明　細　書

発明の名称 ：

ＣＤ１１６およびＣＤ１３１に結合するバイスペシフィック抗体

技術分野

[0001] 本発明は、ＣＤ１１６およびＣＤ１３１に結合する抗原結合ドメインを含むバイスペシフィック抗体、該バイスペシフィック抗体断片、該バイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片をコードするＤＮＡ、該ＤＮＡを含むベクター、該バイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片を生産するハイブリドーマおよび形質転換株、該バイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片の製造方法、該バイスペシフィック抗体またはバイスペシフィック抗体断片を含む治療および診断薬、該バイスペシフィック抗体またはバイスペシフィック抗体断片を用いる治療および診断方法、ならびに該バイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片を含む検出または測定用試薬に関する。

背景技術

[0002] 顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（Ｇｒａｎｕｌｏｃｙｔｅ ｍａｃｒｏｐｈａｇｅ ｃｏｌｏｎｙ－ｓｔｉｍｕｌａｔｉｎｇ ｆａｃｔｏｒ，ＧＭ－ＣＳＦ）は１２７アミノ酸残基からなる約２２ｋＤａの糖タンパク質であり、骨髄球系前駆細胞に作用し、分化・増殖を促進する因子である。恒常的な造血には必要とされないが、肺胞マクロファージの分化に必須である。

[0003] 実際に、ＧＭ－ＣＳＦノックアウト動物を用いた解析において、好中球、単球、好酸球など血球細胞は正常であったが、肺胞マクロファージの成熟障害が認められ肺サーファクタント処理に異常が生じることが報告されている（非特許文献１）。

[0004] ＧＭ－ＣＳＦは細胞膜に発現するＧＭ－ＣＳＦ受容体に特異的に結合することで、その生理作用を発揮する。ＧＭ－ＣＳＦ受容体は好中球、好酸球、

単球、マクロファージ、およびそれらの前駆細胞に発現している。ＧＭ－ＣＳＦ受容体はα鎖（ＣＤ１１６）とβｃ鎖（ｃｏｍｍｏｎβ鎖、ＣＤ１３１）の２種類のサブユニットから構成されるヘテロ多量体である。

[0005] ＣＤ１１６とＣＤ１３１はいずれも１回膜貫通タンパク質であり、サイトカイン受容体スーパーファミリーに属する。ＣＤ１１６がＧＭ－ＣＳＦに対して特異的な結合を担い、ＣＤ１３１はＩＬ－３受容体、ＩＬ－５受容体とも共通した構成分子であり、主にシグナル伝達を担う。

[0006] ＣＤ１３１の細胞内領域にはシグナル伝達分子であるＪＡＫ２が結合しており、ＪＡＫ２およびＣＤ１３１細胞内領域チロシン残基のリン酸化によってＪＡＫ２／ＳＴＡＴ５経路、Ｒａｓ／ＭＡＰキナーゼ経路、ＰＩ－３キナーゼ経路が活性化されて、細胞の生存および増殖・分化・活性化に作用する。

[0007] 定常状態では、ＣＤ１１６とＣＤ１３１は細胞膜上に別々に存在している。ＣＤ１１６およびＣＤ１３１がＧＭ－ＣＳＦ受容体として働く際は、まずＧＭ－ＣＳＦがＣＤ１１６に特異的に結合する。ＣＤ１１６のみではＧＭ－ＣＳＦへの親和性は低いが、ＣＤ１３１が加わると高い親和性で結合し、複合体を形成し、特殊な活性化メカニズムによってシグナル伝達されることが明らかとなっている。図１にそのメカニズムを模式的に示す。

[0008] 図１に示すように、ＣＤ１３１は定常状態で２量体を形成しており、ＣＤ１３１分子がそれぞれＧＭ－ＣＳＦとＣＤ１１６との結合を経て、６量体を形成する。しかし、６量体の状態においてＣＤ１３１の膜貫通領域の距離は１２０Å程度であり、ＪＡＫ２間の距離が遠くシグナルは流れない。さらに、この６量体が２組くみ合わさり、１２量体を形成することで、１２量体中のＣＤ１３１の膜貫通領域間の距離が１０Å程度となり、ＪＡＫ２間の距離が近接し相互リン酸化が可能となり、ＪＡＫ２およびＣＤ１３１細胞内領域チロシン残基のリン酸化が起こり、シグナルが伝達される（非特許文献２、３）。

[0009] これまでに、患者の体内でＧＭ－ＣＳＦに対して過剰な自己抗体が産生さ

れ、ＧＭ－ＣＳＦが中和されることが原因で発症する疾患が報告されている。例えば、後天性の肺胞蛋白症では、高頻度で高濃度の抗ＧＭ－ＣＳＦ自己抗体が認められる（非特許文献４、５）。肺胞蛋白症は肺胞腔内に異常に肺サーファクタントが貯留し呼吸困難となる疾患であるが、自己抗体によってＧＭ－ＣＳＦが中和され、肺胞マクロファージの分化が阻害されることで、肺サーファクタントの処理に異常が生じていると考えられている。またクローン病でも抗ＧＭ－ＣＳＦ自己抗体が認められ、病態形成に寄与していることが報告されている（非特許文献６、７）。

[0010] 組換えＧＭ－ＣＳＦ製剤は、ヨーロッパ、北米、豪州等で１９９０年代に医薬品として承認販売され、癌化学療法後の骨髄抑制、骨髄異形成症候群、再生不良性貧血、骨髄移植後の定着促進などに対して皮下注射剤として用いられる。製剤としては、大腸菌由来のｍｏｌｇｒａｍｏｓｔｉｍと酵母由来のｓａｒｇｒａｍｏｓｔｉｍの２種類があり、両者に顕著な活性差は認められていない（非特許文献８）。これら製剤を用いて、肺胞蛋白症やクローン病の治療が試みられており、特に肺胞蛋白症については治療効果が報告されている（非特許文献９、１０）。

[0011] ＧＭ－ＣＳＦ分子のアミノ酸改変によって自己抗体による中和が軽減された例も報告されているが、その効果はわずかに留まっている（非特許文献１１）。また、ＧＭ－ＣＳＦと同様にＧＭ－ＣＳＦ受容体を介してシグナルを入れる性質を持ちながら、分子としてはＧＭ－ＣＳＦと全く異なるＧＭ－ＣＳＦミメティクスとして、受容体結合ペプチドをリンカーで接続した研究が報告されている（特許文献１）。

先行技術文献

特許文献

[0012] 特許文献1：国際公開第２０１８／２２７１４２号

特許文献2：国際公開第２０１７／０２１５４０号

非特許文献

[0013] 非特許文献1：Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 5592-5596 (1994)

非特許文献2：Cell, 134, 496-507 (2008)

非特許文献3：Cytokine, 74, 247-258 (2015)

非特許文献4：J. Exp. Med., 190, 875-880 (1999)

非特許文献5：Blood, 113, 2547-2556 (2009)

非特許文献6：Gastroenterology, 136, 1261-1271 (2009)

非特許文献7：Inflamm. Bowel Dis., 19, 1671-1680 (2013)

非特許文献8：Eur J Haematol., 55, 348-356 (1995)

非特許文献9：N Engl J Med., 381, 923-932 (2019)

非特許文献10：N Engl J Med., 352, 2193-2201 (2005)

非特許文献11：Protein Eng Des Sel., 28, 461-466 (2015)

非特許文献12：Blood, 103, 1089-1098 (2004)

非特許文献13：EbioMedicine, 30, 730-743 (2015)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0014] 従来研究されてきたＧＭ－ＣＳＦ受容体結合ペプチドは薬効が不十分であるという課題があるが、その原因として、ＧＭ－ＣＳＦ受容体結合ペプチドはＧＭ－ＣＳＦ配列由来であるため、患者の自己抗体により中和される可能性が考えられる。ＧＭ－ＣＳＦに対する自己抗体がＧＭ－ＣＳＦの様々なエピトープに対して産生されていること（非特許文献１２）を考慮すると、患者の自己抗体によるＧＭ－ＣＳＦ受容体ペプチドの中和を、投与ペプチドの分子改変で解決することは困難であると考えられる。

[0015] 一方で、エリスロポイエチン受容体や成長ホルモン受容体のようなホモ二量体からなる受容体のみならず、インターロイキン２（ＩＬ－２）受容体や、繊維芽鎖相棒増殖因子（ＦＧＦ）受容体とβ－Ｋｌｏｔｈｏタンパク複合体といったヘテロ二量体（多量体）からなる受容体に対しても、バイスペシフィック抗体を用いることでアゴニスト取得が可能であることが示されている（非特許文献１３、特許文献２）。しかし、ＧＭ－ＣＳＦ受容体アゴニストについてはこれまで報告されていない。上述のようにＧＭ－ＣＳＦ受容体

の活性化メカニズムは非常に複雑であるため、アゴニスト活性を有する物質の作製は容易ではないと考えられる。ＧＭ－ＣＳＦ受容体へのアゴニスト活性を発揮するためには、ＧＭ－ＣＳＦとの結合によって生じるＣＤ１１６とＣＤ１３１の距離・角度の変化、複合体の形成を模倣する必要があると考えられる。

[0016] 本発明はかかる状況をかんがみて為されたものであり、ＧＭ－ＣＳＦ受容体に対するアゴニスト活性を有するバイスペシフィック抗体、該バイスペシフィック抗体断片、該バイスペシフィック抗体またはバイスペシフィック抗体断片をコードするＤＮＡ、該ＤＮＡを含むベクター、該バイスペシフィック抗体またはバイスペシフィック抗体断片を生産するハイブリドーマおよび形質転換株、該バイスペシフィック抗体またはバイスペシフィック抗体断片の製造方法、該バイスペシフィック抗体またはバイスペシフィック抗体断片を含む治療および診断薬、該バイスペシフィック抗体またはバイスペシフィック抗体断片を用いる治療および診断方法、ならびに該バイスペシフィック抗体またはバイスペシフィック抗体断片を含む検出または測定試薬の提供を目的とする。

課題を解決するための手段

[0017] 本発明者らは、ＧＭ－ＣＳＦ受容体はＣＤ１１６とＣＤ１３１から構成されることから、ＧＭ－ＣＳＦ受容体の構成分子であるＣＤ１１６およびＣＤ１３１に結合する抗原結合ドメインを有するバイスペシフィック抗体の作製により、ＧＭ－ＣＳＦ受容体に対するアゴニスト活性を有するバイスペシフィック抗体が作製できることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0018] すなわち本発明は、以下に関する。

１．第１の抗原結合ドメインおよび第２の抗原結合ドメインを含み、

前記第１の抗原結合ドメインおよび前記第２の抗原結合ドメインのいずれか一方がＣＤ１１６に結合する抗原結合ドメインであり、もう一方がＣＤ１３１に結合する抗原結合ドメインである、バイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

２．Ｇｒａｎｕｌｏｃｙｔｅ ｍａｃｒｏｐｈａｇｅ－ｃｏｌｏｎｙｓｔｉｍｕｌａｔｉｎｇ ｆａｃｔｏｒ（以下、ＧＭ－ＣＳＦと略記する）受容体に対してアゴニスト活性を有する、前記１に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

３．前記第１の抗原結合ドメインおよび前記第２の抗原結合ドメインが、それぞれ重鎖可変領域（以下、ＶＨと略記する）および軽鎖可変領域（以下、ＶＬと略記する）を含む、前記１又は２に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

４．ＣＤ１１６およびＣＤ１３１に１価または２価でそれぞれ結合する、前記１～３のいずれか１に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

５．前記ＣＤ１３１に結合する抗原結合ドメインが、下記（１ａ）～（１ｅ）から選ばれるいずれか１である、前記１～４のいずれか１に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

（１ａ）それぞれ配列番号６１～６３で表されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域（以下、ＣＤＲと略記する）１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号６４～６６で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（１ｂ）それぞれ配列番号６７～６９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号７０～７２で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（１ｃ）それぞれ配列番号７３～７５で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号７６～７８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（１ｄ）それぞれ配列番号７９～８１で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８２～８４で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（１ｅ）それぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ

１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

６．前記ＣＤ１３１に結合する抗原結合ドメインが、下記（１Ａ）～（１Ｅ）から選ばれるいずれか１である、前記１～５のいずれか１に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

（１Ａ）配列番号２１で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号２２で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（１Ｂ）配列番号２３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号２４で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（１Ｃ）配列番号２５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号２６で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（１Ｄ）配列番号２７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号２８で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（１Ｅ）配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

７．前記ＣＤ１１６に結合する抗原結合ドメインが、下記（２ａ）～（２ｑ）および（２ｒ－１）～（２ｒ－１２）から選ばれるいずれか１である、前記１～６のいずれか１に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

（２ａ）それぞれ配列番号３１～３３で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号３４～３６で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｂ）それぞれ配列番号３７～３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号４０～４２で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｃ）それぞれ配列番号４３～４５で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号４６～４８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｄ）それぞれ配列番号４９～５１で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号５２～５４で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｅ）それぞれ配列番号５５～５７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号５８～６０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｆ）それぞれ配列番号１０４～１０６で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｇ）それぞれ配列番号１０７～１０９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｈ）それぞれ配列番号１１０～１１２で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｉ）それぞれ配列番号１１３～１１５で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｊ）それぞれ配列番号１１６～１１８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｋ）それぞれ配列番号１１９～１２１で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｌ）それぞれ配列番号１２２～１２４で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｍ）それぞれ配列番号１２５～１２７で表されるアミノ酸配列を含むＣ

ＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｎ）それぞれ配列番号１２８～１３０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｏ）それぞれ配列番号１３１～１３３で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｐ）それぞれ配列番号１３４～１３６で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｑ）それぞれ配列番号１３７～１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－１）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列中の９番目のアルギニンをリジンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－２）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列中の１７番目のグリシンをアスパラギン酸に置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－３）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列中の９番目のアルギニンをスレオニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３

９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－４）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列中の２番目のフェニルアラニンをロイシンに、９番目のアルギニンをスレオニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－５）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列中の２番目のフェニルアラニンをセリンに、９番目のアルギニンをスレオニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－６）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをバリンに、３番目のセリンをアラニンに、４番目のメチオニンをロイシンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－７）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをフェニルアラニンに、３番目のセリンをアラニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－８）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列の３番目のセリンをア

ラニンに、４番目のメチオニンをロイシンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－９）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをチロシンに、３番目のセリンをアラニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－１０）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをグルタミン酸に置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－１１）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをグルタミン酸に、５番目のチロシンをトリプトファンに、６番目のチロシンをメチオニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－１２）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをフェニルアラニンに、３番目のセリンをアラニンに、４番目のメチオニンをロイシンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で

表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

８．前記ＣＤ１１６に結合する抗原結合ドメインが、下記（２Ａ）～（２Ｙ）および（２Ｚ－１）～（２Ｚ－２０）から選ばれるいずれか１である、前記１～７のいずれか１に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

（２Ａ）配列番号１１で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号１２で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｂ）配列番号１３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号１４で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｃ）配列番号１５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号１６で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｄ）配列番号１７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号１８で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｅ）配列番号１９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号２０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｆ）配列番号９２で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｇ）配列番号９３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｈ）配列番号９４で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｉ）配列番号９５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｊ）配列番号９６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｋ）配列番号９７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｌ）配列番号９８で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｍ）配列番号９９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｎ）配列番号１００で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｏ）配列番号１０１で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｐ）配列番号１０２で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｑ）配列番号１０３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｒ）配列番号１７６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｓ）配列番号１７７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｔ）配列番号１７８で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｕ）配列番号１７９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｖ）配列番号１８２で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｗ）配列番号１８３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｘ）配列番号１８４で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｙ）配列番号１８５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－１）配列番号１９０で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－２）配列番号１９１で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－３）配列番号１９２で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－４）配列番号１９３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－５）配列番号１９４で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－６）配列番号１９５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－７）配列番号１９６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－８）配列番号１９７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－９）配列番号１９８で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－１０）配列番号１９９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－１１）配列番号２００で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－１２）配列番号２０１で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－１３）配列番号２０２で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－１４）配列番号２０３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－１５）配列番号２０４で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－１６）配列番号２０５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－１７）配列番号２０６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－１８）配列番号２０７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－１９）配列番号２０８で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－２０）配列番号２０９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

９．前記第１の抗原結合ドメインがＣＤ１３１に結合する抗原結合ドメインであり、前記第２の抗原結合ドメインがＣＤ１１６に結合する抗原結合ドメインである、前記１～８のいずれか１に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

１０．前記第１の抗原結合ドメインおよび前記第２の抗原結合ドメインがそれぞれＦａｂ（以下、第１のＦａｂ、第２のＦａｂとそれぞれ略記する）であり、

前記第１のＦａｂは、ＶＨおよびＣＨ１ドメインを含む重鎖（VH_1－ＣＨ１）と、軽鎖（ＶＬ－ＣＬ）とを含み、

前記第２のＦａｂは、ＶＨおよびＣＨ１ドメインを含む重鎖（VH_2－ＣＨ１’）と、軽鎖（ＶＬ－ＣＬ）とを含む、

前記１～９のいずれか１に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

１１．前記第１のＦａｂおよび前記第２のＦａｂをそれぞれ１つ、並びにヒンジ領域を含み、

前記第１のＦａｂにおける前記重鎖のＣ末端と、前記第２のＦａｂにおける

前記重鎖のＣ末端とが、前記ヒンジ領域のＮ末端にそれぞれ結合している、前記１０に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

１２.下記第１のポリペプチド、下記第２のポリペプチド、およびヒンジ領域を含み、前記第１のポリペプチドのＣ末端と前記第２のポリペプチドのＣ末端とが前記ヒンジ領域のＮ末端にそれぞれ結合している、前記１０に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

第１のポリペプチド：前記第１のＦａｂ（VH_1－ＣＨ１、ＶＬ－ＣＬ）をＮ末端に少なくとも含む、ポリペプチド。

第２のポリペプチド：前記第２のＦａｂ（VH_2－ＣＨ１’、ＶＬ－ＣＬ）をＣ末端に少なくとも含む、ポリペプチド。

１３．前記第１のＦａｂにおける前記重鎖のＣ末端と、前記第２のＦａｂにおける前記重鎖のＮ末端とが直接またはリンカーを介して結合しているポリペプチド鎖（VH_1－ＣＨ１－VH_2－ＣＨ１’）を２本、およびヒンジ領域を含み、

２本の前記ポリペプチド鎖のＣ末端が前記ヒンジ領域のＮ末端にそれぞれ結合している、前記１０に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

１４．さらにＦｃ領域を含み、前記ヒンジ領域のＣ末端に前記Ｆｃ領域のＮ末端が結合している、前記１１～１３のいずれか１に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

１５．前記バイスペシフィック抗体が下記（ｘ１）～（ｘ１２）および（ｘ１３－１）～（ｘ１３－１２）から選ばれるいずれか１である、前記１～１４のいずれか１に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

（ｘ１）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み

、且つ前記第２の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号１０４～１０６で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ２）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号１０７～１０９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ３）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号１１０～１１２で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ４）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号１１３～１１５で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ５）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み

、且つ前記第２の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号１１６～１１８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ６）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号１１９～１２１で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ７）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号１２２～１２４で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ８）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号１２５～１２７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ９）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み

、且つ前記第２の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号１２８～１３０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１０）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号１３１～１３３で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１１）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号１３４～１３６で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１２）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号１３７～１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１３－１）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬ

を含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列中の９番目のアルギニンをリジンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１３－２）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列中の１７番目のグリシンをアスパラギン酸に置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１３－３）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列中の９番目のアルギニンをスレオニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（Ｘ１３－４）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１３７で表されるアミ

ノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列中の２番目のフェニルアラニンをロイシンに、９番目のアルギニンをスレオニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１３－５）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列中の２番目のフェニルアラニンをセリンに、９番目のアルギニンをスレオニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１３－６）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１３７で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをバリンに、３番目のセリンをアラニンに、４番目のメチオニンをロイシンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１３－７）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ

配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１３７で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをフェニルアラニンに、３番目のセリンをアラニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１３－８）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１３７で表されるアミノ酸配列の３番目のセリンをアラニンに、４番目のメチオニンをロイシンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１３－９）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１３７で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをチロシンに、３番目のセリンをアラニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１３－１０）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをグルタミン酸に置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１３－１１）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをグルタミン酸に、５番目のチロシンをトリプトファンに、６番目のチロシンをメチオニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１３－１２）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１３７で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをフェニルアラニンに、３番目のセリンをアラニンに、４番目のメチオニンをロイシンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含む

ＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

１６．前記バイスペシフィック抗体が下記（ｙ１）～（ｙ１２）および（ｙ１３－１）～（ｙ１３－２０）から選ばれるいずれか１である、前記１～１５のいずれか１に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

（ｙ１）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１７５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ２）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１７６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ３）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１７７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ４）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１７８で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ５）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１７９で表されるアミノ

酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ６）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１８０で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ７）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１８１で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ８）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１８２で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ９）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１８３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１０）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１８４で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１１）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸

配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１８５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１２）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１８６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－１）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１９０で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－２）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１９１で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－３）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１９２で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－４）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１９３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を

含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－５）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１９４で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－６）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１９５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－７）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１９６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－８）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１９７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－９）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１９８で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－１０）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含

むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１９９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－１１）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号２００で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－１２）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号２０１で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－１３）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号２０２で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－１４）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号２０３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－１５）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号２０４で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－１６）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号２０５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－１７）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号２０６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－１８）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号２０７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－１９）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号２０８で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－２０）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号２０９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

１７．前記ポリペプチド鎖が前記第１のＦａｂにおける前記重鎖（VH_1－ＣＨ１）のＣ末端と、前記第２のＦａｂにおける前記重鎖（VH_2－ＣＨ１’）のＮ末端とが直接またはリンカーを介して結合しているポリペプチド鎖であ

り、前記ポリペプチド鎖における（VH_1－ＣＨ１－VH_2）が下記（ｖ１）～（ｖ１２）および（ｖ１３－１）～（ｖ１３－２０）から選ばれるいずれか１である、前記１３または１４に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

（ｖ１）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むVH_1、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１７５で表されるアミノ酸配列を含むVH_2を含む

（ｖ２）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むVH_1、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１７６で表されるアミノ酸配列を含むVH_2を含む

（ｖ３）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むVH_1、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１７７で表されるアミノ酸配列を含むVH_2を含む

（ｖ４）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むVH_1、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１７８で表されるアミノ酸配列を含むVH_2を含む

（ｖ５）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むVH_1、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１７９で表されるアミノ酸配列を含むVH_2を含む

（ｖ６）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むVH_1、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１８０で表されるアミノ酸配列を含むVH_2を含む

（ｖ７）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むVH_1、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１８１で表されるアミノ酸配列を含むVH_2を含む

（ｖ８）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むVH_1、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１８２で表されるアミノ酸配列を含むVH_2を含む

（ｖ９）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１８３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１０）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１８４で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１１）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１８５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１２）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１８６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－１）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１９０で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－２）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１９１で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－３）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１９２で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－４）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１９３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－５）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１９４で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－６）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含

むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１９５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－７）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１９６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－８）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１９７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－９）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１９８で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－１０）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１９９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－１１）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号２００で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－１２）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号２０１で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－１３）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号２０２で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－１４）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号２０３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－１５）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号

２０４で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－１６）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号２０５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－１７）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号２０６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－１８）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号２０７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－１９）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号２０８で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－２０）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号２０９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

１８．前記第１のＦａｂにおける前記重鎖（ＶＨ$_1$－ＣＨ１）のＣ末端と、前記第２のＦａｂにおける前記重鎖（ＶＨ$_2$－ＣＨ１’）のＮ末端とが直接またはリンカーを介して結合している前記ポリペプチド鎖、該ポリペプチド鎖のＣ末端にＮ末端が結合しているヒンジ領域、該ヒンジ領域のＣ末端にＮ末端が結合しているＦｃ領域（ＣＨ２－ＣＨ３）を含む重鎖２本と、軽鎖（ＶＬ－ＣＬ）４本とを含み、

前記ＣＨ１’および前記Ｆｃ領域（ＣＨ２－ＣＨ３）が配列番号１４５～１７２のいずれか１で表されるアミノ酸配列を含み、

前記軽鎖が配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、前記１７に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

Ａ１．ＣＤ１１６およびＣＤ１３１にそれぞれ２価で結合する、前記１～１

８のいずれか１に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

Ａ２．前記第１のＦａｂおよび前記第２のＦａｂをそれぞれ２つ、ヒンジ領域並びにＦｃ領域を含み、

２つの前記第１のＦａｂにおける前記第１の抗原結合ドメインの重鎖のＣ末端がそれぞれ前記ヒンジ領域のＮ末端に結合し、

前記ヒンジ領域のＣ末端が前記Ｆｃ領域のＮ末端に結合し、

前記Ｆｃ領域のＣ末端に、２つの前記第２のＦａｂにおける前記第２の抗原結合ドメインの重鎖のＮ末端がそれぞれ結合している、前記１０、１５、１６およびＡ１のいずれか１に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

Ａ３．前記Ｆｃ領域がＩｇＧ１またはＩｇＧ４サブクラスである、前記１３～１７、Ａ１およびＡ２のいずれか１に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

Ａ４．前記Ｆｃ領域がＩｇＧ１サブクラスであり、ＥＵインデックスで表されるＬ２３４Ａ、Ｌ２３５ＡおよびＧ２３７Ａのアミノ酸残基置換を含む、または前記Ｆｃ領域がＩｇＧ４サブクラスであり、ＥＵインデックスで表されるＳ２２８Ｐ、Ｌ２３５ＥおよびＲ４０９Ｋのアミノ酸残基置換を含む、前記１４～１８およびＡ１～Ａ３のいずれか１に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

Ａ５．前記Ｆｃ領域にさらに、ＥＵインデックスで表されるＨ４３５Ｆのアミノ酸残基置換を含む、前記１４～１８およびＡ１～Ａ４のいずれか１に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

１９．前記１～１８およびＡ１～Ａ５のいずれか１に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片をコードするＤＮＡ。

２０．前記１９に記載のＤＮＡを含有する組換え体ベクター。

２１．前記２０に記載の組換え体ベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。

２２．前記１～１８およびＡ１～Ａ５のいずれか１に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片を有効成分として含有する、ＧＭ－ＣＳＦが関与する疾患の治療および／または診断薬。

Ａ６．前記２１に記載の形質転換株を培地に培養し、培養物中に前記１～１８およびＡ１～Ａ５のいずれか１に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片を生産蓄積させ、該培養物からバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片を採取することを特徴とする前記１～１７およびＡ１～Ａ５のいずれか１に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片の製造方法。

Ａ７．ＧＭ－ＣＳＦが関与する疾患が、ＧＭ－ＣＳＦに対する自己抗体が関与する疾患である、前記２２に記載の治療薬および／または診断薬。

Ａ８．前記１～１８およびＡ１～Ａ５のいずれか１に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片を用いる、ＧＭ－ＣＳＦが関与する疾患の治療および／または診断方法。

Ａ９．ＧＭ－ＣＳＦが関与する疾患がＧＭ－ＣＳＦに対する自己抗体が関与する疾患である、前記Ａ８に記載の治療および／または診断方法。

Ａ１０．ＧＭ－ＣＳＦが関与する疾患の治療および／または診断に使用するための、前記１～１８およびＡ１～Ａ５のいずれか１に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

Ａ１１．ＧＭ－ＣＳＦが関与する疾患がＧＭ－ＣＳＦに対する自己抗体が関与する疾患である、前記Ａ１０に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

Ａ１２．ＧＭ－ＣＳＦが関与する疾患の治療および／または診断薬の製造のための、前記１～１８およびＡ１～Ａ５のいずれか１に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片の使用。

Ａ１３．ＧＭ－ＣＳＦが関与する疾患がＧＭ－ＣＳＦに対する自己抗体が関与する疾患である、前記Ａ１２に記載の使用。

Ａ１４．前記１～１８およびＡ１～Ａ５のいずれか１に記載のバイスペシフ

ィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片を含む、ＣＤ１１６およびＣＤ１３１の少なくとも一方を検出または測定するための試薬。

２３．Ｆｃ領域を含有する抗体をプロテインＡカラムクロマトグラフィーにより精製することを含む、抗体を含有する組成物の精製方法であって、前記抗体は前記Ｆｃ領域においてＨ４３５Ｆの変異が導入されている抗体である、精製方法。

２４．ＣＤ１３１（配列番号２１１）の１６３番目のW、２２１番目のＲを含むエピトープと、ＣＤ１１６（配列番号２１０）の１５６番目のＮ、１５８番目のＫ、１８７番目のＴを含むエピトープとに結合する、前記１～１８のいずれか１に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

発明の効果

[0019] 本発明により、ＣＤ１１６およびＣＤ１３１に結合する新規なバイスペシフィック抗体、ＧＭ－ＣＳＦ受容体に対するアゴニスト活性を有する新規なバイスペシフィック抗体、該バイスペシフィック抗体断片、該バイスペシフィック抗体またはバイスペシフィック抗体断片をコードするＤＮＡ、該ＤＮＡを含むベクター、該バイスペシフィック抗体またはバイスペシフィック抗体断片を生産するハイブリドーマおよび形質転換株、該バイスペシフィック抗体またはバイスペシフィック抗体断片の製造方法、該バイスペシフィック抗体またはバイスペシフィック抗体断片を含む治療および診断薬、該バイスペシフィック抗体またはバイスペシフィック抗体断片を用いる治療および診断方法、ならびに該バイスペシフィック抗体またはバイスペシフィック抗体断片を含む検出または測定試薬を提供できる。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]図１は、ＧＭ－ＣＳＦ受容体の模式図を示す。

[図2]図２は、ＩｇＧ型ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体の模式図を示す。

[図3]図３の（Ａ）および（Ｂ）は、ＩｇＧ型ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイス

ペシフィック抗体のＴＦ－１細胞に対するＧＭ－ＣＳＦ受容体アゴニスト活性を示す。アゴニスト活性は、組換えヒトＧＭ－ＣＳＦ（ｒｈＧＭ－ＣＳＦ）　２００ｐＭ添加時の活性を１００％とした場合のＴＦ－１細胞の増殖率として示す。（Ａ）は、抗ＣＤ１３１抗体としてＣＤ１３１－１６を用いたＩｇＧ型ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体、（Ｂ）は抗ＣＤ１３１抗体としてＣＤ１３１－Ｂ２を用いたＩｇＧ型ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体のアゴニスト活性を示す（２ウェルの平均値）。横軸は、抗体の濃度を示す。

[図4]図４の（Ａ）および（Ｂ）は本発明のバイスペシフィック抗体の構造を示す。図４の（Ａ）はＮ末端型ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体またはＮ末端型ＣＤ１１６－ＣＤ１３１バイスペシフィック抗体の構造を表す。図４の（Ｂ）はＣ末端型ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体またはＣ末端型ＣＤ１１６－ＣＤ１３１バイスペシフィック抗体の構造を表す。

[図5]図５は、ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体のＴＦ－１細胞に対するＧＭ－ＣＳＦ受容体アゴニスト活性を示す。アゴニスト活性は、組換えヒトＧＭ－ＣＳＦ（ｒｈＧＭ－ＣＳＦ）　２００ｐＭ添加時の活性を１００％とした場合のＴＦ－１細胞の増殖率として示す。定常領域はいずれもＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋを使用した。横軸は、抗体の濃度を示す。

[図6]図６は、Ｆｃ領域に変異が挿入されたＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体のＴＦ－１細胞に対するＧＭ－ＣＳＦ受容体アゴニスト活性を示す。アゴニスト活性は、組換えヒトＧＭ－ＣＳＦ（ｒｈＧＭ－ＣＳＦ）　２００ｐＭ添加時の活性を１００％とした場合のＴＦ－１細胞の増殖率として示す（ｎ＝３の平均値±標準偏差）。横軸は、抗体の濃度を示す。

[図7]図７は、Ｆｃ領域に変異が挿入されたＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体のＴＦ－１細胞に対するＧＭ－ＣＳＦ受容体アゴニスト活性を示す。アゴニスト活性は、組換えヒトＧＭ－ＣＳＦ（ｒｈＧＭ－ＣＳＦ）　２００ｐＭ添加時の活性を１００％とした場合のＴＦ－１細胞の増殖率と

して示す。横軸は、抗体の濃度を示す。

[図8]図８は、ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体のヒトＣＤ１４陽性単球に対するアゴニスト活性を示す。ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体を添加した場合の、ヒトＣＤ１４陽性単球表面上のＣＤ２０６の発現変化を示す図である（ｎ＝２の平均値）。定常領域はいずれもＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋを使用した。横軸は、抗体の濃度を示す。

[図9]図９の（Ａ）～（Ｃ）は、ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体が発揮するアゴニスト活性のＧＭ－ＣＳＦ受容体への特異性を示す。ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体の（Ａ）ＧＭ－ＣＳＦ受容体発現Ｂａ／Ｆ３細胞、（Ｂ）ＩＬ－３受容体発現Ｂａ／Ｆ３細胞、（Ｃ）ＩＬ－５受容体発現Ｂａ／Ｆ３細胞へのアゴニスト活性を示す（ｎ＝３の平均値±標準偏差）。定常領域はいずれもＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋを使用した。横軸は、抗体の濃度を示す。

[図10]図１０は、ＧＭ－ＣＳＦ中和抗体が存在する条件下におけるＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体のアゴニスト活性を示す（ｎ＝３の平均値±標準偏差）。定常領域はいずれもＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋを使用した。横軸は、抗体の濃度を示す。

[図11]図１１は、次世代シークエンスシステムを用いて取得された抗ＣＤ１１６抗体から作製されたＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体のＴＦ－１細胞に対するＧＭ－ＣＳＦ受容体アゴニスト活性を示す。アゴニスト活性は、組換えヒトＧＭ－ＣＳＦ（ｒｈＧＭ－ＣＳＦ）　２００ｐＭ添加時の活性を１００％とした場合のＴＦ－１細胞の増殖率として示す（ｎ＝３の平均値±標準偏差）。定常領域はいずれもＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋ　Ｈ４３５Ｆ変異体を使用した。横軸は、抗体の濃度を示す。

[図12]図１２は、アフィニティマチュレーションにより得られた抗ＣＤ１１６抗体から作製されたＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体のＴＦ－１細胞に対するＧＭ－ＣＳＦ受容体アゴニスト活性を示す。アゴニスト活性は、組換えヒトＧＭ－ＣＳＦ（ｒｈＧＭ－ＣＳＦ）　２００ｐＭ添加時

の活性を１００％とした場合のＴＦ－１細胞の増殖率として示す（ｎ＝３の平均値±標準偏差）。定常領域はいずれもＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋ　Ｈ４３５Ｆ変異体を使用した。横軸は、抗体の濃度を示す。

[図13]図１３は、ＣＤ１１６－ＣＤ１３１バイスペシフィック抗体のＴＦ－１細胞に対するＧＭ－ＣＳＦ受容体アゴニスト活性を示す。アゴニスト活性は、組換えヒトＧＭ－ＣＳＦ（ｒｈＧＭ－ＣＳＦ）　２００ｐＭ添加時の活性を１００％とした場合のＴＦ－１細胞の増殖率として示す（ｎ＝３の平均値±標準偏差）。定常領域はいずれもＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋを使用した。横軸は、抗体の濃度を示す。

[図14]図１４の（Ａ）はＣ末端型ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体のＴＦ－１細胞に対するＧＭ－ＣＳＦ受容体アゴニスト活性を示す。図１４の（Ｂ）はＣ末端型ＣＤ１１６－ＣＤ１３１バイスペシフィック抗体のＴＦ－１細胞に対するＧＭ－ＣＳＦ受容体アゴニスト活性を示す。アゴニスト活性は、組換えヒトＧＭ－ＣＳＦ（ｒｈＧＭ－ＣＳＦ）　１０００ｐＭ添加時の活性を１００％とした場合のＴＦ－１細胞の増殖率として示す（ｎ＝３の平均値±標準偏差）。定常領域はいずれもＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋを使用した。横軸は、抗体の濃度を示す。

[図15]図１５は、ＩｇＧ型バイスペシフィック抗体に変換したＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体のＴＦ－１細胞に対するＧＭ－ＣＳＦ受容体アゴニスト活性を示す。アゴニスト活性は、組換えヒトＧＭ－ＣＳＦ（ｒｈＧＭ－ＣＳＦ）　２００ｐＭ添加時の活性を１００％とした場合のＴＦ－１細胞の増殖率として示す（ｎ＝３の平均値±標準偏差）。

[図16]図１６は、価数を制御したＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体の構造を示す。１１６－４０８　Ｄ３１Ａ＿Ｙ９８　ＶＨは、アミノ酸変異により結合活性を消失した１１６－４０８　ＶＨである。括弧内に（抗ＣＤ１１６抗体の価数×抗ＣＤ１３１抗体の価数）を示す。

[図17]図１７の（Ａ）および（Ｂ）は、図１６に示した価数を制御したＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体のＴＦ－１細胞に対するＧＭ－

ＣＳＦ受容体アゴニスト活性を示す。アゴニスト活性は、組換えヒトＧＭ－ＣＳＦ（ｒｈＧＭ－ＣＳＦ）　１０００ｐＭ添加時の活性を１００％とした場合のＴＦ－１細胞の増殖率として示す（ｎ＝３の平均値±標準偏差）。

[図18]図１８の（Ａ）～（Ｃ）は、Ｆｃ領域にＦｃＲｎへの結合を消失させるアミノ酸変異が挿入されたＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体の、ヒトＦｃＲｎへの結合活性解析の結果を示す。図１８の（Ａ）はＦｃ領域としてＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋ野生型（ＷＴ）を用いた場合のヒトＦｃＲｎへの結合を示すセンサーグラム、図１８の（Ｂ）はＦｃ領域としてＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９　Ｉ２５３Ａ変異体を用いた場合、図１８の（Ｃ）はＦｃ領域としてＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９　Ｈ４３５Ｆを用いた場合のセンサーグラムを示す。Ｉ２５３ＡやＨ４３５Ｆ変異体を用いた場合ではヒトＦｃＲｎへの結合が認められない。縦軸はレゾナンユニット（ＲＵ）を、横軸は時間（ｓｅｃ）を示す。

[図19]図１９は、Ｆｃ領域にＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋ変異体を用いた各ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体各変異体のヒトＦｃＲｎへの結合に関する平衡値プロットを示す。縦軸はレゾナンユニット（ＲＵ）を、横軸はバイスペシフィック抗体濃度（Ｍ，ｍｏｌ／Ｌ）を示す。

[図20]図２０は、Ｆｃ領域にＩｇＧ１ＬＡＬＡＧＡ変異体を用いた各ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体各変異体のヒトＦｃＲｎへの結合に関する平衡値プロットを示す。縦軸はレゾナンユニット（ＲＵ）を、横軸はバイスペシフィック抗体濃度（Ｍ，ｍｏｌ／Ｌ）を示す。

発明を実施するための形態

[0021] 本発明は、ＣＤ１１６およびＣＤ１３１に結合する新規なバイスペシフィック抗体、または、ＧＭ－ＣＳＦ受容体に対するアゴニスト活性を有する新規なバイスペシフィック抗体、該バイスペシフィック抗体断片に関する。

[0022] 本発明におけるＣＤ１１６は、ＣＳＦ２ＲＡ、ＧＭ－ＣＳＦＲα、ＧＭ－ＣＳＦ－Ｒ－ａｌｐｈａ、ＣＤｗ１１６、ＣＳＦ２ＲＡＸ、ＣＳＦ２ＲＡＹ、ＣＳＦ２ＲＸ、ＣＳＦ２ＲＹ、ＧＭＣＳＦＲ、ＧＭＲ、ＭＧＣ３８４８お

よびＭＧＣ４８３８と同義として使用される。

[0023] ＣＤ１１６としては例えば、ＮＣＢＩ（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）においてＧｅｎＢａｎｋ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．Ｐ１５５０９に示されるアミノ酸配列を含むヒトＣＤ１１６に示されるアミノ酸配列を含むサルＣＤ１１６などが挙げられる。また、例えば、ＧｅｎＢａｎｋ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．Ｐ１５５０９に示されるアミノ酸配列において１つ以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつＣＤ１１６の機能を有するポリペプチドが挙げられる。

[0024] ＧｅｎＢａｎｋ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．Ｐ１５５０９に示されるアミノ酸配列と通常７０％以上、好ましくは８０％以上、さらに好ましくは９０％以上の相同性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、最も好ましくは９５％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上および９９％以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつＣＤ１１６の機能を有するポリペプチドも本発明のＣＤ１１６に包含される。

[0025] ＧｅｎＢａｎｋ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．Ｐ１５５０９に示されるアミノ酸配列において１以上のアミノ酸残基が欠失、置換、または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドは、部位特異的変異導入法［Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proceeding of the National Academy of Sciences in USA, 82, 488 (1985)］などを用いて、例えば、ＧｅｎＢａｎｋ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．Ｐ１５５０９に示されるアミノ酸配列をコードするＤＮＡに、部位特異的変異を導入することにより得ることができる。欠失、置換または付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、好ましくは１個～数十個、例えば、１～２０個、より好ましくは１個～数個、例えば、１～５個のアミノ酸である。

[0026] ＣＤ１１６をコードする遺伝子としては、例えば、配列番号６またはＧｅｎＢａｎｋ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．Ｘ１７６４８に示されるヒトＣＤ１１６の塩基配列、および配列番号７に示されるサルＣＤ１１６の塩基配列などが挙げられる。

[0027] また、例えば配列番号６、ＧｅｎＢａｎｋ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．Ｘ１７６４８または配列番号７に示される塩基配列において１以上の塩基が欠失、置換または付加された塩基配列からなり、かつＣＤ１１６の機能を有するポリペプチドをコードするＤＮＡを含む遺伝子、配列番号６、ＧｅｎＢａｎｋ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．Ｘ１７６４８または配列番号７に示される塩基配列と好ましくは６０％以上の相同性を有する塩基配列、より好ましくは８０％以上の相同性を有する塩基配列、さらに好ましくは９５％以上の相同性を有する塩基配列からなり、かつＣＤ１１６の機能を有するポリペプチドをコードするＤＮＡを含む遺伝子、並びに配列番号６、ＧｅｎＢａｎｋ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．Ｘ１７６４８または配列番号７に示される塩基配列からなるＤＮＡとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡからなり、かつＣＤ１１６の機能を有するポリペプチドをコードするＤＮＡを含む遺伝子なども、本発明のＣＤ１１６をコードする遺伝子に包含される。

[0028] ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡとしては、例えば配列番号６、ＧｅｎＢａｎｋ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．Ｘ１７６４８または配列番号７に示される塩基配列を有するＤＮＡをプローブに用いた、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法、サザンブロット・ハイブリダイゼーション法、またはＤＮＡマイクロアレイ法などにより得られるハイブリダイズ可能なＤＮＡを意味する。

[0029] 具体的には、ハイブリダイズしたコロニー若しくはプラーク由来のＤＮＡ、または該配列を有するＰＣＲ産物若しくはオリゴＤＮＡを固定化したフィルターまたはスライドグラスを用いて、０．７～１．０ｍｏｌ／Ｌの塩化ナトリウム存在下、６５℃にてハイブリダイゼーション [Molecular Cloning,

