

明 細 書

発明の名称：

抗切断型変異CALR－CD3二重特異性抗体及び医薬組成物

技術分野

[0001] 本発明は、変異型CALRタンパク質に対する特異性を有する二重特異性抗体及びその治療及び診断用途への利用の分野に関する。

背景技術

[0002] フィラデルフィア染色体陰性骨髓増殖性腫瘍（Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms; MPNs）患者の一部では、Calreticulin（CALR）遺伝子の第9エクソンに、塩基欠失や挿入が見出される（非特許文献1、2）。CALR変異遺伝子から産生される変異型CALRタンパク質は、トロンボポエチン（Thrombopoietin; TPO）受容体を恒常的に活性化することで、単独で骨髓増殖性腫瘍（MPN）を引き起こす腫瘍原性を有していることがすでに明らかにされている（非特許文献3～6）。

[0003] MPN患者で見出されるCALR遺伝子変異は、必ず最終エクソンの限局された場所におけるフレームシフト変異であり、フレームシフト変異によるアミノ酸の読み枠のずれは、必ず+1である。これらのことから、変異型CALRタンパク質のC末端には、野生型に存在しない配列が存在し、特にそのC末端の44アミノ酸は、ほぼすべての変異型CALRタンパク質に共通している。その例として、MPN患者で見出されるCALR遺伝子変異の中で最も頻度の高い、52塩基欠失型（Del 52）、その次に頻度が高い、5塩基挿入型（Ins 5）のC末端の配列を野生型CALRタンパク質の当該領域と比較したものを図1〔a〕に示した。

MPNを引き起こす原因である変異型CALRタンパク質は腫瘍細胞に発現していることから、フレームシフト変異により生じた変異型CALRタンパク質に特異的な配列はネオ抗原として、診断時のマーカーや、治療標的と

なる可能性が示唆されていた（特許文献１～２）。

[0004] しかし、前記のフレームシフト変異により出現する変異型ＣＡＬＲタンパク質に特異的な配列（ネオ抗原）を単に認識する抗体では、細胞抽出液や細胞表面における変異型ＣＡＬＲタンパク質を正確に検出できないことが判明した。変異型ＣＡＬＲタンパク質の機能解析の結果、腫瘍細胞に発現している変異型ＣＡＬＲタンパク質の多くが、変異型ＣＡＬＲタンパク質に特異的な配列の中で切断され、ネオ抗原と考えられていた配列の大部分が失われた切断型の変異型ＣＡＬＲタンパク質が多く発現していた。そこで、ネオ抗原中の、切断部位よりＮ末端側に位置する極めて短いアミノ酸配列を特異的に認識する抗体を作製したところ（図１〔ｂ〕）、優れたＭＰＮ治療効果が得られることが明らかになった。これらのことから、ＣＡＬＲ遺伝子変異を有するＭＰＮ患者の診断や治療においては、全長型（未切断型）だけでなく、切断型を含む変異型ＣＡＬＲタンパク質を検出あるいは標的とすることで、より高性能の医薬品が開発できることが示唆された。

[0005] さらに近年、抗癌活性の増強を目的に２種の抗原に対して特異的に結合することが可能な抗体の特性を生かして、特異的な抗腫瘍効果を持った、より有効な治療薬としての研究が盛んに行われている。一方の部位が標的細胞上の表面抗原に、他方の部位がエフェクター細胞上の表面抗原に結合することができる二重特異性抗体が注目されている。エフェクター細胞にはＴ細胞をはじめとする免疫エフェクター細胞が利用されることが多く、二重特異性抗体が標的細胞と免疫エフェクター細胞との間に一時的な相互作用をもたらすことを目的としている。例えば、Ｔ細胞表面抗原のうち、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）タンパク質複合体に由来するＣＤ３イプシロンサブユニットへの結合部位を有する抗体は、主にＴ細胞による標的細胞の溶解を引き起こす、すなわちＴ細胞リダイレクトキリングをすることが可能である。このように、二重特異性抗体は標的細胞並びにＴ細胞に特異的に結合し、Ｔ細胞が標的細胞に直接作用をもたらすことから、癌細胞において異常に発現している物質又は癌化に伴い変化が起こる物質を標的とする研究が進められている。

- [0006] 例えば、特許文献3には、ヒトCD19に対する第1の特異性及びヒトCD3抗原に対する第2の特異性を持つ二重特異性抗体が、特許文献4ではCALRと免疫細胞に関する二重特異性抗体が記載されている。

先行技術文献

特許文献

- [0007] 特許文献1：国際公開第2015/036599号
特許文献2：国際公開第2016/087514号
特許文献3：国際公開第1999/054440号
特許文献4：国際公開第2019/178362号

非特許文献

- [0008] 非特許文献1：Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. The New England journal of medicine. 2013; 369: 2379-90.
非特許文献2：Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. The New England journal of medicine. 2013; 369: 2391-405.
非特許文献3：Araki M, Yang Y, Masubuchi N, et al. Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. Blood. 2016; 127: 1307-16.
非特許文献4：Elf S, Abdelfattah NS, Chen E, et al. Mutant Calreticulin Requires Both Its Mutant C-terminus and the Thrombopoietin Receptor for Oncogenic Transformation. Cancer Discov. 2016; 6: 368-81.
非特許文献5：Marty C, Pecquet C, Nivarthi H, et al. Calreticulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelofibrosis. Blood. 2016; 127: 1317-24.
非特許文献6：Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. Blood. 2017; 129: 667-79.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 変異型C A L Rタンパク質はM P N患者細胞に特異的に発現しているが、変異型C A L Rタンパク質の多くが、切断型の変異型C A L Rタンパク質であった。従って、本発明の課題は、全長型及び切断型の変異型C A L Rタンパク質を正確に検出し、治療応用可能な抗体又は機能性断片を含有する医薬組成物を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0010] 切断部位よりN末端側に位置する極めて短いアミノ酸配列を特異的に認識する抗体を用いることで、切断型の変異型C A L Rタンパク質が培養細胞のみならず、患者末梢血細胞、患者血小板、患者骨髓細胞等においても発現が確認された。この抗切断型変異C A L R抗体を用いると、細胞表面における変異型C A L Rタンパク質の検出感度が飛躍的に向上した。さらには切断型の変異型C A L Rタンパク質とC D 3抗原と結合するタンパク質からなる二重特異性抗体（抗切断型変異C A L R－C D 3二重特異性抗体）を作製したところ、優れたM P N治療効果が得られることが明らかになった。従来ネオ抗原と考えられていた配列に対する抗体を基にした二重特異性抗体では、十分な治療効果が得られないことが判明したことから、全長型及び切断型の変異型C A L Rタンパク質に特異的に結合する、より高性能な二重特異性抗体及び当該抗体を含有する医薬組成物を提供することが重要であることが強く示唆され、本発明を完成した。

[0011] すなわち、本発明は、次の（１）～（２２）を提供するものである。

（１）変異型カルレティキュリンタンパク質に特異的に結合する第１のドメイン及びC D 3抗原に特異的に結合する第２のドメインを有する二重特異性抗体。

（２）前記第１のドメインが、配列番号１の変異型カルレティキュリンタンパク質のエピトープに結合する抗体と競合する、（１）記載の二重特異性抗体。

(3) 変異型カルレティキュリントタンパク質が配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド鎖中、又は配列番号1において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド鎖中に抗原認識部位を有する、(1)又は(2)記載の二重特異性抗体。

(4) 第1のドメインが、野生型カルレティキュリントタンパク質に結合せず、変異型カルレティキュリントタンパク質に対して高い親和性を有する、(1)～(3)のいずれか1項記載の二重特異性抗体。

(5) 第1のドメインが、切断後の変異型カルレティキュリントタンパク質に対して高い親和性を有する、(1)～(4)のいずれか1項記載の二重特異性抗体。

(6) 第1のドメインと変異型カルレティキュリントタンパク質間の結合は、 K_D が 10^{-7} M以下である、(1)～(5)のいずれか1項記載の二重特異性抗体。

(7) 第1のドメインのCDRが、(a)配列番号10、配列番号11又は126、及び配列番号12(VHCDR)で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列、並びに配列番号13、配列番号14又は127、及び配列番号15(VLCDR)で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する、(b)配列番号16-18(VHCDR)で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列、及び配列番号19-21(VLCDR)で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する、又は(c)配列番号22-24(VHCDR)で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列、及び配列番号25-27(VLCDR)で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する、(1)～(6)のいずれか1項に記載の二重特異性抗体。

(8) 第1のドメインが、(d)配列番号2、90、91、92、93、94、133、134、135及び136で示されるアミノ酸配列と80%以

上の相同性を有するアミノ酸配列を有するVH領域、並びに配列番号3、95、96、97、98、99、137、138、139、140及び141で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するVL領域を有する、(e)配列番号4で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するVH領域、及び配列番号5で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するVL領域を有する、又は(f)配列番号6で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するVH領域、及び配列番号7で示されるアミノ酸配列80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するVL領域を有する、(1)～(7)のいずれか1項に記載の二重特異性抗体。

(9)第2のドメインのCDRが、配列番号28、配列番号29又は128、及び配列番号30、129又は130(VHCDR)で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列、並びに配列番号31又は131、配列番号32又は132、及び配列番号33(VLCDR)で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する、(1)～(8)のいずれか1項に記載の二重特異性抗体。

(10)第2のドメインが、配列番号8、204、205及び206で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するVH領域、並びに配列番号9、207及び208で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するVL領域を有する、(1)～(9)のいずれか1項に記載の二重特異性抗体。

(11)二量体化モジュールが一つ又は複数のノブイントゥホール構造を持つヘテロH鎖であり、H鎖の定常領域の349、354、366、368及び407番目から選択される一つ以上の位置のアミノ酸をそれぞれY349C、T366S、L368A、Y407V(ホール又は空洞)S354C、又はT366W(ノブ又は突起)に置換した配列番号209又は210のFc領域を含む、(1)～(10)のいずれか1項に記載の二重特異性抗体。

(12)H鎖Fc領域の234及び235から選択される一つ以上の位置の

アミノ酸をそれぞれL 2 3 4 A又はL 2 3 5 Aに置換した変異を含む配列番号2 1 1の変異Fc領域を含む、(1)～(1 1)のいずれか1項に記載の二重特異性抗体。

(1 3) ヒト抗体、ヒト化抗体、動物由来抗体とヒト抗体のキメラ抗体、又は合成抗体である、(1)～(1 2)のいずれか1項に記載の二重特異性抗体。

(1 4) (1)～(1 3)のいずれか1項に記載の二重特異性抗体、又はその機能的断片を含有する医薬組成物。

(1 5) 骨髄増殖性腫瘍治療又は診断用医薬組成物である(1 4)記載の医薬組成物。

(1 6) (1)～(1 3)のいずれか1項記載の二重特異性抗体、又はその機能的断片を用いて、生体試料中の次の(A)又は(B)のポリペプチドを検出することを特徴とする変異型カルレティキュリンタンパク質の検出方法。

(A) 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

(B) 配列番号1において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド

(1 7) 変異型カルレティキュリンタンパク質の検出に用いるための、(1)～(1 3)のいずれか1項記載の二重特異性抗体、又はその機能的断片。

(1 8) (1)～(1 3)のいずれか1項記載の二重特異性抗体、又はその機能的断片を用いて、生体試料中の次の(A)又は(B)のポリペプチドを検出することを特徴とする骨髄増殖性腫瘍の診断方法。

(A) 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

(B) 配列番号1において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド

(1 9) 骨髄増殖性腫瘍の治療又は診断に用いるための、(1)～(1 3)のいずれか1項に記載の二重特異性抗体、又はその機能的断片。

(2 0) (1)～(1 3)のいずれか1項に記載の二重特異性抗体、又はそ

の機能的断片の骨髓増殖性腫瘍治療薬、又は診断薬製造のための使用。

(21) (1) ~ (13) のいずれか1項に記載の二重特異性抗体、又はその機能的断片を投与することを特徴とする腫瘍の予防、又は治療方法。

(22) 腫瘍が血液腫瘍、好ましくは骨髓増殖性腫瘍、骨髓性白血病、血小板増加症、赤血球増加症、原発性骨髓線維症、又は二次性骨髓性線維症である(21)記載の方法。

発明の効果

[0012] 本発明の二重特異性抗体は前記(A)又は(B)のポリペプチド鎖中に抗原認識部位(エピトープ)を有し、これを用いれば、変異型CALRタンパク質の切断によって生じた切断型の変異型CALRタンパク質を検出でき、細胞表面における変異型CALRタンパク質の検出感度が飛躍的に向上する。また切断型の変異型CALRタンパク質のエピトープと結合する第1の特異性、及びCD3抗原と結合する第2の特異性を有する抗切断型変異CALR-CD3二重特異性抗体を開発することで、変異型CALR陽性細胞に特異的な強い細胞傷害活性を有する抗体が得られる。従って、本発明の二重特異性抗体を用いれば、変異型CALRを発現する疾患を特異的に予防又は治療できる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]変異型CALRタンパク質の特徴を示す図である。〔a〕MPN患者の発症原因であるCALR遺伝子変異は、+1フレームシフト変異であり、その結果できる変異型CALRタンパク質のC末端には、変異型タンパク質に共通したアミノ酸配列が見出される。SP:シグナル配列、N:Nドメイン、P:Pドメイン。矢印は、野生型(WT)と異なるアミノ酸配列が始まる部分を示している。〔b〕変異型CALRタンパク質特異的配列(黒色)内で生じるタンパク質の切断部位よりもN末端側にある、変異型特異的配列を認識する抗体を示す。

[図2]クローンB3、C6及びG1抗体がいずれも全長型と切断型の変異型CALRタンパク質を認識することを示す。詳細には、UT-7/TPO細胞

から分泌されたタンパク質を、クローンB3、C6及びG1抗体を用いてイムノブロット解析した結果を示す。N末端のシグナル配列の下流にFLAGタグを付加したDe152型とIns5型の全長型と、より低分子量の切断型CALRタンパク質の両方が、抗FLAG抗体と同様に、B3、C6、G1いずれの抗体を用いても検出される。

[図3]配列番号2のVH鎖、配列番号3のVL鎖、配列番号8のVH鎖及び配列番号9のVL鎖を用いて作製した抗切断型変異CALR-CD3二重特異性抗体を用いて、〔a〕変異型CALRを発現していないUT-7/TPO vec細胞、〔b〕Ins5変異型CALRを発現させた細胞(UT-7/TPO CALR Ins5細胞)、又は〔c〕De152変異型CALRを発現させた細胞(UT-7/TPO CALR De152細胞)をフローサイトメトリー解析した結果を示す。

[図4]図3記載の抗切断型変異CALR-CD3二重特異性抗体を用いてCD3発現細胞(T-LAK細胞)をフローサイトメトリー解析した結果を示す。

[図5]図3記載の抗切断型変異CALR-CD3二重特異性抗体と抗体の作製に用いた抗原に対する結合強度を、表面プラズモン共鳴解析法により評価した結果を示す。

[図6]抗切断型CALR-CD3二重特異性抗体の概略図を示す。

発明を実施するための形態

[0014] 本発明は、MPNに関連する変異型CALRタンパク質の検出及び診断方法並びにMPNの予防又は治療として用いられる変異型CALRタンパク質に特異的な配列中で切断されて残存するC末端側のポリペプチド(図1〔a〕)の中のわずか13アミノ酸(配列番号1:RRMMRTKMRMRM)を認識する二重特異性抗体であり、変異型CALRタンパク質のC末端側が切断され切断型の変異型CALRタンパク質が生じること、変異型CALRタンパク質の共通領域の大部分が変異型CALRタンパク質から失われることは、本発明者が初めて見出したことである。さらに切断型の変異型CALRタンパク質

と結合する第1のドメインと、CD3抗原に結合する第2のドメインを持つ二重特異性抗体とすることにより、効果的に腫瘍を治療、予防、検出、又は診断できることを見出した。

すなわち、本発明は、切断型の変異型CALRTタンパク質とCD3抗原を特異的に認識する二重特異性抗体、及び当該二重特異性抗体を含む医薬組成物、特にMPNを治療又は予防するための医薬組成物を提供する。

