



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202509079 A

(43)公開日：中華民國 114 (2025) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：113140164

(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 04 月 01 日

(51)Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P37/00 (2006.01)

(30)優先權：2019/04/04 日本

2019-071840

2020/02/13 日本

2020-022256

(71)申請人：日商小野藥品工業股份有限公司(日本)ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD. (JP)
日本

(72)發明人：柴山史朗 SHIBAYAMA, SHIRO (JP)；手塚智也 TEZUKA, TOMOYA (JP)；特爾斯白 馬克 THORSBY, MARK (NL)；迪 克夫 科內利斯 亞德里恩 DE KRUIF, CORNELIS ADRIAAN (NL)；凡 羅 彼得 福克 VAN LOO, PIETER FOKKO (NL)；克羅斯特 林斯 KLOOSTER, RINSE (NL)；羅弗斯 羅伯特斯 科內利斯 ROOVERS, ROBERTUS CORNELIS (NL)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：41 項 圖式數：22 共 143 頁

(54)名稱

雙特異性抗體

(57)摘要

本發明之課題係提供一種用於對自體免疫疾病之預防、症狀進展抑制、復發抑制或治療的新穎藥劑。

本發明之發明人等專心檢討的結果，著眼於PD-1/CD19 雙特異性抗體等作為可解決該課題之物質，確認該雙特異性抗體可成為用於自體免疫疾病之預防、症狀進展抑制、復發抑制或治療的新穎藥劑。再者，確認該雙特異性抗體具有容許PD-1 與屬於其配體之PD-L1 之間的相互作用的特徵。

An object of the present invention is to provide a new drug for prevention, suppression of symptom progression, recurrence suppression or treatment for autoimmune diseases.

As a result of diligent studies, the inventors of the present invention have focused attention on PD-1/CD19 bispecific antibody and the like as a substance capable of solving such problems, and confirmed that the bispecific antibody can be a new drug for prevention, suppression of symptom progression, suppression of recurrence or treatment for autoimmune diseases. In addition, it was confirmed that the bispecific antibody has a characteristic that allows interaction with PD-1 and its ligand, PD-L1.

【發明摘要】

【中文發明名稱】 雙特異性抗體

【英文發明名稱】 BISPECIFIC ANTIBODY

【中文】

本發明之課題係提供一種用於對自體免疫疾病之預防、症狀進展抑制、復發抑制或治療的新穎藥劑。

本發明之發明人等專心檢討的結果，著眼於 PD-1/CD19 雙特異性抗體等作為可解決該課題之物質，確認該雙特異性抗體可成為用於自體免疫疾病之預防、症狀進展抑制、復發抑制或治療的新穎藥劑。再者，確認該雙特異性抗體具有容許 PD-1 與屬於其配體之 PD-L1 之間的相互作用的特徵。

【英文】

An object of the present invention is to provide a new drug for prevention, suppression of symptom progression, recurrence suppression or treatment for autoimmune diseases.

As a result of diligent studies, the inventors of the present invention have focused attention on PD-1/CD19 bispecific antibody and the like as a substance capable of solving such problems, and confirmed that the bispecific antibody can be a new drug for prevention, suppression of symptom progression, suppression of recurrence or treatment for autoimmune diseases. In addition, it was confirmed that the bispecific antibody has a characteristic that allows interaction with PD-1 and its ligand, PD-L1.

【指定代表圖】 無

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 雙特異性抗體

【英文發明名稱】 BISPECIFIC ANTIBODY

【技術領域】

【0001】本發明係關於可與 PD-1 及 CD19 分別特異性結合之雙特異性抗體(以下，簡稱為「PD-1/CD19 雙特異性抗體」)或其抗體斷片(以下，將此等簡稱為「PD-1/CD19 雙特異性抗體等」)、包含其作為有效成分的醫藥組成物以及彼等之醫藥治療用途。

【先前技術】

【0002】PD-1 為屬於免疫球蛋白家族的免疫抑制受體，為具有抑制 B 細胞之免疫活化信號之功能的分子，其中該 B 細胞係藉由來自抗原受體之刺激而活化。從 PD-1 基因剔除小鼠之解析等，已知 PD-1 信號在自體免疫性擴張型心肌症、狼瘡樣症候群、自體免疫性腦脊髓炎、全身性紅斑性狼瘡、移植物對抗宿主疾病(Graft-versus-host disease)、I 型糖尿病及風濕性關節炎等自體免疫疾病之抑制上扮演重要的角色。因此，指出增強 PD-1 信號之物質可成為自體免疫疾病等之預防或治療劑。

【0003】另一方面，CD19 為表現於 B 細胞的膜蛋白，為與 B 細胞受體複合物一起將刺激傳達至 B 細胞的分子。

【0004】關於以預防或治療自體免疫疾病為目的之 PD-1 雙特異性抗體，迄今已有數個報導(專利文獻 1 至 3)，惟，其一標的係屬於 T 細胞受體複合物之成員的 CD3。

【0005】再者，雖亦有以癌治療為目的之關於以 PD-1 及 CD19 為標的之雙特異性抗體的報導(專利文獻 4)，然而關於以自體免疫疾病之預防、症狀之進展抑制、復發抑制或治療為目的之 PD-1/CD19 雙特異性抗體尚未被報導。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0006】

[專利文獻 1]國際公開第 2003/011911 號

[專利文獻 2]國際公開第 2004/072286 號

[專利文獻 3]國際公開第 2013/022091 號

[專利文獻 4]中國專利申請公開第 106939050 號說明書

【發明內容】

[發明欲解決之課題]

【0007】本發明之目的，為提供一種自體免疫疾病等之預防、症狀進展抑制、復發抑制或治療用的新穎藥劑。

[用以解決課題之手段]

【0008】本發明之發明人等專心檢討的結果，著眼於本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體作為解決該課題之物質，進而完成本發明。

【0009】再者，本發明之發明人等，確認該 PD-1/CD19 雙特異性抗體具有容許 PD-1 與為其配體之 PD-L1 間之相互作用的特徵。另外，本發明之發明人等對構成該 PD-1/CD19 雙特異性抗體之與 CD19 特異性結合的第二臂之重鏈，置換或附加一個或複數個胺基酸，藉此，在其精製步驟中，發現容易與副產物分離的 PD-1/CD19 雙特異性抗體。

【0010】亦即，本發明如下述。

【0011】

[1]一種 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，係與 PD-1 及 CD19 分別特異性結合，並且，具有與 PD-1 特異性結合之第一臂及與 CD19 特異性結合之第二臂，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂具有選自下列(A)至(E)之任一重鏈可變區域(以下，將「重鏈可變區域」簡稱為「VH」)：

(A)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 6 之胺基酸序列構成的重鏈可變區域之互補性決定區域 1(以下，將「重鏈可變區域之互補性決定區域 1」簡稱為 VH-CDR1)、

(b)由序列編號 7 之胺基酸序列構成的重鏈可變區域之互補性決定區域 2(以下，將「重鏈可變區域之互補性決定區域 2」簡稱為 VH-CDR2)、及

(c)由序列編號 8 之胺基酸序列構成的重鏈可變區域之互補性決定區域 3(以下，將「重鏈可變區域之互補性決定區域 3」簡稱為 VH-CDR3)，

(B)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 9 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 10 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 11 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(C)具有下列(a)至(c)之 VH ，

(a)由序列編號 12 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1 、

(b)由序列編號 13 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2 、及

(c)由序列編號 14 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3 ，

(D)具有下列(a)至(c)之 VH ，

(a)由序列編號 15 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1 、

(b)由序列編號 16 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2 、及

(c)由序列編號 17 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3 ，以及

(E)具有下列(a)至(c)之 VH ，

(a)由序列編號 18 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1 、

(b)由序列編號 19 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2 、及

(c)由序列編號 20 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3 ；

該與 CD19 特異性結合之第二臂具有選自下列(A)至(E)之任一 VH：

(A)具有下列(a)至(c)之 VH ，

(a)由序列編號 35 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1 、

(b)由序列編號 36 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2 、及

(c)由序列編號 37 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3 ，

(B)具有下列(a)至(c)之 VH ，

(a)由序列編號 38 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1 、

(b)由序列編號 39 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2 、及

(c)由序列編號 40 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3 ，

(C)具有下列(a)至(c)之 VH ，

(a)由序列編號 41 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 42 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 43 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(D)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 44 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 45 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 46 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，以及

(E)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 47 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 48 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 49 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

在該與 PD-1 特異性結合之第一臂中之選自 VH-CDR1、VH-CDR2 及 VH-CDR3 之任一個或複數個 VH-CDR 中，各個任意 1 至 5 個胺基酸殘基可被置換成其他胺基酸，及/或在該與 CD19 特異性結合之第二臂中之選自 VH-CDR1、VH-CDR2 及 VH-CDR3 之任一個或複數個 VH-CDR 中，各個任意 1 至 5 個胺基酸殘基可被置換成其他胺基酸。

[2]如前項[1]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂具有選自下列(A)至(E)之任一 VH：

(A)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 6 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 7 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 8 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(B)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 9 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 10 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 11 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(C)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 12 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 13 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 14 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(D)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 15 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 16 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 17 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，以及

(E)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 18 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 19 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 20 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

該與 CD19 特異性結合之第二臂具有選自下列(A)至(E)之任一 VH：

(A)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 35 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 36 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 37 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(B)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 38 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由 39 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 40 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3、

(C)具有下列(a)至(c)之 VH、

(a)由序列編號 41 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 42 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 43 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3、

(D)具有下列(a)至(c)之 VH、

(a)由序列編號 44 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 45 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 46 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3、以及

(E)具有下列(a)至(c)之 VH、

(a)由序列編號 47 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 48 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 49 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

[3]如前項[1]或[2]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，

(i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 6 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 7 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 8 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

(ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 係選自下列(A)至(E)之任一 VH：

(A)具有下列(a)至(c)之 VH、

(a)由序列編號 35 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 36 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 37 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3、

(B)具有下列(a)至(c)之 VH、

(a)由序列編號 38 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 39 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 40 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3、

(C)具有下列(a)至(c)之 VH、

(a)由序列編號 41 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 42 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 43 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3、

(D)具有下列(a)至(c)之 VH、

(a)由序列編號 44 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 45 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 46 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3、以及

(E)具有下列(a)至(c)之 VH、

(a)由序列編號 47 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 48 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 49 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

[4]如前項[1]或[2]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，

(i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 9 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

- (b)由序列編號 10 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及
- (c)由序列編號 11 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；
- (ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 係選自下列(A)至(E)之任一 VH：
 - (A)具有下列(a)至(c)之 VH，
 - (a)由序列編號 35 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、
 - (b)由序列編號 36 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及
 - (c)由序列編號 37 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，
 - (B)具有下列(a)至(c)之 VH，
 - (a)由序列編號 38 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、
 - (b)由序列編號 39 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及
 - (c)由序列編號 40 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，
 - (C)具有下列(a)至(c)之 VH，
 - (a)由序列編號 41 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、
 - (b)由序列編號 42 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及
 - (c)由序列編號 43 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，
 - (D)具有下列(a)至(c)之 VH，
 - (a)由序列編號 44 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、
 - (b)由序列編號 45 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及
 - (c)由序列編號 46 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，以及
 - (E)具有下列(a)至(c)之 VH，
 - (a)由序列編號 47 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、
 - (b)由序列編號 48 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 49 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

[5]如前項[1]或[2]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，

(i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 12 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 13 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 14 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

(ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 係選自下列(A)至(E)之任一 VH：

(A)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 35 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 36 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 37 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(B)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 38 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 39 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 40 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(C)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 41 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 42 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 43 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(D)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 44 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 45 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 46 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，以及

(E)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 47 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 48 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 49 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

[6]如前項[1]或[2]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，

(i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 15 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 16 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 17 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

(ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 係選自下列(A)至(E)之任一 VH：

(A)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 35 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 36 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 37 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(B)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 38 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 39 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 40 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(C)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 41 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 42 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 43 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(D)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 44 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 45 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 46 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，以及

(E)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 47 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 48 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 49 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

[7]如前項[1]或[2]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，

(i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 18 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 19 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 20 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

(ii)與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 係選自下列(A)至(E)之任一 VH：

(A)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 35 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 36 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 37 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(B)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 38 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 39 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 40 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(C)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 41 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 42 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 43 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(D)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 44 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 45 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 46 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，以及

(E)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 47 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 48 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 49 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

[8]如前項[1]或[2]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，

(i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 6 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 7 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 8 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

(ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 35 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 36 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 37 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

[9]如前項[1]或[2]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，

(i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 6 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 7 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 8 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

(ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 38 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 39 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 40 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

[10]如前項[1]或[2]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，

(i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 6 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 7 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 8 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

(ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 41 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 42 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 43 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

[11]如前項[1]或[2]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，

(i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 6 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 7 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 8 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

(ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 44 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 45 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 46 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

[12]如前項[1]或[2]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，

(i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 6 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 7 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 8 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

(ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 47 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 48 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 49 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

[13]如前項[1]或[2]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，

(i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 9 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 10 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 11 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

(ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 35 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 36 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 37 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

[14] 如前項[1]或[2]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，

(i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 9 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 10 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 11 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

(ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 38 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 39 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 40 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

[15]如前項[1]或[2]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，

(i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 9 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 10 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 11 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

(ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 41 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 42 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 43 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

[16]如前項[1]或[2]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，

(i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

- (a)由序列編號 9 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、
- (b)由序列編號 10 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及
- (c)由序列編號 11 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；
- (ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 具有下列(a)至(c)：
- (a)由序列編號 44 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、
- (b)由序列編號 45 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及
- (c)由序列編號 46 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

[17]如前項[1]或[2]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，

- (i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：
- (a)由序列編號 9 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、
- (b)由序列編號 10 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及
- (c)由序列編號 11 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；
- (ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 具有下列(a)至(c)：
- (a)由序列編號 47 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、
- (b)由序列編號 48 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及
- (c)由序列編號 49 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

[18]如前項[1]或[2]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，

- (i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：
- (a)由序列編號 12 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、
- (b)由序列編號 13 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及
- (c)由序列編號 14 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；
- (ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 35 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 36 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 37 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

[19]如前項[1]或[2]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，

(i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 12 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 13 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 14 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

(ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 38 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 39 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 40 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

[20]如前項[1]或[2]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，

(i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 12 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 13 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 14 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

(ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 41 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 42 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 43 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

[21]如前項[1]或[2]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，

(i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 12 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 13 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 14 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

(ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 44 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 45 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 46 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

[22]如前項[1]或[2]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，

(i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 12 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 13 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 14 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

(ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 47 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 48 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 49 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

[23]如前項[1]或[2]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，

(i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 15 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 16 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 17 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

(ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 35 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 36 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 37 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

[24]如前項[1]或[2]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，

(i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 15 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 16 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 17 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

(ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 38 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 39 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 40 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

[25]如前項[1]或[2]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，

(i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 15 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 16 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 17 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

(ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 41 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 42 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 43 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

[26]如前項[1]或[2]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，

(i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 15 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 16 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 17 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

(ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 44 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 45 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 46 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

[27]如前項[1]或[2]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，

(i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 15 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 16 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 17 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

(ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 47 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 48 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 49 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

[28]如前項[1]或[2]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，

(i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 18 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 19 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 20 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3 ；

(ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 35 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1 、

(b)由序列編號 36 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2 、及

(c)由序列編號 37 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3 。

[29]如前項[1]或[2]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，

(i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 18 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1 、

(b)由序列編號 19 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2 、及

(c)由序列編號 20 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3 ；

(ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 38 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1 、

(b)由序列編號 39 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2 、及

(c)由序列編號 40 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3 。

[30]如前項[1]或[2]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，

(i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 18 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1 、

(b)由序列編號 19 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2 、及

(c)由序列編號 20 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3 ；

(ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 41 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1 、

(b)由序列編號 42 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2 、及

(c)由序列編號 43 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

[31]如前項[1]或[2]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，

(i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 18 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 19 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 20 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

(ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 具有下列(a)至(c)之：

(a)由序列編號 44 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 45 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 46 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

[32]如前項[1]或[2]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，

(i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 18 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 19 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 20 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

(ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 47 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 48 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 49 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

[33]如前項[1]至[32]中任一項記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 之框架(以下，將「框架」簡稱為 FR)區域中，框架 1(以下，簡稱為 FR1)、框架 2(以下，簡稱為 FR2)及框

架 3(以下，簡稱為 FR3)區域，係分別對應於生殖細胞系列型 V 基因 IGHV7-4-1 或其經受體細胞突變之該基因所編碼的胺基酸序列。

[34]如前項[33]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 之框架 4(以下，將「框架 4」簡稱為 FR4)區域，係由生殖細胞系列型 J 基因 JH6c 或其經受體細胞突變之該基因所編碼的胺基酸序列(惟，排除包含於 VH-CDR3 區域之胺基酸序列)構成。

[35]如前項[33]或[34]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 之 FR 區域係包含 FR1 區域，該 FR1 區域係由生殖細胞系列型 V 基因 IGHV7-4-1 之可經受體細胞突變的該基因所編碼，並且，藉由該體細胞突變，序列編號 21 之胺基酸序列中之位置 13 之離胺酸被置換成麩醯胺酸、位置 16 之丙胺酸被置換成纈胺酸、或位置 19 之離胺酸被置換成甲硫胺酸，或者經彼等之任意複數個之組合置換或可被彼等之任意複數個之組合置換。

[36]如前項[33]至[35]中任一項記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 之 FR 區域係包含 FR2 區域，該 FR2 區域係由生殖細胞系列型 V 基因 IGHV7-4-1 之可經受體細胞突變的該基因所編碼，並且，藉由該體細胞突變，序列編號 21 之胺基酸序列中之位置 37 的纈胺酸經置換或可被置換成白胺酸。

[37]如前項[33]至[36]中任一項記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 之 FR 區域係包含 FR3 區域，該 FR3 區域係由生殖細胞系列型 V 基因 IGHV7-4-1 之可經受體細胞突變的該基因所編碼，並且，藉由該體細胞突變，序列編號 21 之胺基酸序列中之位置

77 的絲胺酸被置換成蘇胺酸、或位置 84 之半胱胺酸被置換成絲胺酸或天冬醯胺酸，或者經彼等之任意複數個之組合置換或可被彼等之任意複數個之組合置換。

[38]如前項[33]至[37]中任一項記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 之 FR4 區域，係由生殖細胞系列型 J 基因 JH6c 之可經受體細胞突變的該基因(惟，排除編碼 VH-CDR3 區域之基因區域)編碼，其 FR4 區域之胺基酸序列(Trp-Gly-Lys-Gly-Thr-Thr*-Val-Thr-Val-Ser-Ser)(序列編號 61)中之離胺酸(Lys)經置換或可被置換成麩醯胺酸或天冬醯胺酸，及/或*記號之蘇胺酸(Thr)經置換或可被置換成白胺酸。

[39]如前項[1]至[38]中任一項記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 之 FR 區域中，FR1、FR2 及 FR3 區域分別對應於生殖細胞系列型 V 基因 IGHV5-51 或其經受體細胞突變之該基因所編碼的胺基酸序列。

[40]如前項[39]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 之 FR 區域，係包含 FR1 區域，該 FR1 區域係由生殖細胞系列型 V 基因 IGHV5-51 之可經受體細胞突變的該基因所編碼，並且，藉由該體細胞突變，序列編號 22 之胺基酸序列中之位置 1 之麩胺酸被置換成麩醯胺酸、位置 14 之脯胺酸被置換成絲胺酸、位置 27 之酪胺酸被置換成苯丙胺酸、或位置 30 之蘇胺酸被置換成異白胺酸，或者經彼等之任意複數個之組合置換或可被彼等之任意複數個之組合置換。

[41]如前項[39]或[40]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 之 FR 區域，係包含生殖細胞系列型 V 基因 IGHV5-51 之可經受體細胞突變的該基因所編碼之 FR2 區域。

[42]如前項[39]至[41]中任一項記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 之 FR 區域，係包含 FR3 區域，該 FR3 區域係由生殖細胞系列型 V 基因 IGHV5-51 之可經受體細胞突變的該基因所編碼並且，藉由該體細胞突變，序列編號 22 之胺基酸序列中之位置 76 之異白胺酸被置換成苯丙胺酸、位置 77 之絲胺酸被置換成蘇胺酸或天冬醯胺酸、位置 78 之蘇胺酸被置換成纈胺酸、位置 84 之絲胺酸被置換成天冬醯胺酸、位置 93 之甲硫胺酸被置換成異白胺酸或白胺酸、或位置 97 之丙胺酸被置換成纈胺酸，或者經彼等之任意複數個之組合置換或可被彼等之任意複數個之組合置換。

[43]如前項[1]至[42]中任一項記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 係由選自序列編號 1、序列編號 2、序列編號 3、序列編號 4 及序列編號 5 中之任一個胺基酸序列構成，或者由與該 VH 之胺基酸序列至少 80%、90%、95%、98%或 99%相同的胺基酸序列構成。

[44]如前項[1]至[43]中任一項記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 係由選自序列編號 1、序列編號 2、序列編號 3、序列編號 4 及序列編號 5 中的任一個胺基酸序列構成。

[45]如前項[1]至[44]中任一項記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 係由選自序列編號 30、序列

編號 31、序列編號 32、序列編號 33 及序列編號 34 中之任一個胺基酸序列構成，或者由與該 VH 之胺基酸序列至少 80%、90%、95%、98%或 99%相同的胺基酸序列構成。

[46]如前項[1]至[45]中任一項記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH，係由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33 及序列編號 34 中的任一個胺基酸序列構成，並且，該序列中第 114 號之麩醯胺酸經置換或可被置換成精胺酸的胺基酸序列。

[47]如前項[1]至[45]中任一項記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH，係由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33、序列編號 34、序列編號 62、序列編號 63、序列編號 64、序列編號 65 及序列編號 66 中的任一個胺基酸序列構成。

[48]如前項[1]或[2]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 係由選自序列編號 1、序列編號 2、序列編號 3、序列編號 4 及序列編號 5 中的任一個胺基酸序列構成；該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 係由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33、序列編號 34、序列編號 62、序列編號 63、序列編號 64、序列編號 65 及序列編號 66 中的任一個胺基酸序列構成。

[49]一種 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其係具有與 PD-1 特異性結合之第一臂及與 CD19 特異性結合之第二臂，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 係由選自序列編號 1、序列編號 2、序列編號 3、序列編號 4 及序列編號 5 中的任一個胺基酸序列構成，或由與該 VH 之胺基酸序列至少

80%、90%、95%、98%或 99%相同的胺基酸序列構成；該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 係由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33、序列編號 34、序列編號 62、序列編號 63、序列編號 64、序列編號 65 及序列編號 66 中的任一個胺基酸序列構成，或由與該 VH 之胺基酸序列至少 80%、90%、95%、98%或 99%相同的胺基酸序列構成。

[50]如前項[1]或[2]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 1 之胺基酸序列構成；該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33、序列編號 34、序列編號 62、序列編號 63、序列編號 64、序列編號 65 及序列編號 66 中的任一個胺基酸序列構成。

[51]如前項[1]或[2]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 2 之胺基酸序列構成；該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33、序列編號 34、序列編號 62、序列編號 63、序列編號 64、序列編號 65 及序列編號 66 中的任一個胺基酸序列構成。

[52]如前項[1]或[2]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 3 之胺基酸序列構成；該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33、序列編號 34、序列編號 62、序列編號 63、序列編號 64、序列編號 65 及序列編號 66 中的任一個胺基酸序列構成。

[53]如前項[1]或[2]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 4 之胺基酸序列構成；該

與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33、序列編號 34、序列編號 62、序列編號 63、序列編號 64、序列編號 65 及序列編號 66 中的任一個胺基酸序列構成。

[54]如前項[1]或[2]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 5 之胺基酸序列構成；該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33、序列編號 34、序列編號 62、序列編號 63、序列編號 64、序列編號 65 及序列編號 66 中的任一個胺基酸序列構成。

[55]如前項[1]、[2]或[8]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 1 之胺基酸序列構成；該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由序列編號 30 或序列編號 62 之胺基酸序列構成。

[56]如前項[1]、[2]或[9]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 1 之胺基酸序列構成；該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由序列編號 31 或序列編號 63 之胺基酸序列構成。

[57]如前項[1]、[2]或[10]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 1 之胺基酸序列構成；該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由序列編號 32 或序列編號 64 之胺基酸序列構成。

[58]如前項[1]、[2]或[11]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 1 之胺基酸序列構

成；該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由序列編號 33 或序列編號 65 之胺基酸序列構成。

[59]如前項[1]、[2]或[12]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 1 之胺基酸序列構成；該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由序列編號 34 或序列編號 66 之胺基酸序列構成。

[60]如前項[1]、[2]或[13]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 2 之胺基酸序列構成；該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由序列編號 30 或序列編號 62 之胺基酸序列構成。

[61]如前項[1]、[2]或[14]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 2 之胺基酸序列構成；該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由序列編號 31 或序列編號 63 之胺基酸序列構成。

[62]如前項[1]、[2]或[15]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 2 之胺基酸序列構成；該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由序列編號 32 或序列編號 64 之胺基酸序列構成。

[63]如前項[1]、[2]或[16]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 2 之胺基酸序列構成；該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由序列編號 33 或序列編號 65 之胺基酸序列構成。

[64]如前項[1]、[2]或[17]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 2 之胺基酸序列構成；該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由序列編號 34 或序列編號 66 之胺基酸序列構成。

[65]如前項[1]、[2]或[18]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 3 之胺基酸序列構成；該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由序列編號 30 或序列編號 62 之胺基酸序列構成。

[66]如前項[1]、[2]或[19]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 3 之胺基酸序列構成；該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由序列編號 31 或序列編號 63 之胺基酸序列構成。

[67]如前項[1]、[2]或[20]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 3 之胺基酸序列構成；該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由序列編號 32 或序列編號 64 之胺基酸序列構成。

[68]如前項[1]、[2]或[21]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 3 之胺基酸序列構成；該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由序列編號 33 或序列編號 65 之胺基酸序列構成。

[69]如前項[1]、[2]或[22]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 3 之胺基酸序列構

成；該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由序列編號 34 或序列編號 66 之胺基酸序列構成。

[70]如前項[1]、[2]或[23]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 4 之胺基酸序列構成；該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由序列編號 30 或序列編號 62 之胺基酸序列構成。

[71]如前項[1]、[2]或[24]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 4 之胺基酸序列構成；該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由序列編號 31 或序列編號 63 之胺基酸序列構成。

[72]如前項[1]、[2]或[25]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 4 之胺基酸序列構成；該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由序列編號 32 或序列編號 64 之胺基酸序列構成。

[73]如前項[1]、[2]或[26]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 4 之胺基酸序列構成；該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由序列編號 33 或序列編號 65 之胺基酸序列構成。

[74]如前項[1]、[2]或[27]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 4 之胺基酸序列構成；該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由序列編號 34 或序列編號 66 之胺基酸序列構成。

[75]如前項[1]、[2]或[28]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 5 之胺基酸序列構成；該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由序列編號 30 或序列編號 62 之胺基酸序列構成。

[76]如前項[1]、[2]或[29]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 5 之胺基酸序列構成；該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由序列編號 31 或序列編號 63 之胺基酸序列構成。

[77]如前項[1]、[2]或[30]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 5 之胺基酸序列構成；該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由序列編號 32 或序列編號 64 之胺基酸序列構成。

[78]如前項[1]、[2]或[31]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 5 之胺基酸序列構成；該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由序列編號 33 或序列編號 65 之胺基酸序列構成。

[79]如前項[1]、[2]或[32]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 5 之胺基酸序列構成；該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由序列編號 34 或序列編號 66 之胺基酸序列構成。

[80]如前項[1]至[79]中任一項記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂及/或該與 CD19 特異性結合之第二

臂，分別具有下列(a)至(c)之輕鏈可變區域(以下，將「輕鏈可變區域」簡稱為「VL」)：

(a)由序列編號 26 之胺基酸序列構成的輕鏈可變區域之互補性決定區域 1(以下，將「輕鏈可變區域之互補性決定區域 1」簡稱為 VL-CDR1)、

(b)由序列編號 27 之胺基酸序列構成的輕鏈可變區域之互補性決定區域 2(以下，將「輕鏈可變區域之互補性決定區域 2」簡稱為 VL-CDR2)、及

(c)由序列編號 28 之胺基酸序列構成的輕鏈可變區域之互補性決定區域 3(以下，將「輕鏈可變區域之互補性決定區域 3」簡稱為 VL-CDR3)。

[81]如前項[1]至[80]中任一項記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂及/或該與 CD19 特異性結合之第二臂，分別具有由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL。

[82]一種 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其係與 PD-1 及 CD19 分別特異性結合，且具有與 PD-1 特異性結合之第一臂及與 CD19 特異性結合之第二臂，並且，包含：

