

(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
2015年4月2日(02.04.2015)



(10) 国際公開番号

WO 2015/046554 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 7/00 (2006.01) C12P 21/08 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2014/076001

(22) 国際出願日:

2014年9月30日(30.09.2014)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:

特願 2013-203528 2013年9月30日(30.09.2013) 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: 石井 慎也(ISSHII, Shinya); 〒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: 春名 雅夫, 外(HARUNA, Masao 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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:

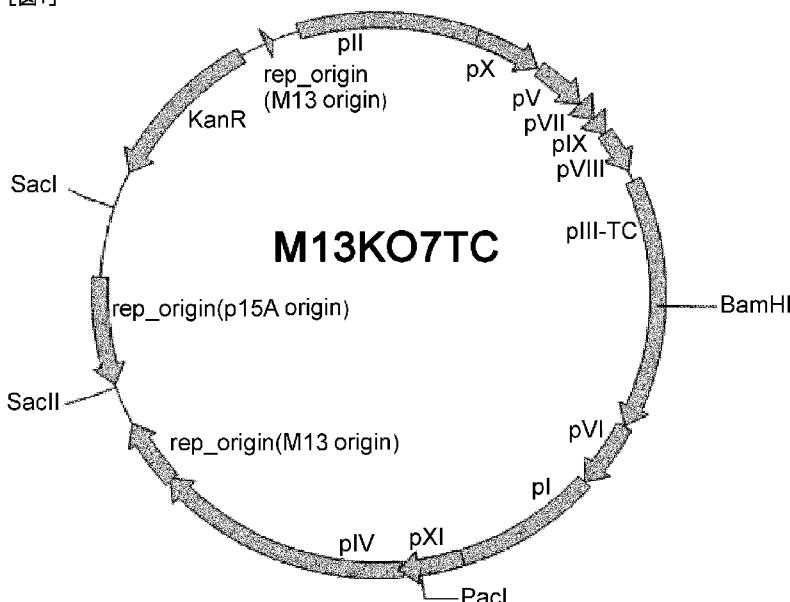
- 国際調査報告(条約第 21 条(3))

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING ANTIGEN-BINDING MOLECULE USING MODIFIED HELPER PHAGE

(54) 発明の名称: 改変されたヘルパーファージを用いて抗原結合分子を作製する方法

[図1]



(57) Abstract: A method for producing a bacteriophage for presenting an antigen-binding molecule, the method being characterized by including a step that brings a helper phage capable of expressing a first polypeptide into contact with a bacterium capable of expressing a second polypeptide, and the first polypeptide and the second polypeptide associating and forming the antigen-binding molecule.

(57) 要約: 抗原結合分子を提示するバクテリオファージを作製する方法であって、第一のポリペプチドを発現可能なヘルパーファージを、第二のポリペプチドを発現可能なバクテリアに接触させる工程を含み、当該第一のポリペプチドと当該第二のポリペプチドが会合して当該抗原結合分子を形成することを特徴とする、方法。



-
- 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))

明 細 書

発明の名称 :

改変されたヘルパーファージを用いて抗原結合分子を作製する方法

技術分野

[0001] [関連出願]

本特許出願は、2013年9月30日に出願された日本国特許出願2013-203528号に基づく優先権の主張を伴うものであり、かかる先の特許出願における全開示内容は、援用することにより本明細書の一部とされる。

[0002] 本発明は、一態様において、抗原結合分子を提示するバクテリオファージを作製する方法などに関する。

背景技術

[0003] 抗体は血漿中での安定性が高く、副作用も少ない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、または、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）。

[0004] 抗体を高機能化させる方法の一つとして、二重特異性抗体（バイスペシフィック抗体、bispecific antibody； BsAb）などの多重特異性抗体が近年注目を集めている。BsAbは、1つの分子内に2つの異なる抗原決定基（エピトープ）に結合可能な部位を有することにより2種類の抗原と結合することができる多価抗体の一種である。

BsAbには通常2種類のH鎖と2種類のL鎖が含まれるが、BsAbを製造する際の問題点として、それらのH鎖とL鎖を一つの細胞に導入し発現させた場合、免疫グロブリンのH鎖及びL鎖が無作為に組み合わされるため、10種類の異なる抗体分子が産生される可能性がある（非特許文献4、特許文献1）。产生さ

れる10種類の抗体のうち、所望の二重特異性を有する抗体は、正しいH鎖とL鎖が組み合わさり、さらに結合特異性の異なる2組のH鎖およびL鎖のペアが組み合わせることによって構成された1種類の抗体のみである。

[0005] このような課題を解決するための方法として、產生されたH鎖を効率的にヘテロダイマー化する方法が知られている。例えば、2つのCH3ドメインに互いに立体的に相補的な構造を導入する方法（非特許文献5、特許文献2）；IgGとIgAのCH3ドメインが互いに結合しないという性質を利用して、2つのCH3ドメインをIgG由来の配列とIgA由来の配列で互い違いに置換することにより所望の組合せのみを作成する方法（SEEDbodies：非特許文献6）；CH3ドメインに変異を導入することにより、2つのH鎖の電荷的相互作用を利用してヘテロダイマー化を促進する方法（特許文献3）等が知られている。

しかし、これらの方法により製造されたH鎖も、依然として誤ったL鎖と対形成し得る。そこで、H鎖のヘテロダイマー化を促進しつつ、共通のL鎖を有する多重特異性抗体を製造する方法が報告されている。共通のL鎖を取得する方法として、L鎖のライブラリーを作製し、それを2つの抗体のH鎖と連続的に組み合わせてそれぞれの抗原に結合可能な抗体をスクリーニングすることにより、共通L鎖を取得する方法（特許文献4）；L鎖のレパートリーが制限された抗体ライブラリーから異なる抗原に結合する抗体を取得し、それらの中から同一のL鎖をもつ抗体を選択する方法（非特許文献7、特許文献1）；2種類の抗体L鎖のCDRをシャッフリングしたキメラL鎖を作成し、両方の抗原に結合可能な共通L鎖をスクリーニングする方法（非特許文献8）；特定のL鎖遺伝子が導入されたトランスジェニクマウスに免疫してL鎖が共通の抗体を取得する方法（特許文献5、特許文献6）；特定のL鎖遺伝子が導入され、H鎖のみが多様性をもつ抗体ライブラリーから、異なる抗原に結合する抗体を取得し、L鎖が共通の抗体を取得する方法（非特許文献14）等が知られている。

また、別の方法として、H鎖とL鎖の定常領域を改変することにより、選択的なヘテロダイマー化を促進する方法（特許文献3）；H鎖可変領域/L鎖可変領域（VH/VL）もしくはH鎖定常領域CH1/L鎖定常領域（CH1/CL）を入れ替えるこ

とにより、所望のヘテロダイマーのみを作成する方法 (Crossmab: 特許文献 7) ; 2種類の抗体を調製した後、*in vitro*でジスルフィド結合を異性化させることにより二重特異性抗体を作製する方法 (DuoBody: 特許文献 8) 等も知られている。

[0006] また、共通H鎖を取得する方法に関連して、共通H鎖ライブラリー、及びL鎖ライブラリーを用いて、様々な抗原に対する抗体を取得後に、共通H鎖と2種類のL鎖(κ鎖、λ鎖)により、二重特異性抗体を作成する方法が知られている (Kappa-Lambda Body : 特許文献 11) 。

[0007] また、同一抗原に対して異なるエピトープを認識する抗体を取得し、バイスペシフィック抗体(特に、バイパラトピック抗体、*biparatopic antibody*)としての利用も考えられる。抗原にバイパラトピック抗体が結合することにより、抗原が単体であってもバイパラトピック抗体によって架橋され、免疫複合体 (Immune complex; IC) を形成させることができる。生体内で免疫複合体を形成させることにより、当該免疫複合体の、血中からの速やかなクリアランスが期待される (特許文献 9) 。

[0008] 一方、抗原結合分子を取得する方法の一つとして、ファージ提示 (ファージディスプレイ) 技術が広く採用されるようになってきている。ファージ提示技術は、例えば抗体のH鎖可変領域およびL鎖可変領域をバクテリオファージの粒子上に提示する技術である。本技術を用いて配列の異なる抗体を提示する多数のバクテリオファージの集団 (ファージ抗体ライブラリー) を作製し、それらの中から任意の抗原に結合する抗体を選択 (選別) することにより、所望の抗原に特異的に結合する抗体を取得することができる。

ファージ提示技術に用いられる代表的なファージは纖維状ファージM13である。ファージ粒子上への抗体の提示は、通常、g3pなどの、ファージのコートタンパク質をコードする遺伝子に、抗体のH鎖可変領域の遺伝子およびL鎖可変領域の遺伝子が連結されたものをファージミドベクターに挿入して、それを大腸菌に導入し、そこにヘルペルファージを感染させることにより行うことができる。ファージ抗体ライブラリーからの抗体のスクリーニングは、固

定化した抗原と抗体ライブラリーを混合して、結合、洗浄、溶出の操作（パンニング、 panning）を行うことにより、抗原に結合可能な抗体を提示したファージを選択（選別）することができる。回収したファージは宿主である大腸菌などに感染させて増幅させることができ、そのようにして増幅されたファージを用いてパンニングを繰り返し行うことにより、抗原に特異的に結合する抗体の比率を高めていくことができる（非特許文献9）。

ファージディスプレイの方法により抗体断片を取得する際には、通常、Fabもしくは一本鎖Fv (scFv) とファージコートタンパク質との融合タンパク質の形態で抗体ライブラリーを作製する。当初は、バクテリオファージのすべての遺伝子情報を含むファージベクターが用いられていたが、現在ではファージミドベクターを用いた方法が一般的になっている。ファージミドベクターはファージベクターに比べてサイズの小さいプラスミドベクターである。提示させたいタンパク質をコードする遺伝子をgene 3やgene 8等のファージコートタンパク質をコードする遺伝子のN末端側に連結した遺伝子がファージミドベクターに挿入される。ファージディスプレイの方法においては、提示されるタンパク質をコードする遺伝子がファージ粒子内にパッケージングされる必要があるため、ファージミドベクター上にはファージのパッケージングシグナルが必要である。また、ファージミドベクターを含む大腸菌からファージを産生させるためには、ファージの構造タンパク質等を供給するM13K07やVCSM13等のヘルパーファージを感染させる必要がある。

このようにして作製したファージ抗体ライブラリーを用いて、対象とする抗原に高親和性の抗体断片を同定する方法として、鎖シャッフリングが用いられてもよい。この方法では、例えば、抗体の抗原結合部位（例えば、L鎖可変領域）をコードするポリヌクレオチドは、ランダムまたは部位特異的突然変異生成により多様化される一方で、抗体の別の抗原結合部位（例えば、H鎖可変領域）をコードするポリヌクレオチドは固定される。これは、例えば、対象とする抗原に結合する抗体のH鎖可変領域をコードする野生型のポリヌクレオチドを、多様化されたL鎖可変領域のポリヌクレオチドのライブラリーを

有するファージディスプレイベクター系にクローニングし、次いで、抗原に対して高親和性で結合するものをスクリーニングすることによって達成できる。典型的には、最初に、H鎖可変領域を固定しながら、L鎖可変領域をシャッフリングする。このような、L鎖シャッフリングを利用した抗体のaffinity maturationの方法としては、pLf1T-3 (L鎖) ファージミドベクターとpHg3A-3 (H鎖-gene3) プラスミドのセットから成るdual-vector system-III (DVS-III) を用いる手法（非特許文献15）；H鎖可変領域のファージディスプレライブラリーを用いて、抗原に対してパンニング操作を行い、その後、パンニング操作により濃縮したH鎖可変領域に対し、ライブラリー化したVL遺伝子を組み合わせ、再度パンニング操作を行う手法（非特許文献16）を挙げてもよい。

[0009] また、ファージディスプレイ法は、対象とする抗原に結合する非ヒト動物由来抗体をヒト化するための手段としても使用されている。例えば、マウスに免疫して得られた抗体のH鎖を固定し、ヒトNaive由来L鎖抗体ライブラリーと組み合わせ、抗原に対してパンニング操作を行うことにより得られたヒト由来抗体L鎖を得て、次いで、L鎖を固定してヒトNaive由来H鎖抗体ライブラリーと組み合わせ、抗原に対して再度パンニング操作を行うことにより、さらにヒト由来抗体H鎖を取得できる。このように、順次、ヒト抗体Libraryと置き換えることにより、非ヒト動物由来抗体を元としてヒト抗体を取得することが可能である（非特許文献17）。

[0010] ヘルパーファージの遺伝子を改変してファージディスプレイを改良した例については、いくつかの報告がある。例えば、Hyper phage（非特許文献10）、CT helper phage（非特許文献11）、Ex-phage（非特許文献12）などが知られている。また、バクテリオファージのゲノムに外来遺伝子を導入した例として、薬剤耐性遺伝子を阻害する物質をコードする遺伝子を導入した例が報告されている（非特許文献13、特許文献10）。しかし、ヘルパーファージを改変して、L鎖またはH鎖が共通の抗体を取得するのに適した新たなファージディスプレイ法を構築したというような報告はこれまでのところな

されていない。

先行技術文献

特許文献

- [0011] 特許文献1 : WO98/50431
特許文献2 : WO96/27011
特許文献3 : WO2006/106905
特許文献4 : WO2004/065611
特許文献5 : WO2011/097603
特許文献6 : US2010/0146647
特許文献7 : WO2009/080251
特許文献8 : WO2008/119353
特許文献9 : WO2013/081143
特許文献10 : WO2009/108406
特許文献11 : WO2012023053

非特許文献

- [0012] 非特許文献1 : Nat Biotechnol (2005) 23, 1073-1078
非特許文献2 : Eur J Pharm Biopharm (2005) 59, 389-396
非特許文献3 : Mol Cells (2005) 20, 17-29
非特許文献4 : Methods Enzymol (1986) 121, 210-228
非特許文献5 : Protein Eng (1996) 9, 617-621
非特許文献6 : Protein Eng Des Sel (2010) 23, 195-202
非特許文献7 : Nat Biotechnol (1998) 16, 677-681
非特許文献8 : PLoS One (2013) 8, e57479
非特許文献9 : Methods Enzymol (1993) 217, 228-257
非特許文献10 : Nat Biotechnol (2001) 19, 75-78
非特許文献11 : Nucleic Acids Res (2003) 31, e59
非特許文献12 : Nucleic Acids Res (2002) 30, e18
非特許文献13 : Proc Natl Acad Sci U S A (2009) 106, 4629-4634

非特許文献14 : J Biol Chem. 2010 Jul 2;285(27):20850-9

非特許文献15 : Immunol Lett. 2010 Aug 16;132(1-2):24-30

非特許文献16 : Protein Eng Des Sel. 2011 Sep;24(9):691-700

非特許文献17 : J Mol Biol. 2000 Feb 25;296(3):833-49

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0013] 本発明はこのような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、一様において、二本のポリペプチドを含む抗原結合分子において、一方のポリペプチド（第一のポリペプチド）が共通で、他方のポリペプチド（第二のポリペプチド）が異なる複数の抗原結合分子を効率的に取得する新規な方法を提供する。

課題を解決するための手段

[0014] 本発明者は、共通した第一のポリペプチドを含む複数の抗原結合分子を効率よく作製する方法について鋭意研究を行った結果、驚くべきことに、第一のポリペプチドを発現可能なヘルパーファージ、および第二のポリペプチドを発現可能なバクテリアを作製し、当該ヘルパーファージを当該バクテリアに感染させることによって、第一のポリペプチドおよび第二のポリペプチドから形成される抗原結合分子を提示するバクテリオファージを作製できることを見出した。その際、アミノ酸配列の異なる複数の第二のポリペプチドを発現可能なバクテリア集団を作製し、それらに第一のポリペプチドを発現可能なヘルパーファージを感染させることによって、第一のポリペプチドはアミノ酸配列が共通で、第二のポリペプチドはアミノ酸配列が異なる抗原結合分子を提示するバクテリオファージの集団（抗原結合分子提示ライブラリー）を作製できることを見出した。さらに、そのようにして作製された抗原結合分子提示ライブラリーから、所望の抗原に対して特異的に結合する抗原結合分子を取得できることを見出した。当該抗原結合分子提示ライブラリーから、複数の抗原に対して特異的に結合する抗原結合分子をそれぞれ取得することによって、当該複数の抗原に対して特異的に結合する多重特異性抗原結

合分子であって、第一のポリペプチドが各抗原結合分子において共通している多重特異性抗原結合分子を作製できることを見出した。

[0015] 本発明は、このような知見に基づいて完成されたものであり、具体的な態様において、例えば、以下の発明に関する。

[1] 抗原結合分子を提示するバクテリオファージを作製する方法であって、第一のポリペプチドを発現可能なヘルパーファージを、第二のポリペプチドを発現可能なバクテリアに接触させる工程を含み、当該第一のポリペプチドと当該第二のポリペプチドが会合して当該抗原結合分子を形成することを特徴とする、方法。

[2] ヘルパーファージのゲノム中に、第一のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが挿入されている、[1]に記載の方法。

[3] 第一のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドがプロモーターに機能的に連結されている、[1]または[2]に記載の方法。

[4] 第一のポリペプチドがファージのコートタンパク質と融合している、[1]から[3]のいずれか一項に記載の方法。

[5] ヘルパーファージがM13K07である、[1]から[4]のいずれか一項に記載の方法。

[6] バクテリアが第二のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、[1]から[5]のいずれか一項に記載の方法。

[7] 第二のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドがファージミドベクターに挿入されている、[1]から[6]のいずれか一項に記載の方法。

[8] 第二のポリペプチドがファージのコートタンパク質と融合している、[1]から[7]のいずれか一項に記載の方法。

[9] 抗原結合分子が抗体可変領域である、[1]から[8]のいずれか一項に記載の方法。

[10] 第一のポリペプチドおよび第二のポリペプチドが、L鎖可変領域を含むポリペプチドおよびH鎖可変領域を含むポリペプチドからなる群からそれぞれ選択され、かつ互いに異なる、[9]に記載の方法。

[11] L鎖可変領域を含むポリペプチドがさらにL鎖定常領域を含むポリペプチドであり、かつ／または、H鎖可変領域を含むポリペプチドがさらにH鎖定常領域を含むポリペプチドである、[10]に記載の方法。

[12] 共通した第一のポリペプチドを含む抗原結合分子提示ライブラリーを作製する方法であって、以下の工程を含む方法：

(a) [1]から[11]のいずれか一項に記載の方法を複数回行う工程であって、当該工程において用いられる複数のバクテリアは、アミノ酸配列の異なる複数の第二のポリペプチドを発現可能なバクテリア集団であり、かつ当該工程において用いられるヘルパーファージは同じアミノ酸配列の第一のポリペプチドを発現可能なヘルパーファージである工程、および

(b) 工程(a)で作製された、抗原結合分子を提示する複数のバクテリオファージを回収する工程。

[13] [12]に記載の方法により作製された抗原結合分子提示ライブラリー。

[14] 所定の抗原に対して特異的に結合する抗原結合分子を取得する方法であって、以下の工程を含む方法：

(a) [13]に記載の抗原結合分子提示ライブラリーに抗原を接触させる工程、および

(b) 当該抗原結合分子提示ライブラリーの中から、当該抗原に結合する抗原結合分子を選択する工程。

[15] 共通した第一のポリペプチドを含む多重特異性抗原結合分子を作製する方法であって、以下の工程を含む方法：

(a) [14]に記載の方法を複数の抗原に対して行う工程、および

(b) 工程(a)で取得された複数の抗原結合分子に含まれる、複数の同じアミノ酸配列の第一のポリペプチドおよび複数の異なるアミノ酸配列の第二のポリペプチドを用いて、多重特異性抗原結合分子を作製する工程であって、当該複数の第二のポリペプチドの各々に当該第一のポリペプチドが会合して、当該複数の抗原に対して特異的に結合する当該複数の抗原結合分子を形成す

ることを特徴とする工程。

〔16〕 共通した第一のポリペプチドを含む多重特異性抗原結合分子を作製する方法であって、以下の工程を含む方法：

(a) 〔14〕に記載の方法を複数の抗原に対して行う工程、

(b) 工程(a)で取得された複数の抗原結合分子に含まれる、複数の同じアミノ酸配列の第一のポリペプチドおよび複数の異なるアミノ酸配列の第二のポリペプチドについて、当該第一のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよび当該複数の第二のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをそれぞれ調製する工程、

(c) 工程(b)で調製された各ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入する工程、および

(d) 工程(c)の宿主細胞を培養し、多重特異性抗原結合分子を回収する工程であって、当該複数の第二のポリペプチドの各々に当該第一のポリペプチドが会合して、当該複数の抗原に対して特異的に結合する当該複数の抗原結合分子を形成することを特徴とする工程。

〔17〕 多重特異性抗原結合分子が二重特異性抗原結合分子である、〔15〕または〔16〕に記載の方法。

〔18〕 抗原結合分子の製造方法であって、以下の工程を含む方法：

(a) 所定の抗原に対して特異的に結合できる、第一のポリペプチドおよび第二のポリペプチドが会合された、参照となる抗原結合分子（親抗原結合分子）の第一のポリペプチドと同じアミノ酸配列の第一のポリペプチドを発現可能なヘルパーファージを、親抗原結合分子の第二のポリペプチドと異なるアミノ酸配列の第二のポリペプチドをそれぞれ発現可能なバクテリア集団に接触させて、共通した第一のポリペプチドと、アミノ酸配列の異なる第二のポリペプチドとがそれぞれ会合された、抗原結合分子（子供抗原結合分子）を提示する複数のバクテリオファージを含む、抗原結合分子提示ライブラリーを作製する工程、および

(b) 工程(a)で作製された抗原結合分子提示ライブラリーに前記抗原を接触

させて、前記抗原に対して特異的に結合できる子供抗原結合分子を選択する工程。

[19] [18]に記載の方法であって、以下の工程をさらに含む方法：

(d) [18]に記載の工程(b)で得られた子供抗原結合分子の第二のポリペプチドと同じアミノ酸配列の第二のポリペプチドを発現可能なヘルパーファージを、子供抗原結合分子の第一のポリペプチドと異なるアミノ酸配列の第一のポリペプチドをそれぞれ発現可能なバクテリア集団に接触させて、共通した第二のポリペプチドと、アミノ酸配列の異なる第一のポリペプチドとがそれぞれ会合された、抗原結合分子（孫抗原結合分子）を提示する複数のバクテリオファージを含む、抗原結合分子提示ライブラリーを作製する工程、および

(e) 工程(d)で作製された抗原結合分子提示ライブラリーに前記抗原を接触させて、前記抗原に対して特異的に結合できる孫抗原結合分子を選択する工程。

[20] 改変されたヘルパーファージおよび当該ヘルパーファージが感染可能なバクテリアの組合せであって、当該ヘルパーファージは、第一のポリペプチドを発現可能なヘルパーファージであり、かつ当該バクテリアは、第二のポリペプチドを発現可能なバクテリアであって、当該第一のポリペプチドと当該第二のポリペプチドが会合して、抗原結合分子を形成することを特徴とする、組合せ。

[21] あるポリペプチドを発現可能な改変されたヘルパーファージであって、当該ポリペプチドが、会合して抗原結合分子を形成することを特徴とする二本のポリペプチドのいずれか一方である、ヘルパーファージ。

[22] 上記に記載の1又は複数の態様を任意に組み合わせたものも、当業者の技術常識に基づいて技術的に矛盾しない限り、本発明に含まれることが当業者には当然に理解される。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]ヘルパーファージM13K07TCのゲノムの模式図である。図中のSacIサイト

にL鎖発現ユニットが挿入された。

[図2]H鎖 (PF1H) 発現ファージミドベクターとL鎖 (PF1L) 発現ヘルパーファージの組合せにより產生されたファージについて、抗ヒトκ鎖抗体に対するELISAを行った結果の図である。L鎖発現ヘルパーファージ (M13K07TC-PF1L) を用いた場合は、ファージ上にFabが提示されていることが確認された。一方、陰性対照のヘルパーファージ (M13K07TC) を用いた場合は、ファージ上へのFabの提示は確認されなかった。

[図3]H鎖 (PF1H) 発現ファージミドベクターとL鎖 (PF1L) 発現ヘルパーファージの組合せにより產生されたファージについて、抗原であるヒトIL-6Rに対するELISAを行った結果の図である。L鎖発現ヘルパーファージ (M13K07TC-PF1L) を用いた場合は、Fab提示ファージが抗原に対して結合能を有していることが確認された。一方、陰性対照のヘルパーファージ (M13K07TC) を用いた場合は、抗原への結合は観察されなかった。

[図4]取得した抗体 : 6RNH-2_02 (図4(a)) , 6RNH-2_37 (図4(b)) , 6RNH-3(2)_32 (図4(c)) , 6RNH-2_42 (図4(d)) の、可溶型ヒトIL-6Rに対する結合活性を、Octet RED384(forteBI0)を用いて評価した結果を示す図である。

[図5]取得した抗体 : PANH-2_52 (図5(a)) , PANH-2_68 (図5(b)) , PANH-3_10 (図5(c)) 、及びPF1抗体 (図5(d)) の、可溶型ヒトPlexinA1、可溶型ヒトIL-6Rに対する結合活性を、Octet RED384(forteBI0)を用いて評価した結果を示す図である。

[図6]取得した抗体 : mIANH-2_27 (図6(a)) , mIANH-3_79 (図6(b)) 、及びPF1抗体 (図6(c)) の、マウスIgA、可溶型ヒトIL-6Rに対する結合活性を、Octet RED384(forteBI0)を用いて評価した結果を示す図である。

[図7]取得した抗体 : 6RPAB3_03 (図7(a)) 、及び抗PlexinA1抗体hPANKB2-3#135 (図7(b)) の、可溶型ヒトIL-6R、可溶型ヒトPlexinA1に対する結合活性を、Octet RED384(forteBI0)を用いて評価した結果を示す図である。

[図8]取得した抗体 : 6RmIAB3(2)_02 (図8(a)) , 6RmIAB3(2)_06 (図8(b)) , 6RmIAB3(2)_16 (図8(c)) 、及び抗マウスIgA抗体mIANMIgL_095 (図8(d)) の

、可溶型ヒトIL-6RおよびマウスIgAに対する結合活性を、Octet RED384(forteBI0)を用いて評価した結果を示す図である。

[図9]取得した抗体：6RhCEB3(2)_10（図9(a))、及び抗CD3抗体hCE115HA/L0000（図9(b))の、可溶型ヒトIL-6RおよびヒトCD3eに対する結合活性を、Octet RED384(forteBI0)を用いて評価した結果を示す図である。

