



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I845231 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 06 月 11 日

(21)申請案號：112111560

(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 07 月 03 日

(51)Int. Cl.：

C07K16/28 (2006.01)**C07K16/30 (2006.01)****A61K39/395 (2006.01)****C12N15/13 (2006.01)****C12N15/62 (2006.01)****A61P35/00 (2006.01)**

(30)優先權：2019/07/05 日本

2019-126503

2019/07/30 日本

2019-139752

(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)；新坊拓也 SHIMBO, TAKUYA (JP)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

(56)參考文獻：

US 2004/0241745A1

US 2008/0025979A1

WO 2017/010874A1

期刊 Jingying Huang et al. A skewed distribution and increased PD-1 +Vβ+CD4+/CD8+ T cells in patients with acute myeloid leukemia. J Leukoc Biol. 106(3). Epub 2019 May 28. 725-732.

審查人員：張茜毓

申請專利範圍項數：7 項 圖式數：23 共 146 頁

(54)名稱

以 PD-1/CD3 雙特異性蛋白質所進行之血液性癌症治療

(57)摘要

本發明之課題係提供對於血液性癌症之預防、症狀進展抑制、復發抑制或治療用之新穎藥劑。本發明之發明者們致力研究的結果，著眼於特異性地結合於 PD-1 之第一臂及特異性地結合於 CD3 的第二臂之雙特異性蛋白質(較佳為 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段)作為可解決相關問題的物質，發現該等雙特異性蛋白質對於血液性癌症對於預防、症狀進展抑制、復發抑制或治療為有用者。

The purpose of the present invention is to provide a novel drug useful in prophylaxis, syndrome progressing inhibition, recurrence inhibition or treatment to blood cancers. The inventors of the present invention have conducted intense studies, and as a result, focuses on a bispecific protein (preferably PD-1/CD3 bispecific antibody or fragments thereof) having a first arm which is specific binding to PD-1 and a second arm which is specific binding to CD3 as a substance able to solve the above issues, and found that the bispecific protein is useful in prophylaxis, syndrome progressing inhibition, recurrence inhibition or treatment to blood cancers.

I845231

【發明摘要】

【中文發明名稱】 以 PD-1/CD3 雙特異性蛋白質所進行之血液性癌症治療

【英文發明名稱】 TREATMENT OF HEMATOLOGICAL CANCER
WITH PD-1/CD3 BISPECIFIC PROTEIN

【中文】

本發明之課題係提供對於血液性癌症之預防、症狀進展抑制、復發抑制或治療用之新穎藥劑。本發明之發明者們致力研究的結果，著眼於特異性地結合於 PD-1 之第一臂及特異性地結合於 CD3 的第二臂之雙特異性蛋白質(較佳為 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段)作為可解決相關問題的物質，發現該等雙特異性蛋白質對於血液性癌症對於預防、症狀進展抑制、復發抑制或治療為有用者。

【英文】

The purpose of the present invention is to provide a novel drug useful in prophylaxis, syndrome progressing inhibition, recurrence inhibition or treatment to blood cancers. The inventors of the present invention have conducted intense studies, and as a result, focuses on a bispecific protein (preferably PD-1/CD3 bispecific antibody or fragments thereof) having a first arm which is specific binding to PD-1 and a second arm which is specific binding to CD3 as a substance able to solve the above issues, and

found that the bispecific protein is useful in prophylaxis, syndrome progressing inhibition, recurrence inhibition or treatment to blood cancers.

【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】 以 PD-1/CD3 雙特異性蛋白質所進行之血液性癌症治療

【英文發明名稱】 TREATMENT OF HEMATOLOGICAL CANCER
WITH PD-1/CD3 BISPECIFIC PROTEIN

【技術領域】

【0001】 本發明係關於可各別特異性地結合於 PD-1 及 CD3 的雙特異性蛋白質(下文中，有簡稱為「PD-1/CD3 雙特異性蛋白質」的情況)的醫藥治療用途。

【先前技術】

【0002】 PD-1 係屬於免疫球蛋白家族的免疫抑制受體，為具有抑制因來自抗原受體的刺激而經活化之 T 細胞的免疫活化信號的功能的分子。由 PD-1 剔除小鼠的解析等，已知 PD-1 信號於自體免疫性擴張型心肌症、類狼瘡症候群、自體免疫性腦脊髓炎、全身性紅斑性狼瘡、移植片對宿主病、I 型糖尿病及風濕性關節炎等自體免疫疾患的抑制扮演重要角色。因此，增強 PD-1 信號的物質被指稱可成為自體免疫疾患等的預防劑或治療劑。

【0003】 截至目前，作為增強 PD-1 信號的物質，已知有辨識 PD-1 的雙特異性抗體(專利文獻 1 至 3)。此雙特異性抗體係將辨識 T 細胞受體複合體的成員之 CD3 的抗體的抗原辨識部位與辨識 PD-1 抗體的抗原辨識

部位經基因工程性地連結者，藉由使 PD-1 位於 T 細胞受體複合體附近的頻率提升，具有增強對於 T 細胞受體複合體之 PD-1 的抑制信號的作用。進一步地，同專利文獻中，亦記載 PD-1 雙特異性抗體可使用於自體免疫疾患等之預防或治療。

【0004】 然而，未有 PD-1/CD3 雙特異性蛋白質有效於血液性癌症的預防或治療的報告。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0005】

[專利文獻 1] 國際公開第 2003/011911 號小冊

[專利文獻 2] 國際公開第 2004/072286 號小冊

[專利文獻 3] 國際公開第 2013/022091 號小冊

【發明內容】

[發明欲解決的課題]

【0006】 本發明的目的係提供對於血液性癌症的預防、症狀進展抑制、復發抑制或治療用之新穎藥劑。

[解決課題用的手段]

【0007】 本發明的發明者們致力研究的結果，作為可解決相關課題的物質，著眼於本發明之 PD-1/CD3 雙特異性蛋白質，確認該等可期待有效於血液性癌症的預防或治療，完成本發明。

【0008】 亦即，本發明係如下述者。

[1] 一種血液性癌症的預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療的劑，係包含具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂及特異性地結合於 CD3 之第二臂之雙特異性蛋白質(本說明書中，與「可各別特異性地結合於 PD-1 及 CD3 的雙特異性蛋白質」同義，關於此，亦有簡稱為「PD-1/CD3 雙特異性蛋白質」)作為有效成分。

[2] 如前項[1]記載的劑，其中，該雙特異性蛋白質為具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂及特異性地結合於 CD3 之第二臂的雙特異性抗體(下文中，亦簡稱為「PD-1/CD3 雙特異性抗體」)或其抗體片段(下文中，亦將該等合併簡稱為「PD-1/CD3 雙特異性抗體等」)。

[3] 如前項[2]記載的劑，其中，該雙特異性抗體等之特異性地結合於 PD-1 之第一臂係具有選自下列(A)至(E)之任一 VH，

(A) 具有(a)由序列編號 6 的胺基酸序列所構成之重鏈可變區的互補決定區 1(下文中，「重鏈可變區的互補決定區 1」亦簡稱為 VH-CDR1)、

(b) 由序列編號 7 的胺基酸序列所構成之重鏈可變區的互補決定區 2 (下文中，「重鏈可變區的互補決定區 2」亦簡稱為 VH-CDR2)及

(c) 由序列編號 8 的胺基酸序列所構成之重鏈可變區的互補決定區 3 (下文中，「重鏈可變區的互補決定區 3」亦簡稱為 VH-CDR3)之重鏈可變區(下文中，「重鏈可變區」亦簡稱為 VH)，

(B) 具有(a)由序列編號 9 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、

(b) 由序列編號 10 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及

(c) 由序列編號 11 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3 之 VH，

(C) 具有 (a)由序列編號 12 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、

- (b) 由序列編號 13 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及
- (c) 由序列編號 14 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3 之 VH，
- (D) 具有 (a)由序列編號 15 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、
- (b) 由序列編號 16 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及
- (c) 由序列編號 17 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3 之 VH，以及
- (E) 具有(a)由序列編號 18 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、
- (b) 由序列編號 19 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及
- (c) 由序列編號 20 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3 之 VH，

此處，特異性地結合於 PD-1 之第一臂中，VH-CDR1、VH-CDR2 及 VH-CDR3 之任一者或複數個 VH-CDR 中，其各別的任意的 1 至 5 個胺基酸殘基亦可以其他胺基酸(較佳為其保留性胺基酸)置換。

[4] 如前項[2]或[3]之任一項記載的劑，其中，該雙特異性抗體等之特異性地結合於 CD3 之第二臂係具有：

- 具有(a) 由序列編號 37 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、
- (b) 由序列編號 38 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及
- (c) 由序列編號 39 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3 之 VH，

此處，特異性地結合於 CD3 之第二臂中，VH-CDR1、VH-CDR2 及 VH-CDR3 之任一者或複數個 VH-CDR 中，其各別的任意的 1 至 5 個胺基酸殘基亦可以其他胺基酸(較佳為其保留性胺基酸)置換。

[5] 如前項[2]至[4]之任一項記載的劑，其中，該雙特異性抗體等之特異性地結合於 PD-1 之第一臂係具有選自下列(A)至(E)之任一 VH，

- (A) 具有 (a) 由序列編號 6 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、

- (b) 由序列編號 7 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及
- (c) 由序列編號 8 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3 之 VH，
- (B) 具有(a)由序列編號 9 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、
- (b) 由序列編號 10 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及
- (c) 由序列編號 11 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3 之 VH，
- (C) 具有(a)由序列編號 12 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、
- (b) 由序列編號 13 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及
- (c) 由序列編號 14 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3 之 VH，
- (D) 具有 (a)由序列編號 15 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、
- (b) 由序列編號 16 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及
- (c) 由序列編號 17 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3 之 VH，以及
- (E) 具有(a) 由序列編號 18 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、
- (b) 由序列編號 19 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及
- (c) 由序列編號 20 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3 之 VH。

[6] 如前項[2]至[5]中任一項記載的劑，其中，該雙特異性抗體等的特異性地結合於 CD3 之第二臂係具有：

- 具有(a) 由序列編號 37 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、
- (b) 由序列編號 38 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及
- (c) 由序列編號 39 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3 之 VH。

[7] 如前項[2]記載的劑，其中，(i) 該雙特異性抗體等之特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VH 係具有

- (a) 由序列編號 6 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、

- (b) 由序列編號 7 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及
- (c) 由序列編號 8 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3，
- (ii) 該雙特異性抗體等的特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VH 係具有
 - (a) 由序列編號 37 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、
 - (b) 由序列編號 38 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及
 - (c) 由序列編號 39 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3。

[8] 如前項[2]記載的劑，其中，(i) 該雙特異性抗體等之特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VH 係具有

- (a) 由序列編號 9 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、
- (b) 由序列編號 10 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及
- (c) 由序列編號 11 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3，
- (ii) 該雙特異性抗體等之特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VH 係具有
 - (a) 由序列編號 37 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、
 - (b) 由序列編號 38 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及
 - (c) 由序列編號 39 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3。

[9] 如前項[2]記載的劑，其中，(i) 該雙特異性抗體等之特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VH 係具有

- (a) 由序列編號 12 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、
- (b) 由序列編號 13 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及
- (c) 由序列編號 14 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3，
- (ii) 該雙特異性抗體等之特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VH 係具有
 - (a) 由序列編號 37 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、

(b) 由序列編號 38 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及

(c) 由序列編號 39 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3。

[10] 如前項[2]記載的劑，其中，(i) 該雙特異性抗體等之特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VH 係具有

(a) 由序列編號 15 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、

(b) 由序列編號 16 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及

(c) 由序列編號 17 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3，

(ii) 該雙特異性抗體等之特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VH 係具有

(a) 由序列編號 37 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、

(b) 由序列編號 38 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及

(c) 由序列編號 39 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3。

[11] 如前項[2]記載的劑，其中，(i) 該雙特異性抗體等之特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VH 係具有

(a) 由序列編號 18 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、

(b) 由序列編號 19 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及

(c) 由序列編號 20 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3，

(ii) 該雙特異性抗體等之特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VH 係具有

(a) 由序列編號 37 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、

(b) 由序列編號 38 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及

(c) 由序列編號 39 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3。

[12] 一種血液性癌症的預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療的劑，係包含具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂及特異性地結合於 CD3 之第二

臂的雙特異性抗體或其抗體片段作為有效成分，其中，特異性地結合於 PD-1 之第一臂係具有：

具有(a) 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)，此處， J^1 所表示的字母或其他的字母，係表示各別胺基酸之一字母縮寫]所構成之 VH-CDR1，

(b) $\text{WJ}^2\text{NTNTU}^2\text{NPTX}^2\text{AQGFTG}$ 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)，此處， J^2 、 U^2 及 X^2 各自所表示的字母或其他的字母，係表示與上述各別為相同意義。]所構成之 VH-CDR2、及

(c) $\text{GDJ}^3\text{VVPTTIWNYYU}^3\text{X}^3\text{MZ}^3\text{V}$ 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)，此處， J^3 、 U^3 、 X^3 及 Z^3 各自所表示的字母或其他的字母，係表示與上述各別為相同意義。]所構成之 VH-CDR3 的 VH，以及

特異性地結合於 CD3 之第二臂係具有：

具有(a) 由序列編號 37 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、

(b) 由序列編號 38 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及

(c) 由序列編號 39 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3 之 VH。

[13] 如前項[12]記載的劑，其中，(a) J^1 表示 G(甘胺酸)， J^2 表示 L(白胺酸)， U^2 表示 E(麩胺酸)， X^2 表示 F(苯丙胺酸)， J^3 表示 M(甲硫胺酸)， U^3 表示 H(組胺酸)， X^3 表示 F(苯丙胺酸)，及 Z^3 表示 D(天冬胺酸)，

(b) J^1 表示 G(甘胺酸), J^2 表示 I(異白胺酸), U^2 表示 G(甘胺酸), X^2 表示 Y(酪胺酸), J^3 表示 L(白胺酸), U^3 表示 H(組胺酸), X^3 表示 Y(酪胺酸), 及 Z^3 表示 E(麩胺酸),

(c) J^1 表示 A(丙胺酸), J^2 表示 L(白胺酸), U^2 表示 E(麩胺酸), X^2 表示 Y(酪胺酸), J^3 表示 M(甲硫胺酸), U^3 表示 Y(酪胺酸), X^3 表示 Y(酪胺酸), 及 Z^3 表示 D(天冬胺酸), 或

(d) J^1 表示 A(丙胺酸), J^2 表示 L(白胺酸), U^2 表示 E(麩胺酸), X^2 表示 F(苯丙胺酸), J^3 表示 M(甲硫胺酸), U^3 表示 H(組胺酸), X^3 表示 F(苯丙胺酸), 及 Z^3 表示 D(天冬胺酸)。

[14] 如前項[2]至[13]中任一項記載的劑, 其中, 該雙特異性抗體等之特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VH 的框架(下文中, 「框架」亦有簡稱為 FR)區中, 框架 1(下文中, 亦有簡稱為 FR1)、框架 2(下文中, 亦有簡稱為 FR2)及框架 3(下文中, 亦簡稱為 FR3)區, 係各自對應於生殖細胞系列型 V 基因 IGHV7-4-1 或有其體細胞突變之該基因所編碼的胺基酸序列。

[15] 如前項[14]記載的劑, 其中, 該雙特異性抗體等之特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VH 的框架 4(下文中, 「框架 4」亦有簡稱為 FR4)區, 係由生殖細胞系列型 J 基因 JH6c 或接受其體細胞突變之該基因所編碼的胺基酸序列(惟, VH-CDR3 區域所包含的胺基酸序列除外)所構成。

[16] 如前項[14]或[15]記載的劑, 其中, 特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VH 的 FR 區係包含: 由可接受生殖細胞系列型 V 基因 IGHV7-4-1 之體細胞突變之該基因所編碼, 藉由該體細胞突變, 序列編號 21 的胺基酸序列中, 位置 13 的離胺酸被置換為麩胺酸、位置 16 的丙胺酸被置換為纈

胺酸、或位置 19 的離胺酸被置換為甲硫胺酸，或經該等之任意複數個組合置換或未置換的 FR1 區。

[17] 如前項[14]~[16]中任一項記載的劑，其中，特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VH 的 FR 區係包含：由可接受生殖細胞系列型 V 基因 IGHV7-4-1 的體細胞突變的該基因所編碼，藉由該體細胞突變，序列編號 21 的胺基酸序列中的位置 37 的纈胺酸被置換為白胺酸或未置換之 FR2 區。

[18] 如前項[14]~[17]中任一項記載的劑，其中，特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VH 的 FR 區係包含：由可接受生殖細胞系列型 V 基因 IGHV7-4-1 的體細胞突變的該基因所編碼，藉由該體細胞突變，序列編號 21 的胺基酸序列中的位置 77 的絲胺酸被置換為蘇胺酸、或位置 84 的半胱胺酸各別地被置換為絲胺酸或天冬醯胺，或經該等之任意複數個組合所置換或未置換之 FR3 區。

[19] 如前項[14]~[18]中任一項記載的劑，其中，特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VH 的 FR4 區係由可接受生殖細胞系列型 J 基因 JH6c 的體細胞突變之該基因(惟，編碼 VH-CDR3 區的基因區除外)所編碼，此 FR4 區的胺基酸序列(Trp-Gly-Lys-Gly-Thr-Thr*-Val-Thr-Val-Ser-Ser)(序列編號 41)中的離胺酸(Lys)亦可置換為麩胺醯胺或天冬醯胺，及/或有 * 記號的蘇胺酸(Thr)置換為白胺酸或未置換。

[20] 如前項[2]~[19]中任一項記載的劑，其中，特異性地結合於 PD-1 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 之任一者的胺基酸序列、或與該 VH 的胺基酸序列至少 80%、90%、95%、98%或 99%相同之胺基酸序列所構成。

[21] 如前項[2]~[11]中任一項記載的劑，其中，特異性地結合於 PD-1 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 之任一者的胺基酸序列所構成。

[22] 如前項[2]~[21]中任一項記載的劑，其中，特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VH 係由選自序列編號 36 的胺基酸序列、或與該 VH 的胺基酸序列至少 80%、90%、95%、98%或 99%相同之胺基酸序列所構成。

[23] 如前項[2]~[21]中任一項記載的劑，其中，特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VH 係由序列編號 36 的胺基酸序列所構成。

[24] 如前項[2]~[6]中任一項記載的劑，其中，特異性地結合於 PD-1 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 之任一者的胺基酸序列所構成，特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VH 係由序列編號 36 的胺基酸序列所構成。

[25] 一種血液性癌症的預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療的劑，係包含具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂及特異性地結合於 CD3 之第二臂之雙特異性抗體或其抗體片段作為有效成分，

特異性地結合於 PD-1 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 之任一者的胺基酸序列、或與該 VH 的胺基酸序列至少 80%、90%、95%、98%或 99%相同之胺基酸序列所構成，

特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VH 係由序列編號 36 的胺基酸序列、或與該 VH 的胺基酸序列至少 80%、90%、95%、98%或 99%相同之胺基酸序列所構成。

[26] 如前項[2]~[7]中任一項記載的劑，其中，特異性地結合於 PD-1 之第一臂中 VH 係由序列編號 1 的胺基酸序列所構成，特異性地結合於 CD3 之第二臂中 VH 係由序列編號 36 的胺基酸序列所構成。

[27] 如前項[2]~[6]及[8]中任一項記載的劑，其中，特異性地結合於 PD-1 之第一臂中 VH 係由序列編號 2 的胺基酸序列所構成，特異性地結合於 CD3 之第二臂中 VH 係由序列編號 36 的胺基酸序列所構成。

[28] 如前項[2]~[6]及[9]中任一項記載的劑，其中，特異性地結合於 PD-1 之第一臂中 VH 係由序列編號 3 的胺基酸序列所構成，特異性地結合於 CD3 之第二臂中 VH 係由序列編號 36 的胺基酸序列所構成。

[29] 如前項[2]~[6]及[10]中任一項記載的劑，其中，特異性地結合於 PD-1 之第一臂中 VH 係由序列編號 4 的胺基酸序列所構成，特異性地結合於 CD3 之第二臂中 VH 係由序列編號 36 的胺基酸序列所構成。

[30] 如前項[2]~[6]及[11]中任一項記載的劑，其中，特異性地結合於 PD-1 之第一臂中 VH 係由序列編號 5 的胺基酸序列所構成，特異性地結合於 CD3 之第二臂中 VH 係由序列編號 36 的胺基酸序列所構成。

[31] 如前項[2]~[30]中任一項記載的劑，其中，該雙特異性抗體等之特異性地結合於 PD-1 之第一臂及/或特異性地結合於 CD3 之第二臂各別地具有：

具有(a) 由序列編號 26 的胺基酸序列所構成之輕鏈可變區的互補決定區 1(下文中，「輕鏈可變區的互補決定區 1」亦簡稱為 VL-CDR1)、

(b) 由序列編號 27 的胺基酸序列所構成之輕鏈可變區的互補決定區 2 (下文中，「輕鏈可變區的互補決定區 2」亦簡稱為 VL-CDR2)、及

(c) 由序列編號 28 的胺基酸序列所構成之輕鏈可變區的互補決定區 3 (下文中,「輕鏈可變區的互補決定區 3」亦簡稱為 VL-CDR3)的輕鏈可變區(下文中,「輕鏈可變區」亦簡稱為「VL」)。

[32] 如前項[2]~[30]中任一項記載的劑,其中,該雙特異性抗體等的特異性地結合於 PD-1 之第一臂及/或特異性地結合於 CD3 之第二臂各別地具有由序列編號 25 的胺基酸序列所構成之 VL。

[33] 一種血液性癌症的預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療的劑,係包含具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂及特異性地結合於 CD3 之第二臂之雙特異性抗體或其抗體片段作為有效成分,

(A) 特異性地結合於 PD-1 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 之任一者的胺基酸序列所構成之 VH 以及由序列編號 25 的胺基酸序列所構成之 VL, 以及

(B) 特異性地結合於 CD3 之第二臂係具有由序列編號 36 的胺基酸序列所構成之 VH 以及序列編號 25 的胺基酸序列所構成之 VL。

[34] 一種血液性癌症的預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療的劑,係包含具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂及特異性地結合於 CD3 之第二臂之雙特異性抗體或其抗體片段作為有效成分,該特異性地結合於 PD-1 之第一臂係與下述者為交叉競爭:(1)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 之任一者的胺基酸序列所構成之 VH 以及由序列編號 25 的胺基酸序列所構成之 VL, 且特異性地結合於 PD-1 的第一臂對於 PD-1 的結合,或(2)由該 VH 及 VL 所構成之特異性地結合 PD-1 之單株抗體的可變區對於 PD-1 的結合。

[35] 一種血液性癌症的預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療的劑，係包含具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂及特異性地結合於 CD3 之第二臂之雙特異性抗體或其抗體片段作為有效成分，經由該特異性地結合於 PD-1 之第一臂對於 PD-1 的結合係藉由下述者而交叉競爭：(1)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 之任一者的胺基酸序列所構成之 VH 以及由序列編號 25 的胺基酸序列所構成之 VL 之特異性地結合於 PD-1 之第一臂，或(2)由該 VH 及 VL 所構成之特異性地結合於 PD-1 之單株抗體的可變區。

[36] 如前項[34]或[35]記載的劑，其中，該特異性地結合於 CD3 之第二臂更與下述者為交叉競爭：(1)具有由序列編號 36 的胺基酸序列所構成之 VH 以及由序列編號 25 的胺基酸序列所構成之 VL 之特異性地結合於 CD3 之第二臂對於 CD3 的結合，或(2)由該 VH 及 VL 所構成之特異性地結合於 CD3 之單株抗體的可變區對於 CD3 的結合。

[37] 如前項[34]或[35]記載的劑，其中，特異性地結合於 CD3 之第二臂具有：

- 具有(a) 由序列編號 37 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、
- (b) 由序列編號 38 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及
- (c) 由序列編號 39 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3 之 VH。

[38] 如前項[34]或[35]記載的劑，其中，特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VH 係由序列編號 36 的胺基酸序列、或與該 VH 的胺基酸序列至少 80%、90%、95%、98%或 99%相同之胺基酸序列所構成。

[39] 如前項[34]或[35]記載的劑，其中，特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VH 係由序列編號 36 的胺基酸序列所構成。

[40] 如前項[34]、[35]及[37]~[39]中任一項記載的劑，其中，特異性地結合於 CD3 之第二臂係具有：

具有(a) 由序列編號 26 的胺基酸序列所構成之 VL-CDR1、

(b) 由序列編號 27 的胺基酸序列所構成之 VL-CDR2 及

(c) 由序列編號 28 的胺基酸序列所構成之 VL-CDR3 之 VL。

[41] 如前項[34]、[35]及[37]~[39]中任一項記載的劑，其中，特異性地結合於 CD3 之第二臂係具有序列編號 25 的胺基酸序列所構成之 VL。

[42] 如前項[2]~[41]中任一項記載的劑，其中，該雙特異性抗體係 IgG 抗體。

[43] 如前項[42]記載的劑，其中，前項[42]記載的 IgG 抗體係 IgG₁ 抗體或 IgG₄ 抗體。

[44] 如前項[42]記載的劑，其中，前項[42]記載的 IgG 抗體係 IgG₁ 抗體。

[45] 如前項[42]記載的劑，其中，前項[42]記載的 IgG 抗體係 IgG₄ 抗體。

[46] 如前項[44]記載的劑，其中，該 IgG₁ 抗體對於 Fc 受體的結合係消失或減弱。

[47] 如前項[44]記載的劑，其中，前項[44]記載的 IgG₁ 抗體中 2 個重鏈恆定區中的 EU 編號系統之第 235 號的白胺酸各別地被置換為甘胺酸，及/或第 236 號的甘胺酸各別地被置換為精胺酸。

[48] 如前項[44]、[46]或[47]記載的劑，其中，具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VH 之重鏈恆定區中依據 EU 編號系統之第 351 號的白胺酸及第 366 號的蘇胺酸均置換為離胺酸，具有特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VH 之重鏈恆定區中的第 351 號的白胺酸被置換為天冬胺酸，且第 368 號的白胺酸被置換為麩胺酸。

[49] 如前項[44]、[46]或[47]記載的劑，其中，具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VH 的重鏈恆定區中依據 EU 編號系統之第 351 號的白胺酸被置換為天冬胺酸，且第 368 號的白胺酸被置換為麩胺酸，具有特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VH 的重鏈恆定區中第 351 號的白胺酸及第 366 號的蘇胺酸均置換為離胺酸。

[50] 如前項[44]及[46]~[49]中任一項記載的劑，其中，前項[44]及[46]~[49]中任一項記載的 IgG₁ 抗體的 2 個重鏈恆定區中依據 EU 編號系統之第 447 號的離胺酸係各別地缺失。

