に挙げられる。一般的に、また好ましくは、アルゴリズムがユーザーの入力サイズパラメータを必要とする場合は、計算において使われるプローブの「サイズ」は半径約1.4オングストローム以下に設定される。さらに、パーソナルコンピュータ用のソフトウェアを使用した表面に露出した領域およびエリアの決定法が、Pacios (Comput. Chem. (1994) 18 (4), 377-386およびJ. Mol. Model. (1995) 1, 46-53) に記載されている。

[0192] さらに、本発明の非限定な一態様では、健常人のリンパ球由来の抗体遺伝子から構築され、そのレパートリーにバイアスを含まない抗体配列であるナイーブ配列からなるナイーブライブラリもまた、ランダム化可変領域ライブラリとして特に好適に使用され得る (Gejimaら (Human Antibodies (2002) 11, 121-129) およびCardosoら (Scand. J. Immunol. (2000) 51, 337-344))
。

[0193] FcRn

免疫グロブリンスーパーファミリーに属するFc γ レセプターと異なり、ヒトFcRnは構造的には主要組織不適合性複合体 (MHC) クラス I のポリペプチドに構造的に類似しクラス I のMHC分子と22から29%の配列同一性を有する (Ghetieら, Immunol. Today (1997) 18 (12), 592-598) 。FcRnは、可溶性 β または軽鎖 (β 2マイクログロブリン) と複合体化された膜貫通 α または重鎖よりなるヘテロダイマーとして発現される。MHCのように、FcRnの α 鎖は3つの細胞外ドメイン (α 1、 α 2、 α 3) よりなり、短い細胞質ドメインはタンパク質を細胞表面に繫留する。 α 1および α 2ドメインが抗体のFc領域中のFcRn結合ドメインと相互作用する (Raghavanら (Immunity (1994) 1, 303-315))
。

[0194] FcRnは、哺乳動物の母性胎盤または卵黄嚢で発現され、それは母親から胎児へのIgGの移動に関与する。加えてFcRnが発現するげっ歯類新生児の小腸では、FcRnが摂取された初乳または乳から母性IgGの刷子縁上皮を横切る移動に関与する。FcRnは多数の種にわたって多数の他の組織、並びに種々の内皮細胞系において発現している。それはヒト成人血管内皮、筋肉血管系、および

肝臓洞様毛細血管でも発現される。FcRnは、IgGに結合し、それを血清にリサイクルすることによって、IgGの血漿中濃度を維持する役割を演じていると考えられている。FcRnのIgG分子への結合は、通常、厳格にpHに依存的であり、最適結合は7.0未満のpH酸性域において認められる。

[0195] 配列番号：12で表されたシグナル配列を含むポリペプチドを前駆体とするヒトFcRnは、生体内で（配列番号：13において、シグナル配列を含むそのポリペプチドが記載されている）ヒト β 2-ミクログロブリンとの複合体を形成する。 β 2-ミクログロブリンと複合体を形成している可溶性ヒトFcRnが通常の組換え発現手法を用いることによって製造される。このような β 2-ミクログロブリンと複合体を形成している可溶性ヒトFcRnに対する本発明のFcRn結合ドメインの結合活性が評価され得る。本発明において、特に記載のない場合は、ヒトFcRnは本発明のFcRn結合ドメインに結合し得る形態であるものを指し、例としてヒトFcRnとヒト β 2-ミクログロブリンとの複合体が挙げられる。

[0196] FcRn、特にヒトFcRnに対するFcRn結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子の結合活性

本発明により提供される抗原結合分子に含まれるFcRn結合ドメインのFcRn、特にヒトFcRnに対する結合活性は、前記結合活性の項で述べられているように、当業者に公知の方法により測定することが可能であり、pH以外の条件については当業者が適宜決定することが可能である。抗原結合ドメインまたは当該ドメイン含む抗原結合分子とヒトFcRnとの結合活性は、KD (Dissociation constant: 解離定数)、見かけのKD (Apparent dissociation constant: 見かけの解離定数)、解離速度であるkd (Dissociation rate: 解離速度)、又は見かけのkd (Apparent dissociation: 見かけの解離速度)等として評価され得る。これらは当業者公知の方法で測定され得る。例えばBiacore (GE healthcare)、スキャッチャードプロット、フローサイトメーター等が使用され得る。

[0197] 本発明のFcRn結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子のヒトF

cRnに対する結合活性を測定する際のpH以外の条件は当業者が適宜選択することが可能であり、特に限定されない。例えば、国際公開W02009/125825に記載されているようにMESバッファー、37°Cの条件において測定され得る。また、本発明のFcRn結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子のヒトFcRnに対する結合活性の測定は当業者公知の方法により行うことが可能であり、例えば、Biacore (GE Healthcare) などを用いて測定され得る。本発明のFcRn結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子とヒトFcRnの結合活性の測定は、FcRn結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子あるいはヒトFcRnを固定化したチップへ、それぞれヒトFcRnあるいはFcRn結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子をアナライトとして流すことによって評価され得る。

[0198] 本発明において、本発明の抗原結合分子または当該分子に含まれるFcRn結合ドメインとFcRnとの結合活性を有する条件としてのpH酸性域とは、通常pH4.0~pH6.5を意味する。好ましくはpH5.5~pH6.5を意味し、特に好ましくは、生体内の早期エンドソーム内のpHに近いpH5.8~pH6.0を意味する。本発明の抗原結合分子または当該分子に含まれるFcRn結合ドメインとFcRnとの結合活性を有する条件としてのpH中性域とは、通常pH6.7~pH10.0を意味する。pH中性域とは、好ましくはpH7.0~pH8.0の任意のpH値によって示される範囲であり、好ましくはpH7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、および8.0から選択され、特に好ましくは生体内の血漿中（血中）のpHに近いpH7.4である。pH7.4でのヒトFcRn結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子とヒトFcRnとの結合アフィニティーが低いためにその結合アフィニティーを評価することが難しい場合には、pH7.4の代わりにpH7.0を用いることができる。測定条件に使用される温度として、ヒトFcRn結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子とヒトFcRnとの結合アフィニティーは、10°C~50°Cの任意の温度で評価してもよい。好ましくは、ヒトFcRn結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子とヒトFcRnとの結合アフィニティーを決定するために、15°C~40°Cの温度が使用される。より好ましくは、20

、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、および35°Cのいずれか1つのような20°Cから35°Cまでの任意の温度も同様に、ヒトFcRn結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子とヒトFcRnとの結合アフィニティーを決定するために使用される。25°Cという温度は本発明の態様の非限定な一例である。

[0199] FcRn結合ドメイン

本発明の抗原結合分子は、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメインを含む。FcRn結合ドメインは、抗原結合分子がpH酸性域においてFcRnに対する結合活性を有していれば特に限定されず、また、直接または間接的にFcRnに対して結合活性を有するドメインであってもよい。そのようなドメインとしては、例えば、直接的にFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメインとして、例えばIgG型免疫グロブリンのFc領域、アルブミン、アルブミンドメイン3、Christiansonら (mAbs (2012) 4 (2), 208-216) 等で記載される抗FcRn抗体、W02007/098420等で記載される抗FcRnペプチド、抗FcRn足場 (Scaffold) 分子等、あるいは間接的にFcRnに対する結合活性を有するIgGやアルブミンに結合する分子等が好適に挙げられる。当該ドメインは、あらかじめpH酸性域においてFcRnに対する結合活性を有しているドメインであればそのまま好適に使用され得る。当該ドメインがpH酸性域においてFcRnに対する結合活性がないまたは弱い場合には、抗原結合分子中のFcRn結合ドメインを形成するアミノ酸を改変してFcRnに対する結合活性を付与することが可能である。また、あらかじめpH酸性域においてFcRnに対する結合活性を有しているドメイン中のアミノ酸を改変して、pH酸性域におけるFcRnに対する結合活性を高めてもよい。FcRn結合ドメインのアミノ酸の改変は、アミノ酸改変前と改変後のpH酸性域におけるFcRnに対する結合活性を比較することによって目的の改変を見出すことが可能である。

[0200] Fc領域

Fc領域は、抗体重鎖の定常領域に由来するアミノ酸配列を含む。Fc領域は、EUナンバリングで表されるおよそ216位のアミノ酸における、パパイン切断

部位のヒンジ領域のN末端から、当該ヒンジ、CH2およびCH3ドメインを含める抗体の重鎖定常領域の部分である。Fc領域は、ヒトIgG1から取得され得るが、IgGの特定のサブクラスに限定されるものでもない。そのようなFc領域の非限定な一態様として、ヒトIgG1（配列番号：14）、IgG2（配列番号：15）、IgG3（配列番号：16）、またはIgG4（配列番号：17）で表されるFc領域が例示される。

[0201] pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメイン

前記のように、本発明の非限定な一態様においては、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメインとしてヒトIgG型免疫グロブリンのFc領域が使用される。当該ドメインとして、あらかじめpH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有しているFc領域であればそのまま用いられ得るが、そのようなFc領域として、例えばヒトIgG（IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4、およびそれらの改変体）のFc領域が挙げられる。また、Fc領域のpH酸性域の条件下におけるFcRnに対する結合活性がない若しくは弱い場合には、当該Fc領域中のアミノ酸を改変することによって所望のFcRnに対する結合活性を有するFc領域が取得され得る。また、Fc領域中のアミノ酸を改変することによってpH酸性域の条件下でFcRnに対する所望の結合活性を有する、または増強されたFc領域も好適に取得され得る。そのような所望の結合活性をもたらすFc領域のアミノ酸改変は、アミノ酸改変前と改変後のpH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を比較することによって見出され得る。例えば、前記「FcRn、特にヒトFcRnに対するFcRn結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子の結合活性」の項で記載された方法によって、そのようなアミノ酸改変が見出され得る。

[0202] そのような改変の非限定な一態様として、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を増強するFc領域の改変を下記に例示する。改変のための好ましいIgG型免疫グロブリンのFc領域（出発Fc領域）としては、例えばヒトIgG（IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4、およびそれらの改変体）のFc領域が挙げられる。出発Fc領域の起源は、限定されないが非ヒト動物の任意の生物またはヒ

トから取得され得る。好ましくは、任意の生物としては、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、アレチネズミ、ネコ、ウサギ、イヌ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ラクダ、および非ヒト霊長類から選択される生物が好適に挙げられる。別の態様において、出発Fc領域はまた、カニクイザル、マーモセット、アカゲザル、チンパンジー、またはヒトから取得され得る。好ましくは、出発Fc領域は、ヒトIgG1から取得され得るが、IgGの特定のサブクラスに限定されるものでもない。このことは、ヒトIgG1（配列番号：14）、IgG2（配列番号：15）、IgG3（配列番号：16）、またはIgG4（配列番号：17）で表されるFc領域を出発Fc領域として適宜用いることができることを意味する。同様に、本明細書において、前記の任意の生物からのIgGの任意のクラスまたはサブクラスのFc領域を、好ましくは出発Fc領域として用いることができることを意味する。天然に存在するIgGのバリエーションまたは操作された型の例は、公知の文献（Curr. Opin. Biotechnol. (2009) 20 (6), 685-91, Curr. Opin. Immunol. (2008) 20 (4), 460-470, Protein Eng. Des. Sel. (2010) 23 (4), 195-202, 国際公開W02009/086320, W02008/092117, W02007/041635, およびW02006/105338）に記載されるがそれらに限定されない。

[0203] 改変の例としては一以上の変異、例えば、出発Fc領域のアミノ酸とは異なるアミノ酸残基に置換された変異、あるいは出発Fc領域のアミノ酸に対して一以上のアミノ酸残基の挿入または出発Fc領域のアミノ酸から一以上のアミノ酸の欠失等が含まれる。好ましくは、改変後のFc領域のアミノ酸配列には、天然に生じないFc領域の少なくとも部分を含むアミノ酸配列を含む。そのような変種は必然的に出発Fc領域と100%未満の配列同一性または類似性を有する。好ましい実施形態において、変種は出発Fc領域のアミノ酸配列と約75%~100%未満のアミノ酸配列同一性または類似性、より好ましくは約80%~100%未満、より好ましくは約85%~100%未満の、より好ましくは約90%~100%未満、最も好ましくは約95%~100%未満の同一性または類似性のアミノ酸配列を有する。本発明の非限定な一態様において、出発Fc領域および本発明の改変されたFc領域の間には少なくとも1つのアミノ酸の差がある。出発F

c領域と改変Fc領域のアミノ酸の違いは、特に前述のEUナンバリングで表されるアミノ酸残基の位置の特定されたアミノ酸の違いによっても好適に特定可能である。

[0204] 他のアミノ酸への改変は、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有する、もしくは酸性域の条件下でヒトFcRnに対する結合活性を高められるかぎり、いかなる位置のアミノ酸も改変され得る。本発明の抗原結合分子が、FcRn結合ドメインとしてヒトIgG1のFc領域を含んでいる場合、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合が、ヒトIgG1の出発Fc領域の結合活性より増強する効果をもたらす改変が含まれていることが好ましい。そのような改変が可能なアミノ酸として、例えば、国際公開W01997/034631に記載されているように、EUナンバリングで表される252位、254位、256位、309位、311位、315位、433位、および/または434位ならびにこれらのアミノ酸に組み合わせる253位、310位、435位、および/または426位のアミノ酸が挙げられる。国際公開W02000/042072に記載されるように、EUナンバリングで表される238位、252位、253位、254位、255位、256位、265位、272位、286位、288位、303位、305位、307位、309位、311位、312位、317位、340位、356位、360位、362位、376位、378位、380位、382位、386位、388位、400位、413位、415位、424位、433位、434位、435位、436位、439位および/または447位のアミノ酸が好適に挙げられる。同様に、そのような改変が可能なアミノ酸として、例えば国際公開W02002/060919に記載されているように、EUナンバリングで表される251位、252位、254位、255位、256位、308位、309位、311位、312位、385位、386位、387位、389位、428位、433位、434位および/または436位のアミノ酸も好適に挙げられる。さらに、そのような改変が可能なアミノ酸として、国際公開W02004/092219に記載されているように、EUナンバリングで表される250位、314位および428位のアミノ酸も挙げられる。加えて、そのような改変が可能なアミノ酸として、例えば国際公開W02006/020114に記載されているように、238位、244位、245位、249位、252位、256位、257位、258位、260位、262位、270位、272位、279位、283位、285位、286位、288位、293位、307位、311位、31

2位、316位、317位、318位、332位、339位、341位、343位、375位、376位、377位、378位、380位、382位、423位、427位、430位、431位、434位、436位、438位、440位、および/または442位のアミノ酸も好適に挙げられる。また、そのような改変が可能なアミノ酸として、例えば国際公開W02010/045193に記載されているように、EUナンバリングで表される251位、252位、307位、308位、378位、428位、430位、434位および/または436位のアミノ酸も好適に挙げられる。これらのアミノ酸の改変によって、IgG型免疫グロブリンのFc領域のpH酸性域の条件下におけるFcRnに対する結合が増強される。

[0205] FcRn結合ドメインとしてヒトIgG1のFc領域を含んでいる場合、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合が、ヒトIgG1の出発Fc領域の結合活性より増強する効果をもたらす改変の非限定な一態様では、EUナンバリングで表される、251位のアミノ酸がArgまたはLeuのいずれか、252位のアミノ酸がPhe、Ser、Thr、またはTyrのいずれか、254位のアミノ酸がSerまたはThrのいずれか、255位のアミノ酸がArg、Gly、Ile、またはLeuのいずれか、256位のアミノ酸がAla、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、またはThrのいずれか、308位のアミノ酸がIleまたはThrのいずれか、309位のアミノ酸がPro、311位のアミノ酸がGlu、Leu、またはSerのいずれか、312位のアミノ酸がAlaまたはAspのいずれか、314位のアミノ酸がAlaまたはLeuのいずれか、385位のアミノ酸がAla、Arg、Asp、Gly、His、Lys、Ser、またはThrのいずれか、386位のアミノ酸がArg、Asp、Ile、Lys、Met、Pro、Ser、またはThrのいずれか、387位のアミノ酸がAla、Arg、His、Pro、Ser、またはThrのいずれか、389位のアミノ酸がAsn、Pro、またはSerのいずれか、428位のアミノ酸がLeu、Met、Phe、Ser、またはThrのいずれか

433位のアミノ酸がArg、Gln、His、Ile、Lys、Pro、またはSerのいずれか、
434位のアミノ酸がHis、Phe、またはTyrのいずれか、もしくは
436位のアミノ酸がArg、Asn、His、Lys、Met、またはThrのいずれか、
の群から選択される少なくとも一つ以上のアミノ酸の改変が挙げられる。また、改変されるアミノ酸の数は特に限定されず、一箇所のみのアミノ酸が改変され得るし、二箇所以上のアミノ酸が改変され得る。

[0206] FcRn結合ドメインとしてヒトIgG1のFc領域を含んでいる場合、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合が、ヒトIgG1の出発Fc領域の結合活性より増強する効果をもたらす改変の非限定な一態様は、EUナンバリングで表される、308位のアミノ酸がIle、309位のアミノ酸がPro、および/または311位のアミノ酸がGluを含む改変であり得る。また、当該改変の別の非限定な一態様は、308位のアミノ酸がThr、309位のアミノ酸がPro、311位のアミノ酸がLeu、312位のアミノ酸がAla、および/または314位のアミノ酸がAlaを含む改変であり得る。また、当該改変のさらに別の非限定な一態様は、308位のアミノ酸がIleまたはThr、309位のアミノ酸がPro、311位のアミノ酸がGlu、Leu、またはSer、312位のアミノ酸がAla、および/または314位のアミノ酸がAlaまたはLeuを含む改変であり得る。当該改変の異なる非限定な一態様は、308位のアミノ酸がThr、309位のアミノ酸がPro、311位のアミノ酸がSer、312位のアミノ酸がAsp、および/または314位のアミノ酸がLeuを含む改変であり得る。

[0207] FcRn結合ドメインとしてヒトIgG1のFc領域を含んでいる場合、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合が、ヒトIgG1の出発Fc領域の結合活性より増強する効果をもたらす改変の非限定な一態様は、EUナンバリングで表される、251位のアミノ酸がLeu、252位のアミノ酸がTyr、254位のアミノ酸がSer、またはThr、255位のアミノ酸がArg、および/または256位のアミノ酸がGluを含む改変であり得る。

[0208] FcRn結合ドメインとしてヒトIgG1のFc領域を含んでいる場合、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合が、ヒトIgG1の出発Fc領域の結合活性より増強する効果をもたらす改変の非限定な一態様は、EUナンバリングで表される、428

位のアミノ酸がLeu、Met、Phe、Ser、またはThrのいずれか、433位のアミノ酸がArg、Gln、His、Ile、Lys、Pro、またはSerのいずれか、434位のアミノ酸がHis、Phe、またはTyrのいずれか、および/または436位のアミノ酸がArg、Asn、His、Lys、Met、またはThrのいずれかを含む改変であり得る。また、当該改変の別の非限定な一態様は、428位のアミノ酸がHisまたはMet、および/または434位のアミノ酸がHisまたはMetを含む改変であり得る。

[0209] FcRn結合ドメインとしてヒトIgG1のFc領域を含んでいる場合、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合が、ヒトIgG1の出発Fc領域の結合活性より増強する効果をもたらす改変の非限定な一態様は、EUナンバリングで表される、385位のアミノ酸がArg、386位のアミノ酸がThr、387位のアミノ酸がArg、および/または389位のアミノ酸がProを含む改変であり得る。また、当該改変の別の非限定な一態様は、385位のアミノ酸がAsp、386位のアミノ酸がProおよび/または389位のアミノ酸がSerを含む改変であり得る。

[0210] さらに、FcRn結合ドメインとしてヒトIgG1のFc領域を含んでいる場合、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合が、ヒトIgG1の出発Fc領域の結合活性より増強する効果をもたらす改変の非限定な一態様では、EUナンバリングで表される、
250位のアミノ酸がGlnまたはGluのいずれか、もしくは
428位のアミノ酸がLeuまたはPheのいずれか、
の群から選択される少なくとも一つ以上のアミノ酸の改変が挙げられる。また、改変されるアミノ酸の数は特に限定されず、一箇所のみのアミノ酸が改変され得るし、二箇所のアミノ酸が改変され得る。

[0211] FcRn結合ドメインとしてヒトIgG1のFc領域を含んでいる場合、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合が、ヒトIgG1の出発Fc領域の結合活性より増強する効果をもたらす改変の非限定な一態様は、EUナンバリングで表される、250位のアミノ酸がGln、および/または428位のアミノ酸がLeuまたはPheのいずれかを含む改変であり得る。また、当該改変の別の非限定な一態様は、250位のアミノ酸がGlu、および/または428位のアミノ酸がLeuまたはPheのいずれかを

含む改変であり得る。

[0212] FcRn結合ドメインとしてヒトIgG1のFc領域を含んでいる場合、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合が、ヒトIgG1の出発Fc領域の結合活性より増強する効果をもたらす改変の非限定な一態様では、EUナンバリングで表される、251位のアミノ酸がAspまたはGluのいずれか、252位のアミノ酸がTyr、307位のアミノ酸がGln、308位のアミノ酸がPro、378位のアミノ酸がVal、380位のアミノ酸がAla、428位のアミノ酸がLeu、430位のアミノ酸がAla、またはLysのいずれか、434位のアミノ酸がAla、His、Ser、またはTyrのいずれか、もしくは436位のアミノ酸がIle、の群から選択される少なくとも二つ以上のアミノ酸の改変が挙げられる。また、改変されるアミノ酸の数は特に限定されず、二箇所のみのアミノ酸が改変され得るし、三箇所以上のアミノ酸が改変され得る。

[0213] FcRn結合ドメインとしてヒトIgG1のFc領域を含んでいる場合、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合が、ヒトIgG1の出発Fc領域の結合活性より増強する効果をもたらす改変の非限定な一態様は、EUナンバリングで表される、307位のアミノ酸がGln、および434位のアミノ酸がAlaまたはSerのいずれかを含む改変であり得る。また、当該改変の別の非限定な一態様は、308位のアミノ酸がPro、および434位のアミノ酸がAlaを含む改変であり得る。また、当該改変のさらに別の非限定な一態様は、252位のアミノ酸がTyr、および434位のアミノ酸がAlaを含む改変であり得る。当該改変の異なる非限定な一態様は、378位のアミノ酸がVal、および434位のアミノ酸がAlaを含む改変であり得る。当該改変の別の異なる非限定な一態様は、428位のアミノ酸がLeu、および434位のアミノ酸がAlaを含む改変であり得る。また、当該改変のさらに別の異なる

る非限定な一態様は、434位のアミノ酸がAla、および436位のアミノ酸がIleを含む改変であり得る。さらに、当該改変のもう一つの非限定な一態様は、308位のアミノ酸がPro、および434位のアミノ酸がTyrを含む改変であり得る。さらに、当該改変の別のもう一つの非限定な一態様は、307位のアミノ酸がGln、および436位のアミノ酸がIleを含む改変であり得る。

[0214] FcRn結合ドメインとしてヒトIgG1のFc領域を含んでいる場合、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合が、ヒトIgG1の出発Fc領域の結合活性より増強する効果をもたらす改変の非限定な一態様は、EUナンバリングで表される、307位のアミノ酸がGln、380位のアミノ酸がAla、および434位のアミノ酸がSerのいずれかを含む改変であり得る。また、当該改変の別の非限定な一態様は、307位のアミノ酸がGln、380位のアミノ酸がAla、および434位のアミノ酸がAlaを含む改変であり得る。また、当該改変のさらに別の非限定な一態様は、252位のアミノ酸がTyr、308位のアミノ酸がPro、および434位のアミノ酸がTyrを含む改変であり得る。当該改変の異なる非限定な一態様は、251位のアミノ酸がAsp、307位のアミノ酸がGln、および434位のアミノ酸がHisを含む改変であり得る。

[0215] FcRn結合ドメインとしてヒトIgG1のFc領域を含んでいる場合、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合が、ヒトIgG1の出発Fc領域の結合活性より増強する効果をもたらす改変の非限定な一態様では、EUナンバリングで表される、238位のアミノ酸がLeu、244位のアミノ酸がLeu、245位のアミノ酸がArg、249位のアミノ酸がPro、252位のアミノ酸がTyr、256位のアミノ酸がPro、257位のアミノ酸がAla、Ile、Met、Asn、Ser、またはValのいずれか、258位のアミノ酸がAsp、260位のアミノ酸がSer、

262位のアミノ酸がLeu、
270位のアミノ酸がLys、
272位のアミノ酸がLeu、またはArgのいずれか、
279位のアミノ酸がAla、 Asp、 Gly、 His、 Met、 Asn、 Gln、 Arg、 Ser、 Thr、 Trp、 またはTyrのいずれか、
283位のアミノ酸がAla、 Asp、 Phe、 Gly、 His、 Ile、 Lys、 Leu、 Asn、 Pro、 Gln、 Arg、 Ser、 Thr、 Trp、 またはTyrのいずれか、
285位のアミノ酸がAsn、
286位のアミノ酸がPhe、
288位のアミノ酸がAsn、 またはProのいずれか、
293位のアミノ酸がVal、
307位のアミノ酸がAla、 Glu、 またはMetのいずれか、
311位のアミノ酸がAla、 Ile、 Lys、 Leu、 Met、 Val、 またはTrpのいずれか、
312位のアミノ酸がPro、
316位のアミノ酸がLys、
317位のアミノ酸がPro、
318位のアミノ酸がAsn、 またはThrのいずれか、
332位のアミノ酸がPhe、 His、 Lys、 Leu、 Met、 Arg、 Ser、 またはTrpのいずれか、
339位のアミノ酸がAsn、 Thr、 またはTrpのいずれか、
341位のアミノ酸がPro、
343位のアミノ酸がGlu、 His、 Lys、 Gln、 Arg、 Thr、 またはTyrのいずれか、
375位のアミノ酸がArg、
376位のアミノ酸がGly、 Ile、 Met、 Pro、 Thr、 またはValのいずれか、
377位のアミノ酸がLys、
378位のアミノ酸がAsp、 またはAsnのいずれか、
380位のアミノ酸がAsn、 Ser、 またはThrのいずれか、
382位のアミノ酸がPhe、 His、 Ile、 Lys、 Leu、 Met、 Asn、 Gln、 Arg、 Ser、 Th

r、Val、Trp、またはTyrのいずれか、
423位のアミノ酸がAsn、
427位のアミノ酸がAsn、
430位のアミノ酸がAla、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、またはTyrのいずれか、
431位のアミノ酸がHis、またはAsnのいずれか、
434位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Trp、またはTyrのいずれか、
436位のアミノ酸がIle、Leu、またはThrのいずれか、
438位のアミノ酸がLys、Leu、Thr、またはTrpのいずれか、
440位のアミノ酸がLys、もしくは、
442位のアミノ酸がLys、
の群から選択される少なくとも二つ以上のアミノ酸の改変が挙げられる。また、改変されるアミノ酸の数は特に限定されず、二箇所のみのアミノ酸が改変され得るし、三箇所以上のアミノ酸が改変され得る。

[0216] FcRn結合ドメインとしてヒトIgG1のFc領域を含んでいる場合、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合が、ヒトIgG1の出発Fc領域の結合活性より増強する効果をもたらす改変の非限定な一態様は、EUナンバリングで表される、257位のアミノ酸がIle、および311位のアミノ酸がIleを含む改変であり得る。また、当該改変の別の非限定な一態様は、257位のアミノ酸がIle、および434位のアミノ酸がHisを含む改変であり得る。また、当該改変のさらに別の非限定な一態様は、376位のアミノ酸がVal、および434位のアミノ酸がHisを含む改変であり得る。

[0217] Fc γ レセプター

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

びR131を含む)、Fc γ RIIb (Fc γ RIIb-1およびFc γ RIIb-2を含む) およびFc γ RIIcを含むFc γ RII (CD32) ; およびアイソフォームFc γ RIIIa (アロタイプV158およびF158を含む) およびFc γ RIIIb (アロタイプFc γ RIIIb-NA1およびFc γ RIIIb-NA2を含む) を含むFc γ RIII (CD16) 、並びにいかなる未発見のヒトFc γ R類またはFc γ Rアイソフォームまたはアロタイプも含まれるが、これらに限定されるものではない。Fc γ Rは、ヒト、マウス、ラット、ウサギおよびサルを含むが、これらに限定されるものではない、いかなる生物由来でもよい。マウスFc γ R類には、Fc γ RI (CD64) 、Fc γ RII (CD32) 、Fc γ RIII (CD16) およびFc γ RIII-2 (Fc γ RIV、CD16-2) 、並びにいかなる未発見のマウスFc γ R類またはFc γ Rアイソフォームまたはアロタイプも含まれるが、これらに限定されない。こうしたFc γ レセプターの好適な例としてはヒトFc γ RI (CD64) 、Fc γ RIIa (CD32) 、Fc γ RIIb (CD32) 、Fc γ RIIIa (CD16) 及び/又はFc γ RIIIb (CD16) が挙げられる。Fc γ RIのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列はそれぞれ配列番号：18 (NM_000566.3) 及び19 (NP_000557.1) に、Fc γ RIIaのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列はそれぞれ配列番号：20 (BC020823.1) 及び21 (AAH20823.1) に、Fc γ RIIbのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列はそれぞれ配列番号：22 (BC146678.1) 及び23 (AAI46679.1) に、Fc γ RIIIaのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列はそれぞれ配列番号：24 (BC033678.1) 及び25 (AAH33678.1) に、及びFc γ RIIIbのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、それぞれ配列番号：26 (BC128562.1) 及び27 (AAI28563.1) に記載されている(カッコ内はRefSeq登録番号を示す)。Fc γ 受容体が、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4モノクローナル抗体のFc領域に結合活性を有するか否かは、上記に記載されるFACSやELISAフォーマットのほか、ALPHAスクリーン (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay) や表面プラズモン共鳴 (SPR) 現象を利用したBIACORE法等によって確認され得る (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103 (11) , 4005-4010) 。

[0218] Fc γ RIa、Fc γ RIbおよびFc γ RIcを含むFc γ RI (CD64) ならびにアイソフォ

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

[0219] 一方、Fc γ RIIb（Fc γ RIIb-1およびFc γ RIIb-2を含む）の自身の細胞質内ドメインには抑制型シグナルを伝達するITIMが含まれている。B細胞ではFc γ RIIbとB細胞レセプター（BCR）との架橋によってBCRからの活性化シグナルが抑制される結果BCRの抗体産生が抑制される。マクロファージでは、Fc γ RIIIとFc γ RIIbとの架橋によって貪食能や炎症性サイトカインの産生能が抑制される。上記のように抑制化シグナルを伝達する能力を有するFc γ レセプターは、本発明においても抑制型Fc γ レセプターと呼ばれる。

[0220] Fc γ レセプターに対する結合活性

本発明の抗原結合分子に含まれるFc γ R結合ドメインのFc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa及び/又はFc γ RIIIbのいずれかのヒトFc γ レセプターに対する結合活性は、上記に記載されるFACSやELISAフォーマットのほか、ALPHAスクリーン（Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay）や表面プラズモン共鳴（SPR）現象を利用したBIACORE法等によって確認することができる（Proc.Natl.Acad.Sci.USA（2006）103（11），4005-4010）。

[0221] ALPHAスクリーンは、ドナーとアクセプターの2つのビーズを使用するALPHAテクノロジーによって下記の原理に基づいて実施される。ドナービーズに結

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

[0222] 例えば、ドナービーズにビオチン標識されたFc γ R結合ドメインを含む抗原結合分子が結合され、アクセプタービーズにはグルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) でタグ化されたFc γ レセプターが結合される。競合する改変Fc γ R結合ドメインを有する抗原結合分子の非存在下では、野生型Fc γ R結合ドメインを含む抗原結合分子とFc γ レセプターとは相互作用し520-620 nmのシグナルを生ずる。タグ化されていない改変Fc γ R結合ドメインを含む抗原結合分子は、野生型Fc γ R結合ドメインを含む抗原結合分子とFc γ レセプター間の相互作用と競合する。競合の結果表れる蛍光の減少を定量することによって相対的な結合親和性が決定され得る。抗体等の抗原結合分子をSulfo-NHS-ビオチン等を用いてビオチン化することは公知である。Fc γ レセプターをGSTでタグ化する方法としては、Fc γ レセプターをコードするポリヌクレオチドとGSTをコードするポリヌクレオチドをインフレームで融合した融合遺伝子が作用可能に連結されたベクターに保持した細胞等において発現し、グルタチオンカラムを用いて精製する方法等が適宜採用され得る。得られたシグナルは例えばGRAPHPAD PRISM (GraphPad社、San Diego) 等のソフトウェアを用いて非線形回帰解析を利用する一部位競合 (one-site competition) モデルに適合させることにより好適に解析される。

[0223] 相互作用を観察する物質の一方 (リガンド) をセンサーチップの金薄膜上に固定し、センサーチップの裏側から金薄膜とガラスの境界面で全反射する

ように光を当てると、反射光の一部に反射強度が低下した部分（SPRシグナル）が形成される。相互作用を観察する物質の他方（アナライト）をセンサーチップの表面に流しリガンドとアナライトが結合すると、固定化されているリガンド分子の質量が増加し、センサーチップ表面の溶媒の屈折率が変化する。この屈折率の変化により、SPRシグナルの位置がシフトする（逆に結合が解離するとシグナルの位置は戻る）。Biacoreシステムは上記のシフトする量、すなわちセンサーチップ表面での質量変化を縦軸にとり、質量の時間変化を測定データとして表示する（センサーグラム）。センサーグラムのカーブからカインेटクス：結合速度定数（ka）と解離速度定数（kd）が、当該定数の比からアフィニティー（KD）が求められる。BIACORE法では阻害測定法も好適に用いられる。阻害測定法の例はProc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103 (11), 4005-4010において記載されている。本発明の抗原結合分子に含まれるFc γ R結合ドメインのFc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa及び/又はFc γ RIIbのいずれかのヒトFc γ レセプターに対する結合活性は、上記例に従ってBiacoreシステムを用いて算出された各ヒトFc γ レセプターに対するKD値、結合量によって判断されることもできる。ここで、各種Fc γ Rのポリペプチドに対する結合量は、各ポリペプチドに対してアナライトである各種Fc γ Rを相互作用させた前後で変化したセンサーグラムにおけるRU値の差を、センサーチップにポリペプチドを捕捉させた前後で変化したセンサーグラムにおけるRU値の差で割った値によっても表わされる。

[0224] 本発明の抗原結合分子に含まれるFc γ R結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子とFc γ レセプターとの結合活性を測定するpHの条件はpH酸性域またはpH中性域の条件が適宜使用され得る。本発明のFc γ R結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子とFc γ レセプターとの結合活性を測定する条件としてのpH中性域とは、通常pH6.7~pH10.0を意味する。好ましくはpH7.0~pH8.0の任意のpH値によって示される範囲であり、好ましくはpH7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、および8.0から選択され、特に好ましくは生体内の血漿中（血中）のpHに近いpH7.4である。本発明に

において、本発明のFc γ R結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子とFc γ レセプターとの結合活性を有する条件としてのpH酸性域とは、通常pH4.0~pH6.5を意味する。好ましくはpH5.5~pH6.5を意味し、特に好ましくは、生体内の早期エンドソーム内のpHに近いpH5.8~pH6.0を意味する。測定条件に使用される温度として、Fc γ R結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子とヒトFc γ レセプターとの結合アフィニティーは、10°C~50°Cの任意の温度で評価され得る。好ましくは、Fc γ R結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子とFc γ レセプターとの結合アフィニティーを決定するために、15°C~40°Cの温度が使用される。より好ましくは、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、および35°Cのいずれか1つのような20°Cから35°Cまでの任意の温度も同様に、Fc γ R結合ドメインまたは当該ドメインを含む抗原結合分子とFc γ レセプターとの結合アフィニティーを決定するために使用される。25°Cという温度は本発明の態様の非限定な一例である。

[0225] Fc γ R結合ドメイン

本発明の抗原結合分子は、抗原に対する結合活性がイオン濃度の条件によって変化する抗原結合ドメイン、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメインに、およびFc γ レセプターに対する選択的な結合活性を有するFc γ レセプター結合ドメイン（以下に、選択的Fc γ R結合ドメインとも指称される）を含む。Fc γ R結合ドメインとしては、例えば、IgG型免疫グロブリンのFc領域、IgG型免疫グロブリンのFc γ R結合ドメイン、抗Fc γ R抗体、抗Fc γ R足場（Scaffold）分子等が好適に挙げられる。当該ドメインは、あらかじめFc γ Rに対する結合活性を有しているドメインであればそのまま好適に使用され得る。当該ドメインがFc γ Rに対する結合活性がないまたは弱い場合には、抗原結合分子中のFc γ R結合ドメインを形成するアミノ酸を改変してFc γ Rに対する結合活性を付与することが可能である。また、あらかじめFc γ Rに対する結合活性を有しているドメイン中のアミノ酸を改変して、Fc γ Rに対する結合活性を高めてもよい。Fc γ R結合ドメインのアミノ酸の改変は

、アミノ酸改変前と改変後のFc γ Rに対する結合活性を比較することによって目的の改変を見出すことが可能である。そのようなFc γ R結合ドメインの非限定な一態様として、ヒトIgG1（配列番号：14）、IgG2（配列番号：15）、IgG3（配列番号：16）、またはIgG4（配列番号：17）で表されるFc領域に含まれるFc γ R結合ドメインが例示される。例えば、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメインとしてIgG型抗体のFc領域が使用される場合には、Fc γ R結合ドメインとして当該Fc領域に含まれるFc γ R結合ドメインが使用され得る。

[0226] Fc γ レセプターに対する選択的な結合活性を有するFc γ R結合ドメイン

本発明のFc γ R結合ドメインが選択的な結合活性を有するか否かは、前記のFc γ レセプターに対する結合活性の項で記載された方法によって決定された各Fc γ レセプターに対する結合活性を比較することによって確認される。本発明によって提供される抗原結合分子に含まれる選択的Fc γ R結合ドメインとして、活性型Fc γ レセプターよりも抑制型Fc γ レセプターに対する結合活性が高いFc γ R結合ドメインが使用され得る。非限定な一態様では、本発明によって提供される抗原結合分子に含まれる選択的Fc γ R結合ドメインとして、Fc γ RIa、Fc γ RIbならびにFc γ RIcを含むFc γ RI（CD64）、（アロタイプV158およびF158を含む）アイソフォームFc γ RIIIaならびに（アロタイプFc γ RIIIb-NA1ならびにFc γ RIIIb-NA2を含む）Fc γ RIIIbを含むFc γ RIII（CD16）、および（アロタイプH131およびR131を含む）アイソフォームFc γ RIIaおよびFc γ R IIcを含むFc γ RII（CD32）のいずれかから選択される活性型Fc γ レセプターよりも（Fc γ RIIb-1およびFc γ RIIb-2を含む）Fc γ RIIbに対する結合活性が高いFc γ R結合ドメインが使用され得る。さらに本発明の非限定な一態様では、本発明によって提供される抗原結合分子に含まれる選択的Fc γ R結合ドメインとして、Fc γ RIa、Fc γ RIb、Fc γ RIc、アロタイプV158を含むFc γ RIIIa、アロタイプF158を含むFc γ RIIIa、アロタイプFc γ RIIIb-NA1を含むFc γ RIIIb、アロタイプFc γ RIIIb-NA2を含むFc γ RIIIb、アロタイプH131を含むFc γ R IIa、アロタイプR131を含むFc γ R IIa、および/またはFc γ R IIcよりも、Fc γ R II

b-1および/またはFc γ RIIb-2に対する結合活性が高いFc γ R結合ドメインが使用され得る。被験対象のFc γ R結合ドメインが、Fc γ レセプターに対する選択的な結合活性を有するFc γ R結合ドメインかどうかは、たとえば、前記のFc γ レセプターに対する結合活性の項で記載された方法によって決定されたFc γ R結合ドメインの、Fc γ RIa、Fc γ RIb、Fc γ RIc、アロタイプV158を含むFc γ RIIIa、アロタイプF158を含むFc γ RIIIa、アロタイプFc γ RIIIb-NA1を含むFc γ RIIIb、アロタイプFc γ RIIIb-NA2を含むFc γ RIIIb、アロタイプH131を含むFc γ RIIIa、アロタイプR131を含むFc γ RIIIa、および/またはFc γ RIIcに対するKD値を、Fc γ RIIb-1および/またはFc γ RIIb-2に対するKD値で除した値（比）、すなわち式1で表されるFc γ R選択性指数を比較することによって判断することが可能である。

[0227] [式1]

Fc γ R選択性指数 = 活性型Fc γ Rに対するKD値 / 抑制型Fc γ Rに対するKD値

[0228] 上記式1において活性型Fc γ Rとは、Fc γ RIa、Fc γ RIb、Fc γ RIc、アロタイプV158を含むFc γ RIIIa、アロタイプF158を含むFc γ RIIIa、アロタイプFc γ RIIIb-NA1を含むFc γ RIIIb、アロタイプFc γ RIIIb-NA2を含むFc γ RIIIb、アロタイプH131を含むFc γ RIIIa、アロタイプR131を含むFc γ RIIIa、および/またはFc γ RIIcをいい、抑制型Fc γ RとはFc γ RIIb-1および/またはFc γ RIIb-2をいい、KD値の測定に用いられる活性型Fc γ Rおよび抑制型Fc γ Rはいずれの組合せから選択され得るが、非限定な一態様としてアロタイプH131を含むFc γ RIIIaに対するKD値を、Fc γ RIIb-1および/またはFc γ RIIb-2に対するKD値で除した値（比）が使用され得る。

[0229] Fc γ R選択性指数としては、例えば、1.2以上、1.3以上、1.4以上、1.5以上、1.6以上、1.7以上、1.8以上、1.9以上、2以上、3以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、15以上、20以上、25以上、30以上、35以上、40以上、45以上、50以上、55以上、60以上、65以上、70以上、75以上、80以上、85以上、90以上、95以上、100以上、110以上、120以上、130以上、140以上、150以上、160以上、170以上、180以上、190以上、200以上、210以上、220

以上、230以上、240以上、250以上、260以上、270以上、280以上、290以上、300以上、310以上、320以上、330以上、340以上、350以上、360以上、370以上、380以上、390以上、400以上、410以上、420以上、430以上、440以上、450以上、460以上、470以上、480以上、490以上、500以上、520以上、540以上、560以上、580以上、600以上、620以上、640以上、660以上、680以上、700以上、720以上、740以上、760以上、780以上、800以上、820以上、840以上、860以上、880以上、900以上、920以上、940以上、960以上、980以上、1000以上、1500以上、2000以上、2500以上、3000以上、3500以上、4000以上、4500以上、5000以上、5500以上、6000以上、6500以上、7000以上、7500以上、8000以上、8500以上、9000以上、9500以上、10000以上、100000以上が挙げられる。

[0230] 本発明の抗原結合分子に含まれる選択的Fc γ R結合ドメインの非限定な一態様として、ヒトIgG1（配列番号：14）、IgG2（配列番号：15）、IgG3（配列番号：16）、またはIgG4（配列番号：17）で表されるFc領域に含まれるFc γ R結合ドメインが改変されたFc領域が例示される。当該改変Fc領域の作製方法として、前記のアミノ酸の改変の項で記載された方法が例示される。そのような改変Fc領域の例として、ヒトIgG（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）のEUナンバリングで表される238位のアミノ酸がAspであるFc領域、またはEUナンバリングで表される328位のアミノ酸がGluであるFc領域が例示される。ヒトIgG（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）のEUナンバリングで表される238位のアミノ酸がAspであるFc領域、またはEUナンバリングで表される328位のアミノ酸がGluであるFc領域および当該Fc領域を含む抗原結合分子は、Fc γ RIa、Fc γ RIb、Fc γ RIc、アロタイプV158を含むFc γ RIIIa、アロタイプF158を含むFc γ RIIIa、アロタイプFc γ RIIIb-NA1を含むFc γ RIIIb、アロタイプFc γ RIIIb-NA2を含むFc γ RIIIb、アロタイプH131を含むFc γ RIIIa、アロタイプR131を含むFc γ RIIIa、および/またはFc γ RIIIcよりも、Fc γ RIIIb-1および/またはFc γ RIIIb-2に対する結合活性が高い。

[0231] 本発明の抗原結合分子に含まれる選択的Fc γ R結合ドメインを含むFc領域お

よび当該Fc領域を含む抗原結合分子は、ヒトIgG1（配列番号：14）、IgG2（配列番号：15）、IgG3（配列番号：16）、またはIgG4（配列番号：17）で表されるFc領域（以下、野生型Fc領域と総称される）および当該野生型Fc領域を含む抗原結合分子と比較して、活性型Fc γ R（Fc γ RIa、Fc γ RIb、Fc γ RIc、アロタイプV158を含むFc γ RIIIa、アロタイプF158を含むFc γ RIIIa、アロタイプFc γ RIIIb-NA1を含むFc γ RIIIb、アロタイプFc γ RIIIb-NA2を含むFc γ RIIIb、アロタイプH131を含むFc γ RIIa、アロタイプR131を含むFc γ RIIa、および/またはFc γ RIIc）に対しても結合活性が維持あるいは減少しているFc領域および当該Fc領域を含む抗原結合分子でもあり得る。

[0232] 野生型Fc領域および野生型Fc領域を含む抗原結合分子と比較して、本発明の抗原結合分子に含まれる選択的Fc γ R結合ドメインを含むFc領域および当該Fc領域を含む抗原結合分子が前記活性型Fc γ Rに対する結合活性が減少している程度としては、例えば、99%以下、98%以下、97%以下、96%以下、95%以下、94%以下、93%以下、92%以下、91%以下、90%以下、88%以下、86%以下、84%以下、82%以下、80%以下、78%以下、76%以下、74%以下、72%以下、70%以下、68%以下、66%以下、64%以下、62%以下、60%以下、58%以下、56%以下、54%以下、52%以下、50%以下、45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、5%以下、4%以下、3%以下、2%以下、1%以下、0.5%以下、0.4%以下、0.3%以下、0.2%以下、0.1%以下、0.05%以下、0.01%以下、0.005%以下が挙げられる。

[0233] 本発明の抗原結合分子に含まれる選択的Fc γ R結合ドメインを含むFc領域および当該Fc領域を含む抗原結合分子は、ヒトIgG1（配列番号：14）、IgG2（配列番号：15）、IgG3（配列番号：16）、またはIgG4（配列番号：17）で表されるFc領域（以下、野生型Fc領域と総称される）および当該野生型Fc領域を含む抗原結合分子と比較して、抑制型Fc γ R（Fc γ RIIb-1および/またはFc γ RIIb-2）に対しても結合活性が増強しているFc領域および当該Fc領域を含む抗原結合分子でもあり得る。

[0234] 野生型Fc領域および野生型Fc領域を含む抗原結合分子と比較して、本発明の抗原結合分子に含まれる選択的Fc γ R結合ドメインを含むFc領域および当該Fc領域を含む抗原結合分子が前記抑制型Fc γ Rに対する結合活性が増強している程度としては、例えば、101%以上、102%以上、103%以上、104%以上、105%以上、106%以上、107%以上、108%以上、109%以上、110%以上、112%以上、114%以上、116%以上、118%以上、120%以上、122%以上、124%以上、126%以上、128%以上、130%以上、132%以上、134%以上、136%以上、138%以上、140%以上、142%以上、144%以上、146%以上、148%以上、150%以上、155%以上、160%以上、165%以上、170%以上、175%以上、180%以上、185%以上、190%以上、195%以上、2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、20倍以上、30倍以上、40倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、90倍以上、100倍以上、200倍以上、300倍以上、400倍以上、500倍以上、600倍以上、700倍以上、800倍以上、900倍以上、1000倍以上、10000倍以上、100000倍以上が挙げられる。

[0235] また、本発明の抗原結合分子に含まれる選択的Fc γ R結合ドメインを含むFc領域および当該Fc領域を含む抗原結合分子は、ヒトIgG1（配列番号：14）、IgG2（配列番号：15）、IgG3（配列番号：16）、またはIgG4（配列番号：17）で表されるFc領域（以下、野生型Fc領域と総称される）および当該野生型Fc領域を含む抗原結合分子と比較して、活性型Fc γ R（Fc γ RIa、Fc γ RIb、Fc γ RIc、アロタイプV158を含むFc γ RIIIa、アロタイプF158を含むFc γ RIIIa、アロタイプFc γ RIIIb-NA1を含むFc γ RIIIb、アロタイプFc γ RIIIb-NA2を含むFc γ RIIIb、アロタイプH131を含むFc γ RIIa、アロタイプR131を含むFc γ RIIa、および/またはFc γ RIIc）に対して結合活性が維持あるいは減少し、ヒトIgG1（配列番号：14）、IgG2（配列番号：15）、IgG3（配列番号：16）、またはIgG4（配列番号：17）で表されるFc領域（以下、野生型Fc領域と総称される）および当該野生型Fc領域を含む抗原結合分子と比較して、抑制型Fc γ R（Fc γ RIIb-1および/またはFc γ RIIb-2）に対して結合活

性が増強しているFc領域および当該Fc領域を含む抗原結合分子でもあり得る。

[0236] また、本発明の抗原結合分子に含まれる選択的Fc γ R結合ドメインを含むFc領域および当該Fc領域を含む抗原結合分子は、ヒトIgG1（配列番号：14）、IgG2（配列番号：15）、IgG3（配列番号：16）、またはIgG4（配列番号：17）で表されるFc領域（以下、野生型Fc領域と総称される）および当該野生型Fc領域を含む抗原結合分子と比較して、抑制型Fc γ レセプター（Fc γ RIIb-1および/またはFc γ RIIb-2）に対する結合活性の増強の程度が、活性型Fc γ レセプター（Fc γ RIa、Fc γ RIb、Fc γ RIc、アロタイプV158を含むFc γ RIIIa、アロタイプF158を含むFc γ RIIIa、アロタイプFc γ RIIIb-NA1を含むFc γ RIIIb、アロタイプFc γ RIIIb-NA2を含むFc γ RIIIb、アロタイプH131を含むFc γ RIIa、アロタイプR131を含むFc γ RIIa）に対する結合活性の増強の程度よりも高いFc領域および当該Fc領域を含む抗原結合分子でもあり得る。

[0237] 本発明は、EUナンバリングで表される238位のアミノ酸がAspであるFc領域またはEUナンバリングで表される328位のアミノ酸がGluであるFc領域に対して、前記アミノ酸の改変の項で説明された態様等により、さらに別の少なくとも一つのFc領域に対する改変を加えることが可能である。また、これらの改変に加え、更に付加的な改変を含むことができる。付加的な改変は、たとえば、アミノ酸の置換、欠損、あるいは修飾のいずれか、あるいはそれらの組み合わせから選択することができる。例えば、Fc γ RIIbに対する結合活性を増強し、かつFc γ RIIa（H型）およびFc γ RIIa（R型）に対する結合活性を維持あるいは低減する改変を加えることが可能である。そのような改変を加えることにより、Fc γ RIIaよりもFc γ RIIbに対する結合選択性が向上する。

[0238] これらの中でも、Fc γ RIIa（R型）よりもFc γ RIIbに対する結合選択性が向上する改変が好ましく、さらにFc γ RIIa（H型）よりもFc γ RIIbに対する結合選択性が向上する改変が好ましい。このような改変として好ましいアミノ酸置換は、例えばEUナンバリング237位で表されるGlyをTrpに置換した改変、EUナンバリング237位で表されるGlyをPheに置換した改変、EUナンバリング238

位で表されるProをPheに置換した改変、EUナンバリング325位で表されるAsnをMetに置換した改変、EUナンバリング267位で表されるSerをIleに置換した改変、EUナンバリング328位で表されるLeuをAspに置換した改変、EUナンバリング267位で表されるSerをValに置換した改変、EUナンバリング328位で表されるLeuをTrpに置換した改変、EUナンバリング267位で表されるSerをGlnに置換した改変、EUナンバリング267位で表されるSerをMetに置換した改変、EUナンバリング236位で表されるGlyをAspに置換した改変、EUナンバリング327位で表されるAlaをAsnに置換した改変、EUナンバリング325位で表されるAsnをSerに置換した改変、EUナンバリング235位で表されるLeuをTyrに置換した改変、EUナンバリング266位で表されるValをMetに置換した改変、EUナンバリング328位で表されるLeuをTyrに置換した改変、EUナンバリング235位で表されるLeuをTrpに置換した改変、EUナンバリング235位で表されるLeuをPheに置換した改変、EUナンバリング239位で表されるSerをGlyに置換した改変、EUナンバリング327位で表されるAlaをGluに置換した改変、EUナンバリング327位で表されるAlaをGlyに置換した改変、EUナンバリング238位で表されるProをLeuに置換した改変、EUナンバリング239位で表されるSerをLeuに置換した改変、EUナンバリング328位で表されるLeuをThrに置換した改変、EUナンバリング328位で表されるLeuをSerに置換した改変、EUナンバリング328位で表されるLeuをMetに置換した改変、EUナンバリング331位で表されるProをTrpに置換した改変、EUナンバリング331位で表されるProをTyrに置換した改変、EUナンバリング331位で表されるProをPheに置換した改変、EUナンバリング327位で表されるAlaをAspに置換した改変、EUナンバリング328位で表されるLeuをPheに置換した改変、EUナンバリング271位で表されるProをLeuに置換した改変、EUナンバリング267位で表されるSerをGluに置換した改変、EUナンバリング328位で表されるLeuをAlaに置換した改変、EUナンバリング328位で表されるLeuをIleに置換した改変、EUナンバリング328位で表されるLeuをGlnに置換した改変、EUナンバリング328位で表されるLeuをValに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをTrpに置換した改変、EUナンバリング334位で表されるL

ysをArgに置換した改変、EUナンバリング268位で表されるHisをGlyに置換した改変、EUナンバリング268位で表されるHisをAsnに置換した改変、EUナンバリング324位で表されるSerをValに置換した改変、EUナンバリング266位で表されるValをLeuに置換した改変、EUナンバリング271位で表されるProをGlyに置換した改変、EUナンバリング332位で表されるIleをPheに置換した改変、EUナンバリング324位で表されるSerをIleに置換した改変、EUナンバリング333位で表されるGluをProに置換した改変、EUナンバリング300位で表されるTyrをAspに置換した改変、EUナンバリング337位で表されるSerをAspに置換した改変、EUナンバリング300位で表されるTyrをGlnに置換した改変、EUナンバリング335位で表されるThrをAspに置換した改変、EUナンバリング239位で表されるSerをAsnに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをLeuに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをIleに置換した改変、EUナンバリング239位で表されるSerをGluに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをPheに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをValに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをTyrに置換した改変、EUナンバリング267位で表されるSerをAspに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをProに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをHisに置換した改変、EUナンバリング334位で表されるLysをAlaに置換した改変、EUナンバリング334位で表されるLysをTrpに置換した改変、EUナンバリング268位で表されるHisをGlnに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをGlnに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをGluに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをMetに置換した改変、EUナンバリング266位で表されるValをIleに置換した改変、EUナンバリング334位で表されるLysをGluに置換した改変、EUナンバリング300位で表されるTyrをGluに置換した改変、EUナンバリング334位で表されるLysをMetに置換した改変、EUナンバリング334位で表されるLysをValに置換した改変、EUナンバリング334位で表されるLysをThrに置換した改変、EUナンバリング334位で表されるLysをSerに置換した改変、EUナンバリング334位で表されるLysをHisに置

換した改変、EUナンバリング334位で表されるLysをPheに置換した改変、EUナンバリング334位で表されるLysをGlnに置換した改変、EUナンバリング334位で表されるLysをProに置換した改変、EUナンバリング334位で表されるLysをTyrに置換した改変、EUナンバリング334位で表されるLysをIleに置換した改変、EUナンバリング295位で表されるGlnをLeuに置換した改変、EUナンバリング334位で表されるLysをLeuに置換した改変、EUナンバリング334位で表されるLysをAsnに置換した改変、EUナンバリング268位で表されるHisをAlaに置換した改変、EUナンバリング239位で表されるSerをAspに置換した改変、EUナンバリング267位で表されるSerをAlaに置換した改変、EUナンバリング234位で表されるLeuをTrpに置換した改変、EUナンバリング234位で表されるLeuをTyrに置換した改変、EUナンバリング237位で表されるGlyをAlaに置換した改変、EUナンバリング237位で表されるGlyをAspに置換した改変、EUナンバリング237位で表されるGlyをGluに置換した改変、EUナンバリング237位で表されるGlyをLeuに置換した改変、EUナンバリング237位で表されるGlyをMetに置換した改変、EUナンバリング237位で表されるGlyをTyrに置換した改変、EUナンバリング330位で表されるAlaをLysに置換した改変、EUナンバリング330位で表されるAlaをArgに置換した改変、EUナンバリング233位で表されるGluをAspに置換した改変、EUナンバリング268位で表されるHisをAspに置換した改変、EUナンバリング268位で表されるHisをGluに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをAspに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをSerに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをThrに置換した改変、EUナンバリング323位で表されるValをIleに置換した改変、EUナンバリング323位で表されるValをLeuに置換した改変、EUナンバリング323位で表されるValをMetに置換した改変、EUナンバリング296位で表されるTyrをAspに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをAlaに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをAsnに置換した改変、EUナンバリング330位で表されるAlaをMetに置換した改変、が挙げられる。

[0239] 更に、これらの改変の中でも好ましいアミノ酸置換は、例えばEUナンバリ

ング237位で表されるGlyをTrpに置換した改変、EUナンバリング237位で表されるGlyをPheに置換した改変、EUナンバリング267位で表されるSerをValに置換した改変、EUナンバリング267位で表されるSerをGlnに置換した改変、EUナンバリング268位で表されるHisをAsnに置換した改変、EUナンバリング271位で表されるProをGlyに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをLeuに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをGlnに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをGluに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをMetに置換した改変、EUナンバリング239位で表されるSerをAspに置換した改変、EUナンバリング267位で表されるSerをAlaに置換した改変、EUナンバリング234位で表されるLeuをTrpに置換した改変、EUナンバリング234位で表されるLeuをTyrに置換した改変、EUナンバリング237位で表されるGlyをAlaに置換した改変、EUナンバリング237位で表されるGlyをAspに置換した改変、EUナンバリング237位で表されるGlyをGluに置換した改変、EUナンバリング237位で表されるGlyをLeuに置換した改変、EUナンバリング237位で表されるGlyをMetに置換した改変、EUナンバリング237位で表されるGlyをTyrに置換した改変、EUナンバリング330位で表されるAlaをLysに置換した改変、EUナンバリング330位で表されるAlaをArgに置換した改変、EUナンバリング233位で表されるGluをAspに置換した改変、EUナンバリング268位で表されるHisをAspに置換した改変、EUナンバリング268位で表されるHisをGluに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをAspに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをSerに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをThrに置換した改変、EUナンバリング323位で表されるValをIleに置換した改変、EUナンバリング323位で表されるValをLeuに置換した改変、EUナンバリング323位で表されるValをMetに置換した改変、EUナンバリング296位で表されるTyrをAspに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをAlaに置換した改変、EUナンバリング326位で表されるLysをAsnに置換した改変、EUナンバリング330位で表されるAlaをMetに置換した改変、が挙げられる。

- [0240] 上記の改変は一箇所であってもよいし、二箇所以上の組み合わせであってもよい。そのような改変で好ましい例としては、表13~14、表16~23、表25~27に記載の改変が挙げられる。
- [0241] 本発明の抗原結合分子に含まれる選択的Fc γ R結合ドメインの別の非限定な一態様として、ヒトIgG1（配列番号：14）、IgG2（配列番号：15）、IgG3（配列番号：16）、またはIgG4（配列番号：17）で表されるFc領域に含まれるFc γ R結合ドメインが改変されたFc領域が例示される。当該改変Fc領域の作製方法として、前記のアミノ酸改変の項に記載された方法が例示される。そのような改変Fc領域の例として、ヒトIgG（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）のEUナンバリングで表される238位のアミノ酸がAsp、およびEUナンバリングで表される271位のアミノ酸がGlyであるFc領域が例示される。ヒトIgG（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）のEUナンバリングで表される238位のアミノ酸がAsp、およびEUナンバリングで表される271位のアミノ酸がGlyであるFc領域および当該Fc領域を含む抗原結合分子は、Fc γ RIa、Fc γ RIb、Fc γ RIc、アロタイプV158を含むFc γ RIIIa、アロタイプF158を含むFc γ RIIIa、アロタイプFc γ RIIIb-NA1を含むFc γ RIIIb、アロタイプFc γ RIIIb-NA2を含むFc γ RIIIb、アロタイプH131を含むFc γ RIIa、アロタイプR131を含むFc γ RIIa、および/またはFc γ RIIcよりも、Fc γ RIIb-1および/またはFc γ RIIb-2に対する結合活性が高い。
- [0242] 本発明は、EUナンバリングで表される238位のアミノ酸がAspおよびEUナンバリングで表される271位のアミノ酸がGlyであるFc領域に対して、前記アミノ酸の改変の項で説明された態様等により、さらに別の少なくとも一つのFc領域に対する改変を加えることが可能である。また、これらの改変に加え、更に付加的な改変を含むことができる。付加的な改変は、たとえば、アミノ酸の置換、欠損、あるいは修飾のいずれか、あるいはそれらの組み合わせから選択することができる。例えば、活性型Fc γ レセプター（Fc γ RIa、Fc γ RIb、Fc γ RIc、アロタイプV158を含むFc γ RIIIa、アロタイプF158を含むFc γ RIIIa、アロタイプFc γ RIIIb-NA1を含むFc γ RIIIb、アロタイプFc γ RIIIb-NA2を含むFc γ RIIIb、アロタイプH131を含むFc γ RIIa、アロタイプR131を含むFc

γ RIIa) に対する結合活性を維持あるいは低減する改変を加えることが可能である。抑制型Fc γ レセプター (Fc γ RIIb-1および/またはFc γ RIIb-2) に対する結合活性を増強し、かつFc γ RIIa (H型) およびFc γ RIIa (R型) に対する結合活性を維持あるいは低減する改変を加えることが可能である。また、抑制型Fc γ レセプター (Fc γ RIIb-1および/またはFc γ RIIb-2) に対する結合活性の増強の程度が、活性型Fc γ レセプター (Fc γ RIa、Fc γ RIb、Fc γ RIc、アロタイプV158を含むFc γ RIIIa、アロタイプF158を含むFc γ RIIIa、アロタイプFc γ RIIIb-NA1を含むFc γ RIIIb、アロタイプFc γ RIIIb-NA2を含むFc γ RIIb、アロタイプH131を含むFc γ RIIa、アロタイプR131を含むFc γ RIIa) に対する結合活性の増強の程度よりも高い改変も加えることが可能である。そのような改変を加えることにより、Fc γ RIIaよりもFc γ RIIbに対する結合選択性が向上する。

[0243] 選択的Fc γ R結合ドメインを含む改変Fc領域の例として、ヒトIgG (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4) のEUナンバリングで表される238位のアミノ酸がAspおよびEUナンバリングで表される271位のアミノ酸がGlyであるFc領域の、EUナンバリングで表される233位、234位、237位、264位、265位、266位、267位、268位、269位、272位、274位、296位、326位、327位、330位、331位、332位、333位、355位、356位、358位、396位、409位、および419位の群から選択される少なくともひとつ以上のアミノ酸が置換されている改変Fc領域が非限定な一態様として例示される。

[0244] また選択的Fc γ R結合ドメインを含む改変Fc領域の非限定な一態様として、ヒトIgG (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4) の238位のアミノ酸がAspおよびEUナンバリングで表される271位のアミノ酸がGlyであるFc領域の、EUナンバリングで表される、

233位のアミノ酸がAsp、

234位のアミノ酸がTyr、

237位のアミノ酸がAsp、

264位のアミノ酸がIle、

265位のアミノ酸がGlu、
266位のアミノ酸がPhe、Met、またはLeuのいずれか、
267位のアミノ酸がAla、Glu、Gly、またはGlnのいずれか、
268位のアミノ酸がAsp、Glu、またはGlnのいずれか、
269位のアミノ酸がAsp、
272位のアミノ酸が、Asp、Phe、Ile、Met、Asn、Pro、またはGlnのいずれか、
、
274位のアミノ酸がGln、
296位のアミノ酸がAsp、またはPheのいずれか、
326位のアミノ酸がAla、またはAspのいずれか、
327位のアミノ酸がGly、
330位のアミノ酸がLys、またはArgのいずれか、
331位のアミノ酸がSer、
332位のアミノ酸がThr、
333位のアミノ酸がThr、Lys、またはArgのいずれか、
355位のアミノ酸がGln、
356位のアミノ酸がGlu、
358位のアミノ酸がMet、
396位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Ile、Lys、Leu、Met、Gln、Arg、またはTyrのいずれか、
409位のアミノ酸がArg、
419位のアミノ酸がGlu、
のいずれかひとつ以上である改変Fc領域が例示される。

[0245] 前記の、さらに別の少なくとも一つのFc領域に対する改変、更に付加的な改変を含むFc領域の非限定な一態様として、表5-1～表5-7に記載されたFc領域が例示され得る。

[0246]

[表5-1]

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

[0247] (表5-2は表5-1の続きの表である。)

[表5-2]

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

[0248] (表5-3は表5-2の続きの表である。)

[表5-3]

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

[0249] (表5-4は表5-3の続きの表である。)

[表5-4]

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

[0250] (表5-5は表5-4の続きの表である。)

[表5-5]

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

[0251] (表5-6は表5-5の続きの表である。)

[表5-6]

改変 Fc 領域	改変アミノ酸 (EU ナンバリング)
BP514	E233D/G237D/P238D/H268E/E272F/P271G
BP517	E233D/G237D/P238D/H268E/E272I/P271G
BP520	E233D/G237D/P238D/H268E/E272M/P271G
BP521	E233D/G237D/P238D/H268E/E272N/P271G
BP523	E233D/G237D/P238D/H268E/E272Q/P271G
BP531	E233D/G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396M
BP532	E233D/G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396M
BP533	E233D/G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396L
BP534	E233D/G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396L
BP535	E233D/G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/Y296D/A327G/A330R/P396M
BP536	E233D/G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/Y296D/A327G/A330R/P396M
BP537	G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/A330R
BP538	G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/A330R
BP539	G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/E272P/Y296D/A330R
BP540	G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/E272P/Y296D/A330R
BP549	G237D/P238D/S267G/H268E/P271G/A330R
BP550	G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R
BP551	G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R
BP552	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R
BP553	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/A330R
BP554	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/A330R
BP555	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R
BP556	G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/Y296D/A330R
BP557	G237D/P238D/S267G/H268D/P271G/Y296D/A330R
BP558	G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/E272D/A330R
BP559	P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/Y296D
BP560	P238D/S267G/H268E/P271G/Y296D/A330R
BP561	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/E272D/Y296D/A330R
BP562	G237D/P238D/H268D/P271G/E272D/Y296D/A330R
BP563	E233D/G237D/P238D/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R

[0252] (表5-7は表5-6の続きの表である。)

[表5-7]

改変 Fc 領域	改変アミノ酸 (EU ナンバリング)
BP564	G237D/P238D/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R
BP565	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R
BP567	E233D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D
BP568	E233D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G

[0253] 抗原結合分子

本発明において、抗原結合分子は、抗原に対する結合活性がイオン濃度の条件によって変化する抗原結合ドメイン、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメイン、およびFc γ レセプターに対する選択的な結合活性を有するFc γ レセプター結合ドメイン（選択的Fc γ R結合ドメイン）を含む分子を表す最も広義な意味として使用されており、具体的には、それらが抗原に対する結合活性を示す限り、様々な分子型が含まれる。抗原に対する結合活性がイオン濃度の条件によって変化する抗原結合ドメイン、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメイン、およびFc γ レセプターに対する選択的な結合活性を有するFc γ レセプター結合ドメイン（選択的Fc γ R結合ドメイン）が結合した分子の例として、例えば抗体が挙げられる。抗体には、単一のモノクローナル抗体（アゴニストおよびアンタゴニスト抗体を含む）、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体等が含まれ得る。また抗体の断片として使用される場合としては、抗原結合ドメインおよび抗原結合断片（例えば、Fab、F(ab')₂、scFvおよびFv）が好適に挙げられ得る。既存の安定な α/β バレルタンパク質構造等の立体構造が scaffold（土台）として用いられ、その一部分の構造のみが抗原結合ドメインの構築のためにライブラリ化されたスキャフォールド分子も、本発明の抗原結合分子に含まれ得る。

[0254] 本発明の抗原結合分子は、FcRnに対する結合ならびにFc γ レセプターおよび/または補体レセプターに対する結合を媒介するFc領域の少なくとも部分を含むことができる。例えば、非限定な一態様において、抗原結合分子は抗体