[図10]L鎖(PF1L)発現ファージミドベクターとH鎖(PF1H)発現ヘルパーファージの組合せにより產生されたファージについて、抗ヒトκ鎖抗体に対するELISAを行った結果の図である。H鎖発現ヘルパーファージ(M13K07AG-PF1H)を用いた場合は、ファージ上にFabが提示されていることが確認された。一方、陰性対照のヘルパーファージ(M13K07TC)を用いた場合は、ファージ上へのFabの提示は確認されなかった。

[図11]L鎖(PF1L)発現ファージミドベクターとH鎖(PF1H)発現ヘルパーファージの組合せにより產生されたファージについて、抗原であるヒトIL-6Rに対するELISAを行った結果の図である。H鎖発現ヘルパーファージ(M13K07AG-PF1H)を用いた場合は、Fab提示ファージが抗原に対して結合能を有していることが確認された。一方、陰性対照のヘルパーファージ(M13K07TC)を用いた場合は、抗原への結合は観察されなかった。

発明を実施するための形態

[0017] 以下に、本発明の好ましい実施態様を説明する。

[0018] 本発明は、一態様において、抗原結合分子を提示するバクテリオファージを作製する方法であって、第一のポリペプチドを発現可能なヘルパーファージを、第二のポリペプチドを発現可能なバクテリアに接触させる工程を含む方法に関する。

本発明における第一のポリペプチドと第二のポリペプチドは、互いに会合して、一つの抗原結合分子を形成することを特徴とする。ヘルパーファージをバクテリアに接触させた結果としては、当該ヘルパーファージが当該バクテリアに感染することが望ましい。

[0019] ヘルパーファージとは、バクテリオファージ（単にファージともいう）の

一種であって、他のバクテリオファージが複製するのを補助する機能を有するバクテリオファージを指す。通常、野生型のバクテリオファージが宿主細胞に感染して、そのゲノムが宿主細胞内に存在する場合、そこからバクテリオファージの複製に必要なタンパク質を全て產生することができるので、宿主細胞内でバクテリオファージのファージ粒子（ビリオン）が構築され、さらにそのファージ粒子内に当該ゲノムがパッケージングされることによって、バクテリオファージが再構成され、それが最終的に細胞外に放出される。しかし、バクテリオファージのゲノム由来のDNAであって、ゲノムの一部が欠失あるいは不活性化するなどして、バクテリオファージの複製に必要なタンパク質を全て產生することができないような不完全なファージDNAの場合、そのようなDNAが宿主細胞内に存在していたとしても、それ自身ではバクテリオファージを再構成することができない。そのような宿主細胞に、ヘルパーファージを感染させた場合、ヘルパーファージのゲノムに由来するタンパク質と合わせて、バクテリオファージの複製に必要なタンパク質を全て產生することができるようになるため、宿主細胞内でファージ粒子が構築され、バクテリオファージを再構成することが可能となる。その際、ヘルパーファージの特徴として、ヘルパーファージのゲノムは、ゲノムの複製起点もしくはパッケージングシグナルに欠陥を有しているため、野生型のバクテリオファージのゲノムと比べてファージ粒子内にパッケージングされる能力が低い（Methods Enzymol (1987) 153, 3-11）。そのため、上記のような不完全なファージDNAであっても、通常のパッケージング能を有しているDNA（例えば、ファージミドベクターなど）であれば、ファージ粒子内にはヘルパーファージのゲノムではなく当該不完全なファージDNAの方が優先的にパッケージングされることになる。結果として、それ自身ではバクテリオファージを再構成できないファージDNAであっても、それを内部に含む形でバクテリオファージを再構成することが可能となる。

[0020] 通常用いられるヘルパーファージは、グラム陰性バクテリアに感染する纖維状ファージに属し、中でもF因子を有する大腸菌に感染するFfファージ（f1

, fd, M13等) が広く用いられている。Ffファージのゲノムは環状の一本鎖DNAからなり、11のタンパク質をコードすることが知られている。それらは、ファージ粒子の構造タンパク質 (g3p (gene 3 proteinまたはpIIIとも呼ばれる、以下同様) , g6p, g7p, g8p, g9p) 、ファージDNAの複製に関与するタンパク質 (g2p, g5p, g10p) 、ファージ粒子の構築と分泌に関与するタンパク質 (g1p, g4p, g11p) に分類され、ファージの増殖にはこれらが全て必要とされている。

[0021] 一態様において、本発明におけるヘルパーファージのゲノムには、野生型と同じく変異のない11のタンパク質がコードされていてもよいし、それらの中に何らかの変異が導入されていてもよい。それらの変異は、通常、後述する抗原結合分子提示ライブラリーを作製する際の提示効率を高める目的や、抗原結合分子提示ライブラリーから所望の抗原結合分子を選択（選別）する際の選択効率を高める目的で導入される。そのような変異として、例えば、gene 3pをコードする遺伝子 (gene 3またはIII) の一部または全部の欠失、gene 3へのアンバー変異の導入、gene 3へのレアコドンの導入、gene 3のリボソーム結合部位への変異の導入、g9pをコードする遺伝子 (gene 9またはIX) へのアンバー変異の導入、g3pへのプロテアーゼ（例えばトリプシン）切断部位の導入などが挙げられる。

一態様において、本発明に用いられるヘルパーファージとしては、M13K07、R408、VCSM13、KM13 (Res Microbiol (2001) 152, 187-191) 、M13MDD3.2 (FEMS Microbiol Lett (1995) 125, 317-321) 、R408d3 (Gene (1997) 198, 99-103) 、VCSM13d3 (Gene (1997) 198, 99-103) 、Hyperphage (Nat Biotechnol (2001) 19, 75-78) 、CT helper phage (Nucleic Acids Res (2003) 31, e59) 、Ex-phage (Nucleic Acids Res (2002) 30, e18) 、Phaberge (J Immunol Methods (2003) 274, 233-244) 、XP5 (J Immunol Methods (2012) 376, 46-54) 、DeltaPhage (Nucleic Acids Res (2012) 40, e120) などを挙げることができる。一般にM13系のヘルパーファージが好ましく、特に好ましい例としては、M13K07を挙げることができる。

- [0022] 一態様において、本発明におけるバクテリアは、ヘルパーファージが感染し得る細胞であれば特に限定されないが、通常は、グラム陰性バクテリアであり、好ましくは大腸菌（例えばTG1、XL1-Blue、XL1-Blue MRF'、ER2738など）である。F因子を有する大腸菌であれば、Ffファージ（M13系のヘルパー ファージを含む）はいずれも感染可能である。
- [0023] 一態様において、本発明において、第一のポリペプチドまたは第二のポリペプチドを発現可能なヘルパーファージまたはバクテリアとは、それらのポリペプチドをある条件下において発現する能力を有しているヘルパーファージまたはバクテリアを意味する。例えばヘルパーファージの場合、バクテリアに感染した際にそれらのポリペプチドを発現する能力を有していればよく、ヘルパーファージ単独で存在する際にそれらのポリペプチドを必ずしも発現していなくてもよい。また、バクテリアの場合、それらのポリペプチドを常時発現していてもよいし、あるいは、ある種の発現誘導物質が存在する条件下でそれらのポリペプチドを発現する能力を有していれば、発現誘導物質が存在しない通常の生育条件下ではそれらのポリペプチドを発現していなくてもよい。
- [0024] 第一のポリペプチドを発現可能なヘルパーファージが第二のポリペプチドを発現可能なバクテリアに感染した結果、それに含まれる第一のポリペプチドおよび第二のポリペプチドがバクテリア内で発現し、互いに会合して抗原結合分子を形成し、同時にヘルパーファージからファージ粒子が再構成される際に当該抗原結合分子が組み込まれることによって、最終的に抗原結合分子が提示されたバクテリオファージが産生されることになる。その際、再構成されるファージ粒子内には、バクテリア由来の第二のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドがパッケージングされて、第二のポリペプチドに関する遺伝子情報が、新たに産生されるバクテリオファージに搭載されることが好ましい。そのためには、限定はされないが、第二のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドはファージミドベクターに挿入されるなどして、ヘルパーファージのゲノムよりも効率的にファージ粒子内にパッケージン

グされる性質を有していることが好ましい。

[0025] 一態様において、本発明におけるヘルパーファージは、そのゲノム中に、第一のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが挿入されていることが好ましい。

第一のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドがヘルパーファージのゲノム中に挿入される位置は特に限定されないが、ヘルパーファージ本来の機能に影響を与えないよう、ファージタンパク質をコードしないゲノムの非翻訳領域に挿入されることが好ましい。そのような好ましい位置の具体例として、ヘルパーファージがM13K07の場合、カナマイシン耐性遺伝子とp15A oriの間に位置しているSacIサイトや、p15A oriとM13 oriの間に位置しているSacIIサイトなどを挙げることができる。あるいは、後述するように、第一のポリペプチドがファージのコートタンパク質と融合している場合には、第一のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドがゲノム中のファージのコートタンパク質をコードするポリヌクレオチドと読み枠が合う形で連結する位置に挿入されてもよい。

[0026] 一態様において、本発明において、第一のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、プロモーターに機能的に連結されていることが好ましい。プロモーターとは、細胞中でRNAポリメラーゼを結合し、下流（3'方向）の配列の転写を開始させることができるポリヌクレオチド配列を表わす。本明細書において、プロモーターに機能的に連結されているとは、プロモーターがある特定の配列に対して適切な位置に配置されることによって、当該配列の転写が制御可能な状態になっていることを意味してよく、プロモーターの当該位置は当該配列とは物理的に離れた場所に配置されていてもよい。本発明において用いられるプロモーターは、構成的プロモーターであっても、誘導性プロモーターであってもよく、広範な種々のプロモーターを用いることができる。原核細胞に適したプロモーターとしては、 β -ラクタマーゼ (bla) プロモーター、ラクトース (lac) プロモーター、トリプトファン (trp) プロモーター、tac プロモーターのようなハイブリッドプロモーター；テトラサ

イクリン (tet) プロモーター、アラビノースプロモーター、 λ ファージプロモーター、T7ファージプロモーター、T5ファージプロモーターなどを挙げることができる。

- [0027] 一態様において、本発明において、第一のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、シャイン-ダルガーノ (SD) 配列などのリボソーム結合部位 (RBS) に連結されていることが好ましい。リボソーム結合部位が適切な位置に配置されることによって、その下流に位置するポリヌクレオチドの翻訳が促進される。リボソーム結合部位は、プロモーターとそれによって制御されるポリヌクレオチド配列の間に配置されてよい。
- [0028] 一態様において、本発明における第一のポリペプチドは、シグナル配列に連結されていることが好ましい。シグナル配列とは、タンパク質が細胞内で発現した後に、その局在化に関するペプチド鎖を表す。シグナル配列は、タンパク質をコードする配列に隣接して配置されてよい。本発明において用いられるシグナル配列は、宿主となるバクテリアのペリプラズム間隙 (periplasmic space) にタンパク質を局在化させるものであることが好ましい。そのようなシグナル配列の例として、pelBシグナル配列、geneIIIシグナル配列、OmpAシグナル配列、phoAシグナル配列、malEシグナル配列、dsbAシグナル配列、大腸菌耐熱性エンテロトキシンシグナル配列、ベータラクタマーゼシグナル配列などを挙げることができる。
- [0029] 一態様において、本発明における第一のポリペプチドは、ファージのコートタンパク質と融合していてもよい。第一のポリペプチドとファージのコートタンパク質との融合は、第一のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとファージのコートタンパク質をコードするポリヌクレオチドとを読み枠が合う形で連結させることにより行うことができる。ファージのコートタンパク質としては、g3p, g6p, g7p, g8p, g9pなどの構造タンパク質であってよい。本発明において第一のポリペプチドが融合するコートタンパク質として好ましいのはg3pまたはg8pであり、より好ましいのはg3pである。
- [0030] コートタンパク質への融合は、第一のポリペプチドをファージ粒子の表面

に提示する目的で行われるため、コートタンパク質のN末端またはC末端にて行われることが好ましい。コートタンパク質は全長のものであってもよいし、N末端やC末端などの一部が欠失しているものであってもよい。また、融合は直接行われてもよいし、任意のリンカーペプチドを介して行われてもよい。ここで、リンカーペプチドに6xHisタグやMycタグ、FLAGタグなどのタグ配列を含めることができるし、あるいは、トリプシン、キモトリプシンなどのプロテアーゼに対するプロテアーゼ認識配列を含めることもできる。タグ配列は当該融合タンパク質の検出などのために有用である。プロテアーゼ認識配列は当該融合タンパク質をプロテアーゼで消化することにより、第一のポリペプチドと第二のポリペプチドが会合して形成された抗原結合分子をファージのコートタンパク質から分離して回収できる点において有用である。

[0031] 一態様において、本発明において、ヘルパーファージが発現可能な第一のポリペプチドの数や種類は特に限定されないが、通常は一種類のみであってよく、場合によってはアミノ酸配列の異なる二種類以上の第一のポリペプチドを発現可能であってもよい。また、本発明のヘルパーファージが発現可能なのは、通常は抗原結合分子の一方（第一のポリペプチド）のみであるが、場合によってはもう一方（第二のポリペプチド）をともに発現可能であってもよい。

[0032] 一態様において、本発明におけるバクテリアは、第二のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むことが好ましい。ここで、バクテリアがポリヌクレオチドを含むとは、当該バクテリアが当該ポリヌクレオチドにより形質転換されていることが望ましい。そして、当該ポリヌクレオチドは、プロモーターに機能的に連結されていることが好ましい。プロモーターとしては、構成的プロモーターであっても、誘導性プロモーターであってもよく、広範な種々のプロモーターを用いることができる。原核細胞に適したプロモーターとしては、 β -ラクタマーゼ (*bla*) プロモーター、ラクトース (*lac*) プロモーター、トリプトファン (*trp*) プロモーター、*tac* プロモーターのようなハイブリッドプロモーター；テトラサイクリン (*tet*) プロモーター、ア

ラビノースプロモーター、 λ ファージプロモーター、T7ファージプロモーター、T5ファージプロモーターなどを挙げることができる。第一のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに連結されるプロモーターと第二のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに連結されるプロモーターとを異なる種類のものにすることによって、例えば一方の発現を促進し、もう一方の発現を抑制するなど、両者の転写を異なる様式で制御することも可能である。

- [0033] 一態様において、本発明において、第二のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、シャイン-ダルガーノ (SD) 配列などのリボソーム結合部位 (RBS) に連結されていることが好ましい。リボソーム結合部位が適切な位置に配置されることによって、その下流に位置するポリヌクレオチドの翻訳が促進される。リボソーム結合部位は、プロモーターとそれによって制御されるポリヌクレオチド配列の間に配置されてよい。
- [0034] 一態様において、本発明における第二のポリペプチドは、シグナル配列に連結されていることが好ましい。シグナル配列は、タンパク質をコードする配列に隣接して配置されてよい。本発明において用いられるシグナル配列は、宿主となるバクテリアのペリプラズム間隙 (periplasmic space) にタンパク質を局在化させるものであることが好ましい。そのようなシグナル配列の例として、pelBシグナル配列、geneIIIシグナル配列、OmpAシグナル配列、phoAシグナル配列、malEシグナル配列、dsbAシグナル配列、大腸菌耐熱性エンテロトキシンシグナル配列、ベータラクタマーゼシグナル配列などを挙げることができる。
- [0035] 一態様において、本発明において、第二のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、ファージミドベクターに挿入されていることが好ましい。ファージミドベクターとは、ファージゲノムの一部を含むようにして作製されたプラスミドベクターであって、バクテリアにおける複製起点（例えばCol E1など）およびバクテリオファージ（例えばM13、f1、fdなど）のゲノムに由来する複製起点が含まれている。ファージミドベクターは、プラスミドベクターと同様に宿主のバクテリア内で増幅される性質を有すると同時に、バク

テリオファージのファージ粒子内にパッケージングされる性質も有する。よって、ファージミドベクターで形質転換されたバクテリアにヘルパーファージが感染した場合、再構成されたファージ粒子内には、ヘルパーファージ本来のゲノムよりもファージミドベクターの方が優先的にパッケージングされることになる。ファージミドベクターとしては、pHEN1、pComb3、pCANTAB5E、pCES1などを挙げることができる。

- [0036] 一態様において、本発明における第二のポリペプチドは、ファージのコートタンパク質と融合していてもよい。第二のポリペプチドとファージのコートタンパク質との融合は、第二のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとファージのコートタンパク質をコードするポリヌクレオチドとを読み枠が合う形で連結させることにより行うことができる。ファージのコートタンパク質としては、g3p, g6p, g7p, g8p, g9pなどの構造タンパク質であってよい。本発明において第二のポリペプチドが融合するコートタンパク質として好ましいのはg3pまたはg8pであり、より好ましいのはg3pである。
- [0037] コートタンパク質への融合は、第二のポリペプチドをファージ粒子の表面に提示する目的で行われるため、コートタンパク質のN末端またはC末端にて行われることが好ましい。コートタンパク質は全長のものであってもよいし、N末端やC末端などの一部が欠失しているものであってもよい。また、融合は直接行われてもよいし、任意のリンカーペプチドを介して行われてもよい。ここで、リンカーペプチドに6xHisタグやMycタグなどのタグ配列を含めることができるとし、あるいは、トリプシン、キモトリプシンなどのプロテアーゼに対するプロテアーゼ認識配列を含めることもできる。タグ配列は当該融合タンパク質の検出などのために有用である。プロテアーゼ認識配列は当該融合タンパク質をプロテアーゼで消化することにより、第一のポリペプチドと第二のポリペプチドが会合して形成された抗原結合分子をファージのコートタンパク質から分離して回収できる点において有用である。
- [0038] 第一のポリペプチドおよび第二のポリペプチドから形成される抗原結合分子がバクテリオファージ上に提示されるためには、第一のポリペプチドま

たは第二のポリペプチドの少なくとも一方がファージのコートタンパク質と融合していることが好ましい。第一のポリペプチドおよび第二のポリペプチドの両者がファージのコートタンパク質と融合している場合は、当該コートタンパク質は同じ種類のもの（例えばg3p, g6p, g7p, g8p, g9pなど）から選択されることが好ましい。

[0039] ファージのコートタンパク質の挿入位置に関して、一態様において、第一のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをg3pやg8p等のファージコートタンパク質をコードする遺伝子のN末端またはC末端側に連結した遺伝子をヘルパーファージに挿入し、かつ、第二のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをファージコートタンパク質に連結せずにファージミドベクターに插入するか；あるいは、第一のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをファージコートタンパク質に連結せずにヘルパーファージに挿入し、かつ、第二のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをg3pやg8p等のファージコートタンパク質をコードする遺伝子のN末端またはC末端側に連結した遺伝子をファージミドベクターに挿入してもよい。

[0040] 本発明において「XをYに提示する」とは、Xを、Xが本来有する機能を保持したままの状態でYの表面に結合させることを意味する。例えば、抗原結合分子をバクテリオファージに提示するとは、抗原結合分子を、その抗原結合能を保持した状態でバクテリオファージ粒子の表面に結合させることを意味してよい。結合は共有結合によって行われてもよいし、非共有結合によって行われてもよい。XとYがともにポリペプチドの場合は、XとYの融合タンパク質を作製することによって好適にXとYを結合させることができる。本発明においては、第一のポリペプチドまたは第二のポリペプチドの少なくとも一方がファージのコートタンパク質と融合していることが好ましい。あるいは、ジスルフィド結合を介して抗原結合分子をバクテリオファージに提示する方法も知られており（W001/005950）、そのような方法を用いて提示が行われてもよい。

[0041] 一態様において、本発明において、バクテリアが発現可能な第二のポリペ

プチドの数や種類は特に限定されないが、後述するように、本発明は、第一のポリペプチドが共通で、第二のポリペプチドが異なる抗原結合分子を多数含む抗原結合分子提示ライブラリーに関するものであるので、そのような抗原結合分子提示ライブラリーを作製するためには、異なる種類の第二のポリペプチドを発現可能な複数のバクテリアが必要となる。すなわち、本発明において用いられる個々のバクテリアは、互いにアミノ酸配列の異なる第二のポリペプチドを発現可能なバクテリアであって、全体として見た場合、多様性に富んだ複数の第二のポリペプチドを発現可能なバクテリア集団であることが好ましい。また、本発明のバクテリアは、通常は抗原結合分子の一方（第二のポリペプチド）のみ発現可能であるが、場合によってはもう一方（第一のポリペプチド）をともに発現可能であってもよい。

[0042] 一態様において、本発明における抗原結合分子とは、第一のポリペプチドおよび第二のポリペプチドの二本のポリペプチドを含む形で形成され、ある抗原に対して特異的に結合する能力を有する分子であれば特に限定されない。第一のポリペプチドおよび第二のポリペプチドは、互いにアミノ酸配列の異なるポリペプチドであることが好ましい。抗原結合分子の好ましい例としては、抗体、Fab、 $F(ab')_2$ 、diabody (Nature Nanotechnology (2007) 2, pp. 751-760)、抗体可変領域、抗体可変領域を含む抗体断片、受容体タンパク質、Fcタンパク質、Fcタンパク質を含む抗体断片、Fc融合タンパク質、あるいは、これらの機能的な断片（抗原結合部位を有し、これらの機能を有する断片）もしくはこれらの機能的な均等物（これらの糖鎖修飾体などの、抗原結合部位を有し、これらの機能を有する均等物）などを挙げができる。

本明細書における抗原結合分子は、いかなる動物種（例えば、ヒト；あるいは、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、サル、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ウシ、ラクダなどの非ヒト動物）やいかなる鳥類に由来してもよい。

[0043] 本明細書における抗原結合分子が抗体（免疫グロブリン）であるか、それ

に由来する分子である場合には、いかなるアイソタイプ（例えばIgG、IgM、IgA、IgD、IgEなど）、およびサブクラス（例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、マウスIgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3など）であるか、それに由来してもよい。抗体またはそれに由来する分子のH鎖は、例えば γ 鎖、 μ 鎖、 α 鎖、 δ 鎖、 ϵ 鎖などのいずれであるか、それらに由来してもよく、また、抗体またはそれに由来する分子のL鎖は、例えば κ 鎖、 λ 鎖などのいずれであるか、それらに由来してもよい。抗体またはそれに由来する分子は、例えばキメラ抗体、ヒト化抗体、親和性成熟抗体などの改変抗体またはそれに由来する分子であってもよい。

一態様において、本発明における抗原結合分子が抗体の場合、第一のポリペプチドはL鎖を含む（もしくは、からなる）、同一の二本のポリペプチドであり、かつ第二のポリペプチドはH鎖を含む（もしくは、からなる）、同一の二本のポリペプチドである；あるいは、第一のポリペプチドはH鎖を含む（もしくは、からなる）、同一の二本のポリペプチドであり、かつ第二のポリペプチドはL鎖を含む（もしくは、からなる）、同一の二本のポリペプチドであることが好ましい。すなわち、第一のポリペプチドおよび第二のポリペプチドは、L鎖を含む（もしくは、からなる）、二本のポリペプチド、およびH鎖を含む（もしくは、からなる）、二本のポリペプチドからなる群からそれぞれ選択され、かつ互いに異なることが好ましい。そのような抗体を用いたファージライブラリー（IgG phage display）は、例えば、FEBS J. 2010 May;277(10):2291-303やW02011062859に記載されるとおり、当業者に公知であり、本発明の抗原結合分子として抗体が使用できることが当業者には当然に理解される。

[0044] $F(ab')は、IgG抗体をペプシン消化することにより作製され得る、抗原結合分子として知られる。 $F(ab')は、2分子のFab'が2つのジスルフィド結合により連結され、抗体からFc領域を除いた構造を有する（2分子のFab' + ヒンジ領域）、2つの抗原結合部位を持つ2価の分子である。$$

一態様において、本発明における抗原結合分子が $F(ab')の場合、第一のポ$

リペプチドはL鎖可変領域を含む、同一の二本のポリペプチドであり、かつ第二のポリペプチドはH鎖可変領域を含む、同一の二本のポリペプチドである；あるいは、第一のポリペプチドはH鎖可変領域を含む、同一の二本のポリペプチドであり、かつ第二のポリペプチドはL鎖可変領域を含む、同一の二本のポリペプチドであることが好ましい。すなわち、第一のポリペプチドおよび第二のポリペプチドは、L鎖可変領域を含む二本のポリペプチド、およびH鎖可変領域を含む二本のポリペプチドからなる群からそれぞれ選択され、かつ互いに異なることが好ましい。そのようなF(ab')₂を用いたファージライブラリーは、例えば、J Immunol Methods. 2004 Jan;284(1-2):119-32に記載されるとおり、当業者に公知であり、本発明の抗原結合分子としてF(ab')₂が使用できることが当業者には当然に理解される。当該文献では、FabとM13バクテリオファージのg3p (gene 3 protein)との間に、IgG1ヒンジ領域とホモ二量体化したロイシンジッパーとからなる二量化ドメインを挿入した「Fab'-zip-」をファージ上に提示させることにより、ファージ上でF(ab')₂を形成させて（「Fab'-zip-phage」）、IgG抗体に類似した、結合力の高い二価のFabを提示するファージライブラリーを構築している。

[0045] diabodyは、可変領域と可変領域をリンカー等で結合したフラグメント（例えば、一本鎖抗体（scFv）等）（以下、diabodyを構成するフラグメント）を2つ結合させて二量体化させたものであり、通常、2つのH鎖可変領域と2つのL鎖可変領域を含み、2つの抗原結合部位を有する(P. Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 6444-6448 (1993)、EP404097号、W093/11161号、Johnson et al., Method in Enzymology, 203, 88-98, (1991)、Holliger et al., Protein Engineering, 9, 299-305, (1996)、Perisic et al., Structure, 2, 1217-1226, (1994)、John et al., Protein Engineering, 12(7), 597-604, (1999)、Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 90, 6444-6448, (1993)、Atwell et al., Mol. Immunol. 33, 1301-1312, (1996))。

diabodyを構成するフラグメントは、H鎖可変領域（またはその断片）とL鎖可変領域（またはその断片）を結合したものが好ましい。diabodyを構成する

フラグメント中において、可変領域と可変領域を結合するリンカーは特に制限されないが、同一フラグメント中の可変領域の間で非共有結合が起こらない程度に短いリンカーを用いることが好ましい。そのようなリンカーの長さは当業者が適宜決定することができ、通常、2~14アミノ酸、好ましくは3~9アミノ酸、特に好ましくは4~6アミノ酸である。この場合、同一フラグメント上にコードされるH鎖可変領域（またはその断片）とL鎖可変領域（またはその断片）とは、その間のリンカーが短いため、同一鎖上のH鎖可変領域（またはその断片）とL鎖可変領域（またはその断片）との間で非共有結合が起こらず、単鎖V領域フラグメントが形成されないため、他のフラグメントとの二量体を形成することができる。二量体を形成する際、diabodyを構成するフラグメント間の結合は、非共有結合（例えば、水素結合、静電的相互作用、またはファンデルワールス力）、共有結合（例えばジスルフィド結合）、または、共有結合と非共有結合の両方でもよい。