[0015] 本明細書において、「二重特異性抗体」とは、異なる抗原に結合可能な少なくとも2つの抗原結合部位を有するモノクローナル抗体のことを指す。具体的には、「二重特異性抗体」とは、例えば、第1の抗体の重鎖の可変領域と第1の抗体の軽鎖の可変領域から形成される第1の抗原結合部位（第1のドメイン）と、第2の抗体の重鎖の可変領域と第2の抗体の軽鎖の可変領域から形成される第2の抗原結合部位（第2のドメイン）とを少なくとも1つずつ含み、異なる2種の抗原認識能を有するタンパク質を意味する。

[0016] 二重特異性抗体の形態としては、特に限定されず、当該技術分野で公知の形態のいずれであってもよく、2種の抗原に対する特異性を保持している限り、それ以外の形態であってもよい。二重特異性抗体の形態は、IgG様型と低分子型に大別される。IgG様型とは、Fc領域を保持した形態である。IgG様型抗体の形態としては、これらに限定されるものではないが、CrossMab、DAF (two-in-one)、DAF (four-in-one)、DutaMab、DT-IgG、knobs-into-holes、knobs-into-holes common LC、SEEDbody、Triomab、 $\kappa\lambda$ -body、DVD-Ig、IgG-scFv、DuoBody等が挙げられる。IgG様型抗体では、Fc領域を保持しているため、ADCCやCDCといったエフェクター機能の発揮、精製の容易化、安定性の改善、血中半減期の延長等が期待される。一方、低分子型とは、通常、重鎖可変領域と軽鎖可変領域とからなるFv領域を基本の構成要素とした形態である。低分子型抗体の形態としては、これらに限定されるものではないが、Diabody (Db)、BiTE、DART、T

and Ab、scDb、triple body、miniantibody、minibody、scFv、tandem scFv、F(ab')₂等が挙げられる。低分子型では、その大きさから、組織透過性の向上や生産性の高さ等が期待される。その他、抗原との結合能を保持したままアミノ酸配列を欠失、置換若しくは付加させたもの、糖鎖の一部又は全部を欠失又は付加させたもの、リンカー等が付加したもの、他のタンパク質と融合させたもの、抗体と低分子医薬とをリンカーを介して結合した抗体薬物複合体（ADC）等の改変抗体も包含される。

[0017] 本発明の二重特異性抗体は、変異型カルレティキュリンタンパク質に特異的に結合する第1のドメイン及びCD3抗原に特異的に結合する第2のドメインを有する。

[0018] 前記第1のドメインは、配列番号1の変異型カルレティキュリンタンパク質のエピトープに結合する抗体と競合する。ここで、変異型カルレティキュリンタンパク質は、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド鎖中、又は配列番号1において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド鎖中に抗原認識部位を有するものであるのが好ましい。

[0019] 前記第1のドメインは、野生型カルレティキュリンタンパク質に結合せず、変異型カルレティキュリンタンパク質に対して高い親和性を有し、特に切断後の変異型カルレティキュリンタンパク質に対して高い親和性を有する。

[0020] 切断型のCALRタンパク質としては、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド（A）及び配列番号1において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド（B）が挙げられる。（B）においては、1～4個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列が好ましく、1～3個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列がより好ましい。より具体的には、配列番号1のC末端側から3アミノ酸が欠失したアミノ酸配列がより好ましい。また、ポリペプチド（B）のアミノ酸配列と配列番号1のアミノ酸配列の

同一性は、８０％以上が好ましく、８５％以上がより好ましく、９０％以上がさらに好ましい。

[0021] 第１のドメインとしては、（Ａ）又は（Ｂ）のポリペプチド鎖中に抗原認識部位（エピトープ）を有する抗体であればよいが、切断型の変異型ＣＡＬＲタンパク質にのみ結合するものであっても、切断型の変異型ＣＡＬＲタンパク質と全長型の変異型ＣＡＬＲタンパク質の両方に結合するものであってもよく、切断型の変異型ＣＡＬＲタンパク質と全長型の変異型ＣＡＬＲタンパク質の両方に結合する「変異型ＣＡＬＲタンパク質」に特異的な抗体であることが好ましい。

[0022] このような第１のドメインは、本発明者らが見出した、抗変異ＣＡＬＲ抗体（クローンＢ３、Ｃ６及びＧ１抗体）の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域、さらに重鎖相補性決定領域（ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２及びＣＤＲ－Ｈ３）及び軽鎖相補性決定領域（ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２及びＣＤＲ－Ｌ３）もしくはその変異体であることが好ましい。

[0023] 第２のドメインは、ＣＤ３抗原に特異的に結合するドメインであればよく、既存の抗ＣＤ３抗体由来の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域、さらに既知の抗ＣＤ３抗体由来の重鎖相補性決定領域（ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２及びＣＤＲ－Ｈ３）及び軽鎖相補性決定領域（ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２及びＣＤＲ－Ｌ３）もしくはその変異体であることが好ましい。既存の抗ＣＤ３抗体としては、ＯＫＴ３が挙げられる。

[0024] 第１のドメイン及び第２のドメインの好ましい例として、抗変異ＣＡＬＲ抗体（クローンＢ３、Ｃ６及びＧ１抗体）とその変異体及び抗ＣＤ３抗体（ＯＫＴ３）とその変異体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域、さらに重鎖相補性決定領域（ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２及びＣＤＲ－Ｈ３）及び軽鎖相補性決定領域（ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２及びＣＤＲ－Ｌ３）のアミノ酸配列を表１－１～１－４に示す。

[0025]

[表1-1]

配列番号	名称	アミノ酸配列
2	B 3 VH	QVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFRNFIHWIKQQPGNGLEWIGWI FPGDGDTEYNQKFNGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGNYN YEYFDYWGGQGMVTVSS
3	B 3 VL	DIQMTQSPASLSASLGETVSIIECLASEDIYSYLAWYQQKPKSPQLLIFAA NRLQDGVPSRFSGSGSGTQFSLKISGMQPEDEGDYFCLQGSKFPPYTFPGPT KLELN
4	C 6 VH	QVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTSYFVHWIKQQPGDGLEWIGWI YPGDGDTEYNHKKFNGKSTLTADRSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGNY DGREVMDAWGQGASVTVSS
5	C 6 VL	DVVLTPPTLSATIGQSVSISCRSSQSLDSDGETYLNWLLQRPQGSPQL LIYSVSNLESGVPNRFSGSGSETDFTLKISGMEADLGYYCMQATHGPYT FGAGTKLELK
6	G 1 VH	QVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTSYFVHWIKQQPGDGLEWIGWI YPGDGDTEYNQKFNGKATLTADRSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGNY DGREVMDAWGQGASVTVSS
7	G 1 VL	DVVLTPPTLSATIGQSVSISCRSSQSLDSDGETYLNWLLQRPQGCPQL LIYSVSNLESGVPNRFSGSGSETDFTLKISGVEADLGYYCMQGTHGPYT FGAGTKLELK
8	hOKT3 VH	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFRYTMHWVRQAPGKLEWIGYI NPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDD HYSLDYWGGQGPVTVSS
204	hOKT3 VH - 2	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFRYTMHWVRQAPGKLEWIGYI NPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYND HYSLDYWGGQGPVTVSS
205	hOKT3 VH - 3	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFRYTMHWVRQAPGKLEWIGYI NPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDD HFSLDYWGGQGPVTVSS
206	hOKT3 VH - 4	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFRYTMHWVRQAPGKLEWIGYI NPSMGATNYNQKVKDRFTISRDNKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDD HYSLDYWGGQGPVTVSS

[0026]

[表1-2]

配列番号	名称	アミノ酸配列
9	hOKT3 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCSASSSVSYMNYQQTPGKAPKRWIYDTS KLASGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISSLPEDLATYYCQQWSSNPFTFGQGTK LQITR
207	hOKT3 VL -2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCSASSSVAYMNYQQTPGKAPKRWIYDTS KLASGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISSLPEDLATYYCQQWSSNPFTFGQGTK LQITR
208	hOKT3 VL -3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCSASSSVSYMNYQQTPGKAPKRWIYNTS KLASGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISSLPEDLATYYCQQWSSNPFTFGQGTK LQITR
10	B3 CDR- H1	GYTFTRNFH
11	B3 CDR- H2	WIFPGDGDTEYNQKFNG
126	B3 CDR- H2-2	WIFPGDADTEYNQKFSG
12	B3 CDR- H3	GNYNYEYFDY
13	B3 CDR- L1	LASEDIYSYLA
14	B3 CDR- L2	AANRLQD
127	B3 CDR- L2-2	AANRLQS
15	B3 CDR- L3	LQGSKFPHY
16	C6 CDR- H1	GYTFTSYFVH
17	C6 CDR- H2	WIYPGDGDTEYNHKKFNG
18	C6 CDR- H3	GNYDGREVMDA
19	C6 CDR- L1	RSSQSLLDSGGETYLN

[0027]

[表1-3]

配列番号	名称	アミノ酸配列
20	C6 CDR-L2	SVSNLES
21	C6 CDR-L3	MQATHGPYT
22	G1 CDR-H1	GYTFTSYFVH
23	G1 CDR-H2	WIYPGDGDTEYNQKFNG
24	G1 CDR-H3	GNYYDGREVMDA
25	G1 CDR-L1	RSSQSLLSDGETYLN
26	G1 CDR-L2	SVSNLES
27	G1 CDR-L3	MQGTHGPYT
28	OKT3 CDR-H1	RYTMH
29	OKT3 CDR-H2	YINPSRGYTNYNQKVKD
128	OKT3 CDR-H2-2	YINPSMGATNYNQKVKD
30	OKT3 CDR-H3	YYDDHYSLDY
129	OKT3 CDR-H3-2	YYNDHYSLDY
130	OKT3 CDR-H3-3	YYDDHFSLDY
31	OKT3 CDR-L1	SASSSVSYMN
131	OKT3 CDR-L1-2	SASSSVAYMN

[0028]

[表1-4]

配列番号	名称	アミノ酸配列
3 2	OKT3 CD R-L 2	DTSKLAS
1 3 2	OKT3 CD R-L 2-2	NTSKLAS
3 3	OKT3 CD R-L 3	QQWSSNPFT

[0029] これらの領域は、切断型の変異型CALRタンパク質の一部又は全長を動物に免疫又はリンパ球を *in vitro* で感作しミエローマと融合させることで得た抗体やファージディスプレイ等の抗体ライブラリー等により得られた抗体の配列情報を基に遺伝子工学的手法でリコンビナント抗体として作製することができる。抗CD3抗体に関する配列情報は、既存の情報より得ることができる。すなわち、得られた遺伝子情報より抗体の重鎖及び軽鎖の遺伝子を合成し、これをベクター（例えば、プラスミド）に挿入後、宿主細胞（例えば、CHO細胞、HEK細胞等）に導入し、宿主細胞を培養することにより、培養物からリコンビナント抗体を採取することができる。抗体の重鎖及び軽鎖の遺伝子を合成するにあたっては、コドンを最適化することが好ましい。

[0030] 本発明の好ましい二重特異性抗体としては、第1のドメインのCDRが、
 （a）配列番号10、配列番号11又は126、及び配列番号12（VHCDR）で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列、並びに配列番号13、配列番号14又は127、及び配列番号15（VLCDR）で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する、
 （b）配列番号16-18（VHCDR）で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列、及び配列番号19-21（VLCDR）で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する、又は
 （c）配列番号22-24（VHCDR）で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列、及び配列番号

25-27 (VLCDR) で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する、二重特異性抗体が挙げられる。

[0031] さらに、第1のドメインが、(d) 配列番号2、90、91、92、93、94、133、134、135及び136で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するVH領域、並びに配列番号3、95、96、97、98、99、137、138、139、140及び141で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するVL領域を有する、(e) 配列番号4で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するVH領域、及び配列番号5で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するVL領域を有する、又は(f) 配列番号6で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するVH領域、及び配列番号7で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するVL領域を有する、二重特異性抗体が挙げられる。

[0032] また、第2のドメインのCDRが、配列番号28、配列番号29又は128、及び配列番号30、129又は130 (VHCDR) で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列、並びに配列番号31又は131、配列番号32又は132、及び配列番号33 (VLCDR) で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する、二重特異性抗体が好ましい。

さらに、第2のドメインが、配列番号8、204、205及び206で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するVH領域、並びに配列番号9、配列番号207及び208で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するVL領域を有する、二重特異性抗体が好ましい。

[0033] 本発明のより好ましい二重特異性抗体としては、第1のドメインのCDRが、(a) 配列番号10、配列番号11又は126、及び配列番号12 (VHCDR) で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸

配列、並びに配列番号 13、配列番号 14 又は 127、及び配列番号 15 (VLCDR) で示されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する、(b) 配列番号 16-18 (VHCDR) で示されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列、及び配列番号 19-21 (VLCDR) で示されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する、又は(c) 配列番号 22-24 (VHCDR) で示されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列、及び配列番号 25-27 (VLCDR) で示されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するものであり；第2のドメインのCDRが、配列番号 28、配列番号 29 又は 128、並びに配列番号 30、配列番号 129 又は 130 (VHCDR) で示されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列、並びに配列番号 31 又は 131、配列番号 32 又は 132、及び配列番号 33 (VLCDR) で示されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するものである二重特異性抗体が挙げられる。

さらに好ましい二重特異性抗体としては、第1のドメインが、(d) 配列番号 2、90、91、92、93、94、133、134、135 及び 136 で示されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するVH領域、及び配列番号 3、95、96、97、98、99、137、138、139、140 及び 141 で示されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するVL領域を有する、(e) 配列番号 4 で示されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するVH領域、及び配列番号 5 で示されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するVL領域を有する、又は(f) 配列番号 6 で示されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するVH領域、及び配列番号 7 で示されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するVL領域を有するものであり、第2のドメインが、配列番号 8、配列番号 204、配列番号 205 及び 206 で示されるア

ミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するVH領域、及び配列番号9、配列番号207及び208で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するVL領域を有する二重特異性抗体が挙げられる。

[0034] 前記のように、本発明の二重特異性抗体の形態としては、前記2種の抗原に対する特異性を保持している限り、どのような形態であってもよく、IgG様型でも低分子型でもよい。具体的には、Fc領域又はヘテロH鎖等を有していてもよい。

[0035] 前記二重特異性抗体の具体例としては、次の(Ⅰ)～(XXVⅡ)から選ばれる抗体が挙げられる。

(Ⅰ) 変異型CALRタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号10、11及び12に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン(VH-A)及び配列番号13、14及び15に示されるアミノ酸配列を含むVLドメイン(VL-A)からなる単鎖Fvであり、CD3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号28、29及び30に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン(VH-B)及び配列番号31、32及び33に示されるアミノ酸配列を含むVLドメイン(VL-B)からなる単鎖Fvであり、N末端側からVH-A、VL-A、VH-B、VL-Bの順番にペプチドリinkerを介して融合しているポリペプチドにさらにFcが融合している二重特異性抗体。場合によってはFcドメインがFc受容体への結合を低下させる一又は複数のアミノ酸置換を含むFcドメインである二重特異性抗体(抗体1:配列番号34)。

(Ⅱ) 変異型CALRタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号10、11及び12に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン(VH-A)及び配列番号13、14及び15に示されるアミノ酸配列を含むVLドメイン(VL-A)からなる単鎖Fvであり、CD3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号28、29及び30に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン(VH-B)及び配列番号31、32及び33に示されるアミノ酸

配列を含むVLドメイン（VL-B）からなる単鎖Fvであり、N末端側からVL-A、VH-A、VH-B、VL-Bの順番にペプチドリンカーを介して融合しているポリペプチドにさらにFcが融合している二重特異性抗体。

（III）変異型CALRタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号10、11及び12に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン（VH-A）及び配列番号13、14及び15に示されるアミノ酸配列を含むVLドメイン（VL-A）からなる単鎖Fvであり、CD3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号28、29及び30に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン（VH-B）及び配列番号31、32及び33に示されるアミノ酸配列を含むVLドメイン（VL-B）からなる単鎖Fvであり、N末端側からVH-B、VL-B、VH-A、VL-Aの順番にペプチドリンカーを介して融合しているポリペプチドにさらにFcが融合している二重特異性抗体。場合によってはFcドメインがFc受容体への結合を低下させる一又は複数のアミノ酸置換を含むFcドメインである二重特異性抗体（抗体3：配列番号36）。