[51] 如前項[42]~[50]中任一項記載的劑，其中，該 IgG 抗體對於新生兒 Fc 受體(下文中亦簡稱為「FcRn」)的結合係消失或減弱。

[52] 如前項[44]、[46]~[51]中任一項記載的劑，其中，該 IgG₁ 抗體中 2 個重鏈恆定區中各別地(1)EU 編號系統之第 252 號的甲硫胺酸被置換為麩胺酸、脯胺酸、精胺酸或天冬胺酸，(2)依據 EU 編號系統之第 434 號的天冬醯胺被置換為白胺酸、及/或(3)依據 EU 編號系統之第 438 號的麩胺醯胺被置換為麩胺酸。

[53] 如前項[44]、[46]~[52]中任一項記載的劑，其中，該 IgG₁ 抗體中 2 個重鏈恆定區中的 EU 編號系統中第 252 號的甲硫胺酸各別地被置換為天冬胺酸。

[54] 如前項[52]或[53]記載的劑，其中，前項[52]或[53]記載的 IgG₁ 抗體於血液中的半衰期，相比於該胺基酸未置換的抗體係縮短。

[55] 如前項[52]或[53]記載的劑，其中，前項[52]或[53]記載的 IgG₁ 抗體於血液中的半衰期、相比於該胺基酸未置換的抗體係縮短至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%或至少 90%。

[56] 如前項[45]記載的劑，其中，前項[45]記載的 IgG₄ 抗體中 2 個重鏈恆定區中依據 EU 編號系統之第 228 號的絲胺酸各別地被置換為脯胺酸。

[57] 如前項[2]~[42]、[44]、[46]、[47]及[49]~[55]中任一項記載的劑，其中，具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VH 的重鏈係包含由選自序列編號 23、序列編號 42、序列編號 43、序列編號 44、序列編號 45、序列編號 46 及序列編號 47 之任一者的胺基酸序列所構成之重鏈恆定區。

[58] 如前項[2]~[42]、[44]、[46]、[47]、[49]~[55]及[57]中任一項記載的劑，其中，具有特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VH 之重鏈係包含由選自序列編號 24、序列編號 48、序列編號 49、序列編號 50、序列編號 51、序列編號 52 及序列編號 53 之任一者的胺基酸序列所構成之重鏈恆定區。

[59] 如前項[2]~[58]中任一項記載的劑，其中，具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VL 的輕鏈及/或具有特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VL 的輕鏈係包含序列編號 29 的胺基酸序列所構成之輕鏈恆定區。

[60] 一種血液性癌症的預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療的劑，係包含具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂及特異性地結合於 CD3 之第二臂之雙特異性抗體或其抗體片段作為有效成分，

(A) 具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 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 任一者的胺基酸序列所構成之 VH，以及由選自序列編號 23、序列編號 42、序列編號 43、序列編號 44、序列編號 45、序列編號 46 及序列編號 47 之任一者的胺基酸序列所構成之重鏈恆定區，

(B) 具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VL 的輕鏈係包含由序列編號 25 的胺基酸序列所構成之 VL 及由序列編號 29 的胺基酸序列所構成之輕鏈恆定區，

(C) 具有特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VH 的重鏈係包含由選自序列編號 36 的胺基酸序列所構成之 VH 以及序列編號 24、序列編號 48、序列編號 49、序列編號 50、序列編號 51、序列編號 52 及序列編號 53 之一者的胺基酸序列所構成之重鏈恆定區，及

(D) 具有特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VL 的輕鏈係包含由序列編號 25 的胺基酸序列所構成之 VL 及由序列編號 29 的胺基酸序列所構成之輕鏈恆定區。

[61] 如前項[2]記載的劑，其中，該雙特異性抗體等之特異性地結合於 PD-1 之第一臂係包含抗 PD-1 抗體的 VH 及 VL，該雙特異性抗體等之特異性地結合於 CD3 之第二臂係包含抗 CD3 抗體的 VH 及 VL。

[62] 如前項[61]記載的劑，其中，該抗 PD-1 抗體選自納武單抗(Nivolumab)、西米普利單抗(Cemiplimab)、匹博利珠單抗(Pembrolizumab)、斯帕塔利單抗(Spartalizumab)、替雷利珠單抗(Tislelizumab)、多斯塔利單抗(Dostarlimab)、特瑞普利單抗(Toripalimab)、卡瑞利珠單抗(Camrelizumab)、杰諾單抗(Genolimzumab)、信替利單抗(Sintilimab)、洛達普利單抗(Lodapolimab)、瑞替弗利單抗(Retifanlimab)、巴斯替利單抗(Balstilimab)、斯普魯利單抗(Serplulimab)、布迪格利單抗(Budigalimab)、普洛格利單抗(Prolgolimab)、薩山利單抗(Sasanlimab)、西曲利單抗(Cetrelimab)、吉柏利單抗(Zimberelimab)、AMP-514、STI-A1110、ENUM 388D4、ENUM 244C8、GLS010、CS1003、BAT-1306、AK105、AK103、BI 754091、LZM009、CMAB819、Sym021、GB226、SSI-361、JY034、HX008、ISU106 及 CX-188 之任一者。

[63] 如前項[61]或[62]記載的劑，其中，該抗 CD3 抗體係選自佛拉魯單抗(Foralumab)、莫羅莫納單抗(Muromonab)-CD3、奧昔珠單抗(Otelixizumab)、替利珠單抗(Teplizumab)及維西珠單抗(Visilizumab)之任一者。

[64] 如前項[1]~[63]中任一項記載的劑，其中，PD-1 及 CD3 各別地為人 PD-1 及人 CD3。

[65] 如前項[1]~[64]中任一項記載的劑，其中，CD3 係 CD3 ϵ 。

[66] 如前項[2]~[65]中任一項記載的劑，其中，該雙特異性抗體係單株抗體。

[67] 如前項[2]~[66]中任一項記載的劑，其中，該雙特異性抗體係單離抗體。

[68] 如前項[1]記載的劑，其中，該雙特異性蛋白質係支架蛋白分子或修飾型肽。

[69] 如前項[68]記載的劑，其中，該支架蛋白分子係呈 Adnectin、Affibody(註冊商標)、Anticalin (註冊商標)、Avimer、DARPin、LRRP、Affilin(註冊商標)、Affitin 或 Fynomer 的形態，該修飾型肽係呈特殊環狀肽、Addbody(註冊商標)或 Mirabody(註冊商標)的形態。

[70] 如前項[1]~[69]中任一項記載的劑，其中，該雙特異性蛋白質或該雙特異性抗體或其抗體片段係各別特異性地結合於表現於標的細胞之血液性癌症的癌細胞之 PD-1 及表現於起效子細胞之淋巴球(例如，T 細胞淋巴球)之 CD3。

[71] 如前項[1]~[69]中任一項記載的劑，其中，該雙特異性蛋白質或該雙特異性抗體或其抗體片段係各別特異性地結合於表現於源自標的細胞之 T 細胞的癌細胞之 PD-1 及 CD3。

[72] 如前項[1]~[70]中任一項記載的劑，其中，特異性地結合於 PD-1 之第一臂係容許 PD-1 及 PD-L1 之間的相互作用。

[73] 如前項[1]~[72]中任一項記載的劑，其中，該血液性癌症係選自多發性骨髓瘤、惡性淋巴瘤、白血病、中樞神經系原發惡性淋巴瘤及骨髓增生症候群之 1 種以上的癌。

[74] 如前項[73]記載的劑，其中，該血液性癌症係惡性淋巴瘤，惡性淋巴瘤係非何金杰氏淋巴瘤或何金杰氏淋巴瘤。

[75] 如前項[74]記載的劑，其中，惡性淋巴瘤係非何金杰氏淋巴瘤，非何金杰氏淋巴瘤係 B 細胞性非何金杰氏淋巴瘤或 T/NK 細胞性非何金杰氏淋巴瘤。

[76] 如前項[75]記載的劑，其中，非何金杰氏淋巴瘤係 B 細胞性非何金杰氏淋巴瘤，B 細胞性非何金杰氏淋巴瘤係前驅 B 細胞淋巴母細胞淋巴瘤、前驅 B 細胞急性淋巴母細胞性白血病、慢性 B 淋巴性白血病、B 細胞幼淋巴球性白血病、淋巴漿細胞性淋巴瘤、結節邊緣區型 B-細胞淋巴瘤、結節外邊緣區型 B-細胞淋巴瘤、脾原發邊緣區 B 細胞性淋巴瘤、毛細胞白血病、毛細胞白血病-變體型、濾泡性淋巴瘤、兒童型濾泡性淋巴瘤、瀰漫性大細胞型 B 細胞性淋巴瘤、瀰漫性大細胞型 B 細胞淋巴瘤-非特定型、脾瀰漫性紅髓小 B 細胞淋巴瘤、淋巴漿細胞性淋巴瘤、原發性縱隔大細胞型 B 細胞性淋巴瘤、原發性滲出性淋巴瘤、伯奇氏淋巴瘤、套膜細胞淋巴瘤、單株 B 細胞淋巴球增多症、脾 B 細胞淋巴瘤/白血病-不能分類型、意義不明的單株珈瑪球蛋白血症-IgM 型、 μ 重鏈病、 λ 重鏈病、 α 重鏈病、漿細胞骨髓瘤、骨孤立性漿細胞瘤、骨外漿細胞瘤、單株免疫球蛋白沉積症、伴隨 IRF4 重排之大細胞型 B 細胞淋巴瘤、原發性皮膚濾泡中心淋巴瘤、富於 T 細胞/組織球之大細胞型 B 細胞淋巴瘤、原發性中樞神經系瀰漫性大細胞型 B 細胞淋巴瘤、原發性皮膚瀰漫性大細胞型 B 細胞淋巴瘤-下肢型、EBV 陽性瀰漫性大細胞型 B 細胞淋巴瘤-非特定型、EBV 陽性黏膜皮膚潰瘍、慢性炎症相關瀰漫性大細胞型 B 細胞淋巴瘤、類淋巴瘤肉芽腫症、血管內大細胞型 B 細胞淋巴瘤、ALK 陽性大細胞型 B 細胞淋巴瘤、漿母細胞淋巴瘤、原發性滲出液淋巴瘤、HHV8 陽性瀰漫性大細胞型 B 細胞淋巴

瘤-非特異型、伴隨 11q 異常的類伯奇氏淋巴瘤、伴隨 MYC 及 BCL2 與 BCL6 之二者或一者的重排的高度惡性 B 細胞淋巴瘤、伴隨高度惡性 B 細胞淋巴瘤-非特異型、或伴隨瀰漫性大細胞型 B 細胞淋巴瘤與典型何金杰氏淋巴瘤的中間特徵之 B 細胞淋巴瘤-不能分類型。

[77] 如前項[75]記載的劑，其中，非何金杰氏淋巴瘤係 T/NK 細胞性非何金杰氏淋巴瘤，T/NK 細胞性非何金杰氏淋巴瘤係前驅 T 細胞淋巴母細胞淋巴瘤、慢性 T 淋巴球性白血病、T 細胞急性淋巴性白血病(T 細胞淋巴母細胞白血病)、T 細胞型大顆粒淋巴球性白血病、大顆粒 NK 細胞性白血病、快速進行性 NK 細胞白血病、末梢性 T 細胞淋巴瘤、末梢性 T 細胞淋巴瘤-非特定型、不能分類末梢性 T 細胞淋巴瘤、血管免疫母細胞 T 細胞性淋巴瘤、未分化大細胞(CD30 陽性)淋巴瘤、血管中心性淋巴瘤、腸管 T 細胞性淋巴瘤、腸症型 T 細胞淋巴瘤、肝脾型 γ - δ T 細胞淋巴瘤、類皮下脂肪組織炎細胞淋巴瘤、蕈狀肉芽腫、塞札來(Sezary)症候群、類何金杰氏/何金杰氏相關未分化大細胞淋巴瘤、結節外 NK/T 細胞淋巴瘤、成人 T 細胞性淋巴瘤、T 細胞前淋巴球性白血病、慢性 NK 細胞淋巴增生異常症、兒童全身性 EBV 陽性 T 細胞淋巴瘤、類種痘類水疱症淋巴增生異常症、結節外 NK/T 細胞淋巴瘤/鼻型、腸症相關 T 細胞淋巴瘤、單形性趨上皮性腸管 T 細胞淋巴瘤、胃腸管和緩進行性 T 細胞淋巴增生異常症、肝脾 T 細胞淋巴瘤、原發性皮膚 CD30 陽性 T 細胞淋巴增生異常症、類淋巴瘤丘疹症、原發性皮膚未分化大細胞型淋巴瘤、原發性皮膚 γ δ T 細胞淋巴瘤、原發性皮膚 CD8 陽性快速進行性趨表皮性細胞傷害性 T 細胞淋巴瘤、原發性肢端皮膚型 CD8 陽性 T 細胞淋巴瘤、原發性皮膚 CD4 陽性小型/中型 T 細胞淋

巴增生性症、濾泡 T 細胞淋巴瘤、伴隨濾泡助手 T 細胞表現型的結節外周 T 細胞淋巴瘤、未分化大細胞淋巴瘤-ALK 陽性型、未分化大細胞淋巴瘤/ALK 陰性型、或乳房植入物相關間變性大細胞淋巴瘤。

[78] 如前項[74]記載的劑，其中，惡性淋巴瘤係何金杰氏淋巴瘤，何金杰氏淋巴瘤係典型何金杰氏淋巴瘤(例如，結節硬化型、混合細胞型、富於淋巴球型及淋巴球減少型)或結節性淋巴球優位型何金杰氏淋巴瘤。

[79] 如前項[73]記載的劑，其中，該血液性癌症係白血病，白血病係急性骨髓性白血病、急性前骨髓球性白血病、急性淋巴母細胞白血病、慢性淋巴性白血病、骨髓發育不良症候群或慢性骨髓性白血病。

[80] 如前項[1]~[79]中任一項記載的劑，其中，該血液性癌症係兒童的血液性癌症。

[81] 如前項[75]記載的劑，其中，非何金杰氏淋巴瘤係 T/NK 細胞性非何金杰氏淋巴瘤，T/NK 細胞性非何金杰氏淋巴瘤係末梢性 T 細胞淋巴瘤或成人 T 細胞性淋巴瘤。

[82] 如前項[1]~[81]中任一項記載的劑，其中，該血液性癌症係經由其他抗癌藥的治療效果不充分或不充足的血液性癌症。

[83] 如前項[1]~[82]中任一項記載的劑，其中，該血液性癌症係經由其他抗癌藥治療後惡化之血液性癌症。

[84] 如前項[1]~[81]中任一項記載的劑，其中，血液性癌症患者係無經由其他抗癌藥之治療病歷。

[85] 如前項[1]~[84]中任一項記載的劑，其中，該血液性癌症係復發性及/或難治性。

[86] 如前項[1]~[85]中任一項記載的劑，其進一步地與其他抗癌藥併用。

[87] 如前項[82]、[83]或[86]記載的劑，其中，該其他抗癌藥係自烷化劑、鉑製劑、代謝拮抗劑(例如，葉酸代謝拮抗藥、吡啶代謝阻礙藥、嘌呤代謝阻礙藥)、核糖核苷酸還原酶阻礙藥、核苷酸類似物、拓撲異構酶阻礙藥、微管聚合阻礙藥、微管脫聚合阻礙藥、抗腫瘤性抗生物質、細胞介素製劑、分子標的藥及癌免疫治療藥所選擇之一種以上之藥劑。

[88] 如前項[86]或[87]記載的劑，其係於前項[87]記載的其他抗癌藥之任何一種以上之藥劑投藥時投藥至患者。

[89] 如前項[86]或[87]記載的劑，其係於前項[87]記載的其他抗癌藥之任何一種以上之藥劑投藥後投藥至患者。

[90] 如前項[86]或[87]記載的劑，其係於前項[87]記載的其他抗癌藥之任何一種以上之藥劑投藥前投藥至患者。

[91] 如前項[1]~[85]中任一項記載的劑，其係與類固醇藥同時投藥。

[92] 如前項[1]~[85]中任一項記載的劑，其係於類固醇藥投藥後投藥。

[93] 靜脈內注射用之前項[1]~[85]中任一項記載的劑。

[94] 包含前項[1]~[72]之任一項所記載的雙特異性蛋白質或雙特異性抗體或其抗體片段作為有效成分之血液性癌症細胞增殖抑制劑。

[1-1] 包含將前項[1]~[72]之任一項所記載的雙特異性蛋白質或雙特異性抗體或其抗體片段的有效量投藥至患者之步驟之血液性癌症的預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療方法。

[2-1] 於血液性癌症的預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療中所使用之前項[1]~[72]之任一項所記載的雙特異性蛋白質或雙特異性抗體或其抗體片段。

[3-1] 於血液性癌症的預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療用之醫藥的製造中之前項[1]~[72]之任一項所記載的雙特異性蛋白質或雙特異性抗體或其抗體片段的使用。

[4-1] 包含具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂及特異性地結合於 CD3 之第二臂之雙特異性抗體或其抗體片段作為有效成分之醫藥組成物，其中，特異性地結合於 PD-1 之第一臂係包含：

選自下列(A)至(E)的任一 VH，

(A) 具有(a) 由序列編號 6 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、

(b) 由序列編號 7 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及

(c) 由序列編號 8 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3 之 VH，

(B) 具有(a) 由序列編號 9 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、

(b) 由序列編號 10 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及

(c) 由序列編號 11 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3 之 VH，

(C) 具有(a) 由序列編號 12 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、

(b) 由序列編號 13 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及

(c) 由序列編號 14 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3 之 VH，

(D) 具有(a) 由序列編號 15 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、

(b) 由序列編號 16 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及

(c) 由序列編號 17 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3 之 VH，以及

- (E) 具有(a) 由序列編號 18 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、
 - (b) 由序列編號 19 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及
 - (c) 由序列編號 20 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3 之 VH，以及
 - (F) 具有(a) 由序列編號 26 的胺基酸序列所構成之 VL-CDR1、
 - (b) 由序列編號 27 的胺基酸序列所構成之 VL-CDR2 及
 - (c) 由序列編號 28 的胺基酸序列所構成之 VL-CDR3 之 VL；
- 特異性地結合於 CD3 之第二臂係包含：

- (A) 具有(a) 由序列編號 37 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、
- (b) 由序列編號 38 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及
- (c) 由序列編號 39 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3 之 VH，以及
- (B) 具有(a) 由序列編號 26 的胺基酸序列所構成之 VL-CDR1、
- (b) 由序列編號 27 的胺基酸序列所構成之 VL-CDR2 及
- (c) 由序列編號 28 的胺基酸序列所構成之 VL-CDR3 之 VL。

[4-2] 如前項[4-1]記載的醫藥組成物，其中，(i) 特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VH 係具有

- (a) 由序列編號 6 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、
- (b) 由序列編號 7 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及
- (c) 由序列編號 8 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3，
- (ii) 特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VH 係具有
- (a) 由序列編號 37 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、
- (b) 由序列編號 38 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及
- (c) 由序列編號 39 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3。

[4-3] 如前項[4-1]記載的醫藥組成物，其中，(i) 特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VH 係具有

- (a) 由序列編號 9 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、
- (b) 由序列編號 10 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及
- (c) 由序列編號 11 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3，
- (ii) 特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VH 係具有
- (a) 由序列編號 37 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、
- (b) 由序列編號 38 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及
- (c) 由序列編號 39 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3。

[4-4] 如前項[4-1]記載的醫藥組成物，其中，(i) 特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VH 係具有

- (a) 由序列編號 12 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、
- (b) 由序列編號 13 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及
- (c) 由序列編號 14 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3，
- (ii) 特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VH 係具有
- (a) 由序列編號 37 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、
- (b) 由序列編號 38 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及
- (c) 由序列編號 39 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3。

[4-5] 如前項[4-1]記載的醫藥組成物，其中，(i) 特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VH 係具有

- (a) 由序列編號 15 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、
- (b) 由序列編號 16 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及

- (c) 由序列編號 17 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3，
- (ii) 特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VH 係具有
 - (a) 由序列編號 37 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、
 - (b) 由序列編號 38 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及
 - (c) 由序列編號 39 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3。

[4-6] 如前項[4-1]記載的醫藥組成物，其中，(i) 特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VH 係具有

- (a) 由序列編號 18 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、
- (b) 由序列編號 19 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及
- (c) 由序列編號 20 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3，
- (ii) 特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VH 係具有
 - (a) 由序列編號 37 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、
 - (b) 由序列編號 38 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及
 - (c) 由序列編號 39 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3。

[4-7] 如前項[4-1]記載的醫藥組成物，其中，特異性地結合於 PD-1 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 之任一者的胺基酸序列所構成，特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VH 係由序列編號 36 的胺基酸序列所構成。

[4-8] 如前項[4-1]或[4-2]記載的醫藥組成物，其中，特異性地結合於 PD-1 之第一臂中之 VH 係由序列編號 1 的胺基酸序列所構成，特異性地結合於 CD3 之第二臂中之 VH 係由序列編號 36 的胺基酸序列所構成。

[4-9] 如前項[4-1]或[4-3]記載的醫藥組成物，其中，特異性地結合於 PD-1 之第一臂中之 VH 係由序列編號 2 的胺基酸序列所構成，特異性地結合於 CD3 之第二臂中之 VH 係由序列編號 36 的胺基酸序列所構成。

[4-10] 如前項[4-1]或[4-4]記載的醫藥組成物，其中，特異性地結合於 PD-1 之第一臂中之 VH 係由序列編號 3 的胺基酸序列所構成，特異性地結合於 CD3 之第二臂中之 VH 係由序列編號 36 的胺基酸序列所構成。

[4-11] 如前項[4-1]或[4-5]記載的醫藥組成物，其中，特異性地結合於 PD-1 之第一臂中之 VH 係由序列編號 4 的胺基酸序列所構成，特異性地結合於 CD3 之第二臂中之 VH 係由序列編號 36 的胺基酸序列所構成。

[4-12] 如前項[4-1]或[4-6]記載的醫藥組成物，其中，特異性地結合於 PD-1 之第一臂中之 VH 係由序列編號 5 的胺基酸序列所構成，特異性地結合於 CD3 之第二臂中之 VH 係由序列編號 36 的胺基酸序列所構成。

[4-13] 如前項[4-1]~[4-12]中任一項記載的醫藥組成物，其中，特異性地結合於 PD-1 之第一臂及/或特異性地結合於 CD3 之第二臂係各別地具有由序列編號 25 的胺基酸序列所構成之 VL。

[4-14] 包含具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂及特異性地結合於 CD3 之第二臂之雙特異性抗體或其抗體片段作為有效成分之醫藥組成物為：

(A) 具有特異性地結合於 PD-1 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 之任一者的胺基酸序列所構成之 VH 以及由序列編號 25 的胺基酸序列所構成之 VL，以及

(B) 具有特異性地結合於 CD3 之第二臂係具有由序列編號 36 的胺基酸序列所構成之 VH 以及由序列編號 25 的胺基酸序列所構成之 VL。

[4-15] 如前項[4-1]~[4-14]中任一項記載的醫藥組成物，其中，該雙特異性抗體係 IgG 抗體。

[4-16] 如前項[4-15]記載的醫藥組成物，其中，該 IgG 抗體係 IgG₁ 抗體。

[4-17] 如前項[4-16]記載的醫藥組成物，其中，該 IgG₁ 抗體對 Fc 受體的結合消失或經減弱。

[4-18] 如前項[4-16]記載的醫藥組成物，其中，該 IgG₁ 抗體的 2 個重鏈恆定區中的 EU 編號系統之第 235 號的白胺酸各別地被置換為甘胺酸，及/或第 236 號的甘胺酸告別地置換為精胺酸。

[4-19] 如前項[4-16]~[4-18]中任一項記載的醫藥組成物，其中，具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VH 之重鏈的恆定區中依據 EU 編號系統之第 351 號的白胺酸被置換為離胺酸，且第 366 號的蘇胺酸被置換為離胺酸，具有特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VH 之重鏈的恆定區中第 351 號的白胺酸被置換為天冬胺酸，且第 368 號的白胺酸被置換為麩胺酸。

[4-20] 如前項[4-16]~[4-18]中任一項記載的醫藥組成物，其中，具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VH 之重鏈的恆定區中依據 EU 編號系統之第 351 號的白胺酸被置換為天冬胺酸，且第 368 號的白胺酸被置換為麩胺酸，具有特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VH 之重鏈的恆定區中第 351 號的白胺酸被置換為離胺酸，且第 366 號的蘇胺酸被置換為離胺酸。

[4-21] 如前項[4-16]~[4-20]中任一項記載的醫藥組成物，其中，該 IgG₁ 抗體的 2 個重鏈恆定區中依據 EU 編號系統之第 447 號的離胺酸係各別地缺失。

[4-22] 如前項[4-1]~[4-16]中任一項記載的醫藥組成物，其中，具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VH 之重鏈係包含序列編號 23 的胺基酸序列所構成之重鏈恆定區。

[4-23] 如前項[4-1]~[4-16]及[4-22]中任一項記載的醫藥組成物，其中，具有特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VH 之重鏈係包含序列編號 24 的胺基酸序列所構成之重鏈恆定區。

[4-24] 如前項[4-1]~[4-23]中任一項記載的醫藥組成物，其中，具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VL 之輕鏈及/或具有特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VL 之輕鏈係包含序列編號 29 的胺基酸序列所構成之輕鏈恆定區。

[4-25] 包含具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂及特異性地結合於 CD3 之第二臂之雙特異性抗體或其抗體片段作為有效成分之醫藥組成物，其中，

(A) 具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VH 之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 之任一者的胺基酸序列所構成之 VH 以及由序列編號 23 的胺基酸序列所構成之重鏈恆定區，

(B) 具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VL 之輕鏈係包含由序列編號 25 的胺基酸序列所構成之 VL 及由序列編號 29 的胺基酸序列所構成之輕鏈恆定區，

(C) 具有特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VH 之重鏈係包含由序列編號 36 的胺基酸序列所構成之 VH 以及由序列編號 24 的胺基酸序列所構成之重鏈恆定區，及

(D) 具有特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VL 之輕鏈係包含由序列編號 25 的胺基酸序列所構成之 VL 及由序列編號 29 的胺基酸序列所構成之輕鏈恆定區。

[4-26] 如前項[4-1]~[4-25]中任一項記載的醫藥組成物，其進一步地包含藥學上容許之載體。

[發明的功效]

【0009】 本發明之 PD-1/CD3 雙特異性蛋白質(較佳為 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段)可期待血液性癌症的預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療的功效。

【圖式簡單說明】

【0010】

圖 1 係顯示共通輕鏈的 VL 及恆定區的胺基酸序列。

圖 2 係顯示共通輕鏈的 VL 之各 CDR 的胺基酸序列。

圖 3 係顯示由生殖細胞系列型 V 基因 IGHV7-4-1 及 IGHV3-33 各別所編碼的胺基酸序列。

圖 4 係顯示特異性地結合於 PD-1 之抗體(下文中亦簡稱為抗 PD-1 抗體)各純株的 VH、生殖細胞系列型基因 IGHV7-4-1 及 JH6c 的序列對準。圖中，各純株的胺基酸序列中的“-”表示與對應的生殖細胞系列型基因 IGHV7-4-1 或者 JH6c 的胺基酸序列為相同的胺基酸，胺基酸的簡稱所記載的部份表示與同生殖細胞系列型基因的胺基酸序列為相異的胺基酸。

