(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-516633
(P2025-516633A)
(43)公表日　令和7年5月30日(2025.5.30)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*39/395 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ	４Ｃ０７６
Ｃ０７Ｋ	*16/28 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/28	ＺＮＡ	４Ｃ０８５
Ｃ０７Ｋ	*16/46 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/46		４Ｈ０４５
Ａ６１Ｐ	*11/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｄ	
Ａ６１Ｐ	*35/04 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/00		

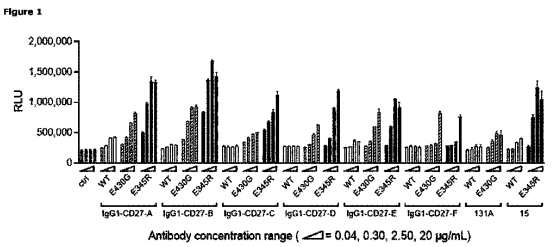
審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全118頁）　最終頁に続く

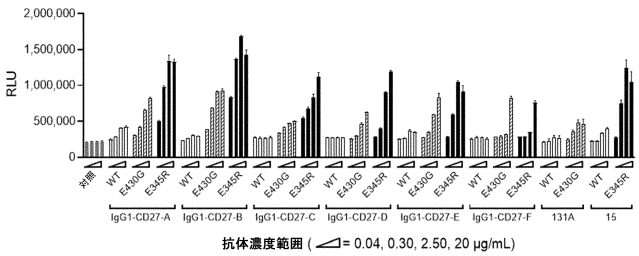
(21)出願番号　特願2024-566508(P2024-566508)
(86)(22)出願日　令和5年5月12日(2023.5.12)
(85)翻訳文提出日　令和6年12月24日(2024.12.24)
(86)国際出願番号　PCT/EP2023/062798
(87)国際公開番号　WO2023/218051
(87)国際公開日　令和5年11月16日(2023.11.16)
(31)優先権主張番号　63/341,406
(32)優先日　令和4年5月12日(2022.5.12)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV
最終頁に続く

(71)出願人　507316398
ジェンマブ エー／エス
デンマーク王国 ２５００ バルビュー
カール ヤコブセンズ ヴェイ ３０
(71)出願人　519011636
ビオンテック エスエー
ドイツ連邦共和国 ５５１３１ マインツ
アン デア ゴルトグルーベ １２
(74)代理人　100102978
弁理士　清水 初志
(74)代理人　100205707
弁理士　小寺 秀紀
(74)代理人　100160923
弁理士　山口 裕孝
(74)代理人　100119507
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　併用療法においてＣＤ２７に結合する能力を有する結合剤

(57)【要約】
本発明は、腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するために、CD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む第1の結合剤を、CD40に結合する第1の結合領域およびCD137に結合する第2の結合領域を含む第2の結合剤と組み合わせて使用する併用療法を提供する。





【特許請求の範囲】
【請求項１】
（ｉ）ＣＤ２７に結合する少なくとも１つの結合領域を含む第１の結合剤;ならびに
（ｉｉ）ＣＤ４０に結合する第１の結合領域およびＣＤ１３７に結合する第２の結合領域を含む第２の結合剤
を対象に投与する工程を含む、対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法。
【請求項２】
前記第１の結合剤が、それぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:５、６、および７に示されている配列を含む重鎖可変（ＶＨ）領域ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３、ならびにそれぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:９、１０および１１に示されている配列を含む軽鎖可変（ＶＬ）領域ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３を含む、請求項１記載の方法。
【請求項３】
前記第１の結合剤が、ヒトＣＤ２７に結合する能力を有する２つの結合領域を含み、前記第１の結合剤が、それぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:５、６、および７に示されている配列を含む重鎖可変（ＶＨ）領域ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３、ならびにそれぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:９、１０および１１に示されている配列を含む軽鎖可変（ＶＬ）領域ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３を含む、請求項１または２記載の方法。
【請求項４】
前記第１の結合剤が、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されている配列を含むＶＨ領域を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項５】
前記第１の結合剤が、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されている配列を含むＶＬ領域を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項６】
前記第１の結合剤が、それぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されている配列を含むＶＨ領域およびＶＬ領域を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項７】
前記第１の結合剤が、抗体、好ましくはヒト抗体またはヒト化抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項８】
前記抗体が、軽鎖定常領域（ＣＬ）および重鎖定常領域（ＣＨ）をさらに含む全長抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項９】
前記軽鎖定常領域がヒトカッパである、請求項８記載の方法。
【請求項１０】
前記軽鎖定常領域がヒトラムダである、請求項８記載の方法。
【請求項１１】
前記第１の結合剤が重鎖定常領域をさらに含み、該重鎖定常領域が、ヒトＩｇＧアイソタイプであり、かつ任意で、改変されたヒトＩｇＧである、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項１２】
前記ヒトＩｇＧまたは改変されたヒトＩｇＧが、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３またはＩｇＧ４、例えばヒトＩｇＧ１より選択される、請求項１１記載の方法。
【請求項１３】
前記ＩｇＧが、１つまたは複数のアミノ酸置換を含む改変されたヒトＩｇＧである、請求項１１または１２記載の方法。
【請求項１４】
前記改変されたヒトＩｇＧが、１つまたは複数のアミノ酸置換、例えば２つ以上のアミノ酸置換を含む、改変されたヒトＩｇＧ１である、請求項１１～１３のいずれか一項記載の方法。

【請求項１５】
前記改変されたヒトIgG重鎖定常領域が、最大で10個のアミノ酸置換、例えば最大で9個、例えば最大で8個、例えば最大で7個、例えば最大で6個、例えば最大で5個、例えば最大で4個、例えば最大で3個、例えば最大で2個のアミノ酸置換を含む、請求項11～14のいずれか一項記載の方法。
【請求項１６】
重鎖定常領域中の前記置換が、野生型IgG1抗体重鎖定常領域を含むことを除いて同一の抗体と比較してCD27アゴニズムの増加を誘導する、請求項11～15のいずれか一項記載の方法。
【請求項１７】
Eu番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置E345またはE430に対応する位置におけるアミノ酸残基が、A、C、D、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、WおよびYを含む群より選択される、請求項11～16のいずれか一項記載の方法。
【請求項１８】
Eu番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置E345に対応する位置におけるアミノ酸残基がRである、請求項11～17のいずれか一項記載の方法。
【請求項１９】
Eu番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置E430に対応する位置におけるアミノ酸残基がGである、請求項11～18のいずれか一項記載の方法。
【請求項２０】
Eu番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置P329に対応する位置におけるアミノ酸残基がRである、請求項11～19のいずれか一項記載の方法。
【請求項２１】
Eu番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置E345およびP329に対応する位置におけるアミノ酸残基が両方ともRである、請求項11～20のいずれか一項記載の方法。
【請求項２２】
前記第1の結合剤が、野生型IgG1重鎖定常領域を含む親抗体と同様の薬物動態プロファイルを有する、請求項11～21のいずれか一項記載の方法。
【請求項２３】
前記第1の結合剤が、SEQ ID NO:12、13、14、15、18、19、20、21、22、23、27、28、29、30、31、32、33、34および36を含む群より選択される配列を含む重鎖定常領域を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項２４】
前記第1の結合剤が、SEQ ID NO:15に示されている配列を含む重鎖定常領域を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項２５】
前記第1の結合剤が重鎖定常領域を含み、該重鎖定常領域が、前記第1の結合剤が親抗体と比べてより低い程度まで1つまたは複数のFc媒介性エフェクター機能を誘導するように改変されている、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項２６】
前記1つまたは複数のFc媒介性エフェクター機能が、少なくとも20%、例えば少なくとも30%または少なくとも40%、または少なくとも50%または少なくとも60%または少なくとも70%、または少なくとも80%または少なくとも90%減少している、請求項25記載の方法。
【請求項２７】
前記第1の結合剤が1つまたは複数のFc媒介性エフェクター機能を誘導しない、請求項25または26記載の方法。
【請求項２８】
前記1つまたは複数のFc媒介性エフェクター機能が、以下の群:
補体依存性細胞傷害（CDC）、補体依存性細胞媒介性細胞傷害（CDCC）、補体活性化、

抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ＡＤＣＣ）、抗体依存性細胞媒介性ファゴサイトーシス（ＡＤＣＰ）、Ｃ１ｑ結合、およびＦｃγＲ結合
より選択される、請求項２５～２７のいずれか一項記載の方法。
【請求項２９】
前記第１の結合剤が、実施例８の方法により測定された場合にＣ１ｑ結合を誘導しない、請求項２５～２８のいずれか一項記載の方法。
【請求項３０】
前記第１の結合剤が一価抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項３１】
前記第１の結合剤が二価抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項３２】
前記第１の結合剤が単一特異性抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項３３】
前記第１の結合剤が、前記請求項のいずれか一項記載のヒトＣＤ２７に結合する能力を有する第１の抗原結合領域と、ヒトＣＤ２７上の異なるエピトープに結合する能力を有するかまたは異なる標的に結合する能力を有する第２の抗原結合領域とを含む二重特異性抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項３４】
ＣＤ２７がヒトＣＤ２７であり、特に、該ヒトＣＤ２７が、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１に示されている配列またはＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:２に示されているヒトＣＤ２７バリアントを含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項３５】
前記第１の結合剤が、
ｅ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域;
ｆ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域;
ｇ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１５に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域;および
ｈ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１７に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項３６】
前記第１の結合剤が、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:３５に示されるアミノ酸配列を含む重鎖およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:２５に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項３７】
前記第１の結合剤が、アセテート、ソルビトール、ポリソルベート８０を含む組成物または製剤中にあり、かつ５～６、好ましくは５.５のｐＨを有する、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項３８】
ＣＤ４０が、ヒトＣＤ４０、特にＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:６２に示される配列を含むヒトＣＤ４０であり、かつ/またはＣＤ１３７が、ヒトＣＤ１３７、特にＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:６３に示される配列を含むヒトＣＤ１３７である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項３９】
（ａ）前記第２の結合剤の第１の結合領域が、それぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４４、４５、および４６に示されるＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）、ならびにそれぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４７、ＹＴＳ、およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４８に示されるＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み;かつ（ｂ）前記第２の結合剤の第２の結合領域が、それぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:５１、５２、および５３に示されるＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）、ならびにそれぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:５４、ＧＡＳ、およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:５５に示されるＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項４０】

（ａ）前記第２の結合剤の第１の結合領域が、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４９に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:５０に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）領域を含み;
かつ
（ｂ）前記第２の結合剤の第２の結合領域が、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:５６に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:５７に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）領域を含む、
前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項４１】
前記第２の結合剤が、多特異性抗体、例えば二重特異性抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項４２】
前記第２の結合剤が、全長抗体または抗体断片の様式である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項４３】
前記第２の結合剤が、第１の結合アームおよび第２の結合アームを含む抗体であり、
該第１の結合アームが、
（ｉ）前記第１の重鎖可変領域（ＶＨ）および第１の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチド、ならびに
（ｉｉ）前記第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第１の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド
を含み;
かつ第２の結合アームが、
（ｉｉｉ）前記第２の重鎖可変領域（ＶＨ）および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチド、ならびに
（ｉｖ）前記第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第２の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド
を含む、
前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項４４】
前記第２の結合剤が、
（ｉ）ＣＤ４０に結合する能力を有する前記第１の結合領域を含む第１の重鎖および軽鎖であって、該第１の重鎖が第１の重鎖定常領域を含み、かつ該第１の軽鎖が第１の軽鎖定常領域を含む、第１の重鎖および軽鎖;ならびに
（ｉｉ）ＣＤ１３７に結合する能力を有する前記第２の結合領域を含む第２の重鎖および軽鎖であって、該第２の重鎖が第２の重鎖定常領域を含み、かつ該第２の軽鎖が第２の軽鎖定常領域を含む、第２の重鎖および軽鎖
を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項４５】
（ｉ）ＥＵ番号付けに従うヒトＩｇＧ１重鎖中のＦ４０５に対応する位置におけるアミノ酸が前記第１の重鎖定常領域（ＣＨ）においてＬであり、かつＥＵ番号付けに従うヒトＩｇＧ１重鎖中のＫ４０９に対応する位置におけるアミノ酸が前記第２の重鎖定常領域（ＣＨ）においてＲであるか、または（ｉｉ）ＥＵ番号付けに従うヒトＩｇＧ１重鎖中のＫ４０９に対応する位置におけるアミノ酸が前記第１の重鎖においてＲであり、かつＥＵ番号付けに従うヒトＩｇＧ１重鎖中のＦ４０５に対応する位置におけるアミノ酸が前記第２の重鎖においてＬである、請求項４３または４４記載の方法。
【請求項４６】
ＥＵ番号付けに従うヒトＩｇＧ１重鎖中の位置Ｌ２３４およびＬ２３５に対応する位置が、前記第１および第２の重鎖においてそれぞれＦおよびＥである、請求項４３～４５のいずれか一項記載の方法。

【請求項４７】
EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置が、前記第1および第2の重鎖定常領域（HC）においてそれぞれF、E、およびAである、請求項43～46のいずれか一項記載の方法。
【請求項４８】
前記第1および第2の重鎖定常領域の両方のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置がそれぞれFおよびEであり、かつ（i）前記第1の重鎖定常領域のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置がLであり、かつ前記第2の重鎖のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置がRであるか、または（ii）前記第1の重鎖定常領域のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置がRであり、かつ前記第2の重鎖のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置がLである、請求項43～47のいずれか一項記載の方法。
【請求項４９】
前記第1および第2の重鎖定常領域の両方のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置が、それぞれF、E、およびAであり、かつ（i）前記第1の重鎖定常領域のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置がLであり、かつ前記第2の重鎖定常領域のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置がRであるか、または（ii）前記第1の重鎖のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置がRであり、かつ前記第2の重鎖のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置がLである、請求項43～48のいずれか一項記載の方法。
【請求項５０】
前記第1および/または第2の重鎖、例えば第2の重鎖の定常領域が、
（a）SEQ ID NO:58または60に示される配列［IgG1-Fc_FEAL］;
（b）（a）における配列の部分配列、例えば、（a）において定義される配列のN末端またはC末端から開始して、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の連続するアミノ酸が欠失している、部分配列;および
（c）（a）または（b）において定義されるアミノ酸配列と比較して、最大で6個の置換、例えば最大で5個の置換、最大で4個の置換、最大で3個、最大で2個の置換または最大で1個の置換を有する配列
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むか、または該アミノ酸配列から本質的になるか、または該アミノ酸配列からなる、請求項43～49のいずれか一項記載の方法。
【請求項５１】
前記第1および/または第2の重鎖、例えば第1の重鎖の定常領域が、
（a）SEQ ID NO:59または61に示される配列［IgG1-Fc_FEAR］;
（b）（a）における配列の部分配列、例えば、（a）において定義される配列のN末端またはC末端から開始して、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の連続するアミノ酸が欠失している、部分配列;および
（c）（a）または（b）において定義されるアミノ酸配列と比較して、最大で6個の置換、例えば最大で5個の置換、最大で4個、最大で3個、最大で2個の置換または最大で1個の置換を有する配列
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むか、または該アミノ酸配列から本質的になるか、または該アミノ酸配列からなる、請求項43～50のいずれか一項記載の方法。
【請求項５２】
前記第2の結合剤がカッパ（κ）軽鎖定常領域を含む、請求項43～51のいずれか一項記載の方法。
【請求項５３】
前記第2の結合剤がラムダ（λ）軽鎖定常領域を含む、請求項43～52のいずれか一項記載の方法。
【請求項５４】

前記第1の軽鎖定常領域がカッパ（κ）軽鎖定常領域またはラムダ（λ）軽鎖定常領域である、請求項43～53のいずれか一項記載の方法。
【請求項５５】
前記第2の軽鎖定常領域がラムダ（λ）軽鎖定常領域またはカッパ（κ）軽鎖定常領域である、請求項43～54のいずれか一項記載の方法。
【請求項５６】
前記第1の軽鎖定常領域がカッパ（κ）軽鎖定常領域でありかつ前記第2の軽鎖定常領域がラムダ（λ）軽鎖定常領域であるか、または前記第1の軽鎖定常領域がラムダ（λ）軽鎖定常領域でありかつ前記第2の軽鎖定常領域がカッパ（κ）軽鎖定常領域である、請求項43～55のいずれか一項記載の方法。
【請求項５７】
前記カッパ（κ）軽鎖が、
（a）SEQ ID NO:16に示される配列、
（b）（a）における配列の部分配列、例えば、（a）において定義される配列のN末端またはC末端から開始して、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の連続するアミノ酸が欠失している、部分配列;および
（c）（a）または（b）において定義されるアミノ酸配列と比較して、最大で10個の置換、例えば最大で9個の置換、最大で8個、最大で7個、最大で6個、最大で5個、最大で4個の置換、最大で3個、最大で2個の置換または最大で1個の置換を有する配列
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項52～56のいずれか一項記載の方法。
【請求項５８】
前記ラムダ（λ）軽鎖が、
（a）SEQ ID NO:17に示される配列、
（b）（a）における配列の部分配列、例えば、（a）において定義される配列のN末端またはC末端から開始して、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の連続するアミノ酸が欠失している、部分配列;および
（c）（a）または（b）において定義されるアミノ酸配列と比較して、最大で10個の置換、例えば最大で9個の置換、最大で8個、最大で7個、最大で6個、最大で5個、最大で4個の置換、最大で3個、最大で2個の置換または最大で1個の置換を有する配列
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項53～57のいずれか一項記載の方法。
【請求項５９】
前記第2の結合剤が、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4からなる群より選択されるアイソタイプの結合剤である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項６０】
前記第2の結合剤が全長IgG1抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項６１】
前記第2の結合剤がIgG1m（f）アロタイプの抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項６２】
前記第2の結合剤が、CD40およびCD137に結合する二重特異性抗体であり、該二重特異性抗体が、（i）SEQ ID NO:64に示されるアミノ酸配列を含む第1の重鎖およびSEQ ID NO:65に示されるアミノ酸配列を含む第1の軽鎖、ならびに（ii）SEQ ID NO:66に示されるアミノ酸配列を含む第2の重鎖およびSEQ ID NO:67に示されるアミノ酸配列を含む第2の軽鎖を有する、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項６３】
（a）前記第1の結合剤が、それぞれSEQ ID NO:5、6、および7に示されている配列を含む重鎖可変（VH）領域CDR1、CDR2、およびCDR3、ならびにそれぞれSEQ ID NO:9、10、および11に示されている配列を含む軽鎖可変（VL）領域CDR1、CDR2、お

よびCDR3を含み;
（b）前記第2の結合剤の第1の結合領域が、それぞれSEQ ID NO:44、45、および46に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む重鎖可変領域（VH）、ならびにそれぞれSEQ ID NO:47、YTS、およびSEQ ID NO:48に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含み;かつ
（c）前記第2の結合剤の第2の結合領域が、それぞれSEQ ID NO:51、52、および53に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む重鎖可変領域（VH）、ならびにそれぞれSEQ ID NO:54、GAS、およびSEQ ID NO:55に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含む、
前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項６４】
（a）前記第1の結合剤が、SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むVH領域、SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列を含むVL領域を含み;
（b）前記第2の結合剤の第1の結合領域が、SEQ ID NO:49に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（VH）およびSEQ ID NO:50に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（VL）領域を含み;かつ
（c）前記第2の結合剤の第2の結合領域が、SEQ ID NO:56に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（VH）およびSEQ ID NO:57に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（VL）領域を含む、
前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項６５】
（a）前記第1の結合剤が、SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むVH領域、SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列を含むVL領域、SEQ ID NO:15に示されるアミノ酸配列を含むCH領域、およびSEQ ID NO:17に示されるアミノ酸配列を含むCL領域を含む抗体であり;
（b）前記第2の結合剤が、第1の結合アームおよび第2の結合アームを含む抗体であり、該第1の結合アームが前記第1の結合領域を含み、かつ第2の結合アームが前記第2の結合領域を含み;
（c）前記第2の結合剤の第1の結合アームが、SEQ ID NO:49に示されるアミノ酸配列を含むVH領域、SEQ ID NO:50に示されるアミノ酸配列を含むVL領域;SEQ ID NO:60に示されるアミノ酸配列を含むCH領域、およびSEQ ID NO:16に示されるアミノ酸配列を含むCL領域を含み;かつ
（d）前記第2の結合剤の第2の結合アームが、SEQ ID NO:56に示されるアミノ酸配列を含むVH領域、SEQ ID NO:57に示されるアミノ酸配列を含むVL領域、SEQ ID NO:61に示されるアミノ酸配列を含むCH領域、およびSEQ ID NO:16に示されるアミノ酸配列を含むCL領域を含む、
前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項６６】
（c）前記第1の結合剤が、SEQ ID NO:35に示されるアミノ酸配列を含む重鎖およびSEQ ID NO:25に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含み;
（d）前記第2の結合剤が、CD40およびCD137に結合する二重特異性抗体であり、該二重特異性抗体が、（i）SEQ ID NO:64に示されるアミノ酸配列を含む第1の重鎖およびSEQ ID NO:65に示されるアミノ酸配列を含む第1の軽鎖、ならびに（ii）SEQ ID NO:66に示されるアミノ酸配列を含む第2の重鎖およびSEQ ID NO:67に示されるアミノ酸配列を含む第2の軽鎖を有する、
前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項６７】
前記対象がヒト対象である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項６８】
前記腫瘍またはがんが固形腫瘍である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項６９】
前記腫瘍がＰＤ-Ｌ１陽性腫瘍である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項７０】
前記腫瘍またはがんが、頭頸部扁平上皮細胞癌（ＨＮＳＣＣ）、例えば口腔、咽頭または喉頭のＨＮＳＣＣである、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項７１】
前記ＨＮＳＣＣが、再発性、切除不能性または転移性である、請求項７０記載の方法。
【請求項７２】
前記腫瘍またはがんが、非小細胞肺がん（ＮＳＣＬＣ）、例えば扁平上皮または非扁平上皮ＮＳＣＬＣである、請求項１～６９のいずれか一項記載の方法。
【請求項７３】
前記ＮＳＣＬＣが、再発性、切除不能性または転移性である、請求項７２記載の方法。
【請求項７４】
前記ＮＳＣＬＣが、上皮増殖因子（ＥＧＦＲ）増感性突然変異および/または未分化リンパ腫（ＡＬＫ）転座および/またはＲＯＳ１再編成を有しない、請求項７２または７３記載の方法。
【請求項７５】
前記ＮＳＣＬＣが、ＮＴＲＫ１/２/３（神経栄養因子受容体チロシンキナーゼ１/２/３）融合陽性であり、かつ/またはＫＲＡＳ（ＫＲＡＳがん原遺伝子、ＧＴＰａｓｅ）、ＢＲＡＦ（Ｂ-Ｒａｆがん原遺伝子、セリン/スレオニンキナーゼ）、もしくはＭＥＴ（ＭＥＴがん原遺伝子、受容体チロシンキナーゼ）遺伝子中に突然変異を有し、かつ/またはＲＥＴ（ｒｅｔがん原遺伝子）遺伝子再編成を有し、かつ前記対象が、それぞれの標的指向型療法での以前の処置を受けている、請求項７２～７４のいずれか一項記載の方法。
【請求項７６】
前記対象が、ＰＤ-１阻害剤またはＰＤ-Ｌ１阻害剤、例えば抗ＰＤ-１抗体または抗ＰＤ-Ｌ１抗体、好ましくは少なくとも２用量のＰＤ-１阻害剤またはＰＤ-Ｌ１阻害剤での以前の処置を受けている、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項７７】
前記対象が、白金ベース療法、または白金が不適格な場合に代替的な化学療法、例えばゲムシタビン含有レジメンでの以前の処置を受けている、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項７８】
前記腫瘍またはがんが、処置、例えばチェックポイント阻害剤での全身処置後に、再発および/または進行したものである、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項７９】
前記対象が、全身療法、例えばＰＤ-１阻害剤またはＰＤ-Ｌ１阻害剤、例えば抗ＰＤ-１抗体または抗ＰＤ-Ｌ１抗体を含む全身療法の、少なくとも１つの以前のラインを受けている、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項８０】
前記がんまたは腫瘍が、再発しているかつ/もしくは難治性であるか、または前記対象が、単剤療法としてもしくは併用療法の一部として投与されるＰＤ-１阻害剤もしくはＰＤ-Ｌ１阻害剤、例えば抗ＰＤ-１抗体もしくは抗ＰＤ-Ｌ１抗体での処置後に進行している、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項８１】
以前の最後の処置が、単剤療法としてまたは併用療法の一部として投与されるＰＤ１阻害剤またはＰＤ-Ｌ１阻害剤、例えば抗ＰＤ-１抗体または抗ＰＤ-Ｌ１抗体での処置であった、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項８２】
ＰＤ-１阻害剤またはＰＤ-Ｌ１阻害剤、例えば抗ＰＤ-１抗体または抗ＰＤ-Ｌ１抗体での最後の処置における進行からの時間が６か月またはそれ未満である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項８３】
以前の最後の処置の一部としてのＰＤ-１阻害剤またはＰＤ-Ｌ１阻害剤、例えば抗ＰＤ-１抗体または抗ＰＤ-Ｌ１抗体の最後の投薬からの時間が6か月またはそれ未満である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項８４】
前記がんまたは腫瘍が、再発しているかつ/もしくは難治性であるか、または前記対象が、
（ｉ）抗ＰＤ-１抗体もしくは抗ＰＤ-Ｌ１抗体での処置後のプラチナダブレット化学療法、または
（ｉｉ）プラチナダブレット化学療法後の抗ＰＤ-１抗体もしくは抗ＰＤ-Ｌ１抗体での処置の間または後に進行している、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項８５】
（ｉ）ＣＤ２７に結合する少なくとも1つの結合領域を含む第1の結合剤、ならびに
（ｉｉ）ＣＤ４０に結合する第1の結合領域およびＣＤ１３７に結合する第2の結合領域を含む第2の結合剤
を含む、キット。
【請求項８６】
前記第1の結合剤が、請求項1～84のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記第2の結合剤が、請求項1～84のいずれか一項において定義される通りである、請求項85記載のキット。
【請求項８７】
前記第1の結合剤、前記第2の結合剤、および存在する場合には1つまたは複数の追加の治療剤が、全身投与用、特に注射または注入用、例えば静脈内注射または注入用である、請求項85または86記載のキット。
【請求項８８】
対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法における使用のための、請求項85～87のいずれか一項記載のキット。
【請求項８９】
前記腫瘍またはがんが、請求項1～84のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記対象が、請求項1～84のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記方法が、請求項1～84のいずれか一項において定義される通りである、請求項88記載の使用のためのキット。
【請求項９０】
（ｉ）ＣＤ２７に結合する少なくとも1つの結合領域を含む第1の結合剤;
（ｉｉ）ＣＤ４０に結合する第1の結合領域およびＣＤ１３７に結合する第2の結合領域を含む第2の結合剤;ならびに
（ｉｉｉ）任意で、薬学的に許容される担体
を含む、薬学的組成物。
【請求項９１】
前記第1の結合剤が、請求項1～84のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記第2の結合剤が、請求項1～84のいずれか一項において定義される通りである、請求項90記載の薬学的組成物。
【請求項９２】
対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法における使用のための、請求項90または91記載の薬学的組成物。
【請求項９３】
前記腫瘍またはがんが、請求項1～84のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記対象が、請求項1～84のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記方法が、請求項1～84のいずれか一項において定義される通りである、請求項92記載の使用のための薬学的組成物。

【請求項９４】
対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法における使用のための第1の結合剤であって、該方法が、
（i）CD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む該第1の結合剤;ならびに
（ii）CD40に結合する第1の結合領域およびCD137に結合する第2の結合領域を含む第2の結合剤
を該対象に投与する工程を含む、前記使用のための第1の結合剤。
【請求項９５】
前記方法が、請求項1～84のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記第1の結合剤が、請求項1～84のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記第2の結合剤が、請求項1～84のいずれか一項において定義される通りである、請求項94記載の使用のための第1の結合剤。
【請求項９６】
対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法における使用のための第2の結合剤であって、該方法が、
（i）CD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む第1の結合剤;ならびに
（ii）CD40に結合する第1の結合領域およびCD137に結合する第2の結合領域を含む該第2の結合剤
を該対象に投与する工程を含む、前記使用のための第2の結合剤。
【請求項９７】
前記方法が、請求項1～84のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記第1の結合剤が、請求項1～84のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記第2の結合剤が、請求項1～84のいずれか一項において定義される通りである、請求項96記載の使用のための第2の結合剤。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するために、CD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む第1の結合剤を、CD40に結合する第1の結合領域およびCD137に結合する第2の結合領域を含む第2の結合剤と組み合わせて使用する併用療法に関する。
【背景技術】
【０００２】
発明の背景
分化クラスター（CD）27（TNFRSF7）は、そのリガンドCD70への結合後にT細胞活性化を共刺激する腫瘍壊死因子（TNF）受容体スーパーファミリー（TNFRSF）の55 kDa I型膜貫通タンパク質メンバーである。それはヒトにおいて、すべてリンパ系列の部分である、T、B、ナチュラルキラー（NK）細胞、およびそれらの直接の前駆細胞の細胞膜上に発現される。ヒトT細胞上で、CD27は、静止αβ $CD4^{+}$（Tregおよび従来型T細胞）、$CD8^{+}$T細胞、幹細胞メモリー細胞、ならびにセントラルメモリー様細胞上に発現される。ヒトB細胞上で、CD27はメモリーB細胞マーカーであり、CD27シグナル伝達は形質細胞へのB細胞の分化を促進する。
【０００３】
CD27の唯一の公知のリガンドはII型膜貫通タンパク質CD70（腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー7、TNFSF7;CD27リガンド、CD27L）であり、これは、T、B、NK、および樹状細胞（DC）を含む、活性化された免疫細胞上にかなり制約的にかつ一過的にのみ発現される。
【０００４】
CD27は、一次免疫応答の早期生成において役割を果たし、T細胞免疫の生成および長期維持のために要求される。CD27-CD70の結合は、活性化B細胞の核因子カッパ軽鎖エ

ンハンサー（NF-κB）およびマイトジェン活性化プロテインキナーゼ（MAPK）8/JunN末端キナーゼ（JNK）経路の活性化に繋がる。アダプタータンパク質TNF受容体関連タンパク質（TRAF）2およびTRAF5は、CD27エンゲージメントの結果としてもたらされるシグナル伝達を媒介することが示されている。

【０００５】

T細胞は、それらのエフェクター機能を解除するために、抗原提示細胞（APC）の表面上の主要組織適合複合体（MHC）分子の文脈におけるそれらのコグネイト抗原のT細胞抗原受容体媒介性認識、および共刺激受容体の活性化を要求する。CD27およびCD28は、T細胞上に発現される最も重要な共刺激受容体であると考えられている。

【０００６】

マウスにおいて、T細胞活性化のプライミング期の間のCD27刺激は、インターロイキン（IL）-2非依存性生存シグナル伝達による抗原特異的$CD4^+$および$CD8^+$T細胞のクローン性拡大増殖を促進することが見出されている（Carr JM et al,Proc Natl Acad Sci USA 2006 Dec 19;130（51）:19454-9（非特許文献1））。CD27はまた、連続的な分裂を通じて活性化されたT細胞のアポトーシスに対抗しており、そしてまたマウス$CD8^+$T細胞のメモリー分化において重要な役割を果たすことが示された（Van de Ven K,Borst J.Immunotherapy 2015;7（6）:655-67（非特許文献2））。結果として、CD27刺激は、リンパ系臓器におけるエフェクターT細胞の生成を促進し、レスポンダーT細胞のレパートリーを広げる。ヒトナイーブT細胞において、CD27刺激は、$CD4^+$T細胞のTヘルパー-1（Th1）分化を促進し、細胞傷害性Tリンパ球のエフェクター分化をサポートする（Oosterwijk et al,Int Immunol.2007 Jun;19（6）:713-8（非特許文献3））。

【０００７】

一部の血液学的悪性腫瘍中の腫瘍細胞上でのその存在とは反対に、CD27発現は固形悪性腫瘍中の腫瘍細胞上では検出されていない。しかしながら、CD27発現リンパ系細胞は、血液学的悪性腫瘍および固形がんの両方の腫瘍微環境（TME）において報告されている。

【０００８】

がんの処置において、免疫応答の関与および刺激は、免疫チェックポイント阻害剤（CPI）の臨床的な成功により例示されるように、抗腫瘍免疫を誘導および/または増強して臨床応答を結果としてもたらすことが示されている。能動免疫応答および/または既存の抗腫瘍免疫は、共刺激シグナル伝達、例えばCD27共刺激シグナル伝達を提供することにより増加され得る。

【０００９】

マウス腫瘍モデルにおいて、T細胞機能およびしたがって抗腫瘍免疫は、アゴニストCD27抗体により増強され得る。ヒトCD27（hCD27）トランスジェニックリンパ腫マウスモデルにおいて、アゴニスト抗体を使用するCD27活性化は、強力な抗腫瘍活性、ならびに$CD4^+$および$CD8^+$T細胞に依存する保護免疫の誘導を示した（He LZ et al.J Immunol.2013 Oct 15;191（8）:4174-83（非特許文献4））。さらには、モノクローナル抗体を使用するCD27活性化は、数ある中でも、白血病（Vitale et al,Keler T.Clin Cancer Res.2012 Jul 15;18（14）:3812-21（非特許文献5））、黒色腫（Roberts DJ,et al.,J Immunother.2010 Oct;33（8）:769-79（非特許文献6））、結腸癌、および胸腺腫（He LZ,et al.,J Immunol.2013 Oct 15;191（8）:4174-83（非特許文献4））に由来するモデルを含む、マウス異種移植片において腫瘍成長を予防した。

【００１０】

ヒトCD27に対するモノクローナル免疫グロブリンG（IgG）1アゴニスト抗体は先行技術において開示されている。

【００１１】

WO2012/004367（特許文献1）においてヒト化抗ヒトCD27アゴニスト抗体（hCD

27.15と指定される）が記載されている。hCD27.15は、免疫応答のCD27媒介性共刺激を活性化させるために結晶化可能断片（Fc）ガンマ受容体（FcγR）発現細胞による架橋を要求しないことが報告されている。しかしながら、この抗体は、hCD27において頻繁に存在する単一ヌクレオチド多型（SNP）（A59T）に結合せず、またカニクイザルCD27に結合しない。

【００１２】

WO2011/130434（特許文献2）は、1F5と指定されるヒトアゴニスト抗ヒトCD27抗体を開示しており、1F5は、FcγR発現細胞による架橋でCD27を活性化させ、さらに可溶性CD70（sCD70）リガンド結合の結合を遮断する。1F5は、標的細胞における補体依存性細胞傷害（CDC）および抗体依存性細胞傷害（ADCC）を含む、Fc媒介性エフェクター機能活性を有すること、ならびに免疫応答を増強すること、ならびにマウスモデルにおいて抗腫瘍活性を有することが報告されている。

【００１３】

WO2018/058022（特許文献3）は、アゴニストマウス抗ヒトCD27抗体131Aおよびそのヒト化バージョンを開示している。131Aは、頻繁に存在するhCD27 SNP A59T、およびカニクイザルCD27に結合することが開示されている。WO2018/058022（特許文献3）は、マウス腫瘍モデルにおいて、抗体131Aは抗体1F5と比較してより強い抗腫瘍応答を有したことをさらに開示している。

【００１４】

WO2019/195452（特許文献4）は、BMS-986215と指定される非リガンド遮断性アゴニスト抗ヒトCD27抗体を開示しており、BMS-986215は、上記されるCD27抗体1F5よりも高いヒトおよびカニクイザルCD27についての親和性を有することが報告されている。BMS-986215の存在下で、そのリガンドCD70への結合によるT細胞のCD27共刺激が起こることが開示されている。BMS-986215は制御性T細胞（Treg）によるCD4^{+}レスポンダーT細胞の抑制を低減させること、ならびにBMS-986215は、C1qに結合し、かつCDC、中程度のADCCおよび低いレベルの抗体依存性細胞ファゴサイトーシス（ADCP）を誘導することがさらに開示されている。BMS-986215は、FcγRの非存在下およびsCD70の非存在下で弱いアゴニスト活性のみを有することがさらに開示されている。

【００１５】

抗CD27抗体は、CD27アゴニズムを誘導するために形質膜上のCD27のクラスタリングを誘導しなければならない。野生型IgG1抗体の場合、CD27のクラスタリングは、FcγR保有細胞、例えば単球、マクロファージ、B細胞および他の免疫細胞との膜結合型CD27抗体の相互作用を通じて達成され得る。帰結として、抗CD27 IgG1分子は、FcγR発現細胞の数が限定されている場合により低い効率であり得る。抗体のFc領域の改変によるエフェクター機能の最適化は、がんまたは他の疾患を処置するための治療抗体の有効性を向上させて、例えば、抗原発現細胞に対する免疫応答を誘発する抗体の能力を向上させ得る。そのような努力は、例えば、WO 2013/004842 A2（特許文献5）;WO 2014/108198 A1（特許文献6）;WO2018/146317（特許文献7）;WO2018/083126（特許文献8）;WO 2018/031258 A1（特許文献9）;Dall'Acqua,Cook et al.J Immunol 2006,177（2）:1129-1138（非特許文献7）;Moore,Chen et al.MAbs 2010 2（2）:181-189（非特許文献8）;Desjarlais and Lazar,Exp Cell Res 2011,317（9）:1278-1285（非特許文献9）;Kaneko and Niwa,BioDrugs 2011,25（1）:1-11（非特許文献10）;Song,Myojo et al.,Antiviral Res 2014,111:60-68（非特許文献11）;Brezski and Georgiou,Curr Opin Immunol 2016,40:62-69（非特許文献12）;Sondermann and Szymkowski,Curr Opin Immunol 2016,40:78-87（非特許文献13）;Zhang,Armstrong et al.MAbs 2017,9（7）:1129-1142.（非特許文献14）;Wang,Mathieu et al.Protein＆Cell 2018,9（1）:63-73（非特許文献15）;Diebolder FJ et al.,Science.2014 Mar 14;343（6176）:1260-3（非特許文献16））において記載されている。

【００１６】
他の中でも、Garber et alは、T細胞上の共刺激受容体、例えば、4-1BB（CD137）、OX40、グルココルチコイド誘導性腫瘍壊死因子受容体ファミリー関連受容体（GITR）および非依存性共刺激（independent co-stimulation;ICOS）を標的とするアゴニスト抗体、ならびにPD-1/PD-L1系を遮断するモノクローナル抗体からなる併用療法の機会を議論している（Garber et al.Nat Rev Drug Discov.2020 Jan;19（1）:3-5（非特許文献17））。Azpilikueta et al.（J Thorac Oncol 2016;11:524-36）（非特許文献18）は、併用療法が単剤処置を凌いだことを示す、マウス肺癌モデルにおけるPD-1遮断抗体および4-1BBターゲティング抗体を含む併用療法からの前臨床データを公開している。また、Diggs et alは、マウス腫瘍肝癌モデルにおけるPD-1遮断抗体と抗CD40抗体の併用療法による改善された抗腫瘍活性について公表した（Diggs et al. J Hepatol. 2021 May;74(5):1145-1154（非特許文献19））。
【００１７】
WO2008/051424A2（特許文献10）は、単独での、または他の免疫調節剤、例えばCD40、OX40、4-1BBもしくはCTLA-4を標的とする抗体と組み合わせた、CD27ターゲティングアゴニスト抗体の投与を含む方法を提供している。
【００１８】
当技術分野におけるこれらおよび他の努力にもかかわらず、しかしながら、他の免疫調節抗体との併用療法として一緒に提供される、CD27にエンゲージメントするための増加したアゴニズムおよび/または増加した効力を有する改善された抗体ベース免疫療法が必要とされている。
【先行技術文献】
【特許文献】
【００１９】
【特許文献１】WO2012/004367
【特許文献２】WO2011/130434
【特許文献３】WO2018/058022
【特許文献４】WO2019/195452
【特許文献５】WO 2013/004842 A2
【特許文献６】WO 2014/108198 A1
【特許文献７】WO2018/146317
【特許文献８】WO2018/083126
【特許文献９】WO 2018/031258 A1
【特許文献１０】WO2008/051424A2
【非特許文献】
【００２０】
【非特許文献１】Carr JM et al,Proc Natl Acad Sci USA 2006 Dec 19;130（51）:19454-9
【非特許文献２】Van de Ven K,Borst J.Immunotherapy 2015;7（6）:655-67
【非特許文献３】Oosterwijk et al,Int Immunol.2007 Jun;19（6）:713-8
【非特許文献４】He LZ et al.J Immunol.2013 Oct 15;191（8）:4174-83
【非特許文献５】Vitale et al,Keler T.Clin Cancer Res.2012 Jul 15;18（14）:3812-21
【非特許文献６】Roberts DJ,et al.,J Immunother.2010 Oct;33（8）:769-79
【非特許文献７】Dall'Acqua,Cook et al.J Immunol 2006,177（2）:1129-1138
【非特許文献８】Moore,Chen et al.MAbs 2010 2（2）:181-189
【非特許文献９】Desjarlais and Lazar,Exp Cell Res 2011,317（9）:1278-1285
【非特許文献１０】Kaneko and Niwa,BioDrugs 2011,25（1）:1-11
【非特許文献１１】Song,Myojo et al.,Antiviral Res 2014,111:60-68
【非特許文献１２】Brezski and Georgiou,Curr Opin Immunol 2016,40:62-69

【非特許文献１３】Sondermann and Szymkowski,Curr Opin Immunol 2016,40:78-87
【非特許文献１４】Zhang,Armstrong et al.MAbs 2017,9（7）:1129-1142.
【非特許文献１５】Wang,Mathieu et al.Protein＆Cell 2018,9（1）:63-73
【非特許文献１６】Diebolder FJ et al.,Science.2014 Mar 14;343（6176）:1260-3
【非特許文献１７】Garber et al.Nat Rev Drug Discov.2020 Jan;19（1）:3-5
【非特許文献１８】Azpilikueta et al.（J Thorac Oncol 2016;11:524-36）
【非特許文献１９】Diggs et al. J Hepatol. 2021 May;74(5):1145-1154

【発明の概要】

【００２１】

本発明は、併用療法におけるCD27に結合する能力を有する結合剤に関する。

【００２２】

第1の局面において、本開示は、i）CD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む第1の結合剤;ならびにii）CD40に結合する第1の結合領域およびCD137に結合する第2の結合領域を含む第2の結合剤を対象に投与する工程を含む、対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法を提供する。

【００２３】

第2の局面において、本開示は、i）CD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む第1の結合剤、ならびにii）CD40に結合する第1の結合領域およびCD137に結合する第2の結合領域を含む第2の結合剤を含む、キットを提供する。

【００２４】

第3の局面において、本開示は、対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法における使用のためのキットであって、i）CD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む第1の結合剤、ならびにii）CD40に結合する第1の結合領域およびCD137に結合する第2の結合領域を含む第2の結合剤を含む、キットを提供する。

【００２５】

第4の局面において、本開示は、i）CD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む第1の結合剤;ii）CD40に結合する第1の結合領域およびCD137に結合する第2の結合領域を含む第2の結合剤;ならびにiii）任意で、薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物を提供する。

【００２６】

第5の局面において、本開示は、対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法における使用のための薬学的組成物であって、i）CD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む第1の結合剤、ii）CD40に結合する第1の結合領域およびCD137に結合する第2の結合領域を含む第2の結合剤；ならびにiii）任意で、薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物を提供する。

【００２７】

第6の局面において、本開示は、対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法における使用のための第1の結合剤であって、該方法が、i）CD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む第1の結合剤;ならびにii）CD40に結合する第1の結合領域およびCD137に結合する第2の結合領域を含む第2の結合剤を該対象に投与する工程を含む、第1の結合剤を提供する。

【００２８】

第7の局面において、本開示は、対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法における使用のための第2の結合剤であって、該方法が、i）CD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む第1の結合剤;ならびにii）CD40に結合する第1の結合領域およびCD137に結合する第2の結合領域を含む第2の結合剤を該対象に投与する工程を含む、第2の結合剤を提供する。

【発明を実施するための形態】
【００２９】
発明の詳細な説明
定義
本発明の文脈における用語「抗体」（Ab）は、抗原に特異的に結合する能力を有する免疫グロブリン分子、免疫グロブリン分子の断片、またはそのいずれかの誘導体を指す。本発明の抗体は、免疫グロブリンのFcドメインおよび抗原結合領域を含む。抗体は、2つのCH2-CH3領域および接続領域、例えば、ヒンジ領域、例えば少なくともFcドメインを一般に含有する。そのため、本発明の抗体はFc領域および抗原結合領域を含んでもよい。免疫グロブリン分子の重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常または「Fc」領域は、免疫系の様々な細胞（例えばエフェクター細胞）および補体システムの構成要素、例えば補体活性化の古典的経路における第1の構成要素であるC1qを含む、宿主組織または因子に対する免疫グロブリンの結合を媒介してもよい。本明細書において使用される場合、文脈に矛盾しなければ、免疫グロブリンのFc領域は、免疫グロブリンCHの少なくともCH2ドメインおよびCH3ドメインを典型的には含有し、接続領域、例えば、ヒンジ領域を含んでもよい。Fc領域は、典型的には、例えば、2つのヒンジ領域を接続するジスルフィドブリッジおよび/または2つのCH3領域の間の非共有結合性相互作用を介して、二量体化した形態である。二量体は、ホモ二量体（2つのFc領域単量体アミノ酸配列は同一である）またはヘテロ二量体（2つのFc領域単量体アミノ酸配列は1つもしくは複数のアミノ酸において異なる）であってもよい。当技術分野において周知のように、全長抗体のFc領域断片は、例えば、パパインでの全長抗体の消化により生成され得る。本明細書において定義されている抗体は、Fc領域および抗原結合領域に加えて、免疫グロブリンCH1領域およびCL領域の1つまたは両方をさらに含んでもよい。抗体はまた、多特異性抗体、例えば二重特異性抗体または類似した分子であってもよい。用語「二重特異性抗体」は、少なくとも2つの異なる、典型的にはオーバーラップしない、エピトープについて特異性を有する抗体を指す。そのようなエピトープは、同じまたは異なる標的上にあってもよい。エピトープが異なる標的上にある場合、そのような標的は、同じ細胞または異なる細胞もしくは細胞タイプ上にあってもよい。上記に指し示されるように、他に記載されないか、または文脈に明確に矛盾しなければ、本明細書における抗体という用語は、Fc領域の少なくとも部分を含み、かつ抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の断片を含む。そのような断片は、任意の公知の技術、例えば酵素切断、ペプチド合成および組換え発現技術により提供されてもよい。抗体の抗原結合機能は全長抗体の断片により行われ得ることが示されている。用語「Ab」または「抗体」に包含される結合性断片の例は、一価抗体（GenmabによりWO2007059782において記載されている）；2つの重鎖のみからなり、例えばラクダ科動物において天然に存在する、重鎖抗体（例えば、Hamers-Casterman（1993）Nature 363:446）；ThioMab、Roche、WO2011069104）；非対称かつ二重特異性抗体様分子である鎖交換操作ドメイン（strand-exchange engineered domain；SEEDまたはSeed-body）（Merck、WO2007110205）；Triomab（Pharma/Fresenius Biotech、Lindhofer et al.1995 J Immunol 155:219；WO2002020039）；FcΔAdp（Regeneron、WO2010151792）；Azymetric Scaffold（Zymeworks/Merck、WO2012/058768）；mAb-Fv（Xencor、WO2011/028952）；Xmab（Xencor）；二重可変ドメイン免疫グロブリン（Abbott、DVD-Ig、米国特許第7,612,181号明細書）；二重ドメイン二重ヘッド抗体（Unilever；Sanofi Aventis、WO20100226923）；Di-diabody（ImClone/Eli Lilly）；ノブ-イントゥー-ホール抗体様式（Genentech、WO9850431）；DuoBody（Genmab、WO 2011/131746）；二重特異性IgG1およびIgG2（Pfizer/Rinat、WO11143545）；DuetMab（MedImmune、US2014/0348839）；静電ステアリング抗体様式（Amgen、EP1870459およびWO 2009089004；Chugai、US201000155133；Oncomed、WO2010129304A2）；二重特異性IgG1およびIgG2（Rinat neurosciences Corporation、

