



(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 I804572 B

(45)公告日：中華民國 112 (2023) 年 06 月 11 日

(21)申請案號：108104191

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 02 月 01 日

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

A61K39/395 (2006.01)

C07K16/46 (2006.01)

C12P21/08 (2006.01)

A61P37/06 (2006.01)

(30)優先權：2018/02/09 日本

2018-021498

2018/08/16 日本

2018-153149

(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)；手塚智也 TEZUKA, TOMOYA (JP)；索羅斯比 馬克 THROSBY, MARK (AU)；迪 克夫 科尼利斯 阿德里安 DE KRUIF, CORNELIS ADRIAAN (NL)；凡 羅 彼得 福克 VAN LOO, PIETER FOKKO (NL)；克羅斯特 林斯 KLOOSTER, RINSE (NL)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

(56)參考文獻：

CN 105051066A

US 2004/0241745A1

US 2008/0025979A1

WO 2017/010874A1

審查人員：張茜毓

申請專利範圍項數：6 項 圖式數：19 共 97 頁

(54)名稱

雙特異性抗體

(57)摘要

本發明的課題係提供一種新穎的藥劑，該藥劑係用以預防、抑制症狀進展、抑制復發或治療自體免疫疾病。

本發明的發明者等進行深入研究的結果，著眼於 PD-1/CD3 雙特異性抗體作為能夠解決該等問題的物質，並且確認此等可作為減輕被稱為輸注反應或細胞介素釋出症候群之副作用的製劑。再者，已確認該雙特異性抗體具有容許 PD-1 與屬於其配位體之 PD-L1 相互作用的特徵，並且發現如此之特徵有助於增強或持續地作用。

An object of the present invention is to provide a novel drug for preventing, suppressing the progress of symptoms, suppressing the recurrence or treating for autoimmune diseases.

As a result of intensive investigations, the inventors of the present invention focused on PD-1 / CD3 bispecific antibodies as substances capable of solving such problems, and have confirmed that they can be a formulation to reduce the occurrence of side effects called infusion reaction or cytokine release syndrome. In addition, it has been confirmed that the bispecific antibody has a feature that permits interaction with PD-1 and its ligand PD-L1, and has been found that such characteristics contribute to the enhancement or continuation of action.

I804572

【發明摘要】**【中文發明名稱】** 雙特異性抗體**【英文發明名稱】** BISPECIFIC ANTIBODY**【中文】**

本發明的課題係提供一種新穎的藥劑，該藥劑係用以預防、抑制症狀進展、抑制復發或治療自體免疫疾病。

本發明的發明者等進行深入研究的結果，著眼於 PD-1/CD3 雙特異性抗體作為能夠解決該等問題的物質，並且確認此等可作為減輕被稱為輸注反應或細胞介素釋出症候群之副作用的製劑。再者，已確認該雙特異性抗體具有容許 PD-1 與屬於其配位體之 PD-L1 相互作用的特徵，並且發現如此之特徵有助於增強或持續地作用。

【英文】

An object of the present invention is to provide a novel drug for preventing, suppressing the progress of symptoms, suppressing the recurrence or treating for autoimmune diseases.

As a result of intensive investigations, the inventors of the present invention focused on PD-1 / CD3 bispecific antibodies as substances capable of solving such problems, and have confirmed that they can be a formulation to reduce the occurrence of side effects called infusion reaction or cytokine release syndrome. In addition, it has been confirmed that the bispecific antibody has a feature that permits interaction with

PD-1 and its ligand PD-L1, and has been found that such characteristics contribute to the enhancement or continuation of action.

【指定代表圖】 無

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 雙特異性抗體

【英文發明名稱】 BISPECIFIC ANTIBODY

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種能夠分別與 PD-1以及 CD3特異性結合的雙特異性抗體(以下，簡稱為 PD-1/CD3雙特異性抗體)、含有其作為有效成分的醫藥組成物以及該等的醫藥治療用途。

【先前技術】

【0002】 PD-1是屬於免疫球蛋白家族的免疫抑制受體，並且是具有抑制由來自抗原受體的刺激而被活化之T細胞的免疫活化訊息之功能的分子。藉由PD-1基因剔除(gene knock out)小鼠的分析，已知PD-1訊息在自體免疫型擴張性心肌病、類狼瘡症候群、自體免疫性腦脊髓炎、全身性紅斑狼瘡、移植物對抗宿主病、I型糖尿病及類風濕性關節炎等自體免疫疾病的抑制中擔任重要的角色。因此，增強PD-1訊息的物質已被指稱可成為自體免疫疾病等的預防或治療劑。

【0003】 迄今為止，已知使用識別 PD-1的雙特異性抗體作為增強 PD-1訊息的物質(專利文獻1至3)。該雙特異性抗體係以基因工學連結了具有識別抗原T細胞受體複合體成員CD3的抗體部位，以及具有識別抗原 PD-1的抗體部位。它透過將 PD-1在 T細胞受體複合體附近定位的頻率提高來增強 PD-1對 T細胞受體複合體的抑制訊息。再者，該專利文獻還說明了 PD-1雙特異性抗體可用於預防或治療自體免疫疾病等。

【0004】此外，在蛋白質製劑中，有被稱為投予後立即產生的輸注反應 (infusion reaction)或是細胞介素釋出症候群之副作用表現的疑慮，因而謀求減輕乃至抑制如此作用的製劑。

【0005】本發明之 PD-1/CD3雙特異性抗體充分地降低被認為係如此之副作用原因的投予後細胞介素的產生刺激，因此，被期待成為可抑制所疑慮之副作用表現的醫藥。

【0006】具有如此特徵的雙特異性抗體係至今為止完全沒有任何報導。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0007】

[專利文獻 1]國際公開第 2003/011911號公報

[專利文獻 2]國際公開第 2004/072286號公報

[專利文獻 3]國際公開第 2013/022091號公報

【發明內容】

[發明欲解決之課題]

【0008】本發明的目的是提供一種新穎的藥劑，該藥劑係用於針對自體免疫疾病的預防、症狀進展抑制、復發的抑制或治療。

[解決課題之手段]

【0009】本發明之發明者們經過深入研究的結果，著眼於本發明之 PD-1/CD3雙特異性抗體能夠作為解決所述課題的物質，並且確認該等可成為減輕被稱為輸注反應或細胞介素釋出症候群之副作用的藥劑，遂而完成本發明。

【0010】再者，本發明者們確認該 PD-1/CD3雙特異性抗體具有容許PD-1與其配位體之PD-L1相互作用的特徵，並且發現如此特徵有助於該 PD-1/CD3雙特異性抗體作用的增強及持續。

【0011】亦即，本發明為如下所述。

[1] 一種PD-1 /CD3雙特異性單株抗體或其抗體片段，該PD-1 /CD3雙特異性單株抗體為具有與PD-1特異性結合的第一臂以及與CD3特異性結合的第二臂，其中，與PD-1特異性結合的第一臂具有選自下列(A)至(E)中之任一個重鏈可變區域(以下，將「重鏈可變區域」簡稱為「VH」)：

(A)具有下列者之VH：

(a)包含序列編號6的胺基酸序列之重鏈可變區域之互補性決定區域1(以下，將「重鏈可變區域之互補性決定區域1」簡稱為VH-CDR1)、

(b)包含序列編號7的胺基酸序列之重鏈可變區域之互補性決定區域2(以下，將「重鏈可變區域之互補性決定區域2」簡稱為VH-CDR2)、

(c)包含序列編號8的胺基酸序列之重鏈可變區域之互補性決定區域3(以下，將「重鏈可變區域之互補性決定區域3」簡稱為VH-CDR3)；

(B)具有下列者的VH：

(a)包含序列編號9的胺基酸序列之VH-CDR1、

(b)包含序列編號10的胺基酸序列之VH-CDR2、以及

(c)包含序列編號11的胺基酸序列之VH-CDR3；

(C)具有下列者的VH：

(a)包含序列編號12的胺基酸序列之VH-CDR1、

(b)包含序列編號13的胺基酸序列之VH-CDR2、以及

(c)包含序列編號14的胺基酸序列之VH-CDR3；

(D)具有下列者的VH：

(a)包含序列編號15的胺基酸序列之VH-CDR1、

(b)包含序列編號16的胺基酸序列之VH-CDR2、以及

(c)包含序列編號17的胺基酸序列之VH-CDR3；

(E)具有下列者的VH：

- (a)包含序列編號18的胺基酸序列之VH-CDR1、
- (b)包含序列編號19的胺基酸序列之VH-CDR2、以及
- (c)包含序列編號20的胺基酸序列之VH-CDR3；

與CD3特異性結合的第二臂具有含有下列者的VH：

- (a)包含序列編號 37 的胺基酸序列之 VH-CDR1、
- (b)包含序列編號 38 的胺基酸序列之 VH-CDR2、以及
- (c)包含序列編號 39 的胺基酸序列之 VH-CDR3。

[2]如前項[1]所述之PD-1/CD3雙特異性單株抗體或其抗體片段，其中，與PD-1特異性結合的第一臂中之VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3中之任一個或複數個VH-CDR中，各自其任意的1至5個胺基酸殘基可經其他胺基酸(較佳為保守性胺基酸(*conservative amino acid*))置換，以及/或與CD3特異性結合的第二臂中之VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3中的任何一個或多個VH-CDR中，各自其任意的1至5個胺基酸殘基可經其他胺基酸(較佳為保守性胺基酸)置換。

[3]如前項[1]或[2]所述之PD-1/CD3雙特異性抗體或其抗體片段，其中，

(i)與PD-1特異性結合的第一臂之VH具有：

- (a)包含序列編號 6 的胺基酸序列之 VH-CDR1、
- (b)包含序列編號 7 的胺基酸序列之 VH-CDR2、以及
- (c)包含序列編號 8 的胺基酸序列之 VH-CDR3；

(ii)與CD3特異性結合的第二臂之VH具有：

- (a)包含序列編號 37 的胺基酸序列之 VH-CDR1、
- (b)包含序列編號 38 的胺基酸序列之 VH-CDR2、以及
- (c)包含序列編號39的胺基酸序列之VH-CDR3。

[4]如前項[1]或[2]所述之PD-1/CD3雙特異性抗體或其抗體片段，其中，

(i)與PD-1特異性結合的第一臂之VH具有：

(a)包含序列編號9的胺基酸序列之VH-CDR1、

(b)包含序列編號10的胺基酸序列之VH-CDR2、以及

(c)包含序列編號11的胺基酸序列之VH-CDR3；

(ii)與CD3特異性結合的第二臂之VH具有：

(a)包含序列編號37的胺基酸序列之VH-CDR1、

(b)包含序列編號38的胺基酸序列之VH-CDR2、以及

(c)包含序列編號39的胺基酸序列之VH-CDR3。

[5]如前項[1]或[2]所述之PD-1/CD3雙特異性抗體或其抗體片段，其中，

(i)與PD-1特異性結合的第一臂之VH具有：

(a)包含序列編號12的胺基酸序列之VH-CDR1、

(b)包含序列編號13的胺基酸序列之VH-CDR2、以及

(c)包含序列編號14的胺基酸序列之VH-CDR3；

(ii)與CD3特異性結合的第二臂之VH具有：

(a)包含序列編號37的胺基酸序列之VH-CDR1、

(b)包含序列編號38的胺基酸序列之VH-CDR2、以及

(c)包含序列編號39的胺基酸序列之VH-CDR3。

[6]如前項[1]或[2]所述之PD-1/CD3雙特異性抗體或其抗體片段，其中，

(i)與PD-1特異性結合的第一臂之VH具有：

(a)包含序列編號15的胺基酸序列之VH-CDR1、

(b)包含序列編號16的胺基酸序列之VH-CDR2、以及

(c)包含序列編號17的胺基酸序列之VH-CDR3；

(ii)與CD3特異性結合的第二臂之VH具有：

(a)包含序列編號37的胺基酸序列之VH-CDR1、

(b)包含序列編號 38 的胺基酸序列之 VH-CDR2、以及

(c)包含序列編號 39 的胺基酸序列之 VH-CDR3。

[7]如前項[1]或[2]所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，

(i)與 PD-1 特異性結合的第一臂之 VH 具有：

(a)包含序列編號 18 的胺基酸序列之 VH-CDR1、

(b)包含序列編號 19 的胺基酸序列之 VH-CDR2、以及

(c)包含序列編號 20 的胺基酸序列之 VH-CDR3；

(ii)與 CD3 特異性結合的第二臂之 VH 具有：

(a)包含序列編號 37 的胺基酸序列之 VH-CDR1、

(b)包含序列編號 38 的胺基酸序列之 VH-CDR2、以及

(c)包含序列編號 39 的胺基酸序列之 VH-CDR3。

[8]一種PD-1/CD3雙特異性抗體或其抗體片段，該PD-1/CD3雙特異性抗體具有與PD-1特異性結合的第一臂以及與CD3特異性結合的第二臂之PD-1/CD3，其中，與PD-1特異性結合的第一臂具有含有下列(a)至(c)之VH：

(a)包含HYJ¹LH所表示的胺基酸序列[序列中，J¹表示G(甘胺酸)或A(丙胺酸)，在此，J¹表示的字母或者其他的字母係表示各個胺基酸的單字母縮寫]之VH-CDR1。

(b)包含WJ²NTNTU²NPTX²AQGFTG所表示的胺基酸序列[序列中，J²表示L(白胺酸)或I(異白胺酸)，U²表示E(麩胺酸)或G(甘胺酸)，X²表示F(苯丙胺酸)或者Y(酪胺酸)，在此，J²、U²和X²分別表示的字母或者其他的字母係分別表示與上述相同的含義]之VH-CDR2、以及

(c)包含GDJ³VVPTTIWNYU³X³MZ³V所表示的胺基酸序列[序列中，J³表示M(甲硫胺酸)或L(白胺酸)，U³表示H(組胺酸)或Y(酪胺酸)，X³表示F(苯丙胺酸)或Y(酪胺酸)，Z³表示D(天門冬胺酸)或E(麩胺酸)，在此，以J³，U³，X³和Z³分別表示的字母或者其他的字母係分別表示與上述相同的含義]之VH-CDR3；以及

與CD3特異性結合的第二臂具有含有下列(a)至(c)之VH：

(a)包含序列編號 37 的胺基酸序列之 VH-CDR1、

(b)包含序列編號 38 的胺基酸序列之 VH-CDR2、以及

(c)包含序列編號39的胺基酸序列之VH-CDR3。

[9]如前項[8]所述之PD-1/CD3雙特異性抗體或其抗體片段，其中，(a)J¹表示G(甘胺酸)，J²表示L(白胺酸)，U²表示E(麩胺酸)，X²表示F(苯丙胺酸)，J³表示M(甲硫胺酸)，U³表示H(組胺酸)，X³表示F(苯丙胺酸)及Z³表示D(天門冬胺酸)；

(b)J¹表示G(甘胺酸)，J²表示I(異白胺酸)，U²表示G(甘胺酸)，X²表示Y(酪胺酸)，J³表示L(白胺酸)，U³表示H(組胺酸)，X³表示Y(酪胺酸)及Z³表示E(麩胺酸)；

(c)J¹表示A(丙胺酸)，J²表示L(白胺酸)，U²表示E(麩胺酸)，X²表示Y(酪胺酸)，J³表示M(甲硫胺酸)，U³表示Y(酪胺酸)，X³表示Y(酪胺酸)，Z³表示D(天門冬胺酸)；
或者是

(d)J¹表示A(丙胺酸)，J²表示L(白胺酸)，U²表示E(麩胺酸)，X²表示F(苯丙胺酸)，J³表示M(甲硫胺酸)，U³表示H(組胺酸)，X³表示F(苯丙胺酸)及Z³表示D(天門冬胺酸)。

[10]如前項[1]至[9]中任一項所述之PD-1/CD3雙特異性抗體或其抗體片段，其中，與PD-1特異性結合的第一臂的VH之框架(以下，將「框架」簡稱為FR)區域中，框架1(以下，簡稱為FR1)、框架2(以下，簡稱為FR2)及框架3(以下，簡稱為FR3)區域係分別對應生殖細胞系列(germline)型V基因IGHV7-4-1或其受到體細胞突變的該基因所編碼的胺基酸序列。

[11]如前項[10]所述之PD-1/CD3雙特異性抗體或其抗體片段，其中，與PD-1特異性結合的第一臂的VH之框架4(以下，將「框架4」簡稱為FR4)區域係包含生殖細胞系列型J基因JH6C或其受到體細胞突變的該基因所編碼的胺基酸序列(惟，排除VH-CDR3區域所包含的胺基酸序列)。

[12]如前項[10]或[11]所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，與 PD-1 特異性結合的第一臂的 VH 之 FR 區域係由 FR1 區域所構成者，該 FR1 區域係由生殖細胞系列型 V 基因 IGHV7-4-1 的受到體細胞突變之該基因所編碼，藉由該體細胞突變，分別在序列編號 21 的胺基酸序列中第 13 位的離胺酸經置換成麩醯胺酸、第 16 位的丙胺酸經置換成纈胺酸、或第 19 位的離胺酸經置換成甲硫胺酸，或者是經該等任意的複數組合置換或可經置換者。

[13]如前項[10]至[12]中任一項所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，與 PD-1 特異性結合的第一臂的 VH 之 FR 區域係由 FR2 區域所構成，該 FR2 區域係由生殖細胞系列型 V 基因 IGHV7-4-1 的受到體細胞突變之該基因所編碼，藉由該體細胞突變，在序列編號 21 的胺基酸序列中第 37 位的纈胺酸經置換成白胺酸，或者是可經置換者。

[14]如前項[10]至[13]中任一項所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，與 PD-1 特異性結合的第一臂的 VH 之 FR 區域係由 FR3 區域所構成，該 FR3 區域係由生殖細胞系列型 V 基因 IGHV7-4-1 的受到體細胞突變之該基因所編碼，藉由該體細胞突變，分別在序列編號 21 的胺基酸序列中第 77 位的絲胺酸經置換成蘇胺酸、第 84 位的半胱胺酸經置換成絲胺酸或天門冬醯胺酸，或者是經該等任意的複數組合置換或可經置換者。

[15]如前項[10]至[14]中任一項所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，與 PD-1 特異性結合的第一臂的 VH 之 FR 區域 4 係由生殖細胞系列型 V 基因 IGHV7-4-1 的受到體細胞突變之該基因(惟，排除編碼 VH-CDR3 區域的基因區域)所編碼，該 FR4 區域之胺基酸序列(Trp-Gly-Lys-Gly-Thr-Thr*-Val-Thr-Val-Ser-Ser)(序列編號 41)中的離胺酸(Lys)經置換成麩醯胺酸或天門冬醯胺酸、以及/或*記號的蘇胺酸(Thr)經置換成白胺酸或者是可經置換。

[16]如前項[1]至[15]中任一項所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，與 PD-1 特異性結合的第一臂的 VH，係包含選自序列編號 1、序列編號 2、序列編號 3、序列編號 4 及序列編號 5 中之任一個胺基酸序列，或與該 VH 的胺基酸序列至少 80%、90%、95%、98%或者是 99%相同的胺基酸序列。

[17]如前項[1]及[3]至[7]中任一項所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，與 PD-1 特異性結合的第一臂的 VH，係包含選自序列編號 1、序列編號 2、序列編號 3、序列編號 4 及序列編號 5 中之任一個胺基酸序列。

[18]如前項[1]至[17]中任一項所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，與 CD3 特異性結合的第二臂的 VH，係包含序列編號 36 的胺基酸序列，或者是與該 VH 的胺基酸序列至少 80%、90%、95%、98%或 99%相同的胺基酸序列。

[19]如前項[1]及[3]至[18]中任一項所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，與 CD3 特異性結合的第二臂的 VH 係包含序列編號 36 的胺基酸序列。

[20]如前項[1]所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，與 PD-1 特異性結合的第一臂的 VH 係包含選自序列編號 1、序列編號 2、序列編號 3、序列編號 4 及序列編號 5 中之任一個胺基酸序列，與 CD3 特異性結合的第二臂之 VH 係包含序列編號 36 的胺基酸序列。

[21]一種 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，該 PD-1/CD3 雙特異性抗體具有與 PD-1 特異性結合的第一臂以及與 CD3 特異性結合的第二臂，其中，

與 PD-1 特異性結合的第一臂的 VH，係包含選自序列編號 1、序列編號 2、序列編號 3、序列編號 4 及序列編號 5 中之任一個胺基酸序列，或者是與該 VH 的胺基酸序列至少 80%、90%、95%、98%或 99%相同的胺基酸序列；

與 CD3 特異性結合的第二臂之 VH，係包含序列編號 36 的胺基酸序列，或者是與該 VH 的胺基酸序列至少 80%、90%、95%、98%或 99%相同的胺基酸序列。

[22]如前項[1]或[3]所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，與 PD-1 特異性結合的第一臂之 VH 係包含序列編號 1 的胺基酸序列，與 CD3 特異性結合的第二臂之 VH 係包含序列編號 36 的胺基酸序列。

[23]如前項[1]或[4]所述之 PD-1/CD3 雙特異性單株抗體或其抗體片段，其中，與 PD-1 特異性結合的第一臂之 VH 係包含序列編號 2 的胺基酸序列，與 CD3 特異性結合的第二臂之 VH，係包含序列編號 36 的胺基酸序列。