圖 5 係顯示抗 PD-1 抗體各純株的 VH 的胺基酸序列。

圖 6 係顯示抗 PD-1 抗體各純株的 VH 中的各 CDR 的胺基酸序列。

圖 7 係顯示特異性地結合於 CD3 之抗體(下文中，亦簡稱為抗 CD3 抗體)純株 CD3-2 的 VH 的胺基酸序列。

圖 8 係顯示抗 CD3 抗體純株 CD3-2 的 VH 中的各 CDR 的胺基酸序列。

圖 9 係顯示 PD-1/CD3 雙特異性單株抗體的各重鏈恆定區的胺基酸序列。

圖 10 係顯示 WO2005/118635 所記載之抗 CD3 抗體純株 15C3 的 VH 的胺基酸序列。又，以下底線標示的胺基酸係表示純株 CD3-1 的製作中經變換為丙胺酸之第 55 號的甘胺酸。

圖 11 係顯示 PD-1/CD3 雙特異性單株抗體各純株對於 PD-1 及 CD3 之結合活性之各別地經確認的 Biacore(註冊商標)測定結果。

圖 12 係顯示 PD-1/CD3 雙特異性單株抗體各純株對於 PD-1 及 CD3 的同時結合性之經確認的流式細胞分析術。

圖 13 係顯示 PD-1/CD3 雙特異性單株抗體各純株對於 PD-1/PD-L1 相互作用影響經確認之流式細胞分析術。

圖 14 係顯示 PD-1/CD3 雙特異性單株抗體各純株對 PD-1 的結合之 PD1-5(Bi)的交叉競爭性。

圖 15 係顯示 PD-1/CD3 雙特異性單株抗體純株 PD1-5(Bi)(0.01~1000ng/mL)對於 B 細胞淋巴瘤細胞株 EB-1(圖中 A)及人 PD-1 強制表現 SU-DHL-4(圖中 B)之細胞增殖抑制作用。

圖 16 係顯示 PD-1/CD3 雙特異性單株抗體純株 PD1-5(Bi)(0.01~1000ng/mL)對於多發性骨髓腫細胞株 RPMI8226 之細胞增殖抑制作用。

圖 17 係顯示 PD-1/CD3 雙特異性單株抗體純株 PD1-5(Bi)(0.1~1000ng/mL)對於成人 T 細胞性淋巴瘤細胞株 ILT-Mat 之細胞增殖抑制作用。

圖 18 係顯示 PD-1/CD3 雙特異性單株抗體純株 PD1-5(Bi)(0.1~1000ng/mL)對於人 PD-1 強制表現 Jurkat(急性 T 細胞性白血病細胞株)之細胞增殖抑制作用。

圖 19 係顯示 PD-1/CD3 雙特異性單株抗體純株 PD1-5(Bi)及 Mut1~Mut3 之人 FcRn 結合性，進行 Biacore(註冊商標)評價的結果。

圖 20 係顯示 PD-1/CD3 雙特異性單株抗體純株 Mut4~Mut6 之人 FcRn 結合性，進行 Biacore(註冊商標)評價的結果。

圖 21 係顯示 PD-1/CD3 雙特異性單株抗體純株 PD1-5(Bi)、Mut1 及 Mut4 之小鼠 FcRn 結合性，進行 Biacore(註冊商標)評價的結果。

圖 22 係顯示 PD-1/CD3 雙特異性單株抗體純株 PD1-5(Bi)(0.1~1000ng/mL)對於 T 細胞急性淋巴性白血病細胞株 HPB-ALL 之細胞增殖抑制作用。

圖 23 係顯示標的細胞的 PD-1 分子數，與 PD-1/CD3 雙特異性單株抗體純株 PD1-5(Bi)存在下之對於來自人末梢血 T 細胞之標的細胞(人 PD-1 強制表現 SU-DHL-4、EB-1 及 RPMI8226)之細胞傷害活性(EC50(ng/mL))的關係。

【實施方式】

【0011】 PD-1(Programmed Cell Death-1)，於人類中，係由 GenBank 登記編號 NP_005009 表示之胺基酸序列所構成之膜型蛋白質。本說明書中記載為「PD-1」的情況，並無特別限定，亦有包含作為其全部同功型、及本發明之「特異性地結合於 PD-1 之第一臂」的抗原決定基受到保存之其等之變異體者而使用的情況。本發明中，作為 PD-1，較佳地為人 PD-1。

【0012】 CD3 係與 T 細胞受體會合而形成 T 細胞受體複合體的膜型蛋白質。本說明書中記載為「CD3」的情況，並無特別限定，亦有包含其亞型(ϵ 、 δ 、 γ 及 ζ 亞型)、及本發明之「特異性地結合於 CD3 之第二臂」的抗原決定基受到保存之其等之變異體者而使用的情況。本發明中，作為 CD3，較佳為 CD3 ϵ ，再者，人 CD3，更佳為人 CD3 ϵ 。

【0013】 本說明書中「單離」意指由宿主細胞所抽取，由複數至無數的成分所包含的夾雜物中經由鑑定、分離及/或精製，成為實質上單一的純粹成分。

【0014】 本說明書中，「雙特異性蛋白質」意指一分子中對於二種不同的抗原分子或者抗原決定基具備持有結合特異性的蛋白質，以具有該結合特異性為限，其形態可為任一者，例如，可列舉雙特異性抗體及其抗體

片段、支架蛋白分子(參照 Current Opinion in Biotechnology (2006), Vol. 17, No. 6, p.653-658、Current Opinion in Biotechnology (2007), Vol. 18, p.1-10、Current Opinion in Structural Biology (1997), Vol. 7, p.463-469 或 Protein Science (2006), Vol. 15, p.14-27)及修飾型肽(例如，特殊環狀肽(J. Synth. Org. Chem., Jpn. (2017), Vol.75, No.11, p.1171-1178)、Addbody(註冊商標)及 Mirabody(註冊商標)等等，但不限定為該等。再者，作為此種支架蛋白分子的例，例如，可列舉 Adnectin(參照 WO2001/64942)、Affibody(註冊商標)(參照 WO95/19374 及 WO2000/63243)、Anticalin(註冊商標)(參照 WO99/16873)、Avimer(參照 Nature Biotechnology (2005), Vol. 23, p.1556-1561)、DARPin(參照 Nature Biotechnology (2004), Vol. 22, p.575-582)、LRRP(Nature (參照 2004), Vol. 430, No. 6996, p.174-180)、Affilin(註冊商標)(參照 WO2001/04144 及 WO2004/106368)、Affitin 參照(Journal of molecular biology (2008), Vol. 383, No. 5, p.1058-1068)及 Fynomer(WO2011/023685)等，但不限定為該等。

【0015】 本說明書中「單株抗體」意指由對於相同的特定抗原結合，實質上均一的抗體集團所獲得之抗體。

【0016】 本說明書中「雙特異性抗體」意指一分子中對於二種不同的抗原分子或者抗原決定基具備持有結合特異性的抗體，「雙特異性單株抗體」意指進一步地由實質上均一的抗體集團所獲得之雙特異性抗體。

【0017】 本發明係關於可各別地特異性地結合於 PD-1 及 CD3 的雙特異性蛋白質(本說明書中，亦簡稱為 PD-1/CD3 雙特異性蛋白質)。本

發明中，作為 PD-1/CD3 雙特異性蛋白質，較佳地為 PD-1/CD3 雙特異性抗體及其抗體片段，再者，作為 PD-1/CD3 雙特異性抗體，較佳地為 PD-1/CD3 雙特異性單株抗體，更佳地為單離 PD-1/CD3 雙特異性單株抗體，進一步較佳地為單離人 PD-1/人 CD3 雙特異性單株抗體。此處，「單離人 PD-1/人 CD3 雙特異性單株抗體」意指對於人 PD-1 與人 CD3，為經單離的雙特異性單株抗體。

【0018】此處，雙特異性抗體的型態，例如有二價抗體、雙特異性 $sc(Fv)_2$ 、雙特異性迷你抗體、雙特異性 $F(ab')_2$ 、雙特異性雜合抗體、共有結合型二價抗體(雙特異性 DART)、雙特異性 $(FvCys)_2$ 、雙特異性 $F(ab'-拉鍊)_2$ 、雙特異性 $(Fv-拉鍊)_2$ 、雙特異性三鏈抗體及雙特異性 mAb^2 等。

【0019】二價抗體為辨識不同抗原的 VH 、 VL 彼此以肽連接子連結之單鏈肽的二聚體 (參照 Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993), Vol. 90, No.14: p.6444-6448)。

【0020】雙特異性 $sc(Fv)_2$ 為以辨識不同抗原的 2 種抗體的 2 組 VH/VL 經由肽連接子接續之單鏈型態所產生之經改變的低分子化抗體(參照 J. Biological Chemistry (1994), Vol. 269: p.199-206)。

【0021】雙特異性 $F(ab')_2$ 係辨識不同 2 種抗原的抗體的 Fab' 片段，藉由雙硫鍵等共價結合之低分子化抗體。

【0022】雙特異性迷你抗體為辨識各別不同的抗原之 $scFv$ 中，抗體的恆定區 $CH3$ 域所連結之經改變的低分子抗體片段，藉由其 $CH3$ 域上的雙硫鍵等共價結合的低分子化抗體(參照 Biochemistry (1992), Vo.31, No.6, p.1579-1584)。

【0023】 雙特異性雜合抗體為辨識不同的 2 種抗原的抗體的重鏈/輕鏈複合體係藉由雙硫鍵等共價結合之完整抗體。

【0024】 本發明中，作為較佳的雙特異性抗體的形態為雙特異性雜合抗體。

【0025】 雙特異性雜合抗體，例如，可由以雜合融合瘤法(參照 US4474893)所製作的融合瘤產生。再者，可將各別地編碼辨識不同抗原的抗體的重鏈及輕鏈之合計 4 種類的 cDNA 於哺乳動物細胞使其共表現及分泌而製造。

【0026】 本發明中所使用的單株抗體可以融合瘤法(例如，參照 Kohler 及 Milstein 等人，Natur (1975)，Vol. 256, p.495-97；Hongo 等人，Hybridoma (1995), Vol. 14, No. 3, p.253-260；Harlow 等人，Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988), Vol. 2)及 Hammerling 等人，Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, p.563-681(Elsevier, N.Y., 1981))、重組 DNA 法(例如，參照 US4816567)、噬菌體展示方法(例如，參照 Ladner 等人之 US5223409、US5403484 及 US5571698、Dower 等人之 US5427908 及 US5580717、McCafferty 等人之 US5969108 及 US6172197 及 Griffiths 等人之 US5885793、US6521404、US6544731、US6555313、US6582915 及 US6593081)製作。

【0027】 抗體或者單株抗體，投藥至人的情況，為了使其抗原性減低或者消失，可以嵌合抗體、人源化抗體或者完全人型抗體的型態製作。

【0028】「嵌合抗體」意指可變區序列與恆定區序列係源自各別的哺乳動物的抗體，例如，可變區序列係源自小鼠抗體、恆定區序列係源自人抗體者。嵌合抗體可由以上述的融合瘤法、重組 DNA 法或者噬菌體展示方法所單離的單離抗體產生融合瘤，將經由習知的手法所單離之編碼抗體可變區的基因，與使用習知方法，連結於編碼源自人的抗體恆定區的基因而製作(例如，參照 Cabilly 等人之 US4816567)。

【0029】「人源化抗體」意指將源自於小鼠方式之別的哺乳動物的生殖細胞型的互補決定區(CDR)序列，移植至人框架序列上的抗體。人源化抗體的情況，可由以上述方法所單離之抗體產生融合瘤，將經由習知手法所單離的編碼抗體 CDR 區的基因，使用習知方法，連結於編碼源自人的抗體框架區的基因而製作(例如，參照 Winter 之 US5225539 及 US5530101、Queen 等人之 US5585089 號及 US6180370)。

【0030】「人抗體」或「完全人型抗體」意指由框架區及 CDR 區所構成之可變區以及恆定區二者皆為源自人生殖細胞型免疫球蛋白序列的抗體。本發明中所使用之人抗體，可將產生人抗體之經形質轉化的小鼠、例如，使用 Humab 小鼠(例如，參照 Lonberg 及 Kay 等人之 US5545806、US5569825、US5625126、US5633425、US5789650、US5877397、US5661016、US5814318、US5874299 及 US5770429)、KM 小鼠(例如，參照 Ishida 等人之 WO2002/43478)、Xeno 小鼠(例如，參照 US5939598、US6075181、US6114598、US6150584 及 US6162963)或 Tc 小鼠(例如，參照 Tomizuka 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000), p.722-727)的方法製作。再者，如同因免疫所引起的人抗體應答，亦可使用人免疫細胞經

再構築的 SCID 小鼠(例如,參照 Wilson 等人之 US5476996 及 US5698767)調製。再者,本發明中所使用之人抗體,亦可以上述噬菌體展示方法製作。

【0031】 本說明書中,PD-1/CD3 雙特異性抗體的「抗體片段」為全長抗體的一部分,具有對於 PD-1 的抗原結合部分及對於 CD3 的抗原結合部分的抗體,例如,可列舉 F(ab')₂ 等。此處,抗原結合部分意指抗體可結合於其抗原的最少單位,例如,經由 VH 及 VL 之每種各別 3 種 CDR 及該等之 CDR 組合而配置可辨識目的抗原的 CDR 的框架區所構成。

【0032】 本說明書中,「共通輕鏈」意指與不同的 2 種以上的重鏈會合,獲得顯示對於各別抗原的結合能力的輕鏈(De Wildt RM 等人, J. Mol. Biol. (1999), Vol. 285, p.895-901、De Kruif 等人, J. Mol. Biol. (2009), Vol. 387, p.548-58、WO2004/009618、WO2009/157771 及 WO2014/051433)。作為此種輕鏈,較佳地,例如,為人 κ 輕鏈 IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01 (根據 IMGT 數據庫的命名法)生殖細胞系列型基因所編碼的輕鏈(下文中,亦簡稱為 IGVK1-39/JK1 共通輕鏈),更佳地,例如,具有包含序列編號 26 的胺基酸序列所構成之 VL-CDR1、序列編號 27 的胺基酸序列所構成之 VL-CDR2 及序列編號 28 的胺基酸序列所構成之 VL-CDR3 的 VL 之該輕鏈,再較佳地,例如,具有序列編號 25 的胺基酸序列所構成之 VL 之該輕鏈。再者,作為共通輕鏈的恆定區,較佳地,可列舉序列編號 29 的胺基酸序列所構成之輕鏈恆定區。本發明中所使用之共通輕鏈的 VL 及恆定區之各別的胺基酸序列示於圖 1,其可變區之各 CDR 的胺基酸序列示於圖 2。

【0033】 本說明書中「同功型」,係使用於作為指稱由重鏈恆定區基因所編碼的抗體類別(例如, IgM 或 IgG)者。作為本發明之 PD-1/CD3 雙特

異性抗體的較佳同功型為 IgG，更佳為 IgG₁ 或 IgG₄。此處，作為 IgG₁，較佳為對 Fc 受體(例如，Fcγ 受體)的結合消失或者經減弱者。具體而言，為藉由其重鏈恆定區的任意胺基酸予以置換、缺失或者插入，可獲得對 Fc 受體的結合消失或者經減弱的 IgG₁ 抗體。例如，可列舉雙特異性抗體之各別的 2 種重鏈恆定區或者絞鍊區上，依據 EU 編號系統之第 235 號的白胺酸被置換為甘胺酸、及/或第 236 號的甘胺酸被置換為精胺酸的抗體。再者，為了使抗體的不均一性減低，較佳於 C 末端的胺基酸、例如，依據 EU 編號系統之第 447 號的離胺酸經缺失的抗體。再者，為了使血液中的半衰期縮短，特佳為對 FcRn 受體的結合消失或者經減弱者。具體地，經由重鏈恆定區中屬於 FcRn 受體結合部位的胺基酸的置換或缺失可使對於相同受體的結合消失或減弱，但於 IgG₁ 抗體的情況，作為此種抗體，可列舉(1)依據 EU 編號系統之第 252 號的甲硫胺酸被置換為麩胺酸、脯胺酸、精胺酸或天冬胺酸、(2)依據 EU 編號系統之第 434 號的天冬醯胺被置換為白胺酸、及/或(3)依據 EU 編號系統之第 438 號的麩胺醯胺被置換為麩胺酸之各別地經置患者。另一方面，雙特異性抗體為 IgG₄ 的情況，於抗體分子內以抑制交換的方式，其重鏈恆定區的任意胺基酸置換、缺失或者插入之變異體為更佳。例如，較佳為位於絞鍊區，依據 EU 編號系統之第 228 號的絲胺酸被置換為脯胺酸的抗體。又，本說明書中，於抗體的可變區的 CDR 與框架所指定的胺基酸位置有遵循 Kabat 規定的情況(參照 Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institute of Health, Bethesda, Md., (1987)及(1991))。再者，恆定區的胺基酸係表示以 Kabat 的胺基酸位置為

準之 EU 編號系統(參照 Sequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No. 91-3242)。

【0034】 本發明之 PD-1/CD3 雙特異性抗體的 Fc 區，亦可使該區的任意胺基酸置換，使得二種不同的重鏈容易會合。作為較佳態樣，例如，可列舉具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VH 之重鏈上的恆定區依據 EU 編號系統之第 351 號的白胺酸被置換為離胺酸、且第 366 號的蘇胺酸被置換為離胺酸，具有特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VH 之重鏈的恆定區中的第 351 號的白胺酸被置換為天冬胺酸、且第 368 號的白胺酸被置換為麩胺酸之 PD-1/CD3 雙特異性抗體。再者，亦可列舉具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VH 之重鏈的恆定區中依據 EU 編號系統之第 351 號的白胺酸被置換為天冬胺酸、且第 368 號的白胺酸被置換為麩胺酸、具有特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VH 之重鏈的恆定區中的第 351 號的白胺酸被置換為離胺酸、且第 366 號的蘇胺酸被置換為離胺酸之 PD-1/CD3 雙特異性抗體。

【0035】 特異性地結合於 PD-1 之第一臂

本說明書中，「特異性地結合於 PD-1 之第一臂」(下文中，亦簡稱為「第一臂」)意指，無論是本發明之雙特異性蛋白質的一部分，或者作為自體單體存在，為特異性地結合於 PD-1 之蛋白質，該雙特異性蛋白質為雙特異性抗體的情況，則該第一臂無論是否包含於抗體或者抗體片段的一部分，或者不為一部分而作為自體單體存在，係至少包含特異性地結合於 PD-1 之抗體(下文中，亦簡稱為抗 PD-1 抗體)的 VH 及 VL，而可特異性地結合於 PD-1 之抗體部分。例如，於此種第一臂，亦包含由構成抗 PD-1 抗體的抗

原結合部位之 VH 及 VL 所構成之抗體的 Fv 部、包含該 VH 及 VL 之抗體的 Fab' 部及 Fab 部。此處，「特異性地結合於 PD-1」，可為對於 PD-1 具有至少 $1 \times 10^{-5} \text{M}$ ，較佳 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ ，更佳 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 為更高的親和性(解離定數(Kd 值))的結合活性直接結合，至少，使用作為實質上不結合於 CD28、CTLA-4 及 ICOS 等之所謂屬於 CD28 家族受體以外的受體成員的特徵。再者，「特異性地結合於 PD-1 之抗體」或者「抗 PD-1 抗體」中之「抗體」雖意指全長抗體，亦即以雙硫鍵連結的 2 種重鏈及 2 種輕鏈所構成之完全長抗體，較佳地為其單株抗體。

【0036】此處，「特異性地結合於 PD-1 之第一臂」係構成抗體部分的情況，作為其較佳態樣，例如，可列舉具有下述 VH 者，

(a) 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)，此處， J^1 表示的字母或其他的字母表示的為各別胺基酸的單一字母簡稱]所構成之 VH-CDR1、

(b) $\text{WJ}^2\text{NTNTU}^2\text{NPTX}^2\text{AQGFTG}$ 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)，此處， J^2 、 U^2 及 X^2 各自所表示的字母或其他的字母，係表示與上述各別為相同意義。]所構成之 VH-CDR2、以及

(c) $\text{GDJ}^3\text{VVPTTIWNYYU}^3\text{X}^3\text{MZ}^3\text{V}$ 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)，此處， J^3 、 U^3 、 X^3 及 Z^3 各自所表示的字母或其他的字母，係表示與上述各別為相同

意義。]所構成之 VH-CDR3。此處，作為較佳的「特異性地結合於 PD-1 之第一臂」的態樣例如，可列舉具有下述 VH 者，

(1a) 具有其 VH-CDR1 之 HYJ^1LH 序列中的 J^1 表示 G(甘胺酸)，其 VH-CDR2 之 $\text{WJ}^2\text{NTNTU}^2\text{NPTX}^2\text{AQGFTG}$ 序列中各別地 J^2 表示 L(白胺酸)、 U^2 表示 E(麩胺酸)、 X^2 表示 F(苯丙胺酸)，其 VH-CDR3 之 $\text{GDJ}^3\text{VVPTTIWNYYU}^3\text{X}^3\text{MZ}^3\text{V}$ 序列中各別地 J^3 表示 M(甲硫胺酸)、 U^3 表示 H(組胺酸)、 X^3 表示 F(苯丙胺酸)、 Z^3 表示 D(天冬胺酸)之各別 VH-CDR 的 VH，

(2a) 具有其 VH-CDR1 之 HYJ^1LH 序列中的 J^1 表示 G(甘胺酸)，其 VH-CDR2 之 $\text{WJ}^2\text{NTNTU}^2\text{NPTX}^2\text{AQGFTG}$ 序列中各別地 J^2 表示 I(異白胺酸)、 U^2 表示 G(甘胺酸)、 X^2 表示 Y(酪胺酸)，其 VH-CDR3 之 $\text{GDJ}^3\text{VVPTTIWNYYU}^3\text{X}^3\text{MZ}^3\text{V}$ 序列中各別地 J^3 表示 L(白胺酸)、 U^3 表示 H(組胺酸)、 X^3 表示 Y(酪胺酸)、 Z^3 表示 E(麩胺酸)之各別 VH-CDR 的 VH，

(3a) 具有其 VH-CDR1 之 HYJ^1LH 序列中的 J^1 表示 A(丙胺酸)，其 VH-CDR2 之 $\text{WJ}^2\text{NTNTU}^2\text{NPTX}^2\text{AQGFTG}$ 序列中各別地 J^2 表示 L(白胺酸)、 U^2 表示 E(麩胺酸)、 X^2 表示 Y(酪胺酸)，其 VH-CDR3 之 $\text{GDJ}^3\text{VVPTTIWNYYU}^3\text{X}^3\text{MZ}^3\text{V}$ 序列中各別地 J^3 表示 M(甲硫胺酸)、 U^3 表示 Y(酪胺酸)、 X^3 表示 Y(酪胺酸)、 Z^3 表示 D(天冬胺酸)之各別 VH-CDR 的 VH，或

(4a) 具有其 VH-CDR1 之 HYJ^1LH 序列中的 J^1 表示 A(丙胺酸)，其 VH-CDR2 之 $\text{WJ}^2\text{NTNTU}^2\text{NPTX}^2\text{AQGFTG}$ 序列中各別地 J^2 表示 L(白胺酸)、 U^2 表示 E(麩胺酸)、 X^2 表示 F(苯丙胺酸)，其 VH-CDR3 之

GDJ³VVPTTIWNYYU³X³MZ³V 序列中各別地 J³ 表示 M(甲硫胺酸)、U³ 表示 H(組胺酸)、X³ 表示 F(苯丙胺酸)、Z³ 表示 D(天冬胺酸)之各別 VH-CDR 的 VH。

【0037】再者，「特異性地結合於 PD-1 之第一臂」係構成抗體部分的情況，作為其另外的態樣，較佳地，例如，可列舉具有選自下述任一 VH 者，

(1b) 包含序列編號 6 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、序列編號 7 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及序列編號 8 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3 的 VH，

(2b) 包含序列編號 9 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、序列編號 10 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及序列編號 11 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3 的 VH，

(3b) 包含序列編號 12 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、序列編號 13 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及序列編號 14 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3 的 VH，

(4b) 包含序列編號 15 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、序列編號 16 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及序列編號 17 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3 的 VH，以及

(5b) 包含序列編號 18 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、序列編號 19 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及序列編號 20 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3 的 VH。

【0038】再者，本發明中，「特異性地結合於 PD-1 之第一臂」係構成抗體部分的情況，其等之中，亦包含於選自上述(1a)~(4a)或(1b)~(5b)之任一 VH 之各別的 VH-CDR 中，其任意的 1~5 個胺基酸殘基置換為其他胺基酸(較佳為其保留性胺基酸)，且與該胺基酸未置換之原本的第一臂對於 PD-1 的結合活性具有同等的結合活性者。例如，VH-CDR1 的情況，1 個胺基酸殘基置換為其他胺基酸(較佳為其保留性胺基酸)，VH-CDR2 或 VH-CDR3 的情況，各別的 1~5 個胺基酸殘基置換為其他胺基酸(較佳為其保留性胺基酸)者。再者，如圖 4 所示方式，各別對應於特異性地結合於 PD-1 之第一臂之抗 PD-1 抗體純株的各 CDR 中，各純株間相異的各胺基酸或其等之任意複數個組合於該純株間可相互地置換。此處，經由保留性胺基酸的置換，意指具有類似側鏈的殘基的可換性，例如，具有脂肪族側鏈的胺基酸群中為甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸及異白胺酸，具有脂肪族羥基側鏈的胺基酸群中為絲胺酸及蘇胺酸，具有含醯胺基側鏈的胺基酸群中為天冬醯胺及麩胺醯胺，具有芳香族側鏈的胺基酸群中為苯丙胺酸、酪胺酸及色胺酸，具有鹼性側鏈的胺基酸群中為離胺酸、精胺酸及組胺酸，具有含硫側鏈的胺基酸群中為半胱胺酸及甲硫胺酸。作為較佳的經由保留性胺基酸置換的例，可列舉纈胺酸、白胺酸及異白胺酸之間的置換，苯丙胺酸及酪胺酸之間的置換，離胺酸及精胺酸之間的置換，丙胺酸及纈胺酸之間的置換以及天冬醯胺及麩胺醯胺之間的置換。再者，此處，上述之「與該胺基酸未置換之原本的第一臂對於 PD-1 的結合活性具有實質同等的結合活性」意指，該胺基酸置換之第一臂對於 PD-1 的結合活性，為該胺基酸

