(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017 年 5 月 18 日(18.05.2017)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2017/082214 A1

(51) 国際特許分類:
C12Q 1/70 (2006.01)　*C07K 16/42* (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)　*C12N 15/09* (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)　*C12P 21/08* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2016/082988

(22) 国際出願日: 2016 年 11 月 7 日(07.11.2016)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2015-219765 2015 年 11 月 9 日(09.11.2015) JP
特願 2016-024016 2016 年 2 月 10 日(10.02.2016) JP

(71) 出願人: 国立大学法人京都工芸繊維大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KYOTO INSTITUTE OF TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒6068585 京都府京都市左京区松ヶ崎橋上町１番地 Kyoto (JP).

(72) 発明者: 熊田 陽一(KUMADA, Yoichi); 〒6068585 京都府京都市左京区松ヶ崎橋上町１番地 国立大学法人京都工芸繊維大学内 Kyoto (JP). 長谷川 祐也(HASEGAWA, Yuya); 〒6068585 京都府京都市左京区松ヶ崎橋上町１番地 国立大学法人京都工芸繊維大学内 Kyoto (JP). 内村 誠一(UCHIMURA, Seiichi); 〒6711283 兵庫県姫路市網干区新在家１２３９ 株式会社ダイセル内 Hyogo (JP).

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

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

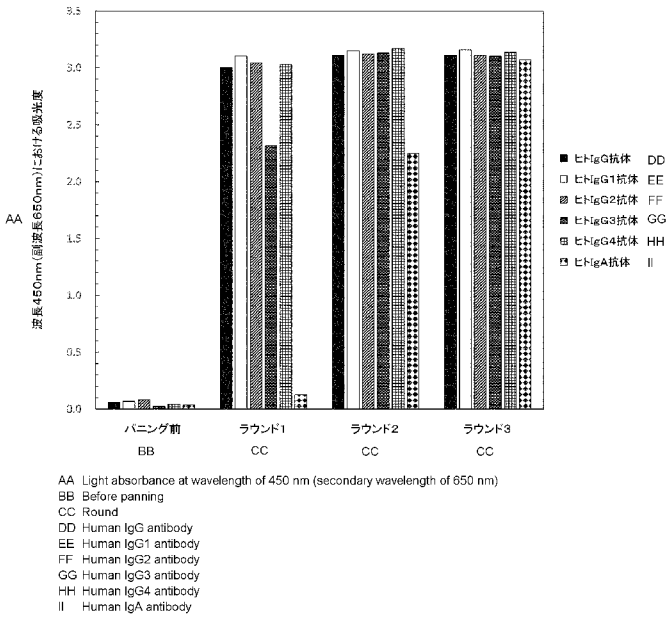
(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,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

[続葉有]

(54) **Title**: SCREENING METHOD FOR SINGLE-CHAIN ANTIBODIES, AND SINGLE-CHAIN ANTIBODIES

(54) 発明の名称 : 単鎖抗体のスクリーニング方法及び単鎖抗体

[図4]



AA Light absorbance at wavelength of 450 nm (secondary wavelength of 650 nm)
BB Before panning
CC Round
DD Human IgG antibody
EE Human IgG1 antibody
FF Human IgG2 antibody
GG Human IgG3 antibody
HH Human IgG4 antibody
II Human IgA antibody

(57) **Abstract**: The present invention addresses the problem of providing: a screening method for single-chain antibodies having an extremely large capacity to bind with antigens, said method having excellent separation efficiency; and single-chain antibodies obtained using said screening method. This problem is solved by a screening method for single-chain antibodies that bind to antigens, said method comprising a step in which antigens bound to multilamellar liposomes are prepared, a step in which a phage library that displays single-chain antibodies is prepared, and a step in which phages displaying single-chain antibodies that bind to the antigens bound to the multilamellar liposomes are selected from the phage library.

(57) 要約: 本発明の課題は、分離効率に優れ、抗原との結合能が極めて大きい単鎖抗体のスクリーニング方法の提供、及び、該スクリーニング法により取得された単鎖抗体の提供である。該課題を、多重膜リポソームに結合した抗原を準備する工程、単鎖抗体を提示するファージライブラリを準備する工程、及び前記ファージライブラリから、前記多重膜リポソームに結合した抗原に結合する単鎖抗体を提示するファージを選択する工程を含む、抗原に結合する単鎖抗体のスクリーニング方法により解決する。

WO 2017/082214 A1

OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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)）

明　細　書

発明の名称 ： 単鎖抗体のスクリーニング方法及び単鎖抗体

技術分野

[0001] 本発明は、単鎖抗体のスクリーニング方法及び単鎖抗体に関する。

背景技術

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

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

[0004] このように、抗体ライブラリを用いたパニングによる抗体医薬の候補となる抗体を取得する方法等が知られている。しかし、当該技術分野においては、抗原とファージとを結合する際には、抗原をポリスチレン製のチューブやプレートに固定することが通常であり、ブロッキングの操作が必要であるこ

とや、チューブ等に吸着したタンパク質が変性してしまうことがあった。その結果、ファージライブラリの中には、ブロッキングに用いたタンパク質や変性したタンパク質と結合するものが生じ、目的とする抗原以外の抗原に結合するファージが取得されてしまうという問題があった。

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

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開２０１５－１４５３６６号公報

特許文献2：特開２０１５－０９７４９６号公報

特許文献3：特表平９－５０６５０８号公報

非特許文献

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

発明の概要

発明が解決しようとする課題

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

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、ファージディスプレイ法により調製した抗体ライブラリを用いてパニングにより目的の抗体を取得する際に、従来のように、抗原をチューブ等に固定する方法を用いた場合に生じる、目的とする抗原以外の抗原

に結合するファージが取得されやすいとの問題を、抗原を多重膜リポソームに結合させるという方法で解決できることを見出した。本発明は以下に示すとおりである。

[0010] 〔１〕

多重膜リポソームに結合した抗原を準備する工程、

単鎖抗体を提示するファージライブラリを準備する工程、及び

前記ファージライブラリから、前記多重膜リポソームに結合した抗原に結合する単鎖抗体を提示するファージを選択する工程

を含む、抗原に結合する単鎖抗体のスクリーニング方法。

〔２〕

前記単鎖抗体が前記抗原に対して１．５×１０$^{-2}$ｓ$^{-1}$以下の解離速度定数を有する、〔１〕に記載の方法。

〔３〕

前記単鎖抗体がウサギ由来である、〔１〕又は〔２〕に記載の方法。

〔４〕

前記抗原がタンパク質である、〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の方法。

〔５〕

前記タンパク質が抗体である、〔４〕に記載の方法。

〔６〕

前記抗体がヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体又はヒト血清由来ＩｇＡポリクローナル抗体である、〔５〕に記載の方法。

〔７〕

前記単鎖抗体がヒト由来抗体のＬ鎖に結合する単鎖抗体である、〔５〕又は〔６〕に記載の方法。

〔８〕

前記タンパク質がエクソソーム由来タンパク質を含む、〔４〕に記載の方法。

〔９〕

前記タンパク質が、Ｓｆ９細胞株由来ＣＤ９のExtracellular Domain 2 （ＥＣ２）部分のみとヒト抗体のＦｃドメインとの融合タンパク質である、〔８〕に記載の方法。

〔１０〕

前記タンパク質がウイルス由来タンパク質である、〔４〕に記載の方法。

〔１１〕

前記ウイルス由来タンパク質がインフルエンザウイルス由来タンパク質である、〔１０〕に記載の方法。

〔１２〕

前記インフルエンザウイルス由来タンパク質がＢ型インフルエンザウイルス由来タンパク質である、〔１１〕に記載の方法。

〔１３〕

前記Ｂ型インフルエンザウイルス由来タンパク質がＢ型インフルエンザウイルス由来Nucleotide-binding Protein である、〔１２〕に記載の方法。

〔１４〕

前記タンパク質が炎症性タンパク質である、〔４〕に記載の方法。

〔１５〕

前記炎症性タンパク質がヒト由来炎症性タンパク質C-reactive Protein (CRP)である、〔１４〕に記載の方法。

〔１６〕

〔１〕～〔１５〕のいずれかに記載のスクリーニング方法によりスクリーニングする工程、

スクリーニングされた単鎖抗体のアミノ酸配列を決定する工程、

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

作成されたＤＮＡ配列を宿主細胞で発現させる工程

を含む、抗体の製造方法。

〔１７〕

抗体をコードするＤＮＡ配列がヒト化抗体をコードする〔１６〕に記載の製造方法。

〔１８〕

ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体に対して３．０×１０$^{-8}$M以下の解離定数を有する単鎖抗体。

〔１９〕

さらに、ヒト血清由来ＩｇＡポリクローナル抗体に結合する、〔１８〕に記載の単鎖抗体。

〔２０〕

ヒト血清由来ＩｇＡポリクローナル抗体に対して１．０×１０$^{-3}$ｓ$^{-1}$以下の解離速度定数を有する単鎖抗体。

〔２１〕

ヒト由来抗体のＬ鎖に対して１．０×１０$^{-3}$ｓ$^{-1}$以下の解離速度定数を有する単鎖抗体。

〔２２〕

エクソソーム由来タンパク質を含むタンパク質に対して８．０×１０$^{-3}$ｓ$^{-1}$以下の解離速度定数を有する単鎖抗体。

〔２３〕

前記タンパク質が、Ｓｆ９細胞株由来ＣＤ９のExtracellular Domain 2 （ＥＣ２）部分のみとヒト抗体のＦｃドメインとの融合タンパク質である、〔２２〕に記載の単鎖抗体。

〔２４〕

ウイルス由来タンパク質に対して１．０×１０$^{-2}$ｓ$^{-1}$以下の解離速度定数を有する単鎖抗体。

〔２５〕

前記ウイルス由来タンパク質がインフルエンザウイルス由来タンパク質である、〔２４〕に記載の単鎖抗体。

〔２６〕

前記インフルエンザウイルス由来タンパク質がＢ型インフルエンザウイルス由来タンパク質である、〔２５〕に記載の鎖抗体。

〔２７〕

前記Ｂ型インフルエンザウイルス由来タンパク質がＢ型インフルエンザウイルス由来Nucleotide-binding Proteinである、〔２６〕に記載の単鎖抗体。

〔２８〕

炎症性タンパク質に対して１．０×１０$^{-2}$ｓ$^{-1}$以下の解離速度定数を有する単鎖抗体。

〔２９〕

前記炎症性タンパク質がC-reactive Protein (CRP)である、〔２８〕に記載の単鎖抗体。

発明の効果

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

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

図面の簡単な説明

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

[図2]実施例２及び比較例２におけるパニング前、ラウンド１終了時、ラウン

ド２終了時、ラウンド３終了時におけるファージ数を示したグラフである。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

すグラフである。

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

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

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

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

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

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

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

[図10]実施例８における、破過曲線である。

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

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

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

光度を示すグラフである。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[図17-8]実施例１０における、ラウンド１終了時に得られた共通クローンの

数を示す表である。

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

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

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

[図19]実施例１２におけるパニング前、ラウンド１終了時、ラウンド２終了時、ラウンド３終了時、ラウンド４終了時におけるファージ数を示したグラフである。

[図20]実施例１２におけるラウンド１終了時、ラウンド２終了時、ラウンド３終了時、ラウンド４終了時における各ファージ数を、それぞれパニング前のファージ数で除した回収率（％）を示したグラフである。

[図21]実施例１３の抗原結合活性評価の結果を示すグラフである。

[図22-1]実施例１３の抗原結合活性評価の結果を示すグラフである。

[図22-2]実施例１３の抗原結合活性評価の結果を示すグラフである。

[図23]実施例１４におけるパニング前、ラウンド１終了時、ラウンド２終了時、ラウンド３終了時、ラウンド４終了時におけるファージ数を示したグラフである。

[図24]実施例１４におけるラウンド１終了時、ラウンド２終了時、ラウンド３終了時、ラウンド４終了時における各ファージ数を、それぞれパニング前のファージ数で除した回収率（％）を示したグラフである。

[図25]実施例１６におけるパニング前、ラウンド１終了時、ラウンド２終了時、ラウンド３終了時におけるファージ数を示したグラフである。

[図26]実施例１６におけるラウンド１終了時、ラウンド２終了時、ラウンド３終了時における各ファージ数を、それぞれパニング前のファージ数で除した回収率（％）を示したグラフである。

発明を実施するための形態

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

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

[0015] ＜１．第一の発明＞

本発明の第一の発明は、次の第一の実施態様および第二の実施態様を含む。

第一の実施態様：多重膜リポソームに結合した抗原を準備する工程、単鎖抗体を提示するファージライブラリを準備する工程、及び前記ファージライブラリから、前記多重膜リポソームに結合した抗原に結合する単鎖抗体を提示するファージを選択する工程を含む、抗原に結合する単鎖抗体のスクリーニング方法。

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

[0016] ＜１－１．第一の発明における第一の実施態様＞

本発明の第一の発明における第一の実施態様は、多重膜リポソームに結合した抗原を準備する工程、単鎖抗体を提示するファージライブラリを準備する工程、及び前記ファージライブラリから、前記多重膜リポソームに結合した抗原に結合する単鎖抗体を提示するファージを選択する工程を含む、抗原

に結合する単鎖抗体のスクリーニング方法である。

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

[0018] ＜（１）多重膜リポソームに結合した抗原を準備する工程＞

［多重膜リポソーム（ＭＬＶｓ）］

多重膜リポソームとしては、抗原を結合できるのであれば特に制限はない。例えば、Journal of Biotechnology 131 (2007) 144-149に記載されるような公知の方法に従って作製することができる。具体的には、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、リン酸ジセチル（ＤＣＰ）、及びＮ－（４－（ｐ－マレイミドフェニル）ブチリル）ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（ＭＰＢ－ＤＰＰＥ）を適量水和するなどして作製できる。

[0019] このとき、水和しただけでは多重膜リポソームと単膜リポソームが混合した状態であることが多いため、遠心分離により多重膜リポソームを分離して用いることが好ましい。遠心分離の条件としては、多重膜リポソームを分離できるのであれば特に制限はない。例えば、２５℃で２分、２０，０００ｇで遠心分離することが挙げられる。

[0020] ［抗原］

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

[0021] 抗原の生物種は特に制限されず、得られる単鎖抗体の用途に従って適宜選択できる。例えば、哺乳動物、昆虫細胞、ウイルスなどが挙げられる。

[0022] 哺乳動物としては、ヒト、ラット、マウス、ウサギ、ニワトリ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、サルなどが挙げられ、好ましくはヒト、ラット、マウス、ウサギ、ニワトリ、ヤギである。抗原は、株化細胞に由来してもよい。

[0023] 昆虫細胞としては、例えば、スポドプテラ・フルギペルダ（Spodoptera frugiperda）、ボンビックス・モリ（Bombyx mori）、ボンビックス・マンダリナ（Bombyx mandarina）、ヘリオシス・ビレセンス（Heliothis virescens）、ヘリオシス・ゼア（Heliothis zea）、マメストラ・ブラッシカス（Mamestra brassicas）、エスチグマン・アクレア（Estigmene acrea）、トリコプルシア・ニ（Trichoplusia ni）などが挙げられる。さらに、スポドプテラ・フルギペルダ（Spodoptera frugiperda）であれば、例えば、sf9細胞株などが挙げられる。抗原は、株化細胞に由来してもよい。

[0024] ウイルスとしては、例えば、インフルエンザウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、単純ヘルペスウイルス、ヒトパピローマウイルス、ウマ脳炎ウイルス、肝炎ウイルスなどが挙げられる。さらに、インフルエンザウイルスであれば、Ａ型インフルエンザウイルス、Ｂ型インフルエンザウイルス、Ｃ型インフルエンザウイルスが挙げられる。

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

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

また、単鎖抗体のアミノ酸配列としては同一だが二以上の異なる部位に結合する単鎖抗体については、例えば、ある抗原を用いたスクリーニングで選

択された単鎖抗体の、他の抗原への結合性を確認すればよい。このことは、当業者であれば容易に理解することができる。

[0026] また、抗原としては、主とする抗原単体を用いてもよいが、例えば、他のタンパク質等の融合タンパク質を用いてもよい。該他のタンパク質は特に制限されないが、例えば、抗体のＦｃドメイン、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、ロイシンジッパー、コイルドコイルペプチド、ストレプトアビジンなどが挙げられる。Ｆｃドメインの場合、その由来は特に制限されないが、例えば、ヒトが挙げられる。いずれの融合タンパク質の調製も公知の方法に従うことができる。

[0027] 抗原として融合タンパク質を用いる場合、ファージライブラリは、その融合タンパク質で動物を免疫して得られたものに限られず、例えば、その融合タンパク質の一部のタンパク質を含む物質で動物を免疫して得られたものであってもよい。

具体的には、タンパク質Ａとタンパク質Ｂとの融合タンパク質の場合、ファージライブラリは、タンパク質Ａで動物を免疫して得られたものであってもよいし、タンパク質Ａと他のタンパク質との融合タンパク質で動物を免疫して得られたものであってもよい。

[0028] また、多重膜リポソームに結合させる抗原と、動物を免疫してファージライブラリを得る際に用いる抗原とは同一であるのが好ましいが、前者が後者の一部であるのも好ましく、後者が前者の一部であるのも好ましい。例を挙げれば、前者が後者の一部であるとは、例えば、前者が単離されたタンパク質であり、後者が細胞膜上に該タンパク質を発現した細胞である場合などが挙げられる。

[0029] 抗原として用いるタンパク質のうち、好ましいタンパク質は抗体である。また、抗原として用いる抗体は、モノクローナル抗体であっても、ポリクローナル抗体であってもよく、得られる単鎖抗体の用途に従って適宜選択できる。

[0030] さらに、抗原として用いる抗体は、ＩｇＧ抗体、ＩｇＭ抗体、ＩｇＡ抗体

、ＩｇＤ抗体、及びＩｇＥ抗体を含むいずれの抗体でもよく、いずれか１種のみでもよいし、２種以上でもよい。さらに、それぞれは、それぞれのサブクラスであってもよく、それぞれのサブクラスのいずれか１種のみでもよいし、２種以上でもよい。

[0031] 例えば、抗原として用いる抗体がヒトＩｇＧ抗体であれば、そのサブクラスは、ヒトＩｇＧ１抗体、ヒトＩｇＧ２抗体、ヒトＩｇＧ３抗体、及びヒトＩｇＧ４抗体が挙げられる。これらのいずれか１種でもよいし、２種以上でもよく、３種以上でもよく、４種全てでもよい。

[0032] また、例えば、抗原として用いる抗体がヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体であれば、そのサブクラスは、ヒト血清由来ＩｇＧ１ポリクローナル抗体、ヒト血清由来ＩｇＧ２ポリクローナル抗体、ヒト血清由来ＩｇＧ３ポリクローナル抗体、及びヒト血清由来ＩｇＧ４ポリクローナル抗体が挙げられる。これらのいずれか１種でもよいし、２種以上でもよく、３種以上でもよく、４種全てでもよい。

[0033] 二以上の異なる抗体の共通部位に結合する単鎖抗体としては、例えば、二以上の異なる抗体の軽鎖（Ｌ鎖）、具体的にはλ鎖又はκ鎖に含まれる共通の部位に結合する単鎖抗体が挙げられる。特に、λ鎖又はκ鎖のアミノ酸配列はアイソタイプとは無関係であることから、λ鎖又はκ鎖に含まれるアミノ酸配列に結合する単鎖抗体が選択されれば、その単鎖抗体が、異なるアイソタイプであってもそのアミノ酸配列を認識して結合することは、当業者であれば容易に理解することができる。

[0034] ここで、選択される単鎖抗体が、抗体の軽鎖（Ｌ鎖）に含まれるアミノ酸配列に結合することや、具体的にλ鎖又はκ鎖に含まれるアミノ酸配列に結合することは、当業者であれば、例えば、ウェスタンブロット法などの公知の方法で確認することができる。

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

抗体などが挙げられる。

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

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

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

[0035] 抗原として用いるタンパク質のうち、他の好ましいタンパク質はエクソソーム由来タンパク質である。エクソソーム由来タンパク質としては、例えば、単鎖膜タンパク質ＣＤ９（ｐ２４）、ＣＤ８１、ＣＤ６３、ＥｐＣＡＭなどが挙げられる。既出の通り、該エクソソーム由来タンパク質は、他のタンパク質との融合タンパク質であることが好ましく、いずれもその一部分であってもよい。

また、エクソソーム由来タンパク質の中でも、単鎖膜タンパク質ＣＤ９（ｐ２４）が好ましい。ＣＤ９は、4つの膜貫通ドメインを持ち、Ｎ末端とＣ末端ともに細胞内にある構造をとっている。ＣＤ９は、ＶＬＡ（Very Late Activation）インテグリン分子やＨＬＡ－ＤＲなどの分子と関連しており、細胞間の接着やシグナル伝達、細胞の運動能に関与すると考えられている。

[0036] 抗原として用いるタンパク質のうち、他の好ましいタンパク質は、ウイルス由来タンパク質である。ウイルス由来タンパク質としては、例えば、インフルエンザウイルス由来タンパク質、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）由来タンパク質、単純ヘルペスウイルス由来タンパク質、ヒトパピローマウイル

ス由来タンパク質、ウマ脳炎ウイルス由来タンパク質、肝炎ウイルス由来タンパク質などが挙げられる。

また、ウイルス由来タンパク質の中でも、インフルエンザウイルス由来タンパク質が好ましく、その中でも、Ａ型インフルエンザウイルス由来タンパク質、Ｂ型インフルエンザウイルス由来タンパク質、Ｃ型インフルエンザウイルス由来タンパク質がより好ましい。

また、Ｂ型インフルエンザウイルス由来タンパク質の中でも、Ｂ型インフルエンザウイルス由来Nucleotide-binding Protein がさらに好ましい。これは、Ｂ型インフルエンザの感染有無の検査に利用可能な抗原である。

[0037] 抗原として用いるタンパク質のうち、他の好ましいタンパク質は、炎症性タンパク質である。炎症性タンパク質としては、例えば、ヒト由来炎症性タンパク質C-reactive Protein (CRP)、ＴＮＦ－α、ＩＬ－６などが挙げられる。

また、炎症性タンパク質の中でも、ヒト由来炎症性タンパク質C-reactive Protein (CRP)が好ましい。これは、体内で炎症反応や組織の破壊が起きているときに発現するタンパク質であり、病気の進行度や重症度、経過、予後などを判定するのに重要な指標として利用されているものである。

[0038] ［多重膜リポソームに抗原を結合する工程］

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

[0039] ＜（２）単鎖抗体を提示するファージライブラリを準備する工程＞

［単鎖抗体を提示するファージライブラリ］

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

[0040] ファージライブラリを構築する方法としては、例えば、特願２０１３－２３３０９６号公報に記載されるような公知の方法が挙げられる。

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

免疫動物としてウサギを用いる場合のプライマーとしては、目的の遺伝子をＰＣＲで特異的に増幅できれば特に制限はないが、重鎖（Ｈ鎖）の可変領域（V_Hドメイン）の遺伝子を増幅するセンスプライマーとしては、例えば、

５’－ＡＡＡＡＡＧＧＣＣＡＴＧＧＣＣＣＡＧＴＣＧＧＴＧＧＡＧＧＡＧＴＣＣＲＧＧ－３’（配列番号１、本明細書においてNco-VH1 Sと称することがある。）、

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

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

５’－ＡＡＡＡＡＧＧＣＣＡＴＧＧＣＣＣＡＧＳＡＧＣＡＧＣＴＧＲＷＧＧ

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

アンチセンスプライマーとしては、例えば、

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

[0041] 軽鎖（Ｌ鎖）の可変領域（V_Lドメイン）の遺伝子を増幅するセンスプライマーとしては、例えば、

５’－ＡＡＴＴＡＡＧＧＡＴＣＣＧＡＧＣＴＣＧＴＧＭＴＧＡＣＣＣＡＧＡＣＴＳＣＡ－３’（配列番号６、本明細書においてBam-Vκ1 Sと称することがある。）、

５’－ＡＡＴＴＡＡＧＧＡＴＣＣＧＡＧＣＴＣＧＡＴＭＴＧＡＣＣＣＡＧＡＣＴＳＣＡ－３’（配列番号７、本明細書においてBam-Vκ2 Sと称することがある。）、

５’－ＡＡＴＴＡＡＧＧＡＴＣＣＧＡＧＣＴＣＧＴＧＡＴＧＡＣＣＣＡＧＡＣＴＧＣＡ－３’（配列番号８、本明細書においてBam-Vκ3 Sと称することがある。）、

５’－ＡＡＴＴＡＡＧＧＡＴＣＣＧＡＧＣＴＣＧＴＧＣＴＧＡＣＴＣＡＧＴＣＧＹＣＣＴＣ－３’（配列番号９、本明細書においてBam-Vλ4 Sと称することがある。）などが挙げられ、

アンチセンスプライマーとしては、例えば、

５’－ＴＡＴＡＴＡＴＧＣＧＧＣＣＧＣＣＧＡＡＣＳＴＫＴＧＡＹＳＷＣＣＡＣ－３’（配列番号１０、本明細書においてVκ-Not ASと称することがある。）、

５’－ＴＴＴＡＡＡＴＴＴＧＣＧＧＣＣＧＣＣＧＡＡＣＣＴＧＴＧＡＣＧＧＴＣＡＧ－３’（配列番号１１、本明細書においてVλ-Not ASと称することがある。）などが挙げられる。

[0042] なお、塩基のＩＵＰＡＣ命名法に基づき、ＷはＡ又はＴ、ＲはＡ又はＧ、

ＭはＡ又はＣ、ＫはＴ又はＧ、ＹはＴ又はＣ、ＳはＧ又はＣ、ＨはＡ、Ｃ又はＴ、ＢはＧ、Ｃ又はＴ、ＶはＡ、Ｇ又はＣ、ＤはＡ、Ｇ又はＴ、ＮはＡ、Ｇ、Ｃ又はＴを表す。

[0043] 次に、これらＰＣＲ産物をファージミドベクターに挿入するための所定の制限酵素による処理等を行う。また、ファージミドベクターにおいても所定の制限酵素による処理等を行う。そして、制限酵素処理をした各遺伝子を、制限酵素処理したファージミドベクターへ挿入する。

[0044] このようにして、重鎖（Ｈ鎖）の可変領域（V_Hドメイン）の遺伝子、及び、軽鎖（Ｌ鎖）の可変領域（V_Lドメイン）の遺伝子が挿入された組換えファージミドベクターを宿主細胞、例えば大腸菌に導入し、さらにヘルパーファージを感染させて培養することで、培養上清中にウサギ由来単鎖抗体を提示したファージのライブラリを産生させることができる。ここで用いるヘルパーファージの種類は特に制限されないが、例えば、ＶＣＳＭ１３などが挙げられる。

[0045] ＜（３）ファージライブラリから、多重膜リポソームに結合した抗原に結合する単鎖抗体を提示するファージを選択する工程（選択工程）＞

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

[0046] ＜（３－１）結合工程＞

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

[0047] （抗原とファージライブラリとの量比）

抗原とファージライブラリとの比は、両者が十分に結合できれば特に制限

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

[0048]（溶媒）

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

[0049]（温度）

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

[0050]（時間）

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

[0051]（その他）

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

[0052]＜（３－２）洗浄工程＞

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

[0053] （遠心分離及び溶媒交換）

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

[0054] このとき用いる溶媒に制限はないが、上記「（３－１）結合工程」で用いた溶媒と同一であることが好ましく、ＰＢＳなどを用いることができる。また、ＢＳＡなどのブロッキング剤を添加しておくことなどができる。さらに、ペレットにこのような溶媒を加えて得られた懸濁液を新たなチューブなどの容器に移す場合には、該容器も同様に、予めブロッキングしておくことが好ましい。また、このようなブロッキング剤を、結合に用いる溶媒に予め添加しておくことなどもできる。

[0055] 遠心分離の条件としては、多重膜リポソームに結合した抗原に結合したファージと結合しなかったファージとを分離できるのであれば特に制限はない。例えば、４℃で２分、２０，０００ｇで遠心分離することが挙げられる。この遠心分離及び溶媒交換は、単回でも複数回繰り返してもよいが、通常２回以上であり、３回以上繰り返すことが好ましい。

[0056] ＜（３－３）溶出工程＞

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

ファージを溶出するための溶液としては、例えば、グリシン－塩酸緩衝液

等を用いることができる。さらに、ファージを溶出した後にその溶液を中和してもよく、その中和には、例えばトリス塩酸緩衝液等を用いることができる。

[0057] ＜（３－４）任意の工程＞

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

[0058] ［増幅工程］

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

[0059] （宿主細胞へのファージの感染、及びファージが感染した宿主細胞の培養）

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

[0060] （宿主細胞へのヘルパーファージの感染、及び培養上清中へのファージの産生）

ファージが感染した宿主細胞に対してヘルパーファージを感染させ、培養することによって、培養上清中に単鎖抗体を提示するファージ及び単鎖抗体

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

[0061] ［反復工程］

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

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

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

[0062] ［遺伝子配列決定工程］

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

[0063] その方法は特に制限されず、非特許文献１に記載されるような公知の方法に従って決定することができる。例えば、次のような方法で決定できる。

上記増幅工程における「宿主細胞へのファージの感染、及びファージが感染した宿主細胞の培養」欄の方法によりファージを感染させた大腸菌をシン

グルコロニー化して、それぞれをサブクローニング後、コロニーごとに、重鎖（Ｈ鎖）の可変領域（V_Hドメイン）の遺伝子、及び、軽鎖（Ｌ鎖）の可変領域（V_Lドメイン）の遺伝子の配列を解析して決定することができる。遺伝子配列の解析は公知の技術を用いることができる。また、遺伝子配列が決定できれば、その遺伝子配列がコードしているアミノ酸配列も決定される。このように遺伝子配列が決定できれば、スクリーニングの効率をモニタリングすることもできる。

[0064] ［クローン選択工程］

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

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

[0065] ［抗原結合活性の評価工程］

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

[0066] 例えば、実施例３－２に記載するような方法が挙げられる。すなわち、ファージミドを含有する宿主細胞をシングルコロニー化し、抗原を固相化したプレートに溶菌後の上清を適用して、マイクロプレートリーダーを用いて吸光度を測定する方法が挙げられる。

本工程は、最終ラウンド及び／又はラウンド間に行ってもよい。抗原に対する結合能が大きい抗体の遺伝子を含むクローンが選択できれば、そのクローンを用いてスクリーニングをより効率よく行うことができる。

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

[0067] 解離速度定数k_{off}、解離定数K_Dを測定する際のサンプルの調製方法は特に制限されないが、例えば、実施例に示されるように、ファージミド含有宿主細胞のコロニーを培養後に溶菌し、遠心分離後の上清を用いることができる。

[0068] また、ファージ及び単鎖抗体が宿主細胞から分泌されたかどうか、又はペリプラズム内に存在していたかどうかについては、次のようにして確認することができる。例えば、実施例に示されるように、ファージミドベクターを用いて単鎖抗体遺伝子を含むＤＮＡ断片を増幅し、これをpET22ベクター（メルク社）などの適当なベクターに挿入すれば、Ｎ末端側にペリプラズム移行シグナル配列（pelB leader signal）、Ｃ末端側にヒスチジンタグ（６ｘHis-tag）が融合された形で単鎖抗体が発現される。当該組換えベクターを含む宿主細胞を培養し、適当な方法により、培養上清および菌体から菌体内可溶性画分を回収できる。この培養上清および菌体内可溶性画分を、それぞれヒスチジンタグをトラップできるカラム等に適用して得られる溶離液を用いて解離定数K_Dを測定することができる。

[0069] 以下に、解離速度定数k_{off}と解離定数K_Dについて説明する。

［解離速度定数k_{off}］

（定義）

本明細書では、抗原と単鎖抗体との結合における解離速度定数k_{off}を次のように定義する。解離速度定数k_{off}は、好ましくなる順に、$1.5\times10^{-2}s^{-1}$以下、$1.0\times10^{-2}s^{-1}$以下、$8.0\times10^{-3}s^{-1}$以下、$7.0\times10^{-3}s^{-1}$以下、$6.0\times10^{-3}s^{-1}$以下、$5.0\times10^{-3}s^{-1}$以下、$4.0\times10^{-3}s^{-1}$以下、$3.0\times10^{-3}s^{-1}$以下、$2.0\times10^{-3}s^{-1}$以下、$1.5\times10^{-3}s^{-1}$以下、$1.0\times10^{-3}s^{-1}$以下、$9.0\times10^{-4}s^{-1}$以下、$8.0\times10^{-4}s^{-1}$以下、$7.0\times10^{-4}s^{-1}$以下、$6.0\times10^{-}$

^{4}ｓ$^{-1}$以下、５．０×１０$^{-4}$ｓ$^{-1}$以下、４．０×１０$^{-4}$ｓ$^{-1}$以下、３．０×１０$^{-4}$ｓ$^{-1}$以下、２．０×１０$^{-4}$ｓ$^{-1}$以下、１．０×１０$^{-4}$ｓ$^{-1}$以下、７．０×１０$^{-5}$ｓ$^{-1}$以下、６．０×１０$^{-5}$ｓ$^{-1}$以下、５．０×１０$^{-5}$ｓ$^{-1}$以下、４．０×１０$^{-5}$ｓ$^{-1}$以下、３．０×１０$^{-5}$ｓ$^{-1}$以下、１．５×１０$^{-5}$ｓ$^{-1}$以下、１．０×１０$^{-5}$ｓ$^{-1}$以下、５．０×１０$^{-6}$ｓ$^{-1}$以下、３．０×１０$^{-6}$ｓ$^{-1}$以下である。解離速度定数ｋ$_{ｏｆｆ}$が小さいほど抗原との結合能が大きく、抗体として有用である。

[0070] 抗原をＡｇ、抗原濃度を［Ａｇ］、抗体をＡｂ、抗体濃度を［Ａｂ］、抗原－抗体複合体をＡｇ・Ａｂ、抗原－抗体複合体濃度を［Ａｇ・Ａｂ］、結合速度定数をｋ$_{ｏｎ}$、解離速度定数をｋ$_{ｏｆｆ}$とした場合、抗原と単鎖抗体との結合反応は下記式（１）、（２）のように表される。

[0071] [数1]

$$Ag + Ab \underset{k_{off}}{\overset{k_{on}}{\rightleftharpoons}} Ag \cdot Ab \quad (1)$$

[0072] [数2]

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

[0073] これを変形すると、下記式（３）のように表される。

[0074] [数3]

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

[0075] Ｂｉａｃｏｒｅなどの送液系では、センサーチップ洗浄時、［Ａｂ］＝０であるため、上記式（３）は、下記式（４）のように表される。

[0076]

[数4]

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

[0077] さらに、時間ｔ＝０における［Ａｇ・Ａｂ］を［Ａｇ・Ａｂ］$_0$とすると、下記式（５）のように表される。

[0078] [数5]

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

[0079] Ｂｉａｃｏｒｅなどの送液系を用いて、抗原と単鎖抗体との結合における解離速度定数を算出する場合には、横軸に時間ｔ、縦軸に

[0080] [数6]

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

[0081] とした測定グラフが描ければ、その傾きから解離速度定数を算出することができる。

[0082] （解離速度定数ｋ$_{off}$の測定方法）

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

[0083] ［解離定数Ｋ$_D$］

解離定数Ｋ$_D$は、好ましくなる順に、１．０×１０$^{-6}$Ｍ以下、７．０×１０

$^{-7}$M以下、５．０×１０$^{-7}$M以下、１．５×１０$^{-7}$M以下、１．０×１０$^{-8}$M以下、９．０×１０$^{-8}$M以下、８．７×１０$^{-8}$M以下、４．０×１０$^{-8}$M以下、３．５×１０$^{-8}$M以下、３．０×１０$^{-8}$M以下、２．５×１０$^{-8}$M以下、１．０×１０$^{-8}$M以下、７．０×１０$^{-9}$M以下、６．０×１０$^{-9}$M以下、５．０×１０$^{-9}$M以下、４．０×１０$^{-9}$M以下、３．０×１０$^{-9}$M以下、１．０×１０$^{-9}$M以下、６．０×１０$^{-10}$M以下、５．０×１０$^{-10}$M以下、１．０×１０$^{-10}$M以下、５．０×１０$^{-11}$M以下、２．０×１０$^{-11}$M以下、１．５×１０$^{-11}$M以下である。解離定数が小さいほど抗原との結合能が大きく、抗体として有用である。尚、一般的な抗体のK_Dは１０ｎM程度であるのに対し、本実施態様における単鎖抗体のK_Dの範囲は上記の通りであり、一般的な抗体に比べて格段に結合能が大きいことが分かる。

[0084] （解離定数K_Dの測定方法）

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

[0085] 解離速度定数k_{off}や解離定数K_Dに着目した際の、本発明の第一の発明が有する優位性は次の通りである。

従来のパニング法では、例えば、選択されたファージを感染させた大腸菌をシングルコロニー化して、それぞれをサブクローニング後、コロニーごとに、重鎖（Ｈ鎖）の可変領域（V_Hドメイン）の遺伝子、及び、軽鎖（Ｌ鎖）の可変領域（V_Lドメイン）の遺伝子の配列を解析して決定する。そして、得られた遺伝子配列を解析し、重複するクローン数が多ければ多いほど、そのクローンを「親和力の大きい（可能性のある）候補」として扱い、単鎖抗体の性質を詳しく解析する。しかし、そもそもファージディスプレイ法では各ステップにおいて様々な摂動が加わるため、遺伝子配列が重複するクローンであっても、それらが、必ずしも結合力や選択性が大きいクローンとは限らない。例えば、ファージの生産量や増殖速度の違いによって、結合力や選択性が小さいクローンも得られることがある。また、単鎖抗体の結合力や選択