[24]如前項[1]或[5]所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，與 PD-1 特異性結合的第一臂之 VH 係包含序列編號 3 的胺基酸序列，與 CD3 特異性結合的第二臂之 VH 係包含序列編號 36 的胺基酸序列。

[25]如前項[1]或[6]所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，與 PD-1 特異性結合的第一臂之 VH 係包含序列編號 4 的胺基酸序列所組成，與 CD3 特異性結合的第二臂之 VH 係包含序列編號 36 的胺基酸序列。

[26]如前項[1]或[7]所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，與 PD-1 特異性結合的第一臂之 VH 係包含序列編號 5 的胺基酸序列，與 CD3 特異性結合的第二臂之 VH 係包含序列編號 36 的胺基酸序列。

[27]如前項[1]至[26]中任一項所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，與 PD-1 特異性結合的第一臂及/或與 CD3 特異性結合的第二臂，各自具有含有下列者之輕鏈可變區域(以下，將「輕鏈可變區域」簡稱為「VL」)：

(a)包含序列編號 26 的胺基酸序列之輕鏈可變區域之互補性決定區域 1(以下，將「輕鏈可變區域之互補性決定區域 1」簡稱為 VL-CDR1)、

(b)包含序列編號 27 的胺基酸序列之輕鏈可變區域之互補性決定區域 2(以下，將「輕鏈可變區域之互補性決定區域 2」簡稱為 VL-CDR2)、及

(c)包含序列編號 28 的胺基酸序列之輕鏈可變區域之互補性決定區域 3(以下，將「輕鏈可變區域之互補性決定區域 3」簡稱為 VL-CDR3)。

[28]如前項[1]至[27]中任一項所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，與 PD-1 特異性結合的第一臂以及/或與 CD3 特異性結合的第二臂，各自具有包含序列編號 25 的胺基酸序列之 VL。

[29]一種 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，該 PD-1/CD3 雙特異性抗體具有與 PD-1 特異性結合的第一臂以及與 CD3 特異性結合的第二臂，並且包含：

(A)與 PD-1 特異性結合的第一臂，該第一臂具有包含選自序列編號 1、序列編號 2、序列編號 3、序列編號 4 及序列編號 5 中之任一個胺基酸序列之 VH 以及包含序列編號 25 的胺基酸序列之 VL，以及

(B)與 CD3 特異性結合的第二臂，該第二臂具有包含序列編號 36 的胺基酸序列之 VH 以及包含序列編號 25 的胺基酸序列之 VL。

[30]一種 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，該 PD-1/CD3 雙特異性抗體具有與 PD-1 特異性結合的第一臂以及與 CD3 特異性結合的第二臂，其中，該與 PD-1 特異性結合的第一臂係與下列結合進行交叉競爭：

(1)與 PD-1 特異性結合的第一臂對 PD-1 的結合，該第一臂具有包含選自序列編號 1、序列編號 2、序列編號 3、序列編號 4 及序列編號 5 中之任一個胺基酸序列之 VH，以及包含序列編號 25 的胺基酸序列之 VL；或

(2)包含該 VH 及該 VL 之與 PD-1 特異性結合之單株抗體的可變區域對 PD-1 的結合。

[31]一種 PD-1/CD3 雙特異性單株抗體或其抗體片段，該 PD-1/CD3 雙特異性單株抗體具有與 PD-1 特異性結合的第一臂以及與 CD3 特異性結合的第二臂，其中，藉

由該具有與PD-1特異性結合的第一臂對PD-1的結合係藉由下列者進行交叉競爭：

(1)與PD-1特異性結合之第一臂，該第一臂具有包含選自序列編號1、序列編號2、序列編號3、序列編號4及序列編號5中之任一個胺基酸序列之VH，以及包含序列編號25的胺基酸序列之VL；或

(2)包含該 VH 和該 VL 之與 PD-1 特異性結合之單株抗體的可變區域。

[32]如前項[30]或[31]所述之PD-1/CD3雙特異性抗體或其抗體片段，更且，該具有與CD3特異性結合之第二臂係與下列結合進行交叉競爭：

(1)與CD3特異性結合之第二臂對CD3的結合，該第二臂具有包含序列編號36的胺基酸序列之VH，以及包含序列編號25的胺基酸序列之VL；或

(2)包含該 VH 及該 VL 之與 CD3 特異性結合之單株抗體的可變區域對 CD3 的結合。

[33]如前項[30]或[31]所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，與CD3 特異性結合的第二臂具有含有下列者之 VH：

(a)包含序列編號 37 的胺基酸序列之 VH-CDR1、

(b)包含序列編號 38 的胺基酸序列之 VH-CDR2、以及

(c)包含序列編號 39 的胺基酸序列之 VH-CDR3。

[34]如前項[30]、[31]或[32]中任一項所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，與 CD3 特異性結合的第二臂之 VH 包含選自序列編號 36 的胺基酸序列、或與該胺基酸序列至少 80%、90%、95%、98%或 99%相同的胺基酸序列。

[35]如前項[30]或[31]所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，與CD3 特異性結合的第二臂之 VH 包含選自序列編號 36 的胺基酸序列。

[36]如前項[30]、[31]及[33]至[35]中任一項所述之 CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，與 CD3 特異性結合的第二臂具有含有下列者的 VL：

- (a)包含序列編號 26 的胺基酸序列之 VL-CDR1、
- (b)包含序列編號 27 的胺基酸序列之 VL-CDR2、以及
- (c)包含序列編號 28 的胺基酸序列之 VL-CDR3。

[37]如前項[30]、[31]及[33]至[35]中任一項所述之 CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，與 CD3 特異性結合的第二臂具有包含序列編號 25 的胺基酸序列之 VL。

[38]如前項[1]至[37]中任一項所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，PD-1/CD3 雙特異性抗體係 IgG 抗體。

[39]如前項[38]所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，前項[38]所述之 IgG 抗體係 IgG₁ 抗體或 IgG₄ 抗體。

[40]如前項[38]所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，前項[38]所述之 IgG 抗體係 IgG₁ 抗體。

[41]如前項[38]所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，前項[38]所述之 IgG 抗體係 IgG₄ 抗體。

[42]如前項[40]所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，前項[40]所述之 IgG₁ 抗體中的兩個重鏈恆定區域中，以 EU 編碼系統編號之第 235 號的白胺酸各自經置換成甘胺酸及/或在第 236 號的甘胺酸各自經置換成精胺酸。

[43]如前項[40]或[42]所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，在具有與 PD-1 特異性結合的第一臂之 VH 的重鏈恆定區域中的以 EU 編碼系統編號之第 351 號的白胺酸以及第 366 號的蘇胺酸均經置換成離胺酸，在具有與 CD3 特異性結合的第二臂之 VH 的重鏈恆定區域中的第 351 號的白胺酸經置換成天門冬胺酸，並且第 368 號的白胺酸經置換成麩胺酸。

[44]如前項[40]或[42]所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，在具有與 PD-1 特異性結合的第一臂之 VH 的重鏈恆定區域中的以 EU 編碼系統編號

之第 351 號的白胺酸經置換成天門冬胺酸，並且，第 368 號的白胺酸經置換成麩胺酸，在具有與 CD3 特異性結合的第二臂之 VH 中的重鏈恆定區域中第 351 號的白胺酸以及第 366 號的蘇胺酸經置換成離胺酸。

[45]如前項[40]及[42]至[44]中任一項所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，前項[40]以及[42]至[44]中任一項所述之 IgG₁ 抗體的 2 個重鏈恆定區域中，分別缺失了以 EU 編碼系統編號的第 447 號的離胺酸。

[46]如前項[41]所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，前項[41]述之 IgG₄ 抗體的兩個重鏈恆定區域中以 EU 編碼系統編號之第 228 號的絲胺酸各自經置換成脯胺酸。

[47]如前項[1]至[38]、[40]、[42]以及[44]中任一項所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，具有與 PD-1 特異性結合的第一臂之 VH 的重鏈，係含有包含序列編號 23 的胺基酸序列之重鏈恆定區域。

[48]如前項[1]至[38]、[40]、[42]、[44]以及[47]中任一項所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，具有與 CD3 特異性結合的第二臂之 VH 的重鏈，係含有包含序列編號 23 的胺基酸序列之重鏈恆定區域。

[49]如前項[1]至[48]中任一項所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，具有與 PD-1 特異性結合的第一臂之 VL 的輕鏈、及/或具有與 CD3 特異性結合的第二臂之 VL 的輕鏈，係含有包含序列編號 29 的胺基酸序列之輕鏈恆定區域。

[50]一種 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，該 PD-1/CD3 雙特異性抗體具有與 PD-1 特異性結合的第一臂以及與 CD3 特異性結合的第二臂，並且，包含下列者：

(A)具有與 PD-1 特異性結合的第一臂之 VH 的重鏈，係含有包含選自序列編號 1、序列編號 2、序列編號 3、序列編號 4 及序列編號 5 中之任一個胺基酸序列之 VH 以及包含序列編號 23 的胺基酸序列之重鏈恆定區域、

(B)具有與 PD-1 特異性結合的第一臂之 VL 的輕鏈，係含有包含序列編號 25 的胺基酸序列之 VL 以及包含序列編號 29 的胺基酸序列之輕鏈恆定區域、

(C)具有與 CD3 特異性結合的第二臂之 VH 的重鏈，係含有包含序列編號 36 的胺基酸序列之 VH 以及包含序列編號 24 的胺基酸序列之重鏈恆定區域、及

(D)具有與 CD3 特異性結合的第二臂之 VL 的輕鏈，係含有包含序列編號 25 的胺基酸序列之 VL 以及含有包含序列編號 29 的胺基酸序列之輕鏈恆定區域。

[51]如前項[1]至[50]其中任一項所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，與 PD-1 特異性結合的第一臂容許 PD-1 及 PD-L1 之間的相互作用。

[52]如前項[1]至[50]其中任一項所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，細胞介素的產生經充分地降低。

[53]如前項[1]至[50]其中任一項所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，與 PD-1 特異性結合的第一臂容許 PD-1 和 PD-L1 之間的相互作用，並且，細胞介素的產生經充分地降低。

[54]如前項[52]或[53]所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，細胞介素至少是 IL-2、IFN- γ 或 TNF- α 。

[55]如前項[1]至[54]中任一項所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，PD-1 以及 CD3 分別係人類 PD-1 以及人類 CD3。

[56]如前項[1]至[55]中任一項所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，CD3 係 CD3 ϵ 。

[57]如前項[1]至[56]其中任一項所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，PD-1/CD3 雙特異性抗體係單株抗體。

[58]如前項[1]至[57]中任一項之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段，其中，PD-1/CD3 雙特異性抗體係單離抗體。

[1-1]一種醫藥組成物，該醫藥組成物含有選自前項[1]至[58]中任一項所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段以及藥學上可接受的載體。

[2-1]一種自體免疫疾病的預防、症狀進展抑制、復發的抑制及/或治療劑，該等劑係含有選自前項[1]至[58]中任一項所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段作為有效成分。

[2-2] 如前項 [2-1]所述之劑，其中，自體免疫疾病係：貝西氏病(Behcet's disease)、全身性紅斑狼瘡、慢性盤狀紅斑狼瘡、多發性硬化症(系統性硬皮症、進行性全身硬化症)、硬皮症、多發性肌炎、皮膚肌炎、結節性動脈周圍炎(結節性多動脈炎、顯微性多血管炎)、大動脈炎症候群(高安氏動脈炎(Takayasu arteritis))、惡性類風濕性關節炎、類風濕性關節炎、幼年特發性關節炎、脊椎關節炎、混合性結締組織病、乾燥症候群(Sjogren's syndrome)、成人史迪爾氏病(Adult Still's disease)、血管炎、過敏性肉芽腫性血管炎、過敏性血管炎、類風濕性血管炎、大型血管炎、ANGA (antineutrophil cytoplasmic antibody(抗嗜中性球細胞質抗體))相關血管炎(例如，肉芽腫性多血管炎以及嗜酸性韋格納肉芽腫(Eosinophilic granulomatosis with polyangitis))、Cogan 氏病、RS3PE (Remitting Seronegative Symmetrical Synovitis with Pitting oedema(緩解性血清陰性對稱型滑膜炎併凹陷性水腫症候群))、顱動脈炎、風濕性多發性肌痛症、纖維肌痛症、抗磷脂質症候群、嗜酸性球性筋膜炎、IgG4 相關疾病 (例如，原發性硬化性膽管炎、自體免疫性胰臟炎等)、格林-巴利症候群(Guillain-Barré syndrome)、重症肌無力、慢性萎縮性胃炎、自體免疫性肝炎、非酒精性脂肪肝炎、原發性膽汁性肝硬化、古巴斯捷氏症候群(Goodpasture Syndrome)、快速進行性腎絲球腎炎(Rapid Progressive Glomerulonephritis)、巨紅血球貧血、自體免疫性溶血性貧血、惡性貧血、自體免

疫性嗜中性球減少症、特發性血小板減少性紫斑病(Idiopathic thrombocytopenic purpura)、巴塞多氏病(Basedow's disease)(格雷夫斯病(Graves'disease)(甲狀腺功能亢進症))、橋本氏病、自體免疫性腎上腺功能不全、原發性甲狀腺機能低下症、艾迪森氏病(Addison's disease)(慢性腎上腺機能減退症)、特發性艾迪森氏病、I型糖尿病、慢性進展型 I 型糖尿病 (成人隱匿遲發性自體免疫性糖尿病)、侷限性硬皮症、乾癬、乾癬性關節炎、大疱性類天疱瘡(Bullous pemphigoid)、天疱瘡、類天疱瘡、妊娠皰疹、線狀 IgA 大疱性皮膚病、後天性水疱性表皮鬆解症(epidermolysis bullosa acquisita)、圓形禿、白斑、尋常性白斑、視神經脊髓炎、慢性炎症性脫髓鞘性多發性神經炎、多灶性運動神經病、類肉瘤病、巨大細胞動脈炎、肌肉萎縮性脊髓側索硬化症、原田氏症、自體免疫性視神經病、特發性無精子症、習慣性流產、炎症性腸病(例如，潰瘍性大腸炎、克隆氏病(Crohn's disease))、腹腔疾病(celiac disease)、僵直性脊椎炎、嚴重氣喘、慢性蕁麻疹、移植免疫、家族性地中海熱、嗜酸性球性鼻竇炎、擴張性心肌病、全身性肥大細胞增生症或包涵體肌炎。

[2-3]一種移植物對抗宿主疾病(GVHD)的預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療劑，該等劑係含有選自前項[1]至[58]中任一項所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段作為有效成分。

[2-4]一種 I 型糖尿病的預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療劑，該等劑係含有選自前項[1]至[58]中任一項所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段作為有效成分，並且與選自：胰島素製劑(例如，人類胰島素、甘精胰島素(insulin glargine)、賴脯胰島素(insulin lispro)、地特胰島素(insulin detemir)、門冬胰島素(insulin aspart)等)、磺醯脲類劑(例如，格列本脲(Glibenclamide)、格列齊特(Gliclazide)、格列美脲(Glimepiride)等)、速效型胰島素分泌促進素(例如，那格列奈(Nateglinide)等)、雙胍類製劑(例如，二甲雙胍(Metformin)等)、胰島素抗性改

善藥(例如，吡格列酮(Pioglitazone)等)、 α -葡萄糖苷酶抑制藥(例如，阿卡波糖(Acarbose)、伏格列波糖(Bogribose)等)、糖尿病性神經病變藥(例如，依帕司他(Epalrestat)、美西律(Mexiletine)、咪達普利(Imidapril)等)、GLP-1 類似物製劑(例如，利拉魯肽(Liraglutide)、艾塞那肽(Exenatide)、利西拉來(Lixisenatide)等)及 DPP-4 抑制藥(例如，西格列汀(Sitagliptin)、維格列汀(Vildagliptin)、阿格列汀(Alogliptin)等)中之任一個以上之藥劑一起投予。

[2-5]一種多發性硬化症的預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療劑，該等劑係含有選自前項[1] 至 [58]中任一項所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段作為有效成分，並且與選自：類固醇藥(例如，乙酸皮質酮(Cortisone Acetate)、氫化皮質酮、氫化皮質酮磷酸鈉、氫化皮質酮琥珀酸鈉、乙酸氟氫皮質酮、去氫皮質醇(Prednisolone)、乙酸去氫皮質醇、去氫皮質醇琥珀酸鈉、乙酸丁酯去氫皮質醇、去氫皮質醇磷酸鈉、乙酸普樂松(Halopredone acetate)、甲基去氫皮質醇、乙酸甲基去氫皮質醇、琥珀酸甲基去氫皮質醇、曲安西龍(Triamcinolone)、乙酸曲安西龍、曲安西龍(Triamcinolone Acetonide)、地塞米松(Dexamethasone)、乙酸地塞米松、地塞米松磷酸鈉、棕櫚酸地塞米松、乙酸對氟米松(Paramethasone Acetate)、倍他米松(Betamethasone)等)、干擾素 β -1a、干擾素 β -1b、乙酸格拉替雷(Glatiramer acetate)、米托蒽醌(Mitoxantrone)、硫唑嘌呤(Azathioprine)、環磷醯胺、環孢菌素(Ciclosporin)、胺甲蝶呤(Methotrexate)、克立賓(Cladribine)、促腎上腺皮質激素(ACTH)、促皮質素(corticotropin)、咪唑立賓(Mizoribine)、他克莫司(Tacrolimus)、芬戈莫德(Fingolimod)及阿倫單抗(Alemtuzumab)中之任一個以上之藥劑一起投予。

[2-6]一種全身性紅斑狼瘡的預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療劑，該等劑含有選自前項[1]至[58]中任一項所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段作為有效成分，並且與選自類固醇藥(例如，前項[2-5]所述之類固醇藥)、免疫抑

制(例如，環孢菌素、他克莫司、芬戈莫德等)以及貝利木單抗(Belimumab)中之任一個以上之藥劑一起投予。

[2-7]一種類風濕性關節炎的預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療劑，該等劑含有選自前項[1]至[58]中任一項所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段作為有效成分，並且與選自類固醇藥(例如，前項[2-5]所述之類固醇藥)、抗風濕藥(例如，胺甲蝶呤、柳氮磺胺吡啶(Salazosulfapyridine)、布西拉明(Bucillamine)、來氟米特(Leflunomide)、咪唑立賓、他克莫司等)、抗細胞介素藥(例如，英夫利昔單抗(Infliximab)、阿達木單抗(Adalimumab)、托珠單抗(Tocilizumab)、依那西普(Etanercept)、戈利木單抗(Golimumab)、塞妥珠單抗(Certolizumab)等)以及阿巴西普(Abatcept)中之任一個以上之藥劑一起投予。

[2-8]一種自體免疫疾病的預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療劑，該等劑含有選自前項[1]至[58]中任一項所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段作為有效成分，並且與選自前項[2-4]至[2-7]中列舉之任一個以上之藥劑一起投予。

[2-9]如前項[2-4]至[2-8]所述之各疾病的預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療劑，該等劑係對被投予前項[2-4]至[2-7]中列舉之任一個以上的藥劑的患者投予。

[2-10]如前項[2-4]至[2-8]所述之各疾病的預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療劑，該等劑係在前項[2-4]至[2-7]中列舉之任一個以上的藥劑投予後進行投予。

[2-11]如前項[2-4]至[2-8]所述之各疾病的預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療劑，該等劑係在前項[2-4]至[2-7]中列舉之任一個以上的藥劑投予前進行投予。

[3-1]一種靜脈內注射用製劑，該製劑含有選自前項[1]至[58]中任一項所述之 PD-1/CD3 雙特異性抗體或其抗體片段、以及藥學上可接受的載體。

[3-2]如前項[3-1]所述之靜脈內注射用製劑，該製劑係用於自體免疫疾病的預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療。

[3-3]如前項[3-1]或[3-2]所述之靜脈內注射用製劑，該製劑係點滴用。

[4-1]一種編碼具有與PD-1特異性結合的第一臂之VH之重鏈的單離核苷酸或其片段，該單離核苷酸構成選自前項[1]至[58]中任一項所述之PD-1/CD3雙特異性抗體。

[4-2]一種編碼與PD-1特異性結合的第一臂之VH的單離核苷酸或其片段，該單離核苷酸構成選自前項[1]至[58]中任一項所述之PD-1/CD3雙特異性抗體。

[4-3]如前項[4-1]或[4-2]所述之單離核苷酸或其片段，其中，與PD-1特異性結合的第一臂之VH係藉由包含選自序列編號30至34的序列之核苷酸所編碼者。

[4-4]一種單離核苷酸或其片段，該單離核苷酸係含有包含選自序列編號30至34的序列之核苷酸。

[5-1]一種表現載體，該表現載體含有前項[4-1]至[4-4]中任一項所述之核苷酸。

[6-1]一種動物細胞，該動物細胞係導入[5-1]所述之表現載體、或是藉由導入相同載體而被轉形(transformation)者。

[7-1]一種自體免疫疾病的預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療方法，該方法係包含對患者投予有效量的選自前項[1]至[58]中任一項所述之PD-1/CD3雙特異性抗體或其抗體片段之步驟。

