202409090

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202409090 A

(43)公開日： 中華民國 113 (2024) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：112117781 (22)申請日： 中華民國 112 (2023) 年 05 月 12 日

(51)Int. Cl.： *C07K16/30 (2006.01)* *A61K39/395 (2006.01)*
A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2022/05/12 美國 63/341,406

(71)申請人：丹麥商珍美寶股份有限公司 (丹麥) GENMAB A/S (DK)
丹麥
德商生物新技術公司 (德國) BIONTECH SE (DE)
德國

(72)發明人：布雷吉 伊斯爾 BREIJ, ESTHER C.W. (NL)；薩辛 烏爾 SAHIN, UGUR (TR)；阿廷塔斯 伊西爾 ALTINTAS, ISIL (TR)；以歐恩 安德烈亞 IOAN, ANDREEA (NL)；柏斯肯 法蘭克 BEURSKENS, FRANK (NL)；鐘 羅伯 DE JONG, ROB N. (NL)；舒曼 珍寧 SCHUURMAN, JANINE (NL)；格濟 保霖 DE GOEJE, PAULINE L. (NL)；沙堤杰 大衛 SATIJN, DAVID P.E. (NL)；博羅斯 彼得 BOROSS, PETER (NL)；埃勒 安德里 IMLE, ANDREA (DE)；紐瑞柏格 克里斯提納 NUERMBERGER, KRISTINA (DE)；穆伊克 亞歷山大 MUIK, ALEXANDER (DE)；吉塞克 弗德里克 GIESEKE, FRIEDERIKE (DE)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：97 項 圖式數：28 共 282 頁

(54)名稱

在組合療法中能夠結合到ＣＤ２７之結合劑

(57)摘要

本發明提供使用與第二結合劑(包含結合到 CD40 之第一結合區及結合到 CD137 之第二結合區)組合的第一結合劑(包含至少一結合到 CD27 之結合區)之組合療法，以降低腫瘤進程或預防腫瘤進程或治療癌症。

The present invention provides combination therapy using a first binding agent comprising at least one binding region binding to CD27 in combination with a second binding agent comprising a first binding region binding to CD40 and a second binding region binding to CD137 to reduce progression or prevent progression of a tumor or treating cancer.

【發明摘要】

【中文發明名稱】

在組合療法中能夠結合到ＣＤ２７之結合劑

【英文發明名稱】

BINDING AGENTS CAPABLE OF BINDING TO CD27 IN COMBINATION THERAPY

【中文】

本發明提供使用與第二結合劑(包含結合到CD40之第一結合區及結合到CD137之第二結合區)組合的第一結合劑(包含至少一結合到CD27之結合區)之組合療法，以降低腫瘤進程或預防腫瘤進程或治療癌症。

【英文】

The present invention provides combination therapy using a first binding agent comprising at least one binding region binding to CD27 in combination with a second binding agent comprising a first binding region binding to CD40 and a second binding region binding to CD137 to reduce progression or prevent progression of a tumor or treating cancer.

【指定代表圖】無

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

在組合療法中能夠結合到ＣＤ２７之結合劑

【英文發明名稱】

BINDING AGENTS CAPABLE OF BINDING TO CD27 IN COMBINATION THERAPY

【技術領域】

【0001】本發明係關於使用與包含結合到CD40之第一結合區及結合到CD137之第二結合區的第二結合劑組合之包含結合到CD27之至少一結合區的第一結合劑的組合療法以降低腫瘤進程或預防腫瘤進程或治療癌症。

【先前技術】

【0002】分化團簇(CD)27(TNFRSF7)是腫瘤壞死因子(TNF)受體超家族(TNFRSF)的55 kDa第I型跨膜蛋白質成員，其在與其配體CD70結合後共刺激T細胞活化。其在人類的T細胞、B細胞、自然殺手(NK)細胞及其直接前驅物細胞膜上表現，其全部都是淋巴系的一部分。在人類T細胞上，CD27在靜息αβ $CD4^+$(Treg和習知T細胞)、$CD8^+$T細胞、幹細胞記憶細胞和中央記憶樣細胞上表現。在人類B細胞上，CD27是記憶B細胞標記物，且CD27傳訊促進B細胞分化為漿細胞。

【0003】CD27唯一已知的配體是第II型跨膜蛋白質CD70(腫瘤壞死因子超家族成員7，TNFSF7；CD27配體，CD27L)，其在活化之免疫細胞(包括T、B、NK和樹突細胞(DC)相當受限且僅短暫表現。

【0004】CD27在初級免疫反應的早期產生中發揮功能，並且是產生和長期維持T細胞免疫所必需。CD27-CD70結合導致活化之B細胞(NF-κB)和促分裂原活化之蛋白質激酶(MAPK)8/Jun N-端激酶(JNK)路徑的核因子κ-輕鏈增強子的活化。轉接蛋白質TNF受體相關之蛋白質(TRAF)2和TRAF5已被顯示可媒介CD27接合產生的傳訊。

【0005】為了釋放其效應子功能，T細胞需要在抗原呈現細胞(APC)表面上主要組織相容複合物(MHC)分子的上下文下其同源抗原的T細胞抗原受體媒介之辨識，並活化共刺激之受體。CD27和CD28被認為是在T細胞上表現的最重要的共刺激受體。

【0006】在小鼠中，已發現T細胞活化之啟動階段期間的CD27刺激藉由介白素(IL)-2獨立的存活傳訊來促進抗原特異性$CD4^+$和$CD8^+$T細胞的選殖擴增(Carr JM等人，Proc Natl Acad Sci USA 2006 Dec 19；130(51):19454-9)。CD27亦在連續分裂過程中抵消活化之T細胞的細胞凋亡，並且亦顯示在小鼠$CD8^+$T細胞的記憶分化中發揮重要功能。(Van de Ven K，Borst J. Immunotherapy 2015；7(6):655-67)。因此，CD27刺激促進淋巴器官中效應子T細胞的產生，並擴大應答者T細胞行為戲目。在人類初始T細

胞中，CD27刺激促進$CD4^+$T細胞的T輔助細胞-1(Th1)分化並支持細胞毒性T淋巴細胞的效應子分化(Oosterwijk等人，Int Immunol. 2007 Jun；19(6):713-8)。

【0007】與其在某些血液惡性腫瘤的腫瘤細胞上之存在相反，在固態惡性腫瘤的腫瘤細胞上未檢測到CD27表現。然而，已經在血液惡性腫瘤和固態癌症的腫瘤微環境(TME)中描述表現CD27的淋巴細胞。

【0008】在癌症的治療中，免疫反應的參與和刺激已顯示誘導及/或增強抗腫瘤免疫，從而導致臨床反應，如免疫查核點抑制劑(CPI)的臨床成功就是例證。可以藉由提供共刺激傳訊，例如CD27共刺激傳訊，來增加主動免疫反應及/或現有的抗腫瘤免疫。

【0009】在小鼠腫瘤模式中，促效性CD27抗體可增強T細胞功能，從而增強抗腫瘤免疫。在人類CD27(hCD27)-轉基因淋巴瘤小鼠模式中，使用促效性抗體之CD27活化顯示有效的抗腫瘤活性和保護性免疫的誘導，這有賴於$CD4^+$和$CD8^+$T細胞(He LZ等人，J Immunol. 2013 Oct 15；191(8):4174-83)。此外，使用單株抗體之CD27活化防止小鼠異種移植物中的腫瘤生長，包括源自白血病(Vitale等人，Keler T. Clin Cancer Res. 2012 Jul 15；18(14):3812-21)、黑色素瘤(Roberts DJ，等人，J Immunother. 2010 Oct；33(8):769-79)、結腸癌、及胸腺瘤(He LZ，等人，J Immunol. 2013 Oct 15；191(8):4174-83)等之模式。

【0010】先前技術中已經揭露抗人類CD27的單株免

疫球蛋白G(IgG)1促效性抗體。

【0011】在WO2012/004367中描述人源化抗-人類CD27促效性抗體(命名為hCD27.15)。據報告，hCD27.15不需要藉由可結晶片段(Fc)γ受體(FcγR)表現之細胞進行交聯來活化CD27媒介的免疫反應共刺激。然而，此抗體不與hCD27(A59T)中頻繁出現的單核苷酸多型性(SNP)結合，也不與石蟹獼猴CD27結合。

【0012】WO2011/130434揭露命名為1F5的人類促效性抗-人類CD27抗體，其藉由FcγR-表現細胞交聯後活化CD27，並進一步阻斷可溶性CD70(sCD70)配體結合的結合。據報告，1F5具有Fc媒介的效應子功能活性，包括對靶細胞的補體依賴性細胞毒殺(CDC)和抗體依賴性細胞毒殺(ADCC)，並增強免疫反應並在小鼠模式中具有抗腫瘤活性。

【0013】WO2018/058022揭露促效性鼠類抗-人類CD27抗體131A及其人源化版本。據揭露，131A結合頻繁出現的hCD27 SNP A59T和石蟹獼猴CD27。WO2018/058022進一步揭露在小鼠腫瘤模式中，與抗體1F5相比，抗體131A具有更強的抗腫瘤反應。

【0014】WO2019/195452揭露名為BMS-986215的非配體阻斷促效性抗-人類CD27抗體，其經報告對人類和石蟹獼猴CD27的親和性高於上述CD27抗體1F5。據揭露，在BMS-986215存在的情況下，T細胞的CD27共刺激是藉由與其配體CD70結合而發生。進一步揭露，BMS-986215降

低調節性T細胞(Treg)對$CD4^+$應答者T細胞的抑制，並且BMS-986215結合C1q並誘導CDC、適度的ADCC和低水平的抗體依賴性細胞吞噬作用(ADCP)。進一步揭露BMS-986215在不存在FcγR和不存在sCD70的情況下僅具有弱的促效劑活性。

【0015】抗CD27抗體必須誘導CD27在細胞膜上聚集以誘導CD27促效作用。在野生型IgG1抗體的情況下，CD27的聚集可以通過膜結合的CD27抗體與FcγR攜帶細胞(諸如，單核球、巨噬細胞、B細胞和其他免疫細胞)的相互作用來達成。因此，當FcγR-表現細胞的數量受限時，抗CD27 IgG1分子可能效率較低。藉由修飾抗體的Fc區來優化效應子功能可以改善治療性抗體治療癌症或其他疾病的有效性，例如，改善抗體引發對抗原表現細胞的免疫反應的能力。此類努力描述於例如WO 2013/004842 A2；WO 2014/108198 A1；WO2018/146317；WO2018/083126；WO 2018/031258 A1；Dall'Acqua、Cook等人，J Immunol 2006、177(2): 1129-1138；Moore，Chen等人，MAbs 2010 2(2): 181-189；Desjarlais及Lazar，Exp Cell Res 2011，317(9): 1278-1285；Kaneko及Niwa，BioDrugs 2011，25(1): 1-11；Song、Myojo等人，Antiviral Res 2014，111: 60-68；Brezski及Georgiou，Curr Opin Immunol 2016，40: 62-69；Sondermann及Szymkowski，Curr Opin Immunol 2016，40: 78-87；Zhang，Armstrong等人，MAbs 2017，9(7): 1129-1142.；Wang、Mathieu等人，Protein & Cell

2018，9(1): 63-73；Diebolder FJ等人，Science. 2014 Mar 14；343(6176):1260-3)。

【0016】其中，Garber等人討論由下述所組成之合併療法的機會：靶向T細胞上共刺激受體的促效性抗體(例如4-1BB(CD137)、OX40、糖皮質素誘導的腫瘤壞死因子受體家族相關受體(GITR)和獨立的共刺激(ICOS)及阻斷PD-1/PD-L1軸的單株抗體(Garber等人，Nat Rev Drug Discov. 2020 Jan；19(1):3至5)。Azpilikueta等人(J Thorac Oncol 2016；11:524-36)已發表包含下述之組合療法的臨床前數據：小鼠肺癌模式中PD-1阻斷抗體和4-1BB靶向抗體，顯示組合療法優於單劑治療。此外，Diggs等人發表關於在鼠類腫瘤肝癌模式中藉由PD-1阻斷抗體與抗CD40抗體組合療法改善之抗腫瘤活性(Diggs等人，J Hepatol. 2021 May；74(5):1145-1154)。

【0017】WO2008/051424A2提供包括單獨投予CD27-靶向之促效性抗體，或與其他免疫調節劑(諸如，靶向CD40、OX40、4-1BB或CTLA-4之抗體)組合投予之方法。

【0018】儘管本領域做出這些和其他努力，仍需要改良之抗體為主的免疫療法，其具有增加的促效作用及/或增加的接合CD27的效力，作為與其他免疫調節抗體的組合療法一起提供。

【發明內容】

【0019】本發明考量在組合療法中能夠結合到CD27

之結合劑。

【0020】在第一態樣中，本發明提供用於降低個體腫瘤進程或預防個體腫瘤進程或治療個體癌症之方法，方法包含投予到個體i) 第一結合劑包含結合到CD27之至少一結合區；以及ii) 第二結合劑包含結合到CD40之第一結合區及結合到CD137之第二結合區。

【0021】在第二態樣中，本發明提供套組，其包含i) 包含結合到CD27之至少一結合區的第一結合劑以及ii) 第二結合劑包含結合到CD40之第一結合區及結合到CD137之第二結合區。

【0022】在第三態樣中，本發明提供套組，其係用於降低個體腫瘤進程或預防個體腫瘤進程或治療個體癌症之方法，套組包含i) 包含結合到CD27之至少一結合區的第一結合劑以及ii) 第二結合劑包含結合到CD40之第一結合區及結合到CD137之第二結合區。

【0023】在第四態樣中，本發明提供醫藥組成物，其包含i) 包含結合到CD27之至少一結合區的第一結合劑；ii) 第二結合劑包含結合到CD40之第一結合區及結合到CD137之第二結合區；以及iii) 視需要地醫藥上可接受之載劑。

【0024】在第五態樣中，本發明提供醫藥組成物，其係用於降低個體腫瘤進程或預防個體腫瘤進程或治個體療癌症之方法，醫藥組成物包含i) 包含結合到CD27之至少一結合區的第一結合劑，ii) 第二結合劑包含結合到CD40

之第一結合區及結合到CD137之第二結合區；以及iii) 視需要地醫藥上可接受之載劑。

【0025】在第六態樣中，本發明提供第一結合劑，其係用於降低個體腫瘤進程或預防個體腫瘤進程或治療個體癌症之方法，方法包含投予到該個體i) 包含結合到CD27之至少一結合區的第一結合劑；以ii) 第二結合劑包含結合到CD40之第一結合區及結合到CD137之第二結合區。

【0026】在第七態樣中，本發明提供第二結合劑，其係用於降低個體腫瘤進程或預防個體腫瘤進程或治療個體癌症之方法，方法包含投予到該個體i) 包含結合到CD27之至少一結合區的第一結合劑；以及ii) 第二結合劑包含結合到CD40之第一結合區及結合到CD137之第二結合區。

【圖式簡單說明】

【0027】[圖1]顯示抗CD27抗體及其六聚化增強的Fc變體的CD27促效劑活性，如在CD27 Jurkat受體BioAssay中測定。Thaw-and-Use GloResponse NFκB-luc2/CD27 Jurkat報告細胞與所指抗體之抗體濃度系列(從左到右：0.04 μg/mL、0.30 μg/mL、2.50 μg/mL，及20 μg/mL)培育6 h。作為CD27細胞內傳訊的讀數，螢光素酶活性藉由測定發光(RLU：相對發光單位)量化。包括以下抗體為WT IgG1及/或具有E430G或E345R突變的變體，如所示：包含E345R突變之非結合抗HIV-gp120對照抗體(IgG1-b12-E345R、ctrl)、抗CD27抗體IgG1-CD27-A、IgG1-CD27-

B、IgG1-CD27-C、IgG1-CD27-D、IgG1-CD27-E、及IgG1-CD27-F、及先前技術抗CD27基準抗體IgG1-CD27-131A及IgG1-CD27-15。

【0028】[圖2]顯示如藉由流式細胞分析技術所測定，抗CD27抗體與表現在(A、C)PBMC中T細胞或(B、D)經CD27轉染之HEK293F細胞上的(A、B)人類和(C、D)石蟹獼猴CD27的結合。抗體結合呈現為中值螢光強度(MFI)。包括抗HIV-gp120抗體IgG1-b12-FEAR(ctrl)作為非結合陰性對照抗體。

【0029】[圖3]顯示如藉由流式細胞分析技術所測定，抗CD27抗體IgG1-CD27-A、IgG1-CD27-B、及IgG1-CD27-C與HEK293F細胞上表現的人類CD27-A59T變體的結合。抗體結合呈現為中值MFI。包括抗HIV-gp120抗體IgG1-b12-FEAL(ctrl)作為非結合陰性對照抗體。

【0030】[圖4]顯示如在CSFE稀釋檢定中藉由流式細胞分析技術所測定，在存在1 μg/mL的攜帶與Fc突變P329R、G237A組合之Fc突變E430R或E345R之CD27特異性抗體變體IgG1-CD27-A、-B、或-C、或K326A-E33A下，經TCR刺激之(A)$CD8^+$及(B)$CD4^+$T細胞的增殖熱圖。來自4個人類健康捐贈者之PBMC作為T細胞之來源。T細胞增殖表現為T細胞分裂指數或增殖之T細胞百分比，其藉由使用FlowJo軟體，閘控已通過CFSE稀釋度($CFSE^{低峰}$)之細胞來計算。

【0031】[圖5]顯示如藉由流式細胞分析技術所測

定，在人類健康捐贈者PBMC與IgG1-CD27-A、IgG1-CD27-A-P329R-E345R或先前技術抗CD27選殖株IgG1-CD27-131A、IgG1-CD27-CDX1127、及IgG1-CD27-BMS986215培育之後，(A、B)未經刺激或(C至F)經TCR刺激之(A、C、E)$CD4^+$或(B、D、F)$CD8^+$T細胞之(A至D)增殖之T細胞百分比、(E、F)擴增指數。包括HIV-gp120抗體變體IgG1-b12-E345R-P329R(ctrl)作為非結合陰性對照抗體。%增殖細胞藉由閘控已通過CFSE稀釋度($CFSE^{低峰}$)之細胞來計算。擴增指數鑑別孔中細胞的倍數增加及使用FlowJo版本10中的增殖建模工具計算。必要時對峰手動調整，以更一致地定義存在的峰數。

【0032】[圖6]顯示如藉由FACS測定，C1q與本發明的膜結合CD27抗體的結合。測試包含E430G或E345R六聚化增強之突變(IgG1-CD27-A-E430G及IgG1-CD27-A-E345R)及P329R突變(IgG1-CD27-A-P329R-E345R)的IgG1-CD27-A變體其與C1q結合的能力。包括抗HIV-gp120抗體IgG1-b12-F405L(ctrl)作為非結合陰性對照抗體。

【0033】[圖7]顯示如藉由表面電漿子共振(SPR)所測定。IgG1-CD27-A-P329R-E345R與人類Fc受體的結合。Biacore表面晶片與抗His抗體共價連接並塗佈有重組His標記之Fc受體(A)FcγRIa、(B)FcγRIIa-H、(C)FcγRIIa-R、(D)FcγRIIb、(E)FcγRIIIa-F、或(F)FcγRIIIa-V。包括抗HIV-gp120抗體IgG1-b12(ctrl)作為參考。顯示的是在扣除背景(無Fc受體流通池)後，藉由Biacore SPR所測定的絕對共振

單位。

【0034】[圖8]顯示如藉由流式細胞分析技術所測定，IgG1-CD27-A-P329R-E345R與人類健康捐贈者PBMC樣本中人類(A)$CD4^+$及(B)$CD8^+$T細胞亞群的結合。陰性對照抗體IgG1-b12-P329R-E345R(ctrl)是包含P329R及E345R突變之抗HIV gp120非結合同型對照抗體。呈現的數據是重複樣本的平均MFI+/-SD。

【0035】[圖9]顯示如在受體檢定中所測定，在存在及不存在FcγR-媒介之交聯下，抗CD27抗體之CD27促效劑活性。NFκB-luc2/CD27 Jurkat報告細胞的固定數量與(A至E)IgG1-CD27-A-P329R-E345R或IgG1-CD27-A、(F至J)IgG1-CD27-131A、IgG1-CD27-CDX1127或IgG1-CD27-BMS986215，在(A、F)不存在或(B至J)存在FcγRIIb-CHO-K1細胞下，以NFκB-luc2/CD27 Jurkat：FcγRIIb CHO-K1比例為(B、G)1：1、(C、H)1：1/3、(D、I)1：1/9、或(E、J)1：1/27培養。IgG1-b12-P329R-E345R及IgG1-b12為抗HIV gp120非結合對照抗體(ctrl)。測量發光為CD27活化的讀數並呈現為相對發光單位(RLU)

【0036】[圖10]顯示在靜脈內注射25 mg/kg IgG-CD27-A或IgG-CD27-A-P329R-E345R抗體後，SCID小鼠血漿中的人類IgG水平。總人類IgG血漿濃度藉由三明治ELISA測定，並在注射後依時間作圖。顯示的數據是每組血液樣本的平均血漿濃度+/-SEM(n=3隻小鼠)。

【0037】[圖11]顯示在存在IgG1-CD27-A-P329R-

E345R或野生型CD20抗體IgG1-CD20下，與hMDM(E：T=2：1)共培養4 h後活CD27+Daudi細胞的百分比。Daudi細胞以CellTrace™ Violet標記，並藉由流式細胞分析技術測量細胞活力。顯示的數據是活Daudi細胞(TO-PRO-3-CTV+CD11b-)的重複平均值±SD百分比，其標準化為2個實驗中所測試的4個捐贈者中的一個捐贈者的無抗體對照。

【0038】[圖12]顯示如藉由ELISA所測定，在NHS中IgG1-CD27-A-P329R-E345R培育後的C4d沉積IgG1-b12-P329R-E345R是同型對照抗體，及IgG1-b12是具有WT Fc結構域的對照抗體；IgG1-b12-RGY是C4d沉積的陽性對照抗體(溶液中的六聚體抗體)。顯示是所進行的三個之一個代表性實驗的一式三份的平均值±SD。

【0039】[圖13]顯示藉由抗CD27抗體在Daudi細胞上CD70結合的抑制。在存在或不存在50 μg/mL之非結合對照抗體(IgG1-b12-P329E-E345R或IgG1-b12)或CD27抗體(IgG1-CD27-A、IgG1-CD27-A-P329R-E345R、IgG1-CD27-CDX1127、IgG1-CD27-BMS986215、或IgG1-CD27-131A)下，CD27+Daudi細胞與6 μg/mL生物素化重組人類CD70 ECD培育。使用BV421標記之鏈球菌親生物素蛋白，藉由流式細胞分析技術檢測生物素化CD70片段與Daudi細胞的結合。顯示的數據是來自所進行的三個之一個代表性實驗的重複孔的gMFI ± SD。

【0040】[圖14]顯示在以抗CD27抗體處理後，在多株活化之CD4+及CD8+T細胞中T細胞活化標記物的表現水

平。人類健康捐贈者PBMC與0.1 μg/mL CD3抗體及30 μg/mL之IgG1-CD27-A-P329R-E345R、CD27抗體基準或非結合對照抗體IgG1-b12-P329R-E345R培育2到5天。在抗體處理樣本中，在(A)$CD4^+$及(B)$CD8^+$T細胞表面上的T細胞活化標誌物HLA-DR、CD69、GITR、CD25、CD107a，及4-1BB之表現水平藉由流式細胞分析技術量化，並呈現為相對於同一捐贈者的非結合對照樣本之呈MFI(± SD)的平均倍數變化。虛線表示以IgG1-b12-P329R-E345R(其用作為非結合對照且設為1)處理的細胞的倍數變化。顯示的數據來自在一個實驗中一式二份測試的三個捐贈者。

【0041】[圖15]顯示在以OVA免疫和以抗CD27抗體處理後，hCD27-KI小鼠脾臟中OVA特異性$CD8^+$T細胞的百分比。hCD27-KI小鼠在第0、12和21天s.c.注射5 mg OVA，且同時以30 mg/kg IgG1-CD27-A-P329R-E345R、IgG1-CD27-CDX1127或非結合對照抗體IgG1-b12-P329R-E345R來i.v.處理。在第28天，小鼠被安樂死，脾臟被切除，並處理為單細胞懸浮液。OVA特異性$CD8^+$T細胞的擴增藉由流式細胞分析技術評估。顯示的數據是來自所進行的一個實驗各處理組(每組5隻小鼠)的$CD8^+$細胞之% OVA^+平均值± SD。

【0042】[圖16]顯示在以OVA免疫和以抗CD27抗體處理後第28天，藉由IFNγ-ELISpot所測量，產生IFNγ的脾細胞的數量。hCD27-KI小鼠在第0、12和21天以5 mg OVA來s.c.注射，且同時以30 mg/kg IgG1-CD27-A-P329R-

E345R、IgG1-CD27-CDX1127、或非結合對照抗體IgG1-b12-P329R-E345R來i.v.處理。在第28天，切除脾臟，將其處理為單細胞懸浮液，並使用IFNγ-ELISpot檢測產生IFNγ的脾細胞。顯示的數據是來自所進行的一個實驗各處理組(每組5隻小鼠)的每孔平均斑點數±SEM。

【0043】[圖17]顯示在以OVA免疫和以抗CD27抗體處理後hCD27-KI小鼠脾臟中活化之$CD8^+$T細胞的百分比。hCD27-KI小鼠在第0、12和21天s.c.注射5 mg OVA，及同時以30 mg/kg IgG1-CD27-A-P329R-E345R、IgG1-CD27-CDX1127、或非結合對照抗體IgG1-b12-P329R-E345R來i.v.處理。在第28天，小鼠被安樂死，脾臟被切除，並處理為單細胞懸浮液。藉由流式細胞分析技術測量脾臟中$CD8^+$細胞的百分比$PD\text{-}1^+$，評估脾臟樣本中$CD8^+$T細胞的活化。顯示的數據是來自所進行的一個實驗各處理組(每組5隻小鼠)的平均值±SD。

【0044】[圖18]顯示在以OVA免疫和以抗CD27抗體處理後hCD27-KI小鼠脾臟中效應子$CD8^+$T細胞的百分比。hCD27-KI小鼠在第0、12和21天s.c.注射5 mg OVA，及同時30 mg/kg IgG1-CD27-A-P329R-E345R、IgG1-CD27-CDX1127、或非結合對照抗體IgG1-b12-P329R-E345R來i.v.處理。在第28天，小鼠被安樂死，脾臟被切除，並處理為單細胞懸浮液。藉由流式細胞分析技術藉由CD44和CD62L的表現評估記憶T細胞的擴增。顯示的數據是來自所進行的一個實驗各處理組(每組5隻小鼠)的平均值±SD。

(A)CD45$^+$細胞之百分比CD8$^+$CD44$^+$CD62L$^-$效應子記憶。(B)CD8$^+$T細胞之百分比CD44$^+$CD62L$^-$效應子記憶。(C)CD45$^+$細胞之百分比CD8$^+$CD44$^-$CD62L$^-$預效應子。(D)CD8$^+$T細胞之百分比CD44$^-$CD62L$^-$預效應子。

【0045】[圖19]顯示在以OVA免疫和以抗CD27抗體處理後hCD27-KI小鼠脾臟中T細胞的百分比。hCD27-KI小鼠在第0、12和21天s.c.注射5 mg OVA，及同時以30 mg/kg IgG1-CD27-A-P329R-E345R、IgG1-CD27-CDX1127、或非結合對照抗體IgG1-b12-P329R-E345R來i.v.處理。在第28天，小鼠被安樂死，脾臟被切除，並處理為單細胞懸浮液。藉由流式細胞分析技術評估血液和脾臟中的CD3$^+$細胞。顯示的數據是來自所進行的一個實驗各處理組(每組5隻小鼠)的平均值±SD。

【0046】[圖20]顯示抗原特異性研究中IgG1-CD27-A-P329R-E345R對T細胞細胞介素產生的影響。將(A)表現內源性PD-1或(B)過度表現PD-1之CLDN6-TCR-表現之CD8+T細胞與表現自體CLDN6之iDC的共培養物與10 μg/mL IgG1-CD27-A-P329R-E345R、CD27基準抗體IgG1-CD27-131A、或非結合對照抗體IgG1-b12-P329R-E345R培育2天。藉由多重ECLIA分析共培養上清液中的細胞介素水平。顯示的數據是在所進行的2個實驗中所測是的七個中的一個代表性捐贈者的一式三份孔的平均濃度±SD。縮寫：CLDN6=密連蛋白6；ECLIA=電化學發光檢定；iDC=未成熟樹突細胞；PD-1=程式化細胞死亡蛋白質1；SD=標

準偏差；TCR=T細胞受體。

【0047】[圖21]顯示與IgG1-CD27-A-P329R-E345R培育的抗原特異性CD8+T細胞中細胞毒殺相關之分子的表現。在存在IgG1-CD27-A-P329R-E345R、CD27基準IgG1-CD27-131A、或非結合對照抗體IgG1-b12-P329R-E345R下，將CLDN6-TCR-電穿孔CD8+T細胞與hCLDN6-MDA-MB-231細胞共培養2天。GzmB及CD107a的細胞內表現藉由流式細胞分析技術測定。顯示現GzmB及CD107a二者CD8+T細胞的百分比，以及在CD8+T細胞中GzmB及CD107a的表現水平(MFI標準化為IgG1-b12-P329R-E345R)。顯示的數據是在2個實驗的單個重複中所測試的六個捐贈者的平均值±SD。**，P<0.01；*，P<0.05；Friedman檢定與Dunn的多重比較檢定。縮寫：CLDN6=密連蛋白6；GzmB=顆粒酶B；MFI=平均螢光強度；SD=標準偏差；TCR=T細胞受體。

【0048】[圖22]顯示在存在IgG1-CD27-A-P329R-E345R下抗原特異性CD8+T細胞媒介之腫瘤細胞毒殺。藉由實時細胞分析評估hCLDN6-MDA-MB-231細胞之CD8+T細胞媒介之毒殺。在存在IgG1-CD27-A-P329R-E345R、CD27基準IgG1-CD27-131A、或非結合對照抗體IgG1-b12-P329R-E345R下，將CLDN6 TCR電穿孔之CD8+T細胞與hCLDN6-MDA-MB-231細胞共培養5天。細胞指數值源自每2小時進行的阻抗測量。AUC是從共培養5天的細胞指數數據中獲得。將各處理條件的AUC標準化為來自相同捐贈

者的IgG1-b12-P329R-E345R處理之培養物。顯示的數據是來自在2個實驗中一式二份所測試的六個捐贈者的平均值±SD。**，P<0.01；Friedman檢驗與Dunn的多重比較檢驗。縮寫：AUC=曲線下面積；CLDN6=密連蛋白6；SD=標準偏差；TCR=T細胞受體。

【0049】[圖23]顯示以IgG1-CD27-A-P329R-E345R處理後初代腫瘤培養物中CD4+及CD8+T細胞及NK細胞的絕對細胞數。在存在或不存在10 μg/mL IgG1-CD27-A-P329R-E345R下，以低劑量IL-2(45至50U/mL)培養人類NSCLC腫瘤組織。處理14天後，藉由流式細胞分析技術測定TIL亞群的絕對細胞計數。顯示的數據是來自所進行的四個中之一個實驗所測試之5個腫瘤組織中之一個的四個重複孔的平均±SD。縮寫：IL=介白素；NK=自然殺手；NSCLC=非小細胞肺癌；SD=標準偏差；U/mL=每mL之單位。

【0050】[圖24]顯示在Daudi及huCD27-K562細胞之細胞表面上IgG1-CD27-A-P329R-E345R抗體之間藉由生物發光共振能量轉移(BRET)分析所測定的分子接近度。細胞與NanoLuc-(供體)及HaloTag-(受體)標記之抗體(各5 μg/mL)：如所示之IgG1-CD27-A-P329R-E345R、WT IgG1-CD27-A或非結合對照IgG1-b12-P329R-E345R的混合物培育。使用抗體對IgG1-CD20-11B8-E430G-LNLuc及IgG1-CD37-37.3-E430G-LHalo作為陽性對照。BRET以milliBRET單位(mBU)=(618 nm_{em}/460 nm_{em}) x 1000計算，

並藉由減去無配體對照值來校正捐贈者滲漏(bleed-through)。顯示的數據是從所進行的三個中的一個代表性實驗的重複孔中校正的BRET。

【0051】[圖25]顯示相較於具有不相關抗原結合區之WT IgG1抗體(IgG1-b12)作為FcγRIa結合之陽性對照，及攜帶P329R及E345R突變之相同抗體的變體(IgG1-b12-P329R-E345R)，IgG1-CD27-A-P329R-E345R與M0和M1巨噬細胞的結合。使用PE標記之山羊抗人類二次抗體藉由流式細胞分析技術偵測抗體與巨噬細胞的結合。顯示的數據是所測試的2個捐贈者之平均值+SD。

【0052】[圖26]顯示由與DuoBody-CD40x4-1BB組合之IgG1-CD27-A-P329R-E345R誘導的多株活化之CD8+T細胞的增殖。CTV標記之人類健康捐贈者PBMC與CD3抗體和IgG1-CD27-A-P329R-E345R及/或DuoBody-CD40x4-1BB培育四天。藉由流式細胞分析技術分析T細胞中的CTV稀釋度，並用於計算擴增指數。顯示的數據來自以0.1 μg/mL CD3抗體刺激的樣本中的CD8+T細胞。值呈現在所進行的四個實驗中所測試的六個捐贈者中的一個代表性捐贈者的單個重複的擴增指數。縮寫：CD=分化團簇；CTV=細胞微量紫；PBMC=周邊血液單核細胞；TCR=T細胞受體。

【0053】[圖27]顯示與DuoBody-CD40x4-1BB組合之IgG1-CD27-A-P329R-E345R對活體外T細胞增殖的影響。人類CD8+T細胞以編碼CLDN6特異性TCR的RNA電穿孔，並以CFSE標記。然後，在不存在或存在DuoBody-CD40x4-

1BB(0.0022、0.0067或0.2 μg/mL)、IgG1-CD27-A-P329R-E345R(0.1、1或10 μg/mL)、或二者的組合，T細胞與以編碼CLDN6之RNA電穿孔之iDC共培養4 d。藉由流式細胞分析技術分析T細胞中的CFSE稀釋度，並用於計算擴增指數。顯示來自在三個獨立實驗中所測試的六個捐贈者中的一個代表性捐贈者的數據。誤差條指示重複孔的SD。虛線表示未經抗體處理與iDC共培養的CD8+T細胞的擴增指數。CFSE，羧基螢光素丁二醯亞胺基酯；CLDN6，密連蛋白-6；iDC，未成熟樹突細胞；SD，標準偏差；TCR，T細胞受體。

【0054】[圖28]顯示與DuoBody-CD40x4-1BB組合之IgG1-CD27-A-P329R-E345R對活體外IFNγ分泌的影響。如圖3所示，在不存在或存在DuoBody-CD40x4-1BB(0.0022、0.0067或0.2 μg/mL)、IgG1-CD27-A-P329R-E345R(0.1、1或10 μg/mL)、或二者的組合下，表現CLDN6特異性TCR的人類CD8+T細胞與表現CLDN6之iDC共培養。2 d後，藉由多重ECLIA在上清液中測定IFNγ濃度。顯示來自所測試的三個捐贈者中的一個代表性捐贈者的數據。誤差條指示重複孔的SD。虛線表示未經抗體處理的CD8+T細胞/iDC共培養物中的IFNγ濃度。CLDN6，密連蛋白-6；ECLIA，電化學發光免疫檢定；iDC，未成熟樹突細胞；SD，標準偏差；TCR，T細胞受體。

【實施方式】

定義

【0055】本發明上下文中的術語「抗體」(Ab)是指具有與抗原特異性結合的能力的免疫球蛋白分子、免疫球蛋白分子的片段或其之一的衍生物。本發明的抗體包含免疫球蛋白的Fc結構域和抗原結合區。抗體通常包含二個CH2-CH3區和連接區，例如樞紐區，例如至少Fc結構域。因此，本發明的抗體可以包含Fc區及抗原結合區。免疫球蛋白分子的重鏈和輕鏈的可變區包含與抗原相互作用的結合結構域。抗體的恆定區或「Fc」區可媒介免疫球蛋白與宿主組織或因子的結合，包括免疫系統的各種細胞(諸如，效應子細胞)和補體系統的組分，諸如，C1q，補體活化經典路徑之第一組分。如本文所用，除非與上下文矛盾，否則免疫球蛋白的Fc區典型包含至少免疫球蛋白CH的CH2結構域和CH3結構域，並且可以包含連接區，例如樞紐區。Fc區典型通過例如連接二個樞紐區的雙硫鍵及/或二個CH3區之間的非共價相互作用而呈二聚化形式。二聚體可以是同二聚體(其中二個Fc區單體胺基酸序列相同)或異二聚體(其中二個Fc區單體胺基酸序列差在一或多個胺基酸)。全長抗體的Fc區片段可以例如藉由用木瓜酶消化全長抗體來產生，如本領域所熟知。除Fc區和抗原結合區外，本文定義的抗體亦進一步包含免疫球蛋白CH1區和CL區中的一者或二者。抗體也可以是多特異性抗體，諸如，雙特異性抗體或類似分子。術語「雙特異性抗體」是指對至少二個不同、典型不重疊的表位具有特異性的抗體。這樣的表位可

以在相同或不同的標靶上。如果表位在不同標靶上，這些標靶可能在相同的細胞或不同的細胞或細胞類型上。如上所述，除非另有說明或與上下文明顯矛盾，本文中的術語抗體包括抗體片段，其包含至少一部分Fc區並且保留特異性結合抗原的能力。此類片段可藉由任何已知技術提供，諸如，酶切割、胜肽合成和重組表現技術。已顯示抗體的抗原結合功能可由全長抗體的片段進行。術語「Ab」或「抗體」中涵蓋的結合片段的例子包括，但不限於，單價抗體(在WO2007059782中由Genmab描述)；重鏈抗體，僅由二條重鏈所組成且自然存在於例如駱駝科中(例如，Hamers-Casterman(1993)Nature 363:446)；ThioMabs，Roche，WO2011069104)；股交換工程化結構域(SEED或Seed-body)，其為不對稱和雙特異性抗體樣分子(Merck，WO2007110205)；Triomab(Pharma/Fresenius Biotech，Lindhofer等人，1995 J Immunol 155:219；WO2002020039)；FcΔAdp(Regeneron，WO2010151792)；Azymetric Scaffold(Zymeworks/Merck，WO2012/058768)；mAb-Fv(Xencor，WO2011/028952)；Xmab(Xencor)；雙可變結構域免疫球蛋白(Abbott，DVD-Ig，美國專利案第7,612,181號)；雙結構域雙頭抗體(Unilever；Sanofi Aventis，WO20100226923)；雙功能抗體(Di-diabody)(ImClone/Eli Lilly)；Knobs-into-holes抗體形式(Genentech，WO9850431)；DuoBody(Genmab，WO 2011/131746)；雙特異性IgG1和IgG2(Pfizer/Rinat，WO11143545)；DuetMab(Med免疫，

US2014/0348839)；靜電掌控(Electrostatic steering)抗體形式(Amgen，EP1870459和WO 2009089004；Chugai，US201000155133；Oncomed，WO2010129304A2)；雙特異性IgG1和IgG2(Rinat neurosciences Corporation，WO11143545)；CrossMAb(Roche，WO2011117329)；LUZ-Y(Genentech)；Biclonic(Merus，WO2013157953)；雙靶向結構域抗體(GSK/Domantis)；識別二個標靶的二合一抗體或雙重功能Fab(Genentech，Nov免疫，Adimab)；交聯單株Mab(Karmanos Cancer Center)；共價融合mAb(AIMM)；CovX-body(CovX/Pfizer)；FynomAbs(Covagen/Janssen ilag)；DutaMab(Dutalys/Roche)；iMab(Med免疫)；IgG-樣雙特異性(ImClone/Eli Lilly，Shen，J.,等人，J Immunol Methods，2007. 318(1-2): p. 65-74)；TIG-body、DIG-body及PIG-body(Pharmabcine)；雙親和性再靶向分子(Fc-DART或Ig-DART，Macrogenics，WO/2008/157379，WO/2010/080538)；BEAT(Glenmark)；Zybodies(Zyngenia)；具有共同輕鏈(Crucell/Merus，US7262028)或共同重鏈(Nov免疫的κλBodies，WO2012023053)的方法，以及包含融合到包含Fc區樣，如scFv-融合體，的抗體片段之多胜肽序列的融合蛋白，ZymoGenetics/BMS之BsAb、Biogen Idec之HERCULES(US007951918)；SCORPIONS(Emergent BioSolutions/Trubion及Zymogenetics/BMS)；Ts2Ab(Med免疫/AZ(Dimasi，N.，等人，J Mol Biol，2009. 393(3): p. 672-92)；scFv融合體(Genentech/

Roche)；scFv融合體(Novartis)；scFv融合體(Immunomedics)；scFv融合體(Changzhou Adam Biotech Inc，CN 102250246)；TvAb(Roche，WO 2012025525，WO 2012025530)；mAb2(f-Star，WO2008/003116)；以及雙scFv-融合體。應當理解術語抗體，除非另有說明，包括單株抗體(諸如，人類單株抗體)、多株抗體、嵌合抗體、人源化抗體、單特異性抗體(諸如，雙價單特異性抗體)、雙特異性抗體、任何同型及/或異型的抗體；抗體混合物(重組多株抗體)，例如藉由Symphogen及Merus(Oligoclonics)利用的技術產生者，WO2015/158867中描述的多聚體Fc蛋白，以及WO2014/031646中描述的融合蛋白質。雖然這些不同的抗體片段和形式通常包含在抗體含義內，它們共同地和各自獨立地是本發明的獨特特徵，呈現不同的生物學特性和效用。

【0056】天然受體的「促效性抗體」是化合物，其結合受體以形成受體-抗體複合物並活化所述受體，從而啟動路徑傳訊及進一步的生物學過程。

【0057】術語「促效作用」和「促效性」在本文中可互換使用，且是指或描述能夠直接或間接地實質上誘導、促進或增強CD27生物活性或活化之抗體。視需要地，「促效性CD27抗體」是能夠藉由與CD27的配體類似的機制活化CD27受體的抗體，已知為CD70(腫瘤壞死因子超家族成員7，TNFSF7；CD27配體，CD27L)，其導致一種或多種細胞內傳訊路徑的活化，其可包括NF-KB和

MAPK8/JNK路徑的活化。如本文所定義的「促效作用」可根據本文的實施例2來確定。

【0058】如本文所描述的「CD27抗體」或「抗CD27抗體」是特異性結合蛋白質CD27，特別是人類CD27的抗體。

【0059】如本文所用，「變體」指蛋白質或多胜肽序列，其與親本或參考序列差在一或多個胺基酸殘基。例如，變體與親本或參考序列具有至少80%，諸如，90%、或95%、或97%、或98%、或99%的序列同一性。此外，或者，變體可以與親本或參考序列相差12個或更少諸如，11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1個突變(群)，諸如，胺基酸殘基之取代、插入、或缺失。因此，本文可互換使用的「變體抗體」或「抗體變體」是指與親本或參考抗體相比差在一或多個胺基酸殘基的抗體，例如在抗原結合區、Fc-區或二者。同樣，「變體Fc區」或「Fc區變體」是指與親本或參考Fc區相比，差在一或多個胺基酸殘基的Fc區，視需要地與親本或參考Fc區胺基酸序列差在12或更少，諸如，11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1個突變(群)，諸如，胺基酸殘基之取代、插入、或缺失。親本或參考Fc區典型是人類野生型抗體的Fc區，根據上下文，它可以是特定的同型。二聚化形式的變體Fc區可以是同二聚體或異二聚體，例如，其中二聚化Fc區的一個胺基酸序列包含突變而另一個與親本或參考野生型胺基酸序列相同。包含Fc區胺基酸序列的野生型(典型是親本或參考

序列)IgG CH和變體IgG恆定區胺基酸序列的例子在表3中列出。

【0060】如本文所用，術語「免疫球蛋白重鏈」或「免疫球蛋白的重鏈」意指免疫球蛋白的重鏈之一。重鏈典型包含重鏈可變區(本文縮寫為VH)和重鏈恆定區(本文縮寫為CH)，其定義免疫球蛋白的同型。重鏈恆定區典型包含三個結構域，CH1、CH2和CH3。本文所用的術語「免疫球蛋白」意指一類結構相關的糖蛋白，其由二對多胜肽鏈、一對輕(L)低分子量鏈和一對重(H)鏈組成，所有四個可能藉由雙硫鍵相互連接。免疫球蛋白的結構已被很好地特徵化(參見例如Fundamental Immunology Ch. 7 Paul、W.、2nd ed. Raven Press、N.Y. 1989)。在免疫球蛋白的結構中，二條重鏈藉由所謂的「樞紐區」中的雙硫鍵相互連接。與重鏈一樣，每條輕鏈典型包含多個區；輕鏈可變區(本文縮寫為VL)和輕鏈恆定區。輕鏈恆定區典型包含一個結構域CL。此外，VH和VL區可以進一步細分為超可變區(或可以在序列及/或結構定義環的形式上為高度變異的高度變異區)，也稱為互補決定區(CDR)，散佈更保守的區，稱為框架區(FR)。各VH和VL典型由三個CDR和四個FR組成，按以下順序從胺基末端到羧基末端排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。本文的CDR序列是根據IMGT所定義(見Lefranc MP.等人，Nucleic Acids Research、27、209-212、1999]及Brochet X. Nucl. Acids Res. 36、W503-508(2008))。

【0061】當在本文中使用時，術語「半分子」、「Fab-臂」和「臂」是指重鏈-輕鏈對。當雙特異性抗體被描述為包含「衍生自」第一抗體的半分子抗體和「衍生自」第二抗體的半分子抗體時，術語「衍生自」表示雙特異性抗體是藉由重組以任何已知的方法產生，將來自該第一和第二抗體中各者的該半分子轉化為所得雙特異性抗體。在本文中，「重組」不旨在受限於任何特定的重組方法，因此包括本文下文描述的用於產生雙特異性抗體的所有方法，包括例如本領域也描述的藉由「半分子交換」的重組，如「Fab臂交換」和DuoBody®方法，以及在核酸水平及/或通過在相同細胞中共表現二個半分子的重組。

【0062】如本文所用，術語「抗原結合區」或「結合區」或抗原結合結構域是指能夠結合抗原的抗體之區。此結合區典型由抗體的VH和VL結構域定義，它們可以進一步細分為超可變區(或可以在序列及/或結構定義環的形式上為高度變異的高度變異區)，也稱為互補決定區(CDR)，散佈更保守的區，稱為框架區(FR)。抗原可以是任何分子，諸如，多胜肽，例如存在於細胞、細菌或病毒顆粒上。除非與上下文相矛盾，術語「抗原結合區」和「抗原結合位點」和「抗原結合結構域」在本發明的上下文中可以互換使用。

【0063】在本發明的上下文中，術語「抗原」和「標靶」可以互換使用，除非與上下文相矛盾。

【0064】如本文所用，術語「結合」是指結合抗體與

預定抗原或標靶的結合，典型當使用抗體作為配體及抗原作為分析物藉由生物層干涉測量法測量時，以對應於1E^{6} M或更低，例如，5E^{7} M或更低、1E^{7} M或更低，諸如，5E^{8} M或更低，諸如，1E^{8} M或更低，諸如，5E^{9} M或更低、或諸如，1E^{9} M或更低之K_D的結合親和性，且以對應於比結合(除了預定抗原或緊密相關之抗原以外)非特異性抗原(例如，BSA、酪蛋白)的其親和性至少低10倍，諸如，至少低100倍，例如至少低1,000倍，諸如，至少低10,000倍，例如至少低100,000倍之K_D的親和性結合預定抗原。

【0065】如本文所用，術語「K_D」(M)是指特定抗體-抗原相互作用的解離平衡常數，並且藉由以k_a除以k_d而獲得。

【0066】如本文所用，術語「k_d」(sec^{-1})是指特定抗體-抗原相互作用的解離速率常數。該值也稱為k_{off}值或解離率(off-rate)。

【0067】如本文所用，術語「k_a」(M^{-1} x sec^{-1})是指特定抗體-抗原相互作用的締合速率常數。該值也稱為k_{on}值或締合率(on-rate)。

【0068】如本文所用，術語「CD27」是指稱為CD27的人類蛋白質，亦已知為腫瘤壞死因子受體超家族成員7(TNFRSF7)。在SEQ ID NO：1(Uniprot ID P26842)所示的胺基酸序列中，胺基酸殘基1至19為訊息胜肽，胺基酸殘基20至240為成熟多胜肽。除非與上下文相矛盾，否則

CD27也可以指CD27的變體、其同功型和異種同源物。包含A59T突變的人類CD27的自然存在變體顯示在SEQ ID NO：2中。

【0069】在石蟹獼猴(Macaca fascicularis)中，CD27蛋白質具有SEQ ID NO：3(Genbank XP_005569963)所示的胺基酸序列。在SEQ ID NO：3所示的240個胺基酸序列中，未定義訊息胜肽。

【0070】術語「抗體結合區」是指抗原的區，其包含抗體結合的表位。抗體結合區域可以使用生物層干涉測量法藉由表位結合、藉由丙胺酸掃描或藉由洗牌(shuffle)檢定(使用抗原構築體，其中抗原區與另一物種的區交換並測定抗體是否仍然結合抗原或不是)來測定。抗體結合區內參與與抗體相互作用的胺基酸可以藉由氫/氘交換質譜法和藉由與其抗原結合的抗體之晶體學來測定。

【0071】術語「表位」是指被抗體特異性結合的抗原決定位。表位通常由分子的表面分組所組成，諸如：胺基酸、糖側鏈或其組合，並且通常具有特定的三維結構特徵，以及特定的電荷特徵。構形和非構形表位的區別在於與前者而非後者的結合在變性溶劑存在下喪失。表位可以包含直接參與結合的胺基酸殘基，以及不直接參與結合的其他胺基酸殘基，諸如，當抗體結合到抗原時被抗體有效阻斷或覆蓋的胺基酸殘基(換句話說，胺基酸殘基在特定抗體的足跡內或緊鄰)。

【0072】如本文所用，術語「單株抗體」、「單株

Ab」、「單株抗體組成物」、「mAb」等是指單分子組成物的抗體分子的製備。單株抗體組成物顯示出對特定表位的單一結合特異性和親和性。因此，術語「人類單株抗體」是指顯示單一結合特異性的抗體，其具有源自人類種系免疫球蛋白序列的可變區和恆定區。人類單株抗體可由融合瘤產生，該融合瘤包括獲自轉基因或轉染色體-非人類動物，諸如，轉基因小鼠或大鼠的B細胞，其具有包含人類重鏈轉基因和輕鏈轉基因的基因組，融合到永生化的細胞中。單株抗體也可以從重組修飾的宿主細胞，或使用支持編碼抗體的核酸序列的試管內轉錄及/或轉譯的細胞萃取物的系統產生。