未置換之原本的第一臂的結合活性的 95%以上，較佳 98%以上，更佳 99%以上。

【0039】再者，本發明中之「特異性地結合於 PD-1 之第一臂」係構成抗體部分的情況，其等之中，其 VH 包含具有上述特定的胺基酸序列之各 VH-CDR，其 VH 的框架的胺基酸序列亦包含具有特定的生殖細胞系列型基因或有其體細胞突變之該基因所編碼的 VH 者。例如，選自上述 (1a)~(4a)或(1b)~(5b)之任一者所示之 VH，可係生殖細胞系列型 V 基因為 IGHV7-4-1，生殖細胞系列型 J 基因為 JH6c 之 VDJ 重組基因或有其體細胞突變之該基因所編碼。此處，藉由生殖細胞系列型的 V 基因 IGHV7-4-1 所各別編碼之胺基酸序列，係對應於序列編號 21 的胺基酸序列(圖 3)。

【0040】本發明之特異性地結合於 PD-1 之第一臂係構成抗體部分的情況，其 VH 的框架亦有藉由生殖細胞系列型的 VDJ 重組基因有體細胞突變之該基因編碼的情況。例如，生殖細胞系列型 V 基因為 IGHV7-4-1，選自上述(1a)~(4a)或(1b)~(5b)之任一者所示 VH 的 FR1、FR2、FR3，於圖 4 所示胺基酸位置，由於與 IGHV7-4-1 基因編碼的胺基酸序列相異，於該各位置具有體細胞突變。例如，FR1 區中，序列編號 21 的胺基酸序列中各別地位置 13 的離胺酸被置換為麩胺醯胺、位置 16 的丙胺酸被置換為纈胺酸、或位置 19 的離胺酸被置換為甲硫胺酸，或者亦可為該等之任意的複數組合予以置換。FR2 區中，序列編號 21 的胺基酸序列中位置 37 的纈胺酸亦可置換為白胺酸。FR3 區中，序列編號 21 的胺基酸序列中各別地位置 77 的絲胺酸被置換為蘇胺酸、位置 84 的半胱胺酸被置換為絲胺酸或天冬醯胺，或者該等之任意的複數組合予以置換。再者，選自上述(1a)~(4a)或

(1b)~(5b 之任一者所示 VH 的 FR4 區中，源自 J 基因 JH6c 的 FR4 區胺基酸序列(Trp-Gly-Lys-Gly-Thr-Thr*-Val-Thr-Val-Ser-Ser)(序列編號 41)中的離胺酸(Lys)亦可置換為麩胺醯胺或天冬醯胺，及/或 * 印的蘇胺酸(Thr)置換為白胺酸。具有上述任一者的胺基酸置換組合之各別的 FR1、FR2、FR3 及 FR4，對於特異性地結合於 PD-1 之第一臂的功能不賦予實質的影響，亦可使用作為框架。

【0041】再者，本發明之「特異性地結合於 PD-1 之第一臂」係構成抗體部分的情況，其等之中，包含具有上述特定的胺基酸序列之各 CDR，且亦包含其 VH 的 FR 的胺基酸序列係為特定的生殖細胞系列型基因或有其體細胞突變之該基因所編碼者。例如，作為該等之第一臂，可列舉具有自序列編號 1~5 選擇之胺基酸序列所構成之 VH 者。

【0042】再者，該等「特異性地結合於 PD-1 之第一臂」中，例如，亦包含與自序列編號 1~5 選擇之任一者的胺基酸序列為至少 80%相同，較佳為至少 90%相同，更佳為至少 95%相同，進一步較佳為至少 98%相同，進一步更佳為至少 99%相同的胺基酸序列所構成之 VH，且與原先的第一臂的 VH 的胺基酸序列的不同為實質上不影響對 PD-1 的結合活性者(下文中，亦簡稱為相同第一臂)。此處，關於胺基酸序列之相同性(同一性)比較中所使用的「%相同」，定義為將 2 種序列對準，與對照胺基酸序列(此處，為了達成最大百分比的相同性的必要情況，為導入間隙後的對照胺基酸序列)為相同的胺基酸序列的百分率。再者，此處，「與原先的第一臂的 VH 的胺基酸序列的差異實質上不影響對 PD-1 的結合活性」意指，相同第

一臂對 PD-1 的結合活性為原先的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。

【0043】進一步別的態樣中，本發明之「特異性地結合於 PD-1 之第一臂」係構成抗體部分的情況，其等之中，亦包含於(1)具有自上述(1a)~(4a)或(1b)~(5b)選擇之任一者所示之 VH 或者自序列編號 1~5 選擇之胺基酸序列所構成之 VH 及共通輕鏈的 VL 之第一臂對於 PD-1 結合，或於(2)由該 VH 及 VL 所構成之特異性地結合於 PD-1 之單株抗體的可變區對於 PD-1 的結合為交叉競爭的抗 PD-1 抗體的可變區(此處，該可變區包含構成其 VH 及 VL)者，再者，對於 PD-1 的結合亦包含具有經由(3)具有自上述(1a)~(4a)或(1b)~(5b)選擇之任一者所示之 VH 或者自序列編號 1~5 選擇之胺基酸序列所構成之 VH 及共通輕鏈的 VL 之第一臂或(4)由該 VH 及 VL 所構成之特異性地結合於 PD-1 之單株抗體的可變區之交叉競爭的抗 PD-1 抗體的可變區者。此處，「對 PD-1 的結合為交叉競爭」意指，藉由本說明書中例示之第一臂與相同或者一部重複的抗原決定基結合，無論其程度而阻礙第一臂對於 PD-1 的結合，或者與該例示之第一臂為相同或者一部重複的抗原決定基結合的抗體之對於 PD-1 的結合，無論其程度而藉由該例示之第一臂予以阻礙，是否為交叉競爭可藉由競爭結合測試進行評價。例如，可使用 Biacore 分析、流式細胞分析術、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))判斷。

【0044】例如，作為經由具有上述(5b)所示之 VH 及共通輕鏈的 VL 之第一臂之對於 PD-1 的結合為交叉競爭者，例如，可列舉具有自上述(1b)~(4b)選擇之任一者所示之 VH 及共通輕鏈的 VL(較佳為具有序列編號

26 的胺基酸序列所構成之 VL-CDR1、序列編號 27 的胺基酸序列所構成之 VL-CDR2 及序列編號 28 的胺基酸序列所構成之 VL-CDR3L)之第一臂，再者，具有自序列編號 1~4 選擇之胺基酸序列所構成之 VH 及共通輕鏈的 VL(較佳為序列編號 25 的胺基酸序列所構成之 VL)之第一臂。

【0045】 再者，例如，作為經由具有自上述(1b)~(4b)選擇之任一者所示之 VH 或者自序列編號 1~4 選擇之胺基酸序列所構成之 VH 及共通輕鏈的 VL 之第一臂對於 PD-1 的結合為交叉競爭者，例如，可列舉具有上述(5b)所示之 VH 及共通輕鏈的 VL(較佳為具有序列編號 26 的胺基酸序列所構成之 VL-CDR1、序列編號 27 的胺基酸序列所構成之 VL-CDR2 及序列編號 28 的胺基酸序列所構成之 VL-CDR3 的 VL)之第一臂，再者，具有序列編號 5 的胺基酸序列所構成之 VH 及共通輕鏈的 VL(較佳為序列編號 25 的胺基酸序列所構成之 VL)之第一臂。

【0046】 此處，本發明之「特異性地結合於 PD-1 之第一臂」係構成抗體部分的情況，作為其等，較佳地，可列舉具有自上述(1b)~(5b)選擇之任一者所示之 VH 之第一臂，再者，該較佳第一臂係如上述方式，亦包含於其 VH 之各 CDR 中，其任意的 1~5 個胺基酸殘基置換為其他胺基酸(較佳為其保留性胺基酸)，且此胺基酸置換實質上不影響對於 PD-1 的結合活性者，再者，再者，如上述方式，VH 的框架的胺基酸序列，亦包含具有生殖細胞系列型 V 基因 IGHV7-4-1 或同 J 基因 JH6c 或具有其體細胞突變之該基因所編碼的 VH 者。因此，作為該第一臂，更佳地，可列舉具有自序列編號 1~5 選擇之任一者的胺基酸序列所構成之 VH 者。

【0047】再者，本發明之「特異性地結合於 PD-1 之第一臂」係構成抗體部分的情況，其 VL 較佳地為共通輕鏈的 VL，作為此種共通輕鏈，較佳地，例如，IGVK1-39/JK1 共通輕鏈，更佳地，例如，具有含序列編號 26 的胺基酸序列所構成之 VL-CDR1、序列編號 27 的胺基酸序列所構成之 VL-CDR2 及序列編號 28 的胺基酸序列所構成之 VL-CDR3 的 VL 之輕鏈，進一步較佳地，例如，具有序列編號 25 的胺基酸序列所構成之 VL 的輕鏈。再者，作為共通輕鏈的恆定區，較佳地，可列舉序列編號 29 的胺基酸序列所構成之輕鏈恆定區。

【0048】本發明之「特異性地結合於 PD-1 之第一臂」，作為一種實施態樣，容許 PD-1 及 PD-L1 的相互作用、PD-1 及 PD-L2 的相互作用、或該二者的相互作用。此處，「容許 PD-1 及 PD-L1 的相互作用、PD-1 及 PD-L2 的相互作用、或該二者的相互作用」意指，即使於本發明相關之 PD-1/CD3 雙特異性抗體為可溶型 PD-L1 或 PD-L2 的濃度的 20 倍過剩存在的狀況下，該 PD-L1 及 PD-1 的相互作用、該 PD-L2 及 PD-1 的相互作用、或該二者的相互作用，與本發明相關之 PD-1/CD3 雙特異性抗體不存在時之該相互作用相比係維持 50%以上，較佳係維持 70%以上，更佳係維持 80%以上。再者，「容許 PD-1 及 PD-L1 的相互作用、PD-1 及 PD-L2 的相互作用、或該二者的相互作用」之定義，係與「實質上不阻礙 PD-1 及 PD-L1 的相互作用、PD-1 及 PD-L2 的相互作用、或該二者的相互作用」之意義以相同意義予以使用。

【0049】 本發明之「特異性地結合於 PD-1 之第一臂」，作為別的實施態樣，亦有阻礙 PD-1 及 PD-L1 的相互作用、PD-1 及 PD-L2 的相互作用、或該二者的相互作用的情況。

【0050】 為了構築本發明相關之 PD-1/CD3 雙特異性抗體所取得之抗 PD-1 單株抗體的各純株，以及其等之 VH 的胺基酸序列及與其序列編號的對應關係示於圖 5，以及該抗 PD-1 單株抗體之各純株的 VH 中之各 CDR 的胺基酸序列與其序列編號的對應關係示於圖 6。

【0051】 再者，作為其他之「特異性地結合於 PD-1 之第一臂」，例如，可列舉習知的抗 PD-1 抗體之 VH 及 VL 的組合，作為該等習知的抗 PD-1 抗體，例如，可列舉納武單抗(Nivolumab)、西米普利單抗(Cemiplimab)、匹博利珠單抗(Pembrolizumab)、斯帕塔利單抗(Spartalizumab)、替雷利珠單抗(Tislelizumab)、多斯塔利單抗(Dostarlimab)、特瑞普利單抗(Toripalimab)、卡瑞利珠單抗(Camrelizumab)、杰諾單抗(Genolimzumab)、信替利單抗(Sintilimab)、洛達普利單抗(Lodapolimab)、瑞替弗利單抗(Retifanlimab)、巴斯替利單抗(Balstilimab)、斯普魯利單抗(Serplulimab)、布迪格利單抗(Budigalimab)、普洛格利單抗(Prolgolimab)、薩山利單抗(Sasanlimab)、西曲利單抗(Cetrelimab)、吉柏利單抗(Zimberelimab)、AMP-514、STI-A1110、ENUM 388D4、ENUM 244C8、GLS010、CS1003、BAT-1306、AK105、AK103、BI 754091、LZM009、CMAB819、Sym021、GB226、SSI-361、JY034、HX008、ISU106 及 CX-188 等，再者，下文中的公開專利申請案：US20180222982、US20180312564、WO2004/056875、WO2006/121168、

WO2008/156712、WO2010/029434、WO2010/029435、WO2010/036959、
WO2011/110604、WO2011/110621、WO2014/179664、WO2014/194302、
WO2014/206107、WO2015/035606、WO2015/036394、WO2015/085847、
WO2015/112800、WO2016/014688、WO2016/015685、WO2016/068801、
WO2016/077397、WO2016/092419、WO2016/106159、WO2016/127179、
WO2016/197497、WO2016/210129、WO2017/011580、WO2017/016497、
WO2017/019846、WO2017/024465、WO2017/024515、WO2017/025016、
WO2017/025051、WO2017/040790、WO2017/055443、WO2017/055547、
WO2017/058115、WO2017/058859、WO2017/079112、WO2017/079116、
WO2017/087599、WO2017/096026、WO2017/106656、WO2017/107885、
WO2017/124050、WO2017/125815、WO2017/132827、WO2017/133540、
WO2017/166804、WO2017/198741、WO2017/201766、WO2017/214182、
WO2018/020476、WO2018/026248、WO2018/034226、WO2018/036472、
WO2018/052818、WO2018/053106、WO2018/068336、WO2018/085358、
WO2018/085468、WO2018/087143、WO2018/091661、WO2018/113258、
WO2018/119474、WO2018/162944、WO2018/192089、WO2018/210230、
WO2018/217227、WO2018/226580、WO2019/005635 或 WO2019/051164
所特定之專利申請明書中各別記載的抗 PD-1 抗體的 VH 及 VL 的組合，亦
可列舉作為特異性地結合於 PD-1 之第一臂之例。再者，上述抗 PD-1 抗體
的 VH 與共通輕鏈的組合，亦可列舉作為特異性地結合於 PD-1 之第一臂
之例。

【0052】 特異性地結合於 CD3 之第二臂

本說明書中，「特異性地結合於 CD3 之第二臂」(下文中，亦簡稱為「第二臂」)意指，本發明相關之雙特異性蛋白質的一部分，或者無關作為其自體單體存在，為特異性地結合於 CD3 之蛋白質，該雙特異性蛋白質為雙特異性抗體的情況，該第二臂包含於抗體或者抗體片段的一部分，或者不為一部分，與作為其自體單體存在與否無關，至少，包含特異性地結合於 CD3 之抗體(下文中，亦簡稱為抗 CD3 抗體)的 VH 及 VL，可特異性地結合於 CD3 之抗體部分。例如，此種第二臂，亦包含由構成抗 CD3 抗體的抗原結合部位之 VH 及 VL 所構成之抗體的 Fv 部、包含該 VH 及 VL 之抗體的 Fab' 部及 Fab 部。此處，「特異性地結合於 CD3」，可作為以具有至少 $1 \times 10^{-5} \text{M}$ 、較佳為 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 、更佳為 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 更高之親和性(解離定數(Kd 值))的結合活性對 CD3 直接結合，實質上不結合其他蛋白質為特徵予以使用。再者，「特異性地結合於 CD3 之抗體」或者「抗 CD3 抗體」之「抗體」意指全長抗體，亦即，由以雙硫鍵結合之 2 種重鏈及 2 種輕鏈所構成之完全長的抗體，較佳地，其單株抗體。

【0053】 此處，「特異性地結合於 CD3 之第二臂」係構成抗體部分的情況，作為其等之較佳態樣，例如，可列舉具有含(1c)序列編號 37 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR1、序列編號 38 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR2 及序列編號 39 的胺基酸序列所構成之 VH-CDR3 之 VH 者。

【0054】 再者，本發明中，「特異性地結合於 CD3 之第二臂」係構成抗體部分的情況，其等之中，亦包含上述(1c)的 VH 中各別的 CDR 中，其任意的 1~5 個胺基酸殘基置換為其他胺基酸(較佳為其保留性胺基酸)，且與經由該胺基酸未置換之原先的第二臂對於 CD3 的結合活性具有實質

上同等的結合活性者。例如，於 CDR1 的情況，可列舉 1 個胺基酸殘基置換為其他胺基酸(較佳為其保留性胺基酸)，於 CDR2 或 CDR3 的情況，可列舉各別的 1~5 個胺基酸殘基置換為其他胺基酸(較佳為其保留性胺基酸)者。此處，「與經由該胺基酸未置換之原先的第二臂對於 CD3 的結合活性具有實質上同等的結合活性」意指，該胺基酸置換之第二臂對於 CD3 的結合活性，係該胺基酸未置換之原先的第二臂的結合活性的 95%以上，較佳為 98%以上，更佳為 99%以上。又，第二臂之各 VH-CDR 之「經由保留性胺基酸置換」，例如，可列舉上述第一臂之胺基酸置換之例。

【0055】再者，本發明中，「特異性地結合於 CD3 之第二臂」係構成抗體部分的情況，其等之中，亦包含其 VH 中，包含具有上述特定的胺基酸序列之各 CDR，其 VH 的 FR 的胺基酸序列具有特定的生殖細胞系列型基因或有其體細胞突變之該基因所編碼的 VH 者。例如，上述(1c)的 VH，係生殖細胞系列型 V 基因為 IGHV3-33 之 VDJ 重組基因或有其體細胞突變之該基因所編碼。此處，藉由生殖細胞系列型的 V 基因 IGHV3-33 所編碼之胺基酸序列(序列編號 22)示於圖 3。再者，作為此種第二臂，可列舉具有序列編號 36 的胺基酸序列所構成之 VH 者。再者，此種第二臂，例如，亦包含具有與序列編號 36 的胺基酸序列為至少 80%相同，較佳為至少 90%相同，更佳為至少 95%相同，進一步較佳為至少 98%相同，進一步更佳為至少 99%相同之胺基酸序列所構成之 VH，且與原先之第二臂的 VH 的胺基酸序列的相異實質上不影響對於 CD3 的結合活性者(下文中，亦簡稱為相同第二臂)。此處，「與原先之第二臂的 VH 的胺基酸序列的相異實質上不影響對於 CD3 的結合活性」意指，相同第二臂對於 CD3 的結合活

性為原先之第二臂之該結合活性的 95%以上，較佳為 98%以上，更佳為 99%以上。

【0056】進一步別的態樣中，本發明之「特異性地結合於 CD3 之第二臂」係構成抗體部分的情況，其等之中，亦包含具有於(1)具有上述(1c)所示之 VH 或序列編號 36 的胺基酸序列所構成之 VH 及共有輕鏈的 VL 之第二臂對於 CD3 的結合或於(2)由該 VH 及 VL 所構成之特異性地結合於 CD3 之單株抗體的可變區對於 CD3 的結合為交叉競爭之抗 CD3 抗體的可變區(此處，該可變區包含構成其 VH 及 VL)者。此處，「對於 CD3 的結合為交叉競爭」意指，藉由與本說明書中例示之第二臂為相同或者一部分重複之抗原決定基結合，無關其程度而阻礙該第二臂對於 CD3 的結合。此處，是否交叉競爭，可根據「特異性地結合於 PD-1 之第一臂」相關說明中所記載的方法，同樣地測定。

【0057】此處，本發明之「特異性地結合於 CD3 之第二臂」係構成抗體部分的情況，作為該等較佳地，可列舉具有上述(1c)所示之 VH 的第二臂，再者，該較佳第二臂，如上述方式，亦包含其 VH 之各 CDR 中，其任意的 1~5 個胺基酸殘基置換為其他胺基酸(較佳為其保留性胺基酸)，且其胺基酸置換實質上不影響對於 CD 的結合活性者，再者，如上述方式，VH 的框架的胺基酸序列，亦包含生殖細胞系列型基因 IGHV3-33 或有其體細胞突變之該基因所編碼的 VH 者。因此，作為該第二臂更佳地，可列舉具有序列編號 36 的胺基酸序列所構成之 VH 者。

【0058】用於構築本發明相關之 PD-1/CD3 雙特異性抗體之抗 CD3 抗體的各純株，於該等之 VH 的胺基酸序列及其序列編號的對應關係示於

圖 7，以及該抗 CD3 抗體之各純株的 VH 中之各 CDR 的胺基酸序列與其序列編號的對應關係示於圖 8。

【0059】 本發明之「特異性地結合於 CD3 之第二臂」係構成抗體部分的情況，其 VL 較佳為共通輕鏈的 VL，作為該方式之共通輕鏈較佳地，例如，IGVK1-39/JK1 共通輕鏈，更佳地，例如，具有含序列編號 26 的胺基酸序列所構成之 VL-CDR1、序列編號 27 的胺基酸序列所構成之 VL-CDR2 及序列編號 28 的胺基酸序列所構成之 VL-CDR3 的 VL 之輕鏈，進一步較佳地，例如，具有序列編號 25 的胺基酸序列所構成之 VL 的輕鏈。再者，作為共通輕鏈的恆定區較佳地，可列舉序列編號 29 的胺基酸序列所構成之輕鏈恆定區。

【0060】 作為本發明之「特異性地結合於 CD3 之第二臂」較佳地，可列舉特異性地結合於 CD3 ϵ 者。

【0061】 再者，作為其他的「特異性地結合於 CD3 之第二臂」，例如，可列舉習知的抗 CD3 抗體的 VH 及 VL 的組合，作為該方式之抗 CD3 抗體，例如，可列舉佛拉魯單抗(Foralumab)、莫羅莫納單抗(Muromonab)-CD3、奧昔珠單抗(Otelixizumab)、替利珠單抗(Teplizumab)及維西珠單抗(Visilizumab)等，再者，伯納吐單抗(Blinatumomab)、卡妥索單抗(Catumaxomab)、西比撒單抗(Cibisatamab)、度伐吐西珠單抗(Duvortuxizumab)、厄吐索單抗(Ertumaxomab)、氟妥珠單抗(Flotetuzumab)、帕索吐西珠單抗(Pasotuxizumab)、索利托單抗(Solitomab)、替班塔芙(Tebentafusp)、替波迪他單抗(Tepoditamab)、AMG-596、MOR209、REGN1979、XmAb13676 及 XmAb14045 之任一者之構

成雙特異性抗體的 CD3 結合部位之 VH 及 VL 的組合，亦可列舉作為特異性地結合於 CD3 之第二臂之例。再者，下文中的公開專利申請案：US20190016823、WO2018/223004、WO2018/223002、US2018/0291114、WO2018/114754、CN107501412、CN106810611、US20170218079、US20170174779、CN106349391、WO2017/070943、WO2017/053856、WO2017/021349、CN106084049、WO2017/021354、WO2016/179003、US20160176980、WO2016/014974、WO2016/016859、US20150266966、CN104098698、WO2014/151438、WO2013/186613、CN102219856、WO2010/052013、WO2010/037836、WO2007/042261、WO2007/033230、WO2003/026692、WO2000/005268、CN106084046、CN106146661 或 WO2010/037835 所特定之專利申請明書中各別記載的抗 CD3 抗體或雙特異性抗體的 CD3 結合部位之 VH 及 VL 的組合，亦可列舉作為特異性地結合於 CD3 之第二臂之例。再者，上述抗 CD3 抗體的 VH 與共通輕鏈的組合，亦可列舉作為特異性地結合於 CD3 之第二臂之例。

【0062】作為本發明相關之 PD-1/CD3 雙特異性抗體之較佳同功型為 IgG 抗體，進一步較佳地，為 IgG₁ 或 IgG₄ 抗體，進一步更佳為 IgG₁ 抗體。

【0063】作為本發明相關之 PD-1/CD3 雙特異性抗體之較佳態樣，例如，可列舉如下特徵之 PD-1/CD3 雙特異性抗體，特異性地結合於 PD-1 之第一臂係

(A) 自上述(1a)~(4a)或(1b)~(5b)選擇之任一者所示之 VH 中，於自 VH-CDR1、VH-CDR2 及 VH-CDR3 選擇之任一者或複數個 CDR 中，其

各別的任意的 1 至 5 個胺基酸殘基亦可以其他胺基酸(較佳為其保留性胺基酸)置換的 VH，及

(B) 包含序列編號 26 的胺基酸序列所構成之 VL-CDR1、序列編號 27 的胺基酸序列所構成之 VL-CDR2 及序列編號 28 的胺基酸序列所構成之 VL-CDR3 的共通輕鏈之 VL；以及

特異性地結合於 CD3 之第二臂係

(C) 上述(1c)所示之 VH 中，於自 VH-CDR1、VH-CDR2 及 VH-CDR3 選擇之任一者或複數個 CDR 中，各別其任意的 1~5 個胺基酸殘基可置換為其他胺基酸(較佳為保留性胺基酸)之 VH，及

(D) 具有含序列編號 26 的胺基酸序列所構成之 VL-CDR1、序列編號 27 的胺基酸序列所構成之 VL-CDR2 及序列編號 28 的胺基酸序列所構成之 VL-CDR3 的共通輕鏈之 VL。

【0064】更佳地，例如，可列舉如下特徵之 PD-1/CD3 雙特異性抗體，特異性地結合於 PD-1 之第一臂係

(A) 自上述(1a)~(4a)或(1b)~(5b)選擇之任一者的 VH，及

(B) 具有含序列編號 26 的胺基酸序列所構成之 VL-CDR1、序列編號 27 的胺基酸序列所構成之 VL-CDR2 及序列編號 28 的胺基酸序列所構成之 VL-CDR3 之共通輕鏈的 VL；以及

特異性地結合於 CD3 之第二臂係

(C) 上述(1c)所示之 VH，及

(D) 具有含序列編號 26 的胺基酸序列所構成之 VL-CDR1、序列編號 27 的胺基酸序列所構成之 VL-CDR2 及序列編號 28 的胺基酸序列所構成之 VL-CDR3 之共通輕鏈的 VL。

【0065】再者，作為本發明相關之 PD-1/CD3 雙特異性抗體之較佳別的態樣，例如，可列舉如下特徵之 PD-1/CD3 雙特異性抗體，特異性地結合於 PD-1 之第一臂係

(A) 自序列編號 1~5 選擇之任一者的胺基酸序列所構成之 VH、或與該 VH 的胺基酸序列為至少 80%相同之胺基酸序列所構成之 VH，及

(B) 具有序列編號 25 的胺基酸序列所構成之共通輕鏈的 VL；以及，特異性地結合於 CD3 之第二臂係

(C) 由序列編號 36 的胺基酸序列所構成之 VH、或與該 VH 的胺基酸序列為至少 80%相同之胺基酸序列所構成之 VH，及

(D) 具有序列編號 25 的胺基酸序列所構成之共通輕鏈的 VL。

作為別的態樣更佳地，例如，可列舉如下特徵之 PD-1/CD3 雙特異性抗體，特異性地結合於 PD-1 之第一臂係

(A) 自序列編號 1~5 選擇之任一者的胺基酸序列所構成之 VH，及

(B) 具有序列編號 25 的胺基酸序列所構成之共通輕鏈的 VL；以及，特異性地結合於 CD3 之第二臂係

(C) 由序列編號 36 的胺基酸序列所構成之 VH，及

(D) 具有序列編號 25 的胺基酸序列所構成之共通輕鏈的 VL。

【0066】本發明相關之 PD-1/CD3 雙特異性抗體之中，同抗體為 IgG₁ 抗體的情況，於各別二種的重鏈恆定區或者絞鍊區上，較佳為依據 EU 編

號系統之第 235 號的白胺酸被置換為甘胺酸、及/或第 236 號的甘胺酸被置換為精胺酸的 IgG₁ 抗體。再者，更佳為該等雙特異性抗體的重鏈 C 末端的胺基酸、例如，依據 EU 編號系統之第 447 號的離胺酸為缺失的抗體。再者，PD-1/CD3 雙特異性抗體為 IgG₄ 抗體的情況，位於其絞鍊區之依據 EU 編號系統之第 228 號的絲胺酸被置換為脯胺酸的抗體為較佳。