(A)與 PD-1 特異性結合之第一臂，係具有由選自序列編號 1、序列編號 2、序列編號 3、序列編號 4 及序列編號 5 中之任一個胺基酸序列構成的 VH 以及由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL，以及

(B)與 CD19 特異性結合之第二臂，係具有由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33、序列編號 34、序列編號 62、序列編號 63、序列編號 64、序列編號 65 及序列編號 66 中之任一個胺基酸序列構成的 VH 以及由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL。

[83]一種 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其係與 PD-1 及 CD19 分別特異性結合，並且，具有與 PD-1 特異性結合之第一臂及與 CD19 特異性結合之第二臂，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂係與下列(1)或(2)交叉競爭對 PD-1 之結合：(1)與 PD-1 特異性結合的第一臂，係具有選自序列編號 1、序列編號 2、序列編號 3、序列編號 4 及序列編號 5 中之任一個胺基酸序列構成的 VH 以及序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL；(2)與 PD-1 特異性結合的單株抗體之可變區域，係由該 VH 及 VL 構成者。

[84]一種 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其係與 PD-1 及 CD19 分別特異性結合，並且，具有與 PD-1 特異性結合之第一臂及與 CD19 特異性結合之第二臂，其中，該與 PD-1 特異性結合的第一臂與下列(1)或(2)交叉競爭對 PD-1 之結合：(1)與 PD-1 特異性結合的第一臂，係具有由選自序列編號 1、序列編號 2、序列編號 3、序列編號 4 及序列編號 5 中之任一個胺基酸序列構成的 VH 以及由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL，且；(2)與 PD-1 特異性結合的單株抗體的可變區域，係由該 VH 及 VL 構成者。

[85]如前項[83]或[84]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 CD19 特異性結合的第二臂進一步與下列(1)或(2)交叉競爭對 CD19 之結合：(1)與 CD19 特異性結合的第二臂，係具有由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33、序列編號 34、序列編號 62、序列編號 63、序列編號 64、序列編號 65 及序列編號 66 中之任一個胺基酸序列構成的 VH 以及由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL；(2)與 CD19 特異性結合的單株抗體之可變區域，係由該 VH 及 VL 構成者。

[86]如前項[83]或[84]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 CD19 特異性結合的第二臂進一步與下列(1)或(2)交叉競爭對 CD19 之結合：(1)與 CD19 特異性結合的第二臂，係具有由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33、序列編號 34、序列編號 62、序列編號 63、序列編號 64、序列編號 65 及序列編號 66 中之任一個胺基酸序列構成的 VH 以及由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL；(2)與 CD19 特異性結合的單株抗體之可變區域，係由該 VH 及 VL 構成者。

[87]如前項[83]或[84]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 CD19 特異性結合之第二臂係選自下列(A)至(E)之任一 VH：

(A)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 35 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 36 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 37 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(B)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 38 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 39 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 40 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(C)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 41 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 42 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 43 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(D)具有下列(a)至(c)之 VH，

- (a)由序列編號 44 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、
- (b)由序列編號 45 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及
- (c)由序列編號 46 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，以及
- (E)具有下列(a)至(c)之 VH，

- (a)由序列編號 47 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、
- (b)由序列編號 48 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及
- (c)由序列編號 49 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

[88]如前項[83]或[84]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 係由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33、序列編號 34、序列編號 62、序列編號 63、序列編號 64、序列編號 65 及序列編號 66 中的任一個胺基酸序列構成，或由與該 VH 之胺基酸序列至少 80%、90%、95%、98%或 99%相同的胺基酸序列構成。

[89]如前項[83]或[84]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 CD19 特異性結合的第二臂之 VH 係由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33、序列編號 34、序列編號 62、序列編號 63、序列編號 64、序列編號 65 及序列編號 66 中的任一個胺基酸序列構成。

[90]如前項[83]至[89]中任一項記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合的第一臂及/或該與 CD19 特異性結合的第二臂具有下列(a)至(c)：

- (a)由序列編號 26 之胺基酸序列構成的 VL-CDR1、
- (b)由序列編號 27 之胺基酸序列構成的 VL-CDR2、及
- (c)由序列編號 28 之胺基酸序列構成的 VL-CDR3。

[91]如前項[83]至[89]中任一項記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合的第一臂及/或該與 CD19 特異性結合的第二臂，具有由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL。

[92]如前項[1]至[91]中任一項記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該 PD-1/CD19 雙特異性抗體為 IgG 抗體。

[93]如前項[92]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，前項[92]記載之 IgG 抗體為 IgG₁ 抗體或 IgG₄ 抗體。

[94]如前項[92]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，前項[92]記載之 IgG 抗體為 IgG₁ 抗體。

[95]如前項[92]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，前項[92]記載之 IgG 抗體為 IgG₄ 抗體。

[96]如前項[94]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，前項[94]記載之 IgG₁ 抗體中的 2 個重鏈恆定區域中，EU 編號系統的第 235 號之白胺酸，分別被置換成甘胺酸，及/或第 236 號之甘胺酸分別被置換成精胺酸。

[97]如前項[94]或[96]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，具有與 PD-1 特異性結合之第一臂之 VH 的重鏈之恆定區域中，根據 EU 編號系統的第 351 號之白胺酸及第 366 號之蘇胺酸皆被置換成離胺酸，具有與 CD19 特異性結合之第二臂之 VH 的重鏈之恆定區域中，第 351 號之白胺酸被置換成天冬胺酸，且第 368 號之白胺酸被置換成麩胺酸。

[98]如前項[94]或[96]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，具有與 PD-1 特異性結合之第一臂之 VH 的重鏈之恆定區域中，根據 EU 編號系統的第 351 號之白胺酸被置換成天冬胺酸，且第 368 號之白胺酸被置換成

麩胺酸；具有與 CD19 特異性結合之第二臂之 VH 的重鏈之恆定區域中，第 351 號之白胺酸及第 366 號之蘇胺酸皆被置換成離胺酸。

[99]如前項[94]及[96]至[98]中任一項記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，前項[94]及[96]至[98]中任一項記載之 IgG₁ 抗體的 2 個重鏈恆定區域中，根據 EU 編號系統的第 447 號之離胺酸分別欠缺。

[100]如前項[95]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，前項[95]記載之 IgG₄ 抗體中的 2 個重鏈恆定區域中，根據 EU 編號系統的第 228 號之絲胺酸分別被置換成脯胺酸。

[101]如前項[94]及[96]至[99]中任一項記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該具有與 CD19 特異性結合之第二臂之 VH 的重鏈，係在其 C 末端進一步具有 Gly(甘胺酸)、Gly-Lys-Lys-Ala(序列編號 67)、Gly-Lys-Ala-Lys-Ala(序列編號 68)、Gly-Arg-Arg-Ala(序列編號 69)或 Gly-Arg-Ala-Arg-Ala(序列編號 70)。

[102]如前項[1]至[94]、[96]、[98]、[99]及[101]中任一項記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該具有與 PD-1 特異性結合之第一臂之 VH 的重鏈，係包含由序列編號 23 之胺基酸序列構成的重鏈恆定區域。

[103]如前項[1]至[94]、[96]、[98]、[99]、[101]及[102]中任一項記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該具有與 CD19 特異性結合之第二臂之 VH 的重鏈，係包含由選自序列編號 24、序列編號 71、序列編號 72、序列編號 73、序列編號 74 及序列編號 75 中之任一個胺基酸序列構成的重鏈恆定區域。

[104]如前項[1]至[103]中任一項記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該具有與 PD-1 特異性結合之第一臂之 VL 的輕鏈及/或該具有與 CD19 特異性結合之第二臂之 VL 的輕鏈，係包含由序列編號 29 之胺基酸序列構成的輕鏈恆定區域。

[105]一種 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其係與 PD-1 及 CD19 分別特異性結合，並且，具有與 PD-1 特異性結合之第一臂及與 CD19 特異性結合之第二臂，其中，

(A)具有與 PD-1 特異性結合之第一臂之 VH 的重鏈，係包含由選自序列編號 1、序列編號 2、序列編號 3、序列編號 4 及序列編號 5 中之任一個胺基酸序列構成的 VH 以及由序列編號 23 之胺基酸序列構成的重鏈恆定區域，

(B)具有與 PD-1 特異性結合之第一臂之 VL 的輕鏈，係包含由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL 及由序列編號 29 之胺基酸序列構成的輕鏈恆定區域，

(C)具有與 CD19 特異性結合之第二臂之 VH 的重鏈，係包含由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33、序列編號 34、序列編號 62、序列編號 63、序列編號 64、序列編號 65 及序列編號 66 中之任一個胺基酸序列構成的 VH 以及由序列編號 24 之胺基酸序列構成的重鏈恆定區域，及

(D)具有與 CD19 特異性結合之第二臂之 VL 的輕鏈，係包含由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL 及由序列編號 29 之胺基酸序列構成的輕鏈恆定區域。

[106]如前項[1]至[105]中任一項記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂容許 PD-1 與 PD-L1 間之相互作用。

[107]如前項[1]至[106]中任一項記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，由該與 PD-1 特異性結合之第一臂的重鏈及輕鏈所構成的複合物之等電點為約 7.4 至約 7.7(較佳為約 7.5 至約 7.6)。

[108]如前項[1]至[107]中任一項記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，由該與 CD19 特異性結合之第二臂的重鏈及輕鏈所構成的複合物之等電點為約 8.3 至約 8.8(較佳為約 8.4 至約 8.6)。

[109]如前項[1]至[108]中任一項記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其係在投予中或投予後 24 小時以內，充分地減低血中或組織中之細胞激素產生。

[110]如前項[1]至[108]中任一項記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂容許 PD-1 及 PD-L1 間之相互作用，且充分地減低細胞激素產生。

[111]如前項[109]或[110]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，細胞激素至少為 IL-2、IFN- γ 或 TNF- α 。

[112]如前項[1]至[111]中任一項記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其係藉由與在相同 B 細胞上分別表現的 PD-1 及 CD19 結合，而抑制 B 細胞之活化。

[113]如前項[1]至[111]中任一項記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其係抑制 T 細胞(較佳為記憶 T 細胞)之活化。

[114]如前項[113]記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其係藉由分別與在 B 細胞上表現的 CD19 及 T 細胞上表現的 PD-1 結合，而抑制 T 細胞之活化。

[115]如前項[1]至[114]中任一項記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，PD-1 及 CD19 分別為人類 PD-1 及人類 CD19。

[116]如前項[1]至[115]中任一項記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該 PD-1/CD19 雙特異性抗體為單株抗體。

[117]如前項[1]至[116]中任一項記載之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該 PD-1/CD19 雙特異性抗體為單離抗體。

[1-1]一種醫藥組成物，其係包含選自前項[1]至[117]中任一項之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片作為有效成分。

[1-2]如前項[1-1]記載之醫藥組成物，其進一步包含至少一種藥學上可容許之載體。

【0012】

[2-1]一種自體免疫疾病之預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療劑，其係包含選自前項[1]至[117]中任一項之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片作為有效成分。

[2-2]如前項[2-1]記載之劑，其中，該自體免疫疾病為貝賽特氏症候群 (Behcet's disease)、全身性紅斑性狼瘡、慢性圓板狀紅斑性狼瘡、多發性硬化症 (全身性硬皮症、進行性全身性硬化症)、硬皮症、多發性肌炎、皮膚肌炎、結節性動脈周圍炎(結節性多發動脈炎、顯微鏡性多發血管炎)、大動脈炎症候群 (高安動脈炎)、惡性關節風濕病、關節風濕病、青年性特發性關節炎、脊椎關節炎、混合性結締組織病、薛格連氏症候群(Sjogren's syndrome)、成人史迪爾氏病(Adult Onset Still's Disease)、血管炎、過敏性肉芽腫性血管炎、過敏性血管炎、類風濕血管炎、大型血管炎、ANCA 關連血管炎(例如，多發血管炎性肉芽

腫症及嗜酸性球性多發血管炎性肉芽腫症)、Cogan 氏症候群、RS3PE 症候群、顫動脈炎、風濕性多發肌痛症、纖維肌痛症、抗磷脂質抗體症候群、嗜酸性球性肌膜炎、IgG4 關連疾病(例如，原發性硬化性膽管炎、自體免疫性胰炎等)、格林巴利症候群(Guillain- Barre Syndrome)、重症肌無力症、慢性萎縮性胃炎、自體免疫性肝炎、非酒精性脂肪肝炎、原發性膽汁性肝硬變、古德巴斯捷症候群(Goodpasture syndrome)、急速進行性絲球體腎炎、巨紅血球性貧血、自體免疫性溶血性貧血、惡性貧血、自體免疫性嗜中性球減少症、特發性血小板減少性紫斑病、Basedow 病(格雷夫茲病(甲狀腺功能亢進症))、橋本病、自體免疫性副腎功能不全、原發性甲狀腺功能降低症、艾迪生氏病(Addison's disease)(慢性副腎皮質功能降低症)、特發性艾迪生氏病、I 型糖尿病、緩慢進行性 I 型糖尿病(成人潛在性自體免疫性糖尿病)、局部性硬皮症、乾癬、乾癬性關節炎、水皰性類天皰瘡、天皰瘡、類天皰瘡、妊娠性皰疹、線狀 IgA 水皰性皮膚症、後天性表皮水皰症、圓形脫毛症、白斑、尋常性白斑、視神經脊髓炎、慢性炎症性脫髓性多發神經炎、多灶性運動神經病、結節病、巨細胞性動脈炎、肌萎縮性側索硬化症、原田病、自體免疫性視神經症、特發性無精子症、習慣性流產、炎症性腸疾病(例如，潰瘍性大腸炎、克隆氏病(Crohn's disease))、乳糜瀉病、強直性脊椎炎、重度氣喘、慢性蕁麻疹、移植免疫、家族性地中海熱、嗜酸性球性副鼻腔炎、擴張型心肌症、全身性肥胖細胞症或封入體肌炎。

[2-3]一種移植物對抗宿主疾病(GVHD)之預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療劑，其係包含選自前項[1]至[117]中任一項之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片作為有效成分。

[2-4]一種 I 型糖尿病之預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療劑，其係包含選自前項[1]至[117]中任一項之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片作為有效成分，其特徵為與選自下列之任一種以上之藥劑一起投予：胰島素(insulin)製劑(例如，人類胰島素、甘精胰島素(Insulin glargine)、離脯胰島素(Insulin lispro)、地特胰島素(Insulin detemir)、門冬胰島素(Insulin aspart)等)、磺醯脲(sulfonylurea)劑(例如，格列本脲(glibenclamide)、格列齊特(gliclazide)、格列美脲(glimepiride)等)、速攻型胰島素分泌促進藥(例如，那格列奈(nateglinide)等)、雙胍類(biguanide)製劑(例如，二甲雙胍(metformin)等)、胰島素抗性改善藥(例如，吡格列酮(pioglitazone)等)、 α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase)抑制藥(例如，阿卡波糖(acarbose)、伏格列波糖(voglibose)等)、糖尿病性神經症治療藥(例如，伊帕司他(epalrestat)、脈序律(mexiletine)、咪達普利(imitapril)等)、GLP-1 類似物製劑(例如，利拉魯肽(liraglutide)、艾塞那肽(exenatide)、利西拉來(lixisenatide)等)及 DPP-4 抑制劑(例如，西他列汀(sitagliptin)、維格列汀(vildagliptin)、阿格列汀(alogliptin)等)。

[2-5]一種多發性硬化症之預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療劑，其係包含選自前項[1]至[117]中任一項之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片作為有效成分，其特徵為與選自下列之任一種以上之藥劑一起投予：類固醇藥(例如，乙酸可體松(cortisone acetate)、氫化可體松(hydrocortisone)、磷酸氫化可體松鈉、琥珀酸氫化可體松鈉、乙酸氟可體松、潑尼松龍(Prednisolone)、乙酸潑尼松龍、琥珀酸潑尼松龍鈉、丁基乙酸潑尼松龍、磷酸潑尼松龍鈉、乙酸鹵潑尼松(halopredone acetate)、甲基潑尼松龍、乙酸甲基潑尼松龍、琥珀酸甲基潑尼松龍鈉、安西諾隆(triamcinolone)、乙酸安西諾隆、曲安奈德(triamcinolone

acetone)、地塞米松(dexamethasone)、乙酸地塞米松、磷酸地塞米松鈉、棕櫚酸地塞米松、乙酸帕拉米松(paramethasone acetate)、倍他米松(betamethasone)等)、干擾素 β -1a、干擾素 β -1b、乙酸格拉替雷(glatiramer acetate)、米托蒽醌(mitoxanthone)、硫唑嘌呤(azathioprine)、環磷醯胺(cyclophosphamide)、環孢黴素(cyclosporine)、甲胺蝶呤(methotrexate)、可拉屈濱(cladribine)、副腎皮質刺激荷爾蒙(ACTH)、促腎上腺皮質激素(corticotropin)、咪唑立濱(mizoribine)、他克莫司(tacrolimus)、芬戈莫德(fingolimod)及阿倫單抗(alemtumab)。

[2-6]一種全身性紅斑性狼瘡之預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療劑，其係包含選自前項[1]至[117]中任一項之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片作為有效成分，其特徵為與選自下列之任一種以上之藥劑一起投予：類固醇藥(例如，前項[2-5]記載之類固醇藥)、免疫抑制劑(例如，環孢黴素、他克莫司、芬戈莫德等)及貝利木單抗(belimumab)。

[2-7]一種關節風濕病之預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療劑，其係包含選自前項[1]至[117]中任一項之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片作為有效成分，其特徵為與選自下列之任一種以上之藥劑一起投予：類固醇藥(例如，前項[2-5]記載之類固醇藥)、抗風濕病藥(例如，甲胺蝶呤、撒樂腸溶錠(sulfasalazine)、布西拉明(bucillamine)、來氟米特(leflunomide)、咪唑立濱、他克莫司等)、抗細胞激素藥(例如，英夫利昔單抗(infliximab)、阿達木單抗(adalimumab)、托珠單抗(tocilizumab)、依那西普(etanercept)、戈利木單抗(golimimumab)、塞妥珠單抗(certolizumab))及阿巴西普(abatacept)。

[2-8]一種自體免疫疾病之預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療劑，其係包含選自前項[1]至[117]中任一項之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片

作為有效成分，其特徵為與前項[2-4]至[2-7]中所列舉的任一種以上之藥劑一起投予。

[2-9]如前項[2-4]至[2-8]記載之各疾病之預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療劑，其特徵為被投予至經投予前項[2-4]至[2-7]中所列舉的任一種以上之藥劑的患者。

[2-10]如前項[2-4]至[2-8]記載之各疾病之預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療劑，其特徵為於前項[2-4]至[2-7]中所列舉的任一種以上之藥劑投予後投予。

[2-11]如前項[2-4]至[2-8]記載之各疾病之預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療劑，其特徵為於前項[2-4]至[2-7]中所列舉的任一種以上之藥劑投予前投予。

【0013】

[3-1]一種靜脈內注射用製劑，其係包含選自前項[1]至[117]中任一項之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片及至少一種藥學上可容許之載體。

[3-2]如前項[3-1]記載之靜脈內注射用製劑，其係用於自體免疫疾病之預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療。

[3-3]如前項[3-1]或[3-2]記載之靜脈內注射用製劑，其為點滴用。

[4-1]一種單離多核苷酸或其斷片，其係編碼重鏈，該重鏈構成選自前項[1]至[117]中任一項之 PD-1/CD19 雙特異性抗體且具有與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH。

[4-2]一種單離多核苷酸或其斷片，其係編碼構成選自前項[1]至[117]中任一項之 PD-1/CD19 雙特異性抗體且與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH。

[4-3]如前項[4-1]或[4-2]記載之單離多核苷酸或其斷片，其中，該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH，係藉由選自序列編號 56 至 60 及序列編號 76 至 80 之鹼基序列構成的多核苷酸編碼。

[4-4]一種單離多核苷酸或其斷片，其係包含由選自序列編號 56 至 60 及序列編號 76 至 80 之鹼基序列構成的多核苷酸。

[5-1]一種表現載體，其係包含前項[4-1]至[4-4]中任一項記載之多核苷酸。

[6-1]一種動物細胞，其係導入前項[5-1]記載之表現載體，或藉由該載體之導入而轉形。

[7-1]一種自體免疫疾病之預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療方法，其係包含對患者投予有效量之選自前項[1]至[117]中任一項之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片。

[8-1]如選自前項[1]至[117]中任一項之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其係使用於自體免疫疾病之預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療。

[9-1]如選自前項[1]至[117]中任一項之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片之用途，其係用以製造用於自體免疫疾病之預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療之醫藥。

【0014】

[10-1]一種單離抗 CD19 單株抗體或其抗體斷片，其係和與 CD19 特異性結合的抗體交叉競爭對 CD19 的結合，該與 CD19 特異性結合的抗體係具有由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33、序列編號 34、序列編號 62、序列編號 63、序列編號 64、序列編號 65 及序列編號 66 中之任一個胺基酸序列構成的 VH 以及由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL，。

[10-2]一種抗體或其抗體斷片，其為單離抗 CD19 單株抗體或其抗體斷片，其中該抗體或其抗體斷片，並且，其係和與 CD19 特異性結合的抗體交叉競爭對 CD19 之結合，該與 CD19 特異性結合的抗體係具有由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33、序列編號 34、序列編號 62、序列編號 63、序列編號 64、序列編號 65 及序列編號 66 中之任一個胺基酸序列構成的 VH 以及由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL。

[10-3]一種單離抗 CD19 單株抗體或其抗體斷片，其具有 VH 及 VL，該 VH 係選自下列(A)至(E)之任一 VH：

(A)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 35 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 36 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 37 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(B)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 38 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 39 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 40 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(C)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 41 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 42 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 43 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(D)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 44 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 45 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及
(c)由序列編號 46 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，以及
(E)具有下列(a)至(c)之 VH、

(a)由序列編號 47 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、
(b)由序列編號 48 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及
(c)由序列編號 49 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

該 VL 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 26 之胺基酸序列構成的 VL-CDR1、
(b)由序列編號 27 之胺基酸序列構成的 VL-CDR2、及
(c)由序列編號 28 之胺基酸序列構成的 VL-CDR3。

[10-4]一種單離抗 CD19 單株抗體或其抗體斷片，其具有 VH 及 VL，該 VH 係選自下列(A)至(E)之任一 VH：

(A)具有下列(a)至(c)之 VH，
(a)由序列編號 35 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、
(b)由序列編號 36 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及
(c)由序列編號 37 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(B)具有下列(a)至(c)之 VH，
(a)由序列編號 38 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、
(b)由序列編號 39 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及
(c)由序列編號 40 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(C)具有下列(a)至(c)之 VH，
(a)由序列編號 41 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 42 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 43 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(D)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 44 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 45 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 46 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，以及

(E)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 47 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 48 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 49 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

該 VL 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 26 之胺基酸序列構成的 VL-CDR1、

(b)由序列編號 27 之胺基酸序列構成的 VL-CDR2、及

(c)由序列編號 28 之胺基酸序列構成的 VL-CDR3；

其中，在選自該 VH 中之 VH-CDR1、VH-CDR2 及 VH-CDR3 的任一個或複數個 CDR 中，其任意 1 至 5 個胺基酸殘基可被其他胺基酸置換。

[10-5]如前項[10-1]至[10-4]中任一項記載之單離抗 CD19 單株抗體或其抗體斷片，其係具有由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33 及序列編號 34 中之任一個胺基酸序列構成的 VH、或由與該 VH 之胺基酸序列至少 80%、90%、95%、98%或 99%相同之胺基酸序列構成的 VH，以及由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL。

[10-6]如前項[10-1]至[10-4]中任一項記載之單離抗 CD19 單株抗體或其抗體斷片，其具有由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33 及序列編號 34 中之任一個胺基酸序列中第 114 號之麩醯胺酸經置換或可被置換成精胺酸之胺基酸序列構成的 VH 以及由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL。

[10-7]如前項[10-1]至[10-4]中任一項記載之單離抗 CD19 單株抗體或其抗體斷片，其具有由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33、序列編號 34、序列編號 62、序列編號 63、序列編號 64、序列編號 65 及序列編號 66 中之任一個胺基酸序列構成的 VH 以及由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL。

[10-8]如前項[10-1]至[10-7]中任一項記載之單離抗 CD19 單株抗體或其抗體斷片，其中，CD19 為人類 CD19。

[10-9]如前項[10-1]至[10-8]中任一項記載之單離 CD19 單株抗體或其抗體斷片，其中，抗 CD19 抗體為 IgG 抗體。

[10-10]如前項[10-9]記載之單離抗 CD19 單株抗體或其抗體斷片，其中，前項[10-9]記載之 IgG 抗體為 IgG₁ 抗體或 IgG₄ 抗體。

[10-11]如前項[10-9]記載之單離抗 CD19 單株抗體或其抗體斷片，其中，前項[10-9]記載之 IgG 抗體為 IgG₁ 抗體。

[10-12]如前項[10-9]記載之單離抗 CD19 單株抗體或其抗體斷片，其中，前項[10-9]記載之 IgG 抗體為 IgG₄ 抗體。

[10-13]如前項[10-1]至[10-11]中任一項記載之單離抗 CD19 單株抗體或其抗體斷片，其中，(1)該重鏈恆定區域中第 351 號之白胺酸被置換成天冬胺酸，且

第 368 號之白胺酸被置換成麩胺酸，或(2)該重鏈恆定區域中第 351 號之白胺酸及第 366 號之蘇胺酸皆被置換成離胺酸。

[10-14]如前項[10-1]至[10-13]中任一項記載之單離抗 CD19 單株抗體或其抗體斷片，其中，該重鏈之 C 末端進一步具有 Gly(甘胺酸)、Gly-Lys-Lys-Ala(序列編號 67)、Gly-Lys-Ala-Lys-Ala(序列編號 68)、Gly-Arg-Arg-Ala(序列編號 69)或 Gly-Arg-Ala-Arg-Ala(序列編號 70)。

[10-15]如前項[10-1]至[10-14]中任一項記載之單離抗 CD19 單株抗體或其抗體斷片，其中，該重鏈包含由選自序列編號 24、序列編號 71、序列編號 72、序列編號 73、序列編號 74 及序列編號 75 中之任一個胺基酸序列構成的重鏈恆定區域。

[11-1]一種自體反應性 B 細胞媒介性疾病之預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療劑，其係包含選自前項[1]至[117]中任一項之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片作為有效成分。

[11-2]如前項[11-1]記載之預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療劑，其中，自體反應性 B 細胞媒介性疾病為：全身性紅斑性狼瘡、格雷夫茲病、重症肌無力症、自體免疫性溶血性貧血、自體免疫性血小板減少症、氣喘、冷凝球蛋白血症、原發性膽管硬化症或惡性貧血。

[12-1]一種自體反應性 B 細胞抑制劑，其係包含選自前項[1]至[117]中任一項之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片作為有效成分。

[12-2]如前項[12-1]記載之自體反應性 B 細胞抑制劑，其中，自體反應性 B 細胞抑制為免疫球蛋白產生抑制。

[12-3]如前項[12-2]記載之自體反應性 B 細胞抑制劑，其中，該免疫球蛋白為 IgG 或 IgM。

[13-1]一種 T 細胞活化抑制劑，其係包含選自前項[1]至[117]中任一項之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片作為有效成分。

[13-2]如前項[13-1]記載之 T 細胞活化抑制劑，其中，該 T 細胞活化抑制為細胞激素產生抑制。

[13-3]如前項[13-1]或[13-2]記載之 T 細胞活化抑制劑，其中，該 T 細胞活化抑制為記憶 T 細胞抑制。

[14-1]一種自體反應性 B 細胞抑制或 T 細胞活化抑制方法，其中，包含對患者投予有效量之選自前項[1]至[117]中任一項之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片。

[15-1]如選自前項[1]至[117]中任一項之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，其係使用於自體反應性 B 細胞抑制或 T 細胞活化抑制。

[16-1]如選自前項[1]至[117]中任一項之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片之用途，其係用於自體反應性 B 細胞抑制劑或 T 細胞活化抑制劑之製造。

[發明效果]

【0015】 本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體，係容許 PD-1 及 PD-L1 間之相互作用，可期待增強或持續自體免疫疾病之預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療之效果。

【圖式簡單說明】

【0016】

圖 1 係顯示共通輕鏈之 VL 及恆定區域的胺基酸序列。

圖 2 係顯示共通輕鏈之 VL 之各 CDR 的胺基酸序列。

圖 3 係顯示分別由生殖細胞系列型 V 基因 IGHV7-4-1 及 IGHV5-51 編碼的胺基酸序列。

圖 4 係顯示與 PD-1 特異性結合之抗體(以下，簡稱為抗 PD-1 抗體)之各殖株(clone)的 VH，與生殖細胞系列型基因 IGHV7-4-1 及 JH6c 之序列比對。圖中，各殖株之胺基酸序列中之“-”表示與對應之生殖細胞系列型基因 IGHV7-4-1 或 JH6c 之胺基酸序列相同的胺基酸，記載胺基酸簡稱的部分表示與該生殖細胞系列型基因之胺基酸序列相異的胺基酸。