[0036]（IV）変異型CALRタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号10、11及び12に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン（VH-A）及び配列番号13、14及び15に示されるアミノ酸配列を含むVLドメイン（VL-A）からなる単鎖Fvであり、CD3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号28、29及び30に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン（VH-B）及び配列番号31、32及び33に示されるアミノ酸配列を含むVLドメイン（VL-B）からなる単鎖Fvであり、N末端側からVH-B、VL-B、VL-A、VH-Aの順番にペプチドリンカーを介して融合しているポリペプチドにさらにFcが融合している二重特異性抗体。場合によってはFcドメインがFc受容体への結合を低下させる一又は複数のアミノ酸置換を含むFcドメインである二重特異性抗体（抗体4：配列番号37）。

(V) 変異型CALRタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号10、11及び12に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン(VH-A)及び配列番号13、14及び15に示されるアミノ酸配列を含むVLドメイン(VL-A)からなる単鎖Fvであり、CD3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号28、29及び30に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン(VH-B)及び配列番号31、32及び33に示されるアミノ酸配列を含むVLドメイン(VL-B)からなる単鎖Fvであり、N末端側からVH-B、VL-A、VH-A、VL-Bの順番にペプチドリンカーを介して融合しているポリペプチドにさらにFcが融合している二重特異性抗体。

(VI) 変異型CALRタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号10、11及び12に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン(VH-A)及び配列番号13、14及び15に示されるアミノ酸配列を含むVLドメイン(VL-A)からなる単鎖Fvであり、CD3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号28、29及び30に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン(VH-B)及び配列番号31、32及び33に示されるアミノ酸配列を含むVLドメイン(VL-B)からなる単鎖Fvであり、N末端側からVL-B、VH-A、VL-A、VH-Bの順番にペプチドリンカーを介して融合しているポリペプチドにさらにFcが融合している二重特異性抗体。場合によってはFcドメインがFc受容体への結合を低下させる一又は複数のアミノ酸置換を含むFcドメインである二重特異性抗体(抗体6:配列番号39)。

[0037] (VII) 変異型CALRタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号10、11及び12に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン(VH-A)及び配列番号13、14及び15に示されるアミノ酸配列を含むVLドメイン(VL-A)からなる単鎖Fvであり、CD3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号28、29及び30に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン(VH-B)及び配列番号31、32及び33に示されるアミノ酸配列を含むVLドメイン(VL-B)からなる単鎖Fvであり、N末端側

からVH-A、VL-B、VH-B、VL-Aの順番にペプチドリンカーを介して融合しているポリペプチドにさらにFcが融合している二重特異性抗体。

(VII) 変異型CALRタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号10、11及び12に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン(VH-A)及び配列番号13、14及び15に示されるアミノ酸配列を含むVLドメイン(VL-A)からなる単鎖Fvであり、CD3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号28、29及び30に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン(VH-B)及び配列番号31、32及び33に示されるアミノ酸配列を含むVLドメイン(VL-B)からなる単鎖Fvであり、N末端側からVL-A、VH-B、VL-B、VH-Aの順番にペプチドリンカーを介して融合しているポリペプチドにさらにFcが融合している二重特異性抗体。

(IX) 変異型CALRタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号10、11及び12に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン(VH-A)及び配列番号13、14及び15に示されるアミノ酸配列を含むVLドメイン(VL-A)からなる単鎖Fvであり、CD3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号28、29及び30に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン(VH-B)及び配列番号31、32及び33に示されるアミノ酸配列を含むVLドメイン(VL-B)からなる単鎖Fvであり、N末端側からVH-A、VL-A、VH-B、VL-Bの順番にペプチドリンカーを介して融合している二重特異性抗体(抗体9:配列番号42)

(X) 変異型CALRタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号10、11及び12に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン(VH-A)及び配列番号13、14及び15に示されるアミノ酸配列を含むVLドメイン(VL-A)からなる単鎖Fvであり、CD3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号28、29及び30に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン(VH-B)及び配列番号31、32及び33に示されるアミノ酸配

列を含むVLドメイン（VL-B）からなる単鎖Fvであり、N末端側からVL-A、VH-A、VH-B、VL-Bの順番にペプチドリンカーを介して融合している二重特異性抗体。

[0038] (X I) 変異型CALRタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号10、11及び12に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン（VH-A）及び配列番号13、14及び15に示されるアミノ酸配列を含むVLドメイン（VL-A）からなる単鎖Fvであり、CD3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号28、29及び30に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン（VH-B）及び配列番号31、32及び33に示されるアミノ酸配列を含むVLドメイン（VL-B）からなる単鎖Fvであり、N末端側からVH-B、VL-B、VH-A、VL-Aの順番にペプチドリンカーを介して融合している二重特異性抗体（抗体11：配列番号44）。

(X I I) 変異型CALRタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号10、11及び12に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン（VH-A）及び配列番号13、14及び15に示されるアミノ酸配列を含むVLドメイン（VL-A）からなる単鎖Fvであり、CD3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号28、29及び30に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン（VH-B）及び配列番号31、32及び33に示されるアミノ酸配列を含むVLドメイン（VL-B）からなる単鎖Fvであり、N末端側からVH-B、VL-B、VL-A、VH-Aの順番にペプチドリンカーを介して融合している二重特異性抗体。

(X I I I) 変異型CALRタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号10、11及び12に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン及び配列番号13、14及び15に示されるアミノ酸配列を含むVLドメインからなるIgG抗体と、前記IgG抗体の重鎖C末端にCD3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号28、29及び30に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン及び配列番号31、32及び33に示されるアミノ酸配列を含むVLドメインからなる単鎖Fvがペプチドリンカーを介して融合してい

る抗体がノブ-イントゥーホール法に従って一方のFcドメインがノブを含み、他方のFcドメインがホールを含むことによりヘテロに会合している二重特異性抗体。場合によってはFcドメインがFc受容体への結合を低下させる一又は複数のアミノ酸置換を含むFcドメインである二重特異性抗体（抗体13：配列番号46、配列番号47、配列48）。

[0039] (XIV) 変異型CALRタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号10、11及び12に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン及び配列番号13、14及び15に示されるアミノ酸配列を含むVLドメインからなるIgG抗体の重鎖C末端にCD3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号28、29及び30に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン及び配列番号31、32及び33に示されるアミノ酸配列を含むVLドメインからなる単鎖Fvがペプチドリンカーを介して融合している二重特異性抗体。場合によってはFcドメインがFc受容体への結合を低下させる一又は複数のアミノ酸置換を含むFcドメインである二重特異性抗体（抗体14：配列番号48、配列番号49）。

(XV) 変異型CALRタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号10、11及び12に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン及び配列番号13、14及び15に示されるアミノ酸配列を含むVLドメインからなるIgG抗体と、CD3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号28、29及び30に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン及び配列番号31、32及び33に示されるアミノ酸配列を含むVLドメインからなる単鎖Fvがペプチドリンカーを介してFcに融合しているscFv-Fcがノブ-イントゥーホール法に従って一方のFcドメインがノブを含み、他方のFcドメインがホールを含むことによりヘテロに会合している二重特異性抗体。場合によってはFcドメインがFc受容体への結合を低下させる一又は複数のアミノ酸置換を含むFcドメインである二重特異性抗体（抗体15：配列番号46、配列番号48、配列番号50）。

(XVI) 変異型CALRタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番

号 10、11 及び 12 に示されるアミノ酸配列を含む V H ドメイン及び配列番号 13、14 及び 15 に示されるアミノ酸配列を含む V L ドメインからなる F a b 断片であって、C D 3 抗原に特異的に結合するドメインが配列番号 28、29 及び 30 に示されるアミノ酸配列を含む V H ドメイン及び配列番号 31、32 及び 33 に示されるアミノ酸配列を含む V L ドメインからなる単鎖 F v であり、変異型 C A L R タンパク質に特異的に結合する F a b 断片の重鎖 C 末端に C D 3 抗原に特異的に結合する単鎖 F v がペプチドリンカーを介して融合している二重特異性抗体（抗体 16：配列番号 48、配列番号 51）。

[0040] (X V I I) 変異型 C A L R タンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号 10、11 及び 12 に示されるアミノ酸配列を含む V H ドメイン及び配列番号 13、14 及び 15 に示されるアミノ酸配列を含む V L ドメインからなる F a b 断片であって、C D 3 抗原に特異的に結合するドメインが配列番号 28、29 及び 30 に示されるアミノ酸配列を含む V H ドメイン及び配列番号 31、32 及び 33 に示されるアミノ酸配列を含む V L ドメインからなる単鎖 F v であり、変異型 C A L R タンパク質に特異的に結合する F a b 断片の重鎖 C 末端に C D 3 抗原に特異的に結合する単鎖 F v がペプチドリンカーを介して融合したポリペプチドにさらに F c が融合している二重特異性抗体。場合によっては F c ドメインが F c 受容体への結合を低下させる一又は複数のアミノ酸置換を含む F c ドメインである二重特異性抗体（抗体 17：配列番号 48、配列番号 52）。

(X V I I I) 変異型 C A L R タンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号 10、11 及び 12 に示されるアミノ酸配列を含む V H ドメイン及び配列番号 13、14 及び 15 に示されるアミノ酸配列を含む V L ドメインからなる F a b 断片であって、C D 3 抗原に特異的に結合するドメインが配列番号 28、29 及び 30 に示されるアミノ酸配列を含む V H ドメイン及び配列番号 31、32 及び 33 に示されるアミノ酸配列を含む V L ドメインからなる単鎖 F v であり、変異型 C A L R タンパク質に特異的に結合する F a b

断片の重鎖C末端にCD3抗原に特異的に結合する単鎖F_vがペプチドリンカーを介して融合したポリペプチドにさらにペプチドリンカーを介してCH3ドメインが融合している二重特異性抗体（抗体18：配列番号48、配列番号53）。

（XIX）変異型CALRタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号10、11及び12に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン及び配列番号13、14及び15に示されるアミノ酸配列を含むVLドメインからなるFab断片であって、CD3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号28、29及び30に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン及び配列番号31、32及び33に示されるアミノ酸配列を含むVLドメインからなる単鎖F_vであり、変異型CALRタンパク質に特異的に結合するFab断片の重鎖C末端にCD3抗原に特異的に結合する単鎖F_vがペプチドリンカーを介して融合し、さらに単鎖F_vのC末端に変異型CALRタンパク質に特異的に結合するFab断片の重鎖N末端がペプチドリンカーを介して融合している二重特異性抗体（抗体19：配列番号48、配列番号54）。

（XX）変異型CALRタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号10、11及び12に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン及び配列番号13、14及び15に示されるアミノ酸配列を含むVLドメインからなるFab断片であって、CD3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号28、29及び30に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン及び配列番号31、32及び33に示されるアミノ酸配列を含むVLドメインからなる単鎖F_vであり、CD3抗原に特異的に結合する単鎖F_vのC末端に変異型CALRタンパク質に特異的に結合するFab断片の重鎖N末端がペプチドリンカーを介して融合している二重特異性抗体（抗体20：配列番号48、配列番号55）。

[0041]（XXI）変異型CALRタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号10、11及び12に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン及び配列番号13、14及び15に示されるアミノ酸配列を含むVLドメインからな

る IgG 抗体であって、CD3 抗原に特異的に結合するドメインが配列番号 28、29 及び 30 に示されるアミノ酸配列を含む VH ドメイン及び配列番号 31、32 及び 33 に示されるアミノ酸配列を含む VL ドメインからなる単鎖 Fv であり、CD3 抗原に特異的に結合する単鎖 Fv の C 末端に変異型 CALR タンパク質に特異的に結合する IgG の重鎖 N 末端がペプチドリンカーを介して融合している二重特異性抗体（配列番号 48、配列番号 56）

。

（XXII）変異型 CALR タンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号 10、11 及び 12 に示されるアミノ酸配列を含む VH ドメイン及び配列番号 13、14 及び 15 に示されるアミノ酸配列を含む VL ドメインからなる Fab 断片であって、CD3 抗原に特異的に結合するドメインが配列番号 28、29 及び 30 に示されるアミノ酸配列を含む VH ドメイン及び配列番号 31、32 及び 33 に示されるアミノ酸配列を含む VL ドメインからなる単鎖 Fv であり、CD3 抗原に特異的に結合する単鎖 Fv の C 末端に変異型 CALR タンパク質に特異的に結合する Fab 断片の重鎖 N 末端がペプチドリンカーを介して融合したポリペプチドにさらにペプチドリンカーを介して CH3 ドメインが融合している二重特異性抗体（抗体 22：配列番号 48、配列番号 57）。

（XXIII）変異型 CALR タンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号 10、11 及び 12 に示されるアミノ酸配列を含む VH ドメイン及び配列番号 13、14 及び 15 に示されるアミノ酸配列を含む VL ドメインからなる Fab 断片であって、CD3 抗原に特異的に結合するドメインが配列番号 28、29 及び 30 に示されるアミノ酸配列を含む VH ドメイン及び配列番号 31、32 及び 33 に示されるアミノ酸配列を含む VL ドメインからなる単鎖 Fv であり、CD3 抗原に特異的に結合する単鎖 Fv の C 末端に変異型 CALR タンパク質に特異的に結合する Fab 断片の軽鎖 N 末端がペプチドリンカーを介して融合している二重特異性抗体（抗体 23：配列番号 58、配列番号 59）。

(X X I V) 変異型C A L Rタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号10、11及び12に示されるアミノ酸配列を含むV Hドメイン及び配列番号13、14及び15に示されるアミノ酸配列を含むV LドメインからなるI g G抗体であって、C D 3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号28、29及び30に示されるアミノ酸配列を含むV Hドメイン及び配列番号31、32及び33に示されるアミノ酸配列を含むV Lドメインからなる単鎖F vであり、C D 3抗原に特異的に結合する単鎖F vのC末端に変異型C A L Rタンパク質に特異的に結合するI g Gの軽鎖N末端がペプチドリリンカーを介して融合している二重特異性抗体（抗体24：配列番号59、配列番号60）。

(X X V) 変異型C A L Rタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号10、11及び12に示されるアミノ酸配列を含むV Hドメイン及び配列番号13、14及び15に示されるアミノ酸配列を含むV LドメインからなるF a b断片であって、C D 3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号28、29及び30に示されるアミノ酸配列を含むV Hドメイン及び配列番号31、32及び33に示されるアミノ酸配列を含むV Lドメインからなる単鎖F vであり、C D 3抗原に特異的に結合する単鎖F vのC末端に変異型C A L Rタンパク質に特異的に結合するF a b断片の軽鎖N末端がペプチドリリンカーを介して融合したポリペプチドと変異型C A L Rタンパク質に特異的に結合するF a b断片の重鎖C末端にさらにペプチドリリンカーを介してC H 3ドメインが融合しているポリペプチドよりなる二重特異性抗体（抗体25：配列番号59、配列番号61）。

(X X V I) 変異型C A L Rタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号10、11及び12に示されるアミノ酸配列を含むV Hドメイン及び配列番号13、14及び15に示されるアミノ酸配列を含むV LドメインからなるF a b断片であって、C D 3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号28、29及び30に示されるアミノ酸配列を含むV Hドメイン及び配列番号31、32及び33に示されるアミノ酸配列を含むV Lドメインからな

る単鎖F_vであり、CD3抗原に特異的に結合する単鎖F_vのC末端に変異型CALRタンパク質に特異的に結合するFab断片の重鎖N末端がペプチドリンカーを介して融合したポリペプチドとCD3抗原に特異的に結合する単鎖F_vのC末端に変異型CALRタンパク質に特異的に結合するFab断片の軽鎖N末端がペプチドリンカーを介して融合したポリペプチドよりなる二重特異性抗体（抗体26：配列番号55、配列番号59）。

（XXVII）変異型CALRタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号10、11及び12に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン及び配列番号13、14及び15に示されるアミノ酸配列を含むVLドメインからなるFab断片であって、CD3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号28、29及び30に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン及び配列番号31、32及び33に示されるアミノ酸配列を含むVLドメインからなる単鎖F_vであり、変異型CALRタンパク質に特異的に結合するFab断片の重鎖C末端にCD3抗原に特異的に結合する単鎖F_vがペプチドリンカーを介して融合したポリペプチドとCD3抗原に特異的に結合する単鎖F_vのC末端に変異型CALRタンパク質に特異的に結合するFab断片の軽鎖N末端がペプチドリンカーを介して融合したポリペプチドよりなる二重特異性抗体（抗体27：配列番号51、配列番号59）。

[0042]

[表2]