【0067】 再者，該等 PD-1/CD3 雙特異性抗體為 IgG₁ 抗體的情況，作為較佳態樣，可列舉具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VH 之重鏈的恆定區中依據 EU 編號系統之第 351 號的白胺酸被置換為離胺酸，且第 366 號的蘇胺酸被置換為離胺酸，具有特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VH 之重鏈的恆定區中的第 351 號的白胺酸被置換為天冬胺酸，且第 368 號的白胺酸被置換為麩胺酸的 IgG₁ 抗體。再者，具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VH 之重鏈的恆定區中依據 EU 編號系統之第 351 號的白胺酸被置換為天冬胺酸，且第 368 號的白胺酸被置換為麩胺酸、具有特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VH 之重鏈的恆定區中的第 351 號的白胺酸被置換為離胺酸，且第 366 號的蘇胺酸被置換為離胺酸的 IgG₁ 抗體亦同樣的較佳。

【0068】 再者，該等 PD-1/CD3 雙特異性抗體為 IgG₁ 抗體的情況，作為較佳態樣，可列舉各別的二種重鏈之恆定區中的(1)依據 EU 編號系統之第 252 號的甲硫胺酸被置換為麩胺酸、脯胺酸、精胺酸或天冬胺酸，(2)依據 EU 編號系統之第 434 號的天冬醯胺被置換為白胺酸，及/或(3)依據 EU 編號系統之第 438 號的麩胺醯胺被置換為麩胺酸之各別經置換的 IgG₁ 抗體。藉由該等胺基酸置換，該 PD-1/CD3 雙特異性抗體於血液中的半衰

期，與同胺基酸未置換之同抗體相比，可期待縮短至少 50%、較佳為至少 60%、更佳為至少 70%、進一步較佳為至少 80%、最較佳為至少 90%。

【0069】 作為重鏈恆定區取入上述之全部胺基酸置換的 PD-1/CD3 雙特異性 IgG₁ 抗體的較佳態樣，例如，可列舉具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VH 之重鏈係具有自序列編號 23、序列編號 42、序列編號 43、序列編號 44、序列編號 45、序列編號 46 及序列編號 47 選擇之任一者的胺基酸序列所構成之重鏈恆定區，具有特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VH 之重鏈係具有自序列編號 24、序列編號 48、序列編號 49、序列編號 50、序列編號 51、序列編號 52 及序列編號 53 選擇之任一者的胺基酸序列所構成之重鏈恆定區的抗體。一些該等的胺基酸序列示於圖 9。

【0070】 作為本發明相關之 PD-1/CD3 雙特異性抗體態樣，最佳地，於本明細書實施例 8 所製作的純株 PD1-1(Bi)、純株 PD1-2(Bi)、純株 PD1-3(Bi)、純株 PD1-4(Bi)及純株 PD1-5(Bi)以及實施例 17 所製作的純株 Mut1、純株 Mut2、純株 Mut3、純株 Mut4、純株 Mut5 及純株 Mut6。

【0071】 作為本發明相關之 PD-1/CD3 雙特異性蛋白質之較佳特徵，可列舉 (1)容許 PD-1 及 PD-L1 的相互作用、PD-1 及 PD-L2 的相互作用、或該二者的相互作用者，(2)細胞介素產生充分減低者，及/或(3)各別特異性地結合於表現於標的細胞之血液性癌症的癌細胞之 PD-1 及表現於起效子細胞之淋巴球(例如，傷害性淋巴球)之 CD3 者。此處，「容許 PD-1 及 PD-L1 的相互作用、PD-1 及 PD-L2 的相互作用、或該二者的相互作用」表示，與「特異性地結合於 PD-1 之第一臂」相關說明所記載的定亦為相同意義。另一方面，「細胞介素產生充分減低」意指，例如，本發明相關之

PD-1/CD3 雙特異性抗體經由點滴等之靜脈內投藥中、或者自投藥的 24 小時內，例如，血中或者組織中之包含 IL-2、IFN- γ 及/或 TNF- α 的細胞介素的濃度不增加，或即使增加亦可經由類固醇投藥而可抑制的程度。再者，「標的細胞」意指接受起效子細胞之淋巴球的細胞傷害作用的細胞，「起效子細胞」意指對標的細胞展現細胞傷害作用的細胞。

【0072】 PD-1/CD3 雙特異性抗體的製造及精製方法

本發明相關之 PD-1/CD3 雙特異性蛋白質之中，特別是，雙特異性抗體及其抗體片段亦可以 WO2014/051433、WO2013/157953 或者 WO2013/157954 所揭示的方法製造。

【0073】 具體地，可將各別已插入(1)編碼具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VH 之重鏈的多核苷酸、(2)編碼具有特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VH 之重鏈的多核苷酸、及(3)編碼共通輕鏈的多核苷酸的表現載體，基因導入至哺乳動物細胞使其形質轉換，同時使其分泌以及表現二重鏈及共有輕鏈進行製造。

【0074】 此處，表現本發明相關之 PD-1/CD3 雙特異性抗體的宿主細胞為可基因導入表現載體，亦可為可表現已導入的表現載體的任何宿主細胞。較佳地，如 SF-9 及 SF-21 細胞等昆蟲細胞，更佳地，可列舉包含 CHO 細胞、BHK 細胞、SP2/0 細胞及 NS-0 骨髓瘤細胞的小鼠細胞，如 COS 及 Vero 細胞等靈長類細胞，如 MDCK 細胞、BRL 3A 細胞、融合瘤、腫瘤細胞、不死化的初代細胞、W138、HepG2、HeLa、HEK293、HT1080 或 PER.C6 等胚性的網膜細胞等哺乳類細胞。又，表現系統的選擇中，以抗體係經適當地糖基化的方式，可使用哺乳類細胞的表現載體及宿主。人細胞株，較

佳為 PER.C6，由於可獲得與人之糖基化的型式一致的抗體，而有利地使用。

【0075】藉由表現載體的基因導入之經形質轉換的宿主細胞中的蛋白質產生，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 進行實施，再者，用於最大化宿主細胞的培養的生產性的一般性指針、順序及實用的方法，可參考 *Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach* (M. Butler, ed., IRL Press, 1991) 進行實施。宿主細胞中的抗體表現，例如，記載於 EP0120694、EP0314161、EP0481790、EP0523949、US4816567 及 WO2000/63403 等公開公報。

【0076】此處，經由習知的方法，可最適化宿主細胞的培養條件，可最適化蛋白質的生產量。培養，例如，可實施培養皿、旋轉瓶或於反應槽之中的批次培養、流加培養、連續培養、經由中空纖維的培養。經由細胞培養，為了大規模且連續地進行重組蛋白質的生產，較佳將細胞於懸濁液之中使其增殖。再者，較佳為於無源自動物或人的血清或無源自動物或人的血清的構成要素的條件下，進行細胞的培養。

【0077】以宿主細胞表現，由該細胞或細胞培養基經由習知的方法所回收的抗體，可使用習知的方法精製。精製方法包含免疫沈降法、離心分離法、過濾、尺寸排除層析、親和性層析、陽離子及/或陰離子交換層析、疏水性相互作用層析等。再者，有較佳使用蛋白質 A 或蛋白質 G 親和性層析的情況 (例如，參照 US4801687 及 US5151504)。

【0078】[醫藥的用途]

本發明相關之 PD-1/CD3 雙特異性蛋白質，對於血液性癌症的預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療為有用者。

【0079】作為本發明相關之 PD-1/CD3 雙特異性蛋白質可預防、症狀進展抑制及/或治療之血液性癌症，例如，可列舉多發性骨髓腫、惡性淋巴瘤(例如，非何金杰氏淋巴瘤(例如，B 細胞性非何金杰氏淋巴瘤(例如，前驅 B 細胞淋巴母細胞淋巴瘤、前驅 B 細胞急性淋巴球芽性白血病、慢性 B 淋巴性白血病(小淋巴球性淋巴瘤或者前驅細胞性白血病)、B 細胞幼淋巴球性白血病、淋巴漿細胞性淋巴瘤、結節邊緣區型 B-細胞淋巴瘤、結節外邊緣區型 B-細胞淋巴瘤(MALT 淋巴瘤)、脾原發邊緣帶 B 細胞性淋巴瘤、毛細胞白血病、毛細胞白血病/變體型、濾泡性淋巴瘤、兒童型濾泡性淋巴瘤、瀰漫性大細胞型 B 細胞性淋巴瘤、瀰漫性大細胞型 B 細胞淋巴瘤/非特定型、脾瀰漫性紅髓小 B 細胞淋巴瘤、淋巴漿細胞性淋巴瘤、原發性縱隔大細胞型 B 細胞性淋巴瘤、原發性滲出性淋巴瘤、伯奇氏淋巴瘤、套膜細胞淋巴瘤、單株 B 細胞淋巴球增多症、脾 B 細胞淋巴瘤/白血病/不能分類型、意義不明的單株珈瑪球蛋白血症/IgM 型、 μ 重鏈病、 λ 重鏈病、 α 重鏈病、漿細胞骨髓腫、骨孤立性漿細胞瘤、骨外漿細胞腫、單株免疫球蛋白沉積症、伴隨 IRF4 重排之大細胞型 B 細胞淋巴瘤、原發性皮膚濾泡中心淋巴瘤、富於 T 細胞/組織球之大細胞型 B 細胞淋巴瘤、原發性中樞神經系瀰漫性大細胞型 B 細胞淋巴瘤、原發性皮膚瀰漫性大細胞型 B 細胞淋巴瘤/下肢型、EBV 陽性瀰漫性大細胞型 B 細胞淋巴瘤/非特定型、EBV 陽性黏膜皮膚潰瘍、慢性炎症相關瀰漫性大細胞型 B 細胞淋巴瘤、類淋巴瘤肉芽腫症、血管內大細胞型 B 細胞淋巴瘤、ALK 陽性大細胞型 B 細胞淋巴瘤、

漿母細胞淋巴瘤、原發性滲出液淋巴瘤、HHV8 陽性瀰漫性大細胞型 B 細胞淋巴瘤/非特異型、伴隨 11q 異常的類伯奇氏淋巴瘤、伴隨 MYC 及 BCL2 與 BCL6 之二者或一者的重排的高度惡性 B 細胞淋巴瘤、伴隨高度惡性 B 細胞淋巴瘤-非特異型及瀰漫性大細胞型 B 細胞淋巴瘤與典型何金杰氏淋巴瘤的中間特徵之 B 細胞淋巴瘤-不能分類型)、T/NK 細胞性非何金杰氏淋巴瘤(例如，前驅 T 細胞淋巴母細胞淋巴瘤、慢性 T 淋巴球性白血病、T 細胞急性淋巴性白血病(T 細胞淋巴母細胞白血病)、T 細胞型大顆粒淋巴球性白血病、大顆粒 NK 細胞性白血病、快速進行性 NK 細胞白血病、末梢性 T 細胞淋巴瘤、末梢性 T 細胞淋巴瘤/非特定型、不能分類末梢性 T 細胞淋巴瘤、血管免疫母細胞 T 細胞性淋巴瘤、未分化大細胞(CD30 陽性)淋巴瘤、血管中心性淋巴瘤、腸管 T 細胞性淋巴瘤、腸症型 T 細胞淋巴瘤、肝脾型 γ - δ T 細胞淋巴瘤、類皮下脂肪組織炎 T 細胞淋巴瘤、蕈狀肉芽腫、塞札來(Sezary)症候群、類何金杰氏/何金杰氏相關未分化大細胞淋巴瘤、結節外 NK/T 細胞淋巴瘤、成人 T 細胞性淋巴瘤、T 細胞前淋巴球性白血病、慢性 NK 細胞淋巴增生異常症、兒童全身性 EBV 陽性 T 細胞淋巴瘤、類種痘類水疱症淋巴增生異常症、結節外 NK/T 細胞淋巴瘤/鼻型、腸症相關 T 細胞淋巴瘤、單形性趨上皮性腸管 T 細胞淋巴瘤、胃腸管和緩進行性 T 細胞淋巴增生異常症、肝脾 T 細胞淋巴瘤、原發性皮膚 CD30 陽性 T 細胞淋巴增生異常症、類淋巴瘤丘疹症、原發性皮膚未分化大細胞型淋巴瘤、原發性皮膚 γ δ T 細胞淋巴瘤、原發性皮膚 CD8 陽性快速進行性趨表皮性細胞傷害性 T 細胞淋巴瘤、原發性肢端皮膚型 CD8 陽性 T 細胞淋巴瘤、原發性皮膚 CD4 陽性小型/中型 T 細胞淋巴增殖性症、濾泡 T 細胞淋巴瘤、伴隨

濾泡助手 T 細胞表現型的結節外周 T 細胞淋巴瘤、未分化大細胞淋巴瘤/ALK 陽性型、未分化大細胞淋巴瘤/ALK 陰性型及乳房植入物相關間變性大細胞淋巴瘤))及何金杰氏淋巴瘤(例如，典型何金杰氏淋巴瘤(例如，結節硬化型、混合細胞型、富於淋巴球型及淋巴球減少型)或結節性淋巴球優位型何金杰氏淋巴瘤))、白血病(例如，急性骨髓性白血病、急性前骨髓球性白血病、急性淋巴母細胞白血病(淋巴母細胞淋巴瘤)、慢性淋巴性白血病(小淋巴球性淋巴瘤)、骨髓發育不良症候群及慢性骨髓性白血病)、中樞神經系原發惡性淋巴瘤、及骨髓增生症候群等。

【0080】本發明中之「治療」意指，例如，某疾患或其症狀受到治癒或改善，「預防」意指某疾患或症狀的發現之未然的防止或者一定期間使其延遲，「症狀進展抑制」意指抑制症狀的進展或惡化而停止病態的進展。又，「預防」的意義也包含復發抑制。「復發抑制」意指防止某疾患或症狀的復發或減低復發的可能性。

【0081】本發明相關之 PD-1/CD3 雙特異性蛋白質，通常以全身的或局部的非經口的形式投藥。作為相關的投藥方法，具體地，可列舉注射投藥、經鼻投藥、經肺投藥、經皮投藥等。作為注射投藥，例如，可列舉靜脈內注射、肌肉內注射、腹腔內注射等，靜脈內注射的情況，較佳經由點滴投藥。其投藥量雖根據年齡、體重、症狀、治療功效、投藥方法、處理時間等而不同，通常成人每一人，每一次 0.1 μ g/kg 至 300mg/kg 的範圍，特別較佳地，0.1mg/kg 至 10mg/kg 的範圍，一日一次至數次非經口投藥，或一日 30 分至 24 小時的範圍靜脈內持續投藥。當然如同前述方式，投藥

量係根據各種條件而變動，有比上述投藥量更少的量為充分的情況，而亦有超過範圍的投藥為必要的情況。

【0082】 製劑

本發明相關之 PD-1/CD3 雙特異性蛋白質，作為注射劑或點滴用的輸液而使其製劑化使用的情況，該注射劑或輸液可為水溶液、懸濁液或乳濁液之任一形態，再者，經由於使用時添加溶劑，進行溶解、懸濁或乳濁而使用，亦可與藥學可容許的載體一起作成固形劑使其製劑化。作為注射劑或點滴用的輸液所使用的溶劑，例如，可使用注射用蒸餾水、生理食鹽水、葡萄糖溶液及等張液(例如，氯化鈉、氯化鉀、甘油、甘露糖醇、山梨糖醇、硼酸、硼砂、丙二醇等的溶液)等。

【0083】 此處，做為藥學上可容許的載體，例如，可列舉安定劑、溶解輔助劑、懸濁化劑、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。作為安定劑，例如，可使用各種胺基酸、白蛋白、球蛋白、膠原蛋白、甘露糖醇、葡萄糖、聚葡萄糖、乙二醇、丙二醇、聚乙二醇、抗壞血酸、亞硫酸氫鈉、硫代硫酸鈉、依地酸鈉、檸檬酸鈉、二丁基羥基甲苯等。作為溶解輔助劑，例如，可使用醇(例如，乙醇等)、多元醇(例如，丙二醇、聚乙二醇等)、非離子性界面活性劑(例如，聚山梨醇酯 20(註冊商標)、聚山梨醇酯 80(註冊商標)、HCO-50 等)等。作為懸濁化劑，例如，可使用單硬脂酸甘油、單硬脂酸鋁、甲基纖維素、羧甲基纖維素、羥甲基纖維素、月桂基硫酸鈉等。作為乳化劑，例如，可使用阿拉伯膠、海藻酸鈉、西黃耆膠等。作為無痛化劑，例如，可使用苯甲基醇、氯丁醇、山梨糖醇等。作為緩衝劑，例如，可使用磷酸緩衝液、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。作為保存劑，例如，可使用對羥基安息香酸甲酯、對羥基安息香酸乙酯、對羥基安息香酸丙酯、對羥基安息香酸丁酯、氯丁醇、苯甲醇、苯札氯銨、脫氫乙酸鈉、依地酸鈉、硼酸、硼砂等。作為防腐劑，例如，可使用苯札氯銨、對羥基安息香酸、氯丁醇等。作為 pH 調整劑，例如，可使用鹽酸、氫氧化鈉、磷酸、乙酸等。作為抗氧化劑，例如，可使用(1)抗壞血酸、鹽酸半胱胺酸、硫酸氫鈉、焦亞硫酸鈉、亞硫酸鈉等方式之水溶性抗氧化劑、(2)抗壞血酸棕櫚酸酯、丁基化羥基茴香醚、丁基化羥基甲苯、卵磷脂、沒食子酸丙酯、 α -生育酚等方式之油溶性抗氧化劑及(3)檸檬酸、乙二胺四乙酸、山梨糖醇、酒石酸、磷酸等方式之金屬螯合劑等。

【0084】注射劑或點滴用的輸液，其最終步驟中可藉由滅菌或者無菌操作法，例如，以過濾器等過濾滅菌，其次填充於無菌的容器而可製造。再者，注射劑或點滴用的輸液，亦可將經由真空乾燥及凍結乾燥之無菌粉末(亦可包含藥學上可容許載體的粉末)，於使用時溶解於適當溶劑而使用。

【0085】併用或配合劑

再者，本發明相關之 PD-1/CD3 雙特異性蛋白質亦可與使用於血液性癌症的預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療之其他藥劑一起組合使用。本發明中，與其他藥劑一起組合使用的情況(併用)的投藥形態，可為 1 個製劑中調配兩成分之調配劑的形態，或者可為作為個別的製劑的投藥形態。經由此併用，可補足其他藥劑之預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療功效，維持至減低投藥量或者投藥次數。本發明相關之 PD-1/CD3 雙特異性蛋白質與其他藥劑分別地投藥的情況，亦可一定期間同時投藥之後，僅

投藥 PD-1/CD3 雙特異性蛋白質或者僅投藥其他藥劑。再者，亦可先投藥本發明相關之 PD-1/CD3 雙特異性抗體等，於該投藥結束後投藥其他藥劑，亦可先投藥其他藥劑，於該投藥結束後投藥本發明相關之 PD-1/CD3 雙特異性蛋白質，各別的投藥方法可相同亦可不同。可提供作為包含本發明相關之 PD-1/CD3 雙特異性蛋白質之製劑與包含其他藥劑之製劑的套組。此處，其他藥劑的投藥量，可以臨床上使用的用量作為基準適宜選擇。再者，其他藥劑亦可將任意的 2 種以上以適宜的比例組合投藥。再者，前述其他藥劑，不只目前為止已發現者，亦包含今後發現者。

【0086】 例如，亦可與選自烷化劑(例如，達卡巴嗪(Dacarbazine)、尼莫司汀(Nimustine)、替莫唑胺(Temozolomide)、福莫司汀(Fotemustine)、苯達莫司汀(Bendamustine)、環磷醯胺(Cyclophosphamide)、異環磷醯胺(Ifosfamide)、卡莫司汀(Carmustine)、丁苯丁酸(Chlorambucil)及丙卡巴嗪(Procarbazine)等)、鉑製劑(例如，順鉑(Cisplatin)、卡鉑(Carboplatin)、奈達鉑(Nedaplatin)及奧沙利鉑(Oxaliplatin)等)、代謝拮抗劑(例如，葉酸代謝拮抗藥(例如，培美曲塞(Pemetrexed)、白葉素(Leucovorin)及甲胺蝶呤(Methotrexate)等)、吡啶代謝阻礙藥(例如，TS-1(註冊商標)、5-氟尿嘧啶、UFT、卡莫夫(Carmofur)、多西氟定(Doxifluridine)、FdUrd、阿糖胞苷(Cytarabine)及卡培他濱(Capecitabine)等)、嘌呤代謝阻礙藥(例如，氟達拉濱(Fludarabine)、克拉曲濱(Cladribine)及奈拉濱(Nelarabine)等)、核糖核苷酸還原酶阻礙藥、核苷酸類似物(例如，吉西他濱(Gemcitabine)等))、拓撲異構酶阻礙藥(例如，依立替康(Irinotecan)、諾吉替康(Nogitecan)及依托泊苷(Etoposide)等)、微管聚合阻礙藥(例如，長春花鹼(Vinblastine)、長春

新鹼(Vincristine)、長春地辛(Vindesine)、長春瑞濱(Vinorelbine)及依瑞布林(Eribulin)等)、微管脫聚合阻礙藥(例如，多西紫杉醇(Docetaxel)及太平洋紫杉醇(Paclitaxel)等)、抗腫瘤性抗生物質(例如，博來黴素(Bleomycin)、絲裂黴素 C (Mitomycin C)、多柔比星(Doxorubicin)、柔紅黴素(Daunorubicin)、伊柔比星(Idarubicin)、依托泊苷(Etoposide)、米托蒽醌(Mitoxantrone)、長春花鹼(Vinblastine)、長春新鹼(Vincristine)、派來黴素(Peplomycin)、安氯黴素(Amrubicin)、阿克拉黴素(Aclarubicin)及表柔比星(Epirubicin)等)、細胞介素製劑(例如，IFN- α 2a、IFN- α 2b、PEG-IFN- α 2b、天然型 IFN- β 及介白素-2 等)、分子標的藥、癌免疫治療藥及其他抗體醫藥等之任何一種以上的藥劑組合使用。

【0087】 此處，作為分子標的藥，例如，可列舉 ALK 阻礙劑(例如，克唑替尼(Crizotinib)、昔立替尼(Ceritinib)、恩薩替尼(Ensartinib)、阿勒替尼(Alectinib)及羅拉替尼(Lorlatinib)等)、BCR-ABL 阻礙劑(例如，伊瑪替尼(Imatinib)及達薩替尼((Dasatinib)等)、AXL 阻礙劑(例如，ONO-7475 及貝申替尼(Bemcentinib)等)、CDK 阻礙劑(例如，迪納西林(Dinaciclib)、玻馬西林(Abemaciclib)、帕柏西林(Palbociclib)及曲拉西林(trilaciclib)等)、BTK 阻礙劑(例如，伊魯替尼(Ibrutinib)及阿卡替尼(Acalabrutinib)等)、PI3K- δ/γ 阻礙劑(例如，屋拉立昔(Umbralisib)、帕薩立昔(Parsaclisib)及 IPI-549 等)、JAK-1/2 阻礙劑(例如，伊塔替尼(Itacitinib)及魯索替尼(Ruxolitinib)等)、FAK 阻礙劑(例如，狄非替尼(Defactinib)等)、Syk/FLT3 雙阻礙劑(例如，咪伐替尼(Mivavotinib)等)、ATR 阻礙劑(例如，克拉替布(Ceralasertib)等)、WEE1 激酶阻礙劑(例如，阿伐替布(Adavosertib)等)、

mTOR 阻礙劑(例如，替莫羅莫司(Temsirolimus)、依維莫司(Everolimus)、維斯替布(Vistusertib)及伊立替康(Irinotecan)等)、HDAC 阻礙劑(例如，伏立諾他(Vorinostat)、羅米地辛(Romidepsin)、恩替諾他(Entinostat)、西達苯胺(Chidamide)、莫西他汀(Mocetinostat)、西他諾司他(Citarinostat)、泛美司他(Panobinostat)、及丙戊酸鹽(Valproate)等)、EZH2 阻礙劑(例如，他則司他(Tazemetostat)等)、STAT3 阻礙劑(例如，那布卡辛(Napabucasin)等)、DNMT 阻礙劑(例如，阿札胞苷(Azacitidine)等)、BCL-2 阻礙劑(例如，那維托克(Navitoclax)及凡尼托克(Venetoclax)等)、SMO 阻礙劑(例如，維莫德吉(Vismodegib)等)、抗 CD20 抗體(例如，利妥昔單抗(Rituximab)、貝妥莫單抗(Blontuvetmab)、依匹莫單抗(Epitumomab)、替依莫單抗(Ibritumomab tiuxetan)、奧卡拉單抗(Ocaratuzumab)、奧瑞珠單抗(Ocrelizumab)、諾莫非諾單抗銻(Technetium (^{99m}Tc) nofetumomab merpentan)、托西莫單抗(Tositumomab)、維妥珠單抗(Veltuzumab)、奧法木單抗(Ofatumumab)、烏布妥昔單抗(Ublituximab)、奧比妥珠單抗(Obinutuzumab)及諾莫非諾單抗(Nofetumomab)等)、抗 CD30 抗體(例如，本妥昔單抗(Brentuximab Vedotin)及依妥木單抗(Iratumumab)等)、抗 CD38 抗體(例如，達拉他單抗(Daratumumab)、依沙妥昔單抗(Isatuximab)、美紮格達單抗(Mezagitamab)、(AT13/5 及 MOR202 等)、抗 TNFRSF10B 抗體(例如，貝努妥單抗(Benufutamab)、柯那吐木單抗(Conatumumab)、德羅圖單抗(Drozitumab)、來沙木單抗(Lexatumumab)、替加珠單抗(Tigatuzumab)、依法酯 α(Eftozanermin alfa)及 DS-8273a 等)、抗 CD40 抗體(例如，巴利昔單抗(Bleselumab)、達西珠單抗(Dacetuzumab)、依卡利