圖 5 係顯示與 CD19 特異性結合之抗體(以下，簡稱為「抗 CD19 抗體」)之各殖株的 VH，與由生殖細胞系列型基因 IGHV5-51 編碼之胺基酸序列的序列比對。圖中之各記號表示與圖 4 者相同的意義。

圖 6 係顯示抗 PD-1 抗體各殖株之 VH 的胺基酸序列。

圖 7 係顯示抗 PD-1 抗體各殖株之 VH 中之各 CDR 的胺基酸序列。

圖 8 係顯示抗 CD19 抗體各殖株之 VH 的胺基酸序列。

圖 9 係顯示抗 CD19 抗體各殖株之 VH 中之各 CDR 的胺基酸序列。

圖 10 係顯示 PD-1/CD19 雙特異性抗體之各重鏈恆定區域的胺基酸序列。

圖 11 係顯示分別確認 PD-1/CD19 雙特異性抗體之各殖株對 PD-1 及 CD19 之結合活性的生物分子交互作用分析(Biacore)測定結果。

圖 12 係顯示分別確認 PD-1/CD19 雙特異性抗體各殖株 CD19-1(Bi)至 CD19-3(Bi)對 CD19 之結合性的流式細胞術。

圖 13 係顯示分別確認 PD-1/CD19 雙特異性抗體各殖株 CD19-4(Bi)及 CD19-5(Bi)對 CD19 之結合性的流式細胞術。

圖 14 係顯示分別確認 PD-1/CD19 雙特異性抗體各殖株 CD19-1(Bi)至 CD19-3(Bi)對 PD-1 之結合性的流式細胞術。

圖 15 係顯示分別確認 PD-1/CD19 雙特異性抗體各殖株 CD19-4(Bi)及 CD19-5(Bi)對 PD-1 之結合性的流式細胞術。

圖 16 係顯示分別確認 PD-1/CD19 雙特異性抗體各殖株 CD19-6(Bi)對 PD-1 及 CD19 之結合性的流式細胞術。

圖 17 係顯示分別確認 PD-1/CD19 雙特異性抗體各殖株對 PD-1 及 CD19 之同時結合性的流式細胞術。

圖 18 係顯示分別確認 PD-1/CD19 雙特異性抗體各殖株對 PD-1/PD-L1 相互作用之影響的流式細胞術。

圖 19 係分別顯示 PD-1/CD19 雙特異性抗體各殖株對試管(in-vitro)中的人類 B 細胞活化時之 IgM 產生的作用結果。再者，圖中之「Ctrl」表示對照群。

圖 20 係分別顯示 PD-1/CD19 雙特異性抗體各殖株(CD19-1(Bi)至 CD19-4(Bi))對生體(in-vivo)中的人類 B 細胞活化時之 IgG₂產生的作用結果。再者，圖中之「Ctrl」表示對照群。

圖 21 係分別顯示 PD-1/CD19 雙特異性抗體殖株 CD19-5(Bi)及 CD19-6(Bi)對生體中的人類 B 細胞活化時之 IgG₂產生的作用結果。再者，圖中之「Ctrl」表示對照群。

圖 22 係顯示 PD-1/CD3 雙特異性抗體殖株 CD19-6(Bi)對從人類末梢血單核細胞之細胞激素產生的作用結果。再者，圖中之「培養基 (medium)」表示對照群。

【實施方式】

【0017】PD-1(Programmed Cell Death-1)(程序性細胞死亡-1)係在人類中以 GenBank 登錄編號 NP_005009 表示之由胺基酸序列構成的膜型蛋白質。在本說明書中，記載為「PD-1」時，只要無特別限定，也有包含其全部同功型(isoform)、及保存有本發明記載之「與 PD-1 特異性結合之第一臂」的抗原決定基(epitope)之該等的改變體者。在本發明中，就 PD-1 而言，較佳為人類 PD-1。

【0018】CD19 係在人類中以 GenBank 登錄編號 NP_001171569 或 NP_001761 所表示之由胺基酸序列構成且表現於 B 細胞的膜蛋白，並且，與 B 細胞受體複合物一起對 B 細胞傳遞刺激的分子。在本說明書中，記載為「CD19」時，只要無特別限定，也有包含保存有本發明記載之「與 CD19 特異性結合之第二臂」的抗原決定基之彼等之改變體者。在本發明中，就 CD19 而言，較佳為人類 CD19。

【0019】在本說明書中，「單離」意指從宿主細胞萃取之包含複數種至無數種成分的夾雜物中，藉由鑑定、分離及/或精製，成為實質上單一之純成分。

【0020】在本說明書中，「單株抗體」意指從對相同的特定抗原進行結合，且實質上均勻之抗體集團得到的抗體。

【0021】在本說明書中，「雙特異性抗體」意指在一分子中具備對於二個相異的抗原分子或抗原決定基之結合特異性的抗體，「雙特異性單株抗體」意指進一步從實質上均勻之抗體集團得到的雙特異性抗體。

【0022】本發明係關於可分別與 PD-1 及 CD19 特異性結合的雙特異性抗體(在本說明書中，簡稱為「PD-1/CD19 雙特異性抗體」)。在本發明中，就 PD-1/CD19 雙特異性抗體而言，較佳為 PD-1/CD19 雙特異性單株抗體，更佳為單離 PD-1/CD19 雙特異性單株抗體，進一步更佳為單離人類 PD-1/人類 CD19 雙特異性單株抗體。其中，「單離人類 PD-1/人類 CD19 雙特異性單株抗體」意指針對人類 PD-1 及人類 CD19 且經單離的雙特異性單株抗體。

【0023】其中，雙特異性抗體之型態方面，例如，雙抗體(diabody)、雙特異性 $sc(Fv)_2$ 、雙特異性迷你抗體、雙特異性 $F(ab')_2$ 、雙特異性雜交抗體、共價鍵型雙抗體(雙特異性 DART)、雙特異性 $(FvCys)_2$ 、雙特異性 $F(ab'-拉鍊)_2$ 、雙特異性 $(Fv-拉鍊)_2$ 、雙特異性三鍵抗體及雙特異性 mAb^2 等。

【0024】雙抗體意指識別相異抗原之 VH、VL 彼此以肽連接子連結成之單鏈肽之二聚物(參照 Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993), Vol. 90, No.14: p.6444-6448)。

【0025】雙特異性 $sc(Fv)_2$ 意指將可識別相異抗原之 2 個抗體的 2 組 VH/VL 經由肽連接子以連續單股之型態產生之經改變的低分子化抗體(參照 J. Biological Chemistry (1994), Vol. 269: p.199-206)。

【0026】雙特異性 $F(ab')_2$ 意指可識別相異之 2 個抗原之抗體的 Fab'斷片，藉由二硫鍵等共價鍵結而成的低分子化抗體。

【0027】雙特異性迷你抗體意指將於可低分子抗體斷片藉由其 CH3 結構域上之二硫鍵等共價鍵結而成的低分子化抗體，該低分子抗體斷片係以使各個識別相異抗原之 scFv 與抗體之恆定區域 CH3 結構域連結之方式而改變者(參照 Biochemistry (1992), Vo.31, No.6, p.1579-1584)。

【0028】雙特異性雜交抗體意指識別相異之 2 個抗原的抗體之重鏈/輕鏈複合物，藉由二硫鍵等共價鍵結而成之完整抗體。

【0029】在本發明中，較佳雙特異性抗體之型態為雙特異性雜交抗體。

【0030】雙特異性雜交抗體，例如，可從以雜交融合瘤法(參照 US4474893)製作的融合瘤產生。再者，可於哺乳動物細胞中使分別編碼識別相異抗原之抗體的重鏈及輕鏈合計 4 種 cDNA 共同表現及分泌而製造。

【0031】本發明中所使用的單株抗體，可利用融合瘤法(例如，參照 Kohler 及 Milstein 等，Nature (1975)，Vol. 256, p.495-97；Hongo 等, Hybridoma (1995), Vol. 14, No. 3, p.253-260；Harlow 等, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988), Vol. 2)及 Hammerling 等, Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, p.563-681(Elsevier, N.Y., 1981))、重組 DNA 法(例如，參照 US4816567)、噬菌體顯示方法(例如，參照 Ladner 等之 US5223409、US5403484 及 US5571698、Dower 等之 US5427908 及 US5580717、McCafferty 等之 US5969108 及 US6172197 及 Griffiths 等之 US5885793、US6521404、US6544731、US6555313、US6582915 及 US6593081)製作。

【0032】抗體或單株抗體，在對人類投予時，為了使其抗原性減低或消失，可以嵌合抗體、人類化抗體或完全人類型抗體之型態製作。

【0033】「嵌合抗體」意指可變區域序列及恆定區域序列源自不同哺乳動物的抗體，例如，可變區域序列源自小鼠抗體，恆定區域序列源自人類抗體者。嵌合抗體，可從以上述融合瘤法、重組 DNA 法或噬菌體顯示方法所單離之產生抗體的融合瘤，將利用周知之手法單離出之編碼抗體可變區域的基因，使用周知之方法與編碼源自人類之抗體恆定區域的基因連結而製作(例如，參照 Cabilly 等之 US4816567)。

【0034】「人類化抗體」意指將源自如小鼠之其他哺乳動物之生殖細胞型的互補性決定區域(CDR)序列，移植至人類框架序列上的抗體。在人類化抗體之情況，亦可從以上述方法單離出之產生抗體之融合瘤，將利用周知之手法單離出之編碼抗體 CDR 區域的基因，使用周知之方法與編碼源自人類之抗體框架區域的基因連結而製作(例如，參照 Winter 之 US5225539 及 US5530101、Queen 等之 US5585089 號及 US6180370)。

【0035】「人類抗體」或「完全人類型抗體」意指由框架區域及 CDR 區域所構成的可變區域以及恆定區域兩者皆為源自人類生殖細胞型免疫球蛋白序列的抗體。在本發明中所使用的人類抗體，可藉由使用轉形成可產生人類抗體的小鼠，例如，Humab 小鼠(例如，參照 Lonberg 及 Kay 等提出之 US5545806、US5569825、US5625126、US5633425、US5789650、US5877397、US5661016、US5814318、US5874299 及 US5770429)、KM 小鼠(例如，參照 Ishida 等之 WO2002/43478)、Xeno 小鼠(例如，參照 US5939598、US6075181、US6114598、US6150584 及 US6162963)或 Tc 小鼠(例如，參照 Tomizuka 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000), p.722-727)的方法製作。再者，亦可以藉由免疫引起人類抗體應答之方式，使用再構築人類免疫細胞之 SCID 331086D1

小鼠(例如，參照 Wilson 等之 US5476996 及 US5698767)進行調製。再者，本發明中所使用之人類抗體，亦可藉由上述噬菌體顯示方法製作。

【0036】在本說明書中，PD-1/CD19 雙特異性抗體之「抗體斷片」意指全長抗體之一部分，且具有針對 PD-1 之抗原結合部分及針對 CD19 之抗原結合部分的抗體，例如，可列舉 $F(ab')_2$ 等。在此，抗原結合部分意指抗體可與其抗原結合之最少單位，例如，由配置有 CDR 的框架區域構成，其中該 CDR 係被配置成：在 VH 及 VL 中各具有之 3 個 CDR 及藉由此等 CDR 的組合而可識別目標抗原。

【0037】在本說明書中，「共通輕鏈」意指與相異之 2 種以上之重鏈會合，並且，可對各個抗原顯示結合能力的輕鏈(De Wildt RM 等，J. Mol. Biol. (1999), Vol. 285, p.895-901、De Kruif 等，J. Mol. Biol. (2009), Vol. 387, p.548-58、WO2004/009618、WO2009/157771 及 WO2014/051433)。如此之共通輕鏈較佳為例如，藉由人類 κ 輕鏈 IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01(根據 IMGT 資料庫之命名法)生殖細胞系列型基因所編碼的輕鏈(以下，簡稱為 IGVK1-39/JK1 共通輕鏈)，更佳為例如，具有 VL 的輕鏈，該 VL 包含由序列編號 26 之胺基酸序列構成之 VL-CDR1、由序列編號 27 之胺基酸序列構成之 VL-CDR2 及由序列編號 28 之胺基酸序列構成之 VL-CDR3；進一步更佳為例如，具有由序列編號 25 之胺基酸序列構成之 VL 的輕鏈。再者，共通輕鏈之恆定區域較佳為由序列編號 29 之胺基酸序列構成的輕鏈恆定區域。將本發明中所使用的共通輕鏈之 VL 及恆定區域之各個胺基酸序列示於圖 1，將其可變區域之各 CDR 的胺基酸序列示於圖 2。

【0038】在本說明書中，「同型(isotype)」意指被用來稱呼由重鏈恆定區域基因編碼之抗體類型(例如，IgM 或 IgG)者。本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體較佳之同型為 IgG，更佳為 IgG₁ 或 IgG₄。在此，就 IgG₁ 而言，以對 Fc 受體之結合經消失或減弱者為較佳。具體而言，藉由將其重鏈恆定區域之任意胺基酸置換、缺失或插入，可得到對 Fc 受體之結合經消失或減弱的 IgG₁ 抗體。例如，可列舉在雙特異性抗體之分別二個重鏈恆定區域或鉸鍊(hinge)區域上，依據 EU 編號系統的第 235 號之白胺酸被置換成甘胺酸，及/或第 236 號之甘胺酸被置換成精胺酸的抗體。再者，為了使抗體之不均勻性減低，以缺失 C 末端之胺基酸，例如，依據 EU 編號系統的第 447 號之離胺酸的抗體為較佳。再者，在雙特異性抗體為 IgG₄ 時，為了抑制抗體分子內之調換(swapping)，以其重鏈恆定區域之任意胺基酸被置換、缺失或插入而成的改變體為更佳。例如，以將位於鉸鍊區域，依據 EU 編號系統的第 228 號之絲胺酸置換成脯胺酸的抗體為較佳。此外，在本說明書中，指定抗體可變區域之 CDR 及框架的胺基酸位置，有依照 Kabat 編號系統規定(參照 Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institute of Health, Bethesda, Md., (1987)及(1991))之情形。再者，恆定區域之胺基酸係依照以 Kabat 之胺基酸位置為基準的 EU 編號系統(參照 Sequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No. 91-3242)表示。

【0039】本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體之 Fc 區域，為了使二個相異之重鏈容易會合，該區域之任意胺基酸可被置換。較佳之態樣例如可舉出：

「具有與 PD-1 特異性結合之第一臂之 VH 的重鏈之恆定區域中，依據 EU 編號系統的第 351 號之白胺酸被置換成離胺酸，且第 366 號之蘇胺酸被置換成離胺

酸；具有與 CD19 特異性結合之第二臂之 VH 的重鏈之恆定區域中，第 351 號之白胺酸被置換成天冬胺酸，且第 368 號之白胺酸被置換成麩胺酸」的 PD-1/CD19 雙特異性抗體。再者，亦可舉出「具有與 PD-1 特異性結合之第一臂之 VH 的重鏈之恆定區域中，依據 EU 編號系統的第 351 號之白胺酸被置換成天冬胺酸，且第 368 號之白胺酸被置換成麩胺酸；具有與 CD19 特異性結合之第二臂之 VH 的重鏈之恆定區域中，第 351 號之白胺酸被置換成離胺酸，且第 366 號之蘇胺酸被置換成離胺酸」的 PD-1/CD19 雙特異性抗體。

【0040】

與 PD-1 特異性結合的第一臂

在本說明書中，「與 PD-1 特異性結合的第一臂」(以下，簡稱為「第一臂」)意指包含於抗體或抗體斷片之一部份，或不是其一部分，不管其自體是否以單獨體存在，至少包含與 PD-1 特異性結合之抗體之 VH，且可與 PD-1 特異性結合的抗體部分，例如，如此之第一臂由抗 PD-1 抗體之 VH 及構成該抗 PD-1 抗體的共通輕鏈之 VL 所構成，再者，第一臂中，亦包含含有該 VH 及 VL 之抗體的 Fab 部分。在此，「與 PD-1 特異性結合」係以下列為特徵被使用：能以具有至少高於 $1 \times 10^{-5} \text{M}$ ，較佳為 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ ，更佳為 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 之親和性(解離常數(Kd 值))的結合活性，對 PD-1 直接結合；至少實質上不結合屬於 CD28、CTLA-4 及 ICOS 等所謂 CD28 家族受體以外之受體成員。再者，「與 PD-1 特異性結合的抗體」或「抗 PD-1 抗體」中的「抗體」，意指全長抗體，亦即，以二硫鍵連結之 2 個重鏈及 2 個輕鏈所構成的全長抗體，較佳為其單株抗體。

【0041】在此，「與 PD-1 特異性結合的第一臂」，例如可舉出具有 VH 者，該 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由 HYJ^1LH 表示之胺基酸序列[序列中， J^1 表示 G(甘胺酸)或 A(丙胺酸)，其他字母分別表示胺基酸之一字簡稱]構成的 VH-CDR1；

(b)由以 $\text{WJ}^2\text{NTNTU}^2\text{NPTX}^2\text{AQGFTG}$ 表示之胺基酸序列[序列中， J^2 表示 L(白胺酸)或 I(異白胺酸)， U^2 表示 E(麩胺酸)或 G(甘胺酸)， X^2 表示 F(苯丙胺酸)或 Y(酪胺酸)，其他字母分別表示與上述相同意義]構成的 VH-CDR2；以及

(c)由以 $\text{GDJ}^3\text{VVPTTIWNYU}^3\text{X}^3\text{MZ}^3\text{V}$ 表示之胺基酸序列[序列中， J^3 表示 M(甲硫胺酸)或 L(白胺酸)， U^3 表示 H(組胺酸)或 Y(酪胺酸)， X^3 表示 F(苯丙胺酸)或 Y(酪胺酸)， Z^3 表示 D(天冬胺酸)或 E(麩胺酸)，其他字母分別表示與上述相同意義]構成的 VH-CDR3。

【0042】再者，「與 PD-1 特異性結合的第一臂」之其他態樣例如可舉出具有選自下列(1b)至(5b)之任一 VH 者：

(1b)包含由序列編號 6 之胺基酸序列構成之 VH-CDR1、由序列編號 7 之胺基酸序列構成之 VH-CDR2 及由序列編號 8 之胺基酸序列構成之 VH-CDR3 的 VH；

(2b)包含由序列編號 9 之胺基酸序列構成之 VH-CDR1、由序列編號 10 之胺基酸序列構成之 VH-CDR2 及由序列編號 11 之胺基酸序列構成之 VH-CDR3 的 VH；

(3b)包含由序列編號 12 之胺基酸序列構成之 VH-CDR1、由序列編號 13 之胺基酸序列構成之 VH-CDR2 及由序列編號 14 之胺基酸序列構成之 VH-CDR3 的 VH；

(4b)包含由序列編號 15 之胺基酸序列構成之 VH-CDR1、由序列編號 16 之胺基酸序列構成之 VH-CDR2 及由序列編號 17 之胺基酸序列構成之 VH-CDR3 的 VH；以及

(5b)包含由序列編號 18 之胺基酸序列構成之 VH-CDR1、由序列編號 19 之胺基酸序列構成之 VH-CDR2 及由序列編號 20 之胺基酸序列構成之 VH-CDR3 的 VH。

【0043】再者，在本發明中的「與 PD-1 特異性結合的第一臂」中，亦包含在選自上述(1b)至(5b)之任一 VH 中的各 VH-CDR 中，其任意 1 至 5 個胺基酸殘基被置換成其他胺基酸(較佳為其保守性胺基酸)，並且，具有與未被該胺基酸置換之原始第一臂對 PD-1 之結合活性實質上同等的結合活性者。例如可舉出，在 VH-CDR1 之情況中，1 個胺基酸殘基被置換成其他胺基酸(較佳為其保守性胺基酸)，在 VH-CDR2 或 VH-CDR3 之情況中，1 至 5 個胺基酸殘基分別被置換成其他胺基酸(較佳為其保守性胺基酸)者。再者，如圖 4 所示，分別對應於與 PD-1 特異性結合之第一臂的抗 PD-1 抗體殖株之各 CDR 中，各殖株間不同的各胺基酸或彼等之任意複數個組合，係可在該等殖株間相互置換。在此，由保守性胺基酸所致之置換，意指具有類似側鏈的殘基之可換性，例如，在具有脂肪族側鏈之胺基酸的群組，為甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸及異白胺酸；在具有脂肪族羥基側鏈之胺基酸的群組中，為絲胺酸及蘇胺酸；在具有含醯胺基之側鏈的胺基酸之群組中，為天冬醯胺酸及麩醯胺酸；在具有芳香族側鏈之胺基酸的群組中，為苯丙胺酸、酪胺酸及色胺酸，在具有鹼性側鏈的胺基酸之群組中，為離胺酸、精胺酸及組胺酸；在具有含硫之側鏈的胺基酸之群組中，為半胱胺酸及甲硫胺酸。較佳之由保守性胺基酸所致之置換之例可列

舉：纈胺酸、白胺酸及異白胺酸間之置換、苯丙胺酸及酪胺酸間之置換、離胺酸及精胺酸間之置換、丙胺酸及纈胺酸間之置換以及天冬醯胺酸及麩醯胺酸間之置換。再者，在此，上述之「具有與未被該胺基酸置換之原始第一臂對 PD-1 之結合活性實質上同等的結合活性」，意指被置換成該胺基酸的第一臂對 PD-1 之結合活性，為未被該胺基酸置換之原始第一臂之結合活性的 95%以上，較佳為 98%以上，更佳為 99%以上。

【0044】再者，本發明中的「與 PD-1 特異性結合之第一臂」亦包含具有 VH 者，在該 VH 中，包含具有上述特定胺基酸序列的各 VH-CDR，以及該 VH 之框架的胺基酸序列係由特定之生殖細胞系列型基因或其經受體細胞突變的該基因編碼。例如，選自上述(1b)至(5b)之任一者所示的 VH，係可由生殖細胞系列型 V 基因為 IGHV7-4-1，生殖細胞系列型 J 基因為 JH6c 的 VDJ 重組基因或其經受體細胞突變的該基因編碼。在此，藉由生殖細胞系列型之 V 基因 IGHV7-4-1 分別編碼的胺基酸序列，係對應序列編號 21 之胺基酸序列(圖 3)。

【0045】本發明之與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 之框架，有由生殖細胞系列型之 VDJ 重組基因經受體細胞突變之該基因編碼之情形。例如，在生殖細胞系列型 V 基因為 IGHV7-4-1 時，選自上述(1b)至(5b)之任一者所示的 VH 之 FR1、FR2、FR3，在圖 4 所示的胺基酸位置中，由於與 IGHV7-4-1 基因所編碼之胺基酸序列不同，意指在該各位置經受體細胞突變。例如，關於 FR1 區域，可將序列編號 21 之胺基酸序列中位置 13 之離胺酸置換成麩醯胺酸、將位置 16 之丙胺酸置換成纈胺酸、或將位置 19 之離胺酸置換成甲硫胺酸，或者可以彼等之任意複數個組合進行置換。關於 FR2 區域，可將序列編號 21 之胺基酸序列中位置 37 之纈胺酸置換成白胺酸。關於 FR3 區域，可將序列編號 21 之

胺基酸序列中位置 77 之絲胺酸置換成蘇胺酸、將位置 84 之半胱胺酸置換成絲胺酸或天冬醯胺酸、或者可以彼等之任意複數個組合進行置換。再者，關於選自上述(1b)至(5b)之任一者所示的 VH 之 FR4 區域，源自 J 基因 JH6c 之 FR4 區域胺基酸序列(Trp-Gly-Lys-Gly-Thr-Thr*-Val-Thr-Val-Ser-Ser)(序列編號 41)中的離胺酸(Lys)，可被置換成麩醯胺酸或天冬醯胺酸，及/或*記號之蘇胺酸(Thr)可被置換成白胺酸。具有上述任何胺基酸置換之組合的各 FR1、FR2、FR3 及 FR4，不會實質地影響與 PD-1 特異性結合之第一臂的功能，亦可作為框架使用。

【0046】再者，在本發明中之「與 PD-1 特異性結合之第一臂」亦包含具有 VH 者，該 VH 包含具有上述特定胺基酸序列的各 CDR，且該 VH 之 FR 的胺基酸序列係由特定之生殖細胞系列型基因或其經受體細胞突變之該基因編碼。例如，如此之第一臂可列舉具有由選自序列編號 1 至 5 之胺基酸序列構成的 VH 者。

【0047】再者，在如此之「與 PD-1 特異性結合之第一臂」中，例如，亦包含：具有由與選自序列編號 1 至 5 中之任一個胺基酸序列至少 80%相同，較佳為至少 90%相同，更佳為至少 95%相同，進一步更佳為至少 98%相同，再進一步更佳為至少 99%相同的胺基酸序列構成的 VH，並且，與原始第一臂之 VH 之胺基酸序列的差異不會對 PD-1 之結合活性造成實質上影響者(以下，簡稱為同源第一臂)。在此，在關於胺基酸序列之相同性之比較中所使用的「%相同」，係定義為使 2 個序列對準排列，並且，與參照之胺基酸序列(在此，為了達成最大百分率之相同性，在必要時，參照之胺基酸序列係導入間隙(gap)者)相同的胺基酸序列之百分率。再者，其中，「與原始之第一臂之 VH 之胺基酸

331086D1 第 66 頁，共 108 頁(發明說明書)

序列的差異不會對 PD-1 之結合活性造成實質上影響」，意指同源第一臂對 PD-1 之結合活性為原始第一臂之該結合活性的 95%以上，較佳為 98%以上，更佳為 99%以上。

【0048】再者，在其他態樣中，在本發明中之「與 PD-1 特異性結合之第一臂」中，亦包含與下述(1)或(2)交叉競爭對 PD-1 之結合的具有抗 PD-1 抗體之可變區域(在此，該可變區域包含構成其之 VH 及 VL)者：(1)具有選自上述(1b)至(5b)之任一者所示的 VH 或由選自序列編號 1 至 5 中之任一個胺基酸序列構成的 VH，以及本說明書中之共通輕鏈的 VL(較佳為由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL)的第一臂，(2)由該 VH 及 VL 構成且與 PD-1 特異性結合的單株抗體之可變區域；再者，亦包含對 PD-1 之結合係藉由下述(3)或(4)進行交叉競爭的具有抗 PD-1 抗體之可變區域者：(3)具有選自上述(1b)至(5b)之任一者所示的 VH 或由選自序列編號 1 至 5 中之任一個胺基酸序列構成的 VH，以及該共通輕鏈之 VL 的第一臂，(4)具有由該 VH 及 VL 構成且與 PD-1 特異性結合的單株抗體之可變區域。在此，「交叉競爭對 PD-1 之結合」，意指藉由與在本說明書例示之第一臂相同或一部分重複的抗原決定基結合，該第一臂對 PD-1 之結合無論其程度如何皆受到抑制，或者是，由與該例示之第一臂相同或一部分重複的抗原決定基結合之抗體所致之對 PD-1 的結合，係無論其程度如何皆受到該例示之第一臂抑制；是否進行交叉競爭係可藉由競爭結合檢定進行評估。例如，可使用下列方法進行判斷：Biacore 分析、ELISA 檢定、流式細胞術、酵素結合免疫吸附檢定法(ELISA)、螢光能量轉移測定法(FRET)或螢光微量測定技術(FMAT(註冊商標))。

【0049】例如，就與具有上述(5b)所示之 VH 及該共通輕鏈之 VL 的第一臂所致之對 PD-1 之結合進行交叉競爭者而言，例如可列舉：具有選自上述(1b)至(4b)之任一者所示之 VH 及該共通輕鏈之 VL(較佳為具有由序列編號 26 之胺基酸序列構成之 VL-CDR1、由序列編號 27 之胺基酸序列構成之 VL-CDR2 及由序列編號 28 之胺基酸序列構成之 VL-CDR3 的 VL)的第一臂；再者，具有由選自序列編號 1 至 4 之胺基酸序列構成的 VH 及該共通輕鏈之 VL(較佳為由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL)的第一臂。

【0050】再者，例如，就與具有選自上述(1b)至(4b)之任一者所示之 VH 或由選自序列編號 1 至 4 之胺基酸序列構成的 VH 及該共通輕鏈之 VL 的第一臂所致之對 PD-1 之結合進行交叉競爭者而言，例如可列舉：具有上述(5b)所示之 VH 及該共通輕鏈之 VL(較佳為具有由序列編號 26 之胺基酸序列構成的 VL-CDR1、由序列編號 27 之胺基酸序列構成的 VL-CDR2 及由序列編號 28 之胺基酸序列構成的 VL-CDR3 之 VL)的第一臂；再者，具有由序列編號 5 之胺基酸序列構成的 VH 及該共通輕鏈之 VL(較佳為由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL)的第一臂。