一様において、本発明における抗原結合分子がdiabodyの場合、第一のポリペプチドはH鎖可変領域（またはその断片）とL鎖可変領域（またはその断片）をリンカーで結合したものであり、第二のポリペプチドはL鎖可変領域（またはその断片）とH鎖可変領域（またはその断片）をリンカーで結合したものである；あるいは、第一のポリペプチドはL鎖可変領域（またはその断片）とH鎖可変領域（またはその断片）をリンカーで結合したものであり、第二のポリペプチドはH鎖可変領域（またはその断片）とL鎖可変領域（またはその断片）をリンカーで結合したものであることが好ましい。すなわち、第一のポリペプチドおよび第二のポリペプチドは、H鎖可変領域（またはその断片）とL鎖可変領域（またはその断片）をリンカーで結合したもの、およびL鎖可変領域（またはその断片）とH鎖可変領域（またはその断片）をリンカーで結合したもの、からなる群からそれぞれ選択され、かつ互いに異なることが好ましい。そのようなdiabodyを用いたファージライブラリーは、例えば、Nat Biotechnol. 1996 Sep;14(9):1149-54 ; US 20070036789に記載されるとおり、当業者に公知であり、本発明の抗原結合分子としてdiabodyが使用できるこ

とが当業者には当然に理解される。

[0046] 一態様において、二本のポリペプチドを含む形態で形成され、あるリガンドに対して特異的に結合する受容体タンパク質も、本発明の抗原結合分子に含むことができる。この場合、受容体タンパク質は、二本の互いにアミノ酸配列の異なるポリペプチドから形成されるヘテロ受容体タンパク質であることが好ましい。受容体タンパク質は、受容体タンパク質の細胞外領域、受容体タンパク質のリガンド結合領域、または、それらと抗体Fc領域との融合タンパク質などであってもよい。抗原結合分子が受容体タンパク質の場合、抗原は受容体タンパク質のリガンドを指す。ヘテロ受容体の例としては、IL-2受容体、IL-3受容体、IL-4受容体、IL-5受容体、IL-6受容体、IL-7受容体、IL-9受容体、IL-10受容体、IL-11受容体、IL-12受容体、IL-13受容体、IL-15受容体、IL-17受容体、IL-23受容体、IL-31受容体、GM-CSF受容体、IFN- α 受容体、IFN- β 受容体、IFN- γ 受容体、CNTF受容体、LIF受容体、OSM受容体、CT-1受容体などを挙げることができる。

[0047] 一態様において、二本のポリペプチドを含む形で形成され、あるFc受容体に対して特異的に結合するFcタンパク質も、本発明の抗原結合分子に含むことができる。Fcタンパク質とは、抗体分子におけるヒンジ部若しくはその一部、CH2、CH3ドメインからなる領域を表し、一般にEU ナンバリング226番目からC末端まで、あるいは230番目からC末端までのアミノ酸配列を指す。あるいは、CH2ドメインおよびCH3ドメイン、もしくはCH3ドメインのみであってもよい。この場合のFcタンパク質は、天然型のFcタンパク質に何らかのアミノ酸変異が加えられた改変型のFcタンパク質であることが好ましく、二本の互いにアミノ酸配列の異なるポリペプチドから形成されることが好ましい。そのようなヘテロなFcタンパク質の例としては、W098/50431、W02006/106905、W02007/114325、W02011/078332、W02013/002362などに記載のFcタンパク質を挙げができる。特にW098/50431には、ヘテロなFcタンパク質を構成する一方のポリペプチドのアミノ酸配列を固定し、もう一方のポリペプチドのアミノ酸配列を改変することによって、多様な配列の中から最もよく互いに

適合する二本のポリペプチドの組合せを選択（選別）可能であることが記載されている。抗原結合分子がFcタンパク質の場合、抗原は各種Fc受容体（例えば、Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIII、またはFcRnなど）を指す。例えば、抗体のFc領域のアミノ酸を改変させて、pH中性条件下でのFcRn(Neonatal Fc Receptor)への結合を増強させたり（W02011/122011）、pH中性条件下でのFc γ レセプターへの結合を増強させることで（W02013/047752）、血中から抗原を素早く除去することが可能であることが報告されている。

別の態様において、上記Fcタンパク質に、タンパク質（例えば、サイトカインまたは受容体細胞外ドメイン）やペプチドを融合させたFc融合タンパク質も、本発明の抗原結合分子に含むことができる。Fc融合タンパク質は、抗体ヒンジ領域および／またはリンカーを含んでもよい。可溶性Fc融合タンパク質は、*in vitro*, *in vivo*実験で広く用いられており、非融合タンパク質に比べて多くの長所を有し得る（Meg L et al., Methods in Molecular Biology 378:33-52, 2007）。また、可溶性Fc融合タンパク質は、ヒト抗体製剤の生産において、抗原特異性を維持しながら多くの免疫学的な問題を排除し得る。代表的な可溶性Fc融合ヒト抗体製剤として、自己免疫疾患治療剤であるEnancept (Amgen) が挙げられ、これは、可溶性TNFレセプター2に、ヒトIgG1のFcを融合させて製造された。当業者は、例えば、W02009/136568、W02007/048122、W02011/115323に記載されるような、当業者に公知の方法を用いて、適宜、Fc融合タンパク質を製造し、ファージライブラリーに用いることができるが理解される。

- [0048] 一態様において、本発明における抗原結合分子が抗体可変領域の場合、第一のポリペプチドはL鎖可変領域を含む（もしくは、からなる）ポリペプチドであり、かつ第二のポリペプチドはH鎖可変領域を含む（もしくは、からなる）ポリペプチドである；あるいは、第一のポリペプチドはH鎖可変領域を含む（もしくは、からなる）ポリペプチドであり、かつ第二のポリペプチドはL鎖可変領域を含む（もしくは、からなる）ポリペプチドであることが好ましい。すなわち、第一のポリペプチドおよび第二のポリペプチドは、L鎖可変領域

を含む（もしくは、からなる）ポリペプチドおよびH鎖可変領域を含む（もしくは、からなる）ポリペプチドからなる群からそれぞれ選択され、かつ互いに異なることが好ましい。

[0049] 一態様において、本発明の目的の一つは、共通した第一のポリペプチドを含む複数の抗原結合分子を作製するのに適したヘルパーファージおよび当該ヘルパーファージが感染可能なバクテリアの組合せを提供することにある。そのような第一のポリペプチドは、抗原結合分子を構成するポリペプチドの一方であれば、任意のアミノ酸配列を有するポリペプチドを選択することができる。例えば、抗原結合分子が抗体可変領域で、第一のポリペプチドがL鎖可変領域を含むポリペプチドまたはH鎖可変領域を含むポリペプチドの場合、当該L鎖可変領域またはH鎖可変領域は、任意のアミノ酸配列を有するL鎖可変領域またはH鎖可変領域の中から選択することができる。すなわち、どのようなアミノ酸配列のL鎖可変領域またはH鎖可変領域を選択しても、それを共通した第一のポリペプチドとして含む複数の抗原結合分子（ここでは抗体可変領域）を作製することができる。L鎖可変領域またはH鎖可変領域は、特定の抗原に結合する抗体に含まれるL鎖可変領域またはH鎖可変領域の中から選択してもよいし、あるいは、特定の抗原で免疫される前のナイーブな抗体に含まれるL鎖可変領域またはH鎖可変領域の中から選択してもよい。

[0050] 特定の抗原に結合する抗体は、当業者に公知のハイブリドーマ法 (Nature (1975) 256, 495) やファージ抗体ライブラリー法 (Nature (1991) 352, 624-628、J Mol Biol (1991) 222, 581-597) により作製することができる。作製された抗体のL鎖可変領域やH鎖可変領域のアミノ酸配列は、ハイブリドーマ法であれば、当該抗体を産生するハイブリドーマに含まれるL鎖やH鎖をコードする遺伝子を、抗体遺伝子に特異的なプライマーを用いたPCR法により増幅しその配列解析を行うことにより同定することができる (J Mol Biol (1991) 222, 581-597、Mol Immunol (1992) 29, 193-203)。また、ファージ抗体ライブラリー法であれば、当該抗体を提示するファージ内に含まれるベクターを単離し、そこに挿入されているL鎖やH鎖をコードする遺伝子の配列解析

を行うことにより同定することができる。

- [0051] 特定の抗原で免疫される前のナイーブな抗体に含まれるL鎖可変領域またはH鎖可変領域のアミノ酸配列は、そのような抗体を産生する末梢血単核球や骨髓細胞、または脾臓細胞などをヒトやその他の動物などから調製し、それらの細胞に含まれるL鎖やH鎖をコードする遺伝子を、抗体遺伝子に特異的なプライマーを用いたPCR法により増幅しその配列解析を行うことにより多数同定することができるので、それらの中から任意のものを選択して用いることができる (J Mol Biol (1991) 222, 581-597, Mol Immunol (1992) 29, 193-203)。
- [0052] 一態様において、本発明における第一のポリペプチドや第二のポリペプチドがL鎖可変領域を含むポリペプチドやH鎖可変領域を含むポリペプチドの場合、それらはさらにL鎖定常領域やH鎖定常領域を含んでいてもよい。第一のポリペプチドに定常領域が含まれていない場合は、第二のポリペプチドにも定常領域が含まれていないことが好ましく、第一のポリペプチドに定常領域が含まれている場合は、第二のポリペプチドにも定常領域が含まれていることが好ましい。また、H鎖定常領域は特にH鎖定常領域CH1ドメインであることが好ましい。ここで、H鎖定常領域CH1ドメインとは、H鎖定常領域の最初からヒンジ領域の直前までの領域を表し、一般にEUナンバリング118番目から225番目までのアミノ酸配列を指す。通常、これらの定常領域は、可変領域の直後に連結される形で含まれる。L鎖定常領域は、κ鎖またはλ鎖のいずれかに由来する定常領域であってもよいし、また、H鎖定常領域は、γ鎖、μ鎖、α鎖、δ鎖、ε鎖のいずれかに由来する定常領域であってもよい。さらに、これらの定常領域は全長であってもよいし、一部が欠失したものであってもよい。また、一部のアミノ酸が置換、欠失、挿入されるなどして改変されたものであってもよい。第一のポリペプチドおよび第二のポリペプチドに定常領域が含まれている場合の好ましい抗原結合分子の例はFabである。
- [0053] また、別の態様において、本発明は、共通した第一のポリペプチドを含む抗原結合分子提示ライブラリーを作製する方法であって、以下の工程を含む

方法に関する：

(a) 抗原結合分子を提示するバクテリオファージを作製する本発明の方法を複数回行う工程であって、当該工程において用いられる複数のバクテリアは、アミノ酸配列の異なる複数の第二のポリペプチドを発現可能なバクテリア集団であり、かつ当該工程において用いられるヘルパーファージは同じアミノ酸配列の第一のポリペプチドを発現可能なヘルパーファージである工程、および

(b) 工程(a)で作製された、抗原結合分子を提示する複数のバクテリオファージを回収する工程。

[0054] 複数のバクテリアは、個々のバクテリアが互いにアミノ酸配列の異なる第二のポリペプチドを発現可能なバクテリアであって、全体として見た場合、多様性に富んだ複数の第二のポリペプチドを発現可能なバクテリア集団であることが好ましい。そのような複数のバクテリアのそれぞれに、同じアミノ酸配列の第一のポリペプチドを発現可能なヘルパーファージを感染させることによって、抗原結合分子を提示する複数のバクテリオファージを作製することができ、それらの抗原結合分子の全てに、共通の第一のポリペプチドと、互いに異なる第二のポリペプチドとが含まれている。そのようにして作製された抗原結合分子を提示する複数のバクテリオファージを回収して混合することにより、共通した第一のポリペプチドを含む抗原結合分子提示ライブラリーを作製することができる。

[0055] 本明細書において、ライブラリーとは、多様なレパートリーを有する複数の構成要素の集合体を意味する。本発明においては、主に、複数のバクテリオファージが集合してできたバクテリオファージライブラリー（ファージライブラリー）を表す。抗原結合分子提示ライブラリーとは、表面に抗原結合分子が提示されたバクテリオファージを構成要素とするライブラリーを意味し、そこに含まれる抗原結合分子は多様なレパートリーを有していることが好ましい。ライブラリーの構成要素の数（ライブラリーのサイズ）は大きいほど好ましく、例えば 10^6 以上、 10^7 以上、 10^8 以上、 10^9 以上、 10^{10} 以上、 10^{11} 以

上、 10^{12} 以上、 10^{13} 以上、 10^{14} 以上などであることが好ましい。抗原結合分子提示ライブラリーを作製する本発明の方法においては、その工程で用いられる複数の第二のポリペプチドを発現可能なバクテリアの数がそのままライブラリーの構成要素の数となるため、当該工程において用いられるバクテリア集団としては、例えば 10^6 以上、 10^7 以上、 10^8 以上、 10^9 以上、 10^{10} 以上、 10^{11} 以上、 10^{12} 以上、 10^{13} 以上、 10^{14} 以上のバクテリアであることが好ましい。

[0056] 通常、上記のような複数回の感染を行うには、複数の第二のポリペプチドを発現可能なバクテリア集団が混合した状態で培養されているところに、同じ第一のポリペプチドを発現可能な複数のヘルパーファージをまとめて感染させればよい。あるいは、1つ以上のバクテリアを含む小規模のバクテリア集団に対してヘルパーファージを個別に感染させてもよい。作製されたバクテリオファージは通常バクテリアの培養上清中に放出されるので、バクテリオファージの回収は、ヘルパーファージ感染後のバクテリアの培養液を遠心分離するなどして培養上清を分離するだけでもよいし、さらにそこにポリエチレングリコール(PEG)を加えてバクテリオファージを沈殿させる方法(PEG沈殿法)を行うなどしてバクテリオファージを単離精製する工程を加えてもよい。

[0057] 抗原結合分子が抗体可変領域で、第二のポリペプチドがL鎖可変領域を含むポリペプチドまたはH鎖可変領域を含むポリペプチドの場合、互いにアミノ酸配列の異なる複数のL鎖可変領域やH鎖可変領域をコードする遺伝子は、生体内などの天然に存在する多数の抗体遺伝子を単離するなどして得ることができる。例えば、ヒトやその他の動物などから末梢血单核球や骨髓細胞、脾臓細胞などの抗体産生細胞を調製し、それらの細胞から得られたRNAをもとに、L鎖可変領域やH鎖可変領域に特異的なプライマーを用いて逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を行うことにより、L鎖可変領域やH鎖可変領域をコードする遺伝子を增幅することができる。その場合、高い多様性を得るという観点から、特定の抗原で免疫される前のナイーブな抗体産生細胞を用いることが好ましいが、場合によっては、特定の抗原で免疫された後のバイアスの

かかった抗体産生細胞を用いてもよい。あるいは、あるL鎖可変領域やH鎖可変領域をコードする遺伝子に人工的に変異を加えるなどして多様性を高めた多数の遺伝子を合成することによっても得ることができる。そのような遺伝子は、例えばError prone PCRなどの手法を用いて人工的に変異を誘発することで作製することもできるし、あるいは、所望の多様性を有する形に配列設計された遺伝子を全合成することによっても作製することができる。

[0058] 別の態様において、抗原結合分子提示ライブラリーを作製する本発明の方法により作製された抗原結合分子提示ライブラリーもまた本発明に含まれる。

[0059] 別の態様において、本発明は、所定の抗原に対して特異的に結合する抗原結合分子を取得する方法であって、以下の工程を含む方法に関する：

- (a) 本発明の抗原結合分子提示ライブラリーに抗原を接触させる工程、および
- (b) 当該抗原結合分子提示ライブラリーの中から、当該抗原に結合する抗原結合分子を選択する工程。

[0060] 一態様において、本発明の抗原結合分子提示ライブラリーは、互いに配列が異なり多様性に富んだ複数の抗原結合分子を含んでいるので、全体として見た場合、多様な種類の抗原に対して結合可能な抗原結合分子の集団となっている。よって、本発明の抗原結合分子提示ライブラリーの中から、スクリーニングによって、所望の抗原に対して特異的に結合する抗原結合分子を選択（選別）することができる。すなわち、本発明の抗原結合分子提示ライブラリーに抗原を接触させることによって、その中に含まれる当該抗原に対して特異的に結合可能な抗原結合分子と当該抗原とが結合して複合体が形成される。そして、当該ライブラリーに含まれる複数の抗原結合分子の中から、抗原と複合体を形成している抗原結合分子と、抗原に結合していない抗原結合分子とを当業者に公知の何らかの方法で分離することによって、当該抗原に対して特異的に結合する抗原結合分子のみを選択（選別）することができる。抗原と複合体を形成している抗原結合分子を分離する方法としては、例

えば、あらかじめビオチンで標識した抗原を抗原結合分子提示ライブラリーに接触させた後、当該ビオチン標識された抗原を、ビーズやプレートなどの担体上に固定化されたアビジンまたはストレプトアビジンに結合させることによって、当該抗原と複合体を形成している抗原結合分子のみをビーズやプレート上に回収することができる。そして、当該ビーズやプレートを洗浄して、抗原結合分子提示ライブラリーの中から抗原に結合していない抗原結合分子を除去することによって、抗原と複合体を形成している抗原結合分子と、抗原に結合していない抗原結合分子とを分離することができる。

[0061] 抗原に対して特異的に結合する抗原結合分子を選別する上記の操作は、複数回繰り返し行われてもよい。すなわち、一度目の選別操作により分離された抗原結合分子群の中には、抗原への結合能が弱い抗原結合分子と強い抗原結合分子が混在していると考えられるので、上記選別操作を繰り返すことによって、抗原への結合能が強い抗原結合分子の存在比率を徐々に高めていくことができる。一実施態様において、一度目の選別操作により分離された抗原結合分子を提示するバクテリオファージを、宿主であるバクテリアに一旦感染させた後、当該バクテリアを培養し増殖させる。本発明において作製されたバクテリオファージ内には、通常、第二のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドがパッケージングされているので、前記バクテリオファージが感染したバクテリア内には、第二のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが存在することになる。すなわち、この状態のバクテリアは、第二のポリペプチドを発現可能なバクテリアであるので、当該バクテリアに、最初の抗原結合分子提示ライブラリーを作製する際に用いたのと同じヘルパー・ファージ（すなわち、同じ第一のポリペプチドを発現可能なヘルパー・ファージ）を感染させることによって、一度目の選択操作で分離されたのと同じ抗原結合分子を提示するバクテリオファージを、数が増幅した状態で再生産することができる。このようにして得られた抗原結合分子を提示するバクテリオファージを再び出発材料として、上記の選択操作を繰り返し行うことによって、抗原への結合能が強い抗原結合分子のみが多く含まれる抗原結合分

子の集団を形成することが可能となる。

- [0062] 抗原結合分子提示ライブラリーに含まれる抗原結合分子はバクテリオファージ上に提示された状態で存在しているが、何らかの方法により抗原結合分子のみを取得することも可能である。例えば、抗原結合分子とファージのコートタンパク質が融合していて、その間にプロテアーゼ（例えばトリプシン）の切断部位が導入されているような場合、抗原結合分子が提示されたバクテリオファージにプロテアーゼを反応させることによって、抗原結合分子とバクテリオファージが分離され、抗原結合分子のみを単離することができる。また、本発明の方法により作製されたバクテリオファージのファージ粒子中に、第二のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドがパッケージングされている場合、本発明のヘルパーファージに含まれる第一のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと合わせて、当該抗原結合分子の配列情報を同定することができ、遺伝子工学的手法により当該抗原結合分子を別途作製することができる。
- [0063] 一態様において、本発明における抗原は、抗原決定基（エピトープ）となり得る構造を含む化合物であれば特に限定ではなく、低分子化合物であってよいし、高分子化合物であってもよい。一般的な抗原の例としては、ポリペプチドやポリヌクレオチド、糖鎖、脂質、あるいはそれらが組み合わさってできた分子などを挙げることができる。それらは天然に存在する材料から単離することによって調製することもできるし、人工的に合成することによって調製することもできる。例えば、抗原がポリペプチドの場合、遺伝子工学的な手法により調製することが可能である。すなわち、当該ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを、遺伝子クローニング法や核酸合成法など当業者に公知の手法により調製し、それを公知の発現ベクターなどに挿入して適当な宿主細胞に導入することによって、当該ポリペプチドを調製することができる。発現したポリペプチドは、通常のイオンクロマトグラフィーやアフィニティクロマトグラフィーなどの方法により精製することができる。

[0064] 本明細書において、抗原結合分子が抗原に特異的に結合するとは、ある抗原に対する抗原結合分子の結合活性が、それ以外の抗原に対する結合活性と比べて、例えば、好ましくは2倍以上、3倍以上、5倍以上、より好ましくは10倍以上、20倍以上、30倍以上、さらに好ましくは50倍以上、100倍以上高いことを意味する。抗原に対する抗原結合分子の結合活性は、ELISAやFACS、Biacoreなどの当業者に公知の方法により測定および比較することができる。上記の定義における抗原はエピトープと言い換えててもよい。すなわち、抗原結合分子が抗原に特異的に結合するとは、抗原結合分子の、あるエピトープに対する結合活性が、それ以外のエピトープに対する結合活性と比べて、例えば、好ましくは2倍以上、3倍以上、5倍以上、より好ましくは10倍以上、20倍以上、30倍以上、さらに好ましくは50倍以上、100倍以上高いことを意味する。

[0065] 別の態様において、本発明は、共通した第一のポリペプチドを含む多重特異性抗原結合分子を作製する方法であって、以下の工程を含む方法に関する：

- (a) 所定の抗原に対して特異的に結合する抗原結合分子を取得する本発明の方法を複数の抗原に対して行う工程、および
- (b) 工程(a)で取得された複数の抗原結合分子に含まれる、複数の同じアミノ酸配列の第一のポリペプチドおよび複数の異なるアミノ酸配列の第二のポリペプチドを用いて多重特異性抗原結合分子を作製する工程であって、当該複数の第二のポリペプチドの各々に当該第一のポリペプチドが会合して、当該複数の抗原に対して特異的に結合する当該複数の抗原結合分子を形成することを特徴とする工程。

[0066] あるいは、上記発明は、さらなる別の態様において、共通した第一のポリペプチドを含む多重特異性抗原結合分子を作製する方法であって、以下の工程を含む方法であってもよい：

- (a) 所定の抗原に対して特異的に結合する抗原結合分子を取得する本発明の方法を複数の抗原に対して行う工程、
- (b) 工程(a)で取得された複数の抗原結合分子に含まれる、複数の同じアミ

ノ酸配列の第一のポリペプチドおよび複数の異なるアミノ酸配列の第二のポリペプチドについて、当該第一のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよび当該複数の第二のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをそれぞれ調製する工程、

(c) 工程(b)で調製された各ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入する工程、および

(d) 工程(c)の宿主細胞を培養し、多重特異性抗原結合分子を回収する工程であって、当該複数の第二のポリペプチドの各々に当該第一のポリペプチドが会合して、当該複数の抗原に対して特異的に結合する当該複数の抗原結合分子を形成することを特徴とする工程。

[0067] 所定の抗原に対して特異的に結合する抗原結合分子を取得する本発明の方法により取得された抗原結合分子には、必ず第一のポリペプチドが含まれているので、複数の抗原に対して当該方法を行った結果取得される複数の抗原結合分子には、共通した第一のポリペプチド、および互いに異なる第二のポリペプチドがいずれも含まれていることになる。そのようにして得られた第一のポリペプチドおよび複数の第二のポリペプチドを組み合わせることにより、複数の第二のポリペプチドの各々は第一のポリペプチドと会合して複数の抗原結合分子を形成するので、それらの複数の抗原結合分子どうしを連結して一つの分子を形成するように再構成すれば、共通した第一のポリペプチドを含む多重特異性抗原結合分子を容易に作製することができる。その際、遺伝子工学的手法を用いて多重特異性抗原結合分子を作製してもよい。すなわち、第一のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよび複数の第二のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをそれぞれ調製して、それらを宿主細胞に導入し、当該ポリヌクレオチドが発現可能な条件で当該宿主細胞を培養する。当該ポリヌクレオチドから発現した複数の第二のポリペプチドの各々は第一のポリペプチドと会合して複数の抗原結合分子を形成するので、それらの複数の抗原結合分子どうしを連結して一つの分子を形成するように再構成すれば、共通した第一のポリペプチドを含む多重特異性抗原結合

分子を容易に発現させることができる。宿主細胞外に発現した多重特異性抗原結合分子の回収は、宿主細胞の培養液から培養上清を遠心分離することによって行うことができるし、あるいは、宿主細胞の細胞抽出液を調製することによって行うことができる。さらにそこから多重特異性抗原結合分子を単離し、精製する工程を加えてもよい (Nat Biotechnol. 1998 Jul;16(7):677-81.)。

- [0068] 第一のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドや複数の第二のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、何らかの発現ベクターに挿入されていることが好ましい。各ポリヌクレオチドが個別の発現ベクターに挿入されていてもよいし、それらがまとめて同じ発現ベクターに挿入されていてもよい。発現ベクターの例として、大腸菌用であればpET、哺乳動物細胞用であればpcDNA3などを挙げることができる。
- [0069] 第一のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドや複数の第二のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが導入される宿主細胞の例としては、大腸菌であればJM109、DH5 α 、HB101、XL1-Blueなどを、哺乳動物細胞であればCHO、COS、HEK293などを挙げることができる。
- [0070] 宿主細胞へのポリヌクレオチドの導入は、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラノン法、エレクトロポレーション法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法など当業者に公知の手法を用いて行うことができる。
- [0071] 宿主細胞から回収された多重特異性抗原結合分子は、例えば、遠心分離、硫酸アノニウム分画、塩析、透析、限外濾過、アフィニティクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーなどの公知の方法により、単離精製されてもよい。
- [0072] 一態様において、本発明における多重特異性抗原結合分子とは、一つの分子内に複数の抗原に対してそれぞれ特異的に結合する複数の抗原結合分子を含む分子を意味する。抗原結合分子どうしが何らかの形で互いに連結して一つの分子を形成していればよく、その際の連結は、共有結合（例えば、ペプチド結合やジスルフィド結合など）によって行われてもよいし、非共有結合