[8-1]如選自前項[1]至[58]中任一項所述之PD-1/CD3雙特異性抗體或其抗體片段，該PD-1/CD3雙特異性抗體係使用於自體免疫疾病的預防、症狀進展抑制，復發抑制及/或治療。

[9-1]一種選自前項[1]至[58]中任一項所述之PD-1/CD3雙特異性抗體或其抗體片段的用途，該用途係用於自體免疫疾病的預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療的醫藥的製造中。

[10-1]一種單離抗PD-1單株抗體或其抗體片段，該單離抗PD-1單株抗體係和與PD-1特異性結合的抗體對PD-1的結合進行交叉競爭，該PD-1特異性結合的抗

體具有包含選自序列編號 1、序列編號 2、序列編號 3、序列編號 4 及序列編號 5 中之任一個胺基酸序列之 VH、以及包含序列編號 25 的胺基酸序列之 VL。

[10-2]一種單離抗 PD-1 單株抗體或其抗體片段，該抗體或其抗體片段對 PD-1 的結合係藉由與 PD-1 特異性結合的抗體進行交叉競爭，該與 PD-1 特異性結合的抗體具有包含選自序列編號 1、序列編號 2、序列編號 3、序列編號 4 及序列編號 5 中之任一個胺基酸序列之 VH、以及包含序列編號 25 的胺基酸序列之 VL。

[10-3]一種單離抗 PD-1 單株抗體或其抗體片段，該單離抗 PD-1 單株抗體含有選自下述任一個之 VH：

(A)具有下列者之 VH：

- (a)包含序列編號 6 的胺基酸序列之 VH-CDR1、
- (b)包含序列編號 7 的胺基酸序列之 VH-CDR2、以及
- (c)包含序列編號 8 的胺基酸序列之 VH-CDR3；

(B)具有下列者之 VH：

- (a)包含序列編號 9 的胺基酸序列之 VH-CDR1、
- (b)包含序列編號 10 的胺基酸序列之 VH-CDR2、以及
- (c)包含序列編號 11 的胺基酸序列之 VH-CDR3；

(C)具有下列者之 VH：

- (a)包含序列編號 12 的胺基酸序列之 VH-CDR1、
- (b)包含序列編號 13 的胺基酸序列之 VH-CDR2、以及
- (c)包含序列編號 14 的胺基酸序列之 VH-CDR3；

(D)具有下列者之 VH：

- (a)包含序列編號 15 的胺基酸序列之 VH-CDR1、
- (b)包含序列編號 16 的胺基酸序列之 VH-CDR2、以及
- (c)包含序列編號 17 的胺基酸序列之 VH-CDR3；

(E)具有下列者之 VH：

- (a)包含序列編號 18 的胺基酸序列之 VH-CDR1、
- (b)包含序列編號 19 的胺基酸序列之 VH-CDR2、以及
- (c)包含序列編號 20 的胺基酸序列之 VH-CDR3；

並且含有具有下述者之 VL：

- (a)包含序列編號 26 的胺基酸序列之 VL-CDR1、
- (b)包含序列編號 27 的胺基酸序列之 VL-CDR2、以及
- (c)包含序列編號 28 的胺基酸序列之 VL-CDR3。

[10-4]如前項[10-3]所述之單離抗 PD-1 單株抗體或其抗體片段，其中，在 VH-CDR1、VH-CDR2 及 VH-CDR3 中之任一個或複數個 CDR 中，其任意的 1 至 5 個胺基酸殘基可經其他胺基酸(較佳為保守性胺基酸)置換。

[10-5]如前項[10-3]或[10-4]所述之單離抗 PD-1 單株抗體或其抗體片段，該單離抗 PD-1 單株抗體具有包含序列編號 1、序列編號 2、序列編號 3、序列編號 4 及序列編號 5 中之任一個胺基酸序列之 VH、或與該 VH 的胺基酸序列至少 80%、90%、95%、98%或 99%相同的胺基酸序列之 VH；以及包含序列編號 25 的胺基酸序列之 VL。

[10-6]如前項[10-1]至[10-5]中任一項所述之單離抗 PD-1 單株抗體或其抗體片段，其中，PD-1 為人類 PD-1。

[10-7]如前項[10-1]至[10-6]中任一項所述之單離抗 PD-1 單株抗體或其抗體片段，其中，抗 PD-1 抗體為 IgG 抗體。

[10-8]如前項[10-7]所述之單離抗 PD-1 單株抗體或其抗體片段，其中，前項[10-7]所述之 IgG 抗體為 IgG₁ 抗體或 IgG₄ 抗體。

[10-9]如前項[10-7]所述之單離抗 PD-1 單株抗體或其抗體片段，其中，前項[10-7]所述之 IgG 抗體為 IgG₁ 抗體。

[10-10]如前項[10-7]所述之單離抗 PD-1 單株抗體或其抗體片段，其中，前項[10-7]所述之 IgG 抗體為 IgG₄ 抗體。

[發明效果]

【0012】 本發明之PD-1/CD3雙特異性抗體，係誘導細胞介素的產生誘導，因而抑制投予後的輸注反應或細胞介素釋出症候群的表現，再者，允許PD-1和PD之間的相互作用，而可期待自體免疫疾病的預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療的效果增強或持續。

【圖式簡單說明】

【0013】

第1圖表示共通輕鏈的VL以及恆定區域之胺基酸序列。

第2圖表示共通輕鏈的VL之各CDR的胺基酸序列。

第3圖表示藉由生殖細胞系列型V基因IGHV7-4-1以及IGHV3-33而分別編碼的胺基酸序列。

第4圖表示與PD-1特異性結合的抗體(以下，簡稱為抗PD-1抗體)的各殖株(clone)的VH，與生殖細胞系列型V基因IGHV7-4-1及JH6c的序列比對。圖中，各殖株的胺基酸序列中的「-」表示為與對應的生殖細胞系列型V基因IGHV7-4-或JH6c的胺基酸序列相同的胺基酸，記載胺基酸的縮寫部分表示與前述生殖細胞系列型基因之胺基酸序列不同的胺基酸。

第5圖表示抗PD-1抗體各殖株的VH之胺基酸序列。

第6圖表示抗PD-1抗體各殖株的VH中各CDR之胺基酸序列。

第7圖表示與CD3特異性結合的抗體(以下，簡稱為抗CD3抗體)殖株CD3-2的VH之胺基酸序列。

第8圖表示抗CD3抗體殖株CD3-2的VH中各CDR之胺基酸序列。

第9圖表示PD-1/CD3雙特異性單株抗體的各重鏈恆定區域之胺基酸序列。

第10圖表示WO2005/118635所記載的抗CD3抗體殖株15C3的VH之胺基酸序列。此外，標示底線的胺基酸，表示在殖株CD3-1的製作中，經置換成丙胺酸之第55位的甘胺酸。

第11圖表示分別確認PD-1/CD3雙特異性單株抗體各殖株對於PD-1和CD3的結合活性之Biacore(生物分子交互作用分析技術)的測定結果的。

第12圖表示流動式細胞測量術(flow cytometry)，其確認了PD-1/CD3雙特異性單株抗體各殖株對PD-1和CD3的同時結合性。

第13圖表示流動式細胞測量術，其確認了PD-1/CD3雙特異性單株抗體各殖株對PD-1/PD-L1相互作用的影響。

第14圖表示PD-1/CD3雙特異性單株抗體各殖株對於從活化的人類T細胞產生IFN- γ 的作用結果。此外，圖中的「Ctrl」表示對照組。

第15圖表示在實驗性過敏性腦脊髓炎小鼠模型(EAE模型)中，PD-1/CD3雙特異性單株抗體各殖株(PD1-1(Bi)、PD1-2(Bi))的治療效果。

第16圖表示在實驗性過敏性腦脊髓炎小鼠模型中，PD-1/CD3雙特異性單株抗體各殖株(PD1-3(Bi)、PD1-4(Bi))的治療效果。

第17圖表示在實驗性過敏性腦脊髓炎小鼠模型中，PD-1/CD3雙特異性單株抗體各個殖株(PD1-5(Bi)、PD1-6(Bi))的治療效果。

第18圖表示PD-1/CD3雙特異性單株抗體各殖株對於從人類末梢血球單核細胞產生細胞介素的作用結果。

第19圖表示PD1-5(Bi)相對於PD-1/CD3雙特異性單株抗體各殖株對PD-1的結合之交叉競爭性。

【實施方式】

【0014】 PD-1(計畫性細胞死亡-1(Programmed Cell Death-1))，在人類中，係由GenBank登錄編號NP_005009所示之胺基酸序列組成的膜型蛋白質。在本說
330015

明書中記載為「PD-1」時，在沒有特別限定之限制下，係有使用其全部異構體(Isoform)、及保存有本發明所述之「與PD-1特異性結合之第一臂」的抗原決定區(Epitope)之該等的變異體的情形。在本發明中，PD-1較佳為人類PD-1。

【0015】 CD3係與T細胞受體締合而形成T細胞受體複合體之膜型蛋白質。於本說明書中記載為「CD3」時，在沒有特別限定之限制下，係有使用其亞型(Subtype)(ϵ 、 δ 、 γ 和 ζ 亞型)、及保存有本發明所述之「特異性結合CD3的第二臂」的抗原決定區之該等的變異體的情形。在本發明中，CD3較佳為CD3 ϵ 及人類CD3，更佳為人類CD3 ϵ 。

【0016】 本說明書中「單離」，意指從複數個乃至無數個成分所含有的夾雜物中，藉由建定、分離及/或精製，成為從宿主細胞所提取之實質上單一純淨的成分。

【0017】 本說明書中「單株抗體」，意指從實質上均勻的抗體集團得到的抗體，其係對相同的特定抗原進行結合。

【0018】 本說明書中「雙特異性抗體」，意指是指一分子中具有對兩個不同的抗原分子或抗原決定區之結合特異性的抗體，「雙特異性單株抗體」進一步意指從實質上均勻的抗體集團得到的雙特異性抗體。

【0019】 本發明係關於可分別與PD-1和CD3特異性結合的雙特異性抗體(於本說明書中，簡稱為PD-1/CD3雙特異性抗體)。在本發明中，作PD-1/CD3雙特異性抗體較佳為PD-1/CD3雙特異性單株抗體，更佳為單離之PD-1/CD3雙特異性單株抗體，又更佳為單離人類PD-1/人類CD3雙特異性單株抗體。此處，「單離人類PD-1/人類CD3雙特異性單株抗體」，意指針對人類PD-1及人類CD3之經單離的雙特異性單株抗體。

【0020】 於此，雙特異性抗體的形態中，例如有：雙鏈抗體(Diabody)、雙特異性sc(Fv)₂、雙特異性微小型抗體(Minibody)、雙特異性F(ab')₂、雙特異性雜合

(hybrid)抗體、共價結合型雙鏈抗體(雙特異性DART)、雙特異性(FvCys)₂、雙特異性F(ab'-拉鏈(zipper))₂、雙特異性(Fv-拉鏈)₂、雙特異性三鏈抗體和雙特異性mAb₂等。

【0021】 雙鏈抗體，係指識別不同抗原的VH、VL彼此藉由多肽鏈連接器(linker)而連節之單鏈多肽的二聚體(參照Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993), Vol. 90, No. 14: p.6444-6448)。

【0022】 雙特異性 sc(Fv)₂，係指識別不同抗原的兩個抗體之兩組VH/ VL以通過多肽連接器連接之單鏈形態而產生的經修飾之低分子化抗體(參照J. Biological Chemistry (1994), Vol. 269 : p. 199-206)。

【0023】 雙特異性F(ab')₂，係指識別兩種不同抗原之Fab'抗體片段，藉由雙硫鍵等而共價鍵結成的低分子化抗體。

【0024】 雙特異性微小型抗體，係指將各個經變異的低分子化抗體片段藉由CH3結構域上的雙硫鍵等而共價鍵結成之低分子化抗體，該低分子化抗體片段係將識別不同抗原的scFv與抗體的恆定區域CH3結構域(domain)鍵結而成者(參照 Biochemistry (1992), Vo. 31, No. 6, p. 1579-1584)。

【0025】 雙特異性雜合抗體，係指識別兩種不同抗原的抗體之重鏈/輕鏈複合體藉由雙硫鍵等共價鍵結成之完整抗體。

【0026】 本發明中，較佳的雙特異性抗體形態，係雙特異性雜合抗體。

【0027】 雙特異性雜合抗體，例如，可從利用雜交融合瘤法(Hybrid hybridoma method)(參照US4474893號)所製作出的融合瘤來產生。再者，也可將分別編碼有識別不同抗原的抗體之重鏈及輕鏈之總計4種類的cDNA在哺乳動物細胞中共同表現與分泌而製造。

【0028】 本發明中所使用的單株抗體係可藉由：融合瘤法(例如，參照 Kohler和 Milstein等, Natur (1975), Vol . 256, p. 495-97 ; Hongo等, Hybridoma 330015

(1995), Vol. 14, No. 3, p.253-260; Harlow等, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press(1988), Vol. 2)及 Hammerling等, Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, p. 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981))、重組DNA法(例如, 參照US4816567)、噬菌體顯示方法(例如, 參照Ladner等之US5223409、US5403484及US5571698; Dower等之US5427908及US5580717; McCafferty等之US5969108及US6172197; 及Griffiths等之US5885793、US6521404、US6544731、US6555313、US658291及US6593081)進行製作。

【0029】 抗體或單株抗體, 在對人類投予時, 為了降低或消除其抗原性, 可以嵌合抗體、人類化抗體或完全人類型抗體的形態進行製作。

【0030】 「嵌合抗體」意指可變區域序列及恆定區域序列源自不同哺乳動物的抗體, 例如, 有可變區域序列源自小鼠抗體, 恆定區域序列源自人類抗體者。嵌合抗體, 係可藉由上述雜交融合瘤法、重組DNA方法或噬菌體顯示方法, 從經單離的抗體產生融合瘤, 單離出編碼抗體可變區域的基因, 並使該基因使用已知的方法, 與編碼源自人類的抗體恆定區域的基因連結(例如, 參照Cabilly等之US4816567)。

【0031】 「人類化抗體」意指將源自如小鼠之其他哺乳動物的生殖細胞系列型的互補性決定區域(CDR)序列移植到人框架序列而成之抗體。在人類化抗體的情形, 亦可利用上述方法從經單離之抗體產生融合瘤, 藉由已知方法單離出編碼抗體CDR的基因, 使該基因使用已知的方法, 與編碼源自人類的抗體框架區域的基因連結(例如, 參照Winter之US5225539及US55300101; Queen等之US5855089及US6180370號)

【0032】 「人類抗體」或「完全人類型抗體」意指包含框架區域和CDR區域之可變區域和恆定區域兩者均源自人類生殖細胞系列型免疫球蛋白序列的抗體。本發明中所使用的人類抗體, 係可藉由使用以產生人類抗體之方式而經轉形

小鼠，例如，Humab小鼠(例如，參照Lonberg和Kay等之US5545806、US5569825、US5625126、US5633425、US5789650、US5877397、US5661016、US5814318號、US5874299及US5770429)、KM小鼠(例如，參照Ishida之WO2002/43478)、Xeno小鼠(例如，參照US5939598、US6075181、US6114598、US6150584及US6162963)或Tc小鼠(例如，參照Tomizuka等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA(2000年),p.722-727)之方法進行製作。再者，以藉由免疫而產生人類抗體反應之方式，亦可使用將人類免疫細胞再構築的SCID小鼠(例如，參照Wilson等之US5476996號及US5698767)進行製備。再者，本發明所使用的人類抗體亦可藉由上述噬菌體顯示方法進行製作。

【0033】於本說明書中，PD-1/CD3雙特異性抗體的「抗體片段」係指全長抗體的一部分，並且具有針對PD-1之抗原結合部分及針對CD3之抗原結合部分的抗體，例如，可舉出F(ab')₂等。在此，抗原結合部分係指抗體可與其抗原結合的最小單位，例如，藉由VH及VL所具有之分別各3個CDR及該等CDR的組合，以可識別目標抗原之方式從配置CDR的框架區域構成。

【0034】於本說明書中，「共通輕鏈」係指可與兩種以上不同的重鏈締合，並且顯示對各個抗原的結合能力的輕鏈(De Wildt RM等, J. Mol. Biol. (1999年), Vol. 285, p.895-901; De Kruif等, J. Mol. Biol. (2009年), Vol. 387, p. 548-58; WO2004/009618、WO2009/157771及WO 2014/051433)。如此之共通輕鏈，較佳為例如由人類κ輕鏈IgVκ1-39*01/IGJκ1*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(以下，簡稱為IGVK1-39/JK1共通輕鏈)，更佳為例如具有VL之該輕鏈，該VL含有包含序列編號26的胺基酸序列之VL-CDR1、包含序列編號27的胺基酸序列之VL-CDR2及包含序列編號28的胺基酸序列之VL-CDR3，又更佳為例如具有包含序列編號25的胺基酸序列之VL的該輕鏈。再者，共通輕鏈的恆定區域較佳可舉出包含序列編號29的胺基酸序列之輕鏈恆定區域。將本

330015 第 28 頁，共 63 頁(發明說明書)

發明所使用的共通輕鏈的VL和恆定區域的各胺基酸序列示於第1圖，將其可變區域的各CDR的胺基酸序列示於第2圖。

【0035】於本說明書中，「同型(isotype)」係指由重鏈恆定區域基因所編碼的抗體類別(class)(例如，IgM或IgG)。作為本發明的PD-1/CD3雙特異性抗體的較佳同型是IgG，更佳為IgG₁或IgG₄。IgG₁較佳為對Fc受體的結合經消除或減弱者。具體而言，將由將重鏈恆定區域的任意胺基酸置換、缺失或插入，而獲得對Fc受體的結合經消除或減弱的IgG₁抗體。可列舉例如：在雙特異性抗體的分別兩個重鏈恆定區域或鉸鏈(Hinge)區域上，以EU編碼系統編號之第235號的白胺酸經置換成甘胺酸、及/或第236號的甘胺酸經置換成精胺酸。再者，為了降低抗體的不均勻性，較佳為缺失C-末端的胺基酸，例如，以EU編碼系統編號之第447號的離胺酸的抗體。進一步，雙特異性抗體為IgG₄時，更佳為以抑制抗體分子內中的調換(swapping)之方式，而於其重鏈恆定區域的任意胺基酸經置換、缺失或插入的變異體。例如，較佳為位於鉸鏈區中的以EU編碼系統編號之第228號的絲胺酸經置換成脯氨酸的抗體。此外，在本說明書中，分割抗體可變區域的CDR及框架的胺基酸位置，係根據Kabat而決定(參照Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institute of Health, Bethesda, Md., (1987)及(1991))。再者，恆定區域的胺基酸係根據以Kabat的胺基酸位置作為基準的EU編碼系統(參照Sequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No. 91-3242)表示。

【0036】本發明的PD-1/CD3雙特異性抗體的Fc區域中，以使兩條不同的重鏈易於締合之方式，在該區域的任意胺基酸亦可經置換。較佳的態樣可列舉例如PD-1 / CD3雙特異性抗體，其係在具有與PD-1特異性結合的第一臂的VH之重鏈上的恆定區域中，以EU編碼系統編號之第351號的白胺酸經置換成離胺酸，並且第366號的蘇胺酸經置換成離胺酸；在具有與CD3特異性結合的第二臂的VH之重鏈上的恆定區域中，第351號的白胺酸經置換成天門冬胺酸，並且第368號的白胺

酸經置換成麩胺酸。再者，亦可舉出PD-1/CD3雙特異性抗體，其係於具有與PD-1特異性結合的第一臂的VH之重鏈上的恆定區域中，以EU編碼系統編號之第351號的白胺酸經置換成天門冬胺酸，並且第368號的白胺酸經置換成麩胺酸；於具有與CD3特異性結合的第二臂的VH之重鏈中的恆定區域中，第351號的白胺酸經置換成天門冬胺酸，並且第366號的蘇胺酸經置換成離胺酸。

【0037】

與PD-1特異性結合的第一臂

於本說明書中，「與PD-1特異性結合的第一臂」(以下，簡稱為「第一臂」)，意指含有抗體或抗體片段的一部分，或者是，不是一部分，且無論是否以其本身單體存在，至少包含與PD-1特異性結合的抗體(以下，簡稱為抗PD-1抗體)的VH，並且可與PD-1特異性結合的抗體部分，例如，如此之第一臂，係由抗PD-1抗體的VH以及構成該抗PD-1抗體之共通輕鏈的VL所構成，進一步第一臂中，亦包含含有該VH及VL的抗體之Fab部分。在此，「與PD-1特異性地結合」係指可藉由具有至少高於 $1 \times 10^{-5} \text{M}$ ，較佳為 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ ，更佳為 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 的親和性(解離常數(Kd值))的結合活性而對PD-1直接結合，並且至少不與CD28、CTLA-4及ICOS等所謂屬於CD28家族受體的其他受體成員實質上地結合為特徵。再者，「與PD-1特異性結合的抗體」或「抗PD-1抗體」中的「抗體」，係指全長抗體，亦即，藉由雙硫鍵連結而成的包含兩條重鏈和兩條輕鏈的全長抗體，較佳為其單株抗體。