WO11143545）；CrossMAb（Roche、WO2011117329）；LUZ-Y（Genentech）；Biclonic（Merus、WO2013157953）；二重ターゲティングドメイン抗体（GSK/Domantis）；Two-in-one抗体または2つの標的を認識する二重作用Fab（Genentech、NovImmune、Adimab）；架橋されたMab（Karmanos Cancer Center）；共有結合的に融合したmAb（AIMM）；CovX-body（CovX/Pfizer）；FynomAb（Covagen/Janssen ilag）；DutaMab（Dutalys/Roche）；iMab（MedImmune）；IgG様二特異物（ImClone/Eli Lilly、Shen,J.,et al.J Immunol Methods,2007.318（1-2）:p.65-74）；TIG-body、DIG-bodyおよびPIG-body（Pharmabcine）；二重親和性再ターゲティング分子（Fc-DARTまたはIg-DART、Macrogenics、WO/2008/157379、WO/2010/080538）；BEAT（Glenmark）；Zybodies（Zyngenia）；共通軽鎖（Crucell/Merus、US7262028）または共通重鎖（NovImmuneによるκλBodies、WO2012023053）を用いるアプローチの他に、Fc領域様scFv融合物を含有する抗体断片に融合したポリペプチド配列を含む融合タンパク質、例えばZymoGenetics/BMSによるBsAb、Biogen IdecによるHERCULES（US007951918）；SCORPIONS（Emergent BioSolutions/TrubionおよびZymogenetics/BMS）；Ts2Ab（MedImmune/AZ（Dimasi,N.,et al.J Mol Biol,2009.393（3）:p.672-92）；scFv融合物（Genentech/Roche）；scFv融合物（Novartis）；scFv融合物（Immunomedics）；scFv融合物（Changzhou Adam Biotech Inc、CN 102250246）；TvAb（Roche、WO 2012025525、WO 2012025530）；mAb2（f-Star、WO2008/003116）；ならびに二重scFv融合物を含むが、これらに限定されない。抗体という用語は、他に特定されなければ、モノクローナル抗体（例えばヒトモノクローナル抗体）、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、単一特異性抗体（例えば二価単一特異性抗体）、二重特異性抗体、任意のアイソタイプおよび/またはアロタイプの抗体；例えばSymphogenおよびMerus（Oligoclonics）により活用された技術により生成される、抗体混合物（組換えポリクローナル）、WO2015/158867に記載されているマルチマーFcタンパク質、ならびにWO2014/031646に記載されている融合タンパク質を含むことが理解されるべきである。これらの異なる抗体断片および様式は抗体の意味に一般に含まれるが、それらは全体的におよび各々独立して本発明の独特の特色であり、異なる生物学的特性および有用性を呈する。

【００３０】

天然の受容体のための「アゴニスト抗体」は、該受容体に結合して受容体-抗体複合体を形成し、かつ該受容体を活性化させ、それにより経路シグナル伝達およびさらなる生物学的プロセスを開始させる化合物である。

【００３１】

用語「アゴニズム」および「アゴニスト（の）」（agonistic）は、本明細書において交換可能に使用され、直接的にまたは間接的に、CD27の生物学的活性または活性化を実質的に誘導し、促進し、または増強する能力を有する抗体を指すか、または記載する。任意で、「アゴニストCD27抗体」は、NF-KBおよびMAPK8/JNK経路の活性化を含んでもよい1つまたは複数の細胞内シグナル伝達経路の活性化を結果としてもたらす、CD70（腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー7、TNFSF7；CD27リガンド、CD27L）として公知の、CD27のリガンドと類似した機序によりCD27受容体を活性化させる能力を有する抗体である。本明細書において定義されている「アゴニズム」は、本明細書の実施例2に従って決定されてもよい。

【００３２】

本明細書に記載されている「CD27抗体」または「抗CD27抗体」は、タンパク質CD27、特にヒトCD27に特異的に結合する抗体である。

【００３３】

「バリアント」は、本明細書において使用される場合、親または参照配列から1つまたは複数のアミノ酸残基において異なるタンパク質またはポリペプチド配列を指す。バリアントは、例えば、親または参照配列に対して少なくとも80%、例えば90%、または95

%、または97%、または98%、または99%の配列同一性を有してもよい。追加的に、または代替的に、バリアントは、12またはそれ未満、例えば11、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1個の変異、例えばアミノ酸残基の置換、挿入、または欠失により、親または参照配列から異なってもよい。よって、本明細書において交換可能に使用される「バリアント抗体」または「抗体バリアント」は、例えば、抗原結合領域、Fc領域または両方において、親または参照抗体と比較して1つまたは複数のアミノ酸残基において異なる抗体を指す。同様に、「バリアントFc領域」または「Fc領域バリアント」は、親または参照Fc領域と比較して1つまたは複数のアミノ酸残基において異なる、任意で、12またはそれ未満、例えば11、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1個の変異、例えばアミノ酸残基の置換、挿入、または欠失により、親または参照Fc領域アミノ酸配列から異なる、Fc領域を指す。親または参照Fc領域は、典型的には、文脈に依存して特定のアイソタイプであってもよい、ヒト野生型抗体のFc領域である。バリアントFc領域は、二量体化した形態であってもよく、ホモ二量体またはヘテロ二量体であってもよく、例えば、二量体化したFc領域のアミノ酸配列の1つが変異を含み、他方が親または参照野生型アミノ酸配列と同一であるものであってもよい。Fc領域アミノ酸配列を含む、野生型（典型的には親または参照配列）IgG CHおよびバリアントIgG定常領域アミノ酸配列の例は、表3に示されている。

【００３４】

用語「免疫グロブリン重鎖」または「免疫グロブリンの重鎖」は、本明細書において使用される場合、免疫グロブリンの重鎖の1つを指すことが意図される。重鎖は、典型的には、重鎖可変領域（本明細書においてVHと略記される）および免疫グロブリンのアイソタイプを定義する重鎖定常領域（本明細書においてCHと略記される）を含む。重鎖定常領域は、3つのドメイン、CH1、CH2、およびCH3を典型的には含む。用語「免疫グロブリン」は、本明細書において使用される場合、構造的に関連する糖タンパク質のクラスであって、ポリペプチド鎖の2つのペア、低分子量軽（L）鎖の1つのペアおよび重（H）鎖の1つのペアからなり、4つすべてがジスルフィド結合により潜在的に相互接続されているものを指すことが意図される。免疫グロブリンの構造は、よく特徴付けられている（例えばFundamental Immunology Ch.7 Paul,W.,2nd ed.Raven Press,N.Y.1989を参照）。免疫グロブリンの構造内で、2つの重鎖は、いわゆる「ヒンジ領域」中のジスルフィド結合を介して相互接続されている。重鎖と同様に、各々の軽鎖は、いくつかの領域；軽鎖可変領域（本明細書においてVLと略記される）および軽鎖定常領域を典型的には含む。軽鎖定常領域は、典型的には、1つのドメイン、CLを含む。さらには、VHおよびVL領域は、フレームワーク領域（FR）と称される、より保存された領域を差し挟まれた、相補性決定領域（CDR）とも称される、超可変性の領域（または構造的に定義されたループの配列および/もしくは形態において超可変的であってもよい超可変領域）にさらに分けられ得る。各々のVHおよびVLは、アミノ末端からカルボキシ末端へと以下の順序:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4において並べられた、3つのCDRおよび4つのFRから典型的には構成される。本明細書におけるCDR配列は、IMGTに従って定義される（Lefranc MP.et al.,Nucleic Acids Research,27,209-212,1999］およびBrochet X.Nucl.Acids Res.36,W503-508（2008）を参照）。

【００３５】

本明細書において使用される場合、用語「半分子」、「Fabアーム」および「アーム」は重鎖-軽鎖ペアのうちの1つを指す。二重特異性抗体が、第1の抗体「に由来する」半分子抗体、および第2の抗体「に由来する」半分子抗体を含むと記載される場合、用語「～に由来する」は、二重特異性抗体が、任意の公知の方法により、該第1および第2の抗体の各々からの該半分子を組み換えて、結果としてもたらされる二重特異性抗体にすることにより生成されたことを指し示す。この文脈において、「組み換える」は、組換えの任意の特定の方法により限定されることは意図されず、そのため、例えば、当技術分野において「Fabアーム交換」およびDuoBody（登録商標）方法としても記載される「半分子交換」による組換えの他に、核酸レベルでのおよび/または同じ細胞中での2つの半分子の

共発現を通じた組換えを含む、以下において本明細書に記載される二重特異性抗体を製造するための方法のすべてを含む。

【００３６】

用語「抗原結合領域」または「結合領域」または抗原結合ドメインは、本明細書において使用される場合、抗原に結合する能力を有する抗体の領域を指す。この結合領域は、フレームワーク領域（ＦＲ）と称される、より保存された領域を差し挟まれた、相補性決定領域（ＣＤＲ）とも称される、超可変性の領域（または構造的に定義されたループの配列および/もしくは形態において超可変的であってもよい超可変領域）にさらに分けられ得る抗体のＶＨおよびＶＬドメインにより典型的には定義される。抗原は、例えば、細胞、細菌、またはビリオン上に存在する、任意の分子、例えばポリペプチドであることができる。用語「抗原結合領域」および「抗原結合性部位」および「抗原結合ドメイン」は、文脈に矛盾しなければ、本発明の文脈において交換可能に使用されてもよい。

【００３７】

用語「抗原」および「標的」は、文脈に矛盾しなければ、本発明の文脈において交換可能に使用されてもよい。

【００３８】

用語「結合」は、本明細書において使用される場合、リガンドとしての抗体およびアナライトとしての抗原を使用してバイオレイヤー干渉法により決定された場合に、典型的には$1E^{6}$ Ｍもしくはそれ未満、例えば$5E^{7}$ Ｍもしくはそれ未満、$1E^{7}$ Ｍもしくはそれ未満、例えば$5E^{8}$ Ｍもしくはそれ未満、例えば$1E^{8}$ Ｍもしくはそれ未満、例えば$5E^{9}$ Ｍもしくはそれ未満、または例えば$1E^{9}$ Ｍもしくはそれ未満のK_Dに対応する結合親和性を有する、予め決定された抗原または標的に対する抗体の結合を指し、予め決定された抗原または密接に関連する抗原以外の非特異的な抗原（例えば、ＢＳＡ、カゼイン）に対する結合についてのその親和性よりも少なくとも10倍低い、例えば少なくとも100倍低い、例えば少なくとも1,000倍低い、例えば少なくとも10,000倍低い、例えば少なくとも100,000倍低いK_Dに対応する親和性で予め決定された抗原に結合する。

【００３９】

用語「K_D」（Ｍ）は、本明細書において使用される場合、特定の抗体-抗原相互作用の解離平衡定数を指し、k_dをk_aで割ることにより得られる。

【００４０】

用語「k_d」（sec^{-1}）は、本明細書において使用される場合、特定の抗体-抗原相互作用の解離速度定数を指す。前記値はまた、k_{off}値またはオフレートと称される。

【００４１】

用語「k_a」（$M^{-1} \times sec^{-1}$）は、本明細書において使用される場合、特定の抗体-抗原相互作用の会合速度定数を指す。前記値はまた、k_{on}値またはオンレートと称される。

【００４２】

用語「ＣＤ27」は、本明細書において使用される場合、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー7（ＴＮＦＲＳＦ7）としても公知の、ＣＤ27と称されるヒトタンパク質を指す。ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:1（Ｕｎｉｐｒｏｔ ＩＤ Ｐ26842）に示されるアミノ酸配列において、アミノ酸残基1～19はシグナルペプチドであり、アミノ酸残基20～240は成熟ポリペプチドである。文脈に矛盾しなければ、ＣＤ27はまた、ＣＤ27のバリアント、そのアイソフォームおよびオルソログを指すことがある。Ａ59Ｔ変異を含むヒトＣＤ27の天然に存在するバリアントはＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:2に示される。

【００４３】

カニクイザル（マカカ・ファシクラリス（Ｍａｃａｃａ ｆａｓｃｉｃｕｌａｒｉｓ））において、ＣＤ27タンパク質は、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:3（Ｇｅｎｂａｎｋ ＸＰ_005569963）に示されるアミノ酸配列を有する。ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:3に示される240アミノ酸の配列において、シグナルペプチドは定義されていない。

【００４４】

用語「抗体結合領域」は、抗体が結合するエピトープを含む、抗原の領域を指す。抗体

結合領域は、バイオレイヤー干渉法を使用してエピトープ結合により、アラニンスキャンにより、またはシャッフルアッセイ（抗原の領域が別の種のものと交換されている抗原構築物を使用し、抗体が抗原に依然として結合するか否かを決定する）により決定されてもよい。抗体との相互作用に関与する抗体結合領域内のアミノ酸は、水素/重水素交換質量分析によりおよびその抗原に結合した抗体の結晶分析により決定されてもよい。

【００４５】

用語「エピトープ」は、抗体により特異的に結合される抗原決定因子を意味する。エピトープは、通常、アミノ酸、糖側鎖またはその組合せなどの分子の表面グルーピングからなり、通常、特定の三次元構造的特徴の他に、特定の電荷的特徴を有する。配座および非配座エピトープは、前者への結合は変性溶媒の存在下で喪失されるが後者への結合はそうではないという点において区別される。エピトープは、結合に直接的に関与するアミノ酸残基、および結合に直接的に関与しない他のアミノ酸残基、例えば抗体が抗原に結合している場合に抗体により有効に遮断またはカバーされるアミノ酸残基（換言すれば、アミノ酸残基は特有の抗体のフットプリント内にあるか、またはその近くに隣接している）を含んでもよい。

【００４６】

用語「モノクローナル抗体」、「モノクローナルＡｂ」、「モノクローナル抗体組成物」、または「ｍＡｂ」などは、本明細書において使用される場合、単一の分子組成の抗体分子の調製物を指す。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープについての単一の結合特異性および親和性を示す。よって、用語「ヒトモノクローナル抗体」は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変および定常領域を有する単一の結合特異性を示す抗体を指す。ヒトモノクローナル抗体は、不死化細胞に融合した、ヒト重鎖導入遺伝子および軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する、トランスジェニックまたはトランス染色体非ヒト動物、例えばトランスジェニックマウスまたはラットから得られたＢ細胞を含むハイブリドーマにより製造されてもよい。モノクローナル抗体はまた、組換えにより改変された宿主細胞から、または抗体をコードする核酸配列のインビトロ転写および/もしくは翻訳をサポートする細胞抽出物を使用するシステムから製造されてもよい。

【００４７】

用語「アイソタイプ」は、本明細書において使用される場合、免疫グロブリンクラス（例えばＩｇＧ、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＤ、ＩｇＡ、ＩｇＥ、もしくはＩｇＭ）またはその任意のアロタイプ、例えば重鎖定常領域遺伝子によりコードされるＩｇＧ１ｍ（ｚａ）およびＩｇＧ１ｍ（ｆ）を指す。さらに、各々の重鎖アイソタイプは、カッパ（κ）またはラムダ（λ）軽鎖のいずれかと組み合わせられ得る。

【００４８】

用語「全長抗体」は、本明細書において使用される場合、抗体が、断片ではなく、天然においてそのアイソタイプについて通常見出される特定のアイソタイプのドメインのすべて、例えば、ＩｇＧ１抗体についてＶＨ、ＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３、ヒンジ、ＶＬおよびＣＬドメインを含有することを指し示す。全長バリアント抗体において、重鎖および軽鎖定常および可変ドメインは、全長親または野生型抗体と比較した場合に抗体の機能的特性を向上させるアミノ酸置換を特に含有してもよい。本発明に係る全長抗体は、（ｉ）完全な重鎖配列および完全な軽鎖配列を含む好適なベクター中にＣＤＲ配列をクローニングする工程、ならびに（ｉｉ）好適な発現系において完全な重鎖および軽鎖配列を発現させる工程を含む方法により製造されてもよい。ＣＤＲ配列または全体可変領域配列のいずれかから出発した場合に全長抗体を製造することは当業者の知識の範囲内である。そのため、当業者は、本発明に係る全長抗体を生成する方法を知っている。

【００４９】

用語「ヒト抗体」は、本明細書において使用される場合、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変およびフレームワーク領域ならびにヒト免疫グロブリン定常ドメインを含む抗体を含むことが意図される。本発明のヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によりコードされないアミノ酸残基を含んでもよい（例えば、変異、挿入または欠失

が、インビトロでランダムもしくは部位特異的変異誘発によりまたはインビボで体細胞変異により導入されている）。しかしながら、用語「ヒト抗体」は、本明細書において使用される場合、別の非ヒト種、例えばマウスの生殖系列に由来するCDR配列がヒトフレームワーク配列上にグラフトされている抗体を含むことは意図されない。

【００５０】

用語「ヒト化抗体」は、本明細書において使用される場合、ヒト抗体定常ドメインおよびヒト可変ドメインに対して高いレベルの配列相同性を含有するように改変されている非ヒト可変ドメインを含有する遺伝子操作された非ヒト抗体を指す。これは、一緒になって抗原結合性部位を形成する6つの非ヒト抗体相補性決定領域（CDR）を相同的なヒトアクセプターフレームワーク領域（FR）上にグラフトすることにより達成され得る（WO92/22653およびEP0629240を参照）。親抗体の結合親和性および特異性を完全に再構成するために、ヒトフレームワーク領域中への親抗体（すなわち、非ヒト抗体）からのフレームワーク残基の置換（復帰突然変異）が要求され得る。構造的相同性モデリングは、抗体の結合特性のために重要なフレームワーク領域中のアミノ酸残基を同定することを助け得る。そのため、ヒト化抗体は、非ヒトCDR配列、主に、非ヒトアミノ酸配列への1つまたは複数のアミノ酸復帰突然変異を任意で含むヒトフレームワーク領域、および完全にヒトの定常領域を含んでもよい。任意で、必ずしも復帰突然変異ではない、追加のアミノ酸改変が、好ましい特徴、例えば親和性および生化学的特性を有するヒト化抗体を得るために応用されてもよい。

【００５１】

用語「Fc領域」または「Fcドメイン」は、本明細書において使用される場合、交換可能に使用されてもよく、抗体のN末端からC末端の方向において、少なくともヒンジ領域、CH2領域およびCH3領域を含む重鎖定常領域の領域を指す。抗体のFc領域は、免疫系の様々な細胞（例えばエフェクター細胞）および補体システムの構成要素を含む、宿主組織または因子に対する免疫グロブリンの結合を媒介してもよい。

【００５２】

用語「親ポリペプチド」または「親抗体」は、他に記載されないか、または文脈に明確に矛盾しなければ、親ポリペプチドまたは親抗体は変異を有しないことを除いて、本発明に係るポリペプチドまたは抗体と同一であるポリペプチドまたは抗体として理解されるべきである。例えば、本発明の抗体IgG1-CD27-AはIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの親抗体である。

【００５３】

用語「ヒンジ領域」は、本明細書において使用される場合、免疫グロブリン重鎖のヒンジ領域を指す。そのため、例えばヒトIgG1抗体のヒンジ領域は、Kabat,E.A.et al.,Sequences of proteins of immunological interest.5th Edition-US Department of Health and Human Services,NIH publication No.91-3242,pp 662,680,689（1991）に示されているEu番号付け（Euインデックス）に従うアミノ酸216～230に対応する。しかしながら、ヒンジ領域はまた、本明細書に記載されている他のサブタイプのいずれかであってもよい。

【００５４】

用語「CH1領域」または「CH1ドメイン」は、本明細書において使用される場合、免疫グロブリン重鎖のCH1領域を指す。そのため、例えばヒトIgG1抗体のCH1領域は、Kabat（前掲）に示されているEu番号付けに従うアミノ酸118～215に対応する。しかしながら、CH1領域はまた、本明細書に記載されている他のサブタイプのいずれかであってもよい。

【００５５】

用語「CH2領域」または「CH2ドメイン」は、本明細書において使用される場合、免疫グロブリン重鎖のCH2領域を指す。そのため、例えばヒトIgG1抗体のCH2領域は、Kabat（前掲）に示されているEu番号付けに従うアミノ酸231～340に対応する。しかしながら、CH2領域はまた、本明細書に記載されている他のサブタイプのいずれかであっ

てもよい。

【００５６】

用語「CH3領域」または「CH3ドメイン」は、本明細書において使用される場合、免疫グロブリン重鎖のCH3領域を指す。そのため、例えばヒトIgG1抗体のCH3領域は、Kabat（前掲）に示されているEu番号付けに従うアミノ酸341～447に対応する。しかしながら、CH3領域はまた、本明細書に記載されている他のサブタイプのいずれかであってもよい。

【００５７】

用語「Fc媒介性エフェクター機能」または「Fcエフェクター機能」は、本明細書において使用される場合、交換可能に使用され、かつ、細胞膜上の標的または抗原に対するポリペプチドまたは抗体の結合の帰結である機能を指すことが意図され、ここで、Fc媒介性エフェクター機能は、ポリペプチドまたは抗体のFc領域に起因する。Fc媒介性エフェクター機能の例は、（i）C1q結合、（ii）補体活性化、（iii）補体依存性細胞傷害（CDC）、（iv）抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）、（v）Fcガンマ受容体（FcγR）結合、（vi）抗体依存性、FcγR媒介性抗原架橋、（vii）抗体依存性細胞ファゴサイトーシス（ADCP）、（viii）補体依存性細胞傷害（CDCC）、（ix）補体増強性細胞傷害、（x）抗体により媒介されるオプソニン化された抗体の補体受容体に対する結合、（xi）オプソニン化、および（xii）（i）～（xi）のいずれかの組合せを含む。

【００５８】

用語「減少したFcエフェクター機能」または「減少したFc媒介性エフェクター機能」は、本明細書において使用される場合、交換可能に使用され、同じアッセイにおける親ポリペプチドまたは抗体のFcエフェクター機能と直接的に比較した場合に抗体について減少しているFcエフェクター機能を指すことが意図される。

【００５９】

用語「不活性」（inertness）、「不活性の」（inert）または「非活性化性の」（non-activating）は、本明細書において使用される場合、少なくとも、いずれのFcγRにも結合することができないか、FcγRのFc媒介性架橋を誘導することができないか、または個々の抗体の2つのFc領域を介して標的抗原のFcγR媒介性架橋を誘導することができないか、またはC1qに結合することができないFc領域を指す。そのため、本発明のある特定の態様において、Fc領域は不活性である。したがって、ある特定の態様において、Fc媒介性エフェクター機能の一部またはすべては減弱されているか、または完全に存在しない。

【００６０】

用語「オリゴマー化」は、本明細書において使用される場合、単量体を有限の重合度まで変換する過程を指すことが意図される。本発明に係る抗体は、例えば、細胞表面における、標的結合後にFc領域の非共有結合性会合を介して、オリゴマー、例えば六量体を形成することができる。Fc:Fc相互作用を通じた細胞表面結合での抗CD27抗体のオリゴマー化は、CD27細胞内シグナル伝達の活性化を結果としてもたらすCD27クラスタリングを増加させてもよい。細胞表面結合でオリゴマー、例えば六量体を形成するE345RまたはE430G変異を含む抗体の能力は、de Jong RN et al,PLoS Biol.2016 Jan 6；14（1）:e1002344に記載されるように評価され得る。抗体のFc-Fc媒介性オリゴマー化は、隣接する抗体の間のFc領域の分子間会合を通じて（細胞）表面上の標的結合後に起こり、E345RまたはE430G変異（Euインデックスによる番号付け）の導入により増加される。

【００６１】

用語「クラスタリング」は、本明細書において使用される場合、非共有結合性相互作用を通じた抗体のオリゴマー化を指す。

【００６２】

用語「Fc-Fc増強性」（Fc-Fc enhancing）は、本明細書において使用される場合、抗体が細胞表面上でオリゴマー、例えば六量体を形成するように2つのFc領域含有抗体の

Fc領域の間の結合強度を増加させること、または該Fc領域の間の相互作用を安定化させることを指すことが意図される。この増強は、抗体のFc領域中のある特定のアミノ酸変異、例えばE345RまたはE430Gにより得られ得る。用語「一価抗体」は、本発明の文脈において、1つのみの抗原結合ドメイン（例えば1つのFabアーム）を用いて、抗原上の特異的なエピトープと相互作用することができる抗体分子を指す。二重特異性抗体の文脈において、「一価抗体結合」は、1つのみの抗原結合ドメイン（例えば1つのFabアーム）を用いる抗原上の1つの特異的なエピトープに対する二重特異性抗体の結合を指す。

【００６３】

用語「単一特異性抗体」は、本発明の文脈において、1つのエピトープのみに対して結合特異性を有する抗体を指す。抗体は、単一特異性、一価抗体（すなわち1つのみの抗原結合領域を有する）または単一特異性、二価抗体（すなわち2つの同一の抗原結合領域を有する抗体）であってもよい。

【００６４】

用語「二重特異性抗体」は、2つの非同一の抗原結合ドメイン、例えば2つの非同一のFabアームまたは非同一のCDR領域を有する2つのFabアームを含む抗体を指す。本発明の文脈において、二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なるエピトープについて特異性を有する。そのようなエピトープは、同じまたは異なる抗原または標的上にあってもよい。エピトープが異なる抗原上にある場合、そのような抗原は、同じ細胞または異なる細胞、細胞タイプもしくは構造、例えば細胞外マトリックスもしくは小胞および可溶性タンパク質上にあってもよい。二重特異性抗体は、そのため、複数の抗原、例えば2つの異なる細胞を架橋する能力を有してもよい。本発明の特定の二重特異性抗体は、CD27および第2の標的に結合する能力を有する。

【００６５】

用語「二価抗体」は、1もしくは2つの標的もしくは抗原上のエピトープに結合するか、または同じ抗原上の1もしくは2つのエピトープに結合する2つの抗原結合領域を有する抗体を指す。それゆえ、二価抗体は、単一特異性二価抗体または二重特異性二価抗体であってもよい。

【００６６】

用語「アミノ酸」および「アミノ酸残基」は、本明細書において交換可能に使用されることがあり、限定的であると理解されるべきではない。アミノ酸は、各々のアミノ酸に特有の側鎖（R基）と共に、アミン（$-NH_2$）およびカルボキシル（-COOH）官能基を含有する有機化合物である。本発明の文脈において、アミノ酸は、構造および化学的特徴に基づいて分類され得る。そのため、アミノ酸のクラスは、以下の表の1つまたは両方において反映され得る。

【００６７】

（表５）R基の構造および一般的な化学的特徴付けに基づく主な分類

クラス	アミノ酸
酸性残基	D および E
塩基性残基	K, R, および H
親水性非荷電性残基	S, T, N, および Q
脂肪族非荷電性残基	G, A, V, L, および I
非極性非荷電性残基	C, M, および P
芳香族残基	F, Y, および W

【００６８】

（表６）アミノ酸残基の代替的な物理的および機能的分類

クラス	アミノ酸
ヒドロキシル基含有残基	S および T
脂肪族残基	I, L, V, および M
シクロアルケニル関連残基	F, H, W, および Y
疎水性残基	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W, および Y
負荷電性残基	D および E
極性残基	C, D, E, H, K, N, Q, R, S, および T
正荷電性残基	H, K, および R
小さい残基	A, C, D, G, N, P, S, T, および V
非常に小さい残基	A, G, および S
ターン形成に関与する残基	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P, および T
柔軟な残基	Q, T, K, S, G, P, D, E, および R

【００６９】
1つのアミノ酸の別のアミノ酸への置換は、保存的または非保存的置換として分類されてもよい。本発明の文脈において、「保存的置換」は、1つのアミノ酸の、類似した構造的および/または化学的特徴を有する別のアミノ酸での置換、例えば1つのアミノ酸残基の、上記の2つの表のいずれかにおいて定義されている同じクラスの別のアミノ酸残基への置換であり:例えば、ロイシンはイソロイシンで置換されてもよく、というのは、それらは両方とも脂肪族の、分岐した疎水性物質であるからである。同様に、アスパラギン酸はグルタミン酸で置換されてもよく、その理由は、それらは両方とも小さい、負に荷電した残基であるからである。
【００７０】
本発明の文脈において、抗体中の置換は、
元々のアミノ酸-位置-置換されたアミノ酸
として指し示され；
任意のアミノ酸残基を指し示すためのコード「Xaa」または「X」を含む、アミノ酸のためのよく認識されている表記法、3文字コード、または1文字コードへの参照が使用される。そのため、XaaまたはXは、20個の天然に存在するアミノ酸のいずれかを典型的には表し得る。用語「天然に存在する」は、本明細書において使用される場合、以下のアミノ酸残基；グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン、リジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、プロリン、トリプトファン、フェニルアラニン、チロシン、メチオニン、およびシステインのいずれか1つを指す。よって、表記「K409R」または「Lys409Arg」は、抗体がアミノ酸位置409におけるリジンのアルギニンでの置換を含むことを意味する。
【００７１】
所与の位置のアミノ酸の、任意の他のアミノ酸への置換は、
元々のアミノ酸-位置；または例えば「K409」
と称される。
【００７２】

元々のアミノ酸および/または置換されたアミノ酸が、1つより多くの、但しすべてではないアミノ酸を含んでもよい改変について、該1つより多くのアミノ酸は、「,」または「/」により分離されてもよい。例えば、位置409におけるリジンの、アルギニン、アラニン、またはフェニルアラニンでの置換は、「Lys409Arg,Ala,Phe」または「Lys409Arg/Ala/Phe」または「K409R,A,F」または「K409R/A/F」または「K409→R、A、もしくはF」である。

【００７３】

そのような指定は、本発明の文脈において交換可能に使用され得るが、同じ意味および目的を有し得る。

【００７４】

さらには、用語「置換」は、任意の1もしくは他の19個の天然アミノ酸への、または他のアミノ酸、例えば非天然アミノ酸への置換を包含する。例えば、位置409におけるアミノ酸Kの置換は、以下の置換:409A、409C、409D、409E、409F、409G、409H、409I、409L、409M、409N、409Q、409R、409S、409T、409V、409W、409P、および409Yの各々を含む。なお、これは指定409Xと同等であり、Xは元々のアミノ酸以外の任意のアミノ酸を指定する。これらの置換はまた、K409A、K409Cなど、またはK409A,Cなど、またはK409A/C/などと指定されてもよい。同じことが、本明細書において言及される各々のおよびあらゆる位置に同様に適用されて、そのような置換のいずれのものも本明細書において特に含まれる。

【００７５】

本発明に係る抗体はまたアミノ酸残基の欠失を含んでもよい。そのような欠失は「del」と表されることがあり、例えば、K409delという記載を含む。そのため、そのような態様において、位置409におけるリジンはアミノ酸配列から欠失している。

【００７６】

用語「宿主細胞」は、本明細書において使用される場合、発現ベクターが導入されている細胞を指すことが意図される。そのような用語は、特定の対象細胞を指すだけでなく、そのような細胞の子孫も指すことが意図されることが理解されるべきである。ある特定の改変が、変異または環境上の影響のいずれかに起因して後続する世代において起こり得るので、そのような子孫は親細胞に実際には同一でないことがあるが、本明細書において使用されるような用語「宿主細胞」の範囲内に依然として含まれる。組換え宿主細胞は、例えば、トランスフェクトーマ、例えばCHO細胞、HEK-293細胞、Expi293F細胞、PER.C6細胞、NS0細胞、およびリンパ球性細胞、ならびに原核細胞、例えば大腸菌（E.coli）ならびに他の真核宿主、例えば植物細胞および真菌を含む。

【００７７】

用語「トランスフェクトーマ」は、本明細書において使用される場合、抗体または標的抗原を発現する組換え真核宿主細胞、例えばCHO細胞、PER.C6細胞、NS0細胞、HEK-293細胞、Expi293F細胞、植物細胞、または、酵母細胞を含む、真菌を含む。

【００７８】

本発明の目的のために、2つのアミノ酸配列の間の配列同一性は、好ましくはバージョン5.0.0またはそれ以降のバージョンのEMBOSSパッケージ（EMBOSS:The European Molecular Biology Open Software Suite,Rice et al.,2000,Trends Genet.16:276-277）のNeedleプログラムにおいて実装されているNeedleman-Wunschアルゴリズム（Needleman and Wunsch,1970,J.Mol.Biol.48:443-453）を使用して決定される。使用されるパラメーターは、10のギャップオープンペナルティ、0.5のギャップ伸長ペナルティ、およびEBLOSUM62（BLOSUM62のEMBOSSバージョン）置換マトリックスである。「最も長い同一性」（-nobriefオプションを使用して得られる）として標識されるNeedleの出力は、同一性パーセントとして使用され、以下:

（同一の残基×100）/（アライメントの長さ-アライメント中のギャップの総数）

のように算出される。

【００７９】

類似した残基の保持は、BLASTプログラム（例えば、標準的な設定BLOSUM62、オープンギャップ＝11および伸長ギャップ＝1を使用するNCBIを通じて利用可能なBLAST 2.2.8）の使用により決定されるように、類似性スコアにより追加的にまたは代替的に測定されてもよい。好適なバリアントは、親配列に対して少なくとも約45％、例えば少なくとも約55％、少なくとも約65％、少なくとも約75％、少なくとも約85％、少なくとも約90％、少なくとも約95％、またはより高い％（例えば、約99％）の類似性を典型的には呈する。

【００８０】

用語「内部移行した」または「内部移行」は、本明細書において使用される場合、分子、例えば本発明に係る抗体が、細胞膜により飲み込まれ、細胞の内部に導かれる生物学的プロセスを指す。内部移行はまた「エンドサイトーシス」と称され得る。

【００８１】

本明細書において使用される場合、用語「エフェクター細胞」は、免疫応答のエフェクター期に関与する免疫細胞を指す。例示的な免疫細胞は、骨髄またはリンパ系起源の細胞、例えばリンパ球（例えばB細胞および細胞溶解性T細胞（CTL）を含むT細胞）、キラー細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、単球、好酸球、多形核細胞、例えば好中球、顆粒球、肥満細胞、および好塩基球を含む。一部のエフェクター細胞は、Fc受容体（FcgR）または補体受容体を発現し、特有の免疫機能を実行する。一部の態様において、エフェクター細胞、例えば、ナチュラルキラー細胞などは、ADCCを誘導する能力を有する。例えば、FcgRを発現する単球、マクロファージ、好中球、樹状細胞およびクッパー細胞は、標的細胞の特異的な殺滅および/または免疫系の他の構成要素への抗原の提示、または抗原を提示する細胞への結合に関与する。一部の態様において、ADCCは、抗体駆動性の古典的な補体活性化によりさらに増強されて、標的細胞上の活性化されたC3断片の沈着を結果としてもたらすことができる。C3切断生成物は、骨髄細胞上に発現される補体受容体（CR）、例えばCR3のリガンドである。エフェクター細胞上のCRによる補体断片の認識は、Fc受容体媒介性ADCCの増強を促進し得る。一部の態様において、抗体駆動性の古典的な補体活性化は標的細胞上のC3断片に繋がる。これらのC3切断生成物は、直接的な補体依存性細胞傷害（CDCC）を促進し得る。一部の態様において、エフェクター細胞は、標的抗原、標的粒子または標的細胞を貪食することがあり、これは、抗体結合に依存し、エフェクター細胞により発現されるFcγRにより媒介され得る。エフェクター細胞上の特定のFcRまたは補体受容体の発現は、液性因子、例えばサイトカインにより調節され得る。例えば、FcγRIの発現は、インターフェロンγ（IFN γ）および/またはG-CSFにより上方調節されることが見出されている。この増強された発現は、標的に対するFcγRI保有細胞の細胞傷害活性を増加させる。エフェクター細胞は、標的抗原を貪食することができるか、または標的細胞を貪食もしくは溶解することができる。一部の態様において、抗体駆動性の古典的な補体活性化は標的細胞上のC3断片に繋がる。これらのC3切断生成物は、エフェクター細胞による直接的なファゴサイトーシスを、または抗体媒介性ファゴサイトーシスを増強することにより間接的にファゴサイトーシスを促進し得る。抗体が不活性のFc領域を有する本明細書におけるある特定の態様において、抗体はFc媒介性エフェクター機能を誘導しない。

【００８２】

「エフェクターT細胞」または「Teffs」または「Teff」は、本明細書において使用される場合、免疫応答の機能、例えば腫瘍細胞の殺滅および/または身体からの腫瘍細胞のクリアランスを結果としてもたらすことができる抗腫瘍免疫応答の活性化を実行するTリンパ球を指す。Teff表現型の例はCD3$^+$CD4$^+$およびCD3$^+$CD8$^+$を含む。Teffは、マーカー、例えばIFNγ、グランザイムBおよびICOSを分泌、含有、または発現し得る。Teffはこれらの表現型に完全に制限され得ないことが理解される。

【００８３】

「メモリーT細胞」は、本明細書において使用される場合、感染が除去された後の長い時間的期間にわたり身体中に残存するTリンパ球を指す。メモリーT細胞の例はセントラ

ルメモリーT細胞（CD45RA-CCR7＋）およびエフェクターメモリーT細胞（CD45RA-CCR7-）を含む。メモリーT細胞はこれらの表現型に完全に制限され得ないことが理解される。

【００８４】

「制御性T細胞」または「Tregs」または「Treg」は、本明細書において使用される場合、他のT細胞および/または他の免疫細胞の活性を、通常はそれらの活性を抑制することにより、調節するTリンパ球を指す。Treg表現型の例はCD3＋CD4＋CD25＋CD127dimである。TregはFoxp3をさらに発現し得る。Tregはこの表現型に完全に制限され得ないことが理解される。

【００８５】

本明細書において使用される場合、用語「補体活性化」は、表面上の抗体-抗原複合体に結合するC1と呼ばれる大きい高分子複合体により開始される古典的な補体経路の活性化を指す。C1は、6つの認識タンパク質C1qおよびセリンプロテアーゼのヘテロ四量体、C1r2C1s2からなる複合体である。C1は、C4のC4aおよびC4bへのならびにC2のC2aおよびC2bへの切断と共に開始される切断反応のシリーズを伴う古典的な補体カスケードの早期事象における第1のタンパク質複合体である。C4bは沈着され、C2aと共にC3転換酵素と呼ばれる酵素活性転換酵素を形成し、C3転換酵素は補体構成要素C3をC3bおよびC3aに切断し、これはC5転換酵素を形成させる。このC5転換酵素はC5をC5aおよびC5bに分割し、最後の構成要素は膜上に沈着され、次いで補体活性化の後期事象のトリガーとなり、該後期事象において末期補体構成要素C5b、C6、C7、C8およびC9は膜侵襲複合体（MAC）にアセンブルする。補体カスケードは、補体依存性細胞傷害（CDC）としても公知の、細胞の溶解を引き起こす細胞膜中のポアの作製を結果としてもたらす。抗体が不活性のFc領域を有する本明細書におけるある特定の態様において、抗体は補体活性化を誘導しない。

【００８６】

補体活性化は、C1q結合有効性、CDC動態CDCアッセイ（WO2013/004842、WO2014/108198に記載されている）を使用することにより、またはBeurskens et al., J Immunol April 1,2012 vol.188 no.7,3532-3541に記載されているC3bおよびC4bの細胞沈着の方法により評価され得る。

【００８７】

用語「C1q結合」は、本明細書において使用される場合、その抗原に結合した抗体に対するC1qの結合の文脈におけるC1qの結合を指すことが意図される。その抗原に結合した抗体は、本明細書に記載される文脈においてインビボおよびインビトロの両方で起こると理解されるべきである。本明細書の実施例8に記載されるように、C1q結合は、例えば、人工的な表面上に固定化された抗体を使用することにより、または細胞もしくはビリオン表面上の予め決定された抗原に結合した抗体を使用することにより評価され得る。抗体オリゴマーに対するC1qの結合は、高いアビディティの結合を結果としてもたらす多価相互作用として本明細書において理解されるべきである。例えば本発明の抗体における変異の導入の結果としてもたらされる、C1q結合における減少は、変異した抗体のC1q結合をその親抗体（同じアッセイ内での変異を有しない本発明の抗体）のC1q結合と比較することにより測定されてもよい。

【００８８】

用語「処置」は、症状または疾患状態の緩和、寛解、停止、または根絶（治癒）の目的を伴う有効量の本発明の治療的に活性の抗体の投与を指す。

【００８９】

用語「有効量」または「治療有効量」は、所望の治療結果を達成するために必要な、投与量および時間的期間についての効果的な量を指す。抗体の治療有効量は、個体の疾患状態、年齢、性別、および体重、ならびに個体において所望の応答を誘発する抗体の能力などの要因に従って変化してもよい。治療有効量はまた、抗体バリアントの任意の毒性または有害効果を治療的に有益な効果が凌ぐ量である。

【００９０】
用語「薬物動態プロファイル」は、本明細書において使用される場合、本明細書の実施例12に記載されるように経時的な血漿IgGレベルとして決定され得る。
【００９１】
用語「CD40」は、本明細書において使用される場合、リガンドTNFSF5/CD40Lの受容体である、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー5（TNFRSF5）としても参照される、CD40を指す。CD40は、マクロファージおよびB細胞においてERKを活性化させてB細胞による免疫グロブリン分泌の誘導に繋がる、TRAF6およびMAP3K8媒介性シグナルを伝達することが公知である。CD40のために使用される他の同義語は、B細胞表面抗原CD40、Bp50、CD40L受容体およびCDw40を含むが、これらに限定されない。1つの態様において、CD40は、UniProtアクセッション番号P25942を有するヒトCD40である。ヒトCD40の配列はSEQ ID NO:68にも示される。SEQ ID NO:68のアミノ酸1～20はヒトCD40のシグナルペプチドに対応し;SEQ ID NO:68のアミノ酸21～193はヒトCD40の細胞外ドメインに対応し;タンパク質の残りの部分;すなわちSEQ ID NO:68のアミノ酸194～215および216～277はそれぞれ膜貫通および細胞質ドメインである。
【００９２】
用語「CD137」は、本明細書において使用される場合、リガンドTNFSF9/4-1BBLの受容体である、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー9（TNFRSF9）としても称される、CD137（4-1BB）を指す。CD137（4-1BB）は、T細胞活性化に関与すると考えられている。CD137のための他の同義語は、4-1BBリガンド受容体、CDw137、T細胞抗原4-1BBホモログおよびT細胞抗原ILAを含むが、これらに限定されない。1つの態様において、CD137（4-1BB）は、UniProtアクセッション番号Q07011を有する、ヒトCD137（4-1BB）である。ヒトCD137の配列はSEQ ID NO:70にも示される。SEQ ID NO:70のアミノ酸1～23はヒトCD137のシグナルペプチドに対応し;SEQ ID NO:70のアミノ酸24～186はヒトCD137の細胞外ドメインに対応し;タンパク質の残りの部分、すなわちSEQ ID NO:70のアミノ酸187～213および214～255はそれぞれ膜貫通および細胞質ドメインである。
【００９３】
Fc領域は、それらのC末端においてリジンを有してもよい。このリジンの起源は、これらのFc領域が由来するヒトにおいて見出される天然に存在する配列である。組換え抗体の細胞培養製造の間に、この末端リジンは、内因性カルボキシペプチダーゼによるタンパク質加水分解により切断除去されて、同じ配列を有するがC末端リジンを欠いた定常領域を結果としてもたらすことができる。抗体の生産の目的のために、この末端リジンをコードするDNAは、抗体がリジンなしで製造されるように配列から省略され得る。末端リジンをコードする核酸配列、またはコードしない核酸配列のいずれかから製造される抗体は、配列および機能において実質的に同一であり、その理由は、例えばCHOベース製造システムにおいて製造される抗体を使用する場合に、末端リジンのプロセシングの程度は典型的には高いからである（Dick,L.W.et al.Biotechnol.Bioeng.2008；100:1132-1143）。それゆえ、本発明に係るタンパク質、例えば抗体は、末端リジンをコードもしくは有することと共にまたはそれなしで生成され得ることが理解される。末端リジンを有する配列、例えば末端リジンを有する定常領域配列は、末端リジンを有しない対応する配列として理解され得ること、および末端リジンを有しない配列もまた、末端リジンを有する対応する配列として理解され得ることもまた本発明に従って理解される。
【００９４】
本開示の局面および態様
第1の局面において、本開示は、対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法であって、i）CD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む第1の結合剤;ならびにii）CD40に結合する第1の結合領域およびCD137に結合する第2の結合領域を含む第2の結合剤を該対象に投与する工程を含む、

方法を提供する。

【００９５】

CD27に結合する第1の結合剤

1つの態様において、第1の結合剤は、ヒトCD27に結合する能力を有する少なくとも1つの抗原結合領域を含み、該第1の結合剤は、それぞれSEQ ID NOs:5、6、および7に示されている配列を含む重鎖可変（VH）領域CDR1、CDR2、およびCDR3、ならびにそれぞれSEQ ID NO:9、10および11に示されている配列を含む軽鎖可変（VL）領域CDR1、CDR2、およびCDR3を含む。

【００９６】

さらなる態様において、第1の結合剤は、それぞれSEQ ID NO:5、6、および7に示されている配列を含むVH領域CDR1、CDR2、およびCDR3、ならびにそれぞれSEQ ID NO:9、10および11に示されている配列を含むVL領域CDR1、CDR2、およびCDR3を含む前記抗原結合領域の2つを含む。本発明により、ヒトCD27に結合することおよびさらにA59Tの突然変異を含むヒトCD27のバリアントに結合することができる抗CD27抗体が提供される。

【００９７】

本発明の一態様において、第1の結合剤は、例えばT細胞上のCD27に結合し、その標的への結合においてアゴニスト性である。本発明により、T細胞の活性化および増殖を刺激する第1の結合剤が提供される。第1の結合剤は、T細胞のメモリー形成および生存をさらに刺激してもよい。そのような第1の結合剤は、例えばがんの処置において有用である。第1の結合剤は、第1の結合剤の毒物学研究のために有用であるカニクイザルCD27に結合する能力をさらに有する。

【００９８】

1つの態様において、本発明の第1の結合剤は、単離された抗体である。

【００９９】

1つの態様において、第1の結合剤は抗体である。別の態様において、第1の結合剤はヒト抗体である。別の態様において、第1の結合剤はヒト化抗体である。別の態様において、第1の結合剤はキメラ抗体である。

【０１００】

本発明の第1の結合剤は好ましい態様において全長抗体である。よって、本発明の第1の結合剤は、軽鎖定常領域（CL）および重鎖定常領域（CH）をさらに含んでもよい。CHは、CH1領域、ヒンジ領域、CH2領域およびCH3領域を好ましくは含む。

【０１０１】

抗体のVHおよびVL中の突然変異は、例えば、その標的抗原に対する抗体の親和性を増加させるため、その潜在的な免疫原性を低減させるためおよび/または宿主細胞により発現される抗体の収率を増加させるために為され得ることが当技術分野において周知である。よって、一部の態様において、本発明に係る第1の結合剤のCDR、VHおよび/またはVL配列のバリアント、特にはそれぞれSEQ ID NO:4およびSEQ ID NO:8に示されているVHおよび/またはVL領域の機能的なバリアントを含む第1の結合剤もまた想定される。機能的なバリアントは、例えば、1つまたは複数のCDRにおいて、親VHおよび/またはVL配列と比較して1つまたは複数のアミノ酸において異なってもよいが、抗原結合領域が親抗体の親和性および/または特異性の少なくとも実質的な割合（少なくとも約50パーセント、60パーセント、70パーセント、80パーセント、90パーセント、95パーセントもしくはより高いパーセント）を保持するか、またはそのすべてを保持することを依然として可能とする。典型的には、そのような機能的なバリアントは、親配列に対して意義深い配列同一性を保持する。例示的なバリアントは、12またはそれ未満、例えば11、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1個の突然変異、例えばアミノ酸残基の置換、挿入、または欠失により、それぞれの親VHまたはVL領域から異なるバリアントを含む。例示的なバリアントは、主に保存的アミノ酸置換により親配列のVHおよび/またはVLおよび/またはCDR領域から異なるバリアントを含み;例えば、バリアント中のアミノ酸置換の1

2、例えば11、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1個は保存的であることができる。本発明のさらなる態様において、第1の結合剤は、それぞれVH CDR領域中および/またはVL CDR領域中に最大で1、2または3個の突然変異を含んでもよい。そのような突然変異は置換であってもよい。そのような置換は、本発明の第1の結合剤の結合親和性および/または結合特異性を重大に変化させないことが好ましい。よって、本発明は、本発明の第1の結合剤のバリアントであって、SEQ ID NO:5、6、および7に示されているVH領域CDR配列、ならびにSEQ ID NO:9、10および11に示されているVL領域CDR配列を含む第1の結合剤と同じ機能的な特色を有する、バリアントを包含する。