配列番号	アミノ酸配列
3 4	QVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFRNFIHWIKQQPGNGLEWIGWIFPGDGDTEYN QKFNGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGNYNYEYFDYWGGQGMVTVSSGGG GSGGGSGGGGSDIQMTQSPASLSASLGETVSI ECLASEDIYSYLAWYQQKPKGKSPQLLIF AANRLQDGVPSRFSGSGSGTQFSLKISGMQPEDEGDYFCLQGSKFPTFGPGTKLELNGGG GSQVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTN YNQVKDRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGGQGTPTVTVSSG GGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWI YDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISSLPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTQLQITRD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
3 5	DIQMTQSPASLSASLGETVSI ECLASEDIYSYLAWYQQKPKGKSPQLLIFAANRLQDGVPSR FSGSGSGTQFSLKISGMQPEDEGDYFCLQGSKFPTFGPGTKLELNGGGSGGGSGGGG QVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFRNFIHWIKQQPGNGLEWIGWIFPGDGDTEYN QKFNGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGNYNYEYFDYWGGQGMVTVSSGGG GSQVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTN YNQVKDRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGGQGTPTVTVSSG GGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWI YDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISSLPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTQLQITRL EVLFQGPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
3 6	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYN QKVKDRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGGQGTPTVTVSSGGG GSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYD TSKLASGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISSLPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTQLQITRGGG GSQVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFRNFIHWIKQQPGNGLEWIGWIFPGDGDTE YNQKFNGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGNYNYEYFDYWGGQGMVTVSSG GGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPASLSASLGETVSI ECLASEDIYSYLAWYQQKPKGKSPQLL IFAANRLQDGVPSRFSGSGSGTQFSLKISGMQPEDEGDYFCLQGSKFPTFGPGTKLELND KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0043]

[表3]

配列番号	アミノ酸配列
3 7	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYN QKVKDRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGGQTPVTVSSGGG GSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLASVGDRTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYD TSKLASGVPSRFSGSGSGTDYFTTISLQPEDIAITYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITRGGG GSDIQMTQSPASLSASLGETVSI ECLASEDIYSYLA WYQQKPGKSPQLLIFAANRLQDGV SRFSGSGSGTQFSLKISGMQPEDEGDYFCLQGSKFYTFPGGTKLELNGGGSGGGSGGG GSQVQLQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTRNFIHWIKQPGNGLEWIGWIFPGDGDTE YNQKFNGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGNYNIEYFDYWGGQVMVTSSD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
3 8	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYN QKVKDRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGGQTPVTVSSGGG GSDIQMTQSPASLSASLGETVSI ECLASEDIYSYLA WYQQKPGKSPQLLIFAANRLQDGV SRFSGSGSGTQFSLKISGMQPEDEGDYFCLQGSKFYTFPGGTKLELNGGGSGGGSGGG GSGGGSGVQLQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTRNFIHWIKQPGNGLEWIGWIFPG DGDTEYNQKFNGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGNYNIEYFDYWGGQVMV TVSSGGGSDIQMTQSPSSLASVGDRTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSK LASGVPSRFSGSGSGTDYFTTISLQPEDIAITYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITRLEVLFQ GPDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
3 9	DIQMTQSPSSLASVGDRTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSRF SSGSGSGTDYFTTISLQPEDIAITYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITRGGGSGVQLQSGAE LVKPGSSVKISCKASGYTFTRNFIHWIKQPGNGLEWIGWIFPGDGDTEYNQKFNGKATLT ADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGNYNIEYFDYWGGQVMVTVSSGGGSGGGSGGG GSGGGGSDIQMTQSPASLSASLGETVSI ECLASEDIYSYLA WYQQKPGKSPQLLIFAANRL QDGVPSRFSGSGSGTQFSLKISGMQPEDEGDYFCLQGSKFYTFPGGTKLELNGGGSGVQ LVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKV KDRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGGQTPVTVSSDKTHTC PPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0044]

[表4]

配列番号	アミノ酸配列
4 0	QVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTRNFIHWIKQQPGNGLEWIGWIFPGDGDTEYN QKFNGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGNYNYEYFDYWGGQVMVTVSSGGG GSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPS RFSGSGSGTDYFTFTISSLPEDIAATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITRGGGSGGGSGGG GSGGGGSQVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPS RGYTNYNQKVDRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGGQTPV TVSSGGGSDIQMTQSPASLSASLGETVSI ECLASEDIYSYLAWYQQKPGKSPQLL IFAAN RLQDGVPSRFSGSGSGTQFSLKISGMQPEDEGDYFCLQGSKFPTFGPGTKLELNDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
4 1	DIQMTQSPASLSASLGETVSI ECLASEDIYSYLAWYQQKPGKSPQLL IFAANRLQDGVPSR FSGSGSGTQFSLKISGMQPEDEGDYFCLQGSKFPTFGPGTKLELNGGGGSQVQLVQSGGG VVQPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVDRFTISR DN SKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGGQTPVTYSSGGGSGGGSGGG GSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLA SGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISSLPEDIAATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITRGGGSGVQ LQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTRNFIHWIKQQPGNGLEWIGWIFPGDGDTEYNQKF NGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGNYNYEYFDYWGGQVMVTVSSLEVLQ GPDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
4 2	QVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTRNFIHWIKQQPGNGLEWIGWIFPGDGDTEYN QKFNGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGNYNYEYFDYWGGQVMVTVSSGGG GSGGGSGGGGSDIQMTQSPASLSASLGETVSI ECLASEDIYSYLAWYQQKPGKSPQLL IFA AANRLQDGVPSRFSGSGSGTQFSLKISGMQPEDEGDYFCLQGSKFPTFGPGTKLELNGGG GSQVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTN YNQKVDRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGGQTPVTVSSG GGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWI YDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISSLPEDIAATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITRH HHHHH
4 3	DIQMTQSPASLSASLGETVSI ECLASEDIYSYLAWYQQKPGKSPQLL IFAANRLQDGVPSR FSGSGSGTQFSLKISGMQPEDEGDYFCLQGSKFPTFGPGTKLELNGGGSGGGSGGGGS QVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTRNFIHWIKQQPGNGLEWIGWIFPGDGDTEYN QKFNGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGNYNYEYFDYWGGQVMVTVSSGGG GSQVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTN YNQKVDRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGGQTPVTVSSG GGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWI YDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISSLPEDIAATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITRH HHHHH

[0045]

[表5]

配列番号	アミノ酸配列
4 4	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYN QKVKDRFTISRDNKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGGQTPVTVSSGGG GSGGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMNWYQQTGKAPKRWIYD TSKLASGVPSRFSGSGSGTDYFTTISLQPEDIAITYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITRGGG GSQVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTRNFIHWIKQPGNGLEWIGWIFPGDGDTE YNQKFNKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGNYNIEYFDYWGGQVMVTVSSG GGGSGGGGSGGGSDIQMTQSPASLSASLGETVSI ECLASEDIYSYLAWYQQKPKSPQLL IFAAANRLQDGVPSRFSGSGSGTQFSLKISGMQPEDEGDYFCLQGSKFPTFGPGTKLELNH HHHHH
4 5	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYN QKVKDRFTISRDNKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGGQTPVTVSSGGG GSGGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMNWYQQTGKAPKRWIYD TSKLASGVPSRFSGSGSGTDYFTTISLQPEDIAITYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITRGGG GSDIQMTQSPASLSASLGETVSI ECLASEDIYSYLAWYQQKPKSPQLLIFAAANRLQDGVPSR FSGSGSGTQFSLKISGMQPEDEGDYFCLQGSKFPTFGPGTKLELNHGGGGSGGGSGGG GSQVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTRNFIHWIKQPGNGLEWIGWIFPGDGDTE YNQKFNKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGNYNIEYFDYWGGQVMVTVSSH HHHHH
4 6	QVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTRNFIHWIKQPGNGLEWIGWIFPGDGDTEYN QKFNKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGNYNIEYFDYWGGQVMVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
4 7	QVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTRNFIHWIKQPGNGLEWIGWIFPGDGDTEYN QKFNKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGNYNIEYFDYWGGQVMVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPREEMTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSQVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTM HWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNKNTAFLQMDSLRPEDTGVYF CARYYDDHYSLDYWGGQTPVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTIT CSASSSVSYMNWYQQTGKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYFTTISLQPEDIA ITYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITR
4 8	DIQMTQSPASLSASLGETVSI ECLASEDIYSYLAWYQQKPKSPQLLIFAAANRLQDGVPSR FSGSGSGTQFSLKISGMQPEDEGDYFCLQGSKFPTFGPGTKLELNRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0046]

[表6]

配列番号	アミノ酸配列
4 9	QVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTRNFIHWIKQQPGNGLEWIGWIFPGDGDTEYN QKFNGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGNYNEYFDYWGGQVMVTSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSQVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTM HWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQVKDRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRPEDTGVIYF CARYYDDHYSLDYWGGQTPVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQTQSPSSLSASVGDRTIT CSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSDTYTFTISSLPEDIA TYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITR
5 0	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYN QVKDRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRPEDTGVIYFCARYYDDHYSLDYWGGQTPVTVSSGGG SGGGGSGGGGSDIQTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYD TSKLASGVPSRFSGSGSDTYTFTISSLPEDIA TYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITREP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVCTLPSPREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
5 1	QVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTRNFIHWIKQQPGNGLEWIGWIFPGDGDTEYN QKFNGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGNYNEYFDYWGGQVMVTSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCGGGGSQVQLVQSGGGVVPGRS LRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQVKDRFTISRDN SKNT AFLQMDSLRPEDTGVIYFCARYYDDHYSLDYWGGQTPVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQT QSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGS GTDYTFTISSLPEDIA TYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITRHHHHH
5 2	QVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTRNFIHWIKQQPGNGLEWIGWIFPGDGDTEYN QKFNGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGNYNEYFDYWGGQVMVTSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCGGGGSQVQLVQSGGGVVPGRS LRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQVKDRFTISRDN SKNT AFLQMDSLRPEDTGVIYFCARYYDDHYSLDYWGGQTPVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQT QSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGS GTDYTFTISSLPEDIA TYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITRDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0047]

[表7]

配列番号	アミノ酸配列
5 3	QVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFRNFIHWIKQQPGNGLEWIGWIFPGDGDTEYN QKFNGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGNYNEYFDYWGGQVMVTSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCGGGGSQVQLVQSGGGVVPGRS LRLSCKASGYTFRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQVKDRFTISRDN SKNT AFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGGQTPVTVSSGGGSGGGGSGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGS GTDYTFTISSSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITRAAAGGGQPREPVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
5 4	QVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFRNFIHWIKQQPGNGLEWIGWIFPGDGDTEYN QKFNGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGNYNEYFDYWGGQVMVTSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCGGGGSQVQLVQSGGGVVPGRS LRLSCKASGYTFRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQVKDRFTISRDN SKNT AFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGGQTPVTVSSGGGSGGGGSGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGS GTDYTFTISSSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITRGGGGSQVQLQQSGAELVKPG SSVKISCKASGYTFRNFIHWIKQQPGNGLEWIGWIFPGDGDTEYNQKFNGKATLTADKSS STAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGNYNEYFDYWGGQVMVTSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCHHHHHH
5 5	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYN QKVKDRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGGQTPVTVSSGGG GSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYD TSKLASGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISSSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITRGGG GSQVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFRNFIHWIKQQPGNGLEWIGWIFPGDGDTE YNQKFNGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGNYNEYFDYWGGQVMVTSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCHHHHHH
5 6	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYN QKVKDRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGGQTPVTVSSGGG GSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYD TSKLASGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISSSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITRGGG GSQVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFRNFIHWIKQQPGNGLEWIGWIFPGDGDTE YNQKFNGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGNYNEYFDYWGGQVMVTSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYCKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0048]

[表8]

配列番号	アミノ酸配列
5 7	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYN QKVKDRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGQGTPTVTVSSGGG GSGGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYD TSKLASGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISLQPEDIAITYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITRGGG GSQVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTRNFIHWIKQQPGNGLEWIGWIFPGDGDTE YNQKFNKGATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGNYNYEYFDYWGQGVMTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCAAAGGGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
5 8	QVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTRNFIHWIKQQPGNGLEWIGWIFPGDGDTEYN QKFNKGATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGNYNYEYFDYWGQGVMTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCHHHHHH
5 9	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYN QKVKDRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGQGTPTVTVSSGGG GSGGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYD TSKLASGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISLQPEDIAITYCQQWSSNPFTFGQGTKLQITRGGG GSDIQMTQSPASLSASLGETVSI ECLASEDIYSYLA WYQQKPKGSPQLLIFAANRLQDGV SRFSGSGSGTQFSLKISGMQPEDEGDYFCLQGSKFPYTFGPGTKLELNRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLT SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
6 0	QVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTRNFIHWIKQQPGNGLEWIGWIFPGDGDTEYN QKFNKGATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGNYNYEYFDYWGQGVMTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
6 1	QVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFTRNFIHWIKQQPGNGLEWIGWIFPGDGDTEYN QKFNKGATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGNYNYEYFDYWGQGVMTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCAAAGGGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0049] また前記の二重特異性抗体としては、さらに次の（X X V I I I）～（L I V）から選ばれる抗体であるのが好ましい。

（X X V I I I）変異型C A L Rタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号2に示されるV Hドメイン（V H－A）及び配列番号3に示されるV Lドメイン（V L－A）からなる単鎖F vであり、C D 3抗原に特異的に

結合するドメインが配列番号8に示されるVHドメイン（VH-B）及び配列番号9に示されるVLドメイン（VL-B）からなる単鎖Fvであり、N末端側からVH-A、VL-A、VH-B、VL-Bの順番にペプチドリンカーを介して融合しているポリペプチドにさらにFcが融合している二重特異性抗体。場合によってはFcドメインがFc受容体への結合を低下させる一又は複数のアミノ酸置換を含むFcドメインである二重特異性抗体（抗体1：配列番号34）。

（XXIX）変異型CALRタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号2に示されるVHドメイン（VH-A）及び配列番号3に示されるVLドメイン（VL-A）からなる単鎖Fvであり、CD3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号8に示されるVHドメイン（VH-B）及び配列番号9に示されるVLドメイン（VL-B）からなる単鎖Fvであり、N末端側からVL-A、VH-A、VH-B、VL-Bの順番にペプチドリンカーを介して融合しているポリペプチドにさらにFcが融合している二重特異性抗体。

（XXX）変異型CALRタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号2に示されるVHドメイン（VH-A）及び配列番号3に示されるVLドメイン（VL-A）からなる単鎖Fvであり、CD3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号8に示されるVHドメイン（VH-B）及び配列番号9に示されるVLドメイン（VL-B）からなる単鎖Fvであり、N末端側からVH-B、VL-B、VH-A、VL-Aの順番にペプチドリンカーを介して融合しているポリペプチドにさらにFcが融合している二重特異性抗体。場合によってはFcドメインがFc受容体への結合を低下させる一又は複数のアミノ酸置換を含むFcドメインである二重特異性抗体（抗体3：配列番号36）。

[0050]（XXXI）変異型CALRタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号2に示されるVHドメイン（VH-A）及び配列番号3に示されるVLドメイン（VL-A）からなる単鎖Fvであり、CD3抗原に特異的に結合

するドメインが配列番号8に示されるVHドメイン（VH-B）及び配列番号9に示されるVLドメイン（VL-B）からなる単鎖Fvであり、N末端側からVH-B、VL-B、VL-A、VH-Aの順番にペプチドリンカーを介して融合しているポリペプチドにさらにFcが融合している二重特異性抗体。場合によってはFcドメインがFc受容体への結合を低下させる一又は複数のアミノ酸置換を含むFcドメインである二重特異性抗体（抗体4：配列番号37）。

（XXXII）変異型CALRタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号2に示されるVHドメイン（VH-A）及び配列番号3に示されるVLドメイン（VL-A）からなる単鎖Fvであり、CD3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号8に示されるVHドメイン（VH-B）及び配列番号9に示されるVLドメイン（VL-B）からなる単鎖Fvであり、N末端側からVH-B、VL-A、VH-A、VL-Bの順番にペプチドリンカーを介して融合しているポリペプチドにさらにFcが融合している二重特異性抗体。