單抗(Iscalimab)、魯卡木單抗(Lucatumumab)、咪塔札單抗(Mitazalimab)、拉伐加單抗(Ravagalimab)、昔利克單抗((Selicrelumab)、替奈昔單抗(Teneliximab)、(ABBV-428 及 APX005M 等)、抗 CD70 抗體(例如，庫沙妥珠單抗(Cusatuzumab)、伏妥珠單抗(Vorsetuzumab)、伏妥珠單抗馬佛多坦(Vorsetuzumab mafodotin)及 ARGX-110 等)、抗 TNFRSF10A 抗體(例如，馬他妥單抗(Mapatumumab)等)、抗 CD79b 抗體(例如，依拉達珠單抗(Iladatuzumab)、依拉達珠單抗維多汀(Iladatuzumab vedotin)及波拉珠單抗維多汀(Polatuzumab vedotin)等)、抗 TNFSF11 抗體(例如，地諾單抗(Denosumab)等)、抗 NCAM1 抗體(例如，洛妥珠單抗美登素(Lorvotuzumab mertansine)等)、抗 CD37 抗體(例如，利洛他單抗(Lilotomab)、利洛他單抗 鐳(Lutetium(¹⁷⁷lu) lilotomab satetraxetan)、那拉妥昔單抗(Naratuximab)、那拉妥昔單抗恩單辛(Naratuximab emtansine)及歐勒妥珠單抗(Otlertuzumab)等)、抗 CD200 抗體(例如，薩瑪利珠單抗(Samalizumab)等)、抗 CD30-CD16A 雙特異性抗體(例如，AFM13 等)、抗 IL3RA-CD3 雙特異性抗體(氟妥珠單抗(Flotetuzumab)及維貝可他單抗(Vibecotamab)、抗 GPRC5D-CD3 雙特異性抗體(他奎達單抗(Talquetamab))、抗 CD3-CD19 雙特異性抗體(例如，度伐吐西單抗(Duvortuxizumab)及伯納吐單抗(Blinatumomab))、抗 TNFRSF17-CD3 雙特異性抗體(替利他單抗(Teclistamab))、抗 CLEC12A-CD3 雙特異性抗體(替波迪他單抗(Tepoditamab))、及抗 CD20-CD3 雙特異性抗體(例如，普拉莫他單抗(Plamotamab)、歐隆尼單抗(Odronextamab)、莫桑尼珠單抗

(Mosunetuzumab)、格羅非單抗(Glofitamab)、依普利他單抗(Epcoritamab)及 REGN1979 等)等。

【0088】再者，作為癌免疫治療藥，例如，可列舉抗 PD-1 抗體(例如，納武單抗(Nivolumab)、西米普利單抗(Cemiplimab)、匹博利珠單抗(Pembrolizumab)、斯帕塔利單抗(Spartalizumab)、替雷利珠單抗(Tislelizumab)、多斯塔利單抗(Dostarlimab)、特瑞普利單抗(Toripalimab)、卡瑞利珠單抗(Camrelizumab)、杰諾單抗(Genolimzumab)、信替利單抗(Sintilimab)、洛達普利單抗(Lodapolimab)、瑞替弗利單抗(Retifanlimab)、巴斯替利單抗(Balstilimab)、斯普魯利單抗(Serplulimab)、布迪格利單抗(Budigalimab)、普洛格利單抗(Prolgolimab)、薩山利單抗(Sasanlimab)、西曲利單抗(Cetrelimab)、吉柏利單抗(Zimberelimab)、AMP-514、STI-A1110、ENUM 388D4、ENUM 244C8、GLS010、CS1003、BAT-1306、AK105、AK103、BI 754091、LZM009、CMAB819、Sym021、GB226、SSI-361、JY034、ISU106、HX008 及 CX-188 等)、抗 PD-L1 抗體(例如，阿特利珠單抗(Atezolizumab)、阿維魯單抗(Avelumab)、度伐魯單抗(Durvalumab)、曼尼利單抗(Manelimab)、帕米利單抗(Pacmilimab)、恩伐利單抗(Envafolimab)、科西貝利單抗(Cosibelimab)、BMS-936559、STI-1010、STI-1011、STI-1014、SHR-1316、CS1001、MSB2311、BGB-A333、KL-A167、AK106、AK104、ZKAB001、FAZ053、CBT-502 及 JS003 等)、PD-1 拮抗劑(例如，AUNP-12、BMS-M1~BMS-M10 之各化合物、BMS-1、BMS-2、BMS-3、BMS-8、BMS-37、BMS-200、BMS-202、BMS-230、BMS-242、BMS-1001、BMS-1166、Incyte-1~Incyte-6 之各化合物、CAMC-

1~CAMC-4 之各化合物、RG_1 及 DPPA-1 等)、PD-L1/VISTA 拮抗劑(例如, CA-170)、PD-L1/TIM3 拮抗劑(例如, CA-327)、抗 PD-L2 抗體、PD-L1 雜合蛋白質、PD-L2 雜合蛋白質(例如, AMP-224 等)、抗 CTLA-4 抗體(例如, 依匹利珠單抗(Ipilimumab)、札利夫列單抗(Zalifrelimab)、努魯利單抗(Nurulimab)及曲美利姆單抗(Tremelimumab)等)、抗 LAG-3 抗體(例如, 雷拉利單抗(Relatlimab)、依拉米利單抗(Ieramylimab)、菲安利單抗(Fianlimab)、恩昔利單抗(Encelimab)及馬維則利單抗(Mavezelimab)等)、抗 TIM3 抗體(例如, MBG453、可波利單抗(Cobolimab)等)、抗 KIR 抗體(例如, 利立魯單抗(Lirilumab)、IPH2101、LY3321367 及 MK-4280 等)、抗 BTLA 抗體、抗 TIGIT 抗體(例如, 替拉格魯單抗(Tiragolumab)、愛替吉單抗(Etigilimab)、威柏托利單抗單抗(Vibostolimab)及 BMS-986207 等)、抗 VISTA 抗體(例如, 奧瓦替利單抗(Onvatilimab)等)、抗 CD137 抗體(例如, 烏瑞魯單抗(Urelumab)及烏托米魯單抗(Utomilumab)等)、抗 CSF-1R 抗體/CSF-1R 阻礙劑(例如, 卡畢拉利單抗(Cabiralizumab)、恩瑪妥珠單抗(Emactuzumab)、單抗 LY3022855、阿沙替林單抗(Axatilimab)、單抗 MCS-110、IMC-CS4、AMG820、培西達替尼(Pexidartinib)、BLZ945 及 ARRY-382 等)、抗 OX40 抗體(例如, MEDI6469、依武索單抗(Ivuxolimab)、MEDI0562、MEDI6383、恩菲佐利摩(Efizonerimod)、GSK3174998、BMS-986178 及 MOXR0916 等)、抗 HVEM 抗體、抗 CD27 抗體(例如, 瓦利魯單抗(Varlilumab)等)、抗 GITR 抗體/GITR 雜合蛋白質(例如, 依法普林 α (Efaprinermin alfa)、依伏吉法林 α (Efgivanermin alfa)、MK-4166、INCAGN01876、GWN323 及 TRX-518 等)、抗 CD28 抗體、

抗 CCR4 抗體(例如，莫加木利珠單抗(Mogamulizumab)等)、抗 B7-H3 抗體(例如，恩諾利妥珠單抗(Enoblituzumab)、米佐他單抗(Mirzotamab)、米佐他單抗克如托克(Mirzotamab clezutoclax)及奧姆巴他單抗(Omburtamab)等)、抗 ICOS 激動劑抗體(例如，伏拉特利單抗(Vopratelimab)及 GSK3359609 等)、抗 CD4 抗體(例如，紮諾利木單抗(Zanolimumab)及 IT1208 等)、抗 DEC-205 抗體/NY-ESO-1 雜合蛋白質(例如，CDX-1401)、抗 SLAMF7 抗體(例如，阿欽妥昔單抗(Azintuxizumab)、阿欽妥昔單抗維多汀(Azintuxizumab vedotin)及依洛妥珠單抗(Elotuzumab)等)、抗 CD73 抗體(例如，奧勒魯單抗(Oleclumab)及 BMS-986179 等)、PEG 化 IL-2(Bempegaldesleukin)、抗 CD40 激動劑抗體(例如，ABBV-428、APX005M 及 RO7009789 等)、IDO 阻礙劑(例如，依帕卡斯他(Epacadostat)、因度昔莫(Indoximod)及林洛斯他(Linrodostat)等)、TLR 激動劑(例如，莫托利莫(Motolimod)、CMP-001、G100、替索托利莫(Tilsotolimod)、SD-101 及 MEDI9197 等)、腺苷 A2A 受體拮抗劑(例如，普瑞德南特(Preladenant)、AZD4635、他米那南特(Taminadenant)及西佛拉南特(Ciforadenant)等)、抗 NKG2A 抗體(例如，莫那利珠單抗(Monalizumab)等)、抗 CSF-1 抗體(例如，PD0360324 等)、免疫增強劑(例如，PV-10 等)、IL-15 超級激動劑(例如，ALT-803)、可溶性 LAG3(例如，IMP321 等)、抗 CD47 抗體/CD47 拮抗劑(例如，ALX148 等)及 IL-12 拮抗劑(例如，M9241 等)等。

【0089】再者，作為其他的抗體醫藥，例如，可列舉抗 IL-1 β 抗體(例如，康那其努單抗(Canakinumab)等)及抗 CCR2 抗體(例如，波洛紮利珠單抗(Plozalizumab)等)等。

再者，本發明相關之 PD-1/CD3 雙特異性蛋白質，亦可與類固醇藥(例如，可體松、可體松乙酸酯、氫化可體松、磷酸氫可體松磷酸酯鈉、氫化可體松琥珀酸酯鈉、氟可體松乙酸酯、潑尼松龍、潑尼松龍乙酸酯、潑尼松龍琥珀酸酯鈉、丁基乙酸酯潑尼松龍、潑尼松龍磷酸酯鈉、氟哌啶醇乙酸酯、甲基潑尼松龍、甲基潑尼松龍乙酸酯、甲基潑尼松龍琥珀酸酯鈉、曲安西龍、乙酸曲安西龍、曲安西龍丙酮酸酯、地塞米松、地塞米松乙酸酯、地塞米松戊酸酯、地塞米松 21-環己烷羧酸酯、地塞米松丙酸酯、地塞米松磷酸酯鈉、地塞米松棕櫚酸酯、地塞米松偏磺基苯甲酸酯鈉、帕拉米松、帕拉米松乙酸酯、倍他米松、倍他米松二丙酸酯、倍他米松戊酸酯、倍他米松乙酸酯、倍他米松丁酸酯丙酸酯及倍他米松磷酸酯鈉等)組合使用。

【0090】本發明雖藉由如下的實施例進一步詳細地說明，但本發明的範圍不限定於該等。基於本發明的記載，所屬技術領域中具有通常知識者可進行各種變更、修飾，該等變更、修飾亦包含於本發明。

[實施例]

【0091】實施例 1：使用重組人 PD-1-Fc 雜合蛋白質對 MeMo(註冊商標)小鼠的免疫

作為本發明相關之特異性地結合於 PD-1 之第一臂係構成抗體部分的情況之取得該等的方法，選擇於 MeMo(註冊商標)小鼠(WO2009/157771 參

照)進行重組人 PD-1 蛋白質免疫的方法。MeMo(註冊商標)小鼠係將包含非重組人重鏈 V 基因區、D 基因區及 J 基因區以及重組人 κ 輕鏈 IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01 生殖細胞系列型基因的基因片段，使其連結於小鼠恆定區基因之受到基因改變的小鼠，藉由抗體的標的蛋白質的直接免疫，可產生具有多樣性之由重鏈與共通輕鏈所構成之抗體。

【0092】 於 12~16 週齡的 12 隻 MeMo(註冊商標)MS5B/MS9 小鼠，使用 Gerbu adjuvant MM(Gerbu Biotechnik、型號#3001)乳化之重組人 PD-1-Fc 雜合蛋白質(R&D Systems、型號 1086-PD)以 14 日間隔各別進行免疫。於免疫第 0 日、第 14 日及第 28 日皮下投藥相同的重組人 PD-1-Fc 雜合蛋白質，於以後的時間點，皮下投藥經溶解於 PBS 的相同的重組人 PD-1-Fc 雜合蛋白質。於免疫第 21 日、第 35 日、第 56 日、第 77 日及第 98 日，經由使用人 PD-1 強制表現 HEK293T 細胞株的流式細胞分析術，評價血清中抗體價。於 1000 倍稀釋的血清中，人 PD-1 強制表現 HEK293T 細胞株經染色的情況，與成為對照之人 PD-1 非表現 HEK293T 細胞株比較，MFI 值為 3 倍以上增加的小鼠的淋巴組織，使用於噬菌體展示庫的構築。滿足進行庫的構築的小鼠，自抗體價的評價日起 3 日，以重組 PD-1-Fc 雜合蛋白質追加免疫，回收脾臟及腹股溝淋巴結。對於人 PD-1 及食蟹猴 PD-1 之血清中抗體價為 1/100 以上，且藉由追加免疫之抗體價不上昇的小鼠，亦回收脾臟及腹股溝淋巴結。由該等淋巴組織抽出 RNA 後，進行 cDNA 合成。

【0093】 實施例 2:具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂之抗 PD-1 抗體取得用之噬菌體展示庫的構築(蛋白質免疫)

使用實施例 1 所調製的 DNA，使用免疫球蛋白重鏈可變區家族為特異性的引子進行 PCR 反應。相同的 PCR 產物以限制酵素 SfiI 及 XhoI 切斷後，插入於使用相同限制酵素切斷的 MV1473 噬菌粒載體[包含編碼共通輕鏈的基因(人 κ 輕鏈 IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01 生殖細胞系列型基因)]，構築相同的庫。

【0094】 實施例 3: 具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂的抗 PD-1 抗體的篩選

使用以人 PD-1-Fc 雜合蛋白質、人 PD-1-His Tag 雜合蛋白質、食蟹猴 PD-1-His Tag 雜合蛋白質或小鼠 PD-1-His Tag 雜合蛋白質被覆的盤，基於對 PD-1 的結合性實施噬菌體選擇。使用人 PD-1-Fc 雜合蛋白質的情況，與噬菌體培養間，藉由添加人 IgG(SIGMA，型號 I4506)，吸收 Fc 反應性純株。將與人 PD-1、食蟹猴 PD-1 及小鼠 PD-1 結合之結合噬菌體濃縮。經由以食蟹猴 PD-1 表現 HEK293T 細胞株的選擇，將與食蟹猴 PD-1 結合之噬菌體濃縮。取得以藉由選擇獲得噬菌體進行形質轉換的大腸菌株 TG1 的純株，製作母盤。

【0095】 再者，基於已吸附人 PD-1-Fc 雜合蛋白質之盤上對於 PD-1 的結合性，由上述選擇所獲得的純株的周質抽出物，實施噬菌體選擇。又，作為選擇基準，對於陰性對照孔(PBS)所獲得的信號(OD₄₅₀ 值)，得到 3 倍以上的信號者作為陽性純株。

【0096】 實施例 4: 具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂之抗 PD-1 抗體的候補純株的 DNA 定序

實施藉由實施例 3 的篩選所取得的陽性純株的重鏈可變區基因的 DNA 定序。所解析的 DNA 序列分類為超級集簇 (CDR3 為相同長度、CDR3 的胺基酸序列為 70%以上相同的一群)與集簇 (重鏈 CDR3 的胺基酸序列為相同的一群)。所取得的 924 個純株，該等分類為 146 種的超級集簇及 194 種的集簇。

【0097】 實施例 5：對於 PD-1 表現細胞經由結合性評價的篩選

由以分類的各超級集簇，選別滿足如下條件的抗 PD-1 單株抗體純株，進行單離。

- (1) 於 CDR 區以高頻度的導入體細胞突變，
- (2) 具有使用頻率高的 VH 生殖細胞系列型基因，及
- (3) 於對於人 PD-1-Fc 雜合蛋白質之結合性篩選中獲得高的信號。

【0098】 使用包含於該等周質抽出物之 Fab 片段，以抗小鼠 IgG 多株抗體檢測對於人 PD-1 表現 CHO-S 細胞株、食蟹猴 PD-1 表現 CHO-S 細胞株之結合性予以評價。所評價的 117 個純株(105 種集簇)中，於包含抗 PD-1 單株抗體純株 PD1-1、PD1-2、PD1-3 及 PD1-4 之 22 個純株確認對於人 PD-1 表現 CHO-S 細胞株的結合性。

【0099】 實施例 6：具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂之抗 PD-1 單株抗體的胺基酸置換體的製作

純株 PD1-1 及 PD1-4，於其重鏈可變區的框架 4 包含脫醯胺化模體 (Asn-Gly)。以脫醯胺化的風險精簡低的第一臂的取得為目的，製作該脫醯胺化模體經變化的變異體。該純株 PD1-4 依據 EU 編號系統之 119 第號的天冬醯胺(Asn)，係經由習知的部位特異性變異法，成為麩胺醯胺而製作精

改變的純株 PD1-5，進行單離。相同純株對於人 PD-1 表現 CHO-S 細胞之結合性亦與純株 PD1-4 為同等。

【0100】 實施例 7：具有特異性地結合於 CD3 之第二臂之抗 CD3 單株抗體的篩選

基於 WO2005/118635 所記載之抗 CD3 抗體純株 15C3 的 VH 及 IGVK1-39/JK1 共通輕鏈所構成之抗 CD3 抗體純株，為了進一步地取得電荷不均一性已減低的安定的 CD3 結合 Fab，實施下述方法，取得本發明相關之具有「特異性地結合於 CD3 之第二臂」之抗 CD3 抗體。

【0101】 示於圖 10 之 15C3 的 VH 的胺基酸序列中，經由底線所示之第 55 號甘胺酸變換為丙胺酸，取得具有與前記抗 CD3 抗體純株為同等的人 CD3 結合性，且電荷不均一性已改善的抗 CD3 抗體純株 CD3-1。

【0102】 再者，為了取得與共通輕鏈(IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01)之 VH/VL 相互作用有改善的複數個 CD3 結合 Fab，基於純株 CD3-1 的 VH，構築其胺基酸殘基已置換的純株 CD3-1 的 VH 變異體所構成之 Fab 為複數表現之噬菌體展示庫。使用 HBP-ALL 細胞或重組人 CD3 ϵ -Fc 蛋白質進行篩選該噬菌體庫。與重組人 CD3 ϵ -Fc 蛋白質結合之噬菌體化學性地使其溶出，使用於細菌的再感染。摘出複數個殘存的細菌菌落後，抽出噬菌體，藉由流式細胞分析術篩選對於細胞表面表現 CD3 的結合。關於顯示 CD3 結合的噬菌體，進行菌落 PCR 使編碼 VH 的 cDNA 擴增，決定其 DNA 序列。

【0103】其結果所取得之具有由序列編號 36 的胺基酸序列所構成之 VH 的抗 CD3 抗體純株 CD3-2，顯示與純株 CD3-1 為同等的 CD3 結合性及電荷均一性。

【0104】實施例 8：PD-1/CD3 雙特異性單株抗體的調製

特異性地結合於 PD-1 之第一臂係構成抗體部分的情況，表現該抗體之各別的重鏈的表現載體，係將實施例 5 所選擇之編碼抗 PD-1 單株抗體純株 PD1-1~PD1-5 及 PD1-6 之各別的重鏈可變區的 DNA，與編碼 IgG₁ 重鏈恆定區的 DNA 各別地連結而製作。另一方面，表現特異性地結合於 CD3 之第二臂的重鏈的表現載體，係將實施例 7 所選擇之抗 CD3 單株抗體純株編碼 CD3-2 的重鏈可變區的 DNA，與編碼 IgG₁ 重鏈恆定區的 DNA 連結而製作。此處，表現該等重鏈恆定區的基因，於特異性地結合於 PD-1 之第一臂的情況係使用表現具有 L351D/L368E 變異(DE 變異)之 Fc 區者，於特異性地結合於 CD3 之第二臂的情況亦使用表現具有 L351K/T366K 變異(KK 變異)之 Fc 區者。該等表現載體中，以與 IGVK1-39/JK1 共通輕鏈同時表現的方式，以包含編碼該等之基因的方式構築。再者，表現該等重鏈恆定區的基因中，為了各別地使 Fc 起效子活性消失，以表現重鏈恆定區的第 235 號白胺酸被置換為甘胺酸，第 236 號甘胺酸被置換為精胺酸的方式改變，再者，為了迴避轉譯後的修飾(processing)，使用重鏈恆定區 C 末端第 447 號的離胺酸經缺失之以改變者。該等表現載體同時於 Free Style 293F 細胞進行基因導入，使抗體產生於培養上清中。回收培養上清，應由蛋白質 A 親和層析進行處理，各別精製本發明相關之 PD-1/CD3 雙特異性單株抗體之純株 PD1-1(Bi)、純株 PD1-2(Bi)、純株 PD1-

3(Bi)、純株 PD1-4(Bi)及純株 PD1-5(Bi)。再者，關於純株 PD1-6(Bi)，亦進行同樣的方法製作。又，該等 PD-1/CD3 雙特異性單株抗體純株，係源自於其製作中所使用之抗 PD-1 單株抗體純株 PD1-1、PD1-2、PD1-3、PD1-4 及 PD1-5 以及 PD1-6，於具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂之點，各別地對應於該等抗 PD-1 單株抗體純株。

【0105】 實施例 9：PD-1/CD3 雙特異性單株抗體的結合性評價

使用人 IgG1-Fc 雜合人 PD-1 細胞外區重組蛋白質或 6×His Tag 雜合食蟹猴 PD-1 細胞外區重組蛋白質進行 Biacore(註冊商標)測定，評價實施例 8 中所取得之 PD-1/CD3 雙特異性單株抗體之第一臂對於各 PD-1 重組蛋白質的結合親和性。又，該重組蛋白質的固定化，係使用 Series S Sensor Chip CM5 感應晶片(GE Healthcare，型號 29-1049-88)。同樣地，使用人 IgG1-Fc 雜合 CD3 δ /CD3 ϵ 細胞外區重組蛋白質進行 Biacore(註冊商標)測定，評價同抗體之第二臂的 CD3 結合親和性。各純株之第一臂對於 PD-1 的結合親和性(K_d 值)以及第二臂對於 CD3 δ /CD3 ϵ 的結合親和性示於圖 11。

【0106】 實施例 10：PD-1/CD3 雙特異性單株抗體的結合性確認

實施例 8 中所取得之 PD-1/CD3 雙特異性單株抗體係確認與 PD-1 及 CD3 同時地各別地特異性結合。

首先，對於表現人 CD3 之人 PD-1 缺失 Jurkat 細胞株(人 T 細胞株)，各別添加純株 PD1-1(Bi)~PD1-6(Bi)，於冰上培育 15 分鐘。洗淨細胞後，添加 3 倍量之經生物素標識的可溶性 PD-1 重組蛋白質(R&D systems，型號 1086-PD-050)，於冰上培育 15 分鐘。洗淨細胞後，添加 100 μ L 的 Alexa

Fluor 488 標識的鏈黴親和素(BioLegend、型號 405235)1.25 μ g/mL，於冰上培育 15 分鐘。洗淨細胞後，進行流式細胞分析術評價可溶性 PD-1 重組蛋白質的結合量。該分析的結果示於圖 12。

【0107】任一純株皆同時與 PD-1 及 CD3 結合。又，未檢出於該實驗系統之非特異性結合。

【0108】實施例 11：PD-1/CD3 雙特異性單株抗體之第一臂的結合特性評價

為了評價實施例 8 中所取得之 PD-1/CD3 雙特異性單株抗體之第一臂對 PD-1/PD-L1 結合的影響，關於同雙特異性單株抗體純株與可溶性 PD-L1 重組蛋白質對 PD-1 的結合進行競爭結合分析。首先，對於人 PD-1 表現 CHO-S 細胞株各別地添加純株 PD1-1(Bi)~PD1-6(Bi)，於冰上培育 30 分鐘。再者，添加 1/20 量的經生物素標識的可溶性 PD-L1 重組蛋白質(R&D systems，型號 156-B7-100)，於冰上培育 30 分鐘。洗淨細胞後，添加 PE 標識鏈黴親和素(BD Pharmingen，型號 554061)於冰上培育 30 分鐘。洗淨細胞後，進行流式細胞分析術評價可溶性 PD-L1 重組蛋白質的結合量。其結果示於圖 13。

【0109】純株 PD1-1(Bi)~PD1-5(Bi)，不論對於可溶性 PD-L1 重組蛋白質是否 20 倍量存在，容許對於 PD-1 之可溶性 PD-L1 重組蛋白質的結合。另一方面，PD1-6(Bi)係於相同條件完全地阻礙對於 PD-1 之可溶性 PD-L1 重組蛋白質的結合。

【0110】實施例 12：PD-1/CD3 雙特異性單株抗體各純株對於 PD-1 的結合之 PD1-5(Bi)的交叉競爭性的評價

為了評價實施例 8 中所取得之 PD-1/CD3 雙特異性單株抗體各純株 PD1-1(Bi)~PD1-5(Bi)之對於 PD-1 的結合之 PD1-5(Bi)的交叉競爭性，進行競爭結合分析。

【0111】 首先，對於人 PD-1 表現 CHO-S 細胞株添加純株 PD1-5(Bi)，於冰上培育 20 分鐘。再者，對於已添加的純株 PD1-5(Bi)各別地添加 1/100 量的經生物素標識的純株 PD1-1(Bi)~PD1-5(Bi)，於冰上培育 20 分鐘。洗淨細胞後，添加 PE 標識鏈黴素親和素(BD Pharmingen，型號 554061)於冰上培育 20 分鐘。洗淨細胞後，進行流式細胞分析術評價經生物素標識的純株 PD1-1(Bi)~PD1-5(Bi)的結合量。其結果示於圖 14。

【0112】 PD1-5(Bi)係顯示阻礙純株 PD1-1(Bi)~PD1-4(Bi)對於 PD-1 的結合，相同純株係顯示該等之對於 PD-1 的結合之交叉競爭。

【0113】 實施例 13：PD-1/CD3 雙特異性單株抗體之對於 B 細胞淋巴瘤細胞株的細胞增殖抑制作用

使用源自健康人末梢血之 pan-T 細胞(STEMCELL，型號 ST-70024)(人 T 細胞)，評價對於 B 細胞淋巴瘤細胞株之細胞增殖抑制作用。於 U 底 96 孔盤，播種人 T 細胞與經 Vybrant DiD Cell-Labeling Solution(Thermo Fisher，型號 V22887)標識的 B 細胞淋巴瘤細胞株 EB-1 或人 PD-1 強制表現 SU-DHL-4，添加 PD-1/CD3 雙特異性單株抗體之純株 PD1-5(Bi)，共培養 48 小時。由各孔回收細胞，利用 Cell Viability Solution 染色，於流式細胞術計數 DiD 陽性活細胞數。不添加抗體的樣品之 DiD 陽性活細胞作為 100%，算出添加 PD1-5(Bi)的樣品的 DiD 陽性活細胞的減少率作為細