またはFc融合タンパク質であり得る。融合タンパク質とは、天然ではそれが自然に連結しない第二のアミノ酸配列を有するポリペプチドに連結された第一のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むキメラポリペプチドをいう。例えば、融合タンパク質は、Fc領域の少なくとも部分（例えば、FcRnに対する結合を付与するFc領域の部分やFc γ レセプターに対する結合を付与するFc領域、補体に対する結合を付与するFc領域の部分）からなるアミノ酸配列、および、例えばレセプターのリガンド結合ドメインまたはリガンドのレセプター結合ドメインからなるアミノ酸配列を含む非免疫グロブリンポリペプチド、を含むことができる。アミノ酸配列は、一緒に融合タンパク質に運ばれる別々のタンパク質に存在できるか、あるいはそれらは通常は同一タンパク質に存在できるが、融合ポリペプチド中の新しい再編成に入れられる。融合タンパク質は、例えば、化学合成によって、またはペプチド領域が所望の関係でコードされたポリヌクレオチドを作成し、それを発現する遺伝子組換えの手法によって作製され得る。

[0255] 本発明の抗原結合ドメイン、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメインおよびFc γ レセプターに対する選択的な結合活性を有するFc γ レセプター結合ドメイン（選択的Fc γ R結合ドメイン）等の各ドメインはポリペプチド結合によって直接連結され得るし、リンカーを介して連結され得る。リンカーとしては、遺伝子工学により導入し得る任意のペプチドリリンカー、又は合成化合物リンカー（例えば、Protein Engineering (1996) 9 (3), 299-305) に開示されるリンカー等が使用され得るが、本発明においてはペプチドリリンカーが好ましい。ペプチドリリンカーの長さは特に限定されず、目的に応じて当業者が適宜選択することが可能であるが、好ましい長さは5アミノ酸以上（上限は特に限定されないが、通常、30アミノ酸以下、好ましくは20アミノ酸以下）であり、特に好ましくは15アミノ酸である。

[0256] 例えば、ペプチドリリンカーの場合：

Ser

Gly · Ser

Gly · Gly · Ser

Ser · Gly · Gly

Gly · Gly · Gly · Ser (配列番号 : 28)

Ser · Gly · Gly · Gly (配列番号 : 29)

Gly · Gly · Gly · Gly · Ser (配列番号 : 30)

Ser · Gly · Gly · Gly · Gly (配列番号 : 31)

Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Ser (配列番号 : 32)

Ser · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly (配列番号 : 33)

Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Ser (配列番号 : 34)

Ser · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly (配列番号 : 35)

(Gly · Gly · Gly · Gly · Ser (配列番号 : 30)) n

(Ser · Gly · Gly · Gly · Gly (配列番号 : 31)) n

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

[0257] 合成化学物リンカー（化学架橋剤）は、ペプチドの架橋に通常用いられている架橋剤、例えばN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）、ジスクシンイミジルスベレート（DSS）、ビス（スルホスクシンイミジル）スベレート（BS3）、ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）（DSP）、ジチオビス（スルホスクシンイミジルプロピオネート）（DTSSP）、エチレングリコールビス（スクシンイミジルスクシネート）（EGS）、エチレングリコールビス（スルホスクシンイミジルスクシネート）（スルホ-EGS）、ジスクシンイミジル酒石酸塩（DST）、ジスルホスクシンイミジル酒石酸塩（スルホ-DST）、ビス[2-（スクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル]スルホン（BSOCOES）、ビス[2-（スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル]スルホン（スルホ-BSOCOES）などであり、これらの架橋剤は市販されている。

[0258] 各ドメインを連結するリンカーが複数用いられる場合には、全て同種のリンカーが用いられ得るし、異種のリンカーも用いられ得る。

また、上記記載で例示されるリンカーのほか、例えばHisタグ、HAタグ、my

cタグ、FLAGタグ等のペプチドタグを有するリンカーも適宜使用され得る。また、水素結合、ジスルフィド結合、共有結合、イオン性相互作用またはこれらの結合の組合せにより互いに結合する性質もまた好適に利用され得る。例えば、抗体のCH1とCL間の親和性が利用されたり、ヘテロFc領域の会合に際して前述の二重特異性抗体を起源とするFc領域が用いられたりする。さらに、ドメイン間に形成されるジスルフィド結合もまた好適に利用され得る。

[0259] 各ドメインをペプチド結合で連結するために、当該ドメインをコードするポリヌクレオチドがインフレームで連結される。ポリヌクレオチドをインフレームで連結する方法としては、制限断片のライゲーションやフュージョンPCR、オーバーラップPCR等の手法が公知であり、本発明の抗原結合分子の作製にも適宜これらの方法が単独または組合せで使用され得る。本発明では、用語「連結され」、「融合され」、「連結」または「融合」は相互交換的に用いられる。これらの用語は、上記の化学結合手段または組換え手法を含めた全ての手段によって、二以上のポリペプチド等のエレメントまたは成分を一つの構造を形成するように連結することをいう。インフレームで連結するとは、二以上のドメイン、エレメントまたは成分がポリペプチドである場合に、当該ポリペプチドの正しい読み取り枠を維持するように連続したより長い読み取り枠を形成するための二以上の読み取り枠の単位の連結をいう。二分子のFabが抗原結合ドメインとして用いられた場合、当該抗原結合ドメインとpH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメインおよびFc γ レセプターに対する選択的な結合活性を有するFc γ レセプター結合ドメイン（選択的Fc γ R結合ドメイン）がリンカーを介することなくペプチド結合によってインフレームで連結された本発明の抗原結合分子である抗体は、本願の好適な抗原結合分子として使用され得る。以下に、抗体の構造を含む本発明の抗原結合分子の非限定な複数の態様が例示される。

[0260] (1) 抗原に対する結合活性がイオン濃度の条件によって変化する二つの可変領域を含むF(ab')₂とpH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有し、Fc γ レセプターに対する選択的な結合活性を有するFc領域を含む抗体

(2) F(ab')₂を形成する可変領域のうち、一方の可変領域が抗原に対する結合活性がイオン濃度の条件によって変化する可変領域であり、もう一方の可変領域がFcγレセプターに対する選択的な結合活性を有する可変領域であるF(ab')₂とpH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFc領域を含む抗体

(3) F(ab')₂を形成する可変領域のうち、一方の可変領域が抗原に対する結合活性がイオン濃度の条件によって変化する可変領域であり、もう一方の可変領域がpH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有する可変領域であるF(ab')₂とFcγレセプターに対する選択的な結合活性を有するFc領域を含む抗体

[0261] 上記の(3)の構造を含む抗体の場合、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有する可変領域として、FcRnに対する結合活性がpHの条件によって変化する可変領域も好適に用いられる。特定の理論に拘束されるものではないが、FcRnに対する結合活性がpHの条件によって変化する可変領域が用いられた場合、酸性エンドソーム内でFcRnに結合した抗体が細胞表面に輸送された際に、当該可変領域がpH中性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有しない可変領域であるときは細胞表面においてFcRnから遊離され血漿中に抗体がリサイクルされ易いとも考えられる。

[0262] 二重特異性抗体とその作製方法

前記の(2)、(3)の構造を含む抗体の調製方法の一態様として、二重特異性抗体の作製方法が適用され得る。二重特異性抗体とは、異なるエピトープに対して特異的に結合する二種類の可変領域を含む抗体である。IgG型の二重特異性抗体はIgG抗体を産生するハイブリドーマ二種を融合することによって生じるhybrid hybridoma (quadroma) によって分泌させることが可能である (Milsteinら (Nature (1983) 305, 537-540))。

[0263] 二重特異性抗体を前記の抗体の項で記載されたような組換え手法を用いて製造する場合、目的の二種の可変領域を含む重鎖をコードする遺伝子を細胞に導入しそれらを共発現させる方法が採用され得る。しかしながら、こうし

た共発現させる方法における重鎖の組合せを考慮するだけでも、(i) 第一のエピトープに結合する可変領域を含む重鎖と第二のエピトープに結合する可変領域を含む重鎖が一对となった重鎖の組合せ、(ii) 第一のエピトープに結合する可変領域を含む重鎖のみが一对となった重鎖の組合せ、(iii) 第二のエピトープに結合する可変領域を含む重鎖のみが一对となった重鎖の組合せが、2 : 1 : 1 の分子数の割合で存在する混合物となる。これら三種類の重鎖の組合せの混合物から目的の重鎖の組合せを含む抗原結合分子を精製することは困難である。

[0264] こうした組換え手法を用いて二重特異性抗体を製造する際に、重鎖を構成するCH3ドメインに適当なアミノ酸置換の改変を加えることによってヘテロな組合せの重鎖を含む二重特異性抗体が優先的に分泌され得る。具体的には、一方の重鎖のCH3ドメインに存在するアミノ酸側鎖をより大きい側鎖 (knob (「突起」の意)) に置換し、もう一方の重鎖のCH3ドメインに存在するアミノ酸側鎖をより小さい側鎖 (hole (「空隙」の意)) に置換することによって、突起が空隙内に配置され得るようにして異種の重鎖形成の促進および同種の重鎖形成の阻害を引き起こす方法である (W01996/027011、Ridgwayら (Protein Engineering (1996) 9, 617-621)、Merchantら (Nat. Biotech. (1998) 16, 677-681)))。

[0265] また、ポリペプチドの会合、またはポリペプチドによって構成される異種多量体の会合の制御方法を、重鎖の会合に利用することによって二重特異性抗体を作製する技術も知られている。即ち、重鎖内の界面を形成するアミノ酸残基を改変することによって、同一配列を有する重鎖の会合が阻害され、配列の異なる二つの重鎖が形成されるように制御する方法が二重特異性抗体の作製に採用され得る (W02006/106905)。このような方法も二重特異性抗体を製造する際に、採用され得る。

[0266] 本発明の非限定な一態様における抗原結合分子に含まれるFc領域としては、上記の二重特異性抗体を起源とするFc領域を形成する二つのポリペプチドが適宜使用され得る。より具体的には、Fc領域を形成する二つのポリペプチ

ドであって、その一方のポリペプチドのアミノ酸配列のうちEUナンバリングで表される349のアミノ酸がCys、366のアミノ酸がTrpであり、他方のポリペプチドのアミノ酸配列のうちEUナンバリングで表される356のアミノ酸がCys、366のアミノ酸がSerに、368のアミノ酸がAlaに、407のアミノ酸がValであることを特徴とする二つのポリペプチドが好適に用いられる。

[0267] そのほかの本発明の非限定な一態様におけるFc領域としては、Fc領域を形成する二つのポリペプチドであって、その一方のポリペプチドのアミノ酸配列のうちEUナンバリングで表される409のアミノ酸がAspであり、他方のポリペプチドのアミノ酸配列のうちEUナンバリングで表される399のアミノ酸がLysであることを特徴とする二つのポリペプチドが好適に用いられる。上記態様では、409のアミノ酸はAspに代えてGlu、399のアミノ酸はLysに代えてArgでもあり得る。また、399のアミノ酸のLysに加えて360のアミノ酸としてAsp又は392のアミノ酸としてAspも好適に追加され得る。

[0268] 本発明の別の非限定な一態様におけるFc領域としては、Fc領域を形成する二つのポリペプチドであって、その一方のポリペプチドのアミノ酸配列のうちEUナンバリングで表される370のアミノ酸がGluであり、他方のポリペプチドのアミノ酸配列のうちEUナンバリングで表される357のアミノ酸がLysであることを特徴とする二つのポリペプチドが好適に用いられる。

[0269] 本発明のさらに別の非限定な一態様におけるFc領域としては、Fc領域を形成する二つのポリペプチドであって、その一方のポリペプチドのアミノ酸配列のうちEUナンバリングで表される439のアミノ酸がGluであり、他方のポリペプチドのアミノ酸配列のうちEUナンバリングで表される356のアミノ酸がLysであることを特徴とする二つのポリペプチドが好適に用いられる。

[0270] 本発明の別の非限定な一態様におけるFc領域としては、これらが組み合わせられた以下の態様のいずれか；
(i) Fc領域を形成する二つのポリペプチドであって、その一方のポリペプチドのアミノ酸配列のうちEUナンバリングで表される409のアミノ酸がAsp、370のアミノ酸がGluであり、他方のポリペプチドのアミノ酸配列のうちEUナンバ

リングで表される399のアミノ酸がLys、357のアミノ酸がLysであることを特徴とする二つのポリペプチド（本態様では、EUナンバリングで表される370のアミノ酸のGluに代えてAspであってもよく、EUナンバリングで表される370のアミノ酸のGluに代えて392のアミノ酸のAspであってもよい）、

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

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

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

[0271] さらに、本発明の別の非限定な一態様において、Fc領域を形成する二つのポリペプチドであって、その一方のポリペプチドのアミノ酸配列のうちEUナ

ンバリングで表される356のアミノ酸がLysであり、他方のポリペプチドのアミノ酸配列のうちEUナンバリングで表される435のアミノ酸がArg、439のアミノ酸がGluであることを特徴とする二つのポリペプチドも好適に用いられる。

[0272] さらに、本発明の別の非限定な一態様において、Fc領域を形成する二つのポリペプチドであって、その一方のポリペプチドのアミノ酸配列のうちEUナンバリングで表される356のアミノ酸がLys、357のアミノ酸がLysであり、他方のポリペプチドのアミノ酸配列のうちEUナンバリングで表される370のアミノ酸がGlu、435のアミノ酸がArg、439のアミノ酸がGluであることを特徴とする二つのポリペプチドも好適に用いられる。

[0273] また、上記の異種の重鎖の会合技術のほか、第一のエピトープに結合する可変領域を形成する軽鎖、および第二のエピトープに結合する可変領域を形成する軽鎖を、各々、第一のエピトープに結合する可変領域を形成する重鎖、および第二のエピトープに結合する可変領域を形成する重鎖に会合させる異種の軽鎖の会合技術として知られるCrossMab技術（Scaefersら（Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (2011) 108, 11187-11192)）も、本発明が提供する抗原結合分子を作製するために使用され得る。

[0274] 薬物動態の改善

本発明において、「血漿中抗原消失能」とは、抗原結合分子が生体内に投与された、あるいは、抗原結合分子の生体内への分泌が生じた際に、血漿中に存在する抗原を血漿中から消失させる能力のことをいう。従って、本発明において、「抗原結合分子の血漿中抗原消失能が増加する」とは、抗原結合分子を投与した際に、抗原に対する結合活性がイオン濃度によって変化しない抗原結合ドメインを含む抗原結合分子、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有しないFcRn結合ドメインを含む抗原結合分子、またはFcγレセプターに対する選択的な結合活性を有しないFcγレセプター結合ドメインを含む抗原結合分子を投与したときと比較して、血漿中から抗原が消失する速さが速くなっていけばよい。抗原結合分子の血漿中抗原消失能が増加したか否かは、例えば、可溶性抗原と抗原結合分子とを生体内に投与し、投与後の

可溶性抗原の血漿中濃度を測定することにより判断することが可能である。抗原に対する結合活性がイオン濃度の条件によって変化する抗原結合ドメイン、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメイン、およびFc γ レセプターに対する選択的な結合活性を有するFc γ レセプター結合ドメイン（選択的Fc γ R結合ドメイン）を含む抗原結合分子と可溶性抗原を投与した後の血漿中の可溶性抗原の濃度が低下している場合には、抗原結合分子の血漿中抗原消失能が増加したと判断することができる。可溶性抗原は、血漿中において抗原結合分子に結合する抗原であっても、または抗原結合分子が結合しない抗原であってもよく、その濃度はそれぞれ「血漿中抗原結合分子結合抗原濃度」および「血漿中抗原結合分子非結合抗原濃度」として決定することができる（後者は「血漿中遊離抗原濃度」と同義である）。「血漿中総抗原濃度」とは、抗原結合分子結合抗原と抗原結合分子非結合抗原とを合計した濃度、または抗原結合分子非結合抗原濃度である「血漿中遊離抗原濃度」を意味することから、可溶性抗原濃度は「血漿中総抗原濃度」として決定することができる。「血漿中総抗原濃度」または「血漿中遊離抗原濃度」を測定する様々な方法が、本明細書において以下に記載するように当該技術分野において周知である。

[0275] 本発明において、「薬物動態の向上」、「薬物動態の改善」、および「優れた薬物動態」は、「血漿中（血中）滞留性の向上」、「血漿中（血中）滞留性の改善」、「優れた血漿中（血中）滞留性」、「血漿中（血中）滞留性を長くする」と言い換えることが可能であり、これらの語句は同じ意味で使用される。

[0276] 本発明において「薬物動態が改善する」とは、抗原結合分子がヒト、またはマウス、ラット、サル、ウサギ、イヌなどの非ヒト動物に投与されてから、血漿中から消失するまで（例えば、細胞内で分解される等して抗原結合分子が血漿中に戻る事が不可能な状態になるまで）の時間が長くなることのみならず、抗原結合分子が投与されてから分解されて消失するまでの間に抗原に結合可能な状態（例えば、抗原結合分子が抗原に結合していない状態）

で血漿中に滞留する時間が長くなることも含む。天然型Fc領域を有するヒトIgGは、非ヒト動物由来のFcRnに結合することができる。例えば、天然型Fc領域を有するヒトIgGはヒトFcRnよりマウスFcRnに強く結合することができることから (Int. Immunol. (2001) 13 (12), 1551-1559)、本発明の抗原結合分子の特性を確認する目的で、好ましくはマウスを用いて投与を行うことができる。別の例として、本来のFcRn遺伝子が破壊されており、ヒトFcRn遺伝子に関するトランスジーンを有して発現するマウス (Methods Mol. Biol. (2010) 602, 93-104) もまた、以下に記載する本発明の抗原結合分子の特性を確認する目的で、投与を行うために用いることができる。具体的には、「薬物動態が改善する」とはまた、抗原に結合していない抗原結合分子（抗原非結合型抗原結合分子）が分解されて消失するまでの時間が長くなることを含む。抗原結合分子が血漿中に存在していても、その抗原結合分子にすでに抗原が結合している場合は、その抗原結合分子は新たな抗原に結合できない。そのため抗原結合分子が抗原に結合していない時間が長くなれば、新たな抗原に結合できる時間が長くなり（新たな抗原に結合できる機会が多くなり）、生体内で抗原が抗原結合分子に結合していない時間を減少させることができ、抗原が抗原結合分子に結合している時間を長くすることが可能となる。抗原結合分子の投与によって血漿中からの抗原の消失を加速することができれば、抗原非結合型抗原結合分子の血漿中濃度が増加し、また、抗原が抗原結合分子に結合している時間が長くなる。つまり、本発明における「抗原結合分子の薬物動態の改善」とは、抗原非結合型抗原結合分子のいずれかの薬物動態パラメーターの改善（血漿中半減期の増加、平均血漿中滞留時間の増加、血漿中クリアランスの低下のいずれか）、あるいは、抗原結合分子投与後に抗原が抗原結合分子に結合している時間の延長、あるいは、抗原結合分子による血漿中からの抗原の消失が加速されること、を含む。抗原結合分子あるいは抗原非結合型抗原結合分子の血漿中半減期、平均血漿中滞留時間、血漿中クリアランス等のいずれかのパラメーター（ファーマコキネティクス演習による理解（南山堂））を測定することにより判断することが可能であ

る。例えば、抗原結合分子をマウス、ラット、サル、ウサギ、イヌ、ヒトなどに投与した場合、抗原結合分子あるいは抗原非結合型抗原結合分子の血漿中濃度を測定し、各パラメーターを算出し、血漿中半減期が長くなった又は平均血漿中滞留時間が長くなった場合等には、抗原結合分子の薬物動態が改善したといえる。これらのパラメーターは当業者に公知の方法により測定することが可能であり、例えば、薬物動態解析ソフトWinNonlin (Pharsight) を用いて、付属の手順書に従いノンコンパートメント (Noncompartmental) 解析することによって適宜評価することができる。抗原に結合していない抗原結合分子の血漿中濃度の測定は当業者公知の方法で実施することが可能であり、例えば、Clin. Pharmacol. (2008) 48 (4), 406-417において測定されている方法を用いることができる。

[0277] 本発明において「薬物動態が改善する」とは、抗原結合分子投与後に抗原が抗原結合分子に結合している時間が延長されたことも含む。抗原結合分子投与後に抗原が抗原結合分子に結合している時間が延長されたか否かは、遊離抗原の血漿中濃度を測定し、遊離抗原の血漿中濃度、あるいは、総抗原濃度に対する遊離抗原濃度の割合が上昇してくるまでの時間により判断することが可能である。

[0278] 抗原結合分子に結合していない遊離抗原の血漿中濃度、あるいは、総抗原濃度に対する遊離抗原濃度の割合は当業者公知の方法で決定され得る。例えば、Pharm. Res. (2006) 23 (1), 95-103において使用されている方法を用いて決定され得る。また、抗原が何らかの機能を生体内で示す場合、抗原が抗原の機能を中和する抗原結合分子（アンタゴニスト分子）と結合しているかどうかは、その抗原の機能が中和されているかどうかで評価することも可能である。抗原の機能が中和されているかどうかは、抗原の機能を反映する何らかの生体内マーカーを測定することによって評価され得る。抗原が抗原の機能を活性化する抗原結合分子（アゴニスト分子）と結合しているかどうかは、抗原の機能を反映する何らかの生体内マーカーを測定することによって評価され得る。

[0279] 遊離抗原の血漿中濃度の測定、血漿中の総抗原量に対する血漿中の遊離抗原量の割合の測定、生体内マーカーの測定などの測定は特に限定されないが、抗原結合分子が投与されてから一定時間が経過した後に行われることが好ましい。本発明において抗原結合分子が投与されてから一定時間が経過した後とは、特に限定されず、投与された抗原結合分子の性質等により当業者が適時決定することが可能であり、例えば抗原結合分子を投与してから1日経過後、抗原結合分子を投与してから3日経過後、抗原結合分子を投与してから7日経過後、抗原結合分子を投与してから14日経過後、抗原結合分子を投与してから28日経過後などが挙げられる。本発明において、「血漿中抗原濃度」とは、抗原結合分子結合抗原と抗原結合分子非結合抗原とを合計した濃度である「血漿中総抗原濃度」、または抗原結合分子非結合抗原濃度である「血漿中遊離抗原濃度」のいずれも含まれる概念である。

[0280] 血漿中総抗原濃度は、抗原結合分子として、抗原に対する結合活性がイオン濃度非依存的である抗原結合ドメインを含む抗原結合分子、または、Fc γ Rに対する結合活性が損なわれたFc領域を含む抗原結合分子、を投与した場合と比較して、または本発明の抗原結合分子を投与しない場合と比較して、本発明の抗原結合分子の投与により、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、200倍、500倍、1,000倍またはそれ以上低減し得る。

[0281] 抗原/抗原結合分子モル比は、以下に示す通りに算出され得る：

A値＝各時点での抗原のモル濃度

B値＝各時点での抗原結合分子のモル濃度

C値＝各時点での抗原結合分子のモル濃度あたりの抗原のモル濃度（抗原／抗原結合分子モル比）

$C=A/B$ 。

[0282] C値がより小さい場合は、抗原結合分子あたりの抗原消失効率がより高いことを示し、C値がより大きい場合は、抗原結合分子あたりの抗原消失効率がより低いことを示す。

[0283] 抗原/抗原結合分子モル比は、上記のように算出され得る。

- [0284] 抗原/抗原結合分子モル比は、抗原結合分子として、抗原に対する結合活性がイオン濃度によって変化しない抗原結合ドメインを含む抗原結合分子、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有しないFcRn結合ドメインを含む抗原結合分子、またはFc γ レセプターに対する選択的な結合活性を有しないFc γ レセプター結合ドメインを含む抗原結合分子、を投与した場合と比較して、本発明の抗原結合分子の投与により2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、200倍、500倍、1,000倍またはそれ以上低減しうる。
- [0285] 本発明において、本発明の抗原結合分子と比較する参照抗原結合分子として、抗原に対する結合活性がイオン濃度によって変化しない抗原結合ドメインを含む抗原結合分子、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有しないFcRn結合ドメインを含む抗原結合分子、またはFc γ レセプターに対する選択的な結合活性を有しないFc γ レセプター結合ドメインを含む抗原結合分子、が用いられる。
- [0286] pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメインの影響を評価する場合において、血漿中総抗原濃度または抗原/抗体モル比の減少は、抗原結合分子がマウスカウンターパート抗原と交差反応しないときは、ヒトFcRnトランスジェニックマウス系統32または系統276 (Jackson Laboratories, *Methods Mol. Biol.* (2010) 602, 93-104) を用い、抗原抗体同時注射モデルまたは定常状態抗原注入モデルのいずれかによって評価することもできる。抗原結合分子がマウスカウンターパートと交差反応するときは、ヒトFcRnトランスジェニックマウス系統32または系統276 (Jackson Laboratories) に抗原結合分子を単に注射することによって評価することもできる。同時注射モデルでは、抗原結合分子と抗原の混合物をマウスに投与する。定常状態抗原注入モデルでは、一定の血漿中抗原濃度を達成するためにマウスに抗原溶液を充填した注入ポンプを埋め込んで、次に抗原結合分子をマウスに注射する。試験抗原結合分子を同じ用量で投与する。血漿中総抗原濃度、血漿中遊離抗原濃度、および血漿中抗原結合分子濃度を、当業者公知の方法を用いて適切な時点で測定する。

[0287] Fc γ レセプターに対する選択的な結合活性を有するFc γ レセプター結合ドメインの影響を評価する場合において、血漿中総抗原濃度または抗原/抗体モル比の減少は、抗原結合分子がマウスカウンターパート抗原と交差反応しない場合は、通常用いられるC57BL/6Jマウス (Charles River Japan) を用い、抗原抗体同時注射モデルまたは定常状態抗原注入モデルのいずれかによって評価することもできる。抗原結合分子がマウスカウンターパートと交差反応する場合は、通常用いられるC57BL/6Jマウス (Charles River Japan) に抗原結合分子を単に注射することによって評価することもできる。

[0288] 同時注射モデルでは、抗原結合分子と抗原の混合物をマウスに投与する。定常状態抗原注入モデルでは、一定の血漿中抗原濃度を達成するためにマウスに抗原溶液を充填した注入ポンプを埋め込んで、次に抗原結合分子をマウスに注射する。試験抗原結合分子を同じ用量で投与する。血漿中総抗原濃度、血漿中遊離抗原濃度、および血漿中抗原結合分子濃度を、当業者公知の方法を用いて適切な時点で測定する。

[0289] 投与2日後、4日後、7日後、14日後、28日後、56日後、または84日後に血漿中の総抗原濃度または遊離抗原濃度および抗原/抗原結合分子モル比を測定して、本発明の長期効果を評価することができる。言い換えれば、本発明の抗原結合分子の特性を評価する目的で、長期間の血漿中抗原濃度が、抗原結合分子の投与2日後、4日後、7日後、14日後、28日後、56日後、または84日後に血漿中の総抗原濃度または遊離抗原濃度および抗原/抗原結合分子モル比を測定することによって決定される。本発明に記載の抗原結合分子によって血漿中抗原濃度または抗原/抗原結合分子モル比の減少が達成されるか否かは、先に記載した任意の1つまたは複数の時点でその減少を評価することにより決定され得る。

[0290] 投与15分後、1時間後、2時間後、4時間後、8時間後、12時間後、または24時間後に、血漿中の総抗原濃度または遊離抗原濃度および抗原/抗原結合分子モル比を測定して、本発明の短期効果を評価することができる。言い換えれば、本発明の抗原結合分子の特性を評価する目的で、短期間の血漿中抗原濃

度が、抗原結合分子の投与15分後、1時間後、2時間後、4時間後、8時間後、12時間後、または24時間後に血漿中の総抗原濃度または遊離抗原濃度および抗原/抗原結合分子モル比を測定することによって決定される。

[0291] 本発明の抗原結合分子の投与経路は、皮内注射、静脈内注射、硝子体内注射、皮下注射、腹腔内注射、非経口注射、および筋肉内注射から選択することができる。

[0292] 本発明においては、ヒトにおける抗原結合分子の薬物動態が改善することが好ましい。ヒトでの血漿中滞留性を測定することが困難である場合には、マウス（例えば、正常マウス、ヒト抗原発現トランスジェニックマウス、ヒトFcRn発現トランスジェニックマウス、等）またはサル（例えば、カニクイザルなど）での血漿中滞留性をもとに、ヒトでの血漿中滞留性を予測することができる。

[0293] 本発明における「抗原結合分子の薬物動態の改善、血漿中滞留性の向上」とは抗原結合分子を生体に投与した際のいずれかの薬物動態パラメーターが改善されていること（血漿中半減期の増加、平均血漿中滞留時間の増加、血漿中クリアランスの低下、バイオアベイラビリティのいずれか）、あるいは、投与後の適切な時間における抗原結合分子の血漿中濃度が向上していることを意味する。抗原結合分子の血漿中半減期、平均血漿中滞留時間、血漿中クリアランス、バイオアベイラビリティ等のいずれかのパラメーター（ファーマコキネティクス 演習による理解（南山堂））を測定することにより判断することが可能である。例えば、抗原結合分子をマウス（ノーマルマウスおよびヒトFcRnトランスジェニックマウス）、ラット、サル、ウサギ、イヌ、ヒトなどに投与した場合、抗原結合分子の血漿中濃度を測定し、各パラメーターを算出し、血漿中半減期が長くなった又は平均血漿中滞留時間が長くなった場合等には、抗原結合分子の薬物動態が改善したといえる。これらのパラメーターは当業者に公知の方法により測定することが可能であり、例えば、薬物動態解析ソフトWinNonlin (Pharsight) を用いて、付属の手順書に従いノンコンパートメント (Noncompartmental) 解析することによって適宜

評価することができる。

- [0294] マウスにおいて、Fc γ RI、Fc γ RIIb、Fc γ RIII、Fc γ RIVの、4種類のFc γ Rがこれまでに見出されている。ヒトにおいてもそれらに対応するFc γ Rとして、Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa、Fc γ RIIIa、Fc γ RIIIbが見出されている。これらのFc γ Rの中で唯一抑制型と考えられているFc γ RIIbはヒト、マウスのいずれにおいても保存されている。他のFc γ RはFc γ RIIIbを除いてImmunoreceptor tyrosine-based activating motif (ITAM) を介して活性化シグナルを伝達するが、Fc γ RIIbは細胞内に有するimmunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) を介して抑制シグナルを伝達している (Nat. Rev. Immunol. (2008) 8, 34-47)。
- [0295] Fc γ RIIbのスプライシングバリエーションとしてFc γ RIIb1とFc γ RIIb2とが報告されている。ヒトおよびマウスのいずれにおいてもFc γ RIIb1はFc γ RIIb2に比べて長い細胞内ドメインを有しており、Fc γ RIIb1はB細胞で発現することが確認され、Fc γ RIIb2はマクロファージ、肥満細胞、樹状細胞、好塩基球、好中球、好酸球で発現することが確認されている (J. Clin. Immunol. (2005) 25 (1), 1-18)。
- [0296] これまでに、ヒトにおいてFc γ RIIbの機能不全、発現低下は自己免疫疾患の発症と相関があることが報告されている。例えば、SLE患者の中にはFc γ RIIbの発現プロモーター領域にある遺伝子多型の影響によって転写活性化因子の結合が弱まり、Fc γ RIIbの発現が低下している例が報告されている (Hum. Genet. (2005) 117, 220-227、J. Immunol. (2004) 172, 7192-7199、J. Immunol. (2004) 172, 7186-7191)。また、SLE患者の中にはFc γ RIIbの233番目のアミノ酸がIleまたはThrという二種類の遺伝子多型が報告されている。この部位はFc γ RIIbの細胞膜貫通領域に存在し、233番目のアミノ酸がThrの場合、Ileの場合と比べて、Fc γ RIIbがリピッドラフトに存在しにくくなり、結果としてFc γ RIIbのシグナル伝達機能が低下することが報告されている (Nat. Med. (2005) 11, 1056-1058、Hum. Mol. Genet., (2005) 14, 2881-2892)。マウスにおいても、C57BL/6マウスのFc γ RIIb遺伝子が破壊されたノックア

ウトマウスは、自己抗体の産生や糸球体腎炎等のSLE様の症状を呈することが報告されている (Immunity 13 (2000) 277-285、J. Exp. Med. (2002) 195, 1167-1174)。また、これまでにSLEの自然発症モデルと考えられてきているマウスにおいてもFc γ RIIbの発現量の低下などが報告されている (Immunogenetics (2000) 51, 429-435、Int. Immunol. (1999) 11, 1685-1691、Curr. Biol. (2000) 10, 227-230、J. Immunol. (2002) 169, 4340-4346)。これらのことから、マウスにおいても、ヒト同様にFc γ RIIbは液性免疫を制御していると考えられる。

[0297] 本発明のFcを有する抗体がFc γ RIIbを介して抗原を消失させる際には、Fc γ RIIbの機能のうち、Fc γ RIIbのエンドサイトーシスの機能が最も重要な寄与をしていると考えられる。上述したようにFc γ RIIbのスプライシングバリエーションとしてFc γ RIIb1とFc γ RIIb2が存在するが、抗体と抗原の免疫複合体のエンドサイトーシスには後者が主に関与していることが報告されている (J. Immunol. (1994), 152 574-585、Science (1992) 256, 1808-1812、Cell (1989) 58, 317-327)。これまでにマウスのFc γ RIIb2はクラスリン被覆ピットに取り込まれて、エンドサイトーシスを起こすことが報告されている (Cell (1989) 58, 317-327)。また、Fc γ RIIb2を介したエンドサイトーシスには dileucine motifが必要と報告されているが、ヒトおよびマウスのいずれにおいても dileucine motifは保存されている (EMBO J. (1994) 13 (13), 2963-2969)。このことから、ヒトにおいてもマウス同様にFc γ RIIb2はエンドサイトーシス能を有すると考えられる。

[0298] その一方で、Fc γ RIIb1はFc γ RIIb2と異なり、エンドサイトーシスを起こさないことが報告されている。Fc γ RIIb1はFc γ RIIb2にはみられない、細胞内ドメイン中の挿入配列が存在する。この配列がFc γ RIIb1のクラスリン被覆ピットへの取り込みを阻害し、その結果としてエンドサイトーシスが阻害されることが考えられている (J. Cell. Biol. (1992) 116, 875-888、J. Cell. Biol. (1989) 109, 3291-3302)。ヒトにおいても、マウス同様にFc γ RIIb1にはFc γ RIIb2の同様の部分に挿入配列が存在するため、類似のメカニズムでFc

γ R11b1とFc γ R11b2のエンドサイトーシス能の違いが生じていると予想される。また、ヒトにおいても、マウスにおいても20分間に細胞表面上の約40%の免疫複合体が細胞内へ取り込まれることが報告されている (Mol. Immunol. (2011) 49, 329-337、Science (1992) 256, 1808-1812)。このことから、ヒトにおいてもFc γ R11b2はマウス同様の速度で免疫複合体を細胞内に取り込んでいると予想される。

[0299] Fc γ R familyのうちFc γ R11bはヒトでもマウスでも唯一細胞内にITIMを有し、発現細胞の分布も同一であることから、免疫の制御における機能も同様であると推測できる。またヒトでもマウスでも同様の速度で免疫複合体が細胞内へ取り込まれるという事実を考慮すると、マウスを用いることで、ヒトにおけるFc γ R11bを介した抗体による抗原の消失効果が予測可能であると考えられる。実際に、実施例5において、pH依存的に可溶性抗原に結合する性質を有する抗原結合分子であるmIgG1と比較して、pH依存的に可溶性抗原に結合する性質を有しマウスFc γ R11bおよびFc γ R111に対するaffinityが増強した抗原結合分子であるmF44およびmF46がノーマルマウスに投与されたときに、mIgG1が投与された場合と比べて抗原のクリアランスを増加することが示された。

[0300] また、後述される実施例6においてFc受容体 γ 鎖欠損マウスを使って同様の実験が実施された。マウスの場合、Fc γ R11b以外のFc γ Rはgamma chainの共存在下でしか発現しないことが報告されているため、Fc受容体 γ 鎖欠損マウスではFc γ R11bしか発現していない。Fc受容体 γ 鎖欠損マウスにpH依存的に可溶性抗原に結合する性質を有する抗原結合分子であるmF44、mF46を投与することで、Fc γ R11b選択的に結合を増強した際の、抗原消失を加速する効果を考察することが可能である。実施例6の結果から、Fc受容体 γ 鎖欠損マウスに投与されたpH依存的に可溶性抗原に結合する性質を有する抗原結合分子であるmF44およびmF46は、同マウスに投与されたpH依存的に可溶性抗原に結合する性質を有する抗原結合分子であるmIgG1と比べて、抗原のクリアランスを増加することが示された。また、実施例6の結果から、mF44およびmF46

はFc受容体 γ 鎖欠損マウスに投与された場合でもノーマルマウスに投与された場合とほぼ同程度に抗原を消失させることが明らかとなった。

[0301] 実施例6においてFc γ RIII欠損マウスを使って同様の実験が実施された。mIgG1およびmF44、mF46はmFc γ RのうちFc γ RIIbおよびFc γ RIIIにのみ結合することから、Fc γ RIII欠損マウスにこれらの抗体を投与することで、Fc γ RIIb選択的に結合を増強した際の、抗原消失を加速する効果を考察することが可能である。実施例6の結果から、Fc γ RIII欠損マウスに投与されたmF44およびmF46は同マウスに投与されたmIgG1と比べて、抗原のクリアランスを増加することが示された。また、実施例6の結果から、mF44およびmF46はFc γ RIII欠損マウスに投与された場合でもノーマルマウスに投与された場合、およびFc受容体 γ 鎖欠損マウスに投与された場合とほぼ同程度に抗原を消失させることが明らかとなった。

[0302] これらの結果から、活性型Fc γ Rに対する結合は増強せず、Fc γ RIIbにだけ選択的に結合を増強することで、抗原消失を加速することが可能であることが明らかとなった。

[0303] 先に考察したこれまでの文献報告に加えて、上記のマウスを使った検証結果から、ヒトの生体中においても、マウスと同様にFc γ RIIbを介した免疫複合体の細胞内への取り込みが生じ、その結果ヒトFc γ RIIbに対して選択的に結合を増強したFcを有する抗体はその抗原の消失を速めることが可能であると考えられる。また、先に考察したように、マウスとヒトとではFc γ RIIbを介した免疫複合体の細胞内への取り込みが同程度の速度で生じると考えられることから、マウスFc γ RIIbに対するaffinityを増強したFcを有する抗体の抗原消失を速める効果と同程度の効果が、ヒトFc γ RIIbに対するaffinityを同程度に増強したFcを用いることでヒトの生体内においても達成することが可能であると考えられた。

[0304] W02009/125825に記載されているように、ヒト化抗IL-6レセプター抗体であるH54/L28-IgG1の抗原に対する結合活性がpHの条件によって変化する、すなわちpH7.4において抗原に結合し、pH5.8において抗原を解離する改変が可変

領域に付与されたFv4-IgG1が抗原である可溶性ヒトIL-6レセプターと共に投与されたマウスにおける可溶性ヒトIL-6レセプターの消失は、H54/L28-IgG1と当該抗原が共に投与されたマウスにおける可溶性ヒトIL-6レセプターの消失よりも大幅に加速されることが示された。なお、本明細書においては、H54/L28-IgG1に含まれる重鎖H54-IgG1および軽鎖L28-CKは、それぞれ配列番号：36および配列番号：37で表され、Fv4-IgG1に含まれる重鎖VH3-IgG1および軽鎖VL3-CKは、それぞれ配列番号：38および配列番号：39で表されている。

[0305] 可溶性ヒトIL-6レセプターに結合する抗体であるH54/L28-IgG1に結合した可溶性ヒトIL-6レセプターは、抗体とともにFcRnによって血漿中にリサイクルされるのに対して、pH依存的に可溶性ヒトIL-6レセプターに結合する抗体であるFv4-IgG1は、エンドソーム内の酸性条件下において抗体に結合した可溶性ヒトIL-6レセプターを解離する。解離した可溶性ヒトIL-6レセプターはライソソームによって分解されるため、可溶性ヒトIL-6レセプターの消失を大幅に加速することが可能となり、さらにpH依存的に可溶性ヒトIL-6レセプターに結合する抗体であるFv4-IgG1はエンドソーム内でFcRnに結合した後に血漿中にリサイクルされる。リサイクルされた当該抗体は再び可溶性ヒトIL-6レセプターに結合することができるため、抗原（可溶性ヒトIL-6レセプター）に対する結合とFcRnによる血漿中でのリサイクルが繰り返される。その結果、ひとつの抗体分子が複数回繰り返し可溶性ヒトIL-6レセプターに結合することが可能となると考えられる（図1）。

[0306] 一方、本発明で開示されるように、pH等のイオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメイン、およびFc γ レセプター結合ドメインを含む抗原結合分子に含まれるFc γ レセプター結合ドメインの、Fc γ Rに対する結合活性が増強された抗原結合分子の投与によって、可溶性抗原の血漿中濃度を大幅に低下させることが可能であることが見出された。

[0307] 特定の理論に拘束されるものではないが、Fc γ Rへの結合が増強されたpH等

のイオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメインを含む抗原結合分子の投与によって観察された予想外の血漿中可溶性抗原濃度の低下は、以下のように説明することも可能である。

[0308] 前記のように、Fv4-IgG1等のイオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子は、複数回繰り返し抗原に結合することが可能になると考えられるが、エンドソーム内において可溶性抗原を解離し、その血漿中からの消失を早める効果は、抗原と抗原結合分子の複合体がエンドソーム内へと取り込まれる速度に依存すると考えられる。各種のFc γ Rへの結合活性が増強された、イオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子は、細胞膜上に発現する各種Fc γ Rに結合することにより、細胞内へと積極的に取り込まれ、当該分子中に含まれるpH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメインとFcRnの結合を介したリサイクルによって再度血漿中に循環することが可能である。すなわち、血漿中において可溶性抗原と複合体を形成した前記抗原結合分子は、細胞膜上に発現したFc γ Rを介して細胞内へ積極的に取り込まれるために、血漿中の可溶性抗原の消失を早める効果が、各種のFc γ Rへの結合活性が増強されていない抗原結合分子より顕著に表れると考えられる。

[0309] 膜型抗原に結合する抗体のFc γ Rに対する結合活性は当該抗体の細胞傷害活性に重要な役割を果たしている。そのため、医薬として用いられる抗体に細胞傷害活性が必要な場合、Fc γ Rに対する結合活性が高いヒトIgG1のアイソタイプが用いられ、さらに当該抗体のFc γ Rに対する結合活性を増強することにより当該抗体の細胞傷害活性が増強される技術は広く用いられている。一方、医薬として用いられ、可溶性抗原に結合する抗体のFc γ Rに対する結合活性の果たす役割はこれまで知られておらず、Fc γ Rに対する結合活性が高いヒトIgG1とFc γ Rに対する結合活性が低いヒトIgG2やヒトIgG4のFc γ Rに対する結合活性の相違が、当該抗体が投与された生体に与える生理的な効果の違いは

これまでに十分に検討されていなかった。実際、本実施例で後述されるように、Fc γ Rに対する結合活性を欠損させた抗体が投与された個体の血漿中での、可溶性抗原の濃度推移に影響が無いことが確認された。一方、本発明において、Fc γ Rに対する結合活性が増強され、イオン濃度の条件によって可溶性抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子が投与された個体の血漿中における可溶性抗原の濃度が大幅に低下したことが見出された。すなわち、可溶性抗原を標的とした抗原結合分子に含まれる、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメインとイオン濃度の条件によって可溶性抗原に対する結合が変化する抗原結合ドメインが組み合わされることによって、Fc γ Rに対する結合を増強させる利点が初めて見出されたといえる。

[0310] 血漿中から当該抗原を消失させるためのex vivoの方法

本発明によって提供される、血漿中から当該抗原を消失させるための方法における抗原結合分子の使用の非限定な一態様として、対象から単離された血漿を本発明の抗原結合分子と接触せしめ形成させた免疫複合体を、FcRnおよびFc γ レセプターを発現する細胞に接触させることを含む、血漿中から当該抗原を消失させるための、いわゆるex vivoの方法における当該抗原結合分子の使用も例示される。抗原結合分子を生体内に投与する方法に代えて/と組み合わせて、抗原結合分子および抗原結合分子に結合する抗原を含む血漿を生体外にいったん取り出した後に、FcRnおよびFc γ レセプターを発現する細胞と接触させ一定期間を経過して細胞外にリサイクル（再分泌または再循環ともいう）された、抗原を結合しない抗原結合分子を含む血漿を生体内に戻すいわゆるex vivoの方法によっても、血漿中の抗原の消失速度を促進させることができる。

[0311] また、本発明によって提供される、血漿中から当該抗原を消失させるための方法における抗原結合分子の使用の非限定な一態様として、本発明の抗原結合分子が投与された対象から単離された血漿中に存在する免疫複合体を、FcRnおよびFc γ レセプターを発現する細胞に接触させることを含む、血漿中か

ら当該抗原を消失させるための、いわゆるex vivoの方法における当該抗原結合分子の使用も例示される。

[0312] 当該抗原が血漿から消失しているか否かは、前述の血漿中の抗原の消失速度が、本発明の抗原結合分子の代わりに、抗原に対する結合活性がイオン濃度によって変化しない抗原結合ドメインを含む抗原結合分子、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有しないFcRn結合ドメインを含む抗原結合分子、またはFc γ レセプターに対する選択的な結合活性を有しないFc γ レセプター結合ドメインを含む抗原結合分子、を対照として比較したときに促進されているか否かを評価すること等によって確認され得る。

[0313] 抗原結合分子の製造方法

本発明は、また以下の工程(a)~(e)を含む、血漿中に存在する抗原を消失する機能を有する抗原結合分子の製造方法；

- (a) 抗原に対する結合活性がイオン濃度の条件によって変化する抗原結合ドメインを得る工程、
- (b) 前記工程(a)で選択された抗原結合ドメインをコードする遺伝子を得る工程、
- (c) 前記工程(b)で得られた遺伝子を、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメイン、およびFc γ レセプターに対する選択的な結合活性を有するFc γ レセプター結合ドメインをコードする遺伝子と作動可能に連結する工程、
- (d) 前記工程(c)で作動可能に連結された遺伝子を含む宿主細胞を培養する工程、
- (e) 前記工程(d)で得られた培養液から抗原結合分子を単離する工程、を提供する。

[0314] 本発明の非限定な一態様では、前記のように選択された条件によって結合活性が変化する抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドが単離された後に、当該ポリヌクレオチドが適切な発現ベクターに挿入される。例えば、抗原結合ドメインが抗体の可変領域である場合には、当該可変領域をコー

ドするcDNAが得られた後に、当該cDNAの両末端に挿入された制限酵素サイトを認識する制限酵素によって該cDNAが消化される。好ましい制限酵素は、抗原結合分子の遺伝子を構成する塩基配列に出現する頻度が低い塩基配列を認識して消化する。更に1コピーの消化断片をベクターに正しい方向で挿入するためには、付着末端を与える制限酵素の挿入が好ましい。上記のように消化された抗原結合分子の可変領域をコードするcDNAを適切な発現ベクターに挿入することによって、本発明の抗原結合分子の発現ベクターが取得され得る。

[0315] 前記のように取得された抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドは、前記の「pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメイン」および「Fc γ レセプターに対する選択的な結合活性を有するFc γ レセプター結合ドメイン」の項にそれぞれ記載される、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメインおよびFc γ レセプターに対する選択的な結合活性を有するFc γ レセプター結合ドメインをコードする遺伝子と作動可能に連結される。連結に際して、直接インフレームで連結することもできるし、各ドメインをコードするポリヌクレオチドがリンカーを介してインフレームで連結され得る。また、上記の各ドメインに加えて、前記の「Fc γ R結合ドメイン」の項に記載されるFc γ R結合ドメインをコードする遺伝子と作動可能に連結される。

[0316] 本発明の抗原結合分子として抗体が使用される場合は、上記の「pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメイン、およびFc γ レセプターに対する選択的な結合活性を有するFc γ レセプター結合ドメイン」として抗体のFc領域をコードするポリヌクレオチドが適宜使用され得る。当該ポリヌクレオチドを改変して「pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性」および「Fc γ レセプターに対する選択的な結合活性」が適宜改変されたFc領域も使用され得る。このような改変の非限定な態様は、前記の「pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメイン」および「Fc γ レセプターに対する選択的な結合活性を有するFc γ レセプター結合ドメイン

」の項にそれぞれ例示されている。

[0317] 所望の抗原結合分子を製造するために、抗原結合分子をコードするポリヌクレオチドが制御配列に作動可能に連結された態様で発現ベクターに組み込まれる。制御配列とは、例えば、エンハンサーやプロモーターを含む。また、発現した抗原結合分子が細胞外に分泌されるように、適切なシグナル配列がアミノ末端に連結され得る。例えばシグナル配列として、アミノ酸配列MGWSCIILFLVATATGVHS（配列番号：4）を有するペプチドが使用されるが、これ以外にも適したシグナル配列が連結され得る。発現されたポリペプチドは上記配列のカルボキシル末端部分で切断され、切断されたポリペプチドが成熟ポリペプチドとして細胞外に分泌され得る。次いで、この発現ベクターによって適当な宿主細胞が形質転換されることによって、所望の抗原結合分子をコードするポリヌクレオチドを発現する組換え細胞が取得され得る。当該組換え細胞から、本発明の抗原結合分子を製造する方法は、前記の抗体の項で記載した方法に準じて製造され得る。

[0318] 核酸に関して「作動可能に連結した」は、その核酸が他の核酸配列と機能的な関係にあることを意味する。例えば、プレシーケンス（presequence）または分泌リーダーのDNAは、あるポリペプチドの分泌に関わっている前駆体タンパク質として発現する場合は、そのポリペプチドのDNAと作動可能的に結合している。プロモーターまたはエンハンサーは、それがコード配列の転写に影響する場合はその配列と作動可能に連結している。または、リボソーム結合部は、それが翻訳を容易にする位置にある場合は作動可能にコード配列と連結している。通常、「作動可能に連結した」は、結合したDNA配列が連続しており、分泌リーダーの場合は連続して読取り枠内にあることを意味する。しかし、エンハンサーは連続する必要はない。連結は適切な制限部位でライゲーションによって達成される。このような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーが、従来慣行に従って使用される。また前記のOverlap Extension PCRの手法によっても連結された核酸が作製され得る。

- [0319] 本発明の非限定な一態様において、前記のように選択された条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合分子をコードするポリヌクレオチドが単離された後に、当該ポリヌクレオチドの改変体が適切な発現ベクターに挿入される。このような改変体の一つとして、ランダム化可変領域ライブラリとして、合成ライブラリや非ヒト動物を起源として作製された免疫ライブラリを用いることによってスクリーニングされた本発明の抗原結合分子をコードするポリヌクレオチド配列がヒト化された改変体が好適に挙げられる。ヒト化された抗原結合分子の改変体の作製方法は、前記のヒト化抗体の作製方法と同様の方法が採用され得る。
- [0320] また、改変体のその他の態様として、ランダム化可変領域ライブラリとして合成ライブラリやナイーブライブラリを用いることによってスクリーニングされた本発明の抗原結合分子の抗原に対する結合親和性の増強（アフィニティ成熟化）をもたらすような改変が、単離されたポリヌクレオチド配列に施された改変体が好適に挙げられる。そのような改変体はCDRの変異誘導（Yangら（*J. Mol. Biol.* (1995) 254, 392-403））、鎖シャッフリング（Marksら（*Bio/Technology* (1992) 10, 779-783））、*E. coli*の変異誘発株の使用（Lowら（*J. Mol. Biol.* (1996) 250, 359-368））、DNAシャッフリング（Pattenら（*Curr. Opin. Biotechnol.* (1997) 8, 724-733））、ファージディスプレイ（Thompsonら（*J. Mol. Biol.* (1996) 256, 77-88））および有性PCR（sexual PCR）（Clameriら（*Nature* (1998) 391, 288-291））を含む種々のアフィニティ成熟化の公知の手順によって取得され得る。
- [0321] 前記のようなアミノ酸の変異が加えられたFc領域の改変体をコードするポリヌクレオチドと、前記のように選択された条件によって結合活性が変化する抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドとがインフレームで連結された重鎖を有する抗原結合分子をコードするポリヌクレオチドも、本発明の改変体の一態様として作製される。
- [0322] 本発明によって、Fc領域をコードするポリヌクレオチドとインフレームで連結されたイオン濃度の条件によって結合活性が変化する抗原結合ドメイン

をコードするポリヌクレオチドが作動可能に連結されたベクターが導入された細胞の培養液から抗原結合分子を回収することを含む抗原結合分子の製造方法が提供される。また、ベクター中に予め作動可能に連結されたFc領域をコードするポリヌクレオチドと、イオン濃度の条件によって結合活性が変化する抗原結合ドメインをコードするポリヌクレオチドが作動可能に連結されたベクターが導入された細胞の培養液から抗原結合分子を回収することを含む抗原結合分子の製造方法もまた提供される。

[0323] 本発明の「抗原結合分子の製造方法」において、当該抗原結合分子による当該抗原の血漿中からの消失を評価する方法として、公知の方法が採用され得る。適切な月齢のマウス等の非ヒト動物の群それぞれに、本発明の抗原結合分子が投与される。投与方法は、後述される「医薬組成物」の項に記載されるように、注射剤型、経鼻投与剤型、経肺投与剤型、経皮投与型の組成物として、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射、頭蓋内注射等により全身または局部的に投与され得る。

[0324] 当該濃度を測定するために、NMR（核磁気共鳴）又は質量分析（MS）などの分光法；SELDI（-TOF）、MALDI（-TOF）、1Dゲルベース分析、2Dゲルベース分析、液体クロマトグラフィー（例えば、高圧液体クロマトグラフィー（HPLC）又は低圧液体クロマトグラフィー（LPLC））、薄層クロマトグラフィー、及びLC-MSベースの技術等が使用され得る。適切なLCMS技術を挙げると、ICAT（登録商標）（Applied Biosystems）又はiTRAQ（登録商標）（Applied Biosystems）が例示され得る。また、対象となる抗原が適切な酵素でさらに消化された抗原のさらなる断片を検出する方法も適宜採用され得る。さらに当該抗原濃度の測定は、直接的または間接的な検出方法によって実施され得る。すなわち当該抗原は、酵素、結合、受容体もしくは輸送タンパク質、抗体、ペプチド、アプタマーもしくはオリゴヌクレオチド、または当該抗原を特異的に結合させることができる任意の合成化学的な受容体もしくは化合物等の、リガンドまたはリガンド類との相互作用を介して、直接的または間接的に検出され得る。当該リガンドは、発光標識、蛍光標識または放射性標識、お

よび/または親和性タグなどの検出可能な標識で修飾され得る。そのような例として、免疫学的方法が例示され得る。

[0325] 好適な測定方法として、当該抗原に存在するエピトープに結合する抗体を使用する免疫学的方法が例示され得る。この免疫学的方法としては、例えば、酵素免疫測定法 (ELISA、EIA)、蛍光免疫測定法 (FIA)、放射免疫測定法 (RIA)、発光免疫測定法 (LIA)、酵素抗体法、蛍光抗体法、イムノクロマトグラフィー法、免疫比濁法、ラテックス比濁法、ラテックス凝集反応測定法等が挙げられる。また、こうした免疫学的方法における測定は、手動操作の手技で行われ得るし、分析装置等の装置を用いても行われ得る。本発明における免疫学的方法は、例えばサンドイッチ法等の公知の方法に従い行うことができる。例えば、担体に固相化された第一の抗体と、生物学的試料及び標識物質によって修飾されている第二の抗体を、同時または順に反応させる。上記の反応によって、担体に固相化された第一の抗体、当該抗原および標識物質によって修飾されている第二の抗体の複合体が形成され、この複合体に含まれる第二の抗体に連結された標識物質を定量することによって、生物学的試料中に含まれる当該抗原の量 (濃度) を測定することができる。

[0326] 例えば、酵素免疫測定法の場合は、第一の抗体が固相化されたマイクロプレート、系列的に希釈された生物学的試料、HRP等の酵素によって修飾された第二の抗体、洗浄バッファー、およびHRP等の酵素による反応を受ける基質が含まれる溶液が好適に用いられる。非限定な測定の一態様では、第二の抗体を修飾する酵素に、その至適条件下で基質を反応させ、その酵素反応生成物の量が光学的方法等により測定され得る。また、蛍光免疫測定法の場合には、第一の抗体が固相化された光導波路、系列的に希釈された生物学的試料、蛍光物質によって修飾された第二の抗体、洗浄バッファーが好適に用いられ得る。非限定な測定の一態様では、第二の抗体を修飾する蛍光物質に照射された励起光によって、その蛍光物質が発する蛍光強度が測定され得る。

[0327] さらに放射免疫測定法の場合には、放射性物質による放射線量が測定される。また、発光免疫測定法の場合には、発光反応系による発光量が測定され

る。また、免疫比濁法、ラテックス比濁法、ラテックス凝集反応測定法等の場合には、エンドポイント法またはレート法により透過光や散乱光が測定される。また、イムノクロマトグラフィー法などを目視により測定する場合には、テストライン上に現れる標識物質の色が目視的に測定される。なお、この目視的に測定する代わりに、分析装置等の機器が適宜使用され得る。

[0328] 医薬組成物

本発明は、本発明の抗原結合分子、本発明の改変方法により作製された抗原結合分子、または本発明の製造方法により製造された抗原結合分子を含む医薬組成物に関する。本発明の抗原結合分子または本発明の製造方法により製造された抗原結合分子はその投与により通常の抗原結合分子と比較して血漿中の抗原濃度を低下させる作用が高い上に、投与された生体による免疫応答や当該生体中の薬物動態等が改変されていることから医薬組成物として有用である。本発明の医薬組成物には医薬的に許容される担体が含まれ得る。

[0329] 本発明において医薬組成物とは、通常、疾患の治療もしくは予防、あるいは検査・診断のための薬剤をいう。

[0330] 本発明の医薬組成物は、当業者に公知の方法を用いて製剤化され得る。例えば、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用され得る。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤等と適宜組み合わせて、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化され得る。これら製剤における有効成分量は、指示された範囲の適当な容量が得られるように設定される。

[0331] 注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施にしたがって処方され得る。注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬（例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウム）を含む等張液が挙げられる。適切な溶解補助剤、例えばアルコール（エタノール等）、ポリアルコール（プロピレ

ングリコール、ポリエチレングリコール等)、非イオン性界面活性剤(ポリソルベート80(TM)、HCO-50等)が併用され得る。

[0332] 油性液としてはゴマ油、大豆油が挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル及び/またはベンジルアルコールも併用され得る。また、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液及び酢酸ナトリウム緩衝液)、無痛化剤(例えば、塩酸プロカイン)、安定剤(例えば、ベンジルアルコール及びフェノール)、酸化防止剤と配合され得る。調製された注射液は通常、適切なアンプルに充填される。

[0333] 本発明の医薬組成物は、好ましくは非経口投与により投与される。例えば、注射剤型、経鼻投与剤型、経肺投与剤型、経皮投与型の組成物が投与される。例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などにより全身または局部的に投与され得る。

[0334] 投与方法は、患者の年齢、症状により適宜選択され得る。抗原結合分子を含有する医薬組成物の投与量は、例えば、一回につき体重1 kgあたり0.0001 mgから1000 mgの範囲に設定され得る。または、例えば、患者あたり0.001~100000 mgの投与量が設定され得るが、本発明はこれらの数値に必ずしも制限されるものではない。投与量及び投与方法は、患者の体重、年齢、症状などにより変動するが、当業者であればそれらの条件を考慮し適当な投与量及び投与方法を設定することが可能である。

[0335] また本発明は、少なくとも本発明の抗原結合分子を含む、本発明の方法に用いるためのキットを提供する。該キットには、その他、薬学的に許容される担体、媒体、使用方法を記載した指示書等をパッケージしておくこともできる。

[0336] また本発明は、本発明の抗原結合分子もしくは本発明の製造方法により製造された抗原結合分子を有効成分として含有する、血漿中の二以上の抗原結合単位および二以上の抗原結合分子を含む複合体の血漿から消失させるための薬剤に関する。

[0337] また本発明は、本発明の抗原結合分子もしくは本発明の製造方法により製

造された抗原結合分子を対象（患者、被験者、等）へ投与する工程を含む、疾患の治療方法に関する。疾患の非限定な一例として、癌、または炎症性疾患が挙げられる。

[0338] また本発明は、本発明の抗原結合分子もしくは本発明の製造方法により製造された抗原結合分子の、血漿中の二以上の抗原結合単位および二以上の抗原結合分子を含む複合体の血漿から消失させるための薬剤の製造における使用に関する。

[0339] また本発明は、本発明の抗原結合分子もしくは本発明の製造方法により製造された抗原結合分子の、血漿中の二以上の抗原結合単位および二以上の抗原結合分子を含む複合体の血漿から消失させるための使用に関する。

[0340] また本発明は、本発明の方法に使用するための、本発明の抗原結合分子または本発明の製造方法により製造された抗原結合分子に関する。

[0341] なお、本発明で記載されているアミノ酸配列に含まれるアミノ酸は翻訳後に修飾（例えば、N末端のグルタミンのピログルタミル化によるピログルタミン酸への修飾は当業者によく知られた修飾である）を受ける場合もあるが、そのようにアミノ酸が翻訳後修飾された場合であっても当然のことながら本発明で記載されているアミノ酸配列に含まれる。

[0342] なお本明細書において引用されたすべての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

[0343] 以下本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

実施例

[0344] [実施例1] pH中性域の条件下でのマウスFc γ Rに対する結合活性が天然型ヒトIgGのFc領域の結合活性より高い抗原結合分子の作製

(1-1) pH依存的ヒトIL-6レセプター結合抗体について

W02009/125825に記載されているH54-IgG1（配列番号：36）とL28-CK（配列番号：37）からなるH54/L28-IgG1はヒト化抗IL-6レセプター抗体であり、VH3-IgG1（配列番号：38）とVL3-CK（配列番号：39）からなるFv4-IgG

1は、H54/L28-IgG1に対して可溶性ヒトIL-6レセプターへpH依存的に結合する特性（pH7.4において結合し、pH5.8において解離する）を付与したヒト化抗IL-6レセプター抗体である。W02009/125825に記載されているマウスのin vivo試験において、H54/L28-IgG1と抗原である可溶性ヒトIL-6レセプターの混合物を投与した群と比較して、Fv4-IgG1と抗原である可溶性ヒトIL-6レセプターの混合物を投与した群において、可溶性ヒトIL-6レセプターが血漿中からの消失が大幅に加速されることが示された。

[0345] 可溶性ヒトIL-6レセプターに結合する抗体であるH54/L28-IgG1に結合した可溶性ヒトIL-6レセプターは、抗体とともにFcRnによって血漿中にリサイクルされるのに対して、pH依存的に可溶性ヒトIL-6レセプターに結合する抗体であるFv4-IgG1は、エンドソーム内の酸性条件下において抗体に結合した可溶性ヒトIL-6レセプターを解離する。解離した可溶性ヒトIL-6レセプターはライソソームによって分解されるため、可溶性ヒトIL-6レセプターの消失を大幅に加速することが可能となり、さらにpH依存的に可溶性ヒトIL-6レセプターに結合する抗体であるFv4-IgG1はエンドソーム内でFcRnに結合した後に血漿中にリサイクルされる。リサイクルされた当該抗体は再び可溶性ヒトIL-6レセプターに結合することができるため、抗原（可溶性ヒトIL-6レセプター）に対する結合とFcRnによる血漿中でのリサイクルが繰り返される。その結果、ひとつの抗体分子が複数回繰り返し可溶性ヒトIL-6レセプターに結合することが可能となると考えられる（図1）。

[0346] (1-2) マウスFc γ Rに対する結合が増強されている抗ヒトIL-6レセプター抗体およびマウスFc γ Rに対する結合を有しない抗ヒトIL-6レセプター抗体の作製

マウスFc γ Rへの結合が増強された抗原結合分子として、VH3-IgG1のEUナンバリングで表される326位のLysがAspに置換され、EUナンバリングで表される328位のLeuがTyrに置換されたVH3-IgG1-F1022（配列番号：40）が作製された。参考実施例1の方法を用いて、VH3-IgG1-F1022を重鎖として含み、VL3-Ckを軽鎖として含む、Fv4-IgG1-F1022が作製された。

[0347] 一方、マウスFc γ Rに対する結合を有しない抗原結合分子として、VH3-IgG1のEUナンバリングで表される235位のLeuがArgに置換され、239位のSerがLysに置換されたVH3-IgG1-F760（配列番号：41）が作製された。参考実施例1の方法を用いて、VH3-IgG1-F760を重鎖として含み、VL3-CKを軽鎖として含む、Fv4-IgG1-F760が作製された。

[0348] （1-3）マウスFc γ Rに対する結合活性の確認

VH3-IgG1、VH3-IgG1-F1022およびVH3-IgG1-F760を重鎖として含み、L（WT）-CK（配列番号：42）を軽鎖として含むVH3/L（WT）-IgG1、VH3/L（WT）-IgG1-F1022およびVH3/L（WT）-IgG1-F760が参考実施例1の方法で作製された。以下のように、これらの抗体のマウスFc γ Rに対する結合が速度論的に解析された。

[0349] （1-4）マウスFc γ Rに対する結合の速度論的解析

Biacore T100 又はT200（GE Healthcare）を用いて、マウスFc γ RI、Fc γ R IIb、Fc γ R III、Fc γ R IV（R&D systems、Sino Biologicalまたは参考実施例2に記載の方法により調製）（以下、マウスFc γ Rs）と抗体との結合が速度論的に解析された。アミンカップリング法によってSensor chip CM4（GE Healthcare）上に適切な量が固定化されたprotein L（ACTIGENまたはBioVision）に、目的の抗体をキャプチャーさせた。次に、マウスFc γ Rsの希釈液とブランクであるランニングバッファをインジェクトすることによって、センサーチップ上にキャプチャーさせた抗体にマウスFc γ Rsを相互作用させた。ランニングバッファとしては20 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05%（w/v）Tween20、pH7.4が用いられ、マウスFc γ Rsの希釈に際してもこのバッファが使用された。センサーチップの再生には10 mmol/L Glycine-HCl、pH1.5が用いられた。測定は全て25°Cで実施された。測定で得られたセンサーグラムから、カイネティクスパラメーターである結合速度定数 k_a （1/Ms）、および解離速度定数 k_d （1/s）が算出された。これらの値をもとに各抗体のヒトFc γ Rに対するKD（M）が算出された。各パラメーターの算出にはBiacore T100 又はT200 Evaluation Software（GE Healthcare）が用いられた。

[0350] その結果、表6に示される測定結果が得られた。VH3/L (WT)-IgG1-F1022は、VH3/L (WT)-IgG1に比較してmFc γ R I、mFc γ R IIおよびmFc γ R IIIに対する結合活性が増強されていることが示された。一方、VH3/L (WT)-IgG1-F760は各種マウスFc γ Rに対する結合が検出されなかったことから、VH3/L (WT)-IgG1-F760は各種マウスFc γ Rに対する結合活性が欠損していることが示された。なお、表中では、VH3/L (WT)-IgG1はIgG1、VH3/L (WT)-IgG1-F1022はF1022、VH3/L (WT)-IgG1-F760はF760と表記した。

[0351] [表6]

改変体名	KD (M)			
	mFc γ RI	mFc γ R II	mFc γ R III	mFc γ R IV
IgG1	5.3E-08	9.8E-07	2.4E-06	8.6E-08
F1022	7.6E-09	1.0E-08	5.5E-09	1.4E-07
F760	検出せず	検出せず	検出せず	検出せず

[0352] (1-5) 低フコース型抗体の作製

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

[0353] [実施例2] Fc γ Rに対する結合活性が天然型ヒトIgGのFc領域の結合活性より高い抗原結合分子の血漿中からの抗原消失効果

(2-1) H54/L28-IgG1およびFv4-IgG1の血漿中からの抗原消失効果

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

験が下記の方法で実施された。

[0354] (2-1-1) ヒトFcRnトランスジェニックマウスを用いたin vivo infusion試験

ヒトFcRnトランスジェニックマウス (B6.mFcRn^{-/-}.hFcRn Tg Line 32 +/+ mouse、Jackson Laboratories、Methods Mol Biol. (2010) 602, 93-104) の背部皮下に可溶性ヒトIL-6レセプターが充填されたinfusion pump (MINI-OSMOTIC PUMP MODEL2004、alzet) を埋め込むことで、血漿中可溶性ヒトIL-6レセプター濃度が定常状態に維持される動物モデルが作製された。その動物モデルに対して投与された抗ヒトIL-6レセプター抗体の投与後の体内動態が評価された。可溶性ヒトIL-6レセプターに対する中和抗体の産生を抑制するため、(公知の方法で取得された) monoclonal anti-mouse CD4 antibodyが尾静脈に20 mg/kgで単回投与された。その後、92.8 μg/mLの可溶性ヒトIL-6レセプターが充填されたinfusion pumpがマウス背部皮下へ埋め込まれた。Infusion pumpが埋め込まれた3日後に、抗ヒトIL-6レセプター抗体が1 mg/kgで尾静脈に単回投与された。抗ヒトIL-6レセプター抗体投与後15分、7時間、1日、2日、4日、7日が経過した後に当該マウスから採血された。採取された血液を直ちに4°C、15,000 rpmで15分間遠心分離することによって、血漿が得られた。分離された血漿は、測定を実施するまで-20°C以下に設定された冷凍庫に保存された。