[0051]（XXXIII）変異型CALRタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号2に示されるVHドメイン（VH-A）及び配列番号3に示されるVLドメイン（VL-A）からなる単鎖Fvであり、CD3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号8に示されるVHドメイン（VH-B）及び配列番号9に示されるVLドメイン（VL-B）からなる単鎖Fvであり、N末端側からVL-B、VH-A、VL-A、VH-Bの順番にペプチドリンカーを介して融合しているポリペプチドにさらにFcが融合している二重特異性抗体。場合によってはFcドメインがFc受容体への結合を低下させる一又は複数のアミノ酸置換を含むFcドメインである二重特異性抗体（抗体6：配列番号39）。

（XXXIV）変異型CALRタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号2に示されるVHドメイン（VH-A）及び配列番号3に示されるVLドメイン（VL-A）からなる単鎖Fvであり、CD3抗原に特異的に結

合するドメインが配列番号8に示されるVHドメイン（VH-B）及び配列番号9に示されるVLドメイン（VL-B）からなる単鎖Fvであり、N末端側からVH-A、VL-B、VH-B、VL-Aの順番にペプチドリンカーを介して融合しているポリペプチドにさらにFcが融合している二重特異性抗体。

（XXXV）変異型CALRタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号2に示されるVHドメイン（VH-A）及び配列番号3に示されるVLドメイン（VL-A）からなる単鎖Fvであり、CD3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号8に示されるVHドメイン（VH-B）及び配列番号9に示されるVLドメイン（VL-B）からなる単鎖Fvであり、N末端側からVL-A、VH-B、VL-B、VH-Aの順番にペプチドリンカーを介して融合しているポリペプチドにさらにFcが融合している二重特異性抗体。

（XXXVI）変異型CALRタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号2に示されるVHドメイン（VH-A）及び配列番号3に示されるVLドメイン（VL-A）からなる単鎖Fvであり、CD3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号8に示されるVHドメイン（VH-B）及び配列番号9に示されるVLドメイン（VL-B）からなる単鎖Fvであり、N末端側からVH-A、VL-A、VH-B、VL-Bの順番にペプチドリンカーを介して融合している二重特異性抗体（抗体9：配列番号42）。

（XXXVII）変異型CALRタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号2に示されるVHドメイン（VH-A）及び配列番号3に示されるVLドメイン（VL-A）からなる単鎖Fvであり、CD3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号8に示されるVHドメイン（VH-B）及び配列番号9に示されるVLドメイン（VL-B）からなる単鎖Fvであり、N末端側からVL-A、VH-A、VH-B、VL-Bの順番にペプチドリンカーを介して融合している二重特異性抗体。

[0052]（XXXVIII）変異型CALRタンパク質に特異的に結合するドメイン

が配列番号2に示されるVHドメイン（VH-A）及び配列番号3に示されるVLドメイン（VL-A）からなる単鎖Fvであり、CD3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号8に示されるVHドメイン（VH-B）及び配列番号9に示されるVLドメイン（VL-B）からなる単鎖Fvであり、N末端側からVH-B、VL-B、VH-A、VL-Aの順番にペプチドリinkerを介して融合している二重特異性抗体（抗体11：配列番号44）。

（XXXIX）変異型CALRタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号2に示されるVHドメイン（VH-A）及び配列番号3に示されるVLドメイン（VL-A）からなる単鎖Fvであり、CD3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号8に示されるVHドメイン（VH-B）及び配列番号9に示されるVLドメイン（VL-B）からなる単鎖Fvであり、N末端側からVH-B、VL-B、VL-A、VH-Aの順番にペプチドリinkerを介して融合している二重特異性抗体。

（XL）変異型CALRタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号2に示されるVHドメイン及び配列番号3に示されるVLドメインからなるIgG抗体と、前記IgG抗体の重鎖C末端にCD3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号8に示されるVHドメイン及び配列番号9に示されるVLドメインからなる単鎖Fvがペプチドリinkerを介して融合している抗体がノブ-イントゥーホール法に従って一方のFcドメインがノブを含み、他方のFcドメインがホールを含むことによりヘテロに会合している二重特異性抗体。場合によってはFcドメインがFc受容体への結合を低下させる一又は複数のアミノ酸置換を含むFcドメインである二重特異性抗体（抗体13：配列番号46、配列番号47、配列番号48）。

[0053] （XLI）変異型CALRタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号2に示されるVHドメイン及び配列番号3に示されるVLドメインからなるIgG抗体の重鎖C末端にCD3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号8に示されるVHドメイン及び配列番号9に示されるVLドメインからなる単鎖Fvがペプチドリinkerを介して融合している二重特異性抗体。場

合によってはF cドメインがF c受容体への結合を低下させる一又は複数のアミノ酸置換を含むF cドメインである二重特異性抗体（抗体14：配列番号48、配列番号49）。

（X L I I）変異型C A L Rタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号2に示されるV Hドメイン及び配列番号3に示されるV LドメインからなるI g G抗体と、C D 3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号8に示されるV Hドメイン及び配列番号9に示されるV Lドメインからなる単鎖F vがペプチドリンカーを介してF cに融合しているs c F v－F cがノーブイントゥーホール法に従って一方のF cドメインがノブを含み、他方のF cドメインがホールを含むことによりヘテロに会合している二重特異性抗体。場合によってはF cドメインがF c受容体への結合を低下させる一又は複数のアミノ酸置換を含むF cドメインである二重特異性抗体（抗体15：配列番号46、配列番号48、配列番号50）。

（X L I I I）変異型C A L Rタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号2に示されるV Hドメイン及び配列番号3に示されるV LドメインからなるF a b断片であって、C D 3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号8に示されるV Hドメイン及び配列番号9に示されるV Lドメインからなる単鎖F vであり、変異型C A L Rタンパク質に特異的に結合するF a b断片の重鎖C末端にC D 3抗原に特異的に結合する単鎖F vがペプチドリンカーを介して融合している二重特異性抗体（抗体16：配列番号48、配列番号51）。

（X L I V）変異型C A L Rタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号2に示されるV Hドメイン及び配列番号3に示されるV LドメインからなるF a b断片であって、C D 3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号8に示されるV Hドメイン及び配列番号9に示されるV Lドメインからなる単鎖F vであり、変異型C A L Rタンパク質に特異的に結合するF a b断片の重鎖C末端にC D 3抗原に特異的に結合する単鎖F vがペプチドリンカーを介して融合したポリペプチドにさらにF cが融合している二重特異性抗

体。場合によってはF cドメインがF c受容体への結合を低下させる一又は複数のアミノ酸置換を含むF cドメインである二重特異性抗体（抗体17：配列番号48、配列番号52）。

（X L V）変異型C A L Rタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号2に示されるV Hドメイン及び配列番号3に示されるV LドメインからなるF a b断片であって、C D 3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号8に示されるV Hドメイン及び配列番号9に示されるV Lドメインからなる単鎖F vであり、変異型C A L Rタンパク質に特異的に結合するF a b断片の重鎖C末端にC D 3抗原に特異的に結合する単鎖F vがペプチドリンカーを介して融合したポリペプチドにさらにペプチドリンカーを介してC H 3ドメインが融合している二重特異性抗体（抗体18：配列番号48、配列番号53）。

（X L V I）変異型C A L Rタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号2に示されるV Hドメイン及び配列番号3に示されるV LドメインからなるF a b断片であって、C D 3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号8に示されるV Hドメイン及び配列番号9に示されるV Lドメインからなる単鎖F vであり、変異型C A L Rタンパク質に特異的に結合するF a b断片の重鎖C末端にC D 3抗原に特異的に結合する単鎖F vがペプチドリンカーを介して融合し、さらに単鎖F vのC末端に変異型C A L Rタンパク質に特異的に結合するF a b断片の重鎖N末端がペプチドリンカーを介して融合している二重特異性抗体（抗体19：配列番号48、配列番号54）。

（X L V I I）変異型C A L Rタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号2に示されるV Hドメイン及び配列番号3に示されるV LドメインからなるF a b断片であって、C D 3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号8に示されるV Hドメイン及び配列番号9に示されるV Lドメインからなる単鎖F vであり、C D 3抗原に特異的に結合する単鎖F vのC末端に変異型C A L Rタンパク質に特異的に結合するF a b断片の重鎖N末端がペプチドリンカーを介して融合している二重特異性抗体（抗体20：配列番号4

8、配列番号55)。

[0054] (X L V I I I) 変異型C A L Rタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号2に示されるV Hドメイン及び配列番号3に示されるV LドメインからなるI g G抗体であって、C D 3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号8に示されるV Hドメイン及び配列番号9に示されるV Lドメインからなる単鎖F vであり、C D 3抗原に特異的に結合する単鎖F vのC末端に変異型C A L Rタンパク質に特異的に結合するI g Gの重鎖N末端がペプチドリンカーを介して融合している二重特異性抗体(配列番号48、配列番号56)。

(X L I X) 変異型C A L Rタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号2に示されるV Hドメイン及び配列番号3に示されるV LドメインからなるF a b断片であって、C D 3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号8に示されるV Hドメイン及び配列番号9に示されるV Lドメインからなる単鎖F vであり、C D 3抗原に特異的に結合する単鎖F vのC末端に変異型C A L Rタンパク質に特異的に結合するF a b断片の重鎖N末端がペプチドリンカーを介して融合したポリペプチドにさらにペプチドリンカーを介してC H 3ドメインが融合している二重特異性抗体(抗体22:配列番号48、配列番号57)。

(L) 変異型C A L Rタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号2に示されるV Hドメイン及び配列番号3に示されるV LドメインからなるF a b断片であって、C D 3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号8に示されるV Hドメイン及び配列番号9に示されるV Lドメインからなる単鎖F vであり、C D 3抗原に特異的に結合する単鎖F vのC末端に変異型C A L Rタンパク質に特異的に結合するF a b断片の軽鎖N末端がペプチドリンカーを介して融合している二重特異性抗体(抗体23:配列番号58、配列番号59)。

(L I) 変異型C A L Rタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号2に示されるV Hドメイン及び配列番号3に示されるV Lドメインからなる

I g G抗体であって、C D 3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号8に示されるV Hドメイン及び配列番号9に示されるV Lドメインからなる単鎖F vであり、C D 3抗原に特異的に結合する単鎖F vのC末端に変異型C A L Rタンパク質に特異的に結合するI g Gの軽鎖N末端がペプチドリンカーを介して融合している二重特異性抗体（抗体24：配列番号59、配列番号60）。

[0055] (L I I) 変異型C A L Rタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号2に示されるV Hドメイン及び配列番号3に示されるV LドメインからなるF a b断片であって、C D 3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号8に示されるV Hドメイン及び配列番号9に示されるV Lドメインからなる単鎖F vであり、C D 3抗原に特異的に結合する単鎖F vのC末端に変異型C A L Rタンパク質に特異的に結合するF a b断片の軽鎖N末端がペプチドリンカーを介して融合したポリペプチドと変異型C A L Rタンパク質に特異的に結合するF a b断片の重鎖C末端にさらにペプチドリンカーを介してC H 3ドメインが融合しているポリペプチドよりなる二重特異性抗体（抗体25：配列番号59、配列番号61）。

(L I I I) 変異型C A L Rタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号2に示されるV Hドメイン及び配列番号3に示されるV LドメインからなるF a b断片であって、C D 3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号8に示されるV Hドメイン及び配列番号9に示されるV Lドメインからなる単鎖F vであり、C D 3抗原に特異的に結合する単鎖F vのC末端に変異型C A L Rタンパク質に特異的に結合するF a b断片の重鎖N末端がペプチドリンカーを介して融合したポリペプチドとC D 3抗原に特異的に結合する単鎖F vのC末端に変異型C A L Rタンパク質に特異的に結合するF a b断片の軽鎖N末端がペプチドリンカーを介して融合したポリペプチドよりなる二重特異性抗体（抗体26：配列番号55、配列番号59）。

(L I V) 変異型C A L Rタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号2に示されるV Hドメイン及び配列番号3に示されるV Lドメインからな

る F a b 断片であって、C D 3 抗原に特異的に結合するドメインが配列番号 8 に示される V H ドメイン及び配列番号 9 に示される V L ドメインからなる単鎖 F v であり、変異型 C A L R タンパク質に特異的に結合する F a b 断片の重鎖 C 末端に C D 3 抗原に特異的に結合する単鎖 F v がペプチドリンカーを介して融合したポリペプチドと C D 3 抗原に特異的に結合する単鎖 F v の C 末端に変異型 C A L R タンパク質に特異的に結合する F a b 断片の軽鎖 N 末端がペプチドリンカーを介して融合したポリペプチドよりなる二重特異性抗体（抗体 27：配列番号 51、配列番号 59）。

[0056] [表9]

アミノ酸配列	塩基配列
配列番号 34	配列番号 62
配列番号 35	配列番号 63
配列番号 36	配列番号 64
配列番号 37	配列番号 65
配列番号 38	配列番号 66
配列番号 39	配列番号 67
配列番号 40	配列番号 68
配列番号 41	配列番号 69
配列番号 42	配列番号 70
配列番号 43	配列番号 71
配列番号 44	配列番号 72
配列番号 45	配列番号 73
配列番号 46	配列番号 74
配列番号 47	配列番号 75
配列番号 48	配列番号 76
配列番号 49	配列番号 77
配列番号 50	配列番号 78
配列番号 51	配列番号 79
配列番号 52	配列番号 80
配列番号 53	配列番号 81
配列番号 54	配列番号 82
配列番号 55	配列番号 83
配列番号 56	配列番号 84
配列番号 57	配列番号 85
配列番号 58	配列番号 86
配列番号 59	配列番号 87
配列番号 60	配列番号 88
配列番号 61	配列番号 89

[0057] 本発明の二重特異性抗体の好ましい具体例は、前記（Ⅰ）～（XXVⅠⅠ）の各配列、又は（XXVⅠⅠⅠ）～（LⅠV）の各配列を有するものであって、これらの領域以外の領域のアミノ酸配列は特に制限されない。また、本発明の抗体は、ヒト化抗体及びヒト以外の哺乳動物抗体でもよい。より具体的には、ヒト以外の哺乳動物、例えば、ラット抗体の重鎖、軽鎖の変領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域からなるキメラ抗体であってもよく、このような抗体はラット抗体の変領域をコードするDNAをヒト抗体の定常領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得ることができる。ヒト化抗体の一例として、以下にVH1～8及びVL1～7を示す（表10-1～10-2及び表11）。

[0058]

[表10-1]

配列番号	名称	アミノ酸配列
9 0	V H 1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRNFIHWVRQAPGQGLEWMGWIFPGDGDTEYNQKFNGR VTMTDTSISTAYMELSSLRSDTAIVYVCARGNYNEYFDYWGGQGMVTVSS
9 1	V H 2	QVQLQESGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRNFIHWVRQAPGQRLWWMGWIFPGDGDTEYNQKFNGR VTITRDTASATAYMELSSLRSEDTAVYVCARGNYNEYFDYWGGQGLTVTVSS
9 2	V H 3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTRNFIHWVRQAPGQSLWWMGWIFPGDGDTEYNQKFNGR ITITRDTASANTAYMELSSLKSEDTAVYVCARGNYNEYFDYWGGQGLTVTVSS
9 3	V H 4	QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGYTFTRNFIHWVRQAPGQALEWMGWIFPGDGDTEYNQKFNGR VTITDRSMSTAYMELSSLRSEDTAMVYVCARGNYNEYFDYWGGQGLTVTVSS
1 3 3	V H 4 - 2	QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGYTFTRNFIHWVRQAPGQALEWMGWIFPGDADTEYNQKFSGR VTITDRSMSTAYMELSSLRSEDTAMVYVCARGNYNEYFDYWGGQGLTVTVSS
9 4	V H 5	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTRNFIHWVRQAPGQGLEWMGWIFPGDGDTEYNQKFNGR VTITADKSTSTAYMQLSLTSEDTAVYFCARGNYNEYFDYWGGQGMVTVSS
1 3 4	V H 6	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTRNFIHWIRQAPGQGLEWIGWIFPGDADTEYNQKFSGR ATITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYVCARGNYNEYFDYWGGQGMVTVSS
1 3 5	V H 7	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTRNFIHWIRQAPGQGLEWIGWIFPGDADTEYNQKFSGR VTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYVCARGNYNEYFDYWGGQGMVTVSS
1 3 6	V H 8	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTRNFIHWIRQAPGQGLEWIGWIFPGDGDTEYNQKFNGR ATITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYVCARGNYNEYFDYWGGQGMVTVSS
9 5	V L 1	DIQMTQSPSFVSASVGDRVITITCLASEDIYSYLAWYQQKPKGAPKLLIFAANRLQDGVPSRFSGGGS GTGFTLTISLQPEDFATYFCLQGSKFPYTFGGGTKLEIN
1 3 7	V L 1 - 2	DIQMTQSPSFVSASVGDRVITITCLASEDIYSYLAWYQQKPKGAPKLLIFAANRLQSGVPSRFSGGGS GTGFTLTISLQPEDFATYFCLQGSKFPYTFGGGTKLEIN
1 3 8	V L 1 - 3	DIQMTQSPSFVSASVGDRVITITCLASEDIYSYLAWYQQKPKGAPKLLIFAANRLQSGVPSRFSGGGS GTGFTLTISLQPEDFATYFCLQGSKFPYTFGGGTKLEIK
1 3 9	V L 1 - 4	DIQMTQSPSFVSASVGDRVITITCLASEDIYSYLAWYQQKPKGAPKLLIFAANRLQDGVPSRFSGGGS GTGFTLTISLQPEDFATYFCLQGSKFPYTFGGGTKLEIK
9 6	V L 2	DIQLTQSPAFLSASLGDRVITITCLASEDIYSYLAWYQQKPKGAPKLLISAANRLQDGVPSRFSGSGS GTEFTLTISLQPEDFATYSCLQGSKFPYTFGGGTKLEIK
9 7	V L 3	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCLASEDIYSYLAWYQQKPKGAPKLLIYAANRLQDGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDLATYYCLQGSKFPYTFGGGTKVEIK
9 8	V L 4	DIQMTQSPSSLSASVGDVTITACLAIEDIYSYLAWYQQKPKGAPKLLIYAANRLQDGVPSRFSGSGS FTDFTLTINSLQPDSDATYYCLQGSKFPYTFGGGTKVDIK