性を評価する方法としてELISA法もよく用いられているが、ｓｃＦｖ濃度が不明な状態でELISA法のようなエンドポイントアッセイ（Endpoint assay）を行った場合、抗原に結合するかどうかは分かっても、抗原に対する単鎖抗体の結合力の大きさを直接的に評価することはできない。

[0086] 本発明の第一の発明では、解離速度定数k_{off}や解離定数K_Dに着目して単鎖抗体を選択することにより、結合力や選択性が大きい単鎖抗体の選択効率を著しく向上することができる。

解離定数K_D＝（解離速度定数k_{off}）／（結合速度定数k_{on}）であるところ、分子の速度以上に結合速度が大きくなることはあり得ず、k_{on}値の大きさには上限があることから、k_{on}値の大小はクローンによって大きく相違しない。従って、クローン間においては、結合速度定数k_{on}よりも解離速度定数k_{off}の方が大きな差を生じやすいため、解離速度定数k_{off}の小さいクローンは、解離定数K_Dの小さいクローンとみなすことができる。すなわち、本発明の第一の発明では、濃度を特定することなく、パニング終了時の単鎖抗体の解離速度定数k_{off}を測定するという方法によって、従来法よりも結合力や選択性が大きい単鎖抗体を効率よく、かつ簡便に、迅速に選択することができる。

[0087] ［単鎖抗体のV_H鎖の相補性決定領域（ＣＤＲ）］

単鎖抗体のV_H鎖の相補性決定領域（ＣＤＲ）は、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。周知の通り、これらの中で、抗原への結合性に最も寄与しているのはＣＤＲ３のアミノ酸配列である。

[0088] 本実施態様における単鎖抗体のV_H鎖のＣＤＲのアミノ酸配列は、抗体を構成したときにその抗体が抗原に結合する限り特に限定されない。このうち、ＣＤＲ３のアミノ酸配列については、抗原としてヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体やヒト血清由来ＩｇＡポリクローナル抗体を、単鎖抗体としてウサギ由来単鎖抗体を用いて本方法を実施した場合には、本明細書の実施例に記載するV_H鎖のＣＤＲ３のアミノ酸配列が好ましい。これらは、抗体を構成したときにその抗体の抗原への結合性が大きいからである。また、これら

の中でも、抗体を構成したときにその抗体の抗原への結合性がより大きいものがより好ましい。

[0089] また、ＣＤＲ１のアミノ酸配列、ＣＤＲ２のアミノ酸配列も同様であり、抗原としてヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体やヒト血清由来ＩｇＡポリクローナル抗体を、単鎖抗体としてウサギ由来単鎖抗体を用いて本方法を実施した場合には、本明細書の実施例に記載するV_H鎖のＣＤＲ１、ＣＤＲ２のアミノ酸配列が好ましい。これらは、抗体を構成したときにその抗体の抗原への結合性が大きいからである。また、これらの中でも、抗体を構成したときにその抗体の抗原への結合性がより大きいものがより好ましい。

[0090] ［V_H鎖のＣＤＲのアミノ酸配列と実質的な相同性を有するアミノ酸配列］

本実施態様におけるV_H鎖のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３のアミノ酸配列はいずれも、抗体を構成したときにその抗体が抗原に結合する限り特に限定されない。抗原としてヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体やヒト血清由来ＩｇＡポリクローナル抗体を、単鎖抗体としてウサギ由来単鎖抗体を用いて本方法を実施した場合には、本明細書の実施例に記載するV_H鎖のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３のアミノ酸配列と、それぞれ８０％以上、好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上の同一性を有するアミノ酸配列であってもよい。

[0091] また、抗原としてヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体やヒト血清由来ＩｇＡポリクローナル抗体を、単鎖抗体としてウサギ由来単鎖抗体を用いて本方法を実施した場合には、本明細書の実施例に記載するV_H鎖のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３のアミノ酸配列において、１～数個のアミノ酸が、置換、欠失、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列であってもよい。ここで、１～数個とは、好ましくは１～５個、より好ましくは１～３個である。

[0092] また、上記置換は保存的置換が好ましく、保存的変異とは、置換部位が芳香族アミノ酸である場合には、Phe、Trp、Tyr間で、置換部位が疎水性アミノ酸である場合には、Leu、Ile、Val間で、極性アミノ酸である場合には、Gln、Asn間で、塩基性アミノ酸である場合には、Lys、Arg、His間で、酸性アミ

ノ酸である場合には、Asp、Glu間で、ヒドロキシル基を持つアミノ酸である場合には、Ser、Thr間でお互いに置換する変異である。

[0093] 保存的置換としては、AlaからSer又はThrへの置換、ArgからGln、His又はLysへの置換、AsnからGlu、Gln、Lys、His又はAspへの置換、AspからAsn、Glu又はGlnへの置換、CysからSer又はAlaへの置換、GlnからAsn、Glu、Lys、His、Asp又はArgへの置換、GluからGly、Asn、Gln、Lys又はAspへの置換、GlyからProへの置換、HisからAsn、Lys、Gln、Arg又はTyrへの置換、IleからLeu、Met、Val又はPheへの置換、LeuからIle、Met、Val又はPheへの置換、LysからAsn、Glu、Gln、His又はArgへの置換、MetからIle、Leu、Val又はPheへの置換、PheからTrp、Tyr、Met、Ile又はLeuへの置換、SerからThr又はAlaへの置換、ThrからSer又はAlaへの置換、TrpからPhe又はTyrへの置換、TyrからHis、Phe又はTrpへの置換、及び、ValからMet、Ile又はLeuへの置換が挙げられる。

[0094] また、抗体を構成したときにその抗体が抗原に結合する限り、当該アミノ酸配列は修飾されていてもよい。該修飾としては、アミド化、脂質鎖の付加（脂肪族アシル化（パルミトイル化、ミリストイル化等）、プレニル化（ファルネシル化、ゲラニルゲラニル化等）等）、リン酸化（セリン残基、スレオニン残基、チロシン残基等におけるリン酸化）、アセチル化、糖鎖の付加（Ｎ－グリコシル化、Ｏ－グリコシル化）等を挙げることができる。

[0095] ［単鎖抗体のＶ$_L$鎖の相補性決定領域（ＣＤＲ）］

単鎖抗体のＶ$_L$鎖の相補性決定領域（ＣＤＲ）は、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。周知の通り、これらＶ$_L$鎖のＣＤＲのアミノ酸配列も、抗原への結合性に寄与している。

[0096] 本実施態様における単鎖抗体のＶ$_L$鎖のＣＤＲのアミノ酸配列は、抗体を構成したときにその抗体が抗原に結合する限り特に限定されない。ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３のアミノ酸配列については、それぞれ、抗原としてヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体やヒト血清由来ＩｇＡポリクローナル抗体を、単鎖抗体としてウサギ由来単鎖抗体を用いて本方法を実施した場合に

は、本明細書の実施例に記載するV_L鎖のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３のアミノ酸配列が好ましい。これらは、抗体を構成したときにその抗体の抗原への結合性が大きいからである。また、これらの中でも、抗体を構成したときにその抗体の抗原への結合性がより大きいものがより好ましい。

[0097] ［V_L鎖のＣＤＲのアミノ酸配列と実質的な相同性を有するアミノ酸配列］

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

[0098] ［単鎖抗体のV_H鎖のフレームワーク領域（ＦＲ）］

単鎖抗体のV_H鎖のフレームワーク領域（ＦＲ）は、ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、及びＦＲ４を含む。周知の通り、これらV_H鎖のＦＲのアミノ酸配列も、抗原への結合性に寄与している。

[0099] 本実施態様における単鎖抗体のV_H鎖のＦＲのアミノ酸配列は、抗体を構成したときにその抗体が抗原に結合する限り特に限定されない。ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、ＦＲ４のアミノ酸配列については、それぞれ、抗原としてヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体やヒト血清由来ＩｇＡポリクローナル抗体を、単鎖抗体としてウサギ由来単鎖抗体を用いて本方法を実施した場合には、本明細書の実施例に記載するV_H鎖のＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、ＦＲ４のアミノ酸配列が好ましい。これらは、抗体を構成したときにその抗体の抗原への結合性が大きいからである。また、これらの中でも、抗体を構成したときにその抗体の抗原への結合性がより大きいものがより好ましい。

[0100] ［V_H鎖のＦＲのアミノ酸配列と実質的な相同性を有するアミノ酸配列］

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

[0101] ［単鎖抗体のV_L鎖のフレームワーク領域（ＦＲ）］

単鎖抗体のV_L鎖のフレームワーク領域（ＦＲ）は、ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、及びＦＲ４を含む。周知の通り、これらV_L鎖のＦＲのアミノ酸配列も、抗原への結合性に寄与している。

[0102] 本実施態様における単鎖抗体のV_L鎖のＦＲのアミノ酸配列は、抗体を構成

したときにその抗体が抗原に結合する限り特に限定されない。ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、ＦＲ４のアミノ酸配列については、それぞれ、抗原としてヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体やヒト血清由来ＩｇＡポリクローナル抗体を、単鎖抗体としてウサギ由来単鎖抗体を用いて本方法を実施した場合には、本明細書の実施例に記載するV_L鎖のＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、ＦＲ４のアミノ酸配列が好ましい、これらは、抗体を構成したときにその抗体の抗原への結合性が大きいからである。また、これらの中でも、抗体を構成したときにその抗体の抗原への結合性がより大きいものがより好ましい。

[0103] ［V_L鎖のＦＲのアミノ酸配列と実質的な相同性を有するアミノ酸配列］

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

[0104] ＜１－２．第一の発明における第二の実施態様＞

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

[0105] ＜（１）第一の実施態様に記載のスクリーニング方法によりスクリーニングする工程＞

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

[0106] ＜（２）スクリーニングされた単鎖抗体のアミノ酸配列を決定する工程＞

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

例えば、既出の「遺伝子配列決定工程」により決定された遺伝子配列に基

づいて、アミノ酸配列を決定することができる。

[0107] ＜（３）決定されたアミノ酸配列の可変領域の配列に基づき、抗体をコードするＤＮＡ配列を作成する工程＞

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

[0108] 抗体をコードするＤＮＡ配列を作成する公知の方法は多数あるが、例えば、アミノ酸配列を決定する工程で決定されたアミノ酸配列の可変領域（Ｖドメイン）をコードするＤＮＡ配列を、所望の定常領域（Ｃドメイン）をコードするＤＮＡと連結し、これを発現ベクターへ組み込む、又は、抗体の可変領域（Ｖドメイン）をコードするＤＮＡを、定常領域のＤＮＡを含む発現ベクターへ組み込むことができる。このとき、例えば、発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込み、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を産生させることができる。

[0109] このとき定常領域（Ｃドメイン）のアミノ酸配列が由来する動物は制限されない。可変領域（Ｖドメイン）のアミノ酸が由来する動物と異なる動物であってもよく、そのような場合に組み合わせて作製される抗体はキメラ抗体となる。例えば、ヒト、ラット、マウス、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、サルなどが挙げられ、好ましくはヒトである。可変領域（Ｖドメイン）のアミノ酸が由来する動物がヒトでなく、定常領域（Ｃドメイン）のアミノ酸配列が由来する動物がヒトの場合、組み合わせて作製される抗体はヒト化抗体となる。

[0110] また、ＤＮＡ配列がコードする抗体は、免疫グロブリンである必要はなく、例えば、ｓｃＦｖ、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、又は$F(ab')_2$などであってもよい。

[0111] （ヒト化抗体をコードＤＮＡ配列）

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

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

[0112] 本実施態様では、例えば、第一の実施態様に記載のスクリーニング方法によりスクリーニングされた単鎖抗体のＣＤＲとヒト抗体のＦＲを連結するように設計したＤＮＡ配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからＰＣＲ法により合成する。得られたＤＮＡを、ヒト抗体定常領域をコードするＤＮＡと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得ることができる。

[0113] ＣＤＲを介して連結されるヒト抗体のＦＲは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、ヒト化抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域におけるフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい。その方法は、例えば、Sato K. et al., Cancer Research 1993, 53: 851-856などに記載されている。また、ＦＲは、異なるクラス又はサブクラスのヒト抗体由来のフレームワーク領域と置換されてもよい。その方法は、例えば、国際公開９９／５１７４３号パンフレットに記載されている。

[0114] また、ヒト化抗体を作製する際に、可変領域（例えば、ＦＲ）や定常領域中のアミノ酸を他のアミノ酸で置換等してもよい。例えば、日本血栓止血学会誌 4 (3): 193-200, 1993に記載される方法を用いてもよい。当該文献に記

載されているように、決定された可変領域のアミノ酸配列とデータバンクにあるヒト抗体の可変領域のアミノ酸とを比較し、両者の骨格（ＦＲ）が最も似ているヒト抗体遺伝子を選択後、コンピュータ・グラフィクスによりその高次構造を解析して、最適な可変領域のアミノ酸配列を決定してもよい。さらに、発現ベクターに組み込み、宿主細胞に導入して抗体を産生させる際に、効率的に産生させるために必要なアミノ酸の置換等をしてもよい。

[0115] アミノ酸の置換は、例えば、１５未満、１０未満、８以下、７以下、６以下、５以下、４以下、３以下、又は２以下のアミノ酸、好ましくは１～５アミノ酸、より好ましくは１又は２アミノ酸の置換であり、置換抗体は、未置換抗体と機能的に同等であるべきである。置換は、保存的アミノ酸置換が望ましく、これは、電荷、側鎖、極性、芳香族性等の性質の類似するアミノ酸間の置換である。性質の類似したアミノ酸は、例えば、塩基性アミノ酸（アルギニン、リジン、ヒスチジン）、酸性アミノ酸（アスパラギン酸、グルタミン酸）、無電荷極性アミノ酸（グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン）、無極性アミノ酸（ロイシン、イソロイシン、アラニン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニン）、分枝鎖アミノ酸（ロイシン、バリン、イソロイシン）、芳香族アミノ酸（フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、ヒスチジン）等に分類しうる。

[0116] ＜（４）作成されたＤＮＡ配列を宿主細胞で発現させる工程＞

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

例えば、抗体を生産するための宿主は哺乳動物起源のものが多いが、当業者であれば、発現したい遺伝子産物に最も適する特定の宿主細胞を適宜選択することができる。一般的な宿主細胞系としては、ＣＨＯ由来細胞株（チャイニーズハムスター卵巣細胞系）、ＣＶ１（サル腎臓系）、ＣＯＳ（ＳＶ４０Ｔ抗原をするＣＶ１の誘導体）、ＳＰ２／０（マウスミエローマ）、Ｐ３ｘ６３－Ａｇ３．６５３（マウスミエローマ）、２９３（ヒト腎臓）、及び

２９３Ｔ（ＳＶ４０Ｔ抗原をする２９３の誘導体）などが挙げられるが、これらに限定されない。宿主細胞系は、各種メーカー、ＡＴＣＣなどの機関、または文献に記載の論文発表機関から入手することができる。

[0117] ＜（５）任意の工程＞

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

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

[0118] ＜２．第二の発明＞

本発明の第二の発明は、次の第一の実施態様ないし第六の実施態様を含む。

第一の実施態様：ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体に対して３．０×１０$^{-8}$Ｍ以下の解離定数を有する単鎖抗体。

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

第三の実施態様：ヒト血清由来ＩｇＡポリクローナル抗体に対して１．０×１０$^{-3}$ｓ$^{-1}$以下の解離速度定数を有する単鎖抗体。

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

第五の実施態様：ヒト由来抗体のＬ鎖に対して１．０×１０$^{-3}$ｓ$^{-1}$以下の解離速度定数を有する単鎖抗体。

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

第七の実施態様：エクソソーム由来タンパク質を含むタンパク質に対して８．０×１０$^{-3}$ｓ$^{-1}$以下の解離速度定数を有する単鎖抗体。

第八の実施態様：ウイルス由来タンパク質に対して１．０×１０$^{-2}$ｓ$^{-1}$以下の解離速度定数を有する単鎖抗体。

第九の実施態様：炎症性タンパク質に対して１．０×１０$^{-2}$ｓ$^{-1}$以下の解離速度定数を有する単鎖抗体。

[0119] ＜２－１．第二の発明における第一の実施態様＞

本発明の第二の発明における第一の実施態様は、ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体に対して３．０×１０$^{-8}$Ｍ以下の解離定数を有する単鎖抗体である。

該単鎖抗体は、好ましくは、さらに、ヒト血清由来ＩｇＡポリクローナル抗体に対する抗体であり、より好ましくは、ヒト血清由来ＩｇＡポリクローナル抗体に対して１．０×１０$^{-3}$ｓ$^{-1}$以下の解離速度定数を有する。また、該単鎖抗体は、これらの抗体のＬ鎖に結合することが好ましく、κ鎖に結合することがより好ましい。

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

[0120] ＜２－２．第二の発明における第二の実施態様＞

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

[0121] ［ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体の分離剤］

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

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

[0122] ［水不溶性担体］

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

[0123] 市販品としては多孔質セルロースゲルであるGCL2000、GC700、アリルデキストランとメチレンビスアクリルアミドを共有結合で架橋したSephacryl S-1000、アクリレート系の担体であるToyopearl、アガロース系の架橋担体であるSepharoseCL4B、エポキシ基で活性化されたポリメタクリルアミドであるオイパーギットC250L等を例示することができる。ただし、本実施態様においてはこれらの担体、活性化担体のみに限定されるものではない。上述の担体はそれぞれ単独で用いてもよいし、任意の２種類以上を混合してもよい。又、本実施態様に用いる水不溶性担体としては、本分離剤の使用目的および方法からみて、表面積が大きいことが望ましく、適当な大きさの細孔を多数有する、すなわち、多孔質であることが好ましい。

[0124] 担体の形態としては、ビーズ状、線維状、膜状（中空糸も含む）など何れ

も可能であり、任意の形態を選ぶことができる。特定の排除限界分子量を持つ担体作製の容易さからビーズ状が特に好ましく用いられる。ビーズ状の平均粒径は１０～２５００μｍのものが使いやすく、とりわけ、単鎖抗体固定化反応のしやすさの点から２５μｍから８００μｍの範囲が好ましい。

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

[0125] 上記担体への単鎖抗体の固定化においては、単鎖抗体の立体障害を小さくすることにより分離効率を向上させ、さらに非特異的な結合を抑えるために、親水性スペーサーを介して固定化することが、より好ましい。親水性スペーサーとしては、例えば、両末端をカルボキシル基、アミノ基、アルデヒド基、エポキシ基などで置換したポリアルキレンオキサイドの誘導体を用いるのが好ましい。

[0126] 上記の担体へ導入される単鎖抗体およびスペーサーとして用いられる有機化合物の固定化方法及び条件は特に限定されるものではないが、一般にタンパク質やペプチドを担体に固定化する場合に採用される方法を例示する。担体を臭化シアン、エピクロロヒドリン、ジグリシジルエーテル、トシルクロライド、トレシルクロライド、ヒドラジンなどと反応させて担体を活性化し（担体が元々持っている官能基より単鎖抗体が反応しやすい官能基に変え）、単鎖抗体と反応、固定化する方法、また、担体と単鎖抗体が存在する系にカルボジイミドのような縮合試薬、または、グルタルアルデヒドのように分子中に複数の官能基を持つ試薬を加えて縮合、架橋することによる固定化方法が挙げられるが、分離剤の滅菌時または利用時に単鎖抗体が担体より容易に脱離しない固定化方法を適用することがより好ましい。

[0127] ［具体例］

ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体の分離剤およびその製造方法の具

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

[0128] ［その他について］

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

[0129] ＜２－３．第二の発明における第三の実施態様＞

本発明の第二の発明における第三の実施態様は、ヒト血清由来ＩｇＡポリクローナル抗体に対して１．０×１０$^{-3}$ｓ$^{-1}$以下の解離速度定数を有する単鎖抗体である。

該単鎖抗体は、好ましくは、さらに、ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体に対する抗体であり、より好ましくは、ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体に対して３．０×１０$^{-8}$Ｍ以下の解離定数を有する。また、該単鎖抗体は、これらの抗体のＬ鎖に結合することが好ましく、κ鎖に結合することがより好ましい。

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

[0130] ＜２－４．第二の発明における第四の実施態様＞

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

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

[0131] ＜２－５．第二の発明における第五の実施態様＞

本発明の第二の発明における第五の実施態様は、ヒト由来抗体のＬ鎖に対して１．０×１０$^{-3}$ｓ$^{-1}$以下の解離速度定数を有する単鎖抗体である。

該単鎖抗体は、好ましくは、ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体及び／又はヒト血清由来ＩｇＡポリクローナル抗体に対する抗体であり、より好ましくは、ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体に対して３．０×１０$^{-8}$Ｍ以下の解離定数を有し、及び／又は、ヒト血清由来ＩｇＡポリクローナル抗体に対して１．０×１０$^{-3}$ｓ$^{-1}$以下の解離速度定数を有する。また、該単鎖抗体は、κ鎖に結合することが好ましい。

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

[0132] ＜２－６．第二の発明における第六の実施態様＞

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

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

[0133] ＜２－７．第二の発明における第七の実施態様＞

本発明の第二の発明における第七の実施態様は、エクソソーム由来タンパク質を含むタンパク質に対して８．０×１０$^{-3}$ｓ$^{-1}$以下の解離速度定数を有する単鎖抗体である。

該エクソソーム由来タンパク質を含むタンパク質は、好ましくは、Ｓｆ９細胞株由来ＣＤ９のExtracellular Domain 2 （ＥＣ２）部分のみとヒト抗体のＦｃドメインとの融合タンパク質である。

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

[0134] ＜２－８．第二の発明における第八の実施態様＞

本発明の第二の発明における第八の実施態様は、ウイルス由来タンパク質

に対して１．０×１０$^{-2}$ｓ$^{-1}$以下の解離速度定数を有する単鎖抗体である。

該ウイルス由来タンパク質は、好ましくは、インフルエンザウイルス由来タンパク質であり、より好ましくは、Ｂ型インフルエンザウイルス由来タンパク質であり、さらに好ましくは、Ｂ型インフルエンザウイルス由来Nucleotide-binding Protein である。

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

[0135] ＜２－９．第二の発明における第九の実施態様＞

本発明の第二の発明における第九の実施態様は、炎症性タンパク質に対して１．０×１０$^{-2}$ｓ$^{-1}$以下の解離速度定数を有する単鎖抗体である。

該炎症性タンパク質は、好ましくは、ヒト由来炎症性タンパク質C-reactive Protein (CRP)である。

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

実施例

[0136] 以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はその要旨を逸脱しない限り、下記の実施例に限定されるものではない。また、便宜のため、実施例番号、比較例番号が連続していない場合もある。

[0137] ＜１．モデル実験＞

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

[0138] ＜１－１．多重膜リポソームとヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体との

結合＞

１０μｍｏｌのジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、１μｍｏｌのリン酸ジセチル（ＤＣＰ）、０．５μｍｏｌのＮ－（４－（ｐ－マレイミドフェニル）ブチリル）ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（ＭＰＢ－ＤＰＰＥ）を、クロロホルム５ｍｌ中に溶解し、１００ｍｌナスフラスコ中で減圧下、クロロホルムを留去した。

[0139] 次に、フラスコ内壁に形成させたリン脂質薄膜を５０℃下、３ｍｌのＰＢＳで水和し、多重膜リポソーム（ＭＬＶｓ）を形成させた。２５℃、２０，０００ｇで２分間の遠心分離を行い、上清を除去した。この操作をさらに２回繰り返した。

[0140] ３ｍｌのＰＢＳで懸濁し、４℃で保存した（これを「反応性ＭＬＶｓ」と称することがある。）。１ｍｌの反応性ＭＬＶｓを２５℃、２０，０００ｇで２分間の遠心分離した。ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体（Ｓｉｇｍａ、＃Ｉ４５０６）を１ｍｇ／ｍｌとなるようにＰＢＳに溶解し、この溶液に、上記遠心分離後の反応性ＭＬＶｓのペレットを分散した。

[0141] モル比にしてヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体の１０倍量の２－イミノチオラン塩酸塩（Ｓｉｇｍａ）を加え、２５℃で３時間以上撹拌しながらインキュベートした。その後、２５℃、２０，０００ｇで２分間の遠心分離を行い、上清を除去し、１ｍｌのＰＢＳで懸濁した。この遠心分離と上清の除去、及び１ｍｌのＰＢＳへの懸濁を１単位としてさらに３回繰り返した。

[0142] 得られた懸濁液をヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体固定化ＭＬＶｓとして４℃で保存した。ＭＬＶｓに固定化されたヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体量はＤＣ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａｓｓａｙで定量した。

[0143] ＜１－２．チューブへのヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体の固定＞

イムノチューブ（Immunotube；Nunc社、Maxisorp（登録商標））に、ＰＢＳで濃度１０μｇ／ｍｌに調製したヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体（Ｓｉｇｍａ、＃Ｉ４５０６）溶液を１ｍｌ加えて４℃で一晩インキュベー

トした。その後、ＰＢＳで５回洗浄し、２％ＢＳＡ－ＰＢＳを１ｍｌ加えて１時間インキュベートした。

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

[0144] なお、ウサギ血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体を用いた場合ではあるが、チューブへ抗体を固定した場合におけるチューブに非特異的に結合する抗体の割合が、多重膜リポソームへ抗体を固定した場合における多重膜リポソームに非特異的に結合する抗体の割合に比べて非常に大きいことが非特許文献１で示されている。当業者であれば、ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体を用いた場合でも同様であることは容易に理解することができる。

[0145] ＜１－３．抗－ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体－マウス由来単鎖抗体を提示するファージのライブラリの調製＞

ｐｅｌＢ　ｌｅａｄｅｒの遺伝子配列、Ｎｃｏ　Ｉサイト、Ｓｐｅ　Ｉサイト、フレキシブルリンカー（G_4S）$_3$の遺伝子配列、ＢａｍＨ　Ｉサイト、Ｎｏｔ　Ｉサイト、ＦＬＡＧ－ｔａｇの遺伝子配列、ｃ－ｍｙｃ－ｔａｇの遺伝子配列、Ａｍｂｅｒ　ストップコドン（ＴＡＧ）、及びｇＩＩＩｐコートタンパク質の遺伝子（Ｎ末端側２５０アミノ酸残基を欠損）を含むＤＮＡを委託合成し、ｐＴ７　Ｂｌｕｅ（メルク社）のＸｂａ　Ｉ／ＢａｍＨ　Ｉサイトに挿入した。このｐＴ７　Ｂｌｕｅ組換えファージミドベクターをｐＰＬＦＭＡΔ２５０ｇＩＩＩｐとし、一連のファージディスプレイの実験に用いた。

[0146] マウスハイブリドーマＣＲＬ－１７８６株（ＡＴＣＣ）より決定した抗－ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体－マウス由来単鎖抗体の遺伝子をＰＣＲで増幅し、組換えファージミドベクターｐＰＬＦＭＡΔ２５０ｇＩＩＩｐのＮｃｏ　Ｉ／Ｎｏｔ　Ｉサイト中に導入した。

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

した（前培養）。

[0147] 前培養液を、ＯＤ６００＝０．１となるように、５０ｍｌの２×ＹＴ培地（１％グルコース、５０ｍｇ／Ｌアンピシリン含有）中に植菌し、３０℃、２００ｒｐｍで振とう培養した。ＯＤ＝１．０付近まで培養後、ヘルパーファージＶＣＳＭ１３を感染多重度（ＭＯＩ）＝２０となるように培養液に加え、３７℃で３０分インキュベートした。３７℃で３０００ｇ、１０分間遠心分離し、上清を除去し、２×ＹＴ培地（５０ｍｇ／Ｌアンピシリン、３５ｍｇ／Ｌカナマイシン含有）５０ｍｌ中に穏やかに懸濁した。３０℃、２００ｒｐｍで１２時間以上振とうし、培養上清中に、抗－ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体－マウス由来単鎖抗体を提示するファージを生産した。

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

[0148] ＜１－４．非提示ファージのライブラリの調製＞

抗－ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体－マウス由来単鎖抗体の遺伝子を挿入していない組換えファージミドベクターｐＰＬＦＭＡΔ２５０ｇＩＩｐで大腸菌ＴＧ１を形質転換したこと以外は、上記１－３と同様にして、非提示ファージを取得した。

[0149] ＜１－５．パニング＞

（疑似ファージライブラリの調製）

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

[0150]

[表1]

表1. 疑似ファージライブラリの組成

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

[0151] ［実施例１－１］

（ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体固定化ＭＬＶｓを用いたパニング）

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

[0152] （ラウンド）

まず各ラウンドにおいて行う操作を説明する。

ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体固定化ＭＬＶｓをＩｇＧ量が１０μｇとなるように加え、ボルテックスした。これを２５℃、２０，０００ｇ、２分間遠心分離し、上清を取り除いて、２％ＢＳＡ－ＰＢＳを０．９ｍｌ加えて再懸濁した。

[0153] 一方で、疑似ファージライブラリ溶液を２５℃、２０，０００ｇ、２分間遠心分離し、上清を回収した。１００μｌの上清をチューブに加えてボルテックスし、２５℃で１時間、ローテーターを用いて転倒混和し、ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体固定化ＭＬＶｓと疑似ファージライブラリとを結合させる反応を行った。

[0154] 上記結合反応液と１ｍｌの２％ＢＳＡ－ＰＢＳを混合し、２５℃、２０，０００ｇ、２分間遠心分離、上清を除去した（洗浄）。洗浄作業は５回繰り返した。

[0155] （パニングにより選択されたファージの取得）

上記チューブ内のヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体固定化ＭＬＶｓ

に１０ｍＭ　グリシン－ＨＣｌ（ｐＨ１．５）を０．９ｍｌ加えて懸濁し、ＢＳＡブロッキングしたチューブに移した。そして、さらに、室温（または４℃）でチューブを１０分間転倒混和して、ファージを溶出した。

[0156] 上記チューブから回収したファージ溶出液０．９ｍｌと０．１ｍｌの２ＭＴｒｉｓ－ＨＣｌ溶液を混合し、ファージ溶出液を中和した。

[0157] 一方で、大腸菌ＴＧ１の培養液をＯＤ＝０．１となるように新しいＬＢ培地１０ｍｌに植菌し、３０℃で培養を行った。

[0158] 中和した溶離液１ｍｌと培養した大腸菌ＴＧ１の培養液１ｍｌを混合し、３７℃で１時間インキュベートした。インキュベート後、２×ＹＴ培地（１％グルコース、５０ｍｇ／Ｌアンピシリン含有）中に添加し、３０℃、２００ｒｐｍでＯＤ６００＝１．０となるまで培養した。

[0159] その培養液に、ヘルパーファージＶＣＳＭ１３を感染多重度（ＭＯＩ）＝２０となるように添加し、３７℃で３０分インキュベートした。３０℃、１５００ｒｐｍで１５分間の遠心分離後に上清を捨て、２×ＹＴ培地（５０ｍｇ／Ｌアンピシリン、５０ｍｇ／Ｌカナマイシン含有）５０ｍｌ中に菌体を再分散させた。これを、３０℃、２００ｒｐｍで１２時間培養を行い、ファージを培養上清中に生産させた。

[0160] その後、３０℃、１５００ｒｐｍで１５分間の遠心分離後に上清を回収し、ＰＥＧ沈殿によって濃縮、精製を行った。最後に、１ｍｌのＰＢＳに分散し、遠心分離によって凝集体を取り除いた。

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

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

[0161] ［実施例１－２］

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

[0162] ［比較例１－１］

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

[0163] （ラウンド）

各ラウンドにおいて行う操作を説明する。

上記１－２の通り、イムノチューブ（Immunotube；Nunc社、Maxisorp（登録商標））に、ＰＢＳで濃度１０μｇ／ｍＩに調製したヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体（Ｓｉｇｍａ、＃Ｉ４５０６）溶液を１ｍＩ加えて４℃で一晩インキュベートした。その後、ＰＢＳで５回洗浄し、２％ＢＳＡ－ＰＢＳを１ｍＩ加えて１時間インキュベートした。

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

[0164] （パニングにより選択されたファージの取得）

大腸菌ＴＧ１の培養液をＯＤ＝０．１となるように新しいＬＢ培地１０ｍＩに植菌し、３０℃で培養を行った。

[0165] 溶離液１ｍＩと培養した大腸菌ＴＧ１の培養液１ｍＩを混合し、３７℃で１時間インキュベートした。インキュベート後、２×ＹＴ培地（１％グルコース、５０ｍｇ／Ｌアンピシリン含有）中に添加し、３０℃、２００ｒｐｍでＯＤ６００＝１．０となるまで培養した。

[0166] その培養液に、ヘルパーファージＶＣＳＭ１３を感染多重度（ＭＯＩ）＝２０となるように添加し、３７℃で３０分インキュベートした。３０℃、１５００ｒｐｍで１５分間の遠心分離後後に上清を捨て、２×ＹＴ培地（５０ｍｇ／Ｌアンピシリン、５０ｍｇ／Ｌカナマイシン含有）５０ｍＩ中に菌体を再分散させた。これを、３０℃、２００ｒｐｍで１２時間培養を行い、培養上清中にファージを生産させた。

[0167] その後、３０℃、１５００ｒｐｍで１５分間の遠心分離後に上清を回収し、ＰＥＧ沈殿によって濃縮、精製を行った。最後に、１ｍｌのＰＢＳに分散し、遠心分離によって凝集体を取り除いた。

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

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

[0168] ［比較例１－２］

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

[0169] ＜１－６．抗－ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体－マウス由来単鎖抗体の遺伝子の有無の確認＞

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

[0170] 得られたファージミドＤＮＡを、１％アガロースゲルを用いた電気泳動によって分離し、エチジウムブロマイド染色によって可視化した。抗－ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体－マウス由来単鎖抗体の遺伝子を挿入していないファージミドベクター（ｐＰＬＦＭＡΔ２５０ｇＩＩＩｐ）と泳動距離を比較し、抗－ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体－マウス由来単鎖抗体の遺伝子の有無を目視で確認した。

[0171] ＜１－７．パニングの結果＞

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

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

ジティブクローン数の割合を示した。さらに、この割合を図１に示した。

[0172] [表2-1]

表２－１

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

[0173] [表2-2]

表２－２

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

[0174] [表3]

表３

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

[0175] 上記結果より、抗原であるヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体をチューブに固定した方法よりも、多重膜リポソームに結合させた方法を用いた方が、効率的なパニングが可能であることが分かった。

[0176] ＜２．ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体に結合するウサギ由来単鎖抗体のスクリーニング方法＞

以下では、ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体に結合するウサギ由来単鎖抗体（以下、「抗－ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体－ウサギ由来単鎖抗体」と称することがある。）を、ファージライブラリの中からスク

リーニングする方法を記載する。

[0177] ＜２－１．多重膜リポソームとヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体との結合＞

上記１－１と同様にして、ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体固定化ＭＬＶｓを調製した。

[0178] ＜２－２．抗－ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体－ウサギ由来単鎖抗体を提示するファージのライブラリの調製＞

まず、公知の方法により、ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体（Ｓｉｇｍａ、＃Ｉ４５０６）でアナウサギを免疫した。そのウサギの脾臓から全ＲＮＡを抽出した。

[0179] 逆転写酵素として、Superscript（登録商標） IV Reverse Transcriptase（Thermo Fisher Scientific社）を用いて全ＲＮＡからｃＤＮＡを作成した。ｃＤＮＡをテンプレートにして、配列番号１～１１のプライマーを用いて、重鎖（Ｈ鎖）の可変領域（V_Hドメイン）の遺伝子、及び、軽鎖（Ｌ鎖）の可変領域（V_Lドメイン）の遺伝子を増幅した。

[0180] 増幅したV_L遺伝子を、ｐＰＬＦＭＡΔｇＩＩＩｐベクターのＢａｍＨ　Ｉ／Ｎｏｔ　Ｉサイトに導入し、これをV_Lライブラリベクターとした。このときの宿主細胞は大腸菌ＴＧ１である。

次に、V_Lライブラリベクターを大腸菌から精製し、増幅したV_H遺伝子を、Ｎｃｏ　Ｉ／Ｓｐｅ　Ｉサイトに導入し、抗－ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体－ウサギ由来単鎖抗体を提示するファージライブラリベクター（２．０×10^7コロニー）を取得した。このときの宿主細胞も大腸菌ＴＧ１である。

[0181] 次に、２×ＹＴ培地（１％グルコース、５０ｍｇ／Ｌアンピシリン含有）５０ｍｌ中に、ファージライブラリベクターを含む大腸菌ＴＧ１を植菌し、３０℃、２００ｒｐｍでＯＤ＝１となるまで振とう培養した。その培養液に、ヘルパーファージＶＣＳＭ１３を感染多重度ＭＯＩ＝２０となるように加え、３７℃で１時間インキュベートした。３０℃、１５００ｒｐｍで１５分

間の遠心分離後に上清を捨て、２×ＹＴ培地（５０ｍｇ／Ｌアンピシリン、５０ｍｇ／Ｌカナマイシン含有）５０ｍｌ中に菌体を懸濁し、３０℃、２００ｒｐｍで１２時間以上培養して、培養上清中にファージを産生させた。

[0182] ４℃、１００００ｇで１５分間の遠心分離を２回行い、上清をファージライブラリとして回収した。そして、ＰＥＧ沈殿によりファージライブラリを濃縮し、１ｍｌの１×ＰＢＳ中に分散した。