【0051】在此，本發明中的「與 PD-1 特異性結合之第一臂」較佳可舉出具有上述(1b)至(5b)所示之 VH 的第一臂，再者，在此較佳之第一臂中，如上述，亦包含在其 VH 之各 CDR 中，其任意之 1 至 5 個胺基酸殘基被其他胺基酸(較佳為其保守性胺基酸)置換，並且，該胺基酸置換不會對 PD-1 之結合活性造成實質上影響者；再者，如上述，亦包含具有 VH 且該 VH 之框架之胺基酸序列係由生殖細胞系列型 V 基因 IGHV7-4-1 或 J 基因 JH6c 或經受彼等之體細胞

突變的該基因編碼者。再者，該第一臂更佳可舉出具有由選自序列編號 1 至 5 中之任一個胺基酸序列構成的 VH 者。

【0052】再者，本發明中的「與 PD-1 特異性結合之第一臂」以包含本說明書中的共通輕鏈之 VL 者為較佳，如此之共通輕鏈較佳為例如 IGVK1-39/JK1 共通輕鏈，更佳為例如具有 VL 的輕鏈，該 VL 包含由序列編號 26 之胺基酸序列構成的 VL-CDR1、由序列編號 27 之胺基酸序列構成的 VL-CDR2 及由序列編號 28 之胺基酸序列構成的 VL-CDR3；進一步更佳為例如具有由序列編號 25 之胺基酸序列構成之 VL 的輕鏈。再者，共通輕鏈之恆定區域較佳為由序列編號 29 之胺基酸序列構成的輕鏈恆定區域。

【0053】再者，「與 PD-1 特異性結合之第一臂」，以容許 PD-1 與 PD-L1 間之相互作用、PD-1 與 PD-L2 間之相互作用、或此二相互作用者為更佳。在此，「容許 PD-1 與 PD-L1 間之相互作用、PD-1 與 PD-L2 間之相互作用、或此二相互作用」意指即使在本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體以可溶型 PD-L1 或 PD-L2 之濃度之 20 倍的過剩量存在之狀況下，該 PD-L1 與 PD-1 間之相互作用、該 PD-L2 與 PD-1 間之相互作用、或此二相互作用，相對於本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體不存在時之該等相互作用，係維持 50%以上，較佳維持 70%以上，更佳維持 80%以上。再者，「容許 PD-1 及 PD-L1 間之相互作用、PD-1 及 PD-L2 間之相互作用、或此二相互作用」之定義係以與「實質上不抑制 PD-1 及 PD-L1 間之相互作用、PD-1 及 PD-L2 間之相互作用、或此二相互作用」同意義地使用。

【0054】為了構築本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體，將取得的抗 PD-1 單株抗體之各殖株，與彼等之 VH 之胺基酸序列及其序列編號之對應關示於圖

6，以及將該抗 PD-1 單株抗體之各殖株之 VH 中各 CDR 之胺基酸序列與其序列編號之對應關係示於圖 7。

【0055】

與 CD19 特異性結合之第二臂

在本說明書中，「與 CD19 特異性結合之第二臂」(以下，簡稱為「第二臂」)意指包含於抗體或抗體斷片之一部分中，或不是其一部分，不管其自體是否以單體存在，至少包含與 CD19 特異性結合之抗體之 VH，且可與 CD19 特異性結合的抗體部分，例如，如此之第二臂係由抗 CD19 抗體之 VH 及構成該抗 CD19 抗體的共通輕鏈之 VL 構成，再者，第二臂中亦含有包含該 VH 及 VL 之抗體的 Fab 部分。在此，「與 CD19 特異性結合」係以下列作為特徵而使用：至少能以具有高於 $1 \times 10^{-5} \text{M}$ ，較佳 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ ，更佳 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 高之親和性(解離常數(Kd 值))的結合活性對 CD19 直接結合，並且，實質上不與其他蛋白質結合。再者，「與 CD19 特異性結合之抗體」或「抗 CD19 抗體」中的「抗體」意指全長抗體，亦即，藉由二硫鍵連結之 2 個重鏈及 2 個輕鏈所構成的全長抗體，較佳為其單株抗體。

【0056】在此，就「與 CD19 特異性結合之第二臂」而言，例如，可列舉包含 VH 者，該 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)以 SYWIJ⁴表示之胺基酸序列[序列中，J⁴表示 G(甘胺酸)或 A(丙胺酸)，其他字母分別表示胺基酸之一字簡稱]構成的 VH-CDR1；

(b)以 IIU⁴PGDSDTRYSPSFQG 表示之胺基酸序列[序列中，U⁴表示 W(色胺酸)或 Y(酪胺酸)，其他字母分別表示與上述相同意義]構成的 VH-CDR2；及

(c)以 $X^4TIVZ^4J^5U^5X^5Z^5AJ^6DU^6$ 表示之胺基酸序列[序列中， X^4 表示 K(離胺酸)、Q(麩醯胺酸)、H(組胺酸)或 R(精胺酸)， Z^4 表示 G(甘胺酸)或 A(丙胺酸)， J^5 表示 T(蘇胺酸)或 V(纈胺酸)， U^5 表示 V(纈胺酸)、I(異白胺酸)或 T(蘇胺酸)， X^5 表示 M(甲硫胺酸)、Y(酪胺酸)、G(甘胺酸)或 H(組胺酸)， Z^5 表示 T(蘇胺酸)、N(天冬醯胺酸)、L(白胺酸)或 W(色胺酸)， J^6 表示 F(苯丙胺酸)或 S(絲胺酸)， U^6 表示 I(異白胺酸)、F(苯丙胺酸)或 Y(酪胺酸)，其他字母分別表示與上述相同意義]構成的 VH-CDR3。

【0057】再者，「與 CD19 特異性結合之第二臂」之其他態樣例如可列舉具有選自下列(1d)至(5d)之任一 VH 者：

(1d)包含由序列編號 35 之胺基酸序列構成之 VH-CDR1、由序列編號 36 之胺基酸序列構成之 VH-CDR2 及由序列編號 37 之胺基酸序列構成之 VH-CDR3 的 VH；

(2d)包含由序列編號 38 之胺基酸序列構成之 VH-CDR1、由序列編號 39 之胺基酸序列構成之 VH-CDR2 及由序列編號 40 之胺基酸序列構成之 VH-CDR3 的 VH；

(3d)包含由序列編號 41 之胺基酸序列構成之 VH-CDR1、由序列編號 42 之胺基酸序列構成之 VH-CDR2 及由序列編號 43 之胺基酸序列構成之 VH-CDR3 的 VH；

(4d)包含由序列編號 44 之胺基酸序列構成之 VH-CDR1、由序列編號 45 之胺基酸序列構成之 VH-CDR2 及由序列編號 46 之胺基酸序列構成之 VH-CDR3 的 VH；以及

(5d)包含由序列編號 47 之胺基酸序列構成之 VH-CDR1、由序列編號 48 之胺基酸序列構成之 VH-CDR2 及由序列編號 49 之胺基酸序列構成之 VH-CDR3 的 VH。

【0058】再者，在本發明中，「與 CD19 特異性結合之第二臂」中，亦包含在選自上述(1d)至(5d)之任一 VH 之各 VH-CDR 中，其任意之 1 至 5 個胺基酸殘基被置換成其他胺基酸(較佳為其保守性胺基酸)，且與未被置換成該等胺基酸之原始第二臂對 CD19 之結合活性相比，具有實質上同等的結合活性者。可列舉例如：在 VH-CDR1 之情況，1 個胺基酸殘基被置換成其他胺基酸(較佳為其保守性胺基酸)，在 VH-CDR2 或 VH-CDR3 之情況，1 至 5 個胺基酸殘基分別被置換成其他胺基酸(較佳為其保守性胺基酸)者。再者，如圖 5 所示，在分別對應於與 CD19 特異性結合之第二臂的抗 CD19 抗體殖株之各 CDR 中，各殖株間不同之各胺基酸或彼等之任意複數個組合，係可在該殖株間相互地置換。在此，「具有與未被置換成該等胺基酸之原始第二臂對 CD19 之結合活性實質上同等的結合活性」意指被置換成該胺基酸之第二臂對 CD19 的結合活性，為未被置換成該胺基酸之原始第二臂之結合活性的 95%以上，較佳為 98%以上，更佳為 99%以上。此外，第二臂之各 VH-CDR 中的「藉由保守性胺基酸所致之置換」，可列出例如上述之第一臂中的胺基酸置換之例。

【0059】又進一步，在本發明之「與 CD19 特異性結合之第二臂」中，亦包含具有 VH 者，於該 VH 中，包含具有上述特定胺基酸序列的各 CDR，並且，該 VH 之 FR 之胺基酸序列係由特定之生殖細胞系列型基因或其經受體細胞突變之該基因所編碼。例如，選自上述(1d)至(5d)之任一 VH，係可由生殖細胞系列型 V 基因為 IGHV5-51 的 VDJ 重組基因或其經受體細胞突變的該基因編

碼。在此，藉由生殖細胞系列型之 V 基因 IGHV5-51 編碼之胺基酸序列，係對應序列編號 22 所示之胺基酸序列(圖 3)。

【0060】本發明之與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 之框架，有由生殖細胞系列型之 VDJ 重組基因經受體細胞突變的該基因編碼之情形。例如，在生殖細胞系列型 V 基因為 IGHV5-51 時，選自上述(1d)至(5d)之任一者所示之 VH 的 FR1 及 FR3，於圖 5 所示之胺基酸位置，由於與 IGHV5-51 基因所編碼的胺基酸序列有差異，意指該各位置受到體細胞突變。例如，關於 FR1 區域，序列編號 22 之胺基酸序列中之位置 1 之麩胺酸可被置換成麩醯胺酸、位置 14 之脯胺酸可被置換成絲胺酸、位置 27 之酪胺酸可被置換成苯丙胺酸、或位置 30 之蘇胺酸可被置換成異白胺酸，或者是可以彼等之任意複數個組合置換。關於 FR3 區域，序列編號 22 之胺基酸序列中之位置 76 的異白胺酸可被置換成苯丙胺酸、位置 77 之絲胺酸可被置換成蘇胺酸或天冬醯胺酸、位置 78 之蘇胺酸可被置換成纈胺酸、位置 84 之絲胺酸可被置換成天冬醯胺酸、位置 93 之甲硫胺酸可被置換成異白胺酸或白胺酸、或位置 97 之丙胺酸可被置換成纈胺酸，或者是可以任意之複數個組合置換。具有上述任一胺基酸置換之組合的各個 FR1 及 FR3，不會對與 CD19 特異性結合之第二臂的功能造成實質上影響，亦可作為框架使用。

【0061】再者，本發明中的「與 CD19 特異性結合之第二臂」亦包含具有 VH 者，該 VH 包含具有上述特定胺基酸序列的各 CDR，並且，該 VH 之 FR 之胺基酸序列係由特定之生殖細胞系列型基因或其經受體細胞突變之該基因所編碼。例如，就如此之第二臂可列舉具有由選自序列編號 30 至 34 中之任一個胺基酸序列構成的 VH 者。

【0062】再者，如此之「與 CD19 特異性結合之第二臂」亦包含例如：具有由與選自序列編號 30 至 34 中之任一個胺基酸序列至少 80%相同，較佳至少 90%相同，更佳至少 95%相同，進一步更佳至少 98%相同，再進一步更佳至少 99%相同之胺基酸序列構成的 VH，並且，與原始之第二臂之 VH 之胺基酸序列間的差異，不會對 CD19 之結合活性造成實質上影響者(以下，簡稱為同源第二臂)。在此，「與原始之第二臂之 VH 之胺基酸序列的差異，不會對 CD19 之結合活性造成實質上影響」，意指同源第二臂對 CD19 之結合活性，為原始之第二臂的該結合活性之 95%以上，較佳為 98%以上，更佳為 99%以上。

【0063】再者，在其他態樣中，本發明中的「與 CD19 特異性結合之第二臂」亦包含與下述(1)或(2)交叉競爭對 CD19 之結合的具有抗 CD19 抗體之可變區域(其中，該可變區域包含構成其之 VH 及 VL)者：(1)具有選自上述(1d)至(5d)之任一者所示之 VH 或由選自序列編號 30 至 34 中之任一個胺基酸序列構成之 VH 以及本說明書中之共有輕鏈之 VL(較佳為由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL)的第二臂；(2)具有由該 VH 及 VL 構成且與 CD19 特異性結合的單株抗體之可變區域；再者，亦包含藉由下述(3)或(4)交叉競爭對 CD19 之結合的具有抗 CD19 抗體之可變區域者：(3)具有選自上述(1d)至(5d)之任一者所示的 VH 或由選自序列編號 30 至 34 中之任一個胺基酸序列構成的 VH 以及該共有輕鏈之 VL 的第二臂，(4)具有由該 VH 及 VL 構成且與 CD19 特異性結合的單株抗體之可變區域。在此，「交叉競爭對 CD19 之結合」意指藉由與在本說明書中例示之第二臂相同或一部分重複之抗原決定基結合，該第二臂對 CD19 之結合無論其程度如何皆受到抑制，或者是，由與該例示之第二臂相同或一部分重複之抗原決定基結合的抗體所致之對 CD19 之結合，係無論其程度如何皆受

到該例示之第二臂抑制。在此，是否進行交叉競爭係可以關於「與 PD-1 特異性結合之第一臂」的說明中記載的方法為基準，同樣地進行測定。

【0064】在此，本發明中的「與 CD19 特異性結合之第二臂」較佳可舉出具有上述(1d)至(5d)所示之 VH 的第二臂，再者，此較佳之第二臂，如上述，亦包含在其 VH 之各 CDR 中，其任意之 1 至 5 個胺基酸殘基被置換成其他胺基酸(較佳為其保守性胺基酸)，且該胺基酸置換不會對 CD19 之結合活性造成實質上影響者，又進一步，如上述，亦包含具有 VH 者，該 VH 之框架之胺基酸序列係由生殖細胞系列型 V 基因 IGHV5-51 或經受其之體細胞突變之該基因編碼。再者，第二臂更佳可舉出具有由選自序列編號 30 至 34 中之任一個胺基酸序列構成的 VH 者。

【0065】再者，在其他態樣中，本發明中的「與 CD19 特異性結合之第二臂」較佳可舉出具有由選自序列編號 30 至 34 中之任一個胺基酸序列構成之 VH 的第二臂，其中，序列編號 30 至 34 之各胺基酸序列中第 114 號之胺基酸經置換或可被置換成精胺酸；更佳為具有由選自序列編號 30 至 34 中之任一個胺基酸序列構成之 VH 的第二臂，其中，序列編號 30 至 34 之各胺基酸序列中的第 114 號之麩醯胺酸被置換成精胺酸；彼等相當於具有分別由選自序列編號 62 至 66 中之任一個胺基酸序列構成之 VH 的第二臂。藉由此等胺基酸置換，可使具有該第二臂之重鏈及輕鏈所構成的複合物(以下，稱為第二臂重鏈/輕鏈複合物)之等電點(pI 值)增加，藉此，在本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體的精製步驟中，尤其是，將該雙特異性抗體與第二臂重鏈/輕鏈複合物之同型二聚物(homodimer)的分離變得容易。此外，在本發明中，第二臂重鏈/輕鏈複合物之等電點較佳為約 8.3 至約 8.9，更佳為約 8.4 至約 8.8。再者，由具有第一臂之重

鏈及輕鏈所構成的複合物(以下，稱為第一臂重鏈/輕鏈複合物)之等電點較佳為約 7.4 至約 7.7，更佳為約 7.5 至約 7.6。

【0066】再者，本發明中的「與 CD19 特異性結合之第二臂」，係以包含本說明書中之共通輕鏈之 VL 者為較佳，如此之共通輕鏈較佳為例如 IGVK1-39/JK1 共通輕鏈，更佳為例如具有包含由序列編號 26 之胺基酸序列構成的 VL-CDR1、由序列編號 27 之胺基酸序列構成的 VL-CDR2 及由序列編號 28 之胺基酸序列構成之 VL-CDR3 的 VL 的輕鏈，進一步更佳為例如具有由序列編號 25 之胺基酸序列構成之 VL 的輕鏈。再者，共通輕鏈之恆定區域較佳可舉出由序列編號 29 之胺基酸序列構成的輕鏈恆定區域。

【0067】以下，將用以構築本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體之抗 CD19 抗體的各殖株，及彼等之 VH 之胺基酸序列及與其序列編號的對應關係示於圖 8，以及將該抗 CD19 抗體之各殖株之 VH 中各 CDR 的胺基酸序列及與其序列編號之對應關係示於圖 9。

【0068】另一方面，就本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體之較佳態樣而言，例如可舉出一種 PD-1/CD19 雙特異性抗體，其特徵為：

與 PD-1 特異性結合之第一臂具有：

(A)VH，其係選自上述(1b)至(5b)之任一者所示之 VH，其中之 VH-CDR1、VH-CDR2 及 VH-CDR3 之任一個或複數個 CDR 中，各任意 1 至 5 個胺基酸殘基可被置換成其他胺基酸(較佳為其保守性胺基酸)，及

(B)VL，其係包含由序列編號 26 之胺基酸序列構成的 VL-CDR1、由序列編號 27 之胺基酸序列構成的 VL-CDR2 及由序列編號 28 之胺基酸序列構成的 VL-CDR3；以及

與 CD19 特異性結合之第二臂具有：

(C)VH，其係選自上述(1d)至(5d)之任一者所示的 VH，選自其中之 VH-CDR1、VH-CDR2 及 VH-CDR3 的任一個或複數個 CDR 中，各任意 1 至 5 個胺基酸殘基可被置換成其他胺基酸(較佳為保守性胺基酸)，及

(D)VL，其係包含由序列編號 26 之胺基酸序列構成的 VL-CDR1、由序列編號 27 之胺基酸序列構成的 VL-CDR2 及由序列編號 28 之胺基酸序列構成的 VL-CDR3。

【0069】更佳是例如可舉出一種 PD-1/CD19 雙特異性抗體，其特徵為：

與 PD-1 特異性結合之第一臂具有：

(A)選自上述(1b)至(5b)之任一項所示 VH，及

(B)包含由序列編號 26 之胺基酸序列構成的 VL-CDR1、由序列編號 27 之胺基酸序列構成的 VL-CDR2 及由序列編號 28 之胺基酸序列構成的 VL-CDR3 之 VL；以及

與 CD19 特異性結合之第二臂具有：

(C)選自上述(1d)至(5d)之任一項所示之 VH 者，及

(D)包含由序列編號 26 之胺基酸序列構成的 VL-CDR1、由序列編號 27 之胺基酸序列構成的 VL-CDR2 及由序列編號 28 之胺基酸序列構成的 VL-CDR3 之 VL。

【0070】再者，就本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體之較佳其他態樣而言，例如可舉出一種 PD-1/CD19 雙特異性抗體，其特徵為：

與 PD-1 特異性結合之第一臂具有：

(A)由選自序列編號 1 至 5 中之任一個胺基酸序列構成的 VH、或由與該 VH 之胺基酸序列至少 80%相同之胺基酸序列構成的 VH，及

(B)由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL；以及，

與 CD19 特異性結合之第二臂具有：

(C)由選自序列編號 30 至 34 及 62 至 66 中之任一個胺基酸序列構成的 VH、或由與該 VH 之胺基酸序列至少 80%相同之胺基酸序列構成的 VH，及

(D)由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL。

【0071】其他態樣更佳是例如可舉出一種 PD-1/CD19 雙特異性抗體，其特徵為：

與 PD-1 特異性結合之第一臂具有：

(A)由選自序列編號 1 至 5 中之任一個胺基酸序列構成的 VH、及

(B)由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL；以及，

與 CD19 特異性結合之第二臂具有：

(C)由選自序列編號 30 至 34 及 62 至 66 中之任一個胺基酸序列構成的 VH、及

(D)由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL。

【0072】再者，其他態樣進一步更佳是例如可舉出一種 PD-1/CD19 雙特異性抗體，其特徵為：

與 PD-1 特異性結合之第一臂具有：

(A)由選自序列編號 1 至 5 中之任一個胺基酸序列構成的 VH、及

(B)由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL；以及

與 CD19 特異性結合之第二臂具有：

(C)由選自序列編號 62 至 66 中之任一個胺基酸序列構成的 VH、及

(D)由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL。

【0073】就本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體而言，較佳同型為 IgG 抗體，進一步更佳為 IgG₁ 或 IgG₄ 抗體，再進一步更佳為 IgG₁ 抗體。在該抗體為 IgG₁ 抗體時，以分別在二個重鏈恆定區域或鉸鍊區域上，依照 EU 編號系統的第 235 號之白胺酸被置換成甘胺酸，及/或第 236 號之甘胺酸被置換成精胺酸的 IgG₁ 抗體為較佳。再者，彼等雙特異性抗體之重鏈 C 末端之胺基酸，例如，以將依據 EU 編號系統的第 447 號之離胺酸缺失的抗體為更佳。再者，在 PD-1/CD19 雙特異性抗體為 IgG₄ 抗體時，以將位於其鉸鍊區域之依據 EU 編號系統的第 228 號之絲胺酸置換成脯胺酸的抗體為較佳。

【0074】再者，該等 PD-1/CD19 雙特異性抗體為 IgG₁ 抗體時的較佳態樣可列舉：具有與 PD-1 特異性結合之第一臂之 VH 的重鏈中，恆定區域之依據 EU 編號系統的第 351 號之白胺酸被置換成離胺酸，且第 366 號之蘇胺酸被置換成離胺酸，具有與 CD19 特異性結合之第二臂之 VH 的重鏈中，恆定區域之第 351 號之白胺酸被置換成天冬胺酸，且第 368 號之白胺酸被置換成麩胺酸的 IgG₁ 抗體。再者，亦同樣較佳的是：具有與 PD-1 特異性結合之第一臂之 VH 的重鏈中，恆定區域之依據 EU 編號系統的第 351 號之白胺酸被置換成天冬胺酸，且第 368 號之白胺酸被置換成麩胺酸，具有與 CD19 特異性結合之第二臂之 VH 的重鏈中，恆定區域之第 351 號之白胺酸被置換成離胺酸，且第 366 號之蘇胺酸被置換成離胺酸的 IgG₁ 抗體。

【0075】就重鏈恆定區域中納入上述全部胺基酸置換的 PD-1/CD19 雙特異性 IgG₁ 抗體之較佳態樣而言，可列舉例如：具有與 PD-1 特異性結合之第一臂

之 VH 的重鏈，係具有由序列編號 23 之胺基酸序列構成的重鏈恆定區域，具有與 CD19 特異性結合之第二臂之 VH 的重鏈，係具有由選自序列編號 24 及序列編號 71 至 75 中之任一個胺基酸序列構成的重鏈恆定區域的抗體。將彼等之胺基酸序列例示於圖 10。

【0076】在此，具有與 CD19 特異性結合之第二臂之 VH 的重鏈，在其 C 末端，經由與其 C 末端胺基酸間之醯胺鍵，可進一步具有 Gly(甘胺酸)、Gly-Lys-Lys-Ala(序列編號 67)、Gly-Lys-Ala-Lys-Ala(序列編號 68)、Gly-Arg-Arg-Ala(序列編號 69)或 Gly-Arg-Ala-Arg-Ala(序列編號 70)。藉由此等胺基酸或肽之附加，可使該第二臂重鏈/輕鏈複合物之等電點(pI 值)增加，藉此，與上述第二臂之 VH 中的胺基酸置換之事例同樣地，尤其是，將該雙特異性抗體與第二臂重鏈/輕鏈複合物之同型二聚物的分離變得容易。此外，關於其 C 末端附加有該胺基酸或肽之第二臂重鏈/輕鏈複合物，就其等電點而言，亦較佳為約 8.3 至約 8.9，更佳為約 8.4 至約 8.8。

【0077】本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體之態樣最佳可列舉：本說明書實施例 12 中所製作的殖株 CD19-1(Bi)、殖株 CD19-2(Bi)、殖株 CD19-3(Bi)、殖株 CD19-4(Bi)及殖株 CD19-5(Bi)，以及實施例 13 中所製作的殖株 CD19-6(Bi)。

【0078】本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體之較佳特徵可列舉：容許 PD-1 及 PD-L1 間之相互作用、PD-1 及 PD-L2 間之相互作用、或此二相互作用。其中，「容許 PD-1 及 PD-L1 間之相互作用、PD-1 及 PD-L2 間之相互作用、或此二相互作用」，表示與關於「與 PD-1 特異性結合之第一臂」之說明中記載之定義相同的意義。

【0079】再者，本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體之較佳特徵可舉出使細胞激素產生充分地減低者。在此，「使細胞激素產生充分地減低」意指例如將本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體藉由點滴等進行靜脈內投予時、或投予後 24 小時以內，例如，血中或組織中之包含 IL-2、IFN- γ 及/或 TNF- α 之細胞激素的濃度未增加，或即使增加，亦為可藉由類固醇投予而抑制之程度。

【0080】再者，本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體之較佳特徵可列舉對 T 細胞(例如，記憶 T 細胞)之活化具有抑制效果者。相同抑制效果，係可作為抑制來自包含 T 細胞之末梢血單核球的細胞激素(例如，IL-2)產生之效果進行評估。

【0081】

PD-1/CD19 雙特異性抗體之製造及精製方法

本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體及其抗體斷片亦可以 WO2014/051433、WO2013/157953 或 WO2013/ 157954 所揭示的方法製造。

【0082】具體而言，可將分別插入有(1)編碼具有與 PD-1 特異性結合之第一臂之 VH 的重鏈的多核苷酸、(2)編碼具有與 CD19 特異性結合之第二臂之 VH 的重鏈的多核苷酸、及(3)編碼共通輕鏈的多核苷酸之表現載體，基因導入至哺乳動物細胞並使其轉形，以使兩重鏈及共有輕鏈一起表現及分泌而製造。

【0083】在此，表現本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體的宿主細胞，可為能將表現載體進行基因導入，並可使被導入之表現載體表現的任何宿主細胞。較佳可列舉：如 SF-9 及 SF-21 細胞之昆蟲細胞；更佳可列舉：包含 CHO 細胞、BHK 細胞、SP2/0 細胞及 NS-0 骨髓瘤細胞之小鼠細胞，如 COS 及 Vero 細胞之靈長類細胞；如 MDCK 細胞、BRL 3A 細胞、融合瘤、腫瘤細胞、不死化

之初代細胞、W138、HepG2、HeLa、HEK293、HT1080 或 PER.C6 之胚性網膜細胞等哺乳類細胞。此外，在表現系統之選擇方面，有以抗體使進行適當糖基化之方式，使用哺乳類之細胞之表現載體及宿主之情形。人類細胞株，較佳為 PER.C6，係有利於使用在得到與人類之糖基化模式一致的抗體。

【0084】藉由表現載體之基因導入而轉形之宿主細胞中的蛋白質之產生，例如，可參考 Current Protocols in Protein Science (1995), Coligan JE, Dunn BM, Ploegh HL, Speicher DW, Wingfield PT, ISBN 0-471-11184-8，Bendig, 1988 而實施，再者，用以將宿主細胞培養之生產性最大化的一般指南、程序及實用方法，係可參考 Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach (M. Butler, ed., IRL Press, 1991)而實施。宿主細胞中之抗體的表現，例如，記載於 EP0120694、EP0314161、EP0481790、EP0523949、US4816567 及 WO2000/63403 等之公開公報。

【0085】在此，宿主細胞之培養條件，可藉由周知之方法進行最佳化，可將蛋白質之生產量最佳化。培養，可在例如培養皿、滾瓶或反應槽中，實施批次培養、分批補料培養、連續培養、中空纖維培養。為了藉由細胞培養進行大規模且連續的重組蛋白質之生產，較佳為使細胞於懸浮液中增殖。再者，以在源自動物或人類之血清、或者非源自動物或人類之血清作為構成要素的條件下進行細胞之培養為較佳。

【0086】藉由宿主細胞表現，從該細胞或細胞培養基以周知之方法回收的抗體，係可使用周知之方法精製。精製方法包含：免疫沉降法、離心法、過濾、大小排除層析、親和性層析、陽離子及/或陰離子交換層析、疏水性相互作用

用層析等。再者，亦有適當使用蛋白質 A 或蛋白質 G 親和性層析的情況(例如，參照 US4801687 及 US5151504)。

【0087】

抗 CD19 單株抗體

本發明包含用以構築本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體的「與 CD19 特異性結合之單株抗體」(以下，簡稱為「抗 CD19 單株抗體」)及彼等之抗體斷片。