[0059]

[表10-2]

配列番号	名称	アミノ酸配列
9 9	V L 5	DIQMTQSPSSVSASVGDSTIECLASEDIYSYLAWYQQKPGKSPKLLIFAANRLQDGVPSTRFSGSGS GTQFTLKISSLPEDFAEYFCLQASKFPYTFGPGTKLELN
1 4 0	V L 6	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCLASEDIYSYLAWYQQKPGKAPKLLIFAANRLQDGVPSTRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCLQGSKFPYTFGPGTKVDIK
1 4 1	V L 7	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCLASEDIYSYLAWYQQKPGKAPKLLIFAANRLQSGVPSTRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCLQGSKFPYTFGPGTKVDIK

[0060] [表11]

アミノ酸配列	塩基配列
配列番号 9 0	配列番号 1 0 0
配列番号 9 1	配列番号 1 0 1
配列番号 9 2	配列番号 1 0 2
配列番号 9 3	配列番号 1 0 3
配列番号 9 4	配列番号 1 0 4
配列番号 9 5	配列番号 1 0 5
配列番号 9 6	配列番号 1 0 6
配列番号 9 7	配列番号 1 0 7
配列番号 9 8	配列番号 1 0 8
配列番号 9 9	配列番号 1 0 9
配列番号 1 3 3	配列番号 1 4 2
配列番号 1 3 4	配列番号 1 4 3
配列番号 1 3 5	配列番号 1 4 4
配列番号 1 3 6	配列番号 1 4 5
配列番号 1 3 7	配列番号 1 4 6
配列番号 1 3 8	配列番号 1 4 7
配列番号 1 3 9	配列番号 1 4 8
配列番号 1 4 0	配列番号 1 4 9
配列番号 1 4 1	配列番号 1 5 0

[0061] また、ヒト化抗体を用いた二重特異性抗体の具体例としては、以下の配列等があるが、これに限定されるわけではない（表 1 2）。

[0062]

[表12]

	配列番号 1 1 6	配列番号 1 1 7	配列番号 1 1 8	配列番号 1 1 9	配列番号 1 2 0
配列番号 1 2 1	抗体 3 1	抗体 3 2	抗体 3 3	抗体 3 4	抗体 3 5
配列番号 1 2 2	抗体 3 6	抗体 3 7	抗体 3 8	抗体 3 9	抗体 4 0
配列番号 1 2 3	抗体 4 1	抗体 4 2	抗体 4 3	抗体 4 4	抗体 4 5
配列番号 1 2 4	抗体 4 6	抗体 4 7	抗体 4 8	抗体 4 9	抗体 5 0
配列番号 1 2 5	抗体 5 1	抗体 5 2	抗体 5 3	抗体 5 4	抗体 5 5

[0063] さらにヒト化された二重特異性抗体の具体例として以下のような抗体が挙げられる（表 1 3－1～1 3－2）。

〔A〕図 6 構造 1 を有するものであって、変異型 C A L R タンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号 1 0、配列番号 1 1 又は 1 2 6、及び配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列を含む V H ドメイン（V H－A）、並びに配列番号 1 3、配列番号 1 4 又は 1 2 7、及び配列番号 1 5 に示されるアミノ酸配列を含む V L ドメイン（V L－A）からなり、C D 3 抗原に特異的に結合するドメインが配列番号 2 8、配列番号 2 9 又は 1 2 8、及び配列番号 3 0、1 2 9 又は 1 3 0 に示されるアミノ酸配列を含む V H ドメイン（V H－B）、並びに配列番号 3 1 又は 1 3 1、配列番号 3 2 又は 1 3 2、及び配列番号 3 3 に示されるアミノ酸配列を含む V L ドメイン（V L－B）からなる二重特異性抗体（抗体 5 6－9 9）。

〔B〕図 6 構造 2 を有するものであって、変異型 C A L R タンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号 1 0、配列番号 1 1 又は 1 2 6、及び配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列を含む V H ドメイン（V H－A）、並びに配列番号 1 3、配列番号 1 4 又は 1 2 7、及び配列番号 1 5 に示されるアミノ酸配列を含む V L ドメイン（V L－A）からなり、C D 3 抗原に特異的に結合するドメインが配列番号 2 8、配列番号 2 9 又は 1 2 8、及び配列番号

30、129又は130に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン（VH-B）並びに配列番号31又は131、配列番号32又は132、及び配列番号33に示されるアミノ酸配列を含むVLドメイン（VL-B）からなる二重特異性抗体（抗体100-104）。

〔C〕図6構造3を有するものであって、変異型CALRタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号10、配列番号11又は126、及び配列番号12に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン（VH-A）、並びに配列番号13、配列番号14又は127、及び配列番号15に示されるアミノ酸配列を含むVLドメイン（VL-A）からなり、CD3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号28、配列番号29又は128、及び配列番号30、129又は130に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン（VH-B）、並びに配列番号31又は131、配列番号32又は132、及び配列番号33に示されるアミノ酸配列を含むVLドメイン（VL-B）からなる二重特異性抗体（抗体105）。

〔D〕図6構造4を有するものであって、変異型CALRタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号10、配列番号11又は126、及び配列番号12に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン（VH-A）、並びに配列番号13、配列番号14又は127、及び配列番号15に示されるアミノ酸配列を含むVLドメイン（VL-A）からなり、CD3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号28、配列番号29又は128、及び配列番号30、129又は130に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン（VH-B）、並びに配列番号31又は131、配列番号32又は132、及び配列番号33に示されるアミノ酸配列を含むVLドメイン（VL-B）からなる二重特異性抗体（抗体106）。

〔E〕図6構造5を有するものであって、変異型CALRタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号10、配列番号11又は126、及び配列番号12に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン（VH-A）、並びに配列番号13、配列番号14又は127、及び配列番号15に示されるアミ

ノ酸配列を含むVLドメイン（VL-A）からなり、CD3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号28、配列番号29又は128、及び配列番号30、129又は130に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン（VH-B）、並びに配列番号31又は131、配列番号32又は132、及び配列番号33に示されるアミノ酸配列を含むVLドメイン（VL-B）からなる二重特異性抗体（抗体107、109-111）。

〔F〕図6構造6を有するものであって、変異型CALRタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号10、配列番号11又は126、及び配列番号12に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン（VH-A）、並びに配列番号13、配列番号14又は127、及び配列番号15に示されるアミノ酸配列を含むVLドメイン（VL-A）からなり、CD3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号28、配列番号29又は128、及び配列番号30、129又は130に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン（VH-B）、並びに配列番号31又は131、配列番号32又は132、及び配列番号33に示されるアミノ酸配列を含むVLドメイン（VL-B）からなる二重特異性抗体（抗体112、113）。

〔G〕図6構造7を有するものであって、変異型CALRタンパク質に特異的に結合するドメインが配列番号10、配列番号11又は126、及び配列番号12に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン（VH-A）、並びに配列番号13、配列番号14又は127、及び配列番号15に示されるアミノ酸配列を含むVLドメイン（VL-A）からなり、CD3抗原に特異的に結合するドメインが配列番号28、配列番号29又は128、及び配列番号30、129又は130に示されるアミノ酸配列を含むVHドメイン（VH-B）、並びに配列番号31又は131、配列番号32又は132、及び配列番号33に示されるアミノ酸配列を含むVLドメイン（VL-B）からなる二重特異性抗体（抗体114）。

[0064]

[表13-1]

名称	構造	アミノ酸配列 1	アミノ酸配列 2	アミノ酸配列 3
抗体 5 6	構造 1	配列番号 1 5 1	配列番号 1 2 1	
抗体 5 7	構造 1	配列番号 1 5 2	配列番号 1 2 1	
抗体 5 8	構造 1	配列番号 1 5 3	配列番号 1 2 1	
抗体 5 9	構造 1	配列番号 1 5 4	配列番号 1 2 1	
抗体 6 0	構造 1	配列番号 1 5 5	配列番号 1 2 1	
抗体 6 1	構造 1	配列番号 1 5 6	配列番号 1 2 1	
抗体 6 2	構造 1	配列番号 1 5 7	配列番号 1 2 1	
抗体 6 3	構造 1	配列番号 1 5 8	配列番号 1 2 1	
抗体 6 4	構造 1	配列番号 1 5 9	配列番号 1 2 1	
抗体 6 5	構造 1	配列番号 1 6 0	配列番号 1 2 1	
抗体 6 6	構造 1	配列番号 1 6 1	配列番号 1 2 1	
抗体 6 7	構造 1	配列番号 1 6 2	配列番号 1 2 1	
抗体 6 8	構造 1	配列番号 1 5 7	配列番号 1 6 5	
抗体 6 9	構造 1	配列番号 1 5 8	配列番号 1 6 5	
抗体 7 0	構造 1	配列番号 1 5 9	配列番号 1 6 5	
抗体 7 1	構造 1	配列番号 1 6 0	配列番号 1 6 5	
抗体 7 2	構造 1	配列番号 1 6 1	配列番号 1 6 5	
抗体 7 3	構造 1	配列番号 1 6 2	配列番号 1 6 5	
抗体 7 4	構造 1	配列番号 1 5 7	配列番号 1 6 7	
抗体 7 5	構造 1	配列番号 1 5 8	配列番号 1 6 7	
抗体 7 6	構造 1	配列番号 1 5 9	配列番号 1 6 7	
抗体 7 7	構造 1	配列番号 1 6 0	配列番号 1 6 7	
抗体 7 8	構造 1	配列番号 1 6 1	配列番号 1 6 7	
抗体 7 9	構造 1	配列番号 1 6 2	配列番号 1 6 6	
抗体 8 0	構造 1	配列番号 1 7 0	配列番号 1 9 7	
抗体 8 1	構造 1	配列番号 1 7 5	配列番号 1 9 7	
抗体 8 2	構造 1	配列番号 1 7 0	配列番号 1 9 8	
抗体 8 3	構造 1	配列番号 1 7 1	配列番号 1 9 8	
抗体 8 4	構造 1	配列番号 1 7 2	配列番号 1 9 8	
抗体 8 5	構造 1	配列番号 1 7 3	配列番号 1 9 8	
抗体 8 6	構造 1	配列番号 1 7 4	配列番号 1 9 8	

[0065]

[表13-2]

抗体 8 7	構造 1	配列番号 1 7 5	配列番号 1 9 8	
抗体 8 8	構造 1	配列番号 1 7 6	配列番号 1 9 8	
抗体 8 9	構造 1	配列番号 1 7 7	配列番号 1 9 8	
抗体 9 0	構造 1	配列番号 1 7 8	配列番号 1 9 8	
抗体 9 1	構造 1	配列番号 1 7 9	配列番号 1 9 8	
抗体 9 2	構造 1	配列番号 1 8 0	配列番号 1 9 8	
抗体 9 3	構造 1	配列番号 1 8 1	配列番号 1 9 8	
抗体 9 4	構造 1	配列番号 1 8 2	配列番号 1 9 7	
抗体 9 5	構造 1	配列番号 1 8 3	配列番号 1 9 7	
抗体 9 6	構造 1	配列番号 1 8 4	配列番号 1 9 7	
抗体 9 7	構造 1	配列番号 1 8 5	配列番号 1 9 7	
抗体 9 8	構造 1	配列番号 1 8 6	配列番号 1 9 7	
抗体 9 9	構造 1	配列番号 1 8 7	配列番号 1 9 7	
抗体 1 0 0	構造 2	配列番号 1 6 3	配列番号 1 6 8	
抗体 1 0 1	構造 2	配列番号 1 6 4	配列番号 1 6 8	
抗体 1 0 2	構造 2	配列番号 1 6 4	配列番号 1 6 9	
抗体 1 0 3	構造 2	配列番号 1 8 9	配列番号 1 9 9	
抗体 1 0 4	構造 2	配列番号 1 9 0	配列番号 1 9 9	
抗体 1 0 5	構造 3	配列番号 1 8 8		
抗体 1 0 6	構造 4	配列番号 1 9 4	配列番号 1 9 7	
抗体 1 0 7	構造 5	配列番号 1 9 1	配列番号 1 9 7	配列番号 2 0 0
抗体 1 0 9	構造 5	配列番号 1 9 3	配列番号 1 9 8	配列番号 2 0 0
抗体 1 1 0	構造 5	配列番号 2 1 2	配列番号 1 9 8	配列番号 2 0 0
抗体 1 1 1	構造 5	配列番号 1 9 1	配列番号 1 9 8	配列番号 2 0 0
抗体 1 1 2	構造 6	配列番号 1 9 5	配列番号 2 0 3	配列番号 2 0 2
抗体 1 1 3	構造 6	配列番号 1 9 5	配列番号 2 0 3	配列番号 1 9 9
抗体 1 1 4	構造 7	配列番号 1 9 6	配列番号 2 0 1	

[0066] また、別のヒト抗体の取得方法も知られている。例えば、ヒトリンパ球を *in vitro* で所望の抗原又は所望の抗原を発現する細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えば U266 と融合させ、抗原への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平 1-59878 参照）。また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を所望の抗原で免疫することで所望のヒト抗体を取得することができる（WO93/12227, WO92/03918, WO94/026

02, WO94/25585, WO96/34096, WO96/33735参照)。さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体 (s c F v) としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することができる。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 s c F v 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を作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらの方法は既に周知であり、WO92/01047, WO92/20791, WO93/06213, WO93/11236, WO93/19172, WO95/01438, WO95/15388を参考にすることができる。

[0067] 二重特異性抗体は、例えば抗変異CALR抗体及び抗CD3抗体をコードするDNAと発現ベクターを用いて二重特異性抗体発現ベクターを構築し、発現ベクターをCHO細胞又はHEK293細胞に導入し、形質転換した細胞を得ることができる。この形質転換細胞を培養した培養液をクロマトグラフィーにより精製し得ることができる。二重特異性抗体の作製方法は既に周知であり、JP2019022497、JP2017137329、JP2015110628を参考にすることができる。

[0068] 抗体のクラスは特に限定されず、IgG、IgM、IgA、IgDあるいはIgE等のいずれのアイソタイプを有する抗体を包含する。精製の容易性等を考慮すると、好ましくはIgGである。

[0069] ドメイン構造としては、抗体断片（フラグメント）等の低分子化抗体や抗体の修飾物が挙げられる。抗体断片の具体例としては、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、s c F v、Diabody等を挙げることができるが、これらに限定されるわけではない。後述の実施例では、Fc受容体への結合親和性を抑制するとされる228、233-238、265、268、309、318、328-331のアミノ酸変異を有するヒトIgG