A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)]を行った後、０．１～２倍濃度のＳＳＣ溶液（１倍濃度のＳＳＣ溶液の組成は、１５０ｍｍｏｌ／Ｌ塩化ナトリウム、１５ｍｍｏｌ／Ｌクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、６５℃条件下でフィルターまたはスライドグラスを洗浄することにより同定できるＤＮＡを挙げることができる。ハイブリダイズ可能なＤＮＡとしては、例えば、配列番号６、ＧｅｎＢａｎｋ　ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．Ｘ１７６４８または配列番号７に示される塩基配列と好ましくは６０％以上の相同性を有するＤＮＡ、より好ましくは８０％以上の相同性を有するＤＮＡ、さらに好ましくは９５％以上の相同性を有するＤＮＡを挙げることができる。

[0030] 真核生物のタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列には、しばしば遺伝子の多型が認められる。本発明において用いられる遺伝子内に、このような多型によって塩基配列に小規模な変異を生じた遺伝子も、本発明におけるＣＤ１１６をコードする遺伝子に包含される。

[0031] 本発明における相同性の数値は、特に明示した場合を除き、当業者に公知の相同性検索プログラムを用いて算出される数値であってよいが、塩基配列については、ＢＬＡＳＴ［J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)］においてデフォルトのパラメータを用いて算出される数値など、アミノ酸配列については、ＢＬＡＳＴ２［Nucleic Acids Research,25, 3389 (1997)、Genome Research, 7, 649 (1997)］においてデフォルトのパラメータを用いて算出される数値などが挙げられる。

[0032] ＣＤ１１６のアミノ酸配列の部分配列からなるポリペプチドは、当業者に公知の方法によって作製でき、例えば、ＣＤ１１６の部分配列からなるポリペプチドは、ＧｅｎＢａｎｋ　ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．Ｐ１５５０９に示されるアミノ酸配列をコードするＤＮＡの一部を欠失させ、これを含む発

現ベクターを導入した形質転換体を培養することにより作製できる。

[0033] また、上記の方法で作製されるポリペプチドまたはＤＮＡに基づいて、上記と同様の方法により、例えば、ＧｅｎＢａｎｋ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．Ｐ１５５０９に示されるアミノ酸配列の部分配列において１以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドを得ることができる。

[0034] さらに、ＣＤ１１６のアミノ酸配列の部分配列からなるポリペプチド、またはＣＤ１１６のアミノ酸配列の部分配列において１以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドは、フルオレニルメチルオキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）法、ｔ－ブチルオキシカルボニル（ｔＢｏｃ）法などの化学合成法によって製造することもできる。

[0035] 本発明におけるＣＤ１１６の細胞外領域としては、例えば、ＧｅｎＢａｎｋ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．Ｐ１５５０９に示されるヒトＣＤ１１６のアミノ酸配列を、公知の膜貫通領域予測プログラムＳＯＳＵＩ、ＴＭＨＭＭ ｖｅｒ．２（https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0）またはＥｘＰＡＳｙ Ｐｒｏｔｅｏｍｉｃｓ Ｓｅｒｖｅｒ（http://Ca.expasy.org/）などを用いて予測された領域などが挙げられる。具体的には、ＣＤ１１６の細胞外領域としてはＧｅｎＢａｎｋ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．Ｐ１５５０９の２３番目～３２０番目に示されるアミノ酸配列が挙げられる。

[0036] ＣＤ１１６の機能としては、リガンドであるＧＭ－ＣＳＦの結合［Cytokine Growth Factor Rev., 12, 19(2001)］が挙げられる。ＣＤ１１６を発現する細胞は例えば、単球、顆粒球、およびそれらの前駆細胞や、内皮細胞や線維芽細胞、ランゲルハンス細胞が挙げられる。

[0037] 本発明におけるＣＤ１３１はＣＳＦ２ＲＢ、ＩＬ３ＲＢ、ＩＬ５ＲＢ、ＳＭＤＰ５、ｃｏｍｍｏｎ β ｒｅｃｅｐｔｏｒ、βｃと同義として使用される。ＣＤ１３１としては例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ Ｅｎｔｒｙ．Ｎｏ．Ｐ３２９２７に示されるアミノ酸配列を含むヒトＣＤ１３１、およびＧｅｎＢ

ａｎｋ　ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＸＰ＿０１５３１２７２４＿１示されるアミノ酸配列を含むサルＣＤ１３１などが挙げられる。また、例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｅｎｔｒｙ．Ｎｏ．Ｐ３２９２７またはＧｅｎＢａｎｋ　ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＸＰ＿０１５３１２７２４＿１に示されるアミノ酸配列において１つ以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつＣＤ１３１の機能を有するポリペプチドが挙げられる。

[0038] ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｅｎｔｒｙ．Ｎｏ．Ｐ３２９２７またはＧｅｎＢａｎｋ　ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＸＰ＿０１５３１２７２４＿１に示されるアミノ酸配列と通常７０％以上、好ましくは８０％以上、さらに好ましくは９０％以上の相同性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、最も好ましくは９５％以上、９６％以上、９７％以上、９８％以上および９９％以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつＣＤ１３１の機能を有するポリペプチドも本発明におけるＣＤ１３１に包含される。

[0039] ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｅｎｔｒｙ．Ｎｏ．Ｐ３２９２７またはＧｅｎＢａｎｋ　ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＸＰ＿０１５３１２７２４＿１において１以上のアミノ酸残基が欠失、置換、または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドは、前述の部位特異的変異導入法などを用いて、例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｅｎｔｒｙ．Ｎｏ．Ｐ３２９２７またはＧｅｎＢａｎｋ　ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．ＸＰ＿０１５３１２７２４＿１に示されるアミノ酸配列をコードするＤＮＡに、部位特異的変異を導入することにより得ることができる。欠失、置換または付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、好ましくは１個～数十個、例えば、１～２０個、より好ましくは１個～数個、例えば、１～５個のアミノ酸である。

[0040] ＣＤ１３１をコードする遺伝子としては、例えば、配列番号１またはＧｅｎＢａｎｋ　ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．Ｍ５９９４１に示されるヒトＣＤ１３１の塩基配列、および配列番号２に示されるサルＣＤ１３１の塩基配列などが挙げられる。

[0041] また、例えば配列番号１、ＧｅｎＢａｎｋ　ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．

Ｍ５９９４１または配列番号２に示される塩基配列において１以上の塩基が欠失、置換または付加された塩基配列からなり、かつＣＤ１３１の機能を有するポリペプチドをコードするＤＮＡを含む遺伝子、配列番号１、ＧｅｎＢａｎｋ　ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．Ｍ５９９４１または配列番号２に示される塩基配列と好ましくは６０％以上の相同性を有する塩基配列、より好ましくは８０％以上の相同性を有する塩基配列、さらに好ましくは９５％以上の相同性を有する塩基配列からなり、かつＣＤ１３１の機能を有するポリペプチドをコードするＤＮＡを含む遺伝子、並びに配列番号１、ＧｅｎＢａｎｋ　ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．Ｍ５９９４１または配列番号２に示される塩基配列からなるＤＮＡとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡからなり、かつＣＤ１３１の機能を有するポリペプチドをコードするＤＮＡを含む遺伝子なども、本発明におけるＣＤ１３１をコードする遺伝子に包まれる。

[0042] ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡとしては、前述と同様に、例えば配列番号１またはＧｅｎＢａｎｋ　ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．Ｍ５９９４１または配列番号２に示される塩基配列を有するＤＮＡをプローブに用いた、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法、サザンブロット・ハイブリダイゼーション法、またはＤＮＡマイクロアレイ法などにより得られるハイブリダイズ可能なＤＮＡを意味する。ハイブリダイズ可能なＤＮＡとしては、例えば、配列番号１、ＧｅｎＢａｎｋ　ａｃｃｅｓｓｉｏｎ　Ｎｏ．Ｍ５９９４１または配列番号２に示される塩基配列と好ましくは６０％以上の相同性を有するＤＮＡ、より好ましくは８０％以上の相同性を有するＤＮＡ、さらに好ましくは９５％以上の相同性を有するＤＮＡを挙げることができる。

[0043] 真核生物のタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列には、しばしば遺伝子の多型が認められる。本発明において用いられる遺伝子内に、このような多型によって塩基配列に小規模な変異を生じた遺伝子も、本発明のＣＤ１３１をコードする遺伝子に包含される。

[0044] ＣＤ１３１のアミノ酸配列の部分配列からなるポリペプチドは、ＵｎｉＰｒｏｔ Ｅｎｔｒｙ．Ｎｏ．Ｐ３２９２７またはＧｅｎＢａｎｋ ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．ＸＰ＿０１５３１２７２４＿１に示されるアミノ酸配列をコードするＤＮＡを用いて、前述と同様に当業者に公知の方法によって作製できる。

[0045] 本発明におけるＣＤ１３１の細胞外領域としては、例えばＵｎｉＰｒｏｔ Ｅｎｔｒｙ．Ｎｏ．Ｐ３２９２７に示されるヒトＣＤ１３１のアミノ酸配列を用いて、前述と同様の方法により予測された領域などが挙げられる。具体的には、ＣＤ１３１の細胞外領域としては、ＵｎｉＰｒｏｔ Ｅｎｔｒｙ．Ｎｏ．Ｐ３２９２７の１７番目～４４３番目に示されるアミノ酸配列が挙げられる。

[0046] ＣＤ１３１の機能としては、ＣＤ１１６（ＧＭ－ＣＳＦＲα）、ＣＤ１２３（ＩＬ－３Ｒα）、ＣＤ１２５（ＩＬ－５Ｒα）と会合し、それぞれＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－３、ＩＬ－５のシグナルを細胞内に伝達すること［Cytokine Growth Factor Rev., 12, 19(2001)］が挙げられる。

[0047] ＣＤ１３１を発現する細胞は例えば、単球、顆粒球および初期Ｂ細胞が挙げられる。

[0048] 抗体とは、イムノグロブリンを構成する重鎖の可変領域および重鎖の定常領域、並びに軽鎖の可変領域および軽鎖の定常領域の全部または一部をコードする遺伝子（「抗体遺伝子」と称する）に由来するタンパク質である。本発明の抗体は、いずれのイムノグロブリンクラスおよびサブクラスを有する抗体または抗体断片をも包含する。

[0049] 重鎖（Ｈ鎖）とは、イムノグロブリン分子を構成する２種類のポリペプチドのうち、分子量が大きい方のポリペプチドを指す。重鎖は抗体のクラスとサブクラスを決定する。ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧおよびＩｇＭは、それぞれα鎖、δ鎖、ε鎖、γ鎖およびμ鎖を重鎖として有し、重鎖の定常領域は異なるアミノ酸配列で特徴付けられる。軽鎖（Ｌ鎖）とは、イムノグロブリン分子を構成する２種類のポリペプチドのうち、分子量が小さい方の

ポリペプチドを指す。ヒトの抗体の場合、軽鎖にはκ鎖とλ鎖の２種類が存在する。

[0050] 可変領域（Ｖ領域）とは、通常は、イムノグロブリンのＮ末端側のアミノ酸配列内に存在する多様性に富んだ領域を指す。可変領域以外の部分は多様性の少ない構造をとることから、定常領域（Ｃ領域）と呼ばれる。重鎖と軽鎖の各可変領域は会合して抗原結合部位を形成し、抗原への抗体の結合特性を決定する。

[0051] ヒトの抗体の重鎖では、可変領域はＫａｂａｔらのＥＵインデックス（Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 1991 Fifth edition）における１番目から１１７番目までのアミノ酸配列に該当し、定常領域は１１８番目以降のアミノ酸配列に該当する。ヒトの抗体の軽鎖ではＫａｂａｔらによる番号付け（Ｋａｂａｔ　ｎｕｍｂｅｒｉｎｇ）における１番目から１０７番目までのアミノ酸配列が可変領域に該当し、１０８番目以降のアミノ酸配列が定常領域に該当する。以下、重鎖可変領域または軽鎖可変領域を、ＶＨまたはＶＬと略記する。

[0052] 抗原結合部位は、抗体において抗原を認識し結合する部位であり、抗原決定基（エピトープ）と相補的な立体構造を形成する部位を指す。抗原結合部位は、抗原決定基との間に強い分子間相互作用を生じる。抗原結合部位は、少なくとも３つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含むＶＨおよびＶＬにより構成される。ヒトの抗体の場合、ＶＨおよびＶＬはそれぞれ３つのＣＤＲを有する。これらのＣＤＲを、それぞれＮ末端側から順番にＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３と称する。

[0053] 定常領域のうち、重鎖定常領域または軽鎖定常領域は、それぞれＣＨまたはＣＬと表記される。ＣＨは、重鎖のサブクラスであるα鎖、δ鎖、ε鎖、γ鎖およびμ鎖によって分類される。ＣＨは、Ｎ末端側より順に整列したＣＨ１ドメイン、ヒンジドメイン、ＣＨ２ドメイン、ＣＨ３ドメインから構成され、ＣＨ２ドメインとＣＨ３ドメインとを併せてＦｃ領域という。一方、ＣＬは、Ｃλ鎖およびＣκ鎖とよばれる２つのサブクラスに分類される。

[0054] モノクローナル抗体は、単一性（ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌｉｔｙ）を保持した抗体産生細胞が分泌する抗体であり、単一のエピトープ（抗原決定基ともいう）を認識する。モノクローナル抗体分子同士は同一のアミノ酸配列（１次構造）を有し、単一の構造をとる。ポリクローナル抗体とは、異なるクローンの抗体産生細胞が分泌する抗体分子の集団をいう。オリゴクローナル抗体とは、複数の異なるモノクローナル抗体を混合した抗体分子の集団をいう。

[0055] エピトープは、抗体が認識し、結合する抗原の構造部位をいう。エピトープとしては、例えば、モノクローナル抗体が認識し、結合する単一のアミノ酸配列、アミノ酸配列からなる立体構造、糖鎖が結合したアミノ酸配列および糖鎖が結合したアミノ酸配列からなる立体構造などが挙げられる。

[0056] 本発明におけるモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマにより産生される抗体、および抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した形質転換体により産生される遺伝子組換え抗体を挙げることができる。

[0057] ハイブリドーマは、例えば、抗原を調製し、該抗原を免疫した動物より抗原特異性を有する抗体産生細胞を取得し、さらに、該抗体産生細胞と骨髄腫細胞とを融合させることによって、調製できる。該ハイブリドーマを培養するか、または該ハイブリドーマを動物に投与して該ハイブリドーマを腹水癌化させ、該培養液または腹水を分離、精製することにより、所望のモノクローナル抗体を取得できる。抗原を免疫する動物としては、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができるが、マウス、ラット、ハムスターおよびラビットなどが好適に用いられる。また、このような被免疫動物から抗体産生能を有する細胞を取得し、該細胞にｉｎｖｉｔｒｏで免疫を施した後に、骨髄腫細胞と融合して、ハイブリドーマを作製することもできる。

[0058] 本発明における遺伝子組換え抗体としては、例えば、組換えマウス抗体、組換えラット抗体、組換えハムスター抗体、組換えラビット抗体、ヒト型キメラ抗体（キメラ抗体ともいう）、ヒト化抗体（ＣＤＲ移植抗体ともいう）

およびヒト抗体などの、遺伝子組換え技術により製造される抗体が挙げられる。遺伝子組換え抗体においては、対象とする動物種や目的に応じて、どの動物種由来の重鎖および軽鎖の可変領域並びに定常領域を適用するかを決定できる。例えば、対象とする動物種がヒトの場合には、可変領域をヒトまたはマウスなどの非ヒト動物由来とし、定常領域およびリンカーをヒト由来とすることができる。

[0059] キメラ抗体とは、ヒト以外の動物（非ヒト動物）の抗体のＶＨおよびＶＬと、ヒト抗体のＣＨおよびＣＬとからなる抗体を指す。非ヒト動物としては、マウス、ラット、ハムスターおよびラビットなど、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。キメラ抗体は、モノクローナル抗体を生産する非ヒト動物由来のハイブリドーマより、ＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡを取得し、ヒト抗体のＣＨおよびＣＬをコードするＤＮＡを有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してキメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入して発現させることによって、製造できる。

[0060] ヒト化抗体とは、非ヒト動物抗体のＶＨおよびＶＬのＣＤＲをヒト抗体のＶＨおよびＶＬの対応するＣＤＲに移植した抗体を指す。ＶＨおよびＶＬのＣＤＲ以外の領域はフレームワーク領域（以下、ＦＲと表記する）と称される。ヒト化抗体は、非ヒト動物抗体のＶＨのＣＤＲのアミノ酸配列と任意のヒト抗体のＶＨのＦＲのアミノ酸配列からなるＶＨのアミノ酸配列をコードするｃＤＮＡと、非ヒト動物抗体のＶＬのＣＤＲのアミノ酸配列と任意のヒト抗体のＶＬのＦＲのアミノ酸配列からなるＶＬのアミノ酸配列をコードするｃＤＮＡを構築し、ヒト抗体のＣＨおよびＣＬをコードするＤＮＡを有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト化抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入して発現させることによって、製造できる。

[0061] ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体をいうが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリーおよびヒト抗体産生トランスジェニック動物から得ら

れる抗体なども含まれる。

[0062] ヒト体内に天然に存在する抗体は、例えば、ヒト末梢血リンパ球にＥＢウイルスなどを感染させて不死化し、クローニングすることにより、該抗体を産生するリンパ球を培養し、該培養上清より該抗体を精製することにより取得できる。

[0063] ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒトＢ細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することにより、Ｆａｂ、ｓｃＦｖ（ｓｉｎｇｌｅ ｃｈａｉｎ Ｆｖ）など抗体断片をファージ表面に発現させたライブラリーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として、所望の抗原結合活性を有する抗体断片を表面に発現しているファージを回収できる。該抗体断片は、さらに、遺伝子工学的手法により２本の完全なＨ鎖および２本の完全なＬ鎖からなるヒト抗体分子へ変換できる。

[0064] ヒト抗体産生トランスジェニック動物は、ヒト抗体遺伝子が細胞内に組み込まれた動物を意味する。具体的には、例えば、マウスＥＳ細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該ＥＳ細胞をマウスの初期胚へ移植後、個体を発生させることにより、ヒト抗体産生トランスジェニックマウスを作製できる。ヒト抗体産生トランスジェニック動物由来のヒト抗体は、通常の非ヒト動物で行われているハイブリドーマ作製法を用いてハイブリドーマを取得し、培養することで、培養上清中に抗体を生産蓄積させることにより調製できる。

[0065] 遺伝子組換え抗体のＣＨとしては、ヒトイムノグロブリンに属すればいかなるものでもよいが、ｈｕｍａｎ ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ Ｇ（ｈＩｇＧ）クラスのものが好ましい。さらにｈＩｇＧクラスに属するｈＩｇＧ１、ｈＩｇＧ２、ｈＩｇＧ３およびｈＩｇＧ４といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、遺伝子組換え抗体のＣＬとしては、ヒトイムノグロブリンに属すればいずれのものでもよく、κクラスまたはλクラスのものを用いることができる。

[0066] 本発明において、バイスペシフィック抗体とは、異なる２種類のエピトープそれぞれに特異的に結合する抗原結合ドメインを有するポリペプチドまた

はタンパク質をいう。バイスペシフィック抗体は、単一の抗原の異なるエピトープに結合してもよいし、異なる抗原に結合してもよい。また、異なる抗原に結合する場合、それらの抗原は同一の細胞に存在していてもよいし、異なる細胞に存在していてもよい。

[0067] 本発明のバイスペシフィック抗体は、異なる２種類のエピトープとして、ＣＤ１３１またはＣＤ１１６にそれぞれ特異的に結合する第１の抗原結合ドメインおよび第２の抗原結合ドメインを含む。第１の抗原結合ドメインおよび第２の抗原結合ドメインのいずれか一方がＣＤ１１６に結合する抗原結合ドメインであり、もう一方がＣＤ１３１に結合する抗原結合ドメインである。

[0068] 本発明のバイスペシフィック抗体のエピトープとしては、ＣＤ１３１（配列番号２１１）の１６３番目のトリプトファン（Ｗ）および２２１番目のアルギニン（Ｒ）を含むエピトープと、ＣＤ１１６（配列番号２１０）の１５６番目のアスパラギン（Ｎ）、１５８番目のリシン（Ｋ）および１８７番目のスレオニン（Ｔ）を含むエピトープとが挙げられる。ＣＤ１３１（配列番号２１１）の１６３番目のトリプトファン（Ｗ）および２２１番目のアルギニン（Ｒ）を含むエピトープ、並びにＣＤ１１６（配列番号２１０）の１５６番目のアスパラギン（Ｎ）、１５８番目のリシン（Ｋ）および１８７番目のスレオニン（Ｔ）を含むエピトープはいずれも立体構造のエピトープである。

[0069] 本発明において、ポリペプチド、抗体もしくは該抗体断片またはバイスペシフィック抗体もしくは該バイスペシフィック抗体断片が、ＣＤ１１６および／またはＣＤ１３１に結合することは、例えば、公知の免疫学的検出法、好ましくは蛍光細胞染色法等を用いて、評価したいＣＤ１３１またはＣＤ１１６を発現した細胞と抗体との結合性を確認する方法により確認できる。また、公知の免疫学的検出法 [Monoclonal Antibodies - Principles and Practice, Third Edition, Academic Press (1996) 、Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) 、単クローン抗体実験マ

ニュアル、講談社サイエンティフィック（1987）］などを組み合わせて用いることもできる。

[0070] 本発明のバイスペシフィック抗体または該抗体断片を構成するアミノ酸配列において、１つ以上のアミノ酸残基が欠失、付加、置換または挿入され、かつ上述の抗体またはその抗体断片と同様な活性を有する抗体またはその抗体断片も、本発明のバイスペシフィック抗体またはその抗体断片に包含される。

[0071] 欠失、置換、挿入および／または付加されるアミノ酸の数は１個以上でありその数は特に限定されないが、Molecular Cloning, The Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press （1989）、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 （1985）、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci USA, 82, 488 (1985) などに記載の部位特異的変異導入法等の周知の技術により、欠失、置換、挿入若しくは付加できる程度の数である。例えば、通常１～数十個、好ましくは１～２０個、より好ましくは１～１０個、さらに好ましくは１～５個である。

[0072] 上記の本発明のバイスペシフィック抗体のアミノ酸配列において１つ以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入または付加されたとは、次のことを示す。同一配列中の任意、かつ１若しくは複数のアミノ酸配列中において、１または複数のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入または付加があることを意味する。また、欠失、置換、挿入または付加が同時に生じる場合もあり、置換、挿入または付加されるアミノ酸残基は天然型と非天然型いずれの場合もある。

[0073] 天然型アミノ酸残基としては、例えば、Ｌ－アラニン、Ｌ－アスパラギン、Ｌ－アスパラギン酸、Ｌ－グルタミン、Ｌ－グルタミン酸、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－ロイシン、Ｌ－リジン、Ｌ－アルギニン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－セリン

、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリンおよびＬ－システインなどが挙げられる。

[0074] 以下に、相互に置換可能なアミノ酸残基の好ましい例を示す。同一群に含まれるアミノ酸残基は相互に置換可能である。

[0075] Ａ群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、２－アミノブタン酸、メチオニン、Ｏ－メチルセリン、ｔ－ブチルグリシン、ｔ－ブチルアラニン、シクロヘキシルアラニン

Ｂ群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、２－アミノアジピン酸、２－アミノスベリン酸

Ｃ群：アスパラギン、グルタミン

Ｄ群：リジン、アルギニン、オルニチン、２，４－ジアミノブタン酸、２，３－ジアミノプロピオン酸

Ｅ群：プロリン、３－ヒドロキシプロリン、４－ヒドロキシプロリン

Ｆ群：セリン、スレオニン、ホモセリン

Ｇ群：フェニルアラニン、チロシン

[0076] 本発明のバイスペシフィック抗体または該抗体断片には、非天然アミノ酸が含まれていてもよく、例えば、国際公開第２０１７／０３０１５６号に開示のあるＺリジン誘導体（Ｎ６－（（ベンジルオキシ）カルボニル）－Ｌ－リジン誘導体）、ＴＣＯ＊－Ｌｙｓ（Ｎ６－（（（トランス－シクロオクト－２－エン－１－イル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジン）またはＢＣＮ－Ｌｙｓ（Ｎ６－（（ビシクロ［６．１．０］ノン－４－イン－９－イルメトキシ）カルボニル）－Ｌ－リジン）が挙げられる。

[0077] 本発明のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片は、翻訳後修飾されたいかなるアミノ酸残基を含む抗体をも包含する。翻訳後修飾としては、例えば、Ｈ鎖のＣ末端におけるリジン残基の欠失［リジン・クリッピング（ｌｙｓｉｎｅ　ｃｌｉｐｐｉｎｇ）］およびポリペプチドのＮ末端におけるグルタミン残基のピログルタミン（ｐｙｒｏＧｌｕ）への置換などが挙げられる［Beck et al, Analytical Chemistry, 85, 715-736(201

3)]。

[0078] 本発明のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片としては、例えばＧＭ－ＣＳＦ受容体のアゴニスト活性を有するバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片が挙げられる。

[0079] 本発明のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片としては、ＣＤ１１６およびＣＤ１３１を発現していない細胞にはＧＭ－ＣＳＦ受容体アゴニスト活性を示さず、ＣＤ１１６およびＣＤ１３１を発現した細胞にのみＧＭ－ＣＳＦ受容体のアゴニスト活性を示すバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片が好ましい。

[0080] また、本発明のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片としては、ＣＤ１３１をＧＭ－ＣＳＦ受容体と共通の構成分子として有する、ＩＬ－３受容体やＩＬ－５受容体にはシグナルを入れないものが好ましい。

[0081] 本発明のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片は、同一細胞上に発現しているＣＤ１１６およびＣＤ１３１に結合してもよいし、異なる細胞上に発現しているＣＤ１１６およびＣＤ１３１に結合してもよいが、同一細胞上に発現しているＣＤ１１６およびＣＤ１３１に結合することが好ましい。

[0082] アゴニスト活性とは、受容体に結合し、その受容体の本来のリガンドと同様の細胞内情報伝達を行う活性を言う。

[0083] 本発明のバイスペシフィック抗体は、ＧＭ－ＣＳＦ受容体に対してアゴニスト活性を有することが好ましい。本発明のバイスペシフィック抗体は、ＣＤ１１６およびＣＤ１３１の両方に結合することで、ＧＭ－ＣＳＦと同様にＧＭ－ＣＳＦ受容体に作用して、アゴニスト活性を発揮し得る。

[0084] 本発明において、ＧＭ－ＣＳＦ受容体に対するアゴニスト活性とは、例えばＧＭ－ＣＳＦが、細胞上のＣＤ１１６およびＣＤ１３１の両方に結合することにより、ＧＭ－ＣＳＦ受容体から細胞内にシグナルが伝達された結果、当該細胞の活性化、細胞増殖促進、細胞生存能増加、分化誘導等をする活性

を言う。具体的には、ＧＭ－ＣＳＦ又は本発明のバイスペシフィック抗体がモノサイト上のＣＤ１１６およびＣＤ１３１の両方に結合することにより、ＧＭ－ＣＳＦ受容体からシグナル伝達され、マクロファージへの分化を誘導する活性を言う。

[0085] 本発明のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片としては、ＧＭ－ＣＳＦ受容体に対するアゴニスト活性を有し、ＧＭ－ＣＳＦ受容体に結合後、細胞内にシグナルを伝達するものが好ましい。また、本発明のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片としては、モノサイト上のＧＭ－ＣＳＦ受容体に結合し、マクロファージへの分化誘導能を有するものが好ましい。

[0086] 本発明のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片としては、同一細胞上に発現するＣＤ１１６およびＣＤ１３１に結合したあと、ＧＭ－ＣＳＦ受容体の複合体形成を誘導し、細胞内にシグナルを伝達するものが好ましい。また、本発明のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片としては、モノサイト上のＣＤ１１６およびＣＤ１３１に結合し、マクロファージへの分化誘導能を有するものが好ましい。

[0087] ＧＭ－ＣＳＦ受容体に対するアゴニスト活性は、例えばヒト赤芽球細胞株ＴＦ－１（ＣＲＬ－２００３）などのＧＭ－ＣＳＦ受容体を発現し、ＧＭ－ＣＳＦ依存的に増殖する細胞を用いて、細胞の増殖率、生存率、または生細胞数などを評価することにより確認できる。

[0088] マクロファージへの分化誘導能は、例えば、ヒト末梢血単核球（ＰＢＭＣ）由来モノサイトなどを用いて、モノサイトおよびマクロファージのマーカー分子であるＣＤ１４とＣＤ２０６の発現量の変化、細胞数、および細胞の形態などを評価することにより確認できる。

[0089] すなわち、本発明のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片として、具体的には、ＣＤ１１６およびＣＤ１３１の両方に結合したときに、ＧＭ－ＣＳＦ受容体アゴニストとして作用するもの、および／またはモノサイトに対してマクロファージの分化誘導能を有するバイスペシフ

ィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片などが挙げられる。

[0090] 一分子のバイスペシフィック抗体が有する、抗原に対する抗原結合ドメインの数を、結合の価数と呼ぶ。例えば、本発明において、一分子のバイスペシフィック抗体が、ＣＤ１１６に結合する抗原結合およびＣＤ１３１に結合する抗原結合ドメインを一つずつ有する場合、かかるバイスペシフィック抗体は、ＣＤ１１６およびＣＤ１３１に、それぞれ一価で結合する。

[0091] 本発明のバイスペシフィック抗体は、ＣＤ１１６およびＣＤ１３１に対し１価または２価でそれぞれ結合することが好ましく、アゴニスト活性を向上する観点から２価で結合することがより好ましい。

[0092] 本発明において、第１の抗原結合ドメインおよび第２の抗原結合ドメインは、ＣＤ１３１またはＣＤ１１６をそれぞれ特異的に認識し、結合するものであればいかなるものでもよい。例えば、抗体、リガンド、受容体、および天然に存在する相互作用分子など遺伝子組換え技術によって作製可能なポリペプチド、タンパク質分子およびその断片、並びに該タンパク質分子の低分子または天然物とのコンジュゲート体などいずれの形態であってもよい。

[0093] また、第１の抗原結合ドメインおよび第２の抗原結合ドメインとしては、抗体（以下、イムノグロブリンとも称する）、リガンドおよび受容体など既知の結合分子の結合ドメインを利用して組換えた結合タンパク質でもよく、具体的には各抗原に結合する抗体のＣＤＲを含む組換えタンパク質、ＣＤＲを含む抗体可変領域（ＶＨおよびＶＬ）、抗体可変領域などの抗体断片および各抗原に結合するリガンドの結合ドメインを含む組換えタンパク質などが挙げられる。

[0094] 本発明において、イムノグロブリンドメインとは、イムノグロブリンに類似したアミノ酸配列を持ち、少なくとも２個のシステイン残基が存在する約１００個のアミノ酸残基からなるペプチドを最小単位とする。本発明においてイムノグロブリンドメインは、上記の最小単位のイムノグロブリンドメインを複数含むポリペプチドをも包含する。イムノグロブリンドメインとしては、例えばイムノグロブリン重鎖のＶＨ、ＣＨ１、ＣＨ２およびＣＨ３、並

びにイムノグロブリン軽鎖のＶＬおよびＣＬなどが挙げられる。

[0095] イムノグロブリンの動物種は特に限定されないが、ヒトであることが好ましい。また、イムノグロブリン重鎖の定常領域のサブクラスは、ＩｇＤ、ＩｇＭ、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１、ＩｇＡ２およびＩｇＥのいずれでもよく、好ましくは、ＩｇＧ由来およびＩｇＭ由来が挙げられる。また、イムノグロブリン軽鎖の定常領域のサブクラスは、κおよびλのいずれでもよい。

[0096] また、イムノグロブリンドメインはイムノグロブリン以外のタンパク質にも存在し、例えば主要組織適合抗原（ＭＨＣ）、ＣＤ１、Ｂ７およびＴ細胞受容体（ＴＣＲ）などのイムノグロブリンスーパーファミリーに属するタンパク質が含むイムノグロブリンドメインが挙げられる。本発明のバイスペシフィック抗体に用いるイムノグロブリンドメインとしては、いずれのイムノグロブリンドメインも適用できる。

[0097] ヒトのＩｇＧの場合、ＣＨ１は、ＥＵインデックスで示される１１８番目から２１５番目のアミノ酸配列を有する領域を指す。同様に、ＣＨ２はＫａｂａｔらのＥＵインデックスで示される２３１番目から３４０番目のアミノ酸配列を有する領域を、ＣＨ３はＫａｂａｔらのＥＵインデックスで示される３４１番目から４４７番目のアミノ酸配列を有する領域を各々指す。ＣＨ１とＣＨ２の間には、ヒンジ（蝶番）領域（以下ヒンジと記載することもある）と呼ばれる柔軟性に富んだアミノ酸領域が存在する。ヒンジ領域は、ＫａｂａｔらのＥＵインデックスで示される２１６番目から２３０番目のアミノ酸配列を有する領域を指す。

[0098] ＣＬは、ヒトの抗体のκ鎖の場合には、Ｋａｂａｔ ｎｕｍｂｅｒｉｎｇで示される１０８番目から２１４番目のアミノ酸配列を有する領域を、λ鎖の場合には、１０８番目から２１５番目のアミノ酸配列を有する領域を各々指す。

[0099] 本発明のバイスペシフィック抗体に含まれるＣＤ１３１に結合する抗原結合ドメインとは、ＣＤ１３１の細胞外領域を特異的に認識し、かつ結合する

機能を有する抗原結合ドメインをいう。

[0100] 本発明のバイスペシフィック抗体に含まれるＣＤ１１６に結合する抗原結合ドメインとは、ＣＤ１１６の細胞外領域を特異的に認識し、かつ結合する機能を有する抗原結合ドメインをいう。

[0101] 本発明のバイスペシフィック抗体は、ＣＤ１１６に結合する抗原結合ドメインおよびＣＤ１３１に結合する抗原結合ドメインのほかに、抗体のＦｃ領域を有していてもよい。Ｆｃ領域は、安定性および調製の容易さの観点から、ＩｇＧ１またはＩｇＧ４サブクラスであることが好ましく、各々下記に示すアミノ酸残基置換を含むことがより好ましい。

（１）Ｆｃ領域がＩｇＧ１サブクラスである場合、ＥＵインデックスで表されるＬ２３４Ａ、Ｌ２３５ＡおよびＧ２３７Ａのアミノ酸残基置換を含むことが好ましく、これらのアミノ酸残基置換に加えてＥＵインデックスで表されるＨ４３５Ｆのアミノ酸残基置換を含むことがより好ましい。

（２）Ｆｃ領域がＩｇＧ４サブクラスである場合、ＥＵインデックスで表されるＳ２２８Ｐ、Ｌ２３５ＥおよびＲ４０９Ｋのアミノ酸残基置換を含むことが好ましく、これらのアミノ酸残基置換に加えてＥＵインデックスで表されるＨ４３５Ｆのアミノ酸残基置換を含むことがより好ましい。

[0102] 本発明において抗原結合ドメインとは、ＣＤ１３１またはＣＤ１１６に対する抗原結合能を有していれば、単鎖であっても複数のポリペプチド鎖からなる多量体であってもよい。抗原結合ドメインとしては、例えばＣＤ１３１またはＣＤ１１６に結合する抗体、抗体断片、またはＧＭ－ＣＳＦの部分断片などが挙げられる。

[0103] 本発明において抗原結合ドメインは、各抗原（ＣＤ１３１またはＣＤ１１６）に結合する抗体のＣＤＲを含む、ＶＨおよびＶＬを含むことが好ましい。

[0104] 本発明におけるＣＤ１３１に結合する抗原結合ドメインとしては、下記（１ａ）～（１ｅ）から選ばれるいずれか１である抗原結合ドメインが挙げられる。

（１ａ）それぞれ配列番号６１～６３で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号６４～６６で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（１ｂ）それぞれ配列番号６７～６９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号７０～７２で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（１ｃ）それぞれ配列番号７３～７５で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号７６～７８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（１ｄ）それぞれ配列番号７９～８１で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８２～８４で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（１ｅ）それぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

[0105] 本発明におけるＣＤ１３１に結合する抗原結合ドメインとしては、より具体的には、下記（１Ａ）～（１Ｅ）から選ばれるいずれか１が挙げられる。

（１Ａ）配列番号２１で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号２２で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（１Ｂ）配列番号２３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号２４で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（１Ｃ）配列番号２５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号２６で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（１Ｄ）配列番号２７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号２８で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（１Ｅ）配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

[0106] 本発明におけるＣＤ１１６に結合する抗原結合ドメインとしては、具体的

には例えば、下記（２ａ）～（２ｑ）および（２ｒ－１）～（２ｒ－１２）から選ばれるいずれか１である抗原結合ドメインが挙げられる。

（２ａ）それぞれ配列番号３１～３３で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号３４～３６で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｂ）それぞれ配列番号３７～３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号４０～４２で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｃ）それぞれ配列番号４３～４５で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号４６～４８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｄ）それぞれ配列番号４９～５１で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号５２～５４で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｅ）それぞれ配列番号５５～５７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号５８～６０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｆ）それぞれ配列番号１０４～１０６で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｇ）それぞれ配列番号１０７～１０９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｈ）それぞれ配列番号１１０～１１２で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｉ）それぞれ配列番号１１３～１１５で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるア

ミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｊ）それぞれ配列番号１１６～１１８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｋ）それぞれ配列番号１１９～１２１で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｌ）それぞれ配列番号１２２～１２４で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｍ）それぞれ配列番号１２５～１２７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｎ）それぞれ配列番号１２８～１３０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｏ）それぞれ配列番号１３１～１３３で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｐ）それぞれ配列番号１３４～１３６で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｑ）それぞれ配列番号１３７～１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－１）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列中の９番目のアルギニンをリジンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で

表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－２）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列中の１７番目のグリシンをアスパラギン酸に置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－３）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列中の９番目のアルギニンをスレオニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－４）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列中の２番目のフェニルアラニンをロイシンに、９番目のアルギニンをスレオニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－５）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列中の２番目のフェニルアラニンをセリンに、９番目のアルギニンをスレオニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－６）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをバリンに、３番目のセリンをアラニンに、４番目のメチオニンをロイシンに

置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－７）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをフェニルアラニンに、３番目のセリンをアラニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－８）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列の３番目のセリンをアラニンに、４番目のメチオニンをロイシンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－９）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをチロシンに、３番目のセリンをアラニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－１０）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをグルタミン酸に置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－１１）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをグルタミン酸に、５番目のチロシンをトリプトファンに、６番目のチロシンをメチオニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－１２）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをフェニルアラニンに、３番目のセリンをアラニンに、４番目のメチオニンをロイシンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

[0107] 本発明におけるＣＤ１１６に結合する抗原結合ドメインとしては、より具体的には、下記（２Ａ）～（２Ｙ）および（２Ｚ－１）～（２Ｚ－２０）から選ばれるいずれか１である抗原結合ドメインが挙げられる。

（２Ａ）配列番号１１で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号１２で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｂ）配列番号１３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号１４で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｃ）配列番号１５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号１６で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｄ）配列番号１７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号１８で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｅ）配列番号１９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号２０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｆ）配列番号９２で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｇ）配列番号９３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｈ）配列番号９４で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｉ）配列番号９５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｊ）配列番号９６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｋ）配列番号９７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｌ）配列番号９８で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｍ）配列番号９９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｎ）配列番号１００で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｏ）配列番号１０１で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｐ）配列番号１０２で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｑ）配列番号１０３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｒ）配列番号１７６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｓ）配列番号１７７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｔ）配列番号１７８で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｕ）配列番号１７９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｖ）配列番号１８２で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｗ）配列番号１８３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｘ）配列番号１８４で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｙ）配列番号１８５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－１）配列番号１９０で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－２）配列番号１９１で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－３）配列番号１９２で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－４）配列番号１９３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－５）配列番号１９４で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－６）配列番号１９５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－７）配列番号１９６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－８）配列番号１９７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－９）配列番号１９８で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－１０）配列番号１９９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－１１）配列番号２００で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－１２）配列番号２０１で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－１３）配列番号２０２で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－１４）配列番号２０３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－１５）配列番号２０４で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－１６）配列番号２０５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－１７）配列番号２０６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－１８）配列番号２０７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－１９）配列番号２０８で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－２０）配列番号２０９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

[0108] 本発明のバイスペシフィック抗体の構造としては、第１の抗原結合ドメインと第２の抗原結合ドメインを含んでいれば特に制限されないが、ＧＭ－ＣＳＦ受容体に対するアゴニスト活性を向上する観点から、それぞれＦａｂであることが好ましい。

[0109] 本明細書において、第１の抗原結合ドメインがＦａｂである場合を第１のＦａｂ、第２の抗原結合ドメインがＦａｂである場合を第２のＦａｂとする

。第１のＦａｂは、ＶＨおよびＣＨ１ドメインを含む第１の抗原結合ドメインの重鎖（以下、第１のＦａｂの重鎖と略す）と、ＶＬおよびＣＬを含む軽鎖とを含むことが好ましく、第２のＦａｂは、ＶＨおよびＣＨ１ドメインを含む第２の結合ドメインの重鎖（以下、第２のＦａｂの重鎖と略す）と、ＶＬおよびＣＬを含む軽鎖とを含むことが好ましい。

[0110] 本発明のバイスペシフィック抗体の構造としては、例えば、下記の（１）～（３）に示す構造が挙げられる。

（１）第１のＦａｂ（VH_1－ＣＨ１、ＶＬ－ＣＬ）および第２のＦａｂ（VH_2－ＣＨ１’、ＶＬ－ＣＬ）をそれぞれ１つ、並びにヒンジ領域を含み、第１のＦａｂにおける重鎖のＣ末端と、第２のＦａｂにおける重鎖のＣ末端とが、該ヒンジ領域のＮ末端にそれぞれ結合している構造（以下、ＩｇＧ型とも略称する）。

ＩｇＧ型バイスペシフィック抗体は、安定性および調製時の容易さの観点から、さらにＦｃ領域を含み、該ヒンジ領域のＣ末端に該Ｆｃ領域のＮ末端が結合している構造であることが好ましい。かかる態様のＩｇＧ型バイスペシフィック抗体の模式図を図２に示す。

（２）下記第１のポリペプチド、下記第２のポリペプチド、およびヒンジ領域を含み、第１のポリペプチドのＣ末端と第２のポリペプチドのＣ末端とが前記ヒンジ領域のＮ末端にそれぞれ結合している構造。

第１のポリペプチド：第１のＦａｂ（VH_1－ＣＨ１、ＶＬ－ＣＬ）をＮ末端に少なくとも含む、ポリペプチド。

第２のポリペプチド：第２のＦａｂ（VH_2－ＣＨ１’、ＶＬ－ＣＬ）をＣ末端に少なくとも含む、ポリペプチド。

かかる態様においては、少なくとも、第１のポリペプチドにおける第１のＦａｂの抗原結合性と、第２のポリペプチドにおける第２のＦａｂの抗原結合性とが保持されていることが好ましい。

かかる態様においては、さらにＦｃ領域を含み、前記ヒンジ領域のＣ末端に該Ｆｃ領域のＮ末端が結合している構造を含むことが好ましい。かかる構

造を含むことにより、第１のポリペプチドによりＣＤ１３１に結合し、かつ第２のポリペプチドによりＣＤ１１６に結合する高次構造をより取りやすくなる。その結果、ＣＤ１１６およびＣＤ１３１に対して優れた結合性を示し、ＧＭ－ＣＳＦ受容体に対する高いアゴニスト活性を示すと考えられる。