[0355] (2-1-2) 電気化学発光法による血漿中hsIL-6R可溶性ヒトIL-6レセプター濃度測定

マウスの血漿中hsIL-6R可溶性ヒトIL-6レセプター濃度は電気化学発光法にて測定された。2000、1000、500、250、125、62.5、31.25 pg/mLに調製されたhsIL-6R可溶性ヒトIL-6レセプター検量線試料および50倍以上希釈されたマウス血漿測定試料を、SULFO-TAG NHS Ester (Meso Scale Discovery) でルテニウム化したMonoclonal Anti-human IL-6R Antibody (R&D) およびBiotinylated Anti-human IL-6 R Antibody (R&D) およびTocilizumabと混合することによって37°Cで1晩反応させた。Tocilizumabの終濃度は333 μg/mLとなるよ

うに調製された。その後、反応液がMA400 PR Streptavidin Plate (Meso Scale Discovery) に分注された。さらに室温で1時間反応させた反応液を洗浄後、Read Buffer T (×4) (Meso Scale Discovery) が分注された。その後ただちにSECTOR PR 400 reader (Meso Scale Discovery) で測定が行われた。hsIL-6R可溶性ヒトIL-6レセプター濃度は検量線のレスポンスから解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて算出された。

[0356] 測定されたヒトIL-6レセプター濃度推移を図2に示した。H54/L28-IgG1と比較して、ヒトIL-6レセプターに対してpH依存的に結合するFv4-IgG1はヒトIL-6レセプター濃度を低下させるすることができたが、ヒトIL-6レセプター濃度を抗体非投与時のベースラインより低下させることができなかった。すなわち、抗原に対してpH依存的に結合する抗体は、抗体投与によって血漿中の抗原濃度を抗体投与前よりも低下させることはできなかった。

[0357] (2-2) Fc γ Rに対する結合活性を増強あるいは低下させた抗体の血漿中からの抗原消失効果

pH依存的ヒトIL-6レセプター結合抗体であるFv4-IgG1に対して、Fc γ Rに対する結合活性を増強あるいは低下させることにより、ヒトIL-6レセプター濃度推移に与える影響が、下記の方法で評価された。実施例1において作製されたFv4-IgG1、Fv4-IgG1-F760、Fv4-IgG1-F1022、Fv4-IgG1-Fucを用いたin vivo infusion試験が下記の方法で実施された。

[0358] (2-2-1) ヒトFcRnトランスジェニックマウスを用いたin vivo infusion試験

ヒトFcRnトランスジェニックマウス (B6.mFcRn^{-/-}.hFcRn Tg Line 32 +/+ mouse、Jackson Laboratories、Methods Mol Biol. (2010), 602, 93-104) の背部皮下に可溶性ヒトIL-6レセプターを充填したinfusion pump (MINI-OSMOTIC PUMP MODEL2004、alzet) を埋め込むことで、血漿中可溶性ヒトIL-6レセプター濃度が定常状態に維持される動物モデルが作製された。その動物モデルに対してヒト免疫グロブリン製剤サングロポール (CSLベーリング株式会社) と同時に投与された抗ヒトIL-6レセプター抗体の投与後の可溶性ヒトIL-

6レセプターの体内動態が評価された。可溶性ヒトIL-6レセプターに対する中和抗体の産生を抑制するため、(公知の方法で取得された) monoclonal anti-mouse CD4 antibodyが尾静脈に20 mg/kgで単回投与された。その後、92.8 μ g/mLの可溶性ヒトIL-6レセプターが充填されたinfusion pumpがマウス背部皮下へ埋め込まれた。Infusion pumpが埋め込まれた3日後に、抗ヒトIL-6レセプター抗体が1 mg/kgで、サングロポールが1000 mg/kgで尾静脈に単回投与された。抗ヒトIL-6レセプター抗体投与後15分、7時間、1日、2日、4日、7日、14日、21日が経過した後に当該マウスから採血された。抗ヒトIL-6レセプター抗体投与後15分、7時間、1日、2日、3日、7日、14日、21日が経過した後に当該マウスから採血された。採取された血液を直ちに4°C、15,000 rpmで15分間遠心分離することによって、血漿が得られた。分離された血漿は、測定を実施するまで-20°C以下に設定された冷凍庫に保存された。

[0359] (2-2-2) 電気化学発光法による血漿中可溶性ヒトIL-6レセプター (hsIL-6R) 濃度測定

(2-1-2) に記載された方法と同様に、マウスの血漿中hsIL-6R可溶性ヒトIL-6レセプター濃度は電気化学発光法にて測定された。

[0360] その結果を図3に示した。Fv4-IgG1のマウスFc γ Rへの結合を欠損させたFv4-IgG1-F760が投与されたマウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度推移はFv4-IgG1が投与されたマウスのそれと同等であることが確認された。膜型抗原に対する細胞傷害活性はFc γ Rに対する結合に依存していることから、Fc γ Rに対する結合を欠損させると細胞傷害活性は無くなることが知られている。一方、可溶性抗原であるヒトIL-6レセプターに対する抗体のマウスFc γ Rに対する結合を欠損させた抗体を投与しても投与されたマウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度の推移に影響が無かったことから、可溶性抗原に対する抗体が投与されたマウスの血漿中の抗原濃度の推移に対しては抗体のFc γ Rに対する結合の寄与が無いとも考えられた。

[0361] しかし、驚くべきことに、マウスFc γ Rに対する結合が増強されているFv4-IgG1-F1022が投与されたマウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度は、Fv4-I

gG1が投与されたマウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度と比較して大幅に低下しており、その低下の程度は、抗体非投与時のヒトIL-6レセプター濃度であるベースラインよりも低下していることが確認された。特に、Fv4-IgG1-F1022が投与されてから3日後の、投与されたマウスの血漿中ヒトIL-6レセプター濃度は、Fv4-IgG1が投与された場合のそれと比較して、約100分の1にまで低下した。このことから、pH依存的にヒトIL-6レセプターに結合し、更にFc γ Rに対する結合が増強されている抗体を投与することにより、投与されたマウスの血漿中ヒトIL-6レセプター濃度が大幅に低下し、その低下の程度は血漿中の抗原濃度を抗体投与前よりも低下させることが可能であることが示された。

[0362] また、低フコース型の糖鎖を有しマウスFc γ R IVに対する結合活性が増強されているFv4-IgG1-Fucが投与されたマウスの血漿中ヒトIL-6レセプター濃度も、Fv4-IgG1が投与されたマウスのそれと比較して低下させることが示された。特に、Fv4-IgG1-Fucが投与されてから7日後の、投与されたマウスの血漿中のヒトIL-6レセプター濃度は、Fv4-IgG1が投与された場合のそれと比較して、約2分の1にまで低下した。このことから、pH依存的にヒトIL-6レセプターに結合し、更にFc γ Rに対する結合が増強されたpH依存的抗原結合分子を投与することにより、投与されたマウスの血漿中の可溶性抗原の濃度を低下させることが可能であるが、Fc γ Rに対する結合を増強するための方法としては、アミノ酸改変を導入することには特に限定されず、例えばEUナンバリング297位に結合した糖鎖が低フコース型糖鎖であるヒトIgGのFc領域を用いることによっても、達成可能であることが示された。しかしながら、抗原濃度を低下させる効果としては、Fv4-F1022と比べてFv4-IgG1-Fucは小さいことが明らかとなった。このことは、複数存在するFc γ R（マウスにおいては、Fc γ RI, II, III, IV）のうち、Fv4-IgG1-Fucにおいて結合が増強されるmFc γ IVは、Fc γ Rとして抗原濃度を低下させる寄与が大きくないとも考えられた。

[0363] このように、pH依存的に可溶性抗原に結合する抗体の、Fc γ Rに対する結合を増強させた抗体を投与することにより、投与された個体中に存在する可溶

型抗原の血漿中濃度を大幅に低下させることが可能であることが見出された。

[0364] 特定の理論に拘束されるものではないが、Fc γ Rへの結合が増強されたpH等のイオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメイン、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメインを含む抗原結合分子の投与によって観察された予想外の血漿中可溶性抗原濃度の低下は、以下のように説明することも可能である。

[0365] 非特異的に細胞内へと取り込まれたIgG抗体は、エンドソーム内の酸性条件下においてエンドソーム内のFcRnに結合することで細胞表面上に戻り、血漿中の中性条件下においてFcRnから解離する。ここで、血漿中において可溶性抗原が一定濃度に維持されたマウスに、可溶性抗原に結合することでその機能を中和する抗体が投与された場合、血漿中の可溶性抗原は投与された抗体との複合体を形成する。当該複合体を形成した状態で細胞内へと取り込まれた可溶性抗原は、抗体のFc領域がエンドソーム内の酸性条件下においてエンドソーム内のFcRnに結合するため、抗体に結合した状態で抗体と共に血漿中へとリサイクルされると考えられる。

[0366] 一方、可溶性抗原に対する抗体がpH依存的に抗原に結合する抗体（すなわち、エンドソーム内の酸性条件下において可溶性抗原を解離する抗体）である場合には、抗体と複合体を形成した状態で非特異的に細胞内へと取り込まれた可溶性抗原は、エンドソーム内において抗体から解離し、細胞内リソゾーム内で分解され血漿中へはリサイクルされない。つまり、可溶性抗原と複合体を形成した状態で細胞内へと取り込まれたFv4-IgG1は、エンドソーム内において可溶性抗原を解離し、その消失を速めることが可能であると考えられる。

[0367] 前記のように、Fv4-IgG1等のイオン濃度の条件によって抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子は、複数回繰り返し抗原に結合することが可能になると考えられるが、エンドソーム内において可溶性抗原を解離し、その血漿中からの消失を早める効果は、抗原と抗原結合

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

[0368] 膜型抗原に結合する抗体のFc γ Rに対する結合活性は当該抗体の細胞傷害活性に重要な役割を果たしている。そのため、医薬として用いられる抗体に細胞傷害活性が必要な場合、Fc γ Rに対する結合活性が高いヒトIgG1のアイソタイプが用いられ、さらに当該抗体のFc γ Rに対する結合活性を増強することにより当該抗体の細胞傷害活性が増強される技術は広く用いられている。

[0369] 一方、医薬として用いられ、可溶性抗原に結合する抗体のFc γ Rに対する結合活性の果たす役割はこれまで知られておらず、Fc γ Rに対する結合活性が高いヒトIgG1とFc γ Rに対する結合活性が低いヒトIgG2やヒトIgG4のFc γ Rに対する結合活性の相違が、当該抗体が投与された生体に与える効果の違いはこれまでに十分に検討されてきていなかった。実際、本実施例においても、Fc γ Rに対する結合活性を欠損させた抗体が投与された個体の血漿中での、可溶性抗原の濃度推移に影響が無いことが確認された。一方、本発明において、Fc γ Rに対する結合活性が増強され、イオン濃度の条件によって可溶性抗原に対する結合活性が変化する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子が投与された個体の血漿中における可溶性抗原の濃度が大幅に低下したことが見出された。すなわち、可溶性抗原を標的とした抗原結合分子に含まれる、pH酸性域の条件下でFcRnに対する結合活性を有するFcRn結合ドメインとイオン濃度の

条件によって可溶性抗原に対する結合が変化する抗原結合ドメインが組み合わされることによって、Fc γ Rに対する結合を増強させる利点が初めて見出されたといえる。

[0370] [実施例3] Fc γ Rに対する結合活性が天然型ヒトIgGのFc領域の結合活性より高く、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性が増強された抗原結合分子の血漿中からの抗原消失効果

[0371] (3-1) Fc γ Rに対する結合活性が天然型ヒトIgGのFc領域の結合活性より高く、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性が増強された抗原結合分子の作製

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

[0372] pH酸性域の条件下におけるヒトFcRnに対する結合活性を向上させることで血漿中滞留性を改善するためのアミノ酸改変の一例として、IgG抗体のEUナンバリングで表される428位のMetをLeuに置換し、434位のAsnをSerに置換する方法 (Nat. Biotechnol, (2010) 28, 157-159)、434位のAsnをAlaに置換する方法 (Drug. Metab. Dispos. (2010) 38 (4), 600-605)、252位のMetをTyrに置換し、254位のSerをThrに置換し、256位のThrをGluに置換する方法 (J. Biol. Chem. (2006) 281, 23514-23524)、250位のThrをGlnに置換し、428位のMetをLeuに置換する方法 (J. Immunol. (2006) 176 (1) 346-356)、434位のAsnをHisに置換する方法 (Clin. Pharm. & Ther. (2011) 89 (2) 283-290.)、ならびにW02010/106180、W02010/045193、W02009/058492、W02008/022152、W02006/050166、W02006/053301、W02006/031370、W02005/123780、W02005/047327、W02005/037867、W02004/035752、W02002/060919など数多くが報告されている。

[0373] 実施例2において、その投与によって可溶性抗原の血漿中濃度を顕著に低

下させる効果が示されたFv4-IgG1-F1022の薬物動態を向上させる目的で、VH3-IgG1-F1022のEUナンバリングで表される428位のMetがLeuに置換され、434位のAsnがSerに置換されたVH3-IgG1-F1093（配列番号：43）が作製された。参考実施例1の方法を用いて、VH3-IgG1-F1093を重鎖として含み、VL3-CKを軽鎖として含む、Fv4-IgG1-F1093が作製された。

[0374] （3-2）Fc γ Rに対する結合活性が天然型ヒトIgGのFc領域の結合活性より高く、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性が増強された抗原結合分子の血漿中からの抗原消失効果

血漿中可溶性ヒトIL-6レセプター濃度が定常状態に維持されたヒトFcRnトランスジェニックマウスを用いて、実施例（2-1-1）の方法と同様に、Fv4-IgG1-F1093のin vivo infusion試験が行われた。当該マウスの血漿中の可溶性ヒトIL-6レセプター濃度は、実施例（2-1-2）の方法で測定された。その結果を図4に示した。

[0375] （3-2-1）ELISA法による血漿中抗ヒトIL-6レセプター抗体濃度の測定

マウス血漿中の抗ヒトIL-6レセプター抗体濃度はELISA法にて測定された。まず、Anti-Human IgG (γ -chain specific) F(ab')₂ Fragment of Antibody (SIGMA) をNunc-Immuno Plate, MaxiSoup (Nalge nunc International) に分注し、4°Cで1晩静置することによってAnti-Human IgG固相化プレートが作成された。血漿中濃度として0.8、0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125 μ g/mLの抗ヒトIL-6レセプター抗体を含む検量線試料と100倍以上希釈されたマウス血漿測定試料が調製された。これらの検量線試料および血漿測定試料100 μ Lに20 ng/mLの可溶性ヒトIL-6レセプターが200 μ L加えられた混合液を、室温で1時間静置させた。その後当該混合液が各ウェルに分注されたAnti-Human IgG固相化プレートをさらに室温で1時間静置させた。その後Biotinylated Anti-human IL-6 R Antibody (R&D) と室温で1時間反応させ、さらにStreptavidin-PolyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies) を室温で1時間反応させた反応液の発色反応が、TMB One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories) を基質として用いて行われた。1N-Sulfuric acid (S

howa Chemical) を添加することによって反応が停止された各ウェルの反応液の450 nmの吸光度が、マイクロプレートリーダーにて測定された。マウス血漿中の抗体濃度は検量線の吸光度から解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて算出された。

[0376] その結果を図5に示した。

[0377] (3-3) pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性を増強することによる薬物動態の改善

図5に示されたとおり、Fv4-IgG1のpH中性域の条件下におけるFc γ Rへの結合活性が増強されたFv4-IgG1-F1022が投与された群では、Fv4-IgG1が投与された群に比べて、投与された抗体の血漿中滞留性が低下することが確認された。一方、Fv4-IgG1-F1022のpH酸性域の条件下におけるヒトFcRnへの結合活性が増強されたFv4-IgG1-F1093が投与された群では、Fv4-IgG1-F1022が投与された群に比べて投与された抗体の血漿中滞留性が大幅に改善されたことが確認された。

[0378] 更に、図4に示すとおり、血漿中の可溶性ヒトIL-6レセプター濃度は、Fv4-IgG1-F1022の投与群とFv4-IgG1-F1093の投与群ではいずれも抗体投与後3日目までは同等の推移を示した。投与後3日目においては、Fv4-IgG1の投与群と比較して、Fv4-IgG1-F1022およびFv4-IgG1-F1093のいずれの投与群でも血漿中の可溶性ヒトIL-6レセプター濃度の約100倍もの顕著な濃度低下が見られた。しかし、抗体投与後7日目においてはFv4-IgG1-F1022投与群における血漿中の可溶性ヒトIL-6レセプター濃度は投与後3日目に比べて上昇する様子が観察されたが、一方でFv4-IgG1-F1093投与群においては血漿中の可溶性ヒトIL-6レセプター濃度の上昇が観察されず、本投与群では可溶性ヒトIL-6レセプター濃度を低下させる効果が持続していることが示された。

[0379] すなわち、Fv4-IgG1-F1093の投与は、投与された個体の血漿中の可溶性ヒトIL-6レセプター濃度をFv4-IgG1に比べて約100分の1にまで低下させ、更にその状態を長期間維持することが出来る、非常に優れた抗原結合分子であることが示された。特定の理論に拘束されるものではないが、ここでみられた

現象は、以下のように説明することも可能である。Fv4-IgG1のpH中性域の条件下におけるFc γ Rに対する結合活性が増強されたFv4-IgG1-F1022は、主に細胞膜上にFc γ Rを発現している細胞に多くの量に取り込まれると考えられる。取り込まれてエンドソームへと移行した抗体は、エンドソーム内でFcRnに結合することにより血漿中へとリサイクルされる。エンドソーム内の酸性pHの条件下において、抗体のFcRnに対する結合活性が十分ではない場合には、エンドソームに取り込まれた抗体は十分にリサイクルされることが出来ないと考えられる。すなわち、Fv4-IgG1-F1022がFv4-IgG1に比べて血漿中滞留性が低下した理由として、エンドソーム内に取り込まれた抗体がFcRnへの結合を介して十分に血漿中にリサイクルされるほどにはpH酸性域の条件下におけるFcRnに対する結合活性が十分でないために、リサイクルされなかった抗体がライソソームにおいて分解を受けたためだとも考えられる。

[0380] 一方、Fv4-IgG1-F1022のpH酸性域の条件下におけるヒトFcRnに対する結合活性を増強したFv4-IgG1-F1093は、Fv4-IgG1-F1022と同様に、主に細胞膜上にFc γ Rを発現している細胞に多くの量に取り込まれると考えられる。取り込まれてエンドソームへと移行した抗体は、エンドソーム内でFcRnに結合することにより血漿中へとリサイクルされるが、Fv4-IgG1-F1093はpH酸性域の条件下におけるヒトFcRnに対する結合活性が増強されているために、エンドソーム内でのFcRnに対する十分な結合活性を有すると考えられる。そのため、Fv4-IgG1-F1093は細胞内に取り込まれた後も、その多くが血漿中へとリサイクルされる。そのためFv4-IgG1-F1022に比べてFv4-IgG1-F1093は投与された個体の血漿中での滞留性が向上したとも考えられる。

[0381] 一方、pH酸性域の条件下において、FcRnに対する結合活性を向上させることで通常の抗体の血漿中滞留性が向上することはこれまでも知られていた。しかしながら、抗体の血漿中滞留性が向上すると、抗体に結合した抗原の血漿中滞留性も向上するため、その分、抗原の血漿中濃度も高くなると考えられた。実際、W02010/088444に記載されているように、IL-6に対するヒトIgG1抗体であるAntibody 18に対して、pH酸性域の条件下においてFcRnに対する結

合活性を向上させるYTE改変を導入したAntibody 18Eは、カニクイザルにおいて、抗体の血漿中滞留性が向上したが、同時に抗原であるIL-6の血漿中濃度も高くなっている。

[0382] しかしながら、驚くべきことに、抗原に対してpH依存的に結合し、Fc γ Rに対する結合活性を増強したFv4-F1022に対して、YTE改変と同様のpH酸性域の条件下においてFcRnに対する結合活性を向上させる改変が導入されたFv4-IgG1-F1093が投与された場合、投与された個体において大幅に抗体の血漿中滞留性が向上したにもかかわらず、当該個体において抗原である可溶性ヒトIL-6レセプター濃度を高くなることはなく、むしろ、抗体投与7日目においては、Fv4-IgG1-F1093が投与された個体のほうがFv4-F1022が投与された個体よりも可溶性ヒトIL-6レセプター濃度が低く維持されていた。

[0383] 特定の理論に拘束されるものではないが、ここでみられた現象は、以下のように説明することも可能である。抗原に対してpH依存的な結合を示さない抗体が生体に投与された後、当該抗体は非特異的に細胞内に取り込まれ、当該抗体に結合したままの抗原は、抗体と同じ程度血漿中にリサイクルされる。一方、pH酸性域の条件下においてFcRnに対する結合活性が増強された抗体は、投与された生体の血漿中にリサイクルされる程度がFcRnに対する結合活性が増強されていない抗体よりも上がるため、当該抗原に結合したままの抗原の当該生体の血漿中にリサイクルされる程度も上がることになる。そのため、投与される抗体の、投与された生体の血漿中滞留性が向上することで当該抗体が結合する抗原の当該生体の血漿中濃度も上昇してしまうとも考えられる。

[0384] 一方、抗原に対してpH依存的に結合し、Fc γ Rに対する結合活性が増強した抗体が生体に投与されたときは、当該抗体は主に細胞膜上にFc γ Rを発現している細胞に取り込まれることによってその血漿中滞留性が悪化する。一方、当該抗体に結合した抗原も当該細胞に取り込まれた後に、エンドソーム内で当該抗体から解離した後にライソソームにおいて分解されることによって、当該生体の血漿中の抗原濃度も低下する。pH酸性域の条件下においてFcRnに

対する結合活性を向上させた場合、Fc γ Rに対する結合活性を増強させることで悪化した抗体の血漿中滞留性は、FcRnによるリサイクル率が上がることで改善する。ここで、抗原に対してpH依存的に結合する抗体に結合した抗原はエンドソーム内で当該抗体から解離し、そのままライソソームで分解されるため、抗原の血漿中濃度が上昇することはないと考えられる。さらに生体に投与された抗体の血漿中滞留性が向上することにより、当該抗体の抗原消失効果が持続し、より長く、抗原濃度を低濃度で維持することが可能であると考えられる。

[0385] 以上のことから、Fc γ Rに対する結合活性が天然型ヒトIgGのFc領域の結合活性より高い抗原結合分子の、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性が増強した抗体が投与された生体では、投与された抗体の血漿中滞留性が向上していることが示された。また、この場合において抗体の血漿中滞留性が向上しても、抗原消失効果は減弱しないことが示された。

[0386] [実施例4] Fc γ Rに対する結合活性が天然型ヒトIgGのFc領域の結合活性より高く、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性が増強された抗原結合分子の血漿中からの抗原消失効果についての更なる検証

(4-1) Fc γ Rに対する結合活性を増強した抗体の抗原消失効果

実施例2において、マウスFc γ Rに対する結合が増強されたFv4-IgG1-F1022が投与された群では、血漿中の抗原濃度が大幅に低下したことが示された。また、実施例3において、Fv4-IgG1-F1022の投与群での血漿中滞留性の低下は、Fv4-IgG1-F1022のpH酸性域の条件下におけるヒトFcRnへの結合活性を増強することにより、大幅に改善することが示された。次に、マウスFc γ Rに対する結合を増強することによる血漿中可溶性抗原の消失効果と、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRnへの結合活性を増強することによる抗体の血漿中滞留性の向上効果が、更に以下のように検証された。

[0387] (4-2) マウスFc γ Rに対する結合が増強されている抗ヒトIL-6レセプター抗体の作製

マウスFc γ Rへの結合が増強された抗原結合分子として、VH3-IgG1のEUナン

バリリングで表される326位のLysがAspに置換されたVH3-IgG1-F1087（配列番号：44）およびVH3-IgG1のEUナンバリリングで表される239位のSerがAspに置換され、332位のIleがGluに置換されたVH3-IgG1-F1182（配列番号：45）が作製された。参考実施例1の方法を用いて、VH3-IgG1-F1087を重鎖として含み、VL3-CKを軽鎖として含むFv4-IgG1-F1087および、VH3-IgG1-F1182を重鎖として含み、VL3-CKを軽鎖として含む、Fv4-IgG1-F1182が作製された。

[0388] (4-3) マウスFc γ Rに対する結合活性の確認

VH3-IgG1-F1087およびVH3-IgG1-F1182を重鎖として含み、L (WT)-CK（配列番号：42）を軽鎖として含むVH3/L (WT)-IgG1-F1087およびVH3/L (WT)-IgG1-F1182が参考実施例1の方法で作製された。これらの抗体およびVH3/L (WT)-IgG1-F1022、VH3/L (WT)-IgG1のマウスFc γ Rに対する結合活性が、参考実施例2の方法で評価された。その結果を表7に示した。また、それぞれの改変体のマウスFc γ Rに対する結合活性が、改変を加える前のIgG1と比較して何倍増強しているかを表8に示した。なお、表中では、VH3/L (WT)-IgG1はIgG1、VH3/L (WT)-IgG1-F1022はF1022、VH3/L (WT)-IgG1-F1087はF1087、VH3/L (WT)-IgG1-F1182はF1182と表記した。

[0389] [表7]

改変体名	KD (M)			
	mFc γ RI	mFc γ RIIb	mFc γ RIII	mFc γ RIV
IgG1	5.3E-08	9.8E-07	2.4E-06	8.6E-08
F1022	7.6E-09	1.0E-08	5.5E-09	1.4E-07
F1087	2.9E-08	5.6E-08	5.2E-08	3.3E-07
F1182	2.4E-09	1.1E-07	4.8E-07	5.3E-10

[0390] [表8]

改変体名	IgG1 に対する結合比			
	mFc γ RI	mFc γ RIIb	mFc γ RIII	mFc γ RIV
IgG1	1.0	1.0	1.0	1.0
F1022	7.0	93.6	440.5	0.6
F1087	1.8	17.5	46.2	0.3
F1182	22.1	9.1	5.0	162.3

[0391] 表8に示すように、F1087およびF1022は、マウスFc γ RI、マウスFc γ RIIbおよびマウスFc γ RIIIに対する結合活性がIgG1に比べて増強しているが、マウスFc γ RIVに対する結合活性は増強していないことが示された。また、F1087のマウスFc γ RI、マウスFc γ RIIb、マウスFc γ RIIIおよびマウスFc γ RIVに対する結合活性は、F1022のそれに比較すると、その増強の程度が弱いことが示された。一方、F1182のマウスFc γ RIおよびマウスFc γ RIVに対する結合活性が大幅に増強している一方で、そのFc γ RIIbおよびFc γ RIIIに対する結合活性はF1022およびF1087のそれに比較すると、その増強の程度は弱いことが示された。このように、これら3種類の改変体は、いずれかのマウスFc γ Rに対する結合増強効果を示したが、どのFc γ Rに対して選択的に結合活性が増強するのか、およびその増強の程度は、改変体によって異なっていることが示された。

[0392] (4-4) Fv4-IgG1-F1087およびFv4-IgG1-F1182の血漿中からの抗原消失効果

ヒトFcRnトランスジェニックマウスを用いたin vivo infusion試験が実施例2の方法と同様に実施され、当該マウスの血漿中の可溶性IL-6レセプターの濃度が測定された。その結果を図6に示した。

[0393] マウスFc γ Rに対する結合活性がFv4-IgG1に比べて増強しているFv4-IgG1-F1087およびFv4-IgG1-F1182が生体内に投与された群では、いずれも、Fv4-IgG1が投与された群に比べて生体中の血漿中可溶性ヒトIL-6レセプターの濃度を低下させることができた。血漿中可溶性ヒトIL-6レセプターの濃度を低下させる効果は、特にマウスFc γ RIIおよびマウスFc γ RIIIに対する結合が増強しているFv4-IgG1-F1087を投与した群において大きかった。一方で、マウスFc γ RIおよびマウスFc γ RIVに対する結合活性が大幅に向上している（マウスFc γ RIIおよびマウスFc γ RIIIに対する結合も数倍増強されている）F1182が生体内に投与された群では、F1182の投与による血漿中可溶性ヒトIL-6レセプターの濃度を低下させる効果が小さかった。これらの結果から、pH依存的抗原結合抗体の投与によりマウスの血漿中の抗原濃度を効率的に低下させるのに

より寄与するマウスFc γ Rは、マウスFc γ RIIおよび/またはマウスFc γ RIIIであると考えられた。すなわち、マウスFc γ RIIおよび/またはマウスFc γ RIIIへの結合が増強したpH依存的抗原結合抗体を生体内に投与することによって、より効率的に生体内の抗原の血漿中濃度を下げることが可能であると考えられた。

[0394] (4-5) Fc γ Rに対する結合活性が天然型ヒトIgGのFc領域の結合活性より高く、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性が増強された抗原結合分子の作製

実施例3において、マウスFc γ Rに対する結合活性が増強しているFv4-IgG1-F1022のpH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性を増強したFv4-IgG1-F1093が投与されたヒトFcRnトランスジェニックマウスにおいて、Fv4-IgG1-F1022が投与されたヒトFcRnトランスジェニックマウスと比較して、抗体の血漿中滞留性が大幅に向上することが示された。この効果が、Fv4-IgG1-F1087およびFv4-IgG1-F1182が投与されたヒトFcRnトランスジェニックマウスにおいても示されるかどうか、更には実施例3で検証された改変とは異なる改変が加えられpH酸性域の条件下におけるヒトFcRnに対する結合活性が増強している改変体が投与されたマウスにおいても同様の効果が示されるかどうか、以下のように検証された。

[0395] Fv4-IgG1-F1087およびFv4-IgG1-F1182のpH酸性域の条件下におけるヒトFcRnに対する結合活性を増強するために、それぞれの重鎖であるVH3-IgG1-F1087およびVH3-IgG1-F1182のEUナンバリングで表される428位のMetがLeuに置換され、434位のAsnがSerに置換されたVH3-IgG1-F1180（配列番号：46）およびVH3-IgG1-F1181（配列番号：47）が作製された。また、Fv4-IgG1-F1087のpH酸性域の条件下におけるヒトFcRnに対する結合活性を増強するために、重鎖であるVH3-IgG1-F1087のEUナンバリングで表される434位のAsnがAlaに置換されたVH3-IgG1-F1412（配列番号：48）が作製された。参考実施例1の方法を用いて、これらを重鎖として含み、VL3-CKを軽鎖として含む、Fv4-IgG1-F1180、Fv4-IgG1-F1181およびFv4-IgG1-F1412が作製された。

[0396] (4-6) pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性を増強することによる薬物動態の改善

ヒトFcRnトランスジェニックマウスにそれぞれFv4-IgG1-F1180、Fv4-IgG1-F1181およびFv4-IgG1-F1412を投与するin vivo infusion試験が実施例2の方法と同様に、実施され、当該マウス群の血漿中可溶性IL-6レセプターの濃度が測定された。Fv4-IgG1-F1087、Fv4-IgG1-F1180、Fv4-IgG1-F1412、Fv4-IgG1-F1181が投与されたマウス群の血漿中可溶性IL-6レセプター濃度の結果を図9に、Fv4-IgG1-F1182、Fv4-IgG1-F1181、Fv4-IgG1が投与されたマウスの血漿中可溶性IL-6レセプター濃度の結果を図10に示した。また、当該マウス群における血漿中抗体濃度が実施例3の方法で測定された。当該マウス群におけるFv4-IgG1-F1087、Fv4-IgG1-F1180、Fv4-IgG1-F1412、Fv4-IgG1の血漿中抗体濃度の結果を図7に、Fv4-IgG1-F1182、Fv4-IgG1-F1181、Fv4-IgG1の血漿中抗体濃度の結果を図8に示した。

[0397] Fv4-IgG1-F1182のpH酸性域におけるヒトFcRnへの結合活性を増強したFv4-IgG1-F1181が投与されたマウス群において、Fv4-IgG1-F1182が投与されたマウス群に比べて抗体の血漿中滞留性の向上が確認された。一方で、Fv4-IgG1-F1181が投与されたマウス群の血漿中可溶性IL-6レセプター濃度はFv4-IgG1-F1182が投与されたマウス群のそれと同等であり、Fv4-IgG1が投与されたマウス群に比べて血漿中可溶性IL-6レセプター濃度がいずれも低下していた。

[0398] 一方、Fv4-IgG1-F1087のpH酸性域におけるヒトFcRnへの結合活性を増強したFv4-IgG1-F1180およびFv4-IgG1-F1412が投与されたマウス群においては、Fv4-IgG1-F1087が投与されたマウス群に比較して抗体の血漿中滞留性が向上しており、驚くべきことにFv4-IgG1が投与されたマウス群の血漿中滞留性と同程度にまで改善していた。また、抗体の血漿中滞留性の改善に伴い、投与されたマウス群の血漿中可溶性IL-6レセプターの濃度の低減効果の持続性も改善されていた。すなわち、Fv4-IgG1-F1180およびFv4-IgG1-F1412の投与から14日後および21日後における、当該投与を受けたマウス群の血漿中可溶性IL-6レセプターの濃度は、Fv4-IgG1-F1087の投与から14日後および2

1日後のそれと比較して、有意に低下していた。

[0399] 以上のことから、Fc γ Rに対する結合活性が天然型ヒトIgGのFc領域の結合活性より高い抗原結合分子のpH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性が増強している抗体の投与により、当該投与を受けた生体の血漿中滞留性の向上が可能であることが、Fv4-IgG1-F1093、Fv4-IgG1-F1181、Fv4-IgG1-F1180およびFv4-IgG1-F1412の4例の抗体が投与されたマウス群において示された。さらに、抗原結合分子が投与された生体の血漿中滞留性が向上しても、当該生体における抗原消失効果は減弱することはなく、むしろ抗原消失効果を持続させることが可能であることが示された。

[0400] pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性を増強させるための改変としては、EUナンバリングで表される428位のMetをLeuに置換し、434位のAsnをSerに置換する方法に加え、EUナンバリングで表される434位のAsnをAlaに置換する方法によっても達成可能であることが示された。このことから、pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性を増強させるために用いられる改変としては特に限定されず、IgG抗体のEUナンバリングで表される428位のMetをLeuに置換し、434位のAsnをSerに置換する方法 (Nat. Biotechnol. (2010) 28, 157-159)、434位のAsnをAlaに置換する方法 (Drug Metab. Dispos. (2010) 38 (4) 600-605)、252位のMetをTyrに置換し、254位のSerをThrに置換し、256位のThrをGluに置換する方法 (J. Biol. Chem. (2006) 281, 23514-23524)、250位のThrをGlnに置換し、428位のMetをLeuに置換する方法 (J. Immunol. (2006) 176 (1), 346-356)、434位のAsnをHisに置換する方法 (Clin. Pharmacol. Ther. (2011) 89 (2) 283-290)、ならびにW02010/106180、W02010/045193、W02009/058492、W02008/022152、W02006/050166、W02006/053301、W02006/031370、W02005/123780、W02005/047327、W02005/037867、W02004/035752、W02002/060919などにおいて記載されるような改変も用いられる。

[0401] (4-7) pH酸性域の条件下におけるヒトFcRn結合活性を増強し、リウマチ因子への結合を抑制した抗原結合分子の作製

ヒト化抗CD4抗体のpH酸性域の条件下においてヒトFcRnに対する結合活性を

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

[0402] (4-6) で示されたように、pH酸性域の条件下においてヒトFcRnに対する結合活性を増強するための改変として、様々なものが報告されているが、これらの改変をFc領域の中のFcRn結合部位に導入することによって、当該部位を認識するリウマチ因子に対する結合性を増強する可能性がある。

[0403] しかしながら、pH酸性域の条件下においてFcRnに対する結合活性を低下させることなく、リウマチ因子に対する結合活性のみを低下させる改変を、Fc領域の当該部位に導入することにより、リウマチ因子に対する結合性を持たずにpH酸性域の条件下におけるヒトFcRnに対する結合活性が増強している抗原結合分子を作製することが可能である。

[0404] そのような、リウマチ因子に対する結合活性を低下させる改変として、EUナンバリングで表される248-257、305-314、342-352、380-386、388、414-421、423、425-437、439、441-444位の改変が用いられる。好ましくは、EUナンバリングで表される387、422、424、426、433、436、438、440位の改変が好ましく用いられる。特に好ましくは、EUナンバリングで表される422位のValをGluまたはSerに置換する改変、424位のSerをArgに置換する改変、433位のHisをAspに置換する改変、436位のTyrをThrへ置換する改変、438位のGlnをArgまたはLysに置換する改変、440位のSerをGluまたはAspに置換する改変が用いられる。これらの改変は、単独で用いられても良いし、複数箇所を組み合わせ用いても良い。

[0405] あるいは、リウマチ因子に対する結合活性を低下させるために、N型糖鎖の付加配列を導入しても良い。具体的には、N型糖鎖付加配列としてAsn-Xxx-Se

r/Thr (XxxはProを除く任意のアミノ酸) が知られているが、この配列をFc領域に導入することによりN型糖鎖を付加させ、N型糖鎖の立体障害によってRFとの結合を阻害することが可能である。N型糖鎖を付加するための改変として、好ましくは、EUナンバリングで表される248位のLysをAsnに置換する改変、424位のSerをAsnに置換する改変、436位のTyrをAsnに置換し438位のGlnをThrに置換する改変、438位のGlnをAsnに置換する改変が用いられる。特に好ましくは、EUナンバリングで表される424位のSerをAsnに置換する改変が用いられる。

[0406] [実施例5] Fc γ Rに対する結合活性が天然型マウスIgGのFc領域の結合活性より高い抗原結合分子の血漿中からの抗原消失効果

(5-1) Fc γ Rに対する結合活性を増強したマウス抗体の抗原消失効果

実施例1から4において、ヒト抗体のFc領域を有し、pH依存的にヒトIL-6レセプターに結合する性質を有する抗原結合分子のマウスFc γ Rに対する結合活性を増強させた抗原結合分子が投与されたヒトFcRnトランスジェニックマウス群において、当該マウスの血漿中可溶性ヒトIL-6レセプターの消失が早められていることが確認された。この効果が、マウスFcRnを有するノーマルマウスにおいて、マウス抗体のFc領域を有し、pH依存的にヒトIL-6レセプターに結合する性質を有する抗原結合分子が投与されたマウスFcRnを有するノーマルマウスにおいても示されるかどうか、以下に示すように検証された。

[0407] (5-2) Fc γ Rに対する結合活性を増強したマウス抗体の作製

pH依存的にヒトIL-6レセプターに結合する性質を有するマウスIgG1抗体の重鎖としてVH3-mIgG1 (配列番号: 49)、軽鎖としてVL3-mk1 (配列番号: 50) が参考実施例1の方法を用いて作製された。また、VH3-mIgG1のマウスFc γ Rに対する結合活性を増強するために、EUナンバリングで表される327位のAlaがAspに置換されたVH3-mIgG1-mF44 (配列番号: 51) が作製された。同様に、VH3-mIgG1のEUナンバリングで表される239位のSerがAspに置換され、327位のAlaがAspに置換されたVH3-mIgG1-mF46 (配列番号: 52) が作製さ

れた。VH3-mIgG1、VH3-mIgG1-mF44あるいはVH3-mIgG1-mF46を重鎖として含み、VL3-mk1を軽鎖として含む、Fv4-mIgG1、Fv4-mIgG1-mF44あるいはFv4-mIgG1-mF46が、参考実施例1の方法を用いて作製された。

[0408] (5-3) マウスFcγRに対する結合活性の確認

VH3-mIgG1、VH3-mIgG1-mF44あるいはVH3-mIgG1-mF46を重鎖として含み、L(WT)-CK (配列番号：42)を軽鎖として含むVH3/L(WT)-mIgG1、VH3/L(WT)-mIgG1-mF44あるいはVH3/L(WT)-mIgG1-mF46が参考実施例1の方法で作製された。これらの抗体のマウスFcγRに対する結合活性が、参考実施例2の方法で評価された。その結果を表9に示した。また、それぞれの改変体のマウスFcγRに対する結合活性が、改変を加える前のmIgG1と比較して何倍増強しているかを表10に示した。なお、表中では、VH3/L(WT)-mIgG1はmIgG1、VH3/L(WT)-mIgG1-mF44はmF44、VH3/L(WT)-mIgG1-mF46はmF46と表記した。

[0409] [表9]

改変体名	KD (M)			
	mFcγRI	mFcγRIIb	mFcγRIII	mFcγRIV
mIgG1	検出せず	1.1E-07	2.1E-07	検出せず
mF44	検出せず	8.9E-09	6.7E-09	検出せず
mF46	検出せず	1.2E-09	3.6E-09	検出せず

[0410] [表10]

改変体名	mIgG1 に対する結合比			
	mFcγRI	mFcγRIIb	mFcγRIII	mFcγRIV
mIgG1	検出せず	1.0	1.0	検出せず
mF44	検出せず	11.9	31.0	検出せず
mF46	検出せず	91.4	57.5	検出せず

[0411] 天然型マウスIgG1抗体のFc領域を有するVH3/L(WT)-mIgG1は、マウスFcγRIおよびマウスFcγRIVに対しては結合を示さず、マウスFcγRIIb およびマウスFcγRIIIに対してのみ結合を示した実施例4の検討結果から、抗原濃度を低下させるのに重要なマウスFcγRはマウスFcγRIIおよび、あるいはマウスFcγRIIIであることが示唆されている)。また、VH3/L(WT)-mIgG1のFcγRに対する結合活性を増強すると考えられる改変が導入されたVH3/L(WT)-mIgG-m

F44およびVH3/L (WT)-mIgG1-mF46のマウスFc γ RIIbおよびマウスFc γ RIIIに対する結合活性はいずれも増強していることが示された。

[0412] (5-4) ノーマルマウスにおける血漿中可溶性IL-6レセプター濃度の低減効果の確認

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

[0413] ノーマルマウス (C57BL/6J mouse, Charles River Japan) の背部皮下に可溶性ヒトIL-6レセプターが充填されたinfusion pump (MINI-OSMOTIC PUMP MODEL2004, alzet) を埋め込むことで、血漿中可溶性ヒトIL-6レセプター濃度が定常状態に維持される動物モデルが作製された。その動物モデルに抗ヒトIL-6レセプター抗体を投与した後の可溶性ヒトIL-6レセプターの体内動態が評価された。可溶性ヒトIL-6レセプターに対する抗体の産生を抑制するため、モノクローナル抗マウスCD4抗体が尾静脈に20 mg/kgで単回投与された。その後、92.8 μ g/mLの可溶性ヒトIL-6レセプターが充填されたinfusion pumpがマウス背部皮下へ埋め込まれた。Infusion pumpが埋め込まれた3日後に、抗ヒトIL-6レセプター抗体が1 mg/kgで尾静脈に単回投与された。抗ヒトIL-6レセプター抗体投与後15分、7時間、1日、2日、4日、7日、14日 (あるいは15日)、21日 (あるいは22日) が経過した後に当該マウスから採血された。採取された血液を直ちに4 $^{\circ}$ C、15,000 rpmで15分間遠心分離することによって、血漿が得られた。分離された血漿は、測定を実施するまで-20 $^{\circ}$ C以下に設定された冷凍庫に保存された。

[0414] 血漿中の可溶性ヒトIL-6レセプター濃度は、実施例(2-1-2)の方法で測定された。その結果を図11に示した。

[0415] 驚くべきことに、mIgG1 (天然型マウスIgG1) のマウスFc γ RIIbおよびマウスFc γ RIIIに対する結合活性を増強する改変が導入されたmF44およびmF46が投与されたマウスでは、mIgG1が投与されたマウスに比較して血漿中IL-6レセプター濃度の顕著な低下がいずれも確認された。特に、mF44の投与後21日目

においても、mF44投与群の血漿中IL-6レセプター濃度は抗体非投与群の血漿中IL-6レセプター濃度に比べて約6倍、mIgG1投与群に比較すると約10倍低下していた。一方、mF46の投与後7日目において、mF46投与群の血漿中IL-6レセプター濃度は抗体非投与群の血漿中IL-6レセプター濃度に比べて約30倍、mIgG1投与群に比較すると約50倍と、顕著に低下していた。

[0416] 以上のことから、ヒトIgG1抗体のFc領域を有する抗原結合分子のマウスFc γ Rに対する結合活性が増強している抗体と同様に、マウスIgG1抗体のFc領域を有する抗原結合分子のマウスFc γ Rに対する結合活性が増強している抗体が投与されたマウスにおいても、血漿中可溶性IL-6レセプターの消失が加速していることが示された。特定の理論に拘束されるものではないが、ここでみられた現象は以下のように説明することも可能である。

[0417] pH依存的に可溶性抗原に結合し、かつFc γ Rに対する結合活性を増強している抗体がマウスに投与されると、主に細胞膜上にFc γ Rを発現している細胞に積極的に取り込まれる。取り込まれた抗体はエンドソーム内の酸性pHの条件下において可溶性抗原を解離した後にFcRnを介して血漿中にリサイクルされる。そのため、このような抗体による血漿中の可溶性抗原を消失させる効果をもたらす要素の一つとしては、当該抗体のFc γ Rに対する結合活性の強さが挙げられる。すなわち、Fc γ Rに対する結合活性が強いほど、より積極的にFc γ R発現細胞へと取り込まれ、血漿中の可溶性抗原を速く消失させることが可能であると考えられる。また、そのような効果は、抗体に含まれるFc領域の由来がヒトIgG1であってもマウスIgG1であっても、Fc γ Rに対する結合活性が増強している限りは、同様に検証できると考えられる。つまり、ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG3、ヒトIgG4、マウスIgG1、マウスIgG2a、マウスIgG2b、マウスIgG3、ラットIgG、サルIgG、ウサギIgGなど、いかなる動物種のFc領域であっても、投与される動物種のFc γ Rに対する結合活性が増強している限りは、いずれを用いても検証することが可能であると考えられる。

[0418] [実施例6] Fc γ RIIb選択的に結合を増強した抗体による抗原消失効果

(6-1) Fc γ RIIbに対する結合活性を選択的に増強した抗体の抗原消失効

果

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

[0419] 実施例5において、天然型マウスIgG1に対してFc γ Rへの結合活性を増強させたmF44およびmF46は、マウスFc γ RIIbおよびマウスFc γ RIIIに対して選択的に結合が増強されていることが示された。この選択的に増強された抗体の結合活性を利用し、マウスFc γ RIIIを発現しない、マウスFc γ RIII欠損マウスまたはFc受容体 γ 鎖欠損マウスにmF44およびmF46を投与することにより、マウスFc γ RIIbに対する結合が増強された抗体を投与する状況を模倣することが可能であると考えられた。

[0420] (6-2) Fc γ RIII欠損マウスを用いたマウスFc γ RIIb選択的結合増強による抗原消失効果の検証

抗ヒトIL-6レセプター抗体としてFv4-mIgG1、Fv4-mIgG1-mF44あるいはFv4-mIgG1-mF46が投与されたFc γ RIII欠損マウスの血漿中可溶性IL-6レセプターの消失効果が、実施例5の方法と同様に検証された。当該マウスの血漿中の可溶性ヒトIL-6レセプター濃度は、実施例(2-1-2)の方法で測定された。その結果を図12に示した。

[0421] 驚くべきことに、mIgG1(天然型マウスIgG1)のマウスFc γ RIIbに対する結合活性が増強された状況が模倣されたmF44およびmF46が投与されたFc γ RIII欠損マウスの血漿中IL-6レセプター濃度は、いずれも、mIgG1が投与されたマウスの血漿中IL-6レセプター濃度に比較していずれも顕著に低下したことが確認された。特に、mF44の投与群の血漿中IL-6レセプター濃度は、mIgG1投与群のそれに比較して約3倍程度に低下させ、抗体投与によって起こる抗原濃度の蓄積が抑制されていた。一方、mF46の投与群の血漿中IL-6レセ

プター濃度は、投与後3日目において、抗体非投与群の血漿中IL-6レセプター濃度に比べて約6倍、mIgG1投与群の血漿中IL-6レセプター濃度に比較すると約25倍と、顕著に低下した。この結果から、pH依存的に抗原に結合する抗ヒトIL-6レセプター抗体の MausFc γ R1Ib に対する結合活性が高いほど、それが投与されたときにマウスの血漿中IL-6レセプター濃度をより低下させることが可能であることが示された。

[0422] (6-3) Fc受容体 γ 鎖欠損マウスを用いた MausFc γ R1Ib 選択的結合増強による抗原消失効果の検証

抗ヒトIL-6レセプター抗体としてFv4-mIgG1、Fv4-mIgG1-mF44またはFv4-mIgG1mF46が投与されたFc受容体 γ 鎖欠損マウスの血漿中可溶性IL-6レセプターの消失効果が、実施例5の方法と同様に検証された。当該マウスの血漿中の可溶性ヒトIL-6レセプター濃度は、実施例(2-1-2)の方法で測定された。その結果を図13に示した。

[0423] Fc γ R1I1I1欠損マウスにmF44およびmF46が投与されたときと同様に、mIgG1(天然型マウスIgG1)に対して MausFc γ R1Ib に対する結合活性のみが選択的に増強された状況が模倣されたmF44およびmF46が投与されたFc受容体 γ 鎖欠損マウスの血漿中IL-6レセプター濃度は、いずれも、mIgG1が投与されたFc受容体 γ 鎖欠損マウスの血漿中IL-6レセプター濃度に比較して顕著に低下したことが確認された。特に、mF44の投与群の血漿中IL-6レセプター濃度は、mIgG1投与群の血漿中IL-6レセプター濃度に比較して約3倍程度に低下し、抗体投与によって起こる抗原濃度の蓄積が抑制されていた。一方、mF46の投与群の血漿中IL-6レセプター濃度は投与後3日目において、抗体非投与群の血漿中IL-6レセプター濃度に比べて約5倍、mIgG1投与群の血漿中IL-6レセプター濃度に比較すると約15倍と、顕著に低下した。

[0424] 実施例(6-2)および(6-3)の結果から、pH依存的に可溶性抗原に結合し、 MausFc γ R1Ib に対する結合活性が選択的に増強した抗体の投与群の血漿中の可溶性抗原濃度は大幅に低下する可能性が示された。

[0425] [実施例7] Fc γ R1I1I1選択的に結合を増強した抗体による抗原消失効果

(7-1) Fc γ RIIIに対する結合活性を選択的に増強した抗体の抗原消失効果

Fc γ RIIb欠損マウス (Fcgr2b(Fc γ RII) mouse, Taconic) (Nature (1996) 379 (6563), 346-349) は、マウスFc γ RI、マウスFc γ RIII、マウスFc γ RIVは発現するが、マウスFc γ RIIbを発現しないマウスである。実施例5において、天然型マウスIgG1のFc γ Rへの結合活性を増強させたmF44およびmF46は、マウスFc γ RIIbおよびマウスFc γ RIIIに対して選択的に結合が増強していることが示された。この選択的に増強された抗体の結合活性を利用し、マウスFc γ RIIbを発現しないマウスFc γ RIIb欠損マウスにmF44およびmF46を投与することにより、マウスFc γ RIIIに対する結合が選択的に増強された抗体を投与する状況を模倣することが可能であると考えられた。

[0426] 実施例6において、マウスFc γ RIIbに対する結合活性が選択的に増強された抗体が投与された状況が模倣されたFc γ RIII欠損マウスの血漿中の可溶性抗原濃度が低下することが示された。一方で、マウスFc γ RIIIに対する結合活性が選択的に増強した抗体が投与された状況が模倣されたFc γ RIIb欠損マウスの血漿中の可溶性抗原濃度が低下するかどうかは以下の試験によって確認された。

(7-2) Fc γ RIIb欠損マウスを用いたマウスFc γ RIII選択的結合増強による抗原消失効果の検証

Fc γ RIIb欠損マウスに抗ヒトIL-6レセプター抗体としてFv4-mIgG1、Fv4-mIgG1-mF44あるいはFv4-mIgG1mF46が投与されたFc γ RIIb欠損マウスの血漿中可溶性IL-6レセプターの消失効果が、実施例5の方法と同様に検証された。血漿中の可溶性ヒトIL-6レセプター濃度は、実施例(2-1-2)の方法で測定された。その結果を図14に示した。

[0427] 驚くべきことに、mIgG1(天然型マウスIgG1)のマウスFc γ RIIIに対する結合活性が選択的に増強したことが模倣されたmF44およびmF46の投与群では、血漿中IL-6レセプター濃度は低下したが実施例6で示されたほどの顕著な低下は確認されなかった。

[0428] 特定の理論に拘束されるものではないが、実施例5、6および7の結果から、以下のように考察することも可能である。mIgG1（天然型マウスIgG1）のマウスFc γ RIIbおよびマウスFc γ RIIIに対する結合活性が選択的に増強されたmF44およびmF46が投与されたマウスFc γ RIIbおよびマウスFc γ RIIIの両方を発現するノーマルマウスの血漿中可溶性IL-6レセプターの消失は顕著に加速することが確認された。また、マウスFc γ RIIbは発現するものの、マウスFc γ RIIIを発現していないマウス（Fc γ RIII欠損マウス、および、Fc受容体 γ 鎖欠損マウス）に、mF44およびmF46が投与された場合でも当該マウスの血漿中可溶性IL-6レセプターの消失は顕著に加速することが確認された。一方で、マウスFc γ RIIIは発現するものの、マウスFc γ RIIbを発現していないマウス（Fc γ RII欠損マウス）に、mF44およびmF46が投与された場合には、当該マウスの血漿中可溶性IL-6レセプターの消失は顕著には加速されなかった。

[0429] 以上のことから、mIgG1（天然型マウスIgG1）のマウスFc γ RIIbおよびマウスFc γ RIIIに対する結合活性が選択的に増強された抗体であるmF44およびmF46は、主にマウスFc γ RIIbを介してFc γ Rを発現する細胞に取り込まれることによって、当該抗体に結合する血漿中の可溶性抗原が消失していると考えられる。一方で、Fc γ RIIIを介した抗体抗原複合体のFc γ R発現細胞への取込みは、血漿中の可溶性抗原の消失に対して大きく寄与していないと考えられる。

[0430] また、実施例4において示されたように、特にマウスFc γ RIIbおよびマウスFc γ RIIIに対する結合活性が向上しているFv4-IgG1-F1087が投与されたマウスの血漿中可溶性IL-6レセプター濃度は顕著に低下した一方で、特にマウスFc γ RIおよびマウスFc γ RIVに対する結合活性が向上しているFv4-IgG1-F1182が投与されたマウスの血漿中可溶性IL-6レセプターの消失効果は、Fv4-IgG1-F1087のそれと比較すると小さかった。

[0431] さらに、実施例2において低フコース型糖鎖を有するためにマウスFc γ RIVに対する結合活性が大幅に増強されている（Science (2005) 310 (5753) 1510-1512）Fv4-IgG1-Fucが投与されたマウスの血漿中可溶性IL-6レセプター濃

度は、Fv4-IgG1が投与されたマウスの血漿中可溶性IL-6レセプター濃度と比較すると低下したものの、その低下の効果は2倍程度と小さかった。そのため、マウスFc γ RIVを介した抗体のFc γ R発現細胞への取り込みは、血漿中の可溶性抗原の消失に対して大きく寄与していないと考えられる。

[0432] これらのことから、マウスにおいて抗体のFc γ R発現細胞への取込みには、複数あるマウスFc γ Rの中で、マウスFc γ RIIbが主な役割を發揮していることが見出された。そのため、特に限定されるものではないが、マウスFc γ R結合ドメインに導入される変異としては、マウスFc γ RIIbに対する結合を増強する変異が特に好ましいとも考えられ得る。

[0433] 本検討によって、pH依存的に可溶性抗原に結合し、Fc γ Rに対する結合活性が増強された抗原結合分子を投与することによって、投与された生体の血漿中の可溶性抗原の消失を早めるためには、投与される抗体のFc γ RIIbに対する結合活性を増強することがより好ましいことがマウスにおいて示された。つまり、pH依存的に可溶性抗原に結合し、Fc γ RIIbに対する結合活性を増強させた抗原結合分子は、生体内に投与された場合に、血漿中の可溶性抗原の消失を早めて、血漿中の可溶性抗原濃度を効果的に低下させることが可能であり、極めて有効な作用を示すことが明らかとなった。

[0434] [実施例8] Fc γ RIIbに対する結合を増強する既存の改変が加えられたFc領域を含む抗体の血小板凝集能の評価

(8-1) Fc γ RIIbに対する結合を増強する既存の改変が加えられたFc領域を含む抗体の作製

実施例7に記したように、Fc γ RIIbに対する選択的に結合活性が増強された抗体を生体に投与することで、当該生体の血漿中から抗原を効率的に消失させることが可能である。また、Fc γ RIIbに対する結合活性が選択的に増強されたFc領域を含む抗体を投与することは、抗体が投与される生体にとって安全性、副作用の観点でも好ましいと考えられた。

[0435] しかしながら、mF44やmF46は、マウスFc γ RIIbとマウスFc γ RIIIの両方に対して結合が増強しており、マウスFc γ RIIbに対する選択的な結合は増強し

ていない。これはマウスFc γ RIIbとマウスFc γ RIIIのホモロジーが高いことから、両者を識別しつつマウスFc γ RIIbに対する選択的な結合を増強する改変を見出すことは困難であるためとも考えられる。また、これまでにマウスFc γ RIIbに対する選択的な結合が増強されたFc領域は報告されていない。同様に、ヒトFc γ RIIbとヒトFc γ RIIa (131Argおよび131Hisの両アロタイプ) とのホモロジーも高いことが知られている。また、両者を識別しつつ、ヒトFc γ RIIbに対する選択的な結合が増強された改変を含むFc領域もこれまで報告されていない (Seungら (Mol. Immunol. (2008) 45, 3926-3933)、Greenwoodら (Eur. J. Immunol. (1993) 23 (5), 1098-1104))。また、Fc γ RIIaに対する結合が増強された抗体は、血小板の凝集活性が増強され、当該抗体が投与された生体が血栓症を発症するリスクを高める可能性があることが報告されている (Meyerら (J. Thromb. Haemost. (2009), 7 (1), 171-181)、Robles-Carrilloら (J. Immunol. (2010), 185 (3), 1577-1583))。そこで、抗体のFc γ RIIaに対する結合が増強された抗体の血小板凝集活性が増強しているか否かが下記のように検証された。

[0436] (8-2) Fc γ RIIbに対する結合を増強する既存の改変が加えられたFc領域を含む抗体のヒトFc γ Rに対する結合活性の評価

ヒトFc γ RIIbに対する結合を増強する既存の改変が加えられたFc領域を含む抗体の、ヒトFc γ RIa、Fc γ RIIaのR型およびH型、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIaに対するアフィニティーが下記のように解析された。抗体H鎖可変領域としてWO 2009/125825に開示されているヒトインターロイキン6レセプターに対する抗体の可変領域であるIL6R-H (配列番号：53) を、抗体H鎖定常領域としてヒトIgG1のC末端のGlyおよびLysを除去したG1dを有するIL6R-G1d (配列番号：54) を含むH鎖が作製された。次に、IL6R-G1dのFc領域がSeungら (Mol. Immunol. (2008) 45, 3926-3933) に記載されている改変であるEUナンバリング267位で表されるSerのGluへの置換、EUナンバリング328位で表されるLeuのPheへの置換によって改変されたIL6R-G1d-v3 (配列番号：55) が作製された。抗体L鎖としてヒトインターロイキン6レセプターに対する抗体のL鎖である

IL6R-L (配列番号：56) を共通に用い、それぞれのH鎖と共に参考実施例1の方法に従い発現させた抗体が精製された。IL6R-G1d、IL6R-G1d-v3を重鎖として含む抗体は、それぞれIgG1、IgG1-v3と以下で呼ばれる。

[0437] 次に、これらの抗体とFc γ Rとの相互作用が、Biacore T100 (GE Healthcare) を用いて速度論的に解析された。ランニングバッファとしてHBS-EP+ (GE Healthcare) を用い、当該相互作用が25°Cの温度で測定された。アミンカップリング法によりProtein AがSeries S Sencor Chip CM5 (GE Healthcare) に固定化されたチップが用いられた。このチップへキャプチャーさせた目的の抗体と、ランニングバッファで希釈した各Fc γ Rを相互作用させ、抗体に対する各Fc γ Rの結合が測定された。測定後は10 mM glycine-HCl、pH1.5をチップに反応させることで、チップにキャプチャーされた抗体が洗浄されることによって、再生されたチップが繰り返し用いられた。測定結果として得られたセンサーグラムをBiacore Evaluation Softwareにより1:1 Langmuir binding modelで解析することで算出された結合速度定数ka (L/mol/s)、解離速度定数kd (1/s) の値から解離定数KD (mol/L) が算出された。IgG1、IgG1-v3の各Fc γ Rに対するKD値を表11 (各抗体の各Fc γ Rに対するKD値) に、またIgG1の各Fc γ Rに対するKD値をIgG1-v3の各Fc γ Rに対するKD値で除したIgG1-v3の相対的なKD値を表12に示した。

[0438] [表11]

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

[0439] [表12]

	Fc γ RIa	Fc γ RIIaR	Fc γ RIIaH	Fc γ RIIb	Fc γ RIIIa
KD 値比	1.8	522	0.51	408	0.35

[0440] この結果から、IgG1のFc領域におけるEUナンバリングで表される267位のSerがGluに、328位のLeuがPheに置換された改変Fc領域 (Mol. Immunol. (2008) 45, 3926-3933) を含む抗体はIgG1のFc領域を含む抗体と比較してFc γ RIIb

に対するアフィニティーが408倍増強し、Fc γ RIIa H型に対するアフィニティーは0.51倍に減弱しているが、Fc γ RIIaのR型に対するアフィニティーが522倍増強していることが確認された。

[0441] (8-3) 血小板凝集能の評価

次に、IgG1のFc領域におけるEUナンバリングで表される267位のSerがGluに、328位のLeuがPheに置換されたFc領域を含む抗体のFc γ RIIaに対するアフィニティーの強弱によって血小板凝集能が変化するかがFc γ RIIaのH型、R型のドナー由来の血小板を用いて検証された。IgEに結合するhIgG1抗体（ヒトIgG1定常領域）の重鎖可変領域およびG1d重鎖定常領域を含む重鎖omalizumab_VH-G1d（配列番号：57）、軽鎖としてomalizumab_VL-CK（配列番号：58）を含む抗体が参考実施例1の方法を用いて作製された。また、omalizumab_VH-G1dのEUナンバリングで表される267位のSerがGluに、328位のLeuがPheに置換されたomalizumab_VH-G1d-v3（配列番号：59）が作製された。参考実施例1の方法を用いて、omalizumab_VH-G1d-v3を重鎖として含み、omalizumab_VL-CKを軽鎖として含む、omalizumab-G1d-v3が作製された。この抗体の血小板凝集能が評価された。

[0442] 血小板凝集は、血小板凝集能測定装置ヘマトレーサー712（株式会社エル・エム・エス）を用いて測定された。まず、約50 mLの全血を、0.5 mLの3.8%クエン酸ナトリウムを含む4.5 mL真空採血管に一定分量ずつ採取された約50 mLの全血を200 gで15分間、遠心分離することによって回収された上清がPlatelet Rich Plasma (PRP) として使用された。緩衝液A（137 mM NaCl、2.7 mM KCl、12 mM NaHCO₃、0.42 mM NaH₂PO₄、2 mM MgCl₂、5 mM HEPES、5.55 mM dextrose、1.5 U/mL apyrase、0.35 % BSA）を用いて洗浄されたPRPは、さらに緩衝液B（137 mM NaCl、2.7 mM KCl、12 mM NaHCO₃、0.42 mM NaH₂PO₄、2 mM MgCl₂、5 mM HEPES、5.55 mM dextrose、2 mM CaCl₂、0.35 % BSA）に置換された。その結果、約300,000/ μ Lの密度の洗浄血小板が調製された。血小板凝集能測定装置に設置された、攪拌棒を含む測定用キュベットに156 μ Lの洗浄血小板が分注された。当該装置内で37.0°Cに維持されたキュベット内で、血

血小板は攪拌棒により1000 rpmで攪拌された。そこに最終濃度がそれぞれ600 $\mu\text{g/mL}$ 及び686 $\mu\text{g/mL}$ となるように調製されたモル比1:1のomalizumab-G1d-v3とIgEの免疫複合体を44 μL 加え、血小板と当該免疫複合体を5分間反応させた。さらに、二次凝集を起こさない濃度のアデノシン2リン酸 (ADP、SIGMA) が反応液に加えられ、凝集が増強されるかが確認された。

[0443] このアッセイで得られた、Fc γ RIIaの遺伝子多型 (H/HまたはR/H) のドナーごとの血小板凝集の結果を図15および16に示した。図15の結果から、Fc γ RIIaの多型 (R/H) を有するドナーの血小板に、免疫複合体を添加した場合に血小板凝集が増強することが示された。一方、図16に示した通り、Fc γ RIIa多型 (H/H) を有するドナーの血小板に、免疫複合体を添加した場合には血小板凝集が増強しなかった。

[0444] 次に活性化マーカーを使って血小板の活性化が評価された。血小板の活性化は、CD62p (p-selectin) もしくは活性型インテグリンといった活性化マーカーの血小板膜表面における発現増加によって測定することができる。先述の方法により調製された洗浄血小板7.7 μL の洗浄血小板に免疫複合体を2.3 μL 添加し室温で5分間反応させた後、さらに最終濃度が30 μM になるようにADPを添加して活性化が惹起され、免疫複合体によってADPによる活性化が増強されるかが確認された。陰性対照には免疫複合体の代わりにリン酸緩衝液 (pH7.4) (Gibco) を添加したサンプルが用いられた。反応後の各サンプルにPE標識抗CD62抗体 (BECTON DICKINSON) 、PerCP標識抗CD61抗体、FITC標識PAC-1抗体 (BD bioscience) を加えることによって染色された。各染色の蛍光強度がフローサイトメーター (FACS CantoII、BD bioscience) を用いて測定された。

[0445] このアッセイ法で得られたCD62p発現の結果を図17に、活性化インテグリン発現の結果を図18に示した。洗浄血小板としてFc γ RIIaの多型がR/Hである一名の健常人から得た洗浄血小板が使用された。ADP刺激により血小板膜表面に発現誘導されるCD62p及び活性型インテグリンは、免疫複合体存在下においていずれも増強された。

[0446] これらの結果から、IgG1のFc領域のEUナンバリングで表される267位のSerがGluに、328位のLeuがPheに置換されたヒトFc γ RIIbに対する結合を増強する既存の改変が加えられたFc領域を含む抗体は、Fc γ RIIaの遺伝子多型のうち131番目のアミノ酸がHである血小板と比べて、131番目のアミノ酸がRである血小板の凝集を促進することが明らかとなった。すなわち、既存のヒトFc γ RIIbに対する結合を増強する既存の改変が加えられたFc領域を含む抗体がFc γ RIIa R型を有するヒトに投与された場合には、血小板凝集による血栓症発症のリスクを高める危険性が示唆された。Fc γ RIIbに対してより選択的な結合を増強する本発明のFc領域を含む抗原結合分子は、抗原の血漿中滞留性の改善のみならず、上記の問題点を克服する可能性が示され、本発明の抗原結合分子の有用性が明白である。