[0183] ＜２－３．パニング＞

［実施例２］

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

[0184] （ラウンド）

各ラウンドにおいて行う操作を説明する。

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

[0185] その後、４℃、２００００ｇで２分間遠心分離し、上清を除去した。２％ＢＳＡ－ＰＢＳを１ｍｌ加えて懸濁し、別のエッペンドルフチューブに移した。この遠心分離、上清除去、２％ＢＳＡ－ＰＢＳによる懸濁、及び別のエッペンドルフチューブに移す操作を１単位として、合計３回繰り返した。

[0186] （パニングにより選択されたファージの取得）

続いて、４℃、２００００ｇで２分間遠心分離し、上清を除去した。１０ｍＭグリシン－ＨＣｌ（ｐＨ１．５）を０．９ｍｌ加えて懸濁し、溶液を別のエッペンドルフチューブに移した。４℃で回転転倒しながら１０分間イン

キュベートし、ファージを溶出した。

４℃、２００００ｇで２分間遠心分離し、上清を別のエッペンドルフチューブに移した。さらに、２Ｍ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）を０．１ｍｌ加えて、ファージ溶出液を中和した。

[0187] 一方で予め培養しておいた指数増殖中期の大腸菌ＴＧ１の培養液１ｍｌを加え、３７℃で３０分インキュベートした。

この溶液を、２×ＹＴ培地（１％グルコース、５０ｍｇ／Ｌアンピシリン含有）に懸濁し、３０℃、２００ｒｐｍで振とう培養した。ＯＤ＝１．０付近まで増殖させた後、ＶＣＳＭ１３を感染多重度（ＭＯＩ）＝２０となるように添加し、３７℃で３０分インキュベートし、３０℃、３０００ｇで１０分間遠心分離した。

[0188] ３０℃、１５００ｒｐｍで１５分間の遠心分離後に上清を除去し、５０ｍｌの２×ＹＴ培地（５０ｍｇ／Ｌアンピシリン、５０ｍｇ／Ｌカナマイシン含有）に菌体を懸濁後、３０℃、２００ｒｐｍで１２時間培養し、ファージを培養上清中に生産させた。

[0189] その後、４℃、２００００ｇで２分間遠心分離し、上清を回収し、ＰＥＧ沈殿（２回）し、１ｍｌのＰＢＳに分散させた。最後に、４℃、２００００ｇで２分間遠心分離し、上清をファージ溶液として回収した。

[0190] ここまでの操作を１ラウンドとする。上記操作によりラウンド１を行ったことになる。

その後、上記ラウンドをさらに２回実施した。すなわち、ラウンド３まで行った。各ラウンドで得られたコロニーからファージミドＤＮＡを回収した。

[0191] ［比較例２］

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

[0192] ＜２－４．ファージの回収から遺伝子配列のシーケンスまで＞

実施例２、比較例２で回収したファージミドＤＮＡから、抗－ヒト血清由

来ＩｇＧポリクローナル抗体－ウサギ由来単鎖抗体の遺伝子の有無を確認した。

[0193] 得られたファージミドＤＮＡを、１％アガロースゲルを用いた電気泳動によって分離し、エチジウムブロマイド染色によって可視化した。抗－ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体－ウサギ由来単鎖抗体の遺伝子を挿入していないファージミドベクター（ｐＰＬＦＭＡΔ２５０ｇＩＩＩｐ）と泳動距離を比較し、抗－ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体－ウサギ由来単鎖抗体の遺伝子の有無を目視で確認した。当該遺伝子の挿入を確認できたファージミドベクターは、ＤＮＡシーケンス解析（受託）によって配列決定を行った。

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

[0194] ＜２－５．パニングの結果＞

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

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

[0195] 上記結果より、実施例２では、ラウンド２において早くも回収率が大幅に増加することが分かった。なお、通常のイムノチューブを用いる方法では、少なくともラウンド３ないし４以上でなければ、ここまでの回収率（％）が得られないことを付言しておく。すなわち、多重膜リポソームを用いることによって、従来技術に比べて顕著に効率的なパニングが可能であることが分かった。

[0196] ＜３－１．抗原結合活性評価１＞

［実施例３－１］

各ラウンドで回収されたファージミド含有大腸菌のペレット単位（すなわ

ち、シングルコロニー化しておらず、ペレットに含まれる大腸菌が含むファージ全体）から得られたウサギ由来単鎖抗体について、以下のようにして抗原結合活性を評価した。

[0197] Maxisorp（登録商標）（Thermo Fisher Scientific社）プレートに、ヒトＩｇＧ１（Ｓｉｇｍａ、＃Ｉ５１５４）、ヒトＩｇＧ２（Ｓｉｇｍａ、＃Ｉ５４０４）、ヒトＩｇＧ３（Ｓｉｇｍａ、＃Ｉ５６５４）、ヒトＩｇＧ４（Ｓｉｇｍａ、＃Ｉ４６３９）、ヒトＩｇＡ（Ｓｉｇｍａ、＃Ｉ４０３６）を、それぞれが最終濃度５μｇ／ｍｌとなるように１００μｌのＰＢＳを添加し、４℃で一晩インキュベートした（抗原の固相化）。

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

[0198] 一方で、実施例２におけるパニング前、ラウンド１終了時、ラウンド２終了時、ラウンド３終了時で得られたファージミド含有大腸菌ペレット２５ｍｌのそれぞれに、２．５ｍｌのBugbuster（登録商標）（メルク社）、及び２．５μＬのBenzonase Nuclease（登録商標）（メルク社）を加えて溶菌後、４℃、１０,０００ｇで１５分間遠心分離し、上清を回収した。

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

[0199] 続いて、ＰＢＳＴでプレートを洗浄し、１０％　Ｂｌｏｃｋｉｎｇ　Ｏｎｅ－ＰＢＳＴで１００００倍希釈したＨＲＰ標識抗ｃ－ｍｙｃ抗体を１００μｌずつ加えて２５℃で１時間インキュベートした。

その後、ＰＢＳＴでプレートを洗浄し、ＴＭＢ溶液を１００μｌずつ加えて５分間インキュベートし、０．３Ｍ硫酸を１００μｌずつ加えて反応を停止した。

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

[0200] 図４にその結果を示す。図４より、ヒトＩｇＧ１抗体、ヒトＩｇＧ２抗体、ヒトＩｇＧ３抗体、ヒトＩｇＧ４抗体に対する結合活性として、わずか１ラウンドのパニング操作により、大きい吸光度を示すことが分かった。すなわち、１ラウンドのパニング操作にもかかわらず、抗原に特異的に結合するファージが濃縮されていることが分かった。

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

[0201] ＜３－２．抗原結合活性評価２＞

［実施例３－２］

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

[0202] 実施例２におけるパニング前、ラウンド１終了時、ラウンド２終了時、ラウンド３終了時で得られたファージミド含有大腸菌のコロニーを、９６ウェルディープウェルプレート内で、１ｍｌのOvernight Express（登録商標、メルク）培地中に植菌し、３０℃、１６００ｒｐｍで２４時間培養後、遠心分離で上清を除去した。これに、０．２ｍｌのBugbuster、及び０．２μＬのBenzonase Nucleaseを加えて溶菌後、遠心分離し、上清を回収した。それ以降は、上記３－１と同様である。

[0203] 図５、表４－１、表４－２に、ラウンド１終了時に得られた４８コロニーから得られたウサギ由来単鎖抗体について行った抗原結合活性評価の結果を示す。尚、「ライブラリ」とは、ファージミド含有大腸菌のペレット単位（すなわち、シングルコロニー化しておらず、ペレットに含まれる大腸菌が含むファージ全体）から得られたウサギ由来単鎖抗体について抗原結合活性を評価した結果である。また、ＯＤ値が０．１以上の場合をポジティブクローンと、それ未満をネガティブクローンとした。

尚、ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体に結合するウサギ由来単鎖抗体のスクリーニング方法において取得されたクローンの名称として、例えば

、「ラウンド１終了時のクローン番号１」のクローンを「Ｒ１－１」や「Ｉ－１」と略すことがある。同様に、例えば、「ラウンド２終了時のクローン番号１」のクローンを「Ｒ２－１」や「ＩＩ－１」と、「ラウンド３終了時のクローン番号１」のクローンを「Ｒ３－１」や「ＩＩＩ－１」と略すことがある。

[0204] [表4-1]

表４－１

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

[0205] [表4-2]

表４－２

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

[0206] 同様に、図６、表５－１、表５－２に、ラウンド２終了時に得られた４８コロニーから得られたウサギ由来単鎖抗体について行った抗原結合活性評価の結果を示す。ここでは、ヒトＩｇＧ１抗体、ヒトＩｇＧ３抗体、ヒトＩｇＡ抗体に対する結合活性の結果を示した。尚、「ライブラリ」とは、上記同様に、ファージミド含有大腸菌のペレット単位（すなわち、シングルコロニー化しておらず、ペレットに含まれる大腸菌が含むファージ全体）から得られたウサギ由来単鎖抗体について抗原結合活性を評価した結果である。また、ＯＤ値が０．１以上の場合をポジティブクローンと、それ未満をネガティブクローンとした。

[0207]

[表5-1]

表５－１

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

[0208]

[表5-2]

表５－２

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

[0209] 同様に、図７－１～図７－８、表６－１～表６－５に、ラウンド３終了時に得られた９６コロニーから得られたウサギ由来単鎖抗体について行った抗原結合活性評価の結果を示す。なお、ＯＤ値が０．１以上の場合をポジティブクローンと、それ未満をネガティブクローンとした。

[0210]

[表6-1]

表6－1

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

[0211]

[表6-2]

表６－２

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

[0212]

[表6-3]

表６－３

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

[0213]

[表6-4]

表６－４

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

[0214]

[表6-5]

表６－５

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

[0215] 以上の結果から以下のことが分かった。

ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体固定化ＭＬＶｓを用いることで、ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体に極めて特異的に結合するファージを効率的に回収することができた。ここで、１ラウンドのパニングで、全クローン数中のポジティブクローン数の割合が５０％を越える結果は、従来技術では困難であり、極めて稀なものである。また、ラウンドを重ねるごとにポジティブクローン数が顕著に増加し、結合量も顕著に増加していることから、多重膜リポソームを用いた本発明にかかるスクリーニング方法は、非常に高効率なスクリーニング技術であるといえる。

[0216] また、単離されたウサギ由来単鎖抗体の多くが、ヒトＩｇＧ１抗体、ヒトＩｇＧ２抗体、ヒトＩｇＧ３抗体、及びヒトＩｇＧ４抗体から成る群から選択される二以上に結合特異性を有していた。特に、ヒトＩｇＧ１抗体とヒトＩｇＧ３抗体の両者への結合量が同じウサギ由来単鎖抗体については、従来用いられているプロテインＡに代わるアフィニティリガンドとなる可能性が高いと考えられる。

[0217] さらに、数は少ないものの、ヒトＩｇＧ１抗体、ヒトＩｇＧ２抗体、ヒトＩｇＧ３抗体、及びヒトＩｇＧ４抗体に加え、ヒトＩｇＡ抗体にも同程度の吸光度を示すものもあった。これは、抗体のＬ鎖に特異性に結合することを示唆しているものと考えられる。

[0218] ＜４．解離速度定数ｋ$_{off}$の測定＞

［実施例４］

ラウンド１終了時に得られた４８コロニー、ラウンド２終了時に得られた４８コロニー、及びラウンド３終了時に得られた９６コロニーのうち、抗原結合活性評価２で吸光度が２．５を超えたコロニーのそれぞれについて、Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｘ－１００（ＧＥヘルスケア社）を用いて解離速度定数ｋ$_{off}$の測定を行った。

[0219] （サンプルの調製）

ファージミド含有大腸菌のコロニーを、９６ウェルディープウェルプレート内で、１ｍｌのOvernight Express（登録商標、メルク）培地中に植菌し、３０℃、１６００ｒｐｍで２４時間培養後、遠心分離で上清を除去した。これに、０．２ｍｌのBugbuster、及び０．２μＬのBenzonase Nucleaseを加えて溶菌後、遠心分離し、上清を回収した。回収した上清をPBSTで１０倍希釈した。

[0220] （測定方法）

以下の測定条件で測定を行った。

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

Running buffer: PBST

Binding time: 300 sec

Dissociation time: 180 sec

Elution: 10mM Glycine, pH 1.5

[0221] 既出の解離速度定数ｋ$_{off}$の算出方法に従って、解離速度定数ｋ$_{off}$を算出し、その大きい順に１位から１４０位までランキングしたものを表７－１～表７－５に示した。

[0222]

[表7-1]

表7－1

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

[0223] [表7-2]

表7－2

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

[0224] [表7-3]

表7－3

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

[0225] [表7-4]

表7－4

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

[0226] [表7-5]

表７－５

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

[0227] ＜５．ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体に結合するウサギ由来単鎖抗体遺伝子のアミノ酸配列の決定＞

［実施例５］

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

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

[0228] 図８－１、図８－２に、決定したアミノ酸配列を示す。以下のことが分かった。なお、図８－１に示す重鎖（Ｈ鎖）の可変領域（V_Hドメイン）の遺伝子について、１位（Ｒ３－７５）の配列を配列番号１２と、２位（Ｒ３－２３）の配列を配列番号１３と、３位（Ｒ３－２６）の配列を配列番号１４と、５位（Ｒ３－５８）の配列を配列番号１５と、６位（Ｒ２－１８）の配列を配列番号１６と、７位（Ｒ２－１６）の配列を配列番号１７と、８位（Ｒ１－２７）の配列を配列番号１８と、１１位（Ｒ３－８）の配列を配列番号１９と、６８位（Ｒ１－７）の配列を配列番号２０とする。

[0229] また、図８－２に示す重鎖（Ｌ鎖）の可変領域（V_Lドメイン）の遺伝子について、１位（Ｒ３－７５）の配列を配列番号２１と、２位（Ｒ３－２３）の配列を配列番号２２と、３位（Ｒ３－２６）の配列を配列番号２３と、５位（Ｒ３－５８）の配列を配列番号２４と、６位（Ｒ２－１８）の配列を配列番号２５と、７位（Ｒ２－１６）の配列を配列番号２６と、８位（Ｒ１－２７）の配列を配列番号２７と、１１位（Ｒ３－８）の配列を配列番号２８と、６８位（Ｒ１－７）の配列を配列番号２９とする。

[0230] １位（Ｒ３－７５）、６位（Ｒ２－１８）、１１位（Ｒ３－８）から得られたウサギ由来単鎖抗体遺伝子は、ＣＤＲ３として、「ＡＴＲＹＤＳＹＧＹＡＹＮＹＷＦＧＴＬＷ（配列番号３０、１９残基）」を有することが分かった。尚、これらのコロニーから取得されたウサギ由来単鎖抗体は、ヒトＩｇＧ１抗体、ヒトＩｇＧ２抗体、ヒトＩｇＧ３抗体、ヒトＩｇＧ４抗体、及びヒトＩｇＡ抗体に結合するものである。

[0231] ２位（Ｒ３－２３）から得られたウサギ由来単鎖抗体遺伝子は、ＣＤＲ３として、「ＧＳＹＹＤＳＨＧＹＡＹＶＳＬＷ（配列番号３１、１５残基）」を有することが分かった。尚、このコロニーから取得されたウサギ由来単鎖抗体は、ヒトＩｇＧ１抗体、ヒトＩｇＧ２抗体、ヒトＩｇＧ３抗体、及びヒトＩｇＧ４抗体に結合するものである。

[0232] ３位（Ｒ３－２６）から得られたウサギ由来単鎖抗体遺伝子は、ＣＤＲ３として、「ＡＴＤＹＧＩＹＧＹＡＹＧＨＬＷ（配列番号３２、１５残基）」であることが分かった。尚、このコロニーから取得されたウサギ由来単鎖抗体は、ヒトＩｇＧ１抗体、ヒトＩｇＧ２抗体、ヒトＩｇＧ３抗体、及びヒトＩｇＧ４抗体に結合するものである。

[0233] ５位（Ｒ３－５８）、８位（Ｒ１－２７）から得られたウサギ由来単鎖抗体遺伝子は、ＣＤＲ３として、「ＡＲＹＳＧＤＮＧＧＴＬＮＬＷ（配列番号３３、１４残基）」を有することが分かった。尚、このコロニーから取得されたウサギ由来単鎖抗体は、ヒトＩｇＧ１抗体、ヒトＩｇＧ２抗体、ヒトＩｇＧ３抗体、及びヒトＩｇＧ４抗体に結合するものである。

[0234] ７位（Ｒ２－１６）から得られたウサギ由来単鎖抗体遺伝子は、ＣＤＲ３として、「ＡＲＹＳＧＤＮＧＧＡＬＮＬＷ（配列番号３４、１４残基）」を有することが分かった。尚、このコロニーから取得されたウサギ由来単鎖抗体は、ヒトＩｇＧ１抗体、ヒトＩｇＧ２抗体、ヒトＩｇＧ３抗体、及びヒトＩｇＧ４抗体に結合するものである。

[0235] ＜６．ヒトＩｇＧ１抗体との結合能の測定＞

［実施例６］

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

[0236] （サンプルの調製方法）

得られたファージミド含有大腸菌のコロニーを、５００ｍｌバッフル付フラスコ内で、５０ｍｌのOvernight Express（登録商標、メルク）培地中に植菌し、３０℃、２００ｒｐｍで２４時間培養後、遠心分離で上清を除去した。これに、５ｍｌのBugbuster、及び０．２μＬのBenzonase Nucleaseを加えて溶菌後、遠心分離し、上清を回収した。これをＰＢＳＴで１０倍希釈し、

測定に用いた。

[0237] （測定方法）

以下の測定条件で測定を行った。

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

Running buffer: PBST

Binding time: 540 sec

Dissociation time: 120 sec

Elution: 10mM Glycine, pH 1.5

[0238] ［比較例６－１］

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

[0239] ［比較例６－２］

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

得られたファージミド含有大腸菌のコロニーを、５００ｍｌバッフル付フラスコ内で、５０ｍｌのOvernight Express（登録商標、メルク）培地中に植菌し、３０℃、２００ｒｐｍで２４時間培養後、遠心分離で上清を除去した。これに、５ｍｌのBugbuster、及び０．２μＬのBenzonase Nucleaseを加えて溶菌後、遠心分離し、上清を回収した。これをＰＢＳＴで１０倍希釈し、測定に用いた。

[0240] 図９－１、図９－２に測定結果を示した。ヒトＩｇＧ１抗体に対する結合能は、いずれのウサギ由来単鎖抗体も、比較例６－１のプロテインＡ、比較例６－２のmouse scFv-FMに比べて顕著に大きいことが分かった。

[0241] ＜７．ヒトＩｇＧ１抗体に対する解離定数K_Dの測定＞

［実施例７］

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

位（Ｒ１－２７）、６８位（Ｒ１－７）となったコロニーから取得されたウサギ由来単鎖抗体について、Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｘ－１００（ＧＥヘルスケア社）を用いて、ヒトＩｇＧ１抗体に対する解離定数K_Dの測定を行った。

[0242] （サンプルの調製方法）

ファージミドベクターよりT7 promoter primerおよびM13 primerを用いてウサギ由来単鎖抗体遺伝子を含むＤＮＡ断片をＰＣＲによって増幅した。ＤＮＡ断片を精製後、制限酵素Ｘｂａ　ＩおよびＮｏｔ　Ｉで消化し、pET22ベクター（メルク）のＸｂａ　Ｉ／Ｎｏｔ　Ｉサイトに挿入した。構築したウサギ由来単鎖抗体発現ベクターは、Ｎ末端側にペリプラズム移行シグナル配列（pelB leader signal）、Ｃ末端側にヒスチジンタグ（６ｘHis-tag）を融合された形で発現される。発現後、ウサギ由来単鎖抗体はペリプラズムに移行し、pelB leader配列はシグナルペプチダーゼによって切断される。

[0243] 構築したウサギ由来単鎖抗体－Ｈｉｓ発現ベクターで大腸菌Rosetta (DE3)を形質転換し、ＬＢアガープレート（５０ｍｇ／Ｌアンピシリン、３５ｍｇ／Ｌカナマイシン含有）上で培養した。得られたシングルコロニーをＬＢ培地１０ｍｌ（５０ｍｇ／Ｌアンピシリン、３５ｍｇ／Ｌカナマイシン含有）中で一晩培養した。得られた培養液を50ml Overnight Express TB培地（メルク）中に植菌し、３７℃、２００ｒｐｍで２４時間培養した。

得られた培養液を遠心分離（１００００ｒｐｍ、４℃、１５分）し、培養上清を得た。また、菌体は、Bugbuster、リゾチーム、Benzonase Nucleaseを含む５ｍｌの溶解バッファと懸濁し、３７℃で１時間インキュベートすることで破砕した。１００００ｒｐｍ、４℃、１５分間遠心分離し、上清を菌体内可溶性画分として回収した。

[0244] 上述の培養上清および菌体内可溶性画分をそれぞれHis-Trap HPカラム（GE Healthcare）にアプライし、０．４Ｍイミダゾールを用いたグラジェント溶出によってウサギ由来単鎖抗体－Ｈｉｓを回収した。また、溶離液のタンパク質濃度をDC Protein assay (Biorad) によって定量した。さらに、溶離液中のウサギ由来単鎖抗体－Ｈｉｓの純度をＳＤＳ－ＰＡＧＥによって確認し

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

[0245] （測定方法）

以下の測定条件で測定を行った。

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

Running buffer: PBST

Binding time: 180 sec

Dissociation time: 600 sec

Elution: 10mM Glycine, pH 1.5

Mode: Single cycle kinetics mode

[0246] 表８に、解離定数K_Dの測定結果を含め、取得されたウサギ由来単鎖抗体の特性をまとめた。１位（Ｒ３－７５）のウサギ由来単鎖抗体のヒトＩｇＧ１抗体に対する解離定数K_Dは５．５×10^{-10}Ｍであることが分かった。一般的なプロテインＡのヒトＩｇＧ１抗体に対する解離定数K_Dは５－１０ｎＭ程度であることを考慮すると、１位（Ｒ３－７５）のウサギ由来単鎖抗体は、ヒトＩｇＧ１抗体に対して非常に強固に結合するものと考えられる。

[0247] なお、表８のＬｏｃａｔｉｏｎにおいては、培養上清のサンプルを用いて活性が確認されたものを「上清」と、可溶性画分のサンプルを用いて活性が確認されたものを「ペリプラズム」と記載した。「上清」の場合には、大腸菌からファージまたはウサギ由来単鎖抗体が分泌されたことを示しており、「ペリプラズム」の場合には、大腸菌のペリプラズム内に存在していたことを示している。

[0248]

[表8]

表8

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

[0249] １位（Ｒ３－７５）、３位（Ｒ３－２６）、および６位（Ｒ２－１８）のウサギ由来単鎖抗体は、培養上清中に分泌されたことが分かった。

[0250] ＜８．ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体の分離剤＞

［実施例８］

（単鎖抗体の調製）

Jar Fermenterを用いた流加培養により、「Ｒ３－２６」の単鎖抗体を大量生産した。さらに、培養上清中に分泌された単鎖抗体をHisTrap HPカラム（GEヘルスケア）を利用した固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー（IMAC）によって精製した。さらに、脱塩・バッファ交換用Hi Trap Desaltingカラム（GEヘルスケア）を用いて０．５Ｍ ＮａＣｌを含む０．１M炭酸バッファー（ｐＨ８．３）に置換、さらには、限外ろ過を用いて濃縮した。最終的に、濃度１ｍｇ／ｍｌ、体積１０ｍｌの単鎖抗体を得た。

[0251] （担体への単鎖抗体の固定化）

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

[0252] （ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体の分離）

単鎖抗体を固定した上記カラム５ｍｌをクロマトグラフィーシステムAKTA

Purifier UPC 10（GEヘルスケア）にセットし、ＰＢＳで平衡化した。そこへ、１ｍｇ／ｍｌに調製したヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体（Ｓｉｇｍａ、＃Ｉ４５０６）を１ｍｌ／ｍｉｎの流速で１０ｍｌ分供給した。その後、カラムをＰＢＳで洗浄し、ＵＶ２８０の値がベースラインとなったのを確認後、０．５Ｍ アルギニン（ｐＨ１．５）を供給して、ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体をカラムから溶出した。

[0253] その結果、図１０に示す通りの破過曲線が得られた。さらに、０．５Ｍ アルギニン（ｐＨ１．５）を用いてヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体をカラムから強制的に解離させたところ、高純度で単離できた。素通り画分と溶出画分とのピーク面積比から、供給したＩｇＧ（１０ｍｇ）の内、およそ５３％（５．３ｍｇ）がカラムに吸着し、溶出された。

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

[0254] ＜９． ヒト抗体のＬ鎖に特異的に結合するウサギ由来単鎖抗体のスクリーニング方法＞

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

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

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

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

[0255] 以下では、ヒト抗体のＬ鎖に特異的に結合するウサギ由来単鎖抗体（以下、「抗－ヒト抗体Ｌ鎖－ウサギ由来単鎖抗体」と称することがある。）を、ファージライブラリの中からスクリーニングする方法を記載する。

尚、抗－ヒト抗体Ｌ鎖－ウサギ由来単鎖抗体のスクリーニング方法において取得されたクローンの名称として、例えば、「ラウンド１終了時のクローン番号１」のクローンを「ＩｇＡ　Ｒ１－１」や「ＩｇＡ　Ｉ－１」と略すことがある。同様に、例えば、「ラウンド２終了時のクローン番号１」のクローンを「ＩｇＡ　Ｒ２－１」や「ＩｇＡ　ＩＩ－１」と、「ラウンド３終了時のクローン番号１」のクローンを「ＩｇＡ　Ｒ３－１」や「ＩｇＡ　ＩＩＩ－１」と略すことがある。

[0256] ＜９－１．多重膜リポソームとヒト血清由来ＩｇＡポリクローナル抗体との結合＞

上記１－１と同様にして、ヒト血清由来ＩｇＡポリクローナル抗体固定化ＭＬＶｓを調製した。ヒト血清由来ＩｇＡポリクローナル抗体には、Ｓｉｇｍａの＃Ｉ４０３６を用いた。

[0257] ＜９－２．抗－ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体－ウサギ由来単鎖抗体を提示するファージのライブラリの調製＞

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

[0258] ＜９－３．パニング＞

［実施例９－１］

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

[0259] ［比較例９－１］

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

[0260] ＜９－４．ファージの回収から遺伝子配列のシーケンスまで＞

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

[0261] ＜９－５．パニングの結果＞

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

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

[0262] 上記結果より、実施例９－１では、ラウンド３において回収率が大幅に増加し、比較例９－１に比べて１００倍以上になった。ヒト血清由来ＩｇＡポリクローナル抗体固定化ＭＬＶｓを用いたパニングにおいても、効率的なパニングが実施できていることが分かった。

[0263] ＜９－６．抗原結合活性評価１＞

［実施例９－２］

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

た抗原としてはヒトＩｇＡ抗体（Ｓｉｇｍａ、＃Ｉ４０３６）を用いたのみであり、抗原結合活性評価もヒトＩｇＡ抗体に対してしか行わなかった。すなわち、ヒトＩｇＧ１抗体等の固相化およびヒトＩｇＧ１抗体等に対する抗原結合活性評価は行わなかった。

[0264] 図１３にその結果を示す。図１３より、ラウンド２においてヒトＩｇＡ抗体に対する抗原結合活性が飛躍的に増加した。さらに、ラウンド３においては、ラウンド２よりもさらにヒトＩｇＡ抗体に対する抗原結合活性が高くなった。この結果より、ヒト血清由来ＩｇＡポリクローナル抗体固定化ＭＬＶｓを担体としてパニングを行った場合でも、ヒトＩｇＡ抗体に対して特異的に結合するファージが濃縮されていることが分かった。

[0265] ＜９－７．抗原結合活性評価２＞

［実施例９－３］

各ラウンドで回収されたファージミド含有大腸菌のコロニーから得られたウサギ由来単鎖抗体について、３－２と同様にして抗原結合活性を評価した。尚、ここでは、プレートに固相化した抗原としてはヒトＩｇＡ抗体（Ｓｉｇｍａ、＃Ｉ４０３６）を用いただけでなく、３－２と同様にヒトＩｇＧ１抗体等も用い、ヒトＩｇＧ１抗体等に対する抗原結合活性評価も行った。

[0266] 図１４、表９－１、表９－２に、ラウンド１終了時に得られた３２コロニーから得られたウサギ由来単鎖抗体について行った抗原結合活性評価の結果を示す。また、ＯＤ値が０．１以上の場合をポジティブクローンと、それ未満をネガティブクローンとした。

[0267]

[表9-1]

表９－１

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

[0268] [表9-2]

表９－２

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

[0269] 同様に、図１５、表１０－１、表１０－２に、ラウンド２終了時に得られた３２コロニーから得られたウサギ由来単鎖抗体について行った抗原結合活性評価の結果を示す。また、ＯＤ値が０．１以上の場合をポジティブクローンと、それ未満をネガティブクローンとした。

[0270]

[表10-1]

表10－1

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

[0271] [表10-2]

表１０－２

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

[0272] 同様に、図１６、表１１－１、表１１－２に、ラウンド３終了時に得られた３２コロニーから得られたウサギ由来単鎖抗体について行った抗原結合活性評価の結果を示す。また、ＯＤ値が０．１以上の場合をポジティブクローンと、それ未満をネガティブクローンとした。

[0273]

[表11-1]

表11－1

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

[0274] [表11-2]

表１１－２

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

[0275] 以上の結果から以下のことが分かった。

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

[0276] ＜９－８．ヒト血清由来ＩｇＡポリクローナル抗体に結合するウサギ由来単鎖抗体遺伝子のアミノ酸配列の決定＞

［実施例１０］

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

[0277] ラウンド１終了時に得られた３２コロニーについて、V_Hドメインの遺伝子配列から決定したアミノ酸配列を図１７－１に示し、各アミノ酸配列について図中に示す通り配列番号を付した。尚、配列が空欄の部分は配列決定ができなかったものである。

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

クローン中の出現確率を図１７－２に示した。「ネガティブクローン」とは、V_HドメインのＣＤＲ３領域のアミノ酸配列が決定できなかったクローンに関するものである。こちらにも、各アミノ酸配列について図中に示す通り配列番号を付した。

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

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

[0278] また、備考欄に、例えば「共通１」と記載されているクローンが複数ある。「共通１」と記載されているクローン群はすべて同一のクローンであることを示している。同様に、「共通２」と記載されているクローン群もすべて同一のクローンであることを示している。ただし、これらの付与番号は便宜的なものに過ぎない。

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

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

[0279] 以上の結果から以下のことが分かった。

図１７－６から分かるように、ラウンド３においては、＜２．ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体に結合するウサギ由来単鎖抗体のスクリーニング方法＞で得られた、「Ｒ２－１８」、「Ｒ３－８（ただし、当該クローンは、Ｒ２－１８と同一クローンである。）」、「Ｒ３－７５」が含むＣＤＲ３のアミノ酸配列である「ＡＴＲＹＤＳＹＧＹＡＹＮＹＷＦＧＴＬＷ（配列

番号３０、１９残基）」を含むV_Hドメインが、全３２クローン中２６クローン取得され、８１．３％の割合で存在した。

[0280] これらのうち、１２クローンと８クローンは、それぞれ、共通１のクローン、共通２のクローンであった。また、他の２クローンは、＜２．ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体に結合するウサギ由来単鎖抗体のスクリーニング方法＞で得られた、「Ｒ２－１８（６位；ただし、当該クローンは、「Ｒ３－８」と同一クローンである。）」と同一の共通４のクローンであった。

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

[0281] さらに、「ＡＲＡＤＹＮＴＶＡＹＦＤＬＷ（１４残基、配列番号１４１）」、「ＡＲＡＤＹＮＴＡＡＹＦＤＬＷ（１４残基、配列番号１４２）」、「ＶＲＡＤＹＮＴＶＳＹＦＤＬＷ（１４残基、配列番号１４３）」のように、V_HドメインのＣＤＲ３のアミノ酸配列において互いに相同性の高いクローンも複数個取得された。

[0282] また、ウェスタンブロットの結果、ラウンド３で取得されたクローンは、V_HドメインのＣＤＲ３のアミノ酸配列の長さに拘わらず、全てがヒト抗体の軽鎖（Ｌ鎖）、具体的にはκ鎖に結合していることが明らかとなった。

[0283] 以上の結果より、ヒト血清由来ＩｇＡポリクローナル抗体を担体に用いてパニングを行うことで、ヒトＩｇＧ抗体とヒトＩｇＡ抗体との共通部分である、ヒト抗体の軽鎖（Ｌ鎖）、具体的にはκ鎖に特異的に結合する単鎖抗体を極めて高効率に回収できることが明らかとなった。

[0284] ＜９－９．解離速度定数k_{off}の測定＞

［実施例１１］

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

、表１２に示した。また、R^2も併せて記載した。

[0285] ［比較例１１］

「ＩｇＡ　Ｒ１－２」を用いた以外は実施例１１と同様にしたものをネガティブコントロールとし、比較例１１とした。

[0286] [表12]

表12

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

[0287] ラウンド３で得られたクローン全てにおいて、ヒトＩｇＡ抗体への結合が確認された。さらに、表１２に示す通り、ラウンド３で取得されたクローンによる単鎖抗体の解離速度定数k_{off}のほとんどは、10^{-5}～10^{-4}ｓｅｃ$^{-1}$のオーダーの範囲にあり、非常に小さかった。特に、３２クローン中１２ク

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

[0288] 以上の結果より、本方法は、ライブラリ中で存在率の低いクローンについても極めて高効率で回収可能であり、高い親和性・特異性を有する単鎖抗体の回収・単離に有効であることがわかった。

[0289] ＜１０．Ｓｆ９細胞株由来ＣＤ９のExtracellular Domain 2 （ＥＣ２）部分のみとヒト抗体のＦｃドメインとの融合タンパク質に結合するウサギ由来単鎖抗体のスクリーニング方法＞

以下では、Ｓｆ９細胞株由来ＣＤ９のExtracellular Domain 2 （ＥＣ２）部分のみとヒト抗体のＦｃドメインとの融合タンパク質（以下、ＥＣ２ｈＦｃと称することがある。）に結合するウサギ由来単鎖抗体（以下、「抗－ＥＣ２ｈＦｃ－ウサギ由来単鎖抗体」と称することがある。）を、ファージライブラリの中からスクリーニングする方法を記載する。

[0290] ＜１０－１．ＥＣ２ｈＦｃの調製＞

ＥＣ２ｈＦｃの遺伝子を含む塩基配列（配列番号１４８）をＰＣＲで増幅し、昆虫細胞用発現ベクターｐＡＣＧＰ６７（BD Bioscience社製）中のＢａｍＨ　Ｉサイト内に導入した。構築したベクターで昆虫細胞Ｓｆ９を形質転換し、さらに、バキュロウィルスを感染させて、１０％ＦＢＳを含むGrace培地中で培養した。培養上清中に生産されたＥＣ２ｈＦｃ遺伝子が導入された組換えバキュロウィルスを回収した。SF900 SFM培地中で継代している昆虫細胞Ｓｆ９に対し、組換えバキュロウィルスを感染させることで、培養上清中にＥＣ２ｈＦｃを産生させた。上清を遠心分離によって回収し、限外濾過ならびにHi Trap Desaltingカラムを用いたゲルクロマトグラフィによってＥＣ２ｈＦｃを回収した。回収されたＥＣ２ｈＦｃは、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、ならびに抗ＣＤ９抗体および抗ヒトＩｇＧ抗体を用いたウェスタンブロット解析によって確認した。

[0291] ＜１０－２．多重膜リポソームとＥＣ２ｈＦｃとの結合＞

上記１－１と同様にして、ＥＣ２ｈＦｃを固定化したＭＬＶｓを調製した。

[0292] ＜１０－３．ウサギ由来単鎖抗体を提示するファージのライブラリの調製＞

ＣＤ９を細胞膜上に強制発現させたＨＥＫ２９３Ｔ細胞を免疫したこと以外は上記２－２と同様にして、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞にＣＤ９を強制発現した細胞に対するウサギ由来単鎖抗体を提示するファージのライブラリを調製した。

[0293] ＜１０－４．パニング＞

［実施例１２］

上記１０－３で調製したファージライブラリと、上記１０－２で調製したＥＣ２ｈＦｃ固定化ＭＬＶｓを用いて、上記２－３と同様にパニングを実施した。

[0294] ＜１０－５．ファージの回収から遺伝子配列のシーケンスまで＞

上記２－２と同様にして、実施例１２で回収したファージミドＤＮＡから、抗－ＥＣ２ｈＦｃ－ウサギ由来単鎖抗体の遺伝子の有無を確認し、シーケンス解析によって配列決定を行った。

[0295] ＜１０－６．パニングの結果＞

図１９に、実施例１２におけるパニング前、ラウンド１終了時、ラウンド２終了時、ラウンド３終了時、ラウンド４終了時におけるファージ数を示した。

また、図２０に、実施例１２におけるラウンド１終了時、ラウンド２終了時、ラウンド３終了時、 ラウンド４終了時における各ファージ数を、それぞれパニング前のファージ数で除した回収率（％）を示した。

[0296] 上記結果より、実施例１２では、ラウンド３において回収率が大幅に増加した。したがって、ＥＣ２ｈＦｃ固定化ＭＬＶｓを用いたパニングにおいても、効率的なパニングが実施できていることが分かった。