【0102】

本発明の別の態様において、第1の結合剤は、SEQ ID NO:4に示されているVH領域に対して少なくとも80%同一の配列を含むVH領域を含む。本発明の別の態様において、第1の結合剤は、SEQ ID NO:4に示されているVH領域に対して少なくとも85%同一の配列を含むVH領域を含む。本発明の別の態様において、第1の結合剤は、SEQ ID NO:4に示されているVH領域に対して少なくとも90%同一の配列を含むVH領域を含む。本発明の別の態様において、第1の結合剤は、SEQ ID NO:4に示されているVH領域に対して少なくとも95%同一の配列を含むVH領域を含む。本発明の別の態様において、第1の結合剤は、SEQ ID NO:4に示されているVH領域に対して少なくとも96%同一の配列を含むVH領域を含む。本発明の別の態様において、第1の結合剤は、SEQ ID NO:4に示されているVH領域に対して少なくとも97%同一の配列を含むVH領域を含む。本発明の別の態様において、第1の結合剤は、SEQ ID NO:4に示されているVH領域に対して少なくとも98%同一の配列を含むVH領域を含む。本発明の別の態様において、第1の結合剤は、SEQ ID NO:4に示されているVH領域に対して少なくとも99%同一の配列を含むVH領域を含む。本発明の別の態様において、第1の結合剤は、SEQ ID NO:4に示されている配列を含むVH領域を含む。

【0103】

本発明の別の態様において、第1の結合剤は、SEQ ID NO:8に示されているVH領域に対して少なくとも80%同一の配列を含むVH領域を含む。本発明の別の態様において、第1の結合剤は、SEQ ID NO:8に示されているVH領域に対して少なくとも85%同一の配列を含むVH領域を含む。本発明の別の態様において、第1の結合剤は、SEQ ID NO:8に示されているVH領域に対して少なくとも90%同一の配列を含むVH領域を含む。本発明の別の態様において、第1の結合剤は、SEQ ID NO:8に示されているVH領域に対して少なくとも95%同一の配列を含むVH領域を含む。本発明の別の態様において、第1の結合剤は、SEQ ID NO:8に示されているVH領域に対して少なくとも96%同一の配列を含むVH領域を含む。本発明の別の態様において、第1の結合剤は、SEQ ID NO:8に示されているVH領域に対して少なくとも97%同一の配列を含むVH領域を含む。本発明の別の態様において、第1の結合剤は、SEQ ID NO:8に示されているVH領域に対して少なくとも98%同一の配列を含むVH領域を含む。本発明の別の態様において、第1の結合剤は、SEQ ID NO:8に示されているVH領域に対して少なくとも99%同一の配列を含むVH領域を含む。本発明の別の態様において、第1の結合剤は、SEQ ID NO:8に示されている配列を含むVH領域を含む。

【0104】

本発明の別の態様において、第1の結合剤は、それぞれSEQ ID NO:4およびSEQ ID NO:8に示されている配列を含むVH領域およびVL領域を含む。

【0105】

第1の結合剤は、ヒトカッパ軽鎖である軽鎖定常領域を含んでもよい。別の態様において、それはヒトラムダ軽鎖定常領域を含んでもよい。

【0106】

第1の結合剤は、ヒトIgGアイソタイプである重鎖定常領域を好ましくはさらに含んでもよい。それは、改変されたヒトIgG定常領域を任意で含んでもよい。そのようなヒトIgGは、CH2およびCH3領域を含むFc領域を含む。Fc領域中のIgG定常領域を改変するこ

とにより、例えば、抗体のFcエフェクター機能を調節すること、またはFc-Fc相互作用およびそれによりクラスター、例えば六量体を形成する抗体の傾向を増加させることが可能である。本発明の1つの態様において、ヒトIgGまたは改変されたヒトIgGは、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4より選択される。1つの態様において、それはIgG1である。別の態様において、それはIgG2である。さらに別の態様において、それはIgG3である。さらなる態様において、それはIgG4である。1つの特定の態様において、IgGは、Fc領域中に1つまたは複数のアミノ酸置換を含む改変されたヒトIgGである。1つの態様において、それは、Fc領域中に1つまたは複数のアミノ酸置換を含む改変されたヒトIgG1であってもよい。本発明のさらなる態様において、IgG1は、Fc領域中に2つ以上のアミノ酸置換を含む。1つの態様において、IgG1 Fc領域は2つのアミノ酸置換を有する。

【０１０７】

本発明のさらなる態様において、改変されたヒトIgG重鎖定常領域は、Fc領域中に最大で10個のアミノ酸置換を含む。別の態様において、それは最大で9個のアミノ酸置換を含む。別の態様において、それは最大で8個のアミノ酸置換を含む。別の態様において、それは最大で7個のアミノ酸置換を含む。別の態様において、それは最大で6個のアミノ酸置換を含む。別の態様において、それは最大で5個のアミノ酸置換を含む。別の態様において、それは最大で4個のアミノ酸置換を含む。別の態様において、それは最大で3個のアミノ酸置換を含む。別の態様において、それはFc領域中に最大で2個のアミノ酸置換を含む。

【０１０８】

EUインデックスにしたがって番号付けされる、ヒトIgG1重鎖中のE430、E345およびS440に対応する位置におけるアミノ酸残基における突然変異は、CDCを誘導する抗体の能力を向上させることができる。理論により縛られないが、これらの位置における1つまたは複数のアミノ酸を置換することにより、抗体のオリゴマー化が刺激され、それにより、Fc媒介性エフェクター機能をモジュレートして、例えば、C1q結合、補体活性化、CDC、ADCP、内部移行、またはインビボ有効性を提供し得る他の関連する機能を増加させることができると考えられる。

【０１０９】

本発明のさらなる態様において、第1の結合剤は、抗原結合領域およびバリアントFc領域を含むバリアント抗体である。

【０１１０】

ある特定の態様において、ヒトCD27に結合する抗体バリアントは、

（a）SEQ ID NO:5に示されている配列を含むVH CDR1、SEQ ID NO:6に示されている配列を含むVH CDR2、SEQ ID NO:7に示されている配列を含むVH CDR3を含むVH領域ならびにアミノ酸残基がEUインデックスにしたがって番号付けされるE430、E345およびS440の1つまたは複数において突然変異を含むヒトIgG1 CH領域を含む重鎖;

（b）SEQ ID NO:9に示されている配列を含むVL CDR1、SEQ ID NO:10に示されている配列を含むVL CDR2、およびSEQ ID NO:11に示されている配列を含むVL CDR3を含むVL領域を含む軽鎖

を含む。

【０１１１】

他のある特定の態様において、ヒトCD27に結合する抗体バリアントは、

（a）SEQ ID NO:4を含むVH領域ならびにアミノ酸残基がEUインデックスにしたがって番号付けされるE430、E345およびS440の1つまたは複数において突然変異を含むヒトIgG1 CH領域を含む重鎖、ならびに

（b）SEQ ID NO:8を含むVL領域を含む軽鎖

を含む。

【０１１２】

本発明にしたがって使用されるバリアント抗体は、バリアントFc領域またはP329、E430およびE345の1つもしくは複数において突然変異を含むバリアントヒトIgG1 CH領

域を含む。以下において、Fc領域中の突然変異への言及は、ヒトIgG1 CH領域中の突然変異に同様に適用されてもよく、逆もまた成り立つ。

【０１１３】

本明細書に記載されるように、Fc領域中の突然変異させるアミノ酸の位置は、Euインデックスにしたがって番号付けされる場合に、天然に存在する（野生型）ヒトIgG1重鎖中のその位置に関して（すなわち、該位置に「対応して」）与えられ得る。そのため、親Fc領域が1つもしくは複数の突然変異を既に含有する場合および/または親Fc領域が、例えば、IgG2、IgG3もしくはIgG4 Fc領域である場合、Euインデックスにしたがって番号付けされるヒトIgG1重鎖中のアミノ酸残基、例えば、E430などに対応するアミノ酸の位置は、アライメントにより決定され得る。特に、親Fc領域は、ヒトIgG1重鎖配列中のE430に対応する位置における残基を同定するために野生型ヒトIgG1重鎖配列とアライメントされる。表3に示される異なるヒトIgG1アロタイプのいずれか1つを含む、任意の野生型ヒトIgG1定常領域アミノ酸配列はこの目的のために有用であり得る。

【０１１４】

本発明の1つの態様において、IgG Fc領域中の改変は、同じアイソタイプ、例えばIgG1の野生型IgG Fc領域を含むことを除いて同一の抗体と比較して増加したCD27アゴニズムを誘導する。これは、例えば、Eu番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置E345および/またはE430に対応するアミノ酸位置においてE以外のアミノ酸を導入することにより得られてもよい。本発明の1つの態様において、Eu番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置E345に対応する位置におけるアミノ酸残基は、A、C、D、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、P、R、S、T、V、WおよびYを含む群より選択される。本発明の別の態様において、Eu番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置E430に対応する位置におけるアミノ酸残基は、A、C、D、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、P、R、S、T、V、Wを含む群より選択される。

【０１１５】

好ましい態様において、Eu番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置E345に対応する位置におけるアミノ酸残基はRである。よって、本発明の第1の結合剤は、Fc領域中のE345R置換を含んでもよい。本発明の別の態様において、Eu番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置E430に対応する位置におけるアミノ酸残基はGである。よって、本発明の第1の結合剤は、Fc領域中のE430G置換を含んでもよい。別の態様において、第1の結合剤は、E430G、E345K、E430S、E430F、E430T、E345Q、E345R、E345Yを含む群より選択されるアミノ酸置換を含む。

【０１１６】

本発明により、抗体結合で細胞表面上のCD27の抗体依存的なクラスタリングに繋がり得る増強したFc-Fc相互作用を有し、それにより本発明の抗体のアゴニズムを増加させる、抗体が提供される。

【０１１７】

本発明の第1の結合剤の別の態様において、Eu番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置P329に対応する位置におけるアミノ酸残基は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、WおよびYを含む群より選択されるアミノ酸で置換される。よって、本発明の第1の結合剤は、位置329において突然変異をさらに含んでもよい。

【０１１８】

本発明のさらなる態様において、第1の結合剤は、Eu番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置P329に対応する位置においてアミノ酸残基Rを有する。よって、本発明の第1の結合剤は、Fc領域中にP329R置換を有してもよい。理論により縛られないが、（例えばSEQ ID NO:13に示されるように）Fc領域中のE345R突然変異を含む本発明の第1の結合剤は増加した血清クリアランスを有すると考えられる。位置329における突然変異、例えば（例えばSEQ ID NO:15に示されるように）P329Rをさらに導入することは、例えばSEQ ID NO:12に示されるwt IgG1を含む第1の結合剤のレベルまで本発明の第1の結合剤のクリアランスを回復させることを本発明者らは見出した。

【０１１９】
別の好ましい態様において、Eu番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置P329およびE345に対応する位置におけるアミノ酸残基は両方ともRである。本発明により、同じVHおよびVL領域を含み、かつ位置329において野生型アミノ酸Pおよび位置345において野生型アミノ酸Eを含むという例外と共に同一のIgG1重鎖定常領域を含む第1の結合剤と比較した場合に、増加したCD27受容体アゴニズムおよび同等の薬物動態特性、例えば血清クリアランスなどを有する第1の結合剤が提供される。
【０１２０】
そのため、一態様において、本発明は、CD27への結合において増加した受容体アゴニズムを有し、かつ、同じVHおよびVL領域を含むが例えばSEQ ID NO:12に示されるものなどの野生型IgG1重鎖定常領域を含む第1の結合剤の薬物動態特性と比較した場合に、同等の、例えば類似したまたは同一の薬物動態特性である薬物動態特性をさらに有する、第1の結合剤を提供する。換言すれば、本発明は、野生型IgG1重鎖定常領域を含むことを除いて同一の第1の結合剤の薬物動態特性と重大には異ならない薬物動態特性を有する第1の結合剤を提供する。
【０１２１】
本発明の他の態様において、第1の結合剤は、先行するセクションのいずれか1つに係るバリアントFc領域を含み、バリアントFc領域は、ヒトIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4 Fc領域からなる群より選択されるヒトIgG Fc領域のバリアントである。すなわち、E430およびE345およびP329に対応するアミノ酸残基の1つまたは複数における突然変異は、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4 Fc領域からなる群より選択されるヒトIgG Fc領域である親Fc領域において為される。好ましくは、親Fc領域は、天然に存在する（野生型）ヒトIgG Fc領域、例えばヒト野生型IgG1、IgG2、IgG3もしくはIgG4 Fc領域、またはその混合されたアイソタイプである。そのため、バリアントFc領域は、（E430およびE345およびP329より選択されるアミノ酸残基の1つまたは複数における）記載される突然変異を除いて、ヒトIgG1、IgG2、IgG3もしくはIgG4アイソタイプ、またはその混合されたアイソタイプであってもよい。
【０１２２】
1つの態様において、親Fc領域および/またはヒトIgG1 CH領域は野生型ヒトIgG1アイソタイプである。
【０１２３】
そのため、バリアントFc領域は、（E430またはE345またはP329における）記載される突然変異を除いて、ヒトIgG1 Fc領域であってもよい。
【０１２４】
特有の態様において、親Fc領域および/またはヒトIgG1 CH領域はヒト野生型IgG1m（f）アイソタイプである。
【０１２５】
特有の態様において、親Fc領域および/またはヒトIgG1 CH領域はヒト野生型IgG1m（z）アイソタイプである。
【０１２６】
特有の態様において、親Fc領域および/またはヒトIgG1 CH領域はヒト野生型IgG1m（a）アイソタイプである。
【０１２７】
特有の態様において、親Fc領域および/またはヒトIgG1 CH領域はヒト野生型IgG1m（x）アイソタイプである。
【０１２８】
特有の態様において、親Fc領域および/またはヒトIgG1 CH領域は、混合されたアロタイプのヒト野生型IgG1、例えばIgG1m（za）、IgG1m（zax）、またはIgG1m（fa）などである。
【０１２９】

そのため、バリアントFc領域および/またはヒトIgG1 CH領域は、（E430またはE345またはP329における）記載される突然変異を除いて、ヒトIgG1m（f）、IgG1m（a）、IgG1m（x）、IgG1m（z）アロタイプまたはそのいずれか2つ以上の混合されたアロタイプであってもよい。

【０１３０】

特有の態様において、親Fc領域および/またはヒトIgG1 CH領域はヒト野生型IgG1m（za）アイソタイプである。

【０１３１】

特有の態様において、親Fc領域はヒト野生型IgG2アイソタイプである。

【０１３２】

特有の態様において、親Fc領域はヒト野生型IgG3アイソタイプである。

【０１３３】

特有の態様において、親Fc領域はヒト野生型IgG4アイソタイプである。

【０１３４】

野生型ヒトIgGアイソタイプおよびIgG1アロタイプの特有の例のCH領域アミノ酸配列は表3に示される。

【０１３５】

別の態様において、本発明は、SEQ ID NO:12、13、14、15、18、19、20、21、22、23、27、28、29、30、31、32、33、34および36を含む群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖定常領域を含む第1の結合剤を提供する。1つの態様において、重鎖定常領域はSEQ ID NO:12のアミノ酸配列を有する。1つの態様において、重鎖定常領域はSEQ ID NO:13のアミノ酸配列を有する。1つの態様において、重鎖定常領域はSEQ ID NO:14のアミノ酸配列を有する。1つの態様において、重鎖定常領域はSEQ ID NO:15のアミノ酸配列を有する。1つの態様において、重鎖定常領域はSEQ ID NO:18のアミノ酸配列を有する。1つの態様において、重鎖定常領域はSEQ ID NO:19のアミノ酸配列を有する。1つの態様において、重鎖定常領域はSEQ ID NO:20のアミノ酸配列を有する。1つの態様において、重鎖定常領域はSEQ ID NO:21のアミノ酸配列を有する。1つの態様において、重鎖定常領域はSEQ ID NO:22のアミノ酸配列を有する。1つの態様において、重鎖定常領域はSEQ ID NO:23のアミノ酸配列を有する。1つの態様において、重鎖定常領域はSEQ ID NO:27のアミノ酸配列を有する。1つの態様において、重鎖定常領域はSEQ ID NO:28のアミノ酸配列を有する。1つの態様において、重鎖定常領域はSEQ ID NO:29のアミノ酸配列を有する。1つの態様において、重鎖定常領域はSEQ ID NO:30のアミノ酸配列を有する。1つの態様において、重鎖定常領域はSEQ ID NO:31のアミノ酸配列を有する。1つの態様において、重鎖定常領域はSEQ ID NO:32のアミノ酸配列を有する。1つの態様において、重鎖定常領域はSEQ ID NO:33のアミノ酸配列を有する。1つの態様において、重鎖定常領域はSEQ ID NO:34のアミノ酸配列を有する。1つの態様において、重鎖定常領域はSEQ ID NO:36のアミノ酸配列を有する。

【０１３６】

一態様において、第1の結合剤は、

a. SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むVH領域
b. SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列を含むVL領域
c. SEQ ID NO:15に示されるアミノ酸配列を含むCH領域および
d. SEQ ID NO:16に示されるアミノ酸配列を含むCL領域

を含む。

【０１３７】

別の態様において、第1の結合剤は、

a. SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むVH領域
b. SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列を含むVL領域
c. SEQ ID NO:12に示されるアミノ酸配列を含むCH領域および

d．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１６に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１３８】
別の態様において、第１の結合剤は、
a．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
b．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
c．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１３に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
d．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１６に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１３９】
別の態様において、第１の結合剤は、
a．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
b．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
c．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１４に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
d．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１６に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１４０】
別の態様において、第１の結合剤は、
a．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
b．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
c．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１８に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
d．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１６に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１４１】
別の態様において、第１の結合剤は、
a．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
b．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
c．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１９に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
d．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１６に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１４２】
別の態様において、第１の結合剤は、
a．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
b．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
c．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:２０に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
d．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１６に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１４３】
別の態様において、第１の結合剤は、
a．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
b．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
c．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:２１に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
d．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１６に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１４４】
別の態様において、第１の結合剤は、
a．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
b．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
c．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:２２に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
d．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１６に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域

を含む。
【０１４５】
別の態様において、第１の結合剤は、
ａ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
ｂ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
ｃ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:２３に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
ｄ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１６に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１４６】
別の態様において、第１の結合剤は、
ａ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
ｂ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
ｃ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:２７に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
ｄ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１６に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１４７】
別の態様において、第１の結合剤は、
ａ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
ｂ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
ｃ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:２８に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
ｄ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１６に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１４８】
別の態様において、第１の結合剤は、
ａ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
ｂ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
ｃ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:２９に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
ｄ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１６に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１４９】
別の態様において、第１の結合剤は、
ａ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
ｂ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
ｃ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:３０に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
ｄ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１６に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１５０】
別の態様において、第１の結合剤は、
ａ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
ｂ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
ｃ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:３１に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
ｄ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１６に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１５１】
別の態様において、第１の結合剤は、
ａ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
ｂ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
ｃ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:３２に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
ｄ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１６に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。

【０１５２】
別の態様において、第１の結合剤は、
ａ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
ｂ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
ｃ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:３３に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
ｄ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１６に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１５３】
別の態様において、第１の結合剤は、
ａ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
ｂ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
ｃ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:３４に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
ｄ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１６に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１５４】
別の態様において、第１の結合剤は、
ａ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
ｂ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
ｃ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:３６に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
ｄ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１６に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１５５】
上記第１の結合剤の代替的な態様において、ＣＬ領域は、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１７に示されるアミノ酸配列であってもよい。
【０１５６】
一態様において、第１の結合剤は、
ｅ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
ｆ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
ｇ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１５に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
ｈ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１７に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１５７】
別の態様において、第１の結合剤は、
ｅ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
ｆ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
ｇ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１２に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
ｈ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１７に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１５８】
別の態様において、第１の結合剤は、
ｅ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
ｆ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
ｇ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１３に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
ｈ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１７に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１５９】
別の態様において、第１の結合剤は、
ｅ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
ｆ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
ｇ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１４に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および

h．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１７に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１６０】
別の態様において、第１の結合剤は、
e．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
f．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
g．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１８に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
h．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１７に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１６１】
別の態様において、第１の結合剤は、
e．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
f．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
g．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１９に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
h．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１７に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１６２】
別の態様において、第１の結合剤は、
e．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
f．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
g．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:２０に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
h．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１７に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１６３】
別の態様において、第１の結合剤は、
e．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
f．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
g．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:２１に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
h．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１７に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１６４】
別の態様において、第１の結合剤は、
e．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
f．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
g．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:２２に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
h．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１７に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１６５】
別の態様において、第１の結合剤は、
e．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
f．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
g．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:２３に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
h．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１７に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１６６】
別の態様において、第１の結合剤は、
e．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
f．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
g．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:２７に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
h．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１７に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域

を含む。
【０１６７】
別の態様において、第１の結合剤は、
ｅ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
ｆ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
ｇ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:２８に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
ｈ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１７に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１６８】
別の態様において、第１の結合剤は、
ｅ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
ｆ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
ｇ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:２９に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
ｈ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１７に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１６９】
別の態様において、第１の結合剤は、
ｅ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
ｆ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
ｇ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:３０に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
ｈ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１７に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１７０】
別の態様において、第１の結合剤は、
ｅ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
ｆ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
ｇ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:３１に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
ｈ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１７に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１７１】
別の態様において、第１の結合剤は、
ｅ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
ｆ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
ｇ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:３２に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
ｈ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１７に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１７２】
別の態様において、第１の結合剤は、
ｅ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
ｆ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
ｇ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:３３に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
ｈ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１７に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１７３】
別の態様において、第１の結合剤は、
ｅ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
ｆ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
ｇ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:３４に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
ｈ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１７に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。

【０１７４】
別の態様において、第１の結合剤は、
ｅ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
ｆ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
ｇ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:３６に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
ｈ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１７に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１７５】
別の態様において、第１の結合剤は、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:２４に示されるアミノ酸配列を含む重鎖およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:２５に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。
【０１７６】
別の態様において、第１の結合剤は、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:３５に示されるアミノ酸配列を含む重鎖およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:２５に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。
【０１７７】
さらに別の態様において、第１の結合剤は、改変を除いて同一の第１の結合剤と比べてより低い程度までＦｃ媒介性エフェクター機能を第１の結合剤が誘導するように改変された重鎖定常領域を含む。その例は、Ｐ３２９ＲおよびＥ３４５Ｒ置換を含む本発明のＣＤ２７結合性抗体である。そのような抗体は、Ｐ３２９Ｒ置換を含まないことを除いて同じ配列を含む抗体と比較して、そしてまたＰ３２９ＲおよびＥ３４５Ｒ置換を含まないことを除いて同じ配列を含む同じ抗体、例えば野生型ＩｇＧ１重鎖と比較して、より低い程度まで１つまたは複数のＦｃ媒介性エフェクター機能を誘導する。１つの態様において、Ｆｃ媒介性エフェクター機能は少なくとも２０％減少している。別の態様において、Ｆｃ媒介性エフェクター機能は少なくとも３０％減少している。別の態様において、Ｆｃ媒介性エフェクター機能は少なくとも４０％減少している。別の態様において、Ｆｃ媒介性エフェクター機能は少なくとも５０％減少している。別の態様において、Ｆｃ媒介性エフェクター機能は少なくとも６０％減少している。別の態様において、Ｆｃ媒介性エフェクター機能は少なくとも７０％減少している。別の態様において、Ｆｃ媒介性エフェクター機能は少なくとも８０％減少している。別の態様において、Ｆｃ媒介性エフェクター機能は少なくとも９０％減少している。別の態様において、第１の結合剤は、１つまたは複数のＦｃ媒介性エフェクター機能を誘導しない。減少しているかまたは全く誘導されない１つまたは複数のＦｃエフェクター機能は、以下の群:補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）、補体依存性細胞媒介性細胞傷害（ＣＤＣＣ）、補体活性化、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ＡＤＣＣ）、抗体依存性細胞媒介性ファゴサイトーシス（ＡＤＣＰ）、Ｃ１ｑ結合、およびＦｃγＲ結合より選択されてもよい。よって、１つの態様において、第１の結合剤は、野生型ＩｇＧ１ ＨＣ定常領域を除いて同一の第１の結合剤と比べて少なくとも２０％、例えば少なくとも３０％、または少なくとも４０％、または少なくとも５０％、または少なくとも６０％、または少なくとも７０％、または少なくとも８０％減少しているか、または少なくとも９０％減少している程度までＣＤＣを誘導する。別の態様において、第１の結合剤はＣＤＣＣを誘導しない。
【０１７８】
別の態様において、第１の結合剤は、野生型ＩｇＧ１ ＨＣ定常領域を有することを除いて同一の第１の結合剤と比べて少なくとも２０％、例えば少なくとも３０％、または少なくとも４０％、または少なくとも５０％、または少なくとも６０％、または少なくとも７０％、または少なくとも８０％減少しているか、または少なくとも９０％減少している程度までＣＤＣＣを誘導する。別の態様において、本発明の第１の結合剤はＣＤＣＣを誘導しない。
【０１７９】
別の態様において、第１の結合剤は、野生型ＩｇＧ１ ＨＣ定常領域を有することを除いて同一の第１の結合剤と比べて少なくとも２０％、例えば少なくとも３０％、または少なくとも４０％、または少なくとも５０％、または少なくとも６０％、または少なくとも７０％、または少なくとも８０％減少しているか、または少なくとも９０％減少している程度までＡＤＣＣを誘導する。別の態様において、第１の結合剤はＡＤＣＣを誘導しない。

【０１８０】
別の態様において、第1の結合剤は、野生型IgG1 HC定常領域を有することを除いて同一の第1の結合剤と比べて少なくとも20%、例えば少なくとも30%、または少なくとも40%、または少なくとも50%、または少なくとも60%、または少なくとも70%、または少なくとも80%減少しているか、または少なくとも90%減少している程度までADCPを誘導する。別の態様において、第1の結合剤はADCPを誘導しない。
【０１８１】
別の態様において、第1の結合剤は、野生型IgG1 HC定常領域を有することを除いて同一の第1の結合剤と比べて少なくとも20%、例えば少なくとも30%、または少なくとも40%、または少なくとも50%、または少なくとも60%、または少なくとも70%、または少なくとも80%減少しているか、または少なくとも90%減少している程度までC1q結合を誘導する。別の態様において、第1の結合剤はC1q結合を誘導しない。好ましくはC1q結合は実施例8におけるように決定される。
【０１８２】
別の態様において、第1の結合剤は、野生型IgG1 HC定常領域を有することを除いて同一の第1の結合剤と比べて少なくとも20%、例えば少なくとも30%、または少なくとも40%、または少なくとも50%、または少なくとも60%、または少なくとも70%、または少なくとも80%減少しているか、または少なくとも90%減少している程度までFcγR結合を誘導する。別の態様において、本発明の第1の結合剤はFcγR結合を誘導しない。好ましくはFcγR結合は実施例9におけるように決定される。
【０１８３】
1つの態様において、第1の結合剤は、P329R置換を含まないことを除いて同じアミノ酸配列を含む第1の結合剤と比較して低減されたC1q結合および低減されたFcγR結合を有する。
【０１８４】
1つの態様において、第1の結合剤は、記載される突然変異を除いて、ヒト抗体である。
【０１８５】
本発明の一態様において、第1の結合剤は一価抗体である。
【０１８６】
別の態様において、第1の結合剤は二価抗体である。
【０１８７】
さらに、第1の結合剤は単一特異性抗体であってもよい。
【０１８８】
1つの態様において、第1の結合剤は、モノクローナル抗体、例えばヒトモノクローナル抗体、例えばヒト二価モノクローナル抗体、例えばヒト二価全長モノクローナル抗体である。
【０１８９】
好ましい態様において、第1の結合剤は、Fc領域中の任意の記載される突然変異を除いて、IgG1抗体、例えば全長IgG1抗体、例えばヒト全長IgG1抗体、任意でヒトモノクローナル全長二価IgG1,κ抗体、例えばヒトモノクローナル全長二価IgG1m（f）,κ抗体である。
【０１９０】
本発明に係る第1の結合剤は、有利には、同じエピトープに結合する2つの抗原結合領域を含む、二価単一特異性様式である。しかしながら、抗原結合領域の1つが異なるエピトープに結合する二重特異性様式もまた想定される。そのため、本明細書における任意の局面または態様にしたがう第1の結合剤は、文脈に矛盾しなければ、単一特異性抗体または二重特異性抗体のいずれかであることができる。
【０１９１】
よって、別の態様において、第1の結合剤は、本明細書に記載されているヒトCD27に結合する能力を有する第1の抗原結合領域と、ヒトCD27上の異なるエピトープに結合す

る能力を有する第2の抗原結合領域とを含む二重特異性抗体である。別の態様において、第1の結合剤は、本明細書に記載されているヒトCD27に結合する能力を有する第1の抗原結合領域と、異なる標的に結合する能力を有する第2の抗原結合領域とを含む二重特異性抗体である。そのような標的は、CD27と異なる細胞上または同じ細胞上にあってもよい。

【０１９２】

本発明の一態様において、第1の結合剤は、SEQ ID NO:1に示されている配列を有するヒトCD27に結合する能力を有する。しかしながら、ヒトCD27は、一部の個体において、そのバリアントとして発現され得る。そのため、別の態様において、本発明の第1の結合剤は、ヒトCD27バリアント、例えばSEQ ID NO:2に示されているヒトCD27バリアントなどに結合する能力をさらに有する。別の態様において、本発明の第1の結合剤は、SEQ ID NO:3に示されるものなどの、カニクイザルCD27に結合する能力をさらに有する。

【０１９３】

本発明のさらなる態様において、第1の結合剤は、CD27発現ヒトT細胞に結合する能力を有する。

【０１９４】

本発明の別の態様において、第1の結合剤は、CD27発現カニクイザルT細胞に結合する能力を有する。

【０１９５】

本発明の1つの態様において、全長IgG1抗体は、HCのC末端リジンが切断されている。そのような抗体は「全長抗体」とも考えられる。

【０１９６】

本発明の別の態様において、第1の結合剤は、ヒトT細胞、例えばCD4$^+$およびCD8$^+$T細胞、例えばヘルパーT細胞および細胞傷害性T細胞の増殖を誘導する能力を有する。そのような活性は、本明細書における実施例6または7に記載されるようにアッセイされてもよい。

【０１９７】

本発明の別の態様において、第1の結合剤は、本明細書の実施例2に記載されているものなどのヒトCD27発現Jurkatレポーター T細胞の活性化を誘導する能力を有する。

【０１９８】

本発明の別の態様において、第1の結合剤は、本明細書の実施例11に記載されているものなどのFcγ受容体IIb架橋の非存在下のヒトCD27発現Jurkatレポーター T細胞の活性化を誘導する能力を有する。

【０１９９】

本発明の別の態様において、第1の結合剤は、セントラルメモリーT細胞表現型を有するCD4＋およびCD8$^+$T細胞の増殖を誘導する能力を有する。

【０２００】

本発明の別の態様において、第1の結合剤は、IFNガンマの産生を誘導する能力を有する。

【０２０１】

本発明の別の態様において、第1の結合剤は、アセテート、ソルビトール、ポリソルベート80を含む組成物または製剤中にあり、かつ5～6、好ましくは5.5のpHを有する。

【０２０２】

<u>CD40およびCD137に結合する第2の結合剤</u>

1つの態様において、CD40は、ヒトCD40、特にSEQ ID NO:62に示される配列を含むヒトCD40である。1つの態様において、CD137は、ヒトCD137、特にSEQ ID NO:63に示される配列を含むヒトCD137である。

【０２０３】

第2の結合剤の1つの態様において、第2の結合剤は、CD40に結合する第1の結合領域

およびCD137に結合する第2の結合領域を含む。

【０２０４】

第2の結合剤の1つの態様において、a）第2の結合剤の第1の結合領域は、それぞれSEQ ID NO:44、45、および46に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む重鎖可変領域（VH）、ならびにそれぞれSEQ ID NO:47、YTS、およびSEQ ID NO:48に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含み;かつb）第2の結合剤の第2の結合領域は、それぞれSEQ ID NO:51、52、および53に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む重鎖可変領域（VH）、ならびにそれぞれSEQ ID NO:54、GAS、およびSEQ ID NO:55に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含む。

【０２０５】

第2の結合剤の1つの態様において、a）第2の結合剤の第1の結合領域は、SEQ ID NO:49に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（VH）およびSEQ ID NO:50に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（VL）領域を含み;

かつ

b）第2の結合剤の第2の結合領域は、SEQ ID NO:56に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（VH）およびSEQ ID NO:57に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（VL）領域を含む。

【０２０６】

第2の結合剤の1つの態様において、第2の結合剤は、多特異性抗体、例えば二重特異性抗体である。

【０２０７】

第2の結合剤の1つの態様において、第2の結合剤は、全長抗体または抗体断片の様式である。

【０２０８】

第2の結合剤の1つの態様において、第2の結合剤は、第1の結合アームおよび第2の結合アームを含む抗体であり、第1の結合アームは、

i）前記第1の重鎖可変領域（VH）および第1の重鎖定常領域（CH）を含むポリペプチド、ならびに

ii）前記第1の軽鎖可変領域（VL）および第1の軽鎖定常領域（CL）を含むポリペプチド

を含み;

かつ第2の結合アームは、

iii）前記第2の重鎖可変領域（VH）および第2の重鎖定常領域（CH）を含むポリペプチド、ならびに

iv）前記第2の軽鎖可変領域（VL）および第2の軽鎖定常領域（CL）を含むポリペプチド

を含む。

【０２０９】

第2の結合剤の1つの態様において、第2の結合剤は、

i）CD40に結合する能力を有する前記第1の結合領域を含む第1の重鎖および軽鎖であって、第1の重鎖が第1の重鎖定常領域を含み、かつ第1の軽鎖が第1の軽鎖定常領域を含む、第1の重鎖および軽鎖;ならびに

ii）CD137に結合する能力を有する前記第2の結合領域を含む第2の重鎖および軽鎖であって、第2の重鎖が第2の重鎖定常領域を含み、かつ第2の軽鎖が第2の軽鎖定常領域を含む、第2の重鎖および軽鎖

を含む。

【０２１０】

第2の結合剤の1つの態様において、（i）EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置におけるアミノ酸は前記第1の重鎖定常領域（CH）においてLであり、か

つEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置におけるアミノ酸は前記第2の重鎖定常領域（CH）においてRであるか、または（ii）EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置におけるアミノ酸は前記第1の重鎖においてRであり、かつEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置におけるアミノ酸は前記第2の重鎖においてLである。

【０２１１】

第2の結合剤の1つの態様において、EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置は、前記第1および第2の重鎖においてそれぞれFおよびEである。

【０２１２】

第2の結合剤の1つの態様において、EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置は、前記第1および第2の重鎖定常領域（HC）においてそれぞれF、E、およびAである。

【０２１３】

第2の結合剤の1つの態様において、第1の重鎖定常領域および第2の重鎖定常領域の両方のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置はそれぞれFおよびEであり、かつ（i）第1の重鎖定常領域のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置はLであり、かつ第2の重鎖のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置はRであるか、または（ii）第1の重鎖定常領域のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置はRであり、かつ第2の重鎖のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置はLである。

【０２１４】

第2の結合剤の1つの態様において、第1の重鎖定常領域および第2の重鎖定常領域の両方のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置は、それぞれF、E、およびAであり、かつ（i）第1の重鎖定常領域のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置はLであり、かつ第2の重鎖定常領域のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置はRであるか、または（ii）第1の重鎖のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置はRであり、かつ第2の重鎖のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置はLである。

【０２１５】

第2の結合剤の1つの態様において、前記第1および/または第2の重鎖、例えば第2の重鎖の定常領域は、

a）SEQ ID NO:58または60に示される配列［IgG1-Fc_FEAL］;

b）a）における配列の部分配列、例えば、a）において定義される配列のN末端またはC末端から開始して、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の連続するアミノ酸が欠失している、部分配列;および

c）a）またはb）において定義されるアミノ酸配列と比較して、最大で6個の置換、例えば最大で5個の置換、最大で4個の置換、最大で3個、最大で2個の置換または最大で1個の置換を有する配列

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むか、または該アミノ酸配列から本質的になるか、または該アミノ酸配列からなる。

【０２１６】

第2の結合剤の1つの態様において、前記第1および/または第2の重鎖、例えば第1の重鎖の定常領域は、

a）SEQ ID NO:59または61に示される配列［IgG1-Fc_FEAR］;

b）a）における配列の部分配列、例えば、a）において定義される配列のN末端またはC末端から開始して、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の連続するアミノ酸が欠失している、部分配列;および

c）a）またはb）において定義されるアミノ酸配列と比較して、最大で6個の置換、例えば最大で5個の置換、最大で4個、最大で3個、最大で2個の置換または最大で1個の置

換を有する配列
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むか、または該アミノ酸配列から本質的になるか、または該アミノ酸配列からなる。
【０２１７】
第２の結合剤の１つの態様において、前記第２の結合剤はカッパ（κ）軽鎖定常領域を含む。
【０２１８】
第２の結合剤の１つの態様において、前記第２の結合剤はラムダ（λ）軽鎖定常領域を含む。
【０２１９】
第２の結合剤の１つの態様において、前記第１の軽鎖定常領域は、カッパ（κ）軽鎖定常領域またはラムダ（λ）軽鎖定常領域である。
【０２２０】
第２の結合剤の１つの態様において、前記第２の軽鎖定常領域は、ラムダ（λ）軽鎖定常領域またはカッパ（κ）軽鎖定常領域である。
【０２２１】
第２の結合剤の１つの態様において、前記第１の軽鎖定常領域はカッパ（κ）軽鎖定常領域でありかつ前記第２の軽鎖定常領域はラムダ（λ）軽鎖定常領域であるか、または前記第１の軽鎖定常領域はラムダ（λ）軽鎖定常領域でありかつ前記第２の軽鎖定常領域はカッパ（κ）軽鎖定常領域である。
【０２２２】
第２の結合剤の１つの態様において、カッパ（κ）軽鎖は、
ａ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１６に示される配列、
ｂ）ａ）における配列の部分配列、例えば、ａ）において定義される配列のＮ末端またはＣ末端から開始して、１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０個の連続するアミノ酸が欠失している、部分配列;および
ｃ）ａ）またはｂ）において定義されるアミノ酸配列と比較して、最大で１０個の置換、例えば最大で９個の置換、最大で８個、最大で７個、最大で６個、最大で５個、最大で４個の置換、最大で３個、最大で２個の置換または最大で１個の置換を有する配列
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。
【０２２３】
第１の局面に従う第２の結合剤の１つの態様において、ラムダ（λ）軽鎖は、
ａ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１７に示される配列、
ｂ）ａ）における配列の部分配列、例えば、ａ）において定義される配列のＮ末端またはＣ末端から開始して、１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０個の連続するアミノ酸が欠失している、部分配列;および
ｃ）ａ）またはｂ）において定義されるアミノ酸配列と比較して、最大で１０個の置換、例えば最大で９個の置換、最大で８個、最大で７個、最大で６個、最大で５個、最大で４個の置換、最大で３個、最大で２個の置換または最大で１個の置換を有する配列
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。
【０２２４】
第１の局面に従う第２の結合剤の１つの態様において、第２の結合剤は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、およびＩｇＧ４からなる群より選択されるアイソタイプである。
【０２２５】
第１の局面に従う第２の結合剤の１つの態様において、第２の結合剤は全長ＩｇＧ１抗体である。
【０２２６】
第１の局面に従う第２の結合剤の１つの態様において、第２の結合剤はＩｇＧ１ｍ（ｆ）アロタイプの抗体である。
【０２２７】

1つの態様において、第2の結合剤は、CD40およびCD137に結合する二重特異性抗体であり、二重特異性抗体は、i）SEQ ID NO:64に示されるアミノ酸配列を含む第1の重鎖およびSEQ ID NO:65に示されるアミノ酸配列を含む第1の軽鎖、ならびにii）SEQ ID NO:66に示されるアミノ酸配列を含む第2の重鎖およびSEQ ID NO:67に示されるアミノ酸配列を含む第2の軽鎖を有する。

【0228】

対象および処置される腫瘍またはがん

本開示にしたがって処置される対象は好ましくはヒト対象である。

【0229】

1つの態様において、腫瘍またはがんは固形腫瘍である。

【0230】

1つの態様において、前記腫瘍はPD-L1陽性腫瘍である。

【0231】

1つの態様において、腫瘍またはがんは、頭頸部扁平上皮細胞癌（HNSCC）、例えば口腔、咽頭または喉頭のHNSCCである。

【0232】

1つの態様において、HNSCCは、再発性、切除不能性または転移性である。

【0233】

1つの態様において、腫瘍またはがんは、非小細胞肺がん（NSCLC）、例えば扁平上皮または非扁平上皮NSCLCである。

【0234】

1つの態様において、NSCLCは、再発性、切除不能性または転移性である。

【0235】

1つの態様において、NSCLCは、上皮増殖因子（EGFR）増感性突然変異および/または未分化リンパ腫（ALK）転座および/またはROS1再編成を有しない。

【0236】

1つの態様において、NSCLCは、NTRK1/2/3（神経栄養因子受容体チロシンキナーゼ1/2/3）融合陽性であり、かつ/またはKRAS（KRASがん原遺伝子、GTPase）、BRAF（B-Rafがん原遺伝子、セリン/スレオニンキナーゼ）、もしくはMET（METがん原遺伝子、受容体チロシンキナーゼ）遺伝子中に突然変異を有し、かつ/またはRET（retがん原遺伝子）遺伝子再編成を有し、かつ対象は、それぞれの標的指向型療法での以前の処置を受けている。

【0237】

1つの態様において、対象は、PD-1阻害剤またはPD-L1阻害剤、例えば抗PD-1抗体または抗PD-L1抗体、好ましくは少なくとも2用量のPD-1阻害剤またはPD-L1阻害剤での以前の処置を受けている。

【0238】

1つの態様において、対象は、白金ベース療法、または白金が不適格な場合に代替的な化学療法、例えばゲムシタビン含有レジメンでの以前の処置を受けている。

【0239】

1つの態様において、腫瘍またはがんは、処置、例えばチェックポイント阻害剤での全身処置後に、再発および/または進行したものである。

【0240】

1つの態様において、対象は、全身療法、例えばPD-1阻害剤またはPD-L1阻害剤、例えば抗PD-1抗体または抗PD-L1抗体を含む全身療法の、少なくとも1つの以前のラインを受けている。

【0241】

1つの態様において、がんまたは腫瘍は、再発しているかつ/もしくは難治性であるか、または対象は、単剤療法としてもしくは併用療法の一部として投与されるPD-1阻害剤もしくはPD-L1阻害剤、例えば抗PD-1抗体もしくは抗PD-L1抗体での処置後に進行し

ている。
【０２４２】
1つの態様において、以前の最後の処置は、単剤療法としてまたは併用療法の一部として投与されるPD1阻害剤またはPD-L1阻害剤、例えば抗PD-1抗体または抗PD-L1抗体での処置であった。
【０２４３】
1つの態様において、PD-1阻害剤またはPD-L1阻害剤、例えば抗PD-1抗体または抗PD-L1抗体での最後の処置における進行からの時間は6か月またはそれ未満である。
【０２４４】
1つの態様において、以前の最後の処置の一部としてのPD-1阻害剤またはPD-L1阻害剤、例えば抗PD-1抗体または抗PD-L1抗体の最後の投薬からの時間は6か月またはそれ未満である。
【０２４５】
1つの態様において、がんまたは腫瘍は、再発しているかつ/もしくは難治性であるか、または対象は、i）抗PD-1抗体もしくは抗PD-L1抗体での処置後のプラチナダブレット化学療法、またはii）プラチナダブレット化学療法後の抗PD-1抗体もしくは抗PD-L1抗体での処置の間または後に進行している。
【０２４６】
第2の局面において、本開示は、i）CD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む第1の結合剤ならびにii）CD40に結合する第1の結合領域およびCD137に結合する第2の結合領域を含む第2の結合剤を含む、キットを提供する。
【０２４７】
第2の局面に係るキットの1つの態様において、第1の結合剤は、本開示の任意の局面または態様において定義される通りである。
【０２４８】
第2の局面に係るキットの1つの態様において、第2の結合剤は、本開示の任意の局面または態様において定義される通りである。
【０２４９】
第2の局面に係るキットの1つの態様において、第1の結合剤、第2の結合剤、および、存在する場合に、1つまたは複数の追加の治療剤は、全身投与のため、特に注射または注入、例えば静脈内注射または注入のためのものである。
【０２５０】
第3の局面において、本開示は、対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法における使用のためのキットであって、i）CD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む第1の結合剤ならびにii）CD40に結合する第1の結合領域およびCD137に結合する第2の結合領域を含む第2の結合剤を含む、キットを提供する。
【０２５１】
第3の局面に係る使用のためのキットの1つの態様において、キットは、本開示の任意の局面または態様において定義される通りである。
【０２５２】
第3の局面に係る使用のためのキットの1つの態様において、腫瘍またはがんは、本開示の任意の局面または態様において定義される通りである。
【０２５３】
第3の局面に係る使用のためのキットの1つの態様において、対象は、本開示の任意の局面または態様において定義される通りである。
【０２５４】
第3の局面に係る使用のためのキットの1つの態様において、方法は、本開示の任意の局面または態様において定義される通りである。
【０２５５】

第4の局面において、本開示は、i）CD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む第1の結合剤;ii）CD40に結合する第1の結合領域およびCD137に結合する第2の結合領域を含む第2の結合剤;ならびにiii）任意で、薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物を提供する。

【０２５６】

第4の局面に係る薬学的組成物の1つの態様において、第1の結合剤は、本開示の任意の局面または態様において定義される通りである。

【０２５７】

第4の局面に係る薬学的組成物の1つの態様において、第2の結合剤は、本開示の任意の局面または態様において定義される通りである。

【０２５８】

第5の局面において、本開示は、対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法における使用のための薬学的組成物であって、i）CD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む第1の結合剤、ii）CD40に結合する第1の結合領域およびCD137に結合する第2の結合領域を含む第2の結合剤、ならびにiii）任意で、薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物を提供する。

【０２５９】

第5の局面に係る使用のための薬学的組成物の1つの態様において、薬学的組成物は、本開示の任意の局面または態様において定義される通りである。

【０２６０】

第5の局面に係る使用のための薬学的組成物の1つの態様において、腫瘍またはがんは、本開示の任意の局面または態様において定義される通りである。

【０２６１】

第5の局面に係る使用のための薬学的組成物の1つの態様において、対象は、本開示の任意の局面または態様において定義される通りである。

【０２６２】

第5の局面に係る使用のための薬学的組成物の1つの態様において、方法は、本開示の任意の局面または態様において定義される通りである。

【０２６３】

第6の局面において、本開示は、対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法における使用のための第1の結合剤であって、該方法が、i）CD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む第1の結合剤;ならびにii）CD40に結合する第1の結合領域およびCD137に結合する第2の結合領域を含む第2の結合剤を該対象に投与する工程を含む、第1の結合剤を提供する。

【０２６４】

第6の局面に係る使用のための第1の結合剤の1つの態様において、方法は、本開示の任意の局面または態様において定義される通りである。

【０２６５】

第6の局面に係る使用のための第1の結合剤の1つの態様において、第1の結合剤は、本開示の任意の局面または態様において定義される通りである。

【０２６６】

第6の局面に係る使用のための第1の結合剤の1つの態様において、第2の結合剤は、本開示の任意の局面または態様において定義される通りである。

【０２６７】

第7の局面において、本開示は、対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法における使用のための第2の結合剤であって、該方法が、i）CD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む第1の結合剤;ならびにii）CD40に結合する第1の結合領域およびCD137に結合する第2の結合領域を含む第2の結合剤を該対象に投与する工程を含む、第2の結合剤を提供する。

【０２６８】

第7の局面に係る使用のための第2の結合剤の1つの態様において、方法は、本開示の任意の局面または態様において定義される通りである。

【０２６９】

第7の局面に係る使用のための第2の結合剤の1つの態様において、第1の結合剤は、本開示の任意の局面または態様において定義される通りである。

【０２７０】

第7の局面に係る使用のための第2の結合剤の1つの態様において、第2の結合剤は、本開示の任意の局面または態様において定義される通りである。

【０２７１】

本明細書において参照される文献および研究の参照は、以上のいずれかが関連する先行技術であるという承認として意図されるものではない。これらの文献の内容に関するすべての陳述は、本出願人に利用可能な情報に基づき、これらの文献の内容の正確性に関するいかなる承認も構成しない。

