(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-516631
(P2025-516631A)
(43)公表日　令和7年5月30日(2025.5.30)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*39/395 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ	４Ｃ０８４
Ｃ０７Ｋ	*16/28 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/28	ＺＮＡ	４Ｃ０８５
Ｃ０７Ｋ	*16/46 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/46		４Ｈ０４５
Ａ６１Ｋ	*45/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｄ	
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00		

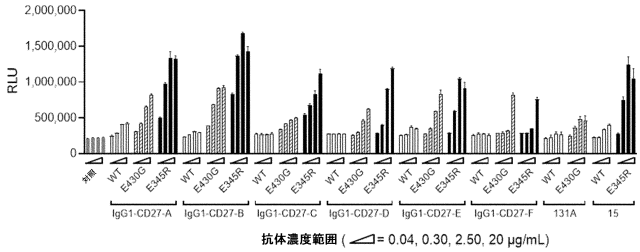
審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全203頁）　最終頁に続く

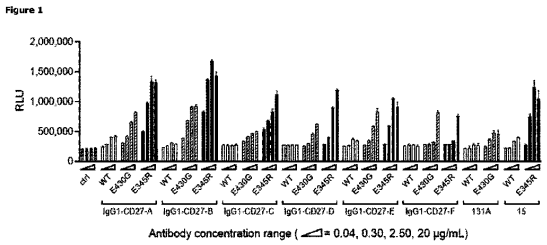
(21)出願番号　特願2024-566504(P2024-566504)
(86)(22)出願日　令和5年5月12日(2023.5.12)
(85)翻訳文提出日　令和6年12月24日(2024.12.24)
(86)国際出願番号　PCT/EP2023/062793
(87)国際公開番号　WO2023/218046
(87)国際公開日　令和5年11月16日(2023.11.16)
(31)優先権主張番号　63/341,397
(32)優先日　令和4年5月12日(2022.5.12)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV
最終頁に続く

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

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

(57)【要約】
本発明は、腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための、PD1/PD-L1阻害剤と組み合わせてCD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む結合剤を使用する併用療法を提供する。





10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
（ｉ）ＣＤ２７に結合する少なくとも１つの結合領域を含む結合剤;および
（ｉｉ）ＰＤ１/ＰＤ-Ｌ１阻害剤
を対象に投与する工程を含む、対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法。
【請求項２】
前記結合剤が、それぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:５、６、および７に示されている配列を含む重鎖可変（ＶＨ）領域ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３、ならびにそれぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:９、１０および１１に示されている配列を含む軽鎖可変（ＶＬ）領域ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３を含む、請求項１記載の方法。
【請求項３】
前記結合剤が、ヒトＣＤ２７に結合する能力を有する２つの結合領域を含み、前記抗体が、それぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:５、６、および７に示されている配列を含む重鎖可変（ＶＨ）領域ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３、ならびにそれぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:９、１０および１１に示されている配列を含む軽鎖可変（ＶＬ）領域ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３を含む、請求項１または２記載の方法。
【請求項４】
前記結合剤が、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されている配列を含むＶＨ領域を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項５】
前記結合剤が、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されている配列を含むＶＬ領域を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項６】
前記結合剤が、それぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されている配列を含むＶＨ領域およびＶＬ領域を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項７】
前記結合剤が、抗体、好ましくはヒト抗体またはヒト化抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項８】
前記抗体が、軽鎖定常領域（ＣＬ）および重鎖定常領域（ＣＨ）をさらに含む全長抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項９】
前記軽鎖定常領域がヒトカッパである、請求項８記載の方法。
【請求項１０】
前記軽鎖定常領域がヒトラムダである、請求項８記載の方法。
【請求項１１】
前記結合剤が重鎖定常領域をさらに含み、該重鎖定常領域が、ヒトＩｇＧアイソタイプの重鎖定常領域であり、かつ任意で、改変されたヒトＩｇＧの重鎖定常領域である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項１２】
前記ヒトＩｇＧまたは改変されたヒトＩｇＧが、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３またはＩｇＧ４、例えばヒトＩｇＧ１より選択される、請求項１１記載の方法。
【請求項１３】
前記ＩｇＧが、１つまたは複数のアミノ酸置換を含む改変されたヒトＩｇＧである、請求項１１または１２記載の方法。
【請求項１４】
前記改変されたヒトＩｇＧが、１つまたは複数のアミノ酸置換、例えば２つ以上のアミノ酸置換を含む、改変されたヒトＩｇＧ１である、請求項１１～１３のいずれか一項記載の方法。
【請求項１５】

前記改変されたヒトIgG重鎖定常領域が、最大で10個のアミノ酸置換、例えば最大で9個、例えば最大で8個、例えば最大で7個、例えば最大で6個、例えば最大で5個、例えば最大で4個、例えば最大で3個、例えば最大で2個のアミノ酸置換を含む、請求項11～14のいずれか一項記載の方法。

【請求項１６】

重鎖定常領域中の前記置換が、野生型IgG1抗体重鎖定常領域を含むことを除いて同一の抗体と比較してCD27アゴニズムの増加を誘導する、請求項11～15のいずれか一項記載の方法。

【請求項１７】

Eu番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置E345またはE430に対応する位置におけるアミノ酸残基が、A、C、D、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、WおよびYを含む群より選択される、請求項11～16のいずれか一項記載の方法。

【請求項１８】

Eu番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置E345に対応する位置におけるアミノ酸残基がRである、請求項11～17のいずれか一項記載の方法。

【請求項１９】

Eu番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置E430に対応する位置におけるアミノ酸残基がGである、請求項11～18のいずれか一項記載の方法。

【請求項２０】

Eu番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置P329に対応する位置におけるアミノ酸残基がRである、請求項11～19のいずれか一項記載の方法。

【請求項２１】

Eu番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置E345およびP329に対応する位置におけるアミノ酸残基が両方ともRである、請求項11～20のいずれか一項記載の方法。

【請求項２２】

前記結合剤が、野生型IgG1重鎖定常領域を含む親抗体と同様の薬物動態プロファイルを有する、請求項11～21のいずれか一項記載の方法。

【請求項２３】

前記結合剤が、SEQ ID NO:12、13、14、15、18、19、20、21、22、23、27、28、29、30、31、32、33、34および36を含む群より選択される配列を含む重鎖定常領域を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項２４】

前記結合剤が、SEQ ID NO:15に示されている配列を含む重鎖定常領域を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項２５】

前記結合剤が重鎖定常領域を含み、該重鎖定常領域が、前記結合剤が親抗体と比べてより低い程度まで1つまたは複数のFc媒介性エフェクター機能を誘導するように改変されている、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項２６】

前記1つまたは複数のFc媒介性エフェクター機能が、少なくとも20%、例えば少なくとも30%または少なくとも40%、または少なくとも50%または少なくとも60%または少なくとも70%、または少なくとも80%または少なくとも90%減少している、請求項25記載の方法。

【請求項２７】

前記結合剤が1つまたは複数のFc媒介性エフェクター機能を誘導しない、請求項25または26記載の方法。

【請求項２８】

前記1つまたは複数のFc媒介性エフェクター機能が、以下の群:
補体依存性細胞傷害（CDC）、補体依存性細胞媒介性細胞傷害（CDCC）、補体活性化、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）、抗体依存性細胞媒介性ファゴサイトーシス（

ADCP）、C1q結合、およびFcγR結合
より選択される、請求項25～27のいずれか一項記載の方法。
【請求項２９】
前記結合剤が、実施例8の方法により測定された場合にC1q結合を誘導しない、請求項25～28のいずれか一項記載の方法。
【請求項３０】
前記結合剤が一価抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項３１】
前記結合剤が二価抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項３２】
前記結合剤が単一特異性抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項３３】
前記結合剤が、前記請求項のいずれか一項記載のヒトCD27に結合する能力を有する第1の抗原結合領域と、ヒトCD27上の異なるエピトープに結合する能力を有するかまたは異なる標的に結合する能力を有する第2の抗原結合領域とを含む二重特異性抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項３４】
CD27がヒトCD27であり、特に、該ヒトCD27が、SEQ ID NO:1に示されている配列またはSEQ ID NO:2に示されているヒトCD27バリアントを含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項３５】
前記結合剤が、
e. SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むVH領域;
f. SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列を含むVL領域;
g. SEQ ID NO:15に示されるアミノ酸配列を含むCH領域;および
h. SEQ ID NO:17に示されるアミノ酸配列を含むCL領域
を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項３６】
前記結合剤が、SEQ ID NO:35に示されるアミノ酸配列を含む重鎖およびSEQ ID NO:25に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項３７】
PD-L1が、ヒトPD-L1、特にSEQ ID NO:98に示される配列を含むヒトPD-L1である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項３８】
PD1がヒトPD1であり、好ましくは、該PD1が、SEQ ID NO:58またはSEQ ID NO:59に示されているアミノ酸配列を有するかまたは含む、あるいはPD1のアミノ酸配列が、SEQ ID NO:58もしくはSEQ ID NO:59に示されているアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%、もしくは100%の同一性を有するか、またはその免疫原性断片である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項３９】
前記PD1/PD-L1阻害剤が、PD1もしくはPD-L1に結合する抗体、好ましくはPD1/PD-L1相互作用のアンタゴニストである抗体であり、かつ/またはPD1もしくはPD-L1遮断抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項４０】
前記PD1/PD-L1阻害剤が、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4からなる群より選択されるアイソタイプの抗体、例えばIgG1アイソタイプの抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項４１】

前記PD1/PD-L1阻害剤が、全長抗体または抗体断片、例えば全長IgG1抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項４２】
前記PD1/PD-L1阻害剤が単一特異性抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項４３】
前記PD1/PD-L1阻害剤が、それぞれSEQ ID NO:99、100および101に示されるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含む重鎖可変領域（VH）、ならびにそれぞれSEQ ID NO:102、LASおよびSEQ ID NO:103に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含む、PD1に結合する抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項４４】
前記PD1/PD-L1阻害剤が、SEQ ID NO:104のアミノ酸配列を含むVH領域およびSEQ ID NO:105のアミノ酸配列を含むVL領域を含む、PD1に結合する抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項４５】
前記PD1/PD-L1阻害剤が、SEQ ID NO:106のアミノ酸配列を含む重鎖およびSEQ ID NO:107のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、PD1に結合する抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項４６】
（a）前記結合剤が、SEQ ID NO:35に示されるアミノ酸配列を含む重鎖およびSEQ ID NO:25に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗体であり;
（b）前記PD1/PD-L1阻害剤がペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーである、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項４７】
（a）前記結合剤が、SEQ ID NO:35に示されるアミノ酸配列を含む重鎖およびSEQ ID NO:25に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗体であり;
（b）前記PD1/PD-L1阻害剤がニボルマブまたはそのバイオシミラーである、
請求項1～42のいずれか一項記載の方法。
【請求項４８】
（a）前記結合剤が、SEQ ID NO:35に示されるアミノ酸配列を含む重鎖およびSEQ ID NO:25に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗体であり;
（b）前記PD1/PD-L1阻害剤がアテゾリズマブまたはそのバイオシミラーである、
請求項1～42のいずれか一項記載の方法。
【請求項４９】
前記PD1/PD-L1阻害剤が、PD1に結合する抗体、またはその抗原結合性断片であり、該PD1に結合する抗体が、それぞれSEQ ID NO:49、46、および45に示されている配列を含むVH領域CDR1、CDR2、およびCDR3、ならびにそれぞれSEQ ID NO:52、QASおよびSEQ ID NO:50に示されている配列を含むVL領域CDR1、CDR2、およびCDR3を含む、請求項1～42のいずれか一項記載の方法。
【請求項５０】
前記PD1に結合する抗体が、SEQ ID NO:56に示されている重鎖可変領域（VH）配列のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%、または100%の同一性を有する配列を含むVHを含む、請求項49記載の方法。
【請求項５１】
前記PD1に結合する抗体が重鎖可変領域（VH）を含み、該VHが、SEQ ID NO:56に示されている配列を含む、請求項50記載の方法。
【請求項５２】
前記PD1に結合する抗体が、SEQ ID NO:57に示されている軽鎖可変領域（VL）配列

のアミノ酸配列に対して少なくとも70％、少なくとも75％、少なくとも80％、少なくとも85％、少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも97％、少なくとも99％、または100％の同一性を有する配列を含むVLを含む、請求項49～51のいずれか一項記載の方法。

【請求項５３】

前記PD1に結合する抗体が軽鎖可変領域（VL）を含み、該VLが、SEQ ID NO:57に示されている配列を含む、請求項52記載の方法。

【請求項５４】

前記PD1に結合する抗体が重鎖可変領域（VH）および軽鎖可変領域（VL）を含み、該VHが、SEQ ID NO:56に示されている配列を含むかまたは有し、かつ該VLが、SEQ ID NO:57に示されている配列を含むかまたは有する、請求項49～53のいずれか一項記載の方法。

【請求項５５】

前記PD1に結合する抗体が重鎖定常領域を含み、

該重鎖定常領域が、

EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の234位に対応する位置における芳香族または非極性アミノ酸、および

EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の236位に対応する位置におけるグリシン以外のアミノ酸

を含む、

請求項49～54のいずれか一項記載の方法。

【請求項５６】

前記236位に対応する位置におけるアミノ酸が塩基性アミノ酸である、請求項55記載の方法。

【請求項５７】

前記塩基性アミノ酸が、リジン、アルギニンおよびヒスチジンからなる群より選択される、請求項56記載の方法。

【請求項５８】

前記塩基性アミノ酸がアルギニン（G236R）である、請求項56または57記載の方法。

【請求項５９】

前記234位に対応する位置におけるアミノ酸が芳香族アミノ酸である、請求項55～58のいずれか一項記載の方法。

【請求項６０】

前記芳香族アミノ酸が、フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンからなる群より選択される、請求項59記載の方法。

【請求項６１】

前記234位に対応する位置におけるアミノ酸が非極性アミノ酸である、請求項55～58のいずれか一項記載の方法。

【請求項６２】

前記非極性アミノ酸が、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニンおよびトリプトファンからなる群より選択される、請求項61記載の方法。

【請求項６３】

前記非極性アミノ酸が、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニンおよびトリプトファンからなる群より選択される、請求項61または62記載の方法。

【請求項６４】

前記234位に対応するアミノ酸がフェニルアラニン（L234F）である、請求項55～63のいずれか一項記載の方法。

【請求項６５】

前記PD1に結合する抗体の前記重鎖定常領域中のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中

の235位に対応する位置におけるアミノ酸が酸性アミノ酸である、請求項55～64のいずれか一項記載の方法。
【請求項６６】
前記酸性アミノ酸がアスパラギン酸またはグルタミン酸である、請求項65記載の方法。
【請求項６７】
前記PD1に結合する抗体の前記重鎖定常領域中のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の235位に対応する位置におけるアミノ酸がグルタミン酸（L235E）である、請求項55～66のいずれか一項記載の方法。
【請求項６８】
前記PD1に結合する抗体の前記重鎖定常領域中の234、235および236位に対応する位置におけるアミノ酸が、234位において非極性または芳香族アミノ酸、235位において酸性アミノ酸、および236位において塩基性アミノ酸である、請求項55～67のいずれか一項記載の方法。
【請求項６９】
前記PD1に結合する抗体の前記重鎖定常領域中で234位に対応するアミノ酸がフェニルアラニンであり、235位に対応するアミノ酸がグルタミン酸であり、かつ236位に対応するアミノ酸がアルギニンである（L234F/L235E/G236R）、請求項55～68のいずれか一項記載の方法。
【請求項７０】
前記PD1に結合する抗体の重鎖定常領域が、SEQ ID NO:38に示されているHC配列のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%、または100%の同一性を有する配列を含む、請求項49～69のいずれか一項記載の方法。
【請求項７１】
前記PD1に結合する抗体の重鎖定常領域が、SEQ ID NO:38に示されている配列を含む、請求項49～70のいずれか一項記載の方法。
【請求項７２】
前記PD1に結合する抗体の重鎖定常領域のアイソタイプがIgG1である、請求項49～71のいずれか一項記載の方法。
【請求項７３】
前記PD1に結合する抗体が、SEQ ID NO:139に示されている配列を有する重鎖、およびSEQ ID NO:140に示されている配列を有する軽鎖を含む、請求項49～72のいずれか一項記載の方法。
【請求項７４】
前記PD1に結合する抗体が、モノクローナル抗体、キメラ抗体、もしくはヒト化抗体、またはそのような抗体の断片である、請求項49～73のいずれか一項記載の方法。
【請求項７５】
前記PD1に結合する抗体が、低減または枯渇されたFc媒介性エフェクター機能を有する、請求項49～74のいずれか一項記載の方法。
【請求項７６】
前記PD1に結合する抗体の定常領域への補体タンパク質C1qの結合が、野生型抗体と比較して、好ましくは少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%または100%、低減される、請求項49～75のいずれか一項記載の方法。
【請求項７７】
前記PD1に結合する抗体へのIgG Fcガンマ受容体の1つまたは複数への結合が、野生型抗体と比較して、好ましくは少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%または100%、低減される、請求項49～76のいずれか一項記載の方法。
【請求項７８】

前記1つまたは複数のIgG Fcガンマ受容体が、FcガンマRI、FcガンマRII、およびFcガンマRIIIの少なくとも1つより選択される、請求項77記載の方法。

【請求項７９】

前記IgG Fcガンマ受容体がFcガンマRIである、請求項77または78記載の方法。

【請求項８０】

前記PD1に結合する抗体が、FcガンマRI媒介性エフェクター機能を誘導する能力を有しないか、または誘導されるFcガンマRI媒介性エフェクター機能が、野生型抗体と比較して、好ましくは少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%もしくは100%、低減される、請求項49～79のいずれか一項記載の方法。

【請求項８１】

前記PD1に結合する抗体が、補体依存性細胞傷害（CDC）媒介性溶解、抗体依存性細胞傷害（ADCC）媒介性溶解、アポトーシス、ホモタイプ接着および/もしくはファゴサイトーシスの少なくとも1つを誘導する能力を有さないか、または補体依存性細胞傷害（CDC）媒介性溶解、抗体依存性細胞傷害（ADCC）媒介性溶解、アポトーシス、ホモタイプ接着および/もしくはファゴサイトーシスの少なくとも1つが、低減された程度において誘導され、好ましくは少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%もしくは100%低減される、請求項49～80のいずれか一項記載の方法。

【請求項８２】

前記PD1に結合する抗体への新生児Fc受容体（FcRn）の結合が、野生型抗体と比較して影響されない、請求項49～81のいずれか一項記載の方法。

【請求項８３】

前記PD1に結合する抗体が、生細胞の表面上に存在するPD1のネイティブなエピトープに結合する、請求項49～82のいずれか一項記載の方法。

【請求項８４】

前記PD1に結合する抗体が、PD1に結合する第1の抗原結合領域および別の抗原に結合する少なくとも1つのさらなる抗原結合領域を含む多特異性抗体である、請求項49～83のいずれか一項記載の方法。

【請求項８５】

前記PD1に結合する抗体が、PD1に結合する第1の抗原結合領域および別の抗原に結合する第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体である、請求項84記載の方法。

【請求項８６】

前記PD1に結合する第1の抗原結合領域が、請求項50～54のいずれか一項に示されている重鎖可変領域（VH）および/または軽鎖可変領域（VL）を含む、請求項84または85記載の方法。

【請求項８７】

（a）前記結合剤が、SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むVH領域、SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列を含むVL領域を含み;

（b）前記PD1に結合する抗体がVH領域およびVL領域を含み、該VHが、SEQ ID NO:56に示されている配列を含むかまたは有し、かつ該VLが、SEQ ID NO:57に示されている配列を含むかまたは有する、

請求項49～86のいずれか一項記載の方法。

【請求項８８】

（a）前記結合剤が、SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むVH領域、SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列を含むVL領域、SEQ ID NO:15に示されるアミノ酸配列を含むCH領域、およびSEQ ID NO:17に示されるアミノ酸配列を含むCL領域を含む抗体であり;

（b）前記PD1に結合する抗体が、SEQ ID NO:56に示されるアミノ酸配列を含むVH領域、SEQ ID NO:57に示されるアミノ酸配列を含むVL領域、SEQ ID NO:38に示さ

れるアミノ酸配列を含むCH領域、およびSEQ ID NO:42に示されるアミノ酸配列を含むCL領域を含む、
請求項49～87のいずれか一項記載の方法。
【請求項８９】
前記PD1/PD-L1阻害剤が、多特異性抗体、例えば二重特異性抗体である、請求項1～41のいずれか一項記載の方法。
【請求項９０】
前記PD1/PD-L1阻害剤が、CD137に結合する第1の結合領域およびPD-L1に結合する第2の結合領域を含むPD-L1阻害剤である、請求項89記載の方法。
【請求項９１】
CD137が、ヒトCD137、特にSEQ ID NO:97に示される配列を含むヒトCD137である、請求項90記載の方法。
【請求項９２】
（a）前記PD-L1阻害剤の第1の結合領域が、SEQ ID NO:79のCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む重鎖可変領域（VH）、ならびにSEQ ID NO:83のCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含み;
かつ
（b）前記PD-L1阻害剤の第2の結合領域が、SEQ ID NO:86のCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む重鎖可変領域（VH）、ならびにSEQ ID NO:90のCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含む、
請求項90または91記載の方法。
【請求項９３】
（a）前記PD-L1阻害剤の第1の結合領域が、それぞれSEQ ID NO:80、81、および82に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む重鎖可変領域（VH）、ならびにそれぞれSEQ ID NO:84、GAS、およびSEQ ID NO:85に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含み;かつ（b）前記PD-L1阻害剤の第2の結合領域が、それぞれSEQ ID NO:87、88、および89に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む重鎖可変領域（VH）、ならびにそれぞれSEQ ID NO:91、DDN、およびSEQ ID NO:92に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含む、請求項90～92のいずれか一項記載の方法。
【請求項９４】
（a）前記PD-L1阻害剤の第1の結合領域が、SEQ ID NO:79に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（VH）およびSEQ ID NO:83に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（VL）領域を含み;
かつ
（b）前記PD-L1阻害剤の第2の結合領域が、SEQ ID NO:86に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（VH）およびSEQ ID NO:90に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（VL）領域を含む、
請求項90～93のいずれか一項記載の方法。
【請求項９５】
前記PD-L1阻害剤が、第1の結合アームおよび第2の結合アームを含む抗体であり、
該第1の結合アームが、
（i）前記第1の重鎖可変領域（VH）および第1の重鎖定常領域（CH）を含むポリペプチド、ならびに
（ii）前記第1の軽鎖可変領域（VL）および第1の軽鎖定常領域（CL）を含むポリペプチド
を含み;
かつ該第2の結合アームが、
（iii）前記第2の重鎖可変領域（VH）および第2の重鎖定常領域（CH）を含むポリペプチド、ならびに

（iv）前記第2の軽鎖可変領域（VL）および第2の軽鎖定常領域（CL）を含むポリペプチド
を含む、
請求項90～94のいずれか一項記載の方法。
【請求項９６】
前記PD-L1阻害剤が、
（i）CD137に結合する能力を有する前記抗原結合領域を含む第1の重鎖および軽鎖であって、該第1の重鎖が第1の重鎖定常領域を含み、かつ該第1の軽鎖が第1の軽鎖定常領域を含む、第1の重鎖および軽鎖;ならびに
（ii）PD-L1に結合する能力を有する前記抗原結合領域を含む第2の重鎖および軽鎖であって、該第2の重鎖が第2の重鎖定常領域を含み、かつ該第2の軽鎖が第2の軽鎖定常領域を含む、第2の重鎖および軽鎖
を含む、
請求項90～95のいずれか一項記載の方法。
【請求項９７】
（i）EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置におけるアミノ酸が前記第1の重鎖定常領域（CH）においてLであり、かつEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置におけるアミノ酸が前記第2の重鎖定常領域（CH）においてRであるか、または（ii）EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置におけるアミノ酸が前記第1の重鎖においてRであり、かつEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置におけるアミノ酸が前記第2の重鎖においてLである、請求項95または96記載の方法。
【請求項９８】
EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置が、前記第1および第2の重鎖においてそれぞれFおよびEである、請求項95～97のいずれか一項記載の方法。
【請求項９９】
EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置が、前記第1および第2の重鎖定常領域（HC）においてそれぞれF、E、およびAである、請求項95～98のいずれか一項記載の方法。
【請求項１００】
前記第1の重鎖定常領域および第2の重鎖定常領域の両方のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置がそれぞれFおよびEであり、かつ（i）前記第1の重鎖定常領域のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置がLであり、かつ前記第2の重鎖のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置がRであるか、または（ii）前記第1の重鎖定常領域のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置がRであり、かつ前記第2の重鎖のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置がLである、請求項95～99のいずれか一項記載の方法。
【請求項１０１】
前記第1の重鎖定常領域および第2の重鎖定常領域の両方のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置が、それぞれF、E、およびAであり、かつ（i）前記第1の重鎖定常領域のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置がLであり、かつ前記第2の重鎖定常領域のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置がRであるか、または（ii）前記第1の重鎖のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置がRであり、かつ前記第2の重鎖のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置がLである、請求項95～100のいずれか一項記載の方法。
【請求項１０２】
前記第1および/または第2の重鎖、例えば第2の重鎖の定常領域が、

（ａ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:９４または９６に示される配列［ＩｇＧ１-Ｆｃ_ＦＥＡＬ］；
（ｂ）（ａ）における配列の部分配列、例えば、（ａ）において定義される配列のＮ末端またはＣ末端から開始して、１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０個の連続するアミノ酸が欠失している、部分配列;および
（ｃ）（ａ）または（ｂ）において定義されるアミノ酸配列と比較して、最大で６個の置換、例えば最大で５個の置換、最大で４個の置換、最大で３個、最大で２個の置換または最大で１個の置換を有する配列
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むか、または該アミノ酸配列から本質的になるか、または該アミノ酸配列からなる、
請求項９５～１０１のいずれか一項記載の方法。
【請求項１０３】
前記第１および/または第２の重鎖、例えば第１の重鎖の定常領域が、
（ａ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:９３または９５に示される配列［ＩｇＧ１-Ｆｃ_ＦＥＡＲ］；
（ｂ）（ａ）における配列の部分配列、例えば、（ａ）において定義される配列のＮ末端またはＣ末端から開始して、１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０個の連続するアミノ酸が欠失している、部分配列;および
（ｃ）（ａ）または（ｂ）において定義されるアミノ酸配列と比較して、最大で６個の置換、例えば最大で５個の置換、最大で４個、最大で３個、最大で２個の置換または最大で１個の置換を有する配列
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むか、または該アミノ酸配列から本質的になるか、または該アミノ酸配列からなる、
請求項９５～１０２のいずれか一項記載の方法。
【請求項１０４】
前記ＰＤ-Ｌ１阻害剤がカッパ（κ）軽鎖定常領域を含む、請求項９５～１０３のいずれか一項記載の方法。
【請求項１０５】
前記ＰＤ-Ｌ１阻害剤がラムダ（λ）軽鎖定常領域を含む、請求項９５～１０４のいずれか一項記載の方法。
【請求項１０６】
前記第１の軽鎖定常領域がカッパ（κ）軽鎖定常領域またはラムダ（λ）軽鎖定常領域である、請求項９５～１０５のいずれか一項記載の方法。
【請求項１０７】
前記第２の軽鎖定常領域がラムダ（λ）軽鎖定常領域またはカッパ（κ）軽鎖定常領域である、請求項９５～１０６のいずれか一項記載の方法。
【請求項１０８】
前記第１の軽鎖定常領域がカッパ（κ）軽鎖定常領域でありかつ前記第２の軽鎖定常領域がラムダ（λ）軽鎖定常領域であるか、または前記第１の軽鎖定常領域がラムダ（λ）軽鎖定常領域でありかつ前記第２の軽鎖定常領域がカッパ（κ）軽鎖定常領域である、請求項９５～１０７のいずれか一項記載の方法。
【請求項１０９】
前記カッパ（κ）軽鎖が、
（ａ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１６に示される配列、
（ｂ）（ａ）における配列の部分配列、例えば、（ａ）において定義される配列のＮ末端またはＣ末端から開始して、１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０個の連続するアミノ酸が欠失している、部分配列;および
（ｃ）（ａ）または（ｂ）において定義されるアミノ酸配列と比較して、最大で１０個の置換、例えば最大で９個の置換、最大で８個、最大で７個、最大で６個、最大で５個、最大で４個の置換、最大で３個、最大で２個の置換または最大で１個の置換を有する配列
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、
請求項１０４～１０８のいずれか一項記載の方法。

【請求項１１０】
前記ラムダ（λ）軽鎖が、
（ａ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１７に示される配列、
（ｂ）（ａ）における配列の部分配列、例えば、（ａ）において定義される配列のＮ末端またはＣ末端から開始して、１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０個の連続するアミノ酸が欠失している、部分配列;および
（ｃ）（ａ）または（ｂ）において定義されるアミノ酸配列と比較して、最大で１０個の置換、例えば最大で９個の置換、最大で８個、最大で７個、最大で６個、最大で５個、最大で４個の置換、最大で３個、最大で２個の置換または最大で１個の置換を有する配列
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、
請求項１０５～１０９のいずれか一項記載の方法。
【請求項１１１】
前記ＰＤ-Ｌ１阻害剤がＩｇＧ１ｍ（ｆ）アロタイプの抗体である、請求項９０～１１０のいずれか一項記載の方法。
【請求項１１２】
前記ＰＤ-Ｌ１阻害剤が、ＣＤ１３７およびＰＤ-Ｌ１に結合する二重特異性抗体であり、該二重特異性抗体が、（ｉ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:７５に示されるアミノ酸配列を含む第１の重鎖およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:７６に示されるアミノ酸配列を含む第１の軽鎖、ならびに（ｉｉ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:７７に示されるアミノ酸配列を含む第２の重鎖およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:７８に示されるアミノ酸配列を含む第２の軽鎖を有する、請求項９０～１１１のいずれか一項記載の方法。
【請求項１１３】
前記ＰＤ-Ｌ１阻害剤がアカスンリマブまたはそのバイオシミラーである、請求項９０～１１２のいずれか一項記載の方法。
【請求項１１４】
（ａ）前記結合剤が、それぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:５、６、および７に示されている配列を含む重鎖可変（ＶＨ）領域ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３、ならびにそれぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:９、１０、および１１に示されている配列を含む軽鎖可変（ＶＬ）領域ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３を含み;
（ｂ）前記ＰＤ-Ｌ１阻害剤の第１の結合領域が、それぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８０、８１、および８２に示されるＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）、ならびにそれぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８４、ＧＡＳ、およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８５に示されるＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み;かつ
（ｃ）前記ＰＤ-Ｌ１阻害剤の第２の結合領域が、それぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８７、８８、および８９に示されるＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）、ならびにそれぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:９１、ＤＤＮ、およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:９２に示されるＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、
請求項９０～１１３のいずれか一項記載の方法。
【請求項１１５】
（ａ）前記結合剤が、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域を含み;
（ｂ）前記ＰＤ-Ｌ１阻害剤の第１の結合領域が、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:７９に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８３に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）領域を含み;かつ
（ｃ）前記ＰＤ-Ｌ１阻害剤の第２の結合領域が、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８６に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:９０に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）領域を含む、
請求項９０～１１４のいずれか一項記載の方法。
【請求項１１６】
（ａ）前記結合剤が、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１５に示されるアミノ酸配列

を含むCH領域、およびSEQ ID NO:17に示されるアミノ酸配列を含むCL領域を含む抗体であり;
（b）前記PD-L1阻害剤が、第1の結合アームおよび第2の結合アームを含む抗体であり、該第1の結合アームが前記第1の結合領域を含み、かつ第2の結合アームが前記第2の結合領域を含み;
（c）前記PD-L1阻害剤の該第1の結合アームが、SEQ ID NO:79に示されるアミノ酸配列を含むVH領域、SEQ ID NO:83に示されるアミノ酸配列を含むVL領域;SEQ ID NO:95に示されるアミノ酸配列を含むCH領域、およびSEQ ID NO:16に示されるアミノ酸配列を含むCL領域を含み;かつ
（d）前記PD-L1阻害剤の該第2の結合アームが、SEQ ID NO:86に示されるアミノ酸配列を含むVH領域、SEQ ID NO:90に示されるアミノ酸配列を含むVL領域、SEQ ID NO:96に示されるアミノ酸配列を含むCH領域、およびSEQ ID NO:17に示されるアミノ酸配列を含むCL領域を含む、
請求項90～115のいずれか一項記載の方法。
【請求項１１７】
（c）前記結合剤が、SEQ ID NO:35に示されるアミノ酸配列を含む重鎖およびSEQ ID NO:25に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含み;
（d）前記PD-L1阻害剤が、CD137およびPD-L1に結合する二重特異性抗体であり、該二重特異性抗体が、（i）SEQ ID NO:75に示されるアミノ酸配列を含む第1の重鎖およびSEQ ID NO:76に示されるアミノ酸配列を含む第1の軽鎖、ならびに（ii）SEQ ID NO:77に示されるアミノ酸配列を含む第2の重鎖およびSEQ ID NO:78に示されるアミノ酸配列を含む第2の軽鎖を有する、
請求項90～116のいずれか一項記載の方法。
【請求項１１８】
（c）前記結合剤が、SEQ ID NO:35に示されるアミノ酸配列を含む重鎖およびSEQ ID NO:25に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含み;
（d）前記PD-L1阻害剤がアカスンリマブまたはそのバイオシミラーである、
請求項90～117のいずれか一項記載の方法。
【請求項１１９】
前記PD1/PD-L1阻害剤が、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、セミプリマブ、ドスタルリマブ、JTX-4014、スパルタリズマブ、カムレリズマブ、シンチリマブ、チスレリズマブ、トリパリマブ、INCMGA00012（MGA012）、AMP-224、AMP-514、またはそのそれぞれのバイオシミラーより選択されるPD1阻害剤である、請求項1～38のいずれか一項記載の方法。
【請求項１２０】
前記PD1阻害剤が、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、セミプリマブ、ドスタルリマブ、JTX-4014、スパルタリズマブ、カムレリズマブ、シンチリマブ、チスレリズマブ、トリパリマブ、INCMGA00012（MGA012）、AMP-514、またはそのそれぞれのバイオシミラーより選択される、請求項1～38のいずれか一項記載の方法。
【請求項１２１】
前記PD1/PD-L1阻害剤が、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、KN035、CK-301、アカスンリマブ、AUNP12、CA-170、BMS-986189、またはそのそれぞれのバイオシミラーより選択されるPD-L1阻害剤である、請求項1～38のいずれか一項記載の方法。
【請求項１２２】
前記PD-L1阻害剤が、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、KN035、CK-301、アカスンリマブ、またはそのそれぞれのバイオシミラーより選択される、請求項1～38のいずれか一項記載の方法。
【請求項１２３】
前記対象がヒト対象である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項１２４】
前記腫瘍またはがんが固形腫瘍である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項１２５】
前記腫瘍がPD-L1陽性腫瘍である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項１２６】
前記腫瘍またはがんが、頭頸部扁平上皮細胞癌（HNSCC）、例えば口腔、咽頭または喉頭のHNSCCである、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項１２７】
前記HNSCCが、再発性、切除不能性または転移性である、請求項126記載の方法。
【請求項１２８】
前記腫瘍またはがんが、非小細胞肺がん（NSCLC）、例えば扁平上皮または非扁平上皮NSCLCである、請求項1～125のいずれか一項記載の方法。
【請求項１２９】
前記NSCLCが、再発性、切除不能性または転移性である、請求項128記載の方法。
【請求項１３０】
前記NSCLCが、上皮増殖因子（EGFR）増感性突然変異および/または未分化リンパ腫（ALK）転座および/またはROS1再編成を有しない、請求項128または129記載の方法。
【請求項１３１】
前記NSCLCが、NTRK1/2/3（神経栄養因子受容体チロシンキナーゼ1/2/3）融合陽性であり、かつ/またはKRAS（KRASがん原遺伝子、GTPase）、BRAF（B-Rafがん原遺伝子、セリン/スレオニンキナーゼ）、もしくはMET（METがん原遺伝子、受容体チロシンキナーゼ）遺伝子中に突然変異を有し、かつ/またはRET（retがん原遺伝子）遺伝子再編成を有し、かつ前記対象が、それぞれの標的指向型療法での以前の処置を受けている、請求項128～130のいずれか一項記載の方法。
【請求項１３２】
前記対象が、PD1阻害剤またはPD-L1阻害剤、例えば抗PD1抗体または抗PD-L1抗体、好ましくは少なくとも2用量のPD1阻害剤またはPD-L1阻害剤での以前の処置を受けている、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項１３３】
前記対象が、白金ベース療法、または白金が不適格な場合に代替的な化学療法、例えばゲムシタビン含有レジメンでの以前の処置を受けている、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項１３４】
前記腫瘍またはがんが、処置、例えばチェックポイント阻害剤での全身処置後に、再発および/または進行した腫瘍またはがんである、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項１３５】
前記対象が、全身療法、例えばPD1阻害剤またはPD-L1阻害剤、例えば抗PD1抗体または抗PD-L1抗体を含む全身療法の、少なくとも1つの以前のラインを受けている、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項１３６】
前記がんまたは腫瘍が、再発しているかつ/もしくは難治性であるか、または前記対象が、単剤療法としてもしくは併用療法の一部として投与されるPD1阻害剤もしくはPD-L1阻害剤、例えば抗PD1抗体もしくは抗PD-L1抗体での処置後に進行している、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項１３７】
以前の最後の処置が、単剤療法としてまたは併用療法の一部として投与されるPD1阻害剤またはPD-L1阻害剤、例えば抗PD1抗体または抗PD-L1抗体での処置であった、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項１３８】

PD1阻害剤またはPD-L1阻害剤、例えば抗PD1抗体または抗PD-L1抗体での最後の処置における進行からの時間が6か月またはそれ未満である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項１３９】

以前の最後の処置の一部としてのPD1阻害剤またはPD-L1阻害剤、例えば抗PD1抗体または抗PD-L1抗体の最後の投薬からの時間が6か月またはそれ未満である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項１４０】

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

（i）抗PD1抗体もしくは抗PD-L1抗体での処置後のプラチナダブレット化学療法、または

（ii）プラチナダブレット化学療法後の抗PD1抗体もしくは抗PD-L1抗体での処置

の間または後に進行している、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項１４１】

（i）CD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む結合剤、および

（ii）PD1/PD-L1阻害剤

を含む、キット。

【請求項１４２】

前記結合剤が、請求項1～140のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記PD1/PD-L1阻害剤が、請求項1～140のいずれか一項において定義される通りである、請求項141記載のキット。

【請求項１４３】

前記結合剤、前記PD1/PD-L1阻害剤、および存在する場合には1つまたは複数の追加の治療剤が、全身投与用、特に注射または注入用、例えば静脈内注射または注入用である、請求項141または142記載のキット。

【請求項１４４】

対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法における使用のための、請求項141～143のいずれか一項記載のキット。

【請求項１４５】

前記腫瘍またはがんが、請求項1～140のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記対象が、請求項1～140のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記方法が、請求項1～140のいずれか一項において定義される通りである、請求項144記載の使用のためのキット。

【請求項１４６】

（i）CD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む結合剤;

（ii）PD1/PD-L1阻害剤;および

（iii）任意で、薬学的に許容される担体

を含む、薬学的組成物。

【請求項１４７】

前記結合剤が、請求項1～140のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記PD1/PD-L1阻害剤が、請求項1～140のいずれか一項において定義される通りである、請求項146記載の薬学的組成物。

【請求項１４８】

対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法における使用のための、請求項146または147記載の薬学的組成物。

【請求項１４９】

前記腫瘍またはがんが、請求項1～140のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記対象が、請求項1～140のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記方法が、請求項1～140のいずれか一項において定義される通りで

ある、請求項148記載の使用のための薬学的組成物。
【請求項１５０】
対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法における使用のための結合剤であって、該方法が、（i）CD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む該結合剤;および（ii）PD1/PD-L1阻害剤を該対象に投与する工程を含む、前記使用のための結合剤。
【請求項１５１】
前記方法が、請求項1～140のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記結合剤が、請求項1～140のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記PD1/PD-L1阻害剤が、請求項1～140のいずれか一項において定義される通りである、請求項150記載の使用のための結合剤。
【請求項１５２】
対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法における使用のためのPD1/PD-L1阻害剤であって、該方法が、（i）CD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む結合剤;および（ii）該PD1/PD-L1阻害剤を該対象に投与する工程を含む、前記使用のためのPD1/PD-L1阻害剤。
【請求項１５３】
前記方法が、請求項1～140のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記結合剤が、請求項1～140のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記PD1/PD-L1阻害剤が、請求項1～140のいずれか一項において定義される通りである、請求項152記載の使用のためのPD1/PD-L1阻害剤。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための、PD1/PD-L1阻害剤と組み合わせてCD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む結合剤を使用する併用療法に関する。
【背景技術】
【０００２】
背景
分化クラスター（CD）27（TNFRSF7）は、そのリガンドCD70への結合後にT細胞活性化を共刺激する腫瘍壊死因子（TNF）受容体スーパーファミリー（TNFRSF）の55kDa I型膜貫通タンパク質メンバーである。それはヒトにおいて、すべてリンパ系列の部分である、T、B、ナチュラルキラー（NK）細胞、およびそれらの直接の前駆細胞の細胞膜上に発現される。ヒトT細胞上で、CD27は、静止αβ $CD4^{+}$（Tregおよび従来型T細胞）、$CD8^{+}$T細胞、幹細胞メモリー細胞、ならびにセントラルメモリー様細胞上に発現される。ヒトB細胞上で、CD27はメモリーB細胞マーカーであり、CD27シグナル伝達は形質細胞へのB細胞の分化を促進する。
【０００３】
CD27の唯一の公知のリガンドはII型膜貫通タンパク質CD70（腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー7、TNFSF7;CD27リガンド、CD27L）であり、これは、T、B、NK、および樹状細胞（DC）を含む、活性化された免疫細胞上にかなり制約的にかつ一過的にのみ発現される。
【０００４】
CD27は、一次免疫応答の早期生成において役割を果たし、T細胞免疫の生成および長期維持のために要求される。CD27-CD70の結合は、活性化B細胞の核因子カッパ軽鎖エンハンサー（NF-κB）およびマイトジェン活性化プロテインキナーゼ（MAPK）8/Jun N末端キナーゼ（JNK）経路の活性化に繋がる。アダプタータンパク質TNF受容体関連タンパク質（TRAF）2およびTRAF5は、CD27エンゲージメントの結果としてもたらされるシグナル伝達を媒介することが示されている。

【０００５】
T細胞は、それらのエフェクター機能を解除するために、抗原提示細胞（APC）の表面上の主要組織適合複合体（MHC）分子の文脈におけるそれらのコグネイト抗原のT細胞抗原受容体媒介性認識、および共刺激受容体の活性化を要求する。CD27およびCD28は、T細胞上に発現される最も重要な共刺激受容体であると考えられている。
【０００６】
マウスにおいて、T細胞活性化のプライミング期の間のCD27刺激は、インターロイキン（IL）-2非依存性生存シグナル伝達による抗原特異的$CD4^+$および$CD8^+$T細胞のクローン性拡大増殖を促進することが見出されている（Carr JM et al,Proc Natl Acad Sci USA 2006 Dec 19;130（51）:19454-9（非特許文献1））。CD27はまた、連続的な分裂を通じて活性化されたT細胞のアポトーシスに対抗しており、そしてまたマウス$CD8^+$T細胞のメモリー分化において重要な役割を果たすことが示された（Van de Ven K,Borst J.Immunotherapy 2015;7（6）:655-67（非特許文献2））。結果として、CD27刺激は、リンパ系臓器におけるエフェクターT細胞の生成を促進し、レスポンダーT細胞のレパートリーを広げる。ヒトナイーブT細胞において、CD27刺激は、$CD4^+$T細胞のTヘルパー-1（Th1）分化を促進し、細胞傷害性Tリンパ球のエフェクター分化をサポートする（Oosterwijk et al,Int Immunol.2007 Jun;19（6）:713-8（非特許文献3））。
【０００７】
一部の血液学的悪性腫瘍中の腫瘍細胞上でのその存在とは反対に、CD27発現は固形悪性腫瘍中の腫瘍細胞上では検出されていない。しかしながら、CD27発現リンパ系細胞は、血液学的悪性腫瘍および固形がんの両方の腫瘍微環境（TME）において報告されている。
【０００８】
がんの処置において、免疫応答の関与および刺激は、免疫チェックポイント阻害剤（CPI）の臨床的な成功により例示されるように、抗腫瘍免疫を誘導および/または増強して臨床応答を結果としてもたらすことが示されている。能動免疫応答および/または既存の抗腫瘍免疫は、共刺激シグナル伝達、例えばCD27共刺激シグナル伝達を提供することにより増加され得る。
【０００９】
マウス腫瘍モデルにおいて、T細胞機能およびしたがって抗腫瘍免疫は、アゴニストCD27抗体により増強され得る。ヒトCD27（hCD27）トランスジェニックリンパ腫マウスモデルにおいて、アゴニスト抗体を使用するCD27活性化は、強力な抗腫瘍活性、ならびに$CD4^+$および$CD8^+$T細胞に依存する保護免疫の誘導を示した（He LZ et al.J Immunol.2013 Oct 15;191（8）:4174-83（非特許文献4））。さらには、モノクローナル抗体を使用するCD27活性化は、数ある中でも、白血病（Vitale et al,Keler T.Clin Cancer Res.2012 Jul 15;18（14）:3812-21（非特許文献5））、黒色腫（Roberts DJ,et al.,J Immunother.2010 Oct;33（8）:769-79（非特許文献6））、結腸癌、および胸腺腫（He LZ,et al.,J Immunol.2013 Oct 15;191（8）:4174-83（非特許文献4））に由来するモデルを含む、マウス異種移植片において腫瘍成長を予防した。
【００１０】
ヒトCD27に対するモノクローナル免疫グロブリンG（IgG）1アゴニスト抗体は先行技術において開示されている。
【００１１】
WO2012/004367（特許文献1）においてヒト化抗ヒトCD27アゴニスト抗体（hCD27.15と指定される）が記載されている。hCD27.15は、免疫応答のCD27媒介性共刺激を活性化させるために結晶化可能断片（Fc）ガンマ受容体（FcyR）発現細胞による架橋を要求しないことが報告されている。しかしながら、この抗体は、hCD27において頻繁に存在する単一ヌクレオチド多型（SNP）（A59T）に結合せず、またカニクイザルC

D27に結合しない。

【００１２】

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

【００１３】

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

【００１４】

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

【００１５】

がん細胞は、T細胞上の阻害性免疫チェックポイントタンパク質、例えばプログラム細胞死タンパク質1（PD-1）、および細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4（CTLA-4）、またはTME内の腫瘍細胞、腫瘍間質もしくは他の細胞上のプログラム細胞死1リガンド1（PD-L1）および/もしくはプログラム細胞死1リガンド2（PD-L2）の上方調節を通じて免疫応答を回避および抑制することができる。CTLA-4およびPD-1は、T細胞活性化を抑制するシグナルを伝達することが公知である。モノクローナル抗体でのこれらのタンパク質の活性の遮断、およびそのためT細胞機能の回復は、ブレークスルーとなるがんに対する療法を与えている。

【００１６】

PD-1（CD279としても公知である）は、活性化T細胞、B細胞、および単球の表面上に発現される免疫調節受容体である。タンパク質PD-1は、PD-L1（CD274としても称される）およびPD-L2（CD273としても公知である）として公知である、2つの天然に存在するリガンドを有する。黒色腫、肺、腎臓、膀胱、食道、胃および他のがんを含む、多様ながんはPD-L1を発現する。そのため、がんにおけるPD-1とのPD-L1の相互作用で、PD-1/PD-L1システムは、Tリンパ球の増殖、サイトカインの放出、および細胞傷害性を阻害し、それにより、T細胞媒介性免疫応答を回避する機会をがん細胞に提供することができる。

【００１７】

PD-1/PD-L1系の活性を調節するために好適なモノクローナル抗体が公知である。PD-1/PD-L1相互作用は、PD-1ターゲティング抗体、例えばペムブロリズマブ（MK-3475、ランブロリズマブもしくはKeytrudaとも命名されている）およびニボルマブ（ONO-4538、BMS-936558もしくはOpdivoとも命名されている）、またはPD-L1に結合するために開発されたモノクローナル抗体、例えばアテゾリズマブ（MPDL3280A、RG7446もしくはTecentriqとも命名されている）などにより阻害され得る。

【００１８】
抗CD27抗体は、CD27アゴニズムを誘導するために形質膜上のCD27のクラスタリングを誘導しなければならない。野生型IgG1抗体の場合、CD27のクラスタリングは、FcγR保有細胞、例えば単球、マクロファージ、B細胞および他の免疫細胞との膜結合型CD27抗体の相互作用を通じて達成され得る。帰結として、抗CD27 IgG1分子は、FcγR発現細胞の数が限定されている場合により低い効率であり得る。抗体のFc領域の改変によるエフェクター機能の最適化は、がんまたは他の疾患を処置するための治療抗体の有効性を向上させて、例えば、抗原発現細胞に対する免疫応答を誘発する抗体の能力を向上させ得る。そのような努力は、例えば、WO 2013/004842 A2（特許文献5）;WO 2014/108198 A1（特許文献6）;WO2018/146317（特許文献7）;WO2018/083126（特許文献8）;WO 2018/031258 A1（特許文献9）;Dall'Acqua,Cook et al.J Immunol 2006,177（2）:1129-1138（非特許文献7）;Moore,Chen et al.MAbs 2010 2（2）:181-189（非特許文献8）;Desjarlais and Lazar,Exp Cell Res 2011,317（9）:1278-1285（非特許文献9）;Kaneko and Niwa,BioDrugs 2011,25（1）:1-11（非特許文献10）;Song,Myojo et al.,Antiviral Res 2014,111:60-68（非特許文献11）;Brezski and Georgiou,Curr Opin Immunol 2016,40:62-69（非特許文献12）;Sondermann and Szymkowski,Curr Opin Immunol 2016,40:78-87（非特許文献13）;Zhang,Armstrong et al.MAbs 2017,9（7）:1129-1142.（非特許文献14）;Wang,Mathieu et al.Protein&Cell 2018,9（1）:63-73（非特許文献15）;Diebolder FJ et al.,Science.2014 Mar 14;343（6176）:1260-3（非特許文献16））において記載されている。
【００１９】
免疫系を活性化させることにより、免疫CPIはまた、一部の患者において自己免疫の副作用を引き起こし得る。追加的に、Fc受容体または補体システムの構成要素とのFcドメインのエンゲージメントはまた、CD27陽性T細胞の望ましくない枯渇を引き起こし得る、ADCC、ADCP、およびCDCの活性化などの、望ましくないエフェクター機能を結果としてもたらし得る。したがって、Fc媒介性エフェクター機能の活性化は、PD-1/PD-L1相互作用を遮断するモノクローナル抗体の文脈において望ましくないことがある。Fc受容体および/または補体システムとエンゲージメントしないFcドメインを含有する広範なIgG抗体様式が開発されており、それにおいて、アミノ酸置換、およびその組合せ（すなわち、非活性化突然変異）が、Fc媒介性エフェクター機能を排除するためにIgG1アイソタイプ抗体の定常重鎖領域中に導入されている（例えば、Chiu et al.,Antibodies 2019 Dec;8（4）:55（非特許文献17）;Liu et al.,Antibodies,2020 Nov 17;9（4）:64;29（10）:457-66（非特許文献18））。そのような置換の例は、L234A-L235A-P329G非活性化突然変異（Schlothauer et al.,Protein Eng.Design and Selection 2016;29（10）:457-66（非特許文献19））、またはL234F-L235E-D265A非活性化突然変異（本明細書においてFEAもしくはFEA様式としても称される;Engelberts et al.,EBioMedicine 2020;52:102625（非特許文献20）;US10590206B2（特許文献10））の導入を含む。他の非活性化様式が、Fc媒介性エフェクター機能をさらに排除するための抗体の定常重鎖領域中のアミノ酸置換（例えば、WO2015/143079（特許文献11）に記載されているE233P-F234V-L235A-G236del非活性化突然変異の導入、またはVafa et al.Methods 2014;65:114-126（非特許文献21）により記載されたF234A-L235A非活性化突然変異の導入）と組み合わせて、低減されたエフェクター機能を有するヒトIgGサブクラスの1つ、ヒトIgG4を使用して開発された。
【００２０】
他の中でも、Garber et alは、T細胞上の共刺激受容体、例えば、4-1BB（CD137）、OX40、グルココルチコイド誘導性腫瘍壊死因子受容体ファミリー関連受容体（GITR）および非依存性共刺激（independent co-stimulation;ICOS）を標的とするアゴニスト抗体、ならびにPD-1/PD-L1系を遮断するモノクローナル抗体からなる併用療法の機会を議論している（Garber et al.Nat Rev Drug Discov.2020 Jan;19（1）:

3-5（非特許文献22））。Azpilikueta et al.（J Thorac Oncol 2016;11:524-36）（非特許文献23）は、併用療法が単剤処置を凌いだことを示す、マウス肺癌モデルにおけるPD-1遮断抗体および4-1BBターゲティング抗体を含む併用療法からの前臨床データを公開している。

【００２１】

WO2008/051424A2（特許文献12）は、単独での、または他の免疫調節剤、例えばCD40、OX40、4-1BBもしくはCTLA-4を標的とする抗体と組み合わせた、CD27ターゲティングアゴニスト抗体の投与を含む方法を提供している。

【００２２】

US10668152B2（特許文献13）は、抗PD-1抗体および抗CD27抗体を投与する工程を含む併用療法を使用してがんを処置するための方法を提供している。

【００２３】

CDX-527はPD-L1xCD27二重特異性IgG1抗体である（Vitale et al.,Cancer Immunol Immunother 2020（非特許文献24））。

【００２４】

WO2018/127916（特許文献14）は、MIRP技術（Multifunctional Immune Recruitment Protein）（DSP-106）に基づくPD1-CD70二重シグナル融合タンパク質を提供している。

【００２５】

WO2015/016718A1（特許文献15）は、例えばPD1/PD-L1相互作用を遮断する抗体と組み合わせて抗CD27抗体を投与することによる、$CD27^+$免疫細胞の刺激によりまたは1つもしくは複数の免疫チェックポイントタンパク質の阻害により寛解されることが公知であるかまたは予想される任意の状態の処置を提供している。

【００２６】

当技術分野におけるこれらおよび他の努力にもかかわらず、しかしながら、他の免疫調節抗体または免疫チェックポイントを遮断する抗体との併用療法として一緒に提供される、CD27にエンゲージメントするための増加したアゴニズムおよび/または増加した効力を有する改善された抗体ベース免疫療法が必要とされている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００２７】

【特許文献１】WO2012/004367
【特許文献２】WO2011/130434
【特許文献３】WO2018/058022
【特許文献４】WO2019/195452
【特許文献５】WO 2013/004842 A2
【特許文献６】WO 2014/108198 A1
【特許文献７】WO2018/146317
【特許文献８】WO2018/083126
【特許文献９】WO 2018/031258 A1
【特許文献１０】US10590206B2
【特許文献１１】WO2015/143079
【特許文献１２】WO2008/051424A2
【特許文献１３】US10668152B2
【特許文献１４】WO2018/127916
【特許文献１５】WO2015/016718A1

【非特許文献】

【００２８】

【非特許文献１】Carr JM et al,Proc Natl Acad Sci USA 2006 Dec 19;130（51）:19454-9

【非特許文献２】Van de Ven K,Borst J.Immunotherapy 2015;7（6）:655-67
【非特許文献３】Oosterwijk et al,Int Immunol.2007 Jun;19（6）:713-8
【非特許文献４】He LZ et al.J Immunol.2013 Oct 15;191（8）:4174-83
【非特許文献５】Vitale et al,Keler T.Clin Cancer Res.2012 Jul 15;18（14）:3812-21
【非特許文献６】Roberts DJ,et al.,J Immunother.2010 Oct;33（8）:769-79
【非特許文献７】Dall'Acqua,Cook et al.J Immunol 2006,177（2）:1129-1138
【非特許文献８】Moore,Chen et al.MAbs 2010 2（2）:181-189
【非特許文献９】Desjarlais and Lazar,Exp Cell Res 2011,317（9）:1278-1285
【非特許文献１０】Kaneko and Niwa,BioDrugs 2011,25（1）:1-11
【非特許文献１１】Song,Myojo et al.,Antiviral Res 2014,111:60-68
【非特許文献１２】Brezski and Georgiou,Curr Opin Immunol 2016,40:62-69
【非特許文献１３】Sondermann and Szymkowski,Curr Opin Immunol 2016,40:78-87
【非特許文献１４】Zhang,Armstrong et al.MAbs 2017,9（7）:1129-1142.
【非特許文献１５】Wang,Mathieu et al.Protein＆Cell 2018,9（1）:63-73
【非特許文献１６】Diebolder FJ et al.,Science.2014 Mar 14;343（6176）:1260-3
【非特許文献１７】Chiu et al.,Antibodies 2019 Dec;8（4）:55
【非特許文献１８】Liu et al.,Antibodies,2020 Nov 17;9（4）:64;29（10）:457-66
【非特許文献１９】Schlothauer et al.,Protein Eng.Design and Selection 2016;29（10）:457-66
【非特許文献２０】Engelberts et al.,EBioMedicine 2020;52:102625
【非特許文献２１】Vafa et al.Methods 2014;65:114-126
【非特許文献２２】Garber et al.Nat Rev Drug Discov.2020 Jan;19（1）:3-5
【非特許文献２３】Azpilikueta et al.（J Thorac Oncol 2016;11:524-36）
【非特許文献２４】Vitale et al.,Cancer Immunol Immunother 2020

【発明の概要】

【００２９】

本発明は、併用療法におけるCD27に結合する能力を有する結合剤に関する。

【００３０】

第1の局面において、本開示は、i）CD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む結合剤;およびii）PD1/PD-L1阻害剤を対象に投与する工程を含む、対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法を提供する。

【００３１】

第2の局面において、本開示は、i）CD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む結合剤およびii）PD1/PD-L1阻害剤を含む、キットを提供する。

【００３２】

第3の局面において、本開示は、対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法における使用のためのキットであって、i）CD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む結合剤およびii）PD1/PD-L1阻害剤を含む、キットを提供する。

【００３３】

第4の局面において、本開示は、i）CD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む結合剤;ii）PD1/PD-L1阻害剤;およびiii）任意で、薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物を提供する。

【００３４】

第5の局面において、本開示は、対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を

予防するためまたはがんを処置するための方法における使用のための薬学的組成物であって、i）CD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む結合剤およびii）PD1/PD-L1阻害剤を含む、薬学的組成物を提供する。

【００３５】

第6の局面において、本開示は、対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法における使用のための結合剤であって、該方法が、i）CD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む結合剤;およびii）PD1/PD-L1阻害剤を該対象に投与する工程を含む、結合剤を提供する。

【００３６】

第7の局面において、本開示は、対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法における使用のためのPD1/PD-L1阻害剤であって、該方法が、i）CD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む結合剤;およびii）PD1/PD-L1阻害剤を該対象に投与する工程を含む、PD1/PD-L1阻害剤を提供する。

【発明を実施するための形態】

【００３７】

発明の詳細な説明

定義

本発明の文脈における用語「抗体」（Ab）は、抗原に特異的に結合する能力を有する免疫グロブリン分子、免疫グロブリン分子の断片、またはそのいずれかの誘導体を指す。本発明の抗体は、免疫グロブリンのFcドメインおよび抗原結合領域を含む。抗体は、2つのCH2-CH3領域および接続領域、例えば、ヒンジ領域、例えば少なくともFcドメインを一般に含有する。そのため、本発明の抗体はFc領域および抗原結合領域を含んでもよい。免疫グロブリン分子の重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常または「Fc」領域は、免疫系の様々な細胞（例えばエフェクター細胞）および補体システムの構成要素、例えば補体活性化の古典的経路における第1の構成要素であるC1qを含む、宿主組織または因子に対する免疫グロブリンの結合を媒介してもよい。本明細書において使用される場合、文脈に矛盾しなければ、免疫グロブリンのFc領域は、免疫グロブリンCHの少なくともCH2ドメインおよびCH3ドメインを典型的には含有し、接続領域、例えば、ヒンジ領域を含んでもよい。Fc領域は、典型的には、例えば、2つのヒンジ領域を接続するジスルフィドブリッジおよび/または2つのCH3領域の間の非共有結合性相互作用を介して、二量体化した形態である。二量体は、ホモ二量体（2つのFc領域単量体アミノ酸配列は同一である）またはヘテロ二量体（2つのFc領域単量体アミノ酸配列は1つもしくは複数のアミノ酸において異なる）であってもよい。当技術分野において周知のように、全長抗体のFc領域断片は、例えば、パパインでの全長抗体の消化により生成され得る。本明細書において定義されている抗体は、Fc領域および抗原結合領域に加えて、免疫グロブリンCH1領域およびCL領域の1つまたは両方をさらに含んでもよい。抗体はまた、多特異性抗体、例えば二重特異性抗体または類似した分子であってもよい。用語「二重特異性抗体」は、少なくとも2つの異なる、典型的にはオーバーラップしない、エピトープについて特異性を有する抗体を指す。そのようなエピトープは、同じまたは異なる標的上にあってもよい。エピトープが異なる標的上にある場合、そのような標的は、同じ細胞または異なる細胞もしくは細胞タイプ上にあってもよい。上記に指し示されるように、他に記載されないか、または文脈に明確に矛盾しなければ、本明細書における抗体という用語は、Fc領域の少なくとも部分を含み、かつ抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の断片を含む。そのような断片は、任意の公知の技術、例えば酵素切断、ペプチド合成および組換え発現技術により提供されてもよい。抗体の抗原結合機能は全長抗体の断片により行われ得ることが示されている。用語「Ab」または「抗体」に包含される結合性断片の例は、一価抗体（GenmabによりWO2007059782において記載されている）；2つの重鎖のみからなり、例えばラクダ科動物において天然に存在する、重鎖抗体（例えば、Hamers-Casterman（1993）Nature 363:44

6）；ThioMab、Roche、WO2011069104）；非対称かつ二重特異性抗体様分子である鎖交換操作ドメイン（strand-exchange engineered domain；SEEDまたはSeed-body）（Merck、WO2007110205）；Triomab（Pharma/Fresenius Biotech、Lindhofer et al.1995 J Immunol 155:219；WO2002020039）；FcΔAdp（Regeneron、WO2010151792）；Azymetric Scaffold（Zymeworks/Merck、WO2012/058768）；mAb-Fv（Xencor、WO2011/028952）；Xmab（Xencor）；二重可変ドメイン免疫グロブリン（Abbott、DVD-Ig、米国特許第7,612,181号明細書）；二重ドメイン二重ヘッド抗体（Unilever；Sanofi Aventis、WO20100226923）；Di-diabody（ImClone/Eli Lilly）；ノブ-イントゥー-ホール抗体様式（Genentech、WO9850431）；DuoBody（Genmab、WO 2011/131746）；二重特異性IgG1およびIgG2（Pfizer/Rinat、WO11143545）；DuetMab（MedImmune、US2014/0348839）；静電ステアリング抗体様式（Amgen、EP1870459およびWO 2009089004；Chugai、US201000155133；Oncomed、WO2010129304A2）；二重特異性IgG1およびIgG2（Rinat neurosciences Corporation、WO11143545）；CrossMAb（Roche、WO2011117329）；LUZ-Y（Genentech）；Biclonic（Merus、WO2013157953）；二重ターゲティングドメイン抗体（GSK/Domantis）；Two-in-one抗体または2つの標的を認識する二重作用Fab（Genentech、NovImmune、Adimab）；架橋されたMab（Karmanos Cancer Center）；共有結合的に融合したmAb（AIMM）；CovX-body（CovX/Pfizer）；FynomAb（Covagen/Janssen ilag）；DutaMab（Dutalys/Roche）；iMab（MedImmune）；IgG様二特異物（ImClone/Eli Lilly、Shen,J.,et al.J Immunol Methods,2007.318（1-2）:p.65-74）；TIG-body、DIG-bodyおよびPIG-body（Pharmabcine）；二重親和性再ターゲティング分子（Fc-DARTまたはIg-DART、Macrogenics、WO/2008/157379、WO/2010/080538）；BEAT（Glenmark）；Zybodies（Zyngenia）；共通軽鎖（Crucell/Merus、US7262028）または共通重鎖（NovImmuneによるκλBodies、WO2012023053）を用いるアプローチの他に、Fc領域様scFv融合物を含有する抗体断片に融合したポリペプチド配列を含む融合タンパク質、例えばZymoGenetics/BMSによるBsAb、Biogen IdecによるHERCULES（US007951918）；SCORPIONS（Emergent BioSolutions/TrubionおよびZymogenetics/BMS）；Ts2Ab（MedImmune/AZ（Dimasi,N.,et al.J Mol Biol,2009.393（3）:p.672-92）；scFv融合物（Genentech/Roche）；scFv融合物（Novartis）；scFv融合物（Immunomedics）；scFv融合物（Changzhou Adam Biotech Inc、CN 102250246）；TvAb（Roche、WO 2012025525、WO 2012025530）；mAb2（f-Star、WO2008/003116）；ならびに二重scFv融合物を含むが、これらに限定されない。抗体という用語は、他に特定されなければ、モノクローナル抗体（例えばヒトモノクローナル抗体）、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、単一特異性抗体（例えば二価単一特異性抗体）、二重特異性抗体、任意のアイソタイプおよび/またはアロタイプの抗体；例えばSymphogenおよびMerus（Oligoclonics）により活用された技術により生成される、抗体混合物（組換えポリクローナル）、WO2015/158867に記載されているマルチマーFcタンパク質、ならびにWO2014/031646に記載されている融合タンパク質を含むことが理解されるべきである。これらの異なる抗体断片および様式は抗体の意味に一般に含まれるが、それらは全体的におよび各々独立して本発明の独特の特色であり、異なる生物学的特性および有用性を呈する。

【００３８】

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

【００３９】

用語「アゴニズム」および「アゴニスト（の）」（agonistic）は、本明細書において交換可能に使用され、直接的にまたは間接的に、CD27の生物学的活性または活性化を

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

【００４０】

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

【００４１】

「バリアント」は、本明細書において使用される場合、親または参照配列から1つまたは複数のアミノ酸残基において異なるタンパク質またはポリペプチド配列を指す。バリアントは、例えば、親または参照配列に対して少なくとも80％、例えば90％、または95％、または97％、または98％、または99％の配列同一性を有してもよい。追加的に、または代替的に、バリアントは、12またはそれ未満、例えば11、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1個の変異、例えばアミノ酸残基の置換、挿入、または欠失により、親または参照配列から異なってもよい。よって、本明細書において交換可能に使用される「バリアント抗体」または「抗体バリアント」は、例えば、抗原結合領域、Fc領域または両方において、親または参照抗体と比較して1つまたは複数のアミノ酸残基において異なる抗体を指す。同様に、「バリアントFc領域」または「Fc領域バリアント」は、親または参照Fc領域と比較して1つまたは複数のアミノ酸残基において異なる、任意で、12またはそれ未満、例えば11、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1個の変異、例えばアミノ酸残基の置換、挿入、または欠失により、親または参照Fc領域アミノ酸配列から異なる、Fc領域を指す。親または参照Fc領域は、典型的には、文脈に依存して特定のアイソタイプであってもよい、ヒト野生型抗体のFc領域である。バリアントFc領域は、二量体化した形態であってもよく、ホモ二量体またはヘテロ二量体であってもよく、例えば、二量体化したFc領域のアミノ酸配列の1つが変異を含み、他方が親または参照野生型アミノ酸配列と同一であるものであってもよい。Fc領域アミノ酸配列を含む、野生型（典型的には親または参照配列）IgG CHおよびバリアントIgG定常領域アミノ酸配列の例は、表3に示されている。