【0073】如本文所用，術語「同型」是指免疫球蛋白類別(例如IgG、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE、或IgM)或其任何同種異型，諸如，IgG1m(za)及IgG1m(f))，其由重鏈恆定區基因編碼。再者，各重鏈同型都可以與κ(卡)或λ(泻)輕鏈組合。

【0074】當用於本文時，術語「全長抗體」表示抗體不是片段，而是包含正常在自然界中發現的同型之特定同型的所有結構域，例如，IgG1抗體之VH、CH1、CH2、CH3、樞紐、VL及CL結構域。在全長變體抗體中，當與全長親本或野生型抗體相比時，重鏈和輕鏈恆定和可變結構域可特別包含改善抗體功能特性的胺基酸取代。根據本發明的全長抗體可以藉由包括以下步驟的方法產生：(i)將CDR序列選殖到包含完整重鏈序列和完整輕鏈序列的合

適的載體中，及(ii) 在合適的表現系統中表現完整的重鏈序列和輕鏈序列。當從CDR序列或完整的可變區序列開始時，生產全長抗體為發明所屬技術領域中具有通常知識者的知識範圍內。因此，發明所屬技術領域中具有通常知識者將知道如何產生根據本發明的全長抗體。

【0075】如本文所用，術語「人類抗體」意指包括包含衍生自人類種系免疫球蛋白序列和人類免疫球蛋白恆定結構域的可變區和構架區的抗體。本發明的人類抗體可包括不由人類種系免疫球蛋白序列編碼的胺基酸殘基(例如，藉由試管內隨機或定點誘變或藉由活體內體細胞突變引入的突變、插入或缺失)。然而，如本文所用，術語「人類抗體」不意指包括其中衍生自另一非人類物種(諸如，小鼠)的種系的CDR序列已被移植到人類框架序列上的抗體。

【0076】如本文所用，術語「人源化抗體」是指基因工程化的非人類抗體，其包含人類抗體恆定結構域和經修飾以包含與人類可變結構域有高度序列同源性的非人類可變結構域。這可以藉由將一起形成抗原結合位點的六個非人類抗體互補決定區(CDR)移植到同源人類接受者框架區(FR)上來實現(見WO92/22653和EP0629240)。為了完全重建親本抗體的結合親和性和特異性，可能需要將親本抗體(即非人類抗體)的構架殘基替換為人構架區(回復突變)。結構同源性建模可能有助於識別框架區中對抗體結合特性很重要的胺基酸殘基。因此，人源化抗體可包含非人類

CDR序列，主要是人類構架區，視需要地包含對非人類胺基酸序列的一或多個胺基酸回復突變，以及完全人類恆定區。視需要地，可以應用不一定是回復突變的額外胺基酸修飾來獲得具有較佳特徵，諸如，親和性和生化特性的人源化抗體。

【0077】如本文所用，術語「Fc區」或「Fc結構域」可互換使用並且是指重鏈恆定區的區，其沿著抗體的N端到C端的方向包含至少樞紐區、CH2區和CH3區。抗體的Fc區可以媒介免疫球蛋白與宿主組織或因子，包括免疫系統的各種細胞(例如效應子細胞)和補體系統的組分的結合。

【0078】術語「親本多胜肽」或「親本抗體」應理解為與根據本發明的多胜肽或抗體相同的多胜肽或抗體，但其中除非特別指明或與上下文明顯矛盾，否則親本多胜肽或親本抗體沒有突變。例如，本發明的抗體IgG1-CD27-A是IgG1-CD27-A-P329R-E345R的親本抗體。

【0079】如本文所用，術語「樞紐區」是指免疫球蛋白重鏈的樞紐區。因此，例如，人類IgG1抗體的樞紐區對應於如Kabat、E.A.等人，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)所列之根據Eu編號(Eu-索引)的胺基酸216至230。然而，樞紐區也可以是本文所述的任何其他亞型。

【0080】如本文所用，術語「CH1區」或「CH1結構域」是指免疫球蛋白重鏈的CH1區。因此，例如，人類IgG1抗體的CH1區對應於如Kabat(出處同上)所列之根據Eu編號的胺基酸118至215。然而，CH1區也可以是本文所述的任何其他亞型。

【0081】如本文所用，術語「CH2區」或「CH2結構域」是指免疫球蛋白重鏈的CH2區。因此，例如，人類IgG1抗體的CH2區對應於如Kabat(出處同上)所列之根據Eu編號的胺基酸231至340。然而，CH2區也可以是本文所述的任何其他亞型。

【0082】如本文所用，術語「CH3區」或「CH3結構域」是指免疫球蛋白重鏈的CH3區。因此，例如，人類IgG1抗體的CH3區對應於如Kabat(出處同上)所列之根據Eu編號的胺基酸341至447。然而，CH3區也可以是本文所述的任何其他亞型。

【0083】如本文所用，術語「Fc媒介之效應子功能」或「Fc效應子功能」可互換使用，且意指多胜肽或抗體與其細胞膜上的標靶或抗原結合的結果的功能，其中，Fc-媒介之效應子功能歸因於多胜肽或抗體的Fc區。Fc媒介之效應子功能的例子包括(i) C1q結合、(ii) 補體活化、(iii) 補體依賴性細胞毒殺(CDC)、(iv) 抗體依賴性細胞媒介之細胞毒性(ADCC)、(v) Fc-γ受體(FcγR)結合、(vi) 抗體依賴性、FcγR媒介之抗原交聯、(vii) 抗體依賴性細胞吞噬作用(ADCP)、(viii) 補體依賴性細胞性細胞毒殺

(CDCC)、(ix) 補體增強之細胞毒殺、(x) 結合由抗體媒介之調理抗體的補體受體、(xi) 調理作用、及(xii)(i)至(xi)中任一項的組合。

【0084】如本文所用，術語「減少之Fc效應子功能(群)」或「減少之Fc媒介之效應子功能」可互換使用，且意指當直接比較相同檢定中親本多胜肽或抗體的Fc效應子功能時，對抗體的Fc效應子功能降低。

【0085】如本文所用，術語「惰性(inertness)」、「惰性(inert)」或「非活化」是指至少不能結合任何FcγR，誘導Fc媒介之FcγR交聯，或誘導藉由單個抗體的二個Fc區的FcγR媒介之靶抗原交聯，或者不能結合C1q的Fc區。因此，在本發明的某些具體實施例中，Fc區是惰性。因此，在某些具體實施例中，一些或所有Fc媒介之效應子功能減弱或完全消失。

【0086】如本文所用，術語「寡聚合」意指將單體轉化為有限聚合度的過程。根據本發明的抗體可以在標靶結合後，例如在細胞表面，通過Fc區的非共價締合形成寡聚體，例如六聚體。抗CD27抗體在通過Fc：Fc相互作用在細胞表面結合後的寡聚合可能會增加CD27聚集，從而導致CD27細胞內傳訊的活化。包含E345R或E430G突變的抗體在細胞表面結合後形成寡聚體(諸如，六聚體)的能力可以如以下所述評估：de Jong RN等人，PLoS Biol. 2016 Jan 6；14(1):e1002344。Fc-Fc媒介之抗體寡聚合發生在(細胞)表面通過相鄰抗體之間Fc區的分子間締合標靶結合後，並

藉由引入E345R或E430G突變(根據Eu索引編號)而增加。

【0087】如本文所用，術語「聚集」指抗體通過非共價相互作用的寡聚合。

【0088】如本文所用，術語「Fc-Fc增強」意指增加二個包含Fc區的抗體的Fc區之間的結合強度，或穩定它們之間的相互作用，使得抗體形成細胞表面的寡聚體，諸如，六聚體。這種增強可以藉由抗體Fc區中的某些胺基酸突變獲得，諸如，E345R或E430G。在本發明的上下文中，術語「單價抗體」是指可以與僅具有一個抗原結合結構域(例如一個Fab臂)的抗原上的特定表位相互作用的抗體分子。在雙特異性抗體的上下文中，「單價抗體結合」是指雙特異性抗體與僅具有一個抗原結合結構域(例如一個Fab臂)的抗原上的一個特定表位的結合。

【0089】本發明上下文中的術語「單特異性抗體」是指僅對一個表位具有結合特異性的抗體。抗體可以是單特異性、單價抗體(即，僅攜帶一個抗原結合區)或單特異性、雙價抗體(即，具有二個相同抗原結合區的抗體)。

【0090】術語「雙特異性抗體」是指包含二個不相同的抗原結合結構域的抗體，例如二個不相同的Fab臂或二個具有不相同的CDR區的Fab臂。在本發明的上下文中，雙特異性抗體對至少二個不同的表位具有特異性。此表位可以在相同或不同的抗原或標靶上。如果表位位於不同的抗原上，則此抗原可以位於相同的細胞或不同的細胞、細胞類型或結構上，諸如，細胞外基質或囊泡和可溶性蛋白

質。雙特異性抗體可因此能夠交聯多種抗原，例如，二種不同的細胞。本發明的特定雙特異性抗體能夠結合到CD27和第二標靶。

【0091】術語「雙價抗體」是指具有二個抗原結合區之抗體，其結合一或二個標靶或抗原之表位或結合同一抗原上的一或二個表位。因此，雙價抗體可以是單特異性、雙價抗體或雙特異性、雙價抗體。

【0092】術語「胺基酸」和「胺基酸殘基」在本文中可以互換使用並且不應被理解為限制性。胺基酸是包含胺(-NH_2)和羧基(-COOH)官能團以及各胺基酸特有的側鏈(R基團)的有機化合物。在本發明的上下文中，胺基酸可以根據結構和化學特徵分類。因此，胺基酸的類別可反映在下表中的一或二個表中：

表5. 基於R基團結構和一般化學特徵的主要分類

分類	胺基酸
酸性殘基	D及E
鹼性殘基	K、R、及H
親水性不帶電殘基	S、T、N、及Q
脂肪族不帶電殘基	G、A、V、L、及I
非極性不帶電殘基	C、M、及P
芳香族殘基	F、Y、及W

表 6. 胺基酸殘基的其他物理和功能分類

分類	胺基酸
包含羥基之殘基	S 及 T
脂肪族殘基	I、L、V、及 M
環烯基相關之殘基	F、H、W、及 Y
疏水性殘基	A、C、F、G、H、I、L、M、R、T、V、W、及 Y
帶負電殘基	D 及 E
極性殘基	C、D、E、H、K、N、Q、R、S、及 T
帶正電殘基	H、K、及 R
小殘基	A、C、D、G、N、P、S、T、及 V
非常小殘基	A、G、及 S
涉及彎形成之殘基	A、C、D、E、G、H、K、N、Q、R、S、P、及 T
可撓性殘基	Q、T、K、S、G、P、D、E、及 R

【0093】一種胺基酸取代為另一種胺基酸可分為保守取代或非保守取代。在本發明的上下文中，「保守取代」是一個胺基酸經另一個具有相似結構及/或化學特徵的胺基酸取代，此一個胺基酸殘基被取代為如上面二個表中任一個所定義的相同分類的另一個胺基酸殘基：例如，白胺酸可以經異白胺酸取代，因為它們均為脂肪族支鏈疏水物。類似地，天門冬胺酸可以經麩胺酸取代，因為它們均為小、帶負電荷的殘基。

【0094】在本發明的上下文中，抗體中的取代係表示為：

原始胺基酸-位置-經取代之胺基酸；

參考公認的胺基酸命名法，使用三字母代碼或一個字母代碼，包括代碼「Xaa」或「X」以表示任何胺基酸殘基。因此，Xaa或X典型可以代表20種自然存在的胺基酸中的任一種。如本文所用，術語「自然存在」是指以下胺

基酸殘基中的任一個；甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、離胺酸、精胺酸、組胺酸、天門冬胺酸、天門冬醯胺酸、麩胺酸、麩醯胺、脯胺酸、色胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸、甲硫胺酸、及半胱胺酸。因此，符號「K409R」或「Lys409Arg」是指抗體在胺基酸位置409中包含用精胺酸取代離胺酸。

【0095】將給定位置的胺基酸取代為任何其他胺基酸稱為：

原始胺基酸-位置；或例如「K409」

【0096】對於其中原始胺基酸(群)及/或經取代之胺基酸(群)可包含多於一個，但不是所有胺基酸(群)的修飾，多於一個胺基酸可以用「、」或「/」分隔。例如，在位置409用精胺酸、丙胺酸或苯丙胺酸取代離胺酸是：

「Lys409Arg、Ala、Phe」或「Lys409Arg/Ala/Phe」或「K409R、A、F」或「K409R/A/F」或「K409成R、A、或F」。

【0097】這種名稱在本發明的上下文中可以互換使用，但具有相同的含義和目的。

【0098】再者，術語「取代」涵蓋取代到任一個或其他十九個天然胺基酸，或到其他胺基酸，諸如，非天然胺基酸。例如，位置409胺基酸K的取代包括以下各取代：409A、409C、409D、409E、409F、409G、409H、409I、409L、409M、409N、409Q、409R、409S、409T、409V、409W、409P、及409Y。順道一提，這等同於名稱409X，

其中X表示原始胺基酸以外的任何胺基酸。這些取代也可以命為K409A、K409C等、或K409A、C等或K409A/C/等。這同樣適用於本文提及的各個及每個位置，以在本文中具體包括任何一個此等取代。

【0099】根據本發明的抗體亦可以包含胺基酸殘基的缺失。這種缺失可以表示為「del」，並且包括例如寫作為K409del。因此，在此類具體實施例中，位置409的離胺酸已從胺基酸序列中刪除。

【0100】如本文所用，術語「宿主細胞」意指其中已引入表現載體的細胞。應當理解，此術語不僅意指特定的個體細胞，而且意指此細胞的後代。由於某些修飾可能由於突變或環境影響而在後代中發生，因此此類後代實際上可能與親本細胞不同，但仍包括在本文所用術語「宿主細胞」的範圍內。重組宿主細胞包括，例如，轉染瘤(transfectomas)，諸如，CHO細胞、HEK-293細胞、Expi293F細胞、PER.C6細胞、NS0細胞和淋巴球細胞，以及原核細胞，諸如，大腸桿菌和其他真核宿主，諸如，植物細胞和真菌。

【0101】如本文所用，術語「轉染瘤」包括表現抗體或標靶抗原的重組真核宿主細胞，諸如，CHO細胞、PER.C6細胞、NS0細胞、HEK-293細胞、Expi293F細胞、植物細胞或真菌，包括酵母細胞。

【0102】為了本發明的目的，使用Needleman-Wunsch演算法(Needleman及Wunsch、1970、J. Mol. Biol. 48: 443-

453)確定二個胺基酸序列之間的序列同一性，如在EMBOSS套裝軟體之Needle程式(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite、Rice等人，2000、Trends Genet. 16: 276-277)，較佳地，5.0.0版或之後版本中所實施。所使用的參數是10之間隙開放罰分、0.5之間隙延伸罰分和EBLOSUM62(BLOSUM62的EMBOSS版本)取代矩陣。標記為「最長同一性」的Needle輸出(使用-nobrief選項獲得)用作為百分比同一性，計算如下：(相同殘基 x 100)/(比對長度-比對中間隙總數)。

【0103】相似殘基的保留也可以或者藉由相似性分數測量，如藉由使用BLAST程式測定(例如，BLAST 2.2.8，可通過NCBI獲得，使用標準設定BLOSUM62、開放間隙=11和延伸間隙=1)。合適的變體典型呈現至少約45%，諸如，至少約55%、至少約65%、至少約75%、至少約85%、至少約90%、至少約95%或更多(例如，約99%)與親本序列的相似性。

【0104】如本文所用，術語「內化(internalized)」或「內化(internalization)」是指生物過程，其中諸如根據本發明的抗體的分子被細胞膜吞沒並吸入細胞內部。內化也可稱為「胞吞作用」。

【0105】如本文所用，術語「效應子細胞(effector cell)」是指參與免疫反應的效應子期的免疫細胞。例示性免疫細胞包括骨髓或淋巴來源的細胞，例如淋巴細胞(諸如，B細胞和T細胞，包括溶細胞性T細胞(CTL))、殺手細

胞、自然殺手細胞、巨噬細胞、單核球、嗜酸性球、多形核細胞，諸如，嗜中性球、顆粒球、肥大細胞和嗜鹼性球。一些效應子細胞表現Fc受體(FcgR)或補體受體並進行特定的免疫功能。在一些具體實施例中，效應子細胞諸如，例如自然殺手細胞能夠誘導ADCC。例如，表現FcgR的單核球、巨噬細胞、嗜中性球、樹突細胞和Kupffer細胞參與標靶細胞的特異性毒殺及/或將抗原呈現給免疫系統的其他組分，或與呈現抗原的細胞結合。在一些具體實施例中，可藉由抗體驅動的經典補體活化進一步增強ADCC，導致活化之C3片段沉積在標靶細胞上。C3切割產物是補體受體(CR)的配體，諸如，在骨髓細胞上表現的CR3。效應子細胞上的CR對補體片段的辨識可能促進增強的Fc受體媒介之ADCC。在一些具體實施例中，抗體驅動的經典補體活化導致標靶細胞上的C3片段。這些C3切割產物可促進直接補體依賴性細胞性細胞毒殺(CDCC)。在一些具體實施例中，效應子細胞可以吞噬標靶抗原、標靶粒子或標靶細胞，這可能取決於抗體結合及由效應子細胞所表現的FcγR媒介。效應子細胞上特定FcR或補體受體的表現可能受體液因子，諸如，細胞介素的調節。例如，已發現FcγRI的表現為由干擾素γ(IFNγ)及/或G-CSF上調節。這種增強的表現增加攜帶FcγRI的細胞針對標靶的細胞毒性活性。效應子細胞可以吞噬標靶抗原或吞噬或切割標靶細胞。在一些具體實施例中，抗體驅動的經典補體活化導致標靶細胞上的C3片段。這些C3切割產物可能促進效應

子細胞的直接吞噬作用或藉由增強抗體媒介之吞噬作用間接促進吞噬作用。在本文的某些抗體具有惰性Fc區的具體實施例中，抗體未誘導Fc媒介之效應子功能。

【0106】如本文所用，「效應子T細胞」或「Teffs」或「Teff」是指進行免疫反應功能的T淋巴細胞，諸如，毒殺腫瘤細胞及/或活化抗腫瘤免疫反應，可從而清除來自身體的腫瘤細胞。Teff表型的例子包括$CD3^+CD4^+$和$CD3^+CD8^+$。Teff可以分泌、包含或表現標記物，諸如，IFNγ、顆粒酶B和ICOS。可以理解，Teff可能不完全限於這些表型。

【0107】如本文所用，「記憶T細胞」是指在去除感染後長期保留在體內的T淋巴細胞。記憶T細胞的例子包括中央記憶T細胞(CD45RA-CCR7+)和效應子記憶T細胞(CD45RA-CCR7-)。應理解，記憶T細胞可能不完全限於這些表型。

【0108】如本文所用，「調節性T細胞」或「'Tregs」或「Treg」是指通常藉由抑制其他T細胞及/或其他免疫細胞的活性來調節其活性的T淋巴細胞。Treg表型的例子為$CD3^+CD4^+CD25^+CD127dim$。Treg可進一步表現Foxp3。應理解，Treg可能不完全限於此表型。

【0109】如本文所用，術語「補體活化」是指經典補體路徑的活化，其藉由與表面上的抗體-抗原複合物結合的稱為C1的大巨分子複合物啟動。C1是複合物，由下述所組成：6個辨識蛋白質C1q和絲胺酸蛋白酶異源四聚體

C1r2C1s2。C1是經典補體級聯早期事件中的第一個蛋白質複合物，其涉及一系列切割反應，這些反應從C4切割成C4a和C4b以及C2切割成C2a和C2b開始。C4b沉積並與C2a一起形成稱為C3轉化酶的酶活性轉化酶，其將補體組分C3切割成C3b和C3a，其形成C5轉化酶。此C5轉化酶將C5分裂成C5a和C5b，而最後組分沉積在膜上，且接著觸發補體活化之晚期事件，其中末端補體組分C5b、C6、C7、C8和C9組裝成膜攻擊複合物(MAC)。補體級聯導致在細胞膜上產生孔隙，從而導致細胞溶解，也稱為補體依賴性細胞毒殺(CDC)。在本文的某些抗體具有惰性Fc區的具體實施例中，抗體未誘導補體活化。

【0110】補體活化可以藉由使用C1q結合功效、CDC動力學CDC檢定(如WO2013/004842、WO2014/108198中所述)或藉由Beurskens等人，J Immunol April 1、2012 vol. 188 no. 7、3532-3541描述的C3b及C4b之細胞沉積方法來評估。

【0111】如本文所用，術語「C1q結合」意指在C1q結合與其抗原結合的抗體的上下文中C1q的結合。與其抗原結合的抗體應理解為在本文所述的上下文中發生在活體內和活體外。C1q結合可以例如藉由使用固定在人造表面上的抗體或藉由使用結合到細胞或病毒顆粒表面上的預定抗原的抗體來評估，如本文實施例8中所述。C1q與抗體寡聚體的結合在本文中應理解為導致高強結合性結合的多價相互作用。C1q結合的減少，例如由於在本發明的抗體中

引入突變，可以藉由比較突變抗體的C1q結合與其親本抗體(同一檢定中本發明的抗體沒有突變)的C1q結合來測量。

【0112】術語「治療」是指為了減輕、改善、阻止或根除(治癒)症狀或疾病狀態的目的而投予有效量的本發明之治療活性抗體。

【0113】術語「有效量」或「治療有效量」是指在必需的劑量和時間期間內有效達到所需治療結果的量。抗體的治療有效量可根據諸如個體的疾病狀態、年齡、性別和體重以及抗體在個體中引發所欲反應的能力之因素而變化。治療有效量也是其中抗體變體的任何毒性或有害效果被治療有益效果超過的量。

【0114】如本文實施例12中所述，如本文所用，術語「藥物動力學概況」可以確定為隨著時間推移的血漿IgG水平。

【0115】如本文所用，術語「CD40」是指CD40，也稱為腫瘤壞死因子受體超家族成員5(TNFRSF5)，其是配體TNFSF5/CD40L的受體。已知CD40轉導TRAF6-和MAP3K8-媒介之訊息，其活化巨噬細胞和B細胞中的ERK，導致B細胞誘導免疫球蛋白分泌。用於CD40的其他同義詞包括，但不限於，B細胞表面抗原CD40、Bp50、CD40L受體和CDw40。在一具體實施例中，CD40是人類CD40，具有UniProt登錄號P25942。人類CD40的序列也顯示在SEQ ID NO：68中。SEQ ID NO：68的胺基酸1至20對

應於人類CD40的訊息胜肽；而SEQ ID NO：68的胺基酸21至193對應於人類CD40的細胞外結構域；而蛋白質的其餘部分；即，來自SEQ ID NO：68的胺基酸194至215和216至277分別是跨膜和細胞質結構域。

【0116】如本文所用，術語「CD137」是指CD137(4-1BB)，也稱為腫瘤壞死因子受體超家族成員9(TNFRSF9)，其是配體TNFSF9/4-1BBL的受體。CD137(4-1BB)被認為參與T細胞活化。CD137的其他同義詞包括，但不限於，4-1BB受體配體、CDw137、T細胞抗原4-1BB同系物和T細胞抗原ILA。在一具體實施例中，CD137(4-1BB)是人類CD137(4-1BB)，具有UniProt登錄號Q07011。人類CD137的序列也顯示在SEQ ID NO：70中。SEQ ID NO：70的胺基酸1至23對應於人類CD137的訊息胜肽；而SEQ ID NO：70的胺基酸24至186對應於人類CD137的細胞外結構域；而蛋白質的其餘部分，即，來自SEQ ID NO：70的胺基酸187至213和214至255分別是跨膜和細胞質結構域。

【0117】Fc區可能在其C端具有離胺酸。此離胺酸的來源是在人類中發現的自然存在的序列，其中這些Fc區源自該序列。在重組抗體的細胞培養生產過程中，此端離胺酸可以藉由內源性羧基胜肽酶的蛋白水解切割，導致具有相同序列但缺少C端離胺酸的恆定區。為了抗體的製造目的，可以從序列中省略編碼此端離胺酸的DNA，使得產生不含離胺酸的抗體。由編碼或不編碼端離胺酸的核酸序列

產生的抗體在序列和功能上實質上相同，因為當例如使用基於CHO的生產系統中所產生的抗體時，端離胺酸的加工程度典型很高(Dick、L.W.等人，Biotechnol. Bioeng. 2008；100: 1132-1143)。因此，應當理解，根據本發明的蛋白質，諸如，抗體，可以在編碼或不編碼或具有或不具有端離胺酸下產生。亦可以理解根據本發明，具有端離胺酸的序列，諸如，具有端離胺酸的恆定區序列，可以理解為相應的沒有端離胺酸的序列，並且沒有端離胺酸的序列也可以理解為具有端離胺酸的相應序列。

本揭露之態樣和具體實施例

【0118】在第一態樣中，本發明提供用於降低個體腫瘤進程或預防個體腫瘤進程或治療個體癌症之方法，該方法包含投予到該個體i) 第一結合劑包含結合到CD27之至少一結合區；以及ii) 第二結合劑包含結合到CD40之第一結合區及結合到CD137之第二結合區。

結合CD27之第一結合劑

【0119】在一具體實施例中，第一結合劑包含能夠結合到人類CD27的至少一抗原結合區，其中，該第一結合劑包含分別包含SEQ ID NO：5、6、及7所列之序列的重鏈可變(VH)區CDR1、CDR2、及CDR3，以及分別包含SEQ ID NO：9、10及11所列之序列的輕鏈可變(VL)區CDR1、CDR2、及CDR3。

【0120】在又一具體實施例中，第一結合劑包含下述該抗原結合區之二者：包含分別包含SEQ ID NO：5、6、及7所列之序列的VH區CDR1、CDR2、及CDR3，及分別包含SEQ ID NO：9、10及11所列之序列的VL區CDR1、CDR2、及CDR3。藉此提供抗CD27抗體，其能夠結合人類CD27並進一步結合包含A59T之突變的人類CD27之變體。

【0121】在本發明之具體實施例中，第一結合劑結合例如，在T細胞之CD27且在結合其標靶時為促效性。藉此提供第一結合劑，其刺激T細胞之活化與增殖。第一結合劑進一步刺激T細胞的記憶形成與存活。此第一結合劑有用於例如，癌症治療。第一結合劑進一步能夠結合到石蟹獼猴CD27，其有用於第一結合劑之毒理研究。

【0122】在一具體實施例中，本發明之第一結合劑為經單離之抗體。

【0123】在一具體實施例中，第一結合劑為抗體。在另一具體實施例中，第一結合劑為人類抗體。在另一具體實施例中，第一結合劑為人源化抗體。在另一具體實施例中，第一結合劑為嵌合抗體。

【0124】本發明之第一結合劑於較佳具體實施例為全長抗體。因此，本發明之第一結合劑可進一步包含輕鏈恆定區(CL)及重鏈恆定區(CH)。CH較佳地包含CH1區、樞紐區、CH2區以及CH3區。

【0125】本領域眾所周知，可以對抗體的VH和VL進行突變，例如，增加抗體對其標靶抗原的親和性，降低其

潛在的免疫原性及/或增加由宿主細胞表現的抗體的產量。因此，在一些具體實施例中，亦考慮包含根據本發明的第一結合劑的CDR、VH及/或VL序列的變體的第一結合劑，特別是分別如SEQ ID NO：4及SEQ ID NO：8所列的VH及/或VL區的功能變體。與親本VH及/或VL序列相比，功能變體可能差在一或多個胺基酸，例如差在一或多個CDR，但仍然允許抗原結合區保留至少相當比例(至少約50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多)或甚至保留親本抗體的所有親和性及/或特異性。典型，此類功能變體與親本序列保持顯著的序列同一性。例示性變體包括那些與個別親本VH或VL區相差12個或更少，諸如，11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1個突變，諸如，胺基酸殘基的取代，插入或缺失。例示性變體包括主要藉由保守胺基酸取代而不同於親本序列的VH及/或VL及/或CDR區的那些；例如，變體中的12個，諸如，11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1個的胺基酸取代可以是保守。在本發明的另外具體實施例中，第一結合劑可以分別在VH CDR區及/或VL CDR區中包含至多1、2或3個突變。這樣的突變可以是取代。較佳地，此類取代不顯著改變本發明第一結合劑的結合親和性及/或結合特異性。因此，本發明涵蓋本發明第一結合劑的變體，其中變體具有與第一結合劑相同的功能特徵，第一結合劑包含如SEQ ID NO：5、6和7所列之VH區CDR序列，如SEQ ID NO：9、10和11所列之VL區CDR序列。

【0126】在本發明之另一具體實施例中，第一結合劑包含VH區，其包含與如SEQ ID NO：4所列之VH區至少80%同一性的序列。在本發明之另一具體實施例中，第一結合劑包含VH區，其包含與如SEQ ID NO：4所列之VH區至少85%同一性的序列。在本發明之另一具體實施例中，第一結合劑包含VH區，其包含與如SEQ ID NO：4所列之VH區至少90%同一性的序列。在本發明之另一具體實施例中，第一結合劑包含VH區，其包含與如SEQ ID NO：4所列之VH區至少95%同一性的序列。在本發明之另一具體實施例中，第一結合劑包含VH區，其包含與如SEQ ID NO：4所列之VH區至少96%同一性的序列。在本發明之另一具體實施例中，第一結合劑包含VH區，其包含與如SEQ ID NO：4所列之VH區至少97%同一性的序列。在本發明之另一具體實施例中，第一結合劑包含VH區，其包含與如SEQ ID NO：4所列之VH區至少98%同一性的序列。在本發明之另一具體實施例中，第一結合劑包含VH區，其包含與如SEQ ID NO：4所列之VH區至少99%同一性的序列。在本發明之另一具體實施例中，第一結合劑包含：包含SEQ ID NO：4所列之序列的VH區。

【0127】在本發明之另一具體實施例中，第一結合劑包含VH區，其包含與如SEQ ID NO：8所列之VH區至少80%同一性的序列。在本發明之另一具體實施例中，第一結合劑包含VH區，其包含與如SEQ ID NO：8所列之VH區至少85%同一性的序列。在本發明之另一具體實施例中，

第一結合劑包含VH區，其包含與如SEQ ID NO：8所列之VH區至少90%同一性的序列。在本發明之另一具體實施例中，第一結合劑包含VH區，其包含與如SEQ ID NO：8所列之VH區至少95%同一性的序列。在本發明之另一具體實施例中，第一結合劑包含VH區，其包含與如SEQ ID NO：8所列之VH區至少96%同一性的序列。在本發明之另一具體實施例中，第一結合劑包含VH區，其包含與如SEQ ID NO：8所列之VH區至少97%同一性的序列。在本發明之另一具體實施例中，第一結合劑包含VH區，其包含與如SEQ ID NO：8所列之VH區至少98%同一性的序列。在本發明之另一具體實施例中，第一結合劑包含VH區，其包含與如SEQ ID NO：8所列之VH區至少99%同一性的序列。在本發明之另一具體實施例中，第一結合劑包含VH區，其包含SEQ ID NO：8所列之序列。

【0128】在本發明之另一具體實施例中，第一結合劑包含分別包含SEQ ID NO：4及SEQ ID NO：8所列之序列的VH及VL區。

【0129】第一結合劑可包含為人類κ輕鏈的輕鏈恆定區。在另一具體實施例中，其可包含人類λ輕鏈恆定區。

【0130】第一結合劑因此可較佳地，進一步包含重鏈恆定區，其為人類IgG同型。其可視需要地包含經修飾之人類IgG恆定區。此人類IgG包含Fc區，其包含CH2及CH3區。藉由修飾Fc區中之IgG恆定區，其例如可能調節抗體之Fc效應子功能或增加Fc-Fc相互作用，藉此抗體傾向形

成團簇，諸如，六聚體。在本發明之一具體實施例中，人類IgG或經修飾之人類IgG係選自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在一具體實施例中，其為IgG1。在另一具體實施例中，其為IgG2。在又另一具體實施例中，其為IgG3。在又一具體實施例中，其為IgG4。在一特定具體實施例中，IgG為在Fc區包含一或多種胺基酸取代的經修飾之人類IgG。在一具體實施例中，其可為在Fc區包含一或多種胺基酸取代的人類IgG1。在本發明之另外具體實施例中，IgG1在Fc區包含二或更多種胺基酸取代。在一具體實施例中，IgG1 Fc區具有二個胺基酸取代。

【0131】在本發明又一具體實施例中，經修飾之人類IgG重鏈恆定區包含在Fc區至多10個胺基酸取代。在另一具體實施例中，其包含至多9個胺基酸取代。在另一具體實施例中，其包含至多8個胺基酸取代。在另一具體實施例中，其包含至多7個胺基酸取代。在另一具體實施例中，其包含至多6個胺基酸取代。在另一具體實施例中，其包含至多5個胺基酸取代。在另一具體實施例中，其包含至多4個胺基酸取代。在另一具體實施例中，其包含至多3個胺基酸取代。在另一具體實施例中，其在Fc區包含至多2個胺基酸取代。

【0132】在對應於人類IgG1重鏈E430、E345及S440的位置之胺基酸殘基突變，其中，胺基酸殘基係根據EU索引編號，可以改善抗體誘導CDC的能力。不受理論的束縛，據信藉由在這些位置取代一或多個胺基酸(群)，可以

刺激抗體的寡聚合，從而調控Fc-媒介之效應子功能，以便例如增加C1q結合、補體活化、CDC、ADCP、內化或其他可能提供活體內功效的相關功能。

【0133】在又一本發明之具體實施例中，第一結合劑為包含抗原結合區以及變體Fc區的變體抗體。

【0134】在某些具體實施例中，結合到人類CD27之抗體變體包含：

(a) 包含VH區的重鏈，其包含：包含SEQ ID NO：5所列之序列的VH CDR1、包含SEQ ID NO：6所列之序列的VH CDR2、包含SEQ ID NO：7所列之序列的VH CDR3及包含在E430、E345及S440之一或多個中的突變之人類IgG1 CH區，胺基酸殘基根據EU索引編號；

(b) 包含VL區的輕鏈，其包含：包含SEQ ID NO：9所列之序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO：10所列之序列的VL CDR2、及包含SEQ ID NO：11所列之序列的VL CDR3。

【0135】在其他某些具體實施例中，結合到人類CD27之抗體變體包含：

(a) 包含VH區的重鏈，其包含SEQ ID NO：4及包含在E430、E345及S440之一或多個中的突變之人類IgG1 CH區，胺基酸殘基根據EU索引編號，以及

(b) 包含VL區的輕鏈，其包含SEQ ID NO：8。

【0136】根據本發明所使用之變體抗體包含變體Fc區或變體人類IgG1 CH區(包含在P329、E430及E345之一或多

個中的突變)。以下，參考在Fc區之突變可同樣應用於人類IgG1 CH區的突變(群)，且反之亦然。

【0137】如本文所述，當根據Eu索引編號時，可關係於(即，「對應於」)其自然存在(野生型)人類IgG1重鏈中的位置來給予在Fc區欲突變的胺基酸位置。因此，如果親本Fc區已經包含一或多個突變及/或如果親本Fc區是例如IgG2、IgG3或IgG4 Fc區時，則對應於根據Eu索引編號在人類IgG1重鏈中之胺基酸殘基(諸如，例如，E430)的胺基酸位置可以藉由比對確定。具體地，將親本Fc區與野生型人類IgG1重鏈序列進行比對，以辨識對應於人類IgG1重鏈序列中E430位置的殘基。任何野生型人類IgG1恆定區胺基酸序列都可用於此目的，包括表3中列出的任何一種不同的人類IgG1異型。

【0138】在本發明之一具體實施例中，相較於相同抗體，但包含相同同型之野生型IgG Fc區(諸如，IgG1)，IgG Fc區之修飾誘導增加之CD27促效作用。例如，這可以藉由以下獲得：在對應於根據Eu編號在人類IgG1重鏈位置E345及/或E430的胺基酸位置引入非E之胺基酸。在本發明之一具體實施例中，對應於根據Eu編號在人類IgG1重鏈位置E345的位置之胺基酸殘基係選自包含下述之群組：A、C、D、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、P、R、S、T、V、W及Y。在本發明之另一具體實施例中，在根據Eu編號對應於人類IgG1重鏈位置E430的位置之胺基酸殘基係選自包含下述之群組：A、C、D、F、G、H、I、K、L、

M、N、Q、P、R、S、T、V、W。

【0139】在較佳具體實施例中，在對應於根據Eu編號在人類IgG1重鏈位置E345的位置之胺基酸殘基為R。因此，本發明之第一結合劑可包含在Fc區之E345R取代。在本發明之另一具體實施例中，在根據Eu編號對應於人類IgG1重鏈位置E430的位置之胺基酸殘基為G。因此，本發明之第一結合劑可包含在Fc區之E430G取代。在另一具體實施例中，第一結合劑包含選自包含下列之群組的胺基酸取代：E430G、E345K、E430S、E430F、E430T、E345Q、E345R、E345Y。

【0140】藉此，提供了具有增強的Fc-Fc相互作用的抗體，這可能導致在抗體結合後在細胞表面上CD27之抗體依賴性聚集，從而增加本發明抗體的促效作用。

【0141】在本發明第一結合劑之另一具體實施例中，在根據Eu編號對應於人類IgG1重鏈位置P329的位置之胺基酸殘基經選自包含下述之群組的胺基酸取代：A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W及Y。因此，本發明之第一結合劑可進一步包含位置329的突變。

【0142】在本發明之另外具體實施例中，第一結合劑在根據Eu編號對應於人類IgG1重鏈位置P329的位置具有胺基酸殘基R。因此，本發明之第一結合劑在Fc區可具有P329R取代。不受理論的束縛，據信在Fc區中包含E345R突變的本發明之第一結合劑(如例如SEQ ID NO：13所列)

具有增加的血清清除率。發明人發現在位置329進一步引入突變，諸如，P329R(如例如，SEQ ID NO：15所列)將本發明之第一結合劑的清除率恢復到包含wt IgG1(如例如，SEQ ID NO：12所列)的第一結合劑的水平。

【0143】在另一較佳的具體實施例中，在對應於根據Eu編號的人類IgG1重鏈之位置P329及E345的位置之胺基酸殘基均為R。藉此提供第一結合劑，當相較於包含相同VH及VL區以及包含相同IgG1重鏈恆定區(除了在位置329包含野生型胺基酸P及在位置345包含野生型胺基酸E以外)的第一結合劑時，其具有增強的CD27受體促效作用和相當的藥物動力學特性，諸如，例如，血清清除率。

【0144】因此，在具體實施例中，本發明提供第一結合劑，其在結合CD27後具有增強的受體促效作用且進一步具有相當的藥物動力學特性，諸如，當相較於包含相同VH及VL區，但包含野生型IgG1重鏈恆定區(諸如，例如，如SEQ ID NO：12所列)之第一結合劑的藥物動力學特性時，類似或甚至相同的藥物動力學特性。換言之，本發明提供第一結合劑，其具有比相同第一結合劑(除了包含野生型IgG1重鏈恆定區以外)之藥物動力學特性未顯著不同的藥物動力學特性。

【0145】在本發明的其他具體實施例中，第一結合劑包含根據前述部分中任一個的變體Fc區，變體Fc區是選自下列所組成群組的人類IgG Fc區之變體：人類IgG1、IgG2、IgG3及IgG4 Fc區。也就是說，對應於E430和E345

和P329的一或多個胺基酸殘基的突變是在親本Fc區中進行，親本Fc區是選選自下列所組成群組的人類IgG Fc區：IgG1、IgG2、IgG3和IgG4 Fc區。較佳地，親本Fc區是自然存在(野生型)人類IgG Fc區，諸如，人類野生型IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc區、或其混合同型。因此，除了所主張之突變(在選自E430和E345和P329的一或多個胺基酸殘基中)之外，變體Fc區可以是人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同型、或其混合同型。

【0146】在一具體實施例中，親本Fc區及/或人類IgG1 CH區為野生型人類IgG1同型。

【0147】因此，除了所主張之突變(在E430或E345或P329)以外、變體Fc區可為人類IgG1 Fc區。

【0148】在特定具體實施例中，親本Fc區及/或人類IgG1 CH區為人類野生型IgG1m(f)同型。

【0149】在特定具體實施例中，親本Fc區及/或人類IgG1 CH區為人類野生型IgG1m(z)同型。

【0150】在特定具體實施例中，親本Fc區及/或人類IgG1 CH區為人類野生型IgG1m(a)同型。

【0151】在特定具體實施例中，親本Fc區及/或人類IgG1 CH區為人類野生型IgG1m(x)同型。

【0152】在特定具體實施例中，親本Fc區及/或人類IgG1 CH區為混合同種異型之人類野生型IgG1，諸如，IgG1m(za)、IgG1m(zax)、IgG1m(fa)等。

【0153】因此，除了所主張之突變(在E430或E345或

P329)以外、變體Fc區及/或人類IgG1 CH區可為人類IgG1m(f)、IgG1m(a)、IgG1m(x)、IgG1m(z)同種異型或其任二或更多種之混合同種異型。

【0154】在特定具體實施例中，親本Fc區及/或人類IgG1 CH區為人類野生型IgG1m(za)同型。

【0155】在特定具體實施例中，親本Fc區為人類野生型IgG2同型。

【0156】在特定具體實施例中，親本Fc區為人類野生型IgG3同型。

【0157】在特定具體實施例中，親本Fc區為人類野生型IgG4同型。

【0158】野生型人類IgG同型及IgG1異型的特定實施例之CH區胺基酸序列席如表3所列。

【0159】在另一具體實施例中，本發明提供第一結合劑，其包含重鏈恆定區，其包含選自包含下述之群組的胺基酸序列：SEQ ID Nos 12、13、14、15、18、19、20、21、22、23、27、28、29、30、31、32、33、34及36。在一具體實施例中，重鏈恆定區具有SEQ ID NO：12之胺基酸序列。在一具體實施例中，重鏈恆定區具有SEQ ID NO：13之胺基酸序列。在一具體實施例中，重鏈恆定區具有SEQ ID NO：14之胺基酸序列。在一具體實施例中，重鏈恆定區具有SEQ ID NO：15之胺基酸序列。在一具體實施例中，重鏈恆定區具有SEQ ID NO：18之胺基酸序列。在一具體實施例中，重鏈恆定區具有SEQ ID NO：19

之胺基酸序列。在一具體實施例中，重鏈恆定區具有SEQ ID NO：20之胺基酸序列。在一具體實施例中，重鏈恆定區具有SEQ ID NO：21之胺基酸序列。在一具體實施例中，重鏈恆定區具有SEQ ID NO：22之胺基酸序列。在一具體實施例中，重鏈恆定區具有 SEQ ID NO：23之胺基酸序列。在一具體實施例中，重鏈恆定區具有SEQ ID NO：27之胺基酸序列。在一具體實施例中，重鏈恆定區具有SEQ ID NO：28之胺基酸序列。在一具體實施例中，重鏈恆定區具有SEQ ID NO：29之胺基酸序列。在一具體實施例中，重鏈恆定區具有SEQ ID NO：30之胺基酸序列。在一具體實施例中，重鏈恆定區具有SEQ ID NO：31之胺基酸序列。在一具體實施例中，重鏈恆定區具有SEQ ID NO：32之胺基酸序列。在一具體實施例中，重鏈恆定區具有SEQ ID NO：33之胺基酸序列。在一具體實施例中，重鏈恆定區具有SEQ ID NO：34之胺基酸序列。在一具體實施例中，重鏈恆定區具有SEQ ID NO：36之胺基酸序列。

【0160】在具體實施例中，第一結合劑包含：

a. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區

b. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區

c. 包含SEQ ID NO：15所列之胺基酸序列的CH區以及

d. 包含SEQ ID NO：16所列之胺基酸序列的CL區。

【0161】在另一具體實施例中，第一結合劑包含：

a. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區

b. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區

c. 包含SEQ ID NO：12所列之胺基酸序列的CH區以及

d. 包含SEQ ID NO：16所列之胺基酸序列的CL區。

【0162】在另一具體實施例中，第一結合劑包含：

a. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區

b. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區

c. 包含SEQ ID NO：13所列之胺基酸序列的CH區以及

d. 包含SEQ ID NO：16所列之胺基酸序列的CL區。

【0163】在另一具體實施例中，第一結合劑包含：

a. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區

b. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區

c. 包含SEQ ID NO：14所列之胺基酸序列的CH區以及

d. 包含SEQ ID NO：16所列之胺基酸序列的CL區。

【0164】在另一具體實施例中，第一結合劑包含：

a. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區

b. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區

c. 包含SEQ ID NO：18所列之胺基酸序列的CH區以及

d. 包含SEQ ID NO：16所列之胺基酸序列的CL區。

【0165】在另一具體實施例中，第一結合劑包含：

a. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區

b. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區

c. 包含SEQ ID NO：19所列之胺基酸序列的CH區以及

d. 包含SEQ ID NO：16所列之胺基酸序列的CL區。

【0166】在另一具體實施例中，第一結合劑包含：

a. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區

b. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區

c. 包含SEQ ID NO：20所列之胺基酸序列的CH區以及

d. 包含SEQ ID NO：16所列之胺基酸序列的CL區。

【0167】在另一具體實施例中，第一結合劑包含：

a. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區

b. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區

c. 包含SEQ ID NO：21所列之胺基酸序列的CH區以及

d. 包含SEQ ID NO：16所列之胺基酸序列的CL區。

【0168】在另一具體實施例中，第一結合劑包含：

a. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區

b. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區

c. 包含SEQ ID NO：22所列之胺基酸序列的CH區以及

d. 包含SEQ ID NO：16所列之胺基酸序列的CL區。

【0169】在另一具體實施例中，第一結合劑包含：

a. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區

b. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區

c. 包含SEQ ID NO：23所列之胺基酸序列的CH區以及

d. 包含SEQ ID NO：16所列之胺基酸序列的CL區。

【0170】在另一具體實施例中，第一結合劑包含：

a. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區

b. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區

c. 包含SEQ ID NO：27所列之胺基酸序列的CH區以及

d. 包含SEQ ID NO：16所列之胺基酸序列的CL區。

【0171】在另一具體實施例中，第一結合劑包含：

a. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區

b. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區

c. 包含SEQ ID NO：28所列之胺基酸序列的CH區以及

d. 包含SEQ ID NO：16所列之胺基酸序列的CL區。

【0172】在另一具體實施例中，第一結合劑包含：

a. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區

b. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區

c. 包含SEQ ID NO：29所列之胺基酸序列的CH區以及

d. 包含SEQ ID NO：16所列之胺基酸序列的CL區。

【0173】在另一具體實施例中，第一結合劑包含：

a. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區

b. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區

c. 包含SEQ ID NO：30所列之胺基酸序列的CH區以及

d. 包含SEQ ID NO：16所列之胺基酸序列的CL區。

【0174】在另一具體實施例中，第一結合劑包含：

a. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區

b. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區

c. 包含SEQ ID NO：31所列之胺基酸序列的CH區以及

d. 包含SEQ ID NO：16所列之胺基酸序列的CL區。

【0175】在另一具體實施例中，第一結合劑包含：

a. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區

b. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區

c. 包含SEQ ID NO：32所列之胺基酸序列的CH區以及

d. 包含SEQ ID NO：16所列之胺基酸序列的CL區。

【0176】在另一具體實施例中，第一結合劑包含：

a. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區

b. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區

c. 包含SEQ ID NO：33所列之胺基酸序列的CH區以及

d. 包含SEQ ID NO：16所列之胺基酸序列的CL區。

【0177】在另一具體實施例中，第一結合劑包含：

a. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區

b. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區

c. 包含SEQ ID NO：34所列之胺基酸序列的CH區以及

d. 包含SEQ ID NO：16所列之胺基酸序列的CL區。

【0178】在另一具體實施例中，第一結合劑包含：

a. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區

b. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區

c. 包含SEQ ID NO：36所列之胺基酸序列的CH區以及

d. 包含SEQ ID NO：16所列之胺基酸序列的CL區。

【0179】在上述第一結合劑之替代具體實施例中，CL區可為SEQ ID NO：17所列之胺基酸序列。

【0180】在具體實施例中，第一結合劑包含：

e. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區

f. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區

g. 包含SEQ ID NO：15所列之胺基酸序列的CH區以及

h. 包含SEQ ID NO：17所列之胺基酸序列的CL區。

【0181】在另一具體實施例中，第一結合劑包含：

e. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區

f. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區

g. 包含SEQ ID NO：12所列之胺基酸序列的CH區以及

h. 包含SEQ ID NO：17所列之胺基酸序列的CL區。

【0182】在另一具體實施例中，第一結合劑包含：

e. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區

f. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區

g. 包含SEQ ID NO：13所列之胺基酸序列的CH區以及

h. 包含SEQ ID NO：17所列之胺基酸序列的CL區。

【0183】在另一具體實施例中，第一結合劑包含：

e. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區

f. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區

g. 包含SEQ ID NO：14所列之胺基酸序列的CH區以及

h. 包含SEQ ID NO：17所列之胺基酸序列的CL區。

【0184】在另一具體實施例中，第一結合劑包含：

e. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區

f. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區

g. 包含SEQ ID NO：18所列之胺基酸序列的CH區以及

h. 包含SEQ ID NO：17所列之胺基酸序列的CL區。

【0185】在另一具體實施例中，第一結合劑包含：

e. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區

f. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區

g. 包含SEQ ID NO：19所列之胺基酸序列的CH區以及

h. 包含SEQ ID NO：17所列之胺基酸序列的CL區。

【0186】在另一具體實施例中，第一結合劑包含：

e. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區

f. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區

g. 包含SEQ ID NO：20所列之胺基酸序列的CH區以及

h. 包含SEQ ID NO：17所列之胺基酸序列的CL區。

【0187】在另一具體實施例中，第一結合劑包含：

e. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區

f. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區

g. 包含SEQ ID NO：21所列之胺基酸序列的CH區以及

h. 包含SEQ ID NO：17所列之胺基酸序列的CL區。

【0188】在另一具體實施例中，第一結合劑包含：

e. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區

f. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區

g. 包含SEQ ID NO：22所列之胺基酸序列的CH區以及

h. 包含SEQ ID NO：17所列之胺基酸序列的CL區。

【0189】在另一具體實施例中，第一結合劑包含：

e. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區

f. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區

g. 包含SEQ ID NO：23所列之胺基酸序列的CH區以及

h. 包含SEQ ID NO：17所列之胺基酸序列的CL區。

【0190】在另一具體實施例中，第一結合劑包含：

e. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區

f. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區

g. 包含SEQ ID NO：27所列之胺基酸序列的CH區以及

h. 包含SEQ ID NO：17所列之胺基酸序列的CL區。

【0191】在另一具體實施例中，第一結合劑包含：

e. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區

f. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區

g. 包含SEQ ID NO：28所列之胺基酸序列的CH區以及

h. 包含SEQ ID NO：17所列之胺基酸序列的CL區。

【0192】在另一具體實施例中，第一結合劑包含：

e. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區

f. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區

g. 包含SEQ ID NO：29所列之胺基酸序列的CH區以及

h. 包含SEQ ID NO：17所列之胺基酸序列的CL區。

【0193】在另一具體實施例中，第一結合劑包含：

e. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區

f. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區

g. 包含SEQ ID NO：30所列之胺基酸序列的CH區以及

h. 包含SEQ ID NO：17所列之胺基酸序列的CL區。

【0194】在另一具體實施例中，第一結合劑包含：

e. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區

f. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區

g. 包含SEQ ID NO：31所列之胺基酸序列的CH區以及

h. 包含SEQ ID NO：17所列之胺基酸序列的CL區。

【0195】在另一具體實施例中，第一結合劑包含：

e. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區

f. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區

g. 包含SEQ ID NO：32所列之胺基酸序列的CH區以及

h. 包含SEQ ID NO：17所列之胺基酸序列的CL區。

【0196】在另一具體實施例中，第一結合劑包含：

e. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區

f. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區

g. 包含SEQ ID NO：33所列之胺基酸序列的CH區以及

h. 包含SEQ ID NO：17所列之胺基酸序列的CL區。

【0197】在另一具體實施例中，第一結合劑包含：

e. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區

f. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區

g. 包含SEQ ID NO：34所列之胺基酸序列的CH區以及

h. 包含SEQ ID NO：17所列之胺基酸序列的CL區。

【0198】在另一具體實施例中，第一結合劑包含：

e. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區

f. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區

g. 包含SEQ ID NO：36所列之胺基酸序列的CH區以及

h. 包含SEQ ID NO：17所列之胺基酸序列的CL區。

【0199】在另一具體實施例中，第一結合劑包含：包含SEQ ID NO：24所列之胺基酸序列的重鏈以及包含SEQ ID NO：25所列之胺基酸序列的輕鏈。

【0200】在另一具體實施例中，第一結合劑包含：包含SEQ ID NO：35所列之胺基酸序列的重鏈及包含SEQ ID NO：25所列之胺基酸序列的輕鏈。

【0201】在又另一具體實施例中，第一結合劑包含重鏈恆定區，其相對於除了修飾之外的相同第一結合劑，為經修飾以致於第一結合劑誘導Fc-媒介之效應子功能至較少程度。關於此的例子為包含P329R及E345R取代的本發明之CD27結合抗體。此抗體相較於包含相同序列但不包含P329R取代的抗體，及亦相較於包含相同序列但不包含P329R與E345R取代的相同抗體(諸如，野生型IgG1重鏈)，誘導一或多種Fc-媒介之效應子功能(群)至較少程度。在一具體實施例中，Fc-媒介之效應子功能減少至少20%。在另一具體實施例中，Fc-媒介之效應子功能減少至少30%。在另一具體實施例中，Fc-媒介之效應子功能減少至少40%。在另一具體實施例中，Fc-媒介之效應子功能減少至少