によって行われてもよい。抗原結合分子どうしの結合は、直接行われてもよいし、リンカーペプチドのようなリンカー分子を介して行われてもよい。多重特異性抗原結合分子の例としては、抗原結合分子が抗体可変領域の場合、複数のH鎖可変領域およびL鎖可変領域が直接あるいはリンカーペプチドを介してペプチド結合で連結され、さらに分子内でH鎖可変領域とL鎖可変領域が適宜会合して複数の抗体可変領域を形成する分子（例えば、diabody、triabody、single-chain diabodyなど）を挙げることができる。また、別の例としては、H鎖可変領域とH鎖定常領域、およびL鎖可変領域とL鎖定常領域とがそれぞれペプチド結合で連結されるとともに、H鎖定常領域どうしがジスルフィド結合などで連結され、さらに分子内でH鎖可変領域とL鎖可変領域が適宜会合して複数の抗体可変領域を形成する分子（例えば、IgG、IgM、IgA、IgD、IgEなどの抗体（免疫グロブリン）分子）を挙げることができる。多重特異性抗原結合分子に含まれる各抗原結合分子は、互いに異なる抗原に結合する抗原結合分子であってもよいし、同じ抗原に含まれる異なる抗原決定基（エピトープ）に結合する抗原結合分子であってもよい。場合によっては、同じ抗原の同じエピトープに結合する抗原結合分子であってもよい。多重特異性抗原結合分子に含まれる抗原結合分子の数を二つ、三つ、四つなどと増やすことによって、二重特異性抗原結合分子、三重特異性抗原結合分子、四重特異性抗原結合分子などをそれぞれ作製することができる。本発明において好ましい多重特異性抗原結合分子は、二重特異性抗原結合分子（例えば、二重特異性抗体）である。

[0073] 多重特異性抗原結合分子は様々な目的で使用することができるが、その中の一つに、医薬組成物の有効成分として疾患の治療に使用できることがすでに知られている。例えば、癌の治療において、腫瘍抗原に結合する抗原結合分子および細胞障害活性を誘起する分子に結合する抗原結合分子を含む二重特異性抗原結合分子は、腫瘍細胞に対して特異的に細胞障害を誘起することができる分子として有用である。腫瘍抗原としては、例えば、CD15、p185 (HER2)、p97、OVCAR-3、L-D1、EGFR、CAMA1、CD19、MoV18、NCAM、FBP、AMOC-

31、Id-1、CD22、CD7、CD38、CEA、CD30などが挙げられる。また、細胞障害活性を誘起する分子としては、例えば、Fc γ RI、Fc γ RIII (CD16) 、CD3などが挙げられる。また、感染性疾患の治療において、ウィルスに結合する抗原結合分子および細胞障害活性を誘起する分子に結合する抗原結合分子を含む二重特異性抗原結合分子は、ウィルス感染細胞に対して特異的に細胞障害を誘起することができる分子として有用である。ウィルスとしては、例えば、単純ヘルペスウィルス (HSV) 、インフルエンザウィルス、ヒト免疫不全ウィルス (HIV) などを挙げることができる。他には、フィブリンに結合する抗原結合分子およびプラスミノーゲン活性化因子に結合する抗原結合分子を含む二重特異性抗原結合分子は、血栓を溶解させる医薬として有用である。プラスミノーゲン活性化因子としては、例えば、組織型プラスミノーゲン活性化因子 (tPA) 、ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子 (uPA) などを挙げができる。さらに、サイトカインのヘテロ受容体を構成する各ポリペプチド鎖に対してそれぞれ結合する抗原結合分子を含む二重特異性抗原結合分子の中から、当該サイトカインのアゴニスト分子を取得することができる (W02004/060919) 。ヘテロ受容体を有するサイトカインとしては、例えば、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、IL-23、IL-31、GM-CSF、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、CNTF、LIF、OSM、CT-1などを挙げができる。また、酵素に結合する抗原結合分子および当該酵素の基質に結合する抗原結合分子を含む二重特異性抗原結合分子の中から、当該酵素反応を増強する補因子の作用を代替可能な機能性分子を取得することができる (W02005/035754) 。そのような酵素-基質-補因子の組合せとして、例えば、血液凝固第IX因子 (FIXa) -血液凝固第X因子 (FX) -血液凝固第VIII因子 (FVIII/FVIIIa) の組合せ、プロテインZ依存性プロテインインヒビター (ZPI) - 血液凝固第X因子 (FX/FXa) - プロテインZ (PZ) の組合せ、トロンбин-トロンбин活性化線溶阻害因子 (TAFI) - トロンボモジュリン (TM) の組合せなどを挙げができる。

[0074] また、上記以外にも、真菌治療 (特開平5-199894) 、免疫応答誘導 (特表

平10-511085)、免疫化学 (R.R. Suresh et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 7989-7993、C. Milstein and A.C. Cuello (1983) Nature 305 : 537-540) などに多重特異性抗原結合分子が使用され得ることが報告されている。

[0075] 一態様において、本発明における多重特異性抗原結合分子が二重特異性抗体（例えば、IgGなど）でL鎖が共通の場合は、2種類のH鎖のヘテロダイマー化を促進するための各種改変などを加えることが好ましい。そのような改変としては、2種類のH鎖のCH3ドメインに互いに立体的に相補的な構造を導入する改変 (Ridgway et al. (1996) Protein Eng. 9: 617-21、W096/27011)、2種類のH鎖のCH3ドメインをIgG由来の配列とIgA由来の配列で互い違いに置換する改変 (SEEDbodies: Protein Eng Des Sel. 2010 Apr; 23(4):195-202)、2種類のH鎖のCH3ドメインに電荷的相互作用が生じるような変異を導入する改変 (W02006/106905) 等がすでに知られている。

[0076] 別の態様において、本発明は、抗原結合分子の製造方法であって、以下の工程を含む方法に関する：

(a) 所定の抗原に対して特異的に結合できる、第一のポリペプチドおよび第二のポリペプチドが会合された、参照となる抗原結合分子（親抗原結合分子）の第一のポリペプチドと同じアミノ酸配列の第一のポリペプチドを発現可能なヘルパーファージを、親抗原結合分子の第二のポリペプチドと異なるアミノ酸配列の第二のポリペプチドをそれぞれ発現可能なバクテリア集団に接触させて、共通した第一のポリペプチドと、アミノ酸配列の異なる第二のポリペプチドとがそれぞれ会合された、抗原結合分子（子供抗原結合分子）を提示する複数のバクテリオファージを含む、抗原結合分子提示ライブラリーを作製する工程、および

(b) 工程(a)で作製された抗原結合分子提示ライブラリーに前記抗原を接触させて、前記抗原に対して特異的に結合できる子供抗原結合分子を選択する工程。

当該方法は、さらに、以下の工程を含んでよい。

(c) 工程(b)で選択した子供抗原結合分子の中から、親抗原結合分子と比較して異なる物性を有する子供抗原結合分子を取得する工程。

さらなる態様において、当該抗原結合分子の製造方法は、以下の工程をさらに含む方法に關してもよい：

(d) 前記工程(b)で選択されたか、または前記工程(c)で取得された子供抗原結合分子の第二のポリペプチドと同じアミノ酸配列の第二のポリペプチドを発現可能なヘルパーファージを、子供抗原結合分子の第一のポリペプチドと異なるアミノ酸配列の第一のポリペプチドをそれぞれ発現可能なバクテリア集団に接触させて、共通した第二のポリペプチドと、アミノ酸配列の異なる第一のポリペプチドとがそれぞれ会合された、抗原結合分子（孫抗原結合分子）を提示する複数のバクテリオファージを含む、抗原結合分子提示ライブラリーを作製する工程、および

(e) 工程(d)で作製された抗原結合分子提示ライブラリーに前記抗原を接触させて、前記抗原に対して特異的に結合できる孫抗原結合分子を選択する工程。

当該方法は、さらに、以下の工程を含んでよい。

(f) 工程(e)で選択した孫抗原結合分子の中から、子供抗原結合分子と比較して異なる物性を有する孫抗原結合分子を取得する工程。

[0077] ここで、前記工程(c)または前記工程(f)における前記物性は、限定はされないが、例えば、等電点、熱安定性、化学的安定性、溶解度、粘度、糖鎖付加状況、抗原結合分子自身の均一性、免疫原性、および／または、前記抗原に対する親和性もしくは結合特異性 (J Biol Chem 2005; 280:24880-7) を意味してよい。

[0078] 一実施態様において、当該抗原結合分子の製造方法により、参照となる抗原結合分子と比較して、抗原に対する親和性もしくは結合特異性が優れた抗原結合分子；熱安定性もしくは化学的安定性が優れた抗原結合分子；溶解度が向上された抗原結合分子；糖鎖付加アミノ酸配列が含まれない抗原結合分子；抗原結合分子自身の均一性が向上された分子；免疫原性（のリスク）が

低下した抗原結合分子；および／または、等電点または粘度が変更された抗原結合分子が提供される。当該抗原結合分子の製造方法が、抗原に対する親和性が優れた抗原結合分子を提供する場合には、当該方法は、抗原結合分子を親和性成熟する方法に関する。

さらに、当該方法により物性が劣った抗体が得られた場合であっても、例えば、非ヒト動物由来抗体のヒト化等に用いることができるので有利である(*J Mol Biol.* 2000 Feb 25;296(3):833-49.)。例えば、非ヒト動物由来の第一のポリペプチドを固定し、ヒト由来の第二のポリペプチドのライブラリーと組み合わせ、抗原に対してパンニング操作を行うことにより、ヒト由来の第二のポリペプチドを取得することができる。引き続き、第二のポリペプチドを固定しヒト由来の第一のポリペプチドのライブラリーと組み合わせ、抗原に対してパンニング操作を行うことにより、ヒト由来の第一のポリペプチドを取得することができる。このように、順次、ヒト抗体Libraryと置き換えることにより、非ヒト動物由来抗体を元としてヒト抗体を取得することが可能である。

[0079] 例えば、抗体の可変領域のアミノ酸残基のうち表面に露出し得る少なくとも1つのアミノ酸残基を置換して電荷(pI:等電点)を変えることで、抗体の血中半減期、平均血中滞留時間を延長または短縮するか、あるいは、血中クリアランスを低下または向上させることが可能であることが報告されている(WO2007/114319; WO2009/041643)。

例えば、抗体のH鎖可変領域とL鎖可変領域の界面にあるアミノ酸残基を変えることで、熱安定性を向上させることができることが報告されている(*J Mol Biol.* 2003 Jan 17;325(3):531-53)。

例えば、抗体可変領域のグルタミン残基をグルタミン酸残基に置換することにより、化学的安定性を向上させることができることが報告されている(*Anticancer Drugs.* 2010 Nov;21(10):907-16)。

例えば、抗体可変領域の疎水性残基を疎水性の低い残基に置換することにより、溶解度を向上させることができることが報告されている(*Protein*

Sci. 2010 May;19(5):954-66)。

また、抗体可変領域からN型糖鎖付加配列を除くことにより、産生される抗体の不均一性を低減させることが可能であることが報告されている (J Mol Biol. 2011 Oct 14;413(1):261-78)。

したがって、当業者は、所与の目的に応じて、当該抗原結合分子の製造方法により、抗体の安定性や等電点などを変えることで、例えば、抗体の血中半減期、平均血中滞留時間を延長または短縮するか、あるいは、血中クリアランスを低下または向上させることができることを理解する。

[0080] 前記工程(c)または前記工程(f)を実施する場合において、抗原結合分子を取得する方法としては、当業者に公知の方法であれば特に限定はされない。

例えば、抗原と接触させて、当該抗原に対して特異的に結合できる抗原結合分子を選択してきた後に、所望の物性を有する抗原結合分子群についてパンニング操作を行わずに、当該物性を評価（例えば、測定または予測）してもよい (MAbs. 2011 May-Jun;3(3):243-52)。あるいは、パンニング操作を行い、候補となる抗原結合分子を選抜した（絞り込んだ）後に、当該物性を評価してもよい。

例えば、前記「異なる物性」が抗原に対する親和性の場合には、ELISA、FACS、表面プラズモン共鳴を利用するBiacore、あるいは、本実施例で用いたOctet systemのようなバイオレイヤー干渉法 (BioLayer Interferometry: BLI) を利用してもよい。

例えば、前記「異なる物性」が等電点の場合には、得られた抗原結合分子のアミノ酸配列に基づいて、Getetyx等の当業者に公知の市販のソフトを用いて、等電点を計算（予測）することが可能である。一実施態様において、抗原に対して十分な特異的結合能を有する抗原結合分子のアミノ酸配列について等電点予測を行い、所望の等電点を有する分子を選択してよい。あるいは、等電点電気泳動 (IEF) 等を用いて、実際に等電点を測定してもよい (Protein Eng Des Sel. 2010 May;23(5):385-92)。

例えば、前記「異なる物性」が熱安定性または化学的安定性の場合には、

パンニング操作の前に抗原結合分子に熱を加えた後、あるいは抗原結合分子を変性させた後に、抗原に対してパンニング操作を行ってもよい (Methods Mol Biol. 2012;907:123-44)。

[0081] 別の態様において、本発明は、改変されたヘルパーファージおよび当該ヘルパーファージが感染可能なバクテリアの組合せであって、当該ヘルパーファージは、第一のポリペプチドを発現可能なヘルパーファージであり、かつ当該バクテリアは、第二のポリペプチドを発現可能なバクテリアである、組合せに関する。

本発明における第一のポリペプチドと第二のポリペプチドは、互いに会合して、一つの抗原結合分子を形成することを特徴とする。

[0082] 一態様において、本発明におけるヘルパーファージおよびバクテリアの組合せとは、当該バクテリアに当該ヘルパーファージを感染させることを前提として、両者を構成要件として含むもの全般を指す。両者が混合される前の互いに別個の物であって、まだ両者が感染可能な状態になっていないものも本発明に含まれるし、両者が混合された後の混合物であって、すでに両者が感染可能な状態になっているものも本発明に含まれる。

[0083] 別の態様において、本発明の改変されたヘルパーファージおよび当該ヘルパーファージが感染可能なバクテリアの組合せを製造する方法も、本発明に含まれる。本発明の改変されたヘルパーファージは、ヘルパーファージのゲノムDNAに制限酵素切斷部位を利用して第一のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを挿入し、そのようにして作製された改変ヘルパーファージのゲノムDNAを宿主であるバクテリアに導入することによって作製することができる。ヘルパーファージがM13K07の場合の好ましい制限酵素切斷部位としては、カナマイシン耐性遺伝子とp15A oriの間に位置しているSacIサイトや、p15A oriとM13 oriの間に位置しているSacIIサイトなどを挙げることができる。上記のようにして改変されたヘルパーファージのゲノムDNAが導入されたバクテリア内ではファージ粒子が産生され、さらにその中に当該改変されたヘルパーファージのゲノムDNAがパッケージングされることによって、改変され

たヘルパーファージが再構成される。また、当該ヘルパーファージが感染可能なバクテリアは、バクテリアに第二のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを導入することによって作製することができる。

[0084] 別の態様において、本発明の改変されたヘルパーファージおよび当該ヘルパーファージが感染可能なバクテリアの組合せにおいて、そこに含まれる改変されたヘルパーファージもまた本発明に含まれる。すなわち、本発明は、あるポリペプチドを発現可能な改変されたヘルパーファージであって、当該ポリペプチドが、会合して抗原結合分子を形成することを特徴とする二本のポリペプチドのいずれか一方であるヘルパーファージに関する。あるいは、本発明は、第一のポリペプチドを発現可能な改変されたヘルパーファージであって、当該第一のポリペプチドが別の第二のポリペプチドと会合して、一つの抗原結合分子を形成できることを特徴とするヘルパーファージに関する。

[0085] 別の態様において、本発明の改変されたヘルパーファージを含むキットも、本発明に含まれる。すなわち、本発明は、あるポリペプチドを発現可能な改変されたヘルパーファージであって、当該ポリペプチドが、会合して抗原結合分子を形成することを特徴とする二本のポリペプチドのいずれか一方であるヘルパーファージを含むキットに関する。あるいは、本発明は、第一のポリペプチドを発現可能な改変されたヘルパーファージであって、当該第一のポリペプチドが別の第二のポリペプチドと会合して、一つの抗原結合分子を形成できることを特徴とするヘルパーファージを含むキットに関する。それらは、抗原結合分子を提示するバクテリオファージを作製するためのキット、共通した第一のポリペプチドを含む抗原結合分子提示ライブラリーを作製するためのキット、所定の抗原に対して特異的に結合する抗原結合分子を取得するためのキット、共通した第一のポリペプチドを含む多重特異性抗原結合分子を作製するためのキット、あるいは参照となる抗原結合分子とは異なる物性を有する抗原結合分子を製造するためのキットであることができる。本発明のキットは、当該ヘルパーファージが感染可能なバクテリアであつ

て、抗原結合分子を形成する前記二本のポリペプチドのうちの残りの一方のポリペプチドを発現可能なバクテリア、あるいは当該ヘルパーファージが感染可能なバクテリアであって、前記第二のポリペプチドを発現可能なバクテリアをさらに含んでいてもよい。

- [0086] 本明細書に記載の1又は複数の態様を任意に組み合わせたものも、当業者の技術常識に基づいて技術的に矛盾しない限り、本発明に含まれることが当業者には当然に理解される。
- [0087] 本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。
- [0088] 第一の、第二などの用語が種々の要素を表現するために用いられるが、これらの要素はそれらの用語によって限定されるべきではないことが理解される。これらの用語は一つの要素を他の要素と区別するためのみに用いられているのであり、例えば、第一の要素を第二の要素と記し、同様に、第二の要素を第一の要素と記すことは、本発明の範囲を逸脱することなく可能であると理解される。
- [0089] 本明細書で用いられる用語は、特定の実施態様を説明するために用いられ、発明を限定する意図として理解されてはならない。異なる定義が明示されていない限り、本明細書で用いられる用語（技術用語及び科学用語を含む。）は、本発明が属する技術分野における当業者によって広く理解されるものと同じ意味を有するものとして解釈され、かつ、理想化され、又は、過度に形式的な意味において解釈されるべきではない。
- [0090] 本明細書で用いられる用語「含む」は、文脈上明らかに異なる理解をすべき場合を除き、記述された事項（部材、工程、要素、数字等）が存在することを意図するものであり、それ以外の事項（部材、工程、要素、数字等）が存在することを排除しない。
- [0091] 本発明の実施態様は模式図を参照しつつ説明される場合があるが、説明を明確にするために誇張されて表現される場合がある。
- [0092] 本明細書に記載の数値は、文脈に反しない限り、当業者の技術常識に従っ

て、一定の幅を有する値であると理解される。例えば「1mg」の記載は「約1mg」と記載されているものと理解され、一定の変動量を包含するものとして理解される。また、本明細書において、例えば、「1～5個」と記載されている場合、文脈に反しない限り、「1個、2個、3個、4個、5個」と、それぞれの値が個別具体的に記載されているものと理解される。

実施例

[0093] 本発明は、以下の実施例によってさらに例示されるが、下記の実施例に限定されるものではない。

[0094] [実施例 1] H鎖発現ファージミドベクターとL鎖発現ヘルパーファージの組合せによるFab提示ファージ産生法の確立

(1-1) L鎖発現ユニットを組み込んだL鎖発現ヘルパーファージの構築
ヘルパーファージのゲノムに、プロモーター、シグナル配列、抗体L鎖遺伝子などを組み込むことにより、L鎖発現ヘルパーファージの構築を行った。本ヘルパーファージが感染した大腸菌からは抗体L鎖の発現が可能となる。

具体的には、ヘルパーファージ(M13K07: Invitrogen)を大腸菌株XL1-Blueへ感染させ、一晩振とう培養を行った後、ヘルパーファージからのゲノム抽出を行った (QIAprep Spin Miniprep Kit : QIAGEN)。ヘルパーファージゲノムに含まれるgene 3遺伝子のN2ドメインにBamHIサイト、gene 1にPacIサイトがある。得られたヘルパーファージゲノムをBamHI, PacIで切断した後、0.6% アガロースゲルにて電気泳動を行い、ゲル切り出し精製 (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up system: Promega) を行うことにより、gene 3～gene 1部分のDNA断片および残りのゲノム側のDNA断片をそれぞれ調製した。調製されたgene 3～gene 1部分のDNA断片を鋳型としてPCRを行い、gene 3のN2ドメインとCTドメインの間にトリプシン切断配列をコードするDNAが挿入されたDNA断片を新たに作成した。改変前のgene 3のアミノ酸配列を配列番号：1に、改変されたgene 3のアミノ酸配列を配列番号：2に示す。このDNA断片を、先に調製した残りのゲノム側のDNA断片と再び連結させることにより、ヘルパーファージのpIIIタンパク質のN2ドメインとCTドメインの間にトリプシン切断

配列を挿入したヘルパーファージM13K07TCが構築された(特表2002-514413を参考)。

ヘルパーファージM13K07TCを大腸菌株ER2738へ感染させ、一晩振とう培養を行った後、感染大腸菌からヘルパーファージM13K07TCのゲノム抽出を行った(NucleoBond Xtra Midi Plus)。L鎖発現ユニットを組み込む場所として、カナマイシン耐性遺伝子とp15A oriの間に位置しているSacIサイトを選択した(図1)。この場所に限らず、p15A oriとM13 oriの間に位置しているSacIIサイト等への挿入でも問題ないと考えられる。上記方法にて精製したヘルパーファージM13K07TCゲノムをSacIで切斷した後、0.6%アガロースゲルにて電気泳動を行い、ゲル切り出し精製(Wizard SV Gel and PCR Clean-Up system: Promega)を行うことにより、目的のDNA断片(M13K07TC/SacI)を得た。

導入する抗体L鎖(VLおよびCL)として、抗ヒトIL-6R抗体であるPF1のL鎖を用いた。この際、L鎖定常領域のC末端にあるCysのAlaへの置換が大腸菌におけるFab発現に有利であることが知られている(J Biol Chem. 2003 Oct 3; 278(40): 38194-38205)、そのような配列を用いた。lacプロモーター-pelBシグナル配列-PF1 L鎖遺伝子をin-fusion法(In-Fusion HD Cloning Kit: Clontech)にて、M13K07TC/SacIへ挿入し、大腸菌株ER2738へエレクトロポレーション法により導入した。lacプロモーターの核酸配列を配列番号：3に、pelBシグナル配列のアミノ酸配列および核酸配列を配列番号：4および配列番号：5に、PF1 L鎖のアミノ酸配列および核酸配列を配列番号：6および配列番号：7にそれぞれ示す。

得られた大腸菌を培養し、培養上清に2.5 M NaCl/10%PEGを添加してPEG沈殿法によりヘルパーファージを精製した。得られたヘルパーファージM13K07T C-PF1Lのタイターを一般的なプラーク形成法にて確認した。

[0095] (1-2) H鎖発現ファージミドベクターの構築

ファージ表面上に抗体H鎖を発現するためのファージミドベクターを構築した。ファージミドベクターは、プラスミドベクターにファージ粒子へのパッケージングシグナル、プロモーター、シグナル配列、抗体H鎖遺伝子、リンカ

一遺伝子、gene3遺伝子などをそれぞれ機能的に挿入することにより作製した。抗体H鎖はリンカーペプチドを介してgene3タンパク質(g3p)と融合している。導入する抗体H鎖(VHおよびCH1からなるFd)として、抗ヒトIL-6R抗体であるPF1のH鎖を用いた。PF1 H鎖のアミノ酸配列を配列番号：8に示す。構築したファージミドベクターを大腸菌株ER2738へエレクトロポレーション法により導入し、PF1 H鎖発現ファージミドベクターを保持する大腸菌ER2738/pAG-PF1Hを構築した。

[0096] (1-3) H鎖発現ファージミドベクターとL鎖発現ヘルパーファージの組合せによるFab提示ファージの產生

大腸菌ER2738/pAG-PF1HをOD 0.5付近まで培養した後、ヘルパーファージM13K07TC-PF1LもしくはM13K07TCを感染させた。培地交換を実施後、30°Cで一晩培養し、培養上清を回収した。ファージが產生された大腸菌の培養液に2.5 M NaCl/10%PEGを添加してファージを沈殿させ、それをTBSにて溶解しファージ液を取得した。得られたファージのタイマーを一般的なコロニー形成法にて確認した。

[0097] (1-4) ファージELISA法によるファージへのFab提示の確認

ファージELISA法により、產生されたファージのFab提示の確認および抗原への結合能の確認を行った。StreptaWell 96マイクロタイタープレート(Roche)へGoat anti-Human Kappa Biotin抗体(EY LABORATORIES)、もしくはビオチン標識ヒトIL-6Rを含む100 μLのPBSを添加し、プレートをコーティングした。当該プレートの各ウェルを0.1xTBST(0.1%Tween20を含む0.1xTBS)にて洗浄することによって抗原を除いた後、当該ウェルに0.02% Skim Milk-0.1xTBS(0.02% Skim Milkを含む0.1xTBS)250 μLを加え1時間以上ブロッキングした。0.02% Skim Milk-0.1xTBSを除いた後、各ウェルに0.02% Skim Milk-0.1xTBSにて希釀されたファージ液を加え37°Cで1時間静置することによって、ファージ上に提示された抗体をGoat anti-Human Kappa Biotin抗体もしくはビオチン化ヒトIL-6Rに結合させた。0.1xTBSTにて洗浄された後、各ウェルに0.1xTBSTにて希釀されたHRP結合抗M13抗体(Amersham Pharmacia Biotech)

を添加し1時間インキュベーションした。0.1xTBSTにて洗浄後、各ウェルにTMB single溶液（ZYMED）を添加し、さらに硫酸を添加して溶液の発色反応を停止させた後、450 nmの吸光度を測定した。

その結果、H鎖発現ファージミドベクターとL鎖発現ヘルパーファージM13K07TC-PF1Lとを組み合わせてファージを產生させた場合にのみファージ上にFabが提示され（図2）、また、ファージ上に提示されたFabが抗原結合能を維持していることが確認された（図3）。

[0098] [実施例2] ナイープH鎖を含むファージミドライブラリーの構築と、ナイープH鎖およびPF1 L鎖を含むFabファージライブラリーの产生

ヒト末梢血単核球（PBMC）から調製したポリA RNAや、市販されているヒトポリA RNAなどを鋳型として、PCR法によりナイープH鎖可変領域遺伝子が増幅された。これらをファージミドベクターへ挿入し、構築されたファージミドベクターを大腸菌株ER2738へエレクトロポレーション法により導入したところ、 1.1×10^{10} 程度のコロニーが得られた。