[0297] ＜１０－７．解離速度定数k_{off}の測定＞

［実施例１３］

＜４．解離速度定数ｋ$_{off}$の測定＞と同様にして、ラウンド３終了時に得られた４８コロニー、ならびに、ラウンド４終了時に得られた４８コロニーについて解離速度定数ｋ$_{off}$の測定を行った。その結果を図２１、図２２－１、図２２－２に示した。

[0298] ラウンド３および４で得られたクローン全てにおいて、ＥＣ２ｈＦｃへの結合が確認された。さらに、図２２に示す通り、ラウンド３および４で取得されたクローンによる単鎖抗体の解離速度定数ｋ$_{off}$のほとんどは、10^{-3} ｓｅｃ$^{-1}$のオーダーの範囲にあり、非常に小さかった。

[0299] 以上の結果より、本方法は、ライブラリ中で存在率の低いクローンについても極めて高効率で回収可能であり、高い親和性・特異性を有する単鎖抗体の回収・単離に有効であることがわかった。

[0300] ＜１１．Ｂ型インフルエンザウイルス由来Nucleotide-binding Protein に結合するウサギ由来単鎖抗体のスクリーニング方法＞

以下では、Ｂ型インフルエンザウイルス由来Nucleotide-binding Proteinに結合するウサギ由来単鎖抗体（以下、「抗－Ｂ型インフルエンザウイルス由来ＮＰ－ウサギ由来単鎖抗体」と称することがある。）を、ファージライブラリの中からスクリーニングする方法を記載する。

[0301] ＜１１－１．Ｂ型インフルエンザウイルス由来ＮＰの調製＞

ＮＰの遺伝子を含む塩基配列（配列番号１４９）をpETBAベクター（株式会社バイオダイナミクス研究所製）内にクローニングし、本ベクターで大腸菌Rosetta（DE３）を形質転換した。形質転換体をOvernight Express TB medium（＋Amp）100ml中に植菌し、30℃、200rpmで24時間培養した。菌体を遠心分離で回収後、Bugbuster、リゾチーム、Benzonaseを含むLysis Bufferを用いて溶菌し、遠心分離によって上清を回収した。さらに、これをHis Trap HPカラムにアプライし、カラムを洗浄後、500 mMイミダゾールを用いて溶出した。PBSで透析後、4℃で保存した。

[0302] ＜１１－２．多重膜リポソームとＢ型インフルエンザウイルス由来ＮＰとの

結合＞

上記１－１と同様にして、Ｂ型インフルエンザウイルス由来ＮＰを固定化したＭＬＶｓを調製した。

[0303] ＜１１－３．抗－Ｂ型インフルエンザウイルス由来ＮＰ－ウサギ由来単鎖抗体を提示するファージのライブラリの調製＞

Ｂ型インフルエンザウイルス由来ＮＰでアナウサギを免疫したこと以外は上記２－２と同様にして、抗－Ｂ型インフルエンザウイルス由来ＮＰ－ウサギ由来単鎖抗体を提示するファージのライブラリを調製した。

[0304] ＜１１－４．パニング＞

［実施例１４］

上記１１－３で調製したファージライブラリと、上記１１－２で調製したＢ型インフルエンザウイルス由来ＮＰ固定化ＭＬＶｓを用いて、上記２－３と同様にパニングを実施した。

[0305] ＜１１－５．ファージの回収から遺伝子配列のシーケンスまで＞

上記２－２と同様にして、実施例１４で回収したファージミドＤＮＡから、抗－Ｂ型インフルエンザウイルス由来ＮＰ－ウサギ由来単鎖抗体の遺伝子の有無を確認し、シーケンス解析によって配列決定を行った。

[0306] ＜１１－６．パニングの結果＞

図２３に、実施例１４におけるパニング前、ラウンド１終了時、ラウンド２終了時、ラウンド３終了時、ラウンド４終了時におけるファージ数を示した。

また、図２４に、実施例１４におけるラウンド１終了時、ラウンド２終了時、ラウンド３終了時、 ラウンド４終了時における各ファージ数を、それぞれパニング前のファージ数で除した回収率（％）を示した。

[0307] 上記結果より、実施例１４では、ラウンド３において回収率が大幅に増加した。したがって、Ｂ型インフルエンザウイルス由来ＮＰ固定化ＭＬＶｓを用いたパニングにおいても、効率的なパニングが実施できていることが分かった。

[0308] ＜１１－７．解離速度定数ｋ$_{off}$の測定＞

［実施例１５］

＜４．解離速度定数ｋ$_{off}$の測定＞と同様にして、ラウンド３終了時に得られた４８コロニー、ならびに、ラウンド４終了時に得られた４８コロニーについて解離速度定数ｋ$_{off}$の測定を行った。その結果を表１４－１、表１４－２、表１４－３に示した。

[0309] [表14-1]

表14－1

クローン番号	解離速度定数 koff (s^-1)	クローン番号	解離速度定数 koff (s^-1)
NP R3-1	8.93E-04	NP R3-26	2.92E-03
NP R3-4	測定不能	NP R3-27	3.15E-03
NP R3-6	2.09E-03	NP R3-28	測定不能
NP R3-7	1.81E-03	NP R3-33	3.10E-03
NP R3-10	1.43E-03	NP R3-35	2.06E-03
NP R3-12	1.03E-02	NP R3-36	4.27E-03
NP R3-14	9.77E-04	NP R3-37	4.15E-03
NP R3-16	9.58E-03	NP R3-38	1.35E-03
NP R3-17	1.38E-03	NP R3-39	3.88E-03
NP R3-19	9.74E-04	NP R3-43	2.46E-03
NP R3-20	8.68E-03	NP R3-45	3.42E-04
NP R3-23	6.76E-04	NP R3-46	8.35E-03
NP R3-24	2.47E-03	NP R3-47	4.09E-04

[0310]

[表14-2]

表14－2

クローン番号	解離速度定数 koff (s^-1)	クローン番号	解離速度定数 koff (s^-1)
NP R4-01	1.72E-03	NP R4-29	8.92E-04
NP R4-06	測定不能	NP R4-30	1.69E-03
NP R4-07	1.36E-03	NP R4-31	1.18E-02
NP R4-08	2.69E-03	NP R4-32	1.02E-03
NP R4-10	6.68E-05	NP R4-33	3.73E-03
NP R4-11	1.27E-02	NP R4-34	7.73E-04
NP R4-12	測定不能	NP R4-35	2.70E-03
NP R4-13	9.00E-04	NP R4-36	測定不能
NP R4-14	1.91E-04	NP R4-37	8.46E-04
NP R4-15	8.42E-03	NP R4-38	9.55E-04
NP R4-17	2.98E-03	NP R4-39	1.08E-03
NP R4-18	2.84E-03	NP R4-40	9.24E-04
NP R4-21	3.57E-03	NP R4-41	8.14E-04
NP R4-22	1.96E-04	NP R4-42	3.30E-04
NP R4-23	8.45E-04	NP R4-43	6.08E-03
NP R4-24	9.00E-04	NP R4-44	1.45E-03
NP R4-25	3.47E-03	NP R4-45	9.00E-04
NP R4-26	2.86E-03	NP R4-46	3.33E-04
NP R4-27	9.99E-04	NP R4-47	2.75E-03
NP R4-28	3.29E-04	NP R4-48	9.59E-04

[0311]

[表14-3]

表14－3

順位	クローン番号	解離速度定数 koff (s^-1)	順位	クローン番号	解離速度定数 koff (s^-1)	順位	クローン番号	解離速度定数 koff (s^-1)
1	NP R4-10	6.68E-05	23	NP R3-14	9.77E-04	45	NP R3-33	3.10E-03
2	NP R4-14	1.91E-04	24	NP R4-27	9.99E-04	46	NP R3-38	3.15E-03
3	NP R4-22	1.96E-04	25	NP R4-32	1.02E-03	47	NP R4-25	3.47E-03
4	NP R4-28	3.29E-04	26	NP R4-39	1.08E-03	48	NP R4-21	3.57E-03
5	NP R4-42	3.30E-04	27	NP R4-07	1.36E-03	49	NP R3-28	3.70E-03
6	NP R4-46	3.33E-04	28	NP R3-17	1.38E-03	50	NP R4-33	3.73E-03
7	NP R3-45	3.42E-04	29	NP R3-10	1.43E-03	51	NP R3-39	3.88E-03
8	NP R3-47	4.09E-04	30	NP R4-44	1.45E-03	52	NP R3-37	4.15E-03
9	NP R3-23	6.76E-04	31	NP R4-30	1.69E-03	53	NP R3-36	4.27E-03
10	NP R4-34	7.73E-04	32	NP R4-01	1.72E-03	54	NP R4-43	6.08E-03
11	NP R4-41	8.14E-04	33	NP R3-7	1.81E-03	55	NP R3-46	8.35E-03
12	NP R4-23	8.45E-04	34	NP R3-35	2.06E-03	56	NP R4-15	8.42E-03
13	NP R4-37	8.46E-04	35	NP R3-6	2.09E-03	57	NP R3-20	8.68E-03
14	NP R4-29	8.92E-04	36	NP R3-43	2.46E-03	58	NP R3-16	9.58E-03
15	NP R3-01	8.93E-04	37	NP R3-24	2.47E-03	59	NP R3-12	1.03E-02
16	NP R4-13	9.00E-04	38	NP R4-08	2.69E-03	60	NP R4-31	1.18E-02
17	NP R4-24	9.00E-04	39	NP R4-35	2.70E-03	61	NP R4-11	1.27E-02
18	NP R4-45	9.00E-04	40	NP R4-47	2.75E-03	62	NP R4-06	測定不能
19	NP R4-40	9.24E-04	41	NP R4-18	2.84E-03	63	NP R4-12	測定不能
20	NP R4-38	9.55E-04	42	NP R4-26	2.86E-03	64	NP R3-4	測定不能
21	NP R4-48	9.59E-04	43	NP R3-26	2.92E-03	65	NP R3-27	測定不能
22	NP R3-19	9.74E-04	44	NP R4-17	2.98E-03	66	NP R4-36	測定不能

[0312] ラウンド３および４で得られたクローン全てにおいて、Ｂ型インフルエンザウイルス由来ＮＰへの結合が確認された。さらに、表１４－１、表１４－２、表１４－３に示す通り、ラウンド３および４で取得されたクローンによる単鎖抗体の解離速度定数k_{off}のほとんどは、10^{-3} sec^{-1}のオーダー以下の範囲にあり、非常に小さかった。

[0313] 以上の結果より、本方法は、ライブラリ中で存在率の低いクローンについても極めて高効率で回収可能であり、高い親和性・特異性を有する単鎖抗体の回収・単離に有効であることがわかった。

[0314] また、単離されたクローンのアミノ酸配列を解析し、同一・同類クローン

を除く解離速度定数k_{off}の小さな６種類のクローンについて、ＳＰＲセンサを用いて解離定数K_Dの測定を行った。表１５に示すとおり、得られたK_D値の大部分が10^{-8} Mオーダーであり、Ｂ型インフルエンザの検査に利用可能なＢ型インフルエンザウイルス由来ＮＰ抗原に対して高い親和力を有するｓｃＦｖが単離できていることが示された。

[0315] [表15]

表15

クローン番号	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (M)	R_{max} (RU)
NP R3-1	1.47E+04	4.63E-04	3.14E-08	1070
NP R3-47	3.07E+03	1.95E-03	6.36E-07	399.3
NP R4-7	9.98E+03	1.10E-03	1.10E-07	827.8
NP R4-10	2.00E+04	4.24E-04	2.12E-08	934.4
NP R4-14	1.28E+04	1.11E-03	8.68E-08	465.3
NP R4-41	1.70E+04	5.40E-04	3.18E-08	1967

[0316] ＜１２．ヒト由来炎症性タンパク質C-reactive Protein (CRP)に結合するウサギ由来単鎖抗体のスクリーニング方法＞

以下では、ヒト由来炎症性タンパク質C-reactive Protein (CRP)に結合するウサギ由来単鎖抗体（以下、「抗－ヒト由来ＣＲＰ－ウサギ由来単鎖抗体」と称することがある。）を、ファージライブラリの中からスクリーニングする方法を記載する。

[0317] ＜１２－１．ヒト由来ＣＲＰ＞

ヒト由来ＣＲＰとしては、ｒＣＲＰ（Ｃ‐リアクティブプロテイン（リコンビナント））（オリエンタル酵母工業株式会社製、＃47190000）を用いた。

[0318] ＜１２－２．多重膜リポソームとヒト由来ＣＲＰとの結合＞

上記１－１と同様にして、ヒト由来ＣＲＰを固定化したＭＬＶｓを調製した。

[0319] ＜１２－３．抗－ヒト由来ＣＲＰ－ウサギ由来単鎖抗体を提示するファージのライブラリの調製＞

ヒト由来ＣＲＰでアナウサギを免疫したこと以外は上記２－２と同様にし

て、抗－ＣＲＰ－ウサギ由来単鎖抗体を提示するファージのライブラリを調製した。

[0320] ＜１２－４．パニング＞

［実施例１６］

上記１２－３で調製したファージライブラリと、上記１２－２で調製したヒト由来ＣＲＰ固定化ＭＬＶｓを用いて、上記２－３と同様にパニングを実施した。

[0321] ＜１２－５．ファージの回収から遺伝子配列のシーケンスまで＞

上記２－２と同様にして、実施例１６で回収したファージミドＤＮＡから、抗－ヒト由来ＣＲＰ－ウサギ由来単鎖抗体の遺伝子の有無を確認し、シーケンス解析によって配列決定を行った。

[0322] ＜１２－６．パニングの結果＞

図２５に、実施例１６におけるパニング前、ラウンド１終了時、ラウンド２終了時、ラウンド３終了時におけるファージ数を示した。

また、図２６に、実施例１６におけるラウンド１終了時、ラウンド２終了時、ラウンド３終了時における各ファージ数を、それぞれパニング前のファージ数で除した回収率（％）を示した。

[0323] 上記結果より、実施例１６では、ラウンド２において回収率が大幅に増加した。したがって、ヒト由来ＣＲＰ固定化ＭＬＶｓを用いたパニングにおいても、効率的なパニングが実施できていることが分かった。

[0324] ＜１２－７．解離速度定数k_{off}の測定＞

［実施例１７］

＜４．解離速度定数k_{off}の測定＞と同様にして、ラウンド２終了時に得られた４８コロニー、ならびに、ラウンド３終了時に得られた４８コロニーについて解離速度定数k_{off}の測定を行った。その結果を表１６に示した。

[0325]

[表16]

表16

順位	クローン番号	解離速度定数 koff (s^-1)	順位	クローン番号	解離速度定数 koff (s^-1)	順位	クローン番号	解離速度定数 koff (s^-1)
1	CRP R3-40	1.21E-05	23	CRP R3-36	1.74E-03	45	CRP R2-16	2.61E-03
2	CRP R3-41	5.31E-05	24	CRP R2-26	1.75E-03	46	CRP R3-09	2.66E-03
3	CRP R3-19	1.63E-04	25	CRP R2-5	1.77E-03	47	CRP R3-47	2.93E-03
4	CRP R2-10	1.88E-04	26	CRP R2-29	1.77E-03	48	CRP R2-37	3.06E-03
5	CRP R2-7	2.00E-04	27	CRP R3-13	1.77E-03	49	CRP R3-42	3.11E-03
6	CRP R2-34	2.64E-04	28	CRP R3-24	1.81E-03	50	CRP R3-05	3.35E-03
7	CRP R2-6	3.81E-04	29	CRP R2-14	1.91E-03	51	CRP R2-42	3.67E-03
8	CRP R3-02	5.77E-04	30	CRP R2-2	1.93E-03	52	CRP R2-36	3.89E-03
9	CRP R2-32	6.24E-04	31	CRP R2-12	1.95E-03	53	CRP R3-37	4.61E-03
10	CRP R2-45	6.47E-04	32	CRP R2-46	1.95E-03	54	CRP R3-06	5.25E-03
11	CRP R3-11	8.37E-04	33	CRP R3-21	1.98E-03	55	CRP R3-48	6.11E-03
12	CRP R3-39	8.68E-04	34	CRP R3-26	2.13E-03	56	CRP R2-48	6.30E-03
13	CRP R3-03	8.80E-04	35	CRP R2-44	2.18E-03	57	CRP R3-45	6.58E-03
14	CRP R3-16	9.10E-04	36	CRP R3-17	2.22E-03	58	CRP R3-20	7.15E-03
15	CRP R3-43	9.88E-04	37	CRP R2-4	2.24E-03	59	CRP R2-15	7.69E-03
16	CRP R2-19	1.02E-03	38	CRP R3-14	2.24E-03	60	CRP R3-44	8.29E-03
17	CRP R3-31	1.22E-03	39	CRP R3-38	2.28E-03	61	CRP R3-29	1.07E-02
18	CRP R3-46	1.42E-03	40	CRP R3-23	2.33E-03	62	CRP R2-09	測定不能
19	CRP R3-28	1.54E-03	41	CRP R2-18	2.37E-03	63	CRP R2-27	測定不能
20	CRP R3-12	1.64E-03	42	CRP R2-3	2.53E-03	64	CRP R3-18	測定不能
21	CRP R2-31	1.66E-03	43	CRP R3-27	2.55E-03	65	CRP R3-30	測定不能
22	CRP R3-34	1.67E-03	44	CRP R2-17	2.59E-03			

[0326] ラウンド２および３で得られたクローン全てにおいて、ヒト由来ＣＲＰへの結合が確認された。さらに、表１６に示す通り、ラウンド２および３で取得されたクローンによる単鎖抗体の解離速度定数k_{off}のほとんどは、10^{-3} sec^{-1}のオーダーの範囲にあり、非常に小さかった。

[0327] 以上の結果より、本方法は、ライブラリ中で存在率の低いクローンについても極めて高効率で回収可能であり、高い親和性・特異性を有する単鎖抗体の回収・単離に有効であることがわかった。

[0328] また、単離されたクローンのアミノ酸配列を解析し、同一・同類クローンを除く解離速度定数k_{off}の小さな６種類のクローンについて、ＳＰＲセンサ

を用いて解離定数K_Dの測定を行った。その結果を表１７に示した。

[0329] [表17]

表17

クローン番号	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (M)	R_{max} (RU)	cycle method	simulation
CRP R2-6	6.09×10^{4}	2.66×10^{-5}	4.37×10^{-10}	120.6	single	1:1 binding
CRP R2-7	測定不能	測定不能	測定不能	測定不能	single	Bivalent
CRP R2-45	1.52×10^{4}	5.16×10^{-5}	3.39×10^{-9}	147.4	single	1:1 binding
CRP R3-2	4.70×10^{4}	1.92×10^{-4}	4.07×10^{-9}	126.7	single	1:1 binding
CRP R3-19	4.16×10^{4}	9.02×10^{-5}	2.17×10^{-9}	100.1	single	1:1 binding
CRP R3-40	2.34×10^{5}	2.84×10^{-6}	1.21×10^{-11}	74.35	single	Bivalent

[0330] 表１７に示すとおり、得られたK_D値の大部分が１０$^{-9}$ Ｍオーダー以下であり、炎症検査に利用可能なバイオマーカー、ヒト由来ＣＲＰに対して高い親和力を有するｓｃＦｖが単離できていることが示された。

産業上の利用可能性

[0331] 本発明は、例えば、抗体医薬の製造方法に適用できる。

請求の範囲

[請求項1] 多重膜リポソームに結合した抗原を準備する工程、

単鎖抗体を提示するファージライブラリを準備する工程、及び

前記ファージライブラリから、前記多重膜リポソームに結合した抗原に結合する単鎖抗体を提示するファージを選択する工程

を含む、抗原に結合する単鎖抗体のスクリーニング方法。

[請求項2] 前記単鎖抗体が前記抗原に対して１．５×１０$^{-2}$ｓ$^{-1}$以下の解離速度定数を有する、請求項１に記載の方法。

[請求項3] 前記単鎖抗体がウサギ由来である、請求項１又は２に記載の方法。

[請求項4] 前記抗原がタンパク質である、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。

[請求項5] 前記タンパク質が抗体である、請求項４に記載の方法。

[請求項6] 前記抗体がヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体又はヒト血清由来ＩｇＡポリクローナル抗体である、請求項５に記載の方法。

[請求項7] 前記単鎖抗体がヒト由来抗体のＬ鎖に結合する単鎖抗体である、請求項５又は６に記載の方法。

[請求項8] 前記タンパク質がエクソソーム由来タンパク質を含む、請求項４に記載の方法。

[請求項9] 前記タンパク質が、Ｓｆ９細胞株由来ＣＤ９のExtracellular Domain 2 （ＥＣ２）部分のみとヒト抗体のＦｃドメインとの融合タンパク質である、請求項８に記載の方法。

[請求項10] 前記タンパク質がウイルス由来タンパク質である、請求項４に記載の方法。

[請求項11] 前記ウイルス由来タンパク質がインフルエンザウイルス由来タンパク質である、請求項１０に記載の方法。

[請求項12] 前記インフルエンザウイルス由来タンパク質がＢ型インフルエンザウイルス由来タンパク質である、請求項１１に記載の方法。

[請求項13] 前記Ｂ型インフルエンザウイルス由来タンパク質がＢ型インフルエ

ンザウイルス由来Nucleotide-binding Protein である、請求項１２に記載の方法。

[請求項14] 前記タンパク質が炎症性タンパク質である、請求項４に記載の方法。

[請求項15] 前記炎症性タンパク質がヒト由来炎症性タンパク質C-reactive Protein (CRP)である、請求項１４に記載の方法。

[請求項16] 請求項１～１５のいずれか１項に記載のスクリーニング方法によりスクリーニングする工程、

スクリーニングされた単鎖抗体のアミノ酸配列を決定する工程、

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

作成されたＤＮＡ配列を宿主細胞で発現させる工程

を含む、抗体の製造方法。

[請求項17] 抗体をコードするＤＮＡ配列がヒト化抗体をコードする請求項１６に記載の製造方法。

[請求項18] ヒト血清由来ＩｇＧポリクローナル抗体に対して３．０×１０$^{-8}$M以下の解離定数を有する単鎖抗体。

[請求項19] さらに、ヒト血清由来ＩｇＡポリクローナル抗体に結合する、請求項１８に記載の単鎖抗体。

[請求項20] ヒト血清由来ＩｇＡポリクローナル抗体に対して１．０×１０$^{-3}$ｓ$^{-1}$以下の解離速度定数を有する単鎖抗体。

[請求項21] ヒト由来抗体のＬ鎖に対して１．０×１０$^{-3}$ｓ$^{-1}$以下の解離速度定数を有する単鎖抗体。

[請求項22] エクソソーム由来タンパク質を含むタンパク質に対して８．０×１０$^{-3}$ｓ$^{-1}$以下の解離速度定数を有する単鎖抗体。

[請求項23] 前記タンパク質が、Ｓｆ９細胞株由来ＣＤ９のExtracellular Domain 2 （ＥＣ２）部分のみとヒト抗体のＦｃドメインとの融合タンパク質である、請求項２２に記載の単鎖抗体。

[請求項24] ウイルス由来タンパク質に対して１．０×１０$^{-2}$ｓ$^{-1}$以下の解離速度定数を有する単鎖抗体。

[請求項25] 前記ウイルス由来タンパク質がインフルエンザウイルス由来タンパク質である、請求項２４に記載の単鎖抗体。

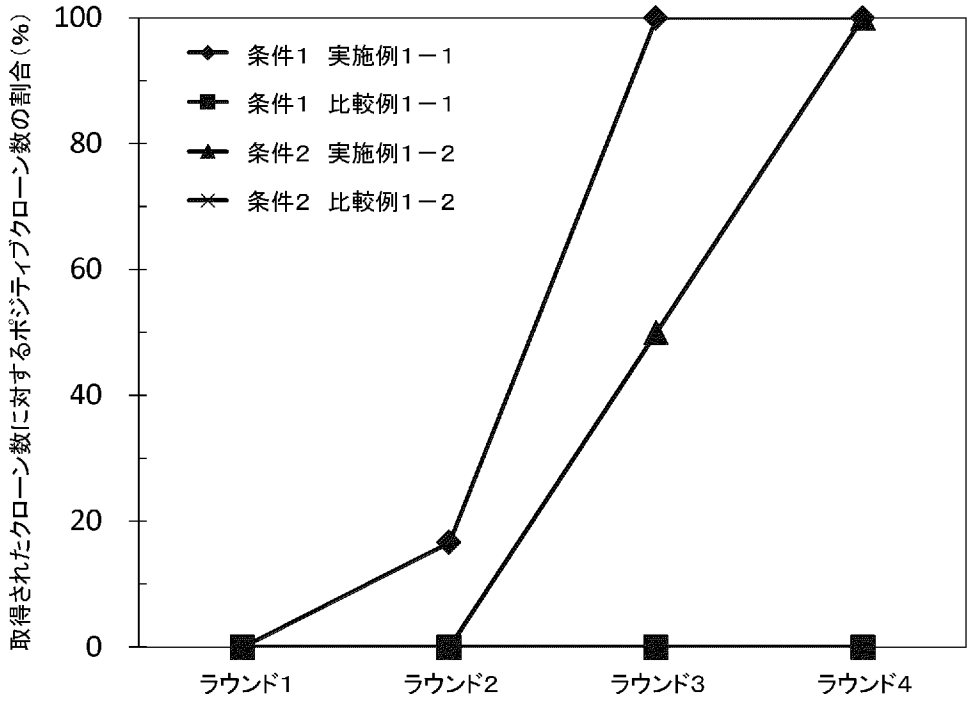
[請求項26] 前記インフルエンザウイルス由来タンパク質がＢ型インフルエンザウイルス由来タンパク質である、請求項２５に記載の鎖抗体。

[請求項27] 前記Ｂ型インフルエンザウイルス由来タンパク質がＢ型インフルエンザウイルス由来Nucleotide-binding Proteinである、請求項２６に記載の単鎖抗体。

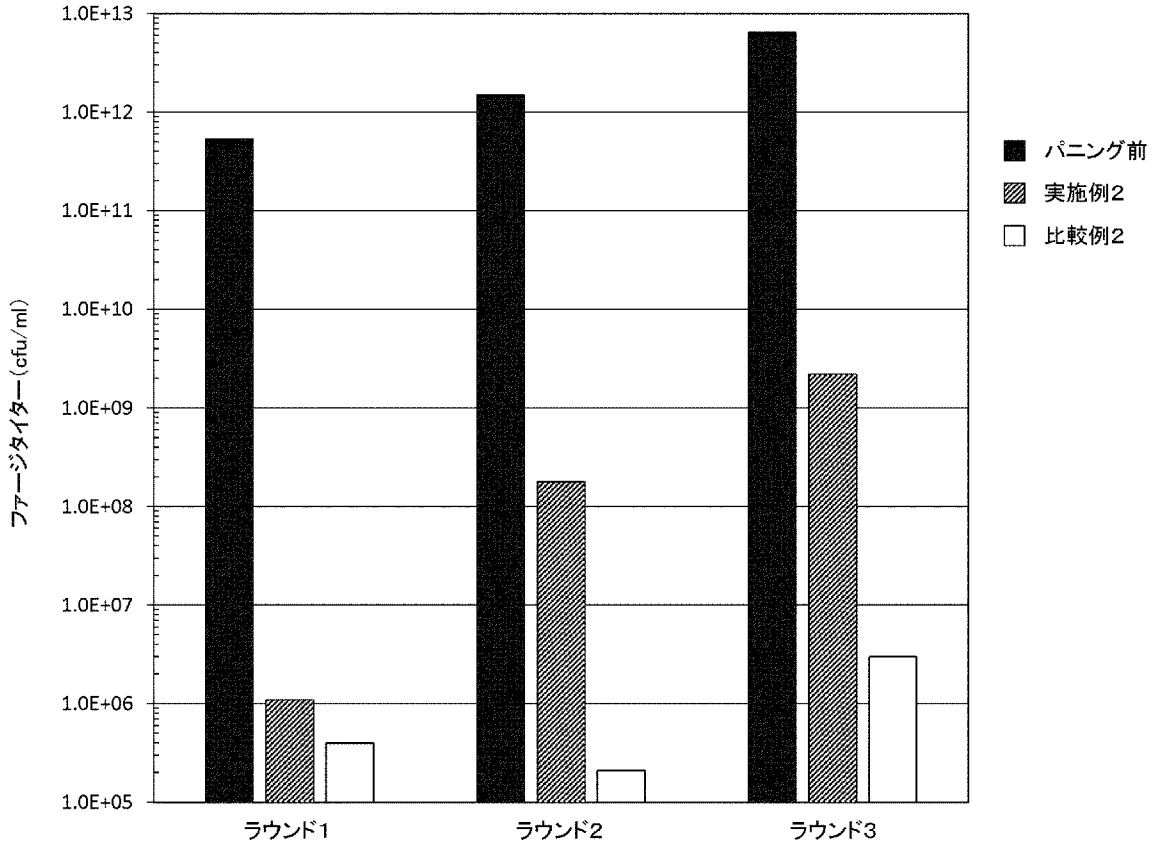
[請求項28] 炎症性タンパク質に対して１．０×１０$^{-2}$ｓ$^{-1}$以下の解離速度定数を有する単鎖抗体。

[請求項29] 前記炎症性タンパク質がC-reactive Protein (CRP)である、請求項２８に記載の単鎖抗体。

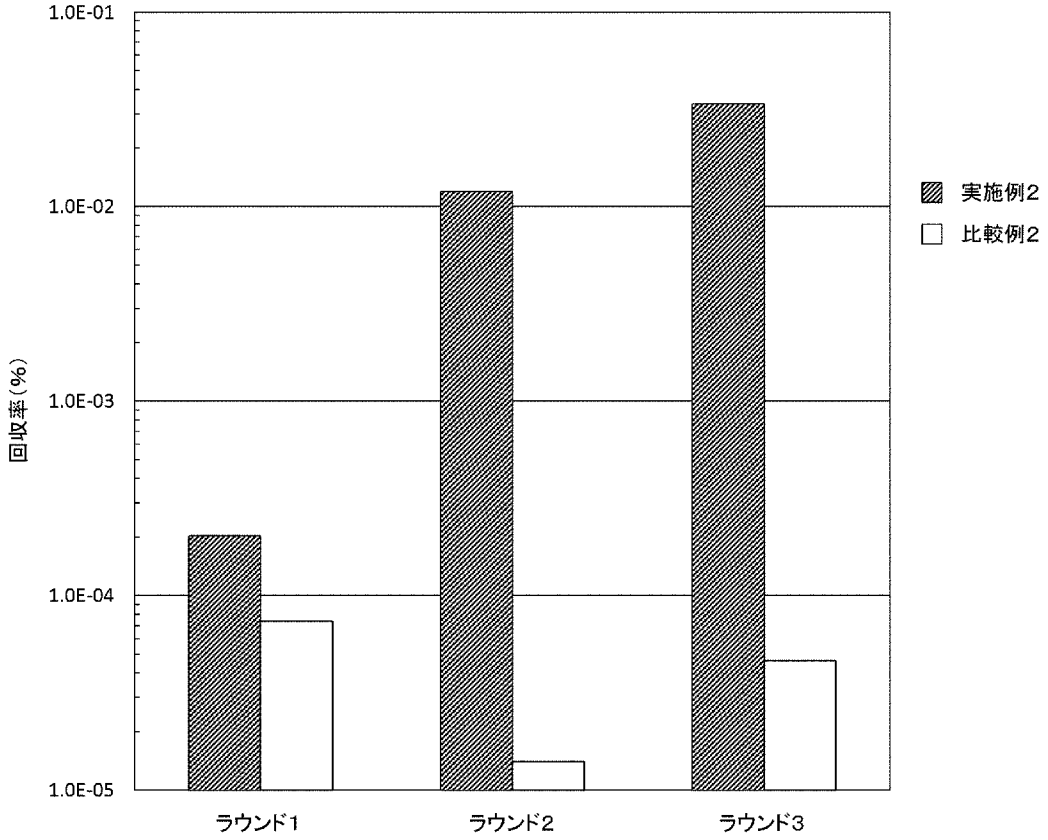
[図1]


取得されたクローン数に対するポジティブクローン数の割合（%）
100
80
60
40
20
0
条件1 実施例1－1
条件1 比較例1－1
条件2 実施例1－2
条件2 比較例1－2
ラウンド1
ラウンド2
ラウンド3
ラウンド4

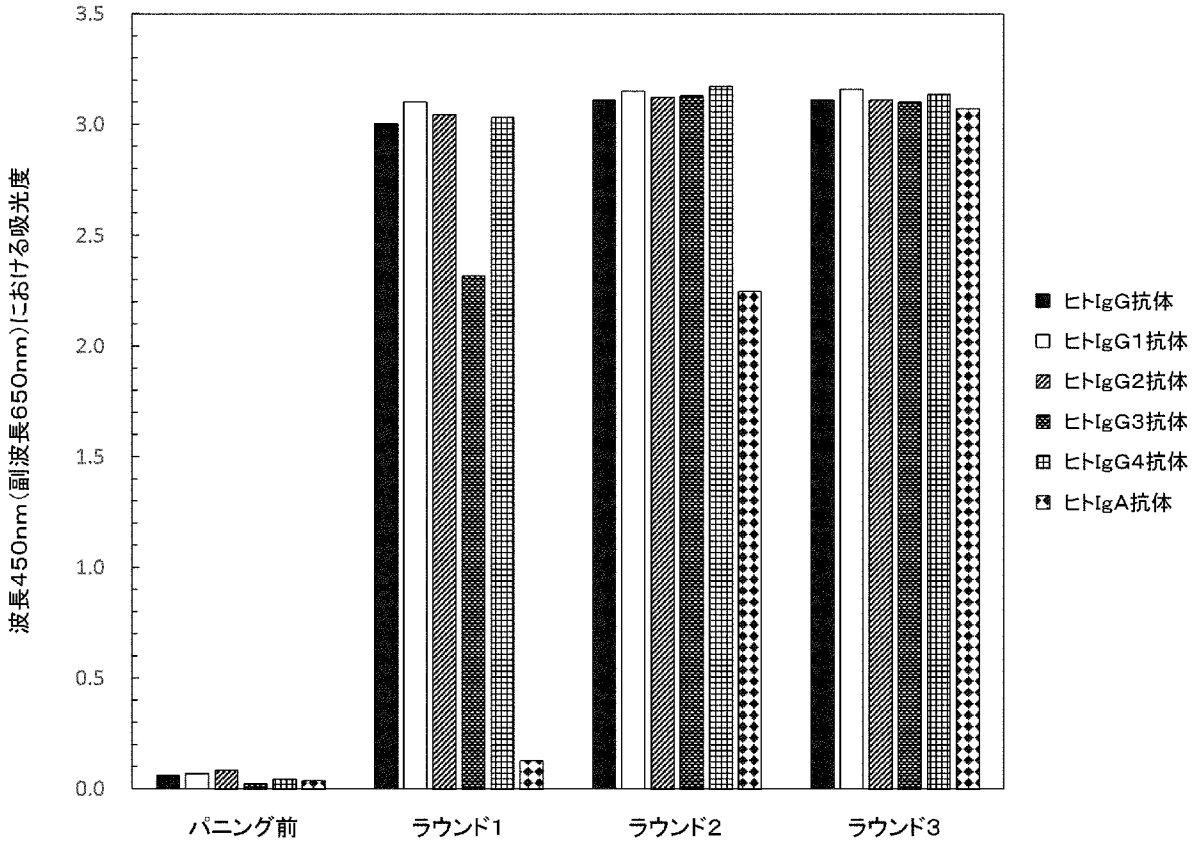
[図2]


ファージタイター（cfu/ml）
1.0E+13
1.0E+12
1.0E+11
1.0E+10
1.0E+09
1.0E+08
1.0E+07
1.0E+06
1.0E+05
パニング前
実施例2
比較例2
ラウンド1
ラウンド2
ラウンド3