【０２７２】

記載（以下の例を含む）は、当業者が様々な態様を製造および使用することを可能にするために提示される。特定のデバイス、技術、および応用の記載は、例としてのみ提供される。本明細書に記載される例に対する様々な修飾は、当業者に容易に明らかであり、本明細書において定義される一般的な原理は、様々な態様の精神および範囲から離れることなく他の例および応用に適用され得る。そのため、様々な態様は、本明細書に記載および示される例に限定されることは意図されず、請求項と一貫する範囲にかなっている。

【０２７３】

本開示の項目

1．（i）CD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む第1の結合剤;ならびに
（ii）CD40に結合する第1の結合領域およびCD137に結合する第2の結合領域を含む第2の結合剤
を対象に投与する工程を含む、対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法。

【０２７４】

2．前記第1の結合剤が、それぞれSEQ ID NO:5、6、および7に示されている配列を含む重鎖可変（VH）領域CDR1、CDR2、およびCDR3、ならびにそれぞれSEQ ID NO:9、10および11に示されている配列を含む軽鎖可変（VL）領域CDR1、CDR2、およびCDR3を含む、項目1の方法。

【０２７５】

3．前記第1の結合剤が、ヒトCD27に結合する能力を有する2つの結合領域を含み、前記第1の結合剤が、それぞれSEQ ID NO:5、6、および7に示されている配列を含む重鎖可変（VH）領域CDR1、CDR2、およびCDR3、ならびにそれぞれSEQ ID NO:9、10および11に示されている配列を含む軽鎖可変（VL）領域CDR1、CDR2、およびCDR3を含む、項目1または2の方法。

【０２７６】

4．前記第1の結合剤が、SEQ ID NO:4に示されている配列を含むVH領域を含む、前記項目のいずれかの方法。

【０２７７】

5．前記第1の結合剤が、SEQ ID NO:8に示されている配列を含むVL領域を含む、前記項目のいずれかの方法。

【０２７８】

6．前記第1の結合剤が、それぞれSEQ ID NO:4およびSEQ ID NO:8に示されている配列を含むVH領域およびVL領域を含む、前記項目のいずれかの方法。

【０２７９】

7．前記第1の結合剤が、抗体、好ましくはヒト抗体またはヒト化抗体である、前記項目のいずれかの方法。

【０２８０】
8．前記抗体が、軽鎖定常領域（ＣＬ）および重鎖定常領域（ＣＨ）をさらに含む全長抗体である、前記項目のいずれかの方法。
【０２８１】
9．前記軽鎖定常領域がヒトカッパである、項目8の方法。
【０２８２】
10．前記軽鎖定常領域がヒトラムダである、項目8の方法。
【０２８３】
11．前記第1の結合剤が重鎖定常領域をさらに含み、該重鎖定常領域が、ヒトIgGアイソタイプであり、かつ任意で、改変されたヒトIgGである、前記項目のいずれかの方法。
【０２８４】
12．前記ヒトIgGまたは改変されたヒトIgGが、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4、例えばヒトIgG1より選択される、項目11の方法。
【０２８５】
13．前記IgGが、1つまたは複数のアミノ酸置換を含む改変されたヒトIgGである、項目11または12の方法。
【０２８６】
14．前記改変されたヒトIgGが、1つまたは複数のアミノ酸置換、例えば2つ以上のアミノ酸置換を含む、改変されたヒトIgG1である、項目11～13のいずれかの方法。
【０２８７】
15．前記改変されたヒトIgG重鎖定常領域が、最大で10個のアミノ酸置換、例えば最大で9個、例えば最大で8個、例えば最大で7個、例えば最大で6個、例えば最大で5個、例えば最大で4個、例えば最大で3個、例えば最大で2個のアミノ酸置換を含む、項目11～14のいずれかの方法。
【０２８８】
16．重鎖定常領域中の前記置換が、野生型IgG1抗体重鎖定常領域を含むことを除いて同一の抗体と比較してCD27アゴニズムの増加を誘導する、項目11～15のいずれかの方法。
【０２８９】
17．Eu番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置E345またはE430に対応する位置におけるアミノ酸残基が、A、C、D、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、WおよびYを含む群より選択される、項目11～16のいずれかの方法。
【０２９０】
18．Eu番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置E345に対応する位置におけるアミノ酸残基がRである、項目11～17のいずれかの方法。
【０２９１】
19．Eu番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置E430に対応する位置におけるアミノ酸残基がGである、項目11～18のいずれかの方法。
【０２９２】
20．Eu番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置P329に対応する位置におけるアミノ酸残基がRである、項目11～19のいずれかの方法。
【０２９３】
21．Eu番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置E345およびP329に対応する位置におけるアミノ酸残基が両方ともRである、項目11～20のいずれかの方法。
【０２９４】
22．前記第1の結合剤が、野生型IgG1重鎖定常領域を含む親抗体と同様の薬物動態プロファイルを有する、項目11～21のいずれかの方法。
【０２９５】
23．前記第1の結合剤が、SEQ ID NO:12、13、14、15、18、19、20、21、22、23、27、28、29、30、31、32、33、34および36を含む群より選択される配列を含

む重鎖定常領域を含む、前記項目のいずれかの方法。
【０２９６】
24．前記第1の結合剤が、SEQ ID NO:15に示されている配列を含む重鎖定常領域を含む、前記項目のいずれかの方法。
【０２９７】
25．前記第1の結合剤が重鎖定常領域を含み、該重鎖定常領域が、前記第1の結合剤が親抗体と比べてより低い程度まで1つまたは複数のFc媒介性エフェクター機能を誘導するように改変されている、前記項目のいずれかの方法。
【０２９８】
26．前記1つまたは複数のFc媒介性エフェクター機能が、少なくとも20％、例えば少なくとも30％または少なくとも40％、または少なくとも50％または少なくとも60％または少なくとも70％、または少なくとも80％または少なくとも90％減少している、項目25の方法。
【０２９９】
27．前記第1の結合剤が1つまたは複数のFc媒介性エフェクター機能を誘導しない、項目25または26の方法。
【０３００】
28．前記1つまたは複数のFc媒介性エフェクター機能が、以下の群:
補体依存性細胞傷害（CDC）、補体依存性細胞媒介性細胞傷害（CDCC）、補体活性化、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）、抗体依存性細胞媒介性ファゴサイトーシス（ADCP）、C1q結合、およびFcγR結合
より選択される、項目25～27のいずれかの方法。
【０３０１】
29．前記第1の結合剤が、実施例8の方法により測定された場合にC1q結合を誘導しない、項目25～28のいずれかの方法。
【０３０２】
30．前記第1の結合剤が一価抗体である、前記項目のいずれかの方法。
【０３０３】
31．前記第1の結合剤が二価抗体である、前記項目のいずれかの方法。
【０３０４】
32．前記第1の結合剤が単一特異性抗体である、前記項目のいずれかの方法。
【０３０５】
33．前記第1の結合剤が、前記項目のいずれかのヒトCD27に結合する能力を有する第1の抗原結合領域と、ヒトCD27上の異なるエピトープに結合する能力を有するかまたは異なる標的に結合する能力を有する第2の抗原結合領域とを含む二重特異性抗体である、前記項目のいずれかの方法。
【０３０６】
34．CD27がヒトCD27であり、特に、該ヒトCD27が、SEQ ID NO:1に示されている配列またはSEQ ID NO:2に示されているヒトCD27バリアントを含む、前記項目のいずれかの方法。
【０３０７】
35．前記第1の結合剤が、
a．SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むVH領域;
b．SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列を含むVL領域;
c．SEQ ID NO:15に示されるアミノ酸配列を含むCH領域;および
d．SEQ ID NO:17に示されるアミノ酸配列を含むCL領域
を含む、前記項目のいずれかの方法。
【０３０８】
36．前記第1の結合剤が、SEQ ID NO:35に示されるアミノ酸配列を含む重鎖およびSEQ ID NO:25に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、前記項目のいずれかの方法。

【０３０９】
３７．前記第１の結合剤が、アセテート、ソルビトール、ポリソルベート８０を含む組成物または製剤中にあり、かつ５～６、好ましくは５.５のｐＨを有する、前記項目のいずれかの方法。
【０３１０】
３８．ＣＤ４０が、ヒトＣＤ４０、特にＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:６２に示される配列を含むヒトＣＤ４０であり、かつ/またはＣＤ１３７が、ヒトＣＤ１３７、特にＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:６３に示される配列を含むヒトＣＤ１３７である、前記項目のいずれかの方法。
【０３１１】
３９．（ａ）前記第２の結合剤の第１の結合領域が、それぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４４、４５、および４６に示されるＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）、ならびにそれぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４７、ＹＴＳ、およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４８に示されるＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み;かつ（ｂ）前記第２の結合剤の第２の結合領域が、それぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:５１、５２、および５３に示されるＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）、ならびにそれぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:５４、ＧＡＳ、およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:５５に示されるＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、前記項目のいずれかの方法。
【０３１２】
４０．（ａ）前記第２の結合剤の第１の結合領域が、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４９に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:５０に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）領域を含み;
かつ
（ｂ）前記第２の結合剤の第２の結合領域が、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:５６に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:５７に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）領域を含む、
前記項目のいずれかの方法。
【０３１３】
４１．前記第２の結合剤が、多特異性抗体、例えば二重特異性抗体である、前記項目のいずれかの方法。
【０３１４】
４２．前記第２の結合剤が、全長抗体または抗体断片の様式である、前記項目のいずれかの方法。
【０３１５】
４３．前記第２の結合剤が、第１の結合アームおよび第２の結合アームを含む抗体であり、
該第１の結合アームが、
（ｉ）前記第１の重鎖可変領域（ＶＨ）および第１の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチド、ならびに
（ｉｉ）前記第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第１の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド
を含み;
かつ第２の結合アームが、
（ｉｉｉ）前記第２の重鎖可変領域（ＶＨ）および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチド、ならびに
（ｉｖ）前記第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第２の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド
を含む、
前記項目のいずれかの方法。
【０３１６】
４４．前記第２の結合剤が、
（ｉ）ＣＤ４０に結合する能力を有する前記第１の結合領域を含む第１の重鎖および軽鎖で

あって、該第1の重鎖が第1の重鎖定常領域を含み、かつ該第1の軽鎖が第1の軽鎖定常領域を含む、第1の重鎖および軽鎖;ならびに
（ii）CD137に結合する能力を有する前記第2の結合領域を含む第2の重鎖および軽鎖であって、該第2の重鎖が第2の重鎖定常領域を含み、かつ該第2の軽鎖が第2の軽鎖定常領域を含む、第2の重鎖および軽鎖
を含む、前記項目のいずれかの方法。
【０３１７】
45．（i）EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置におけるアミノ酸が前記第1の重鎖定常領域（CH）においてLであり、かつEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置におけるアミノ酸が前記第2の重鎖定常領域（CH）においてRであるか、または（ii）EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置におけるアミノ酸が前記第1の重鎖においてRであり、かつEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置におけるアミノ酸が前記第2の重鎖においてLである、項目43または44の方法。
【０３１８】
46．EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置が、前記第1および第2の重鎖においてそれぞれFおよびEである、項目43～45のいずれかの方法。
【０３１９】
47．EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置が、前記第1および第2の重鎖定常領域（HC）においてそれぞれF、E、およびAである、項目43～46のいずれかの方法。
【０３２０】
48．前記第1および第2の重鎖定常領域の両方のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置がそれぞれFおよびEであり、かつ（i）前記第1の重鎖定常領域のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置がLであり、かつ前記第2の重鎖のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置がRであるか、または（ii）前記第1の重鎖定常領域のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置がRであり、かつ前記第2の重鎖のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置がLである、項目43～47のいずれかの方法。
【０３２１】
49．前記第1および第2の重鎖定常領域の両方のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置が、それぞれF、E、およびAであり、かつ（i）前記第1の重鎖定常領域のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置がLであり、かつ前記第2の重鎖定常領域のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置がRであるか、または（ii）前記第1の重鎖のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置がRであり、かつ前記第2の重鎖のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置がLである、項目43～48のいずれかの方法。
【０３２２】
50．前記第1および/または第2の重鎖、例えば第2の重鎖の定常領域が、
（a）SEQ ID NO:58または60に示される配列［IgG1-Fc_FEAL］;
（b）（a）における配列の部分配列、例えば、（a）において定義される配列のN末端またはC末端から開始して、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の連続するアミノ酸が欠失している、部分配列;および
（c）（a）または（b）において定義されるアミノ酸配列と比較して、最大で6個の置換、例えば最大で5個の置換、最大で4個の置換、最大で3個、最大で2個の置換または最大で1個の置換を有する配列
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むか、または該アミノ酸配列から本質的になるか、または該アミノ酸配列からなる、項目43～49のいずれかの方法。
【０３２３】

51．前記第1および/または第2の重鎖、例えば第1の重鎖の定常領域が、
（a）SEQ ID NO:59または61に示される配列［IgG1-Fc_FEAR］;
（b）（a）における配列の部分配列、例えば、（a）において定義される配列のN末端またはC末端から開始して、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の連続するアミノ酸が欠失している、部分配列;および
（c）（a）または（b）において定義されるアミノ酸配列と比較して、最大で6個の置換、例えば最大で5個の置換、最大で4個、最大で3個、最大で2個の置換または最大で1個の置換を有する配列
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むか、または該アミノ酸配列から本質的になるか、または該アミノ酸配列からなる、項目43～50のいずれかの方法。
【0324】
52．前記第2の結合剤がカッパ（κ）軽鎖定常領域を含む、項目43～51のいずれかの方法。
【0325】
53．前記第2の結合剤がラムダ（λ）軽鎖定常領域を含む、項目43～52のいずれかの方法。
【0326】
54．前記第1の軽鎖定常領域がカッパ（κ）軽鎖定常領域またはラムダ（λ）軽鎖定常領域である、項目43～53のいずれかの方法。
【0327】
55．前記第2の軽鎖定常領域がラムダ（λ）軽鎖定常領域またはカッパ（κ）軽鎖定常領域である、項目43～54のいずれかの方法。
【0328】
56．前記第1の軽鎖定常領域がカッパ（κ）軽鎖定常領域でありかつ前記第2の軽鎖定常領域がラムダ（λ）軽鎖定常領域であるか、または前記第1の軽鎖定常領域がラムダ（λ）軽鎖定常領域でありかつ前記第2の軽鎖定常領域がカッパ（κ）軽鎖定常領域である、項目43～55のいずれかの方法。
【0329】
57．前記カッパ（κ）軽鎖が、
（a）SEQ ID NO:16に示される配列、
（b）（a）における配列の部分配列、例えば、（a）において定義される配列のN末端またはC末端から開始して、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の連続するアミノ酸が欠失している、部分配列;および
（c）（a）または（b）において定義されるアミノ酸配列と比較して、最大で10個の置換、例えば最大で9個の置換、最大で8個、最大で7個、最大で6個、最大で5個、最大で4個の置換、最大で3個、最大で2個の置換または最大で1個の置換を有する配列
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、項目52～56のいずれかの方法。
【0330】
58．前記ラムダ（λ）軽鎖が、
（a）SEQ ID NO:17に示される配列、
（b）（a）における配列の部分配列、例えば、（a）において定義される配列のN末端またはC末端から開始して、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の連続するアミノ酸が欠失している、部分配列;および
（c）（a）または（b）において定義されるアミノ酸配列と比較して、最大で10個の置換、例えば最大で9個の置換、最大で8個、最大で7個、最大で6個、最大で5個、最大で4個の置換、最大で3個、最大で2個の置換または最大で1個の置換を有する配列
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、項目53～57のいずれかの方法。
【0331】
59．前記第2の結合剤が、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4からなる群より選択されるアイソタイプの結合剤である、前記項目のいずれかの方法。

【０３３２】
６０．前記第２の結合剤が全長IgG１抗体である、前記項目のいずれかの方法。
【０３３３】
６１．前記第２の結合剤がIgG１m（f）アロタイプの抗体である、前記項目のいずれかの方法。
【０３３４】
６２．前記第２の結合剤が、CD４０およびCD１３７に結合する二重特異性抗体であり、該二重特異性抗体が、（i）SEQ ID NO:６４に示されるアミノ酸配列を含む第１の重鎖およびSEQ ID NO:６５に示されるアミノ酸配列を含む第１の軽鎖、ならびに（ii）SEQ ID NO:６６に示されるアミノ酸配列を含む第２の重鎖およびSEQ ID NO:６７に示されるアミノ酸配列を含む第２の軽鎖を有する、前記項目のいずれかの方法。
【０３３５】
６３．（a）前記第１の結合剤が、それぞれSEQ ID NO:５、６、および７に示されている配列を含む重鎖可変（VH）領域CDR１、CDR２、およびCDR３、ならびにそれぞれSEQ ID NO:９、１０、および１１に示されている配列を含む軽鎖可変（VL）領域CDR１、CDR２、およびCDR３を含み;
（b）前記第２の結合剤の第１の結合領域が、それぞれSEQ ID NO:４４、４５、および４６に示されるCDR１、CDR２、およびCDR３配列を含む重鎖可変領域（VH）、ならびにそれぞれSEQ ID NO:４７、YTS、およびSEQ ID NO:４８に示されるCDR１、CDR２、およびCDR３配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含み;かつ
（c）前記第２の結合剤の第２の結合領域が、それぞれSEQ ID NO:５１、５２、および５３に示されるCDR１、CDR２、およびCDR３配列を含む重鎖可変領域（VH）、ならびにそれぞれSEQ ID NO:５４、GAS、およびSEQ ID NO:５５に示されるCDR１、CDR２、およびCDR３配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含む、
前記項目のいずれかの方法。
【０３３６】
６４．（a）前記第１の結合剤が、SEQ ID NO:４に示されるアミノ酸配列を含むVH領域、SEQ ID NO:８に示されるアミノ酸配列を含むVL領域を含み;
（b）前記第２の結合剤の第１の結合領域が、SEQ ID NO:４９に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（VH）およびSEQ ID NO:５０に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（VL）領域を含み;かつ
（c）前記第２の結合剤の第２の結合領域が、SEQ ID NO:５６に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（VH）およびSEQ ID NO:５７に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（VL）領域を含む、
前記項目のいずれかの方法。
【０３３７】
６５．（a）前記第１の結合剤が、SEQ ID NO:４に示されるアミノ酸配列を含むVH領域、SEQ ID NO:８に示されるアミノ酸配列を含むVL領域、SEQ ID NO:１５に示されるアミノ酸配列を含むCH領域、およびSEQ ID NO:１７に示されるアミノ酸配列を含むCL領域を含む抗体であり;
（b）前記第２の結合剤が、第１の結合アームおよび第２の結合アームを含む抗体であり、該第１の結合アームが前記第１の結合領域を含み、かつ第２の結合アームが前記第２の結合領域を含み;
（c）前記第２の結合剤の第１の結合アームが、SEQ ID NO:４９に示されるアミノ酸配列を含むVH領域、SEQ ID NO:５０に示されるアミノ酸配列を含むVL領域;SEQ ID NO:６０に示されるアミノ酸配列を含むCH領域、およびSEQ ID NO:１６に示されるアミノ酸配列を含むCL領域を含み;かつ
（d）前記第２の結合剤の第２の結合アームが、SEQ ID NO:５６に示されるアミノ酸配列を含むVH領域、SEQ ID NO:５７に示されるアミノ酸配列を含むVL領域、SEQ ID NO:６１に示されるアミノ酸配列を含むCH領域、およびSEQ ID NO:１６に示されるアミノ

酸配列を含むCL領域を含む、
前記項目のいずれかの方法。
【０３３８】
66. （a）前記第1の結合剤が、SEQ ID NO:35に示されるアミノ酸配列を含む重鎖およびSEQ ID NO:25に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含み;
（b）前記第2の結合剤が、CD40およびCD137に結合する二重特異性抗体であり、該二重特異性抗体が、（i）SEQ ID NO:64に示されるアミノ酸配列を含む第1の重鎖およびSEQ ID NO:65に示されるアミノ酸配列を含む第1の軽鎖、ならびに（ii）SEQ ID NO:66に示されるアミノ酸配列を含む第2の重鎖およびSEQ ID NO:67に示されるアミノ酸配列を含む第2の軽鎖を有する、
前記項目のいずれかの方法。
【０３３９】
67. 前記対象がヒト対象である、前記項目のいずれかの方法。
【０３４０】
68. 前記腫瘍またはがんが固形腫瘍である、前記項目のいずれかの方法。
【０３４１】
69. 前記腫瘍がPD-L1陽性腫瘍である、前記項目のいずれかの方法。
【０３４２】
70. 前記腫瘍またはがんが、頭頸部扁平上皮細胞癌（HNSCC）、例えば口腔、咽頭または喉頭のHNSCCである、前記項目のいずれかの方法。
【０３４３】
71. 前記HNSCCが、再発性、切除不能性または転移性である、項目70の方法。
【０３４４】
72. 前記腫瘍またはがんが、非小細胞肺がん（NSCLC）、例えば扁平上皮または非扁平上皮NSCLCである、項目1～69のいずれかの方法。
【０３４５】
73. 前記NSCLCが、再発性、切除不能性または転移性である、項目72の方法。
【０３４６】
74. 前記NSCLCが、上皮増殖因子（EGFR）増感性突然変異および/または未分化リンパ腫（ALK）転座および/またはROS1再編成を有しない、項目72または73の方法。
【０３４７】
75. 前記NSCLCが、NTRK1/2/3（神経栄養因子受容体チロシンキナーゼ1/2/3）融合陽性であり、かつ/またはKRAS（KRASがん原遺伝子、GTPase）、BRAF（B-Rafがん原遺伝子、セリン/スレオニンキナーゼ）、もしくはMET（METがん原遺伝子、受容体チロシンキナーゼ）遺伝子中に突然変異を有し、かつ/またはRET（retがん原遺伝子）遺伝子再編成を有し、かつ前記対象が、それぞれの標的指向型療法での以前の処置を受けている、項目72～74のいずれかの方法。
【０３４８】
76. 前記対象が、PD-1阻害剤またはPD-L1阻害剤、例えば抗PD-1抗体または抗PD-L1抗体、好ましくは少なくとも2用量のPD-1阻害剤またはPD-L1阻害剤での以前の処置を受けている、前記項目のいずれかの方法。
【０３４９】
77. 前記対象が、白金ベース療法、または白金が不適格な場合に代替的な化学療法、例えばゲムシタビン含有レジメンでの以前の処置を受けている、前記項目のいずれかの方法。
【０３５０】
78. 前記腫瘍またはがんが、処置、例えばチェックポイント阻害剤での全身処置後に、再発および/または進行したものである、前記項目のいずれかの方法。
【０３５１】
79. 前記対象が、全身療法、例えばPD-1阻害剤またはPD-L1阻害剤、例えば抗PD-1

抗体または抗PD-L1抗体を含む全身療法の、少なくとも1つの以前のラインを受けている、前記項目のいずれかの方法。

【０３５２】

80．前記がんまたは腫瘍が、再発しているかつ/もしくは難治性であるか、または前記対象が、単剤療法としてもしくは併用療法の一部として投与されるPD-1阻害剤もしくはPD-L1阻害剤、例えば抗PD-1抗体もしくは抗PD-L1抗体での処置後に進行している、前記項目のいずれかの方法。

【０３５３】

81．以前の最後の処置が、単剤療法としてまたは併用療法の一部として投与されるPD1阻害剤またはPD-L1阻害剤、例えば抗PD-1抗体または抗PD-L1抗体での処置であった、前記項目のいずれかの方法。

【０３５４】

82．PD-1阻害剤またはPD-L1阻害剤、例えば抗PD-1抗体または抗PD-L1抗体での最後の処置における進行からの時間が6か月またはそれ未満である、前記項目のいずれかの方法。

【０３５５】

83．以前の最後の処置の一部としてのPD-1阻害剤またはPD-L1阻害剤、例えば抗PD-1抗体または抗PD-L1抗体の最後の投薬からの時間が6か月またはそれ未満である、前記項目のいずれかの方法。

【０３５６】

84．前記がんまたは腫瘍が、再発しているかつ/もしくは難治性であるか、または前記対象が、

（i）抗PD-1抗体もしくは抗PD-L1抗体での処置後のプラチナダブレット化学療法、または

（ii）プラチナダブレット化学療法後の抗PD-1抗体もしくは抗PD-L1抗体での処置の間または後に進行している、前記項目のいずれかの方法。

【０３５７】

85．（i）CD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む第1の結合剤、ならびに

（ii）CD40に結合する第1の結合領域およびCD137に結合する第2の結合領域を含む第2の結合剤

を含む、キット。

【０３５８】

86．前記第1の結合剤が、項目1～84のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記第2の結合剤が、項目1～84のいずれか一項において定義される通りである、項目85のキット。

【０３５９】

87．前記第1の結合剤、前記第2の結合剤、および存在する場合には1つまたは複数の追加の治療剤が、全身投与用、特に注射または注入用、例えば静脈内注射または注入用である、項目85または86のキット。

【０３６０】

88．対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法における使用のための、項目85～87のいずれかのキット。

【０３６１】

89．前記腫瘍またはがんが、項目1～84のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記対象が、項目1～84のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記方法が、項目1～84のいずれか一項において定義される通りである、項目88の使用のためのキット。

【０３６２】

90．（i）CD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む第1の結合剤;

（ii）CD40に結合する第1の結合領域およびCD137に結合する第2の結合領域を含む

第2の結合剤;ならびに
（iii）任意で、薬学的に許容される担体
を含む、薬学的組成物。
【０３６３】
91．前記第1の結合剤が、項目1～84のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記第2の結合剤が、項目1～84のいずれか一項において定義される通りである、項目90の薬学的組成物。
【０３６４】
92．対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法における使用のための、項目90または91の薬学的組成物。
【０３６５】
93．前記腫瘍またはがんが、項目1～84のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記対象が、項目1～84のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記方法が、項目1～84のいずれか一項において定義される通りである、項目92の使用のための薬学的組成物。
【０３６６】
94．対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法における使用のための第1の結合剤であって、該方法が、
（i）CD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む該第1の結合剤;ならびに
（ii）CD40に結合する第1の結合領域およびCD137に結合する第2の結合領域を含む第2の結合剤
を該対象に投与する工程を含む、前記使用のための第1の結合剤。
【０３６７】
95．前記方法が、項目1～84のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記第1の結合剤が、項目1～84のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記第2の結合剤が、項目1～84のいずれか一項において定義される通りである、項目94の使用のための第1の結合剤。
【０３６８】
96．対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法における使用のための第2の結合剤であって、該方法が、
（i）CD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む第1の結合剤;ならびに
（ii）CD40に結合する第1の結合領域およびCD137に結合する第2の結合領域を含む該第2の結合剤
を該対象に投与する工程を含む、前記使用のための第2の結合剤。
【０３６９】
97．前記方法が、項目1～84のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記第1の結合剤が、項目1～84のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記第2の結合剤が、項目1～84のいずれか一項において定義される通りである、項目96の使用のための第2の結合剤。
【０３７０】
本開示のさらなる局面が本明細書に開示される。
【実施例】
【０３７１】
実施例1：DuoBody-CD40x4-1BBならびに抗ヒトCD27抗体およびそのFcバリアントの生成
免疫化およびハイブリドーマ生成を通じた抗ヒトCD27抗体の生成はAldevron GmbH（Freiburg、Germany）において行った。ヒトCD27（全長およびECD）をコードするcDNAをAldevronの専有的な発現プラスミドにクローニングした。粒子衝撃用の携帯式デバイス（「遺伝子銃」）を使用するヒトCD27 cDNA被覆金粒子の皮内適用を使用した、OmniRat動物（完全ヒトイディオタイプを有する抗体の多様化されたレパート

リーを発現するトランスジェニックラット；Ligand Pharmaceuticals Inc.）の免疫化により、抗CD27抗体を生成した。血清試料を免疫化のシリーズの後に収集し、全長ヒトCD27発現のために上述の発現プラスミドを一過的にトランスフェクトされたHEK細胞におけるフローサイトメトリーにより試験した。抗体産生細胞をラット脾臓から単離し、標準的な手順に従ってマウス骨髄腫細胞（Ag8）と融合させた。CD27特異的抗体を産生するハイブリドーマからのRNAをシークエンシングのために抽出した。

【０３７２】

71のCD27抗体の一団から、6つの抗体をさらなる特徴付けのために初代T細胞に対する結合およびインビトロでのCD27結合競合アッセイにおける多様性に基づいて選択した。これらの6つの抗体は、本明細書においてIgG1-CD27-A、IgG1-CD27-B、IgG1-CD27-C、IgG1-CD27-D、IgG1-CD27-EおよびIgG1-CD27-Fと命名される。関心対象の重鎖および軽鎖の生産のために不利と考えられたアミノ酸残基（例えば、遊離システインまたはグリコシル化部位）を除去するための単一点変異を有する場合もある可変領域を遺伝子合成し、ヒト抗体軽鎖およびヒトIgG1重鎖のための骨格配列を含有する発現ベクターにクローニングした。

【０３７３】

6つの異なる抗体のFcバリアントを、Eu番号付けに従う以下のアミノ酸変異の1つまたは複数の導入により生成した:E345R、E430G、P329R、G237A、K326A、E333A（下記の表1および表3を参照）。以下に記載されているインビトロでの機能的特徴付けの後に、CD27特異的IgG1-CD27-A（VH SEQ ID NO: 4; VL SEQ ID NO: 8）は最も最適な生物学的特性を有すると考えられた。ベンチマークとして本明細書において使用された先行技術のCD27ターゲティング抗体の配列は以下のように得られた:IgG1-CD27-15（WO2012004367；SEQ ID NO:3および4）、IgG1-CD27-131A（WO2018/058022；SEQ ID NO:10および15）、IgG1-CD27-CDX1127（WO2016145085；SEQ ID NO:1および2）、ならびにIgG1-CD27-BMS986215（WO2019195452A1；SEQ ID NO:8および9）。タイプI抗ヒトCD20抗体のVHおよびVL配列はWO2019/145455A1（SEQ ID NO:35および39）において以前に記載されている。

【０３７４】

DuoBody-CD40x4-1BBは、一方のアームでCD40に結合し他方のアームで4-1BBに結合するDuoBody技術プラットフォーム（WO2011131746A2）に基づく二重特異性抗体である。DuoBody-CD40x4-1BBは、親クローンIgG1-CD40-001（HC SEQ ID NO:49;LC SEQ ID NO:50;HCDR1 SEQ ID NO:44、HCDR2 SEQ ID NO:45、HCDR3 SEQ ID NO:46、LCDR1 SEQ ID NO:47、LCDR2:YTS、LCDR3 SEQ ID NO:48）およびIgG1-CD137-009（HC SEQ ID NO:56;LC SEQ ID NO:57;HCDR1 SEQ ID NO:51、HCDR2 SEQ ID NO:52、HCDR3 SEQ ID NO:53、LCDR1 SEQ ID NO:54、LCDR2:GAS、LCDR3 SEQ ID NO:55）を使用して生成した。対照抗体として、抗HIV gp120抗体IgG1-b12を本出願において使用した（Barbas et al.,J Mol Biol 1993 230:812-823;VH:本出願のSEQ ID NO 37、VL:SEQ ID NO 41）。

【０３７５】

（表１）アミノ酸配列のリスト

SEQ ID NO:	識別名	アミノ酸配列
1	ヒト CD27	MARPHPWWLCVLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPG TFLVKDCDQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLV RNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHP QPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLPARTLSTHWPPQRSLCSS DFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLHQRRKYRSNKGESPVEPAEPCHYSC PREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP
2	CD27-A59T バリアント	MARPHPWWLCVLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPG TFLVKDCDQHRK**T**AQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLV RNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHP QPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLPARTLSTHWPPQRSLCSS DFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLHQRRKYRSNKGESPVEPAEPCHYSC PREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP
3	カニクイザル CD27	MARPHPWWLCFLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPG TFLVKDCDQHRKAAQCHPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLI RNCTITANAVCACRNGWQCRDKECTECDPPPNPSLTTWPSQALGPH PQPTHLPYVNEMLEARTAGHMQTLADFRHLPARTLSTHWPPQRSLCS

		SDFIRILVIFSGMFLVFTLAGTLFLHQQRKYRSNKGESPMEPAEPCPYS CPREEEGSTIPIQEDYRKPEPASSP
4	CD27-A VH	QVQLMQSGSELKKPGASVKVSCRASGYTFTTYAMNWVRQAPGQGPE WMGWINTNTGNPTYAQGFTGRFVFSLDTTVTTTYLQISSLKAEDTAV YFCAREAGSFDYWGQGTLVTVSS
5	CD27-A VH CDR1	GYTFTTYA
6	CD27-A VH CDR2	INTNTGNP
7	CD27-A VH CDR3	AREAGSFDY
8	CD27-A VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVYYYNYVSWYQQHPGRAPK LVIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLRAEDEADYYCSSYTV NRVWVFGGGTKLTVL
9	CD27-A VL CDR1	SSDVYYYNY
10	CD27-A VL CDR2	DVS
11	CD27-A VL CDR3	SSYTVNRVWV
12	定常領域ヒト IgG1m(f)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
13	定常領域ヒト IgG1-E345R	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR**R**PQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
14	定常領域ヒト IgG1-P329R	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKAL**R**APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
15	定常領域ヒト IgG1-delK E345R+P329R	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKAL**R**APIEKTISKAKGQPR**R**PQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
16	ヒトカッパLC	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC

17	ヒトラムダ LC	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSP VKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGST VEKTVAPTECS
18	定常領域ヒト IgG1m(f)-delK	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
19	定常領域ヒト IgG1m(a)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK PVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
20	定常領域ヒト IgG1m(x)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK PVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEGLHNHYTQKSLSLSPGK
21	定常領域ヒト IgG2	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVD KTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
22	定常領域ヒト IgG3	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVD KRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRC PEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK
23	定常領域ヒト IgG4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVD KRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
24	E345R+P329R を伴う CD27-A IgG1 HC	QVQLMQSGSELKKPGASVKVSCRASGYTFTTYAMNWVRQAPGQGPE WMGWINTNTGNPTYAQGFTGRFVFSLDTTVTTTYLQISSLKAEDTAV YFCAREAGSFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH

		NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**R**API EKTISKAKGQPR**R**PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
25	CD27-A LC	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVYYYNYVSWYQQHPGRAPK LVIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLRAEDEADYYCSSYTV NRVWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWK SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
26	マウス CD27	MAWPPPYWLCMLGTLVGLSATLAPNSCPDKHYWTGGGLCCRMCEPG TFFVKDCEQDRTAAQCDPCIPGTSFSPDYHTRPHCESCRHCNSGFLIR NCTVTANAECSCSKNWQCRDQECTECDPPLNPALTRQPSETPSPQPP PTHLPHGTEKPSWPLHRQLPNSTVYSQRSSHRPLCSSDCIRIFVTFSS MFLIFVLGAILFFHQRRNHGPNEDRQAVPEEPCPYSCPREEEGSAIPIQ EDYRKPEPAFYP
27	ヒト IgG1-Fc- E345R+P32 9R	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKAL**R**APIEKTISKAKGQPR**R**PQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
28	定常領域 ヒトIgG1m(f) (c末端リジン を有しない)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
29	定常領域 ヒトIgG1-E345R (c末端リジン を有しない)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR**R**PQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
30	定常領域 ヒトIgG1-P329R (c末端リジン を有しない)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKAL**R**APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
31	定常領域 ヒトIgG1m(a) (c末端リジン を有しない)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK PVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

32	定常領域 ヒトIgG1m(x) (c末端リジン を有しない)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK PVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEGLHNHYTQKSLSLSPG
33	定常領域 ヒトIgG2 (c末端リジン を有しない)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVD KTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
34	定常領域 ヒトIgG3 (c末端リジン を有しない)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVD KRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRC PEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPG
35	E345R+P329R を伴う CD27-A IgG1 HC (c末端リジン を有しない)	QVQLMQSGSELKKPGASVKVSCRASGYTFTTYAMNWVRQAPGQGPE WMGWINTNTGNPTYAQGFTGRFVFSLDTTVTTTYLQISSLKAEDTAV YFCAREAGSFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**R**API EKTISKAKGQPR**R**PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
36	ヒト IgG1-Fc- E345R+P329R (c末端リジン を有しない)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKAL**R**APIEKTISKAKGQPR**R**PQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
37	VH gp120- b12	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFVIHWVRQAPGQRFE WMGWINPYNGNKEFSAKFQDRVTFTADTSANTAYMELRSLRSADTA VYYCARVGPYSWDDSPQDNYYMDVWGKGTTVIVSS
38	VH gp120- b12 CDR1	GYRFSNFV
39	VH gp120- b12 CDR2	INPYNGNK
40	VH gp120- b12 CDR3	ARVGPYSWDDSPQDNYYMDV
41	VL gp120- b12	EIVLTQSPGTLSLSPGERATFSCRSSHSIRSRRVAWYQHKPGQAPRLV IHGVSNRASGISDRFSGSGSGTDFTLTITRVEPEDFALYYCQVYGASS YTFGQGTKLERK

42	VL gp120-b12 CDR1	HSIRSRR
	VL gp120-b12 CDR2	GVS
43	VL gp120-b12-CDR3	QVYGASSYT
44	CD40-001 VH CDR1	GYTFTEYI
45	CD40-001 VH CDR2	IIPNNGGT
46	CD40-001 VH CDR3	TRREVYGRNYYALDY
47	CD40-001 VL CDR1	QGINNY
	CD40-001 VL CDR2	YTS
48	CD40-001 VL CDR3	QQYSNLPYT
49	CD40-001 VH ヒト化	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFTEYIMHWVRQAPGQGLE WMGGIIPNNGGTSYNQKFQGRVTMTVDKSTSTGYMELSSLRSEDTA VYYCTRREVYGRNYYALDYWGQGTLVTVSS
50	CD40-001 VL ヒト化	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQGINNYLNWYQQKPGKAVKLL IYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQYSNLPY TFGGGTKVEIK
51	CD137-009 VH CDR1	GFSLNDYW
52	CD137-009 VH CDR2	IDVGGSL
53	CD137-009 VH CDR3	ARGGLTYGFDL
54	CD137-009 VL CDR1	EDISSY
	CD137-009 VL CDR2	GAS
55	CD137-009 VL CDR3	HYYATISGLGVA
56	CD137-009 VH ヒト化	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFSLNDYWMSWVRQAPGKGLE WVGYIDVGGSLYYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVY YCARGGLTYGFDLWGQGTLVTVSS
57	CD137-009 VL ヒト化	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISSYLAWYQQKPGKAPKRLI YGASDLASGVPSRFSASGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCHYYATISGL GVAFGGGTKVEIK
58	IgG1-FEAL-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VV**A**VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF **L**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

59	IgG1-FEAR-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VV**A**VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYS**R**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
60	C末端Lysを有しない IgG1-FEAL-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF LLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
61	C末端Lysを有しない IgG1-FEAR-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
62	ヒトCD40 成熟 タンパク質	EPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECLPCGESEFL DTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEGWHCTSE ACESCVLHRSCSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAFEKCH PWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVVCGPQDRLRALVVIPIIFGILFAILLV LVFIKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCQ PVTQEDGKESRISVQERQ
63	ヒトCD137 成熟 タンパク質	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCK GVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKK GCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPS PADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSV VKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
64	CD40-001 重鎖	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFTEYIMHWVRQAPGQGLE WMGGIIPNNGGTSYNQKFQGRVTMTVDKSTSTGYMELSSLRSEDTA VYYCTRREVYGRNYYALDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC PAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
65	CD40-001 軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQGINNYLNWYQQKPGKAVKLL IYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQYSNLPY TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
66	CD137-009 重鎖	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFSLNDYWMSWVRQAPGKGLE WVGYIDVGGSLYYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVY YCARGGLTYGFDLWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEG

		GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
67	CD137-009 軽鎖	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISSYLAWYQQKPGKAPKRLI YGASDLASGVPSRFSASGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCHYYATISGL GVAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
68	ヒトCD40 前駆体	MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKL VSDCTEFTETECLPCGESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQK GTSETDTICTCEEGWHCTSEACESCVLHRSCSPGFGVKQIATGVSDT ICEPCPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVVCGP QDRLRALVVIPIIFGILFAILLVLVFIKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFP DDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ
69	ヒトCD40 成熟 タンパク質	EPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECLPCGESEFL DTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEGWHCTSE ACESCVLHRSCSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAFEKCH PWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVVCGPQDRLRALVVIPIIFGILFAILLV LVFIKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCQ PVTQEDGKESRISVQERQ
70	ヒトCD137 前駆体	MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPC PPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCL GAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCS LDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQII SFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE DGCSCRFPEEEEGGCEL
71	IgG1-CD27-A-P329R-E345R-LNluc	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVYYYNYVSWYQQHPGRAPK LVIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLRAEDEADYYCSSYTV NRVWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWK SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS**SLGSSGVFTLEDFVGDWRQ TAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKID IHVIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVI DGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERL INPDGSLLFRVTINGVTGWRLCERILA**
72	IgG1-CD27-A-P329R-E345R-LHalo	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVYYYNYVSWYQQHPGRAPK LVIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLRAEDEADYYCSSYTV NRVWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWK SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS**SLEPTTEDLYFQSDNDGSEI GTGFPFDPHYVEVLGERMHYVDVGPRDGTPVLFLHGNPTSSY VWRNIIPHVAPTHRCIAPDLIGMGKSDKPDLGYFFDDHVRFM DAFIEALGLEEVVLVIHDWGSALGFHWAKRNPERVKGIAFME FIRPIPTWDEWPEFARETFQAFRTTDVGRKLIIDQNVFIEGTL PMGVVRPLTEVEMDHYREPFLNPVDREPLWRFPNELPIAGEP ANIVALVEEYMDWLHQSPVPKLLFWGTPGVLIPPAEAARLAK SLPNCKAVDIGPGLNLLQEDNPDLIGSEIARWLSTLEISG**
73	IgG1-b12-P329R-	EIVLTQSPGTLSLSPGERATFSCRSSHSIRSRRVAWYQHKPGQAPRLV IHGVSNRASGISDRFSGSGSGTDFTLTITRVEPEDFALYYCQVYGASS YTFGQGTKLERKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA

	E345R-LNLuc	KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**SLGSSGVFTLEDFVGDWRQTA GYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIH VIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVID GVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLI NPDGSLLFRVTINGVTGWRLCERILA**
74	IgG1-b12-P329R-E345R-LHalo	EIVLTQSPGTLSLSPGERATFSCRSSHSIRSRRVAWYQHKPGQAPRLV IHGVSNRASGISDRFSGSGSGTDFTLTITRVEPEDFALYYCQVYGASS YTFGQGTKLERKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**SLEPTTEDLYFQSDNDGSEIG TGFPFDPHYVEVLGERMHYVDVGPRDGTPVLFLHGNPTSSYV WRNIIPHVAPTHRCIAPDLIGMGKSDKPDLGYFFDDHVRFMD AFIEALGLEEVVLVIHDWGSALGFHWAKRNPERVKGIAFMEFI RPIPTWDEWPEFARETFQAFRTTDVGRKLIIDQNVFIEGTLPM GVVRPLTEVEMDHYREPFLNPVDREPLWRFPNELPIAGEPANI VALVEEYMDWLHQSPVPKLLFWGTPGVLIPPAEAARLAKSLP NCKAVDIGPGLNLLQEDNPDLIGSEIARWLSTLEISG**
75	IgG1-CD27-A-LNLuc	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVYYYNYVSWYQQHPGRAPK LVIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLRAEDEADYYCSSYTV NRVWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWK SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS**SLGSSGVFTLEDFVGDWRQ TAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKID IHVIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVI DGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERL INPDGSLLFRVTINGVTGWRLCERILA**
76	IgG1-CD27-A-LHalo	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVYYYNYVSWYQQHPGRAPK LVIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLRAEDEADYYCSSYTV NRVWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWK SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS**SLEPTTEDLYFQSDNDGSEI GTGFPFDPHYVEVLGERMHYVDVGPRDGTPVLFLHGNPTSSY VWRNIIPHVAPTHRCIAPDLIGMGKSDKPDLGYFFDDHVRFM DAFIEALGLEEVVLVIHDWGSALGFHWAKRNPERVKGIAFME FIRPIPTWDEWPEFARETFQAFRTTDVGRKLIIDQNVFIEGTL PMGVVRPLTEVEMDHYREPFLNPVDREPLWRFPNELPIAGEP ANIVALVEEYMDWLHQSPVPKLLFWGTPGVLIPPAEAARLAK SLPNCKAVDIGPGLNLLQEDNPDLIGSEIARWLSTLEISG**
77	IgG1-CD20-11B8-E430G-LNLuc	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLI YDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSDWPL TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**SLGSSGVFTLEDFVGDWRQTA GYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIH VIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVID GVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLI NPDGSLLFRVTINGVTGWRLCERILA**
78	IgG1-CD37-37.3-E430G-LHalo	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIRSNLAWYQQKQGKSPQLL VNVATNLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGTYYCQHYWG TTWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**SLEPTTEDLYFQSDNDGSEI**

		GTGFPFDPHYVEVLGERMHYVDVGPRDGTPVLFLHGNPTSSY VWRNIIPHVAPTHRCIAPDLIGMGKSDKPDLGYFFDDHVRFM DAFIEALGLEEVVLVIHDWGSALGFHWAKRNPERVKGIAFME FIRPIPTWDEWPEFARETFQAFRTTDVGRKLIIDQNVFIEGTL PMGVVRPLTEVEMDHYREPFLNPVDREPLWRFPNELPIAGEP ANIVALVEEYMDWLHQSPVPKLLFWGTPGVLIPPAEAARLAK SLPNCKAVDIGPGLNLLQEDNPDLIGSEIARWLSTLEISG

【０３７６】

実施例２：ＣＤ２７活性化レポーター細胞アッセイにおける抗ＣＤ２７抗体のアゴニスト活性

E345RまたはE430G六量体化増強性Fc変異を有するおよび有しない異なる抗CD27抗体のCD27アゴニスト活性を、CD27 Thaw and Use Bioassay kit（Promega、Custom Assay Services、CAS＃CS1979A25）を使用して測定した。キットは、ヒトCD27の構成的な発現と共にNF-κB応答エレメントの制御下でホタルルシフェラーゼ遺伝子を発現するNF-κBレポーター-Jurkat組換え細胞を含有し、これを本質的に製造者の使用説明書に従って使用した。簡潔に述べれば、Thaw-and-Use GloResponse NFκB-luc2/CD27細胞を解凍し、96ウェル平底培養プレート（PerkinElmer、カタログ＃6005680）中、Bio-Glo Luciferase Assay Buffer中の抗体希釈系列（最終濃度範囲0.04～20μg/mL）と37℃、5％CO_2で6hインキュベートした。抗CD27抗体は、野生型（WT＊）IgG1-CD27-A、IgG1-CD27-B、IgG1-CD27-C、IgG1-CD27-D、IgG1-CD27-E、IgG1-CD27-F、およびE430GまたはE345R変異を宿す各々のバリアントであった。抗CD27ベンチマーク抗体は、IgG1-CD27-131A（WTおよびE430Gバリアント）ならびに非六量体化IgG1-CD27-15（IgG1-CD27-15-P329R-E345R-K439E；六量体化を予防するFc変異の組合せを有し、そのため変異はこの実験の文脈において機能的に関連せず、したがって図中でWTと称される）ならびにE345R変異を含むIgG1-CD27-15の六量体化バリアントであった。抗HIV gp120ヒト抗体、IgG1-b12-E345Rを非結合性陰性対照抗体（対照）として使用した。抗体のインキュベーション後に、Bio-Glo Luciferase Assay Reagent（RTに平衡化した）を各々のウェルに加え、RTで5～10分間インキュベートした。EnVision Multilabel Reader（PerkinElmer）を使用して発光を測定し、GraphPad Prismソフトウェアを使用して生成された棒図表において相対発光単位（RLU）として提示した。

【０３７７】

六量体化増強性Fc変異（E345RまたはE430G）の導入は、抗体クローンIgG1-CD27-A～-Eならびにベンチマーク抗体IgG1-CD27-131A（E430Gと共に試験された）およびIgG1-CD27-15（E345Rと共に試験された）について、対応するWT抗体と比較してCD27アゴニズムの増強を結果としてもたらした（図1）。