50%。在另一具體實施例中，Fc-媒介之效應子功能減少至少60%。在另一具體實施例中，Fc-媒介之效應子功能減少至少70%。在另一具體實施例中，Fc-媒介之效應子功能減少至少80%。在另一具體實施例中，Fc-媒介之效應子功能減少至少90%。在另一具體實施例中，第一結合劑未誘導一或多種Fc-媒介之效應子功能。降低或完全沒有誘導之一或多種Fc-效應子功能可選自下列群組：補體依賴性細胞毒殺(CDC)、補體依賴性細胞-媒介之細胞毒殺(CDCC)、補體活化、抗體-依賴性細胞-媒介之細胞毒殺(ADCC)、抗體-依賴性細胞-媒介之吞噬作用(ADCP)、C1q結合及FcγR結合。因此，在一具體實施例中，相對於相同第一結合劑但為野生型IgG1 HC恆定區，第一結合劑誘導CDC減少至少20%，諸如，至少30%、或至少40%、或至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%、或減少至少90%的程度。在另一具體實施例中，第一結合劑未誘導CDC。

【0202】在另一具體實施例中，相對於相同第一結合劑但具有野生型IgG1 HC恆定區，第一結合劑CDCC減少至少20%，諸如，至少30%、或至少40%、或至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%、或減少至少90%的程度。在另一具體實施例中，本發明之第一結合劑未誘導CDCC。

【0203】在另一具體實施例中，相對於相同第一結合劑但具有野生型IgG1 HC恆定區，第一結合劑ADCC減少至

少20%，諸如，至少30%、或至少40%、或至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%、或減少至少90%的程度。在另一具體實施例中，第一結合劑未誘導ADCC。

【0204】在另一具體實施例中，相對於相同第一結合劑但具有野生型IgG1 HC恆定區，第一結合劑誘導ADCP減少至少20%，諸如，至少30%、或至少40%、或至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%、或減少至少90%的程度。在另一具體實施例中，第一結合劑未誘導ADCP。

【0205】在另一具體實施例中，相對於相同第一結合劑但具有野生型IgG1 HC恆定區，第一結合劑誘導C1q結合減少至少20%，諸如，至少30%、或至少40%、或至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%、或減少至少90%的程度。在另一具體實施例中，第一結合劑未誘導C1q結合。較佳地，C1q結合係如實施例8中所測定。

【0206】在另一具體實施例中，相對於相同第一結合劑但具有野生型IgG1 HC恆定區，第一結合劑誘導FcγR結合減少至少20%，諸如，至少30%、或至少40%、或至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%、或減少至少90%的程度。在另一具體實施例中，本發明之第一結合劑未誘導FcγR結合。較佳地，FcγR結合係如實施例9中所測定。

【0207】在一具體實施例中，相較於包含相同胺基酸序列但不包含P329R取代的第一結合劑，第一結合劑已降低C1q結合且降低FcγR結合。

【0208】在一具體實施例中，第一結合劑除了所主張之突變，為人類抗體。

【0209】在本發明之具體實施例中，第一結合劑為單價抗體。

【0210】在另一具體實施例中，第一結合劑為雙價抗體。

【0211】再者，第一結合劑可為單特異性抗體。

【0212】在一具體實施例中，第一結合劑為單株抗體，諸如，人類單株抗體，諸如，人類雙價單株抗體，諸如，人類雙價全長單株抗體。

【0213】在較佳具體實施例中，第一結合劑除了在Fc區中視需要主張之突變，為IgG1抗體，諸如，全長IgG1抗體，諸如，人類全長IgG1抗體，視需要地人類單株全長雙價IgG1、κ抗體，例如，人類單株全長雙價IgG1m(f)、κ抗體。

【0214】根據本發明的第一結合劑有利地呈雙價單特異性形式，包含結合相同表位的二個抗原結合區。然而，也考慮其中一個抗原結合區結合不同表位的雙特異性形式。因此，除非與上下文矛盾，否則根據本文任何態樣或具體實施例的第一結合劑可以是單特異性抗體或雙特異性抗體。

【0215】因此，在另一具體實施例中，第一結合劑為雙特異性抗體，包含能夠如本文所述結合人類CD27之第一抗原結合區及包含能夠結合到人類CD27上不同表位之

第二抗原結合區。在另一具體實施例中，第一結合劑為雙特異性抗體，包含能夠如本文所述結合人類CD27之第一抗原結合區及包含能夠結合不同標靶之第二抗原結合區。此標靶可在與CD27不同細胞或在相同細胞上。

【0216】在本發明之具體實施例中，第一結合劑為能夠結合到具有SEQ ID NO：1所列之序列的人類CD27。然而、人類CD27可以在一些個體中表現為其變體。因此，在另一具體實施例中，本發明之第一結合劑進一步能夠結合到人類CD27變體，諸如，例如，SEQ ID NO：2所列之人類CD27變體。在另一具體實施例中，本發明之第一結合劑如果進一步能夠結合到石蟹獼猴CD27，諸如，SEQ ID NO：3所列。

【0217】在本發明之另外具體實施例中，第一結合劑為能夠結合表現CD27之人類T細胞。

【0218】在本發明之另一具體實施例中，第一結合劑為能夠結合表現CD27之石蟹獼猴T細胞。

【0219】在本發明之一具體實施例中，全長IgG1抗體已具有HC之C端離胺酸切割。此抗體必被認為是「全長抗體」。

【0220】在本發明之另一具體實施例中，第一結合劑能夠誘導人類T細胞，諸如，$CD4^+$及$CD8^+$T細胞，諸如，輔助性T細胞及胞毒型T細胞之增殖。此活性可如本文實施例6或7中所述檢定。

【0221】在本發明之另一具體實施例中，第一結合劑

能夠誘導表現人類CD27之Jurkat受體T細胞之活化，諸如，如本文實施例2中所述。

【0222】在本發明之另一具體實施例中，在不存在Fcγ受體IIb交聯下，第一結合劑能夠誘導表現人類CD27之Jurkat受體T細胞之活化，諸如，如本文實施例11中所述。

【0223】在本發明之另一具體實施例中，第一結合劑能夠誘導具有中央記憶T細胞表型之CD4+及$CD8^+$T細胞之增殖。

【0224】在本發明之另一具體實施例中，第一結合劑能夠誘導IFNγ產生。

【0225】在本發明之另一具體實施例中，第一結合劑係於包含乙酸鹽、山梨醇、聚山梨醇酯80、且具有5至6，較佳地，5.5之pH的組成物或調配物。

結合CD40及CD137之第二結合劑

【0226】在一具體實施例中，CD40為人類CD40，特別是，人類CD40包含SEQ ID NO：62所列之序列。在一具體實施例中，CD137為人類CD137，特別是包含SEQ ID NO：63所列之序列的人類CD137。

【0227】在第二結合劑之一具體實施例中，第二結合劑包含結合到CD40之第一結合區及結合到CD137之第二結合區。

【0228】在第二結合劑之一具體實施例中，a)第二結合劑之第一結合區包含：包含分別於SEQ ID NO：44、

45、及46所列之CDR1、CDR2、及CDR3序列的重鏈可變區(VH)，以及包含分別於SEQ ID NO：47、YTS、及SEQ ID NO：48所列之CDR1、CDR2、及CDR3序列的輕鏈可變區(VL)；以及b)第二結合劑之第二結合區包含：包含分別於SEQ ID NO：51、52、及53所列之CDR1、CDR2、及CDR3序列的重鏈可變區(VH)，以及包含分別於SEQ ID NO：54、GAS、及SEQ ID NO：55所列之CDR1、CDR2、及CDR3序列的輕鏈可變區(VL)。

【0229】在第二結合劑之一具體實施例中，a) 第二結合劑之第一結合區包含：包含SEQ ID NO：49所列之胺基酸序列的重鏈可變區(VH)及包含SEQ ID NO：50所列之胺基酸序列的輕鏈可變區(VL)區；

以及

b) 第二結合劑之第二結合區包含：包含SEQ ID NO：56所列之胺基酸序列的重鏈可變區(VH)及包含SEQ ID NO：57所列之胺基酸序列的輕鏈可變區(VL)區。

【0230】在第二結合劑之一具體實施例中，第二結合劑為多特異性抗體，諸如，雙特異性抗體。

【0231】在第二結合劑之一具體實施例中，第二結合劑係呈全長抗體或抗體片段之形式。

【0232】在第二結合劑之一具體實施例中，其中，第二結合劑為包含第一結合臂及第二結合臂的抗體，其中，

第一結合臂包含

i) 包含該第一重鏈可變區(VH)與第一重鏈恆定區

(CH)之多胜肽，及

ii) 包含該第一輕鏈可變區(VL)與第一輕鏈恆定區(CL)之多胜肽；

以及第二結合臂包含

iii) 包含第二重鏈可變區(VH)及第二重鏈恆定區(CH)的多胜肽，及

iv) 包含第二輕鏈可變區(VL)及第二輕鏈恆定區(CL)的多胜肽。

【0233】在第二結合劑之一具體實施例中，該第二結合劑包含

i) 包含能夠結合到CD40之該第一結合區的第一重鏈及輕鏈，第一重鏈包含第一重鏈恆定區而第一輕鏈包含第一輕鏈恆定區；以及

ii) 包含能夠結合CD137之該第二結合區的第二重鏈及輕鏈，第二重鏈包含第二重鏈恆定區而第二輕鏈包含第二輕鏈恆定區。

【0234】在第二結合劑之一具體實施例中，(i) 在根據Eu編號對應於人類IgG1重鏈F405的位置之胺基酸為在該第一重鏈恆定區(CH)之L，及在根據Eu編號對應於人類IgG1重鏈K409的位置之胺基酸為在該第二重鏈恆定區(CH)之R、或(ii) 在根據Eu編號對應於人類IgG1重鏈K409的位置之胺基酸為該第一重鏈之R，及在根據Eu編號對應於人類IgG1重鏈F405的位置之胺基酸為在該第二重鏈之L。

【0235】在第二結合劑之一具體實施例中，在根據Eu編號對應於人類IgG1重鏈位置L234及L235的位置分別為在該第一及第二重鏈之F及E。

【0236】在第二結合劑之一具體實施例中，其中，在根據Eu編號對應於人類IgG1重鏈位置L234、L235、及D265的位置分別為在該第一及第二重鏈恆定區(HC)之F、E、及A。

【0237】在第二結合劑之一具體實施例中，在根據第一及第二重鏈恆定區二者的Eu編號，對應於人類IgG1重鏈位置L234及L235的位置分別為F及E，以及其中，(i) 根據第一重鏈恆定區的Eu編號，對應於人類IgG1重鏈F405的位置為L，而根據第二重鏈的Eu編號，對應於人類IgG1重鏈K409的位置為R，或(ii) 根據第一重鏈恆定區的Eu編號，對應於人類IgG1重鏈K409的位置為R、而根據第二重鏈的Eu編號，對應於人類IgG1重鏈F405的位置為L。

【0238】在第二結合劑之一具體實施例中，在根據第一及第二重鏈恆定區二者的Eu編號，對應於人類IgG1重鏈位置L234、L235、及D265的位置分別為F、E、及A，以及其中，(i) 根據第一重鏈恆定區的Eu編號，對應於人類IgG1重鏈F405的位置為L、而根據第二重鏈恆定區的Eu編號，對應於人類IgG1重鏈K409的位置為R、或(ii) 根據第一重鏈的Eu編號，對應於人類IgG1重鏈K409的位置為R，而根據第二重鏈的Eu編號，對應於人類IgG1重鏈F405的位置為L。

【0239】在第二結合劑之一具體實施例中，該第一及/或第二重鏈(諸如，第二重鏈)的恆定區，包含或基本上由下述所組成或由下述所組成：選自由下述所組成之群組的胺基酸序列

a) SEQ ID NO：58或60所列之序列[IgG1-Fc_FEAL]；

b) 在a)中之序列的次序列，諸如，次序列，其中，從在a)中所定義之序列的N端或C端開始1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個連續胺基酸已經刪除；以及

c) 相較於a)或b)中所定義之胺基酸序列，具有至多6個取代，諸如，至多5個取代、至多4個取代、至多3個、至多2個取代或至多1個取代之序列。

【0240】在第二結合劑之一具體實施例中，該第一及/或第二重鏈(諸如，第一重鏈)之恆定區包含或基本上由下述所組成或由下述所組成：選自由下述所組成之群組的胺基酸序列

a) SEQ ID NO：59或61所列之序列[IgG1-Fc_FEAR]；

b) 在a)中之序列的次序列，諸如，次序列，其中，從在a)中所定義之序列的N端或C端開始1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個連續胺基酸已經刪除；以及

c) 相較於a)或b)中所定義之胺基酸序列，具有至多6個取代，諸如，至多5個取代、至多4個、至多3個、至多2個取代或至多1個取代之序列。

【0241】在第二結合劑之一具體實施例中，該第二結合劑包含κ(κ)輕鏈恆定區。

【0242】在第二結合劑之一具體實施例中，該第二結合劑包含λ(λ)輕鏈恆定區。

【0243】在第二結合劑之一具體實施例中，該第一輕鏈恆定區為κ(κ)輕鏈恆定區或λ(λ)輕鏈恆定區。

【0244】在第二結合劑之一具體實施例中，該第二輕鏈恆定區為λ(λ)輕鏈恆定區或κ(κ)輕鏈恆定區。

【0245】在第二結合劑之一具體實施例中，該第一輕鏈恆定區為κ(κ)輕鏈恆定區且該第二輕鏈恆定區為λ(λ)輕鏈恆定區或該第一輕鏈恆定區為λ(λ)輕鏈恆定區且該第二輕鏈恆定區為κ(κ)輕鏈恆定區。

【0246】在第二結合劑之一具體實施例中，κ(κ)輕鏈包含選自由下述所組成之群組的胺基酸序列

a) SEQ ID NO：16所列之序列，

b) 在a)中之序列的次序列，諸如，次序列，其中，從在a)中所定義之序列的N端或C端開始1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個連續胺基酸已經刪除；以及

c) 相較於a)或b)中所定義之胺基酸序列，具有至多10個取代，諸如，至多9個取代、至多8個、至多7個、至多6個、至多5個、至多4個取代、至多3個、至多2個取代或至多1個取代之序列。

【0247】根據第一態樣的第二結合劑之一具體實施例中，λ(λ)輕鏈包含選自由下述所組成之群組的胺基酸序列

a) SEQ ID NO：17所列之序列，

b) 在a)中之序列的次序列，諸如，次序列，其中，從在a)中所定義之序列的N端或C端開始1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個連續胺基酸已經刪除；以及

c) 相較於a)或b)中所定義之胺基酸序列，具有至多10個取代，諸如，至多9個取代、至多8個、至多7個、至多6個、至多5個、至多4個取代、至多3個、至多2個取代或至多1個取代之序列。

【0248】在根據第一態樣的第二結合劑之一具體實施例中，第二結合劑為選自由IgG1、IgG2、IgG3、及IgG4所組成之群組的同型。

【0249】在根據第一態樣的第二結合劑之一具體實施例中，第二結合劑為全長IgG1抗體。

【0250】在根據第一態樣的第二結合劑之一具體實施例中，第二結合劑為IgG1m(f)同種異型之抗體。

【0251】在一具體實施例中，第二結合劑為結合到CD40及CD137之雙特異性抗體，雙特異性抗體具有i) 包含SEQ ID NO：64所列之胺基酸序列的第一重鏈及包含SEQ ID NO：65所列之胺基酸序列的第一輕鏈，以及ii)包含SEQ ID NO：66所列之胺基酸序列的第二重鏈與包含SEQ ID NO：67所列之胺基酸序列的第二輕鏈。

欲治療之個體及腫瘤或癌症

【0252】根據本揭露欲治療之個體較佳地為人類個

體。

【0253】在一具體實施例中，腫瘤或癌症為固態腫瘤。

【0254】在一具體實施例中，該腫瘤為PD-L1陽性腫瘤。

【0255】在一具體實施例中，腫瘤或癌症為頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC)，諸如，口腔、咽或喉之HNSCC。

【0256】在一具體實施例中，HNSCC為復發、不可切除或轉移。

【0257】在一具體實施例中，腫瘤或癌症為非小細胞肺癌(NSCLC)，諸如，鱗狀或非鱗狀NSCLC。

【0258】在一具體實施例中，NSCLC為復發、不可切除或轉移。

【0259】在一具體實施例中，NSCLC不具有表皮生長因子(EGFR)-致敏突變及/或未分化淋巴瘤(ALK)移位及/或ROS1重排。

【0260】在一具體實施例中，NSCLC為NTRK1/2/3(神經營養性受體酪胺酸激酶1/2/3)融合陽性，及/或具有KRAS的突變(KRAS原致癌基因，GTPase)、BRAF(B-Raf原致癌基因，絲胺酸/蘇胺酸激酶)、或MET(MET原致癌基因、受體酪胺酸激酶)基因，及/或具有RET(ret原致癌基因)基因重排、及個體已接受個別靶向療法的先前治療。

【0261】在一具體實施例中，個體已接受PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑(諸如，抗-PD-1抗體或抗-PD-L1抗體)的先

前治療，較佳地，至少二個劑量之PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【0262】在一具體實施例中，個體已接受鉑為主之療法或若鉑不合用，替代性化學療法，例如，包含吉西他濱(gemcitabine)之方案之先前治療。

【0263】在一具體實施例中，腫瘤或癌症在治療，諸如，查核點抑制劑的全身性治療之後，已復發及/或已有進展。

【0264】在一具體實施例中，個體已接受至少一先前線的全身性療法，諸如，包含PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，諸如，抗-PD-1抗體或抗-PD-L1抗體的全身性療法。

【0265】在一具體實施例中，以PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，諸如，抗PD-1抗體或抗-PD-L1抗體治療之後，癌症或腫瘤已復發及/或為頑抗性、或個體已有進展，PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑以單療法或作為組合療法之部分投予。

【0266】在一具體實施例中，最後的先前治療是與PD1抑制劑或PD-L1抑制劑，諸如，抗PD-1抗體或抗-PD-L1抗體一起，PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑以單療法或作為組合療法之部分投予。

【0267】在一具體實施例中，以PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，諸如，抗PD-1抗體或抗-PD-L1抗體最後治療的進程時間為6個月或更少。

【0268】在一具體實施例中，從以PD-1抑制劑或PD-

L1抑制劑，諸如，抗PD-1抗體或抗-PD-L1抗體最後給藥作為最後的先前治療之部分起的時間為6個月或更少。

【0269】在一具體實施例中，在下述期間或之後，癌症或腫瘤已復發及/或為頑抗性、或個體已有進展：i) 以抗-PD-1抗體或抗-PD-L1抗體治療後的鉑雙重化學療法、或ii) 鉑雙重化學療法之後的抗-PD-1抗體或抗-PD-L1抗體治療。

【0270】在第二態樣中，本發明提供套組，其包含i) 包含結合到CD27之至少一結合區的第一結合劑以及ii) 包含結合到CD40之第一結合區及結合到CD137之第二結合區的第二結合劑。

【0271】在根據第二態樣的套組之一具體實施例中，第一結合劑係如本揭露之任何態樣或具體實施例中所定義。

【0272】在根據第二態樣的套組之一具體實施例中，第二結合劑係如本揭露之任何態樣或具體實施例中所定義。

【0273】在根據第二態樣的套組之一具體實施例中，第一結合劑、第二結合劑、及，若存在，一或多種額外的治療劑係用於全身性投予，特別是用於注射或輸液，諸如，靜脈內注射或輸液。

【0274】在第三態樣中，本發明提供套組，其係用於降低個體腫瘤進程或預防個體腫瘤進程或治療個體癌症之方法，該套組包含i) 包含結合到CD27之至少一結合區的

第一結合劑以及ii) 包含結合到CD40之第一結合區及結合到CD137之第二結合區的第二結合劑。

【0275】在根據第三態樣的套組之一具體實施例中，套組係如本揭露之任何態樣或具體實施例中所定義。

【0276】在根據第三態樣的套組之一具體實施例中，腫瘤或癌症係如本揭露之任何態樣或具體實施例中所定義。

【0277】在根據第三態樣的套組之一具體實施例中，個體係如本揭露之任何態樣或具體實施例中所定義。

【0278】在根據第三態樣的套組之一具體實施例中，方法係如本揭露之任何態樣或具體實施例中所定義。

【0279】在第四態樣中，本發明提供醫藥組成物，包含i) 包含結合到CD27之至少一結合區的第一結合劑；ii) 包含結合到CD40之第一結合區及結合到CD137之第二結合區的第二結合劑；以及iii) 視需要地醫藥上可接受之載劑。

【0280】在根據第四態樣的醫藥組成物之一具體實施例中，第一結合劑係如本揭露之任何態樣或具體實施例中所定義。

【0281】在根據第四態樣的醫藥組成物之一具體實施例中，第二結合劑係如本揭露之任何態樣或具體實施例中所定義。

【0282】在第五態樣中，本發明提供醫藥組成物，其係用於降低個體腫瘤進程或預防個體腫瘤進程或治療個體

癌症之方法，該醫藥組成物包含i) 包含結合到CD27之至少一結合區的第一結合劑，ii) 包含結合到CD40之第一結合區及結合到CD137之第二結合區的第二結合劑；以及iii) 視需要地醫藥上可接受之載劑。

【0283】在根據第五態樣的使用醫藥組成物之一具體實施例中，醫藥組成物係如本揭露之任何態樣或具體實施例中所定義。

【0284】在根據第五態樣的使用醫藥組成物之一具體實施例中，腫瘤或癌症係如本揭露之任何態樣或具體實施例中所定義。

【0285】在根據第五態樣的使用醫藥組成物之一具體實施例中，個體係如本揭露之任何態樣或具體實施例中所定義。

【0286】在根據第五態樣的使用醫藥組成物之一具體實施例中，方法係如本揭露之任何態樣或具體實施例中所定義。

【0287】在第六態樣中，本發明提供第一結合劑，其係用於降低個體腫瘤進程或預防個體腫瘤進程或治療個體癌症之方法，該方法包含投予到該個體i) 包含結合到CD27之至少一結合區的第一結合劑；以及ii) 包含結合到CD40之第一結合區及結合到CD137之第二結合區的第二結合劑。

【0288】在根據第六態樣的使用第一結合劑之一具體實施例中，方法係如本揭露之任何態樣或具體實施例中所

定義。

【0289】在根據第六態樣的使用第一結合劑之一具體實施例中，第一結合劑係如本揭露之任何態樣或具體實施例中所定義。

【0290】在根據第六態樣的使用第一結合劑之一具體實施例中，第二結合劑係如本揭露之任何態樣或具體實施例中所定義。

【0291】在第七態樣中，本發明提供第二結合劑，其係用於降低個體腫瘤進程或預防個體腫瘤進程或治療個體癌症之方法，該方法包含投予到該個體i) 包含結合到CD27之至少一結合區的第一結合劑；以及ii) 包含結合到CD40之第一結合區及結合到CD137之第二結合區的第二結合劑。

【0292】在根據第七態樣的使用第二結合劑之一具體實施例中，方法係如本揭露之任何態樣或具體實施例中所定義。

【0293】在根據第七態樣的使用第二結合劑之一具體實施例中，第一結合劑係如本揭露之任何態樣或具體實施例中所定義。

【0294】在根據第七態樣的使用第二結合劑之一具體實施例中，第二結合劑係如本揭露之任何態樣或具體實施例中所定義。

【0295】此處引用的文件和研究的引用並不意味著承認上述任一是相關的先前技術。關於這些文件內容的所有

陳述均基於申請人可獲得的資訊，並不構成對這些文件內容正確性的任何承認。

【0296】提出描述(包括以下實施例)以使發明所屬技術領域中具有通常知識者能夠製作和使用各種具體實施例。特定裝置、技術和應用的描述僅作為實施例提供。對本文描述的實施例的各種修飾對於發明所屬技術領域中具有通常知識者將是顯而易見，並且本文定義的一般原理可以應用於其他實施例和應用，而不背離各種具體實施例的精神和範疇。因此，各種具體實施例不旨在限於本文描述和顯示的實施例，而是符合與申請專利範圍一致的範圍。

本揭露之項目

1. 降低個體腫瘤進程或預防個體腫瘤進程或治療個體癌症之方法，該方法包含投予到該個體

i) 包含結合到CD27之至少一結合區的第一結合劑；以及

ii) 包含結合到CD40之第一結合區及結合到CD137之第二結合區的第二結合劑。

2. 如項目1之方法，其中，該第一結合劑包含分別包含SEQ ID NO：5、6、及7所列之序列的重鏈可變(VH)區CDR1、CDR2、及CDR3，及分別包含SEQ ID NO：9、10及11所列之序列的輕鏈可變(VL)區CDR1、CDR2、及CDR3。

3. 如項目1或2之方法，其中，該第一結合劑包含能

夠結合到人類CD27之二個結合區，其中，該第一結合劑包含分別包含SEQ ID NO：5、6、及7所列之序列的重鏈可變(VH)區CDR1、CDR2、及CDR3，以及分別包含SEQ ID NO：9、10及11所列之序列的輕鏈可變(VL)區CDR1、CDR2、及CDR3。

4. 如前述項目中任一項之方法，其中，該第一結合劑包含：包含SEQ ID NO：4所列之序列的VH區。

5. 如前述項目中任一項之方法，其中，該第一結合劑包含：包含SEQ ID NO：8所列之序列的VL區。

6. 如前述項目中任一項之方法，其中，該第一結合劑包含分別包含SEQ ID NO：4及SEQ ID NO：8所列之序列的VH及VL區。

7. 如前述項目中任一項之方法，其中，該第一結合劑為抗體，較佳地，人類或人源化抗體。

8. 如前述項目中任一項之方法，其中，抗體為全長抗體進一步包含輕鏈恆定區(CL)及重鏈恆定區(CH)。

9. 如項目8之方法，其中，輕鏈恆定區為人類κ。。

10. 如項目8之方法，其中，輕鏈恆定區為人類λ。

11. 如前述項目中任一項之方法，其中，該第一結合劑進一步包含重鏈恆定區，其為人類IgG同型，視需要地為經修飾之人類IgG。

12. 如項目之方法11，其中，人類IgG或經修飾之人類IgG係選自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4，諸如，人類IgG1。

13. 如項目11或12之方法，其中，IgG為包含一或多種胺基酸取代的經修飾之人類IgG。

14. 如項目11至13中任一項之方法，其中，經修飾之人類IgG為包含一或多種胺基酸取代(諸如，二或更多種胺基酸取代)的經修飾之人類IgG1。

15. 如項目11至14中任一項之方法，其中，經修飾之人類IgG重鏈恆定區包含至多10個胺基酸取代，諸如，至多9，諸如，至多8，諸如，至多7，諸如，至多6，諸如，至多5，諸如，至多4，諸如，至多3，諸如，至多2個胺基酸取代。

16. 如項目11至15中任一項之方法，其中，該重鏈恆定區的取代誘導增加之CD27促效作用相較於除了包含野生型IgG1抗體重鏈恆定區之相同抗體。

17. 如項目11至16中任一項之方法，其中，對應於根據Eu編號在人類IgG1重鏈位置E345或E430的位置之胺基酸殘基係選自包含下述之群組：A、C、D、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W及Y。

18. 如項目11至17中任一項之方法，其中，對應於根據Eu編號在人類IgG1重鏈位置E345的位置之胺基酸殘基為R。

19. 如項目11至18中任一項之方法，其中，在根據Eu編號對應於人類IgG1重鏈位置E430的位置之胺基酸殘基為G。

20. 如項目11至19中任一項之方法，其中，在根據Eu

編號對應於人類IgG1重鏈位置P329的位置之胺基酸殘基為R。

21. 如項目11至20中任一項之方法，其中，在根據Eu編號對應於人類IgG1重鏈位置E345及P329的位置之胺基酸殘基均為R。

22. 如項目11至21中任一項之方法，其中，第一結合劑具有如同包含野生型IgG1重鏈恆定區的親本抗體之藥物動力學概況。

23. 如前述項目中任一項之方法，其中，第一結合劑包含重鏈恆定區，其包含選自包含下述之群組的序列：SEQ ID No 12、13、14、15、18、19、20、21、22、23、27、28、29、30、31、32、33、34及36。

24. 如前述項目中任一項之方法，其中，第一結合劑包含重鏈恆定區，其包含SEQ ID No 15所列之序列。

25. 如前述項目中任一項之方法，其中，該第一結合劑包含重鏈恆定區，其經修飾，以致於第一結合劑誘導相較於親本抗體，一或多種Fc-媒介之效應子功能至較小範圍。

26. 如項目25之方法，其中，一或多種Fc-媒介之效應子功能減少至少20%，諸如，至少30%或至少40%、或至少50%或至少60%或至少70%、或至少80%或至少90%。

27. 如項目25或26之方法，其中，第一結合劑未誘導一或多種Fc-媒介之效應子功能。

28. 如項目25至27中任一項之方法，其中，一或多種

Fc-媒介之效應子功能係選自下列群組：補體依賴性細胞毒殺(CDC)、補體依賴性細胞-媒介之細胞毒殺(CDCC)、補體活化、抗體-依賴性細胞-媒介之細胞毒殺(ADCC)、抗體-依賴性細胞-媒介之吞噬作用(ADCP)、C1q結合及FcγR結合。

29. 如項目25至28中任一項之方法，其中，當藉由實施例8之方法測量時，第一結合劑未誘導C1q結合。

30. 如前述項目中任一項之方法，其中，第一結合劑為單價抗體。

31. 如前述項目中任一項之方法，其中，第一結合劑為雙價抗體。

32. 如前述項目中任一項之方法，其中，第一結合劑為單特異性抗體。

33. 如前述項目中任一項之方法，其中，第一結合劑為根據前述項目中任一項之包含能夠結合人類CD27之第一抗原結合區且包含能夠結合到人類CD27上不同表位或能夠結合不同標靶的第二抗原結合區的雙特異性抗體。

34. 如前述項目中任一項之方法，其中，CD27為人類CD27，特別是，該人類CD27包含SEQ ID NO：1所列之序列或SEQ ID NO：2所列之人類CD27變體。

35. 如前述項目中任一項之方法，其中，該第一結合劑包含：

a. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區；

b. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區；

c. 包含SEQ ID NO：15所列之胺基酸序列的CH區；以及

d. 包含SEQ ID NO：17所列之胺基酸序列的CL區。

36. 如前述項目中任一項之方法，其中，該第一結合劑包含：包含SEQ ID NO：35所列之胺基酸序列的重鏈及包含SEQ ID NO：25所列之胺基酸序列的輕鏈。

37. 如前述項目中任一項之方法，其中，第一結合劑係於包含乙酸鹽、山梨醇、聚山梨醇酯80、且具有5至6，較佳地，5.5之pH的組成物或調配物。

38. 如前述項目中任一項之方法，其中，CD40為人類CD40，特別是，人類CD40包含SEQ ID NO：62所列之序列，及/或CD137為人類CD137，特別是包含SEQ ID NO：63所列之序列的人類CD137。

39. 如前述項目中任一項之方法，其中，a) 第二結合劑之第一結合區包含：包含分別於SEQ ID NO：44、45、及46所列之CDR1、CDR2、及CDR3序列的重鏈可變區(VH)，以及包含分別於SEQ ID NO：47、YTS、及SEQ ID NO：48所列之CDR1、CDR2、及CDR3序列的輕鏈可變區(VL)；以及b) 第二結合劑之第二結合區包含：包含分別於SEQ ID NO：51、52、及53所列之CDR1、CDR2、及CDR3序列的重鏈可變區(VH)，以及包含分別於SEQ ID NO：54、GAS、及SEQ ID NO：55所列之CDR1、CDR2、及CDR3序列的輕鏈可變區(VL)。

40. 如前述項目中任一項之方法，其中，

a) 第二結合劑之第一結合區包含：包含SEQ ID NO：49所列之胺基酸序列的重鏈可變區(VH)及包含SEQ ID NO：50所列之胺基酸序列的輕鏈可變區(VL)區；

以及

b) 第二結合劑之第二結合區包含：包含SEQ ID NO：56所列之胺基酸序列的重鏈可變區(VH)及包含SEQ ID NO：57所列之胺基酸序列的輕鏈可變區(VL)區。

41. 如前述項目中任一項之方法，其中，第二結合劑為多特異性抗體，諸如，雙特異性抗體。

42. 如前述項目中任一項之方法，其中，第二結合劑係呈全長抗體或抗體片段之形式。

43. 如前述項目中任一項之方法，其中，第二結合劑為包含第一結合臂及第二結合臂的抗體，其中，

第一結合臂包含

i) 包含該第一重鏈可變區(VH)與第一重鏈恆定區(CH)之多胜肽，及

ii) 包含該第一輕鏈可變區(VL)與第一輕鏈恆定區(CL)之多胜肽；

以及第二結合臂包含

iii) 包含第二重鏈可變區(VH)及第二重鏈恆定區(CH)的多胜肽，及

iv) 包含第二輕鏈可變區(VL)及第二輕鏈恆定區(CL)的多胜肽。

44. 如前述項目中任一項之方法，其中，該第二結合

劑包含

i) 包含能夠結合到CD40之該第一結合區的第一重鏈及輕鏈，第一重鏈包含第一重鏈恆定區以及第一輕鏈包含第一輕鏈恆定區；以及

ii) 包含能夠結合CD137之該第二結合區的第二重鏈及輕鏈，第二重鏈包含第二重鏈恆定區而第二輕鏈包含第二輕鏈恆定區。

45. 如項目43或44之方法，其中，(i) 在根據Eu編號對應於人類IgG1重鏈F405的位置之胺基酸為在該第一重鏈恆定區(CH)之L，及在根據Eu編號對應於人類IgG1重鏈K409的位置之胺基酸為在該第二重鏈恆定區(CH)之R、或(ii) 在根據Eu編號對應於人類IgG1重鏈K409的位置之胺基酸為該第一重鏈之R，及在根據Eu編號對應於人類IgG1重鏈F405的位置之胺基酸為在該第二重鏈之L。

46. 如項目43至45中任一項之方法，其中，在根據Eu編號對應於人類IgG1重鏈位置L234及L235的位置分別為在該第一及第二重鏈之F及E。

47. 如項目43至46中任一項之方法，其中，在根據Eu編號對應於人類IgG1重鏈位置L234、L235、及D265的位置分別為在該第一及第二重鏈恆定區(HC)之F、E、及A。

48. 如項目43至47中任一項之方法，其中，根據第一及第二重鏈恆定區二者的Eu編號對應於人類IgG1重鏈位置L234及L235的位置分別為F及E，以及，其中，(i) 根據第一重鏈恆定區的Eu編號對應於人類IgG1重鏈F405的位置為

L，及根據第二重鏈的Eu編號，對應於人類IgG1重鏈K409的位置為R，或(ii) 根據第一重鏈恆定區的Eu編號對應於人類IgG1重鏈K409的位置為R，及根據第二重鏈的Eu編號，對應於人類IgG1重鏈F405的位置為L。

49. 如項目43至48中任一項之方法，其中，根據第一及第二重鏈恆定區二者的Eu編號對應於人類IgG1重鏈位置L234、L235、及D265的位置分別為F、E、及A，以及其中，(i) 根據第一重鏈恆定區的Eu編號對應於人類IgG1重鏈F405的位置為L，及根據第二重鏈恆定區的Eu編號，對應於人類IgG1重鏈K409的位置為R，或(ii) 根據第一重鏈的Eu編號，對應於人類IgG1重鏈K409的位置為R，及根據第二重鏈的Eu編號，對應於人類IgG1重鏈F405的位置為L。

50. 如項目43至49中任一項之方法，其中，該第一及/或第二重鏈，諸如，第二重鏈的恆定區包含或基本上由下述所組成或由下述所組成：選自由下述所組成之群組的胺基酸序列

a) SEQ ID NO：58或60所列之序列[IgG1-Fc_FEAL]；

b) 在a)中之序列的次序列，諸如，次序列，其中，從在a)中所定義之序列的N端或C端開始1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個連續胺基酸已經刪除；以及

c) 相較於a)或b)中所定義之胺基酸序列，具有至多6個取代，諸如，至多5個取代、至多4個取代、至多3個、

至多2個取代或至多1個取代之序列。

51. 如項目43至50中任一項之方法，其中，該第一及/或第二重鏈，諸如，第一重鏈之恆定區包含或基本上由下述所組成或由下述所組成：選自由下述所組成之群組的胺基酸序列

a) SEQ ID NO：59或61所列之序列[IgG1-Fc_FEAR]；

b) 在a)中之序列的次序列，諸如，次序列，其中，從在a)中所定義之序列的N端或C端開始1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個連續胺基酸已經刪除；以及

c) 相較於a)或b)中所定義之胺基酸序列，具有至多6個取代，諸如，至多5個取代、至多4個、至多3個、至多2個取代或至多1個取代之序列。

52. 如項目43至51中任一項之方法，其中，該第二結合劑包含κ(κ)輕鏈恆定區。

53. 如項目43至52中任一項之方法，其中，該第二結合劑包含λ(λ)輕鏈恆定區。

54. 如項目43至53中任一項之方法，其中，該第一輕鏈恆定區為κ(κ)輕鏈恆定區或λ(λ)輕鏈恆定區。

55. 如項目43至54中任一項之方法，其中，該第二輕鏈恆定區為λ(λ)輕鏈恆定區或κ(κ)輕鏈恆定區。

56. 如項目43至55中任一項之方法，其中，該第一輕鏈恆定區為κ(κ)輕鏈恆定區且該第二輕鏈恆定區為λ(λ)輕鏈恆定區或該第一輕鏈恆定區為λ(λ)輕鏈恆定區且該第二

輕鏈恆定區為κ(κ)輕鏈恆定區。

57. 如項目52至56中任一項之方法，其中，κ(κ)輕鏈包含選自由下述所組成之群組的胺基酸序列

a) SEQ ID NO：16所列之序列，

b) 在a)中之序列的次序列，諸如，次序列，其中，從在a)中所定義之序列的N端或C端開始1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個連續胺基酸已經刪除；以及

c) 相較於a)或b)中所定義之胺基酸序列，具有至多10個取代，諸如，至多9個取代、至多8個、至多7個、至多6個、至多5個、至多4個取代、至多3個、至多2個取代或至多1個取代之序列。

58. 如項目53至57中任一項之方法，其中，λ(λ)輕鏈包含選自由下述所組成之群組的胺基酸序列

a) SEQ ID NO：17所列之序列，

b) 在a)中之序列的次序列，諸如，次序列，其中，從在a)中所定義之序列的N端或C端開始1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個連續胺基酸已經刪除；以及

c) 相較於a)或b)中所定義之胺基酸序列，具有至多10個取代，諸如，至多9個取代、至多8個、至多7個、至多6個、至多5個、至多4個取代、至多3個、至多2個取代或至多1個取代之序列。

59. 如前述項目中任一項之方法，其中，第二結合劑為選自由IgG1、IgG2、IgG3、及IgG4所組成之群組的同型。

60. 如前述項目中任一項之方法，其中，第二結合劑為全長IgG1抗體。

61. 如前述項目中任一項之方法，其中，第二結合劑為IgG1m(f)同種異型之抗體。

62. 如前述項目中任一項之方法，其中，第二結合劑為結合到CD40及CD137之雙特異性抗體，雙特異性抗體具有i) 包含SEQ ID NO：64所列之胺基酸序列的第一重鏈及包含SEQ ID NO：65所列之胺基酸序列的第一輕鏈，以及ii) 包含SEQ ID NO：66所列之胺基酸序列的第二重鏈與包含SEQ ID NO：67所列之胺基酸序列的第二輕鏈。

63. 如前述項目中任一項之方法，其中，

a) 第一結合劑包含分別包含SEQ ID NO：5、6、及7所列之序列的重鏈可變(VH)區CDR1、CDR2、及CDR3，以及分別包含SEQ ID NO：9、10及11所列之序列的輕鏈可變(VL)區CDR1、CDR2、及CDR3；

b) 第二結合劑之第一結合區包含：包含分別於SEQ ID NO：44、45、及46所列之CDR1、CDR2、及CDR3序列的重鏈可變區(VH)，以及包含分別於SEQ ID NO：47、YTS、及SEQ ID NO：48所列之CDR1、CDR2、及CDR3序列的輕鏈可變區(VL)；以及

c) 第二結合劑之第二結合區包含：包含分別於SEQ ID NO：51、52、及53所列之CDR1、CDR2、及CDR3序列的重鏈可變區(VH)，以及包含分別於SEQ ID NO：54、GAS、及SEQ ID NO：55所列之CDR1、CDR2、及CDR3序

列的輕鏈可變區(VL)。

64. 如前述項目中任一項之方法，其中，

a) 第一結合劑包含：包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區，包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區；

b) 第二結合劑之第一結合區包含：包含SEQ ID NO：49所列之胺基酸序列的重鏈可變區(VH)及包含SEQ ID NO：50所列之胺基酸序列的輕鏈可變區(VL)區；以及

c) 第二結合劑之第二結合區包含：包含SEQ ID NO：56所列之胺基酸序列的重鏈可變區(VH)及包含SEQ ID NO：57所列之胺基酸序列的輕鏈可變區(VL)區。

65. 如前述項目中任一項之方法，其中，

a) 該第一結合劑為抗體，其包含：包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區，其包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區，包含SEQ ID NO：15所列之胺基酸序列的CH區，及包含SEQ ID NO：17所列之胺基酸序列的CL區；

b) 該第二結合劑為包含第一結合臂及第二結合臂的抗體，第一結合臂包含第一結合區而第二結合臂包含第二結合區；

c) 第二結合劑之第一結合臂包含：包含SEQ ID NO：49所列之胺基酸序列的VH區，包含SEQ ID NO：50所列之胺基酸序列的VL區；包含SEQ ID NO：60所列之胺基酸序列的CH區，及包含SEQ ID NO：16所列之胺基酸序

列的CL區；以及

d) 第二結合劑的第二結合臂包含：包含SEQ ID NO：56所列之胺基酸序列的VH區，包含SEQ ID NO：57所列之胺基酸序列的VL區，包含SEQ ID NO：61所列之胺基酸序列的CH區，及包含SEQ ID NO：16所列之胺基酸序列的CL區。

66. 如前述項目中任一項之方法，其中，

a) 該第一結合劑包含：包含SEQ ID NO：35所列之胺基酸序列的重鏈及包含SEQ ID NO：25所列之胺基酸序列的輕鏈；

b) 該第二結合劑為結合到CD40及CD137之雙特異性抗體，雙特異性抗體具有i) 包含SEQ ID NO：64所列之胺基酸序列的第一重鏈及包含SEQ ID NO：65所列之胺基酸序列的第一輕鏈，以及ii) 包含SEQ ID NO：66所列之胺基酸序列的第二重鏈與包含SEQ ID NO：67所列之胺基酸序列的第二輕鏈。

67. 如前述項目中任一項之方法，其中，個體為人類個體。

68. 如前述項目中任一項之方法，其中，腫瘤或癌症為固態腫瘤。

69. 根據前述項目中任一項之方法，其中，該腫瘤為PD-L1陽性腫瘤。

70. 如前述項目中任一項之方法，其中，腫瘤或癌症為頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC)，諸如，口腔、咽或喉之

HNSCC。

71. 如項目70之方法，其中，HNSCC為復發、不可切除或轉移。

72. 如項目1至69中任一項之方法，其中，腫瘤或癌症為非小細胞肺癌(NSCLC)，諸如，鱗狀或非鱗狀NSCLC。

73. 如項目72之方法，其中，NSCLC為復發、不可切除或轉移。

74. 如項目72或73之方法，其中，NSCLC不具有表皮生長因子(EGFR)-致敏突變及/或未分化淋巴瘤(ALK)移位及/或ROS1重排。

75. 如項目72至74中任一項之方法，其中，NSCLC為NTRK1/2/3(神經營養性受體酪胺酸激酶1/2/3)融合陽性，及/或具有KRAS(KRAS原致癌基因，GTPase)、BRAF(B-Raf原致癌基因，絲胺酸/蘇胺酸激酶)、或MET(MET原致癌基因，受體酪胺酸激酶)基因的突變，及/或具有RET(ret原致癌基因)基因重排，及個體已接受個別靶向療法的先前治療。

76. 如前述項目中任一項之方法，其中，個體已接受PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑(諸如，抗-PD-1抗體或抗-PD-L1抗體)的先前治療，較佳地，至少二個劑量之PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

77. 如前述項目中任一項之方法，其中，個體已接受鉑為主之療法或若鉑不合用，替代性化學療法，例如，包

含吉西他濱(gemcitabine)之方案之先前治療。

78. 如前述項目中任一項之方法，其中，腫瘤或癌症在治療，諸如，查核點抑制劑的全身性治療之後，已復發及/或已有進展。

79. 如前述項目中任一項之方法，其中，個體已接受至少一先前線的全身性療法，諸如，包含PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，諸如，抗-PD-1抗體或抗-PD-L1抗體的全身性療法。

80. 如前述項目中任一項之方法，其中，以PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，諸如，抗PD-1抗體或抗-PD-L1抗體治療之後，癌症或腫瘤已復發及/或為頑抗性、或個體已有進展，PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑以單療法或作為組合療法之部分投予。

81. 如前述項目中任一項之方法，其中，最後的先前治療是與PD1抑制劑或PD-L1抑制劑，諸如，抗PD-1抗體或抗-PD-L1抗體一起，PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑以單療法或作為組合療法之部分投予。

82. 如前述項目中任一項之方法，其中，以PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，諸如，抗PD-1抗體或抗-PD-L1抗體最後治療的進程時間為6個月或更少。

83. 如前述項目中任一項之方法，其中，從以PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，諸如，抗PD-1抗體或抗-PD-L1抗體最後給藥作為最後的先前治療之部分起的時間為6個月或更少。

84. 如前述項目中任一項之方法，其中，在下述期間或之後，癌症或腫瘤已復發及/或為頑抗性、或個體已有進展

i) 以抗-PD-1抗體或抗-PD-L1抗體治療後的鉑雙重化學療法，或

ii) 鉑雙重化學療法之後的抗-PD-1抗體或抗-PD-L1抗體治療。

85. 套組包含

i) 包含結合到CD27之至少一結合區的第一結合劑以及

ii) 包含結合到CD40之第一結合區及結合到CD137之第二結合區的第二結合劑。

86. 根據項目85之套組，其中，第一結合劑為如項目1至84中任一項所定義及/或第二結合劑為如項目1至84中任一項所定義。

87. 根據項目85或86之套組，其中，第一結合劑、第二結合劑、及，若存在，一或多種額外的治療劑係用於全身性投予，特別是用於注射或輸液，諸如，靜脈內注射或輸液。

88. 根據項目85至87中任一項之套組，其係用於降低個體腫瘤進程或預防個體腫瘤進程或治療個體癌症之方法。

89. 根據項目88之使用套組，其中，腫瘤或癌症為如項目1至84中任一項所定義，及/或個體為如項目1至84中任一項所定義，及/或方法為如項目1至84中任一項所定義。

90. 醫藥組成物包含

i) 包含結合到CD27之至少一結合區的第一結合劑；

ii) 包含結合到CD40之第一結合區及結合到CD137之第二結合區的第二結合劑；以及

iii) 視需要地醫藥上可接受之載劑。

91. 根據項目90之醫藥組成物，其中，第一結合劑為如項目1至84中任一項所定義及/或第二結合劑為如項目1至84中任一項所定義。

92. 根據項目90或91之醫藥組成物，其係用於降低個體腫瘤進程或預防個體腫瘤進程或治療個體癌症之方法。

93. 根據項目92之使用醫藥組成物，其中，腫瘤或癌症為如項目1至84中任一項所定義，及/或個體為如項目1至84中任一項所定義，及/或方法為如項目1至84中任一項所定義。

94. 第一結合劑，其係用於降低個體腫瘤進程或預防個體腫瘤進程或治療個體癌症之方法，該方法包含投予到該個體

i) 包含結合到CD27之至少一結合區的第一結合劑；以及

ii) 包含結合到CD40之第一結合區及結合到CD137之第二結合區的第二結合劑。

95. 根據項目94之使用第一結合劑，其中，方法為如項目1至84中任一項所定義，及/或第一結合劑為如項目1至84中任一項所定義，及/或第二結合劑為如項目1至84中

任一項所定義。

96. 第二結合劑，其係用於降低個體腫瘤進程或預防個體腫瘤進程或治療個體癌症之方法，該方法包含投予到該個體

i) 包含結合到CD27之至少一結合區的第一結合劑；以及

ii) 包含結合到CD40之第一結合區及結合到CD137之第二結合區的第二結合劑。

97. 根據項目96之使用第二結合劑，其中，方法為如項目1至84中任一項所定義，及/或第一結合劑為如項目1至84中任一項所定義，及/或第二結合劑為如項目1至84中任一項所定義。