【００４２】

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

の順序:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4において並べられた、3つのCDRおよび4つのFRから典型的には構成される。本明細書におけるCDR配列は、別様に述べられているか文脈に矛盾しない限り、IMGTに従って定義される（Lefranc MP.et al.,Nucleic Acids Research,27,209-212,1999］およびBrochet X.Nucl.Acids Res.36,W503-508（2008）を参照）。

【００４３】

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

【００４４】

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

【００４５】

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

【００４６】

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

【００４７】

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

【００４８】

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

【００４９】

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

【００５０】
用語「CD27」は、本明細書において使用される場合、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー7（TNFRSF7）としても公知の、CD27と称されるヒトタンパク質を指す。SEQ ID NO:1（Uniprot ID P26842）に示されるアミノ酸配列において、アミノ酸残基1～19はシグナルペプチドであり、アミノ酸残基20～240は成熟ポリペプチドである。文脈に矛盾しなければ、CD27はまた、CD27のバリアント、そのアイソフォームおよびオルソログを指すことがある。A59T変異を含むヒトCD27の天然に存在するバリアントはSEQ ID NO:2に示される。
【００５１】
カニクイザル（マカカ・ファシクラリス（Macaca fascicularis））において、CD27タンパク質は、SEQ ID NO:3（Genbank XP_005569963）に示されるアミノ酸配列を有する。SEQ ID NO:3に示される240アミノ酸の配列において、シグナルペプチドは定義されていない。
【００５２】
用語「抗体結合領域」は、抗体が結合するエピトープを含む、抗原の領域を指す。抗体結合領域は、バイオレイヤー干渉法を使用してエピトープ結合により、アラニンスキャンにより、またはシャッフルアッセイ（抗原の領域が別の種のものと交換されている抗原構築物を使用し、抗体が抗原に依然として結合するか否かを決定する）により決定されてもよい。抗体との相互作用に関与する抗体結合領域内のアミノ酸は、水素/重水素交換質量分析によりおよびその抗原に結合した抗体の結晶分析により決定されてもよい。
【００５３】
用語「エピトープ」は、抗体により特異的に結合される抗原決定因子を意味する。エピトープは、通常、アミノ酸、糖側鎖またはその組合せなどの分子の表面グルーピングからなり、通常、特定の三次元構造的特徴の他に、特定の電荷的特徴を有する。配座および非配座エピトープは、前者への結合は変性溶媒の存在下で喪失されるが後者への結合はそうではないという点において区別される。エピトープは、結合に直接的に関与するアミノ酸残基、および結合に直接的に関与しない他のアミノ酸残基、例えば抗体が抗原に結合している場合に抗体により有効に遮断またはカバーされるアミノ酸残基（換言すれば、アミノ酸残基は特有の抗体のフットプリント内にあるか、またはその近くに隣接している）を含んでもよい。
【００５４】
用語「モノクローナル抗体」、「モノクローナルAb」、「モノクローナル抗体組成物」、または「mAb」などは、本明細書において使用される場合、単一の分子組成の抗体分子の調製物を指す。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープについての単一の結合特異性および親和性を示す。よって、用語「ヒトモノクローナル抗体」は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変および定常領域を有する単一の結合特異性を示す抗体を指す。ヒトモノクローナル抗体は、不死化細胞に融合した、ヒト重鎖導入遺伝子および軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する、トランスジェニックまたはトランス染色体非ヒト動物、例えばトランスジェニックマウスまたはラットから得られたB細胞を含むハイブリドーマにより製造されてもよい。モノクローナル抗体はまた、組換えにより改変された宿主細胞から、または抗体をコードする核酸配列のインビトロ転写および/もしくは翻訳をサポートする細胞抽出物を使用するシステムから製造されてもよい。
【００５５】
用語「アイソタイプ」は、本明細書において使用される場合、免疫グロブリンクラス（例えばIgG、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE、もしくはIgM）またはその任意のアロタイプ、例えば重鎖定常領域遺伝子によりコードされるIgG1m（za）およびIgG1m（f）を指す。さらに、各々の重鎖アイソタイプは、カッパ（κ）またはラムダ（λ）軽鎖のいずれかと組み合わせられ得る。
【００５６】
用語「全長抗体」は、本明細書において使用される場合、抗体が、断片ではなく、天然

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

【００５７】

用語「ヒト抗体」は、本明細書において使用される場合、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変およびフレームワーク領域ならびにヒト免疫グロブリン定常ドメインを含む抗体を含むことが意図される。本発明のヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によりコードされないアミノ酸残基を含んでもよい（例えば、変異、挿入または欠失が、インビトロでランダムもしくは部位特異的変異誘発によりまたはインビボで体細胞変異により導入されている）。しかしながら、用語「ヒト抗体」は、本明細書において使用される場合、別の非ヒト種、例えばマウスの生殖系列に由来するCDR配列がヒトフレームワーク配列上にグラフトされている抗体を含むことは意図されない。

【００５８】

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

【００５９】

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

【００６０】

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

【００６１】

用語「ヒンジ領域」は、本明細書において使用される場合、免疫グロブリン重鎖のヒンジ領域を指す。そのため、例えばヒトIgG1抗体のヒンジ領域は、Kabat,E.A.et al.,Sequences of proteins of immunological interest.5th Edition-US Departme

nt of Health and Human Services,NIH publication No.91-3242,pp 662,680,689（1991）に示されているEu番号付け（Euインデックス）に従うアミノ酸216～230に対応する。しかしながら、ヒンジ領域はまた、本明細書に記載されている他のサブタイプのいずれかであってもよい。

【００６２】

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

【００６３】

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

【００６４】

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

【００６５】

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

【００６６】

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

【００６７】

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

【００６８】

用語「オリゴマー化」は、本明細書において使用される場合、単量体を有限の重合度まで変換する過程を指すことが意図される。本発明に係る抗体は、例えば、細胞表面におけ

る、標的結合後にFc領域の非共有結合性会合を介して、オリゴマー、例えば六量体を形成することができる。Fc:Fc相互作用を通じた細胞表面結合での抗CD27抗体のオリゴマー化は、CD27細胞内シグナル伝達の活性化を結果としてもたらすCD27クラスタリングを増加させてもよい。細胞表面結合でオリゴマー、例えば六量体を形成するE345RまたはE430G変異を含む抗体の能力は、de Jong RN et al,PLoS Biol.2016 Jan 6；14（1）:e1002344に記載されるように評価され得る。抗体のFc-Fc媒介性オリゴマー化は、隣接する抗体の間のFc領域の分子間会合を通じて（細胞）表面上の標的結合後に起こり、E345RまたはE430G変異（Euインデックスによる番号付け）の導入により増加される。

【００６９】

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

【００７０】

用語「Fc-Fc増強性」（Fc-Fc enhancing）は、本明細書において使用される場合、抗体が細胞表面上でオリゴマー、例えば六量体を形成するように2つのFc領域含有抗体のFc領域の間の結合強度を増加させること、または該Fc領域の間の相互作用を安定化させることを指すことが意図される。この増強は、抗体のFc領域中のある特定のアミノ酸変異、例えばE345RまたはE430Gにより得られ得る。用語「一価抗体」は、本発明の文脈において、1つのみの抗原結合ドメイン（例えば1つのFabアーム）を用いて、抗原上の特異的なエピトープと相互作用することができる抗体分子を指す。二重特異性抗体の文脈において、「一価抗体結合」は、1つのみの抗原結合ドメイン（例えば1つのFabアーム）を用いる抗原上の1つの特異的なエピトープに対する二重特異性抗体の結合を指す。

【００７１】

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

【００７２】

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

【００７３】

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

【００７４】

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

【００７５】

（表２０）R基の構造および一般的な化学的特徴付けに基づく主な分類

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

【００７６】

（表２１）アミノ酸残基の代替的な物理的および機能的分類

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

【００７７】

１つのアミノ酸の別のアミノ酸への置換は、保存的または非保存的置換として分類されてもよい。本発明の文脈において、「保存的置換」は、1つのアミノ酸の、類似した構造的および/または化学的特徴を有する別のアミノ酸での置換、例えば1つのアミノ酸残基の、上記の2つの表のいずれかにおいて定義されている同じクラスの別のアミノ酸残基への置換であり:例えば、ロイシンはイソロイシンで置換されてもよく、というのは、それらは両方とも脂肪族の、分岐した疎水性物質であるからである。同様に、アスパラギン酸はグルタミン酸で置換されてもよく、その理由は、それらは両方とも小さい、負に荷電した残基であるからである。

【００７８】

本発明の文脈において、抗体中の置換は、

元々のアミノ酸-位置-置換されたアミノ酸

として指し示され；

任意のアミノ酸残基を指し示すためのコード「Xaa」または「X」を含む、アミノ酸の

ためのよく認識されている表記法、3文字コード、または1文字コードへの参照が使用される。そのため、XaaまたはXは、20個の天然に存在するアミノ酸のいずれかを典型的には表し得る。用語「天然に存在する」は、本明細書において使用される場合、以下のアミノ酸残基；グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン、リジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、プロリン、トリプトファン、フェニルアラニン、チロシン、メチオニン、およびシステインのいずれか1つを指す。よって、表記「K409R」または「Lys409Arg」は、抗体がアミノ酸位置409におけるリジンのアルギニンでの置換を含むことを意味する。

【００７９】

所与の位置のアミノ酸の、任意の他のアミノ酸への置換は、

元々のアミノ酸-位置；または例えば「K409」

と称される。

【００８０】

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

【００８１】

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

【００８２】

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

【００８３】

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

【００８４】

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

【００８５】

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

293細胞、Expi293F細胞、植物細胞、または、酵母細胞を含む、真菌を含む。

【００８６】

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

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

のように算出される。

【００８７】

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

【００８８】

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

【００８９】

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

これらのC3切断生成物は、エフェクター細胞による直接的なファゴサイトーシスを、または抗体媒介性ファゴサイトーシスを増強することにより間接的にファゴサイトーシスを促進し得る。抗体が不活性のFc領域を有する本明細書におけるある特定の態様において、抗体はFc媒介性エフェクター機能を誘導しない。

【００９０】

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

【００９１】

「メモリーT細胞」は、本明細書において使用される場合、感染が除去された後の長い時間的期間にわたり身体中に残存するTリンパ球を指す。メモリーT細胞の例はセントラルメモリーT細胞（CD45RA-CCR7＋）およびエフェクターメモリーT細胞（CD45RA-CCR7-）を含む。メモリーT細胞はこれらの表現型に完全に制限され得ないことが理解される。

【００９２】

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

【００９３】

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

【００９４】

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

【００９５】

用語「C1q結合」は、本明細書において使用される場合、その抗原に結合した抗体に対するC1qの結合の文脈におけるC1qの結合を指すことが意図される。その抗原に結合した抗体は、本明細書に記載される文脈においてインビボおよびインビトロの両方で起こると理解されるべきである。本明細書の実施例8に記載されるように、C1q結合は、例えば、人工的な表面上に固定化された抗体を使用することにより、または細胞もしくはビリオン表面上の予め決定された抗原に結合した抗体を使用することにより評価され得る。抗

体オリゴマーに対するC1qの結合は、高いアビディティの結合を結果としてもたらす多価相互作用として本明細書において理解されるべきである。例えば本発明の抗体における変異の導入の結果としてもたらされる、C1q結合における減少は、変異した抗体のC1q結合をその親抗体（同じアッセイ内での変異を有しない本発明の抗体）のC1q結合と比較することにより測定されてもよい。

【００９６】

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

【００９７】

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

【００９８】

用語「薬物動態プロファイル」は、本明細書において使用される場合、本明細書の実施例12に記載されるように経時的な血漿IgGレベルとして決定され得る。

【００９９】

用語「CD137」は、本明細書において使用される場合、リガンドTNFSF9/4-1BBLの受容体である、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー9（TNFRSF9）としても称される、CD137（4-1BB）を指す。CD137（4-1BB）は、T細胞活性化に関与すると考えられている。CD137のための他の同義語は、4-1BBリガンド受容体、CD137、T細胞抗原4-1BBホモログおよびT細胞抗原ILAを含むが、これらに限定されない。1つの態様において、CD137（4-1BB）は、UniProtアクセッション番号Q07011を有する、ヒトCD137（4-1BB）である。ヒトCD137の配列はSEQ ID NO:130にも示される。SEQ ID NO:130のアミノ酸1～23はヒトCD137のシグナルペプチドに対応し;SEQ ID NO:130のアミノ酸24～186はヒトCD137の細胞外ドメインに対応し;タンパク質の残りの部分、すなわちSEQ ID NO:130のアミノ酸187～213および214～255はそれぞれ膜貫通および細胞質ドメインである。

【０１００】

「プログラム死-1（PD-1）」（Programmed Death-1）受容体は、CD28ファミリーに属する免疫阻害性受容体を指す。

【０１０１】

用語「PD-L1」は、本明細書において使用される場合、ヒトPD-L1（hPD-L1）、hPD-L1のバリアント、アイソフォーム、および種ホモログ、例えばマカク（カニクイザル）、アフリカゾウ、イノシシおよびマウスPD-L1（例えば、それぞれGenbankアクセッション番号NP_054862.1、XP_005581836、XP_003413533、XP_005665023およびNP_068693を参照）、ならびにhPD-L1と少なくとも1つの共通のエピトープを有するアナログを含む。ヒトPD-L1の配列はまた、SEQ ID NO:98（成熟配列）、およびSEQ ID NO:129に示され、アミノ酸1～18はシグナルペプチドであることが予測される。用語「PD-L2」は、本明細書において使用される場合、ヒトPD-L2（hPD-L2）、hPD-L2のバリアント、アイソフォーム、および種ホモログ、ならびにhPD-L2と少なくとも1つの共通のエピトープを有するアナログを含む。PD-1のリガンド（PD-L1およびPD-L2）は、抗原提示細胞、例えば樹状細胞またはマクロファージ、および他の免疫細胞の表面上に発現される。PD-L1またはPD-L2へのPD-1の結合はT細胞活性化の下方調節を結果としてもたらす。PD-L1および/またはPD-L2を発現するがん細胞は、PD-1を発現するT細胞をスイッチオフして、抗がん免疫応答の抑制を結果としてもたらすことができる。PD-1とそのリガンドとの間の相互作用は、腫瘍浸潤性リンパ球における減少、T細胞受容体媒介性増殖における減少、およびがん性細胞による免疫逃避を結果としてもたらす。免疫抑制は、PD-L1とのPD-1の局所的な相互作用を阻害することにより逆

転させることができ、効果は、PD-L2とのPD-1の相互作用もまた遮断される場合に追加的である。

【０１０２】

用語「PD-1」は、プログラム細胞死-1に関し、細胞により天然に発現されるか、またはPD-1遺伝子をトランスフェクトされた細胞により発現されるPD-1の任意のバリアント、コンホメーション、アイソフォームおよび種ホモログを含む。好ましくは、「PD-1」は、ヒトPD-1、特に、配列表のSEQ ID NO:58に示されているアミノ酸配列（NCBI参照配列:NP_005009.2）を有するタンパク質、または配列表のSEQ ID NO:60に示されている核酸配列（NCBI参照配列:NM_005018.2）により好ましくはコードされるタンパク質に関する。「PD-1」のための代替的な名称はCD279およびSLEB2を含む。

【０１０３】

用語「PD-1」は、細胞により天然に発現されるか、またはPD-1遺伝子をトランスフェクトされた細胞中/上に発現されるヒトPD-1の翻訳後修飾バリアント、アイソフォームおよび種ホモログを含む。

【０１０４】

用語「PD-1バリアント」は、（i）PD-1スプライスバリアント、（ii）特には異なるN-グリコシル化状態を有するバリアントを含む、PD-1翻訳後修飾バリアント、（iii）PD-1コンホメーションバリアントを包含する。そのようなバリアントは、可溶性形態のPD-1を含んでもよい。

【０１０５】

PD-1は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属するI型膜タンパク質である（The EMBO Journal（1992）,vol.11,issue 11,p.3887-3895）。ヒトPD-1タンパク質は、配列表のSEQ ID NO:58に示されている配列の24～170位のアミノ酸から構成される細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン（SEQ ID NO:58に示されている配列の171～191位のアミノ酸）および細胞質ドメイン（SEQ ID NO:58に示されている配列の192～288位のアミノ酸）を含む。用語「PD-1断片」は、本明細書において使用される場合、PD-1タンパク質の任意の断片、好ましくは免疫原性断片を包含する。該用語はまた、例えば、全長タンパク質の上記のドメインまたはこれらのドメインの任意の断片、特に免疫原性断片を包含する。ヒトPD-1タンパク質の好ましい細胞外ドメインのアミノ酸配列は、配列表のSEQ ID NO:59に示されている。

【０１０６】

Fc領域は、それらのC末端においてリジンを有してもよい。このリジンの起源は、これらのFc領域が由来するヒトにおいて見出される天然に存在する配列である。組換え抗体の細胞培養製造の間に、この末端リジンは、内因性カルボキシペプチダーゼによるタンパク質加水分解により切断除去されて、同じ配列を有するがC末端リジンを欠いた定常領域を結果としてもたらすことができる。抗体の生産の目的のために、この末端リジンをコードするDNAは、抗体がリジンなしで製造されるように配列から省略され得る。末端リジンをコードする核酸配列、またはコードしない核酸配列のいずれかから製造される抗体は、配列および機能において実質的に同一であり、その理由は、例えばCHOベース製造システムにおいて製造される抗体を使用する場合に、末端リジンのプロセシングの程度は典型的には高いからである（Dick,L.W.et al.Biotechnol.Bioeng.2008；100:1132-1143）。それゆえ、本発明に係るタンパク質、例えば抗体は、末端リジンをコードもしくは有することと共にまたはそれなしで生成され得ることが理解される。末端リジンを有する配列、例えば末端リジンを有する定常領域配列は、末端リジンを有しない対応する配列として理解され得ること、および末端リジンを有しない配列もまた、末端リジンを有する対応する配列として理解され得ることもまた本発明に従って理解される。

【０１０７】

本開示の局面および態様

第1の局面において、本開示は、対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法であって、i）CD27に結合する少なくと

も1つの結合領域を含む結合剤;およびii）PD1/PD-L1阻害剤を該対象に投与する工程を含む、方法を提供する。

【０１０８】

CD27に結合する結合剤

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

【０１０９】

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

【０１１０】

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

【０１１１】

1つの態様において、結合剤は、単離された抗体である。

【０１１２】

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

【０１１３】

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

【０１１４】

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

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

【0115】

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

【0116】

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

【0117】

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

【0118】

本発明に係る方法において使用される結合剤は、ヒトカッパ軽鎖である軽鎖定常領域を含んでもよい。別の態様において、それはヒトラムダ軽鎖定常領域を含んでもよい。

【0119】

結合剤は、ヒトIgGアイソタイプである重鎖定常領域を好ましくはさらに含んでもよい。それは、改変されたヒトIgG定常領域を任意で含んでもよい。そのようなヒトIgGは、CH2およびCH3領域を含むFc領域を含む。Fc領域中のIgG定常領域を改変することにより、例えば、抗体のFcエフェクター機能を調節すること、またはFc-Fc相互作用およびそれによりクラスター、例えば六量体を形成する抗体の傾向を増加させることが可能であ

る。本発明の1つの態様において、ヒトIgGまたは改変されたヒトIgGは、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4より選択される。1つの態様において、それはIgG1である。別の態様において、それはIgG2である。さらに別の態様において、それはIgG3である。さらなる態様において、それはIgG4である。1つの特定の態様において、IgGは、Fc領域中に1つまたは複数のアミノ酸置換を含む改変されたヒトIgGである。1つの態様において、それは、Fc領域中に1つまたは複数のアミノ酸置換を含む改変されたヒトIgG1であってもよい。本発明のさらなる態様において、IgG1は、Fc領域中に2つ以上のアミノ酸置換を含む。1つの態様において、IgG1 Fc領域は2つのアミノ酸置換を有する。

【０１２０】

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

【０１２１】

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

【０１２２】

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

【０１２３】

ある特定の態様において、ヒトCD27に結合する抗体バリアントは、

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

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

を含む。

【０１２４】

他のある特定の態様において、ヒトCD27に結合する抗体バリアントは、

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

（b）SEQ ID NO:8を含むVL領域を含む軽鎖

を含む。

【０１２５】

ヒトCD27に結合する本発明のバリアント抗体は、バリアントFc領域またはP329、E430およびE345の1つもしくは複数において突然変異を含むバリアントヒトIgG1 CH領域を含む。以下において、Fc領域中の突然変異への言及は、ヒトIgG1 CH領域中の突然変異に同様に適用されてもよく、逆もまた成り立つ。

【０１２６】
本明細書に記載されるように、Fc領域中の突然変異させるアミノ酸の位置は、Euインデックスにしたがって番号付けされる場合に、天然に存在する（野生型）ヒトIgG1重鎖中のその位置に関して（すなわち、該位置に「対応して」）与えられ得る。そのため、親Fc領域が1つもしくは複数の突然変異を既に含有する場合および/または親Fc領域が、例えば、IgG2、IgG3もしくはIgG4 Fc領域である場合、Euインデックスにしたがって番号付けされるヒトIgG1重鎖中のアミノ酸残基、例えば、E430などに対応するアミノ酸の位置は、アライメントにより決定され得る。特に、親Fc領域は、ヒトIgG1重鎖配列中のE430に対応する位置における残基を同定するために野生型ヒトIgG1重鎖配列とアライメントされる。表3に示される異なるヒトIgG1アロタイプのいずれか1つを含む、任意の野生型ヒトIgG1定常領域アミノ酸配列はこの目的のために有用であり得る。
【０１２７】
本発明の1つの態様において、IgG Fc領域中の改変は、同じアイソタイプ、例えばIgG1の野生型IgG Fc領域を含むことを除いて同一の抗体と比較して増加したCD27アゴニズムを誘導する。これは、例えば、Eu番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置E345および/またはE430に対応するアミノ酸位置においてE以外のアミノ酸を導入することにより得られてもよい。本発明の1つの態様において、Eu番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置E345に対応する位置におけるアミノ酸残基は、A、C、D、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、P、R、S、T、V、WおよびYを含む群より選択される。本発明の別の態様において、Eu番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置E430に対応する位置におけるアミノ酸残基は、A、C、D、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、P、R、S、T、V、Wを含む群より選択される。
【０１２８】
好ましい態様において、Eu番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置E345に対応する位置におけるアミノ酸残基はRである。よって、本発明の結合剤は、Fc領域中のE345R置換を含んでもよい。本発明の別の態様において、Eu番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置E430に対応する位置におけるアミノ酸残基はGである。よって、本発明の結合剤は、Fc領域中のE430G置換を含んでもよい。別の態様において、結合剤は、E430G、E345K、E430S、E430F、E430T、E345Q、E345R、E345Yを含む群より選択されるアミノ酸置換を含む。
【０１２９】
本発明により、結合剤は、抗体結合で細胞表面上のCD27の抗体依存的なクラスタリングに繋がり得る増強したFc-Fc相互作用を有し、それにより本発明の結合剤のアゴニズムを増加させる1つまたは複数の抗体の形態において提供される。
【０１３０】
本発明にしたがって使用される結合剤の別の態様において、Eu番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置P329に対応する位置におけるアミノ酸残基は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、WおよびYを含む群より選択されるアミノ酸で置換される。よって、本発明にしたがって使用される結合剤は、位置329において突然変異をさらに含んでもよい。
【０１３１】
本発明のさらなる態様において、結合剤は、Eu番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置P329に対応する位置においてアミノ酸残基Rを有する。よって、本発明の結合剤は、Fc領域中にP329R置換を有してもよい。理論により縛られないが、（例えばSEQ ID NO:13に示されるように）Fc領域中のE345R突然変異を含む結合剤は増加した血清クリアランスを有すると考えられる。位置329における突然変異、例えば（例えばSEQ ID NO:15に示されるように）P329Rをさらに導入することは、例えばSEQ ID NO:12に示されるwt IgG1を含む結合剤のレベルまで結合剤のクリアランスを回復させることを本発明者らは見出した。
【０１３２】

別の好ましい態様において、Eu番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置P329およびE345に対応する位置におけるアミノ酸残基は両方ともRである。本発明により、同じVHおよびVL領域を含み、かつ位置329において野生型アミノ酸Pおよび位置345において野生型アミノ酸Eを含むという例外と共に同一のIgG1重鎖定常領域を含む結合剤と比較した場合に、増加したCD27受容体アゴニズムおよび同等の薬物動態特性、例えば血清クリアランスなどを有する結合剤が提供される。

【０１３３】

そのため、一態様において、結合剤は、CD27への結合において増加した受容体アゴニズムを有し、かつ、同じVHおよびVL領域を含むが例えばSEQ ID NO:12に示されるものなどの野生型IgG1重鎖定常領域を含む結合剤の薬物動態特性と比較した場合に、同等の、例えば類似したまたは同一の薬物動態特性である薬物動態特性をさらに有する。換言すれば、結合剤は、野生型IgG1重鎖定常領域を含むことを除いて同一の結合剤の薬物動態特性と重大に異ならない薬物動態特性を有してもよい。

【０１３４】

本発明の他の態様において、結合剤は、先行するセクションのいずれか1つに係るバリアントFc領域を含み、バリアントFc領域は、ヒトIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4 Fc領域からなる群より選択されるヒトIgG Fc領域のバリアントである。すなわち、E430およびE345およびP329に対応するアミノ酸残基の1つまたは複数における突然変異は、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4 Fc領域からなる群より選択されるヒトIgG Fc領域である親Fc領域において為される。好ましくは、親Fc領域は、天然に存在する（野生型）ヒトIgG Fc領域、例えばヒト野生型IgG1、IgG2、IgG3もしくはIgG4 Fc領域、またはその混合されたアイソタイプである。そのため、バリアントFc領域は、（E430およびE345およびP329より選択されるアミノ酸残基の1つまたは複数における）記載される突然変異を除いて、ヒトIgG1、IgG2、IgG3もしくはIgG4アイソタイプ、またはその混合されたアイソタイプであってもよい。

【０１３５】

1つの態様において、親Fc領域および/またはヒトIgG1 CH領域は野生型ヒトIgG1アイソタイプである。

【０１３６】

そのため、バリアントFc領域は、（E430またはE345またはP329における）記載される突然変異を除いて、ヒトIgG1 Fc領域であってもよい。

【０１３７】

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

【０１３８】

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

【０１３９】

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

【０１４０】

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

【０１４１】

特有の態様において、親Fc領域および/またはヒトIgG1 CH領域は、混合されたアロタイプのヒト野生型IgG1、例えばIgG1m（za）、IgG1m（zax）、またはIgG1m（fa）などである。

【０１４２】

そのため、バリアントFc領域および/またはヒトIgG1 CH領域は、（E430またはE345またはP329における）記載される突然変異を除いて、ヒトIgG1m（f）、IgG1m（

a）、IgG1m（x）、IgG1m（z）アロタイプまたはそのいずれか2つ以上の混合されたアロタイプであってもよい。

【０１４３】

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

【０１４４】

特有の態様において、親Fc領域はヒト野生型IgG2アイソタイプである。

【０１４５】

特有の態様において、親Fc領域はヒト野生型IgG3アイソタイプである。

【０１４６】

特有の態様において、親Fc領域はヒト野生型IgG4アイソタイプである。

【０１４７】

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

【０１４８】

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

【０１４９】

一態様において、結合剤は、

a. SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むVH領域

b. SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列を含むVL領域

c. SEQ ID NO:15に示されるアミノ酸配列を含むCH領域および

d. SEQ ID NO:16に示されるアミノ酸配列を含むCL領域

を含む。

【０１５０】

別の態様において、結合剤は、

a. SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むVH領域

b. SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列を含むVL領域

c. SEQ ID NO:12に示されるアミノ酸配列を含むCH領域および

d. SEQ ID NO:16に示されるアミノ酸配列を含むCL領域

を含む。

【０１５１】

別の態様において、第１の結合は、
ａ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
ｂ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
ｃ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１３に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
ｄ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１６に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１５２】
別の態様において、結合剤は、
ａ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
ｂ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
ｃ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１４に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
ｄ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１６に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１５３】
別の態様において、結合剤は、
ａ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
ｂ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
ｃ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１８に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
ｄ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１６に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１５４】
別の態様において、結合剤は、
ａ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
ｂ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
ｃ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１９に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
ｄ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１６に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１５５】
別の態様において、結合剤は、
ａ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
ｂ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
ｃ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:２０に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
ｄ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１６に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１５６】
別の態様において、結合剤は、
ａ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
ｂ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
ｃ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:２１に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
ｄ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１６に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１５７】
別の態様において、結合剤は、
ａ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
ｂ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
ｃ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:２２に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
ｄ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１６に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。
【０１５８】
別の態様において、結合剤は、

a．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
b．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
c．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:２３に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
d．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１６に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。

【０１５９】

別の態様において、結合剤は、
a．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
b．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
c．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:２７に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
d．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１６に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。

【０１６０】

別の態様において、結合剤は、
a．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
b．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
c．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:２８に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
d．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１６に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。

【０１６１】

別の態様において、結合剤は、
a．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
b．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
c．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:２９に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
d．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１６に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。

【０１６２】

別の態様において、本発明に係る結合剤は、
a．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
b．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
c．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:３０に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
d．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１６に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。

【０１６３】

別の態様において、結合剤は、
a．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
b．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
c．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:３１に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
d．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１６に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。

【０１６４】

別の態様において、結合剤は、
a．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域
b．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されるアミノ酸配列を含むＶＬ領域
c．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:３２に示されるアミノ酸配列を含むＣＨ領域および
d．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:１６に示されるアミノ酸配列を含むＣＬ領域
を含む。

【０１６５】

別の態様において、結合剤は、
a．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されるアミノ酸配列を含むＶＨ領域

b．SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列を含むVL領域
c．SEQ ID NO:33に示されるアミノ酸配列を含むCH領域および
d．SEQ ID NO:16に示されるアミノ酸配列を含むCL領域
を含む。

【０１６６】

別の態様において、結合剤は、
a．SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むVH領域
b．SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列を含むVL領域
c．SEQ ID NO:34に示されるアミノ酸配列を含むCH領域および
d．SEQ ID NO:16に示されるアミノ酸配列を含むCL領域
を含む。

【０１６７】

別の態様において、結合剤は、
a．SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むVH領域
b．SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列を含むVL領域
c．SEQ ID NO:36に示されるアミノ酸配列を含むCH領域および
d．SEQ ID NO:16に示されるアミノ酸配列を含むCL領域
を含む。

【０１６８】

代替的な態様において、CL領域は、SEQ ID NO:17に示されるアミノ酸配列であってもよい。

【０１６９】

一態様において、結合剤は、
e．SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むVH領域
f．SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列を含むVL領域
g．SEQ ID NO:15に示されるアミノ酸配列を含むCH領域および
h．SEQ ID NO:17に示されるアミノ酸配列を含むCL領域
を含む。

【０１７０】

別の態様において、結合剤は、
e．SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むVH領域
f．SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列を含むVL領域
g．SEQ ID NO:12に示されるアミノ酸配列を含むCH領域および
h．SEQ ID NO:17に示されるアミノ酸配列を含むCL領域
を含む。

【０１７１】

別の態様において、結合剤は、
e．SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むVH領域
f．SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列を含むVL領域
g．SEQ ID NO:13に示されるアミノ酸配列を含むCH領域および
h．SEQ ID NO:17に示されるアミノ酸配列を含むCL領域
を含む。

【０１７２】

別の態様において、結合剤は、
e．SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むVH領域
f．SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列を含むVL領域
g．SEQ ID NO:14に示されるアミノ酸配列を含むCH領域および
h．SEQ ID NO:17に示されるアミノ酸配列を含むCL領域
を含む。

【０１７３】

別の態様において、結合剤は、
e．SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むVH領域
f．SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列を含むVL領域
g．SEQ ID NO:18に示されるアミノ酸配列を含むCH領域および
h．SEQ ID NO:17に示されるアミノ酸配列を含むCL領域
を含む。

【０１７４】
別の態様において、結合剤は、
e．SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むVH領域
f．SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列を含むVL領域
g．SEQ ID NO:19に示されるアミノ酸配列を含むCH領域および
h．SEQ ID NO:17に示されるアミノ酸配列を含むCL領域
を含む。

【０１７５】
別の態様において、結合剤は、
e．SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むVH領域
f．SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列を含むVL領域
g．SEQ ID NO:20に示されるアミノ酸配列を含むCH領域および
h．SEQ ID NO:17に示されるアミノ酸配列を含むCL領域
を含む。

【０１７６】
別の態様において、結合剤は、
e．SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むVH領域
f．SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列を含むVL領域
g．SEQ ID NO:21に示されるアミノ酸配列を含むCH領域および
h．SEQ ID NO:17に示されるアミノ酸配列を含むCL領域
を含む。

【０１７７】
別の態様において、結合剤は、
e．SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むVH領域
f．SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列を含むVL領域
g．SEQ ID NO:22に示されるアミノ酸配列を含むCH領域および
h．SEQ ID NO:17に示されるアミノ酸配列を含むCL領域
を含む。

【０１７８】
別の態様において、結合剤は、
e．SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むVH領域
f．SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列を含むVL領域
g．SEQ ID NO:23に示されるアミノ酸配列を含むCH領域および
h．SEQ ID NO:17に示されるアミノ酸配列を含むCL領域
を含む。

【０１７９】
別の態様において、結合剤は、
e．SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むVH領域
f．SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列を含むVL領域
g．SEQ ID NO:27に示されるアミノ酸配列を含むCH領域および
h．SEQ ID NO:17に示されるアミノ酸配列を含むCL領域
を含む。

【０１８０】
別の態様において、結合剤は、

e. SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むVH領域
f. SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列を含むVL領域
g. SEQ ID NO:28に示されるアミノ酸配列を含むCH領域および
h. SEQ ID NO:17に示されるアミノ酸配列を含むCL領域
を含む。

【０１８１】

別の態様において、結合剤は、
e. SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むVH領域
f. SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列を含むVL領域
g. SEQ ID NO:29に示されるアミノ酸配列を含むCH領域および
h. SEQ ID NO:17に示されるアミノ酸配列を含むCL領域
を含む。

【０１８２】

別の態様において、結合剤は、
e. SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むVH領域
f. SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列を含むVL領域
g. SEQ ID NO:30に示されるアミノ酸配列を含むCH領域および
h. SEQ ID NO:17に示されるアミノ酸配列を含むCL領域
を含む。

【０１８３】

別の態様において、結合剤は、
e. SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むVH領域
f. SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列を含むVL領域
g. SEQ ID NO:31に示されるアミノ酸配列を含むCH領域および
h. SEQ ID NO:17に示されるアミノ酸配列を含むCL領域
を含む。

【０１８４】

別の態様において、結合剤は、
e. SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むVH領域
f. SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列を含むVL領域
g. SEQ ID NO:32に示されるアミノ酸配列を含むCH領域および
h. SEQ ID NO:17に示されるアミノ酸配列を含むCL領域
を含む。

【０１８５】

別の態様において、結合剤は、
e. SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むVH領域
f. SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列を含むVL領域
g. SEQ ID NO:33に示されるアミノ酸配列を含むCH領域および
h. SEQ ID NO:17に示されるアミノ酸配列を含むCL領域
を含む。

【０１８６】

別の態様において、結合剤は、
e. SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むVH領域
f. SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列を含むVL領域
g. SEQ ID NO:34に示されるアミノ酸配列を含むCH領域および
h. SEQ ID NO:17に示されるアミノ酸配列を含むCL領域
を含む。

【０１８７】

別の態様において、結合剤は、
e. SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むVH領域

f. SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列を含むVL領域
g. SEQ ID NO:36に示されるアミノ酸配列を含むCH領域および
h. SEQ ID NO:17に示されるアミノ酸配列を含むCL領域
を含む。

【０１８８】

別の態様において、結合剤は、SEQ ID NO:24に示されるアミノ酸配列を含む重鎖およびSEQ ID NO:25に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【０１８９】

別の態様において、結合剤は、SEQ ID NO:35に示されるアミノ酸配列を含む重鎖およびSEQ ID NO:25に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【０１９０】

さらに別の態様において、結合剤は、改変を除いて同一の結合剤と比べてより低い程度までFc媒介性エフェクター機能を結合剤が誘導するように改変された重鎖定常領域を含む。その例は、P329RおよびE345R置換を含む本発明のCD27結合性抗体である。そのような抗体は、P329R置換を含まないことを除いて同じ配列を含む抗体と比較して、そしてまたP329RおよびE345R置換を含まないことを除いて同じ配列を含む同じ抗体、例えば野生型IgG1重鎖と比較して、より低い程度まで1つまたは複数のFc媒介性エフェクター機能を誘導する。1つの態様において、Fc媒介性エフェクター機能は少なくとも20％減少している。別の態様において、Fc媒介性エフェクター機能は少なくとも30％減少している。別の態様において、Fc媒介性エフェクター機能は少なくとも40％減少している。別の態様において、Fc媒介性エフェクター機能は少なくとも50％減少している。別の態様において、Fc媒介性エフェクター機能は少なくとも60％減少している。別の態様において、Fc媒介性エフェクター機能は少なくとも70％減少している。別の態様において、Fc媒介性エフェクター機能は少なくとも80％減少している。別の態様において、Fc媒介性エフェクター機能は少なくとも90％減少している。別の態様において、結合剤は、1つまたは複数のFc媒介性エフェクター機能を誘導しない。減少しているかまたは全く誘導されない1つまたは複数のFcエフェクター機能は、以下の群:補体依存性細胞傷害（CDC）、補体依存性細胞媒介性細胞傷害（CDCC）、補体活性化、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）、抗体依存性細胞媒介性ファゴサイトーシス（ADCP）、C1q結合、およびFcγR結合より選択されてもよい。よって、1つの態様において、結合剤は、野生型IgG1 HC定常領域を除いて同一の結合剤と比べて少なくとも20％、例えば少なくとも30％、または少なくとも40％、または少なくとも50％、または少なくとも60％、または少なくとも70％、または少なくとも80％減少しているか、または少なくとも90％減少している程度までCDCを誘導する。別の態様において、結合剤はCDCを誘導しない。

【０１９１】

別の態様において、結合剤は、野生型IgG1 HC定常領域を有することを除いて同一の結合剤と比べて少なくとも20％、例えば少なくとも30％、または少なくとも40％、または少なくとも50％、または少なくとも60％、または少なくとも70％、または少なくとも80％減少しているか、または少なくとも90％減少している程度までCDCCを誘導する。別の態様において、結合剤はCDCCを誘導しない。

【０１９２】

別の態様において、結合剤は、野生型IgG1 HC定常領域を有することを除いて同一の結合剤と比べて少なくとも20％、例えば少なくとも30％、または少なくとも40％、または少なくとも50％、または少なくとも60％、または少なくとも70％、または少なくとも80％減少しているか、または少なくとも90％減少している程度までADCCを誘導する。別の態様において、結合剤はADCCを誘導しない。

【０１９３】

別の態様において、結合剤は、野生型IgG1 HC定常領域を有することを除いて同一の結合剤と比べて少なくとも20％、例えば少なくとも30％、または少なくとも40％、または少なくとも50％、または少なくとも60％、または少なくとも70％、または少なく

とも80％減少しているか、または少なくとも90％減少している程度までADCPを誘導する。別の態様において、結合剤はADCPを誘導しない。

【０１９４】

別の態様において、結合剤は、野生型IgG1 HC定常領域を有することを除いて同一の結合剤と比べて少なくとも20％、例えば少なくとも30％、または少なくとも40％、または少なくとも50％、または少なくとも60％、または少なくとも70％、または少なくとも80％減少しているか、または少なくとも90％減少している程度までC1q結合を誘導する。別の態様において、結合剤はC1q結合を誘導しない。好ましくはC1q結合は実施例8におけるように決定される。

【０１９５】

別の態様において、結合剤は、野生型IgG1 HC定常領域を有することを除いて同一の結合剤と比べて少なくとも20％、例えば少なくとも30％、または少なくとも40％、または少なくとも50％、または少なくとも60％、または少なくとも70％、または少なくとも80％減少しているか、または少なくとも90％減少している程度までFcγR結合を誘導する。別の態様において、結合剤はFcγR結合を誘導しない。好ましくはFcγR結合は実施例9におけるように決定される。

【０１９６】

1つの態様において、結合剤は、P329R置換を含まないことを除いて同じアミノ酸配列を含む結合剤と比較して低減されたC1q結合および低減されたFcγR結合を有する。

【０１９７】

1つの態様において、本明細書における任意の局面または態様において使用される結合剤は、記載される突然変異を除いて、ヒト抗体である。

【０１９８】

本発明の一態様において、結合剤は一価抗体である。

【０１９９】

別の態様において、結合剤は二価抗体である。

【０２００】

さらに、本発明の結合剤は単一特異性抗体であってもよい。

【０２０１】

1つの態様において、本明細書における任意の局面または態様において使用される結合剤は、モノクローナル抗体、例えばヒトモノクローナル抗体、例えばヒト二価モノクローナル抗体、例えばヒト二価全長モノクローナル抗体である。

【０２０２】

好ましい態様において、本明細書における任意の局面または態様において使用される結合剤は、Fc領域中の任意の記載される突然変異を除いて、IgG1抗体、例えば全長IgG1抗体、例えばヒト全長IgG1抗体、任意でヒトモノクローナル全長二価IgG1,κ抗体、例えばヒトモノクローナル全長二価IgG1m（f）,κ抗体である。

【０２０３】

本発明に関して使用される結合剤は、有利には、同じエピトープに結合する2つの抗原結合領域を含む、二価単一特異性様式である。しかしながら、抗原結合領域の1つが異なるエピトープに結合する二重特異性様式もまた想定される。そのため、本明細書における任意の局面または態様にしたがって使用される結合剤は、文脈に矛盾しなければ、単一特異性抗体または二重特異性抗体のいずれかであることができる。

【０２０４】

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

【０２０５】
本発明の一態様において、結合剤は、SEQ ID NO:1に示されている配列を有するヒトCD27に結合する能力を有する。しかしながら、ヒトCD27は、一部の個体において、そのバリアントとして発現され得る。そのため、別の態様において、結合剤は、ヒトCD27バリアント、例えばSEQ ID NO:2に示されているヒトCD27バリアントなどに結合する能力をさらに有する。別の態様において、結合剤は、SEQ ID NO:3に示されるものなどの、カニクイザルCD27に結合する能力をさらに有する。
【０２０６】
本発明のさらなる態様において、結合剤は、CD27発現ヒトT細胞に結合する能力を有する。
【０２０７】
本発明の別の態様において、結合剤は、CD27発現カニクイザルT細胞に結合する能力を有する。
【０２０８】
本発明の1つの態様において、全長IgG1抗体は、HCのC末端リジンが切断されている。そのような抗体は「全長抗体」とも考えられる。
【０２０９】
本発明の別の態様において、結合剤は、ヒトT細胞、例えばCD4$^+$およびCD8$^+$T細胞、例えばヘルパーT細胞および細胞傷害性T細胞の増殖を誘導する能力を有する。そのような活性は、本明細書における実施例6または7に記載されるようにアッセイされてもよい。
【０２１０】
本発明の別の態様において、結合剤は、本明細書の実施例2に記載されているものなどのヒトCD27発現JurkatレポーターT細胞の活性化を誘導する能力を有する。
【０２１１】
本発明の別の態様において、結合剤は、本明細書の実施例11に記載されているものなどのFcγ受容体IIb架橋の非存在下のヒトCD27発現JurkatレポーターT細胞の活性化を誘導する能力を有する。
【０２１２】
本発明の別の態様において、結合剤は、セントラルメモリーT細胞表現型を有するCD4＋およびCD8$^+$T細胞の増殖を誘導する能力を有する。
【０２１３】
本発明の別の態様において、結合剤は、IFNガンマの産生を誘導する能力を有する。
【０２１４】
本発明の別の態様において、結合剤は、アセテート、ソルビトール、ポリソルベート80を含む組成物または製剤中にあり、かつ5～6、好ましくは5.5のpHを有する。
【０２１５】
PD1/PD-L1阻害剤
1つの態様において、PD1/PD-L1阻害剤は、PD-1と関連付けられる阻害性シグナルを予防する。1つの態様において、PD1/PD-L1阻害剤は、PD-1と関連付けられる阻害性シグナル伝達を妨害または阻害する抗体、またはその断片である。1つの態様において、PD1/PD-L1阻害剤は、阻害性シグナル伝達を妨害または阻害する小分子阻害剤である。1つの態様において、PD1/PD-L1阻害剤は、阻害性シグナル伝達を妨害または阻害するペプチドベース阻害剤である。1つの態様において、PD1/PD-L1阻害剤は、阻害性シグナル伝達を妨害または阻害する阻害性核酸分子である。
【０２１６】
本明細書に記載されるような、PD-1シグナル伝達の阻害または遮断は、免疫抑制の予防または逆転およびがん細胞に対するT細胞免疫の確立または増強を結果としてもたらす。1つの態様において、本明細書に記載されるような、PD-1シグナル伝達の阻害は、免疫系の機能障害を低減または阻害する。1つの態様において、本明細書に記載されるよう

な、PD-1シグナル伝達の阻害は、機能不全免疫細胞の機能不全をより小さくする。1つの態様において、本明細書に記載されるような、PD-1シグナル伝達の阻害は、機能不全T細胞の機能不全をより小さくする。

【０２１７】

1つの態様において、PD-L1は、ヒトPD-L1、特にSEQ ID NO:98に示される配列を含むヒトPD-L1である。

【０２１８】

1つの態様において、PD1はヒトPD1である。好ましくは、PD1は、SEQ ID NO:58またはSEQ ID NO:59に示されているアミノ酸配列を有するかまたは含む、あるいはPD1のアミノ酸配列は、SEQ ID NO:58もしくはSEQ ID NO:59に示されているアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%、もしくは100%の同一性を有するか、またはその免疫原性断片である。

【０２１９】

1つの態様において、PD1/PD-L1阻害剤は、PD-1とPD-L1との間の相互作用を予防する。

【０２２０】

PD1/PD-L1阻害剤は、抗体、その抗原結合性断片、または要求される特異性の抗原結合性断片を有する抗体部分を含むその構築物であってもよい。抗体またはその抗原結合性断片は本明細書に記載される通りである。PD1/PD-L1阻害剤である抗体またはその抗原結合性断片は、特に、PD-1に結合する抗体またはその抗原結合性断片、およびPD-L1に結合する抗体またはその抗原結合性断片を含む。抗体または抗原結合性断片はまた、本明細書に記載されるように、さらなる部分にコンジュゲートされてもよい。特に、抗体またはその抗原結合性断片は、キメラ化、ヒト化またはヒト抗体である。

【０２２１】

1つの態様において、PD1/PD-L1阻害剤である抗体は、単離された抗体である。

【０２２２】

1つの態様において、PD1/PD-L1阻害剤は、PD-1とPD-L1との間の相互作用を予防する抗体、断片またはその構築物である。

【０２２３】

PD1/PD-L1阻害剤は、阻害性核酸分子、例えばオリゴヌクレオチド、siRNA、shRNA、アンチセンスDNAまたはRNA分子、およびアプタマー（例えば、DNAまたはRNAアプタマー）、特にアンチセンス-オリゴヌクレオチドであってもよい。1つの態様において、siRNAであるPD1/PD-L1阻害剤は、mRNAに干渉し、したがって翻訳、例えば、PD-1タンパク質の翻訳を遮断する。

【０２２４】

1つの態様において、PD1/PD-L1阻害剤は、PD-1受容体と、そのリガンド、PD-L1および/またはPD-L2の1つまたは複数との間の相互作用を妨害または阻害する抗体、その抗原結合性部分またはその構築物である。PD-1またはPD-L1に結合し、かつPD-1とそのリガンドの1つまたは複数との間の相互作用を妨害または阻害する抗体は、当技術分野において公知である。ある特定の態様において、抗体、その抗原結合性部分またはその構築物は、PD-1に特異的に結合する。ある特定の態様において、抗体、その抗原結合性部分またはその構築物は、PD-L1に特異的に結合する。

【０２２５】

ある特定の好ましい態様において、PD1/PD-L1阻害剤は、PD-1に結合する抗体、例えばPD-1遮断抗体である。ある特定の好ましい態様において、PD1/PD-L1阻害剤は、PD-L1に結合する抗体、例えばPD-L1遮断抗体である。

【０２２６】

例示的なPD1/PD-L1阻害剤は、抗PD-1抗体、例えばBGB-A317（BeiGene;US 8,735,553、WO 2015/35606およびUS 2015/0079109を参照）、ランブロリズマ

ブ（例えば、WO2008/156712においてhPD109Aならびにそのヒト化誘導体h409A1、h409A16およびh409A17として開示されている）、AB137132（Abcam）、EH12.2H7およびRMP1-14（＃BE0146;Bioxcell Lifesciences Pvt.LTD.）、MIH4（Affymetrix eBioscience）、ニボルマブ（OPDIVO、BMS-936558;Bristol Myers Squibb;米国特許第8,008,449号;WO 2013/173223;WO 2006/121168を参照）、ペムブロリズマブ（KEYTRUDA;MK-3475;Merck;WO 2008/156712を参照）、ピジリズマブ（CT-011;CureTech;Hardy et al.,1994,Cancer Res.,54（22）:5793-6およびWO 2009/101611を参照）、PDR001（Novartis;WO 2015/112900を参照）、MEDI0680（AMP-514;AstraZeneca;WO 2012/145493を参照）、TSR-042（WO 2014/179664を参照）、セミプリマブ（REGN-2810;Regeneron;H4H7798N;US 2015/0203579およびWO 2015/112800を参照）、JS001（TAIZHOU JUNSHI PHARMA;Si-Yang Liu et al.,2007,J.Hematol.Oncol.70:136を参照）、AMP-224（GSK-2661380;Li et al.,2016,Int J Mol Sci 17（7）:1151ならびにWO 2010/027827およびWO 2011/066342を参照）、PF-06801591（Pfizer）、チスレリズマブ（BGB-A317;BeiGene;WO 2015/35606、米国特許第9,834,606号、およびUS 2015/0079109を参照）、BI 754091、SHR-1210（WO2015/085847を参照）、ならびにWO 2006/121168に記載されている抗体17D8、2D3、4H1、4A11、7D3、および5F4、INCSHR1210（Jiangsu Hengrui Medicine;SHR-1210としても公知である;WO 2015/085847を参照）、TSR-042（Tesaro Biopharmaceutical;ANB011としても公知である;WO2014/179664を参照）、GLS-010（Wuxi/Harbin Gloria Pharmaceuticals;WBP3055としても公知である;Si-Yang et al.,2017,J.Hematol.Oncol.70:136を参照）、STI-1110（Sorrento Therapeutics;WO 2014/194302を参照）、AGEN2034（Agenus;WO 2017/040790を参照）、MGA012（Macrogenics;WO 2017/19846を参照）、IBI308（Innovent;WO 2017/024465、WO 2017/025016、WO 2017/132825、およびWO 2017/133540を参照）、セトレリマブ（JNJ-63723283;JNJ-3283;Calvo et al.,J.Clin.Oncol.36,no.5_suppl（2018）58を参照）、ゲノリムズマブ（CBT-501;Patel et al.,J.ImmunoTher.Cancer,2017,5（Suppl 2）:P242を参照）、ササンリマブ（PF-06801591;Youssef et al.,Proc.Am.Assoc.Cancer Res.Ann.Meeting 2017;Cancer Res 2017;77（13 Suppl）:Abstractを参照）、トリパリマブ（JS-001;US 2016/0272708を参照）、カムレリズマブ（SHR-1210;INCSHR-1210;US 2016/376367;Huang et al.,Clin.Cancer Res.2018;24（6）:1296-1304を参照）、スパルタリズマブ（PDR001;WO 2017/106656;Naing et al.,J.Clin.Oncol.34,no.15_suppl（2016）3060-3060を参照）、BCD-100（JSC BIOCAD、Russia;WO 2018/103017を参照）、バルスチリマブ（AGEN2034;WO 2017/040790を参照）、シンチリマブ（IBI-308;WO 2017/024465およびWO 2017/133540を参照）、エザベンリマブ（BI-754091;US 2017/334995;Johnson et al.,J.Clin.Oncol.36,no.5_suppl（2018）212-212を参照）、ジンベレリマブ（GLS-010;WO 2017/025051を参照）、LZM-009（US 2017/210806を参照）、AK-103（WO 2017/071625、WO 2017/166804、およびWO 2018/036472を参照）、レチファンリマブ（MGA-012;WO 2017/019846を参照）、Sym-021（WO 2017/055547を参照）、CS1003（CN107840887を参照）、例えば、US 7,488,802、US 8,008,449、US 8,168,757、WO 03/042402、WO 2010/089411（抗PD-L1抗体をさらに開示している）、WO 2010/036959、WO 2011/159877（TIM-3に対する抗体をさらに開示している）、WO 2011/082400、WO 2011/161699、WO 2009/014708、WO 03/099196、WO 2009/114335、WO 2012/145493（PD-L1に対する抗体をさらに開示している）、WO 2015/035606、WO 2014/055648（抗KIR抗体をさらに開示している）、US 2018/0185482（抗PD-L1および抗TIGIT抗体をさらに開示している）、US 8,008,449、US 8,779,105、US 6,808,710、US 8,168,757、US 2016/0272708、およびUS 8

,354,509に記載されている、抗PD-1抗体、例えば、Shaabani et al.,2018,Expert Op Ther Pat.,28（9）:665-678およびSasikumar and Ramachandra,2018,BioDrugs,32（5）:481-497に開示されている、PD-1シグナル伝達経路に対する小分子アンタゴニスト、例えば、WO 2019/000146およびWO 2018/103501に開示されている、PD-1に方向付けられたsiRNA、WO 2018/222711に開示されている可溶性PD-1タンパク質、ならびに、例えば、WO 2018/022831に記載されている、可溶性形態のPD-1を含む腫瘍溶解性ウイルスを含むが、これらに限定されない。

【０２２７】

ある特定の態様において、PD1/PD-L1阻害剤は、ニボルマブ（OPDIVO;BMS-936558）もしくはそのバイオシミラー、ペムブロリズマブ（KEYTRUDA;MK-3475）もしくはそのバイオシミラー、ピジリズマブ（CT-011）、PDR001、MEDI0680（AMP-514）もしくはそのバイオシミラー、TSR-042、REGN2810、JS001、AMP-224（GSK-2661380）、PF-06801591、BGB-A317、BI 754091、またはSHR-1210である。

【０２２８】

ある特定の態様において、PD1/PD-L1阻害剤は、本明細書に記載される抗PD1もしくは抗PD-L1抗体または抗原結合性断片のうちの1つの相補性決定領域（CDR）、例えばニボルマブ、Amp-514、チスレリズマブ、セミプリマブ、TSR-042、JNJ-63723283、CBT-501、PF-06801591、JS-001、カムレリズマブ、PDR001、BCD-100、AGEN2034、IBI-308、BI-754091、GLS-010、LZM-009、AK-103、MGA-012、Sym-021およびCS1003からなる群より選択される1つの抗PD1もしくは抗PD-L1抗体または抗原結合性断片のCDRを含む、抗PD1もしくは抗PD-L1抗体またはその抗原結合性断片である。

【０２２９】

ある特定の態様において、PD1/PD-L1阻害剤は、上記される抗PD1もしくは抗PD-L1抗体または抗原結合性断片のうちの1つの重鎖可変領域および軽鎖可変領域、例えばニボルマブ、Amp-514、チスレリズマブ、セミプリマブ、TSR-042、JNJ-63723283、CBT-501、PF-06801591、JS-001、カムレリズマブ、PDR001、BCD-100、AGEN2034、IBI-308、BI-754091、GLS-010、LZM-009、AK-103、MGA-012、Sym-021およびCS1003からなる群より選択される1つの抗PD1もしくは抗PD-L1抗体または抗原結合性断片の重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む、抗PD1もしくは抗PD-L1抗体またはその抗原結合性断片である。

【０２３０】

ある特定の態様において、PD1/PD-L1阻害剤は、ニボルマブ、Amp-514、チスレリズマブ、セミプリマブ、TSR-042、JNJ-63723283、CBT-501、PF-06801591、JS-001、カムレリズマブ、PDR001、BCD-100、AGEN2034、IBI-308、BI-754091、GLS-010、LZM-009、AK-103、MGA-012、Sym-021およびCS1003からなる群より選択される抗PD-1もしくは抗PD-L1抗体またはその抗原結合性断片である。

【０２３１】

ある特定の態様において、PD1/PD-L1阻害剤は、PD1またはPD-L1に結合する抗体である。一部の好ましい態様において、PD1/PD-L1阻害剤は、PD1/PD-L1相互作用のアンタゴニストである抗体である。一部の好ましい態様において、PD1/PD-L1阻害剤は、PD1遮断抗体またはPD-L1遮断抗体である。

【０２３２】

ある特定の態様において、PD1/PD-L1阻害剤は、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4からなる群より選択されるアイソタイプの抗体、例えばIgG1アイソタイプの抗体である。1つの態様において、PD1/PD-L1阻害剤はIgG1アイソタイプの抗体である。1つの態様において、PD1/PD-L1阻害剤はIgG2アイソタイプの抗体である。1つの態様において、PD1/PD-L1阻害剤はIgG3アイソタイプの抗体である。1つの態様において、PD1/PD-L1阻害剤はIgG4アイソタイプの抗体である。

【０２３３】
ある特定の態様において、ＰＤ１/ＰＤ-Ｌ１阻害剤は、全長抗体または抗体断片、例えば全長IgG1抗体である。
【０２３４】
ある特定の態様において、ＰＤ１/ＰＤ-Ｌ１阻害剤は単一特異性抗体である。
【０２３５】
１つの態様において、ＰＤ１/ＰＤ-Ｌ１阻害剤は、それぞれSEQ ID NO:９９、１００および１０１に示されるＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）、ならびにそれぞれSEQ ID NO:１０２、LASおよびSEQ ID NO:１０３に示されるＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、ＰＤ１に結合する抗体である。
【０２３６】
１つの態様において、ＰＤ１/ＰＤ-Ｌ１阻害剤は、SEQ ID NO:１０４のアミノ酸配列を含むＶＨ領域およびSEQ ID NO:１０５のアミノ酸配列を含むＶＬ領域を含む、ＰＤ１に結合する抗体である。
【０２３７】
１つの態様において、ＰＤ１/ＰＤ-Ｌ１阻害剤は、SEQ ID NO:１０６のアミノ酸配列を含む重鎖およびSEQ ID NO:１０７のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、ＰＤ１に結合する抗体である。
【０２３８】
好ましい態様において、ＰＤ１/ＰＤ-Ｌ１阻害剤はペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーである。
【０２３９】
好ましい態様において、ＰＤ１/ＰＤ-Ｌ１阻害剤はニボルマブまたはそのバイオシミラーである。
【０２４０】
好ましい態様において、ＰＤ１/ＰＤ-Ｌ１阻害剤はアテゾリズマブまたはそのバイオシミラーである。
【０２４１】
一部の態様において、ＰＤ１/ＰＤ-Ｌ１阻害剤は、ＰＤ１阻害剤、例えばＰＤ１遮断抗体である。一部の態様において、ＰＤ１/ＰＤ-Ｌ１阻害剤は、ＰＤ-Ｌ１阻害剤、例えばＰＤ-Ｌ１遮断抗体である。
【０２４２】
ある特定の態様において、ＰＤ１/ＰＤ-Ｌ１阻害剤は、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、セミプリマブ、ドスタルリマブ、JTX-4014、スパルタリズマブ、カムレリズマブ、シンチリマブ、チスレリズマブ、トリパリマブ、INCMGA00012（ＭＧＡ０１２）、AMP-224、AMP-514、またはそのそれぞれのバイオシミラーより選択されるＰＤ１阻害剤である。
【０２４３】
ある特定の態様において、ＰＤ１阻害剤は、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、セミプリマブ、ドスタルリマブ、JTX-4014、スパルタリズマブ、カムレリズマブ、シンチリマブ、チスレリズマブ、トリパリマブ、INCMGA00012（ＭＧＡ０１２）、AMP-514、またはそのそれぞれのバイオシミラーより選択される。
【０２４４】
ある特定の態様において、ＰＤ１/ＰＤ-Ｌ１阻害剤は、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、KN035、CK-301、アカスンリマブ、AUNP12、CA-170、BMS-986189、またはそのそれぞれのバイオシミラーより選択されるＰＤ-Ｌ１阻害剤である。
【０２４５】
ある特定の態様において、ＰＤ-Ｌ１阻害剤は、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、KN035、CK-301、アカスンリマブ、またはそのそれぞれのバイオシミラーより選択される。

【０２４６】
さらなる好ましい態様において、PD1/PD-L1阻害剤は、PD-1に結合する抗体である。PD-1に結合する抗体は、HCDR1、HCDR2、およびHCDR3配列を含む重鎖可変領域（VH）ならびにLCDR1、LCDR2、およびLCDR3配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含んでもよく、HCDR1、HCDR2およびHCDR3配列は、それぞれSEQ ID NO:49、SEQ ID NO:46、およびSEQ ID NO:45に示されている配列を含むかまたは有し、かつLCDR1、LCDR2およびLCDR3配列は、それぞれSEQ ID NO:52、QAS、およびSEQ ID NO:50に示されている配列を含むかまたは有する。そのような抗体の特定の、非限定な例は、MAB-19-0202である。

【０２４７】
用語「重鎖可変領域」（「VH」としても称される）および「軽鎖可変領域」（「VL」としても称される）は、それらの最も一般的な意味において本明細書において使用され、フレームワーク領域（FR）とも称される他の領域を差し挟まれた、相補性決定領域（CDR）を含むことができる任意の配列を含む。フレームワーク領域は、とりわけ、特にVHおよびVLのフォールディングおよび対合後に、抗原結合性部位を形成できるようにCDRを配置させる。好ましくは、各々のVHおよびVLは、アミノ末端からカルボキシ末端へと以下の順序:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4において並べられた、3つのCDRおよび4つのFRから構成される。すなわち、用語「重鎖可変領域」および「軽鎖可変領域」は、ネイティブな抗体中または本明細書において例示されているVHおよびVL配列（配列表のSEQ ID NOs:54～57）中に見出され得るような配列に限定されると解釈されるべきではない。これらの用語は、CDRを含みかつ適切に配置させる能力を有する任意の配列、例えばネイティブな抗体のVLおよびVH領域に由来しているか、または配列表のSEQ ID NOs:54～57に示されている配列に由来しているような配列を含む。特に、フレームワーク領域の配列は、それぞれVHおよびVLの特徴を喪失することなく改変され得る（アミノ酸置換に関するバリアントおよび配列長さに関するバリアント、すなわち、挿入または欠失バリアントの両方を含む）ことが当業者により理解される。好ましい態様において、任意の改変はフレームワーク領域に限定される。しかし、CDR、超可変および可変領域もまた、PD-1に結合する能力を喪失することなく改変され得るという事実もまた当業者はよく認識している。例えば、CDR領域は、本明細書において特定される領域と同一であるか、または高度に相同的である。「高度に相同的」により、1～5個、好ましくは1～4個、例えば1～3個または1もしくは2個の置換がCDR中で為されてもよいことが想定される。追加的に、超可変および可変領域は、本明細書に特に開示される領域と実質的な相同性を示すように改変されてもよい。

【０２４８】
PD-1に結合する抗体において、本明細書において特定されているCDRは、2つの異なるCDR同定方法を使用することにより同定されている。本明細書において使用される第1の番号付けスキームはKabat（Wu and Kabat,1970;Kabat et al.,1991）に従い、第2のスキームはIMGT番号付け（Lefranc,1997;Lefranc et al.,2005）である。第3のアプローチにおいて、両方の同定スキームの交差部分（intersection）が使用されている。

【０２４９】
PD-1に結合する抗体は、1つまたは複数のCDRを含んでもよく、本明細書に記載されているCDRのセットまたはCDRのセットの組合せは、前記CDRを、それらの介在性フレームワーク領域（本明細書においてフレーミング領域もしくはFRとしても称される）または前記フレームワーク領域の部分と共に含む。好ましくは、部分は、第1および第4のフレームワーク領域のいずれかまたは両方の少なくとも約50％を含み、50％は、第1のフレームワーク領域のC末端50％および第4のフレームワーク領域のN末端50％である。組換えDNA技術により為される抗体の構築は、免疫グロブリン重鎖、他の可変ドメイン（例えばダイアボディの製造におけるもの）またはタンパク質標識を含むさらなるタンパク質配列に本開示の可変領域を接合するためのリンカーの導入を含む、クローニングまた

は他のマニピュレーション工程を促すために導入されるリンカーによるコードされる可変領域のNまたはC末端への残基の導入を結果としてもたらしてもよい。

【０２５０】

PD-1に結合する抗体は、SEQ ID NO:56のいずれか1つに示されている重鎖可変領域（VH）配列のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%、または100%の同一性を有する配列を含むVHを含んでもよい。1つの態様において、抗体は重鎖可変領域（VH）を含み、VHは、SEQ ID NO:56のいずれか1つに示されている配列を含む。1つの態様において、抗体は、SEQ ID NO:57のいずれか1つに示されている軽鎖可変領域（VL）配列のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%、または100%の同一性を有する配列を含むVLを含む。1つの態様において、抗体は軽鎖可変領域（VL）を含み、VLは、SEQ ID NO:57のいずれか1つに示されている配列を含む。

【０２５１】

PD-1に結合する抗体は重鎖可変領域（VH）および軽鎖可変領域（VL）を含んでもよく、VHは、SEQ ID NO:56に示されている配列を含むか、もしくは有し、かつVLは、SEQ ID NO:57に示されている配列を含むか、もしくは有し、またはこれらの配列のそれぞれのバリアントを含むか、もしくは有する。PD-1に結合する抗体の別の例は、SEQ ID NO:56に示されている配列、またはそのバリアントを含むかまたは有するVH、およびSEQ ID NO:57に示されている配列、またはそのバリアントを含むかまたは有するVLを含んでもよい。そのような抗体の特定の、非限定な例は、MAB-19-0618である。抗体MAB-19-0618は、MAB-19-0202から誘導されている。前記重鎖可変領域（VH）および前記軽鎖可変領域（VL）のバリアントならびにこれらのバリアントVHおよびVLのそれぞれの組合せもまた本開示により包含される。

【０２５２】

PD-1に結合する抗体は重鎖および軽鎖を含んでもよく、重鎖は、SEQ ID NO:38または128に示されている配列を含むかまたは有する重鎖定常領域、およびSEQ ID NO:56に示されている配列を含むかまたは有する重鎖可変領域（VH）を含み、かつ軽鎖は、SEQ ID NO:42に示されている配列を含むかまたは有する軽鎖定常領域、およびSEQ ID NO:57に示されている配列を含むかまたは有する軽鎖可変領域（VL）を含む。

【０２５３】

PD-1に結合する抗体は重鎖および軽鎖を含んでもよく、重鎖は、SEQ ID NO:38または128に示されている配列を含むかまたは有する重鎖定常領域、ならびにSEQ ID NO:56に示されている配列のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含む重鎖可変領域（VH）を含み、かつ軽鎖は、SEQ ID NO:42に示されている配列を含むかまたは有する軽鎖定常領域、およびSEQ ID NO:57に示されている配列のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含む軽鎖可変領域を含む。例えば、CDR1、CDR2およびCDR3配列は、本明細書において特定される通りである。

【０２５４】

PD-1に結合する抗体は、モノクローナル、キメラもしくはモノクローナルヒト化抗体またはそのような抗体の断片であってもよい。抗体は、例えば、二重特異性抗体を含む、全体抗体またはその抗原結合性断片であることができる。

【０２５５】

PD-1に結合する抗体において、1つまたは複数の、好ましくは両方の重鎖定常領域は、前記抗体へのC1qの結合が野生型抗体と比較して低減される、好ましくは少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、または100%低減されるように改変されていてもよい。1つの態様において、C1q結合はELISAにより決定され得る。