【0038】 在此，作為「與PD-1特異性結合的第一臂」係可舉出含有者，該VH具有：

- (a)HYJ¹LH所示之胺基酸序列[序列中，J¹表示G(甘胺酸)或A(丙胺酸)，在此，J¹表示的字母或者其他的字母係表示各胺基酸的單字母縮寫]之VH-CDR1、
- (b)WJ²NTNTU²NPTX²AQGFTG所示之胺基酸序列[序列中，J²表示L(白胺酸)或I(異白胺酸)，U²表示E(麩胺酸)或G(甘胺酸)，X²表示F(苯丙胺酸)或Y(酪胺酸)，

在此， J^2 、 U^2 和 X^2 表示的字母或其他的字母係分別表示與上述相同意義]之VH-CDR2、以及

(c)GDJ³VVPTTIWNYYU³X³MZ³V所示之胺基酸序列[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(天門冬胺酸)或E(麩胺酸)，在此， J^3 、 U^3 、 X^3 和 Z^3 表示的字母或者其他的字母係分別表示與上述相同意義]之VH-CDR3。

【0039】 在此，較佳的「與PD-1特異性結合的第一臂」的態樣，可列舉例如具有含有下列各個VH-CDR之VH者：

(1a)具有下列各個VH-CDR之VH，其屬於VH-CDR1之HYJ¹LH序列中的 J^1 表示G(甘胺酸)，其屬於VH-CDR2之WJ²NTNTU²NPTX²AQGFTG序列中的 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)，其屬於VH-CDR3之GDJ³VVPTTIWNYYU³X³MZ³V序列中的 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(天門冬胺酸)；

(2a)具有下列各個VH-CDR之VH，其屬於VH-CDR1之HYJ¹LH序列中的 J^1 表示G(甘胺酸)，其屬於VH-CDR2之WJ²NTNTU²NPTX²AQGFTG序列中的 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)，其屬於VH-CDR3之GDJ³VVPTTIWNYYU³X³MZ³V序列中的 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)；

(3a)具有下列各個VH-CDR之VH，其屬於VH-CDR1之HYJ¹LH中的 J^1 表示A(丙胺酸)，其屬於VH-CDR2之WJ²NTNTU²NPTX²AQGFTG序列中的 J^2 表示L(白胺酸)、 U^2 表示E(麩胺酸)、 X^2 表示Y(酪胺酸)，其屬於VH-CDR3之GDJ³VVPTTIWNYYU³X³MZ³V序列中的 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(天門冬胺酸)；

(4a)具有下列各個VH-CDR之VH，其屬於VH-CDR1之HYJ¹LH序列中的J¹表示A(丙胺酸)，其屬於VH-CDR2之WJ²NTNTU²NPTX²AQGFTG序列中的J²表示L(白胺酸)、U²表示E(麩胺酸)、X²表示F(苯丙胺酸)，其屬於VH-CDR3之GDJ³VVPTTIWNYU³X³MZ³V序列中的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(天門冬胺酸)。

【0040】再者，較佳的「與PD-1特異性結合的第一臂」的其他態樣，可列舉例如具有選自下列VH中之任一個VH者：

(1b)含有包含序列編號 6 的胺基酸序列之 VH-CDR1、包含序列編號 7 的胺基酸序列之 VH-CDR2、以及包含序列編號 8 的胺基酸序列之 VH-CDR3 的 VH；

(2b)含有包含序列編號 9 的胺基酸序列之 VH-CDR1、包含序列編號 10 的胺基酸序列之 VH-CDR2、以及包含序列編號 11 的胺基酸序列之 VH-CDR3 的 VH；

(3b)含有包含序列編號 12 的胺基酸序列之 VH-CDR1、包含序列編號 13 的胺基酸序列之 VH-CDR2、以及包含序列編號 14 的胺基酸序列之 VH-CDR3 的 VH；

(4b)含有包含序列編號 15 的胺基酸序列之 VH-CDR1、包含序列編號 16 的胺基酸序列之 VH-CDR2、以及包含序列編號 17 的胺基酸序列之 VH-CDR3 的 VH；

(5b)含有包含序列編號 18 的胺基酸序列之 VH-CDR1、包含序列編號 19 的胺基酸序列之 VH-CDR2、以及包含序列編號 20 的胺基酸序列之 VH-CDR3 的 VH。

【0041】再者，在本發明的「與PD-1特異性結合的第一臂」中，亦包含在選自上述(1a)至(4a)或(1b)至(5b)中之任一個VH中的各VH-CDR中，其任意的1至5個胺基酸殘基經置換成其他胺基酸(較佳為保守性胺基酸)，並且，與未置換成該胺基酸的原始第一臂對PD-1之結合活性具有實質上同等的結合活性者。可列舉例如，在VH-CDR1的情況中，1個胺基酸殘基經置換成其保守性胺基酸，在VH-CDR2或VH-CDR3的情況中，1或2個胺基酸殘基經置換成其保守性胺基酸者。在此，使用保守性胺基酸的置換，意指具有類似的側鏈的殘基之可換性，例如，在

具有脂肪族側鏈的胺基酸群組中，係甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸及異白胺酸；在具有脂肪族羥基側鏈中的胺基酸群組中，係絲胺酸和蘇胺酸；在具有含醯胺側鏈的胺基酸群組中，係天門冬醯胺酸及麩醯胺酸；在具有芳香族側鏈的胺基酸群組中，係苯丙胺酸、酪胺酸及色胺酸；在具有鹼性側鏈的胺基酸群組中，係離胺酸、精胺酸及組胺酸；在具有含硫側鏈的胺基酸群組中，係半胱胺酸和甲硫胺酸。較佳的使用保守性胺基酸置換之例可列舉：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、丙胺酸和纈胺酸之間的置換以及天門冬醯胺酸和麩醯胺酸之間的置換。再者，在此，上述「與未經置換成該胺基酸的原始第一臂之對PD-1的結合活性具有實質上同等的結合活性」，係指經該胺基酸置換的第一臂對PD-1的結合活性，係未經置換成該胺基酸的原始第一臂對PD-1之結合活性的95%以上，較佳為98%以上，更佳為99%以上。

【0042】 再者，在本發明之「與PD-1特異性結合的第一臂」中，亦包含具有下述VH者，在其VH中，該VH含有具有上述特定胺基酸序列的各VH-CDR，並且，其VH的框架的胺基酸序列係由特定生殖細胞系列型基因或其受到體細胞突變的該基因所編碼。例如，選自上述(1a)至(4a)或(1b)至(5b)中之任一個所示之VH，係可由VDJ重組基因或其受到體細胞突變的該基因所編碼，該VDJ重組基因係生殖細胞系列型V基因為IGHV7-4-1，且生殖細胞系列型J基因為JH6c者。在此，由生殖細胞系列型之V基因IGHV7-4-1所編碼的胺基酸序列，係對應序列編號21的胺基酸序列(第3圖)。

【0043】 本發明之與PD-1特異性結合的第一臂之VH的框架，係有由生殖細胞系列型之VDJ重組基因受到體細胞突變的該基因所編碼之情形。例如，生殖細胞系列型V基因為IGHV7-4-1之選自上述(1a)至(4a)或(1b)至(5b)中之任一個所示的VH的FR1、FR2及FR3，係在第4圖所示之胺基酸位置中，與IGHV7-4-1基因

所編碼的胺基酸序列不同，因此，在該各個位置中受到體細胞突變。例如，關於FR1區域，在序列編號21的胺基酸序列中，第13位的離胺酸可經置換成麩醯胺酸、第16位的丙胺酸可經置換成纈胺酸、或第19位的離胺酸可經置換成甲硫胺酸，或者是，亦可以該等的任意複數個組合置換。關於FR2區域，在序列編號21的胺基酸序列中，第37位的纈胺酸亦可經置換成白胺酸。關於FR3，在序列編號21的胺基酸序列中，第77位的絲胺酸可經置換成蘇胺酸、第84位的半胱胺酸可經置換成絲胺酸或天門冬醯胺酸，或者是，亦可以該等的任意複數個組合置換。再者，關於選自上述(1a)至(4a)或(1b)至(5b)中之任一個所示之VH的FR4區域，源自J基因JH6c的FR4區域胺基酸序列(Trp-Gly-Lys-Gly-Thr-Thr*-Val-Thr-Val-Ser-Ser)(序列編號41)中的離胺酸(Lys)亦可經置換成麩醯胺酸或天門冬醯胺酸、及/或*標記的蘇胺酸(Thr)可經置換成白胺酸。具有上述任一個胺基酸置換的組合之各個FR1、FR2、FR3及FR4，亦不會對與PD-1特異性結合的第一臂的功能造成實質上的影響，且可作為框架使用。

【0044】再者，在本發明之「與PD-1特異性結合的第一臂」中，亦包含含有上述具有特定胺基酸序列的各CDR，並且，其VH的FR胺基酸序列，係由特定的生殖細胞系列型基因或者其受到體細胞突變的該基因所編碼者。例如，如此之第一臂可舉出具有包含選自序列編號1至5的胺基酸序列之VH者。

【0045】再者，在如此之「與PD-1特異性結合的第一臂」中，例如，亦包含下述者(以下，簡稱為相同第一臂)，該相同第一臂係具有包含與選自序列編號1至5中之任一個胺基酸序列至少80%相同，較佳為至少90%相同，更佳為至少95%相同，又更佳為至少98%相同，又再更佳為至少99%相同的胺基酸序列之VH，並且，與原始第一臂之VH的胺基酸序列間的差異不會對與PD-1的結合活性造成實質上影響者。在此，關於胺基酸序列的相同性的比較中所使用的「%相同」，係指將兩個序列對齊，並且，定義為與參照之胺基酸序列(在此，在必須達成最

大百分率的相同性時，係導入有間隙(gap)的參照用胺基酸序列)相同的胺基酸序列之百分率。再者，在此，「與原始第一臂之VH的胺基酸序列間的差異不會對與PD-1的結合活性造成實質上影響」，意指該相同第一臂對PD-1的結合活性為原始第一臂的該結合活性的95%以上，較佳為98%以上，更佳為99%以上。

【0046】在又一其他態樣中，本發明之「與PD-1特異性結合的第一臂」，亦包含與下列結合進行交叉競爭的具有抗PD-1抗體的可變區域者(在此，該可變區域包含構成其之VH及VL)：(1)第一臂對PD-1的結合，該第一臂具有選自上述(1a)至(4a)或(1b)至(5b)中的任一個所示之VH或包含選自序列編號1至序列編號5之胺基酸序列之VH、以及共通輕鏈之VL，或者是，(2)單株抗體的可變區域對PD-1的結合，該單株抗體包含該VH及VL的與PD-1特異性結合的；再者，亦包含藉由下列者進行交叉競爭的具有抗PD-1抗體的可變區域者：(3)具有選自上述(1a)至(4a)或(1b)至(5b)中的任一個所示之VH、或包含選自序列編號1至序列編號5之胺基酸序列之VH以及共通輕鏈的第一臂；或者是，(4)包含該VH及VL的與PD-1特異性結合的單株抗體的可變區域。在此，「與對PD-1的結合進行交叉競爭」，意指藉由結合與本說明書所例示的第一臂相同或一部份重複的抗原決定區，無論該第一臂對PD-1的結合程度皆進行阻礙，或者是，利用與該例示之第一臂相同或一部份重複的抗原決定區結合的抗體進行對PD-1的結合，係藉由該例示的第一臂而無論其程度皆進行阻礙，是否進行交叉競爭係可藉由競合結合分析進行評估。例如，可使用Biacore分析、ELISA分析、流動式細胞測量術、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))進行判斷。

【0047】例如，與具有上述(5b)所示的VH及共通輕鏈的VL之第一臂對PD-1的結合進行交叉競爭者，可列舉例如：具有選自上述(1b)至(4b)中之任一個之VH及共通輕鏈的VL(較佳為，具有包含序列編號26的胺基酸序列之VL-CDR1、包含

序列編號27的胺基酸序列之VL-CDR2、包含序列編號28的胺基酸序列之VL-CDR3的VL)的第一臂、以及具有包含選自序列編號1至4的胺基酸序列之VH及共通輕鏈的VL(較佳為，包含序列編號25的胺基酸序列的VL)之第一臂。

【0048】再者，例如，與具有選自上述(1b)至(4b)中之任一個VH或選自序列編號1至4之胺基酸序列之VH、以及共通輕鏈的VL等之第一臂對PD-1的結合進行交叉競爭者，可列舉例如：具有上述(5b)所示的VH以及共通輕鏈的VL(較佳為，包含序列編號26的胺基酸序列之VL-CDR1、包含序列編號27的胺基酸序列之VL-CDR2、包含序列編號28的胺基酸序列之VL-CDR3的VL)之第一臂、以及具有包含序列編號5的胺基酸序列的VH及共通輕鏈的VL(較佳為，包含序列編號25的胺基酸序列的VL)之第一臂。

【0049】在此，本發明之「與PD-1特異性結合的第一臂」，較佳可舉出具有選自上述(1b)至(5b)中之任一個VH之第一臂，再者，該較佳的第一臂中，如上述，亦包含於其VH的各CDR中，其任意1至5個胺基酸殘基經置換成其他胺基酸(較佳為，保守胺性基酸)，並且，該胺基酸置換不會實質上地影響對PD-1的結合活性者，再者，進一步如上所述，亦包含具有VH者，該VH為VH框架中的胺基酸序列，係由生殖細胞系列型V基因IGHV7-4-1或生殖細胞系列型J基因JH6c或者是該等受到體細胞突變的該基因所編碼。並且，該第一臂較佳可舉出具有包含選自序列編號1至5中之任一個胺基酸序列之VH。

【0050】再者，本發明之「與PD-1特異性結合的第一臂」較佳為含有共通輕鏈的VL，如此之共通輕鏈，較佳為例如，IGVK1-39/JK1共通輕鏈，更佳為例如，含有下述VL-CDR的VL，例如，具有VL的輕鏈，該VL含有包含序列編號26的胺基酸序列之VL-CDR1、包含序列編號27的胺基酸序列之VL-CDR2、及包含包含序列編號28的胺基酸序列之VL-CDR3，又更佳為例如，具有包含序列編號

25的胺基酸序列之VL的輕鏈。再者，共通輕鏈的恆定區域較佳可舉出包含序列編號29的胺基酸序列之輕鏈恆定區域。

【0051】再者，「與PD-1特異性結合的第一臂」，更佳為容許PD-1與PD-L1間的相互作用、PD-1與PD-L2間的相互作用、或者是該等兩相互作用者。在此，「容許PD-1與PD-L1間的相互作用、PD-1與PD-L2間的相互作用、或者是該等兩相互作用者」，意指本發明之PD-1/CD3雙特異性抗體即使存在於可溶性PD-L1或PD-L2濃度為20倍過量的情況下，相對於不存在本發明之PD-1/CD3雙特異性抗體時的相互作用，該PD-L1與PD-1間的相互作用、PD-L2與PD-1間的相互作用或該等兩相互作用，維持50%以上，較佳為維持70%以上，更佳為維持80%以上。再者，「容許PD-1與PD-L1間的相互作用、PD-1與PD-L2間的相互作用、或者是該等二相互作用」的定義，係有使用與「不會實質上阻礙PD-1與PD-L1間的相互作用、PD-1與PD-L2間的相互作用、或者是該等兩相互作用」之意義同義的情形。

【0052】將為了構築本發明之PD-1/CD3雙特異性抗體而被取得的抗PD-1單株抗體的各殖株，與該等的VH的胺基酸序列及其序列編號的對應關係示於第5圖，以及，將該抗PD-1單株抗體的各殖株的VH中各CDR的胺基酸序列與其序列編號的對應關係示於第6圖。

【0053】

與CD3特異性結合的第二臂

在本說明書中，「與CD3特異性結合的第二臂」(以下，簡稱為「第二臂」)，意指含有抗體或抗體片段的一部分，或者是，不是一部分，且無論是否以其本身單體存在，至少包含有與CD3特異性結合抗體(以下，簡稱為抗CD3抗體)的VH，並且可與CD3特異性結合的抗體部分，例如，如此之第二臂，係由抗CD3抗體的VH以及構成該抗CD3抗體之共通輕鏈的VL所構成，再者，第二臂中亦包含含有該VH及VL的抗體之Fab部分。在此，「與CD3特異性結合」係指可藉由具有至少

高於 $1 \times 10^{-5} \text{M}$ ，較佳為 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ ，更佳為 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 的親和力(解離常數(K_d 值))的結合活性而對CD3直接結合，並且不與其他蛋白質實質上地結合為特徵。再者，「與CD3特異性結合的抗體」或「抗CD3抗體」中的「抗體」，係指全長抗體，亦即，藉由雙硫鍵連結而成的包含兩條重鏈和兩條輕鏈的全長抗體，較佳為其單株抗體。

【0054】 在此，如此之「與CD3特異性結合的第二臂」，可列舉出例如具有下列VH者：

(1c)含有包含序列編號37的胺基酸序列之VH-CDR1、包含序列編號38的胺基酸序列之VH-CDR2、及包含序列編號39的胺基酸序列之VH-CDR3的VH。

【0055】 再者，在本發明之「與CD3特異性結合的第二臂」中，亦包含在上述之(1c)的VH中的各CDR中，任意1至5個胺基酸殘基經置換成其他胺基酸(較佳為保守性胺基酸)，並且，具有與未經置換成該胺基酸的原始第二臂對CD3的結合活性實質上同等的結合活性者。可列舉例如，在CDR1的情況中，1個胺基酸殘基經置換成保守性胺基酸，在CDR2或CDR3的情況中，1或2個胺基酸殘基經置換成保守性胺基酸。在此，「具有與未經置換成該胺基酸的原始第二臂對CD3的結合活性實質上同等的結合活性」，係指經該胺基酸置換的第二臂對CD3的結合活性，係未經置換成該胺基酸的原始第二臂的結合活性的95%以上，較佳為98%以上，更佳為99%以上。此外，第二臂的各VH-CDR中的「利用保守性胺基酸的置換」中，可列舉例如上述第一臂中的胺基酸置換之例。

【0056】 再者，在本發明之「與CD3特異性結合的第二臂」中，亦包含具有VH者，其VH中，含有具有上述特定胺基酸序列的各CDR，並且，其VH的框架的胺基酸序列，係由特定生殖細胞系列型基因或其受到體細胞突變的該基因所編碼者。例如，上述(1c)的VH，係由生殖細胞系列型V基因為IGHV3-33的VDJ

重組基因、或其受到體細胞突變的該基因所編碼。在此，將由生殖細胞系列型的V基因IGHV3-33所編碼的胺基酸序列(序列編號22)示於第3圖。

【0057】再者，在本發明之「與CD3特異性結合的第二臂」，亦包含VH者，該VH含有具有上述特定胺基酸序列的各CDR，並且，其VH的FR的胺基酸序列，係由特定的生殖細胞系列型基因或其受到體細胞突變的該基因所編碼者。例如，如此之第二臂可舉出具有包含序列編號36的胺基酸序列之VH者。

【0058】再者，在如此「與CD3特異性結合的第二臂」中，例如，亦包含下述者(以下，簡稱為相同第二臂)，該第二臂具有包含選自與序列編號36的胺基酸序列至少80%相同，較佳為至少90%相同，更佳為至少95%相同，又更佳為至少98%相同，又再更佳為至少99%相同的胺基酸序列之VH，並且，與原始第二臂之VH的胺基酸序列間的差異不會對CD3的結合活性造成實質上影響者。在此，「與原始第二臂之VH的胺基酸序列間的差異不會對CD3的結合活性造成實質上影響」，意指相同第二臂對CD3的結合活性為原始第二臂的該結合活性的95%以上，較佳為98%以上，更佳為99%以上。

【0059】在另一態樣中，本發明之「與CD3特異性結合的第二臂」中，亦包含具有與下列結合進行交叉競爭的抗CD3抗體的可變區域者(在此，該可變區域包含構成其之VH及VL)：(1)第二臂對CD3的結合，該第二臂具有上述(1c)所示之VH或包含序列編號36之胺基酸序列之VH、以及共通輕鏈的VL；或者是，(2)包含該VH及VL的與CD3特異性結合的單株抗體的可變區域對CD3的結合。在此，「對CD3的結合進行交叉競爭」，亦指藉由結合與本說明書所例示之第二臂相同或一部份重複的抗原決定區，而無論其程度皆阻礙該第二臂對CD3的結合。在此，是否進行交叉競爭，可以在「與PD-1特異性結合的第一臂」的相關說明中所記載的方法為基準同樣地進行測定。

【0060】在此，本發明之「與CD3特異性結合的第二臂」，較佳可舉出如具有上述(1c)所示之VH的第二臂，再者，該較佳的第二臂中，如上述，亦包含在其VH的各CDR中，其任意1至5個胺基酸殘基經置換成其他胺基酸(較佳為保守性胺基酸)，並且，該胺基酸置換不會實質上地影響對CD3的結合活性，進一步，如上所述，亦包含具有VH者，該VH為VH框架的胺基酸序列係由生殖細胞系列型V基因IGHV3-33或其受到體細胞突變的該基因編碼者。並且，該第二臂較佳可舉出具有包含序列編號36的胺基酸序列之VH者。