かかる構造の一態様としては、下記（２－１）～（２－４）が挙げられる。

（２－１）第１のＦａｂと第２のＦａｂとをＮ末端から順に含む第１のポリペプチド、第１のＦａｂと第２のＦａｂとをＮ末端から順に含む第２のポリペプチド、およびヒンジ領域を含む構造。かかる構造において、第１のポリペプチドと第２のポリペプチドは、それぞれ、第１のＦａｂにおける重鎖（VH_1－ＣＨ１）のＣ末端と、第２のＦａｂにおける重鎖（VH_2－ＣＨ１’）のＮ末端とが直接またはリンカーを介して結合しているポリペプチド鎖（VH_1－ＣＨ１－VH_2－ＣＨ１’）を含み、該ポリペプチド鎖のＣ末端が該ヒンジ領域のＮ末端にそれぞれ結合している（以下、かかる構造をＮ末端型とも略称する）。

Ｎ末端型バイスペシフィック抗体は、安定性の観点から、さらにＦｃ領域を含み、該ヒンジ領域のＣ末端に該Ｆｃ領域のＮ末端が結合している構造であることが好ましい。かかる態様のＮ末端型バイスペシフィック抗体の模式図を図４の（Ａ）に示す。具体的な一実施態様としては、例えば、図１６に示されるＧＭ４０８ＷＴ（２×２）が挙げられる。

（２－２)第１のＦａｂと第２のＦａｂとをＮ末端から順に含む第１のポリペプチド、第２のＦａｂを含む第２のポリペプチド、およびヒンジ領域を含む構造。かかる構造においては、第１のポリペプチドは、第１のＦａｂにおける重鎖（VH_1－ＣＨ１）のＣ末端と、第２のＦａｂにおける重鎖（VH_2－ＣＨ１’）のＮ末端とが直接またはリンカーを介して結合しているポリペプチド鎖（VH_1－ＣＨ１－VH_2－ＣＨ１’）を含む。

かかる態様においては、さらにＦｃ領域を含み、前記ヒンジ領域のＣ末端に該Ｆｃ領域のＮ末端が結合している構造を含むことが好ましい。具体的な

一実施態様としては、例えば、図１６に示されるＧＭ４０８ｖ８（２×１）が挙げられる。

（２－３）第１のＦａｂと第２のＦａｂとをＮ末端から順に含む第１のポリペプチド、第２のＦａｂと第２のＦａｂとをＮ末端から順に含む第２のポリペプチド、およびヒンジ領域を含む構造であり、且つ第２のポリペプチドにおけるＮ末端側の第２のＦａｂについて第２の抗原に対する結合活性を失活させる変異がVH_2に導入された構造。

かかる構造においては、第１のポリペプチドは、第１のＦａｂにおける重鎖（VH_1－ＣＨ１）のＣ末端と、第２のＦａｂにおける重鎖（VH_2－ＣＨ１’）のＮ末端とが直接またはリンカーを介して結合しているポリペプチド鎖（VH_1－ＣＨ１－VH_2－ＣＨ１’）を含む。また、第２のポリペプチドは、第２のＦａｂにおける重鎖（VH_2－ＣＨ１）のＣ末端と、第２のＦａｂにおける重鎖（VH_2－ＣＨ１’）のＮ末端とが直接またはリンカーを介して結合しているポリペプチド鎖（VH_2－ＣＨ１－VH_2－ＣＨ１’）を含む。

かかる態様においては、さらにＦｃ領域を含み、前記ヒンジ領域のＣ末端に該Ｆｃ領域のＮ末端が結合している構造を含むことが好ましい。

（２－４）前記（２－１）の構造において、第２のポリペプチドにおける第２のＦａｂについて第２の抗原に対する結合活性を失活させる変異がVH_1に導入された構造。具体的な一実施態様としては、例えば、図１６に示されるＧＭ４０８ｖ２（１×２）が挙げられる。

（２－５）前記（２－３）の構造において、さらに、第１のポリペプチドにおける第２のＦａｂについて第２の抗原に対する結合活性を失活させる変異が重鎖のVH_2に導入された構造。具体的な一実施態様としては、例えば、図１６に示されるＧＭ４０８ｖ３（１×１）が挙げられる。

前記（２－３）～（２－５）において、第２のＦａｂについて第２の抗原に対する結合活性を失活させるための重鎖のVH_2に導入する変異としては、例えば、Ｄ３１ＡおよびＹ９８Ａが挙げられる。

（３）第１のＦａｂ（VH_1－ＣＨ１、ＶＬ－ＣＬ）および第２のＦａｂ（Ｖ

H_2－ＣＨ１’、ＶＬ－ＣＬ）をそれぞれ２つ、ヒンジ領域並びにＦｃ領域を含み、２つの第１のＦａｂにおける重鎖のＣ末端がそれぞれ該ヒンジ領域のＮ末端に結合し、該ヒンジ領域のＣ末端が該Ｆｃ領域のＮ末端に結合し、該Ｆｃ領域のＣ末端に、２つの第２のＦａｂにおける重鎖のＮ末端がそれぞれ結合している構造（以下、Ｃ末端型とも略称する）。Ｃ末端型バイスペシフィック抗体の模式図を図４の（Ｂ）に示す。

[0111] ＧＭ－ＣＳＦ受容体に対するアゴニスト活性を向上する観点から、前記（１）～（３）の構造の中でも、（２）のＮ末端型バイスペシフィック抗体であることが好ましい。

[0112] 抗原結合ドメインを化学連結する際に用いるリンカーは、抗原結合ドメインを化学連結するのに必要な官能基を有しているものであれば特に限定されないが、その分子中にポリオキシエチレン基－（CH_2CH_2O）ｎ－（ｎは１から２０００の整数）を有しているリンカーが好ましい。その繰り返し数ｎは１～１００の整数であることが好ましく、１～２５の整数であることがより好ましい。

[0113] 本発明の抗原結合ドメインに含まれる非天然アミノ酸がアジド基を有する場合、用いるリンカーはアルキニル基を含むものが好ましい。その場合、抗原結合ドメインとリンカーを化学連結する反応として、ヒュスゲン［３＋２］環化付加反応（Kolb et al., Angew Chem Int Ed Engl. 40. 2004-21, 2001）を用いることができる。

[0114] 抗原結合ドメイン間を適切なペプチドリンカーのアミノ酸配列で連結して組換えタンパク質として発現させるバイスペシフィック抗体のペプチドリンカーとしては特に限定されないが、例えば、Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒの繰返し配列であるいわゆるＧＳリンカー、イムノグロブリンドメインまたはその断片を含むリンカーなどが挙げられるが、組換えタンパク質として発現可能であればいずれのアミノ酸配列からなるリンカーも使用できる。

[0115] 本発明のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片は

、第１の抗原結合ドメインがＣＤ１３１に結合する抗原結合ドメインであり、第２の抗原結合ドメインがＣＤ１１６に結合する抗原結合ドメインであることが好ましい。第１の抗原結合ドメインおよび第２の抗原結合ドメインがそれぞれＦａｂである場合、第１のＦａｂがＣＤ１３１に結合する抗原結合ドメインであり、第２のＦａｂがＣＤ１１６に結合する抗原結合ドメインであることが好ましい。

[0116] 本発明のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片として、例えば、第１のＦａｂが以下の（１ａ）～（１ｅ）からなる群より選ばれる１つであり、第２のＦａｂが下記（２ａ）～（２ｑ）および（２ｒ－１）～（２ｒ－１２）からなる群より選ばれる１つであるバイスペシフィック抗体が挙げられる。

（１ａ）それぞれ配列番号６１～６３で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号６４～６６で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（１ｂ）それぞれ配列番号６７～６９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号７０～７２で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（１ｃ）それぞれ配列番号７３～７５で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号７６～７８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（１ｄ）それぞれ配列番号７９～８１で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８２～８４で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（１ｅ）それぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ａ）それぞれ配列番号３１～３３で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号３４～３６で表されるアミノ

酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｂ）それぞれ配列番号３７～３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号４０～４２で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｃ）それぞれ配列番号４３～４５で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号４６～４８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｄ）それぞれ配列番号４９～５１で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号５２～５４で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｅ）それぞれ配列番号５５～５７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号５８～６０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｆ）それぞれ配列番号１０４～１０６で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｇ）それぞれ配列番号１０７～１０９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｈ）それぞれ配列番号１１０～１１２で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｉ）それぞれ配列番号１１３～１１５で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｊ）それぞれ配列番号１１６～１１８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｋ）それぞれ配列番号１１９～１２１で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｌ）それぞれ配列番号１２２～１２４で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｍ）それぞれ配列番号１２５～１２７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｎ）それぞれ配列番号１２８～１３０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｏ）それぞれ配列番号１３１～１３３で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｐ）それぞれ配列番号１３４～１３６で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｑ）それぞれ配列番号１３７～１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－１）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列中の９番目のアルギニンをリジンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－２）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列中の１７番目のグリシンをアスパラギン

酸に置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－３）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列中の９番目のアルギニンをスレオニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－４）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列中の２番目のフェニルアラニンをロイシンに、９番目のアルギニンをスレオニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－５）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列中の２番目のフェニルアラニンをセリンに、９番目のアルギニンをスレオニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－６）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをバリンに、３番目のセリンをアラニンに、４番目のメチオニンをロイシンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－７）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをフェニルアラニンに、３番目のセリンをアラニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－８）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列の３番目のセリンをアラニンに、４番目のメチオニンをロイシンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－９）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをチロシンに、３番目のセリンをアラニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－１０）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをグルタミン酸に置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－１１）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをグルタミン酸に、５番目のチロシンをトリプトファンに、６番目のチロシンをメチオニンに置換する改変

が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－１２）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをフェニルアラニンに、３番目のセリンをアラニンに、４番目のメチオニンをロイシンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

[0117] 本発明のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片として、具体的には例えば、第１のＦａｂが以下の（１Ａ）～（１Ｅ）からなる群より選ばれる１つであり、第２のＦａｂが下記（２Ａ）～（２Ｙ）および（２Ｚ－１）～（２Ｚ－２０）からなる群より選ばれる１つであるバイスペシフィック抗体が挙げられる。

（１Ａ）配列番号２１で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号２２で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（１Ｂ）配列番号２３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号２４で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（１Ｃ）配列番号２５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号２６で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（１Ｄ）配列番号２７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号２８で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（１Ｅ）配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ａ）配列番号１１で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号１２で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｂ）配列番号１３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号１４で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｃ）配列番号１５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号１６で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｄ）配列番号１７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号１８で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｅ）配列番号１９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号２０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｆ）配列番号９２で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｇ）配列番号９３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｈ）配列番号９４で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｉ）配列番号９５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｊ）配列番号９６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｋ）配列番号９７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｌ）配列番号９８で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｍ）配列番号９９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｎ）配列番号１００で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｏ）配列番号１０１で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｐ）配列番号１０２で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｑ）配列番号１０３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｒ）配列番号１７６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｓ）配列番号１７７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｔ）配列番号１７８で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｕ）配列番号１７９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｖ）配列番号１８２で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｗ）配列番号１８３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｘ）配列番号１８４で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｙ）配列番号１８５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－１）配列番号１９０で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－２）配列番号１９１で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－３）配列番号１９２で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－４）配列番号１９３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－５）配列番号１９４で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－６）配列番号１９５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－７）配列番号１９６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－８）配列番号１９７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－９）配列番号１９８で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－１０）配列番号１９９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－１１）配列番号２００で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－１２）配列番号２０１で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－１３）配列番号２０２で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－１４）配列番号２０３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－１５）配列番号２０４で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－１６）配列番号２０５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－１７）配列番号２０６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－１８）配列番号２０７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－１９）配列番号２０８で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－２０）配列番号２０９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

[0118] 後述する表１～３にＣＤ１３１またはＣＤ１１６に結合するＦａｂの各クローン名と、それに含まれるＶＨ、ＶＬ、およびＣＤＲのアミノ酸配列の配列番号を示す。以降、クローン名を用いるときは、これらのＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列を含むＦａｂまたは抗体のことを表す。

[0119] 本発明のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片として、例えば、実施例において後述する、１３１－０３、１３１－１６、１３１－１８、１３１－Ｂ１または１３１－Ｂ２のＶＨおよびＶＬを含む第１のＦａｂと、１１６－０８、１１６－０９、１１６－１８、１１６－２１、１１６－２２、１１６－３９８、１１６－４１２、１１６－４１２ａ、１１６－４１３、１１６－４１３ａ、１１６－４２１、１１６－４２１ａ、１１６－４３３、１１６－４３３ａ、１１６－４３５、１１６－４３９、１１６－４６３、１１６－４６３ａ、１１６－４６４、１１６－４６４ａ、１１６－４６５、１１６－４６５ａ、１１６－４６６、１１６－４６６ａまたは１１６－４０８のＶＨおよびＶＬを含む第２のＦａｂと、を含むバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片が挙げられる。これらのバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片は、Ｎ末端型であることが好ましい。

[0120] 本発明のバイスペシフィック抗体として、以下に限定されるものではないが、例えば下記（ｘ１）～（ｘ１２）および（ｘ１３－１）～（ｘ１３－１２）からなる群より選ばれるいずれか１つが挙げられる。下記（ｘ１）～（ｘ１２）および（ｘ１３－１）～（ｘ１３－１２）において、第１の抗原結合ドメインおよび第２の抗原結合ドメインは、それぞれ第１のＦａｂおよび第２のＦａｂであることが好ましい。

（ｘ１）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み

、且つ前記第２の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号１０４～１０６で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ２）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号１０７～１０９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ３）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号１１０～１１２で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ４）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号１１３～１１５で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ５）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み

、且つ前記第２の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号１１６～１１８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ６）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号１１９～１２１で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ７）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号１２２～１２４で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ８）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号１２５～１２７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ９）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み

、且つ前記第２の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号１２８～１３０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１０）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号１３１～１３３で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１１）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号１３４～１３６で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１２）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号１３７～１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１３－１）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬ

を含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列中の９番目のアルギニンをリジンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１３－２）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列中の１７番目のグリシンをアスパラギン酸に置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１３－３）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列中の９番目のアルギニンをスレオニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（Ｘ１３－４）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１３７で表されるアミ

ノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列中の２番目のフェニルアラニンをロイシンに、９番目のアルギニンをスレオニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１３－５）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列中の２番目のフェニルアラニンをセリンに、９番目のアルギニンをスレオニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１３－６）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１３７で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをバリンに、３番目のセリンをアラニンに、４番目のメチオニンをロイシンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１３－７）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ

配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１３７で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをフェニルアラニンに、３番目のセリンをアラニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１３－８）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１３７で表されるアミノ酸配列の３番目のセリンをアラニンに、４番目のメチオニンをロイシンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１３－９）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１３７で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをチロシンに、３番目のセリンをアラニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１３－１０）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをグルタミン酸に置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１３－１１）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをグルタミン酸に、５番目のチロシンをトリプトファンに、６番目のチロシンをメチオニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１３－１２）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１３７で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをフェニルアラニンに、３番目のセリンをアラニンに、４番目のメチオニンをロイシンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含む

ＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

[0121] 本発明のバイスペシフィック抗体としては、具体的には下記（ｙ１）～（ｙ１２）および（ｙ１３－１）～（ｙ１３－２０）から選ばれるいずれか１が挙げられる。下記（ｙ１）～（ｙ１２）および（ｙ１３－１）～（ｙ１３－２０）において、第１の抗原結合ドメインおよび第２の抗原結合ドメインは、それぞれ第１のＦａｂおよび第２のＦａｂであることが好ましい。

（ｙ１）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１７５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ２）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１７６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ３）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１７７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ４）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１７８で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ５）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを

含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１７９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ６）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１８０で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ７）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１８１で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ８）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１８２で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ９）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１８３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１０）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１８４で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１１）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１８５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１２）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１８６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－１）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１９０で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－２）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１９１で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－３）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１９２で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－４）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１９３で表される

アミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－５）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１９４で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－６）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１９５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－７）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１９６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－８）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１９７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－９）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１９８で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－１０）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるア

ミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１９９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－１１）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号２００で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－１２）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号２０１で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－１３）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号２０２で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－１４）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号２０３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－１５）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号２０４で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列

を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－１６）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号２０５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－１７）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号２０６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－１８）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号２０７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－１９）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号２０８で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－２０）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号２０９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

[0122] 本発明のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片として、好ましくは、１３１－Ｂ２を含む第１のＦａｂと、１１６－３９８、

１１６－４１２ａ、１１６－４１３ａ、１１６－４２１ａ、１１６－４３３ａ、１１６－４３５、１１６－４３９、１１６－４６３ａ、１１６－４６４ａ、１１６－４６５ａ、１１６－４６６ａまたは１１６－４０８を含む第２のＦａｂと、を含むバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片が挙げられる。

[0123] 本発明のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片として、より好ましくは、第１のＦａｂにおける重鎖のＣ末端と、第２のＦａｂにおける重鎖のＮ末端とが直接またはリンカーを介して結合しているポリペプチド鎖を２本、およびヒンジ領域を含み、２本の前記ポリペプチド鎖のＣ末端が前記ヒンジ領域のＮ末端にそれぞれ結合している、バイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片であって、第１のＦａｂおよび第２のＦａｂが下記（ｚ１）～（ｚ１２）のいずれか１である、バイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片が挙げられる。

（ｚ１）第１のＦａｂが１３１－Ｂ２を含み、第２のＦａｂが１１６－３９８を含む

（ｚ２）第１のＦａｂが１３１－Ｂ２を含み、第２のＦａｂが１１６－４１２ａを含む

（ｚ３）第１のＦａｂが１３１－Ｂ２を含み、第２のＦａｂが１１６－４１３ａを含む

（ｚ４）第１のＦａｂが１３１－Ｂ２を含み、第２のＦａｂが１１６－４２１ａを含む

（ｚ５）第１のＦａｂが１３１－Ｂ２を含み、第２のＦａｂが１１６－４３３ａを含む

（ｚ６）第１のＦａｂが１３１－Ｂ２を含み、第２のＦａｂが１１６－４３５を含む

（ｚ７）第１のＦａｂが１３１－Ｂ２を含み、第２のＦａｂが１１６－４３９を含む

（ｚ８）第１のＦａｂが１３１－Ｂ２を含み、第２のＦａｂが１１６－４６

３ａを含む

（ｚ９）第１のＦａｂが１３１－Ｂ２を含み、第２のＦａｂが１１６－４６４ａを含む

（ｚ１０）第１のＦａｂが１３１－Ｂ２を含み、第２のＦａｂが１１６－４６５ａを含む

（ｚ１１）第１のＦａｂが１３１－Ｂ２を含み、第２のＦａｂが１１６－４６６ａを含む

（ｚ１２）第１のＦａｂが１３１－Ｂ２を含み、第２のＦａｂが１１６－４０８を含む

[0124] 本発明のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片の一態様として、具体的には例えば、図４の（Ａ）に示すようにＮ末端型であり、第１のＦａｂにおける重鎖（VH_1－ＣＨ１）のＣ末端と、第２のＦａｂにおける重鎖（VH_2－ＣＨ１’）のＮ末端とが直接またはリンカーを介して結合しているポリペプチド鎖（VH_1－ＣＨ１－VH_2－ＣＨ１’）を含み、該ポリペプチド鎖のＣ末端がヒンジ領域のＮ末端に結合し、該ヒンジ領域のＣ末端にＦｃ領域（ＣＨ２－ＣＨ３）のＮ末端が結合している重鎖（VH_1－ＣＨ１－VH_2－ＣＨ１’－ＣＨ２－ＣＨ３）を２本、および軽鎖（ＶＬ－ＣＬ）を４本含む構造であって、該重鎖においてVH_1は好ましくは配列番号２１、２３、２５、２７および２９のいずれか１で表されるアミノ酸配列、より好ましくは配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含み、且つVH_2は配列番号１７５～１８６のいずれか１で表されるアミノ酸配列を含むことが好ましい。

[0125] 前記態様において、前記重鎖（VH_1－ＣＨ１－VH_2－ＣＨ１’－ＣＨ２－ＣＨ３）における（VH_1－ＣＨ１－VH_2）は、下記（ｖ１）～（ｖ１２）および（ｖ１３－１）～（ｖ１３－２０）から選ばれるいずれか１であることが好ましい。

（ｖ１）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むVH_1、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１７５で

表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ２）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１７６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ３）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１７７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ４）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１７８で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ５）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１７９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ６）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１８０で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ７）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１８１で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ８）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１８２で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ９）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１８３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１０）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１８４で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１１）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１８５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１２）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１８６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－１）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１９０で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－２）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１９１で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－３）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１９２で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－４）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１９３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－５）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１９４で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－６）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１９５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－７）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１９６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－８）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含

むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１９７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－９）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１９８で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－１０）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１９９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－１１）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号２００で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－１２）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号２０１で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－１３）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号２０２で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－１４）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号２０３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－１５）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号２０４で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－１６）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号２０５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－１７）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号

２０６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－１８）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号２０７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－１９）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号２０８で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－２０）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号２０９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

[0126] 前記態様において、前記重鎖における（ＣＨ１’－ＣＨ２－ＣＨ３）は配列番号１４５～１７２のいずれか１で表されるアミノ酸配列を含むことが好ましい。また、前記態様において、前記軽鎖（ＶＬ－ＣＬ）におけるＶＬは配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むことがより好ましい。

[0127] また、本発明のバイスペシフィック抗体には、ＣＤ１１６および／またはＣＤ１３１への結合において、上記いずれかのバイスペシフィック抗体と競合するバイスペシフィック抗体も含まれる。

[0128] さらに、本発明のバイスペシフィック抗体には、上記いずれかのバイスペシフィック抗体が認識するＣＤ１１６および／またはＣＤ１３１のエピトープと同じエピトープを認識するバイスペシフィック抗体、上記いずれかのバイスペシフィック抗体が認識するＣＤ１１６および／またはＣＤ１３１のエピトープの一部を認識するバイスペシフィック抗体、
および、上記いずれかのバイスペシフィック抗体が認識するＣＤ１１６および／またはＣＤ１３１のエピトープを含むエピトープを認識するバイスペシフィック抗体も含まれる。

[0129] 本発明のバイスペシフィック抗体は、抗体の定常領域に起因するエフェクター活性を有していても、有していなくてもよいが、エフェクター活性を有さないものが好ましい。

[0130] エフェクター活性とは、抗体のＦｃ領域を介して引き起こされる抗体依存性の細胞傷害活性を指し、例えば、抗体依存性細胞傷害活性（Ａｎｔｉｂｏｄｙ－Ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ ａｃｔｉｖｉｔｙ；ＡＤＣＣ活性）、補体依存性細胞傷害活性（Ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ－Ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ ａｃｔｉｖｉｔｙ；ＣＤＣ活性）、マクロファージや樹状細胞などの食細胞による抗体依存性貪食活性（Ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ｃｅｌｌｕｌａｒ ｐｈａｇｏｃｙｔｏｓｉｓ ａｃｔｉｖｉｔｙ；ＡＤＣＰ活性）およびオプソニン効果などが挙げられる。

[0131] 本発明においてＡＤＣＣ活性およびＣＤＣ活性は、公知の測定方法［Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993)］を用いて測定することができる。

[0132] ＡＤＣＣ活性とは、標的細胞上の抗原に結合した抗体が、抗体のＦｃ領域を介して免疫細胞のＦｃ受容体と結合することで免疫細胞（ナチュラルキラー細胞など）を活性化し、標的細胞を傷害する活性をいう。

[0133] Ｆｃ受容体（ＦｃＲ）は、抗体のＦｃ領域に結合する受容体であり、抗体の結合によりさまざまなエフェクター活性を誘発する。各ＦｃＲは抗体のサブクラスに対応し、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＡ、ＩｇＭはそれぞれＦｃγＲ、ＦｃεＲ、ＦｃαＲ、ＦｃμＲに特異的に結合する。さらにＦｃγＲには、ＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）、ＦｃγＲＩＩ（ＣＤ３２）およびＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）のサブタイプが存在し、それぞれのサブタイプにはＦｃγＲＩＡ、ＦｃγＲＩＢ、ＦｃγＲＩＣ、ＦｃγＲＩＩＡ、ＦｃγＲＩＩＢ、ＦｃγＲＩＩＣ、ＦｃγＲＩＩＩＡおよびＦｃγＲＩＩＩＢのアイソフォームが存在する。これらの異なるＦｃγＲは異なる細胞上に存在する［Annu. Rev. Immunol. 9:457-492(1991)］。ヒトにおいては、ＦｃγＲＩＩＩＢは好中球に特異的に発現しており、ＦｃγＲＩＩＩＡは単球、ナチュラルキラー細胞（ＮＫ細胞）、マクロファージおよび一部のＴ細胞に発現する。ＦｃγＲＩＩＩＡへの抗体の結合を介して、ＮＫ細胞依存的なＡＤＣＣ活性が誘発され

る。

[0134] ＣＤＣ活性とは、標的細胞上の抗原に結合した抗体が血液中の補体関連タンパク質群からなる一連のカスケード（補体活性化経路）を活性化し、標的細胞を傷害する活性をいう。また、補体の活性化により生じるタンパク質断片により、免疫細胞の遊走および活性化が誘導される。ＣＤＣ活性のカスケードは、まずＣ１ｑがＦｃ領域に結合し、次に２つのセリンプロテアーゼであるＣ１ｒおよびＣ１ｓと結合することで、Ｃ１複合体を形成し開始される。

[0135] 本発明のバイスペシフィック抗体または該抗体断片の抗原発現細胞に対するＣＤＣ活性、またはＡＤＣＣ活性は、公知の測定方法［Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993)］により評価することができる。

[0136] 本発明のバイスペシフィック抗体のエフェクター活性を制御する方法としては、抗体のＦｃ領域（ＣＨ２およびＣＨ３ドメインからなる定常領域）の２９７番目のアスパラギン（Ａｓｎ）に結合するＮ－結合複合型糖鎖の還元末端に存在するＮ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）にα－１，６結合するフコース（コアフコースともいう）の量を制御する方法（国際公開第２００５／０３５５８６号、国際公開第２００２／３１１４０号および国際公開第００／６１７３９号）や、抗体のＦｃ領域のアミノ酸残基の改変により制御する方法（国際公開第００／４２０７２号）などが知られている。

[0137] バイスペシフィック抗体に付加するフコースの量を制御することで、抗体のＡＤＣＣ活性を増加または低下させることができる。例えば、抗体のＦｃに結合しているＮ－結合複合型糖鎖に結合するフコースの含量を低下させる方法として、α１，６－フコース転移酵素遺伝子が欠損した宿主細胞を用いてバイスペシフィック抗体を発現することで、高いＡＤＣＣを有するバイスペシフィック抗体を取得することができる。一方、バイスペシフィック抗体のＦｃに結合しているＮ－結合複合型糖鎖に結合するフコースの含量を増加させる方法として、α１，６－フコース転移酵素遺伝子を導入した宿主細胞を用いて抗体を発現させることで、低いＡＤＣＣ活性を有するバイスペシフ

ィック抗体を取得することができる。

[0138] また、バイスペシフィック抗体のＦｃ領域のアミノ酸残基を改変することでＡＤＣＣ活性やＣＤＣ活性を増加または低下させることができる。例えば、米国特許出願公開第２００７／０１４８１６５号明細書に記載のＦｃ領域のアミノ酸配列を用いることで、バイスペシフィック抗体のＣＤＣ活性を増加させることができる。また、米国特許第６，７３７，０５６号明細書、米国特許第７，２９７，７７５号明細書または米国特許第７，３１７，０９１号明細書などに記載のアミノ酸改変を行うことで、ＡＤＣＣ活性またはＣＤＣ活性を、増加させることも低下させることもできる。

[0139] さらに、上述の方法を組み合わせることにより、エフェクター活性が制御されたバイスペシフィック抗体を取得してもよい。

[0140] 本発明のバイスペシフィック抗体の安定性は、精製過程や一定条件下で保存されたサンプルにおいて形成される凝集体（オリゴマー）量を測定することによって評価することができる。すなわち、同一条件下で凝集体量が低減する場合を、抗体の安定性が向上したものと評価する。凝集体量は、ゲルろ過クロマトグラフィーを含む適当なクロマトグラフィーを用いて凝集した抗体と凝集していない抗体とを分離することによって測定することができる。

[0141] 本発明のバイスペシフィック抗体の生産性は、抗体産生細胞から培養液中に産生される抗体量を測定することによって評価することができる。より具体的には、培養液から産生細胞を除いた培養上清に含まれる抗体の量をＨＰＬＣ法やＥＬＩＳＡ法などの適当な方法で測定することによって評価することができる。

[0142] 本発明において、抗体断片とは、抗原結合部位を含み、該抗原に対する抗原結合活性を有するタンパク質である。例えばＦａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、ｓｃＦｖ、Ｄｉａｂｏｄｙ、ｄｓＦｖ、ＶＨＨまたはＣＤＲを含むペプチドなどが挙げられる。

[0143] Ｆａｂは、ＩｇＧ抗体をタンパク質分解酵素パパインで処理して得られる断片のうち（Ｈ鎖の２２４番目のアミノ酸残基で切断される）、Ｈ鎖のＮ末

端側約半分とＬ鎖全体とがジスルフィド結合（Ｓ－Ｓ結合）で結合した、分子量約５万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

[0144] Ｆ（ａｂ’）$_2$は、ＩｇＧをタンパク質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち（Ｈ鎖の２３４番目のアミノ酸残基で切断される）、Ｆａｂがヒンジ領域のＳ－Ｓ結合を介して結合されたものよりやや大きい、分子量約１０万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

[0145] Ｆａｂ’は、上記Ｆ（ａｂ’）$_2$のヒンジ領域のＳ－Ｓ結合を切断した、分子量約５万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

[0146] ｓｃＦｖは、１本のＶＨと１本のＶＬとを１２残基以上の適当なペプチドリンカー（Ｐ）を用いて連結した、ＶＨ－Ｐ－ＶＬまたはＶＬ－Ｐ－ＶＨポリペプチドであり、抗原結合活性を有する抗体断片である。

[0147] Ｄｉａｂｏｄｙは、抗原結合特異性の同じまたは異なるｓｃＦｖが２量体を形成した抗体断片であり、同じ抗原に対する２価の抗原結合活性、または異なる抗原に対し各々特異的な抗原結合活性を有する抗体断片である。

[0148] ｄｓＦｖは、ＶＨおよびＶＬ中の各１アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを、該システイン残基間のＳ－Ｓ結合を介して結合させたものをいう。

[0149] ＶＨＨは、ナノボディとも言い、ＶＨＨ抗体における重鎖可変領域を指し、他のポリペプチドの存在なしで抗原に結合することができる。

[0150] ＶＨＨ抗体は、アルパカ等のラクダ科の動物およびサメ等の軟骨魚に存在する抗体であり、軽鎖とＣＨ１がなく、重鎖のみからなる。

[0151] ＣＤＲを含むペプチドは、ＶＨまたはＶＬのＣＤＲの少なくとも１領域を含んで構成される。複数のＣＤＲを含むペプチドは、ＣＤＲ同士を直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させることで作製することができる。ＣＤＲを含むペプチドは、本発明のバイスペシフィック抗体のＶＨおよびＶＬのＣＤＲをコードするＤＮＡを構築し、該ＤＮＡを原核生物用発現ベクターまたは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。また

、ＣＤＲを含むペプチドは、Ｆｍｏｃ法またはｔＢｏｃ法などの化学合成法によって製造することもできる。

[0152] 本発明において、バイスペシフィック抗体断片とは、本質的にバイスペシフィック抗体の部分構造からなり、２種類の抗原に対する抗原結合活性を有していれば、いずれのバイスペシフィック抗体の断片であってもよい。

[0153] 本発明のバイスペシフィック抗体又は該バイスペシフィック抗体断片にＦｃが融合したタンパク質、そこにさらに抗体断片が結合した融合タンパク質、該Ｆｃと天然に存在するリガンドまたは受容体とが結合したＦｃ融合タンパク質（イムノアドヘシンともいう）、および複数のＦｃ領域を融合させたＦｃ融合タンパク質等も本発明のバイスペシフィック抗体に包含される。また、抗体のエフェクター活性の増強または欠損、抗体の安定化、および血中半減期の制御を目的とした技術が適用されたＦｃ領域も、本発明のバイスペシフィック抗体に用いることができる。

[0154] 前記した血中半減期の制御を目的とした技術としては、例えば、ｐＨ６．０におけるＦｃＲｎへの結合を切断して、抗体のリサイクリングを阻害する方法が挙げられる。

ｐＨ６．０におけるＦｃＲｎへの結合を切断して、抗体のリサイクリングを阻害する方法としては、例えば、ＥＵインデックスで表される２５３番目のＩｌｅ、３１０番目のＨｉｓ、４３５番目のＨｉｓおよび４３６番目のＴｙｒから選ばれる少なくとも１にアミノ酸残基の改変を導入することが好ましい。かかる改変としては、具体的には例えば、Ｈ４３５Ｆが挙げられる。

ＦｃＲｎは細胞外（ｐＨ７．０－７．５）ではＦｃ領域に結合せず、細胞内に取り込まれたＩｇＧと初期エンドソーム内（ｐＨ６．０）で結合し、ＩｇＧを細胞外にリサイクルすることで血中濃度を維持していると考えられている（Biochemistry, 34, 14649 (1995) DOI: 10.1021/bi00045a005；Nat. Rev. Immunol., 7, 715 (2007) DOI: 10.1038/nri2155）。ｐＨ６．０におけるＦｃ領域とＦｃＲｎの結合に重要な残基は、アミノ酸変異（ＡｌａへのＩ換）導入により結合活性が顕著に低下する部位として探索された結果、上記

したＥＵインデックスで表される２５３番目のＩｌｅ、３１０番目のＨｉｓ、４３５番目のＨｉｓ、４３６番目のＴｙｒと同定されている（J. Immunol., 176, 346(2006);Int. Immunol., 13, 993 (2001)、J. Biol. Chem., 276, 6591 (2001);J. Immunol., 169, 5171 (2002)）。

[0155] 本発明のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片としては、本発明のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片に放射性同位元素、低分子の薬剤、高分子の薬剤、タンパク質または抗体医薬などを化学的または遺伝子工学的に結合させた抗体の誘導体を包含する。

[0156] 本発明におけるバイスペシフィック抗体の誘導体は、本発明のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片のＮ末端側或いはＣ末端側、該バイスペシフィック抗体またはそのバイスペシフィック抗体断片中の適当な置換基或いは側鎖、さらには該バイスペシフィック抗体またはそのバイスペシフィック抗体断片中の糖鎖などに、放射性同位元素、低分子の薬剤、高分子の薬剤、免疫賦活剤、タンパク質または抗体医薬などを化学的手法［抗体工学入門、地人書館（１９９４）］により結合させることで製造することができる。

[0157] また、本発明におけるバイスペシフィック抗体の誘導体は、本発明のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片をコードするＤＮＡと、所望のタンパク質または抗体医薬をコードするＤＮＡとを連結させて、発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを適当な宿主細胞へ導入し発現させる、遺伝子工学的手法により製造することができる。

[0158] 放射性同位元素としては、例えば、^{111}Ｉｎ、^{131}Ｉ、^{125}Ｉ、^{90}Ｙ、^{64}Ｃｕ、^{99}Ｔｃ、^{77}ＬｕまたはAt^{211}などが挙げられる。放射性同位元素は、クロラミンＴ法などによって抗体に直接結合させることができる。また、放射性同位元素をキレートする物質を抗体に結合させてもよい。キレート剤としては、例えば、１－イソチオシアネートベンジル－３－メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸（ＭＸ－ＤＴＰＡ）などが挙げられる。

[0159] 低分子の薬剤としては、例えば、アルキル化剤、ニトロソウレア剤、代謝拮抗剤、抗生物質、植物アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、ホルモン療法剤、ホルモン拮抗剤、アロマターゼ阻害剤、Ｐ糖蛋白阻害剤、白金錯体誘導体、Ｍ期阻害剤若しくはキナーゼ阻害剤などの抗癌剤［臨床腫瘍学、癌と化学療法社（１９９６）］、ハイドロコーチゾン若しくはプレドニゾンなどのステロイド剤、アスピリン若しくはインドメタシンなどの非ステロイド剤、金チオマレート若しくはペニシラミンなどの免疫調節剤、サイクロフォスファミド若しくはアザチオプリンなどの免疫抑制剤またはマレイン酸クロルフェニラミン若しくはクレマシチンのような抗ヒスタミン剤などの抗炎症剤［炎症と抗炎症療法、医歯薬出版株式会社（１９８２）］などが挙げられる。

[0160] 抗癌剤としては、例えば、アミフォスチン（エチオール）、シスプラチン、ダカルバジン（ＤＴＩＣ）、ダクチノマイシン、メクロレタミン（ナイトロジェンマスタード）、ストレプトゾシン、シクロフォスファミド、イホスファミド、カルムスチン（ＢＣＮＵ）、ロムスチン（ＣＣＮＵ）、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、エピルビシン、ゲムシタビン（ゲムザール）、ダウノルビシン、プロカルバジン、マイトマイシン、シタラビン、エトポシド、５－フルオロウラシル、フルオロウラシル、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ブレオマイシン、ダウノマイシン、ペプロマイシン、エストラムスチン、パクリタキセル（タキソール）、ドセタキセル（タキソテア）、アルデスロイキン、アスパラギナーゼ、ブスルファン、カルボプラチン、オキサリプラチン、ネダプラチン、クラドリビン、カンプトテシン、１０－ヒドロキシ－７－エチル－カンプトテシン（ＳＮ３８）、フロクスウリジン、フルダラビン、ヒドロキシウレア、イダルビシン、メスナ、イリノテカン（ＣＰＴ－１１）、ノギテカン、ミトキサントロン、トポテカン、ロイプロリド、メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、ヒドロキシカルバミド、プリカマイシン、ミトタン、ペガスパラガーゼ、ペントスタチン、ピポブロマン、ストレプトゾシン、タモキシフェン、ゴセレリン、リュープロレ

ニン、フルタミド、テニポシド、テストラクトン、チオグアニン、チオテパ、ウラシルマスタード、ビノレルビン、クロラムブシル、ハイドロコーチゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、ビンデシン、ニムスチン、セムスチン、カペシタビン、トムデックス、アザシチジン、ＵＦＴ、オキザロプラチン、ゲフィチニブ（イレッサ）、イマチニブ（ＳＴＩ５７１）、エルロチニブ、ＦＭＳ－ｌｉｋｅ ｔｙｒｏｓｉｎｅ ｋｉｎａｓｅ ３（Ｆｌｔ３）阻害剤、ｖａｓｃｕｌａｒ ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｏｔｒ ｒｅｃｅｐｔｏｒ（ＶＥＧＦＲ）阻害剤、ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ ｒｅｃｅｐｔｏｒ（ＦＧＦＲ）阻害剤、タルセバなどのｅｐｉｄｅｒｍａｌ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ ｒｅｃｅｐｔｏｒ（ＥＧＦＲ）阻害剤、ラディシコール、１７－アリルアミノ－１７－デメトキシゲルダナマイシン、ラパマイシン、アムサクリン、オール－トランスレチノイン酸、サリドマイド、レナリドマイド、アナストロゾール、ファドロゾール、レトロゾール、エキセメスタン、金チオマレート、Ｄ－ペニシラミン、ブシラミン、アザチオプリン、ミゾリビン、シクロスポリン、ラパマイシン、ヒドロコルチゾン、ベキサロテン（タルグレチン）、タモキシフェン、デキサメタゾン、プロゲスチン類、エストロゲン類、アナストロゾール（アリミデックス）、ロイプリン、アスピリン、インドメタシン、セレコキシブ、アザチオプリン、ペニシラミン、金チオマレート、マレイン酸クロルフェニラミン、クロロフェニラミン、クレマシチン、トレチノイン、ベキサロテン、砒素、ボルテゾミブ、アロプリノール、カリケアマイシン、イブリツモマブチウキセタン、タルグレチン、オゾガミン、クラリスロマシン、ロイコボリン、ケトコナゾール、アミノグルテチミド、スラミン、メトトレキセート若しくはメイタンシノイドまたはその誘導体などが挙げられる。

[0161] 低分子の薬剤と本発明のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片とを結合させる方法としては、例えば、グルタールアルデヒドを介して薬剤と該抗体のアミノ基間を結合させる方法、または水溶性カルボ

ジイミドを介して薬剤のアミノ基と該抗体のカルボキシル基とを結合させる方法などが挙げられる。

[0162] 高分子の薬剤としては、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、アルブミン、デキストラン、ポリオキシエチレン、スチレンマレイン酸コポリマー、ポリビニルピロリドン、ピランコポリマー、またはヒドロキシプロピルメタクリルアミドなどが挙げられる。これらの高分子化合物を本発明のバイスペシフィック抗体または抗体断片に結合させることにより、（１）化学的、物理的若しくは生物的な種々の因子に対する安定性の向上、（２）血中半減期の顕著な延長、または（３）免疫原性の消失若しくは抗体産生の抑制、などの効果が期待される［バイオコンジュゲート医薬品、廣川書店（１９９３）］。

[0163] 例えば、ＰＥＧと本発明のバイスペシフィック抗体を結合させる方法としては、ＰＥＧ化修飾試薬と反応させる方法などが挙げられる［バイオコンジュゲート医薬品、廣川書店（１９９３）］。ＰＥＧ化修飾試薬としては、リジンのε－アミノ基への修飾剤（日本国特開昭６１－１７８９２６号公報）、アスパラギン酸およびグルタミン酸のカルボキシル基への修飾剤（日本国特開昭５６－２３５８７号公報）、またはアルギニンのグアニジノ基への修飾剤（日本国特開平２－１１７９２０号公報）などが挙げられる。

[0164] 免疫賦活剤としては、イムノアジュバントとして知られている天然物でもよく、具体例としては、免疫を亢進する薬剤が、β（１→３）グルカン（例えば、レンチナンまたはシゾフィラン）、またはαガラクトシルセラミド（ＫＲＮ７０００）などが挙げられる。

[0165] タンパク質としては、例えば、ＮＫ細胞、マクロファージまたは好中球などの免疫担当細胞を活性化するサイトカイン若しくは増殖因子または毒素タンパク質などが挙げられる。

[0166] サイトカインまたは増殖因子としては、例えば、インターフェロン（以下、ＩＦＮと記す）－α、ＩＦＮ－β、ＩＦＮ－γ、インターロイキン（以下、ＩＬと記す）－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、

ＩＬ－２３、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）、顆粒球／マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）またはマクロファージコロニー刺激因子（Ｍ－ＣＳＦ）などが挙げられる。

[0167] 毒素タンパク質としては、例えば、リシン、ジフテリアトキシンまたはＯＮＴＡＫなどが挙げられ、毒性を調節するためにタンパク質に変異を導入したタンパク毒素も含まれる。

[0168] タンパク質または抗体医薬との融合抗体は、本発明のバイスペシフィック抗体または抗体断片をコードするｃＤＮＡにタンパク質をコードするｃＤＮＡを連結させ、融合抗体をコードするＤＮＡを構築し、該ＤＮＡを原核生物または真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