これらの大腸菌に実施例1で構築したヘルパーファージM13K07TC-PF1Lを感染させ培養することにより、ナイープH鎖とPF1 L鎖を含むFabを提示するヒト抗体ファージディスプレイライブラリー（NH-PF1Lライブラリー）を構築した。

[0099] [実施例3] PF1 L鎖を有し、かつ各種抗原に結合可能なFabの取得

(3-1) ビオチン標識ヒトPlexinA1の調製

単回膜貫通タンパク質であるヒトプレキシンA1（hPlexinA1）の細胞外領域を以下のように調製した。NCBI Reference Sequence NP_115618（配列番号：9）のアミノ酸配列をもとに合成されたhPlexinA1遺伝子から、膜貫通領域と予想される1245番目のアラニン以降を除去し、代わりにFLAGタグ配列（配列番号：13）を付加した。さらに1-26番目までのシグナルペプチド（配列番号：14）を人工シグナルペプチドHMM+38（配列番号：15）に置換した。作製されたhPlexinA1（配列番号：10）をコードする遺伝子を動物細胞用発現ベクターに組み込み、293Fectin（Invitrogen）を用いてFreeStyle293細胞（

Invitrogen)に導入した。このとき、目的遺伝子の発現効率の向上のため、EBNA1（配列番号：17）を発現する遺伝子を同時に導入した。前述の手順に従って遺伝子導入された細胞を37°C、8% CO₂で6日間培養し、目的のタンパク質を培養上清中に分泌させた。

目的のhPlexinA1を含む細胞培養液を0.22 μmボトルトップフィルターでろ過し、培養上清を得た。D-PBS(-)(和光純薬)で平衡化された抗FLAG抗体M2アガロース(Sigma-Aldrich)に培養上清をアプライした後、FLAGペプチドを溶解したD-PBSを加えることにより目的のhPlexinA1を溶出させた。次に、D-PBS(-)で平衡化されたSuperdex 200(GEヘルスケア)を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより、hPlexinA1を含む画分を分取した。

上述のように作製されたhPlexinA1に対してEZ-Link NHS-PEG4-Biotin (Thermo SCIENTIFIC)を用いることにより、ビオチン標識hPlexinA1が調製された。

[0100] (3-2) ビオチン標識マウスIgA-Fc領域の調製

マウスIgA-Fc領域 (mIgA-Fc：マウスIgAのCH2およびCH3ドメイン、配列番号：11) のC末端にビオチンを付加する目的で、mIgA-Fcをコードする遺伝子断片の下流に、ビオチンリガーゼによってビオチンが付加される特異的な配列 (AviTag配列、配列番号：16) をコードする遺伝子断片をリンカーを介して連結させた。mIgA-FcとAviTag配列が連結されたタンパク質 (mIgA_CH2-CH3-Avitag (配列番号：12)) をコードする遺伝子断片を動物細胞発現用ベクターに組み込み、構築されたプラスミドベクターを293Fectin (Invitrogen)を用いてFreeStyle293細胞 (Invitrogen)に導入した。このときEBNA1（配列番号：17）を発現する遺伝子およびビオチンリガーゼ (BirA、配列番号：18) を発現する遺伝子を同時に導入し、さらにmIgA-Fcをビオチン標識する目的でビオチンを添加した。前述の手順に従って遺伝子が導入された細胞を37°C、8% CO₂で6日間培養し、目的のタンパク質を培養上清中に分泌させた。

目的のmIgA-Fcを含む細胞培養液を0.22 μmボトルトップフィルターでろ過

し、培養上清を得た。20 mM Tris-HCl, pH7.4で平衡化されたHiTrap Q HP (GEヘルスケア)に、同溶液で希釈された培養上清をアプライし、NaClの濃度勾配により目的のmIgA-Fcを溶出させた。次に、50 mM Tris-HCl, pH8.0で平衡化されたSoftLink Avidin カラム (Promega) に、同溶液で希釈された前記HiTrap Q HP溶出液をアプライし、5 mM ビオチン, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH8.0で目的のmIgA-Fcを溶出させた。その後、Superdex200(GEヘルスケア)を用いたゲルろ過クロマトグラフィーによって、目的外の不純物であるmIgA-Fc会合体を除去し、バッファーが20 mM Histidine-HCl, 150 mM NaCl, pH 6.0に置換された精製mIgA-Fcを得た。

[0101] (3-3) ビオチン標識ヒトIL-6Rの調製

可溶型ヒトIL-6R (hIL-6R、配列番号：19) のC末端にビオチンを付加する目的で、可溶型hIL-6Rをコードする遺伝子断片の下流に、ビオチンリガーゼによってビオチンが付加される特異的な配列 (AviTag配列、配列番号：16) をコードする遺伝子断片をリンカーを介して連結させた。可溶型hIL-6RとAviTag配列が連結されたタンパク質 (shIL6R-Avitag、配列番号：20) をコードする遺伝子断片を動物細胞発現用ベクターに組み込み、構築されたプラスミドベクターを293Fectin (Invitrogen)を用いてFreeStyle293細胞 (Invitrogen)に導入した。このときEBNA1 (配列番号：17) を発現する遺伝子およびビオチンリガーゼ (BirA、配列番号：18) を発現する遺伝子を同時に導入し、さらに可溶型hIL-6Rをビオチン標識する目的でビオチンを添加した。前述の手順に従って遺伝子が導入された細胞を37°C、8% CO₂で培養し、目的のタンパク質を培養上清中に分泌させた。

目的の可溶型hIL-6Rを含む細胞培養液から、(3-2)と同様の方法で精製を行い、ビオチン標識hIL-6Rを得た。

[0102] (3-4) NH-PF1Lライブラリーからの各種抗原 (ヒトPlexinA1、マウスIgA-Fc、ヒトIL-6R) に結合する抗体断片の取得

実施例2で構築されたPF1 L鎖を含む抗体ライブラリー (NH-PF1Lライブラリー) から、各種抗原 (hPlexinA1、mIgA-Fc、hIL-6R) に結合する抗体断片

の選抜を、各抗原への結合能を指標として実施した。

ヒトナイーブH鎖遺伝子が挿入されたファージミドベクターを保持する大腸菌に、ヘルパーファージM13K07TC-PF1Lを感染させ培養することにより、ヒト抗体H鎖とPF1 L鎖を含むFabを提示するヒト抗体ファージディスプレイライブラリー（NH-PF1Lライブラリー）が構築された。ファージが產生された大腸菌の培養液に2.5 M NaCl/10%PEGを添加してファージを沈殿させ、それをTBSにて希釀することによってファージライブラリー液を得た。次に、ファージライブラリー液に終濃度4%となるようBSAを添加して、ファージライブラリー液をブロッキングした。パンニング方法として、一般的な方法である磁気ビーズに固定化された抗原を用いるパンニング方法が参考された（J. Immunol. Methods. (2008) 332(1-2), 2-9、J. Immunol. Methods. (2001) 247(1-2), 191-203、Biotechnol. Prog. (2002) 18(2), 212-220、Mol. Cell Proteomics (2003) 2(2), 61-69）。磁気ビーズとして、NeutrAvidin coated beads (Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) もしくはStreptavidin coated beads (Dynabeads M-280 Streptavidin) が用いられた。具体的には、調製されたファージライブラリー液にビオチン標識抗原（ビオチン標識hPlexinA1、ビオチン標識mIgA-Fc、ビオチン標識hIL-6R）を加え、ファージライブラリー液と抗原を室温にて60分間接触させた。1回目のパンニングでは250 pmol、2回目のパンニングでは40 pmol、3回目のパンニングでは10 pmolのビオチン標識抗原がそれぞれ用いられた。そこにBSA溶液でブロッキングされた磁気ビーズを加え、抗原-ファージ複合体と磁気ビーズを室温にて15分間結合させた。回収されたビーズは1 mLのTBST (0.1% Tween20を含むTBS) と1 mLのTBSにて洗浄された。その後、ビーズに1 mg/mLのトリプシン溶液0.5 mLを加えて室温で15分間懸濁させた後、即座に磁気スタンドを用いてビーズを分離し、上清のファージ溶液を回収した。回収されたファージ溶液を、対数増殖期 (OD₆₀₀ =0.4-0.7) まで培養された10 mLの大腸菌株ER2738に添加し、37°Cで1時間緩やかに攪拌培養することによって、ファージを大腸菌に感染させた。感染された大腸菌は225 mm × 225 mmのプレートへ播種された。次に、播種された大

腸菌を回収して培養した後、ヘルパーファージM13K07TC-PF1Lを感染させ培養することにより、PF1 L鎖を含むFabを提示するファージを産生させた。培養液からファージを回収することによって、ファージライブラリー液が調製された。これを1回のパンニングとし、合計3回のパンニングが繰り返された。

[0103] (3-5) 各種抗原（ヒトPlexinA1、マウスIgA-Fc、ヒトIL-6R）に結合する抗体のファージELISA法によるスクリーニング

(3-4) で実施されたパンニングが2回または3回終了した後に得られた大腸菌のシングルコロニーから、常法 (Methods Mol. Biol. (2002) 178, 13 3-145) に習ってファージの産生を行い、ファージ含有培養上清を回収した。その際、ヘルパーファージにはM13K07TC-PF1Lを用いた。培養上清は以下の手順でELISAに供された。

ビオチン標識抗原（hPlexinA1、mIgA-Fc、hIL-6R）を含む、もしくは含まない100 μLのPBSにて、StreptaWell 96マイクロタイタープレート (Roche) を一晩コーティングした。当該プレートの各ウェルを0.1xTBST (0.1% Tween20を含む0.1xTBS) にて洗浄することによって抗原を除いた後、各ウェルを250 μLの0.02% SkimMilk-0.1xTBS(0.02% SkimMilkを含む0.1xTBS)にて1時間以上ブロッキングした。0.02% SkimMilk-0.1xTBSを除いた後、各ウェルにファージ培養上清を加え、プレートを37°Cで1時間静置することによって、ファージ上に提示された抗体を各ウェルに存在するビオチン標識抗原に結合させた。各ウェルを0.1xTBSTにて洗浄した後、0.1xTBSTによって希釀されたHRP結合抗M13抗体 (Amersham Pharmacia Biotech) を添加し、プレートを1時間インキュベーションした。各ウェルをTBSTにて洗浄後、TMB single溶液 (ZYMED) を添加し、さらに溶液の発色反応を硫酸の添加により停止させた後、各ウェルの450 nmの吸光度を測定した。

上記のファージELISAの結果、抗原をコーティングしていないプレートに対する抗原をコーティングしたプレートの発色比が2倍以上で、かつ抗原をコーティングしたプレートでの発色が0.2以上のものを抗原特異的に結合するクローンと判断した。さらに、抗原特異的に結合すると判断されたクローンに対

し、抗体断片遺伝子の塩基配列解析が行われた。

ファージELISAの結果を表1に示す。表中におけるR2はパンニング2回終了後のクローン、R3はパンニング3回終了後のクローンをそれぞれ表す。その結果、hPlexinA1、mIgA-Fc、hIL-6Rの各抗原に対して特異的に結合し、かつ配列の異なる複数のクローンが得られた。

[0104] [表1]

	hPlexinA1		mIgA-Fc		hIL-6R	
	R2	R3	R2	R3	R2	R3
評価クローン数	94	94	94	94	94	94
抗原特異的クローン数	39	75	4	34	42	92
抗原特異的クローンの配列の種類	7	4	1	2	26	9

[0105] [実施例4] PF1 L鎖をもつ各種抗原結合抗体のIgGでの結合能評価

(4-1) 取得されたPF1 L鎖を有する各種抗原（ヒトPlexinA1、マウスIgA-Fc、ヒトIL-6R）結合抗体の発現および精製

実施例3においてヒトIL-6Rに対する結合抗体として取得された抗体のうち、6RNH-2_02（重鎖、配列番号：21）、6RNH-2_37（重鎖、配列番号：22）、6RNH-3(2)_32（重鎖、配列番号：23）、6RNH-2_42（重鎖、配列番号：24）の4抗体を、ヒトPlexinA1に対する結合抗体として取得された抗体のうち、PANH-2_52（重鎖、配列番号：25）、PANH-2_68（重鎖、配列番号：26）、PANH-3_10（重鎖、配列番号：27）の3抗体を、マウスIgA-Fcに対する結合抗体として取得された抗体のうち、mIANH-2_27（重鎖、配列番号：28）、mIANH-3_79（重鎖、配列番号：29）の2抗体を、以下の方法を用いて発現して、当該抗体の精製が行われた。これら全ての抗体は、軽鎖としてPF1のL鎖（軽鎖、配列番号：67）を有する抗体である。また、比較対象として、抗IL-6R抗体であるPF1抗体（重鎖、配列番号：68；軽鎖、配列番号：67）についても、以下の方法を用いて発現し、当該抗体の精製が行われた。FreeStyle 293 Expression Medium培地（Invitrogen）に懸濁されたヒト胎児

腎細胞由来FreeStyle 293-F株 (Invitrogen) が 1.33×10^6 細胞/mLの細胞密度で6ウェルプレートの各ウェルへ3 mLずつ播種された。調製されたプラスミドは、リポフェクション法によって細胞へ導入された。 CO_2 インキュベーター (37度、8% CO_2 、90 rpm) 中で4日間培養が行われた。rProtein A Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences) を用いて当業者公知の方法を用いて、上記で得られた培養上清から抗体が精製された。分光光度計を用いて精製された抗体溶液の280 nmでの吸光度が測定された。PACE法により算出された吸光係数を用いることによって、得られた測定値から抗体濃度が算出された (Protein Science (1995) 4, 2411-2423)。

[0106] (4-2) 取得された抗体の可溶型ヒトIL-6Rに対する結合能の評価

Octet RED384(forteBI0)を用いて、(4-1)で取得された抗体 (6RNH-2_02, 6RNH-2_37, 6RNH-3(2)_32, 6RNH-2_42) の可溶型ヒトIL-6Rに対する結合活性が評価された。バッファーとしてHBS-EP+ Buffer(GE Healthcare)を用いて結合評価が行われた。

Protein G Biosensors (forteBI0)に、抗体を結合させた後、可溶型ヒトIL-6Rと120秒接触させ、バイオセンサー上の抗体と相互作用させ、引き続きバッファーに120秒接触させ、抗体・抗原の相互作用を測定した。その後、10 mMol/L Glycin-HCl, pH1.5と接触させ、バイオセンサーが再生された。測定は30°Cで行われた。得られたセンサーグラムを図4に示した。6RNH-2_02, 6RNH-2_37, 6RNH-3(2)_32, 6RNH-2_42のすべての抗体が、可溶型ヒトIL-6Rと結合することが示された。

[0107] (4-3) 取得された抗体の可溶型ヒトPlexinA1に対する結合能の評価

Octet RED384(forteBI0)を用いて、(4-1)で取得された抗体 (PANH-2_52, PANH-2_68, PANH-3_10) および、抗ヒトIL-6R抗体であるPF1抗体の、可溶型ヒトPlexinA1、可溶型ヒトIL-6Rに対する結合活性が評価された。バッファーとしてHBS-EP+ Buffer(GE Healthcare)を用いて結合評価が行われた。

Protein G Biosensors (forteBI0)に、抗体を結合させた後、可溶型ヒトPlexinA1もしくは可溶型ヒトIL-6Rと120秒接触させ、バイオセンサー上の抗体

と相互作用させ、引き続きバッファーに120秒接触させ、抗体・抗原の相互作用を測定した。その後、10mmol/L Glycin-HCl, pH1.5と接触させ、バイオセンサーが再生された。測定は30°Cで行われた。得られたセンサーグラムを図5に示した。PANH-2_52, PANH-2_68, PANH-3_10のすべての抗体が、可溶型ヒトIL-6Rと結合せず、可溶型ヒトPlexinA1に結合することが示された。

[0108] [4-4] 取得された抗体のマウスIgAに対する結合能の評価

Octet RED384(forteBI0)を用いて、(4-1)で取得された抗体 (mIANH-2_27, mIANH-3_79)、および、PF1抗体の、マウスIgA、可溶型ヒトIL-6Rに対する結合活性が評価された。バッファーとしてHBS-EP+ Buffer(GE Healthcare)を用いて結合評価が行われた。

Protein G Biosensors (forteBI0)に、抗体を結合させた後、マウスIgAもしくは可溶型ヒトIL-6Rと120秒接触させ、バイオセンサー上の抗体と相互作用させ、引き続きバッファーに120秒接触させ、抗体・抗原の相互作用を測定した。その後、10mmol/L Glycin-HCl, pH1.5と接触させ、バイオセンサーが再生された。測定は30°Cで行われた。得られたセンサーグラムを図6に示した。mIANH-2_27, mIANH-3_79のすべての抗体が、可溶型ヒトIL-6Rと結合せず、マウスIgAに結合することが示された。

[0109] [実施例5] 固定L鎖を有する、IL-6Rに結合可能なFabの取得

(5-1) 固定L鎖（同じアミノ酸配列のL鎖）を持つFabファージライブラリーの产生

実施例1に記載の方法により、抗ヒトPlexinA1抗体hPANKB2-3#135のL鎖（配列番号：30）を発現するヘルパーファージとしてM13K07TC-PAL、抗マウスIgA抗体mIANMIgL_095のL鎖（配列番号：31）を発現するヘルパーファージとしてM13K07TC-IAL、および、抗ヒトCD3抗体ヒト化CE115のL鎖であるL0000（配列番号：32）を発現するヘルパーファージとしてM13K07TC-CELを構築した。

実施例2に記載のナイーブH鎖を含むファージミドライブライバーを導入した大腸菌に、上記ヘルパーファージを感染させることにより、ナイーブH鎖と抗

PlexinA1抗体L鎖を含むFabを提示するヒト抗体ファージディスプレイライブ
ラリー（NH-PALライブラリー）、ナイーブH鎖と抗マウスIgA抗体L鎖を含むFa
bを提示するヒト抗体ファージディスプレイライブラリー（NH-IALライブラリ
ー）、ナイーブH鎖と抗CD3抗体L鎖を含むFabを提示するヒト抗体ファージデ
ィスプレイライブラリー（NH-CELライブラリー）を構築した。ファージが産
生された大腸菌の培養液に2.5 M NaCl/10%PEGを添加してファージを沈殿させ
、それをTBSにて希釀することによってファージライブラリー液を得た。

[0110] (5-2) 固定L鎖抗体ライブラリー（NH-PALライブラリー、NH-IALライブラ
リー、NH-CELライブラリー）からのIL-6Rに結合する抗体断片の取得

(5-1) で構築された固定L鎖抗体ライブラリー（NH-PALライブラリー、
NH-IALライブラリー、NH-CELライブラリー）のファージライブラリー液から
、ヒトIL-6Rに結合する抗体断片の選抜を、ヒトIL-6Rへの結合能を指標とし
て実施した。

それぞれのファージライブラリー液に終濃度4%となるようBSAを添加して、
ファージライブラリー液をブロッキングした。パンニング方法として、一般
的な方法である磁気ビーズに固定化された抗原を用いるパンニング方法が参
照された (J. Immunol. Methods. (2008) 332(1-2), 2-9、J. Immunol. Met
hods. (2001) 247(1-2), 191-203、Biotechnol. Prog. (2002) 18(2), 212-
220、Mol. Cell Proteomics (2003) 2(2), 61-69)。磁気ビーズとして、Ne
utrAvidin coated beads (Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) もし
くはStreptavidin coated beads (Dynabeads M-280 Streptavidin) が用いら
れた。具体的には、調製されたファージライブラリー液にビオチン標識抗原
(ビオチン標識hIL-6R) を加え、ファージライブラリー液と抗原を室温にて6
0分間接触させた。1回目のパンニングでは250 pmol、2回目のパンニングでは
40 pmol、3回目のパンニングでは10 pmolのビオチン標識抗原がそれぞれ用い
られた。そこにBSA溶液でブロッキングされた磁気ビーズを加え、抗原-ファ
ージ複合体と磁気ビーズを室温にて15分間結合させた。回収されたビーズは1
mLのTBST (0.1% Tween20を含むTBS) と1 mLのTBSにて洗浄された。その後、

ビーズに1 mg/mLのトリプシン溶液0.5 mLを加えて室温で15分間懸濁させた後、即座に磁気スタンドを用いてビーズを分離し、上清のファージ溶液を回収した。回収されたファージ溶液を、対数増殖期 ($OD_{600} = 0.4-0.7$) まで培養された10 mLの大腸菌株ER2738に添加し、37°Cで1時間緩やかに攪拌培養することによって、ファージを大腸菌に感染させた。感染された大腸菌は225 mm × 225 mmのプレートへ播種された。次に、播種された大腸菌を回収して培養した後、ヘルパーファージ (M13K07TC-PAL、M13K07TC-IAL, もしくはM13K07TC-CEL) を感染させ培養することにより、抗PlexinA1抗体L鎖、抗マウスIgA抗体L鎖、もしくは抗CD3抗体L鎖を含むFabを提示するファージを産生させた。培養液からファージを回収することによって、ファージライブラリー液が調製された。これを1回のパンニングとし、合計3回のパンニングが繰り返された。

[0111] (5-3) 抗原（ヒトIL-6R）に結合する抗体の、ファージELISA法によるスクリーニング

(5-2) で実施されたパンニングが2回または3回終了した後に得られた大腸菌のシングルコロニーから、常法 (Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145) に習ってファージの産生を行い、ファージ含有培養上清を回収した。その際、ヘルパーファージには用いたファージライブラリーに応じてM13K07TC-PAL、M13K07TC-IAL, もしくはM13K07TC-CELを用いた。培養上清は以下の手順でELISAに供された。

ビオチン標識抗原（ビオチン標識hIL-6R）を含む、もしくは含まない $100 \mu L$ のPBSにて、StreptaWell 96マイクロタイタープレート (Roche) を一晩コードィングした。当該プレートの各ウェルを $0.1 \times$ TBST (0.1% Tween20を含む $0.1 \times$ TBS) にて洗浄することによって抗原を除いた後、各ウェルを $250 \mu L$ の 0.02% SkimMilk- $0.1 \times$ TBS(0.02% SkimMilkを含む $0.1 \times$ TBS)にて1時間以上ブロッキングした。 0.02% SkimMilk- $0.1 \times$ TBSを除いた後、各ウェルにファージ培養上清を加え、1時間静置することによって、ファージ上に提示された抗体を各ウェルに存在するビオチン標識抗原に結合させた。各ウェルを $0.1 \times$ TBSTにて洗浄

した後、0.1xTBSTによって希釈されたHRP結合抗M13抗体（Amersham Pharmacia Biotech）を添加し、プレートを1時間インキュベーションした。各ウェルをTBSTにて洗浄後、TMB single溶液（ZYMED）を添加し、さらに溶液の発色反応を硫酸の添加により停止させた後、各ウェルの450 nmの吸光度を測定した。

上記のファージELISAの結果、抗原をコーティングしていないプレートに対する抗原をコーティングしたプレートの発色比が2倍以上で、かつ抗原をコーティングしたプレートでの発色が0.2以上のものを抗原特異的に結合するクローンと判断した。さらに、抗原特異的に結合すると判断されたクローンに対し、抗体断片遺伝子の塩基配列解析が行われた。

ファージELISAの結果を表2に示す。表中におけるR2はパンニング2回終了後のクローン、R3はパンニング3回終了後のクローンをそれぞれ表す。その結果、各々のファージライブラリーからhIL-6Rに対して特異的に結合し、かつ配列の異なる複数のクローンが得られた。

[0112] [表2]

	NH-PAL		NH-IAL		NH-CEL	
	R2	R3	R2	R3	R2	R3
評価クローン数	96	96	96	96	96	96
抗原特異的 クローン数	0	10	43	87	5	13
抗原特異的 クローンの 配列の種類	0	1	23	25	3	4

[0113] [実施例6] 固定L鎖でのヒトIL-6Rに結合可能な抗体の、IgGでの結合能評価 (6-1) ヒトCD3e(hCD3e)の調製

ヒトCD3e(hCD3e)の細胞外領域を以下のように調製した。NCBI Reference Sequence NP_000724（配列番号：33）のアミノ酸配列をもとに合成されたhCD3e遺伝子から、膜貫通領域と予想される130番目のバリン以降を除去し、代

わりにFLAG タグ配列（配列番号：13）を付加した。作製されたhCD3e（配列番号：34）をコードする遺伝子が挿入された発現ベクターが作製された。

作製された発現ベクターがFreeStyle293-F細胞（Invitrogen社）に導入され、一過性にhCD3eが発現した。得られた培養上清が20 mM Tris-HCl, pH7.4により平衡化されたQ Sepharose FFカラム（GE Healthcare社）に添加され、当該カラムの洗浄の後、塩化ナトリウムの濃度勾配による溶出が実施された。hCD3eを含む画分が10 mM リン酸ナトリウム緩衝液pH7.4により平衡化されたmacro-Prep Ceramic Hydroxyapatite Type-I, 20 μmカラム（Bio-Rad社）に添加され、当該カラムの洗浄の後、リン酸ナトリウム緩衝液の濃度勾配による溶出が実施された。hCD3eを含む画分が限外ろ過膜で濃縮された後、濃縮液がD-PBS(-)により平衡化されたSuperdex 200カラム（GE Healthcare社）に添加された。その溶出液のhCD3e画分のみを回収することにより、精製hCD3eが得られた。

[0114] (6-2) 取得された、各種固定L鎖を有するヒトIL-6R結合抗体の発現および精製

実施例5において、抗マウスIgA抗体mIANMIgL_095 のL鎖を有する、ヒトIL-6Rに対する結合抗体として取得された抗体のうち、6RmIAB3(2)_02（重鎖、配列番号：35；軽鎖、配列番号：65），6RmIAB3(2)_06（重鎖、配列番号：36；軽鎖、配列番号：65），6RmIAB3(2)_16（重鎖、配列番号：37；軽鎖、配列番号：65）の3抗体を、以下の方法を用いて発現して、培養上清が回収された。FreeStyle 293 Expression Medium培地（Invitrogen）に懸濁されたヒト胎児腎細胞由来FreeStyle 293-F株（Invitrogen）が 8.0×10^5 細胞/mLの細胞密度で96ウェルディープウェルプレートの各ウェルへ0.4mLずつ播種された。調製されたプラスミドは、リポフェクション法によって細胞へ導入された。CO₂インキュベーター（37度、8%CO₂、450 rpm）中で4日間培養が行われた。