【0061】以下，將用以構築本發明之PD-1/CD3雙特異性抗體的抗CD3抗體的各殖株，與該等的VH的胺基酸序列及其序列編號的對應關示於第7圖，以及，將該抗CD3抗體的各殖株的VH中的各CDR的胺基酸序列與其序列編號的對應關示於第8圖。

【0062】本發明之「與CD3特異性結合的第二臂」，較佳為含有共通輕鏈的VL者，如此之共通輕鏈較佳為例如IGVK1-39/JK1共通輕鏈，更佳為例如含有下述VL-CDR的VL，例如，具有VL者的輕鏈，該VL含有包含序列編號26的胺基酸序列之VL-CDR1、包含序列編號27的胺基酸序列之VL-CDR2、及包含序列編號28的胺基酸序列之VL-CDR3，又更佳為例如具有包含序列編號25的胺基酸序列之VL的輕鏈。再者，共通輕鏈的恆定區域，較佳可舉出包含序列編號29的胺基酸序列之輕鏈恆定區域。

【0063】本發明之「與CD3特異性結合的第二臂」，較佳可舉出與CD3 ϵ 特異性結合者。

【0064】作為本發明之PD-1/CD3雙特異性抗體之較佳同型為IgG抗體，更佳為IgG₁抗體或IgG₄抗體，又更佳為IgG₁抗體。

【0065】 作為本發明之PD-1/CD3雙特異性抗體的較佳態樣，可列舉例如以下述為特徵的PD-1/CD3雙特異性抗體，該PD-1/CD3雙特異性抗體係與PD-1特異性結合的第一臂具有：

(A)在選自上述(1a)至(4a)或(1b)至(5b)中之任一個所述之VH中，選自VH-CDR1、VH-CDR2及VH-CDR3中的任一個或複數個CDR中，其任意1至5個胺基酸殘基可分別經置換成其他胺基酸(較佳為保守性胺基酸)的VH、以及

(B)含有包含序列編號26的胺基酸序列之VL-CDR1、包含序列編號27的胺基酸序列之VL-CDR2、及包含序列編號28的胺基酸序列之VL-CDR3之共通輕鏈的VL；以及

與CD3特異性結合的第二臂具有：

(C)在上述(1c)所示之VH中，選自VH-CDR1、VH-CDR2及VH-CDR3中的任一個或複數個CDR中，其任意1至5個胺基酸殘基可分別經置換成其他胺基酸(較佳為保守性胺基酸)的VH、以及

(D)含有序列編號26的胺基酸序列之VL-CDR1、包含序列編號27的胺基酸序列之VL-CDR2、及包含序列編號28的胺基酸序列之VL-CDR3之共通輕鏈的VL。

【0066】 更佳為，例如，可舉出以下述為特徵的PD-1/CD3雙特異性抗體，該PD-1/CD3雙特異性抗體係與PD-1特異性結合的第一臂具有：

(A)選自上述(1a)至(4a)或(1b)至(5b)中之任一個的VH、以及

(B)含有包含序列編號26的胺基酸序列之VL-CDR1、包含序列編號27的胺基酸序列之VL-CDR2、及包含序列編號28的胺基酸序列之VL-CDR3之共通輕鏈的VL；以及

與CD3特異性結合的第二臂具有：

(C)上述(1c)所表示VH、以及

(D)含有包含序列編號26的胺基酸序列之VL-CDR1、包含序列編號27的胺基酸序列之VL-CDR2、及包含序列編號28的胺基酸序列之VL-CDR3之共通輕鏈的VL。

【0067】再者，本發明的PD-1/CD3雙特異性抗體的較佳其他態樣，可列舉例如以下述為特徵的PD-1/CD3雙特異性抗體，該PD-1/CD3雙特異性抗體係與PD-1特異性結合的第一臂具有：

(A)包含選自序列編號1至5中之任一個胺基酸序列之VH、或包含與該VH的胺基酸序列至少80%相同的胺基酸序列之VH、以及

(B)包含序列編號25的胺基酸序列之共通輕鏈的VL；以及

與CD3特異性結合的第二臂具有：

(C)包含序列編號36的胺基酸序列之VH、或包含與該VH的胺基酸序列至少80%相同之胺基酸序列之VH、以及

(D)包含序列編號25的胺基酸序列之共通輕鏈的VL。

【0068】該其他態樣更佳可列舉例如以下述為特徵的PD-1/CD3雙特異性抗體，該PD-1/CD3雙特異性抗體係與PD-1特異性結合的第一臂具有：

(A)包含選自序列編號1至5中之任一個胺基酸序列之VH、以及

(B)包含序列編號25的胺基酸序列之共通輕鏈的VL；以及

與CD3特異性結合的第二臂具有：

(C)包含序列編號36的胺基酸序列之VH、以及

(D)包含序列編號25的胺基酸序列之共通輕鏈的VL。

【0069】在本發明之PD-1/CD3雙特異性抗體中，在相同抗體是IgG₁抗體時，較佳為在各兩個重鏈恆定區域或是鉸鏈區域中，以EU編碼系統編號之第235號的白胺酸經置換成甘胺酸，及/或第236號的甘胺酸經置換成精胺酸。再者，更佳為缺失該等雙特異性抗體的重鏈C末端的胺基酸，例如，以EU編碼系統編號之第447號的離胺酸的抗體。再者，在PD-1/CD3雙特異性抗體是IgG抗體時，較佳

為，位於其鉸鏈區域之EU編碼系統編號的第228號的絲胺酸經置換成脯胺酸之抗體。

【0070】再者，該等PD-1/CD3雙特異性抗體是IgG₁抗體時之較佳態樣可舉出，具有與PD-1特異性結合的第一臂之VH的重鏈中的恆定區域中，以EU編碼系統編號的第351號的白胺酸經置換成離胺酸，並且第366號的蘇胺酸經置換成離胺酸；具有與CD3特異性結合的第二臂之VH的重鏈中的恆定區域中，第351號的白胺酸經置換成天門冬胺酸，並且第368號的白胺酸經置換成脯氨酸的IgG₁抗體。再者，亦同樣較佳為：在具有與PD-1特異性結合的第一臂之VH的重鏈中的恆定區域中，以EU編碼系統編號之第351號的白胺酸經置換成天門冬胺酸，並且第368號的白胺酸經置換成麩胺酸；具有與CD3特異性結合的第二臂之VH的重鏈中的恆定區域中，第351白胺酸經置換成離胺酸，並且第366號的蘇胺酸經置換成離胺酸的IgG₁抗體。

【0071】重鏈恆定區域中包含上述所有的胺基酸置換的PD-1/CD3雙特異性IgG₁抗體之較佳態樣可列舉例如，具有與PD-1特異性結合的第一臂之VH的重鏈，係具有包含序列編號23的胺基酸序列之重鏈恆定區域，並且，具有與CD3特異性結合的第二臂之VH的重鏈，係具有包含序列編號24的胺基酸序列之重鏈恆定區域的抗體。該等胺基酸序列示於第9圖。

【0072】本發明之PD-1/CD3雙特異性結合抗體的最佳態樣，係本說明書實施例8中所製作的殖株PD1-1(Bi)、殖株PD1-2(Bi)、殖株PD1-3(Bi)、殖株PD1-4(Bi)及殖株PD1-5(Bi)。

【0073】作為本發明之PD-1/CD3雙特異性抗體的較佳特徵可列舉：(1)容許PD-1與PD-L1間的相互作用、PD-1與PD-L2間的相互作用、或該等兩相互作用；及/或(2)充分地降低細胞介素的產生者。在此，「容許PD-1與PD-L1間的相互作用、PD-1與PD-L2間的相互作用、或該等兩相互作用」，係表示與在「與PD-1特

異性結合的第一臂」的相關說明中所記載的定義相同意義。另一方面，「充分地降低細胞介素的產生」，意指例如，藉由點滴等將本發明之PD-1/CD3雙特異性抗體進行靜脈內投予中、或是投予後24小時內，例如，血液中或組織中含有IL-2、IFN- γ 及/或TNF- α 的細胞介素的濃度不會增加，或者是，即使增加仍為可藉由投予類固醇而抑制的程度。

【0074】

PD-1/CD3雙特異性抗體的製造及精製方法

本發明之PD-1/CD3雙特異性抗體及其抗體片段也可藉由WO2014/051433、WO2013/157953或WO2013/157954所揭示的方法進行製造。

【0075】 具體而言，可將分別插入了(1)編碼具有與PD-1特異性結合的第一臂之VH的重鏈的多核苷酸、(2)編碼具有與CD3特異性結合的第二臂之VH的重鏈的多核苷酸、及(3)編碼共通輕鏈的多核苷酸的表現載體，基因轉入至哺乳動物細胞中並進行轉形，而使兩個重鏈以及共通輕鏈一起表現並分泌而製造。

【0076】 在此，表現本發明之PD-1/CD3雙特異性抗體的宿主細胞，亦可為可基因導入表現載體，並且可表現被導入的表現載體的任何宿主細胞。較佳可列舉：如SF-9及SF-21細胞之昆蟲細胞；更佳可列舉：包含CHO細胞、BHK細胞、SP2/0細胞及NS-0骨髓瘤細胞之小鼠細胞；如COS及Vero細胞之靈長類細胞；如MDCK細胞、BRL 3A細胞、融合瘤、腫瘤細胞、不死化初代細胞、W138、HepG2、HeLa、HEK293、HT1080或如PER.C6之胚胎視網膜細胞等哺乳類細胞。此外，在表現系統的選擇中，以使抗體被適當地糖基化之方式，有使用哺乳類細胞的表現載體及宿主之情形。人類細胞株，較佳為PER.C6，係有利於用於獲得與人類糖基化模式一致的抗體。

【0077】 藉由表現載體的基因導入而轉形的宿主細胞中的蛋白質的產生係可參考例如：Current Protocols in Protein Science(1995), Coligan JE, Dunn BM, 330015

Ploegh HL, Speicher DW, Wingfield PT, ISBN 0-471-11184-8, Bendig, 1988而實施，再者，用以使宿主細胞的培養生產性最大化的一般指南、程序及實用方法，係可參考 *Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach* (M. Butler, ed., IRL Press, 1991)而實施。宿主細胞中的抗體表現，係記載於例如：EP0120694、EP0314161、EP0481790、EP0523949、US 4816567及 WO2000/63403等公開公報中。

【0078】 在此，宿主細胞的培養條件係可藉由已知的方法最適化，並且可將蛋白質的產生量最適化。培養係可例如在培養皿、培養燒瓶(roller bottle)或反應槽中，藉由批次培養、流加培養、連續培養、利用中空系統的培養來實施。為了藉由細胞培養而大規模並且連續地生產重組蛋白，較佳為使細胞於懸浮液中增殖。再者，較佳為在不含有源自動物或人類血清、或者是源自動物或人類血清的構成要素的條件下進行細胞的培養。

【0079】 在宿主細胞中表現，並且從其細胞或細胞培養基藉由已知的方法而被回收的抗體，係可使用已知的方法精製。精製的方法包含：免疫沉降法、離心、過濾、尺寸排阻層析法、親和性層析法、陽離子及/或陰離子交換層析法、疏水性相互作用層析法等。再者，亦有適用蛋白質A或蛋白質G親和層析法法之情形(例如，參照US4801687及US5151504)。

【0080】

抗PD-1單株抗體

本發明係包含用以構築本發明PD-1/CD3雙特異性抗體之「與PD-1特異性結合的單株抗體」(以下，簡稱為「抗PD-1單株抗體」)及該等的抗體片段。

【0081】 作為本發明之抗PD-1單株抗體的一個態樣，係藉由VH和本發明中共通輕鏈的VL締合，而可與PD-1特異性結合的單株抗體。在此，所謂「與PD-1特異性結合」，係指以可藉由具有至少高於 $1 \times 10^{-5} \text{M}$ ，較佳為 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ ，更佳為 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 之親和力(解離常數(K_d 值))的結合活性而對PD-1直接結合，並且，至少不

與CD28、CTLA-4及ICOS等所位屬於CD28家族的其他受體成員實質上地結合為特徵。在此，「與PD-1特異性結合的單株抗體」中之「抗體」，係指全長抗體，亦即，藉由雙硫鍵連結而成的包含兩條重鏈和兩條輕鏈之全長抗體。再者，「與PD-1特異性結合的單株抗體的片段」，係全長抗體的一部分，並且至少含有抗原結合部分的抗體，可列舉例如：Fab、Fab'、Fv、scFv及F(ab')₂等。

【0082】 作為本發明之抗PD-1單株抗體，可列舉例如，具有構成「與PD-1特異性結合的第一臂的VH，其為選自由上述(1a)至(4a)或(1b)至(5b)其中任一之VH，或者為具有由選自序列編號1至5的胺基酸序列之VH，以及本說明書中所述共通輕鏈的VL。

【0083】 再者，在本發明之抗PD-1單株抗體中，亦包含具有下述VH者，該VH係在選自上述(1a)至(4a)或(1b)至(5b)中的任一VH中的各CDR中，其任意1至5個胺基酸殘基經置換成其他胺基酸(較佳為保守性胺基酸)，並且，具有與含有未經置換成該胺基酸的原始VH的抗PD-1單株抗體對PD-1的結合活性有同等結合活性者。可列舉例如，在其CDR1的情況中，1個胺基酸殘基經置換成保守性胺基酸，在CDR2或CDR3的情況中，1或2個胺基酸殘基經置換成保守性胺基酸。在此，「具有與含有未經置換成該胺基酸的原始VH的抗PD-1單株抗體對PD-1的結合活性有同等結合活性」，意指經置換成該胺基酸之抗PD-1單株抗體對PD-1的結合活性，係未經置換成該胺基酸的原始VH的結合活性的95%以上，較佳為98%以上，更佳為99%以上。

【0084】 再者，本發明的抗PD-1單株抗體中，亦包含具有下述VH者，於其VH中包含具有上述特定胺基酸序列的各CDR，並且，其VH的框架胺基酸序列，係由特定生殖細胞系列型基因或其受到體細胞突變的該基因所編碼者，例如，在上述「與PD-1特異性結合的第一臂」的相關說明中所列舉的由特定生殖細胞系列型基因、或其受到體細胞突變的該基因所編碼之特定的VH等。

【0085】再者，在本發明之抗PD-1單株抗體之中，具有含有選自上述(1a)至(4a)或(1b)至(5b)中的任一個VH中的各CDR，並且，其VH的FR胺基酸序列係由特定生殖細胞系列型基因、或其受到體細胞突變的該基因所編碼的VH者，可列舉例如，具有包含選自序列編號1至5的胺基酸序列的VH者。再者，在如此之抗PD-1單株抗體中，亦包含例如，具有包含與選自序列編號1至5中之任一個胺基酸序列至少80%相同，較佳為至少90%相同，更佳為至少95%相同，又更佳為至少98%相同，又再更佳為至少99%相同之胺基酸序列之VH，並且，與具有原始VH的抗PD-1單株抗體對PD-1的結合活性實質上同等的結合活性者。在此，「與具有原始VH的抗PD-1單株抗體對PD-1的結合活性實質上同等的結合活性」，意指具有包含該任一個胺基酸序列之VH之抗PD-1單株抗體對PD-1的結合活性為95%以上，較佳為98%以上，更佳為99%以上。

【0086】在另一態樣中，本發明之抗PD-1單株抗體，亦包含：與具有選自上述(1a)至(4a)或(1b)至(5b)中的任一個VH、或包含選自序列編號1至5的胺基酸序列之VH之抗PD-1單株抗體對PD-1的結合進行交叉競爭的抗PD-1單株抗體；以及，對PD-1的結合係藉由具有選自上述(1a)至(4a)或(1b)至(5b)中之任一個VH、或包含選自序列編號1至5中之任一個胺基酸序列之VH的抗PD-1單株抗體而進行交叉競爭的抗PD-1單株抗體。

【0087】本發明之抗PD-1單株抗體的較佳特徵，係與本發明之PD-1/CD3雙特異性抗體同樣地，可列舉例如：容許PD-1與PD-L1間的相互作用、PD-1與PD-L2間的相互作用、該等兩相互作用者。

【0088】

編碼PD-1/CD3雙特異性抗體的多核苷酸

編碼PD-1/CD3雙特異性抗體的多核苷酸係由下述多核苷酸構成：(1)編碼具有與PD-1特異性結合的第一臂之VH的重鏈之多核苷酸、(2)編碼具有與CD3特異

性結合的第二臂之VH的重鏈之多核苷酸、及(3)編碼共通輕鏈的多核苷酸。在此，編碼具有特異性結合PD-1的第一臂之VH的重鏈之多核苷酸，係由編碼與PD-1特異性結合的第一臂之VH的多核苷酸、以及編碼具有該VH之重鏈的恆定區域的多核苷酸所構成，同樣地，編碼具有與CD3特異性結合的第二臂之VH的重鏈之多核苷酸，係由編碼與CD3特異性結合的第二臂之VH的多核苷酸、以及編碼具有該VH之重鏈的恆定區域的多核苷酸所構成。

【0089】編碼PD-1/CD3雙特異性抗體的多核苷酸，只要是具有分別編碼該等構成PD-1/CD3雙特異性抗體的部分之多核苷酸者則可為任意多核苷酸，也可為基因組DNA、cDNA、合成DNA、RNA、DNA-RNA雜合體。編碼一個胺基酸的密碼子已知有1至6種，例如可分別對應如下：，Phe為TTT或TTC，Leu為TTA、TTG、CTT、CTC、CTA或CTG，Ile為ATT、ATC或ATA，Met為ATG，Val為GTT、GTC、GTA或GTG，Ser為TCT、TCC、TCA或TCG，Pro為CCT、CCC、CCA或CCG，Thr為ACT、ACC、ACA或ACG，Ala為GCT、GCC、GCA或GCG，Tyr為TAT或TAC，His為CAT或CAC，Gln為CAA或CAG，Asn為AAT或AAC，Lys為AAA或AAG，Asp為GAT或GAC，Glu為GAA或GAG，Cys為TGT或TGC，Trp為TGG，Arg為CGT、CGC、CGA或CGG，Ser為AGT或AGC，Arg為AGA或AGG，及Gly為GGT、GGC、GGA或是GGG，因此，在編碼PD-1/CD3雙特異性抗體的多核苷酸中，包含對應各胺基酸的各種密碼子經任意組合的多核苷酸。編碼與PD-1特異性結合的第一臂之VH的多核苷酸，較佳可舉出例如，包含選自分別編碼殖株PD1-1至PD1-5的VH之序列編號30至34中之任一個鹼基序列的多核苷酸；編碼與CD3特異性結合的第二臂之VH的多核苷酸，較佳可舉出例如，包含編碼殖株CD3-2的VH之序列編號40的鹼基序列之多核苷酸。再者，編碼共通輕鏈的可變區域的多核苷酸，較佳可舉出包含序列編號35的鹼基序列之多核苷酸。

【0090】

[醫藥的用途]

本發明之PD-1/CD3雙特異性抗體係對自體免疫疾病或移植物對抗宿主疾病(GVHD)的預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療有用。

【0091】 本發明之PD-1/CD3雙特異性抗體可預防、抑制症狀進展及/或治療的自體免疫疾病係可列舉例如：貝西氏病、全身性紅斑狼瘡、慢性盤狀紅斑狼瘡、多發性硬化症(系統性硬皮症、進行性全身硬化症)、硬皮症、多發性肌炎、皮膚肌炎、結節性動脈周圍炎(結節性多動脈炎、顯微性多血管炎)、大動脈炎症候群(高安氏動脈炎)、惡性類風濕性關節炎、類風濕性關節炎、幼年特發性關節炎、脊椎關節炎、混合性結締組織病、乾燥症候群、成人史迪爾氏病、血管炎、過敏性肉芽腫性血管炎、過敏性血管炎、類風濕性血管炎、大型血管炎、ANGA相關血管炎(例如，肉芽腫性多血管炎以及嗜酸性韋格納肉芽腫)、Cogan氏病、RS3PE、顱動脈炎、風濕性多發性肌痛症、纖維肌痛症、抗磷脂質症候群、嗜酸性球性筋膜炎、IgG4相關疾病(例如，原發性硬化性膽管炎、自體免疫性胰臟炎等)、格林-巴利症候群、重症肌無力、慢性萎縮性胃炎、自體免疫性肝炎、非酒精性脂肪肝炎、原發性膽汁性肝硬化、古巴斯捷氏症候群、快速進行性腎絲球腎炎、巨紅血球貧血、自體免疫性溶血性貧血、惡性貧血、自體免疫性嗜中性球減少症、特發性血小板減少性紫斑病、巴塞多氏病(格雷夫斯病(甲狀腺功能亢進症))、橋本氏病、自體免疫性腎上腺功能不全、原發性甲狀腺機能低下症、艾迪森氏病(慢性腎上腺機能減退症)、特發性艾迪森氏病、I型糖尿病、慢性進展型I型糖尿病(成人隱匿遲發性自體免疫性糖尿病)、侷限性硬皮症、乾癬、乾癬性關節炎、大疱性類天疱瘡、天疱瘡、類天疱瘡、妊娠皰疹、線狀IgA大疱性皮膚病、後天性水疱性表皮鬆解症、圓形禿、白斑、尋常性白斑、視神經脊髓炎、慢性炎症性脫髓鞘性多發性神經炎、多灶性運動神經病、肉瘤病、巨大細胞動脈炎、肌肉萎縮性脊髓側索硬化症、原田氏症、自體免疫性視神經病、特發性無精子症、