【0088】 本發明之抗 CD19 單株抗體之一態樣，係藉由 VH 與本發明中的共通輕鏈之 VL 會合，而可與 CD19 特異性結合之單株抗體。在此，「與 CD19 特異性結合」係以下列為特徵而使用：可以至少具有高於 $1 \times 10^{-5} \text{M}$ ，較佳 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ ，更佳 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 之親和性(解離常數(K_d 值))的結合活性對 CD19 直接結合，並也不與其他蛋白質實質上結合。其中，「與 CD19 特異性結合之單株抗體」中的「抗體」意指全長抗體，亦即，以二硫鍵連結之 2 個重鏈及 2 個輕鏈構成的全長抗體。再者，「與 CD19 特異性結合之單株抗體之斷片」意指為全長抗體之一部分，至少包含抗原結合部分的抗體，例如，可列舉 Fab、Fab'、Fv、scFv 及 $F(ab')_2$ 等。

【0089】 本發明之抗 CD19 單株抗體可列舉例如具有構成「與 CD19 特異性結合之第二臂」之 VH 的選自上述(1d)至(5d)之任一 VH 或選自序列編號 30 至 34 中之任一個胺基酸序列構成的 VH 及本說明書中的共通輕鏈之 VL(較佳為由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL)者。

【0090】 再者，本發明之抗 CD19 單株抗體，亦包含具有 VH 者，該 VH 在選自上述(1d)至(5d)之任一 VH 中的各個 CDR 中，其任意之 1 至 5 個胺基酸

殘基被置換成其他胺基酸(較佳為保守性胺基酸)，並且，與具有未被置換成該等胺基酸之原始 VH 的抗 CD19 單株抗體對 CD19 之結合活性相比，具有實質上同等的結合活性。例如，在 VH 之 CDR1 之情況，可列舉 1 個胺基酸殘基被置換成其他胺基酸(較佳為保守性胺基酸)；在 CDR2 或 CDR3 之情況，可列舉各 1 至 5 個胺基酸殘基被置換成其他胺基酸(較佳為保守性胺基酸)者。再者，如圖 5 所示，在抗 CD19 單株抗體殖株之各 CDR 中，各殖株間不同的各胺基酸或彼等之任意複數個組合在該殖株間可相互地置換。在此，「與具有未被置換成該等胺基酸之原始 VH 的抗 CD19 單株抗體對 CD19 之結合活性相比，實質上具有同等之結合活性」意指置換成該等胺基酸的抗 PD-1 單株抗體對 CD19 之結合活性，為具有未被置換成該等胺基酸之原始 VH 的抗 PD-1 單株抗體之結合活性的 95%以上，較佳為 98%以上，更佳為 99%以上。

【0091】再者，本發明之抗 CD19 單株抗體亦包含具有 VH 者，在該 VH 中，包含具有上述特定胺基酸序列的各 CDR，並且，該 VH 之框架之胺基酸序列係由特定之生殖細胞系列型基因或其經受體細胞突變之該基因所編碼；例如，在上述關於「與 CD19 特異性結合之第二臂」之說明中所列舉的：具有由特定之生殖細胞系列型基因或其經受體細胞突變之該基因所編碼的特定 VH 者等。

【0092】再者，在本發明之抗 CD19 單株抗體中，係具有 VH 者，該 VH 包含選自上述(1d)至(5d)之任一 VH 中的各個 CDR，該 VH 之 FR 之胺基酸序列係由具有特定之生殖細胞系列型基因或其經受體細胞突變之該基因所編碼，就具有該 VH 者而言，可舉出例如具有由選自序列編號 30 至 34 之胺基酸序列構成的 VH 者。再者，在如此之抗 CD19 單株抗體中，例如，亦包含具有由與選

自序列編號 30 至 34 中之任一個胺基酸序列至少 80%相同，較佳至少 90%相同，更佳至少 95%相同，進一步更佳至少 98%相同，再進一步更佳至少 99%相同之胺基酸序列構成的 VH，且與具有原始 VH 之抗 CD19 單株抗體對 CD19 之結合活性相比，具有實質上同等的結合活性者。在此，「與具有原始 VH 之抗 CD19 單株抗體對 CD19 之結合活性相比，具有實質上同等的結合活性」意指具有由該任一個胺基酸序列構成之 VH 的抗 CD19 單株抗體對 CD19 之結合活性的 95%以上，較佳為 98%以上，更佳為 99%以上。

【0093】在又一其他態樣中，本發明之抗 CD19 單株抗體中，亦包含：(1) 與具有選自上述(1d)至(5d)之任一 VH 或由選自序列編號 30 至 34 之胺基酸序列構成之 VH，以及本說明書中之共通輕鏈之 VL(較佳為序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL)的抗 CD19 單株抗體交叉競爭對 CD19 之結合的抗 PD-1 單株抗體；以及(2)與具有選自上述(1d)至(5d)之任一 VH 或由選自序列編號 30 至 34 中之任一個胺基酸序列構成之 VH、以及該共通輕鏈之 VL 的抗 CD19 單株抗體交叉競爭對 CD19 之結合的抗 CD19 單株抗體。

【0094】再者，在又一其他態樣中，本發明之抗 CD19 單株抗體可舉出：具有由選自序列編號 30 至 34 中之任一個胺基酸序列中之第 114 號之胺基酸經置換或可被置換成精胺酸之胺基酸序列構成的 VH 及本說明書中之共通輕鏈之 VL(較佳為序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL)者；更佳為具有由選自序列編號 30 至 34 中之任一個胺基酸序列中第 114 號之麩醯胺酸被置換成精胺酸之胺基酸序列構成的 VH 及該共通輕鏈之 VL 者，該等相當於分別具有由選自序列編號 62 至 66 中之任一個胺基酸序列構成的 VH 及該共通輕鏈之 VL 的抗 CD19 單株抗體。

【0095】

編碼 PD-1/CD19 雙特異性抗體之多核苷酸

編碼 PD-1/CD19 雙特異性抗體之多核苷酸係由下列(1)至(3)構成：(1)編碼具有與 PD-1 特異性結合之第一臂之 VH 的重鏈的多核苷酸、(2)編碼具有與 CD19 特異性結合之第二臂之 VH 的重鏈的多核苷酸、及(3)編碼共通輕鏈的多核苷酸。在此，編碼具有與 PD-1 特異性結合之第一臂之 VH 的重鏈的多核苷酸，係由編碼與 PD-1 特異性結合之第一臂之 VH 的多核苷酸及編碼具有該 VH 之重鏈之恆定區域的多核苷酸所構成，同樣地，編碼具有與 CD19 特異性結合之第二臂之 VH 的重鏈的多核苷酸，係由編碼與 CD19 特異性結合之第二臂之 VH 的多核苷酸及編碼具有該 VH 之重鏈之恆定區域的多核苷酸所構成。

【0096】編碼 PD-1/CD19 雙特異性抗體之多核苷酸，只要是具有分別編碼構成此等 PD-1/CD19 雙特異性抗體之部分的多核苷酸者，則可為任意者，亦可為基因組 DNA、cDNA、合成 DNA、RNA、DNA-RNA 雜交之任一者。編碼一個胺基酸之密碼子已知有 1 至 6 種，例如，Phe 對應於 TTT 或 TTC，Leu 對應於 TTA、TTG、CTT、CTC、CTA 或 CTG，Ile 對應於 ATT、ATC 或 ATA，Met 對應於 ATG，Val 對應於 GTT、GTC、GTA 或 GTG，Ser 對應於 TCT、TCC、TCA 或 TCG，Pro 對應於 CCT、CCC、CCA 或 CCG，Thr 對應於 ACT、ACC、ACA 或 ACG，Ala 對應於 GCT、GCC、GCA 或 GCG，Tyr 對應於 TAT 或 TAC，His 對應於 CAT 或 CAC，Gln 對應於 CAA 或 CAG，Asn 對應於 AAT 或 AAC，Lys 對應於 AAA 或 AAG，Asp 對應於 GAT 或 GAC，Glu 對應於 GAA 或 GAG，Cys 對應於 TGT 或 TGC，Trp 對應於 TGG，Arg 對應於 CGT、CGC、CGA 或 CGG，Ser 對應於 AGT 或 AGC，Arg 對應於 AGA 或

AGG，及 Gly 對應於 GGT、GGC、GGA 或 GGG，因此，在編碼 PD-1/CD19 雙特異性抗體之多核苷酸中，包含對應各胺基酸之各密碼子為任意組合的多核苷酸。編碼與 PD-1 特異性結合之第一臂之 VH 的多核苷酸較佳可舉出例如：由選自分別編碼植株 PD1-1 至 PD1-5 之 VH 的序列編號 50 至 54 之任一個鹼基序列所構成的多核苷酸；編碼與 CD19 特異性結合之第二臂之 VH 的多核苷酸較佳可舉出例如：由選自分別編碼植株 CD19-5、CD19-1、CD19-4、CD19-2 及 CD19-3 之 VH 的序列編號 56 至 60 及序列編號 76 至 80 之任一個鹼基序列所構成的多核苷酸。再者，編碼共通輕鏈之可變區域的多核苷酸較佳可舉出由序列編號 55 之鹼基序列構成的多核苷酸。

【0097】

醫藥用途

本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體等，係可用於自體免疫疾病或移植物對抗宿主疾病(GVHD)之預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療。

【0098】本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體等可預防、症狀進展抑制及/或治療的自體免疫疾病可列舉例如：貝賽特氏症候群、全身性紅斑性狼瘡、慢性圓板狀紅斑性狼瘡、多發性硬化症(全身性硬皮症、進行性全身性硬化症)、硬皮症、多發性肌炎、皮膚肌炎、結節性動脈周圍炎(結節性多發動脈炎、顯微鏡性多發血管炎)、大動脈炎症候群(高安動脈炎)、惡性關節風濕病、關節風濕病、青年性特發性關節炎、脊椎關節炎、混合性結締組織病、薛格連氏症候群、成人史迪爾氏病、血管炎、過敏性肉芽腫性血管炎、過敏性血管炎、類風濕血管炎、大型血管炎、ANCA 關連血管炎(例如，多發血管炎性肉芽腫症及嗜酸性球性多發血管炎性肉芽腫症)、Cogan 氏症候群、RS3PE 症候群、顳動脈

炎、風濕性多發肌痛症、纖維肌痛症、抗磷脂質抗體症候群、嗜酸性球性肌膜炎、IgG₄ 關連疾病(例如，原發性硬化性膽管炎、自體免疫性胰炎等)、格林巴利症候群、重症肌無力症、慢性萎縮性胃炎、自體免疫性肝炎、非酒精性脂肪肝炎、原發性膽汁性肝硬變、古德巴斯捷症候群、急速進行性絲球體腎炎、巨紅血球性貧血、自體免疫性溶血性貧血、惡性貧血、自體免疫性嗜中性球減少症、特發性血小板減少性紫斑病、Basedow 病(格雷夫茲病(甲狀腺功能亢進症))、橋本病、自體免疫性副腎功能不全、原發性甲狀腺功能降低症、艾迪生氏病(慢性副腎皮質功能降低症)、特發性艾迪生氏病、I 型糖尿病、徐緩進行性 I 型糖尿病(成人潛在性自體免疫性糖尿病)、局部性硬皮症、乾癬、乾癬性關節炎、水皰性類天皰瘡、天皰瘡、類天皰瘡、妊娠性皰疹、線狀 IgA 水皰性皮膚症、後天性表皮水皰症、圓形脫毛症、白斑、尋常性白斑、視神經脊髓炎、慢性炎症性脫髓性多發神經炎、多灶性運動神經病、結節病、巨細胞性動脈炎、肌萎縮性側索硬化症、原田病、自體免疫性視神經症、特發性無精子症、習慣性流產、炎症性腸疾病(例如，潰瘍性大腸炎、克隆氏病)、乳糜瀉病、強直性脊椎炎、重症氣喘、慢性蕁麻疹、移植免疫、家族性地中海熱、嗜酸性球性副鼻腔炎、擴張型心肌症、全身性肥胖細胞症及封入體肌炎等。

【0099】本發明中，「治療」意指例如使某種疾病或其症狀治癒或改善，「預防」意指使某種疾病或症狀之表現防範於未然，或延遲一定期間，「症狀進展抑制」意指抑制症狀之進展或惡化，而停止病態之進行。再者，「預防」之意義亦包含復發抑制。「復發抑制」意指防止某種疾病或症狀之復發，或使復發之可能性減低。

【0100】再者，在其他態樣中，本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體等可用於自體反應性 B 細胞媒介性疾病之預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療。自體反應性 B 細胞媒介性疾病可列舉：全身性紅斑性狼瘡、格雷夫茲病、重症肌無力症、自體免疫性溶血性貧血、自體免疫性血小板減少症、氣喘、冷凝球蛋白血症、原發性膽管硬化症及惡性貧血等。在該醫藥用途中，本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體等，係介入對自體反應性 B 細胞的抑制作用。在此，對自體反應性 B 細胞的抑制作用中，包含抑制 IgG 及 IgM 等免疫球蛋白產生之作用。再者，本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體等，具有對記憶 T 細胞活化之抑制作用。在此，對記憶 T 細胞活化之抑制作用，包含抑制細胞激素產生之作用。

【0101】本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體等通常以全身性或局部性，非經口之形式投予。就其投予方法而言，具體而言，可列舉注射投予、經鼻投予、經肺投予、經皮投予等。注射投予可列舉例如：靜脈內注射、肌肉內注射、腹腔內注射等，靜脈內注射時，較佳為由點滴進行之投予。其投予量雖隨年齡、體重、症狀、治療效果、投予方法、處理時間等而異，惟，通常成人每一人，每一次在 0.1 μ g/kg 至 300mg/kg 之範圍，特佳為 0.1mg/kg 至 10mg/kg 之範圍內，以一日一次至數次非經口投予，或在一日 30 分至 24 小時之範圍進行靜脈內持續投予。當然，如前述，由於投予量隨各種條件而變動，有少於上述投予量之量即充分的情況，再者，亦有必須超過範圍進行投予之情況。

【0102】

製劑

本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體等，在作為注射劑或點滴用之輸液而製劑化使用時，該注射劑或輸液可為水溶液、懸浮液或乳化液之任一種型態，再者，亦可在使用時藉由添加溶劑而使其溶解、懸浮或乳化而使用的方式，與藥學上可容許之載體一起被製劑化成固體製劑。就注射劑或點滴用之輸液所使用的溶劑而言，可使用例如：注射用蒸餾水、生理食鹽水、葡萄糖溶液及等張液(例如，氯化鈉、氯化鉀、甘油、甘露醇、山梨醇、硼酸、硼砂、丙二醇等之溶液)等。

【0103】在此，藥學上可容許之載體可列舉例如：穩定劑、溶解輔助劑、懸浮化劑、乳化劑、無痛化劑、緩衝劑、保存劑、防腐劑、pH 調整劑及抗氧化劑等。穩定劑可使用例如：各種胺基酸、白蛋白、球蛋白、明膠、甘露醇、葡萄糖、葡萄糖聚糖、乙二醇、丙二醇、聚乙二醇、抗壞血酸、亞硫酸氫鈉、硫代硫酸鈉、乙底酸鈉、檸檬酸鈉、二丁基羥基甲苯等。溶解輔助劑可使用例如：醇(例如，乙醇等)、聚醇(例如，丙二醇、聚乙二醇等)、非離子性界面活性劑(例如，Polysorbate 20(註冊商標)、Polysorbate 80(註冊商標)、HCO-50 等)等。懸浮化劑可使用例如：甘油單硬脂酸酯、單硬脂酸鋁、甲基纖維素、羧基甲基纖維素、羥基甲基纖維素、月桂基硫酸鈉等。乳化劑可使用例如：阿拉伯膠、海藻酸鈉、黃耆膠等。無痛化劑可使用例如：苧醇、氯丁醇、山梨醇等。緩衝劑可使用例如：磷酸緩衝液、乙酸緩衝液、硼酸緩衝液、碳酸緩衝液、檸檬酸緩衝液、TRIS 緩衝液、麩胺酸緩衝液、 ϵ 胺基己酸緩衝液等。保存劑可使用例如：對羥基苯甲酸甲酯、對羥基苯甲酸乙酯、對羥基苯甲酸丙酯、對羥基苯甲酸丁酯、氯丁醇、苧醇、苯扎氯銨(benzalkonium chloride)、脫氫乙酸鈉、乙底酸鈉、硼酸、硼砂等。防腐劑可使用例如：苯扎氯銨、對羥基苯甲酸、氯

331086D1 第 90 頁，共 108 頁(發明說明書)

丁醇等。pH 調整劑可使用例如：鹽酸、氫氧化鈉、磷酸、乙酸等。抗氧化劑可使用例如：(1)如抗壞血酸、半胱胺酸鹽酸鹽、硫酸氫鈉、偏亞硫酸氫鈉、亞硫酸鈉等水溶性抗氧化劑、(2)如棕櫚酸抗壞血酸酯、丁基化羥基茴香醚、丁基化羥基甲苯、卵磷酯、沒食子酸丙酯、 α -生育酚等油溶性抗氧化劑及(3)如檸檬酸、伸乙基二胺四乙酸、山梨醇、酒石酸、磷酸等金屬螯合劑等。

【0104】注射劑或點滴用之輸液，可在其最後步驟中滅菌，或藉由無菌操作法，例如，以過濾器等過濾而滅菌，繼而充填於無菌之容器中而製造。再者，注射劑或點滴用之輸液，亦可將藉由真空乾燥及凍結乾燥所致之無菌粉末(可包含藥學上可容許之載體的粉末)，於用時溶解於適當溶劑而使用。

【0105】

併用或摻合劑

再者，本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體等亦可與於自體免疫疾病之預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療的其他藥劑一起組合使用。在本發明中，與其他藥劑一起組合使用(併用)時的投予形態，可為 1 個製劑中摻合兩成分之摻合劑的形態，再者，亦可呈各別製劑之投予形態。藉由其併用，可補足其他藥劑之預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療效果，亦可使投予量或投予次數維持或減低。在將本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體等與其他藥劑分別投予時，可於一定期間同時投予，之後，只投予 PD-1/CD19 雙特異性抗體等或只投予其他藥劑。再者，亦可先投予本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體等，於其投予完成後再投予其他藥劑，或先投予其他藥劑，於其投予完成後，隨後投予本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體等，各別之投予方法可相同，亦可相異。亦可提供包含本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體等之製劑與包含其他藥劑之製

劑的套組。在此，其他藥劑之投予量可依照臨床上所用之用量作為基準而適當地選擇。再者，其他藥劑亦可將任意 2 種以上以適當之比例組合而投予。再者，該其他藥劑，不僅為迄今已發現者，亦包含今後被發現者。

【0106】例如，在將本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體等適當使用於 I 型糖尿病之預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療的情況，亦可與選自胰島素製劑(例如，人類胰島素、甘精胰島素、離脯胰島素、地特胰島素、門冬胰島素等)、磺醯脲劑(例如，格列本脲、格列齊特、格列美脲等)、速攻型胰島素分泌促進藥(例如，那格列奈等)、雙胍類製劑(例如，二甲雙胍等)、胰島素抗性改善藥(例如，吡格列酮等)、 α -葡萄糖苷酶抑制藥(例如，阿卡波糖、伏格列波糖等)、糖尿病性神經症治療藥(例如，伊帕司他、脈序律、咪達普利等)、GLP-1 類似物製劑(例如，利拉魯肽、艾塞那肽、利西拉來等)及 DPP-4 抑制劑(例如，西他列汀、維格列汀、阿格列汀等)等的任何一種以上之藥劑組合使用。

【0107】再者，例如，將本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體等適用於多發性硬化症之預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療時，可與選自下列的任何一種以上之藥劑組合使用：類固醇藥(例如，乙酸可體松、氫化可體松、磷酸氫化可體松鈉、琥珀酸氫化可體松鈉、乙酸氟可體松、潑尼松龍、乙酸潑尼松龍、琥珀酸潑尼松龍鈉、丁基乙酸潑尼松龍、磷酸潑尼松龍鈉、乙酸鹵潑尼松、甲基潑尼松龍、乙酸甲基潑尼松龍、琥珀酸甲基潑尼松龍鈉、安西諾隆、乙酸安西諾隆、曲安奈德(triamcinolone acetonide)、地塞米松、乙酸地塞米松、磷酸地塞米松鈉、棕櫚酸地塞米松、乙酸帕拉米松、倍他米松等)、干擾素 β -1a、干擾素 β -1b、乙酸格拉替雷、米托蒽醌、硫唑嘌呤、環磷醯胺、環孢黴

素、甲胺蝶呤、可拉屈濱、副腎皮質刺激荷爾蒙(ACTH)、促腎上腺皮質激素、咪唑立濱、他克莫司、芬戈莫德及阿侖單抗等。

【0108】再者，例如，在將本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體等適用於全身性紅斑性狼瘡之預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療時，亦可與選自下列的任何一種以上之藥劑組合使用：類固醇藥(例如，上述記載之類固醇藥)、免疫抑制劑(例如，環孢黴素、他克莫司、芬戈莫德等)及貝利木單抗。

【0109】例如，在將本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體等適用於關節風濕病之預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療時，可與選自下列的任何一種以上之藥劑組合使用：類固醇藥(例如，上述記載之類固醇藥)、抗風濕病藥(例如，甲胺蝶呤、撒樂腸溶錠、布西拉明、來氟米特、咪唑立濱、他克莫司等)或抗細胞激素藥(例如，英夫利昔單抗、阿達木單抗、托珠單抗、依那西普、戈利木單抗及塞妥珠單抗等)及阿巴西普等。

【0110】在適用於其他自體免疫疾病之預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療的情況，可將本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體等與上述記載的其他藥劑之任何一種以上組合使用。

【0111】藉由下述實施例進一步詳細地說明本發明，然而本發明之範圍不以此為限。所屬技術領域具有通常知識者可依據本發明之記載進行各種變更、修飾，此等變更、修飾亦包含於本發明。

[實施例]

【0112】

實施例 1：使用重組人類 PD-1-Fc 融合蛋白對 MeMo(註冊商標)小鼠之免疫

就取得本發明之與 PD-1 特異性結合之第一臂的方法而言，選擇對 MeMo(註冊商標)小鼠(參照 WO2009/157771)以重組人類 PD-1 蛋白質進行免疫之方法。MeMo(註冊商標)小鼠，係將包含非重組人類重鏈 V 基因區域、D 基因區域及 J 基因區域以及重組人類 κ 輕鏈 IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01 生殖細胞系列型基因之基因斷片，以連結於小鼠恆定區域基因之方式而使基因經改變的小鼠，藉由將抗體之標的蛋白質進行直接免疫，而可產生由具有多樣性之重鏈及共通輕鏈構成的抗體。

【0113】對 12 至 16 週齡之 12 隻 MeMo(註冊商標)小鼠，分別以使用 Gerbu adjuvant MM(Gerbu Biotechnik，型號#3001)乳液化後的重組人類 PD-1-Fc 融合蛋白質(R&D Systems，型號 1086-PD)，每隔 14 日進行免疫。在免疫第 0 日、第 14 日及第 28 日，將該重組人類 PD-1-Fc 融合蛋白質進行皮下投予，隨後之時程，則以溶解於 PBS 之該重組人類 PD-1-Fc 融合蛋白質進行皮下投予。在免疫第 21 日、第 35 日、第 56 日、第 77 日及第 98 日，使用強制表現人類 PD-1 之 HEK293T 細胞株，藉由流式細胞術評估血清中抗體價。在稀釋 1000 倍之血清中將強制表現人類 PD-1 之 HEK293T 細胞株染色時，將相對於作為對照的人類 PD-1 非表現 HEK293T 細胞株，MFI 值增加 3 倍以上之小鼠之淋巴組織，使用於噬菌體顯示庫之構築。滿足進入基因庫構築基準的小鼠，從抗體價之評估日開始至 3 日，以重組 PD-1-Fc 融合蛋白質進行追加免疫，回收脾臟及鼠蹊部淋巴節。亦回收下列小鼠之脾臟及鼠蹊部淋巴節，該小鼠係相對於人類 PD-1 及食蟹猴 PD-1 之血清中抗體價為 1/100 以上，且經由追加免疫而抗體價未上升者。從該等淋巴組織萃取 RNA 後，進行 cDNA 合成。

【0114】

實施例 2：用於抗 PD-1 抗體取得之噬菌體顯示庫的構築(蛋白免疫)

使用實施例 1 中所調製之 DNA，使用對免疫球蛋白重鏈可變區域家族特異之引子進行 PCR 反應。將該 PCR 產物以限制酵素 SfiI 及 XhoI 切斷後，將其插入至使用該限制酵素切斷之噬菌粒(phagemid)載體[包含編碼共通輕鏈之基因(人類 κ 輕鏈 IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01 生殖細胞系列型基因)]，而構築該基因庫。

【0115】

實施例 3：抗 PD-1 抗體之篩選

使用塗覆有人類 PD-1-Fc 融合蛋白質、人類 PD-1-His 標籤融合蛋白質、食蟹猴 PD-1-His 標籤融合蛋白質或小鼠 PD-1-His 標籤融合蛋白質之盤，根據對 PD-1 之結合性實施噬菌體選拔。在使用人類 PD-1-Fc 融合蛋白質時，與噬菌體培育間，藉由添加人類 IgG(SIGMA，型號 I4506)，吸收 Fc 反應性殖株。將與人類 PD-1、食蟹猴 PD-1 及小鼠 PD-1 結合的結合噬菌體濃縮。藉由強制表現食蟹猴 PD-1 之 HEK293T 細胞株的選拔，將與食蟹猴 PD-1 結合之噬菌體濃縮。取得利用藉由選拔所得之噬菌體而經轉形的大腸菌株 TG1 之殖株，並製作出母盤(master plate)。

【0116】再者，根據吸附有人類 PD-1-Fc 融合蛋白質之盤上之對 PD-1 的結合性，從上述選拔得到的殖株之周質(periplasm)萃取物，實施噬菌體選拔。此外，就選擇之基準而言，相對於以陰性對照孔(PBS)得到之信號(OD₄₅₀ 值)，將得到 3 倍以上之信號者當作陽性殖株。

【0117】

實施例 4：抗 PD-1 抗體之候補殖株之 DNA 定序

實施藉由實施例 3 之篩選取得的陽性殖株之重鏈可變區域基因之 DNA 定序。所解析之 DNA 序列被分類為超級叢集(super cluster)(重鏈 CDR3 為相同長度，該 CDR3 之胺基酸序列為 70%以上相同之一群)及叢集(cluster)(重鏈 CDR3 之胺基酸序列為相同之一群)。取得數百個殖株，將彼等分類為超級叢集及叢集。

【0118】

實施例 5：藉由對於 PD-1 表現細胞之結合性評估進行的篩選

從所分類之各個超級叢集，選取滿足以下條件的抗 PD-1 單株抗體殖株並單離。

- (1) 體細胞突變被高頻率地導入至 CDR 區域，
- (2) 具有使用頻率高之 VH 的生殖細胞系列型基因，及
- (3) 在對人類 PD-1-Fc 融合蛋白質之結合性篩選中得到高信號。

【0119】使用該等周質萃取物所含的 Fab 斷片，以抗小鼠 IgG 多株抗體檢測其對強制表現人類 PD-1 之 CHO-S 細胞株、強制表現食蟹猴 PD-1 之 CHO-S 細胞株的結合性，藉此進行評估。在所評估之 117 個殖株(105 種叢集)中，於包含抗 PD-1 單株抗體殖株 PD1-1、PD1-2、PD1-3 及 PD1-4 的 22 個殖株，確認對人類 PD-1 表現 CHO-S 細胞株之結合性。

【0120】

實施例 6：抗 PD-1 單株抗體之胺基酸置換體之製作

殖株 PD1-1 及 PD1-4 係在其重鏈可變區域之框架 4 包含脫醯胺化模體(motif)(Asn-Gly)。以取得脫醯胺化之風險經降低的 PD-1 臂為目的，製作該脫醯胺化模體經變換的變異體。製造並單離殖株 PD1-5，該殖株 PD1-5 係殖株

PD1-4 之依據 EU 編號系統之第 119 號的天冬醯胺酸(Asn)藉由周知之部位特異性變異法改變成為麩醯胺酸者。該殖株 PD1-5 對強制表現人類 PD-1 之 CHO-S 細胞的結合性，係與殖株 PD1-4 同等。

【0121】

實施例 7：使用 CD19 表現質體載體對 MeMo(註冊商標)小鼠之免疫

就取得本發明之與 CD19 特異性結合之第二臂的方法而言，選擇以人類 CD19 表現質體載體及食蟹猴 CD19 表現質體載體對 MeMo(註冊商標)小鼠(參照 WO2009/157771)進行免疫的方法。