【０３７８】

IgG-CD27-A、BおよびCは、試験されたすべての濃度においてE430GまたはE345Rの導入後にCD27アゴニスト活性の増強を実証した一方、六量体化増強性変異を含有するIgG1-CD27-DおよびEバリアントは、最低の抗体濃度においてアゴニズムの増加を示さなかった。E430GまたはE345R変異を有するIgG1-CD27-Fバリアントは、試験された最も高い抗体濃度においてのみCD27アゴニズムの増強を示した。バリアントIgG1-CD27-A～-Eについて、E345R変異の導入はE430G変異よりも強いCD27活性化を結果としてもたらした。E345R変異を有する抗体IgG1-CD27-A～-Eは、E430G変異を有するIgG1-CD27-131AまたはE345R変異を有するCD27-15と比較してそれぞれより高いまたは類似したCD27活性化レベルを示した。

＊IgG1-CD27-BおよびIgG1-CD27-FについてのWT抗体は、この実験の文脈において機能的に関連しないIgG Fcドメイン中のF405L変異を有していた。

【０３７９】

実施例3：組換えヒト、マウスおよびカニクイザルCD27についての抗ヒトCD27抗体の結合親和性

組換えヒト、カニクイザルおよびマウスのCD27タンパク質についての5つの抗ヒトCD27 IgG1抗体（IgG1-CD27-A、-B、-C、-Dおよび-E）の結合親和性を、Octet HTX機器（ForteBio、Portsmouth、UK）上で標識フリーバイオレイヤー干渉法を使用して決定した。抗体がCD27について一価であるように1つのCD27特異的Fabアームおよび非結合性Fabアームを含む、二重特異性抗体を使用して、実験を行った。（Labrijn AF et al.,Nat Protoc.2014 Oct；9（10）:2450-63に記載されるように）CD27抗体と非結合性抗体との間の制御されたFabアーム交換によりこれらの二重特異性抗体を生成した。

【０３８０】

ヒトおよびマウスのCD27についてのCD27抗体の親和性を決定するために、100nMの組換えHisタグ付加マウスまたはヒトCD27タンパク質（Sino Biological、カタログ＃10039-H08B1［ヒト］、カタログ＃50110-M08H［マウス］）を、予めコンディショニングされたanti-Penta-HIS（HIS1K）バイオセンサー（ForteBio、カタログ＃18-5120）に600秒間ロードした。

【０３８１】

カニクイザルCD27についてのCD27抗体の親和性を評価するために、5μg/mLの組換えカニクイザルCD27-Fc融合タンパク質（R＆D systems、カタログ＃9904-CD-100）を、活性化されたAmine Reactive 2nd Generation（AR2G）バイオセンサー（ForteBio、カタログ＃18-5092）にロードした。

【０３８２】

Sample Diluent（ForteBio、カタログ＃18-1104）中の300秒間のベースライン測定後に、CD27抗体の会合（200秒）および解離（1,000秒）を、Sample Diluent中の2倍希釈ステップを伴う0.78～800nMの抗体濃度系列について決定した。150kDaの抗体分子質量を算出のために使用した。参照センサーをSample Diluentとインキュベートした。

【０３８３】

Data Acquisition Software v11.1.1.19（ForteBio）を使用してデータを取得し、Data Analysis Software v9.0.0.14（ForteBio）を用いて分析した。参照センサーの減算により抗体毎にデータトレースを補正した。Y軸はベースラインの最後の10秒にアライメントし、解離に対するInterstep CorrectionアライメントおよびSavitzky-Golayフィルタリングを適用した。応答が＜0.05nmであり、かつ算出された平衡が飽和に近い（50秒の解離時間を使用してReq/Rmax＞95％）場合にデータトレースを分析から除外した。200秒に設定された会合および50秒に設定された解離時間について関心対象のウィンドウを使用してデータを1:1モデルとフィッティングした。解離時間は、曲線フィットの良好性の概算値である決定係数（R^2）（優先的に＞0.98）、曲線の目視検査、および会合工程の間の少なくとも5％のシグナル減衰に基づいて選択した。

【０３８４】

ヒトCD27についての親和性を、ナノモル濃度範囲のK_D値と共に3つのCD27抗体（IgG1-CD27-A、-B、-C）について正確に決定することができた（表2）。IgG1-CD27-D、および-Eについて、バイオレイヤー干渉法実験により、類似した範囲の親和性を伴うヒトCD27への結合が確認されたが、最適以下の曲線フィッティングのため正確なK_D値の算出は可能でなかった（表2に示される）。

【０３８５】

IgG1-CD27-Aおよび-Bはまた、ヒトCD27と同じ範囲のK_D値を伴う、組換えカニクイザルCD27への結合を示した。IgG1-CD27-C、-Dおよび-Eで得られた結果により、類似した範囲の親和性を伴うカニクイザルCD27への結合も確認されたが、最適以下の曲線フィッティングのため正確なK_D値の算出は可能でなかった（表2に示される）。

【０３８６】

組換えマウスCD27への結合は、抗体IgG1-CD27-Cについてのみ観察された。

【０３８７】

（表２）指し示される種からのCD27に対するIgG1-CD27-A～-E抗体の結合親和性

試料	ローディング試料	K_D (M)	k_{on} (1/Ms)	k_{dis} (1/s)
IgG1-CD27-A	ヒトCD27-His	1.3E-07	1.3E+05	1.8E-02
	マウス CD27-His	n.b.		
	カニクイザル CD27-Fc	1.2E-07	1.7E+05	2.0E-02
IgG1-CD27-B	ヒト CD27-His	5.4E-08	3.3E+05	1.8E-02
	マウス CD27-His	n.b.		
	カニクイザル CD27-Fc	3.5E-08	6.5E+05	2.3E-02
IgG1-CD27-C	ヒト CD27-His	7.0E-08	1.4E+05	9.8E-03
	マウス CD27-His	4.3E-07	5.0E+04	2.2E-02
	カニクイザル CD27-Fc	5.1E-08*	1.2E+05*	6.4E-03*
IgG1-CD27-D	ヒト CD27-His	4.5E-08*	1.4+05*	6.4E-03*
	マウス CD27-His	n.b.	n.b.	n.b.
	カニクイザル CD27-Fc	2.1E-08*	2.4E+05*	5.0E-03*
IgG1-CD27-E	ヒトCD27-His	4.9E-08*	1.3+05*	6.4E-03*
	マウス CD27-His	n.b.	n.b.	n.b.
	カニクイザル CD27-Fc	3.5E-08*	1.6E+05*	5.5E-03*

*:結合が観察されたが、KD、k_{on}およびk_{dis}は、1:1モデルを使用して信頼できない解釈を結果としてもたらす、最適以下の曲線フィッティングに起因して低い信頼性の値である。
n.b.:結合は観察されなかった。

【０３８８】
実施例4：細胞表面に発現されるヒトおよびカニクイザルのCD27に対する抗CD27抗体の結合
細胞表面に発現されるヒトおよびカニクイザルのCD27に対する抗CD27抗体IgG1-CD27-A～-E*および先行技術のIgG1-CD27-131A*の結合を、一過的にトランスフェクトされたHEK293F細胞およびCD27を内因性に発現する初代T細胞を使用してフローサイトメトリーにより分析した。非結合性対照抗体IgG1-b12-FEARを陰性対照抗体として使用した。

【０３８９】
製造者の使用説明書に従って293fectin Transfection Reagent（ThermoFisher、カタログ＃12347019）を使用して、FreeStyle 293-F懸濁細胞（HEK293F；ThermoFisher、カタログ＃R79007）を、全長ヒトまたはカニクイザルCD27をコードする哺乳動物発現ベクターpSBを用いて一過的にトランスフェクトした。

【０３９０】
ヒトおよびカニクイザルのPBMCを、ヒト健常ドナー（Sanquin Blood Bank、the Netherlands）またはカニクイザル（BPRC、the Netherlands、カタログ＃S-1135）から得られたバフィコートから、製造者の使用説明書に従ってLymphocyte Separation Medium（LSM；Corning、カタログ＃25-072CV）を使用して低密度勾配遠心分離により精製した。

【０３９１】
PBS（Lonza、カタログ＃BE17-517Q）＋1％BSA（Roche、カタログ＃10735086001）＋0.02％アジ化ナトリウム（Bio-World、カタログ＃41920044-3）からなるFACS緩衝液を用いる洗浄工程を間に伴う逐次的なインキュベーションのために細胞を96ウェルプレート（100,000細胞/ウェル；Greiner Bio-one、カタログ＃650180）に播種した。以下のインキュベーションを適用した:抗体濃度系列（0.0001～10μg/mLの最終濃度）を4℃で30分間；生/死マーカーFVS510（BD、カタログ＃564406、PBS中1:1,000の希釈）をRTで20分間；PE標識ポリクローナルヤギ抗ヒトIgG（Jackson Immuno Research、カタログ＃109-116-098、1:500の希釈）を4℃で30分間；およびT細胞同定のための抗CD3抗体（抗ヒトCD3:BD、カタログ＃555335、1:10の希釈；抗カニクイザルCD3:Miltenyi、カタログ＃130-091-998、1:10の希釈）

を4℃で30分間。すべての試料をFACSCelestaフローサイトメーター（BD）およびFlowJoソフトウェアにおいて分析した。GraphPad Prismを使用してデータを処理および可視化した。

【０３９２】

すべての試験された抗体は、ヒトT細胞およびトランスフェクトされたHEK293F細胞の両方において、ヒトCD27に対する用量依存的な結合を示した（図2A、図2B）。IgG1-CD27-AおよびIgG1-CD27-131Aについての中間的な結合、ならびにIgG1-CD27-DおよびIgG1-CD27-Eについての低い結合と比較して、最も高い最大の結合がIgG1-CD27-BおよびIgG1-CD27-Cについて観察され、差異はヒトT細胞を使用して最も著しかった。カニクイザルCD27 T細胞に対する結合について、最も高い結合がIgG1-CD27-Bについて観察され、続いてIg1-CD27-131AおよびIgG1-CD27-Aであった。より低い結合がIgG1-CD27-Dおよび-Eについて観察された一方、IgG1-CD27-Cはカニクイザル T細胞に対する最小の結合を示した。すべてのCD27抗体は、カニクイザルCD27をトランスフェクトされたHEK細胞に対する用量依存的な結合を示した。最も高い最大の結合がIgG1-CD27-BおよびIgG1-CD27-131-Aについて観察され、いくぶんより低い結合がIgG1-CD27-A、-Dおよび-Eについて観察された。IgG1-CD27-Cは、カニクイザルCD27をトランスフェクトされたHEK細胞に対する最も低い結合を示した（図2C、図2D）。

【０３９３】

結論として、IgG1-CD27-AおよびIgG1-CD27-Bは、ヒトまたはカニクイザルT細胞上に内因性に発現される、およびトランスフェクトされたHEK細胞において一過的に発現されるヒトおよびカニクイザルのCD27に対する用量依存的な結合を示した。IgG1-CD27-AおよびIgG-CD27-131AはヒトT細胞に対する同等の結合を示した一方、IgG1-CD27-Bはより高い最大の結合を示した。

＊注記:IgG1-CD27-A、-B、-C、-Dおよび-Eは、この実験の文脈において機能的に関連しないIgG Fcドメイン中の変異F405L-L234F-L235E-D265Aを有していた。IgG1-CD27-131Aは、IgG1 Fcドメイン中の機能的に関連しないF405L変異を有していた。

【０３９４】

実施例5：天然ヒトCD27-A59Tバリアントに対する抗CD27抗体の結合

ヒト集団の約19％は、細胞外ドメイン中にA59T変異を宿す天然のCD27バリアントを発現する（SEQ ID NO.2）。ヒトCD27-A59Tに対する結合を抗CD27抗体IgG1-CD27-A、IgG1-CD27-B、IgG1-CD27-C＊およびベンチマークIgG1-CD27-131Aについてフローサイトメトリーにより試験した。非結合性抗体IgG1-b12-FEALを陰性対照抗体として使用した。ヒトCD27-A59Tを発現する一過的にトランスフェクトされたHEK293F細胞（15,000細胞/ウェル）を一次試験抗体IgG1-CD27-A～-C、非結合性対照抗体IgG1-b12（対照）、および、CD27-A59Tに結合することが以前（WO2018/058022）に記載されている先行技術ベンチマークIgG-CD27-131Aの濃度系列（10倍希釈ステップを使用して0.0001～10μg/mL）とインキュベートした。インキュベーション後に、ポリクローナルヤギ抗ヒトIgGを用いて抗体をPE標識した。結合をFACSCelestaフローサイトメーター（BD）およびFlowJoソフトウェアにおいて分析した。GraphPad Prism v.8を使用してデータを処理および可視化した。

【０３９５】

試験された抗CD27抗体IgG1-CD27-A、IgG1-CD27-B、IgG1-CD27-C、およびIgG1-CD27-131Aは、異なる抗体の間の類似した結合曲線と共にCD27-A59TトランスフェクトHEK293F細胞に対する用量依存的な結合を示した（図3）。

＊注記:IgG1-CD27-A、-Bおよび-Cは、この実験の文脈において機能的に関連しないIgG Fcドメイン中の変異F405L-L234F-L235E-D265Aを有していた。IgG1-CD27-131Aは、IgG1 Fcドメイン中の機能的に関連しないF405L変異を有していた。

【０３９６】

実施例6：抗CD27抗体によるヒトT細胞増殖の誘導

E345RまたはE430G変異の導入でのFc-Fc相互作用を通じたIgG六量体化の増強は抗CD27抗体のCD27アゴニスト活性を増強したので（実施例2）、TCR活性化T細胞の増殖を増加させるE430GまたはE345R変異を有するIgG1-CD27-A、IgG1-CD27-B、およびIgG1-CD27-C抗体バリアントの能力をインビトロで試験した。

【０３９７】

追加的に、C1qおよびFcγRに対する結合を低減させる（G237AもしくはP329R）またはC1qに対する結合を増強する（K326A/E333A二重変異）ことが報告されたFc変異を導入して、E345RまたはE430G変異を有するCD27抗体のCD27アゴニスト活性に対するそれらの潜在的な効果を試験した。K326A/E333A二重変異は、C1q結合を増強することおよびFc-Fc相互作用増強性変異を含むDR5特異的ヒト化IgG1抗体のアゴニスト活性の増強に寄与することが、以前に示された（WO2018/146317A1）。E430GまたはE345Rに加えて、変異G237A、P329R、またはK326A/E333Aを、IgG1-CD27-A、IgG1-CD27-BおよびIgG1-Cに導入し（表3）、健常ドナーから得られたヒトPBMC（Sanquin Blood Bank、the Netherlands）を使用してT細胞増殖に対するそれらの効果を決定した。

【０３９８】

（表３）抗体IgG1-CD27-A、IgG1-CD27-B、またはIgG1-CD27-CのFcドメイン中の変異およびそれらの生物学的効果

Fc 変異	E430G	E345R	P329R	G237A	K326/E333A
効果の説明	六量体化の増強	六量体化の増強	C1q/FcγR結合の低減	C1q/FcγR結合の低減	C1q結合の増強
抗体*					
IgG1-CD27-X-E430G	+				
IgG1-CD27-X-P329R-E430G	+		+		
IgG1-CD27-X-G237A-E430G	+			+	
IgG1-CD27-X-K326A-E333A-E430G	+				+
IgG1-CD27-X-E345R		+			
IgG1-CD27-X-P329R-E345R		+	+		
IgG1-CD27-X-G237A-E345R		+		+	
IgG1-CD27-X-K326A-E333A-E345R		+			+

*IgG1-CD27-XにおけるXは、IgG1-CD27クローンIgG1-CD27-A、IgG1-CD27-B、またはIgG1-CD27-Cを指す。

【０３９９】

PBMCをPBS中に5×10^6細胞/mLの密度で再懸濁し、製造者の使用説明書に従ってCellTrace CFSE Cell Proliferation Kit（Invitrogen、カタログ＃C34564；1:10,000）を使用してCFSEで標識した。CFSE標識されたPBMC（100,000細胞/ウェル）を、96ウェル丸底プレート（Greiner Bio-one、カタログ＃650180）中、5%Normal Human Serum（NHS；Sanquin、製品＃B0625）を補充したT-cell Activation Medium（ATCC、カタログ＃80528190）中で、T細胞を活性化させるための0.1μg/mLの抗CD3抗体クローンUCHT1（Stemcell Technologies、カタログ＃60011）、およびCD27抗体（1μg/mLの最終濃度）と共に、37℃/5%CO_2で96hインキュベートした。フローサイトメトリーによる$CD4^+$および$CD8^+$T細胞サブセット中の生存

細胞の同定のために、細胞を生/死マーカーFVS510（1:1,000）とRTで20分間、ならびにAPC-eFluor780標識された抗ヒトCD4抗体（Invitrogen、カタログ＃47-0048-42、1:50）、AlexaFluor700標識された抗ヒトCD8a抗体（BioLegend、カタログ＃301028；1:100）、PE-Cy7標識されたマウス抗ヒトCD14抗体（BD Biosciences、カタログ＃557742；1:50）およびBV785標識された抗ヒトCD19抗体（BioLegend、カタログ＃363028；1:50）を含有するリンパ球マーカー用の染色ミックスと4℃の暗所中で30分間、逐次的にインキュベートした。試料をFACSCelesta（BD Biosciences）フローサイトメーターで測定し、生存$CD4^+$および$CD8^+$T細胞サブセット（$FVS510^-CD14^-CD19^-CD4^+$および$FVS510^-CD14^-CD19^-CD8^+$）におけるCFSE希釈ピークを、FlowJo 10ソフトウェアを使用してT細胞増殖についてのリードアウトとして分析した。両方ともFlowJoソフトウェア（バージョン10）を使用することにより算出された細胞の増殖のパーセンテージまたは分裂指数としてT細胞増殖を表した。細胞の増殖（分裂）のパーセンテージは、CFSE希釈を経た細胞（$CFSE^{low\ peaks}$）についてゲーティングすることにより決定した。分裂指数は、細胞が経た分裂の平均数である。GraphPad Prismバージョン8を使用してヒートマップを生成した。4人の異なる健常ドナーからのPBMCを使用して増殖アッセイを行った。

【０４００】

E430GまたはE345R変異を有するIgG1-CD27-A、-Bおよび-Cのバリアントは、試験された4人のドナーのうちの2人において対照抗体と比較して$CD8^+$T細胞の増殖における小さい増加を誘導した。E430G変異を有するIgG1-CD27-A、-Bまたは-Cバリアントへの追加の変異（P329R、G237AまたはK326A/E333A）の導入は、4人のPBMCドナーにわたり$CD8^+$T細胞増殖における変動する効果を示した。対照的に、E345R変異を有するIgG1-CD27-AおよびIgG1-CD27-CバリアントへのP329R変異の導入は、活性化$CD8^+$T細胞の増殖を増強する能力を一貫して増加させた。これはIgG1-CD27-Aに特に該当し、測定された$CD8^+$T細胞増殖は、ドナーの各々においてIgG-CD27-A-E345R、IgG1-CD27-B-E345RおよびIgG1-CD27-C-E345Rについて同等であった一方、追加のP329R変異の導入は、IgG1-CD27-B-E345RまたはIgG1-CD27-C-E345Rと比較してクローンIgG1-CD27-A-E345Rについて$CD8^+$T細胞増殖におけるより高い増加に一貫して繋がった。そのため、TCR活性化$CD8^+$T細胞の増殖におけるP329R変異と組み合わせたE345R変異の効果は、IgG1-CD27-BおよびIgG1-CD27-Cよりもクローンの IgG1-CD27-Aについて一貫してより大きかった。試験されたすべての抗体バリアントにわたり、IgG1-CD27-A-E345R-P329Rは、すべてのドナーにおいて$CD8^+$T細胞増殖における最大の増加を誘導した（図4A）。

【０４０１】

E345R変異を有するCD27抗体バリアントへの変異G237AまたはK326A-E333Aの追加は、単一変異E345Rを含む抗体と比較して、試験されたクローンのいずれにおいても$CD8^+$T細胞の増殖を増加させなかったか、または最小にのみ増加させた（図4A）。

【０４０２】

$CD4^+$T細胞においても、T細胞増殖における最も高いかつ最も一貫した増加は、IgG1-CD27-A-E345R-P329Rの存在下で観察された（図4B）。$CD4^+$T細胞増殖は、E430GまたはE345R変異のみを有するIgG1-CD27-A、-Bおよび-Cバリアントの間で概して同等であった一方、追加のP329R変異の導入は、IgG1-CD27-A-E430GまたはE430GもしくはE345R変異のいずれかを有するIgG1-CD27-Bもしくは-Cバリアントと比較して、E345Rバリアントを有するIgG1-CD27-Aバリアントについて$CD4^+$T細胞増殖におけるより大きい増加に繋がった。この効果は、試験された4人のドナーのうちの3人において観察された。ドナー1において、$CD4^+$T細胞増殖におけるE430GまたはE345Rに加えた追加の変異の効果は一般に小さく、このドナーにおいて観察された効果は他の3人のドナーにおいて再現されなかった。

【０４０３】

P329R変異とのE345Rの組合せはまた、IgG1-CD27-Cについて$CD4^+$T細胞増殖を

一貫して増加させたが、単独でのE345R変異と、E345RとP329Rとの組合せとの間の差異は、クローン-Aについてよりもクローンの IgG1-CD27-Cについてより小さかった。クローンIgG1-CD27-Bについて、CD4＋T細胞増殖における控えめな増加が、4人のドナーのうちの2人においてIgG1-CD27-B-E345Rと比較してIgG1-CD27-B-E345R-P329Rについて観察された。

【０４０４】

E430G変異を有するIgG1-CD27-A、-B、または-CバリアントへのP329R、G327AまたはK326A/E333A変異の導入は、CD4＋T細胞増殖において効果を誘導しなかったか、または誘導が一貫していなかった。同様に、E345R変異を有するIgG1-CD27-A、-Bまたは-CバリアントにおけるG327AまたはK326A/E333Aの導入後に効果は観察されなかったか、または一貫しない効果が観察された。

【０４０５】

要約すると、IgG1-CD27-A-E345R-P329Rは、活性化CD8＋およびCD4＋T細胞の増殖において最も高い増加を一貫して誘導し、IgG1-CD27-A-E345R-P329Rは最も効率的なCD27アゴニズムを誘導することを実証した。P329R変異を有するDR5特異的、六量体化増強抗体は、P329R変異を有しないDR5特異的六量体化増強抗体と比較して、DR5アゴニズムを誘導する能力の低減を以前に示した（Overdijk et al,Mol Canc Ther 2020）。そのため、IgG1-CD27-AにおけるE345R変異に加えてP329R変異を導入することがCD27アゴニスト活性を増強することは驚くべきことと考えられた。さらに、E345R＋P329R変異の組み合わせられた効果がIgG1-CD27-BまたはIgG1-CD27-CよりもIgG1-CD27-Aについて一貫してより大きかった理由は知られていない。

【０４０６】

実施例7：抗CD27抗体IgG1-CD27-A-P329R-E345RによるヒトT細胞増殖の誘導

TCR刺激ヒトCD4＋およびCD8＋T細胞の増殖を増加させるIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの能力を、ヒト健常ドナーPBMCを使用してCSFE希釈アッセイにおいて分析し、先行技術の抗CD27クローンIgG1-CD27-131A＊、IgG1-CD27-CDX1127、およびIgG1-CD27-BMS986215＊と比較した。T細胞増殖アッセイは、軽微な逸脱（75,000細胞/ウェル；濃度範囲0.002～10μg/mL）と共に、実施例6に記載されるように行った。抗CD3刺激を伴わないT細胞を使用する試料を含めて、T細胞受容体活性化の非存在下での抗体の潜在的なCD27アゴニスト活性を試験した（図5Aおよび図5B）。そのような活性は、抗体が静止T細胞の増殖を誘導することができる場合に安全性のリスクを課すので望ましくない。

【０４０７】

FlowJoソフトウェアを使用して、細胞分裂を指し示すCFSE蛍光の低減を伴う細胞のパーセンテージとして、増殖したT細胞のパーセンテージ（図5A、図5B、図5C、図5D）を算出した。拡大増殖指数（図5Eおよび図5F）はウェル中の細胞の増加倍数を同定し、FlowJoバージョン10中のProliferation Modelingツールを使用して算出された。ピークに対する手動の調整を必要な場合に行って、存在するピークの数をより一貫して定義した。

【０４０８】

ここで試験された本発明のCD27抗体および先行技術抗体のいずれも、刺激されていないT細胞、すなわちCD3架橋の非存在下で、増殖を誘導しなかった（図5Aおよび図5B）。

【０４０９】

CD27抗体のほとんどは、試験された最も高い抗体濃度において活性化CD4＋およびCD8＋T細胞のある程度の増殖を誘導した（図5Cおよび図5D）。これに基づいて、拡大増殖指数を算出した（図5Eおよび図5F）。本発明の抗体IgG1-CD27-A-P329R-E345Rは、先行技術の抗CD27クローンIgG1-CD27-131A、IgG1-CD27-CDX1127およびIgG1-CD27-BMS986215と比較してインビトロでCD4＋およびCD8＋T細胞の増殖をより著しく増強した。

＊IgG1-CD27-131AおよびIgG1-CD27-BMS986215のために、この実験の文脈において機能的に関連しない、F405L変異を有するバリアントを使用した。

【０４１０】

実施例8：膜結合型CD27抗体に対するC1qの結合

P329R変異は、C1qおよびFcγRとのIgG1抗体の相互作用を低減させることが以前に記載された（Overdijk et al,Molecular Cancer Therapeutics 2020）。E345R変異を含むIgG1-CD27-AのC1q結合に対するP329R変異の効果を、ヒト健常ドナーT細胞を使用してインビトロで細胞C1q結合アッセイにおいて試験した。抗HIV gp120抗体IgG1-b12-F405Lを非結合性アイソタイプ対照抗体（対照）として使用した。RosetteSep Human T cell Enrichment cocktail（Stemcell、カタログ＃15061）を使用してヒト健常ドナーPBMCからT細胞を濃縮し、0.1％BSAおよび1％Pen/Strep［Lonza、カタログ＃DE17-603E］）を補充した培養培地（RPMI 1640［Gibco、カタログ＃A10491-01］に再懸濁した。T細胞（2×10^6細胞/ウェル）を、抗体希釈系列（15μg/mLの最終アッセイ濃度で開始した8回の5倍希釈）を含むポリスチレン96ウェル丸底プレート中37℃で15分間プレインキュベートして、抗体をT細胞に結合させた。次に、細胞を氷上で冷却し、ヒトC1qの供給源としてNHSを補充し（20％NHSの最終アッセイ濃度）、氷上で45分間インキュベートした。細胞を引き続いて、FITC標識されたウサギ抗ヒトC1q抗体（DAKO、カタログ＃F0254；20μg/mL）と氷上で30分間インキュベートし、TO-PRO-3（ThermoFisher、カタログ＃T3605；1:5,000の希釈）を含むFACS緩衝液に再懸濁した。生細胞におけるFITCシグナルを測定するフローサイトメトリーによりC1q結合を決定した。

【０４１１】

膜結合型WT IgG1-CD27-A抗体はC1q結合を示さなかった（図6）。六量体化増強性変異E430GまたはE345Rの導入（IgG1-CD27-A-E430GおよびIgG1-CD27-A-E345R）は、細胞表面上の六量体抗体環構造に対する六量体C1qタンパク質の結合アビディティの増加と合致して、T細胞表面上のCD27抗体に対するC1qの結合を結果としてもたらした（図6）。IgG1-CD27-A-E345RにおけるP329R変異の導入（IgG1-CD27-A-P329R-E345R）はC1q結合の喪失を結果としてもたらし（図6）、IgG1-CD27-A-P329R-E345RはC1qに結合できないことを実証した。

【０４１２】

これらのデータは、IgG1-CD27-A-P329R-E345RはT細胞の細胞表面上のCD27への結合時にC1qに結合できないことを示す。これは、C1q結合はIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの抗体誘導性CD27アゴニスト活性に寄与しないことを指し示す。これは、他の六量体化増強アゴニスト抗体について以前に記載されたこととは対照的である。さらに、C1q結合の欠如は、IgG1-CD27-A-P329R-E345Rは補体活性化の古典的経路を活性化させることができないことを指し示す。そのため、IgG1-CD27-A-P329R-E345Rは、その活性は望ましくないT細胞における補体活性化およびCDCを誘導しないことが予想される。

【０４１３】

実施例9：ヒトFc受容体に対する抗CD27抗体の結合

ヒトFcγRバリアントに対するIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの結合を、Biacore表面プラズモン共鳴（SPR）システムを使用して分析し、抗HIV gp120抗体IgG1-b12（対照）と比較した。製造者の使用説明書に従ってアミン-カップリングおよびHis捕捉キット（Cytiva、カタログ＃BR100050およびカタログ＃29234602）を使用してBiacore Series S Sensor Chips CM5（Cytiva、カタログ＃29104988）を抗His抗体で共有結合的に被覆した。次に、HBS-P＋（Cytiva、カタログ＃BR100827）中の125nMのFcγ受容体FcγRIa、FcγRIIa（167-His［H］および167-Arg［R］）、FcγRIIbまたはFcγRIIIa（176-Phe［F］および176-Val［V］）（Sino Biological、カタログ＃10256-H08S-B、カタログ＃10374-H27H、カタログ＃10374-H27H1-B、カタログ＃10259-H27H-B、カタログ＃10389-H27H-Bおよびカタログ＃103

89-H27H1-B）を表面上に捕捉させた。3サイクルの緩衝液の後に、抗体試料を36サイクルにわたり注入して、FcγRIについて0～3,000nMおよび他のFcγRについて0～10,000nMの抗体範囲を使用して結合曲線を生成した。FcR被覆表面（活性表面）上で分析された各々の試料を、バックグラウンド補正のために使用されたFcRを有しない並列フローセル（参照表面）上でも分析した。10mMのグリシン-HCl（pH 1.5）（Cytiva、カタログ＃BR100354）を使用して表面の再生により抗His被覆表面からの解離を行った。Biacore Insight Evaluationソフトウェア（Cytiva）を使用してセンサーグラムを生成し、4パラメーターロジスティック（4PL）フィットを適用して、参照試料（対照）に対するIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの相対的な結合を算出した。

【０４１４】

高親和性受容体FcγRIaに対するIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの結合は、対照抗体と比較して強く低減されたが、より高い抗体濃度においてある程度の結合が観察された（図7A）。IgG1-CD27-A-P329R-E345Rは、ヒト低親和性受容体FcγRIIa（図7Bおよび図7C）、FcγRIIb（図7D）ならびにFcγRIIIa（図7Eおよび図7F）に結合しなかった。

【０４１５】

結論として、IgG1-CD27A-P329R-E345Rは、ヒトIgG Fc受容体に対する最小の結合を示す（FcγRIa）か、または結合を示さない（FcγRIIa、FcγRIIb、およびFcγRIIIa）。

【０４１６】

実施例10：ヒトT細胞に対する抗CD27抗体IgG1-CD27-A-E345R-P329Rの結合

フローサイトメトリーを使用してヒト健常ドナーT細胞上のCD27に対するIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの結合をより詳細に特徴付けた。抗HIV gp120抗体バリアントIgG1-b12-P329R-E345Rを非結合性対照抗体（対照）として使用した。ヒトPBMCを、ヒト健常ドナーから得られたバフィコートから単離した。FACS緩衝液中のPBMC（1×10^5細胞/ウェル）をポリスチレン96ウェル丸底プレート（Greiner bio-one、カタログ＃650101）に加え、300×gで3分間、4℃での遠心分離によりペレット化した。細胞を、FACS緩衝液中への連続抗体希釈液（3倍希釈ステップにおいて0.0015～10μg/mLの範囲）50μL/ウェルの中に再懸濁し、4℃で30分間インキュベートした。細胞をペレット化し、FACS緩衝液で2回洗浄し、50μL/ウェルにおいてFITCコンジュゲート二次抗体（FITC AffiniPure F（ab'）$_2$断片ヤギ抗ヒトIgG、F（ab'）$_2$断片特異物、Jackson ImmunoResearch、カタログ＃109-096-097、1:100の希釈）と4℃の暗所中で30分間インキュベートした。細胞を再びペレット化し、FACS緩衝液で2回洗浄し、BV711標識された抗ヒトCD19抗体（BioLegend、カタログ＃302246、1:50）、AlexaFluor700標識された抗ヒトCD8a抗体（BioLegend、カタログ＃301028、1:100）、APC-eFluor780標識された抗ヒトCD4抗体（Invitrogen、カタログ＃47-0048-42、1:50）、PE-CF594標識されたマウス抗ヒトCD56抗体（BD Biosciences、カタログ＃564849、1:100）、PE-Cy7標識されたマウス抗ヒトCD14抗体（BD Biosciences、カタログ＃557742、1:50）およびeFluor450標識された抗ヒトCD3抗体（Invitrogen、カタログ＃48-0037-42、1:200）を含有するリンパ球マーカー用の50μL/ウェルの染色ミックス中で4℃の暗所中で30分間インキュベートした。細胞を再びペレット化し、FACS緩衝液を使用して2回洗浄し、死細胞マーカー7-アミノ-アクチノマイシンD（7-AAD；BD Biosciences、カタログ＃51-68981E、1:240の希釈）を含有する80μLのFACS緩衝液に再懸濁した。試料をLSRFortessa（BD）フローサイトメーター上でフローサイトメトリーにより測定し、FlowJoソフトウェアを使用して分析した。GraphPad Prism 8ソフトウェアを使用して非線形回帰（可変の傾きを伴うシグモイド用量-応答）を使用して結合曲線を分析した。

【０４１７】

抗CD27抗体IgG1-CD27-A-P329R-E345Rは、$CD4^+$および$CD8^+$T細胞についての類似した結合特徴と共に、健常ドナーT細胞に対する用量依存的な結合を示した（図8

）。

【０４１８】

実施例１１：抗ＣＤ２７抗体ＩｇＧ１-ＣＤ２７-Ａ-Ｐ３２９Ｒ-Ｅ３４５ＲによるＣＤ２７細胞シグナル伝達のＦｃγＲ非依存的な誘導

二次的なＦｃγＲ媒介性架橋に非依存的にＣＤ２７シグナル伝達を誘導することができるＣＤ２７特異的モノクローナル抗体は、ＦｃγＲ陽性細胞の非存在下で免疫賦活性であり得、これはＦｃγＲ保有細胞の頻度が低い腫瘍において利点となる。

【０４１９】

ＩｇＧ１-ＣＤ２７-Ａ-Ｐ３２９Ｒ-Ｅ３４５ＲのＣＤ２７アゴニスト活性をＦｃγＲ保有細胞の存在または非存在下で試験し、対応するＷＴ抗体ＩｇＧ１-ＣＤ２７-Ａならびに先行技術抗体ＩｇＧ１-ＣＤ２７-１３１Ａ＊、ＩｇＧ１-ＣＤ２７-ＣＤＸ１１２７、およびＩｇＧ１-ＣＤ２７-ＢＭＳ９８６２１５＊と比較した。非結合性抗体ＩｇＧ１-ｂ１２-Ｐ３２９Ｒ-Ｅ３４５Ｒを陰性対照（対照）として使用した。ＣＤ２７レポーターアッセイは、本質的に実施例２に記載されるように行ったが、本実施例において、Ｔｈａｗ-ａｎｄ-Ｕｓｅ ＧｌｏＲｅｓｐｏｎｓｅ ＮＦκＢ-ｌｕｃ２/ＣＤ２７ Ｊｕｒｋａｔ細胞を、膜結合型抗体のＦｃγＲ媒介性架橋を促すことができるヒトＦｃｙＲＩＩｂ発現細胞の存在下で培養するという例外を伴った。

【０４２０】

Ｔｈａｗ-ａｎｄ-Ｕｓｅ ｅｆｆｅｃｔｏｒ ＦｃγＲＩＩｂ ＣＨＯ-Ｋ１細胞（Ｐｒｏｍｅｇａ、カタログ＃ＪＡ２２５１）を、希釈せずにまたは３つの増加性希釈（１/３、１/９、１/２７）で、９６ウェル平底培養プレート（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ、カタログ＃０８１５）にプレーティングし、３７℃/５％CO_2で終夜インキュベートした。抗体の段階希釈（最終濃度範囲０.０００２～１０μｇ/ｍＬ）を含有する、Ｂｉｏ-Ｇｌｏ Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ Ａｓｓａｙ Ｂｕｆｆｅｒ中の固定された細胞濃度（非希釈ＦｃγＲＩＩｂ ＣＨＯ-Ｋ１細胞についての１:１のＮＦκＢ-ｌｕｃ２/ＣＤ２７ Ｊｕｒｋａｔ:ＦｃγＲＩＩｂ ＣＨＯ-Ｋ１比で開始する）のＴｈａｗ-ａｎｄ-Ｕｓｅ ＮＦκＢ-ｌｕｃ２/ＣＤ２７ Ｊｕｒｋａｔ細胞懸濁液により接着ＦｃｙＲＩＩｂ発現細胞の上清を置き換えた。３７℃/５％CO_2での６ｈのインキュベーション後に、プレートをＲＴに平衡化し、生物発光を測定し、実施例２に記載されるようにＲＬＵとして提示した。

【０４２１】

ＩｇＧ１-ＣＤ２７-Ａ-Ｐ３２９Ｒ-Ｅ３４５Ｒは、ＦｃγＲＩＩｂ発現細胞に非依存的に、用量依存的なＣＤ２７活性化を誘導した（図９Ａ）。対照的に、Ｅ３４５Ｒ六量体化増強性変異およびＰ３２９Ｒ変異を有しない、対応するＷＴ抗体ＩｇＧ１-ＣＤ２７-Ａは、ＦｃγＲＩＩｂ発現細胞の存在下でのみＣＤ２７アゴニズムを示した（図９Ａ～図９Ｅ）。同様に、先行技術抗体ＩｇＧ１-ＣＤ２７-１３１Ａ、ＩｇＧ１-ＣＤ２７-ＣＤＸ１１２７およびＩｇＧ１-ＣＤ２７-ＢＭＳ９８６２１５によるＣＤ２７活性化もまたＦｃγＲＩＩｂ発現細胞の存在に依存し、ＮＦκＢ-ｌｕｃ２/ＣＤ２７ Ｊｕｒｋａｔ:ＦｃγＲＩＩｂ ＣＨＯ-Ｋ１比の減少と共に徐々に減少した（図９Ｆ～図９Ｊ）。

【０４２２】

結論として、これらのデータは、ＩｇＧ１-ＣＤ２７-Ａ-Ｐ３２９Ｒ-Ｅ３４５Ｒは二次的なＦｃγＲ媒介性架橋に非依存的にＣＤ２７アゴニズムを誘導できることを指し示す。これは、ＣＤ２７アゴニズムを誘導するためにＦｃγＲ保有細胞の存在に依存した先行技術の抗ＣＤ２７抗体とは対照的である。

＊ＩｇＧ１-ＣＤ２７-１３１ＡおよびＩｇＧ１-ＣＤ２７-ＢＭＳ９８６２１５のために、この実験の文脈において機能的に関連しない、Ｆ４０５Ｌ変異を有するバリアントを使用した。

【０４２３】

実施例１２：マウスにおいて研究された、標的結合の非存在下での抗ＣＤ２７抗体ＩｇＧ１-ＣＤ２７-Ａ-Ｐ３２９Ｒ-Ｅ３４５Ｒの薬物動態（ＰＫ）分析

標的結合の非存在下での、抗ＣＤ２７抗体ＩｇＧ１-ＣＤ２７-Ａ-Ｐ３２９Ｒ-Ｅ３４５Ｒ＊の薬物動態特徴をマウスにおいて分析し、対応するＷＴ抗体ＩｇＧ１-ＣＤ２７-Ａ＊と比較した。ＩｇＧ１-ＣＤ２７-Ａはマウスに結合せず（実施例３、表２）、したがって、標的結合の非存在下で、インビボでＩｇＧ１-ＣＤ２７-ＡおよびＩｇＧ１-ＣＤ２７-Ａ-Ｐ３２９Ｒ-Ｅ３４５Ｒの薬物動態挙動を試験するために実験を設計した。研究は、Ｃｒｏｗｎ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（Ｃｈｉｎａ）により、有資格

の職員により、承認されたIACUCプロトコールおよびCrown Bioscience,Inc.Standard Operating Proceduresに従って実行した。11～12週齢の雌SCIDマウス（C.B-17、Vital River Laboratory Animal Technology Co.,Ltd.（VR、Beijing、China；3匹のマウス/群）の静脈内に500μgの抗体（25mg/kg）を200μLの注射体積で注射した。40μLの血液試料を抗体投与の10分、4時間、1日、2日、7日、14日および21日後に収集し、血漿を血液試料から収集し、ELISAによる全ヒトIgG濃度の決定まで-80℃で貯蔵した。96ウェルELISAプレート（Greiner、カタログ＃655092）を2μg/mLの抗ヒトIgG（Sanquin、The Netherlands、商品＃M9105、ロット＃8000260395）を用いて4℃で終夜被覆し、引き続いてPBSA（0.2%ウシ血清アルブミン［BSA、Roche、カタログ＃10735086001］を補充したPBS）を用いて1h遮断した。次に、間に洗浄工程を伴って、抗ヒトIgG被覆プレートを、プレートシェーカー上RTで1h、ELISA Buffer（0.05%Tween20［Sigma-Aldrich、カタログ＃P1379］を補充したPBSA）中で段階希釈された血漿試料と、RTで1hポリクローナルペルオキシダーゼコンジュゲートヤギ抗ヒトIgG二次抗体（Jackson、カタログ＃109-035-098）と、および最後に2,2'-アジノ-ビス（3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸）（ABTS；Roche、カタログ＃11112422001）と、逐次的にインキュベートした。2%シュウ酸（Riedel de Haen、カタログ＃33506）を加えることにより反応を停止させた。注射のために使用されたそれぞれの材料の希釈系列を使用して参照曲線を生成した。吸光度をEL808マイクロタイタープレートリーダー（BioSPX）において405nmで測定し、全ヒトIgG濃度（μg/mL）をプロットした。

【0424】

マウスにおいて静脈内注射後の異なる時点に血漿IgGレベルを測定することにより決定された、IgG1-CD27-A-P329R-E345RのPKプロファイルと対応物WT抗体IgG1-CD27-AのPKプロファイルとの間に、実質的な差異はなかった（図10）。

【0425】

初期（分布）段階におけるより急な低下が、マウスにおけるヒトIgG1についての予測と比較して、IgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびそのWT対応物（IgG1-CD27-A）について観察されたが、両方の抗体の末期排除は、2コンパートメントモデルに基づくヒト野生型IgG1についての予測速度と合致していた（Bleeker WK,Teeling JL,Hack CE.Blood.2001 Nov 15；98（10）:3136-42）。

【0426】

合わせると、これは、P329RおよびE345R変異の導入は標的結合の非存在下でIgG1-CD27-Aの薬物動態特性に影響しなかったことを実証する。

注記:この実施例に記載される実験は、この実験の文脈において機能的に関連しない、F405L変異を有するIgG1-CD27-AおよびIgG1-CD27-A-P329R-E345Rのバリアントを使用した。

【0427】

実施例13：抗CD27抗体IgG1-CD27-A-P329R-E345Rによる抗体依存性細胞ファゴサイトーシスの誘導

抗体依存性細胞傷害（ADCC）は、主にNK細胞上に発現されるFcγRIIIaを通じて媒介される一方、抗体依存性細胞ファゴサイトーシス（ADCP）は、FcγRI、FcγRIIa、およびFcγRIIIを介して単球、マクロファージ、好中球、および樹状細胞により媒介され得る（Hayes,J.M et al 2016）。FcγRIa発現免疫細胞のエフェクター機能におけるFcγRIaに対する抗CD27抗体IgG1-CD27-A-P329R-E345Rの残留結合（実施例9）の効果を理解するために、CTV標識されたCD27^{+}バーキットリンパ腫Daudi細胞を標的細胞として、およびヒト単球由来マクロファージ（hMDM）をエフェクター細胞（E:T＝2:1）として使用して、ADCPを誘導するIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの能力をインビトロで分析した。

【0428】

製造者の使用説明書に従ってCD14マイクロビーズ（Miltenyi Biotec、カタログ番

号130-050-201）を使用して陽性選択によりPBMCからhMDMを単離した。PBMCを遠心分離（1,200RPM、5分、RT）し、氷冷した単球単離緩衝液（PBS、0.5%BSA、2mM EDTA）に1.25×10^7PBMC/mLの密度で再懸濁した。80μLのPBMC懸濁液当たり20μLのCD14マイクロビーズを加え、ローラーバンク上4℃で15分間、撹拌と共にインキュベートした。30mLの氷冷した単球単離緩衝液を加え、PBMC/CD14マイクロビーズ混合物を遠心分離（300×g、10分、4℃）し、6mLの氷冷した単球単離緩衝液に再懸濁した。LSカラム（Miltenyi Biotec、カタログ番号130-042-401）を3mLの氷冷した単球単離緩衝液でリンスし、各々のカラムに3mLのPBMC/CD14マイクロビーズ混合物をロードした。$CD14^-$細胞を流し、氷冷した単球単離緩衝液中でカラムを3回洗浄した後に、プランジャーを使用することにより$CD14^+$単球を3mLの氷冷した単球単離緩衝液に回収した。ViaStain（商標）Viability Dyeアクリジンオレンジ/ヨウ化プロピジウム（AOPI；Nexcelom Bioscience、カタログ番号CS2-0106）を使用してCellometer Auto 2000 Cell Viability Counter（Nexcelom Bioscience）において$CD14^+$細胞をカウントし、RTでプレートを静置することにより細胞採取を可能とするUpCell（商標）Surfaceを有する100mm^2 Nunc（商標）ディッシュ（Thermo Fisher Scientific、カタログ番号174902）中のマクロファージコロニー刺激因子（M-CSF；Gibco、カタログ番号PH9501；50ng/mLの最終濃度）および3mLの単球懸濁液（すなわち、2.4×10^6個の単球）を補充したCelgene（登録商標）GMP DC培地（CellGenix、カタログ番号20801-0500）に0.8×10^6細胞/mLの密度で再懸濁した。3日のインキュベーションの後に、5×M-CSFを含有する2mLの新鮮な培地をプレートに加えた。7日間のインキュベーション（37℃、5%CO_2）の後に、RTでプレートを1～1.5h静置することによりマクロファージを表面から剥離した。剥離したマクロファージを遠心分離によりペレット化し、AOPIを使用してカウントし、培養培地（10%DBSIを含むRPMI 1640）に1×10^6細胞/mLの密度で再懸濁した。

【0429】

製造者の使用説明書に従ってCellTrace（商標）Violet Cell Proliferation Kit（Thermo Fisher Scientific、カタログ番号C34557）を使用してヒトバーキットリンパ腫Daudi細胞（ATCC（登録商標）CCL-213（商標））を標識した。簡潔に述べれば、Cell Trace Violet（CTV）を0.2μMの最終濃度までPBS中の1mL当たり1×10^6個のDaudi細胞に加え、暗所中37℃で20分間インキュベートした（15mLのインキュベーション体積）。10mLのDBSIを加えて、結合していない色素を不活性化させた。細胞を遠心分離（300×g、5分）によりペレット化し、PBS中で洗浄し、AOPIでカウントした。CTV標識されたDaudi細胞を培養培地に0.5×10^6細胞/mLの密度で再懸濁した。

【0430】

ADCPアッセイのために、hMDM（50,000細胞/ウェル）およびCTV標識されたDaudi細胞（25,000細胞/ウェル）を一緒に（E:T＝2:1）、氷上で、96ウェルプレート中150μLの最終体積の培養培地に播種し、抗CD27抗体IgG1-CD27-A-P329R-E345Rまたは抗CD20抗体IgG1-CD20（10倍希釈で0.000001～10μg/mLの濃度範囲）と4h（37℃、5%CO_2）インキュベートした。インキュベーション後に、100μLのHuman BD Fc Block（商標）（BD Biosciences、カタログ番号564220；FACS緩衝液中1:100）を加え、4℃で10分間インキュベートした。細胞を遠心分離（300×g、5分）によりペレット化し、PE-Cy7コンジュゲート抗ヒトCD11b抗体（BioLegend、カタログ番号301322；1:80）およびTO-PRO-3（Thermo Fisher Scientific、カタログ番号T3605；1:25,000）を含有するFACS緩衝液に再懸濁し、4℃で30分間インキュベートした。細胞を洗浄し、FACS緩衝液に再懸濁し、FACSymphony（商標）A3 Cell Analyzer（BD Biosciences）上で収集および分析した。FlowJoソフトウェアを使用してデータを分析して、生存標的細胞数および食細胞hMDMを測定し、GraphPad Prismソフトウェアを使用して処理および可視化した。