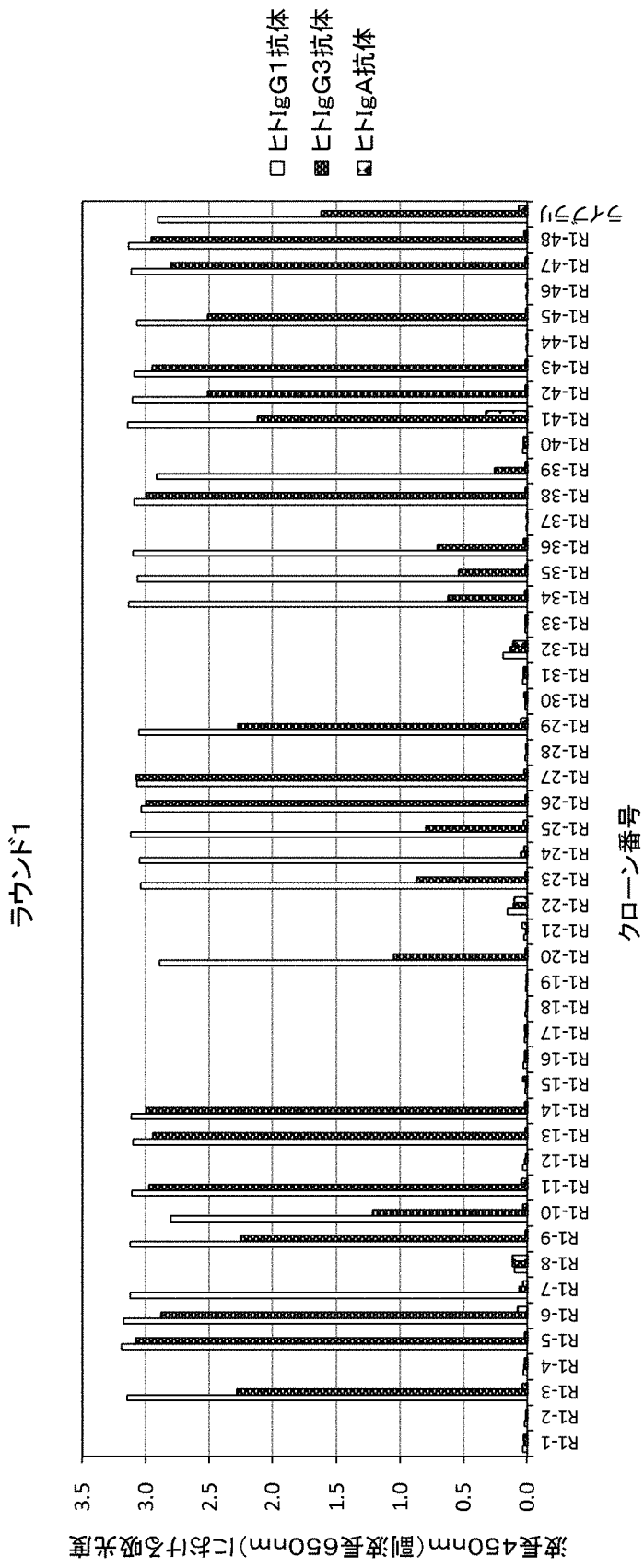
[図3]


1.0E-01
1.0E-02
1.0E-03
1.0E-04
1.0E-05
回収率(%)
ラウンド1
ラウンド2
ラウンド3
実施例2
比較例2

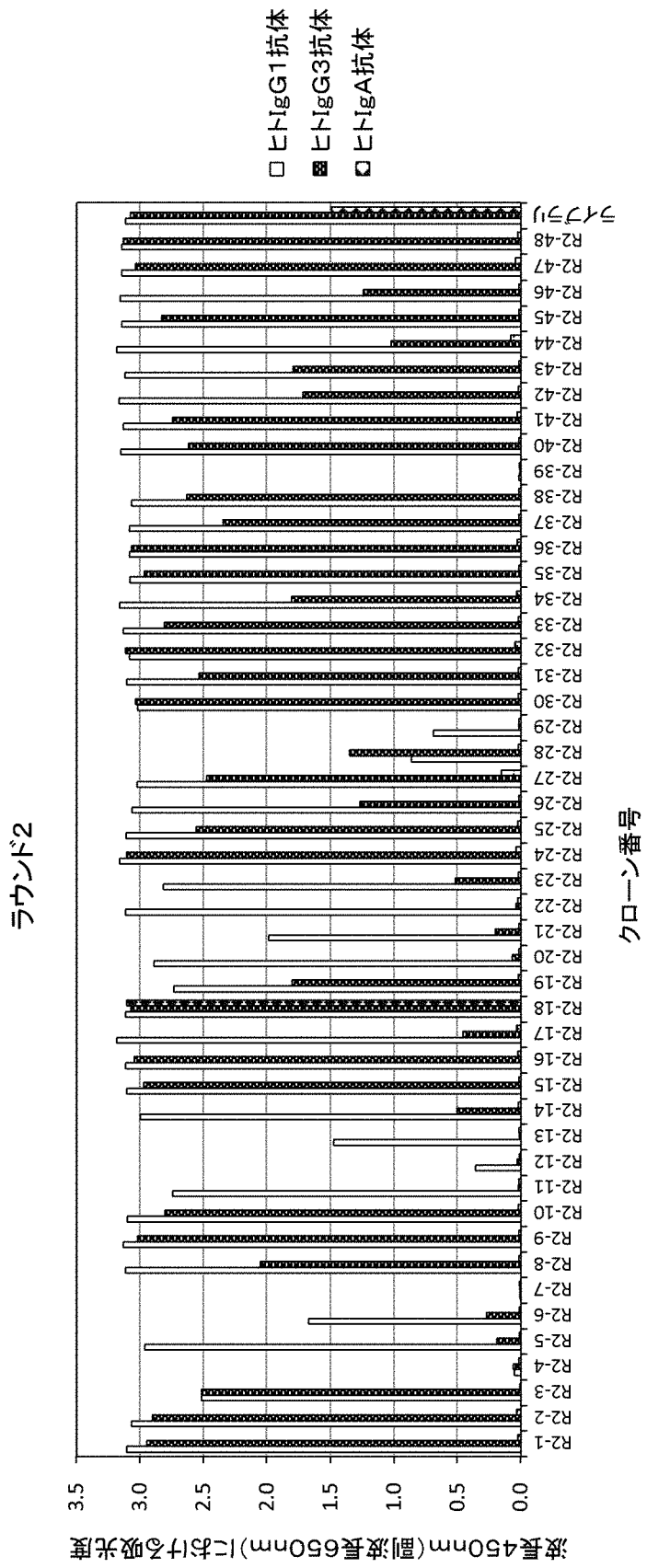
[図4]


3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
波長450nm(副波長650nm)における吸光度
パニング前
ラウンド1
ラウンド2
ラウンド3
ヒトIgG抗体
ヒトIgG1抗体
ヒトIgG2抗体
ヒトIgG3抗体
ヒトIgG4抗体
ヒトIgA抗体

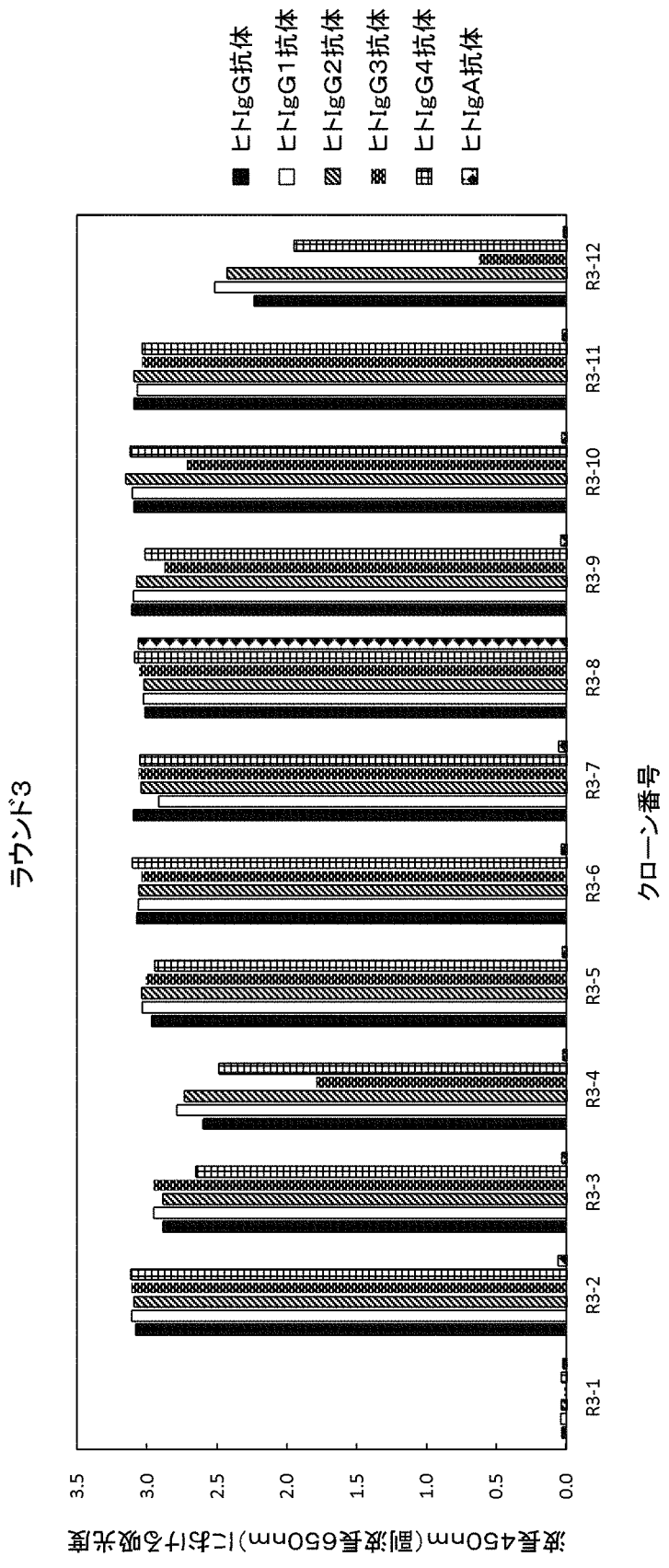
[図5]


□ヒトIgG1抗体
▩ヒトIgG3抗体
▨ヒトIgA抗体
ラウンド1
波長450nm(副波長650nm)における吸光度
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
クローン番号
R1-1
R1-2
R1-3
R1-4
R1-5
R1-6
R1-7
R1-8
R1-9
R1-10
R1-11
R1-12
R1-13
R1-14
R1-15
R1-16
R1-17
R1-18
R1-19
R1-20
R1-21
R1-22
R1-23
R1-24
R1-25
R1-26
R1-27
R1-28
R1-29
R1-30
R1-31
R1-32
R1-33
R1-34
R1-35
R1-36
R1-37
R1-38
R1-39
R1-40
R1-41
R1-42
R1-43
R1-44
R1-45
R1-46
R1-47
R1-48
ラベルなし

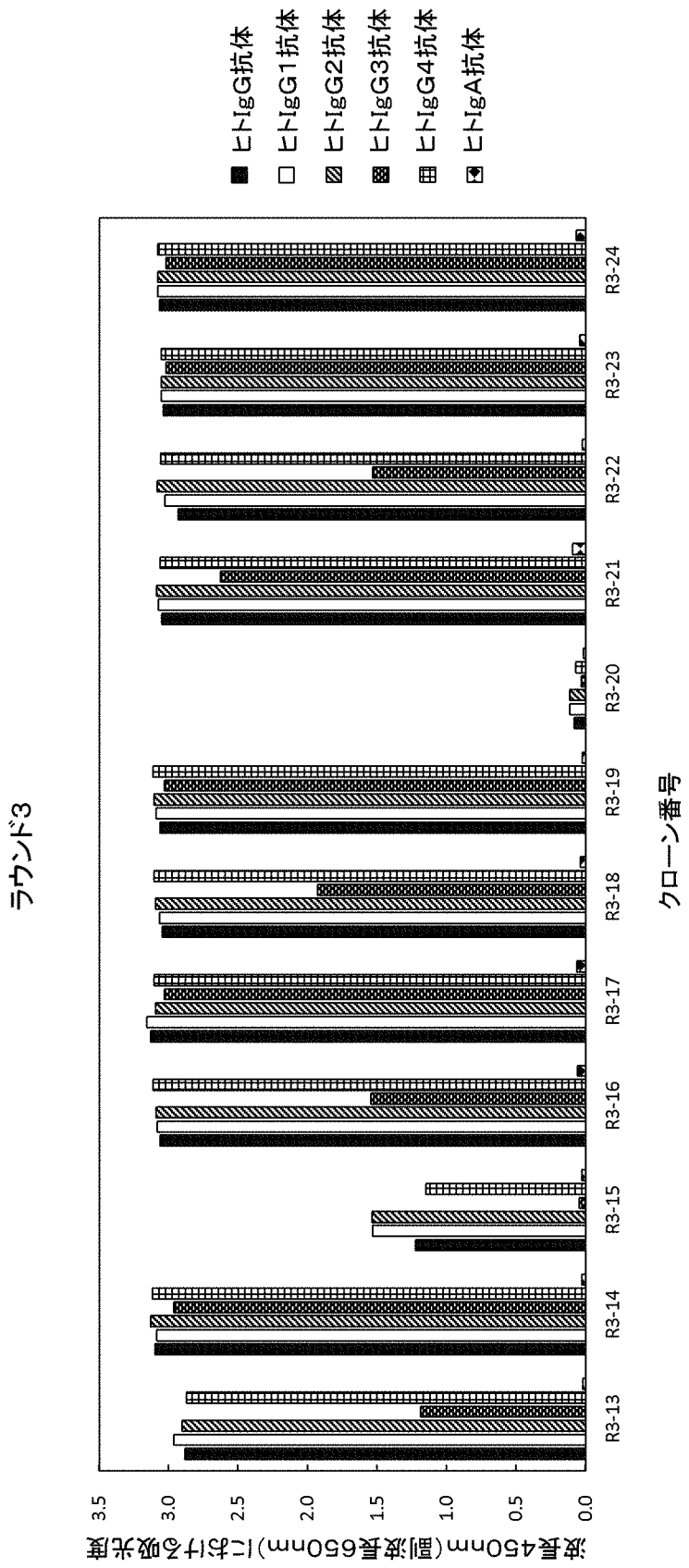
[図6]


□ヒトIgG1抗体
▩ヒトIgG3抗体
◘ヒトIgA抗体
ラウンド2
クローン番号
波長450nm(副波長650nm)における吸光度
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
R2-1
R2-2
R2-3
R2-4
R2-5
R2-6
R2-7
R2-8
R2-9
R2-10
R2-11
R2-12
R2-13
R2-14
R2-15
R2-16
R2-17
R2-18
R2-19
R2-20
R2-21
R2-22
R2-23
R2-24
R2-25
R2-26
R2-27
R2-28
R2-29
R2-30
R2-31
R2-32
R2-33
R2-34
R2-35
R2-36
R2-37
R2-38
R2-39
R2-40
R2-41
R2-42
R2-43
R2-44
R2-45
R2-46
R2-47
R2-48
ラベンダー

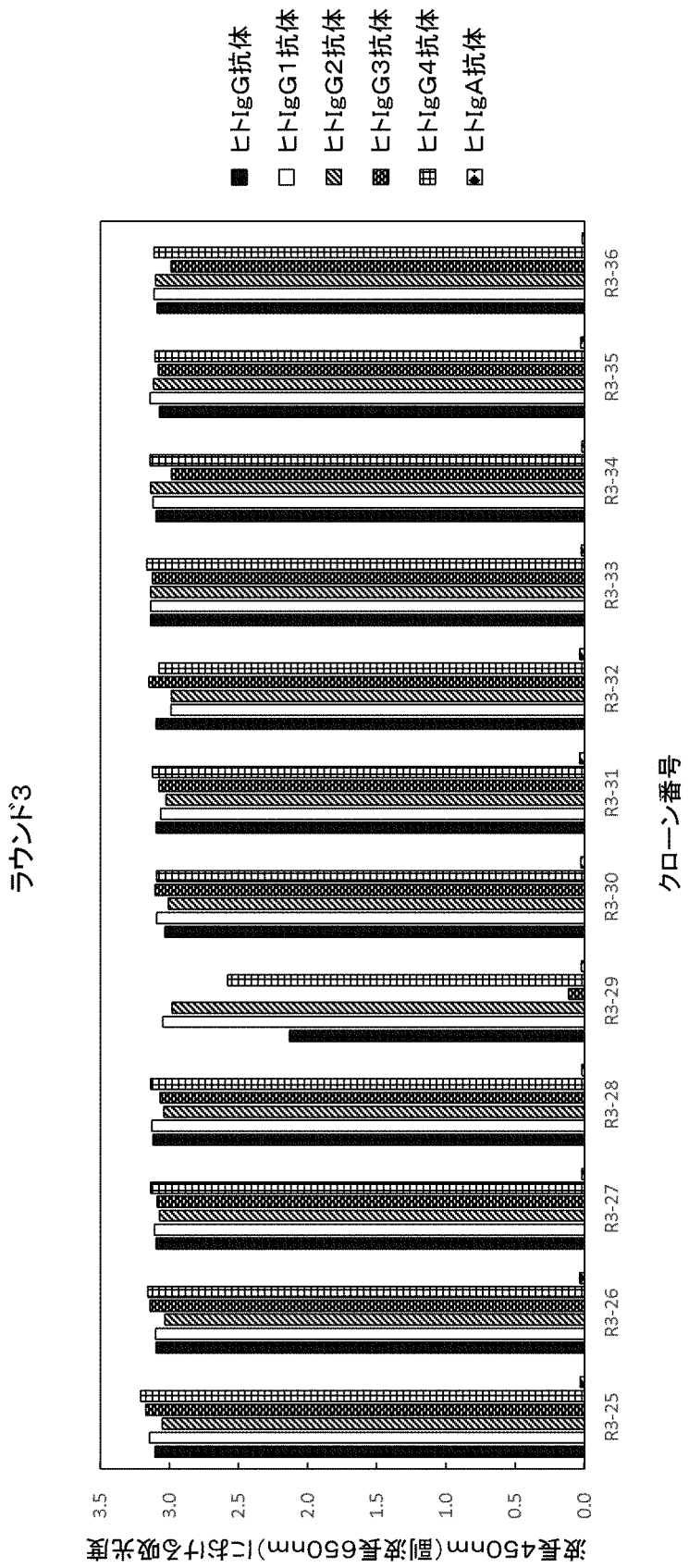
[図7-1]


ヒトIgG抗体
ヒトIgG1抗体
ヒトIgG2抗体
ヒトIgG3抗体
ヒトIgG4抗体
ヒトIgA抗体
ラウンド3
波長450nm(副波長650nm)における吸光度
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
R3-1
R3-2
R3-3
R3-4
R3-5
R3-6
R3-7
R3-8
R3-9
R3-10
R3-11
R3-12
クローン番号

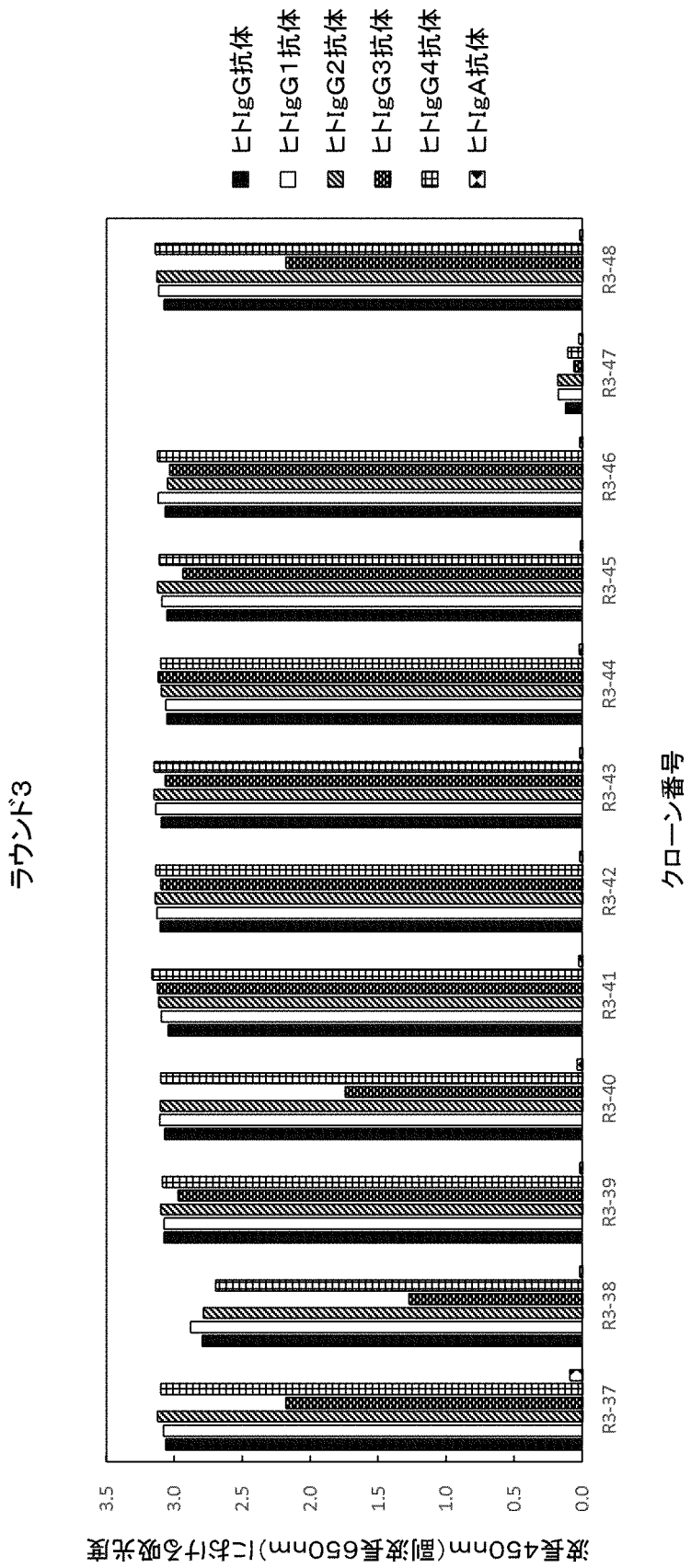
[図7-2]


ヒトIgG抗体
ヒトIgG1抗体
ヒトIgG2抗体
ヒトIgG3抗体
ヒトIgG4抗体
ヒトIgA抗体
ラウンド3
波長450nm(副波長650nm)における吸光度
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
R3-13
R3-14
R3-15
R3-16
R3-17
R3-18
R3-19
R3-20
R3-21
R3-22
R3-23
R3-24
クローン番号

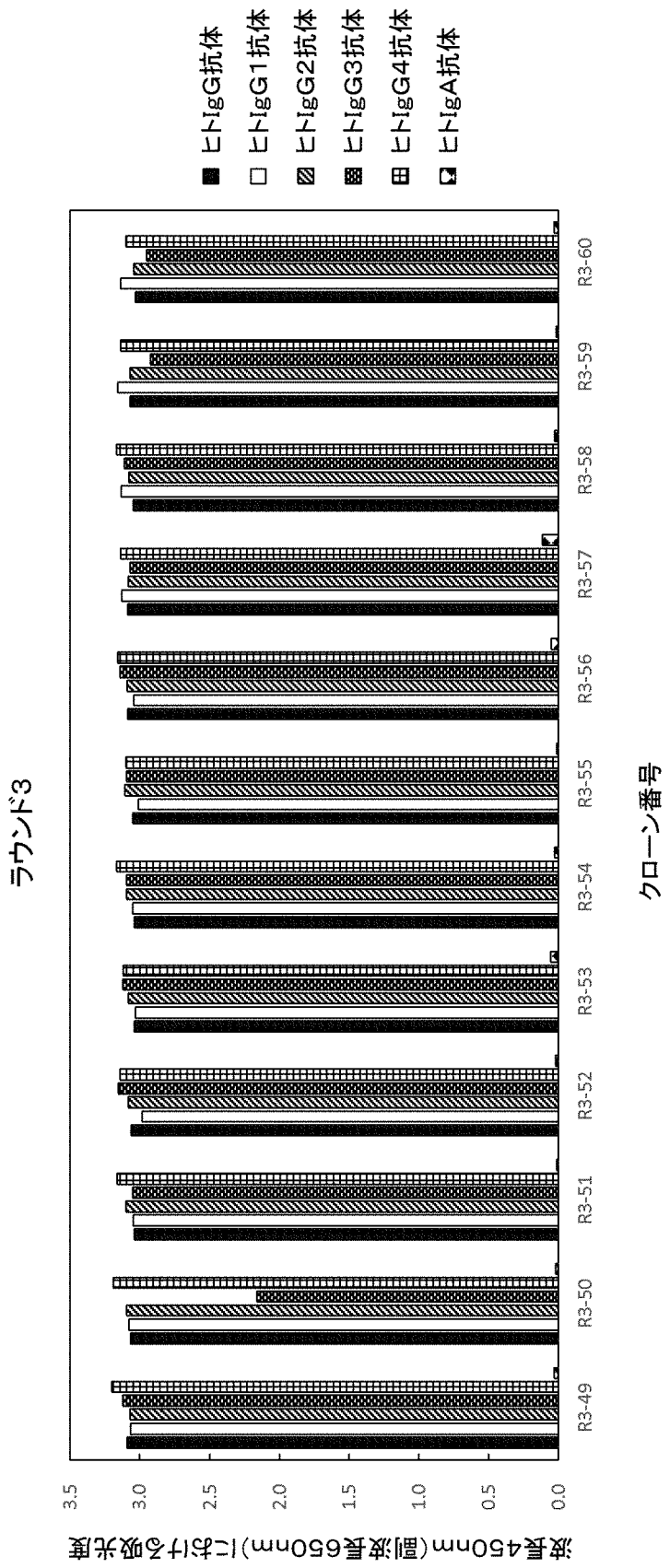
[図7-3]


ヒトIgG抗体
ヒトIgG1抗体
ヒトIgG2抗体
ヒトIgG3抗体
ヒトIgG4抗体
ヒトIgA抗体
ラウンド3
波長450nm(副波長650nm)における吸光度
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
R3-25
R3-26
R3-27
R3-28
R3-29
R3-30
R3-31
R3-32
R3-33
R3-34
R3-35
R3-36
クローン番号

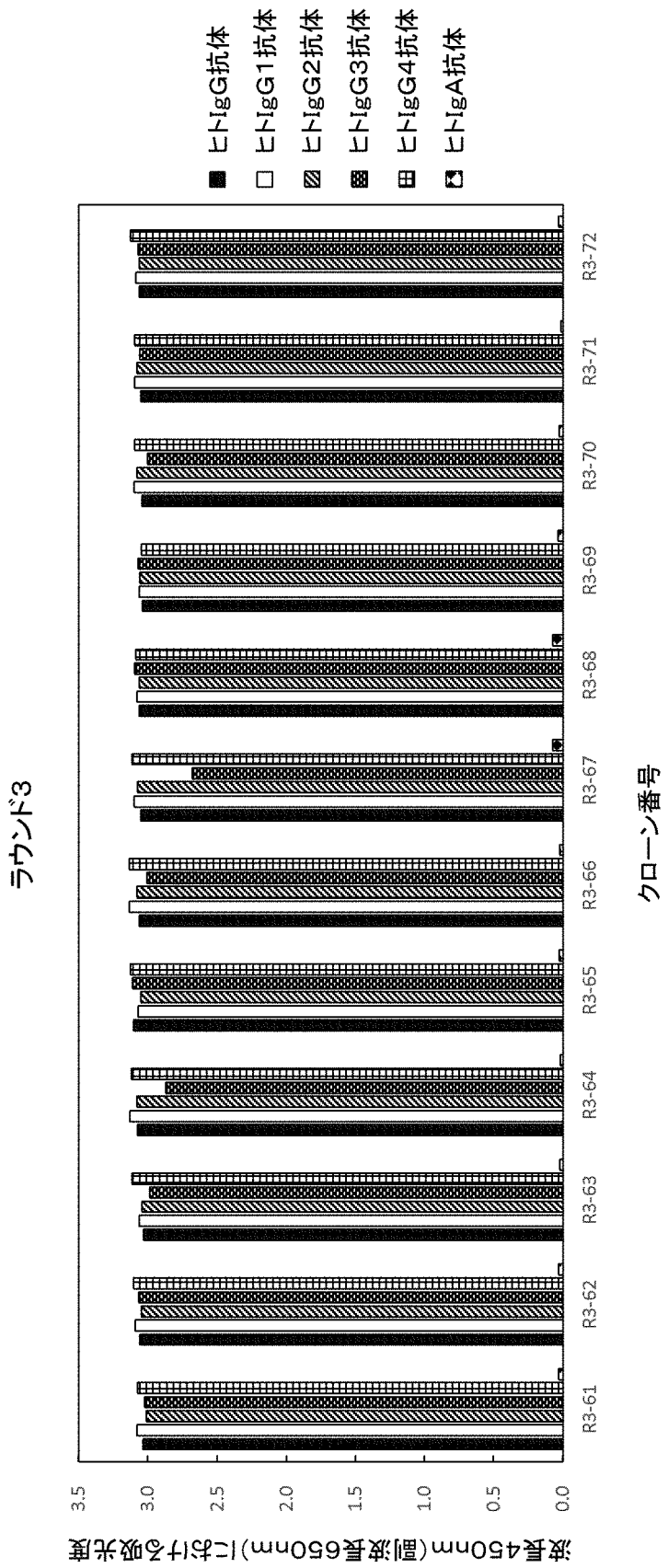
[図7-4]


ヒトIgG抗体
ヒトIgG1抗体
ヒトIgG2抗体
ヒトIgG3抗体
ヒトIgG4抗体
ヒトIgA抗体
ラウンド3
波長450nm(副波長650nm)における吸光度
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
R3-37
R3-38
R3-39
R3-40
R3-41
R3-42
R3-43
R3-44
R3-45
R3-46
R3-47
R3-48
クローン番号

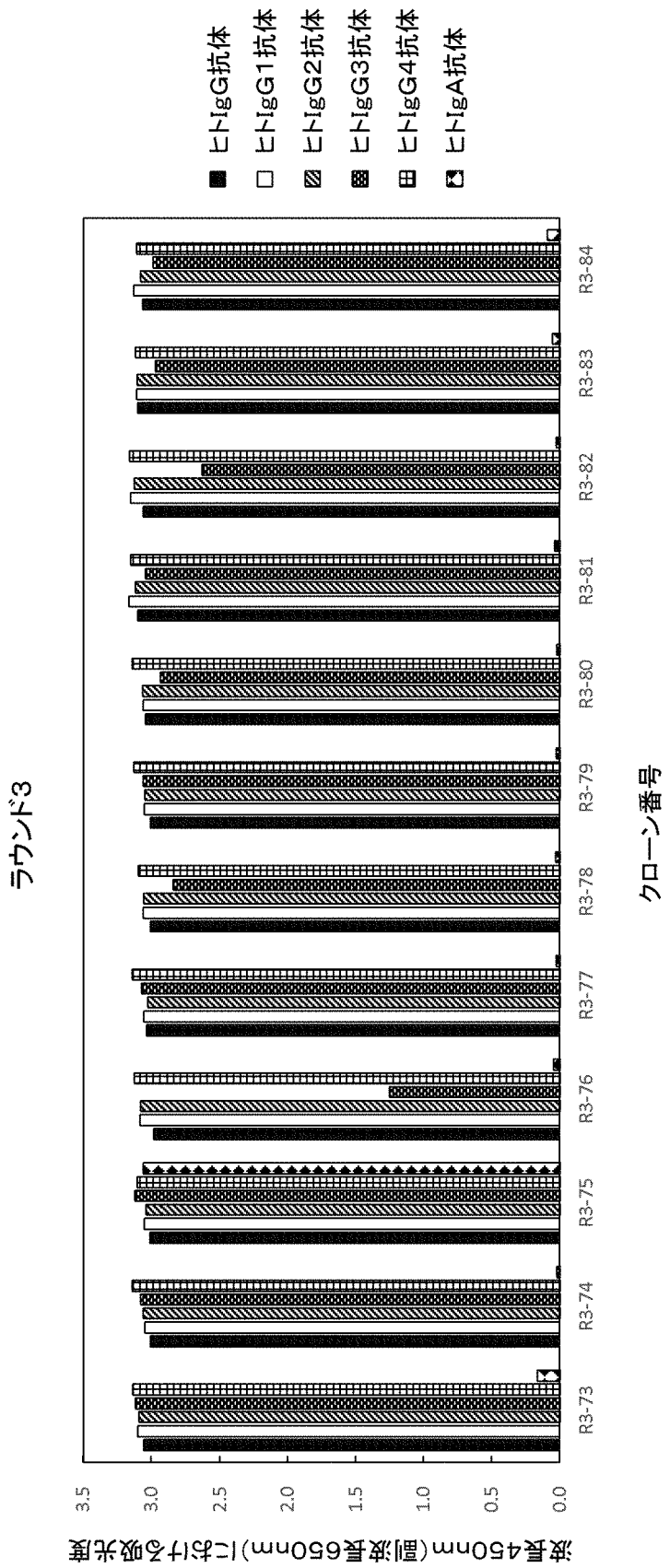
[図7-5]


ヒトIgG抗体
ヒトIgG1抗体
ヒトIgG2抗体
ヒトIgG3抗体
ヒトIgG4抗体
ヒトIgA抗体
ラウンド3
波長450nm(副波長650nm)における吸光度
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
R3-49
R3-50
R3-51
R3-52
R3-53
R3-54
R3-55
R3-56
R3-57
R3-58
R3-59
R3-60
クローン番号

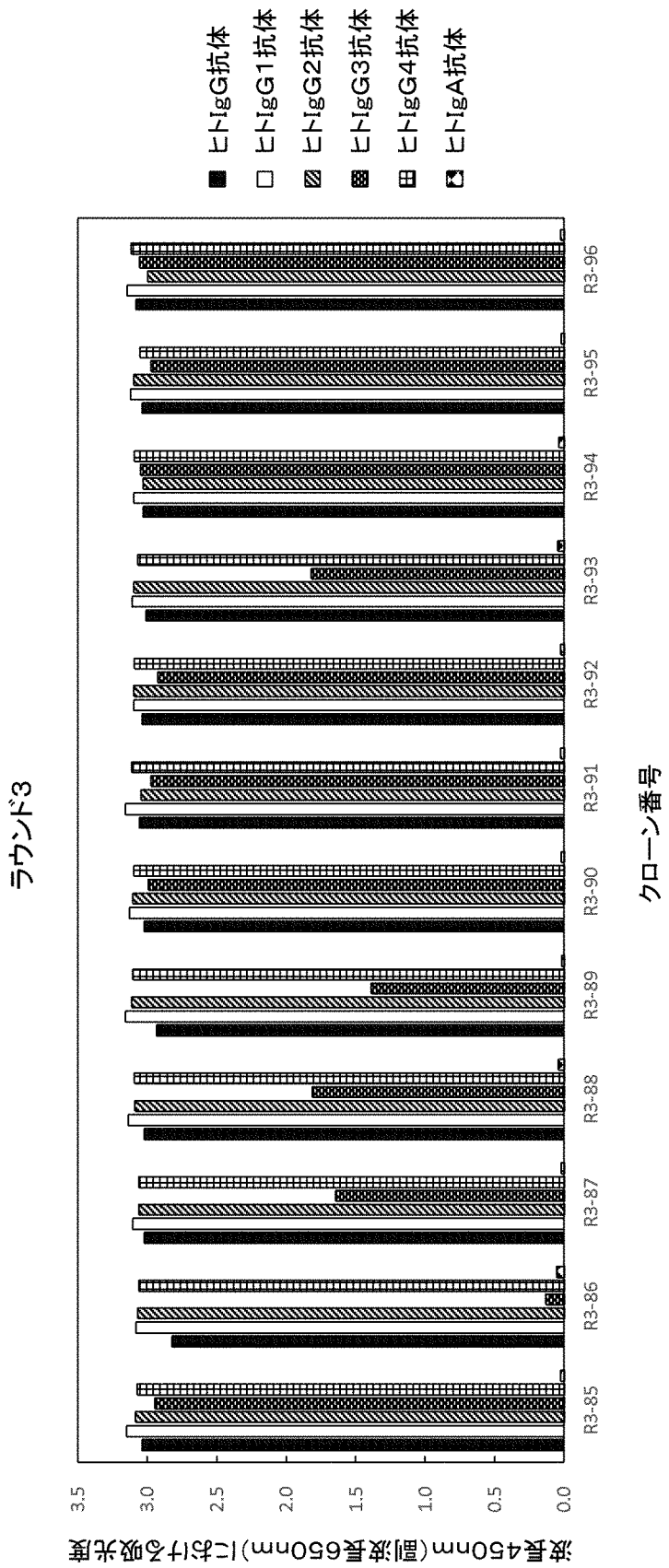
[図7-6]


ヒトIgG抗体
ヒトIgG1抗体
ヒトIgG2抗体
ヒトIgG3抗体
ヒトIgG4抗体
ヒトIgA抗体
ラウンド3
波長450nm(副波長650nm)における吸光度
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
R3-61
R3-62
R3-63
R3-64
R3-65
R3-66
R3-67
R3-68
R3-69
R3-70
R3-71
R3-72
クローン番号

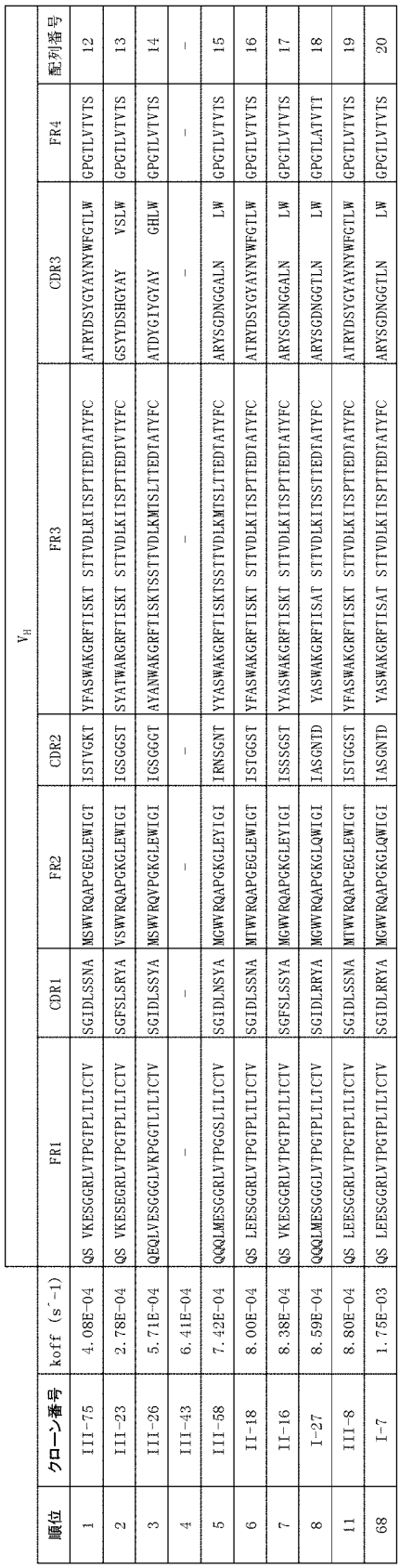
[図7-7]