[0447] [実施例9] P238D 改変に加えてヒンジ部分の改変を導入した改変体のFc γ R IIbに対する結合の網羅的解析

ヒト天然型IgG1に対してEUナンバリングで表される238位のProがAspに置換されたFcに対し、さらにFc γ RIIbへの結合を上げると天然型抗体の解析から予測される他の改変を組み合わせても、期待される組合せ効果は得られなかった。そこで、EUナンバリングで表される238位のProがAspに置換された改変Fcに対して網羅的改変を導入することによって、さらにFc γ RIIbへの結合を増強する改変体を見出すことが試みられた。抗体H鎖として用いられたIL6R-G1d (配列番号：54)のEUナンバリングで表される252位のMetをTyrに置換する改変、EUナンバリングで表される434位のAsnをTyrに置換する改変が導入されたIL6R-F11 (配列番号：60)が作製された。さらに、IL6R-F11に対してEUナンバリングで表される238位のProをAspに置換する改変が導入されたIL6R-F652 (配列番号：61)が作製された。L6R-F652に対し、EUナンバリングで表される238位の残基の近傍の領域 (EUナンバリングで表される234位から237位、239位)が元のアミノ酸とシステインを除く18種類のアミノ酸にそれぞれ置換された抗体H鎖配列を含む発現プラスミドがそれぞれ調製された。抗体L鎖としてはIL6R-L (配列番号：56)が用いられた。これらの改変体が参考

実施例 1 と同様の方法により発現、精製された。これらのFc変異体はPD variantと呼ばれる。参考実施例 2 と同様の方法により各PD variantのFc γ RIIa R型およびFc γ RIIbに対する相互作用が網羅的に評価された。

[0448] 以下の方法に従って、それぞれのFc γ Rとの相互作用解析結果を表す図が作成された。各PD variantの各Fc γ Rに対する結合量の値を、コントロールとした改変導入前の抗体（EUナンバリングで表される238位のProがAspに置換された改変であるIL6R-F652/IL6R-L）の各Fc γ Rに対する結合量の値で割り、さらに100倍した値が各PD variantの各Fc γ Rに対する相対的な結合活性の値として表された。横軸に各PD variantのFc γ RIIbに対する相対的な結合活性の値、縦軸に各PD variantのFc γ RIIa R型に対する相対的な結合活性の値をそれぞれ表示した（図 19）。

[0449] その結果、11種類の改変体のFc γ RIIbに対する結合が、当該各改変導入前の抗体と比較して増強し、Fc γ RIIa R型に対する結合を維持または増強する効果があることが見出された。これらの11種類の改変体のFc γ RIIbおよびFc γ RIIa Rに対する結合活性をまとめた結果を表 13 に示した。なお、表中の配列番号は評価した改変体のH鎖の配列番号を、また、改変とはIL6R-F11（配列番号：60）に対して導入した改変を表す。

[0450] [表13]

改変体名	改変	Fc γ RIIb に対する 相対的結合活性	Fc γ RIIaR に対する 相対的結合活性
IL6R-F652/IL6R-L	P238D	100	100
IL6R-PD042/IL6R-L	P238D/L234W	106	240
IL6R-PD043/IL6R-L	P238D/L234Y	112	175
IL6R-PD079/IL6R-L	P238D/G237A	101	138
IL6R-PD080/IL6R-L	P238D/G237D	127	222
IL6R-PD081/IL6R-L	P238D/G237E	101	117
IL6R-PD082/IL6R-L	P238D/G237F	108	380
IL6R-PD086/IL6R-L	P238D/G237L	112	268
IL6R-PD087/IL6R-L	P238D/G237M	109	196
IL6R-PD094/IL6R-L	P238D/G237W	122	593
IL6R-PD095/IL6R-L	P238D/G237Y	124	543
IL6R-PD097/IL6R-L	P238D/S239D	139	844

[0451] P238Dが導入された改変体に対して前記の11種類の改変が、さらに組み合わせられて導入された改変体の相対的なFc γ RIIbに対する結合活性の値、およびP

238Dを含まないFcに当該改変が導入された改変体の相対的なFc γ RIIbに対する結合活性の値を図20に示した。これら11種類の改変は、P238D改変に更に導入すると、導入前に比べてFc γ RIIbに対する結合量が增強していた。一方、G237F、G237W、およびS239Dを除く8種類の改変がP238Dを含まない改変体に導入された場合、Fc γ RIIbに対する結合を低減する効果を示していた（データ示さず）。

この結果から、天然型IgG1に対して導入した改変の効果にもとづいてP238D改変が含まれる改変体に対して同改変を組み合わせるときの効果を予測するのは困難であることが明らかとなった。また、いかえれば今回見出された8種類の改変は、P238D改変が含まれる改変体に対して同改変を組み合わせるときの本検討を行わなければ見出すことが不可能な改変である。

[0452] 表13に示した改変体のFc γ RIa、Fc γ RIIaR、Fc γ RIIaH、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIaVに対するKD値を参考実施例2と同様の方法で測定した結果を表14に示した。なお、表中の改変とはIL6R-F11（配列番号：60）に対して導入された改変を表す。ただし、IL6R-F11を作製する際の鑄型としたIL6R-G1d/IL6R-Lについては、*として示した。また、表中のKD (IIaR)/KD (IIb)およびKD (IIaH)/KD (IIb)はそれぞれ、各改変体のFc γ RIIaRに対するKD値を各改変体のFc γ RIIbに対するKD値で割った値、各改変体のFc γ RIIaHに対するKD値を各改変体のFc γ RIIbに対するKD値で割った値を示す。親ポリペプチドのKD (IIb)/改変体のKD (IIb)は、親ポリペプチドのFc γ RIIbに対するKD値を各改変体のFc γ RIIbに対するKD値で割った値を指す。これらに加えて、各改変体のFc γ RIIaRおよびFc γ RIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値/親ポリペプチドのFc γ RIIaRおよびFc γ RIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値を表14に示した。ここで親ポリペプチドとは、IL6R-F11（配列番号：60）をH鎖に持つ改変体のことを指す。なお、表14のうち灰色で塗りつぶされたセルは、Fc γ RのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解析できないと判断されたため、参考実施例2に記載された

[式2]

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

の式を利用して算出した値である。

[0453] 表14に示されたように、いずれの改変体もIL6R-F11と比較してFcγRIIbに対する親和性が向上し、その向上の幅は1.9倍から5.0倍であった。各改変体のFcγRIIaRに対するKD値/各改変体のFcγRIIbに対するKD値の比、および各改変体のFcγRIIaHに対するKD値/各改変体のFcγRIIbに対するKD値の比は、FcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性に対する相対的なFcγRIIbに対する結合活性を表す。つまり、この値は各改変体のFcγRIIbへの結合選択性の高さを示した値であり、この値が大きければ大きいほどFcγRIIbに対して結合選択性が高い。親ポリペプチドであるIL6R-F11/IL6R-LのFcγRIIaRに対するKD値/FcγRIIbに対するKD値の比、およびFcγRIIaHに対するKD値/FcγRIIbに対するKD値の比はいずれも0.7であるため、表14のいずれの改変体も親ポリペプチドよりもFcγRIIbへの結合選択性が向上していた。改変体のFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値/親ポリペプチドのFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値が1以上であるとは、その改変体のFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方の結合が親ポリペプチドのFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方の結合と同等であるか、より低減していることを意味する。今回得られた改変体ではこの値が0.7から5.0であったため、今回得られた改変体のFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方の結合は親ポリペプチドのそれと比較してほぼ同等か、それよりも低減していたといえる。これらの結果から、今回得られた改変体では親ポリペプチドと比べて、FcγRIIa R型およびH型への結合活性を維持または低減しつつ、FcγRIIbへの結合活性を増強しており、FcγRIIbへの選択性が向上していることが明らかとなった。また、FcγRIaおよびFcγRIIIaVに対しては、いずれの改変体もIL6R-F11と比較して親和性が低下していた。

[0454]

[表14]

改変	KD [nmol/L]					FcγRIIIaV FcγRIIIaV	KD[IIaR]/ KD[IIb]	KD[IIaH]/ KD[IIb]	親ポリペプチドの KD(IIb)/ 改変ポリペプチドの KD(IIb)	改変体のFcγRIIIaRおよびFcγRIIIaHに 対する結合活性のうち強い方のKD値/ 親ポリペプチドのFcγRIIIaRおよびFcγRIIIaH に対する結合活性のうち強い方のKD値
	FcγRIa	FcγRIIaR	FcγRIIIaH	FcγRIIb	FcγRIIIaV					
*	3.2E-10	1.0E-06	6.7E-07	2.6E-06	3.5E-07	0.4	0.3	2.6	0.1	
	9.0E-10	5.0E-06	5.0E-06	6.8E-06	1.5E-06	0.7	0.7	1.0	1.0	
L234W/P238D	6.3E-08	1.6E-05	1.9E-05	2.0E-06	3.7E-05	8.1	9.5	3.4	3.2	
L234Y/P238D	7.5E-08	2.6E-05	2.3E-05	1.6E-06	4.5E-05	15.9	14.4	4.2	4.6	
G237A/P238D	1.4E-07	3.2E-05	2.1E-05	3.0E-06	3.7E-05	10.5	7.0	2.3	4.2	
G237D/P238D	1.4E-07	2.1E-05	2.5E-05	2.0E-06	4.3E-05	10.7	12.8	3.5	4.2	
G237E/P238D	3.4E-07	3.8E-05	2.5E-05	3.6E-06	4.1E-05	10.6	7.0	1.9	5.0	
G237F/P238D	5.2E-08	1.4E-05	1.6E-05	3.4E-06	4.3E-05	4.1	4.7	2.0	2.8	
G237L/P238D	1.2E-07	1.8E-05	1.8E-05	2.6E-06	4.1E-05	6.9	7.1	2.7	3.5	
G237M/P238D	5.2E-08	2.2E-05	2.0E-05	2.9E-06	3.7E-05	7.7	7.0	2.4	4.0	
G237W/P238D	3.6E-08	7.2E-06	1.2E-05	2.3E-06	3.8E-05	3.1	5.2	2.9	1.4	
G237Y/P238D	9.3E-08	7.9E-06	1.5E-05	2.3E-06	4.2E-05	3.4	6.4	2.9	1.6	
P238D/S239D	4.9E-09	3.5E-06	1.9E-05	1.4E-06	1.7E-05	2.6	14.0	5.0	0.7	

[0455] [実施例 10] P238Dを含むFcとFc γ RIIb細胞外領域との複合体のX線結晶構造解析

先の実施例9に示した通り、P238Dを含むFcに対して、Fc γ RIIbとの結合活性を向上する、あるいはFc γ RIIbへの選択性を向上させると天然型IgG1抗体の解析から予測された改変を導入しても、Fc γ RIIbに対する結合活性が減弱することが明らかとなり、この原因としてFcとFc γ RIIbとの相互作用界面の構造がP238Dを導入することで変化していることが考えられた。そこで、この現象の原因を追及するためP238Dの変異をもつIgG1のFc（以下、Fc（P238D）と呼ぶ）とFc γ RIIb細胞外領域との複合体の立体構造をX線結晶構造解析により明らかにし、天然型IgG1のFc（以下、Fc（WT）と呼ぶ）とFc γ RIIb細胞外領域との複合体との立体構造を対比することによって、これらの結合様式が比較された。なお、FcとFc γ R細胞外領域との複合体の立体構造に関する複数の報告がすでにあり、Fc（WT）/Fc γ RIIIb細胞外領域複合体（Nature（2000）400, 267-273、J. Biol. Chem.（2011）276, 16469-16477）、Fc（WT）/Fc γ RIIIa細胞外領域複合体（Proc. Natl. Acad. Sci. USA（2011）108, 12669-126674）、およびFc（WT）/Fc γ RIIa細胞外領域複合体（J. Immunol.（2011）187, 3208-3217）の立体構造が解析されている。これまでにFc（WT）/Fc γ RIIb細胞外領域複合体の立体構造は解析されていないが、Fc（WT）との複合体の立体構造が既知であるFc γ RIIaとFc γ RIIbでは細胞外領域においてアミノ酸配列の93%が一致し、非常に高い相同性を有していることから、Fc（WT）/Fc γ RIIb細胞外領域複合体の立体構造はFc（WT）/Fc γ RIIa細胞外領域複合体の結晶構造からモデリングにより推定された。

[0456] Fc（P238D）/Fc γ RIIb細胞外領域複合体についてはX線結晶構造解析により分解能2.6Åで立体構造を決定した。その解析結果の構造を図21に示した。2つのFc CH2ドメインの間にFc γ RIIb細胞外領域が挟まれるように結合しており、これまで解析されたFc（WT）とFc γ RIIIa、Fc γ RIIIb、Fc γ RIIaの各細胞外領域との複合体の立体構造と類似していた。次に詳細な比較のため、Fc（P238D）/Fc γ RIIb細胞外領域複合体の結晶構造とFc（WT）/Fc γ RIIb細胞

外領域複合体のモデル構造とを、Fc γ RIIb細胞外領域ならびにFc CH2ドメインAに対しC α 原子間距離をもとにした最小二乗法により重ね合わせた（図22）。その際、Fc CH2ドメインB同士の重なり程度は良好でなく、この部分に立体構造的な違いがあることが明らかとなった。さらにFc (P238D) / Fc γ RIIb細胞外領域複合体の結晶構造ならびにFc (WT) / Fc γ RIIb細胞外領域複合体のモデル構造を使い、抽出されたFc γ RIIb細胞外領域とFc CH2ドメインBとの間でその距離が3.7Å以下の原子ペアを比較することによって、Fc γ RIIbとFc (WT) CH2ドメインBとの間の原子間相互作用とFc γ RIIbとFc (P238D) CH2ドメインBとの間の原子間相互作用が比較された。表15に示すとおり、Fc (P238D)とFc (WT)では、Fc CH2ドメインBとFc γ RIIbとの間の原子間相互作用は一致していなかった。

[0457]

[表15]

Fc γ RIIb 原子	Fc(P648D) CH2 ドメイン B 相互作用相手 (原子間距離, Å)	Fc(WT) CH2 ドメイン B 相互作用相手 (原子間距離, Å)
Val 116 CG2		Asp 265 OD2 (3.47) Gly 237 O (3.65)
Ser 126 OG	Ser 298 N (3.31) Ser 298 CB (3.32) Tyr 296 O (3.05)	
Lys 128 CA	Ser 298 OG (3.50)	
Phe 129 CB	Ser 298 O (3.36)	
Phe 129 CD2		Asn 297 CB (3.50) Asn 297 CG (3.43)
Lys 128 C	Ser 298 OG (3.47)	
Phe 129 N	Ser 298 OG (3.30)	
Phe 129 O	Ser 267 OG (3.54)	
Arg 131 CB		Val 266 O (3.02)
Arg 131 CG		Val 266 O (3.22)
Arg 131 CD		Val 266 CG1 (3.45) Val 266 C (3.55) Val 266 O (3.10)
Arg 131 NE	Ala 327 O (3.60)	Val 266 C (3.66) Val 266 O (3.01) Val 266 N (3.49)
Arg 131 CZ	Asp 270 CG (3.64) Asp 270 OD2 (3.22) Asp 270 OD1 (3.27) Ala 327 CB (3.63)	Val 266 N (3.13)
Arg 131 NH1	Asp 270 CG (3.19) Asp 270 OD2 (2.83) Asp 270 OD1 (2.99) Ser 267 CB (3.56)	Val 266 CG1 (3.47) Val 266 N (3.43) Thr 299 OG1 (3.66) Ser 298 O (3.11)
Arg 131 NH2	Asp 270 CG (3.20) Asp 270 OD2 (2.80) Asp 270 OD1 (2.87) Ala 327 CB (3.66)	Asp 265 CA (3.16) Val 266 N (3.37)
Tyr 157 CE1		Leu 234 CG (3.64) Leu 234 CD1 (3.61)
Tyr 157 OH		Gly 236 O (3.62) Leu 234 CA (3.48) Leu 234 CG (3.45)

[0458] さらにFc CH2ドメインAならびにFc CH2ドメインB単独同士でC α 原子間距離をもとにした最小二乗法によって、Fc (P238D) / Fc γ RIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造とFc (WT) / Fc γ RIIb細胞外領域複合体のモデル構造の重合せをおこなうことによって、P238D付近の詳細構造が比較された。Fc (P238D)の変異導入位置であるEUナンバリングで表される238位のアミノ酸残基の位置がFc (WT)とは変化することにもない、ヒンジ領域から続く238位のアミノ酸残基の近辺のループ構造がFc (P238D)とFc (WT)では変化していることがわかる(図23)。もともとFc (WT)においてはEUナンバリングで表される238

位のProはFcの内側にあり、238位の周囲の残基と疎水性コアを形成している。ところが、EUナンバリングで表される238位のProが、電荷をもち非常に親水的なAspに変化した場合、変化したAsp残基がそのまま疎水性コアに存在することは脱溶媒和の点でエネルギー的に不利となる。そこでFc (P238D)ではこのエネルギー的な不利を解消するため、EUナンバリングで表される238位のアミノ酸残基が溶媒側に配向する形に変化し、238位のアミノ酸残基付近のループ構造の変化をもたらしたと考えられる。さらに、このループはS-S結合で架橋されたヒンジ領域から距離的に遠くないことから、その構造変化が局所的な変化にとどまらず、Fc CH2ドメインAとドメインBの相対的な配置にも影響し、その結果、Fc γ RIIbとFc CH2ドメインBとの間の原子間相互作用に違いをもたらしたと推察される。このためP238D改変を既に有するFcに、天然型IgGにおいてFc γ RIIbに対する選択性、結合活性を向上させる改変を組み合わせても予測される効果が得られなかったと考えられる。

[0459] また、P238Dの導入による構造変化の結果、Fc CH2ドメインAにおいては、変異が導入されたP238Dに隣接するEUナンバリングで表される237位のGlyの主鎖とFc γ RIIbの160位のTyrとの間に水素結合が認められる(図24)。このTyr160に相当する残基はFc γ RIIaではPheであり、Fc γ RIIaとの結合の場合ではこの水素結合は形成されない。160位のアミノ酸は、Fcとの相互作用界面におけるFc γ RIIaとFc γ RIIbの間の数少ない違いの一つであることを併せて考慮すると、Fc γ RIIbに特有となるこの水素結合の有無が、Fc (P238D)のFc γ RIIbに対する結合活性の向上と、Fc γ RIIaに対する結合活性の低減を招き、選択性向上の原因になったと推測される。また、Fc CH2ドメインBについてはEUナンバリングで表される270位のAspとFc γ RIIbの131位のArgとの間に静電的な相互作用が認められる(図25)。Fc γ RIIaのアロタイプの一つであるFc γ RIIa H型では、Fc γ RIIbの131位のArgに対応する残基がHisであり、この静電相互作用は形成できない。このことからFc γ RIIa R型と比較してFc γ RIIa H型ではFc (P238D)に対する結合活性が低減している理由が説明可能である。このようなX線結晶構造解析の結果に基づく考察から、P238Dの導入によるそ

の付近のループ構造の変化とそれに伴うドメイン配置の相対的な変化が天然型IgGとFc γ Rとの結合ではみられない新たな相互作用が形成され、P238D改変体のFc γ RIIbに対する選択的な結合プロファイルにつながっている可能性があることが明らかとなった。

[0460] [Fc (P238D)の発現精製]

P238D改変を含むFcの調製は以下のように行われた。まず、hIL6R-IgG1-v1 (配列番号：62)のEUナンバリングで表される220位のCysをSerに置換し、EUナンバリングで表される236位のGluからそのC末端をPCRによってクローニングした遺伝子配列Fc (P238D)を参考実施例1に記載された方法と同様な方法で発現ベクターの作製、発現、精製が行われた。なお、EUナンバリングで表される220位のCysは通常のIgG1においては、L鎖のCysとdisulfide bondを形成しているが、Fcのみを調製する場合にはL鎖を共発現させないことから、不要なdisulfide bond形成を回避するために当該Cys残基はSerに置換された。

[0461] [Fc γ RIIb細胞外領域の発現精製]

Fc γ RIIb細胞外領域は、参考実施例2の方法にしたがって調製された。

[0462] [Fc (P238D) / Fc γ RIIb細胞外領域複合体の精製]

結晶化に使用するため得られたFc γ RIIb細胞外領域サンプル 2 mgに対し、glutathione S-transferaseとの融合蛋白として大腸菌により発現精製したEndo F1 (Protein Science (1996) 5, 2617-2622) 0.29 mgを加え、0.1M Bis-Tris pH6.5のBuffer条件で、室温にて3日間静置することにより、Fc γ RIIb細胞外領域のAsnに直接結合したN-acetylglucosamine以外のN型糖鎖が切断された。次に5000MWC0の限外ろ過膜により濃縮された糖鎖切断処理が施されたFc γ RIIb細胞外領域サンプルは、20mM HEPS pH7.5, 0.05M NaClで平衡化したゲルろ過カラムクロマトグラフィー (Superdex200 10/300) により精製された。さらに得られた糖鎖切断Fc γ RIIb細胞外領域画分にFc (P238D)をモル比でFc γ RIIb細胞外領域のほうが若干過剰となるよう混合された。10000MWC0の限外ろ過膜により濃縮された前記混合液を20 mM HEPS pH7.5、0.05M NaClで平

衡化したゲルろ過カラムクロマトグラフィー (Superdex200 10/300) を用いて精製することによって、Fc (P238D) / Fc γ RIIb細胞外領域複合体のサンプルが得られた。

[0463] [Fc (P238D) / Fc γ RIIb細胞外領域複合体の結晶化]

10000MWC0の限外ろ過膜 により約10 mg/mlまで濃縮された前記のFc (P238D) / Fc γ RIIb細胞外領域複合体の試料を用いて、シッティングドロップ蒸気拡散法により当該複合体が結晶化された。結晶化にはHydra II Plus One (MATRIX)を用い、100 mM Bis-Tris pH6.5、17% PEG3350、0.2 M Ammonium acetate、および2.7%(w/v) D-Galactoseのリザーバー溶液に対し、リザーバー溶液：結晶化サンプルを0.2 μ l：0.2 μ lで混合して結晶化ドロップを作成した。シールされた当該結晶化ドロップを20°Cに静置することによって、薄い板状の結晶が得られた。

[0464] [Fc (P238D) / Fc γ RIIb細胞外領域複合体結晶からのX線回折データの測定]

得られたFc (P238D) / Fc γ RIIb細胞外領域複合体の単結晶一つは100 mM Bis-Tris pH6.5、20% PEG3350、Ammonium acetate、2.7% (w/v) D-Galactose、Ethylene glycol 22.5%(v/v) の溶液に浸漬された後、微小なナイロンループレ付きのピンを用いて溶液ごとすくいとられ、液体窒素中で凍結された。その後、高エネルギー加速器研究機構の放射光施設フォトンファクトリーBL-1Aにて当該結晶からのX線回折データが測定された。なお、測定中は常に-178°Cの窒素気流中に置くことによって凍結状態を維持し、ビームラインに備え付けられたCCDディテクタQuantum 270 (ADSC) によって、結晶を0.8° ずつ回転させながらトータル225枚のX線回折画像が収集された。得られた回折画像からの格子定数の決定、回折斑点の指数付け、ならびに回折データの処理には、プログラムXia2 (CCP4 Software Suite)、XDS Package (Walfgang Kabsch) ならびにScala (CCP4 Software Suite) を用い、最終的に分解能2.46 Åまでの当該結晶の回折強度データが得られた。本結晶は、空間群P21に属し、格子定数 $a = 48.85 \text{ \AA}$ 、 $b = 76.01 \text{ \AA}$ 、 $c = 115.09 \text{ \AA}$ 、 $\alpha = 90^\circ$ 、 $\beta = 100.70$

°、 $\gamma = 90^\circ$ であった。

[0465] [Fc (P238D) / Fc γ RIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造解析]

Fc (P238D) / Fc γ RIIb細胞外領域複合体の結晶構造決定は、プログラムPhaser (CCP4 Software Suite) を用いた分子置換法によりおこなわれた。得られた結晶格子の大きさとFc (P238D) / Fc γ RIIb細胞外領域複合体の分子量から非対称単位中の複合体の数は一個と予想された。Fc (WT) / Fc γ RIIIa細胞外領域複合体の結晶構造であるPDB code:3SGJの構造座標から、A鎖239-340番ならびにB鎖239-340番のアミノ酸残基部分を別座標として取り出し、それぞれFc CH2ドメインの探索用モデルと設定した。同じくPDB code:3SGJの構造座標から、A鎖341-444番とB鎖341-443番のアミノ酸残基部分を一つの座標として取り出し、Fc CH3ドメインの探索用モデルと設定した。最後にFc γ RIIb細胞外領域の結晶構造であるPDB code:2FCBの構造座標からA鎖6-178番のアミノ酸残基部分を取り出しFc γ RIIb細胞外領域の探索用モデルと設定した。Fc CH3ドメイン、Fc γ RIIb細胞外領域、Fc CH2ドメインの順番に各探索用モデルの結晶格子内での向きと位置を、回転関数および並進関数から決定し、Fc (P238D) / Fc γ RIIb細胞外領域複合体結晶構造の初期モデルが得られた。得られた初期モデルに対し2つのFc CH2ドメイン、2つのFc CH3ドメインならびにFc γ RIIb細胞外領域を動かす剛体精密化をおこなったところ、この時点で25-3.0 Åの回折強度データに対し、結晶学的信頼度因子R値は40.4%、Free R値は41.9%となった。さらにプログラムRefmac5 (CCP4 Software Suite) を用いた構造精密化と、実験的に決定された構造因子 F_o とモデルから計算された構造因子 F_c ならびにモデルから計算された位相をもとに算出された $2F_o - F_c$ 、 $F_o - F_c$ を係数とする電子密度マップを見ながらのモデル修正をプログラムCoot (Paul Emsley) でおこなった。これらの作業を繰り返すことによってモデルの精密化がおこなわれた。最後に $2F_o - F_c$ 、 $F_o - F_c$ を係数とする電子密度マップをもとに水分子をモデルに組み込み、精密化をおこなうことによって、最終的に分解能25-2.6 Åの24291個の回折強度データを用い、4846個の非水素原子を含むモデルに対し、結晶学的信頼度因子R値は23.7%、Free R値は27.6%となっ

た。

[0466] [Fc (WT) / Fc γ RIIb細胞外領域複合体のモデル構造作成]

Fc (WT) / Fc γ RIIa細胞外領域複合体の結晶構造であるPDB code:3RY6の構造座標をベースに、プログラムDiscovery Studio 3.1 (Accelrys) のBuild Mutants機能を使い、Fc γ RIIbのアミノ酸配列と一致するように構造座標中のFc γ RIIaに変異が導入された。その際、Optimization LevelをHigh、Cut Radiusを4.5とし、5つのモデルを発生させ、その中から最もエネルギースコアが良いものを採用し、Fc (WT) / Fc γ RIIb細胞外領域複合体のモデル構造と設定した。

[0467] [実施例 1 1] 結晶構造に基づいて改変箇所を決定したFc改変体のFc γ Rに対する結合の解析

実施例 1 0 で得られたFc (P238D)とFc γ RIIb細胞外領域との複合体のX線結晶構造解析の結果に基づき、EUナンバリングで表される238位のProがAspに置換された改変FcにおいてFc γ RIIbとの相互作用に影響を与えることが予測される部位 (EUナンバリングで表される233位、240位、241位、263位、265位、266位、267位、268位、271位、273位、295位、296位、298位、300位、323位、325位、326位、327位、328位、330位、332位、334位の残基) に対して網羅的な改変が導入された改変体を構築することによって、P238D 改変に加えてさらにFc γ RIIbとの結合を増強する改変の組合せを得ることが可能であるか検討した。

[0468] IL6R-G1d (配列番号 : 5 4) に対し、EUナンバリングで表される439位のLysがGluに置換されたIL6R-B3 (配列番号 : 6 3) が作製された。次に、IL6R-B3の、EUナンバリングで表される238位のProがAspに置換されたIL6R-BF648が作製された。抗体L鎖としてはIL6R-L (配列番号 : 5 6) が共通に用いられた。参考実施例 1 と同様の方法に従い発現させたこれらの抗体の改変体が精製された。参考実施例 2 の方法によって各Fc γ R (Fc γ RIa、Fc γ RIIa H型、Fc γ RIIa R型、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa V型) に対するこれら抗体改変体の結合が網羅的に評価された。

[0469] 以下の方法に従って、それぞれのFc γ Rとの相互作用解析結果を表す図が作成された。各改変体の各Fc γ Rに対する結合量の値を、コントロールとした改変導入前の抗体（EUナンバリングで表される238位のProがAspに置換された改変であるIL6R-BF648/IL6R-L）の各Fc γ Rに対する結合量の値で割り、さらに100倍した値が各改変体の各Fc γ Rに対する相対的な結合活性の値として表された。横軸に各改変体のFc γ RIIbに対する相対的な結合活性の値、縦軸に各改変体のFc γ RIIa R型に対する相対的な結合活性の値をそれぞれ表示した（図26）。

[0470] その結果、図26に示すように、全改変中24種類の改変体は、改変導入前の抗体と比較してFc γ RIIbに対する結合が維持または増強していることが見出された。これらの改変体のそれぞれのFc γ Rに対する結合に関し、表16に示した。なお、表中の改変とはIL6R-B3（配列番号：63）に対して導入された改変を表す。ただし、IL6R-B3を作製する際の鋳型としたIL6R-G1d/IL6R-Lについては、*として示した。

[0471]

[表16]

改変体名	改変	相対的結合				
		FcγRIa	FcγRIIaR	FcγRIIaH	FcγRIIb	FcγRIIIa
IL6R-G1d/IL6R-L	*	140	650	1670	62	3348
IL6R-B3/IL6R-L		145	625	1601	58	3264
IL6R-BF648/IL6R-L	P238D	100	100	100	100	100
IL6R-2B002/IL6R-L	P238D/E233D	118	103	147	116	147
IL6R-BP100/IL6R-L	P238D/S267A	121	197	128	110	138
IL6R-BP102/IL6R-L	P238D/S267Q	104	165	66	106	86
IL6R-BP103/IL6R-L	P238D/S267V	56	163	69	107	77
IL6R-BP106/IL6R-L	P238D/H268D	127	150	110	116	127
IL6R-BP107/IL6R-L	P238D/H268E	123	147	114	118	129
IL6R-BP110/IL6R-L	P238D/H268N	105	128	127	101	127
IL6R-BP112/IL6R-L	P238D/P271G	119	340	113	157	102
IL6R-2B128/IL6R-L	P238D/Y296D	95	87	37	103	96
IL6R-2B169/IL6R-L	P238D/V323I	73	92	83	104	94
IL6R-2B171/IL6R-L	P238D/V323L	116	117	115	113	122
IL6R-2B172/IL6R-L	P238D/V323M	140	244	179	132	144
IL6R-BP136/IL6R-L	P238D/K326A	117	159	103	119	102
IL6R-BP117/IL6R-L	P238D/K326D	124	166	96	118	105
IL6R-BP120/IL6R-L	P238D/K326E	125	175	92	114	103
IL6R-BP126/IL6R-L	P238D/K326L	113	167	132	103	146
IL6R-BP119/IL6R-L	P238D/K326M	117	181	133	110	145
IL6R-BP142/IL6R-L	P238D/K326N	98	103	97	106	102
IL6R-BP121/IL6R-L	P238D/K326Q	118	155	135	113	157
IL6R-BP118/IL6R-L	P238D/K326S	101	132	128	104	144
IL6R-BP116/IL6R-L	P238D/K326T	110	126	110	108	114
IL6R-BP911/IL6R-L	P238D/A330K	52	101	108	119	120
IL6R-BP078/IL6R-L	P238D/A330M	106	101	89	105	91
IL6R-BP912/IL6R-L	P238D/A330R	60	81	93	103	97

[0472] 表16に示した改変体のFcγRIa, FcγRIIaR, FcγRIIaH, FcγRIIb, Fcγ

RIIIa V型に対するKD値を参考実施例2の方法で測定した結果を表13にまとめた。表中の改変とはIL6R-B3（配列番号：63）に対して導入した改変を表す。ただし、IL6R-B3を作製する際の鑄型としたIL6R-G1d/IL6R-Lについては、*として示した。また、表中のKD (IIaR)/KD (IIb)およびKD (IIaH)/KD (IIb)はそれぞれ、各改変体のFc γ RIIaRに対するKD値を各改変体のFc γ RIIbに対するKD値で割った値、各改変体のFc γ RIIaHに対するKD値を各改変体のFc γ RIIbに対するKD値で割った値を示す。親ポリペプチドのKD (IIb)/改変ポリペプチドのKD (IIb)は、親ポリペプチドのFc γ RIIbに対するKD値を各改変体のFc γ RIIbに対するKD値で除した値を指す。これらに加えて、各改変体のFc γ RIIaRおよびFc γ RIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値/親ポリペプチドのFc γ RIIaRおよびFc γ RIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値を表17に示した。ここで親ポリペプチドとは、IL6R-B3（配列番号：63）をH鎖に持つ改変体のことを指す。なお、表17のうち灰色で塗りつぶしたセルは、Fc γ RのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解析できないと判断されたため、参考実施例2に記載された

〔式2〕

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

の式を利用して算出した値である。

[0473]

[表17]

改変体名	改変	KD(nmol/L)						KD(IIaR)/ KD(IIb)	親ポリペプチド のKD(IIb)/ 改変 ポリペプチド のKD(IIb)	改変体のFcγRIIIaおよび FcγRIIIbに対する結合活性 のうち強い方のKD値/親ポリ ペプチドのFcγRIIIaおよび FcγRIIIbに対する結合活性 のうち強い方のKD値
		FcγRIa	FcγRIIaR	FcγRIIIaH	FcγRIIb	FcγRIIIaV	KD(IIaR)/ KD(IIb)			
IL6R-G1a/IL6R-L		3.2E-10	1.0E-06	6.7E-07	2.6E-06	3.5E-07	0.4	0.3	1.2	0.9
IL6R-B3/IL6R-L		4.2E-10	1.1E-06	7.7E-07	3.1E-06	3.3E-07	0.3	0.2	1.0	1.0
IL6R-BF648/IL6R-L	P238D	1.1E-08	1.5E-05	4.0E-05	1.2E-06	7.1E-05	13.0	33.9	2.6	19.9
IL6R-BE002/IL6R-L	P238D/E233D	6.4E-09	1.9E-05	8.6E-05	9.3E-07	5.3E-05	20.4	92.3	3.3	24.7
IL6R-BF100/IL6R-L	P238D/S267A	1.1E-09	7.8E-06	4.6E-05	1.1E-06	5.9E-05	7.3	42.6	2.9	10.2
IL6R-BF102/IL6R-L	P238D/S267Q	8.2E-09	8.4E-06	6.1E-05	9.0E-07	8.2E-05	9.4	67.6	3.4	11.0
IL6R-BF103/IL6R-L	P238D/S267W	3.5E-08	1.1E-05	8.8E-05	1.2E-06	1.1E-04	9.0	71.5	2.5	14.4
IL6R-BF106/IL6R-L	P238D/H268D	4.0E-09	1.1E-05	3.6E-05	9.3E-07	5.5E-05	11.6	38.7	3.3	14.0
IL6R-BF107/IL6R-L	P238D/H268E	1.5E-09	1.2E-05	5.2E-05	9.3E-07	6.3E-05	12.7	56.1	3.3	15.3
IL6R-BF110/IL6R-L	P238D/H268N	7.3E-09	1.7E-05	4.7E-05	1.5E-06	6.4E-05	11.7	31.5	2.1	22.6
IL6R-BF112/IL6R-L	P238D/P271G	6.5E-09	3.5E-06	3.5E-05	3.2E-07	6.9E-05	11.0	109.4	9.7	4.6
IL6R-2B128/IL6R-L	P238D/Y296D	1.3E-08	2.6E-05	3.4E-05	1.4E-06	7.2E-05	17.7	23.6	2.1	33.1
IL6R-2B169/IL6R-L	P238D/V323I	2.5E-08	1.9E-05	4.8E-05	1.2E-06	7.5E-05	15.8	40.7	2.6	24.3
IL6R-2B171/IL6R-L	P238D/V323L	9.1E-09	1.6E-05	3.4E-05	1.1E-06	5.7E-05	15.0	31.8	2.9	20.8
IL6R-2B172/IL6R-L	P238D/V323M	3.0E-09	6.1E-06	2.1E-05	7.7E-07	4.8E-05	8.0	27.3	4.0	8.0
IL6R-BF136/IL6R-L	P238D/K325A	6.6E-09	9.1E-06	3.8E-05	8.0E-07	6.9E-05	11.4	47.6	3.9	11.8
IL6R-BF117/IL6R-L	P238D/K325D	4.1E-09	9.2E-06	4.1E-05	8.0E-07	6.7E-05	11.6	51.4	3.9	12.0
IL6R-BF120/IL6R-L	P238D/K325E	6.6E-09	9.6E-06	6.5E-05	1.0E-06	7.9E-05	9.3	63.1	3.0	12.5
IL6R-BF126/IL6R-L	P238D/K325L	7.4E-09	1.1E-05	4.5E-05	1.4E-06	5.6E-05	7.8	31.7	2.2	14.4
IL6R-BF119/IL6R-L	P238D/K325M	7.0E-09	9.9E-06	4.5E-05	1.1E-06	5.6E-05	8.7	39.5	2.7	12.8
IL6R-BF142/IL6R-L	P238D/K325N	5.3E-09	1.8E-05	9.3E-05	1.2E-06	1.1E-04	15.5	79.5	2.6	23.5
IL6R-BF121/IL6R-L	P238D/K325Q	1.1E-08	1.3E-05	4.4E-05	1.1E-06	5.2E-05	11.7	40.4	2.8	16.6
IL6R-BF118/IL6R-L	P238D/K325S	1.2E-08	1.5E-05	4.6E-05	1.2E-06	5.6E-05	13.2	40.0	2.7	19.7
IL6R-BF116/IL6R-L	P238D/K325T	2.6E-09	1.5E-05	5.4E-05	1.1E-06	7.2E-05	13.3	48.2	2.8	19.4
IL6R-BF911/IL6R-L	P238D/A330K	4.9E-08	1.6E-05	3.7E-05	8.9E-07	5.8E-05	18.5	41.7	3.5	21.3
IL6R-BF078/IL6R-L	P238D/A330M	8.2E-09	1.5E-05	4.5E-05	1.1E-06	7.8E-05	13.4	41.3	2.8	19.0
IL6R-BF912/IL6R-L	P238D/A330R	3.8E-08	2.6E-05	3.8E-05	1.5E-06	7.8E-05	17.8	25.9	2.1	34.0

[0474] 表17から、いずれの改変体もIL6R-B3と比較してFc γ RIIbに対する親和性が向上し、その向上の幅は2.1倍から9.7倍であった。各改変体のFc γ RIIaRに対するKD値/各改変体のFc γ RIIbに対するKD値の比、および各改変体のFc γ RIIaHに対するKD値/各改変体のFc γ RIIbに対するKD値の比は、Fc γ RIIaRおよびFc γ RIIaHに対する結合活性に対する相対的なFc γ RIIbに対する結合活性を表す。つまり、この値は各改変体のFc γ RIIbへの結合選択性の高さを示した値であり、この値が大きければ大きいほどFc γ RIIbに対して結合選択性が高い。親ポリペプチドであるIL6R-B3/IL6R-LのFc γ RIIaRに対するKD値/Fc γ RIIbに対するKD値の比、およびFc γ RIIaHに対するKD値/Fc γ RIIbに対するKD値の比はそれぞれ0.3、0.2であるため、表17のいずれの改変体も親ポリペプチドよりもFc γ RIIbへの結合選択性が向上していた。改変体のFc γ RIIaRおよびFc γ RIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値/親ポリペプチドのFc γ RIIaRおよびFc γ RIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値が1以上であるとは、その改変体のFc γ RIIaRおよびFc γ RIIaHに対する結合活性のうち強い方の結合が親ポリペプチドのFc γ RIIaRおよびFc γ RIIaHに対する結合活性のうち強い方の結合と同等であるか、より低減していることを意味する。今回得られた改変体ではこの値が4.6から34.0であったため、今回得られた改変体のFc γ RIIaRおよびFc γ RIIaHに対する結合活性のうち強い方の結合は親ポリペプチドのそれよりも低減していたといえる。これらの結果から、今回得られた改変体では親ポリペプチドと比べて、Fc γ RIIa R型およびH型への結合活性を維持または低減しつつ、Fc γ RIIbへの結合活性を増強しており、Fc γ RIIbへの選択性を向上させていることが明らかとなった。また、Fc γ RIaおよびFc γ RIIIaVに対しては、いずれの改変体もIL6R-B3と比較して親和性が低下していた。

[0475] 得られた組合せ改変体のうち、有望なものについて、結晶構造からその効果の要因が考察された。図27にはFc (P238D) / Fc γ RIIb細胞外領域複合体の結晶構造を示した。この中で、左側に位置するH鎖をFc Chain A、右側に位置するH鎖をFc Chain Bとする。ここでFc Chain AにおけるEUナンバリングで

表される233位の部位は、Fc γ RIIbの113位のLysの近傍に位置することが分かる。ただし、本結晶構造においては、E233の側鎖はその電子密度がうまく観察されておらず、かなり運動性の高い状態にある。従ってEUナンバリングで表される233位のGluをAspに置換する改変は、側鎖が1炭素分短くなることによって側鎖の自由度が小さくなり、その結果、Fc γ RIIbの113位のLysとの相互作用形成時のエントロピーロスが低減され、結果、結合自由エネルギーの向上に寄与しているものと推測される。

[0476] 図28には同じくFc (P238D) / Fc γ RIIb細胞外領域複合体の構造のうち、EUナンバリングで表される330位の部位近傍の環境を示した。この図から、Fc (P238D) のFc Chain AのEUナンバリングで表される330位の部位周辺はFc γ R IIbの85位のSer、86位のGlu、163位のLysなどから構成される親水的な環境であることが分かる。従って、EUナンバリングで表される330位のAlaをLys、あるいはArgに置換する改変は、Fc γ R IIbの85位のSer、ないし86位のGluとの相互作用強化に寄与しているものと推測される。

[0477] 図29にはFc (P238D) / Fc γ RIIb細胞外領域複合体および、Fc (WT) / Fc γ R IIIa細胞外領域複合体の結晶構造を、Fc Chain Bに対しC α 原子間距離をもとにした最小二乗法により重ね合わせ、EUナンバリングで表される271位のProの構造を示した。これら二つの構造は、良く一致するが、EUナンバリングで表される271位のProの部位においては異なる立体構造となっている。また、Fc (P238D) / Fc γ R IIb細胞外領域複合体結晶構造においては、この周辺の電子密度が弱いことを考え合わせると、Fc (P238D)/Fc γ R IIbにおいては、EUナンバリングで表される271位がProであることで、構造上、大きな負荷がかかっており、それによってこのループ構造が最適な構造をとり得ていない可能性が示唆された。従って、EUナンバリングで表される271位のProをGlyに置換する改変は、このループ構造に柔軟性を与え、Fc γ R IIbと相互作用するうえで最適な構造をとらせる際のエネルギー的な障害を軽減することで、結合増強に寄与しているものと推測される。

[0478] [実施例12] P238Dと組み合わせることによりFc γ R IIbへの結合を増強する

改変の組合せ効果の検証

実施例 9 および 11 において得られた改変の中で、Fc γ RIIbへの結合を増強する効果もしくはFc γ RIIbへの結合を維持し、他のFc γ Rへの結合を抑制する効果がみられた改変同士を組み合わせることによる効果が検証された。

[0479] 実施例 11 の方法と同様に、表 13 および 17 から選択された特に優れた改変が、抗体H鎖IL6R-BF648に対して導入された。抗体L鎖としてIL6R-Lが用いられ、参考実施例 1 と同様の方法に従い発現した抗体が精製された。参考実施例 2 と同様の方法により各Fc γ R (Fc γ RIa、Fc γ RIIa H型、Fc γ RIIa R型、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa V型) に対する結合が網羅的に評価された。

[0480] 以下の方法に従って、それぞれのFc γ Rとの相互作用解析結果について相対的結合活性が算出された。各改変体の各Fc γ Rに対する結合量の値を、コントロールとした改変導入前の抗体 (EUナンバリングで表される238位のProがAspに置換されたIL6R-BF648/IL6R-L) の各Fc γ Rに対する結合量の値で除し、さらに100倍した値が各改変体の各Fc γ Rに対する相対的な結合活性の値として表された (表 18)。なお、表中の改変とはIL6R-B3 (配列番号: 63) に対して導入した改変を表す。ただし、IL6R-B3を作製する際の鋳型としたIL6R-G1d/IL6R-Lについては、*として示した。

[0481]

[表18-1]

改变体名	改变	相对的结合活性					
		FcgRIa	FcgRIIaR	FcgRIIaH	FcgRIIb	FcgRIIIaV	
L6R-G1d/L6R-L		140	650	1670	62	3348	
L6R-B3/L6R-L		145	625	1601	58	3264	
L6R-BF648/L6R-L	P238D	100	100	100	100	100	
L6R-2B253/L6R-L	P233D/P238D/V323M	155	288	207	156	126	
L6R-2B261/L6R-L	P233D/P238D/Y296D	100	94	91	115	87	
L6R-BP082/L6R-L	P233D/P238D/A330K	74	126	106	136	87	
L6R-BP083/L6R-L	P238D/Y296D/A330K	50	87	91	122	107	
L6R-BP064/L6R-L	P238D/V323M/A330K	109	203	162	141	106	
L6R-BP085/L6R-L	G237D/P238D/A330K	19	279	158	152	104	
L6R-BP066/L6R-L	P238D/K326A/A330K	72	155	116	137	123	
L6R-BP087/L6R-L	L234Y/P238D/A330K	33	163	179	137	158	
L6R-BP088/L6R-L	G237D/P238D/K326A/A330K	25	377	166	161	122	
L6R-BP089/L6R-L	L234Y/P238D/K326A/A330K	43	222	186	147	136	
L6R-BP129/L6R-L	P238D/P238D/Y296D/A330K	68	111	98	138	95	
L6R-BP130/L6R-L	P233D/P238D/V323M/A330K	104	272	224	160	115	
L6R-BP131/L6R-L	P233D/G237D/P238D/A330K	33	354	253	150	118	
L6R-BP132/L6R-L	P233D/P238D/K326A/A330K	91	191	130	150	120	
L6R-BP133/L6R-L	P238D/L234Y/P238D/A330K	41	174	151	137	114	
L6R-BP143/L6R-L	L234Y/P238D/K326A	86	236	143	133	114	
L6R-BP144/L6R-L	G237D/P238D/K326A	64	204	108	121	128	
L6R-BP145/L6R-L	L234Y/G237D/P238D	41	350	224	152	153	
L6R-BP146/L6R-L	L234Y/G237D/P238D/K326A	50	445	203	156	180	
L6R-BP147/L6R-L	L234Y/G237D/P238D/K326A/A330K	24	650	582	177	209	
L6R-BP148/L6R-L	P233D/L234Y/G237D/P238D/K326A/A330K	33	603	462	176	227	
L6R-BP149/L6R-L	P233D/L234Y/G237D/P238D/Y296D/K326A/A330K	29	539	401	173	186	
L6R-BP150/L6R-L	L234Y/G237D/P238D/K326A/A330K	30	757	770	183	204	
L6R-BP151/L6R-L	P233D/L234Y/G237D/P238D/K326A/A330K	39	705	621	180	221	
L6R-BP152/L6R-L	P233D/L234Y/G237D/P238D/Y296D/K326A/A330K	34	638	548	178	146	
L6R-BP176/L6R-L	P233D/P238D/K326D/A330K	102	201	128	147	131	
L6R-BP177/L6R-L	P233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/K326D/A330K	57	691	409	177	186	
L6R-BP178/L6R-L	P233D/G237D/P238D/P271G/A330K	51	653	259	179	110	
L6R-BP179/L6R-L	G237D/P238D/P271G/K326A/A330K	39	570	226	177	125	
L6R-BP180/L6R-L	G237D/P238D/P271G/A330K	29	602	203	179	100	

[0482] 表18-2は表18-1の続きの表である。

[表18-2]

U6R-BP181/U6R-L	P233D/P238D/P271G/K326A/A330K	108	362	150	170	122
U6R-BP182/U6R-L	P233D/P238D/P271G/Y296D/A330K	95	413	139	173	120
U6R-BP183/U6R-L	P233D/L234Y/P238D/P271G/K326A/A330K	83	423	191	164	113
U6R-BP184/U6R-L	P233D/P238D/P271G/A330K	96	436	131	171	106
U6R-BP185/U6R-L	P233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/Y296D/K326A/A330K	47	670	446	179	191
U6R-BP186/U6R-L	P233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/K326A/A330K	43	614	366	175	143
U6R-BP187/U6R-L	L234Y/P238D/P271G/K326A/A330K	68	387	205	157	124
U6R-BP188/U6R-L	P233D/G237D/P238D/H266D/P271G/A330K	74	636	234	179	121
U6R-BP189/U6R-L	G237D/P238D/H266D/P271G/K326A/A330K	56	557	163	177	141
U6R-BP190/U6R-L	G237D/P238D/H266D/P271G/A330K	50	615	224	161	155
U6R-BP191/U6R-L	P233D/P238D/H266D/P271G/K326A/A330K	125	382	145	170	142
U6R-BP192/U6R-L	P233D/P238D/H266D/P271G/Y296D/A330K	109	406	123	172	118
U6R-BP193/U6R-L	P233D/P238D/H266D/P271G/A330K	113	449	154	173	135
U6R-BP194/U6R-L	P233D/L234Y/G237D/P238D/H266D/P271G/K326A/A330K	69	672	395	178	249
U6R-BP195/U6R-L	P233D/L234Y/G237D/P238D/H266D/P271G/Y296D/K326A/A330K	68	661	344	181	221
U6R-BP196/U6R-L	L234Y/P238D/H266D/P271G/K326A/A330K	69	402	195	157	137
U6R-BP197/U6R-L	P233D/L234Y/G237D/P238D/H266D/P271G/Y296D/K326D/A330K	71	642	294	179	206
U6R-BP198/U6R-L	P233D/L234Y/P238D/H266D/P271G/K326A/A330K	104	449	168	164	157
U6R-BP199/U6R-L	P233D/P238D/K326D/A330K	112	172	116	144	103
U6R-BP200/U6R-L	P233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/K326D/A330R	60	754	517	188	164
U6R-BP201/U6R-L	P233D/G237D/P238D/P271G/A330R	57	696	359	186	121
U6R-BP202/U6R-L	G237D/P238D/P271G/K326A/A330R	43	615	285	185	108
U6R-BP203/U6R-L	G237D/P238D/P271G/A330R	35	637	255	185	68
U6R-BP204/U6R-L	P233D/P238D/P271G/K326A/A330R	110	301	137	165	121
U6R-BP205/U6R-L	P233D/P238D/P271G/Y296D/A330R	97	335	106	167	93
U6R-BP206/U6R-L	P233D/P238D/P271G/A330R	101	362	123	168	92
U6R-BP207/U6R-L	P233D/P238D/A330R	74	103	103	124	97
U6R-BP208/U6R-L	P233D/G237D/P238D/H266D/P271G/A330R	81	690	310	188	118
U6R-BP209/U6R-L	G237D/P238D/H266D/P271G/K326A/A330R	66	625	267	186	153
U6R-BP210/U6R-L	G237D/P238D/H266D/P271G/A330R	57	661	279	167	135
U6R-BP211/U6R-L	P233D/P238D/H266D/P271G/K326A/A330R	128	312	111	165	87
U6R-BP212/U6R-L	P233D/P238D/H266D/P271G/Y296D/A330R	117	363	135	173	122
U6R-BP213/U6R-L	P233D/P238D/H266D/P271G/A330R	118	382	123	169	100
U6R-BP214/U6R-L	P233D/L234Y/G237D/P238D/Y296D/K326D/A330K	36	498	285	174	165

[0483] 表18に示した改変体のFcγRIa, FcγRIIaR, FcγRIIaH, FcγRIIb, FcγRIIIa V型に対するKD値を参考実施例2の方法で測定した結果を表19-1および19-2にまとめた。表中の改変とはIL6R-B3（配列番号：63）に対して導入した改変を示した。ただし、IL6R-B3を作製する際の鑄型としたIL6R-G1d/IL6R-Lは、*として示した。また、表中のKD (IIaR)/KD (IIb)およびKD (IIaH)/KD (IIb)はそれぞれ、各改変体のFcγRIIaRに対するKD値を当該改変体のFcγRIIbに対するKD値で除した値、各改変体のFcγRIIaHに対するKD値を当該改変体のFcγRIIbに対するKD値で除した値を示す。親ポリペプチドのKD (IIb)/改変ポリペプチドのKD (IIb)は、親ポリペプチドのFcγRIIbに対するKD値を当該改変体のFcγRIIbに対するKD値で除した値を指す。これらに加えて、各改変体のFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値/親ポリペプチドのFcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値を表19-1および19-2に示した。ここで親ポリペプチドとは、IL6R-B3（配列番号：63）をH鎖に持つ改変体のことを指す。なお、表19-1および19-2のうち灰色で塗りつぶされたセル中の数値は、FcγRのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解析できないと判断されたため、参考実施例2に記載された

〔式2〕

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

の式を利用して算出した数値である。

[0484] 表19-1および19-2から、いずれの改変体もIL6R-B3と比較してFcγRIIbに対する親和性が向上し、その向上の幅は3.0倍から99.0倍であった。各改変体のFcγRIIaRに対するKD値/各改変体のFcγRIIbに対するKD値の比、および各改変体のFcγRIIaHに対するKD値/各改変体のFcγRIIbに対するKD値の比は、FcγRIIaRおよびFcγRIIaHに対する結合活性に対する相対的なFcγRIIbに対する結合活性を表す。つまり、この値は各改変体のFcγRIIbへの結合選択性の高さを示した値であり、この値が大きければ大きいほどFcγRIIbに対して結合選択性が高い。親ポリペプチドであるIL6R-B3/IL6R-LのFcγRIIaRに

対するKD値/Fc γ RIIbに対するKD値の比、およびFc γ RIIaHに対するKD値/Fc γ RIIbに対するKD値の比はそれぞれ0.3、0.2であるため、表19-1および19-2のいずれの改変体も親ポリペプチドよりもFc γ RIIbへの結合選択性が向上していた。改変体のFc γ RIIaRおよびFc γ RIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値/親ポリペプチドのFc γ RIIaRおよびFc γ RIIaHに対する結合活性のうち強い方のKD値が1以上であるとは、その改変体のFc γ RIIaRおよびFc γ RIIaHに対する結合活性のうち強い方の結合が親ポリペプチドのFc γ RIIaRおよびFc γ RIIaHに対する結合活性のうち強い方の結合と同等であるか、より低減していることを意味する。今回得られた改変体ではこの値が0.7から29.9であったため、今回得られた改変体のFc γ RIIaRおよびFc γ RIIaHに対する結合活性のうち強い方の結合は親ポリペプチドのそれと比較してほぼ同等か、それよりも低減していたといえる。これらの結果から、今回得られた改変体では親ポリペプチドと比べて、Fc γ RIIa R型およびH型への結合活性を維持または低減しつつ、Fc γ RIIbへの結合活性を増強しており、Fc γ RIIbへの選択性を向上させていることが明らかとなった。また、Fc γ RIaおよびFc γ RIIIaVに対しては、いずれの改変体もIL6R-B3と比較して親和性が低下していた。

[0485]

[表19-1]

変異体名	KD (mol/L)					親ポリペプチドのKD (IIB) / 変異ポリペプチドのKD (IIB)	KD (IIB) / KD (IIB) / KD (IIB)	変異体のFcγRIIIaに対する結合活性のうち強い方のKD値 / 親ポリペプチドのFcγRIIIaに対する結合活性のうち強い方のKD値 / 変異体のFcγRIIIaに対する結合活性のうち強い方のKD値
	FcγRIIIa	FcγRIIIaR	FcγRIIIaH	FcγRIIIaV	FcγRIIIaV			
IL6R-G1G/IL6R-L	3.2E-10	1.0E-06	6.7E-07	2.6E-06	3.3E-07	0.4	0.3	0.9
IL6R-E9/IL6R-L	4.2E-10	1.1E-06	7.7E-07	3.1E-06	3.3E-07	0.3	0.2	1.0
IL6R-EF848/IL6R-L	1.1E-08	1.5E-05	4.0E-05	1.2E-06	7.1E-06	13.0	33.9	19.9
IL6R-2E259/IL6R-L	1.4E-09	5.0E-06	1.3E-06	4.3E-07	5.0E-06	11.5	30.1	6.5
IL6R-2E261/IL6R-L	9.0E-09	2.2E-05	3.3E-05	1.0E-06	7.3E-05	21.8	32.4	28.6
IL6R-EP062/IL6R-L	1.3E-08	1.2E-05	3.7E-05	5.4E-07	3.1E-05	22.8	69.0	15.8
IL6R-EP063/IL6R-L	3.6E-08	2.3E-05	4.4E-05	7.9E-07	6.6E-06	29.0	55.5	29.9
IL6R-EP084/IL6R-L	7.0E-09	7.3E-06	2.4E-05	5.0E-07	6.7E-05	14.3	47.6	9.4
IL6R-EP085/IL6R-L	2.9E-07	4.2E-06	2.4E-05	3.2E-07	8.8E-05	13.1	74.5	5.5
IL6R-EP086/IL6R-L	2.7E-08	9.7E-06	3.4E-05	5.7E-07	5.7E-05	17.1	59.9	12.6
IL6R-EP087/IL6R-L	3.8E-08	9.7E-06	2.1E-05	6.1E-07	4.4E-06	16.0	34.7	12.6
IL6R-EP089/IL6R-L	3.9E-07	2.9E-06	2.3E-05	2.2E-07	5.7E-05	13.3	106.5	3.7
IL6R-EP089/IL6R-L	6.3E-08	5.4E-06	2.0E-05	3.9E-07	5.1E-05	16.6	51.9	8.3
IL6R-EP129/IL6R-L	2.5E-06	1.5E-05	4.0E-05	5.2E-07	7.5E-05	29.3	77.5	6.0
IL6R-EP130/IL6R-L	1.8E-09	5.3E-06	3.6E-05	3.0E-07	7.1E-05	17.5	85.5	6.9
IL6R-EP131/IL6R-L	1.2E-07	3.1E-06	1.4E-05	2.5E-07	5.3E-05	12.5	56.9	4.0
IL6R-EP132/IL6R-L	1.5E-08	8.0E-06	3.0E-05	3.7E-07	5.3E-05	21.5	81.1	10.3
IL6R-EP133/IL6R-L	1.3E-07	6.6E-06	2.6E-05	5.6E-07	5.3E-05	19.5	46.8	11.2
IL6R-EP143/IL6R-L	1.6E-08	5.7E-06	2.7E-05	5.7E-07	6.3E-05	10.0	47.1	7.5
IL6R-EP144/IL6R-L	3.7E-08	6.9E-06	3.6E-05	7.9E-07	5.3E-05	8.7	45.8	8.9
IL6R-EP145/IL6R-L	1.2E-07	3.4E-06	1.7E-05	3.4E-07	4.5E-05	9.9	49.9	4.4
IL6R-EP146/IL6R-L	7.4E-08	2.1E-06	1.8E-05	2.3E-07	3.3E-05	9.3	80.0	2.7
IL6R-EP147/IL6R-L	1.4E-07	6.9E-07	5.1E-06	6.6E-06	3.3E-05	13.6	77.7	1.2
IL6R-EP148/IL6R-L	8.9E-08	1.1E-06	7.0E-06	7.5E-06	9.0E-05	14.5	93.8	1.4
IL6R-EP149/IL6R-L	3.2E-07	1.4E-06	6.4E-06	9.3E-06	3.7E-05	15.0	89.9	1.6
IL6R-EP150/IL6R-L	3.2E-07	5.5E-07	3.4E-06	3.1E-06	3.4E-05	17.7	109.0	0.7
IL6R-EP151/IL6R-L	8.4E-08	4.7E-07	4.7E-06	4.0E-06	3.1E-05	16.9	117.8	0.9
IL6R-EP152/IL6R-L	7.3E-08	8.1E-07	5.6E-06	4.1E-06	4.3E-05	19.5	135.9	1.0
IL6R-EP176/IL6R-L	7.3E-09	6.9E-06	3.0E-05	5.6E-07	5.4E-05	19.1	83.1	8.9
IL6R-EP177/IL6R-L	3.3E-07	7.1E-07	8.2E-06	5.2E-06	3.7E-05	13.8	159.2	60.0
IL6R-EP178/IL6R-L	4.3E-08	1.4E-05	5.1E-05	5.1E-06	6.4E-05	18.1	272.4	1.3
IL6R-EP179/IL6R-L	6.4E-08	1.4E-06	1.6E-05	6.4E-06	5.3E-05	16.7	190.9	1.8
IL6R-EP180/IL6R-L	9.8E-08	1.2E-06	1.8E-05	6.2E-06	7.0E-05	18.6	290.8	43.9
IL6R-EP181/IL6R-L	7.5E-09	3.2E-06	2.6E-05	1.6E-07	5.7E-05	20.3	162.5	4.2
IL6R-EP182/IL6R-L	1.0E-08	2.6E-06	2.8E-05	1.1E-07	5.8E-05	23.5	256.9	3.3

[0486] 表19-2は表19-1の続きの表である。

[表19-2]

IL6R-BP163/IL6R-L E233D/I234Y/G237D/P238D/P271G/K326A/A330K	1.7E-06	2.5E-06	1.5E-05	2.4E-07	5.6E-05	10.7	62.5	12.9	3.3
IL6R-BP164/IL6R-L E233D/I234Y/G237D/P271G/A330K	1.1E-06	2.3E-06	3.0E-05	1.3E-07	5.6E-05	16.2	236.1	24.5	3.0
IL6R-BP185/IL6R-L E233D/I234Y/G237D/P238D/P271G/K326A/A330K	5.3E-08	9.8E-07	7.3E-05	6.9E-08	3.5E-05	12.5	105.2	44.5	1.1
IL6R-BP186/IL6R-L E330K	4.5E-06	9.6E-07	9.3E-06	6.1E-08	4.9E-05	15.6	152.5	50.7	1.3
IL6R-BP187/IL6R-L E234Y/P238D/P271G/K326A/A330K	2.5E-06	2.8E-06	1.9E-06	2.9E-07	5.6E-05	9.7	62.3	10.7	3.8
IL6R-BP188/IL6R-L E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/A330K	2.1E-06	1.0E-06	1.6E-06	4.6E-06	5.6E-05	31.9	350.1	67.6	1.3
IL6R-BP189/IL6R-L E237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	4.2E-08	1.4E-06	1.2E-05	7.4E-08	4.3E-05	18.5	263.8	41.8	1.8
IL6R-BP190/IL6R-L E237D/P238D/H268D/P271G/A330K	6.3E-08	1.1E-06	1.7E-05	5.8E-08	4.3E-05	19.3	292.6	53.2	1.5
IL6R-BP191/IL6R-L E233D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	4.0E-09	3.0E-05	2.7E-05	1.5E-07	4.9E-05	30.3	184.9	21.2	3.8
IL6R-BP192/IL6R-L E233D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K	6.6E-09	2.6E-06	3.2E-05	1.1E-07	5.9E-05	23.1	263.2	37.3	3.4
IL6R-BP193/IL6R-L E233D/P238D/H268D/P271G/A330K	6.3E-09	2.2E-06	2.5E-05	1.2E-07	5.2E-05	18.3	206.6	25.5	2.9
IL6R-BP194/IL6R-L E330K	2.4E-06	6.2E-07	6.5E-06	5.2E-06	2.7E-05	15.8	163.5	59.4	1.1
IL6R-BP195/IL6R-L E233D/I234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K 326A/A330K	2.3E-06	9.1E-07	1.0E-05	5.0E-06	3.1E-05	18.2	200.8	62.0	1.2
IL6R-BP196/IL6R-L E234Y/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	1.4E-06	3.0E-06	1.9E-05	2.2E-07	5.1E-05	13.4	85.2	13.9	3.9
IL6R-BP197/IL6R-L E233D/I234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K E268D/A330K	1.9E-06	9.8E-07	1.2E-05	5.8E-06	3.2E-05	17.1	208.7	53.7	1.3
IL6R-BP198/IL6R-L E233D/I234Y/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	1.1E-06	2.2E-06	2.0E-05	2.0E-07	4.4E-05	11.0	101.5	15.7	2.8
IL6R-BP199/IL6R-L E233D/P238D/K326D/A330K	6.4E-09	3.8E-05	2.5E-05	4.9E-07	5.1E-05	17.5	53.0	8.3	11.1
IL6R-BP200/IL6R-L E233D/I234Y/G237D/P238D/P271G/K326D/A330K	3.3E-06	6.3E-07	4.2E-06	3.4E-06	3.2E-05	16.6	123.9	91.2	0.8
IL6R-BP201/IL6R-L E233D/G237D/P238D/P271G/A330K	5.1E-08	8.4E-07	9.9E-05	4.0E-08	5.2E-05	21.0	172.1	77.1	1.1
IL6R-BP202/IL6R-L E237D/P238D/P271G/K326A/A330K	9.5E-06	1.2E-06	9.2E-06	6.4E-08	5.9E-05	19.2	144.0	48.4	1.6
IL6R-BP203/IL6R-L E237D/P238D/P271G/A330K	1.8E-07	9.9E-07	1.1E-05	4.9E-08	7.3E-05	20.5	226.8	63.7	1.3
IL6R-BP204/IL6R-L E233D/P238D/P271G/K326A/A330K	7.6E-09	4.5E-06	2.1E-05	2.5E-07	5.2E-05	17.6	82.7	12.2	5.8
IL6R-BP205/IL6R-L E233D/P238D/P271G/Y296D/A330K	7.7E-08	3.5E-05	2.6E-05	1.6E-07	5.6E-05	21.6	176.1	19.4	4.5
IL6R-BP206/IL6R-L E233D/P238D/P271G/A330K	8.2E-09	3.1E-06	2.4E-05	2.0E-07	5.9E-05	16.1	123.1	15.8	4.1
IL6R-BP207/IL6R-L E233D/P238D/P271G/A330K	3.2E-08	1.9E-05	2.9E-05	6.4E-07	5.6E-05	23.0	94.5	3.7	25.1
IL6R-BP208/IL6R-L E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/A330K	1.9E-06	6.5E-07	6.3E-06	3.2E-06	5.3E-05	26.3	256.2	95.4	1.1
IL6R-BP209/IL6R-L E237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	3.9E-06	1.2E-06	1.0E-05	5.1E-08	4.1E-05	22.7	195.3	60.4	1.5
IL6R-BP210/IL6R-L E237D/P238D/H268D/P271G/A330K	6.5E-08	1.0E-06	9.5E-06	3.9E-06	4.6E-05	25.4	241.1	78.4	1.3
IL6R-BP211/IL6R-L E233D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	4.2E-09	4.1E-06	2.7E-05	2.2E-07	7.2E-05	18.5	130.5	13.8	5.4
IL6R-BP212/IL6R-L E233D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K	5.2E-09	3.5E-06	2.2E-05	1.7E-07	5.2E-05	21.1	133.3	16.7	4.5
IL6R-BP213/IL6R-L E233D/P238D/H268D/P271G/A330K	4.1E-09	3.1E-06	2.4E-05	1.8E-07	6.3E-05	17.7	136.4	17.6	4.0
IL6R-BP214/IL6R-L E233D/I234Y/G237D/P238D/Y296D/K326D/A330K	5.9E-06	1.7E-06	9.2E-06	1.2E-07	3.8E-05	14.5	73.0	26.2	2.2

[0487] [実施例 1 3] Fc γ RIIbへの結合が増強された改変体の作製

実施例 8 で示されたように、Fc γ RIIbへの結合を増強する際に、他の活性型Fc γ Rに対する結合を可能な限り抑制したうえで、Fc γ RIIbへの結合を増強することが好ましい。そこで、Fc γ RIIbへの結合を増強する、または選択性を向上する効果がある改変同士を組み合わせ、さらにFc γ RIIbへの結合が増強されまたは選択性が向上した改変体が作製された。具体的には、Fc γ RIIbへの結合の増強、選択性の向上において優れた効果を示すP238Dの改変を基礎とし、実施例 9、実施例 1 1、実施例 1 2においてP238Dの改変と組み合わせることで効果が見られた改変同士がさらに組み合わせられた。

[0488] IL6R-G1d (配列番号：5 4)、IL6R-B3 (配列番号：6 3) のFc領域に、実施例 9、実施例 1 1、実施例 1 2においてP238Dの改変と組み合わせることで効果が認められた改変である、E233D、L234Y、G237D、S267Q、H268D、P271G、Y296D、K326D、K326A、A330R、A330Kを組み合わせる改変体が作製された。抗体鎖としてIL6R-L (配列番号：5 6) を用いて、参考実施例 1 の方法に従い、これらの改変体を重鎖を含む抗体が発現、精製された。参考実施例 2 の方法により各改変体の各Fc γ R (Fc γ RIa、Fc γ RIIaH、Fc γ RIIaR、Fc γ RIIb、Fc γ R IIIaV) に対する結合が評価された。