【0122】 MeMo(註冊商標)小鼠，係以使包含非重組人類重鏈 V 基因區域、D 基因區域及 J 基因區域以及重組人類 κ 輕鏈 IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01 生殖細胞系列型基因的基因斷片與小鼠恆定區域基因連結之方式，而使基因經改變的小鼠，藉由表現抗體之標的蛋白質的質體載體，對 MeMo(註冊商標)進行免疫，而可產生由具有多樣性之重鏈及共通輕鏈構成的抗體。

【0123】 以人類 CD19 表現質體載體及/或食蟹猴 CD19 表現質體載體各別或交互地對 12 至 16 週齡之 12 隻 MeMo(註冊商標)小鼠進行免疫。表現質體載體係於免疫第 0 日、第 3 日、第 6 日、第 14 日、第 17 日、第 28 日、第 31 日、第 42 日、第 49 日、第 63 日及/或第 70 日投予。藉由使用人類 CD19 表現細胞株之流式細胞術，評估血清中抗體價。在稀釋 100 倍之血清中將人類 CD19 表現細胞株染色時，將與作為對照的人類 CD19 非表現細胞株相比，MFI 值增加 3 倍以上之小鼠的淋巴組織，用於噬菌體顯示庫(phage display library)之構築。滿足進入庫構築之基準的小鼠，於追加免疫後，回收脾臟及鼠蹊部淋巴

節。從該等淋巴組織萃取 RNA 後，藉由使用 IgG 恆定區域特異性引子之逆轉錄反應，進行 cDNA 合成。

【0124】

實施例 8：取得 CD19 抗體用之噬菌體顯示庫的構築

從於實施例 7 調製之 DNA，使用對免疫球蛋白重鏈可變區域家族具特異性之引子進行 PCR 反應。將該 PCR 產物以限制酵素切斷後，插入至使用該限制酵素切斷後之噬菌粒載體[包含編碼共通輕鏈之基因(人類 κ 輕鏈 IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01 生殖細胞系列型基因)]，而構築該庫。

【0125】

實施例 9：抗 CD19 抗體之篩選

使用人類 CD19-Fc 融合蛋白質(R&D systems，型號 9269-CD)、食蟹猴 CD19-Fc 融合蛋白質(NovoPro Bioscience，型號 504385)、人類 B 細胞株 Raji 或強制表現食蟹猴 CD19 之 HEK293T 細胞株，依據對 CD19 之結合性實施噬菌體選拔。取得以藉由選拔所得到之噬菌體轉形後的大腸菌株 TG1 之殖株，製作母盤。此外，就選擇基準而言，相對於陰性對照所得到之信號(OD₄₅₀ 值或 MFI)，將得到 3 倍以上之信號者當作陽性殖株。

【0126】

實施例 10：抗 CD19 抗體之候選殖株之 DNA 定序

實施藉由實施例 9 之篩選所取得的陽性殖株之重鏈可變區域基因的 DNA 定序。所解析之 DNA 序列，被分類為超級叢集(重鏈 CDR3 為相同之長度，重鏈可變區域之胺基酸序列相互地為 70%以上相同之一群)及叢集(重鏈 CDR3 及重鏈可變區域之胺基酸序列分別彼此相同之一群)。

【0127】在初次篩選中，取得數百個殖株，將該等分類為超級叢集、叢集及 4 種生殖細胞系列。在第 2 次篩選中，取得數百個殖株，分類為超級叢集、叢集及 8 種生殖細胞系列。其中，19 種超級叢集與初次篩選不同。

【0128】

實施例 11：藉由對 CD19 之結合性評估進行之篩選

從分類之各超級叢集，選取滿足以下條件的抗 CD19 單株抗體殖株並單離。

- (1)體細胞突變被高頻率地導入至 CDR 區域，
- (2)具有使用頻率高的 VH 之生殖細胞系列型基因，及
- (3)在對 CD19 之結合性篩選中得到高信號。

【0129】使用該等周質萃取物所含的 Fab 斷片，評估對 CD19 之結合性。

【0130】在所評估之殖株中，於包含抗 CD19 單株抗體殖株 CD19-1、CD19-2、CD19-3、CD19-4 及 CD19-5 之複數個殖株中，確認對人類 CD19 表現細胞株之結合性。

【0131】

實施例 12：PD-1/CD19 雙特異性抗體之調製

表現與 PD-1 特異性結合之第一臂的各個重鏈之表現載體，係將編碼實施例 5 及實施例 6 所選出之抗 PD-1 單株抗體殖株 PD1-1 至 PD1-5 之各個重鏈可變區域的 DNA，分別連結編碼 IgG₁ 重鏈恆定區域之 DNA 而製作。另一方面，表現與 CD19 特異性結合之第二臂的重鏈之表現載體，係將編碼實施例 11 所選出的抗 CD19 單株抗體殖株 CD19-1 至 CD19-5 之重鏈可變區域的 DNA，與編碼 IgG₁ 重鏈恆定區域之 DNA 連結而製作。在此，表現該等重鏈恆定區域的基

因中，在與 PD-1 特異性結合之第一臂的情況，使用表現具有 L351D/L368E 變異(DE 變異)之 Fc 區域者；在與 CD19 特異性結合之第二臂的情況，使用具有 L351K/T366K 變異(KK 變異)之 Fc 區域者。此等表現載體中，為一起表現 IGVK1-39/JK1 共通輕鏈，以包含編碼其之基因的方式構築。再者，表現此等重鏈恆定區域之基因中，為了分別使 Fc 效應子活性消失，以重鏈恆定區域之第 235 號白胺酸被置換成甘胺酸，第 236 號甘胺酸被置換成精胺酸而表現的方式改變，再者，為了迴避轉譯後之程序，使用改變成重鏈恆定區域 C 末端第 447 號之離胺酸缺失者。將此等表現載體一起對 Free Style 293F 細胞進行基因導入，於培養上清液中使抗體產生。回收培養上清液，藉由蛋白質 A 親和性層析處理，分別精製出本發明之 PD-1/CD19 雙特異性單株抗體的殖株 CD19-1(Bi)、殖株 CD19-2(Bi)、殖株 CD19-3(Bi)、殖株 CD19-4(Bi)及殖株 CD19-5(Bi)。

【0132】此外，此等 PD-1/CD19 雙特異性抗體殖株，在具有與 CD19 特異性結合之第二臂係源自其製作中所使用的抗 CD19 單株抗體殖株 CD19-1、CD19-2、CD19-3、CD19-4 及 CD19-5 的觀點而言，係分別對應於該等抗 CD19 單株抗體殖株。再者，此等 PD-1/CD19 雙特異性抗體殖株，任一者皆具有源自 PD1-5 之與 PD-1 特異性結合之第一臂。

【0133】

實施例 13：抗 CD19 單株抗體之變異體及對應該等的 PD-1/CD19 雙特異性抗體之製作

在實施例 12 中所製作之 PD-1/CD19 雙特異性抗體殖株，在為了醫藥品化之放大規模的生產步驟中，有無法充分地達成與第一臂重鏈/輕鏈複合物、第二

臂重鏈/輕鏈複合物及/或屬於該等之各同型二聚物的副產物之分離精製之情形。因此，在陽離子交換層析精製時，以提升該雙特異性抗體與該副產物之分離為目的，製作出等電點經提升的抗 CD19 單株抗體之胺基酸變異體。

【0134】將表示殖株 CD19-5 之 VH 之胺基酸序列的序列編號 30 中之第 114 號之麩醯胺酸，藉由周知之部位特異性變異法製造出置換成精胺酸之變異體。此外，在本發明中，將該變異體命名為「CD19-6」。再者，各抗體之等電點，係使用基因及胺基酸序列解析軟體 Genetyx(Genetyx 股份有限公司)來計算。

【0135】再者，藉由周知之基因改變手法，製作出於具有 CD19-6 之 VH 的重鏈之 C 末端(惟，具有屬於 C 末端胺基酸之離胺酸)分別附加有甘胺酸及序列編號 67 至 70 所示之肽之型態的各變異體(以下，將此等統合記載為「CD19-6/C 末端肽附加物」)。此外，在本發明中，於 CD19-6 之該 C 末端附加有序列編號 67 所示之肽之型態的變異體被命名為「CD19-7」。

【0136】依照與實施例 12 同樣之手法，將此等分別插入有編碼抗 CD19 單株抗體之變異體的各 DNA 及編碼殖株 PD1-5 之 DNA 之該實施例記載之各表現載體，基因導入至 Free Style 293F 細胞，並於培養上清液中使抗體產生。回收培養上清液，藉由用蛋白質 A 親和性層析進行處理，分別將本實施例中所製作的源自各變異體的本發明之雙特異性抗體精製。此等之中，將源自 CD19-6 之該雙特異性抗體命名為「CD19-6(Bi)」，將源自 CD19-7 之該雙特異性抗體殖株命名為「CD19-7(Bi)」。

【0137】

實施例 14：PD-1/CD19 雙特異性抗體與副產物之精製分離的檢討

針對在實施例 12 及 13 中分別製作的 PD-1/CD19 雙特異性抗體，檢討與該等製造中可能生成之副產物間的精製分離是否成功。

【0138】將實施例 12 及 13 中分別回收之該雙特異性抗體所包含的培養上清液，另外藉由蛋白質 A 親和性層析及大小排除層析處理，將該雙特異性抗體及相當於副產物之抗 PD-1 抗體及抗 CD19 抗體分別精製。

【0139】將包含此等各精製抗體之溶劑，以成為 pH6.0 之方式，藉由超過濾法(Ultrafiltration method)進行緩衝液置換。將緩衝液置換後之各精製抗體施加於使用緩衝液 A(pH7.0)平衡化後的陽離子交換管柱 TSKgel SP-STAT Column(東曹，型號 0021964)中。藉由使用了包含 1mol/L 氯化鈉之緩衝液 B(pH7.0)的鹽梯度，將結合於管柱之各精製抗體溶出。此外，將移動相之流速設為 0.5mL/分鐘，溶出設定成緩衝液 A 至緩衝液 B 之直線性梯度，將施加各精製抗體開始後 0 至 10 分鐘，緩衝液 B 設為 0%，經 10 至 40 分鐘將緩衝液 B 從 0%直線性地增加至 100%，於 40 至 50 分時將緩衝液 B 設為 100%。

【0140】殖株 CD19-2(等電點：8.32)、CD19-5(等電點：8.40)、CD19-6(等電點：8.49)及 CD19-7(等電點：8.75)之陽離子交換管柱中的保持時間(分鐘)，分別為 15.167、15.185、15.749 及 17.521；針對殖株 CD19-6 及 CD19-7 係延長保持時間。另一方面，殖株 PD1-3(等電點：7.67)及 PD1-5(等電點：7.52)未結合於陽離子交換管柱而溶出。

【0141】另一方面，PD-1/CD19 雙特異性抗體殖株 CD19-2(Bi)及 CD19-5(Bi)未結合於陽離子交換管柱而溶出，惟，殖株 CD19-6(Bi)及 CD19-7(Bi)之保持時間(分)為 13.715 及 14.955。

【0142】如上述，藉由第二臂中的胺基酸置換或對其重鏈 C 末端之附加特定肽而提昇等電點，藉此，在陽離子交換層析精製時，謀求提升屬於目標物之本發明之雙特異性抗體與屬於副產物之抗 PD-1 抗體及抗 CD19 抗體的分離，而成為可提供該副產物之混入經極度地減低的本發明之雙特異性抗體。

【0143】

實施例 15：PD-1/CD19 雙特異性抗體之結合性評估

藉由使用人類 IgG1-Fc 融合人類 PD-1 細胞外區域重組蛋白質(R&D systems，型號 1086-PD)之 Biacore 測定，評估實施例 12 及 13 中所取得的 PD-1/CD19 雙特異性單株抗體之第一臂對 PD-1 重組蛋白質的結合親和性。此外，該重組蛋白質之固定化，係使用 Series S Sensor Chip CM5 感測晶片(GE Healthcare，型號 29-1049-88)。

【0144】同樣地，藉由使用人類 IgG1-Fc 融合人類 CD19 細胞外區域重組蛋白質(R&D systems，型號 9269-CD)的 Biacore 測定，評估該抗體之第二臂的 CD19 結合親和性。將各殖株之第一臂對 PD-1 之結合親和性(Kd 值)以及第二臂對 CD19 之結合親和性示於圖 11。與具有未受實施例 13 之胺基酸置換之結構的 CD19-5(Bi)之活性相比，確認提升了 CD19-6(Bi)對 PD-1 及 CD19 之各結合親和性。

【0145】

實施例 16：PD-1/CD19 雙特異性抗體之結合性確認

確認實施例 12 及 13 中所取得的 PD-1/CD19 雙特異性抗體分別與人類 PD-1、食蟹猴 PD-1、人類 CD19 及食蟹猴 CD19 特異性結合。對於強制表現人類 PD-1 之 CHO-S 細胞株、強制表現食蟹猴 PD-1 之 CHO-S 細胞株、CHO-S 細胞

株、強制表現人類 CD19 之 CHO-K1 細胞株、強制表現食蟹猴 CD19 之 CHO-K1 細胞株及 CHO-K1 細胞株，分別添加殖株 CD19-1(Bi)至 CD19-6(Bi)，於冰上進行 20 分鐘培育。將細胞洗淨後，添加 100 μ L 之 PE 標識山羊抗人類 IgG-Fc F(ab')₂斷片抗體(ThermoFisher，型號 H10104)，並於冰上培育 20 分鐘。將細胞洗淨後，藉由流式細胞術評估該抗體之第一臂之 PD-1 結合性及第二臂之 CD19 結合性。將該檢定之結果示於圖 12 至圖 16。

【0146】任一殖株均與人類 PD-1、食蟹猴 PD-1、人類 CD19 及食蟹猴 CD19 結合。再者，未檢驗出此實驗系統之非特異性結合。

【0147】確認實施例 12 中所取得的 PD-1/CD19 雙特異性單株抗體同時與 PD-1 及 CD19 分別特異性結合。首先，對於強制表現人類 CD19 之 CHO-K1 細胞株及 CHO-K1 細胞株，分別添加殖株 CD19-1(Bi)至 CD19-5(Bi)，並於冰上培育 20 分鐘。將細胞洗淨後，添加 100 μ L 之 6 $\times$ His 標籤融合人類 PD-1 細胞外區域重組蛋白質(R&D systems，型號 8986-PD)，並於冰上培育 20 分鐘。將細胞洗淨後，添加 100 μ L 之 AlexaFluor488 標識小鼠抗 His 標籤抗體(MBL，型號 D291-A48)，並於冰上培育 20 分鐘。將細胞洗淨後，藉由流式細胞術，評估人類 PD-1 細胞外區域重組蛋白質之結合量。將該檢定之結果示於圖 17。

【0148】任一殖株均同時與 PD-1 及 CD19 結合。再者，未檢驗出此實驗系統中的非特異性結合。

【0149】

實施例 17：PD-1/CD19 雙特異性抗體之第一臂的結合特性評估

為了評估實施例 12 中所取得的 PD-1/CD19 雙特異性抗體之第一臂對 PD-1/PD-L1 結合之影響，進行關於該雙特異性抗體殖株及可溶性 PD-L1 重組蛋白 331086D1

質對 PD-1 之結合的競爭結合檢定。首先，對於強制表現人類 PD-1 之 CHO-S 細胞株，於冰上分別添加殖株 CD19-1(Bi)至 CD19-5(Bi)、尼武單抗(nivolumab) 及抗人類 PD-1 抗體 J105(Immunology Letters, 2002, Vol.83, Issue 3, p.215-220)。再者，使用生物素標識用套組(同仁化學研究所，型號 LK03)，於冰上添加生物素化的可溶性 PD-L1 重組蛋白質(R&D systems，型號 156-B7)。將細胞洗淨後，於冰上添加 APC 標識鏈黴親和素(streptavidin) (BioLegend，型號 405207)。將細胞洗淨後，藉由流式細胞術，評估可溶性 PD-L1 重組蛋白質之結合量。將其結果示於圖 18。

【0150】殖株 CD19-1(Bi)至 CD19-5(Bi)係容許可溶性 PD-L1 重組蛋白質對 PD-1 之結合。另一方面，尼武單抗及 J105 係在相同條件下，完全地抑制可溶性 PD-L1 重組蛋白質對 PD-1 之結合。

【0151】再者，將實施例 5 中取得的抗 PD-1 單株抗體殖株 PD1-1 至 PD1-4 分別作為第一臂的雙特異性抗體，藉由同樣之評估，確認其容許可溶性 PD-L1 重組蛋白質對 PD-1 之結合。

【0152】

實施例 18：PD-1/CD19 雙特異性抗體對活化 B 細胞之試管中(in vitro)抑制作用

從來自健康人類之末梢血單核細胞(LONZA，型號 CC-2702)，藉由 B Cell 分離套組(Isolation Kit) II, human(Miltenyi Biotec，型號 130-091-151)分離 B 細胞，使用該 B 細胞評估對人類 IgM 產生之抑制作用。在細胞培養盤中播種人類 B 細胞，添加抗人類 CD79B 抗體(LifeSpan Biosciences，型號 LS-C134648)、人類 CD40L 重組蛋白質(Enzo Life Sciences，型號 ALX-522-110)、人類 IL-21 重組蛋白質(R&D systems，型號 8879-IL)，並進行活化處置。處置殖株 CD19-

1(Bi)至 CD19-5(Bi)或對照抗體，藉由 ELISA 法(ThermoFisher，型號 BMS2098)定量活化處置後之培養上清液中所含的 IgM。將其結果示於圖 19。殖株 CD19-1(Bi)至 CD19-5(Bi)均抑制 IgM 產生。此外，圖中之 IgM 產生量(ng/mL)，係以平均值±標準誤差(N=4)表示。

【0153】

實施例 19：PD-1/CD19 雙特異性抗體對活化 B 細胞之生體中(in vivo)抑制作用

使用移植了來自健康人類之末梢血單核細胞(LONZA，型號 CC-2702)的 NOD.Cg-PrkdcscidIl2rgtm1Wjl/SzJ 小鼠(以下，簡稱為 NSG 小鼠)，評估對人類 IgG₂ 產生之抑制作用。對每 1 隻 NSG 小鼠移植 1×10^7 個來自健康人類之末梢血單核細胞。在移植第 3 日、第 7 日、第 10 日、第 14 日及第 17 日，將殖株 CD19-1(Bi)至 CD19-4(Bi)或對照抗體以 3mg/kg 之投予量，分別以 1 日 1 次進行腹腔內投予。在移植第 21 日，從尾靜脈進行採血並調製血清。另一方面，關於殖株 CD19-5(Bi)及 CD19-6(Bi)，在移植第 3 日、第 7 日及第 10 日，以同樣之用法用量，分別進行腹腔內投予。此時亦以並行方式，將對照抗體進行腹腔內投予。在移植第 14 日從尾靜脈進行採血並調製血清。藉由 ELISA 法(ThermoFisher，型號 BMS2093)定量血清中所含的人類 IgG₂。在圖 20 及 21 中顯示其結果。殖株 CD19-1(Bi)至 CD19-6(Bi)均抑制 IgG₂ 產生。此外，圖中之 IgG₂ 產生量(μg/mL)，係以平均值±標準誤差(N=4 至 8)表示。

【0154】

實施例 20：對於 PD-1/CD19 雙特異性抗體對 PD-1 之結合的交叉競爭性之評估

為了評估雙特異性抗體對 PD-1 之結合的交叉競爭性，進行競合結合檢定，該雙特異性抗體係將在 PD-1/CD19 雙特異性抗體之製作中所使用的抗 PD-1 單株抗體之各殖株 PD1-1 至 PD1-5 作為第一臂者。

【0155】首先，對於表現人類 PD-1 之 CHO-S 細胞株，於冰上添加以殖株 PD1-5 作為第一臂的雙特異性抗體。再者，分別添加各以生物素標識之殖株 PD1-1 至 PD1-5 作為第一臂的雙特異性抗體，並於冰上培育。將細胞洗淨後，添加 PE 標識鏈黴親和素(BD Pharmingen，型號 554061)，並於冰上培育。將細胞洗淨後藉由流式細胞術，評估生物素標識之該抗體的結合量。

【0156】以殖株 PD1-5 作為第一臂之雙特異性抗體，抑制分別以殖株 PD1-1 至 PD1-4 作為第一臂之該抗體對 PD-1 的結合，可確認彼等對 PD-1 之結合進行交叉競爭。

【0157】

實施例 21：PD-1/CD19 雙特異性抗體在試管中(in vitro)對於從人類末梢血單核細胞之細胞激素釋出的作用的評估

以解析 PD-1/CD19 雙特異性抗體之細胞激素釋出活性為目的，分別實施本發明之雙特異性抗體殖株及小鼠抗人類 CD3 抗體 OKT3(BioLegend，型號 317304)添加至人類末梢血單核細胞(以下，稱為人類 PBMC)的實驗。

【0158】對人類 PBMC(LONZA，型號 CC-2702)添加殖株 CD19-6(Bi)及 OKT3 並進行培養。藉由使用了細胞計數珠陣列(Cytometric Bead Array)(BD Biosciences，型號 551809)之流式細胞術，定量培養上清液中所含的 IL-2。將其結果示於圖 22。此外，圖中之 IL-2 產生量(pg/mL)，係以平均值±標準誤差(N=3)表示。

【0159】與 OKT3 顯著地誘導 IL-2 產生相比，未觀察到藉由 CD19-6(Bi)所致的 IL-2 產生。

【0160】

實施例 22：PD-1/CD19 雙特異性抗體之物理化學穩定性評估

本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體，在藉由示差掃描熱析法(DSC)之結構穩定性評估、藉由擴散係數變化率(DLS)測定之膠體穩定性及應力條件下(例如，pH3 至 4/5°C下或 pH7/5°C下/凍結熔解 5 次)的化學穩定性(例如，蛋白質濃度變化、分子構造變化、有無會合/凝集、有無電荷變異體(charge variant)生成、構造變化及對 CD19 之結合性)的任一項物理化學穩定性評估中，均確認顯示良好之性能。

[產業上之可利用性]

【0161】本發明之 PD-1/CD19 雙特異性抗體或其抗體斷片，在自體免疫疾病或移植物對抗宿主疾病(GVHD)之預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療上有用。

【符號說明】

無。

【序列表】

P20-006WO_PCT_雙特異性抗體_20200324_151347_0.txt

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種雙特異性抗體或其抗體斷片，係與 PD-1 及 CD19 分別特異性結合，並且，具有與 PD-1 特異性結合之第一臂及與 CD19 特異性結合之第二臂，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂具有選自下列(A)至(E)之任一 VH：

(A)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 6 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 7 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 8 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(B)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 9 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 10 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 11 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(C)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 12 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 13 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 14 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(D)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 15 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 16 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 17 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，以及

(E)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 18 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 19 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2 及

(c)由序列編號 20 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3 ；

該與 CD19 特異性結合之第二臂具有選自下列(A)至(E)之任一 VH：

(A)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 35 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 36 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 37 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(B)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 38 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 39 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 40 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(C)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 41 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 42 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 43 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(D)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 44 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 45 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 46 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，以及

(E)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 47 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 48 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2 及

(c)由序列編號 49 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

在此，在與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 中之選自 VH-CDR1、VH-CDR2 及 VH-CDR3 之任一個或複數個 CDR 中，各個任意 1 至 5 個胺基酸殘基可經置換成保守性胺基酸，及/或，在與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 中之選自 VH-CDR1、VH-CDR2 及 VH-CDR3 之任一個或複數個 CDR 中，各個任意 1 至 5 個胺基酸殘基可經置換成保守性胺基酸。

【請求項2】 如請求項 1 所述之雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂具有選自下列(A)至(E)之任一 VH：

(A)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 6 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 7 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 8 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(B)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 9 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 10 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 11 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(C)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 12 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 13 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 14 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(D)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 15 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 16 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及
(c)由序列編號 17 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，以及
(E)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 18 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、
(b)由序列編號 19 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及
(c)由序列編號 20 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

該與 CD19 特異性結合之第二臂具有選自下列(A)至(E)之任一 VH：

(A)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 35 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、
(b)由序列編號 36 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及
(c)由序列編號 37 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(B)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 38 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、
(b)由序列編號 39 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及
(c)由序列編號 40 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(C)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 41 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、
(b)由序列編號 42 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及
(c)由序列編號 43 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(D)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 44 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、
(b)由序列編號 45 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 46 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，以及

(E)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 47 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 48 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 49 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

【請求項3】如請求項 1 或 2 所述之雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，

(i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 6 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 7 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 8 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

(ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 係選自下列(A)至(E)之任一 VH：

(A)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 35 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 36 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 37 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(B)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 38 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 39 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 40 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(C)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 41 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 42 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 43 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(D)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 44 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 45 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 46 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，以及

(E)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 47 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 48 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 49 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

【請求項4】 如請求項 1 或 2 所述之雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，

(i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 9 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 10 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2 及

(c)由序列編號 11 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

(ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 係選自下列(A)至(E)之任一 VH：

(A)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 35 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 36 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 37 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(B)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 38 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 39 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 40 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(C)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 41 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 42 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 43 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(D)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 44 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 45 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 46 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，以及

(E)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 47 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 48 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 49 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

【請求項5】 如請求項 1 或 2 所述之雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，

(i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 12 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 13 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2 及

(c)由序列編號 14 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

(ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 係選自下列(A)至(E)之任一 VH：

(A)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 35 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 36 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 37 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(B)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 38 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 39 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 40 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(C)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 41 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 42 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 43 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(D)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 44 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 45 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 46 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，以及

(E)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 47 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 48 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 49 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

【請求項6】 如請求項 1 或 2 所述之雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，

(i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 15 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 16 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2 及

(c)由序列編號 17 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

(ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 係選自下列(A)至(E)之任一 VH：

(A)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 35 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 36 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 37 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(B)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 38 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 39 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 40 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(C)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 41 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 42 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 43 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(D)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 44 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 45 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 46 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，以及

(E)具有下列(a)至(c)之 VH、

(a)由序列編號 47 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 48 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 49 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

【請求項7】 如請求項 1 或 2 所述之雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，

(i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 18 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 19 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2 及

(c)由序列編號 20 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

(ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 係選自下列(A)至(E)之任一 VH：

(A)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 35 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 36 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 37 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(B)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 38 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 39 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 40 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(C)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 41 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 42 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 43 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(D)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 44 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 45 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 46 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，以及

(E)具有下列(a)至(c)之 VH，

- (a)由序列編號 47 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、
- (b)由序列編號 48 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及
- (c)由序列編號 49 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

【請求項8】 如請求項 1 至 7 中任一項所述之雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 之 FR1、FR2 及 FR3 區域，係分別對應於生殖細胞系列型 V 基因 IGHV7-4-1 之可經受體細胞突變的該基因所編碼的胺基酸序列；FR4 區域係由生殖細胞系列型 J 基因 JH6c 之可經受體細胞突變之該基因所編碼的胺基酸序列構成，惟，排除包含於 VH-CDR3 區域之胺基酸序列。

【請求項9】 如請求項 1 至 8 中任一項所述之雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 之 FR1、FR2 及 FR3 區域，係分別對應於生殖細胞系列型 V 基因 IGHV5-51 之可經受體細胞突變的該基因所編碼之胺基酸序列。

【請求項10】 如請求項 1 至 9 中任一項所述之雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 係由選自序列編號 1、序列編號 2、序列編號 3、序列編號 4 及序列編號 5 的任一個胺基酸序列、或與該 VH 之胺基酸序列至少 80%相同的胺基酸序列構成。

【請求項11】 如請求項 1 至 10 中任一項所述之雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 係由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33、序列編號 34、序列編號 62、序列編號 63、序列編號 64、序列編號 65 及序列編號 66 中之任一個胺基酸序列、或與該 VH 之胺基酸序列至少 80%相同的胺基酸序列構成。

【請求項12】 如請求項 1 或 2 所述之雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 係由選自序列編號 1、序列編號 2、序列編號 3、序列編號 4 及序列編號 5 中之任一個胺基酸序列構成，該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 係由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33、序列編號 34、序列編號 62、序列編號 63、序列編號 64、序列編號 65 及序列編號 66 中之任一個胺基酸序列構成。

【請求項13】 如請求項 1 至 3 中任一項所述之雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 1 之胺基酸序列構成，該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33、序列編號 34、序列編號 62、序列編號 63、序列編號 64、序列編號 65 及序列編號 66 中的任一個胺基酸序列構成。

【請求項14】 如請求項 1、2 或 4 所述之雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 2 之胺基酸序列構成，該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33、序列編號 34、序列編號 62、序列編號 63、序列編號 64、序列編號 65 及序列編號 66 中之任一個胺基酸序列構成。

【請求項15】 如請求項 1、2 或 5 所述之雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 3 之胺基酸序列構成，該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33、序列編號 34、序列編號 62、序列編號 63、序列編號 64、序列編號 65 及序列編號 66 中之任一個胺基酸序列構成。