胞增殖抑制率。其結果各別地示於圖 15(A)及(B)。經由 PD1-5(Bi)添加之任一者的 B 細胞淋巴瘤細胞株皆為增殖抑制。

【0114】 實施例 14:PD-1/CD3 雙特異性單株抗體之對於多發性骨髓腫細胞株的細胞增殖抑制作用

使用源自健康人末梢血之 pan-T 細胞(STEMCELL, 型號 ST-70024)(人 T 細胞), 評價對於多發性骨髓腫細胞株之細胞增殖抑制作用。於 U 底 96 孔盤, 播種人 T 細胞與經 Vybrant DiD Cell-Labeling Solution(Thermo Fisher, 型號 V22887)標識的多發性骨髓腫細胞株 RPMI8226, 添加 PD-1/CD3 雙特異性單株抗體之純株 PD1-5(Bi), 共培養 48 小時。由各孔回收細胞, 利用 Cell Viability Solution 染色, 於流式細胞術計數 DiD 陽性活細胞數。不添加抗體的樣品之 DiD 陽性活細胞作為 100%, 算出添加 PD1-5(Bi)的樣品的 DiD 陽性活細胞的減少率作為細胞增殖抑制率。其結果示於圖 16。經由 PD1-5(Bi)添加 RPMI8226 為增殖抑制。

【0115】 實施例 15:PD-1/CD3 雙特異性單株抗體之對於成人 T 細胞性淋巴瘤細胞株的細胞增殖抑制作用

使用源自健康人末梢血之 pan-T 細胞(STEMCELL, 型號 ST-70024)(人 T 細胞), 評價對於成人 T 細胞性淋巴瘤細胞株之細胞增殖抑制作用。於 U 底 96 孔盤, 播種人 T 細胞與經 Vybrant DiD Cell-Labeling Solution(Thermo Fisher, 型號 V22887)標識的成人 T 細胞性淋巴瘤細胞株 ILT-Ma, 添加 PD-1/CD3 雙特異性單株抗體之純株 PD1-5(Bi), 共培養 48 小時。由各孔回收細胞, 利用 Cell Viability Solution 染色, 於流式細胞術計數 DiD 陽性活細胞數。不添加抗體的樣品之 DiD 陽性活細胞作為 100%, 算出添

加 PD1-5(Bi)的樣品的 DiD 陽性活細胞的減少率作為細胞增殖抑制率。其結果示於圖 17。經由 PD1-5(Bi)添加之 ILT-Mat 為增殖抑制。

【0116】 實施例 16：PD-1/CD3 雙特異性單株抗體之對於急性 T 細胞性白血病細胞株的細胞增殖抑制作用

使用源自健康人末梢血之 pan-T 細胞(STEMCELL, 型號 ST-70024)(人 T 細胞), 評價對於急性 T 細胞性白血病細胞株的細胞增殖抑制作用。於 U 底 96 孔盤, 播種人 T 細胞與經 Vybrant DiD Cell-Labeling Solution (Thermo Fisher, 型號 V22887)標識的人 PD-1 強制表現 Jurkat(急性 T 細胞性白血病細胞株), 添加 PD-1/CD3 雙特異性單株抗體之純株 PD1-5(Bi), 共培養 48 小時。由各孔回收細胞, 利用 Cell Viability Solution 染色, 於流式細胞術計數 DiD 陽性活細胞數。不添加抗體的樣品之 DiD 陽性活細胞作為 100%, 算出添加 PD1-5(Bi)的樣品的 DiD 陽性活細胞的減少率作為細胞增殖抑制率。其結果示於圖 18。經由 PD1-5(Bi)添加之人 PD-1 強制表現 Jurkat 為增殖抑制。

【0117】 實施例 17：於人 FcRn 結合部位的胺基酸導入變異之 PD-1/CD3 雙特異性單株抗體的製作與 FcRn 結合性評價

PD-1/CD3 雙特異性單株抗體純株 PD1-5(Bi)的重鏈恆定區中依據 EU 編號系統之第 252 號的甲硫胺酸各別地經置換為麩胺酸、脯胺酸、精胺酸及天冬胺酸之抗體純株 Mut1、Mut2、Mut3 及 Mut4, 各別地根據關於胺基酸置換的習知技術的方法製作。再者, 進行同樣的方法各別地製作相同純株 PD1-5(Bi)的重鏈恆定區中依據 EU 編號系統知第 434 號的天冬醯胺

經置換為白胺酸的抗體純株 Mut5，第 438 號的麩胺醯胺經置換為麩胺酸的抗體純株 Mut6。

【0118】其次，該等抗體各別地，對於人 FcRn 或小鼠 FcRn 之結合親和性，使用表面電漿共振評價。於 Biacore T200(GE Healthcare)組裝 Biotin CAPture Kit(GE Healthcare，型號 28-9202-34)的 Series S Sensor Chip CAP，各別地固定、Human FcRn-human B2M(Immunitrack，型號 ITF01)及 Murine FcRn-murine B2M(Immunitrack，型號 ITF07)。於 pH6.0 的條件各別地評價 PD1-5(Bi)及 Mut1~Mut6 的結合性。各別地，對人 FcRn 的結合性實驗結果示於圖 19 及 20，對小鼠 FcRn 的結合性實驗結果示於圖 21。

【0119】Mut1~Mut6 之對人 FcRn 的各親和性，與 PD1-5(Bi)(解離定數(K_D 值)： $2.75 \times 10^{-8} M$)相比較為降低，特別是，Mut4 及 Mut2 為顯著降低者。Mut1 及 Mut4 之對小鼠 FcRn 的各親和性比 PD1-5(Bi)(K_D 值： $1.61 \times 10^{-8} M$)更為降低 (Mut1 之 K_D 值： $4.67 \times 10^{-8} M$)，特別是，Mut4 為顯著降低者。

【0120】實施例 18：PD-1/CD3 雙特異性單株抗體純株 Mut4 之血中動態

其次，使用人 CD3 ϵ /人 PD-1 敲入 C57BL/6 小鼠，評價純株 Mut4 之活體中(in vivo)血中動態。又，人 CD3 ϵ /人 PD-1 敲入 C57BL/6 小鼠，係將根據 Genesis. 2009 Jun;47(6):414-22 所記載的方法製作之人 CD3 ϵ 敲入小鼠及人 PD-1 敲入小鼠，經由習知的方法藉由使其交配而製作。

【0121】 將相同純株於該 C57BL/6 小鼠的尾部靜脈內投藥後 30 分以及 1、2、4、8、24 及 288 小時的時間點，以剪刀剪傷小鼠尾靜脈的一部分，於經肝素處理的管採取約 40 μ L 的血液。採血液進行離心分離調製血漿，使用電化學發光(ECL)法測定相同純株的血漿中濃度。由血漿中濃度的推移，算出其血中半衰期。

【0122】 測定的結果，相同純株的血中半衰期為 8.0 小時，比原本的 PD1-5(Bi)的血中半衰期更為縮短約 160 小時。

【0123】 實施例 19：PD-1/CD3 雙特異性單株抗體之對於 T 細胞急性淋巴性白血病細胞株的細胞增殖抑制作用

使用源自健康人末梢血脂單核細胞(HemaCare，型號 PB009C-1)(人 PBMC)，評價對於 T 細胞急性淋巴性白血病細胞株之細胞增殖抑制作用。於 U 底 96 孔盤播種人 PBMC 及經 Vybrant DiD Cell-Labeling Solution (Thermo Fisher，型號 V22887)標識的 T 細胞急性淋巴性白血病細胞株 HPB-ALL，添加 PD-1/CD3 雙特異性單株抗體之純株 PD1-5(Bi)，共培養 72 小時。由各孔回收細胞，利用 Cell Viability Solution 染色，於流式細胞術計數 DiD 陽性活細胞數。不添加抗體的樣品之 DiD 陽性活細胞作為 100%，算出添加 PD1-5(Bi)的樣品的 DiD 陽性活細胞的減少率作為細胞增殖抑制率。其結果示於圖 22。經由 PD1-5(Bi)添加之 HPB-ALL 為增殖抑制。

【0124】 實施例 20：PD-1/CD3 雙特異性單株抗體之對於皮膚 T 細胞淋巴瘤細胞株的細胞增殖抑制作用

使用源自健康人末梢血脂單核細胞(Precision for Medicine, 型號 93000-10M)(人 PBMC), 評價對於皮膚 T 細胞淋巴瘤細胞株之細胞增殖抑制作用。於 U 底 96 孔盤播種人 PBMC 及經 Vybrant DiD Cell-Labeling Solution(Thermo Fisher, 型號 V22887)標識的皮膚 T 細胞淋巴瘤(蕈狀肉芽腫)細胞株 MJ, 添加 PD-1/CD3 雙特異性單株抗體之純株 PD1-5(Bi), 共培養 72 小時。由各孔回收細胞, 利用 SYTOX Green Dead Cell Stain (Thermo Fisher Scientific, 型號 S34860)染色, 於流式細胞術計數 DiD 陽性活細胞數。不添加抗體的樣品之 DiD 陽性活細胞作為 100%, 算出添加 PD1-5(Bi)的樣品的 DiD 陽性活細胞的減少率作為細胞增殖抑制率。經由 PD1-5(Bi)添加, 皮膚 T 細胞淋巴瘤細胞株 MJ 為增殖抑制。

【0125】 實施例 21: 標的細胞上之 PD-1 表現量愈 PD-1/CD3 雙特異性單株抗體之細胞傷害活性的評價

對於人 PD-1 強制表現 SU-DHL-4、EB-1 及 RPMI8226 之各標的細胞, 根據實施例 13 及 14 所記載的方法各別測定 PD-1/CD3 雙特異性單株抗體純株 PD1-5(Bi)的細胞傷害活性, 算出其 EC50(ng/mL)。另一方面, 以流體細胞術測定表現於該等標的細胞表面之每 1 細胞的 PD-1 分子數。各標的細胞的 PD-1 分子數與細胞傷害活性的 EC50 之關係作成散布圖示於圖 23。又, 圖中的虛線係基於非線性回歸分析(兩對數模式: $Y = 10^{(\text{斜率} \times \log X + Y \text{ 節距})}$, Y: EC50 (ng/mL), X: PD-1 分子數, 斜率: 直線的傾斜, Y 節距: Y 切點)算出者, 圖中的數式係對應於該兩對數模式的數式。再者, R^2 表示決定係數。

【0126】 根據標的細胞之 PD-1 表現量的增加，可確認 PD1-5(Bi)存在下之對於人末梢血 T 細胞的標的細胞之細胞傷害活性為增強。

[產業上可利用性]

【0127】 本發明相關之 PD-1/CD3 雙特異性蛋白質對於血液性癌症的預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療為有用者。

【符號說明】

無。

【序列表】

- <110> 日商小野藥品工業股份有限公司 (ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD.)
- <120> 以 PD-1/CD3 雙特異性蛋白質所進行之血液性癌症治療
(Treatment of hematological cancer with PD-1/CD3 bispecific protein)
- <130> P20-109W0
- <150> JP 2019-126503
- <151> 2019-07-05
- <150> JP 2019-139752
- <151> 2019-07-30
- <160> 53
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 127
- <212> PRT
- <213> 智人 (Homo sapiens)
- <400> 1

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Gln Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
20 25 30

Gly Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Leu Asn Thr Asn Thr Glu Asn Pro Thr Phe Ala Gln Gly Phe
50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Asp Met Val Val Pro Thr Thr Ile Trp Asn Tyr Tyr His
100 105 110

Phe Met Asp Val Trp Gly Asn Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 2
<211> 127
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 2

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Gln Pro Gly Val
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
20 25 30

Gly Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Asp Leu Val Val Pro Thr Thr Ile Trp Asn Tyr Tyr His
100 105 110

Tyr Met Glu Val Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 3
<211> 127
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Met Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
20 25 30

Ala Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Leu Asn Thr Asn Thr Glu Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Asp Met Val Val Pro Thr Thr Ile Trp Asn Tyr Tyr Tyr
100 105 110

Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 4
<211> 127
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 4

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Gln Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
20 25 30

Ala Leu His Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Leu Asn Thr Asn Thr Glu Asn Pro Thr Phe Ala Gln Gly Phe
50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Asp Met Val Val Pro Thr Thr Ile Trp Asn Tyr Tyr His
100 105 110

Phe Met Asp Val Trp Gly Asn Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

120

125

<210> 5

<211> 127

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 5

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Gln Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr

20 25 30

Ala Leu His Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Leu Asn Thr Asn Thr Glu Asn Pro Thr Phe Ala Gln Gly Phe

50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Thr Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Asp Met Val Val Pro Thr Thr Ile Trp Asn Tyr Tyr His

100 105 110

Phe Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 6

His Tyr Gly Leu His

1 5

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 7

Trp Leu Asn Thr Asn Thr Glu Asn Pro Thr Phe Ala Gln Gly Phe Thr
1 5 10 15

Gly

<210> 8
<211> 18
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 8

Gly Asp Met Val Val Pro Thr Thr Ile Trp Asn Tyr Tyr His Phe Met
1 5 10 15

Asp Val

<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 9

His Tyr Gly Leu His
1 5

<210> 10
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 10

Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe Thr
1 5 10 15

Gly

<210> 11
<211> 18
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 11

Gly Asp Leu Val Val Pro Thr Thr Ile Trp Asn Tyr Tyr His Tyr Met

1 5 10 15

Glu Val

<210> 12
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 12

His Tyr Ala Leu His
1 5

<210> 13
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 13

Trp Leu Asn Thr Asn Thr Glu Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe Thr
1 5 10 15

Gly

<210> 14
<211> 18
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 14

Gly Asp Met Val Val Pro Thr Thr Ile Trp Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Met
1 5 10 15

Asp Val

<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 15

His Tyr Ala Leu His
1 5

<210> 16

<211> 17
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 16

Trp Leu Asn Thr Asn Thr Glu Asn Pro Thr Phe Ala Gln Gly Phe Thr
1 5 10 15

Gly

<210> 17
<211> 18
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 17

Gly Asp Met Val Val Pro Thr Thr Ile Trp Asn Tyr Tyr His Phe Met
1 5 10 15

Asp Val

<210> 18
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 18

His Tyr Ala Leu His
1 5

<210> 19
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 19

Trp Leu Asn Thr Asn Thr Glu Asn Pro Thr Phe Ala Gln Gly Phe Thr
1 5 10 15

Gly

<210> 20
<211> 18
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 20

Gly Asp Met Val Val Pro Thr Thr Ile Trp Asn Tyr Tyr His Phe Met
1 5 10 15

Asp Val

<210> 21
<211> 98
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 21

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Cys Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg

<210> 22
<211> 98
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 22

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg

- <210> 23
- <211> 329
- <212> PRT
- <213> 智人(Homo sapiens)
- <400> 23

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Gly Arg Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Asp Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Glu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 24

<211> 329
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 24

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Gly Arg Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Lys Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 25
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 25

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 30
<211> 381
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(381)

<400> 30
cag gtg cag ctg gtg caa tct ggg tct gag ttg aag cag cct ggg gcc 48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Gln Pro Gly Ala
1 5 10 15

tca gtg aag gtt tcc tgt aag gct tct gga tac acc ttc act cac tat 96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
20 25 30

ggt ttg cat tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg 144
Gly Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

gga tgg ctc aac acc aac act gag aac cca acg ttt gcc cag ggc ttc 192
Gly Trp Leu Asn Thr Asn Thr Glu Asn Pro Thr Phe Ala Gln Gly Phe
50 55 60

aca gga cgg ttt gtc ttc tcc ttg gac acc tct gtc acc acg gca tat 240
Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

ctg cag atc agc agc ctg aag gct gag gac act gcc gta tat tac tgt 288
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcg aga ggg gat atg gta gta ccg act act ata tgg aac tac tac cac336
Ala Arg Gly Asp Met Val Val Pro Thr Thr Ile Trp Asn Tyr Tyr His
100105110

ttc atg gac gtc tgg ggc aac ggc acc ctg gtc acc gtc tcg agt381
Phe Met Asp Val Trp Gly Asn Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115120125

<210> 31
<211> 381
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (381)

<400> 3148
cag gtg cag ctg gtg caa tct ggg tct gag ttg aag cag cct ggg gtc
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Gln Pro Gly Val
151015

tca gtg aag gtt tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc act cac tat96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
202530

ggc tta cat tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg144
Gly Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
354045

gga tgg atc aac acc aac act ggg aac cca acg tat gcc cag ggc ttc192
Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
505560

aca gga cgg ttt gtc ttc tcc ttg gac acc tct gtc agc acg gca tat240
Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65707580

ctg cag atc agc agc cta aag gct gaa gac act gcc gtg tat tac tgt288
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
859095

gcg aga ggg gat tta gta gta cca act act ata tgg aac tac tac cac336
Ala Arg Gly Asp Leu Val Val Pro Thr Thr Ile Trp Asn Tyr Tyr His
100105110

tac atg gag gtc tgg ggc aaa ggc acc ctg gtc acc gtc tcg agt381
Tyr Met Glu Val Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115120125

<210> 32
<211> 381
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (381)

<400> 32
cag gtg cag ctg gtg caa tct ggg tct gag ttg aag aag cct ggg gcc 48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

tca gtg atg gtt tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc act cac tat 96
Ser Val Met Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr
20 25 30

gct ttg cat tgg gtg cgc cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg 144
Ala Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

gga tgg ctc aat acc aac act gag aat cca acg tat gcc cag ggc ttc 192
Gly Trp Leu Asn Thr Asn Thr Glu Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
50 55 60

aca gga cgg ttt gtc ttc tcc ttg gac acc tct gtc acc acg gca tat 240
Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

ctg cag atc aac agc cta aag gct gag gac act gcc gtg tat tac tgt 288
Leu Gln Ile Asn Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcg aga ggg gat atg gta gta cca act act ata tgg aac tac tac tac 336
Ala Arg Gly Asp Met Val Val Pro Thr Thr Ile Trp Asn Tyr Tyr Tyr
100 105 110

tac atg gac gtc tgg ggc aaa ggg acc acg gtc acc gtc tcg agt 381
Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 33
<211> 381
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (381)

<400> 33
cag gtg cag ctg gtg caa tct ggg tct gag ttg aag cag cct ggg gcc 48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Gln Pro Gly Ala
1 5 10 15

tca gtg aag gtt tcc tgt aag gct tct gga tac acc ttc act cac tat 96

Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	His	Tyr	
			20					25					30			
gct	ttg	cat	tgg	ttg	cga	cag	gcc	cct	gga	caa	ggg	ctt	gag	tgg	atg	144
Ala	Leu	His	Trp	Leu	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
		35					40					45				
gga	tgg	ctc	aac	acc	aac	act	gag	aac	cca	acg	ttt	gcc	cag	ggc	ttc	192
Gly	Trp	Leu	Asn	Thr	Asn	Thr	Glu	Asn	Pro	Thr	Phe	Ala	Gln	Gly	Phe	
	50					55					60					
aca	gga	cgt	ttt	gtc	ttc	tct	ttg	gac	acc	tct	gtc	acc	acg	gca	tat	240
Thr	Gly	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Val	Thr	Thr	Ala	Tyr	
65					70					75					80	
ctg	cag	atc	agc	agc	ctg	aag	gct	gag	gac	act	gcc	gta	tat	tac	tgt	288
Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
gcg	aga	ggg	gat	atg	gta	gta	ccg	act	act	ata	tgg	aac	tac	tac	cac	336
Ala	Arg	Gly	Asp	Met	Val	Val	Pro	Thr	Thr	Ile	Trp	Asn	Tyr	Tyr	His	
			100					105					110			
ttc	atg	gac	gtc	tgg	ggc	aac	ggg	acc	acg	gtc	acc	gtc	tcg	agt		381
Phe	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Asn	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser		
		115					120					125				
<210> 34																
<211> 381																
<212> DNA																
<213> 智人(Homo sapiens)																
<220>																
<221> CDS																
<222> (1).. (381)																
<400> 34																
cag	gtg	cag	ctg	gtg	caa	tct	ggg	tct	gag	ttg	aag	cag	cct	ggg	gcc	48
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Leu	Lys	Gln	Pro	Gly	Ala	
1				5					10					15		
tca	gtg	aag	gtt	tcc	tgt	aag	gct	tct	gga	tac	acc	ttc	act	cac	tat	96
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	His	Tyr	
			20					25					30			
gct	ttg	cat	tgg	ttg	cga	cag	gcc	cct	gga	caa	ggg	ctt	gag	tgg	atg	144
Ala	Leu	His	Trp	Leu	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
		35					40					45				
gga	tgg	ctc	aac	acc	aac	act	gag	aac	cca	acg	ttt	gcc	cag	ggc	ttc	192
Gly	Trp	Leu	Asn	Thr	Asn	Thr	Glu	Asn	Pro	Thr	Phe	Ala	Gln	Gly	Phe	
	50					55					60					
aca	gga	cgt	ttt	gtc	ttc	tct	ttg	gac	acc	tct	gtc	acc	acg	gca	tat	240
Thr	Gly	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Val	Thr	Thr	Ala	Tyr	

65	70	75	80	
ctg cag atc agc agc ctg aag gct gag gac act gcc gta tat tac tgt				288
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys				
	85	90	95	
gcg aga ggg gat atg gta gta ccg act act ata tgg aac tac tac cac				336
Ala Arg Gly Asp Met Val Val Pro Thr Thr Ile Trp Asn Tyr Tyr His				
	100	105	110	
ttc atg gac gtc tgg ggc cag ggg acc acg gtc acc gtc tcg agt				381
Phe Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser				
	115	120	125	
<210> 35				
<211> 321				
<212> DNA				
<213> 智人(Homo sapiens)				
<220>				
<221> CDS				
<222> (1).. (321)				
<400> 35				
gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga				48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly				
1	5	10	15	
gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att agc agc tac				96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr				
	20	25	30	
tta aat tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc				144
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile				
	35	40	45	
tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc				192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly				
	50	55	60	
agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct				240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro				
65	70	75	80	
gaa gat ttt gca act tac tac tgt caa cag agt tac agt acc cct cca				288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro				
	85	90	95	
acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gag atc aaa				321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys				
	100	105		
<210> 36				
<211> 118				

<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 36

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gln Ile Trp Tyr Asn Ala Arg Lys Gln Glu Tyr Ser Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Gly Thr Gly Tyr Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 37
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 37

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 38
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 38

Gln Ile Trp Tyr Asn Ala Arg Lys Gln Glu Tyr Ser Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 39
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 39

Gly Thr Gly Tyr Asn Trp Phe Asp Pro
1 5

<210> 40
<211> 354
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (354)

<400> 40
cag gtg cag ctg gtg cag tct ggc ggc gga gtg gtg cag ccc ggc aga 48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

agc ctg aga ctg agc tgc gtg gcc agc ggc ttc acc ttc agc agc tac 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

ggc atg cac tgg gtc cgc cag gcc cct ggc aag gga ctg gaa tgg gtg 144
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

gcc cag atc tgg tac aac gcc cgg aag cag gaa tac tct gac agc gtg 192
Ala Gln Ile Trp Tyr Asn Ala Arg Lys Gln Glu Tyr Ser Asp Ser Val
50 55 60

aag ggc cgg ttc acc atc agc cgg gac aac agc aag aac acc ctg tac 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

ctg cag atg aac agc ctc cgg gcc gag gac acc gcc gtg tac tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

acc cgg ggc acc ggc tac aat tgg ttc gac cct tgg ggc cag ggc acc 336
Thr Arg Gly Thr Gly Tyr Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

ctg gtc acc gtc tcc agt 354
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 41
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 41

Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 42
<211> 329
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 42

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Gly Arg Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Glu Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145					150					155					160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
				165					170					175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
			180					185					190		
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
		195					200					205			
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
	210					215					220				
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Asp	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
225					230					235					240
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Glu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
			245						250					255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
			260					265					270		
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
		275					280					285			
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
	290					295					300				
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
305					310					315					320
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly							
				325											
<210>	43														
<211>	329														
<212>	PRT														
<213>	智人(Homo sapiens)														
<400>	43														
Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Gly Arg Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Pro Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Asp Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Glu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 44
<211> 329
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 44

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Gly Arg Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Arg Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Asp Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Glu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 45
<211> 329
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 45

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Gly Arg Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Asp Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195

200

205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210215220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Asp Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225230235240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Glu Val Lys Gly Phe Tyr
245250255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260265270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275280285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290295300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305310315320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 46
<211> 329
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 46

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
151015

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
202530

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
354045

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
505560

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Gly Arg Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Asp Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Glu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Leu His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 47
<211> 329
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 47

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Gly Arg Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Asp Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Glu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Glu Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 48
<211> 329
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 48

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Gly Arg Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Glu Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Lys Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245

250

255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260265270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275280285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290295300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305310315320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 49
<211> 329
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 49

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
151015

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
202530

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
354045

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
505560

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65707580

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
859095

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100105110

Pro Ala Pro Glu Leu Gly Arg Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Pro Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Lys Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 50
<211> 329
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 50

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Gly Arg Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Arg Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Lys Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 51
<211> 329
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 51

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Gly Arg Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Asp Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Lys Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290					295					300					
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
305					310					315					320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly															
325															
<210> 52															
<211> 329															
<212> PRT															
<213> 智人(Homo sapiens)															
<400> 52															
Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr															
20 25 30															
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser															
35 40 45															
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser															
50 55 60															
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr															
65 70 75 80															
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys															
85 90 95															
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys															
100 105 110															
Pro Ala Pro Glu Leu Gly Arg Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro															
115 120 125															
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys															
130 135 140															
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp															
145 150 155 160															

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Lys Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Leu His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 53
<211> 329
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 53

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20					25					30						
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	
35					40					45						
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	
50					55					60						
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	
65					70					75					80	
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	
85					90					95						
Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	
100					105					110						
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Gly	Arg	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	
115					120					125						
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	
130					135					140						
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	
145					150					155					160	
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	
165					170					175						
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	
180					185					190						
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
195					200					205						
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	
210					215					220						
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Lys	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	
225					230					235					240	
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Lys	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	
245					250					255						

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Glu Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種醫藥組成物的用途，係用以製造T細胞淋巴瘤的治療劑，該醫藥組成物包含具有特異性地結合於PD-1之第一臂及特異性地結合於CD3之第二臂之雙特異性抗體或其抗體片段作為有效成分，其中

(A) 特異性地結合於 PD-1 之第一臂具有由序列編號 5 的胺基酸序列所構成之 VH 以及由序列編號 25 的胺基酸序列所構成之 VL；並且

(B) 特異性地結合於 CD3 之第二臂具有由序列編號 36 的胺基酸序列所構成之 VH 以及由序列編號 25 的胺基酸序列所構成之 VL。

【請求項2】 如請求項 1 所述的用途，其中，前述雙特異性抗體為 IgG₁ 抗體。

【請求項3】 如請求項 1 或 2 所述的用途，其中，具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VH 之重鏈係具有由序列編號 23 的胺基酸序列所構成之重鏈恆定區。

【請求項4】 如請求項 1 或 2 所述的用途，其中，具有特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VH 之重鏈係具有由序列編號 24 的胺基酸序列所構成之重鏈恆定區。

【請求項5】 如請求項 1 或 2 所述的用途，其中，具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VL 之輕鏈及具有特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VL 之輕鏈係各自具有由序列編號 29 的胺基酸序列所構成之輕鏈恆定區。

【請求項6】 一種醫藥組成物的用途，係用以製造 T 細胞淋巴瘤的治療劑，該醫藥組成物包含具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂及特異性地結合於 CD3 之第二臂之雙特異性抗體或其抗體片段作為有效成分，其中