[0489] 各改変体の各Fc γ Rに対するKDを表 2 0 に示した。なお、改変とはIL6R-B3 (配列番号：6 3) に対して導入した改変を示した。ただし各改変体を作製する際の鋳型としたIL6R-B3/IL6R-Lは*として示した。表中の「KD (IIaR)/KD (IIb)」とは、各改変体のFc γ RIIaRに対するKDを各改変体のFc γ RIIbに対するKDで除した値であり、この値が大きいほどFc γ RIIbへの選択性が高いことを示す。「親ポリペプチドのKD (IIb)/改変ポリペプチドのKD (IIb)」は、IL6R-B3/IL6R-LのFc γ RIIbに対するKD値を各改変体のFc γ RIIbに対するKD値で除した値を指す。また、「親ポリペプチドのKD (IIaR)/改変ポリペプチドのKD (IIaR)」は、IL6R-B3/IL6R-LのFc γ R IIaRに対するKD値を各改変体のFc γ R IIaRに対するKD値で除した値を指す。なお、表 2 0 中灰色で塗りつぶされたセル中の数値は、Fc γ RのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析で

は正しく解析できないと判断されたため、参考実施例 2 に記載された

〔式 2〕

$$KD = C \cdot R_{\max} / (R_{\text{eq}} - RT) - C$$

の式を利用して算出された数値である。

[0490]

[表20]

変異体名	変異	Fe Y R1aIに 対するKD (mol/L)	Fe Y R1aIIに 対するKD (mol/L)	Fe Y R1bIに 対するKD (mol/L)	Fe Y R1IIaV に対するKD (mol/L)	KD (IIaR)/KD (IIb)	親ホリペプチドの KD (IIb)/変異ホ リペプチドのKD (IIb)	親ホリペプチドの KD (IIaR)/変異ホ リペプチドのKD (IIaR)
IL6R-G1d/IL6R-L		3.20E-10	1.00E-06	6.70E-07	3.50E-07	0.4	1.2	1.1
IL6R-B3/IL6R-L		4.20E-10	1.10E-06	7.70E-07	3.30E-07	0.3	1	1
IL6R-BP219/IL6R-L	*	1.10E-08	1.30E-05	4.00E-05	7.10E-05	12.5	2.6	0.1
IL6R-BP215/IL6R-L	P238D	4.30E-08	1.50E-06	1.40E-05	6.70E-05	31.7	75.6	0.8
IL6R-BP216/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/A330K	6.20E-07	2.90E-06	2.60E-05	5.30E-05	20.7	22.1	0.4
IL6R-BP217/IL6R-L	G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/A330K	2.80E-06	3.60E-06	2.80E-05	6.00E-05	24	20.7	0.3
IL6R-BP218/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/K326D/A330K	3.70E-08	1.30E-06	1.20E-05	3.80E-05	19.7	40.8	0.7
IL6R-BP219/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/A330K	4.60E-08	6.10E-07	2.50E-05	2.90E-05	17.9	91.2	1.8
IL6R-BP220/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K	2.00E-08	1.10E-06	1.20E-05	5.80E-05	30.6	86.1	1
IL6R-BP221/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/Y296D/K326A/A330R	1.30E-07	7.10E-07	2.50E-06	4.50E-05	25.4	110.7	1.5
IL6R-BP222/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/P271G/K326A/A330R	5.10E-08	7.10E-07	5.60E-06	3.40E-08	20.9	91.2	1.5
IL6R-BP223/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330R	2.70E-08	6.00E-07	2.80E-06	3.20E-05	24	124	1.8
IL6R-BP224/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/A330K	6.20E-09	4.50E-07	9.50E-06	4.10E-05	12.9	88.6	2.4
IL6R-BP225/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/A330K	9.50E-08	6.90E-07	2.80E-06	3.20E-05	19.7	88.6	1.6
IL6R-BP226/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/P271G/K326D/A330R	5.20E-08	5.70E-07	2.40E-06	3.60E-05	17.3	93.9	1.9
IL6R-BP227/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/K326D/A330R	2.70E-08	6.20E-07	2.30E-06	2.10E-05	19.4	96.9	1.8
IL6R-BP228/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/A330K	5.50E-09	4.20E-07	1.10E-05	4.00E-08	10.5	77.5	2.6
IL6R-BP229/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/K326A/A330R	5.60E-08	8.10E-07	3.80E-06	3.70E-05	19.3	73.8	1.4
IL6R-BP230/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R	1.40E-08	5.70E-07	9.60E-06	6.70E-05	27.1	147.6	1.9
IL6R-BP231/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R	9.40E-09	7.40E-07	1.10E-05	2.30E-08	32.2	134.8	1.5
IL6R-BP232/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/P271G/K326A/A330K	7.60E-08	8.40E-07	2.80E-06	4.50E-05	15	55.4	1.3
IL6R-BP233/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/P271G/A330K	7.00E-08	6.90E-07	2.80E-06	3.70E-08	18.6	83.8	1.6
IL6R-BP234/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/A330K	6.50E-09	1.20E-06	2.00E-05	1.20E-07	10	25.8	0.9
IL6R-BP235/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R	3.50E-09	6.80E-07	7.50E-06	4.40E-08	15.5	70.5	1.6
IL6R-BP236/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/A330R	7.70E-09	8.40E-07	1.90E-05	6.50E-08	12.9	47.7	1.3
IL6R-BP237/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/A330K	4.10E-09	1.10E-06	1.90E-05	1.00E-07	11	31	1
IL6R-BP238/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R	2.40E-09	6.40E-07	7.00E-06	3.60E-08	17.8	86.1	1.7
IL6R-BP239/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/A330K	7.60E-09	8.10E-07	1.70E-05	6.00E-08	13.5	51.7	1.4
IL6R-BP240/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/A330R	7.60E-09	1.50E-06	2.60E-05	9.50E-08	15.8	32.6	0.7
IL6R-BP241/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/K326D/A330R	1.10E-09	6.80E-07	9.00E-06	4.50E-08	15.1	68.9	1.6
IL6R-BP242/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330R	1.90E-09	7.50E-07	8.60E-06	5.10E-08	14.7	60.8	1.5
IL6R-BP243/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/A330K	3.00E-09	5.40E-07	6.00E-06	3.60E-08	15	86.1	2
IL6R-BP244/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/A330R	7.80E-09	1.80E-06	2.60E-05	1.10E-07	16.4	28.2	0.6
IL6R-BP245/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/A330R	8.00E-09	1.40E-06	2.30E-05	3.90E-05	16.9	37.3	0.8
IL6R-BP247/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/A330K	7.50E-09	8.10E-07	1.20E-05	9.20E-08	17.4	53.7	0.7
IL6R-BP248/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R	1.70E-09	8.20E-07	1.10E-05	3.70E-08	21.9	83.8	1.4
IL6R-BP249/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R	7.00E-09	6.20E-07	7.20E-06	3.50E-08	23.4	88.6	1.3
IL6R-BP250/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R	7.00E-09	6.20E-07	7.20E-06	3.70E-08	16.8	83.8	1.8

[0491] ヒト天然型IgG1の配列を含むIL6R-G1d/IL6R-LにK439Eの改変が導入されたIL6R-B3/IL6R-Lの各Fc γ Rに対する結合を1とした場合に、IL6R-G1d/IL6R-LのFc γ RIaへの結合が1.3倍、Fc γ RIIaRへの結合が1.1倍、Fc γ RIIaHへの結合が1.1倍、Fc γ RIIbへの結合が1.2倍、Fc γ RIIIaVへの結合が0.9倍であり、IL6R-G1d/IL6R-LとIL6R-B3/IL6R-Lのこれら全てのFc γ Rに対する結合は同等であった。従って各改変体の各Fc γ Rへの結合を当該改変導入前のIL6R-B3/IL6R-Lと比較することは、各改変体の各Fc γ Rへの結合をヒト天然型IgG1の配列を含むIL6R-G1d/IL6R-Lの各Fc γ Rへの結合と比較することと同等であると考えられる。そこでこれ以降の実施例においては各改変体の各Fc γ Rへの結合活性を当該改変導入前のIL6R-B3/IL6R-Lの各Fc γ Rへのと比較することとした。表20から、改変導入前のIL6R-B3と比較していずれの改変体のFc γ RIIbへの結合活性も向上しており、最も低かったIL6R-BF648/IL6R-Lの結合活性が2.6倍、最も高かったIL6R-BP230/IL6R-Lの結合活性は147.6倍向上していた。また、選択性を示すKD (IIaR)/KD (IIb)の数値は、最も低かったIL6R-BP234/IL6R-Lで10.0、最も高かったIL6R-BP231/IL6R-Lで32.2となり、いずれの改変体の当該数値も改変導入前のIL6R-B3/IL6R-Lの0.3と比較して選択性が向上していた。なお、いずれの改変体も、Fc γ RIa、Fc γ RIIaH、Fc γ RIIIaVへの結合活性は改変導入前のIL6R-B3/IL6R-Lのそれよりも低かった。

[0492] [実施例14] Fc γ RIIbに対する結合を増強したFc領域とFc γ RIIb細胞外領域との複合体およびFc γ RIIaR細胞外領域との複合体のX線結晶構造解析

実施例13において最もFc γ RIIbへの結合が増強された改変体IL6R-BP230/IL6R-LのFc γ RIIbへの結合は、改変導入前のIL6R-B3/IL6R-Lと比較して約150倍に増強され、Fc γ RIIaRへの結合も1.9倍程度の増強に抑えられている。従ってIL6R-BP230/IL6R-LはFc γ RIIbへの結合、選択性共に優れた改変体であるが、可能な限りFc γ RIIaRへの結合を抑制したうえでFc γ RIIbへの結合がさらに増強されたより好ましい改変体を作製する可能性が模索された。

[0493] 実施例10の図25に示したように、P238Dの改変を含むFc領域では、CH2ドメインBのEUナンバリング270位で表されるAspとFc γ RIIbの131番目

のArgとの間で強固な静電相互作用が形成されるが、この131番目のアミノ酸残基がFc γ RIIIaおよびFc γ RIIaHではHisであるのに対し、Fc γ RIIaRではFc γ RIIbと同じArgである。その結果、Fc γ RIIaRとFc γ RIIbとの間では131番目のアミノ酸残基とCH2ドメインBのEUナンバリング270位で表されるAspとの相互作用に差が生じない。これが、Fc領域のFc γ RIIbへの結合とFc γ RIIaRへの結合の選択性が出にくい要因となっていると考えられた。

[0494] 一方で、Fc γ RIIaとFc γ RIIb細胞外領域のアミノ酸配列は、その93%が同一で非常に高い相同性を有している。天然型IgG1のFc領域（以下Fc (WT)）とFc γ RIIaRの細胞外領域複合体の結晶構造（J. Immunol. (2011) 187, 3208-3217）の分析によると、両者の相互作用の界面付近においては、Fc γ RIIaRとFc γ RIIbとの間でわずか3アミノ酸（Gln127、Leu132、Phe160）の違いしか見いだせておらず、Fc領域のFc γ RIIbへの結合とFc γ RIIaRへの結合の選択性の改善には相当な困難が予想された。

[0495] そのため、Fc領域のさらなるFc γ RIIbに対する結合活性の増強とFc領域のFc γ RIIbに対する結合とFc γ RIIaRへの結合の選択性の向上を図るために、Fc γ RIIbに対する結合が増強されたFc領域とFc γ RIIb細胞外領域との複合体の立体構造だけではなく、Fc γ RIIbに対する結合を増強したFc領域とFc γ RIIaR細胞外領域との複合体の立体構造が併せて解析され、当該Fc領域とFc γ RIIbとの相互作用と当該Fc領域とFc γ RIIaRとの相互作用の微妙な差異が明らかになることが重要と考えられた。そこで、最初にIL6R-BP230/IL6R-Lの作製において基礎となった改変体であって実施例12において作製されたIL6R-BP208/IL6R-LのFc領域からK439Eの改変が除かれたFc (P208) とFc γ RIIb細胞外領域、またはFc γ RIIaR細胞外領域との複合体のX線結晶構造が解析された。

[0496] (14-1) Fc (P208) とFc γ RIIb細胞外領域との複合体のX線結晶構造解析

[0497] [Fc (P208) の発現精製]

Fc (P208)は以下のように調製された。まず、IL6R-BP208の、EUナンバリングで表される439位のGluを天然型ヒトIgG1の配列であるLysにしたIL6R-P208が作製された。次にEUナンバリングで表される220位のCysがSerに置換された

改変体をコードするDNAを鋳型として、EUナンバリングで表される216位のGluからそのC末端がPCRによってクローニングされた遺伝子配列Fc (P208)がクローニングされた。参考実施例1に記載の方法にしたがって発現ベクターの作製、発現、精製を行った。なお、通常のIgG1のEUナンバリングで表される220位のCysは、L鎖に存在するCysとジスルフィド結合を形成しているが、Fc領域のみを調製する場合、L鎖を共発現させないため、不要なdisulfide bond形成を回避するために当該220位のCysはSerに置換された。

[0498] [Fc γ RIIb細胞外領域の発現精製]

Fc γ RIIb細胞外領域は、参考実施例2の方法にしたがって調製された。

[0499] [Fc (P208) Fc γ RIIb細胞外領域複合体の精製]

glutathione S-transferaseとの融合蛋白として大腸菌内で発現されたEndo F1 (Protein Science (1996) 5, 2617-2622) の精製産物0.15 mgが加えられた、結晶化のために得られた1.5 mgのFc γ RIIb細胞外領域サンプルを、0.1M Bis-Tris pH6.5のバッファー中で、室温にて3日間静置することにより、当該Fc γ RIIb細胞外領域サンプル中のN型糖鎖がAsnに直接結合したN-acetylglucosamineを残して切断された。次に5000MWC0の限外ろ過膜により濃縮された前記の糖鎖切断処理が施されたFc γ RIIb細胞外領域サンプルは、20mM HEPES pH7.5, 0.1M NaClで平衡化されたゲルろ過カラムクロマトグラフィー (Superdex200 10/300) によって精製された。さらに、Fc (P208) がモル比でFc γ RIIb細胞外領域のほうが若干過剰となるよう加えられた、前記の糖鎖切断Fc γ RIIb細胞外領域の精製画分は、10000MWC0の限外ろ過膜により濃縮され、その後、25mM HEPES pH7.5, 0.1M NaClで平衡化されたゲルろ過カラムクロマトグラフィー (Superdex200 10/300) により精製された。前記のように得られた精製画分が、Fc (P208) / Fc γ RIIb細胞外領域複合体のサンプルとして以後の検討に使用された。

[0500] [Fc (P208)/Fc γ RIIb複合体細胞外領域複合体の結晶化]

10000MWC0の限外ろ過膜 により約10 mg/mlまで濃縮されたFc (P208) / Fc γ RIIb細胞外領域複合体のサンプルは、ハンギングドロップ蒸気拡散法によ

りSeeding法が併用して結晶化された。結晶化にはVDXmプレート (Hampton Research) を用い、0.1M Bis-Tris pH6.5、19%(w/v) PEG3350、0.2 M Potassium Phosphate dibasicのリザーバー溶液に対し、リザーバー溶液：結晶化サンプル=0.85 μ l：0.85 μ lで混合して作成された結晶化ドロップに、同様な条件で得られた同複合体の結晶をSeed Bead (Hampton Research) を用いて砕いた種結晶溶液から作成した希釈溶液0.15 μ lを添加し、リザーバーの入ったウェルに密閉、20°Cに静置することにより、板状の結晶が得られた。

[0501] [Fc (P208)/Fc γ RIIb細胞外領域複合体結晶からのX線回折データの測定]

前記のように得られたFc (P208) / Fc γ RIIb細胞外領域複合体の単結晶の一つを0.1M Bis-Tris pH6.5、24% (w/v) PEG3350、0.2 M Potassium Phosphate dibasic、20% (v/v) Ethylene glycolの溶液に浸した後、微小なナイロンループ付きのピンで溶液ごとすくいとり、液体窒素中で凍結させた当該単結晶からのX線回折データは、Spring-8のBL32XUにて測定された。なお、測定中、常に-178°Cの窒素気流中に置くことで凍結状態が維持され、ビームライン備え付けのCCDディテクタMX-225HE (RAYONIX) により、当該単結晶を0.6°ずつ回転させながら計300枚の当該単結晶のX線回折画像が収集された。得られた回折画像からの格子定数の決定、回折斑点の指数付け、および回折データの処理には、プログラムXia2 (J. Appl. Cryst. (2010) 43, 186-190)、XDS Package (Acta Cryst. (2010) D66, 125-132) およびScala (Acta Cryst. (2006) D62, 72-82) を用い、最終的に分解能2.81 Åまでの当該単結晶の回折強度データが得られた。本結晶は、空間群C222₁に属し、格子定数 a = 156.69 Å、b = 260.17 Å、c = 56.85 Å、 $\alpha = 90^\circ$ 、 $\beta = 90^\circ$ 、 $\gamma = 90^\circ$ であった。

[0502] [Fc (P208) / Fc γ RIIb細胞外領域複合体のX線結晶構造解析]

Fc (P208) / Fc γ RIIb細胞外領域複合体の構造は、プログラムPhaser (J. Appl. Cryst. (2007) 40, 658-674) を用いた分子置換法により決定された。得られた結晶格子の大きさとFc (P208) / Fc γ RIIb細胞外領域複合体の分子量から非対称単位中の複合体の数は一個と予想された。Fc (WT) / Fc γ RIIIa

細胞外領域複合体の結晶構造であるPDB code:3SGJの構造座標から別座標として取り出されたA鎖239-340番ならびにB鎖239-340番のアミノ酸残基部分が、Fc領域のCH2ドメインの探索用モデルとして使用された。同じくPDB code:3SGJの構造座標から一つの座標として取り出されたA鎖341-444番とB鎖341-443番のアミノ酸残基部分がFc領域のCH3ドメインの探索用モデルとして使用された。最後にFc γ R2b細胞外領域の結晶構造であるPDB code:2FCBの構造座標から取り出されたA鎖6-178番のアミノ酸残基部分がFc (P208)の探索用モデルとして使用された。Fc領域のCH3ドメイン、Fc γ R2b細胞外領域、Fc領域のCH2ドメインの各探索用モデルの結晶格子内での向きと位置を、回転関数および並進関数から決定しようとしたところ、CH2ドメインの一つの位置がうまく決定されなかった。そこで残りの三つの部分から計算された位相をもとに計算された電子密度マップから、Fc (WT) / Fc γ R3a細胞外領域複合体の結晶構造を参考にしながら最後のCH2ドメインAの位置が決定され、Fc (P208) / Fc γ R2b細胞外領域複合体結晶構造の初期モデルが得られた。得られた初期モデルに対し二つのFc領域のCH2ドメイン、二つのFc領域のCH3ドメインおよびFc γ R2b細胞外領域を動かす剛体精密化をおこなったところ、剛体精密化が行われた時点で25-3.0 Åの回折強度データを用いた構造モデルの結晶学的信頼度因子R値は42.6%、Free R値は43.7%となった。さらにプログラムREFMAC5 (Acta Cryst. (2011) D67, 355-367)を用いた構造精密化と、実験的に決定された構造因子 F_o と構造モデルから計算された構造因子Fc領域および構造モデルから計算された位相をもとに算出された $2F_o - F_c$ 、 $F_o - F_c$ を係数とする電子密度マップをみながら、構造モデルをプログラムCoot (Acta Cryst. (2010) D66, 486-501)を用いて修正する作業を繰り返すことで構造モデルの精密化がおこなわれた。さらに $2F_o - F_c$ 、 $F_o - F_c$ を係数とする電子密度マップをもとに水分子を構造モデルに組み込み、精密化を行うことで、最終的に分解能25-2.81 Åの27259個の回折強度データを用いた、4786個の非水素原子を含む構造モデルの、結晶学的信頼度因子R値は24.5%、Free R値は28.2%となった。

[0503] 構造解析の結果、Fc (P208)/Fc γ R2b細胞外領域複合体の立体構造が分解

能2.81 Åで決定された。その解析の結果、取得された構造を図30に示した。2つのFc領域のCH2ドメインの間にFcγRIIbの細胞外領域が挟まれるように結合しており、これまで解析された天然型IgGのFcであるFc (WT)とFcγRIIIa (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2011) 108, 12669-126674)、FcγRIIIb (Nature (2000) 400, 267-273、J. Biol. Chem. (2011) 276, 16469-16477)、およびFcγRIIa (J. Immunol. (2011) 187 (6), 3208-3217)の各細胞外領域との複合体の立体構造と類似していた。

[0504] 細部をみると、Fc (P208) /FcγRIIb細胞外領域の複合体では、G237DならびにP238Dの改変の導入の影響により、Fc (WT)/FcγRIIa細胞外領域の複合体と比較して、Fc領域のCH2ドメインAのヒンジ領域から続くEUナンバリングで表される233位から239位のループ構造が変化していた(図31)。この結果、Fc (P208)のEUナンバリングで表される237位のAsp主鎖とFcγRIIbの160番目のTyr側鎖との間に強固な水素結合の形成が認められた(図32)。この160番目のアミノ酸残基はFcγRIIaHおよびFcγRIIaRともにPheであり、水素結合の形成は不可能なことから、本水素結合はFc (P208)のFcγRIIbに対する結合活性の向上ならびにFcγRIIaに対する結合活性の低減というFc (P208)のFcγRIIbへの結合とFcγRIIaへの結合の選択性の獲得に重要な寄与をしているとも考えられる。

[0505] 一方で、Fc (P208)のEUナンバリングで表される237位のAspの側鎖自体はFcγRIIbとの結合に際してとくに目立った相互作用は形成しておらず、Fc領域内部のほかの残基との相互作用もみられなかった。このEUナンバリングで表される237位のAspの周囲には、Fc領域内のEUナンバリングで表される332位のIle、333位のGlu、334位のLysが近傍に位置していた(図33)。これらの部位のアミノ酸残基を親水性残基に置換することによってFc (P208)のEUナンバリングで表される237位のAsp側鎖と相互作用を形成させ、ループ構造を安定化できれば、当該Fc領域とFcγRIIbの160番目のTyrとの水素結合形成にともなうエントロピー的なエネルギー損失を軽減することにつながり、結合自由エネルギーの増加、つまり結合活性の向上につながる可能性も考えられた。

- [0506] 実施例10において示されたP238Dの改変を含むFc (P238D)とFc γ RIIb細胞外領域の複合体のX線結晶構造とFc (P208)とFc γ RIIb細胞外領域の複合体のX線結晶構造を比較すると、Fc (P208)はFc (P238D)と比較し、新たに5個の変異を含んでおり、その多くは側鎖レベルの変化にとどまる。ただし、Fc領域のCH2ドメインBにおいてはEUナンバリングで表される271位のProをGlyへと改変したことで、主鎖レベルでの位置変化がみられるとともに、併せてEUナンバリングで表される266-270位のループの構造変化がおきていた(図34)。実施例11に示したように、Fc (P238D)のEUナンバリングで表される270位のAspがFc γ RIIbの131番目のArgと強固な静電相互作用を形成する際に、このEUナンバリングで表される271位のPro部分に立体化学的なストレスがかかっている可能性が示唆された。今回EUナンバリングで表される271位のアミノ酸のGlyへの改変によりみられた構造変化は、改変前のProにたまっていた構造的なひずみが解消された結果と考えられ、その解消分がFc γ RIIbとの結合自由エネルギーの改善、つまり結合活性の向上につながったと推察され得る。
- [0507] さらにこのEUナンバリングで表される266-271位のループの構造変化に起因して、EUナンバリングで表される292位のArgが二状態をとりつつ構造変化をおこしていることが確認された。その際、このEUナンバリングで表される292位のArgとFc (P208)における改変残基の一つであるEUナンバリングで表される268位のAspとで形成される静電相互作用(図34)が、本ループ構造の安定化に寄与している可能性が考えられた。本ループ中のEUナンバリングで表される270位のAspとFc γ RIIbの131番目のArgとで形成される静電相互作用が、Fc (P208)とFc γ RIIbの結合活性に大きく寄与していることから、当該ループ構造を結合時のコンフォメーションに安定化させることで、結合にともなうエントロピー的なエネルギー損失が軽減され、本改変が結合自由エネルギーの増加つまり結合活性の向上につながった可能性がある。
- [0508] また、本構造解析結果をもとに、さらなる活性向上を目指した改変の可能性が精査され、改変導入部位の候補のひとつとしてEUナンバリングで表される239位のSerが見出された。図35に示すとおり、Fc γ RIIbの117番目のLys

が構造的にみてもっとも自然な形で伸びる方向にこのCH2ドメインBのEUナンバリングで表される239位のSerが位置している。ただ、今回の解析ではFc γ R IIbの117番目のLysの電子密度は観察されていないことから、一定の構造はとっておらず、現状ではFc (P208)との相互作用へのこのLys117の関与は限定的であるとも考えられる。このCH2ドメインBのEUナンバリングで表される239位のSerを、負電荷を有するAspまたはGluへと改変した場合、正電荷をもつFc γ R IIbの117番目のLysとの間に静電相互作用が期待でき、その結果としてFc γ R IIbへの結合活性の向上が期待された。

[0509] 一方、CH2ドメインAにおけるEUナンバリングで表される239位のSerの構造をみると、本アミノ酸側鎖は、EUナンバリングで表される236位のGlyの主鎖と水素結合を形成し、ヒンジ領域から続き、Fc γ R IIbの160番目のTyrの側鎖と水素結合を形成するEUナンバリングで表される237位のAspを含む233位から239位にかけてのループ構造を安定化させていると考えられた (図32)。当該ループ構造を結合時のコンフォメーションに安定化させることは、結合にともなうエントロピー的なエネルギー損失を軽減し、結果として結合自由エネルギーの増加つまり結合活性の向上につながる。一方、このCH2ドメインAにおけるEUナンバリングで表される239位のSerをAspまたはGluへと改変した場合、EUナンバリングで表される236位のGlyの主鎖との水素結合が失われ、ループ構造の不安定化につながる可能性もあり得る。さらにすぐ近くに存在するEUナンバリングで表される265位のAspとの静電反発をも招く可能性があり、さらなるループ構造の不安定化が起きるとも考えられた。この不安定化された分のエネルギーは、Fc γ R IIbとの結合自由エネルギーの減少に働くため、結果として結合活性の低下を招くことにもなり得る。

[0510] (14-2) Fc (P208) とFc γ R IIaR細胞外領域との複合体のX線結晶構造解析

[Fc γ R IIaR細胞外領域の発現精製]

Fc γ R IIaR細胞外領域は、参考実施例2の方法にしたがって調製された。

[0511] [Fc (P208) / Fc γ R IIaR型細胞外領域複合体の精製]

S-transferaseとの融合蛋白として大腸菌内で発現されたEndo F1 (Protein Science (1996) 5, 2617-2622) の精製産物0.15 mg、20 μ lの5 U/ml 濃度のEndo F2 (QA-bio) および20 μ lの5 U/ml 濃度のEndo F3 (QA-bio) が加えられた、1.5 mgの精製されたFc γ RIIa Rの細胞外領域サンプルを、0.1M Na Acetate pH4.5のバッファー中で、室温にて9日間静置の後、さらに、0.07 mgの前記Endo F1、7.5 μ l の前記Endo F2および7.5 μ l の前記Endo F3の追加後3日間静置することにより、当該Fc γ RIIa R細胞外領域サンプル中のN型糖鎖がAsnに直接結合したN-acetylglucosamineを残して切断された。次に10000MWC0の限外ろ過膜により濃縮された前記の糖鎖切断処理が施されたFc γ RIIaR細胞外領域サンプルは、25 mM HEPES pH7、0.1M NaClで平衡化したゲルろ過カラムクロマトグラフィー (Superdex200 10/300) によって精製された。さらに、Fc (P208) をモル比でFc γ RIIaR細胞外領域のほうが若干過剰となるよう加えられた、前記の糖鎖切断Fc γ RIIaR細胞外領域の精製画分は、10000MWC0の限外ろ過膜による濃縮後、25mM HEPES pH7、0.1M NaClで平衡化されたゲルろ過カラムクロマトグラフィー (Superdex200 10/300) により精製された。前記のように得られた精製画分が、Fc (P208)/Fc γ RIIaR型細胞外領域複合体のサンプルとして以後の検討に使用された。

[0512] [Fc (P208)/Fc γ RIIaR型細胞外領域複合体の結晶化]

10000MWC0の限外ろ過膜 により約10 mg/mlまで濃縮されたFc (P208)/Fc γ R IIa R型細胞外領域複合体のサンプルは、シッティングドロップ蒸気拡散法にて結晶化された。0.1 M Bis-Tris pH7.5、26% (w/v) PEG3350、0.2 M Ammonium Sulfaeのリザーバー溶液に対し、リザーバー溶液：結晶化サンプル=0.8 μ l : 1.0 μ lで混合して作成された結晶化ドロップを、シールで密閉して20°Cに静置することにより、板状の結晶が得られた。

[0513] [Fc (P208)/Fc γ RIIaR細胞外領域複合体結晶からのX線回折データの測定]

前記のように得られたFc (P208)/Fc γ RIIaR細胞外領域複合体の単結晶の一つを0.1 M Bis-Tris pH7.5、27.5% (w/v) PEG3350、0.2 M Ammonium Sulfate、20% (v/v) Glycerolの溶液に浸した後、微小なナイロンループレ付きのピン

で溶液ごとすくいとり、液体窒素中で凍結させた当該単結晶中からのX線回折データは、高エネルギー加速器研究機構の放射光施設フォトンファクトリー-BL-17Aにて測定された。なお、測定中、常に -178°C の窒素気流中に置くことで凍結状態が維持され、ビームライン備え付けのCCDディテクタQuantum 315r (ADSC) により、当該単結晶を 0.6° ずつ回転させながら計225枚の当該単結晶のX線回折画像が収集された。得られた回折画像からの格子定数の決定、回折斑点の指数付け、および回折データの処理は、プログラムXia2 (J. Appl. Cryst. (2010) 43, 186-190)、XDS Package (Acta Cryst. (2010) D66, 125-132) およびScala (Acta Cryst. (2006) D62, 72-82) を用い、最終的に分解能 2.87 \AA までの回折強度データが得られた。本結晶は、空間群 $C222_1$ に属し、格子定数 $a = 154.31\text{ \AA}$ 、 $b = 257.61\text{ \AA}$ 、 $c = 56.19\text{ \AA}$ 、 $\alpha = 90^{\circ}$ 、 $\beta = 90^{\circ}$ 、 $\gamma = 90^{\circ}$ であった。

[0514] [Fc (P208)/Fc γ RIIaR型細胞外領域複合体のX線結晶構造解析]

Fc (P208)/Fc γ RIIaR型細胞外領域複合体の構造は、プログラムPhaser (J. Appl. Cryst. (2007) 40, 658-674) を用いた分子置換法により決定された。得られた結晶格子の大きさとFc (P208)/Fc γ RIIaR細胞外領域複合体の分子量から非対称単位中の複合体の数は一個と予想された。実施例(14-1)で得られたFc (P208)/Fc γ RIIb細胞外領域複合体の結晶構造を探索用モデルとして用いて、Fc (P208)/Fc γ RIIaR細胞外領域複合体の結晶格子内での向きと位置が、回転関数および並進関数から決定された。さらに得られた初期構造モデルに対し、二つのFc領域のCH₂ドメイン、二つのFc領域のCH₃ドメインおよびFc γ RIIaR細胞外領域を独立に動かす剛体精密化をおこなったところ、剛体精密化が終了した時点で $25-3.0\text{ \AA}$ の回折強度データを用いた構造モデルの結晶学的信頼度因子R値は38.4%、Free R値は30.0%となった。さらにプログラムREFMAC5 (Acta Cryst. (2011) D67, 355-367) を用いた構造精密化と、実験的に決定された構造因子 F_o とモデルから計算された構造因子 F_c ならびにモデルから計算された位相をもとに算出された $2F_o-F_c$ 、 F_o-F_c を係数とする電子密度マップをみながら当該構造モデルをプログラムCoot (Acta Cryst. (

2010) D66, 486-501) を用いて修正する作業を繰り返すことで構造モデルの精密化がおこなわれた。最後に2Fo-Fc、Fo-Fcを係数とする電子密度マップをもとに水分子をモデルに組み込み、精密化をおこなうことで、最終的に分解能25-2.87 Åの24838個の回折強度データを用いた、4758個の非水素原子を含む構造モデルの、結晶学的信頼度因子R値は26.3%、Free R値は38.0%となった。

[0515] 構造解析の結果、Fc (P208)/Fc γ RIIaR細胞外領域複合体の立体構造が分解能2.87 Åで決定された。Fc (P208)/Fc γ RIIaR型細胞外領域複合体の結晶構造を、実施例(14-1)に示したFc (P208)/Fc γ RIIb細胞外領域複合体との結晶構造と比較したところ、両Fc γ レセプター間の非常に高いアミノ酸同一性を反映し、全体構造から把握されるレベルでは、ほとんど差異は見られなかった(図36)。

[0516] しかし、電子密度レベルで構造を詳細にみるとFc領域のFc γ RIIbへの結合とFc γ RIIaRへの結合の選択性の改善をもたらす可能性のある差異が見出された。Fc γ RIIaRの160番目のアミノ酸残基はTyrではなくPheであり、図37に示したとおり、P238Dの改変を含むFc領域とFc γ RIIbとの結合に際して存在したFc領域CH2ドメインAのEUナンバリングで表される237位のアミノ酸残基の主鎖とFc γ RIIbの160番目Tyrとの間の水素結合は、P238Dの改変を含むFc領域とFc γ RIIbとの結合では形成されないと考えられる。この水素結合の不形成がP238Dの改変が導入されたFc領域のFc γ RIIbへの結合とFc γ RIIaRへの結合の選択性改善の主要因と考えられるが、さらに電子密度レベルで比較してみると、当該Fc領域とFc γ RIIbとの複合体ではEUナンバリングで表される235位のLeu、およびEUナンバリングで表される234位のLeuの側鎖の電子密度が明確に確認可能であるのに対し、当該Fc領域とFc γ RIIaRとの複合体ではこれら側鎖の電儀密度が明確ではなく、EUナンバリングで表わされる237位近辺のループが、この付近でのFc γ RIIaRとの相互作用の低下にともない、ゆらいていると考えられた。一方、当該Fc領域のCH2ドメインBの同じ領域の構造を比較すると(図38)、当該Fc領域とFc γ RIIbとの複合体構造ではEUナンバリング

で表される237位のAspまでの電子密度が確認できるのに対し、当該Fc領域とFc γ RIIaRとの複合体では、EUナンバリングで表される237位のAspより手前の3残基、すなわちEUナンバリングで表される234位のLeu程度まで電子密度が確認することが可能であり、Fc γ RIIbへの結合と比較し、より広い領域を使って相互作用を形成していると考えられた。以上から、当該Fc領域とFc γ RIIbとの結合では、EUナンバリングで表される234位から238位の領域におけるFc領域のCH2ドメインA側の寄与が、当該Fc領域とFc γ RIIaRとの結合では、EUナンバリングで表される234位から238位の領域におけるFc領域のCH2ドメインB側の寄与が大きい可能性が示唆された。

[0517] [実施例15] 結晶構造に基づいて改変箇所を決定したFc改変体

実施例14においてFc γ RIIbへの結合が増強された改変体(P208)のドメインB内で、P271G改変の導入にともなう周囲の構造変化の結果として、EUナンバリングで表される268位のAspが、EUナンバリングで表される292位のArgと静電相互作用していることが示唆された(図34)。この相互作用形成がEUナンバリングで表される266位から271位のループ構造の安定化に働き、結果としてFc γ RIIbへの結合増強に寄与した可能性が考えられた。そこで、当該改変体のEUナンバリングで表される268位のAspをGluに置換することによって、前記の静電相互作用が強化され、当該改変体のループ構造をさらに安定化させることで、Fc γ RIIbへの結合増強が可能か否かが検討された。また図33に示したとおり、Fc γ RIIbのEUナンバリングで表される160位のTyrは、P208のドメインAのEUナンバリングで表される237位のAspの主鎖と相互作用している。一方、EUナンバリングで表される237位のAspの側鎖は、分子内のEUナンバリングで表される332位のIle、333位のGlu、334位のLysの近傍に位置しているが特に目立った相互作用は形成していない。そこで、これらの部位を親水性アミノ酸残基に置換することでEUナンバリングで表される237位のAspの側鎖との相互作用を強めて、EUナンバリングで表される266位から271位のループ構造を安定化することで、Fc γ RIIbの160番目のTyrとの相互作用が増強されるか否かが、併せて検証された。

[0518] 実施例 13 において作製された IL6R-BP230/IL6R-L の、H268E、I332T、I332S、I332E、I332K、E333K、E333R、E333S、E333T、K334S、K334T、K334E の改変がそれぞれ導入された改変体が作製された。抗体 L 鎖としては IL6R-L (配列番号：56) が用いられた。参考実施例 1 の方法に従い発現した、前記の重鎖の改変体と IL6R-L の軽鎖を含む抗体が精製された。精製された抗体の各 Fc γ R (Fc γ RIa、Fc γ RIIaH、Fc γ RIIaR、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIaV) に対する結合が、参考実施例 2 の方法によって評価された。

[0519] 各改変体の各 Fc γ R に対する KD を表 21 に示した。なお、表中の改変とは IL6R-B3 (配列番号：63) に対して導入された改変を示した。ただし IL6R-BP230 を作製する際の鋳型として用いられた IL6R-B3/IL6R-L は*として示した。また、表中の親ポリペプチドの KD (IIb)/改変ポリペプチドの KD (IIb) は、IL6R-B3/IL6R-L の Fc γ RIIb に対する KD 値を各改変体の Fc γ RIIb に対する KD 値で除した値を指す。また、親ポリペプチドの KD (IIaR)/改変ポリペプチドの KD (IIaR) は、IL6R-B3/IL6R-L の Fc γ R IIaR に対する KD 値を各改変体の Fc γ R IIaR に対する KD 値で除した値を指す。KD (IIaR)/KD (IIb) とは、各改変体の Fc γ R IIIaR に対する KD を当該改変体の Fc γ R IIIaR に対する KD で除した値であり、この値が大きいほど Fc γ R IIIaR への選択性が高いことを示す。なお、表 21 のうち灰色で塗りつぶされたセルの数値は、Fc γ R の IgG に対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解析できないと判断されたため、参考実施例 2 に記載された

[式 2]

$$KD = C \cdot R_{\max} / (R_{\text{eq}} - RT) - C$$

の式を利用して算出された数値である。

[0520]

[表21]

改変体名	IL6R-BP230に 加えた改変	Fc γ RIIaに 対するKD (mol/L)	Fc γ RIIaR に対するKD (mol/L)	Fc γ RIIaH に対するKD (mol/L)	Fc γ RIIbに 対するKD (mol/L)	Fc γ RIIaV に対するKD (mol/L)	KD (IIaR)/KD (IIb)	親ポリペプチドの KD(IIaR)/改変ポリ ペプチドのKD(IIaR)	親ポリペプチドの KD(IIb)/改変ポリ ペプチドのKD(IIb)
IL6R-G1d/IL6R-L		3.20E-10	1.00E-06	6.70E-07	2.60E-06	3.50E-07	0.4	1.1	1.2
IL6R-B3/IL6R-L	*	4.20E-10	1.10E-06	7.70E-07	3.10E-06	3.30E-07	0.3	1	1
IL6R-BP230/IL6R-L		1.40E-08	5.70E-07	9.60E-08	2.10E-08	6.70E-05	27.5	1.9	149
IL6R-BP264/IL6R-L	H268E	6.50E-09	4.80E-07	9.20E-06	1.20E-08	5.20E-05	40.6	2.3	265
IL6R-BP384/IL6R-L	K334R	3.00E-09	1.30E-06	1.80E-05	7.10E-08	4.30E-05	17.7	0.9	43.5
IL6R-BP390/IL6R-L	I332S	1.60E-09	4.90E-07	7.30E-06	2.10E-08	2.90E-05	22.9	2.2	144.9
IL6R-BP391/IL6R-L	I332T	9.60E-10	3.40E-07	4.40E-06	1.30E-08	1.90E-05	26.6	3.2	242.2
IL6R-BP392/IL6R-L	I332K	7.90E-09	7.30E-06	2.80E-05	9.90E-07	2.90E-05	7.3	0.2	3.1
IL6R-BP393/IL6R-L	I332R	1.10E-08	3.90E-06	4.60E-05	2.70E-06	4.80E-05	1.4	0.3	1.2
IL6R-BP465/IL6R-L	E333K	1.60E-08	6.10E-07	1.50E-05	2.10E-08	6.70E-05	29.8	1.8	151.2
IL6R-BP466/IL6R-L	E333R	1.50E-08	5.20E-07	1.10E-05	1.70E-08	2.90E-05	30.4	2.1	181.3
IL6R-BP467/IL6R-L	K334S	8.90E-10	1.10E-06	1.20E-05	4.10E-08	3.20E-05	25.8	1	75.4
IL6R-BP468/IL6R-L	K334T	9.70E-10	1.10E-06	9.70E-06	4.00E-08	2.70E-05	26.3	1	77.7
IL6R-BP469/IL6R-L	E333S	1.30E-08	6.00E-07	1.20E-05	2.30E-08	3.70E-05	26.4	1.8	136.6
IL6R-BP470/IL6R-L	E333T	1.50E-08	4.90E-07	1.60E-05	1.60E-08	3.70E-05	30.6	2.2	192.5

[0521] IL6R-BP230/IL6R-Lに対してH268Eの改変が導入されたIL6R-BP264/IL6R-L、E333Kの改変が導入されたIL6R-BP465/IL6R-L、E333Rの改変が導入されたIL6R-BP466/IL6R-L、E333Tの改変が導入されたIL6R-BP470のFc γ RIIbへの結合活性、およびFc γ RIIbの選択性は、IL6R-BP230/IL6R-Lのそれと比較して共に向上していた。またI332Tの改変が導入されたIL6R-BP391/IL6R-LのFc γ RIIbの選択性は、IL6R-BP230/IL6R-Lと比較して低下するものの、Fc γ RIIbへの結合活性が向上していた。

[0522] [実施例16] EUナンバリングで表される271位の周辺のアミノ酸残基への改変の網羅的導入

Fc (P208)とFc γ RIIbの構造とFc (P238D)/Fc γ RIIbの構造の比較において最も違いがみられるのは、Fc領域のCH2ドメインBのEUナンバリングで表される271位の近傍の構造である(図33)。実施例11に示したようにFc (P238D)ではEUナンバリングで表される270位のAspがFc γ RIIbの131番目のArgと強固な静電相互作用を形成する際に、EUナンバリングで表される271位のPro部分に立体化学的なストレスがかかっている可能性が示唆された。Fc (P208)/Fc γ RIIbの構造においてはEUナンバリングで表される271位のProのGlyへの置換により、この構造的なひずみを解消するように主鎖レベルでの位置変化がおきており、その結果、271位の近傍の構造が大きく変化したと考えられる。この変化した271位の近傍の構造をさらに安定化させることができれば、Fc γ RIIbの131番目のArgとの静電相互作用を形成結合にともなうエントロピー的

なエネルギー損失をさらに軽減できる可能性も考えられた。そこで、EUナンバリングで表される271位の周辺のアミノ酸残基に対する改変を網羅的に導入することにより、Fc領域のFcγRIIbに対する結合の増強あるいは選択性の向上を示す改変が探索された。

[0523] 改変を網羅的に導入する鋳型として、IL6R-B3（配列番号：63）に対して、E233D、G237D、P238D、H268E、P271Gの改変が導入されたIL6R-BP267が作製された。抗体L鎖としてはIL6R-L（配列番号：56）が用いられた。参考実施例1の方法に従い発現した、前記の重鎖の改変体とIL6R-Lの軽鎖を含む抗体が精製された。精製された抗体の各FcγR（FcγRIa、FcγRIIaH、FcγRIIaR、FcγRIIb、FcγRIIIaV）に対する結合が、参考実施例2の方法によって評価された。IL6R-BP267のEUナンバリングで表される264位、265位、266位、267位、269位、272位のアミノ酸が置換前のアミノ酸とCysを除く18種類のアミノ酸にそれぞれ置換された。抗体L鎖としてはIL6R-L（配列番号：56）が用いられた。参考実施例1の方法に従い発現した、前記の重鎖の改変体とIL6R-Lの軽鎖を含む抗体が精製された。精製された抗体の各FcγR（FcγRIa、FcγRIIaH、FcγRIIaR、FcγRIIb、FcγRIIIaV）に対する結合が、参考実施例2の方法によって評価された。得られた改変体の中から、改変を導入する前のIL6R-BP267/IL6R-LのFcγRIIbへの結合またはFcγRIIbの選択性と比較してFcγRIIbへの結合が増強された改変体、あるいはFcγRIIbへの選択性が向上した改変体を表22に示した。

[0524] [表22]

改変体名	IL6R-BP267に加えた改変	FcγRIaに対するKD (mol/L)	FcγRIIaRに対するKD (mol/L)	FcγRIIaHに対するKD (mol/L)	FcγRIIbに対するKD (mol/L)	FcγRIIIaVに対するKD (mol/L)	KD (IIaR)/KD (IIb)	親ポリペプチドのKD (IIaR)/改変ポリペプチドのKD (IIaK)	親ポリペプチドのKD (IIb)/改変ポリペプチドのKD (IIb)
IL6R-B3/IL6R-L	*	3.20E-10	1.00E-06	6.70E-07	2.60E-06	3.50E-07	0.4	1	1
IL6R-BP267/IL6R-L		4.00E-09	1.70E-06	1.90E-05	1.30E-07	5.30E-05	13	0.6	20.5
IL6R-BP348/IL6R-L	S267A	5.50E-10	7.00E-07	2.20E-05	4.60E-08	2.70E-05	15.3	1.4	56.9
IL6R-BP300/IL6R-L	V264I	9.60E-09	6.90E-07	2.20E-05	5.80E-08	5.60E-05	11.9	1.4	44.8
IL6R-BP367/IL6R-L	E269D	3.10E-09	1.20E-06	4.60E-05	1.00E-07	5.30E-05	11.7	0.8	25.7
IL6R-BP350/IL6R-L	S267E	8.90E-10	1.50E-07	8.30E-05	1.00E-07	8.90E-05	1.5	6.5	25.2
IL6R-BP333/IL6R-L	V266F	9.10E-09	1.50E-06	3.40E-05	1.20E-07	5.90E-05	12.5	0.7	22.2
IL6R-BP352/IL6R-L	S267G	1.80E-09	1.90E-06	2.80E-05	1.20E-07	4.30E-05	15.7	0.5	21.3
IL6R-BP339/IL6R-L	V266M	4.60E-09	1.40E-06	1.80E-05	1.30E-07	2.40E-05	11.3	0.7	20.6
IL6R-BP520/IL6R-L	E272M	3.90E-09	3.00E-06	3.10E-05	1.70E-07	4.70E-05	17.5	0.3	14.9
IL6R-BP523/IL6R-L	E272Q	3.70E-09	2.70E-06	2.90E-05	1.70E-07	4.10E-05	15.9	0.4	15.5
IL6R-BP313/IL6R-L	D265E	2.60E-08	1.30E-05	4.70E-05	8.40E-07	3.80E-05	15.6	0.1	3.1
IL6R-BP513/IL6R-L	E272D	3.80E-09	1.70E-06	3.90E-05	1.10E-07	7.50E-05	15.4	0.6	23.6
IL6R-BP521/IL6R-L	E272N	3.60E-09	2.90E-06	4.40E-05	1.90E-07	9.90E-05	15.2	0.3	13.5
IL6R-BP338/IL6R-L	V266L	1.50E-08	2.20E-06	2.20E-05	1.50E-07	2.50E-05	15	0.5	17.9
IL6R-BP517/IL6R-L	E272I	3.20E-09	2.10E-06	2.20E-05	1.40E-07	3.50E-05	14.7	0.5	18.1
IL6R-BP514/IL6R-L	E272F	4.30E-09	3.00E-06	6.40E-05	2.10E-07	9.10E-05	14	0.3	12.3

[0525] 各改変体の各FcγRに対するKDを表22に示した。なお、表中の改変とは、鑄型としたIL6R-BP267に対して導入された改変を示した。ただしIL6R-B3を製作する際の鑄型として用いられたIL6R-B3/IL6R-Lは*として示した。また、表中の親ポリペプチドのKD (IIb)/改変ポリペプチドのKD (IIb)は、IL6R-B3/IL6R-LのFcγRIIbに対するKD値を各改変体のFcγRIIbに対するKD値で除した値を指す。また、親ポリペプチドのKD (IIaR)/改変ポリペプチドのKD (IIaR)は、IL6R-B3/IL6R-LのFcγRIIaRに対するKD値を各改変体のFcγRIIaRに対するKD値で除した値を指す。KD (IIaR)/KD (IIb)とは、各改変体のFcγRIIaRに対するKDを当該改変体のFcγRIIbに対するKDで除した値であり、この値が大きいほどFcγRIIbへの選択性が高いことを示す。なお、表22中灰色で塗りつぶされたセル中の数値は、FcγRのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解析できないと判断されたため、参考実施例2に記載された

[式2]

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

の式を利用して算出された数値である。

[0526] 表22に示された改変体のFcγRIa、FcγRIIaH、FcγRIIIaVへの結合活性はいずれも、IL6R-B3/IL6R-Lのそれと比較して維持または減少していた。また、IL6R-BP267/IL6R-Lに対してそれぞれS267A、V264I、E269D、S267E、V266F、S267G、V266Mの改変が加えられた改変体のFcγRIIbへの結合活性は、改変を加える前のIL6R-BP267/IL6R-Lのそれと比較して増強されていた。また、IL6R-BP267/IL6R-Lに対してそれぞれS267A、S267G、E272M、E272Q、D265E、E272D、E272N、V266L、E272I、E272Fの改変が加えられた改変体のKD (IIaR)/KD (IIb)の値は、改変を加える前のIL6R-BP267/IL6R-Lのそれと比較して増加しており、S267A、S267G、E272M、E272Q、D265E、E272D、E272N、V266L、E272I、E272Fの改変がFcγRIIbへの選択性を向上させる効果を示すことが明らかとなった。

[0527] [実施例17] CH3領域への改変の導入によるFcγRIIbへの結合増強

EUナンバリングで表される396位のProをLeuに置換する改変はFc γ RIIbへの結合を増強することが報告されている (Cancer Res. (2007) 67, 8882-8890)。EUナンバリングで表される396位のアミノ酸はFc γ Rとの相互作用には直接関与しない部位であるが、抗体の構造を変化させることでFc γ Rとの相互作用に影響を与えらることも考えられる。そこで、Fc領域のEUナンバリングで表される396位のアミノ酸に改変を網羅的に導入することにより、Fc領域のFc γ RIIbへの結合あるいは選択性が向上するか否かが検証された。

[0528] 改変を網羅的に導する鋳型として、IL6R-B3 (配列番号: 63) に対して、E233D、G237D、P238D、S267A、H268E、P271G、A330Rの改変が導入されたIL6R-BP423が作製された。IL6R-BP423のEUナンバリングで表される396位のアミノ酸が置換前のアミノ酸とシステインを除く18種類のアミノ酸に置換された改変体が作製された。抗体L鎖としてはIL6R-L (配列番号: 56) が用いられた。参考実施例1の方法に従い、発現した前記の重鎖の改変体とIL6R-Lの軽鎖を含む抗体が精製された。精製された抗体の各Fc γ R (Fc γ RIa、Fc γ RIIaH、Fc γ RIIaR、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIaV) に対する結合が、参考実施例2の方法によって評価された。得られた改変体の各Fc γ Rへの結合を表23に示した。

[0529]

[表23]

改変体名	IL6R-BP423 に加えた改変	FcγRIaIaI に対するKD (mol/L)	FcγRIIaRI に対するKD (mol/L)	FcγRIIaH に対するKD (mol/L)	FcγRIIbI に対するKD (mol/L)	FcγRIIIaV に対するKD (mol/L)	KD (IIaR)/ KD (IIb)	親ポリペプチドの KD (IIaR)/改変ポ リペプチドのKD (IIaR)	親ポリペプチドの KD (IIb)/改変ポリ ペプチドのKD (IIb)
IL6R-G1d/IL6R-L		3.20E-10	1.00E-06	6.70E-07	2.60E-06	3.50E-07	0.4	1.1	1.2
IL6R-B3/IL6R-L	*	4.20E-10	1.10E-06	7.70E-07	3.10E-06	3.30E-07	0.3	1	1
IL6R-BP423/IL6R-L		7.70E-10	1.80E-07	2.00E-06	5.10E-09	1.60E-05	34.2	6.3	604
IL6R-BP447/IL6R-L	P396A	9.00E-10	1.60E-07	2.00E-06	5.30E-09	2.50E-05	29.7	7	584
IL6R-BP448/IL6R-L	P396D	7.50E-10	1.30E-07	1.40E-06	4.10E-09	9.70E-06	31.7	8.5	759
IL6R-BP449/IL6R-L	P396E	9.10E-10	1.40E-07	1.50E-06	4.60E-09	1.20E-05	29.8	8	667
IL6R-BP450/IL6R-L	P396F	8.40E-10	1.20E-07	1.30E-06	4.10E-09	9.60E-06	29.4	9.2	763
IL6R-BP451/IL6R-L	P396G	9.80E-10	1.80E-07	2.00E-06	6.20E-09	1.20E-05	29.2	6.1	499
IL6R-BP452/IL6R-L	P396H	7.50E-10	1.30E-07	1.50E-06	5.10E-09	1.10E-05	25.9	8.3	602
IL6R-BP453/IL6R-L	P396I	7.50E-10	1.20E-07	9.30E-07	4.60E-09	7.40E-06	25.5	9.4	675
IL6R-BP454/IL6R-L	P396K	8.20E-09	1.30E-07	1.40E-06	4.80E-09	9.10E-06	27.5	8.4	649
IL6R-BP455/IL6R-L	P396L	7.50E-10	1.30E-07	1.60E-06	4.00E-09	8.50E-06	31.8	8.6	767
IL6R-BP456/IL6R-L	P396M	6.00E-10	1.20E-07	2.00E-06	3.50E-09	9.20E-06	35.3	8.9	888
IL6R-BP457/IL6R-L	P396N	9.10E-10	1.50E-07	2.60E-06	5.20E-09	1.30E-05	28.9	7.3	591
IL6R-BP458/IL6R-L	P396Q	7.80E-10	1.40E-07	1.40E-06	4.50E-09	1.10E-05	31.1	7.9	687
IL6R-BP459/IL6R-L	P396R	1.10E-09	1.50E-07	1.40E-06	5.10E-09	1.20E-05	28.9	7.5	607
IL6R-BP460/IL6R-L	P396S	8.70E-10	1.60E-07	3.20E-06	6.50E-09	1.40E-05	25.2	6.7	478
IL6R-BP461/IL6R-L	P396T	1.30E-09	1.30E-07	1.50E-06	5.10E-09	9.90E-06	24.4	8.8	602
IL6R-BP462/IL6R-L	P396V	9.70E-10	1.30E-07	1.40E-06	5.20E-09	9.00E-06	25	8.5	593
IL6R-BP463/IL6R-L	P396W	1.30E-09	1.60E-07	1.90E-06	5.60E-09	1.20E-05	28.1	7	554
IL6R-BP464/IL6R-L	P396Y	1.10E-09	1.30E-07	2.10E-06	4.00E-09	9.90E-06	31.5	8.7	773

[0530] なお、表中の「IL6R-BP423に加えた改変」とは、鑄型としたIL6R-BP423に対して導入された改変を示した。ただし、IL6R-BP423を作製する際の鑄型として用いられたIL6R-B3/IL6R-Lは*として示した。また、表中の親ポリペプチドのKD (IIb)/改変ポリペプチドのKD (IIb)は、IL6R-B3/IL6R-LのFcγRIIbに対するKD値を各改変体のFcγRIIbに対するKD値で除した値を指す。また、親ポリペプチドのKD (IIaR)/改変ポリペプチドのKD (IIaR)は、IL6R-B3/IL6R-LのFcγRIIaRに対するKD値を各改変体のFcγRIIaRに対するKD値で除した値を指す。KD (IIaR)/KD (IIb)とは、各改変体のFcγRIIaRに対するKDを当該改変体のFcγRIIbに対するKDで除した値であり、この値が大きいほどFcγRIIbへの選択性が高いことを示す。なお、表23中灰色で塗りつぶされたセル中の数値は、FcγRのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解析できないと判断されたため、参考実施例2に記載された

[式2]

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

の式を利用して算出された数値である。

[0531] 表23の結果より、IL6R-BP423/IL6R-Lに対してP396Mの改変が導入されたIL6R-BP456/IL6R-L、P396Lの改変導入されたIL6R-BP455/IL6R-L、P396Yの改変が導入されたIL6R-BP464/IL6R-L、P396Fの改変が導入されたIL6R-BP450/IL6R-L、P396Dの改変が導入されたIL6R-BP448/IL6R-L、P396Qの改変が導入されたIL6R-BP458/IL6R-L、P396Iの改変が導入されたIL6R-BP453/IL6R-L、P396Eの改変が導入されたIL6R-BP449/IL6R-L、P396Kの改変が導入されたIL6R-BP454/IL6R-L、P396Rの改変が導入されたIL6R-BP459/IL6R-LのFcγRIIbへの結合活性は、いずれも改変を導入する前のIL6R-BP423/IL6R-Lのそれと比較して向上していた。また、IL6R-BP423/IL6R-Lに対してP396Mの改変が導入されたIL6R-BP456/IL6R-LのKD (IIaR)/KD (IIb)の値は、改変が導入する前のIL6R-BP423/IL6R-Lのそれと比較して大きく、FcγRIIbへの選択性が向上していた。表23中で作製された改変体はいずれもFcγRIa、FcγRIIaH、FcγRIIIaVへの結合活性は親ポリペプチドであるIL6R-B3/IL6R-Lのそれよりも低かった。

[0532] [実施例 18] サブクラス配列の利用によるFcγRIIbへの結合が増強された改変体の作製

ヒトIgGに存在するサブクラスによって、FcγRへの結合プロファイルが異なる。IgG1とIgG4の各FcγRへの結合活性の違いを、FcγRIIbへの結合活性の増強、および/または選択性の向上に利用できるか否かが検証された。はじめに、IgG1とIgG4の各FcγRへの結合活性が解析された。抗体H鎖としては、ヒトIgG4のEUナンバリングで表される228位のSerがProに置換され、C末端のGlyおよびLysが除去されたFc領域であるG4dを含むIL6R-G4d（配列番号：64）が抗体H鎖として作製された。抗体L鎖としてはIL6R-L（配列番号：56）が用いられた。参考実施例1の方法に従い発現した、IL6R-Lの軽鎖とIL6R-G1d/IL6R-LまたはIL6R-G4d/IL6R-Lを含む抗体が精製された。精製された抗体の各FcγR（FcγRIa、FcγRIIaH、FcγRIIaR、FcγRIIb、FcγRIIIaV）に対する結合が、参考実施例2の方法によって評価された。得られた改変体の各FcγRへの結合を表24にまとめた。

[0533] [表24]

改変体名	FcγRIaに対するKD (mol/L)	FcγRIIaRに対するKD (mol/L)	FcγRIIaHに対するKD (mol/L)	FcγRIIbに対するKD (mol/L)	FcγRIIIaVに対するKD (mol/L)
IL6R-G1d/IL6R-L	1.20E-10	9.70E-07	6.50E-07	3.90E-06	4.20E-07
IL6R-G4d/IL6R-L	6.60E-10	2.10E-06	3.40E-06	2.60E-06	3.40E-06

[0534] IL6R-G4d/IL6R-LのFcγRIIbへの結合は、IL6R-G1d/IL6R-Lのそれと比較して1.5倍強いものに対して、IL6R-G4d/IL6R-LのFcγRIIaRへの結合は、IL6R-G1d/IL6R-Lのそれと比較して2.2倍弱いことが示された。また、IL6R-G4d/IL6R-LのFcγRIa、FcγRIIaH、FcγRIIIaVへの結合活性は、IL6R-G1d/IL6R-Lのそれと比較して弱かった。以上の結果から、IL6R-G4dのFcγRIIbへの結合活性、選択性共に、IL6R-G1dと比較して好ましい性質を有していることが明らかとなった。

[0535] 図39はG1dとG4dのCH1からC末端までの配列（EUナンバリングで表される118位から445位）の比較を示したアラインメントである。図39中の黒く塗りつぶされたアミノ酸はG1dとG4dで異なるアミノ酸残基であることを示してい

る。これらの異なるアミノ酸の中から、Fc γ Rとの相互作用に関与すると予想される部位をいくつか選択し、Fc γ RIIbへの結合活性、選択性の観点で共に好ましい性質を付与するG4dの配列中の少なくとも一つ以上のアミノ酸残基をFc γ RIIbへの結合が増強された改変体に移植することで、更なるFc γ RIIbへの結合のさらなる増強、および/または選択性のさらなる向上が可能であるか否かが検証された。

[0536] 具体的には、IL6R-BP230に対して、A327Gの改変が導入されたIL6R-BP473、A330Sの改変が導入されたIL6R-BP472、P331Sの改変が導入されたIL6R-BP471、A330SおよびP331Sの改変が導入されたIL6R-BP474、A327GおよびA330Sの改変が導入されたIL6R-BP475、A327G、A330S、およびP331Sの改変が導入されたIL6R-BP476、A327GおよびP331Sの改変が導入されたIL6R-BP477が作製された。またIL6R-BP230のEUナンバリングで表される118位のAlaから225位のThrまでのアミノ酸がEUナンバリングで表される118位のAlaから222位のProまでからなるG4dの配列のアミノ酸に置換されたIL6R-BP478が作製された。抗体鎖としてはIL6R-L（配列番号：56）が用いられた。参考実施例1の方法に従い、前記の重鎖の改変体とIL6R-Lの軽鎖を含む抗体が精製された。精製された抗体の各Fc γ R（Fc γ RIa、Fc γ RIIaH、Fc γ RIIaR、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIaV）に対する結合が参考実施例2の方法により評価された。

[0537] 各改変体の各Fc γ Rに対するKDを表25に示した。なお、表中の、「親ポリペプチドのKD（IIb）/改変ポリペプチドのKD（IIb）」は、IL6R-B3/IL6R-LのFc γ RIIbに対するKD値を各改変体のFc γ RIIbに対するKD値で除した値を指す。表中の「IL6R-BP230に加えた改変」とはIL6R-BP230に対して導入された改変を示した。ただし、IL6R-BP230を作製する際の鋳型としたIL6R-B3/IL6R-Lは*1として示した。また、IL6R-BP230のEUナンバリングで表される118位のAlaから225位のThrまでが、EUナンバリングで表される118位のAlaから222位のProまでからなるG4dの配列に置換されたIL6R-BP478は*2として示した。「親ポリペプチドのKD（IIaR）/改変ポリペプチドのKD（IIaR）」は、IL6R-B3/IL6R-LのFc γ R IIaRに対するKD値を当該改変体のFc γ R IIaRに対するKD値で除した値

を指す。KD (IIaR)/KD (IIb)とは、各改変体のFc γ RIIaRに対するKDを当該改変体のFc γ RIIbに対するKDで除した値であり、この値が大きいほどFc γ RIIbへの選択性が高いことを示す。なお、表25において灰色で塗りつぶされたセル中の数値は、Fc γ RのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解析できないと判断されたため、参考実施例2に記載された

[式2]

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

の式を利用して算出された数値である。

[0538]

[0539] 表25に記載された改変体のうち、A327Gの改変が導入されたIL6R-BP473/IL6R-LのFc γ RIIbへの結合はIL6R-BP230/IL6R-Lのそれと比較して1.2倍増強されていた。また、IL6R-BP230のEUナンバリングで表される118位のAlaから225位のThrまでのアミノ酸が、EUナンバリングで表される118位のAlaから222位のProまでからなるG4dの配列のアミノ酸に置換されたIL6R-BP478/IL6R-LのFc γ RIIbへの結合は、IL6R-BP230/IL6R-Lのそれと比較して1.1倍増強し、IL6R-BP478/IL6R-L Fc γ RIIaRへの結合は、IL6R-BP230/IL6R-Lのそれと比較して0.9倍低減していた。いずれの改変体のFc γ RIa、Fc γ RIIaH、Fc γ RIIIaVへの結合活性は、親ポリペプチドであるIL6R-B3/IL6R-Lのそれよりも低かった。

[0540] ここまでの検討において、改変体IL6R-BP230/IL6R-LのEUナンバリングで表される327位のアミノ酸に対してヒトIgG4の配列中のアミノ酸に置換するA327Gの改変を導入することで、Fc γ RIIbへの結合活性が増強されることが示された。そこでIgG4とIgG1の配列で異なる部位であって、EUナンバリングで表される327位以外のアミノ酸についてさらに検討が行われた。具体的には、抗体H鎖として使用されたIL6R-BP230に対して、各々EUナンバリングで表されるK274Qが導入されたIL6R-BP541、Y296Fが導入されたIL6R-BP542、H268Qが導入されたIL6R-BP543、R355Qが導入されたIL6R-BP544、D356Eが導入されたIL6R-BP545、L358Mが導入されたIL6R-BP546、K409Rが導入されたIL6R-BP547、Q419Eが導入されたIL6R-BP548が作製された。抗体L鎖としてはIL6R-Lが共通して用いられた。参考実施例1の方法に従い、前記の重鎖の改変体とIL6R-Lの軽鎖を含む抗体が精製された。精製された抗体の各Fc γ R (Fc γ RIa、Fc γ RIIaH、Fc γ RIIaR、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIaV) に対する結合が参考実施例2の方法により評価された。

[0541] 各改変体の各Fc γ Rに対するKDを表26に示した。なお、表中の、「親ポリペプチドのKD (IIb)/改変ポリペプチドのKD (IIb)」は、IL6R-B3/IL6R-LのFc γ RIIbに対するKD値を各改変体のFc γ RIIbに対するKD値で除した値を指す。表中の「IL6R-BP230に加えた改変」とはIL6R-BP230に対して導入された改変を示した。ただし、IL6R-BP230を作製する際の鋳型としたIL6R-B3/IL6R-Lは*

1として示した。「親ポリペプチドのKD (IIaR)/改変ポリペプチドのKD (IIaR)」は、IL6R-B3/IL6R-LのFcγR IIaRに対するKD値を当該改変体のFcγR IIaRに対するKD値で除した値を指す。KD (IIaR)/KD (IIb)とは、各改変体のFcγR IIaRに対するKDを当該改変体のFcγRIIbに対するKDで除した値であり、この値が大きいほどFcγRIIbへの選択性が高いことを示す。なお、表26において灰色で塗りつぶされたセル中の数値は、FcγRのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解析できないと判断されたため、参考実施例2に記載された

[式2]

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

の式を利用して算出された数値である。

[0542] [表26]

改変体名	IL6R-BP230に 加えた改変	FcγRIa に対する KD(mol/L)	FcγRIIaR に対する KD(mol/L)	FcγRIIaH に対する KD(mol/L)	FcγRIIb に対する KD(mol/L)	FcγRIIaV に対する KD(mol/L)	KD(IIaR)/ KD(IIb)	親ポリペ チドの KD(IIaR)/ 改変ポリ ペプチドの KD(IIaR)	親ポリペ チドの KD(IIb)/ 改変ポリ ペプチドの KD(IIb)
IL6R-G1d/IL6R-L		3.2E-10	1.0E-06	6.7E-07	2.6E-06	3.5E-07	0.4	1.1	1.2
IL6R-B3/IL6R-L	*1	4.2E-10	1.1E-06	7.7E-07	3.1E-06	3.3E-07	0.3	1.0	1.0
IL6R-BP230/IL6R-L		1.0E-08	4.9E-07	9.7E-06	1.8E-08	3.9E-05	28.0	2.2	175.6
IL6R-BP541/IL6R-L	K274Q	1.1E-08	4.5E-07	9.3E-06	1.6E-08	4.1E-05	27.8	2.4	189.6
IL6R-BP542/IL6R-L	Y296F	1.3E-08	4.9E-07	9.7E-06	2.0E-08	4.3E-05	24.4	2.2	153.7
IL6R-BP543/IL6R-L	H268Q	2.3E-08	5.6E-07	7.4E-06	2.0E-08	4.6E-05	27.3	1.9	151.5
IL6R-BP544/IL6R-L	R355Q	9.8E-09	4.8E-07	1.2E-05	1.7E-08	4.5E-05	28.8	2.2	183.9
IL6R-BP545/IL6R-L	D356E	9.9E-09	5.7E-07	9.1E-06	1.7E-08	4.5E-05	32.7	1.9	178.6
IL6R-BP546/IL6R-L	L358M	9.0E-09	5.0E-07	1.0E-05	1.5E-08	3.7E-05	32.8	2.2	204.6
IL6R-BP547/IL6R-L	K409R	1.2E-08	4.9E-07	7.5E-06	1.9E-08	3.5E-05	25.5	2.2	162.6
IL6R-BP548/IL6R-L	Q419E	1.2E-08	5.0E-07	9.4E-06	1.9E-08	3.4E-05	26.2	2.2	161.8