【０２５６】

「野生型」または「WT」または「ネイティブ」により、アレルバリエーションを含む、天然において見出されるアミノ酸配列が意味される。野生型アミノ酸配列、ペプチドまたはタンパク質は、意図的に改変されていないアミノ酸配列を有する。

【０２５７】

PD-1に結合する抗体において、1つまたは複数の、好ましくは両方の重鎖定常領域は、抗体へのIgG Fcガンマ受容体の1つまたは複数の結合が、野生型抗体と比較して、好ましくは少なくとも70％、少なくとも80％、少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも97％、または100％、低減されるように改変されていてもよい。1つの態様において、1つまたは複数のIgG Fcガンマ受容体は、FcガンマRI、FcガンマRII、およびFcガンマRIIIの少なくとも1つより選択される。1つの態様において、IgG FcガンマRIはFcガンマRIである。

【０２５８】

1つの態様において、PD-1に結合する抗体は、FcガンマRI媒介性エフェクター機能を誘導する能力を有しないか、または誘導されるFcガンマRI媒介性エフェクター機能は、野生型抗体と比較して、好ましくは少なくとも70％、少なくとも80％、少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも97％もしくは100％、低減される。

【０２５９】

1つの態様において、PD-1に結合する抗体は、補体依存性細胞傷害（CDC）媒介性溶解、抗体依存性細胞傷害（ADCC）媒介性溶解、アポトーシス、ホモタイプ接着および/もしくはファゴサイトーシスの少なくとも1つを誘導する能力を有さないか、または補体依存性細胞傷害（CDC）媒介性溶解、抗体依存性細胞傷害（ADCC）媒介性溶解、アポトーシス、ホモタイプ接着および/もしくはファゴサイトーシスの少なくとも1つは、低減された程度において誘導され、好ましくは少なくとも70％、少なくとも80％、少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも97％もしくは100％低減される。

【０２６０】

抗体依存性細胞媒介性細胞傷害は、本明細書において「ADCC」としても称される。ADCCは、標的細胞が抗体によりマーキングされていることを好ましくは要求する、本明細書に記載されているエフェクター細胞、特にリンパ球の細胞殺滅能力を説明する。

【０２６１】

ADCCは、抗体が腫瘍細胞上の抗原に結合し、かつ抗体Fcドメインが免疫エフェクター細胞の表面上のFc受容体（FcR）にエンゲージメントする場合に好ましくは起こる。Fc受容体のいくつかのファミリーが同定されており、特定の細胞集団は、定義されるFc受容体を特徴的に発現する。ADCCは、抗原提示および腫瘍に方向付けられたT細胞応答の誘導に繋がる可変の程度の即時の腫瘍破壊を直接的に誘導するための機序として見ることができる。好ましくは、ADCCのインビボ誘導は、腫瘍に方向付けられたT細胞応答および宿主由来抗体応答に繋がる。

【０２６２】

補体依存性細胞傷害は、本明細書において「CDC」としても称される。CDCは、抗体により方向付けられ得る別の細胞殺滅方法である。IgMは、補体活性化のための最も有効なアイソタイプである。IgG1およびIgG3もまた、古典的な補体活性化経路を介するCDCの方向付けにおいて両方とも非常に有効である。好ましくは、このカスケードにおいて、抗原-抗体複合体の形成は、参加する抗体分子、例えばIgG分子のC_H2ドメイン上の近接した複数のC1q結合性部位の露出を結果としてもたらす（C1qは補体C1の3つのサブコンポーネントのうちの1つである）。好ましくは、これらの露出されたC1q結合性部位は、以前に低い親和性であったC1q-IgG相互作用を高いアビディティのものに変換し、これは、他の補体タンパク質のシリーズを伴う事象のカスケードをトリガーし、かつエフェクター細胞走化/活性化因子C3aおよびC5aのタンパク質分解放出に繋がる。好ましくは、補体カスケードは膜攻撃複合体の形成で終わり、これは、細胞の内外への水および溶質の自由な通過を促す細胞膜中の細孔を作製し、かつアポトーシスに繋がり得る。

【０２６３】

1つの態様において、PD-1に結合する抗体は、低減または枯渇されたエフェクター機能を有する。1つの態様において、抗体は、ADCCもしくはCDCまたは両方を媒介しない。

【０２６４】

1つの態様において、PD-1に結合する抗体の1つまたは複数の、好ましくは両方の重鎖定常領域は、抗体への新生児Fc受容体（FcRn）の結合が野生型抗体と比較して影響されないように改変されている。

【０２６５】

1つの態様において、抗体が結合することができるPD-1はヒトPD-1である。1つの態様において、PD-1は、SEQ ID NO:58またはSEQ ID NO:59に示されているアミノ酸配列を有するかまたは含む、あるいはPD-1のアミノ酸配列は、SEQ ID NO:58もしくはSEQ ID NO:59に示されているアミノ酸配列に対して少なくとも70％、少なくとも75％、少なくとも80％、少なくとも85％、少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも97％、少なくとも99％、もしくは100％の同一性を有するか、またはその免疫原性断片である。1つの態様において、抗体は、生細胞の表面上に存在するPD-1のネイティブなエピトープに結合する能力を有する。

【０２６６】

1つの態様において、PD-1に結合する抗体は重鎖定常領域を含み、重鎖定常領域は、EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の234位に対応する位置における芳香族または非極性アミノ酸およびEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の236位に対応する位置におけるグリシン以外のアミノ酸を含む。

【０２６７】

用語「～位に対応するアミノ酸」および類似した表現は、本明細書において使用される場合、ヒトIgG1重鎖中のアミノ酸位置番号を指す。他の免疫グロブリン中の対応するアミノ酸位置は、ヒトIgG1とのアライメントにより見出されてもよい。そのため、別の配列中のアミノ酸またはセグメント「に対応する」1つの配列中のアミノ酸またはセグメントは、標準的な配列アライメントプログラム、例えばALIGN、ClustalWまたは類似したものを典型的にはデフォルトの設定で使用して他のアミノ酸またはセグメントとアライメントし、かつヒトIgG1重鎖に対して少なくとも50％、少なくとも80％、少なくとも90％、または少なくとも95％の同一性を有するアミノ酸またはセグメントである。配列または配列中のセグメントをアライメントし、かつそれにより本開示に係るアミノ酸位置に対応する配列中の位置を決定する方法は当技術分野において周知であると考えられる。

【０２６８】

例えば、本開示の配列表のSEQ ID NO.38に係るアミノ酸配列に関して、EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の234～236位に対応するアミノ酸位置は、SEQ ID NO.38のアミノ酸位置117～119であり、Fは117位（EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の234位に対応する）に位置し、Eは118位（EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の235位に対応する）に位置し、Rは119位（EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の236位に対応する）に位置する。下記に示されている配列において、FERアミノ酸配列に下線を引いており、かつ太字で示している。

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS 60

GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FER**G 120

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN 180

STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE 240

MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW 300

QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG 329

【０２６９】

本明細書において他に指し示されるか、または他に文脈に明確に矛盾する場合を除いて、本開示の全体を通じて抗体重鎖定常領域中のアミノ酸位置へのすべての参照は、Kabatに示されているEU番号付け（Kabat,E.A.et al.,Sequences of proteins of immunological interest.5th Edition-US Department of Health and Human Services,NIH publication No.91-3242,pp 662,680,689（1991）に記載されている）にしたがってヒトIgG1重鎖中のそれぞれの位置に対応する位置を指す。

【０２７０】

1つの態様において、PD-1に結合する抗体は、低減もしくは枯渇されたFc媒介性エフェクター機能を有するか、または同じ抗原結合領域ならびにヒトIgG1ヒンジ、CH2およびCH3領域を含む重鎖定常領域（CH）を含む別の抗体と比較してより低い程度までFc媒介性エフェクター機能を誘導する、重鎖定常領域を含む。

【０２７１】

1つの特有の態様において、PD-1に結合する抗体中の前記重鎖定常領域（CH）は、抗体が、改変されていない重鎖定常領域（CH）を含むことを除いて同一である抗体と比較してより低い程度までFc媒介性エフェクター機能を誘導するように改変される。

【０２７２】

用語「Fc媒介性エフェクター機能」は、本明細書において使用される場合、特に、IgG Fc受容体（FcガンマR、FcγR）結合、C1q結合、ADCC、CDCおよびその任意の組合せのリストより選択されるような機能を指す。

【０２７３】

本開示の文脈において、多特異性抗体を含む、抗体に関して使用される用語「低減または枯渇されたFc媒介性エフェクター機能を有する」は、抗体が、（i）前記抗体と同じCDR配列、特に同じ第1および第2の抗原結合領域、ならびに（ii）ヒトIgG1ヒンジ、CH2およびCH3領域を含む2つの重鎖を含むヒトIgG1抗体と比較したレベルにおいて、好ましくは5％またはより高い％、10％またはより高い％、20％またはより高い％、より好ましくは50％またはより高い％、最も好ましくは75％またはより高い％の、Fc媒介性エフェクター機能の全体的な減少を引き起こすことを意味し、そのような機能は、特に、IgG Fc受容体（FcガンマR、FcγR）結合、C1q結合、ADCCまたはCDCのリストより選択される。「枯渇されたFc媒介性エフェクター機能」または類似した語句は、完全なまたは本質的に完全な阻害、すなわち、0へのまたは本質的に0への低減を含む。

【０２７４】

本開示の文脈において、多特異性抗体を含む、抗体に関して使用される用語「より低い程度までFc媒介性エフェクター機能を誘導する」は、抗体が、（i）前記抗体と同じCDR配列、特に同じ第1および第2の抗原結合領域、ならびに（ii）ヒトIgG1ヒンジ、CH2およびCH3領域を含む2つの重鎖を含むヒトIgG1抗体と比較してより低い程度まで、Fc媒

介性エフェクター機能を誘導することを意味し、そのような機能は、特に、IgG Fc受容体（FcガンマR、FcγR）結合、C1q結合、ADCCまたはCDCのリストより選択される。

【０２７５】

Fc媒介性エフェクター機能は、Fcγ受容体への結合剤の結合、C1qへの結合、またはFcγ受容体のFc媒介性架橋の誘導を測定することにより決定されてもよい。特に、Fc媒介性エフェクター機能は、C1qおよび/またはIgG FCガンマRIへの結合剤の結合を測定することにより決定されてもよい。

【０２７６】

PD-1に結合する抗体の使用に関する1つの態様において、EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の236位に対応する位置におけるアミノ酸は塩基性アミノ酸である。

【０２７７】

用語「アミノ酸」および「アミノ酸残基」は、本明細書において交換可能に使用されることがあり、限定的であると理解されるべきではない。アミノ酸は、各々のアミノ酸に特有の側鎖（R基）と共に、アミン（-NH_2）およびカルボキシル（-COOH）官能基を含有する有機化合物である。本開示の文脈において、アミノ酸は、構造および化学的特徴に基づいて分類され得る。

【０２７８】

本開示において、アミノ酸残基は、以下の略語を使用することにより表現される。また、明示的に他に指し示されなければ、ペプチドおよびタンパク質のアミノ酸配列は、N末端からC末端へ（左末端から右末端へ）と同定され、N末端は第1の残基として同定される。アミノ酸は、以下のように、それらの3文字略語、1文字略語、または完全名により指定される。Ala:A:アラニン;Asp:D:アスパラギン酸;Glu:E:グルタミン酸;Phe:F:フェニルアラニン;Gly:G:グリシン;His:H:ヒスチジン;Ile:I:イソロイシン;Lys:K:リジン;Leu:L:ロイシン;Met:M:メチオニン;Asn:N:アスパラギン;Pro:P:プロリン;Gln:Q:グルタミン;Arg:R:アルギニン;Ser:S:セリン;Thr:T:スレオニン;Val:V:バリン;Trp:W:トリプトファン;Tyr:Y:チロシン;Cys:C:システイン。

【０２７９】

天然に存在するアミノ酸はまた、一般に4つのファミリーに分けられることがある:酸性（アスパラギン酸、グルタミン酸）、塩基性（リジン、アルギニン、ヒスチジン）、非極性（アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、および非荷電性極性（グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシン）アミノ酸。フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンは、芳香族アミノ酸として一緒に分類されることがある。

【０２８０】

PD-1に結合する抗体の使用に関する1つの態様において、EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の236位に対応する位置における塩基性アミノ酸は、リジン、アルギニンおよびヒスチジンからなる群より選択される。1つの態様において、EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の236位に対応する位置における塩基性アミノ酸はアルギニン（G236R）である。そのようなアミノ酸置換はまた、本明細書においてG236Rと称される。用語「G236R」は、EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の236位においてアミノ酸グリシン（G）がアルギニン（R）により置換されていることを指し示す。本開示において、類似した用語が他のアミノ酸位置およびアミノ酸のために使用される。そうでないことが指し示されなければ、これらの用語における参照されるアミノ酸位置は、EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のアミノ酸位置である。

【０２８１】

PD-1に結合する抗体の使用に関する1つの態様において、EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の234位に対応する位置におけるアミノ酸は芳香族アミノ酸である。1つの態様において、この位置における芳香族アミノ酸は、フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンからなる群より選択される。

【０２８２】

1つの態様において、PD-1に結合する抗体の使用に関して、EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の234位に対応する位置におけるアミノ酸は非極性アミノ酸である。1つの態様において、この位置における非極性アミノ酸は、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニンおよびトリプトファンからなる群より選択される。1つの態様において、この位置における非極性アミノ酸は、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニンおよびトリプトファンからなる群より選択される。

【０２８３】

PD-1に結合する抗体の使用に関する1つの態様において、EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の234位に対応する位置におけるアミノ酸はフェニルアラニン（L234F）である。

【０２８４】

EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の234および236位に対応する位置における可能なアミノ酸の例示的な組合せを下記に示す。

【０２８５】

（表２２）

アミノ酸位置 234	アミノ酸位置 236
フェニルアラニン (F)	アルギニン (R)
トリプトファン (W)	アルギニン (R)
チロシン (Y)	アルギニン (R)
アラニン (A)	アルギニン (R)
バリン (V)	アルギニン (R)
ロイシン (L)	アルギニン (R)
イソロイシン (I)	アルギニン (R)
プロリン (P)	アルギニン (R)
メチオニン (M)	アルギニン (R)
フェニルアラニン (F)	リジン (K)
トリプトファン (W)	リジン (K)
チロシン (Y)	リジン (K)
アラニン (A)	リジン (K)
バリン (V)	リジン (K)
ロイシン (L)	リジン (K)
イソロイシン (I)	リジン (K)
プロリン (P)	リジン (K)
メチオニン (M)	リジン (K)
フェニルアラニン (F)	ヒスチジン (H)
トリプトファン (W)	ヒスチジン (H)
チロシン (Y)	ヒスチジン (H)
アラニン (A)	ヒスチジン (H)
バリン (V)	ヒスチジン (H)
ロイシン (L)	ヒスチジン (H)
イソロイシン (I)	ヒスチジン (H)
プロリン (P)	ヒスチジン (H)
メチオニン (M)	ヒスチジン (H)

【０２８６】

例えば、ＥＵ番号付けに従うヒトＩｇＧ１重鎖中の２３４および２３６位に対応する位置において、特に以下のアミノ酸が、ＰＤ-１に結合する抗体の重鎖定常領域中に存在してもよい：２３４Ｆ/２３６Ｒ、２３４Ｗ/２３６Ｒ、２３４Ｙ/２３６Ｒ、２３４Ａ/２３６Ｒ、２３４Ｌ/２３６Ｒ、２３４Ｆ/２３６Ｋ、２３４Ｗ/２３６Ｋ、２３４Ｙ/２３６Ｋ、２３４Ａ/２３６Ｋ、２３４Ｌ/２３６Ｋ、２３４Ｆ/２３６Ｈ、２３４Ｗ/２３６Ｈ、２３４Ｙ/２３６Ｈ、２３４Ａ/２３６Ｈ、または２３４Ｌ/２３６Ｈ。

【０２８７】

２３４および２３６位における上述のアミノ酸またはアミノ酸置換は、ＰＤ-１に結合する抗体の１つの重鎖中にのみまたはＰＤ-１に結合する抗体の両方の重鎖中に存在してもよい。

抗体の第1および第2の重鎖中に存在するそれぞれのアミノ酸は、互いから独立して選択されてもよい。

【０２８８】

例えば、PD-1に結合する抗体の少なくとも1つの重鎖は以下の配列（SEQ ID NO:38）を含むことができる:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS 60

GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FLR**G 120

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN 180

STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE 240

MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW 300

QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG 329

【０２８９】

前記重鎖においてEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の234および236位に対応する位置におけるアミノ酸が上記に特定される通りであるPD-1に結合する抗体に関する1つの態様において、さらにはEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の235位に対応する位置におけるアミノ酸は酸性アミノ酸である。1つの態様において、この位置における酸性アミノ酸は、アスパラギン酸またはグルタミン酸より選択される。1つの態様において、EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の235位に対応する位置におけるアミノ酸はグルタミン酸（L235E）である。

【０２９０】

PD-1に結合する抗体に関する1つの態様において、重鎖定常領域において、EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の234、235および236位に対応する位置におけるアミノ酸は、234位において非極性または芳香族アミノ酸、235位において酸性アミノ酸、および236位において塩基性アミノ酸である。

【０２９１】

EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の234、235および236位に対応する位置における可能なアミノ酸の例示的な組合せを下記に示す。

【０２９２】

（表２３）

アミノ酸位置 234	アミノ酸位置 235	アミノ酸位置 236
フェニルアラニン (F)	アスパラギン酸（D）または グルタミン酸（E）	アルギニン (R)
トリプトファン (W)	アスパラギン酸（D）または グルタミン酸（E）	アルギニン (R)
チロシン (Y)	アスパラギン酸（D）または グルタミン酸（E）	アルギニン (R)
アラニン (A)	アスパラギン酸（D）または グルタミン酸（E）	アルギニン (R)
バリン (V)	アスパラギン酸（D）または グルタミン酸（E）	アルギニン (R)
ロイシン (L)	アスパラギン酸（D）または グルタミン酸（E）	アルギニン (R)
イソロイシン (I)	アスパラギン酸（D）または グルタミン酸（E）	アルギニン (R)
プロリン (P)	アスパラギン酸（D）または グルタミン酸（E）	アルギニン (R)
メチオニン (M)	アスパラギン酸（D）または グルタミン酸（E）	アルギニン (R)
フェニルアラニン (F)	アスパラギン酸（D）または グルタミン酸（E）	リジン (K)

トリプトファン (W)	アスパラギン酸（D）または グルタミン酸（E）	リジン (K)
チロシン (Y)	アスパラギン酸（D）または グルタミン酸（E）	リジン (K)
アラニン (A)	アスパラギン酸（D）または グルタミン酸（E）	リジン (K)
バリン (V)	アスパラギン酸（D）または グルタミン酸（E）	リジン (K)
ロイシン (L)	アスパラギン酸（D）または グルタミン酸（E）	リジン (K)
イソロイシン (I)	アスパラギン酸（D）または グルタミン酸（E）	リジン (K)
プロリン (P)	アスパラギン酸（D）または グルタミン酸（E）	リジン (K)
メチオニン (M)	アスパラギン酸（D）または グルタミン酸（E）	リジン (K)
フェニルアラニン (F)	アスパラギン酸（D）または グルタミン酸（E）	ヒスチジン (H)
トリプトファン (W)	アスパラギン酸（D）または グルタミン酸（E）	ヒスチジン (H)
チロシン (Y)	アスパラギン酸（D）または グルタミン酸（E）	ヒスチジン (H)
アラニン (A)	アスパラギン酸（D）または グルタミン酸（E）	ヒスチジン (H)
バリン (V)	アスパラギン酸（D）または グルタミン酸（E）	ヒスチジン (H)
ロイシン (L)	アスパラギン酸（D）または グルタミン酸（E）	ヒスチジン (H)
イソロイシン (I)	アスパラギン酸（D）または グルタミン酸（E）	ヒスチジン (H)
プロリン (P)	アスパラギン酸（D）または グルタミン酸（E）	ヒスチジン (H)
メチオニン (M)	アスパラギン酸（D）または グルタミン酸（E）	ヒスチジン (H)

【０２９３】

例えば、ＥＵ番号付けに従うヒトＩｇＧ１重鎖中の２３４、２３５および２３６位に対応する位置において、特に以下のアミノ酸が、ＰＤ-１に結合する抗体の重鎖定常領域中に存在してもよい:２３４Ｆ/２３５Ｅ/２３６Ｒ、２３４Ｗ/２３５Ｅ/２３６Ｒ、２３４Ｙ/２３５Ｅ/２３６Ｒ、２３４Ａ/２３５Ｅ/２３６Ｒ、２３４Ｌ/２３５Ｅ/２３６Ｒ、２３４Ｆ/２３５Ｄ/２３６Ｒ、２３４Ｗ/２３５Ｄ/２３６Ｒ、２３４Ｙ/２３５Ｄ/２３６Ｒ、２３４Ａ/２３５Ｄ/２３６Ｒ、２３４Ｌ/２３５Ｄ/２３６Ｒ、２３４Ｆ/２３５Ｌ/２３６Ｒ、２３４Ｗ/２３５Ｌ/２３６Ｒ、２３４Ｙ/２３５Ｌ/２３６Ｒ、２３４Ａ/２３５Ｌ/２３６Ｒ、２３４Ｌ/２３５Ｌ/２３６Ｒ、２３４Ｆ/２３５Ａ/２３６Ｒ、２３４Ｗ/２３５Ａ/２３６Ｒ、２３４Ｙ/２３５Ａ/２３６Ｒ、２３４Ａ/２３５Ａ/２３６Ｒ、２３４Ｌ/２３５Ａ/２３６Ｒ、２３４Ｆ/２３５Ｅ/２３６Ｋ、２３４Ｗ/２３５Ｅ/２３６Ｋ、２３４Ｙ/

235E/236K、234A/235E/236K、234L/235E/236K、234F/235D/236K、234W/235D/236K、234Y/235D/236K、234A/235D/236K、234L/235D/236K、234F/235L/236K、234W/235L/236K、234Y/235L/236K、234A/235L/236K、234L/235L/236K、234F/235A/236K、234W/235A/236K、234Y/235A/236K、234A/235A/236K、234L/235A/236K、234F/235E/236H、234W/235E/236H、234Y/235E/236H、234A/235E/236H、234L/235E/236H、234F/235D/236H、234W/235D/236H、234Y/235D/236H、234A/235D/236H、234L/235D/236H、234F/235L/236H、234W/235L/236H、234Y/235L/236H、234A/235L/236H、234L/235L/236H、234F/235A/236H、234W/235A/236H、234Y/235A/236H、234A/235A/236H、または234L/235A/236H。

【0294】

234、235および236位における上述のアミノ酸またはアミノ酸置換は、抗体の1つの重鎖中にのみまたは抗体の両方の重鎖中に存在してもよい。抗体の第1および第2の重鎖中に存在するそれぞれのアミノ酸は、互いから独立して選択されてもよい。

【0295】

例えば、PD-1に結合する抗体の少なくとも1つの重鎖は以下の配列（SEQ ID NO:128または38）を含むことができる:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS 60

GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FER**G 120

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN 180

STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE 240

MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW 300

QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG 329

【0296】

文脈が他に指し示す場合を除いて、例えば、表22および表23に示されるような、適用可能な場合の、本出願における234、236および235位におけるすべての記載されるアミノ酸置換の任意の順列組合せ（permutations）および組合せが、本出願の記載により開示されていると考えられるべきである。例えば、抗体の1つの態様において、第1の重鎖は、EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の234～236位に対応する位置においてアミノ酸FERを含むか、または第1の重鎖は、SEQ ID NO:38に示されるアミノ酸配列を含むか、もしくは該アミノ酸配列から本質的になるか、もしくは該アミノ酸配列からなり、かつ前記抗体の第2の重鎖は、EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の234～236位に対応する位置において他のアミノ酸、例えば、アミノ酸AAGもしくはLLGを含むか、または前記抗体の第2の重鎖は、SEQ ID NO:37もしくは43に示されるアミノ酸配列を含むか、もしくは該アミノ酸配列から本質的になるか、もしくは該アミノ酸配列からなる。抗体の別の態様において、第1および第2の重鎖は、EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の234～236位に対応する位置において同じアミノ酸、すなわち、EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の234位に対応する位置において同じ芳香族または非極性アミノ酸、例えばF、およびEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の236位に対応する位置においてグリシン以外の同じアミノ酸、例えば、R、例えばFERまたはFLRの特定の組合せを含む。

【0297】

1つの態様において、PD-1に結合する抗体は、少なくとも1つまたは2つの重鎖定常領域を含み、234位に対応するアミノ酸はフェニルアラニンであり、235位に対応するアミノ酸はグルタミン酸であり、かつ236位に対応するアミノ酸はアルギニンである（L234F/L235E/G236R＝FER）。

【０２９８】

1つの態様において、PD-1に結合する抗体は、SEQ ID NO:38に示されている重鎖定常領域配列のアミノ酸配列に対して少なくとも70％、少なくとも75％、少なくとも80％、少なくとも85％、少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも97％、少なくとも99％、または100％の同一性を有する配列を含む1つまたは複数の重鎖定常領域（CH）を含む。

【０２９９】

1つの態様において、PD-1に結合する抗体は、1つまたは複数の、例えば、2つの重鎖定常領域（CH）を含み、重鎖定常領域は、SEQ ID NO:38に示されている配列を含む。

【０３００】

1つの態様において、PD-1に結合する抗体は、SEQ ID NO:139に示されている配列を有する重鎖、およびSEQ ID NO:140に示されている配列を有する軽鎖を含む。

【０３０１】

抗体は好ましくはIgG1アイソタイプである。

【０３０２】

本明細書において使用される場合、用語「アイソタイプ」は、重鎖定常領域遺伝子によりコードされる免疫グロブリンクラスを指す。IgG1アイソタイプが本明細書において言及される場合、該用語は、特定のアイソタイプ配列、例えば、特有のIgG1配列に限定されず、抗体が他のアイソタイプよりもそのアイソタイプ、例えばIgG1に配列において近いことを指し示すために使用される。そのため、例えば、本明細書に開示されるIgG1抗体は、定常領域中のバリエーションを含む、天然に存在するIgG1抗体の配列バリアントであってもよい。

【０３０３】

IgG1抗体は、アロタイプ（Jefferis and Lefranc 2009.mAbs Vol 1 Issue 4 1-7において総説される）と称される複数の多型バリアントにおいて存在することができ、そのいずれも、本明細書における態様の一部における使用のために好適である。ヒト集団における一般的なアロタイプバリアントは、文字a、f、n、zまたはその組合せにより指定されるものである。本明細書における態様のいずれにおいても、抗体は、ヒトIgG Fc領域を含む重鎖Fc領域を含んでもよい。さらなる態様において、ヒトIgG Fc領域はヒトIgG1を含む。

【０３０４】

哺乳動物において2つのタイプの軽鎖、すなわち、ラムダおよびカッパがある。免疫グロブリン鎖は可変領域および定常領域を含む。定常領域は、免疫グロブリンの異なるアイソタイプ内で本質的に保存され、可変部分は高度に多様化し、抗原認識の原因となる。

【０３０５】

例えばまたは一態様において、本発明本発明にしたがって使用される抗体、好ましくはモノクローナル抗体は、ヒトIgG1/κもしくはヒトIgG1/λ定常部分を好ましくは含む、IgG1、κアイソタイプもしくはλアイソタイプであるか、または抗体、好ましくはモノクローナル抗体は、IgG1、λ（ラムダ）もしくはIgG1、κ（カッパ）抗体に由来し、好ましくはヒトIgG1、λ（ラムダ）もしくはヒトIgG1、κ（カッパ）抗体に由来する。

【０３０６】

1つの態様において、PD-1に結合する抗体は、SEQ ID NO:42に示されている軽鎖定常領域（LC）配列のアミノ酸配列に対して少なくとも70％、少なくとも75％、少なくとも80％、少なくとも85％、少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも97％、少なくとも99％、または100％の同一性を有する配列を含むLCを有する軽鎖を含む。1つ

の態様において、抗体は、SEQ ID NO:42に示されている配列を含む軽鎖定常領域（LC）を有する軽鎖を含む。

【０３０７】

本発明の1つの態様において、PD-1に結合する抗体は、全長IgG1抗体、例えば、例えば、IgG1、κである。本発明の1つの態様において、結合剤は、全長ヒトIgG1抗体、例えば、IgG1、κである。

【０３０８】

1つの態様において、PD-1に結合する抗体は、他の結合性特異物に対して誘導体化、連結または共発現され得る。別の態様において、抗体は、別の機能分子、例えば、別のペプチドまたはタンパク質（例えば、Fab'断片）に対して誘導体化、連結、またはそれと共発現され得る。例えば、1つまたは複数の他の分子実体、例えば別の抗体（例えば、二重特異性または多特異性抗体を製造するため）に（例えば、化学的カップリング、遺伝子融合、非共有結合性会合またはその他により）機能的に連結され得る。

【０３０９】

PD-1に結合する抗体はヒト抗体であってもよい。用語「ヒト抗体」は、本明細書において使用される場合、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変および定常領域を有する抗体を含むことが意図される。PD-1に結合するヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によりコードされないアミノ酸残基を含んでもよい（例えば、突然変異がインビトロでランダムもしくは部位特異的突然変異誘発によりまたはインビボで体細胞突然変異により導入されている）。

【０３１０】

本開示は、PD-1のための少なくとも1つの第1の結合性特異物および第2の標的エピトープ（またはさらなる標的エピトープ）のための第2の結合性特異物（またはさらなる結合性特異物）を含む二重特異性および多特異性分子の使用を含む。

【０３１１】

1つの態様において、PD-1に結合する多特異性抗体の第1の抗原結合領域は、本明細書に示されている重鎖可変領域（VH）および/または軽鎖可変領域（VL）を含む。

【０３１２】

PD-1に結合する多特異性抗体の使用に関する1つの態様において、抗体は、全長抗体、例えば上述されている全長IgG1、λ（ラムダ）またはIgG1、κ（カッパ）抗体に由来する、第1および第2の結合アームを含む。1つの態様において、第1および第2の結合アームはモノクローナル抗体に由来する。例えばまたは好ましい態様において、第1および/または第2の結合アームは、ヒトIgG1/κまたはヒトIgG1/λ定常部分を好ましくは含む、IgG1、κアイソタイプまたはλアイソタイプに由来する。

【０３１３】

本発明にしたがって使用される多特異性または二重特異性抗体のPD-1に結合する前記第1の抗原結合領域は、PD-L1および/またはPD-L2との結合についてPD-1と競合する抗体の重鎖および軽鎖可変領域を含んでもよい。多特異性または二重特異性抗体の使用に関する1つの態様において、PD-1に結合する第1の抗原結合領域は、本明細書に示されている重鎖可変領域（VH）および/または軽鎖可変領域（VL）を含む。

【０３１４】

本明細書において使用される場合、用語「エフェクター細胞」は、免疫応答の認知および活性化期ではなく、免疫応答のエフェクター期に関与する免疫細胞を指す。例示的な免疫細胞は、骨髄またはリンパ系起源の細胞、例えばリンパ球（例えばB細胞および細胞溶解性T細胞（CTL）を含むT細胞）、キラー細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、単球、好酸球、好中球、多形核細胞、顆粒球、肥満細胞、および好塩基球を含む。

【０３１５】

「標的細胞」は、抗体により標的とされ得る対象（例えば、ヒトまたは動物）における任意の望ましくない細胞を意味する。好ましい態様において、標的細胞は腫瘍細胞である。

【０３１６】
別の態様において、PD1/PD-L1阻害剤は、多特異性抗体、例えば二重特異性抗体である。
【０３１７】
好ましい態様において、PD1/PD-L1阻害剤は、CD137に結合する第1の結合領域およびPD-L1に結合する第2の結合領域を含むPD-L1阻害剤である。
【０３１８】
1つの態様において、PD-L1は、ヒトPD-L1、特にSEQ ID NO:98に示される配列を含むヒトPD-L1である。1つの態様において、CD137は、ヒトCD137、特にSEQ ID NO:97に示される配列を含むヒトCD137である。
【０３１９】
1つの態様において、a）PD-L1阻害剤の第1の結合領域は、それぞれSEQ ID NO:80、81、および82に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む重鎖可変領域（VH）、ならびにそれぞれSEQ ID NO:84、GAS、およびSEQ ID NO:85に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含み;かつb）PD-L1阻害剤の第2の結合領域は、それぞれSEQ ID NO:87、88、および89に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む重鎖可変領域（VH）、ならびにそれぞれSEQ ID NO:91、DDN、およびSEQ ID NO:92に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含む。
【０３２０】
1つの態様において、a）PD-L1阻害剤の第1の結合領域は、SEQ ID NO:79に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（VH）およびSEQ ID NO:83に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（VL）領域を含み;かつb）PD-L1阻害剤の第2の結合領域は、SEQ ID NO:86に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（VH）およびSEQ ID NO:90に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（VL）領域を含む。
【０３２１】
1つの態様において、PD-L1阻害剤は、多特異性抗体、例えば二重特異性抗体である。
【０３２２】
1つの態様において、PD-L1阻害剤は、全長抗体または抗体断片の様式である。
【０３２３】
1つの態様において、PD-L1阻害剤は、第1の結合アームおよび第2の結合アームを含む抗体であり、第1の結合アームは、
i）前記第1の重鎖可変領域（VH）および第1の重鎖定常領域（CH）を含むポリペプチド、ならびに
ii）前記第1の軽鎖可変領域（VL）および第1の軽鎖定常領域（CL）を含むポリペプチド
を含み;
かつ第2の結合アームは、
iii）前記第2の重鎖可変領域（VH）および第2の重鎖定常領域（CH）を含むポリペプチド、ならびに
iv）前記第2の軽鎖可変領域（VL）および第2の軽鎖定常領域（CL）を含むポリペプチド
を含む。
【０３２４】
1つの態様において、PD-L1阻害剤は、
i）CD137に結合する能力を有する前記抗原結合領域を含む第1の重鎖および軽鎖であって、第1の重鎖が第1の重鎖定常領域を含み、かつ第1の軽鎖が第1の軽鎖定常領域を含む、第1の重鎖および軽鎖;ならびに
ii）PD-L1に結合する能力を有する前記抗原結合領域を含む第2の重鎖および軽鎖であって、第2の重鎖が第2の重鎖定常領域を含み、かつ第2の軽鎖が第2の軽鎖定常領域を含

む、第2の重鎖および軽鎖
を含む。
【０３２５】
1つの態様において、（i）EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置におけるアミノ酸は前記第1の重鎖定常領域（CH）においてLであり、かつEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置におけるアミノ酸は前記第2の重鎖定常領域（CH）においてRであるか、または（ii）EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置におけるアミノ酸は前記第1の重鎖においてRであり、かつEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置におけるアミノ酸は前記第2の重鎖においてLである。
【０３２６】
1つの態様において、EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置は、前記第1および第2の重鎖においてそれぞれFおよびEである。
【０３２７】
1つの態様において、EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置は、前記第1および第2の重鎖定常領域（HC）においてそれぞれF、E、およびAである。
【０３２８】
1つの態様において、PD-L1阻害剤中の第1の重鎖定常領域および第2の重鎖定常領域の両方のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置はそれぞれFおよびEであり、かつ（i）第1の重鎖定常領域のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置はLであり、かつ第2の重鎖のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置はRであるか、または（ii）第1の重鎖定常領域のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置はRであり、かつ第2の重鎖のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置はLである。
【０３２９】
1つの態様において、PD-L1阻害剤中の第1の重鎖定常領域および第2の重鎖定常領域の両方のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置は、それぞれF、E、およびAであり、かつ（i）第1の重鎖定常領域のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置はLであり、かつ第2の重鎖定常領域のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置はRであるか、または（ii）第1の重鎖のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置はRであり、かつ第2の重鎖のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置はLである。
【０３３０】
1つの態様において、PD-L1阻害剤中の前記第1および/または第2の重鎖、例えば第2の重鎖の定常領域は、
a）SEQ ID NO:94または96に示される配列［IgG1-Fc_FEAL］;
b）a）における配列の部分配列、例えば、a）において定義される配列のN末端またはC末端から開始して、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の連続するアミノ酸が欠失している、部分配列;および
c）a）またはb）において定義されるアミノ酸配列と比較して、最大で6個の置換、例えば最大で5個の置換、最大で4個の置換、最大で3個、最大で2個の置換または最大で1個の置換を有する配列
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むか、または該アミノ酸配列から本質的になるか、または該アミノ酸配列からなる。
【０３３１】
1つの態様において、PD-L1阻害剤中の前記第1および/または第2の重鎖、例えば第1の重鎖の定常領域は、
a）SEQ ID NO:93または95に示される配列［IgG1-Fc_FEAR］;
b）a）における配列の部分配列、例えば、a）において定義される配列のN末端または

C末端から開始して、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の連続するアミノ酸が欠失している、部分配列;および
c）a）またはb）において定義されるアミノ酸配列と比較して、最大で6個の置換、例えば最大で5個の置換、最大で4個、最大で3個、最大で2個の置換または最大で1個の置換を有する配列
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むか、または該アミノ酸配列から本質的になるか、または該アミノ酸配列からなる。

【０３３２】

1つの態様において、前記PD-L1阻害剤はカッパ（κ）軽鎖定常領域を含む。

【０３３３】

1つの態様において、前記PD-L1阻害剤はラムダ（λ）軽鎖定常領域を含む。

【０３３４】

1つの態様において、PD-L1阻害剤の前記第1の軽鎖定常領域は、カッパ（κ）軽鎖定常領域またはラムダ（λ）軽鎖定常領域である。

【０３３５】

1つの態様において、PD-L1阻害剤の前記第2の軽鎖定常領域は、ラムダ（λ）軽鎖定常領域またはカッパ（κ）軽鎖定常領域である。

【０３３６】

1つの態様において、PD-L1阻害剤の前記第1の軽鎖定常領域はカッパ（κ）軽鎖定常領域でありかつ前記第2の軽鎖定常領域はラムダ（λ）軽鎖定常領域であるか、または前記第1の軽鎖定常領域はラムダ（λ）軽鎖定常領域でありかつ前記第2の軽鎖定常領域はカッパ（κ）軽鎖定常領域である。

【０３３７】

1つの態様において、PD-L1阻害剤のカッパ（κ）軽鎖は、
a）SEQ ID NO:16に示される配列、
b）a）における配列の部分配列、例えば、a）において定義される配列のN末端またはC末端から開始して、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の連続するアミノ酸が欠失している、部分配列;および
c）a）またはb）において定義されるアミノ酸配列と比較して、最大で10個の置換、例えば最大で9個の置換、最大で8個、最大で7個、最大で6個、最大で5個、最大で4個の置換、最大で3個、最大で2個の置換または最大で1個の置換を有する配列
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。

【０３３８】

1つの態様において、PD-L1阻害剤のラムダ（λ）軽鎖は、
a）SEQ ID NO:17に示される配列、
b）a）における配列の部分配列、例えば、a）において定義される配列のN末端またはC末端から開始して、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の連続するアミノ酸が欠失している、部分配列;および
c）a）またはb）において定義されるアミノ酸配列と比較して、最大で10個の置換、例えば最大で9個の置換、最大で8個、最大で7個、最大で6個、最大で5個、最大で4個の置換、最大で3個、最大で2個の置換または最大で1個の置換を有する配列
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。

【０３３９】

1つの態様において、PD-L1阻害剤は、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4からなる群より選択されるアイソタイプである。

【０３４０】

1つの態様において、PD-L1阻害剤は全長IgG1抗体である。

【０３４１】

1つの態様において、PD-L1阻害剤はIgG1m（f）アロタイプの抗体である。

【０３４２】

1つの態様において、PD-L1阻害剤は、CD137およびPD-L1に結合する二重特異性抗体であり、二重特異性抗体は、i）SEQ ID NO:75に示されるアミノ酸配列を含む第1の重鎖およびSEQ ID NO:76に示されるアミノ酸配列を含む第1の軽鎖、ならびにii）SEQ ID NO:77に示されるアミノ酸配列を含む第2の重鎖およびSEQ ID NO:78に示されるアミノ酸配列を含む第2の軽鎖を有する。

【０３４３】

1つの態様において、PD-L1阻害剤はアカスンリマブまたはそのバイオシミラーである。

【０３４４】

対象および処置される腫瘍またはがん

本開示にしたがって処置される対象は好ましくはヒト対象である。

【０３４５】

1つの態様において、腫瘍またはがんは固形腫瘍である。

【０３４６】

1つの態様において、前記腫瘍はPD-L1陽性腫瘍である。

【０３４７】

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

【０３４８】

1つの態様において、HNSCCは、再発性、切除不能性または転移性である。

【０３４９】

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

【０３５０】

1つの態様において、NSCLCは、再発性、切除不能性または転移性である。

【０３５１】

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

【０３５２】

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

【０３５３】

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

【０３５４】

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

【０３５５】

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

【０３５６】

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

【０３５７】

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

【０３５８】

1つの態様において、以前の最後の処置は、単剤療法としてまたは併用療法の一部として投与されるPD1阻害剤またはPD-L1阻害剤、例えば抗PD-1抗体または抗PD-L1抗体での処置であった。

【０３５９】

1つの態様において、PD-1阻害剤またはPD-L1阻害剤、例えば抗PD-1抗体または抗PD-L1抗体での最後の処置における進行からの時間は6か月またはそれ未満である。

【０３６０】

1つの態様において、以前の最後の処置の一部としてのPD-1阻害剤またはPD-L1阻害剤、例えば抗PD-1抗体または抗PD-L1抗体の最後の投薬からの時間は6か月またはそれ未満である。

【０３６１】

1つの態様において、がんまたは腫瘍は、再発しているかつ/もしくは難治性であるか、または対象は、i）抗PD-1抗体もしくは抗PD-L1抗体での処置後のプラチナダブレット化学療法、またはii）プラチナダブレット化学療法後の抗PD-1抗体もしくは抗PD-L1抗体での処置の間または後に進行している。

【０３６２】

第2の局面において、本開示は、i）CD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む結合剤およびii）PD1/PD-L1阻害剤を含む、キットを提供する。

【０３６３】

第2の局面に係るキットの1つの態様において、結合剤は、本開示の任意の局面または態様において定義される通りである。

【０３６４】

第2の局面に係るキットの1つの態様において、PD1/PD-L1阻害剤は、本開示の任意の局面または態様において定義される通りである。

【０３６５】

第2の局面に係るキットの1つの態様において、結合剤、PD1/PD-L1阻害剤、および、存在する場合に、1つまたは複数の追加の治療剤は、全身投与のため、特に注射または注入、例えば静脈内注射または注入のためのものである。

【０３６６】

第3の局面において、本開示は、対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法における使用のためのキットであって、i）CD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む結合剤およびii）PD1/PD-L1阻害剤を含む、キットを提供する。

【０３６７】

第3の局面に係る使用のためのキットの1つの態様において、キットは、本開示の任意の局面または態様において定義される通りである。

【０３６８】

第3の局面に係る使用のためのキットの1つの態様において、腫瘍またはがんは、本開示の任意の局面または態様において定義される通りである。

【０３６９】

第3の局面に係る使用のためのキットの1つの態様において、対象は、本開示の任意の局面または態様において定義される通りである。

【０３７０】

第3の局面に係る使用のためのキットの1つの態様において、方法は、本開示の任意の局面または態様において定義される通りである。

【０３７１】
第４の局面において、本開示は、ｉ）ＣＤ２７に結合する少なくとも１つの結合領域を含む結合剤;ｉｉ）ＰＤ１/ＰＤ-Ｌ１阻害剤;およびｉｉｉ）任意で、薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物を提供する。
【０３７２】
第４の局面に係る薬学的組成物の１つの態様において、結合剤は、本開示の任意の局面または態様において定義される通りである。
【０３７３】
第４の局面に係る薬学的組成物の１つの態様において、ＰＤ１/ＰＤ-Ｌ１阻害剤は、本開示の任意の局面または態様において定義される通りである。
【０３７４】
第５の局面において、本開示は、対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法における使用のための薬学的組成物であって、ｉ）ＣＤ２７に結合する少なくとも１つの結合領域を含む結合剤およびｉｉ）ＰＤ１/ＰＤ-Ｌ１阻害剤を含む、薬学的組成物を提供する。
【０３７５】
第５の局面に係る使用のための薬学的組成物の１つの態様において、薬学的組成物は、本開示の任意の局面または態様において定義される通りである。
【０３７６】
第５の局面に係る使用のための薬学的組成物の１つの態様において、腫瘍またはがんは、本開示の任意の局面または態様において定義される通りである。
【０３７７】
第５の局面に係る使用のための薬学的組成物の１つの態様において、対象は、本開示の任意の局面または態様において定義される通りである。
【０３７８】
第５の局面に係る使用のための薬学的組成物の１つの態様において、方法は、本開示の任意の局面または態様において定義される通りである。
【０３７９】
第６の局面において、本開示は、対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法における使用のための結合剤であって、該方法が、ｉ）ＣＤ２７に結合する少なくとも１つの結合領域を含む結合剤;およびｉｉ）ＰＤ１/ＰＤ-Ｌ１阻害剤を該対象に投与する工程を含む、結合剤を提供する。
【０３８０】
第６の局面に係る使用のための結合剤の１つの態様において、方法は、本開示の任意の局面または態様において定義される通りである。
【０３８１】
第６の局面に係る使用のための結合剤の１つの態様において、結合剤は、本開示の任意の局面または態様において定義される通りである。
【０３８２】
第６の局面に係る使用のための結合剤の１つの態様において、ＰＤ１/ＰＤ-Ｌ１阻害剤は、本開示の任意の局面または態様において定義される通りである。
【０３８３】
第７の局面において、本開示は、対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法における使用のためのＰＤ１/ＰＤ-Ｌ１阻害剤であって、該方法が、ｉ）ＣＤ２７に結合する少なくとも１つの結合領域を含む結合剤;およびｉｉ）ＰＤ１/ＰＤ-Ｌ１阻害剤を該対象に投与する工程を含む、ＰＤ１/ＰＤ-Ｌ１阻害剤を提供する。
【０３８４】
第７の局面に係る使用のためのＰＤ１/ＰＤ-Ｌ１阻害剤の１つの態様において、方法は、本開示の任意の局面または態様において定義される通りである。

【０３８５】
第７の局面に係る使用のためのＰＤ１/ＰＤ-Ｌ１阻害剤の１つの態様において、結合剤は、本開示の任意の局面または態様において定義される通りである。
【０３８６】
第７の局面に係る使用のためのＰＤ１/ＰＤ-Ｌ１阻害剤の１つの態様において、ＰＤ１/ＰＤ-Ｌ１阻害剤は、本開示の任意の局面または態様において定義される通りである。
【０３８７】
本明細書において参照される文献および研究の参照は、以上のいずれかが関連する先行技術であるという承認として意図されるものではない。これらの文献の内容に関するすべての陳述は、本出願人に利用可能な情報に基づき、これらの文献の内容の正確性に関するいかなる承認も構成しない。
【０３８８】
記載（以下の例を含む）は、当業者が様々な態様を製造および使用することを可能にするために提示される。特定のデバイス、技術、および応用の記載は、例としてのみ提供される。本明細書に記載される例に対する様々な修飾は、当業者に容易に明らかであり、本明細書において定義される一般的な原理は、様々な態様の精神および範囲から離れることなく他の例および応用に適用され得る。そのため、様々な態様は、本明細書に記載および示される例に限定されることは意図されず、請求項と一貫する範囲にかなっている。
【０３８９】
本開示の項目
１．（ｉ）ＣＤ２７に結合する少なくとも１つの結合領域を含む結合剤;および
（ｉｉ）ＰＤ１/ＰＤ-Ｌ１阻害剤
を対象に投与する工程を含む、対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法。
【０３９０】
２．前記結合剤が、それぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:５、６、および７に示されている配列を含む重鎖可変（ＶＨ）領域ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３、ならびにそれぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:９、１０および１１に示されている配列を含む軽鎖可変（ＶＬ）領域ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３を含む、項目１の方法。
【０３９１】
３．前記結合剤が、ヒトＣＤ２７に結合する能力を有する２つの結合領域を含み、前記抗体が、それぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:５、６、および７に示されている配列を含む重鎖可変（ＶＨ）領域ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３、ならびにそれぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:９、１０および１１に示されている配列を含む軽鎖可変（ＶＬ）領域ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３を含む、項目１または２の方法。
【０３９２】
４．前記結合剤が、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４に示されている配列を含むＶＨ領域を含む、前記項目のいずれかの方法。
【０３９３】
５．前記結合剤が、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されている配列を含むＶＬ領域を含む、前記項目のいずれかの方法。
【０３９４】
６．前記結合剤が、それぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８に示されている配列を含むＶＨ領域およびＶＬ領域を含む、前記項目のいずれかの方法。
【０３９５】
７．前記結合剤が、抗体、好ましくはヒト抗体またはヒト化抗体である、前記項目のいずれかの方法。
【０３９６】
８．前記抗体が、軽鎖定常領域（ＣＬ）および重鎖定常領域（ＣＨ）をさらに含む全長抗体である、前記項目のいずれかの方法。

【０３９７】
9．前記軽鎖定常領域がヒトカッパである、項目8の方法。
【０３９８】
10．前記軽鎖定常領域がヒトラムダである、項目8の方法。
【０３９９】
11．前記結合剤が重鎖定常領域をさらに含み、該重鎖定常領域が、ヒトIgGアイソタイプの重鎖定常領域であり、かつ任意で、改変されたヒトIgGの重鎖定常領域である、前記項目のいずれかの方法。
【０４００】
12．前記ヒトIgGまたは改変されたヒトIgGが、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4、例えばヒトIgG1より選択される、項目11の方法。
【０４０１】
13．前記IgGが、1つまたは複数のアミノ酸置換を含む改変されたヒトIgGである、項目11または12の方法。
【０４０２】
14．前記改変されたヒトIgGが、1つまたは複数のアミノ酸置換、例えば2つ以上のアミノ酸置換を含む、改変されたヒトIgG1である、項目11～13のいずれかの方法。
【０４０３】
15．前記改変されたヒトIgG重鎖定常領域が、最大で10個のアミノ酸置換、例えば最大で9個、例えば最大で8個、例えば最大で7個、例えば最大で6個、例えば最大で5個、例えば最大で4個、例えば最大で3個、例えば最大で2個のアミノ酸置換を含む、項目11～14のいずれかの方法。
【０４０４】
16．重鎖定常領域中の前記置換が、野生型IgG1抗体重鎖定常領域を含むことを除いて同一の抗体と比較してCD27アゴニズムの増加を誘導する、項目11～15のいずれかの方法。
【０４０５】
17．Eu番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置E345またはE430に対応する位置におけるアミノ酸残基が、A、C、D、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、WおよびYを含む群より選択される、項目11～16のいずれかの方法。
【０４０６】
18．Eu番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置E345に対応する位置におけるアミノ酸残基がRである、項目11～17のいずれかの方法。
【０４０７】
19．Eu番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置E430に対応する位置におけるアミノ酸残基がGである、項目11～18のいずれかの方法。
【０４０８】
20．Eu番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置P329に対応する位置におけるアミノ酸残基がRである、項目11～19のいずれかの方法。
【０４０９】
21．Eu番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置E345およびP329に対応する位置におけるアミノ酸残基が両方ともRである、項目11～20のいずれかの方法。
【０４１０】
22．前記結合剤が、野生型IgG1重鎖定常領域を含む親抗体と同様の薬物動態プロファイルを有する、項目11～21のいずれかの方法。
【０４１１】
23．前記結合剤が、SEQ ID NO:12、13、14、15、18、19、20、21、22、23、27、28、29、30、31、32、33、34および36を含む群より選択される配列を含む重鎖定常領域を含む、前記項目のいずれかの方法。
【０４１２】

24. 前記結合剤が、SEQ ID NO:15に示されている配列を含む重鎖定常領域を含む、前記項目のいずれかの方法。

【0413】

25. 前記結合剤が重鎖定常領域を含み、該重鎖定常領域が、前記結合剤が親抗体と比べてより低い程度まで1つまたは複数のFc媒介性エフェクター機能を誘導するように改変されている、前記項目のいずれかの方法。

【0414】

26. 前記1つまたは複数のFc媒介性エフェクター機能が、少なくとも20%、例えば少なくとも30%または少なくとも40%、または少なくとも50%または少なくとも60%または少なくとも70%、または少なくとも80%または少なくとも90%減少している、項目25の方法。

【0415】

27. 前記結合剤が1つまたは複数のFc媒介性エフェクター機能を誘導しない、項目25または26の方法。

【0416】

28. 前記1つまたは複数のFc媒介性エフェクター機能が、以下の群:
補体依存性細胞傷害（CDC）、補体依存性細胞媒介性細胞傷害（CDCC）、補体活性化、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）、抗体依存性細胞媒介性ファゴサイトーシス（ADCP）、C1q結合、およびFcγR結合
より選択される、項目25～27のいずれかの方法。

【0417】

29. 前記結合剤が、実施例8の方法により測定された場合にC1q結合を誘導しない、項目25～28のいずれかの方法。

【0418】

30. 前記結合剤が一価抗体である、前記項目のいずれかの方法。

【0419】

31. 前記結合剤が二価抗体である、前記項目のいずれかの方法。

【0420】

32. 前記結合剤が単一特異性抗体である、前記項目のいずれかの方法。

【0421】

33. 前記結合剤が、前記項目のいずれかのヒトCD27に結合する能力を有する第1の抗原結合領域と、ヒトCD27上の異なるエピトープに結合する能力を有するかまたは異なる標的に結合する能力を有する第2の抗原結合領域とを含む二重特異性抗体である、前記項目のいずれかの方法。

【0422】

34. CD27がヒトCD27であり、特に、該ヒトCD27が、SEQ ID NO:1に示されている配列またはSEQ ID NO:2に示されているヒトCD27バリアントを含む、前記項目のいずれかの方法。

【0423】

35. 前記結合剤が、
e. SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むVH領域;
f. SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列を含むVL領域;
g. SEQ ID NO:15に示されるアミノ酸配列を含むCH領域;および
h. SEQ ID NO:17に示されるアミノ酸配列を含むCL領域
を含む、前記項目のいずれかの方法。

【0424】

36. 前記結合剤が、SEQ ID NO:35に示されるアミノ酸配列を含む重鎖およびSEQ ID NO:25に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、前記項目のいずれかの方法。

【0425】

37. PD-L1が、ヒトPD-L1、特にSEQ ID NO:98に示される配列を含むヒトPD-L1で

ある、前記項目のいずれかの方法。
【０４２６】
38．PD1がヒトPD1であり、好ましくは、該PD1が、SEQ ID NO:58またはSEQ ID NO:59に示されているアミノ酸配列を有するかまたは含む、あるいはPD1のアミノ酸配列が、SEQ ID NO:58もしくはSEQ ID NO:59に示されているアミノ酸配列に対して少なくとも70％、少なくとも75％、少なくとも80％、少なくとも85％、少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも97％、少なくとも99％、もしくは100％の同一性を有するか、またはその免疫原性断片である、前記項目のいずれかの方法。
【０４２７】
39．前記PD1/PD-L1阻害剤が、PD1もしくはPD-L1に結合する抗体、好ましくはPD1/PD-L1相互作用のアンタゴニストである抗体であり、かつ/またはPD1もしくはPD-L1遮断抗体である、前記項目のいずれかの方法。
【０４２８】
40．前記PD1/PD-L1阻害剤が、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4からなる群より選択されるアイソタイプの抗体、例えばIgG1アイソタイプの抗体である、前記項目のいずれかの方法。
【０４２９】
41．前記PD1/PD-L1阻害剤が、全長抗体または抗体断片、例えば全長IgG1抗体である、前記項目のいずれかの方法。
【０４３０】
42．前記PD1/PD-L1阻害剤が単一特異性抗体である、前記項目のいずれかの方法。
【０４３１】
43．前記PD1/PD-L1阻害剤が、それぞれSEQ ID NO:99、100および101に示されるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含む重鎖可変領域（VH）、ならびにそれぞれSEQ ID NO:102、LASおよびSEQ ID NO:103に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含む、PD1に結合する抗体である、前記項目のいずれかの方法。
【０４３２】
44．前記PD1/PD-L1阻害剤が、SEQ ID NO:104のアミノ酸配列を含むVH領域およびSEQ ID NO:105のアミノ酸配列を含むVL領域を含む、PD1に結合する抗体である、前記項目のいずれかの方法。
【０４３３】
45．前記PD1/PD-L1阻害剤が、SEQ ID NO:106のアミノ酸配列を含む重鎖およびSEQ ID NO:107のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、PD1に結合する抗体である、前記項目のいずれかの方法。
【０４３４】
46．（a）前記結合剤が、SEQ ID NO:35に示されるアミノ酸配列を含む重鎖およびSEQ ID NO:25に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗体であり;
（b）前記PD1/PD-L1阻害剤がペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーである、前記項目のいずれかの方法。
【０４３５】
47．（a）前記結合剤が、SEQ ID NO:35に示されるアミノ酸配列を含む重鎖およびSEQ ID NO:25に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗体であり;
（b）前記PD1/PD-L1阻害剤がニボルマブまたはそのバイオシミラーである、
項目1～42のいずれかの方法。
【０４３６】
48．（a）前記結合剤が、SEQ ID NO:35に示されるアミノ酸配列を含む重鎖およびSEQ ID NO:25に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗体であり;
（b）前記PD1/PD-L1阻害剤がアテゾリズマブまたはそのバイオシミラーである、
項目1～42のいずれかの方法。

【０４３７】
49．前記PD1/PD-L1阻害剤が、PD1に結合する抗体、またはその抗原結合性断片であり、該PD1に結合する抗体が、それぞれSEQ ID NO:49、46、および45に示されている配列を含むVH領域CDR1、CDR2、およびCDR3、ならびにそれぞれSEQ ID NO:52、QASおよびSEQ ID NO:50に示されている配列を含むVL領域CDR1、CDR2、およびCDR3を含む、項目1～42のいずれかの方法。
【０４３８】
50．前記PD1に結合する抗体が、SEQ ID NO:56に示されている重鎖可変領域（VH）配列のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%、または100%の同一性を有する配列を含むVHを含む、項目49の方法。
【０４３９】
51．前記PD1に結合する抗体が重鎖可変領域（VH）を含み、該VHが、SEQ ID NO:56に示されている配列を含む、項目50の方法。
【０４４０】
52．前記PD1に結合する抗体が、SEQ ID NO:57に示されている軽鎖可変領域（VL）配列のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%、または100%の同一性を有する配列を含むVLを含む、項目49～51のいずれかの方法。
【０４４１】
53．前記PD1に結合する抗体が軽鎖可変領域（VL）を含み、該VLが、SEQ ID NO:57に示されている配列を含む、項目52の方法。
【０４４２】
54．前記PD1に結合する抗体が重鎖可変領域（VH）および軽鎖可変領域（VL）を含み、該VHが、SEQ ID NO:56に示されている配列を含むかまたは有し、かつ該VLが、SEQ ID NO:57に示されている配列を含むかまたは有する、項目49～53のいずれかの方法。
【０４４３】
55．前記PD1に結合する抗体が重鎖定常領域を含み、
該重鎖定常領域が、
EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の234位に対応する位置における芳香族または非極性アミノ酸、および
EU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の236位に対応する位置におけるグリシン以外のアミノ酸
を含む、
項目49～54のいずれかの方法。
【０４４４】
56．前記236位に対応する位置におけるアミノ酸が塩基性アミノ酸である、項目55の方法。
【０４４５】
57．前記塩基性アミノ酸が、リジン、アルギニンおよびヒスチジンからなる群より選択される、項目56の方法。
【０４４６】
58．前記塩基性アミノ酸がアルギニン（G236R）である、項目56または57の方法。
【０４４７】
59．前記234位に対応する位置におけるアミノ酸が芳香族アミノ酸である、項目55～58のいずれかの方法。
【０４４８】
60．前記芳香族アミノ酸が、フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンからなる群より選択される、項目59の方法。

【０４４９】
61．前記234位に対応する位置におけるアミノ酸が非極性アミノ酸である、項目55～58のいずれかの方法。
【０４５０】
62．前記非極性アミノ酸が、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニンおよびトリプトファンからなる群より選択される、項目61の方法。
【０４５１】
63．前記非極性アミノ酸が、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニンおよびトリプトファンからなる群より選択される、項目61または62の方法。
【０４５２】
64．前記234位に対応するアミノ酸がフェニルアラニン（L234F）である、項目55～63のいずれかの方法。
【０４５３】
65．前記PD1に結合する抗体の前記重鎖定常領域中のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の235位に対応する位置におけるアミノ酸が酸性アミノ酸である、項目55～64のいずれかの方法。
【０４５４】
66．前記酸性アミノ酸がアスパラギン酸またはグルタミン酸である、項目65の方法。
【０４５５】
67．前記PD1に結合する抗体の前記重鎖定常領域中のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の235位に対応する位置におけるアミノ酸がグルタミン酸（L235E）である、項目55～66のいずれかの方法。
【０４５６】
68．前記PD1に結合する抗体の前記重鎖定常領域中の234、235および236位に対応する位置におけるアミノ酸が、234位において非極性または芳香族アミノ酸、235位において酸性アミノ酸、および236位において塩基性アミノ酸である、項目55～67のいずれかの方法。
【０４５７】
69．前記PD1に結合する抗体の前記重鎖定常領域中で234位に対応するアミノ酸がフェニルアラニンであり、235位に対応するアミノ酸がグルタミン酸であり、かつ236位に対応するアミノ酸がアルギニンである（L234F/L235E/G236R）、項目55～68のいずれかの方法。
【０４５８】
70．前記PD1に結合する抗体の重鎖定常領域が、SEQ ID NO:38に示されているHC配列のアミノ酸配列に対して少なくとも70％、少なくとも75％、少なくとも80％、少なくとも85％、少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも97％、少なくとも99％、または100％の同一性を有する配列を含む、項目49～69のいずれかの方法。
【０４５９】
71．前記PD1に結合する抗体の重鎖定常領域が、SEQ ID NO:38に示されている配列を含む、項目49～70のいずれかの方法。
【０４６０】
72．前記PD1に結合する抗体の重鎖定常領域のアイソタイプがIgG1である、項目49～71のいずれかの方法。
【０４６１】
73．前記PD1に結合する抗体が、SEQ ID NO:139に示されている配列を有する重鎖、およびSEQ ID NO:140に示されている配列を有する軽鎖を含む、項目49～72のいずれかの方法。
【０４６２】
74．前記PD1に結合する抗体が、モノクローナル抗体、キメラ抗体、もしくはヒト化抗

体、またはそのような抗体の断片である、項目49～73のいずれかの方法。
【0463】
75. 前記PD1に結合する抗体が、低減または枯渇されたFc媒介性エフェクター機能を有する、項目49～74のいずれかの方法。
【0464】
76. 前記PD1に結合する抗体の定常領域への補体タンパク質C1qの結合が、野生型抗体と比較して、好ましくは少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%または100%、低減される、項目49～75のいずれかの方法。
【0465】
77. 前記PD1に結合する抗体へのIgG Fcガンマ受容体の1つまたは複数への結合が、野生型抗体と比較して、好ましくは少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%または100%、低減される、項目49～76のいずれかの方法。
【0466】
78. 前記1つまたは複数のIgG Fcガンマ受容体が、FcガンマRI、FcガンマRII、およびFcガンマRIIIの少なくとも1つより選択される、項目77の方法。
【0467】
79. 前記IgG Fcガンマ受容体がFcガンマRIである、項目77または78の方法。
【0468】
80. 前記PD1に結合する抗体が、FcガンマRI媒介性エフェクター機能を誘導する能力を有しないか、または誘導されるFcガンマRI媒介性エフェクター機能が、野生型抗体と比較して、好ましくは少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%もしくは100%、低減される、項目49～79のいずれかの方法。
【0469】
81. 前記PD1に結合する抗体が、補体依存性細胞傷害（CDC）媒介性溶解、抗体依存性細胞傷害（ADCC）媒介性溶解、アポトーシス、ホモタイプ接着および/もしくはファゴサイトーシスの少なくとも1つを誘導する能力を有さないか、または補体依存性細胞傷害（CDC）媒介性溶解、抗体依存性細胞傷害（ADCC）媒介性溶解、アポトーシス、ホモタイプ接着および/もしくはファゴサイトーシスの少なくとも1つが、低減された程度において誘導され、好ましくは少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%もしくは100%低減される、項目49～80のいずれかの方法。
【0470】
82. 前記PD1に結合する抗体への新生児Fc受容体（FcRn）の結合が、野生型抗体と比較して影響されない、項目49～81のいずれかの方法。
【0471】
83. 前記PD1に結合する抗体が、生細胞の表面上に存在するPD1のネイティブなエピトープに結合する、項目49～82のいずれかの方法。
【0472】
84. 前記PD1に結合する抗体が、PD1に結合する第1の抗原結合領域および別の抗原に結合する少なくとも1つのさらなる抗原結合領域を含む多特異性抗体である、項目49～83のいずれかの方法。
【0473】
85. 前記PD1に結合する抗体が、PD1に結合する第1の抗原結合領域および別の抗原に結合する第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体である、項目84の方法。
【0474】
86. 前記PD1に結合する第1の抗原結合領域が、項目50～54のいずれか一項に示されている重鎖可変領域（VH）および/または軽鎖可変領域（VL）を含む、項目84または8

5の方法。
【０４７５】
87．（a）前記結合剤が、SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むVH領域、SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列を含むVL領域を含み;
（b）前記PD1に結合する抗体がVH領域およびVL領域を含み、該VHが、SEQ ID NO:56に示されている配列を含むかまたは有し、かつ該VLが、SEQ ID NO:57に示されている配列を含むかまたは有する、
項目49～86のいずれかの方法。
【０４７６】
88．（a）前記結合剤が、SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むVH領域、SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列を含むVL領域、SEQ ID NO:15に示されるアミノ酸配列を含むCH領域、およびSEQ ID NO:17に示されるアミノ酸配列を含むCL領域を含む抗体であり;
（b）前記PD1に結合する抗体が、SEQ ID NO:56に示されるアミノ酸配列を含むVH領域、SEQ ID NO:57に示されるアミノ酸配列を含むVL領域、SEQ ID NO:38に示されるアミノ酸配列を含むCH領域、およびSEQ ID NO:42に示されるアミノ酸配列を含むCL領域を含む、
項目49～87のいずれかの方法。
【０４７７】
89．前記PD1/PD-L1阻害剤が、多特異性抗体、例えば二重特異性抗体である、項目1～41のいずれかの方法。
【０４７８】
90．前記PD1/PD-L1阻害剤が、CD137に結合する第1の結合領域およびPD-L1に結合する第2の結合領域を含むPD-L1阻害剤である、項目89の方法。
【０４７９】
91．CD137が、ヒトCD137、特にSEQ ID NO:97に示される配列を含むヒトCD137である、項目90の方法。
【０４８０】
92．（a）前記PD-L1阻害剤の第1の結合領域が、SEQ ID NO:79のCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む重鎖可変領域（VH）、ならびにSEQ ID NO:83のCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含み;
かつ
（b）前記PD-L1阻害剤の第2の結合領域が、SEQ ID NO:86のCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む重鎖可変領域（VH）、ならびにSEQ ID NO:90のCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含む、
項目90または91の方法。
【０４８１】
93．（a）前記PD-L1阻害剤の第1の結合領域が、それぞれSEQ ID NO:80、81、および82に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む重鎖可変領域（VH）、ならびにそれぞれSEQ ID NO:84、GAS、およびSEQ ID NO:85に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含み;かつ（b）前記PD-L1阻害剤の第2の結合領域が、それぞれSEQ ID NO:87、88、および89に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む重鎖可変領域（VH）、ならびにそれぞれSEQ ID NO:91、DDN、およびSEQ ID NO:92に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含む、項目90～92のいずれかの方法。
【０４８２】
94．（a）前記PD-L1阻害剤の第1の結合領域が、SEQ ID NO:79に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（VH）およびSEQ ID NO:83に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（VL）領域を含み;
かつ