【0297】本文揭露本揭露的其他態樣。

實施例1：產生DuoBody-CD40x4-1BB及抗-人類CD27抗體及其Fc變體

【0298】通過免疫和融合瘤產生來產生抗人類CD27抗體在Aldevron GmbH(Freiburg，Germany)進行。將編碼人類CD27(全長和ECD)的cDNA選殖到Aldevron專有表現質體中。抗CD27抗體是藉由OmniRat動物(表現具有完全人類個體基因型的抗體多樣化庫的轉基因大鼠；Ligand Pharmaceuticals Inc.)使用粒子轟擊的手持式裝置，使用皮內應用人類CD27 cDNA包覆的金粒子(「基因槍」)的免疫產生。在一系列免疫後收集血清樣品，並藉由流式細胞分

析技術對為全長人類CD27表現用上述表現質體瞬時轉染的HEK細胞測試。根據標準程序，從大鼠脾臟中單離產生抗體的細胞並與小鼠骨髓瘤細胞(Ag8)融合。萃取來自產生CD27特異性抗體的融合瘤之RNA用於定序。

【0299】根據與初代T細胞的結合和活體外CD27結合競爭檢定的多樣性，從一組71種CD27抗體中選擇了六種抗體用於進一步特徵化。這六種抗體在本文中命名為IgG1-CD27-A、IgG1-CD27-B、IgG1-CD27-C、IgG1-CD27-D、IgG1-CD27-E及IgG1-CD27-F。感興趣的重鏈和輕鏈的可變區，在一些情況下具有單點突變以去除被認為是製造責任的胺基酸殘基(例如，游離半胱胺酸或醣基化位點)，被基因合成並選殖到包含人類抗體輕鏈和人類IgG1重鏈的骨架序列的表現載體中。

【0300】六種不同抗體的Fc變體是藉由引入一或多個以下胺基酸突變產生，根據Eu編號：E345R、E430G、P329R、G237A、K326A、E333A，見下表1和3。在如下所述的活體外功能特徵後，CD27特異性IgG1-CD27-A(VH SEQ ID NO：4；VL SEQ ID NO：8)被認為具有最佳生物學特性。本文中用作基準的先前技術CD27靶向抗體的序列已如下獲得：IgG1-CD27-15(WO2012004367；SEQ ID No 3及4)、IgG1-CD27-131A(WO2018/058022；SEQ ID No 10及15)、IgG1-CD27-CDX1127(WO2016145085；SEQ ID No：1及2)，及IgG1-CD27-BMS986215(WO2019195452A1；SEQ ID No 8及9)。第I型抗人類CD20抗體的VH和VL序列

先前已在WO2019/145455A1(SEQ ID No 35及39)中描述。

【0301】基於DuoBody技術平台(WO2011131746A2)，DuoBody-CD40x4-1BB為雙特異性抗體，其一臂結合CD40而另一臂結合4-1BB。DuoBody-CD40x4-1BB使用親代選殖株產生：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)及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)。作為對照抗體，使用抗HIV gp120抗體IgG1-b12在本申請案(Barbas等人，J Mol Biol 1993 230：812-823；本申請案之VH：SEQ ID NO 37、VL：SEQ ID NO 41)。

表1 - 胺基酸序列之列表

SEQ ID NO:	識別號	胺基酸序列
1	人類 CD27	MARPHPWWLCVLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPG TFLVKDCDQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLV RNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHP QPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLPARTLSTHWPPQRSLCSS DFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLHQRRKYRSNKGESPVEPAEPCHYSC PREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP
2	CD27-A59T 變體	MARPHPWWLCVLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPG TFLVKDCDQHRKTAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLV RNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHP QPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLPARTLSTHWPPQRSLCSS DFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLHQRRKYRSNKGESPVEPAEPCHYSC PREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP
3	Cyno 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	恆定區人類 IgG1m(f)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
13	恆定區人類 IgG1-E345R	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR**R**PQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
14	恆定區人類 IgG1-P329R	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKAL**R**APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
15	恆定區人類 IgG1-delK E345R+P329R	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKAL**R**APIEKTISKAKGQPR**R**PQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
16	人類κLC	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
17	人類λLC	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSP

		VKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGST VEKTVAPTECS
18	恆定區人類 IgG1m(f)- delK	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
19	恆定區人類 IgG1m(a)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK PVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
20	恆定區人類 IgG1m(x)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK PVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEGLHNHYTQKSLSLSPGK
21	恆定區人類 IgG2	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVD KTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
22	恆定區人類 IgG3	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVD KRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRC PEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK
23	恆定區人類 IgG4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVD KRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
24	具有 E345R+P32 9R之 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	小鼠 CD27	MAWPPPYWLCMLGTLVGLSATLAPNSCPDKHYWTGGGLCCRMCEPG TFFVKDCEQDRTAAQCDPCIPGTSFSPDYHTRPHCESCRHCNSGFLIR NCTVTANAECSCSKNWQCRDQECTECDPPLNPALTRQPSETPSPQPP PTHLPHGTEKPSWPLHRQLPNSTVYSQRSSHRPLCSSDCIRIFVTFSS MFLIFVLGAILFFHQRRNHGPNEDRQAVPEEPCPYSCPREEEGSAIPIQ EDYRKPEPAFYP
27	人類 IgG1-Fc-E345R+P329R	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKAL**R**APIEKTISKAKGQPR**R**PQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
28	恆定區人類 IgG1m(f) (而無c端離胺酸)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
29	恆定區人類 IgG1-E345R (而無c端離胺酸)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR**R**PQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
30	恆定區人類 IgG1-P329R (而無c端離胺酸)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKAL**R**APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
31	恆定區人類 IgG1m(a) (而無c端離胺酸)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK PVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
32	恆定區人類	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK

	IgG1m(x) (而無c端離胺酸)	PVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEGLHNHYTQKSLSLSPG
33	恆定區人類IgG2 (而無c端離胺酸)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVD KTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
34	恆定區人類IgG3 (而無c端離胺酸)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVD KRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRC PEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPG
35	具有E345R+P329R (而無c端離胺酸)之CD27-A IgG1 HC	QVQLMQSGSELKKPGASVKVSCRASGYTFTTYAMNWVRQAPGQGPE WMGWINTNTGNPTYAQGFTGRFVFSLDTTVTTTYLQISSLKAEDTAV YFCAREAGSFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALRAPI EKTISKAKGQPRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
36	人類IgG1-Fc-E345R+P329R (而無c端離胺酸)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALRAPIEKTISKAKGQPRRPQVYTLPPSRE 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人源化	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFTEYIMHWVRQAPGQGLE WMGGIIPNNGGTSYNQKFQGRVTMTVDKSTSTGYMELSSLRSEDTA VYYCTRREVYGRNYYALDYWGQGTLVTVSS
50	CD40-001 VL 人源化	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 人源化	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFSLNDYWMSWVRQAPGKGLE WVGYIDVGGSLYYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVY YCARGGLTYGFDLWGQGTLVTVSS
57	CD137-009 VL 人源化	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	IgG1-FEAL-Fc 而無c端 **Lys**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF LLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
61	IgG1-FEAR-Fc而無c端 **Lys**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
62	人類**CD40** 成熟蛋白質	EPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECLPCGESEFL DTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEGWHCTSE ACESCVLHRSCSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAFEKCH PWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVVCGPQDRLRALVVIPIIFGILFAILLV LVFIKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCQ PVTQEDGKESRISVQERQ
63	人類**CD137** 成熟蛋白質	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCK GVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKK GCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPS PADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSV VKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
64	CD40-001 重鏈	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFTEYIMHWVRQAPGQGLE WMGGIIPNNGGTSYNQKFQGRVTMTVDKSTSTGYMELSSLRSEDTA VYYCTRREVYGRNYYALDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC PAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
65	CD40-001 輕鏈	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQGINNYLNWYQQKPGKAVKLL IYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQYSNLPY TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
66	CD137-009 重鏈	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFSLNDYWMSWVRQAPGKGLE WVGYIDVGGSLYYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVY YCARGGLTYGFDLWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP

		IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
67	CD137-009 輕鏈	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISSYLAWYQQKPGKAPKRLI YGASDLASGVPSRFSASGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCHYYATISGL GVAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
68	人類**CD40** 前驅物	MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKL VSDCTEFTETECLPCGESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQK GTSETDTICTCEEGWHCTSEACESCVLHRSCSPGFGVKQIATGVSDT ICEPCPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVVCGP QDRLRALVVIPIIFGILFAILLVLVFIKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFP DDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ
69	人類**CD40** 成熟蛋白質	EPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECLPCGESEFL DTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEGWHCTSE ACESCVLHRSCSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAFEKCH PWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVVCGPQDRLRALVVIPIIFGILFAILLV LVFIKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCQ PVTQEDGKESRISVQERQ
70	人類**CD137** 前驅物	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-E345R-	EIVLTQSPGTLSLSPGERATFSCRSSHSIRSRRVAWYQHKPGQAPRLV IHGVSNRASGISDRFSGSGSGTDFTLTITRVEPEDFALYYCQVYGASS YTFGQGTKLERKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA

	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

實施例2：在CD27活化受體細胞檢定中抗CD27抗體之促效劑活性

【0302】使用CD27 Thaw及Use Bioassay套組(Promega，Custom Assay Services、CAS # CS1979A25)測量具有和不具有E345R或E430G六聚化增強Fc突變的不同抗CD27抗體的CD27促效劑活性。套組包含NF-κB Reporter-Jurkat重組細胞(在具有人類CD27的組成型表現之NF-κB反應元件的控制下表現螢火蟲螢光素酶基因)且基本上根據製造商的說明書使用。簡言之，將Thaw-and-Use GloResponse NFκB-luc2/CD27 Jurkat細胞解凍並在37℃、5% CO_2中於96孔平底培養盤(PerkinElmer，Cat # 6005680)(在Bio-Glo 螢光素酶檢定緩衝液中有抗體稀釋連續(最終濃度範圍0.04至20 μg/mL)培養6h。抗CD27抗體為野生型(WT*)IgG1-CD27-A、IgG1-CD27-B、IgG1-CD27-C、IgG1-CD27-D、IgG1-CD27-E、IgG1-CD27-F、及各帶有E430G或E345R突變之變體。抗CD27基準抗體是IgG1-CD27-131A(WT及E430G變體)和非六聚化IgG1-CD27-15(IgG1-CD27-15-P329R-E345R-K439E，其攜帶可防止六聚化的Fc突變組合。因此，突變在本實驗的上下文中在功能

上無關，故在圖中稱為WT)和包含E345R突變的IgG1-CD27-15的六聚化變體。抗HIV gp120人類抗體IgG1-b12-E345R用作非結合陰性對照抗體(ctrl)。抗體培育後，將Bio-Glo螢光素酶檢定試劑(與RT平衡)添加到各孔中，並在RT下培育5至10分鐘。使用EnVision Multilabel Reader (PerkinElmer)測量發光，並在使用GraphPad Prism軟體所生成的條形圖中顯示為相對發光單位(RLU)。

【0303】相較於用於抗體選殖株IgG1-CD27-A至-E和基準抗體IgG1-CD27-131A(以E430G測試)及IgG1-CD27-15(以E345R測試；圖1)的相應WT抗體相比，六聚化增強Fc突變(E345R或E430G)的引入導致增強的CD27促效作用。

【0304】儘管IgG-CD27-A、B和C在引入E430G或E345R後在所有測試濃度下證實增強的CD27促效劑活性，但包含六聚化增強突變的IgG1-CD27-D和E變體在最低抗體濃度下並未表現出增強的促效作用。具有E430G或E345R突變的IgG1-CD27-F變體僅在測試的最高抗體濃度下顯示增強的CD27促效作用。對於變體IgG1-CD27-A到-E，引入E345R突變導致比E430G突變更強的CD27活化。相較於分別具有E430G突變的IgG1-CD27-131A或具有E345R突變的CD27-15，具有E345R突變的抗體IgG1-CD27-A至-E顯示出更高或相似的CD27活化水平。

【0305】*對於IgG1-CD27-B和IgG1-CD27-F的WT抗體在IgG Fc結構域中攜帶F405L突變，其在本實驗的上下文下在功能上無關緊要。

實施例3抗-人類CD27抗體對重組人類、小鼠及石蟹獼猴CD27之結合親和性

【0306】使用無標記生物層干涉測量法在Octet HTX儀器(FortéBio，Portsmouth，UK)測定5種抗人類CD27 IgG1抗體(IgG1-CD27-A、-B、-C、-D及-E)對於重組人類、石蟹獼猴及小鼠CD27蛋白質的結合親和性。使用包含一個CD27特異性Fab臂和非結合Fab臂的雙特異性抗體進行實驗，因此抗體對CD27是單價。這些雙特異性抗體是藉由CD27抗體和非結合抗體之間受控的Fab臂交換產生的(Labrijn AF等人、Nat Protoc. 2014 Oct；9(10):2450-63中所述)。

【0307】為了測定CD27抗體對人類和小鼠CD27的親和性，將100 nM重組His標記之小鼠或人類CD27蛋白質(Sino Biological，Cat # 10039-H08B1 [人類]，Cat # 50110-M08H [小鼠])裝載到預調節抗Penta-HIS(HIS1K)生物感測器(FortéBio，Cat # 18-5120)600秒。

【0308】為了評估CD27抗體對石蟹獼猴CD27的親和性，將5 μg/mL的重組石蟹獼猴CD27-Fc融合蛋白質(R&D系統，Cat # 9904-CD-100)裝載到活化之胺反應性第二代(AR2G)生物感測器(FortéBio，Cat # 18-5092)。

【0309】在樣本稀釋劑(FortéBio，Cat # 18-1104)中進行基線測量300秒後，對在樣本稀釋液中二倍稀釋步驟的0.78至800 nM之抗體濃度系列測定CD27抗體的締合(200

秒)和解離(1,000秒)。使用150 kDa的抗體分子質量進行計算。參考感測器與樣本稀釋劑一起培育。

【0310】使用Data Acquisition Software v11.1.1.19(FortéBio)獲取數據，並使用Data Analysis Software v9.0.0.14(FortéBio)分析。藉由減去參考感測器來校正各抗體的數據軌跡。Y軸與基線的最後10秒對齊，並應用步間校正對齊(Interstep Correction alignment)解離和Savitzky-Golay過濾。當反應為<0.05 nm且計算的平衡接近飽和時(使用50秒的解離時間，Req/Rmax>95%)，數據痕跡被排除在分析之外。數據採用1：1模式進行擬合，使用感興趣窗口將關聯設置為200秒，及將解離時間設置為50秒。解離時間是根據決定係數(R^2)選擇，其為對曲線擬合優度的估計(優先>0.98)、曲線的目視檢查以及締合步驟期間至少5%的訊息衰減。

【0311】可以準確測定具有奈米莫耳範圍之K_D值(表2)的三種CD27抗體(IgG1-CD27-A、-B、-C)對人類CD27的親和性，對於IgG1-CD27-D，及-E，生物層干涉測量法實驗確認與人類CD27的結合具有相似範圍內的親和性，儘管次優化曲線擬合不允許計算正確的K_D值(如表2所示)。

【0312】IgG1-CD27-A及-B也顯示與重組石蟹獼猴CD27的結合，其具有與人類CD27相同範圍的K_D值。用IgG1-CD27-C、-D及-E所獲得的結果也確認以相似範圍內的親和性與石蟹獼猴CD27的結合，儘管次優化曲線擬合不允許計算正確的K_D值(如表2所示)。

【0313】對抗體IgG1-CD27-C僅觀察到與重組小鼠CD27的結合。

表2. IgG1-CD27-A至-E抗體對來自指定物種的CD27之結合親和性。

樣本	載入樣本	K_D (M)	k_{on} (1/Ms)	k_{dis} (1/s)
IgG1-CD27-A	人類 CD27-His	1.3E-07	1.3E+05	1.8E-02
	小鼠 CD27-His	n.b.		
	Cyno CD27-Fc	1.2E-07	1.7E+05	2.0E-02
IgG1-CD27-B	人類 CD27-His	5.4E-08	3.3E+05	1.8E-02
	小鼠 CD27-His	n.b.		
	Cyno CD27-Fc	3.5E-08	6.5E+05	2.3E-02
IgG1-CD27-C	人類 CD27-His	7.0E-08	1.4E+05	9.8E-03
	小鼠 CD27-His	4.3E-07	5.0E+04	2.2E-02
	Cyno CD27-Fc	5.1E-08*	1.2E+05*	6.4E-03*
IgG1-CD27-D	人類 CD27-His	4.5E-08*	1.4+05*	6.4E-03*
	小鼠 CD27-His	n.b.	n.b.	n.b.
	Cyno CD27-Fc	2.1E-08*	2.4E+05*	5.0E-03*
IgG1-CD27-E	人類 CD27-His	4.9E-08*	1.3+05*	6.4E-03*
	小鼠 CD27-His	n.b.	n.b.	n.b.
	Cyno CD27-Fc	3.5E-08*	1.6E+05*	5.5E-03*

*：觀察到結合，但由於次優化曲線擬合，KD、k_{on}和k_{dis}是不太可靠的值，導致使用1:1模式的不可靠解釋。

n.b.:沒有觀察到結合。

實施例4：抗CD27抗體對經細胞表面表現之人類與石蟹獼猴CD27之結合

【0314】使用瞬時轉染的HEK293F細胞和初代T細胞(其內源性表現CD27)藉由流式細胞分析技術分析抗CD27抗體IgG1-CD27-A至-E*和先前技術IgG1-CD27-131A*與經細胞表面表現的人類和石蟹獼猴CD27的結合。非結合對照抗體IgG1-b12-FEAR用作陰性對照抗體。

【0315】根據製造商的說明書，使用293fectin轉染試劑(ThermoFisher，Cat # 12347019)，用編碼全長人類或石蟹獼猴CD27的哺乳動物表現載體pSB瞬時轉染FreeStyle 293-F懸浮細胞(HEK293F；ThermoFisher，Cat #

R79007)。

【0316】根據製造商的說明書，使用淋巴球分離培養基(LSM；Corning，Cat # 25-072CV)，藉由低密度梯度離心，從人類健康捐贈者(Sanquin Blood Bank，Netherlands)或從石蟹獼猴(BPRC，Netherlands，Cat # S-1135)所得之膚色血球層純化人類及石蟹獼猴PBMC。

【0317】將細胞接種在96孔盤(每孔100,000個細胞；Greiner Bio-one，Cat # 650180)中進行連續培育，中間使用FACS緩衝液進行洗滌步驟，該緩衝液由PBS(Lonza，Cat # BE17-517Q)+1% BSA(Roche，Cat # 10735086001)+0.02%疊氮化鈉(Bio-World，Cat # 41920044-3)。應用以下培育：抗體濃度系列(0.0001至10 μg/mL最終濃度)在4℃下30 min；活/死標記FVS510(BD，Cat # 564406，在PBS中以1：1,000稀釋)在RT下20 min；PE標記之多株山羊抗人類IgG(Jackson Immuno Research，Cat # 109-116-098，以1：500稀釋)在4℃下30 min；和用於T細胞鑑定的抗CD3抗體(抗人類CD3：BD，Cat # 555335，以1：10稀釋；抗cyno CD3：Miltenyi，Cat # 130-091-998，以1：10稀釋)在4℃下30 min。所有樣本均在FACSCelesta流式細胞儀(BD)和FlowJo軟體上分析。使用GraphPad Prism處理和視覺化數據。

【0318】所有測試的抗體均顯示與人類CD27的劑量依賴性結合，包括人類T細胞和經轉染的HEK293F細胞(圖2A、B)。相較於IgG1-CD27-A和IgG1-CD27-131A的中間結

合，及IgG1-CD27-D及IgG1-CD27-E的低結合，觀察到IgG1-CD27-B和IgG1-CD27-C最高的最大結合，使用人類T細胞時差異最為明顯。對於與石蟹獼猴CD27 T細胞結合，觀察到IgG1-CD27-B最高結合，其次是Ig1-CD27-131A及IgG1-CD27-A。對於IgG1-CD27-D及-E觀察到較低結合，而IgG1-CD27-C顯示與石蟹獼猴T細胞的結合最小。所有CD27抗體都顯示與用石蟹獼猴CD27轉染的HEK細胞的劑量依賴性結合。對於IgG1-CD27-B及IgG1-CD27-131-A觀察到最高的最大結合，對於IgG1-CD27-A、-D及-E觀察到稍低的結合。IgG1-CD27-C顯示與用石蟹獼猴CD27轉染的HEK細胞的結合最低(圖2C，D)。

【0319】總之，IgG1-CD27-A和IgG1-CD27-B顯示與在人類或石蟹獼猴T細胞上內源性表現之人類和石蟹獼猴CD27的劑量依賴性結合，並在經轉染的HEK細胞中瞬時表現。IgG1-CD27-A和IgG-CD27-131A顯示與人類T細胞相當的結合，而IgG1-CD27-B顯示更高的最大結合。

【0320】*N.B. IgG1-CD27-A、-B、-C、-D及-E在IgG Fc結構域中攜帶突變F405L-L234F-L235E-D265A，其在本實驗的上下文中在功能上無關。IgG1-CD27-131A在IgG1 Fc結構域中攜帶功能無關的F405L突變。

實施例5：抗CD27抗體對天然人類CD27-A59T變體之結合

【0321】大約19%的人類族群表現天然CD27變體，在細胞外結構域(SEQ ID NO. 2)中帶有A59T突變。藉由流式

細胞分析技術測試抗CD27抗體IgG1-CD27-A、IgG1-CD27-B、IgG1-CD27-C*和基準IgG1-CD27-131A與人類CD27-A59T的結合。非結合抗體IgG1-b12-FEAL用作陰性對照抗體。表現人類CD27-A59T的瞬時轉染的HEK293F細胞(每孔15,000個細胞)與濃度系列(0.0001-10 μg/mL，使用10倍稀釋步驟)的一次測試抗體IgG1-CD27-A至-C、非結合對照抗體IgG1-b12(ctrl)、以及先前技術基準IgG-CD27-131A(其先前被描述為與CD27-A59T(WO2018/058022)結合)一起培育。培育後，用多株山羊抗人類IgG對抗體PE標記。在FACSCelesta流式細胞儀(BD)和FlowJo軟體上分析結合。使用GraphPad Prism v.8處理和視覺化數據。

【0322】測試的抗CD27抗體IgG1-CD27-A、IgG1-CD27-B、IgG1-CD27-C，及IgG1-CD27-131A顯示與經CD27-A59T轉染的HEK293F細胞(在不同抗體之間具有相似的結合曲線)的劑量依賴性結合(圖3)。

【0323】*N.B. IgG1-CD27-A、-B和-C在IgG Fc結構域中攜帶突變F405L-L234F-L235E-D265A，其在本實驗的上下文中在功能上無關。IgG1-CD27-131A在IgG1 Fc結構域中攜帶功能無關的F405L突變。

實施例6：抗CD27抗體對人類T細胞增殖之誘導

【0324】由於在引入E345R或E430G突變後通過Fc-Fc相互作用增強之IgG六聚化增強抗CD27抗體的CD27促效劑活性(實施例2)，在活體外測試攜帶E430G或E345R突變以

增加TCR活化之T細胞增殖的之IgG1-CD27-A、IgG1-CD27-B，及IgG1-CD27-C抗體變體之能力。

【0325】此外，據報導降低與C1q和FcγR(G237A或P329R)結合或增強與C1q結合(K326A/E333A雙突變)的Fc突變被引入以測試其對攜帶E345R或E430G突變之CD27抗體的CD27促效劑活性的潛在影響。K326A/E333A雙突變先前顯示增強C1q結合及有助於增強包含Fc-Fc相互作用增強突變的DR5特異性人源化IgG1抗體的促效性活性(WO2018/146317A1)。除E430G或E345R外，亦向IgG1-CD27-A、IgG1-CD27-B和IgG1-C引入突變G237A、P329R、或K326A/E333A(表3)，並使用從健康捐贈者(Sanquin血庫，Netherlands)所獲得的人類PBMC測定其對T細胞增殖的影響。

表3. 抗體IgG1-CD27-A、IgG1-CD27-B或IgG1-CD27-C的Fc結構域突變及其生物學效應

Fc突變	E430G	E345R	P329R	G237A	K326/E333A
所述之功效	增強之六聚化	增強之六聚化	降低之C1q/FcγR結合	降低之C1q/FcγR結合	增強之C1q結合
抗體*					
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中的X係指IgG1-CD27選殖株IgG1-CD27-A、IgG1-CD27-B或IgG1-CD27-C。

【0326】根據製造商的說明書，PBMC以5x10^{6}個細胞

/mL的密度再懸浮於PBS中，並使用CellTrace CFSE細胞增殖套組(Invitrogen，Cat # C34564；1：10,000)用CFSE標記。在37℃/5% CO_2，將經CFSE標記之PBMC(100,000個細胞/孔)在96孔圓底盤(Greiner Bio-one，Cat # 650180)中與0.1 μg/mL抗CD3抗體選殖株UCHT1(Stemcell Technologies，Cat # 60011)培育以在補充有5%正常人類血清(NHS；Sanquin、Product # B0625)的T細胞活化培養基(ATCC，Cat # 80528190)中活化T細胞和CD27抗體(1 μg/mL最終濃度)96 h。為了藉由流式細胞分析技術鑑定$CD4^+$及$CD8^+$T細胞亞群中的活細胞，細胞依次與活/死標記物FVS510(1：1,000)在RT下培育20 min，及淋巴球標記物之染色混合物(APC-eFluor780-標記之抗-人類CD4抗體(Invitrogen，Cat # 47-0048-42、1：50)、AlexaFluor700-標記之抗-人類CD8a抗體(BioLegend，Cat # 301028；1：100)、PE-Cy7-標記之小鼠抗-人類CD14抗體(BD Biosciences，Cat # 557742；1：50)及BV785-標記之抗-人類CD19抗體(BioLegend，Cat # 363028；1：50))在黑暗中4℃培育30 min。在FACSCelesta(BD Biosciences)流式細胞儀上測量樣本，並使用FlowJo 10軟體作為T細胞增殖的讀數分析活$CD4^+$和$CD8^+$T細胞亞群($FVS510^-CD14^-CD19^-CD4^+$及$FVS510^-CD14^-CD19^-CD8^+$)中的CFSE稀釋峰。T細胞增殖表示為增殖細胞的百分比或使用FlowJo軟體(版本10)所計算的分裂指數(分裂指數)。藉由對經過CFSE稀釋度($CFSE^{低峰}$)的細胞管制來測定增殖(分裂)細胞的百分比。

分裂指數是細胞經歷的平均分裂數。使用GraphPad Prism版本8生成熱圖。使用來自四個不同健康捐贈者的PBMC進行增殖檢定。

【0327】在所測試的四個捐贈者中的二個，相較於對照抗體，攜帶E430G或E345R突變的IgG1-CD27-A、-B和-C變體誘導$CD8^+$T細胞增殖的小幅增加。將額外的突變(P329R、G237A或K326A/E333A)引入攜帶E430G突變的IgG1-CD27-A、-B或-C變體顯示對四個PBMC捐贈者的$CD8^+$T細胞增殖的不同影響。相比之下，將P329R突變引入到攜帶E345R突變的IgG1-CD27-A和IgG1-CD27-C變體持續增加其增強活化之$CD8^+$T細胞增殖的能力。這特別適用於IgG1-CD27-A：而測量的$CD8^+$T細胞增殖與各捐贈者中的IgG-CD27-A-E345R、IgG1-CD27-B-E345R及IgG1-CD27-C-E345R相當，相較於IgG1-CD27-B-E345R或IgG1-CD27-C-E345R，引入額外的P329R突變始終導致選殖株IgG1-CD27-A-E345R的$CD8^+$T細胞增殖較高的增加。因此，E345R突變與P329R突變組合對TCR活化之$CD8^+$T細胞增殖對選殖株IgG1-CD27-A的影響始終比對IgG1-CD27-B和IgG1-CD27-C大。在所有測試的抗體變體中，IgG1-CD27-A-E345R-P329R在所有捐贈者中誘導$CD8^+$T細胞增殖的最大增加(圖4A)。

【0328】相較於包含單突變E345R的抗體，將G237A或K326A-E333A突變添加到攜帶E345R突變的CD27抗體變體不會或僅最低限度地增加任何測試選殖株中$CD8^+$T細胞

的增殖(圖4A)。

【0329】同樣在$CD4^+$T細胞中，在IgG1-CD27-A-E345R-P329R存在下，觀察到T細胞增殖的最高和最一致的增加(圖4B)。儘管僅攜帶E430G或E345R突變的IgG1-CD27-A、-B及-C變體之間的$CD4^+$T細胞增殖通常相當，但相較於攜帶E430G或E345R突變之IgG1-CD27-A-E430G或IgG1-CD27-B或-C變體，引入額外的P329R突變導致攜帶E345R變體之IgG1-CD27-A變體於$CD4^+$T細胞增殖更大的增加。在所測試的四分之三的捐贈者中觀察到這種影響。在捐贈者1中，除了E430G或E345R之外的額外突變對$CD4^+$T細胞增殖的影響通常很小，並且在此捐贈者中觀察到的影響不會在其他三個捐贈者中重現。

【0330】E345R與P329R突變的組合也持續增加IgG1-CD27-C的$CD4^+$T細胞增殖，儘管單獨的E345R突變與E345R和P329R的組合之間的差異對選殖株IgG1-CD27-C比對選殖株-A更小。對於選殖株IgG1-CD27-B，在四個捐贈者中的二個中，相較於IgG1-CD27-B-E345R，IgG1-CD27-B-E345R-P329R觀察到$CD4^+$T細胞增殖適度增加。

【0331】將P329R、G327A或K326A/E333A突變引入攜帶E430G突變的IgG1-CD27-A、-B、或-C變體不會或不會始終地誘導對$CD4^+$T細胞增殖的影響。同樣地，在攜帶E345R突變的IgG1-CD27-A、-B或-C變體中引入G327A或K326A/E333A後，未觀察到效果或效果不一致。

【0332】總之IgG1-CD27-A-E345R-P329R始終誘導活

化之CD8+和CD4+T細胞增殖的最高增加，證實IgG1-CD27-A-E345R-P329R誘導最有效的CD27促效作用。相較於無P329R突變的DR5特異性六聚化增強抗體，具有P329R突變的DR5特異性六聚化增強抗體先前顯示誘導DR5促效作用的能力降低(Overdijk等人，Mol Canc Ther 2020)。因此，令人驚訝的是，在IgG1-CD27-A中除了E345R突變外引入P329R突變增強CD27促效劑活性。再者，尚不清楚為什麼E345R+P329R突變的組合對IgG1-CD27-A的影響始終大於對IgG1-CD27-B或IgG1-CD27-C的影響。

實施例7：抗CD27抗體IgG1-CD27-A-P329R-E345R對人類T細胞增殖的誘導

【0333】IgG1-CD27-A-P329R-E345R增加TCR刺激之人類CD4+和CD8+T細胞增殖的能力使用人類健康捐贈者PBMC在CSFE稀釋檢定中分析，並與先前技術抗CD27選殖株IgG1-CD27-131A*、IgG1-CD27-CDX1127，及IgG1-CD27-BMS986215*比較。T細胞增殖測定如實施例6中所述進行，有微小偏差(75,000個細胞/孔；濃度範圍0.002-10 μg/mL)。使用沒有抗CD3刺激的T細胞的樣本被包括在內，以測試在沒有T細胞受體活化存在下抗體的潛在CD27促效劑活性(圖5A和5B)。這種活性是不需要，因為如果抗體能夠誘導靜息T細胞的增殖，會帶來安全風險。

【0334】計算增殖的T細胞百分比(圖5A、B、C、D)為具有降低之CFSE螢光的細胞百分比，使用FlowJo軟體

指示細胞分裂。擴增指數(圖5E和5F)辨識孔中細胞的倍數增加，並使用FlowJo版本10中的增殖建模工具計算。必要時對峰進行手動調整，以更一致地定義存在的峰數量。

【0335】本發明的CD27抗體和此處測試的先前技術抗體無一誘導未經刺激之T細胞(即，在CD3交聯不存在下)增殖(圖5A和B)。

【0336】大多數CD27抗體在所測試的最高抗體濃度下誘導活化之$CD4^+$和$CD8^+$T細胞的一些增殖(圖5C和D)。基於此，計算擴增指數(圖5E和F)。相較於先前技術抗CD27選殖株IgG1-CD27-131A、IgG1-CD27-CDX1127及IgG1-CD27-BMS986215，本發明的抗體IgG1-CD27-A-P329R-E345R在活體外更顯著地增強$CD4^+$和$CD8^+$T細胞的增殖。

【0337】*對於IgG1-CD27-131A及IgG1-CD27-BMS986215，使用攜帶F405L突變(其在本實驗的上下文中在功能上無關)的變體。

實施例8：C1q與膜結合之CD27抗體的結合

【0338】先前描述P329R突變降低IgG1抗體與C1q和FcγR的相互作用(Overdijk等人，Molecular Cancer Therapeutics 2020)。P329R突變對包含E345R突變的IgG1-CD27-A的C1q結合的影響在活體外使用人類健康捐贈者T細胞在細胞C1q結合檢定中測試。抗HIV gp120抗體IgG1-b12-F405L用作為非結合同型對照抗體(ctrl)。T細胞使用

RosetteSep人類T細胞富集混合物(Stemcell，Cat # 15061)從人類健康捐贈者PBMC富集，並再懸浮於培養基(RPMI 1640[Gibco，Cat # A10491至01]，補充0.1% BSA及1% Pen/Strep[Lonza，Cat # DE17-603E])。T細胞(2x10^6個細胞/孔)在聚苯乙烯96孔圓底盤中與抗體稀釋系列(從15 μg/mL最終檢定濃度開始的8x5倍稀釋)在37℃下預培育15 min以允許抗體與T細胞結合。然後，將細胞在冰上冷卻，補充NHS作為人類C1q的來源(20% NHS最終檢定濃度)並在冰上培育45 min。隨後將細胞與FITC標記之兔抗人類C1q抗體(DAKO，Cat # F0254；20 μg/mL)在冰上培育30 min，然後用TO-PRO-3(ThermoFisher，Cat # T3605；1：5,000稀釋)再懸浮於FACS緩衝液。藉由流式細胞分析技術測量活細胞上的FITC訊息來測定C1q結合。

【0339】膜結合之WT IgG1-CD27-A抗體未顯示C1q結合(圖6)。引入六聚化增強突變E430G或E345R(IgG1-CD27-A-E430G及IgG1-CD27-A-E345R)導致C1q與T細胞表面的CD27抗體結合，這與六聚體C1q蛋白質對細胞表面之六聚體抗體環結構的增加結合強結合性一致(圖6)。引入P329R突變在IgG1-CD27-A-E345R(IgG1-CD27-A-P329R-E345R)導致C1q結合喪失(圖6)，證實IgG1-CD27-A-P329R-E345R無法結合C1q。

【0340】這些數據顯示IgG1-CD27-A-P329R-E345R在與T細胞之細胞表面的CD27結合後不能結合C1q。這指示C1q結合對IgG1-CD27-A-P329R-E345R的抗體誘導的CD27

促效劑活性沒有貢獻。這與之前針對其他六聚化增強的促效性抗體所描述的形成對比。再者，缺乏C1q結合指示IgG1-CD27-A-P329R-E345R無法活化補體活化之經典路徑。因此，不預期IgG1-CD27-A-P329R-E345R誘導T細胞上的補體活化和CDC(這些活性是不需要)。

實施例9：抗CD27抗體與人類Fc受體的結合

【0341】使用Biacore表面電漿子共振(SPR)系統分析IgG1-CD27-A-P329R-E345R與人類FcγR變體的結合，並與抗HIV gp120抗體IgG1-b12(ctrl)比較。根據製造商的說明書，BiacoreS系列S感測器晶片CM5(Cytiva，Cat # 29104988)使用胺偶合和His捕捉套組(Cytiva，Cat # BR100050及Cat # 29234602)以抗His抗體共價塗佈。接著，在HBS-P+(Cytiva，Cat # BR100827)中之125 nM Fcγ-受體FcγRIa、FcγRIIa(167-His[H]及167-Arg[R])、FcγRIIb或FcγRIIIa(176-Phe[F]及176-Val[V])(Sino Biological，Cat # 10256-H08S-B，Cat # 10374-H27H，Cat # 10374-H27H1-B，Cat # 10259-H27H-B，Cat # 10389-H27H-B及Cat # 10389-H27H1-B)被捕捉到表面上。緩衝液三個循環後，使用0至3,000 nM(對於FcγRI)及0至10,000 nM(對於其他FcγR)之抗體範圍，將抗體樣本注射到36個循環以產生結合曲線。在FcR塗佈之表面(活性表面)上分析的各樣本也在沒有FcR的平行流通池(參考表面)(用於背景校正)上進行分析。藉由使用10 mM甘胺酸-HCl pH1.5(Cytiva，Cat #

BR100354)表面再生來進行從抗His塗佈之表面解離。使用Biacore Insight Evaluation軟體(Cytiva)產生傳感圖，並應用四參數邏輯(4PL)擬合來計算IgG1-CD27-A-P329R-E345R與參考樣本(ctrl)的相對結合。

【0342】相較於ctrl抗體，IgG1-CD27-A-P329R-E345R與高親和性受體FcγRIa的結合大大降低，儘管在較高抗體濃度下觀察到一些結合(圖7A)。IgG1-CD27-A-P329R-E345R不與人類低親和性受體FcγRIIa(圖7B和C)、FcγRIIb(圖7D)和FcγRIIIa(圖7E和F)結合。

【0343】總之，IgG1-CD27A-P329R-E345R顯示與人類IgG Fc受體的結合極少(FcγRIa)或沒有結合(FcγRIIa、FcγRIIb，及FcγRIIIa)。

實施例10：抗CD27抗體IgG1-CD27-A-E345R-P329R與人類T細胞的結合

【0344】使用流式細胞分析技術更詳細地特徵化IgG1-CD27-A-P329R-E345R與人類健康捐贈者T細胞上CD27的結合。抗HIV gp120抗體變體IgG1-b12-P329R-E345R用作為非結合對照抗體(ctrl)。人類PBMC是從人類健康捐贈者所獲得的膚色血球層中單離出來。將FACS緩衝液中的PBMC($1x10^5$個細胞/孔)添加到聚苯乙烯96孔圓底盤(Greiner bio-one，Cat # 650101)中，並在4℃下以300xg離心3 min進行沉澱。將細胞再懸浮在FACS緩衝液中的50 μL/孔系列抗體稀釋液中(3倍稀釋步驟範圍為0.0015至10

μg/mL)，並在4℃下培育30 min。將細胞沉澱，用FACS緩衝液洗滌二次，並在50 μL/孔中與FITC共軛之二次抗體(FITC AffiniPure F(ab')$_2$片段山羊抗-人類IgG、F(ab')$_2$片段特異性，Jackson ImmunoResearch，Cat # 109-096-097，1：100稀釋)在黑暗中4℃培育30 min。再次沉澱細胞，用FACS緩衝液洗滌二次，並在50 μL/孔的淋巴球標記物染色混合物中於黑暗中4℃培育30 min，其中包含BV711-標記之抗-人類CD19抗體(BioLegend，Cat#302246，1：50)、AlexaFluor700-標記之抗-人類CD8a抗體(BioLegend，Cat#301028，1：100)、APC-eFluor780-標記之抗-人類CD4抗體(Invitrogen，Cat#47-0048-42，1：50)、PE-CF594-標記之小鼠抗-人類CD56抗體(BDBiosciences，Cat#564849，1：100)、PE-Cy7-標記之小鼠抗-人類CD14抗體(BDBiosciences，Cat#557742，1：50)及eFluor450-標記之抗-人類CD3抗體(Invitrogen，Cat # 48-0037-42，1：200)。再次沉澱細胞，使用FACS緩衝液洗滌二次，並再懸浮於含有死細胞標記物7-胺基-放線菌素D(7-AAD；BD Biosciences，Cat # 51-68981E，1：240稀釋)的80μL FACS緩衝液中。在LSRFortessa(BD)流式細胞儀上藉由流式細胞分析技術測量樣本，並使用FlowJo軟體分析。使用GraphPad Prism 8軟體使用非線性回歸(具有可變斜率的S形劑量反應)分析結合曲線。

【0345】抗CD27抗體IgG1-CD27-A-P329R-E345R顯示與健康捐贈者T細胞的劑量依賴性結合，對$CD4^+$和$CD8^+$T

細胞具有相似的結合特徵(圖8)。

實施例11：藉由抗CD27抗體IgG1-CD27-A-P329R-E345R之CD27細胞傳訊的非FcγR依賴性誘導

【0346】獨立於二級FcγR媒介之交聯，可誘導CD27傳訊之CD27特異性單株抗體，在沒有FcγR陽性細胞存在下可為免疫刺激性，這在攜帶FcγR之細胞頻率低的腫瘤中具有優勢。

【0347】在存在或不存在攜帶FcγR之細胞下測試IgG1-CD27-A-P329R-E345R的CD27促效劑活性，並與相應的WT抗體IgG1-CD27-A和先前技術抗體IgG1-CD27-131A*、IgG1-CD27-CDX1127，及IgG1-CD27-BMS986215*比較。非結合抗體IgG1-b12-P329R-E345R用作為陰性對照(ctrl)。基本上如實施例2中所述進行CD27受體檢定，除了在當前實施例中，Thaw-and-Use GloResponse NFκB-luc2/CD27 Jurkat細胞在存在可協助膜結合抗體之FcγR-媒介之交聯的人類FcyRIIb-表現之細胞下培養。

【0348】將Thaw-and-Use效應子FcγRIIb CHO-K1細胞(Promega，Cat # JA2251)種在96孔平底盤(PerkinElmer，Cat # 0815)中，未稀釋或三個遞增稀釋度(1/3、1/9、1/27)並在37℃/5% CO_2下培育過夜。貼壁FcyRIIb-表現之細胞的上清液被在Bio-Glo螢光素酶檢定緩衝液中固定細胞濃度的Thaw-and-Use NFκB-luc2/CD27 Jurkat細胞懸浮液替換(對於未稀釋FcγRIIb CHO-K1細胞從1：1之NFκB-

luc2/CD27 Jurkat：FcγRIIb CHO-K1比例開始)，包含連續稀釋的抗體(最終濃度範圍0.0002至10 μg/mL)。在37℃/5% CO_2下培育6 h後，將盤平衡至RT及測量生物發光並如實施例2中所述以RLU表示。

【0349】IgG1-CD27-A-P329R-E345R誘導劑量依賴性CD27活化，這與FcγRIIb-表現之細胞無關(圖9A)。相較之下，相應的WT抗體IgG1-CD27-A(沒有E345R六聚化增強突變和P329R突變)僅在存在FcγRIIb-表現之細胞下顯示CD27促效作用(圖9A至E)。同樣地，先前技術抗體IgG1-CD27-131A、IgG1-CD27-CDX1127及IgG1-CD27-BMS986215對CD27的活化也取決於FcγRIIb-表現之細胞的存在，並隨著NFκB-luc2/CD27 Jurkat：FcγRIIb CHO-K1比例的減少而逐漸減少(圖9F至J)。

【0350】總之，這些數據指出IgG1-CD27-A-P329R-E345R可以獨立於二級FcγR-媒介之交聯誘導CD27促效作用。這與先前技術抗CD27抗體相反，其依賴於攜帶FcγR的細胞的存在來誘導CD27促效作用。

【0351】*對於IgG1-CD27-131A及IgG1-CD27-BMS986215，使用攜帶F405L突變(其在本實驗的上下文中在功能上無關)的變體。

實施例12：在小鼠中研究，在不存在標靶結合下，抗CD27抗體IgG1-CD27-A-P329R-E345R的藥物動力學(PK)分析，

【0352】在不存在標靶結合下，在小鼠中分析抗CD27抗體IgG1-CD27-A-P329R-E345R*的藥物動力學特徵，並與相應的WT抗體IgG1-CD27-A*比較。IgG1-CD27-A不與小鼠CD27結合(實施例3，表2)，因此該實驗之設計是在測試在不存在標靶結合下，IgG1-CD27-A及IgG1-CD27-A-P329R-E345R在活體內的藥物動力學行為，根據批准的IACUC協議和Crown Bioscience, Inc標準操作程序，該研究由合格人類員由Crown Bioscience(中國)進行。11至12週齡雌性SCID小鼠(C.B-17、Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.(VR，Beijing，China；每組3隻小鼠)靜脈注射200 μL注射體積中之500 μg抗體(25 mg/kg)。在抗體投予後10 min、4 h、1d、2d、7d、14d和21d收集40 μL血液樣本，從血液樣本中收集血漿並儲存在-80℃直至藉由ELISA測定總人類IgG濃度。96孔ELISA盤(Greiner，Cat # 655092)在4℃與2 μg/mL抗人類IgG(Sanquin，Netherlands，Article # M9105，Lot# 8000260395)塗佈過夜，以及隨後用PBSA(補充有0.2%牛血清白蛋白[BSA，Roche，Cat # 10735086001]的PBS)阻斷1 h。接著，在其間進行洗滌步驟，將抗人類IgG塗佈之盤在盤振盪器上與在ELISA緩衝液(補充0.05% Tween 20之PBSA [Sigma-Aldrich，Cat # P1379])中連續稀釋的血漿樣本及多株過氧化酶共軛之山羊抗人類IgG二次抗體(Jackson，Cat # 109-035-098))，最後是2,2'-次偶氮基-雙(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS；Roche，Cat #

11112422001)在RT下依序培育1小時。藉由添加2%草酸(Riedel de Haen，Cat # 33506)終止反應。用於注射的各種材料的稀釋系列用於產生參考曲線。在EL808微量滴定盤讀數器(BioSPX)中測量405 nm的吸光度，並繪製總人類IgG濃度(以μg/mL為單位)。

【0353】如在小鼠靜脈內注射後在不同時間點測量血漿IgG水平所測定，IgG1-CD27-A-P329R-E345R與對應的WT抗體IgG1-CD27-A的PK概況之間沒有實質性差異(圖10)。

【0354】儘管相較於小鼠中人類IgG1的預測，IgG1-CD27-A-P329R-E345R及其WT對應物(IgG1-CD27-A)在初始(分佈)階段觀察到更陡峭的下降，但二種抗體的最終消除是與基於2室模式的人類野生型IgG1的預測率一致(Bleeker WK，Teeling JL，、Hack CE. Blood. 2001 Nov 15；98(10):3136-42)。

【0355】總之，這證實在不存在標靶結合下，引入P329R和E345R突變不會影響IgG1-CD27-A的藥物動力學特性。

【0356】N.B.在此實施例描述之實驗使用攜帶F405L突變(其在本實驗的上下文中在功能上無關)之IgG1-CD27-A及IgG1-CD27-A-P329R-E345R的變體。

實施例13：藉由抗CD27抗體IgG1-CD27-A-P329R-E345R對抗體依賴性細胞吞噬作用的誘導

【0357】抗體依賴性細胞細胞毒殺(ADCC)主要通過NK細胞上表現的FcγRIIIa媒介，而抗體依賴性細胞吞噬作用(ADCP)可藉由單核球、巨噬細胞、嗜中性球和樹突細胞通過FcγRI、FcγRIIa、及FcγRIII媒介(Hayes, J.M等人2016)。為了解抗CD27抗體IgG1-CD27-A-P329R-E345R與FcγRIa的殘留結合(實施例9)對FcγRIa-表現之免疫細胞的效應子功能的影響，使用CTV-標記之$CD27^+$Burkitt氏淋巴瘤Daudi細胞作為標靶細胞及人類單核球衍生之巨噬細胞(hMDM)作為效應子細胞(E：T=2：1)，在活體外分析IgG1-CD27-A-P329R-E345R誘導ADCP之能力。

【0358】根據製造商的說明書，使用CD14微珠(Miltenyi Biotec，cat. No. 130-050-201)藉由陽性選擇從PBMC中單離hMDM。將PBMC離心(1,200RPM，5 min，RT)並以1.25×10^7 PBMC/mL的密度再懸浮於冰冷的單核球單離緩衝液(PBS，0.5% BSA，2 mM EDTA)中。每80 μL之PBMC懸浮液添加20 μL CD14微珠，並在4℃下在滾動試驗檯(rollerbank)上攪拌培育15 min。加入30 mL冰冷的單核球單離緩衝液，PBMC/CD14微珠混合物離心(300×g，10 min，4℃)並再懸浮於6 mL冰冷的單核球單離緩衝液中。LS管柱(Miltenyi Biotec，cat. no. 130-042-401)用3 mL冰冷的單核球單離緩衝液沖洗，且每根管柱裝載3 mL PBMC/CD14微珠混合物。在$CD14^-$細胞流過並在冰冷的單核球單離緩衝液中洗滌3次管柱後，使用柱塞將$CD14^+$單核球回收到3 mL的冰冷單核球單離緩衝液。使用ViaStain™

Viability Dye吖啶橙/碘化丙啶(propidium iodide)(AOPI；Nexcelom Bioscience，cat. no. CS2-0106)在Cellometer Auto 2000 Cell Viability Counter(Nexcelom Bioscience)上計數$CD14^+$細胞，並以0.8×10^6個細胞/mL的密度再懸浮於Celgene® GMP DC培養基(CellGenix，cat. no. 20801-0500)(補充有巨噬細胞聚落刺激因子(M-CSF；Gibco，cat. no. PH9501；50 ng/mL最終濃度)及在帶有UpCell™表面之100 mm^2 Nunc™培養皿中之3 mL的單核球懸浮液(即，2.4×10^6個單核球)，其允許藉由將盤留在RT下收穫細胞(Thermo Fisher Scientific，cat. no. 174902)。培育三天後，將包含5×M-CSF的2 mL新鮮培養基添加到盤中。培育7天(37℃，5% CO_2)後，藉由將盤在RT下放置1至1.5 h，使巨噬細胞從表面分離。分離的巨噬細胞藉由離心沉澱，使用AOPI計數，並以1×10^6個細胞/mL的密度再懸浮於培養基中(RPMI 1640，含10% DBSI)。

【0359】根據製造商的說明書，使用CellTrace™ Violet細胞增殖套組(Thermo Fisher Scientific，cat. no. C34557)標記人類Burkitt氏淋巴瘤Daudi細胞(ATCC® CCL-213™)。簡言之，在PBS中添加Cell Trace Violet(CTV)至最終濃度為0.2 μM至1×10^6個Daudi細胞/mL，並在37℃的黑暗中培育20 min(15mL培育體積)。添加10 mL DBSI以去活化未結合的染料。藉由離心(300×g，5 min)沉澱細胞，在PBS中洗滌，並用AOPI計數。CTV標記之Daudi細胞以0.5×10^6個細胞/mL的密度再懸浮於培養基中。