【請求項16】 如請求項 1、2 或 6 所述之雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 4 之胺基酸序列構成，該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由選自序列編號 30、序列編號 31、

序列編號 32、序列編號 33、序列編號 34、序列編號 62、序列編號 63、序列編號 64、序列編號 65 及序列編號 66 中之任一個胺基酸序列構成。

【請求項17】 如請求項 1、2 或 7 所述之雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 5 之胺基酸序列構成，該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33、序列編號 34、序列編號 62、序列編號 63、序列編號 64、序列編號 65 及序列編號 66 中之任一個胺基酸序列構成。

【請求項18】 如請求項 1 至 17 中任一項所述之雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂及/或該與 CD19 特異性結合之第二臂分別具有 VL，該 VL 具有下列(a)至(c)：

- (a)由序列編號 26 之胺基酸序列構成的 VL-CDR1、
- (b)由序列編號 27 之胺基酸序列構成的 VL-CDR2、及
- (c)由序列編號 28 之胺基酸序列構成的 VL-CDR3。

【請求項19】 如請求項 1 至 17 中任一項所述之雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂及/或該與 CD19 特異性結合之第二臂，係分別具有由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL。

【請求項20】 一種雙特異性抗體或其抗體斷片，係與 PD-1 及 CD19 分別特異性結合，且具有與 PD-1 特異性結合之第一臂及與 CD19 特異性結合之第二臂，並且其係包含：

- (A) 與 PD-1 特異性結合之第一臂，係具有由選自序列編號 1、序列編號 2、序列編號 3、序列編號 4 及序列編號 5 中之任一個胺基酸序列構成的 VH，以及由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL，以及

(B) 與 CD19 特異性結合之第二臂，係具有由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33、序列編號 34、序列編號 62、序列編號 63、序列編號 64、序列編號 65 及序列編號 66 中之任一個胺基酸序列構成的 VH，以及由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL。

【請求項21】 一種雙特異性抗體或其抗體斷片，係與 PD-1 及 CD19 分別特異性結合，並且，具有與 PD-1 特異性結合之第一臂及與 CD19 特異性結合之第二臂，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂係與下列(1)或(2)交叉競爭對 PD-1 之結合：(1)與 PD-1 特異性結合的第一臂，係具有由選自序列編號 1、序列編號 2、序列編號 3、序列編號 4 及序列編號 5 中之任一個胺基酸序列構成的 VH 以及由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL；(2)與 PD-1 特異性結合之單株抗體的可變區域，係由該 VH 及 VL 構成者。

【請求項22】 一種雙特異性抗體或其抗體斷片，係與 PD-1 及 CD19 分別特異性結合，並且，具有與 PD-1 特異性結合之第一臂及與 CD19 特異性結合之第二臂，其中，由該與 PD-1 特異性結合之第一臂所致之對 PD-1 之結合，係藉由下列(1)或(2)進行交叉競爭，(1)與 PD-1 特異性結合的第一臂，係具有由選自序列編號 1、序列編號 2、序列編號 3、序列編號 4 及序列編號 5 中之任一個胺基酸序列構成的 VH 以及由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL；(2)與 PD-1 特異性結合之單株抗體的可變區域，係由該 VH 及 VL 構成者。

【請求項23】 如請求項 21 或 22 所述之雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 CD19 特異性結合之第二臂進一步與下列(1)或(2)交叉競爭對 CD19 之結合：(1)與 CD19 特異性結合的第二臂，係具有由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33、序列編號 34、序列編號 62、序列編號 63、序列編號 64、序列編號 65 及序列編號 66 中之任一個胺基酸序列構成的 VH 以及

由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL；(2)與 CD19 特異性結合之單株抗體的可變區域，係由該 VH 及 VL 構成者。

【請求項24】 如請求項 1 至 23 中任一項所述之雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該與 PD-1 特異性結合的第一臂容許 PD-1 與 PD-L1 間之相互作用。

【請求項25】 如請求項 1 至 24 中任一項所述之雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該雙特異性抗體為 IgG 抗體。

【請求項26】 如請求項 25 所述之雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該 IgG 抗體為 IgG₁ 抗體或 IgG₄ 抗體。

【請求項27】 如請求項 25 所述之雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該 IgG 抗體為 IgG₁ 抗體。

【請求項28】 如請求項 27 所述之雙特異性抗體或其抗體斷片，係對 Fc 受體之結合經消失或減弱者。

【請求項29】 如請求項 28 所述之雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該雙特異性抗體的 2 個重鏈恆定區域中，依據 EU 編號系統的第 235 號之白胺酸分別被置換成甘胺酸，及/或第 236 號之甘胺酸分別被置換成精胺酸。

【請求項30】 如請求項 27 至 29 中任一項所述之雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，具有與 PD-1 特異性結合之第一臂之 VH 的重鏈之恆定區域中，依據 EU 編號系統的第 351 號之白胺酸被置換成離胺酸，且第 366 號之蘇胺酸被置換成離胺酸；具有與 CD19 特異性結合之第二臂之 VH 的重鏈之恆定區域中，第 351 號之白胺酸被置換成天冬胺酸，且第 368 號之白胺酸被置換成麩胺酸。

【請求項31】 如請求項 27 至 29 中任一項所述之雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，具有與 PD-1 特異性結合之第一臂之 VH 的重鏈之恆定區域中，依據 EU 編號系統的第 351 號之白胺酸被置換成天冬胺酸，且第 368 號之白胺酸被

置換成麩胺酸；具有與 CD19 特異性結合之第二臂之 VH 的重鏈之恆定區域中，第 351 號之白胺酸被置換成離胺酸，且第 366 號之蘇胺酸被置換成離胺酸。

【請求項32】 如請求項 27 至 31 中任一項所述之雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該雙特異性抗體之 2 個重鏈恆定區域中，依據 EU 編號系統的第 447 號之離胺酸分別欠缺。

【請求項33】 如請求項 1 至 28 中任一項所述之雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該具有與 PD-1 特異性結合之第一臂之 VH 的重鏈，係包含由序列編號 23 之胺基酸序列構成的重鏈恆定區域。

【請求項34】 如請求項 1 至 29、31 及 33 中任一項所述之雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，該具有與 CD19 特異性結合之第二臂之 VH 的重鏈，係包含由選自序列編號 24、序列編號 71、序列編號 72、序列編號 73、序列編號 74 及序列編號 75 中之任一個胺基酸序列構成的重鏈恆定區域。

【請求項35】 如請求項 1 至 34 中任一項所述之雙特異性抗體或其抗體斷片，其中，具有與 PD-1 特異性結合之第一臂之 VL 的輕鏈及/或具有與 CD19 特異性結合之第二臂之 VL 的輕鏈，係包含由序列編號 29 之胺基酸序列構成的輕鏈恆定區域。

【請求項36】 一種雙特異性抗體或其抗體斷片，係與 PD-1 及 CD19 分別特異性結合，並且，具有與 PD-1 特異性結合之第一臂及與 CD19 特異性結合之第二臂，其中：

(A)具有與 PD-1 特異性結合之第一臂之 VH 的重鏈，係包含由選自序列編號 1、序列編號 2、序列編號 3、序列編號 4 及序列編號 5 中之任一個胺基酸序列構成的 VH 以及由序列編號 23 之胺基酸序列構成的重鏈恆定區域，

(B)具有與 PD-1 特異性結合之第一臂之 VL 的輕鏈，係包含由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL 及由序列編號 29 之胺基酸序列構成的輕鏈恆定區域，

(C)具有與 CD19 特異性結合之第二臂之 VH 的重鏈，係包含由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33、序列編號 34、序列編號 62、序列編號 63、序列編號 64、序列編號 65 及序列編號 66 中之任一個胺基酸序列構成的 VH 以及由序列編號 24 之胺基酸序列構成的重鏈恆定區域，及

(D)具有與 CD19 特異性結合之第二臂之 VL 的輕鏈，係包含由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL 及由序列編號 29 之胺基酸序列構成的輕鏈恆定區域。

【請求項37】 一種醫藥組成物，係包含選自請求項 1 至 36 中任一項所述之雙特異性抗體或其抗體斷片，及藥學上可容許之載體。

【請求項38】 一種自體免疫疾病之預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療劑，係包含選自請求項 1 至 36 中任一項所述之雙特異性抗體或其抗體斷片作為有效成分。

【請求項39】 如請求項 38 所述之自體免疫疾病之預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療劑，其中，自體免疫疾病為貝賽特氏症候群、全身性紅斑性狼瘡、慢性圓板狀紅斑性狼瘡、多發性硬化症、硬皮症、多發性肌炎、皮膚肌炎、結節性動脈周圍炎、大動脈炎症候群、惡性關節風濕病、關節風濕病、青年性特發性關節炎、脊椎關節炎、混合性結締組織病、薛格連氏症候群、成人史迪爾氏病、血管炎、過敏性肉芽腫性血管炎、過敏性血管炎、類風濕血管炎、大型血管炎、ANCA 關連血管炎、Cogan 氏症候群、RS3PE 症候群、顫動脈炎、風濕性多發肌痛症、纖維肌痛症、抗磷脂質抗體症候群、嗜酸性球性肌膜炎、IgG4 關連疾病、格林巴利症候群、重症肌無力症、慢性萎縮性胃炎、自體免疫性肝炎、非酒精性脂肪肝炎、原發性膽汁性肝硬變、古德巴斯捷症候群、急速進行性絲球體腎

炎、巨紅血球性貧血、自體免疫性溶血性貧血、惡性貧血、自體免疫性嗜中性球減少症、特發性血小板減少性紫斑病、Basedow 病(格雷夫茲病(甲狀腺功能亢進症))、橋本病、自體免疫性副腎功能不全、原發性甲狀腺功能降低症、艾迪生氏病、特發性艾迪生氏病、I 型糖尿病、徐緩進行性 I 型糖尿病、局部性硬皮症、乾癬、乾癬性關節炎、水皰性類天皰瘡、天皰瘡、類天皰瘡、妊娠性皰疹、線狀 IgA 水皰性皮膚症、後天性表皮水皰症、圓形脫毛症、白斑、尋常性白斑、視神經脊髓炎、慢性炎症性脫髓性多發神經炎、多灶性運動神經病、結節病、巨細胞性動脈炎、肌萎縮性側索硬化症、原田病、自體免疫性視神經症、特發性無精子症、習慣性流產、炎症性腸疾病、乳糜瀉病、強直性脊椎炎、重症氣喘、慢性蕁麻疹、移植免疫、家族性地中海熱、嗜酸性球性副鼻腔炎、擴張型心肌症、全身性肥胖細胞症或封入體肌炎。

【請求項40】 如請求項 38 或 39 所述之自體免疫疾病之預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療劑，係與選自下列之任一種以上藥劑一起投予：胰島素(insulin)製劑、磺醯脲(sulfonylurea)劑、速攻型胰島素分泌促進藥、雙胍類(biguanide)製劑、胰島素抗性改善藥、 α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase)抑制藥、糖尿病性神經症治療藥、GLP-1 類似物製劑、DPP-4 抑制劑、類固醇藥、干擾素 β -1a、干擾素 β -1b、乙酸格拉替雷(glatiramer acetate)、米托蒽醌(mitoxanthone)、硫唑嘌呤(azathioprine)、環磷醯胺(cyclophosphamide)、環孢黴素(cyclosporine)、甲胺蝶呤(methotrexate)、可拉屈濱(cladribine)、副腎皮質刺激荷爾蒙(ACTH)、促腎上腺皮質激素(corticotropin)、咪唑立濱(mizoribine)、他克莫司(tacrolimus)、芬戈莫德(fingolimod)、阿倫單抗(alemtumab)、免疫抑制劑、貝利木單抗(belimumab)、抗風濕病藥、抗細胞激素藥及阿巴西普(abatacept)。

【請求項41】 一種移植物對抗宿主疾病(GVHD)之預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療劑，係包含選自請求項 1 至 36 中任一項所述之雙特異性抗體或其抗體斷片作為有效成分。

14512[illegible]

CH4

Q100-1~Q100-6 各 VII 列 101V6 列之配列

Q100-1		Q100-2	Q100-3	Q100-4	Q100-5	Q100-6
101V6-1	(SEQ ID No. 22)	TCVAVQSGADHKKQGSLSKTSCKOSCVSP4	(SYNTO)	TAHOUTOKOLAHMO	TEVTPDSHATSHSFOO	
Q100-2 VII (SEQ ID No. 23)	Q100-2	Q100-3	Q100-4	Q100-5	Q100-6	
Q100-3 VII (SEQ ID No. 24)	Q100-3	Q100-4	Q100-5	Q100-6	Q100-7	
Q100-4 VII (SEQ ID No. 25)	Q100-4	Q100-5	Q100-6	Q100-7	Q100-8	
Q100-5 VII (SEQ ID No. 26)	Q100-5	Q100-6	Q100-7	Q100-8	Q100-9	
Q100-6 VII (SEQ ID No. 27)	Q100-6	Q100-7	Q100-8	Q100-9	Q100-10	
Q100-7 VII (SEQ ID No. 28)	Q100-7	Q100-8	Q100-9	Q100-10	Q100-11	

Q100-1		Q100-2	Q100-3	Q100-4	Q100-5	Q100-6
101V6-1	(SEQ ID No. 22)	TCVAVQSGADHKKQGSLSKTSCKOSCVSP4	(SYNTO)	TAHOUTOKOLAHMO	TEVTPDSHATSHSFOO	
Q100-2 VII (SEQ ID No. 23)	Q100-2	Q100-3	Q100-4	Q100-5	Q100-6	
Q100-3 VII (SEQ ID No. 24)	Q100-3	Q100-4	Q100-5	Q100-6	Q100-7	
Q100-4 VII (SEQ ID No. 25)	Q100-4	Q100-5	Q100-6	Q100-7	Q100-8	
Q100-5 VII (SEQ ID No. 26)	Q100-5	Q100-6	Q100-7	Q100-8	Q100-9	
Q100-6 VII (SEQ ID No. 27)	Q100-6	Q100-7	Q100-8	Q100-9	Q100-10	
Q100-7 VII (SEQ ID No. 28)	Q100-7	Q100-8	Q100-9	Q100-10	Q100-11	

Q100-1

Clone No.	SEQ ID No.	Amplified Sequence
101V6-1	1	QVQLVQSGSHLKPGASVYVSCASQTTHHVALHVAATQATQQQLHWMOVLNTNINPTFAQGTFGRVVISLDTSVITATLQISLKATDITAYAVCARQDNVAVPTIRWVYAHIMDNYVGGGTLTVSS
101V6-2	2	QVQLVQSGSHLKPGASVYVSCASQTTHHVALHVAATQATQQQLHWMOVLNTNINPTFAQGTFGRVVISLDTSVITATLQISLKATDITAYAVCARQDNVAVPTIRWVYAHIMDNYVGGGTLTVSS
101V6-3	3	QVQLVQSGSHLKPGASVYVSCASQTTHHVALHVAATQATQQQLHWMOVLNTNINPTFAQGTFGRVVISLDTSVITATLQISLKATDITAYAVCARQDNVAVPTIRWVYAHIMDNYVGGGTLTVSS
101V6-4	4	QVQLVQSGSHLKPGASVYVSCASQTTHHVALHVAATQATQQQLHWMOVLNTNINPTFAQGTFGRVVISLDTSVITATLQISLKATDITAYAVCARQDNVAVPTIRWVYAHIMDNYVGGGTLTVSS
101V6-5	5	QVQLVQSGSHLKPGASVYVSCASQTTHHVALHVAATQATQQQLHWMOVLNTNINPTFAQGTFGRVVISLDTSVITATLQISLKATDITAYAVCARQDNVAVPTIRWVYAHIMDNYVGGGTLTVSS

Q100-1

Clone No.	SEQ ID No.	Amplified Sequence
101V6-1	1	QVQLVQSGSHLKPGASVYVSCASQTTHHVALHVAATQATQQQLHWMOVLNTNINPTFAQGTFGRVVISLDTSVITATLQISLKATDITAYAVCARQDNVAVPTIRWVYAHIMDNYVGGGTLTVSS
101V6-2	2	QVQLVQSGSHLKPGASVYVSCASQTTHHVALHVAATQATQQQLHWMOVLNTNINPTFAQGTFGRVVISLDTSVITATLQISLKATDITAYAVCARQDNVAVPTIRWVYAHIMDNYVGGGTLTVSS
101V6-3	3	QVQLVQSGSHLKPGASVYVSCASQTTHHVALHVAATQATQQQLHWMOVLNTNINPTFAQGTFGRVVISLDTSVITATLQISLKATDITAYAVCARQDNVAVPTIRWVYAHIMDNYVGGGTLTVSS
101V6-4	4	QVQLVQSGSHLKPGASVYVSCASQTTHHVALHVAATQATQQQLHWMOVLNTNINPTFAQGTFGRVVISLDTSVITATLQISLKATDITAYAVCARQDNVAVPTIRWVYAHIMDNYVGGGTLTVSS
101V6-5	5	QVQLVQSGSHLKPGASVYVSCASQTTHHVALHVAATQATQQQLHWMOVLNTNINPTFAQGTFGRVVISLDTSVITATLQISLKATDITAYAVCARQDNVAVPTIRWVYAHIMDNYVGGGTLTVSS

Q100-1

Clone No.	Seq ID No.	Amino Acid Sequence
CD19-6	30	QVQIVQSGATVKKISPGSLKISCKGSGYSITSYWIGWVROMPKGKLIAMNG INPQDSITRYSPSTQQQVTHSADKSIATYIQWSSLKASDTANNVCARRTI NQVVMATWPIVGGQIMVTVSS
CD19-1	31	IAQIVQSGATVKKISPGSLKISCKGSGYSITSYWIGWVROMPKGKLIAMNG INPQDSITRYSPSTQQQVTHSADKSIATYIQWSSLKASDTANNVCARRTI IYATIMNATPIWQQQITVTVSS
CD19-4	32	QVQIVQSGATVKKISPGSLKISCKGSGYSITSYWIGWVROMPKGKLIAMNG INPQDSITRYSPSTQQQVTHSADKSIATYIQWSSLKASDTANNVCARRTI IKATITKATINWQQQIMVTVSS
CD19-2	33	QVQIVQSGATVKKISPGSLKISCKGSGYSITSYWIGWVROMPKGKLIAMNG INPQDSITRYSPSTQQQVTHSADKSIATYIQWSSLKASDTANNVCARRTI LATIMLAWWQQQDYVSS
CD19-3	34	EYQIVQSGATVKKISPGSLKISCKGSGYSITSYWIGWVROMPKGKLIAMNG INPQDSITRYSPSTQQQVTHSADKSIATYIQWSSLKASDTANNVCARRTI IYATIMWASBYWQQQIMVTVSS
CD19-6	62	QVQIVQSGATVKKISPGSLKISCKGSGYSITSYWIGWVROMPKGKLIAMNG INPQDSITRYSPSTQQQVTHSADKSIATYIQWSSLKASDTANNVCARRTI NQVVMATWPIVGGQIMVTVSS

[E|8]

Clone No.	Seq ID No.	CDR1	Seq ID No.	CDR1	Seq ID No.	CDR1
CD19-6	35	EYVW	36	INPQDSITRYSPSTQQ	37	KTIWQVATVANN
CD19-1	38	EYVQ	39	INPQDSITRYSPSTQQ	40	QHYATVASSANN
CD19-4	41	EYVA	42	INPQDSITRYSPSTQQ	43	INPQATVAKANN
CD19-2	44	EYVQ	45	INPQDSITRYSPSTQQ	46	QHYATVQANN
CD19-3	47	EYVQ	48	INPQDSITRYSPSTQQ	49	KTIWATVWASDY

[E|9]

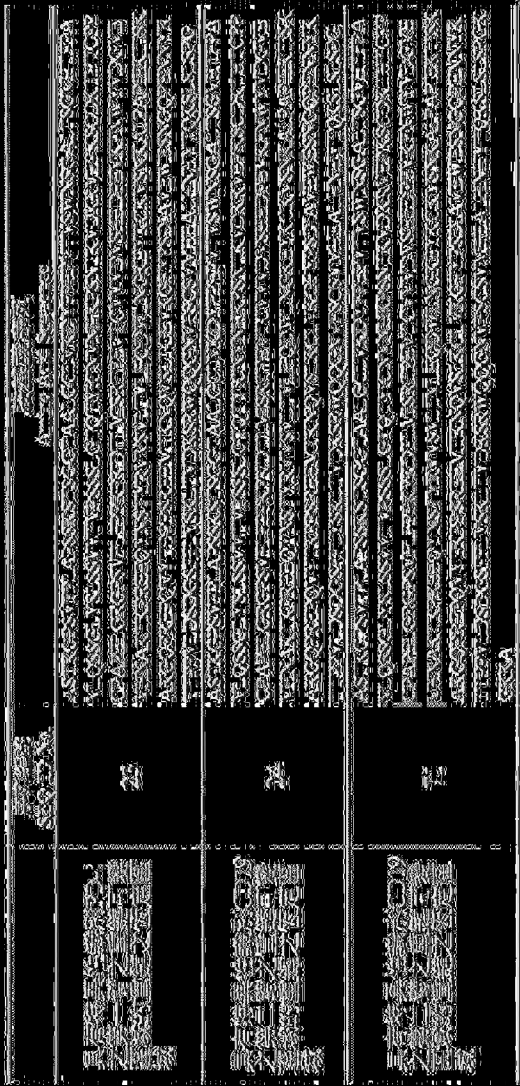
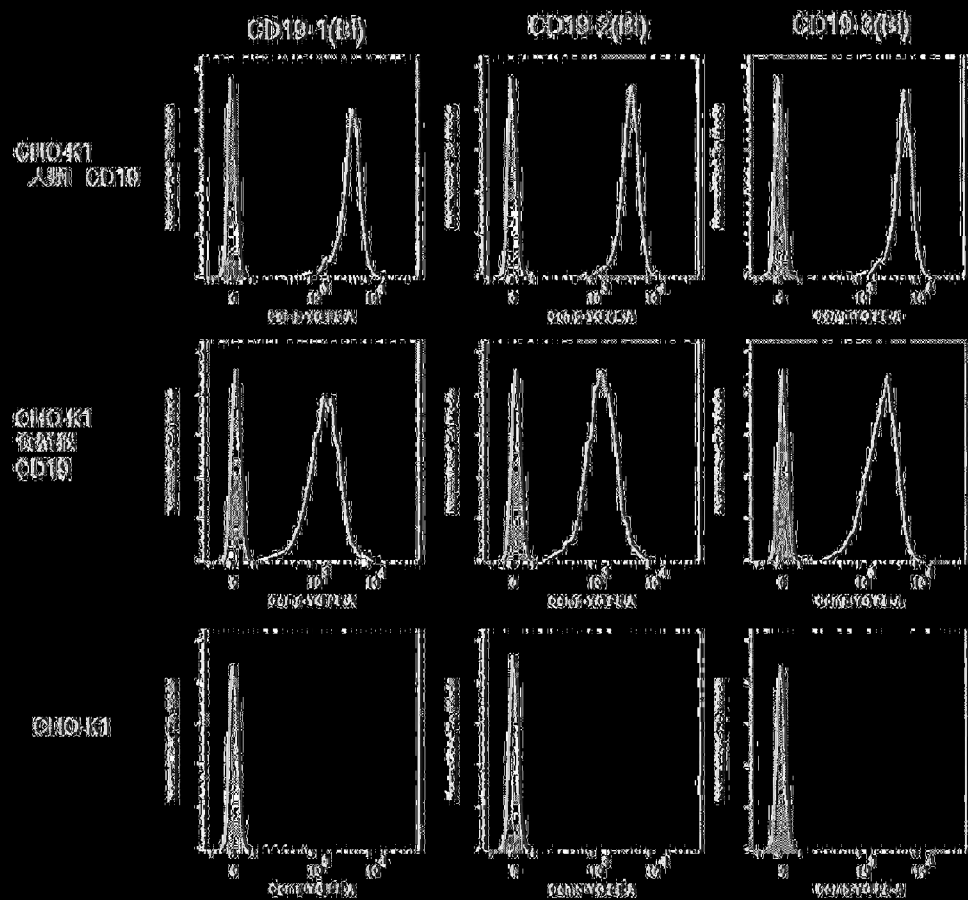


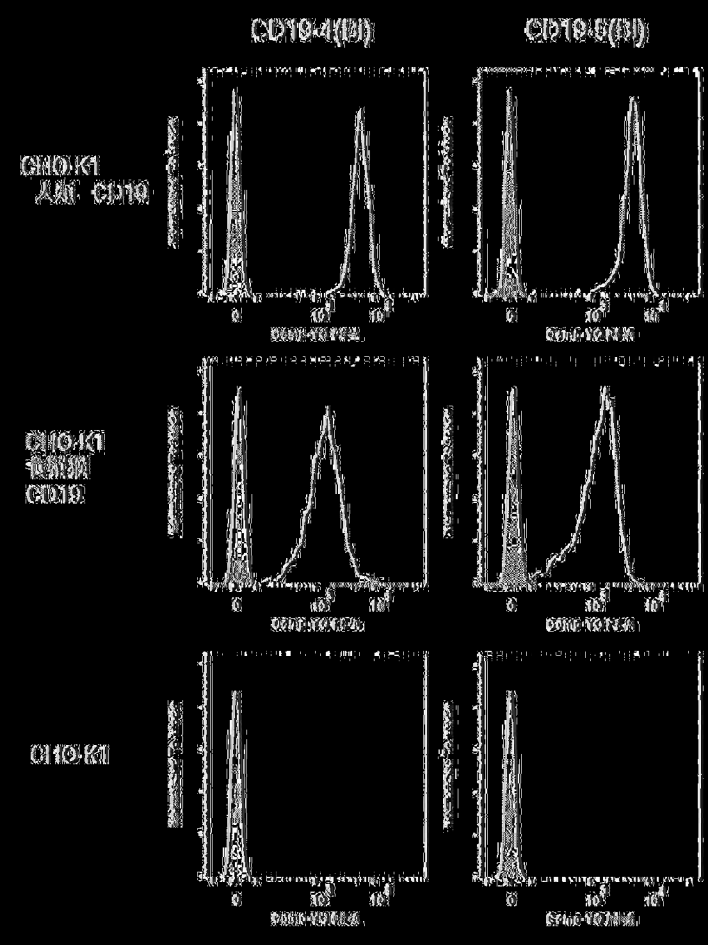
Figure 10

Clone No.	人CD19 Kd (pmol/L)	人CD19-1 Kd (pmol/L)
CD19-1(W)	11.3	7.6
CD19-2(W)	13.6	6.7
CD19-3(W)	5.7	6.8
CD19-4(W)	12.5	6.7
CD19-5(W)	6.6	7.6
CD19-6(W)	3.1	1.4

Figure 11



(图12)



[IM13]