実施例5において抗PlexinA1抗体hPANKB2-3#135のL鎖を有するヒトIL-6Rに

に対する結合抗体として取得された抗体のうち、6RPAB3_03（重鎖、配列番号：38；軽鎖、配列番号：64）の1抗体を、抗CD3抗体ヒト化CE115のL鎖を有するヒトIL-6Rに対する結合抗体として取得された抗体のうち、6RhCEB3(2)_10（重鎖、配列番号：39；軽鎖、配列番号：66）の1抗体を、以下の方針を用いて発現して、当該抗体の精製が行われた。FreeStyle 293 Expression Medium培地（Invitrogen）に懸濁されたヒト胎児腎細胞由来FreeStyle 293-F株（Invitrogen）が 1.33×10^6 細胞/mLの細胞密度で6ウェルプレートの各ウェルへ3 mLずつ播種された。調製されたプラスミドは、リポフェクション法によって細胞へ導入された。CO₂インキュベーター（37度、8%CO₂、90 rpm）中で4日間培養が行われた。rProtein A SepharoseTM Fast Flow（Amersham Biosciences）を用いて当業者公知の方法を用いて、上記で得られた培養上清から抗体が精製された。分光光度計を用いて精製された抗体溶液の280 nmでの吸光度が測定された。PACE法により算出された吸光係数を用いることによって、得られた測定値から抗体濃度が算出された（Protein Science（1995）4, 2411-2423）。

[0115] (6-3) 取得された抗PlexinA1抗体L鎖を有する抗体の、ヒトIL-6Rに対する結合能の評価

Octet RED384(forteBI0)を用いて、(6-2)で取得された抗体（6RPAB3_03）および抗PlexinA1抗体hPANKB2-3#135（重鎖、配列番号：40；軽鎖、配列番号：64）の、可溶型ヒトIL-6Rおよび可溶型ヒトPlexinA1に対する結合活性が評価された。バッファーとしてHBS-EP+ Buffer(GE Healthcare)を用いて結合評価が行われた。

Protein G Biosensors (forteBI0)に抗体を結合させた後、可溶型ヒトIL-6Rおよび可溶型ヒトPlexinA1と120秒接触させ、バイオセンサー上の抗体と相互作用させ、引き続きバッファーに120秒接触させ、抗体・抗原の相互作用を測定した。その後、10mmol/L Glycin-HCl, pH1.5と接触させ、バイオセンサーが再生された。測定は30°Cで行われた。得られたセンサーグラムを図7に示した。

6RPAB3_03抗体が、可溶型ヒトPlexinA1と結合せず、可溶型ヒトIL-6Rに結合することが示された。

[0116] (6-4) 取得された抗マウスIgA抗体L鎖を有する抗体の、ヒトIL-6Rに対する結合能の評価

Octet RED384(forteBI0)を用いて、(6-2)で取得された抗体 (6RmIAB3(2)_02, 6RmIAB3(2)_06, 6RmIAB3(2)_16) および抗マウスIgA抗体mIANM IgL_095 (重鎖、配列番号：4 1； 軽鎖、配列番号：6 5) の、可溶型ヒトIL-6RおよびマウスIgAに対する結合活性が評価された。バッファーとしてHBS-EP+ Buffer(GE Healthcare)を用いて結合評価が行われた。

Protein G Biosensors (forteBI0)に抗体を結合させた後、可溶型ヒトIL-6RおよびマウスIgAと120秒接触させ、バイオセンサー上の抗体と相互作用させ、引き続きバッファーに120秒接触させ、抗体・抗原の相互作用を測定した。その後、10mmol/L Glycin-HCl, pH1.5と接触させ、バイオセンサーが再生された。測定は30°Cで行われた。得られたセンサーグラムを図8に示した。

6RmIAB3(2)_02, 6RmIAB3(2)_06, 6RmIAB3(2)_16のすべての抗体が、マウスIgAと結合せず、可溶型ヒトIL-6Rに結合することが示された。

[0117] (6-5) 取得された抗CD3抗体L鎖を有する抗体の、ヒトIL-6Rに対する結合能の評価

Octet RED384(forteBI0)を用いて、(6-2)で取得された抗体 (6RhCEB3(2)_10) および抗CD3抗体hCE115HA/L0000(重鎖、配列番号：4 2；軽鎖、配列番号：6 6) の、可溶型ヒトIL-6RおよびヒトCD3e(hCD3e)に対する結合活性が評価された。バッファーとしてHBS-EP+ Buffer(GE Healthcare)を用いて結合評価が行われた。

Protein G Biosensors (forteBI0)に、抗体を結合させた後、可溶型ヒトIL-6RおよびヒトCD3eと120秒接触させ、バイオセンサー上の抗体と相互作用させ、引き続きバッファーに120秒接触させ、抗体・抗原の相互作用を測定した。その後、10mmol/L Glycin-HCl, pH1.5と接触させ、バイオセンサーが再生された。測定は30°Cで行われた。得られたセンサーグラムを図9に示した。

6RhCEB3(2)_10抗体が、ヒトCD3eと結合せず、可溶型ヒトIL-6Rに結合することが示された。

[0118] [実施例7] L鎖発現ファージミドベクターとH鎖発現ヘルパーファージの組合せによるFab提示ファージ産生法の確立

(7-1) H鎖-gene3融合体発現ユニットを組み込んだH鎖発現ヘルパーファージの構築

ヘルパーファージのゲノムに、プロモーター、シグナル配列、抗体H鎖遺伝子、phage gene3遺伝子などを組み込むことにより、H鎖(VHおよびCH1からなるFd)-gene3発現ヘルパーファージの構築を行った。本ヘルパーファージが感染した大腸菌からは抗体H鎖(VHおよびCH1からなるFd)-gene3の発現が可能となる。

具体的には、ヘルパーファージM13K07TCを大腸菌株ER2738へ感染させ、一晩振とう培養を行った後、感染大腸菌からヘルパーファージM13K07TCのゲノム抽出を行った (NucleoBond Xtra Midi Plus)。H鎖-gene3発現ユニットを組み込む場所として、カナマイシン耐性遺伝子 (KanR) とp15A oriの間に位置しているSacIサイトを選択した (図1)。この場所に限らず、p15A oriとM13 oriの間に位置しているSacIIサイト等への挿入でも問題ないと考えられる。上記方法にて精製したヘルパーファージM13K07TCゲノムをSacIで切断した後、0.6% アガロースゲルにて電気泳動を行い、ゲル切り出し精製 (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up system: Promega) を行うことにより、目的のDNA断片 (M13K07TC/SacI)を得た。

導入する抗体H鎖(VHおよびCH1からなるFd)として、抗ヒトIL-6R抗体であるPF1のH鎖を用いた。PF1のH鎖のアミノ酸配列を配列番号8に、塩基配列を配列番号43にそれぞれ示す。抗体H鎖(VHおよびCH1からなるFd)はリンカーペプチドを介してgene3タンパク質 (g3p) と融合している。araCリプレッサー-araBAD改変プロモーター-*malE*シグナル配列-PF1H鎖遺伝子-gene3遺伝子をin-fusion法 (In-Fusion HD Cloning Kit: Clontech) にて、M13K07TC/SacIへ挿入し、大腸菌株ER2738へエレクトロポレーション法により導入した。

araCリプレッサーの核酸配列を配列番号：44に、araBAD改変プロモーターの核酸配列を配列番号：45に、maIEシグナル配列のアミノ酸配列および核酸配列を配列番号：46および配列番号：47にそれぞれ示す。Gene3遺伝子としては、Helper phageに存在するgene3遺伝子と異なる核酸配列（配列番号48）のものを用いた。

得られた大腸菌を培養し、培養上清に2.5 M NaCl/10%PEGを添加してPEG沈殿法によりヘルパーファージを精製した。得られたヘルパーファージM13K07AG-PF1Hのタイターを一般的なプラーク形成法にて確認した。

[0119] (7-2) L鎖発現ファージミドベクターの構築

抗体L鎖を発現するためのファージミドベクターを構築した。ファージミドベクターは、プラスミドベクターにファージ粒子へのパッケージングシグナル、プロモーター、シグナル配列、抗体L鎖遺伝子などをそれぞれ機能的に挿入することにより作製した。この際、L鎖定常領域のC末端にあるCysのAlaへの置換が大腸菌におけるFab発現に有利であることが知られているので (J Biol Chem. 2003 Oct 3; 278(40): 38194-38205) 、そのような配列を用いた。構築したファージミドベクターを大腸菌株ER2738へエレクトロポレーション法により導入し、PF1 L鎖発現ファージミドベクターを保持する大腸菌ER2738/pL-PF1Lを構築した。

[0120] (7-3) L鎖発現ファージミドベクターとH鎖発現ヘルパーファージの組合せによるFab提示ファージの產生

大腸菌ER2738/pL-PF1LをOD 0.5付近まで培養した後、ヘルパーファージM13K07AG-PF1HもしくはM13K07TCを感染させた。IPTG 25uM、Arabinose 0.2%を含む培地に培地交換を実施後、30°Cで一晩培養し、培養上清を回収した。ファージが產生された大腸菌の培養液に2.5 M NaCl/10%PEGを添加してファージを沈殿させ、それをTBSにて溶解しファージ液を取得した。得られたファージのタイターを一般的なコロニー形成法にて確認した。

[0121] (7-4) ファージELISA法によるファージへのFab提示の確認

ファージELISA法により、產生されたファージのFab提示の確認および抗原

への結合能の確認を行った。StreptaWell 96マイクロタイタープレート (Roche) へGoat anti-Human Kappa Biotin抗体 (EY LABORATORIES) 、もしくはビオチン標識ヒトIL-6Rを含む100 μLのPBSを添加し、プレートをコーティングした。当該プレートの各ウェルを0.1xTBST (0.1%Tween20を含む0.1xTBS) にて洗浄することによって抗原を除いた後、当該ウェルに0.02% Skim Milk-0.1xTBS(0.02% Skim Milkを含む0.1xTBS) 250 μLを加え1時間以上ブロッキングした。0.02% Skim Milk-0.1xTBSを除いた後、各ウェルに0.02% Skim Milk-0.1xTBSにて希釈されたファージ液を加え1時間静置することによって、ファージ上に提示された抗体をGoat anti-Human Kappa Biotin抗体もしくはビオチン標識ヒトIL-6Rに結合させた。0.1xTBSTにて洗浄された後、各ウェルに0.1xTBSTにて希釈されたHRP結合抗M13抗体 (Amersham Pharmacia Biotech) を添加し1時間インキュベーションした。0.1xTBSTにて洗浄後、各ウェルにTMB single溶液 (ZYMED) を添加し、さらに硫酸を添加して溶液の発色反応を停止させた後、450 nmの吸光度を測定した。

その結果、L鎖発現ファージミドベクターとH鎖発現ヘルパーファージM13K07AG-PF1Hとを組み合わせてファージを產生させた場合にのみファージ上にFabが提示され（図10）、また、ファージ上に提示されたFabが抗原結合能を維持していることが確認された（図11）。

[0122] [実施例8] ナイーブL鎖を含むファージミドライブラリーの構築と、ナイーブL鎖および抗PlexinA1抗体H鎖を含むFabファージライブラリーの产生

(8-1) ナイーブL鎖を含むファージミドライブラリーの構築

ヒト末梢血単核球（PBMC）から調製したポリA RNAや、市販されているヒトポリA RNAなどを鋳型として、PCR法によりナイーブL鎖遺伝子が増幅された。これらをファージミドベクターへ挿入し、構築されたファージミドベクターを大腸菌株ER2738へエレクトロポレーション法により導入したところ、 6.5×10^6 程度のコロニーが得られた。

[0123] (8-2) ナイーブL鎖および抗PlexinA1抗体H鎖を含むFabファージライブラリーの产生

実施例7に記載の方法により、抗PlexinA1抗体hPANLB2-3_264のH鎖（配列番号：49）、抗PlexinA1抗体hPANLB2-3_342のH鎖（配列番号：50）、および抗PlexinA1抗体hPANLB2-3_359のH鎖（配列番号：51）を発現するヘルペーファージ（M13K07AG-hPNL264H、M13K07AG-hPNL342H、M13K07AG-hPNL359H）をそれぞれ構築した。

(8-1)に記載のナイーブL鎖を含むファージミドライブラリーを導入した大腸菌に、上記ヘルペーファージ（M13K07AG-hPNL264H、M13K07AG-hPNL342H、M13K07AG-hPNL359H）をそれぞれ感染させることにより、ナイーブL鎖と各種抗PlexinA1抗体H鎖を含むFabを提示するヒト抗体ファージディスプレイライブラリー（264H-NLライブラリー、342H-NLライブラリー、359H-NLライブラリー）を構築した。ファージが產生された大腸菌の培養液に2.5 M NaCl/10%PEGを添加してファージを沈殿させ、それをTBSにて希釀することによってファージライブラリー液を得た。

[0124] [実施例9] 抗PlexinA1抗体の抗原結合能が増強されたFabの取得

(9-1) 固定H鎖抗体ライブラリーを用いた、ヒトPlexinA1に強く結合する抗体断片の取得

実施例8で構築された固定H鎖抗体ライブラリー（264H-NLライブラリー、342H-NLライブラリー、359H-NLライブラリー）のファージライブラリー液から、ヒトPlexinA1に結合する抗体断片の選抜を、ヒトPlexinA1への結合能を指標として実施した。

それぞれのファージライブラリー液に終濃度4%となるようBSAを添加して、ファージライブラリー液をブロッキングした。パンニング方法として、一般的な方法である磁気ビーズに固定化された抗原を用いるパンニング方法が参考された（J. Immunol. Methods. (2008) 332(1-2), 2-9、J. Immunol. Methods. (2001) 247(1-2), 191-203、Biotechnol. Prog. (2002) 18(2), 212-220、Mol. Cell Proteomics (2003) 2(2), 61-69）。磁気ビーズとして、NeutrAvidin coated beads (Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) もしくはStreptavidin coated beads (Dynabeads M-280 Streptavidin) が用いら

れた。具体的には、調製されたファージライブライー液にビオチン標識抗原（ビオチン標識hPlexinA1）を加え、ファージライブライー液と抗原を室温にて60分間接触させた。1回目のパンニングでは10 pmol、2回目以降のパンニングでは1 pmolのビオチン標識抗原がそれぞれ用いられた。その後、用いたビオチン標識抗原の100倍量の未標識抗原（可溶型ヒトPlexinA1）を加え、10分間競合させた。そこにBSA溶液でブロッキングされた磁気ビーズを加え、抗原-ファージ複合体と磁気ビーズを室温にて15分間結合させた。回収されたビーズは1 mLのTBST（0.1% Tween20を含むTBS）と1 mLのTBSにて洗浄された。その後、ビーズに1 mg/mLのトリプシン溶液0.5 mLを加えて室温で15分間懸濁させた後、即座に磁気スタンドを用いてビーズを分離し、上清のファージ溶液を回収した。回収されたファージ溶液を、対数増殖期（OD₆₀₀ = 0.4-0.7）まで培養された10 mLの大腸菌株ER2738に添加し、37°Cで1時間緩やかに攪拌培養することによって、ファージを大腸菌に感染させた。感染された大腸菌は225 mm × 225 mmのプレートへ播種された。次に、播種された大腸菌を回収して培養した後、（8-2）で構築された抗PlexinA1抗体H鎖遺伝子が導入されたヘルパーファージを当該大腸菌に感染させ、培養することにより、各種抗PlexinA1抗体H鎖を含むFabを提示するファージを産生させた。培養液からファージを回収することによって、ファージライブライー液が調製された。これを1回のパンニングとし、合計4回のパンニングが繰り返された。

[0125] (9-2) 抗原（ヒトPlexinA1）に結合する抗体のファージELISA法によるスクリーニング

(9-1) で実施されたパンニングが2回、3回もしくは4回終了した後に得られた大腸菌のシングルコロニーから、常法（Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145）に習ってファージの産生を行い、ファージ含有培養上清を回収した。その際、ヘルパーファージには、用いたファージライブライーに応じてM13K07AG-hPNL264H、M13K07AG-hPNL342H、もしくはM13K07AG-hPNL359Hを用いた。培養上清は以下の手順でELISAに供された。

ビオチン標識抗原（ビオチン標識hPlexinA1）を含む、もしくは含まない10

0 μLのPBSにて、StreptaWell 96マイクロタイタープレート (Roche) を一晩コーティングした。当該プレートの各ウェルを0.1xTBST (0.1% Tween20を含む0.1xTBS) にて洗浄することによって抗原を除いた後、各ウェルを250 μLの0.02% SkimMilk-0.1xTBS(0.02% SkimMilkを含む0.1xTBS)にて1時間以上ブロッキングした。0.02% SkimMilk-0.1xTBSを除いた後、各ウェルにファージ培養上清を加え、プレートを1時間静置することによって、ファージ上に提示された抗体を各ウェルに存在するビオチン標識抗原に結合させた。各ウェルを0.1xTBSTにて洗浄した後、0.1xTBSTによって希釈されたHRP結合抗M13抗体 (Amersham Pharmacia Biotech) を添加し、プレートを1時間インキュベーションした。各ウェルをTBSTにて洗浄後、TMB single溶液 (ZYMED) を添加し、さらに溶液の発色反応を硫酸の添加により停止させた後、各ウェルの450 nmの吸光度を測定した。

上記のファージELISAの結果、抗原をコーティングしていないプレートに対する抗原をコーティングしたプレートの発色比が2倍以上で、かつ抗原をコーティングしたプレートでの発色が0.2以上のものを抗原特異的に結合するクローンと判断した。さらに、抗原特異的に結合すると判断されたクローンに対し、抗体断片遺伝子の塩基配列解析が行われた。

ファージELISAの結果を表3に示す。表中におけるR2はパンニング2回終了後のクローン、R3はパンニング3回終了後のクローン、R4はパンニング4回終了後のクローンをそれぞれ表す。その結果、各々のファージライブラリー (264H-NLライブラリー、342H-NLライブラリー、359H-NLライブラリー) から、hPlexinA1に対して特異的に結合し、かつ配列の異なる複数のクローンが得られた。

[0126]

[表3]

	264H-NL ライブラリー			342H-NL ライブラリー			359H-NL ライブラリー		
	R2	R3	R4	R2	R3	R4	R2	R3	R4
評価クローン数	96	96	96	96	96	96	96	96	96
抗原特異的 クローン数	5	25	94	38	68	92	74	65	93
抗原特異的 クローンの 配列の種類	3	18	86	36	66	71	66	57	71

[0127] [実施例10] 抗PlexinA1抗体のaffinity maturation産物の、 IgGでの結合能評価

(10-1) 取得されたヒトPlexinA1結合抗体の発現および精製

実施例9において、264H-NLライブラリーからヒトPlexinA1に対する結合抗体として取得された抗体のうち、PLR2H264#002（重鎖、配列番号：58；軽鎖、配列番号：52）、PLR4H264#061（重鎖、配列番号：58；軽鎖、配列番号：53）、PLR3H264#022（重鎖、配列番号：58；軽鎖、配列番号：54）の3抗体を、342H-NLライブラリーからヒトPlexinA1に対する結合抗体として取得された抗体のうち、PLR2H342#009（重鎖、配列番号：59；軽鎖、配列番号：55）の1抗体を、359H-NLライブラリーからヒトPlexinA1に対する結合抗体として取得された抗体のうち、PLR2H359#087（重鎖、配列番号：60；軽鎖、配列番号：56）、PLR2H359#062（重鎖、配列番号：60；軽鎖、配列番号：57）の2抗体を、以下の方法を用いて発現させて、当該抗体の精製が行われた。また、比較対象として、親抗体であるhPANLB2-3_264（重鎖、配列番号：58、軽鎖、配列番号：61）、hPANLB2-3_342（重鎖、配列番号：59、軽鎖、配列番号：62）、hPANLB2-3_359（重鎖、配列番号：60、軽鎖、配列番号：63）、についても以下の方法を用いて発現し、当該抗体の精製が行われた。FreeStyle 293 Expression Medium培地（Invitrogen）に懸濁されたヒト胎児腎細胞由来FreeStyle 293-F株（Invitrogen）が 1.33×10^6 細胞/mLの細胞密度で6ウェルプレートの各ウェルへ3 mLずつ播種された

。調製されたプラスミドは、リポフェクション法によって細胞へ導入された。CO₂インキュベーター（37度、8%CO₂、90 rpm）中で4日間培養が行われた。r Protein A Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences) を用いて当業者公知の方法を用いて、上記で得られた培養上清から抗体が精製された。分光光度計を用いて精製された抗体溶液の280 nmでの吸光度が測定された。PACE法により算出された吸光係数を用いることによって、得られた測定値から抗体濃度が算出された (Protein Science (1995) 4, 2411-2423)。

[0128] (10-2) 取得された抗PlexinA1抗体の結合能評価

(10-1) で得られた抗体の抗原に対する結合性を表面プラズモン共鳴(SPR)解析により評価した。

SPR解析においてはBiacoreT200 (GEヘルスケアジャパン社) を用いて解析を行った。Sensor Chip CM4の表面に組換え型ProteinA/G (サーモサイエンティフィック社) とAmine Coupling Kit (GEヘルスケアジャパン社) を用いて抗ヒトPlexinA1抗体を固相化した。抗原はタンパク質のC末側にFLAGタグを付加した、ヒトPlexinA1タンパク質のセマドメイン (28番目グルタミン酸-514番目セリン)を使用した。抗原の調製は以下の通り。ヒトPlexinA1のセマドメインに対応するcDNAを組み込んだ発現ベクターをFreeStyle293細胞に導入して培養後、得られた培養液を抗FLAG-M2抗体を固相化したアフィニティカラムに通し、FLAGペプチドで溶出された画分をゲルろ過精製した。得られた抗原を20 mM ACES, 150 mM NaCl, 0.05% ポリソルベート20, 1.2 mM CaCl₂, pH7.4で段階希釈し、流速30 μL/minで添加した。この測定系によりヒトPlexinA1タンパク質と抗ヒトPlexinA1抗体との解離定数 (KD) をデータ解析ソフトウェア (BIA T200 Evaluation software ver.2) を用いて計算した。結果を表4に示す。

L鎖を再選択する前の抗体と比較し、結合能が増強された抗体を取得することができた。

また、この方法の別の利用法として、結合能が増強されなかった抗体であっても、非ヒト動物由来抗体のヒト化に用いることが可能である (J Mol Biol

. 2000 Feb 25;296(3):833-49.)。非ヒト動物由来抗体のH鎖を固定し、ヒトナイーブ由来L鎖抗体ライブラリーと組み合わせ、抗原に対してパンニング操作を行うことにより、ヒト由来抗体L鎖を取得することができる。引き続き、L鎖を固定しヒトナイーブ由来H鎖抗体ライブラリーと組み合わせ、抗原に対してパンニング操作を行うことにより、ヒト由来抗体H鎖を取得することができる。このように、順次、ヒト抗体Libraryと置き換えることにより、非ヒト動物由来抗体を元としてヒト抗体を取得することが可能であることが当業者には理解されよう。

[0129] [表4]

Sample Name	KD (M)	Relative KD improvement
hPANLB2-3_264	1.73E-07	1.0 (control)
PLR2H264#002	1.38E-07	1.3
PLR4H264#061	4.10E-08	4.2
PLR3H264#022	5.69E-08	3.0
hPANLB2-3_342	3.45E-08	1.0 (control)
PLR2H342#009	1.82E-09	19.0
hPANLB2-3_359	1.35E-08	1.0 (control)
PLR2H359#087	4.62E-09	2.9
PLR2H359#062	3.93E-09	3.4

表4中、Relative KD improvement は、親抗体と比較しKD値で何倍結合能が増強したかを示した値である。各々の親抗体に対し、親和性が増強された抗体が得られた。

産業上の利用可能性

[0130] 一態様において、本発明によって、共通した第一のポリペプチドを含む複数の抗原結合分子を効率よく作製する方法が提供される。

従来のファージディスプレイ技術によっても、第一のポリペプチドの配列が固定された抗原結合分子提示ライブラリーを作製することは可能であったが、第一のポリペプチドと第二のポリペプチドの両方を同時に発現可能なバ

クテリアのライブラリーを作製することから、一度作製されたライブラリー中の第一のポリペプチドの配列を後から変更することは極めて困難であり、また、抗原結合分子提示ライブラリーの作製には通常多大な時間と労力を要するものであることから、第一のポリペプチドの配列が固定されたライブラリーを複数作製することは非常に困難であった。

一方、本発明においては、第二のポリペプチドを発現可能なバクテリアのライブラリーを一度作製すれば、ヘルパーファージに含まれる第一のポリペプチドのみを変更することによって、第一のポリペプチドの配列が固定された抗原結合分子提示ライブラリーを次々と簡便に作製することができるため、作業効率を飛躍的に高めることが可能となる。本発明は、新規なファージディスプレイ技術として極めて有用である。本発明を応用した一例として、共通したL鎖またはH鎖を含む多重特異性抗体の創出などを挙げることができる。

請求の範囲

- [請求項1] 抗原結合分子を提示するバクテリオファージを作製する方法であつて、第一のポリペプチドを発現可能なヘルパーファージを、第二のポリペプチドを発現可能なバクテリアに接触させる工程を含み、当該第一のポリペプチドと当該第二のポリペプチドが会合して当該抗原結合分子を形成することを特徴とする、方法。
- [請求項2] ヘルパーファージのゲノム中に、第一のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが挿入されている、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 第一のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドがプロモーターに機能的に連結されている、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項4] 第一のポリペプチドがファージのコートタンパク質と融合している、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項5] ヘルパーファージがM13K07である、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項6] バクテリアが第二のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項7] 第二のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドがファージミドベクターに挿入されている、請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項8] 第二のポリペプチドがファージのコートタンパク質と融合している、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項9] 抗原結合分子が抗体可変領域である、請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項10] 第一のポリペプチドおよび第二のポリペプチドが、L鎖可変領域を含むポリペプチドおよびH鎖可変領域を含むポリペプチドからなる群からそれぞれ選択され、かつ互いに異なる、請求項9に記載の方法。
- [請求項11] L鎖可変領域を含むポリペプチドがさらにL鎖定常領域を含むポリペプチドであり、かつ／または、H鎖可変領域を含むポリペプチドがさ

らにH鎖定常領域を含むポリペプチドである、請求項10に記載の方法。

[請求項12] 共通した第一のポリペプチドを含む抗原結合分子提示ライブラリーを作製する方法であって、以下の工程を含む方法：

(a) 請求項1から11のいずれか一項に記載の方法を複数回行う工程であって、当該工程において用いられる複数のバクテリアは、アミノ酸配列の異なる複数の第二のポリペプチドを発現可能なバクテリア集団であり、かつ当該工程において用いられるヘルパーファージは同じアミノ酸配列の第一のポリペプチドを発現可能なヘルパーファージである工程、および