【0360】對於ADCP檢定，將hMDM(50,000個細胞/孔)和CTV標記之Daudi細胞(25,000個細胞/孔)在冰上一起接種(E：T=2：1)於96孔盤(最終體積為150 μL培養基)中，並與抗CD27抗體IgG1-CD27-A-P329R-E345R或抗-CD20抗體IgG1-CD20(以10倍稀釋0.000001至10 μg/mL濃度範圍)培育4 h(37℃，5% CO_2)。培育後，加入100 μL人類BD Fc Block™(BD Biosciences，cat. no. 564220；在FACS緩衝液之1：100)並在4℃下培育10 min。藉由離心(300×g，5 min)沉澱細胞，再懸浮於含有PE-Cy7共軛之抗人類CD11b抗體(BioLegend，cat. no. 301322；1：80)和TO-PRO-3(Thermo Fisher Scientific，cat. no. T3605；1：25,000)的FACS緩衝液及在4℃下培育30 min。洗滌細胞，將其再懸浮於FACS緩衝液中，並在FACSymphony™ A3細胞分析儀(BD Biosciences)上收集和分析。使用FlowJo軟體分析數據以測量活標靶細胞數和吞噬性細胞hMDM，並使用GraphPad Prism軟體處理和視覺化。

【0361】根據以下公式計算每種條件下活Daudi細胞的百分比：

%活Daudi細胞=

$$\left(\frac{\text{與測試抗體培育之\% } TO\text{-}PRO\text{-}3^{-}CD11b^{-}CTV^{+}\text{細胞}}{\text{未與抗體培育之\% } TO\text{-}PRO\text{-}3^{-}CD11b^{-}CTV^{+}\text{細胞}}\right)\times 100$$

各條件下吞噬性hMDM的量測定為

% TO-PRO-3^{-}CD11b^{+}CTV^{+}細胞。

【0362】IgG1-CD27-A-P329R-E345R沒有增加吞噬性

hMDM的百分比或降低吞噬作用檢定中活Daudi細胞的百分比，其係使用來自四個不同健康人類捐贈者的hMDM。這證實殘留的1 FcγRIa結合不會導致IgG1-CD27-A-P329R-E345R的FcγRIa-媒介之效應子功能(如圖11所示來自代表性人類健康捐贈者的數據)。如吞噬性hMDM百分比的增加和活Daudi細胞百分比的降低所證實，陽性對照抗體IgG1-CD20有效誘導表現高水平CD20的Daudi細胞的吞噬作用。

【0363】總之，與FcγRIa的殘餘結合不足以誘導CD27$^+$細胞的IgG1-CD27-A-P329R-E345R依賴性ADCP。

實施例14：藉由測量C4d沉積所測定的由抗CD27抗體IgG1-CD27-A-P329R-E345R的液相、標靶非依賴性補體活化

【0364】Fc-Fc相互作用增強的抗體通常以單體IgG1分子存在於溶液中，並在標靶結合後在細胞表面六聚化以在活性Fc區的情況下形成C1q對接位置(Diebolder, C.A等人2014；de Jong, R. N等人，2016)。抗CD27抗體IgG1-CD27-A-P329R-E345R的IgG Fc結構域藉由引入P329R突變而靜默，這導致缺乏與膜結合之IgG1-CD27-A-P329R-E345R的C1q結合(圖6)。為了確認IgG1-CD27-A-P329R-E345R在不存在標靶結合下不能活化溶液中的補體，藉由測定C4d沉積來研究液相、標靶非依賴性補體活化，這被認為是測量經典補體路徑之活化。使用MicroVue™ C4d酶免疫檢定(EIA；Quidel，cat. no. A008)藉由酶聯免疫吸附

檢定(ELISA)分析IgG1-CD27-A-P329R-E345R的液相C4d片段沉積，並根據製造商的程序進行。熱聚集γ球蛋白(HAGG；Complement Activator；Quidel，cat. no. A114)用作為檢定的陽性對照。包括IgG1-b12及IgG1-b12-RGY(WO2014006217A1))作為對照抗體。已描述在IgG1抗體中引入E345R/E430G/S440Y(RGY)Fc突變以誘導溶液中形成六聚體，從而導致液相補體活化(Diebolder, C. A等人，2014；Wang, G., R. N等人，2016；de Jong, R. N等人，2016)。包括IgG1-b12-P329R-E345R為同型對照抗體。

【0365】在磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)中製備抗體稀釋液至1 mg/mL的濃度，HAGG除外，其稀釋至10 mg/mL的濃度。然後，將測試樣本進一步稀釋成在90%(最終濃度)正常人類血清(NHS)(CompTech, Lot. No. 42a)中100 μg/mL(對於單株IgG)或1,000 μg/mL(對於HAGG)之濃度並在37℃下培育1 h。同時，包含「無抗體」樣本(無抗體，90% NHS)和「僅PBS」樣本(無抗體，無NHS)作為陰性對照。接著，將樣本在冷套組提供的補體樣本稀釋液中按1：250稀釋。同時，將塗佈小鼠抗人類C4d抗體的試紙置於96孔盤中，並在第一次洗滌之後，同1-min等待步驟以250至300 μL洗滌緩衝液洗滌檢定孔3次。將測試樣本添加到孔中(100 μL/孔)，且作為陰性對照，僅在ELISA中使用補體樣本稀釋劑(空白)。同時，將套組提供的100 μL標準品(標準品A至E)和內部對照添加到個別的孔中。將盤在RT下培育30 min。然後，如上所述用洗滌緩衝液將盤洗滌5次。

將50 μL之C4d共軛物(過氧化酶共軛之山羊抗人類C4d)添加到孔中，並將盤在RT下培育30 min。如上所述用洗滌緩衝液之5洗滌步驟後，加入100 μL之C4d質[0.7% 2-2'-次偶氮基-二-(3-乙基苯并噻唑啉磺酸二銨鹽]，及再次將盤在RT下培育30 min。最後，添加50 μL套組提供的終止溶液，並在1 h內使用ELISA盤讀取器(EL808 BioSPX，BioTek)在405 nm測量光密度。

【0366】IgG1-CD27-A-P329R-E345R和對照抗體IgG1-b12-P329R-E345R(具有與IgG1-CD27-A-P329R-E345R相同的Fc骨架)在100 μg/mL的測試濃度下未誘導液相C4d沉積；測量的C4d水平與具有野生型Fc結構域(IgG1-b12)和無抗體對照的對照抗體的背景水平相似(圖12)。相較之下，已知在溶液中形成六聚體的陽性對照抗體IgG1-b12-RGY誘導C4d沉積至與HAGG相同的水平。

【0367】這些數據顯示IgG1-CD27-A-P329R-E345R在活體外不誘導標靶非依賴性、液相補體活化。

實施例15：抗CD27抗體IgG1-CD27-A-P329R-E345R與CD70競爭配體結合的能力

【0368】為測定抗CD27抗體IgG1-CD27-A-P329R-E345R是否干擾CD27與其天然配體CD70的相互作用，在存在和不存在過量IgG1-CD27-A-P329R-E345R下，研究飽和濃度的生物素化重組人類CD70細胞外結構域(ECD)與CD27(在人類Burkitt氏淋巴瘤細胞株Daudi上內源性表現)

的結合。

【0369】培養在RPMI 1640培養基(Gibco，cat. no. A10491-01)(補充10%捐贈者含鐵牛血清(DBSI；Gibco，cat. no. 20731-030))中的Daudi細胞(ATCC® CCL-213™)以50,000個細胞/孔種在圓底96孔盤(Greiner Bio One，cat. no. 650261)中。藉由離心(300×g，4℃下3 min)沉澱細胞，並再懸浮於包含抗CD27或對照抗體(50 μg/mL最終濃度)的FACS緩衝液(PBS，1% BSA [Roche，cat. no. 1073508600])。以飽和濃度(6 μg/mL)添加生物素化重組人類CD70 ECD(Abcam，cat. no. ab271443)，並將細胞在4℃下培育30 min。

【0370】將細胞洗滌二次並再懸浮於包含Brilliant Violet(BV)421™標記之鏈球菌親生物素蛋白(BioLegend，cat. no. 405225；0.0025 μg/mL最終濃度)及R藻紅素(PE)標記之多株AffiniPure F(ab')$_2$片段山羊抗人類IgGFc(Jackson ImmunoResearch，cat. no. 109 116098；0.0025 μg/mL最終濃度)的FACS緩衝液中在4℃下30 min。將細胞洗滌二次，再懸浮在包含TO-PRO-3碘化物(Thermo Fisher Scientific，cat. no. T3605；1:25,000)的FACS緩衝液中並分析。在BD FACSymphony™ A3流式細胞儀(BD Biosciences)上收集數據並使用FlowJo軟體進行分析。為了補償，將一滴UltraComp eBeads™補償珠(Life Technologies，cat. no. 01至2222-42)添加到各孔中。加入2 μL的各抗體並將混合物培育20 min。將盤旋轉下來並將珠

子再懸浮在FACS緩衝液中並測量。對於活力補償，將細胞在65℃下處理10 min，並與活細胞1：1混合。將細胞離下來並再懸浮於用FACS緩衝液稀釋的TO-PRO-3中。使用GraphPad Prism處理和視覺化數據。

【0371】IgG1-CD27-A-P329R-E345R或IgG1-CD27-A不阻斷CD70 ECD與$CD27^+$Daudi細胞的結合，因為CD70結合水平相當於與以非結合同型對照抗體IgG1-b12-P329R-E345R或IgG1-b12培育的Daudi細胞、或無抗體的細胞的結合水平(圖13)。此外，先前技術抗CD27抗體IgG1-CD27-BMS986215及IgG1-CD27-131A顯示對CD27與CD70 ECD結合的弱阻斷影響。相較之下，CD70無法在先前技術抗CD27抗體IgG1-CD27-CDX1127(先前被報告阻斷配體結合(Vitale等人，2012))存在下與Daudi細胞上的表面CD27結合(圖13)。

【0372】總之，IgG1-CD27-A-P329R-E345R結合不會藉由在Daudi細胞上其天然配體CD70阻斷CD27的結合。

實施例16：多株刺激的人類PBMC與抗CD27抗體培育後的T細胞活化標誌物表現

【0373】使用從三個不同的健康人類捐贈者獲得的PBMC研究IgG1-CD27-A-P329R-E345R對多株活化T細胞中T細胞活化標誌物表現的影響。在將PBMC與IgG1-CD27-A-P329R-E345R或先前技術抗CD27抗體培育二天和5天後，分析HLA-DR、CD25、CD107a和4-1BB的表現。

【0374】將新鮮單離的75,000個PBMC/孔接種在細胞培養基中，96孔U型底盤(Greiner Bio-One)中。一式二份的孔與抗CD3抗體(UCHT1選殖株；Stemcell；0.1 μg/mL)；以及IgG1-CD27-A-P329R-E345R(以3倍稀釋0.0005至30 μg/mL)；或先前技術抗CD27抗體IgG1-CD27-CDX1127、IgG1-CD27-131A，及IgG1-CD27-BMS986215(30 μg/mL)；或非結合對照抗體IgG1-b12-P329R-E345R(10 μg/mL)同時培育。為了在沒有處理下確定各活化標記物之表現，用單獨的培養基補充具有未處理(無抗-CD3或抗CD27抗體)細胞的一式二份對照孔。為了設置識別活化標記物陽性細胞的閘門，使用螢光減一(FMO)對照。對於FMO對照，實驗中所使用的所有抗體，除了對應於一式二份孔中的活化標記物之抗體外，都添加到來自用抗CD3抗體活化之一名捐贈者的75,000 PBMC/孔。包括來自沒有染色抗體的單孔中各捐贈者的未處理細胞作為陰性對照。為了檢測活細胞，各捐贈者的未處理細胞在單孔中單獨用4′,6-二甲脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染色。

【0375】培育二天或5天(37℃，5% CO_2)後，用FACS緩衝液洗滌盤一次，並再懸浮於FACS緩衝液中的抗體混合物(包含針對T細胞活化標記物4-1BB、CD25、CD107a、人類白血球抗原(HLA)-DR的抗體；和用於在流式細胞分析技術中閘控$CD4^+$和$CD8^+$T細胞亞群的抗體)。在4℃培育30 min後，所有盤用FACS緩衝液洗滌二次，並將細胞再懸浮於FACS緩衝液中。使用FlowJo軟體在BD LSRFortessa細

胞分析儀上分析樣本，以測定CD4+及CD8+T細胞上各T細胞活化標記物之中值螢光強度(MFI)和陽性細胞百分比。抗CD27抗體誘導的T細胞活化標記物表現水平的變化表示為抗CD27抗體樣本相對於非結合對照抗體IgG1-b12-P329R-E345R的MFI倍數變化。使用FlowJo軟體在BD LSRFortessa™細胞分析儀(BD Biosciences)上分析樣本。

【0376】IgG1-CD27-A-P329R-E345R增加活化之CD4+T細胞上CD25、CD107a和4-1BB的表現(圖14A)。這些效果在培育2天後比培育5天後更明顯。在CD8+T細胞上，與IgG1-CD27-A-P329R-E345R培育導致2天和5天培育後HLA-DR、CD107a和4-1BB的表現增加(圖14B)。

【0377】在與三種先前技術抗體培育2天和5天後，亦評估T細胞活化標記物的表現。IgG1-CD27-131A及IgG1-CD27-BMS986215誘導CD4+及CD8+T細胞上HLA-DR、4-1BB、CD25和CD107a表現的相當增加，而以IgG1-CD27-CDX1127培育2或5天對T細胞活化標誌物表現的影響較不明顯。

【0378】總之，多株活化之PBMC與IgG1-CD27-A-P329R-E345R的培育導致在CD4+及CD8+T細胞上之活化標記物HLA-DR、CD25、CD107a和4-1BB的表現增加。

實施例17：在人類CD27-KI小鼠模式中注射抗CD27抗體後OVA蛋白質免疫小鼠中OVA特異性CD8+T細胞的百分比

【0379】藉由流式細胞分析技術分析IgG1-CD27-A-

P329R-E345R處理對脾細胞中hCD27 KI OVA模式中抗原特異性T細胞擴增的影響。

【0380】C57BL/6背景的同合子型人類CD27(hCD27)-KI小鼠(hCD27 KI小鼠)獲自北京Biocytogen Co., Ltd.(品系名稱C57BL/6-Cd27tm1(CD27)/Bcgen, Stock no. 110006)。此品系是與Crown Bioscience的HuGEMM™平台合作開發的，在具有功能性免疫系統的小鼠內特徵為人源化藥物標靶(在本例中為CD27)。在hCD27 KI小鼠中，編碼細胞外結構域的小鼠CD27基因的外顯子1至5被人類CD27外顯子1至5替換。藉由在hCD27-KI小鼠中皮下(s.c.)注射免疫原卵白蛋白(OVA)在活體內誘導OVA特異性T細胞，並藉由以抗體同時靜脈內(i.v.)處理小鼠來測試IgG1-CD27-A-P329R-E345R的促效劑效果。

【0381】在第0天，給小鼠s.c.注射5 mg OVA (InvivoGen，cat. no. vac-pova-100, lot. no. EFP-42-04)，並藉由i.v.注射IgG1-CD27-A-P329R-E345R(30 mg/kg)、IgG1-CD27-CDX1127(30 mg/kg)或IgG1-b12-P329R-E345R (30 mg/kg)到尾部靜脈處理。在第12天和第21天，與第0天一樣，用OVA加強小鼠並用抗體處理。在第10天、第19天和第24天，藉由頰囊或隱靜脈在包含乙二胺四乙酸二鉀的BD Microtainer®血液收集管(K2-EDTA；BD，cat. no. 365974)中收集血液並立即用於進一步分析。第28天，安樂死小鼠並在無菌條件下切除脾臟。

【0382】根據製造商的說明書，將在RPMI1640培養

基(Thermo Fisher Scientific，cat. no. C22400500BT)中切除的脾臟組織轉移到gentleMACs™ C管(Miltenyi Biotec，cat. no. 130-093-237)，並使用gentleMACS™解離器(Miltenyi cat. no. 130-093-235)機械解離成單細胞懸液。解離後，細胞懸浮液藉由70 μm細胞濾過器(Falcon，cat. no. 352350)過濾。接著，藉由在3 mL洗滌緩衝液(無菌PBS [Hyclone，SH0256.01B]，補充4% FBS [Gibco，cat. no. 10099 141])中再懸浮來洗滌樣本二次。在Cellometer Auto T4(Nexcelom Bioscience)上計數細胞，並將細胞數調整為每管2×10^6個脾細胞。

【0383】將2×10^6個脾細胞轉移至FACS管(Falcon，cat. no. 352052)並再懸浮於補充1 μg/mL純化之大鼠抗-小鼠CD16/CD32(小鼠BD Fc Block™，BD Biosciences，cat. no. 553141)的洗滌緩衝液(無菌PBS[Hyclone，SH0256.01B]，補充4% FBS[Gibco，cat. no. 10099 141])。在黑暗中2至8℃預培育10 min後，加10 μL PE-標記之OVA四聚體(MBL Life science，cat. no. TS 5001 1C)，及在進一步在黑暗中2至8℃培育30至60 min之前，輕輕渦旋樣本。不洗滌之下，添加用於T細胞亞群流式細胞分析技術閘控的經標記之抗體和化合物。將樣本輕輕渦旋並在2至8℃下在黑暗中再培育30 min。接著，藉由在2 mL洗滌緩衝液中再懸浮，將樣本洗滌二次，並以300×g離心5 min。最後，將細胞再懸浮於250 μL洗滌緩衝液中，並在BD LSRFortessa™ X-20細胞分析儀(BD Biosciences)上分析。

使用Kaluza分析軟體(Beckman Coulter)處理數據。

【0384】在同時注射OVA蛋白質疫苗的小鼠脾臟中，IgG1-CD27-A-P329R-E345R 增加OVA特異性$CD8^+$T細胞的百分比。在用30 mg/kg IgG1-CD27-CDX1127處理的小鼠中，OVA特異性$CD8^+$T細胞的百分比低於IgG1-CD27-A-P329R-E345R-處理組，且相當於IgG1-b12-P329R-E345R處理組(圖15)。在周邊血液樣本中也進行類似的觀察。

實施例18：從注射抗CD27抗體的OVA免疫小鼠脾臟的OVA特異性$CD8^{+T}$細胞之IFNγ分泌

【0385】將在RPMI1640培養基(見實施例17)中的切除脾臟組織在70 μm細胞濾過器(Falcon，cat. no. 352350)上輕輕搗碎，藉由離心(1,500 rpm、5 min)沉澱，並再懸浮於10 mL銨-氯化物-鉀(ACK)溶解緩衝液(Invitrogen，cat. no. A1049201)。在RT下3至5 min培育後，用10至20 mL PBS洗滌樣本二次，並再懸浮於補充50 U/mL青黴素及50 μg/mL鏈黴素(pen/strep，Gibco，cat. no. 15070-063)之5 mL Cellular Technology Limited(CTL)Test™培養基(ImmunoSpot，cat. no. CTLT-005)中。所收集的脾細胞再次通過70 μm細胞濾過器過濾，並在Vi-CELL™ XR細胞活力分析儀(Beckman Coulter)上計數，以使用包含pen/strep的CTL測試培養基將濃度調整至3.125×10^6個細胞/mL。

【0386】基本上如製造商所述，使用小鼠IFN-γ ELISpotPLUS套組(Mabtech，cat. no. 3321-4HPW-2)分析脾

細胞產生的IFNγ。預塗佈之MultiScreenHTS IP過濾器(MSIP)白色盤(mAb AN18)每孔用200 μL無菌PBS洗滌四次，並用包含pen/strep之200 μL CTL-測試培養基調節(RT，30 min)。去除培養基，及將5×10^5個脾細胞/孔與2 μg/mL $OVA_{257-264}$胜肽SIINFEKL(Invivogen，cat. no. vac-sin)或亂序對照胜肽FILKSINE(SB-PEPTIDE，cat. no. SB073-1MG)在總體積為180 μL/孔，在加濕培養箱(37℃，5% CO_2)中一式二份培養20 h。作為IFNγ產生的陽性對照，將脾細胞與由500 ng/mL肉豆蔻酸乙酸佛波醇酯(PMA)及10 μg/mL離子黴素(ionomycin)(PMA+離子黴素(ionomycin)，Dakewe Biotech，cat. no. DKW ST PI)組成的細胞刺激混合物平行培育。包含不具胜肽的脾細胞培養物作為陰性對照。培育後，除去細胞並用PBS洗滌盤5次。接著，將盤依序與生物素化檢測mAb(R4-6A2；RT、2 h)、鏈球菌親生物素蛋白-山葵過氧化酶(HRP；RT，1 h)、及最後3,3′,5,5′-四甲基聯苯胺(TMB)受質溶液(均由套組提供)培育，中間有5個洗滌步驟。當明顯的斑點出現時，藉由在去離子水中充分洗滌來停止反應。使用spotAID V8軟體(AID)在AID iSpot ELISpot讀取器(Autoimmun Diagnostika[AID]GMBH、ELR08IFL)上計數斑點。使用GraphPad Prism軟體分析ELISpot數據並以條形圖呈現，且呈現為來自每治療組所有小鼠，每孔平均數±SEM(n=5)。

【0387】來自所有IgG1-CD27-A-P329R-E345R-處理

動物組的脾細胞顯示對OVA胜肽處理有反應之IFNγ產生增加，如ELISpot分析所證實(圖16)。用亂序對照胜肽刺激脾細胞不誘導或誘導極少的IFNγ產生，表明IFNγ是由OVA特異性T細胞產生。相較之下，在用30 mg/kg IgG1-CD27-CDX1127處理的小鼠的脾細胞中未觀察到IFNγ產生。

實施例19：在活體內OVA免疫小鼠中，IgG1-CD27-A-P329R-E345R處理對T細胞活化的影響

【0388】藉由分析源自OVA處理的hCD27-KI小鼠的$CD8^+$T細胞上PD-1表現，活體內研究IgG1-CD27-A-P329R-E345R處理對$CD8^+$T細胞活化之影響。如實施例17所述處理小鼠。同樣，藉由FACS獲得和分析脾細胞的方法如實施例17中描述。

【0389】IgG1-CD27-A-P329R-E345R在第28天誘導$CD8^+$T細胞表現活化標記物PD-1之百分比增加。以IgG1-CD27-CDX1127或對照抗體IgG1-b12-P329R-E345R所處理之動物中，$CD8^+PD\text{-}1^+$T細胞百分為低(圖17)。

實施例20：IgG1-CD27-A-P329R-E345R處理對在OVA免疫小鼠中T細胞亞群活體內誘導的影響

【0390】藉由分析OVA處理的hCD27-KI小鼠脾細胞樣本中CD44和CD62L的表現，研究IgG1-CD27-A-P329R-E345R對T細胞亞群擴增的影響。源自IgG1-CD27-A-P329R-E345R-處理、OVA免疫的hCD27-KI小鼠脾臟的記

憶CD8⁺T細胞藉由流式細胞分析技術進行定量。記憶T細胞被分類為效應子記憶(CD44⁺CD62L⁻)和前效應子T細胞(CD44⁻CD62L⁻；Nakajima，Y., K等人2018)。如實施例17所述處理小鼠。同樣，藉由FACS獲得和分析脾細胞的方法如實施例17中描述。

【0391】當相較於以IgG1-b12-P329R-E345R處理的小鼠的脾細胞，IgG1-CD27-A-P329R-E345R(30 mg/kg)在第28天誘導脾臟中前效應子T細胞和效應子記憶CD8⁺T細胞的百分比增加(圖18)。在CD45⁺族群中，IgG1-CD27-A-P329R-E345R誘導前效應子T細胞和效應子記憶T細胞百分比高於IgG1-CD27-CDX1127(30 mg/kg)，而這些T細胞族群之相當平均百分比是由脾細胞之CD8⁺部分中的二種抗CD27抗體誘導。

實施例21：IgG1-CD27-A-P329R-E345R處理對OVA免疫小鼠中T細胞活體內擴增的影響

【0392】IgG1-CD27-A-P329R-E345R對T細胞擴增的影響藉由分析來自OVA處理的hCD27-KI小鼠的脾細胞和血液樣本中CD3的表現來研究。如實施例17所述處理小鼠。藉由流式細胞分析技術獲得和分析脾細胞和血液樣本的方法如實施例17中描述。

【0393】相較於以非結合對照抗體IgG1-b12-P329R-E345R處理，以30 mg/kg IgG1-CD27-A-P329R-E345R處理OVA免疫的hCD27-KI小鼠沒有增加脾臟中CD3⁺T細胞的百

分比(圖19)。相較之下，以基準抗體IgG1-CD27-CDX1127(30 mg/kg)處理導致脾臟中$CD3^+$T細胞減少。在周邊血液樣本中進行類似的觀察。

實施例22：在抗原特異性研究中，IgG1-CD27-A-P329R-E345R對T細胞細胞介素產生的影響

【0394】使用已被其同源抗原刺激的T細胞研究IgG1-CD27-A-P329R-E345R增加細胞介素產生的能力。根據製造商的說明書，藉由Ficoll-Paque密度梯度分離(GE Healthcare，cat. no. 17 1440 03)從健康人類捐贈者所獲得的膚色血球層中單離PBMC。

【0395】人類磁性CD14和CD8微珠(Miltenyi Biotec，分別為cat. no. 130 050 201及130 045 201)用於從人類PBMC中陽性選擇$CD14^+$單核球和陰性選擇$CD14^-$PBL，以及從冷凍PBL陽性選擇$CD8^+$T細胞。將細胞懸浮液離心並以每80 μL MACS緩衝液1×10^7活細胞再懸浮於磁性活化細胞分選(MACS)緩衝液(具5mM EDTA、1%人類白蛋白之Dulbecco氏磷酸鹽緩衝溶液[DPBS])中。每1×10^7個細胞，添加12 μL CD14或CD8微珠。隨後的MACS分離使用自動磁性細胞分離儀器或藉由手動分離進行。根據製造商的說明書，使用autoMACS® Pro Separator(Miltenyi Biotec)進行自動MACS分離。將洗提的$CD14^+$單核球和$CD8^+$T細胞離心(RT下8 min，300×g)，再懸浮於X-VIVO 15培養基(Lonza)中，並以赤蘚紅B溶液計數以供進一步使用；即，

單核球分化為iDC或$CD8^+$T細胞以PD-1及/或CLDN6特異性T細胞受體(TCR)mRNA的電穿孔。

【0396】為了產生單核球衍生的iDC，多達40×10^6個PBMC衍生的$CD14^+$單核球在補充100 ng/mL人類顆粒球/巨噬細胞聚落刺激因子(GM-CSF；Miltenyi Biotec，cat. no. 130-093-868)及50 ng/mL人類IL-4 (Miltenyi Biotec，cat. no. 130093 924)之DC培養基(RPMI 1640、5%混合人類血清[PHS；One Lambda，cat. no. A25761]、1×最低基礎培養基非基礎胺基酸溶液[MEM NEAA、Life Technologies，cat. no. 11140 035]、1 mM丙酮酸鈉[Life Technologies，cat. no. 11360 039])中，於T175角瓶中培養(37℃，5% CO_2)5天。培養三天後，替換各角瓶的一半培養基。由於從角瓶中取出的培養基包含非黏附的單核球，將其離心(8 min，300×g，RT)，棄去上清液，將細胞沉澱再懸浮於新鮮的DC培養基中，然後與200 ng/mL GM-CSF及200 ng/mL IL-4(最終濃度)一起返回起始角瓶。培育5天後，使用包含2 mM EDTA的10 mL DPBS分離黏附在培養角瓶上的iDC(37℃，10 min)。洗滌經單離之iDC，沉澱(RT下8 min，300×g)並用於以CLDN6 mRNA電穿孔。

【0397】以編碼對人類CLDN6特異性之小鼠TCR的α和β鏈的RNA單獨或與編碼PD-1的RNA一起電穿孔人類$CD8^+$T細胞，及以編碼人類CLDN6的RNA電穿孔人類單核球衍生的iDC。使用ECM 830 Square Wave Electroporation System(BTX®)在RT下將多達5×10^6個iDC或15×10^6個$CD8^+$T

細胞在250 μL X-VIVO 15培養基中電穿孔。細胞與RNA混合、脈衝(T細胞500 V，3 ms或iDC 300V，12 ms)，並立即以750 μL預熱檢定培養基(IMDM GlutaMAX [Life technologies，cat. no. 31980030]與5% PHS)稀釋。將經電穿孔的iDC轉移到6孔或12孔盤中並O/N培養(37℃，5% CO_2)。O/N培育後，藉由流式細胞分析技術評估經電穿孔的$CD8^+$T細胞和iDC，以評估細胞純度、轉染RNA的表現($CD8^+$T細胞上的PD-1和CLDN6-TCR以及iDC上的CLDN6)、和$CD8^+$T細胞上的CD27和PD-1以及iDC上的PD-L1之基線表現。大約78%至93%、78%至92%、及36%至98%的經電穿孔的$CD8^+$T細胞分別表現CLDN6-TCR、PD-1和內源性CD27。大約47%至91%和94%至99%的經電穿孔的iDC分別表現CLDN6和內源性PD-L1(未顯示)。

【0398】$CD8^+$T細胞和iDC以10：1的比例(每孔7.5×10^4個T細胞和7.5×10^3個iDC)種在96孔圓底盤中。IgG1-CD27-A-P329R-E345R在檢定培養基中稀釋，並將25 μL的稀釋IgG1-CD27-A-P329R-E345R添加到孔中，以達到10 μg/mL的最終濃度。同樣地，加入對照抗體IgG1-CD27-131A及IgG1-b12-P329R-E345R以達到10 μg/mL的最終濃度。藉由測量轉導表現CLDN6-TCR的T細胞上清液中的細胞介素，活體外分析抗體處理後的抗原特異性T細胞活性，這些T細胞與轉導表現和呈現CLDN6的iDC共培養。二天後收集上清液，並依照製造商的說明書，使用10-spot U-PLEX ImmunoOncology第1組(人類)套組(MSD；cat. No.

K151AEL 2)藉由多重電化學發光檢定(ECLIA)測定多種促炎性(proinflammatory)細胞介素和趨化因子的濃度。

【0399】對於10-spot U-PLEX Immuno-Oncology第1組套組，生物素化捕捉抗體與指定連接子(具有生物素結構域)在RT下預培育30 min，然後與終止溶液培育30 min。藉由在RT下搖動培育1小時，將盤塗佈經連接子共軛之捕捉抗體的混合物。以1×MSD洗滌緩衝液洗滌盤3次。上清液樣本或套組標準品在檢定稀釋劑中按1：2稀釋，加入孔中並在RT下持續振盪培育2小時。將盤以洗滌緩衝液洗滌3次，並在持續振盪下與套組中的SULFO-TAG共軛之檢測抗體在RT下培育1 h。在添加讀取緩衝液B以催化電化學發光反應之前，以洗滌緩衝液洗滌盤3次。藉由在MESO QuickPlex SQ 120顯影器(MSD)上測量光強度，立即對盤分析。

【0400】由IgG1-CD27-A-P329R-E345R所誘導的細胞介素產生的變化藉由在培育二天後來自$CD8^+$T細胞/iDC共培養物的上清液中之多重ECLIA來評估(n=4不同的捐贈者)。IgG1-CD27-A-P329R-E345R在CD8+T細胞/iDC與表現內源性PD-1水平的$CD8^+$T細胞共培養物中誘導GM-CSF和IFNγ產生顯著增加(圖20A)，而亦觀察到IL-13和TNFα產生的增加。在包含PD-1過表現之T細胞的培養物中觀察到相同細胞介素的顯著增加(圖20B)。雖然當T細胞過度表現PD-1時，細胞介素水平通常減少，但在IgG1-CD27-A-P329R-E345R存在下細胞介素產生的相對增加(增加倍數)

通常高於此設置(圖20A和B)。相較之下，相較於非結合對照抗體IgG1-b12-P329R-E345R，先前技術抗CD27抗體IgG1-CD27-131A顯示對細胞介素產生的影響最小(圖20A和B)。

實施例23：藉由與IgG1-CD27-A-P329R-E345R培育之抗體特異性CD8⁺T細胞，細胞毒殺相關之分子的表現

【0401】藉由經轉導表現CLDN6-TCR之人類健康捐贈者T細胞與MDA-MB-231_hCLDN6標靶細胞之共培養物中的流式細胞分析技術，分析抗原特異性T細胞上細胞毒殺相關之分子的表現來研究抗體處理後T細胞媒介之細胞毒殺的誘導。

【0402】MDA-MB-231_hCLDN6細胞是藉由慢病毒轉導產生。為此，在12孔組織培養盤之每孔中種入在補充10% FBS(非熱去活化)的250 μL Dulbecco氏經修飾之eagle培養基(DMEM、Thermo Fisher Scientific，cat. no. 31966-047)中之2×10^5 MDA-MB-231個細胞。細胞在37℃ (7.5% CO_2)下培育1至2 h。將包含編碼人類CLDN6的慢病毒載體(pL64b42E(EF1a-h密連蛋白6)Hygro-T2A-GFP)的上清液在冰上解凍並在總體積為750 μL DMEM/10% FBS中稀釋以獲得2×10^5、8×10^4，及3.2×10^4 TU/mL之力價。這些力價分別對應於1、0.4和0.16的MOI。然後將上清液加入到MDA-MB-231細胞中，及將細胞在37℃ (5% CO_2)下無干擾培育72 h。對於當前實施例中描述的實驗，MDA-MB-231-

hCLDN6細胞在DMEM/10% FBS中培養。細胞在70%至90%匯合時傳代或收穫用於實驗。藉由以Accutase(Thermo Fisher Scientific，cat. no. A11105010)處理5 min(37℃，7.5% CO_2)分離細胞，並藉由添加培養基再懸浮細胞。將細胞離心(RT下300×g，4 min)及計數。MDA-MB-231_hCLDN6細胞培養不超過20代。

【0403】以1.2至1.5×10^4細胞/孔將MDA-MB-231_hCLDN6細胞種在96孔平底盤(用於流式細胞分析技術分析)和xCELLigence E盤(Agilent，cat. no. 05232368001；用於阻抗測量)中)並允許在RT下安置30 min。接著，將盤分別在培養箱和xCELLigence實時細胞分析(RTCA)儀器(ACEA Biosciences)中培育一天(37℃，5% CO_2)。

【0404】經單離之$CD8^+$T細胞(見實施例22)以CLDN6特異性TCR mRNA電穿孔並O/N培育。$CD8^+$T細胞單離和電穿孔後，T細胞培養物包含49%至99%的$CD8^+$T細胞。在這些經電穿孔的$CD8^+$T細胞中，約78%至93%表現CLDN6-TCR，及59%至98%的CLDN6-TCR^+CD8^+細胞為$CD27^+$。將細胞離心(RT下8 min，300×g)，再懸浮於DMEM/10% FBS中並計數。將細胞再次離心，以3×10^6個細胞/mL再懸浮於DMEM/10% FBS中，並添加到包含先前接種的MDA-MB-231_hCLDN6細胞的孔中(1.5×10^5個$CD8^+$T細胞/孔；T細胞：腫瘤細胞，效應子：標靶，比例為10：1)。將IgG1-CD27-A-P329R-E345R、IgG1-CD27-131A，及非結合對照抗體IgG1-b12-P329R-E345R以10 μg/mL添加到共培養物

中。藉由流式細胞分析技術測定CD107a及GzmB表現。

【0405】在10 μg/mL IgG1-CD27-A-P329R-E345R存在下培育二天後，相較於以非結合對照抗體或先前技術抗CD27抗體IgG1-CD27-131A處理，$GzmB^+CD107a^+CD8^+$T細胞的百分比顯著增強(圖21)。

【0406】總之，這些數據顯示IgG1-CD27-A-P329R-E345R能夠在活化之抗原特異性T細胞上誘導細胞毒殺相關之分子。

實施例24：IgG1-CD27-A-P329R-E345R誘導T細胞媒介之腫瘤細胞毒殺之能力

【0407】為了評估T細胞媒介之細胞毒殺，在IgG1-CD27-A-P329R-E345R、先前技術抗CD27抗體IgG1-CD27-131A、或非結合對照抗體IgG1-b12-P329R-E345R存在下，將經CLDN6-TCR-電穿孔的$CD8^+$T細胞與MDA-MB-231_hCLDN6細胞共培養在xCELLigence實時細胞分析儀(Acea Biosciences)中5天，每隔二小時阻抗測量，如實施例23中所述。細胞指數值源自每隔二小時進行之阻抗測量。曲線下面積(AUC)是從共培養5天的細胞指數數據中獲得。AUC被標準化為以IgG1-b12-P329R-E345R處理的共培養物。阻抗的大小取決於細胞數量、細胞形態和細胞大小以及細胞附著在盤上的強度，在這種特殊情況下其全部作為腫瘤細胞質量的間接讀數。在此實驗設定中阻抗的減少被認為是$CD8^+$T細胞腫瘤細胞毒殺的替代指標。應該注

意的是，阻抗可能低估由於T細胞增殖引起的腫瘤細胞毒殺。

【0408】IgG1-CD27-A-P329R-E345R誘導細胞指數減少，腫瘤細胞毒殺之指標。IgG1-CD27-131A對細胞指數沒有明顯影響，指出增加腫瘤細胞毒殺的能力很小(圖22)。

實施例25：IgG1-CD27-A-P329R-E345R誘導腫瘤浸潤性淋巴球之擴增之能力

【0409】使用已從NSCLC患者手術切除的冷凍保存之腫瘤來離體評估IgG1-CD27-A-P329R-E345R誘導腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)亞群($CD4^+$及$CD8^+$T細胞、NK細胞、及調節性T細胞[Treg])之擴增的能力。

【0410】手術切除的人類NSCLC組織被收到運輸培養基(HypoThermosol® FRS保存溶液[BioLife Solutions，cat. no. 101104]、7.5 μg/mL雙性黴素B[Thermo Fisher Scientific，cat. no. 15290026]、及300單位/mL(U/mL) pen/strep[Thermo Fisher Scientific，cat. no. 15140-122])。樣本在洗滌介質(5 mL X-VIVO 15 [Lonza]、2.5 μg/mL雙性黴素B、[Thermo Fisher Scientific]及100 U/mL pen/strep [Thermo Fisher Scientific])中洗滌3次並轉移到細胞培養皿。以手術刀去除脂肪組織和壞死區域，並將組織切成約5 mm^3的片段。各片段都放在一個單獨的冷凍管中，並向各管中添加1 mL冷凍培養基(FBS，10% DMSO)。將小管轉

移到置於-80℃冰箱中的受控冷凍室(Mr. Frosty冷凍容器)。在-80℃下至少16 h後，將小管轉移到液態氮中進行長期儲存。

【0411】各實驗在37℃水浴中解凍4至6個包含來自一個腫瘤標本的約5 mm^3腫瘤片段的冷凍保存小管約2 min，並以洗滌介質洗滌5次並轉移到細胞培養皿中。以手術刀將腫瘤片段進一步解剖成大約1 mm^3的片段。大多數片段用於在以IL-2和處理抗體培養後的TIL擴增，而其餘片段用於測定基線時特定細胞表面標記物的表現，無任何處理。

【0412】將每孔2個腫瘤片段(平均)種在包含45至50 U/mL IL-2(Proleukin S；Novartis Pharma，cat. no. PZN-02238131)之0.1 mL預熱TIL培養基(X-VIVO 15 [Lonza]，具2%人類血清白蛋白 [HSA；CSL Behring，cat. no. PZN-00504775]、100 U/mL pen/strep[Thermo Fisher Scientific]、及2.5 μg/mL雙性黴素B[Thermo Fisher Scientific])之24孔盤(用於檢定中的2 mL/孔總體積容量)。IgG1-CD27-A-P329R-E345R在包含45至50 U/mL IL-2的TIL培養基中稀釋，並酌情將900 μL之此稀釋液加入孔中。孔中的最終IgG1-CD27-A-P329R-E345R濃度為1或10 μg/mL。作為對照，將不含抗體的包含45至50 U/mL IL-2的培養基添加到個別孔中的腫瘤片段。對於各捐贈者的各實驗條件(37℃，5% CO_2)培育總共8至16個孔。

【0413】培養3天後，向孔中加入包含45至50 U/mL

IL-2及IgG1-CD27-A-P329R-E345R的新鮮TIL培養基(1 mL/孔，抗體濃度同上)。在檢定開始後的第5天和第14/17天之間，以顯微鏡定期監測培養物從組織片段遷移的TIL的增殖和TIL微團簇的形成。如果在培養7或8個培養天後，在一個孔中觀察到>25個TIL微團簇，則將來自2個相同處理的原始孔的細胞和組織片段再懸浮並匯集到有培養基之6孔盤的一個孔中(用於檢定中的5至6 mL/孔總體積容量)及加入包含TIL培養基的新鮮IL2(估計33 U/mL IL-2最終濃度)。

【0414】每二到三天，以包含TIL培養基的新鮮IL-2補充培養物。添加到培養物中的培養基的IL-2濃度降低至10 U/mL，或在整個檢定中，以培養基補充孔後首先降低至25 U/mL，然後降低至10 U/mL。在第14天或第17天，收穫細胞用於流式細胞分析技術分析。

【0415】相較於單獨以IL-2處理之對照培養物，IgG1-CD27-A-P329R-E345R 增強TIL亞型之擴增，對$CD8^+$T細胞及Treg觀察到細胞計數最大相關增加、接著為$CD4^+$T細胞、及NK細胞。對於所有TIL亞群，IgG1-CD27-A-P329R-E345R在1 μg/mL 的擴增比10 μg/mL更明顯(表4及圖23)。

表4. 經IgG1-CD27-A-P329R-E345R處理的TIL的倍數擴增

【0416】在存在或不存在**IgG1-CD27-A-P329R-E345R**

下，將源自人類NSCLC標本的腫瘤組織與低劑量IL-2一起培養。處理14至17天後，藉由流式細胞分析技術測定所示細胞亞群的絕對細胞計數。顯示經**IgG1-CD27-A-P329R-E345R**處理的培養物相對於以IL-2處理的培養物的細胞數倍數差異。顯示的數據來自在5個獨立實驗中測試的個別患者的5個腫瘤組織。P=0.0236，1 μg/mL對上10 μg/mL **IgG1-CD27-A-P329R-E345R**(雙向ANOVA)。

細胞族群	全TIL		$CD4^+$ T細胞		$CD8^+$ T細胞		Treg		NK cells	
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]平均和SD計算排除患者#561，以提高細胞群之間的可比性。
縮寫ANOVA=變異數分析；n.d.=未測定；NK=自然殺手；NSCLC=非小細胞肺癌；
SD=標準偏差；TIL=浸潤性淋巴球 Treg =調節性T細胞。

實施例26：BRET分析以評估細胞表面上IgG1-CD27-A-P329R-E345R分子之分子間相互作用

【0417】使用生物發光共振能量轉移(BRET)分析測定攜帶六聚化增強突變(E345R)的CD27抗體在與細胞表面的CD27結合後增加分子間Fc-Fc相互作用的能力。這種基於分子接近度的檢定藉由測量從生物發光蛋白質供體到螢光

蛋白受體的能量轉移來檢測蛋白質相互作用。僅當供者和受體在緊密接近時才會發生能量轉移(<10 nm [Wu及Brand、1994；Dacres等人，2012])。

【0418】首先，使用間接免疫螢光法檢定(QIFIKIT、Agilent Technologies，cat no. K0078)，在huCD27-K562(經基因修飾以穩定表現人類CD27之人類慢性骨髓性白血病細胞株)、及在Daudi細胞測定CD27(以及CD20及CD37(作為陽性對照分子))之細胞表面表現。細胞以100,000個細胞/孔接種，並與10 μg/mL一次抗體(CD27：IgG1-7730-143-C102S-FEAL；CD20：IgG1-11B8-FEAR；CD37：IgG1-3009-010-FEAR)培育。隨後與FITC標記之多株山羊抗人類IgG(Jackson Immuno Research，cat. no. 109-096-097)培育，同時與塗佈經定義數量之抗體分子的QIFIKIT珠培育。各細胞的抗體分子數是藉由在校準曲線上插入測試樣本的測量平均螢光強度(MFI)來測定，該校準曲線是藉由繪製個別珠群體的MFI對各珠子的已知抗體分子數而產生。在LSRFortessa Cell Analyzer流式細胞儀(BD Biosciences)上測量樣本並使用FlowJo軟體進行分析。

【0419】QiFi分析顯示Daudi細胞上有中度CD27表現和高CD20和CD37表現，而huCD27-K562細胞表現高水平的CD27，但沒有CD20和CD37(表5)。

表5：各細胞抗體分子的細胞表面表現

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

【0420】基本上根據製造商的說明書進行BRET檢定(NanoBRET™ System，Promega，cat no. N1661)。為了產生NanoLuc (供體)和HaloTag(受體)標記之抗體，藉由如實施例1所述，基因合成、選殖到適當的表現載體中，並產生全長抗體來製備具有NanoLuc或HaloTag的可變輕鏈序列(表1，序列71至78)。為了分析，將0.5x10^5個huCD27-K562或Daudi細胞以100 µL的總體積種在96孔圓底盤(Greiner Bio-One，cat. no. 650101)中。藉由離心(300xg下3 min)將細胞沉澱並再懸浮於包含濃度各為5 µg/mL的NanoLuc或HaloTag標記抗體對的混合物之50 µL檢定培養基(Opti-MEM I [Gibco，cat. no. 11058-021] +4% FBS [ATCC，cat. no. 30-2020])。接著，添加50 µL HaloTag NanoBret 618 ligand (Promega，cat. no. G980A，1：1000稀釋於檢定培養基)。對於各抗體混合物，藉由添加不含HaloTag NanoBret 618配體的50 µL培養基，平行製備無配體對照樣本。將細胞在黑暗中37℃下培育30 min、以培養基洗滌2次、並再懸浮於不含FBS的100 µL測定培養基中。將25 µL NanoBRET NanoGLO受質(Promega，cat. no. N1571，在不含FBS的檢定培養基中1：200稀釋)添加到各孔中。將盤搖動30 s，並將各樣本的120 µL轉移到

OptiPlate(Perkin Elmer，cat. no. 6005299)。使用EnVision Multilabel Reader (Perkin Elmer)測量460 nm的供體發射和618 nm的受體發射。

【0421】BRET係以milliBRET單位(mBU)=(618 nm_{em}/460 nm_{em}) x 1000計算。

【0422】結果報告為Corrected BRET，其為針對供體貢獻的背景或滲漏(bleedthrough)而校正，且計算為：mBU配體-mBU無配體對照。

【0423】將在細胞表面結合CD27後NanoLuc-及HaloTag-標記之IgG1-CD27-A-P329R-E345R抗體的接近度與攜帶相同標記的WT IgG1-CD27-A抗體比較。包含誘導六聚化的E430G突變的IgG1-CD20-11B8-E430G-LNLuc及IgG1-CD37-37.3-E430G-LHalo抗體(WO2019243636A1)作為接近度誘導BRET的陽性對照。使用分子接近度測定法，先前顯示IgG1-CD20-11B8-E430G及IgG1-CD37-37.3-E430G在與表現CD20和CD37的細胞結合後形成異六聚體(Oostindie，S. C.等人，Haematologica，2019)。將非結合抗體IgG1-b12-P329R-E345R作陰性對照。

【0424】作為BRET訊息誘導的陽性和陰性對照，Daudi細胞(高CD20和CD37表現)和huCD27-K562細胞(無CD20和CD37表現)被抗體對IgG1-CD20-11B8-E430G-LNLuc及IgG1-CD37-37.3-E430G-LHalo調理。僅在Daudi細胞上檢測到BRET誘導，而在缺乏CD20和CD37的huCD27-K562細胞上未檢測到(圖24)。同樣地，非結合對照抗體對

(IgG1-b12-P329R-E345R-LNLuc+IgG1-b12-P329R-E345R-LHalo)未在任一細胞株上誘導BRET。當huCD27-K562細胞經帶有六聚化增強突變的NanoLuc-及HaloTag-標記之CD27抗體混合物調理(IgG1-CD27-A-P329R-E345R-LNLuc+IgG1-CD27-A-P329R-E345R-LHalo)時，檢測到高BRET，而Daudi細胞上的BRET未超過背景水平(圖24)。相較於攜帶P329R及E345R突變的CD27抗體，IgG1-CD27-A-LNLuc及IgG1-CD27-A-LHalo(WT)抗體的混合物在huCD27-K562細胞上誘導顯著較低的BRET，並且在Daudi細胞上沒有BRET。這些結果指示BRET訊息與較高的目標表現相關。發現huCD27-K562細胞上的CD27表現比在Daudi細胞上高~26倍，而huCD27-K562細胞上CD27結合之IgG1-CD27-A-P329R-E345R的BRET水平比在Daudi細胞上高~24倍。NanoLuc-及HaloTag-標記之非結合及CD27-結合抗體對(分別為IgG1-b12-P329R-E345R-LNLuc+IgG1-CD27-A-P329R-E345R-LHalo、及IgG1-CD27-A-P329R-E345R-LNLuc+IgG1-b12-P329R-E345R-LHalo)未在任一細胞株上誘導BRET。這確認所觀察到的BRET取決於與細胞表面標靶結合的供體和受體抗體的同時相互作用。

【0425】總之，相較於其WT變體，IgG1-CD27-A-P329R-E345R在huCD27-K562細胞上誘導高BRET。這一發現確認，相較於其WT變體，膜結合之IgG1-CD27-A-P329R-E345R分子之間增強之接近度與細胞表面結合之抗體之間E345R增強之Fc-Fc相互作用一致。

【0426】N.B. 此實施例所描述的實驗使用攜帶F405L突變的IgG1-CD27-A之變體，其在本實驗的上下文中在功能上無關。

實施例27：IgG1-CD27-A-P329R-E345R與FcγRIa$^+$M0及M1巨噬細胞之結合

【0427】實施例9使用表面電漿子共振(SPR)評估IgG1-CD27-A-P329R-E345R與人類FcγR變體的結合，顯示與重組人類IgG Fc受體分子的結合極少(FcγRIa)或沒有結合(FcγRIIa、FcγRIIb，及FcγRIIIa)。此殘留的FcγRIa結合不足以誘導CD27$^+$細胞的IgG1-CD27-A-P329R-E345R依賴性ADCP(見實施例13)。為了進一步排除IgG1-CD27-A-P329R-E345R與FcγRIa陽性巨噬細胞的相互作用，測定Fc媒介之IgG1-CD27-A-P329R-E345R與M0和M1巨噬細胞的結合。

【0428】如實施例13所述，從2個健康捐贈者的PBMC中單離人類CD14$^+$單核球，並藉由在補充有50 ng/mL M-CSF(Gibco，cat. no. PHC9501)之培養基(CellGenix，cat. no. 20801-0500)培養細胞而分化成單核球衍生之巨噬細胞以獲得M0巨噬細胞，或在補充有用於分化成M1巨噬細胞之50 ng/mL GM-CSF (Immunotools，cat. no. 11343125)之培養基(CellGenix，cat. no. 20801-0500)培養細胞。培養6天後，根據表6中所定義的標記物的表現，藉由FACS分析確認M0和M1表型。此外，2種巨噬細胞亞型都經確認表現