（ｂ）前記ＰＤ-Ｌ１阻害剤の第２の結合領域が、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:８６に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:９０に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）領域を含む、
項目９０～９３のいずれかの方法。
【０４８３】
９５．前記ＰＤ-Ｌ１阻害剤が、第１の結合アームおよび第２の結合アームを含む抗体であり、
該第１の結合アームが、
（ｉ）前記第１の重鎖可変領域（ＶＨ）および第１の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチド、ならびに
（ｉｉ）前記第１の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第１の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド
を含み;
かつ該第２の結合アームが、
（ｉｉｉ）前記第２の重鎖可変領域（ＶＨ）および第２の重鎖定常領域（ＣＨ）を含むポリペプチド、ならびに
（ｉｖ）前記第２の軽鎖可変領域（ＶＬ）および第２の軽鎖定常領域（ＣＬ）を含むポリペプチド
を含む、
項目９０～９４のいずれかの方法。
【０４８４】
９６．前記ＰＤ-Ｌ１阻害剤が、
（ｉ）ＣＤ１３７に結合する能力を有する前記抗原結合領域を含む第１の重鎖および軽鎖であって、該第１の重鎖が第１の重鎖定常領域を含み、かつ該第１の軽鎖が第１の軽鎖定常領域を含む、第１の重鎖および軽鎖;ならびに
（ｉｉ）ＰＤ-Ｌ１に結合する能力を有する前記抗原結合領域を含む第２の重鎖および軽鎖であって、該第２の重鎖が第２の重鎖定常領域を含み、かつ該第２の軽鎖が第２の軽鎖定常領域を含む、第２の重鎖および軽鎖
を含む、
項目９０～９５のいずれかの方法。
【０４８５】
９７．（ｉ）ＥＵ番号付けに従うヒトＩｇＧ１重鎖中のＦ４０５に対応する位置におけるアミノ酸が前記第１の重鎖定常領域（ＣＨ）においてＬであり、かつＥＵ番号付けに従うヒトＩｇＧ１重鎖中のＫ４０９に対応する位置におけるアミノ酸が前記第２の重鎖定常領域（ＣＨ）においてＲであるか、または（ｉｉ）ＥＵ番号付けに従うヒトＩｇＧ１重鎖中のＫ４０９に対応する位置におけるアミノ酸が前記第１の重鎖においてＲであり、かつＥＵ番号付けに従うヒトＩｇＧ１重鎖中のＦ４０５に対応する位置におけるアミノ酸が前記第２の重鎖においてＬである、項目９５または９６の方法。
【０４８６】
９８．ＥＵ番号付けに従うヒトＩｇＧ１重鎖中の位置Ｌ２３４およびＬ２３５に対応する位置が、前記第１および第２の重鎖においてそれぞれＦおよびＥである、項目９５～９７のいずれかの方法。
【０４８７】
９９．ＥＵ番号付けに従うヒトＩｇＧ１重鎖中の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５、およびＤ２６５に対応する位置が、前記第１および第２の重鎖定常領域（ＨＣ）においてそれぞれＦ、Ｅ、およびＡである、項目９５～９８のいずれかの方法。
【０４８８】
１００．前記第１の重鎖定常領域および第２の重鎖定常領域の両方のＥＵ番号付けに従うヒトＩｇＧ１重鎖中の位置Ｌ２３４およびＬ２３５に対応する位置がそれぞれＦおよびＥであり、かつ（ｉ）前記第１の重鎖定常領域のＥＵ番号付けに従うヒトＩｇＧ１重鎖中のＦ４０５に対応する位置がＬであり、かつ前記第２の重鎖のＥＵ番号付けに従うヒトＩｇＧ１重鎖中のＫ４０９に対

応する位置がRであるか、または（ii）前記第1の重鎖定常領域のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置がRであり、かつ前記第2の重鎖のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置がLである、項目95～99のいずれかの方法。

【０４８９】

101．前記第1の重鎖定常領域および第2の重鎖定常領域の両方のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置が、それぞれF、E、およびAであり、かつ（i）前記第1の重鎖定常領域のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置がLであり、かつ前記第2の重鎖定常領域のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置がRであるか、または（ii）前記第1の重鎖のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置がRであり、かつ前記第2の重鎖のEU番号付けに従うヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置がLである、項目95～100のいずれかの方法。

【０４９０】

102．前記第1および/または第2の重鎖、例えば第2の重鎖の定常領域が、

（a）SEQ ID NO:94または96に示される配列［IgG1-Fc_FEAL］;

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

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

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

項目95～101のいずれかの方法。

【０４９１】

103．前記第1および/または第2の重鎖、例えば第1の重鎖の定常領域が、

（a）SEQ ID NO:93または95に示される配列［IgG1-Fc_FEAR］;

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

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

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

項目95～102のいずれかの方法。

【０４９２】

104．前記PD-L1阻害剤がカッパ（κ）軽鎖定常領域を含む、項目95～103のいずれかの方法。

【０４９３】

105．前記PD-L1阻害剤がラムダ（λ）軽鎖定常領域を含む、項目95～104のいずれかの方法。

【０４９４】

106．前記第1の軽鎖定常領域がカッパ（κ）軽鎖定常領域またはラムダ（λ）軽鎖定常領域である、項目95～105のいずれかの方法。

【０４９５】

107．前記第2の軽鎖定常領域がラムダ（λ）軽鎖定常領域またはカッパ（κ）軽鎖定常領域である、項目95～106のいずれかの方法。

【０４９６】

108．前記第1の軽鎖定常領域がカッパ（κ）軽鎖定常領域でありかつ前記第2の軽鎖定

常領域がラムダ（λ）軽鎖定常領域であるか、または前記第1の軽鎖定常領域がラムダ（λ）軽鎖定常領域でありかつ前記第2の軽鎖定常領域がカッパ（κ）軽鎖定常領域である、項目95～107のいずれかの方法。

【０４９７】

109．前記カッパ（κ）軽鎖が、

（a）SEQ ID NO:16に示される配列、

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

（c）（a）または（b）において定義されるアミノ酸配列と比較して、最大で10個の置換、例えば最大で9個の置換、最大で8個、最大で7個、最大で6個、最大で5個、最大で4個の置換、最大で3個、最大で2個の置換または最大で1個の置換を有する配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、

項目104～108のいずれかの方法。

【０４９８】

110．前記ラムダ（λ）軽鎖が、

（a）SEQ ID NO:17に示される配列、

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

（c）（a）または（b）において定義されるアミノ酸配列と比較して、最大で10個の置換、例えば最大で9個の置換、最大で8個、最大で7個、最大で6個、最大で5個、最大で4個の置換、最大で3個、最大で2個の置換または最大で1個の置換を有する配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、

項目105～109のいずれかの方法。

【０４９９】

111．前記PD-L1阻害剤がIgG1m（f）アロタイプの抗体である、項目90～110のいずれかの方法。

【０５００】

112．前記PD-L1阻害剤が、CD137およびPD-L1に結合する二重特異性抗体であり、該二重特異性抗体が、（i）SEQ ID NO:75に示されるアミノ酸配列を含む第1の重鎖およびSEQ ID NO:76に示されるアミノ酸配列を含む第1の軽鎖、ならびに（ii）SEQ ID NO:77に示されるアミノ酸配列を含む第2の重鎖およびSEQ ID NO:78に示されるアミノ酸配列を含む第2の軽鎖を有する、項目90～111のいずれかの方法。

【０５０１】

113．前記PD-L1阻害剤がアカスンリマブまたはそのバイオシミラーである、項目90～112のいずれかの方法。

【０５０２】

114．（a）前記結合剤が、それぞれSEQ ID NO:5、6、および7に示されている配列を含む重鎖可変（VH）領域CDR1、CDR2、およびCDR3、ならびにそれぞれSEQ ID NO:9、10、および11に示されている配列を含む軽鎖可変（VL）領域CDR1、CDR2、およびCDR3を含み;

（b）前記PD-L1阻害剤の第1の結合領域が、それぞれSEQ ID NO:80、81、および82に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む重鎖可変領域（VH）、ならびにそれぞれSEQ ID NO:84、GAS、およびSEQ ID NO:85に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含み;かつ

（c）前記PD-L1阻害剤の第2の結合領域が、それぞれSEQ ID NO:87、88、および89に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む重鎖可変領域（VH）、ならびにそれぞれSEQ ID NO:91、DDN、およびSEQ ID NO:92に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含む、

項目90～113のいずれかの方法。
【0503】
115. （a）前記結合剤が、SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むVH領域、SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列を含むVL領域を含み;
（b）前記PD-L1阻害剤の第1の結合領域が、SEQ ID NO:79に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（VH）およびSEQ ID NO:83に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（VL）領域を含み;かつ
（c）前記PD-L1阻害剤の第2の結合領域が、SEQ ID NO:86に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（VH）およびSEQ ID NO:90に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（VL）領域を含む、
項目90～114のいずれかの方法。
【0504】
116. （a）前記結合剤が、SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列を含むVH領域、SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸配列を含むVL領域、SEQ ID NO:15に示されるアミノ酸配列を含むCH領域、およびSEQ ID NO:17に示されるアミノ酸配列を含むCL領域を含む抗体であり;
（b）前記PD-L1阻害剤が、第1の結合アームおよび第2の結合アームを含む抗体であり、該第1の結合アームが前記第1の結合領域を含み、かつ第2の結合アームが前記第2の結合領域を含み;
（c）前記PD-L1阻害剤の該第1の結合アームが、SEQ ID NO:79に示されるアミノ酸配列を含むVH領域、SEQ ID NO:83に示されるアミノ酸配列を含むVL領域;SEQ ID NO:95に示されるアミノ酸配列を含むCH領域、およびSEQ ID NO:16に示されるアミノ酸配列を含むCL領域を含み;かつ
（d）前記PD-L1阻害剤の該第2の結合アームが、SEQ ID NO:86に示されるアミノ酸配列を含むVH領域、SEQ ID NO:90に示されるアミノ酸配列を含むVL領域、SEQ ID NO:96に示されるアミノ酸配列を含むCH領域、およびSEQ ID NO:17に示されるアミノ酸配列を含むCL領域を含む、
項目90～115のいずれかの方法。
【0505】
117. （a）前記結合剤が、SEQ ID NO:35に示されるアミノ酸配列を含む重鎖およびSEQ ID NO:25に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含み;
（b）前記PD-L1阻害剤が、CD137およびPD-L1に結合する二重特異性抗体であり、該二重特異性抗体が、（i）SEQ ID NO:75に示されるアミノ酸配列を含む第1の重鎖およびSEQ ID NO:76に示されるアミノ酸配列を含む第1の軽鎖、ならびに（ii）SEQ ID NO:77に示されるアミノ酸配列を含む第2の重鎖およびSEQ ID NO:78に示されるアミノ酸配列を含む第2の軽鎖を有する、
項目90～116のいずれかの方法。
【0506】
118. （a）前記結合剤が、SEQ ID NO:35に示されるアミノ酸配列を含む重鎖およびSEQ ID NO:25に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含み;
（b）前記PD-L1阻害剤がアカスンリマブまたはそのバイオシミラーである、
項目90～117のいずれかの方法。
【0507】
119. 前記PD1/PD-L1阻害剤が、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、セミプリマブ、ドスタルリマブ、JTX-4014、スパルタリズマブ、カムレリズマブ、シンチリマブ、チスレリズマブ、トリパリマブ、INCMGA00012（MGA012）、AMP-224、AMP-514、またはそのそれぞれのバイオシミラーより選択されるPD1阻害剤である、項目1～38のいずれかの方法。
【0508】
120. 前記PD1阻害剤が、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、セミプリマブ、ドスタルリ

マブ、JTX-4014、スパルタリズマブ、カムレリズマブ、シンチリマブ、チスレリズマブ、トリパリマブ、INCMGA00012（MGA012）、AMP-514、またはそのそれぞれのバイオシミラーより選択される、項目1～38のいずれかの方法。

【０５０９】

121．前記PD1/PD-L1阻害剤が、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、KN035、CK-301、アカスンリマブ、AUNP12、CA-170、BMS-986189、またはそのそれぞれのバイオシミラーより選択されるPD-L1阻害剤である、項目1～38のいずれかの方法。

【０５１０】

122．前記PD-L1阻害剤が、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、KN035、CK-301、アカスンリマブ、またはそのそれぞれのバイオシミラーより選択される、項目1～38のいずれかの方法。

【０５１１】

123．前記対象がヒト対象である、前記項目のいずれかの方法。

【０５１２】

124．前記腫瘍またはがんが固形腫瘍である、前記項目のいずれかの方法。

【０５１３】

125．前記腫瘍がPD-L1陽性腫瘍である、前記項目のいずれかの方法。

【０５１４】

126．前記腫瘍またはがんが、頭頸部扁平上皮細胞癌（HNSCC）、例えば口腔、咽頭または喉頭のHNSCCである、前記項目のいずれかの方法。

【０５１５】

127．前記HNSCCが、再発性、切除不能性または転移性である、項目126の方法。

【０５１６】

128．前記腫瘍またはがんが、非小細胞肺がん（NSCLC）、例えば扁平上皮または非扁平上皮NSCLCである、項目1～125のいずれかの方法。

【０５１７】

129．前記NSCLCが、再発性、切除不能性または転移性である、項目128の方法。

【０５１８】

130．前記NSCLCが、上皮増殖因子（EGFR）増感性突然変異および/または未分化リンパ腫（ALK）転座および/またはROS1再編成を有しない、項目128または129の方法。

【０５１９】

131．前記NSCLCが、NTRK1/2/3（神経栄養因子受容体チロシンキナーゼ1/2/3）融合陽性であり、かつ/またはKRAS（KRASがん原遺伝子、GTPase）、BRAF（B-Rafがん原遺伝子、セリン/スレオニンキナーゼ）、もしくはMET（METがん原遺伝子、受容体チロシンキナーゼ）遺伝子中に突然変異を有し、かつ/またはRET（retがん原遺伝子）遺伝子再編成を有し、かつ前記対象が、それぞれの標的指向型療法での以前の処置を受けている、項目128～130のいずれかの方法。

【０５２０】

132．前記対象が、PD1阻害剤またはPD-L1阻害剤、例えば抗PD1抗体または抗PD-L1抗体、好ましくは少なくとも2用量のPD1阻害剤またはPD-L1阻害剤での以前の処置を受けている、前記項目のいずれかの方法。

【０５２１】

133．前記対象が、白金ベース療法、または白金が不適格な場合に代替的な化学療法、例えばゲムシタビン含有レジメンでの以前の処置を受けている、前記項目のいずれかの方法。

【０５２２】

134．前記腫瘍またはがんが、処置、例えばチェックポイント阻害剤での全身処置後に、再発および/または進行した腫瘍またはがんである、前記項目のいずれかの方法。

【０５２３】
１３５．前記対象が、全身療法、例えばＰＤ１阻害剤またはＰＤ-Ｌ１阻害剤、例えば抗ＰＤ１抗体または抗ＰＤ-Ｌ１抗体を含む全身療法の、少なくとも１つの以前のラインを受けている、前記項目のいずれかの方法。
【０５２４】
１３６．前記がんまたは腫瘍が、再発しているかつ/もしくは難治性であるか、または前記対象が、単剤療法としてもしくは併用療法の一部として投与されるＰＤ１阻害剤もしくはＰＤ-Ｌ１阻害剤、例えば抗ＰＤ１抗体もしくは抗ＰＤ-Ｌ１抗体での処置後に進行している、前記項目のいずれかの方法。
【０５２５】
１３７．以前の最後の処置が、単剤療法としてまたは併用療法の一部として投与されるＰＤ１阻害剤またはＰＤ-Ｌ１阻害剤、例えば抗ＰＤ１抗体または抗ＰＤ-Ｌ１抗体での処置であった、前記項目のいずれかの方法。
【０５２６】
１３８．ＰＤ１阻害剤またはＰＤ-Ｌ１阻害剤、例えば抗ＰＤ１抗体または抗ＰＤ-Ｌ１抗体での最後の処置における進行からの時間が６か月またはそれ未満である、前記項目のいずれかの方法。
【０５２７】
１３９．以前の最後の処置の一部としてのＰＤ１阻害剤またはＰＤ-Ｌ１阻害剤、例えば抗ＰＤ１抗体または抗ＰＤ-Ｌ１抗体の最後の投薬からの時間が６か月またはそれ未満である、前記項目のいずれかの方法。
【０５２８】
１４０．前記がんまたは腫瘍が、再発しているかつ/もしくは難治性であるか、または前記対象が、
（ｉ）抗ＰＤ１抗体もしくは抗ＰＤ-Ｌ１抗体での処置後のプラチナダブレット化学療法、または
（ｉｉ）プラチナダブレット化学療法後の抗ＰＤ１抗体もしくは抗ＰＤ-Ｌ１抗体での処置
の間または後に進行している、前記項目のいずれかの方法。
【０５２９】
１４１．（ｉ）ＣＤ２７に結合する少なくとも１つの結合領域を含む結合剤、および
（ｉｉ）ＰＤ１/ＰＤ-Ｌ１阻害剤
を含む、キット。
【０５３０】
１４２．前記結合剤が、項目１～１４０のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記ＰＤ１/ＰＤ-Ｌ１阻害剤が、項目１～１４０のいずれか一項において定義される通りである、項目１４１のキット。
【０５３１】
１４３．前記結合剤、前記ＰＤ１/ＰＤ-Ｌ１阻害剤、および存在する場合には１つまたは複数の追加の治療剤が、全身投与用、特に注射または注入用、例えば静脈内注射または注入用である、項目１４１または１４２のキット。
【０５３２】
１４４．対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法における使用のための、項目１４１～１４３のいずれかのキット。
【０５３３】
１４５．前記腫瘍またはがんが、項目１～１４０のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記対象が、項目１～１４０のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記方法が、項目１～１４０のいずれか一項において定義される通りである、項目１４４の使用のためのキット。
【０５３４】
１４６．（ｉ）ＣＤ２７に結合する少なくとも１つの結合領域を含む結合剤;

（ii）PD1/PD-L1阻害剤;および
（iii）任意で、薬学的に許容される担体
を含む、薬学的組成物。
【０５３５】
147．前記結合剤が、項目1～140のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記PD1/PD-L1阻害剤が、項目1～140のいずれか一項において定義される通りである、項目146の薬学的組成物。
【０５３６】
148．対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法における使用のための、項目146または147の薬学的組成物。
【０５３７】
149．前記腫瘍またはがんが、項目1～140のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記対象が、項目1～140のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記方法が、項目1～140のいずれか一項において定義される通りである、項目148の使用のための薬学的組成物。
【０５３８】
150．対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法における使用のための結合剤であって、該方法が、（i）CD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む該結合剤;および（ii）PD1/PD-L1阻害剤を該対象に投与する工程を含む、前記使用のための結合剤。
【０５３９】
151．前記方法が、項目1～140のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記結合剤が、項目1～140のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記PD1/PD-L1阻害剤が、項目1～140のいずれか一項において定義される通りである、項目150の使用のための結合剤。
【０５４０】
152．対象において腫瘍の進行を低減させるもしくは進行を予防するためまたはがんを処置するための方法における使用のためのPD1/PD-L1阻害剤であって、該方法が、（i）CD27に結合する少なくとも1つの結合領域を含む結合剤;および（ii）該PD1/PD-L1阻害剤を該対象に投与する工程を含む、前記使用のためのPD1/PD-L1阻害剤。
【０５４１】
153．前記方法が、項目1～140のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記結合剤が、項目1～140のいずれか一項において定義される通りであり、かつ/または前記PD1/PD-L1阻害剤が、項目1～140のいずれか一項において定義される通りである、項目152の使用のためのPD1/PD-L1阻害剤。
【０５４２】
本開示のさらなる局面が本明細書に開示される。
【実施例】
【０５４３】
実施例1：DuoBody-PD-L1x4-1BBならびに抗ヒトCD27抗体およびそのFcバリアントの生成
免疫化およびハイブリドーマ生成を通じた抗ヒトCD27抗体の生成はAldevron GmbH（Freiburg、Germany）において行った。ヒトCD27（全長およびECD）をコードするcDNAをAldevronの専有的な発現プラスミドにクローニングした。粒子衝撃用の携帯式デバイス（「遺伝子銃」）を使用するヒトCD27 cDNA被覆金粒子の皮内適用を使用した、OmniRat動物（完全ヒトイディオタイプを有する抗体の多様化されたレパートリーを発現するトランスジェニックラット；Ligand Pharmaceuticals Inc.）の免疫化により、抗CD27抗体を生成した。血清試料を免疫化のシリーズの後に収集し、全長ヒトCD27発現のために上述の発現プラスミドを一過的にトランスフェクトされたHEK細胞におけるフローサイトメトリーにより試験した。抗体産生細胞をラット脾臓から単離し、

標準的な手順に従ってマウス骨髄腫細胞（Ag8）と融合させた。CD27特異的抗体を産生するハイブリドーマからのRNAをシークエンシングのために抽出した。

【０５４４】

71のCD27抗体の一団から、6つの抗体をさらなる特徴付けのために初代T細胞に対する結合およびインビトロでのCD27結合競合アッセイにおける多様性に基づいて選択した。これらの6つの抗体は、本明細書においてIgG1-CD27-A、IgG1-CD27-B、IgG1-CD27-C、IgG1-CD27-D、IgG1-CD27-EおよびIgG1-CD27-Fと命名される。

【０５４５】

関心対象の重鎖および軽鎖の生産のために不利と考えられたアミノ酸残基（例えば、遊離システインまたはグリコシル化部位）を除去するための単一点変異を有する場合もある可変領域を遺伝子合成し、ヒト抗体軽鎖およびヒトIgG1重鎖のための骨格配列を含有する発現ベクターにクローニングした。

【０５４６】

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

【０５４７】

DuoBody-PD-L1x4-1BBは、一方のアームでPD-L1に結合し他方のアームで4-1BBに結合する（WO2021/156326A1）DuoBody技術プラットフォーム（WO2011131746A2）に基づく二重特異性抗体である。DuoBody-PD-L1x4-1BBは、親クローンIgG1-CD137-009-H7（HC SEQ ID NO:75;LC SEQ ID NO:76;HCDR1 SEQ ID NO:80、HCDR2 SEQ ID NO:81、HCDR3 SEQ ID NO:82、LCDR1 SEQ ID NO:84、LCDR2:GAS、LCDR3 SEQ ID NO:85）およびIgG1-PD-L1-547（HC SEQ ID NO:77;LC SEQ ID NO:78;HCDR1 SEQ ID NO:87、HCDR2 SEQ ID NO:88、HCDR3 SEQ ID NO:89、LCDR1 SEQ ID NO:91、LCDR2:DDN、LCDR3 SEQ ID NO:92）を使用して生成した。対照抗体として、抗HIV gp120抗体IgG1-b12を本出願において使用した（Barbas et al.,J Mol Biol 1993 230:812-823;VH:本出願のSEQ ID NO 68、VL:SEQ ID NO 72）。

【０５４８】

（表１）アミノ酸配列のリスト

SEQ ID NO:	識別名	アミノ酸配列
1	ヒトCD27	MARPHPWWLCVLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDCDQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLPARTLSTHWPPQRSLCSSDFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLHQRRKYRSNKGESPVEPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP
2	CD27-A59T バリアント	MARPHPWWLCVLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDCDQHRK**T**AQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTI

		TANAECACRNGWQCRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPYV SEMLEARTAGHMQTLADFRQLPARTLSTHWPPQRSLCSSDFIRILVIFSG MFLVFTLAGALFLHQRRKYRSNKGESPVEPAEPCHYSCPREEEGSTIPIQE DYRKPEPACSP
3	カニクイザル CD27	MARPHPWWLCFLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFL VKDCDQHRKAAQCHPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLIRNCTIT ANAVCACRNGWQCRDKECTECDPPPNPSLTTWPSQALGPHPQPTHLPYV NEMLEARTAGHMQTLADFRHLPARTLSTHWPPQRSLCSSDFIRILVIFSG MFLVFTLAGTLFLHQQRKYRSNKGESPMEPAEPCPYSCPREEEGSTIPIQE DYRKPEPASSP
4	CD27-A VH	QVQLMQSGSELKKPGASVKVSCRASGYTFTTYAMNWVRQAPGQGPEWM GWINTNTGNPTYAQGFTGRFVFSLDTTVTTTYLQISSLKAEDTAVYFCARE AGSFDYWGQGTLVTVSS
5	CD27-A VH CDR1	GYTFTTYA
6	CD27-A VH CDR2	INTNTGNP
7	CD27-A VH CDR3	AREAGSFDY
8	CD27-A VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVYYYNYVSWYQQHPGRAPKLVI YDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLRAEDEADYYCSSYTVNRVW VFGGGTKLTVL
9	CD27-A VL CDR1	SSDVYYYNY
10	CD27-A VL CDR2	DVS
11	CD27-A VL CDR3	SSYTVNRVWV
12	定常領域ヒト IgG1m(f)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
13	定常領域ヒト IgG1-E345R	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR**R**PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
14	定常領域ヒト IgG1-P329R	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKAL**R**APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
15	定常領域ヒト IgG1-delK	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE

	E345R+P329R	DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**R**APIEKTISKAKGQPR**R**PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
16	ヒトカッパLC	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
17	ヒトラムダLC	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
18	定常領域ヒトIgG1m(f)-delK	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
19	定常領域ヒトIgG1m(a)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKPVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
20	定常領域ヒトIgG1m(x)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKPVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEGLHNHYTQKSLSLSPGK
21	定常領域ヒトIgG2	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
22	定常領域ヒトIgG3	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK
23	定常領域ヒトIgG4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG

10 20 30 40 50

		FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
24	E345R+P329R を伴う CD27-A IgG1 HC	QVQLMQSGSELKKPGASVKVSCRASGYTFTTYAMNWVRQAPGQGPEWM GWINTNTGNPTYAQGFTGRFVFSLDTTVTTTYLQISSLKAEDTAVYFCARE AGSFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALRAPIEKTISKAKGQPRRPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
25	CD27-A LC	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVYYYNYVSWYQQHPGRAPKLVI YDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLRAEDEADYYCSSYTVNRVW VFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTV AWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQV THEGSTVEKTVAPTECS
26	マウス CD27	MAWPPPYWLCMLGTLVGLSATLAPNSCPDKHYWTGGGLCCRMCEPGTFF VKDCEQDRTAAQCDPCIPGTSFSPDYHTRPHCESCRHCNSGFLIRNCTVT ANAECSCSKNWQCRDQECTECDPPLNPALTRQPSETPSPQPPPTHLPHGT EKPSWPLHRQLPNSTVYSQRSSHRPLCSSDCIRIFVTFSSMFLIFVLGAILF FHQRRNHGPNEDRQAVPEEPCPYSCPREEEGSAIPIQEDYRKPEPAFYP
27	ヒト IgG1-Fc-E345R+P329R	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALRAPIEKTISKAKGQPRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
28	定常領域 ヒトIgG1m(f) (c末端リジンを有しない)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
29	定常領域 ヒトIgG1-E345R (c末端リジンを有しない)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
30	定常領域 ヒトIgG1-P329R (c末端リジンを有しない)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALRAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
31	定常領域ヒト IgG1m(a)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKPVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE

	(c末端リジンを有しない)	DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
32	定常領域ヒトIgG1m(x)(c末端リジンを有しない)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKPVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEGLHNHYTQKSLSLSPG
33	定常領域ヒトIgG2(c末端リジンを有しない)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
34	定常領域ヒトIgG3(c末端リジンを有しない)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPG
35	E345R+P329Rを伴うCD27-A IgG1 HC(c末端リジンを有しない)	QVQLMQSGSELKKPGASVKVSCRASGYTFTTYAMNWVRQAPGQGPEWMGWINTNTGNPTYAQGFTGRFVFSLDTTVTTTYLQISSLKAEDTAVYFCARE AGSFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**R**APIEKTISKAKGQPR**R**PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
36	ヒトIgG1-Fc-E345R+P329R(c末端リジンを有しない)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**R**APIEKTISKAKGQPR**R**PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
37	定常領域ヒトHC IgG1m(f)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
38	定常領域ヒト	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK

	HC IgG1m(f)-L234F-L235E-G236R およびバリアント	SCDKTHTCPPCPAPE**X₁X₂X₃**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG ここで、 **X₁** = A, V, L, I, P, F, M または W, 好ましくは I, P, F, M または W, より好ましくは F; **X₂** = L, D または E, 好ましくは D または E, より好ましくは E; **X₃** = Gではなく, 好ましくは K, R または H, より好ましくは R; 最も好ましくは **X₁X₂X₃** = FER
39	定常領域ヒト HC IgG1m(f)-L234F-L235E-G236R-K409R	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FER**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS**R**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
40	定常領域ヒト HC IgG1m(f)-E430G	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH**G**ALHNHYTQKSLSLSPG
41	定常領域ヒト HC IgG4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
42	定常領域ヒトカッパ LC	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
43	重鎖ヒト IgG1-LALA	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
44	HCDR 3 Kabat および IMGTの交差部分	AFYDDYDYNV

	(= Kabat)	
45	HCDR 3 IMGT	ARAFYDDYDYNV
46	HCDR 2 Kabat および IMGTの交差部分 （＝IMGT）	ISGGTIG
47	HCDR 2 Kabat	IISGGTIGHYASWAKG
	HCDR 1 Kabat および IMGTの交差部分	SYN
48	HCDR 1 Kabat	SYNMG
49	HCDR 1 IMGT	GFSLYSYN
50	LCDR 3 交差部分＝ Kabat＝ IMGT	AGGYSSSSDTT
	LCDR2 Kabat および IMGTの交差部分 （＝IMGT）	QAS
51	LCDR2 Kabat	QASKLET
52	LCDR1 Kabat および IMGTの交差部分 （＝IMGT）	QSVYGNNQ
53	LCDR1 Kabat	QSSQSVYGNNQLS
54	VH MAB-19-0202	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLYSYNMGWVRQAPGKGLEYIGIIS GGTIGHYASWAKGRFTISKTSSTTVDLKMTSLTTEDTATYFCARAFYDDY DYNVWGPGTLVTVSS
55	VL MAB-19-0202	AAVLTQTPSPVSAAVGGTVTISCQSSQSVYGNNQLSWYQQKPGQPPKLLI YQASKLETGVPSRFKGSGSGTQFTLTISDLESDDAATYYCAGGYSSSSDT TFGGGTEVVVK
56	VH IgG1-PD1 （MAB-19-0202に 由来するH5）	QVQLVESGGGLVQPGTSLRLSCSVS**GFSLYSYN**MGWVRQAPGKGLEYI GI**ISGGTIG**HYASWAKGRFTISRDTSKTTLYLQMNSLTTEDTATYFC**ARA FYDDYDYNV**WGPGTLVTVSS
57	VL IgG1-PD1 （MAB-19-0202に 由来するL4）	AIQLTQSPSSLSASVGGTVTITCQSS**QSVYGNNQ**LSWYQQKPGQPPKLL IY**QAS**KLETGVPSRFRGSGSGTQFTLTISSLQSEDFATYYC**AGGYSSSSD TT**FGGGTEVVVK
58	ヒトPD-1 完全	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGD NATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRV TQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTER

		RAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRAAR GTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTE YATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL
59	ヒトPD-1 完全 細胞外ドメイン	FLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPS NQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYL CGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLV
60	核酸 ヒトPD-1	agtttcccttccgctcacctccgcctgagcagtggagaaggcggcactctggtggggctgctc caggcatgcagatcccacaggcgccctggccagtcgtctgggcggtgctacaactgggctg gcggccaggatggttcttagactccccagacaggccctggaacccccccaccttctccccagc cctgctcgtggtgaccgaaggggacaacgccaccttcacctgcagcttctccaacacatcgg agagcttcgtgctaaactggtaccgcatgagccccagcaaccagacggacaagctggccgc cttccccgaggaccgcagccagcccggccaggactgccgcttccgtgtcacacaactgccca acgggcgtgacttccacatgagcgtggtcagggcccggcgcaatgacagcggcacctacct ctgtggggccatctccctggcccccaaggcgcagatcaaagagagcctgcgggcagagctc agggtgacagagagaagggcagaagtgcccacagcccaccccagcccctcacccaggcca gccggccagttccaaaccctggtggttggtgtcgtgggcggcctgctgggcagcctggtgct gctagtctgggtcctggccgtcatctgctcccgggccgcacgagggacaataggagccagg cgcaccggccagcccctgaaggaggacccctcagccgtgcctgtgttctctgtggactatgg ggagctggatttccagtggcgagagaagaccccggagccccccgtgccctgtgtccctgagc agacggagtatgccaccattgtctttcctagcggaatgggcacctcatcccccgcccgcaggg gctcagctgacggccctcggagtgcccagccactgaggcctgaggatggacactgctcttgg cccctctgaccggcttccttggccaccagtgttctgcagaccctccaccatgagcccgggtcag cgcatttcctcaggagaagcaggcagggtgcaggccattgcaggccgtccaggggctgagc tgcctgggggcgaccggggctccagcctgcacctgcaccaggcacagccccaccacaggac tcatgtctcaatgcccacagtgagcccaggcagcaggtgtcaccgtcccctacagggagggc cagatgcagtcactgcttcaggtcctgccagcacagagctgcctgcgtccagctccctgaatc tctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgcctgcggcccggggctgaaggcgccgtggccc tgcctgacgccccggagcctcctgcctgaacttgggggctggttggagatggccttggagca gccaaggtgcccctggcagtggcatcccgaaacgccctggacgcagggcccaagactggg cacaggagtgggaggtacatggggctggggactccccaggagttatctgctccctgcaggc ctagagaagtttcagggaaggtcagaagagctcctggctgtggtgggcagggcaggaaac ccctccacctttacacatgcccaggcagcacctcaggccctttgtggggcagggaagctgag gcagtaagcgggcaggcagagctggaggcctttcaggcccagccagcactctggcctcctg ccgccgcattccaccccagcccctcacaccactcgggagagggacatcctacggtcccaagg tcaggagggcagggctggggttgactcaggcccctcccagctgtggccacctgggtgttggg agggcagaagtgcaggcacctagggcccccccatgtgcccaccctgggagctctccttggaa cccattcctgaaattatttaaaggggttggccgggctcccaccagggcctgggtgggaaggt acaggcgttcccccggggcctagtacccccgccgtggcctatccactcctcacatccacacac tgcacccccactcctggggcagggccaccagcatccaggcggccagcaggcacctgagtgg ctgggacaagggatccccccttccctgtggttctattatattataattataattaaatatgagagc atgctaaggaaaa
61	VH CD52-CAMPATH-1H	QVQLQESGPGLVRPSQTLSLTCTVS**GFTFTDFY**MNWVRQPPGRGLEWI GF**IRDKAKGYTT**EYNPSVKGRVTMLVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYY C**AREGHTAAPFDY**WGQGSLVTVSS
62	VH CD52-CAMPATH-1H CDR1	GFTFTDFY

63	VH CD52-CAMPATH-1H CDR2	IRDKAKGYTT
64	VH CD52-CAMPATH-1H CDR3	AREGHTAAPFDY
65	VL CD52-CAMPATH-1H	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKAS**QNIDKY**LNWYQQKPGKAPKLLIY **NTN**NLQTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYC**LQHISRPRT**FG QGTKVEIK
66	VL CD52-CAMPATH-1H CDR1	QNIDKY
	VL CD52-CAMPATH-1H CDR2	NTN
67	VL CD52-CAMPATH-1H CDR3	LQHISRPRT
68	VH gp120-b12	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFVIHWVRQAPGQRFEWM GWINPYNGNKEFSAKFQDRVTFTADTSANTAYMELRSLRSADTAVYYCAR VGPYSWDDSPQDNYYMDVWGKGTTVIVSS
69	VH gp120-b12 CDR1	GYRFSNFV
70	VH gp120-b12 CDR2	INPYNGNK
71	VH gp120-b12 CDR3	ARVGPYSWDDSPQDNYYMDV
72	VL gp120-b12	EIVLTQSPGTLSLSPGERATFSCRSSHSIRSRRVAWYQHKPGQAPRLVIH GVSNRASGISDRFSGSGSGTDFTLTITRVEPEDFALYYCQVYGASSYTFG QGTKLERK
73	VL gp120-b12 CDR1	HSIRSRR
	VL gp120-b12 CDR2	GVS
74	VL gp120-b12-CDR3	QVYGASSYT
75	CD137-009 重鎖	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFSLNDYWMSWVRQAPGKGLEWV GYIDVGGSLYYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCARG GLTYGFDLWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
76	CD137-009 軽鎖	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISSYLAWYQQKPGKAPKRLIYG ASDLASGVPSRFSASGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCHYYATISGLGVAF GGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW

		KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
77	PD-L1-547 重鎖	EVQLLEPGGGLVQPGGSLRLSCEASGSTFSTYAMSWVRQAPGKGLEWVS GFSGSGGFTFYADSVRGRFTISRDSSKNTLFLQMSSLRAEDTAVYYCAIPA RGYNYGSFQHWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G
78	PD-L1-547 軽鎖	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYD DNDRPSGLPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVV FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVA WKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS
79	VH_CD137-009-H7	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFSLNDYWMSWVRQAPGKGLEWV GYIDVGGSLYYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCARG GLTYGFDLWGQGTLVTVSS
80	VH_CD137-009-H7_CDR1	GFSLNDYW
81	VH_CD137-009-H7_CDR2	IDVGGSL
82	VH_CD137-009-H7_CDR3	ARGGLTYGFDL
83	VL_CD137-009-L2	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISSYLAWYQQKPGKAPKRLIYG ASDLASGVPSRFSASGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCHYYATISGLGVAF GGGTKVEIK
84	VL_CD137-009-L2_CDR1	EDISSY
	VL_CD137-009-L2_CDR2	GAS
85	VL_CD137-009-L2_CDR3	HYYATISGLGVA
86	VH-PD-L1-547	EVQLLEPGGGLVQPGGSLRLSCEASGSTFSTYAMSWVRQAPGKGLEWVS GFSGSGGFTFYADSVRGRFTISRDSSKNTLFLQMSSLRAEDTAVYYCAIPA RGYNYGSFQHWGQGTLVTVSS
87	VH- PD-L1-547-CDR1	GSTFSTYA
88	VH- PD-L1-547-CDR2	FSGSGGFT
89	VH- PD-L1-547-CDR3	AIPARGYNYGSFQH
90	VL- PD-L1-547	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYD DNDRPSGLPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVV FGGGTKLTVL
91	VL- PD-L1-547-CDR1	NIGSKS

	VL- PD-L1-547-CDR2	DDN
92	VL- PD-L1-547-CDR3	QVWDSSSDHVV
93	IgG1-FEAR-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV**A**VSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS**R**LTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
94	IgG1-FEAL-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV**A**VSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF**L**LYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
95	C末端リジンを有しない IgG1-FEAR-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV**A**VSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS**R**LTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
96	C末端リジンを有しない IgG1-FEAL-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV**A**VSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF**L**LYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
97	ヒトCD137（UniProtKB-Q07011；成熟配列）	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVF RTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDC CFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGA SSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYI FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
98	ヒトPD-L1（UniProtKB-Q9NZQ7；成熟配列）	FTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVH GEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYG GADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPVTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSS DHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTA ELVIPELPLAHPPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQ DTNSKKQSDTHLEET
99	ペムブロリズマブ VH CDR1	GYTFTNYY
100	ペムブロリズマブ VH CDR2	INPSNGGT
101	ペムブロリズマブ VH CDR3	ARRDYRFDMGFDY
102	ペムブロリズマブ VL CDR1	KGVSTSGYSY

	ペムブロリズマブ VL CDR2	LAS
103	ペムブロリズマブ VL CDR3	QHSRDLPLT
104	ペムブロリズマブ VH	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWM GGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCAR RDYRFDMGFDYWGQGTTVTVSS
105	ペムブロリズマブ VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRL LIYLASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTF GGGTKVEIK
106	ペムブロリズマブ 重鎖	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWM GGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCAR RDYRFDMGFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGLTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTK TYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
107	ペムブロリズマブ 軽鎖	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRL LIYLASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTF GGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
108	ニボルマブ重鎖	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWV AVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCAT NDDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
109	ニボルマブ軽鎖	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDA SNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
110	アテゾリズマブ 重鎖	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWV AWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR RHWPGGFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY ASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK

111	アテゾリズマブ軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
112	MAB-19-0202-HC FR1	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLY
113	MAB-19-0202-HC FR2	WVRQAPGKGLEYIG
114	MAB-19-0202-HC FR3	RFTISKTSSTTVDLKMTSLTTEDTATYFCAR
115	MAB-19-0202-HC FR4	WGPGTLVTVSS
116	MAB-19-0202-LC FR1	AAVLTQTPSPVSAAVGGTVTISC
117	MAB-19-0202-LC FR2	WYQQKPGQPPKLLIY
118	MAB-19-0202-LC FR3	GVPSRFKGSGSGTQFTLTISDLESDDAATYYC
119	MAB-19-0202-LC FR4	FGGGTEVVVK
120	MAB-19-0202-H5 FR1	QVQLVESGGGLVQPGTSLRLSCSVSGFSLY
121	MAB-19-0202-H5 FR2	WVRQAPGKGLEYIG
122	MAB-19-0202-H5 FR3	RFTISRDTSKTTLYLQMNSLTTEDTATYFCAR
123	MAB-19-0202-H5 FR4	WGPGTLVTVSS
124	MAB-19-0202-L4 FR1	AIQLTQSPSSLSASVGGTVTITC
125	MAB-19-0202-L4 FR2	WYQQKPGQPPKLLIY
126	MAB-19-0202-L4 FR3	GVPSRFRGSGSGTQFTLTISSLQSEDFATYYC
127	MAB-19-0202-L4 FR4	FGGGTEVVVK
128	定常領域 ヒトHC IgG1m(f)-L234F-L235E-G236R	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPE**FER**GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
129	ヒトPD-L1（UniProtKB-Q9NZQ7; シグナルペプチド配列: aa 1～18を含む）	MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECFPVEKQLDLAA LIVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQIT DVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPVTSEHE LTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTT NEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPPNERTHLVILGAILLCLGVALTF IFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET

130	ヒトCD137（UniProtKB-Q07011；シグナルペプチド配列：aa 1～23を含む）	MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPP NSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGC SMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVL VNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTA LLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE GGCEL
131	IgG1-CD27-A-P329R-E345R-LNluc	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVYYYNYVSWYQQHPGRAPKLVI YDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLRAEDEADYYCSSYTVNRVW VFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTV AWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQV THEGSTVEKTVAPTECS**SLGSSGVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLE QGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQ MGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPY EGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGVTG WRLCERILA**
132	IgG1-CD27-A-P329R-E345R-LHalo	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVYYYNYVSWYQQHPGRAPKLVI YDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLRAEDEADYYCSSYTVNRVW VFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTV AWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQV THEGSTVEKTVAPTECS**SLEPTTEDLYFQSDNDGSEIGTGFPFDPHY VEVLGERMHYVDVGPRDGTPVLFLHGNPTSSYVWRNIIPHVAPT HRCIAPDLIGMGKSDKPDLGYFFDDHVRFMDAFIEALGLEEVVLVI HDWGSALGFHWAKRNPERVKGIAFMEFIRPIPTWDEWPEFARET FQAFRTTDVGRKLIIDQNVFIEGTLPMGVVRPLTEVEMDHYREPFL NPVDREPLWRFPNELPIAGEPANIVALVEEYMDWLHQSPVPKLLF WGTPGVLIPPAEAARLAKSLPNCKAVDIGPGLNLLQEDNPDLIGS EIARWLSTLEISG**
133	IgG1-b12-P329R-E345R-LNLuc	EIVLTQSPGTLSLSPGERATFSCRSSHSIRSRRVAWYQHKPGQAPRLVIH GVSNRASGISDRFSGSGSGTDFTLTITRVEPEDFALYYCQVYGASSYTFG QGTKLERKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC**SLGSSGVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLE QGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQ MGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPY EGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGVTG WRLCERILA**
134	IgG1-b12-P329R-E345R-LHalo	EIVLTQSPGTLSLSPGERATFSCRSSHSIRSRRVAWYQHKPGQAPRLVIH GVSNRASGISDRFSGSGSGTDFTLTITRVEPEDFALYYCQVYGASSYTFG QGTKLERKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC**SLEPTTEDLYFQSDNDGSEIGTGFPFDPHYV EVLGERMHYVDVGPRDGTPVLFLHGNPTSSYVWRNIIPHVAPTH RCIAPDLIGMGKSDKPDLGYFFDDHVRFMDAFIEALGLEEVVLVIH DWGSALGFHWAKRNPERVKGIAFMEFIRPIPTWDEWPEFARETF QAFRTTDVGRKLIIDQNVFIEGTLPMGVVRPLTEVEMDHYREPFL NPVDREPLWRFPNELPIAGEPANIVALVEEYMDWLHQSPVPKLLF WGTPGVLIPPAEAARLAKSLPNCKAVDIGPGLNLLQEDNPDLIGS EIARWLSTLEISG**
135	IgG1-CD27-A-LNLuc	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVYYYNYVSWYQQHPGRAPKLVI YDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLRAEDEADYYCSSYTVNRVW VFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTV AWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQV

		THEGSTVEKTVAPTECS**SLGSSGVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLE QGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQ MGQIEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPY EGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGVTG WRLCERILA**
136	IgG1-CD27-A-LHalo	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVYYYNYVSWYQQHPGRAPKLVI YDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLRAEDEADYYCSSYTVNRVW VFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTV AWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQV THEGSTVEKTVAPTECS**SLEPTTEDLYFQSDNDGSEIGTGFPFDPHY VEVLGERMHYVDVGPRDGTPVLFLHGNPTSSYVWRNIIPHVAPT HRCIAPDLIGMGKSDKPDLGYFFDDHVRFMDAFIEALGLEEVVLVI HDWGSALGFHWAKRNPERVKGIAFMEFIRPIPTWDEWPEFARET FQAFRTTDVGRKLIIDQNVFIEGTLPMGVVRPLTEVEMDHYREPFL NPVDREPLWRFPNELPIAGEPANIVALVEEYMDWLHQSPVPKLLF WGTPGVLIPPAEAARLAKSLPNCKAVDIGPGLNLLQEDNPDLIGS EIARWLSTLEISG**
137	IgG1-CD20-11B8-E430G-LNLuc	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDA SNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSDWPLTFGGG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC**SLGSSGVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGG VSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQ IEKIFKVVYPVDDHHFKVILHYGTLVIDGVTPNMIDYFGRPYEGIA VFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLLFRVTINGVTGWRL CERILA**
138	IgG1-CD37-37.3-E430G-LHalo	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIRSNLAWYQQKQGKSPQLLVNV ATNLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGTYYCQHYWGTTWTFG GGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC**SLEPTTEDLYFQSDNDGSEIGTGFPFDPHYVE VLGERMHYVDVGPRDGTPVLFLHGNPTSSYVWRNIIPHVAPTHR CIAPDLIGMGKSDKPDLGYFFDDHVRFMDAFIEALGLEEVVLVIHD WGSALGFHWAKRNPERVKGIAFMEFIRPIPTWDEWPEFARETFQ AFRTTDVGRKLIIDQNVFIEGTLPMGVVRPLTEVEMDHYREPFLNP VDREPLWRFPNELPIAGEPANIVALVEEYMDWLHQSPVPKLLFW GTPGVLIPPAEAARLAKSLPNCKAVDIGPGLNLLQEDNPDLIGSEI ARWLSTLEISG**
139	IgG1-PD1 重鎖	QVQLVESGGGLVQPGTSLRLSCSVS**GFSLYSYN**MGWVRQAPGKGLEYI GI**ISGGTIG**HYASWAKGRFTISRDTSKTTLYLQMNSLTTEDTATYFC**ARA FYDDYDYNV**WGPGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FER**GPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G
140	IgG1-PD1 軽鎖	AIQLTQSPSSLSASVGGTVTITCQSS**QSVYGNNQ**LSWYQQKPGQPPKLL IY**QAS**KLETGVPSRFRGSGSGTQFTLTISSLQSEDFATYYC**AGGYSSSSD TT**FGGGTEVVVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０５４９】

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

Ｅ３４５ＲまたはＥ４３０Ｇ六量体化増強性Ｆｃ変異を有するおよび有しない異なる抗ＣＤ２７抗体のＣＤ２７アゴニスト活性を、ＣＤ２７ Ｔｈａｗ ａｎｄ Ｕｓｅ Ｂｉｏａｓｓａｙ ｋｉｔ（Ｐｒｏｍｅｇａ、Ｃｕｓｔｏｍ Ａｓｓａｙ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ、ＣＡＳ＃ＣＳ１９７９Ａ２５）を使用して測定した。キットは、ヒトＣＤ２７の構成的な発現と共にＮＦ-κＢ応答エレメントの制御下でホタルルシフェラーゼ遺伝子を発現するＮＦ-κＢレポーター-Ｊｕｒｋａｔ組換え細胞を含有し、これを本質的に製造者の使用説明書に従って使用した。簡潔に述べれば、Ｔｈａｗ-ａｎｄ-Ｕｓｅ ＧｌｏＲｅｓｐｏｎｓｅ ＮＦκＢ-ｌｕｃ２/ＣＤ２７細胞を解凍し、９６ウェル平底培養プレート（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ、カタログ＃

6005680）中、Bio-Glo Luciferase Assay Buffer中の抗体希釈系列（最終濃度範囲0.04～20μg/mL）と37℃、5％CO_2で6hインキュベートした。抗CD27抗体は、野生型（WT＊）IgG1-CD27-A、IgG1-CD27-B、IgG1-CD27-C、IgG1-CD27-D、IgG1-CD27-E、IgG1-CD27-F、およびE430GまたはE345R変異を宿す各々のバリアントであった。抗CD27ベンチマーク抗体は、IgG1-CD27-131A（WTおよびE430Gバリアント）ならびに非六量体化IgG1-CD27-15（IgG1-CD27-15-P329R-E345R-K439E；六量体化を予防するFc変異の組合せを有し、そのため変異はこの実験の文脈において機能的に関連せず、したがって図中でWTと称される）ならびにE345R変異を含むIgG1-CD27-15の六量体化バリアントであった。抗HIV gp120ヒト抗体、IgG1-b12-E345Rを非結合性陰性対照抗体（対照）として使用した。抗体のインキュベーション後に、Bio-Glo Luciferase Assay Reagent（RTに平衡化した）を各々のウェルに加え、RTで5～10分間インキュベートした。EnVision Multilabel Reader（PerkinElmer）を使用して発光を測定し、GraphPad Prismソフトウェアを使用して生成された棒図表において相対発光単位（RLU）として提示した。

【０５５０】

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

【０５５１】

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

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

【０５５２】

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

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

【０５５３】

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

【０５５４】

カニクイザルCD27についてのCD27抗体の親和性を評価するために、5μg/mLの組

換えカニクイザルCD27-Fc融合タンパク質（R&D systems、カタログ＃9904-CD-100）を、活性化されたAmine Reactive 2nd Generation（AR2G）バイオセンサー（ForteBio、カタログ＃18-5092）にロードした。

【０５５５】

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

【０５５６】

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

【０５５７】

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

【０５５８】

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

【０５５９】

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

【０５６０】

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

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

＊:結合が観察されたが、KD、k_{on}およびk_{dis}は、1:1モデルを使用して信頼できない解釈を結果としてもたらす、最適以下の曲線フィッティングに起因して低い信頼性の値である。
n.b.:結合は観察されなかった。
【０５６１】
実施例4：細胞表面に発現されるヒトおよびカニクイザルのCD27に対する抗CD27抗体の結合
細胞表面に発現されるヒトおよびカニクイザルのCD27に対する抗CD27抗体IgG1-CD27-A～-E＊および先行技術のIgG1-CD27-131A＊の結合を、一過的にトランスフェクトされたHEK293F細胞およびCD27を内因性に発現する初代T細胞を使用してフローサイトメトリーにより分析した。非結合性対照抗体IgG1-b12-FEARを陰性対照抗体として使用した。
【０５６２】
製造者の使用説明書に従って293fectin Transfection Reagent（ThermoFisher、カタログ＃12347019）を使用して、FreeStyle 293-F懸濁細胞（HEK293F；ThermoFisher、カタログ＃R79007）を、全長ヒトまたはカニクイザルCD27をコードする哺乳動物発現ベクターpSBを用いて一過的にトランスフェクトした。
【０５６３】
ヒトおよびカニクイザルのPBMCを、ヒト健常ドナー（Sanquin Blood Bank、the Netherlands）またはカニクイザル（BPRC、the Netherlands、カタログ＃S-1135）から得られたバフィコートから、製造者の使用説明書に従ってLymphocyte Separation Medium（LSM；Corning、カタログ＃25-072CV）を使用して低密度勾配遠心分離により精製した。
【０５６４】
PBS（Lonza、カタログ＃BE17-517Q）＋1％BSA（Roche、カタログ＃10735086001）＋0.02％アジ化ナトリウム（Bio-World、カタログ＃41920044-3）からなるFACS緩衝液を用いる洗浄工程を間に伴う逐次的なインキュベーションのために細胞を96ウェルプレート（100,000細胞/ウェル；Greiner Bio-one、カタログ＃650180）に播種した。以下のインキュベーションを適用した:抗体濃度系列（0.0001～10μg/mLの最終濃度）を4℃で30分間；生/死マーカーFVS510（BD、カタログ＃564406、PBS中1:1,000の希釈）をRTで20分間；PE標識ポリクローナルヤギ抗ヒトIgG（Jackson Immuno Research、カタログ＃109-116-098、1:500の希釈）を4℃で30分間；およびT細胞同定のための抗CD3抗体（抗ヒトCD3:BD、カタログ＃555335、1:10の希釈；抗カニクイザルCD3:Miltenyi、カタログ＃130-091-998、1:10の希釈）を4℃で30分間。すべての試料をFACSCelestaフローサイトメーター（BD）およびFlowJoソフトウェアにおいて分析した。GraphPad Prismを使用してデータを処理および可視化した。
【０５６５】
すべての試験された抗体は、ヒトT細胞およびトランスフェクトされたHEK293F細胞の両方において、ヒトCD27に対する用量依存的な結合を示した（図2A、図2B）。IgG1-CD27-AおよびIgG1-CD27-131Aについての中間的な結合、ならびにIgG1-CD27-DおよびIgG1-CD27-Eについての低い結合と比較して、最も高い最大の結合がIgG1-CD27-BおよびIgG1-CD27-Cについて観察され、差異はヒトT細胞を使用して最も著しかった。カニクイザルCD27 T細胞に対する結合について、最も高い結合がIgG1-CD27-Bについて観察され、続いてIg1-CD27-131AおよびIgG1-CD27-Aであった。より低い結合がIgG1-CD27-Dおよび-Eについて観察された一方、IgG1-CD27-Cはカニクイザル T細胞に対する最小の結合を示した。すべてのCD27抗体は、カニクイザルCD27をトランスフェクトされたHEK細胞に対する用量依存的な結合を示した。最も高い最大の結合がIgG1-CD27-BおよびIgG1-CD27-131-Aについて観察され、いくぶんより低い結合がIgG1-CD27-A、-Dおよび-Eについて観察された。IgG1-CD27-Cは、カニクイザ

ルCD27をトランスフェクトされたHEK細胞に対する最も低い結合を示した（図2C、図2D）。

【０５６６】

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

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

【０５６７】

実施例5：天然ヒトCD27-A59Tバリアントに対する抗CD27抗体の結合

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

【０５６８】

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

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

【０５６９】

実施例6：抗CD27抗体によるヒトT細胞増殖の誘導

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

【０５７０】

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

【０５７１】

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

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

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

【０５７２】

PBMCをPBS中に5×10^6細胞/mLの密度で再懸濁し、製造者の使用説明書に従ってCellTrace CFSE Cell Proliferation Kit（Invitrogen、カタログ＃C34564；1:10,000）を使用してCFSEで標識した。CFSE標識されたPBMC（100,000細胞/ウェル）を、96ウェル丸底プレート（Greiner Bio-one、カタログ＃650180）中、5%Normal Human Serum（NHS；Sanquin、製品＃B0625）を補充したT-cell Activation Medium（ATCC、カタログ＃80528190）中で、T細胞を活性化させるための0.1μg/mLの抗CD3抗体クローンUCHT1（Stemcell Technologies、カタログ＃60011）、およびCD27抗体（1μg/mLの最終濃度）と共に、37℃/5%CO_2で96hインキュベートした。フローサイトメトリーによる$CD4^+$および$CD8^+$T細胞サブセット中の生存細胞の同定のために、細胞を生/死マーカーFVS510（1:1,000）とRTで20分間、ならびにAPC-eFluor780標識された抗ヒトCD4抗体（Invitrogen、カタログ＃47-0048-42、1:50）、AlexaFluor700標識された抗ヒトCD8a抗体（BioLegend、カタログ＃301028；1:100）、PE-Cy7標識されたマウス抗ヒトCD14抗体（BD Biosciences、カタログ＃557742；1:50）およびBV785標識された抗ヒトCD19抗体（BioLegend、カタログ＃363028；1:50）を含有するリンパ球マーカー用の染色ミックスと4℃の暗所中で30分間、逐次的にインキュベートした。試料をFACSCelesta（BD Biosciences）フローサイトメーターで測定し、生存$CD4^+$および$CD8^+$T細胞サブセット（$FVS510^-CD14^-CD19^-CD4^+$および$FVS510^-CD14^-CD19^-CD8^+$）におけるCFSE希釈ピークを、FlowJo 10ソフトウェアを使用してT細胞増殖についてのリードアウトとして分析した。両方ともFlowJoソフトウェア（バージョン10）を使用することにより算出された細胞の増殖のパーセンテージまたは分裂指数としてT細胞増殖を表した。細胞の増殖（分裂）のパーセンテージは、CFSE希釈を経た細胞（$CFSE^{low\ peaks}$）についてゲーティングすることにより決定した。分裂指数は、細胞が経た分裂の平均数である。GraphPad Prismバージョン8を使用してヒートマップを生成した。4人の異なる健常ドナーからのPBMCを使用して増殖アッセイを行った。

【０５７３】
E430GまたはE345R変異を有するIgG1-CD27-A、-Bおよび-Cのバリアントは、試験された4人のドナーのうちの2人において対照抗体と比較してCD8＋T細胞の増殖における小さい増加を誘導した。E430G変異を有するIgG1-CD27-A、-Bまたは-Cバリアントへの追加の変異（P329R、G237AまたはK326A/E333A）の導入は、4人のPBMCドナーにわたりCD8＋T細胞増殖における変動する効果を示した。対照的に、E345R変異を有するIgG1-CD27-AおよびIgG1-CD27-CバリアントへのP329R変異の導入は、活性化CD8＋T細胞の増殖を増強する能力を一貫して増加させた。これはIgG1-CD27-Aに特に該当し、測定されたCD8＋T細胞増殖は、ドナーの各々においてIgG-CD27-A-E345R、IgG1-CD27-B-E345RおよびIgG1-CD27-C-E345Rについて同等であった一方、追加のP329R変異の導入は、IgG1-CD27-B-E345RまたはIgG1-CD27-C-E345Rと比較してクローンIgG1-CD27-A-E345RについてCD8＋T細胞増殖におけるより高い増加に一貫して繋がった。そのため、TCR活性化CD8＋T細胞の増殖におけるP329R変異と組み合わせたE345R変異の効果は、IgG1-CD27-BおよびIgG1-CD27-Cよりもクローンについて一貫してより大きかった。試験されたすべての抗体バリアントにわたり、IgG1-CD27-A-E345R-P329Rは、すべてのドナーにおいてCD8＋T細胞増殖における最大の増加を誘導した（図4A）。

【０５７４】
E345R変異を有するCD27抗体バリアントへの変異G237AまたはK326A-E333Aの追加は、単一変異E345Rを含む抗体と比較して、試験されたクローンのいずれにおいてもCD8＋T細胞の増殖を増加させなかったか、または最小にのみ増加させた（図4A）。

【０５７５】
CD4＋T細胞においても、T細胞増殖における最も高いかつ最も一貫した増加は、IgG1-CD27-A-E345R-P329Rの存在下で観察された（図4B）。CD4＋T細胞増殖は、E430GまたはE345R変異のみを有するIgG1-CD27-A、-Bおよび-Cバリアントの間で概して同等であった一方、追加のP329R変異の導入は、IgG1-CD27-A-E430GまたはE430GもしくはE345R変異のいずれかを有するIgG1-CD27-Bもしくは-Cバリアントと比較して、E345Rバリアントを有するIgG1-CD27-AバリアントについてCD4＋T細胞増殖におけるより大きい増加に繋がった。この効果は、試験された4人のドナーのうちの3人において観察された。ドナー1において、CD4＋T細胞増殖におけるE430GまたはE345Rに加えた追加の変異の効果は一般に小さく、このドナーにおいて観察された効果は他の3人のドナーにおいて再現されなかった。

【０５７６】
P329R変異とのE345Rの組合せはまた、IgG1-CD27-CについてCD4＋T細胞増殖を一貫して増加させたが、単独でのE345R変異と、E345RとP329Rとの組合せとの間の差異は、クローン-Aについてよりもクローンについてより小さかった。クローンIgG1-CD27-Bについて、CD4＋T細胞増殖における控えめな増加が、4人のドナーのうちの2人においてIgG1-CD27-B-E345Rと比較してIgG1-CD27-B-E345R-P329Rについて観察された。

【０５７７】
E430G変異を有するIgG1-CD27-A、-B、または-CバリアントへのP329R、G327AまたはK326A/E333A変異の導入は、CD4＋T細胞増殖において効果を誘導しなかったか、または誘導が一貫していなかった。同様に、E345R変異を有するIgG1-CD27-A、-Bまたは-CバリアントにおけるG327AまたはK326A/E333Aの導入後に効果は観察されなかったか、または一貫しない効果が観察された。

【０５７８】
要約すると、IgG1-CD27-A-E345R-P329Rは、活性化CD8＋およびCD4＋T細胞の増殖において最も高い増加を一貫して誘導し、IgG1-CD27-A-E345R-P329Rは最も効率的なCD27アゴニズムを誘導することを実証した。P329R変異を有するDR5特異的、六量体化増強抗体は、P329R変異を有しないDR5特異的六量体化増強抗体と比較して、

DR5アゴニズムを誘導する能力の低減を以前に示した（Overdijk et al,Mol Canc Ther 2020）。そのため、IgG1-CD27-AにおけるE345R変異に加えてP329R変異を導入することがCD27アゴニスト活性を増強することは驚くべきことと考えられた。さらに、E345R＋P329R変異の組み合わせられた効果がIgG1-CD27-BまたはIgG1-CD27-CよりもIgG1-CD27-Aについて一貫してより大きかった理由は知られていない。

【０５７９】

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

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

【０５８０】

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

【０５８１】

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

【０５８２】

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

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

【０５８３】

実施例8：膜結合型CD27抗体に対するC1qの結合

P329R変異は、C1qおよびFcγRとのIgG1抗体の相互作用を低減させることが以前に記載された（Overdijk et al,Molecular Cancer Therapeutics 2020）。E345R変異を含むIgG1-CD27-AのC1q結合に対するP329R変異の効果を、ヒト健常ドナーT細胞を使用してインビトロで細胞C1q結合アッセイにおいて試験した。抗HIV gp120抗体IgG1-b12-F405Lを非結合性アイソタイプ対照抗体（対照）として使用した。RosetteSep Human T cell Enrichment cocktail（Stemcell、カタログ＃15061）を使用してヒト健常ドナーPBMCからT細胞を濃縮し、0.1％BSAおよび1％Pen/Strep［Lonza、カタログ＃DE17-603E］）を補充した培養培地（RPMI 1640［Gibco、カタログ＃A10491-01］に再懸濁した。T細胞（2×10^{6}細胞/ウェル）を、抗体希釈系列（15μg/mLの最終アッセイ濃度で開始した8回の5倍希釈）を含むポリスチレン96ウェル丸底プレート中37℃で15分間プレインキュベートして、抗体をT細胞に結合させた。次に、細胞を氷上で冷却し、ヒトC1qの供給源としてNHSを補充し（20％NHSの最終ア

ッセイ濃度）、氷上で45分間インキュベートした。細胞を引き続いて、FITC標識されたウサギ抗ヒトC1q抗体（DAKO、カタログ＃F0254；20μg/mL）と氷上で30分間インキュベートし、TO-PRO-3（ThermoFisher、カタログ＃T3605；1:5,000の希釈）を含むFACS緩衝液に再懸濁した。生細胞におけるFITCシグナルを測定するフローサイトメトリーによりC1q結合を決定した。

【０５８４】

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

【０５８５】

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

【０５８６】

実施例9：ヒトFc受容体に対する抗CD27抗体の結合

ヒトFcγRバリアントに対するIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの結合を、Biacore表面プラズモン共鳴（SPR）システムを使用して分析し、抗HIV gp120抗体IgG1-b12（対照）と比較した。製造者の使用説明書に従ってアミン-カップリングおよびHis捕捉キット（Cytiva、カタログ＃BR100050およびカタログ＃29234602）を使用してBiacore Series S Sensor Chips CM5（Cytiva、カタログ＃29104988）を抗His抗体で共有結合的に被覆した。次に、HBS-P＋（Cytiva、カタログ＃BR100827）中の125nMのFcγ受容体FcγRIa、FcγRIIa（167-His［H］および167-Arg［R］）、FcγRIIbまたはFcγRIIIa（176-Phe［F］および176-Val［V］）（Sino Biological、カタログ＃10256-H08S-B、カタログ＃10374-H27H、カタログ＃10374-H27H1-B、カタログ＃10259-H27H-B、カタログ＃10389-H27H-Bおよびカタログ＃10389-H27H1-B）を表面上に捕捉させた。3サイクルの緩衝液の後に、抗体試料を36サイクルにわたり注入して、FcγRIについて0～3,000nMおよび他のFcγRについて0～10,000nMの抗体範囲を使用して結合曲線を生成した。FcR被覆表面（活性表面）上で分析された各々の試料を、バックグラウンド補正のために使用されたFcRを有しない並列フローセル（参照表面）上でも分析した。10mMのグリシン-HCl（pH 1.5）（Cytiva、カタログ＃BR100354）を使用して表面の再生により抗His被覆表面からの解離を行った。Biacore Insight Evaluationソフトウェア（Cytiva）を使用してセンサーグラムを生成し、4パラメーターロジスティック（4PL）フィットを適用して、参照試料（対照）に対するIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの相対的な結合を算出した。

【０５８７】

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

【０５８８】

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

【０５８９】

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

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

【０５９０】

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

【０５９１】

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

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

【０５９２】

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

【０５９３】
Thaw-and-Use effector FcγRIIb CHO-K1細胞（Promega、カタログ＃JA2251）を、希釈せずにまたは3つの増加性希釈（1/3、1/9、1/27）で、96ウェル平底培養プレート（PerkinElmer、カタログ＃0815）にプレーティングし、37℃/5％CO_2で終夜インキュベートした。抗体の段階希釈（最終濃度範囲0.0002～10μg/mL）を含有する、Bio-Glo Luciferase Assay Buffer中の固定された細胞濃度（非希釈FcγRIIb CHO-K1細胞についての1:1のNFκB-luc2/CD27 Jurkat:FcγRIIb CHO-K1比で開始する）のThaw-and-Use NFκB-luc2/CD27 Jurkat細胞懸濁液により接着FcγRIIb発現細胞の上清を置き換えた。37℃/5％CO_2での6hのインキュベーション後に、プレートをRTに平衡化し、生物発光を測定し、実施例2に記載されるようにRLUとして提示した。