[0169] 上記抗体の誘導体を検出方法、定量方法、検出用試薬、定量用試薬または診断薬として使用する場合に、本発明のバイスペシフィック抗体またはその抗体断片に結合する薬剤としては、通常の免疫学的検出法または測定法で用いられる標識体が挙げられる。標識体としては、例えば、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼ若しくはルシフェラーゼなどの酵素、アクリジニウムエステル若しくはロフィンなどの発光物質、またはフルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）若しくはテトラメチルローダミンイソチオシアネート（ＲＩＴＣ）、Ａｌｅｘａ（登録商標） Ｆｌｕｏｒ ４８８、Ｒ－ｐｈｙｃｏｅｒｙｔｈｒｉｎ（Ｒ－ＰＥ）などの蛍光物質などが挙げられる。

[0170] 本発明には、ＣＤＣ活性またはＡＤＣＣ活性などの細胞傷害活性を有するバイスペシフィック抗体および該バイスペシフィック抗体断片が包含される。本発明のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片の抗原発現細胞に対するＣＤＣ活性またはＡＤＣＣ活性は公知の測定方法［Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 （1993）］により評価することができる。

[0171] また、本発明は、ＣＤ１１６およびＣＤ１３１を特異的に認識し結合する

バイスペシフィック抗体若しくは該バイスペシフィック抗体断片を含む組成物、または該バイスペシフィック抗体若しくは該バイスペシフィック抗体断片を有効成分として含有する、ＣＤ１１６およびＣＤ１３１の少なくとも一方が関係する疾患、好ましくはＣＤ１１６およびＣＤ１３１の発現細胞が関与する疾患の治療薬に関する。

[0172] ＣＤ１１６およびＣＤ１３１の少なくとも一方が関与する疾患としては、ＣＤ１１６およびＣＤ１３１の少なくとも一方が関与している疾患であればいかなるものでもよいが、例えば、ＧＭ－ＣＳＦが関与する疾患、がん、白血球減少症、各種感染症、アルツハイマー病、ＧＭ－ＣＳＦの中和抗体が関連する疾患などが挙げられる。

[0173] 本発明において、ＧＭ－ＣＳＦが関与する疾患又はＧＭ－ＣＳＦの中和抗体が関与する疾患としては、例えば、メラノーマ、頭頸部がん、乳がん、消化器がん、膵癌、肝細胞がん、前立腺がん、結腸直腸がん、肺がん、腎細胞がん、卵巣がん、化学療法による白血球減少症、骨髄移植による白血球減少症、再生不良性貧血による白血球減少症、骨髄異形成症候群による白血球減少症、骨髄移植における骨髄機能回復、急性骨髄性白血病、慢性骨髄単球性白血病、敗血症、真菌症、ＨＩＶ感染症、インフルエンザウィルス感染症、非結核性抗酸菌感染症、急性呼吸促迫症候群、肺胞蛋白症、クローン病などが挙げられる。

[0174] 本発明のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片、またはこれらの誘導体を含有する治療薬は、有効成分としての該バイスペシフィック抗体若しくは該バイスペシフィック抗体断片、またはこれらの誘導体のみを含むものであってもよいが、通常は薬理学的に許容される１以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野において公知の任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが好ましい。

[0175] 投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが好ましく、例えば、経口投与、または経肺投与、口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内若しくは静脈内などの非経口投与が挙げられる。中でも、静脈内または経肺

投与が好ましい。

[0176] 投与形態としては、例えば、吸入剤、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏またはテープ剤などが挙げられる。

[0177] 投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢および体重などにより異なるが、通常成人１日当たり１０μｇ／ｋｇ～１０ｍｇ／ｋｇである。

[0178] さらに、本発明は、本発明のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片を含有する、ＣＤ１１６およびＣＤ１３１の少なくとも一方の免疫学的検出用若しくは測定用試薬、またはＣＤ１１６およびＣＤ１３１の少なくとも一方が関係する疾患、好ましくはＣＤ１１６およびＣＤ１３１の発現細胞が関与する疾患の診断薬に関する。また、本発明は、本発明のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片を用いた、ＣＤ１１６およびＣＤ１３１の少なくとも一方の免疫学的検出用若しくは測定用方法、ＣＤ１１６およびＣＤ１３１の少なくとも一方が関係する疾患、好ましくはＣＤ１１６およびＣＤ１３１の発現細胞が関与する疾患の治療方法、またはＣＤ１１６およびＣＤ１３１の少なくとも一方が関係する疾患、好ましくはＣＤ１１６およびＣＤ１３１の発現細胞が関与する疾患の診断方法に関する。

[0179] 本発明においてＣＤ１１６およびＣＤ１３１の少なくとも一方の量を検出または測定する方法としては、任意の公知の方法が挙げられる。例えば、免疫学的検出または測定方法などが挙げられる。

[0180] 免疫学的検出または測定方法とは、標識を施した抗原または抗体を用いて、抗体量または抗原量を検出または測定する方法である。免疫学的検出または測定方法としては、例えば、放射免疫測定法（ＲＩＡ）、酵素免疫測定法（ＥＩＡまたはＥＬＩＳＡ）、蛍光免疫測定法（ＦＩＡ）、発光免疫測定法（ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ　ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ）、ウエスタンブロット法または物理化学的手法などが挙げられる。

[0181] 本発明のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片を用いてＣＤ１１６およびＣＤ１３１の少なくとも一方が発現した細胞を検出または測定することにより、ＣＤ１１６およびＣＤ１３１の少なくとも一方が関係する疾患、好ましくはＣＤ１１６およびＣＤ１３１の発現細胞が関与する疾患を診断することができる。

[0182] ＣＤ１１６およびＣＤ１３１の少なくとも一方が発現している細胞の検出には、公知の免疫学的検出法を用いることができるが、例えば、免疫沈降法、免疫細胞染色法、免疫組織染色法または蛍光抗体染色法などが挙げられる。また、例えば、ＦＭＡＴ８１００ＨＴＳシステム（アプライドバイオシステム社製）などの蛍光抗体染色法なども挙げられる。

[0183] 本発明においてＣＤ１１６およびＣＤ１３１の少なくとも一方を検出または測定する対象となる生体試料としては、例えば、組織細胞、血液、血漿、血清、膵液、尿、糞便、組織液または培養液など、ＣＤ１１６およびＣＤ１３１の少なくとも一方が発現した細胞を含む可能性のあるものであれば特に限定されない。

[0184] 本発明のバイスペシフィック抗体若しくは該バイスペシフィック抗体断片、またはこれらの誘導体を含有する診断薬は、目的とする診断方法に応じて、抗原抗体反応を行なうための試薬、該反応の検出用試薬を含んでもよい。抗原抗体反応を行なうための試薬としては、例えば、緩衝剤、塩などが挙げられる。

[0185] 検出用試薬としては、例えば、前記バイスペシフィック抗体若しくは該バイスペシフィック抗体断片、またはこれらの誘導体に結合する標識された二次抗体、または標識に対応した基質などの通常の免疫学的検出または測定法に用いられる試薬が挙げられる。

[0186] 以下、本発明のバイスペシフィック抗体の作製方法、該バイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片の活性評価方法、並びに該バイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片を用いた疾患の治療方法および診断方法について具体的に記載する。

[0187] １．モノクローナル抗体の作製方法

本発明におけるモノクローナル抗体の製造方法は、下記の作業工程を包含する。すなわち、（１）免疫原として使用する抗原の精製および細胞表面に抗原が過剰発現した細胞の作製の少なくとも一方、（２）抗原を動物に免疫した後、血液を採取しその抗体価を検定して脾臓などを摘出する時期を決定し、抗体産生細胞を調製する工程、（３）骨髄腫細胞（ミエローマ）の調製、（４）抗体産生細胞とミエローマとの細胞融合、（５）目的とする抗体を産生するハイブリドーマ群の選別、（６）ハイブリドーマ群からの単クローン（ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ）細胞の分離（クローニング）、（７）場合によっては、モノクローナル抗体を大量に製造するためのハイブリドーマの培養、またはハイブリドーマを移植した動物の飼育、（８）このようにして製造されたモノクローナル抗体の生理活性およびその抗原結合特異性の検討、または標識試薬としての特性の検定、などである。

[0188] 以下、本発明におけるＣＤ１１６およびＣＤ１３１に結合するバイスペシフィック抗体を作製するために使用する、ＣＤ１１６に結合するモノクローナル抗体およびＣＤ１３１に結合するモノクローナル抗体の作製方法を上記の工程に沿って詳述する。該抗体の作製方法はこれに制限されず、例えば脾臓細胞以外の抗体産生細胞およびミエローマを使用することもできる。

[0189] （１）抗原の精製

ＣＤ１１６またはＣＤ１３１を発現させた細胞は、ＣＤ１１６またはＣＤ１３１の全長またはその部分長をコードするｃＤＮＡを含む発現ベクターを、大腸菌、酵母、昆虫細胞または動物細胞などに導入することにより、得ることができる。また、ＣＤ１１６およびＣＤ１３１の少なくとも一方を多量に発現している各種ヒト腫瘍培養細胞またはヒト組織などからＣＤ１１６およびＣＤ１３１の少なくとも一方を精製し、抗原として使用することができる。また、該腫瘍培養細胞または該組織などをそのまま抗原として用いることもできる。さらに、Ｆｍｏｃ法またはｔＢｏｃ法などの化学合成法によりＣＤ１１６またはＣＤ１３１の部分配列を有する合成ペプチドを調製し、抗

原に用いることもできる。

[0190] 本発明で用いられるＣＤ１１６またはＣＤ１３１は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)やCurrent Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)などに記載された方法などを用い、例えば以下の方法により、該ＣＤ１１６またはＣＤ１３１をコードするＤＮＡを宿主細胞中で発現させることで製造することができる。

[0191] ＣＤ１１６またはＣＤ１３１をコードする部分を含む完全長ｃＤＮＡを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換え体ベクターを作製する。上記完全長ｃＤＮＡの代わりに、完全長ｃＤＮＡをもとにして調製された、ポリペプチドをコードする部分を含む適当な長さのＤＮＡ断片を用いてもよい。次に、得られた該組換え体ベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、ＣＤ１１６またはＣＤ１３１を生産する形質転換株を得ることができる。

[0192] 発現ベクターとしては、使用する宿主細胞における自律複製または染色体中への組込みが可能で、かつＣＤ１１６またはＣＤ１３１をコードするＤＮＡを転写できる位置に適当なプロモーターを含有しているものであれば、いずれも用いることができる。

[0193] 宿主細胞としては、例えば、大腸菌などのエシェリヒア属などに属する微生物、酵母、昆虫細胞または動物細胞など、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

[0194] 大腸菌などの原核生物を宿主細胞として用いる場合、組換え体ベクターは、原核生物中で自律複製が可能であるとともに、プロモーター、リボソーム結合配列、ＣＤ１１６またはＣＤ１３１をコードする部分を含むＤＮＡ、並びに転写終結配列を含むベクターであることが好ましい。また、該組換え体ベクターには、転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。さらに、該組換え体ベクターは、プロモーターを制御する遺伝子を含んでもよい。

[0195] 該組換え体ベクターとしては、リボソーム結合配列であるシャイン・ダルガノ配列と開始コドンとの間を適当な距離（例えば、６～１８塩基）に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

[0196] また、該ＣＤ１１６またはＣＤ１３１をコードするＤＮＡの塩基配列としては、宿主内での発現に最適なコドンとなるように塩基を置換することができ、これにより目的とするＣＤ１１６またはＣＤ１３１の生産率を向上させることができる。

[0197] 発現ベクターとしては、使用する宿主細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができ、例えば、ｐＢＴｒｐ２、ｐＢＴａｃ１、ｐＢＴａｃ２（以上、ロシュ・ダイアグノスティックス社製）、ｐＫＫ２３３－２（ファルマシア社製）、ｐＳＥ２８０（インビトロジェン社製）、ｐＧＥＭＥＸ－１（プロメガ社製）、ｐＱＥ－８（キアゲン社製）、ｐＫＹＰ１０（日本国特開昭５８－１１０６００号公報）、ｐＫＹＰ２００［Agricultural Biological Chemistry, 48, 669 (1984) ］、ｐＬＳＡ１［Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989) ］、ｐＧＥＬ１［Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985) ］、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＩＩ ＳＫ（－）（ストラタジーン社製）、ｐＴｒｓ３０［大腸菌ＪＭ１０９／ｐＴｒＳ３０（ＦＥＲＭ ＢＰ－５４０７）より調製］、ｐＴｒｓ３２［大腸菌ＪＭ１０９／ｐＴｒＳ３２（ＦＥＲＭ ＢＰ－５４０８）より調製］、ｐＧＨＡ２［大腸菌ＩＧＨＡ２（ＦＥＲＭ ＢＰ－４００）より調製、日本国特開昭６０－２２１０９１号公報］、ｐＧＫＡ２［大腸菌ＩＧＫＡ２（ＦＥＲＭ ＢＰ－６７９８）より調製、日本国特開昭６０－２２１０９１号公報］、ｐＴｅｒｍ２（米国特許第４，６８６，１９１号明細書、米国特許第４，９３９，０９４号明細書、米国特許第５，１６０，７３５号明細書）、ｐＳｕｐｅｘ、ｐＵＢ１１０、ｐＴＰ５、ｐＣ１９４、ｐＥＧ４００［J. Bacteriol., 172, 2392 （1990）］、ｐＧＥＸ（ファルマシア社製）、ｐＥＴシステム（ノバジェン社製）またはｐＭＥ１８ＳＦＬ３（東洋紡社製）などが挙げられる。

[0198] プロモーターとしては、使用する宿主細胞中で機能するものであればいか

なるものでもよい。例えば、ｔｒｐプロモーター（Ｐｔｒｐ）、ｌａｃプロモーター、ＰＬプロモーター、ＰＲプロモーターまたはＴ７プロモーターなどの、大腸菌またはファージなどに由来するプロモーターが挙げられる。また、例えば、Ｐｔｒｐを２つ直列させたタンデムプロモーター、ｔａｃプロモーター、ｌａｃＴ７プロモーター、またはｌｅｔ　Ｉプロモーターなどの人為的に設計改変されたプロモーターなども挙げられる。

[0199] 宿主細胞としては、例えば、大腸菌ＸＬ１－Ｂｌｕｅ、大腸菌ＸＬ２－Ｂｌｕｅ、大腸菌ＤＨ１、大腸菌ＭＣ１０００、大腸菌ＫＹ３２７６、大腸菌Ｗ１４８５、大腸菌ＪＭ１０９、大腸菌ＨＢ１０１、大腸菌Ｎｏ．４９、大腸菌Ｗ３１１０、大腸菌ＮＹ４９、または大腸菌ＤＨ５αなどが挙げられる。

[0200] 宿主細胞への組換え体ベクターの導入方法としては、使用する宿主細胞へＤＮＡを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法［Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)、Gene, 17, 107 (1982)、Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979)］が挙げられる。

[0201] 動物細胞を宿主として用いる場合、発現ベクターとしては、動物細胞中で機能するものであればいずれも用いることができ、例えば、ｐｃＤＮＡＩ（インビトロジェン社製）、ｐｃＤＭ８（フナコシ社製）、ｐＡＧＥ１０７［日本国特開平３－２２９７９号公報；Cytotechnology, 3, 133 (1990)］、ｐＡＳ３－３（日本国特開平２－２２７０７５号公報）、ｐＣＤＭ８［Nature, 329, 840 (1987)］、ｐｃＤＮＡＩ／Ａｍｐ（インビトロジェン社製）、ｐｃＤＮＡ３．１（インビトロジェン社製）、ｐＲＥＰ４（インビトロジェン社製）、ｐＡＧＥ１０３［J. Biochemistry, 101, 1307 (1987)］、ｐＡＧＥ２１０、ｐＭＥ１８ＳＦＬ３またはｐＫＡＮＴＥＸ９３（国際公開第９７／１０３５４号）などが挙げられる。

[0202] プロモーターとしては、動物細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）のｉｍｍ

ｅｄｉａｔｅ　ｅａｒｌｙ（ＩＥ）遺伝子のプロモーター、ＳＶ４０の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、ＳＲαプロモーターまたはモロニーマウス白血病ウイルスのプロモーター若しくはエンハンサーが挙げられる。また、ヒトＣＭＶのＩＥ遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

[0203] 宿主細胞としては、例えば、ヒトバーキットリンパ腫細胞Ｎａｍａｌｗａ、アフリカミドリザル腎臓由来細胞ＣＯＳ、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞ＣＨＯ、またはヒト白血病細胞ＨＢＴ５６３７（日本国特開昭６３－０００２９９号公報）などが挙げられる。

[0204] 宿主細胞への組換え体ベクターの導入方法としては、動物細胞にＤＮＡを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法［Cytotechnology, 3, 133 (1990)］、リン酸カルシウム法（日本国特開平２－２２７０７５号公報）、またはリポフェクション法［Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)］などが挙げられる。

[0205] 以上のようにして得られるＣＤ１１６またはＣＤ１３１をコードするＤＮＡを組み込んだ組換え体ベクターを保有する微生物、または動物細胞などに由来する形質転換体を培地中で培養し、培養物中に該ＣＤ１１６および／またはＣＤ１３１を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、ＣＤ１１６またはＣＤ１３１を製造することができる。該形質転換体を培地中で培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

[0206] 真核生物由来の細胞で発現させた場合には、糖または糖鎖が付加されたＣＤ１１６またはＣＤ１３１を得ることができる。

[0207] 誘導性のプロモーターを用いた組換え体ベクターで形質転換した微生物を培養する際には、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、ｌａｃプロモーターを用いた組換え体ベクターで形質転換した微生物を培養する場合にはイソプロピル－β－Ｄ－チオガラクトピラノシドなどを

、ｔｒｐプロモーターを用いた組換え体ベクターで形質転換した微生物を培養する場合にはインドールアクリル酸などを、各々培地に添加してもよい。

[0208] 動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、例えば、一般に使用されているＲＰＭＩ１６４０培地［The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)］、ＥａｇｌｅのＭＥＭ培地［Science, 122, 501 (1952)］、ダルベッコ改変ＭＥＭ培地[Virology, 8, 396 (1959)］、１９９培地［Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73, 1 (1950)］、Ｉｓｃｏｖｅ’ｓ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ Ｍｅｄｉｕｍ（ＩＭＤＭ）培地、またはこれら培地に牛胎児血清（ＦＢＳ）などを添加した培地などが挙げられる。培養は、通常ｐＨ６～８、３０～４０℃、５％CO_2存在下などの条件下で１～７日間行う。また、培養中に、必要に応じて、カナマイシン、ペニシリンなどの抗生物質を培地に添加してもよい。

[0209] ＣＤ１１６またはＣＤ１３１をコードする遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、分泌生産または融合タンパク質発現などの方法［Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)］を用いることができる。ＣＤ１１６またはＣＤ１３１の生産方法としては、例えば、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、または宿主細胞外膜上に生産させる方法が挙げられ、使用する宿主細胞や、生産させるＣＤ１１６またはＣＤ１３１の構造を変えることにより、適切な方法を選択することができる。

[0210] 例えば、細胞外領域のアミノ酸配列をコードするＤＮＡに、抗体のＦｃ領域をコードするＤＮＡ、グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）をコードするＤＮＡ、またはＦＬＡＧタグをコードするＤＮＡまたはＨｉｓｔｉｄｉｎｅタグをコードするＤＮＡなどを連結したＤＮＡを作製して、発現し精製することで抗原融合タンパク質を作製することができる。具体的には、例えばＣＤ１１６またはＣＤ１３１の細胞外領域をヒトＩｇＧのＦｃ領域に結合させたＦｃ融合タンパク質、ＣＤ１１６またはＣＤ１３１の細胞外領域とグルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）との融合タンパク質が

挙げられる。

[0211] ＣＤ１１６またはＣＤ１３１が宿主細胞内または宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法［J. Biol. Chem., 264, 17619（1989）］、ロウらの方法［Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 （1989）、Genes Develop., 4, 1288（1990）］、日本国特開平０５－３３６９６３号公報、または国際公開第１９９４／２３０２１号などに記載の方法を用いることにより、ＣＤ１１６またはＣＤ１３１を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。また、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子などを用いた遺伝子増幅系（日本国特開平２－２２７０７５号公報）を利用してＣＤ１１６またはＣＤ１３１の生産量を上昇させることもできる。

[0212] 生産したＣＤ１１６またはＣＤ１３１は、例えば、以下のようにして単離、精製することができる。

[0213] ＣＤ１１６またはＣＤ１３１が細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後に細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液に懸濁後、超音波破砕機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、またはダイノミルなどを用いて細胞を破砕し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離して得られる上清から、通常のタンパク質の単離精製法、すなわち溶媒抽出法、硫安などによる塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル（ＤＥＡＥ）－セファロース、ＤＩＡＩＯＮ ＨＰＡ－７５（三菱ケミカル社製）などのレジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、Ｓ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ ＦＦ（ファルマシア社製）などのレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロースなどのレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、または等電点電気泳動などの電気泳動法などの手法を、単独でまたは組み合わせて用いることで、精製タンパク質を得ることができる。

[0214] ＣＤ１１６またはＣＤ１３１が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、上記と同様に細胞を回収後破砕し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分

として該ＣＤ１１６またはＣＤ１３１の不溶体を回収する。回収した該ＣＤ１１６またはＣＤ１３１の不溶体をタンパク質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈または透析することにより、該ＣＤ１１６またはＣＤ１３１を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法によりポリペプチドの精製タンパク質を得ることができる。

[0215] ＣＤ１１６またはＣＤ１３１またはその糖修飾体などの誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清において該ＣＤ１１６またはＣＤ１３１、またはその糖修飾体などの誘導体を回収することができる。該培養上清を上記と同様に遠心分離などの手法を用いて処理することにより、可溶性画分を取得し、該可溶性画分から上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製タンパク質を得ることができる。

[0216] また、本発明において用いられるＣＤ１１６またはＣＤ１３１は、Ｆｍｏｃ法またはｔＢｏｃ法などの化学合成法によっても製造することができる。具体的には、例えば、アドバンストケムテック社製、パーキン・エルマー社製、ファルマシア社製、プロテインテクノロジインストルメント社製、シンセセル－ベガ社製、パーセプチブ社製、または島津製作所社製などのペプチド合成機を利用して化学合成することができる。

[0217] （２）抗体産生細胞の調製工程

マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ウシ、またはアルパカなどの動物に、（１）で得られる抗原を免疫して、その動物の脾臓、リンパ節または末梢血中の抗体産生細胞を採取する。また、動物としては、例えば、富塚らの文献［Tomizuka. et al., Proc Natl Acad Sci USA., 97, 722 (2000)］に記載されているヒト由来抗体を産生するトランスジェニックマウス、免疫原性を高めるためにＣＤ１１６またはＣＤ１３１のコンディショナルノックアウトマウスなどが被免疫動物として挙げられる。

[0218] 免疫は、フロイントの完全アジュバント、または水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチンなどの適当なアジュバントとともに抗原を投与することにより行う。マウス免疫の際の免疫原投与法は、皮下注射、腹腔内注射、静

脈内注射、皮内注射、筋肉内注射または足蹠注射などいずれでもよいが、腹腔内注射、足蹠注射または静脈内注射が好ましい。抗原が部分ペプチドである場合には、ＢＳＡ（ウシ血清アルブミン）、またはＫＬＨ（Ｋｅｙｈｏｌｅ　Ｌｉｍｐｅｔ　ｈｅｍｏｃｙａｎｉｎ）などのキャリアタンパク質とのコンジュゲート体を作製し、これを免疫原として用いる。

[0219] 抗原の投与は、１回目の投与の後、１～２週間おきに５～１０回行う。各投与後３～７日目に眼底静脈叢より採血し、その血清の抗体価を酵素免疫測定法［Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory（1988）］などを用いて測定する。免疫に用いた抗原に対し上記の血清が十分な抗体価を示した動物を、融合用抗体の産生細胞の供給源として用いれば、以後の操作の効果を高めることができる。

[0220] 抗原の最終投与後３～７日目に、免疫した動物より脾臓などの抗体産生細胞を含む組織を摘出し、抗体産生細胞を採取する。抗体産生細胞は、形質細胞およびその前駆細胞であるリンパ球であり、これは個体のいずれの部位から得てもよく、一般には脾臓、リンパ節、骨髄、扁桃、末梢血、またはこれらを適宜組み合わせたもの等から得ることができるが、脾臓細胞が最も一般的に用いられる。脾臓細胞を用いる場合には、脾臓を細断してほぐした後、遠心分離し、さらに赤血球を除去することにより、融合用抗体産生細胞を取得する。

[0221]（３）ミエローマの調製工程

ミエローマとしては、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギまたはヒト等の哺乳動物に由来する自己抗体産生能のない細胞を用いることが出来るが、一般的にはマウスから得られた株化細胞、例えば、８－アザグアニン耐性マウス（ＢＡＬＢ／ｃ由来）ミエローマ細胞株Ｐ３－Ｘ６３Ａｇ８－Ｕ１（Ｐ３－Ｕ１）［Current Topics in Microbiology and Immunology, 18, 1（1978）］、Ｐ３－ＮＳ１／１－Ａｇ４１（ＮＳ－１）［European J. Immunology, 6, 511（1976）］、ＳＰ２／０－Ａｇ１４（ＳＰ－２）［Nature, 276, 269（1978）］、Ｐ３－Ｘ６３－Ａｇ８６５３（６５３）［J. Im

munology, 123, 1548 (1979)]、またはＰ３－Ｘ６３－Ａｇ８（Ｘ６３）[Nature, 256, 495 (1975)]などが用いられる。該細胞株は、適当な培地、例えば８－アザグアニン培地［グルタミン、２－メルカプトエタノール、ゲンタマイシン、ＦＣＳおよび８－アザグアニンを加えたＲＰＭＩ－１６４０培地］、イスコフ改変ダルベッコ培地（Ｉｓｃｏｖｅ’ｓ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ Ｍｅｄｉｕｍ；以下「ＩＭＤＭ」という）、またはダルベッコ改変イーグル培地（Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｅａｇｌｅ Ｍｅｄｉｕｍ；以下「ＤＭＥＭ」という）などの培地で継代培養する。細胞融合の３～４日前に上記の細胞株を正常培地（例えば、１０％ ＦＣＳを含むＤＭＥＭ培地）で継代培養し、融合を行う当日に２×10^7個以上の細胞数を確保する。

[0222] （４）細胞融合

（２）で得られる融合用抗体産生細胞と（３）で得られるミエローマ細胞を、Ｍｉｎｉｍｕｍ Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ Ｍｅｄｉｕｍ（ＭＥＭ）培地またはＰＢＳ（リン酸二ナトリウム１．８３ｇ、リン酸一カリウム０．２１ｇ、食塩７．６５ｇ、蒸留水１リットル、ｐＨ７．２）でよく洗浄し、融合用抗体産生細胞：ミエローマ細胞＝５：１～１０：１になるように混合し、遠心分離した後、上清を除く。沈澱した細胞集塊をよくほぐした後、ポリエチレングリコール－１０００（ＰＥＧ－１０００）、ＭＥＭ培地およびジメチルスルホキシドの混合液を、３７℃にて攪拌しながら加える。さらに１～２分間毎にＭＥＭ培地１～２ｍＬを数回加えた後、ＭＥＭ培地を加えて全量が５０ｍＬになるようにする。遠心分離後、上清を除き、沈澱した細胞集塊を緩やかにほぐした後、ＨＡＴ培地［ヒポキサンチン、チミジンおよびアミノプテリンを加えた正常培地］中に緩やかに細胞を懸濁する。この懸濁液を５％CO_2インキュベータ中、３７℃にて７～１４日間培養する。

[0223] また、以下の方法でも細胞融合を行うことができる。脾臓細胞とミエローマ細胞とを無血清培地（例えばＤＭＥＭ）、またはリン酸緩衝生理食塩液（以下「リン酸緩衝液」という）でよく洗浄し、脾臓細胞とミエローマ細胞の

細胞数の比が５：１～１０：１程度になるように混合し、遠心分離する。上清を除去し、沈澱した細胞集塊をよくほぐした後、撹拌しながら１ｍＬの５０％（ｗ／ｖ）ポリエチレングリコール（分子量１０００～４０００）を含む無血清培地を滴下する。その後、１０ｍＬの無血清培地をゆっくりと加えた後、遠心分離する。再び上清を捨て、沈澱した細胞を適量のヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン（ＨＡＴ）液およびヒトインターロイキン－２（ＩＬ－２）を含む正常培地（以下、ＨＡＴ培地という）中に懸濁して培養用プレート（以下、プレートという）の各ウェルに分注し、５％炭酸ガス存在下、３７℃にて２週間程度培養する。途中適宜ＨＡＴ培地を補う。

[0224] （５）ハイブリドーマ群の選択

融合に用いたミエローマ細胞が８－アザグアニン耐性株である場合、すなわちヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＨＧＰＲＴ）欠損株である場合は、融合しなかったミエローマ細胞およびミエローマ細胞同士の融合細胞は、ＨＡＴ培地中では生存することができない。一方、抗体産生細胞同士の融合細胞および抗体産生細胞とミエローマ細胞とのハイブリドーマは、ＨＡＴ培地中で生存することができるが、抗体産生細胞同士の融合細胞はやがて寿命に達する。したがって、ＨＡＴ培地中での培養を続けることによって、抗体産生細胞とミエローマ細胞とのハイブリドーマのみが生き残り、結果的にハイブリドーマを取得することができる。

[0225] コロニー状に生育してきたハイブリドーマについて、ＨＡＴ培地からアミノプテリンを除いた培地（以下、ＨＴ培地という）への培地交換を行う。その後、培養上清の一部を採取し、後述する抗体価測定法を用いて、抗体を産生するハイブリドーマを選択することができる。抗体価の測定方法としては、例えば、放射性同位元素免疫定量法（ＲＩＡ法）、固相酵素免疫定量法（ＥＬＩＳＡ法）、蛍光抗体法および受身血球凝集反応法など種々の公知技術が挙げられるが、検出感度、迅速性、正確性および操作の自動化の可能性などの観点から、ＲＩＡ法またはＥＬＩＳＡ法が好ましい。

[0226] 抗体価を測定することにより、所望の抗体を産生することが判明したハイ

ブリドーマを、別のプレートに移しクローニングを行う。このクローニング法としては、例えば、プレートの１ウェルに１個の細胞が含まれるように希釈して培養する限界希釈法、軟寒天培地中で培養しコロニーを回収する軟寒天法、マイクロマニュピレーターによって１個の細胞を単離する方法、セルソーターによって１個の細胞を単離する方法などが挙げられる。

[0227] 抗体価の認められたウェルについて、例えば限界希釈法によるクローニングを２～４回繰り返し、安定して抗体価の認められたものを、ＣＤ１１６またはＣＤ１３１に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ株として選択する。

[0228] （６）モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理［２，６，１０，１４－テトラメチルペンタデカン（Ｐｒｉｓｔａｎｅ）０．５ｍＬを腹腔内投与し、２週間飼育する］した８～１０週令のマウスまたはヌードマウスに、（５）で得られるモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを腹腔内に注射する。１０～２１日でハイブリドーマは腹水癌化する。このマウスから腹水を採取し、遠心分離して固形分を除去後、４０～５０％硫酸アンモニウムで塩析し、カプリル酸沈殿法、ＤＥＡＥ－セファロースカラム、プロテインＡカラムまたはゲル濾過カラムによる精製を行い、ＩｇＧまたはＩｇＭ画分を集め、精製モノクローナル抗体とする。また、同系統のマウス（例えば、ＢＡＬＢ／ｃ）若しくはＮｕ／Ｎｕマウス、ラット、モルモット、ハムスターまたはウサギ等の腹腔内で該ハイブリドーマを増殖させることにより、ＣＤ１１６またはＣＤ１３１に結合するモノクローナル抗体を大量に含む腹水を得ることができる。

[0229] （５）で得られたモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを、１０％ＦＢＳ添加を添加したＲＰＭＩ１６４０培地などで培養した後、遠心分離により上清を除き、ＧＩＴ培地、または５％ダイゴＧＦ２１を添加したＨｙｂｒｉｄｏｍａ－ＳＦＭ培地等に懸濁し、フラスコ培養、スピナー培養またはバック培養などにより３～７日間培養する。得られた細胞懸濁液を遠心分離し、得られた上清よりプロテインＡカラムまたはプロテインＧカラムによる精製

を行ない、ＩｇＧ画分を集め、精製モノクローナル抗体を得ることもできる。精製の簡便な方法としては、市販のモノクローナル抗体精製キット（例えば、ＭＡｂＴｒａｐ　ＧＩＩキット；アマシャムファルマシアバイオテク社製）等を利用することもできる。

[0230] 抗体のサブクラスの決定は、サブクラスタイピングキットを用いて酵素免疫測定法により行う。蛋白量の定量は、ローリー法および２８０ｎｍにおける吸光度［１．４（ＯＤ２８０）＝イムノグロブリン１ｍｇ／ｍＬ］より算出する方法により行うことができる。

[0231] （７）ＣＤ１１６またはＣＤ１３１に対するモノクローナル抗体の結合アッセイ

ＣＤ１１６またはＣＤ１３１に対するモノクローナル抗体の結合活性は、オクテルロニー（Ｏｕｃｈｔｅｒｌｏｎｙ）法、ＥＬＩＳＡ法、ＲＩＡ法、フローサイトメトリー法（ＦＣＭ）または表面プラズモン共鳴法（ＳＰＲ）などのバインディングアッセイ系により測定することができる。

[0232] オクテルロニー法は簡便ではあるが、抗体の濃度が低い場合には濃縮操作が必要である。一方、ＥＬＩＳＡ法またはＲＩＡ法を用いた場合は、培養上清をそのまま抗原吸着固相と反応させ、さらに二次抗体として各種イムノグロブリンアイソタイプ、サブクラスに対応する抗体を用いることにより、抗体のアイソタイプ、サブクラスを同定すると共に、抗体の結合活性を測定することが可能である。

[0233] 手順の具体例としては、精製または部分精製した組換えＣＤ１１６またはＣＤ１３１をＥＬＩＳＡ用９６穴プレート等の固相表面に吸着させ、さらに抗原が吸着していない固相表面を抗原と無関係なタンパク質、例えばウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）によりブロッキングを行う。ＥＬＩＳＡプレートをｐｈｏｓｐｈａｔｅ　ｂｕｆｆｅｒ　ｓａｌｉｎｅ（ＰＢＳ）および０．０５％　Ｔｗｅｅｎ２０を含むＰＢＳ（Ｔｗｅｅｎ－ＰＢＳ）などで洗浄後、段階希釈した第１抗体（例えばマウス血清、培養上清など）を反応させ、プレートに固定化された抗原へ抗体を結合させる。次に、第２抗体としてビオ

チン、酵素（ｈｏｒｓｅ　ｒａｄｉｓｈ　ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ；ＨＲＰ、ａｌｋａｌｉｎｅ　ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ；ＡＬＰなど）、化学発光物質または放射線化合物などで標識した抗イムノグロブリン抗体を分注して、プレートに結合した第１抗体に第２抗体を反応させる。Ｔｗｅｅｎ－ＰＢＳでよく洗浄した後、第２抗体の標識物質に応じた反応を行い、標的抗原に対し特異的に反応するモノクローナル抗体を選択する。

[0234] ＦＣＭ法では、抗体の抗原発現細胞に対する結合活性を測定することができる［Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993)］。抗体が細胞膜上に発現している膜タンパク質抗原に結合することは、当該抗体が天然に存在する抗原の立体構造を認識し、結合することを意味する。

[0235] ＳＰＲ法としては、Ｂｉａｃｏｒｅによるｋｉｎｅｔｉｃｓ解析が挙げられる。例えば、Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ１００を用い、抗原と被験物質との間の結合におけるｋｉｎｅｔｉｃｓを測定し、その結果を機器付属の解析ソフトウェアで解析をする。手順の具体例としては、抗マウスＩｇＧ抗体をセンサーチップＣＭ５にアミンカップリング法により固定した後、ハイブリドーマ培養上清または精製モノクローナル抗体などの被験物質を流して適当量を結合させ、さらに濃度既知の複数濃度の抗原を流して、結合および解離を測定する。

[0236] 次に、得られたデータについて、機器付属のソフトウェアを用いて１：１バインディングモデルによるｋｉｎｅｔｉｃｓ解析を行い、各種パラメータを取得する。または、ＣＤ１１６またはＣＤ１３１をセンサーチップ上に、例えばアミンカップリング法により固定した後、濃度既知の複数濃度の精製モノクローナル抗体を流して、結合および解離を測定する。得られたデータについて、機器付属のソフトウェアを用いてバイバレントバインディングモデルによるｋｉｎｅｔｉｃｓ解析を行い、各種パラメータを取得する。

[0237] また、本発明において、ＣＤ１１６またはＣＤ１３１に対する抗体と競合してＣＤ１１６またはＣＤ１３１に結合する抗体は、上述のバインディングアッセイ系に被検抗体を共存させて反応させることにより、選択することが

できる。すなわち、被検抗体を加えた時に抗原との結合が阻害される抗体をスクリーニングすることにより、ＣＤ１１６またはＣＤ１３１への結合について、前記で取得した抗体と競合する抗体を得ることができる。

[0238] （８）ＣＤ１１６またはＣＤ１３１に対するモノクローナル抗体のエピトープの同定

本発明において、抗体が認識し結合するエピトープの同定は以下のようにして行うことができる。

[0239] 例えば、抗原の部分欠損体、種間で異なるアミノ酸残基を改変した変異体、または特定のドメインを改変した変異体を作製し、該欠損体または変異体に対する抗体の反応性が低下すれば、欠損部位またはアミノ酸改変部位が該抗体のエピトープであることが明らかになる。このような抗原の部分欠損体および変異体は、適当な宿主細胞、例えば大腸菌、酵母、植物細胞または哺乳動物細胞などを用いて、分泌タンパク質として取得してもよいし、宿主細胞の細胞膜上に発現させて抗原発現細胞として調製してもよい。膜型抗原の場合は、抗原の立体構造を保持したまま発現させるために、宿主細胞の膜上に発現させることが好ましい。また、抗原の１次構造または立体構造を模倣した合成ペプチドを作製し、抗体の反応性を確認することもできる。合成ペプチドは、公知のペプチド合成技術を用いて、その分子の様々な部分ペプチドを作製する方法等が挙げられる。

[0240] 例えば、ヒトおよびマウスのＣＤ１１６またはＣＤ１３１の細胞外領域について、各領域を構成するドメインを適宜組み合わせたキメラタンパク質を作製し、該タンパク質に対する抗体の反応性を確認することで、抗体のエピトープを同定することができる。その後、さらに細かく、その対応部分のオリゴペプチド、または該ペプチドの変異体等を、当業者に周知のオリゴペプチド合成技術を用いて種々合成し、該ペプチドに対する抗体の反応性を確認することでエピトープを特定することができる。多種類のオリゴペプチドを得るための簡便な方法として、市販のキット［例えば、ＳＰＯＴｓキット（ジェノシス・バイオテクノロジーズ社製）、マルチピン合成法を用いた一連

のマルチピン・ペプチド合成キット（カイロン社製）等］を利用することもできる。

[0241] ＣＤ１１６またはＣＤ１３１に結合する抗体断片、例えばＦａｂは、上記に記載のハイブリドーマを用いた方法の他、Ｐｈａｇｅ　Ｄｉｓｐｌａｙ法、Ｙｅａｓｔ　ｄｉｓｐｌａｙ法などの技術により単離し、取得することが出来る［Emmanuelle Laffy et. al., Human Antibodies 14, 33-55, （2005）］。

[0242] ＣＤ１１６またはＣＤ１３１に結合する抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体は、上述のバインディングアッセイ系で得た抗体のエピトープを同定し、該エピトープの部分的な合成ペプチド、該エピトープの立体構造を模した合成ペプチド、または該エピトープの組換え体等を作製し、免疫することで取得することができる。

[0243] 例えば、エピトープが膜タンパク質であれば、全細胞外領域または一部の細胞外ドメインを、適当なタグ、例えば、ＦＬＡＧタグ、Ｈｉｓｔｉｄｉｎｅタグ、ＧＳＴタンパク質または抗体Ｆｃ領域などに連結した組換え融合タンパク質を作製し、該組換えタンパク質を免疫することで、より効率的に該エピトープ特異的な抗体を作製することができる。

[0244] ２．遺伝子組換え抗体の作製

遺伝子組換え抗体の作製例として、P. J. Delves., ANTIBODY PRODUCTION ESSENTIAL TECHNIQUES., 1997 WILEY、P. Shepherd and C. Dean. Monoclonal Antibodies., 2000 OXFORD UNIVERSITY PRESSおよびJ. W. Goding., Monoclonal Antibodies: principles and practice., 1993 ACADEMIC PRESSなどに概説されているが、以下にキメラ抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体の作製方法を示す。また、遺伝子組換えマウス、ラット、ハムスターおよびラビット抗体についても、同様の方法で作製することができる。

[0245] （１）ハイブリドーマからのモノクローナル抗体のＶ領域をコードするｃＤＮＡの取得

モノクローナル抗体のＶＨおよびＶＬをコードするｃＤＮＡの取得は、例

えば以下のようにして行うことができる。

[0246] まず、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマよりｍＲＮＡを抽出し、ｃＤＮＡを合成する。次に、合成したｃＤＮＡをファージまたはプラスミドなどのベクターにクローニングしてｃＤＮＡライブラリーを作製する。該ライブラリーより、抗体のＣ領域部分またはＶ領域部分をコードするＤＮＡをプローブとして用いて、ＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡを有する組換えファージまたは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。単離した組換えファージまたは組換えプラスミド内のＶＨまたはＶＬの全塩基配列を決定し、当該塩基配列よりＶＨまたはＶＬの全アミノ酸配列を推定する。

[0247] ハイブリドーマの作製に用いる非ヒト動物としては、マウス、ラット、ハムスターまたはウサギなどを用いるが、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなる動物も用いることができる。

[0248] ハイブリドーマからの全ＲＮＡの調製には、チオシアン酸グアニジン－トリフルオロ酢酸セシウム法［Methods in Enzymol., 154, 3 （1987）］、またはＲＮＡ ｅａｓｙ ｋｉｔ（キアゲン社製）などのキットなどを用いる。

[0249] 全ＲＮＡからのｍＲＮＡの調製には、オリゴ（ｄＴ）固定化セルロースカラム法［Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) ］、またはＯｌｉｇｏ－ｄＴ３０＜Ｓｕｐｅｒ＞ｍＲＮＡ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（タカラバイオ社製）などのキットなどを用いる。また、Ｆａｓｔ Ｔｒａｃｋ ｍＲＮＡ Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（インビトロジェン社製）またはＱｕｉｃｋＰｒｅｐ ｍＲＮＡ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（ファルマシア社製）などのキットを用いて、ｍＲＮＡを調製することもできる。

[0250] ｃＤＮＡの合成およびｃＤＮＡライブラリーの作製には、公知の方法［Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) 、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1, John Wiley & Sons (1987-1997) ］またはＳｕｐｅｒＳｃｒ

ｉｐｔ Ｐｌａｓｍｉｄ Ｓｙｓｔｅｍ ｆｏｒ ｃＤＮＡ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ａｎｄ Ｐｌａｓｍｉｄ Ｃｌｏｎｉｎｇ（インビトロジェン社製）若しくはＺＡＰ－ｃＤＮＡ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ Ｋｉｔ（ストラタジーン社製）などのキットなどを用いる。