人類Fc受FcγRIa、FcγRII及FcγRIIIa(表6)。

表6：

表型標計物	M0	M1
CD40 (BD Pharmingen, cat. no. 561211, 1:50 稀釋)	+	+
CD86 (MACS, cat. no. 30-097-877, 1:50 稀釋)	+	++
CD163 (Biolegend, cat.no. 333612, 1:200 稀釋)	+/-	-
CD206 (Biolegend, cat. no. 321136, 1:200 稀釋)	+/-	+
Fc 受體		
FcγRIa (Biolegend, cat. no. 305006, 1:25 稀釋)	++	++
FcγRII (BD Pharmingen, cat. no. 552883, 1:50 稀釋)	++	++
FcγRIIIa (BD Pharmingen, cat. no. 555407, 1:50 稀釋)	+	+/-

【0429】將IgG1-CD27-A-P329R-E345R與M0和M1巨噬細胞的結合和WT IgG1抗體(IgG1-b12)與不相關抗原結合區(作為FcγRIa結合的陽性對照)的結合比較，以及與亦攜帶先前描述降低與FcγR的相互作用之P329R突變的相同抗體之變體(IgG1-b12-P329R-E345R)比較。由於巨噬細胞不應表現CD27，因此假設所觀察到的任何結合都是通過FcγRIa發生，其為唯一結合單價IgG的FcγR。分化的巨噬細胞與IgG1-CD27-A-P329R-E345R或對照抗體(DC培養基中30 μg/mL)培育15 min，及PE標記之多株山羊抗人類IgG(Jackson Immuno Research，cat. no. 109-116-097，稀釋1：200、4℃下30 min)。培育後，將細胞洗滌並再懸浮於包含核染色DAPI(BD Pharmingen，cat. no. 564907，1：5000稀釋)的100 μL FACS緩衝液中。在FACSymphony流式細胞儀(BD Biosciences)上測量樣本並使用FlowJo軟體分析。

【0430】沒有觀察到IgG1-CD27-A-P329R-E345R或對

照IgG1-b12-P329R-E345R與自二個獨立捐贈者單離的M0或M1巨噬細胞的高於背景(僅二次抗體)的結合(圖25)。包含活性Fc區之WT IgG1-b12始終與M0和M1巨噬細胞結合。

【0431】結論，IgG1-CD27-A-P329R-E345R及對照IgG1-b12-P329R-E345R不與表現FcγRIa、FcγRII及FcγRIIIa的M0或M1巨噬細胞結合。

實施例28：藉由與DuoBody-CD40x4-1BB組合之IgG1-CD27-A-P329R-E345R誘導多株活化之人類CD8$^+$T細胞的增殖

【0432】與DuoBody-CD40x4-1BB組合之IgG1-CD27-A-P329R-E345R對活化之人類CD8$^+$T細胞的影響藉由流式細胞分析技術使用新鮮單離的人類健康捐贈者PBMC(其中T細胞以CD3抗體多株刺激)分析。

【0433】根據製造商的說明書，使用淋巴球分離介質(Corning，cat. no. 25-072-CI)藉由低密度梯度離心從人類健康捐贈者膚色血球層中新鮮單離人類周邊血液單核細胞(PBMC)。PBMC以補充有含鐵的2%捐贈者牛血清(DBSI；Gibco，cat. no. 20371-030)之PBS(HyClone，cat. no. SH3A3830.03)，密度為10×10^{6}細胞/mL洗滌2次且根據製造商的說明書，使用CellTrace™ Violet細胞增殖套組(Invitrogen，cat. no. C34557A、以PBS稀釋)以CTV標記。CTV標記之PMBC(7.5×10^{4}個細胞/孔)置於圓底96孔盤(Greiner Bio-One，cat. no. 650180)中並與抗CD3抗體

(aCD3、選殖珠UCHT1，檢定中最終濃度0.1 μg/mL，Stemcell，cat. no. 60011)，在檢定培養基(RPMI 1640 [Lonza，cat. no. 12-115F]、含鐵10%捐贈者牛血清[DBSI；Gibco，cat. no. 20731-030]、1% Pen/Strep [Lonza，cat no. DE17-603E])中混合以觸發T細胞活化。隨後，將經aCD3刺激的PBMC與IgG1-CD27-A-P329R-E345R(以5倍稀釋0.0016至10 μg/mL)及DuoBody-CD40x4-1BB (以5倍稀釋0至0.000064 μg/mL)單獨或組合培育，總體積為150 μL，在37℃下4天。將細胞懸浮液沉澱並與包含淋巴球標記物AF700-標記之抗-人類CD8 (BD BioLegend，cat. no. 301028，1：50)之FACS緩衝液(PBS[Lonza，cat. no. BE17517Q]、0.02%疊氮化鈉[bioWorld，cat. no. 41920044 3]、0.1% BSA[Roche，cat. no. 43279213]、2 mM EDTA [Sigma，cat. no. BCCD3789])在4℃下培育30 min。細胞以FACS緩衝液洗滌3次，並再懸浮於包含活力染料TO-PRO-3 (Invitrogen，cat. no. T3605)的FACS緩衝液中。在FACS Symphony (BD)上獲取流式細胞分析技術數據。

【0434】使用FlowJo軟體(v10.7.3)中的增殖建模工具分析活$CD8^+$T細胞亞群($CD8^+$7-AAD)中的CTV稀釋峰，並根據以下公式測定擴增指數：

培養開始時的細胞數=(G0)+(G1)/2+(G2)/4+(G3)/8+(G4)/16 +...(GN/2N)

擴增指數=總細胞數(總和G0到GN)/開始時的細胞數

G0到GN是單增殖峰，G0代表未分裂的細胞分數，而

GN代表分裂N次的細胞分數。

【0435】在整個抗體濃度範圍內，在單獨以IgG1-CD27-A-P329R-E345R處理的PBMC樣本中觀察到$CD8^+$(**圖26)T細胞增殖呈劑量依賴性增加**。單獨使用DuoBody-CD40x4-1BB處理的樣本的劑量反應曲線顯示鐘形曲線，在抗體濃度為1 μg/mL時達到最大擴增指數。IgG1-CD27-A-P329R-E345R與DuoBody-CD40x4-1BB的組合比各抗體單獨更有效地增加$CD8^+$T細胞增殖，並且在與對DuoBody-CD40x4-1BB所測試的中至高濃度(0.04至5 μg/mL)組合之在最高測試IgG1-CD27-A-P329R-E345R濃度(2至10 μg/mL)達到最大效果。

【0436】這些數據指示，相較於各抗體單獨，IgG1-CD27-A-P329R-E345R與DuoBody-CD40x4-1BB的組合顯示較高的T細胞增殖增加。

實施例29：測定與DuoBody-CD40x4-1BB組合之IgG1-CD27-A-P329R-E345R增強T細胞增殖之能力的抗原特異性刺激檢定

【0437】為了測定相較於單劑活性，IgG1-CD27-A-P329R-E345R及DuoBody-CD40x4-1BB對T細胞增殖和細胞介素產生的組合效果，使用健康人類CD8+T細胞及表現同源抗原之未成熟樹突細胞(iDC)的共培養物進行抗原特異性增殖檢定。

【0438】HLA-A*02^+周邊血液單核細胞(PBMC)獲自

健康捐贈者(Transfusionszentrale，University Hospital，Mainz，Germany)。根據製造商的說明書，使用抗CD14微珠(Miltenyi；cat. no. 130-050-201)藉由磁活化細胞分選(MACS)技術從PBMC中單離單核球。將周邊血液淋巴球(PBL，CD14陰性部分)冷凍保存在包含10% DMSO(AppliChem GmbH，cat. no. A3672,0050)及10%人類白蛋白(CSL Behring，PZN 00504775)的RPMI 1640中用於T細胞單離。為了分化成iDC，將40×10^6單核球/mL在包含5%混合人類血清(One Lambda Inc., cat. no. A25761)、1 mM丙酮酸鈉(Life technologies GmbH，cat. no. 11360-039)、1x非必需胺基酸(Life Technologies GmbH，cat. no. 11140-035)、200 ng/mL顆粒球-巨噬細胞聚落刺激因子(GM-CSF；Miltenyi，cat. no. 130-093-868)及200 ng/mL人類介白素-4(IL-4；Miltenyi，cat. no. 130-093-924)的RPMI 1640(Life Technologies GmbH，cat. no. 61870-010)中培養5天。在第3天，將一半的培養基替換為包含補充劑的新鮮培養基。在第5天，藉由收集非黏附細胞收穫iDC，並藉由與包含2 mM EDTA的Dulbecco氏磷酸鹽緩衝鹽水(DPBS)在37℃下培育10 min來分離黏附細胞。以DPBS洗滌後，將iDC冷凍保存在包含10% DMSO(AppliChem GmbH，cat. no A3672,0050)的FBS(Sigma-Aldrich，cat. no. F7524)中，以備將來用於抗原特異性T細胞檢定。

【0439】在抗原特異性$CD8^+$T細胞刺激檢定開始前一天，將來自同一捐贈者的冷凍PBL和iDC解凍。根據製造

商的說明書，使用抗CD8微珠(Miltenyi，cat. no. 130-045-201)藉由MACS技術從PBL中單離$CD8^+$T細胞。約10×10^6至15×10^6個$CD8^+$T細胞以各10 μg之活體外轉錄之(IVT)-RNA(編碼特異於人類密連蛋白-6 (CLDN6；HLA-A*02-限制；述於WO 2015150327 A1)之鼠類TCR的α及β鏈)在250 μL X-VIVO™ 15培養基(Lonza，cat. no. BE02-060Q)中電穿孔。將細胞轉移至4-mm電穿孔比色管(VWR International GmbH，cat. no. 732-0023)並使用BTX ECM® 830 Electroporation System(BTX；500 V，3 ms脈衝)電穿孔。電穿孔後立即將細胞轉移到包含5%混合人類血清的新鮮IMDM GlutaMAX培養基(Life Technologies GmbH，cat. no. 319800-030)中，並在37℃、5% CO_2下靜置至少1小時。根據製造商的說明書，在PBS中使用0.8 μM羧基螢光素丁二醯亞胺基酯(Carboxyfluorescein succinimidyl ester(CFSE；Life Technologies GmbH，cat. no V12883)標記T細胞，並在補充有5%人類血清的IMDM培養基中培育過夜。

【0440】使用如上所述的電穿孔系統(300V，12 ms脈衝)，在250 μL X VIVO™ 15培養基中，以編碼全長人類CLDN6(WO 2015150327 A1)的2 μg IVT-RNA對多達5×10^6個解凍的iDC電穿孔，並在補充有5%混合人類血清的IMDM培養基中培育過夜。

【0441】在96孔圓底盤中，包含5%匯集人類血清的IMDM培養基中，於存在IgG1-CD27-A-P329R-E345R

(0.1、1或10 μg/mL)、DuoBody-CD40x4-1BB(0.0022、0.0067或0.2 μg/mL)、或二者之組合下，以1：10(DC：T細胞)的比例，將電穿孔的iDC與電穿孔CFSE-標記之T細培育。培養4天後，以APC共軛之抗人類CD8抗體(例如，PE-Cy7共軛，BD Biosciences，cat. no. 557750)對細胞染色。使用BD FACSCelesta™流式細胞儀(Becton Dickinson GmbH)藉由流式細胞分析技術分析在$CD8^+$T細胞中的CFSE稀釋度來評估T細胞增殖。使用FlowJo軟體版本10.7.1分析流式細胞分析技術數據。使用FlowJo中的增殖建模工具評估$CD8^+$T細胞的CFSE標記之稀釋，並使用以下公式計算擴增指數：

培養開始時的細胞數=(G0)+(G1)/2+(G2)/4+(G3)/8+(G4)/16+...(GN/2N)

擴增指數=總細胞數(總和G0到GN)/開始時的細胞數

G0到GN是單增殖峰，G0代表未分裂的細胞分數，GN代表分裂N次的細胞分數。

依照製造商的程序，細胞培養上清液中的細胞介素濃度藉由多重電化學發光免疫檢定(ECLIA)，使用V-Plex Proinflammatory Panel 1(人類)檢定檢測人類干擾素(IFN)γ (Meso Scale Discovery，cat. no. K15049D)。

【0442】相較於未經抗體處理的共培養物，以IgG1-CD27-A-P329R-E345R或DuoBody-CD40x4-1BB單劑處理劑量依賴性地增強CD8+T細胞增殖。IgG1-CD27-A-P329R-

E345R及DuoBody-CD40x4-1BB的組合進一步增強單劑活性(圖27)。以1或10 μg/mL IgG1-CD27-A-P329R-E345R及0.0067或0.2 μg/mL DuoBody-CD40x4-1BB的組合治療導致比以單獨各化合物的治療更高的增殖，儘管相較於單劑DuoBody-CD40x4-1BB，增加為適度。

【0443】相較於未經抗體處理的共培養物，以IgG1-CD27-A-P329R-E345R或DuoBody-CD40x4-1BB單劑處理劑量依賴性地增強促炎性細胞介素IFNγ的分泌(圖28)。1或10 μg/mL IgG1-CD27-A-P329R-E345R及0.0067 μg/mL DuoBody-CD40x4-1BB的組合治療進一步增強細胞介素分泌，儘管相較於單劑DuoBody-CD40x4-1BB，增加為適度。

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing originalFreeTextLanguageCode="en"  dtdVersion="V1_3"
fileName="895371-Sequence Listing (CH).xml" softwareName="WIPO Sequence"
softwareVersion="2.3.0" productionDate="2023-09-21">
 <ApplicationIdentification>
  <IPOfficeCode>TW</IPOfficeCode>
  <ApplicationNumberText>112117781</ApplicationNumberText>
  <FilingDate>2023-05-12</FilingDate>
 </ApplicationIdentification>
 <ApplicantFileReference>P0199-WO-PCT</ApplicantFileReference>
 <EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <IPOfficeCode>US</IPOfficeCode>
  <ApplicationNumberText>US 63/341,406</ApplicationNumberText>
  <FilingDate>2022-05-12</FilingDate>
 </EarliestPriorityApplicationIdentification>
 <ApplicantName languageCode="zh">丹麥商珍美寶股份有限公司</ApplicantName>
 <ApplicantNameLatin>Genmab A/S</ApplicantNameLatin>
 <InventorName languageCode="zh">布雷吉  伊斯爾</InventorName>
 <InventorNameLatin>Breij, Esther C.W.</InventorNameLatin>
 <InventionTitle languageCode="zh">在組合療法中能夠結合到ＣＤ２７之結合劑
</InventionTitle>
 <InventionTitle languageCode="en">Binding agents capable of binding to CD27 in
combination therapy</InventionTitle>
 <SequenceTotalQuantity>78</SequenceTotalQuantity>
 <SequenceData sequenceIDNumber="1">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>260</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..260</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q2">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MARPHPWWLCVLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDCDQHRKAAQC
DPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQP
THLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLPARTLSTHWPPQRSLCSSDFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLHQRRKYRSNKG
ESPVEPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="2">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>260</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..260</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q4">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MARPHPWWLCVLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDCDQHRKTAQC
DPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQP
THLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLPARTLSTHWPPQRSLCSSDFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLHQRRKYRSNKG
ESPVEPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP</INSDSeq_sequence>
```

```
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="3">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>260</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..260</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q6">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MARPHPWWLCFLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDCDQHRKAAQC
HPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLIRNCTITANAVCACRNGWQCRDKECTECDPPPNPSLTTWPSQALGPHPQP
THLPYVNEMLEARTAGHMQTLADFRHLPARTLSTHWPPQRSLCSSDFIRILVIFSGMFLVFTLAGTLFLHQQRKYRSNKG
ESPMEPAEPCPYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPASSP</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="4">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>116</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..116</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
```

```
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q8">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLMQSGSELKKPGASVKVSCRASGYTFTTYAMNWVRQAPGQGPEWMGWINTNTGNPTYAQ
GFTGRFVFSLDTTVTTTYLQISSLKAEDTAVYFCAREAGSFDYWGQGTLVTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="5">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q10">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>GYTFTTYA</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
```

<SequenceData sequenceIDNumber="6">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q12">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>INTNTGNP</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="7">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q14">

```
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>AREAGSFDY</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="8">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>110</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..110</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q16">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVYYYNYVSWYQQHPGRAPKLVIYDVSNRPSGVSN
RFSGSKSGNTASLTISGLRAEDEADYYCSSYTVNRVWVFGGGTKLTVL</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="9">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q18">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>SSDVYYYNY</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="10">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="11">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q22">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>SSYTVNRVWV</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="12">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>330</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..330</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q24">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
```

```
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="13">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>330</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..330</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q26">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="14">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>330</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..330</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
```

```
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q28">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALRAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="15">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>329</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..329</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q30">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
```

<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALRAPIEKTISKA
KGQPRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="16">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>107</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q32">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="17">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>106</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>

```
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..106</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q34">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQS
NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="18">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>329</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..329</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q36">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
```

<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="19">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>330</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..330</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q38">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKPVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="20">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>330</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>

```
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..330</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q40">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKPVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEGLHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="21">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>326</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..326</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q42">
```

```
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="22">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>377</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..377</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q44">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCP
RCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK</INS
DSeq_sequence>
```

```
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="23">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>327</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..327</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q46">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="24">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>446</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..446</INSDFeature_location>
```

```
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q48">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLMQSGSELKKPGASVKVSCRASGYTFTTYAMNWVRQAPGQGPEWMGWINTNTGNPTYAQ
GFTGRFVFSLDTTVTTTYLQISSLKAEDTAVYFCAREAGSFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALRAPIEKTISKAKGQPRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_sequen
ce>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="25">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>216</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..216</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q50">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVYYYNYVSWYQQHPGRAPKLVIYDVSNRPSGVSN
RFSGSKSGNTASLTISGLRAEDEADYYCSSYTVNRVWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD
FYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS</INSD
Seq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="26">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>250</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..250</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q52">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Mus musculus</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MAWPPPYWLCMLGTLVGLSATLAPNSCPDKHYWTGGGLCCRMCEPGTFFVKDCEQDRTAAQC
DPCIPGTSFSPDYHTRPHCESCRHCNSGFLIRNCTVTANAECSCSKNWQCRDQECTECDPPLNPALTRQPSETPSPQPPP
THLPHGTEKPSWPLHRQLPNSTVYSQRSSHRPLCSSDCIRIFVTFSSMFLIFVLGAILFFHQRRNHGPNEDRQAVPEEPC
PYSCPREEEGSAIPIQEDYRKPEPAFYP</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="27">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>330</INSDSeq_length>
```

```
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..330</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q54">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALRAPIEKTISKA
KGQPRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="28">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>329</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..329</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier id="q56">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="29">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>329</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..329</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q58">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_sequence>
```

```
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="30">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>329</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..329</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q60">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALRAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="31">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>329</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..329</INSDFeature_location>
```

```
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q62">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKPVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="32">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>329</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..329</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q64">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
```

```
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKPVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEGLHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="33">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>325</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..325</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q66">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="34">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>376</INSDSeq_length>
```

```
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..376</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q68">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCP
RCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPG</INSD
Seq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="35">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>445</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..445</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q70">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLMQSGSELKKPGASVKVSCRASGYTFTTYAMNWVRQAPGQGPEWMGWINTNTGNPTYAQ
GFTGRFVFSLDTTVTTTYLQISSLKAEDTAVYFCAREAGSFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALRAPIEKTISKAKGQPRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_sequenc
e>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="36">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>329</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..329</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q72">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
```

TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALRAPIEKTISKA
KGQPRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="37">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>127</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..127</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q74">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFVIHWVRQAPGQRFEWMGWINPYNGNKEFSA
KFQDRVTFTADTSANTAYMELRSLRSADTAVYYCARVGPYSWDDSPQDNYYMDVWGKGTTVIVSS</INSDSeq_seque
nce>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="38">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

```
    <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q76">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GYRFSNFV</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="39">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q78">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>INPYNGNK</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
```

```
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="40">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q80">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>ARVGPYSWDDSPQDNYYMDV</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="41">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>108</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..108</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier id="q82">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EIVLTQSPGTLSLSPGERATFSCRSSHSIRSRRVAWYQHKPGQAPRLVIHGVSNRASGISDR
FSGSGSGTDFTLTITRVEPEDFALYYCQVYGASSYTFGQGTKLERK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="42">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q84">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>HSIRSRR</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="43">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
```

```
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q86">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>QVYGASSYT</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="44">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q88">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
```

```
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>GYTFTEYI</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="45">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q90">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>IIPNNGGT</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="46">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>15</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..15</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
```

```
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q92">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>TRREVYGRNYYALDY</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="47">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>6</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..6</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q94">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>QGINNY</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="48">
```

```
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q96">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>QQYSNLPYT</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="49">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>122</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..122</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q98">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFTEYIMHWVRQAPGQGLEWMGGIIPNNGGTSYNQ
KFQGRVTMTVDKSTSTGYMELSSLRSEDTAVYYCTRREVYGRNYYALDYWGQGTLVTVSS</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="50">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>107</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q100">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQGINNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYTSSLHSGVPSRF
SGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQYSNLPYTFGGGTKVEIK</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="51">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q102">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GFSLNDYW</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="52">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q104">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
```

```
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>IDVGGSL</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="53">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q106">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>ARGGLTYGFDL</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="54">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>6</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..6</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q108">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>EDISSY</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="55">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>12</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..12</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q110">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>HYYATISGLGVA</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="56">
 <INSDSeq>
```

```
    <INSDSeq_length>117</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..117</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q112">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFSLNDYWMSWVRQAPGKGLEWVGYIDVGGSLYYAAS
VKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCARGGLTYGFDLWGQGTLVTVSS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="57">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>110</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..110</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q114">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISSYLAWYQQKPGKAPKRLIYGASDLASGVPSRF
SASGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCHYYATISGLGVAFGGGTKVEIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="58">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>330</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..330</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q116">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="59">
  <INSDSeq>
```

```
    <INSDSeq_length>330</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..330</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q118">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="60">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>329</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..329</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q120">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="61">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>329</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..329</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q122">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQ
```

GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="62">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>257</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..257</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q124">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECLPCGESEFLDTWNRETHCHQHKY
CDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEGWHCTSEACESCVLHRSCSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAFEKCH
PWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVVCGPQDRLRALVVIPIIFGILFAILLVLVFIKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDL
PGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="63">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>232</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..232</INSDFeature_location>

```
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q126">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAE
CDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADL
SPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF
PEEEEGGCEL</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="64">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>451</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..451</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q128">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
```

<INSDSeq_sequence>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFTEYIMHWVRQAPGQGLEWMGGIIPNNGGTSYNQ
KFQGRVTMTVDKSTSTGYMELSSLRSEDTAVYYCTRREVYGRNYYALDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP
KSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_s
equence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="65">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>214</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..214</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q130">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQGINNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYTSSLHSGVPSRF
SGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQYSNLPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDSe
q_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="66">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>446</INSDSeq_length>

<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..446</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q132">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFSLNDYWMSWVRQAPGKGLEWVGYIDVGGSLYYAAS
VKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCARGGLTYGFDLWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
THTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_sequen
ce>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="67">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>217</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..217</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q134">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISSYLAWYQQKPGKAPKRLIYGASDLASGVPSRF
SASGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCHYYATISGLGVAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INS
DSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="68">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>277</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..277</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q136">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECLPC
GESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEGWHCTSEACESCVLHRSCSPGFGVKQIATGVSDTI
CEPCPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVVCGPQDRLRALVVIPIIFGILFAILLVLVFIKKVAKKP
TNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ</INSDSeq_sequence>

```
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="69">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>257</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..257</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q138">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECLPCGESEFLDTWNRETHCHQHKY
CDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEGWHCTSEACESCVLHRSCSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAFEKCH
PWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVVCGPQDRLRALVVIPIIFGILFAILLVLVFIKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDL
PGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="70">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>255</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..255</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
```

```
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q140">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTC
DICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLD
GKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLY
IFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="71">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>392</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..392</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q142">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVYYYNYVSWYQQHPGRAPKLVIYDVSNRPSGVSN
RFSGSKSGNTASLTISGLRAEDEADYYCSSYTVNRVWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD
```

FYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECSSLGSSG
VFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKV
VYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGVT
GWRLCERILA</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="72">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>529</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..529</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q144">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVYYYNYVSWYQQHPGRAPKLVIYDVSNRPSGVSN
RFSGSKSGNTASLTISGLRAEDEADYYCSSYTVNRVWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD
FYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECSSLEPTT
EDLYFQSDNDGSEIGTGFPFDPHYVEVLGERMHYVDVGPRDGTPVLFLHGNPTSSYVWRNIIPHVAPTHRCIAPDLIGMG
KSDKPDLGYFFDDHVRFMDAFIEALGLEEVVLVIHDWGSALGFHWAKRNPERVKGIAFMEFIRPIPTWDEWPEFARETFQ
AFRTTDVGRKLIIDQNVFIEGTLPMGVVRPLTEVEMDHYREPFLNPVDREPLWRFPNELPIAGEPANIVALVEEYMDWLH
QSPVPKLLFWGTPGVLIPPAEAARLAKSLPNCKAVDIGPGLNLLQEDNPDLIGSEIARWLSTLEISG</INSDSeq_seq
uence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="73">
<INSDSeq>

```
    <INSDSeq_length>391</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..391</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q146">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EIVLTQSPGTLSLSPGERATFSCRSSHSIRSRRVAWYQHKPGQAPRLVIHGVSNRASGISDR
FSGSGSGTDFTLTITRVEPEDFALYYCQVYGASSYTFGQGTKLERKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECSLGSSGV
FTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVV
YPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGVTG
WRLCERILA</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="74">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>528</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..528</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q148">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EIVLTQSPGTLSLSPGERATFSCRSSHSIRSRRVAWYQHKPGQAPRLVIHGVSNRASGISDR
FSGSGSGTDFTLTITRVEPEDFALYYCQVYGASSYTFGQGTKLERKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECSLEPTTE
DLYFQSDNDGSEIGTGFPFDPHYVEVLGERMHYVDVGPRDGTPVLFLHGNPTSSYVWRNIIPHVAPTHRCIAPDLIGMGK
SDKPDLGYFFDDHVRFMDAFIEALGLEEVVLVIHDWGSALGFHWAKRNPERVKGIAFMEFIRPIPTWDEWPEFARETFQA
FRTTDVGRKLIIDQNVFIEGTLPMGVVRPLTEVEMDHYREPFLNPVDREPLWRFPNELPIAGEPANIVALVEEYMDWLHQ
SPVPKLLFWGTPGVLIPPAEAARLAKSLPNCKAVDIGPGLNLLQEDNPDLIGSEIARWLSTLEISG</INSDSeq_sequ
ence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="75">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>392</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..392</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q150">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
```

</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVYYYNYVSWYQQHPGRAPKLVIYDVSNRPSGVSN
RFSGSKSGNTASLTISGLRAEDEADYYCSSYTVNRVWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD
FYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECSSLGSSG
VFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKV
VYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGVT
GWRLCERILA</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="76">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>529</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..529</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q152">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVYYYNYVSWYQQHPGRAPKLVIYDVSNRPSGVSN
RFSGSKSGNTASLTISGLRAEDEADYYCSSYTVNRVWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD
FYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECSSLEPTT
EDLYFQSDNDGSEIGTGFPFDPHYVEVLGERMHYVDVGPRDGTPVLFLHGNPTSSYVWRNIIPHVAPTHRCIAPDLIGMG
KSDKPDLGYFFDDHVRFMDAFIEALGLEEVVLVIHDWGSALGFHWAKRNPERVKGIAFMEFIRPIPTWDEWPEFARETFQ
AFRTTDVGRKLIIDQNVFIEGTLPMGVVRPLTEVEMDHYREPFLNPVDREPLWRFPNELPIAGEPANIVALVEEYMDWLH
QSPVPKLLFWGTPGVLIPPAEAARLAKSLPNCKAVDIGPGLNLLQEDNPDLIGSEIARWLSTLEISG</INSDSeq_seq
uence>
</INSDSeq>

</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="77">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>390</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..390</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q154">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARF
SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSDWPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECSLGSSGVF
TLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVY
PVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGVTGW
RLCERILA</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="78">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>527</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..527</INSDFeature_location>

```
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q156">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIRSNLAWYQQKQGKSPQLLVNVATNLADGVPSRF
SGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGTYYCQHYWGTTWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECSLEPTTED
LYFQSDNDGSEIGTGFPFDPHYVEVLGERMHYVDVGPRDGTPVLFLHGNPTSSYVWRNIIPHVAPTHRCIAPDLIGMGKS
DKPDLGYFFDDHVRFMDAFIEALGLEEVVLVIHDWGSALGFHWAKRNPERVKGIAFMEFIRPIPTWDEWPEFARETFQAF
RTTDVGRKLIIDQNVFIEGTLPMGVVRPLTEVEMDHYREPFLNPVDREPLWRFPNELPIAGEPANIVALVEEYMDWLHQS
PVPKLLFWGTPGVLIPPAEAARLAKSLPNCKAVDIGPGLNLLQEDNPDLIGSEIARWLSTLEISG</INSDSeq_seque
nce>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種降低個體腫瘤進程或預防個體腫瘤進程或治療個體癌症之方法，該方法包含投予到該個體

i) 第一結合劑，包含至少一結合到CD27之結合區；以及

ii) 第二結合劑，包含結合到CD40之第一結合區及結合到CD137之第二結合區。

【請求項2】如請求項1之方法，其中，該第一結合劑包含分別包含SEQ ID NO：5、6、及7所列之序列的重鏈可變(VH)區CDR1、CDR2、及CDR3，以及分別包含SEQ ID NO：9、10及11所列之序列的輕鏈可變(VL)區CDR1、CDR2、及CDR3。

【請求項3】如請求項1或2之方法，其中，該第一結合劑包含能夠結合到人類CD27之二個結合區，其中，該第一結合劑包含分別包含SEQ ID NO：5、6、及7所列之序列的該重鏈可變(VH)區CDR1、CDR2、及CDR3，及分別包含SEQ ID NO：9、10及11所列之序列的該輕鏈可變(VL)區CDR1、CDR2、及CDR3。

【請求項4】如前述請求項中任一項之方法，其中，該第一結合劑包含：包含SEQ ID NO：4所列之序列的VH區。

【請求項5】如前述請求項中任一項之方法，其中，該第一結合劑包含：包含SEQ ID NO：8所列之序列的VL區。

【請求項6】如前述請求項中任一項之方法，其中，該第一結合劑包含分別包含SEQ ID NO：4及SEQ ID NO：8所列之序列的該VH及VL區。

【請求項7】如前述請求項中任一項之方法，其中，該第一結合劑為抗體，較佳地，為人類或人源化抗體。

【請求項8】如前述請求項中任一項之方法，其中，該抗體為全長抗體，其進一步包含輕鏈恆定區(CL)及重鏈恆定區(CH)。

【請求項9】如請求項8之方法，其中，該輕鏈恆定區為人類κ。

【請求項10】如請求項8之方法，其中，該輕鏈恆定區為人類λ。

【請求項11】如前述請求項中任一項之方法，其中，該第一結合劑進一步包含重鏈恆定區，其為人類IgG同型，視需要地為經修飾之人類IgG。

【請求項12】如請求項11之方法，其中，該人類IgG或經修飾之人類IgG係選自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4，諸如，人類IgG1。

【請求項13】如請求項11或12之方法，其中，該IgG為包含一或多種胺基酸取代的經修飾之人類IgG。

【請求項14】如請求項11至13中任一項之方法，其中，該經修飾之人類IgG為包含一或多種胺基酸取代，諸如，二或更多種胺基酸取代，的經修飾之人類IgG1。

【請求項15】如請求項11至14中任一項之方法，其

中，該經修飾之人類IgG重鏈恆定區包含至多10個胺基酸取代，諸如，至多9個，諸如，至多8個，諸如，至多7個，諸如，至多6個，諸如，至多5個，諸如，至多4個，諸如，至多3個，諸如，至多2個胺基酸取代。

【請求項16】如請求項11至15中任一項之方法，其中，相較於除了包含野生型IgG1抗體重鏈恆定區之相同抗體，該重鏈恆定區的該取代誘導增加之CD27促效作用。

【請求項17】如請求項11至16中任一項之方法，其中，在根據Eu編號對應於人類IgG1重鏈位置E345或E430的位置之胺基酸殘基係選自包含下述之群組：A、C、D、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W及Y。

【請求項18】如請求項11至17中任一項之方法，其中，在根據Eu編號對應於人類IgG1重鏈位置E345的位置之胺基酸殘基為R。

【請求項19】如請求項11至18中任一項之方法，其中，在根據Eu編號對應於人類IgG1重鏈位置E430的位置之胺基酸殘基為G。

【請求項20】如請求項11至19中任一項之方法，其中，在根據Eu編號對應於人類IgG1重鏈位置P329的位置之胺基酸殘基為R。

【請求項21】如請求項11至20中任一項之方法，其中，在根據Eu編號對應於人類IgG1重鏈位置E345及P329的位置之胺基酸殘基均為R。

【請求項22】如請求項11至21中任一項之方法，其

中，該第一結合劑具有如同包含野生型IgG1重鏈恆定區的親本抗體之藥物動力學概況。

【請求項23】如前述請求項中任一項之方法，其中，該第一結合劑包含重鏈恆定區，其包含選自包含下述之群組的序列：SEQ ID No 12、13、14、15、18、19、20、21、22、23、27、28、29、30、31、32、33、34及36。

【請求項24】如前述請求項中任一項之方法，其中，該第一結合劑包含重鏈恆定區，其包含SEQ ID No 15所列之序列。

【請求項25】如前述請求項中任一項之方法，其中，該第一結合劑包含重鏈恆定區，其經修飾，以致於該第一結合劑誘導相較於親本抗體，一或多種Fc-媒介之效應子功能至較小範圍。

【請求項26】如請求項25之方法，其中，該一或多種Fc-媒介之效應子功能減少至少20%，諸如，至少30%或至少40%、或至少50%或至少60%或至少70%、或至少80%或至少90%。

【請求項27】如請求項25或26之方法，其中，該第一結合劑未誘導一或多種Fc-媒介之效應子功能。

【請求項28】如請求項25至27中任一項之方法，其中，該一或多種Fc-媒介之效應子功能係選自下列群組：補體依賴性細胞毒殺(CDC)、補體依賴性細胞-媒介之細胞毒殺(CDCC)、補體活化、抗體-依賴性細胞-媒介之細胞毒殺(ADCC)、抗體-依賴性細胞-媒介之吞噬作用(ADCP)、

C1q結合及FcγR結合。

【請求項29】如請求項25至28中任一項之方法，其中，當藉由實施例8之方法測量時，該第一結合劑未誘導C1q結合。

【請求項30】如前述請求項中任一項之方法，其中，該第一結合劑為單價抗體。

【請求項31】如前述請求項中任一項之方法，其中，該第一結合劑為雙價抗體。

【請求項32】如前述請求項中任一項之方法，其中，該第一結合劑為單特異性抗體。

【請求項33】如前述請求項中任一項之方法，其中，該第一結合劑為雙特異性抗體，其包含能夠結合根據前述請求項中任一項之人類CD27的第一抗原結合區及包含能夠結合到人類CD27上不同表位或能夠結合不同標靶的第二抗原結合區。

【請求項34】如前述請求項中任一項之方法，其中，CD27為人類CD27，特別是該人類CD27包含SEQ ID NO：1所列之序列或SEQ ID NO：2所列之人類CD27變體。

【請求項35】如前述請求項中任一項之方法，其中，該第一結合劑包含：

e. 包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區；

f. 包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區；

g. 包含SEQ ID NO：15所列之胺基酸序列的CH區；以及

h. 包含SEQ ID NO：17所列之胺基酸序列的CL區。

【請求項36】如前述請求項中任一項之方法，其中，該第一結合劑包含：包含SEQ ID NO：35所列之胺基酸序列的重鏈與包含SEQ ID NO：25所列之胺基酸序列的輕鏈。

【請求項37】如前述請求項中任一項之方法，其中，該第一結合劑係於包含乙酸鹽、山梨醇、聚山梨醇酯80、且具有5至6，較佳地，5.5之pH的組成物或調配物。

【請求項38】如前述請求項中任一項之方法，其中，CD40為人類CD40，特別是包含SEQ ID NO：62所列之序列的人類CD40，及/或CD137為人類CD137，特別是包含SEQ ID NO：63所列之序列的人類CD137。

【請求項39】如前述請求項中任一項之方法，其中，a) 該第二結合劑之該第一結合區包含：包含分別於SEQ ID NO：44、45、及46所列之CDR1、CDR2、及CDR3序列的重鏈可變區(VH)，以及包含分別於SEQ ID NO：47、YTS、及SEQ ID NO：48所列之CDR1、CDR2、及CDR3序列的輕鏈可變區(VL)；以及b) 該第二結合劑之該第二結合區包含：包含分別於SEQ ID NO：51、52、及53所列之CDR1、CDR2、及CDR3序列的重鏈可變區(VH)，以及：包含分別於SEQ ID NO：54、GAS、及SEQ ID NO：55所列之CDR1、CDR2、及CDR3序列的輕鏈可變區(VL)。

【請求項40】如前述請求項中任一項之方法，其中，

a) 該第二結合劑之該第一結合區包含：包含SEQ ID

NO：49所列之胺基酸序列的重鏈可變區(VH)及包含SEQ ID NO：50所列之胺基酸序列的輕鏈可變區(VL)區；

以及

b) 該第二結合劑之該第二結合區包含：包含SEQ ID NO：56所列之胺基酸序列的重鏈可變區(VH)及包含SEQ ID NO：57所列之胺基酸序列的輕鏈可變區(VL)區。

【請求項41】如前述請求項中任一項之方法，其中，該第二結合劑為多特異性抗體，諸如，雙特異性抗體。

【請求項42】如前述請求項中任一項之方法，其中，該第二結合劑係呈全長抗體或抗體片段之形式。

【請求項43】如前述請求項中任一項之方法，其中，該第二結合劑為包含第一結合臂及第二結合臂的抗體，其中，

該第一結合臂包含

i) 包含第一重鏈可變區(VH)與第一重鏈恆定區(CH)的多胜肽，及

ii) 包含第一輕鏈可變區(VL)與第一輕鏈恆定區(CL)的多胜肽；

以及該第二結合臂包含

iii) 包含第二重鏈可變區(VH)及第二重鏈恆定區(CH)的多胜肽，及

iv) 包含第二輕鏈可變區(VL)及第二輕鏈恆定區(CL)的多胜肽。

【請求項44】如前述請求項中任一項之方法，其中，

該第二結合劑包含

i) 包含能夠結合到CD40之該第一結合區的第一重鏈及輕鏈，該第一重鏈包含第一重鏈恆定區且該第一輕鏈包含第一輕鏈恆定區；以及

ii) 包含能夠結合CD137之該第二結合區的第二重鏈及輕鏈，該第二重鏈包含第二重鏈恆定區且該第二輕鏈包含第二輕鏈恆定區。

【請求項45】如請求項43或44之方法，其中，(i) 在根據Eu編號對應於人類IgG1重鏈F405的位置之胺基酸為在該第一重鏈恆定區(CH)之L，及在根據Eu編號對應於人類IgG1重鏈K409的位置之胺基酸為在該第二重鏈恆定區(CH)之R，或(ii) 在根據Eu編號對應於人類IgG1重鏈K409的位置之胺基酸為在該第一重鏈之R，及在根據Eu編號對應於人類IgG1重鏈F405的位置之胺基酸為在該第二重鏈之L。

【請求項46】如請求項43至45中任一項之方法，其中，在根據Eu編號對應於人類IgG1重鏈位置L234及L235的位置分別為在該第一及第二重鏈之F與E。

【請求項47】如請求項43至46中任一項之方法，其中，在根據Eu編號對應於人類IgG1重鏈位置L234、L235、及D265的位置分別為在該第一及第二重鏈恆定區(HC)之F、E、與A。

【請求項48】如請求項43至47中任一項之方法，其中，該第一與第二重鏈恆定區二者在根據Eu編號對應於人

類IgG1重鏈位置L234及L235的位置分別為F及E，以及，其中，(i) 該第一重鏈恆定區在根據Eu編號對應於人類IgG1重鏈F405的位置為L，以及該根據第二重鏈的Eu編號，對應於人類IgG1重鏈K409的位置為R，或(ii) 該第一重鏈恆定區在根據Eu編號對應於人類IgG1重鏈K409的位置為R，以及該根據第二重鏈的Eu編號，對應於人類IgG1重鏈F405的位置為L。

【請求項49】如請求項43至48中任一項之方法，其中，該第一與第二重鏈恆定區二者在根據Eu編號對應於人類IgG1重鏈位置L234、L235、及D265的位置分別為F、E、及A，以及，其中，(i) 該第一重鏈恆定區在根據Eu編號對應於人類IgG1重鏈F405的位置為L，及該根據第二重鏈恆定區的Eu編號，對應於人類IgG1重鏈K409的位置為R，或(ii) 該第一重鏈在根據Eu編號對應於人類IgG1重鏈K409的位置為R，及該根據第二重鏈的Eu編號，對應於人類IgG1重鏈F405的位置為L。

【請求項50】如請求項43至49中任一項之方法，其中，該第一及/或第二重鏈，諸如，該第二重鏈之該恆定區包含或基本上由下述所組成或由下述所組成：選自由下述所組成之群組的胺基酸序列：

a) SEQ ID NO：58或60所列之序列[IgG1-Fc_FEAL]；

b) 在a)中之該序列的次序列，諸如，次序列，其中，從a)所定義之該序列的N端或C端開始，1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個連續胺基酸已經刪除；以及

c) 相較於a)或b)中所定義之該胺基酸序列，具有至多6個取代之序列，諸如，至多5個取代、至多4個取代、至多3個、至多2個取代或至多1個取代。

【請求項51】如請求項43至50中任一項之方法，其中，該第一及/或第二重鏈，諸如，該第一重鏈之該恆定區包含或基本上由下述所組成或由下述所組成：選自由下述所組成之群組的胺基酸序列：

a) SEQ ID NO：59或61所列之序列[IgG1-Fc_FEAR]；

b) 在a)中之該序列的次序列，諸如，次序列，其中，從a)所定義之該序列的N端或C端開始，1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個連續胺基酸已經刪除；以及

c) 相較於a)或b)中所定義之該胺基酸序列，具有至多6個取代，諸如，至多5個取代、至多4個、至多3個、至多2個取代或至多1個取代之序列。

【請求項52】如請求項43至51中任一項之方法，其中，該第二結合劑包含κ (κ) 輕鏈恆定區。

【請求項53】如請求項43至52中任一項之方法，其中，該第二結合劑包含λ (λ) 輕鏈恆定區。

【請求項54】如請求項43至53中任一項之方法，其中，該第一輕鏈恆定區為κ (κ) 輕鏈恆定區或λ (λ) 輕鏈恆定區。

【請求項55】如請求項43至54中任一項之方法，其中，該第二輕鏈恆定區為λ (λ) 輕鏈恆定區或κ (κ) 輕鏈恆定區。

【請求項56】如請求項43至55中任一項之方法，其中，該第一輕鏈恆定區為κ (κ)輕鏈恆定區且該第二輕鏈恆定區為λ (λ) 輕鏈恆定區或該第一輕鏈恆定區為λ (λ) 輕鏈恆定區且該第二輕鏈恆定區為κ (κ)輕鏈恆定區。

【請求項57】如請求項52至56中任一項之方法，其中，該κ (κ)輕鏈包含選自由下述所組成之群組的胺基酸序列：

a) SEQ ID NO：16所列之序列，

b) 在a)中之該序列的次序列，諸如，次序列，其中，從a)所定義之該序列的N端或C端開始，1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個連續胺基酸已經刪除；以及

c) 相較於a)或b)中所定義之該胺基酸序列，具有至多10個取代，諸如，至多9個取代、至多8個、至多7個、至多6個、至多5個、至多4個取代、至多3個、至多2個取代或至多1個取代之序列。

【請求項58】如請求項53至57中任一項之方法，其中，該λ (λ) 輕鏈包含選自由下述所組成之群組的胺基酸序列：

a) SEQ ID NO：17所列之序列，

b) 在a)中之該序列的次序列，諸如，次序列，其中，從a)所定義之該序列的N端或C端開始，1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個連續胺基酸已經刪除；以及

c) 相較於a)或b)中所定義之該胺基酸序列，具有至多10個取代，諸如，至多9個取代、至多8個、至多7個、

至多6個、至多5個、至多4個取代、至多3個、至多2個取代或至多1個取代之序列。

【請求項59】如前述請求項中任一項之方法，其中，該第二結合劑為選自由IgG1、IgG2、IgG3、及IgG4所組成之群組的同型。

【請求項60】如前述請求項中任一項之方法，其中，該第二結合劑為全長IgG1抗體。

【請求項61】如前述請求項中任一項之方法，其中，該第二結合劑為該IgG1m(f)同種異型之抗體。

【請求項62】如前述請求項中任一項之方法，其中，該第二結合劑為結合到CD40及CD137之雙特異性抗體，該雙特異性抗體具有i) 包含SEQ ID NO：64所列之胺基酸序列的第一重鏈與包含SEQ ID NO：65所列之胺基酸序列的第一輕鏈，以及ii) 包含SEQ ID NO：66所列之胺基酸序列的第二重鏈與包含SEQ ID NO：67所列之胺基酸序列的第二輕鏈。

【請求項63】如前述請求項中任一項之方法，其中，

a) 該第一結合劑包含分別包含SEQ ID NO：5、6、及7所列之序列的重鏈可變(VH)區CDR1、CDR2、及CDR3，以及分別包含SEQ ID NO：9、10及11所列之序列的輕鏈可變(VL)區CDR1、CDR2、及CDR3；

b) 該第二結合劑之該第一結合區包含：包含分別於SEQ ID NO：44、45、及46所列之CDR1、CDR2、及CDR3序列的重鏈可變區(VH)，以及包含分別於SEQ ID NO：

47、YTS、及SEQ ID NO：48所列之CDR1、CDR2、及CDR3序列的輕鏈可變區(VL)；以及

c) 該第二結合劑之該第二結合區包含：包含分別於SEQ ID NO：51、52、及53所列之CDR1、CDR2、及CDR3序列的重鏈可變區(VH)，以及包含分別於SEQ ID NO：54、GAS、及SEQ ID NO：55所列之CDR1、CDR2、及CDR3序列的輕鏈可變區(VL)。

【請求項64】如前述請求項中任一項之方法，其中，

a) 該第一結合劑包含：包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區、包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區；

b) 該第二結合劑之該第一結合區包含：包含SEQ ID NO：49所列之胺基酸序列的重鏈可變區(VH)及包含SEQ ID NO：50所列之胺基酸序列的輕鏈可變區(VL)區；以及

c) 該第二結合劑之該第二結合區包含：包含SEQ ID NO：56所列之胺基酸序列的重鏈可變區(VH)及包含SEQ ID NO：57所列之胺基酸序列的輕鏈可變區(VL)區。

【請求項65】如前述請求項中任一項之方法，其中，

a) 該第一結合劑為抗體，其包含：包含SEQ ID NO：4所列之胺基酸序列的VH區、包含SEQ ID NO：8所列之胺基酸序列的VL區、包含SEQ ID NO：15所列之胺基酸序列的CH區、及包含SEQ ID NO：17所列之胺基酸序列的CL區；

b) 該第二結合劑為包含第一結合臂及第二結合臂的

抗體，該第一結合臂包含該第一結合區而第二結合臂包含該第二結合區；

c) 該第二結合劑之該第一結合臂包含：包含SEQ ID NO：49所列之胺基酸序列的VH區、包含SEQ ID NO：50所列之胺基酸序列的VL區；包含SEQ ID NO：60所列之胺基酸序列的CH區、及包含SEQ ID NO：16所列之胺基酸序列的CL區；以及

d) 該第二結合劑的該第二結合臂包含：包含SEQ ID NO：56所列之胺基酸序列的VH區、包含SEQ ID NO：57所列之胺基酸序列的VL區、包含SEQ ID NO：61所列之胺基酸序列的CH區、及包含SEQ ID NO：16所列之胺基酸序列的CL區。

【請求項66】如前述請求項中任一項之方法，其中，

c) 該第一結合劑包含：包含SEQ ID NO：35所列之胺基酸序列的重鏈與包含SEQ ID NO：25所列之胺基酸序列的輕鏈；

d) 該第二結合劑為結合到CD40及CD137之雙特異性抗體，該雙特異性抗體具有i) 包含SEQ ID NO：64所列之胺基酸序列的第一重鏈與包含SEQ ID NO：65所列之胺基酸序列的第一輕鏈，以及ii) 包含SEQ ID NO：66所列之胺基酸序列的第二重鏈與包含SEQ ID NO：67所列之胺基酸序列的第二輕鏈。

【請求項67】如前述請求項中任一項之方法，其中，該個體為人類個體。

【請求項68】如前述請求項中任一項之方法，其中，該腫瘤或癌症為固態腫瘤。

【請求項69】根據前述請求項中任一項之方法，其中，該腫瘤為PD-L1陽性腫瘤。

【請求項70】如前述請求項中任一項之方法，其中，該腫瘤或癌症為頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC)，諸如，口腔、咽或喉之HNSCC。

【請求項71】如請求項70之方法，其中，該HNSCC為復發、不可切除或轉移。

【請求項72】如請求項1至69中任一項之方法，其中，該腫瘤或癌症為非小細胞肺癌(NSCLC)，諸如，鱗狀或非鱗狀NSCLC。

【請求項73】如請求項72之方法，其中，該NSCLC為復發、不可切除或轉移。

【請求項74】如請求項72或73之方法，其中，該NSCLC不具有表皮生長因子(EGFR)-致敏突變及/或未分化淋巴瘤(ALK)移位及/或ROS1重排。

【請求項75】如請求項72至74中任一項之方法，其中，該NSCLC為NTRK1/2/3(神經營養性受體酪胺酸激酶1/2/3)融合陽性，及/或具有KRAS(KRAS原致癌基因，GTPase)、BRAF(B-Raf原致癌基因，絲胺酸/蘇胺酸激酶)、或MET(MET原致癌基因，受體酪胺酸激酶)基因的突變，及/或具有RET(ret原致癌基因)基因重排，且該個體已接受個別標靶療法之先前治療。

【請求項76】如前述請求項中任一項之方法，其中，該個體已接受PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑的先前治療，諸如，抗-PD-1抗體或抗-PD-L1抗體，較佳地，至少二個劑量之該PD-1抑制劑或該PD-L1抑制劑。

【請求項77】如前述請求項中任一項之方法，其中，該個體已接受鉑為主之療法或若鉑不合宜時的替代性化學療法的先前治療，例如，包含吉西他濱(gemcitabine)之方案。

【請求項78】如前述請求項中任一項之方法，其中，該腫瘤或癌症在治療，諸如，查核點抑制劑的全身性治療之後，已復發及/或已有進展。

【請求項79】如前述請求項中任一項之方法，其中，該個體已接受至少一先前線的全身性療法，諸如，包含PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，諸如，抗-PD-1抗體或抗-PD-L1抗體之全身性療法。

【請求項80】如前述請求項中任一項之方法，其中，以PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，諸如，抗PD-1抗體或抗-PD-L1抗體治療之後，該癌症或腫瘤已復發及/或為頑抗性、或該個體已有進展，該PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑作為單療法或作為組合療法之部分投予。