【０５９４】
IgG1-CD27-A-P329R-E345Rは、FcγRIIb発現細胞に非依存的に、用量依存的なCD27活性化を誘導した（図9A）。対照的に、E345R六量体化増強性変異およびP329R変異を有しない、対応するWT抗体IgG1-CD27-Aは、FcγRIIb発現細胞の存在下でのみCD27アゴニズムを示した（図9A～図9E）。同様に、先行技術抗体IgG1-CD27-131A、IgG1-CD27-CDX1127およびIgG1-CD27-BMS986215によるCD27活性化もまたFcγRIIb発現細胞の存在に依存し、NFκB-luc2/CD27 Jurkat:FcγRIIb CHO-K1比の減少と共に徐々に減少した（図9F～図9J）。

【０５９５】
結論として、これらのデータは、IgG1-CD27-A-P329R-E345Rは二次的なFcγR媒介性架橋に非依存的にCD27アゴニズムを誘導できることを指し示す。これは、CD27アゴニズムを誘導するためにFcγR保有細胞の存在に依存した先行技術の抗CD27抗体とは対照的である。
＊IgG1-CD27-131AおよびIgG1-CD27-BMS986215のために、この実験の文脈において機能的に関連しない、F405L変異を有するバリアントを使用した。

【０５９６】
実施例12：マウスにおいて研究された、標的結合の非存在下での抗CD27抗体IgG1-CD27-A-P329R-E345Rの薬物動態（PK）分析
標的結合の非存在下での、抗CD27抗体IgG1-CD27-A-P329R-E345R＊の薬物動態特徴をマウスにおいて分析し、対応するWT抗体IgG1-CD27-A＊と比較した。IgG1-CD27-Aはマウスに結合せず（実施例3、表2）、したがって、標的結合の非存在下で、インビボでIgG1-CD27-AおよびIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの薬物動態挙動を試験するために実験を設計した。研究は、Crown Bioscience（China）により、有資格の職員により、承認されたIACUCプロトコールおよびCrown Bioscience,Inc.Standard Operating Proceduresに従って実行した。11～12週齢の雌SCIDマウス（C.B-17、Vital River Laboratory Animal Technology Co.,Ltd.（VR、Beijing、China；3匹のマウス/群）の静脈内に500μgの抗体（25mg/kg）を200μLの注射体積で注射した。40μLの血液試料を抗体投与の10分、4時間、1日、2日、7日、14日および21日後に収集し、血漿を血液試料から収集し、ELISAによる全ヒトIgG濃度の決定まで-80℃で貯蔵した。96ウェルELISAプレート（Greiner、カタログ＃655092）を2μg/mLの抗ヒトIgG（Sanquin、The Netherlands、商品＃M9105、ロット＃8000260395）を用いて4℃で終夜被覆し、引き続いてPBSA（0.2％ウシ血清アルブミン［BSA、Roche、カタログ＃10735086001］を補充したPBS）を用いて1h遮断した。次に、間に洗浄工程を伴って、抗ヒトIgG被覆プレートを、プレートシェーカー上RTで1h、ELISA Buffer（0.05％Tween20［Sigma-Aldrich、カタログ＃P1379］を補充したPBSA）中で段階希釈された血漿試料と、RTで1hポリクローナルペルオキシダーゼコンジュゲートヤギ抗ヒトIgG二次抗体（Jackson、カタログ＃109-035-098）と、および最後に2,2'-アジノ-ビス（3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸）（ABTS；Roche、カタログ＃11112422001）と、逐次的にインキュベートした。2％シュ

ウ酸（Riedel de Haen、カタログ＃33506）を加えることにより反応を停止させた。注射のために使用されたそれぞれの材料の希釈系列を使用して参照曲線を生成した。吸光度をEL808マイクロタイタープレートリーダー（BioSPX）において405nmで測定し、全ヒトIgG濃度（μg/mL）をプロットした。

【０５９７】

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

【０５９８】

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

【０５９９】

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

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

【０６００】

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

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

【０６０１】

製造者の使用説明書に従ってCD14マイクロビーズ（Miltenyi Biotec、カタログ番号130-050-201）を使用して陽性選択によりPBMCからhMDMを単離した。PBMCを遠心分離（1,200RPM、5分、RT）し、氷冷した単球単離緩衝液（PBS、0.5%BSA、2mM EDTA）に1.25×10^{7}PBMC/mLの密度で再懸濁した。80μLのPBMC懸濁液当たり20μLのCD14マイクロビーズを加え、ローラーバンク上4℃で15分間、撹拌と共にインキュベートした。30mLの氷冷した単球単離緩衝液を加え、PBMC/CD14マイクロビーズ混合物を遠心分離（300×g、10分、4℃）し、6mLの氷冷した単球単離緩衝液に再懸濁した。LSカラム（Miltenyi Biotec、カタログ番号130-042-401）を3mLの氷冷した単球単離緩衝液でリンスし、各々のカラムに3mLのPBMC/CD14マイクロビーズ混合物をロードした。CD14^{-}細胞を流し、氷冷した単球単離緩衝液中でカラムを3回洗浄した後に、プランジャーを使用することによりCD14^{+}単球を3mLの氷冷した単球単離緩衝液に回収した。ViaStain（商標）Viability Dyeアクリジンオレンジ/ヨウ化プロピジウム（AOPI；Nexcelom Bioscience、カタログ番号CS2-0106）を使用してCellometer Auto 2000 Cell Viability Counter（Nexcelom Bioscience）においてCD14^{+}細胞をカウントし、RTでプレートを静置することにより細胞採取を可能とするUpCell（商標）Surfaceを有する100mm^{2} Nunc（商標）ディッシュ（Thermo Fisher Scientific、カタログ番号174902）中のマクロファージコロニー刺激因子（

M-CSF；Gibco、カタログ番号PH9501；50ng/mLの最終濃度）および3mLの単球懸濁液（すなわち、2.4×10^6個の単球）を補充したCelgene（登録商標）GMP DC培地（CellGenix、カタログ番号20801-0500）に0.8×10^6細胞/mLの密度で再懸濁した。3日のインキュベーションの後に、5×M-CSFを含有する2mLの新鮮な培地をプレートに加えた。7日間のインキュベーション（37℃、5％CO_2）の後に、RTでプレートを1～1.5h静置することによりマクロファージを表面から剥離した。剥離したマクロファージを遠心分離によりペレット化し、AOPIを使用してカウントし、培養培地（10％DBSIを含むRPMI 1640）に1×10^6細胞/mLの密度で再懸濁した。

【０６０２】

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

【０６０３】

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

【０６０４】

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

％ 生存Daudi細胞 ＝

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

【０６０５】

各々の条件についての食細胞hMDMの量は、TO-PRO-3^{-}CD11b^{+}CTV^{+}細胞の％として決定した。

【０６０６】

IgG1-CD27-A-P329R-E345Rは、4人の異なるヒト健常ドナーからのhMDMを使用して、ファゴサイトーシスアッセイにおいて食細胞hMDMのパーセンテージを増加させることも生存Daudi細胞のパーセンテージを低減させることもなかった。これは、残留FcγRIa結合は、IgG1-CD27-A-P329R-E345RについてFcγRIa媒介性エフェクター機能を結果としてもたらさなかったことを実証する（代表的なヒト健常ドナーからのデータを図11に示す）。食細胞hMDMのパーセンテージにおける増加および生存Daudi細胞のパーセンテージにおける減少により実証されるように、陽性対照抗体IgG1-CD20は、

高いレベルのCD20を発現するDaudi細胞のファゴサイトーシスを効率的に誘導した。

【０６０７】

結論として、FcγRIaに対する残留結合は、$CD27^{+}$細胞のIgG1-CD27-A-P329R-E345R依存性ADCPを誘導するために十分でなかった。

【０６０８】

実施例14：C4d沈着の測定により決定された、抗CD27抗体IgG1-CD27-A-P329R-E345Rによる、流体相での標的非依存的補体活性化

Fc-Fc相互作用増強抗体は、溶液中で単量体IgG1分子として一般に存在し、標的結合で細胞表面上で六量体化して、活性Fc領域の場合にC1qドッキング場所を形成する（Diebolder,C.A et al 2014；de Jong,R.N et al,2016）。抗CD27抗体IgG1-CD27-A-P329R-E345RのIgG FcドメインはP329R変異の導入によりサイレンシングされ、これは、膜結合型IgG1-CD27-A-P329R-E345Rに対するC1q結合の欠如を結果としてもたらす（図6）。IgG1-CD27-A-P329R-E345Rは標的結合の非存在下で溶液中で補体を活性化させることができないことを確認するために、古典的な補体経路の活性化のための指標と考えられるC4d沈着の決定により標的非依存的な補体活性化を調べた。MicroVue（商標）C4d Enzyme Immunoassay（EIA；Quidel、カタログ番号A008）を使用して酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）によりIgG1-CD27-A-P329R-E345Rによる流体相C4d断片沈着を分析し、これは製造者のプロトコールに従って行った。Heat Aggregated Gamma Globulin（HAGG；補体活性化剤；Quidel、カタログ番号A114）をアッセイのための陽性対照として使用した。IgG1-b12およびIgG1-b12-RGY（WO2014006217A1）を対照抗体として含めた。IgG1抗体中のE345R/E430G/S440Y（RGY）Fc変異の導入は、溶液中での六量体の形成を誘導して、流体相補体活性化を結果としてもたらすことが記載されている（Diebolder,C.A et al,2014；Wang,G.,R.N et al,2016；de Jong,R.N et al,2016）。IgG1-b12-P329R-E345Rをアイソタイプ対照抗体として含めた。

【０６０９】

10mg/mLの濃度まで希釈されたHAGGを除いて、リン酸緩衝化食塩水（PBS）中で1mg/mLの濃度までの抗体希釈液を調製した。次に、試験試料を90％（最終濃度）の通常ヒト血清（NHS）（CompTech、ロット番号42a）中で100μg/mL（モノクローナルIgG）または1,000μg/mL（HAGG）の濃度までさらに希釈し、37℃で1hインキュベートした。並行して、「抗体なし」試料（抗体なし、90％NHS）および「PBS単独」試料（抗体なし、NHSなし）を陰性対照として含めた。次に、キットに提供される冷却したComplement Specimen Diluent中で試料を1:250に希釈した。一方、マウス抗ヒトC4d抗体を被覆したストリップを96ウェルプレートに入れ、最初の洗浄後の1分の待機工程と共に250～300μLの洗浄緩衝液を用いてアッセイウェルを3回洗浄した。試験試料をウェル（100μL/ウェル）に加え、陰性対照として、補体検体希釈剤のみ（ブランク）をELISAにおいて使用した。並行して、キットにより提供される100μLの標準品（標準A-E）および内部対照を別々のウェルに加えた。プレートをRTで30分間インキュベートした。次に、プレートを上記されている洗浄緩衝液で5回洗浄した。50μLのC4dコンジュゲート（ペルオキシダーゼコンジュゲートヤギ抗ヒトC4d）をウェルに加え、プレートをRTで30分間インキュベートした。上記されている洗浄緩衝液での5回の洗浄工程後に、100μLのC4d基質［0.7％ 2-2'-アジノ-ジ-（3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸ジアンモニウム塩］を加え、再びプレートをRTで30分間インキュベートした。最後に、50μLのキットにより提供される停止溶液を加え、1h以内に、ELISAプレートリーダー（EL808 BioSPX、BioTek）を使用して405nmで光学密度を測定した。

【０６１０】

IgG1-CD27-A-P329R-E345Rおよび対照抗体IgG1-b12-P329R-E345R（IgG1-CD27-A-P329R-E345Rと同じFc骨格を有する）は、100μg/mLの試験された濃度において流体相C4d沈着を誘導せず；測定されたC4dレベルは、野生型Fcドメインを有する対照抗体（IgG1-b12）および抗体なし対照のバックグラウンドレベルと類似してい

た（図12）。対照的に、溶液中で六量体を形成することが既知である陽性対照抗体IgG1-b12-RGYは、HAGGと同じレベルまでC4d沈着を誘導した。

【０６１１】

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

【０６１２】

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

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

【０６１３】

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

【０６１４】

細胞を2回洗浄し、Brilliant Violet（BV）421（商標）標識されたストレプトアビジン（BioLegend、カタログ番号405225；0.0025μg/mLの最終濃度）およびRフィコエリトリン（PE）標識されたポリクローナルAffiniPure F（ab'）$_2$断片ヤギ-抗ヒトIgG Fc（Jackson ImmunoResearch、カタログ番号109 116098；0.0025μg/mLの最終濃度）を含有するFACS緩衝液に4℃で30分間再懸濁した。細胞を2回洗浄し、TO-PRO-3ヨージド（Thermo Fisher Scientific、カタログ番号T3605；1:25,000）を含有するFACS緩衝液に再懸濁し、分析した。データをBD FACSymphony（商標）A3フローサイトメーター（BD Biosciences）上で収集し、FlowJoソフトウェアを使用して分析した。補償のために、1滴のUltraComp eBeads（商標）Compensation Beads（Life Technologies、カタログ番号01-2222-42）を各々のウェルに加えた。2μLの各々の抗体を加え、ミックスを20分間インキュベートした。プレートを遠心沈降にかけ、ビーズをFACS緩衝液に再懸濁し、測定した。生存の補償のために、細胞を65℃で10分間処理し、生存細胞と1:1で混合した。細胞を遠心沈降させ、FACS緩衝液中に希釈されたTO-PRO-3に再懸濁した。GraphPad Prismを使用してデータを処理および可視化した。

【０６１５】

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

【０６１６】

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

【０６１７】
実施例１６：抗ＣＤ２７抗体とのポリクローナルに刺激されたヒトＰＢＭＣのインキュベーションでのＴ細胞活性化マーカーの発現
ポリクローナルに活性化されたＴ細胞におけるＴ細胞活性化マーカーの発現に対するＩｇＧ１-ＣＤ２７-Ａ-Ｐ３２９Ｒ-Ｅ３４５Ｒの効果を、３人の異なる健常ヒトドナーから得られたＰＢＭＣを使用して研究した。ＰＢＭＣをＩｇＧ１-ＣＤ２７-Ａ-Ｐ３２９Ｒ-Ｅ３４５Ｒまたは先行技術の抗ＣＤ２７抗体と２日間および５日間インキュベートした後にＨＬＡ-ＤＲ、ＣＤ２５、ＣＤ１０７ａ、および４-１ＢＢの発現を分析した。
【０６１８】
９６ウェルＵ底プレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ Ｂｉｏ-Ｏｎｅ）中の細胞培養培地に、１ウェル当たり、新たに単離された７５,０００個のＰＢＭＣを播種した。二連のウェルを同時に抗ＣＤ３抗体（ＵＣＨＴ１クローン；Ｓｔｅｍｃｅｌｌ；０.１μｇ/ｍＬ）；およびＩｇＧ１-ＣＤ２７-Ａ-Ｐ３２９Ｒ-Ｅ３４５Ｒ（３倍希釈における０.０００５～３０μｇ/ｍＬ）；または先行技術の抗ＣＤ２７抗体ＩｇＧ１-ＣＤ２７-ＣＤＸ１１２７、ＩｇＧ１-ＣＤ２７-１３１Ａ、およびＩｇＧ１-ＣＤ２７-ＢＭＳ９８６２１５（３０μｇ/ｍＬ）；または非結合性対照抗体ＩｇＧ１-ｂ１２-Ｐ３２９Ｒ-Ｅ３４５Ｒ（１０μｇ/ｍＬ）と共にインキュベートした。処理の非存在下での各々の活性化マーカーの発現を決定するために、非処理（抗ＣＤ３抗体も抗ＣＤ２７抗体もなし）の細胞を含む二連の対照ウェルに単独で培養培地を補充した。活性化マーカー陽性細胞を同定するためのゲートを設定するために、ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ ｍｉｎｕｓ ｏｎｅ（ＦＭＯ）対照を使用した。ＦＭＯ対照のために、二連のウェル中の活性化マーカーに対応するものを除く実験において使用されたすべての抗体を、抗ＣＤ３抗体を用いて活性化された１人のドナーからのウェル当たり７５,０００個のＰＢＭＣに加えた。染色抗体を含まない単一のウェル中の各々のドナーからの非処理の細胞を陰性対照として含めた。生存細胞を検出するために、各々のドナーからの非処理の細胞を単一のウェル中で４',６-ジアミジノ-２-フェニルインドール（ＤＡＰＩ）単独で染色した。
【０６１９】
２日間または５日間のインキュベーション（３７℃、５％CO_2）の後に、プレートをＦＡＣＳ緩衝液で１回洗浄し、Ｔ細胞活性化マーカー４-１ＢＢ、ＣＤ２５、ＣＤ１０７ａ、ヒト白血球抗原（ＨＬＡ）-ＤＲのための抗体；ならびにフローサイトメトリーにおいてＣＤ４$^+$およびＣＤ８$^+$Ｔ細胞サブセットをゲーティングするための抗体を含有するＦＡＣＳ緩衝液中の抗体混合物に再懸濁した。４℃で３０分間のインキュベーションの後に、すべてのプレートをＦＡＣＳ緩衝液で２回洗浄し、細胞をＦＡＣＳ緩衝液に再懸濁した。ＦｌｏｗＪｏソフトウェアを使用してＢＤ ＬＳＲＦｏｒｔｅｓｓａ Ｃｅｌｌ Ａｎａｌｙｚｅｒ上で試料を分析して、ＣＤ４$^+$およびＣＤ８$^+$Ｔ細胞上の各々のＴ細胞活性化マーカーについての中央値蛍光強度（ＭＦＩ）および陽性細胞のパーセンテージを決定した。Ｔ細胞活性化マーカーの発現レベルにおける抗ＣＤ２７抗体誘導性の変化を、非結合性対照抗体ＩｇＧ１-ｂ１２-Ｐ３２９Ｒ-Ｅ３４５Ｒと比べた抗ＣＤ２７抗体試料のＭＦＩにおける変化倍数として提示した。ＦｌｏｗＪｏソフトウェアを使用してＢＤ ＬＳＲＦｏｒｔｅｓｓａ（商標）Ｃｅｌｌ Ａｎａｌｙｚｅｒ（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）上で試料を分析した。
【０６２０】
ＩｇＧ１-ＣＤ２７-Ａ-Ｐ３２９Ｒ-Ｅ３４５Ｒは、活性化ＣＤ４$^+$Ｔ細胞上のＣＤ２５、ＣＤ１０７ａおよび４-１ＢＢの発現を増加させた（図１４Ａ）。これらの効果は、５日のインキュベーションの後よりも２日のインキュベーションの後により著しかった。ＣＤ８$^+$Ｔ細胞上で、ＩｇＧ１-ＣＤ２７-Ａ-Ｐ３２９Ｒ-Ｅ３４５Ｒとのインキュベーションは、２日のインキュベーション後および５日のインキュベーション後の両方においてＨＬＡ-ＤＲ、ＣＤ１０７ａおよび４-１ＢＢの発現の増加を結果としてもたらした（図１４Ｂ）。
【０６２１】
３つの先行技術抗体との２日間および５日間のインキュベーションでのＴ細胞活性化マーカーの発現も評価した。ＩｇＧ１-ＣＤ２７-１３１ＡおよびＩｇＧ１-ＣＤ２７-ＢＭＳ９８６２１５は、ＣＤ４$^+$およびＣＤ８$^+$Ｔ細胞上のＨＬＡ-ＤＲ、４-１ＢＢ、ＣＤ２５、およびＣＤ１０７ａの発現における同等の増加を誘導したが、Ｔ細胞活性化マーカー発現に対するＩｇＧ１-ＣＤ２７-ＣＤＸ１１２７との２日間または５日間のインキュベーションの効果はより弱いものであった。

【０６２２】
結論として、IgG1-CD27-A-P329R-E345Rとのポリクローナルに活性化されたPBMCのインキュベーションは、CD4＋およびCD8＋T細胞上の活性化マーカーHLA-DR、CD25、CD107aおよび4-1BBの発現の増加を結果としてもたらした。
【０６２３】
実施例17：ヒトCD27-KIマウスモデルにおける抗CD27抗体の注射後のOVAタンパク質免疫化マウスにおけるOVA特異的CD8＋T細胞のパーセンテージ
脾臓細胞におけるhCD27 KI OVAモデルにおける抗原特異的T細胞の拡大増殖に対するIgG1-CD27-A-P329R-E345R処置の効果をフローサイトメトリーにより分析した。
【０６２４】
C57BL/6バックグラウンドのホモ接合性ヒトCD27（hCD27）-KIマウス（hCD27 KIマウス）をBeijing Biocytogen Co.,Ltd.（系統名C57BL/6-Cd27tm1（CD27）/Bcgen、ストック番号110006）から得た。この系統は、Crown BioscienceのHuGEMM（商標）プラットフォームとの共同で開発され、機能的な免疫系を有するマウス内のヒト化された薬物標的（この場合CD27）を特色とするものであった。hCD27 KIマウスにおいて、細胞外ドメインをコードするマウスCD27遺伝子のエクソン1～5をヒトCD27エクソン1～5により置き換えた。OVA特異的T細胞をhCD27-KIマウスにおいて免疫原オボアルブミン（OVA）の皮下（s.c.）注射によりインビボで誘導し、静脈内（i.v.）に抗体を用いてマウスを同時に処置することによりIgG1-CD27-A-P329R-E345Rのアゴニスト効果を試験した。
【０６２５】
0日目に、マウスにs.c.で5mgのOVA（InvivoGen、カタログ番号vac-pova-100、ロット番号EFP-42-04）を注射し、尾静脈へのIgG1-CD27-A-P329R-E345R（30mg/kg）、IgG1-CD27-CDX1127（30mg/kg）またはIgG1-b12-P329R-E345R（30mg/kg）のi.v.注射により処置した。12日目および21日目に、マウスをOVAでブーストし、0日目と同様の抗体で処置した。10日目、19日目および24日目に、頬袋または伏在静脈を介してエチレンジアミン四酢酸二カリウム（K2-EDTA；BD、カタログ番号365974）を含有するBD Microtainer（登録商標）血液収集チューブ中に血液を収集し、さらなる分析において直ちに使用した。28日目に、マウスを安楽死させ、無菌条件下で脾臓を切除した。
【０６２６】
RPMI1640培地（Thermo Fisher Scientific、カタログ番号C22400500BT）中の切除された脾臓組織をgentleMACs（商標）C Tubes（Miltenyi Biotec、カタログ番号130-093-237）に移し、製造者の使用説明書に従ってgentleMACS（商標）Dissociator（Miltenyi、カタログ番号130-093-235）を使用して単一細胞懸濁液に機械的に解離させた。解離後に、細胞懸濁液を70μmの細胞ストレーナー（Falcon、カタログ番号352350）に通して濾過した。次に、試料を3mLの洗浄緩衝液（4% FBS［Gibco、カタログ番号10099 141］を補充した無菌PBS［Hyclone、SH0256.01B］）中の再懸濁により2回洗浄した。細胞をCellometer Auto T4（Nexcelom Bioscience）でカウントし、細胞の数をチューブ当たり2×10^6個の脾臓細胞に調整した。
【０６２７】
2×10^6個の脾臓細胞をFACSチューブ（Falcon、カタログ番号352052）に移し、1μg/mLの精製されたラット抗マウスCD16/CD32（Mouse BD Fc Block（商標）、BD Biosciences、カタログ番号553141）を補充した洗浄緩衝液（4% FBS［Gibco、カタログ番号10099 141］を補充した無菌PBS［Hyclone、SH0256.01B］）に再懸濁した。2～8℃の暗所中で10分間のプレインキュベーションの後に、10μLのPE標識されたOVA四量体（MBL Life science、カタログ番号TS 5001 1C）を加え、試料を穏やかにボルテックスした後に、2～8℃の暗所中で30～60分間さらにインキュベートした。洗浄なしで、T細胞サブセットのフローサイトメトリーゲーティングのために使用される標識された抗体および化合物を加えた。試料を穏やかにボルテックスし、2～8℃

の暗所中でさらに30分間インキュベートした。次に、試料を2mLの洗浄緩衝液中の再懸濁により2回洗浄し、300×gで5分間遠心分離した。最後に、細胞を250μLの洗浄緩衝液に再懸濁し、BD LSRFortessa（商標）X-20 Cell Analyzer（BD Biosciences）で分析した。Kaluza Analysis Software（Beckman Coulter）を使用してデータを処理した。

【０６２８】

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

【０６２９】

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

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

【０６３０】

本質的に製造者により説明されるように、Mouse IFN-γ ELISpotPLUS kit（Mabtech、カタログ番号3321-4HPW-2）を使用して脾臓細胞によるIFNγ産生を分析した。プレコーティングされたMultiScreenHTS IP Filter（MSIP）白色プレート（mAbAN18）をウェル当たり200μLの無菌PBSで4回洗浄し、pen/strepを含有する200μLのCTL-Test Mediumでコンディショニングした（RT、30分）。培地を除去し、ウェル当たり5×10^5個の脾臓細胞を二連で2μg/mLの$OVA_{257-264}$ペプチドSIINFEKL（Invivogen、カタログ番号vac-sin）、またはスクランブル化対照ペプチドFILKSINE（SB-PEPTIDE、カタログ番号SB073-1MG）と180μL/ウェルの総体積で20h、加湿されたインキュベーター（37℃、5%CO_2）中でインキュベートした。IFNγ産生の陽性対照として、脾臓細胞を並行して、500ng/mLのホルボールミリステートアセテート（PMA）および10μg/mLのイオノマイシン（PMA+イオノマイシン、Dakewe Biotech、カタログ番号DKW ST PI）からなる細胞刺激カクテルとインキュベートした。ペプチドなしの脾臓細胞の培養物を陰性対照として含めた。インキュベーション後に、細胞を除去し、プレートをPBSで5回洗浄した。次に、プレートを、間にPBSでの5回の洗浄工程と共に、ビオチン化検出mAb（R4-6A2；RT、2h）、ストレプトアビジン-ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP；RT、1h）、および最後に3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン（TMB）基質溶液（すべてキットにより提供される）と逐次的にインキュベートした。別個のスポットが出現した場合、脱イオン水中での大規模な洗浄により反応を停止させた。spotAID V8ソフトウェア（AID）を使用してAID iSpot ELISpot Reader（Autoimmun Diagnostika [AID] GMBH、ELR08IFL）上でスポットをカウントした。GraphPad Prismソフトウェアを使用してELISpotデータを分析し、棒図表に提示し、処置群当たりのすべてのマウス（n＝5）からのウェル当たりのスポットの平均数±SEMとして提示した。

【０６３１】
ELISpot分析により実証されるように、すべてのIgG1-CD27-A-P329R-E345R処置動物群からの脾臓細胞は、OVAペプチドでの処置に応答してIFNγ産生を増加させたことを示した（図16）。スクランブル化対照ペプチドでの脾臓細胞の刺激は、IFNγ産生を誘導しなかったか、または最小のIFNγ産生を誘導し、IFNγはOVA特異的T細胞により産生されたことを示唆した。対照的に、IFNγ産生は、30mg/kgのIgG1-CD27-CDX1127で処置されたマウスからの脾臓細胞において観察されなかった。
【０６３２】
実施例19：インビボでのOVA免疫化マウスにおけるT細胞活性化に対するIgG1-CD27-A-P329R-E345R処置の効果
CD8$^+$T細胞活性化に対するIgG1-CD27-A-P329R-E345R処置の効果を、OVA処置されたhCD27-KIマウスに由来するCD8$^+$T細胞上のPD-1の発現を分析することによりインビボで研究した。実施例17に記載されるようにマウスを処置した。また、脾臓細胞を得、それをFACSにより分析する方法は実施例17に記載されている。
【０６３３】
IgG1-CD27-A-P329R-E345Rは、28日目に活性化マーカーPD-1を発現するCD8$^+$T細胞のパーセンテージにおける増加を誘導した。CD8$^+$PD-1$^+$T細胞のパーセンテージは、IgG1-CD27-CDX1127または対照抗体IgG1-b12-P329R-E345Rで処置された動物において低かった（図17）。
【０６３４】
実施例20：OVA免疫化マウスにおけるT細胞サブセットのインビボ誘導に対するIgG1-CD27-A-P329R-E345R処置の効果
T細胞サブセットの拡大増殖に対するIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの効果を、OVA処置されたhCD27-KIマウスからの脾臓細胞試料中のCD44およびCD62Lの発現を分析することにより研究した。IgG1-CD27-A-P329R-E345R処置された、OVA免疫化された、hCD27-KIマウスの脾臓に由来するメモリーCD8$^+$T細胞を、フローサイトメトリーにより定量化した。メモリーT細胞をエフェクターメモリー（CD44$^+$CD62L$^-$）およびプレエフェクターT細胞（CD44$^-$CD62L$^-$；Nakajima,Y.,K et al 2018）として分類した。実施例17に記載されるようにマウスを処置した。また、脾臓細胞を得、それをFACSにより分析する方法は、実施例17に記載されている。
【０６３５】
IgG1-CD27-A-P329R-E345R（30mg/kg）は、IgG1-b12-P329R-E345Rで処置されたマウスの脾臓細胞と比較した場合に28日目に脾臓中のプレエフェクターT細胞およびエフェクターメモリーCD8$^+$T細胞のパーセンテージの増加を誘導した（図18）。CD45$^+$集団内で、IgG1-CD27-A-P329R-E345Rは、IgG1-CD27-CDX1127（30mg/kg）よりも高いパーセンテージのプレエフェクターT細胞およびエフェクターメモリーT細胞を誘導したが、同等の平均パーセンテージのこれらのT細胞集団が、脾臓細胞のCD8$^+$画分中で両方の抗CD27抗体により誘導された。
【０６３６】
実施例21：OVA免疫化マウスにおけるT細胞のインビボ拡大増殖に対するIgG1-CD27-A-P329R-E345R処置の効果
T細胞の拡大増殖に対するIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの効果を、OVA処置されたhCD27-KIマウスからの脾臓細胞および血液試料中のCD3の発現を分析することにより研究した。実施例17に記載されるようにマウスを処置した。また、脾臓細胞および血液試料を得、それらをフローサイトメトリーにより分析する方法は、実施例17に記載されている。
【０６３７】
30mg/kgのIgG1-CD27-A-P329R-E345RでのOVA免疫化hCD27-KIマウスの処置は、非結合性対照抗体IgG1-b12-P329R-E345Rでの処置と比較して、脾臓におけるCD3$^+$T細胞のパーセンテージを増加させなかった（図19）。対照的に、ベンチマーク抗

体IgG1-CD27-CDX1127（30mg/kg）での処置は、脾臓におけるCD3$^+$T細胞の減少を結果としてもたらした。類似した観察が末梢血試料において為された。

【０６３８】

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

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

【０６３９】

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

【０６４０】

単球由来iDCの生成のために、最大40×10^{6}個のPBMC由来CD14$^+$単球をT175フラスコ中、100ng/mLのヒト顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF；Miltenyi Biotec、カタログ番号130-093-868）および50ng/mLのヒトIL-4（Miltenyi Biotec、カタログ番号130093 924）を補充したDC培地（RPMI 1640、5%のプールされたヒト血清［PHS；One Lambda、カタログ番号A25761］、1×最小必須培地非必須アミノ酸溶液［MEM NEAA、Life Technologies、カタログ番号11140 035］、1mMピルビン酸ナトリウム［Life Technologies、カタログ番号11360 039］）中で5日間培養（37℃、5%CO_2）した。3日の培養後に、フラスコ当たり培地の半分を置き換えた。フラスコから得られた培地は非接着性単球を含んでいたため、それを遠心分離（8分、300×g、RT）し、上清を捨て、細胞ペレットを新鮮なDC培地に再懸濁し、次に、200ng/mLのGM-CSFおよび200ng/mLのIL-4（最終濃度）と共に元々のフラスコに戻した。5日のインキュベーションの後に、培養フラスコに接着していたiDCを、2mM EDTAを含有する10mLのDPBSを使用して剥離した（37℃、10分）。単離されたiDCを洗浄し、ペレット化（8分、300×g、RT）し、CLDN6 mRNAを用いるエレクトロポレーションのために使用した。

【０６４１】

ヒトCD8$^+$T細胞に、ヒトCLDN6に特異的なマウスTCRのアルファおよびベータ鎖をコードするRNAを、単独でまたはPD-1をコードするRNAと共に、エレクトロポレートし、ヒト単球由来iDCに、ヒトCLDN6をコードするRNAをエレクトロポレートした。最大5×10^{6}個のiDCまたは15×10^{6}個のCD8$^+$T細胞を、ECM 830 Square Wave Electroporation System（BTX（登録商標））を使用してRTで250μLのX-VIVO 15培地中でエレクトロポレートした。細胞をRNAと混合し、パルス処理（T細胞について500V、3ms、またはiDCについて300V、12ms）し、750μLの予め温めたアッセイ培地（5%PHSを含むIMDM GlutaMAX［Life technologies、カタログ番号31980030］）で直ちに希釈した。エレクトロポレートしたiDCを6または12ウェルプレートに移し、

O/N（37℃、5％CO_2）培養した。O/Nのインキュベーションの後に、エレクトロポレートしたCD8＋T細胞およびiDCをフローサイトメトリーにより評価して、細胞純度、トランスフェクトされたRNAの発現（CD8＋T細胞上のPD-1およびCLDN6-TCRならびにiDC上のCLDN6）、ならびにCD8＋T細胞上のCD27およびPD-1ならびにiDC上のPD-L1のベースライン発現を評価した。エレクトロポレートしたCD8＋T細胞の約78％～93％、78％～92％、および36％～98％は、それぞれCLDN6-TCR、PD-1、および内因性CD27を発現した。エレクトロポレートしたiDCの約47％～91％および94％～99％は、それぞれCLDN6および内因性PD-L1を発現した（図示せず）。

【０６４２】

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

【０６４３】

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

【０６４４】

2日のインキュベーション後のCD8＋T細胞/iDC共培養物からの上清におけるマルチプレックスECLIAによりサイトカイン産生におけるIgG1-CD27-A-P329R-E345R誘導性変化を評価した（n＝4の異なるドナー）。IgG1-CD27-A-P329R-E345Rは、内因性レベルのPD-1を発現するCD8＋T細胞を用いるCD8＋T細胞/iDC共培養物においてGM-CSFおよびIFNγの産生における有意な増加を誘導したが（図20A）、IL-13およびTNFα産生における増加も観察された。同じサイトカインについてのかなりの増加が、PD-1過剰発現T細胞を含有する培養物において観察された（図20B）。T細胞がPD-1を過剰発現する場合にサイトカインレベルは一般に減少したが、IgG1-CD27-A-P329R-E345Rの存在下でのサイトカイン産生における相対的な増加（増加倍数）はこの設定において概して高かった（図20Aおよび図20B）。対照的に、先行技術の抗CD27抗体IgG1-CD27-131Aは、非結合性対照抗体IgG1-b12-P329R-E345Rと比較してサイトカイン産生に対する最小の効果を示した（図20Aおよび図20B）。

【０６４５】

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

CLDN6-TCRを発現するように形質導入されたヒト健常ドナーT細胞およびMDA-MB-231_hCLDN6標的細胞の共培養物においてフローサイトメトリーにより抗原特異的T細

胞上の細胞傷害性関連分子の発現を分析することにより抗体処理でのT細胞媒介性細胞傷害の誘導を研究した。

【０６４６】

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

【０６４７】

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

【０６４８】

単離された$CD8^+$T細胞（実施例22を参照）にCLDN6特異的TCR mRNAをエレクトロポレートし、O/Nでインキュベートした。$CD8^+$T細胞単離およびエレクトロポレーションの後に、T細胞培養物は49%～99%の$CD8^+$T細胞を含有した。これらのエレクトロポレートされた$CD8^+$T細胞のうち、約78%～93%はCLDN6-TCRを発現し、CLDN6-$TCR^+$$CD8^+$細胞の59%～98%は$CD27^+$であった。細胞を遠心分離（8分、300×g、RT）し、DMEM/10%FBSに再懸濁し、カウントした。細胞を再び遠心分離し、3×10^6細胞/mLでDMEM/10%FBSに再懸濁し、以前に播種されたMDA-MB-231_hCLDN6細胞を含有するウェルに加えた（1.5×10^5個の$CD8^+$T細胞/ウェル；T細胞:腫瘍細胞比、エフェクター:標的比は10:1）。IgG1-CD27-A-P329R-E345R、IgG1-CD27-131A、および非結合性対照抗体IgG1-b12-P329R-E345Rを共培養物に10μg/mLで加えた。CD107aおよびGzmBの発現をフローサイトメトリーにより決定した。

【０６４９】

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

【０６５０】

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

【０６５１】

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

T細胞媒介性細胞傷害を評価するために、CLDN6-TCRエレクトロポレート$CD8^+$T細胞をMDA-MB-231_hCLDN6細胞と、IgG1-CD27-A-P329R-E345R、先行技術の抗CD27抗体IgG1-CD27-131A、または非結合性対照抗体IgG1-b12-P329R-E345Rの

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

【０６５２】

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

【０６５３】

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

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

【０６５４】

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

【０６５５】

1つの腫瘍検体からの約5mm^3の腫瘍断片を含有する4～6個の凍結保存されたバイアルを実験毎に37℃の水浴中で約2分間解凍し、洗浄培地で5回洗浄し、細胞培養ディッシュに移した。腫瘍断片を外科用メスで約1mm^3の断片にさらに解剖した。断片のほとんどは、IL-2および処理抗体との培養でのTIL拡大増殖のために使用し、残りの断片は、いかなる処理も伴わない、ベースラインでの特有の細胞表面マーカーの発現を決定するために使用した。

【０６５６】

（平均で）ウェル当たり2つの腫瘍断片を24ウェルプレート（2mL/ウェルの総体積容量がアッセイにおいて使用された）中の0.1mLの予め温めたTIL培養培地（45～50U/mLのIL-2（Proleukin S；Novartis Pharma、カタログ番号PZN-02238131）を含有する2%ヒト血清アルブミン［HSA；CSL Behring、カタログ番号PZN-00504775］、100U/mLのpen/strep［Thermo Fisher Scientific］、および2.5μg/mLのアムホテリシンB［Thermo Fisher Scientific］を含むX-VIVO 15［Lonza］）に播種した。IgG1-CD27-A-P329R-E345Rを、45～50U/mLのIL-2を含有するTIL培養培地中で希釈し、900μLのこの希釈液を適宜ウェルに加えた。ウェル中の最終IgG

1-CD27-A-P329R-E345R濃度は1または10μg/mLであった。対照として、抗体なしで45～50U/mLのIL-2を含有する培地を別々のウェル中の腫瘍断片に加えた。全部で8～16個のウェルをドナー毎の各々の実験条件（37℃、5％CO_2）のためにインキュベートした。

【０６５７】

3日の培養後に、45～50U/mLのIL-2およびIgG1-CD27-A-P329R-E345Rを含有する新鮮なTIL培養培地をウェルに加えた（1mL/ウェル、上記と同じ抗体濃度）。アッセイ開始の5～14/17日後に、培養物を顕微鏡で、組織断片から遊走したTILの増殖およびTILマイクロクラスターの形成について、定期的にモニターした。7日または8日の培養の後に25個より多くのTILマイクロクラスターが1つのウェル中に観察された場合、2つの同一に処理された元々のウェルからの細胞および組織断片を、培養培地を含む6ウェルプレートの1つのウェルに再懸濁およびプールし（5～6mL/ウェルの総体積容量をアッセイにおいて使用した）、新鮮なIL 2含有TIL培養培地を加えた（33U/mLのIL-2最終濃度と概算された）。

【０６５８】

2～3日毎に、培養物に新鮮なIL-2含有TIL培養培地を補充した。培養物に加える培地中のIL-2濃度を10U/mLに低減したか、または最初に25U/mL、その後に10U/mLに低減し、アッセイの全体を通じてウェルに培地を補充した。14または17日目に、細胞をフローサイトメトリー分析のために採取した。

【０６５９】

IgG1-CD27-A-P329R-E345Rは、IL-2単独で処理された対照培養物と比較してTILサブタイプの拡大増殖を増強し、細胞カウントにおける最大の相対的な増加が$CD8^+$T細胞およびTregについて観察され、続いて$CD4^+$T細胞、およびNK細胞であった。すべてのTILサブセットについて、拡大増殖は、10μg/mLよりも1μg/mLでIgG1-CD27-A-P329R-E345Rを用いた場合に、より著しかった（表4および図23）。

【０６６０】

（表４）IgG1-CD27-A-P329R-E345R処理されたTILの拡大増殖倍数

ヒトNSCLC検体に由来する腫瘍組織をIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの存在または非存在下で低用量IL-2と共に培養した。指し示される細胞サブセットの絶対細胞カウントを処理の14～17日後にフローサイトメトリーにより決定した。IL-2で処理された培養物と比べたIgG1-CD27-A-P329R-E345R処理された培養物についての細胞数における差異倍数を示している。示されるデータは、5つの独立した実験において試験された個々の患者からの5つの腫瘍組織からのものである。P＝0.0236、1μg/mL vs.10μg/mL IgG1-CD27-A-P329R-E345R（二元配置ANOVA）。

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

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

【０６６１】

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

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

【０６６２】

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

【０６６３】

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

びCD37を発現しなかった（表5）。

【0664】

（表５）細胞当たりの抗体分子の細胞表面発現

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

【0665】

BRETアッセイ（NanoBRET（商標）System、Promega、カタログ番号N1661）は、本質的に製造者の使用説明書に従って行った。NanoLuc（ドナー）およびHaloTag（アクセプター）タグ付加抗体を生成するために、NanoLucまたはHaloTagのいずれかを有する可変軽鎖配列（表1、配列131～138）を遺伝子合成により調製し、適切な発現ベクターにクローニングし、実施例1に記載されるように全長抗体を製造した。分析のために、0.5×10^5個のhuCD27-K562またはDaudi細胞を96ウェル丸底プレート（Greiner Bio-One、カタログ番号650101）に100μLの総体積で播種した。細胞を遠心分離（3分、300×g）によりペレット化し、各々5μg/mLの濃度でNanoLucまたはHaloTagタグ付加抗体ペアの混合物を含有する50μLのアッセイ培地（Opti-MEM I［Gibco、カタログ番号11058-021］＋4%FBS［ATCC、カタログ番号30-2020］）に再懸濁した。次に、50μLのHaloTag NanoBret 618リガンド（Promega、カタログ番号G980A、アッセイ培地中1:1000の希釈）を加えた。各々の抗体混合物のために、HaloTag NanoBret 618リガンドを含まない50μLの培地を加えることにより、無リガンド対照試料を並行して調製した。細胞を37℃の暗所中で30分間インキュベートし、培地で2回洗浄し、FBSを含まない100μLのアッセイ培地に再懸濁した。25μLのNanoBRET NanoGLO基質（Promega、カタログ番号N1571、FBSを含まないアッセイ培地中1:200の希釈）を各々のウェルに加えた。プレートを30s振盪し、120μLの各々の試料をOptiPlate（Perkin Elmer、カタログ番号6005299）に移した。EnVision Multilabel Reader（Perkin Elmer）を使用して460nmにおいてドナー発光および618nmにおいてアクセプター発光を測定した。

【0666】

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

【0667】

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

【0668】

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

【0669】

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

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

【０６７０】

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

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

【０６７１】

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

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

【０６７２】

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

【０６７３】

（表６）

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

【０６７４】

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

【０６７５】

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

【０６７６】

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

【０６７７】

実施例28:IgG1-PD1およびスクリーニング材料の生成

PD-1およびFcγR構築物

様々な全長PD-1バリアント:ヒト（Homo sapiens;UniProtKB ID:Q15116）、カニクイザル（Macaca fascicularis;UniProtKB ID:B0LAJ3）、イヌ（Canis familiaris;UniProtKB ID:E2RPS2）、ウサギ（Oryctolagus cuniculus;UniProtKB ID:G1SUF0）、ブタ（Sus scrofa;UniProtKB ID:A0A287A1C3）、ラット（Rattus norvegicus;UniProtKB ID:D3ZIN8）、およびマウス（Mus musculus;UniProtKB ID:Q02242）をコードするプラスミドの他に、ヒトFcγRIa（UniProt KB ID:P12314）をコードするプラスミドを生成した。

【０６７８】

全長PD-1またはFcγRバリアントを一過的に発現するCHO-S細胞株の生成

製造者の使用説明書にしたがってFreeStyle（商標）MAX Reagent（ThermoFisher Scientific、カタログ番号16447100）およびOptiPRO（商標）無血清培地（The

rmoFisher Scientific、カタログ番号12309019）を使用して、CHO-S細胞（懸濁増殖に適合されたCHO細胞のサブクローン;ThermoFisher Scientific、カタログ番号R800-07）にPD-1またはFcγRプラスミドをトランスフェクトした。

【０６７９】

抗体バリアントの製造

IgG1-PD1

3匹のニュージーランドホワイトウサギを組換えヒトHisタグ付加PD-1タンパク質（R&D Systems、カタログ番号8986-PD）で免疫化した。血液からの単一のB細胞を選別し、ヒトPD-1酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、細胞ヒトPD-1結合アッセイおよびヒトPD-1/PD-L1遮断バイオアッセイによりPD-1特異的抗体の産生について上清をスクリーニングした。スクリーニング陽性B細胞から、RNAを抽出し、シークエンシングを行った。重鎖および軽鎖の可変領域を遺伝子合成し、Fcγ受容体との相互作用を最小化するために突然変異L234AおよびL235A（LALA;Labrijn et al.Sci Rep 2017,7:2476）（アミノ酸位置番号はEu番号付けによる）を含有するヒト免疫グロブリン定常部分（IgG1/κ）（SEQ ID NO:43）のN末端にクローニングした。

【０６８０】

293フリートランスフェクション試薬（Novagen/Merck）を使用したHEK293-FreeStyle細胞の一過性トランスフェクションをTecan Freedom Evoデバイスにより実行した。プレートオートサンプラーを有するDionex Ultimate 3000 HPLC上でのプロテインAアフィニティークロマトグラフィーを使用して細胞上清から、製造されたキメラ抗体を精製した。特にヒトPD-1 ELISA、細胞ヒトPD-1結合アッセイ、ヒトPD-1/PD-L1遮断バイオアッセイ、およびT細胞増殖アッセイにより再試験するさらなる分析のために、精製された抗体を使用した。キメラウサギ抗体MAB-19-0202（SEQ ID NO:54および55）が最良成績クローンとして同定され、引き続いてそれをヒト化した。

【０６８１】

キメラPD-1抗体MAB-19-0202の可変領域配列を以下の表に示す。表7は重鎖の可変領域を示し、表8は軽鎖の可変領域を示す。両方の場合において、フレーミング領域（FR）の他にKabat番号付けによる相補性決定領域（CDR）が定義される。下線を引いたアミノ酸は、IMGT番号付けによるCDRを示す。太字はKabatおよびIMGT番号付けの交差部分を示す。

【０６８２】

（表７）

重鎖							
配列 ID	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
MAB-19-0202-HC SEQ ID NO: 54	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLY	**SYN**MG	WVRQAPGKGLEYIG	**IISGGTIG**HYASWAKG	RFTISKTSSTTVDLKMTSLTTEDTATYFCAR	**AFYDDYDYNV**	WGPGTLVTVSS

【０６８３】

（表８）

軽鎖							
配列 ID	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
MAB-19-0202-LC SEQ ID NO: 55	AAVLTQ TPSPVS AAVGGT VTISC	QSS**QS VYGNN Q**LS	WYQQK PGQPPK LLIY	**QAS**KLE T	GVPSRF KGSGS GTQFTL TISDLE SDDAAT YYC	**AGGYS SSSDT T**	FGGGTE VVVK

【０６８４】
ヒト化された重鎖および軽鎖可変領域抗体配列を構造モデリング補助ＣＤＲグラフティングにより生成し、遺伝子を合成し、ヒト免疫グロブリン定常部分（ＬＡＬＡ突然変異を有するＩｇＧ１/κ）のＮ末端にクローニングした。特にヒトＰＤ-１ ＥＬＩＳＡ、細胞ヒトＰＤ-１結合アッセイ、ヒトＰＤ-１/ＰＤ-Ｌ１遮断バイオアッセイ、およびＴ細胞増殖アッセイにより再試験するさらなる分析のために、ヒト化抗体を使用した。ヒト化抗体ＭＡＢ-１９-０６１８（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:５６および５７）が最良成績クローンとして同定された。

【０６８５】
組換えヒト化配列の抗体ＩＤへのヒト化軽鎖および重鎖の割り当てを表９に列記している。ヒト化軽鎖および重鎖の可変領域配列を表１０および表１１に示す。表１０は重鎖の可変領域を示し、表１１は軽鎖の可変領域を示す。両方の場合において、フレーミング領域（ＦＲ）の他にＫａｂａｔ番号付けによる相補性決定領域（ＣＤＲ）が定義される。下線を引いたアミノ酸は、ＩＭＧＴ番号付けによるＣＤＲを示す。

【０６８６】
（表９）

抗体 ID	軽鎖		重鎖	
	ヒト化 バリアント	軽鎖 SEQ ID NO:	ヒト化 バリアント	重鎖 SEQ ID NO:
MAB-19-0618	**MAB-19-0202-L4**	**57**	**MAB-19-0202-H5**	**56**

【０６８７】
（表１０）

重鎖							
配列 ID	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
MAB-19-0202-H5 SEQ ID NO: 56	QVQLVE SGGGLV QPGTSL RLSCSV SGFSLY	SYNMG	WVRQA PGKGLE YIG	IISGGTI GHYAS WAKG	RFTISR DTSKTT LYLQMN SLTTED TATYFC AR	AFYDDY DYNV	WGPGT LVTVSS

【０６８８】
（表１１）

軽鎖							
配列 ID	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
MAB-19-0202-L4 SEQ ID NO: 57	AIQLTQ SPSSLS ASVGGT VTITC	QSSQS VYGNN QLS	WYQQK PGQPPK LLIY	QASKLE T	GVPSRF RGSGS GTQFTL TISSLQ SEDFAT YYC	AGGYSS SSDTT	FGGGTE VVVK

【０６８９】

ＭＡＢ-１９-０６１８の重鎖および軽鎖の可変領域の配列を遺伝子合成し、Ｆｃサイレンシング突然変異Ｌ２３４Ｆ、Ｌ２３５ＥおよびＧ２３６Ｒ（ＦＥＲ）（アミノ酸位置番号はＥｕ番号付けによる）を含有するヒトＩｇＧ１ｍ（ｆ）重鎖定常ドメイン（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:３８）ならびにヒトカッパ軽鎖定常ドメイン（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４２）をコードするコドン最適化配列を有する発現ベクターにライゲーション非依存性クローニング（ＬＩＣ）によりクローニングした。得られた抗体はＩｇＧ１-ＰＤ１と指定した。

【０６９０】

ＧＳ Ｘｃｅｅｄ（登録商標）Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ（Ｌｏｎｚａ）を使用して、ＩｇＧ１-ＰＤ１を発現する安定な細胞株を生成した。ＩｇＧ１-ＰＤ１の重鎖および軽鎖をコードする配列をそれぞれ発現ベクターｐＸＣ-１８.４およびｐＸＣ-Ｋａｐｐａ（グルタミンシンテターゼ［ＧＳ］遺伝子を含有する）にＬｏｎｚａ Ｂｉｏｌｏｇｉｃｓ ｐｌｃ.によりクローニングした。次に、ＩｇＧ１-ＰＤ１の重鎖および軽鎖の両方をコードする二重遺伝子ベクター（ＤＧＶ）を、重鎖ベクターからの完全な発現カセットを軽鎖ベクターにライゲートすることにより構築した。このＤＧＶのＤＮＡを制限酵素ＰｖｕＩ-ＨＦ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ、Ｒ３１５０Ｌ）で線状化し、ＣＨＯＫ１ＳＶ（登録商標）ＧＳ-ＫＯ（登録商標）細胞の安定なトランスフェクションのために使用した。ＩｇＧ１-ＰＤ１を機能的特徴付けのために精製した。

【０６９１】

ＩｇＧ１-ＣＤ５２-Ｅ４３０Ｇ

Ｆｃドメイン（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４０）中のＥ４３０Ｇ六量体化増強突然変異（ＷＯ２０１３/００４８４２ Ａ２）およびＣＤ５２特異的抗体、ＣＡＭＰＡＴＨ-１Ｈと同一の抗原結合性ドメインを有するヒトＩｇＧ１抗体をＣ１ｑ結合およびＦｃγＲシグナル伝達実験実験（Ｃｒｏｗｅ ｅｔ ａｌ.,１９９２ Ｃｌｉｎ Ｅｘｐ Ｉｍｍｕｎｏｌ.８７（１）:１０５-１１０）における陽性対照として使用した（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ.６１および６５）。

【０６９２】

対照抗体

ＨＩＶ１ ｇｐ１２０特異的抗体、ｂ１２と同一の抗原結合性ドメインを有するヒトＩｇＧ１抗体をいくつかの実験（Ｂａｒｂａｓ ｅｔ ａｌ.,Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ.１９９３ Ａｐｒ ５;２３０（３）:８１２-２）において陰性対照として使用した。ｂ１２のV_HおよびV_Lドメイン（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ.６８および７２）をデノボ遺伝子合成（ＧｅｎｅＡｒｔ Ｇｅｎｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ;ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｇｅｒｍａｎｙ）により調製し、選択された結合性ドメインのために適切なように、ヒトＩｇＧ１ｍ（ｆ）アロタイプのヒトＩｇＧ１重鎖定常領域（すなわちＣＨ１、ヒンジ、ＣＨ２およびＣＨ３領域）（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:３７）もしくはそのバリアント（Ｌ２３４Ｆ/Ｌ２３５Ｅ/Ｇ２３６Ｒ突然変異および追加の、この研究の文脈において機能的に関連しない、Ｆｃドメイン中のＫ４０９Ｒ突然変異を含有する;ＦＥＲＲ突然変異と略記される）（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:３９）を含有するか、またはヒトＩｇＧ４重鎖定常領域（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４１）;またはヒトカッパ軽鎖の定常領域（ＬＣ）（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ:４２）を含有する発現ベクターにクローニングした。抗体を産生細胞株中への重鎖および軽鎖発現ベクターのトランスフェクションにより得、機能的特徴付けのために精製した。

【０６９３】
実施例29:様々な種からのPD-1へのIgG1-PD1の結合
非臨床毒物学研究のために一般的に使用される種のPD-1へのIgG1-PD1の結合を、異なる動物種からのPD-1を一過的に発現するCHO-S細胞を使用してフローサイトメトリーにより評価した。
【０６９４】
CHO-S細胞（5×10^{4}細胞/ウェル）を丸底96ウェルプレートに播種した。IgG1-PD1、IgG1-ctrl-FERR、およびペムブロリズマブの抗体希釈液（1.7×10^{-4}～30μg/mLまたは5.6×10^{-5}～10μg/mL、3倍希釈液）を、0.1％［w/v］のウシ血清アルブミン［BSA;Roche、カタログ番号10735086001］および0.02％［w/v］のアジ化ナトリウム［NaN_3;bioWORLD、カタログ番号41920044-3］）を補充したGenmab（GMB）蛍光活性化細胞選別（FACS）緩衝液（リン酸緩衝化食塩水［PBS;Lonza、カタログ番号BE17-517Q、蒸留水中のPBSで1倍に希釈］）中に調製した。ペムブロリズマブのためのIgG4アイソタイプ対照（BioLegend、カタログ番号403702）は、試験された最も高い濃度（30μg/mLまたは10μg/mL）でのみ含めた。細胞を遠心分離し、上清を除去し、細胞を50μLの抗体希釈液中で30分間4℃でインキュベートした。細胞をGMB FACS緩衝液で2回洗浄し、光から保護して、50μLの二次抗体R-フィコエリトリン（PE）コンジュゲートヤギ抗ヒトIgG F（ab'）$_2$（Jackson ImmunoResearch、カタログ番号109-116-098;GMB FACS緩衝液中で1:500に希釈）と30分間4℃でインキュベートした。細胞をGMB FACS緩衝液で2回洗浄し、2mMのエチレンジアミン四酢酸（EDTA;Sigma-Aldrich、カタログ番号03690）および4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール（DAPI）生存マーカー（1:5,000;BD Pharmingen、カタログ番号564907）を補充したGMB FACS緩衝液中に再懸濁した。（DAPI排除により同定される）生存細胞に結合する抗体を、FlowJoソフトウェアを使用してIntellicyt（登録商標）iQue PLUS Screener（Intellicyt Corporation）上のフローサイトメトリーにより分析した。GraphPad Prismにおいて非線形回帰分析（4パラメーター用量応答曲線フィット）を使用して結合曲線を分析した。
【０６９５】
異なる種のPD-1へのIgG1-PD1の結合を、細胞表面上にヒト、カニクイザル、イヌ、ウサギ、ブタ、ラット、またはマウスPD-1タンパク質を発現するように一過的にトランスフェクトされたCHO-S細胞を使用してフローサイトメトリーにより評価した。IgG1-PD1の用量依存的な結合がヒトおよびカニクイザルPD-1について観察された（図26A～B）。ペムブロリズマブは同等の結合を実証した。IgG1-PD1の実質的に低減された交差反応性が、最も高い濃度においてのみ、齧歯動物PD-1（マウス、ラット）に対して観察され（図26C～D）、結合は、毒物学研究において頻繁に使用される他の種（ウサギ、イヌ、ブタ）のPD-1に対して観察されなかった（図26E）。IgG1-PD1の結合は非トランスフェクト対照細胞に対して観察されず（図26E）、陰性対照として含まれたIgG1-ctrl-FERRの結合も、試験された種のいずれのPD-1に対しても観察されなかった（図26）。
【０６９６】
結論として、IgG1-PD1は、膜発現ヒトおよびカニクイザルPD-1に対する同等の結合ならびにマウス、ラット、ウサギ、イヌ、およびブタPD-1に対する有意により低いまたは無結合を示した。
【０６９７】
実施例30:表面プラズモン共鳴により決定されたヒトおよびカニクイザルPD-1への結合
ヒトおよびカニクイザルPD-1への固定化されたIgG1-PD1、ペムブロリズマブ、およびニボルマブの結合を、Biacore 8K SPRシステムを使用して表面プラズモン共鳴（SPR）により分析した。C末端Hisタグを有する組換えヒトおよびカニクイザルPD-1細胞外ドメイン（ECD）をSino Biologicalから得た（それぞれカタログ番号HPLC-10377-H08Hおよび90311-C08H）。

【０６９８】
製造者の使用説明書にしたがってアミン-カップリングおよびHuman Antibody Capture Kit,Type 2（Cytiva、カタログ番号BR100050およびBR100839）を使用してBiacore Series S Sensor Chips CM5（Cytiva、カタログ番号29149603）を抗Fc抗体で共有結合的に被覆した。
【０６９９】
引き続いて、HBS-EP＋緩衝液（Cytiva、カタログ番号BR100669;蒸留水［B Braun、カタログ番号00182479E］中で1倍に希釈）中に希釈された、IgG1-PD1（2nM）、ニボルマブ（Bristol-Myers Squibb、ロット番号ABP6534;1.25nM）、およびペムブロリズマブ（Merck Sharp＆Dohme、ロット番号T019263;1.25nM）を、10μL/分の流速および60秒の接触時間と共に、25℃で表面上に捕捉させた。これは約50共鳴単位（RU）の捕捉レベルを結果としてもたらした。
【０７００】
HBS-EP＋緩衝液の3回のスタートアップサイクル後に、ヒトまたはカニクイザルPD-1 ECD試料（0.19～200nM;HBS-EP＋緩衝液中の2倍希釈;12サイクル）を注入して結合曲線を生成した。抗体被覆表面（活性表面）上で分析された各々の試料を、バックグラウンド補正のために使用された抗体を有しない並列フローセル（参照表面）上でも分析した。
【０７０１】
各々のサイクルの終わりに、10mMのグリシン-HCl pH 1.5（Cytiva、カタログ番号BR100354）を使用して表面を再生させた。Biacore Insight Evaluationソフトウェア（Cytiva）において予め定義された「Multi-cycle kinetics using capture」評価方法を使用してデータを分析した。ヒトまたはカニクイザルPD-1の最も高い濃度（200nM）を有する試料は、データのより良好な曲線フィットを可能とするために分析から省略した。
【０７０２】
固定化されたIgG1-PD1は、1.45±0.05nMの結合親和性（K_D）でヒトPD-1 ECDに結合した（表10）。ニボルマブおよびペムブロリズマブは、IgG1-PD1のK_Dと同等の結合親和性、すなわち低ナノモル範囲内のK_D値（それぞれ4.43±0.08nMおよび3.59±0.10nM）でヒトPD-1 ECDに結合した（表12）。
【０７０３】
固定化されたIgG1-PD1は、ヒトPD-1についてのIgG1-PD1の親和性と同等の、2.74±0.58nMのK_DでカニクイザルPD-1 ECDに結合した（表11）。ニボルマブおよびペムブロリズマブは、カニクイザルPD-1 ECDについてのIgG1-PD1のK_Dと同等のならびにヒトPD-1 ECDについてのニボルマブおよびペムブロリズマブのK_Dと同等の結合親和性、すなわち低ナノモル範囲内のK_D値（それぞれ2.93±0.58nMおよび0.90±0.06nM）でカニクイザルPD-1 ECDに結合した（表13）。
【０７０４】
（表１２）表面プラズモン共鳴により決定された場合のヒトPD-1の細胞外ドメインに対するPD-1抗体の結合親和性。ヒトPD-1のECDについてのIgG1-PD1、ニボルマブ、およびペムブロリズマブの会合速度定数k_a（1/Ms）、解離速度定数k_d（1/s）および平衡解離定数K_D（M）はSPRにより決定した。

抗体	K_D (M)		k_a (1/M × s)		k_d (1/s)	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD
IgG1-PD1[a]	1.45×10^{-9}	4.51×10^{-11}	5.17×10^{5}	2.03×10^{4}	7.51×10^{-4}	9.61×10^{-6}
ニボルマブ[b]	4.43×10^{-9}	8.49×10^{-11}	4.06×10^{5}	3.54×10^{3}	1.80×10^{-3}	2.12×10^{-5}
ペムブロリズマブ[b]	3.59×10^{-9}	9.90×10^{-11}	2.12×10^{6}	1.36×10^{6}	7.57×10^{-3}	4.71×10^{-3}

[a] 3回の独立した実験からの平均およびSD。
[b] 2回の独立した実験からの平均およびSD。
略語:K_D＝平衡解離定数;k_a＝会合速度定数;k_d＝解離速度定数またはオフレート;SD＝標準偏差。

【０７０５】

（表１３）表面プラズモン共鳴により決定された場合のカニクイザルPD-1の細胞外ドメインに対するPD-1抗体の結合親和性。カニクイザルPD-1のECDについてのIgG1-PD1、ニボルマブ、およびペムブロリズマブの会合速度定数k_a（1/Ms）、解離速度定数k_d（1/s）および平衡解離定数K_D（M）はSPRにより決定した。

抗体	K_D (M)		k_a (1/M × s)		k_d (1/s)	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD
IgG1-PD1[a]	2.74×10^{-9}	5.79×10^{-10}	5.34×10^{5}	9.39×10^{4}	1.43×10^{-3}	7.23×10^{-5}
ニボルマブ[a]	2.93×10^{-9}	5.81×10^{-10}	3.28×10^{5}	5.07×10^{4}	9.43×10^{-4}	9.07×10^{-5}
ペムブロリズマブ[b]	8.99×10^{-10}	5.73×10^{-11}	7.14×10^{5}	3.04×10^{4}	6.42×10^{-4}	6.86×10^{-5}

[a] 3回の独立した実験からの平均およびSD。
[b] 2回の独立した実験からの平均およびSD。
略語:K_D＝平衡解離定数;k_a＝会合速度定数;k_d＝解離速度定数またはオフレート;SD＝標準偏差。

【０７０６】

実施例31:PD-1リガンド結合およびPD-1/PD-L1シグナル伝達に対するIgG1-PD1の効果

IgG1-PD1は古典的な免疫チェックポイント阻害剤として機能することを確認するために、PD-1リガンド結合およびPD-1チェックポイント機能を妨害するIgG1-PD1の能力をインビトロで評価した。

【０７０７】

膜発現ヒトPD-1に対する組換えヒトPD-L1およびPD-L2とのIgG1-PD1の競合的な結合をフローサイトメトリーにより評価した。ヒトPD-1を一過的にトランスフェクトしたCHO-S細胞（実施例26を参照;5×10^4細胞/ウェル）を丸底96ウェルプレート（Greiner、カタログ番号650180）のウェルに加え、ペレット化し、氷上に置いた。PBS（Cytiva、カタログ番号SH3A3830.03）中に希釈されたビオチン化された組換えヒトPD-L1（R&D Systems、カタログ番号AVI156）またはPD-L2（R&D Systems、カタログ番号AVI1224）を細胞に加え（最終濃度:1μg/mL）、その直後に、PBS中に希釈されたある濃度範囲のIgG1-PD1、ペムブロリズマブ（MSD、ロット番号T019263およびT036998）、またはIgG1-ctrl-FERRを加えた（最終濃度:3倍希釈工程において30μg/mL～0.5ng/mL）。細胞を次に45分間RTでインキュベートした。細胞をPBSで2回洗浄し、光から保護して、50μLのストレプトアビジン-アロフィコシアニン（R&D Systems、カタログ番号F0050;PBS中に1:20で希釈）と30分間4℃でインキュベートした。細胞をPBSで2回洗浄し、20μLのGMB FACS緩衝液中に再懸濁した。FlowJoソフトウェアを使用してIntellicyt（登録商標）iQue Screener PLUS（Sartorius）上でのフローサイトメトリーによりストレプトアビジン-アロフィコシアニン結合を分析した。

【０７０８】

本質的に製造者に記載されるように、生物発光細胞ベースPD-1/PD-L1遮断レポーターアッセイ（Promega、カタログ番号J1255）を使用してPD-1およびPD-L1の機能的な相互作用に対するIgG1-PD1の効果を決定した。簡潔に述べれば、PD-L1 aAPC/CHO-K1細胞およびPD-1エフェクター細胞の共培養物を、段階希釈されたIgG1-PD1、ペムブロリズマブ（MSD、ロット番号10749880もしくはT019263）、ニボルマブ（Bristol-Myers Squibb、ロット番号11024601）、またはIgG1-ctrl-FERR（最終アッセイ濃度:3倍希釈において15～0.0008μg/mLまたは5倍希釈において10～0.0032μg/mL）と6h、37℃、5% CO_2でインキュベートした。細胞を次にRTで、再構成されたBio-Glo（商標）と5～30分間インキュベートした後に、Infinite（登録商標）F200 PRO Reader（Tecan）またはEnVision Multilabel Plate Reader（PerkinElmer）を使用して発光（相対光単位［RLU］）を測定した。

【０７０９】

GraphPad Prismソフトウェアを使用して非線形回帰分析（4パラメーター用量応答曲線フィット）により用量応答曲線を分析し、最大（阻害）効果の50%が観察された濃度（EC_{50}/IC_{50}）を、フィッティングされた曲線から導出した。

【０７１０】

IgG1-PD1は、PD-L1結合阻害について2.059±0.653μg/mL（13.9±4.4nM）およびPD-L2結合阻害について1.659±0.721μg/mL（11.2±4.9nM）、すなわちナノモル範囲のIC_{50}値と共に（表14）、膜発現ヒトPD-1に対するヒトPD-L1およびPD-L2の結合を用量依存的な方式で妨害した（図27）。ペムブロリズマブは、同等の効力と共に、すなわちナノモル範囲のIC_{50}値と共に、PD-L1およびPD-L2結合阻害を示した。

【０７１１】

細胞ベース生物発光PD-1/PD-L1遮断レポーターアッセイを使用してPD-1/PD-L1系の機能的な遮断を試験した。ヒトPD-1を発現し、かつNFAT-RE駆動性ルシフェラーゼを宿すレポーターJurkat T細胞と、ヒトPD-L1および抗原非依存性TCR活性化因子を発現するPD-L1 aAPC/CHOK1細胞との共培養を、IgG1-PD1、ペムブロリズマブ、またはニボルマブの濃度希釈系列の非存在および存在下でインキュベートした。IgG1-ctrl-FERRを陰性対照として含めた。PD-1/PD-L1相互作用の遮断は、PD1/PDL1媒介性阻