[0251] ｃＤＮＡライブラリーの作製の際に、ハイブリドーマから抽出したｍＲＮＡを鋳型として合成したｃＤＮＡを組み込むベクターとしては、該ｃＤＮＡを組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。

[0252] 例えば、ＺＡＰ Ｅｘｐｒｅｓｓ [Strategies, 5, 58 (1992)]、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＩＩ ＳＫ（＋） [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、λＺＡＰＩＩ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ社製）、λｇｔ１０、λｇｔ１１ [DNA Cloning: A Practical Approach, I, 49 (1985)]、Ｌａｍｂｄａ ＢｌｕｅＭｉｄ（クローンテック社製）、λＥｘＣｅｌｌ、ｐＴ７Ｔ３－１８Ｕ（ファルマシア社製）、ｐｃＤ２ [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)] またはｐＵＣ１８ [Gene, 33, 103 (1985)] などを用いる。

[0253] ファージまたはプラスミドベクターにより構築されるｃＤＮＡライブラリーを導入する大腸菌には、該ｃＤＮＡライブラリーを導入、発現および維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ＸＬ１－Ｂｌｕｅ ＭＲＦ’ [Strategies, 5, 81 (1992)]、Ｃ６００ [Genetics, 39, 440 (1954)]、Ｙ１０８８、Ｙ１０９０ [Science, 222, 778 (1983)]、ＮＭ５２２ [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、Ｋ８０２ [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)]、またはＪＭ１０５ [Gene, 38, 275 (1985)] などを用いる。

[0254] ｃＤＮＡライブラリーからの非ヒト抗体のＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡクローンの選択には、アイソトープ若しくは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法、またはプラーク・ハイブリダイゼーション法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] などを用いる。

[0255] また、プライマーを調製し、ｍＲＮＡから合成したｃＤＮＡまたはｃＤＮ

Ａライブラリーを鋳型として、Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ　Ｃｈａｉｎ　Ｒｅａｃｔｉｏｎ法［以下、ＰＣＲ法と表記する、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition , Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1, John Wiley & Sons (1987-1997)］を行うことにより、ＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡを調製することもできる。

[0256] 選択されたｃＤＮＡを、適当な制限酵素などで切断した後、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ　ＳＫ（－）（ストラタジーン社製）などのプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法などにより該ｃＤＮＡの塩基配列を決定する。例えば、ジデオキシ法［Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)］などの反応を行った後、Ａ．Ｌ．Ｆ．ＤＮＡシークエンサー（ファルマシア社製）などの塩基配列自動分析装置などを用いて解析する。

[0257] 決定した全塩基配列からＶＨおよびＶＬの全アミノ酸配列をそれぞれ推定し、既知の抗体のＶＨおよびＶＬの全アミノ酸配列［Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)］と比較することにより、取得したｃＤＮＡが、分泌シグナル配列を含めて抗体のＶＨおよびＶＬ各々の完全なアミノ酸配列をコードしているか否かを確認する。

[0258] 分泌シグナル配列を含む抗体のＶＨおよびＶＬ各々の完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体のＶＨおよびＶＬの全アミノ酸配列［Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)］と比較することにより、分泌シグナル配列の長さおよびＮ末端アミノ酸配列を推定することができ、さらにそれらが属するサブグループを同定することができる。

[0259] また、ＶＨおよびＶＬの各ＣＤＲのアミノ酸配列は、既知の抗体のＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列［Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)］と比較することによって推定することができる。

[0260] また、得られたＶＨおよびＶＬの完全なアミノ酸配列について、例えば、ＳＷＩＳＳ－ＰＲＯＴまたはＰＩＲ－Ｐｒｏｔｅｉｎなどの任意のデータベースを用いてＢＬＡＳＴ法［J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)］などによる相同性検索を行うことで、当該ＶＨおよびＶＬの完全なアミノ酸配列が新規なものであるか否かを確認することができる。

[0261] （２）遺伝子組換え抗体発現ベクターの構築

遺伝子組換え抗体発現ベクターは、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体のＣＨおよびＣＬの少なくとも一方をコードするＤＮＡをクローニングすることにより構築することができる。

[0262] ヒト抗体のＣ領域としては、任意のヒト抗体のＣＨおよびＣＬを用いることができ、例えば、ヒト抗体のγ１サブクラスのＣＨおよびκクラスのＣＬなどを用いることができる。ヒト抗体のＣＨおよびＣＬをコードするＤＮＡとしてはｃＤＮＡを用いるが、エキソンとイントロンからなる染色体ＤＮＡを用いることもできる。

[0263] 動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体のＣ領域をコードする遺伝子を組み込んで発現できるものであれば、いかなるものでも用いることができ、例えば、ｐＡＧＥ１０７［Cytotechnol., 3, 133 (1990)］、ｐＡＧＥ１０３［J. Biochem., 101, 1307 (1987)］、ｐＨＳＧ２７４［Gene, 27, 223 (1984)］、ｐＫＣＲ［Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 1527 (1981)］、pSG1bd2-4［Cytotechnol., 4, 173 (1990)］、またはｐＳＥ１ＵＫ１Ｓｅｄ１－３［Cytotechnol., 13, 79 (1993)］、ＩＮＰＥＰ４（Ｂｉｏｇｅｎ－ＩＤＥＣ社製）、Ｎ５ＫＧ１ｖａｌ（米国特許第６，００１，３５８号明細書）、Ｎ５ＫＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋ（国際公開第２００６／０３３３８６号に記載）、Ｎ５ＫＧ２ベクター（国際公開第２００３／０３３５３８号に記載）、トランスポゾンベクター（国際公開第２０１０／１４３６９８号）などを用いることができる。

[0264] 動物細胞用発現ベクターのプロモーターとエンハンサーとしては、ＳＶ４０の初期プロモーター［J. Biochem., 101, 1307 (1987)］、モロニーマウ

ス白血病ウイルスＬＴＲ［Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960（1987）］、ＣＭＶプロモーター（米国特許第５，１６８，０６２号明細書）または免疫グロブリンH鎖のプロモーター［Cell, 41, 479 （1985）］とエンハンサー［Cell, 33, 717（1983）］などを用いることができる。

[0265] 遺伝子組換え抗体の発現には、ベクターの構築の容易さ、動物細胞への導入の容易さ、細胞内における抗体Ｈ鎖およびＬ鎖の発現量の均衡性などの観点から、抗体Ｈ鎖およびＬ鎖の両遺伝子を搭載したベクター（タンデム型ベクター）［J. Immunol. Methods, 167, 271 （1994）］を用いるが、抗体Ｈ鎖とＬ鎖の各遺伝子を別々に搭載した複数のベクター（セパレート型ベクター）を組み合わせて用いることもできる。

[0266] タンデム型の遺伝子組換え抗体発現ベクターとしては、ｐＫＡＮＴＥＸ９３（国際公開第９７／１０３５４号）、ｐＥＥ１８［Hybridoma, 17, 559（1998）］、Ｎ５ＫＧ１ｖａｌ（米国特許第６，００１，３５８号明細書）、Ｎ５ＫＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋ（国際公開第２００６／０３３３８６号に記載）、Ｎ５ＫＧ２ベクター（国際公開第２００３／０３３５３８号に記載）、Ｔｏｌ２トランスポゾンベクター（国際公開第２０１０／１４３６９８号）などを用いる。

[0267]（３）キメラ抗体発現ベクターの構築

（２）で得られる遺伝子組換え抗体発現ベクター内のヒト抗体のＣＨまたはＣＬをコードする遺伝子の各々の上流に、（１）で得られる非ヒト抗体のＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡを各々クローニングすることで、キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。

[0268] まず、非ヒト抗体のＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡの３’末端側と、ヒト抗体のＣＨまたはＣＬの５’末端側とを連結するために、連結部分の塩基配列が適切なアミノ酸をコードし、かつ適当な制限酵素認識配列になるように設計したＶＨおよびＶＬのｃＤＮＡを作製する。次に、作製したＶＨおよびＶＬのｃＤＮＡを、（２）で得られる遺伝子組換え抗体発現ベクター内のヒト抗体のＣＨまたはＣＬをコードする遺伝子の各々の上流に、それら

が適切な形で発現する様にそれぞれクローニングし、キメラ抗体発現ベクターを構築する。

[0269] また、非ヒト抗体のＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡを、適当な制限酵素の認識配列を両端に有する合成ＤＮＡを用いてＰＣＲ法によりそれぞれ増幅し、（２）で得られる遺伝子組換え抗体発現ベクターにクローニングすることで、キメラ抗体発現ベクターを構築することもできる。

[0270] （４）ヒト化抗体のＶ領域をコードするｃＤＮＡの作製

ヒト化抗体のＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡは、以下のようにして作製することができる。まず、（１）で得られる非ヒト抗体のＶＨまたはＶＬのＣＤＲのアミノ酸配列を移植するヒト抗体のＶＨまたはＶＬのフレームワーク領域（以下、ＦＲと表記する）のアミノ酸配列をそれぞれ選択する。

[0271] 選択するＦＲのアミノ酸配列には、ヒト抗体由来のものであればいずれのものでも用いることができる。例えば、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｄａｔａ Ｂａｎｋなどのデータベースに登録されているヒト抗体のＦＲのアミノ酸配列、またはヒト抗体のＦＲの各サブグループの共通アミノ酸配列［Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services（1991）］などを用いる。抗体の結合活性の低下を抑えるために、元の非ヒト抗体のＶＨまたはＶＬのＦＲのアミノ酸配列とできるだけ高い相同性（６０％以上）を有するヒトＦＲのアミノ酸配列を選択する。

[0272] 次に、選択したヒト抗体のＶＨまたはＶＬのＦＲのアミノ酸配列に、元の非ヒト抗体のＣＤＲのアミノ酸配列をそれぞれ移植し、ヒト化抗体のＶＨまたはＶＬのアミノ酸配列をそれぞれ設計する。設計したアミノ酸配列を、抗体遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度［Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)］を考慮してＤＮＡ配列に変換することで、ヒト化抗体のＶＨまたはＶＬのｃＤＮＡ配列をそれぞれ設計する。

[0273] 設計したｃＤＮＡ配列に基づき、１００～１５０塩基前後の長さからなる数本の合成ＤＮＡを合成し、それらを用いてＰＣＲ反応を行う。この場合、

ＰＣＲ反応における反応効率および合成可能なＤＮＡ長の観点から、好ましくはＨ鎖およびＬ鎖に対し各々４～６本の合成ＤＮＡを設計する。また、可変領域全長の合成ＤＮＡを合成して用いることもできる。

[0274] さらに、両端に位置する合成ＤＮＡの５’末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、（２）で得られる遺伝子組換え抗体発現ベクターに、容易にヒト化抗体のＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡをクローニングすることができる。ＰＣＲ反応後、増幅産物をｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ　ＳＫ（－）（ストラタジーン社製）などのプラスミドにそれぞれクローニングし、（１）に記載の方法と同様の方法により塩基配列を決定し、所望のヒト化抗体のＶＨまたはＶＬのアミノ酸配列をコードするＤＮＡ配列を有するプラスミドを取得する。

[0275] （５）ヒト化抗体のＶ領域のアミノ酸配列の改変

ヒト化抗体は、非ヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＣＤＲのみをヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲに移植しただけでは、その抗原結合活性は元の非ヒト抗体に比べて低下する［BIO/TECHNOLOGY, 9, 266（1991）］。そのため、ヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲのアミノ酸配列のうち、直接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基、ＣＤＲのアミノ酸残基と相互作用するアミノ酸残基、および抗体の立体構造を維持し間接的に抗原との結合に関与しているアミノ酸残基を同定し、それらのアミノ酸残基を元の非ヒト抗体のアミノ酸残基に置換することにより、低下したヒト化抗体の抗原結合活性を上昇させることができる。

[0276] 抗原結合活性に関わるＦＲのアミノ酸残基を同定するために、Ｘ線結晶解析［J. Mol. Biol., 112, 535（1977）］またはコンピューターモデリング［Protein Engineering, 7, 1501（1994）］などを用いることにより、抗体の立体構造の構築および解析を行うことができる。また、それぞれの抗体について数種の改変体を作製し、それぞれの抗原結合活性との相関を検討することを繰り返し、試行錯誤することで、必要な抗原結合活性を有する改変ヒト化抗体を取得できる。

[0277] ヒト抗体のＶＨおよびＶＬのＦＲのアミノ酸残基は、改変用合成ＤＮＡを用いて（４）に記載のＰＣＲ反応を行うことにより、改変することができる。ＰＣＲ反応後の増幅産物について、（１）に記載の方法により、塩基配列を決定し、目的とする改変が施されたことを確認する。

[0278] （６）ヒト化抗体発現ベクターの構築

（２）で得られる遺伝子組換え抗体発現ベクターのヒト抗体のＣＨまたはＣＬをコードするそれぞれの遺伝子の上流に、構築したヒト化抗体のＶＨまたはＶＬをコードするｃＤＮＡをそれぞれクローニングし、ヒト化抗体発現ベクターを構築することができる。

[0279] 例えば、（４）および（５）で得られるヒト化抗体のＶＨまたはＶＬを構築する際に用いる合成ＤＮＡのうち、両端に位置する合成ＤＮＡの５’末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、（２）で得られる遺伝子組換え抗体発現ベクター内のヒト抗体のＣＨまたはＣＬをコードする各遺伝子の上流に、それらが適切な形で発現するようにそれぞれクローニングする。

[0280] （７）ヒト抗体発現ベクターの構築

ヒト抗体を産生する動物を被免疫動物として用いて、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを樹立した場合には、（１）において、ヒト抗体のＶＨおよびＶＬのアミノ酸配列およびｃＤＮＡ配列を得ることができる。そこで、（２）で得られる遺伝子組換え抗体発現ベクターのヒト抗体のＣＨまたはＣＬをコードするそれぞれの遺伝子の上流に、（１）で得たヒト抗体のＶＨまたはＶＬをコードする遺伝子をそれぞれクローニングすることで、ヒト抗体発現ベクターを構築することができる。

[0281] （８）遺伝子組換え抗体の一過性発現

（３）、（６）および（７）で得られる遺伝子組換え抗体発現ベクター、またはそれらを改変した発現ベクターを用いて遺伝子組換え抗体を一過性に発現させ、得られた多種類の遺伝子組換え抗体の抗原結合活性を効率的に評価することができる。

[0282] 発現ベクターを導入する宿主細胞には、遺伝子組換え抗体を発現できる宿

主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができるが、例えばＣＯＳ－７細胞［American Type Culture Collection（ATCC）番号：CRL1651］を用いる。ＣＯＳ－７細胞への発現ベクターの導入には、ＤＥＡＥ－デキストラン法［Methods in Nucleic Acids Res., CRC press（1991）］、またはリポフェクション法［Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413（1987）］などを用いる。

[0283] 発現ベクターの導入後、培養上清中の遺伝子組換え抗体の発現量および抗原結合活性を、酵素免疫抗体法［Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third Edition, Academic Press（1996）、Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory（1988）、単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック（１９８７）］などを用いて測定する。

[0284] （９）遺伝子組換え抗体の安定的発現株の取得と遺伝子組換え抗体の調製

（３）、（６）および（７）で得られた遺伝子組換え抗体発現ベクターを適当な宿主細胞に導入することにより遺伝子組換え抗体を安定的に発現する形質転換株を得ることができる。

[0285] 宿主細胞への発現ベクターの導入としては、例えば、エレクトロポレーション法［日本国特開平２－２５７８９１号公報、Cytotechnology, 3, 133（1990）］、カルシウムイオン方法、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法などが挙げられる。また、後述の動物に遺伝子を導入する方法としては、例えば、マイクロインジェクション法、ＥＳ細胞にエレクトロポレーション法やリポフェクション法を用いて遺伝子を導入する方法、および核移植法などが挙げられる。

[0286] 遺伝子組換え抗体発現ベクターを導入する宿主細胞としては、遺伝子組換え抗体を発現させることができる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。例えば、マウスＳＰ２／０－Ａｇ１４細胞（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ１５８１）、マウスＰ３Ｘ６３－Ａｇ８．６５３細胞（ＡＴＣＣ　ＣＲ

Ｌ１５８０）、チャイニーズハムスターＣＨＯ－Ｋ１細胞（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－６１）、ＤＵＫＸＢ１１（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－９０９６）、Ｐｒｏ－５細胞（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－１７８１）、ＣＨＯ－Ｓ細胞（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｃａｔ　Ｎｏ．１１６１９）、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子（ｄｈｆｒ）が欠損したＣＨＯ細胞（ＣＨＯ／ＤＧ４４細胞）［Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216 (1980)］、レクチン耐性を獲得したＬｅｃ１３細胞［Somatic Cell and Molecular genetics, 12, 55 (1986)］、α１，６－フコース転移酵素遺伝子が欠損したＣＨＯ細胞（国際公開第２００５／０３５５８６号、国際公開第０２／３１１４０号）、ラットＹＢ２／３ＨＬ．Ｐ２．Ｇ１１．１６Ａｇ．２０細胞（ＡＴＣＣ番号：ＣＲＬ１６６２）などを用いる。

[0287] また、細胞内糖ヌクレオチドＧＤＰ－フコースの合成に関与する酵素などのタンパク質、Ｎ－グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端のＮ－アセチルグルコサミンの６位にフコースの１位がα結合する糖鎖修飾に関与する酵素などのタンパク質、または細胞内糖ヌクレオチドＧＤＰ－フコースのゴルジ体への輸送に関与するタンパク質などの活性が低下または欠失した宿主細胞、例えばα１，６－フコース転移酵素遺伝子が欠損したＣＨＯ細胞（国際公開第２００５／０３５５８６号、国際公開第０２／３１１４０号）などを用いることもできる。

[0288] 発現ベクターの導入後、遺伝子組換え抗体を安定的に発現する形質転換株を、Ｇ４１８硫酸塩（以下、Ｇ４１８と表記する）などの薬剤を含む動物細胞培養用培地で培養することにより選択する（日本国特開平２－２５７８９１号公報）。

[0289] 動物細胞培養用培地には、ＲＰＭＩ１６４０培地（インビトロジェン社製）、ＧＩＴ培地（日本製薬社製）、ＥＸ－ＣＥＬＬ３０１培地（ジェイアールエイチ社製）、ＥＸ－ＣＥＬＬ３０２培地（ジェイアールエイチ社製）、ＥＸ－ＣＥＬＬ３２５培地（ジェイアールエイチ社製）、ＩＭＤＭ培地（インビトロジェン社製）若しくはＨｙｂｒｉｄｏｍａ－ＳＦＭ培地（インビト

ロジェン社製）、またはこれらの培地にＦＢＳなどの各種添加物を添加した培地などを用いる。得られた形質転換株を培地中で培養することで、培養上清中に遺伝子組換え抗体を発現、蓄積させる。培養上清中の遺伝子組換え抗体の発現量および抗原結合活性はＥＬＩＳＡ法などにより測定することができる。また、ＤＨＦＲ増幅系（日本国特開平２－２５７８９１号公報）などを利用して、形質転換株の産生する遺伝子組換え抗体の発現量を上昇させることができる。

[0290] 遺伝子組換え抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテインＡカラムを用いて精製することができる［Monoclonal Antibodies - Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)］。また、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーおよび限外濾過など、タンパク質の精製で用いられる方法を組み合わせて精製することもできる。

[0291] 本発明の一実施形態として、Ｆｃ領域を含有する抗体をプロテインＡカラムクロマトグラフィーにより精製することを含む、抗体を含有する組成物の精製方法であって、前記抗体は前記Ｆｃ領域においてＨ４３５Ｆの変異が導入されている抗体である、精製方法が挙げられる。Ｆｃ領域においてＨ４３５Ｆの変異が導入されている抗体はプロテインＡカラムに対する結合性に優れ、プロテインＡカラムクロマトグラフィーにより精製することで、高い精製効率を実現できる。

[0292] 精製した遺伝子組換え抗体のＨ鎖、Ｌ鎖または抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法［Nature, 227, 680 (1970)］、またはウェスタンブロット法［Monoclonal Antibodies - Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)］など用いて測定することができる。

[0293] （１０）非天然型アミノ酸残基を導入した抗体または抗体断片の取得

非天然型アミノ酸残基を導入した抗体または抗体断片は、国際公開第２０

１７／０３０１５６号に記載の方法に従って取得することができる。

[0294] ３．バイスペシフィック抗体の作製

本発明のバイスペシフィック抗体は、例えば、ＣＤ１３１に結合する第１の抗原結合ドメインとＣＤ１１６に結合する第２の抗原結合ドメインとをそれぞれ作製し、それらを連結させることによって作製できる。

[0295] ３－１．ＣＤ１１６に結合する第１の抗原結合ドメインの作製

第１の抗原結合ドメインが、抗体または抗体断片である場合、上記１．および２．に記載の方法で、抗体のＣＤＲまたは可変領域のアミノ酸配列をコードするＤＮＡ配列を決定する。さらに、該ＣＤＲまたは可変領域を含む抗原結合ドメインを設計し、該抗原結合ドメインのアミノ酸配列をコードするＤＮＡ配列を設計する。それを、例えば２．（２）に記載の遺伝子組み換え抗体発現ベクターに組み込み、該抗原結合ドメインを発現させることによって作製することができる。

[0296] 具体的には、例えば第１の抗原結合ドメインがＦａｂである場合、上記１．および２．に記載の方法で、抗体のＣＤＲのＤＮＡ配列を決定する。さらに、決定した重鎖のＣＤＲを含むＶＨ配列とＣＨ１配列を連結したポリペプチド鎖をコードするＤＮＡ配列、および決定した軽鎖のＣＤＲを含むＶＬ配列とＣＬ配列を連結したポリペプチド鎖をコードするＤＮＡ配列を設計する。それらのＤＮＡ配列を、例えば２．（２）に記載の遺伝子組み換え抗体発現ベクターに組み込み、該抗原結合ドメインを発現させることによって作製することができる。

[0297] 第１の抗原結合ドメインが、ＧＭ－ＣＳＦまたはＣＤ１１６に対する結合能を有するタンパク質のＣＤ１１６への結合部分を含むポリペプチドである場合、そのポリペプチドをコードするＤＮＡ配列を設計し、例えば２．（２）に記載の遺伝子組み換え抗体発現ベクターに組み込み、該抗原結合ドメインを発現させることによって作製することができる。

[0298] 作製した抗原結合ドメインの抗原結合活性は、上記方法で評価し、抗原結合活性を保持しているものを選択することができる。

[0299] ３－２．ＣＤ１３１に結合する第２の抗原結合ドメインの作製

ＣＤ１３１に結合する抗原結合ドメインは、上記３－１．と同様の方法により、作製することができる。また、第１と第２の抗原結合ドメインを適当なアミノ酸配列で連結させて組換えタンパク質を発現させる場合も上述の方法で本発明のバイスペシフィック抗体を作製することができる。

[0300] ３－３．２つの抗原結合ドメインの連結

上記３－１．および３－２．で作製したＣＤ１１６およびＣＤ１３１に結合する抗原結合ドメインを以下の方法で連結させて、バイスペシフィック抗体を作製する。

[0301] それぞれの抗原結合ドメインに含まれるアミノ酸残基を使用し、任意のリンカーを介して化学連結することができる。連結に使用されるアミノ酸残基は、天然型アミノ酸残基でも非天然型アミノ酸残基でもよい。天然型アミノ酸残基としては、例えば、システイン、チロシン、セリン、スレオニン、リジン、グルタミン酸、アスパラギン酸を用いることができる。非天然型アミノ酸残基としては、例えば、国際公開公報２０１７／０３０１５６号に開示のあるＺリジン誘導体（Ｎ６－（（ベンジルオキシ）カルボニル）－Ｌ－リジン誘導体）、ＴＣＯ＊－Ｌｙｓ（Ｎ６－（（（トランス－シクロオクト－２－エン－１－イル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジン）またはＢＣＮ－Ｌｙｓ（Ｎ６－（（ビシクロ［６．１．０］ノン－４－イン－９－イルメトキシ）カルボニル）－Ｌ－リジン）を用いることができる。

[0302] 抗原結合ドメインを連結する方法としては、抗原結合ドメインに含まれるその他のアミノ酸に影響を与えることなく、選択的にリンカーと反応させることができるという理由から、非天然型アミノ酸残基を介した化学連結を用いることが好ましい。

[0303] 抗原結合ドメインを連結する際に用いる方法は特に限定されず、所望のアミノ酸残基とリンカーを化学連結するいずれの方法も用いることができる。例えば、化学反応を利用した化学連結［抗体工学入門，地人書館(1994)、Kolb et al., Angew Chem Int Ed Engl. 40. 2004-21, 2001］が挙げられる。

[0304] 抗原結合ドメインを化学連結する際に用いるリンカーは、抗原結合ドメインに含まれるアミノ酸残基と反応するのに必要な官能基を有しているものであれば特に限定されない。例えば、それぞれアジド－Ｚリジン誘導体を含む抗原結合ドメイン２つを連結する場合、１つの分子中に２つのアルキニル基を有するリンカーを用いることで、抗原結合ドメインを連結することができる。

[0305] また、３－１．および３－２．で作製した抗原結合ドメインがＦａｂである場合、抗体のヒンジ領域の一部または全部をそれぞれの抗原結合ドメインのＣ末端側に付加し、Ｓ－Ｓ結合により（Ｆａｂ’）２の構造を有するバイスペシフィック抗体を作製することもできる。そこにＦｃを付加し、ＩｇＧ抗体型のバイスペシフィック抗体を作製することもできる。

[0306] ４．本発明のバイスペシフィック抗体またはそのバイスペシフィック抗体断片の活性評価

精製したバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片の活性評価は、以下のように行うことができる。

[0307] ＣＤ１１６およびＣＤ１３１の少なくとも一方を発現した細胞株に対する本発明のバイスペシフィック抗体の結合活性は、前述の１．（７）記載のバインディングアッセイ系を用いて測定することができる。

[0308] ＣＤ１１６およびＣＤ１３１の少なくとも一方を発現した細胞に対するＣＤＣ活性、またはＡＤＣＣ活性は公知の測定方法［Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993)］により測定することができる。

[0309] 本発明のバイスペシフィック抗体のＧＭ－ＣＳＦ受容体に対するアゴニスト活性は次の方法で測定することができる。例えば、ＧＭ－ＣＳＦ依存的に増殖をするＴＦ－１細胞を９６穴プレートに播種し、ＧＭ－ＣＳＦまたは本発明のバイスペシフィック抗体を添加して一定期間培養した後に、ＡＴＰルシフェラーゼ反応による発光強度を測定することにより、細胞の増殖率を測定する。

[0310] 上記方法において、ＧＭ－ＣＳＦ非添加群のＴＦ－１細胞増殖率を０％、

ＧＭ－ＣＳＦ添加群の細胞増殖率を１００％とした時に、バイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片の添加群で、細胞増殖率が３０％以上の時にアゴニスト活性があるとする。バイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片のアゴニスト活性は、ＧＭ－ＣＳＦを１００％とした際に、好ましくは４０％以上、より好ましくは５０％以上、更に好ましくは６０％以上、さらにより好ましくは７０％以上であることが望ましい。

[0311] 本発明のバイスペシフィック抗体のＧＭ－ＣＳＦ受容体に対するアゴニスト活性は、モノサイトからマクロファージへの分化誘導活性によっても評価できる。分化誘導活性は、次の方法で測定することができる。例えば、モノサイトを９６穴プレートに播種し、バイスペシフィック抗体を添加して一定期間培養した後に、ＣＤ１４およびＣＤ２０６の発現量の変化をフローサイトメトリー法により解析する。

[0312] ＣＤ１１６およびＣＤ１３１から細胞内へのシグナル伝達は、細胞内のタンパク質のリン酸化をウェスタンブロット法などにより検出することにより評価することができる。

[0313] ５．本発明のバイスペシフィック抗体または該抗体断片を用いた疾患の治療方法

本発明のバイスペシフィック抗体または該抗体断片は、ＧＭ－ＣＳＦが関与する疾患またはＧＭ－ＣＳＦの中和抗体が関与する疾患の治療に用いることができる。例えば、メラノーマ、頭頸部がん、乳がん、消化器がん、膵癌、肝細胞がん、前立腺がん、結腸直腸がん、肺がん、腎細胞がん、卵巣がん、化学療法による白血球減少症、骨髄移植による白血球減少症、再生不良性貧血による白血球減少症、骨髄異形成症候群による白血球減少症、骨髄移植における骨髄機能回復、急性骨髄性白血病、慢性骨髄単球性白血病、敗血症、真菌症、HIV感染症、インフルエンザウィルス感染症、非結核性抗酸菌感染症、急性呼吸促迫症候群、肺胞蛋白症、クローン病、アルツハイマー病および各種感染症などが挙げられる。

[0314] 本発明のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片、またはこれらの誘導体を含有する治療薬は、有効成分としての該抗体若しくは該抗体断片、またはこれらの誘導体のみを含むものであってもよいが、通常は薬理学的に許容される１以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野において公知の方法により製造した医薬製剤として提供される。

[0315] 投与経路としては、例えば、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内若しくは静脈内などの非経口投与が挙げられる。投与形態としては、例えば、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏またはテープ剤などが挙げられる。各種製剤は、通常用いられている賦形剤、増量剤、結合剤、浸潤剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、溶解補助剤、防腐剤、着色料、香味剤、および安定化剤などを用いて常法により製造することができる。

[0316] 賦形剤としては、例えば、乳糖、果糖、ブドウ糖、コーンスターチ、ソルビット、結晶セルロース、滅菌水、エタノール、グリセロール、生理食塩水および緩衝液などが挙げられる。崩壊剤としては、例えば、澱粉、アルギン酸ナトリウム、ゼラチン、炭酸カルシウム、クエン酸カルシウム、デキストリン、炭酸マグネシウムおよび合成ケイ酸マグネシウムなどが挙げられる。

[0317] 結合剤としては、例えば、メチルセルロースまたはその塩、エチルセルロース、アラビアゴム、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロースおよびポリビニルピロリドンなどが挙げられる。滑沢剤としては、例えば、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ポリエチレングリコールおよび硬化植物油などが挙げられる。

[0318] 安定化剤としては、例えば、アルギニン、ヒスチジン、リジン、メチオニンなどのアミノ酸、ヒト血清アルブミン、ゼラチン、デキストラン４０、メチルセルロース、亜硫酸ナトリウム、メタ亜硫酸ナトリウムなどが挙げられる。

[0319] その他の添加剤としては、例えば、シロップ、ワセリン、グリセリン、エタノール、プロピレングリコール、クエン酸、塩化ナトリウム、亜硝酸ソー

ダおよびリン酸ナトリウムなどが挙げられる。

[0320] 経口投与に適当な製剤としては、例えば、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤または顆粒剤などが挙げられる。

[0321] 乳剤またはシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール若しくは果糖などの糖類、ポリエチレングリコール若しくはプロピレングリコールなどのグリコール類、ごま油、オリーブ油若しくは大豆油などの油類、ｐ－ヒドロキシ安息香酸エステル類などの防腐剤、またはストロベリーフレーバー若しくはペパーミントなどのフレーバー類などを添加剤として用いて製造される。

[0322] カプセル剤、錠剤、散剤または顆粒剤などは、乳糖、ブドウ糖、ショ糖若しくはマンニトールなどの賦形剤、デンプン若しくはアルギン酸ナトリウムなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム若しくはタルクなどの滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース若しくはゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性剤、またはグリセリンなどの可塑剤などを添加剤として用いて製造される。

[0323] 非経口投与に適当な製剤としては、例えば、注射剤、座剤または噴霧剤などが挙げられる。注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、またはその両者の混合物からなる担体などを用いて製造される。

[0324] 座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸などの担体を用いて製造される。噴霧剤は、受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ本発明のモノクローナル抗体またはその抗体断片を微細な粒子として分散させ、吸収を容易にさせる担体などを用いて製造される。担体としては、例えば、乳糖またはグリセリンなどが挙げられる。また、エアロゾルまたはドライパウダーとして製造することもできる。さらに、上記非経口剤においても、経口投与に適当な製剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

[0325] 本発明のバイスペシフィック抗体の有効量と適切な希釈剤および薬理学的に使用し得るキャリアとの組合せとして投与される有効量は、１回につき体重１ｋｇあたり０．０００１ｍｇ～１００ｍｇであり、２日から８週間間隔

で投与される。

[0326] ６．本発明のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片を用いた疾患の診断方法

本発明のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片を用いて、ＣＤ１１６およびＣＤ１３１の少なくとも一方が発現した細胞を検出または測定することにより、ＧＭ－ＣＳＦが関与する疾患またはＧＭ－ＣＳＦの中和抗体が関与する疾患を診断することができる。

[0327] ＧＭ－ＣＳＦが関与する疾患の診断は、例えば、以下のようにＣＤ１１６およびＣＤ１３１の少なくとも一方を検出または測定して行うことができる。

[0328] まず、複数の健常者の生体から採取した生体試料について、本発明のバイスペシフィック抗体若しくは該バイスペシフィック抗体断片、またはこれらの誘導体を用い、下記の免疫学的手法を用いて、ＣＤ１１６およびＣＤ１３１の少なくとも一方の検出または測定を行い、健常者の生体試料中のＣＤ１１６およびＣＤ１３１の少なくとも一方の存在量を調べる。

[0329] 次に、被験者の生体試料中についても同様にＣＤ１１６およびＣＤ１３１の少なくとも一方の存在量を調べ、その存在量を健常者の存在量と比較する。被験者のＣＤ１１６およびＣＤ１３１の少なくとも一方の存在量が健常者と比較して増加または減少している場合に、ＧＭ－ＣＳＦが関与する疾患であると診断できる。

[0330] 免疫学的手法とは、標識を施した抗原または抗体を用いて、抗体量または抗原量を検出または測定する方法である。例えば、放射性物質標識免疫抗体法、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、発光免疫測定法、ウェスタンブロット法または物理化学的手法などが挙げられる。

[0331] 放射性物質標識免疫抗体法としては、例えば、抗原または抗原を発現した細胞などに、本発明のバイスペシフィック抗体または該抗体断片を反応させ、さらに放射線標識を施した抗イムノグロブリン抗体または結合断片を反応させた後、シンチレーションカウンターなどで測定する方法が挙げられる。

[0332] 酵素免疫測定法としては、例えば、抗原または抗原を発現した細胞などに、本発明のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片を反応させ、さらに標識を施した抗イムノグロブリン抗体または結合断片を反応させた後、発色色素を吸光光度計で測定する方法が挙げられる。例えば、サンドイッチＥＬＩＳＡ法などが挙げられる。

[0333] 酵素免疫測定法で用いる標識体としては、公知の酵素標識［酵素免疫測定法、医学書院（１９８７）］を用いることができる。例えば、アルカリフォスファターゼ標識、ペルオキシダーゼ標識、ルシフェラーゼ標識、またはビオチン標識などを用いる。

[0334] サンドイッチＥＬＩＳＡ法は、固相に抗体を結合させた後、検出または測定対象である抗原をトラップさせ、トラップされた抗原に第２の抗体を反応させる方法である。該ＥＬＩＳＡ法では、検出または測定したい抗原に結合する抗体または抗体断片であって、抗原結合部位の異なる２種類の抗体を準備し、そのうち、第１の抗体または抗体断片をあらかじめプレート（例えば、９６穴プレート）に吸着させ、次に第２の抗体または抗体断片をＦＩＴＣなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼなどの酵素、またはビオチンなどで標識しておく。上記の抗体が吸着したプレートに、生体内から分離された細胞若しくはその破砕液、組織若しくはその破砕液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、または眼液などを反応させた後、標識した抗体または抗体断片を反応させ、標識物質に応じた検出反応を行う。濃度既知の抗原を段階的に希釈して作製した検量線より、被験サンプル中の抗原濃度を算出する。

[0335] サンドイッチＥＬＩＳＡ法に用いる抗体としては、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれを用いてもよく、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、またはＦ（ａｂ’）$_2$などの抗体断片を用いてもよい。サンドイッチＥＬＩＳＡ法で用いる２種類の抗体の組み合わせとしては、異なるエピトープに結合するモノクローナル抗体または該抗体断片の組み合わせでもよいし、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体またはその抗体断片との組み合わせでもよい。

[0336] 蛍光免疫測定法としては、例えば、文献［Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック（１９８７）］などに記載された方法で測定する。蛍光免疫測定法で用いる標識体としては、公知の蛍光標識［蛍光抗体法、ソフトサイエンス社（１９８３）］を用いることができる。例えば、ＦＩＴＣまたはＲＩＴＣなどを用いる。

[0337] 発光免疫測定法としては、例えば、文献［生物発光と化学発光　臨床検査４２、廣川書店（１９９８）］などに記載された方法で測定する。発光免疫測定法で用いる標識体としては、公知の発光体標識が挙げられ、例えば、アクリジニウムエステルまたはロフィンなどを用いる。

[0338] ウェスタンブロット法としては、抗原または抗原を発現した細胞などをＳＤＳ（ドデシル硫酸ナトリウム）－ＰＡＧＥ［Antibodies - A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory (1988)］で分画した後、該ゲルをポリフッ化ビニリデン（ＰＶＤＦ）膜またはニトロセルロース膜にブロッティングし、該膜に抗原に結合する抗体または抗体断片を反応させ、さらにＦＩＴＣなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼなどの酵素標識、またはビオチン標識などを施した抗ＩｇＧ抗体またはその抗体断片を反応させた後、該標識を可視化することによって測定する。一例を以下に示す。

[0339] まず、所望のアミノ酸配列を有するポリペプチドを発現している細胞や組織を溶解し、還元条件下でレーンあたりのタンパク質量として０．１～３０μｇをＳＤＳ－ＰＡＧＥ法により泳動する。次に、泳動されたタンパク質をＰＶＤＦ膜にトランスファーし１～１０％ＢＳＡを含むＰＢＳ（以下、ＢＳＡ－ＰＢＳと表記する）に室温で３０分間反応させブロッキング操作を行う。ここで本発明のバイスペシフィック抗体を反応させ、０．０５～０．１％のＴｗｅｅｎ－２０を含むＰＢＳ（Ｔｗｅｅｎ－ＰＢＳ）で洗浄し、ペルオキシダーゼ標識したヤギ抗マウスＩｇＧを室温で２時間反応させる。Ｔｗｅｅｎ－ＰＢＳで洗浄し、ＥＣＬ　Ｗｅｓｔｅｒｎ　Ｂｌｏｔｔｉｎｇ　Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　Ｒｅａｇｅｎｔｓ（アマシャム社製）などを用いて該抗体

が結合したバンドを検出することにより、抗原を検出する。ウェスタンブロット法での検出に用いられる抗体としては、天然型の立体構造を保持していないポリペプチドに結合できる抗体が用いられる。

[0340] 物理化学的手法としては、例えば、抗原であるＣＤ１１６およびＣＤ１３１の少なくとも一方と本発明のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片とを結合させることにより、凝集体を形成させて、該凝集体を検出する。この他に物理化学的手法として、毛細管法、一次元免疫拡散法、免疫比濁法またはラテックス免疫比濁法［臨床検査法提要、金原出版（１９９８）］などを用いることもできる。

[0341] ラテックス免疫比濁法では、抗体または抗原を感作させた粒径０．１～１μｍ程度のポリスチレンラテックスなどの担体を用い、対応する抗原または抗体により抗原抗体反応を起こさせると、反応液中の散乱光は増加し、透過光は減少する。この変化を吸光度または積分球濁度として検出することにより、被験サンプル中の抗原濃度などを測定する。

[0342] 一方、ＣＤ１１６およびＣＤ１３１の少なくとも一方が発現している細胞の検出または測定には、公知の免疫学的検出法を用いることができるが、好ましくは免疫沈降法、免疫細胞染色法、免疫組織染色法または蛍光抗体染色法などを用いる。

[0343] 免疫沈降法としては、ＣＤ１１６およびＣＤ１３１の少なくとも一方を発現した細胞などを本発明のバイスペシフィック抗体またはその抗体断片と反応させた後、プロテインＧセファロースなどのイムノグロブリンに特異的な結合能を有する担体を加えて、抗原抗体複合体を沈降させる。

[0344] または、以下のような方法によっても行なうことができる。まず、ＥＬＩＳＡ用９６穴プレートに本発明のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片を固相化した後、ＢＳＡ－ＰＢＳによりブロッキングする。次に、ＢＳＡ－ＰＢＳを捨てＰＢＳでよく洗浄した後、ＣＤ１１６およびＣＤ１３１の少なくとも一方を発現している細胞や組織の溶解液を反応させる。よく洗浄した後のプレートより、免疫沈降物をＳＤＳ－ＰＡＧＥ用サ

ンプルバッファーで抽出し、上記のウェスタンブロッティングにより検出する。

[0345] 免疫細胞染色法または免疫組織染色法とは、抗原を発現した細胞または組織などを、場合によっては抗体の透過性を良くするために界面活性剤やメタノールなどで処理した後、本発明のバイスペシフィック抗体と反応させ、さらにＦＩＴＣなどの蛍光標識、ペルオキシダーゼなどの酵素標識またはビオチン標識などを施した抗イムノグロブリン抗体またはその結合断片と反応させた後、該標識を可視化し、顕微鏡にて顕鏡する方法である。また、蛍光標識の抗体と細胞を反応させ、フローサイトメーターにて解析する蛍光抗体染色法［Monoclonal Antibodies - Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック（１９８７）］により検出を行うことができる。特に、本発明のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片は、蛍光抗体染色法により、細胞膜上に発現しているＣＤ１１６およびＣＤ１３１の少なくとも一方を検出できる。

[0346] また、蛍光抗体染色法のうち、ＦＭＡＴ８１００ＨＴＳシステム（アプライドバイオシステム社製）などを用いた場合には、形成された抗体－抗原複合体と、抗体－抗原複合体の形成に関与していない遊離の抗体または抗原とを分離することなく、抗原量または抗体量を測定できる。

実施例

[0347] ［実施例１］ＣＤ１３１、ＣＤ１１６抗原発現ベクターおよび可溶性抗原の作製

（１）ヒト、サル、およびマウスＣＤ１３１発現ベクターの作製

ヒトＣＤ１３１遺伝子の塩基配列（Ｇｅｎｂａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｕｍｂｅｒ：Ｍ５９９４１）、サルＣＤ１３１遺伝子の塩基配列（Ｇｅｎｂａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｕｍｂｅｒ：ＸＰ＿０１５３１２７２４＿１）、およびマウスＣＤ１３１遺伝子の塩基配列（Ｇｅｎｂａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｕｍｂｅｒ：Ｍ３４３９７）から、ヒト、サル、およ

びマウスＣＤ１３１全長のアミノ酸配列を取得し、哺乳類細胞での発現に最適なコドンに変換を行い、ヒト、サル、およびマウスＣＤ１３１全長をコードする塩基配列を得た。

[0348] ヒトおよびサルＣＤ１３１全長の塩基配列（配列番号１、配列番号２）を有するＤＮＡを全合成し、ｐＥＦ６－ｍｙｃ－Ｈｉｓベクター（サーモフィッシャー社製）に、Ｉｎｆｕｓｉｏｎ－ＨＤ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｋｉｔ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ社製）を用いて挿入し、ヒトおよびサルＣＤ１３１全長発現ベクターを得た。