[0543] 表26に示したように、IL6R-BP230/IL6R-Lに対して各々EUナンバリングで表されるK274Qが導入されたIL6R-BP541/IL6R-L、R355Qが導入されたIL6R-BP544/IL6R-L、D356Eが導入されたIL6R-BP545/IL6R-L、L358Mが導入されたIL6R-BP546/IL6R-Lは改変導入前のIL6R-BP230/IL6R-Lと比較してFcγRIIbへの結合が増強されていた。またこの中で、IL6R-BP230/IL6R-Lに対して各々EUナンバリングで表されるR355Qが導入されたIL6R-BP544/IL6R-L、D356Eが導入されたIL6R-BP545/IL6R-L、L358Mが導入されたIL6R-BP546/IL6R-Lは改変導入前のIL6R-BP230/IL6R-Lと比較してKD(IIaR)/KD(IIb)の値が増加しており、FcγRI

Ibへの選択性についても向上する改変であることが示された。

[0544] [実施例 19] Fc γ RIIbへの結合の増強、選択性の向上をもたらす改変の組合せの検討

これまでの検討において見出されたFc γ RIIbへの結合活性あるいは選択性を向上させる改変のさらなる組合せが検討された。具体的には、IL6R-B3（配列番号：63）に対してこれまでの検討の中でFc γ RIIbへの結合の増強、および/または選択性の向上をもたらした改変の組合せが導入された。また比較対照として既存のFc γ RIIbへの結合を増強する改変（Seungら（Mol. Immunol. (2008) 45, 3926-3933））である、S267E、およびL328Fの改変がIL6R-B3に導入されたIL6R-BP253が作製された。抗体L鎖としてはIL6R-L（配列番号：56）が用いられた。参考実施例1の方法に従い発現した、前記の重鎖の改変体とIL6R-Lの軽鎖を含む抗体が精製された。精製された抗体の各Fc γ R（Fc γ RIa、Fc γ RIIaH、Fc γ RIIaR、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIaV）に対する結合が、参考実施例2の方法によって評価された。

[0545] 各改変体の各Fc γ Rに対するKDを表27に示した。なお、表中の改変とはIL6R-B3（配列番号：63）に対して導入された改変を示した。ただし各改変体を作製する際の鋳型としたIL6R-B3/IL6R-Lは*として示した。親ポリペプチドのKD（IIb）/改変ポリペプチドのKD（IIb）は、IL6R-B3/IL6R-LのFc γ RIIbに対するKD値を各改変体のFc γ RIIbに対するKD値で除した値を指す。また、親ポリペプチドのKD（IIaR）/改変ポリペプチドのKD（IIaR）は、IL6R-B3/IL6R-LのFc γ R IIaRに対するKD値を当該改変体のFc γ R IIaRに対するKDで除した値を指す。KD（IIaR）/KD（IIb）とは、各改変体のFc γ RIIaRに対するKDを当該改変体のFc γ RIIbに対するKDで除した値であり、この値が大きいほどFc γ RIIaRと比較してFc γ RIIbへの選択性が高いことを示す。またKD（IIaH）/KD（IIb）とは、各改変体のFc γ RIIaHに対するKDを当該改変体のFc γ RIIbに対するKDで除した値であり、この値が大きいほどFc γ RIIaHと比較してFc γ RIIbへの選択性が高いことを示す。なお、表27において灰色で塗りつぶされたセル中の数値は、Fc γ RのIgGに対する結合が微弱であり、速度論的な解析では正しく解

析できないと判断されたため、参考実施例 2 に記載された

〔式 2〕

$$KD = C \cdot R_{\max} / (R_{\text{eq}} - RT) - C$$

の式を利用して算出された数値である。

[0546]

[表27]

変更様名	変更	FogR1aIに対する Kd (mol/L)	FogR1aR に対する Kd (mol/L)	FogR1aH に対する Kd (mol/L)	FogR1bC に対する Kd (mol/L)	FogR1aV に対する Kd (mol/L)	KD(IaR)/ KD(Ib)	霧ボリペブ 子トの Kd(IaR)/ Kd(Ib)	霧ボリペブ 子トの Kd(Ib)/改 変ボリ ペブ子トの Kd(Ib)
BP1		3.2E-10	1.0E-06	6.7E-07	2.8E-06	3.5E-07	0.4	0.8	1.1
BP2	*	4.2E-10	1.1E-06	7.7E-07	3.1E-06	3.3E-07	0.3	0.2	1.0
BP253	S267E/1928F	6.7E-11	2.1E-09	1.2E-06	1.1E-08	9.6E-06	0.2	107.1	528.8
BP262	S263D/P238D/H268E/P271G	1.0E-08	2.0E-06	4.5E-06	1.2E-07	5.6E-06	17.0	375.0	0.5
BP264	E233D/G237D/P238D/H268E/P271G/Y296D/A330R	7.4E-09	3.5E-07	2.8E-06	1.2E-08	2.6E-05	29.3	227.6	3.2
BP265	S263D/P238D/H268E/P271G/A330R	2.9E-08	6.3E-07	1.2E-05	1.5E-08	9.6E-06	41.2	789.5	1.8
BP266	E233D/G237D/P238D/H268E/P271G/A330R	1.4E-08	3.2E-07	1.1E-05	1.8E-08	4.0E-05	18.0	621.5	3.4
BP268	S263D/P238D/H268E/P271G/Y296D	4.5E-08	1.8E-06	2.1E-05	9.2E-08	2.8E-05	19.3	228.5	0.6
BP269	S263D/P238D/H268E/P271G/Y296D	1.4E-08	2.2E-06	7.2E-05	1.1E-07	1.4E-04	19.6	637.2	0.5
BP423	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R	7.7E-10	1.8E-07	2.0E-06	5.1E-06	1.9E-05	34.2	390.6	9.3
BP425	E233D/G237D/P238D/V266L/S267A/H268E/P271G/A330R	4.1E-09	2.2E-07	1.5E-06	9.1E-06	4.2E-05	23.6	1644.7	5.1
BP426	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R	1.0E-08	1.6E-07	4.9E-06	5.9E-08	4.1E-05	27.8	8361.8	6.8
BP428	E233D/G237D/P238D/S267G/H268E/P271G/A330R	4.9E-08	3.9E-07	4.2E-05	1.4E-08	3.6E-05	28.0	3000.0	2.8
BP429	E233D/G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/A330R	6.2E-09	1.7E-07	3.5E-06	5.4E-08	6.8E-05	31.5	548.1	6.5
BP430	E233D/G237D/P238D/V266L/S267G/H268E/P271G/A330R	1.7E-08	2.2E-07	1.1E-05	1.2E-08	3.5E-05	18.5	508.1	4.9
BP431	E233D/G237D/P238D/S267G/H268E/P271G/A330R	3.6E-08	4.1E-07	7.6E-06	8.4E-08	3.2E-05	34.3	649.6	2.7
BP434	E233D/G237D/P238D/H268E/P271G/Y296D/A330R/1932T	5.5E-10	3.4E-07	4.1E-06	1.2E-08	2.5E-05	27.2	593.9	3.3
BP435	E233D/G237D/P238D/H268E/P271G/Y296D/A330R/1932T	1.0E-08	2.2E-07	3.4E-06	1.5E-08	2.2E-05	27.1	217.9	2.6
BP436	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/1932T	2.8E-10	4.2E-07	2.1E-06	5.1E-09	1.3E-05	49.8	411.0	4.9
BP437	S263D/P238D/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/1932T	7.5E-10	2.2E-07	1.4E-06	5.9E-08	1.1E-05	37.7	236.5	4.9
BP438	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/1932T	2.1E-10	1.8E-07	1.6E-06	8.8E-06	6.8E-06	32.7	293.6	6.2
BP439	E233D/G237D/P238D/V264I/V266L/S267A/H268E/P271G/A330R	6.7E-08	1.3E-07	2.8E-06	6.1E-08	6.6E-05	20.9	460.5	8.7
BP440	E233D/G237D/P238D/V264I/V266L/S267A/H268E/P271G/A330R	8.7E-08	1.3E-07	1.8E-06	5.2E-08	2.8E-05	24.0	507.1	9.8
BP441	E233D/G237D/P238D/V266L/H268E/P271G/A330R	1.7E-08	3.6E-07	6.0E-06	1.5E-08	3.7E-05	24.0	502.0	3.0
BP442	E233D/G237D/P238D/H268E/P271G/A330R	4.5E-08	3.8E-07	4.7E-06	1.2E-08	2.5E-05	30.6	378.0	2.8
BP443	E233D/G237D/P238D/V266L/H268E/P271G/A330R	1.8E-08	5.1E-07	9.5E-06	2.8E-08	2.3E-05	21.7	406.0	2.2
BP445	E233D/G237D/P238D/V264I/V266L/S267A/H268E/P271G	2.0E-08	8.0E-07	1.5E-06	2.6E-08	2.4E-05	31.0	581.4	13.8
BP479	E233D/G237D/P238D/V266L/H268E/P271G	5.3E-08	9.0E-07	1.5E-05	5.8E-08	4.0E-05	16.1	268.3	1.2
BP480	E233D/G237D/P238D/V266L/H268E/P271G	1.3E-08	6.3E-06	2.1E-05	2.0E-07	4.6E-05	32.1	107.7	0.2
BP483	E233D/G237D/P238D/V266L/S267A/H268E/P271G	1.0E-08	4.0E-07	6.8E-06	1.8E-08	2.4E-05	20.5	350.5	2.8
BP484	E233D/G237D/P238D/V266L/S267A/H268E/P271G	1.3E-08	1.3E-06	1.8E-05	7.8E-06	2.5E-05	16.3	230.8	0.8
BP487	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396M	6.2E-10	7.8E-07	1.1E-06	4.8E-08	2.5E-05	17.1	240.7	1.4
BP489	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	1.2E-08	3.9E-08	6.4E-07	1.2E-08	1.0E-05	39.9	730.4	29.3
BP489	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	2.2E-08	7.4E-08	1.6E-06	1.0E-08	2.0E-05	40.1	564.9	14.8
BP490	S263D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R	1.3E-08	4.3E-08	8.7E-07	1.8E-08	1.2E-05	42.8	670.0	25.7
BP491	S263D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R	4.5E-08	1.1E-07	2.4E-06	2.4E-08	2.9E-05	46.7	1000.0	9.8
BP492	S263D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R	5.9E-08	1.2E-07	2.2E-06	3.0E-08	2.1E-05	36.9	723.7	9.3
BP492	P238D/V264I/S267A/H268E/P271G	7.9E-10	9.2E-07	1.6E-05	2.4E-08	3.6E-05	30.3	670.0	1.2
BP493	P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D	8.2E-10	1.1E-06	1.9E-05	2.1E-08	3.5E-05	52.1	900.5	1.0
BP494	S263D/P238D/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	3.9E-08	2.5E-07	5.4E-06	6.5E-08	4.0E-05	36.3	620.7	4.3
BP495	S263D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R	8.3E-08	4.9E-07	1.2E-05	9.7E-08	3.3E-05	50.9	1243.5	2.2
BP496	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D	1.2E-08	4.7E-07	3.7E-06	1.0E-08	3.0E-05	25.5	201.1	2.3
BP497	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R	2.1E-08	8.5E-08	9.6E-07	1.1E-08	2.8E-05	21.0	236.5	12.9
BP498	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R/P396L	1.3E-08	3.1E-08	9.3E-07	1.7E-08	1.0E-05	30.3	563.6	21.7
BP499	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396L	1.2E-08	4.9E-08	1.0E-06	1.9E-08	1.2E-05	38.9	684.9	22.3

改変体名	改変	FogRIaIに対する FogRIaI/KD(mol/L)	FogRIaHに対する FogRIaH/KD(mol/L)	FogRIbに対する FogRIb/KD(mol/L)	FogRIaVに対する FogRIaV/KD(mol/L)	KD(IterR)/KD(IterB)	KD(IterR)/KD(IterB) 変異子の 下の	KD(IterR)/KD(IterB) 変異子の 下の		
BP500	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D	2.3E-06	7.2E-07	2.5E-05	2.4E-06	3.9E-05	1.033.1	1.5	128.1	
BP501	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G	2.1E-06	6.3E-07	1.4E-05	2.5E-06	1.9E-05	555.6	1.7	129.0	
BP502	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A327G/A330R	2.1E-06	1.1E-07	1.3E-06	3.7E-06	2.4E-05	352.3	1.01	84.0	
BP503	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A327G/A330R/P396M	1.2E-06	5.7E-08	6.5E-07	1.7E-06	2.1E-05	502.9	19.4	1812.9	
BP504	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P	1.4E-06	4.5E-07	1.6E-05	2.4E-06	3.4E-05	658.4	2.4	127.6	
BP505	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D	1.1E-06	4.3E-07	1.1E-05	3.1E-06	3.6E-05	20.0	514.0	2.6	144.8
BP506	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P/Y296D/A330R	3.1E-06	1.2E-07	2.5E-06	9.4E-06	5.5E-05	36.1	791.0	9.2	906.4
BP507	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P/A330R	2.6E-06	1.0E-07	1.8E-06	2.9E-06	2.6E-05	34.2	618.6	11.1	1065.3
BP508	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P/Y296D	1.4E-06	5.4E-07	2.0E-05	2.1E-06	6.1E-05	26.0	961.5	2.0	149.0
BP509	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/Y296D	1.1E-06	5.2E-07	7.9E-06	1.8E-06	7.3E-05	29.2	443.8	2.1	174.2
BP510	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P/A330R	6.0E-06	1.7E-07	4.0E-06	3.8E-06	2.5E-05	43.5	1041.7	6.6	807.3
BP511	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P/Y296D/A330R	6.0E-06	1.8E-07	4.3E-06	3.5E-06	7.1E-05	50.6	1235.6	6.3	890.8
BP531	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396M	9.4E-06	1.2E-07	3.5E-06	3.8E-06	2.7E-05	38.1	933.3	8.9	826.7
BP532	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396M	1.2E-06	9.4E-08	1.9E-06	3.2E-06	2.6E-05	29.3	559.8	11.7	939.8
BP533	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396M	7.7E-06	1.2E-07	2.6E-06	4.1E-06	2.7E-05	28.3	634.1	9.2	756.1
BP534	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396M	9.3E-06	9.1E-08	1.8E-06	4.0E-06	2.5E-05	30.7	606.1	12.1	1049.8
BP535	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A327G/A330R/P396M	1.1E-06	9.2E-08	1.3E-06	3.0E-06	3.3E-05	29.2	806.0	11.9	790.9
BP536	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A327G/A330R/P396M	8.8E-06	7.8E-08	1.3E-06	3.0E-06	2.9E-05	26.8	457.7	13.9	1048.8
BP537	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R	2.9E-06	2.7E-07	3.1E-06	6.9E-06	3.6E-05	38.1	447.3	4.1	447.3
BP539	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R	5.5E-06	2.0E-07	3.0E-06	5.9E-06	3.9E-05	30.6	568.2	5.4	597.1
BP539	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P/Y296D/A330R	6.4E-06	3.3E-07	5.6E-06	8.4E-06	3.4E-05	38.0	666.7	3.4	399.0
BP540	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P/Y296D/A330R	9.8E-06	2.1E-07	4.8E-06	5.7E-06	3.9E-05	36.8	802.8	5.2	541.0
BP549	1.8E-06 5.7E-07 1.1E-05 1.6E-06 2.4E-05 36.9 696.2 1.9 196.2	1.8E-06	5.7E-07	1.1E-05	1.6E-06	2.4E-05	36.9	696.2	1.9	196.2
BP550	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R	2.5E-06	3.4E-07	5.0E-06	7.6E-06	4.8E-05	44.2	655.3	3.3	406.3
BP551	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R	3.2E-06	2.5E-07	2.8E-06	6.4E-06	4.8E-05	38.1	436.5	4.5	492.1
BP552	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R	3.2E-06	9.7E-08	1.9E-06	2.6E-06	3.0E-05	37.3	739.6	11.4	1196.9
BP553	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/A330R	3.4E-06	9.6E-08	1.4E-06	3.1E-06	2.0E-05	27.8	453.1	12.8	1009.2
BP554	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/A330R	8.0E-06	1.5E-07	2.3E-06	4.4E-06	2.4E-05	32.7	518.0	7.6	696.2
BP555	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R	9.4E-06	1.6E-07	3.2E-06	4.1E-06	3.0E-05	39.7	778.6	6.7	754.3
BP556	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	4.8E-06	3.0E-07	5.3E-06	8.4E-06	5.0E-05	35.4	692.1	3.7	399.9
BP557	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	1.3E-06	8.5E-07	1.5E-05	2.0E-06	2.8E-05	42.0	746.3	1.3	154.2
BP558	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/A330R	1.3E-06	3.3E-07	4.9E-06	9.0E-06	3.6E-05	36.4	543.2	9.4	349.7
BP559	P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/Y296D	1.1E-06	1.6E-06	2.0E-05	2.8E-06	4.1E-05	58.4	711.7	0.7	110.3
BP560	P238D/S267G/H268E/P271G/Y296D/A330R	5.6E-06	4.2E-08	1.8E-05	1.8E-07	4.1E-05	22.8	168.5	0.3	16.8
BP561	G233D/G237D/P238D/H268D/P271G/E272D/Y296D/A330R	9.4E-06	5.1E-07	5.3E-06	1.8E-06	3.7E-05	28.0	291.2	2.2	170.3
BP562	G237D/P238D/H268D/P271G/E272D/Y296D/A330R	2.9E-06	6.8E-07	1.1E-05	2.4E-06	5.3E-05	29.0	466.1	1.6	131.4
BP563	E233D/G237D/P238D/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R	1.2E-06	4.6E-07	8.3E-06	1.6E-06	3.8E-05	29.1	526.3	2.4	196.2
BP564	G237D/P238D/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R	3.1E-06	5.0E-07	1.0E-05	2.2E-06	4.9E-05	26.2	454.5	1.8	140.9
BP565	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	2.4E-06	2.8E-07	4.7E-06	5.5E-06	2.1E-05	41.5	856.1	4.8	594.7
BP567	E233D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D	2.1E-10	8.9E-07	1.7E-05	1.4E-06	3.9E-05	64.4	1251.9	1.2	224.6
BP568	E233D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G	1.9E-10	6.8E-07	1.1E-05	1.5E-06	2.5E-05	46.1	748.3	1.6	210.9

[0547] 表27に記載された改変体のうち、Fc γ RIIbへの結合を増強する既存の改変が加えられたIL6R-BP253/IL6R-LのFc γ RIIbおよびFc γ RIIaRに対する結合活性は、改変導入前のIL6R-B3/IL6R-Lのそれと比較して、それぞれ277倍、および529倍増強された。また、IL6R-BP253/IL6R-LのFc γ RIaへの結合活性もIL6R-B3/IL6R-Lのそれよりも増強されていた。一方、IL6R-BP253/IL6R-LのFc γ RIIaHおよびFc γ RIIIaVへの結合はIL6R-B3/IL6R-Lのそれと比較して減弱していた。その他の改変体のうち、IL6R-BP436/IL6R-LとIL6R-BP438/IL6R-LのFc γ RIaへの結合が、改変導入前のIL6R-B3/IL6R-Lのそれと比較してわずかに増強されたが、それ以外の改変体のFc γ RIaへの結合はいずれも減弱していた。また、いずれの改変体のFc γ RIIaH、およびFc γ RIIIaVへの結合は、IL6R-B3/IL6R-Lのそれと比較して減弱していた。

[0548] IL6R-BP489/IL6R-L、IL6R-BP487/IL6R-L、IL6R-BP499/IL6R-L、IL6R-BP498/IL6R-L、IL6R-BP503/IL6R-L、IL6R-BP488/IL6R-L、IL6R-BP490/IL6R-L、IL6R-BP445/IL6R-L、IL6R-BP552/IL6R-L、IL6R-BP507/IL6R-L、IL6R-BP536/IL6R-L、IL6R-BP534/IL6R-L、IL6R-491/IL6R-L、IL6R-BP553/IL6R-L、IL6R-BP532/IL6R-L、IL6R-BP506/IL6R-L、IL6R-BP511/IL6R-L、IL6R-BP502/IL6R-L、IL6R-BP531/IL6R-L、IL6R-BP510/IL6R-L、IL6R-BP535/IL6R-L、IL6R-BP497/IL6R-L、IL6R-BP533/IL6R-L、IL6R-BP555/IL6R-L、IL6R-BP554/IL6R-L、IL6R-BP436/IL6R-L、IL6R-BP423/IL6R-L、IL6R-BP440/IL6R-L、IL6R-BP538/IL6R-L、IL6R-BP429/IL6R-L、IL6R-BP438/IL6R-L、IL6R-BP565/IL6R-L、IL6R-BP540/IL6R-L、IL6R-BP426/IL6R-L、IL6R-BP437/IL6R-L、IL6R-BP439/IL6R-L、IL6R-BP551/IL6R-L、IL6R-BP494/IL6R-L、IL6R-BP537/IL6R-L、IL6R-BP550/IL6R-L、IL6R-BP556/IL6R-L、IL6R-BP539/IL6R-L、IL6R-BP558/IL6R-L、IL6R-BP425/IL6R-L、IL6R-BP495/IL6R-LのFc γ RIIbへの結合は、Fc γ RIIbへの結合を増強する既存の改変が加えられたIL6R-BP253/IL6R-Lのそれと比較して上回った。これらの中でFc γ RIIbへの結合が最も低かったIL6R-BP495/IL6R-Lから、最も高かったIL6R-BP489/IL6R-Lまでの増強の幅は、IL6R-B3/IL6R-Lの結合を1とした場合に321倍から3100倍までであった。

[0549] 本検討で作製された改変体と、既存のFc γ RIIbへの結合増強改変体であるIL6R-BP253/IL6R-Lを比較すると、KD (IIaR)/KD (IIb)の値は、最も低かったIL6R-BP479/IL6R-Lで16.1、最も高かったIL6R-BP567/IL6R-Lで64.4であり、いずれの改変体もIL6R-BP253/IL6R-Lの0.2と比較して高かった。またKD (IIaH)/KD (IIb)の値は、最も低かったIL6R-BP480/IL6R-Lで107.7、最も高かったIL6R-BP426/IL6R-Lで8362であり、いずれの改変体もIL6R-BP253/IL6R-Lの107.1と比較して高かった。これらの結果から、表27に示された改変体はいずれも、既存のFc γ RIIbに対する結合増強改変が加えられた改変体と比較してFc γ RIIbへの選択性が向上した改変体であることが示された。特に、IL6R-BP559/IL6R-L、IL6R-BP493/IL6R-L、IL6R-BP557/IL6R-L、IL6R-BP492/IL6R-L、IL6R-BP500/IL6R-LはいずれもFc γ RIIaRへの結合をIL6R-B3/IL6R-Lのそれと比較して1.5倍以下に維持しつつ、Fc γ RIIbへの結合活性が100倍以上に増強されていることから、Fc γ RIIaRへの結合を増強することによる副作用を回避しながらFc γ RIIbへの結合増強による効果を示すことが期待された。したがってこれらの改変体は、Fc γ RIIbへの結合活性、および選択性の両面で既存技術によって作製された抗体よりも優れた改変体であるといえる。

[0550] また、特定の理論に拘束されるものではないが、Y296Dを含む改変体であるIL6R-BP567/IL6R-LおよびIL6R-BP493/IL6R-L と比べて、高いTreg誘導能を有するTregitope配列 (De Grootら (Blood (2008) 112, 3303-3311)) が保存されており、高いTreg誘導活性をもつと考えられる改変体であるIL6R-BP568/IL6R-LおよびIL6R-BP492/IL6R-Lがより有効な改変体である可能性もある。これらの改変体のFc γ RIIbに対する結合活性および選択性についてみると、IL6R-BP568/IL6R-Lは天然型と比較してFc γ RIIaRへの結合が1.6倍、Fc γ RIIbへの結合が211倍であり、また、IL6R-BP492/IL6R-LはFc γ RIIaRへの結合が1.2倍、Fc γ RIIbへの結合が131倍であり、これらの改変体はFc γ RIIbに対する高い結合活性と選択性を有していた。

[0551] [実施例20] カルシウム依存的にヒトIgAに結合する抗体の調製

(20-1) ヒトIgA (hIgA) の調製

実施例2から4で、マウスFc γ Rに対する結合が増強されたpH依存的に抗原であるヒトIL-6レセプターに結合する分子は血漿中の抗原濃度を大幅に低下させることが可能であることが示された。次に、ヒトIL-6レセプター以外の抗原に対してpH依存的に結合し、マウスFc γ Rに対する結合が増強された抗体が投与された生体の血漿中の可溶性抗原を消失させる効果が同様に観察されるかについて更なる検証を行うために、ヒトIgAを抗原とする抗体を用いた試験が新たに実施された。抗原であるヒトIgA（以下hIgAとも呼ばれる）（可変領域は抗ヒトIL6R抗体）は以下のような組換え技術を用いて調製された。H（WT）-IgA1（配列番号：65）とL（WT）-CK（配列番号：42）を含む組み組換えベクターを含む宿主細胞を培養することによって発現されたhIgAが、当業者公知の方法によってイオン交換クロマトグラフィーおよびゲルろ過クロマトグラフィーを用いて精製された。

[0552] （20-2）hIgAに結合する抗体の発現と精製

GA2-IgG1（重鎖配列番号：66、軽鎖配列番号：67）はhIgAに結合する抗体である。GA2-IgG1（重鎖配列番号：66、軽鎖配列番号：67）をコードするDNA配列が動物細胞発現用プラスミドに当業者公知の方法で組み込まれた。抗体は以下の方法を用いて発現および精製された。ヒト胎児腎細胞由来FreeStyle 293-F株（Invitrogen）をFreeStyle 293 Expression Medium培地（Invitrogen）に懸濁させた細胞懸濁液が、 1.33×10^6 個/mLの細胞密度で6 well plateの各ウェルへ3 mLずつ播種された。次に、リポフェクション法により調製されたプラスミドが細胞へ導入された。当該細胞はCO₂インキュベーター（37°C、8%CO₂、90 rpm）で4日間培養され、単離されたその培養上清から、rProtein A Sepharose™ Fast Flow（Amersham Biosciences）を用いて当業者公知の方法で抗体が精製された。精製された抗体溶液の吸光度（波長：280nm）が、分光光度計を用いて測定された。得られた測定値からPACE法によって算出された吸光係数を用いて抗体濃度が算出された（Protein Science（1995）4, 2411-2423）。

[0553] （20-3）取得された抗体のhIgAに対するカルシウム依存的結合能の評価

Biacore T200 (GE Healthcare) を用いて、実施例 (20-2) で単離された抗体のhIgA結合活性 (解離定数KD (M)) が評価された。ランニングバッファとして3 μ Mまたは1.2 mM CaCl₂を含有する0.05% tween20、20 mmol/L ACE S、150 mmol/L NaCl (pH7.4またはpH5.8) を用いて当該結合活性が測定された。アミノカップリング法で適切な量の組換え型プロテインA/G (Thermo Scientific) が固定化されたSensor chip CM5 (GE Healthcare) に、抗体を結合させた。次に、アナライトとして適切な濃度のhIgA ((A1-1) に記載) をインジェクトすることによって、hIgAとセンサーチップ上の抗体を相互作用させた。測定は37°Cで行われた。測定後、10 mmol/L Glycine-HCl、 pH1.5をインジェクトすることによって、センサーチップが再生された。Biacore T200 Evaluation Software (GE Healthcare) を用いて、カーブフィッティングによる解析および平衡値解析により、測定結果から解離定数KD (M) が算出された。その結果を表28に示した。GA2-IgG1はCa²⁺濃度が1.2 mMの条件下ではhIgAに強く結合するが、Ca²⁺濃度が3 μ Mの条件下ではhIgAに弱く結合することが示された。また、GA2-IgG1はCa²⁺濃度が1.2 mMの条件下で、pH7.4においてはヒトIgAに強く結合するが、pH5.8においてはヒトIgAに弱く結合することが示された。すなわち、GA2-IgG1は、ヒトIgAに対して、pH依存的、および、カルシウム依存的に結合することが明らかとなった。

[0554] [表28]

抗体名	条件	Fit	ka	kd	KD[M]
GA2-IgG1	pH7.4, 1.2mM Ca	1:1binding model	4.0E+05	1.6E-02	3.9E-08
	pH7.4, 3 μ M Ca	Steady State Affinity	-	-	6.7E-06
	pH5.8, 1.2mM Ca	Steady State Affinity	-	-	4.0E-06
	pH5.8, 3 μ M Ca	Steady State Affinity	-	-	5.0E-06

[0555] [実施例21] カルシウム依存的にhIgAに結合する抗体の改変体の調製

次に、血漿中からの抗原 (hIgA) の消失をさらに増大させることを目的に、カルシウム依存的にhIgAに結合するGA2-IgG1に対してマウスFc γ Rに対する結合を増強するためにGA2-IgG1のEUナンバリングで表される328位のLeuがTyrに置換されたGA2-F1087 (重鎖配列番号: 68) が作製された。GA2-F1087 (

重鎖配列番号：68、軽鎖配列番号：67) をコードするDNA配列が当業者に公知の方法で組み込まれた動物発現用プラスミドを用いて、上述の方法で発現したこれらの抗体改変体の濃度が、精製後に測定された。この改変を含む抗体は実施例(4-3)に示されるように、マウスFc γ Rに対する結合が大幅に増強していた。

[0556] [実施例22] Ca依存性hIgA結合抗体が投与されたノーマルマウスにおける抗原の血漿中滞留性への影響の評価

(22-1) ノーマルマウスが用いられたin vivo試験

ノーマルマウス (C57BL/6J mouse, Charles River Japan) に対してhIgA (ヒトIgA: 実施例(20-1)にて作製) が単独で投与された、またはhIgAおよび抗hIgA抗体が同時に投与された後の、hIgAおよび抗hIgA抗体の体内動態が評価された。hIgA溶液 (80 μ g/mL)、または、hIgAと抗hIgA抗体の混合溶液が尾静脈に10 mL/kgの用量で単回投与された。抗hIgA抗体としては、上述のGA2-IgG1およびGA2-F1087が使用された。

[0557] 混合溶液中のhIgA濃度は全て80 μ g/mLであり、抗hIgA抗体濃度は2.69 mg/mLであった。このとき、hIgAに対して抗hIgA抗体は十分量過剰に存在することから、hIgAは大部分が抗体に結合していると考えられた。GA-hIgG1が投与された群では、投与後5分間、7時間、1日間、2日間、3日間、7日間でマウスから採血が行われた。またGA-F1087が投与された群では、投与後5分間、30分間、1時間、2時間、1日間、3日間、7日間でマウスから採血が行われた。採取された血液を直ちに4 $^{\circ}$ C、12,000 rpmで15分間遠心分離することによって、血漿が得られた。分離された血漿は、測定を実施するまで-20 $^{\circ}$ C以下に設定された冷凍庫に保存された。

[0558] (22-2) ELISA法によるノーマルマウス血漿中の抗hIgA抗体濃度測定

マウス血漿中の抗hIgA抗体濃度はELISA法にて測定された。まずAnti-Human IgG(γ -chain specific) F(ab')₂ Fragment of Antibody (SIGMA) がその各ウェルに分注されたNunc-Immuno Plate, MaxiSoup (Nalge nunc International) を4 $^{\circ}$ Cで1晩静置することによってAnti-Human IgG固相化プレートが作成

された。血漿中濃度の標準液として0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125、0.01563、0.007813 $\mu\text{g/mL}$ に調製された抗hIgA抗体の検量線試料と100倍以上希釈されたマウス血漿測定試料が、前記のAnti-Human IgG固相化プレートに分注された後、当該プレートが25°Cで1時間インキュベーションされた。その後、Goat Anti-Human IgG (γ chain specific) Biotin (BIOT) Conjugate (Southern Biotechnology Associates Inc.) が前記プレートの各ウェルに分注された後、当該プレートを25°Cで1時間反応させた。さらに、Streptavidin-PolyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies) が前記プレートの各ウェルに分注された後、当該プレートを25°Cで1時間反応させた。TMB One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories) を基質として用いた発色反応が1N-Sulfuric acid (Showa Chemical) を用いて停止された後、マイクロプレートリーダーを用いて各ウェルの反応液の450 nmの吸光度が測定された。マウス血漿中の抗hIgA抗体濃度は検量線の吸光度から解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて算出された。この方法で測定された静脈内投与後のノーマルマウスにおけるGA2-IgG1およびGA2-F1087の血漿中抗体濃度推移を図40に示した。その結果、hIgAと強いpH依存的な結合活性を有するクローンGA2-IgG1はFc γ Rとの結合を増強したとしても、その血漿中抗体濃度が大きく低下しないことが確認された。

[0559] (22-3) ELISA法による血漿中hIgA濃度測定

マウスの血漿中hIgA濃度はELISA法にて測定された。まずGoat anti-Human IgA Antibody (BETHYL) がその各ウェルに分注されたNunc-Immuno Plate, MaxiSoup (Nalge nunc International) を4°Cで1晩静置することによってAnti-Human IgA固相化プレートが作成された。血漿中濃度の標準液として0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625 $\mu\text{g/mL}$ に調製されたhIgAの検量線試料が用いられた。検量線試料および100倍以上希釈されたマウス血漿測定試料の各100 μL に対し、500ng/mL hL6Rを200 μL 加えて混合し、室温で1時間静置した。その後、混合溶液100 μL が分注された前記のAnti-Human IgA固相化プレートプレートは室温で1時間静置された。次に、Biotinylated Anti-human

IL-6 R Antibody (R&D) が前記プレートの各ウェルに分注された後、当該プレートを室温で1時間反応させた。更にStreptavidin-PolyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies) が前記プレートの各ウェルに分注された後、当該プレートを室温で1時間反応させた。TMB One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories) を基質として用いた発色反応が1N-Sulfuric acid (Showa Chemical) を用いて停止された後、マイクロプレートリーダーを用いて各ウェルの反応液の450 nmの吸光度が測定された。マウス血漿中濃度は検量線の吸光度から解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて算出された。この方法で測定した静脈内投与後のノーマルマウスにおける血漿中hIgA濃度推移を図4 1に示した。

[0560] その結果、hIgA単独の消失に対して、hIgA と100倍以上のCa依存的な結合活性を有するGA2-IgG1が同時に投与されたマウスでは、hIgA の消失がhIgA単独と比較して加速された。さらに、hIgAとFc γ Rに対して結合が増強されたGA2-F1087が投与されたマウスの血漿中では、投与一日後に測定範囲 (0.006 μ g/mL以上) よりhIgAの濃度が低下し、GA-IgG1が投与されたマウスの血漿中よりも大幅にhIgAの消失が加速された。以上から、実施例2から実施例7ではIL6Rと抗IL6R抗体が投与されたマウスにおいて、Fc γ Rに対する結合が増強された抗体による抗原の除去効果の増強が示されたが、抗原がhIgAと抗hIgA抗体が投与されたマウスでも同様の効果が示されることが明らかになった。これまでの実施例で得られてきた結果から、この場合の抗原の除去も主にFc γ R IIbを介していると考えられる。

[0561] [実施例2 3] pH依存的抗IgE抗体の取得

(2 3 - 1) 抗ヒトIgE抗体の取得

pH依存的抗ヒトIgE抗体を取得するために、抗原であるヒトIgE (重鎖配列番号: 69、軽鎖配列番号: 70) (可変領域は抗ヒトGlypican3抗体からなる) をFreeStyle293 (Life Technologies) を用いて発現させた。発現したヒトIgEは当業者公知の一般的なカラムクロマトグラフィー法により精製して、調製された。取得された多数の抗体の中から、ヒトIgEにpH依存的に結合する

抗体が選抜された。選抜された抗ヒトIgE抗体の重鎖および軽鎖の可変領域が、ヒトIgG1重鎖定常領域、および、ヒト軽鎖定常領域と融合された抗体遺伝子が組み込まれたベクターを用いて発現した組換え抗ヒトIgE抗体が精製された。作製された抗体はクローン278（以下278-IgG1と表記する、重鎖配列番号：71、軽鎖配列番号：72）と命名された。

[0562] (23-2) 抗ヒトIgE抗体のヒトIgEに対する結合活性およびpH依存的結合活性の評価

エンドソーム内で抗原を解離することができる抗体は、抗原に対してpH依存的に結合するだけでなく、Ca依存的に結合する抗原に結合することによっても創製することが可能である。そこで、278-IgG1およびコントロールとなるpH/Ca依存的IgE結合能を有さないヒトIgG1抗体であるXolair (omalizumab, Novartis) の、ヒトIgE (hIgE) に対するpH依存的結合能およびpH/Ca依存的結合能が評価された。すなわち、Biacore T200 (GE Healthcare) を用いて、278-IgG1およびXolairのhIgEに対する結合活性（解離定数KD (M)）が評価された。ランニングバッファーとして以下3種を用いて測定が行われた。

- ・ 1.2 mmol/l CaCl₂ /0.05% tween20, 20 mmol/l ACES, 150 mmol/l NaCl, pH 7.4
- ・ 1.2 mmol/l CaCl₂ /0.05% tween20, 20 mmol/l ACES, 150 mmol/l NaCl, pH 5.8
- ・ 3 μmol/l CaCl₂ /0.05% tween20, 20 mmol/l ACES, 150 mmol/l NaCl, pH 5.8

[0563] 適切な量の化学合成されたヒトグリピカン3タンパク質由来配列（配列番号：73）のC末端に存在するLysにビオチンが付加されたペプチド（以下「ビオチン化GPC3ペプチド」と記載する）が、Sensor chip SA (GE Healthcare) 上に添加され、ストレプトアビジンとビオチンの親和性を利用して同Sensor chip SA上に固定化された。適切な濃度のヒトIgEをインジェクトして、ビオチン化GPC3ペプチドに捕捉させることで、ヒトIgEがチップ上に固定化された。アナライトとして適切な濃度の278-IgG1をインジェクトして、センサーチ

チップ上のヒトIgEと相互作用させた。その後、10 mmol/L Glycine-HCl, pH1.5をインジェクトして、センサーチップが再生された。相互作用は全て37°Cで測定された。Biacore T200 Evaluation Software (GE Healthcare) を用いた、カーブフィッティングによる測定結果の解析により、結合速度定数ka (1/Ms)及び解離速度定数kd (1/s)が算出された。これらの定数を元に解離定数KD (M)が算出された。さらに、pH5.8, 1.2 mM Ca条件とpH7.4, 1.2 mM Ca条件の下での各抗体のKD比を算出してpH依存性結合が、pH5.8, 3µM Ca条件とpH7.4, 1.2 mM Ca条件の下での各抗体のKD比を算出してpH/Ca依存性結合が評価された。その結果を表29に示した。

[0564] [表29]

抗体名(略名)	バッファー条件	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	pH依存性	
					KD(pH5.8, 1.2 mM Ca) /KD(pH7.4, 1.2 mM Ca)	pH/Ca依存性 KD(pH5.8, 3 µM Ca) /KD(pH7.4, 1.2 mM Ca)
クローン278	pH7.4, 1.2 mM Ca	1.5E+06	3.6E-03	2.4E-09	842.5	1636.5
	pH5.8, 1.2 mM Ca	1.2E+05	2.3E-01	2.0E-06		
	pH5.8, 3 µM Ca	6.2E+04	2.4E-01	3.9E-06		
Xolair	pH7.4, 1.2 mM Ca	2.5E+06	1.1E-02	4.4E-09	2.3	2.9
	pH5.8, 1.2 mM Ca	2.4E+06	2.4E-02	9.9E-09		
	pH5.8, 3 µM Ca	1.4E+06	1.7E-02	1.3E-08		

[0565] [実施例24] pH依存的にヒトIgEに結合する抗体の改変体の調製

次に、血漿中からの抗原（ヒトIgE）の消失をさらに増大させることを目的に、pH依存的にヒトIgEに結合する278-IgG1に対してマウスFcγRに対する結合を増強するために278-IgG1のEUナンバリングで表される328位のLeuがTyrに置換された278-F1087（重鎖配列番号：74、軽鎖配列番号：72）をコードするDNA配列が当業者に公知の方法で動物発現用プラスミドに組み込まれた。当該プラスミドが導入された動物細胞を用いて、上述の方法で発現したこれらの抗体改変体の濃度が、その精製後に測定された。

[0566] [実施例25] 278-IgG1のin vivo評価

(25-1) In vivo評価用のヒトIgE (hIgE (Asp6)) の調製

重鎖（配列番号：75）および軽鎖（配列番号：70）からなるin vivo評価用のヒトIgEであるhIgE (Asp6)（可変領域は抗ヒトGlypican3抗体）は、実施例（23-1）と同様の方法で調製された。hIgE (Asp6) は、ヒトIgEのN

型糖鎖のヘテロジェニティーが抗原であるヒトIgEの血漿中濃度推移の影響を受けないようにするために、ヒトIgEの6か所のN型糖鎖結合サイトのアスパラギンがアスパラギン酸に改変された分子である。

[0567] (25-2) クローン278が投与されたノーマルマウスの血漿中のヒトIgEの消失加速効果の検証

実施例2から4および22で、pH依存的に抗原であるヒトIL-6レセプターおよびヒトIgAに結合しマウスFc γ Rに対する結合が増強された分子が投与されたマウスの血漿中の抗原濃度が大幅に低下したことが示された。マウスFc γ Rに対する結合を増強した場合に、ヒトIL-6レセプター、およびヒトIgA以外の抗原に対してpH依存的に結合しマウスFc γ Rに対する結合が増強された抗体が投与された生体の血漿中の可溶性抗原の消失効果が同様に観察されるかについて更なる検証を行うために、ヒトIgEを抗原とする抗体を用いた試験が新たに実施された。

[0568] C57BL/6Jマウス (Charles river Japan) にhIgE (Asp6) が単独投与、もしくはhIgE (Asp6) および抗hIgE抗体 (278-IgG1と278-F1087) が同時投与された後のhIgE (Asp6) および抗ヒトIgE抗体の体内動態が評価された。hIgE (Asp6) (20 μ g/mL) もしくはhIgE (Asp6) および抗ヒトIgE抗体の混合溶液 (濃度は表30に記載したように、いずれの抗体も同じ濃度になるように調製された) が尾静脈から10mL/kgで単回投与された。このとき、hIgE (Asp6) に対して各抗体は十分量過剰に存在することから、hIgE (Asp6) はほぼ全て抗体に結合していると考えられた。クローン278 (278-IgG1) が投与された群では、投与後5分間、2時間、7時間、1日間、2日間、4日間、5日間、7日間、14日間、21日間で当該マウスから血液が採血された。278-F1087が投与された群では、5分間、30分間、1時間、2時間、1日間、3日間、7日間、14日間、21日間で当該マウスから血液が採血された。また、採取された血液をただちに4 $^{\circ}$ C、15,000 rpmで5分間遠心分離して、血漿が得られた。分離された血漿は、測定を実施するまで、-20 $^{\circ}$ C以下に設定された冷凍庫に保存された。

[0569]

[表30]

抗 hIgE 抗体	投与液中 hIgE (Asp6)濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	投与液中抗 hIgE 抗体濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
278-IgG1	20	100
278-F1087	20	100

[0570] (25-3) ノーマルマウスの血漿中の抗ヒトIgE抗体濃度の測定

マウス血漿中の抗hIgE抗体濃度はELISA法にて測定された。血漿中濃度として0.4、0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625 $\mu\text{g/mL}$ の検量線試料が調製された。hIgE (Asp6) と抗hIgE抗体の免疫複合体を均一にするため、検量線およびマウス血漿測定試料には、1 $\mu\text{g/mL}$ となるようにhIgE (Asp6) を添加し、278-hIgG1投与群および対応する検量線試料は室温で30分静置させた。また、278-F1087投与群および対応する検量線試料は37°Cで一晩攪拌された。静置もしくは攪拌後の検量線およびマウス血漿測定試料をAnti-Human Kappa Light Chain Antibody (Bethyl Laboratories) が固相化されたイムノプレート (Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp (Nalge nunc International)) に分注し、室温で2時間静置攪拌 (278-F1087投与群の試料および278-F1087の検量線試料) もしくは4°Cで一晩静置 (278-hIgG1投与群の試料および278-hIgG1の検量線試料) させた。その後、Rabbit anti-Human IgG (Fc) Secondary antibody, Biotin conjugate (Pierce Biotechnology) およびStreptavidin-Poly HRP80 (Stereospecific Detection Technologies) をそれぞれ1時間順次反応させた。TMB One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories) を基質として用いた発色反応を1 N-Sulfuric acid (Showa Chemical) で反応停止後、当該発色をマクロプレートリーダーにて450nmの吸光度を測定する方法によってマウス血漿中濃度が測定された。マウス血漿中濃度は検量線の吸光度から解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて算出された。この方法で測定された静脈内投与後の血漿中抗体濃度推移を図4 2に示した。その結果、ヒトIgEに対して強いpH依存的な結合活性を有する278-IgG1のFc γ Rとの結合が増強された改変体が投与されたマウスにおいて、当該マウスの血漿中における抗体濃度は278-IgG1のそれと比較しても大きく低下しな

いことが確認された。

[0571] (25-4) ノーマルマウスの血漿中のhIgE (Asp6) 濃度の測定

マウス血漿中hIgE (Asp6) 濃度はELISA法にて測定された。血漿中濃度として192、96、48、24、12、6、3 ng/mLの検量線試料が調製された。hIgE (Asp6) と抗hIgE抗体の免疫複合体を均一にするため、検量線およびマウス血漿測定試料には、278-hIgG1を投与した群では10 μ g/mLとなるようにXolair (Novartis) を添加し、室温で30分静置させた。278-F1087を投与した群では20 μ g/mLとなるように278-F1022 (重鎖配列番号：76、軽鎖配列番号：72、実施例24と同様に調製) もしくは278-F760 (重鎖配列番号：77、軽鎖配列番号：72、実施例A5と同様に調製) を添加し、37 $^{\circ}$ Cで60時間攪拌した。マウス血漿測定試料をanti-human IgEが固相化されたイムノプレート (MABTECH) もしくは、anti-human IgE (clone 107、MABTECH) が固相化されたイムノプレート (Nunc F96 MicroWell Plate (Nalge nunc International)) に分注し、室温で2時間静置もしくは攪拌もしくは4 $^{\circ}$ Cで一晩静置させた。その後、human GPC3 core protein (配列番号：78)、NHS-PEG4-Biotin (Thermo Fisher Scientific) でbiotin化された抗GPC3抗体 (社内調製)、Streptavidin-PolyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies) をそれぞれ1時間順次反応させた。TMB One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories) を基質として用いた発色反応を1 N-Sulfuric acid (Showa Chemical) で反応停止後、当該発色をマイクロプレートリーダーにて450nmの吸光度を測定する方法、もしくはSuperSignal(r) ELISA Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific) を基質として発光反応を行い、マイクロプレートリーダーにて発光強度を測定する方法によってマウス血漿中濃度が測定された。マウス血漿中濃度は検量線の吸光度もしくは発光強度から解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて算出された。この方法で測定された静脈内投与後の血漿中hIgE (Asp6) 濃度推移を図43に示した。

[0572] その結果、ヒトIgE単独の消失に対して、強いpH依存的な結合活性を有する

278-IgG1とヒトIgEが同時に投与されたマウスでは、ヒトIgEの消失がヒトIgE単独と比較して加速された。さらに278-IgG1に対してFc γ Rとの結合が増強された278-F1087とヒトIgEが投与されたマウスでは、ヒトIgEの消失が、ヒトIgE単独および278-IgG1とヒトIgEが投与されたマウスよりも大幅に加速されることが確認された。すなわち、これまでに述べられたFc γ Rとの結合が増強された抗IL6R抗体や抗IgA抗体のみならず、Fc γ Rとの結合が増強された抗IgE抗体が投与されたマウスにおいても、抗原の消失が加速されることが示された。これまでの実施例で得られてきた結果から、この場合の抗原の除去も主にFc γ RIIbを介していると考えられる。

[0573] [実施例26] Fc γ RIIbに対する結合活性が天然型マウスIgGのFc領域の結合活性より高い抗原結合分子の血漿中からの抗原消失効果

(26-1) Fc γ RIIbに対して選択的に結合活性を増強したマウス抗体の抗原消失効果

[0574] 実施例5から7において、マウス抗体のFc領域を有し、pH依存的にヒトIL-6レセプターに結合する性質を有する抗原結合分子のマウスFc γ Rに対する結合活性を増強させた抗原結合分子が投与されたノーマルマウス群、および、マウスFc γ RIIbに対する結合活性が選択的に増強された抗体が投与された状況が模倣されたFc γ RIII欠損マウスおよびFc受容体 γ 鎖欠損マウス群の検討結果などから、pH依存的に可溶性抗原に結合し、Fc γ RIIbに対して選択的に結合活性を増強させた抗原結合分子は、生体内に投与された場合に、血漿中の可溶性抗原を効率的に消失させることが可能であることが示された。この効果が、マウスFc γ RIIbに対して選択的に結合活性を増強させたマウスFc領域を有し、pH依存的にヒトIL-6レセプターに結合する性質を有する抗原結合分子が投与されたノーマルマウスにおいても示されるかどうか、以下に示すように検証された。

[0575] (26-2) Fc γ RIIbに対して選択的に結合活性を増強したマウス抗体の作製

pH依存的にヒトIL-6レセプターに結合する性質を有するマウスIgG1抗体の

重鎖としてVH3-mIgG1（配列番号：49）、軽鎖としてVL3-mk1（配列番号：50）が参考実施例1の方法を用いて作製された。また、VH3-mIgG1の Maus Fc γ RIIbに対する結合活性を増強するために、EUナンバリングで表される230位のThrがGluに置換され、231位のValがAlaに置換され、232位のProがAsnに置換され、238位のSerがGluに置換され、239位のSerがAspに置換されたVH3-mIgG1-MB367（配列番号：79）が作製された。VH3-mIgG1あるいはVH3-mIgG1-MB367を重鎖として含み、VL3-mk1を軽鎖として含む、Fv4-mIgG1あるいはFv4-mIgG1-MB367が、参考実施例1の方法を用いて発現、精製された。

[0576] (26-3) マウスFc γ Rに対する結合活性の確認

VH3-mIgG1あるいはVH3-mIgG1-MB367を重鎖として含み、L (WT)-CK（配列番号：42）を軽鎖として含むVH3/L (WT)-mIgG1あるいはVH3/L (WT)-mIgG1-MB367が参考実施例1の方法を用いて発現・精製された。これらの抗体の Maus Fc γ Rに対する結合活性が、参考実施例2の方法で評価され、その結果を表31に示した。また、それぞれの改変体の Maus Fc γ Rに対する結合活性が、改変を加える前のmIgG1に比較して何倍増強しているかを表32に示した。

[0577] [表31]

改変体名	KD (M)	
	mFc γ RIIb	mFc γ RIII
VH3/L (WT)-mIgG1	2.10E-07	2.82E-07
VH3/L (WT)-mIgG1-MB367	1.32E-09	4.54E-08

[0578] [表32]

改変体名	mIgG1 に対する結合比	
	mFc γ RIIb	mFc γ RIII
VH3/L (WT)-mIgG1	1.0	1.0
VH3/L (WT)-mIgG1-MB367	158.6	6.2

[0579] 表32の結果より、VH3/L (WT)-mIgG1に上述の5つの改変を導入したVH3/L (WT)-mIgG1-MB367は、導入前と比較して、 Maus Fc γ RIIbに対する結合活性を約160倍増強させたのに対し、 Maus Fc γ RIIIに対する結合活性は6.2倍増強させた。すなわち、VH3/L (WT)-mIgG1-MB367は選択的かつ増強した Maus Fc γ RIIbに対する結合活性を示した。

[0580] (26-4) ノーマルマウスにおける血漿中可溶性ヒトIL-6レセプター濃度の低減効果の確認

抗ヒトIL-6レセプター抗体としてFv4-mIgG1あるいはFv4-mIgG1-MB367が投与されたノーマルマウスの血漿中可溶性ヒトIL-6レセプターの消失効果が以下のように検証された。

[0581] (26-4-1) ノーマルマウスを用いたin vivo試験

ノーマルマウス (C57BL/6J mouse, Charles River Japan) に可溶性ヒトIL-6レセプターおよび抗ヒトIL-6レセプターマウス抗体を同時投与した後の可溶性ヒトIL-6レセプターおよび抗ヒトIL-6レセプターマウス抗体の体内動態が評価された。可溶性ヒトIL-6レセプターと抗ヒトIL-6レセプターマウス抗体の混合溶液を尾静脈に10 mL/kgで単回投与した。この際、可溶性ヒトIL-6レセプターは50 μ g/kg、抗ヒトIL-6レセプターマウス抗体は1 mg/kgの用量で投与された。抗ヒトIL-6レセプターマウス抗体としては、上述のFv4-mIgG1およびFv4-mIgG1-MB367が使用された。抗ヒトIL-6レセプターマウス抗体投与後5分、7時間、1日、2日、3日、7日、14日、21日、28日が経過した後に当該マウスから採血が行なわれた。採取された血液を直ちに4°C、15,000 rpmで15分間遠心分離することによって、血漿が得られた。分離した血漿は、測定を実施するまで-20°C以下に設定された冷凍庫に保存された。

[0582] (26-4-2) ELISA法による血漿中抗ヒトIL-6レセプターマウス抗体濃度の測定

マウス血漿中の抗ヒトIL-6レセプターマウス抗体濃度はELISA法にて測定された。まず、可溶性ヒトIL-6レセプターをNunc-Immuno Plate, MaxiSoup (Nalge nunc International) に分注し、4°Cで1晩静置することによって可溶性ヒトIL-6レセプター固相化プレートが作成された。血漿中濃度として2.50、1.25、0.625、0.313、0.156、0.078、0.039 μ g/mLの抗ヒトIL-6レセプターマウス抗体を含む検量線試料と100倍以上希釈されたマウス血漿測定試料が調製された。これらの検量線試料および血漿測定試料100 μ Lが各ウェルに分注された可溶性ヒトIL-6レセプター固相化プレートを室温で2時間攪拌させた

その後Anti-Mouse IgG-Peroxidase antibody (SIGMA) を室温で2時間反応させた反応液の発色反応が、TMB One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories) を基質として用いて行われた。1N-Sulfuric acid (Sho wa Chemical) を添加することによって反応が停止された各ウェルの反応液の450 nmの吸光度が、マイクロプレートリーダーにて測定された。マウス血漿中の抗体濃度は検量線の吸光度から解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて算出された。その結果を図44に示した。

[0583] (26-4-3) 電気化学発光法による血漿中可溶性ヒトIL-6レセプター濃度測定

マウスの血漿中hsIL-6R濃度は電気化学発光法にて測定した。血漿中濃度として12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.781, 0.391, 0.195 ng/mLに調整したhsIL-6R検量線試料および50倍以上希釈したマウス血漿測定試料を調製し、SULFO-TAG NHS Ester (Meso Scale Discovery) でルテニウム化したMonoclonal Anti-human IL-6R Antibody (R&D) およびBiotinylated Anti-human IL-6 R Antibody (R&D) およびトシリズマブ溶液(中外製薬)を混合し37°Cで1晩反応させた。その後、0.5%BSA(w/v)を含有したPBS-Tween溶液を用いて5°Cで1晩BlockingしたStreptavidin Gold Multi-ARRAY Plate (Meso Scale Discovery) に分注した。さらに室温で2時間反応させ洗浄後、Read Buffer T(×2) (Meso Scale Discovery) を分注し、ただちにSECTOR Imager 2400 (Meso Scale Discovery) で測定を行った。hsIL-6R濃度は検量線のレスポンスから解析ソフトウェアSOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて算出した。その結果を図45に示した。

[0584] 図44に示した通り、マウスFcγRIIbに対する結合活性が選択的に増強されたFv4-mIgG1-MB367が投与された群では、Fv4-mIgG1が投与された群と同等の血漿中抗体濃度推移が示された一方で、マウスFcγRIIbに対する結合活性の増強による血漿中抗体滞留性の低下はみられなかった。一方、図45に示した通り、マウスFcγRIIbに対する結合活性が選択的に増強されたFv4-mIgG1-MB367が投与された群では、Fv4-mIgG1が投与された群と比較して、血漿中

の可溶性IL-6レセプター濃度が顕著に低下していた。

[0585] 以上のことから、pH依存的に可溶性抗原に結合し、Fc γ RIIbに対して選択的に結合活性を増強させた抗原結合分子は、生体内に投与された場合に、血漿中の可溶性抗原を効率的に消失させることが可能であることがノーマルマウスにおいても示された。特定の理論に拘束されるものではないが、ここでみられた現象は以下のように説明することも可能である。

[0586] pH依存的に可溶性抗原に結合し、かつFc γ RIIbに対する結合活性を増強している抗体がマウスに投与されると、主に細胞膜上にFc γ RIIbを発現している細胞に積極的に取り込まれる。取り込まれた抗体はエンドソーム内の酸性pHの条件下において可溶性抗原を解離した後にFcRnを介して血漿中にリサイクルされる。そのため、このような抗体による血漿中の可溶性抗原を消失させる効果をもたらす要素の一つとしては、当該抗体のFc γ RIIbに対する結合活性の強さが挙げられる。すなわち、Fc γ RIIbに対する結合活性が強いほど、より積極的にFc γ RIIb発現細胞へと取り込まれ、血漿中の可溶性抗原を速く消失させることが可能であると考えられる。また、そのような効果は、抗体に含まれるFc領域の由来がヒトIgG1であってもマウスIgG1であっても、Fc γ RIIbに対する結合活性が増強している限りは、同様に検証できると考えられる。つまり、ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG3、ヒトIgG4、マウスIgG1、マウスIgG2a、マウスIgG2b、マウスIgG3、ラットIgG、サルIgG、ウサギIgGなど、いかなる動物種のFc領域であっても、投与される動物種のFc γ RIIbに対する結合活性が増強している限りは、いずれを用いても検証することが可能であると考えられる。

[0587] [参考実施例1] 抗体の発現ベクターの作製および抗体の発現と精製

抗体の可変領域のH鎖およびL鎖の塩基配列をコードする全長の遺伝子の合成は、Assemble PCR等を用いて、当業者公知の方法で作製した。アミノ酸置換の導入はPCR等を用いて当業者公知の方法で行った。得られたプラスミド断片を動物細胞発現ベクターに挿入し、H鎖発現ベクターおよびL鎖発現ベクターを作製した。得られた発現ベクターの塩基配列は当業者公知の方法で決定

した。作製したプラスミドをヒト胎児腎癌細胞由来HEK293H株 (Invitrogen社)、またはFreeStyle293細胞 (Invitrogen社) に、一過性に導入し、抗体の発現を行った。得られた培養上清を回収した後、 $0.22\mu\text{m}$ フィルターMILLEX(R)-GV (Millipore)、または $0.45\mu\text{m}$ フィルターMILLEX(R)-GV (Millipore) を通して培養上清を得た。得られた培養上清から、rProtein A Sepharose Fast Flow (GEヘルスケア) またはProtein G Sepharose 4 Fast Flow (GEヘルスケア) を用いて当業者公知の方法で、抗体を精製した。精製抗体濃度は、分光光度計を用いて280 nmでの吸光度を測定し、得られた値からPACE等の方法により算出された吸光係数を用いて抗体濃度を算出した (Protein Science (1995); 4, 2411-2423)。

[0588] [参考実施例2] Fc γ Rの調製方法および改変抗体とFc γ Rとの相互作用解析方法

Fc γ Rの細胞外ドメインを以下の方法で調製した。まずFc γ Rの細胞外ドメインの遺伝子の合成を当業者公知の方法で実施した。その際、各Fc γ Rの配列はNCBIに登録されている情報に基づき作製した。具体的には、Fc γ RIについてはNCBIのアクセッション番号NM_000566 (バージョン番号NM_000566.3) の配列、Fc γ RIIaについてはNCBIのアクセッション番号NM_001136219 (バージョン番号NM_001136219.1) の配列、Fc γ RIIbについてはNCBIのアクセッション番号NM_004001 (バージョン番号NM_004001.3) の配列、Fc γ RIIIaについてはNCBIのアクセッション番号NM_001127593 (バージョン番号NM_001127593.1) の配列、Fc γ RIIIbについてはNCBIのアクセッション番号NM_000570 (バージョン番号NM_000570.3) の配列に基づいて作製し、C末端にHisタグを付加した。またFc γ RIIa、Fc γ RIIIa、Fc γ RIIIbは多型が存在することが知られているが、Fc γ RIIaの多型部位はWarmerdamら (J. Exp. Med. (1990) 172, 19-25)、Fc γ RIIIaの多型部位はWuら (J. Clin. Invest. (1997) 100 (5), 1059-1070)、Fc γ RIIIbの多型部位はOryら (J. Clin. Invest. (1989) 84, 1688-1691) を参考にして作製した。

[0589] 得られた遺伝子断片を動物細胞発現ベクターに挿入し、発現ベクターを作

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

[0590] Biacore T100（GEヘルスケア）、Biacore T200（GEヘルスケア）、Biacore A100、Biacore 4000を用いて、各改変抗体と上記で調製したFc γ レセプターとの相互作用解析を行った。ランニングバッファーにはHBS-EP+（GEヘルスケア）を用い、測定温度は25 $^{\circ}$ Cとした。Series S Sensor Chip CM5（GEヘルスケア）またはSeries S sensor Chip CM4（GEヘルスケア）に、アミンカップリング法により抗原ペプチド、ProteinA（Thermo Scientific）、Protein A/G（Thermo Scientific）、Protein L（ACTIGENまたはBioVision）を固定化したチップ、あるいはSeries S Sensor Chip SA（certified）（GEヘルスケア）に対して予めビオチン化しておいた抗原ペプチドを相互作用させ、固定化したチップを用いた。

[0591] これらのセンサーチップに目的の抗体をキャプチャーさせ、ランニングバッファーで希釈したFc γ レセプターを相互作用させ、抗体に対する結合量を測定し、抗体間で比較した。ただし、Fc γ レセプターの結合量はキャプチャ

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

[0592] また、各改変抗体のFcγRに対するKD値を算出するため速度論的な解析は以下の方法にしたがって実施した。まず、上記のセンサーチップに目的の抗体をキャプチャーさせ、ランニングバッファーで希釈したFcγレセプターを相互作用させ、得られたセンサーグラムに対してBiacore Evaluation Softwareにより測定結果を1:1 Langmuir binding modelでglobal fittingさせることで結合速度定数ka (L/mol/s)、解離速度定数kd(1/s)を算出し、その値から解離定数KD (mol/L) を算出した。

[0593] また、各改変抗体とFcγRとの相互作用が微弱で、上記の速度論的な解析では正しく解析できないと判断された場合、その相互作用についてはBiacore T 100 Software Handbook BR1006-48 Edition AEに記載の以下の1:1結合モデル式を利用してKDを算出した。

[0594] 1:1 binding modelで相互作用する分子のBiacore上での挙動は以下の式3によって表わすことができる。

[式3]

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

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

C: concentration

RI: bulk refractive index contribution in the sample

Rmax: analyte binding capacity of the surface

[0595] この式を変形すると、KDは以下の式2のように表わすことができる。

[式2]

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

[0596] この式にRmax、RI、Cの値を代入することで、KDを算出することが可能である。RI、Cについては測定結果のセンサーグラム、測定条件から値を求めることができる。Rmaxの算出については、以下の方法にしたがった。その測定回に同時に評価した比較対象となる相互作用が十分強い抗体について、上記の1:1 Langmuir binding modelでglobal fittingさせた際に得られたRmaxの値を、比較対象となる抗体のセンサーチップへのキャプチャー量で除し、評価したい改変抗体のキャプチャー量で乗じて得られた値をRmaxとした。

請求の範囲

- [請求項1] 抗原に対する結合活性がイオン濃度の条件によって変化する抗原結合ドメイン、およびEUナンバリングで表される238位のアミノ酸がAsp、ならびに271位のアミノ酸がGlyであるFc領域を含む抗原結合分子の当該抗原を血漿中から消失させるための使用。
- [請求項2] 前記Fc領域が、さらにEUナンバリングで表される、233位、234位、237位、264位、265位、266位、267位、268位、269位、272位、274位、296位、326位、327位、330位、331位、332位、333位、355位、356位、358位、396位、409位、および419位の群から選択される少なくとも一つ以上のアミノ酸が置換されているFc領域である請求項1に記載の使用。
- [請求項3] 前記Fc領域のEUナンバリングで表される；
233位のアミノ酸がAsp、
234位のアミノ酸がTyr、
237位のアミノ酸がAsp、
264位のアミノ酸がIle、
265位のアミノ酸がGlu、
266位のアミノ酸がPhe、Met、またはLeuのいずれか、
267位のアミノ酸がAla、Glu、Gly、またはGlnのいずれか、
268位のアミノ酸がAsp、Glu、またはGlnのいずれか、
269位のアミノ酸がAsp、
272位のアミノ酸がAsp、Phe、Ile、Met、Asn、Pro、またはGln、
274位のアミノ酸がGln、
296位のアミノ酸がAsp、またはPheのいずれか、
326位のアミノ酸がAla、またはAspのいずれか、
327位のアミノ酸がGly、
330位のアミノ酸がLys、またはArgのいずれか、
331位のアミノ酸がSer、

332位のアミノ酸がThr、
333位のアミノ酸がThr、Lys、またはArgのいずれか、
355位のアミノ酸がGln、
356位のアミノ酸がGlu、
358位のアミノ酸がMet、
396位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Ile、Lys、Leu、Met、Gln、Arg、
またはTyrのいずれか、
409位のアミノ酸がArg、
419位のアミノ酸がGlu、
のいずれかひとつ以上であるFc領域である請求項2に記載の使用。

[請求項4] 前記抗原結合ドメインが、前記抗原に対する結合活性がカルシウムイオン濃度の条件によって変化する抗原結合ドメインである、請求項1から3のいずれか一項に記載の使用。

[請求項5] 前記抗原結合ドメインが、前記抗原に対する低カルシウムイオン濃度の条件下での結合活性が、前記抗原に対する高カルシウムイオン濃度の条件下での結合活性よりも低いように結合活性が変化する抗原結合ドメインである、請求項4に記載の使用。

[請求項6] 前記抗原結合ドメインが、前記抗原に対する結合活性がpHの条件によって変化する抗原結合ドメインである、請求項1から3のいずれか一項に記載の使用。

[請求項7] 前記抗原結合ドメインが、前記抗原に対するpH酸性域の条件下での結合活性がpH中性域の条件下での結合活性よりも低いように結合活性が変化する抗原結合ドメインである、請求項6に記載の使用。

[請求項8] 前記抗原結合ドメインが抗体の可変領域である、請求項1から7のいずれか一項に記載の使用。

[請求項9] 前記Fc領域が配列番号：14、15、16または17のいずれかに含まれるFc領域においてEUナンバリングで表される238位のアミノ酸がAsp、ならびに271位のアミノ酸がGlyであるFc領域である請求項1

から 8 のいずれか一項に記載の使用。

[請求項10] 前記Fc領域のpH酸性域の条件下でのFcRnに対する結合活性が、配列番号：14、15、16または17のいずれかに含まれるFc領域のFcRnに対する結合活性より増強されているFc領域である、請求項1から8のいずれか一項に記載の使用。

[請求項11] 前記の増強されているFc領域が、配列番号：14、15、16、または17のいずれかに含まれるFc領域のアミノ酸配列のうち、EUナンバリングで表される244位、245位、249位、250位、251位、252位、253位、254位、255位、256位、257位、258位、260位、262位、265位、270位、272位、279位、283位、285位、286位、288位、293位、303位、305位、307位、308位、309位、311位、312位、314位、316位、317位、318位、332位、339位、340位、341位、343位、356位、360位、362位、375位、376位、377位、378位、380位、382位、385位、386位、387位、388位、389位、400位、413位、415位、423位、424位、427位、428位、430位、431位、433位、434位、435位、436位、438位、439位、440位、442位または447位の群から選択される少なくとも一つ以上のアミノ酸が置換されているFc領域である請求項10に記載の使用。