習慣性流產、炎症性腸病(例如，潰瘍性大腸炎、克隆氏病)、腹腔疾病、僵直性脊椎炎、嚴重氣喘、慢性蕁麻疹、移植免疫、家族性地中海熱、嗜酸性球性鼻竇炎、擴張性心肌病、全身性肥大細胞增生症以及包涵體肌炎等。

【0092】 在本發明中，「治療」係指例如治癒或改善某種疾病或其症狀，「預防」係指將某種疾病或症狀的發作防範於未然或延遲一段時間，「症狀進展抑制」係指抑制症狀的進展或惡化而阻止疾病狀態的進展。此外，「預防」的含義中亦包括復發抑制。所謂「復發抑制」係指防止某種疾病或症狀的復發或降低復發的可能性。

【0093】 本發明之PD-1/CD3雙特異性抗體通常係以非經口的形式進行全身性或局部性投予。所述之投予方法，具體而言，可列舉：注射投予、經鼻投予、經肺投予、經皮投予等。注射投予可列舉例如：靜脈內注射、肌肉內注射、腹腔內注射等，在靜脈內注射時，較佳為利用點滴進行投予。其投予量根據年齡、體重、症狀、治療效果、投予方法、處理時間等而不同，惟，通常為成人每人每次，在0.1 μ g/kg至300mg/kg的範圍內，特佳為0.1mg/kg至10mg/kg的範圍內，一天一次至數次進行非經口投予，或在每天1小時至24小時的範圍內在靜脈內連續投予。當然，如上述，頭與量係根據各種條件而變動，因此，有少於上述投予量即足夠的情形，亦有投予必須超過範圍的情形。

【0094】

製劑

本發明之PD-1/CD3雙特異性抗體在作為注射劑或點滴用的輸注液而製劑化使用時，該注射劑或輸液可為水溶液、懸浮液或乳狀液中的任一種形態，再者，亦可以在使用時加入溶劑而溶解、懸浮或乳化使用之方式，而與藥學上可接受的載體一起製劑化成固形劑。在注射劑或點滴用之輸注液所使用的溶劑可使用例

如：注射用蒸餾水、生理食鹽水、葡萄糖溶液及等張液(例如，氯化鈉、氯化鉀、甘油、甘露醇、山梨糖醇、硼酸、硼砂、丙二醇等溶液)等。

【0095】在此，藥學上可接受的載體可使用例如：穩定劑、溶解補助劑、懸浮化劑、乳化劑、鎮痛劑、緩衝劑、保存劑、防腐劑、pH調整劑及抗氧化劑等。穩定劑可使用例如：各種胺基酸、白蛋白、球蛋白、明膠、甘露醇、葡萄糖、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、乙二胺四乙酸二鈉、檸檬酸鈉、以及二丁基羥基甲苯等。溶解補助劑可使用例如：醇(例如，乙醇等)、多元醇(例如，丙二醇、聚乙二醇等)、非離子性表面活性劑等(例如，Polysorbate 20(註冊商標)、Polysorbate 80(註冊商標)等)。懸浮劑可使用例如：甘油單硬脂酸酯、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。乳化劑可使用例如：阿拉伯樹膠、海藻酸鈉、黃蓍膠等。鎮痛劑可使用例如：苯甲醇、氯丁醇、山梨糖醇等。緩衝液可使用例如：磷酸緩衝液、乙酸緩衝液、硼酸緩衝液、碳酸緩衝液、檸檬酸緩衝液、托立斯(Tris)緩衝液、麩胺酸緩衝液、 ϵ 胺基己酸緩衝液等。保存劑可使用例如：對羥基苯甲酸甲酯、對羥基苯甲酸乙酯、對羥基苯甲酸丙酯、對羥基苯甲酸丁酯、氯丁醇、苯甲醇、氯化苄烷銨、去水乙酸鈉、乙二胺四乙酸二鈉、硼酸、硼砂等。防腐劑可使用例如：氯化苄烷銨、對羥基苯甲酸、氯丁醇等。pH調整劑可使用例如：鹽酸、氫氧化鈉、磷酸、乙酸等。抗氧化劑可使用例如：(1)如抗壞血酸、半胱胺酸鹽酸鹽、硫酸氫鈉、偏亞硫酸氫鈉、亞硫酸鈉之水溶性抗氧化劑；(2)如抗壞血酸棕櫚酸酯、丁基化羥基甲氧苯、丁基化羥基甲苯、卵磷脂、沒食子酸丙酯及 α -生育酚之油溶性抗氧化劑；(3)如檸檬酸、乙二胺四乙酸、山梨糖醇、酒石酸、磷酸之金屬螯合劑等。

【0096】注射劑或點滴用輸液，係可在其最後步驟中藉由滅菌或無菌過濾，例如，過濾器進行過濾並滅菌，接著，藉由填充於無菌容器中而製造。再

者，注射劑或點滴用輸液，亦可為在使用時將真空乾燥及冷凍乾燥的無菌粉末(亦可為含有藥學上可接受的載體的粉末)溶解在適當的溶劑而使用。

【0097】

併用或調配劑

再者，本發明之PD-1/CD3雙特異性抗體，亦可與用於自體免疫疾病的預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療的其他藥劑一起組合使用。在本發明中，與其他藥劑一起組合使用(併用)時的投予形態中，可為一個製劑中調配有兩種成分的調配劑的形態，亦可為作為各別的製劑之投予形態。藉由該併用，可補充其他藥劑的預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療效果，亦可以維持或降低投予量或投予次數。在本發明的PD-1/CD3雙特異性抗體與其他藥劑分別投予時，可為在一段期間同時投予，然後，僅施用PD-1/CD3雙特異性抗體或其他藥劑。再者，亦可為先投予本發明的PD-1/CD3雙特異性抗體，在其投予結束後再投予其他藥劑，也可為先投予其他藥劑，在其投予結束後，後投予本發明的PD-1/CD3雙特異性抗體，各種施用方法可相同亦可不同。亦可提供含有本發明的PD-1/CD3雙特異性抗體的製劑及其他藥劑的製劑套組。在此，其他藥劑的投予量，係可以臨床使用的用量為基準而適當地選擇。再者，其他藥劑係可將任意的2種以上以適當的比例組合並投予。再者，前述其他藥劑不僅包括迄今為止發現者，亦包括今後發現者。

【0098】 例如，將本發明之PD-1/CD3雙特異性抗體應用於I型糖尿病之預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療時，也可與與選自下述中的任一種以上的藥劑組合使用：胰島素製劑(例如，人類胰島素、甘精胰島素、賴脯胰島素、地特胰島素、門冬胰島素等)、磺醯脲類劑(例如，格列本脲、格列齊特、格列美脲等)、速效型胰島素分泌促進藥(例如，那格列奈等)、雙胍類製劑(例如，二甲雙胍等)、胰島素抗性改善藥(例如，吡格列酮等)； α -葡萄糖苷酶抑制藥(例如，阿

卡波糖、伏格列波糖等)、糖尿病性神經病變治療藥(例如,依帕司他、美西律、咪達普利等)、GLP-1類似物製劑(例如,利拉魯肽、艾塞那肽、利西拉來等)及DPP-4抑制藥(例如,西格列汀、維格列汀、阿格列汀等)。

【0099】再者,例如,將本發明之PD-1/CD3雙特異性抗體應用於多發性硬化症之預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療時,也可與選自下述中的任意一種以上的藥劑組合使用:類固醇藥(例如,乙酸皮質酮、氫化皮質酮、氫化皮質酮磷酸鈉、氫化皮質酮琥珀酸鈉、乙酸氟氫皮質酮、乙酸氟氫皮質酮、去氫皮質醇、乙酸去氫皮質醇、琥珀酸去氫皮質醇、乙酸丁酯去氫皮質醇、磷酸去氫皮質醇鈉、乙酸普樂松、乙酸甲基強的松龍、乙酸甲基強的松龍、甲基強的松龍鈉、曲安西龍、乙酸曲安西龍、曲安奈德、地塞米松、乙酸地塞米松、地塞米松磷酸鈉、棕櫚酸地塞米松、乙酸對氟米松、倍他米松等)、干擾素 β -1a、干擾素 β -1b、乙酸格拉替雷、米托蒽醌、硫唑嘌呤、環磷醯胺、環孢菌素、胺甲蝶呤、克立賓、促腎上腺皮質激素(ACTH)、促皮質素、咪唑立賓、他克莫司、芬戈莫德、阿倫單抗等。

【0100】再者,例如,將本發明之PD-1/CD3雙特異性抗體應用於全身性紅斑狼瘡之預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療時,也可與選自下述任一種以上之藥劑組合使用:類固醇藥(例如,上述記載之類固醇藥)、免疫抑制藥(例如,環孢菌素、他克莫司、芬戈莫德等)和貝利木單抗(貝利木單抗)等。

【0101】例如,將本發明之PD-1/CD3雙特異性抗體應用於類風濕性關節炎之預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療時,也可與選自下述任一種以上之藥劑組合使用:類固醇(例如,上述記載的類固醇)、抗風濕藥(例如,胺甲蝶呤、柳氮磺胺吡啶、布西拉明、來氟米特、咪唑立賓、他克莫司等)或抗細胞介素藥(例如,英夫利昔單抗、阿達木單抗、托珠單抗、依那西普、戈利木單抗、塞妥珠單抗等))和阿巴西普等。

【0102】應用於其他自體免疫疾病的預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療時，亦可將本發明之PD-1/CD3雙特異性抗體與上述所記載之其他藥劑的任何一種以上組合使用。

【0103】藉由下述實施例進一步詳細地說明本發明，但本發明的範圍不限定於此。所屬技術領域具有通常知識者可依據本發明之記載進行各種變更、修飾，該等變更、修飾亦包含於本發明中。

(實施例)

【0104】

實施例1：使用重組人類PD-1-Fc融合蛋白對MeMo小鼠的免疫

取得本發明之與PD-1特異性結合第一臂的方法，選擇將重組人類PD-1蛋白質對MeMo小鼠(參照WO2009/157771)進行免疫的方法。MeMo小鼠，係以使含有非重組人類重鏈V基因區域、D基因區域及J基因區域以及重組人類κ輕鏈IgVκ1-39*01/IGJκ1*01生殖細胞系列型基因的基因片段，與小鼠恆定區域基因連結的方式而經基因改變的小鼠，藉由將抗體的目標蛋白質進行直接免疫，而可產生具有多樣性的包含重鏈及共通輕鏈之抗體。

【0105】將使用Gerbu佐劑 MM(Gerbu Biotechnik，型號 # 3001)而乳化的重組人類PD-1-Fc融合蛋白質(R&D Systems，型號1086-PD)，以14天間隔分別對12隻12至16週齡的MeMo MS5B/MS9小鼠進行免疫。在免疫第0、14和28天，皮下投予相同重組人類PD-1-Fc融合蛋白質，在之後的時間點，皮下投予溶解在PBS中的相同重組之重組人類PD-1-Fc融合蛋白質。在免疫第21天、第35天、第56天、第77天和第98天，藉由使用了人類PD-1強制表現HEK293T細胞株之流動式細胞測量術評估血清中抗體力價。將在1000倍稀釋後的血清中染色人類PD-1強制表現HEK293T細胞株時，相對於成為對照組的人類PD-1非表現HEK293T細胞株，MFI值增加為3倍以上的小鼠淋巴組織使用於噬菌體展示庫(Phage display 330015

library)。符合進行庫構築基準的小鼠，係從評估抗體力價的評價日起3日間，使用重組PD-1-Fc融合蛋白質進行追加免疫，並回收脾臟和鼠蹊部淋巴結。針對相對於人類PD-1和食蟹獼猴PD-1之血清中抗體力價為1/100以上，並且藉由追加免疫抗體力價未上升的小鼠亦進行同樣的處置後，回收脾臟及鼠蹊部淋巴結。從該等淋巴組織中提取RNA後，進行cDNA合成。

【0106】

實施例2：用以取得具有與PD-1特異性結合的第一臂之抗PD-1抗體的噬菌體展示庫的構築(蛋白質免疫)

使用實施例1中調製的DNA，使用特異性的引子對免疫球蛋白重鏈可變區域家族進行PCR反應。利用限制酵素SfiII及XhoI切斷相同PCR產物後，將其插入至使用相同限制酵素切斷的MV1473噬菌粒(phagemid)載體[包含編碼共通輕鏈的基因(人類κ輕鏈IgVκ1-39*01/IGJκ1*01生殖細胞系列型基因)]，構築出相同展示庫。

【0107】

實施例3：具有與PD-1特異性結合的第一臂之抗PD-1抗體的篩選

使用吸附有人類PD-1-Fc融合蛋白質、人類PD-1-His標籤融合蛋白質、食蟹獼猴PD-1-His標籤融合蛋白質或小鼠PD-1-His標籤融合蛋白質的盤(plate)，以對PD-1的結合性為基準進行噬菌體選擇。使用人類PD-1-Fc融合蛋白質時，在與噬菌體進行培養期間，藉由添加人類IgG(SIGMA，型號I4506)，而迴避選擇到Fc反應性植株。藉由對於人類PD-1、食蟹獼猴PD-1及小鼠PD-1的選擇而濃縮結合噬菌體。實施以對於表現食蟹獼猴PD-1的HEK293T細胞株的結合性為基準的噬菌體選擇而濃縮結合噬菌體。取得藉由利用選擇而得到的噬菌體而轉形的大腸桿菌菌株TG1，並製備作主盤(master plate)。

【0108】進一步，以吸附有人類PD-1-Fc融合蛋白質的盤上的對PD-1結合性為基準，從上述選擇得到的殖株的周質(Periplasm)提取物實施噬菌體選擇。此外，就進行選擇的基準而言，相對於在陰性對照孔(PBS)獲得的信號(OD₄₅₀值)，以獲得3倍以上信號值者作為陽性殖株。

【0109】

實施例4：具有與PD-1特異性結合的第一臂之抗PD-1抗體的候補殖株的DNA定序
實施由實施例3的篩選而取得的陽性殖株之重鏈可變區域基因的DNA定序。經解析的DNA序列分類為超群集(super cluster)(與CDR3長度相同且與重鏈可變區域的胺基酸序列為70%以上相同的群)、及群集(與CDR3及重鏈可變區域的胺基酸序列相同的群)。取得924個殖株，並且，該等被分類為146種超群集及194種群集。

【0110】

實施例5：利用對於PD-1表現細胞的結合性評估進行的篩選

從經分類的各超群集中，挑選滿足下述條件的抗PD-1單株抗體殖株並單離。

- (1)CDR區域被高頻率地導入體細胞突變、
- (2)具有使用頻率高的VH之生殖細胞系列型基因、以及
- (3)在對於人類PD-1-Fc融合蛋白質的結合性篩選中獲得高信號。

【0111】使用該等周質提取物所含有的Fab片段將對於表現人類PD-1之CHO-S細胞株、表現食蟹獼猴PD-1之CHO-S細胞株的結合性藉由抗小鼠IgG多殖株抗體進行檢測並評估。在經評估的117個殖株(105種群集)之中，在含有抗PD-1單株抗體之殖株PD1-1、PD1-2、PD1-3及PD1-4之22個殖株中，確認到對於表現人類PD-1之CHO-S細胞株的結合性。

【0112】

實施例6：具有與PD-1特異性結合的第一臂之抗PD-1單殖株抗體的胺基酸置換體的製作

殖株PD1-1和PD1-4，係在其重鏈可變區域的框架4含有脫醯胺化基序(motif)(Asn-Gly)。以取得脫醯胺化風險經降低的第一臂為目的，製作出該脫醯胺基序經變換的突變體。藉由已知的定點突變法(Site-directed mutagenesis)，製作出殖株PD1-4中EU編碼系統編號之第119號的天門冬醯胺酸(Asn)經修改變成的殖株PD1-5並單離。殖株PD-15對於表現人類PD-1的CHO-S細胞的結合性，亦與殖株PD1-4同等。

【0113】

實施例7：具有與CD3特異性結合的第二臂的抗CD3單株抗體的篩選

以WO2005/118635所記載的抗CD3抗體殖株15C3之VH以及包含IGVK1-39/JK1共通輕鏈之抗CD3抗體殖株為基礎，進一步，為了取得電荷不均勻性經降低的穩定的CD3結合之Fab，利用下述方法取得具有本發明之「與CD3特異性結合的第二臂」之抗CD3抗體。

【0114】 在第10圖所示的15C3的VH的胺基酸序列中，藉由將以底線標示的第55號甘胺酸變換為丙胺酸，而取得具有與前述抗CD3抗體殖株同等的人類CD3結合性，並且，電荷不均勻性亦經改善的抗CD3抗體殖株CD3-1。

【0115】 進一步，以獲得複數個CD3結合Fab為目的，以殖株CD3-1的VH為基礎，預測具有可改善共通輕鏈(IgVκ1-39*01/IGJκ1*01)與VH/VL相互作用的胺基酸殘基，並且構築出將包含該胺基酸殘基經置換成殖株CD3-1的VH突變體的Fab複數表現之噬菌體展示庫。將該噬菌體庫使用HBP-ALL細胞或重組人類CD3ε-Fc蛋白質，並且使用所屬技術領域具有通常知識者所習知的方法進行篩選。化學性溶出與重組人類CD3ε-Fc蛋白質結合的噬菌體，並使用於細菌的再感染。在挑出複數個存活的細菌菌落後，提取噬菌體，並藉由流動式細胞測量術針

對與細胞表面表現CD3的結合進行篩選。針對顯示出CD3結合的全部噬菌體進行菌落PCR，使編碼VH的cDNA增幅並確定其DNA序列。

【0116】 由該結果所取得的具有包含序列編號36的胺基酸序列之VH之抗CD3抗體殖株CD3-2，係顯示出與殖株CD3-1同等的CD3結合性和電荷均勻性。

【0117】

實施例8：PD-1/CD3雙特異性單株抗體的製備

表現與PD-1特異性結合第一臂的各個重鏈之表現載體，係將編碼實施例5選出的抗PD-1單株抗體殖株PD1-1至PD1-5以及PD1-6的各個重鏈可變區域的DNA，分別與編碼IgG₁重鏈恆定區域的DNA通過連結而製作。另一方面，表現與CD3特異性結合的第二臂的重鏈的表現載體，係將編碼實施例7選出的抗CD3單株抗體殖株CD3-2的重鏈可變區域的DNA與編碼IgG₁重鏈恆定區域的DNA連結而製作。在此，在該等表現重鏈恆定區域的基因中，在與PD-1特異性結合的第一臂的情況中，係使用表現具有L351D/L368E突變(DE突變)的Fc區域者；在與CD3特異性結合的第二臂的情況中，係使用表現具有L351K/T366K突變(KK突變)的Fc區域者。該等表現載體中，以使IGVK1-39/JK1的共通輕鏈也一起表現的方式，而以含有編碼該共通輕鏈的基因之方式進行構築。再者，在該等表現重鏈恆定區域的基因中，為了分別消除Fc效應子(effector)活性，以表現重鏈恆定區域之第235號的白胺酸經置換成甘胺酸，第236號的甘胺酸經置換成精胺酸的方式進行改變，進一步，為了避免轉譯後的加工，使用經改變成缺失重鏈恆定區域C末端第447號的離胺酸者。將該等表現載體一起基因導入至Free Style 293F細胞中，並在培養上清液中產生抗體。回收培養上清液，利用蛋白質A親和層析法處理，藉此分別精製出屬於本發明之PD-1/CD3雙特異性單株抗體的殖株PD1-1(Bi)、殖株PD1-2(Bi)、殖株PD1-3(Bi)、殖株PD1-4(Bi)及殖株PD1-5(Bi)。再者，針對殖株PD1-6(Bi)亦利用同樣的方法製作。此外，該等PD-1/CD3雙特異性單株抗體殖株，在

具有源自其製作中所使用的抗PD-1單株抗體殖株PD1-1、PD1-2、PD1-3、PD1-4、PD1-5及PD1-6與PD-1特異性結合的第一臂之觀點中，分別對應該等抗PD-1單株抗體殖株。

【0118】

實施例9：PD-1/CD3雙特異性單株抗體的結合性評估

利用Biacore測定來評估實施例8中取得的PD-1/CD3雙特異性單株抗體之第一臂對各PD-1重組蛋白的結合親和性，該Biacore測定係使用人類IgG1-Fc融合人類PD-1細胞外區域重組蛋白質或者6×His標籤融合食蟹獼猴PD-1細胞外區域重組蛋白質。此外，在該重組蛋白質的固定化中，使用Series S Sensor Chip CM5傳感器芯片(GE Healthcare製，型號29-1049-88)。同樣地，利用Biacore測定來評估相同抗體的第二臂之CD3結合親和性，該Biacore測定使用人類IgG1-Fc融合CD3δ/CD3ε細胞外區域重組蛋白質。將各殖株的第一臂對PD-1的結合親和性(Kd值)及第二臂對CD3δ/CD3ε的結合親和性示於第11圖。

【0119】

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中取得的PD-1/CD3雙特異性單株抗體經確認皆分別與PD-1及CD3同時地特異性結合。