【0431】

各々の条件についての生存Daudi細胞のパーセンテージは、以下の式によって算出し

た。
% 生存Daudi細胞 =

$$\left(\frac{\text{試験抗体とインキュベートされた } TO-PRO-3^{-}CD11b^{-}CTV^{+} \text{ 細胞の\%}}{\text{抗体なしでインキュベートされた } TO-PRO-3^{-}CD11b^{-}CTV^{+} \text{ 細胞の\%}}\right) \times 100$$

【０４３２】
各々の条件についての食細胞hMDMの量は、TO-PRO-3-CD11b+CTV+細胞の%として決定した。
【０４３３】
IgG1-CD27-A-P329R-E345Rは、4人の異なるヒト健常ドナーからのhMDMを使用して、ファゴサイトーシスアッセイにおいて食細胞hMDMのパーセンテージを増加させることも生存Daudi細胞のパーセンテージを低減させることもなかった。これは、残留FcγRIa結合は、IgG1-CD27-A-P329R-E345RについてFcγRIa媒介性エフェクター機能を結果としてもたらさなかったことを実証する（代表的なヒト健常ドナーからのデータを図11に示す）。食細胞hMDMのパーセンテージにおける増加および生存Daudi細胞のパーセンテージにおける減少により実証されるように、陽性対照抗体IgG1-CD20は、高いレベルのCD20を発現するDaudi細胞のファゴサイトーシスを効率的に誘導した。
【０４３４】
結論として、FcγRIaに対する残留結合は、CD27+細胞のIgG1-CD27-A-P329R-E345R依存性ADCPを誘導するために十分でなかった。
【０４３５】
実施例14：C4d沈着の測定により決定された、抗CD27抗体IgG1-CD27-A-P329R-E345Rによる、流体相での標的非依存的補体活性化
Fc-Fc相互作用増強抗体は、溶液中で単量体IgG1分子として一般に存在し、標的結合で細胞表面上で六量体化して、活性Fc領域の場合にC1qドッキング場所を形成する（Diebolder,C.A et al 2014；de Jong,R.N et al,2016）。抗CD27抗体IgG1-CD27-A-P329R-E345RのIgG FcドメインはP329R変異の導入によりサイレンシングされ、これは、膜結合型IgG1-CD27-A-P329R-E345Rに対するC1q結合の欠如を結果としてもたらす（図6）。IgG1-CD27-A-P329R-E345Rは標的結合の非存在下で溶液中で補体を活性化させることができないことを確認するために、古典的な補体経路の活性化のための指標と考えられるC4d沈着の決定により標的非依存的な補体活性化を調べた。MicroVue（商標）C4d Enzyme Immunoassay（EIA；Quidel、カタログ番号A008）を使用して酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）によりIgG1-CD27-A-P329R-E345Rによる流体相C4d断片沈着を分析し、これは製造者のプロトコールに従って行った。Heat Aggregated Gamma Globulin（HAGG；補体活性化剤；Quidel、カタログ番号A114）をアッセイのための陽性対照として使用した。IgG1-b12およびIgG1-b12-RGY（WO2014006217A1）を対照抗体として含めた。IgG1抗体中のE345R/E430G/S440Y（RGY）Fc変異の導入は、溶液中での六量体の形成を誘導して、流体相補体活性化を結果としてもたらすことが記載されている（Diebolder,C.A et al,2014；Wang,G.,R.N et al,2016；de Jong,R.N et al,2016）。IgG1-b12-P329R-E345Rをアイソタイプ対照抗体として含めた。
【０４３６】
10mg/mLの濃度まで希釈されたHAGGを除いて、リン酸緩衝化食塩水（PBS）中で1mg/mLの濃度までの抗体希釈液を調製した。次に、試験試料を90%（最終濃度）の通常ヒト血清（NHS）（CompTech、ロット番号42a）中で100μg/mL（モノクローナルIgG）または1,000μg/mL（HAGG）の濃度までさらに希釈し、37℃で1hインキュベートした。並行して、「抗体なし」試料（抗体なし、90%NHS）および「PBS単独」試料（抗体なし、NHSなし）を陰性対照として含めた。次に、キットに提供される冷却したComplement Specimen Diluent中で試料を1:250に希釈した。一方、マウス抗ヒトC4d抗体を被覆したストリップを96ウェルプレートに入れ、最初の洗浄後の1分の

待機工程と共に250～300μLの洗浄緩衝液を用いてアッセイウェルを3回洗浄した。試験試料をウェル（100μL/ウェル）に加え、陰性対照として、補体検体希釈剤のみ（ブランク）をELISAにおいて使用した。並行して、キットにより提供される100μLの標準品（標準A-E）および内部対照を別々のウェルに加えた。プレートをRTで30分間インキュベートした。次に、プレートを上記されている洗浄緩衝液で5回洗浄した。50μLのC4dコンジュゲート（ペルオキシダーゼコンジュゲートヤギ抗ヒトC4d）をウェルに加え、プレートをRTで30分間インキュベートした。上記されている洗浄緩衝液での5回の洗浄工程後に、100μLのC4d基質［0.7% 2-2'-アジノ-ジ-（3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸ジアンモニウム塩］を加え、再びプレートをRTで30分間インキュベートした。最後に、50μLのキットにより提供される停止溶液を加え、1h以内に、ELISAプレートリーダー（EL808 BioSPX、BioTek）を使用して405nmで光学密度を測定した。

【0437】

IgG1-CD27-A-P329R-E345Rおよび対照抗体IgG1-b12-P329R-E345R（IgG1-CD27-A-P329R-E345Rと同じFc骨格を有する）は、100μg/mLの試験された濃度において流体相C4d沈着を誘導せず；測定されたC4dレベルは、野生型Fcドメインを有する対照抗体（IgG1-b12）および抗体なし対照のバックグラウンドレベルと類似していた（図12）。対照的に、溶液中で六量体を形成することが既知である陽性対照抗体IgG1-b12-RGYは、HAGGと同じレベルまでC4d沈着を誘導した。

【0438】

これらのデータは、IgG1-CD27-A-P329R-E345Rは、標的非依存的な、流体相補体活性化をインビトロで誘導しなかったことを示す。

【0439】

実施例15：CD70とリガンド結合について競合する抗CD27抗体IgG1-CD27-A-P329R-E345Rの能力

抗CD27抗体IgG1-CD27-A-P329R-E345Rがその天然リガンドCD70とのCD27の相互作用に干渉するかどうかを決定するために、ヒトバーキットリンパ腫細胞株Daudi上に内因性に発現されるCD27に対する飽和濃度のビオチン化組換えヒトCD70細胞外ドメイン（ECD）の結合を過剰なIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの存在および非存在下で研究した。

【0440】

鉄を含む10%ドナーウシ血清（DBSI；Gibco、カタログ番号20731-030）を補充したRPMI 1640培地（Gibco、カタログ番号A10491-01）中で培養されたDaudi細胞（ATCC（登録商標）CCL-213（商標））を、丸底96ウェルプレート（Greiner Bio One、カタログ番号650261）に50,000個の細胞/ウェルで播種した。細胞を遠心分離（300×g、3分、4℃）によりペレット化し、抗CD27または対照抗体（50μg/mLの最終濃度）を含有するFACS緩衝液（PBS、1%BSA［Roche、カタログ番号10735086 00］）に再懸濁した。ビオチン化組換えヒトCD70 ECD（Abcam、カタログ番号ab271443）を飽和濃度（6μg/mL）で加え、細胞を4℃で30分間インキュベートした。

【0441】

細胞を2回洗浄し、Brilliant Violet（BV）421（商標）標識されたストレプトアビジン（BioLegend、カタログ番号405225；0.0025μg/mLの最終濃度）およびRフィコエリトリン（PE）標識されたポリクローナルAffiniPure F（ab'）$_2$断片ヤギ-抗ヒトIgG Fc（Jackson ImmunoResearch、カタログ番号109 116098；0.0025μg/mLの最終濃度）を含有するFACS緩衝液に4℃で30分間再懸濁した。細胞を2回洗浄し、TO-PRO-3ヨージド（Thermo Fisher Scientific、カタログ番号T3605；1:25,000）を含有するFACS緩衝液に再懸濁し、分析した。データをBD FACSymphony（商標）A3フローサイトメーター（BD Biosciences）上で収集し、FlowJoソフトウェアを使用して分析した。補償のために、1滴のUltraComp eBeads（商標）Compensation Beads（Life Technologies、カタログ番号01-2222-42）を各々のウェルに加えた。2μLの各々の抗体を加え、ミックスを20分間インキュベートした。プレートを遠心沈

降にかけ、ビーズをFACS緩衝液に再懸濁し、測定した。生存の補償のために、細胞を65℃で10分間処理し、生存細胞と1:1で混合した。細胞を遠心沈降させ、FACS緩衝液中に希釈されたTO-PRO-3に再懸濁した。GraphPad Prismを使用してデータを処理および可視化した。

【０４４２】

IgG1-CD27-A-P329R-E345RまたはIgG1-CD27-Aは、CD27$^+$Daudi細胞に対するCD70 ECDの結合を遮断せず、CD70結合レベルは、非結合性アイソタイプ対照抗体IgG1-b12-P329R-E345RもしくはIgG1-b12とインキュベートされたDaudi細胞、または抗体なしの細胞の場合と同等であった（図13）。また、先行技術の抗CD27抗体IgG1-CD27-BMS986215およびIgG1-CD27-131Aは、CD70 ECDに対するCD27の結合における弱い遮断効果を示した。対照的に、CD70は、リガンド結合を遮断することが以前に報告された先行技術の抗CD27抗体IgG1-CD27-CDX1127（Vitale et al、2012）の存在下でDaudi細胞上の表面CD27に結合することができなかった（図13）。

【０４４３】

結論として、IgG1-CD27-A-P329R-E345Rの結合は、Daudi細胞上の天然リガンドCD70によるCD27の結合を遮断しない。

【０４４４】

実施例16：抗CD27抗体とのポリクローナルに刺激されたヒトPBMCのインキュベーションでのT細胞活性化マーカーの発現

ポリクローナルに活性化されたT細胞におけるT細胞活性化マーカーの発現に対するIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの効果を、3人の異なる健常ヒトドナーから得られたPBMCを使用して研究した。PBMCをIgG1-CD27-A-P329R-E345Rまたは先行技術の抗CD27抗体と2日間および5日間インキュベートした後にHLA-DR、CD25、CD107a、および4-1BBの発現を分析した。

【０４４５】

96ウェルU底プレート（Greiner Bio-One）中の細胞培養培地に、1ウェル当たり、新たに単離された75,000個のPBMCを播種した。二連のウェルを同時に抗CD3抗体（UCHT1クローン；Stemcell；0.1μg/mL）；およびIgG1-CD27-A-P329R-E345R（3倍希釈における0.0005～30μg/mL）；または先行技術の抗CD27抗体IgG1-CD27-CDX1127、IgG1-CD27-131A、およびIgG1-CD27-BMS986215（30μg/mL）；または非結合性対照抗体IgG1-b12-P329R-E345R（10μg/mL）と共にインキュベートした。処理の非存在下での各々の活性化マーカーの発現を決定するために、非処理（抗CD3抗体も抗CD27抗体もなし）の細胞を含む二連の対照ウェルに単独で培養培地を補充した。活性化マーカー陽性細胞を同定するためのゲートを設定するために、fluorescence minus one（FMO）対照を使用した。FMO対照のために、二連のウェル中の活性化マーカーに対応するものを除く実験において使用されたすべての抗体を、抗CD3抗体を用いて活性化された1人のドナーからのウェル当たり75,000個のPBMCに加えた。染色抗体を含まない単一のウェル中の各々のドナーからの非処理の細胞を陰性対照として含めた。生存細胞を検出するために、各々のドナーからの非処理の細胞を単一のウェル中で4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール（DAPI）単独で染色した。

【０４４６】

2日間または5日間のインキュベーション（37℃、5％CO_2）の後に、プレートをFACS緩衝液で1回洗浄し、T細胞活性化マーカー4-1BB、CD25、CD107a、ヒト白血球抗原（HLA）-DRのための抗体；ならびにフローサイトメトリーにおいてCD4$^+$およびCD8$^+$T細胞サブセットをゲーティングするための抗体を含有するFACS緩衝液中の抗体混合物に再懸濁した。4℃で30分間のインキュベーションの後に、すべてのプレートをFACS緩衝液で2回洗浄し、細胞をFACS緩衝液に再懸濁した。FlowJoソフトウェアを使用してBD LSRFortessa Cell Analyzer上で試料を分析して、CD4$^+$およびCD8$^+$T細胞上の各々のT細胞活性化マーカーについての中央値蛍光強度（MFI）および陽性細胞のパーセンテージを決定した。T細胞活性化マーカーの発現レベルにおける抗CD27抗体誘導性

の変化を、非結合性対照抗体IgG1-b12-P329R-E345Rと比べた抗CD27抗体試料のMFIにおける変化倍数として提示した。FlowJoソフトウェアを使用してBD LSRFortessa（商標）Cell Analyzer（BD Biosciences）上で試料を分析した。

【０４４７】

IgG1-CD27-A-P329R-E345Rは、活性化CD4$^+$T細胞上のCD25、CD107aおよび4-1BBの発現を増加させた（図14A）。これらの効果は、5日のインキュベーションの後よりも2日のインキュベーションの後により著しかった。CD8$^+$T細胞上で、IgG1-CD27-A-P329R-E345Rとのインキュベーションは、2日のインキュベーション後および5日のインキュベーション後の両方においてHLA-DR、CD107aおよび4-1BBの発現の増加を結果としてもたらした（図14B）。

【０４４８】

3つの先行技術抗体との2日間および5日間のインキュベーションでのT細胞活性化マーカーの発現も評価した。IgG1-CD27-131AおよびIgG1-CD27-BMS986215は、CD4$^+$およびCD8$^+$T細胞上のHLA-DR、4-1BB、CD25、およびCD107aの発現における同等の増加を誘導したが、T細胞活性化マーカー発現に対するIgG1-CD27-CDX1127との2日間または5日間のインキュベーションの効果はより弱いものであった。

【０４４９】

結論として、IgG1-CD27-A-P329R-E345Rとのポリクローナルに活性化されたPBMCのインキュベーションは、CD4$^+$およびCD8$^+$T細胞上の活性化マーカーHLA-DR、CD25、CD107aおよび4-1BBの発現の増加を結果としてもたらした。

【０４５０】

実施例17：ヒトCD27-KIマウスモデルにおける抗CD27抗体の注射後のOVAタンパク質免疫化マウスにおけるOVA特異的CD8$^+$T細胞のパーセンテージ

脾臓細胞におけるhCD27 KI OVAモデルにおける抗原特異的T細胞の拡大増殖に対するIgG1-CD27-A-P329R-E345R処置の効果をフローサイトメトリーにより分析した。

【０４５１】

C57BL/6バックグラウンドのホモ接合性ヒトCD27（hCD27）-KIマウス（hCD27 KIマウス）をBeijing Biocytogen Co.,Ltd.（系統名C57BL/6-Cd27tm1（CD27）/Bcgen、ストック番号110006）から得た。この系統は、Crown BioscienceのHuGEMM（商標）プラットフォームとの共同で開発され、機能的な免疫系を有するマウス内のヒト化された薬物標的（この場合CD27）を特色とするものであった。hCD27 KIマウスにおいて、細胞外ドメインをコードするマウスCD27遺伝子のエクソン1～5をヒトCD27エクソン1～5により置き換えた。OVA特異的T細胞をhCD27-KIマウスにおいて免疫原オボアルブミン（OVA）の皮下（s.c.）注射によりインビボで誘導し、静脈内（i.v.）に抗体を用いてマウスを同時に処置することによりIgG1-CD27-A-P329R-E345Rのアゴニスト効果を試験した。

【０４５２】

0日目に、マウスにs.c.で5mgのOVA（InvivoGen、カタログ番号vac-pova-100、ロット番号EFP-42-04）を注射し、尾静脈へのIgG1-CD27-A-P329R-E345R（30mg/kg）、IgG1-CD27-CDX1127（30mg/kg）またはIgG1-b12-P329R-E345R（30mg/kg）のi.v.注射により処置した。12日目および21日目に、マウスをOVAでブーストし、0日目と同様の抗体で処置した。10日目、19日目および24日目に、頬袋または伏在静脈を介してエチレンジアミン四酢酸二カリウム（K2-EDTA；BD、カタログ番号365974）を含有するBD Microtainer（登録商標）血液収集チューブ中に血液を収集し、さらなる分析において直ちに使用した。28日目に、マウスを安楽死させ、無菌条件下で脾臓を切除した。

【０４５３】

RPMI1640培地（Thermo Fisher Scientific、カタログ番号C22400500BT）中の切除された脾臓組織をgentleMACs（商標）C Tubes（Miltenyi Biotec、カタログ番号130-093-237）に移し、製造者の使用説明書に従ってgentleMACS（商標）Di

ssociator（Miltenyi、カタログ番号130-093-235）を使用して単一細胞懸濁液に機械的に解離させた。解離後に、細胞懸濁液を70μmの細胞ストレーナー（Falcon、カタログ番号352350）に通して濾過した。次に、試料を3mLの洗浄緩衝液（4% FBS［Gibco、カタログ番号10099 141］を補充した無菌PBS［Hyclone、SH0256.01B］）中の再懸濁により2回洗浄した。細胞をCellometer Auto T4（Nexcelom Bioscience）でカウントし、細胞の数をチューブ当たり2×10^6個の脾臓細胞に調整した。

【0454】

2×10^6個の脾臓細胞をFACSチューブ（Falcon、カタログ番号352052）に移し、1μg/mLの精製されたラット抗マウスCD16/CD32（Mouse BD Fc Block（商標）、BD Biosciences、カタログ番号553141）を補充した洗浄緩衝液（4% FBS［Gibco、カタログ番号10099 141］を補充した無菌PBS［Hyclone、SH0256.01B］）に再懸濁した。2～8℃の暗所中で10分間のプレインキュベーションの後に、10μLのPE標識されたOVA四量体（MBL Life science、カタログ番号TS 5001 1C）を加え、試料を穏やかにボルテックスした後に、2～8℃の暗所中で30～60分間さらにインキュベートした。洗浄なしで、T細胞サブセットのフローサイトメトリーゲーティングのために使用される標識された抗体および化合物を加えた。試料を穏やかにボルテックスし、2～8℃の暗所中でさらに30分間インキュベートした。次に、試料を2mLの洗浄緩衝液中の再懸濁により2回洗浄し、300×gで5分間遠心分離した。最後に、細胞を250μLの洗浄緩衝液に再懸濁し、BD LSRFortessa（商標）X-20 Cell Analyzer（BD Biosciences）で分析した。Kaluza Analysis Software（Beckman Coulter）を使用してデータを処理した。

【0455】

IgG1-CD27-A-P329R-E345Rは、OVAタンパク質ワクチン接種を同時に注射されたマウスの脾臓においてOVA特異的$CD8^+$T細胞のパーセンテージを増加させた。30mg/kgのIgG1-CD27-CDX1127で処置されたマウスにおけるOVA特異的$CD8^+$T細胞のパーセンテージは、IgG1-CD27-A-P329R-E345R処置群よりも低く、IgG1-b12-P329R-E345R処置群と同等であった（図15）。末梢血試料において同様の観察がなされた。

【0456】

実施例18：抗CD27抗体を注射されたOVA免疫化マウスの脾臓からのOVA特異的$CD8^+$T細胞によるIFNγ分泌

RPMI1640培地中の切除された脾臓組織（実施例17を参照）を70μmの細胞ストレーナー（Falcon、カタログ番号352350）で穏やかにマッシュし、遠心分離（1,500rpm、5分）によりペレット化し、10mLのAmmonium-Chloride-Potassium（ACK）Lysing Buffer（Invitrogen、カタログ番号A1049201）に再懸濁した。RTで3～5分のインキュベーションの後に、試料を10～20mLのPBSで2回洗浄し、50U/mLのペニシリンおよび50μg/mLのストレプトマイシン（pen/strep、Gibco、カタログ番号15070-063）を補充した5mLのCellular Technology Limited（CTL）Test（商標）Medium（ImmunoSpot、カタログ番号CTLT-005）に再懸濁した。収集された脾臓細胞を再び70μmの細胞ストレーナーに通して濾過し、Vi-CELL（商標）XR Cell Viability Analyzer（Beckman Coulter）でカウントして、pen/strepを含有するCTL-Test Mediumで3.125×10^6細胞/mLに濃度を調整した。

【0457】

本質的に製造者により説明されるように、Mouse IFN-γ ELISpotPLUS kit（Mabtech、カタログ番号3321-4HPW-2）を使用して脾臓細胞によるIFNγ産生を分析した。プレコーティングされたMultiScreenHTS IP Filter（MSIP）白色プレート（mAbAN18）をウェル当たり200μLの無菌PBSで4回洗浄し、pen/strepを含有する200μLのCTL-Test Mediumでコンディショニングした（RT、30分）。培地を除去し、ウェル当たり5×10^5個の脾臓細胞を二連で2μg/mLの$OVA_{257-264}$ペプチドSIINFEKL（Invivogen、カタログ番号vac-sin）、またはスクランブル化対照ペプチドFILKSINE（

SB-PEPTIDE、カタログ番号SB073-1MG）と180μL/ウェルの総体積で20h、加湿されたインキュベーター（37℃、5％CO_2）中でインキュベートした。IFNγ産生の陽性対照として、脾臓細胞を並行して、500ng/mLのホルボールミリステートアセテート（PMA）および10μg/mLのイオノマイシン（PMA＋イオノマイシン、Dakewe Biotech、カタログ番号DKW ST PI）からなる細胞刺激カクテルとインキュベートした。ペプチドなしの脾臓細胞の培養物を陰性対照として含めた。インキュベーション後に、細胞を除去し、プレートをPBSで5回洗浄した。次に、プレートを、間にPBSでの5回の洗浄工程と共に、ビオチン化検出mAb（R4-6A2；RT、2h）、ストレプトアビジン-ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP；RT、1h）、および最後に3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン（TMB）基質溶液（すべてキットにより提供される）と逐次的にインキュベートした。別個のスポットが出現した場合、脱イオン水中での大規模な洗浄により反応を停止させた。spotAID V8ソフトウェア（AID）を使用してAID iSpot ELISpot Reader（Autoimmun Diagnostika [AID] GMBH、ELR08IFL）上でスポットをカウントした。GraphPad Prismソフトウェアを使用してELISpotデータを分析し、棒図表に提示し、処置群当たりのすべてのマウス（n＝5）からのウェル当たりのスポットの平均数±SEMとして提示した。

【０４５８】

ELISpot分析により実証されるように、すべてのIgG1-CD27-A-P329R-E345R処置動物群からの脾臓細胞は、OVAペプチドでの処置に応答してIFNγ産生を増加させたことを示した（図16）。スクランブル化対照ペプチドでの脾臓細胞の刺激は、IFNγ産生を誘導しなかったか、または最小のIFNγ産生を誘導し、IFNγはOVA特異的T細胞により産生されたことを示唆した。対照的に、IFNγ産生は、30mg/kgのIgG1-CD27-CDX1127で処置されたマウスからの脾臓細胞において観察されなかった。

【０４５９】

実施例19：インビボでのOVA免疫化マウスにおけるT細胞活性化に対するIgG1-CD27-A-P329R-E345R処置の効果

$CD8^+$T細胞活性化に対するIgG1-CD27-A-P329R-E345R処置の効果を、OVA処置されたhCD27-KIマウスに由来する$CD8^+$T細胞上のPD-1の発現を分析することによりインビボで研究した。実施例17に記載されるようにマウスを処置した。また、脾臓細胞を得、それをFACSにより分析する方法は実施例17に記載されている。

【０４６０】

IgG1-CD27-A-P329R-E345Rは、28日目に活性化マーカーPD-1を発現する$CD8^+$T細胞のパーセンテージにおける増加を誘導した。$CD8^+PD\text{-}1^+$T細胞のパーセンテージは、IgG1-CD27-CDX1127または対照抗体IgG1-b12-P329R-E345Rで処置された動物において低かった（図17）。

【０４６１】

実施例20：OVA免疫化マウスにおけるT細胞サブセットのインビボ誘導に対するIgG1-CD27-A-P329R-E345R処置の効果

T細胞サブセットの拡大増殖に対するIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの効果を、OVA処置されたhCD27-KIマウスからの脾臓細胞試料中のCD44およびCD62Lの発現を分析することにより研究した。IgG1-CD27-A-P329R-E345R処置された、OVA免疫化された、hCD27-KIマウスの脾臓に由来するメモリー$CD8^+$T細胞を、フローサイトメトリーにより定量化した。メモリーT細胞をエフェクターメモリー（$CD44^+CD62L^-$）およびプレエフェクターT細胞（$CD44^-CD62L^-$；Nakajima,Y.,K et al 2018）として分類した。実施例17に記載されるようにマウスを処置した。また、脾臓細胞を得、それをFACSにより分析する方法は、実施例17に記載されている。

【０４６２】

IgG1-CD27-A-P329R-E345R（30mg/kg）は、IgG1-b12-P329R-E345Rで処置されたマウスの脾臓細胞と比較した場合に28日目に脾臓中のプレエフェクターT細胞およびエフェクターメモリー$CD8^+$T細胞のパーセンテージの増加を誘導した（図18）

。CD45$^+$集団内で、IgG1-CD27-A-P329R-E345Rは、IgG1-CD27-CDX1127（30mg/kg）よりも高いパーセンテージのプレエフェクターT細胞およびエフェクターメモリーT細胞を誘導したが、同等の平均パーセンテージのこれらのT細胞集団が、脾臓細胞のCD8$^+$画分中で両方の抗CD27抗体により誘導された。

【０４６３】

実施例21：OVA免疫化マウスにおけるT細胞のインビボ拡大増殖に対するIgG1-CD27-A-P329R-E345R処置の効果

T細胞の拡大増殖に対するIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの効果を、OVA処置されたhCD27-KIマウスからの脾臓細胞および血液試料中のCD3の発現を分析することにより研究した。実施例17に記載されるようにマウスを処置した。また、脾臓細胞および血液試料を得、それらをフローサイトメトリーにより分析する方法は、実施例17に記載されている。

【０４６４】

30mg/kgのIgG1-CD27-A-P329R-E345RでのOVA免疫化hCD27-KIマウスの処置は、非結合性対照抗体IgG1-b12-P329R-E345Rでの処置と比較して、脾臓におけるCD3$^+$T細胞のパーセンテージを増加させなかった（図19）。対照的に、ベンチマーク抗体IgG1-CD27-CDX1127（30mg/kg）での処置は、脾臓におけるCD3$^+$T細胞の減少を結果としてもたらした。類似した観察が末梢血試料において為された。

【０４６５】

実施例22：抗原特異的研究におけるT細胞サイトカイン産生に対するIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの効果

サイトカイン産生を増加させるIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの能力を、コグネイト抗原により刺激されたT細胞を使用して研究した。製造者の使用説明書に従ってFicoll-Paque密度勾配分離（GE Healthcare、カタログ番号17 1440 03）により健常ヒトドナーから得られたバフィコートからPBMCを単離した。

【０４６６】

ヒト磁気CD14およびCD8マイクロビーズ（Miltenyi Biotec、それぞれカタログ番号130 050 201および130 045 201）をヒトPBMCからのCD14$^+$単球の陽性選択およびCD14$^-$PBLの陰性選択、ならびに凍結されたPBLからのCD8$^+$T細胞の陽性選択のために使用した。細胞懸濁液を遠心分離し、磁気活性化細胞選別（MACS）緩衝液（5mMのEDTA、1%ヒトアルブミンを含むダルベッコリン酸緩衝化食塩水［DPBS］）に80μLのMACS緩衝液当たり1×10^{7}個の生細胞で再懸濁した。1×10^{7}個の細胞当たり、12μLのCD14またはCD8マイクロビーズを加えた。引き続いてのMACS分離を、自動化された磁気細胞分離機器を使用してまたは手動の分離により行った。自動化されたMACS分離は、製造者の使用説明書に従ってautoMACS（登録商標）Pro Separator（Miltenyi Biotec）を使用して行った。溶出されたCD14$^+$単球およびCD8$^+$T細胞を遠心分離（8分、300×g、RT）し、X-VIVO 15培地（Lonza）に再懸濁し、エリスロシンB溶液を用いてさらなる使用；すなわち、iDCへの単球分化またはPD-1および/もしくはCLDN6特異的T細胞受容体（TCR）mRNAを用いたCD8$^+$T細胞のエレクトロポレーションのためにカウントした。

【０４６７】

単球由来iDCの生成のために、最大40×10^{6}個のPBMC由来CD14$^+$単球をT175フラスコ中、100ng/mLのヒト顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF；Miltenyi Biotec、カタログ番号130-093-868）および50ng/mLのヒトIL-4（Miltenyi Biotec、カタログ番号130093 924）を補充したDC培地（RPMI 1640、5%のプールされたヒト血清［PHS；One Lambda、カタログ番号A25761］、1×最小必須培地非必須アミノ酸溶液［MEM NEAA、Life Technologies、カタログ番号11140 035］、1mMピルビン酸ナトリウム［Life Technologies、カタログ番号11360 039］）中で5日間培養（37℃、5%CO_2）した。3日の培養後に、フラスコ当たり培地の半分を置き換えた。フラスコから得られた培地は非接着性単球を含んでいたため、それを遠心

分離（8分、300×g、RT）し、上清を捨て、細胞ペレットを新鮮なDC培地に再懸濁し、次に、200ng/mLのGM-CSFおよび200ng/mLのIL-4（最終濃度）と共に元々のフラスコに戻した。5日のインキュベーションの後に、培養フラスコに接着していたiDCを、2mM EDTAを含有する10mLのDPBSを使用して剥離した（37℃、10分）。単離されたiDCを洗浄し、ペレット化（8分、300×g、RT）し、CLDN6 mRNAを用いるエレクトロポレーションのために使用した。

【0468】

ヒトCD8$^+$T細胞に、ヒトCLDN6に特異的なマウスTCRのアルファおよびベータ鎖をコードするRNAを、単独でまたはPD-1をコードするRNAと共に、エレクトロポレートし、ヒト単球由来iDCに、ヒトCLDN6をコードするRNAをエレクトロポレートした。最大5×10^{6}個のiDCまたは15×10^{6}個のCD8$^+$T細胞を、ECM 830 Square Wave Electroporation System（BTX（登録商標））を使用してRTで250μLのX-VIVO 15培地中でエレクトロポレートした。細胞をRNAと混合し、パルス処理（T細胞について500V、3ms、またはiDCについて300V、12ms）し、750μLの予め温めたアッセイ培地（5%PHSを含むIMDM GlutaMAX [Life technologies、カタログ番号31980030]）で直ちに希釈した。エレクトロポレートしたiDCを6または12ウェルプレートに移し、O/N（37℃、5%CO_2）培養した。O/Nのインキュベーションの後に、エレクトロポレートしたCD8$^+$T細胞およびiDCをフローサイトメトリーにより評価して、細胞純度、トランスフェクトされたRNAの発現（CD8$^+$T細胞上のPD-1およびCLDN6-TCRならびにiDC上のCLDN6）、ならびにCD8$^+$T細胞上のCD27およびPD-1ならびにiDC上のPD-L1のベースライン発現を評価した。エレクトロポレートしたCD8$^+$T細胞の約78%～93%、78%～92%、および36%～98%は、それぞれCLDN6-TCR、PD-1、および内因性CD27を発現した。エレクトロポレートしたiDCの約47%～91%および94%～99%は、それぞれCLDN6および内因性PD-L1を発現した（図示せず）。

【0469】

CD8$^+$T細胞およびiDCを10:1の比（ウェル当たり7.5×10^{4}個のT細胞および7.5×10^{3}個のiDC）で96ウェル丸底プレートに播種した。IgG1-CD27-A-P329R-E345Rをアッセイ培地中で希釈し、25μLの希釈されたIgG1-CD27-A-P329R-E345Rをウェルに加えて、10μg/mLの最終濃度に達した。同様に、対照抗体IgG1-CD27-131AおよびIgG1-b12-P329R-E345Rを10μg/mLの最終濃度に達するまで加えた。CLDN6を発現および提示するように形質導入されたiDCと共培養された、CLDN6-TCRを発現するように形質導入されたT細胞の上清中のサイトカインを測定することにより、抗体処理での抗原特異的T細胞活性をインビトロで分析した。上清を2日後に収集し、複数の炎症促進性サイトカインおよびケモカインの濃度を、製造者の使用説明書に従って10-spot U-PLEX ImmunoOncology Group 1（human）kit（MSD；カタログ番号K151AEL2）を使用してマルチプレックス電気化学発光アッセイ（ECLIA）により決定した。

【0470】

10-spot U-PLEX Immuno-Oncology Group 1 kitのために、ビオチン化された捕捉抗体を、ビオチン結合ドメインを有する割り当てられたリンカーと共にRTで30分間プレインキュベートし、続いて停止溶液と30分インキュベートした。RTで振盪と共に1hrインキュベートすることにより、リンカーにより連結された捕捉抗体のミックスでプレートを被覆した。プレートを1×MSD洗浄緩衝液で3回洗浄した。上清試料またはキット標準品をアッセイ希釈剤中で1:2に希釈し、ウェルに加え、RTで2h、一定の振盪と共にインキュベートした。プレートを洗浄緩衝液で3回洗浄し、キットからのSULFO-TAGコンジュゲート検出抗体とRTで1h、一定の振盪と共にインキュベートした。プレートを洗浄緩衝液で3回洗浄した後に、電気化学発光反応を触媒するためにリード緩衝液Bを加えた。MESO QuickPlex SQ 120 imager（MSD）で光強度を測定することによりプレートを直ちに分析した。

【0471】

2日のインキュベーション後のCD8$^+$T細胞/iDC共培養物からの上清におけるマルチプ

レックスECLIAによりサイトカイン産生におけるIgG1-CD27-A-P329R-E345R誘導性変化を評価した（n＝4の異なるドナー）。IgG1-CD27-A-P329R-E345Rは、内因性レベルのPD-1を発現するCD8$^+$T細胞を用いるCD8$^+$T細胞/iDC共培養物においてGM-CSFおよびIFNγの産生における有意な増加を誘導したが（図20A）、IL-13およびTNFα産生における増加も観察された。同じサイトカインについてのかなりの増加が、PD-1過剰発現T細胞を含有する培養物において観察された（図20B）。T細胞がPD-1を過剰発現する場合にサイトカインレベルは一般に減少したが、IgG1-CD27-A-P329R-E345Rの存在下でのサイトカイン産生における相対的な増加（増加倍数）はこの設定において概して高かった（図20Aおよび図20B）。対照的に、先行技術の抗CD27抗体IgG1-CD27-131Aは、非結合性対照抗体IgG1-b12-P329R-E345Rと比較してサイトカイン産生に対する最小の効果を示した（図20Aおよび図20B）。

【0472】

実施例23：IgG1-CD27-A-P329R-E345Rとインキュベートされた抗原特異的CD8$^+$T細胞による細胞傷害性関連分子の発現

CLDN6-TCRを発現するように形質導入されたヒト健常ドナーT細胞およびMDA-MB-231_hCLDN6標的細胞の共培養物においてフローサイトメトリーにより抗原特異的T細胞上の細胞傷害性関連分子の発現を分析することにより抗体処理でのT細胞媒介性細胞傷害の誘導を研究した。

【0473】

MDA-MB-231_hCLDN6細胞をレンチウイルス形質導入により生成した。この目的のために、10%FBS（非熱不活化）を補充した250μLのダルベッコ改変イーグル培地（DMEM、Thermo Fisher Scientific、カタログ番号31966～047）中の2×10^5個のMDA-MB-231細胞を12ウェル組織培養プレート中のウェル毎に播種した。細胞を37℃（7.5%CO_2）で1～2hインキュベートした。ヒトCLDN6をコードするレンチウイルスベクター（pL64b42E（EF1a-hClaudin6）Hygro-T2A-GFP）を含有する上清を氷上で解凍し、750μLのDMEM/10%FBSの総体積で希釈して、2×10^5、8×10^4、および3.2×10^4TU/mLの力価を得た。これらの力価は、それぞれ1、0.4、および0.16のMOIに対応した。上清を次にMDA-MB-231細胞に加え、細胞を撹乱なしで37℃（5%CO_2）で72hインキュベートした。本実施例に記載される実験のために、MDA-MB-231-hCLDN6細胞をDMEM/10%FBS中で培養した。細胞を継代し、70%～90%のコンフルエンスにおいて実験のために採取した。細胞をAccutase（Thermo Fisher Scientific、カタログ番号A11105010）で5分間（37℃、7.5%CO_2）の処理により剥離し、培養培地の追加により再懸濁した。細胞を遠心分離（300×g、4分、RT）し、カウントした。MDA-MB-231_hCLDN6細胞は、20継代より多く培養しなかった。

【0474】

MDA-MB-231_hCLDN6細胞を$1.2\sim1.5\times10^4$細胞/ウェルで96ウェル平底プレート（フローサイトメトリー分析のため）およびxCELLigence E-plates（Agilent、カタログ番号05232368001；インピーダンス測定のため）に播種し、RTで30分間静置した。次に、プレートをそれぞれインキュベーターおよびxCELLigence real-time cell analysis（RTCA）機器（ACEA Biosciences）において1日インキュベートした（37℃、5%CO_2）。

【0475】

単離されたCD8$^+$T細胞（実施例22を参照）にCLDN6特異的TCR mRNAをエレクトロポレートし、O/Nでインキュベートした。CD8$^+$T細胞単離およびエレクトロポレーションの後に、T細胞培養物は49%～99%のCD8$^+$T細胞を含有した。これらのエレクトロポレートされたCD8$^+$T細胞のうち、約78%～93%はCLDN6-TCRを発現し、CLDN6-TCR$^+$CD8$^+$細胞の59%～98%はCD27$^+$であった。細胞を遠心分離（8分、300×g、RT）し、DMEM/10%FBSに再懸濁し、カウントした。細胞を再び遠心分離し、3×10^6細胞/mLでDMEM/10%FBSに再懸濁し、以前に播種されたMDA-MB-231_hCLDN6細胞を含有するウェルに加えた（1.5×10^5個のCD8$^+$T細胞/ウェル；T細胞:腫瘍細

胞比、エフェクター:標的比は10:1）。IgG1-CD27-A-P329R-E345R、IgG1-CD27-131A、および非結合性対照抗体IgG1-b12-P329R-E345Rを共培養物に10μg/mLで加えた。CD107aおよびGzmBの発現をフローサイトメトリーにより決定した。

【０４７６】

10μg/mLのIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの存在下での2日のインキュベーションの後に、GzmB$^+$CD107a$^+$CD8$^+$T細胞のパーセンテージは、非結合性対照抗体または先行技術の抗CD27抗体IgG1-CD27-131Aでの処理と比較して有意に増強された（図21）。

【０４７７】

結論として、これらのデータは、IgG1-CD27-A-P329R-E345Rは、活性化された抗原特異的T細胞上に細胞傷害性関連分子を誘導することができたことを示す。

【０４７８】

実施例24：T細胞媒介性腫瘍細胞傷害を誘導するIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの能力

T細胞媒介性細胞傷害を評価するために、CLDN6-TCRエレクトロポレートCD8$^+$T細胞をMDA-MB-231_hCLDN6細胞と、IgG1-CD27-A-P329R-E345R、先行技術の抗CD27抗体IgG1-CD27-131A、または非結合性対照抗体IgG1-b12-P329R-E345Rの存在下で5日間、実施例23に記載されるように、2時間間隔でのインピーダンス測定と共に、xCELLigenceリアルタイム細胞分析機器（Acea Biosciences）において共培養した。2時間間隔で実行されたインピーダンス測定から細胞指数値を導出した。曲線下面積（AUC）を5日の共培養にかけての細胞指数データから得た。IgG1-b12-P329R-E345Rで処理された共培養物に対してAUCを正規化した。インピーダンスの規模は、細胞数、細胞形態、および細胞サイズならびにプレートへの細胞接着の強度に依存し、これらは共に、腫瘍細胞量の間接的なリードアウトとしてこの特定の場合において使用される。この実験設定におけるインピーダンスにおける減少は、CD8$^+$T細胞による腫瘍細胞殺滅の代用物と考えられる。インピーダンスは、T細胞の増殖に起因して腫瘍細胞殺滅を過小評価し得ることが留意されるべきである。

【０４７９】

IgG1-CD27-A-P329R-E345Rは、腫瘍細胞殺滅の指標となる、細胞指数における減少を誘導した。IgG1-CD27-131Aは、細胞指数に対する可視的な効果を有さず、腫瘍細胞殺滅を増加させる最小の能力を指し示した（図22）。

【０４８０】

実施例25：腫瘍浸潤性リンパ球の拡大増殖を誘導するIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの能力

腫瘍浸潤性リンパ球（TIL）サブセット（CD4$^+$およびCD8$^+$T細胞、NK細胞、ならびに制御性T細胞［Treg］）の拡大増殖を誘導するIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの能力を、NSCLC患者から外科的に切除された凍結保存された腫瘍を使用してエクスビボで評価した。

【０４８１】

外科的に切除されたヒトNSCLC組織を輸送培地（HypoThermosol（登録商標）FRS Preservation Solution［BioLife Solutions、カタログ番号101104］、7.5μg/mLのアムホテリシンB［Thermo Fisher Scientific、カタログ番号15290026］、および300単位/mL（U/mL）のpen/strep［Thermo Fisher Scientific、カタログ番号15140-122］）中で受領した。試料を洗浄培地（5mLのX-VIVO 15［Lonza］、2.5μg/mLのアムホテリシンB、［Thermo Fisher Scientific］および100U/mLのpen/strep［Thermo Fisher Scientific］）で3回洗浄し、細胞培養ディッシュに移した。脂肪組織および壊死区画を外科用メスで除去し、組織を約5mm^{3}の断片に切断した。各々の断片を個々のクライオバイアルに入れ、1mLの凍結培地（FBS、10%DMSO）を各々のバイアルに加えた。バイアルを、-80℃の冷凍器中に置かれた制御された凍結チャンバー（Mr.Frosty凍結コンテナー）に移した。-80℃で少なくとも16hの後に、バイアルを長期貯蔵のために液体窒素に移した。

【０４８２】
１つの腫瘍検体からの約５ｍｍ^{3}の腫瘍断片を含有する４～６個の凍結保存されたバイアルを実験毎に３７℃の水浴中で約２分間解凍し、洗浄培地で５回洗浄し、細胞培養ディッシュに移した。腫瘍断片を外科用メスで約１ｍｍ^{3}の断片にさらに解剖した。断片のほとんどは、ＩＬ-２および処理抗体との培養でのＴＩＬ拡大増殖のために使用し、残りの断片は、いかなる処理も伴わない、ベースラインでの特有の細胞表面マーカーの発現を決定するために使用した。
【０４８３】
（平均で）ウェル当たり２つの腫瘍断片を２４ウェルプレート（２ｍＬ/ウェルの総体積容量がアッセイにおいて使用された）中の０.１ｍＬの予め温めたＴＩＬ培養培地（４５～５０Ｕ/ｍＬのＩＬ-２（Ｐｒｏｌｅｕｋｉｎ Ｓ；Ｎｏｖａｒｔｉｓ Ｐｈａｒｍａ、カタログ番号ＰＺＮ-０２２３８１３１）を含有する２％ヒト血清アルブミン［ＨＳＡ；ＣＳＬ Ｂｅｈｒｉｎｇ、カタログ番号ＰＺＮ-００５０４７７５］、１００Ｕ/ｍＬのｐｅｎ/ｓｔｒｅｐ［Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ］、および２.５μｇ/ｍＬのアムホテリシンＢ［Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ］を含むＸ-ＶＩＶＯ １５［Ｌｏｎｚａ］）に播種した。ＩｇＧ１-ＣＤ２７-Ａ-Ｐ３２９Ｒ-Ｅ３４５Ｒを、４５～５０Ｕ/ｍＬのＩＬ-２を含有するＴＩＬ培養培地中で希釈し、９００μＬのこの希釈液を適宜ウェルに加えた。ウェル中の最終ＩｇＧ１-ＣＤ２７-Ａ-Ｐ３２９Ｒ-Ｅ３４５Ｒ濃度は１または１０μｇ/ｍＬであった。対照として、抗体なしで４５～５０Ｕ/ｍＬのＩＬ-２を含有する培地を別々のウェル中の腫瘍断片に加えた。全部で８～１６個のウェルをドナー毎の各々の実験条件（３７℃、５％CO_2）のためにインキュベートした。
【０４８４】
３日の培養後に、４５～５０Ｕ/ｍＬのＩＬ-２およびＩｇＧ１-ＣＤ２７-Ａ-Ｐ３２９Ｒ-Ｅ３４５Ｒを含有する新鮮なＴＩＬ培養培地をウェルに加えた（１ｍＬ/ウェル、上記と同じ抗体濃度）。アッセイ開始の５～１４/１７日後に、培養物を顕微鏡で、組織断片から遊走したＴＩＬの増殖およびＴＩＬマイクロクラスターの形成について、定期的にモニターした。７日または８日の培養の後に２５個より多くのＴＩＬマイクロクラスターが１つのウェル中に観察された場合、２つの同一に処理された元々のウェルからの細胞および組織断片を、培養培地を含む６ウェルプレートの１つのウェルに再懸濁およびプールし（５～６ｍＬ/ウェルの総体積容量をアッセイにおいて使用した）、新鮮なＩＬ ２含有ＴＩＬ培養培地を加えた（３３Ｕ/ｍＬのＩＬ-２最終濃度と概算された）。
【０４８５】
２～３日毎に、培養物に新鮮なＩＬ-２含有ＴＩＬ培養培地を補充した。培養物に加える培地中のＩＬ-２濃度を１０Ｕ/ｍＬに低減したか、または最初に２５Ｕ/ｍＬ、その後に１０Ｕ/ｍＬに低減し、アッセイの全体を通じてウェルに培地を補充した。１４または１７日目に、細胞をフローサイトメトリー分析のために採取した。
【０４８６】
ＩｇＧ１-ＣＤ２７-Ａ-Ｐ３２９Ｒ-Ｅ３４５Ｒは、ＩＬ-２単独で処理された対照培養物と比較してＴＩＬサブタイプの拡大増殖を増強し、細胞カウントにおける最大の相対的な増加が$CD8^+$Ｔ細胞およびＴｒｅｇについて観察され、続いて$CD4^+$Ｔ細胞、およびＮＫ細胞であった。すべてのＴＩＬサブセットについて、拡大増殖は、１０μｇ/ｍＬよりも１μｇ/ｍＬでＩｇＧ１-ＣＤ２７-Ａ-Ｐ３２９Ｒ-Ｅ３４５Ｒを用いた場合に、より著しかった（表４および図２３）。
【０４８７】
（表４）ＩｇＧ１-ＣＤ２７-Ａ-Ｐ３２９Ｒ-Ｅ３４５Ｒ処理されたＴＩＬの拡大増殖倍数
ヒトＮＳＣＬＣ検体に由来する腫瘍組織をＩｇＧ１-ＣＤ２７-Ａ-Ｐ３２９Ｒ-Ｅ３４５Ｒの存在または非存在下で低用量ＩＬ-２と共に培養した。指し示される細胞サブセットの絶対細胞カウントを処理の１４～１７日後にフローサイトメトリーにより決定した。ＩＬ-２で処理された培養物と比べたＩｇＧ１-ＣＤ２７-Ａ-Ｐ３２９Ｒ-Ｅ３４５Ｒ処理された培養物についての細胞数における差異倍数を示している。示されるデータは、５つの独立した実験において試験された個々の患者からの５つの腫瘍組織からのものである。Ｐ＝０.０２３６、１μｇ/ｍＬ ｖｓ.１０μｇ/ｍＬ ＩｇＧ１-ＣＤ２７-Ａ-Ｐ３２９Ｒ-Ｅ３４５Ｒ（二元配置ＡＮＯＶＡ）。

細胞集団	全TIL		CD4+ T細胞		CD8+ T細胞		Treg		NK細胞	
IgG1-CD27-A-P329R-E345R 濃度 (μg/mL)	1	10	1	10	1	10	1	10	1	10
患者#578	14.9	2.1	19.3	2.3	19.6	2.9	86.9	2.1	11.3	1.1
患者#507	27.9	5.1	33.7	4.4	107.1	17.4	32.2	11.9	14.4	6.0
患者#594	0.6	1.5	0.4	1.0	1.8	2.2	0.4	2.3	0.8	2.6
患者#592	0.9	0.8	0.4	0.2	2.9	1.7	4.8	2.6	2.3	1.2
患者#561	0.8	1.6	0.2	2.9	0.8	1.0	n.d.	n.d.	1.1	1.2
平均±SD[a]	11.1±11.3	2.4±1.6	13.5±14.0	2.0±1.6	32.9±43.4	6.1±6.6	31.1±34.5	4.9±4.1	7.2±5.8	2.7±2.0