害性シグナルの放出を結果としてもたらして、TCR活性化およびNFAT-RE媒介性ルシフェラーゼ発現（発光の測定）に繋がる。IgG1-PD1は、PD-1^{+}レポーターT細胞においてTCRシグナル伝達の用量依存的な増加を誘導した（図28）。EC_{50}は0.165±0.056μg/mL（1.12±0.38nM;表15）であった。ペムブロリズマブは同様に、0.129±0.051μg/mL（0.86±0.34nM）のEC_{50}と共に、すなわち同等の効力と共に、TCRシグナル伝達のPD-1媒介性阻害を軽減した。ニボルマブは、0.479±0.198μg/mL（3.28±1.36nM）のEC_{50}と共に、すなわちわずかにより低い効力と共に、TCRシグナル伝達の阻害を軽減した。

【０７１２】

要約すると、IgG1-PD1は、PD-1リガンド結合を遮断することおよびPD-1免疫チェックポイント機能を妨害することにより、インビトロで古典的な免疫チェックポイント阻害剤として作用する。

【０７１３】

（表１４）PD-1リガンド結合のIgG1-PD1媒介性阻害のIC_{50}値。IC_{50}値は競合結合曲線から算出した。

ヒトPD-L1との競合的な結合 (平均 IC_{50} [± SD])				ヒトPD-L2との競合的な結合 (平均 IC_{50} [± SD])			
IgG1-PD1		ペムブロリズマブ		IgG1-PD1		ペムブロリズマブ	
μg/mL	nM	μg/mL	nM	μg/mL	nM	μg/mL	nM
2.059 [± 0.653]	13.9 [± 4.4]	1.134 [± 0.493]	7.6 [± 3.3]	1.659 [± 0.721]	11.2 [± 4.9]	1.186 [± 0.770]	8.0 [± 5.2]

略語:IC_{50}＝阻害効果の50％が観察された濃度;PD-1＝プログラム細胞死タンパク質1;PD-L1＝プログラム細胞死1リガンド1;PD-L2＝プログラム細胞死1リガンド2;SD＝標準偏差。

【０７１４】

（表１５）PD-1/PD-L1チェックポイント遮断のEC_{50}。PD-1/PD-L1遮断レポーターアッセイにおいてPD-1^{+}レポーターT細胞およびPD-L1 aAPC/CHO-K細胞の共培養物をIgG1-PD1、ペムブロリズマブ、またはニボルマブの濃度系列とインキュベートした。レポーターT細胞において下流のTCRシグナル伝達およびルシフェラーゼ発現を結果としてもたらすPD-1/PD-L1チェックポイント機能の阻害を、発光を測定することにより決定した。得られた用量応答曲線から、EC_{50}値を算出した。

平均 EC_{50} [± SD]					
IgG1-PD1		ペムブロリズマブ		ニボルマブ	
μg/mL	nM	μg/mL	nM	μg/mL	nM
0.165 [± 0.056]	1.12 [± 0.38]	0.129 [± 0.051]	0.86 [± 0.34]	0.479 [± 0.198]	3.28 [± 1.36]

略語:aAPC＝人工抗原提示細胞;CHO＝チャイニーズハムスター卵巣;EC_{50}＝最大効果の50%が観察される濃度;PD-1＝プログラム細胞死タンパク質1;PD-L1＝プログラム細胞死1リガンド1;SD＝標準偏差;TCR＝T細胞受容体。

【０７１５】

実施例32:活性化T細胞の増殖を増強するIgG1-PD1の能力を決定するための抗原特異的増殖アッセイ

T細胞増殖を増強するIgG1-PD1の能力を決定するために、PD-1過剰発現ヒト$CD8^+$T細胞を使用して抗原特異的増殖アッセイを実行した。

【０７１６】

HLA-A＊02＋末梢血単核細胞（PBMC）を健常ドナーから得た（Transfusionszentrale、University Hospital、Mainz、Germany）。製造者の使用説明書にしたがって抗CD14マイクロビーズ（Miltenyi;カタログ番号130-050-201）を使用して磁気活性化細胞選別（MACS）技術によりPBMCから単球を単離した。T細胞単離のために10% DMSO（AppliChem GmbH、カタログ番号A3672,0050）および10%ヒトアルブミン（CSL Behring、PZN 00504775）を含有するRPMI 1640中で末梢血リンパ球（PBL、CD14陰性画分）を凍結保存した。未熟DC（iDC）への分化のために、1mL当たり1×106個の単球を、5%のプールされたヒト血清（One Lambda Inc.、カタログ番号A25761）、1mMのピルビン酸ナトリウム（Life technologies GmbH、カタログ番号11360-039）、1x非必須アミノ酸（Life Technologies GmbH、カタログ番号11140-035）、200ng/mLの顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF;Miltenyi、カタログ番号130-093-868）および200ng/mLのインターロイキン-4（IL-4;Miltenyi、カタログ番号130-093-924）を含有するRPMI 1640（Life Technologies GmbH、カタログ番号61870-010）中で5日間培養した。3日の培養日の後に、培地の半分を新鮮な培地で置き換えた。5日目に、非接着細胞を収集することによりiDCを採取し、2mMのEDTAを含有するダルベッコリン酸緩衝化食塩水（DPBS）との10分間37°でのインキュベーションにより接着細胞を剥離した。DPBSでの洗浄後に、抗原特異的T細胞アッセイにおける将来的な使用のために10% DMSOを含有するウシ胎仔血清（FBS;Sigma-Aldrich、カタログ番号F7524）中でiDCを凍結保存した。

【０７１７】

抗原特異的$CD8^+$T細胞増殖アッセイの開始の1日前に、同じドナーからの凍結されたPBLおよびiDCを解凍した。製造者の使用説明書にしたがって抗CD8マイクロビーズ（Miltenyi、カタログ番号130-045-201）を使用してMACS技術によりPBLから$CD8^+$T細胞を単離した。約10×10^6～15×10^6個の$CD8^+$T細胞に、250μLのX-Vivo15培地（Lonza、カタログ番号BE02-060Q）中で、各々10μgの、ヒトクローディン-6（CLDN6）に特異的なマウスTCR（HLA-A＊02制限）のアルファおよびベータ鎖をコードするインビトロ転写（IVT）-RNA（WO 2015150327 A1に記載されている）と、PD-1（UniProt Q15116）をコードする10μgのIVT-RNAとをエレクトロポレートし

た。細胞を4mmエレクトロポレーションキュベット（VWR International GmbH、カタログ番号732-0023）に移し、BTX ECM（登録商標）830 Electroporation System（BTX;500V、1x3msパルス）を使用してエレクトロポレートした。エレクトロポレーションの直後に、5%のプールされたヒト血清を含有する新鮮なIMDM GlutaMAX培地（Life Technologies GmbH、カタログ番号319800-030）に細胞を移し、37℃、5% CO_2で少なくとも1時間静置した。製造者の使用説明書にしたがってPBS中の1.6μMのカルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル（CFSE;Life Technologies GmbH、カタログ番号V12883）を使用してT細胞を標識し、5%のプールされたヒト血清を補充したIMDM培地中で終夜インキュベートした。

【０７１８】

最大5×10^6個の解凍されたiDCに、250μLのX-Vivo15培地中で、上記のエレクトロポレーションシステム（300V、1x12msパルス）を使用して、全長ヒトCLDN6をコードする2μgのIVT-RNA（WO 2015150327 A1）をエレクトロポレートし、5%のプールされたヒト血清を補充したIMDM培地中で終夜インキュベートした。

【０７１９】

翌日、細胞を採取した。iDC上のCLDN6の細胞表面発現の他に、T細胞上のCLDN6特異的TCRおよびPD-1の細胞表面発現をフローサイトメトリーにより確認した。この目的のために、iDCをDyLight650コンジュゲートCLDN6特異的抗体（商業的に入手不可;自社製造）で染色した。T細胞をbrilliant violet（BV）421コンジュゲート抗マウスTCR-β鎖抗体（Becton Dickinson GmbH、カタログ番号562839）およびアロフィコシアニン（APC）コンジュゲート抗ヒトPD-1抗体（Thermo Fisher Scientific、カタログ番号17-2799-42）で染色した。

【０７２０】

エレクトロポレートしたiDCを、エレクトロポレートした、CFSE標識されたT細胞と1:10の比で、96ウェル丸底プレート中の5%のプールされたヒト血清を含有するIMDM培地中、4倍段階希釈（範囲0.00005～0.8μg/mL）のIgG1-PD1、ペムブロリズマブ（Keytruda（登録商標）、MSD Sharp&Dohme GmbH、PZN 10749897）、またはニボルマブ（Opdivo（登録商標）、Bristol-Myers Squibb、PZN 11024601）の存在下でインキュベートした。陰性対照抗体IgG1-ctrl-FERRを0.8μg/mLの単一の濃度で使用した。4日の培養後に、細胞をAPCコンジュゲート抗ヒトCD8抗体で染色した。BD FACSCelesta（商標）フローサイトメーター（Becton Dickinson GmbH）を使用して$CD8^+$T細胞におけるCFSE希釈のフローサイトメトリー分析によりT細胞増殖を評価した。

【０７２１】

FlowJo softwareバージョン10.7.1を使用してフローサイトメトリーデータを分析した。FlowJoにおける増殖モデリングツールを使用して$CD8^+$T細胞のCFSE標識希釈を評価し、積分式を使用して拡大増殖指数を算出した。4パラメーター対数フィットを使用してGraphPad Prismバージョン9（GraphPad Software,Inc.）において用量応答曲線を生成した。GraphPad Prismバージョン9を使用してフリードマン検定およびダン多重比較検定により統計的有意性を決定した。

【０７２２】

$CD8^+$T細胞の抗原特異的増殖は、ピコモル範囲のEC_{50}値（表16）と共に、IgG1-PD1により用量依存的な方式で増強された（図29）。ペムブロリズマブまたはニボルマブでの処理もまた、用量依存的な方式でT細胞増殖を増強した。ペムブロリズマブの平均EC_{50}はIgG1-PD1と同等であった一方、ニボルマブのEC_{50}はIgG1-PD1の場合よりも有意（P＝0.0267）に高かった。

【０７２３】

（表１６）抗原特異的増殖アッセイにおけるEC_{50}値。抗原特異的T細胞増殖アッセイにより測定された$CD8^+$T細胞拡大増殖指数を使用してIgG1-PD1、ペムブロリズマブ、およびニボルマブのEC_{50}値を決定した。示されるデータは、4パラメーター対数フィッ

トに基づいて算出された値である。略語:EC_{50}＝半数最大有効濃度;FERR＝L234F/L235E/G236R-K409R;PD1＝プログラム細胞死タンパク質1;SD＝標準偏差。

平均 EC_{50} [± SD]					
IgG1-PD1		ペムブロリズマブ		ニボルマブ	
μg/mL	nM	μg/mL	nM	μg/mL	nM
0.0124 [± 0.0018]	0.0837 [± 0.0123]	0.0152 [± 0.0049]	0.1018 [± 0.0333]	0.0701 [± 0.0238]	0.4802 [± 0.1632]

【０７２４】

実施例33:同種ＭＬＲアッセイにおけるサイトカイン分泌に対するIgG1-PD1の効果

混合リンパ球反応（ＭＬＲ）アッセイにおいてサイトカイン分泌を増強するIgG1-PD1の能力を調べるために、ヒト成熟樹状細胞（mDC）およびCD8$^+$T細胞の3つの独特の同種ペアをIgG1-PD1の存在下で共培養した。IFNγ特異的イムノアッセイを使用してIFNγのレベルを測定し、カスタマイズしたLuminexマルチプレックスイムノアッセイを使用して単球化学誘引タンパク質-1（ＭＣＰ-1）、GM-CSF、インターロイキン（IL）-1β、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL12-p40、IL-15、IL-17α、および腫瘍壊死因子（TNFα）のレベルを決定した。

【０７２５】

ヒトCD14$^+$単球を健常ドナーから得た（BioIVT）。未熟樹状細胞（iDC）への分化のために、10％熱不活化ウシ胎仔血清（FBS;Gibco、カタログ番号16140071）、100ng/mLのGM-CSFおよび300ng/mLのIL-4（BioLegend、カタログ番号766206）を補充したRPMI-1640完全培地（ATCC改変製剤;Thermo Fisher、カタログ番号A1049101）中37℃で6日間、単球を培養した。4日目に、培地を、補充物を含む新鮮な培地で置き換えた。iDCを成熟させるために、10％ FBS、100ng/mLのGM-CSF、300ng/mLのIL-4、および5μg/mLのリポ多糖（LPS;Thermo Fisher Scientific、カタログ番号00 4976 93）を補充したRPMI-1640完全培地中37℃で、ＭＬＲアッセイの開始に先立って24h、細胞をインキュベートした。並行して、同種健常ドナーから得られた精製されたCD8$^+$T細胞（BioIVT）を解凍し、10％ FBSおよび10ng/mLのIL-2（BioLegend、カタログ番号589106）を補充したRPMI-1640完全培地中37℃で終夜インキュベートした。

【０７２６】

翌日、LPS成熟樹状細胞（mDC）および同種CD8$^+$T細胞を採取し、予め温めたAIM-V培地（Thermo Fisher Scientific、カタログ番号12055091）中にそれぞれ4×10^{5}細胞/mLおよび4×10^{6}細胞/mLで再懸濁した。mDC（20,000細胞/ウェル）を同種ナイーブCD8$^+$T細胞（200,000細胞/ウェル）と、抗体濃度範囲（0.001～30μg/mL）のIgG1-PD1、IgG1-ctrl-FERR、もしくはペムブロリズマブ（MSD、カタログ番号T019263）の存在下で、または30μg/mLのIgG4アイソタイプ対照（BioLegend、カタログ番号403702）の存在下で96ウェル丸底プレート中のAIM-V培地中37℃でインキュベートした。

【０７２７】

5日後に、無細胞上清を各々のウェルから新たな96ウェルプレートに移し、サイトカイン濃度のさらなる分析まで-80℃で貯蔵した。

【０７２８】

製造者の使用説明書にしたがってEnvision機器上のIFNγ特異的イムノアッセイ（Al

pha Lisa IFNγキット;Perkin Elmer、カタログ番号AL217）を使用してIFNγレベルを決定した。

【０７２９】

Human TH17 Magnetic Bead Panel（MILLIPLEX（登録商標））に基づくカスタマイズしたLuminex（登録商標）マルチプレックスイムノアッセイ（Millipore、注文番号SPR1526）を使用してMCP-1、GM-CSF、IL-1β、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL12-p40、IL-15、IL-17αおよびTNFαのレベルを決定した。簡潔に述べれば、無細胞上清を解凍し、10μLの各々の試料を、1×洗浄緩衝液で予備洗浄された384ウェルプレート（Greiner Bio-One、カタログ番号781096）のウェル中の10μLのアッセイ緩衝液に加えた。並行して、アッセイ緩衝液中の10μLの標準品または対照をウェルに加えた後に、10μLのアッセイ培地を加えた。異なるサイトカインに対する磁気ビーズを混合し、ビーズ希釈剤中で1倍濃度まで希釈した後に、10μLの混合されたビーズを各々のウェルに加えた。プレートを密閉し、4℃で振盪しながら終夜インキュベートした。ウェルを60μLの1×洗浄緩衝液で3回洗浄した。引き続いて、10μLの特注検出抗体を各々のウェルに加え、プレートを密閉し、RTで振盪しながら1hインキュベートした。次に、10μLのストレプトアビジン-PEを各々のウェルに加え、プレートを密閉し、RTで振盪しながら30分間インキュベートした。ウェルを上記のように60μLの1×洗浄緩衝液で3回洗浄した後に、RTで5分間振盪することにより75μLのLuminex Sheath Fluid中にビーズを再懸濁した。試料をLuminex FlexMap 3Dシステムに流した。

【０７３０】

MLRアッセイの始めおよび終わりに、PE-Cy7コンジュゲート抗PD-1（BioLegend、カタログ番号329918;1:20）、アロフィコシアニンコンジュゲート抗PD-L1（BioLegend、カタログ番号329708;1:80）、BUV496コンジュゲート抗CD3（BD Biosciences、カタログ番号612940;1:20）、およびBUV395コンジュゲート抗CD8（BD Biosciences、カタログ番号563795;1:20）を使用してフローサイトメトリーによりCD8$^+$T細胞上のPD-1の発現およびmDC上のPD-L1の発現を確認した。

【０７３１】

IgG1-PD1は、用量依存的な方式でIFNγの分泌を一貫して増強した（図30）。IgG1-PD1はまた、MCP-1、GM-CSF、IL-2、IL-6、IL-12p40、IL-17α、IL-10、およびTNFαの分泌を増強した（図31）。ペムブロリズマブはサイトカイン分泌に対して同等の効果を有した。

【０７３２】

実施例34:IgG1-PD1に結合するC1qの評価

定常重鎖領域中にFER Fcサイレンシング突然変異を宿すIgG1-PD1への補体タンパク質C1qの結合を、活性化ヒトCD8$^+$T細胞を使用して評価した。陽性対照として、IgG1-CD52-E430Gを含めたが、これは、CD52抗体CAMPATH-1Hに基づくV_HおよびV_Lドメインを有し、かつ細胞表面に結合した場合にC1qに効率的に結合することが公知であるFc増強骨格を有する。非結合性陰性対照抗体として、IgG1-ctrl-FERRおよびIgG1-ctrlを含めた。

【０７３３】

すべて製造者の使用説明書にしたがって、RosetteSep（商標）Human CD8$^+$T Cell Enrichment Cocktail（Stemcell Technologies、カタログ番号15023C.2）を使用した陰性選択により、または、CD8マイクロビーズ（Miltenyi Biotec、カタログ番号130-045-201）およびLSカラム（Miltenyi Biotec、カタログ番号130-042-401）を使用した、磁気活性化細胞選別（MACS）を介する陽性選択により、健常ボランティアから得られたバフィコート（Sanquin）からヒトCD8$^+$T細胞を精製（濃縮）した。精製されたT細胞をT細胞培地（鉄を含む10％熱不活化ドナーウシ血清［DBSI;Gibco、カタログ番号20731-030］およびペニシリン/ストレプトマイシン［pen/strep;Lonza、カタログ番号DE17-603E］を補充した、25mMのHEPESおよびL-グルタミン［

Lonza、カタログ番号BE12-115F］を含む（Roswell Park Memorial Institute［RPMI］-1640培地）中に再懸濁した。

【０７３４】

抗CD3/CD28ビーズ（Dynabeads（商標）Human T-Activator CD3/CD28;ThermoFisher Scientific、カタログ番号11132D）をPBSで洗浄し、T細胞培地中に再懸濁した。ビーズを、濃縮されたヒトCD8$^+$T細胞に1:1の比で加え、37℃、5% CO_2で48hインキュベートした。次に、磁石を使用してビーズを除去し、細胞をPBS中で2回洗浄し、再びカウントした。

【０７３５】

IgG1-PD1（30μg/mL）およびR-フィコエリトリン（PE）コンジュゲートヤギ抗ヒトIgG F（ab'）$_2$（GMB FACS緩衝液中で1:200に希釈;Jackson ImmunoResearch、カタログ番号109-116-098）、または商用のPEコンジュゲートPD-1抗体（BioLegend、カタログ番号329906;1:50に希釈）を使用して、活性化CD8$^+$T細胞上のPD-1発現をフローサイトメトリーにより確認した。

【０７３６】

活性化CD8$^+$T細胞を丸底96ウェルプレート中に播種し（30,000または50,000細胞/ウェル）、ペレット化し、30μLのアッセイ培地（0.1%［w/v］のウシ血清アルブミン画分V［BSA;Roche、カタログ番号10735086001］およびペニシリン/ストレプトマイシンを補充した、25mMのHEPESおよびL-グルタミンを含むRPMI-1640）中に再懸濁した。引き続いて、50μLのIgG1-PD1、IgG1-ctrl-FERR、IgG1-CD52-E430G、またはIgG1-ctrl（アッセイ培地中での3倍希釈工程において1.7×10^{-4}～30μg/mLの最終濃度）をウェルの各々に加え、37℃で15分間インキュベートして抗体を細胞に結合させた。

【０７３７】

ヒト血清（20μL/ウェル;Sanquin、ロット20L15-02）を、C1qの供給源として、20%の最終濃度まで加えた。細胞を氷上で45分間インキュベートし、続いて冷GMB FACS緩衝液で2回洗浄し、50μLのフルオレセインイソチオシアネート（FITC）コンジュゲートウサギ抗ヒトC1q（20μg/mLの最終濃度［DAKO、カタログ番号F0254］;GMB FACS緩衝液中で1:75に希釈）とアロフィコシアニンコンジュゲートマウス抗CD8（BD Biosciences、カタログ番号555369;GMB FACS緩衝液中で1:50に希釈）の存在または非存在下、4℃の暗所で30分間インキュベートした。細胞を冷GMB FACS緩衝液で2回洗浄し、2mMのエチレンジアミン四酢酸（EDTA;Sigma-Aldrich、カタログ番号03690）および4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール（DAPI）生存色素（1:5,000;BD Pharmingen、カタログ番号564907）を補充した20μLのGMB FACS緩衝液中に再懸濁した。（DAPI排除により同定される）生存細胞に結合するC1qを、IntelliCyt（登録商標）iQue Screener PLUS（Sartorius）またはiQue3（Sartorius）上のフローサイトメトリーにより分析した。GraphPad Prismソフトウェアを使用して非線形回帰分析（可変の傾きを伴うシグモイド用量-応答）を使用して結合曲線を分析した。

【０７３８】

膜結合IgG1-CD52-E430Gに対する用量依存的なC1q結合が観察された一方、膜結合IgG1-PD1または非結合性対照抗体に対するC1q結合は観察されなかった（図32）。

【０７３９】

これらの結果は、IgG1-PD1の機能的に不活性の骨格はC1qに結合しないことを示す。

【０７４０】

実施例35:SPRにより決定された場合のFcγ受容体へのIgG1-PD1の結合

固定化されたFcγR（FcγRIa、FcγRIIa、FcγRIIbおよびFcγRIIIa）へのIgG1-PD1の結合をSPRによりインビトロで評価した。両方の多型バリアントをFcγRIIa（H131およびR131）ならびにFcγRIIIa（V158およびF158）のために含めた。FcγR結合についての陽性対照として、野生型Fc領域を有するIgG1-ctrlを含めた。

【０７４１】

第1の実験において、固定化されたヒト組換えFcγRバリアント（FcγRIa、FcγRIIa、FcγRIIb、およびFcγRIIIa）へのIgG1-PD1、またはIgG1-ctrlの結合を、Biacore 8K SPRシステムを使用して分析した。同じ方法を使用した、実験の第2のセットにおいて、IgG1-PD1、ニボルマブ（Bristol-Meyers Squibb、ロット番号ABP6534）、ペムブロリズマブ（Merck Sharp＆Dohme、ロット番号U013442）、ドスタルリマブ（GlaxoSmithKline、ロット番号1822049）、セミプリマブ（Regeneron、ロット番号1F006A）、IgG1-ctrl、またはIgG4-ctrlの結合を分析した。

【０７４２】

製造者の使用説明書にしたがってアミンカップリングおよびHis捕捉キット（Cytiva、カタログ番号BR100050およびカタログ番号29234602）を使用してBiacore Series S Sensor Chips CM5（Cytiva、カタログ番号29104988）に抗ヒスチジン（His）抗体を共有結合的に被覆した。HBS-EP＋（Cytiva、カタログ番号BR100669）中に希釈されたFcγRIa、FcγRIIa（H131およびR131）、FcγRIIbならびにFcγRIIIa（V158およびF158）（SinoBiological、それぞれカタログ番号10256-H08S-B、10374-H08H1、10374-H27H、10259-H27H、10389-H27H1、および10389-H27H）を10μL/分の流速および60秒の接触時間で抗His被覆センサーチップの表面上に捕捉させて、約350～600共鳴単位（RU）の捕捉レベルを得た。

【０７４３】

HBS-EP＋緩衝液の3回のスタートアップサイクル後に、表17に示されている抗体範囲を使用して、試験抗体（IgG1-PD1、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ドスタルリマブ、セミプリマブ、IgG1-ctrl、またはIgG4-ctrl）を注入して結合曲線を生成した。FcγRが捕捉された表面（活性表面）上で分析された各々の試料を、バックグラウンド補正のために使用されたFcγRが捕捉されていない並列フローセル（参照表面）上でも分析した。（mock）アナライトとしてHBS-EP＋を含有する第3のスタートアップサイクルを他のセンサーグラムから差し引いて二重参照データを得た。

【０７４４】

各々のサイクルの終わりに、10mMのグリシン-HCl pH 1.5（Cytiva、カタログ番号BR100354）を使用して表面を再生させた。Biacore Insight Evaluationソフトウェア（Cytiva）を使用してセンサーグラムを生成し、4パラメーターロジスティックフィットをエンドポイント測定値に適用した（捕捉後ベースラインに対する結合プラトー）。第1の実験（n＝1;適格SPRアッセイ）のデータを図33に示し;実験の第2のセット（n＝3）のデータを図34に示す。

【０７４５】

（表１７）個々のFcγRへの結合についての試験条件

FcγR	試験された抗PD-1抗体濃度範囲		
	出発濃度 (nM)	希釈倍数	最低濃度 (nM)
FcγRIa	3,000	1:3	0.02
FcγRIIa-H131	10,000	1:2.5	0.42
FcγRIIa-R131	10,000	1:2.5	0.42
FcγRIIb	10,000	1:2	4.9
FcγRIIIa-V158	10,000	1:3	0.06
FcγRIIIa-F158	10,000	1:2.5	0.42

【０７４６】

第1の実験からの結果は、すべてのFcγRへのIgG1-ctrlの結合を示したが、IgG1-PD1についてFcγRIa、FcγRIIa（H131およびR131）、FcγRIIb、ならびにFcγRIIIa（V158およびF158）への結合は観察されなかった（図31）。

【０７４７】

実験の第2のセットからの結果は、IgG1-PD1についてのFcγR結合の欠如を裏付けた（図32）。IgG4-ctrlならびに試験された他の抗PD-1抗体（ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ドスタルリマブ、およびセミプリマブ;すべてIgG4サブクラス）は、FcγRIa、FcγRIIa-H131、FcγRIIa-R131、およびFcγRIIbへの明確な結合、ならびにFcγRIIIa-F158およびFcγRIIIa-V158への最小～ごく最小の結合を実証した。

【０７４８】

これらのデータは、IgG1-PD1のFcドメインについてのFcγR結合の欠如を裏付け、かつFcγRがニボルマブ、ペムブロリズマブ、ドスタルリマブ、およびセミプリマブに結合することを実証する。以上を合わせると、これらのデータは、IgG1-PD1のFcドメインはFcγR媒介性エフェクター機能（ADCC、ADCP）を誘導できないことを示唆する。

【０７４９】

実施例36:フローサイトメトリーにより決定された場合の細胞表面発現FcγRIaへのIgG1-PD1の結合

ヒト細胞表面発現FcγRIaへのIgG1-PD1、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ドスタルリマブ、およびセミプリマブの結合を、フローサイトメトリーを使用して分析した。

【０７５０】

一過的にトランスフェクトされたCHO-S細胞上にFcγRIaを発現させ、FITCコンジュゲート抗FcγRI抗体（BioLegend、カタログ番号305006;1:25）を使用してフローサイトメトリーにより細胞表面発現を確認した。実施例27に記載されるようにトランスフェクトCHO-S細胞への抗PD-1抗体の結合を評価した。簡潔に述べれば、IgG1-PD1、ニボルマブ（Bristol-Meyers Squibb、ロット番号ABP6534）、ペムブロリズマブ（Merck Sharp＆Dohme、ロット番号U013442）、ドスタルリマブ（GlaxoSmith Kline、ロット番号1822049）、セミプリマブ（Regeneron、ロット番号1F006A）、IgG1-ctrl、およびIgG1-ctrl-FERRの抗体希釈液（最終濃度:1.69×10^{-4}～10μg/mL、3倍希釈）をGMB FACS緩衝液中に調製した。細胞を遠心分離し、上清を除去し、細胞（50μL中30,000細胞）を50μLの抗体希釈液と30分間4℃でインキュベートした。細胞をGMB FACS緩衝液で2回洗浄し、光から保護して、50μLの二次抗体（PEコンジュゲートヤギ抗ヒトIgG F（ab'）$_2$;1:500）と30分間4℃でインキュベートした。細胞をGMB FACS緩衝液で2回洗浄し、2mMのEDTAおよびDAPI生存マーカーを補充したGMB FACS緩衝液中に再懸濁した（1:5,000）。

【０７５１】

生存細胞に結合する抗体を、PE陽性、DAPI陰性細胞のゲーティングによりFlowJoソフトウェアを使用してIntellicyt iQue PLUS Screener（Intellicyt Corporation）上のフローサイトメトリーにより分析した。GraphPad Prismにおいて非線形回帰分析（4パラメーター用量応答曲線フィット）を使用して結合曲線を分析した。

【０７５２】

フローサイトメトリー結合アッセイにおいて、陽性対照抗体IgG1-ctrl（野生型Fc領域を有する）は、FcγRIaを一過的に発現する細胞への結合を示したが、陰性対照抗体IgG1-ctrl-FERR（FER不活性突然変異および追加の、この研究の文脈において機能的に関連しない、K409R突然変異を含有するFc領域を有する）について結合は観察されなかった（図35）。IgG1-PD1について結合は観察されなかったが、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、セミプリマブ、およびドスタルリマブについて濃度依存的な結合が観察された。

【０７５３】

これらのデータは、IgG1-PD1のFcドメインについてのFcγRIa結合の欠如を裏付け、かつFcγRIaがニボルマブ、ペムブロリズマブ、ドスタルリマブ、およびセミプリマブに結合することを実証する。以上を合わせると、これらのデータは、IgG1-PD1のFcドメインはFcγRIa媒介性エフェクター機能を誘導できないことを示唆する。

【０７５４】

実施例37:IgG1-PD1による新生児Fc受容体への結合

新生児Fc受容体（FcRn）は、分解からIgGを保護することによりIgGの長い血漿中半減期の原因となる。IgGは、酸性（pH 6.0）エンドソーム環境中でFcRnに結合するが、中性pH（pH 7.4）でFcRnから解離する。FcRnへの抗体のこのpH依存性の結合は、FcRnと共に抗体のリサイクリングを引き起こして、細胞内抗体分解を予防し、したがってその抗体のインビボ薬物動態の指標となる。固定化されたFcRnへのIgG1-PD1の結合を表面プラズモン共鳴（SPR）の手段によりpH 6.0およびpH 7.4においてインビトロで評価した。

【０７５５】

固定化されたヒトFcRnへのIgG1-PD1の結合を、Biacore 8K SPRシステムを使用して分析した。製造者の使用説明書にしたがってアミン-カップリングおよびHis捕捉キット（Cytiva、カタログ番号BR100050およびカタログ番号29234602）を使用してBiacore Series S Sensor Chips CM5（Cytiva、カタログ番号29104988）を抗ヒスチジン（His）抗体で共有結合的に被覆した。pH 7.4のPBS-P＋緩衝液（Cytiva、カタログ番号28995084）中または（塩酸［Sigma-Aldrich、カタログ番号07102］の添加により）6.0にpHを調整されたPBS-P＋緩衝液中で5nM被覆濃度に希釈されたFcRn（SinoBiological、カタログ番号CT071-H27H-B）を10μL/分の流速および60秒の接触時間と共に抗His被覆センサーチップの表面上に捕捉させた。これは約50RUの捕捉レベルを結果としてもたらした。pH 6.0またはpH 7.4のPBS-P＋緩衝液の3回のスタートアップサイクル後に、試験抗体（pH 6.0またはpH 7.4のPBS-P＋緩衝液中のIgG1-PD1、ペムブロリズマブ（MSD、ロット番号T019263）、またはニボルマブ（Bristol-Myers Squibb、ロット番号ABP6534）の6.25～100nMの2倍希釈系列）を注入して結合曲線を生成した。FcRnが捕捉された表面（活性表面）上で分析された各々の試料を、バックグラウンド補正のために使用されたFcRnが捕捉されていない並列フローセル（参照表面）上でも分析した。（mock）アナライトとしてHBS-EP＋を含有する第3のスタートアップサイクルを他のセンサーグラムから差し引いて二重参照データを得た。各々のサイクルの終わりに、10mMのグリシンHCl pH 1.5（Cytiva、カタログ番号BR100354）を使用して表面を再生させた。Biacore Insight Evaluationソフトウェア（Cytiva）において予め定義された「Multi-cycle kinetics using capture」評価方法を使用してデータを分析した。データは、技術的重複物を用いた3回の別々の実験に基づく。

【０７５６】

pH 6.0において、IgG1-PD1は50nMの平均親和性（K_D）と共にFcRnに結合し（表18）、これは野生型Fc領域を有するIgG1-ctrl抗体と同等である（文献において広範囲の親和性が野生型IgG1分子について報告されており;同じアッセイセットアップを用いた先行する自社実験において、34nMの平均K_Dが12データ点にわたりIgG1-ctrlについて測定された）。ペムブロリズマブおよびニボルマブの親和性は約2分の1の低さだった（それぞれ116nMおよび133nMのK_D）。FcRn結合はpH 7.4で観察されなかった（図示せず）。以上を合わせると、これらの結果は、IgG1-PD1 Fc領域中のFER不活性突然変異はFcRn結合に影響しないことを実証し、かつIgG1-PD1はインビボで典型的なIgG薬物動態特性を保持することを示唆する。

【０７５７】

（表１８）SPRにより決定された場合のFcRnについての親和性。ヒトFcRnを被覆されたセンサーチップへのIgG1-PD1、ペムブロリズマブ、およびニボルマブの結合はSPRにより分析した。平均親和性およびSDは、技術的重複物を用いた3回の独立した測定に基づく。

抗体	K_D (M)		k_a (1/M × s)		k_d (1/s)	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD
IgG1-PD1	4.99×10^{-8}	6.85×10^{-9}	8.65×10^{5}	6.79×10^{4}	4.29×10^{-2}	4.88×10^{-3}
ニボルマブ	1.33×10^{-7}	2.01×10^{-8}	5.18×10^{5}	4.70×10^{4}	6.89×10^{-2}	1.19×10^{-2}
ペムブロリズマブ	1.16×10^{-7}	1.69×10^{-8}	5.46×10^{5}	4.42×10^{4}	6.36×10^{-2}	1.15×10^{-2}

略語:K_D＝平衡解離定数;k_a＝会合速度定数;k_d＝解離速度定数またはオフレート;SD＝標準偏差。

【０７５８】

実施例38:標的結合の非存在下でのIgG1-PD1の薬物動態分析

IgG1-PD1の薬物動態特性をマウスにおいて分析した。PD-1は、活性化されたBおよびT細胞上に主に発現されるため、その発現は、成熟BおよびT細胞を欠いている非腫瘍保有SCIDマウスにおいて限定されることが予想される。さらには、IgG1-PD1は、マウスPD-1を一過的に過剰発現する細胞への実質的に低減された交差反応性を示す（実施例27）。したがって、非腫瘍保有SCIDマウスにおけるIgG1-PD1の薬物動態（PK）特性は、標的結合の非存在下でのIgG1-PD1のPK特性を反映することが予想される。

【０７５９】

この研究におけるマウスは、Central Laboratory Animal Facility（Utrecht、the Netherlands）において飼育した。食物および水が自由に提供される個々に換気されたケージ中ですべてのマウスを保った。すべての実験は、指令書（2010/63/EU）から翻訳されたオランダ動物保護法（WoD）を遵守し、Dutch Central Commission for animal experimentsおよび地域の研究倫理委員会により承認された。群当たり3匹のマウスを使用して、SCIDマウス（C.B-17/IcrHan（登録商標）Hsd-Prkdc^{scid}、Envigo）の静脈内に1または10mg/kgのIgG1-PD1を注射した。血液試料（40μL）を伏在静脈または頬静脈から抗体投与の10分、4h、1日、2日、8日、14日、および21日後に収集した。血液を、K_2-エチレンジアミン四酢酸を含有するバイアル中に収集し、抗体濃度の決定まで-65℃で貯蔵した。

【０７６０】

全ヒトIgG（hIgG）電気化学発光イムノアッセイ（ECLIA）により、特定のhIgG濃度を決定した。Meso Scale Discovery（MSD）標準プレート（96-well MULTI-ARRAY plate、カタログ番号L15XA-3）を、PBS（Lonza、カタログ番号BE17-156Q）中に希釈されたマウス抗hIgG捕捉抗体（IgG2amm-1015-6A05）で16～24h、2～8℃で被覆した。PBS-Tween（PBS-T;0.05％（w/v）のTween-20［Sigma、カタログ番号P1379］を補充したPBS）でプレートを洗浄して、結合していない抗体を除去した後に、占有されていない表面を60±5分間RTでブロッキングし（3％（w/v）のBlocker-A［MSD、カタログ番号R93AA-1］を補充したPBS-T）、続いてPBS-Tで洗浄した。マウス血漿試料を最初にアッセイ緩衝液（1％（w/v）のBlocker-Aを補充したPBS-T）中で50倍（2％マウス血漿）に希釈した。参照曲線を作成するために、IgG1-PD1（注射のために使用した材料と同じバッチ）をキャリブレーター希釈剤（アッセイ緩衝液

中の2%マウス血漿［K_2EDTA、プールされた血漿、BIOIVT、カタログ番号MSE00PLK2PNN］）中に希釈した（測定範囲:0.156～20.0μg/mL;アンカー点:0.0781および40.0μg/mL）。試料中に存在する抗体濃度の予想される広い範囲を受容するために、試料を試料希釈剤（アッセイ緩衝液中の2%マウス血漿）中で1:10または1:50に追加的に希釈した。被覆およびブロッキングされたプレートを50μLの希釈されたマウス試料、参照曲線、および適切な品質対照試料（参照曲線の範囲をカバーする、IgG1-PD1でスパイクされたプールされたマウス血漿）とRTで90±5分間インキュベートした。PBS-Tでの洗浄後に、プレートをSULFO-TAGコンジュゲートマウス抗hIgG検出抗体IgG2amm-1015-4A01とRTで90±5分間インキュベートした。PBS-Tでの洗浄後に、リード緩衝液（Read Buffer）（MSD GOLD Read Buffer、カタログ番号R92TG-2）を加えることおよびMSD Sector S600プレートリーダーを使用して約620nmでの光放出を測定することにより、固定化された抗体を可視化した。分析データの処理は、SoftMax Pro GxP Software v7.1を使用して行った。定量下限（LLOQ）を下回るかまたは定量上限（ULOQ）を上回る外挿は許容しなかった。

【０７６１】

標的結合の非存在下でのIgG1-PD1の血漿クリアランスプロファイルは、ヒトにおけるIgG1クリアランスに基づいて2コンパートメントモデルにより予測されるSCIDマウスにおける野生型ヒトIgG1抗体のクリアランスプロファイル（Bleeker et al.,2001,Blood.98（10）:3136-42）と同等であった（図36）。留意された臨床的な観察はなく、体重損失は観察されなかった。

【０７６２】

結論として、これらのデータは、IgG1-PD1のPK特性は、標的結合の非存在下で通常のヒトIgG抗体の場合と同等であることを示す。

【０７６３】

実施例39:ヒトPD-1ノックインマウスにおけるIgG1-PD1の抗腫瘍活性

IgG1-PD1は、マウスPD-1を一過的に過剰発現する細胞への限定された結合を示すに過ぎない（実施例27）。したがって、インビボでIgG1-PD1の抗腫瘍活性を評価するために、マウスPD-1遺伝子座においてヒトPD-1細胞外ドメイン（ECD）を発現するように操作されたC57BL/6マウス（hPD-1ノックイン［KI］マウス）を使用した。

【０７６４】

すべての動物実験は、Crown Bioscience Inc.において行い、実行に先立ってそのInstitutional Animal Care and Use Committee（IACUC）により承認された。動物は、Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care（AAALAC）の規則により規定される優良動物試験基準（good animal practice）にしたがって飼育し、取り扱った。7～9週齢のC57BL/6バックグラウンドの雌ホモ接合性ヒトPD-1ノックインマウス（hPD-1 KIマウス;Beijing Biocytogen Co.,Ltd;C57BL/6-Pdcd1$^{tm1（PDCD1）}$/Bcgen、ストック番号110003）の右下脇腹の皮下（SC）に同系MC38結腸がん細胞（1×10^{6}細胞）を注射した。キャリパーを使用して腫瘍成長を評価し（無作為化後に週当たり3回）、キャリパー測定値から腫瘍体積＝0.5×（長さ×幅^2）として腫瘍体積（mm^3）を算出し、ここで、長さは最長腫瘍寸法であり、幅は長さに垂直な最長腫瘍寸法である。腫瘍が約60mm^{3}の平均体積に達した時（0日目として表される）に腫瘍体積および体重に基づいてマウスを無作為化した（群当たり9匹のマウス）。処置の開始時に、マウスの静脈内（IV;投薬体積はPBS中10mL/kg）に0.5、2、もしくは10mg/kgのIgG1-PD1もしくはペムブロリズマブ（Crown Bioscience Inc.によりMerckから取得、ロット番号T042260）、または10mg/kgのアイソタイプ対照抗体IgG1-ctrl-FERRを注射した。後続する用量を腹腔内（IP）に投与した。3週間の週当たり2用量の投薬レジメン（2QW×3）を使用した。動物を罹病および死亡について1日毎にモニターし、他の臨床的な観察について常法通りにモニターした。腫瘍体積が1,500mm^{3}を上回った場合または動物が他の人道的エンドポイントに達した場合に個々のマウスについての実験を終了した。

【０７６５】
群間で無増悪生存期間を比較するために、曲線フィットを個々の腫瘍成長グラフに適用して、各々のマウスについて500mm^{3}の腫瘍体積を超える進行の日を確立した。これらの日の値をカプラン-マイヤー生存曲線においてプロットし、これを使用して、SPSSソフトウェアを使用した個々の曲線の間のマンテル-コックス分析を行った。すべての群が依然としてインタクトであった最後の日（すなわち、研究における最初の腫瘍関連死まで、すなわち11日目）にノンパラメトリックマン-ホイットニー分析（GraphPad Prism）を使用して群間の腫瘍体積における差異を比較した。P値に付随して、メジアンにおける差異の95％信頼区間（ホッジス・レーマン）を含むメジアン値（群毎）を提示している。
【０７６６】
マウスは病気の徴候を示さなかったが、2匹のマウスは死亡した（2mg/kg IgG1-PD1群における1匹および2mg/kgペムブロリズマブ処置群における1匹）。これらの死の原因は決定されなかった。
【０７６７】
IgG1-PD1およびペムブロリズマブでの処置は、試験されたすべての用量で腫瘍成長を阻害した（図37A）。すべての処置群が完了した最後の日である11日目に、IgG1-PD1またはペムブロリズマブで処置されたマウスにおける腫瘍は、試験されたすべての用量で、10mg/kgのIgG1-ctrl-FERRで処置されたマウスにおける腫瘍よりも有意に小さかった（図37B）。追加的に、10mg/kgにおいて、IgG1-PD1で処置されたマウスにおける腫瘍体積は、同等の用量のペムブロリズマブで処置されたマウスにおけるよりも有意に小さかった（マン-ホイットニー検定、p＝0.0188）。
【０７６８】
IgG1-PD1またはペムブロリズマブでの処置は、試験されたすべての用量で、10mg/kgのIgG1-ctrl-FERRで処置されたマウスと比較して無増悪生存期間（PFS）を有意に増加させた（図37C）。10mg/kgにおいて、IgG1-PD1で処置されたマウスにおける無増悪生存期間は、ペムブロリズマブで処置されたマウスと比較して有意に延長された（メジアンPFS 10mg/kg IgG1-PD1:20.56日、メジアンPFS 10mg/kgペムブロリズマブ:13.94日;P値＝0.0021）。
【０７６９】
結論として、IgG1-PD1はMC38腫瘍保有hPD-1 KIマウスにおいて強力な抗腫瘍活性を呈した。
【０７７０】
実施例40:ヒトPD-1ノックインマウスにおけるIgG1-PD1のPD活性
IgG1-PD1はMC38腫瘍保有hPD-1 KIマウスにおいて強力な抗腫瘍活性を示した（実施例39）。IgG1-PD1処置の薬力学的効果を探索するために、MC38腫瘍保有hPD-1 KIマウスをIgG1-PD1で処置し、血液、脾臓、および腫瘍試料を、予め決定された時点に収集した。フローサイトメトリーおよび免疫組織化学（IHC）を使用して免疫細胞に対するIgG1-PD1処置の効果を決定した。
【０７７１】
実施例39に記載されるようにMC38腫瘍保有hPD-1 KIマウスモデルを確立した。腫瘍が約60mm^{3}の平均体積に達した時（0日目として表される）に腫瘍体積に基づいてマウスを無作為化した（群当たり12匹のマウス）。処置の開始時に、マウス（投薬体積はPBS中10mL/kg）に0.5もしくは10mg/kgのIgG1-PD1、10mg/kgのペムブロリズマブ（Crown Bioscience Inc.によりMerckから取得、ロット番号U036695）、または10mg/kgのアイソタイプ対照抗体IgG1-ctrl-FERRを0、3、および7日目にIVで注射した。動物を罹病および死亡について1日毎にモニターし、他の臨床的な観察について常法通りにモニターした。マウスは病気の徴候を示さなかった。2、4、および8日目に、動物を安楽死させ、末梢血細胞の免疫表現型分析のために心臓穿刺（各々の時点において処置群当たり4匹のマウス）を通じて血液を収集した。追加的に、脾臓および腫瘍を採取した。IHC分析のために腫瘍をホルマリン固定およびパラフィン包埋した。

【０７７２】

製造者の使用説明書にしたがってgentleMACS（商標）Dissociator（130-096-427、Miltenyi）を使用して脾臓を酵素的に解離させた。得られた細胞懸濁液を70μm細胞ストレーナー（Falcon、カタログ番号352350）に通して濾過し、5mLのFACS洗浄緩衝液（PBS中の10％ FBS［Gibco、カタログ番号10099-141］、40mMのEDTA［Boston BioProducts、カタログ番号BM-711-K］）で洗浄した。RBC溶解緩衝液（Bio-gems、カタログ番号64010-00-100）を使用して赤血球細胞を溶解した。細胞をFACS洗浄緩衝液で2回洗浄し、細胞カウンティングのためにPBS中に再懸濁した。

【０７７３】

血液試料および解離された脾臓試料をMouse BD Fc Block（商標）（BD Biosciences、カタログ番号553141）と4℃の暗所中で10分間インキュベートし、その後に細胞を、Fc遮断緩衝液中に希釈された表19に記載の抗体パネルを用いて4℃で30分間染色した。引き続いて、血液試料をRTでの追加の10分のインキュベーションのためにRBC溶解緩衝液とインキュベートした。次に、血液および解離された脾臓試料の両方からの細胞を洗浄緩衝液で3回洗浄した。各々の試料に、100μLの123count eBeads（eBioscience、カタログ番号01-1234-42）を加え、その後に試料をフローサイトメトリーにより分析した。Kaluza Analysis Softwareを使用してフローサイトメトリーデータを分析した。

【０７７４】

（表１９）免疫表現型分析用抗体パネル

マーカー	フルオロフォア	クローン	供給業者	カタログ番号	アイソタイプ	希釈
CD45	PerCP-Cy5.5	30-F11	BioLegend	103132	Rat IgG2b, κ	1:50
CD3	BUV395	17A2	BD Biosciences	740268	Rat IgG2b, κ	1:50
CD4	BV510	GK1.5	BioLegend	100449	Rat IgG2b, κ	1:40
CD8	PE-eF610	53-6.7	eBioscience	61-0081-82	Rat IgG2a, κ	1:50
CD44	AF700	IM7	BioLegend	103026	Rat IgG2b, κ	1:50
CD62L	BV785	MEL-14	BioLegend	104440	Rat IgG2a, κ	1:50
CD19 [a]	FITC	6D5	BioLegend	115506	Rat IgG2a, κ	1:50
CD11b [a]	FITC	M1/70	BioLegend	101206	Rat IgG2b, κ	1:50
I-A/I-E (MHC II)	BV711	M5/114.15.2	BioLegend	107643	Rat IgG2b, κ	1:50
固定可能生存色素	eF780	N.A.	eBioscience	65-0865-14	N.A.	1:100

[a] CD19およびCD11bを単一のチャネルにおいて組み合わせて、CD19および/またはCD11bを発現する細胞を除外した。略語:BUV＝Brilliant Ultra Violet;BV＝Brilliant Violet;CD＝分化クラスター;Cy＝シアニン;eF＝eFluor;FITC＝フルオレセインイソチオシアネート;IgG＝免疫グロブリンG;MHC＝主要組織適合複合体;N.A.＝該当せず;PE＝フィコエリトリン;PerCP＝ペリジニン-クロロフィル-タンパク質。

【０７７５】

ウサギ抗CD3ε（Ventana、クローン2GV6、カタログ番号790-4341;最終濃度0.4μg/mL）、ウサギ抗CD4（Abcam、クローンEPR19514、カタログ番号ab183685;最終濃度5μg/mL）、ウサギ抗CD8（Cell Signaling、クローンD4W2Z、カタログ番号98941;1:200に希釈）、およびウサギ抗GZMB抗体（Abcam、クローンEPR22645-206、カタログ番号ab255598;最終濃度5μg/mL）を使用してIHCにおいて異種移植腫瘍組織におけるCD3、CD4、CD8、およびグランザイムB（GZMB）の発現を評

価し、続いて、潜在的な残存マウスIgGへの結合を回避するための抗ウサギ特異的検出プロトコール（HQ signal amplification kit、Roche、カタログ番号06472320001と組み合わせたCD8 IHCアッセイのためのOmniMap DAB anti-Rb detection kit、Roche、カタログ番号05269679001）を行った。HALOソフトウェア（Indica Labs）を使用した適合された画像分析アルゴリズムを用いてデジタル画像上で生存腫瘍領域内の細胞定量を行った。生存（非壊死）腫瘍区画内のすべての有核細胞のうちのマーカー陽性細胞のパーセンテージを算出することにより細胞定量リードアウトを生成した。

【０７７６】

非結合性対照抗体IgG1-ctrl-FERRと比較して、10mg/kgのIgG1-PD1での処置は、8日目に末梢血中のT細胞（$CD3^+$、$CD4^+$、および$CD8^+$）の数の増加の明確な傾向を結果としてもたらしたが、10mg/kgのペムブロリズマブでの処置は末梢T細胞の数における統計的に有意な減少に繋がった（図38）。並行して、エフェクターメモリー（$CD44^+CD62L^-$）$CD8^+$T細胞のパーセンテージは、8日目に、対照処置と比較した場合に、10mg/kgのIgG1-PD1で処置されたマウスの脾臓において有意に増加したが、10mg/kgのペムブロリズマブで処置されたマウスの脾臓においてはそうではなかった（図39A）。ナイーブ（$CD44^-CD62L^+$）$CD8^+$T細胞のパーセンテージにおける随伴的な有意な減少が、対照マウスおよび10mg/kgのペムブロリズマブで処置されたマウスと比較した場合に10mg/kgのIgG1-PD1で処置されたマウスの脾臓において観察された。10mg/kgのIgG1-PD1での処置は、8日目に脾臓中のMHCクラスII^+CD8^+T細胞のパーセンテージを有意に増加させ、T細胞活性化の増加を示唆した（図39B）。MHCクラスII^+CD8^+T細胞のパーセンテージにおける同等の増加が、10mg/kgのペムブロリズマブで処置されたマウスの脾臓において観察された。

【０７７７】

8日目に、腫瘍内$CD3^+$および$CD8^+$T細胞の数は、対照マウスにおけるよりも10mg/kgのペムブロリズマブで処置されたマウスにおいて有意に低かった（図40A～図40C）。さらには、8日目に、細胞傷害性エフェクター分子GZMBを発現する腫瘍内細胞のパーセンテージは、10mg/kgのペムブロリズマブで処置されたマウスおよび対照マウスにおけるよりも10mg/kgのIgG1-PD1で処置されたマウスにおいて有意に高かった（図40D）。

【０７７８】

結論として、IgG1-PD1のインビボ抗腫瘍活性は、末梢血および腫瘍内T細胞の数における増加、脾臓中のエフェクターメモリーおよび活性化（MHCクラスII^+）$CD8^+$T細胞のパーセンテージの増加、ならびに腫瘍内$GZMB^+$細胞のパーセンテージの増加と関連付けられた。比較として、ペムブロリズマブで処置されたマウスは、限定された薬力学的変化を示した。

【０７７９】

実施例41．IgG1-PD1によるマクロファージの結合

IgG1-PD1はFcγRへの結合を示さなかったが、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ドスタルリマブ、およびセミプリマブはFcγRへの結合を示した（実施例35）。FcγR発現M2c様マクロファージに結合するこれらの抗体の能力を、フローサイトメトリーを使用してインビトロで評価した。

【０７８０】

ヒト末梢血単核細胞（PBMC）を3人の健常ヒトドナーのバフィコート（Sanquin blood supply foundation、the Netherlands）からLeucoSep（商標）チューブ（Greiner、カタログ番号227290）中に、製造者の使用説明書にしたがってLymphocyte Separation Medium（Promocell、カタログ番号C-44010）での密度勾配遠心分離（800×gで20分、低ブレーキ）により精製した。製造者の使用説明書にしたがって抗CD14マイクロビーズ（Miltenyi;カタログ番号130-050-201）を使用してMACS技術によりPBMCからヒト単球を精製した。$CD14^+$単球を1.0×10^6細胞/mLの密度で、50ng/mLのM-CSF（Gibco、カタログ番号PHC9501）を補充したCellGenix（登録商標

）GMP DC培地（CellGenix、カタログ番号20801-0500）中に再懸濁した。M2c様マクロファージに向けて単球を偏らせるために、精製された単球を、UpCell（商標）Surfaceを有する100mm^2 Nunc（商標）ディッシュ（1.0×10^{6}細胞/mLの密度でディッシュ当たり8×10^{6}細胞;Thermo Fisher Scientific、カタログ番号174902）中のM-CSF補充CellGenix GMP DC培地中にプレーティングし、7日間培養（37℃、5% CO_2）し、続いて50ng/mLのM-CSF、50ng/mLのIL-4（R&D Systems、カタログ番号204-IL）、および50ng/mLのIL-10（R&D Systems、カタログ番号1064-IL/CF）を補充したCellGenix GMP DC培地中で3日間培養した。次に、ディッシュをRTで40～60分間放置することにより培養ディッシュ表面からマクロファージを剥離させた。剥離されたマクロファージを遠心分離（300×gで5分）によりペレット化し、カウントし、1.5×10^{6}細胞/mLの密度でCellGenix GMP DC培地中に再懸濁した。Brilliant Violet（BV）421コンジュゲート抗ヒトCD163（BioLegend、カタログ番号333612;1:200に希釈）およびBV711コンジュゲート抗ヒトCD206（BioLegend、カタログ番号321136;1:200に希釈）の混合物を使用してフローサイトメトリーにより単球由来マクロファージのM2c様表現型を確認した。FITCコンジュゲート抗ヒトCD64（FcγRIa;BioLegend、カタログ番号305006;1:25に希釈）、FITCコンジュゲート抗ヒトCD32（FcγRII;BD Pharmingen、カタログ番号552883;1:50に希釈）、PEコンジュゲート抗ヒトCD16a（FcγRIIIa;BD Pharmingen、カタログ番号555407;1:50に希釈）、PEコンジュゲート抗PD-1抗体（BioLegend、カタログ番号329906、1:50に希釈）、FITCコンジュゲートIgG1アイソタイプ対照（BioLegend、カタログ番号400108;1:25に希釈）、およびPEコンジュゲートIgG1アイソタイプ対照（BD Pharmingen、カタログ番号555749;1:50に希釈）を使用してM2c様マクロファージ上のFcγRおよびPD-1発現を評価した。M2c様マクロファージをIgG1-PD1、ペムブロリズマブ（MSD、ロット番号U013442）、ニボルマブ（Bristol-Myers Squibb、ロット番号ABP6534）、IgG4アイソタイプ対照（BioLegend、カタログ番号403702）、IgG1-ctrl、およびIgG1-ctrl-FERRと24hインキュベートし、FACS緩衝液で2回洗浄した。細胞を、FACS緩衝液中に希釈されたPEコンジュゲートヤギ抗ヒトIgG F（ab'）$_2$（Jackson ImmunoResearch、カタログ番号109-116-097;1:200に希釈）と4℃で30分間インキュベートした。FACS緩衝液での2回の洗浄後に、細胞を、生存色素4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール（DAPI;BD Pharmingen、カタログ番号564907;1:5,000に希釈）を補充したFACS緩衝液中に再懸濁し、引き続いてBD LSRFortessa（商標）Cell Analyzer上で測定し、FlowJoにおいて分析した。

【０７８１】

細胞膜上に発現されたFcγRへのIgG1-PD1、ペムブロリズマブ、およびニボルマブの結合を、（3人の健常ドナーからの）ヒト単球由来M2c様マクロファージを使用して評価した。FcγRIa、FcγRII、およびFcγRIIIaの発現ならびにPD-1発現の非存在がフローサイトメトリーにより最初に確認された（図41A）。野生型IgG1 Fcドメインを有するIgG1-ctrl、Fc不活性IgG1-ctrl-FERR、およびIgG4アイソタイプ対照を対照として含めた。IgG1-ctrlは24hのインキュベーション後にM2c様マクロファージへの効率的な結合を示した一方、結合は、IgG1-PD1またはIgG1-ctrl-FERRについて、試験されたドナーのいずれについても観察されなかった（図41B）。反対に、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、およびIgG4アイソタイプ対照抗体はすべて、バックグラウンド対照の場合を上回る結合を示した。合わせると、これらのデータは、IgG1-PD1はFcγR発現M2c様マクロファージに結合しないが、ペムブロリズマブおよびニボルマブはFcγR発現M2c様マクロファージに結合することを実証する。

【０７８２】

実施例42．IgG1-PD1により誘導されるFcγRシグナル伝達

IgG1-PD1はFcγRまたはM2c様マクロファージへの結合を示さなかったが、IgG4骨格を有する抗PD-1抗体は該結合を示した（実施例35および41）。FcγRシグナル伝達を誘導するこれらの抗体の能力を、細胞ベースFcエフェクター活性レポーターアッセイ

を使用してインビトロで評価した。

【０７８３】

IgG1-PD1、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ドスタルリマブ、およびセミプリマブにより誘導されるFcγRI、FcγRIIa-H131、FcγRIIa-R131、およびFcγRIIbシグナル伝達を、本質的に製造者により記載されるように生物発光細胞ベースレポーターアッセイ（Promega、それぞれカタログ番号GA1341、G988A、CS178B11、およびG988ACS1781E01）を使用して評価した。簡潔に述べれば、PD-1をトランスフェクトされたCHO細胞（自社で生成;実施例28）を、段階希釈されたIgG1-PD1、ペムブロリズマブ（MSD、ロット番号W003098）、ニボルマブ（Bristol-Myers Squibb、ロット番号8006768）、ドスタルリマブ（GlaxoSmithKline、ロット番号1822049）、セミプリマブ（Regeneron、ロット番号1F006A）、IgG1-ctrl-FERR、またはIgG4アイソタイプ（BioLegend、カタログ番号403702）（FcγRIアッセイにおける最終アッセイ内濃度:25倍希釈において30～1.23×10^{-7}μg/mL;他のFcγRアッセイにおける最終アッセイ濃度:5倍希釈において30～0.00192μg/mL）と15分間37℃、5％ CO_2でプレインキュベートした。六量体化増強E430G突然変異を有するIgG1-CD52-E430Gを陽性対照として含めた。遺伝子操作されたFcγRI、FcγRIIa-H（FcγRIIa-H131）、FcγRIIa-R（FcγRIIa-R131）、およびFcγRIIbエフェクター細胞を培養物に1:1の比で加え、その後に試料を5h、37℃、5％ CO_2でインキュベートした。次に、試料をRTで、再構成されたBio-Glo（商標）と10分間RTでインキュベートした後に、EnVision Multilabel Plate Reader（PerkinElmer）を使用して発光（RLU）を測定した。

【０７８４】

E430G六量体化増強突然変異を有する膜結合IgG1-CD52-E430Gは、強いFcγRI、FcγRIIa-R131、FcγRIIa-H131、およびFcγRIIbシグナル伝達を誘導した。膜結合ペムブロリズマブ、ニボルマブ、セミプリマブ、およびドスタルリマブ（すべてIgG4サブクラス）もまた、より低い程度までであるが、FcγRI、FcγRIIa-R131、FcγRIIa-H131、およびFcγRIIbシグナル伝達を誘導したが、膜結合IgG1-PD1および非結合性対照抗体（IgG1-ctrl-FERR、IgG4アイソタイプ）はこれらのシグナル伝達を誘導しなかった（図42）。

【０７８５】

以上を合わせると、これらのデータは、膜結合ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ドスタルリマブ、およびセミプリマブは、FcγRI、FcγRIIa-R131、FcγRIIa-H131、およびFcγRIIbシグナル伝達を誘導することを実証する。対照的に、膜結合IgG1-PD1は、FcγR媒介性シグナル伝達を誘導することができず、IgG1-PD1のFcドメインの機能的な不活性を裏付ける。

【０７８６】

実施例43:DuoBody-PD-L1x4-1BBと組み合わせたIgG1-CD27-A-P329R-E345Rによるポリクローナル活性化ヒトT細胞の増殖の誘導

活性化ヒトT細胞に対するDuoBody-PD-L1x4-1BBと組み合わせたIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの効果を、T細胞がCD3抗体でポリクローナルに刺激された新たに単離されたヒト健常ドナーPBMCを使用してフローサイトメトリーにより分析した。

【０７８７】

製造者の使用説明書にしたがってリンパ球分離培地（PromoCell、カタログ番号C-44010）およびLeucoSepチューブ（Greiner Bio-One、カタログ番号227290）を使用して低密度勾配遠心分離によりヒト健常ドナーバフィコートからヒト末梢血単核細胞（PBMC）を新たに単離した。PBMCをPBS中に10×10^{6}細胞/mLの密度で再懸濁し、製造者の使用説明書にしたがってCellTrace（商標）Violet Cell Proliferation Kit（Thermo Fisher Scientific、カタログ番号C34557）を使用してCTVで標識した。CTV標識されたPBMC（75,000細胞/ウェル）を96ウェルU底プレート（Greiner Bio-One、カタログ番号650180）中に播種し、培養培地（RPMI 1640 [Lonza、カタロ

グ番号12-115F］、鉄［DBSI;Gibco、カタログ番号20731-030］、1% Pen/Strep［Lonza、カタログ番号DE17-603E］を含む10%ドナーウシ血清;またはHepesおよびL-グルタミン［Lonza、カタログ番号12-722F］;5%ヒト血清［Sigma Aldrich、カタログ番号H4522、65℃で30分間熱不活性化］、1% Pen/Strep［Lonza］を含むIMDM）中でIgG1-CD27-A-P329R-E345R（5倍希釈において0.016～10μg/mL）およびDuoBody-PD-L1x4-1BB（5倍希釈において0.000064～5μg/mL）と共に0.1μg/mLのCD3抗体クローンUCHT1（Stemcell、カタログ番号60011）と4日間インキュベートした。細胞懸濁液をペレット化し、FACS緩衝液（PBS［Lonza、カタログ番号BE17517Q］、0.02%アジ化ナトリウム［bioWorld、カタログ番号41920044 3］、0.1% BSA［Roche、カタログ番号43279213］、2mMのEDTA［Sigma、カタログ番号BCCD3789］）で1回洗浄し、リンパ球マーカーであるFITC標識された抗ヒトCD4（BD Biosciences、カタログ番号345768;1:50）およびAPC標識された抗ヒトCD8（BD Biosciences、カタログ番号555369;1:50）を含有するFACS緩衝液と4℃で30分間インキュベートした。細胞を2回洗浄し、生存色素7-アミノアクチノマイシンD（7-AAD;BD Biosciences、カタログ番号51 68981E;1:240）を含有するFACS緩衝液中に再懸濁した。フローサイトメトリーデータをiQue+（BioRad）上で取得した。

【0788】

生存$CD4^+$および$CD8^+$T細胞サブセット（それぞれ$FITC\text{-}CD4^+APC\text{-}CD8^-7\text{-}AAD^-$および$FITC\text{-}CD4^-APC\text{-}CD8^+7\text{-}AAD^-$）におけるCTV希釈ピークを、FlowJoソフトウェア（v10.7.1）中の増殖モデリングツールを使用して分析し、以下の式にしたがって拡大増殖指数を決定した:

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

拡大増殖指数＝全細胞数（G0～GNの和）/開始時の細胞の数

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

【0789】

$CD4^+$（図43A）および$CD8^+$（図43B）T細胞増殖における用量依存的な増加が、単独でのIgG1-CD27-A-P329R-E345Rで処理されたPBMC試料において全抗体濃度範囲にかけて観察された。単独でのDuoBody-PD-L1x4-1BBで処理された試料の用量応答曲線はベル形の曲線を示し、中間の濃度で最も高い拡大増殖指数に達した。DuoBody-PD-L1x4-1BBとのIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの組合せは、単独での各々の抗体よりも強力に$CD4^+$および$CD8^+$T細胞増殖を増加させ、最大の効果は、DuoBody-PD-L1x4-1BBについて試験された中～高濃度（0.04～5μg/mL）と組み合わせた最も高い試験されたIgG1-CD27-A-P329R-E345R濃度（2～10μg/mL）において到達された。

【0790】

これらのデータは、DuoBody-PD-L1x4-1BBとのIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの組合せは、単独での各々の抗体と比較して活性化T細胞の増殖におけるより高い増加を誘導したことを示す。

【0791】

実施例44:T細胞増殖およびサイトカイン分泌を増強するDuoBody-PD-L1x4-1BBまたはPD-1/PD-L1阻害剤と組み合わせたIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの能力を決定するための抗原特異的刺激アッセイ

単剤活性と比較したT細胞増殖およびサイトカイン産生に対するPD-L1および4-1BBを標的とする二重特異性抗体またはPD-1/PD-L1阻害剤とのIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの組合せ効果を決定するために、PD-1過剰発現健常ヒト$CD8^+$T細胞およびコグネイト抗原発現未熟樹状細胞（iDC）の共培養物を使用して抗原特異的刺激アッセイを実行した。

【０７９２】
HLA-A＊02^{+}末梢血単核細胞（PBMC）を健常ドナーから得た（Transfusionszentrale、University Hospital、Mainz、Germany）。製造者の使用説明書にしたがって抗CD14マイクロビーズ（Miltenyi;カタログ番号130-050-201）を使用して磁気活性化細胞選別（MACS）技術によりPBMCから単球を単離した。T細胞単離のために10％ DMSO（AppliChem GmbH、カタログ番号A3672,0050）および10％ヒトアルブミン（CSL Behring、PZN 00504775）を含有するRPMI 1640中で末梢血リンパ球（PBL、CD14陰性画分）を凍結保存した。iDCへの分化のために、1mL当たり40×10^{6}個の単球を、5％のプールされたヒト血清（One Lambda Inc.、カタログ番号A25761）、1mMのピルビン酸ナトリウム（Life technologies GmbH、カタログ番号11360-039）、1x非必須アミノ酸（Life Technologies GmbH、カタログ番号11140-035）、200ng/mLの顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF;Miltenyi、カタログ番号130-093-868）および200ng/mLのヒトインターロイキン-4（IL-4;Miltenyi、カタログ番号130-093-924）を含有するRPMI 1640（Life Technologies GmbH、カタログ番号61870-010）中で5日間培養した。3日目に、培地の半分を、補充物を含有する新鮮な培地で置き換えた。5日目に、非接着細胞を収集することによりiDCを採取し、2mMのEDTAを含有するダルベッコリン酸緩衝化食塩水（DPBS）との10分間37℃でのインキュベーションにより接着細胞を剥離した。DPBSでの洗浄後に、抗原特異的T細胞アッセイにおける将来的な使用のために10％ DMSO（AppliChem GmbH、カタログ番号A3672,0050）を含有するFBS（Sigma-Aldrich、カタログ番号F7524）中でiDCを凍結保存した。