【0120】 首先，對於表現人類CD3的人類PD-1缺失Jurkat細胞株(人類T細胞株)中，分別添加殖株PD1-1(Bi)至PD1-6(Bi)，並在冰上培養15分鐘。洗淨細胞後，添加3倍量的經生物素標記的可溶性PD-1重組蛋白質(R&Dsystems，型號1086-PD-050)，並在冰上培養15分鐘。洗淨細胞後，添加1.25μg/mL之Alexa Fluor 488標記的鏈黴親和素(Streptavidin)(BioLegend，型號405235)100μL，並在冰上培養15分鐘。洗淨細胞後，利用流動式細胞測量術評估可溶性PD-1重組蛋白的結合量。將該分析結果示於第12圖。

【0121】任一殖株皆同時與PD-1及CD3結合。此外，在該實驗系統中未檢測到非特異性結合。

【0122】

實施例11：PD-1/CD3雙特異性單株抗體的第一臂的結合特性評估

為了評估實施例8所取得的PD-1/CD3雙特異性單殖株抗體的第一臂對PD-1/PD-L1結合的影響，進行關於相同雙特異性單株抗體殖株與可溶性PD-L1重組蛋白質對PD-1的結合的競爭結合分析。首先，對表現人類PD-1的CHO-S細胞株分別添加殖株PD1-1(Bi)至PD1-6(Bi)，並在冰上培養30分鐘。進一步，添加1/20量的生物素標記的可溶性PD-L1重組蛋白質(R & D systems，型號156-B7-100)並在冰上培養30分鐘。洗淨細胞後，添加PE標記的鏈黴親和素(BD Pharmingen，型號554061)並在冰上培養30分鐘。洗淨細胞後，利用流動式細胞測量術評估可溶性PD-L1重組蛋白質的結合量。將結果示於第13圖。

【0123】殖株PD1-1(Bi)至PD1-5(Bi)儘管相對於可溶性PD-L1重組蛋白質，以20倍量存在，仍容許可溶性PD-L1重組蛋白對PD-1的結合。另一方面，PD1-6(Bi)係在相同條件下完全阻礙可溶性PD-L1重組蛋白對PD-1的結合。

【0124】

實施例12：PD-1/CD3雙特異性單株抗體對活化的CD4T細胞的體外(in vitro)抑制作用

使用源自健康人類末梢血液的CD4陽性T細胞(LONZA，型號2W-200)(人類T細胞)，評估對來自活化T細胞的IFN- γ 之抑制作用。在固定有抗人類TCRV β 8抗體(Thermo Scientific，型號TCR1750)之細胞培養盤中接種人類T細胞，並添加抗人類CD28抗體(BioLegend，型號302923)，進行72小時活化處置。接著，將經過該活化處置的人類T細胞在含有100Units/mL的人類IL-2(R & D Systems，型號202-IL)的新鮮培養基中培養過夜。進一步，將回收的人類T細胞接種在另一個固定有

抗人類TCRV β 8抗體的細胞培養板，同樣地，添加抗人類CD28抗體，再度進行活化處置。此時，在分別添加殖株PD1-1(Bi)至PD1-6(Bi)後，將再活化處置96小時後的培養上清液所含有的IFN- γ (pg/)利用ELISA法定量。將結果示於第14圖。針對殖株PD1-1(Bi)至PD1-5(Bi)確認到IFN- γ 產生抑製作用。針對殖株PD1-6(Bi)，確認到其抑制作用相對於其他殖株有減弱的傾向。此外，對照抗體係使用與第一臂的取得法相同的方法，並使用將破傷風類毒素免疫而取得的抗體作為非特異性抗體。

【0125】

實施例13：PD-1/CD3雙特異性單株抗體在實驗性過敏性腦脊髓炎小鼠模型(EAE模型)中的體內(in vivo)作用

在使用人類CD3 ϵ /人類PD-1基因敲入(Knock in)C57BL/6小鼠的EAE模型中，評估本發明之PD-1/CD3雙特異性單株抗體的體內作用，該小鼠係CD3 ϵ 及PD-1基因分別置換成人類CD3 ϵ 和人類PD-1基因。混合結核死菌H37Ra(BDBiosciences，型號231141)和不完全弗氏佐劑(Freund's adjuvant)(BDBiosciences，型號263910)，調製出含有4mg/mL的結核死菌H37Ra的完全弗氏佐劑(CFA)。將1mg/mL的MOG胜肽(ANASPEC，型號AS-60130)與等量的CFA混合而調製乳液，並作為EAE模型的誘發劑。將200 μ L的該誘發劑皮下注射於該C57BL/6小鼠尾根部分，在其免疫處置當天和第二天，分別將200 μ L的1 μ g/mL百日咳毒素(SIGMA-ALDRICH，型號P7208)進行尾部靜脈內投予。接著，在免疫處置的第6天及第7天，將殖株PD1-1(Bi)至PD1-6(Bi)分別以2mg/kg的投予量、每天一次，對該C57BL/6小鼠進行腹腔內投予。免疫處置日以後，將神經症狀根據大貫等人的方法進行評估(Onuki M, et al., Microsc Res Tech 2001 ; 52 ; 731-9)。評分神經症狀的程度(正常：分數0；尾部鬆弛：分數1；後肢部分麻痺：分數2；後肢麻痺：分數3；前肢麻痺：分數4；垂死或死亡：分數5)、確認到多種神經症狀時，採用較高值作為評估日的神經症狀

分數。此外，死亡例係神經症狀分數為5直到研究結束為止。第15至17圖顯示其評估結果。此外，人類CD3 ϵ /人類PD-1基因敲入C57BL/6小鼠，係藉由將根據Genesis. 2009Jun ; 47(6) ; 414-22所記載的方法所製作的人類CD3 ϵ 基因敲入小鼠以及人類PD-1基因敲入小鼠，利用已知的方法使其交配而製作出。

【0126】 殖株PD1-1(Bi)至PD1-5(Bi)，係在EAE模型中顯著地抑制神經症狀的發作，惟，殖株PD1-6(Bi)未顯示出顯著的抑制效果。

【0127】

實施例14：PD-1/CD3雙特異性單株抗體對於來自人類末梢血液單核細胞的細胞介素釋出的體外作用

以解析PD-1/CD3雙特異性單株抗體的細胞介素釋出活性為目的，進行將本發明之PD-1/CD3雙特異性單株抗體殖株或專利文獻3所揭示的PD-1/CD3雙特異性scDb(J110×UCHT1)添加至人類末梢血液單核細胞(以下，簡稱為人類PBMC)的實驗。以使PD-1/CD3雙特異性單株抗體的各殖株及J110×UCHT1分別成為30 μ g/mL和10 μ g/mL之方式添加至人類PBMC(LONZA，型號CC-2702)，並進行24小時的培養。將培養24小時後的培養上清液中所含有的IL-2利用多重免疫分析(Multiplex immunoassay)(BIO-RAD，型號M50000007A)進行定量。將其結果示於第18圖。圖中的IL-2產生量(pg/mL)以平均值 $\pm$ 標準誤差(N=3)顯示。

【0128】 相對於J110×UCHT1係顯著地誘導IL-2產生，PD-1/CD3雙特異性單株抗體各殖株的IL-1產生係較低者。

【0129】

實施例15：PD1-5(Bi)相對於PD-1/CD3雙特異性單株抗體各殖株對PD-1的結合之交叉競爭性的評估

為了評估PD1-5(Bi)相對於在實施例8中取得的PD-1/CD3雙特異性單株抗體各殖株PD1-1(Bi)至PD1-5(Bi)對PD-1的結合之交叉競爭性，進行競爭結合分析。

【0130】 首先，將殖株PD1-5(Bi)添入至表現人類PD-1的CHO-S細胞株，並在冰上培養20分鐘。進一步，分別添加相對於所添加的殖株PD1-5(Bi)為1/100量的經生物素標記的殖株PD1-1(Bi)至PD1-5(Bi)，並在冰上培養20分鐘。洗淨細胞後，添加PE標記的鏈黴親和素(BD Pharmingen，型號554061)並在冰上培養20分鐘。洗淨細胞後，利用流動式細胞測量術評估經生物素標記的殖株PD1-1(Bi)至PD1-5(Bi)的結合量。將其結果示於第19圖。

【0131】 PD1-5(Bi)係阻礙殖株PD1-1(Bi)至PD1-4(Bi)對PD-1的結合，並且，相同殖株係顯示出相對於該等對PD-1的結合進行交叉競爭。

[產業上之可利用性]

【0132】 本發明之PD-1/CD3雙特異性抗體或其抗體片段係對自體免疫疾病或移植物抗宿主病(GVHD)的預防、症狀進展抑制、復發抑制及/或治療有用。

【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> 雙特異性抗體
- <130> P18-199W0
- <140> 108104191
- <141> 2019-02-01
- <150> JP 2018-021498
- <151> 2018-02-09
- <150> JP 2018-153149
- <151> 2018-08-16
- <160> 41
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 127
- <212> PRT
- <213> 智人
- <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

<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

<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

<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

<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

<400> 6

His Tyr Gly Leu His
1 5

<210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<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

<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

<400> 9

His Tyr Gly Leu His
1 5

<210> 10
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<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

<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

<400> 12

His Tyr Ala Leu His
1 5

<210> 13
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<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

<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

<400> 15

His Tyr Ala Leu His
1 5

<210> 16
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<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

<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

<400> 18

His Tyr Ala Leu His
1 5

<210> 19
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<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

<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

<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

<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

<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

<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

<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
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 26
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 26

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 27
<211> 7

<212> PRT
<213> 智人

<400> 27

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 28

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 29
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 29

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

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

<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 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 ggc acc ctg gtc acc gtc tcg agt 381
Phe Met Asp Val Trp Gly Asn Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 31
<211> 381
<212> DNA
<213> 智人

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

<400> 31
cag gtg cag ctg gtg .caa tct ggg tct gag ttg aag cag cct ggg gtc 48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Gln Pro Gly Val
1 5 10 15

tca gtg aag gtt tcc tgc 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 tta 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 atc aac acc aac act ggg aac cca acg tat gcc cag ggc ttc 192
Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
50 55 60

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

ctg cag atc agc agc cta aag gct gaa gac act gcc gtg 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 tta gta gta cca act act ata tgg aac tac tac cac 336
Ala Arg Gly Asp Leu Val Val Pro Thr Thr Ile Trp Asn Tyr Tyr His
100 105 110

tac atg gag gtc tgg ggc aaa ggc acc ctg gtc acc gtc tcg agt 381
Tyr Met Glu Val Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 32
<211> 381
<212> DNA
<213> 智人

<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

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

<400> 33 48
cag gtg cag ctg gtg caa tct ggg tct gag ttg aag cag cct ggg gcc
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

<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

<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

<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

<400> 37

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 38
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<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

<400> 39

Gly Thr Gly Tyr Asn Trp Phe Asp Pro
1 5

<210> 40
<211> 354
<212> DNA
<213> 智人

<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

<400> 41

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

【發明申請專利範圍】

【第1項】一種雙特異性抗體，該雙特異性抗體係具有與PD-1特異性結合的第一臂以及與CD3特異性結合的第二臂，並且，對PD-1及CD3分別特異性結合，其中，

(A)與PD-1特異性結合的第一臂具有包含序列編號5的胺基酸序列之VH以及包含序列編號25的胺基酸序列之VL，

(B)與CD3特異性結合的第二臂具有包含序列編號36的胺基酸序列之VH以及包含序列編號25的胺基酸序列之VL。

【第2項】如申請專利範圍第1項所述之雙特異性抗體，係IgG₁抗體。

【第3項】如申請專利範圍第1或2項所述之雙特異性抗體，其中，具有與PD-1特異性結合的第一臂之VH的重鏈，係具有包含序列編號23的胺基酸序列之重鏈恆定區域。

【第4項】如申請專利範圍第1或2項所述之雙特異性抗體，其中，具有與CD3特異性結合的第二臂之VH的重鏈，係具有包含序列編號24的胺基酸序列之重鏈恆定區域。

【第5項】如申請專利範圍第1或2項所述之雙特異性抗體，其中，具有與PD-1特異性結合的第一臂之VL的輕鏈、及具有與CD3特異性結合的第二臂之VL的輕鏈，係分別具有包含序列編號29的胺基酸序列之輕鏈恆定區域。

【第6項】一種雙特異性抗體，係具有與PD-1特異性結合的第一臂以及與CD3特異性結合的第二臂，並且對PD-1及CD3分別特異性結合，其中，該雙特異性抗體係包含：

(A)具有與PD-1特異性結合的第一臂之VH的重鏈、

(B)具有與PD-1特異性結合的第一臂之VL的輕鏈、

(C)具有與CD3特異性結合的第二臂之VH的重鏈、及

(D)具有與CD3特異性結合的第二臂之VL的輕鏈；

(a)前述具有與PD-1特異性結合的第一臂之VH的重鏈，係具有包含序列編號5的胺基酸序列之VH以及包含序列編號23的胺基酸序列之重鏈恆定區域；

(b)前述具有與PD-1特異性結合的第一臂之VL的輕鏈，係具有包含序列編號25的胺基酸序列之VL以及包含序列編號29的胺基酸序列之輕鏈恆定區域；

(c)前述具有與CD3特異性結合的第二臂之VH的重鏈，係具有包含序列編號36的胺基酸序列之VH以及包含序列編號24的胺基酸序列之重鏈恆定區域；以及

(d)前述具有與CD3特異性結合的第二臂之VL的輕鏈，係具有包含序列編號25的胺基酸序列之VL以及包含序列編號29的胺基酸序列之輕鏈恆定區域。

【發明圖式】

共同輕鏈 Common Light Chain	序列編號 SEQ ID No.	胺基酸序列 Amino Acid Sequence
可變區域 Variable Region	25	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFILTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK
恆定區域 Constant Region	29	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【第1圖】

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

【第2圖】

生殖系列型 V基因	序列編號 SEQ ID No.	胺基酸序列 Amino Acid Sequence
IGHV7-4-1	21	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAMN WVVRQAPGQGLEWMGWINTNTGNPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVYYCAR
IGHV3-33	22	QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVTWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

【第3圖】

PD1-1至PD1-5之各VH與IGHV7-4-1/JH6c之比對

	FR1	CDR1	FR2	CDR2
IGHV7-4-1 (序列編號 21)	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAMN	WVRQAPGQGLEWMG	WINTNTGNPTYAQGFTG	
PD1-1 VH (序列編號 1)	Q	H-GLH	L-E-F	
PD1-2 VH (序列編號 2)	Q-Y	H-GLH		
PD1-3 VH (序列編號 3)	M	H-LH	L-E	
PD1-4 VH (序列編號 4)	Q	H-LH	L-E-F	
PD1-5 VH (序列編號 5)	Q	H-LH	L-E-F	

	FR3	CDR3	FR4
IGHV7-4-1 (序列編號 21)	RFVFSLDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVYYCAR		
D 基因 (未知)			
JH6c		HYYYYYMDV	WGKGITVTSS
PD1-1 VH (序列編號 1)	T-S	GDMVPTTIWN-HF	N-L
PD1-2 VH (序列編號 2)	S	GDLVPTTIWN-H-E	L
PD1-3 VH (序列編號 3)	T-N	GDMVPTTIWN	
PD1-4 VH (序列編號 4)	T-S	GDMVPTTIWN-HF	N
PD1-5 VH (序列編號 5)	T-S	GDMVPTTIWN-HF	Q

【第4圖】

殖株編號 Clone No.	序列編號 SEQ ID No.	胺基酸序列 Amino Acid Sequence
PD1-1	1	QVQLVQSGSELKQPGASVKVSKASGYTFTHYGLHWVRQAPGQGLEWMGWLNT NTENPTFAQGFTGRFVFSLDTSVTTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGDMVVPPTIWN YYHFMVWVGNGTLTVSS
PD1-2	2	QVQLVQSGSELKQPGVSVKVSCKASGYTFTHYGLHWVRQAPGQGLEWMGWINT NTGNPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGDLVVPPTIWN YYHYMEVWVGKGLTVSS
PD1-3	3	QVQLVQSGSELKPGASVMVSKASGYTFTHYALHWVRQAPGQGLEWMGWLNT NTENPTYAQGFTGRFVFSLDTSVTTAYLQINSLKAEDTAVYYCARGDMVVPPTIW NYYYYMDVWVGKGTITVSS
PD1-4	4	QVQLVQSGSELKQPGASVKVSKASGYTFTHYALHWLRQAPGQGLEWMGWLNT NTENPTFAQGFTGRFVFSLDTSVTTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGDMVVPPTIWN YYHFMVWVGNGTITVSS
PD1-5	5	QVQLVQSGSELKQPGASVKVSKASGYTFTHYALHWLRQAPGQGLEWMGWLNT NTENPTFAQGFTGRFVFSLDTSVTTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGDMVVPPTIWN YYHFMVWVGQGTITVSS

【第5圖】

殖株編號 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	GDMVVPPTIWNYYHFMV
PD1-2	9	HYGLH	10	WINTNTGNPTYAQGFTG	11	GDLVVPPTIWNYYHYMEV
PD1-3	12	HYALH	13	WLNTNTENPTYAQGFTG	14	GDMVVPPTIWNYYYYMDV
PD1-4	15	HYALH	16	WLNTNTENPTFAQGFTG	17	GDMVVPPTIWNYYHFMV
PD1-5	18	HYALH	19	WLNTNTENPTFAQGFTG	20	GDMVVPPTIWNYYHFMV

【第6圖】

殖株編號 Clone No.	序列編號 SEQ ID No.	胺基酸序列 Amino Acid Sequence
CD3-2	36	QVQLVQSGGGVYQPGRSRLSCVASFITFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAQI WYNARKQEYSDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGY NWFDPWVGQGLTVSS

【第7圖】

殖株編號 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	QIWWYNARKQEYSDSVKG	39	GTGYNWFDP

【第8圖】

	序列編號 SEQ ID No.	胺基酸序列 Amino Acid Sequence
具有特異性識別PD-1之第一臂的重鏈可變區之重鏈恒定區域	23	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGRGSPVFLPPPKPKDILMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTDPPSRREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVNHEALHNHYTQKSLSLSPG
具有特異性識別CD3之第二臂的重鏈可變區之重鏈恒定區域	24	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGRGSPVFLPPPKPKDILMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTKPPSRREEMTKNQVSLKCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVNHEALHNHYTQKSLSLSPG

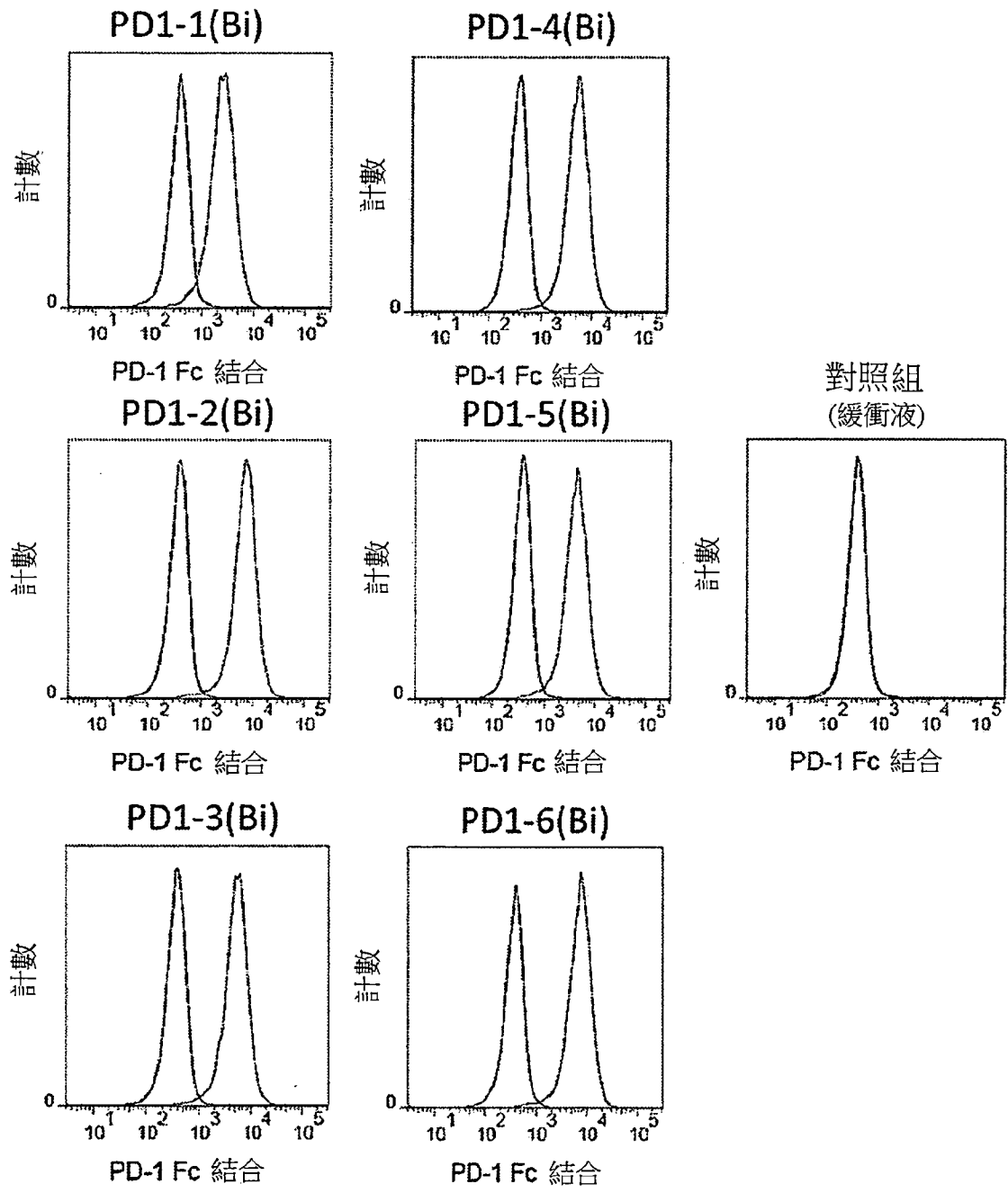
【第9圖】

植株15C3之VH之胺基酸序列:
QVQLVQSGGGVVPQGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWAAIWYNGRKQDYADSVKGRFTISRDNSEN
TLVYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGITGYNWFDPPWGQGTILVTVSS