ヒトIgG抗体
ヒトIgG1抗体
ヒトIgG2抗体
ヒトIgG3抗体
ヒトIgG4抗体
ヒトIgA抗体
ラウンド3
波長450nm(副波長650nm)における吸光度
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
R3-73
R3-74
R3-75
R3-76
R3-77
R3-78
R3-79
R3-80
R3-81
R3-82
R3-83
R3-84
クローン番号

[図7-8]


ヒトIgG抗体
ヒトIgG1抗体
ヒトIgG2抗体
ヒトIgG3抗体
ヒトIgG4抗体
ヒトIgA抗体
ラウンド3
波長450nm(副波長650nm)における吸光度
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
R3-85
R3-86
R3-87
R3-88
R3-89
R3-90
R3-91
R3-92
R3-93
R3-94
R3-95
R3-96
クローン番号

[図8-1]

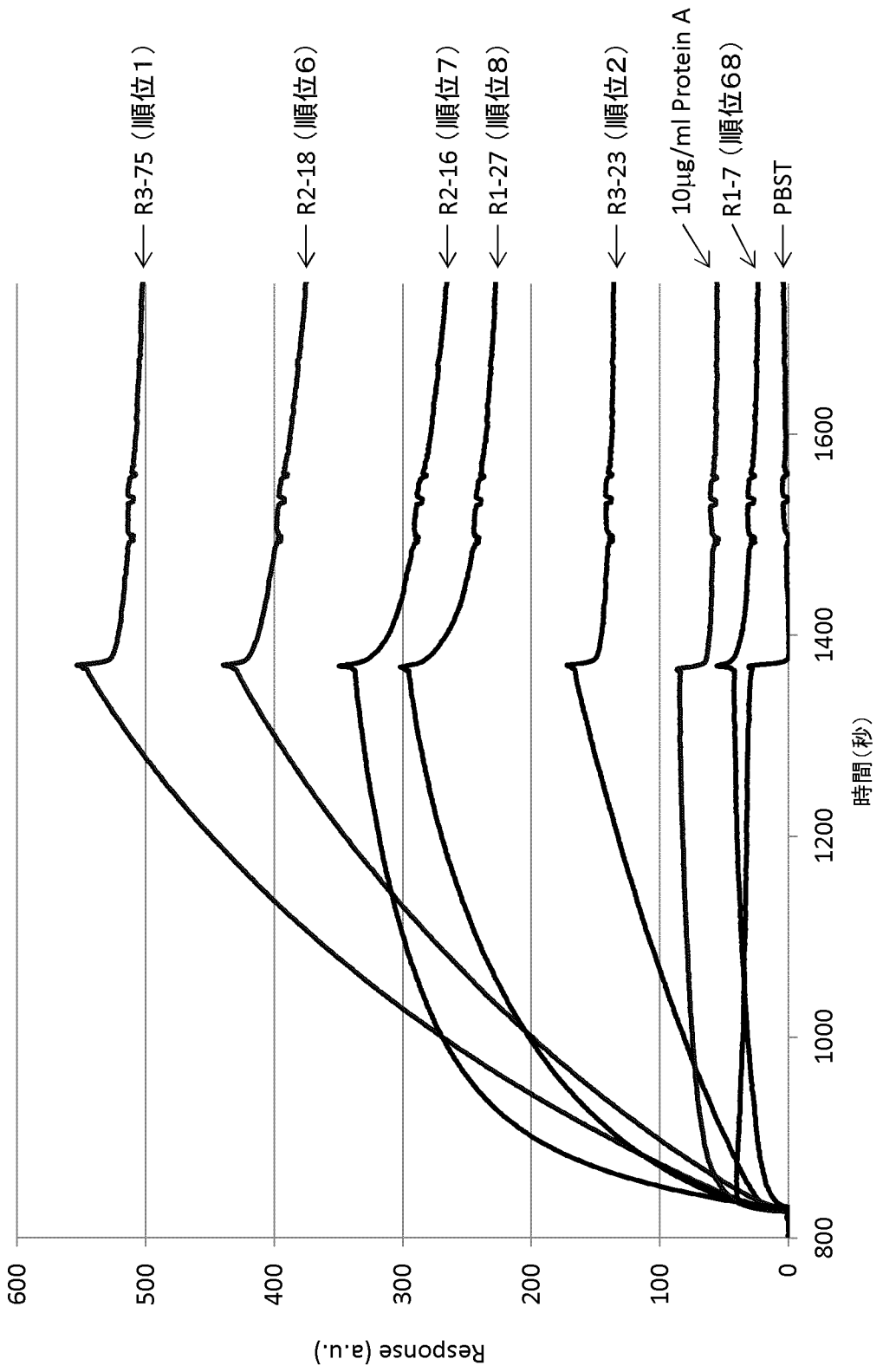


順位	クローン番号	koff (s-1)	V_H								配列番号
			FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4		
1	III-75	4.08E-04	QS VKESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSSNA	MSWVRQAPGEGLEWIGT	ISIVGKT	YFASWAKGRFTISKT STTVDLRITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS		12
2	III-23	2.78E-04	QS VKESEGRLVTPGTPLTLTCTV	SGFSLSRYA	VSWVRQAPGKGLEWIGI	IGSGGST	SYATWARGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTVTYFC	GSYYDSHGYAY VSLW	GPGTLVTVTS		13
3	III-26	5.71E-04	QBQLVESGGGLVKPGGTLTLTCTV	SGIDLSSYA	MSWVRQVPGKGLEWIGI	IGSGGGT	AYAWWAKGRFTISKTSSTTVDLKMTSLTTEDTATYFC	ATDYGIYGYAY GHLW	GPGTLVTVTS		14
4	III-43	6.41E-04	-	-	-	-	-	-	-		-
5	III-58	7.42E-04	QQQLMESGGRLVTPGGSLTLTCTV	SGIDLNSYA	MGWVRQAPGKGLEYIGI	IRNSGNT	YYASWAKGRFTISKTSSTTVDLKMTSLTTEDTATYFC	ARYSGDNGGALN LW	GPGTLVTVTS		15
6	II-18	8.00E-04	QS LEESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSSNA	MTWVRQAPGEGLEWIGT	ISTGGST	YFASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS		16
7	II-16	8.38E-04	QS VKESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGFSLSSYA	MGWVRQAPGKGLEYIGI	ISSSGST	YYASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ARYSGDNGGALN LW	GPGTLVTVTS		17
8	I-27	8.59E-04	QQQLMESGGGLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLRRYA	MGWVRQAPGKGLQWIGI	IASGNTD	YASWAKGRFTISAT STTVDLKITSSTTEDTATYFC	ARYSGDNGGTLN LW	GPGTLATVTT		18
11	III-8	8.80E-04	QS LEESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSSNA	MTWVRQAPGEGLEWIGT	ISTGGST	YFASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS		19
68	I-7	1.75E-03	QS LEESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLRRYA	MGWVRQAPGKGLQWIGI	IASGNTD	YASWAKGRFTISAT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ARYSGDNGGTLN LW	GPGTLVTVTS		20

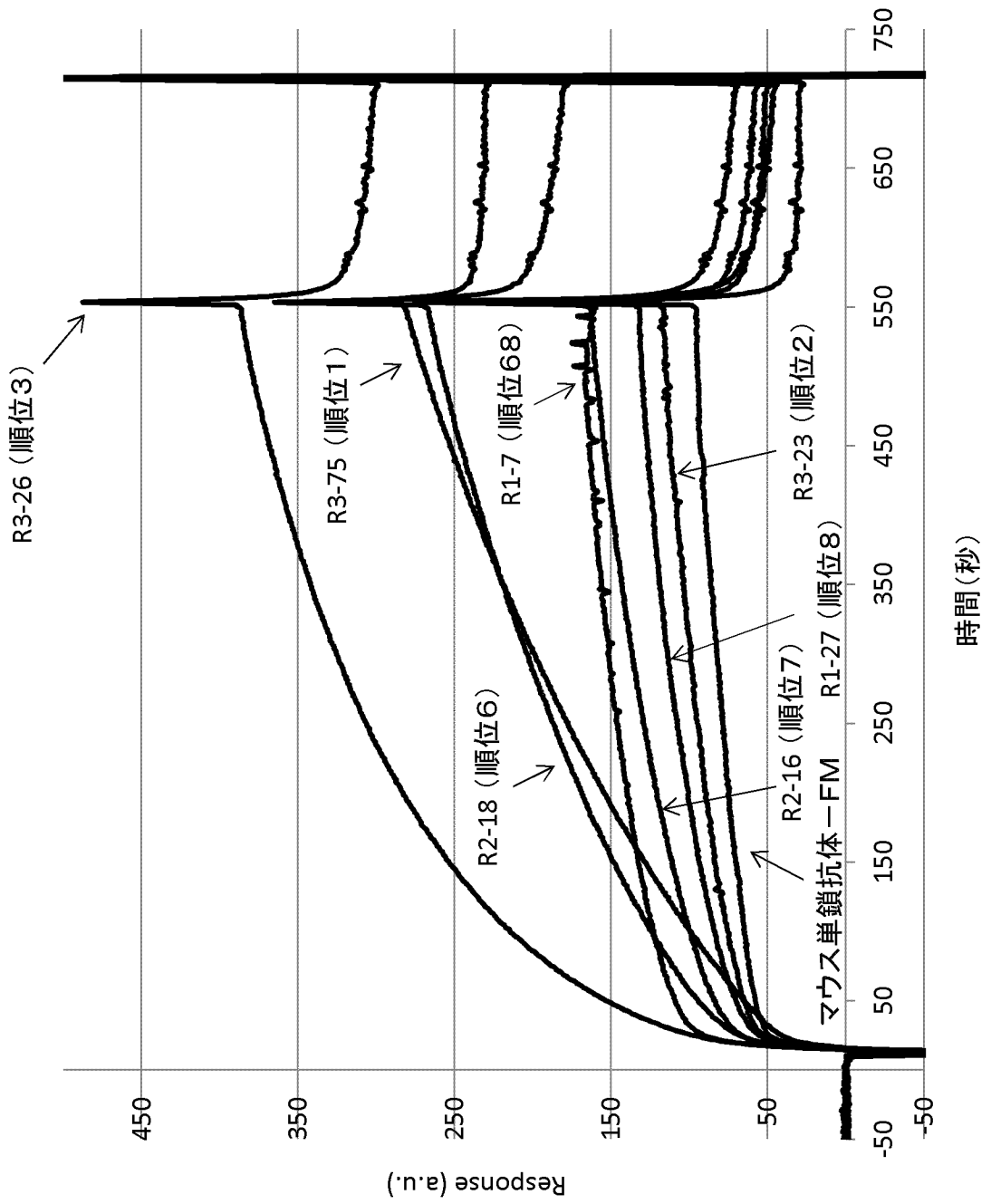
[図8-2]

			V_L							
順位	クローン番号	koff (s^-1)	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	配列番号
1	III-75	4.08E-04	ELDLIQTPPSVSGAVGGTVTIKCQAS	ENINSE	LAWYQQKPGQRPKLLIY	DAS	KLASGVPSRFSGSGSGTEYTLTISGMQCDDAATYYC	QSTYYDGNYYYA	FGGGTEVDVTRS	21
2	III-23	2.78E-04	ELVLIQTPSPVSGAVGGTVTINCQAS	QSISTA	LAWYQQKPGQPPKLLIY	SAS	TLASGVSSRFKGSGSGTGFTLTISDLECADAATYYC	QSYYGSSSD NA	FGGGTEVVIKRS	22
3	III-26	5.71E-04	ELVMTQTASPVSAAVGGTVTIKCQAS	QSISTA	LAWYQQRPGQPPKLLIY	DAS	TLASGVSSRFKGSGSGTEFTLTISDLECADAATYYC	QTYFGSDTD NA	FGEGTEVEITGS	23
4	III-43	6.41E-04	-	-	-	-	-	-	-	-
5	III-58	7.42E-04	ELVMTQTAASVSGPVGGTVTIKCQAS	EFIRNY	LAWYQQKPGQPPKLLIY	TTS	NLASGVPSRFSGSGSGTEYTLTISDLECADAATYYC	QNYYDISTYGNA	FGGGTEVVVIKGS	24
6	II-18	8.00E-04	ELVMTQTAASVSEPVGGTVTIKCQAS	QNINNE	LAWYQQKPGQRPKLLIY	DAS	KLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISGMQCDDAATYYC	QSTYYDGNYYYA	FGGGTEVDVKGS	25
7	II-16	8.38E-04	ELDLIQTAASVSEPVGGTVTISCQSS	QHIRSY	LAWYQQKPGQPPKLLIS	AAS	TLASGVSSRFKGSGSGTEFTLTISDLECADAATYYC	QRYYDIRNYGNG	FGGGTEVEITGS	26
8	I-27	8.59E-04	ELVMTQTAASVSEPVGGTVTIKCQAS	EHIRNY	LAWYQQKPGQPPKLLIY	TTS	NLASGVPSRFSGSGSGTEYTLTISDLECADAATYYC	QNYYDISTYGNT	FGGGTEVDVKGS	27
11	III-8	8.80E-04	ELVMTQTAASVSEPVGGTVTINCQAS	QSISDE	LAWYQQKPGQRPKLLIY	DAS	DLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISGVQCDDAATYYC	QSAYYDGRYYYA	FGGGTEVEVTGS	28
68	I-7	1.75E-03	ELVMTQTAASVSEPVGGTVTIKCQAS	QSISSY	LAWYQQKPGQPPKLLIY	AAS	NLASGVSSRFKGSGSGTEFTLTISDLECADAATYYC	QSYYSISSYGNT	FGGGTEVEITGS	29

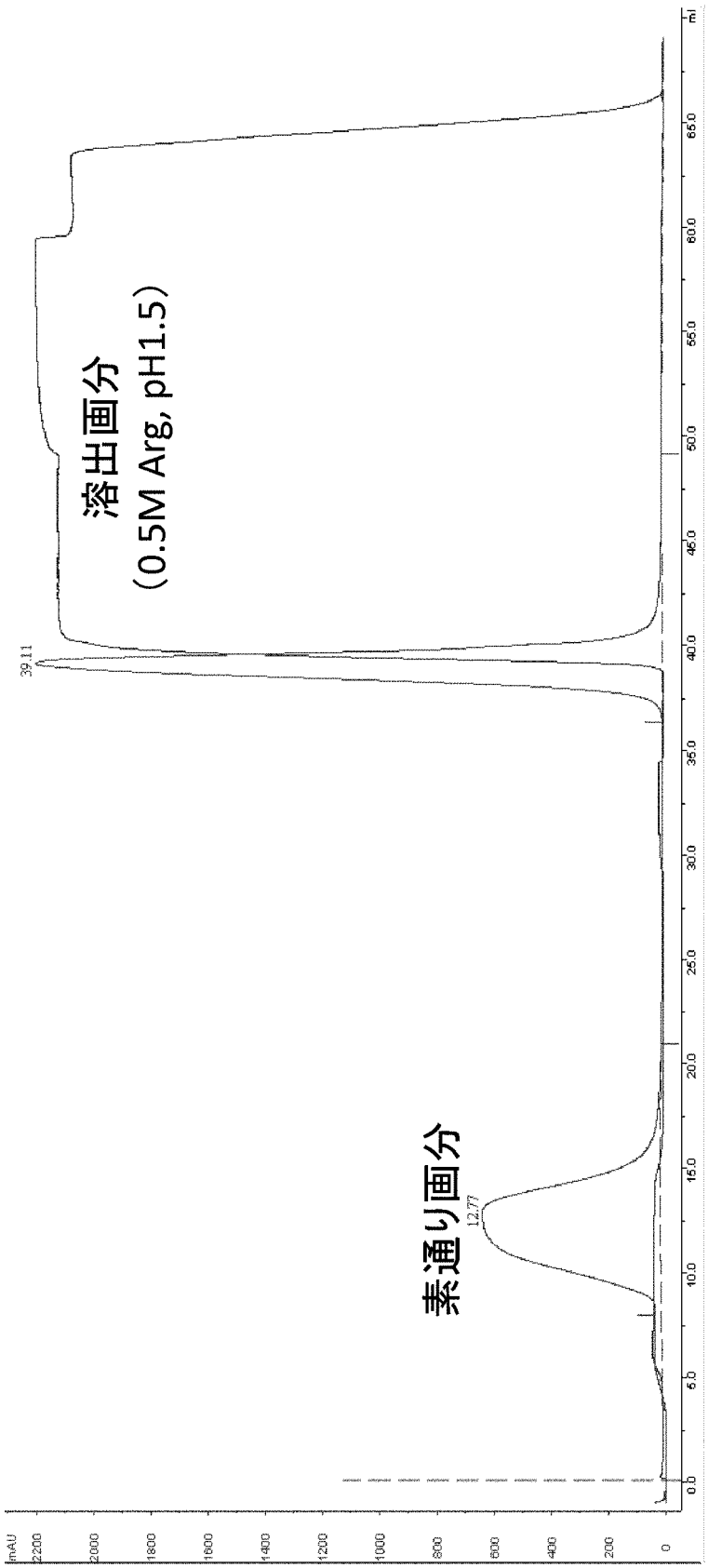
[図9-1]


R3-75（順位1）
R2-18（順位6）
R2-16（順位7）
R1-27（順位8）
R3-23（順位2）
10μg/ml Protein A
R1-7（順位68）
PBST
Response (a.u.)
0
100
200
300
400
500
600
800
1000
1200
1400
1600
時間（秒）

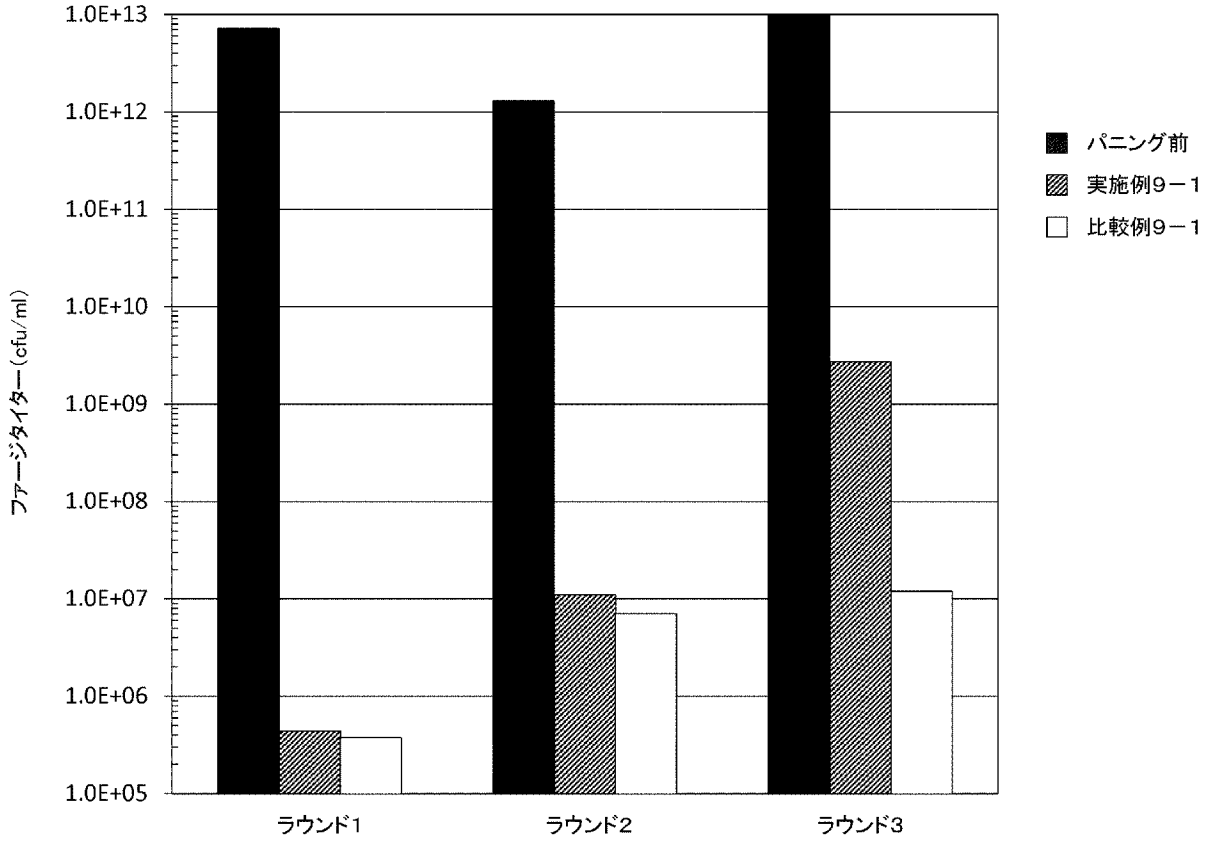
[図9-2]


R3-26（順位3）
R3-75（順位1）
R1-7（順位68）
R3-23（順位2）
R2-18（順位6）
R1-27（順位8）
R2-16（順位7）
マウス単鎖抗体－FM
Response (a.u.)
450
350
250
150
50
-50
-50
50
150
250
350
450
550
650
750
時間（秒）

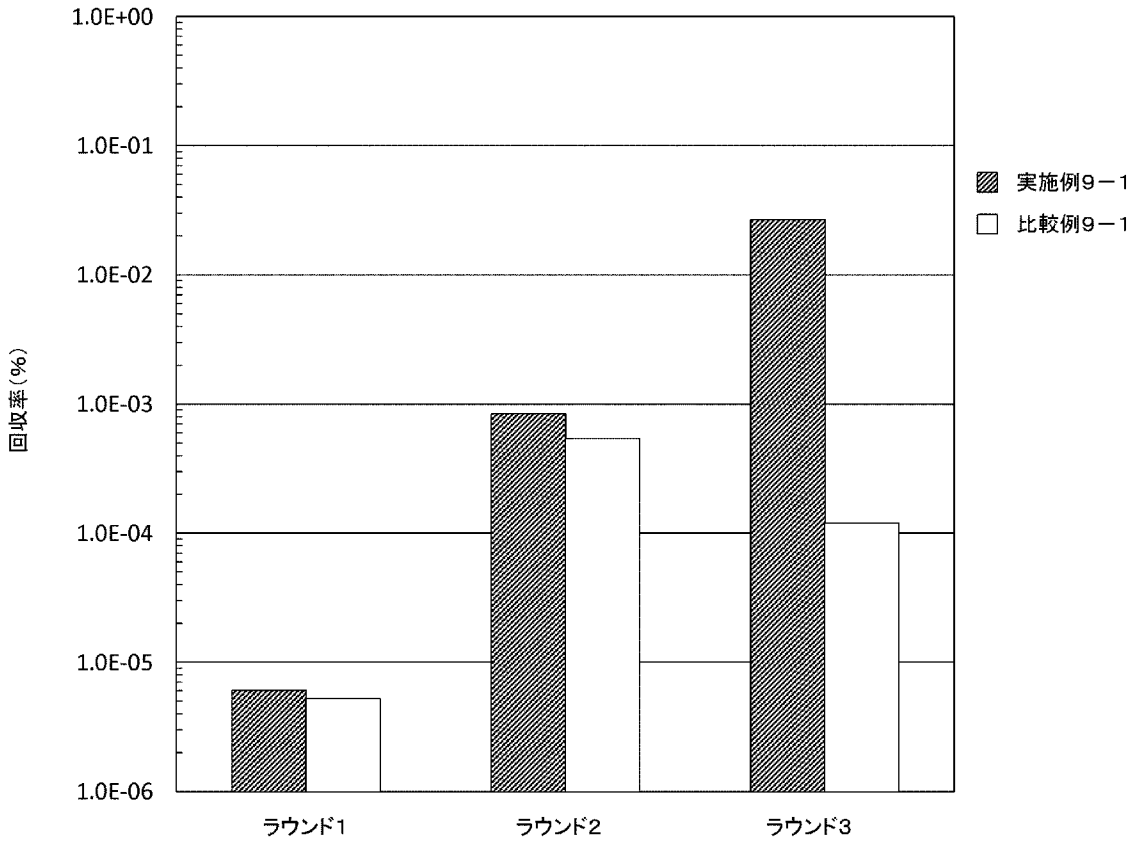
[図10]


溶出画分
(0.5M Arg, pH1.5)
素通り画分
39.11
12.77
mAU
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0.0
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
35.0
40.0
45.0
50.0
55.0
60.0
65.0
ml

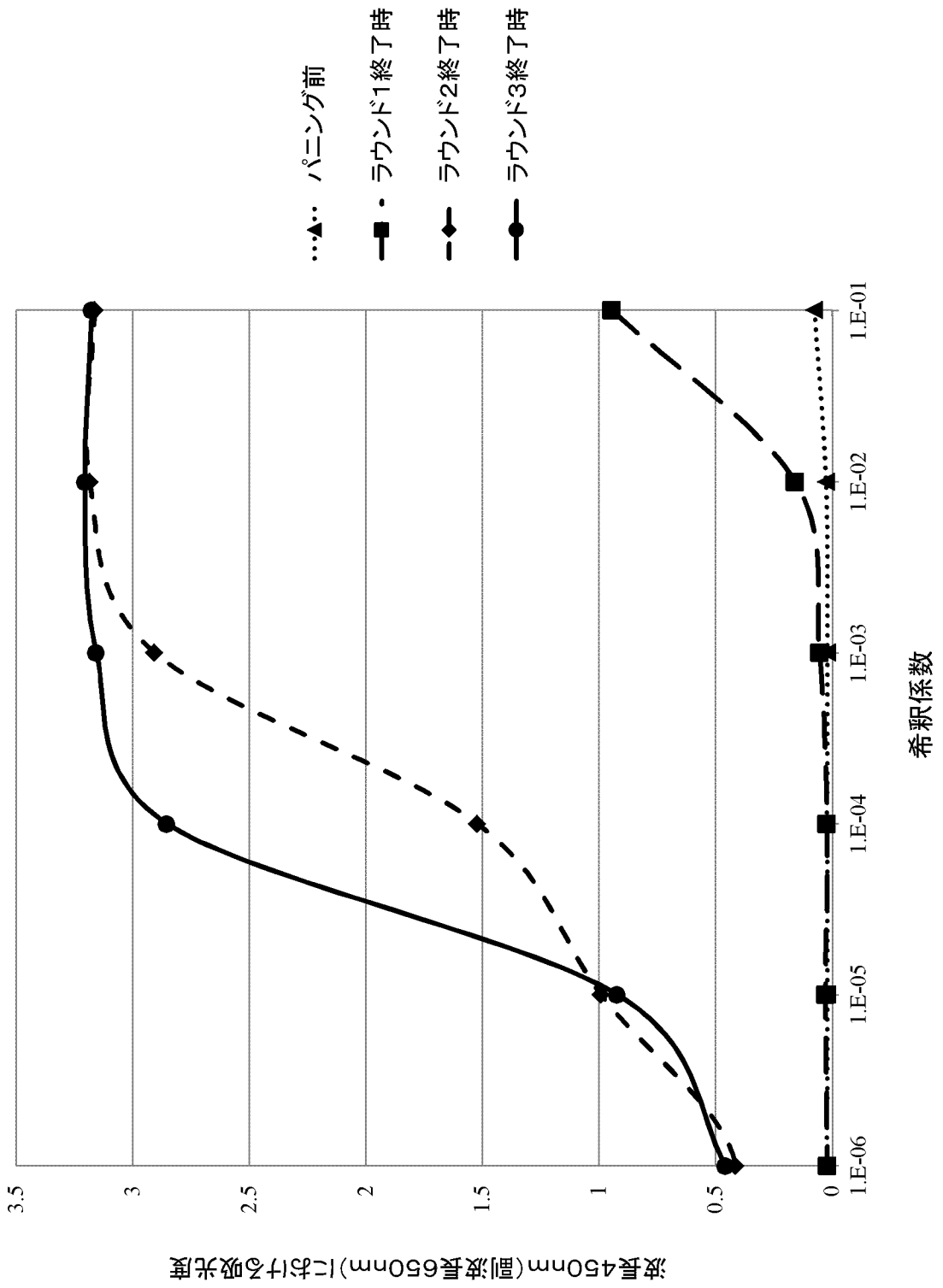
[図11]


1.0E+13
1.0E+12
1.0E+11
1.0E+10
1.0E+09
1.0E+08
1.0E+07
1.0E+06
1.0E+05
ファージタイター(cfu/ml)
ラウンド1
ラウンド2
ラウンド3
パニング前
実施例9－1
比較例9－1

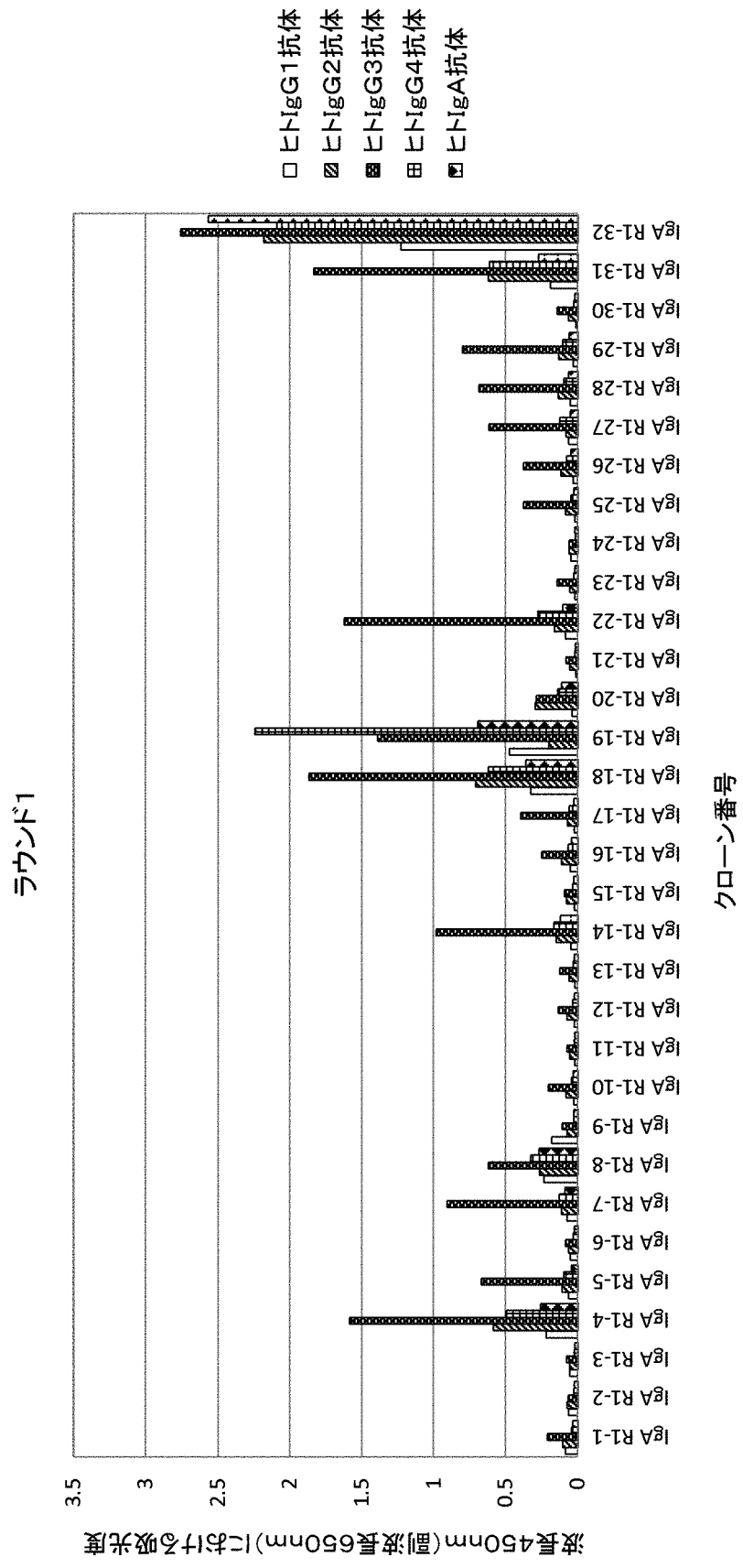
[図12]


1.0E+00
1.0E-01
1.0E-02
1.0E-03
1.0E-04
1.0E-05
1.0E-06
回収率(%)
ラウンド1
ラウンド2
ラウンド3
実施例9－1
比較例9－1

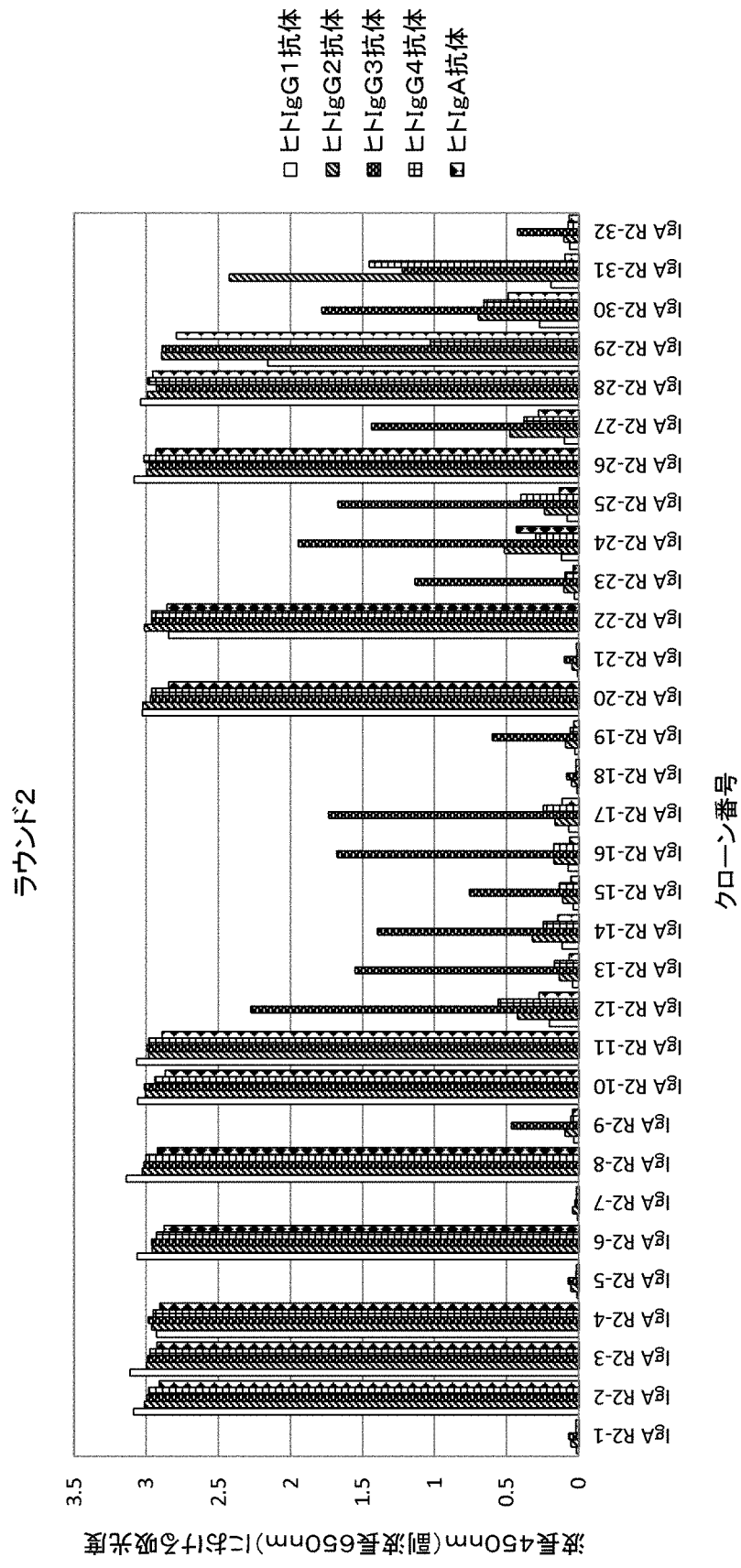
[図13]


パニング前
ラウンド1終了時
ラウンド2終了時
ラウンド3終了時
波長450nm(副波長650nm)における吸光度
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
1.E-06
1.E-05
1.E-04
1.E-03
1.E-02
1.E-01
希釈係数