[請求項12] 前記の増強されているFc領域が、配列番号：14、15、16、または17に含まれるFc領域のアミノ酸配列のうち、EUナンバリングで表される；

244位のアミノ酸がLeu、

245位のアミノ酸がArg、

249位のアミノ酸がPro、

250位のアミノ酸がGlnまたはGluのいずれか、もしくは

251位のアミノ酸がArg、Asp、Glu、またはLeuのいずれか、

252位のアミノ酸がPhe、Ser、Thr、またはTyrのいずれか、

254位のアミノ酸がSerまたはThrのいずれか、

255位のアミノ酸がArg、Gly、Ile、またはLeuのいずれか、

256位のアミノ酸がAla、 Arg、 Asn、 Asp、 Gln、 Glu、 Pro、 またはThr
のいずれか、
257位のアミノ酸がAla、 Ile、 Met、 Asn、 Ser、 またはValのいずれか
、
258位のアミノ酸がAsp、
260位のアミノ酸がSer、
262位のアミノ酸がLeu、
270位のアミノ酸がLys、
272位のアミノ酸がLeu、 またはArgのいずれか、
279位のアミノ酸がAla、 Asp、 Gly、 His、 Met、 Asn、 Gln、 Arg、 Ser、
Thr、 Trp、 またはTyrのいずれか、
283位のアミノ酸がAla、 Asp、 Phe、 Gly、 His、 Ile、 Lys、 Leu、 Asn、
Pro、 Gln、 Arg、 Ser、 Thr、 Trp、 またはTyrのいずれか、
285位のアミノ酸がAsn、
286位のアミノ酸がPhe、
288位のアミノ酸がAsn、 またはProのいずれか、
293位のアミノ酸がVal、
307位のアミノ酸がAla、 Glu、 Gln、 またはMetのいずれか、
308位のアミノ酸がIle、 Pro、 またはThrのいずれか、
309位のアミノ酸がPro、
311位のアミノ酸がAla、 Glu、 Ile、 Lys、 Leu、 Met、 Ser 、 Val、 また
はTrpのいずれか、
312位のアミノ酸がAla、 Asp、 またはProのいずれか、
314位のアミノ酸がAlaまたはLeuのいずれか、
316位のアミノ酸がLys、
317位のアミノ酸がPro、
318位のアミノ酸がAsn、 またはThrのいずれか、
332位のアミノ酸がPhe、 His、 Lys、 Leu、 Met、 Arg、 Ser、 またはTrp

のいずれか、

339位のアミノ酸がAsn、Thr、またはTrpのいずれか、

341位のアミノ酸がPro、

343位のアミノ酸がGlu、His、Lys、Gln、Arg、Thr、またはTyrのいずれか、

375位のアミノ酸がArg、

376位のアミノ酸がGly、Ile、Met、Pro、Thr、またはValのいずれか

、

377位のアミノ酸がLys、

378位のアミノ酸がAsp、Asn、またはValのいずれか、

380位のアミノ酸がAla、Asn、Ser、またはThrのいずれか、

382位のアミノ酸がPhe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrのいずれか、

385位のアミノ酸がAla、Arg、Asp、Gly、His、Lys、Ser、またはThrのいずれか、

386位のアミノ酸がArg、Asp、Ile、Lys、Met、Pro、Ser、またはThrのいずれか、

387位のアミノ酸がAla、Arg、His、Pro、Ser、またはThrのいずれか

、

389位のアミノ酸がAsn、Pro、またはSerのいずれか、

423位のアミノ酸がAsn、

427位のアミノ酸がAsn、

428位のアミノ酸がLeu、Met、Phe、Ser、またはThrのいずれか、

430位のアミノ酸がAla、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、またはTyrのいずれか、

431位のアミノ酸がHis、またはAsnのいずれか、

433位のアミノ酸がArg、Gln、His、Ile、Lys、Pro、またはSerのいずれか、

434位のアミノ酸がAla、Gly、His、Phe、Ser、Trp、またはTyrのいずれか、

436位のアミノ酸がArg、Asn、His、Ile、Leu、Lys、Met、またはThrのいずれか、

438位のアミノ酸がLys、Leu、Thr、またはTrpのいずれか、

440位のアミノ酸がLys、もしくは、

442位のアミノ酸がLys、

の群から選択される少なくとも一つ以上のアミノ酸である、請求項1に記載の使用。

[請求項13] 前記抗原結合分子が抗体である、請求項1から12のいずれか一項に記載の使用。

[請求項14] 抗原に対する結合活性がイオン濃度の条件によって変化する抗原結合ドメイン、およびEUナンバリングで表される238位のアミノ酸がAsp、ならびに271位のアミノ酸がGlyであるFc領域を含む抗原結合分子を含む医薬組成物。

[請求項15] 前記Fc領域が、さらにEUナンバリングで表される、233位、234位、237位、264位、265位、266位、267位、268位、269位、272位、274位、296位、326位、327位、330位、331位、332位、333位、355位、356位、358位、396位、409位、および419位の群から選択される少なくとも一つ以上のアミノ酸が置換されているFc領域である請求項14に記載の医薬組成物。

[請求項16] 前記Fc領域のEUナンバリングで表される；

233位のアミノ酸がAsp、

234位のアミノ酸がTyr、

237位のアミノ酸がAsp、

264位のアミノ酸がIle、

265位のアミノ酸がGlu、

266位のアミノ酸がPhe、Met、またはLeuのいずれか、

267位のアミノ酸がAla、Glu、Gly、またはGlnのいずれか、
268位のアミノ酸がAsp、Glu、またはGlnのいずれか、
269位のアミノ酸がAsp、
272位のアミノ酸がAsp、Phe、Ile、Met、Asn、Pro、またはGlnのいずれか、
274位のアミノ酸がGln、
296位のアミノ酸がAsp、またはPheのいずれか、
326位のアミノ酸がAla、またはAspのいずれか、
330位のアミノ酸がLys、またはArgのいずれか、
327位のアミノ酸がGly、
331位のアミノ酸がSer、
332位のアミノ酸がThr、
333位のアミノ酸がThr、Lys、またはArgのいずれか、
355位のアミノ酸がGln、
356位のアミノ酸がGlu、
358位のアミノ酸がMet、
396位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Ile、Lys、Leu、Met、Gln、Arg、
またはTyrのいずれか、
409位のアミノ酸がArg、
419位のアミノ酸がGlu、
のいずれかひとつ以上であるFc領域である請求項15に記載の医薬組成物。

[請求項17]

以下の(a)から(e)の工程；

- (a) 抗原に対する結合活性がイオン濃度の条件によって変化する抗原結合ドメインを得る工程、
- (b) 前記工程(a)で選択された抗原結合ドメインをコードする遺伝子を得る工程、
- (c) 前記工程(b)で得られた遺伝子を、EUナンバリングで表される23

8位のアミノ酸がAsp、ならびに271位のアミノ酸がGlyであるFc領域をコードする遺伝子と作動可能に連結する工程、

(d) 前記工程(c)で作動可能に連結された遺伝子を含む宿主細胞を培養する工程、

(e) 前記工程(d)で得られた培養液から抗原結合分子を単離する工程、
を含む抗原結合分子の製造方法。

[請求項18] 前記Fc領域が、さらにEUナンバリングで表される、233位、234位、237位、264位、265位、266位、267位、268位、269位、272位、274位、296位、326位、327位、330位、331位、332位、333位、355位、356位、358位、396位、409位、および419位の群から選択される少なくとも一つ以上のアミノ酸が置換されているFc領域である請求項17に記載の製造方法。

[請求項19] 前記Fc領域のEUナンバリングで表される；
233位のアミノ酸がAsp、
234位のアミノ酸がTyr、
237位のアミノ酸がAsp、
264位のアミノ酸がIle、
265位のアミノ酸がGlu、
266位のアミノ酸がPhe、Met、またはLeuのいずれか、
267位のアミノ酸がAla、Glu、Gly、またはGlnのいずれか、
268位のアミノ酸がAsp、Glu、またはGlnのいずれか、
269位のアミノ酸がAsp、
272位のアミノ酸がAsp、Phe、Ile、Met、Asn、Pro、またはGlnのいずれか、
274位のアミノ酸がGln、
296位のアミノ酸がAsp、またはPheのいずれか、
326位のアミノ酸がAla、またはAspのいずれか、

327位のアミノ酸がGly、
330位のアミノ酸がLys、またはArgのいずれか、
331位のアミノ酸がSer、
332位のアミノ酸がThr、
333位のアミノ酸がThr、Lys、またはArgのいずれか、
355位のアミノ酸がGln、
356位のアミノ酸がGlu、
358位のアミノ酸がMet、
396位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Ile、Lys、Leu、Met、Gln、Arg、
またはTyrのいずれか、
409位のアミノ酸がArg、
419位のアミノ酸がGlu、
のいずれかひとつ以上であるFc領域である請求項18に記載の製造方法。

[請求項20]

以下の(a)から(e)の工程；

- (a) 抗原に対する結合活性がイオン濃度の条件によって変化する抗原結合ドメインを得る工程、
 - (b) 前記工程(a)で選択された抗原結合ドメインをコードする遺伝子を得る工程、
 - (c) 前記工程(b)で得られた遺伝子を、EUナンバリングで表される238位のアミノ酸がAsp、ならびに271位のアミノ酸がGlyであるFc領域をコードする遺伝子と作動可能に連結する工程、
 - (d) 前記工程(c)で作動可能に連結された遺伝子を含む宿主細胞を培養する工程、
 - (e) 前記工程(d)で得られた培養液から抗原結合分子を単離する工程、
- を含む当該抗原結合分子を含む医薬組成物の製造方法。

[請求項21]

前記Fc領域が、さらにEUナンバリングで表される、233位、234位、

237位、264位、265位、266位、267位、268位、269位、272位、274位、296位、326位、327位、330位、331位、332位、333位、355位、356位、358位、396位、409位、および419位の群から選択される少なくとも一つ以上のアミノ酸が置換されているFc領域である請求項20に記載の製造方法。

[請求項22]

前記Fc領域のEUナンバリングで表される；

233位のアミノ酸がAsp、

234位のアミノ酸がTyr、

237位のアミノ酸がAsp、

264位のアミノ酸がIle、

265位のアミノ酸がGlu、

266位のアミノ酸がPhe、Met、またはLeuのいずれか、

267位のアミノ酸がAla、Glu、Gly、またはGlnのいずれか、

268位のアミノ酸がAsp、Glu、またはGlnのいずれか、

269位のアミノ酸がAsp、

272位のアミノ酸がAsp、Phe、Ile、Met、Asn、Pro、またはGlnのいずれか、

274位のアミノ酸がGln、

296位のアミノ酸がAsp、またはPheのいずれか、

326位のアミノ酸がAla、またはAspのいずれか、

327位のアミノ酸がGly、

330位のアミノ酸がLys、またはArgのいずれか、

331位のアミノ酸がSer、

332位のアミノ酸がThr、

333位のアミノ酸がThr、Lys、またはArgのいずれか、

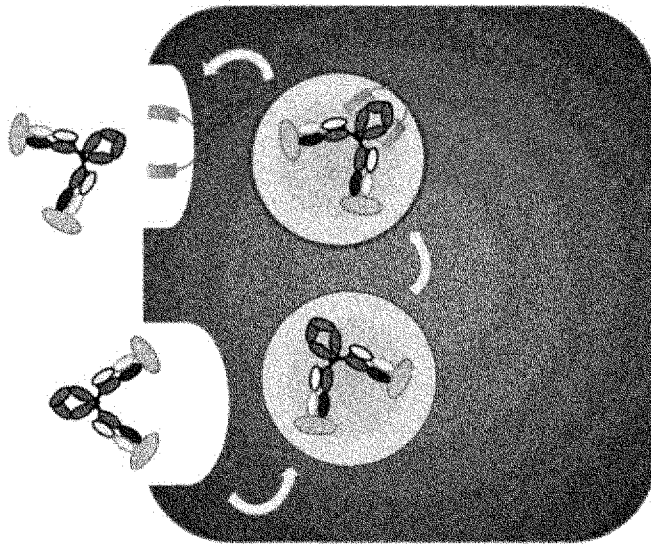
355位のアミノ酸がGln、

356位のアミノ酸がGlu、

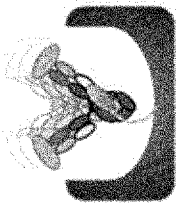
358位のアミノ酸がMet、

396位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Ile、Lys、Leu、Met、Gln、Arg、
またはTyrのいずれか、
409位のアミノ酸がArg、
419位のアミノ酸がGlu、
のいずれかひとつ以上であるFc領域である請求項21に記載の製造方法。

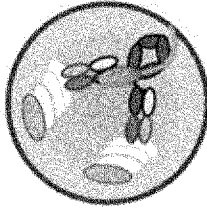
既存の中和抗体



pH中性域における FcγR結合活性の増強

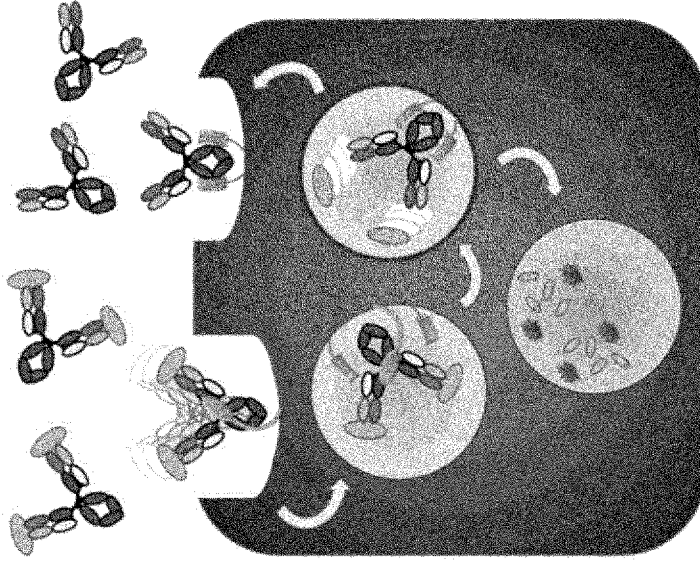


イオン濃度依存性抗原結合能

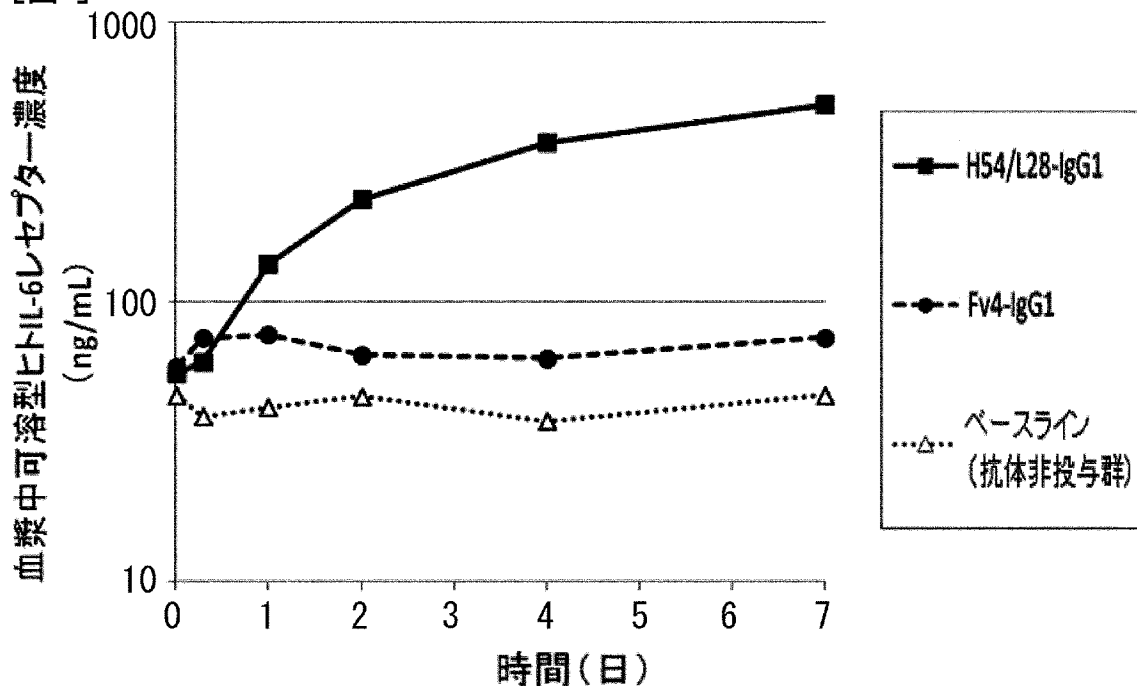


[図1]

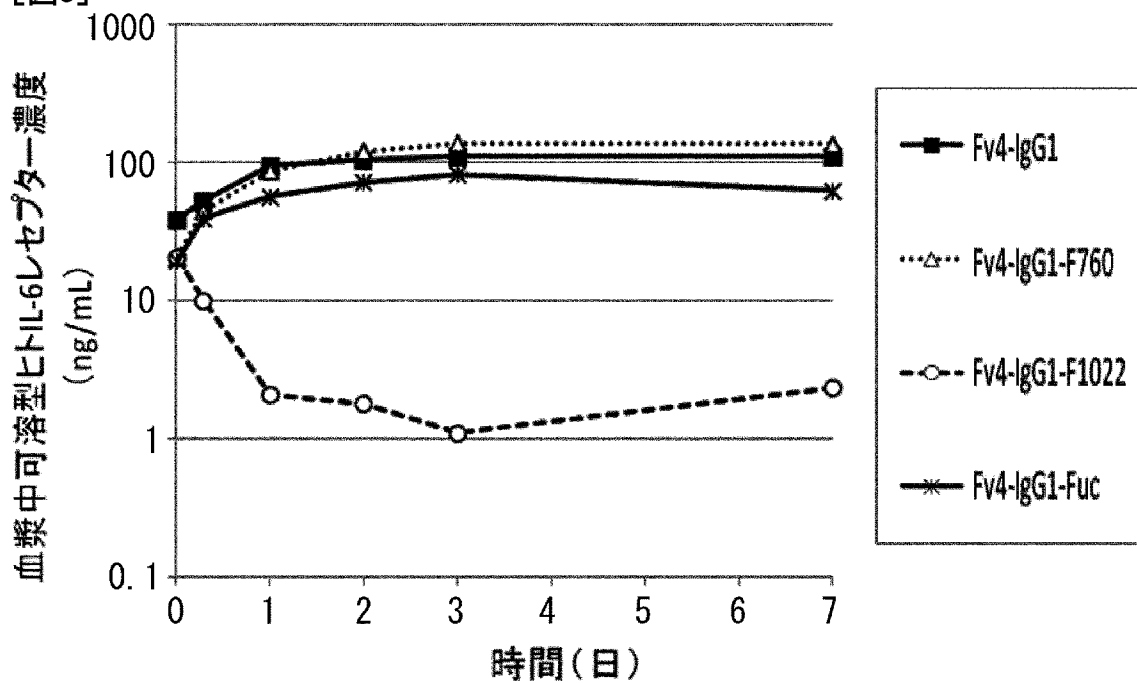
pH中性域の条件下における FcγR結合活性を増強したイオン濃度依存性抗原結合抗体



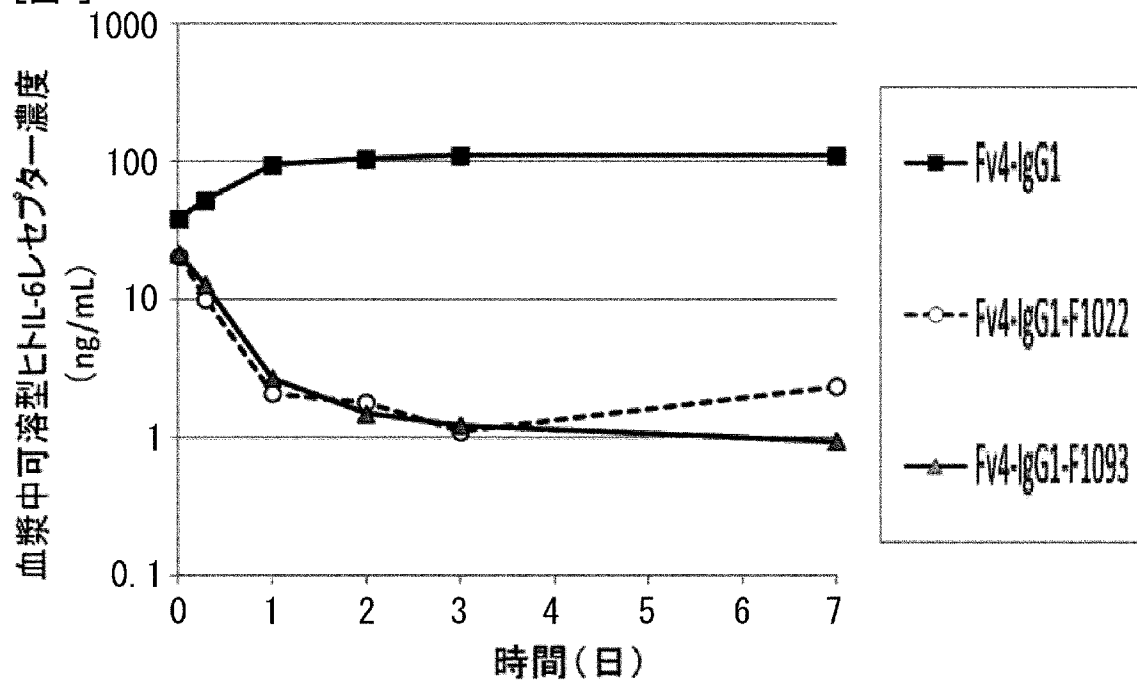
[図2]



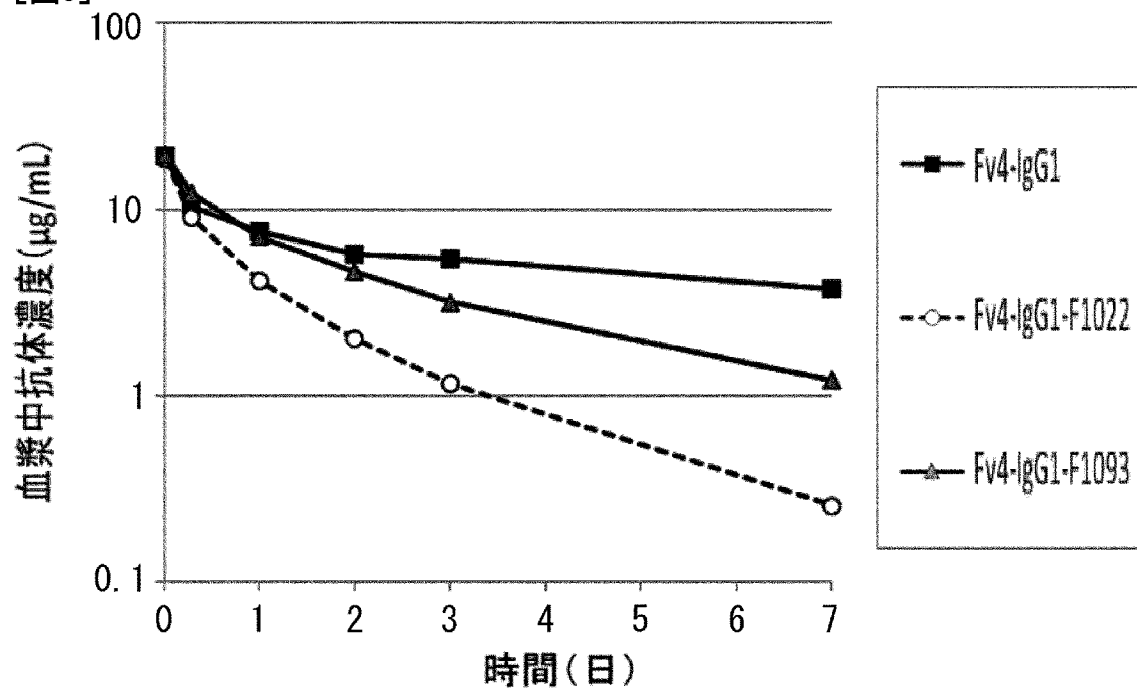
[図3]



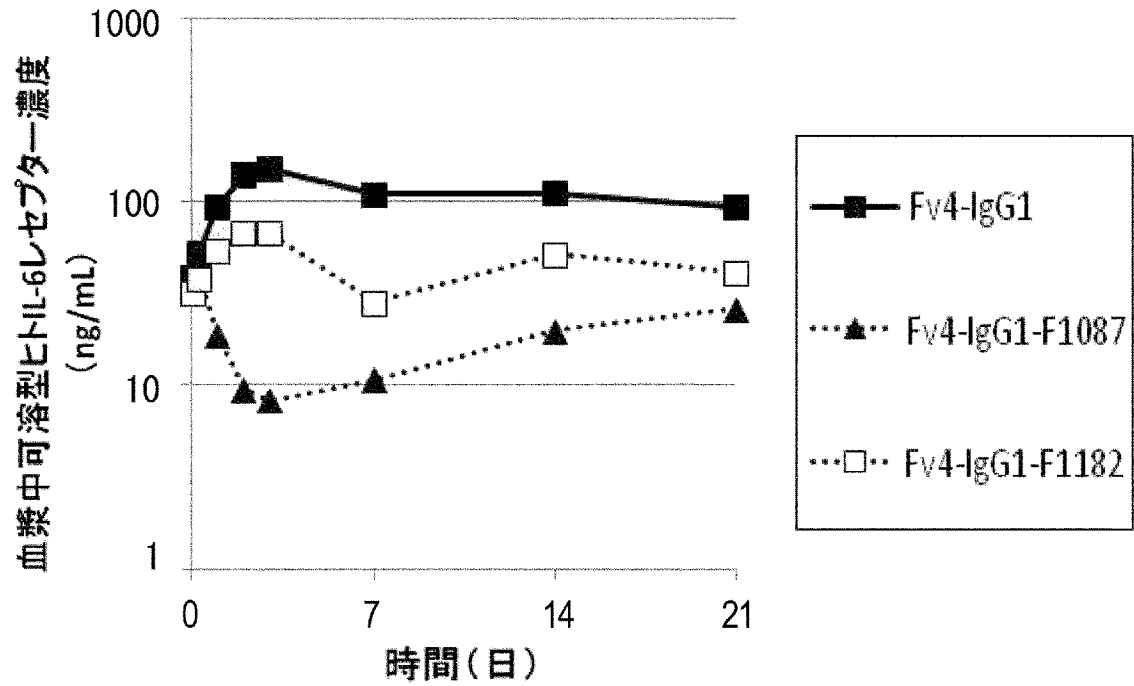
[図4]



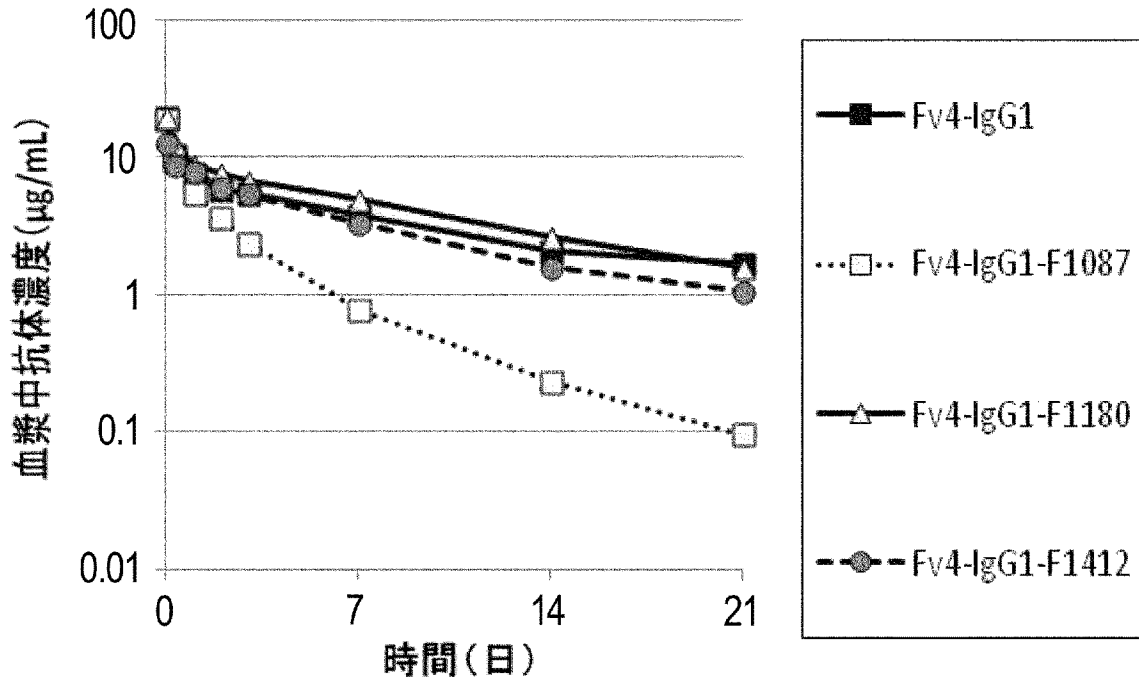
[図5]



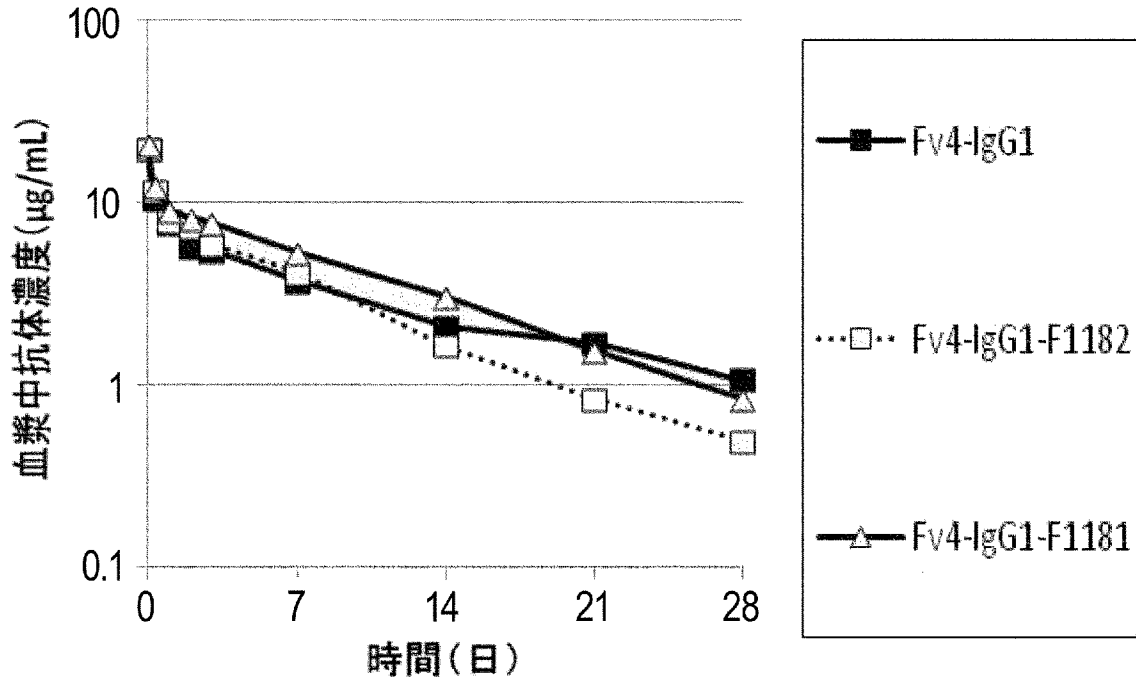
[図6]



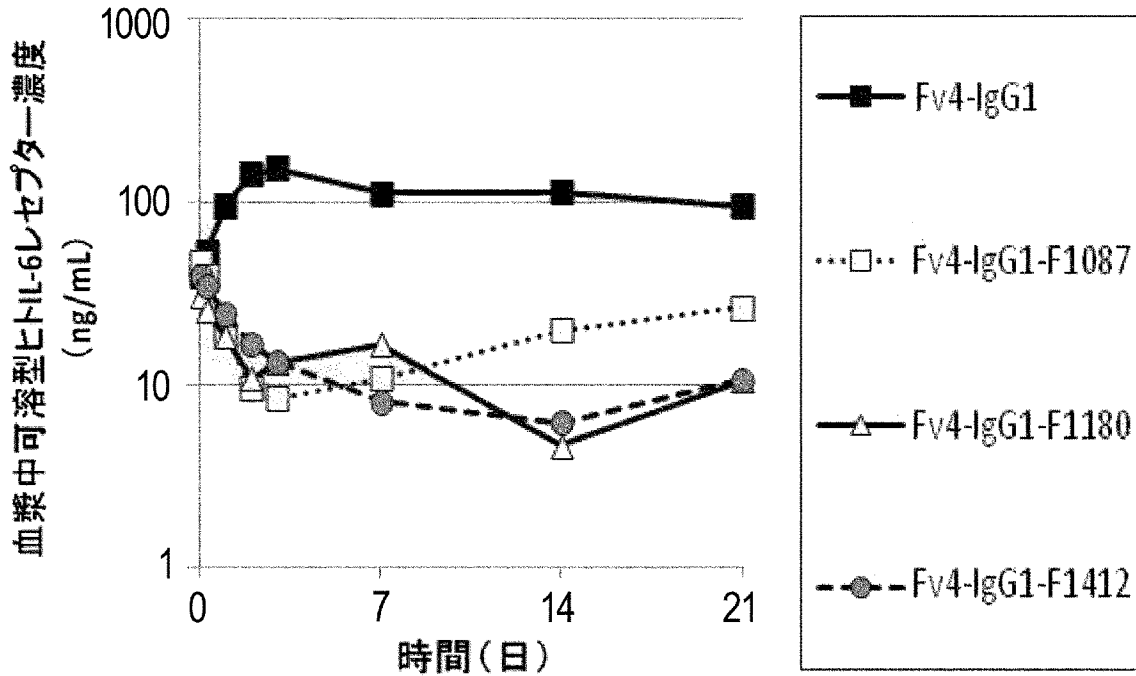
[図7]



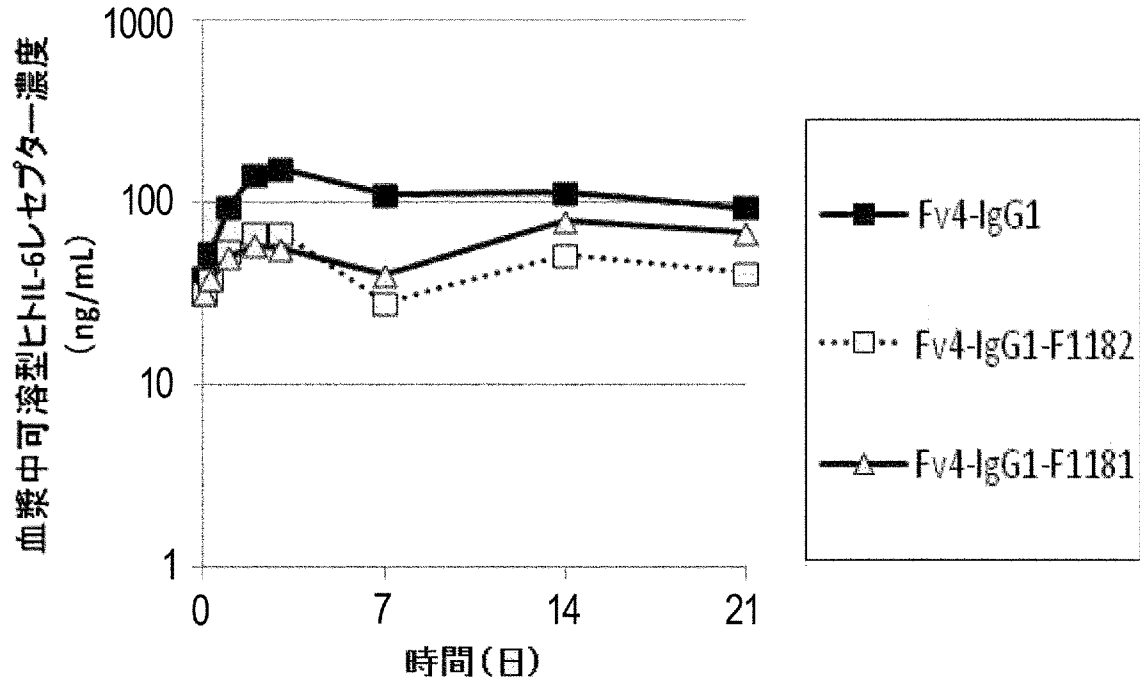
[図8]



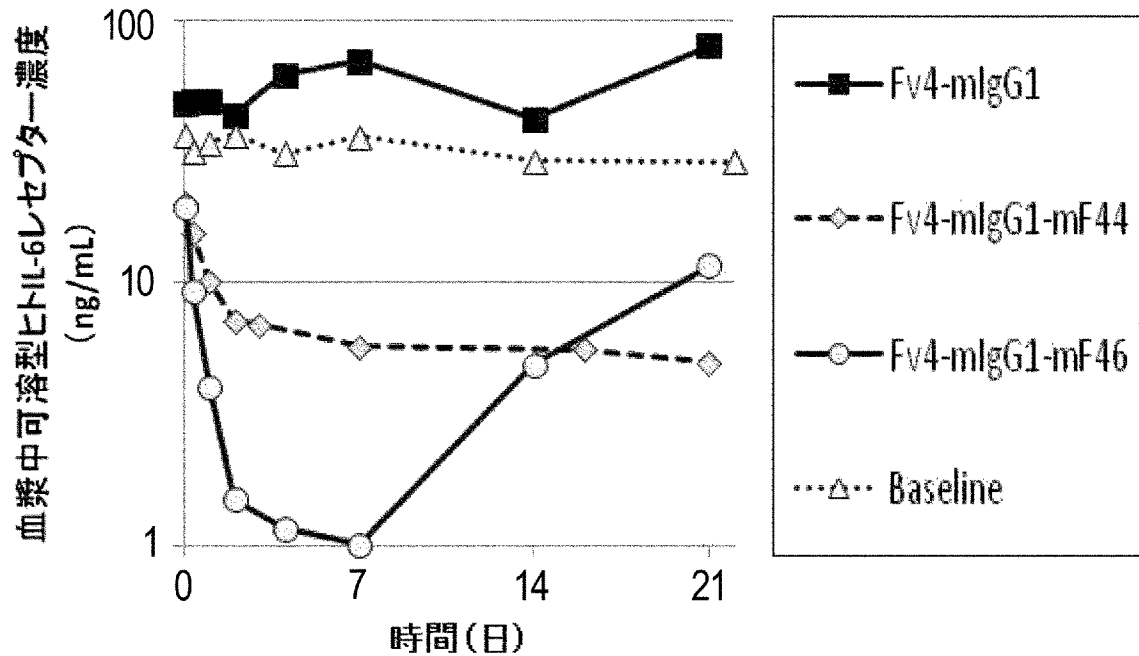
[図9]



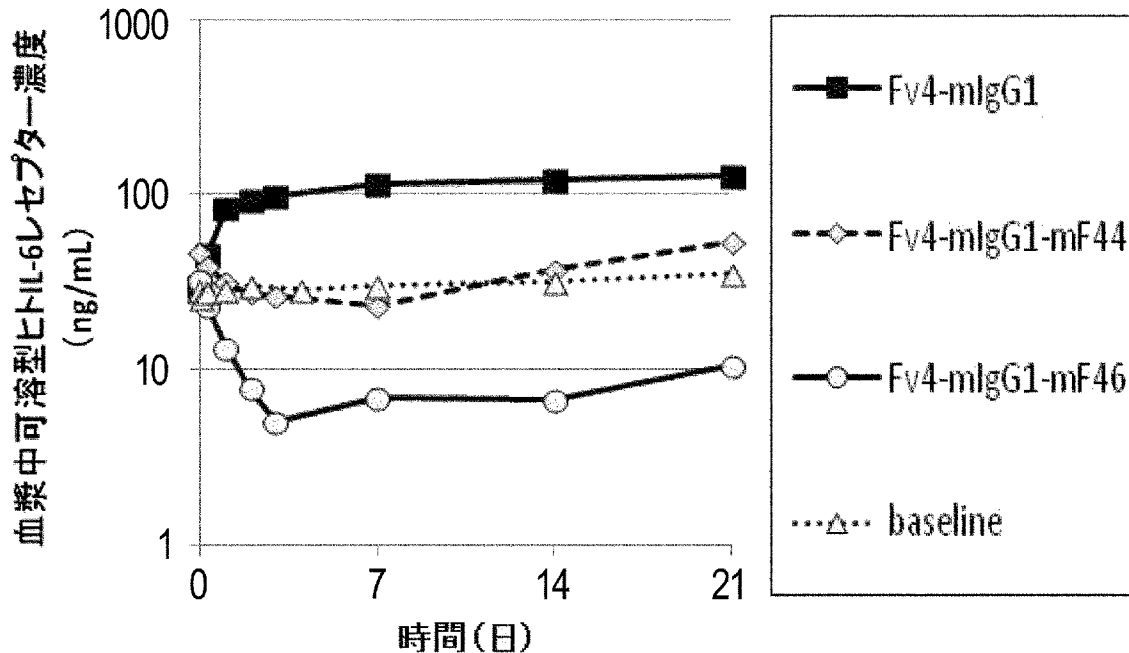
[図10]



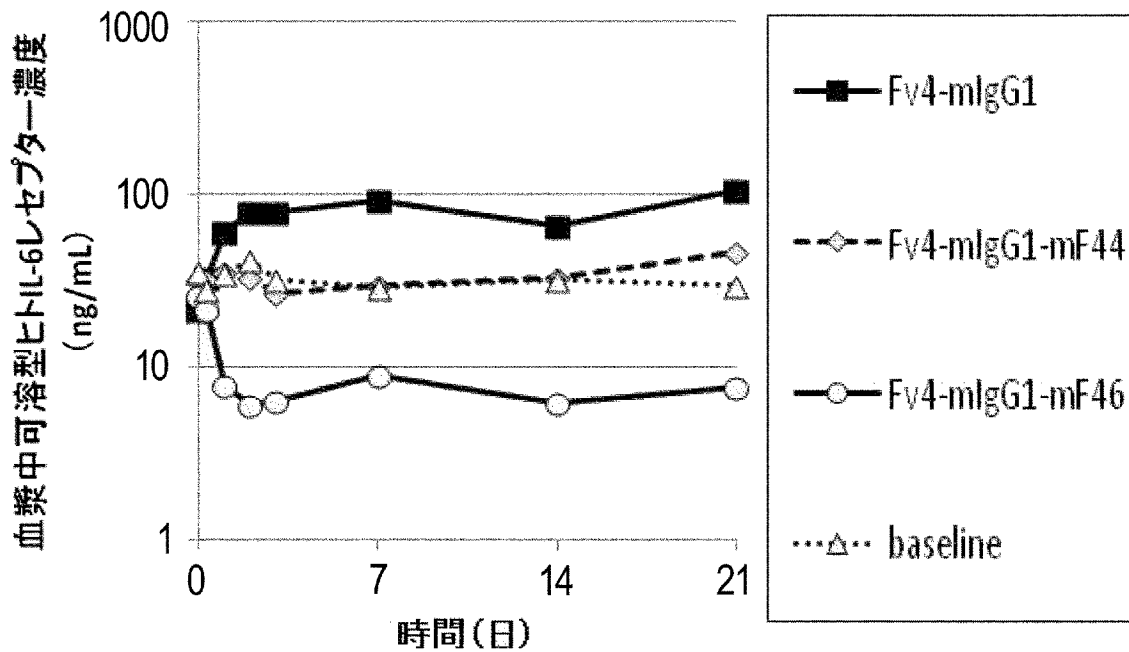
[図11]



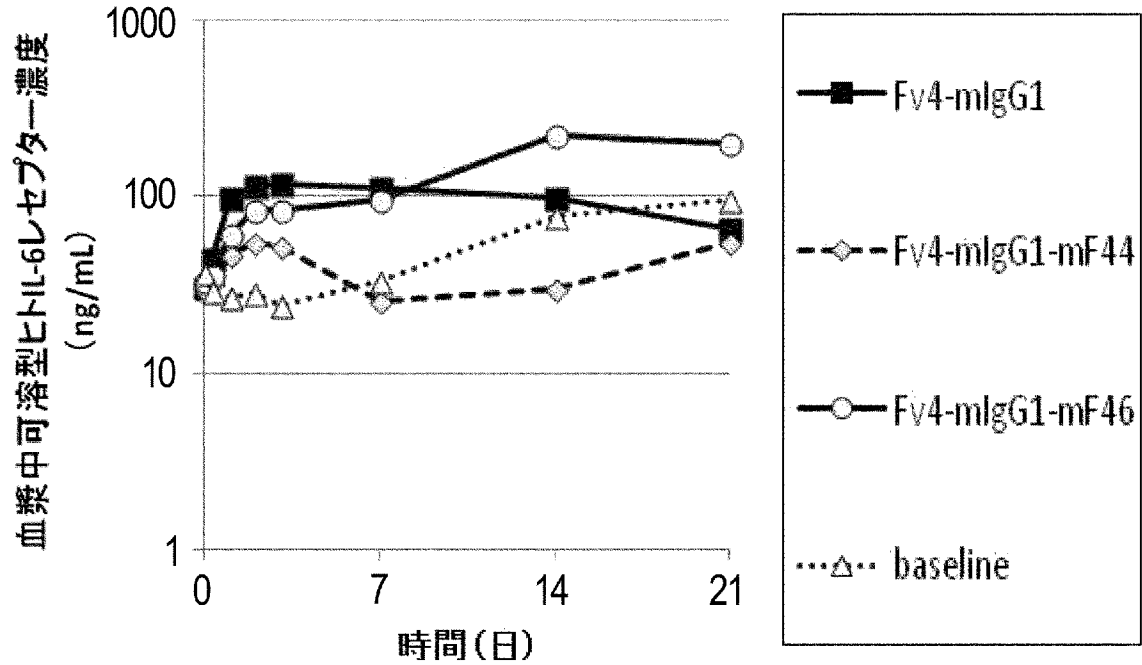
[図12]



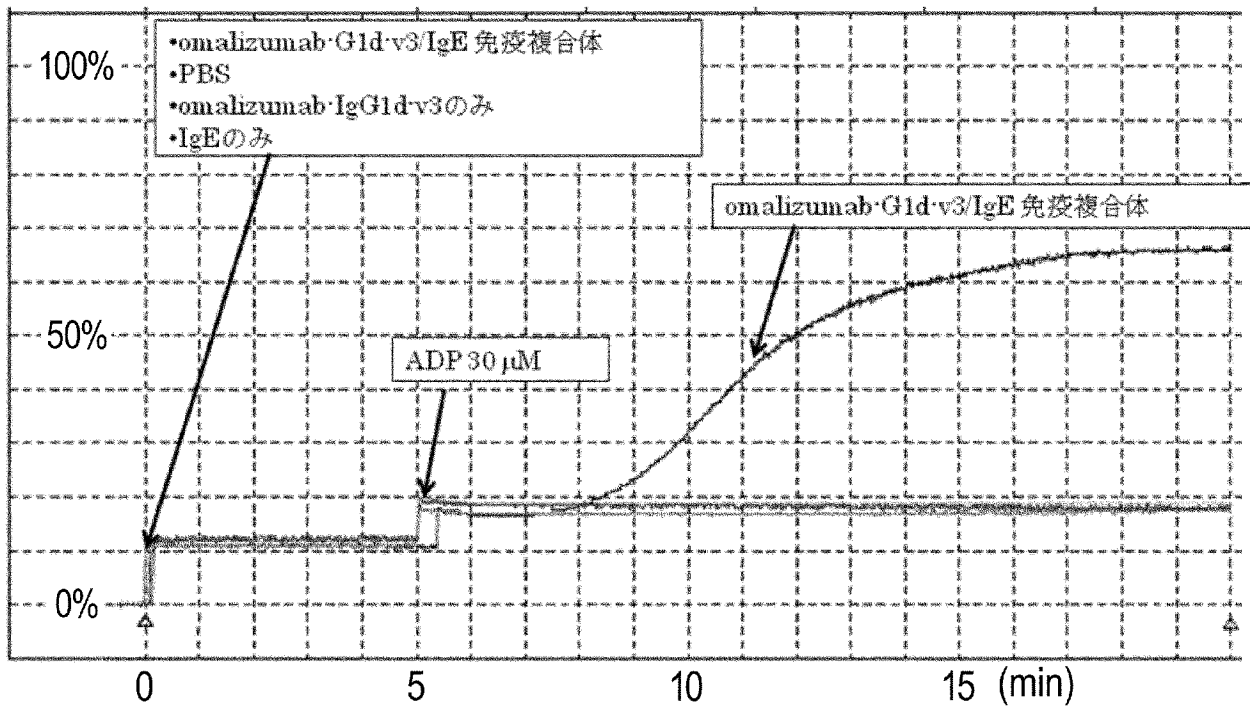
[図13]



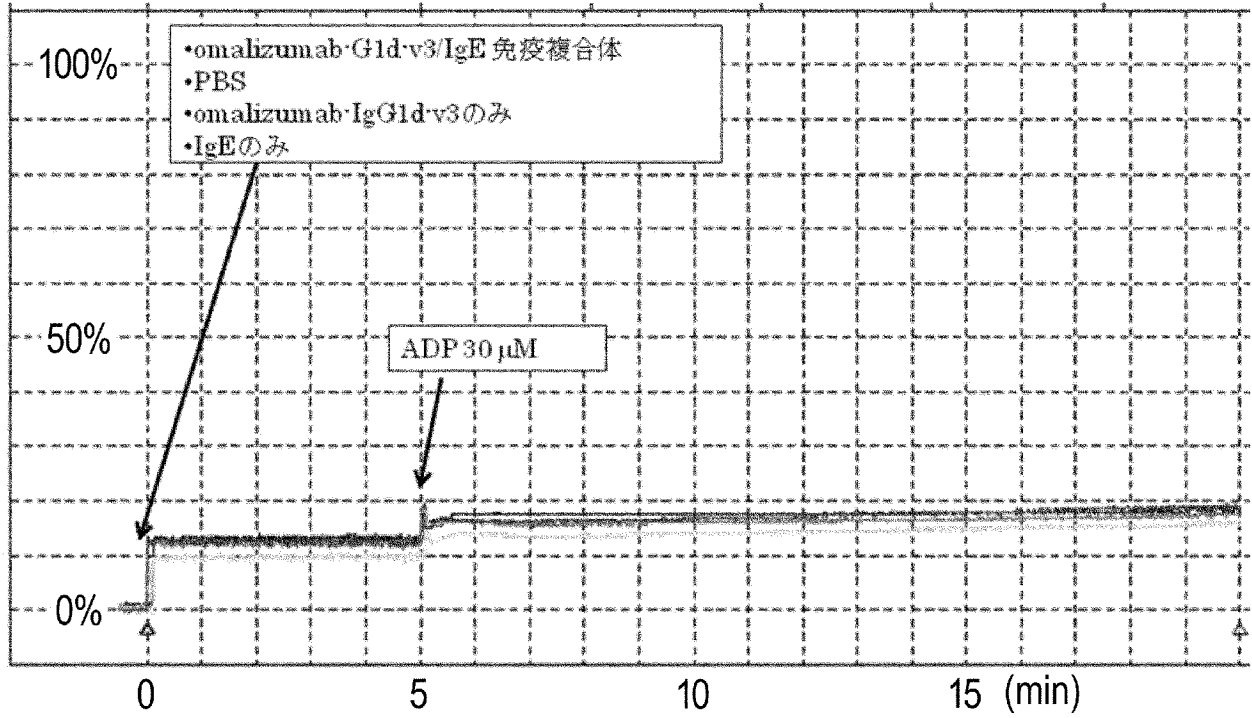
[図14]



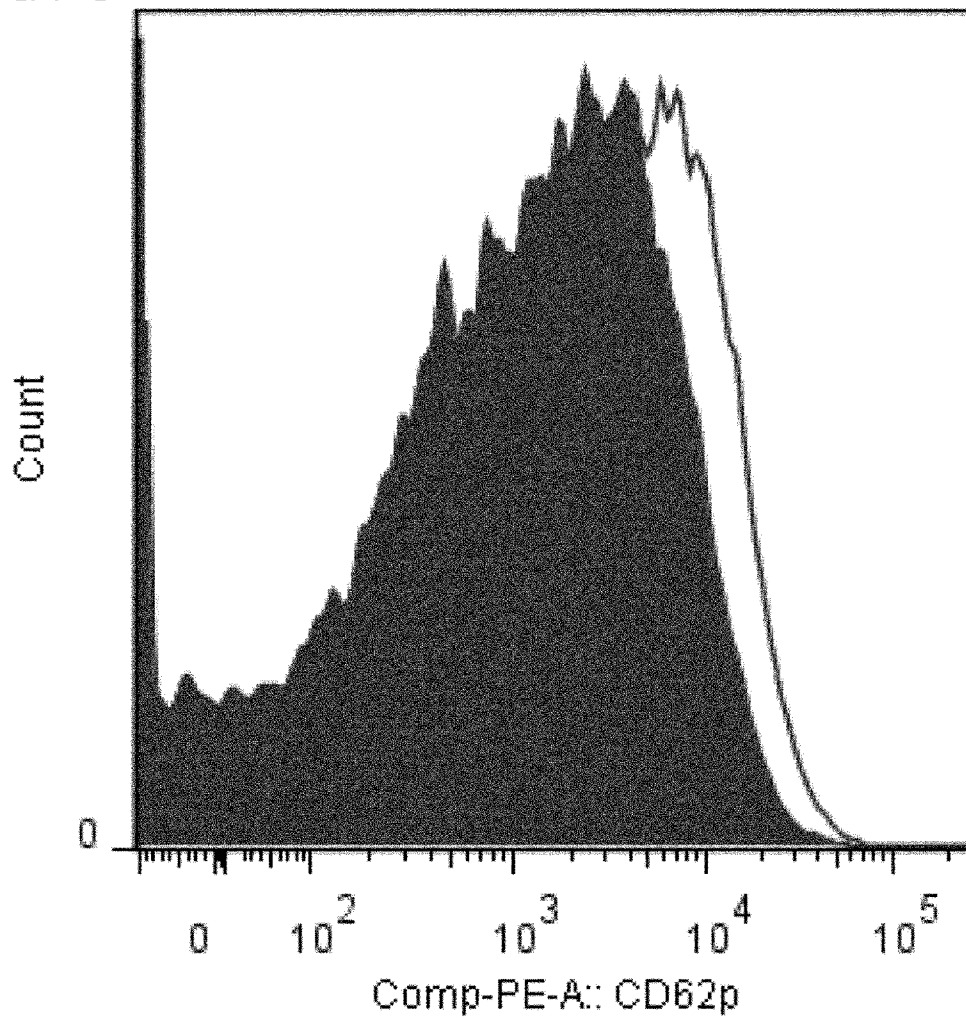
[図15]



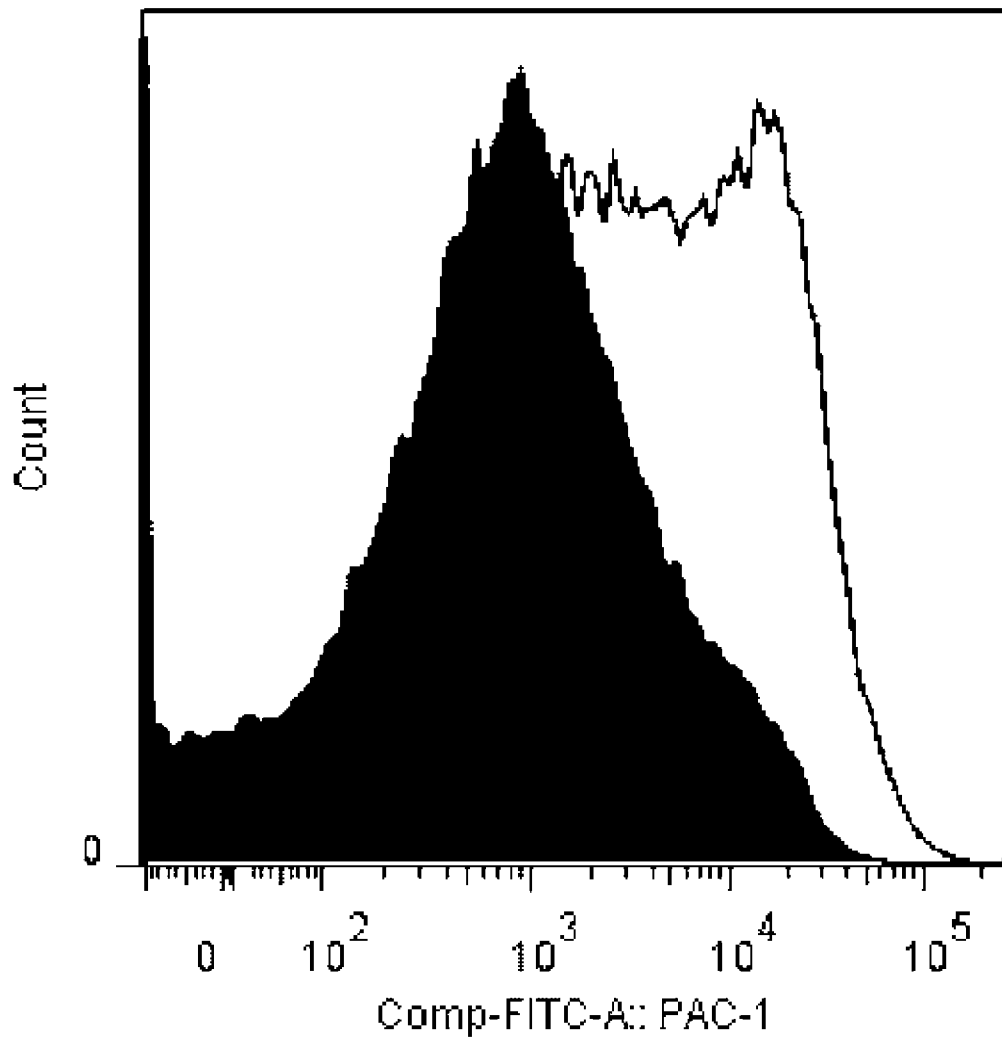
[図16]



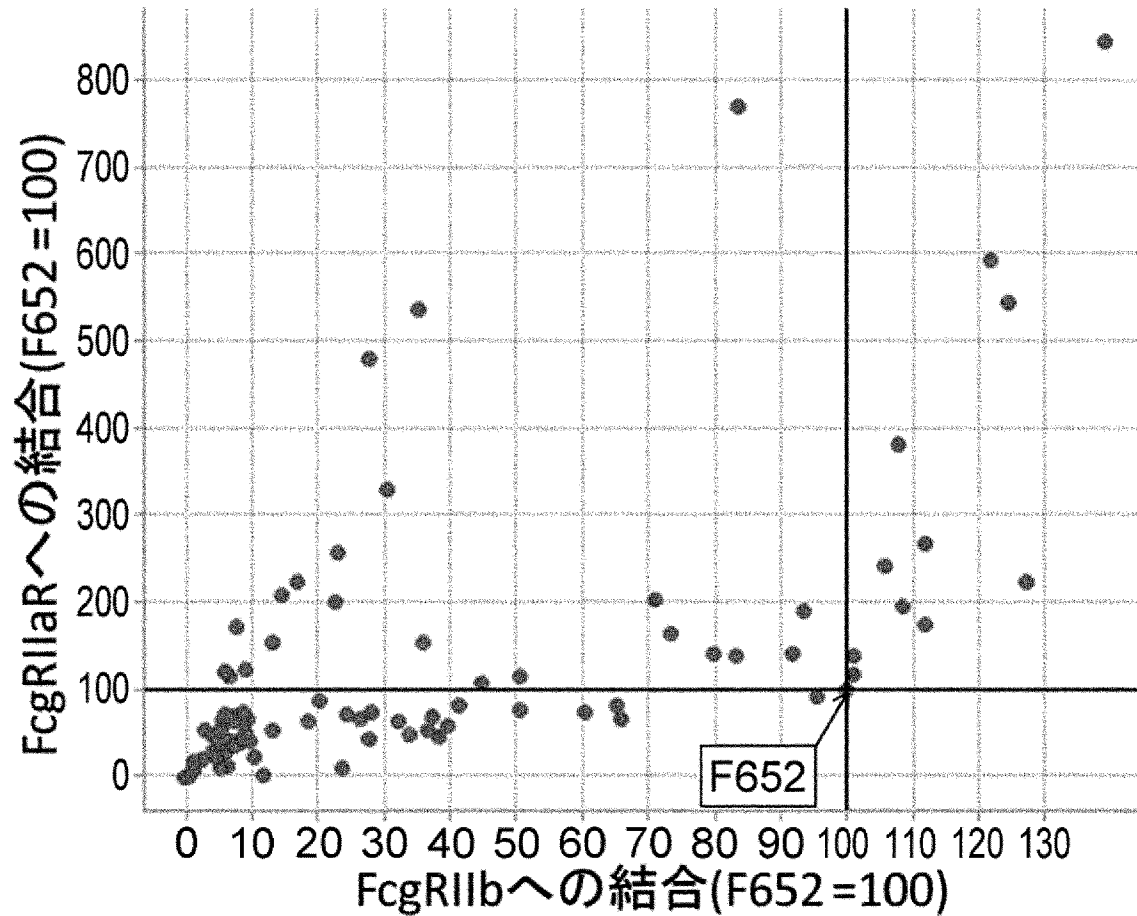
[図17]



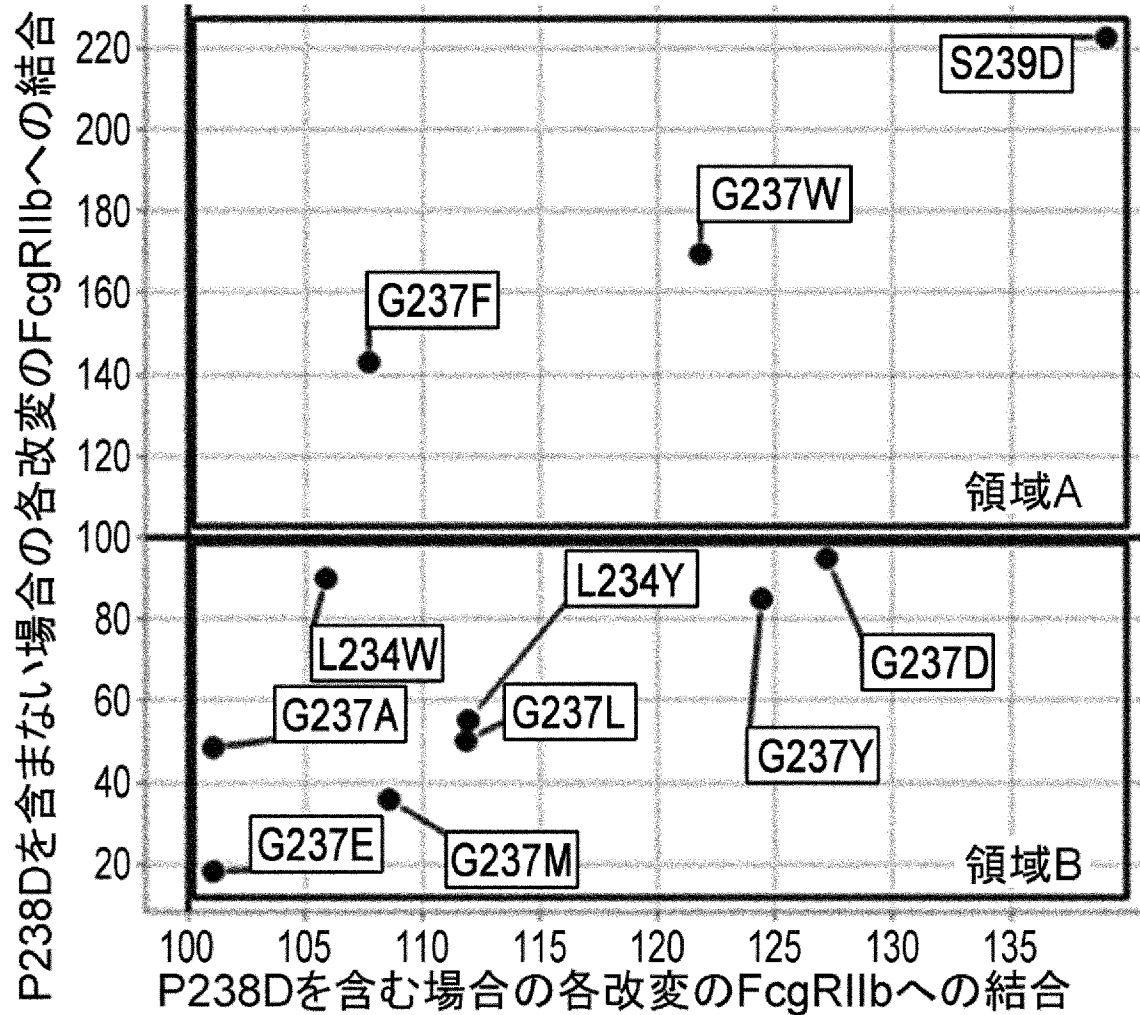
[図18]



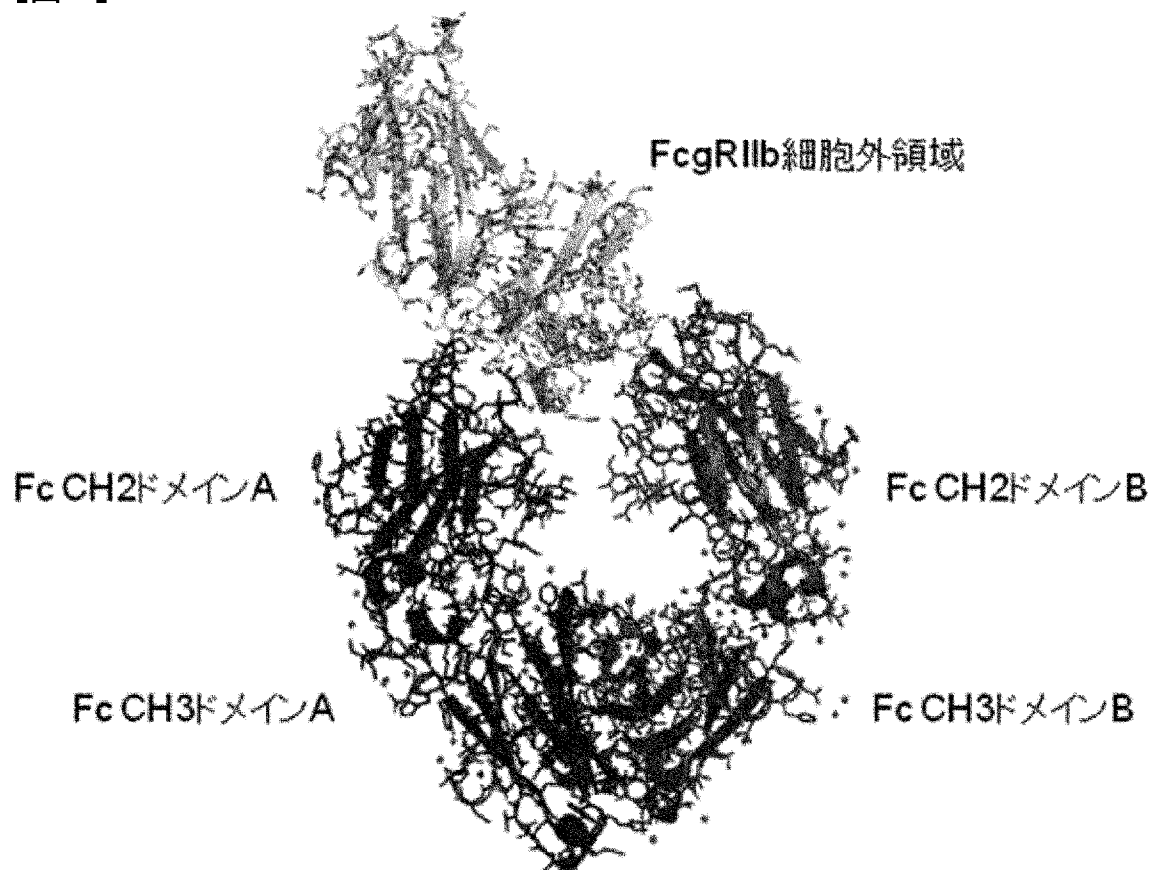
[図19]