該雙特異性抗體係由下列(A)至(D)所構成，

(A) 具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VH 之重鏈、

(B) 具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VL 之輕鏈、

(C) 具有特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VH 之重鏈、及

(D) 具有特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VL 之輕鏈；

(a) 具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VH 之重鏈具有由序列編號 5 的胺基酸序列所構成之 VH 以及由序列編號 23 的胺基酸序列所構成之重鏈恆定區；

(b) 具有特異性地結合於 PD-1 之第一臂的 VL 之輕鏈具有由序列編號 25 的胺基酸序列所構成之 VL 以及由序列編號 29 的胺基酸序列所構成之輕鏈恆定區；

(c) 具有特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VH 之重鏈具有由序列編號 36 的胺基酸序列所構成之 VH 以及由序列編號 24 的胺基酸序列所構成之重鏈恆定區；並且

(d) 具有特異性地結合於 CD3 之第二臂的 VL 之輕鏈具有由序列編號 25 的胺基酸序列所構成之 VL 以及由序列編號 29 的胺基酸序列所構成之輕鏈恆定區。

【請求項7】 如請求項 1、2 或 6 所述的用途，其中，T 細胞淋巴瘤為末梢性 T 細胞淋巴瘤、或皮膚 T 細胞淋巴瘤。

【發明圖式】

共通輕鏈 Common Light Chain	序列編號 SEQ ID No.	胺基酸序列 Amino Acid Sequence
可變區 Variable Region	25	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI YAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQSYSTPPT FGQGTKVEIK
恆定區 Constant Region	29	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC

【圖1】

共通輕鏈 Common Light Chain	序列編號 SEQ ID No.	CDR1	序列編號 SEQ ID No.	CDR2	序列編號 SEQ ID No.	CDR3
CDRs	26	RASQSISSYLN	27	AASSLQS	28	QQSYSTPPT

【圖2】

生殖系列 V基因	序列編號 SEQ ID No.	胺基酸序列 Amino Acid Sequence
IGHV7-4-1	21	QVQLVQSGSELKPGASVKVSCKASGYTFTSYAMNWVRQAP GQGLEWMGWINTNTGNPTYAQGFTGRFVSLDTSVSTAYLQI CSLKAEDTAVYYCAR
IGHV3-33	22	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTSSYGMHWVRQAPG KGLEWVAWIWDGSKNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAR

【圖3】

PD1-1 至 PD1-5 各 VH 及 IGHV7-4-1/JH6c 的對準

	FR1	CDR1	FR2	CDR2
IGHV7-4-1 (SEQ ID No. 21)	QVQLVQSGSELKPGASVKVSCKASGYTFT	SYAMN	WVRQAPGQGLEWAG	WINTNTGNPTYAQGFTG
PD1-1 VH (SEQ ID No. 1)	Q	H-GLH		L-E-F
PD1-2 VH (SEQ ID No. 2)	Q-V	H-GLH		
PD1-3 VH (SEQ ID No. 3)	M	H-LH		L-E
PD1-4 VH (SEQ ID No. 4)	Q	H-LH	L	L-E-F
PD1-5 VH (SEQ ID No. 5)	Q	H-LH	L	L-E-F

	FR3	CDR3	FR4
IGHV7-4-1 (SEQ ID No. 21)	RFVFSLDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVYYCAR		
D gene (unknown)			
JH6c		HYYYYYMDV	WGKGTIVTVSS
PD1-1 VH (SEQ ID No. 1)	T-S	GDMVVPTTIWN-HF	N-L
PD1-2 VH (SEQ ID No. 2)	S	GDLVVPTTIWN-H-E	L
PD1-3 VH (SEQ ID No. 3)	T-N	GDMVVPTTIWN	
PD1-4 VH (SEQ ID No. 4)	T-S	GDMVVPTTIWN-HF	N
PD1-5 VH (SEQ ID No. 5)	T-S	GDMVVPTTIWN-HF	Q

【圖4】

純株編號 Clone No.	序列編號 SEQ ID No.	胺基酸序列 Amino Acid Sequence
PD1-1	1	QVQLVQSGSELKQPGASVKVSKKASGYTFTHYGLHWVRQAPGGLEWMGWLNT NTENPTFAQGFTGRFVFLDTSVTTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGDMVVPITWV YYHFMDVWGNGLVTSS
PD1-2	2	QVQLVQSGSELKQPGVSVKVSCKASGYTFTHYGLHWVRQAPGGLEWMGWINT NTGNPTYAQGFTGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGDLVVPITWV YYHYMEVWVGKGLVTSS
PD1-3	3	QVQLVQSGSELKKPGASVMVSKKASGYTFTHYALHWVRQAPGGLEWMGWLNT NTENPTYAQGFTGRFVFLDTSVTTAYLQNSLKAEDTAVYYCARGDMVVPITWV NYYYMDVWVGKGTITVSS
PD1-4	4	QVQLVQSGSELKQPGASVKVSKKASGYTFTHYALHWLRQAPGGLEWMGWLNT NTENPTFAQGFTGRFVFLDTSVTTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGDMVVPITWV YYHFMDVWGNGLTITVSS
PD1-5	5	QVQLVQSGSELKQPGASVKVSKKASGYTFTHYALHWLRQAPGGLEWMGWLNT NTENPTFAQGFTGRFVFLDTSVTTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGDMVVPITWV YYHFMDVWVGQGITVTVSS

【圖5】

純株編號 Clone No.	序列編號 SEQ ID No.	CDR1	序列編號 SEQ ID No.	CDR2	序列編號 SEQ ID No.	CDR3
PD1-1	6	HYGLH	7	WLNTNTENPTFAQGFTG	8	GDMVVPITWVNYHFMDV
PD1-2	9	HYGLH	10	WNTNTGNPTYAQGFTG	11	GDLVVPITWVNYHYMEV
PD1-3	12	HYALH	13	WLNTNTENPTFAQGFTG	14	GDMVVPITWVNYYYMDV
PD1-4	15	HYALH	16	WLNTNTENPTFAQGFTG	17	GDMVVPITWVNYHFMDV
PD1-5	18	HYALH	19	WLNTNTENPTFAQGFTG	20	GDMVVPITWVNYHFMDV

【圖6】

純株編號 Clone No.	序列編號 SEQ ID No.	胺基酸序列 Amino Acid Sequence
CD3-2	36	QVQLVQSGGGVQPGRLRLSCVASGFTSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAQI WYNARKQEYSDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGY NWFDPWQGGLTITVSS

【圖7】

純株編號 Clone No.	序列編號 SEQ ID No.	CDR1	序列編號 SEQ ID No.	CDR2	序列編號 SEQ ID No.	CDR3
CD3-2	37	SYGMH	38	QIWYNARKQEYSDSVKG	39	GTGYNWFDP

【圖8】

	序列編號 SEQ ID No.	胺基酸序列 Amino Acid Sequence
具有特異地辨識PD-1 的第一臂的重鏈可變 區的重鏈之恆定區	23	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELGRG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTDPPSREE MTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG
具有特異地辨識CD3 的第二臂的重鏈可變 區的重鏈之恆定區	24	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELGRG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTKPPSREE MTKNQVSLKCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG
具有特異地辨識PD-1 的第一臂的重鏈可變 區的重鏈之改變恆定區	45	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELGRG PSVFLFPPKPKDTLDIRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTDPPSREE MTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG
具有特異地辨識CD3 的第二臂的重鏈可變 區的重鏈之改變恆定區	51	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELGRG PSVFLFPPKPKDTLDIRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTKPPSREE MTKNQVSLKCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG

【圖9】

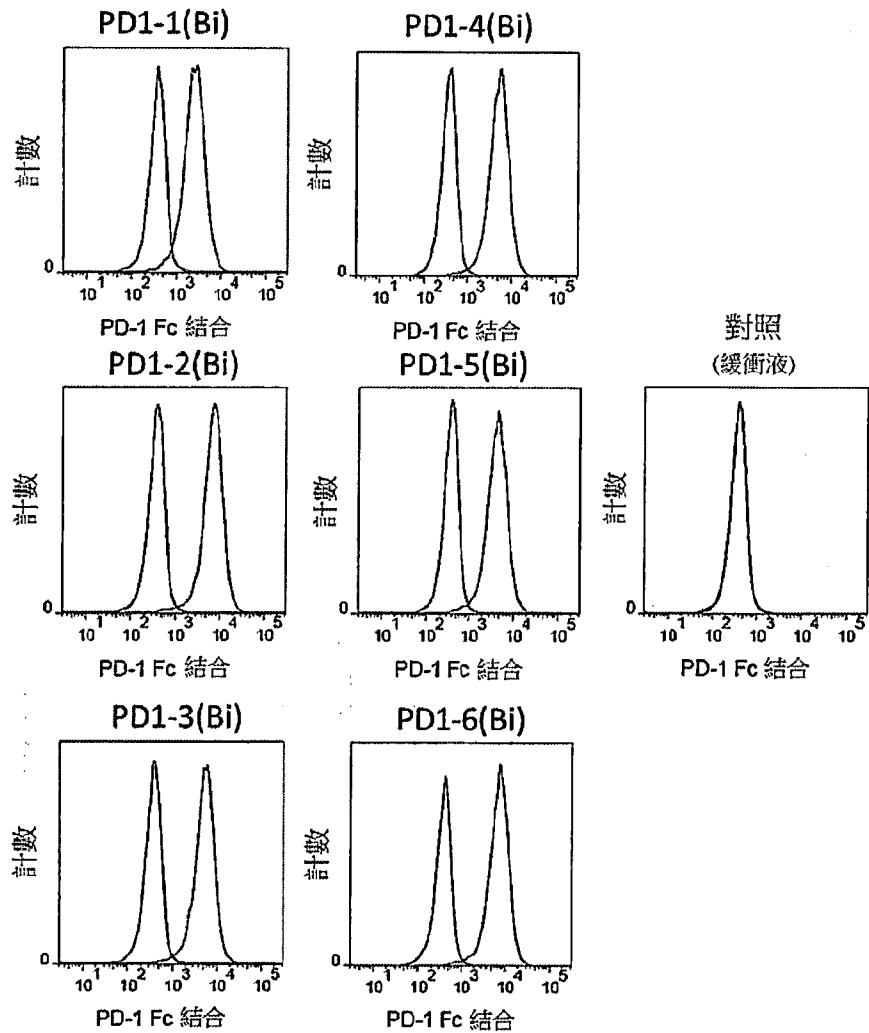
純株 15C3 的 VH 的胺基酸序列：

QVQLVQSGGGVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAAIWYNGRKQDYADSVKGRFTISRDN SKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTYNWFDPWGQGLTVTVSS

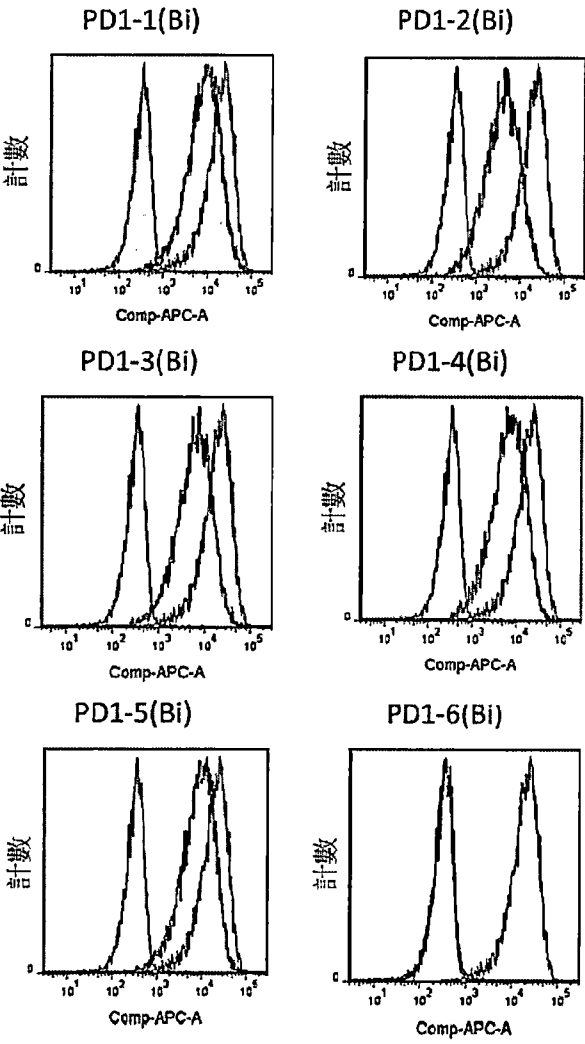
【圖10】

第一臂的PD-1結合活性		
純株編號	人PD-1	食蟹猴PD-1
	Kd (nmol/L)	Kd (nmol/L)
PD1-1(Bi)	0.6	0.3
PD1-2(Bi)	0.7	0.4
PD1-3(Bi)	3.8	2.0
PD1-4(Bi)	0.9	0.7
PD1-5(Bi)	0.7	0.4
PD1-6(Bi)	0.8	21.8
第二臂的CD3結合活性		
純株編號	人 CD3δ/CD3ε	
	Kd (nmol/L)	
CD3-2	19.2	

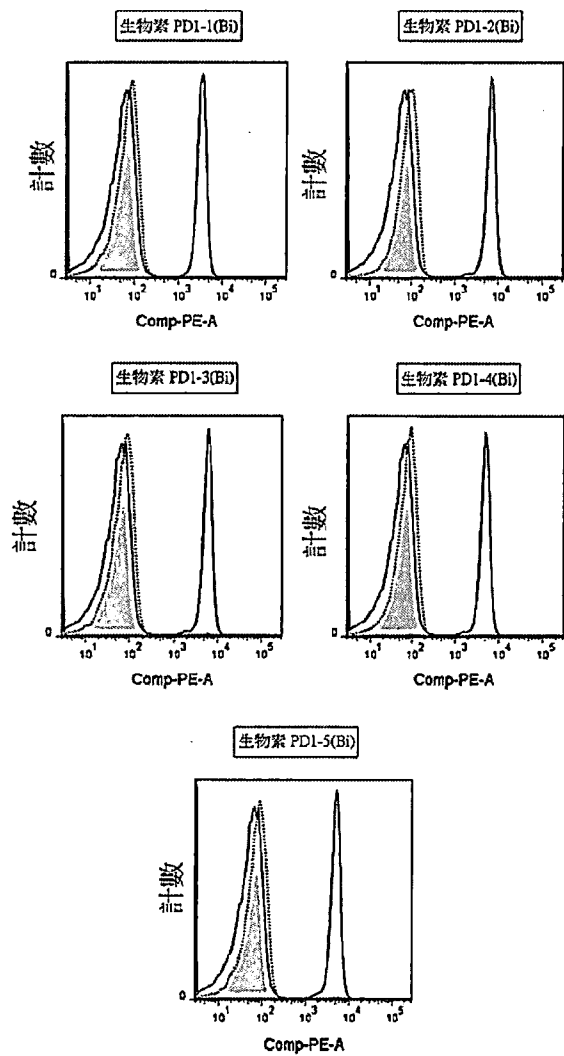
【圖11】



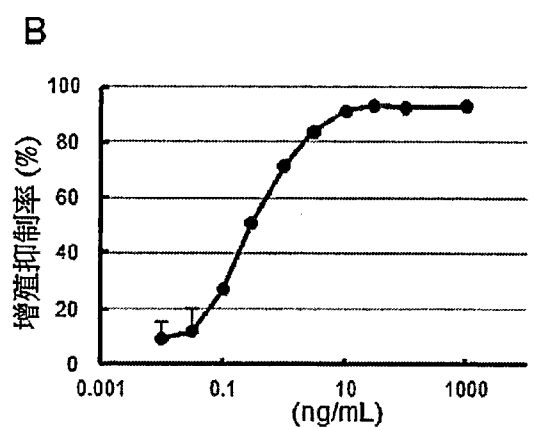
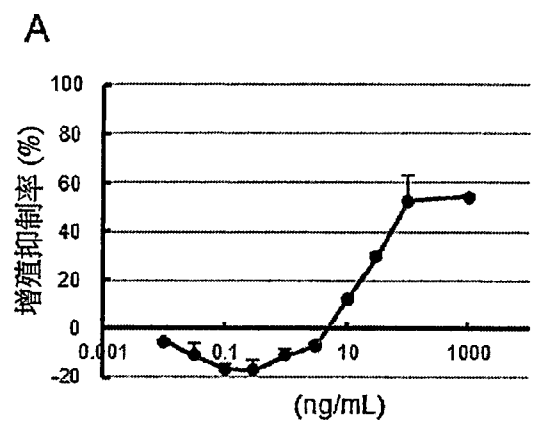
【圖12】



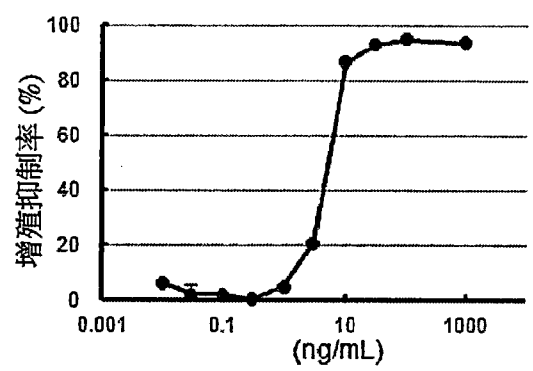
【圖13】



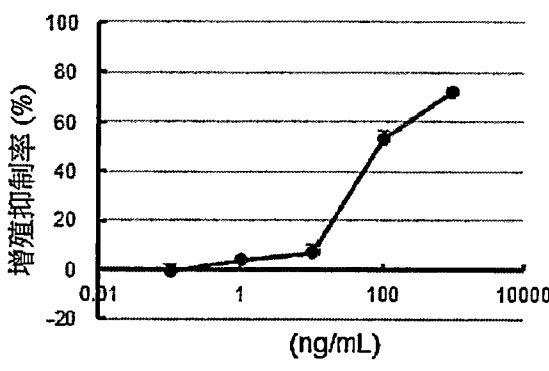
【圖14】



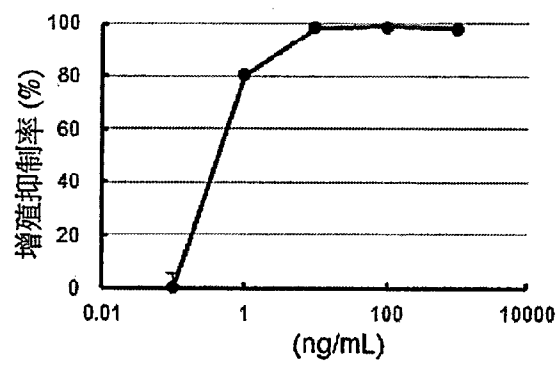
【圖15】



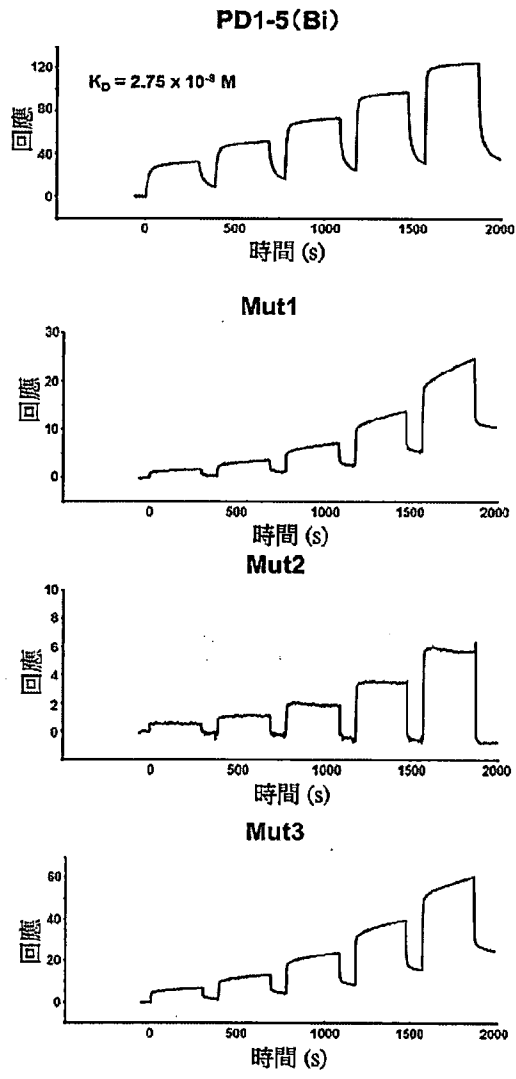
【圖16】



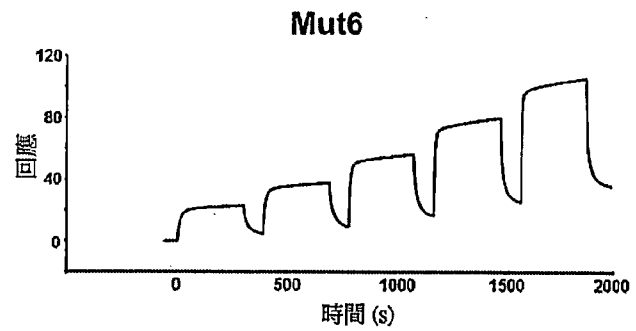
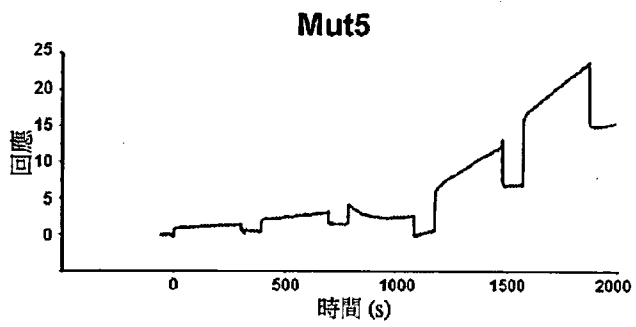
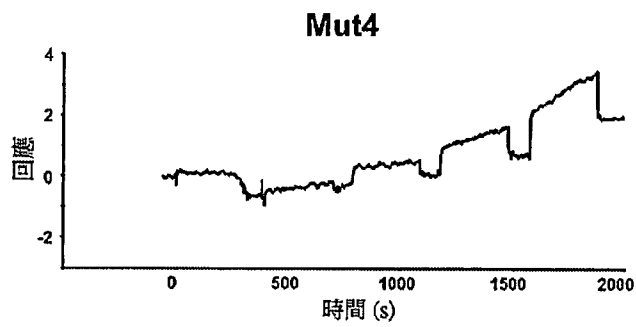
【圖17】



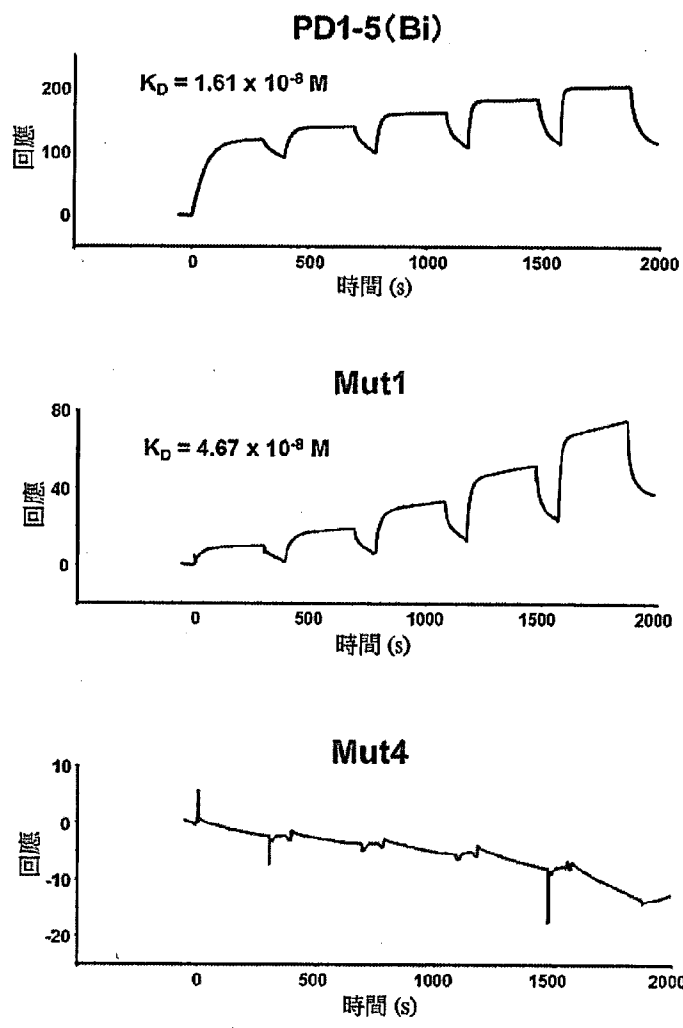
【圖18】



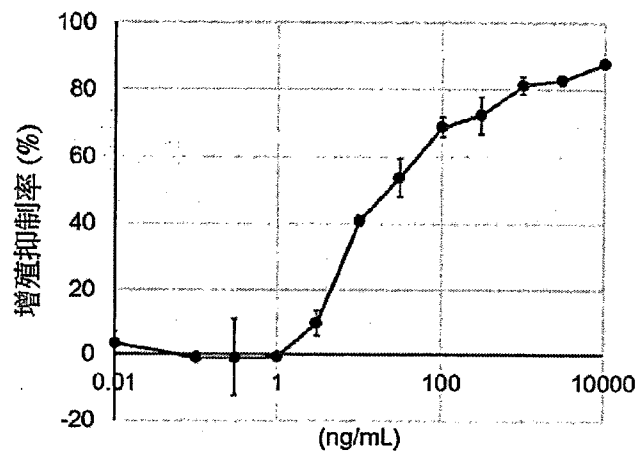
【圖19】



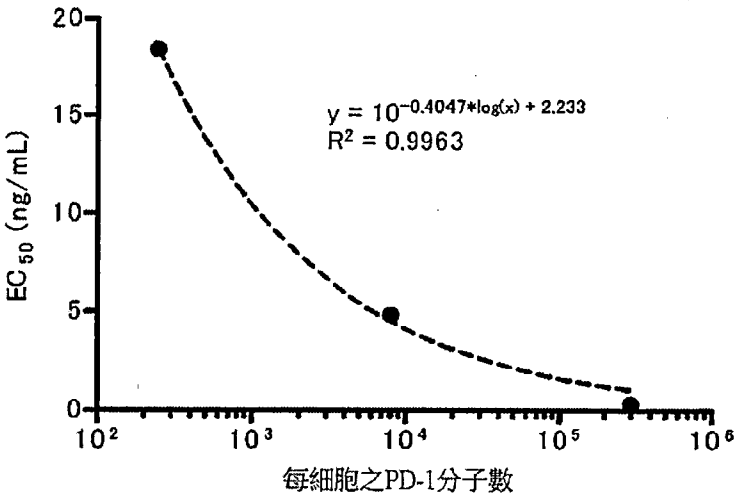
【圖20】



【圖21】



【圖22】



【圖23】