[0349] ヒト、サル、およびマウスＣＤ１３１細胞外領域の塩基配列を有するＤＮＡ（配列番号３、配列番号４、配列番号５）と、シグナル配列とヒトＦｃ配列またはＨｉｓタグ配列を付加した塩基配列を有するＤＮＡを全合成し、ｐＣｌベクター（Ｐｒｏｍｅｇａ社製）に、Ｉｎｆｕｓｉｏｎ－ＨＤ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｋｉｔ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ社製）を用いて挿入し、ヒト、サルおよびマウスＣＤ１３１可溶性抗原発現ベクターを得た。

[0350] （２）ヒト、サル、およびマウスＣＤ１１６発現ベクターの作製

ヒトＣＤ１１６遺伝子の塩基配列（Ｇｅｎｂａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｕｍｂｅｒ：Ｘ１７６４８）、マウスＣＤ１１６遺伝子の塩基配列（Ｇｅｎｂａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｕｍｂｅｒ：Ｍ８５０７８）から、ヒト、マウスＣＤ１１６全長のアミノ酸配列を取得した。サルＣＤ１１６についてはカニクイザルｔｏｔａｌ ＲＮＡよりクローニングし全長の塩基配列およびアミノ酸配列情報を得た。これらアミノ酸配列を哺乳類細胞での発現に最適なコドンに変換を行い、ヒト、サル、およびマウスＣＤ１１６全長をコードする塩基配列を得た。

[0351] ヒトおよびサルＣＤ１１６全長の塩基配列（配列番号６、配列番号７）を全合成し、ｐＣｌベクター（Ｐｒｏｍｅｇａ社製）に、Ｉｎｆｕｓｉｏｎ－ＨＤ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｋｉｔ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ社製）を用いて挿入し、ヒトおよびサルＣＤ１１６全長発現ベクターを得た。

[0352] ヒト、サル、およびマウスＣＤ１１６細胞外領域の塩基配列（配列番号８

、配列番号９、配列番号１０）を有するＤＮＡと、シグナル配列とヒトＦｃ配列またはＨｉｓタグ配列を付加した塩基配列を有するＤＮＡを全合成し、ｐＣＩベクター（Ｐｒｏｍｅｇａ社製）に、Ｉｎｆｕｓｉｏｎ－ＨＤ　ＣＩｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔ（ＣＩｏｎｔｅｃｈ社製）を用いて挿入し、ヒト、サルおよびマウスＣＤ１１６可溶性抗原発現ベクターを得た。

[0353] （３）可溶性ＣＤ１３１タンパク質および可溶性ＣＤ１１６タンパク質の作製

Ｅｘｐｉ２９３（商標）Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ社製）を用いて、（１）で作製したヒト、サルおよびマウスＣＤ１３１可溶性抗原発現ベクター（ヒトＦｃ融合体またはＨｉｓタグ融合体）、および（２）で作製したヒト、サルおよびマウスＣＤ１１６可溶性抗原発現ベクター（ヒトＦｃ融合体またはＨｉｓタグ融合体）、をＥｘｐｉ２９３Ｆ細胞に導入して培養し、一過性にタンパク質を発現させた。ベクター導入４～５日後に培養上清を回収し、孔径０．２２μｍのメンブランフィルター（ＭＩＬＬＩＰＯＲＥ社製）で濾過した。

[0354] 前記培養上清をＰｒｏｔｅｉｎ　Ａ樹脂（ＭａｂＳｅｌｅｃｔ、ＧＥヘルスケア社製）またはｃＯｍｐｌｅｔｅ　Ｈｉｓ－Ｔａｇ　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｒｅｓｉｎ（ロシュ社製）を用いてアフィニティー精製を行った。

[0355] ＰｒｏｔｅｉｎＡ樹脂を用いたヒトＦｃ融合体の精製は、培養上清中のタンパク質をプロテインＡに吸着させたのち、Ｄ－ＰＢＳ（－）にて洗浄し、２０ｍＭクエン酸ナトリウム、５０ｍＭ　ＮａＣｌ緩衝液（ｐＨ３．４）により溶出して、１Ｍリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ７．０）を含むチューブに回収した。

[0356] ｃＯｍｐｌｅｔｅ　Ｈｉｓ－Ｔａｇ　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｒｅｓｉｎを用いたＨｉｓタグ融合体の精製は、培養上清中のタンパク質を、２０ｍＭ　リン酸、５００ｍＭ　ＮａＣｌバッファーで平衡化したレジンに吸着させたのち、２０ｍＭ　リン酸、５００ｍＭ　ＮａＣｌ、５ｍＭ　イミダゾ

ールバッファーで洗浄し、２０ｍＭ　リン酸、５００ｍＭ　ＮａＣｌ、２５０ｍＭ　イミダゾールバッファーで溶出し、チューブに回収した。

[0357] 次に、ＮＡＰ－２５（ＧＥヘルスケア社製）を用いて、溶出液をＤ－ＰＢＳ（－）に置換した後、孔径０．２２μｍのメンブレンフィルターＭｉｌｌｅｘ－Ｇｖ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社製）でろ過滅菌した。

[0358] 取得したタンパク質の濃度は、波長２８０ｎｍの吸光度を測定して、各タンパク質のアミノ酸配列から推定される吸光係数を用いて算出した。

[0359] ［実施例２］抗ヒトＣＤ１３１モノクローナル抗体、および抗ヒトＣＤ１１６モノクローナル抗体の作製

（１）動物への免疫と抗体産生細胞の調製

ヒト抗体産生マウス［Ishida & Lonberg, IBC‘s 11th Antibody Engineering, Abstract 2000;Ishida, I. et al., Cloning & Stem Cells 4, 91-102 (2002)、および石田　功（２００２）実験医学２０，６，８４６－８５１］に、免疫原として、ヒトＣＤ１３１－Ｆｃ（R&D システムズ社製）または実施例１で作製したヒトＣＤ１３１可溶性抗原（ヒトＦｃ融合体）、ヒトＣＤ１１６可溶性抗原（ヒトＦｃ融合体）を２０μｇ／匹または５０μｇ／匹で計４～６回投与した。初回免疫時のみ、アジュバントとしてＡｌｕｍゲル（０．２５ｍｇ／匹または２ｍｇ／匹）および不活性化百日咳菌懸濁液（ナカライテスク社製）（１×１０^{9}個／匹）を添加した。

[0360] 初回免疫から２週間後に２回目免疫、その１週間後に３回目免疫、３回目免疫から２週間後に最終免疫を行った。なお、一部の個体については、３回目免疫から２週間間隔で２回の追加免疫を行ったのち、２週間後に最終免疫を行った。最終免疫から４日後に解剖してリンパ節または脾臓を外科的に摘出した。摘出したリンパ節または脾臓をホモジナイズした後、セルストレイナー（ファルコン社製）を通して細胞をチューブへ移し、遠心分離して細胞を沈殿させた。

[0361] 得られた脾臓細胞は、赤血球除去試薬（シグマアルドリッチ社製）と混和し、３７℃の湯浴で１分間反応させた後、ＭＥＭ培地（シグマアルドリッチ

社製）で希釈を行った後、更に遠心分離を行った。得られた脾細胞またはリンパ球は、ＭＥＭ培地で２回洗浄した後、ハイブリドーマの作製または抗体ライブラリーの作製に供した。

[0362] （２）ハイブリドーマの作製

８－アザグアニン耐性マウス骨髄腫細胞株ｐ３－Ｕ１［Ｐ３Ｘ６３Ａｇ８Ｕ．１、ＡＴＣＣ：ＣＲＬ－１５９７、Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、６、５１１（１９７６）］をＲＰＭＩ １６４０培地（和光純薬社製）に１０％ ＦＢＳ（Ａｃｃｅｓｓ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ社製）、ゲンタマイシン（２０μｇ／ｍＬ）を添加した培地で培養し、細胞融合時に必要な細胞数（３×１０^{7}ｃｅｌｌｓ以上）となるまで拡大培養した。

[0363] （１）で得られたマウス脾細胞またはリンパ球と、骨髄腫細胞を２：１になるように混合し、遠心分離（１５００ｒｐｍ、５分間）した。得られた沈殿画分（細胞群）をほぐしたのち、ＧｅｎｏｍＯＮＥ－ＣＦ（石原産業社製）を用いて細胞融合を行った。氷上で５分間反応させたのち、３７℃で１５分間インキュベートした。

[0364] その後、クローニングメデュームＣＭ－Ｂ（積水メディカル株式会社製）に１０％ ＦＢＳ（Ａｃｃｅｓｓ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ社製）、ＨＡＴ ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ（サーモフィッシャー社製）、ゲンタマイシン（２０μｇ／ｍＬ）を添加した培地（以下、ＨＡＴ培地）を加え、２．５～５×１０^{6}ｃｅｌｌｓ／１８ｍＬとなるように懸濁し、９６ウェルプレートにＡ列を除いて２００μＬずつ播種し、３７℃、５％CO_2の条件下で８～１０日間培養した。培地交換は、スクリーニングの１～２日前にＨＡＴ培地を用いて行い、培地交換から１～２日後の培養上清を用いて、以下に記載するハイブリドーマのスクリーニングを行った。

[0365] （３）抗ヒトＣＤ１３１抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング

抗ヒトＣＤ１３１抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングは、ＥＬＩＳＡおよびＦＣＭにより行った。ＥＬＩＳＡによるスクリーニングは、実施例

１－（３）で調製したヒトＣＤ１３１可溶性抗原（Ｈｉｓタグ体）、サルＣＤ１３１可溶性抗原（Ｈｉｓタグ体）、およびマウスＣＤ１３１可溶性抗原（Ｈｉｓタグ体）を固相化させた固相抗原ＥＬＩＳＡ系を用いた。

[0366] 各種抗原タンパク質を、Ｄ－ＰＢＳ（－）（ナカライテスク社製）にて５μｇ／ｍＬに調製したものを９６ウェルまたは３８４ウェルのＥＬＩＳＡ用プレート（ＭＡＸＩＳＯＲＰ　ＮＵＮＣ－ＩＭＭＮＯ　ＰＬＡＴＥ、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）に５０μＬ／ウェルまたは２５μＬ／ウェルで分注し、４℃にて一晩静置して吸着させたのち、ＰＢＳで２～３回洗浄し、１％ＢＳＡ－ＰＢＳ（ナカライテスク社製）を１００μＬ／ウェルまたは５０μＬ／ウェルで分注し、室温にて１時間静置してブロッキングした。

[0367] 次に、ハイブリドーマ上清を５０μＬ／ウェルまたは２５μＬ／ウェルで分注し、室温にて１時間静置した。このプレートをＰＢＳＴで３回洗浄した後、１％ＢＳＡ－ＰＢＳで希釈したＰｅｒｏｘｉｄａｓｅ標識Ｇｏａｔ　Ａｎｔｉ－Ｈｕｍａｎ　ＩｇＧ，Ｆｃγ　ｆｒａｇｍｅｎｔ　ｓｐｅｃｉｆｉｃ抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ社製、Ｃａｔ＃１０９－０３５－００８）を５０μＬ／ウェルまたは２５μＬ／ウェルで分注し、室温にて１時間静置した。

[0368] このプレートをＰＢＳＴで３回洗浄し、ＡＢＴＳ（２，２’－Ａｚｉｎｏ－ｂｉｓ（３－ｅｔｈｙｌｂｅｎｚｏｔｈｉａｚｏｌｉｎｅ－６－ｓｕｌｆｏｎｉｃ　Ａｃｉｄ、Ｗａｋｏ社製、Ｃａｔ＃０１６－０８５２１）基質液またはＴＭＢ基質液（サーモフィッシャー社製）を５０μＬ／ウェルまたは２５μＬ／ウェルで添加して発色させ、適当な発色が得られたところで、１％ＳＤＳ溶液または０．５ｍｏｌ／Ｌ硫酸を等量添加して発色を停止させたのち、サンプル波長４１５ｎｍ、リファレンス波長４９０ｎｍにおける吸光度（４１５ｎｍ－４９０ｎｍ）またはサンプル波長４５０ｎｍ、リファレンス波長５７０ｎｍにおける吸光度（４５０ｎｍ－５７０ｎｍ）をプレートリーダー（Ｓｐｅｃｔｒａ　Ｍａｘ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ社

製、またはＳＰＡＲＫ　１０Ｍ、ＴＥＣＡＮ社製）を用いて測定した。

[0369] ＦＣＭによるスクリーニングは、Ｅｘｐｉ２９３（商標）Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ社製）に、実施例１－（１）で作製したヒトおよびサルＣＤ１３１全長発現ベクターを一過性導入した細胞および未導入細胞を用いた。各細胞を１％ＢＳＡ－ＰＢＳ（ナカライテスク社製）に懸濁し、１～２×１０^{5}細胞／ウェルとなるように９６ウェルプレートに分注し、氷上で３０分間インキュベートしたのち、遠心分離（２０００ｒｐｍ、２分間）した。上清を除去後、ハイブリドーマ上清を２０～５０μＬ／ウェルで分注し、氷上で３０分間反応させた。遠心分離と１％ＢＳＡ－ＰＢＳによる洗浄を１～２回行ったのち、１％ＢＳＡ－ＰＢＳで希釈したＡＰＣ標識Ｆ（ａｂ’）$_{2}$ Ｆｒａｇｍｅｎｔ　Ｇｏａｔ　Ａｎｔｉ－Ｈｕｍａｎ　ＩｇＧ，Ｆｃγ　ｆｒａｇｍｅｎｔ　ｓｐｅｃｉｆｉｃ抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ社製、Ｃａｔ＃１０９－１３６－０９８）　を５０μＬ／ウェルで分注し、氷上、遮光下で３０分間反応させた。遠心分離と１％ＢＳＡ－ＰＢＳによる洗浄を３回行ったのち、１％ＢＳＡ－ＰＢＳに懸濁し、フローサイトメーター（ＦＡＣＳ　Ｃａｎｔｏ　ＩＩ、ＢＤバイオサイエンス社製、またはＣｙＡｎ　ＡＤＰ、ＢＥＣＫＭＡＮ　ＣＯＵＬＴＥＲ社製）により蛍光強度の測定を行った。

[0370] （４）抗ヒトＣＤ１１６抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング

抗ヒトＣＤ１１６抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングは、ＥＬＩＳＡおよびＦＣＭにより行った。ＥＬＩＳＡによるスクリーニングは、Ｔｅｔｒａ　Ｈｉｓ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ（キアゲン社製、Ｃａｔ＃３４６７０）を固相化させたプレートに、実施例１－（３）で調製したヒトＣＤ１１６可溶性抗原（Ｈｉｓタグ体）、サルＣＤ１１６可溶性抗原（Ｈｉｓタグ体）、およびマウスＣＤ１１６可溶性抗原（Ｈｉｓタグ体）をキャプチャーさせた間接固相抗原ＥＬＩＳＡ系を用いた。

[0371] Ｔｅｔｒａ　Ｈｉｓ　Ａｎｔｉｂｏｄｙを、Ｄ－ＰＢＳ（－）（ナカライテスク社製）にて５μｇ／ｍＬに調製したものを９６ウェルまたは３８４ウ

ェルのＥＬＩＳＡ用プレート（ＭＡＸＩＳＯＲＰ　ＮＵＮＣ－ＩＭＭＮＯ　ＰＬＡＴＥ、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）に５０μＬ／ウェルまたは２５μＬ／ウェルで分注し、４℃にて一晩静置して吸着させたのち、ＰＢＳで２～３回洗浄し、１％ＢＳＡ－ＰＢＳ（ナカライテスク社製）を１００μＬ／ウェルまたは５０μＬ／ウェルで分注し、室温にて１時間静置してブロッキングした。

[0372] 次に、実施例１－（３）で調製したヒトＣＤ１１６可溶性抗原（Ｈｉｓタグ体）、サルＣＤ１１６可溶性抗原（Ｈｉｓタグ体）、マウスＣＤ１１６可溶性抗原（Ｈｉｓタグ体）を５μｇ／ｍＬに１％ＢＳＡ－ＰＢＳで希釈したものを５０μＬ／ウェルまたは２５μＬ／ウェルで分注し、室温にて１時間静置した。このプレートをＰＢＳＴで３回洗浄した後、１％ＢＳＡ－ＰＢＳで希釈したハイブリドーマ上清を５０μＬ／ウェルまたは２５μＬ／ウェルで分注し、室温にて１時間静置した。このプレートをＰＢＳＴで３回洗浄した後、１％ＢＳＡ－ＰＢＳで希釈したＰｅｒｏｘｉｄａｓｅ標識Ｇｏａｔ　Ａｎｔｉ－Ｈｕｍａｎ　ＩｇＧ，Ｆｃ抗体（ＩＢＬ社製、Ｃａｔ＃１７５０７）を５０μＬ／ウェルまたは２５μＬ／ウェルで分注し、室温にて１時間静置した。

[0373] このプレートをＰＢＳＴで３回洗浄し、ＡＢＴＳ（２，２’－Ａｚｉｎｏ－ｂｉｓ（３－ｅｔｈｙｌｂｅｎｚｏｔｈｉａｚｏｌｉｎｅ－６－ｓｕｌｆｏｎｉｃ　Ａｃｉｄ、Ｗａｋｏ社製、Ｃａｔ＃０１６－０８５２１）基質液またはＴＭＢ基質液（サーモフィッシャー社製）を５０μＬ／ウェルまたは２５μＬ／ウェルで添加して発色させ、適当な発色が得られたところで、１％ＳＤＳ溶液または０．５ｍｏｌ／Ｌ硫酸を等量添加して発色を停止させたのち、サンプル波長４１５ｎｍ、リファレンス波長４９０ｎｍにおける吸光度（４１５ｎｍ－４９０ｎｍ）またはサンプル波長４５０ｎｍ、リファレンス波長５７０ｎｍにおける吸光度（４５０ｎｍ－５７０ｎｍ）をプレートリーダー（Ｓｐｅｃｔｒａ　Ｍａｘ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ社製、またはＳＰＡＲＫ　１０Ｍ、ＴＥＣＡＮ社製）を用いて測定した。

[0374] ＦＣＭによるスクリーニングは、Ｅｘｐｉ２９３（商標）Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ社製）に、実施例１－（２）で作製したヒトおよびサルＣＤ１１６全長発現ベクターを一過性導入した細胞および未導入細胞を用いた。各細胞を１％ＢＳＡ－ＰＢＳ（ナカライテスク社製）に懸濁し、１～２×１０^{5}細胞／ウェルとなるように９６ウェルプレートに分注し、氷上で３０分間インキュベートしたのち、遠心分離（２０００ｒｐｍ、２分間）した。

[0375] 上清を除去後、ハイブリドーマ上清を２０～５０μＬ／ウェルで分注し、氷上で３０分間反応させた。遠心分離と１％ＢＳＡ－ＰＢＳによる洗浄を１～２回行った後、１％ＢＳＡ－ＰＢＳで希釈したＡＰＣ標識Ｆ（ａｂ’）$_{2}$ Ｆｒａｇｍｅｎｔ Ｇｏａｔ Ａｎｔｉ－Ｈｕｍａｎ ＩｇＧ, Ｆｃγ ｆｒａｇｍｅｎｔ ｓｐｅｃｉｆｉｃ抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ Ｉｍｍｕｎｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ社製、Ｃａｔ＃１０９－１３６－０９８） を５０μＬ／ウェルで分注し、氷上、遮光下で３０分間反応させた。

[0376] 遠心分離と１％ＢＳＡ－ＰＢＳによる洗浄を３回行ったのち、１％ＢＳＡ－ＰＢＳに懸濁し、フローサイトメーター（ＦＡＣＳ Ｃａｎｔｏ ＩＩ、ＢＤバイオサイエンス社製、またはＣｙＡｎ ＡＤＰ、ＢＥＣＫＭＡＮ ＣＯＵＬＴＥＲ社製）により蛍光強度の測定を行った。

[0377] （５）ハイブリドーマの単離および抗体遺伝子配列の解析

ハイブリドーマのスクリーニングにより選択した陽性ウェルのハイブリドーマについて、セルソーター（ＳＯＮＹ社製、ＳＨ８００）を用いてＨＡＴ培地を分注した９６ウェルプレートに播種し単クローン化を行った。

[0378] ３７℃、５％ＣＯ$_{2}$の条件下、ウェル内の細胞がスクリーニングに適した細胞数になるまで、培養を行い、得られた単クローンハイブリドーマ培養上清を用いて、（２）または（３）に記載した方法によるスクリーニングを再度行い、抗ＣＤ１３１モノクローナル抗体産生ハイブリドーマおよび抗ＣＤ１１６モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを樹立した。

[0379] 得られたハイブリドーマからＭａｇＮＡｐｕｒｅ ９６（Ｒｏｃｈｅ社製

）およびＭａｇＮＡ　Ｐｕｒｅ　９６　Ｃｅｌｌｕｌａｒ　ＲＮＡ　Ｌａｒｇｅ　Ｖｏｌｕｍｅ　Ｋｉｔ（Ｒｏｃｈｅ社製）を用い、ｔｏｔａｌ　ＲＮＡを調製した。調製したｔｏｔａｌ　ＲＮＡを鋳型として、ＳＭＡＲＴｅｒ　ＲＡＣＥ　５’／３’　Ｋｉｔ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ社製）を用いて、ｃＤＮＡを作製した。

[0380] 得られた各ハイブリドーマに対応するｃＤＮＡを鋳型として、キット添付のユニバーサルプライマーＡ　ｍｉｘ（フォワードプライマーを含有する）と、ヒトＩｇＧ重鎖定常領域または軽鎖定常領域をコードするリバースプライマーを組み合わせたＰＣＲ反応を、ＰｒｉｍｅＳＴＡＲ　Ｍａｘ　ＤＮＡ　Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（タカラバイオ社製）を用いて行うことで、重鎖抗体遺伝子断片および軽鎖抗体遺伝子断片を増幅させた。

[0381] 増幅した重鎖抗体遺伝子断片および軽鎖抗体遺伝子断片について、ダイレクトシーケンス法によるＤＮＡシーケンス解析、または、Ｚｅｒｏ　Ｂｌｕｎｔ　ＴＯＰＯ　ＰＣＲ　ＣｌｏｎｉｎｇＫｉｔ　ｆｏｒ　Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ（インビトロジェン社製）を用いたサブクローニング法によるＤＮＡシーケンス解析により、配列同定を行った。

[0382] ダイレクトシーケンス法によるＤＮＡシーケンス解析は、ＰＣＲ産物１０μＬに対して、ＥｘｏＳＡＰ－ＩＴ－Ｅｘｐｒｅｓｓ（サーモフィッシャー社製）を４μＬ添加し、３７℃、４分間、８０℃、１分間の反応を行った後、滅菌水で希釈したサンプルを鋳型として、Ｎｅｓｔｅｄ－ＰＣＲに使用したプライマーの末端配列に対応するプライマーを用いて行った。

[0383] Ｚｅｒｏ　Ｂｌｕｎｔ　ＴＯＰＯ　ＰＣＲ　ＣｌｏｎｉｎｇＫｉｔ　ｆｏｒ　Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ（インビトロジェン社製）を用いたサブクローニング法によるＤＮＡシーケンス解析は、以下の手順で行った。ＰＣＲ産物を、ｐＣＲ４ベクター（インビトロジェン社製）に挿入したのち、得られたプラスミドを、大腸菌ＤＨ５α株に導入した。

[0384] 得られた形質転換株より自動プラスミド抽出機（クラボウ社製）を用いて抽出したプラスミドを鋳型として用い、Ｚｅｒｏ　Ｂｌｕｎｔ　ＴＯＰＯ

ＰＣＲ ＣｌｏｎｉｎｇＫｉｔ ｆｏｒ Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇに添付のＭ１３プライマーを用いて、ＤＮＡシーケンス解析を行った。

[0385] ＤＮＡシーケンス解析結果から、完全長のＶＨをコードする塩基配列またはＶＬをコードする塩基配列を確認し、各ハイブリドーマが発現するＣＤ１３１に対する抗体およびＣＤ１１６に対する抗体のアミノ酸配列を決定した。それぞれのクローン名、ＶＨ、ＶＬおよびＣＤＲのアミノ酸配列と配列番号との対応を、表１および表２に示す。

[0386] 表１に、ＣＤ１３１抗体のクローン名、ＶＨをコードする全塩基配列から推定されるアミノ酸配列、およびＶＨのＣＤＲ１～３（以下ではＨＣＤＲ１～３と記載することもある）のアミノ酸配列、ＶＬをコードする全塩基配列から推定されるアミノ酸配列、およびＶＬのＣＤＲ１～３（以下ではＬＣＤＲ１～３と記載することもある）のアミノ酸配列、の配列番号を示す。

表２に、ＣＤ１１６抗体のクローン名、ＶＨをコードする全塩基配列から推定されるアミノ酸配列、およびＶＨのＣＤＲ１～３（以下ではＨＣＤＲ１～３と記載することもある）のアミノ酸配列、ＶＬをコードする全塩基配列から推定されるアミノ酸配列、およびＶＬのＣＤＲ１～３（以下ではＬＣＤＲ１～３と記載することもある）のアミノ酸配列、の配列番号を示す。

[0387]

[表1]

クローン名	VH全長 アミノ酸 配列番号	HCDR1 アミノ酸 配列番号	HCDR2 アミノ酸 配列番号	HCDR3 アミノ酸 配列番号	VL全長 アミノ酸 配列番号	LCDR1 アミノ酸 配列番号	LCDR2 アミノ酸 配列番号	LCDR3 アミノ酸 配列番号
131-03	21	61	62	63	22	64 (34と同一)	65 (35と同一)	66
131-16	23	67	68	69	24	70	71	72
131-18	25	73	74	75	26	76 (70と同一)	77 (71と同一)	78
131-B1	27	79	80	81	28	82 (70と同一)	83 (71と同一)	84
131-B2	29	85	86	87 (81と同一)	30 (28と同一)	88 (70と同一)	89 (71と同一)	90 (84と同一)

[0388] [表2]

クローン名	VH全長 アミノ酸 配列番号	HCDR1 アミノ酸 配列番号	HCDR2 アミノ酸 配列番号	HCDR3 アミノ酸 配列番号	VL全長 アミノ酸 配列番号	LCDR1 アミノ酸 配列番号	LCDR2 アミノ酸 配列番号	LCDR3 アミノ酸 配列番号
116-08	11	31	32	33	12	34	35	36
116-09	13	37	38	39	14	40	41	42 (40と同一)
116-18	15	43 (37と同一)	44 (38と同一)	45	16	46	47 (41と同一)	48
116-21	17	49 (37と同一)	50 (38と同一)	51	18	52 (40と同一)	53 (41と同一)	54 (40と同一)
116-22	19	55	56	57	20	58	59	60

[0389] （６）抗ヒトＣＤ１１６抗体ファージライブラリーの作製

実施例２－（５）において得られた配列番号３０で示されるアミノ酸配列を有するＣＤ１３１抗体のＬ鎖を有するＣＤ１１６抗体ファージライブラリーを下記の方法で作製した。実施例２－（１）において得られたリンパ節細胞または脾臓細胞からＲＮｅａｓｙ　Ｍｉｎｉ　Ｐｌｕｓ　ｋｉｔ（ＱＩＡＧＥＮ社製）を用いてＲＮＡを抽出し、ＳＭＡＲＴｅｒ　ＲＡＣＥ　ｃＤＮＡ増幅キット（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ社製）にてｃＤＮＡを増幅させ、さらにＰＣＲにてＶＨ遺伝子断片を増幅させた。

[0390] 前記ＶＨのＤＮＡ断片および配列番号９１で示される塩基配列を有するＶＬのＤＮＡ断片を、ファージミドｐＣＡＮＴＡＢ　５Ｅ（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ社製）のタグ配列をＦＬＡＧ－Ｈｉｓタグおよびトリプシン認識配列に変更したベクターに挿入し、大腸菌ＴＧ１（Ｌｕｃｉｇｅｎ社製）を形質転換して大腸菌ライブラリーを得た。

[0391] 得られた大腸菌ライブラリーを増幅し、ＶＣＳＭ１３　Ｉｎｔｅｒｆｅｒｅｎｃｅ　Ｒｅｓｉｓｔａｎｔ　Ｈｅｌｐｅｒ　Ｐｈａｇｅ（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）に感染させることで、配列番号９１で示されるＶＬの塩基配列を有し、ＶＨ遺伝子がライブラリー化されたＣＤ１１６抗体ファージライブラリーを得た。

[0392] （７）ファージディスプレイ法による抗ヒトＣＤ１１６抗体のスクリーニング

実施例２－（６）で得られたＣＤ１１６抗体ファージライブラリーを用いて、下記のファージディスプレイ法により、配列番号３０で示されるアミノ酸配列を有するＣＤ１３１抗体のＬ鎖を有する抗ＣＤ１１６モノクローナル抗体を取得した。

[0393] 実施例１－（３）で調製したヒトＣＤ１１６可溶性抗原（Ｈｉｓタグ体）、およびサルＣＤ１１６可溶性抗原（Ｈｉｓタグ体）を、ＥＺ－Ｌｉｎｋ　Ｓｕｌｆｏ－ＨＮＳ－ＬＣ－Ｂｉｏｔｉｎ，　Ｎｏ－Ｗｅｉｇｈｔ　Ｆｏｒｍａｔ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）を用い

てビオチン化し、ビオチン化ヒトＣＤ１１６可溶性抗原（Ｈｉｓタグ体）およびビオチン化サルＣＤ１１６可溶性抗原（Ｈｉｓタグ体）を得た。

[0394] ビオチン化ヒトＣＤ１１６可溶性抗原（Ｈｉｓタグ体）と、ＣＤ１１６免疫ヒト抗体Ｍ１３ファージライブラリーを室温下で１～２時間反応させたのち、ストレプトアビジン（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ社製）を固相化しＳｕｐｅｒＢｌｏｃｋ　Ｂｌｏｃｋｉｎｇ　Ｂｕｆｆｅｒ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ社製）を用いてブロッキングしたＭＡＸＩＳＯＲＰ　ＳＴＡＲＴＵＢＥに添加した。

[0395] 室温で３０分～１時間反応させたのち、Ｄ－ＰＢＳ（－）および０．１％Ｔｗｅｅｎ２０含有ＰＢＳ（以下ＰＢＳ－Ｔと記載する。和光純薬工業社製）で洗浄した後に、０．２５％トリプシン（ナカライテスク社製）でファージを溶出した。溶出したファージをＴＧ１コンピテントセルに感染させ、増幅させた。

[0396] 得られたファージを、ＭＡＸＩＳＯＲＰ　ＳＴＡＲＴＵＢＥに固相化したビオチン化ヒトＣＤ１１６可溶性抗原（Ｈｉｓタグ体）と再度反応させた後、チューブを洗浄し、ファージを溶出した。この操作を繰り返し、ヒトＣＤ１１６およびサルＣＤ１１６に特異的に結合する抗体分子を提示したファージを濃縮した。

[0397] 濃縮されたファージをＴＧ１に感染させることにより得た形質転換大腸菌から、プラスミドを調製した。調製したプラスミドを用いてＭｉｘ＆Ｇｏ　Ｃｏｍｐｅｔｅｎｔ　Ｃｅｌｌｓ－Ｓｔｒａｉｎ　ＴＧ１（Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ社製）を形質転換し、ＳＯＢＡＧプレート（２．０％　トリプトン、０．５％　Ｙｅａｓｔ　ｅｘｔｒａｃｔ、０．０５％　ＮａＣｌ、２．０％　グルコース、１０ｍＭ　$MgCl_2$、１００μｇ／ｍＬ　アンピシリン、１．５％　アガー）に播種してコロニーを形成させた。コロニーを植菌して数時間培養後、１ｍＭ　ＩＰＴＧ（ナカライテスク社製）を添加し、再度培養することで単クローンの大腸菌培養上清を得た。

[0398] 得られた単クローンの大腸菌培養上清を用いて、以下に記載するＥＬＩＳ

Ａ法およびＦＣＭ法にて、ヒトＣＤ１１６およびサルＣＤ１１６の両方に結合するクローンのスクリーニングを実施した。

[0399] ＥＬＩＳＡによるスクリーニングでは、ＭＡＸＩＳＯＲＰプレート（ＮＵＮＣ社製）にストレプトアビジン（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ社製）を固相化し、１％ＢＳＡ－ＰＢＳ（ナカライテスク社製）を用いてブロッキングした後、ビオチン化ヒトＣＤ１１６可溶性抗原（Ｈｉｓタグ体）、またはビオチン化サルＣＤ１１６可溶性抗原（Ｈｉｓタグ体）を結合させた。該プレートの各ウェルに各々の大腸菌培養上清を加え、室温下で６０分間反応させた後、各ウェルをＰＢＳ－Ｔで３回洗浄した。

[0400] 次いで、ＨＲＰ標識Ｇｏａｔ ｐｏｌｙ， ａｎｔｉ－ｈｕｍａｎ ｌｇＧ Ｆ（ａｂ’）$_2$（Ａｂｃａｍ社製）を１％ＢＳＡ－ＰＢＳで１０００倍に希釈し、各ウェルに５０μＬずつ加え、室温下３０分間インキュベートした。マイクロプレートを、ＰＢＳ－Ｔで３回洗浄後、ＴＭＢ発色基質液（ＤＡＫＯ社製）を各ウェルに５０μＬずつ加え、室温下で１０分間インキュベートした。各ウェルに２Ｎ ＨＣｌ溶液（５０μＬ／ｗｅｌｌ）を加えて発色反応を止め、波長４５０ｎｍ（参照波長５７０ｎｍ）での吸光度をプレートリーダー（ＥｎＳｐｉｒｅ：パーキン・エルマー社製）で測定した。

[0401] ＦＣＭによるスクリーニングは、Ｅｘｐｉ２９３（商標）Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ社製）に、実施例１－（２）で作製したヒトおよびサルＣＤ１１６全長発現ベクターを一過性導入した細胞および未導入細胞を用いた。各細胞を１％ＢＳＡ－ＰＢＳ（ナカライテスク社製）に懸濁し、１～２×１０^{5}細胞／ウェルとなるように９６ウェルプレートに分注し、氷上で３０分間インキュベートしたのち、遠心分離（２０００ｒｐｍ、２分間）した。

[0402] 上清を除去後、大腸菌培養上清およびａｎｔｉ－ＦＬＡＧ Ｍ２ Ａｎｔｉｂｏｄｙ（ＳＩＧＭＡ社製）を２０～５０μＬ／ウェルで分注し、氷上で３０分間反応させた。遠心分離と１％ＢＳＡ－ＰＢＳによる洗浄を１～２回行ったのち、１％ＢＳＡ－ＰＢＳで希釈したＡＰＣ標識Ｇｏａｔ ａｎｔｉ

－Ｍｏｕｓｅ　ＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）　抗体（Ｓｏｕｔｈｅｎ　Ｂｉｏ社製）を５０μＬ／ウェルで分注し、氷上、遮光下で３０分間反応させた。

[0403] 遠心分離と１％ＢＳＡ－ＰＢＳによる洗浄を３回行ったのち、１％ＢＳＡ－ＰＢＳに懸濁し、フローサイトメーター（ＦＡＣＳ　Ｃａｎｔｏ　ＩＩ、ＢＤバイオサイエンス社製、またはＣｙＡｎ　ＡＤＰ、ＢＥＣＫＭＡＮ　ＣＯＵＬＴＥＲ社製）により蛍光強度の測定を行った。

[0404] スクリーニングの結果、ヒトＣＤ１１６およびサルＣＤ１１６の両方に結合したクローンについて、ＶＨ配列の解析を行い、得られた結果を表３に示す。

[0405] 表３に、ＶＬのアミノ酸配列が配列番号３０である抗ＣＤ１１６抗体のクローン名、ＶＨをコードする全塩基配列から推定されるアミノ酸配列、およびＶＨのＣＤＲ１～３（以下ではＨＣＤＲ１～３と記載することもある）のアミノ酸配列の配列番号を示す。

[0406]

[表3]

クローン名	VH全長 アミノ酸 配列番号	HCDR1 アミノ酸 配列番号	HCDR2 アミノ酸 配列番号	HCDR3 アミノ酸 配列番号	VL全長 アミノ酸 配列番号	LCDR1 アミノ酸 配列番号	LCDR2 アミノ酸 配列番号	LCDR3 アミノ酸 配列番号
116-398	92	104	105	106	30 (28と同一)	88 (70と同一)	89 (71と同一)	90 (84と同一)
116-412	93	107	108	109 (106と同一)	30 (28と同一)	88 (70と同一)	89 (71と同一)	90 (84と同一)
116-413	94	110 (107と同一)	111	112(106と同一	30 (28と同一)	88 (70と同一)	89 (71と同一)	90 (84と同一)
116-421	95	113 (107と同一)	114 (105と同一)	115 (106と同一)	30 (28と同一)	88 (70と同一)	89 (71と同一)	90 (84と同一)
116-433	96	116 (125と同一)	117 (105と同一)	118(106と同一	30 (28と同一)	88 (70と同一)	89 (71と同一)	90 (84と同一)
116-435	97	119 (104と同一)	120 (105と同一)	121 (106と同一)	30 (28と同一)	88 (70と同一)	89 (71と同一)	90 (84と同一)
116-439	98	122 (107と同一)	123 (105と同一)	124(106と同一	30 (28と同一)	88 (70と同一)	89 (71と同一)	90 (84と同一)
116-463	99	125 (116と同一)	126 (105と同一)	127 (106と同一)	30 (28と同一)	88 (70と同一)	89 (71と同一)	90 (84と同一)
116-464	100	128 (107と同一)	129 (105と同一)	130 (106と同一)	30 (28と同一)	88 (70と同一)	89 (71と同一)	90 (84と同一)
116-465	101	131 (107と同一)	132	133 (106と同一)	30 (28と同一)	88 (70と同一)	89 (71と同一)	90 (84と同一)
116-466	102	134 (107と同一)	135	136 (106と同一)	30 (28と同一)	88 (70と同一)	89 (71と同一)	90 (84と同一)
116-408	103	137 (107と同一)	138 (105と同一)	139	30 (28と同一)	88 (70と同一)	89 (71と同一)	90 (84と同一)

[0407] ［実施例３］ＣＤ１３１とＣＤ１１６に結合するＩｇＧ型バイスペシフィック抗体の作製と活性評価

（１）ＣＤ１３１とＣＤ１１６に結合するＩｇＧ型バイスペシフィック抗体の作製

実施例２において取得した抗ＣＤ１３１抗体の配列および抗ＣＤ１１６抗体の配列を有するＩｇＧ型バイスペシフィック抗体発現ベクターを作製した。ＩｇＧ型バイスペシフィック抗体の構造は、論文Ｍａｂｓ，　７，　３７７（２０１５）、および論文Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，Ｄｅｓｉｇｎ　＆　Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ，　２９，　４５７，（２０１６）を参考とし、図２に記載するＫｏｂｓ－ｉｎｔｏ－Ｈｏｌｅｓを用いたヘテロＨ鎖を有するバイスペシフィック抗体であり、以下、ＩｇＧ型ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体と記載する。

[0408] Ｐｒｏｍｅｇａ社製ｐＣＩ　ベクターを共通主骨格としてシグナル配列下流にヒト抗体遺伝子を発現させるために必要な制限酵素サイトを導入し、以下のように２種類の全合成によってＨ鎖、Ｌ鎖発現用のベクターを作製した。

[0409] 第一の抗原（ＣＤ１１６）に対する抗体発現ベクターとして、Ｈ鎖可変領域として配列番号１１、１３、１５、１７および１９のいずれか１で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するＤＮＡ断片と、Ｈ鎖定常領域配列としてＬ鎖のミスペアリングを抑制するＦ１２６Ｃ／Ｃ２２０Ａ変異、ヘテロＨ鎖とするためのＳ３５４Ｃ／Ｔ３６６Ｗ変異、エフェクター活性を消失させるＬ２３４Ａ／Ｌ２３５Ａ／Ｐ３２９Ｇ変異を含む配列番号１４０で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するＤＮＡ断片とを連結し、Ｌ鎖可変領域として配列番号１２、１４、１６、１８および２０のいずれかで示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するＤＮＡ断片と、Ｌ鎖定常領域としてＬ鎖のミスペアリングを抑制するＳ１２１Ｃ／Ｃ２１４Ｓ変異を含む配列番号１４１で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するＤＮＡ断片とを連結した。

[0410] 同様に、第二の抗原（ＣＤ１３１）に対する抗体発現ベクターとして、Ｈ鎖可変領域として配列番号２１、２３、２５、２７および２９のいずれかで示されるアミノ酸配列を有するＤＮＡ断片と、Ｈ鎖定常領域配列としてヘテロＨ鎖とするためのＹ３４９Ｃ／Ｔ３６６Ｓ／Ｌ３６８Ａ／Ｙ４０７Ｖ／Ｈ４３５Ｒ／Ｙ４３６Ｆ変異を含む配列番号１４２で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するＤＮＡ断片とを連結し、Ｌ鎖可変領域として配列番号２２、２４、２６、２８および３０のいずれかで示されるアミノ酸配列を有するＤＮＡ断片と、Ｌ鎖定常領域配列として配列番号１４３で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するＤＮＡ断片とを連結した。

[0411] これら第一の抗原（ＣＤ１１６）に対する抗体発現ベクターと第二の抗原（ＣＤ１３１）に対する抗体発現ベクターを任意の組み合わせで、Ｅｘｐｉ２９３（商標）Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ社製）を用いて、Ｅｘｐｉ２９３細胞に共遺伝子導入し、１６時間後にＴｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ Ｅｎｈａｎｃｅｒを添加して、一過性発現系で合計２５種類のＩｇＧ型バイスペシフィック抗体を発現させた。

[0412] ベクター導入３～５日後に培養上清を回収し、孔径０．２２μｍのメンブランフィルター（ＭＩＬＬＩＰＯＲＥ社製）で濾過した後、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ａ樹脂（ＰＯＲＯＳ ＭａｂＣａｐｔｕｒｅ Ａ Ａｆｆｉｎｉｔｙ Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ Ｒｅｓｉｎ、Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）を用いて抗体をアフィニティー精製した。洗浄液として２０ｍＭクエン酸ナトリウム、１５０ｍＭ ＮａＣｌ緩衝液（ｐＨ６．０）を用いた。Ｐｒｏｔｅｉｎ Ａに吸着させた抗体を、４０ｍＭ酢酸ナトリウム、５００ｍＭ 塩化カルシウム緩衝液（ｐＨ４．６）により溶出し、１Ｍリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ７．０）を含むチューブに回収した。

[0413] 次に、ＮＡＰ－２５（ＧＥヘルスケア社製）を用いて、溶出液をＤ－ＰＢＳ（－）に置換した後、孔径０．２２μｍのメンブレンフィルターＭｉｌｌｅｘ－Ｇｖ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社製）でろ過滅菌した。

[0414] 取得したＩｇＧ型ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体の濃度

は、波長２８０ｎｍの吸光度を測定して、各抗体のアミノ酸配列から推定される吸光係数を用いて算出した。

[0415] （２）ＩｇＧ型ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体のアゴニスト活性解析

上記で調製した２５種類のＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体について、以下の方法でアゴニスト活性を解析した。活性解析は、ＧＭ－ＣＳＦシグナルに依存して増殖活性を示すＴＦ－１細胞株（ＡＴＣＣ，ＣＲＬ－２００３）を使用した。