(b) 工程(a)で作製された、抗原結合分子を提示する複数のバクテリオファージを回収する工程。

[請求項13] 請求項12に記載の方法により作製された抗原結合分子提示ライブラリー。

[請求項14] 所定の抗原に対して特異的に結合する抗原結合分子を取得する方法であって、以下の工程を含む方法：

(a) 請求項13に記載の抗原結合分子提示ライブラリーに抗原を接触させる工程、および

(b) 当該抗原結合分子提示ライブラリーの中から、当該抗原に結合する抗原結合分子を選択する工程。

[請求項15] 共通した第一のポリペプチドを含む多重特異性抗原結合分子を作製する方法であって、以下の工程を含む方法：

(a) 請求項14に記載の方法を複数の抗原に対して行う工程、および

(b) 工程(a)で取得された複数の抗原結合分子に含まれる、複数の同じアミノ酸配列の第一のポリペプチドおよび複数の異なるアミノ酸配列の第二のポリペプチドを用いて、多重特異性抗原結合分子を作製する工程であって、当該複数の第二のポリペプチドの各々に当該第一

のポリペプチドが会合して、当該複数の抗原に対して特異的に結合する当該複数の抗原結合分子を形成することを特徴とする工程。

[請求項16] 共通した第一のポリペプチドを含む多重特異性抗原結合分子を作製する方法であって、以下の工程を含む方法：

- (a) 請求項14に記載の方法を複数の抗原に対して行う工程、
- (b) 工程(a)で取得された複数の抗原結合分子に含まれる、複数の同じアミノ酸配列の第一のポリペプチドおよび複数の異なるアミノ酸配列の第二のポリペプチドについて、当該第一のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよび当該複数の第二のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをそれぞれ調製する工程、
- (c) 工程(b)で調製された各ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入する工程、および
- (d) 工程(c)の宿主細胞を培養し、多重特異性抗原結合分子を回収する工程であって、当該複数の第二のポリペプチドの各々に当該第一のポリペプチドが会合して、当該複数の抗原に対して特異的に結合する当該複数の抗原結合分子を形成することを特徴とする工程。

[請求項17] 多重特異性抗原結合分子が二重特異性抗原結合分子である、請求項15または16に記載の方法。

[請求項18] 抗原結合分子の製造方法であって、以下の工程を含む方法：

- (a) 所定の抗原に対して特異的に結合できる、第一のポリペプチドおよび第二のポリペプチドが会合された、参照となる抗原結合分子（親抗原結合分子）の第一のポリペプチドと同じアミノ酸配列の第一のポリペプチドを発現可能なヘルパーファージを、親抗原結合分子の第二のポリペプチドと異なるアミノ酸配列の第二のポリペプチドをそれぞれ発現可能なバクテリア集団に接触させて、共通した第一のポリペプチドと、アミノ酸配列の異なる第二のポリペプチドとがそれぞれ会合された、抗原結合分子（子供抗原結合分子）を提示する複数のバクテリオファージを含む、抗原結合分子提示ライブラリーを作製する工

程、および

(b) 工程(a)で作製された抗原結合分子提示ライブラリーに前記抗原を接触させて、前記抗原に対して特異的に結合できる子供抗原結合分子を選択する工程。

[請求項19]

請求項18に記載の方法であって、以下の工程をさらに含む方法：

(d) 請求項18に記載の工程(b)で得られた子供抗原結合分子の第二のポリペプチドと同じアミノ酸配列の第二のポリペプチドを発現可能なヘルパーファージを、子供抗原結合分子の第一のポリペプチドと異なるアミノ酸配列の第一のポリペプチドをそれぞれ発現可能なバクテリア集団に接触させて、共通した第二のポリペプチドと、アミノ酸配列の異なる第一のポリペプチドとがそれぞれ会合された、抗原結合分子（孫抗原結合分子）を提示する複数のバクテリオファージを含む、抗原結合分子提示ライブラリーを作製する工程、および

(e) 工程(d)で作製された抗原結合分子提示ライブラリーに前記抗原を接触させて、前記抗原に対して特異的に結合できる孫抗原結合分子を選択する工程。

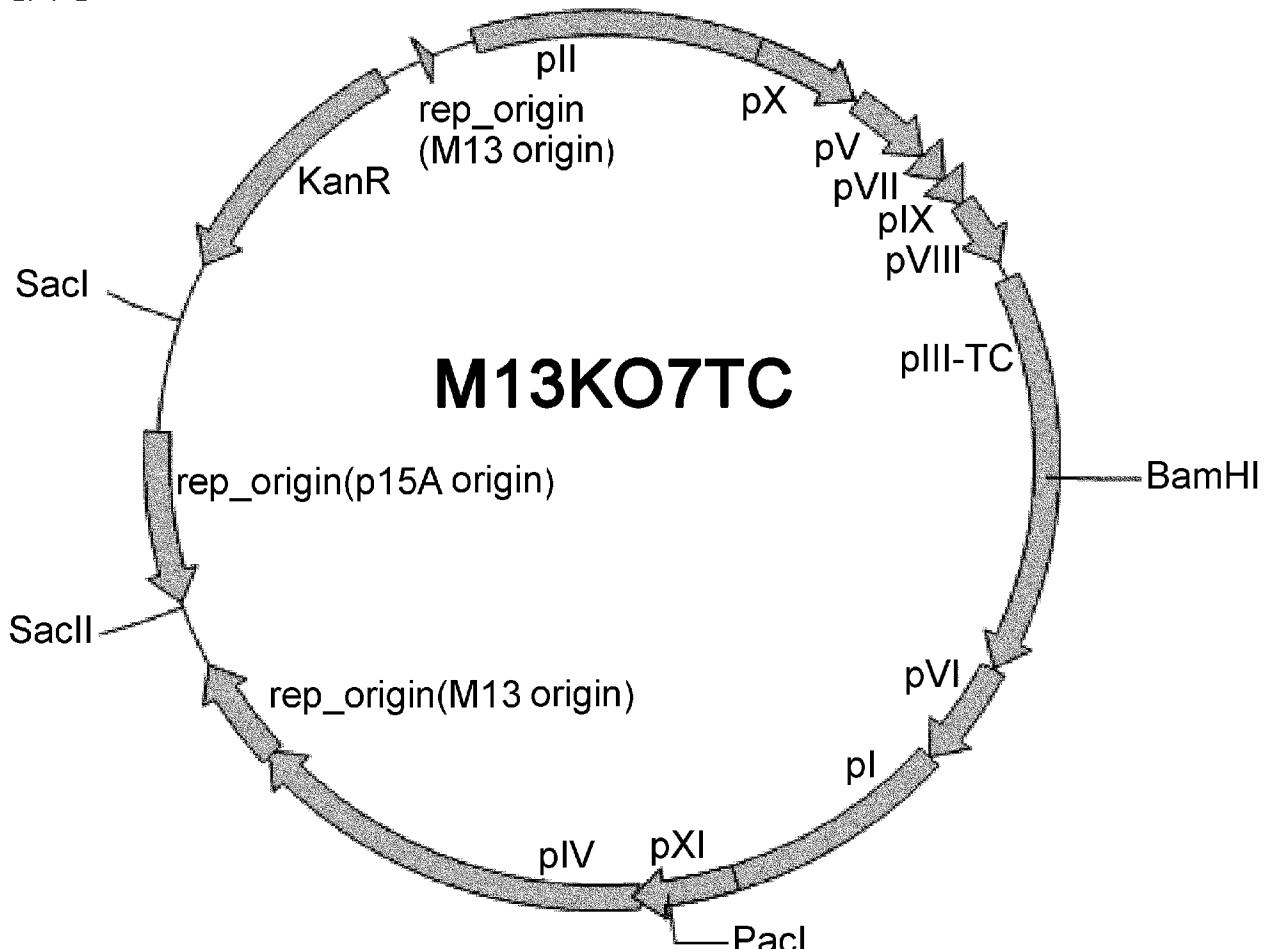
[請求項20]

改変されたヘルパーファージおよび当該ヘルパーファージが感染可能なバクテリアの組合せであって、当該ヘルパーファージは、第一のポリペプチドを発現可能なヘルパーファージであり、かつ当該バクテリアは、第二のポリペプチドを発現可能なバクテリアであって、当該第一のポリペプチドと当該第二のポリペプチドが会合して、抗原結合分子を形成することを特徴とする、組合せ。

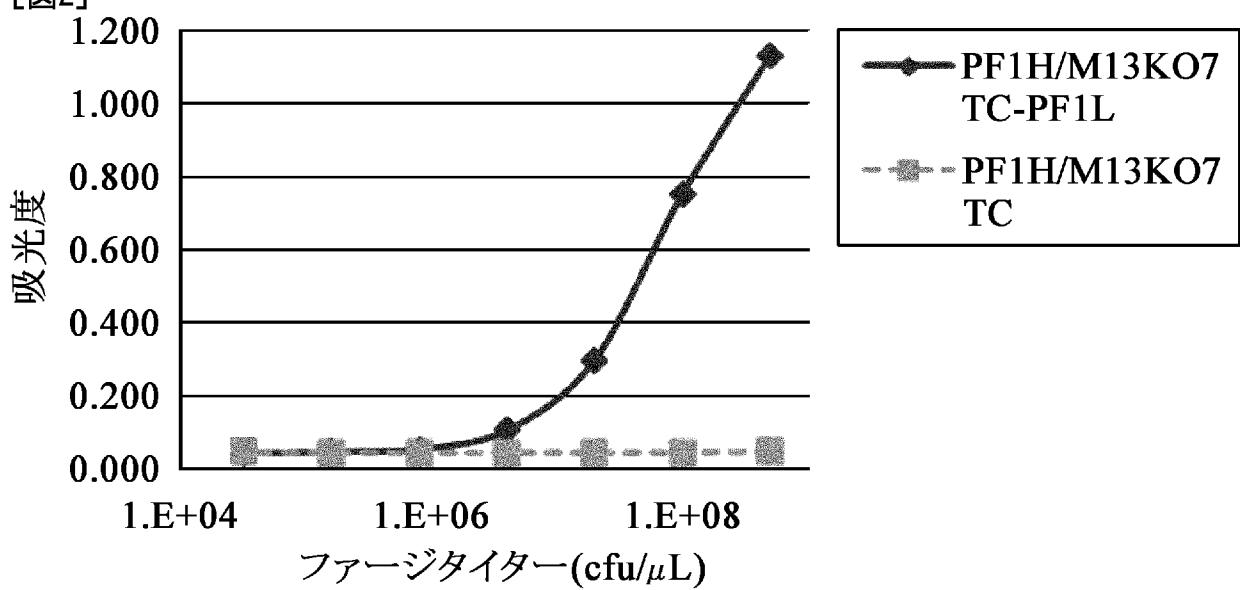
[請求項21]

あるポリペプチドを発現可能な改変されたヘルパーファージであって、当該ポリペプチドが、会合して抗原結合分子を形成することを特徴とする二本のポリペプチドのいずれか一方である、ヘルパーファージ。

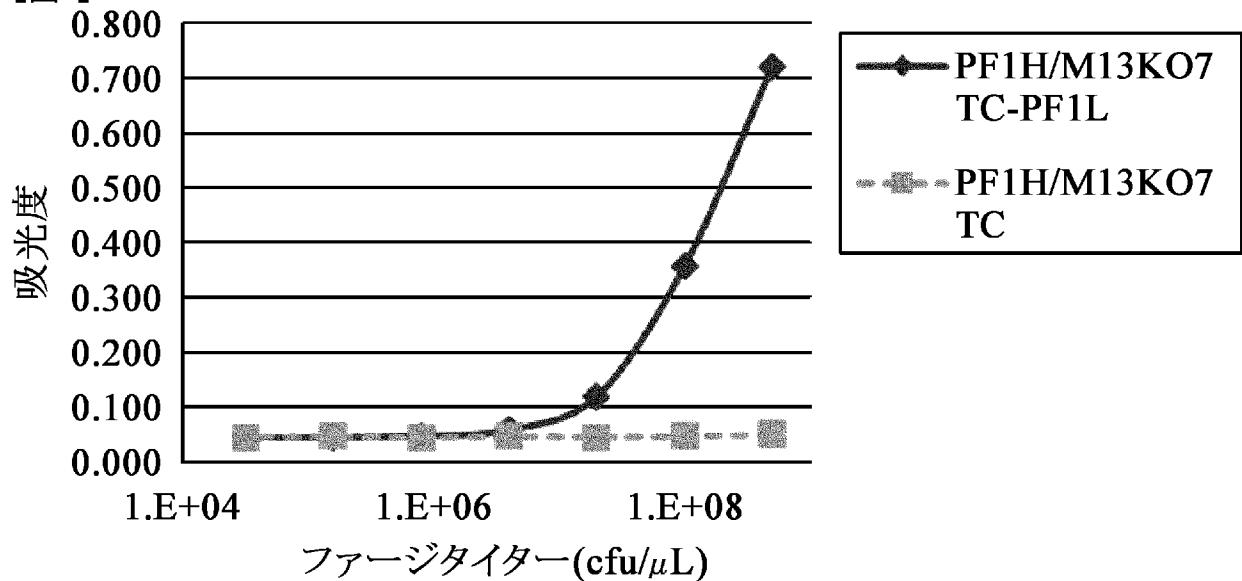
[図1]



[図2]

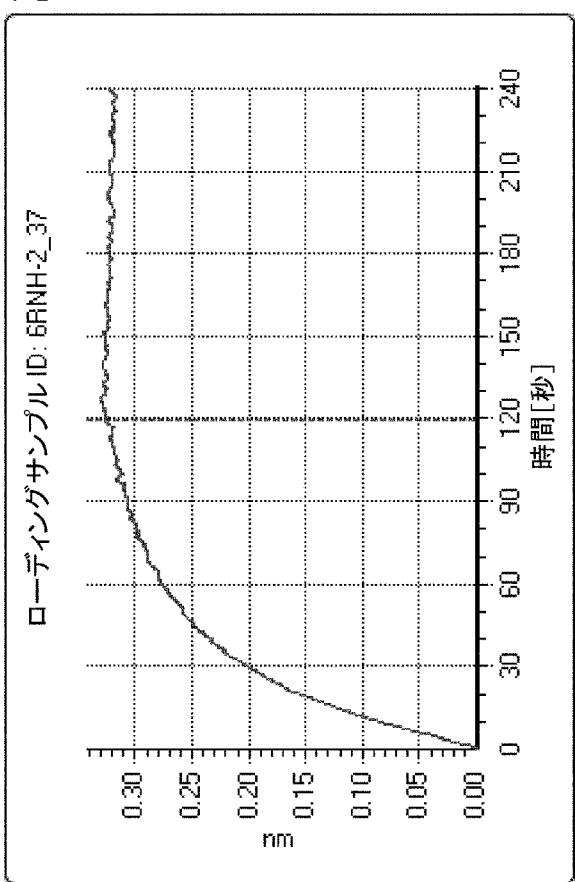


[図3]

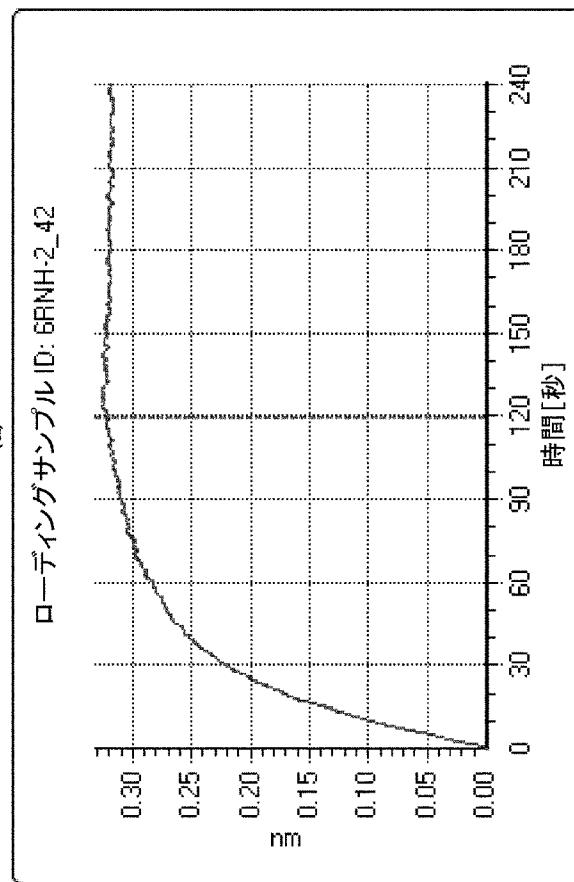


[図4]

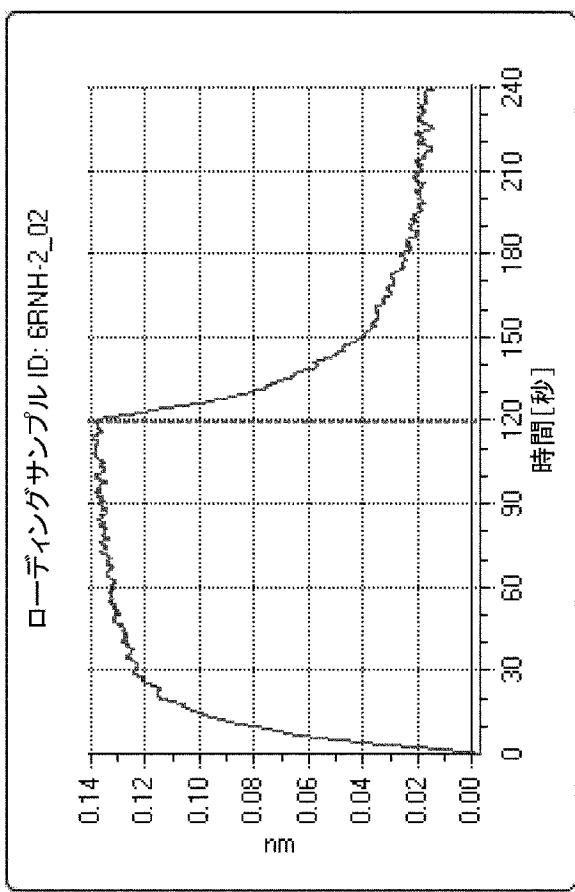
(b)



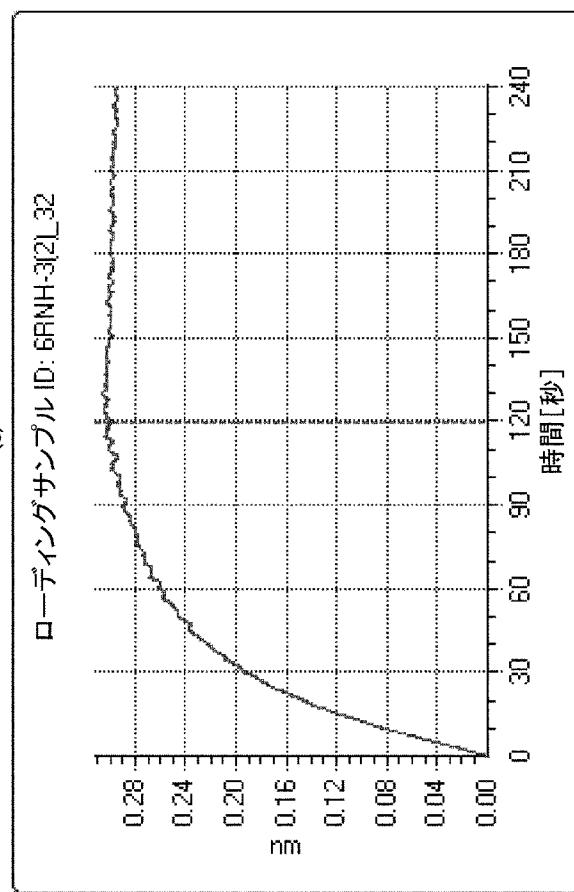
(d)



(a)

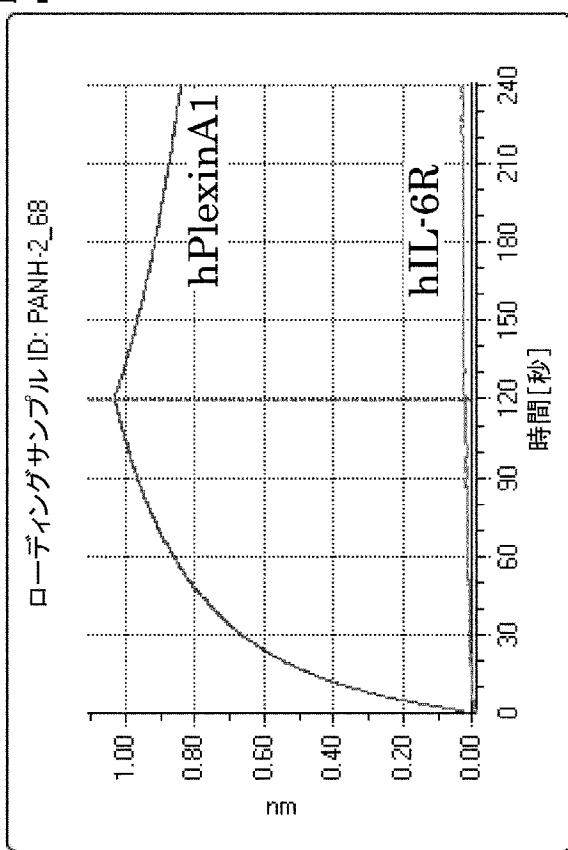


(c)

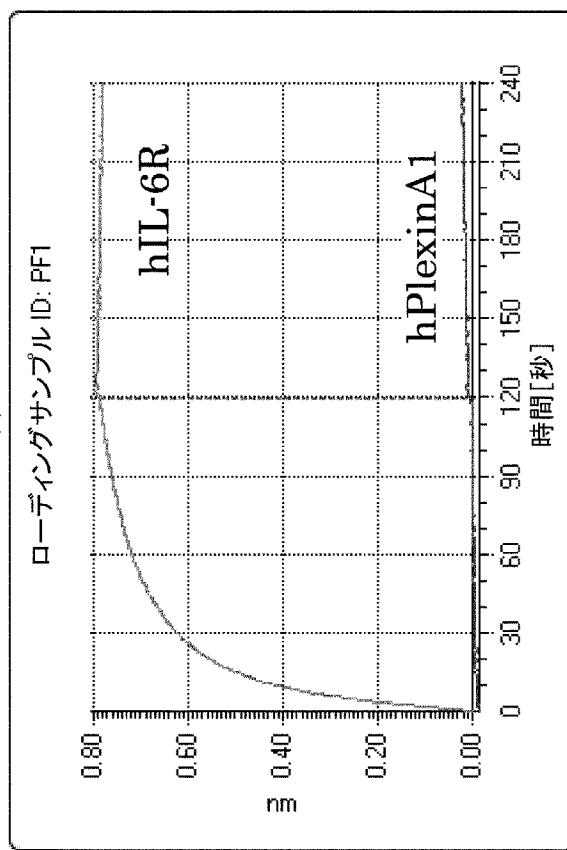


[図5]

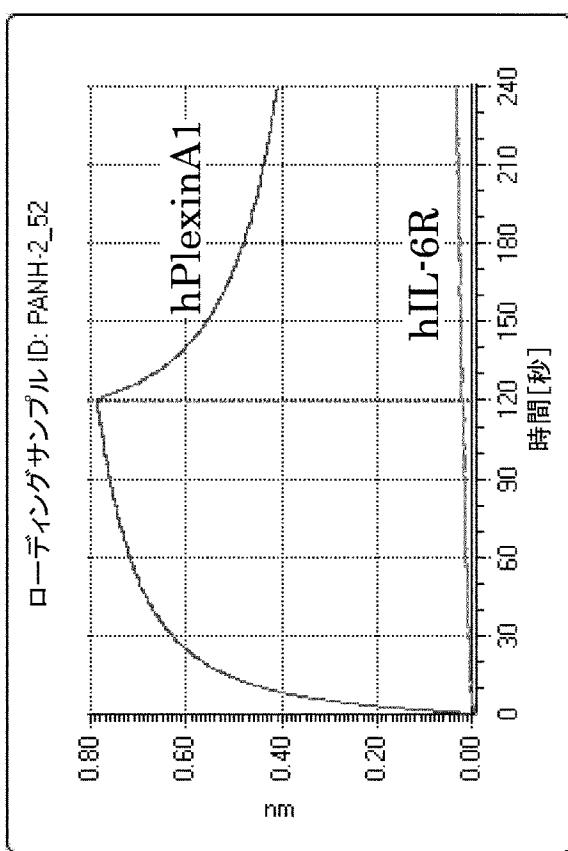
(b)



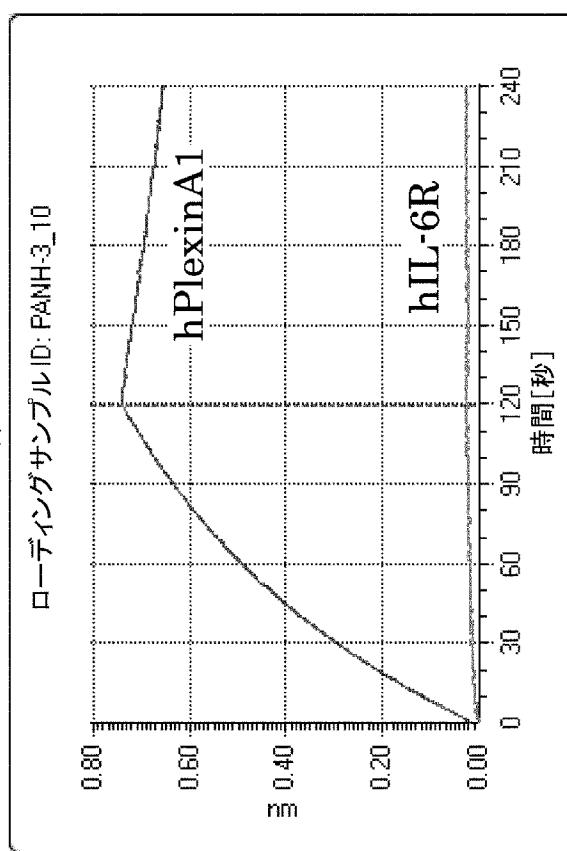
(d)



(a)