【請求項81】如前述請求項中任一項之方法，其中，最後的先前治療是與PD1抑制劑或PD-L1抑制劑，諸如，抗PD-1抗體或抗-PD-L1抗體一起，該PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑作為單療法或作為組合療法之部分投予。

【請求項82】如前述請求項中任一項之方法，其中，以PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，諸如，抗PD-1抗體或抗-PD-L1抗體最後治療的進程時間為6個月或更少。

【請求項83】如前述請求項中任一項之方法，其中，該從以PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，諸如，抗PD-1抗體或抗-PD-L1抗體最後給藥作為最後的先前治療之部分起的時間為6個月或更少。

【請求項84】如前述請求項中任一項之方法，其中，在下述期間或之後，該癌症或腫瘤已復發及/或為頑抗性、或該個體已有進展

i) 以抗-PD-1抗體或抗-PD-L1抗體治療後的鉑雙重化學療法，或

ii) 鉑雙重化學療法之後以抗-PD-1抗體或抗-PD-L1抗體治療。

【請求項85】一種套組，包含

i) 包含結合到CD27之至少一結合區的第一結合劑以及

ii) 包含結合到CD40之第一結合區及結合到CD137之第二結合區的第二結合劑。

【請求項86】根據請求項85之套組，其中，該第一結合劑為如請求項1至84中任一項所定義及/或該第二結合劑為如請求項1至84中任一項所定義。

【請求項87】根據請求項85或86之套組，其中，該第一結合劑、該第二結合劑、及，若存在，一或多種額外的

治療劑係用於全身性投予，特別是用於注射或輸液，諸如，靜脈內注射或輸液。

【請求項88】根據請求項85至87中任一項之套組，其係用於降低個體腫瘤進程或預防個體腫瘤進程或治療個體癌症之方法。

【請求項89】根據請求項88之使用套組，其中，該腫瘤或癌症為如請求項1至84中任一項所定義，及/或該個體為如請求項1至84中任一項所定義，及/或該方法為如請求項1至84中任一項所定義。

【請求項90】一種醫藥組成物，包含

i) 包含結合到CD27之至少一結合區的第一結合劑；

ii) 包含結合到CD40之第一結合區及結合到CD137之第二結合區的第二結合劑；以及

iii) 視需要地醫藥上可接受之載劑。

【請求項91】根據請求項90之醫藥組成物，其中，該第一結合劑為如請求項1至84中任一項所定義及/或該第二結合劑為如請求項1至84中任一項所定義。

【請求項92】根據請求項90或91之醫藥組成物，其係用於降低個體腫瘤進程或預防個體腫瘤進程或治療個體癌症之方法。

【請求項93】根據請求項92之使用醫藥組成物，其中，該腫瘤或癌症為如請求項1至84中任一項所定義，及/或該個體為如請求項1至84中任一項所定義，及/或該方法為如請求項1至84中任一項所定義。

【請求項94】一種用於降低個體腫瘤進程或預防個體腫瘤進程或治療個體癌症之方法之第一結合劑，該方法包含投予到該個體

i) 包含結合到CD27之至少一結合區的該第一結合劑；以及

ii) 包含結合到CD40之第一結合區及結合到CD137之第二結合區的第二結合劑。

【請求項95】根據請求項94之使用第一結合劑，其中，該方法為如請求項1至84中任一項所定義，及/或該第一結合劑為如請求項1至84中任一項所定義，及/或該第二結合劑為如請求項1至84中任一項所定義。

【請求項96】一種用於降低個體腫瘤進程或預防個體腫瘤進程或治療個體癌症之方法之第二結合劑，該方法包含投予到該個體

i) 包含結合到CD27之至少一結合區的第一結合劑；以及

ii) 該包含結合到CD40之第一結合區及結合到CD137之第二結合區的第二結合劑。

【請求項97】根據請求項96之使用第二結合劑，其中，該方法為如請求項1至84中任一項所定義，及/或該第一結合劑為如請求項1至84中任一項所定義，及/或該第二結合劑為如請求項1至84中任一項所定義。

【發明圖式】

圖2
(A)
(B)
(C)
(D)
抵抗觸控
抵抗觸控
抵抗觸控
抵抗觸控

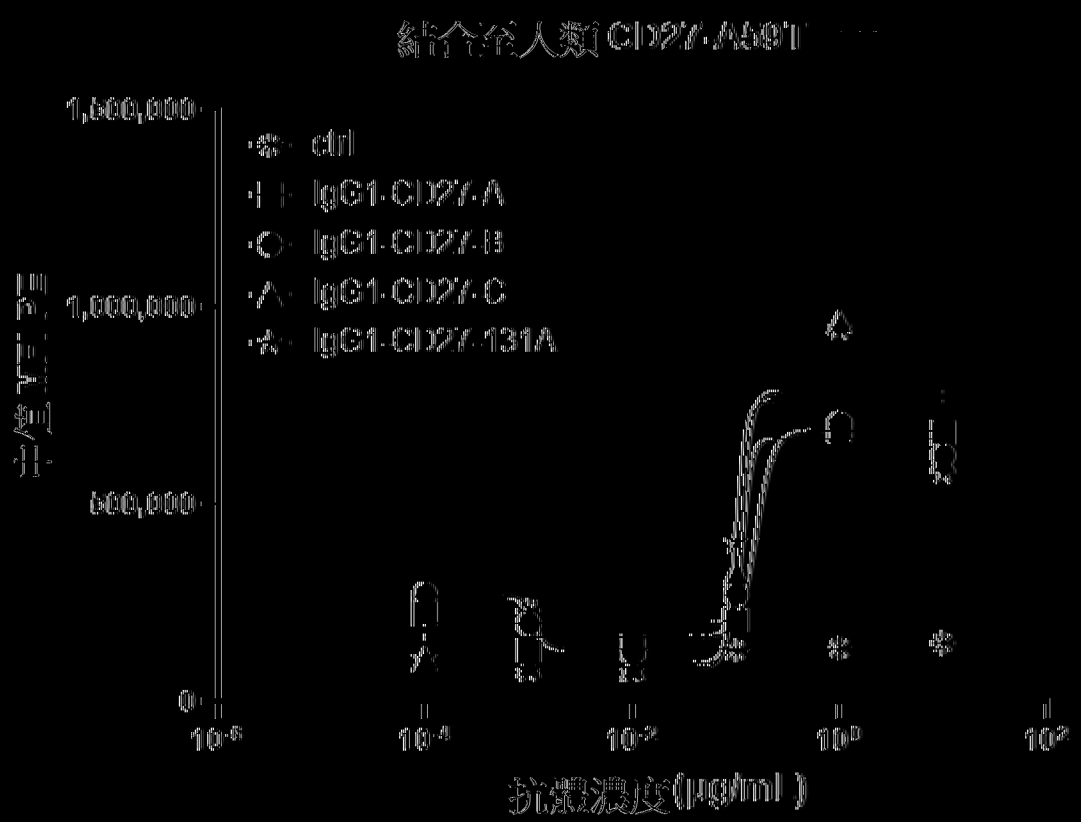
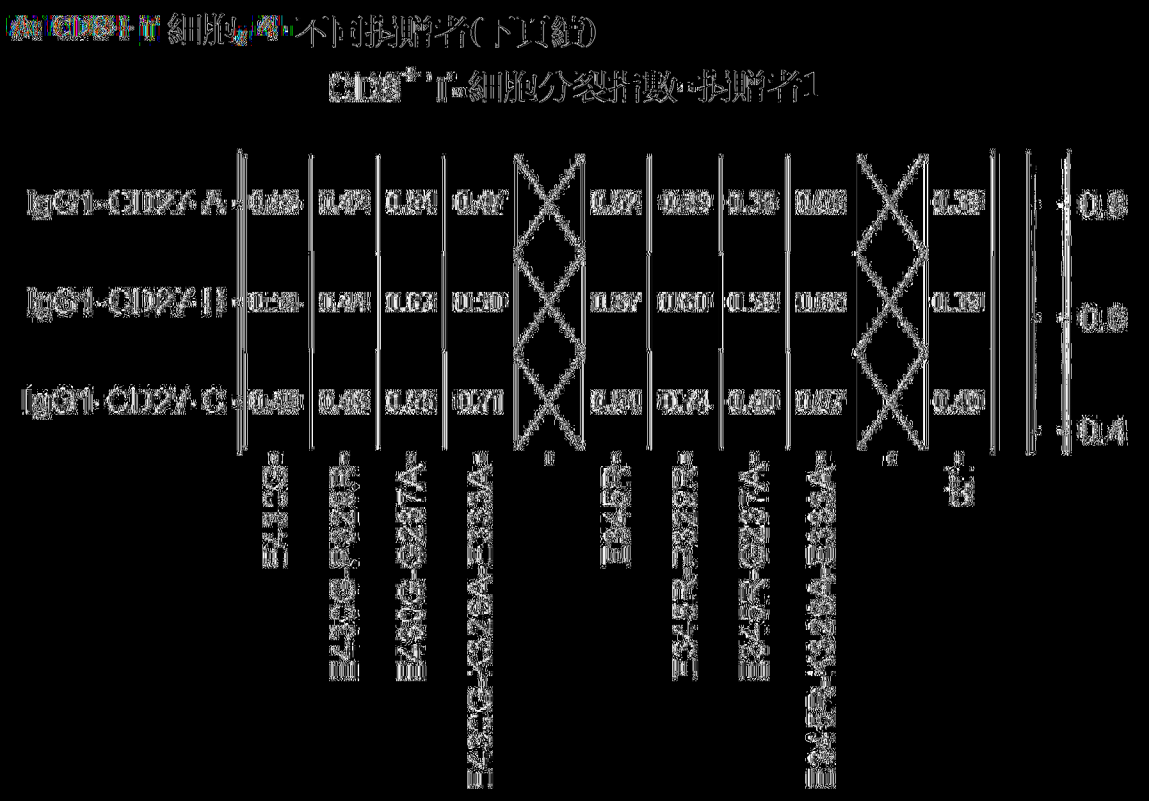
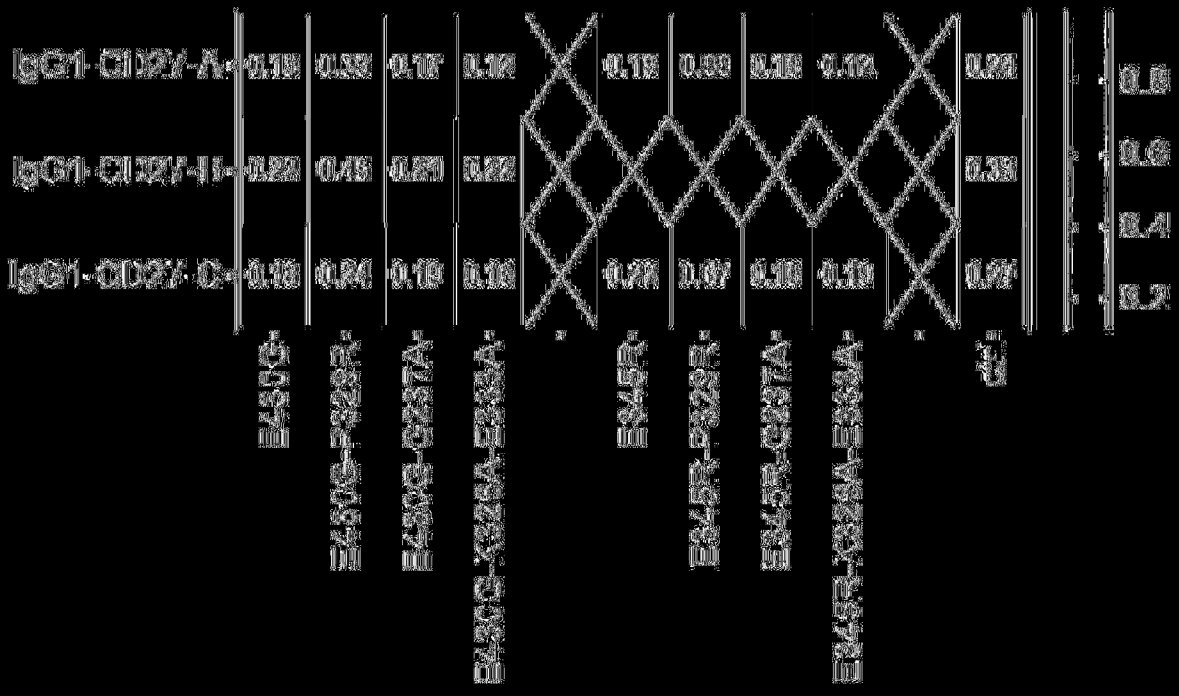

結合於人類 CD27-A301
1,500,000
1,000,000
500,000
0
螢光強度
ctrl
IgG1-CD27-A
IgG1-CD27-B
IgG1-CD27-C
IgG1-CD27-131A
10-5
10-4
10-3
10-2
10-1
10-0
抗體濃度(pg/ml)

圖 3


CD8+ T 細胞，來自不同捐贈者(下頁續)
CD8+ T 細胞分裂指數-捐贈者1
IgG1-CD27-A
IgG1-CD27-B
IgG1-CD27-C
0.445
0.428
0.504
0.467
0.877
0.859
0.536
0.808
0.588
0.388
0.451
0.688
0.877
0.650
0.530
0.652
0.388
0.388
0.488
0.488
0.626
0.671
0.891
0.874
0.680
0.875
0.451
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
IgG1-CD27-A 與 IgG1-CD27-B 的差異
IgG1-CD27-A 與 IgG1-CD27-C 的差異
IgG1-CD27-B 與 IgG1-CD27-C 的差異
IgG1-CD27-A 與 IgG1-CD27-B 的差異
IgG1-CD27-A 與 IgG1-CD27-C 的差異
IgG1-CD27-B 與 IgG1-CD27-C 的差異
CD8+ T 細胞分裂指數-捐贈者2
IgG1-CD27-A
IgG1-CD27-B
IgG1-CD27-C
0.887
0.828
0.881
0.833
0.874
1.66
0.914
1.08
0.89
0.888
0.830
0.881
1.14
1.05
1.71
0.860
1.08
0.887
0.887
0.887
0.833
1.05
1.61
0.847
0.871
0.892
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
IgG1-CD27-A 與 IgG1-CD27-B 的差異
IgG1-CD27-A 與 IgG1-CD27-C 的差異
IgG1-CD27-B 與 IgG1-CD27-C 的差異
IgG1-CD27-A 與 IgG1-CD27-B 的差異
IgG1-CD27-A 與 IgG1-CD27-C 的差異
IgG1-CD27-B 與 IgG1-CD27-C 的差異

(圖 4A)

CD8+ T 細胞分裂指數 - 捐贈者3



增殖的 CD8+ T 細胞 % - 捐贈者4

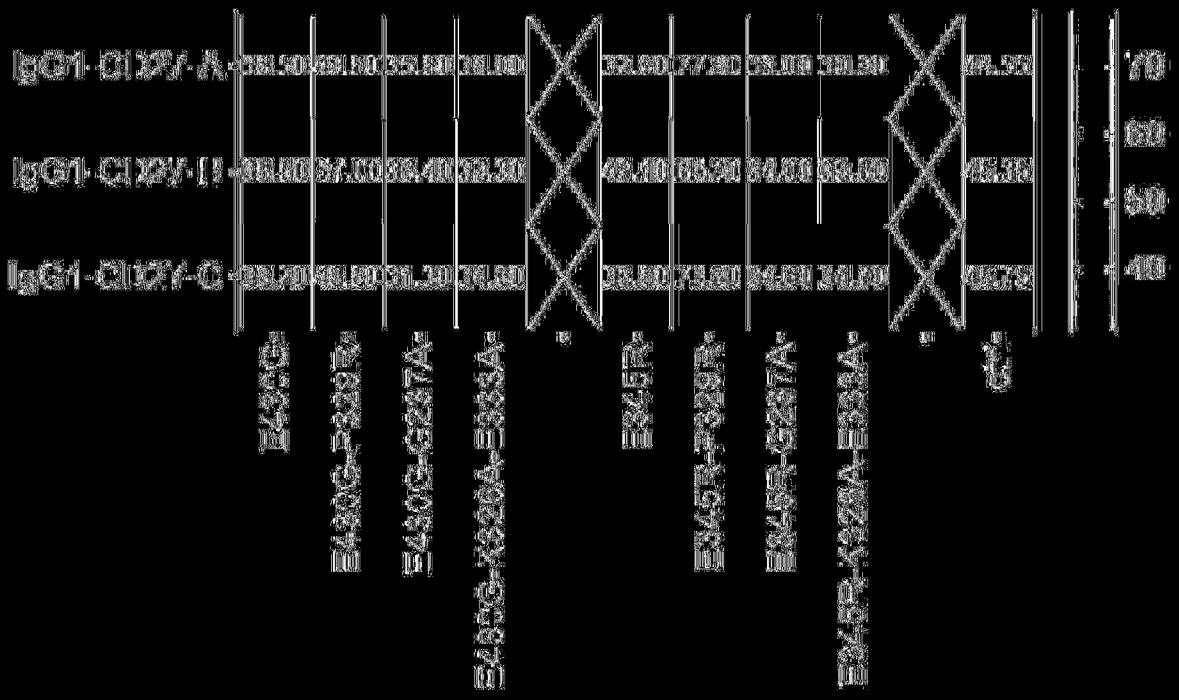
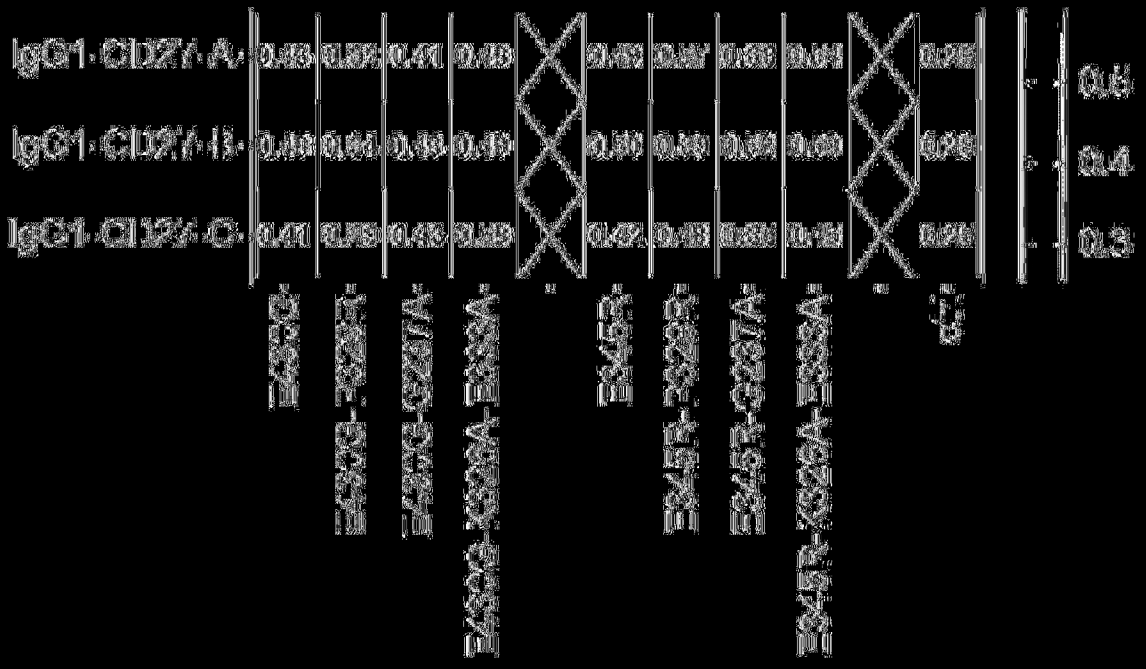


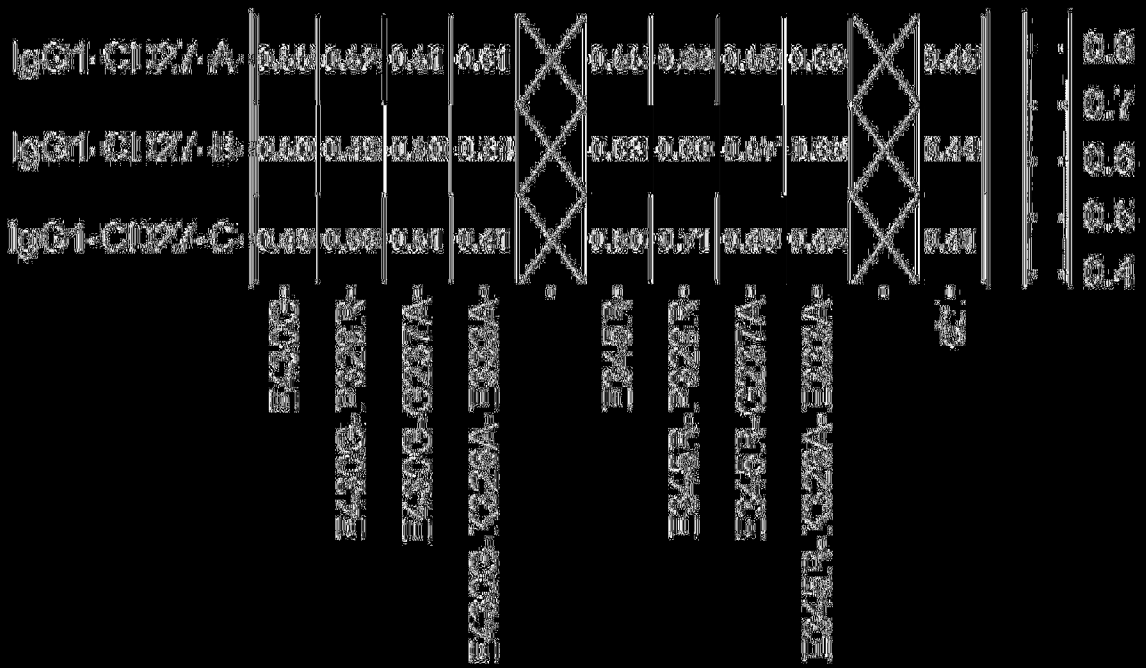
圖 4A (續)

CD4+T細胞，4個不同捐贈者（下頁續）

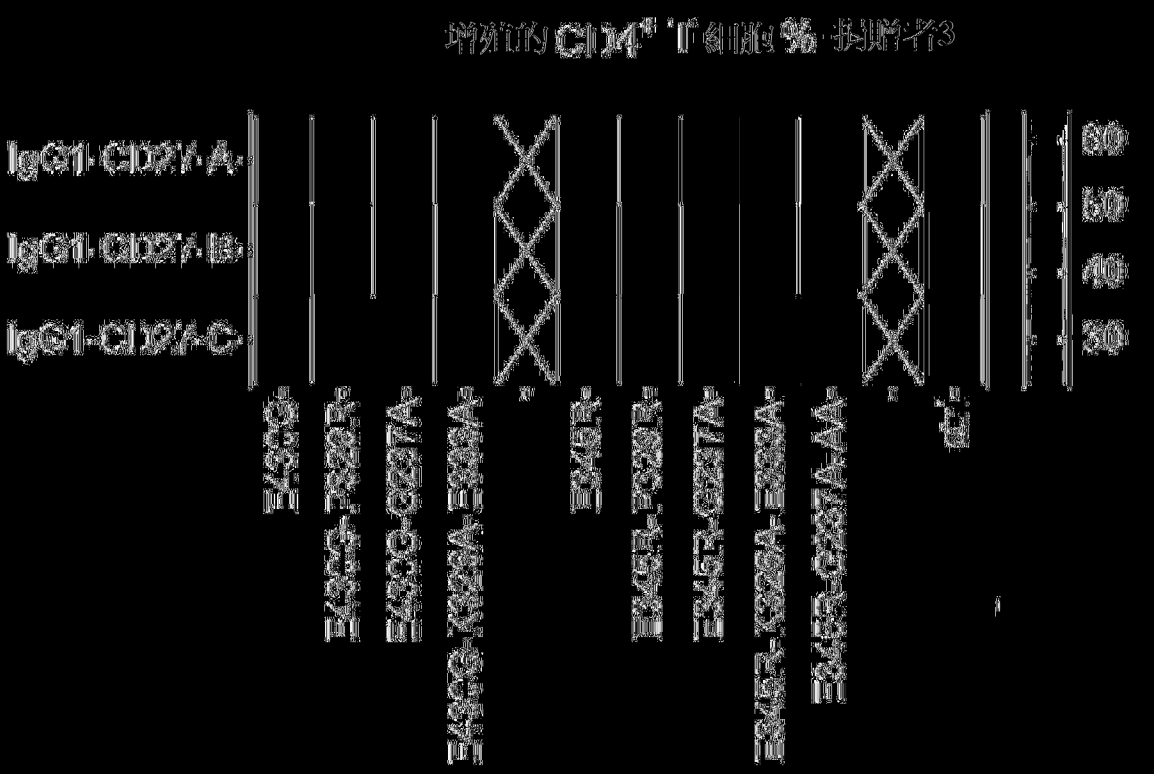
CD4+T細胞分裂指數-捐贈者1

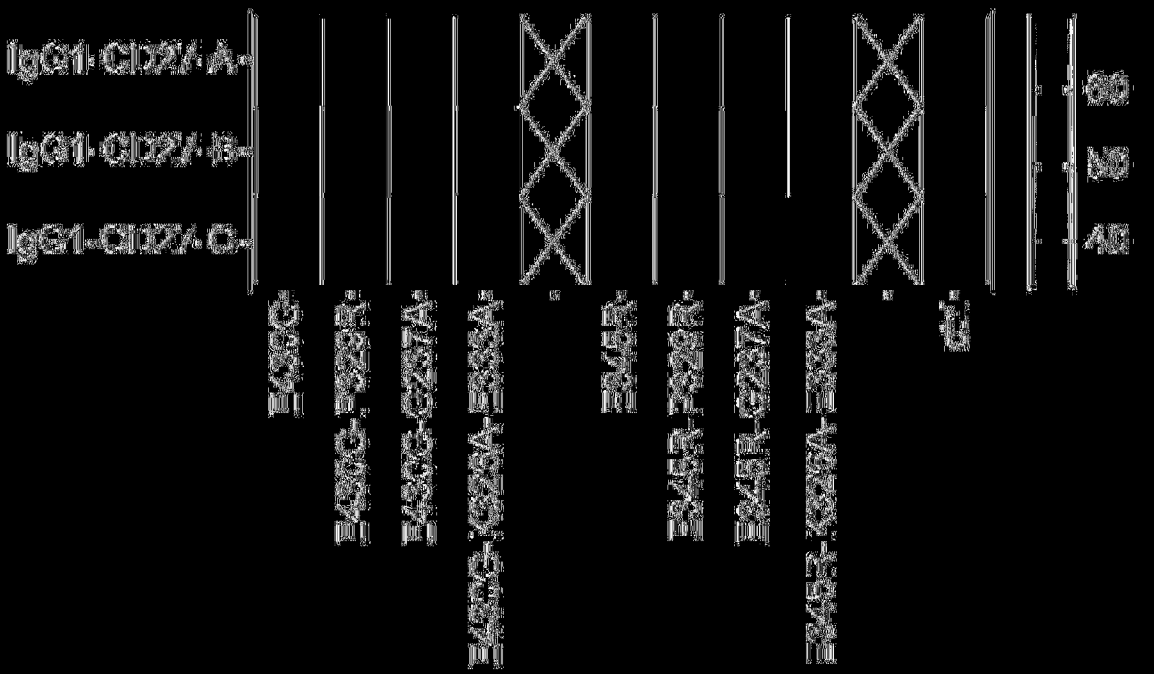


CD4+T細胞分裂指數-捐贈者2



（圖 4B）


增殖的 CD4+ T 細胞 % - 捐贈者3
IgG1-CD27-A-
IgG1-CD27-B-
IgG1-CD27-C-
60
50
40
30
IgG1
IgG1-CD27-C-SEA
IgG1-CD27-C-SEA + VMSA-GMCSF
IgG1-CD27-C-SEA + VMSA-GMCSF + 抗PD-1
IgG1-CD27-C-SEA + VMSA-GMCSF + 抗PD-L1
IgG1-CD27-C-SEA + VMSA-GMCSF + 抗CTLA-4
IgG1-CD27-C-SEA + VMSA-GMCSF + 抗PD-1 + 抗CTLA-4
IgG1-CD27-C-SEA + VMSA-GMCSF + 抗PD-L1 + 抗CTLA-4


增殖的 CD4+ T 細胞 % - 捐贈者4
IgG1-CD27-A-
IgG1-CD27-B-
IgG1-CD27-C-
60
50
40
IgG1
IgG1-CD27-C-SEA
IgG1-CD27-C-SEA + VMSA-GMCSF
IgG1-CD27-C-SEA + VMSA-GMCSF + 抗PD-1
IgG1-CD27-C-SEA + VMSA-GMCSF + 抗PD-L1
IgG1-CD27-C-SEA + VMSA-GMCSF + 抗CTLA-4
IgG1-CD27-C-SEA + VMSA-GMCSF + 抗PD-1 + 抗CTLA-4
IgG1-CD27-C-SEA + VMSA-GMCSF + 抗PD-L1 + 抗CTLA-4

[圖 4B] (續)

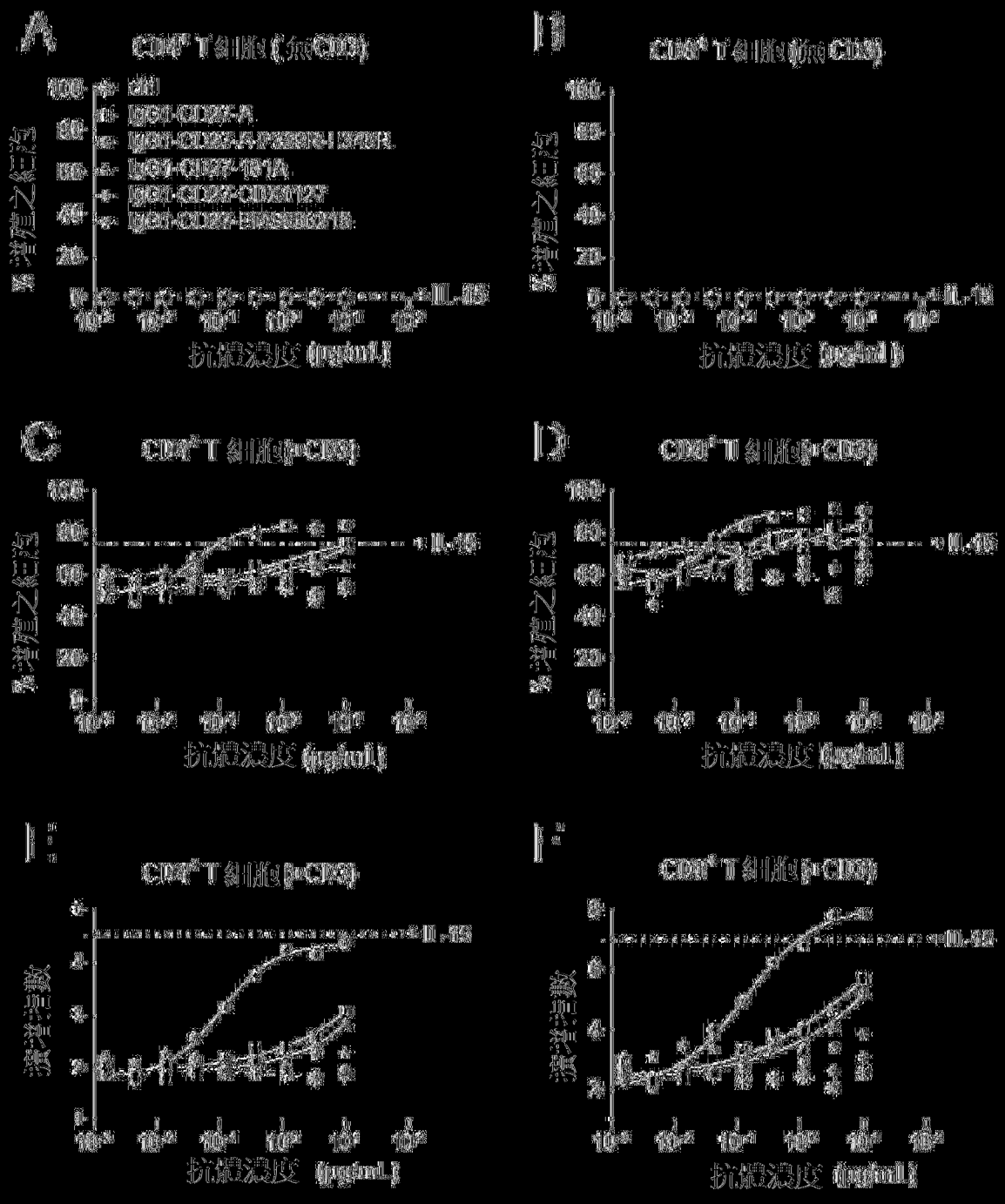
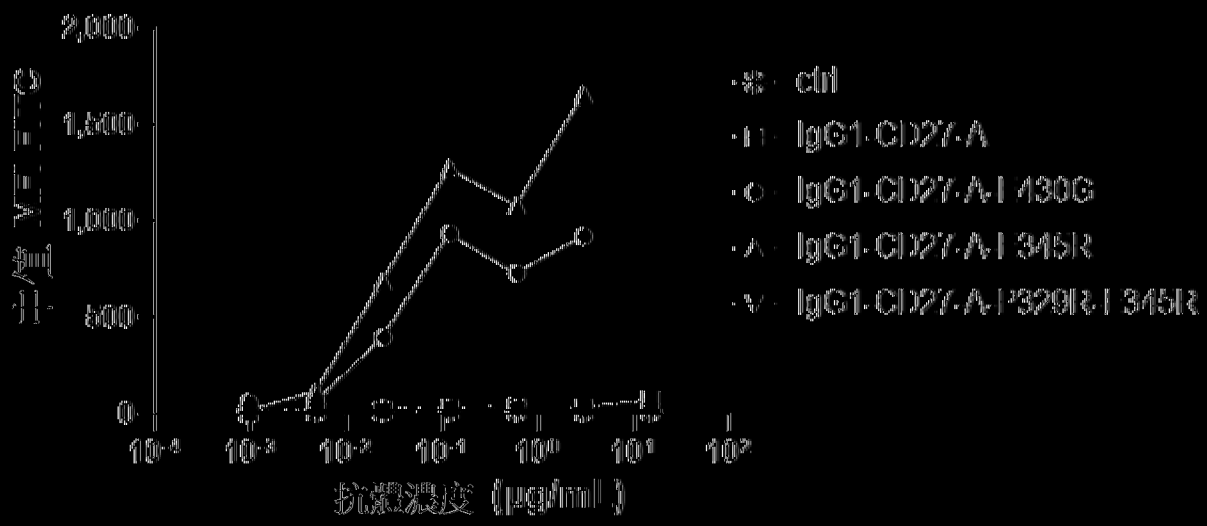

A
CD8+ T細胞 (抗CD3)
IL-15
抗體濃度 (ng/mL)
B
CD8+ T細胞 (抗CD3)
IL-15
抗體濃度 (ng/mL)
C
CD8+ T細胞 (抗CD3)
IL-15
抗體濃度 (ng/mL)
D
CD8+ T細胞 (抗CD3)
IL-15
抗體濃度 (ng/mL)
E
CD8+ T細胞 (抗CD3)
IL-15
抗體濃度 (ng/mL)
F
CD8+ T細胞 (抗CD3)
IL-15
抗體濃度 (ng/mL)

圖 5


2,000
1,500
1,000
500
0
10⁻⁴
10⁻³
10⁻²
10⁻¹
10⁰
10¹
10²
抗體濃度 (pg/ml)
ctrl
IgG1-CD27-A
IgG1-CD27-A-I 430G
IgG1-CD27-A-I 345R
IgG1-CD27-A-P329R-I 345R

|(圖 6)|

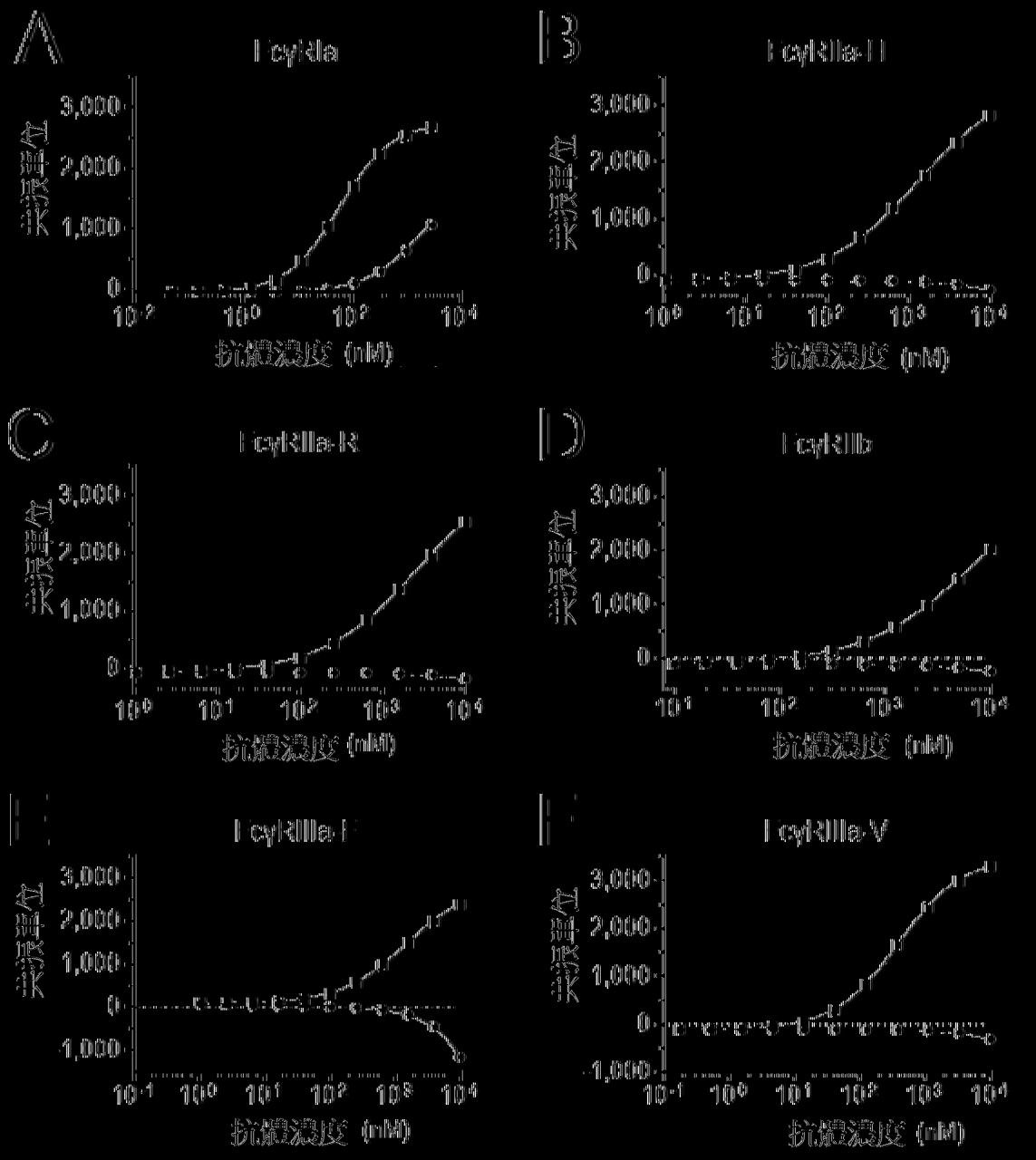
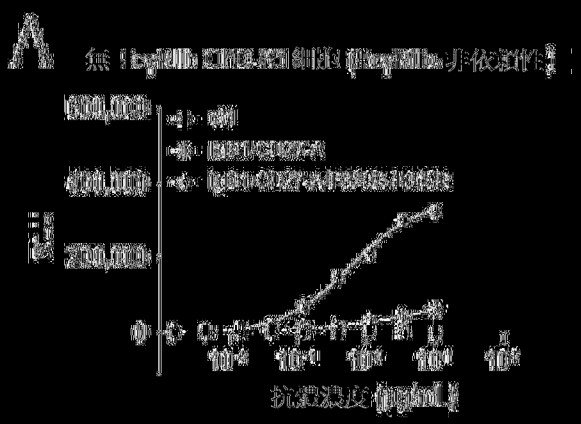
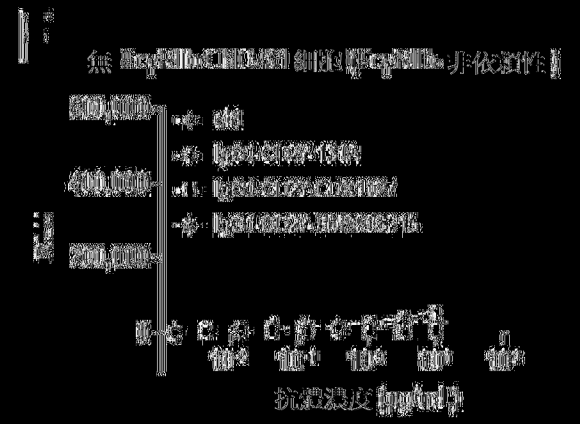
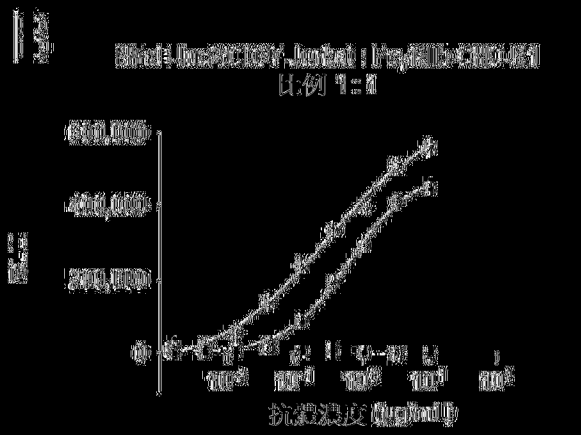

A
FcγRIa
B
FcγRIIa-H
C
FcγRIIa-R
D
FcγRIIb
E
FcγRIIa-I
F
FcγRIIa-V
螢光強度
抗體濃度 (nM)
ctrl
IgG1-CD27-A129R-I345R

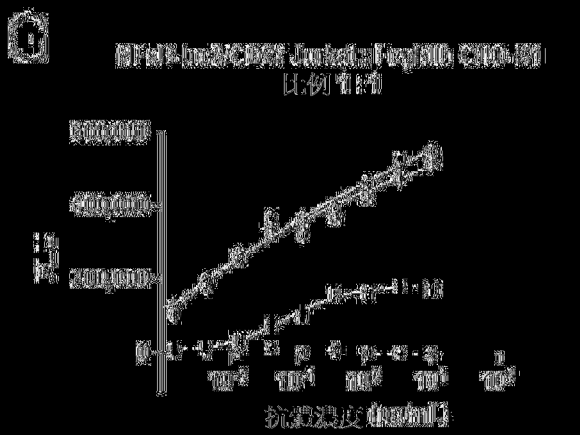
圖 7

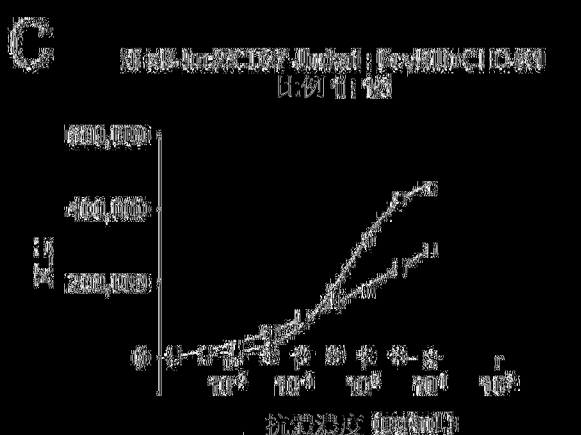
圖8
A
B
A'
B'
第一電極
第二電極
第一絕緣層
第二絕緣層
第三絕緣層
第四絕緣層
第五絕緣層
第六絕緣層
第七絕緣層
第八絕緣層
第九絕緣層
第十絕緣層
第十一絕緣層
第十二絕緣層
第十三絕緣層
第十四絕緣層
第十五絕緣層
第十六絕緣層
第十七絕緣層
第十八絕緣層
第十九絕緣層
第二十絕緣層
第二十一絕緣層
第二十二絕緣層
第二十三絕緣層
第二十四絕緣層
第二十五絕緣層
第二十六絕緣層
第二十七絕緣層
第二十八絕緣層
第二十九絕緣層
第三十絕緣層
第三十一絕緣層
第三十二絕緣層
第三十三絕緣層
第三十四絕緣層
第三十五絕緣層
第三十六絕緣層
第三十七絕緣層
第三十八絕緣層
第三十九絕緣層
第四十絕緣層
第四十一絕緣層
第四十二絕緣層
第四十三絕緣層
第四十四絕緣層
第四十五絕緣層
第四十六絕緣層
第四十七絕緣層
第四十八絕緣層
第四十九絕緣層
第五十絕緣層
第五十一絕緣層
第五十二絕緣層
第五十三絕緣層
第五十四絕緣層
第五十五絕緣層
第五十六絕緣層
第五十七絕緣層
第五十八絕緣層
第五十九絕緣層
第六十絕緣層
第六十一絕緣層
第六十二絕緣層
第六十三絕緣層
第六十四絕緣層
第六十五絕緣層
第六十六絕緣層
第六十七絕緣層
第六十八絕緣層
第六十九絕緣層
第七十絕緣層
第七十一絕緣層
第七十二絕緣層
第七十三絕緣層
第七十四絕緣層
第七十五絕緣層
第七十六絕緣層
第七十七絕緣層
第七十八絕緣層
第七十九絕緣層
第八十絕緣層
第八十一絕緣層
第八十二絕緣層
第八十三絕緣層
第八十四絕緣層
第八十五絕緣層
第八十六絕緣層
第八十七絕緣層
第八十八絕緣層
第八十九絕緣層
第九十絕緣層
第九十一絕緣層
第九十二絕緣層
第九十三絕緣層
第九十四絕緣層
第九十五絕緣層
第九十六絕緣層
第九十七絕緣層
第九十八絕緣層
第九十九絕緣層
第一百絕緣層


A
無 FcγRIIb 之 CHO-K1 細胞 (FcγRIIb- 非依賴性)
抗體濃度 (ng/mL)


B
無 FcγRIIb 之 CHO-K1 細胞 (FcγRIIb- 非依賴性)
抗體濃度 (ng/mL)


D
比例 1:1
抗體濃度 (ng/mL)


E
比例 1:3
抗體濃度 (ng/mL)


C
比例 1:10
抗體濃度 (ng/mL)

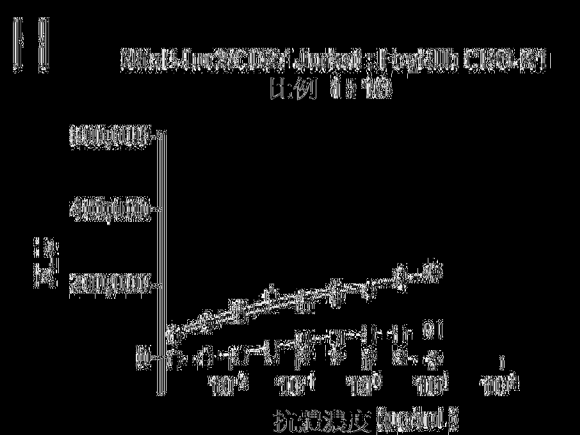
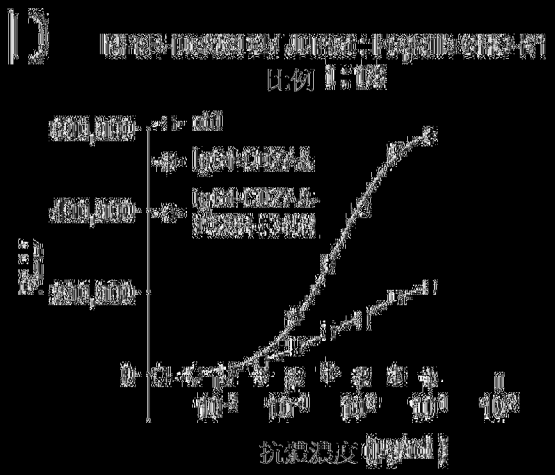
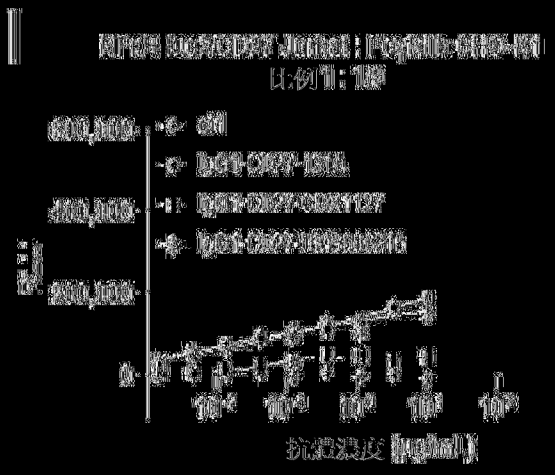
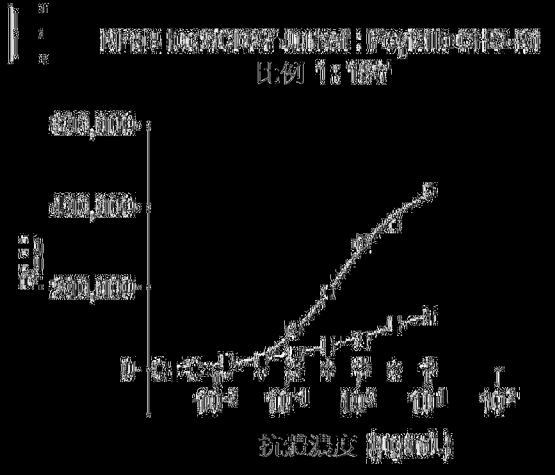
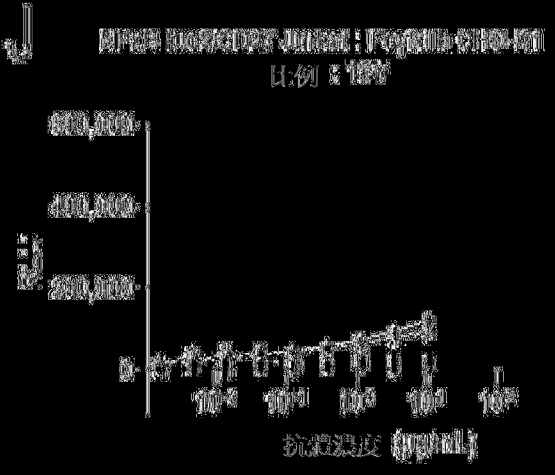

F
比例 1:30
抗體濃度 (ng/mL)