【０７９３】
抗原特異的CD8^{+}T細胞刺激アッセイの開始の1日前に、同じドナーからの凍結されたPBLおよびiDCを解凍した。製造者の使用説明書にしたがって抗CD8マイクロビーズ（Miltenyi、カタログ番号130-045-201）を使用してMACS技術によりPBLからCD8^{+}T細胞を単離した。約10×10^{6}～15×10^{6}個のCD8^{+}T細胞に、250μLのX-VIVO（商標）15培地（Lonza、カタログ番号BE02-060Q）中で、各々10μgの、ヒトクローディン-6（CLDN6）に特異的なマウスTCR（HLA-A＊02制限）のアルファおよびベータ鎖をコードするインビトロ転写（IVT）-RNA（WO 2015150327 A1に記載されている）およびヒトPD-1（UniProt Q15116）をコードする10μgのIVT-RNAとをエレクトロポレートした。細胞を4mmエレクトロポレーションキュベット（VWR International GmbH、カタログ番号732-0023）に移し、BTX ECM（登録商標）830 Electroporation System（BTX;500V、3msパルス）を使用してエレクトロポレートした。エレクトロポレーションの直後に、5％のプールされたヒト血清を含有する新鮮なIMDM GlutaMAX培地（Life Technologies GmbH、カタログ番号319800-030）に細胞を移し、37℃、5％ CO_2で少なくとも1時間静置した。製造者の使用説明書にしたがってPBS中の0.8μMのカルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル（CFSE;Life Technologies GmbH、カタログ番号V12883）を使用してT細胞を標識し、5％のヒト血清を補充したIMDM培地中で終夜インキュベートした。

【０７９４】
最大5×10^{6}個の解凍されたiDCに、250μLのX VIVO 15培地中で、上記のエレクトロポレーションシステム（300V、12msパルス）を使用して、全長ヒトCLDN6をコードする2μgのIVT-RNA（WO 2015150327 A1）をエレクトロポレートし、5％のプールされたヒト血清を補充したIMDM培地中で終夜インキュベートした。

【０７９５】
エレクトロポレートしたiDCを、エレクトロポレートした、CFSE標識されたT細胞と1:10（DC:T細胞）の比で、抗CD27抗体IgG1-CD27-A-P329R-E345R（0.1、1、もしくは10μg/mL）もしくはIgG1-CD27-131A（10μg/mL）の存在下、またはDuoBody-PD-L1x4-1BB（0.2μg/mL）、IgG1-PD1（0.8μg/mL）、ペムブロリズマブ（Keytruda（登録商標）、Merck Sharp＆Dohme GmbH、PZN 10749897;0.8

μg/mL）、ニボルマブ（Opdivo（登録商標）、Bristol-Myers-Squibb 1102460 1;1.6μg/mL）、アテゾリズマブ（Tecentriq（著作権）、Roche PZN 11306050; 0.4μg/mL）の存在下、単独でまたはIgG1-CD27-A-P329R-E345R（0.1、1、もしくは10μg/mL）もしくはIgG1-CD27-131A（10μg/mL）と組み合わせて、96ウェル丸底プレート中の5%のプールされたヒト血清を含有するIMDM培地中でインキュベートした。4日の培養後に、細胞をAPCコンジュゲート抗ヒトCD8抗体で染色した。BD FACSCelesta（商標）フローサイトメーター（Becton Dickinson GmbH）を使用してCD8$^+$T細胞におけるCFSE希釈のフローサイトメトリー分析によりT細胞増殖を評価した。

【０７９６】

FlowJo softwareバージョン10.7.1を使用してフローサイトメトリーデータを分析した。FlowJoにおける増殖モデリングツールを使用してCD8$^+$T細胞のCFSE標識希釈を評価し、以下の式を使用して拡大増殖指数を算出した。

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

拡大増殖指数＝全細胞数（G0～GNの和）/開始時の細胞の数

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

【０７９７】

製造者のプロトコールにしたがって10のヒトサイトカイン（GM-CSF、IL-2、IL-8、IL-10、IL-12p70、IL-13、インターフェロン［IFN］γ、IFNγ誘導性タンパク質［IP］-10［C-X-Cモチーフケモカインリガンド10としても公知である］、マクロファージ化学走性誘引タンパク質［MCP］1、および腫瘍壊死因子［TNF］-α）のパネルの検出用の特製のU-Plex biomarker group 1（ヒト）アッセイ（Meso Scale Discovery、カタログ番号K15067L-2）または10のヒトサイトカイン（GM-CSF、IL-2、IL-12p70、IL-13、インターフェロン［IFN］γ、IFNγ誘導性タンパク質［IP］-10［C-X-Cモチーフケモカインリガンド10としても公知である］、マクロファージ化学走性誘引タンパク質［MCP］1、マクロファージ炎症性タンパク質［MIP］-1β、sCD27および腫瘍壊死因子［TNF］α）のパネルの検出用のU-Plex Immuno-Oncology Group 1（ヒト）アッセイ（Meso Scale Discovery、カタログ番号K151AEL-2）を使用してマルチプレックス電気化学発光イムノアッセイ（ECLIA）により細胞培養上清中のサイトカイン濃度を決定した。

【０７９８】

IgG1-CD27-A-P329R-E345RまたはDuoBody-PD-L1x4-1BBでの単剤処理は、PD-1過剰発現CD8$^+$T細胞の増殖を増強した（図44A）。IgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびDuoBody-PD-L1x4-1BBの組合せでの処理は、各々の化合物を個々に用いた処理よりも高い増殖に繋がった。

【０７９９】

1または10μg/mLのIgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびIgG1-PD1、ペムブロリズマブ、ニボルマブまたはアテゾリズマブの組合せは、単剤としてのIgG1-CD27-A-P329R-E345Rおよび抗PD-（L）1抗体と比較してPD-1過剰発現CD8$^+$T細胞の増殖を増強した（図44B）。対照的に、IgG1-PD1またはニボルマブとの10μg/mLのIgG1-CD27-131Aの組合せは増殖における軽微な増加に繋がったに過ぎず、ペムブロリズマブまたはアテゾリズマブとの10μg/mLのIgG1-CD27-131Aの組合せは、それぞれの抗PD-（L）1単剤処理と比較して増殖を増加させなかった。

【０８００】

IgG1-CD27-A-P329R-E345Rでの単剤処理は、処理されていない共培養物と比較してPD-1過剰発現CD8$^+$T細胞およびiDCの共培養物において、炎症促進性サイトカインIFN-γおよびGM-CSFの分泌を若干増強し、TNFαおよびIL-2の分泌を増強しなかった（図45A）。DuoBody-PD-L1x4-1BB単剤処理はこれらのサイトカインの分泌を著し

く増強した一方、IgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびDuoBody-PD-L1x4-1BBとの組合せ処理はそれをさらに増強した。

【０８０１】

1または10μg/mLのIgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびIgG1-PD1、ペムブロリズマブ、ニボルマブまたはアテゾリズマブでの組合せ処理は、単剤処理と比較してIFNγの分泌を増強した（図45B）。IgG1-PD1もしくはニボルマブを伴う1および10μg/mLのIgG1-CD27-A-P329R-E345Rまたはペムブロリズマブもしくはアテゾリズマブを伴う10μg/mLのIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの濃度において、上清中に測定された全IFNγレベルは、単剤で観察されたIFNγレベルの合計よりも高かった。対照的に、10μg/mLのIgG1-CD27-131AおよびIgG1-PD1、ペムブロリズマブ、ニボルマブまたはアテゾリズマブの組合せは、IFNγ分泌における増加に繋がらなかったか、または軽微な増加に繋がるに過ぎなかった。

【０８０２】

これらのデータは、PD-1/PD-L1阻害剤とのまたはDuoBody-PD-L1x4-1BBとのIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの組合せは、単独での各々の抗体と比較してCD8$^+$T細胞増殖およびサイトカイン分泌におけるより強い増加を誘導したことを示す。

【０８０３】

実施例45:CLDN6特異的T細胞媒介性細胞傷害に対するIgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびDuoBody-PD-L1x4-1BBの組合せの効果

組み合わせたIgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびDuoBody-PD-L1x4-1BB処理でのT細胞媒介性細胞傷害の誘導を、CLDN6-TCRを発現するヒト健常ドナーT細胞およびMDA-MB-231_hCLDN6標的細胞の共培養物において細胞インピーダンス測定により分析した。

【０８０４】

MDA-MB-231_hCLDN6細胞をレンチウイルス形質導入により生成した。この目的のために、10% FBS（Biochrom、カタログ番号S0115;非熱不活化）を補充した250μLのダルベッコ改変イーグル培地（DMEM、Thermo Fisher Scientific、カタログ番号31966-047）中の2×10^{5}個のMDA-MB-231ヒト乳がん細胞を12ウェル組織培養プレート中のウェル毎に播種した。細胞を37℃（7.5% CO_2）で1～2hインキュベートした。ヒトCLDN6をコードするレンチウイルスベクター（pL64b42E（EF1a-hClaudin6）Hygro-T2A-GFP）を含有する上清を氷上で解凍し、750μLのDMEM/10% FBSの総体積で希釈して、2×10^5、8×10^4、および3.2×10^{4}TU/mLの力価を得た。これらの力価は、それぞれ1、0.4、および0.16のMOIに対応した。上清を次にMDA-MB-231細胞に加え、細胞を撹乱なしで37℃（5% CO_2）で72hインキュベートした。本実施例に記載される実験のために、MDA-MB-231-hCLDN6細胞をDMEM/10% FBS中で培養した。細胞を継代し、70%～90%のコンフルエンスにおいて実験のために採取した。細胞をAccutase（Thermo Fisher Scientific、カタログ番号A11105010）で5分間（37℃、7.5% CO_2）の処理により剥離し、培養培地の追加により再懸濁した。細胞を遠心分離（300×g、4分、RT）し、カウントした。MDA-MB-231_hCLDN6細胞は、20継代より多く培養しなかった。

【０８０５】

製造者の使用説明書にしたがって、ヒト磁性CD8マイクロビーズ（Miltenyi Biotec、カタログ番号130-045-201）を、凍結された末梢血白血球からのCD8$^+$T細胞の陽性選択のために使用した。細胞懸濁液を遠心分離し、磁気活性化細胞選別（MACS）緩衝液（5mMのEDTA［Sigma-Aldrich、カタログ番号03690］および1%ヒトアルブミン［CSL Behring、カタログ番号PZN-00504775］を含むダルベッコPBS［Thermo Fisher、カタログ番号14190250］）に80μLのMACS緩衝液当たり1×10^{7}個の生細胞で再懸濁した。1×10^{7}個の細胞当たり、12μLのCD8マイクロビーズを加えた。細胞およびMicroBeadsの混合物を2～8℃で15分間インキュベートした。MACS緩衝液での洗浄後に、混合物を遠心分離（8分、300×g、室温［RT］）によりペレット化し、MA

CS緩衝液中に再懸濁し、30μm細胞ストレーナー（BD Biosciences、カタログ番号340626）に通して濾過した。引き続いてのMACS分離を、利用可能性に依存して、自動化された磁気細胞分離機器を使用してまたは手動の分離により行った。自動化されたMACS分離は、autoMACS（登録商標）Pro Separator（Miltenyi Biotec）を使用して行った。細胞/マイクロビーズ混合物をロードする前に製造者の使用説明書にしたがってMACS緩衝液で磁気分離カラムをリンスした。予め設定された陽性選択プログラム「POSSEL_s」を使用した。手動でのMACS分離のために、LSカラム（Miltenyi Biotec、カタログ番号130-042-401）をMidiMACS（商標）またはQuadroMACS（商標）Separator中に置き、MACS緩衝液で平衡化した。CD8マイクロビーズで標識された細胞をカラムにロードし、細胞を重力流により通過させた。MACS緩衝液での3回の洗浄後に、カラムを磁石から取り外し、磁気ビーズ標識で標識された細胞を、供給されたプランジャーを使用してMACS緩衝液を用いて2工程において溶出させた。

【０８０６】

単離されたCD8$^+$T細胞に、ヒトCLDN6に特異的なマウスTCRのアルファおよびベータ鎖をコードするRNAをエレクトロポレートした。最大10～15×10^{6}個のCD8$^+$T細胞を、ECM 830 Square Wave Electroporation System（BTX（登録商標））を使用してRTで250μLのX-VIVO（商標）15 SF培地（Lonza、カタログ番号BE02-060Q）中でエレクトロポレートした。細胞をRNAと混合し、パルス処理（500V、3ms）し、750μLの予め温めたアッセイ培地（5% PHSを含むIMDM GlutaMAX [Life technologies、カタログ番号31980030]）で直ちに希釈した。終夜のインキュベーションの後に、エレクトロポレートしたCD8$^+$T細胞をフローサイトメトリーにより評価して、細胞純度、トランスフェクトされたRNAの発現およびCD8$^+$T細胞上のCD27のベースライン発現を評価した。この目的のために、30～50μLの染色緩衝液（DPBS、2% FBS、2mMのEDTA）中でそれぞれ1:600、1:100および1:50に希釈された滴定された量のBV605標識抗CD8、DyLight650標識抗CLDN6およびBV480標識抗CD27を用いてCD8、CD27およびCLDN6について単一細胞懸濁液を最初に染色した。固定可能生存色素eFluor780（Thermo Fisher Scientific、カタログ番号65-0865-14;1:2,000）を染色の間に加えた。染色手順は、2～8℃で光から保護して15～20分間実行した。細胞を染色緩衝液で2回洗浄し（5分、450×g、RT）、フローサイトメトリー分析のために染色緩衝液中に再懸濁した。フローサイトメトリーデータをBD FACSCelestaフローサイトメーター上で取得した。エレクトロポレートしたCD8$^+$T細胞の約78%～93%、78%～92%、および36%～98%は、それぞれCLDN6-TCRおよび内因性CD27を発現した。

【０８０７】

腫瘍細胞殺滅のリアルタイム細胞分析をxCELLigenceリアルタイム細胞分析（RTCA）機器（ACEA Biosciences）上でのインピーダンス測定により行った。この実験設定におけるインピーダンスにおける減少は、CD8$^+$T細胞による腫瘍細胞殺滅の代用物と考えられる。インピーダンスは、T細胞の増殖に起因して腫瘍細胞殺滅を過小評価し得ることが留意されるべきである。MDA-MB-231_hCLDN6細胞を1.2～1.5×10^{4}細胞/ウェルでxCELLigence E-plate 96（Agilent、カタログ番号05232368001）中に播種し、RTで30分間静置した。次に、プレートをxCELLigence RTCA機器中で1日間インキュベートした（37℃、5% CO_2）。

【０８０８】

CLDN6-TCRを発現するT細胞を1.5×10^5 CD8$^+$T細胞/ウェルで、播種されたMDA-MB-231_hCLDN6細胞に加えて、10:1のT細胞:腫瘍細胞（エフェクター:標的）比とした。IgG1-CD27-A-P329R-E345R（1もしくは10μg/mL）、DuoBody-PD-L1x4-1BB（0.2μg/mL）、または非結合性対照抗体IgG1-b12-P329R-E345R（10μg/mL）を共培養物に加えた。E-plate 96中の共培養物を抗体の存在下、xCELLigence RTCA機器中で5日間妨害なしにインキュベートし、全細胞量のリードアウト（細胞指数）として2時間間隔でインピーダンス測定を行った。時間における細胞指数値を示すグラ

フを、GraphPad Prismソフトウェアを使用して図表的に表示し、それを使用して、試験抗体で処理された各々の共培養について非結合性対照抗体IgG1-b12-P329R-E345Rで処理された共培養物に対して正規化された曲線下面積（AUC）を決定した。

【０８０９】

リアルタイム細胞分析は、単独でのIgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびDuoBody-PD-L1x4-1BBは、陰性対照抗体IgG1-b12-P329R-E345Rと比較してCD8＋T細胞媒介性腫瘍細胞殺滅を実質的に増強することを示した（図46A）。腫瘍細胞殺滅は、両方の化合物を組合せで使用した場合に最も著しかった。プールされた分析において、IgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびDuoBody-PD-L1x4-1BBの組合せで処理された培養物の正規化されたAUCは、単独でのIgG1-CD27-A-P329R-E345Rで処理された培養物のAUCよりも有意に低かった（図46B）。統計的に有意でなかったが、組合せで処理された培養物のAUCはまた、単独でのDuoBody-PD-L1x4-1BBで処理された場合よりも低かった。

【０８１０】

実施例46:抗原特異的細胞傷害性アッセイにおけるT細胞細胞傷害性関連分子の発現に対するIgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびDuoBody-PD-L1x4-1BBの組合せの効果

抗原特異的CD8＋T細胞上の脱顆粒マーカーCD107aおよび細胞傷害性メディエーターグランザイムB（GzmB）の発現に対するIgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびDuoBody-PD-L1x4-1BBの組合せの効果を、実施例40に記載されるように、抗体とインキュベートされたhCLDN6-MDA-MB-231細胞とのCLDN6-TCR発現CD8＋T細胞の共培養物を使用してフローサイトメトリーにより評価した。

【０８１１】

共培養物を抗体の存在下で2日間インキュベートし、引き続いてフローサイトメトリーによる分析のためにCD8、CD107a（リソソーム関連膜タンパク質-1［LAMP-1］）、およびGzmBについて染色したが、但し、CD107aは細胞傷害性顆粒上に発現され、それと共にT細胞脱顆粒で再内部移行されることを考慮して、CD107a抗体は共培養の開始時にすべての処理条件に既に加えた。フローサイトメトリーのために、本質的に実施例40に記載されている手順を以下の逸脱と共に行った。2日のインキュベーション後に、Golgi-Plug（Brefeldin A;220μL中の最終希釈:1:1,000）を含有する小体積のアッセイ培地（20μL/ウェル）を細胞に加え、続いてさらに4hインキュベートした。その後に細胞を採取し、CD8＋T細胞における細胞内GzmBおよびCD107aの発現をフローサイトメトリーにより分析した。細胞内染色のために、細胞を最初に染色緩衝液で2回洗浄し（5分、450×g、RT）、200μLのHistofix 2%（Carl Roth;カタログ番号P087.4、DPBSで1:2に希釈）中に再懸濁し、続いて、光から保護して、2～8℃で少なくとも20分インキュベートした。細胞を次に遠心分離し（5分、600×g、2～8℃）、1×透過処理緩衝液（Thermo Fisher Scientific、カタログ番号00-8333-56）で洗浄し、1×透過処理緩衝液中の滴定された量のPE標識された抗GzmB（BD、カタログ番号561142;1:2300に希釈）およびAF647標識された抗CD107a抗体（Biolegend、カタログ番号328611;1:2,500に希釈）を使用して細胞内マーカーについて染色した。細胞内マーカーについての染色手順は、光から保護して2～8℃で20～60分間実行した。細胞を次に1×透過処理緩衝液で2回洗浄し（5分、600×g、RT）、フローサイトメトリー分析のために染色緩衝液中に再懸濁した。フローサイトメトリーデータをBD FACSCelestaフローサイトメーター上で取得した。6人の健常ドナーからの細胞を使用してGzmBおよびCD107aについて測定された平均蛍光強度（MFI）を対照抗体IgG1-b12-P329R-E345R（10μg/mL）のMFIに対して正規化した。

【０８１２】

IgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびDuoBody-PD-L1x4-1BBの組合せ処理の増加した細胞傷害能力は、単独でのDuoBody-PD-L1x4-1BBでの処理と比較して有意に増加したGzmBの発現レベルと関連付けられた（図47A）。追加的に、CD107aの発現レベルは、IgG1-CD27-A-P329R-E345Rのみでの処理と比較してIgG1-CD27-A-P329

R-E345RおよびDuoBody-PD-L1x4-1BBの組合せ処理により増加した（図47B）。10μg/mLのIgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびDuoBody-PD-L1x4-1BBの組合せは、単独でのDuoBody-PD-L1x4-1BB処理と比較してGzmBおよびCD107aの両方を発現するCD8$^+$T細胞のパーセンテージを有意に増加させた（図40C）。単独での1または10μg/mLのIgG1-CD27-A-P329R-E345RまたはDuoBody-PD-L1x4-1BBでの単剤処理は、非結合性対照抗体IgG1-b12-P329R-E345Rでの処理と比較してGzmBおよびCD107aの両方を発現するCD8$^+$T細胞のパーセンテージを増加させた。

【０８１３】

結論として、IgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびDuoBody-PD-L1x4-1BBの組合せ処理による細胞傷害能力における増加は、CD8＋T細胞における脱顆粒マーカーCD107aおよび細胞傷害性メディエーターGzmBの増加した発現と関連付けられた。

【０８１４】

実施例47:エクスビボでのDuoBody-PD-L1x4-1BBと組み合わせたIgG1-CD27-A-P329R-E345Rで処理されたNSCLC腫瘍断片からの細胞培養物における腫瘍浸潤性リンパ球の拡大増殖

腫瘍浸潤性リンパ球（TIL）の異なるサブセットの拡大増殖に対するIgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびDuoBody-PD-L1x4-1BBの組合せ処理の効果を評価した。TILを使用したエクスビボ研究は、University Hospital Mainz、Germanyで3人のNSCLC患者から外科的に切除された凍結保存された腫瘍組織を使用して行った。

【０８１５】

外科的に切除されたヒトNSCLC組織を輸送培地（HypoThermosol（登録商標）FRS Preservation Solution［BioLife Solutions、カタログ番号101104］、7.5μg/mLのアムホテリシンB［Thermo Fisher Scientific、カタログ番号15290026］、および300単位/mL（U/mL）のペニシリン/ストレプトマイシン［Thermo Fisher Scientific、カタログ番号15140-122］）中で受領した。試料を洗浄培地（5mLのX-VIVO 15［Lonza］、2.5μg/mLのアムホテリシンB［Thermo Fisher Scientificおよび100U/mLのペニシリン/ストレプトマイシン［Thermo Fisher Scientific］）で3回洗浄し、細胞培養ディッシュに移した。脂肪組織および壊死区画を外科用メスで除去し、組織を約5mm^{3}の断片に切断した。各々の断片を個々のクライオバイアルに入れ、1mLの凍結培地（FBS［Biochrom、カタログ番号S0115］、10% DMSO［AppliChem、カタログ番号A3672,0100］）を各々のバイアルに加えた。バイアルを、-80℃の冷凍器中に置かれた制御された凍結チャンバー（Mr.Frosty凍結コンテナー;Thermo Fisher Scientific）に移した。-80℃で少なくとも16hの後に、バイアルを長期貯蔵のために液体窒素に移した。

【０８１６】

1つの腫瘍検体からの約5mm^{3}の腫瘍断片を各々含有する4～6個の凍結保存されたバイアルを実験毎に37℃の水浴中で約2分間解凍し、洗浄培地で5回洗浄し、細胞培養ディッシュに移した。腫瘍断片を外科用メスで約1mm^{3}の断片にさらに解剖した。断片のほとんどは、IL-2および処理抗体との培養でのTIL拡大増殖のために使用し、残りの断片は、いかなる処理も伴わない、ベースラインでの特有の細胞表面マーカーの発現を決定するために使用した。

【０８１７】

（平均で）ウェル当たり2つの腫瘍断片を24ウェルプレート（2mL/ウェルの総体積容量がアッセイにおいて使用された）中の100μLの予め温めたTIL培養培地（45～50U/mLのIL-2（Proleukin S;Novartis Pharma、カタログ番号PZN-02238131）を含有する2%ヒト血清アルブミン［HSA;CSL Behring、カタログ番号PZN-00504775］、100U/mLのペニシリン/ストレプトマイシン、および2.5μg/mLのアムホテリシンBを含むX-VIVO 15［Lonza、カタログ番号BE02-060Q］）に播種した。抗体を、45～50U/mLのIL-2を含有するTIL培養培地中で希釈し、0.9mLのこれらの希釈液を適宜ウェルに加えた。ウェル中の最終IgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびDuoBody-PD-

L1x4-1BB濃度はそれぞれ1または10μg/mLおよび0.2μg/mLであった。対照として、抗体を含まないIL-2含有培地を別々のウェルに加えた。全部で8～16個のウェルをドナー毎の各々の実験条件のために使用した。プレートを37℃、5％ CO_2でインキュベートした。

【０８１８】

3日の培養後に、45～50U/mLのIL-2、IgG1-CD27-A-P329R-E345R、およびDuoBody-PD-L1x4-1BBを含有する新鮮なTIL培養培地をウェルに加えた（1mL/ウェル、上記と同じ抗体濃度）。アッセイ開始の5～14日後に、培養物を顕微鏡で組織断片から遊走したTILの増殖およびTILマイクロクラスターの形成について定期的にモニターした。7または8培養日の後に25個より多くのTILマイクロクラスターが1つのウェル中に観察された場合、2つの同一に処理された元々のウェルからの細胞および組織断片を、培養培地を含む6ウェルプレートの1つのウェルに再懸濁およびプールし（5～6mL/ウェルの総体積容量をアッセイにおいて使用した）、新鮮なIL 2含有TIL培養培地を加えた（33U/mLのIL-2）。2～3日毎に、培養物に新鮮なIL-2含有TIL培養培地を補充した。培養物に加える培地中のIL-2濃度を10U/mLに低減したか、または最初に25U/mL、その後に10U/mLに低減し、アッセイの全体を通じてウェルに培地を補充した。以下に記載されるようにフローサイトメトリーにより培養物を分析した。凍結保存された腫瘍断片を解凍し、上記のようにさらに解剖した。プランジャーおよび細胞ストレーナーを用いて腫瘍断片の機械的な解離により単一細胞懸濁液を生成した。細胞を遠心分離し（8分、300×g、RT）、フローサイトメトリー分析のために染色緩衝液中に再懸濁した。

【０８１９】

フローサイトメトリー分析のために、単一細胞懸濁液を最初に、30～50μLの染色緩衝液（ダルベッコPBS［DPBS;Thermo Fisher、カタログ番号14190250］、2％ FBS、および2mMのEDTA［Sigma、カタログ番号BCCD3789］）中に希釈された滴定された量の抗体（表20）を用いて細胞表面マーカーについて染色した。

【０８２０】

（表２０）フローサイトメトリーのために使用された蛍光標識された抗体。

標的	標識	参照番号	業者	希釈
CD3	Pacific Blue	558117	BD Biosciences	1:100
CD4	PerCP-eF710	46-0047-42	Thermo Fisher Scientific	1:100 – 1:200
CD8α	BV605	564116	BD Biosciences	1:400
CD25	APC-eF780	47-0259-42	Thermo Fisher Scientific	1:100
CD56	BV786	740979	BD Biosciences	1:100

【０８２１】

Brilliant Stain Buffer Plus（BD Biosciences、カタログ番号566385）を抗体ミックスに1:5の最終希釈で加えた。固定可能生存色素700（BD Biosciences、カタログ番号564997;1:1,000～1:1,500）を細胞表面染色の間に加えた。染色手順は、2～8℃で光から保護して15～20分間実行した。細胞を染色緩衝液で2回洗浄し（5分、450×g、RT）、フローサイトメトリー分析のために染色緩衝液中に再懸濁した。

【０８２２】

フローサイトメトリーデータをBD FAC SymphonyまたはBD FACSCelestaフローサイトメーター上で取得した。取得に先立って、30μLのCountBright Absolute counting beads（Thermo Fisher Scientific、カタログ番号C36950）を各々の試料に絶対細胞カウントのために加えた。以下のTIL集団がフローサイトメトリーにより同定および定量化された:$CD4^+$および$CD8^+$T細胞、ならびにナチュラルキラー（NK）細胞

。単一細胞のライブゲート内で、CD56$^+$NK細胞およびCD3$^+$をゲートした。CD3$^+$ゲート内で、さらなるゲーティングをCD4$^+$およびCD8$^+$細胞に対して行った。FlowJo Softwareバージョン10.7.1を使用してフローサイトメトリーデータを分析した。以下の式を使用して絶対細胞数を決定した:

$$細胞数 = \frac{事象カウント(細胞)}{事象カウント(ビーズ)} \times ビーズ濃度 \times 試料体積$$

【０８２３】

単独処理としてのIgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびDuoBody-PD-L1x4-1BBは、それぞれ3つの検体のうちの2つおよび3つの検体のうちの3つにおいてCD8$^+$T細胞およびNK細胞の増殖を誘導した（図48および表21）。CD8$^+$T細胞およびNK細胞拡大増殖は、IgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびDuoBody-PD-L1x4-1BBの組合せ処理によりさらに増強された。重要なことに、CD8$^+$T細胞およびNK細胞に対する強い組合せ効果が、IgG1-CD27-A-P329R-E345R（検体＃592）またはDuoBody-PD-L1x4-1BB（検体＃578）のいずれかが小さな単剤効果を有する検体において検出可能であった。単独でのDuoBody-PD-L1x4-1BBはCD4$^+$T細胞に対してわずかな効果を有し、組合せ処理は単剤IgG1-CD27-A-P329R-E345Rと比較してCD4$^+$T細胞拡大増殖を実質的に増強しなかった。

【０８２４】

（表２１）IL-2のみと比較したIgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびDuoBody-PD-L1x4-1BBの組合せで処理されたTILサブセットの拡大増殖倍数。ヒトNSCLC検体に由来する腫瘍断片を低用量IL-2のみと、または1μg/mLのIgG1-CD27-A-P329R-E345R、0.2μg/mLのDuoBody-PD-L1x4-1BB、もしくは両方の組合せの存在下で培養した。指し示される細胞サブセットの絶対細胞カウントを14日後にフローサイトメトリーにより決定した。IL-2のみで処理された培養物と比べた抗体で処理された培養物の数における差異倍数を示している。示されるデータは、3回の独立した実験からのものである。NK、ナチュラルキラー;n.d.、決定されていない;n.t.、試験されていない;PD-L1、プログラム細胞死1リガンド1;SD、標準偏差。

	陰性対照（抗体なし）と比べた、抗体で処理された試料の細胞数における差異倍数								
細胞集団	**CD4$^+$ T 細胞**			**CD8$^+$ T 細胞**			**NK 細胞**		
IgG1-CD27-A-P329R-E345R	**+**	**-**	**+**	**+**	**-**	**+**	**+**	**-**	**+**
DuoBody-PD-L1x4-1BB	**-**	**+**	**+**	**-**	**+**	**+**	**-**	**+**	**+**
患者#561	0.8	1.0	1.2	0.2	3.2	1.5	1.1	11.2	13.4
患者#578	19.3	1.9	9.8	19.6	4.3	31.3	11.3	5.0	51.3
患者#592	0.4	0.3	1.8	2.3	14.6	41.5	2.3	26.9	54.6
平均 ± SD	9.9 ± 9.5	1.1 ± 0.7	6.8 ± 4.5	7.4 ± 8.7	7.4 ± 5.1	24.8 ± 17.0	4.9 ± 4.6	14.4 ± 9.2	39.8 ± 18.7

【０８２５】
実施例48:IgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびPD1/PD-L1チェックポイント阻害剤の組合せはCD8混合リンパ球反応アッセイにおいてIFNγ産生の増強を示す
IgG1-PD1またはペムブロリズマブとのIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの組合せが単独での各々の抗体での処理を上回る増強した免疫活性化を結果としてもたらし得るかどうかを分析するために、混合リンパ球反応（MLR）アッセイを行った。同種樹状細胞（DC）およびT細胞を、IgG1-PD1もしくはペムブロリズマブと組み合わせたIgG1-CD27-A-P329R-E345R、または同じ濃度範囲内の単独での該抗体のいずれかの存在下で5日間共培養した。
【０８２６】
MLRアッセイのために使用した同種ドナーペアからのCD14$^+$単球およびCD8$^+$T細胞はBioIVTから得た（表22）。
【０８２７】
（表２２）MLRアッセイにおいて使用した単球およびT細胞の同種ドナーペア

ドナーペア	ヒトCD14$^+$単球		ヒトCD8$^+$ T細胞	
	ロット番号	ドナー ID	ロット番号	ドナー ID
1	LS112418861	58355	LS1170885	CC00481
2			LS1169965	M7281

【０８２８】
CD14$^+$単球を未熟DC（iDC）に分化させるために、1mL当たり1.5×10^{6}個の単球をT25培養フラスコ（Falcon、カタログ番号353108）中の、10%熱不活化FBS（Thermo Fisher Scientific、カタログ番号16140071）、100ng/mLのGM-CSF（BioLegend、カタログ番号766106）および300ng/mLのIL-4（BioLegend、カタログ番号766206）を補充したRPMI-1640培地（ATCC改変;Thermo Fisher Scientific、カタログ番号A1049101）中、37℃、5% CO_2で6日間インキュベートした。4日目に、古い培地を吸引し、補充物を含む新鮮な培地を加えた。6日目に、非接着細胞を収集することによりiDCを採取した。iDCを成熟させるために、10% FBS、100ng/mLのGM-CSF、300ng/mLのIL-4、および5μg/mLのリポ多糖（LPS;Thermo Fisher Scientific、カタログ番号00-4976-93）を補充したRPMI-1640培地（ATCC改変）中37℃、5% CO_2で、MLRアッセイの開始に先立って24h、1mL当たり1～1.5×10^{6}個の細胞をインキュベートした。
【０８２９】
MLRアッセイの開始の1日前に、ヒトCD8$^+$T細胞を解凍し、1×10^{6}細胞/mLで、T75培養フラスコ（Falcon、カタログ番号353136）中の10% FBSおよび10ng/mLのIL-2（BioLegend、カタログ番号589106）を補充したRPMI-1640培地（ATCC改変）中、37℃、5% CO_2で終夜インキュベートした。翌日、CD8$^+$T細胞およびLPS成熟DCを採取し、予め温めたAIM-V培地（Thermo Fisher Scientific、カタログ番号12055091）中にそれぞれ4×10^{6}細胞/mLおよび4×10^{5}細胞/mLで再懸濁した。同種ドナーペアからの20,000個のDCおよび200,000個のCD8$^+$T細胞を丸底96ウェルプレート中のAIM-V培地中、IgG1-CD27-A-P329R-E345R（最終濃度範囲0.001～30μg/mL）、IgG1-PD1（最終濃度範囲0.001～100μg/mL）、および/またはペムブロリズマブ（最終濃度:1μg/mL）の段階希釈の存在下、37℃、5% CO_2で5日間共培養（1:10のDC:T細胞比）した。並行して、ドナーの応答性を確認するために、T細胞をImmunoCult（商標）Human CD3/CD28 T Cell Activator（Stemcell、カタログ番号10971）と37℃で5日間インキュベートした。5日後に、プレートを500×gで5分間遠心分離し、無細胞上清を各々のウェルから新たな丸底96ウェルプレートに移し、サイトカイン濃度のさらなる分析まで-80℃で貯蔵した。

【０８３０】
サイトカイン分泌を評価するために、5日目のMLRアッセイの上清中のサイトカインレベルをイムノアッセイにより決定した。製造者の使用説明書にしたがってEnvision機器上のAlphaLISA Human IFNγ Detection Kit（PerkinElmer、カタログ番号AL217）を使用してIFNγレベルを決定した。本質的に製造者により記載されるように、MILLIPLEX（登録商標）MAP Human TH17 Magnetic Bead Panel（HTH17MAG-14K）に基づくカスタマイズしたLuminex（登録商標）マルチプレックスイムノアッセイ（Millipore、注文番号SPR1526）を使用してGM-CSFのレベルを決定した。簡潔に述べれば、MLRアッセイからの凍結された上清を解凍し、10μLの各々の試料を、1×のキットに提供される洗浄緩衝液で予備洗浄された384ウェルプレート（Greiner Bio-One、カタログ番号781096）のウェル毎に10μLのアッセイ緩衝液に加えた。並行した対照ウェルにおいて、10μLのAIM-V培地をアッセイ緩衝液中の10μLの標準品または対照に加えた。GM-CSFに対する抗体を被覆した、色でコード化された磁気ビーズを混合し、ビーズ希釈剤中で1倍濃度まで希釈した後に、10μLの混合されたビーズを各々のウェルに加えた。プレートを1,000RPMへのパルススピンにより短時間遠心分離し、密閉し、振盪しながら4℃で終夜インキュベートした。Flick and Blot Magnetic Separation Plate for 384-well plates（Thermo Fisher Scientific、カタログ番号VP 771HHG4）を使用してウェル当たり60μLの1×洗浄緩衝液でビーズを3回洗浄した。引き続いて、ビオチン化された特注の検出抗体のカクテル10μLを各々のウェルに加え、プレートを1,000RPMへのパルススピンにより短時間遠心分離し、密閉し、振盪しながらRTで1hインキュベートした。次に、10μLのPEコンジュゲートストレプトアビジンを各々のウェルに加え、プレートを1,000RPMへのパルススピンにより短時間遠心分離し、密閉し、振盪しながらRTで30分間インキュベートした。ウェルを上記のように60μLの1×洗浄緩衝液で3回洗浄し、その後にビーズをRTで5分間振盪することにより75μLのLuminex Sheath Fluid中に再懸濁した。各々のウェルから、50μLの試料を収集し、FLEXMAP 3D Calibration Kit（Millipore、カタログ番号F3D-CAL-K25）を使用して較正されたLuminex FLEXMAP 3D（登録商標）システムに流した。5パラメーターロジスティック曲線フィッティング方法を使用して、中央値蛍光強度（MFI）の曲線フィッティングをBelysa（商標）Immunoassay Curve-Fitting Software（Merck）において行った。

【０８３１】
単独でのIgG1-CD27-A-P329R-E345R（10μg/mL）での処理はIFNyまたはGM-CSFの分泌を誘導しなかったが、単独での1μg/mLのIgG1-PD1またはペムブロリズマブのいずれかでの処理はIFNγおよびGM-CSFの両方の分泌を誘導した（図49）。IFNγおよびGM-CSFの分泌は、IgG1-PD1（1μg/mL）またはペムブロリズマブ（1μg/mL）のいずれかでの処理を10μg/mLのIgG1-CD27-A-P329R-E345Rと組み合わせることにより増強された。

【０８３２】
IgG1-CD27-A-P329R-E345Rおよび抗PD-1阻害剤抗体の組合せ処理が免疫活性化を相乗的に増加させるのかどうかを評価するために、IgG1-PD1とのIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの組合せから得られたIFNγ分泌データを各々のドナーペアについて別々に処理して相乗作用分析を行った。対照値（非処理対照ウェル）を差し引くことにより各々の処理条件におけるIFNγ（μg/ml）の濃度を正規化し、アッセイ（IFNγ誘導）における最大値のパーセンテージとして表した。R（v4.1.0）中のSynergyFinderパッケージ（v3.2.2;Zheng,S et al.2021.SynergyFinder Plus:towards a better interpretation and annotation of drug combination screening datasets.bioRxiv,10.1101/2021.06.01.446564）を使用して、組み合わせられた2つの抗体の間の相互作用を分析した。相乗効果は、2つの参照モデル（相乗作用スコアリングモデル）:Highest Single Agent（HAS;Berenbaum,M.C.（1989）What is synergy？Pharmacol Rev,41,93-141）およびBliss（Bliss,C.I.（1939）The Toxicity of Po

isons Applied Jointly1.Annals of Applied Biology,26,585-615）により算出された予想される効果を上回る観察された効果の余剰分として定義した。モデルの各々は、予想される効果に関する異なる仮定を行う（詳細についてそれぞれの参考文献を参照）。

【０８３３】

IgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびIgG1-PD1の組合せ処理は、IgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびIgG1-PD1濃度の範囲にわたり両方のモデルにおいて相乗作用を示した（図50）。ドナーペア1において、0.01μg/mLのIgG1-PD1をIgG1-CD27-A-P329R-E345R濃度の範囲（0.1～30μg/mL）と組み合わせた場合に最も強い相乗作用が観察された（図50A）。ドナーペア2において、1μg/mLのIgG1-PD1をIgG1-CD27-A-P329R-E345R濃度の範囲（0.01～10μg/mL）と組み合わせた場合に最も強い相乗作用が観察された（図50B）。

【０８３４】

総合すると、これらのデータは、IgG1-CD27-A-P329R-E345Rおよび抗PD1抗体の組合せ処理はCD8 MLRアッセイにおいて単一の処理と比較してサイトカイン分泌を増強できることを示す。IFNγ分泌は、IgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびIgG1-PD1の組合せ処理により相乗的に増強されることが示された。

【０８３５】

実施例49:抗原特異的T細胞媒介性細胞傷害に対するIgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびPD-1/PD-L1阻害剤の組合せの効果

組み合わせたIgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびPD-1/PD-L1阻害剤処理でのT細胞媒介性細胞傷害の誘導を、PD-1過剰発現およびCLDN6-TCR発現ヒト健常ドナーCD8$^+$T細胞ならびに標的としてのヒトPD-L1およびCLDN6発現乳がん細胞株の共培養においてインピーダンス測定を介してリアルタイム細胞分析により分析した。

【０８３６】

ヒトPD-L1$^+$乳がん細胞株MDA-MB-231（ATCC（登録商標）、HTB-26TM）にレンチウイルス形質導入によりモデル抗原クローディン-6を安定的に形質導入した。実施例45に記載されるように、解凍されたHLA-A＊02陽性PBMCからのCD8$^+$T細胞の陽性選択のために磁性抗ヒトCD8マイクロビーズ（Miltenyi Biotec、カタログ番号130-045-201）を使用した。CD8$^+$T細胞の純度は91％を上回っていた。実施例45に記載されるように、精製されたCD8$^+$T細胞に、PD-1をコードするRNAの他に、ヒトCLDN6に特異的なマウスTCRのアルファおよびベータ鎖をコードするRNAをエレクトロポレートした。

【０８３７】

終夜のインキュベーション後に、エレクトロポレートしたCD8$^+$T細胞上のCLDN6-TCRおよびPD-1の細胞表面発現をフローサイトメトリーにより確認した。この目的のために、7-アミノアクチノマイシンD（7-AAD;BD Biosciences、カタログ番号51-68981E;1:100に希釈）、50μLの染色緩衝液（DPBS、2％ FBS、2mMのEDTA）中にそれぞれ1:400、1:50および1:33で希釈された、滴定された量のBV605標識された抗CD8、Alexa Fluor 488標識された抗PD-1およびBV421標識された抗TCRβ抗体を用いて、生存、CD8、PD-1およびマウスTCRβについて単一細胞懸濁液を染色した。染色手順は、2～8℃で光から保護して15分間実行した。細胞を染色緩衝液で2回洗浄し（5分、460×g、RT）、フローサイトメトリー分析のために染色緩衝液中に再懸濁した。フローサイトメトリーデータをBD FACSCelestaフローサイトメーター上で取得した。エレクトロポレートしたCD8$^+$T細胞の約48％～95％および52％～92％は、それぞれPD-1およびCLDN6-TCRを発現した。

【０８３８】

実施例45に記載されるように、腫瘍細胞殺滅のリアルタイム細胞分析をxCELLigenceリアルタイム細胞分析（RTCA）機器（ACEA Biosciences）上でのインピーダンス測定により行った。CLDN6-TCRおよびPD-1を発現するT細胞を7.5×10^4 CD8$^+$T細胞/

ウェルで、1.5×10^{4}個の播種されたMDA-MB-231_hCLDN6細胞に加えて、5:1のT細胞:腫瘍細胞（エフェクター:標的）比とした。IgG1-CD27-A-P329R-E345R（10μg/mL）、IgG1-PD1（0.8μg/mL）、ペムブロリズマブ（0.8μg/mL）、ニボルマブ（1.6μg/mL）、またはアテゾリズマブ（0.4μg/mL）を共培養物に、単剤としてまたはIgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびPD-1/PD-L1阻害剤の組合せとして加えた。非結合性抗体IgG1-b12-P329R-E345R（10μg/mL）を陰性対照として使用した。共培養物を抗体の存在下、xCELLigence RTCA機器中で5～6日間妨害なしにインキュベートし、全細胞量のリードアウトとして2～3時間間隔でインピーダンス測定を行った。1（細胞指数）に設定された、CD8$^+$T細胞/腫瘍細胞共培養の開始の時点に対してデータを正規化した。時間における細胞指数値を示すグラフを、GraphPad Prismソフトウェアを使用して図表的に表示し、それを使用して、試験抗体で処理された各々の共培養について非結合性対照抗体IgG1-b12-P329R-E345Rで処理された共培養物に対して正規化された曲線下面積（AUC）を決定した。

【０８３９】

リアルタイム細胞分析は、単剤としてのIgG1-CD27-A-P329R-E345Rおよびすべての試験されたPD-1/PD-L1阻害剤は、非結合性対照抗体IgG1-b12-P329R-E345Rと比較してCD8$^+$T細胞媒介性腫瘍細胞殺滅を増強することを示した（図51A）。PD-1/PD-L1阻害剤をIgG1-CD27-A-P329R-E345Rと組み合わせて使用した場合に腫瘍細胞殺滅はさらに増強された。11～14ドナーからのプールされた分析において、IgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびIgG1-PD1、ペムブロリズマブ、ニボルマブまたはアテゾリズマブの組合せで処理された培養物は、単剤処理と比較して正規化されたAUC値を有意に低下させることを示した（図51B）。

【０８４０】

実施例50:抗原特異的細胞傷害性アッセイにおけるT細胞細胞傷害性関連分子の発現に対するIgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびPD-1/PD-L1阻害剤の組合せの効果

抗原特異的CD8$^+$T細胞上の脱顆粒マーカーCD107a（リソソーム関連膜タンパク質-1［LAMP-1］）および細胞傷害性メディエータータンパク質グランザイムB（GzmB）の発現に対するIgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびPD-1/PD-L1阻害剤の組合せの効果を、実施例49に記載されるように、MDA-MB-231_hCLDN6細胞とのPD-1過剰発現およびCLDN6-TCR発現CD8$^+$T細胞の共培養物を使用してフローサイトメトリーにより評価した。

【０８４１】

共培養物を抗体の存在下で2日間インキュベートし、引き続いて生存の他に、CD8、CD107a、およびGzmB発現についてフローサイトメトリーにより分析した。CD107aは細胞傷害性顆粒上に発現され、したがってT細胞脱顆粒で再内部移行されることを考慮して、AF647標識された抗CD107a抗体（Biolegend、カタログ番号328611;1:3,333に希釈）は共培養の開始時にすべての処理条件に既に加えた。2日のインキュベーション後に、Golgi-Plug（Brefeldin A;220μL中の最終希釈:1:1,000）を含有する小体積のアッセイ培地（20μL/ウェル）を細胞に加え、続いて37℃で4hインキュベートした。細胞外染色のために、細胞を遠心分離し、BV605標識された抗CD8抗体（1:600）および固定可能生存色素eFluor780（Thermo Fisher Scientific、カタログ番号65-0865-14;1:2,000）を含有する50μLの染色緩衝液中に再懸濁した。細胞外染色手順は、光から保護して2～8℃で20分間実行した。引き続いての細胞内染色のために、細胞を染色緩衝液で2回洗浄し（5分、460×g、RT）、200μLのHistofix 2%（Carl Roth;カタログ番号P087.4、DPBSで1:2に希釈）中に再懸濁し、続いて、光から保護して、RTで15分間インキュベートした。細胞を遠心分離し（5分、460×g、2～8℃）、透過処理緩衝液（Thermo Fisher Scientific、カタログ番号00-8333-56）で洗浄し、透過処理緩衝液中のPE標識された抗GzmB抗体（BD、カタログ番号561142;1:300に希釈）を使用してGzmBについて染色した。細胞内染色手順は、光から保護して2～8℃で20分間実行した。細胞を次に透過処理緩衝液で2回洗浄し（5分、460×g、RT）、フ

ローサイトメトリー分析のために染色緩衝液中に再懸濁した。フローサイトメトリーデータをBD FACSCelestaフローサイトメーター上で取得した。

【０８４２】

IgG1-CD27-A-P329R-E345RまたはPD-1/PD-L1阻害剤での単剤処理は、非結合性対照抗体IgG1-b12-P329R-E345Rでの処理と比較してGzmBおよびCD107aの両方を発現するCD8$^+$T細胞のパーセンテージを増加させた（図52）。IgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびPD-1/PD-L1阻害剤の組合せは、単剤処理と比較してGzmBおよびCD107aの両方を発現するCD8$^+$T細胞のパーセンテージを有意に増加させた。

【０８４３】

結論として、IgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびPD-1/PD-L1の組合せ処理によるCD8$^+$T細胞の細胞傷害能力における増加（実施例49）は、CD8$^+$T細胞による脱顆粒マーカーCD107aおよび細胞傷害性メディエータータンパク質GzmBの発現の増加を伴った。

【図面の簡単な説明】

【０８４４】

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

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

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

【図４Ａ－１】図4は、CSFE希釈アッセイにおいてフローサイトメトリーにより決定された、Fc変異P329R、G237A、またはK326A-E33Aと組み合わせてFc変異E430RまたはE345Rを宿す1μg/mLのCD27特異的抗体バリアントIgG1-CD27-A、-B、または-Cの存在下でTCR刺激された（A）CD8$^+$および（B）CD4$^+$T細胞の増殖のヒートマップを示す。4人のヒト健常ドナーからのPMBCをT細胞の供給源として使用した。FlowJoソフトウェアを使用することによりCFSE希釈を経た細胞（CFSE$^{low\ peaks}$）についてゲーティングすることにより算出された、T細胞分裂指数またはT細胞の増殖のパーセンテージとしてT細胞増殖を表した。

【図４Ａ－２】図4A-1の説明を参照のこと。

【図４Ｂ－１】図4A-1の説明を参照のこと。

【図４Ｂ－２】図4A-1の説明を参照のこと。

【図５】図5は、フローサイトメトリーにより決定された、IgG1-CD27-A、IgG1-CD27-A-P329R-E345R、または先行技術の抗CD27クローンIgG1-CD27-131A、IgG1-CD27-CDX1127、およびIgG1-CD27-BMS986215とのヒト健常ドナーPBMCのインキュベーション後の（A、B）非刺激、または（C～F）TCR刺激された、（A、C、E）C

D4^{+}、または（B、D、F）CD8^{+}T細胞の、（A～D）増殖したT細胞のパーセンテージ、（E、F）拡大増殖指数を示す。抗HIV-gp120抗体バリアントIgG1-b12-E345R-P329R（対照）を非結合性陰性対照抗体として含めた。CFSE希釈を経た細胞（CFSE$^{low\ peaks}$）についてゲーティングすることにより細胞の増殖%を算出した。拡大増殖指数は、ウェル中の細胞の増加倍数を同定し、FlowJoバージョン10中のProliferation Modelingツールを使用して算出された。ピークに対する手動の調整を必要な場合に行って、存在するピークの数をより一貫して定義した。

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

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

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

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

【図９－２】図9-1の説明を参照のこと。

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

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

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

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

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

【図１４Ａ－２】図14A-1の説明を参照のこと。

【図１４Ｂ－１】図14A-1の説明を参照のこと。

【図１４Ｂ－２】図14A-1の説明を参照のこと。

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

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

【図１７】図17は、OVAを用いた免疫化および抗CD27抗体を用いた処理後のhCD27-KIマウスの脾臓における活性化CD8$^+$T細胞のパーセンテージを示す。hCD27-KIマウスにs.c.で5mgのOVAを0、12および21日目に注射し、同時にi.v.で30mg/kgのIgG1-CD27-A-P329R-E345R、IgG1-CD27-CDX1127または非結合性対照抗体IgG1-b12-P329R-E345Rを用いて処置した。28日目に、マウスを安楽死させ、脾臓を切除し、単一細胞懸濁液として加工した。フローサイトメトリーにより脾臓中のCD8$^+$細胞のPD-1$^+$パーセンテージを測定することによりCD8$^+$T細胞の活性化を脾臓試料において評価した。示されるデータは、行われた1回の実験からの処置群（5匹のマウス/群）当たりの平均±SDである。

【図１８】図18は、OVAを用いた免疫化および抗CD27抗体を用いた処理後のhCD27-KIマウスの脾臓におけるエフェクターCD8$^+$T細胞のパーセンテージを示す。hCD27-KIマウスにs.c.で5mgのOVAを0、12および21日目に注射し、同時にi.v.で30mg/kgのI

gG1-CD27-A-P329R-E345R、IgG1-CD27-CDX1127または非結合性対照抗体IgG1-b12-P329R-E345Rを用いて処置した。28日目に、マウスを安楽死させ、脾臓を切除し、単一細胞懸濁液として加工した。メモリーT細胞の拡大増殖をフローサイトメトリーによりCD44およびCD62Lの発現により評価した。示されるデータは、行われた1回の実験からの処置群（5匹のマウス/群）当たりの平均±SDである。（A）$CD45^+$細胞のうち$CD8^+CD44^+CD62L^-$エフェクターメモリーのパーセンテージ。（B）$CD8^+$T細胞のうち$CD44^+CD62L^-$エフェクターメモリーのパーセンテージ。（C）$CD45^+$細胞のうち$CD8^+CD44^-CD62L^-$プレエフェクターのパーセンテージ。（D）$CD8^+$T細胞のうち$CD44^-CD62L^-$プレエフェクターのパーセンテージ。

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

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

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

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

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

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

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

【図２６－１】図26は、異なる種のPD-1へのIgG1-PD1の結合を示す。異なる種のPD-1を一過的にトランスフェクトされたCHO-S細胞をIgG1-PD1、ペムブロリズマブ、または非結合性対照抗体IgG1-ctrl-FERRおよびIgG4-ctrlとインキュベートし、フローサイトメトリーを使用して結合を分析した。IgG1-PD1とインキュベートされた非トランスフェクトCHO-S細胞を陰性対照として含めた。A～B。示されるデータは、4回の実験のうちの1つの代表的な実験からの二連のウェルの幾何平均蛍光強度（gMFI）±SDである。C～D。示されるデータは、2回の実験のうちの1つの代表的な実験からの二連のウェルのgMFI±SDである。E。示されるデータは、4回の実験のうちの1つの代表的な実験からの二連のウェルの幾何平均蛍光強度（gMFI）±SDである。略語:gMFI＝幾何平均蛍光強度;PD-1＝プログラム細胞死タンパク質1;PE＝R-フィコエリトリン。

【図２６－２】図26-1の説明を参照のこと。

【図２７】図27は、ヒトPD-1に対するPD-L1およびPD-L2とのIgG1-PD1の競合的な結合を示す。ヒトPD-1を一過的にトランスフェクトされたCHO-S細胞を1μg/mLのビオチン化組換えヒトPD-L1（A）またはPD-L2（B）とIgG1-PD1またはペムブロリズマブの存在下でインキュベートした。IgG1-ctrl-FERRを陰性対照として含めた。細胞をストレプトアビジン-アロフィコシアニンで染色し、ビオチン化PD-L1またはPD-L2に結合した細胞のパーセンテージを、フローサイトメトリーを使用してストレプトアビジン-アロフィコシアニン$^+$細胞のパーセンテージを測定することにより決定した。無抗体対照中および非トランスフェクト試料中のストレプトアビジン-アロフィコシアニン$^+$細胞のパーセンテージを破線で示している。示されるデータは、3回の別々の実験のうちの1つの代表的な実験からの単一の複製物からである。略語:Ab＝抗体;CHO-S＝チャイニーズハムスター卵巣、懸濁液;ctrl＝対照;FERR＝L234F/L235E/G236R-K409R;PD-1＝プログラム細胞死タンパク質1;PD-L1＝プログラム細胞死1リガンド1;PD-L2＝プログラム細胞死1リガンド2。

【図２８】図28は、IgG1-PD1によるPD-1/PD-L1チェックポイントの機能的な阻害を示す。細胞ベース生物発光PD-1/PD-L1遮断レポーターアッセイを使用してPD-1/PD-

L1系の遮断を試験した。示されるデータは、5（ペムブロリズマブおよびIgG1-PD1）、3（IgG1-ctrl-FERR）または2（ニボルマブ）回の実験のうちの1つの代表的な実験における二連のウェルの平均発光±SDである。略語:FERR＝L234F/L235E/G236R-K409R;PD1＝プログラム細胞死タンパク質1;PD-L1＝プログラム細胞死1リガンド1;RLU＝相対光単位;SD＝標準偏差。

【図２９】図29は、抗原特異的T細胞増殖アッセイにおけるIgG1-PD1によるCD8＋T細胞増殖の増強を示す。ヒトCD8＋T細胞に、CLDN6特異的TCRをコードするRNAおよびPD-1をコードするRNAをエレクトロポレートし、CFSEで標識した。T細胞を次に、CLDN6をコードするRNAをエレクトロポレートしたiDCと、IgG1-PD1、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、またはIgG1-ctrl-FERRの存在下で共培養した。T細胞におけるCFSE希釈を4日後にフローサイトメトリーにより分析し、それを使用して拡大増殖指数を算出した。3回の独立した実験において評価された4人のドナーのうちの1人の代表的なドナー（26268_B）からのデータを示している。エラーバーは二連のウェルのSDを表す。GraphPad Prismを使用して4パラメーター対数フィットにより曲線をフィッティングした。略語:CFSE＝カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル;FERR＝L234F/L235E/G236R-K409R;PD1＝プログラム細胞死タンパク質1;SD＝標準偏差。

【図３０】図30は、同種MLRアッセイにおけるIgG1-PD1誘導性IFNγ分泌を示す。同種ヒトmDCおよびCD8＋T細胞の3つの独特のドナーペアをIgG1-PD1またはペムブロリズマブの存在下で5日間共培養した。IgG1-ctrl-FERRおよびIgG4アイソタイプ対照を陰性対照として含めた。IFNγ特異的イムノアッセイを使用して上清中でIFNγ分泌を分析した。示されるデータは、3つの独特の同種ドナーペアについての平均±平均の標準誤差（SEM）の濃度である。略語:FERR＝L234F/L235E/G236R-K409R;IFN＝インターフェロン;IgG＝免疫グロブリンG;mDC＝成熟樹状細胞;MLR＝混合リンパ球反応;SEM＝平均の標準誤差。

【図３１】図31は、同種MLRアッセイにおけるIgG1-PD1誘導性サイトカイン分泌を示す。同種ヒトmDCおよびCD8＋T細胞の3つの独特のドナーペアを1μg/mLのIgG1-PD1またはペムブロリズマブの存在下で5日間共培養した。IgG1-ctrl-FERRを陰性対照として含めた。Luminexを使用して上清中でサイトカイン分泌を分析した。（A）処理されていない共培養物において測定されたサイトカインレベルに対する平均変化倍数としてサイトカインレベルを表している。（B）3つの独特の同種ドナーペアのサイトカイン産生のレベルを示しており、水平線は、平均、上限、および下限を示す。略語:FC＝変化倍数;FERR＝L234F/L235E/G236R-K409R;GM-CSF＝顆粒球マクロファージコロニー刺激因子;IgG＝免疫グロブリンG;IL＝インターロイキン;MCP-1＝単球化学誘引タンパク質1;mDC＝成熟樹状細胞;MLR＝混合リンパ球反応;TNF＝腫瘍壊死因子。

【図３２】図32は、膜結合IgG1-PD1へのC1qの結合を示す。刺激されたヒトCD8＋T細胞を使用してIgG1-PD1へのC1qの結合を分析した。IgG1-PD1、IgG1-ctrl-FERR、IgG1-ctrl、または陽性対照抗体IgG1-CD52-E430G（不活性突然変異を有さずかつ六量体化増強突然変異を有する）とのインキュベーション後に、細胞をC1qの供給源としてのヒト血清とインキュベートした。C1qの結合をFITCコンジュゲートウサギ抗C1q抗体で検出した。示されるデータは、3回の同等の実験の間での7人のドナーのうちの1人の代表的なドナーからの二連のウェルからの幾何平均蛍光強度（gMFI）±標準偏差（SD）である。略語:FITC＝フルオレセインイソチオシアネート;gMFI＝幾何平均蛍光強度;PE＝R-フィコエリトロシアニン。

【図３３－１】図33は、IgG1-PD1のFcγR結合を示す。固定化されたヒト組換えFcγR構築物へのIgG1-PD1の結合をSPRにより適格アッセイにおいて分析した（n＝1）。IgG1-PD1のFcγRIa（A）、FcγRIIa-H131（B）、FcγRIIa-R131（C）、FcγRIIb（D）、FcγRIIIa-F158（E）、およびFcγRIIIa-V158（F）結合。抗体IgG1-ctrl（FER不活性突然変異を有しない）を結合についての陽性対照として含めた。略語:ctrl＝対照;FcγR＝Fcガンマ受容体;IgG＝免疫グロブリンG;PD-1＝プログラム細胞死タンパク質1;RU＝共鳴単位。

【図３３－２】図33-1の説明を参照のこと。
【図３４－１】図34は、IgG1-PD1およびいくつかの他の抗PD-1抗体のFcγR結合を示す。固定化されたヒト組換えFcγR構築物へのIgG1-PD1、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ドスタルリマブ、およびセミプリマブの結合をSPRにより分析した（n＝3）。試験抗体のFcγRIa（A）、FcγRIIa-H131（B）、FcγRIIa-R131（C）、FcγRIIb（D）、FcγRIIIa-F158（E）、およびFcγRIIIa-V158（F）結合。IgG1-ctrlおよびIgG4-ctrl抗体を、野生型Fc領域を有するIgG1およびIgG4分子のFcγR結合についての陽性対照として含めた。3回の別々の実験の結合応答±SDを示している。略語:ctrl＝対照;FcγR＝Fcガンマ受容体;IgG＝免疫グロブリンG;PD-1＝プログラム細胞死タンパク質1;RU＝共鳴単位。
【図３４－２】図34-1の説明を参照のこと。
【図３５】図35は、IgG1-PD1およびいくつかの他の抗PD-1抗体のFcγRIa結合を示す。ヒトFcγRIaを一過的に発現するCHO-S細胞へのIgG1-PD1、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ドスタルリマブ、およびセミプリマブの結合をフローサイトメトリーにより分析した。IgG1-ctrlおよびIgG1-ctrl-FERRをそれぞれ陽性および陰性対照として含めた。略語:ctrl＝対照;FcγR＝Fcガンマ受容体;FERR＝L234F/L235E/G236R-K409R;huIgG＝ヒト免疫グロブリンG;PD-1＝プログラム細胞死タンパク質1;PE＝R-フィコエリトリン。
【図３６】図36は、マウス血漿試料中の全ヒトIgGを示す。マウスの静脈内に1または10mg/kgのIgG1-PD1をt＝0に注射し、連続血漿試料を注射の10分、4h、1日、2日、8日、14日、および21日後に採取した。血漿試料中の全huIgGをECLIAにより各々のマウスについて決定した。データを3匹の個々のマウスの平均huIgG濃度±SDとして表している。破線は、ヒトにおけるIgGクリアランスに基づいて2コンパートメントモデルにより予測される野生型（wt）huIgGの血漿濃度を示す（Bleeker et al.,2001,Blood.98（10）:3136-42）。点線はLLOQおよびULOQを示す。略語:huIgG＝ヒトIgG;IgG＝免疫グロブリンG;LLOQ＝定量下限;PD-1＝プログラム細胞死タンパク質1;SD＝標準偏差;ULOQ＝定量上限。
【図３７－１】図37は、ヒトPD-1ノックインマウスにおけるIgG1-PD1の抗腫瘍活性を示す。MC38結腸がん同系腫瘍モデルをSC移植によりhPD-1 KIマウスにおいて確立した。マウスに0.5、2、もしくは10mg/kgのIgG1-PD1もしくはペムブロリズマブまたは10mg/kgのIgG1-ctrl-FERRを2QW×3で投与した（群当たり9匹のマウス）。（A）群が完了した最後の時点までの、各々の群における平均腫瘍体積±SEM。（B）すべての群が完了した最後の日（11日目）における異なる群の腫瘍体積。示されるデータは、各々の処置群中の個々のマウスにおける腫瘍体積の他に、処置群毎の平均腫瘍体積±SEMである。マン-ホイットニー分析を使用して、処置群の腫瘍体積をIgG1-ctrl-FERR処置群に対して比較した;＊p＜0.05、＊＊p＜0.01、および＊＊＊p＜0.001。C.500mm^3より小さい腫瘍体積を有するマウスのパーセンテージとして定義される無増悪生存期間をカプラン-マイヤー曲線として示している。分析では、腫瘍体積が500mm^3を超える前に、16日目に不定の原因に起因して死亡していた2mg/kg IgG1-PD1群からの1匹のマウスを除外した。略語:2QW×3＝週当たり2回で3週間;ctrl＝対照;FERR＝L234F/L235E/G236R/K409R突然変異;IgG＝免疫グロブリンG;KI＝ノックイン;PD-1＝プログラム細胞死タンパク質1;SC＝皮下;SEM＝平均の標準誤差。
【図３７－２】図37-1の説明を参照のこと。
【図３８】図38は、IgG1-PD1で処置されたヒトPD-1ノックインマウスにおける末梢T細胞カウント動態を示す。MC38結腸がん同系腫瘍モデルをSC移植によりhPD-1 KIマウスにおいて確立した。マウスに0.5もしくは10mg/kgのIgG1-PD1、10mg/kgのペムブロリズマブ、または10mg/kgのIgG1-ctrl-FERRを0、3、および7日目に投与した（群当たり12匹のマウス）。末梢血試料を2、4、および8日目に群当たり4匹のマウスから安楽死後に収集し、フローサイトメトリーにより分析した。生存CD45＋白血球亜集団内の血液1μL当たりのCD3＋（A）、CD4＋（B）、およびCD8＋（C）T細胞の数の

平均±SDを示している。マン-ホイットニー分析を使用して、処置群をIgG1-ctrl-FERR処置群に対して、および10mg/kg IgG1-PD1群を10mg/kgペムブロリズマブ群と比較した;＊p＜0.05。略語:ctrl＝対照;FERR＝L234F/L235E/G236R/K409R突然変異;IgG＝免疫グロブリンG;KI＝ノックイン;PD-1＝プログラム細胞死タンパク質1;SC＝皮下;SD＝標準偏差。

【図３９】図39は、IgG1-PD1で処置されたヒトPD-1ノックインマウスにおける脾臓T細胞サブセット上のPDマーカーを示す。MC38結腸がん同系腫瘍モデルをSC移植によりhPD-1 KIマウスにおいて確立した。マウスに0.5もしくは10mg/kgのIgG1-PD1、10mg/kgのペムブロリズマブ、または10mg/kgのIgG1-ctrl-FERRを0、3、および7日目に投与した（群当たり12匹のマウス）。脾臓を2、4、および8日目に採取し（n＝群および時点当たり4匹のマウス）、フローサイトメトリーにより分析した。8日目の脾臓中の全CD8＋T細胞集団内のエフェクターメモリー（CD44＋CD62L-）、セントラルメモリー（CD44＋CD62L＋）、およびナイーブ（CD44-CD62L＋）CD8＋T細胞のパーセンテージ（A）、ならびにMHCクラスII＋細胞のパーセンテージ（B）の平均±SDを示している。マン-ホイットニー分析を使用して、処置群をIgG1-ctrl-FERR処置群に対して、および10mg/kg IgG1-PD1群を10mg/kgペムブロリズマブ群と比較した;＊p＜0.05。略語:ctrl＝対照;FERR＝L234F/L235E/G236R/K409R突然変異;IgG＝免疫グロブリンG;KI＝ノックイン;PD-1＝プログラム細胞死タンパク質1;SC＝皮下;SD＝標準偏差。