のH鎖定常領域やヘテロH鎖のための349、354、366、368、407アミノ酸変異を示すが、これらに限定されるものではない。

[0070] また、本発明の抗体のうち、前記(A)又は(B)のポリペプチドの検出に用いる抗体はこれらのポリペプチドに結合すればよい。一方、MPNの予防又は治療に用いる抗体は、前記(A)又は(B)のポリペプチドに結合し、細胞傷害活性を有する抗体が好ましい。

[0071] 切断型の変異型CALRタンパク質に結合する抗体としては、配列番号1で表される配列を有するポリペプチド鎖に結合する抗体であればよいが、切断型の変異型CALRタンパク質中の配列番号1で表されるアミノ酸配列部分への結合において、少なくとも前記抗体、又はその機能的断片のいずれか一つと競合する抗体であることが好ましい。

[0072] 変異型CALR-CD3二重特異性抗体の変異型CALRタンパク質に対する親和性は、結合定数(K_D)が、 10^{-7} M以下であるとよく、好ましくは、 10^{-8} M以下である。結合定数は、表面プラズモン共鳴(SPR)法により測定することが好ましいが、簡易的には変異型CALR発現細胞に対する結合の濃度依存性からフローサイトメトリー解析により求めることもできる。

[0073] ここで、前記検出に用いられる生体試料としては、例えば被験者から採取された生体試料であって、(A)又は(B)のポリペプチドが含まれる試料が挙げられる。具体的には、全血、血漿、血清、リンパ球、リンパ液、血小板、単核球、顆粒球、唾液や尿などの体液、骨髓生検により得られる組織標本(骨髓液、骨髓組織)等が挙げられる。

[0074] (A)又は(B)のポリペプチドの検出手段としては、液体クロマトグラフィー質量分析法、免疫学的法、特異的結合能を有する低/中分子や核酸あるいは核酸誘導体を用いた方法等が挙げられるが、簡便かつ測定感度が高い免疫学的方法が好ましい。

[0075] 免疫学的方法としては、(A)又は(B)のポリペプチド鎖中に抗原認識部位(エピトープ)を有する抗体、又はその機能的断片を用いる免疫学的方法が好ましい。(A)又は(B)のポリペプチド鎖中のエピトープとしては

、（Ａ）又は（Ｂ）のポリペプチド鎖中に存在する配列であればよく、（Ａ）又は（Ｂ）のポリペプチド鎖中の連続する３アミノ酸以上のアミノ酸を有するペプチドが好ましく、（Ａ）又は（Ｂ）のポリペプチド鎖中の連続する５アミノ酸以上のアミノ酸を有するペプチドがより好ましい。

[0076] 免疫学的方法に用いる抗体は、例えば（Ａ）又は（Ｂ）のポリペプチド鎖中の連続する３アミノ酸以上のアミノ酸を有するペプチドを抗原として用いて得られる抗体であればよく、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、あるいは二重特異性抗体であってもよいが、二重特異性抗体が好ましい。ここでモノクローナル抗体は、例えば（Ａ）又は（Ｂ）のポリペプチド鎖中の連続する３アミノ酸以上のアミノ酸を有するペプチドを感作することにより得られた抗体産生細胞と骨髓腫細胞とを細胞融合させてハイブリドーマを作製し、目的とする抗体を産生するクローンを選択し、この細胞を増殖させて製造することができる。二重特異性抗体は、抗体をコードするＤＮＡと発現ベクターを用いて二重特異性抗体発現ベクターを構築し、これにより形質転換させた細胞を増殖させて製造することができる。

[0077] 免疫学的方法としては、イムノクロマト法、酵素標識免疫学的測定法（ＥＩＡ）、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、凝集法、比濁法、フローサイトメトリー法、組織免疫染色法、ウェスタンブロット等のイムノブロット法等のいずれも用いることができる。ここでイムノブロット法は、ポリペプチドをメンブレンに転写し、メンブレン上のポリペプチドを抗体で検出する方法である。抗体の検出には、酵素標識、蛍光標識等が用いられる。

[0078] 生体試料中に（Ａ）又は（Ｂ）のポリペプチドが検出されれば、当該生体試料はＭＰＮ患者由来の生体試料であると判定することができる。

[0079] 本発明のＭＰＮ診断薬は、前記（Ａ）又は（Ｂ）のポリペプチド鎖中に抗原認識部（エピトープ）を有する抗体を含有する。この抗体は、前述の抗体であるのが好ましい。

また、本発明のＭＰＮ診断薬には、前記抗体の他、緩衝液、測定実施プロトコール等が含まれていてもよい。

- [0080] 本発明のM P N 予防又は治療薬等の医薬組成物は、前記の抗体を含有すればよいが、薬学的に許容しうる担体とともに、混合、溶解、乳化、カプセル封入、あるいは凍結乾燥等により、製剤化して製造することができる。
- [0081] 本発明の医薬組成物の予防又は治療対象となるM P N は、変異型C A L R が検出されるM P N であるのが好ましい。
- [0082] 経口投与用の好適な製剤は、本発明抗体を、水あるいは生理食塩水のような希釈剤に有効量を溶解させた液剤、有効量を固体や顆粒として含んでいるカプセル剤、顆粒剤、散剤、又は錠剤、適当な分散媒中に有効量を懸濁させた懸濁液剤、有効量を溶解させた溶液を適当な分散媒中に分散させ乳化させた乳剤等である。
- [0083] 非経口投与用には、本発明抗体を、薬学的に許容しうる溶媒、賦形剤、結合剤、安定化剤、分散剤等とともに、注射用溶液、懸濁液、乳剤、クリーム剤、軟膏剤、吸入剤、坐剤等の剤形に製剤化することができる。注射用の処方においては、本発明の抗体を水性溶液、好ましくはハanks溶液、リンゲル溶液、又は生理的食塩緩衝液等の生理学的に適合性の緩衝液中に溶解することができる。さらに、本発明の医薬は、油性又は水性のベヒクル中で、懸濁液、溶液、又は乳濁液等の形状をとることができる。あるいは、本発明抗体を粉体の形態で製造し、使用前に滅菌水等を用いて水溶液又は懸濁液を調製してもよい。吸入による投与用には、本発明抗体を粉末化し、ラクトース又はデンプン等の適当な基剤とともに粉末混合物とすることができる。坐剤処方では、本発明抗体をカカオバター等の慣用の坐剤基剤と混合することにより製造することができる。さらに、本発明の治療剤は、ポリマーマトリクス等に封入して、持続放出用製剤として処方することができる。
- [0084] 本発明のM P N 治療薬のスクリーニング法は、前記（A）又は（B）のポリペプチドを認識する抗体やタンパク質、低／中分子、核酸あるいは核酸誘導体をスクリーニングすることを特徴とする。具体的には、（A）又は（B）のポリペプチドを認識する抗体を用いた、抗体依存性細胞傷害活性や補体依存性細胞傷害活性を有する抗体医薬の開発が挙げられる。前記本発明の抗

体が、本発明のスクリーニング法により得られた抗体医薬の例である。この他にも、(A)又は(B)のポリペプチドに特異的に結合する低分子あるいは中分子化合物、核酸あるいは核酸誘導体、タンパク質等を作成し、殺細胞効果を有する低分子あるいは中分子化合物、核酸あるいは核酸誘導体、タンパク質等を腫瘍細胞特異的に送達する抗腫瘍薬の開発が挙げられる。

実施例

[0085] 次に実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に何ら限定されない。

[0086] [試験例1] 切断型を含む変異型CALRタンパク質を認識する抗体の作製
配列番号1に含まれるアミノ酸配列(RRMMRTKMR)のC末端あるいはN末端にシステインを付加したペプチドを合成し、キャリアタンパク質キーホールリンペットヘモシアニン(Keyhole Limpet Hemocyanin; KLH)と結合させてから、8週齢のメスのWKY/IZMラットに免疫し、追加免疫後にリンパ球を回収した。リンパ球をマウスミエローマSP2細胞とPEG法により細胞融合させてから、選択培地で培養しハイブリドーマを取得した。培養上清中の抗体の特異性を、免疫したペプチドや精製タンパク質を用いたELISA法によりスクリーニングすることで、切断型を含む変異型CALRタンパク質に結合する抗体を産生するハイブリドーマ(クローンB3、C6及びG1)を取得した。これらのハイブリドーマから産生された抗体を精製し、試験に用いた(クローンB3抗体、C6抗体及びG1抗体)。

[0087] [試験例2] 変異型CALR発現細胞の作製

ヒト巨核芽球性白血病細胞株UT-7/TPO細胞に、DeI 52あるいはIns 5型の変異型CALRタンパク質を発現させることで腫瘍性に増殖するUT-7/TPO CALR DeI 52細胞及びUT-7/TPO CALR Ins 5細胞と、コントロールとして遺伝子導入に使用したベクターのみを導入したUT-7/TPO vec細胞を、 6.0×10^5 個/mLの密度でOptiMEM培地(Thermo Fisher)

に播種し、5%CO₂存在下において37℃で32時間培養した。この際、UT-7/TPO vec細胞は、10ng/mL TPOを含む培地で培養した。

[0088] [試験例3] 変異型CALRタンパク質を認識することの確認

N末端のシグナル配列の下流にFLAGタグを挿入したDe152型あるいはIns5型の変異型CALRを発現するUT-7/TPO細胞を培養し、分泌された変異型CALRタンパク質を含む培養上清を遠心分離（1,600g×5分、4℃）により調製した。得られた培養上清をSDSと還元剤存在下で加熱処理したあと、SDSポリアクリルアミド電気泳動法によりゲル上に展開した上で、ポリビニルデンジフルオライド（PVDF）膜に電氣的に転写し、5%スキムミルクを含むTBS-T溶液と室温で1時間反応させてから、ラットクローンB3、C6、G1抗体、あるいはマウス抗DYKDDDDK tag抗体（富士フイルム和光純薬）を含む5%BSA/TBS-T溶液と4℃において一晩反応させた。TBS-T溶液による洗浄を行なった後、それぞれ、ペルオキシダーゼ標識されたヤギ抗ラットIgG抗体（Jackson Immuno Research Inc.）、あるいはペルオキシダーゼ標識されたヤギ抗マウスIgG抗体（Jackson Immuno Research Inc.）を含む5%スキムミルク/TBS-T溶液と室温で1時間反応を行なった。PVDF膜をTBS-T溶液で洗浄した後に、ペルオキシダーゼ発光試薬と反応させて得られたシグナルを、FUSION撮像装置を使用して検出した。

その結果、図2に示すように、クローンB3、C6及びG1抗体はいずれも全長型と切断型の変異型CALRタンパク質を認識することが確認された。

[0089] [試験例4] 本発明抗体の配列情報の決定

本発明の抗体の重鎖及び軽鎖の配列情報を、抗体を産生する細胞から、PureLinc RNA Miniキット（Thermo Fisher）を使用して、mRNAを調製した。得られたmRNAを鋳型に、重鎖あるい

は軽鎖特異的な逆転写プライマーを用いて、Rapid amplification of cDNA ends法によりcDNAを合成した後、プラスミドにクローニングした。得られたプラスミドをサンガーシーケンス解析することで、重鎖と軽鎖のcDNAの全長配列を決定した。

[0090] [実施例1] 二重特異性抗体の調製

材料及び試験方法

クローンB3、C6、G1抗体及び抗CD3抗体の配列情報（表1-1～1-4）を元にした二重特異性抗体をコードするDNAと発現ベクター（pcDNA3.4, Thermo Fisher）を用いて二重特異性抗体発現ベクターを構築した。上記の発現ベクターをCHO細胞又はHEK293細胞にExpiFectamine CHO Transfection Kit（Thermo Fisher）又はExpiFectamine 293 Transfection Kit（Thermo Fisher）により導入し、形質転換した細胞を培養したのちに遠心分離及びフィルトレーションにより細胞を除去し、培養液を回収した。抗体の精製はニッケル結合アガロースを用いたアフィニティクロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーの組み合わせ、Protein Aアフィニティクロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーの組み合わせ、又はCapture Select kappa XLレジン（Thermo Fisher）を用いたアフィニティクロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーの組み合わせで実施した。また、上記と同様の手法により特許文献4及び特許文献2に記載の配列情報を元にした二重特異性抗体（抗体28：配列番号110及び配列番号111、抗体29：配列番号112及び配列番号113、抗体30：配列番号114及び配列番号115）及びB3キメラ抗体（配列番号48及び配列番号60）を調製した。

[0091] [実施例2] フローサイトメトリー解析による細胞表面の変異型CALRタンパク質を認識することの確認

材料及び試験方法

コントロールとして遺伝子導入に使用したベクターのみを導入したUT-7/TPO vec細胞、変異型CALRを発現するUT-7/TPO CALR Ins 5細胞及びUT-7/TPO CALR Del 52細胞をウシ胎児非働化血清（FBS）10%を含むIMDM培地を用いて、5%CO₂存在下において37℃で培養した。増殖期の細胞 5×10^4 個を遠心分離（400g×5分、4℃）後、FBS/PBS溶液中で各種抗体を5μg/mLの濃度に調製し、氷上で30分間反応させた。反応後、MACS bufferを用いて2回細胞を洗浄した後、2次抗体として、抗ヒトFc抗体をFBS/PBS溶液中において2.5μg/mLの濃度に調製し、氷上で30分間反応させた。反応終了後にMACS bufferを加えて遠心分離（400g×5分、4℃）し、上清を廃棄することで細胞を2回洗浄し、BD LSRFortessa X-20（BD Biosciences）を用いてフローサイトメトリー解析により、シグナルを定量した。

[0092] 配列番号2のVH鎖、配列番号3のVL鎖、配列番号8のVH鎖及び配列番号9のVL鎖を用いて作製した、代表的な抗切断型変異CALR-CD3二重特異性抗体を用いて、〔a〕UT-7/TPO vec細胞、〔b〕UT-7/TPO CALR Ins 5細胞及び〔c〕UT-7/TPO CALR Del 52細胞をフローサイトメトリー解析した結果を示す。

その結果、図3に示すように、評価した二重特異性抗体は、変異型CALRタンパク質を細胞表面上に発現する細胞を特異的に認識することが確認された。

[0093] [実施例3] フローサイトメトリー解析による細胞表面のCD3抗原を認識することの確認

材料及び試験方法

健康なヒトドナーから単離された末梢血単核細胞（PBMC）を抗CD3抗体（タカラバイオ）で4～24時間コーティングしたプレートで2日間培養後、IL-2と10%FBSを含むRPMI-1640培地（Sigma-Aldrich）でさらに10～21日間培養してT-LAK細胞を誘導

した。T-LAK細胞 5×10^5 個を遠心分離（ $400\text{ g} \times 5$ 分、 4°C ）後、FBS/PBS溶液中で配列番号2のVH鎖、配列番号3のVL鎖、配列番号8のVH鎖及び配列番号9のVL鎖を用いて作製した抗切断型変異CALR-CD3二重特異性抗体を $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ の濃度に調製し、氷上で30分間反応させた。反応後、MACS bufferを用いて2回細胞を洗浄した後、2次抗体として、抗ヒトFc抗体をFBS/PBS溶液中において $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ の濃度に調製し、氷上で30分間反応させた。反応終了後にMACS bufferを加えて遠心分離（ $400\text{ g} \times 5$ 分、 4°C ）し、上清を廃棄することで細胞を2回洗浄し、BD LSRFortessa X-20（BD Biosciences）を用いてフローサイトメトリー解析により、シグナルを定量した。

[0094] その結果、図4に示すように、本発明の二重特異性抗体は、T-LAK細胞表面に発現するCD3抗原を特異的に認識することが確認された。

[0095] [実施例4] 表面プラズモン共鳴解析による抗原結合力の評価

材料及び試験方法

表面プラズモン共鳴解析装置Biacore T200（GEヘルスケア）に表面プラズモン共鳴解析用のセンサーチップ（GEヘルスケア）を装填してから、HBS-EPバッファー（GEヘルスケア）で平衡化した。Acetate 5.5（GEヘルスケア）で $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ の濃度に調製した、配列番号2のVH鎖、配列番号3のVL鎖、配列番号8のVH鎖及び配列番号9のVL鎖を用いて作製した抗切断型変異CALR-CD3二重特異性抗体を、Amine coupling kit（GEヘルスケア）を用いて、固定化量が200RUとなるよう固定化した。続いて、HBS-EPバッファーにより20、10、5、2.5、1.25nMの濃度に調製した、配列番号1に含まれるアミノ酸配列（RRMMRTKMR）のN末端にシステインを付加したペプチドを用いて、表面プラズモン共鳴を測定し、Biacore T200 Evaluation Softwareにより解離定数を取得した。