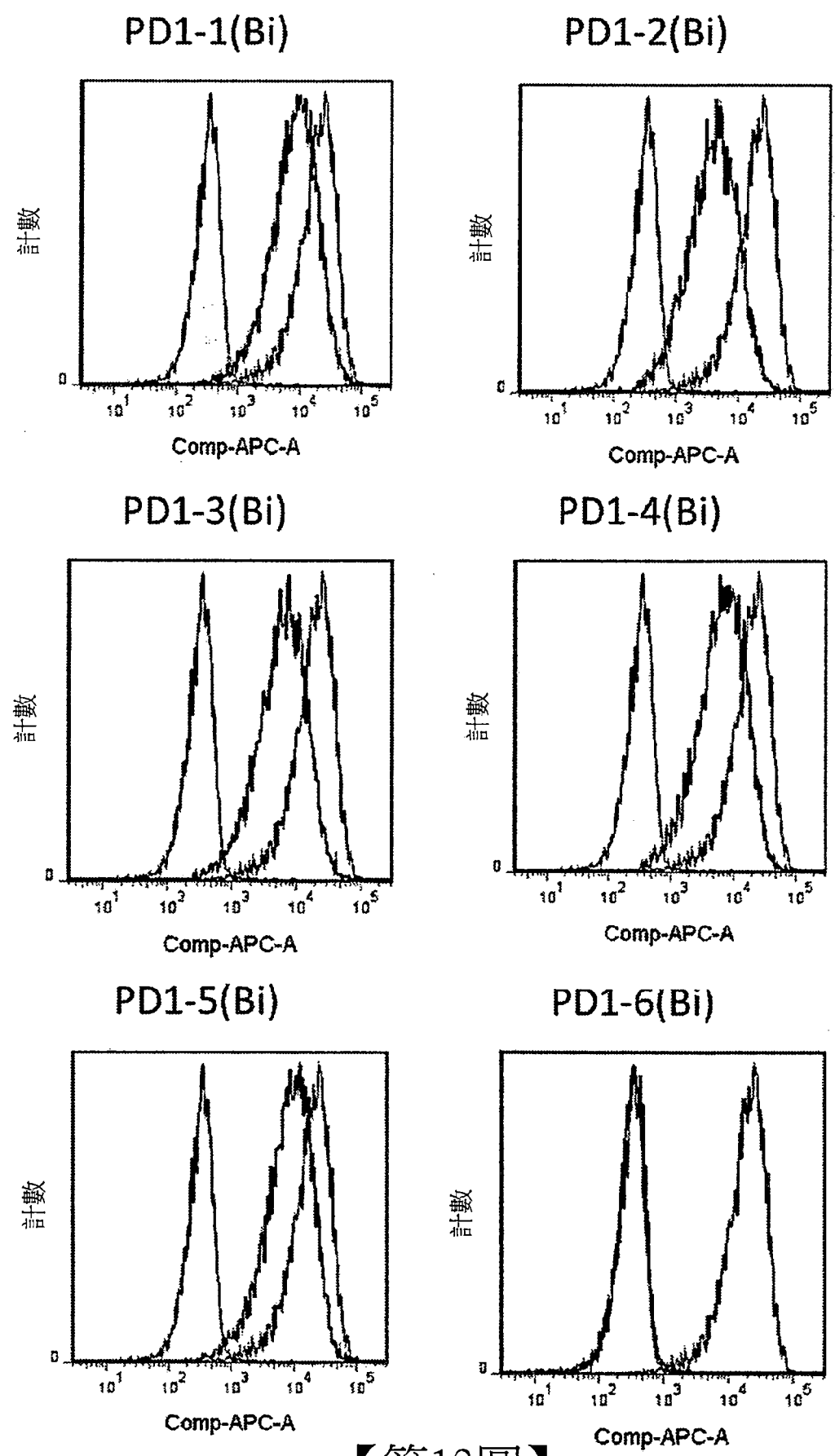
【第10圖】

第一臂之PD-1結合活性		
殖株編號	人類PD-1	食蟹獼猴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
第二臂之CD3結合活性		
殖株編號	人類 CD3δ/CD3ε	
	Kd (nmol/L)	
CD3-2	19.2	

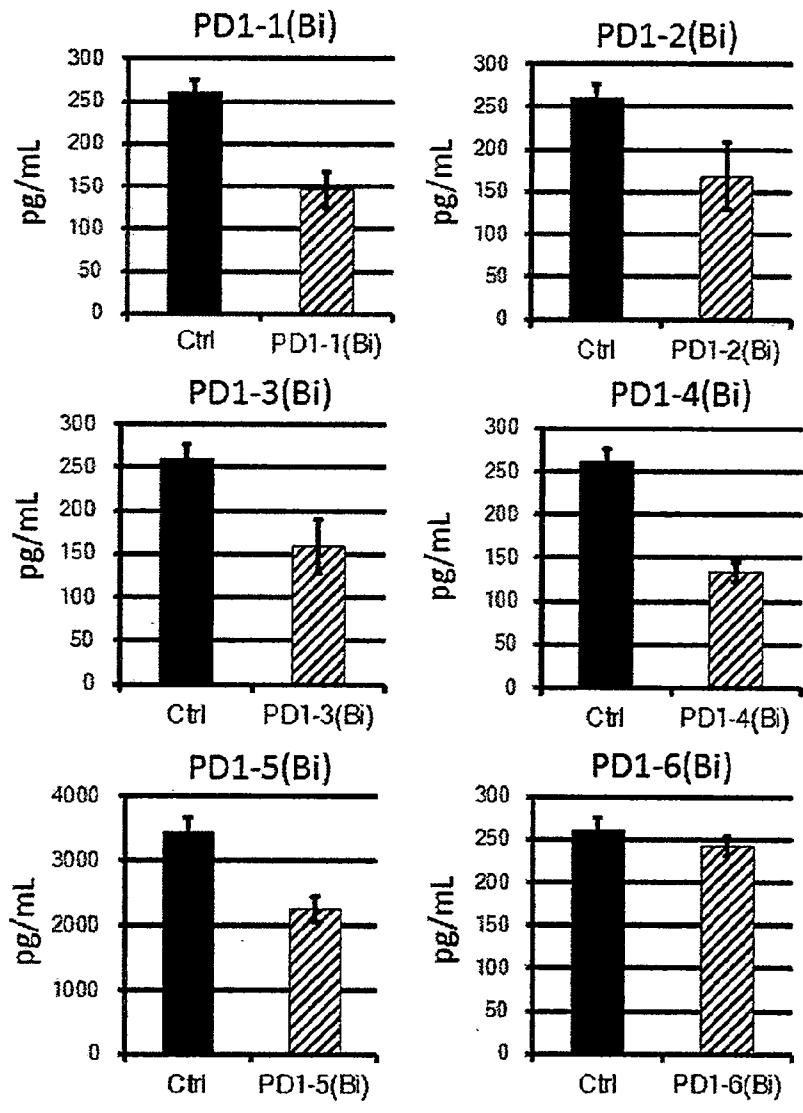
【第11圖】



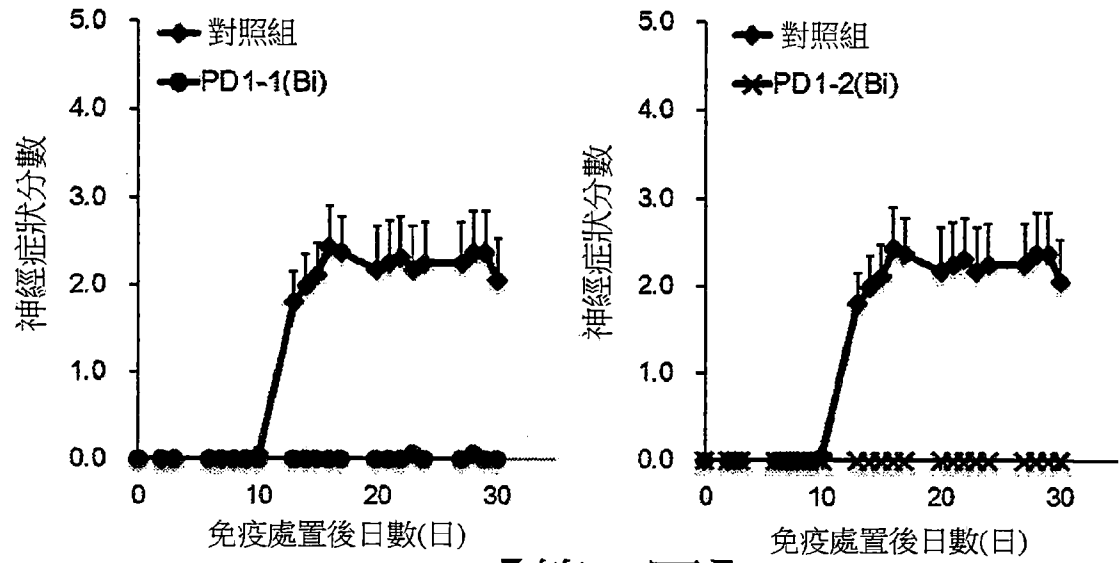
【第12圖】



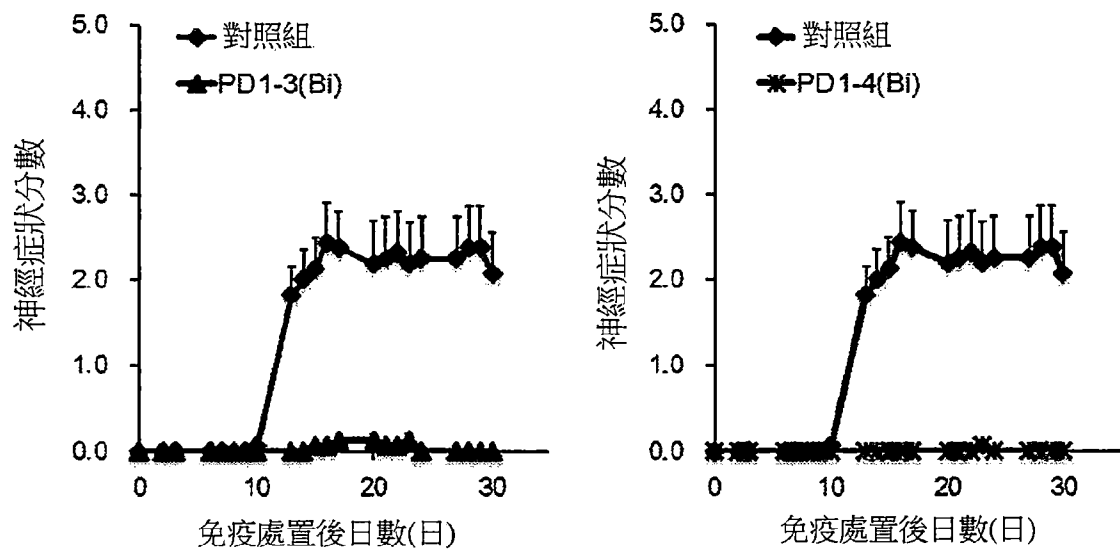
【第13圖】



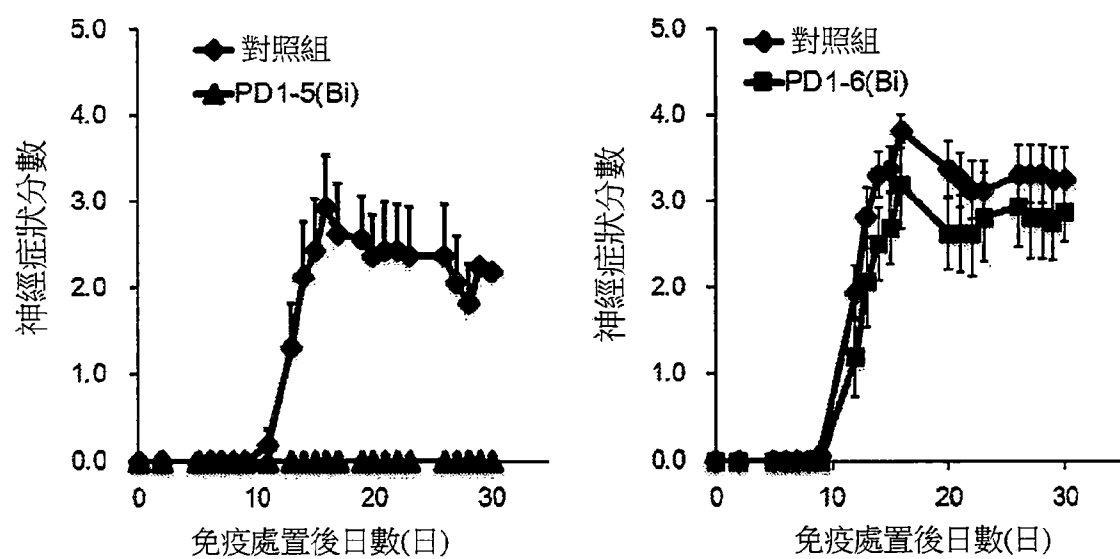
【第14圖】



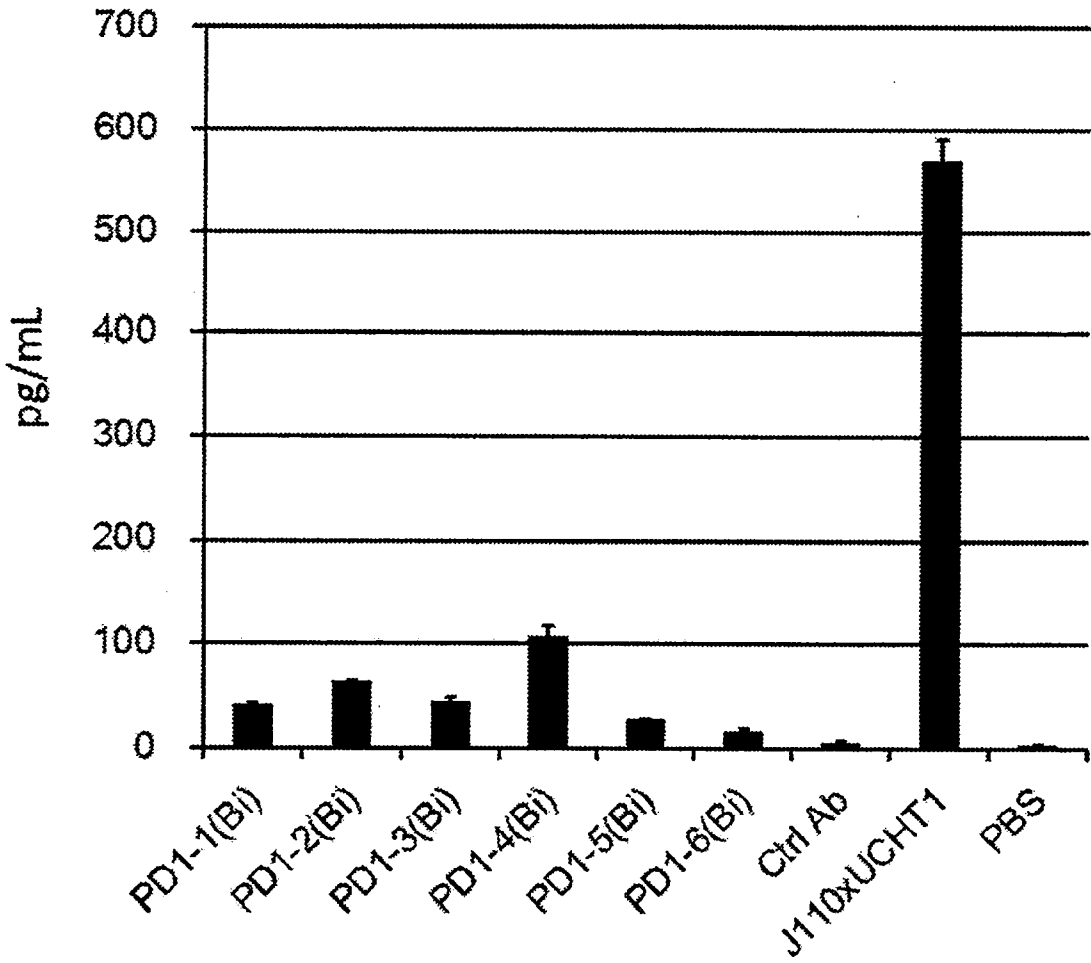
【第15圖】



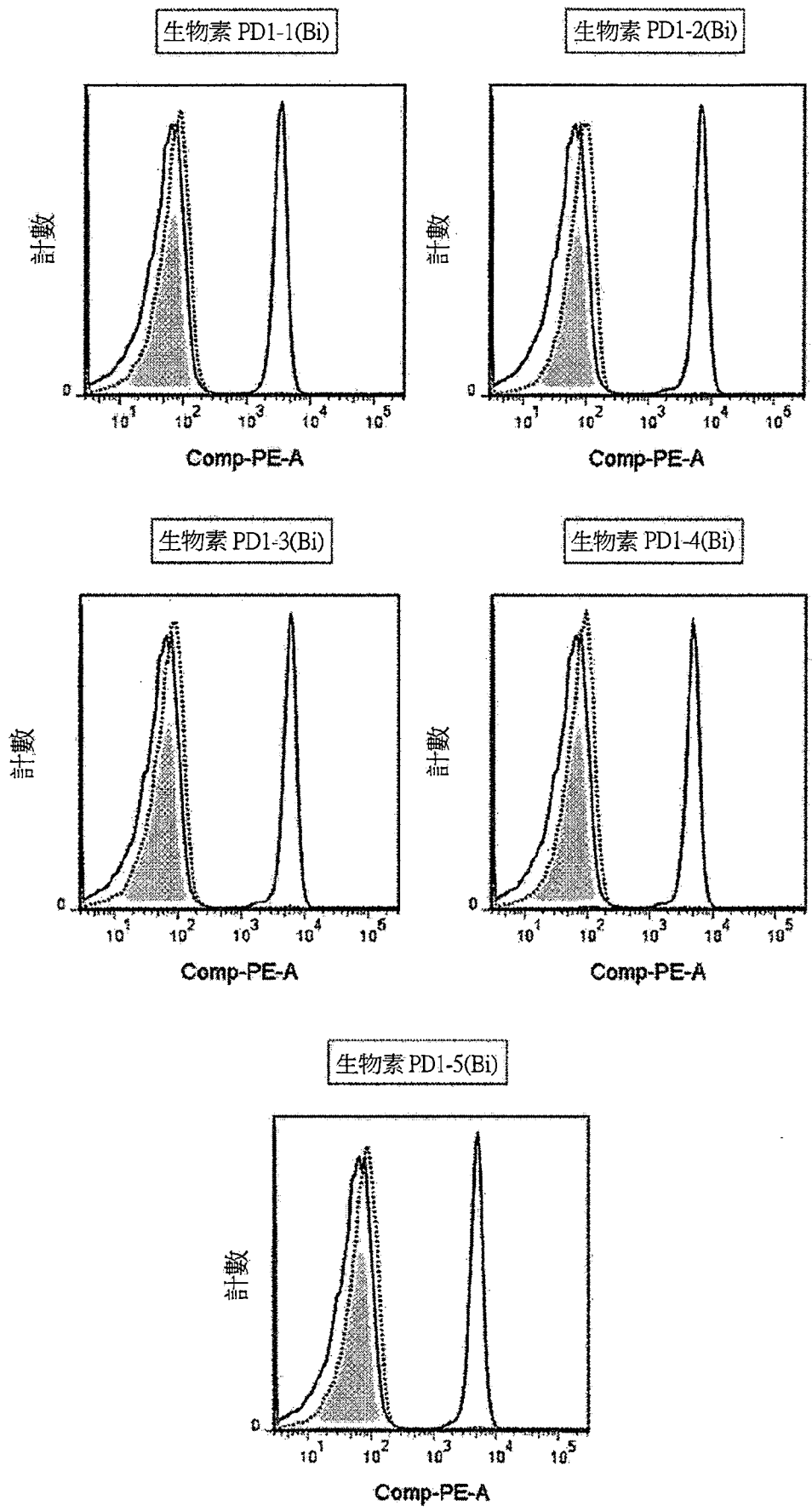
【第16圖】



【第17圖】



【第18圖】



【第19圖】