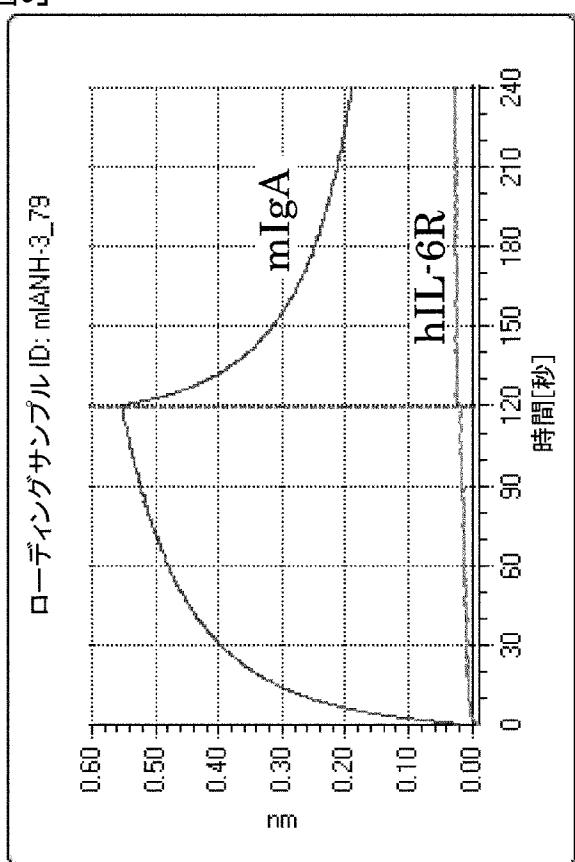


(c)

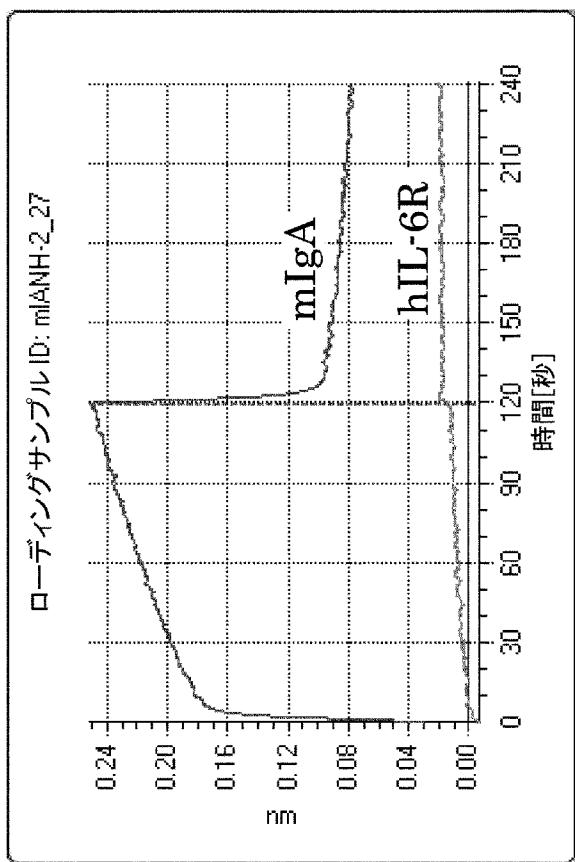


[図6]

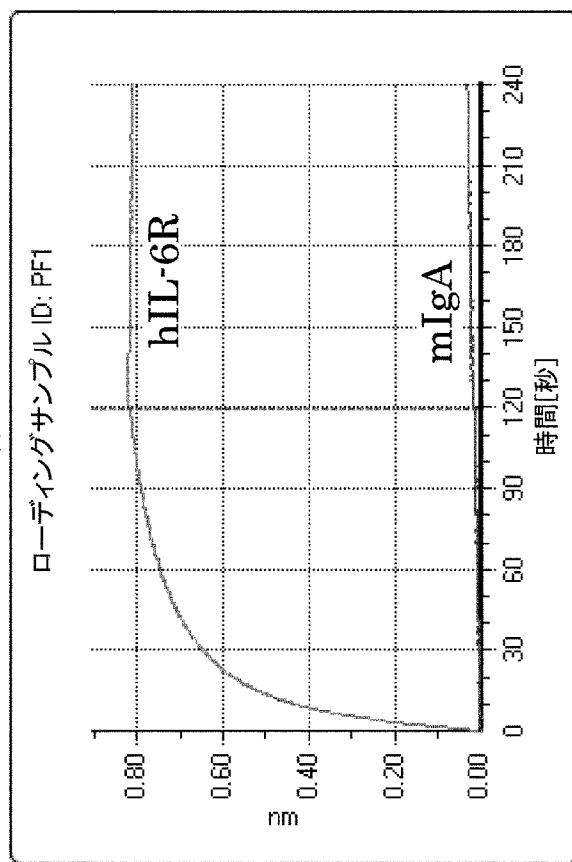
(b)



(a)

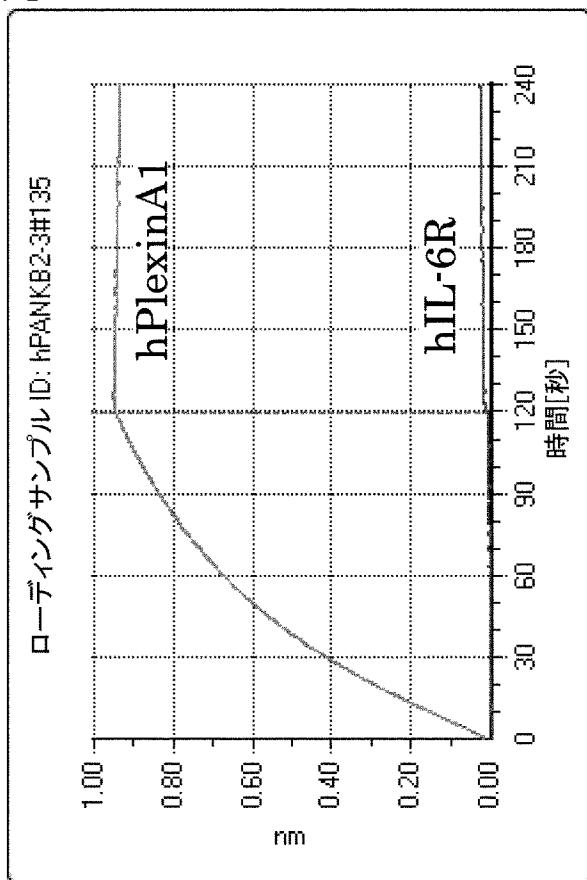


(c)

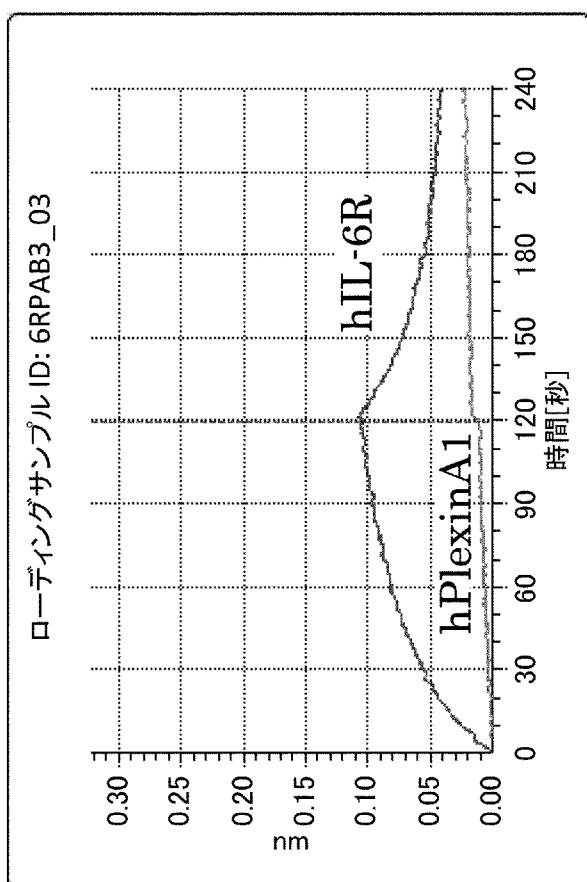


[図7]

(b)

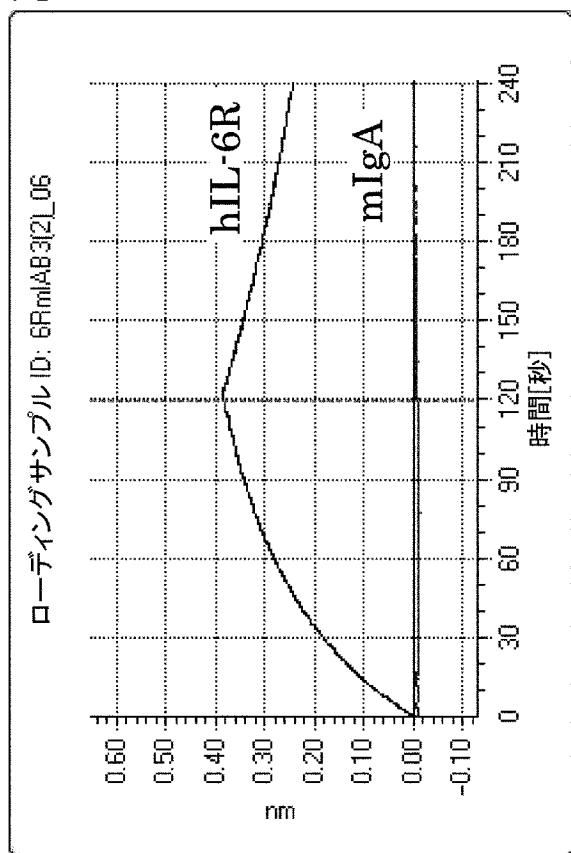


(a)

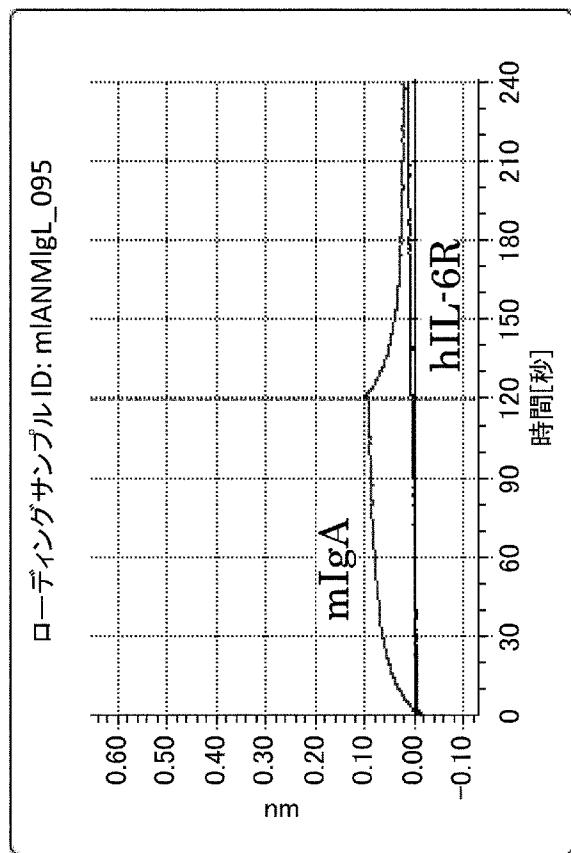


[図8]

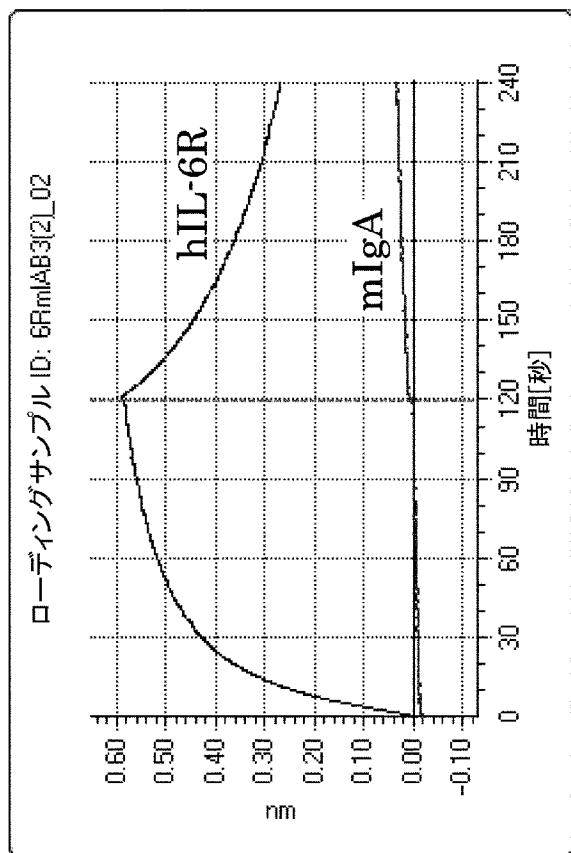
(b)



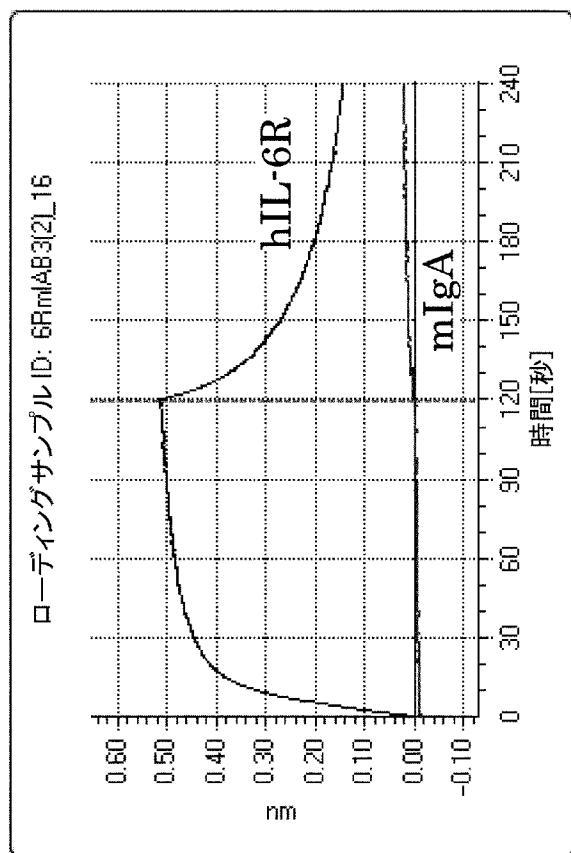
(d)



(a)

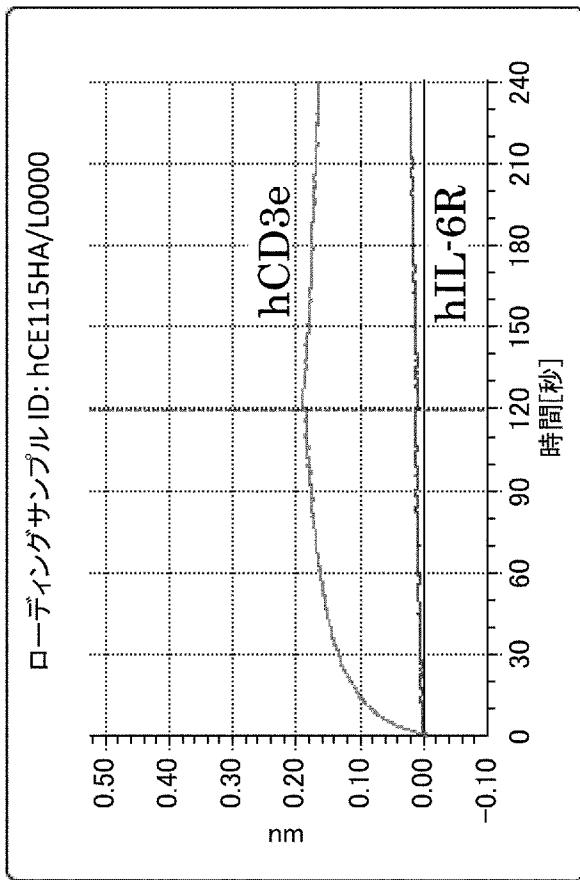


(c)

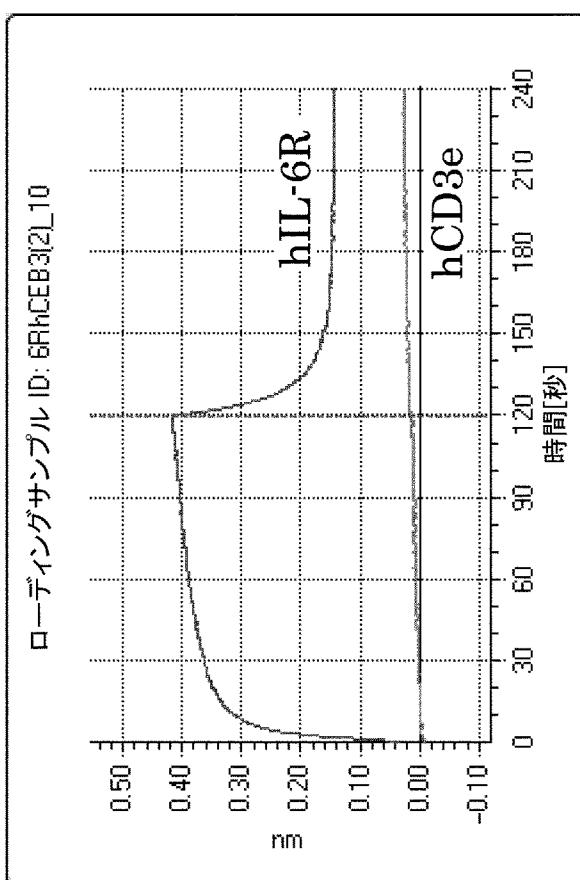


[図9]

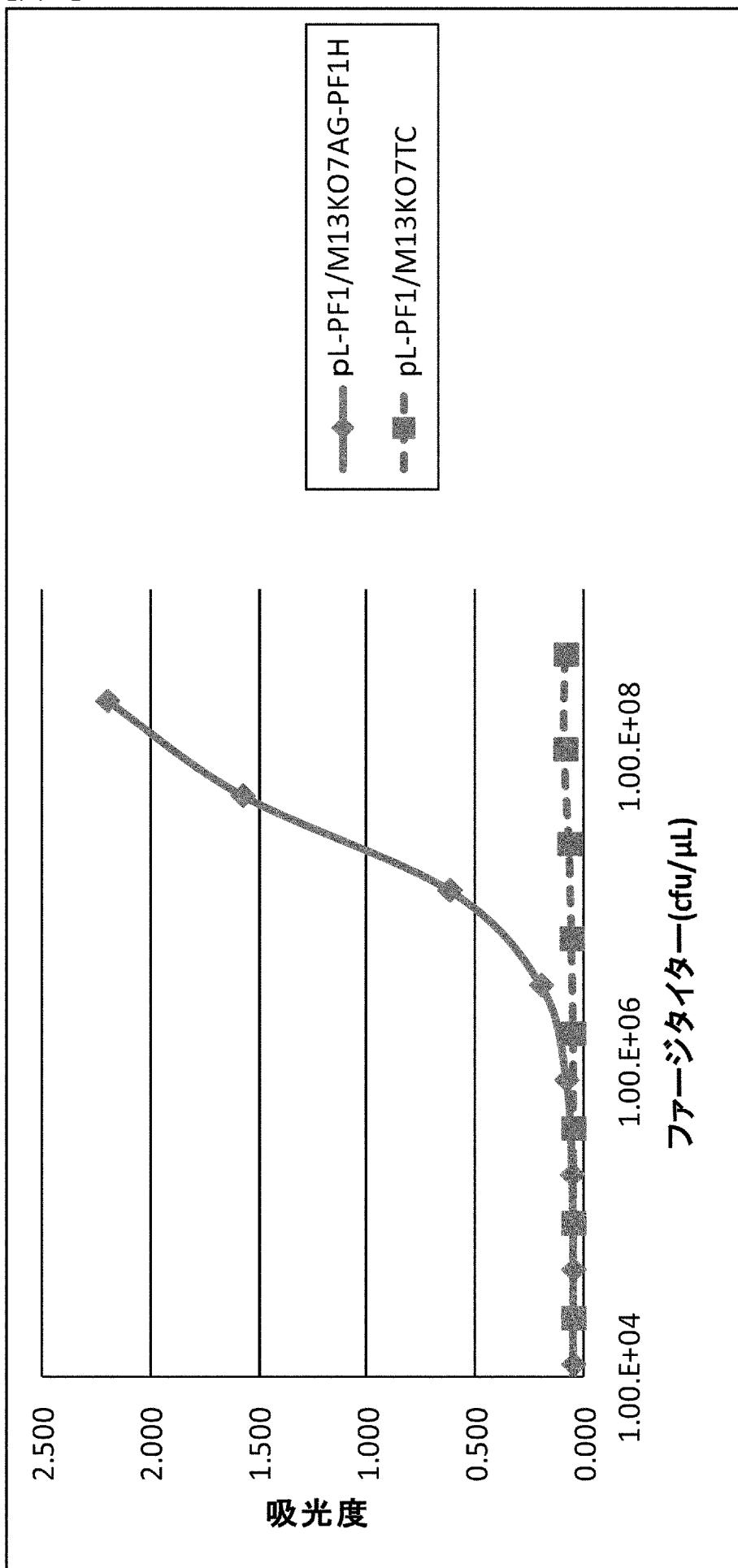
(b)



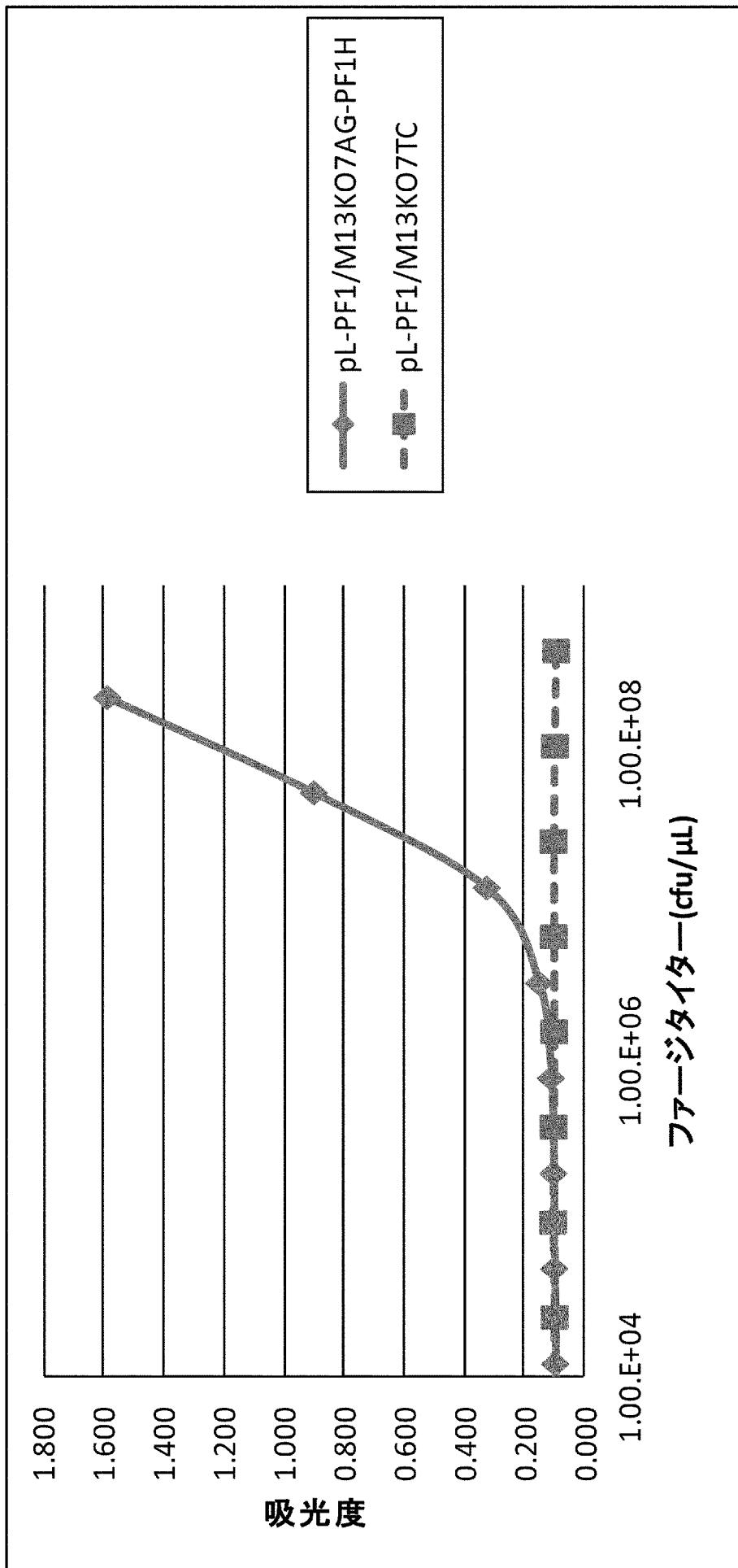
(a)



[図10]



[図11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/076001

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N7/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N1/00-7/08, C12N15/00-15/90, C12P1/00-41/00

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	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

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

CAPLUS/REGISTRY/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	WO 2004/065611 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 05 August 2004 (05.08.2004), entire text (particularly, claims; page 15, lines 8 to 10; page 16, lines 10 to 15) & JP 4477579 B & US 2006/0159673 A1 & EP 1605058 A1 & DE 602004021095 D & AT 431423 T	1-21
A	WO 2001/062907 A1 (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.), 30 August 2001 (30.08.2001), entire text (particularly, claims; page 35, lines 7 to 11) & JP 4656478 B & JP 2011-87586 A & US 8101553 B1 & EP 1264885 A1 & AU 3412501 A	1-21

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
11 December, 2014 (11.12.14)

Date of mailing of the international search report
22 December, 2014 (22.12.14)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12N7/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12N1/00-7/08, C12N15/00-15/90, C12P1/00-41/00

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	1971-2014年
日本国実用新案登録公報	1996-2014年
日本国登録実用新案公報	1994-2014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）

Cplus/REGISTRY/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	WO 2004/065611 A1 (中外製薬株式会社) 2004.08.05, 全文 (特に請求の範囲, 第15頁8-10行目, 第16頁第10-15行目参照) & JP 4477579 B & US 2006/0159673 A1 & EP 1605058 A1 & DE 602004021095 D & AT 431423 T	1-21
A	WO 2001/062907 A1 (株式会社医学生物学研究所) 2001.08.30, 全文 (特に請求の範囲, 第35頁第7-11行目参照) & JP 4656478 B & JP 2011-87586 A & US 8101553 B1 & EP 1264885 A1 & AU 3412501 A	1-21

□ 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」国際出願目前で、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 11.12.2014	国際調査報告の発送日 22.12.2014
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/JP） 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） 一宮 里枝 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 4B 3441