[a]平均およびSDの算出では、細胞集団の間のより良好な比較可能性のために患者#561を除外している。
略語:ANOVA＝分散分析；n.d.＝決定せず；NK＝ナチュラルキラー；NSCLC＝非小細胞肺がん；SD＝標準偏差；TIL＝腫瘍浸潤性リンパ球；Treg＝制御性T細胞。

【0488】
実施例26：細胞表面上のIgG1-CD27-A-P329R-E345R分子の分子間相互作用を評価するためのBRET分析

細胞表面上のCD27への結合後に分子間Fc-Fc相互作用を増加させる六量体化増強性変異（E345R）を宿すCD27抗体の能力を、生物発光共鳴エネルギー移動（BRET）分析を使用して決定した。この分子近接性ベースアッセイは、生物発光タンパク質ドナーから蛍光タンパク質アクセプターへのエネルギー移動を測定することによりタンパク質相互作用を検出する。エネルギー移動は、ドナーおよびアクセプターが緊密な近接性（＜10nm［Wu and Brand,1994；Dacres et al,2012］）にある場合にのみ起こる。

【0489】
最初に、CD27の他に、（陽性対照分子として）CD20およびCD37の細胞表面発現を、ヒトCD27を安定的に発現するように遺伝子改変されたヒト慢性骨髄性白血病細胞株、huCD27-K562上で、およびDaudi細胞上で、間接免疫蛍光アッセイ（QIFIKIT、Agilent Technologies、カタログ番号K0078）を使用して決定した。細胞を100,000細胞/ウェルで播種し、10μg/mLの一次抗体（CD27:IgG1-7730-143-C102S-FEAL；CD20:IgG1-11B8-FEAR；CD37:IgG1-3009-010-FEAR）とインキュベートした。これに続いて、FITC標識されたポリクローナルヤギ抗ヒトIgG（Jackson Immuno Research、カタログ番号109-096-097）とのインキュベーション、これと並行して、定義された数の抗体分子で被覆されたQIFIKITビーズとのインキュベーションを行った。ビーズ当たりの既知の数の抗体分子に対して個々のビーズ集団の平均蛍光強度（MFI）をプロットすることにより生成された較正曲線において試験試料の測定されたMFIを補間することにより、細胞当たりの抗体分子の数を決定した。試料をLSRFortessa Cell Analyzerフローサイトメーター（BD Biosciences）で測定し、FlowJoソフトウェアを使用して分析した。

【0490】
QiFi分析は、Daudi細胞上の中等度のCD27発現ならびに高いCD20およびCD37発現を示した一方、huCD27-K562細胞は、高いレベルのCD27を発現したが、CD20およ

びCD37を発現しなかった（表5）。

【０４９１】

（表５）細胞当たりの抗体分子の細胞表面発現

	huCD27-K562	Daudi
CD27	390,373	15,484
CD20	-	180,217
CD37	-	219,663

【０４９２】

BRETアッセイ（NanoBRET（商標）System、Promega、カタログ番号N1661）は、本質的に製造者の使用説明書に従って行った。NanoLuc（ドナー）およびHaloTag（アクセプター）タグ付加抗体を生成するために、NanoLucまたはHaloTagのいずれかを有する可変軽鎖配列（表1、配列71～78）を遺伝子合成により調製し、適切な発現ベクターにクローニングし、実施例1に記載されるように全長抗体を製造した。分析のために、0.5×10^5個のhuCD27-K562またはDaudi細胞を96ウェル丸底プレート（Greiner Bio-One、カタログ番号650101）に100μLの総体積で播種した。細胞を遠心分離（3分、300×g）によりペレット化し、各々5μg/mLの濃度でNanoLucまたはHaloTagタグ付加抗体ペアの混合物を含有する50μLのアッセイ培地（Opti-MEM I［Gibco、カタログ番号11058-021］＋4%FBS［ATCC、カタログ番号30-2020］）に再懸濁した。次に、50μLのHaloTag NanoBret 618リガンド（Promega、カタログ番号G980A、アッセイ培地中1:1000の希釈）を加えた。各々の抗体混合物のために、HaloTag NanoBret 618リガンドを含まない50μLの培地を加えることにより、無リガンド対照試料を並行して調製した。細胞を37℃の暗所中で30分間インキュベートし、培地で2回洗浄し、FBSを含まない100μLのアッセイ培地に再懸濁した。25μLのNanoBRET NanoGLO基質（Promega、カタログ番号N1571、FBSを含まないアッセイ培地中1:200の希釈）を各々のウェルに加えた。プレートを30s振盪し、120μLの各々の試料をOptiPlate（Perkin Elmer、カタログ番号6005299）に移した。EnVision Multilabel Reader（Perkin Elmer）を使用して460nmにおいてドナー発光および618nmにおいてアクセプター発光を測定した。

【０４９３】

BRETはmilliBRET単位（mBU）＝（$618nm_{em}/460nm_{em}$）×1000において算出した。

【０４９４】

結果は補正BRETとして報告しており、これは、ドナー寄与のバックグラウンドまたはブリードスルーについて補正されており、mBUリガンド-mBU無リガンド対照として算出される。

【０４９５】

細胞表面上のCD27に結合した後のNanoLucおよびHaloTag標識されたIgG1-CD27-A-P329R-E345R抗体の近接性を、同じタグを有するWT IgG1-CD27-A抗体と比較した。六量体化を誘導するE430G変異（WO2019243636A1）を含有する、IgG1-CD20-11B8-E430G-LNLucおよびIgG1-CD37-37.3-E430G-LHalo抗体を近接性誘導性BRETのための陽性対照として使用した。IgG1-CD20-11B8-E430GおよびIgG1-CD37-37.3-E430Gは、分子近接性アッセイを使用して、CD20およびCD37を発現する細胞への結合でヘテロ六量体を形成することが以前に示されている（Oostindie,S.C.et al,Haematologica,2019）。非結合性抗体IgG1-b12-P329R-E345Rを陰性対照として使用した。

【０４９６】

BRETシグナル誘導の陽性および陰性対照として、Daudi細胞（高いCD20およびCD3

7発現）およびhuCD27-K562細胞（CD20およびCD37発現なし）を、抗体ペアIgG1-CD20-11B8-E430G-LNLucおよびIgG1-CD37-37.3-E430G-LHaloでオプソニン化した。BRET誘導はDaudi細胞においてのみ検出され、CD20およびCD37を欠いたhuCD27-K562細胞において検出されなかった（図24）。同様に、非結合性対照抗体ペア（IgG1-b12-P329R-E345R-LNLuc＋IgG1-b12-P329R-E345R-LHalo）は、いずれの細胞株においてもBRETを誘導しなかった。huCD27-K562細胞を、六量体化増強性変異を有するNanoLucおよびHaloTag標識されたCD27抗体の混合物（IgG1-CD27-A-P329R-E345R-LNLuc＋IgG1-CD27-A-P329R-E345R-LHalo）でオプソニン化した場合、高いBRETが検出されたが、Daudi細胞におけるBRETはバックグラウンドレベルを上回らなかった（図24）。IgG1-CD27-A-LNLucおよびIgG1-CD27-A-LHalo（WT）抗体の混合物は、P329RおよびE345R変異を有するCD27抗体と比較して、huCD27-K562細胞においてかなり低いBRETを誘導し、Daudi細胞においてBRETを誘導しなかった。これらの結果は、BRETシグナルはより高い標的発現と関連付けられたことを指し示す。huCD27-K562細胞上のCD27発現は、Daudi細胞上よりも約26倍高いことが見出され、huCD27-K562細胞上のCD27結合性IgG1-CD27-A-P329R-E345RについてのBRETレベルはDaudi細胞におけるよりも約24倍高かった。NanoLucおよびHaloTag標識された非結合性およびCD27結合性抗体ペアの混合物（それぞれIgG1-b12-P329R-E345R-LNLuc＋IgG1-CD27-A-P329R-E345R-LHalo、およびIgG1-CD27-A-P329R-E345R-LNLuc＋IgG1-b12-P329R-E345R-LHalo）は、いずれの細胞株においてもBRETを誘導しなかった。これは、観察されたBRETは、細胞表面標的に結合したドナーおよびアクセプター抗体の同時の相互作用に依存していたことを裏付ける。

【０４９７】

要約すると、IgG1-CD27-A-P329R-E345Rは、そのWTバリアントと比較してhuCD27-K562細胞において高いBRETを誘導した。この発見は、細胞表面結合抗体の間のE345R増強性Fc-Fc相互作用と合致して、そのWTバリアントと比較した、膜結合型IgG1-CD27-A-P329R-E345R分子の間の近接性の増強を裏付ける。

注記:この実施例に記載される実験は、この実験の文脈において機能的に関連しない、F405L変異を有するIgG1-CD27-Aのバリアントを使用した。

【０４９８】

実施例27：FcγRIa^{+}M0およびM1マクロファージに対するIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの結合

実施例9では、表面プラズモン共鳴（SPR）を使用してヒトFcγRバリアントに対するIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの結合を評価し、組換えヒトIgG Fc受容体分子に対する最小の結合（FcγRIa）または結合なし（FcγRIIa、FcγRIIb、およびFcγRIIIa）を示した。この残留FcγRIa結合は、CD27^{+}細胞のIgG1-CD27-A-P329R-E345R依存性ADCPを誘導するために十分でなかった（実施例13を参照）。FcγRIa陽性マクロファージとのIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの相互作用をさらに除外するために、M0およびM1マクロファージに対するIgG1-CD27-A-P329R-E345RのFc媒介性結合を決定した。

【０４９９】

実施例13に記載されるようにヒトCD14^{+}単球を2人の健常ドナーからのPBMCから単離し、M0マクロファージを得るために50ng/mLのM-CSF（Gibco、カタログ番号PHC9501）、またはM1マクロファージへの分化のために50ng/mLのGM-CSF（Immunotools、カタログ番号11343125）を補充した培地（CellGenix、カタログ番号20801-0500）中で細胞を培養することにより、単球由来マクロファージに分化させた。6日の培養後に、M0およびM1表現型が、表6において定義されているマーカーの発現に応じてFACS分析により確認された。追加的に、両方のマクロファージサブタイプは、ヒトFc受容体FcγRIa、FcγRIIおよびFcγRIIIaを発現することが確認された（表6）。

【０５００】

（表６）

表現型マーカー	M0	M1
CD40 (BD Pharmingen, カタログ番号 561211, 1:50 希釈)	+	+
CD86 (MACS, カタログ番号 30-097-877, 1:50 希釈)	+	++
CD163 (Biolegend,カタログ番号333612, 1:200 希釈)	+/-	-
CD206 (Biolegend, カタログ番号 321136, 1:200 希釈)	+/-	+
Fc 受容体		
FcγRIa (Biolegend, カタログ番号 305006, 1:25 希釈)	++	++
FcγRII (BD Pharmingen, カタログ番号 552883, 1:50 希釈)	++	++
FcγRIIIa (BD Pharmingen, カタログ番号 555407, 1:50 希釈)	+	+/-

【０５０１】

Ｍ０およびＭ１マクロファージに対するIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの結合を、ＦｃγＲＩａ結合についての陽性対照としての関連しない抗原結合領域を有するＷＴ IgG1抗体（IgG1-b12）、およびＦｃγＲとの相互作用を低減させることが以前に記載されたＰ３２９Ｒ変異も有する同じ抗体のバリアント（IgG1-b12-P329R-E345R）の結合と比較した。マクロファージはＣＤ２７を発現しないはずであるので、観察される任意の結合は、一価IgGに結合する唯一のＦｃγＲであるＦｃγＲＩａを介して起こるという仮説が立てられる。分化したマクロファージをIgG1-CD27-A-P329R-E345Rまたは対照抗体（ＤＣ培地中３０μｇ/ｍＬ）、およびＰＥ標識されたポリクローナルヤギ抗ヒトIgG（Jackson Immuno Research、カタログ番号109-116-097、希釈1:200、３０分、４℃）と１５分間インキュベートした。インキュベーション後に、細胞を洗浄し、核染色性ＤＡＰＩ（ＢＤ Pharmingen、カタログ番号５６４９０７、1:5000の希釈）を含有する１００μＬのＦＡＣＳ緩衝液に再懸濁した。試料をＦＡＣＳymphonyフローサイトメーター（ＢＤ Biosciences）で測定し、ＦｌｏｗＪｏソフトウェアを使用して分析した。

【０５０２】

２人の独立したドナーから単離されたＭ０またはＭ１マクロファージに対するバックグラウンド（二次抗体のみ）を上回る結合は、IgG1-CD27-A-P329R-E345Rまたは対照IgG1-b12-P329R-E345Rのいずれでも観察されなかった（図２５）。活性Ｆｃ領域を含有するＷＴ IgG1-b12は、Ｍ０およびＭ１マクロファージの両方に一貫して結合した。

【０５０３】

結論として、IgG1-CD27-A-P329R-E345Rおよび対照IgG1-b12-P329R-E345Rは、ＦｃγＲＩａ、ＦｃγＲＩＩおよびＦｃγＲＩＩＩａを発現するＭ０またはＭ１マクロファージに結合しない。

【０５０４】

実施例28:DuoBody-CD40x4-1BBと組み合わせたIgG1-CD27-A-P329R-E345Rによるポリクローナル活性化$CD8^+$Ｔ細胞の増殖の誘導

活性化ヒト$CD8^+$Ｔ細胞に対するDuoBody-CD40x4-1BBと組み合わせたIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの効果を、Ｔ細胞がＣＤ３抗体でポリクローナルに刺激された新たに単離されたヒト健常ドナーＰＢＭＣを使用してフローサイトメトリーにより分析した。

【０５０５】

製造者の使用説明書にしたがってリンパ球分離培地（Corning、カタログ番号25-072-CI）を使用して低密度勾配遠心分離によりヒト健常ドナーバフィコートからヒト末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を新たに単離した。鉄を含む２％ドナーウシ血清（DBSI;Gibco、カタログ番号20371-030）を補充したＰＢＳ（HyClone、カタログ番号SH3A3830.03）中10×10^6細胞/ｍＬの密度でＰＢＭＣを２回洗浄し、製造者の使用説明書にしたがってＣｅｌｌＴｒａｃｅ（商標）Violet Cell Proliferation Kit（Invitrogen、カタログ番号C34557A、ＰＢＳ中に希釈）を使用してＣＴＶで標識した。ＣＴＶ標識されたＰＭＢＣ（7.5×104

細胞/ウェル）を丸底96ウェルプレート（Greiner Bio-One、カタログ番号650180）中にプレーティングし、アッセイ培地（RPMI 1640［Lonza、カタログ番号12-115F］、鉄を含む10％ドナーウシ血清［DBSI;Gibco、カタログ番号20731-030］、1％Pen/Strep［Lonza、カタログ番号DE17-603E］）中の抗CD3抗体（aCD3、クローンUCHT1、アッセイにおける最終濃度0.1μg/mL、Stemcell、カタログ番号60011）と混合してT細胞活性化をトリガーした。引き続いて、aCD3で刺激されたPBMCを、単独または組合せのいずれかで、IgG1-CD27-A-P329R-E345R（5倍希釈において0.0016～10μg/mL）およびDuoBody-CD40x4-1BB（5倍希釈において0～0.000064μg/mL）と150μLの総体積において37℃で4日間インキュベートした。細胞懸濁液をペレット化し、リンパ球マーカーAF700標識抗ヒトCD8（BD BioLegend、カタログ番号301028、1:50）を含有するFACS緩衝液（PBS［Lonza、カタログ番号BE17517Q］、0.02％アジ化ナトリウム［bioWorld、カタログ番号41920044 3］、0.1％BSA［Roche、カタログ番号43279213］、2mMのEDTA［Sigma、カタログ番号BCCD3789］）と4℃で30分間インキュベートした。細胞をFACS緩衝液で3回洗浄し、生存色素TO-PRO-3（Invitrogen、カタログ番号T3605）を含有するFACS緩衝液中に再懸濁した。フローサイトメトリーデータをFACS Symphony（BD）上で取得した。

【０５０６】

生存CD8$^+$T細胞サブセット（CD8$^+$7-AAD）におけるCTV希釈ピークを、FlowJoソフトウェア（v10.7.3）中の増殖モデリングツールを使用して分析し、以下の式にしたがって拡大増殖指数を決定した:

培養の開始時の細胞の数＝（G0）＋（G1）/2＋（G2）/4＋（G3）/8＋（G4）/16＋...（GN/2N）

拡大増殖指数＝全細胞数（G0～GNの和）/開始時の細胞の数

G0～GNは単一増殖ピークであり、G0は未分裂の細胞画分を表し、GNはN回分裂した細胞画分を表す。

【０５０７】

CD8$^+$（図26）T細胞増殖における用量依存的な増加が、単独でのIgG1-CD27-A-P329R-E345Rで処理されたPBMC試料において全抗体濃度範囲にかけて観察された。単独でのDuoBody-CD40x4-1BBで処理された試料の用量応答曲線はベル形の曲線を示し、1μg/mLの抗体濃度で最大の拡大増殖指数に達した。DuoBody-CD40x4-1BBとのIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの組合せは、単独での各々の抗体よりも強力にCD8$^+$T細胞増殖を増加させ、最大の効果は、DuoBody-CD40x4-1BBについて試験された中～高濃度（0.04～5μg/mL）と組み合わせた最も高い試験されたIgG1-CD27-A-P329R-E345R濃度（2～10μg/mL）において到達された。

【０５０８】

これらのデータは、DuoBody-CD40x4-1BBとのIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの組合せは、単独での各々の抗体と比較してT細胞増殖におけるより高い増加を示したことを指し示す。

【０５０９】

実施例29:T細胞増殖を増強するDuoBody-CD40x4-1BBと組み合わせたIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの能力を決定するための抗原特異的刺激アッセイ

単剤活性と比較したT細胞増殖およびサイトカイン産生に対するIgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびDuoBody-CD40x4-1BBの組合せ効果を決定するために、健常ヒトCD8＋T細胞およびコグネイト抗原発現未熟樹状細胞（iDC）の共培養物を使用して抗原特異的刺激アッセイを実行した。

【０５１０】

HLA-A＊02$^+$末梢血単核細胞（PBMC）を健常ドナーから得た（Transfusionszentrale、University Hospital、Mainz、Germany）。製造者の使用説明書にしたがって抗CD14マイクロビーズ（Miltenyi;カタログ番号130-050-201）を使用して磁気活性化細胞選別（MACS）技術によりPBMCから単球を単離した。T細胞単離のために10％

DMSO（AppliChem GmbH、カタログ番号A3672,0050）および10%ヒトアルブミン（CSL Behring、PZN 00504775）を含有するRPMI 1640中で末梢血リンパ球（PBL、CD14陰性画分）を凍結保存した。iDCへの分化のために、1mL当たり40×10^6個の単球を、5%のプールされたヒト血清（One Lambda Inc.、カタログ番号A25761）、1mMのピルビン酸ナトリウム（Life technologies GmbH、カタログ番号11360-039）、1x非必須アミノ酸（Life Technologies GmbH、カタログ番号11140-035）、200ng/mLの顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF;Miltenyi、カタログ番号130-093-868）および200ng/mLのヒトインターロイキン-4（IL-4;Miltenyi、カタログ番号130-093-924）を含有するRPMI 1640（Life Technologies GmbH、カタログ番号61870-010）中で5日間培養した。3日目に、培地の半分を、補充物を含有する新鮮な培地で置き換えた。5日目に、非接着細胞を収集することによりiDCを採取し、2mMのEDTAを含有するダルベッコリン酸緩衝化食塩水（DPBS）との10分間37℃でのインキュベーションにより接着細胞を剥離した。DPBSでの洗浄後に、抗原特異的T細胞アッセイにおける将来的な使用のために10% DMSO（AppliChem GmbH、カタログ番号A3672,0050）を含有するFBS（Sigma-Aldrich、カタログ番号F7524）中でiDCを凍結保存した。

【０５１１】

抗原特異的$CD8^+$T細胞刺激アッセイの開始の1日前に、同じドナーからの凍結されたPBLおよびiDCを解凍した。製造者の使用説明書にしたがって抗CD8マイクロビーズ（Miltenyi、カタログ番号130-045-201）を使用してMACS技術によりPBLから$CD8^+$T細胞を単離した。約10×10^6～15×10^6個の$CD8^+$T細胞に、250μLのX-VIVO（商標）15培地（Lonza、カタログ番号BE02-060Q）中で、各々10μgの、ヒトクローディン-6（CLDN6）に特異的なマウスTCR（HLA-A＊02制限）のアルファおよびベータ鎖をコードするインビトロ転写（IVT）-RNA（WO 2015150327 A1に記載されている）をエレクトロポレートした。細胞を4mmエレクトロポレーションキュベット（VWR International GmbH、カタログ番号732-0023）に移し、BTX ECM（登録商標）830 Electroporation System（BTX;500V、3msパルス）を使用してエレクトロポレートした。エレクトロポレーションの直後に、5%のプールされたヒト血清を含有する新鮮なIMDM GlutaMAX培地（Life Technologies GmbH、カタログ番号319800-030）に細胞を移し、37℃、5% CO_2で少なくとも1時間静置した。製造者の使用説明書にしたがってPBS中の0.8μMのカルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル（CFSE;Life Technologies GmbH、カタログ番号V12883）を使用してT細胞を標識し、5%のヒト血清を補充したIMDM培地中で終夜インキュベートした。

【０５１２】

最大5×10^6個の解凍されたiDCに、250μLのX VIVO（商標）15培地中で、上記のエレクトロポレーションシステム（300V、12msパルス）を使用して、全長ヒトCLDN6をコードする2μgのIVT-RNA（WO 2015150327 A1）をエレクトロポレートし、5%のプールされたヒト血清を補充したIMDM培地中で終夜インキュベートした。

【０５１３】

エレクトロポレートしたiDCを、エレクトロポレートした、CFSE標識されたT細胞と1:10（DC:T細胞）の比で、IgG1-CD27-A-P329R-E345R（0.1、1もしくは10μg/mL）、DuoBody-CD40x4-1BB（0.0022、0.0067もしくは0.2μg/mL）、または両方の組合せの存在下で、96ウェル丸底プレート中の5%のプールされたヒト血清を含有するIMDM培地中でインキュベートした。4日の培養後に、細胞をAPCコンジュゲート抗ヒトCD8抗体（例えば、PE-Cy7コンジュゲート、BD Biosciences、カタログ番号557750）で染色した。BD FACSCelesta（商標）フローサイトメーター（Becton Dickinson GmbH）を使用して$CD8^+$T細胞におけるCFSE希釈のフローサイトメトリー分析によりT細胞増殖を評価した。FlowJoソフトウェアバージョン10.7.1を使用してフローサイトメトリーデータを分析した。FlowJoにおける増殖モデリングツールを使用して$CD8^+$T細胞のCFSE標識希釈を評価し、以下の式を使用して拡大増殖指数を算出した:

培養の開始時の細胞の数＝（G0）＋（G1）/2＋（G2）/4＋（G3）/8＋（G4）/16＋...（GN/2N）
拡大増殖指数＝全細胞数（G0～GNの和）/開始時の細胞の数
G0～GNは単一増殖ピークであり、G0は未分裂の細胞画分を表し、GNはN回分裂した細胞画分を表す。

【０５１４】

製造者のプロトコールにしたがってヒトインターフェロン（IFN）γの検出用のV-Plex Proinflammatory Panel 1（ヒト）アッセイ（Meso Scale Discovery、カタログ番号K15049D）を使用してマルチプレックス電気化学発光イムノアッセイ（ECLIA）により細胞培養上清中のサイトカイン濃度を決定した。

【０５１５】

IgG1-CD27-A-P329R-E345RまたはDuoBody-CD40x4-1BBでの単剤処理は、抗体処理なしの共培養物と比較してCD8＋T細胞増殖を用量依存的に増強した。IgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびDuoBody-CD40x4-1BBの組合せは、単剤活性をさらに増強した（図27）。1または10μg/mLのIgG1-CD27-A-P329R-E345Rおよび0.0067または0.2μg/mLのDuoBody-CD40x4-1BBの組合せでの処理は、単剤DuoBody-CD40x4-1BBと比較した増加は小さかったが、個々に各々の化合物での処理よりも高い増殖に繋がった。

【０５１６】

IgG1-CD27-A-P329R-E345RまたはDuoBody-CD40x4-1BBでの単剤処理は、抗体処理なしの共培養物と比較して炎症促進性サイトカインIFNγの分泌を用量依存的に増強した（図28）。1または10μg/mLのIgG1-CD27-A-P329R-E345Rおよび0.0067μg/mLのDuoBody-CD40x4-1BBでの組合せ処理は、単剤DuoBody-CD40x4-1BBと比較した増加は小さかったが、サイトカイン分泌をさらに増強した。

【図面の簡単な説明】

【０５１７】

【図１】図1は、CD27 Jurkatレポーターバイオアッセイにおいて決定された、抗CD27抗体およびその六量体化増強FcバリアントのCD27アゴニスト活性を示す。解凍して使用されるGloResponse NFκB-luc2/CD27 Jurkatレポーター細胞を、抗体濃度系列（左から右に0.04μg/mL、0.30μg/mL、2.50μg/mL、および20μg/mL）の指し示される抗体と6hインキュベートした。ルシフェラーゼ活性を、CD27細胞内シグナル伝達についてのリードアウトとして、発光（RLU:相対発光単位）を決定することにより定量化した。指し示されるように、以下の抗体をWT IgG1および/またはE430Gもしくは E345R変異を有するバリアントとして含めた:E345R変異を含む非結合性抗HIV-gp120対照抗体（IgG1-b12-E345R、対照）、抗CD27抗体IgG1-CD27-A、IgG1-CD27-B、IgG1-CD27-C、IgG1-CD27-D、IgG1-CD27-E、およびIgG1-CD27-F、ならびに先行技術の抗CD27ベンチマーク抗体IgG1-CD27-131AおよびIgG1-CD27-15。

【図２】図2は、フローサイトメトリーにより決定された、（A、C）PBMC中のT細胞上または（B、D）CD27トランスフェクトHEK293F細胞上に発現された（A、B）ヒトCD27および（C、D）カニクイザルCD27に対する抗CD27抗体の結合を示す。抗体結合を中央値蛍光強度（MFI）として提示している。抗HIV-gp120抗体IgG1-b12-FEAR（対照）を非結合性陰性対照抗体として含めた。

【図３】図3は、フローサイトメトリーにより決定された、HEK293F細胞上に発現されたヒトCD27-A59Tバリアントに対する抗CD27抗体IgG1-CD27-A、IgG1-CD27-B、およびIgG1-CD27-Cの結合を示す。抗体結合を中央値MFIとして提示している。抗HIV-gp120抗体IgG1-b12-FEAL（対照）を非結合性陰性対照抗体として含めた。

【図４Ａ－１】図4は、CSFE希釈アッセイにおいてフローサイトメトリーにより決定された、Fc変異P329R、G237A、またはK326A-E33Aと組み合わせてFc変異E430RまたはE345Rを宿す1μg/mLのCD27特異的抗体バリアントIgG1-CD27-A、-B、または-Cの存在下でTCR刺激された（A）$CD8^+$および（B）$CD4^+$T細胞の増殖のヒートマッ

プを示す。4人のヒト健常ドナーからのPMBCをT細胞の供給源として使用した。FlowJoソフトウェアを使用することによりCFSE希釈を経た細胞（CFSE$^{low\ peaks}$）についてゲーティングすることにより算出された、T細胞分裂指数またはT細胞の増殖のパーセンテージとしてT細胞増殖を表した。

【図４Ａ－２】図4A-1の説明を参照のこと。

【図４Ｂ－１】図4A-1の説明を参照のこと。

【図４Ｂ－２】図4A-1の説明を参照のこと。

【図５】図5は、フローサイトメトリーにより決定された、IgG1-CD27-A、IgG1-CD27-A-P329R-E345R、または先行技術の抗CD27クローンIgG1-CD27-131A、IgG1-CD27-CDX1127、およびIgG1-CD27-BMS986215とのヒト健常ドナーPBMCのインキュベーション後の（A、B）非刺激、または（C～F）TCR刺激された、（A、C、E）CD4^{+}、または（B、D、F）CD8^{+}T細胞の、（A～D）増殖したT細胞のパーセンテージ、（E、F）拡大増殖指数を示す。抗HIV-gp120抗体バリアントIgG1-b12-E345R-P329R（対照）を非結合性陰性対照抗体として含めた。CFSE希釈を経た細胞（CFSE$^{low\ peaks}$）についてゲーティングすることにより細胞の増殖%を算出した。拡大増殖指数は、ウェル中の細胞の増加倍数を同定し、FlowJoバージョン10中のProliferation Modelingツールを使用して算出された。ピークに対する手動の調整を必要な場合に行って、存在するピークの数をより一貫して定義した。

【図６】図6は、FACSにより決定された、本発明の膜結合型CD27抗体に対するC1qの結合を示す。E430GまたはE345R六量体化増強性変異（IgG1-CD27-A-E430GおよびIgG1-CD27-A-E345R）ならびにP329R変異（IgG1-CD27-A-P329R-E345R）を含有するIgG1-CD27-Aバリアントを、C1qに結合する能力について試験した。抗HIV-gp120抗体IgG1-b12-F405L（対照）を非結合性陰性対照抗体として含めた。

【図７】図7は、表面プラズモン共鳴（SPR）により決定された、ヒトFc受容体に対するIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの結合を示す。Biacore表面チップを抗His抗体と共有結合的に連結し、組換えHisタグ付加Fc受容体（A）FcγRIa、（B）FcγRIIa-H、（C）FcγRIIa-R、（D）FcγRIIb、（E）FcγRIIIa-F、または（F）FcγRIIIa-Vで被覆した。抗HIV-gp120抗体IgG1-b12（対照）を参照として含めた。示されるのは、バックグラウンドサブトラクション（無Fc受容体フローセル）後のBiacore SPRにより決定された場合の絶対共鳴単位である。

【図８】図8は、フローサイトメトリーにより決定された、ヒト健常ドナーPBMC試料中のヒト（A）CD4^{+}および（B）CD8^{+}T細胞サブセットに対するIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの結合を示す。陰性対照抗体IgG1-b12-P329R-E345R（対照）は、P329RおよびE345R変異を含む抗HIV gp120非結合性アイソタイプ対照抗体である。提示されるデータは、二連の試料の平均MFI＋/-SDである。

【図９－１】図9は、レポーターアッセイにおいて決定された、FcγR媒介性架橋の存在および非存在下での抗CD27抗体のCD27アゴニスト活性を示す。固定された数のNFκB-luc2/CD27 Jurkatレポーター細胞を、（B、G）1:1、（C、H）1:1/3、（D、I）1:1/9、または（E、J）1:1/27のNFκB-luc2/CD27 Jurkat:FcγRIIb CHO-K1比において、FcγRIIb-CHO-K1細胞の（A、F）非存在または（B～J）存在下で、（A～E）IgG1-CD27-A-P329R-E345RまたはIgG1-CD27-A、（F～J）IgG1-CD27-131A、IgG1-CD27-CDX1127またはIgG1-CD27-BMS986215と培養した。IgG1-b12-P329R-E345RおよびIgG1-b12は抗HIV gp120非結合性対照抗体（対照）である。発光をCD27活性化についてのリードアウトとして測定し、相対発光単位（RLU）として提示した。

【図９－２】図9-1の説明を参照のこと。

【図１０】図10は、25mg/kgのIgG-CD27-AまたはIgG-CD27-A-P329R-E345R抗体の静脈内注射後の、SCIDマウスの血漿中のヒトIgGレベルを示す。全ヒトIgG血漿濃度をサンドイッチELISAにより決定し、注射後の時間に対してプロットした。示されるデータは、群（n＝3匹のマウス）毎の血液試料の平均血漿濃度＋/-SEMである。

【図１１】図11は、IgG1-CD27-A-P329R-E345Rまたは野生型CD20抗体IgG1-CD20の存在下でのhMDMとの4hの共培養（E:T＝2:1）後の生存CD27$^+$Daudi細胞のパーセンテージを示す。Daudi細胞をCellTrace（商標）Violetで標識し、細胞生存をフローサイトメトリーにより測定した。示されるデータは、2回の実験において試験された4人のドナーのうちの1人についての抗体なし対照に対して正規化された生存Daudi細胞（TO-PRO-3$^-$CTV$^+$CD11b$^-$）のパーセンテージの二連の平均±SDである。

【図１２】図12は、ELISAにより決定された、NHS中のIgG1-CD27-A-P329R-E345Rのインキュベーションでの C4d沈着を示す。IgG1-b12-P329R-E345Rはアイソタイプ対照抗体であり、IgG1-b12はWT Fcドメインを有する対照抗体であり；IgG1-b12-RGYはC4d沈着についての陽性対照抗体（溶液中の六量体抗体）である。示されるのは、行われた3回の実験のうちの1つの代表的な実験の三連の平均±SDである。

【図１３】図13は、抗CD27抗体によるDaudi細胞上のCD70結合の阻害を示す。CD27$^+$Daudi細胞を、50μg/mLの非結合性対照抗体（IgG1-b12-P329E-E345RもしくはIgG1-b12）またはCD27抗体（IgG1-CD27-A、IgG1-CD27-A-P329R-E345R、IgG1-CD27-CDX1127、IgG1-CD27-BMS986215、もしくはIgG1-CD27-131A）の存在または非存在下で6μg/mLのビオチン化組換えヒトCD70 ECDとインキュベートした。Daudi細胞に対するビオチン化CD70断片の結合を、BV421標識ストレプトアビジンを使用してフローサイトメトリーにより検出した。示されるデータは、行われた3回の実験のうちの1つの代表的な実験の二連のウェルからのgMFI±SDである。

【図１４Ａ－１】図14は、抗CD27抗体を用いた処理でのポリクローナルに活性化されたCD4$^+$およびCD8$^+$T細胞におけるT細胞活性化マーカーの発現レベルを示す。ヒト健常ドナーPBMCを0.1μg/mLのCD3抗体および30μg/mLのIgG1-CD27-A-P329R-E345R、CD27抗体ベンチマークまたは非結合性対照抗体IgG1-b12-P329R-E345Rと2日間または5日間インキュベートした。抗体処理された試料中の（A）CD4$^+$および（B）CD8$^+$T細胞の表面上のT細胞活性化マーカーHLA-DR、CD69、GITR、CD25、CD107a、および4-1BBの発現レベルをフローサイトメトリーにより定量化し、同じドナーの非結合性対照試料と比べたMFI（±SD）における平均変化倍数として提示した。点線は、非結合性対照として使用され、1に設定されたIgG1-b12-P329R-E345Rを用いて処理された細胞についての変化倍数を示す。示されるデータは、1つの実験において二連で試験された3人のドナーからのものである。

【図１４Ａ－２】図14A-1の説明を参照のこと。

【図１４Ｂ－１】図14A-1の説明を参照のこと。

【図１４Ｂ－２】図14A-1の説明を参照のこと。

【図１５】図15は、OVAを用いた免疫化および抗CD27抗体を用いた処理後のhCD27-KIマウスの脾臓におけるOVA特異的CD8$^+$T細胞のパーセンテージを示す。hCD27-KIマウスにs.c.で5mgのOVAを0、12および21日目に注射し、同時にi.v.で30mg/kgのIgG1-CD27-A-P329R-E345R、IgG1-CD27-CDX1127または非結合性対照抗体IgG1-b12-P329R-E345Rを用いて処置した。28日目に、マウスを安楽死させ、脾臓を切除し、単一細胞懸濁液として加工した。OVA特異的CD8$^+$T細胞の拡大増殖をフローサイトメトリーにより評価した。示されるデータは、行われた1回の実験からの処置群（5匹のマウス/群）当たりのCD8$^+$細胞のOVA$^+$%の平均±SDである。

【図１６】図16は、IFNγ-ELISpotにより測定された、OVAを用いた免疫化および抗CD27抗体を用いた処理後28日目におけるIFNγ産生脾臓細胞の数を示す。hCD27-KIマウスにs.c.で5mgのOVAを0、12および21日目に注射し、同時にi.v.で30mg/kgのIgG1-CD27-A-P329R-E345R、IgG1-CD27-CDX1127、または非結合性対照抗体IgG1-b12-P329R-E345Rを用いて処置した。28日目に、脾臓を切除し、単一細胞懸濁液として加工し、IFNγ-ELISpotを使用してIFNγ産生脾臓細胞を検出した。示されるデータは、行われた1回の実験からの各々の処置群（5匹のマウス/群）のウェル当たりのスポットの数の平均±SEMである。

【図１７】図17は、OVAを用いた免疫化および抗CD27抗体を用いた処理後のhCD27-

KIマウスの脾臓における活性化CD8$^+$T細胞のパーセンテージを示す。hCD27-KIマウスにs.c.で5mgのOVAを0、12および21日目に注射し、同時にi.v.で30mg/kgのIgG1-CD27-A-P329R-E345R、IgG1-CD27-CDX1127または非結合性対照抗体IgG1-b12-P329R-E345Rを用いて処置した。28日目に、マウスを安楽死させ、脾臓を切除し、単一細胞懸濁液として加工した。フローサイトメトリーにより脾臓中のCD8$^+$細胞のPD-1$^+$パーセンテージを測定することによりCD8$^+$T細胞の活性化を脾臓試料において評価した。示されるデータは、行われた1回の実験からの処置群（5匹のマウス/群）当たりの平均±SDである。

【図１８】図18は、OVAを用いた免疫化および抗CD27抗体を用いた処理後のhCD27-KIマウスの脾臓におけるエフェクターCD8$^+$T細胞のパーセンテージを示す。hCD27-KIマウスにs.c.で5mgのOVAを0、12および21日目に注射し、同時にi.v.で30mg/kgのIgG1-CD27-A-P329R-E345R、IgG1-CD27-CDX1127または非結合性対照抗体IgG1-b12-P329R-E345Rを用いて処置した。28日目に、マウスを安楽死させ、脾臓を切除し、単一細胞懸濁液として加工した。メモリーT細胞の拡大増殖をフローサイトメトリーによりCD44およびCD62Lの発現により評価した。示されるデータは、行われた1回の実験からの処置群（5匹のマウス/群）当たりの平均±SDである。（A）CD45$^+$細胞のうちのCD8$^+$CD44$^+$CD62L$^-$エフェクターメモリーのパーセンテージ。（B）CD8$^+$T細胞のうちのCD44$^+$CD62L$^-$エフェクターメモリーのパーセンテージ。（C）CD45$^+$細胞のうちのCD8$^+$CD44$^-$CD62L$^-$プレエフェクターのパーセンテージ。（D）CD8$^+$T細胞のうちのCD44$^-$CD62L$^-$プレエフェクターのパーセンテージ。

【図１９】図19は、OVAを用いた免疫化および抗CD27抗体を用いた処理後のhCD27-KIマウスの脾臓におけるT細胞のパーセンテージを示す。hCD27-KIマウスにs.c.で5mgのOVAを0、12および21日目に注射し、同時にi.v.で30mg/kgのIgG1-CD27-A-P329R-E345R、IgG1-CD27-CDX1127または非結合性対照抗体IgG1-b12-P329R-E345Rを用いて処置した。28日目に、マウスを安楽死させ、脾臓を切除し、単一細胞懸濁液として加工した。血液および脾臓中のCD3$^+$細胞をフローサイトメトリーにより評価した。示されるデータは、行われた1回の実験からの処置群（5匹のマウス/群）当たりの平均±SDである。

【図２０】図20は、抗原特異的研究におけるT細胞サイトカイン産生に対するIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの効果を示す。（A）内因性PD-1を発現するかまたは（B）PD-1を過剰発現するCLDN6-TCR発現CD8＋T細胞および自家CLDN6発現iDCの共培養物を、10μg/mLのIgG1-CD27-A-P329R-E345R、CD27ベンチマーク抗体IgG1-CD27-131A、または非結合性対照抗体IgG1-b12-P329R-E345Rと2日間インキュベートした。共培養上清中のサイトカインレベルをマルチプレックスECLIAにより分析した。示されるデータは、行われた2回の実験において試験された7人のドナーのうちの1人の代表的なドナーからの三連のウェルの濃度の平均±SDである。略語:CLDN6＝クローディン6；ECLIA＝電気化学発光アッセイ；iDC＝未熟樹状細胞；PD-1＝プログラム細胞死タンパク質1；SD＝標準偏差；TCR＝T細胞受容体。

【図２１】図21は、IgG1-CD27-A-P329R-E345Rとインキュベートされた抗原特異的CD8＋T細胞における細胞傷害性関連分子の発現を示す。CLDN6-TCRエレクトロポレートCD8＋T細胞をIgG1-CD27-A-P329R-E345R、CD27ベンチマークIgG1-CD27-131A、または非結合性対照抗体IgG1-b12-P329R-E345Rの存在下でhCLDN6-MDA-MB-231細胞と2日間共培養した。GzmBおよびCD107aの細胞内発現をフローサイトメトリーにより決定した。GzmBおよびCD107aの両方を発現するCD8＋T細胞のパーセンテージの他に、CD8＋T細胞におけるGzmBおよびCD107aの発現レベル（IgG1-b12-P329R-E345Rに対して正規化されたMFI）を示す。示されるデータは、2回の実験の実験における単一の複製物において試験された6人のドナーの平均±SDである。＊＊、P＜0.01；＊、P＜0.05；ダンの多重比較検定を伴うフリードマン検定。略語:CLDN6＝クローディン6；GzmB＝グランザイムB；MFI＝平均蛍光強度；SD＝標準偏差；TCR＝T細胞受容体。

【図２２】図22は、IgG1-CD27-A-P329R-E345Rの存在下での抗原特異的CD8＋T細胞媒介性腫瘍細胞殺滅を示す。hCLDN6-MDA-MB-231細胞のCD8＋T細胞媒介性殺滅をリアルタイム細胞分析により評価した。CLDN6 TCRエレクトロポレートCD8＋T細胞をIgG1-CD27-A-P329R-E345R、CD27ベンチマークIgG1-CD27-131A、または非結合性対照抗体IgG1-b12-P329R-E345Rの存在下でhCLDN6-MDA-MB-231細胞と5日間共培養した。2時間間隔で実行されたインピーダンス測定から細胞指数値を導出した。AUCを5日の共培養にかけての細胞指数データから得た。各々の処理条件のAUCを、同じドナーからのIgG1-b12-P329R-E345R処理された培養物に対して正規化した。示されるデータは、2回の実験中の実験において二連で試験された6人のドナーからの平均±SDである。＊＊、P＜0.01；ダンの多重比較検定を伴うフリードマン検定。略語:AUC＝曲線下面積；CLDN6＝クローディン6；SD＝標準偏差；TCR＝T細胞受容体。

【図２３】図23は、IgG1-CD27-A-P329R-E345Rでの処理後の原発性腫瘍培養物中のCD4＋およびCD8＋T細胞ならびにNK細胞の絶対細胞数を示す。ヒトNSCLC腫瘍組織を10μg/mLのIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの存在または非存在下で低用量IL-2（45～50U/mL）と共に培養した。TILサブセットの絶対細胞カウントを処理の14日後にフローサイトメトリーにより決定した。示されるデータは、行われた4回の実験のうちの1つにおいて試験された5つの腫瘍組織のうちの1つからの4つの複製ウェルの平均±SDである。略語:IL＝インターロイキン；NK＝ナチュラルキラー；NSCLC＝非小細胞肺がん；SD＝標準偏差；U/mL＝単位/mL。

【図２４】図24は、Daudi細胞およびhuCD27-K562細胞の細胞表面上のIgG1-CD27-A-P329R-E345R抗体間の生物発光共鳴エネルギー移動（BRET）分析により決定された、分子近接性を示す。細胞を、指し示されるようにNanoLuc（ドナー）およびHaloTag（アクセプター）タグ付加抗体（各々5μg/mL）:IgG1-CD27-A-P329R-E345R、WT IgG1-CD27-Aまたは非結合性対照IgG1-b12-P329R-E345Rの混合物とインキュベートした。抗体ペアIgG1-CD20-11B8-E430G-LNLucおよびIgG1-CD37-37.3-E430G-LHaloを陽性対照として使用した。BRETをmilliBRET単位（mBU）＝（618nm$_{em}$/460nm$_{em}$）×1000において算出し、無リガンド対照の値を引くことによりドナーブリードスルー（bleed-through）について補正した。示されるデータは、行われた3回の実験のうちの1つの代表的な実験の二連のウェルからの補正BRETである。

【図２５】図25は、FcγRIa結合についての陽性対照としての関連しない抗原結合領域を有するWT IgG1抗体（IgG1-b12）、ならびにP329RおよびE345R変異を有する同じ抗体のバリアント（IgG1-b12-P329R-E345R）と比較した、M0およびM1マクロファージに対するIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの結合を示す。マクロファージに対する抗体の結合を、PE標識ヤギ抗ヒト二次抗体を使用してフローサイトメトリーにより検出した。示されるデータは、試験された2人のドナーの平均＋SDである。

【図２６】図26は、DuoBody-CD40x4-1BBと組み合わせたIgG1-CD27-A-P329R-E345Rにより誘導されたポリクローナル活性化CD8＋T細胞の増殖を示す。CTV標識されたヒト健常ドナーPBMCをCD3抗体ならびにIgG1-CD27-A-P329R-E345Rおよび/またはDuoBody-CD40x4-1BBと4日間インキュベートした。T細胞におけるCTV希釈をフローサイトメトリーにより分析し、それを使用して拡大増殖指数を算出した。示されるデータは、0.1μg/mLのCD3抗体で刺激された試料中のCD8＋T細胞からのものである。値は、行われた4回の実験において試験された6人のドナーのうちの1人の代表的なドナーからの単一の複製物の拡大増殖指数を提示する。略語:CD＝分化クラスター;CTV＝cell trace violet;PBMC＝末梢血単核細胞;TCR＝T細胞受容体。

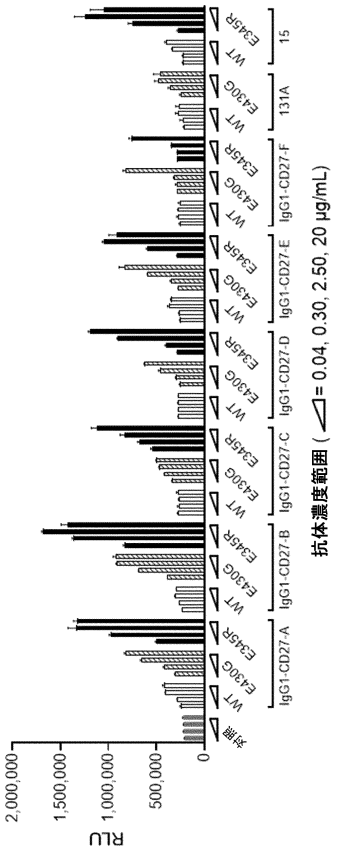
【図２７】図27は、インビトロでのT細胞増殖に対するDuoBody-CD40x4-1BBと組み合わせたIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの効果を示す。ヒトCD8＋T細胞に、CLDN6特異的TCRをコードするRNAをエレクトロポレートし、CFSEで標識した。T細胞を次に、CLDN6をコードするRNAをエレクトロポレートしたiDCと、DuoBody-CD40x4-1BB（0.0022、0.0067もしくは0.2μg/mL）、IgG1-CD27-A-P329R-E345R（0.1、1もしくは10μg/mL）、または両方の組合せの非存在または存在下で、4日間共培養

した。T細胞におけるCFSE希釈をフローサイトメトリーにより分析し、それを使用して拡大増殖指数を算出した。3回の独立した実験において試験された6人のドナーのうちの1人の代表的なドナーからのデータを示している。エラーバーは二連のウェルのSDを指し示す。点線は、抗体処理なしでiDCと共培養されたCD8＋T細胞の拡大増殖指数を表す。CFSE、カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル;CLDN6、クローディン-6;iDC、未熟樹状細胞;SD、標準偏差;TCR、T細胞受容体。