[0416] ２ｎｇ／ｍＬの組換えヒトＧＭ－ＣＳＦ（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ）が添加された１０％ ＦＢＳ、Ｇｅｎｔａｍｉｃｉｎ Ｓｕｌｆａｔｅ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ ５０μｇ／ｍＬ添加ＲＰＭＩ１６４０培地（ｎａｃａｌａｉｔｅｓｑｕｅ）で継代維持されたＴＦ－１細胞を遠心し、Ｍａｃｒｏｐｈａｇｅ－ＳＦＭ培地（ＧＩＢＣＯ）で３回洗浄後、Ｍａｃｒｏｐｈａｇｅ－ＳＦＭ培地に２．５×10^5ｃｅｌｌｓ／ｍＬとなるように懸濁し、９６－ｗｅｌｌ ｐｌａｔｅ（Ｇｒｅｉｎｅｒ）に1ｗｅｌｌあたり８０μＬ、２．０×10^4ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌとなるように分注した。

[0417] その後、各ＩｇＧ型ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体サンプルを終濃度の５倍でＭａｃｒｏｐｈａｇｅ－ＳＦＭ培地を用いて調製し、２０μＬ／ｗｅｌｌで添加し、３７℃、５％ CO_2条件で３日間静置培養した。３日後、発光試薬ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ２．０（Ｐｒｏｍｅｇａ）を１００μＬ／ｗｅｌｌで添加した後、マイクロプレートリーダーＡＲＶＯ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）を用いてＡＴＰルシフェラーゼ反応による発光強度を測定した。

[0418] 組換えヒトＧＭ－ＣＳＦ ２００ｐＭ添加群の発光の平均値を１００％として、各ＩｇＧ型ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体によるＴＦ－１細胞の増殖率を算出した。代表的な結果を図３の（Ａ）および（Ｂ）に示す。

[0419] 図３の（Ａ）および（Ｂ）に示すように、各ＩｇＧ型ＣＤ１３１－ＣＤ１

１６バイスペシフィック抗体は、アゴニスト活性を示した。

[0420] ［実施例４］ＣＤ１３１とＣＤ１１６に結合するバイスペシフィック抗体の作製と活性評価

（１）ＣＤ１３１とＣＤ１１６に結合するバイスペシフィック抗体の作製

実施例２において取得した抗ＣＤ１３１抗体配列および抗ＣＤ１１６抗体配列を有する表４に示すバイスペシフィック抗体を作製した。

[0421]

[表4]

	抗CD116抗体			抗CD131抗体		
バイスペシフィック抗体名称	クローン名	VH全長アミノ酸配列番号	VL全長アミノ酸配列番号	クローン名	VH全長アミノ酸配列番号	VL全長アミノ酸配列番号
GM398	116-398	175 (92と同一)	30 (28と同一)	131-B2	29	30 (28と同一)
GM412	116-412a	176	30 (28と同一)	131-B2	29	30 (28と同一)
GM413	116-413a	177	30 (28と同一)	131-B2	29	30 (28と同一)
GM421	116-421a	178	30 (28と同一)	131-B2	29	30 (28と同一)
GM433	116-433a	179	30 (28と同一)	131-B2	29	30 (28と同一)
GM435	116-435	180 (97と同一)	30 (28と同一)	131-B2	29	30 (28と同一)
GM439	116-439	181 (98と同一)	30 (28と同一)	131-B2	29	30 (28と同一)
GM463	116-463a	182	30 (28と同一)	131-B2	29	30 (28と同一)
GM464	116-464a	183	30 (28と同一)	131-B2	29	30 (28と同一)
GM465	116-465a	184	30 (28と同一)	131-B2	29	30 (28と同一)
GM466	116-466a	185	30 (28と同一)	131-B2	29	30 (28と同一)
GM408	116-408	186 (103と同一)	30 (28と同一)	131-B2	29	30 (28と同一)

[0422] バイスペシフィック抗体の構造は、図４の（Ａ）に示すＮ末端型構造を有し、ＶＨ１は抗ＣＤ１３１抗体のＶＨ（アミノ酸配列を配列番号２９で示す）、ＣＨ１はヒトＩｇＧ４のＣＨ１（アミノ酸配列を配列番号１４４で示す

）、ＶＨ２は抗ＣＤ１１６抗体のＶＨ、定常領域は国際公開第２００６／０３３３８６号記載のヒトＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋ（アミノ酸配列を配列番号１４５で示す）、野生型ＩｇＧ１、もしくは、国際公開第２００６／０３１６５３号記載のヒトＩｇＧ１　ＬＡＬＡＧＡ変異体（アミノ酸配列を配列番号１４６で示す）等のヒト抗体の定常領域配列、またはその改変配列（アミノ酸配列を配列番号１４７～１７２で示す）であるバイスペシフィック抗体とした。かかるバイスペシフィック抗体を、以下、ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体と記載する。

[0423] Ｌ鎖発現ベクターとしては、シグナル配列およびヒトＬ鎖（κ鎖）定常領域配列を有したｐＣＩ－ＯｔＣＭＶ＿ｈＫベクターを用いた。Ｈ鎖発現ベクターとしては、シグナル配列およびヒトＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋを有したｐＣＩ－ＯｔＣＡＧ＿ｈＧ４ＰＥ（Ｒ４０９Ｋ）ベクター、またはヒトＩｇＧ１ＬＡＬＡＧＡを有したｐＣＩ－ＯｔＣＡＧ＿ｈＧ１ＬＡＬＡＧＡベクターを用いた。なおこれらのベクターは、Ｐｒｏｍｅｇａ社製ｐＣＩベクターを共通主骨格としてヒト抗体遺伝子を発現させるために必要な制限酵素サイトを導入し、全合成によって作製されたベクターである。

[0424] ｐＣＩ－ＯｔＣＭＶ＿ｈＫベクターの適切な制限酵素サイトに、全合成したＶＬの配列番号９１で示される塩基配列を有するＤＮＡ断片を挿入し、ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体のＬ鎖発現ベクターを得た。

[0425] また、配列番号１７３に示す抗ＣＤ１３１抗体ＶＨの塩基配列を有するＤＮＡ断片、配列番号１７７に示すヒトＩｇＧ４のＣＨ１をコードする塩基配列を有するＤＮＡ断片、および、アミノ酸配列を配列番号１７５～１８６に示すいずれか１の抗ＣＤ１１６抗体ＶＨのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するＤＮＡ断片を、全合成またはＰＣＲ増幅により調製し、３つのＤＮＡ断片をアセンブルＰＣＲにより連結したのち、ｐＣＩ－ＯｔＣＡＧ＿ｈＧ４ＰＥ（Ｒ４０９Ｋ）、またはｐＣＩ－ＯｔＣＡＧ＿ｈＧ１ＬＡＬＡＧＡベクターの適切な制限酵素サイトに挿入し、ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体のＨ鎖発現ベクターを得た。

[0426] 作製したＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体のＬ鎖発現ベクターおよびＨ鎖発現ベクターを、以下の方法で遺伝子導入し、ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体をそれぞれ発現させ精製した。

[0427] Ｅｘｐｉ２９３（商標）Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ社製）を用いて、Ｅｘｐｉ２９３細胞に、ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体のＬ鎖発現ベクターおよびＨ鎖発現ベクターを共遺伝子導入し、１６時間後にＴｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ Ｅｎｈａｎｃｅｒを添加して、一過性発現系で抗体を発現させた。

[0428] ベクター導入３～５日後に培養上清を回収し、孔径０．２２μｍのメンブランフィルター（ＭＩＬＬＩＰＯＲＥ社製）で濾過した後、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ａ樹脂（ＭａｂＳｅｌｅｃｔ、ＧＥヘルスケア社製）を用いて抗体をアフィニティー精製した。洗浄液としてＤ－ＰＢＳ（－）を用いた。Ｐｒｏｔｅｉｎ Ａに吸着させた抗体を、２０ｍＭクエン酸ナトリウム、５０ｍＭ ＮａＣｌ緩衝液（ｐＨ３．４）により溶出し、１Ｍリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ７．０）を含むチューブに回収した。

[0429] 次に、ＮＡＰ－２５（ＧＥヘルスケア社製）を用いて、溶出液をＤ－ＰＢＳ（－）に置換した後、孔径０．２２μｍのメンブレンフィルターＭｉｌｌｅｘ－Ｇｖ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社製）でろ過滅菌した。

[0430] 取得したＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体の濃度は、波長２８０ｎｍの吸光度を測定して、各抗体のアミノ酸配列から推定される吸光係数を用いて算出した。また、取得したＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体のＦｃ領域の有無がアゴニスト活性に与える影響を解析するため、Ｆｃ領域が野生型ＩｇＧ１であるバイスペシフィック抗体を、酵素ＩｄｅＳ（Ｐｒｏｍｅｇａ社製）を用いて添付プロトコールに従って処理し、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００ｉｎｃｒｅａｓｅカラム（ＧＥヘルスケア社製）を用いてサイズ排除クロマトグラフィーを行うことで、Ｆｃ領域が除去されたバイスペシフィック抗体を調製した。

[0431] （２）ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体の結合活性の解析

上記で調製したＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体について、抗原結合活性をＥＬＩＳＡ（Ｅｎｚｙｍｅ－Ｌｉｎｋｅｄ　Ｉｍｍｕｎｏ　Ｓｏｒｂｅｎｔ　Ａｓｓａｙ）にて解析した。

[0432] 実施例１で調製したヒトＣＤ１３１またはＣＤ１１６可溶性抗原（Ｈｉｓタグ体）をＤ－ＰＢＳ（－）（ナカライテスク社製）にて５μｇ／ｍＬに調製したものを９６ウェルまたは３８４ウェルのＥＬＩＳＡ用プレート（ＭＡＸＩＳＯＲＰ　ＮＵＮＣ－ＩＭＭＮＯ　ＰＬＡＴＥ、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）に５０μＬ／ウェルまたは２５μＬ／ウェルで分注し、４℃にて一晩静置して吸着させたのち、ＰＢＳで２～３回洗浄し、１％ＢＳＡ－ＰＢＳ（ナカライテスク社製）を１００μＬ／ウェルまたは５０μＬ／ウェルで分注し、室温にて１時間静置してブロッキングした。次に、ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体溶液を５０μＬ／ウェルまたは２５μＬ／ウェルで分注し、室温にて１時間静置した。このプレートをＰＢＳＴで３回洗浄した後、１％ＢＳＡ－ＰＢＳで希釈したＰｅｒｏｘｉｄａｓｅ標識Ｇｏａｔ　Ａｎｔｉ－Ｈｕｍａｎ　ＩｇＧ，Ｆｃγ　ｆｒａｇｍｅｎｔ　ｓｐｅｃｉｆｉｃ抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ社製、Ｃａｔ＃１０９－０３５－００８）を５０μＬ／ウェルまたは２５μＬ／ウェルで分注し、室温にて１時間静置した。このプレートをＰＢＳＴで３回洗浄し、ＡＢＴＳ（２，２’－Ａｚｉｎｏ－ｂｉｓ（３－ｅｔｈｙｌｂｅｎｚｏｔｈｉａｚｏｌｉｎｅ－６－ｓｕｌｆｏｎｉｃ　Ａｃｉｄ、Ｗａｋｏ社製、Ｃａｔ＃０１６－０８５２１）基質液またはＴＭＢ基質液（サーモフィッシャー社製）を５０μＬ／ウェルまたは２５μＬ／ウェルで添加して発色させ、適当な発色が得られたところで、１％ＳＤＳ溶液または０．５ｍｏｌ／Ｌ硫酸を等量添加して発色を停止させたのち、サンプル波長４１５ｎｍ、リファレンス波長４９０ｎｍにおける吸光度（４１５ｎｍ－４９０ｎｍ）またはサンプル波長４５０ｎｍ、リファレンス波長５７０ｎｍにおける吸光度（４５０ｎｍ－５７０ｎｍ）をプレートリーダー（Ｓｐｅｃｔｒａ　Ｍａｘ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ社製、または

ＳＰＡＲＫ　１０Ｍ、ＴＥＣＡＮ社製）を用いて測定した。

[0433] その結果、ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体はヒトＣＤ１３１またはＣＤ１１６に結合することを確認できた。

[0434] （３）ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体のアゴニスト活性解析

上記で調製した７種類のＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体（ＧＭ３９８、ＧＭ４０８、ＧＭ４１３、ＧＭ４３５、ＧＭ４６３、ＧＭ４６４、ＧＭ４６６、定常領域はいずれもＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋを使用）について、実施例３－（２）と同様にアゴニスト活性を解析した。結果を図５に示す。

[0435] 図５に示すようにＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体はいずれも組換えヒトＧＭ－ＣＳＦに匹敵するアゴニスト活性を示した。また、図６に示すように、３種類のバイスペシフィック抗体（ＧＭ４０８、ＧＭ４６３、ＧＭ４６６）について、Ｆｃ領域の有無がアゴニスト活性に与える影響を解析したところ、該アゴニスト活性はＦｃ領域の有無によって影響を受けないことがわかった。さらに、図７に示すように、Ｆｃ領域への変異導入によっても影響を受けないことが確認された。

[0436] なお、実施例４（１）において、１３１－１６（ＶＨのアミノ酸配列を配列番号２３、ＶＬのアミノ酸配列を配列番号２４で示す）との組み合わせで４３種類、１３１－Ｂ２（ＶＨのアミノ酸配列を配列番号２９、ＶＬのアミノ酸配列を配列番号３０で示す）との組み合わせで、それぞれ異なる抗ＣＤ１１６抗体のＶＨ配列を有するＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体を調製しアゴニスト活性を解析した結果、上記の７種類のバイスペシフィック抗体が特に高いアゴニスト活性を示すことがわかった。

[0437] （４）ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体のヒトＣＤ１４陽性単球に対するアゴニスト活性

ヒト単球は、組換えヒトＧＭ－ＣＳＦを添加して培養することによりｉｎｖｉｔｒｏでマクロファージに分化し、その過程で単球のマーカー分子で

あるＣＤ１４の発現が低下し、マクロファージのマーカー分子であるＣＤ２０６の発現が上昇する。したがって、ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体のヒト単球に対するアゴニスト活性を、単球からマクロファージへの分化に伴うＣＤ２０６発現の変化を指標に評価した。加えて、細胞の形態観察による評価を実施した。

[0438] 実施例４（３）でアゴニスト活性を評価した７種類のＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体（ＧＭ３９８、ＧＭ４０８、ＧＭ４１３、ＧＭ４３５、ＧＭ４６３、ＧＭ４６４、ＧＭ４６６、定常領域はいずれもＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋを使用）について本評価を実施した。

[0439] ヒトＣＤ１４陽性単球は、凍結ヒト末梢血単核細胞（ＡｌｌＣｅｌｌｓ）から、ヒトＣＤ１４マイクロビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ）およびＬＳ　Ｃｏｌｕｍｎ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を用いて調製した。調製したＣＤ１４陽性単球を培養培地［ＲＰＭＩ１６４０（ｎａｃａｌａｉ　ｔｅｓｑｕｅ）＋１０％　ＦＢＳ＋１％　Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｎ－Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｉｎ，Ｍｉｘｅｄ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（ｎａｃａｌａｉ　ｔｅｓｑｕｅ）］にて１．６×10^{6}ｃｅｌｌｓ／ｍＬに調製し、５０μＬ／ｗｅｌｌの条件で９６ｗｅｌｌ平底プレート（Ｎｕｎｃ）に播種した。

[0440] 終濃度が４０００、８００、１６０、３２、６．４、１．２８ｐＭとなるように培地にて調製したＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体（ＧＭ４６４）、および終濃度が２０００、４００、８０、１６、３．２、０．６４ｐＭとなるように培地にて調製したＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体（ＧＭ３９８、ＧＭ４０８、ＧＭ４１３、ＧＭ４３５、ＧＭ４６３、ＧＭ４６６、定常領域はいずれもＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋを使用）および組換えヒトＧＭ－ＣＳＦ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を５０μＬ／ｗｅｌｌ添加し、ＣＤ１４陽性単球と３７℃、５％CO_2の条件下で７日間、共培養した。

[0441] ７日後に、各濃度のＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体もしくは組換えヒトＧＭ－ＣＳＦと７日間培養した細胞の形態を、ＥＶＯＳ　Ｘ

Ｌ Ｃｏｒｅ Ｉｍａｇｉｎｇ Ｓｙｓｔｅｍ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）にて撮影して観察した。

[0442] その結果、ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体もしくは組換えヒトＧＭ－ＣＳＦと共培養した細胞の形態は、類似性が認められた。また、ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体もしくは組換えヒトＧＭ－ＣＳＦの濃度依存的に細胞のサイズが大きくなり、ｗｅｌｌあたりの細胞数が多くなった。

[0443] 共培養後、プレート底面に付着した細胞を剥離して回収した。回収した細胞を、ＦｃＲ Ｂｌｏｃｋｉｎｇ Ｒｅａｇｅｎｔ，ｈｕｍａｎ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ）にてＦｃＲをブロッキングした。その後、蛍光標識された抗ヒトＣＤ１４抗体（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）もしくは抗ヒトＣＤ２０６抗体（ＢＤバイオサイエンス）にて細胞表面上の各分子を染色し、ＦＡＣＳＣａｎｔｏ ＩＩ（ＢＤバイオサイエンス）にて蛍光強度を測定した。結果を図８に示す。

[0444] 図８に示すように、すべてのＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体および組換えヒトＧＭ－ＣＳＦを添加した細胞において、濃度依存的なＣＤ２０６の発現上昇が認められた。また、ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体のＣＤ２０６の発現上昇のエフィカシーは、組換えヒトＧＭ－ＣＳＦと同程度であった。

[0445] 以上より、これら本発明のバイスペシフィック抗体は、ヒト末梢血単核細胞由来のＣＤ１４陽性単球に対してＧＭ－ＣＳＦと同等のアゴニスト活性を示し、マクロファージへ分化誘導させることが確認された。

[0446] ［実施例５］ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体のＧＭ－ＣＳＦ受容体への特異性の解析

（１）ヒトＧＭ－ＣＳＦ受容体、ＩＬ－３受容体、ＩＬ－５受容体発現ベクターの構築

ＧＭ－ＣＳＦ受容体とＩＬ－３受容体、ＩＬ－５受容体は、受容体の構成分子としてＣＤ１３１を共通して有している。そこで、取得したＣＤ１３１

－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体のＧＭ－ＣＳＦ受容体への特異性を解析した。

[0447] ヒトＧＭ－ＣＳＦ受容体、ＩＬ－３受容体、およびＩＬ－５受容体発現ベクターは、下記〔１〕～〔３〕のアミノ酸配列をコードする塩基配列の５’末端にＥｃｏＲＩとＫｏｚａｋ配列、３’末端にｓｔｏｐ ｃｏｄｏｎとＮｏｔＩ配列を付加し、ＥｃｏＲＩとＮｏｔＩで消化されたｐＥＦ６／Ｍｙｃ－Ｈｉｓ Ｃ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に挿入することで構築した。

[0448] 〔１〕ヒトＧＭ－ＣＳＦ受容体発現ベクター：ＣＳＦ２ＲＡ（ＣＤ１１６，ＵｎｉＰｒｏｔ Ｅｎｔｒｙ．Ｎｏ．Ｐ１５５０９）の細胞外ドメイン、ＣＳＦ２ＲＢ（ＣＤ１３１，ＵｎｉＰｒｏｔ Ｅｎｔｒｙ．Ｎｏ．Ｐ３２９２７）の細胞外ドメイン、Ａｚａｍｉ－Ｇｒｅｅｎ配列をｆｕｒｉｎタンパク質の認識配列を挟んで接続したアミノ酸配列（配列番号１４７）

〔２〕ヒトＩＬ－３受容体発現ベクター：ＩＬ３ＲＡ（ＣＤ１２３，ＵｎｉＰｒｏｔ Ｅｎｔｒｙ．Ｎｏ．Ｐ２６９５１）の細胞外ドメイン、ＣＳＦ２ＲＢ（ＣＤ１３１，ＵｎｉＰｒｏｔ Ｅｎｔｒｙ．Ｎｏ．Ｐ３２９２７）の細胞外ドメイン、Ａｚａｍｉ－Ｇｒｅｅｎ配列をｆｕｒｉｎタンパク質の認識配列を挟んで接続したアミノ酸配列（配列番号１４８）

〔３〕ヒトＩＬ－５受容体発現ベクター：ＩＬ５ＲＡ（ＣＤ１２５，ＵｎｉＰｒｏｔ Ｅｎｔｒｙ．Ｎｏ．Ｑ０１３４４）の細胞外ドメイン、ＣＳＦ２ＲＢ（ＣＤ１３１，ＵｎｉＰｒｏｔ Ｅｎｔｒｙ．Ｎｏ．Ｐ３２９２７）の細胞外ドメイン、Ａｚａｍｉ－Ｇｒｅｅｎ配列をｆｕｒｉｎタンパク質の認識配列を挟んで接続したアミノ酸配列（配列番号１４９）

[0449] （２）ヒトＧＭ－ＣＳＦ受容体、ＩＬ－３受容体、ＩＬ－５受容体を発現するＢａ／Ｆ３細胞の作製

上記ベクターをＮｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ ２ｂ（Ｌｏｎｚａ）とＣｅｌｌ Ｌｉｎｅ Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ ｋｉｔ Ｖ（Ｌｏｎｚａ）を用いてＢａ／Ｆ３に遺伝子導入し、培養用培地［５ｎｇ／ｍＬ マウスＩＬ－３（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ）、１０％ ＦＢＳ（ＧＩＢＣＯ）、

１０μｇ／ｍＬ Ｂｌａｓｔｉｃｉｄｉｎ（ＩｎｖｉｖｏＧｅｎ）、ＲＰＭＩ１６４０（ｎａｃａｌａｉ ｔｅｓｑｕｅ）］を用いて培養した。

[0450] ４日後、目的遺伝子が導入された細胞を選抜するため、終濃度１０ｎｇ／ｍＬでヒトＧＭ－ＣＳＦ（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ）、もしくはヒトＩＬ－３（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ）、ＩＬ－５（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ）をそれぞれ加えた薬剤選抜用培地［１０％ ＦＢＳ（ＧＩＢＣＯ）、５０μｇ／ｍＬ Ｇｅｎｔａｍｙｃｉｎ（ｎａｃａｌａｉ ｔｅｓｑｕｅ）、５０ｍｇ／ｍＬ Ｇ４１８（ｎａｃａｌａｉ ｔｅｓｑｕｅ）、ＲＰＭＩ１６４０（ｎａｃａｌａｉ ｔｅｓｑｕｅ）、以降選抜用培地とも記載する］に培地交換し、２週間培養した。

[0451] 次に選抜用培地に懸濁後、限界希釈法にてそれぞれのサイトカインに対して高感受性を示すクローンを選抜した。作製したヒトＧＭ－ＣＳＦ受容体、ヒトＩＬ－３受容体、またはヒトＩＬ－５受容体を発現するＢａ／Ｆ３細胞を、それぞれＢａ／Ｆ３－ｈＧＭ－ＣＳＦＲ、Ｂａ／Ｆ３－ｈＩＬ－３Ｒ、またはＢａ／Ｆ３－ｈＩＬ－５Ｒと記載する。

[0452] （３）ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体のＧＭ－ＣＳＦ受容体への特異性の解析

選抜用培地を用いて培養したＢａ／Ｆ３－ｈＧＭ－ＣＳＦＲ、Ｂａ／Ｆ３－ｈＩＬ－３Ｒ、Ｂａ／Ｆ３－ｈＩＬ－５Ｒを遠心管に回収し、１２００ｒｐｍで３分間、遠心分離後、上清を吸引除去し、さらにＤＰＢＳ（ｎａｃａｌａｉ ｔｅｓｑｕｅ）で４回洗浄した。アッセイ用培地［１０％ ＦＢＳ（ＧＩＢＣＯ）、５０μｇ／ｍＬ Ｂｌａｓｔｉｃｉｄｉｎ（ＩｎｖｉｖｏＧｅｎ）、ＲＰＭＩ１６４０（ｎａｃａｌａｉ ｔｅｓｑｕｅ）］に５．０×１０^{4}ｃｅｌｌｓ／ｍＬに懸濁し、９６－ｗｅｌｌプレートに８０μＬ／ｗｅｌｌで播種した。

[0453] その後、ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体、組換えヒトＧＭ－ＣＳＦ（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ）、組換えヒトＩＬ－３（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ）、または組換えヒトＩＬ－５（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ）を

終濃度の５倍で培地を用いて調製し、２０μＬ／ｗｅｌｌで添加し、３７℃、５％CO_2条件で３日間静置培養した。

[0454] ３日後、発光試薬ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ２．０（Ｐｒｏｍｅｇａ）を１００μＬ／ｗｅｌｌで添加した後、マイクロプレートリーダーＡＲＶＯ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）を用いてＡＴＰルシフェラーゼ反応による発光強度を測定した。組換えヒトＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－３、ＩＬ－５　１ｎＭ添加群の発光の平均値を１００％として、各ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体サンプルの増殖率を算出した。結果を図９の（Ａ）～（Ｃ）に示す。

[0455] 図９の（Ａ）～（Ｃ）に示すように、ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体はヒトＧＭ－ＣＳＦ受容体を発現させたＢａ／Ｆ３に対してのみ細胞増殖活性を示し、ヒトＩＬ－３受容体またはＩＬ－５受容体を発現させたＢａ／Ｆ３に対しては細胞増殖活性を示さなかった。よって、ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体はＧＭ－ＣＳＦ受容体に特異的にアゴニスト活性を示すことを確認できた。

[0456] ［実施例６］抗ＧＭ－ＣＳＦ中和抗体存在下でのＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体のアゴニスト活性の解析

実施例５でアゴニスト活性を解析したＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体３種について、ＧＭ－ＣＳＦ中和抗体が存在する条件下におけるアゴニスト活性を解析した。ＧＭ－ＣＳＦ中和抗体としては、文献［Protein Eng Des Sel., 28, 461 (2015)］でＧＭ－ＣＳＦ中和活性が報告されているヤギ抗ヒトＧＭ－ＣＳＦポリクローナル抗体（Ｒ＆Ｄ）を使用した。

[0457] 実施例３と同様に、ＴＦ－１細胞を洗浄後、Ｍａｃｒｏｐｈａｇｅ－ＳＦＭ培地（ＧＩＢＣＯ）に３．３×10^5ｃｅｌｌｓ／ｍＬとなるように懸濁し、９６－ｗｅｌｌ　ｐｌａｔｅ（Ｇｒｅｉｎｅｒ）に1ｗｅｌｌあたり６０μＬ、２．０×10^4ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌとなるように分注した。

[0458] 組換えＧＭ－ＣＳＦおよびＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体を１００ｐＭとなるようにＭａｃｒｏｐｈａｇｅ－ＳＦＭ培地で希釈し、

２０μＬ／ｗｅｌｌで添加した。またＧＭ－ＣＳＦ中和抗体は１０００ｎＭとなるようにＭａｃｒｏｐｈａｇｅ－ＳＦＭ培地で希釈し、１０倍希釈で希釈系列を作製し２０μＬ／ｗｅｌｌで添加した。

[0459] ３７℃、５％ CO_2条件で３日間静置培養した後、発光試薬ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ２．０（Ｐｒｏｍｅｇａ）を１００μＬ／ｗｅｌｌで添加し、マイクロプレートリーダーＡＲＶＯ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）を用いてＡＴＰルシフェラーゼ反応による発光強度を測定した。ＧＭ－ＣＳＦ中和抗体を添加していない群の発光の平均値を１００％として、ＧＭ－ＣＳＦ中和抗体を各濃度で添加した場合の増殖率を算出した。結果を図１０に示す。

[0460] 解析の結果、組換えＧＭ－ＣＳＦによる細胞増殖は、ＧＭ－ＣＳＦ中和抗体の抗体濃度依存的に阻害されたが、図１０に示すように、本発明のＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体による細胞増殖は、いずれの濃度のＧＭ－ＣＳＦ中和抗体の存在下でも阻害されなかった。従って、本発明のＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体は、ＧＭ－ＣＳＦ中和抗体存在下であっても、ＧＭ－ＣＳＦ受容体アゴニスト活性を有することが確認された。

[0461] [実施例７]ＣＤ１３１とＣＤ１１６に結合するバイスペシフィック抗体の作製と活性評価

（１）次世代シーケンシングシステムを用いた抗ＣＤ１１６モノクローナル抗体の取得

実施例２－（６）の濃縮されたファージをＴＧ１に感染させることにより取得した大腸菌から調製したＤＮＡを用いて、Ｉｏｎ Ｓ５（商標）システム（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）で配列解析を行い、濃縮されている抗体のアミノ酸配列として配列番号１９０～１９９で示されるアミノ酸配列を選択した。

[0462] （２）抗ＣＤ１１６抗体のアフィニティマチュレーションによる抗ＣＤ１１６モノクローナル抗体の取得

Ａｂｗｉｚ Ｂｉｏ社にてファージディスプレイ法を用いて、ＧＭ４０８

の抗ＣＤ１１６クローンＶＨのＣＤＲ１～３のアミノ酸配列を改変した抗ＣＤ１１６抗体のスクリーニングを行った。得られた抗体のアミノ酸配列情報を解析し、抗体のアミノ酸配列として配列番号２００～２０９で示されるアミノ酸配列を選択した。

[0463] （３）ＣＤ１３１とＣＤ１１６に結合するバイスペシフィック抗体の作製

実施例７－（１）、（２）において取得した抗ＣＤ１１６抗体配列および抗ＣＤ１３１抗体配列を有するバイスペシフィック抗体発現ベクターを作製した。

バイスペシフィック抗体の構造は、図４の（Ａ）に示すＮ末端型構造を有し、ＶＨ１は抗ＣＤ１３１抗体のＶＨ（アミノ酸配列を配列番号２９で示す）、ＣＨ１はヒトＩｇＧ４のＣＨ１（アミノ酸配列を配列番号１４４で示す）、ＶＨ２は抗ＣＤ１１６抗体のＶＨ、定常領域はヒトＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９ＫにＥＵインデックスで表されるＨ４３５Ｆのアミノ酸残基置換を加えた（アミノ酸配列を配列番号１５５で示す）ヒト抗体の定常領域配列であるＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体とした。軽鎖はＧＭ４０８と同一の軽鎖を用いた。

[0464] Ｌ鎖発現ベクターとしては、シグナル配列およびヒトＬ鎖（κ鎖）定常領域配列を有したｐＣＩ－ＯｔＣＭＶ＿ｈＫベクターを用いた。Ｈ鎖発現ベクターとしては、シグナル配列およびヒトＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９ＫおよびＨ４３５Ｆ変異を有したｐｃＤＮＡ３．４ベクター（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製）を用いた。作製したＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体のＬ鎖発現ベクターおよびＨ鎖発現ベクターを実施例４と同様の手法で遺伝子導入、発現および精製し、ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体をそれぞれ取得した。

[0465] （４）ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体のＣＤ１１６に対する結合活性の解析

実施例７－（２）で取得したクローンについて、ＣＤ１１６に対する親和性をＢｉａｃｏｒｅ　Ｔ２００システム（Ｃｙｔｉｖａ社）を用い評価した。

Ｒｕｎｎｉｎｇ ｂｕｆｆｅｒはＨＢＳ－ＥＰ＋ ｂｕｆｆｅｒ（Ｃｙｔｉｖａ）を用いた。Ａｎｔｉ－ｈｕｍａｎ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｃａｐｔｕｒｅ ｋｉｔおよびＡｍｉｎｅ Ｃｏｕｐｌｉｎｇ Ｋｉｔ（Ｃｙｔｉｖａ）を用い、Ａｎｔｉ－ｈｕｍａｎ Ｆｃ抗体をＣＭ５ Ｓｅｎｓｏｒ ｃｈｉｐ（Ｃｙｔｉｖａ）表面に固定化した。この際、コントロールフローセルにも各抗体の固定化を実施した。

[0466] Ａｎｔｉ－ｈｕｍａｎ Ｆｃを固定化したチップを用いてＣＤ１１６タンパク質に対するＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体の結合評価を行った。測定ではまず、１０ｎＭに希釈したＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体を９０ｓｅｃ（流速：１０μＬ／ｍｉｎ）添加することでチップ上にＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体をキャプチャーさせた。次に０．３３、１、３、９又は２７ｎＭに希釈した実施例１－（３）で調製したヒトＣＤ１１６可溶性抗原（Ｈｉｓタグ体）を１２０ｓｅｃ（流速：３０μＬ／ｍｉｎ）ずつ添加し、解離時間９０ｓｅｃ（流速：３０μＬ／ｍｉｎ）で測定した。サルＣＤ１１６可溶性抗原（Ｈｉｓタグ体）を用いた実験では３、９、２７、８１又は２４３ｎＭの濃度で添加した。

[0467] 定量解析においては、Ｂｉａｃｏｒｅ Ｔ２００ Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ Ｓｏｆｔｗａｒｅ ｖｅｒｓｉｏｎ ３．２（Ｃｙｔｉｖａ）にて、Ｓｉｎｇｌｅ ｃｙｃｌｅ ｋｉｎｅｔｉｃｓ法により算出した。結果を表５に示す。

[0468] [表5]

	hCD116-His			cynoCD116-His		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
GM408	2.62×10^{5}	8.99×10^{-3}	3.43×10^{-8}	2.98×10^{4}	3.22×10^{-3}	1.08×10^{-7}
GM408_H101	1.51×10^{5}	8.77×10^{-3}	5.81×10^{-8}	1.29×10^{4}	2.27×10^{-3}	1.76×10^{-7}
GM408_H102	1.34×10^{5}	6.52×10^{-3}	4.87×10^{-8}	1.20×10^{4}	1.60×10^{-3}	1.34×10^{-7}
GM408_H103	1.16×10^{5}	6.18×10^{-3}	5.34×10^{-8}	6.46×10^{3}	4.82×10^{-3}	7.47×10^{-7}
GM408_H104	2.77×10^{5}	6.52×10^{-3}	2.35×10^{-8}	3.24×10^{4}	1.85×10^{-3}	5.71×10^{-8}
GM408_H105	1.63×10^{5}	6.28×10^{-3}	3.85×10^{-8}	1.51×10^{4}	1.64×10^{-3}	1.09×10^{-7}
GM408_H301	9.87×10^{5}	9.14×10^{-4}	9.26×10^{-10}	7.49×10^{4}	5.10×10^{-4}	6.82×10^{-9}
GM408_H302	8.53×10^{5}	1.41×10^{-3}	1.65×10^{-9}	8.09×10^{4}	3.93×10^{-4}	4.86×10^{-9}
GM408_H303	6.44×10^{5}	1.31×10^{-3}	2.04×10^{-9}	4.44×10^{4}	6.19×10^{-4}	1.39×10^{-8}
GM408_H106	1.91×10^{5}	7.59×10^{-3}	3.98×10^{-8}	1.32×10^{4}	2.51×10^{-3}	1.90×10^{-7}
GM408_H107	9.22×10^{4}	8.68×10^{-3}	9.41×10^{-8}	6.49×10^{3}	2.36×10^{-3}	3.63×10^{-7}

[0469] 表５に示す通り、ＧＭ４０８_Ｈ３０１、Ｈ３０２およびＨ３０３のＣＤ１１６に対する結合活性は、元のＧＭ４０８よりも優れることが分かった。

結合活性が高いクローンを用いることにより、標的細胞に対するアゴニスト作用の特異性を高めることが期待できる。

[0470] （５）ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体のアゴニスト活性解析

上記で調製した２０種類のＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体（定常領域はいずれもＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋ　Ｈ４３５Ｆを使用）について、実施例３－（２）と同様の手法で２日間静置培養によりアゴニスト活性を解析した。結果を図１１および１２に示す。

[0471] 図１１および１２に示すようにＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体はいずれも組換えヒトＧＭ－ＣＳＦに匹敵するアゴニスト活性を示した。

[0472] ［実施例８］ＣＤ１１６－ＣＤ１３１バイスペシフィック抗体の作製とアゴニスト活性の解析

実施例４に示した３種類のＮ末端型ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体（ＧＭ４０８、ＧＭ４６３、ＧＭ４６６）について、図４の（Ａ）に示すＶＨ１とＶＨ２を入れ替え、Ｎ末端型のＣＤ１１６－ＣＤ１３１バイスペシフィック抗体を実施例４（１）と同様に作製した（ＧＭ４０８　ｉｎｖｅｒｓｅ、ＧＭ４６３　ｉｎｖｅｒｓｅ、ＧＭ４６６　ｉｎｖｅｒｓｅ、定常領域はいずれもＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋを使用）。これらのＣＤ１１６－ＣＤ１３１バイスペシフィック抗体のアゴニスト活性を、実施例３（２）と同様に解析した。結果を図１３に示す。

[0473] 図１３に示すように、これらのＣＤ１１６－ＣＤ１３１バイスペシフィック抗体は、いずれもＧＭ－ＣＳＦ受容体アゴニスト活性を示すことが確認された。

[0474] ［実施例９］Ｃ末端型ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体およびＣ末端型ＣＤ１１６－ＣＤ１３１バイスペシフィック抗体の作製とアゴニ

スト活性の解析

実施例４に示した３種類のＮ末端型ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体（ＧＭ４０８、ＧＭ４６３、ＧＭ４６６）を基に、Ｃ末端型バイスペシフィック抗体を２種類作製した。図４の（Ｂ）に示す通り、ＶＨ１にＣＤ１３１結合ＶＨ配列を有し、ＶＨ２にＣＤ１１６結合ＶＨ配列を有するＣ末端型ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体（Ｃｔ　ＧＭ４０８、Ｃｔ　ＧＭ４６３、Ｃｔ　ＧＭ４６６、定常領域はいずれもＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋを使用）および、ＶＨ１にＣＤ１１６結合ＶＨ配列を有し、ＶＨ２にＣＤ１３１結合ＶＨ配列を有するＣ末端型ＣＤ１１６－ＣＤ１３１バイスペシフィック抗体（Ｃｔ　ＧＭ４０８　ｉｎｖｅｒｓｅ、Ｃｔ　ＧＭ４６３　ｉｎｖｅｒｓｅ、Ｃｔ　ＧＭ４６６　ｉｎｖｅｒｓｅ、定常領域はいずれもＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋを使用）を実施例３（２）と同様に作製し、アゴニスト活性を解析した。結果を図１４の（Ａ）および（Ｂ）に示す。

[0475] その結果、図１４の（Ａ）に示すＣ末端型ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体と比較し、図１４の（Ｂ）に示すＣ末端型ＣＤ１１６－ＣＤ１３１バイスペシフィック抗体が高いＧＭ－ＣＳＦ受容体アゴニスト活性を示すことが確認された。

[0476] ［実施例１０］ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体のＩｇＧ型バイスペシフィック抗体への変換とアゴニスト活性解析

実施例４に示した３種類のＮ末端型ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体（ＧＭ４０８、ＧＭ４６３、ＧＭ４６６）について、図２に示すＩｇＧ型ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体として、実施例３（１）と同様に調製した。作製したＩｇＧ型ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体について、実施例３（２）と同様にアゴニスト活性を解析した結果を図１５に示す。解析の結果、これらのＩｇＧ型ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体は、いずれもＧＭ－ＣＳＦ受容体アゴニスト活性を示すことが確認された。

[0477] ［実施例１１］高活性を発揮するＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体の解析

実施例４に記載されたＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体ＧＭ４０８について、抗ＣＤ１３１抗体と抗ＣＤ１１６抗体の価数を制御した改変体を作製し、ＧＭ－ＣＳＦ受容体アゴニスト活性への影響を解析した。

[0478] 図１６に示す通り、各改変体を実施例３（１）および実施例４（１）と同様に作製した（定常領域はいずれもＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋを使用）。ＣＤ１３１およびＣＤ１１６へ結合する価数を制御する目的で、抗ＣＤ１１６抗体１１６－４０８のＣＤＲ１およびＣＤＲ３に２アミノ酸変異（Ｄ３１ＡおよびＹ９８Ａ、Ｄ３１Ａ＿Ｙ９８Ａと表記）を導入したＣＤ１１６への結合活性が完全に消失したＶＨを作製した。二種類のＨ鎖を組み合わせるＧＭ４０８ｖ１（２×１）、ＧＭ４０８ｖ２（１×２）、ＧＭ４０８ｖ３（１×１）、ＧＭ４０８ｖ６（１×１）、ＧＭ４０８ｖ７（１×２）、ＧＭ４０８ｖ８（２×１）については、実施例３（１）と同様にＫｎｏｂｓ－ｉｎｔｏ－Ｈｏｌｅｓ（第一のＨ鎖にＳ３５４Ｃ／Ｔ３６６W変異、第二のＨ鎖にＹ３４９Ｃ／Ｔ３６６Ｓ／Ｌ３６８Ａ／Ｙ４０７Ｖ／Ｈ４３５Ｒ／Ｙ４３６Ｆ変異）を用いた。この時、軽鎖可変領域はいずれも同一であるため実施例３（１）とは異なり、第一のＨ鎖と第二のＨ鎖、およびＬ鎖定常領域はいずれも変異を含まない野生型配列を使用した。各改変体について、実施例３（２）と同様にアゴニスト活性を解析した。結果を図１７（Ａ）、（Ｂ）に示す。

[0479] 括弧内の数字は（抗ＣＤ１１６抗体の価数×抗ＣＤ１３１抗体の価数）を表す。野生型のＧＭ４０８ＷＴ（２×２）に加えて、ＧＭ４０８ｖ１（２×１）、ＧＭ４０８ｖ２（１×２）およびＧＭ４０８ｖ３（１×１）、ＧＭ４０８ｖ６（１×１）、ＧＭ４０８ｖ７（１×２）およびＧＭ４０８ｖ８（２×１）においてＧＭ－ＣＳＦ受容体アゴニスト活性を発揮することが確認された。しかし、ＧＭ４０８ｖ４（０×２）、ＧＭ４０８ｖ５（２×０）ではＧＭ－ＣＳＦ受容体アゴニスト活性は確認できず、アゴニスト活性を発揮す

る上でＣＤ１１６およびＣＤ１３１の両方への結合が重要であることが確認された。

[0480] ［実施例１２］　ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体のエピトープ解析

実施例４に記載されたＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体を構成する抗ＣＤ１１６抗体１１６－４０８、および抗ＣＤ１３１抗体１３１－Ｂ２について、それぞれの抗原であるヒトＣＤ１１６、ヒトＣＤ１３１におけるエピトープをＩｎｔｅｇｒａｌ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ社への委託により解析した。

[0481] ヒトＣＤ１１６およびＣＤ１３１に対して網羅的にアミノ酸置換（Ａｌａ置換）を導入し、抗ＣＤ１１６抗体１１６－４０８、および抗ＣＤ１３１抗体１３１－Ｂ２の結合活性を大きく減弱させるＡｌａ置換部位を同定することで、エピトープを解析実施した。まず、網羅的にＡｌａ置換が導入されたヒトＣＤ１１６、およびＣＤ１３１を発現する発現ベクターを、哺乳類細胞用ベクターを用いて作製した。

[0482] ヒトＣＤ１１６については、ヒトＣＤ１１６細胞外ドメイン全長２８９アミノ酸、ヒトＣＤ１３１については、ヒトＣＤ１３１細胞外ドメイン３に相当する１００アミノ酸が置換された（ヒトＣＤ１１６アミノ酸置換体については２８９種類、ヒト１３１アミノ酸置換体については１００種類の発現ベクターが作製された）。