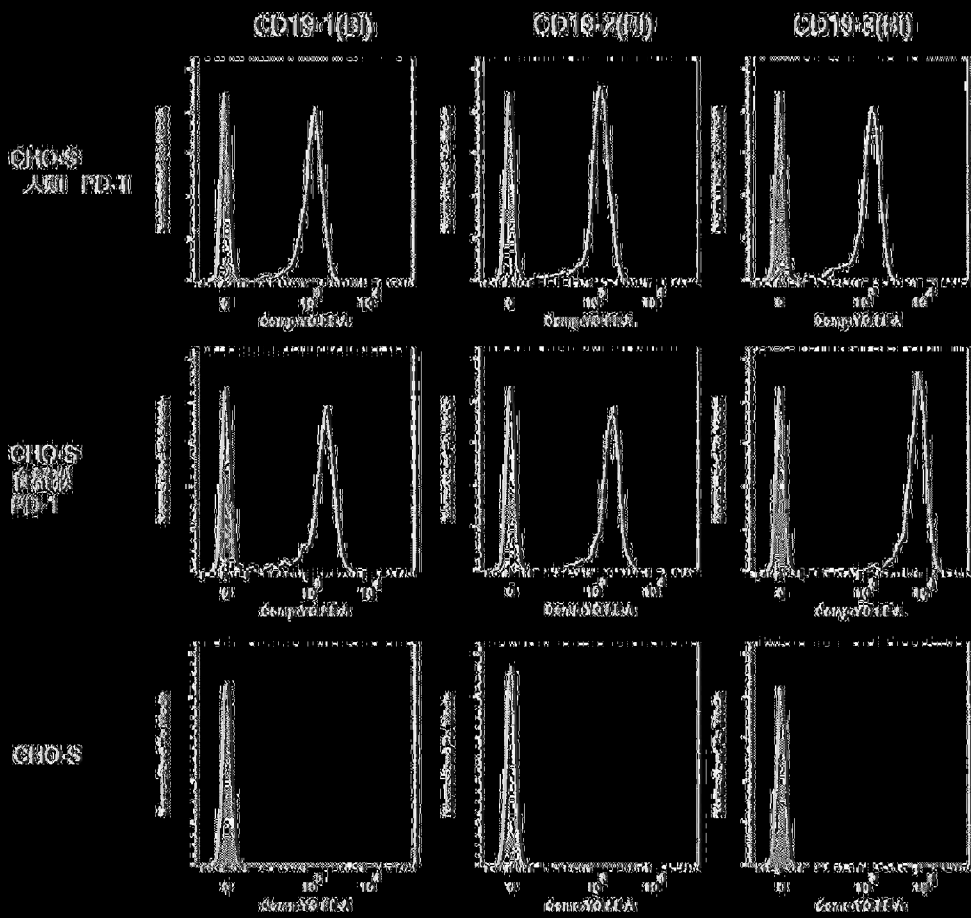
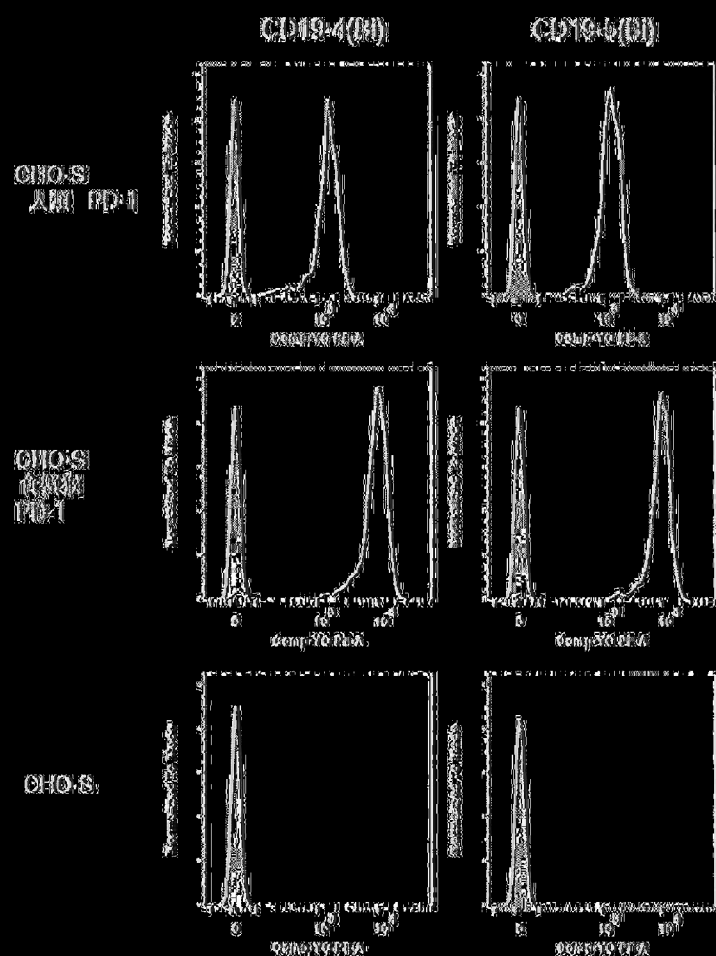
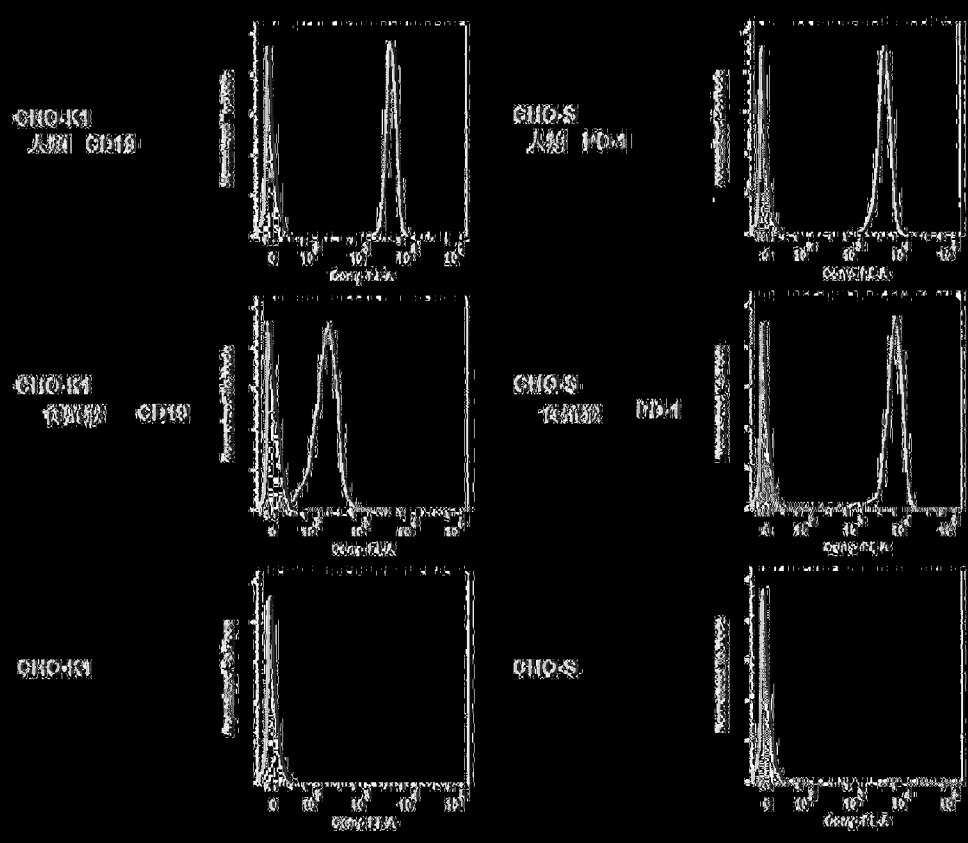


Figure 14



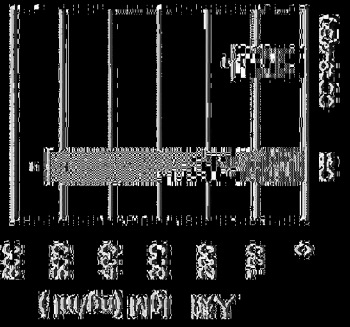
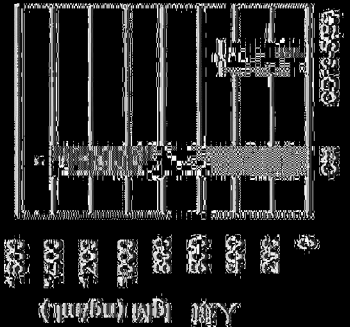
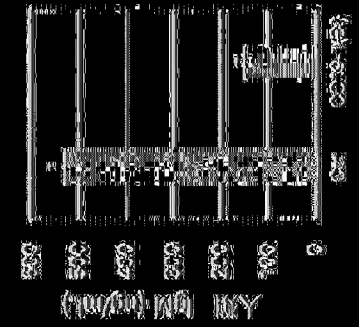
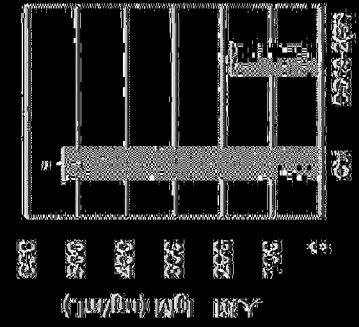
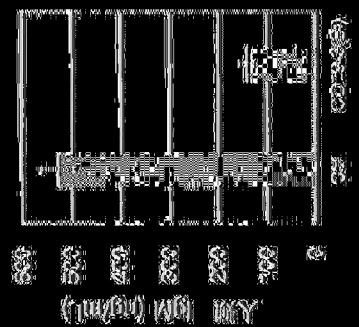
[Fig 15]



(16)



372



6.19

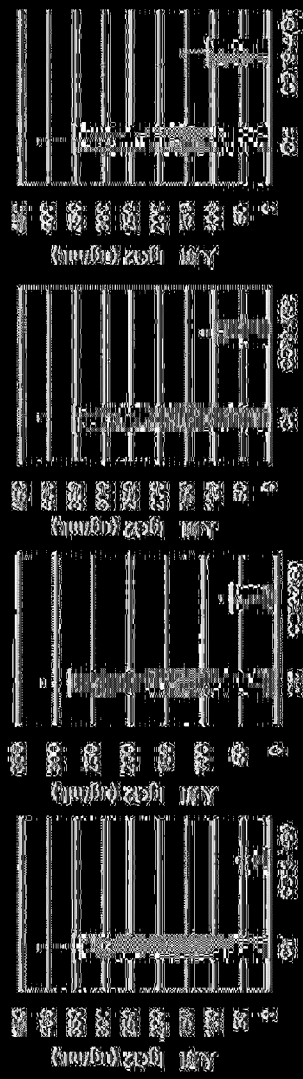


Figure 20

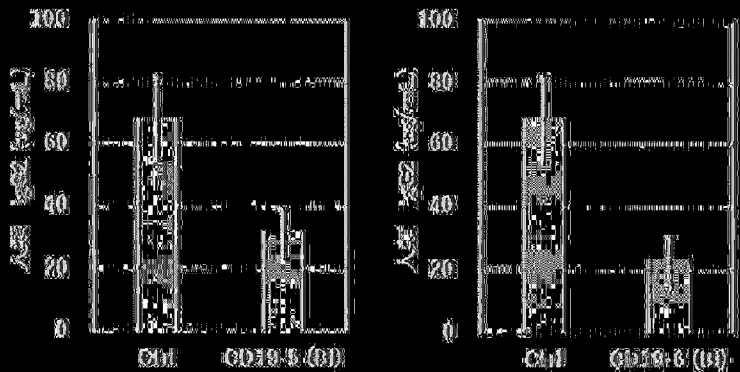
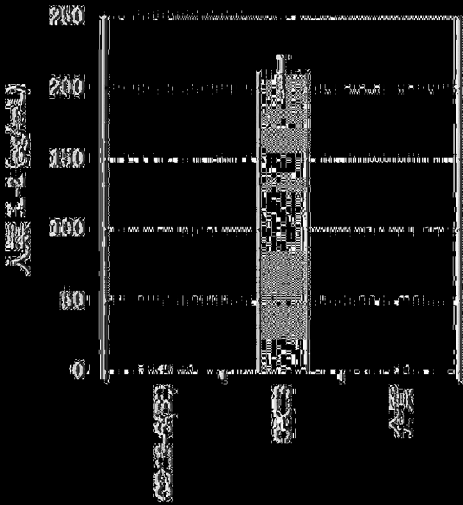


Figure 21



[[M222]]

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種醫藥組成物，其係含有雙特異性抗體或其抗體斷片作為有效成分，該雙特異性抗體或其抗體斷片係與 PD-1 及 CD19 分別特異性結合，並且，具有與 PD-1 特異性結合之第一臂及與 CD19 特異性結合之第二臂，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂具有選自下列(A)至(E)之任一 VH：

(A)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 6 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 7 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 8 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(B)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 9 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 10 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 11 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(C)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 12 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 13 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 14 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(D)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 15 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 16 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 17 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，以及

(E)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 18 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 19 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2 及

(c)由序列編號 20 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

該與 CD19 特異性結合之第二臂具有選自下列(A)至(E)之任一 VH：

(A)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 35 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 36 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 37 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(B)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 38 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 39 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 40 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(C)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 41 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 42 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 43 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(D)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 44 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 45 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 46 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，以及

(E)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 47 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 48 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2 及

(c)由序列編號 49 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

該與 PD-1 特異性結合之第一臂及該與 CD19 特異性結合之第二臂分別具有 VL，該 VL 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 26 之胺基酸序列構成的 VL-CDR1、

(b)由序列編號 27 之胺基酸序列構成的 VL-CDR2、及

(c)由序列編號 28 之胺基酸序列構成的 VL-CDR3；

在此，在與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 中之選自 VH-CDR1、VH-CDR2 及 VH-CDR3 之任一個或複數個 CDR 中，各個任意 1 至 5 個胺基酸殘基可經置換成保守性胺基酸，及/或，在與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 中之選自 VH-CDR1、VH-CDR2 及 VH-CDR3 之任一個或複數個 CDR 中，各個任意 1 至 5 個胺基酸殘基可經置換成保守性胺基酸。

【請求項2】 如請求項 1 所述之醫藥組成物，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂具有選自下列(A)至(E)之任一 VH：

(A)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 6 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 7 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 8 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(B)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 9 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 10 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 11 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(C)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 12 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 13 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 14 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(D)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 15 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 16 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 17 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，以及

(E)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 18 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 19 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 20 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

該與 CD19 特異性結合之第二臂具有選自下列(A)至(E)之任一 VH：

(A)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 35 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 36 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 37 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(B)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 38 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 39 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 40 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(C)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 41 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 42 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 43 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(D)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 44 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 45 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 46 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，以及

(E)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 47 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 48 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 49 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

【請求項3】如請求項 1 或 2 所述之醫藥組成物，其中，

(i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 6 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 7 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 8 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

(ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 係選自下列(A)至(E)之任一 VH：

(A)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 35 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 36 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 37 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(B)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 38 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 39 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 40 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(C)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 41 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 42 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 43 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(D)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 44 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 45 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 46 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，以及

(E)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 47 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 48 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 49 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

【請求項4】如請求項 1 或 2 所述之醫藥組成物，其中，

(i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 9 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 10 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2 及

(c)由序列編號 11 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

(ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 係選自下列(A)至(E)之任一 VH：

(A)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 35 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 36 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 37 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(B)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 38 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 39 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 40 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(C)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 41 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 42 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 43 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(D)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 44 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 45 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 46 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，以及

(E)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 47 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 48 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 49 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

【請求項5】如請求項 1 或 2 所述之醫藥組成物，其中，

(i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 12 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 13 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2 及

(c)由序列編號 14 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3 ；

(ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 係選自下列(A)至(E)之任一 VH ：

(A)具有下列(a)至(c)之 VH ，

(a)由序列編號 35 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1 、

(b)由序列編號 36 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2 、 及

(c)由序列編號 37 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3 ，

(B)具有下列(a)至(c)之 VH ，

(a)由序列編號 38 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1 、

(b)由序列編號 39 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2 、 及

(c)由序列編號 40 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3 ，

(C)具有下列(a)至(c)之 VH ，

(a)由序列編號 41 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1 、

(b)由序列編號 42 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2 、 及

(c)由序列編號 43 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3 ，

(D)具有下列(a)至(c)之 VH ，

(a)由序列編號 44 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1 、

(b)由序列編號 45 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2 、 及

(c)由序列編號 46 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3 ， 以及

(E)具有下列(a)至(c)之 VH ，

(a)由序列編號 47 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1 、

(b)由序列編號 48 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2 、 及

(c)由序列編號 49 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

【請求項6】 如請求項 1 或 2 所述之醫藥組成物，其中，

(i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 15 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 16 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2 及

(c)由序列編號 17 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

(ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 係選自下列(A)至(E)之任一 VH：

(A)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 35 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 36 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 37 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(B)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 38 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 39 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 40 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(C)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 41 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 42 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 43 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(D)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 44 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 45 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 46 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，以及

(E)具有下列(a)至(c)之 VH、

(a)由序列編號 47 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 48 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 49 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

【請求項7】 如請求項 1 或 2 所述之醫藥組成物，其中，

(i)該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 具有下列(a)至(c)：

(a)由序列編號 18 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 19 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2 及

(c)由序列編號 20 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3；

(ii)該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 係選自下列(A)至(E)之任一 VH：

(A)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 35 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 36 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 37 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(B)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 38 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 39 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 40 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(C)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 41 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 42 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 43 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，

(D)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 44 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 45 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 46 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3，以及

(E)具有下列(a)至(c)之 VH，

(a)由序列編號 47 之胺基酸序列構成的 VH-CDR1、

(b)由序列編號 48 之胺基酸序列構成的 VH-CDR2、及

(c)由序列編號 49 之胺基酸序列構成的 VH-CDR3。

【請求項8】如請求項 1 至 7 中任一項所述之醫藥組成物，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 之 FR1、FR2 及 FR3 區域，係分別對應於生殖細胞系列型 V 基因 IGHV7-4-1 之可經受體細胞突變的該基因所編碼的胺基酸序列；FR4 區域係由生殖細胞系列型 J 基因 JH6c 之可經受體細胞突變之該基因所編碼的胺基酸序列構成，惟，排除包含於 VH-CDR3 區域之胺基酸序列。

【請求項9】如請求項 1 至 8 中任一項所述之醫藥組成物，其中，該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 之 FR1、FR2 及 FR3 區域，係分別對應於生殖細胞系列型 V 基因 IGHV5-51 之可經受體細胞突變的該基因所編碼之胺基酸序列。

【請求項10】如請求項 1 至 9 中任一項所述之醫藥組成物，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 係由選自序列編號 1、序列編號 2、序列編號 3、序列編號 4 及序列編號 5 的任一個胺基酸序列、或與該 VH 之胺基酸序列至少 80% 相同的胺基酸序列構成。

【請求項11】如請求項 1 至 10 中任一項所述之醫藥組成物，其中，該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 係由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33、序列編號 34、序列編號 62、序列編號 63、序列編號 64、序列編號 65 及序列編號 66 中之任一個胺基酸序列、或與該 VH 之胺基酸序列至少 80%相同的胺基酸序列構成。

【請求項12】如請求項 1 或 2 所述之醫藥組成物，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂的 VH 係由選自序列編號 1、序列編號 2、序列編號 3、序列編號 4 及序列編號 5 中之任一個胺基酸序列構成，該與 CD19 特異性結合之第二臂的 VH 係由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33、序列編號 34、序列編號 62、序列編號 63、序列編號 64、序列編號 65 及序列編號 66 中之任一個胺基酸序列構成。

【請求項13】如請求項 1 至 3 中任一項所述之醫藥組成物，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 1 之胺基酸序列構成，該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33、序列編號 34、序列編號 62、序列編號 63、序列編號 64、序列編號 65 及序列編號 66 中的任一個胺基酸序列構成。

【請求項14】如請求項 1、2 或 4 所述之醫藥組成物，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 2 之胺基酸序列構成，該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33、序列編號 34、序列編號 62、序列編號 63、序列編號 64、序列編號 65 及序列編號 66 中之任一個胺基酸序列構成。

【請求項15】如請求項 1、2 或 5 所述之醫藥組成物，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 3 之胺基酸序列構成，該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33、序列編號 34、序列編號 62、序列編號 63、序列編號 64、序列編號 65 及序列編號 66 中之任一個胺基酸序列構成。

【請求項16】如請求項 1、2 或 6 所述之醫藥組成物，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 4 之胺基酸序列構成，該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33、序列編號 34、序列編號 62、序列編號 63、序列編號 64、序列編號 65 及序列編號 66 中之任一個胺基酸序列構成。

【請求項17】如請求項 1、2 或 7 所述之醫藥組成物，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂中的 VH 係由序列編號 5 之胺基酸序列構成，該與 CD19 特異性結合之第二臂中的 VH 係由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33、序列編號 34、序列編號 62、序列編號 63、序列編號 64、序列編號 65 及序列編號 66 中之任一個胺基酸序列構成。

【請求項18】如請求項 1 至 17 中任一項所述之醫藥組成物，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂及/或該與 CD19 特異性結合之第二臂，係分別具有由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL。

【請求項19】一種醫藥組成物，其係含有雙特異性抗體或其抗體斷片作為有效成分，該雙特異性抗體或其抗體斷片係與 PD-1 及 CD19 分別特異性結合，且具有與 PD-1 特異性結合之第一臂及與 CD19 特異性結合之第二臂，其中，

(A) 與 PD-1 特異性結合之第一臂，係具有由選自序列編號 1、序列編號 2、序列編號 3、序列編號 4 及序列編號 5 中之任一個胺基酸序列構成的 VH，以及由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL，

(B) 與 CD19 特異性結合之第二臂，係具有由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33、序列編號 34、序列編號 62、序列編號 63、序列編號 64、序列編號 65 及序列編號 66 中之任一個胺基酸序列構成的 VH，以及由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL。

【請求項20】一種醫藥組成物，其係含有雙特異性抗體或其抗體斷片作為有效成分，該雙特異性抗體或其抗體斷片係與 PD-1 及 CD19 分別特異性結合，並且，具有與 PD-1 特異性結合之第一臂及與 CD19 特異性結合之第二臂，其中，該與 PD-1 特異性結合之第一臂係與下列(1)或(2)交叉競爭對 PD-1 之結合：(1)與 PD-1 特異性結合的第一臂，係具有由選自序列編號 1、序列編號 2、序列編號 3、序列編號 4 及序列編號 5 中之任一個胺基酸序列構成的 VH 以及由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL；(2)與 PD-1 特異性結合之單株抗體的可變區域，係由該 VH 及 VL 構成者。

【請求項21】一種醫藥組成物，其係含有雙特異性抗體或其抗體斷片作為有效成分，該雙特異性抗體或其抗體斷片係與 PD-1 及 CD19 分別特異性結合，並且，具有與 PD-1 特異性結合之第一臂及與 CD19 特異性結合之第二臂，其中，由該與 PD-1 特異性結合之第一臂所致之對 PD-1 之結合，係藉由下列(1)或(2)進行交叉競爭，(1)與 PD-1 特異性結合的第一臂，係具有由選自序列編號 1、序列編號 2、序列編號 3、序列編號 4 及序列編號 5 中之任一個胺基酸序列構成的 VH

以及由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL；(2)與 PD-1 特異性結合之單株抗體的可變區域，係由該 VH 及 VL 構成者。

【請求項22】如請求項 20 或 21 所述之醫藥組成物，其中，該與 CD19 特異性結合之第二臂進一步與下列(1)或(2)交叉競爭對 CD19 之結合：(1)與 CD19 特異性結合的第二臂，係具有由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33、序列編號 34、序列編號 62、序列編號 63、序列編號 64、序列編號 65 及序列編號 66 中之任一個胺基酸序列構成的 VH 以及由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL；(2)與 CD19 特異性結合之單株抗體的可變區域，係由該 VH 及 VL 構成者。

【請求項23】如請求項 1 至 22 中任一項所述之醫藥組成物，其中，該與 PD-1 特異性結合的第一臂容許 PD-1 與 PD-L1 間之相互作用。

【請求項24】如請求項 1 至 23 中任一項所述之醫藥組成物，其中，該雙特異性抗體為 IgG 抗體。

【請求項25】如請求項 24 所述之醫藥組成物，其中，該 IgG 抗體為 IgG₁ 抗體或 IgG₄ 抗體。

【請求項26】如請求項 24 所述之醫藥組成物，其中，該 IgG 抗體為 IgG₁ 抗體。

【請求項27】如請求項 26 所述之醫藥組成物，其中，屬於 IgG₁ 抗體之該雙特異性抗體對 Fc 受體之結合經消失或減弱。

【請求項28】如請求項 27 所述之醫藥組成物，其中，該雙特異性抗體的 2 個重鏈恆定區域中，依據 EU 編號系統的第 235 號之白胺酸分別被置換成甘胺酸，及/或第 236 號之甘胺酸分別被置換成精胺酸。

【請求項29】如請求項 26 至 28 中任一項所述之醫藥組成物，其中，具有與 PD-1 特異性結合之第一臂之 VH 的重鏈之恆定區域中，依據 EU 編號系統的第 351 號之白胺酸被置換成離胺酸，且第 366 號之蘇胺酸被置換成離胺酸；具有與 CD19 特異性結合之第二臂之 VH 的重鏈之恆定區域中，第 351 號之白胺酸被置換成天冬胺酸，且第 368 號之白胺酸被置換成麩胺酸。

【請求項30】如請求項 26 至 28 中任一項所述之醫藥組成物，其中，具有與 PD-1 特異性結合之第一臂之 VH 的重鏈之恆定區域中，依據 EU 編號系統的第 351 號之白胺酸被置換成天冬胺酸，且第 368 號之白胺酸被置換成麩胺酸；具有與 CD19 特異性結合之第二臂之 VH 的重鏈之恆定區域中，第 351 號之白胺酸被置換成離胺酸，且第 366 號之蘇胺酸被置換成離胺酸。

【請求項31】如請求項 26 至 30 中任一項所述之醫藥組成物，其中，該雙特異性抗體之 2 個重鏈恆定區域中，依據 EU 編號系統的第 447 號之離胺酸分別欠缺。

【請求項32】如請求項 1 至 27 中任一項所述之醫藥組成物，其中，該具有與 PD-1 特異性結合之第一臂之 VH 的重鏈，係包含由序列編號 23 之胺基酸序列構成的重鏈恆定區域。

【請求項33】如請求項 1 至 28、30 及 32 中任一項所述之醫藥組成物，其中，該具有與 CD19 特異性結合之第二臂之 VH 的重鏈，係包含由選自序列編號 24、序列編號 71、序列編號 72、序列編號 73、序列編號 74 及序列編號 75 中之任一個胺基酸序列構成的重鏈恆定區域。

【請求項34】如請求項 1 至 33 中任一項所述之醫藥組成物，其中，具有與 PD-1 特異性結合之第一臂之 VL 的輕鏈及/或具有與 CD19 特異性結合之第二臂之 VL 的輕鏈，係包含由序列編號 29 之胺基酸序列構成的輕鏈恆定區域。

【請求項35】一種醫藥組成物，其係含有雙特異性抗體或其抗體斷片作為有效成分，該雙特異性抗體或其抗體斷片係與 PD-1 及 CD19 分別特異性結合，並且，具有與 PD-1 特異性結合之第一臂及與 CD19 特異性結合之第二臂，其中，該雙特異性抗體係由下列(A)至(D)構成：

- (A) 具有與 PD-1 特異性結合之第一臂之 VH 的重鏈、
- (B) 具有與 PD-1 特異性結合之第一臂之 VL 的輕鏈、
- (C) 具有與 CD19 特異性結合之第二臂之 VH 的重鏈、及
- (D) 具有與 CD19 特異性結合之第二臂之 VL 的輕鏈；其中，
 - (a)具有與 PD-1 特異性結合之第一臂之 VH 的重鏈，係包含由選自序列編號 1、序列編號 2、序列編號 3、序列編號 4 及序列編號 5 中之任一個胺基酸序列構成的 VH 以及由序列編號 23 之胺基酸序列構成的重鏈恆定區域，
 - (b)具有與 PD-1 特異性結合之第一臂之 VL 的輕鏈，係包含由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL 及由序列編號 29 之胺基酸序列構成的輕鏈恆定區域，
 - (c)具有與 CD19 特異性結合之第二臂之 VH 的重鏈，係包含由選自序列編號 30、序列編號 31、序列編號 32、序列編號 33、序列編號 34、序列編號 62、序列編號 63、序列編號 64、序列編號 65 及序列編號 66 中之任一個胺基酸序列構成的 VH 以及由序列編號 24 之胺基酸序列構成的重鏈恆定區域，及
 - (d)具有與 CD19 特異性結合之第二臂之 VL 的輕鏈，係包含由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL 及由序列編號 29 之胺基酸序列構成的輕鏈恆定區域。

【請求項36】一種醫藥組成物，其係含有雙特異性抗體作為有效成分，該雙特異性抗體係與 PD-1 及 CD19 分別特異性結合，並且，具有與 PD-1 特異性結合之第一臂及與 CD19 特異性結合之第二臂，其中，該雙特異性抗體係由下列(A)至(D)構成：

- (A) 具有與 PD-1 特異性結合之第一臂之 VH 的重鏈、
- (B) 具有與 PD-1 特異性結合之第一臂之 VL 的輕鏈、
- (C) 具有與 CD19 特異性結合之第二臂之 VH 的重鏈、及
- (A) 具有與 CD19 特異性結合之第二臂之 VL 的輕鏈；其中，
 - (a)具有與 PD-1 特異性結合之第一臂之 VH 的重鏈，係包含由序列編號 5 之胺基酸序列構成的 VH 以及由序列編號 23 之胺基酸序列構成的重鏈恆定區域，
 - (b)具有與 PD-1 特異性結合之第一臂之 VL 的輕鏈，係包含由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL 及由序列編號 29 之胺基酸序列構成的輕鏈恆定區域，
 - (c)具有與 CD19 特異性結合之第二臂之 VH 的重鏈，係包含由序列編號 62 之胺基酸序列構成的 VH 以及由序列編號 24 之胺基酸序列構成的重鏈恆定區域，及
 - (d)具有與 CD19 特異性結合之第二臂之 VL 的輕鏈，係包含由序列編號 25 之胺基酸序列構成的 VL 及由序列編號 29 之胺基酸序列構成的輕鏈恆定區域。

【請求項37】如請求項 1 至 36 中任一項所述之醫藥組成物，其更含有藥學上可容許之載體。