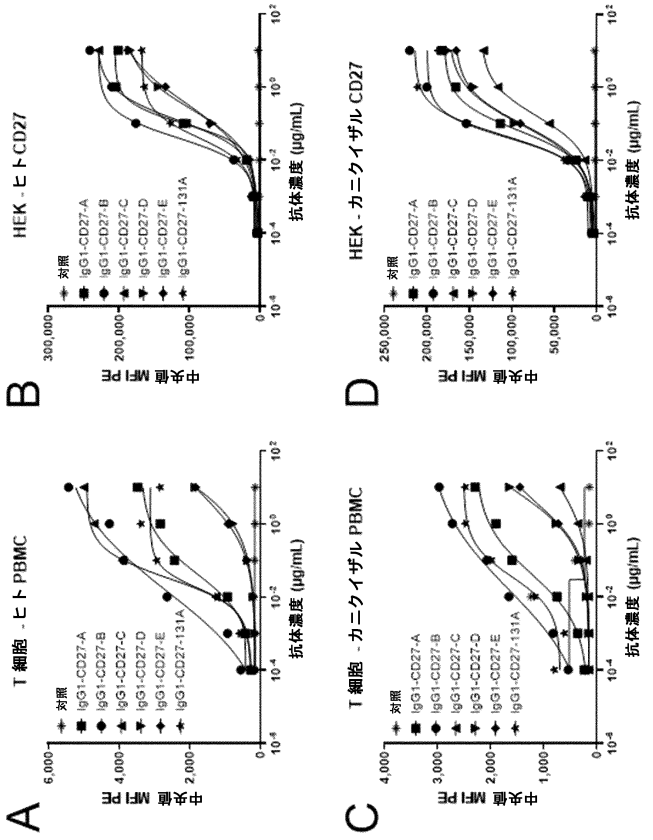
【図２８】図28は、インビトロでのIFNγ分泌に対するDuoBody-CD40x4-1BBと組み合わせたIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの効果を示す。CLDN6特異的TCRを発現するヒトCD8＋T細胞を図3におけるようにCLDN6発現iDCと、DuoBody-CD40x4-1BB（0.0022、0.0067もしくは0.2μg/mL）、IgG1-CD27-A-P329R-E345R（0.1、1もしくは10μg/mL）、または両方の組合せの非存在または存在下で、共培養した。2日後に、IFNγ濃度を上清中でマルチプレックスECLIAにより決定した。試験された3人のドナーのうちの1人の代表的なドナーからのデータを示している。エラーバーは二連のウェルのSDを指し示す。点線は、抗体処理なしでのCD8＋T細胞/iDC共培養物中のIFNγ濃度を表す。CLDN6、クローディン-6;ECLIA、電気化学発光イムノアッセイ;iDC、未熟樹状細胞;SD、標準偏差;TCR、T細胞受容体。

【図面】

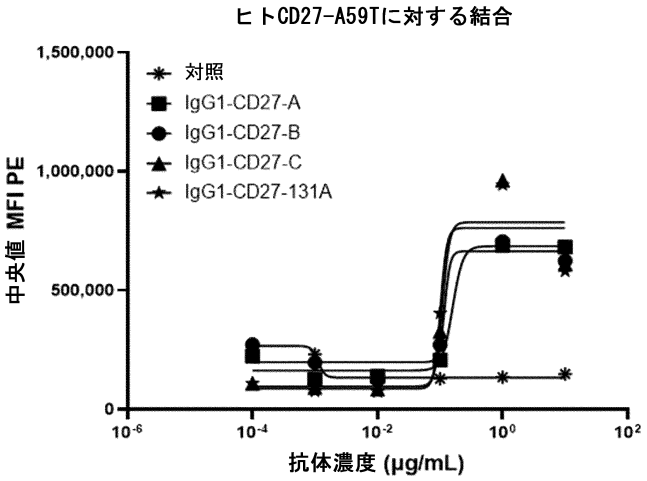
【図１】



【図２】

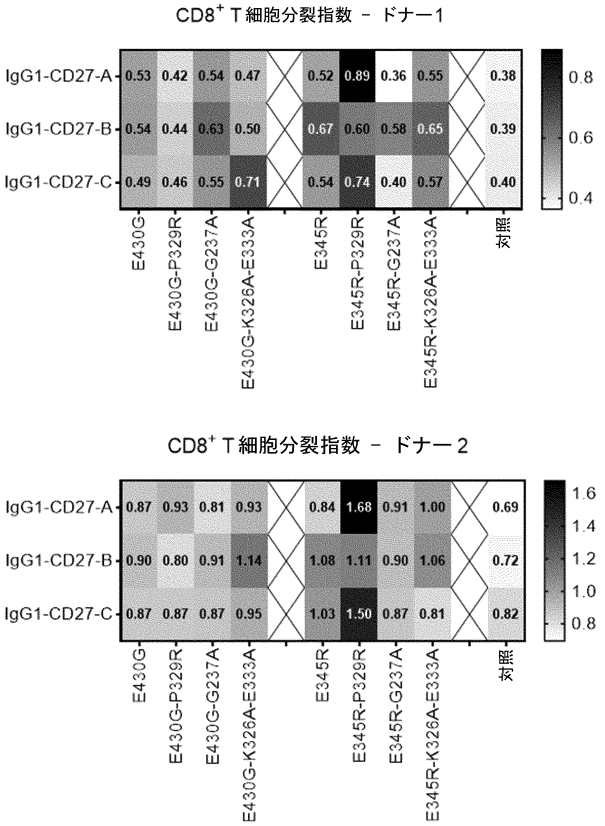


【図３】

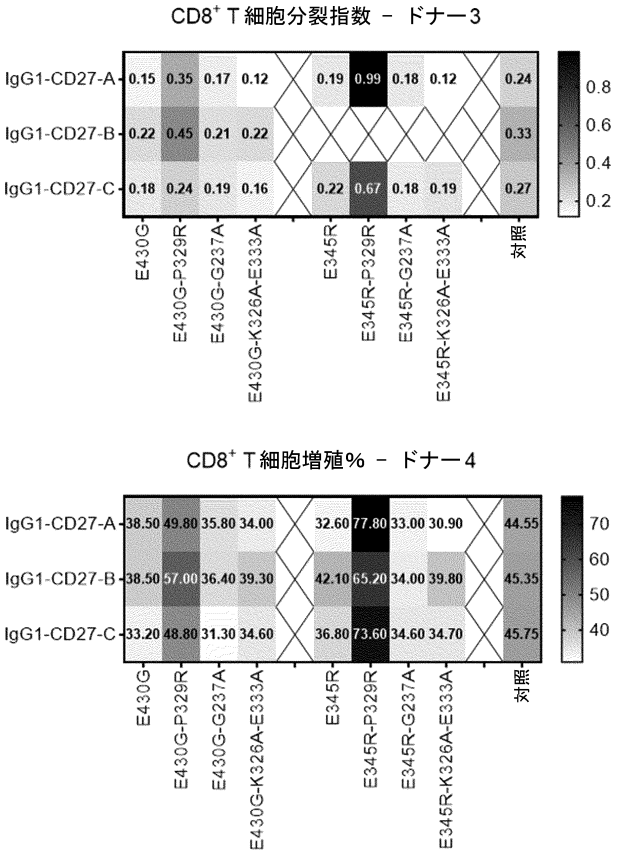


【図４Ａ－１】

A: CD8+ T細胞、4人の異なるドナー（次ページに続く）

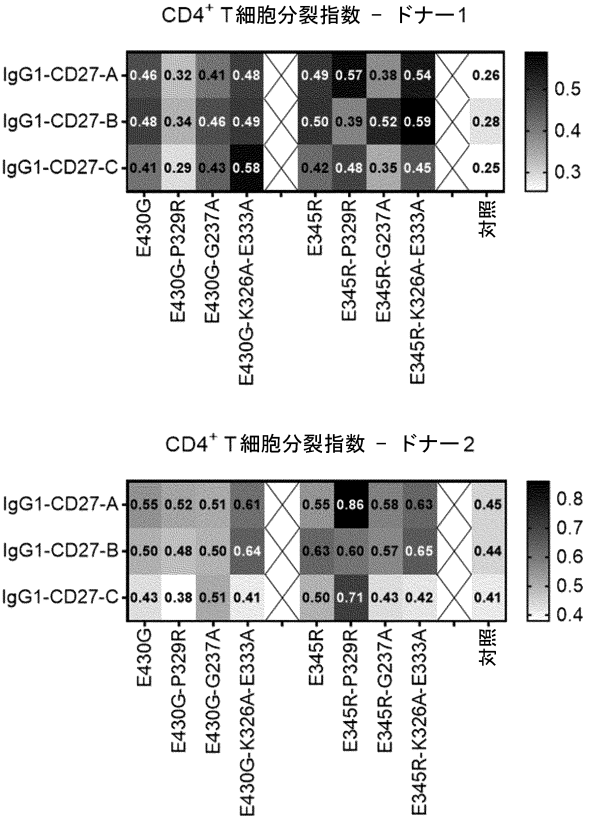


【図４Ａ－２】

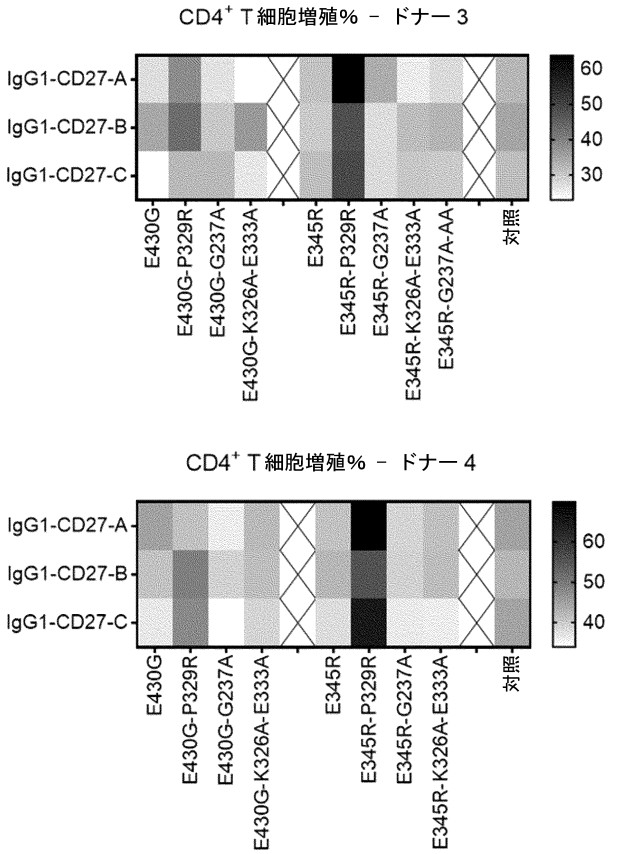


【図４Ｂ－１】

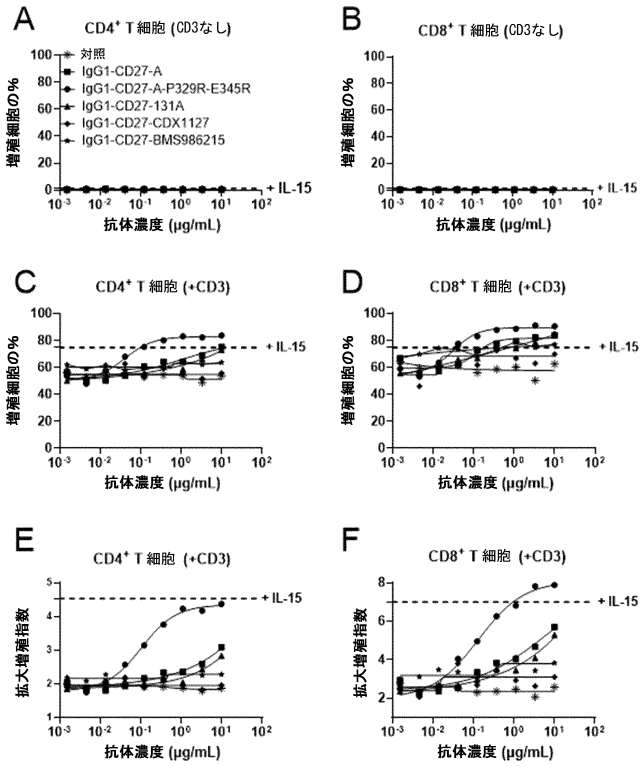
CD4+ T細胞、4人の異なるドナー（次ページに続く）



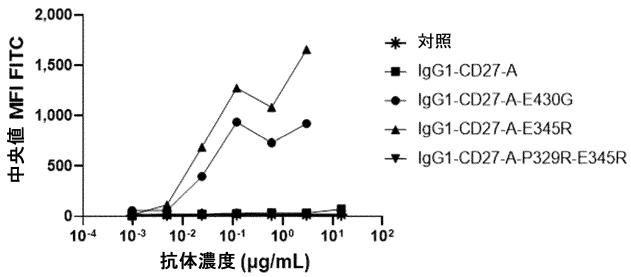
【図４Ｂ－２】


CD4+ T細胞増殖% - ドナー3
IgG1-CD27-A
IgG1-CD27-B
IgG1-CD27-C
E430G
E430G-P329R
E430G-G237A
E430G-K326A-E333A
E345R
E345R-P329R
E345R-G237A
E345R-K326A-E333A
E345R-G237A-AA
対照
60
50
40
30
CD4+ T細胞増殖% - ドナー4
IgG1-CD27-A
IgG1-CD27-B
IgG1-CD27-C
E430G
E430G-P329R
E430G-G237A
E430G-K326A-E333A
E345R
E345R-P329R
E345R-G237A
E345R-K326A-E333A
対照
60
50
40

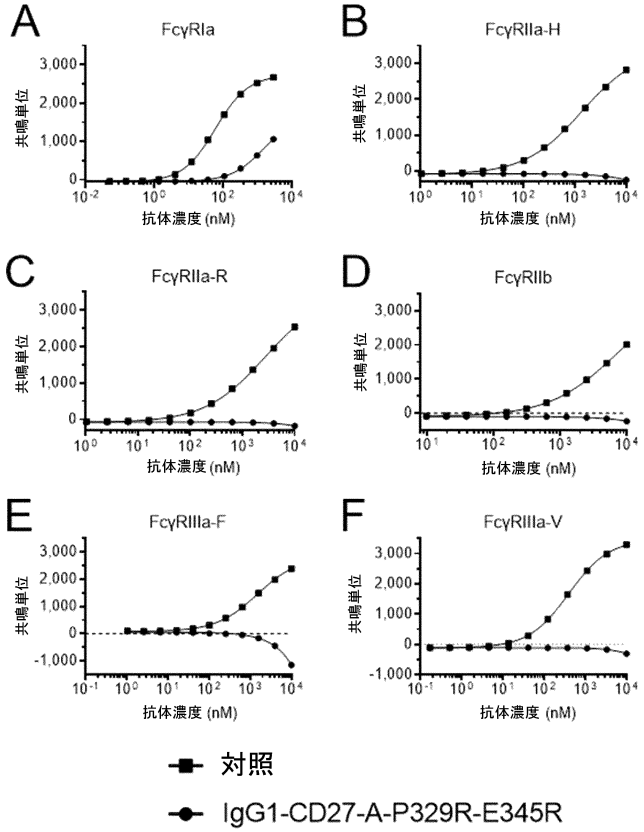
【図５】


A
CD4+ T細胞 (CD3なし)
B
CD8+ T細胞 (CD3なし)
対照
IgG1-CD27-A
IgG1-CD27-A-P329R-E345R
IgG1-CD27-131A
IgG1-CD27-CDX1127
IgG1-CD27-BMS986215
+ IL-15
増殖細胞の%
抗体濃度 (μg/mL)
C
CD4+ T細胞 (+CD3)
D
CD8+ T細胞 (+CD3)
E
CD4+ T細胞 (+CD3)
F
CD8+ T細胞 (+CD3)
拡大増殖指数

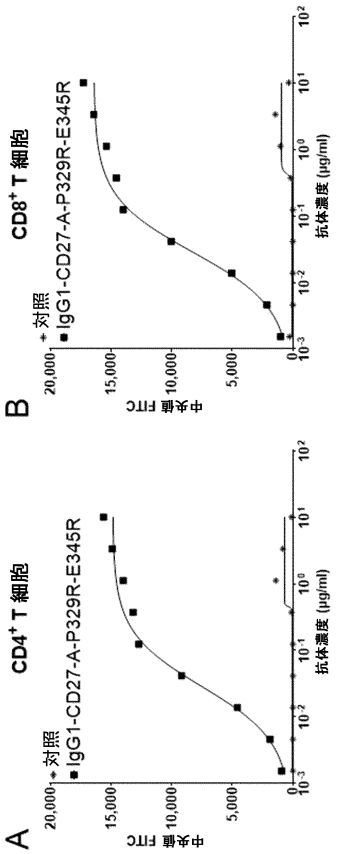
【図６】


中央値 MFI FITC
抗体濃度 (μg/mL)
対照
IgG1-CD27-A
IgG1-CD27-A-E430G
IgG1-CD27-A-E345R
IgG1-CD27-A-P329R-E345R

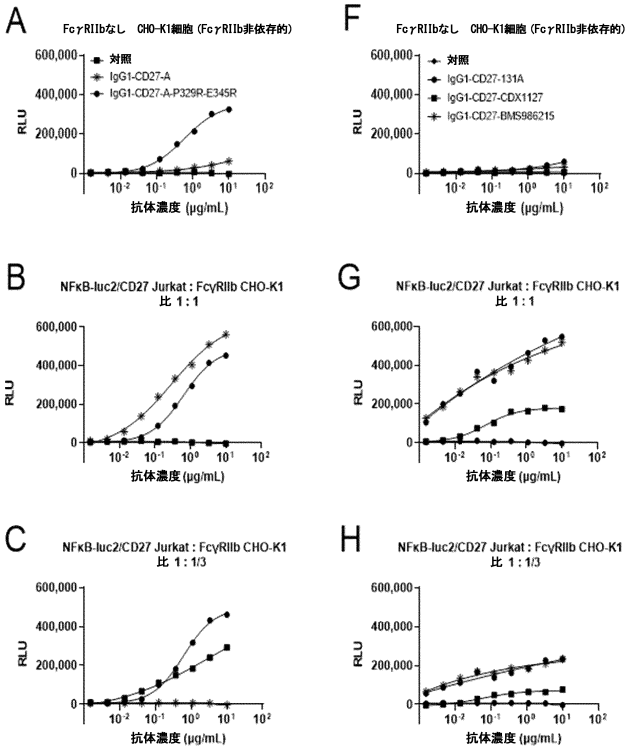
【図７】


A
FcγRIa
B
FcγRIIa-H
C
FcγRIIa-R
D
FcγRIIb
E
FcγRIIIa-F
F
FcγRIIIa-V
共鳴単位
抗体濃度 (nM)
対照
IgG1-CD27-A-P329R-E345R

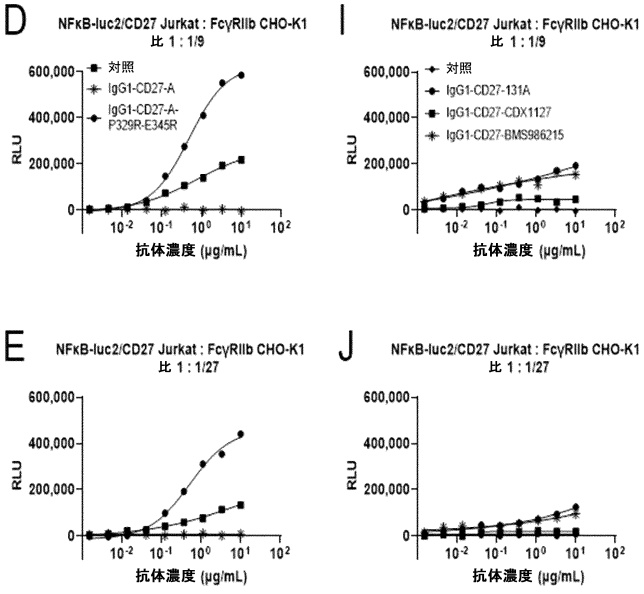
【図８】



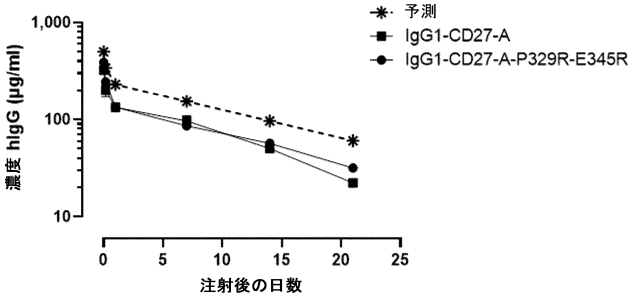
【図９－１】



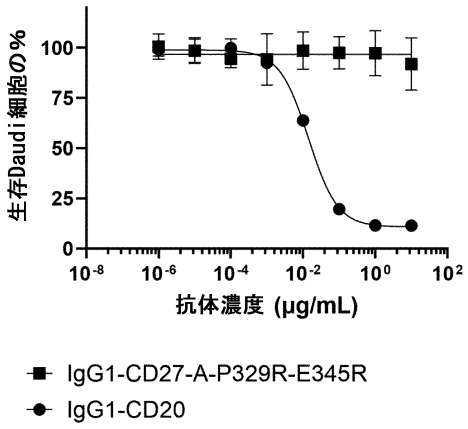
【図９－２】



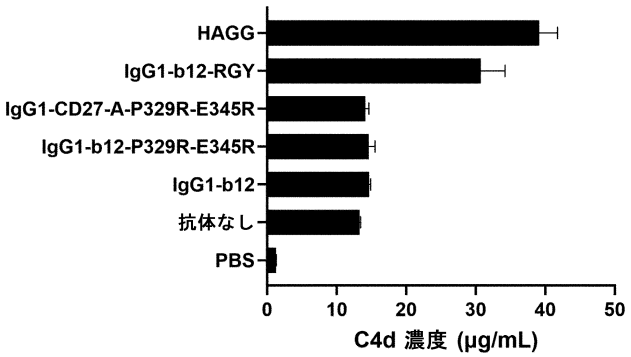
【図１０】



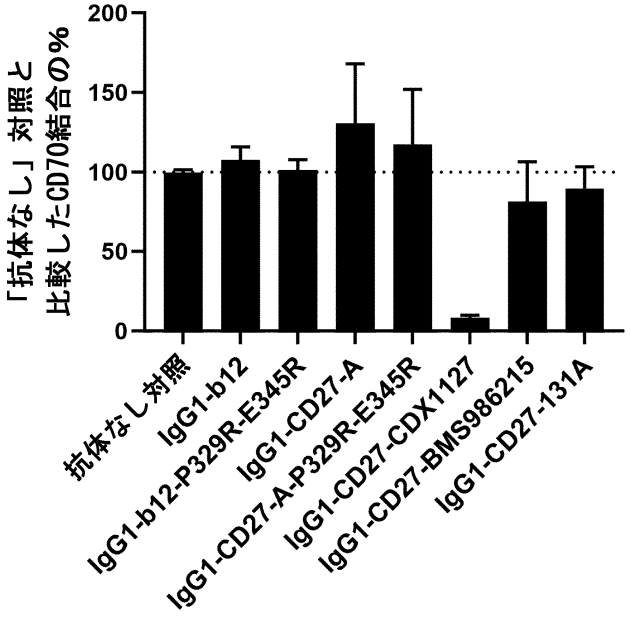
【図１１】



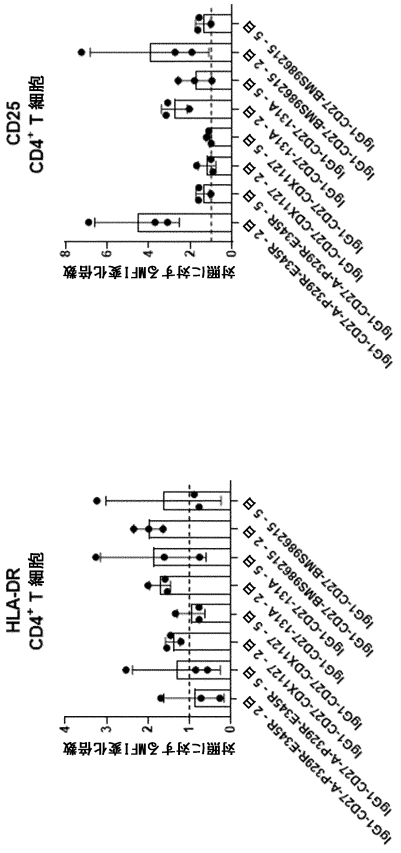
【図１２】



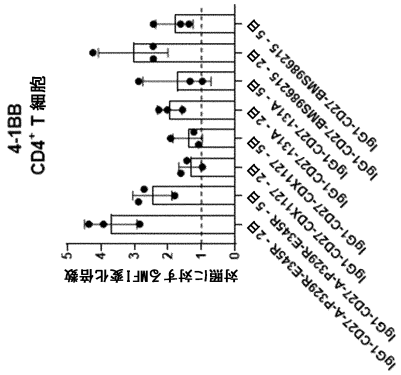
【図１３】



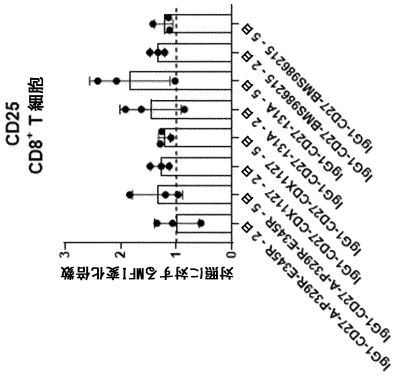
【図１４Ａ－１】

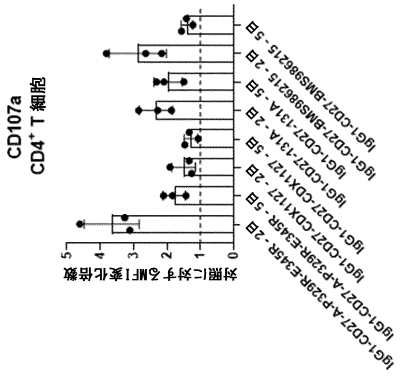


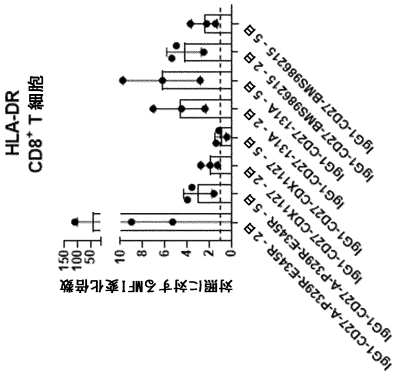
【図１４Ａ－２】



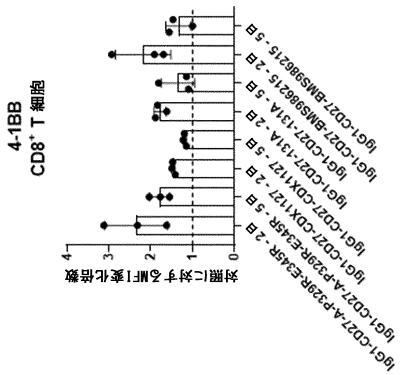
【図１４Ｂ－１】

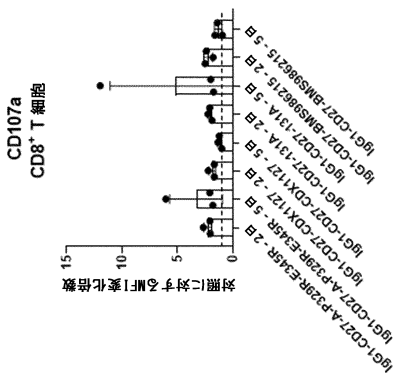




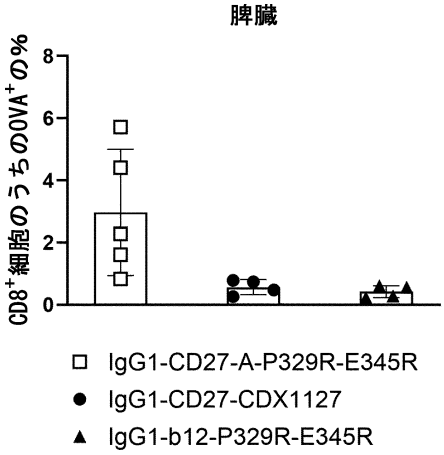


【図１４Ｂ－２】

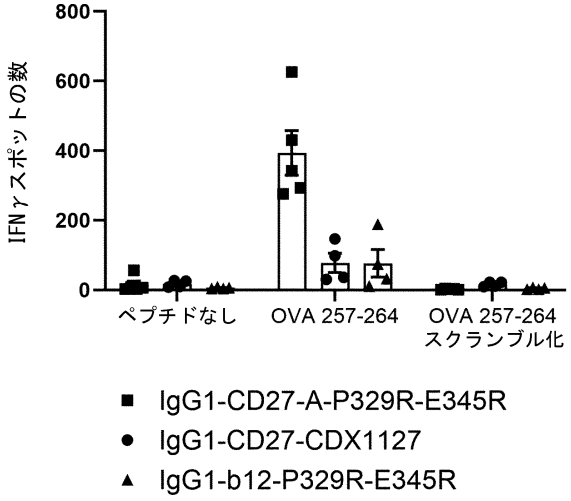




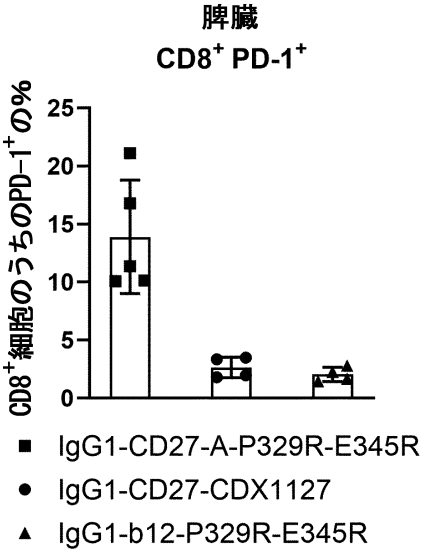
【図１５】



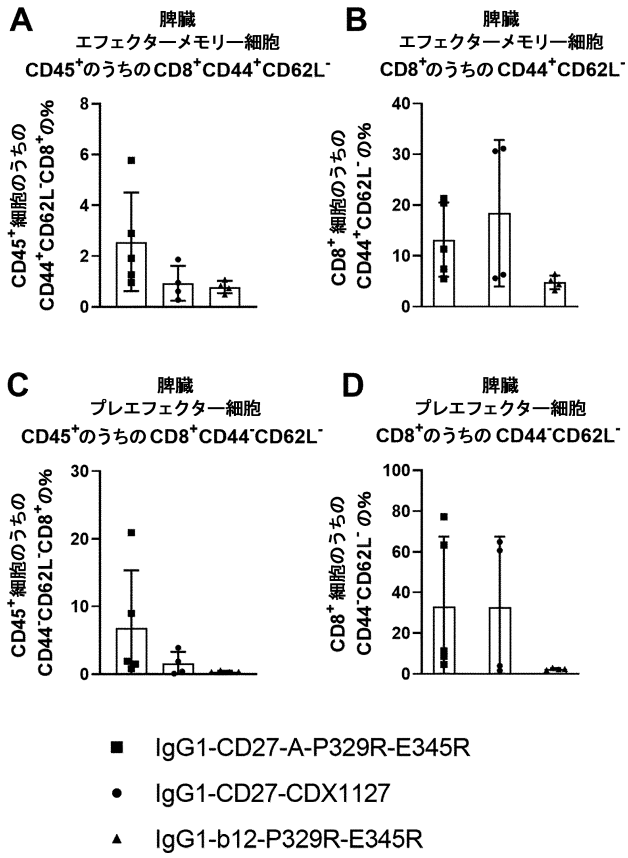
【図１６】



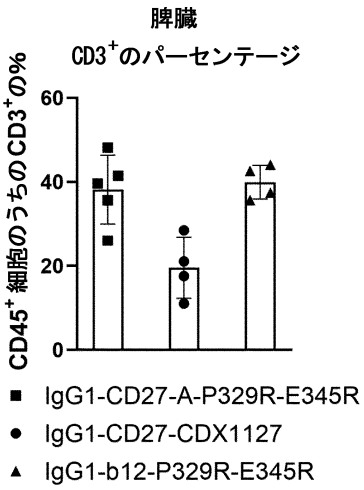
【図１７】



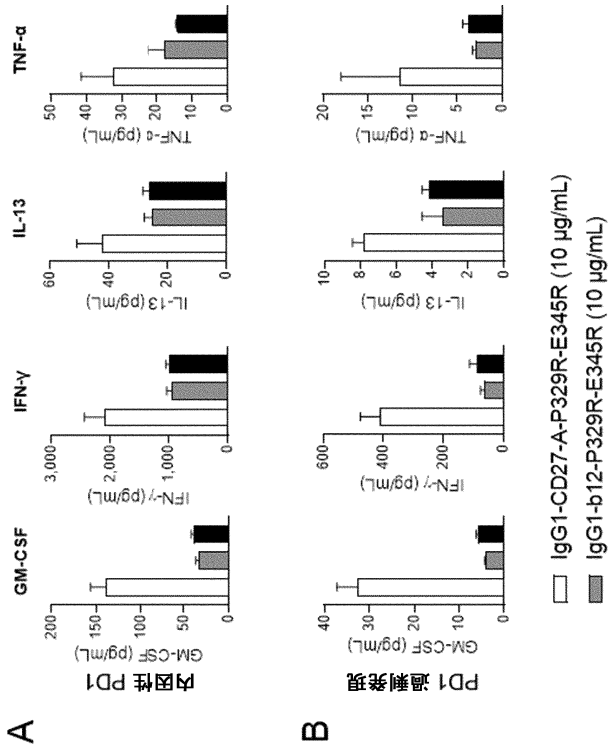
【図１８】



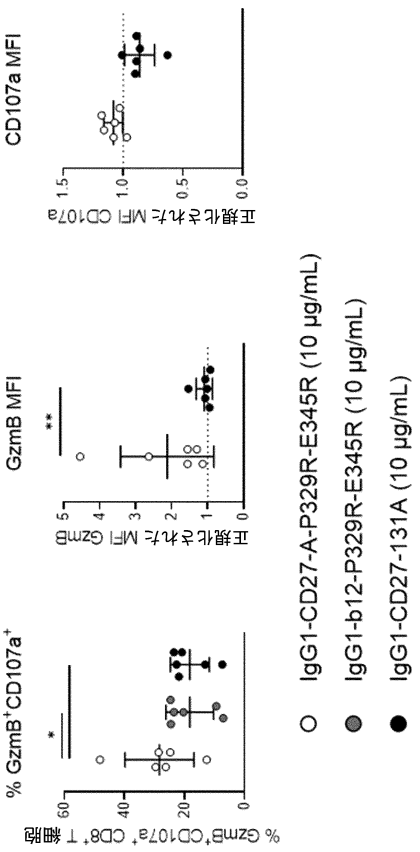
【図１９】



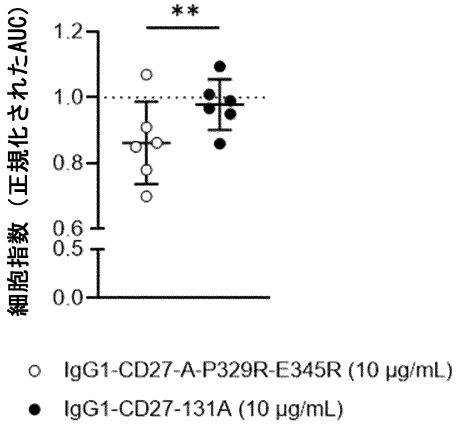
【図２０】



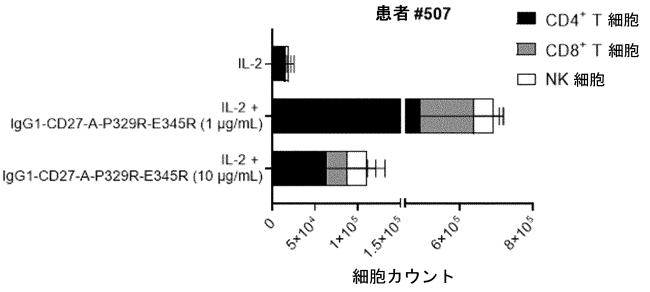
【図２１】



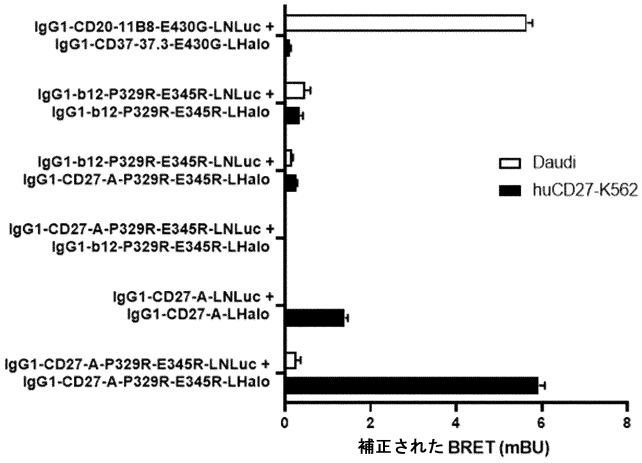
【図２２】



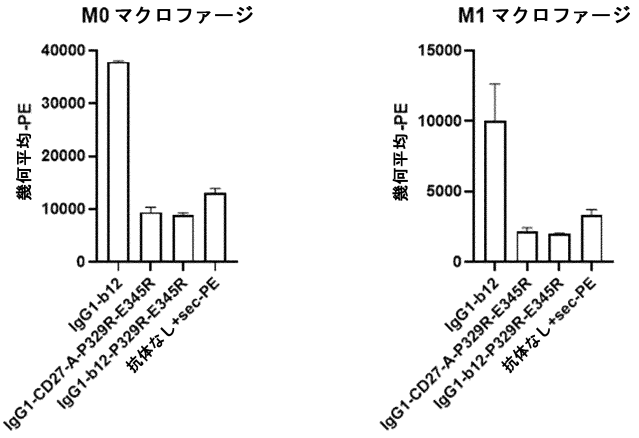
【図２３】



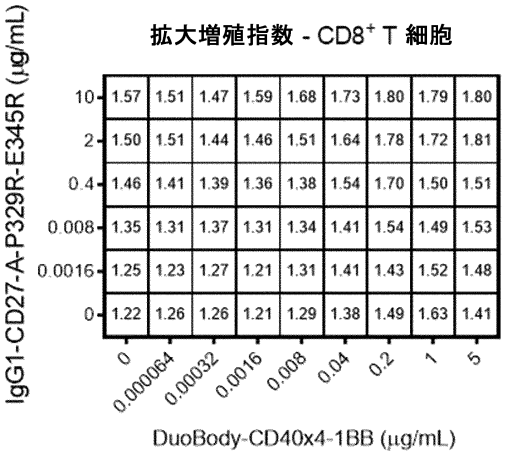
【図２４】



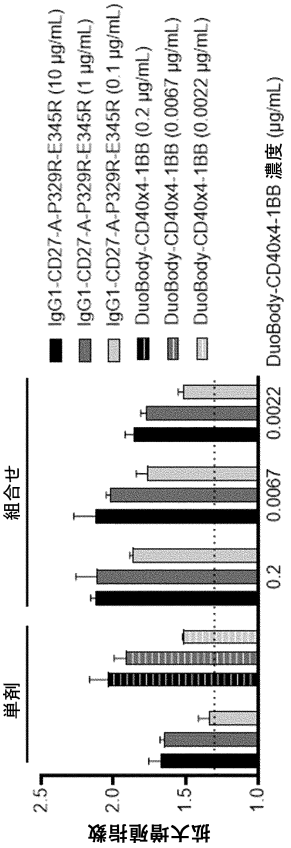
【図２５】



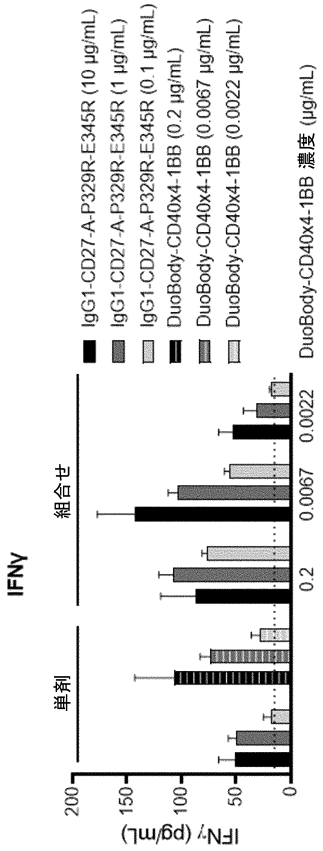
【図２６】



【図２７】



【図２８】



【配列表】

<u>２０２５５１６６３３０００００１．ｘｍｌ</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2023/062798

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed.

   b. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. [ ] With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/062798

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61P35/00 C07K16/28
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61P C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TOMOYASU UNO ET AL: "Eradication of established tumors in mice by a combination antibody-based therapy", NATURE MEDICINE, vol. 12, no. 6, 7 May 2006 (2006-05-07), pages 693-698, XP055123624, ISSN: 1078-8956, DOI: 10.1038/nm1405 abstract -----	1-97
A	WO 2018/011421 A1 (GENMAB AS [DK]; BIONTECH AG [DE]) 18 January 2018 (2018-01-18) page 1, line 13 - page 2, line 10 page 117, line 34 - page 118, line 16 ----- -/--	1-97

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C. [x] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
12 July 2023	19/07/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Page, Michael

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/062798

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2019/195452 A1 (BRISTOL MYERS SQUIBB CO [US]) 10 October 2019 (2019-10-10) cited in the application page 4, line 24 - page 5, line 3 page 11, line 13 - page 13, line 2	1-97
A	US 2018/044427 A1 (ARMSTRONG ANTHONY [US] ET AL) 15 February 2018 (2018-02-15) paragraphs [0219], [0285], [0452], [0460]	1-97
A	WO 2019/040808 A1 (JANSSEN BIOTECH INC [US]) 28 February 2019 (2019-02-28) page 32, paragraph 7 - page 33, paragraph 2; claims 26,40,44-46	1-97
A,P	WO 2022/189498 A1 (GENMAB AS [DK]; BIONTECH SE [DE]) 15 September 2022 (2022-09-15) page 1, line 15 - page 2, line 26 page 4, line 2 - line 9 page 28, line 36 - page 29, line 18 page 56, line 31 - page 57, line 16	1-97
A,P	WO 2023/285552 A1 (BIONTECH SE [DE]; GENMAB AS [DK]) 19 January 2023 (2023-01-19) page 1, line 16 - page 3, line 8 page 4, line 2 - line 8 claims 2,59,63	1-97

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2023/062798

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2018011421 A1	18-01-2018	AU 2017296095 A1	17-01-2019
		BR 112019000512 A2	24-04-2019
		CA 3030636 A1	18-01-2018
		CN 109641959 A	16-04-2019
		EA 201990293 A1	31-07-2019
		EP 3484922 A1	22-05-2019
		IL 264142 A	28-02-2019
		JP 7138630 B2	16-09-2022
		JP 2019533466 A	21-11-2019
		JP 2022184871 A	13-12-2022
		KR 20190028508 A	18-03-2019
		MA 45672 A	22-05-2019
		SG 11201811431V A	30-01-2019
		US 2020062853 A1	27-02-2020
		US 2020247899 A1	06-08-2020
		US 2021317225 A1	14-10-2021
		US 2022033510 A1	03-02-2022
		US 2022064317 A1	03-03-2022
		US 2023089969 A1	23-03-2023
		WO 2018011421 A1	18-01-2018
WO 2019195452 A1	10-10-2019	CN 112292399 A	29-01-2021
		EP 3774903 A1	17-02-2021
		JP 2021520201 A	19-08-2021
		KR 20200140315 A	15-12-2020
		US 2021155703 A1	27-05-2021
		WO 2019195452 A1	10-10-2019
US 2018044427 A1	15-02-2018	AU 2017308590 A1	14-02-2019
		AU 2023200719 A1	09-03-2023
		CA 3033661 A1	15-02-2018
		CN 109863170 A	07-06-2019
		EP 3497120 A1	19-06-2019
		IL 264512 A	28-02-2019
		JP 7178342 B2	25-11-2022
		JP 2019533427 A	21-11-2019
		KR 20190038617 A	08-04-2019
		MA 45919 A	19-06-2019
		SG 11201900746R A	27-02-2019
		US 2018044427 A1	15-02-2018
		WO 2018031258 A1	15-02-2018
WO 2019040808 A1	28-02-2019	CA 3074317 A1	28-02-2019
		EP 3672611 A1	01-07-2020
		JP 7250766 B2	03-04-2023
		JP 2020537492 A	24-12-2020
		US 2019062420 A1	28-02-2019
		WO 2019040808 A1	28-02-2019
WO 2022189498 A1	15-09-2022	NONE	
WO 2023285552 A1	19-01-2023	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
A61P	*35/00*	*(2006.01)*	A61P	35/04		
A61P	*43/00*	*(2006.01)*	A61P	35/00		
A61K	*47/26*	*(2006.01)*	A61P	43/00	121	
A61K	*47/14*	*(2017.01)*	A61P	43/00	111	
			A61K	47/26		
			A61K	47/14		

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士　刑部 俊
(74)代理人　100142929
弁理士　井上 隆一
(74)代理人　100148699
弁理士　佐藤 利光
(74)代理人　100188433
弁理士　梅村 幸輔
(74)代理人　100128048
弁理士　新見 浩一
(74)代理人　100129506
弁理士　小林 智彦
(74)代理人　100114340
弁理士　大関 雅人
(74)代理人　100214396
弁理士　塩田 真紀
(74)代理人　100121072
弁理士　川本 和弥
(74)代理人　100221741
弁理士　酒井 直子
(74)代理人　100114926
弁理士　枝松 義恵
(72)発明者　ブレイ エステル シー． ダブリュ．
オランダ王国 ユトレヒト ３５８４ シーティー ウプサララーン １５ ジェンマブ ビー．ブイ．内
(72)発明者　サヒン ウグル
ドイツ連邦共和国 ５５１１６ マインツ アン デア ゴルトグルーベ １２ ビオンテック エスエー内
(72)発明者　アルティンタシュ イシル
オランダ王国 ユトレヒト ３５８４ シーティー ウプサララーン １５ ジェンマブ ビー．ブイ．内
(72)発明者　イオアン アンドレア
オランダ王国 ユトレヒト ３５８４ シーティー ウプサララーン １５ ジェンマブ ビー．ブイ．内
(72)発明者　ビュルスケンス フランク
オランダ王国 ユトレヒト ３５８４ シーティー ウプサララーン １５ ジェンマブ ビー．ブイ．内
(72)発明者　デ ヨング ロブ エヌ．
オランダ王国 ユトレヒト ３５８４ シーティー ウプサララーン １５ ジェンマブ ビー．ブイ．内
(72)発明者　スフールマン ジャニーヌ
オランダ王国 ユトレヒト ３５８４ シーティー ウプサララーン １５ ジェンマブ ビー．ブイ．内
(72)発明者　ド フーイェ ポーリン リンダ
オランダ王国 ユトレヒト ３５８４ シーティー ウプサララーン １５ ジェンマブ ビー．ブイ．内

(72)発明者　サテイン ダヴィッド
オランダ王国 ユトレヒト ３５８４ シーティー ウプサララーン １５ ジェンマブ ビー．ブイ．内
(72)発明者　ボロシュ ペーテル
オランダ王国 ユトレヒト ３５８４ シーティー ウプサララーン １５ ジェンマブ ビー．ブイ．内
(72)発明者　イムレ アンドレア
ドイツ連邦共和国 ５５１１６ マインツ アン デア ゴルトグルーベ １２ ビオンテック エスエー内
(72)発明者　ニュルンベルガー クリスティーナ
ドイツ連邦共和国 ５５１１６ マインツ アン デア ゴルトグルーベ １２ ビオンテック エスエー内
(72)発明者　ムイク アレクサンダー
ドイツ連邦共和国 ５５１１６ マインツ アン デア ゴルトグルーベ １２ ビオンテック エスエー内
(72)発明者　ギーゼケ フリーデリケ
ドイツ連邦共和国 ５５１１６ マインツ アン デア ゴルトグルーベ １２ ビオンテック エスエー内

Ｆターム（参考）　4C076　AA12 BB11 CC27 DD37 DD44 EE23
4C085　AA13 AA14 BB11 BB36 CC01 DD62 EE03 GG02
4H045　AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 EA20 FA74
GA26