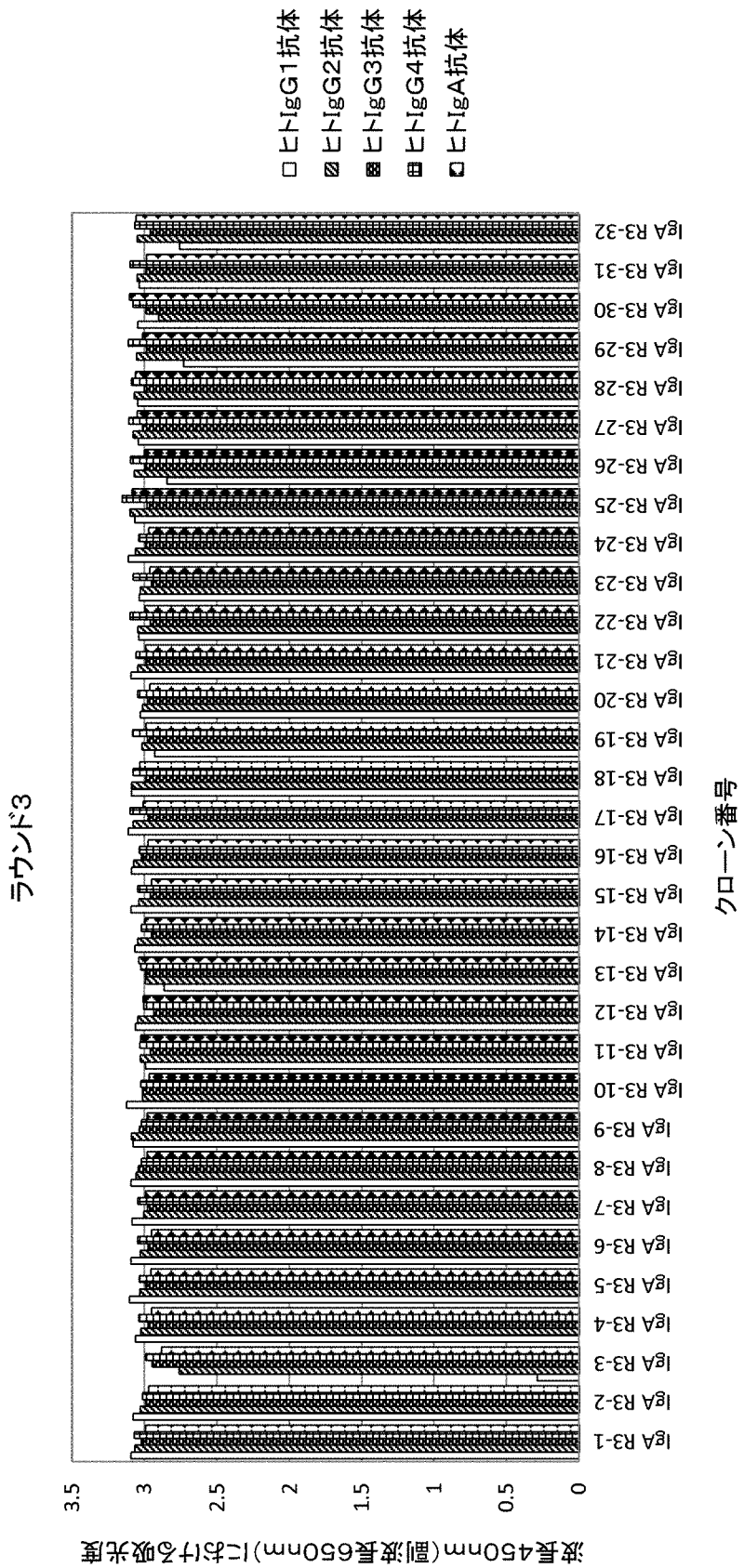
[図14]


□ヒトIgG1抗体
▨ヒトIgG2抗体
▩ヒトIgG3抗体
⊞ヒトIgG4抗体
◪ヒトIgA抗体
波長450nm(副波長650nm)におけるOD吸光度
ラウンド1
クローン番号
IgA R1-1
IgA R1-2
IgA R1-3
IgA R1-4
IgA R1-5
IgA R1-6
IgA R1-7
IgA R1-8
IgA R1-9
IgA R1-10
IgA R1-11
IgA R1-12
IgA R1-13
IgA R1-14
IgA R1-15
IgA R1-16
IgA R1-17
IgA R1-18
IgA R1-19
IgA R1-20
IgA R1-21
IgA R1-22
IgA R1-23
IgA R1-24
IgA R1-25
IgA R1-26
IgA R1-27
IgA R1-28
IgA R1-29
IgA R1-30
IgA R1-31
IgA R1-32
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5

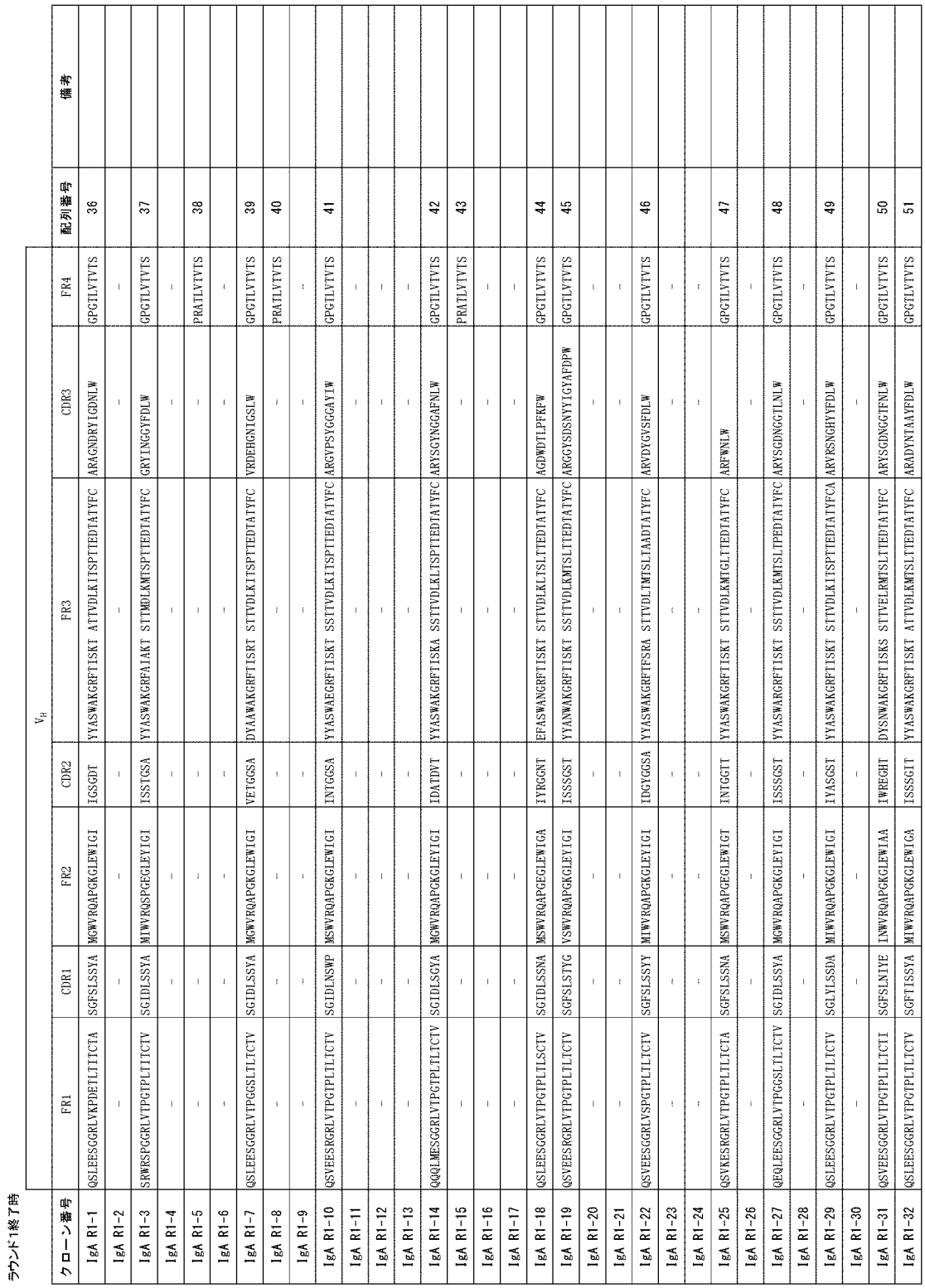
[図15]


□ヒトIgG1抗体
▨ヒトIgG2抗体
▩ヒトIgG3抗体
⊞ヒトIgG4抗体
◪ヒトIgA抗体
ラウンド2
波長450nm(副波長650nm)における吸光度
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
クローン番号
IgA R2-1
IgA R2-2
IgA R2-3
IgA R2-4
IgA R2-5
IgA R2-6
IgA R2-7
IgA R2-8
IgA R2-9
IgA R2-10
IgA R2-11
IgA R2-12
IgA R2-13
IgA R2-14
IgA R2-15
IgA R2-16
IgA R2-17
IgA R2-18
IgA R2-19
IgA R2-20
IgA R2-21
IgA R2-22
IgA R2-23
IgA R2-24
IgA R2-25
IgA R2-26
IgA R2-27
IgA R2-28
IgA R2-29
IgA R2-30
IgA R2-31
IgA R2-32

[図16]


□ヒトIgG1抗体
▨ヒトIgG2抗体
▩ヒトIgG3抗体
▦ヒトIgG4抗体
◘ヒトIgA抗体
波長450nm(副波長650nm)における吸光度
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
クローン番号
IgA R3-1
IgA R3-2
IgA R3-3
IgA R3-4
IgA R3-5
IgA R3-6
IgA R3-7
IgA R3-8
IgA R3-9
IgA R3-10
IgA R3-11
IgA R3-12
IgA R3-13
IgA R3-14
IgA R3-15
IgA R3-16
IgA R3-17
IgA R3-18
IgA R3-19
IgA R3-20
IgA R3-21
IgA R3-22
IgA R3-23
IgA R3-24
IgA R3-25
IgA R3-26
IgA R3-27
IgA R3-28
IgA R3-29
IgA R3-30
IgA R3-31
IgA R3-32
ラウンド3

[図17-1]



ラウンド1終了時

クローン番号	V_H							配列番号	備考
	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4		
IgA R1-1	QSLEESGGRLVKPDETLTITCTA	SGFSLSSYA	MGWVRQAPGKGLEWIGI	IGSGDT	YYASWAKGRFTISKT ATTVDLKITSPTTEDTATYFC	ARAGNDRYIGDNLW	GPGTLVTVTS	36	
IgA R1-2	-	-	-	-	-	-	-		
IgA R1-3	SRWRSPGGRLVTPGTPLTITCTV	SGIDLSSYA	MTWVRQSPGEGLEYIGI	ISSTGSA	YYASWAKGRFAIAKT STTMDLKMTSPTTEDTATYFC	GRYINGGYFDLW	GPGTLVTVTS	37	
IgA R1-4	-	-	-	-	-	-	-		
IgA R1-5	-	-	-	-	-	-	PRATLVTVTS	38	
IgA R1-6	-	-	-	-	-	-	-		
IgA R1-7	QSLEESGGRLVTPGGSLTLTCTV	SGIDLSSYA	MGWVRQAPGKGLEWIGI	VETGGSA	DYAAWAKGRFTISRT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	VRDEHGNTGSLW	GPGTLVTVTS	39	
IgA R1-8	-	-	-	-	-	-	PRATLVTVTS	40	
IgA R1-9	-	-	-	-	-	-	-		
IgA R1-10	QSVEESRGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLNSWP	MSWVRQAPGKGLEWIGI	INTGGSA	YYASWAEGRFTISKT SSTTVDLKITSPTTEDTATYFC	ARGVPSYGGGAYIW	GPGTLVTVTS	41	
IgA R1-11	-	-	-	-	-	-	-		
IgA R1-12	-	-	-	-	-	-	-		
IgA R1-13	-	-	-	-	-	-	-		
IgA R1-14	QGQQLMESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSGYA	MGWVRQAPGKGLEYIGI	IDATDWT	YYASWAKGRFTISKA SSTTVDLKLTSPTTEDTATYFC	ARYSGYNGGAFNLW	GPGTLVTVTS	42	
IgA R1-15	-	-	-	-	-	-	PRATLVTVTS	43	
IgA R1-16	-	-	-	-	-	-	-		
IgA R1-17	-	-	-	-	-	-	-		
IgA R1-18	QSLEESGGRLVTPGTPLTLSCTV	SGIDLSSNA	MSWVRQAPGEGLEWIGA	IYRGGNT	EFASWANGRFTISKT STTVDLKLTSLTTEDTATYFC	AGDWDTLPFKFW	GPGTLVTVTS	44	
IgA R1-19	QSVEESRGRLVTPGTPLTLTCTV	SGFSLSTYG	VSWVRQAPGKGLEYIGI	ISSSGST	YYANWAKGRFTISKT SSTTVDLKMTSLTTEDTATYFC	ARGGYSDSNYYIGYAFDPFW	GPGTLVTVTS	45	
IgA R1-20	-	-	-	-	-	-	-		
IgA R1-21	-	-	-	-	-	-	-		
IgA R1-22	QSVEESGGRLVSPGTPLTLTCTV	SGFSLSSYY	MTWVRQAPGKGLEYIGI	IDGYGGSA	YYASWAKGRFTFSRA STTVDLTMTSLTAADTATYFC	ARVDYGVSFDLW	GPGTLVTVTS	46	
IgA R1-23	-	-	-	-	-	-	-		
IgA R1-24	-	-	-	-	-	-	-		
IgA R1-25	QSVKESRGRLVTPGTPLTLTCTA	SGFSLSSNA	MSWVRQAPGEGLEWIGT	INTGGTT	YYASWAKGRFTISKT STTVDLKMTGLTTEDTATYFC	ARFWNLW	GPGTLVTVTS	47	
IgA R1-26	-	-	-	-	-	-	-		
IgA R1-27	QEQLEESGGRLVTPGGSLTLTCTV	SGIDLSSYA	MGWVRQAPGKGLEYIGI	ISSSGST	YYASWARGRFTISKT SSTTVDLKMTSLTPEDTATYFC	ARYSGDNGGTLNLW	GPGTLVTVTS	48	
IgA R1-28	-	-	-	-	-	-	-		
IgA R1-29	QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGLYLSSDA	MTWVRQAPGKGLEWIGI	IYASGST	YYASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTATYFCA	ARVRSNGHYVFDLW	GPGTLVTVTS	49	
IgA R1-30	-	-	-	-	-	-	-		
IgA R1-31	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTI	SGFSLNIYE	INWVRQAPGKGLEWIAA	IWREGHT	DYSNWAKGRFTISKS STTVELKMTSLTTEDTATYFC	ARYSGDNGGTFNLW	GPGTLVTVTS	50	
IgA R1-32	QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGFTISSYA	MTWVRQAPGKGLEWIGA	ISSSGIT	YYASWAKGRFTISKT AITVDLKMTSLTTEDTATYFC	ARADYNTAAYFDLW	GPGTLVTVTS	51	

[図17-2]

ラウンド1終了時

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

[図17-3]

ラウンド2終了時

クローン番号	V_H							配列番号	備考
	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4		
IgA R2-1	-	-	-	-	-	-	-		
IgA R2-2	QEQLMESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGFSLSGYA	VTWVRQAPGEGLEWIGT	ISTVGST	YFASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS	65	
IgA R2-3	QQQLMESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSSNA	MTWVRQAPGEGLEWIGT	ISTGGST	YFASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS	66	共通2
IgA R2-4	QS VEESGGRLVSPGTPLTLTCTV	SGFSLSSYY	MIWVRQAPGKGLEYIGM	IDGYGGNA	YYANWAKGRFTVSKA ATTVDLKMTSLTTEDTATYFC	VRADYNTVSYFDLW	GPGTLVTVTS	67	共通7
IgA R2-5	-	-	-	-	-	-	-		
IgA R2-6	QS LEESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSSNA	MTWVRQAPGEGLEWIGT	ISTGGST	YFASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS	68	共通1
IgA R2-7	QS LEESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSDYA	VTWVRQAPGKGLEWIGT	ISTYTNT	YYASWAKGRFTSRT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS	69	
IgA R2-8	QQQLMESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSSNA	MTWVRQAPGEGLEWIGT	ISTGGST	YFASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS	70	共通2
IgA R2-9	QS LEESGGGLVTPGGSLTLACTV	SGIDLSSNA	MGWVRQAPGKGLEWIGL	INSGGNT	YYASWAKGRFTISRT STTVDLQMTSPTTEDTATYFC	ARAGDSVSTLALW	GPGTLVTVTS	71	
IgA R2-10	QS VEESGGRLVSPGTPLTLTCTA	SGFSLSTYY	MIWVRQAPGKGLEYIGS	IDGYDGDT	YYATWAKGRFTVSKT AITVDLKMTSLTTEDTATYFC	ARADYNTVAYFDLW	GPGTLVTVTS	72	共通6
IgA R2-11	QQQLMESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSSNA	MTWVRQAPGEGLEWIGT	ISTGGST	YFASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS	73	共通2
IgA R2-12	QS VEESRGRLVTPGTPLTLTCTV	SGFSLSSYA	MGWFRLAPGKGLEWIGI	ITTGDSI	YYANWAKGRFTISKT STTVDLRITSPTTADTATYFC	ARGNIGIGWGSYYFNFW	GPGTLVTVTS	74	
IgA R2-13	QS VEESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSSYA	MSWVRQAPGKGLEWIGY	ITTRDKT	YYTNWANGRFTISKT STSVSLRIASPTTEDTATYFC	ATALYADDGNTLW	GPGTLVTVTS	75	
IgA R2-14	QS LEESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGFSLSSYP	MGWFRQAPGKGLEYIGA	INTGGST	YYASWARGRFTVSRT STTVDLKMTSLTAEDTATYFC	VRHDDDLIFNLW	GPGTLVTVTS	76	
IgA R2-15	-	-	-	-	-	-	-		
IgA R2-16	QQQLVESGGRLVTPGTPLTLTCTA	SGFSLSNYY	MGWVRQAPGKGLQWIAY	IWQSGIA	YYASWARGRFTISRT STTVDLKMPSLTAADTAAYFC	ARDYDGGYALW	GPGTLVTVTS	77	
IgA R2-17	QS LEESGGRLVTPGTPLTLTCTA	SGFSLSSYY	MSWVRQAPGKGLEWIGS	IDTNSNT	YYASWYKGRFTISKT STTVDLKMTSPTTEDTATYFC	VRGVIGATGDLW	GPGTLVTVTS	78	
IgA R2-18	-	-	-	-	-	-	-		
IgA R2-19	QS VEESRGRLVTPGTPLTLTCTV	SGFSLSSYA	ISWVRQAPGKGLEWIGY	ILAGGSA	YYANWAKGRFTISKT STTVELKVTSPTTEDTATYFC	ARGGAGYNTVGLNLW	GPGTLVTVTS	79	
IgA R2-20	QEQLMESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGFSLSGYA	VTWVRQAPGEGLEWIGT	ISTVGST	YFASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS	80	
IgA R2-21	-	-	-	-	-	-	-		
IgA R2-22	QS VEESGGRLVSPGTPLTLTCTV	SGFSLSSYY	MIWVRQAPGKGLEYIGM	IDGYGGNA	YYANWAKGRFTVSKA ATTVDLKMTSLTTEDTATYFC	VRADYNTVSYFDLW	GPGTLVTVTS	81	共通7
IgA R2-23	QS VKESEGRLVTPGTPLTLTCTV	SGFSLSNYN	MGWVRQAPGKGLEYIGA	IYSSGPT	YYASWAKGRFTISKT STTVDLEMTSLTSEDTATYFC	AKNDDPFETYDLW	GPGTLVTVTS	82	
IgA R2-24	QS VEESRGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLMSNA	MGWVRQAPGKGLEYIGI	ISSSGST	YYASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDAATYFC	ARAIGDNGGYFNLW	GPGTLVTVTS	83	
IgA R2-25	QFEQLEESGGGLVTPGTPLTLTCTA	SGFSLDSYY	MIWVRQAPGEGLEWIGI	IGGGGDT	AYASWAKGRFTISKT STTVDLKMTSLTTEDTATYFC	ARDVDGGYALW	GPGTLVTVTS	84	
IgA R2-26	QS LEESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSSNA	MIWVRQAPGEGLEWIGT	ISTGGST	YFASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS	85	共通1
IgA R2-27	QS VEESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLNNYA	MGWVRQAPGKGLEYIGI	ISYGGSA	YYASWAKGRFTISRT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ARGDYDNYGYGYAYLNFW	GPGTLVTVTS	86	
IgA R2-28	-	-	-	-	-	-	-		
IgA R2-29	QS VEESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSSYP	MGWVRQAPGKGLEYIGI	ISDSDNT	YYASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ARGWLYFDLW	GPGTLVTVTS	87	
IgA R2-30	QS LEESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLNSYA	MGWVRQAPGEGLEWIGI	ITSSSIT	YYASWAKGRFTISKT STTVDLKMTSLTTEDTATYFC	ARGDYNNNWDYFNLW	GPGTLVTVTS	88	
IgA R2-31	QS VEESGGRLVTPGTPLTLTCTI	SGFSLNIYE	INWVRQAPGKGLEWIAA	IWREGHT	DYSNWAKGRFTISKS STTVELRMTSLTTEDTATYFC	ARYSGDNGGIFNLW	GPGTLVTVTS	89	
IgA R2-32	QS LEESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGFSLSSYA	MNWVRQAPGKGLEWITF	IGTGGDI	YYANWAKGRFTISKT STTVDLKIASPTTEDTATYFC	ARGDTGGSLYRHFNLW	GPGTLVTVTS	90	

[図17-4]

ラウンド2終了時

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

[図17-5]

ラウンド3終了時

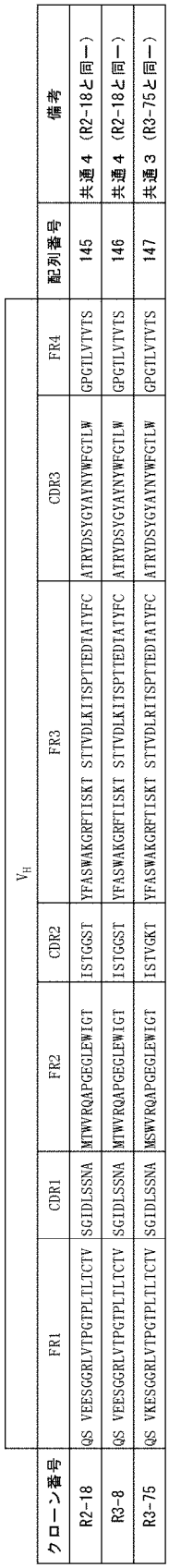
	V_H								
クローン番号	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	配列番号	備考
IgA R3-1	QS VKESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSSNA	MSWVRQAPGEGLEWIGT	ISTVGKT	YFASWAKGRFTISKT STTVDLRITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS	108	共通3 (R3-75と同一)
IgA R3-2	QQQLMESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSSNA	MTWVRQAPGEGLEWIGT	ISTGGST	YFASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS	109	共通2
IgA R3-3	QS LEESGGRLVTPGGSLTLTCTA	SGFSLSAYD	INWVRQAPGKGLEWIGM	ISGSGGST	YYASWAKGRFTISKT STTVDLKMTSLTAADTATYFC	ARGFDNYNLW	GPGTLVTVTS	110	
IgA R3-4	QQQLMESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSSNA	MTWVRQAPGEGLEWIGT	ISTGGST	YFASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS	111	共通2
IgA R3-5	QS VEESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSSNA	MTWVRQAPGEGLEWIGT	ISTGGST	YFASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS	112	共通4 (R2-18と同一)
IgA R3-6	QS LEESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSSNA	MTWVRQAPGEGLEWIGT	ISTGGST	YFASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS	113	共通1
IgA R3-7	QS LEESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSNNA	MSWVRQAPGEGLEWIGT	ISTGGSA	YYASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS	114	共通5
IgA R3-8	QQQLMESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSSNA	MTWVRQAPGEGLEWIGT	ISTGGST	YFASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS	115	共通2
IgA R3-9	QS VKESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSSNA	MSWVRQAPGEGLEWIGT	ISTVGKT	YFASWAKGRFTISKT STTVDLRITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS	116	共通3 (R3-75と同一)
IgA R3-10	QS LEESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSSNA	MTWVRQAPGEGLEWIGT	ISTGGST	YFASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS	117	共通1
IgA R3-11	QS LEESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSSNA	MTWVRQAPGEGLEWIGT	ISTGGST	YFASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS	118	共通1
IgA R3-12	QQQLMESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSSNA	MTWVRQAPGEGLEWIGT	ISTGGST	YFASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS	119	共通2
IgA R3-13	QS VEESGGRLVSPGTPLTLTCTV	SGFSLSSYY	MIWVRQAPGKGLEYIGM	IDGYGGNA	YYANWAKGRFTVSKA ATTVDLKMTSLTTEDTATYFC	VRADYNTVSYFDLW	GPGTLVTVTS	120	共通7
IgA R3-14	QS LEESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSSNA	MTWVRQAPGEGLEWIGT	ISTGGST	YFASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS	121	共通1
IgA R3-15	QS LEESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSSNA	MTWVRQAPGEGLEWIGT	ISTGGST	YFASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS	122	共通1
IgA R3-16	QS LEESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSSNA	MTWVRQAPGEGLEWIGT	ISTGGST	YFASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS	123	共通1
IgA R3-17	QQQLMESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSSNA	MTWVRQAPGEGLEWIGT	ISTGGST	YFASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS	124	共通2
IgA R3-18	QS VEESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSSNA	MTWVRQAPGEGLEWIGT	ISTGGST	YFASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS	125	共通4 (R2-18と同一)
IgA R3-19	QS VEESGGRLVSPGTPLTLTCTA	SGFSLSTYY	MIWVRQAPGKGLEYIGS	IDGYDGDT	YYATWAKGRFVSKT ATTVDLKMTSLTTEDTATYFC	ARADYNTVAYFDLW	GPGTLVTVTS	126	共通6
IgA R3-20	QS LEESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSSNA	MTWVRQAPGEGLEWIGT	ISTGGST	YFASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS	127	共通1
IgA R3-21	QS LEESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSSNA	MTWVRQAPGEGLEWIGT	ISTGGST	YFASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS	128	共通1
IgA R3-22	QQQLMESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSSNA	MTWVRQAPGEGLEWIGT	ISTGGST	YFASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS	129	共通2
IgA R3-23	QQQLMESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSSNA	MTWVRQAPGEGLEWIGT	ISTGGST	YFASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS	130	共通2
IgA R3-24	QS LEESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSNNA	MSWVRQAPGEGLEWIGT	ISTGGSA	YYASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS	131	共通5
IgA R3-25	QQQLMESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSSNA	MTWVRQAPGEGLEWIGT	ISTGGST	YFASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS	132	共通2
IgA R3-26	QS VKESGGRLVSPGTPLTLTCTV	SGFSLSSYY	MIWVRQAPGKGLEYIGS	IDGYDGDT	YYATWAKGRFTVSKT ATTVDLKMTSLTTEDTATYFC	ARADYNTVAYFDLW	GPGTLVTVTS	133	
IgA R3-27	QS LEESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSSNA	MTWVRQAPGEGLEWIGT	ISTIGST	YFASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS	134	共通1
IgA R3-28	QS LEESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSSNA	MTWVRQAPGEGLEWIGT	ISTIGTT	YFASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS	135	共通1
IgA R3-29	QS LEESGGRLVSPGTPLTLTCTV	SGFSLSTYY	MIWVRQAPGKGLEYIGS	IDGYGGNA	YYATWAKGRFTISKT ATTVDLKMTSLTTEDTATYFC	ARADYNTAAYFDLW	GPGTLVTVTS	136	
IgA R3-30	QS LEESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSSNA	MTWVRQAPGEGLEWIGT	ISTGGST	YFASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS	137	共通1
IgA R3-31	QS LEESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSSNA	MTWVRQAPGEGLEWIGT	ISTGGST	YFASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS	138	共通1
IgA R3-32	QS LEESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGFSLSSYY	MIWVRQAPGKGLEYIGS	IDGYGGSA	YYATWAKGRFTVSKT ATTVDLKMTSLTTEDTATYFC	ARADYNTAAYFDLW	GPGTLVTVTS	139	

[図17-6]

ラウンド3終了時

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

[図17-7]



クローン番号	V_H							配列番号	備考
	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4		
R2-18	QS VEESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSSNA	MTWVRQAPGEGLEWIGT	ISTGGST	YFASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS	145	共通４（R2-18と同一）
R3-8	QS VEESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSSNA	MTWVRQAPGEGLEWIGT	ISTGGST	YFASWAKGRFTISKT STTVDLKITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS	146	共通４（R2-18と同一）
R3-75	QS VKESGGRLVTPGTPLTLTCTV	SGIDLSSNA	MSWVRQAPGEGLEWIGT	ISTVGKT	YFASWAKGRFTISKT STTVDLRITSPTTEDTATYFC	ATRYDSYGYAYNYWFGTLW	GPGTLVTVTS	147	共通３（R3-75と同一）

[図17-8]

ラウンド1終了時

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

[図17-9]

ラウンド2終了時

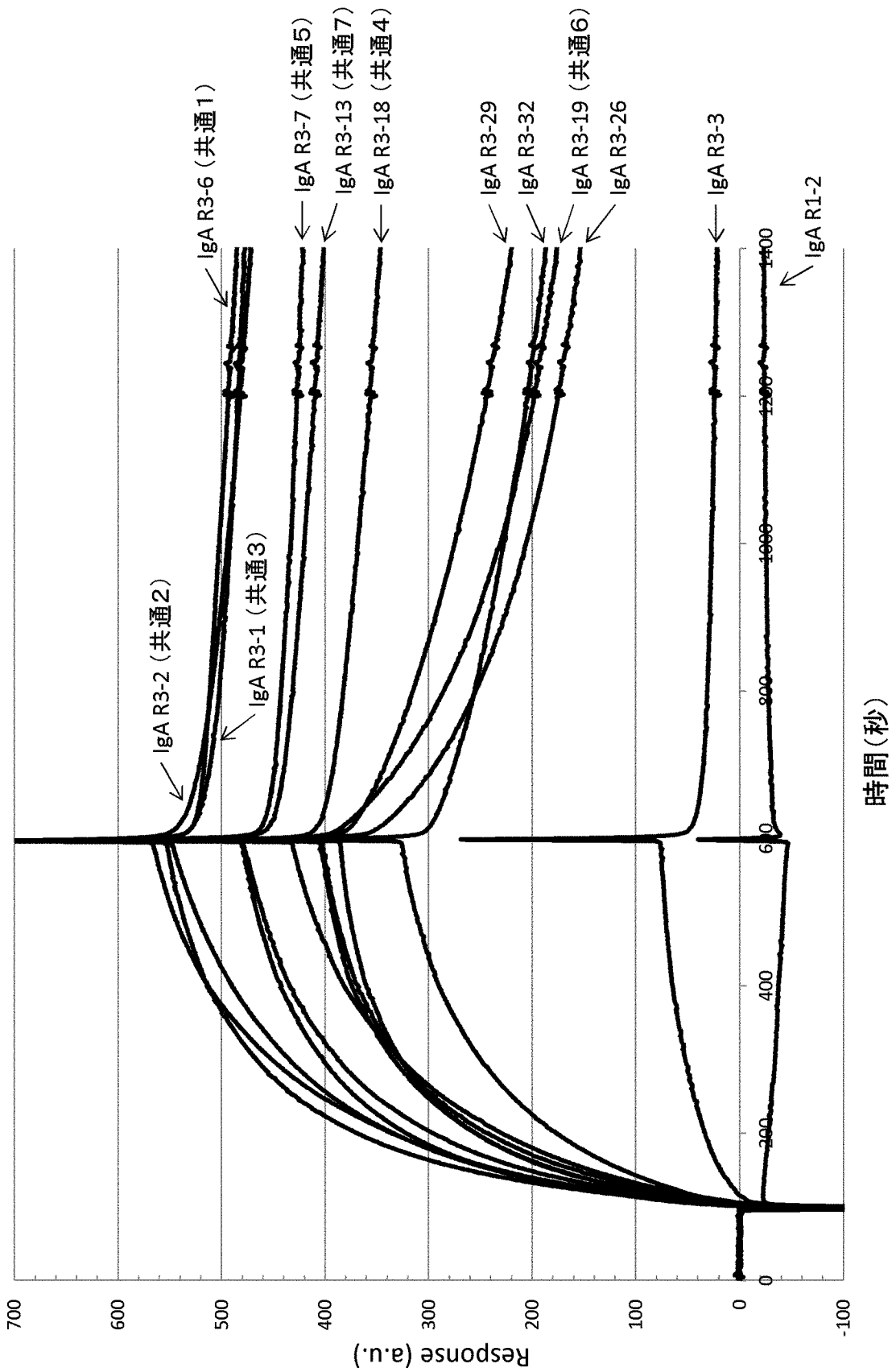
	クローン数
共通１	2
共通２	3
共通３（R3-75と同一）	0
共通４（R2-18と同一）	0
共通５	0
共通６	1
共通７	2

[図17-10]

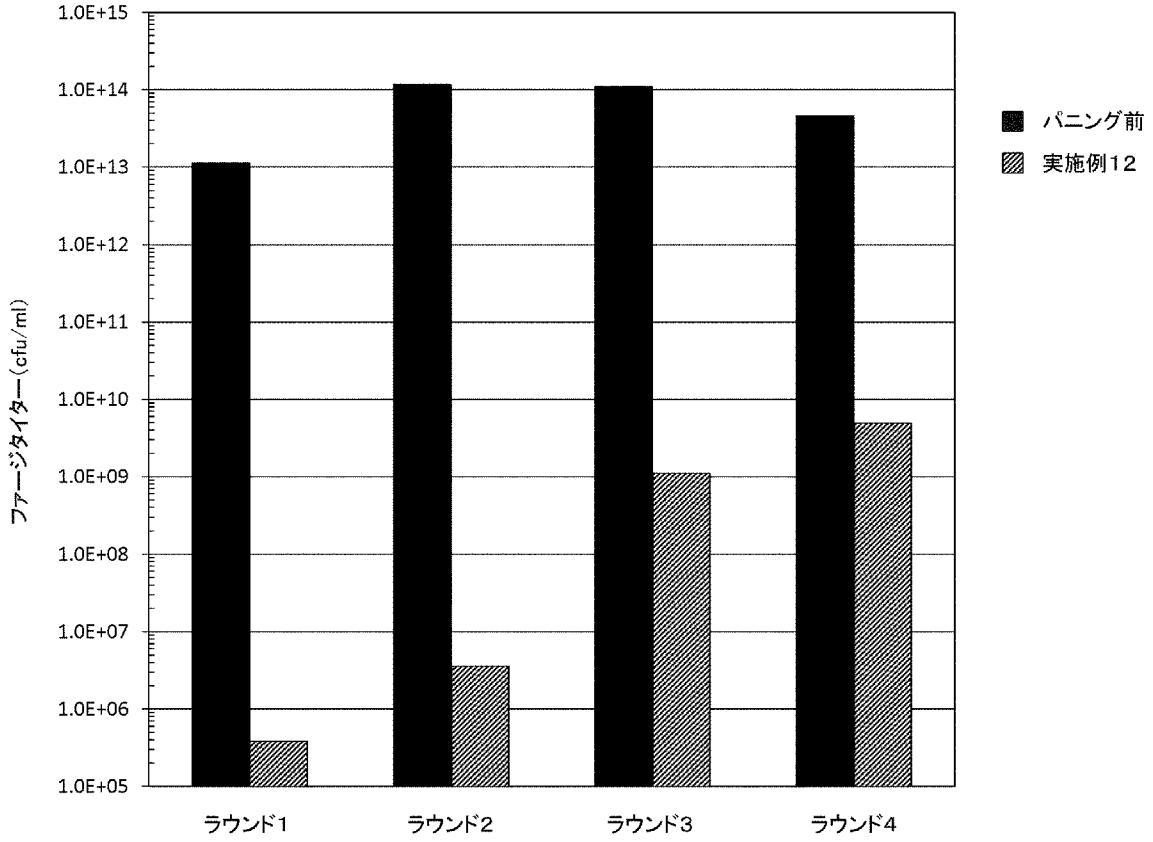
ラウンド3終了時

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

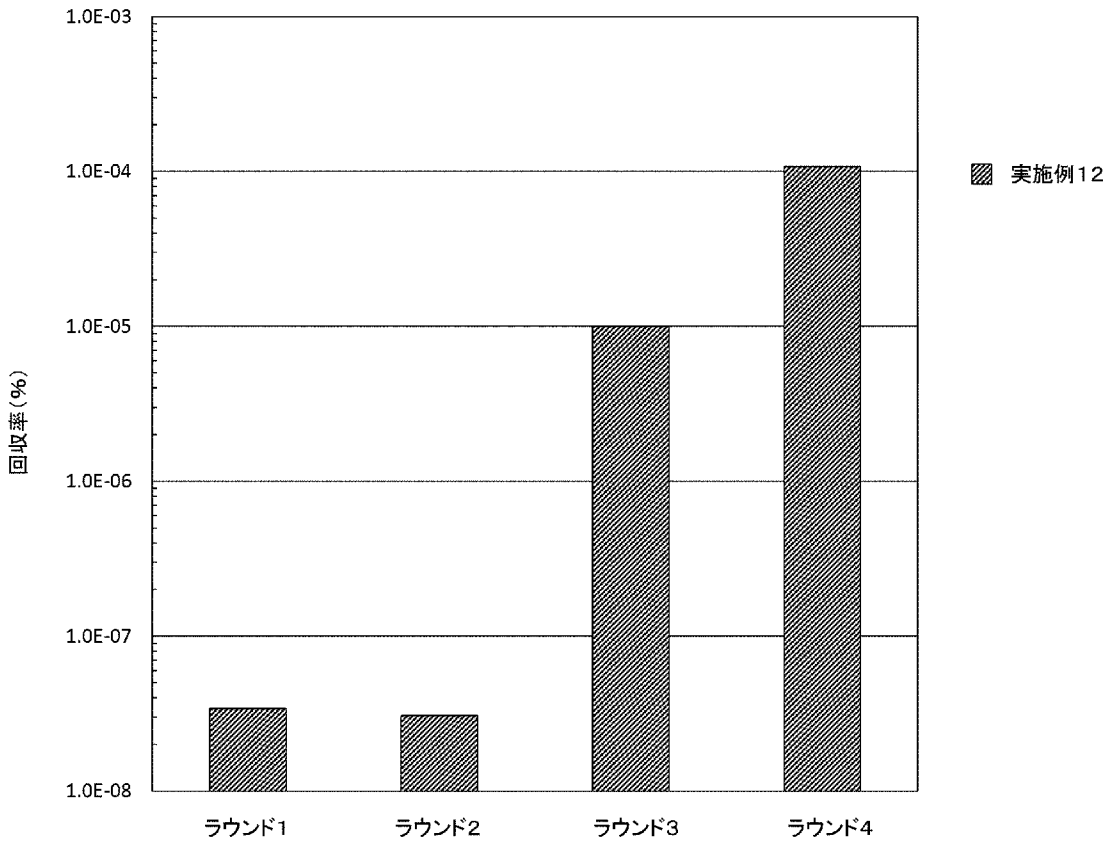
[図18]