また別の手法として、*Biolayer Interferometry* 技術及び表面プラズモン共鳴技術を応用した分子間相互作用解析システム *B L I t z* (*F o r t e b i o*社)を用いて測定した。具体的には、*A n t i - P e n t a - H I S*もしくは*P r o t e i n A*のバイオセンサー (*F o r t e b i o*社)を用い、配列番号1のN末端にFc領域及びHisタグを付加した蛋白質を0.1mg/mLの濃度で固相化した。続いて、作製した抗体1-114を500、100、50nMの濃度に調製して反応させ、解離定数を取得した。

[0096] その結果、図5、表14及び表16-1～16-2に示すように、本発明の二重特異性抗体は、変異型CALRタンパク質と強力に結合することがわかる。

[0097]

[表14]

名称	K _D 値 (M)	名称	K _D 値 (M)
抗体 1	6. 5 5 E - 1 1	抗体 1 9	7. 2 8 E - 1 0
抗体 3	1. 5 5 E - 8	抗体 2 0	1. 2 4 E - 8
抗体 4	1. 2 5 E - 9	抗体 2 2	< 1 E - 1 2
抗体 6	1. 3 4 E - 1 0	抗体 2 3	6. 7 9 E - 9
抗体 9	6. 5 5 E - 9	抗体 2 4	5. 3 1 E - 1 0
抗体 1 1	N. D.	抗体 2 5	N. D.
抗体 1 3	< 1 E - 1 2	抗体 2 6	1. 2 3 E - 8
抗体 1 4	< 1 E - 1 2	抗体 2 7	1. 3 6 E - 8
抗体 1 5	6. 6 8 E - 9	抗体 2 8 (配列番号 1 1 0 及び 1 1 1)	1. 4 8 E - 3
抗体 1 6	2. 8 3 E - 9	抗体 2 9 (配列番号 1 1 2 及び 1 1 3)	5. 7 0 E - 6
抗体 1 7	< 1 E - 1 2	抗体 3 0 (配列番号 1 1 4 及び 1 1 5)	—
抗体 1 8	< 1 E - 1 2	B 3 キメラ抗体 (配列番号 4 8 及 び 6 0)	< 1 E - 1 2

— : 抗体発現なし

N. D. : Not Determined

[0098] [実施例 5] *in vitro* 細胞傷害活性評価

材料及び試験方法

二重特異性抗体の細胞傷害活性は、蛍光色素放出に基づいた細胞溶解アッセイにおいて測定された。本発明の抗体が *in vitro* で免疫エフェクター細胞による標的細胞の細胞溶解を誘導するかを確認した。免疫エフェクター細胞は T-LAK 細胞を使用した。NK 細胞、マクロファージ、単球、樹状細胞、又は PBMC 等である場合も非常に類似のアッセイを使用することができる。

変異型 CALR を発現させた UT-7/TPO CALR Ins 5 細

胞を、約 $10\mu\text{M}$ Calcein-AM (PromoKine) を用いて 37°C で 30 分間標識し、HBSS で 3 回洗浄した。適切な数の標識標的細胞をカウント後、96 ウェル丸底培養プレートに入れて様々な濃度の二重特異性抗体、対照タンパク質の存在下又は非存在下、又は抗体不添加において 37°C で 2 時間インキュベーションした。T-LAK 細胞は健康なヒトドナーから単離された PBMC を、抗 CD3 抗体 (タカラバイオ) で 4 ~ 24 時間コーティングしたプレートで 2 日間培養後、IL-2 と 10% FBS を含む RPMI-1640 培地でさらに 10 ~ 21 日間培養して誘導した。免疫エフェクター細胞と標識標的細胞の比率を 10 : 1 で添加した。他の免疫エフェクター細胞 : 標識標的細胞比も適切である。標識標的細胞、二重特異性抗体及び免疫エフェクター細胞を含有するプレートを、5% CO_2 で 1 ~ 6 時間、 37°C で培養した。1 ~ 6 時間反応後、細胞を遠心分離 ($125\text{rpm} \times 5\text{分}$) し、上清を回収した。その後、上清を 96 ウェル平底培養プレートに入れて、インキュベーション培地における放出された色素を蛍光読み取り装置 (Synergy H1M、バイオテックジャパン) で $485/526\text{nm}$ で吸光度を測定した。正規化のために、標識標的細胞の最大溶解率 (= 100%) は、 $10 \times \text{Lysis Solution}$ の添加により得られた。最小溶解率 (= 0%) は、任意の構築物又は抗体を含まずに、標識標的細胞をインキュベートしたウェルから算出した。次式を用いて細胞溶解率を計算した : $[(\text{二重特異性抗体の存在下での腫瘍細胞の溶解率}) - (\text{二重特異性抗体の非存在下での腫瘍細胞の溶解率})] / [(\text{最大溶解率}) - (\text{最小溶解率})]$ 。S 字形の用量応答曲線は、Prism Software (GraphPad Software Inc., San Diego) により計算され、 EC_{50} 値 (50% 効果濃度) が算出された。

[0099] 表 15 に示すように、本発明の二重特異性抗体は変異型 CALR を発現させた UT-7/TPO CALR Ins 5 細胞に対して細胞傷害活性を示した。

[0100]

[表15]

名称	EC50 (pM)	名称	EC50 (pM)
抗体 1	20	抗体 19	3714
抗体 3	19	抗体 20	1463
抗体 4	23	抗体 22	101
抗体 6	85	抗体 23	370
抗体 9	1528	抗体 24	138
抗体 11	1262	抗体 25	56
抗体 13	4473	抗体 26	39
抗体 14	989	抗体 27	36
抗体 15	1290	抗体 28 (配列番号 110 及び 111)	5433
抗体 16	334	抗体 29 (配列番号 112 及び 113)	634
抗体 17	46	抗体 30 (配列番号 114 及び 115)	—
抗体 18	81	B3キメラ抗体 (配列番号 48 及 び 60)	>10000

—：抗体発現なし

[0101] ヒト化した抗体（抗体 56～抗体 114）については表 16-1～16-2 に示すように、変異型 CALR タンパク質と強力に結合し、変異型 CALR を発現させた UT-7/TPO CALR Ins 5 細胞に対して細胞傷害活性を示した。

[0102]

[表16-1]

名称	結合親和性 KD (M)	細胞傷害活性 EC 50 (pM)
抗体 5 6	$< 1 \text{ E} - 12$	4 5
抗体 5 7	$< 1 \text{ E} - 12$	3 9 8
抗体 5 8	$< 1 \text{ E} - 12$	1 5 3 1
抗体 5 9	$< 1 \text{ E} - 12$	4 6 9
抗体 6 0	$< 1 \text{ E} - 12$	7 7
抗体 6 1	$< 1 \text{ E} - 12$	9 7 6 3
抗体 6 2	$< 1 \text{ E} - 12$	9 1
抗体 6 3	$2.62 \text{ E} - 10$	1 9 7
抗体 6 4	$< 1 \text{ E} - 12$	8 2 9
抗体 6 5	$< 1 \text{ E} - 12$	3 9 7
抗体 6 6	$< 1 \text{ E} - 12$	1 1 5
抗体 6 7	$< 1 \text{ E} - 12$	5 8 9 9
抗体 6 8	$< 1 \text{ E} - 12$	2 7
抗体 6 9	$< 1 \text{ E} - 12$	1 6 2
抗体 7 0	$< 1 \text{ E} - 12$	5 0 7
抗体 7 1	$5.54 \text{ E} - 10$	4 4 8
抗体 7 2	$< 1 \text{ E} - 12$	9 3
抗体 7 3	$< 1 \text{ E} - 12$	N. D.
抗体 7 4	$< 1 \text{ E} - 12$	3 1
抗体 7 5	$< 1 \text{ E} - 12$	7 7
抗体 7 6	$< 1 \text{ E} - 12$	3 0 0
抗体 7 7	$< 1 \text{ E} - 12$	1 2 9
抗体 7 8	$< 1 \text{ E} - 12$	6 3
抗体 7 9	$< 1 \text{ E} - 12$	N. D.
抗体 8 0	$< 1 \text{ E} - 12$	2 8
抗体 8 1	$< 1 \text{ E} - 12$	N. D.
抗体 8 2	$< 1 \text{ E} - 12$	2 2
抗体 8 3	$< 1 \text{ E} - 12$	1 1 0
抗体 8 4	$< 1 \text{ E} - 12$	2 7 7
抗体 8 5	$< 1 \text{ E} - 12$	3 8 9

[0103]

[表16-2]

名称	結合親和性 KD (M)	細胞傷害活性 EC 50 (pM)
抗体 8 6	$< 1 \text{ E} - 12$	5 8
抗体 8 7	$< 1 \text{ E} - 12$	N. D.
抗体 8 8	$< 1 \text{ E} - 12$	2 8
抗体 8 9	$< 1 \text{ E} - 12$	7 7
抗体 9 0	$< 1 \text{ E} - 12$	2 6 9
抗体 9 1	$< 1 \text{ E} - 12$	2 3 0
抗体 9 2	$< 1 \text{ E} - 12$	4 7
抗体 9 3	$< 1 \text{ E} - 12$	N. D.
抗体 9 4	$< 1 \text{ E} - 12$	3 2
抗体 9 5	$< 1 \text{ E} - 12$	N. D.
抗体 9 6	$< 1 \text{ E} - 12$	N. D.
抗体 9 7	$< 1 \text{ E} - 12$	N. D.
抗体 9 8	$< 1 \text{ E} - 12$	N. D.
抗体 9 9	$< 1 \text{ E} - 12$	N. D.
抗体 1 0 0	$< 1 \text{ E} - 12$	1 0 8 1
抗体 1 0 1	$< 1 \text{ E} - 12$	1 6 6 4
抗体 1 0 2	$< 1 \text{ E} - 12$	8 5 0
抗体 1 0 3	$< 1 \text{ E} - 12$	3 9 9
抗体 1 0 4	$< 1 \text{ E} - 12$	6 2 1
抗体 1 0 5	$1. 5 4 \text{ E} - 9$	2 6
抗体 1 0 6	$4. 9 9 \text{ E} - 9$	2 5 6 5
抗体 1 0 7	$1. 2 1 \text{ E} - 8$	3 8 6 9
抗体 1 0 9	$9. 9 1 \text{ E} - 9$	3 7 9 6
抗体 1 1 0	$5. 3 3 \text{ E} - 9$	2 5 4 1
抗体 1 1 1	$1. 2 8 \text{ E} - 8$	6 1 0 8
抗体 1 1 2	$< 1 \text{ E} - 12$	N. D.
抗体 1 1 3	$3. 2 4 \text{ E} - 11$	N. D.
抗体 1 1 4	$6. 0 6 \text{ E} - 9$	7 9 0

N. D. : Not Determined

請求の範囲

- [請求項1] 変異型カルレティキュリントパク質に特異的に結合する第1のドメイン及びCD3抗原に特異的に結合する第2のドメインを有する二重特異性抗体。
- [請求項2] 前記第1のドメインが、配列番号1の変異型カルレティキュリントパク質のエピトープに結合する抗体と競合する、請求項1記載の二重特異性抗体。
- [請求項3] 変異型カルレティキュリントパク質が配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド鎖中、又は配列番号1において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド鎖中に抗原認識部位を有する、請求項1又は2記載の二重特異性抗体。
- [請求項4] 第1のドメインが、野生型カルレティキュリントパク質に結合せず、変異型カルレティキュリントパク質に対して高い親和性を有する、請求項1～3のいずれか1項記載の二重特異性抗体。
- [請求項5] 第1のドメインが、切断後の変異型カルレティキュリントパク質に対して高い親和性を有する、請求項1～4のいずれか1項記載の二重特異性抗体。
- [請求項6] 第1のドメインと変異型カルレティキュリントパク質間の結合は、 K_D が 10^{-7} M以下である、請求項1～5のいずれか1項記載の二重特異性抗体。
- [請求項7] 第1のドメインのCDRが、(a)配列番号10、配列番号11又は126、及び配列番号12(VHCDR)で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列、並びに配列番号13、配列番号14又は127、及び配列番号15(VLCDR)で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する、(b)配列番号16-18(VHCDR)で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列、及び配列番号19-2

1 (V L C D R) で示されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する、又は (c) 配列番号 22-24 (V H C D R) で示されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列、及び配列番号 25-27 (V L C D R) で示されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する、請求項 1~6 のいずれか 1 項に記載の二重特異性抗体。

[請求項8]

第1のドメインが、(d) 配列番号 2、90、91、92、93、94、133、134、135 及び 136 で示されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する V H 領域、並びに配列番号 3、95、96、97、98、99、137、138、139、140 及び 141 で示されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する V L 領域を有する、(e) 配列番号 4 で示されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する V H 領域、及び配列番号 5 で示されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する V L 領域を有する、又は (f) 配列番号 6 で示されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する V H 領域、及び配列番号 7 で示されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する V L 領域を有する、請求項 1~7 のいずれか 1 項に記載の二重特異性抗体。

[請求項9]

第2のドメインの C D R が、配列番号 28、配列番号 29 又は 128、及び配列番号 30、129 又は 130 (V H C D R) で示されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列、並びに配列番号 31 又は 131、配列番号 32 又は 132、及び配列番号 33 (V L C D R) で示されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する、請求項 1~8 のいずれか 1 項に記載の二重特異性抗体。

[請求項10]

第2のドメインが、配列番号 8、配列番号 204、配列番号 205 及び 206 で示されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するア

ミノ酸配列を有するVH領域、並びに配列番号9、配列番号207及び208で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するVL領域を有する、請求項1～9のいずれか1項に記載の二重特異性抗体。

[請求項11] 二量体化モジュールが一つ又は複数のノブイントゥホール構造を持つヘテロH鎖であり、H鎖の定常領域の349、354、366、368、及び407番目から選択される一つ以上の位置のアミノ酸をそれぞれY349C、T366S、L368A、Y407V（ホール又は空洞）、S354C又はT366W（ノブ又は突起）に置換した配列番号209又は210のFc領域を含む、請求項1～10のいずれか1項に記載の二重特異性抗体。

[請求項12] H鎖Fc領域の234及び235から選択される一つ以上の位置のアミノ酸をそれぞれL234A又はL235Aに置換した変異を含む配列番号211の変異Fc領域を含む、請求項1～11のいずれか1項に記載の二重特異性抗体。

[請求項13] ヒト抗体、ヒト化抗体、動物由来抗体とヒト抗体のキメラ抗体、又は合成抗体である、請求項1～12のいずれか1項に記載の二重特異性抗体。

[請求項14] 請求項1～13のいずれか1項に記載の二重特異性抗体、又はその機能性断片を含有する医薬組成物。

[請求項15] 骨髄増殖性腫瘍治療又は診断用医薬組成物である、請求項14記載の医薬組成物。

[請求項16] 請求項1～13のいずれか1項記載の二重特異性抗体、又はその機能断片を用いて、生体試料中の次の(A)又は(B)のポリペプチドを検出することを特徴とする変異型カルレティキュリントタンパク質の検出方法。

(A) 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

(B) 配列番号1において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若

しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド

[請求項17] 変異型カルレティキュリンタンパク質の検出に用いるための、請求項1～13のいずれか1項記載の二重特異性抗体、又はその機能的断片。

[請求項18] 請求項1～13のいずれか1項記載の二重特異性抗体、又はその機能的断片を用いて、生体試料中の次の（A）又は（B）のポリペプチドを検出することを特徴とする骨髓増殖性腫瘍の診断方法。

（A）配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

（B）配列番号1において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド

[請求項19] 骨髓増殖性腫瘍の治療又は診断に用いるための、請求項1～13のいずれか1項に記載の二重特異性抗体、又はその機能的断片。

[請求項20] 請求項1～13のいずれか1項に記載の二重特異性抗体、又はその機能的断片の骨髓増殖性腫瘍治療薬、又は診断薬製造のための使用。

[請求項21] 請求項1～13のいずれか1項に記載の二重特異性抗体、又はその機能的断片を投与することを特徴とする腫瘍の予防又は治療方法。

[請求項22] 腫瘍が血液腫瘍、好ましくは骨髓増殖性腫瘍、骨髓性白血病、血小板増加症、赤血球増加症、原発性骨髓線維症、又は二次性骨髓性線維症である請求項21記載の方法。