圖 9

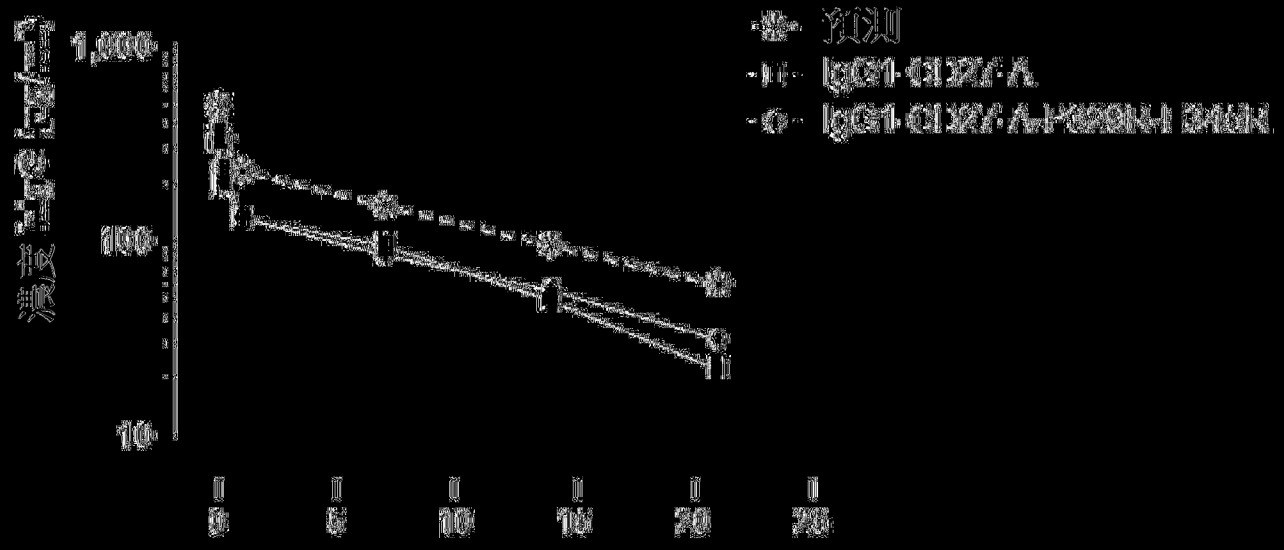

比例 1：128
抗體濃度 (ng/mL)


比例 1：128
抗體濃度 (ng/mL)


比例 1：128
抗體濃度 (ng/mL)


比例 1：128
抗體濃度 (ng/mL)

（圖 9）續


預測
IgG1-G1S27-A
IgG1-G1S27-A-P329N-H 84.6N
1,000
100
10
0
5
10
15
20
25
注射之後天數

|(圖 10)|


100
75
50
25
0
抗體濃度 (μg/ml)
IgG1-CD2Y-A-I329R-I345R
IgG1-CD20

圖 11

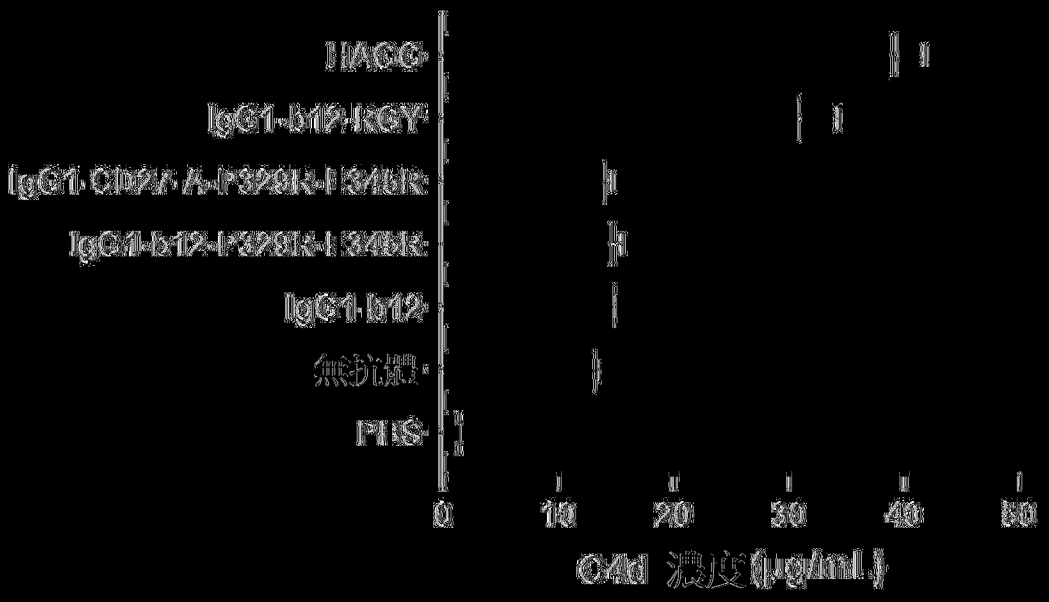
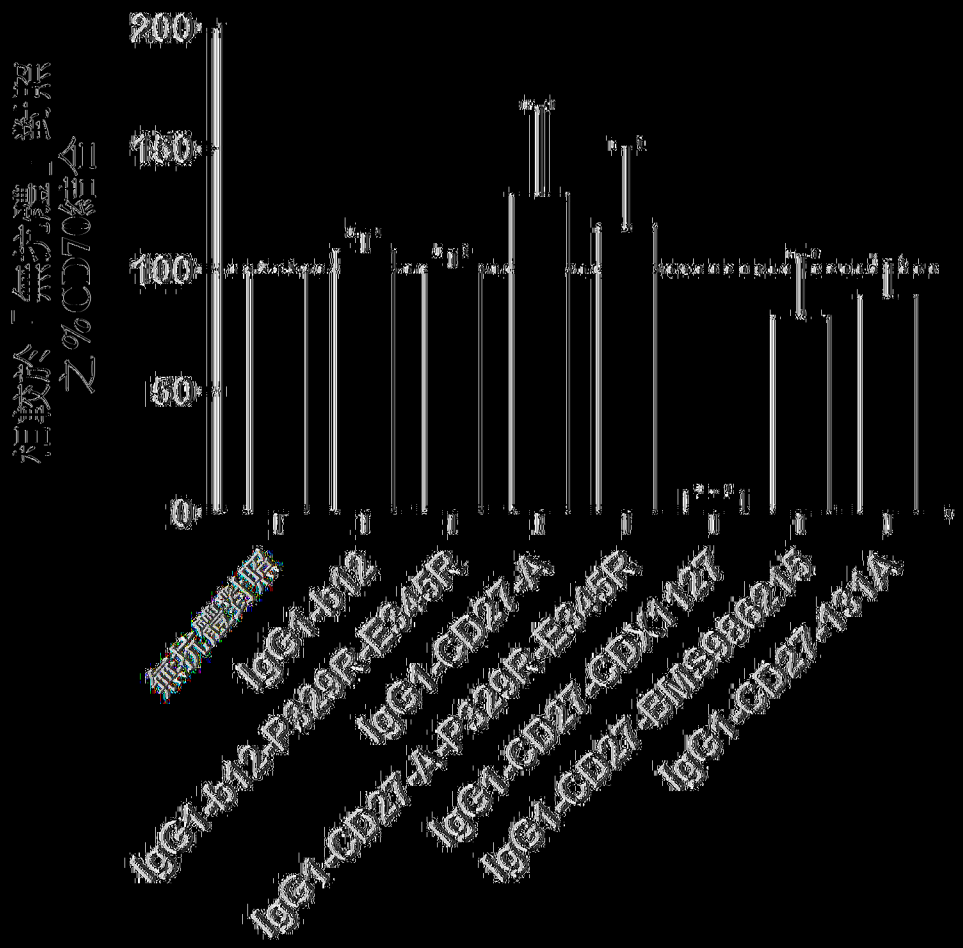
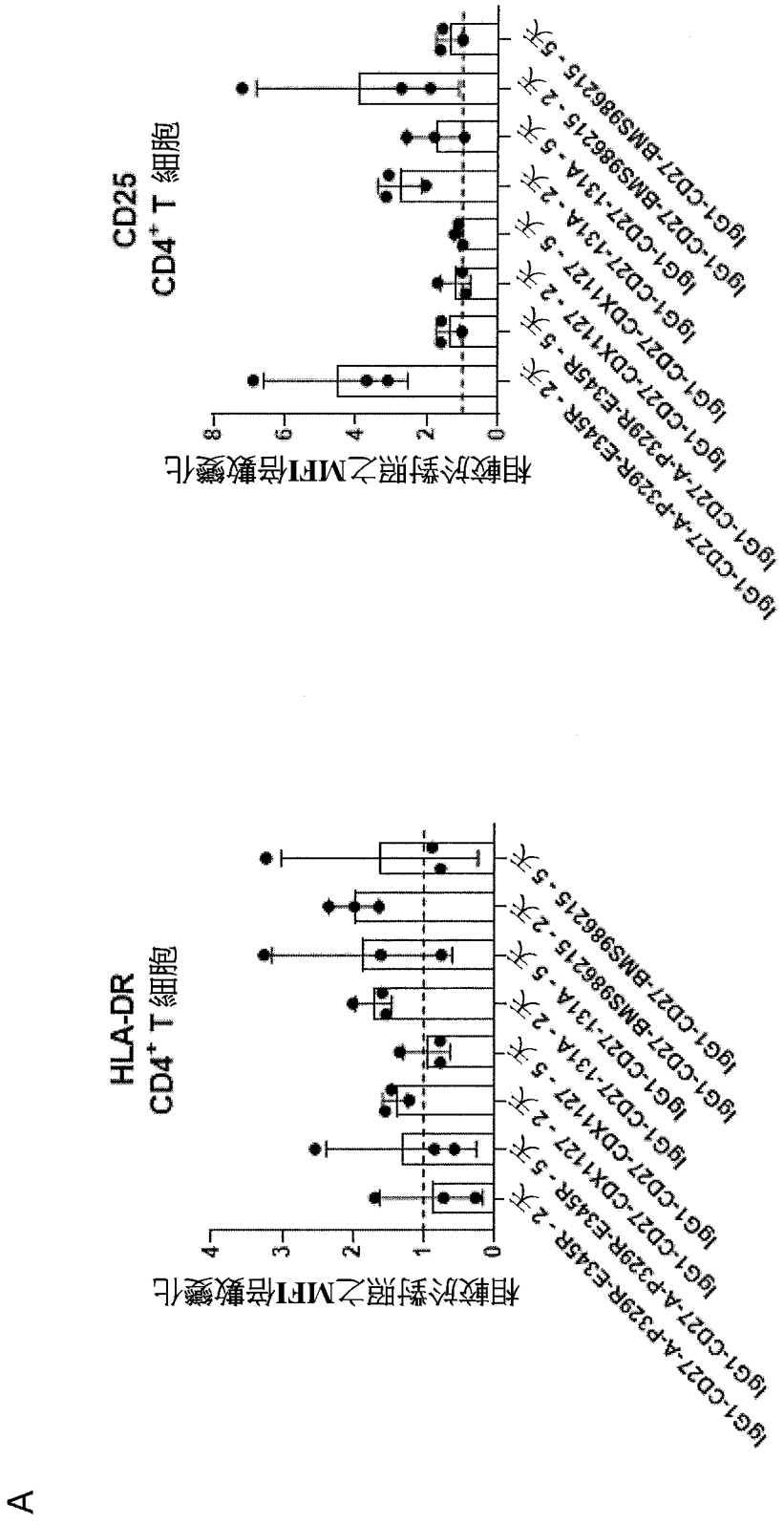

HAGG
IgG1-b12-RGY
IgG1-CD2Y-A-I329R-I345R
IgG1-b12-I329R-I345R
IgG1-b12
無抗體
PBS
0
10
20
30
40
50
C4d 濃度 (μg/ml)

圖 12


200
100
50
0
IgG1-hu12
IgG1-hu12-F32R-E34R
IgG1-CD27-A
IgG1-CD27-A-F32R-E34R
IgG1-CD27-CDX1127
IgG1-CD27-EWSS86215
IgG1-CD27-A3514

(圖 13)


A
HLA-DR
CD4+ T 細胞
相較於對照之MFI倍數變化
0
1
2
3
4
IgG1-CD27-A-P329R-E345R - 2天
IgG1-CD27-E345R - 5天
IgG1-CD27-CDX1127 - 2天
IgG1-CD27-CDX1127 - 5天
IgG1-CD27-131A - 2天
IgG1-CD27-131A - 5天
IgG1-CD27-BMS986215 - 2天
IgG1-CD27-BMS986215 - 5天
CD25
CD4+ T 細胞
相較於對照之MFI倍數變化
0
2
4
6
8
IgG1-CD27-A-P329R-E345R - 2天
IgG1-CD27-E345R - 5天
IgG1-CD27-CDX1127 - 2天
IgG1-CD27-CDX1127 - 5天
IgG1-CD27-131A - 2天
IgG1-CD27-131A - 5天
IgG1-CD27-BMS986215 - 2天
IgG1-CD27-BMS986215 - 5天

【圖 14】

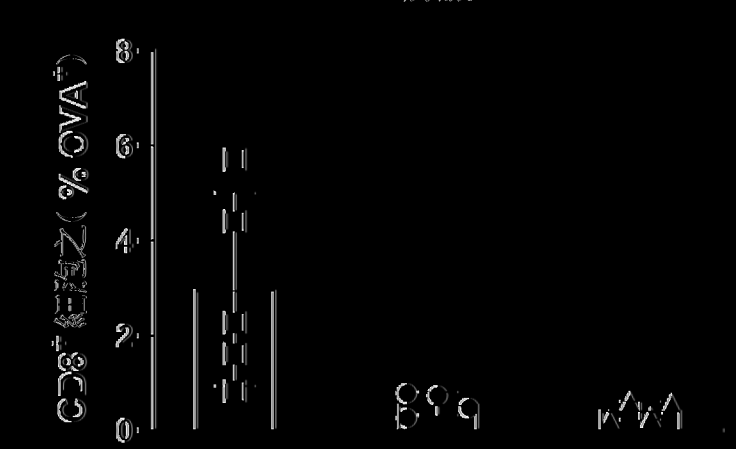
社會公益信託之IMDE作業流程
委託人
受託人
信託監察人
信託財產
信託利益
信託成立
信託終止
信託變更
信託財產移轉
信託利益分配
信託監察
信託報告
信託資訊揭露
信託費用
信託稅務
信託會計
信託審計
信託清算
信託解散
信託重整
信託合併
信託分割
信託轉讓
信託繼承
信託贈與
信託遺贈
信託捐贈
信託公益
信託慈善
信託教育
信託文化
信託藝術
信託科學
信託環保
信託醫療
信託社福
信託弱勢
信託災難
信託緊急
信託救助
信託募款
信託義賣
信託義工
信託志工
信託NGO
信託NPO
信託社團
信託基金會
信託財團
信託法人
信託自然人
信託代理人
信託見證人
信託公證人
信託律師
信託會計師
信託稽核
信託內控
信託風險
信託合規
信託法遵
信託洗錢防制
信託資恐防制
信託KYC
信託CDD
信託EDD
信託PEP
信託制裁名單
信託黑名單
信託灰名單
信託白名單
信託交易監控
信託異常交易
信託可疑交易
信託申報
信託通報
信託調查
信託凍結
信託沒收
信託返還
信託賠償
信託和解
信託訴訟
信託仲裁
信託調解
信託申訴
信託檢舉
信託吹哨者
信託保護
信託隱私
信託個資
信託資安
信託備份
信託還原
信託災備
信託營運持續
信託BCP
信託DRP
信託演練
信託教育訓練
信託認證
信託考試
信託證照
信託繼續教育
信託學分
信託研討會
信託論壇
信託期刊
信託白皮書
信託指引
信託準則
信託規範
信託標準
信託ISO
信託COSO
信託COBIT
信託ITIL
信託PMP
信託PRINCE2
信託Agile
信託Scrum
信託Kanban
信託DevOps
信託CI/CD
信託Git
信託GitHub
信託GitLab
信託Bitbucket
信託Jira
信託Confluence
信託Slack
信託Teams
信託Zoom
信託Webex
信託Meet
信託Line
信託WeChat
信託Telegram
信託Signal
信託WhatsApp
信託Messenger
信託Skype
信託FaceTime
信託Viber
信託KakaoTalk
信託Discord
信託Reddit
信託Quora
信託Medium
信託Substack
信託Blog
信託Podcast
信託YouTube
信託Vimeo
信託TikTok
信託Instagram
信託Facebook
信託Twitter
信託LinkedIn
信託Pinterest
信託Tumblr
信託Flickr
信託500px
信託Behance
信託Dribbble
信託ArtStation
信託DeviantArt
信託Pixiv
信託Weibo
信託Douban
信託Zhihu
信託Baidu
信託Google
信託Bing
信託Yahoo
信託DuckDuckGo
信託Yandex
信託Naver
信託Daum
信託Kakao
信託Rakuten
信託Amazon
信託eBay
信託Alibaba
信託Taobao
信託Tmall
信託JD
信託Pinduoduo
信託Meituan
信託Ele.me
信託Uber
信託Lyft
信託Grab
信託Gojek
信託Didi
信託Airbnb
信託Booking
信託Expedia
信託Trip
信託Agoda
信託Hotels
信託Kayak
信託Priceline
信託Orbitz
信託Travelocity
信託Hotwire
信託Skyscanner
信託Momondo
信託Google Flights
信託Google Maps
信託Google Earth
信託Google Translate
信託Google Drive
信託Google Docs
信託Google Sheets
信託Google Slides
信託Google Forms
信託Google Keep
信託Google Calendar
信託Google Meet
信託Google Chat
信託Google Voice
信託Google Fi
信託Google Pay
信託Google Wallet
信託Google Play
信託Google One
信託Google Cloud
信託Google Workspace
信託Google Admin
信託Google Vault
信託Google Takeout
信託Google Analytics
信託Google Tag Manager
信託Google Ads
信託Google AdSense
信託Google AdMob
信託Google Search Console
信託Google Trends
信託Google Scholar
信託Google Books
信託Google News
信託Google Alerts
信託Google Finance
信託Google Shopping
信託Google Photos
信託Google Lens
信託Google Assistant
信託Google Nest
信託Google Home
信託Google Pixel
信託Google Chromecast
信託Google Fiber
信託Google Stadia
信託Google Duo
信託Google Hangouts
信託Google Allo
信託Google Inbox
信託Google Reader
信託Google Wave
信託Google Buzz
信託Google Latitude
信託Google Checkout
信託Google Base
信託Google Answers
信託Google Video
信託Google Groups
信託Google Code
信託Google Sites
信託Google Page Creator
信託Google Notebook
信託Google Desktop
信託Google Toolbar
信託Google Gadgets
信託Google Web Accelerator
信託Google Search Appliance
信託Google Mini
信託Google Urchin
信託Google Feedburner
信託Google Blogger
信託Google Picasa
信託Google Orkut
信託Google Dodgeball
信託Google Jaiku
信託Google Pyra Labs
信託Google Writely
信託Google Upstartle
信託Google Keyhole
信託Google Where 2 Technologies
信託Google Zipdash
信託Google Waze
信託Google Nest Labs
信託Google DeepMind
信託Google Boston Dynamics
信託Google Wing
信託Google Verily
信託Google Calico
信託Google X
信託Google Moonshot Factory
信託Google Loon
信託Google Project Wing
信託Google Project Loon
信託Google Project Soli
信託Google Project Jacquard
信託Google Project Ara
信託Google Project Tango
信託Google Project Glass
信託Google Project Fi
信託Google Project Stadia
信託Google Project Duo
信託Google Project Hangouts
信託Google Project Allo
信託Google Project Inbox
信託Google Project Reader
信託Google Project Wave
信託Google Project Buzz
信託Google Project Latitude
信託Google Project Checkout
信託Google Project Base
信託Google Project Answers
信託Google Project Video
信託Google Project Groups
信託Google Project Code
信託Google Project Sites
信託Google Project Page Creator
信託Google Project Notebook
信託Google Project Desktop
信託Google Project Toolbar
信託Google Project Gadgets
信託Google Project Web Accelerator
信託Google Project Search Appliance
信託Google Project Mini
信託Google Project Urchin
信託Google Project Feedburner
信託Google Project Blogger
信託Google Project Picasa
信託Google Project Orkut
信託Google Project Dodgeball
信託Google Project Jaiku
信託Google Project Pyra Labs
信託Google Project Writely
信託Google Project Upstartle
信託Google Project Keyhole
信託Google Project Where 2 Technologies
信託Google Project Zipdash
信託Google Project Waze
信託Google Project Nest Labs
信託Google Project DeepMind
信託Google Project Boston Dynamics
信託Google Project Wing
信託Google Project Verily
信託Google Project Calico
信託Google Project X
信託Google Project Moonshot Factory
信託Google Project Loon

相關系統或之MDB伴隨資料
data_type_1
data_type_2
data_type_3
data_type_4
data_type_5
data_type_6
data_type_7
data_type_8
data_type_9
data_type_10

圖 3

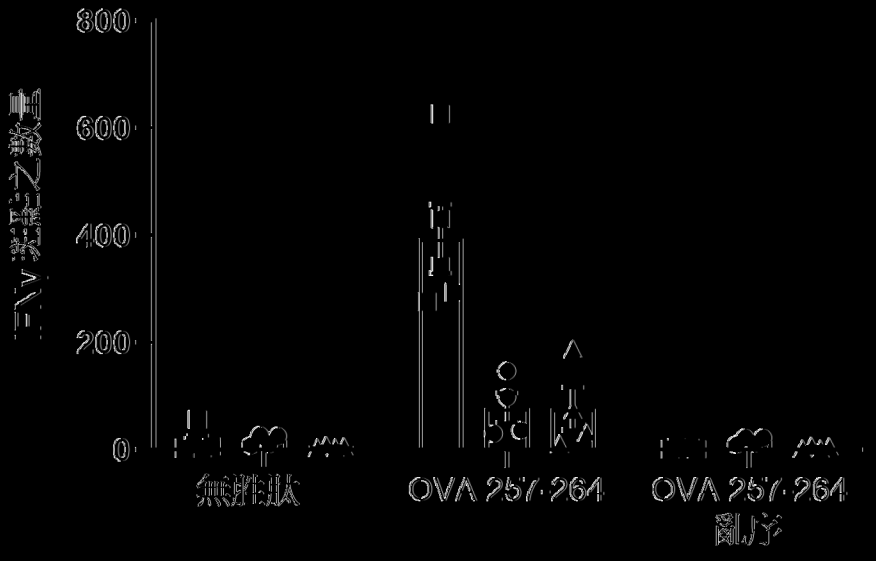
相關系統或之MDB伴隨資料
data_type_1
data_type_2
data_type_3
data_type_4
data_type_5
data_type_6
data_type_7
data_type_8
data_type_9
data_type_10

圖 (3)



□ IgG1-CD27-A-P329R-I-345R
○ IgG1-CD27-CDX1127
△ IgG1-b12-P329R-I-345R

図15



□ IgG1-CD27-A-P329R-I-345R
○ IgG1-CD27-CDX1127
△ IgG1-b12-P329R-I-345R

図16

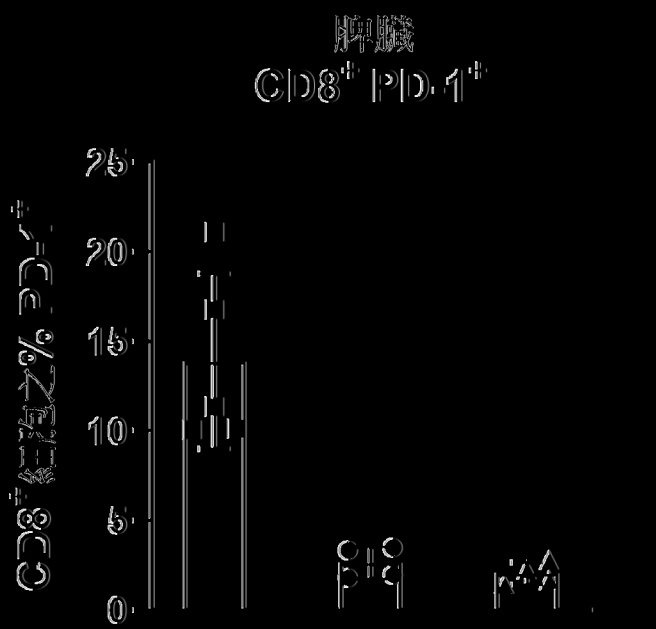
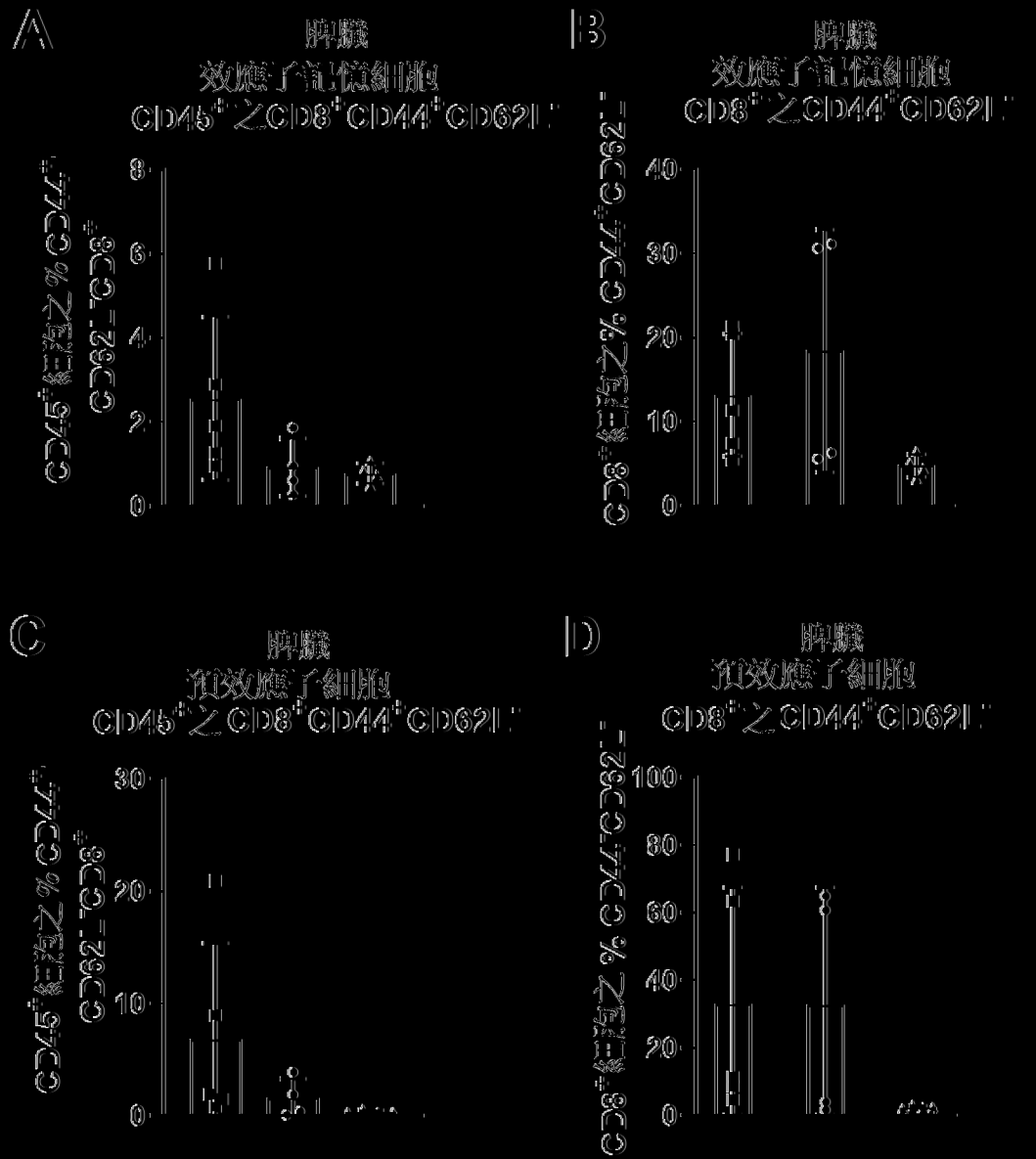

脾臟
CD8+ PD-1+
25
20
15
10
5
0
□ IgG1-CD27-A-P329R-I-345R
○ IgG1-CD27-CDX1127
△ IgG1-b12-P329R-I-345R

圖 17


A
脾臟
效應子記憶細胞
CD45+之CD8+CD44+CD62L-
CD45+細胞之% CD44+ CD62L- CD8+
B
脾臟
效應子記憶細胞
CD8+之CD44+CD62L-
CD8+細胞之% CD44+ CD62L-
C
脾臟
預效應子細胞
CD45+之CD8+CD44+CD62L-
CD45+細胞之% CD44+ CD62L- CD8+
D
脾臟
預效應子細胞
CD8+之CD44+CD62L-
CD8+細胞之% CD44+ CD62L-
□ IgG1-CD27-A-P329R-L345R
○ IgG1-CD27-CDX1127
△ IgG1-b12-P329R-L345R

(圖 18)

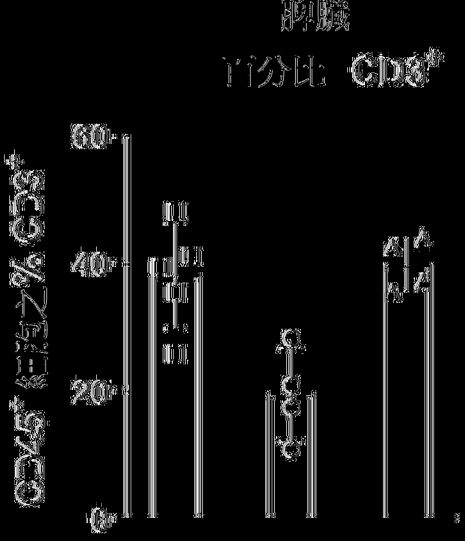
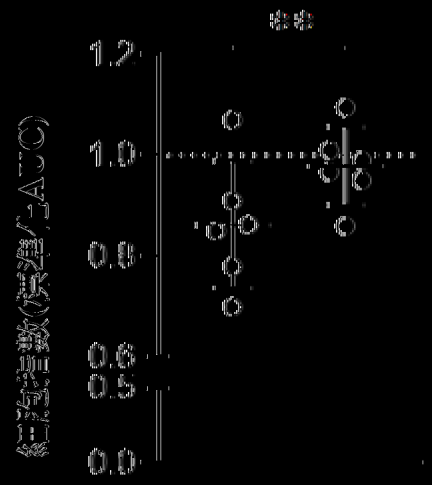

脾臟
T細胞百分比 CD8+
60
40
20
0
IgG1-CD27-A-F329R-F345R
IgG1-CD27-CDX112
IgG1-b12-F329R-F345R

圖 19

(A)
(B)
(C)
(D)
(E)
(F)
(G)
(H)
(I)
(J)
(K)
(L)
(M)
(N)
(O)
(P)
(Q)
(R)
(S)
(T)
(U)
(V)
(W)
(X)
(Y)
(Z)
(AA)
(AB)
(AC)
(AD)
(AE)
(AF)
(AG)
(AH)
(AI)
(AJ)
(AK)
(AL)
(AM)
(AN)
(AO)
(AP)
(AQ)
(AR)
(AS)
(AT)
(AU)
(AV)
(AW)
(AX)
(AY)
(AZ)
(BA)
(BB)
(BC)
(BD)
(BE)
(BF)
(BG)
(BH)
(BI)
(BJ)
(BK)
(BL)
(BM)
(BN)
(BO)
(BP)
(BQ)
(BR)
(BS)
(BT)
(BU)
(BV)
(BW)
(BX)
(BY)
(BZ)
(CA)
(CB)
(CC)
(CD)
(CE)
(CF)
(CG)
(CH)
(CI)
(CJ)
(CK)
(CL)
(CM)
(CN)
(CO)
(CP)
(CQ)
(CR)
(CS)
(CT)
(CU)
(CV)
(CW)
(CX)
(CY)
(CZ)
(DA)
(DB)
(DC)
(DD)
(DE)
(DF)
(DG)
(DH)
(DI)
(DJ)
(DK)
(DL)
(DM)
(DN)
(DO)
(DP)
(DQ)
(DR)
(DS)
(DT)
(DU)
(DV)
(DW)
(DX)
(DY)
(DZ)
(EA)
(EB)
(EC)
(ED)
(EE)
(EF)
(EG)
(EH)
(EI)
(EJ)
(EK)
(EL)
(EM)
(EN)
(EO)
(EP)
(EQ)
(ER)
(ES)
(ET)
(EU)
(EV)
(EW)
(EX)
(EY)
(EZ)
(FA)
(FB)
(FC)
(FD)
(FE)
(FF)
(FG)
(FH)
(FI)
(FJ)
(FK)
(FL)
(FM)
(FN)
(FO)
(FP)
(FQ)
(FR)
(FS)
(FT)
(FU)
(FV)
(FW)
(FX)
(FY)
(FZ)
(GA)
(GB)
(GC)
(GD)
(GE)
(GF)
(GG)
(GH)
(GI)
(GJ)
(GK)
(GL)
(GM)
(GN)
(GO)
(GP)
(GQ)
(GR)
(GS)
(GT)
(GU)
(GV)
(GW)
(GX)
(GY)
(GZ)
(HA)
(HB)
(HC)
(HD)
(HE)
(HF)
(HG)
(HH)
(HI)
(HJ)
(HK)
(HL)
(HM)
(HN)
(HO)
(HP)
(HQ)
(HR)
(HS)
(HT)
(HU)
(HV)
(HW)
(HX)
(HY)
(HZ)
(IA)
(IB)
(IC)
(ID)
(IE)
(IF)
(IG)
(IH)
(II)
(IJ)
(IK)
(IL)
(IM)
(IN)
(IO)
(IP)
(IQ)
(IR)
(IS)
(IT)
(IU)
(IV)
(IW)
(IX)
(IY)
(IZ)
(JA)
(JB)
(JC)
(JD)
(JE)
(JF)
(JG)
(JH)
(JI)
(JJ)
(JK)
(JL)
(JM)
(JN)
(JO)
(JP)
(JQ)
(JR)
(JS)
(JT)
(JU)
(JV)
(JW)
(JX)
(JY)
(JZ)
(KA)
(KB)
(KC)
(KD)
(KE)
(KF)
(KG)
(KH)
(KI)
(KJ)
(KK)
(KL)
(KM)
(KN)
(KO)
(KP)
(KQ)
(KR)
(KS)
(KT)
(KU)
(KV)
(KW)
(KX)
(KY)
(KZ)
(LA)
(LB)
(LC)
(LD)
(LE)
(LF)
(LG)
(LH)
(LI)
(LJ)
(LK)
(LL)
(LM)
(LN)
(LO)
(LP)
(LQ)
(LR)
(LS)
(LT)
(LU)
(LV)
(LW)
(LX)
(LY)
(LZ)
(MA)
(MB)
(MC)
(MD)
(ME)
(MF)
(MG)
(MH)
(MI)
(MJ)
(MK)
(ML)
(MM)
(MN)
(MO)
(MP)
(MQ)
(MR)
(MS)
(MT)
(MU)
(MV)
(MW)
(MX)
(MY)
(MZ)
(NA)
(NB)
(NC)
(ND)
(NE)
(NF)
(NG)
(NH)
(NI)
(NJ)
(NK)
(NL)
(NM)
(NN)
(NO)
(NP)
(NQ)
(NR)
(NS)
(NT)
(NU)
(NV)
(NW)
(NX)
(NY)
(NZ)
(OA)
(OB)
(OC)
(OD)
(OE)
(OF)
(OG)
(OH)
(OI)
(OJ)
(OK)
(OL)
(OM)
(ON)
(OO)
(OP)
(OQ)
(OR)
(OS)
(OT)
(OU)
(OV)
(OW)
(OX)
(OY)
(OZ)
(PA)
(PB)
(PC)
(PD)
(PE)
(PF)
(PG)
(PH)
(PI)
(PJ)
(PK)
(PL)
(PM)
(PN)
(PO)
(PP)
(PQ)
(PR)
(PS)
(PT)
(PU)
(PV)
(PW)
(PX)
(PY)
(PZ)
(QA)
(QB)
(QC)
(QD)
(QE)
(QF)
(QG)
(QH)
(QI)
(QJ)
(QK)
(QL)
(QM)
(QN)
(QO)
(QP)
(QQ)
(QR)
(QS)
(QT)
(QU)
(QV)
(QW)
(QX)
(QY)
(QZ)
(RA)
(RB)
(RC)
(RD)
(RE)
(RF)
(RG)
(RH)
(RI)
(RJ)
(RK)
(RL)
(RM)
(RN)
(RO)
(RP)
(RQ)
(RR)
(RS)
(RT)
(RU)
(RV)
(RW)
(RX)
(RY)
(RZ)
(SA)
(SB)
(SC)
(SD)
(SE)
(SF)
(SG)
(SH)
(SI)
(SJ)
(SK)
(SL)
(SM)
(SN)
(SO)
(SP)
(SQ)
(SR)
(SS)
(ST)
(SU)
(SV)
(SW)
(SX)
(SY)
(SZ)
(TA)
(TB)
(TC)
(TD)
(TE)
(TF)
(TG)
(TH)
(TI)
(TJ)
(TK)
(TL)
(TM)
(TN)
(TO)
(TP)
(TQ)
(TR)
(TS)
(TT)
(TU)
(TV)
(TW)
(TX)
(TY)
(TZ)
(UA)
(UB)
(UC)
(UD)
(UE)
(UF)
(UG)
(UH)
(UI)
(UJ)
(UK)
(UL)
(UM)
(UN)
(UO)
(UP)
(UQ)
(UR)
(US)
(UT)
(UU)
(UV)
(UW)
(UX)
(UY)
(UZ)
(VA)
(VB)
(VC)
(VD)
(VE)
(VF)
(VG)
(VH)
(VI)
(VJ)
(VK)
(VL)
(VM)
(VN)
(VO)
(VP)
(VQ)
(VR)
(VS)
(VT)
(VU)
(VV)
(VW)
(VX)
(VY)
(VZ)
(WA)
(WB)
(WC)
(WD)
(WE)
(WF)
(WG)
(WH)
(WI)
(WJ)
(WK)
(WL)
(WM)
(WN)
(WO)
(WP)
(WQ)
(WR)
(WS)
(WT)
(WU)
(WV)
(WW)
(WX)
(WY)
(WZ)
(XA)
(XB)
(XC)
(XD)
(XE)
(XF)
(XG)
(XH)
(XI)
(XJ)
(XK)
(XL)
(XM)
(XN)
(XO)
(XP)
(XQ)
(XR)
(XS)
(XT)
(XU)
(XV)
(XW)
(XX)
(XY)
(XZ)
(YA)
(YB)
(YC)
(YD)
(YE)
(YF)
(YG)
(YH)
(YI)
(YJ)
(YK)
(YL)
(YM)
(YN)
(YO)
(YP)
(YQ)
(YR)
(YS)
(YT)
(YU)
(YV)
(YW)
(YX)
(YY)
(YZ)
(ZA)
(ZB)
(ZC)
(ZD)
(ZE)
(ZF)
(ZG)
(ZH)
(ZI)
(ZJ)
(ZK)
(ZL)
(ZM)
(ZN)
(ZO)
(ZP)
(ZQ)
(ZR)
(ZS)
(ZT)
(ZU)
(ZV)
(ZW)
(ZX)
(ZY)
(ZZ)

圖 (20)

（二）



- IgG1-CD27-A1329R+S315R (10 μg/ml)
- IgG1-CD27-131A (10 μg/ml)

圖 22

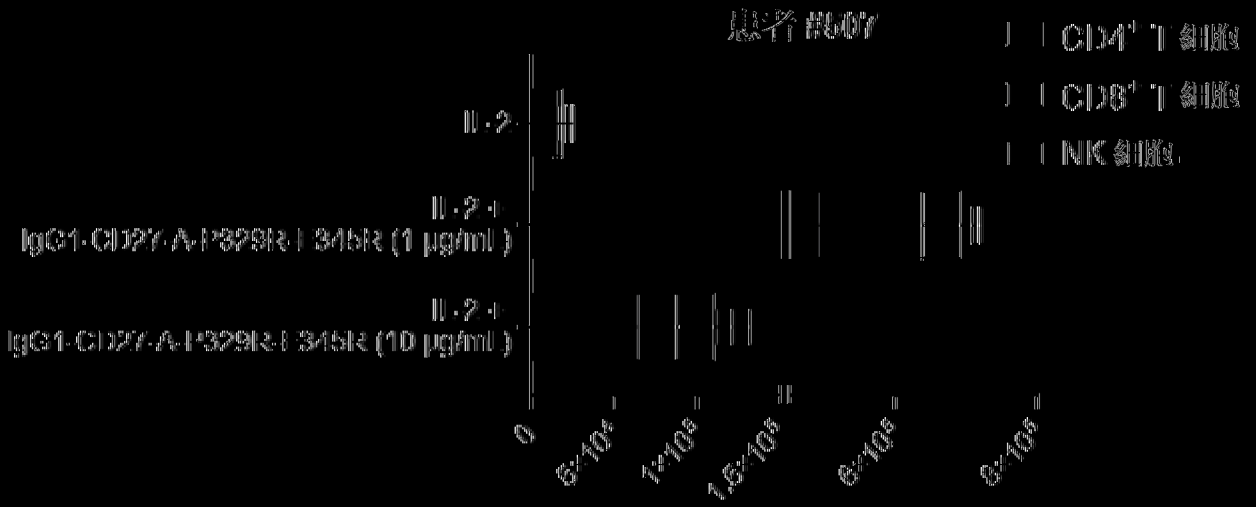
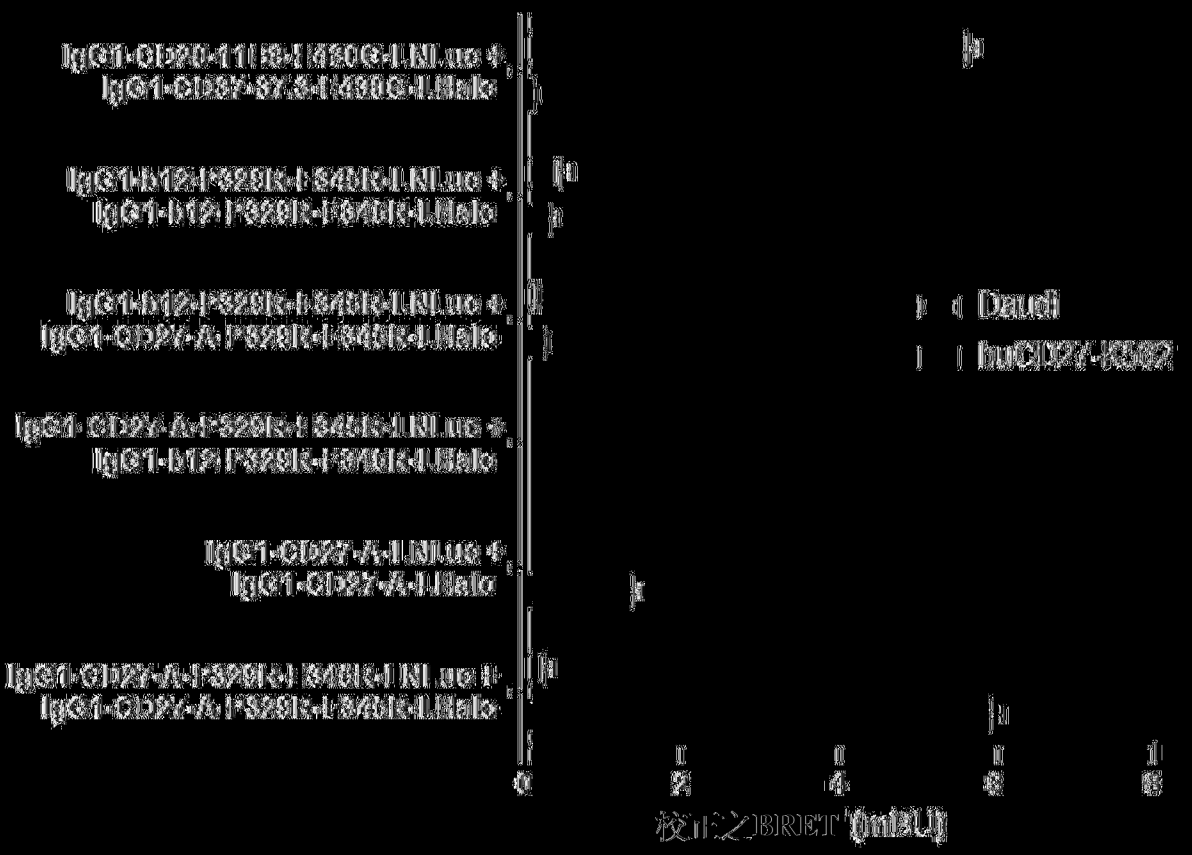
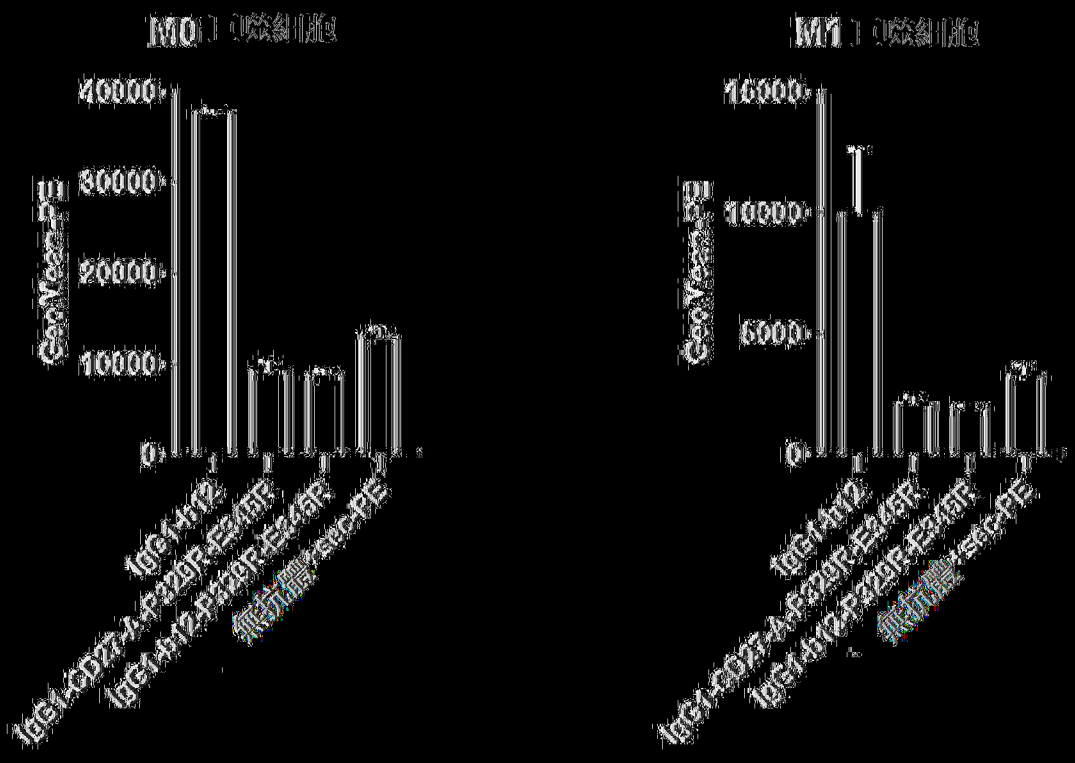


圖 23


IgG1-Cb220-11 Nluc
IgG1-Cb327-87.3-11 Halo
IgG1-b12-11 329R-11 345R-11 Nluc
IgG1-b12-11 329R-11 345R-11 Halo
IgG1-b12-11 329R-b 345R-11 Nluc
IgG1-Cb22y-Ay-11 329R-11 345R-11 Halo
IgG1-Cb22y-Ay-11 329R-11 345R-11 Nluc
IgG1-b12-11 329R-11 345R-11 Halo
IgG1-Cb22y-Ay-11 Nluc
IgG1-Cb22y-Ay-11 Halo
IgG1-Cb22y-Ay-11 329R-11 345R-11 Nluc
IgG1-Cb22y-Ay-11 329R-11 345R-11 Halo
Daudi
huCD27-K562
0
2
4
6
8
校正之BRET (mBU)

|(圖 24)|


M0 噴細胞
40000
30000
20000
10000
0
Conversion
IgG1-Q27A-F270R-E345R
IgG1-Q27A-F270R-E345R
無抗體
M1 噴細胞
16000
10000
6000
0
Conversion
IgG1-Q27A-F270R-E345R
IgG1-Q27A-F270R-E345R
無抗體

(圖 25)

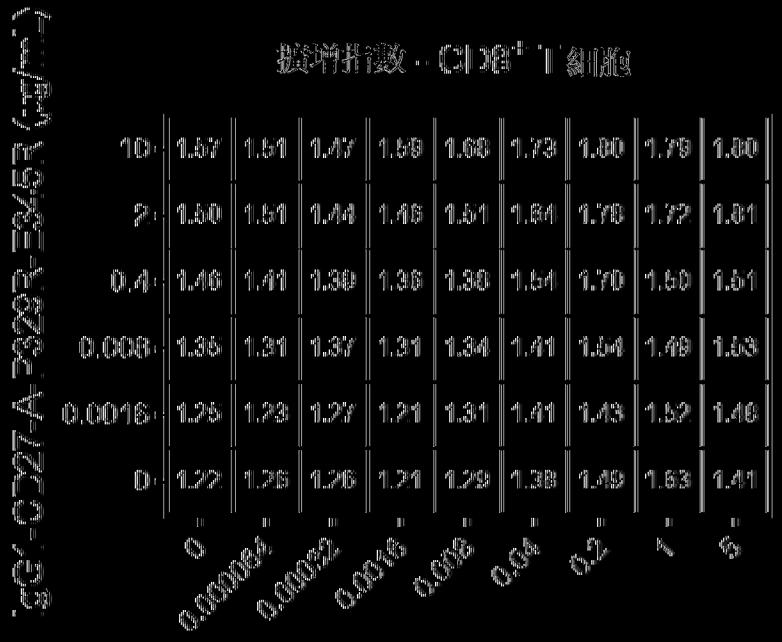

擴增指數：CD3+ T 細胞
IFN-γ 分泌量 (pg/mL)
DuoBody-CD3(0x1-1B3 (μg/ml)
10
2
0.4
0.008
0.0016
0
1.57 1.51 1.47 1.59 1.68 1.73 1.80 1.79 1.80
1.50 1.51 1.44 1.46 1.51 1.64 1.70 1.72 1.61
1.46 1.41 1.30 1.36 1.38 1.54 1.70 1.50 1.51
1.35 1.31 1.37 1.31 1.34 1.41 1.54 1.49 1.53
1.25 1.23 1.27 1.21 1.31 1.41 1.43 1.52 1.46
1.22 1.25 1.26 1.21 1.29 1.38 1.49 1.63 1.41

圖 26

圖 27
無
無
無

（28）