IgA R3-6（共通1）
IgA R3-7（共通5）
IgA R3-13（共通7）
IgA R3-18（共通4）
IgA R3-29
IgA R3-32
IgA R3-19（共通6）
IgA R3-26
IgA R3-3
IgA R1-2
IgA R3-2（共通2）
IgA R3-1（共通3）
Response (a.u.)
700
600
500
400
300
200
100
0
-100
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
時間（秒）

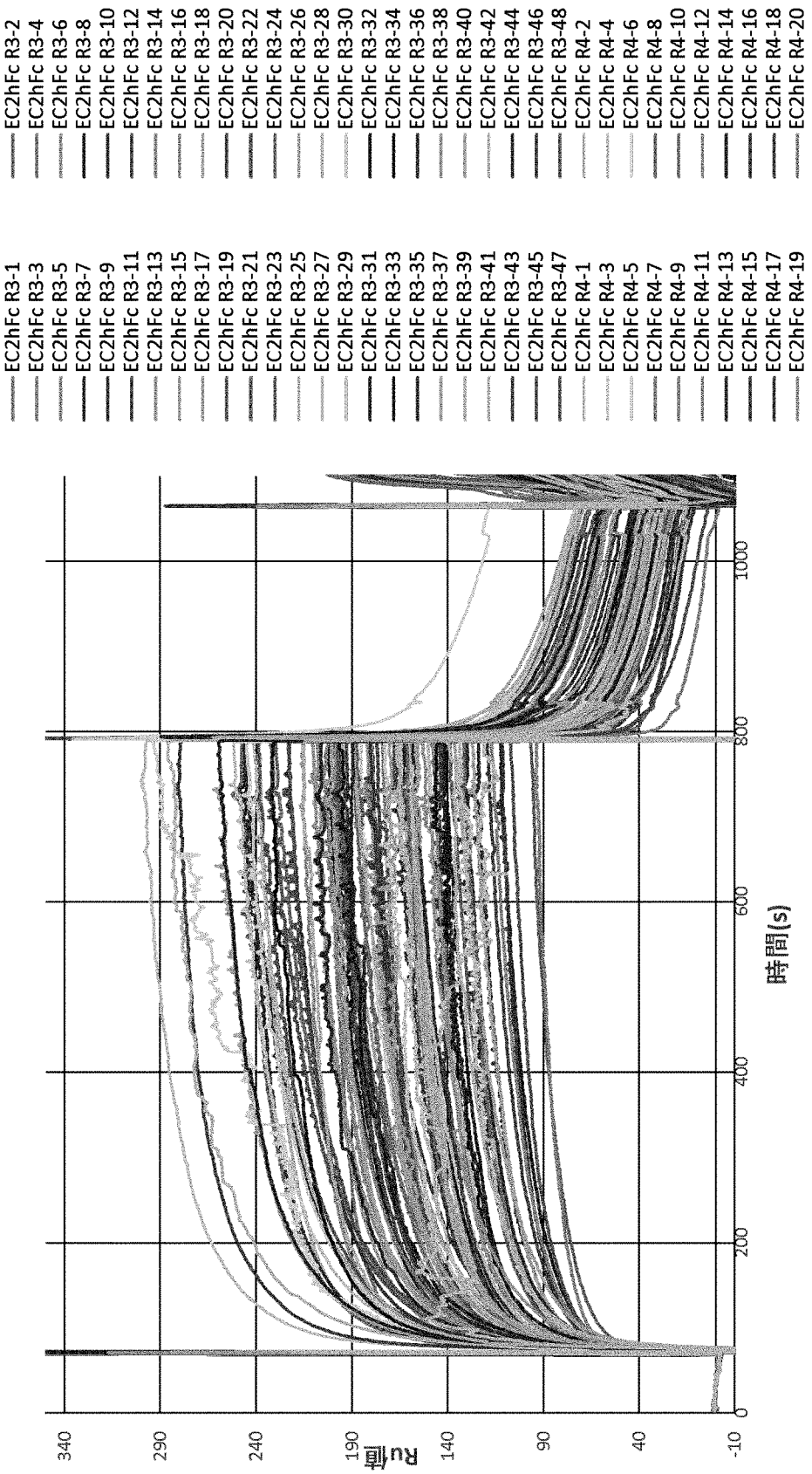
[図19]


1.0E+15
1.0E+14
1.0E+13
1.0E+12
1.0E+11
1.0E+10
1.0E+09
1.0E+08
1.0E+07
1.0E+06
1.0E+05
ファージタイター（cfu/ml）
ラウンド1
ラウンド2
ラウンド3
ラウンド4
パニング前
実施例12

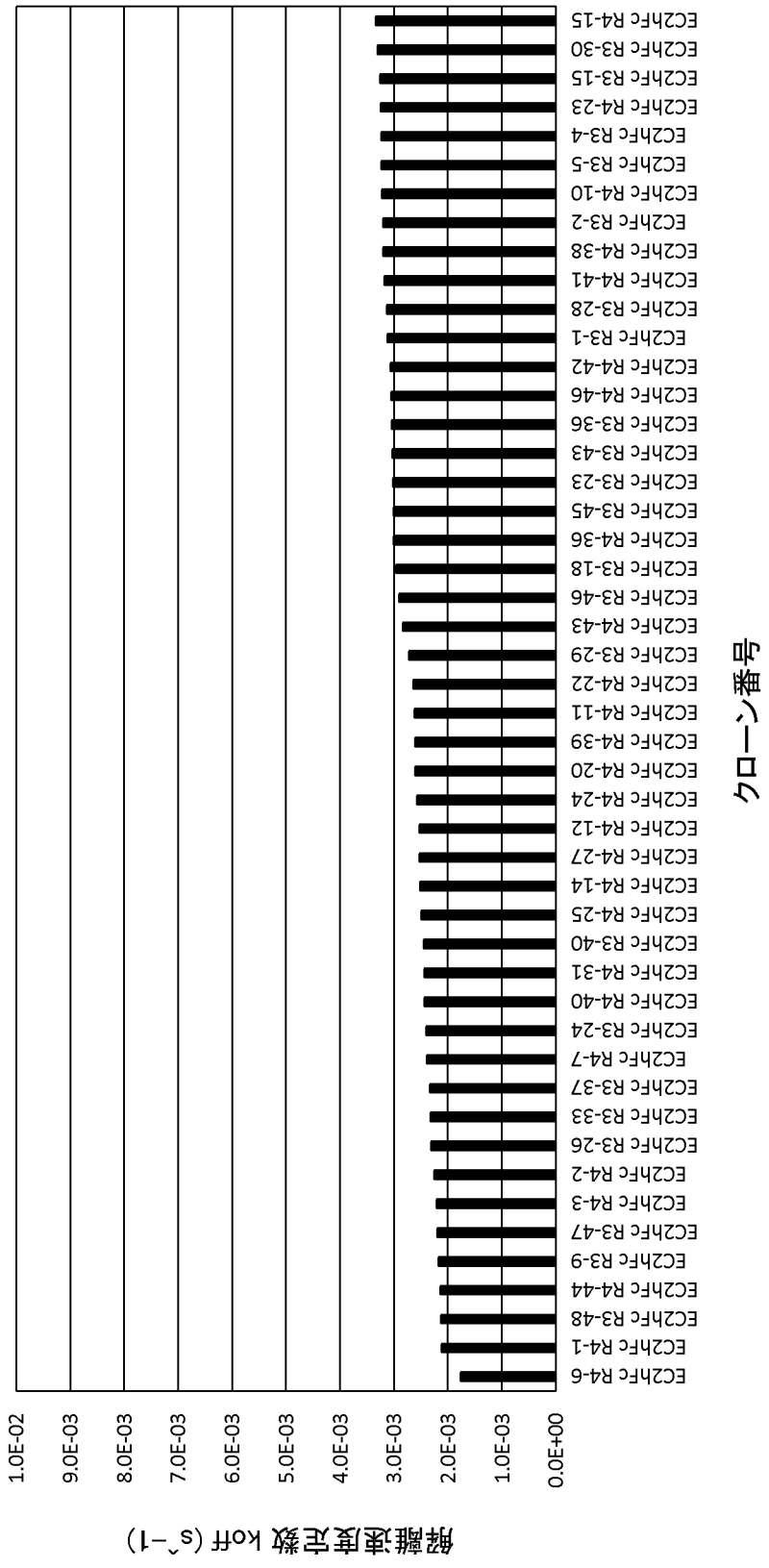
[図20]


1.0E-03
1.0E-04
1.0E-05
1.0E-06
1.0E-07
1.0E-08
回収率（%）
ラウンド1
ラウンド2
ラウンド3
ラウンド4
実施例12

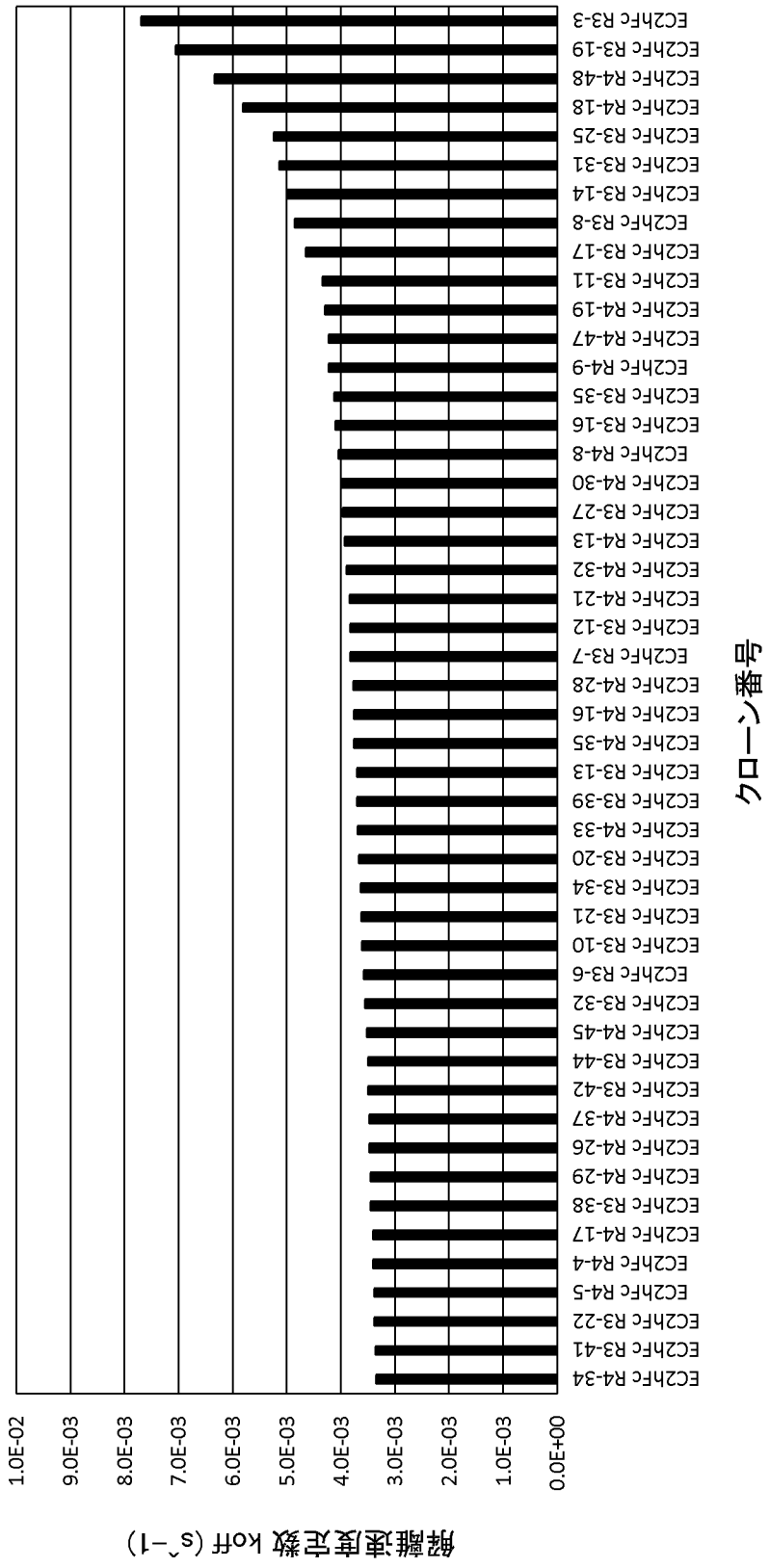
[図21]


EC2hFc R3-1
EC2hFc R3-2
EC2hFc R3-3
EC2hFc R3-4
EC2hFc R3-5
EC2hFc R3-6
EC2hFc R3-7
EC2hFc R3-8
EC2hFc R3-9
EC2hFc R3-10
EC2hFc R3-11
EC2hFc R3-12
EC2hFc R3-13
EC2hFc R3-14
EC2hFc R3-15
EC2hFc R3-16
EC2hFc R3-17
EC2hFc R3-18
EC2hFc R3-19
EC2hFc R3-20
EC2hFc R3-21
EC2hFc R3-22
EC2hFc R3-23
EC2hFc R3-24
EC2hFc R3-25
EC2hFc R3-26
EC2hFc R3-27
EC2hFc R3-28
EC2hFc R3-29
EC2hFc R3-30
EC2hFc R3-31
EC2hFc R3-32
EC2hFc R3-33
EC2hFc R3-34
EC2hFc R3-35
EC2hFc R3-36
EC2hFc R3-37
EC2hFc R3-38
EC2hFc R3-39
EC2hFc R3-40
EC2hFc R3-41
EC2hFc R3-42
EC2hFc R3-43
EC2hFc R3-44
EC2hFc R3-45
EC2hFc R3-46
EC2hFc R3-47
EC2hFc R3-48
EC2hFc R4-1
EC2hFc R4-2
EC2hFc R4-3
EC2hFc R4-4
EC2hFc R4-5
EC2hFc R4-6
EC2hFc R4-7
EC2hFc R4-8
EC2hFc R4-9
EC2hFc R4-10
EC2hFc R4-11
EC2hFc R4-12
EC2hFc R4-13
EC2hFc R4-14
EC2hFc R4-15
EC2hFc R4-16
EC2hFc R4-17
EC2hFc R4-18
EC2hFc R4-19
EC2hFc R4-20
RU値
340
290
240
190
140
90
40
-10
0
200
400
600
800
1000
時間(s)

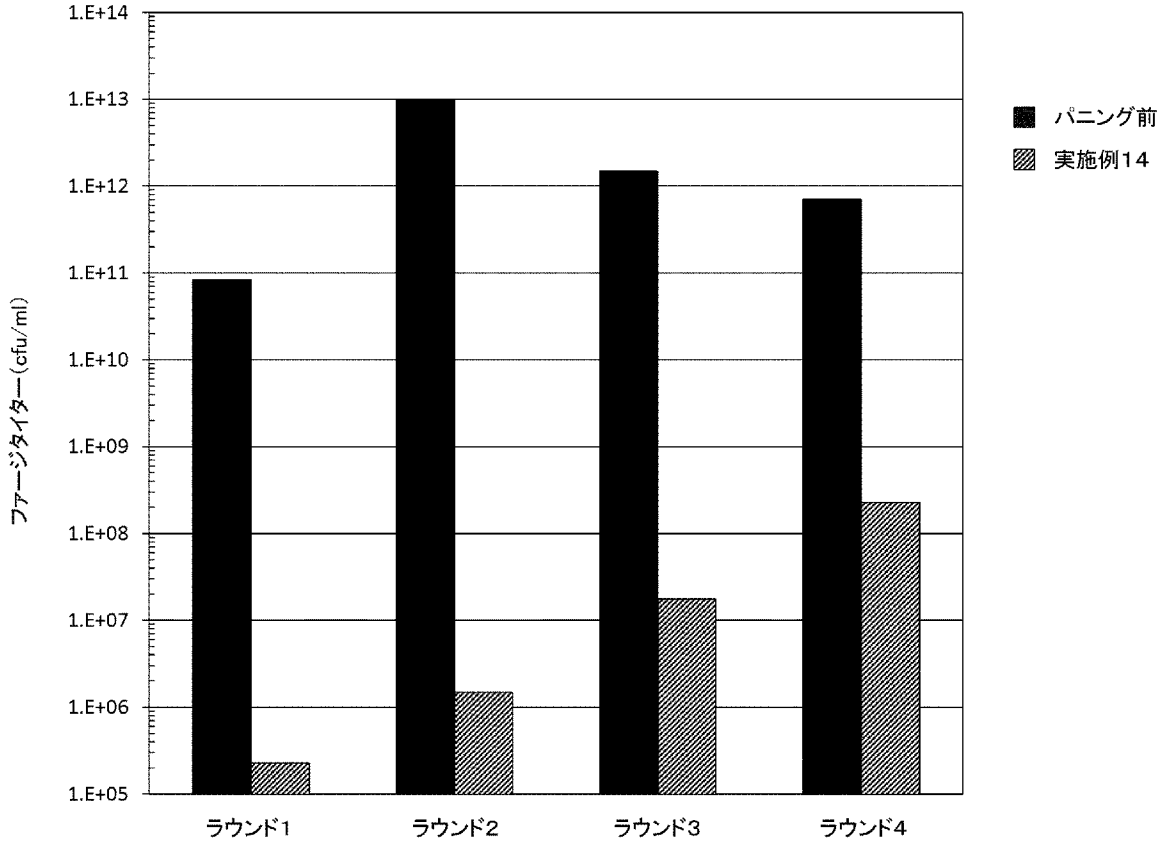
[図22-1]


解離速度定数 koff (s^-1)
1.0E-02
9.0E-03
8.0E-03
7.0E-03
6.0E-03
5.0E-03
4.0E-03
3.0E-03
2.0E-03
1.0E-03
0.0E+00
クローン番号
EC2hFc R4-6
EC2hFc R4-1
EC2hFc R3-48
EC2hFc R4-44
EC2hFc R3-9
EC2hFc R4-47
EC2hFc R4-3
EC2hFc R4-2
EC2hFc R3-26
EC2hFc R3-33
EC2hFc R3-37
EC2hFc R4-7
EC2hFc R3-24
EC2hFc R4-40
EC2hFc R4-31
EC2hFc R3-40
EC2hFc R4-25
EC2hFc R4-14
EC2hFc R4-27
EC2hFc R4-12
EC2hFc R4-24
EC2hFc R4-20
EC2hFc R4-39
EC2hFc R4-11
EC2hFc R4-22
EC2hFc R3-29
EC2hFc R4-43
EC2hFc R3-46
EC2hFc R3-18
EC2hFc R4-36
EC2hFc R3-45
EC2hFc R3-23
EC2hFc R3-43
EC2hFc R3-36
EC2hFc R4-46
EC2hFc R4-42
EC2hFc R3-1
EC2hFc R3-28
EC2hFc R4-41
EC2hFc R4-38
EC2hFc R3-2
EC2hFc R4-10
EC2hFc R3-5
EC2hFc R3-4
EC2hFc R4-23
EC2hFc R3-15
EC2hFc R3-30
EC2hFc R4-15

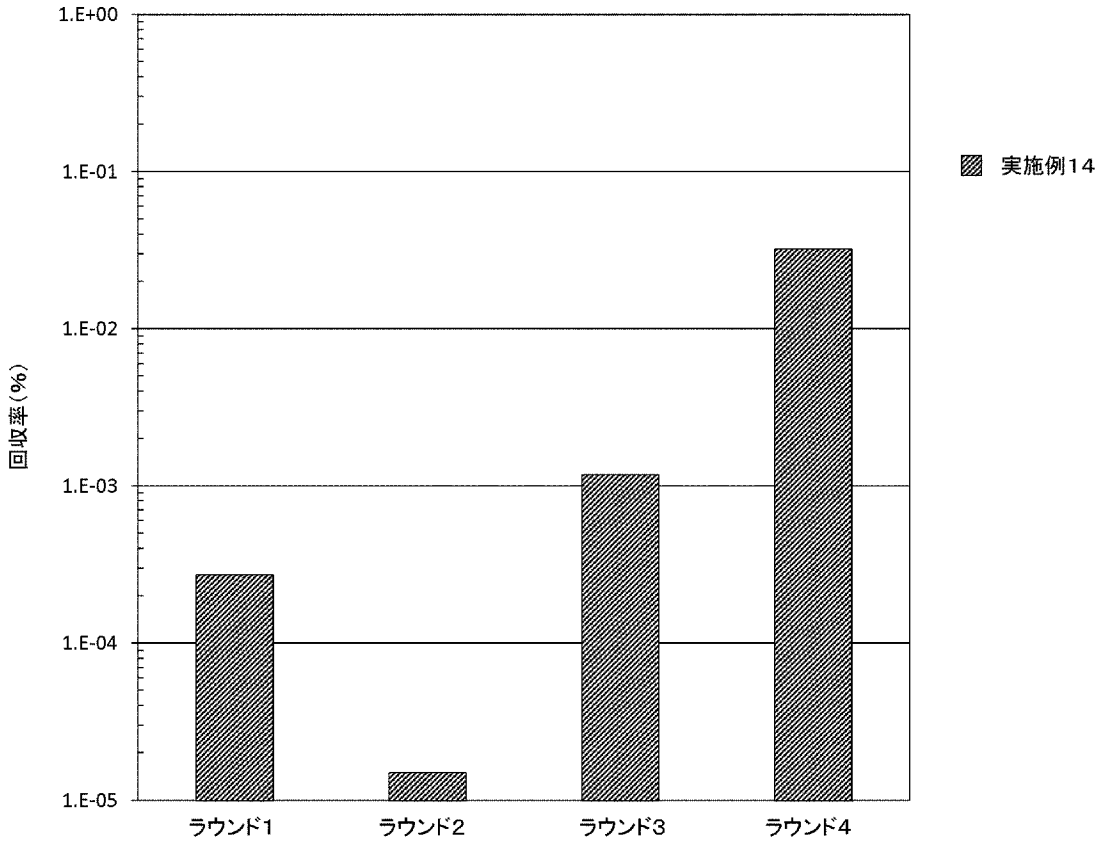
[図22-2]


解離速度定数 koff (s^-1)
1.0E-02
9.0E-03
8.0E-03
7.0E-03
6.0E-03
5.0E-03
4.0E-03
3.0E-03
2.0E-03
1.0E-03
0.0E+00
クローン番号
EC2hFc R4-34
EC2hFc R3-41
EC2hFc R3-22
EC2hFc R4-5
EC2hFc R4-4
EC2hFc R4-17
EC2hFc R3-38
EC2hFc R4-29
EC2hFc R4-26
EC2hFc R4-37
EC2hFc R3-42
EC2hFc R3-44
EC2hFc R4-45
EC2hFc R3-32
EC2hFc R3-6
EC2hFc R3-10
EC2hFc R3-21
EC2hFc R3-34
EC2hFc R3-20
EC2hFc R4-33
EC2hFc R3-39
EC2hFc R3-13
EC2hFc R4-35
EC2hFc R4-16
EC2hFc R4-28
EC2hFc R3-7
EC2hFc R3-12
EC2hFc R4-21
EC2hFc R4-32
EC2hFc R4-13
EC2hFc R3-27
EC2hFc R4-30
EC2hFc R4-8
EC2hFc R3-16
EC2hFc R3-35
EC2hFc R4-9
EC2hFc R4-47
EC2hFc R4-19
EC2hFc R3-11
EC2hFc R3-17
EC2hFc R3-8
EC2hFc R3-14
EC2hFc R3-31
EC2hFc R3-25
EC2hFc R4-18
EC2hFc R4-48
EC2hFc R3-19
EC2hFc R3-3

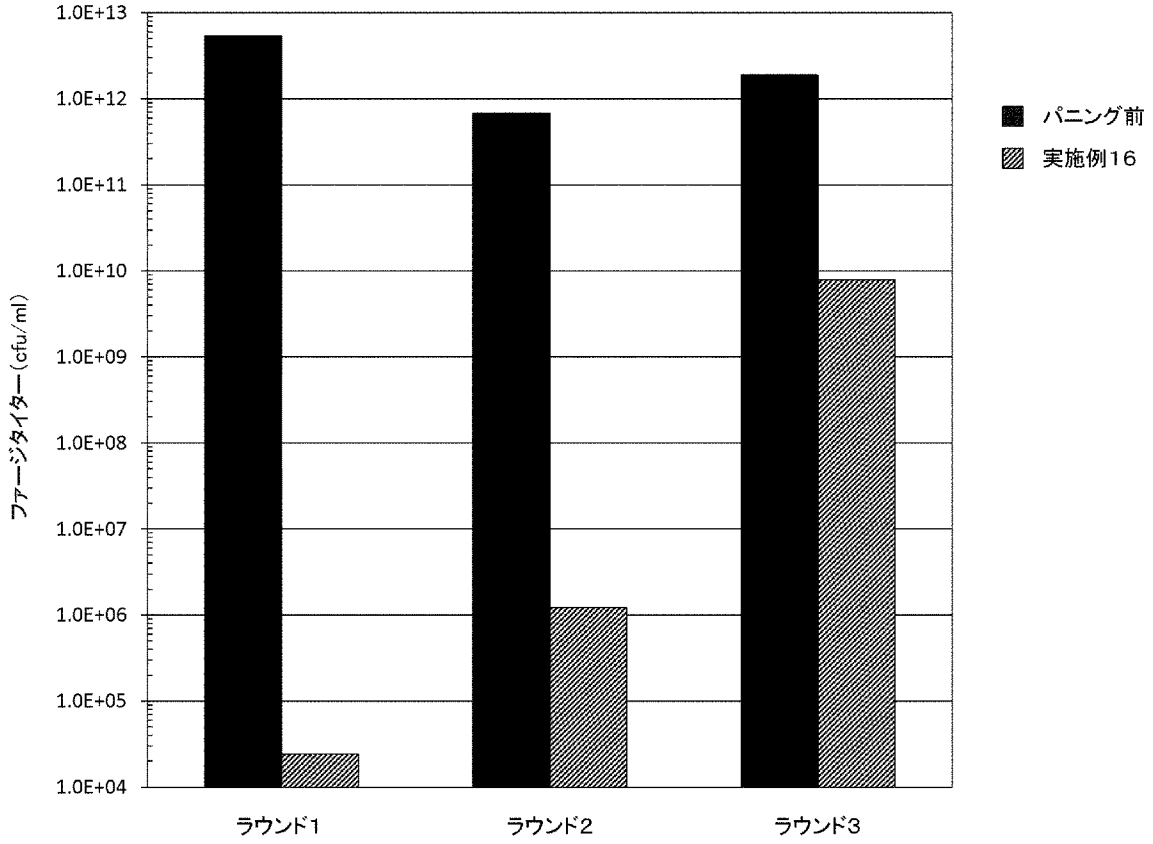
[図23]


1.E+14
1.E+13
1.E+12
1.E+11
1.E+10
1.E+09
1.E+08
1.E+07
1.E+06
1.E+05
ファージタイター（cfu/ml）
ラウンド1
ラウンド2
ラウンド3
ラウンド4
パニング前
実施例14

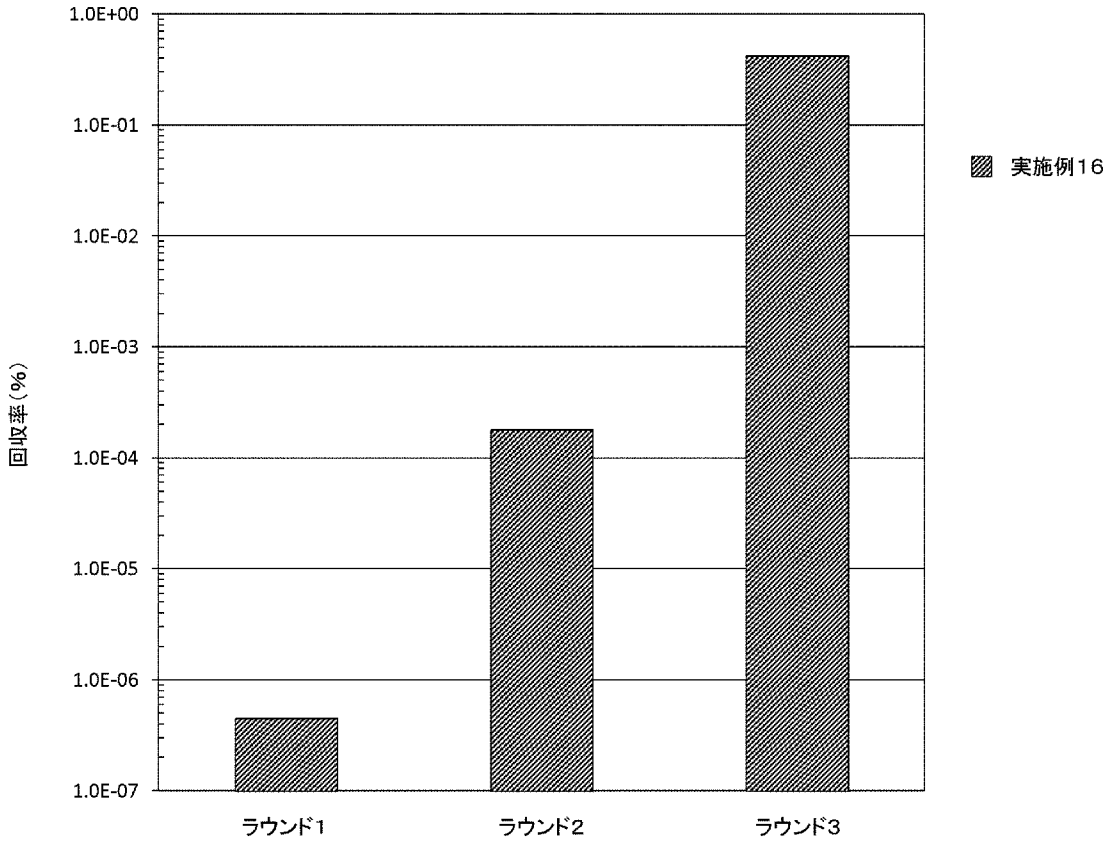
[図24]


1.E+00
1.E-01
1.E-02
1.E-03
1.E-04
1.E-05
回収率（%）
ラウンド1
ラウンド2
ラウンド3
ラウンド4
実施例14

[図25]


1.0E+13
1.0E+12
1.0E+11
1.0E+10
1.0E+09
1.0E+08
1.0E+07
1.0E+06
1.0E+05
1.0E+04
ファージタイター(cfu/ml)
ラウンド1
ラウンド2
ラウンド3
パニング前
実施例16

[図26]


1.0E+00
1.0E-01
1.0E-02
1.0E-03
1.0E-04
1.0E-05
1.0E-06
1.0E-07
回収率(%)
ラウンド1
ラウンド2
ラウンド3
実施例16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/082988

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12Q1/70(2006.01)i, *C07K16/10*(2006.01)i, *C07K16/18*(2006.01)i, *C07K16/28*(2006.01)i, *C07K16/42*(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)
C12Q1/70, C07K16/10, C07K16/18, C07K16/28, C07K16/42, C12N15/09, C12P21/08

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

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	KUMADA, Y. et al., Application of Protein-Coupled Liposomes to Effective Affinity Screening from Phage Library, Journal of Chromatography A, 2005, 1080(1), pp. 22-28, Abstract, Conclusions	1-4,16-17/5-15/18-29
X/Y/A	LIANG, M. et al., Detection of High- and Low-Affinity Antibodies against a Human Monoclonal Antibody Using Various Technology Platforms, ASSAY and Drug Development Technologies, 2007, 5(5), pp. 1-8, Abstract, Table 1	18/5-6/1-4,7-17,19-29

☒ 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	Date of mailing of the international search report
26 January 2017 (26.01.17)	07 February 2017 (07.02.17)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/082988

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	WALKER, M. R. et al., Immunogenic and Antigenic Epitopes of Ig XXV. Monoclonal Antibodies that Differentiate the Mcg+/Mcg- and Oz+/Oz- C Region Isotypes of Human λ L Chains, The Journal of Immunology, 1988, 140(5), pp. 1600-1604, Abstract	18-21/5-7/ 1-4,8-17, 22-29
X/Y/A	COOK, G. A. et al., Identification of CD9 Extracellular Domains Important in Regulation of CHO Cell Adhesion to Fibronectin and Fibronectin Pericellular Matrix Assembly, Blood, 2002, 100(13), pp. 4502-4511, Abstract	22-23/8-9/ 1-7,10-21, 24-29
X/Y/A	WO 2005/007698 A1 (Fujirebio Inc.), 27 January 2005 (27.01.2005), abstract; claims & KR 10-2006-0054333 A & CN 1826355 A & RU 2006103302 A	24-27/10-13/ 1-9,14-23, 28-29
X/Y/A	YING, S. C. et al., Localization of Sequence-Determined Neoepitopes and Neutrophil Digestion Fragments of C-Reactive Protein Utilizing Monoclonal Antibodies and Synthetic Peptides, Molecular Immunology, 1992, 29(5), pp. 677-687, Abstract	28-29/14-15/ 1-13,16-27
A	WO 2010/126115 A1 (Japan Science and Technology Agency), 04 November 2010 (04.11.2010), & JP 5526448 B	1-29
A	JP 2002-522096 A (Pangene Corp.), 23 July 2002 (23.07.2002), & WO 2000/009755 A2 & EP 1105472 A2	1-29

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１６／０８２９８８

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12Q1/70(2006.01)i, C07K16/10(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i, C07K16/42(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.　C12Q1/70, C07K16/10, C07K16/18, C07K16/28, C07K16/42, C12N15/09, C12P21/08

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	１９７１－２０１７年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１７年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１７年

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

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
X/ Y/ A	KUMADA, Y. et al., Application of Protein-Coupled Liposomes to Effective Affinity Screening from Phage Library, Journal of Chromatography A, 2005, 1080(1), pp. 22-28, Abstract, Conclusions	1-4, 16-17/ 5-15/ 18-29

☑　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	国際調査報告の発送日
２６．０１．２０１７	０７．０２．２０１７

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）　４Ｂ　５３７４
星　浩臣
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

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
X/ Y/ A	LIANG, M. et al., Detection of High- and Low-Affinity Antibodies against a Human Monoclonal Antibody Using Various Technology Platforms, ASSAY and Drug Development Technologies, 2007, 5(5), pp. 1-8, Abstract, Table 1	18/ 5-6/ 1-4, 7-17, 19-29
X/ Y/ A	WALKER, M. R. et al., Immunogenic and Antigenic Epitopes of Ig XXV. Monoclonal Antibodies that Differentiate the Mcg+/Mcg- and Oz+/Oz- C Region Isotypes of Human λ L Chains, The Journal of Immunology, 1988, 140(5), pp. 1600-1604, Abstract	18-21/ 5-7/ 1-4, 8-17, 22-29
X/ Y/ A	COOK, G. A. et al., Identification of CD9 Extracellular Domains Important in Regulation of CHO Cell Adhesion to Fibronectin and Fibronectin Pericellular Matrix Assembly, Blood, 2002, 100(13), pp. 4502-4511, Abstract	22-23/ 8-9/ 1-7, 10-21, 24-29
X/ Y/ A	WO 2005/007698 A1（富士レビオ株式会社）2005.01.27, 要約、請求の範囲 & KR 10-2006-0054333 A & CN 1826355 A & RU 2006103302 A	24-27/ 10-13/ 1-9, 14-23, 28-29
X/ Y/ A	YING, S. C. et al., Localization of Sequence-Determined Neoepitopes and Neutrophil Digestion Fragments of C-Reactive Protein Utilizing Monoclonal Antibodies and Synthetic Peptides, Molecular Immunology, 1992, 29(5), pp. 677-687, Abstract	28-29/ 14-15/ 1-13, 16-27
A	WO 2010/126115 A1（独立行政法人科学技術振興機構）2010.11.04, & JP 5526448 B	1-29
A	JP 2002-522096 A（バンジーン・コーポレイション）2002.07.23, & WO 2000/009755 A2 & EP 1105472 A2	1-29