[0483] これら発現ベクターをそれぞれＨＥＫ－２９３Ｔ細胞へ導入し、Ａｌａ置換が導入された変異型ヒトＣＤ１１６あるいはヒトＣＤ１３１を発現させた。酵素処理により抗ＣＤ１１６抗体１１６－４０８、および抗ＣＤ１３１抗体１３１－Ｂ２からＦａｂを調製し、ＰＢＳを用いて０．２５μｇ／ｍＬに調製し、変異型ヒトＣＤ１１６あるいはヒトＣＤ１３１発現ＨＥＫ－２９３Ｔに２５℃で３０分間反応させた。ＰＢＳで洗浄後、ＰＢＳで７．５μｇ／ｍＬに調製した二次抗体抗（ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ（登録商標）　４８８　ＡｆｆｉｎｉＰｕｒｅ　Ｇｏａｔ　Ａｎｔｉ－Ｈｕｍａｎ　ＩｇＧ　Ｆ（ａ

b’）$_2$ Ｆｒａｇｍｅｎｔ，Ｊａｃｋｓｏｎ ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ社製）を２５℃で３０分間反応させ、フローサイトメトリー法によりＦａｂ結合量を解析した。

[0484] 変異型ヒトＣＤ１１６、変異型ヒトＣＤ１３１がそれぞれ野生型ヒトＣＤ１１６、野生型ヒトＣＤ１３１の７０％以上の発現量を有し、Ｆａｂ結合量が４０％以下に減弱するＡｌａ置換部位がエピトープを構成するアミノ酸残基として選抜された。その結果を表６に示す。解析の結果、抗ＣＤ１１６抗体１１６－４０８についてはヒトＣＤ１１６におけるＮ１５６、Ｋ１５８、Ｔ１８７、抗ＣＤ１３１抗体１３１－Ｂ２についてはヒトＣＤ１３１におけるＷ１６３、Ｒ２２１がエピトープとして同定された。

[0485] [表6]

116-408 epitope

Binding Reactivity (% WT)	
Mutation	116-408
N156A	5.8
K158A	35.2
T187A	16.2
K213A	98.4
Y248A	78.2
L249A	92.4
D250A	95.8
F251A	99.3
D300A	84.8
R302A	93.8

131-B2 epitope

Binding Reactivity (% WT)	
Mutation	131-B2
D144A	129
D146A	88.4
H147A	109.9
W163A	-9
G198A	193.5
P199A	96.8
R221A	38

[0486] ［実施例１３］ＦｃＲｎへの結合が消失したＦｃ変異の同定

抗体Ｆｃ領域とＮｅｏｎａｔａｌ Ｆｃ ｒｅｃｅｐｔｏｒ（ＦｃＲｎ）の結合は、抗体の血中半減期維持（Nat. Rev. Immunol., 7, 715 (2007)）、および肺胞から血中への抗体のトランスサイトーシス（Proc Natl Acad Sci U S A., 101, 9763 (2004)）に重要だと示唆されている。ゆえに、本発明の

バイスペシフィック抗体を経肺投与する場合において、ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体とＦｃＲｎとの結合を消失させることで、肺胞中におけるＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体の滞留性が向上し、持続的な治療効果が期待される。加えて、ＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体の血中半減期が短縮されることにより、肺から全身循環血に漏出したバイスペシフィック抗体による予期せぬ副作用リスクが低減することが期待される。

[0487] ｐＨ６．０における抗体Ｆｃ領域とＦｃＲｎの結合に重要な残基として知られるＩｌｅ２５３、Ｈｉｓ３１０、Ｈｉｓ４３５、Ｔｙｒ４３６に対して、各種アミノ酸置換を導入したＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体変異体を実施例４（１）と同様に作製した（定常領域はＩｇＧ４ＰＥＲ４０９Ｋ、並びにＩｇＧ１　ＬＡＬＡＧＡを使用した。それぞれ、配列番号１４７～１５９、配列番号１６０～１７２で示す）。作製したＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体変異体のヒトＦｃＲｎ結合活性を、下記の通り表面プラズモン共鳴法（ＳＰＲ法）により解析した。

[0488] 測定機器として、Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ１００並びにＴ２００（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社製）を使用した。Ａｍｉｎｅ　Ｃｏｕｐｌｉｎｇ　Ｋｉｔ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社製）を用いて、Ａｃｅｔａｔｅ　４．５（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社製）で２０μｇ／ｍＬに希釈したＡｎｔｉ－Ｈｉｓ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ（ＢＳＡ－Ｆｒｅｅ，　ＱＩＡＧＥＮ社製）を添付文書に従いＣＭ５センサーチップ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社製）に固定化した。ヒトＦｃＲｎ（インハウス調製品）をＨＢＳ－ＥＰ＋　（ｐＨ　７．４，ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社製）で１０μｇ／ｍＬに希釈し、１０μＬ／ｍｉｎの流速で１２０秒間添加した。

[0489] 次いで、アナライトとして１０００ｎＭより５回の段階希釈で２倍ずつ希釈したＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体変異体（ｐＨ　６．０のＨＢＳ－ＥＰ＋溶液で希釈）を３０μＬ／ｍｉｎの流速で添加し、ＦｃＲｎとの結合反応を６０秒間、解離反応を１５０秒間測定した。測定は平衡

値解析法で行い、得られたセンサーグラムは、Ｂｉａ　Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社製）を用いて解析した。結果を図１８の（Ａ）～（Ｃ）、図１９、図２０に示す。

[0490] 図１８の（Ａ）および（Ｂ）に示すように、定常領域として野生型ＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋを使用したＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体が明確なヒトＦｃＲｎへの結合を示す条件において、ＦｃＲｎへの結合が消失することが報告されているＩ２５３Ａ変異体（Int Immunol.,18, 1759（2006））が結合反応を示さないことを確認した。

[0491] 図１９は、定常領域として変異挿入ＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋを使用した変異体について、各アナライト濃度における平衡状態のＲＵ値をプロットした図を示す。図１９に示すように、Ｔｙｒ４３６にアミノ酸変異を導入した変異体では弱い結合活性が残存した一方で、Ｉｌｅ２５３、Ｈｉｓ３１０、Ｈｉｓ４３５にアミノ酸変異が導入された変異体はいずれも結合を消失することを確認した。

[0492] 図２０に示す通り、定常領域として変異挿入ＩｇＧ１　ＬＡＬＡＧＡを使用した変異体についても、変異挿入ＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋを使用した場合と同様の結果となった。

[0493] ［実施例１４］　ＦｃＲｎへの結合が消失したＦｃ変異体のＰｒｏｔｅｉｎ Ａ結合活性の解析

実施例１３で作製したＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体各変異体について、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａへの結合活性を実施例１３と同様にＢｉａｃｏｒｅ　Ｔ１００並びにＴ２００を使用して実施した。

[0494] Ａｍｉｎｅ　Ｃｏｕｐｌｉｎｇ　Ｋｉｔを用いて、添付文書に従いＡｃｅｔａｔｅ　４．５で１．０μｇ／ｍＬに希釈したＰｒｏｔｅｉｎ　Ａ（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ　由来、Ｎａｃａｌａｉ社製）をＣＭ５センサーチップに７５　ＲＵ固定化した。次いで、アナライトとして１００ｎＭより５回の段階希釈で４倍ずつ希釈した上記抗体サンプル（ｐＨ７．４のＨＢＳ－ＥＰ＋溶液で希釈）を３０μＬ／ｍｉｎの流速で添加し

、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａとの結合反応を１２０秒間、解離反応を１２０秒間測定した。

[0495] 測定はシングルサイクルカイネティクス法で行った。得られたセンサーグラムは、Ｂｉａ　Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社製）を用いて解析し、Ｂｉｖａｌｅｎｔ　ａｎａｌｙｔｅ　ｍｏｄｅｌにて各抗体の速度論定数を算出した。結合速度定数（ｋａ）、解離速度定数（ｋｄ）および結合親和性（ＫＤ）を求めた。結果を表７、表８に示す。

[0496] 表７および表８に示すように、野生型ＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９ＫおよびＩｇＧ１　ＬＡＬＡＧＡを用いたＣＤ１３１－ＣＤ１１６バイスペシフィック抗体がＰｒｏｔｅｉｎ　Ａへ１０ｎＭ程度の親和性を示す条件において、実施例１３でＦｃＲｎへの結合を消失することが確認されたＩｌｅ２５３、Ｈｉｓ３１０、Ｈｉｓ４３５へのアミノ酸変異挿入の多くはＰｒｏｔｅｉｎ　Ａ結合親和性も消失させた。しかし、ＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋ　Ｈ４３５Ｆ変異体、ＩｇＧ１　ＬＡＬＡＧＡ　Ｈ４３５Ｆ変異体では、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａへの結合親和性が野生型と同等に維持された。

[0497] 現行、抗体医薬の多くはＰｒｏｔｅｉｎ　Ａアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製されている。よって、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａへの結合活性を維持したままＦｃＲｎ結合を消失する変異体は、生産面で好ましい。

[0498]

[表7]

No.	sample	K_D (nM)	Rmax (RU)
01	GM408_hIgG4PE(R409K)_WT	11.3	359.6
02	GM408_hIgG4PE(R409K)_I253A	ND	35.0
03	GM408_hIgG4PE(R409K)_I253H	ND	0.4
04	GM408_hIgG4PE(R409K)_I253D	ND	0.2
05	GM408_hIgG4PE(R409K)_I253S	ND	0.2
06	GM408_hIgG4PE(R409K)_H310D	ND	15.3
07	GM408_hIgG4PE(R409K)_H310G	ND	29.8
08	GM408_hIgG4PE(R409K)_H435A	ND	149.2
08	GM408_hIgG4PE(R409K)_H435E	ND	5.8
10	GM408_hIgG4PE(R409K)_H435F	9.7	325.8
11	GM408_hIgG4PE(R409K)_H435T	ND	1.9
12	GM408_hIgG4PE(R409K)_Y436A	35.1	214.4
13	GM408_hIgG4PE(R409K)_Y436E	34.9	214.8
14	GM408_hIgG4PE(R409K)_Y436G	30.4	260.9

[0499]

[表8]

No.	sample	K_D (nM)	Rmax (RU)
15	GM408_hIgG1_LALAGA_WT	10.5	351.4
16	GM408_hIgG1_LALAGA_I253A	ND	33.3
17	GM408_hIgG1_LALAGA_I253H	ND	0.2
18	GM408_hIgG1_LALAGA_I253D	ND	0.0
19	GM408_hIgG1_LALAGA_I253S	ND	0.0
20	GM408_hIgG1_LALAGA_H310D	ND	6.8
21	GM408_hIgG1_LALAGA_H310G	ND	61.4
22	GM408_hIgG1_LALAGA_H435A	ND	162.3
23	GM408_hIgG1_LALAGA_H435E	ND	1.1
24	GM408_hIgG1_LALAGA_H435F	9.7	392.5
25	GM408_hIgG1_LALAGA_H435T	ND	1.6
26	GM408_hIgG1_LALAGA_Y436A	26.1	292.3
27	GM408_hIgG1_LALAGA_Y436E	28.3	271.8
28	GM408_hIgG1_LALAGA_Y436G	20.5	306.2

[0500] 本発明を特定の態様を参照して詳細に説明したが、本発明の精神と範囲を離れることなく様々な変更および修正が可能であることは、当業者にとって明らかである。なお、本出願は、２０２１年８月２６日付けで出願された日本特許出願（特願２０２１－１３８１８１）に基づいており、その全体が引用により援用される。また、ここに引用されるすべての参照は全体として取り込まれる。

配列表フリーテキスト

[0501] 配列番号１：ヒトＣＤ１３１の全長塩基配列

配列番号２：サルＣＤ１３１の全長塩基配列

配列番号３：ヒトＣＤ１３１細胞外領域の塩基配列

配列番号４：サルＣＤ１３１細胞外領域の塩基配列

配列番号５：マウスＣＤ１３１細胞外領域の塩基配列

配列番号６：ヒトＣＤ１１６の全長塩基配列

配列番号７：サルＣＤ１１６の全長塩基配列

配列番号８：ヒトＣＤ１１６細胞外領域の塩基配列

配列番号９：サルＣＤ１１６細胞外領域の塩基配列

配列番号１０：マウスＣＤ１１６細胞外領域の塩基配列

配列番号１１：１１６－０８　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号１２：１１６－０８　ＶＬのアミノ酸配列

配列番号１３：１１６－０９　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号１４：１１６－０９　ＶＬのアミノ酸配列

配列番号１５：１１６－１８　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号１６：１１６－１８　ＶＬのアミノ酸配列

配列番号１７：１１６－２１　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号１８：１１６－２１　ＶＬのアミノ酸配列

配列番号１９：１１６－２２　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号２０：１１６－２２　ＶＬのアミノ酸配列

配列番号２１：１３１－０３　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号２２：１３１－０３　ＶＬのアミノ酸配列

配列番号２３：１３１－１６　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号２４：１３１－１６　ＶＬのアミノ酸配列

配列番号２５：１３１－１８　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号２６：１３１－１８　ＶＬのアミノ酸配列

配列番号２７：１３１－Ｂ１　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号２８：１３１－Ｂ１　ＶＬのアミノ酸配列

配列番号２９：１３１－Ｂ２　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号３０：１３１－Ｂ２　ＶＬのアミノ酸配列

配列番号３１：１１６－０８　ＶＨ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号３２：１１６－０８　ＶＨ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号３３：１１６－０８　ＶＨ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号３４：１１６－０８　ＶＬ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号３５：１１６－０８　ＶＬ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列
配列番号３６：１１６－０８　ＶＬ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列
配列番号３７：１１６－０９　ＶＨ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列
配列番号３８：１１６－０９　ＶＨ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列
配列番号３９：１１６－０９　ＶＨ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列
配列番号４０：１１６－０９　ＶＬ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列
配列番号４１：１１６－０９　ＶＬ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列
配列番号４２：１１６－０９　ＶＬ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列
配列番号４３：１１６－１８　ＶＨ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列
配列番号４４：１１６－１８　ＶＨ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列
配列番号４５：１１６－１８　ＶＨ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列
配列番号４６：１１６－１８　ＶＬ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列
配列番号４７：１１６－１８　ＶＬ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列
配列番号４８：１１６－１８　ＶＬ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列
配列番号４９：１１６－２１　ＶＨ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列
配列番号５０：１１６－２１　ＶＨ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列
配列番号５１：１１６－２１　ＶＨ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列
配列番号５２：１１６－２１　ＶＬ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列
配列番号５３：１１６－２１　ＶＬ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列
配列番号５４：１１６－２１　ＶＬ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列
配列番号５５：１１６－２２　ＶＨ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列
配列番号５６：１１６－２２　ＶＨ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列
配列番号５７：１１６－２２　ＶＨ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列
配列番号５８：１１６－２２　ＶＬ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列
配列番号５９：１１６－２２　ＶＬ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列
配列番号６０：１１６－２２　ＶＬ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列
配列番号６１：１３１－０３　ＶＨ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列
配列番号６２：１３１－０３　ＶＨ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号６３：１３１－０３　ＶＨ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列
配列番号６４：１３１－０３　ＶＬ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列
配列番号６５：１３１－０３　ＶＬ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列
配列番号６６：１３１－０３　ＶＬ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列
配列番号６７：１３１－１６　ＶＨ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列
配列番号６８：１３１－１６　ＶＨ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列
配列番号６９：１３１－１６　ＶＨ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列
配列番号７０：１３１－１６　ＶＬ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列
配列番号７１：１３１－１６　ＶＬ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列
配列番号７２：１３１－１６　ＶＬ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列
配列番号７３：１３１－１８　ＶＨ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列
配列番号７４：１３１－１８　ＶＨ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列
配列番号７５：１３１－１８　ＶＨ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列
配列番号７６：１３１－１８　ＶＬ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列
配列番号７７：１３１－１８　ＶＬ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列
配列番号７８：１３１－１８　ＶＬ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列
配列番号７９：１３１－Ｂ１　ＶＨ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列
配列番号８０：１３１－Ｂ１　ＶＨ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列
配列番号８１：１３１－Ｂ１　ＶＨ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列
配列番号８２：１３１－Ｂ１　ＶＬ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列
配列番号８３：１３１－Ｂ１　ＶＬ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列
配列番号８４：１３１－Ｂ１　ＶＬ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列
配列番号８５：１３１－Ｂ２　ＶＨ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列
配列番号８６：１３１－Ｂ２　ＶＨ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列
配列番号８７：１３１－Ｂ２　ＶＨ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列
配列番号８８：１３１－Ｂ２　ＶＬ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列
配列番号８９：１３１－Ｂ２　ＶＬ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列
配列番号９０：１３１－Ｂ２　ＶＬ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号９１：１３１－Ｂ２　ＶＬのアミノ酸配列

配列番号９２：１１６－３９８のアミノ酸配列

配列番号９３：１１６－４１２のアミノ酸配列

配列番号９４：１１６－４１３のアミノ酸配列

配列番号９５：１１６－４２１のアミノ酸配列

配列番号９６：１１６－４３３のアミノ酸配列

配列番号９７：１１６－４３５のアミノ酸配列

配列番号９８：１１６－４３９のアミノ酸配列

配列番号９９：１１６－４６３のアミノ酸配列

配列番号１００：１１６－４６４のアミノ酸配列

配列番号１０１：１１６－４６５のアミノ酸配列

配列番号１０２：１１６－４６６のアミノ酸配列

配列番号１０３：１１６－４０８のアミノ酸配列

配列番号１０４：１１６－３９８　ＶＨ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号１０５：１１６－３９８　ＶＨ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号１０６：１１６－３９８　ＶＨ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号１０７：１１６－４１２　ＶＨ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号１０８：１１６－４１２　ＶＨ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号１０９：１１６－４１２　ＶＨ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号１１０：１１６－４１３　ＶＨ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号１１１：１１６－４１３　ＶＨ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号１１２：１１６－４１３　ＶＨ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号１１３：１１６－４２１　ＶＨ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号１１４：１１６－４２１　ＶＨ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号１１５：１１６－４２１　ＶＨ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号１１６：１１６－４３３　ＶＨ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号１１７：１１６－４３３　ＶＨ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号１１８：１１６－４３３　ＶＨ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号１１９：１１６－４３５　ＶＨ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号１２０：１１６－４３５　ＶＨ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号１２１：１１６－４３５　ＶＨ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号１２２：１１６－４３９　ＶＨ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号１２３：１１６－４３９　ＶＨ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号１２４：１１６－４３９　ＶＨ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号１２５：１１６－４６３　ＶＨ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号１２６：１１６－４６３　ＶＨ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号１２７：１１６－４６３　ＶＨ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号１２８：１１６－４６４　ＶＨ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号１２９：１１６－４６４　ＶＨ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号１３０：１１６－４６４　ＶＨ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号１３１：１１６－４６５　ＶＨ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号１３２：１１６－４６５　ＶＨ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号１３３：１１６－４６５　ＶＨ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号１３４：１１６－４６６　ＶＨ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号１３５：１１６－４６６　ＶＨ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号１３６：１１６－４６６　ＶＨ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号１３７：１１６－４０８　ＶＨ　ＣＤＲ１のアミノ酸配列

配列番号１３８：１１６－４０８　ＶＨ　ＣＤＲ２のアミノ酸配列

配列番号１３９：１１６－４０８　ＶＨ　ＣＤＲ３のアミノ酸配列

配列番号１４０：ＤｕｅｔＭＡｂ　ＬＡＬＡＰＧ　ＣＨ１～ＣＨ３定常領域１のアミノ酸配列

配列番号１４１：ＤｕｅｔＭＡｂ　ＬＡＬＡＰＧ　ＣＬ定常領域１のアミノ酸配列

配列番号１４２：ＤｕｅｔＭＡｂ　ＬＡＬＡＰＧ　ＣＨ１～ＣＨ３定常領域２のアミノ酸配列

配列番号１４３：ＤｕｅｔＭＡｂ　ＬＡＬＡＰＧ　ＣＬ定常領域２のアミノ

酸配列

配列番号１４４：ＩｇＧ４ＣＨ１定常領域のアミノ酸配列

配列番号１４５：ＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋ　ＣＨ１～ＣＨ３定常領域のアミノ酸配列

配列番号１４６：ＩｇＧ１　ＬＡＬＡＧＡ　ＣＨ１～ＣＨ３定常領域のアミノ酸配列

配列番号１４７：ＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋ　ＣＨ１～ＣＨ３定常領域Ｉ２５３Ａ変異体のアミノ酸配列

配列番号１４８：ＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋ　ＣＨ１～ＣＨ３定常領域Ｉ２５３Ｈ変異体のアミノ酸配列

配列番号１４９：ＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋ　ＣＨ１～ＣＨ３定常領域Ｉ２５３Ｄ変異体のアミノ酸配列

配列番号１５０：ＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋ　ＣＨ１～ＣＨ３定常領域Ｉ２５３Ｓ変異体のアミノ酸配列

配列番号１５１：ＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋ　ＣＨ１～ＣＨ３定常領域Ｈ３１０Ｄ変異体のアミノ酸配列

配列番号１５２：ＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋ　ＣＨ１～ＣＨ３定常領域Ｈ３１０Ｇ変異体のアミノ酸配列

配列番号１５３：ＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋ　ＣＨ１～ＣＨ３定常領域Ｈ４３５Ａ変異体のアミノ酸配列

配列番号１５４：ＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋ　ＣＨ１～ＣＨ３定常領域Ｈ４３５Ｅ変異体のアミノ酸配列

配列番号１５５：ＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋ　ＣＨ１～ＣＨ３定常領域Ｈ４３５Ｆ変異体のアミノ酸配列

配列番号１５６：ＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋ　ＣＨ１～ＣＨ３定常領域Ｈ４３５Ｔ変異体のアミノ酸配列

配列番号１５７：ＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋ　ＣＨ１～ＣＨ３定常領域Ｙ４３６Ａ変異体のアミノ酸配列

配列番号１５８：ＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋ　ＣＨ１～ＣＨ３定常領域Ｙ４３６Ｅ変異体のアミノ酸配列

配列番号１５９：ＩｇＧ４ＰＥ　Ｒ４０９Ｋ　ＣＨ１～ＣＨ３定常領域Ｙ４３６Ｇ変異体のアミノ酸配列

配列番号１６０：ＩｇＧ１　ＬＡＬＡＧＡ　ＣＨ１～ＣＨ３定常領域Ｉ２５３Ａ変異体のアミノ酸配列

配列番号１６１：ＩｇＧ１　ＬＡＬＡＧＡ　ＣＨ１～ＣＨ３定常領域Ｉ２５３Ｈ変異体のアミノ酸配列

配列番号１６２：ＩｇＧ１　ＬＡＬＡＧＡ　ＣＨ１～ＣＨ３定常領域Ｉ２５３Ｄ変異体のアミノ酸配列

配列番号１６３：ＩｇＧ１　ＬＡＬＡＧＡ　ＣＨ１～ＣＨ３定常領域Ｉ２５３Ｓ変異体のアミノ酸配列

配列番号１６４：ＩｇＧ１　ＬＡＬＡＧＡ　ＣＨ１～ＣＨ３定常領域Ｈ３１０Ｄ変異体のアミノ酸配列

配列番号１６５：ＩｇＧ１　ＬＡＬＡＧＡ　ＣＨ１～ＣＨ３定常領域Ｈ３１０Ｇ変異体のアミノ酸配列

配列番号１６６：ＩｇＧ１　ＬＡＬＡＧＡ　ＣＨ１～ＣＨ３定常領域Ｈ４３５Ａ変異体のアミノ酸配列

配列番号１６７：ＩｇＧ１　ＬＡＬＡＧＡ　ＣＨ１～ＣＨ３定常領域Ｈ４３５Ｅ変異体のアミノ酸配列

配列番号１６８：ＩｇＧ１　ＬＡＬＡＧＡ　ＣＨ１～ＣＨ３定常領域Ｈ４３５Ｆ変異体のアミノ酸配列

配列番号１６９：ＩｇＧ１　ＬＡＬＡＧＡ　ＣＨ１～ＣＨ３定常領域Ｈ４３５Ｔ変異体のアミノ酸配列

配列番号１７０：ＩｇＧ１　ＬＡＬＡＧＡ　ＣＨ１～ＣＨ３定常領域Ｙ４３６Ａ変異体のアミノ酸配列

配列番号１７１：ＩｇＧ１　ＬＡＬＡＧＡ　ＣＨ１～ＣＨ３定常領域Ｙ４３６Ｅ変異体のアミノ酸配列

配列番号１７２：ＩｇＧ１　ＬＡＬＡＧＡ　ＣＨ１～ＣＨ３定常領域Ｙ４３６Ｇ変異体のアミノ酸配列

配列番号１７３：１３１－Ｂ２　ＶＨの塩基配列

配列番号１７４：ＩｇＧ４ＣＨ１定常領域の塩基配列

配列番号１７５：ＧＭ３９８　１１６　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号１７６：ＧＭ４１２　１１６　ＶＨ　ＦＲ１をバイスペシフィック抗体に最適化したアミノ酸配列

配列番号１７７：ＧＭ４１３　１１６　ＶＨ　ＦＲ１をバイスペシフィック抗体に最適化したアミノ酸配列

配列番号１７８：ＧＭ４２１　１１６　ＶＨ　ＦＲ１をバイスペシフィック抗体に最適化したアミノ酸配列

配列番号１７９：ＧＭ４３３　１１６　ＶＨ　ＦＲ１をバイスペシフィック抗体に最適化したアミノ酸配列

配列番号１８０：ＧＭ４３５　１１６　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号１８１：ＧＭ４３９　１１６　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号１８２：ＧＭ４６３　１１６　ＶＨ　ＦＲ１をバイスペシフィック抗体に最適化したアミノ酸配列

配列番号１８３：ＧＭ４６４　１１６　ＶＨ　ＦＲ１をバイスペシフィック抗体に最適化したアミノ酸配列

配列番号１８４：ＧＭ４６５　１１６　ＶＨ　ＦＲ１をバイスペシフィック抗体に最適化

配列番号１８５：ＧＭ４６６　１１６　ＶＨ　ＦＲ１をバイスペシフィック抗体に最適化

配列番号１８６：ＧＭ４０８　１１６　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号１８７：ｈｕｍａｎ　ＧＭ－ＣＳＦ受容体発現ベクターのアミノ酸配列

配列番号１８８：ｈｕｍａｎ　ＩＬ－３受容体発現ベクターのアミノ酸配列

配列番号１８９：ｈｕｍａｎ　ＩＬ－５受容体発現ベクターのアミノ酸配列

配列番号１９０：ＧＭ４０８ｎｇｓ００７　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号１９１：ＧＭ４０８ｎｇｓ０５８　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号１９２：ＧＭ４０８ｎｇｓ３６５　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号１９３：ＧＭ４０８ｎｇｓ１２７　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号１９４：ＧＭ４０８ｎｇｓ００８　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号１９５：ＧＭ４０８ｎｇｓ３００　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号１９６：ＧＭ４０８ｎｇｓ０４１　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号１９７：ＧＭ４０８ｎｇｓ０４８　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号１９８：ＧＭ４０８ｎｇｓ０４７　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号１９９：ＧＭ４０８ｎｇｓ５３９　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号２００：ＧＭ４０８＿Ｈ１０１　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号２０１：ＧＭ４０８＿Ｈ１０２　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号２０２：ＧＭ４０８＿Ｈ１０３　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号２０３：ＧＭ４０８＿Ｈ１０４　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号２０４：ＧＭ４０８＿Ｈ１０５　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号２０５：ＧＭ４０８＿Ｈ３０１　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号２０６：ＧＭ４０８＿Ｈ３０２　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号２０７：ＧＭ４０８＿Ｈ３０３　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号２０８：ＧＭ４０８＿Ｈ１０６　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号２０９：ＧＭ４０８＿Ｈ１０７　ＶＨのアミノ酸配列

配列番号２１０：ｈｕｍａｎ＿ＣＤ１１６ＥＣＤ（２３－３２０）のアミノ酸配列

配列番号２１１：ｈｕｍａｎ＿ＣＤ１３１ＥＣＤ（１７－４４３）のアミノ酸配列

請求の範囲

[請求項1] 第１の抗原結合ドメインおよび第２の抗原結合ドメインを含み、

前記第１の抗原結合ドメインおよび前記第２の抗原結合ドメインのいずれか一方がＣＤ１１６に結合する抗原結合ドメインであり、もう一方がＣＤ１３１に結合する抗原結合ドメインである、バイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

[請求項2] Ｇｒａｎｕｌｏｃｙｔｅ ｍａｃｒｏｐｈａｇｅ－ｃｏｌｏｎｙｓｔｉｍｕｌａｔｉｎｇ ｆａｃｔｏｒ（以下、ＧＭ－ＣＳＦと略記する）受容体に対してアゴニスト活性を有する、請求項１に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

[請求項3] 前記第１の抗原結合ドメインおよび前記第２の抗原結合ドメインが、それぞれ重鎖可変領域（以下、ＶＨと略記する）および軽鎖可変領域（以下、ＶＬと略記する）を含む、請求項１又は２に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

[請求項4] ＣＤ１１６およびＣＤ１３１に１価または２価でそれぞれ結合する、請求項１～３のいずれか１項に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

[請求項5] 前記ＣＤ１３１に結合する抗原結合ドメインが、下記（１ａ）～（１ｅ）から選ばれるいずれか１である、請求項１～４のいずれか１項に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

（１ａ）それぞれ配列番号６１～６３で表されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域（以下、ＣＤＲと略記する）１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号６４～６６で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（１ｂ）それぞれ配列番号６７～６９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号７０～７２で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（１ｃ）それぞれ配列番号７３～７５で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号７６～７８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（１ｄ）それぞれ配列番号７９～８１で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８２～８４で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（１ｅ）それぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

[請求項6] 前記ＣＤ１３１に結合する抗原結合ドメインが、下記（１Ａ）～（１Ｅ）から選ばれるいずれか１である、請求項１～５のいずれか１項に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

（１Ａ）配列番号２１で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号２２で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（１Ｂ）配列番号２３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号２４で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（１Ｃ）配列番号２５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号２６で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（１Ｄ）配列番号２７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号２８で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（１Ｅ）配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

[請求項7] 前記ＣＤ１１６に結合する抗原結合ドメインが、下記（２ａ）～（２ｑ）および（２ｒ－１）～（２ｒ－１２）から選ばれるいずれか１である、請求項１～６のいずれか１項に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

（２ａ）それぞれ配列番号３１～３３で表されるアミノ酸配列を含む

ＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号３４～３６で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｂ）それぞれ配列番号３７～３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号４０～４２で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｃ）それぞれ配列番号４３～４５で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号４６～４８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｄ）それぞれ配列番号４９～５１で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号５２～５４で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｅ）それぞれ配列番号５５～５７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号５８～６０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｆ）それぞれ配列番号１０４～１０６で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｇ）それぞれ配列番号１０７～１０９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｈ）それぞれ配列番号１１０～１１２で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｉ）それぞれ配列番号１１３～１１５で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｊ）それぞれ配列番号１１６～１１８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０

で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｋ）それぞれ配列番号１１９～１２１で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｌ）それぞれ配列番号１２２～１２４で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｍ）それぞれ配列番号１２５～１２７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｎ）それぞれ配列番号１２８～１３０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｏ）それぞれ配列番号１３１～１３３で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｐ）それぞれ配列番号１３４～１３６で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｑ）それぞれ配列番号１３７～１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－１）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列中の９番目のアルギニンをリジンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－２）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列中の１７番目のグリシンをアスパラギン酸に置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－３）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列中の９番目のアルギニンをスレオニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－４）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列中の２番目のフェニルアラニンをロイシンに、９番目のアルギニンをスレオニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－５）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列中の２番目のフェニルアラニンをセリンに、９番目のアルギニンをスレオニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－６）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをバリンに、３番目のセリンをアラニンに、４番目のメチオニン

をロイシンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－７）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをフェニルアラニンに、３番目のセリンをアラニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－８）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列の３番目のセリンをアラニンに、４番目のメチオニンをロイシンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－９）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをチロシンに、３番目のセリンをアラニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－１０）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをグルタミン酸に置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含む

ＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－１１）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをグルタミン酸に、５番目のチロシンをトリプトファンに、６番目のチロシンをメチオニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

（２ｒ－１２）配列番号１３７で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをフェニルアラニンに、３番目のセリンをアラニンに、４番目のメチオニンをロイシンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む

[請求項8] 前記ＣＤ１１６に結合する抗原結合ドメインが、下記（２Ａ）～（２Ｙ）および（２Ｚ－１）～（２Ｚ－２０）から選ばれるいずれか１である、請求項１～７のいずれか１項に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

（２Ａ）配列番号１１で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号１２で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｂ）配列番号１３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号１４で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｃ）配列番号１５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号１６で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｄ）配列番号１７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号１８で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｅ）配列番号１９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号２０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｆ）配列番号９２で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｇ）配列番号９３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｈ）配列番号９４で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｉ）配列番号９５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｊ）配列番号９６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｋ）配列番号９７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｌ）配列番号９８で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｍ）配列番号９９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｎ）配列番号１００で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｏ）配列番号１０１で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｐ）配列番号１０２で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｑ）配列番号１０３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｒ）配列番号１７６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｓ）配列番号１７７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｔ）配列番号１７８で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｕ）配列番号１７９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｖ）配列番号１８２で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｗ）配列番号１８３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｘ）配列番号１８４で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｙ）配列番号１８５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－１）配列番号１９０で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－２）配列番号１９１で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－３）配列番号１９２で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－４）配列番号１９３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－５）配列番号１９４で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－６）配列番号１９５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－７）配列番号１９６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

（２Ｚ－８）配列番号１９７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む
（２Ｚ－９）配列番号１９８で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む
（２Ｚ－１０）配列番号１９９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む
（２Ｚ－１１）配列番号２００で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む
（２Ｚ－１２）配列番号２０１で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む
（２Ｚ－１３）配列番号２０２で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む
（２Ｚ－１４）配列番号２０３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む
（２Ｚ－１５）配列番号２０４で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む
（２Ｚ－１６）配列番号２０５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む
（２Ｚ－１７）配列番号２０６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む
（２Ｚ－１８）配列番号２０７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む
（２Ｚ－１９）配列番号２０８で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む
（２Ｚ－２０）配列番号２０９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む

[請求項9] 前記第１の抗原結合ドメインがＣＤ１３１に結合する抗原結合ドメインであり、前記第２の抗原結合ドメインがＣＤ１１６に結合する抗

原結合ドメインである、請求項１～８のいずれか１項に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

[請求項10] 前記第１の抗原結合ドメインおよび前記第２の抗原結合ドメインがそれぞれＦａｂ（以下、第１のＦａｂ、第２のＦａｂとそれぞれ略記する）であり、

前記第１のＦａｂは、ＶＨおよびＣＨ１ドメインを含む重鎖（VH_1－ＣＨ１）と、軽鎖（ＶＬ－ＣＬ）とを含み、

前記第２のＦａｂは、ＶＨおよびＣＨ１ドメインを含む重鎖（VH_2－ＣＨ１’）と、軽鎖（ＶＬ－ＣＬ）とを含む、

請求項１～９のいずれか１項に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

[請求項11] 前記第１のＦａｂおよび前記第２のＦａｂをそれぞれ１つ、並びにヒンジ領域を含み、

前記第１のＦａｂにおける前記重鎖のＣ末端と、前記第２のＦａｂにおける前記重鎖のＣ末端とが、前記ヒンジ領域のＮ末端にそれぞれ結合している、請求項１０に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

[請求項12] 下記第１のポリペプチド、下記第２のポリペプチド、およびヒンジ領域を含み、前記第１のポリペプチドのＣ末端と前記第２のポリペプチドのＣ末端とが前記ヒンジ領域のＮ末端にそれぞれ結合している、請求項１０に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

第１のポリペプチド：前記第１のＦａｂ（VH_1－ＣＨ１、ＶＬ－ＣＬ）をＮ末端に少なくとも含む、ポリペプチド。

第２のポリペプチド：前記第２のＦａｂ（VH_2－ＣＨ１’、ＶＬ－ＣＬ）をＣ末端に少なくとも含む、ポリペプチド。

[請求項13] 前記第１のＦａｂにおける前記重鎖のＣ末端と、前記第２のＦａｂにおける前記重鎖のＮ末端とが直接またはリンカーを介して結合して

いるポリペプチド鎖（VH_1－ＣＨ１－VH_2－ＣＨ１’）を２本、およびヒンジ領域を含み、

２本の前記ポリペプチド鎖のＣ末端が前記ヒンジ領域のＮ末端にそれぞれ結合している、請求項１０に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

[請求項14] さらにＦｃ領域を含み、前記ヒンジ領域のＣ末端に前記Ｆｃ領域のＮ末端が結合している、請求項１１～１３のいずれか１項に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

[請求項15] 前記バイスペシフィック抗体が下記（ｘ１）～（ｘ１２）および（ｘ１３－１）～（ｘ１３－１２）から選ばれるいずれか１である、請求項１～１４のいずれか１項に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

（ｘ１）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号１０４～１０６で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ２）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号１０７～１０９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ３）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、そ

れぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号１１０～１１２で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ４）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号１１３～１１５で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ５）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号１１６～１１８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ６）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号１１９～１２１で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ７）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、そ

れぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号１２２～１２４で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ８）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号１２５～１２７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ９）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号１２８～１３０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１０）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号１３１～１３３で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１１）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８

７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号１３４～１３６で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１２）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号１３７～１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１３－１）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列中の９番目のアルギニンをリジンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１３－２）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤ

Ｒ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列中の１７番目のグリシンをアスパラギン酸に置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１３－３）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列中の９番目のアルギニンをスレオニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（Ｘ１３－４）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列中の２番目のフェニルアラニンをロイシンに、９番目のアルギニンをスレオニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１３－５）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列中の２番目のフェニルアラニンをセリンに、９番目のアルギニンをスレオニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１３－６）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１３７で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをバリンに、３番目のセリンをアラニンに、４番目のメチオニンをロイシンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１３－７）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１３７で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをフェニルアラニンに、３番目のセリンをアラニンに置換する改変が導入されたア

ミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１３－８）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１３７で表されるアミノ酸配列の３番目のセリンをアラニンに、４番目のメチオニンをロイシンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１３－９）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１３７で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをチロシンに、３番目のセリンをアラニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１３－１０）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８

５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをグルタミン酸に置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１３－１１）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１３７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号１３９で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをグルタミン酸に、５番目のチロシンをトリプトファンに、６番目のチロシンをメチオニンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｘ１３－１２）前記第１の抗原結合ドメインがそれぞれ配列番号８５～８７で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＨ、および、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１３７で表されるアミノ酸配列の２番目のロイシンをフェニルアラニンに、３番目のセリンをアラニンに、４番目のメチオニンをロイシンに置換する改変が導入されたアミノ酸配列を含むＣＤＲ１、配列番号１３８で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２および配列番号

１３９で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３を含むＶＨ、並びに、それぞれ配列番号８８～９０で表されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１～３を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

[請求項16] 前記バイスペシフィック抗体が下記（ｙ１）～（ｙ１２）および（ｙ１３－１）～（ｙ１３－２０）から選ばれるいずれか１である、請求項１～１５のいずれか１項に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

（ｙ１）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１７５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ２）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１７６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ３）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１７７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ４）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１７８で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ５）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミ

ノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１７９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ６）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１８０で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ７）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１８１で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ８）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１８２で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ９）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１８３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１０）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１８４で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表

されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１１）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１８５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１２）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１８６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－１）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１９０で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－２）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１９１で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－３）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１９２で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－４）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ

酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１９３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体（ｙ１３－５）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１９４で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体（ｙ１３－６）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１９５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体（ｙ１３－７）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１９６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体（ｙ１３－８）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１９７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体（ｙ１３－９）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１９８で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－１０）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号１９９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－１１）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号２００で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－１２）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号２０１で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－１３）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号２０２で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－１４）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号２０３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３

０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－１５）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号２０４で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－１６）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号２０５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－１７）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号２０６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－１８）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号２０７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－１９）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミ

ノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号２０８で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

（ｙ１３－２０）前記第１の抗原結合ドメインが配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、且つ前記第２の抗原結合ドメインが配列番号２０９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ、および、配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、バイスペシフィック抗体

[請求項17] 前記ポリペプチド鎖が前記第１のＦａｂにおける前記重鎖（VH_1－ＣＨ１）のＣ末端と、前記第２のＦａｂにおける前記重鎖（VH_2－ＣＨ１’）のＮ末端とが直接またはリンカーを介して結合しているポリペプチド鎖（VH_1－ＣＨ１－VH_2－ＣＨ１’）であり、前記ポリペプチド鎖における（VH_1－ＣＨ１－VH_2）が下記（ｖ１）～（ｖ１２）および（ｖ１３－１）～（ｖ１３－２０）から選ばれるいずれか１である、請求項１３または１４に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

（ｖ１）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むVH_1、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１７５で表されるアミノ酸配列を含むVH_2を含む

（ｖ２）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むVH_1、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１７６で表されるアミノ酸配列を含むVH_2を含む

（ｖ３）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むVH_1、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１７７で表されるアミノ酸配列を含むVH_2を含む

（ｖ４）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含

むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１７８で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ５）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１７９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ６）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１８０で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ７）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１８１で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ８）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１８２で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ９）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１８３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１０）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１８４で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１１）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１８５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１２）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１８６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－１）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ

１、配列番号１９０で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－２）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１９１で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－３）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１９２で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－４）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１９３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－５）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１９４で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－６）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１９５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－７）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１９６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－８）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１９７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－９）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１９８で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－１０）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号１９９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－１１）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号２００で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－１２）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号２０１で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－１３）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号２０２で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－１４）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号２０３で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－１５）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号２０４で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－１６）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号２０５で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－１７）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号２０６で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－１８）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号２０７で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－１９）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_1$、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号２０８で表されるアミノ酸配列を含むＶＨ$_2$を含む

（ｖ１３－２０）Ｎ末端から順に、配列番号２９で表されるアミノ酸

配列を含むVH_1、配列番号１４４で表されるアミノ酸配列を含むＣＨ１、配列番号２０９で表されるアミノ酸配列を含むVH_2を含む

[請求項18] 前記第１のＦａｂにおける前記重鎖（VH_1－ＣＨ１）のＣ末端と、前記第２のＦａｂにおける前記重鎖（VH_2－ＣＨ１’）のＮ末端とが直接またはリンカーを介して結合している前記ポリペプチド鎖、該ポリペプチド鎖のＣ末端にＮ末端が結合しているヒンジ領域、該ヒンジ領域のＣ末端にＮ末端が結合しているＦｃ領域（ＣＨ２－ＣＨ３）を含む重鎖２本と、軽鎖（ＶＬ－ＣＬ）４本とを含み、

前記ＣＨ１’および前記Ｆｃ領域（ＣＨ２－ＣＨ３）が配列番号１４５～１７２のいずれか１で表されるアミノ酸配列を含み、

前記軽鎖が配列番号３０で表されるアミノ酸配列を含むＶＬを含む、請求項１７に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片。

[請求項19] 請求項１～１８のいずれか１項に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片をコードするＤＮＡ。

[請求項20] 請求項１９に記載のＤＮＡを含有する組換え体ベクター。

[請求項21] 請求項２０に記載の組換え体ベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換株。

[請求項22] 請求項１～１８のいずれか１項に記載のバイスペシフィック抗体または該バイスペシフィック抗体断片を有効成分として含有する、ＧＭ－ＣＳＦが関与する疾患の治療および／または診断薬。