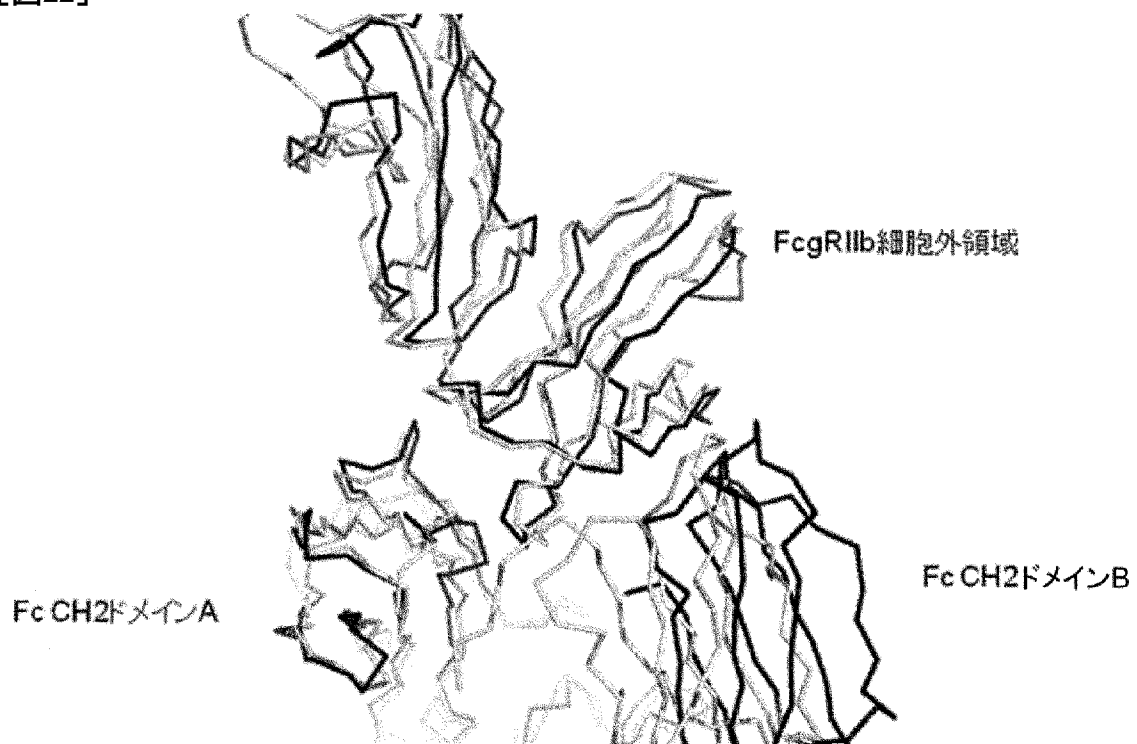
[図20]



[図21]

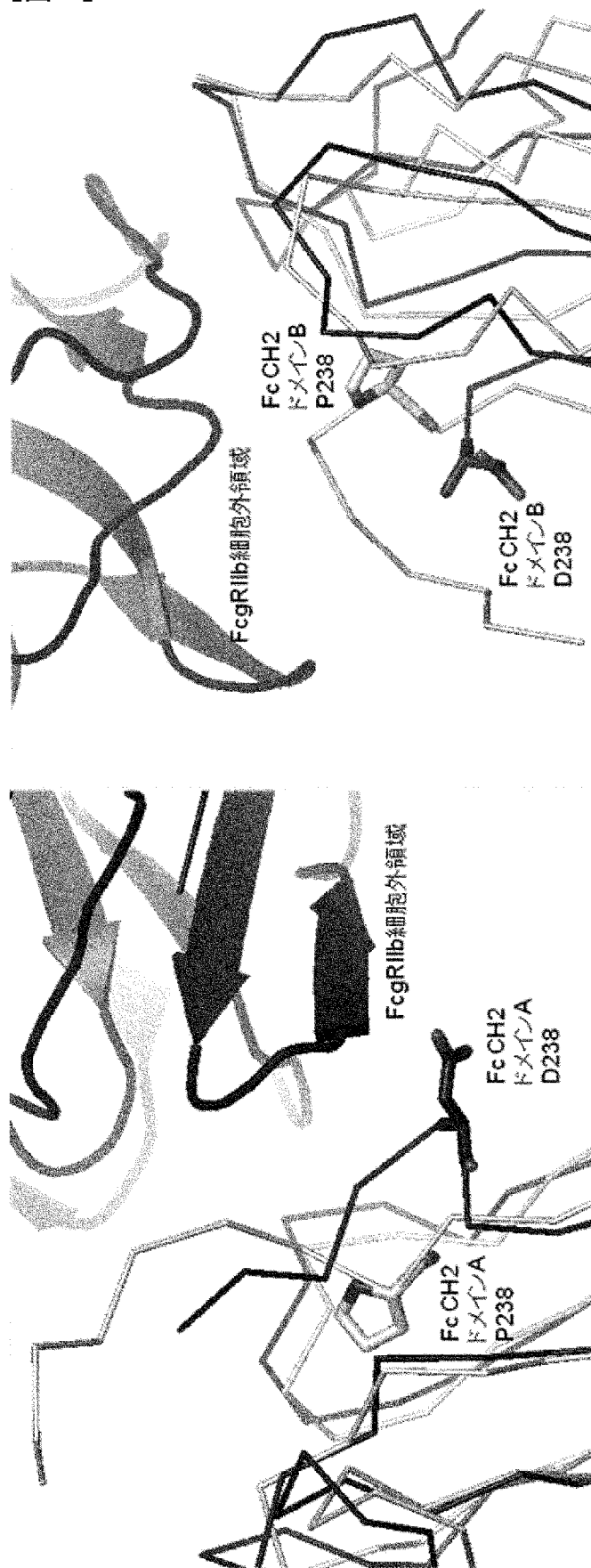


[図22]



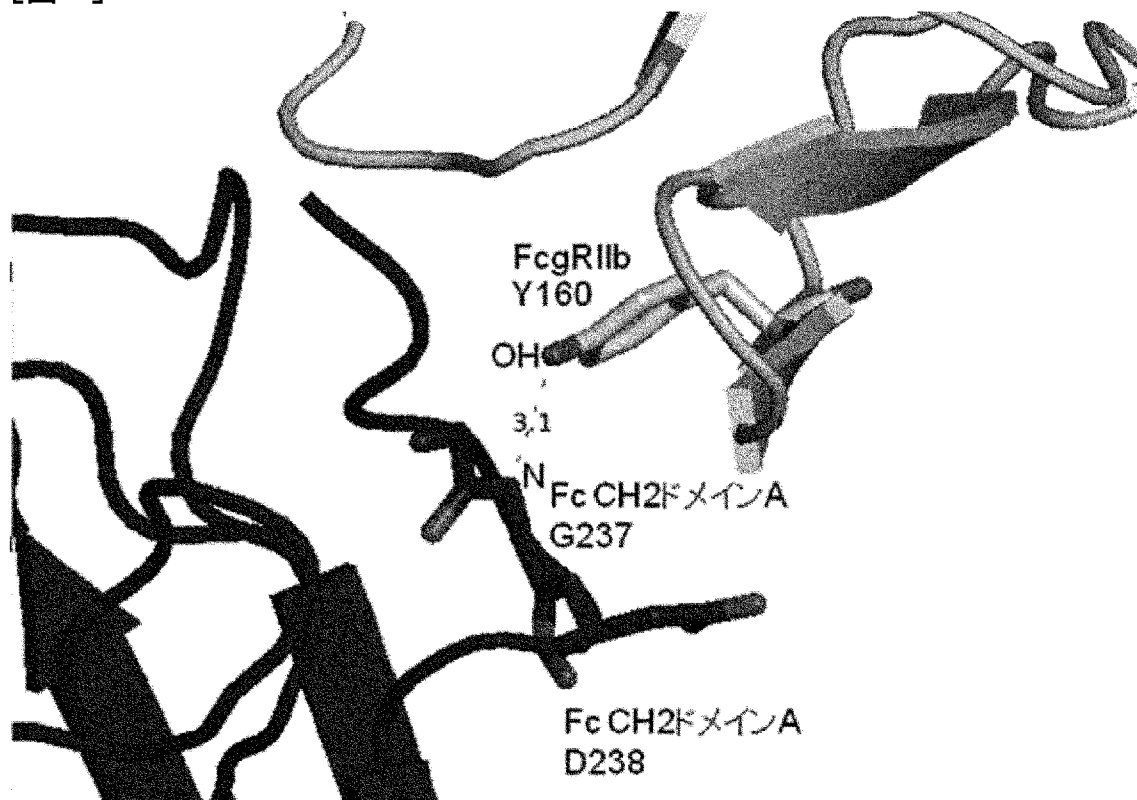
黒 Fc(P238D) / Fc γ RIIb細胞外領域複合体の結晶構造
灰色 Fc(WT) / Fc γ RIIb細胞外領域複合体のモデル構造

[図23]

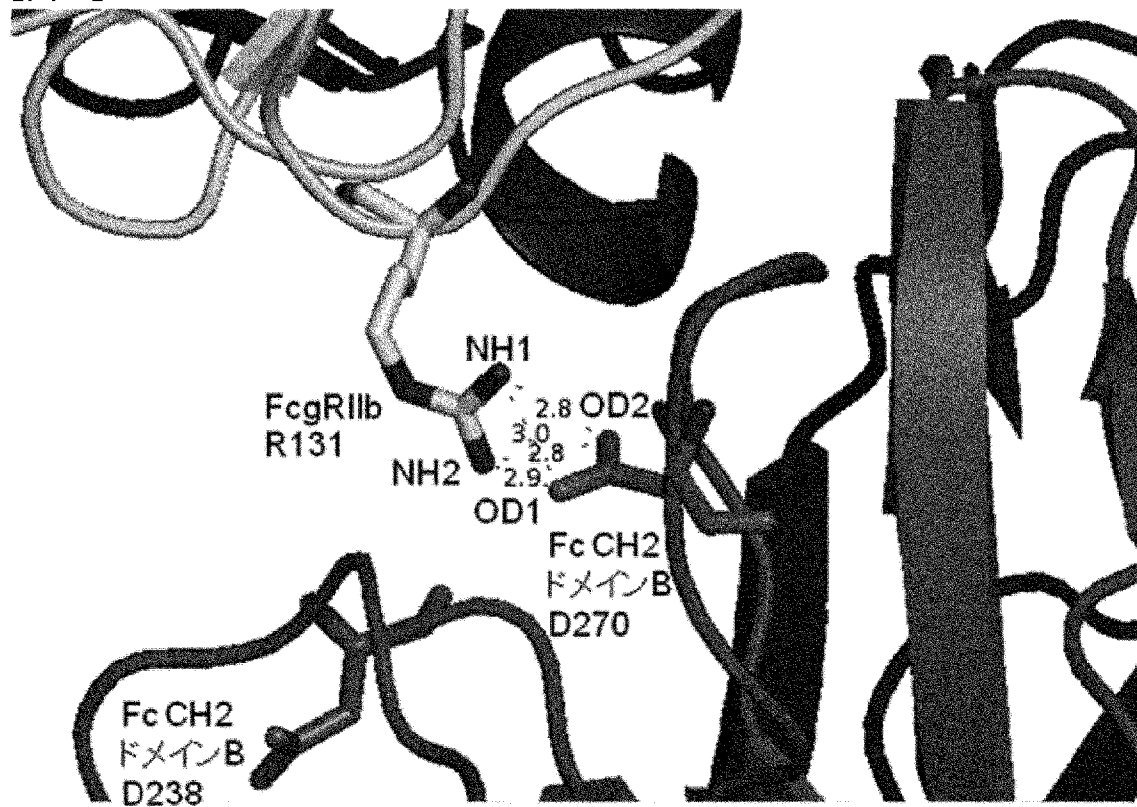


黒 Fc(P238D) / FcγRIIb細胞外領域複合体の結晶構造
 灰色 Fc(WT) / FcγRIIb細胞外領域複合体のモデル構造

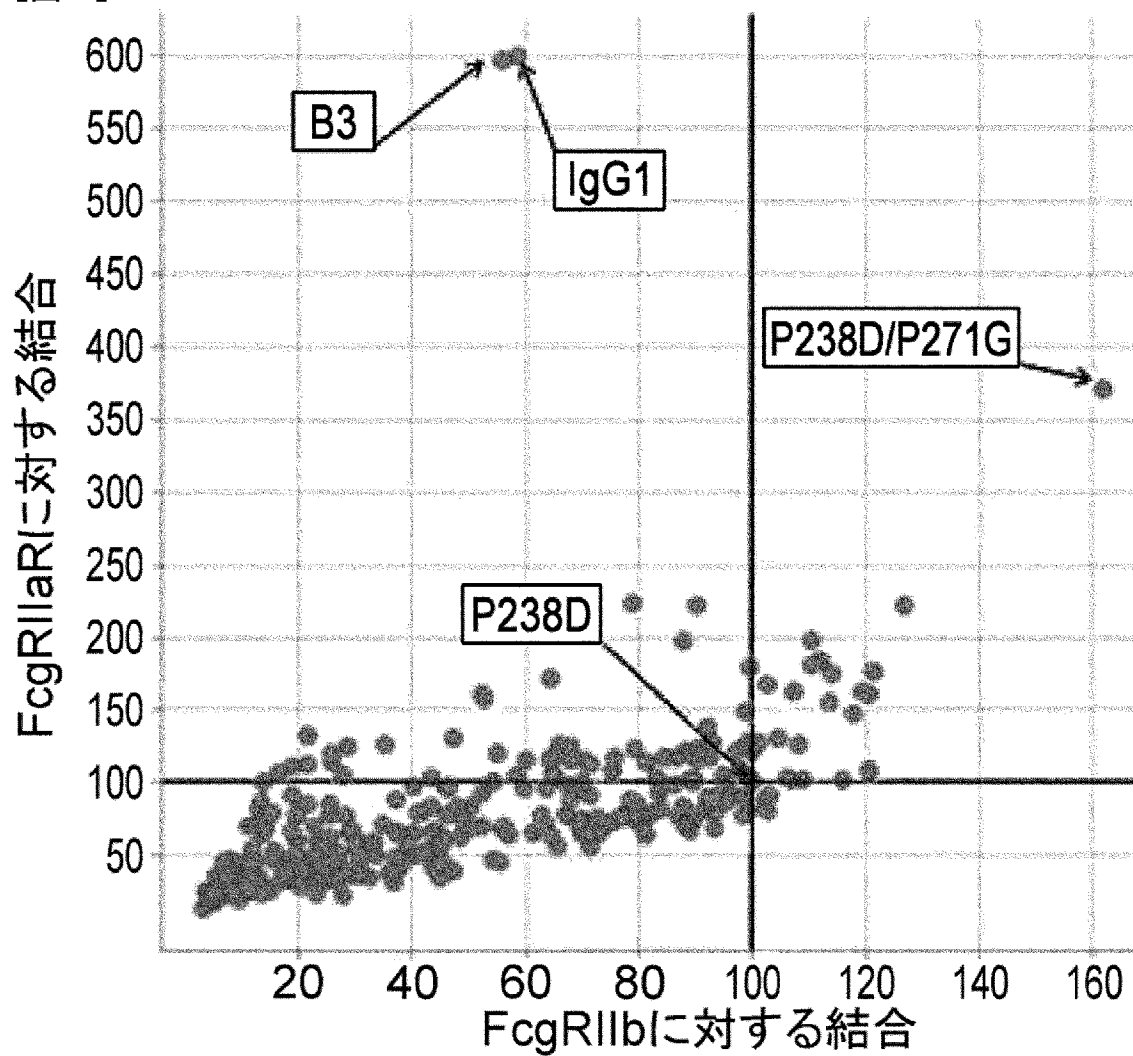
[図24]



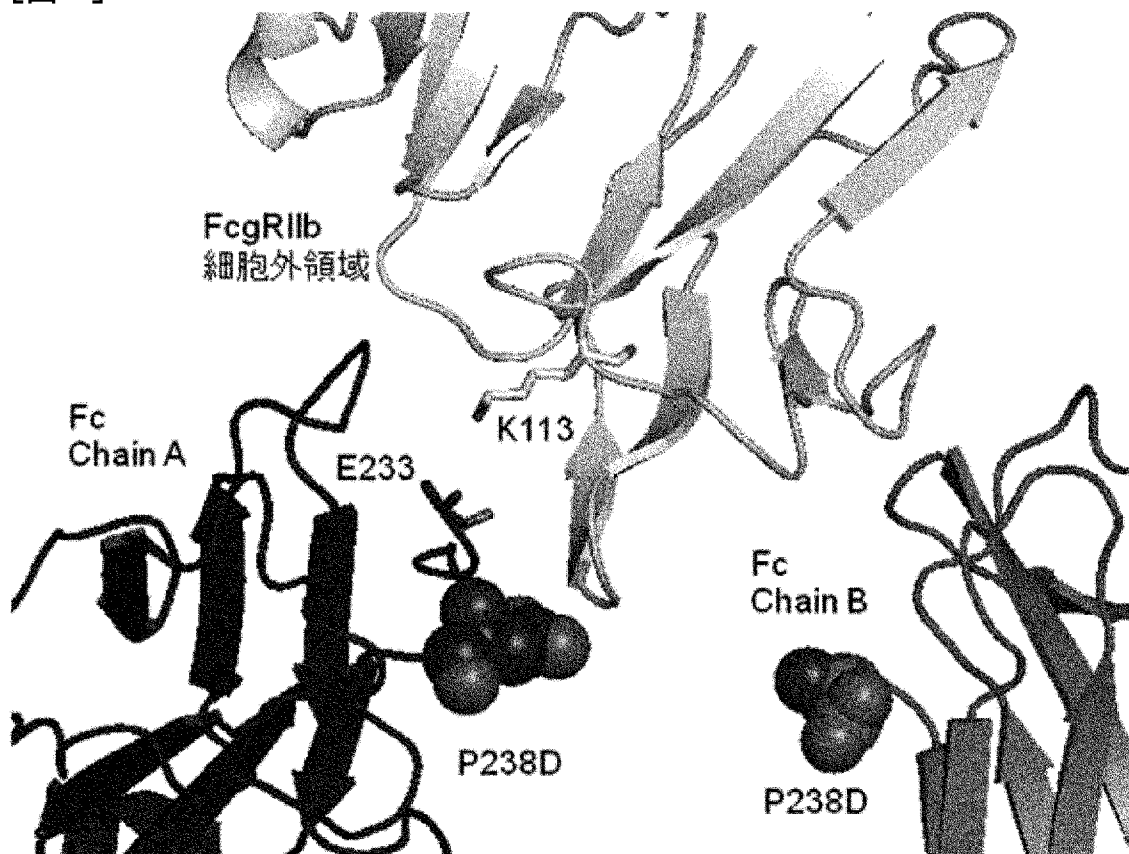
[図25]



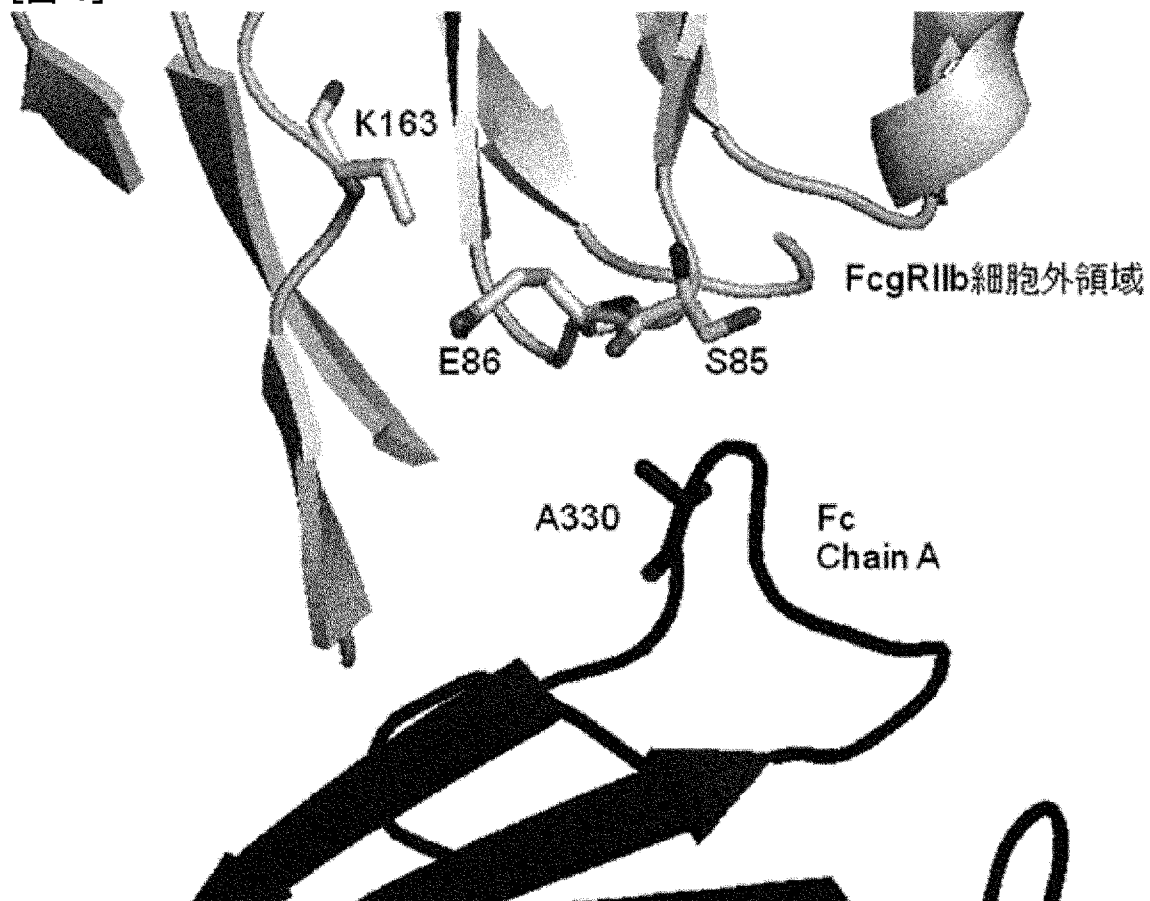
[図26]



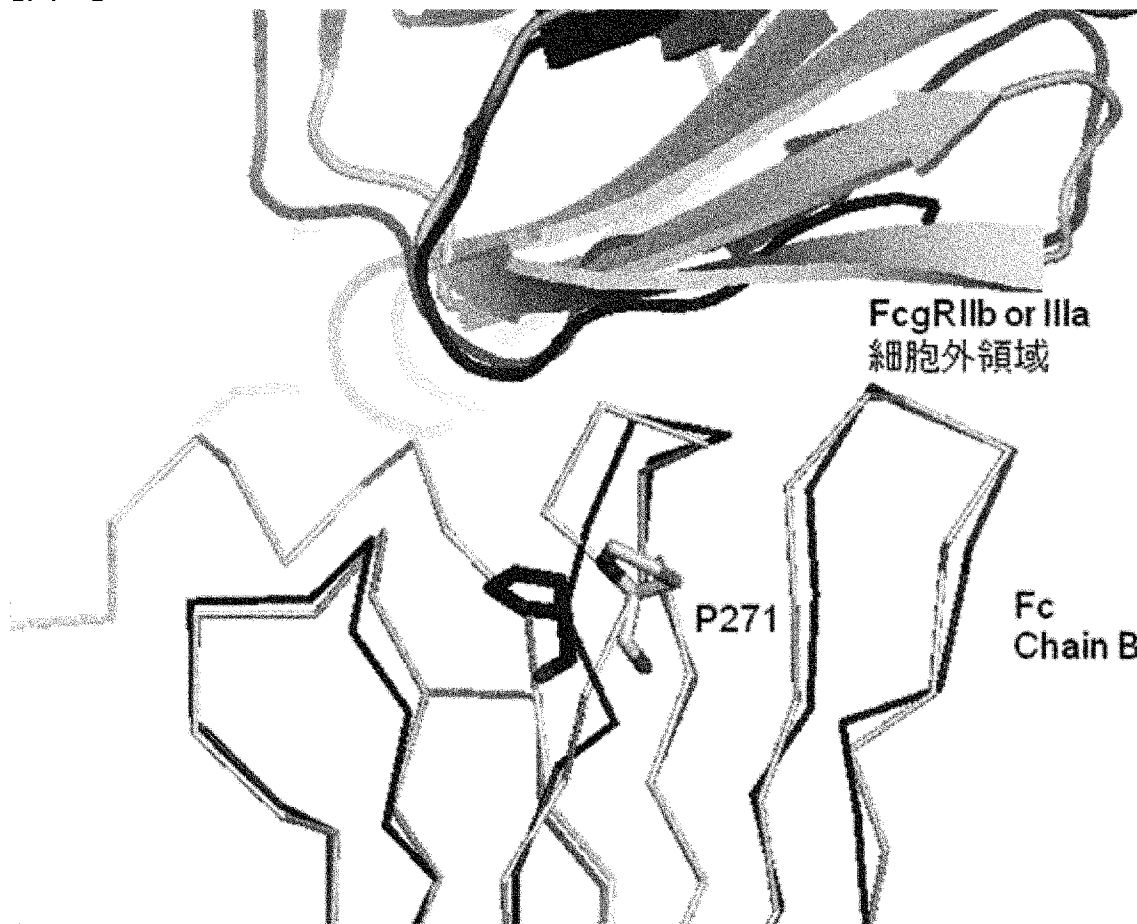
[図27]



[図28]



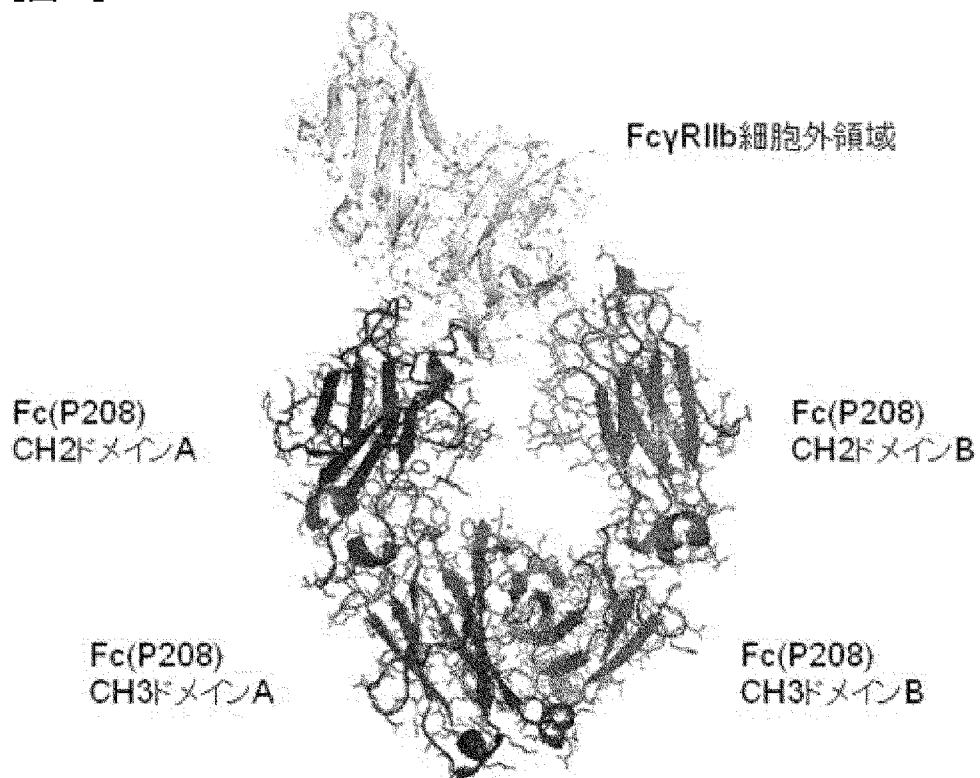
[図29]



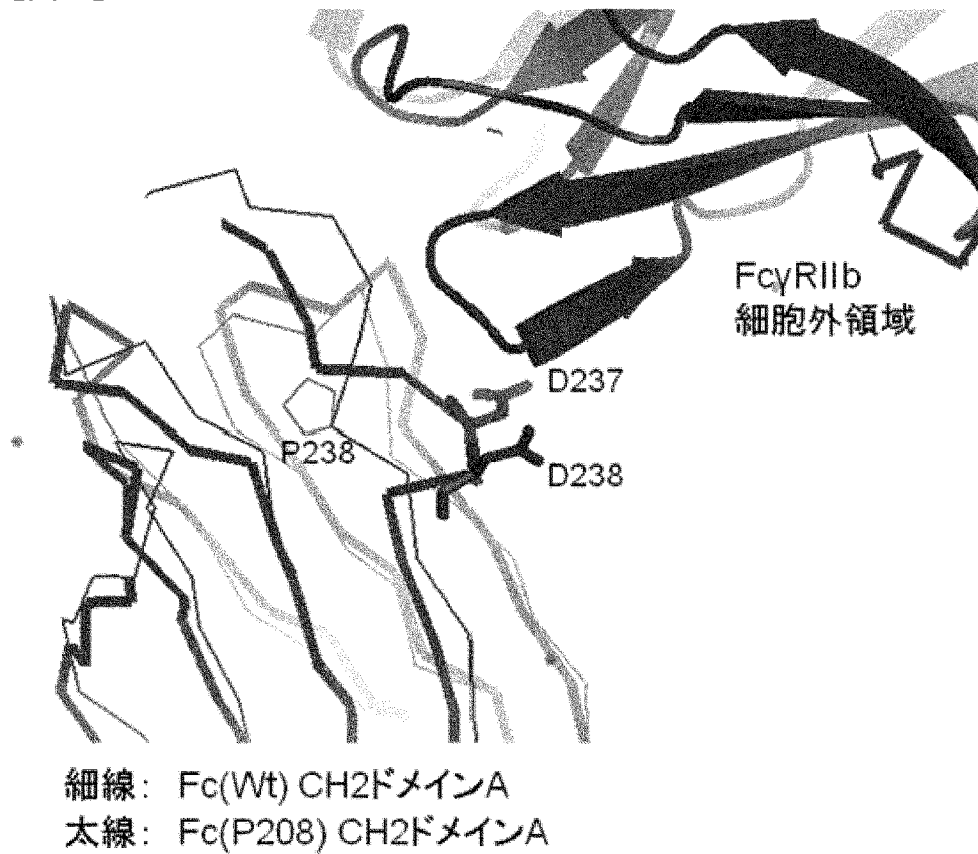
黒 Fc(P238D) / Fc γ RIIb細胞外領域複合体の結晶構造

灰色 Fc(WT) / Fc γ RIIIa細胞外領域複合体の結晶構造 (PDB code:3SGJ)

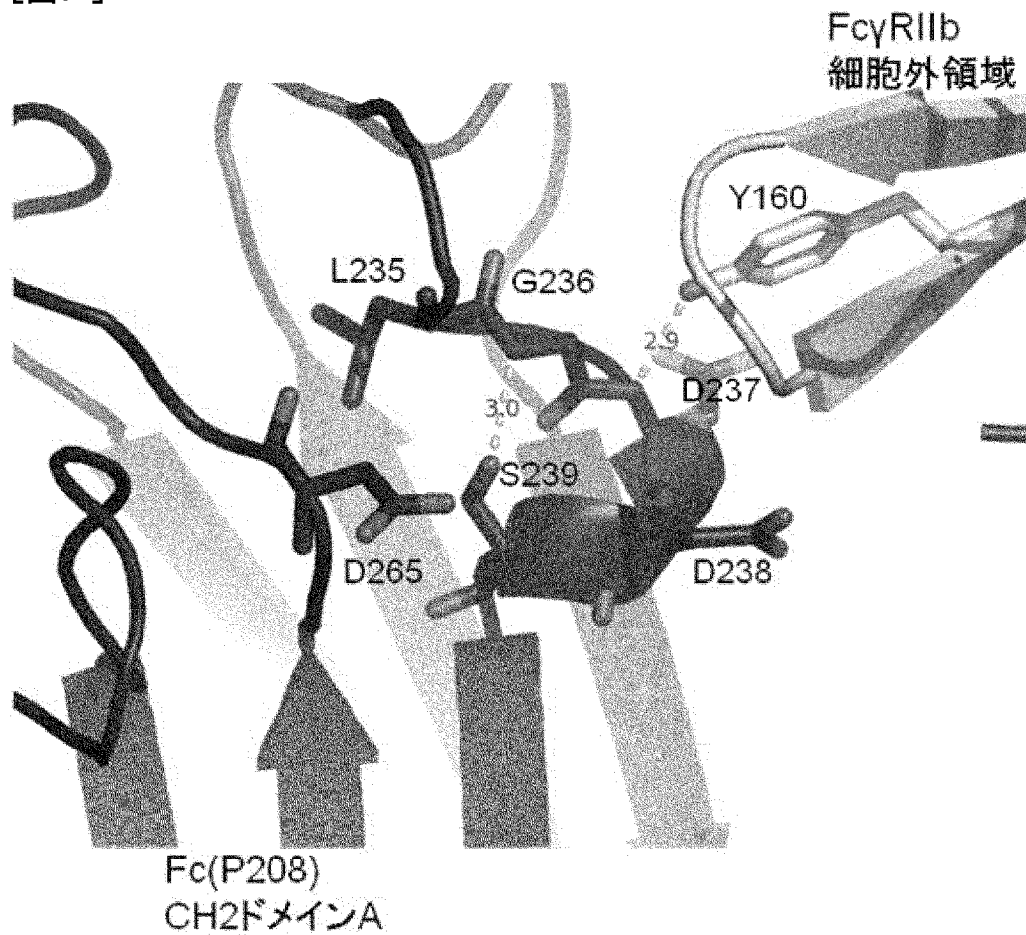
[図30]



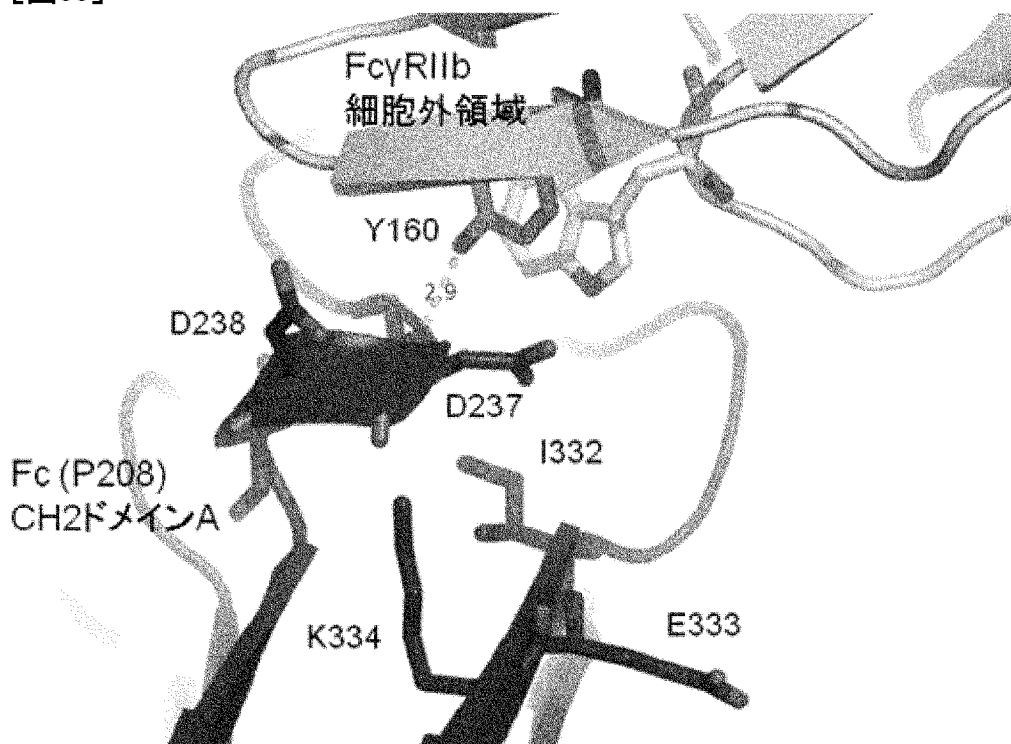
[図31]



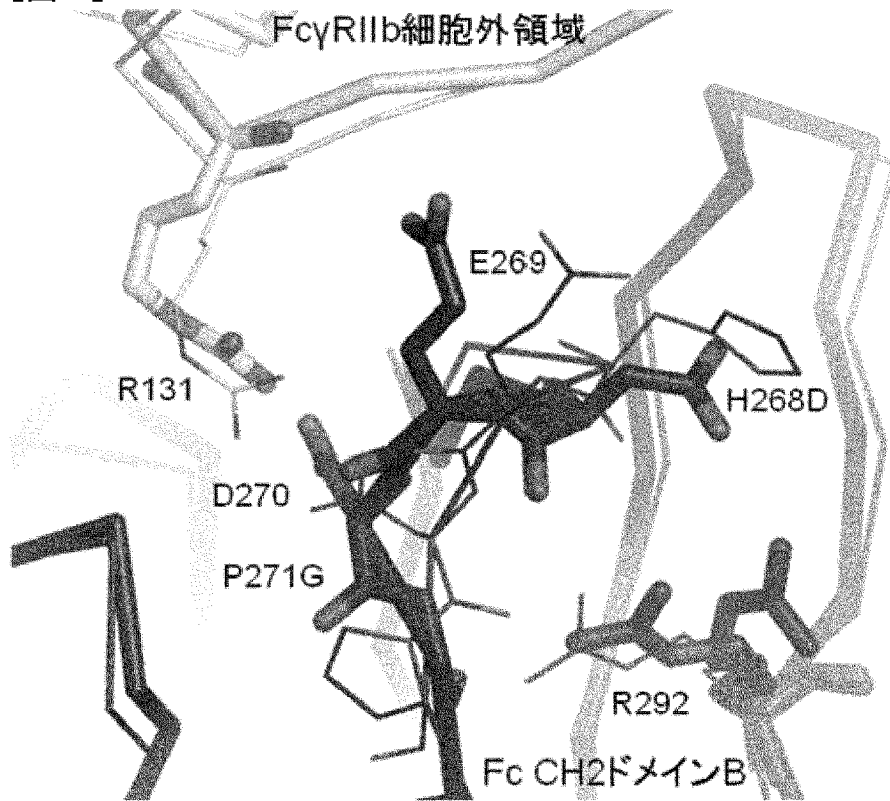
[図32]



[図33]



[図34]



細線: Fc(P238D)/FcγRIIb 細胞外領域複合体X線結晶構造

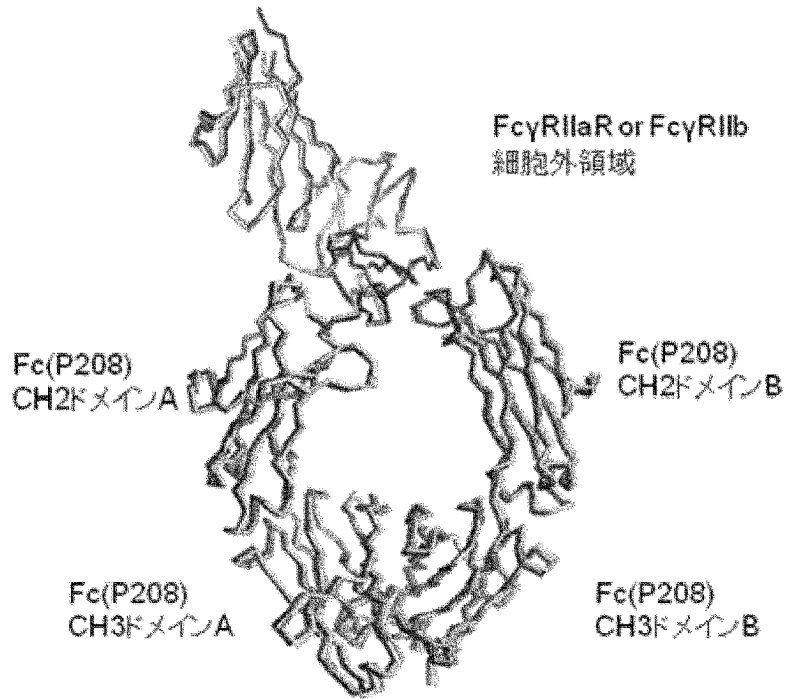
太線: Fc(P208)/FcγRIIb 細胞外領域複合体X線結晶構造

[図35]



細線: Fc(P208)、太線: FcγRIIb細胞外領域

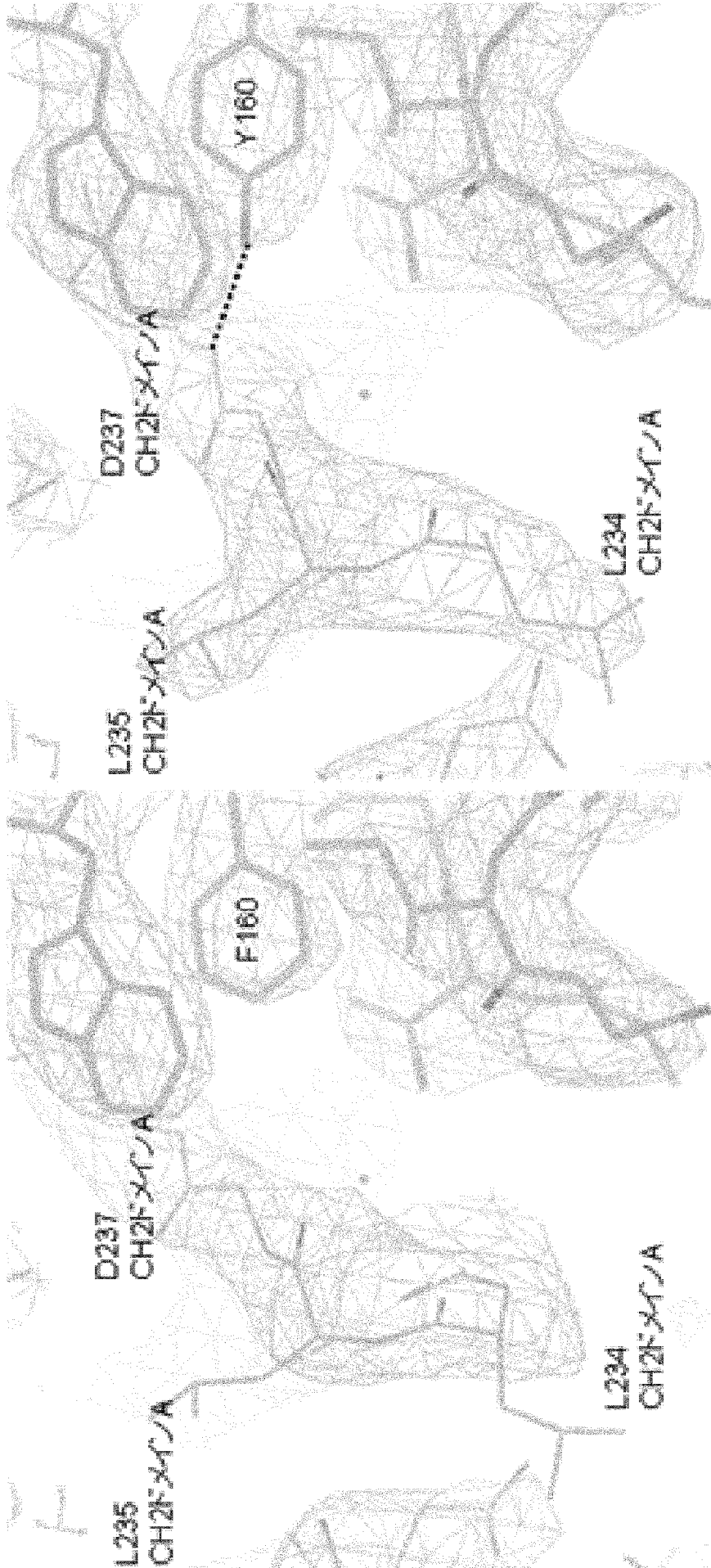
[図36]



黒色： Fc(P208)/FcγRIIIaR 細胞外領域複合体X線結晶構造

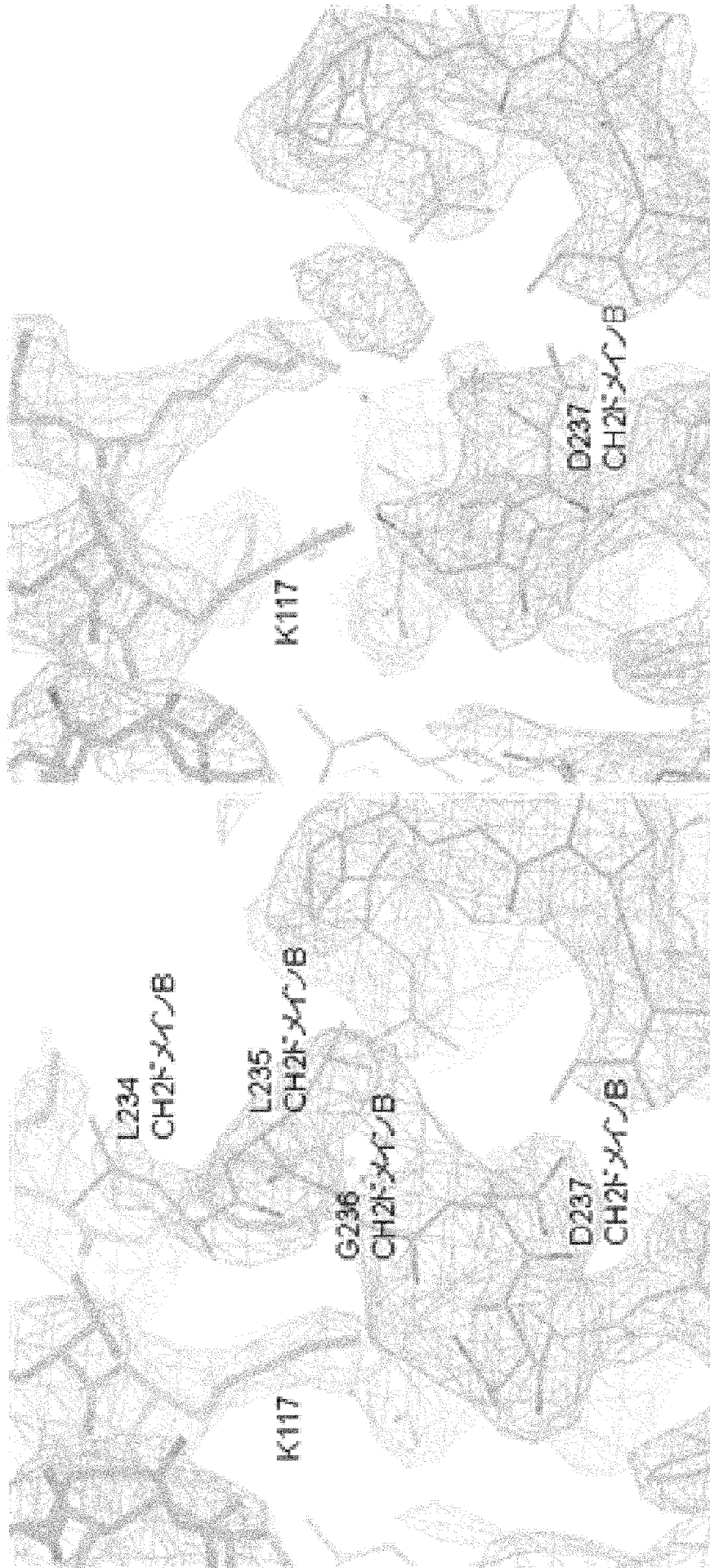
灰色： Fc(P208)/FcγRIIIb 細胞外領域複合体X線結晶構造

[図37]



細線：Fc(P208)、太線：FcyRIIaR or FcyRIIb細胞外領域
 左：Fc(P208)/FcyRIIaR 細胞外領域複合体X線結晶構造
 右：Fc(P208)/FcyRIIb 細胞外領域複合体X線結晶構造

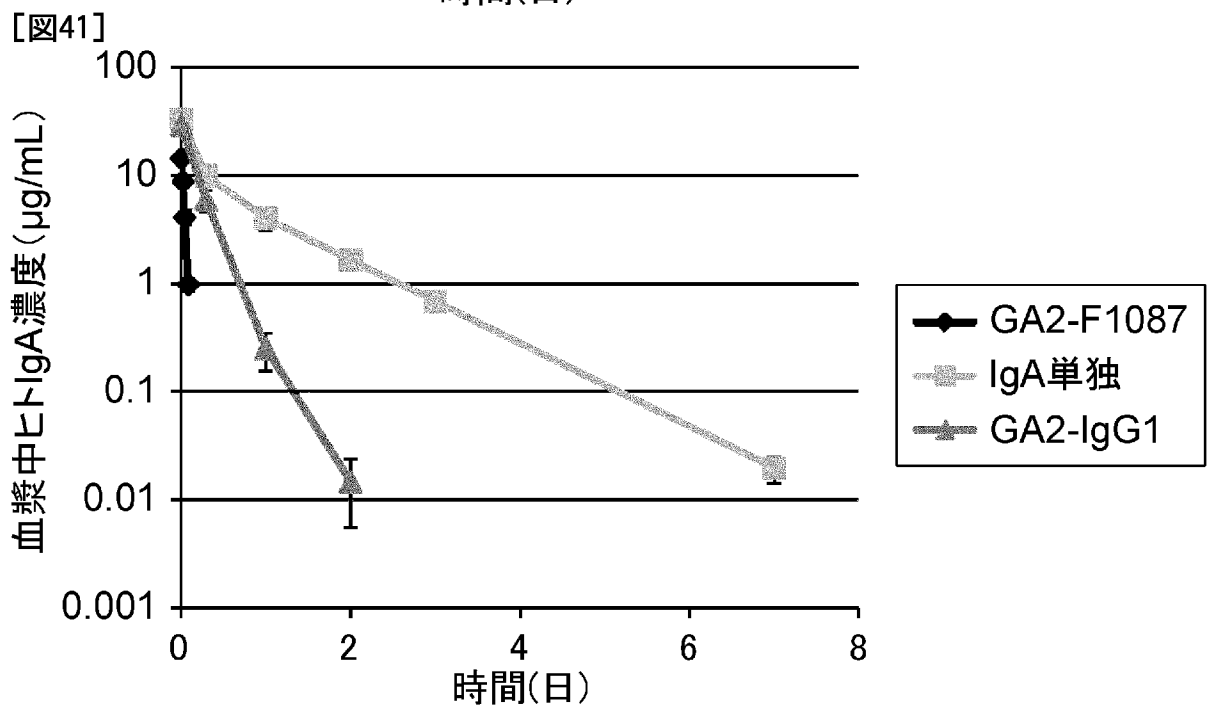
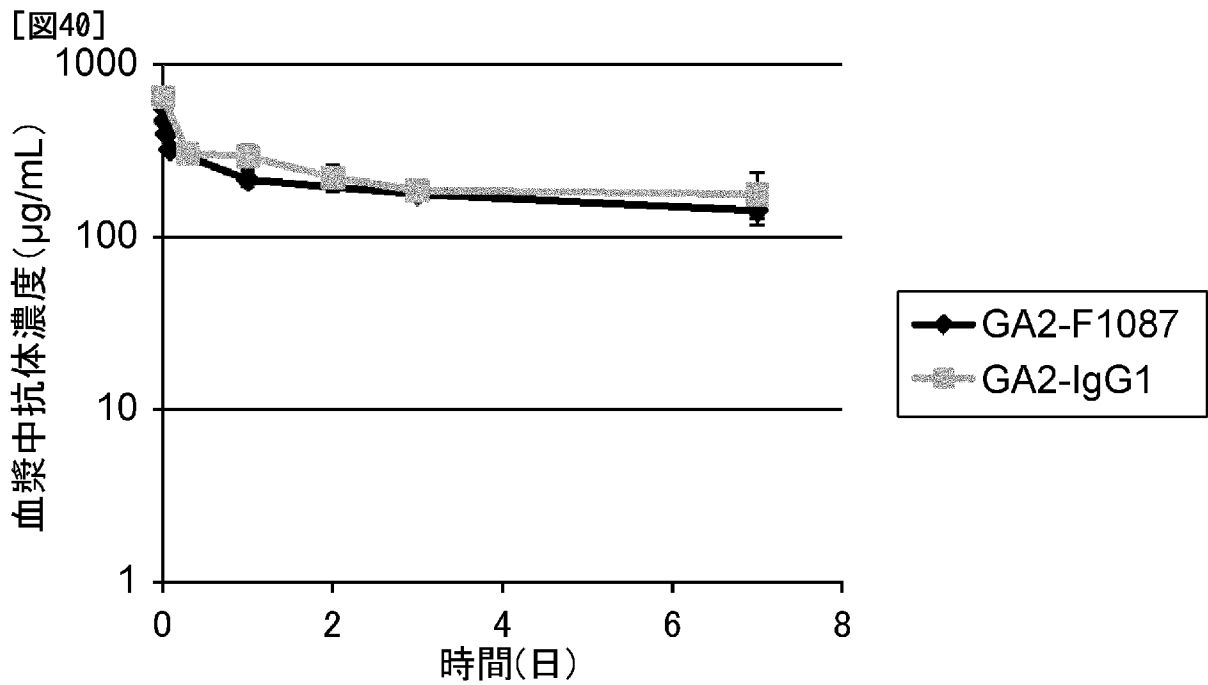
[図38]

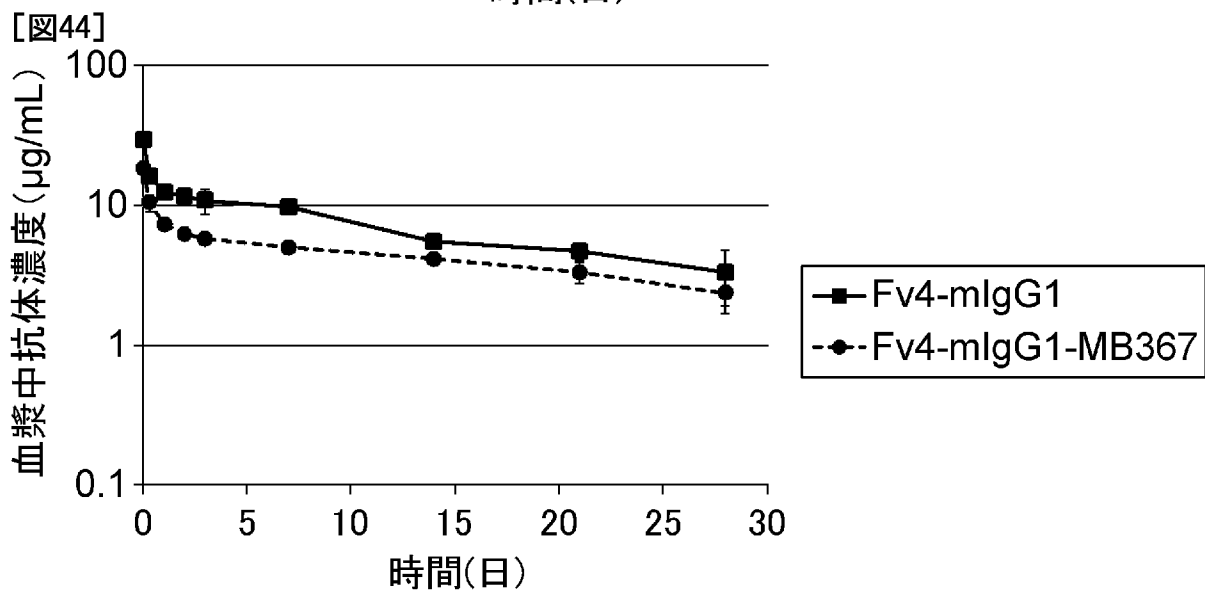
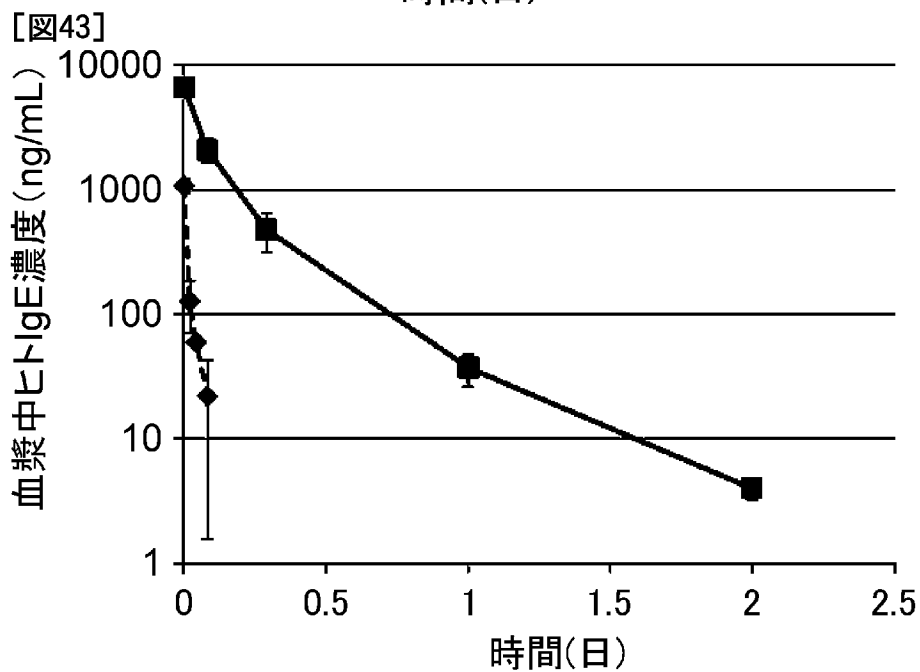
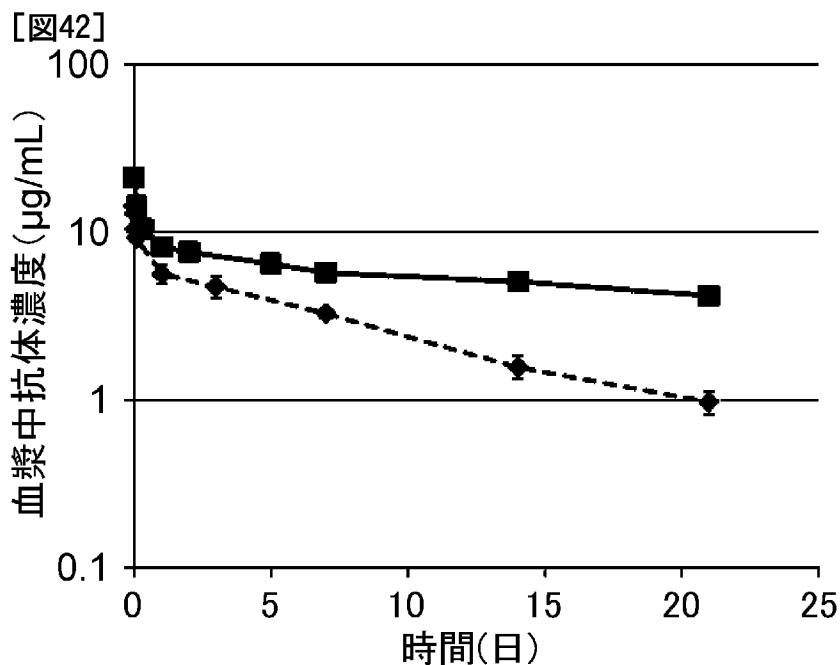


細線: Fc(P208)、太線: FcγRIIaR or FcγRIIb細胞外領域
 左: Fc(P208)/FcγRIIaR 細胞外領域複合体X線結晶構造
 右: Fc(P208)/FcγRIIb 細胞外領域複合体X線結晶構造

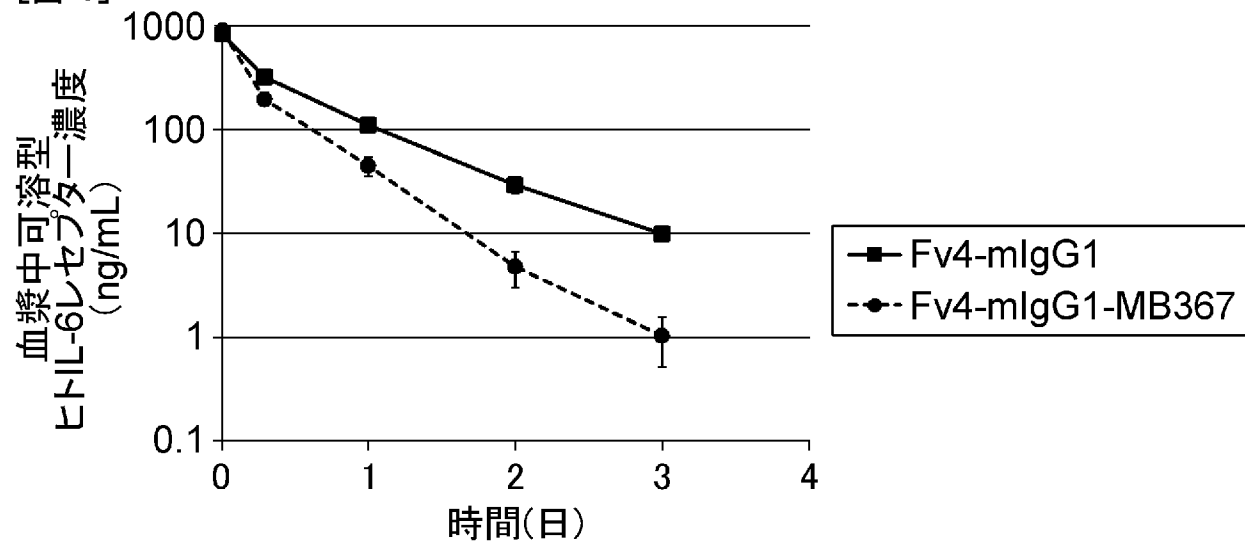
[39]

G1d 118 ASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPEVTVSWNSGALTSQVHTFFAVLQSSGLYSLSVVVTVFPSSSLGTQTYIICNVVNHKPS
G4d 118 ASTKGPSVFPPLAPCSRSTSESATAALGCLVKDYFPEPEVTVSWNSGALTSQVHTFFAVLQSSGLYSLSVVVTVFPSSSLGTQTYIICNVVDHKPS
G1d 208 NTKVDKQVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
G4d 208 NTKVDKQVESK--YGPFCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSEDEPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN
G1d 298 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPAEIKETISKAKGQPREPQVYTIIPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEMESNGQP
G4d 298 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTIIPPSQEFEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEMESNGQP
G1d 388 ENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSKLLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP (配列番号 : 80)
G4d 388 ENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL (配列番号 : 81)





[図45]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/054461

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K39/395(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C12P21/02(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)n

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)

A61K39/395, A61P29/00, A61P35/00, C12P21/02, C07K16/18

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	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

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

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JdreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2008-511292 A (Applied Molecular Evolution, Inc.), 17 April 2008 (17.04.2008), & US 2007/0224188 A1 & EP 1776384 A & EP 2213683 A1 & CA 2573192 A & NO 20071192 A & CN 101001873 A & AU 2005274905 A & CA 2779559 A	1-22
A	WO 2009/125825 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 15 October 2009 (15.10.2009), & US 2011/0111406 A1 & EP 2275443 A1 & AU 2009234675 A & CA 2721052 A & CN 102056946 A & NZ 588507 A & TW 201000127 A & RU 2010145939 A	1-22

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
17 April, 2013 (17.04.13)

Date of mailing of the international search report
07 May, 2013 (07.05.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/054461

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2010/107109 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 23 September 2010 (23.09.2010), & US 2012/0071634 A1 & EP 2409990 A1 & TW 201100542 A	1-22
A	JP 2007-532139 A (Macrogenics, Inc.), 15 November 2007 (15.11.2007), & US 2005/0260213 A1 & EP 1747237 A & WO 2005/115452 A2 & CA 2563314 A & CN 101001872 A & AU 2005247301 A	1-22
A	IGAWA T. et al., Antibody recycling by engineered pH-dependent antigen binding improves the duration of antigen neutralization, Nature Biotechnology, 2010, Vol.28, No.11, p.1203-1207	1-22
A	ZALEVSKY J. et al., Enhanced antibody half-life improves in vivo activity, Nature Biotechnology, 2010, Vol.28, No.2, p.157-159	1-22
A	SUZUKI T. et al., Importance of Neonatal FcR in Regulating the Serum Half-Life of Therapeutic Proteins Containing the Fc Domain of Human IgG1: A Comparative Study of the Affinity of Monoclonal Antibodies and Fc-Fusion Proteins to Human Neonatal FcR, The Journal of Immunology, 2010, Vol.184, p.1968-1976	1-22
A	YEUNG Y. A. et al., Engineering Human IgG1 Affinity to Human Neonatal Fc Receptor: Impact of Affinity Improvement on Pharmacokinetics in Primates, The Journal of Immunology, 2009, Vol.182, p.7663-7671	1-22
A	MI W. et al., Targeting the Neonatal Fc Receptor for Antigen Delivery Using Engineered Fc Fragments, The Journal of Immunology, 2008, Vol.181, p.7550-7561	1-22
E,A	WO 2012/132067 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 04 October 2012 (04.10.2012), (Family: none)	1-22
E,A	WO 2012/133782 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 04 October 2012 (04.10.2012), & EP 2552955 A & AU 2011233390 A & CA 2794860 A & TW 201202419 A	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/054461

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E,A	WO 2013/047729 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 04 April 2013 (04.04.2013), (Family: none)	1-22
E,A	WO 2013/047748 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 04 April 2013 (04.04.2013), (Family: none)	1-22
E,A	WO 2013/047752 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 04 April 2013 (04.04.2013), (Family: none)	1-22

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K39/395(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C12P21/02(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)n

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 (IPC))

Int.Cl. A61K39/395, A61P29/00, A61P35/00, C12P21/02, C07K16/18

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	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2013年
日本国実用新案登録公報	1996-2013年
日本国登録実用新案公報	1994-2013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)

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JdreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の 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 請求項の番号
A	JP 2008-511292 A (アプライド モレキュラー エボリューション, インコーポレイテッド) 2008.04.17, & US 2007/0224188 A1 & EP 1776384 A & EP 2213683 A1 & CA 2573192 A & NO 20071192 A & CN 101001873 A & AU 2005274905 A & CA 2779559 A	1-22
A	WO 2009/125825 A1 (中外製薬株式会社) 2009.10.15, & US 2011/0111406 A1 & EP 2275443 A1 & AU 2009234675 A & CA 2721052 A & CN 102056946 A & NZ 588507 A & TW 201000127 A & RU 2010145939 A	1-22

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
 「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
 「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)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「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
 「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
 「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
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17.04.2013

国際調査報告の発送日

07.05.2013

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号100-8915
 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)

上條 のぶよ

電話番号 03-3581-1101 内線 3439

4U

9454

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の 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 請求項の番号
A	WO 2010/107109 A1 (中外製薬株式会社) 2010.09.23, & US 2012/0071634 A1 & EP 2409990 A1 & TW 201100542 A	1-22
A	JP 2007-532139 A (マイクロジェニクス, インコーポレーテッド) 2007.11.15, & US 2005/0260213 A1 & EP 1747237 A & WO 2005/115452 A2 & CA 2563314 A & CN 101001872 A & AU 2005247301 A	1-22
A	IGAWA T. et al., Antibody recycling by engineered pH-dependent antigen binding improves the duration of antigen neutralization, Nature Biotechnology, 2010, Vol.28, No.11, p.1203-1207	1-22
A	ZALEVSKY J. et al., Enhanced antibody half-life improves in vivo activity, Nature Biotechnology, 2010, Vol.28, No.2, p.157-159	1-22
A	SUZUKI T. et al., Importance of Neonatal FcR in Regulating the Serum Half-Life of Therapeutic Proteins Containing the Fc Domain of Human IgG1: A Comparative Study of the Affinity of Monoclonal Antibodies and Fc-Fusion Proteins to Human Neonatal FcR, The Journal of Immunology, 2010, Vol.184, p.1968-1976	1-22
A	YEUNG Y. A. et al., Engineering Human IgG1 Affinity to Human Neonatal Fc Receptor: Impact of Affinity Improvement on Pharmacokinetics in Primates, The Journal of Immunology, 2009, Vol.182, p.7663-7671	1-22
A	MI W. et al., Targeting the Neonatal Fc Receptor for Antigen Delivery Using Engineered Fc Fragments, The Journal of Immunology, 2008, Vol.181, p.7550-7561	1-22
E A	WO 2012/132067 A1 (中外製薬株式会社) 2012.10.04, (ファミリーなし)	1-22
E A	WO 2012/133782 A1 (中外製薬株式会社) 2012.10.04, & EP 2552955 A & AU 2011233390 A & CA 2794860 A & TW 201202419 A	1-22
E A	WO 2013/047729 A1 (中外製薬株式会社) 2013.04.04, (ファミリーなし)	1-22
E A	WO 2013/047748 A1 (中外製薬株式会社) 2013.04.04, (ファミリーなし)	1-22

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の 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 請求項の番号
E A	WO 2013/047752 A1 (中外製薬株式会社) 2013. 04. 04, (ファミリーなし)	1 - 2 2