【図４０】図40は、IgG1-PD1で処置されたヒトPD-1ノックインマウスにおける腫瘍内細胞における変化を示す。MC38結腸がん同系腫瘍モデルをSC移植によりhPD-1 KIマウスにおいて確立した。マウスに0.5もしくは10mg/kgのIgG1-PD1、10mg/kgのペムブロリズマブ、または10mg/kgのIgG1-ctrl-FERRを0、3、および7日目に投与した（群当たり12匹のマウス）。異種移植腫瘍を8日目に切除し（n＝群当たり4匹のマウス）、IHCにより分析した。8日目のすべての有核細胞のうちのCD3＋T細胞（A）、CD4＋T細胞（B）、CD8＋T細胞（C）、およびGZMB＋細胞（D）のパーセンテージの平均±SDを示している。マン-ホイットニー分析を使用して、処置群をIgG1-ctrl-FERR処置群に対して、および10mg/kg IgG1-PD1群を10mg/kgペムブロリズマブ群と比較した;＊p＜0.05。略語:ctrl＝対照;FERR＝L234F/L235E/G236R/K409R突然変異;GZMB＝グランザイムB;IgG＝免疫グロブリンG;KI＝ノックイン;PD-1＝プログラム細胞死タンパク質1;SC＝皮下;SD＝標準偏差。

【図４１】図41は、ヒト単球由来FcγR＋M2c様マクロファージへのIgG1-PD1および他の抗PD-1抗体の結合を示す。（A）試験された3人のドナーのうちの1人の代表的なドナーの、正規化データのオーバーレイヒストグラムにおいて可視化された、関連するアイソタイプ対照および非染色M2c様マクロファージと比べた、FcγRIa、FcγRII、FcγRIIIa、およびPD-1の発現。（B）24hのインキュベーション後のヒト単球由来FcγR＋M2c様マクロファージへのIgG1-PD1、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、および対照抗体の結合をフローサイトメトリーにより分析した。結合は、バックグラウンド対照の結合（黒い点線により示される、二次抗体のみでの結合）と比べて示している。ドットは、2回の独立した実験において測定された3人の個々のドナーを表し、棒グラフおよびエラーバーは3人のドナーのそれぞれ平均±SDを表す。略語:ctrl＝対照;FERR＝L234F/L235E/G236R/K409R突然変異;PD-1＝プログラム細胞死タンパク質1;SD＝標準偏差。

【図４２】図42は、膜結合IgG1-PD1および他の抗PD-1抗体により誘導されたFcγRシグナル伝達を示す。膜結合IgG1-PD1およびいくつかの他の抗PD-1抗体により誘導されるFcγRシグナル伝達を、細胞ベース生物発光FcγRI（A）、FcγRIIa-R131（B）、FcγRIIa-H131（C）、およびFcγRIIb（D）レポーターアッセイを使用して試験した。六量体化増強E430G突然変異を有するIgG1-CD52-E430Gを陽性対照として含めた。示されるデータは、3回の実験のうちの1つの代表的な実験における二連のウェルの平均相対光単位±SDである。略語:Ab＝抗体;FERR＝L234F/L235E/G236R/K409R突然変異;PD-1＝プログラム細胞死タンパク質1;RLU＝相対光単位;SD＝標準偏差。

【図４３】図43は、DuoBody-PD-L1x4-1BBと組み合わせたIgG1-CD27-A-P329R-E345Rにより誘導されたポリクローナル活性化CD4＋およびCD8＋T細胞の増殖を示す。CTV標識されたヒト健常ドナーPBMCをCD3抗体ならびにIgG1-CD27-A-P329R-E345Rおよび/またはDuoBody-PD-L1x4-1BBと4日間インキュベートした。T細胞におけるCTV希釈をフローサイトメトリーにより分析し、それを使用して拡大増殖指数を算出した。示されるデータは、0.1μg/mLのCD3抗体で刺激された試料中の（A）CD4＋および（B）CD8＋T細胞からのものである。値は、行われた4回の実験において試験された6人のドナーのうちの1人の代表的なドナーからの単一の複製物の拡大増殖指数を提示する。略語:CD＝分化クラスター;CTV＝cell trace violet;PBMC＝末梢血単核細胞;PD-L1＝プログラム細胞死1リガンド1;TCR＝T細胞受容体。

【図４４Ａ】図44は、インビトロでのT細胞増殖に対するDuoBody-PD-L1x4-1BB、IgG1-PD1、ペムブロリズマブ、ニボルマブまたはアテゾリズマブと組み合わせたIgG1-CD27-A-P329R-E345RまたはIgG1-CD27-131Aの効果を示す。ヒトCD8＋T細胞に、CLDN6特異的TCRをコードするRNAおよびPD-1をコードするRNAをエレクトロポレートし、CFSEで標識した。T細胞を次に、CLDN6をエレクトロポレートしたiDCと、（A）IgG1-CD27-A-P329R-E345R（1もしくは10μg/mL）および/もしくはDuoBody-PD-L1x4-1BB（0.2μg/mL）の存在下で、または（B）IgG1-CD27-A-P329R-E345R（0.1、1もしくは10μg/mL）、IgG1-CD27-131A（10μg/mL）、IgG1-PD1（0.8μg/mL）、ペムブロリズマブ（0.8μg/mL）、ニボルマブ（1.6μg/mL）、アテゾリズマブ（0.4μg/mL）もしくはIgG1-CD27-A-P329R-E345RもしくはIgG1-CD27-131Aおよび抗PD-（L）1抗体の1つの組合せの存在下で、4日間共培養した。T細胞におけるCFSE希釈をフローサイトメトリーにより分析し、それを使用して拡大増殖指数を算出した。3回の独立した実験において試験された3～7人のドナーのうちの1人の代表的なドナーからのデータを示している（IgG1-CD27-A-P329R-E345R、IgG1-PD1、ペムブロリズマブ:n＝7;ニボルマブ、アテゾリズマブ:n＝6;IgG1-CD27-131A:n＝3）。エラーバーは二連のウェルのSDを示す。点線は、抗体処理なしでiDCと共培養されたCD8＋T細胞の拡大増殖指数を表す。CFSE、カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル;CLDN6、クローディン-6;iDC、未熟樹状細胞;PD-1、プログラム細胞死タンパク質1;SD、標準偏差;TCR、T細胞受容体。

【図４４Ｂ】図44Aの説明を参照のこと。

【図４５Ａ】図45は、インビトロでのサイトカイン分泌に対するDuoBody-PD-L1x4-1BB、IgG1-PD1、ペムブロリズマブ、ニボルマブまたはアテゾリズマブと組み合わせたIgG1-CD27-A-P329R-E345RまたはIgG1-CD27-131Aの効果を示す。CLDN6特異的TCRおよびPD-1を発現するヒトCD8＋T細胞を図37におけるようにCLDN6発現iDCと、（A）IgG1-CD27-A-P329R-E345R（1もしくは10μg/mL）および/もしくはDuoBody-PD-L1x4-1BB（0.2μg/mL）の存在下で、または（B）IgG1-CD27-A-P329R-E345R（0.1、1もしくは10μg/mL）、IgG1-CD27-131A（10μg/mL）、IgG1-PD1（0.8μg/mL）、ペムブロリズマブ（0.8μg/mL）、ニボルマブ（1.6μg/mL）、アテゾリズマブ（0.4μg/mL）もしくはIgG1-CD27-A-P329R-E345RもしくはIgG1-CD27-131Aおよび抗PD-（L）1抗体の1つの組合せの存在下で、共培養した。2（A）または4（B）日後に、（A）IFNγ、GM-CSF、TNFα、およびIL-2または（B）IFNγのサイトカイン濃度を上清中でマルチプレックスECLIAにより決定した。試験された4（A）または3～7（B、IgG1-CD27-A-P329R-E345R、IgG1-PD1、ペムブロリズマブ:n＝7;ニボルマブ、アテゾリズマブ:n＝6;IgG1-CD27-131A:n＝3）人のドナーのうちの1人の代表的なドナーからのデータを示している。エラーバーは三連のウェルのSDを示す。点線は、抗体処理なしでのCD8＋T細胞/iDC共培養物中のサイトカイン濃度を表す。CFSE、カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル;CLDN6、クローディン-6;ECLIA、電気化学発光イムノアッセイ;iDC、未熟樹状細胞;PD-1、プログラム細胞死タンパク質1;SD、標準偏差;TCR、T細胞受容体。

【図４５Ｂ】図45Aの説明を参照のこと。

【図４６】図46は、インビトロでのCD8＋T細胞細胞傷害に対する組み合わせたIgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびDuoBody-PD-L1x4-1BB処理の効果を示す。MDA-MB-231_hCLDN6細胞に対するCD8＋T細胞媒介性細胞傷害活性をリアルタイム細胞分析により評価した。CLDN6-TCR発現CD8＋T細胞をhCLDN6-MDA-MB-231細胞と5日間、IgG1-CD27-A-P329R-E345R（1もしくは10μg/mL）、DuoBody-PD-L1x4-1BB（0.2μg/mL）、両方の組合せ、または陰性対照抗体IgG1-b12-P329R-E345R（10μg/mL）の存在下で共培養した。2時間間隔で実行されたインピーダンス測定から細胞指数値を導出した。（A）評価された6人のドナーのうちの、1人のドナーの細胞指数曲線。エラーバーは二連のウェルのSDを示す。（B）5日の共培養の持続期間全体にかけての細胞指数データを使用してAUC分析を行った。各々の処理条件のAUCを、同じドナーからのIgG1-b12-P329R-E345R処理された培養物に対して正規化した。2回の個々の実験からのプールされたデータを示している。エラーバーはSDを示す（n＝6、各々のドナーについて二連のウェルの平均）。＊、P＜0.05;ダン多重比較検定を伴うフリードマン検定。

【図４７】図47は、インビトロでのGzmBおよびCD107a発現に対する組み合わせたIgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびDuoBody-PD-L1x4-1BB処理の効果を示す。CLDN6-TCR発現CD8＋T細胞をMDA-MB-231_hCLDN6細胞と2日間、IgG1-CD27-A-P329R-E345R（1もしくは10μg/mL）、DuoBody-PD-L1x4-1BB（0.2μg/mL）、両方の組合せ、または陰性対照抗体IgG1-b12-P329R-E345R（10μg/mL）の存在下で共培養した。GzmBおよびCD107aの細胞内発現をフローサイトメトリーにより分析した。CD8＋T細胞のうちの、（点線により示されるような、IgG1-b12-P329R-E345Rに対して正規化された）（A）GzmB、（B）CD107a、または（C）GzmBおよびCD107aの両方を発現するCD8＋T細胞のパーセンテージを示している。点線および灰色の影付きは、IgG1-b12-P329R-E345Rで処理された共培養物中のGzmB＋CD107a＋細胞の平均パーセンテージならびに範囲（すなわち最大および最小）を示す。2回の個々の実験からのプールされたデータ（n＝6人のドナー）を示している。エラーバーはSDを示す。＊、P＜0.05;ダン多重比較検定を伴うフリードマン検定。

【図４８】図48はNSCLC TILサブセットの細胞数を示す。ヒトNSCLC検体に由来する腫瘍断片を低用量IL-2のみと、または1μg/mLのIgG1-CD27-A-P329R-E345R、0.2μg/mLのDuoBody-PD-L1x4-1BB、もしくは両方の組合せの存在下で培養した。指し示される細胞サブセットの絶対細胞カウントを14日後にフローサイトメトリーにより決定した。記号は複製ウェルを表し、線は、行われた3回の実験のうちの1つの実験からの複製物の平均を表す。NK、ナチュラルキラー;PD-L1、プログラム細胞死1リガンド1;SD、標準偏差。

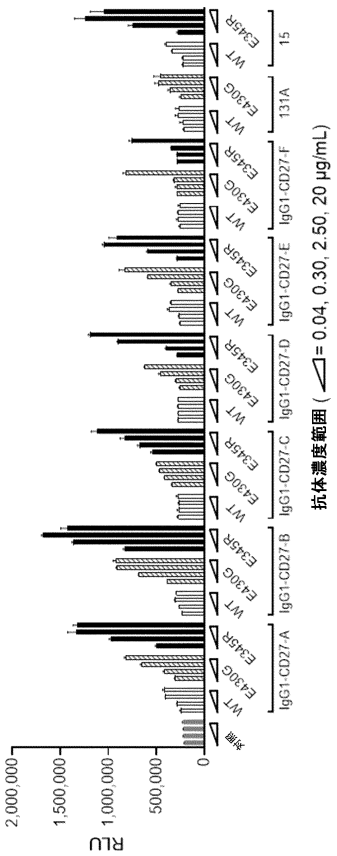
【図４９】図49は、10μg/mLのIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの非存在または存在下でIgG1-PD1（1μg/mL）またはペムブロリズマブ（1μg/mL）で処理された、CD8混合リンパ球反応（MLR）アッセイにおいて測定された場合のサイトカイン濃度を示す。（A）IFNγおよび（B）GM-CSFの濃度レベル（pg/ml）を示している。2回の個々の実験からのプールされたデータ（n＝2人のドナー）を示している。エラーバーはSDを示す。

【図５０Ａ－１】図50は、10μg/mLのIgG1-CD27-A-P329R-E345Rの非存在または存在下でIgG1-PD1（1μg/mL）またはペムブロリズマブ（1μg/mL）で処理された、CD8 MLRアッセイにおいて測定された場合のサイトカイン濃度についての相乗作用分析を示す。対照値（非処理対照ウェル）を差し引くことにより各々の処理条件におけるIFNγの濃度を正規化し、アッセイ（IFNγ誘導）における最大値のパーセンテージとして表した。IFNγ誘導値は2つの複製物の平均を表す。組み合わせられた2つの抗体の間の相互作用を、R（v4.1.0）中のSynergyFinderパッケージ（v3.2.2）[1]を使用して分析した。相乗効果は、2つの参照モデル（相乗作用スコアリングモデル）:Highest Single Agent（HSA）およびBlissにより算出された予想される効果を上回る観察された効果の余剰分として定義した。HSAおよびBliss相乗作用分析プロットを2つの異なるド

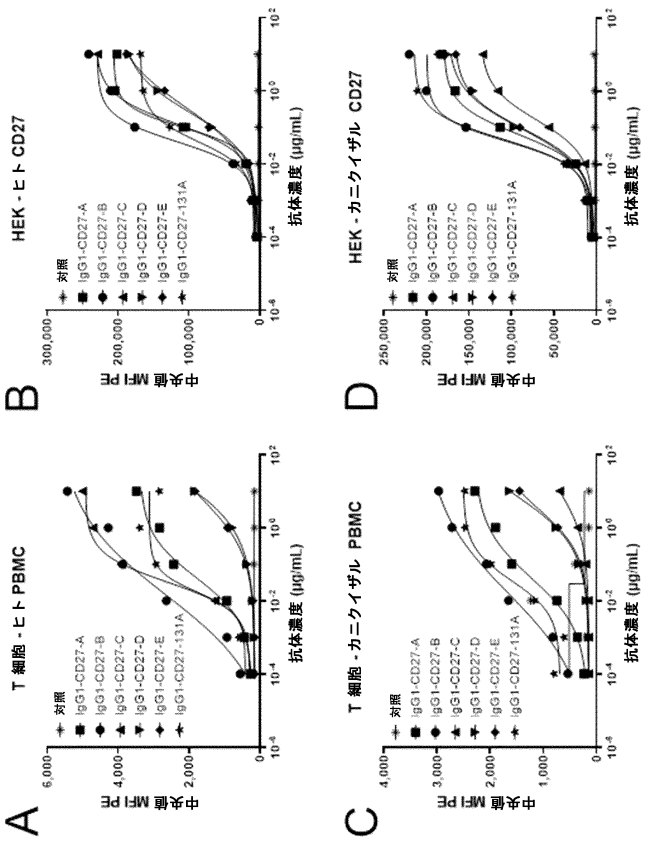
ナーペア（AおよびB）について示している。
【図５０Ａ－２】図50A-1の説明を参照のこと。
【図５０Ｂ－１】図50A-1の説明を参照のこと。
【図５０Ｂ－２】図50A-1の説明を参照のこと。
【図５１Ａ】図51は、インビトロでのCD8＋T細胞細胞傷害に対する組み合わせたIgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびPD-1/PD-L1阻害剤処理の効果を示す。MDA-MB-231_hCLDN6細胞に対するCD8＋T細胞媒介性細胞傷害活性をリアルタイム細胞分析により評価した。PD-1およびCLDN6-TCR発現CD8＋T細胞をMDA-MB-231_hCLDN6細胞と5～6日間、単剤またはIgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびPD-1/PD-L1阻害剤の組合せのいずれかとしての、IgG1-CD27-A-P329R-E345R（10μg/mL）、IgG1-PD1（0.8μg/mL）、ペムブロリズマブ（0.8μg/mL）、ニボルマブ（1.6μg/mL）、アテゾリズマブ（0.4μg/mL）、または非結合性対照抗体IgG1-b12-P329R-E345R（10μg/mL）の存在下で共培養した。2～3時間間隔で実行されたインピーダンス測定から細胞指数値を導出した。（A）評価された11～14人のドナーのうちの1人のドナーの細胞指数曲線。（B）5～6日の共培養の持続期間全体にかけての細胞指数データを使用してAUC分析を行った。各々の処理条件のAUCを、同じドナーからのIgG1-b12-P329R-E345R処理された培養物（点線）に対して正規化した。6回の個々の実験において試験された11～14人のドナーからのプールされたデータを示している。エラーバーはSDを示す（記号は各々のドナーについて二連のウェルの平均を示す）。＊、P＜0.05;＊＊、P＜0.01;＊＊＊、P＜0.001;ダン多重比較検定を伴うフリードマン検定。
【図５１Ｂ】図51Aの説明を参照のこと。
【図５２】図52は、インビトロでのCD8＋T細胞によるGzmBおよびCD107a発現に対する組み合わせたIgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびPD-1/PD-L1阻害剤処理の効果を示す。PD-1およびCLDN6-TCR発現CD8＋T細胞をMDA-MB-231_hCLDN6細胞と2日間、単剤またはIgG1-CD27-A-P329R-E345RおよびPD-1/PD-L1阻害剤の組合せのいずれかとしての、IgG1-CD27-A-P329R-E345R（10μg/mL）、IgG1-PD1（0.8μg/mL）、ペムブロリズマブ（0.8μg/mL）、ニボルマブ（1.6μg/mL）、アテゾリズマブ（0.4μg/mL）、または非結合性対照抗体IgG1-b12-P329R-E345R（10μg/mL）の存在下で共培養した。GzmBおよびCD107aの細胞内発現をフローサイトメトリーにより分析した。GzmBおよびCD107aの両方を発現するCD8＋T細胞のパーセンテージを、6回の個々の実験において試験された11～14人のドナーからのプールされたデータとして示している。点線は、IgG1-b12-P329R-E345Rで処理された共培養物中のGzmB＋CD107a＋細胞の平均を示す。エラーバーはSDを示す（記号は各々のドナーについて二連のウェルの平均を示す）。＊、P＜0.05;＊＊、P＜0.01;＊＊＊、P＜0.001;＊＊＊＊、P＜0.0001;ダン多重比較検定を伴うフリードマン検定。

【図面】

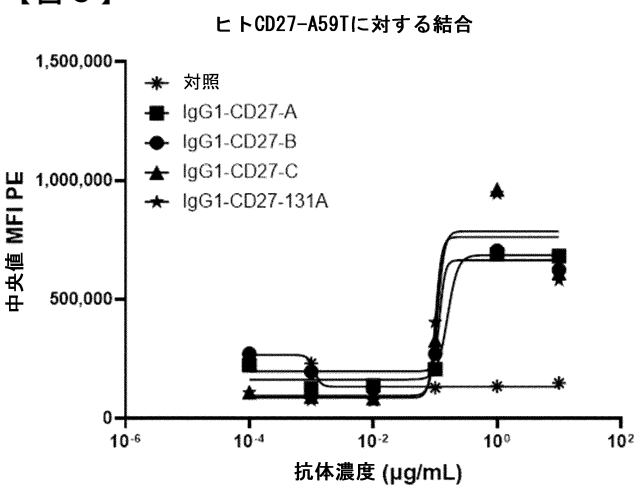
【図１】



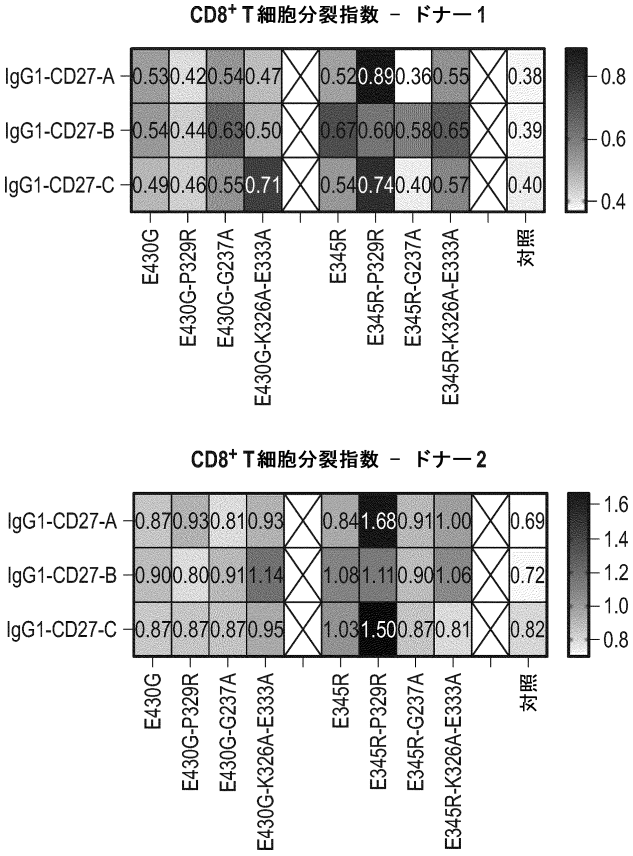
【図２】



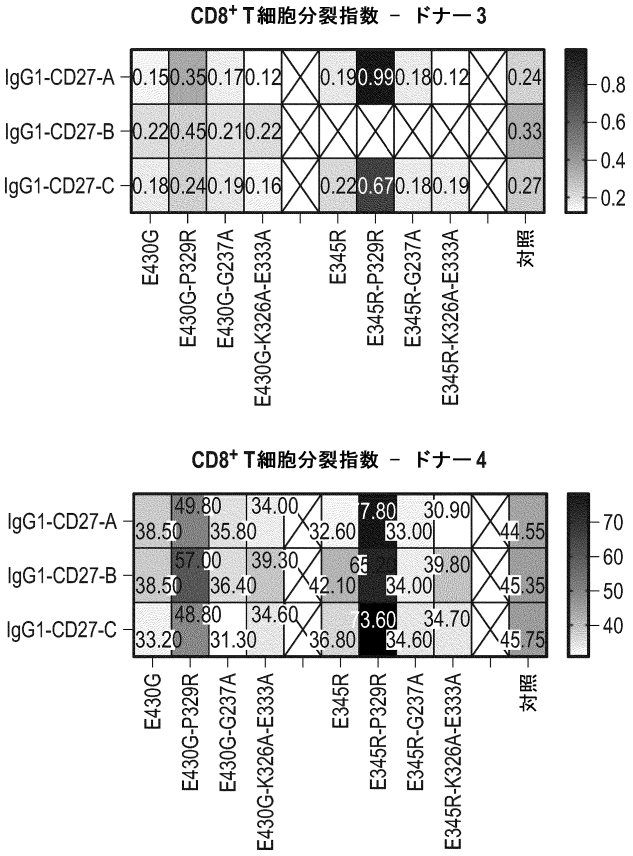
【図３】



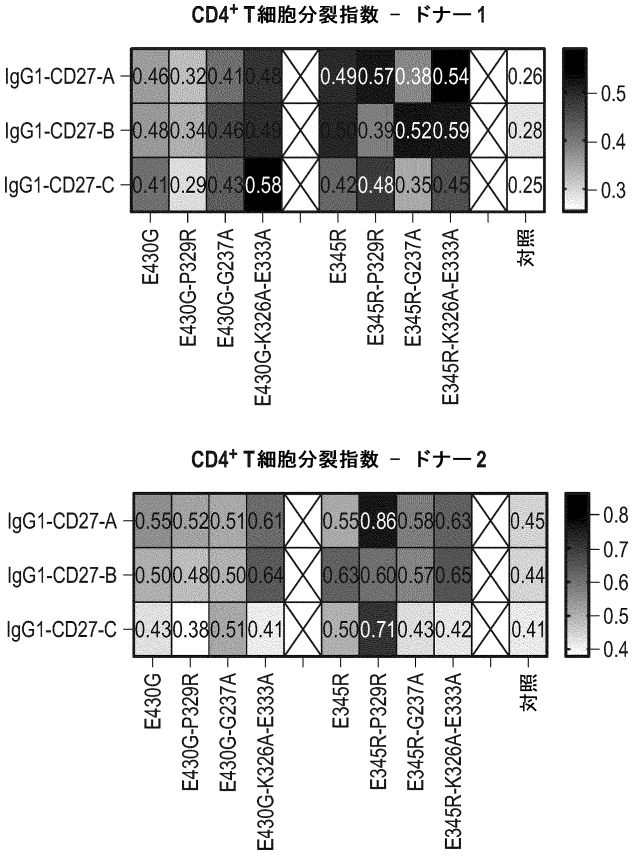
【図４Ａ－１】



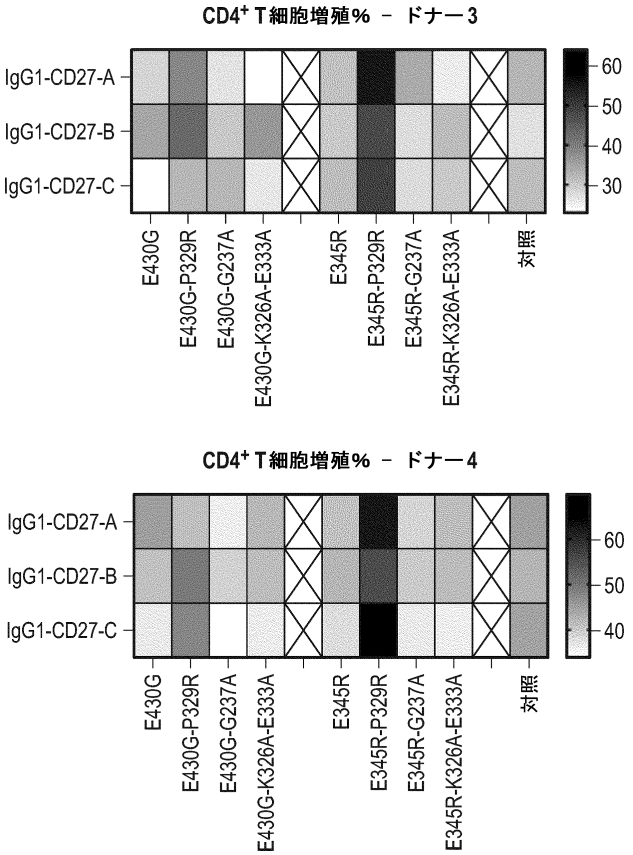
【図４Ａ－２】



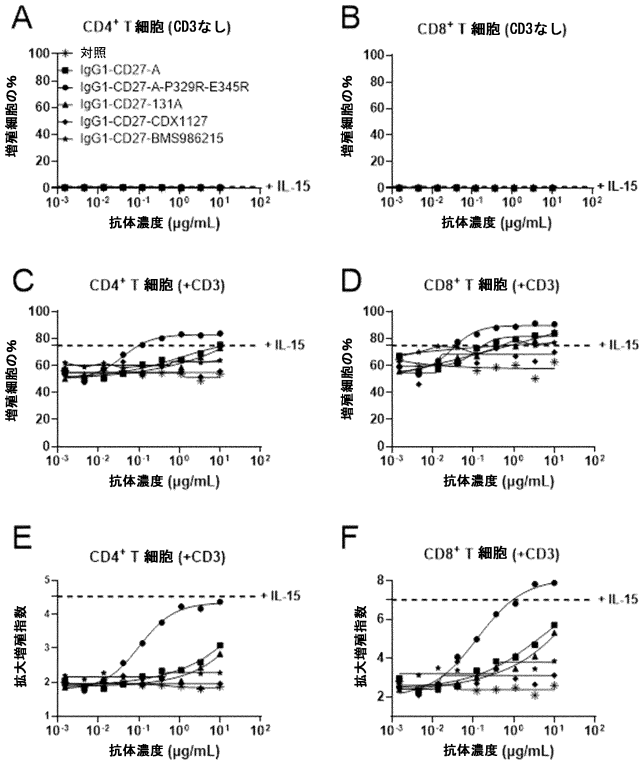
【図４Ｂ－１】



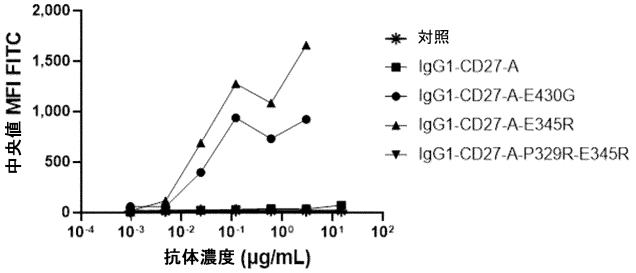
【図４Ｂ－２】



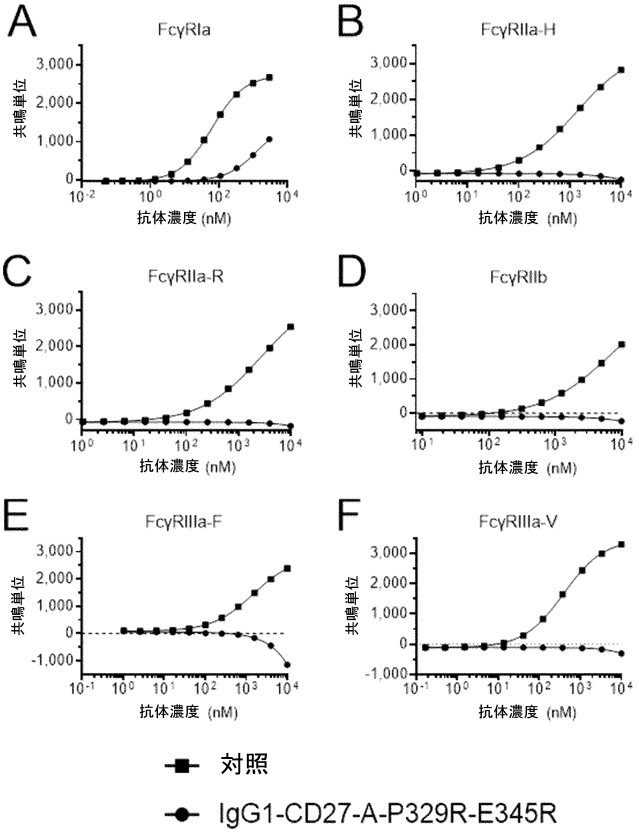
【図５】



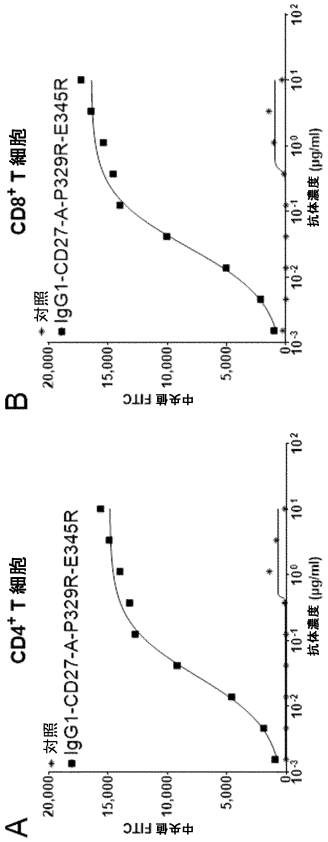
【図６】


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

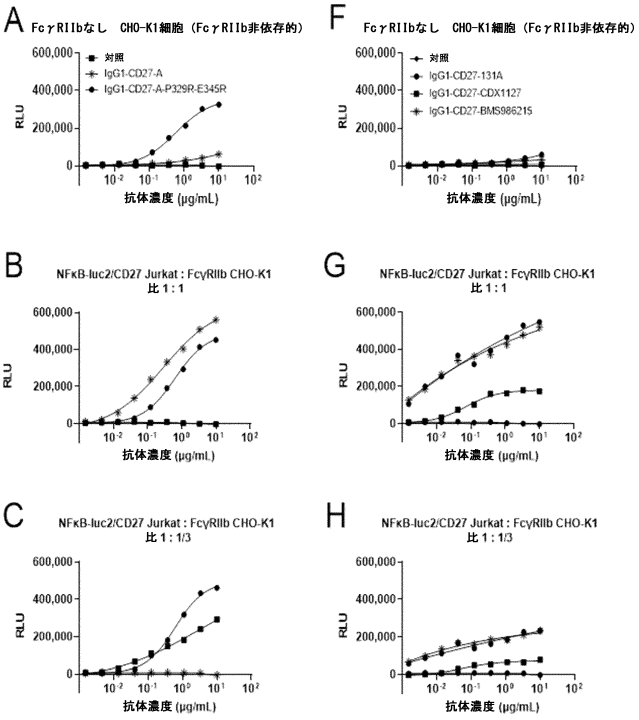
【図７】


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

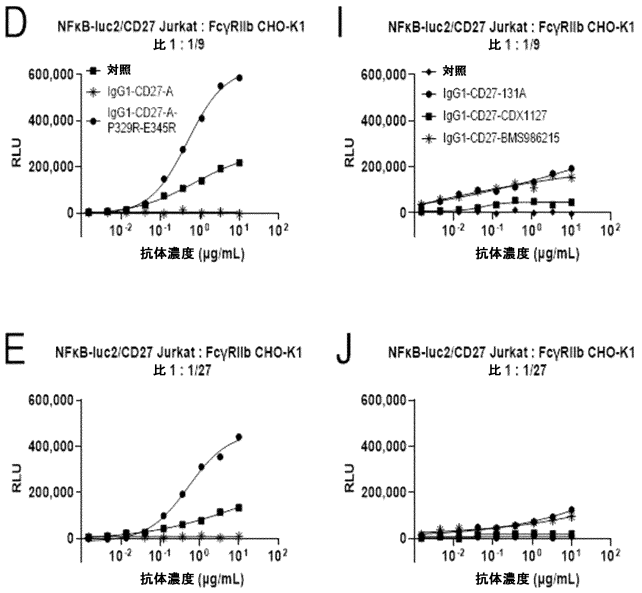
【図８】


B CD8+ T細胞
A CD4+ T細胞
対照
IgG1-CD27-A-P329R-E345R
中央値 FITC
抗体濃度 (μg/ml)

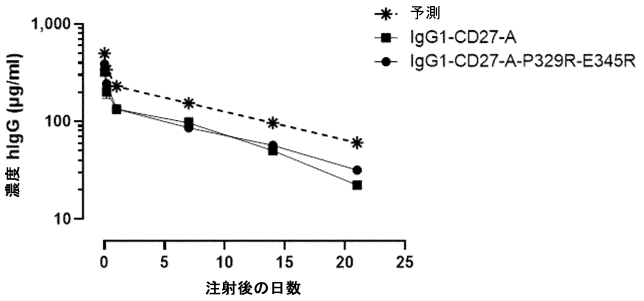
【図９－１】


A FcγRIIbなし CHO-K1細胞（FcγRIIb非依存的）
F FcγRIIbなし CHO-K1細胞（FcγRIIb非依存的）
対照
IgG1-CD27-A
IgG1-CD27-A-P329R-E345R
IgG1-CD27-131A
IgG1-CD27-CDX1127
IgG1-CD27-BMS986215
RLU
抗体濃度 (μg/mL)
B NFκB-luc2/CD27 Jurkat : FcγRIIb CHO-K1 比 1 : 1
G NFκB-luc2/CD27 Jurkat : FcγRIIb CHO-K1 比 1 : 1
C NFκB-luc2/CD27 Jurkat : FcγRIIb CHO-K1 比 1 : 1/3
H NFκB-luc2/CD27 Jurkat : FcγRIIb CHO-K1 比 1 : 1/3

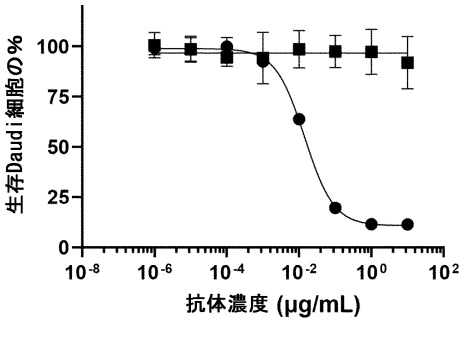
【図９－２】



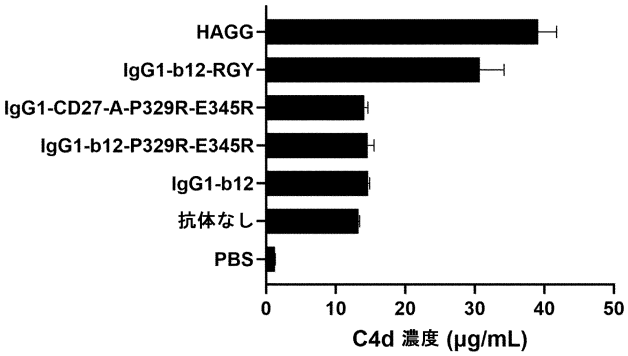
【図１０】



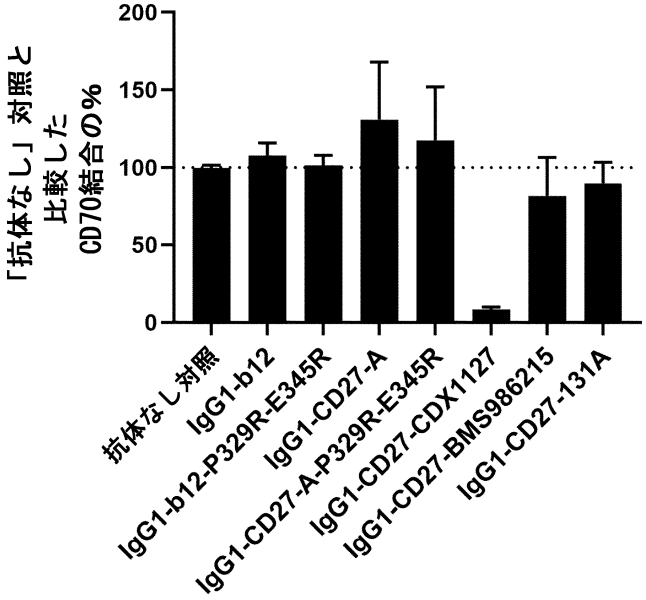
【図１１】



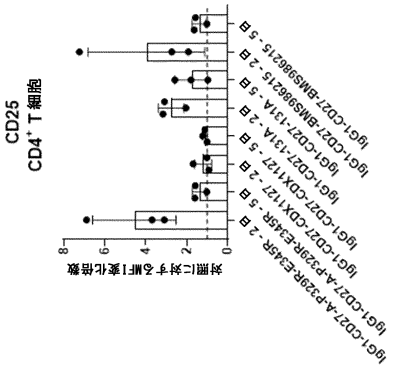
【図１２】

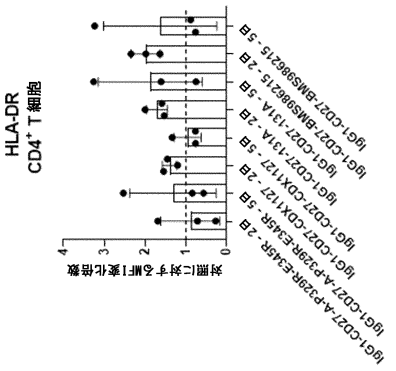


【図１３】

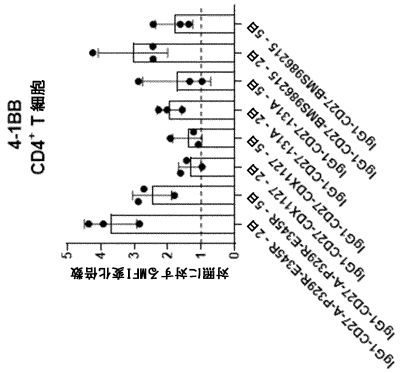


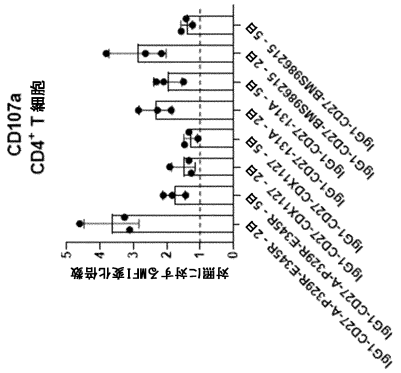
【図１４Ａ－１】



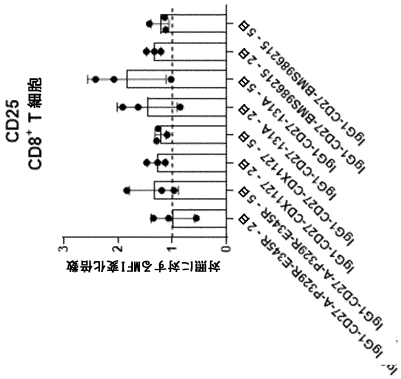


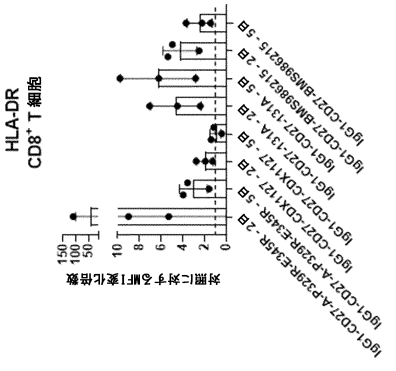
【図１４Ａ－２】



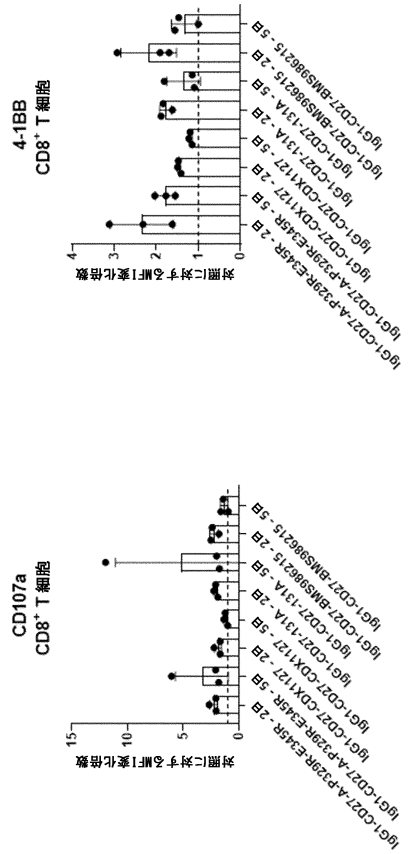


【図１４Ｂ－１】

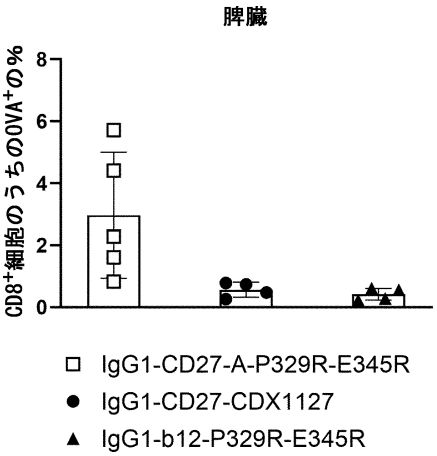




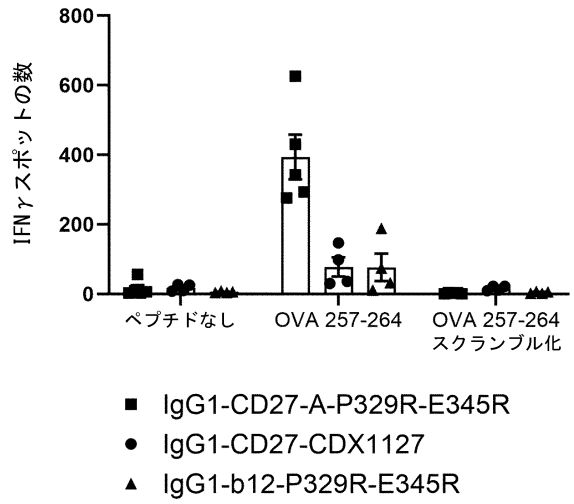
【図１４Ｂ－２】



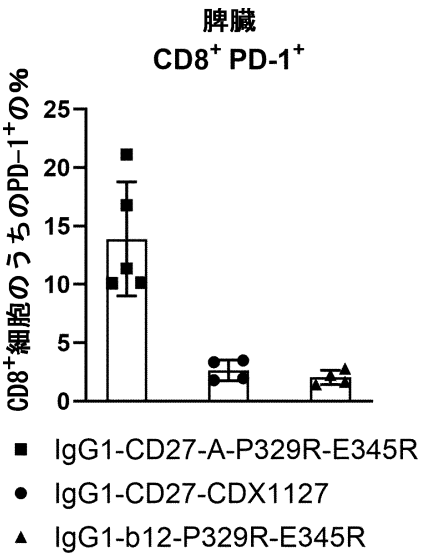
【図１５】



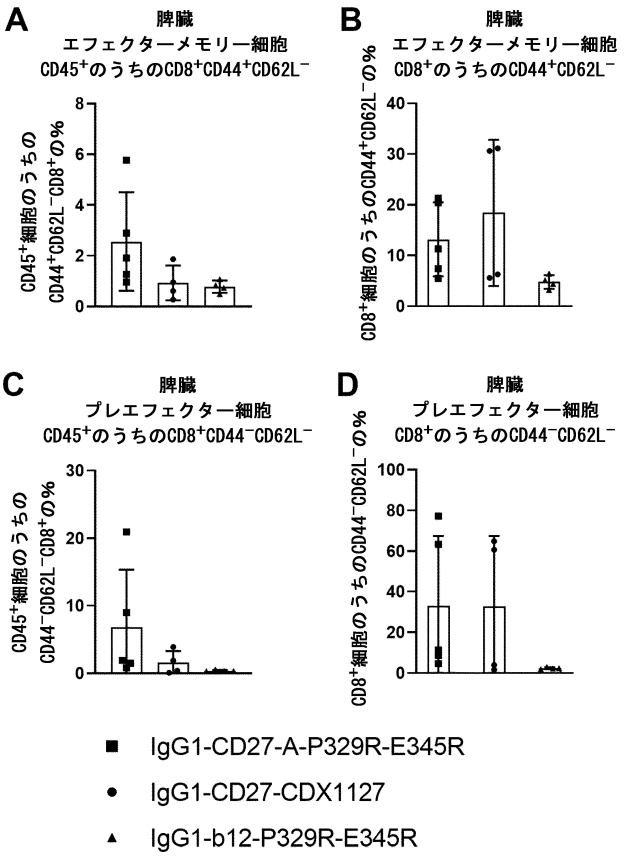
【図１６】



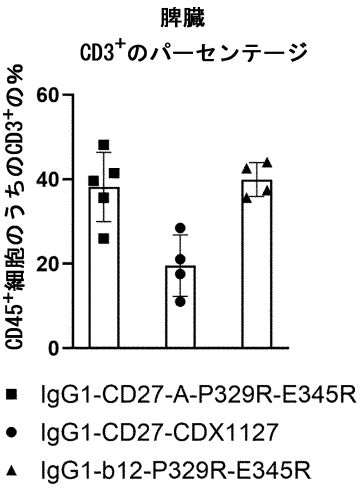
【図１７】



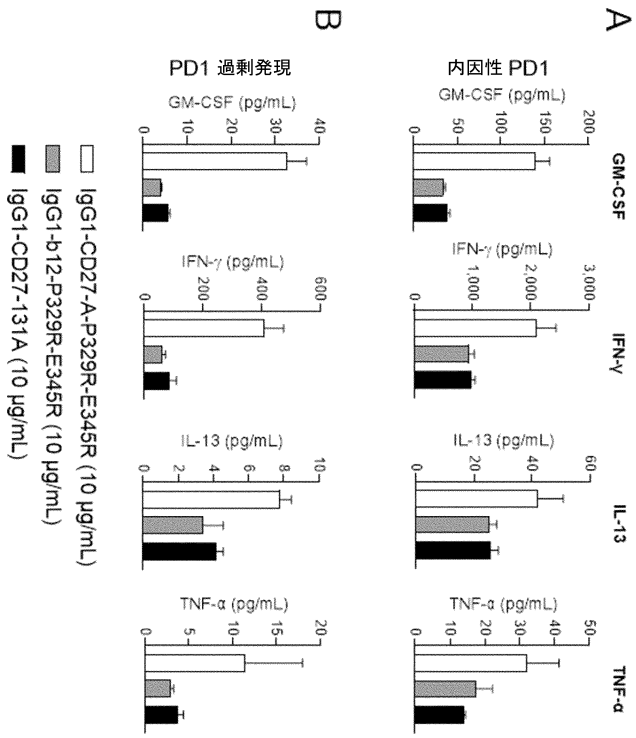
【図１８】



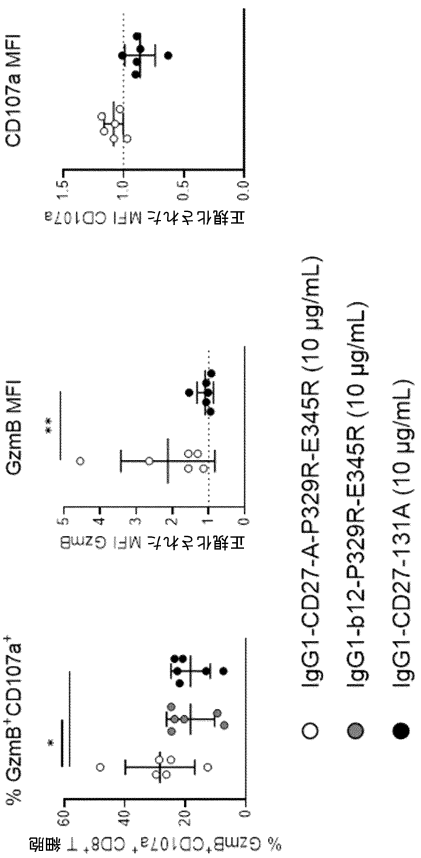
【図１９】



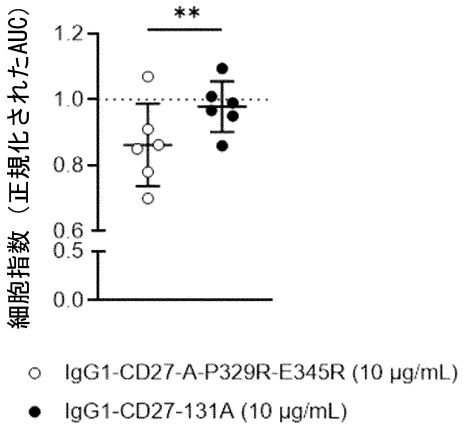
【図２０】



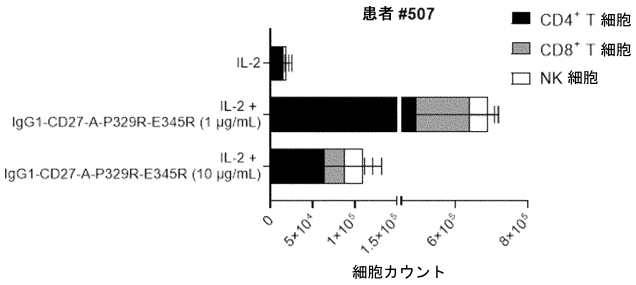
【図２１】



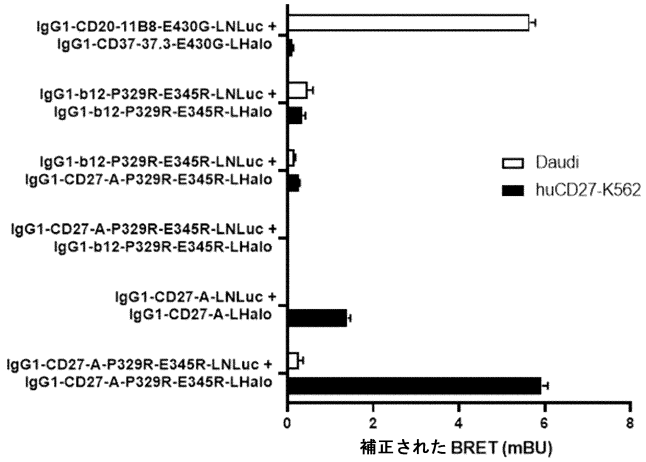
【図２２】



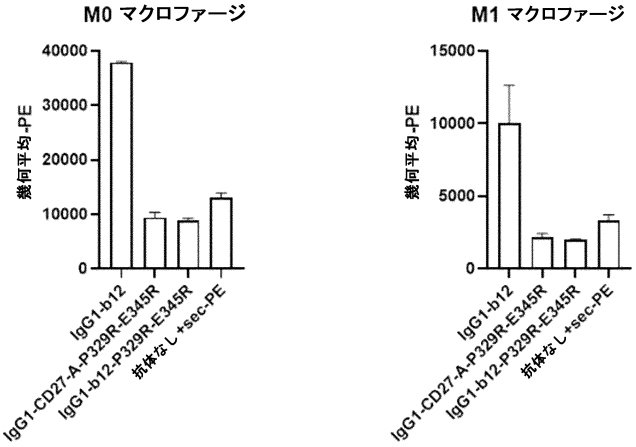
【図２３】



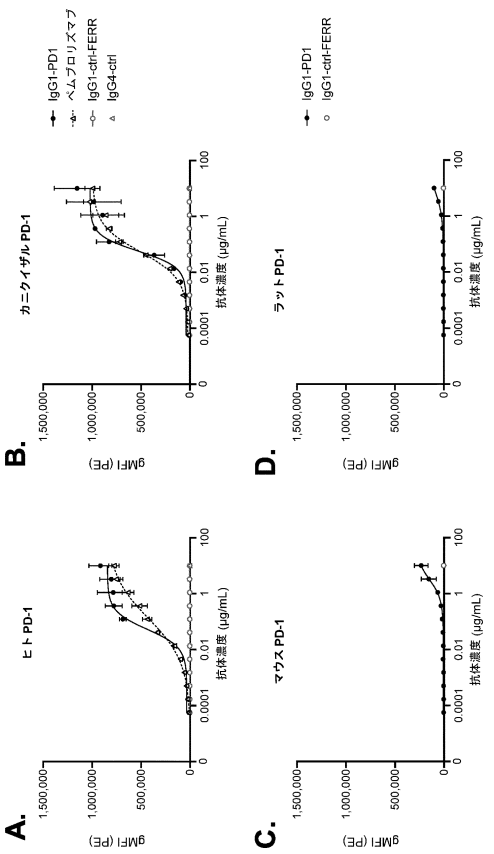
【図２４】



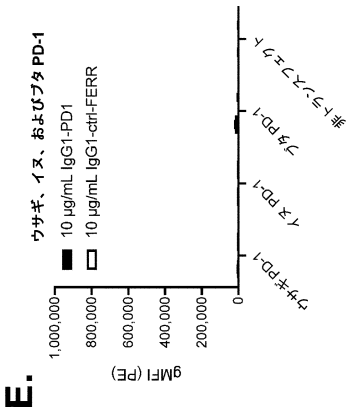
【図２５】



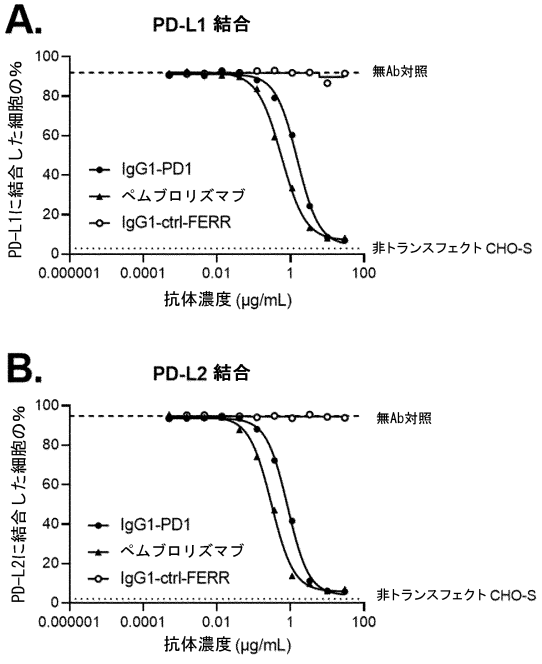
【図２６－１】



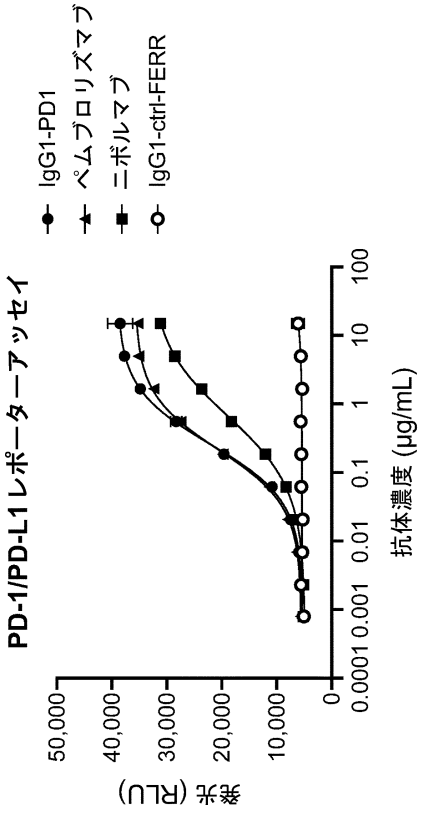
【図２６－２】



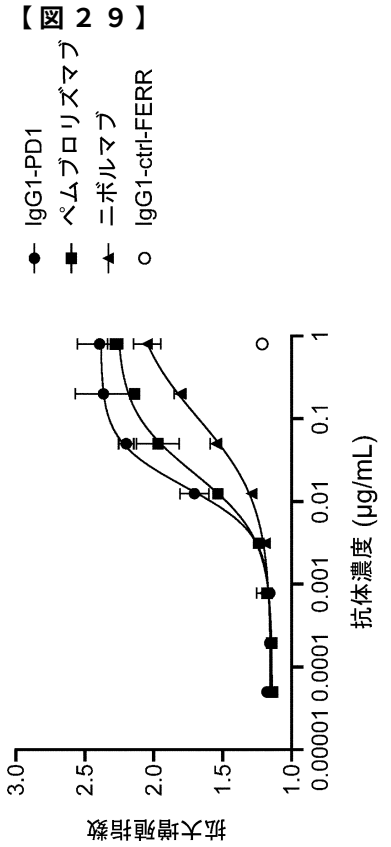
【図２７】



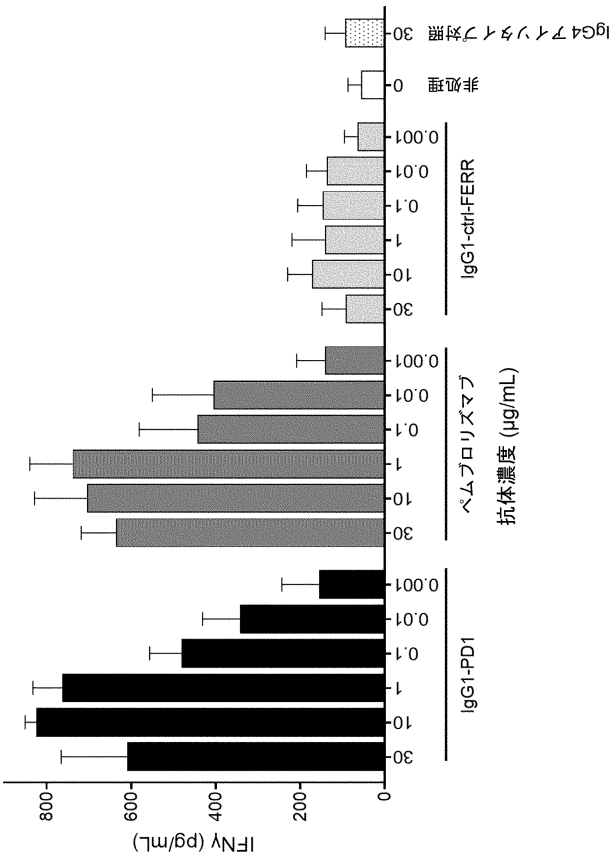
【図２８】



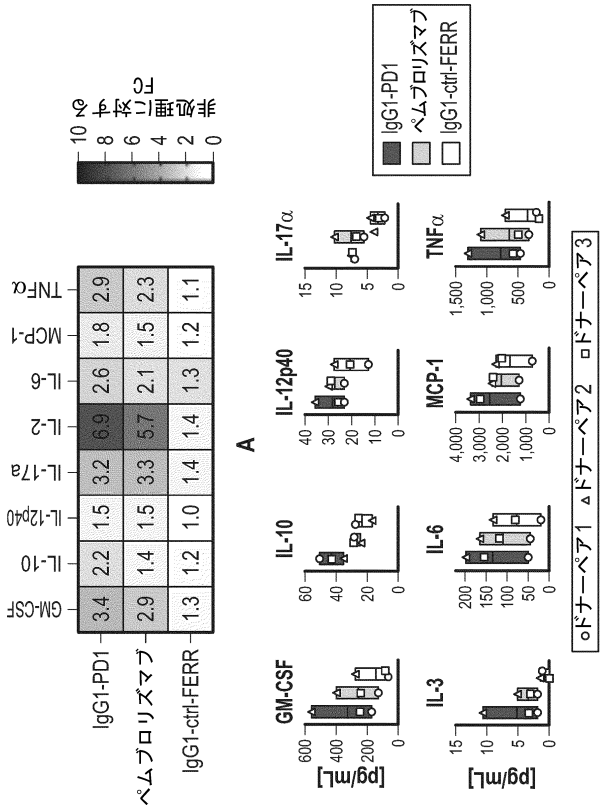
【図２９】



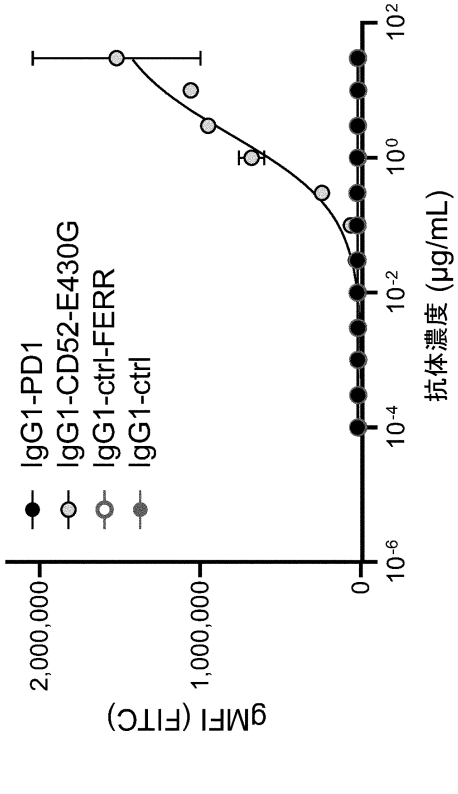
【図３０】



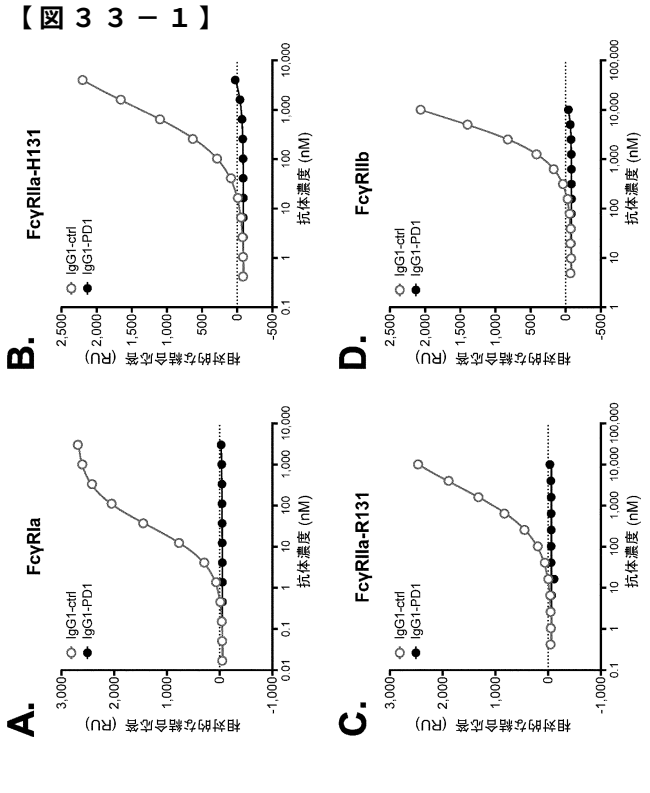
【図３１】



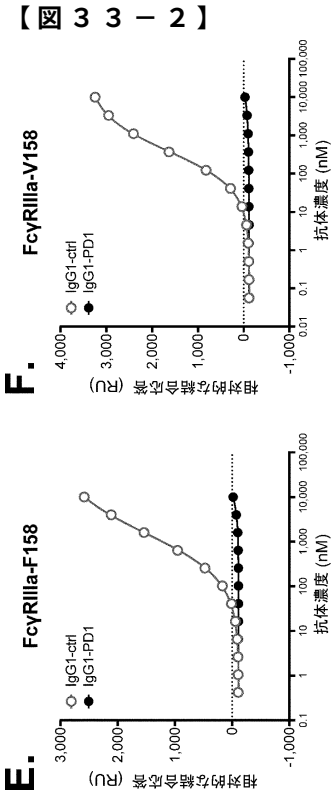
【図３２】



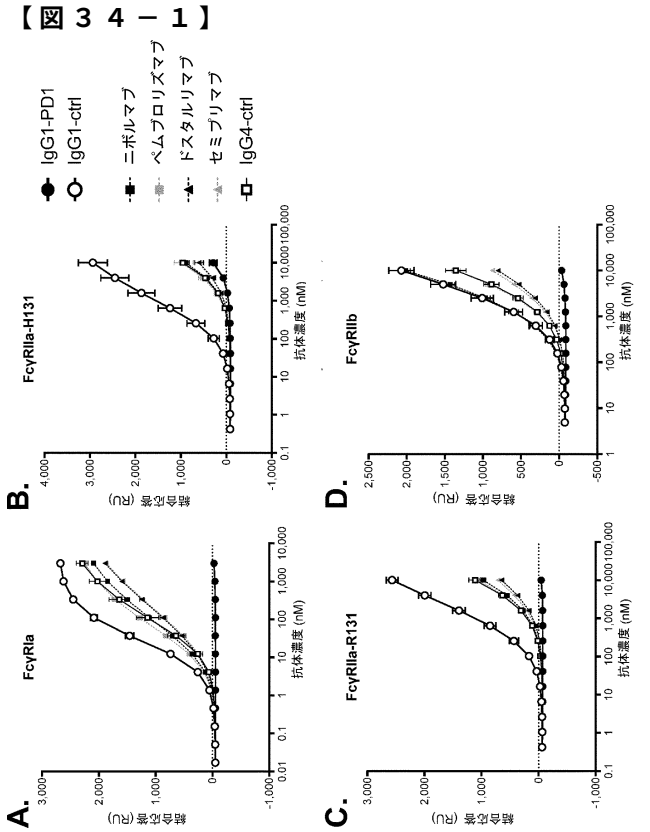
【図３３－１】



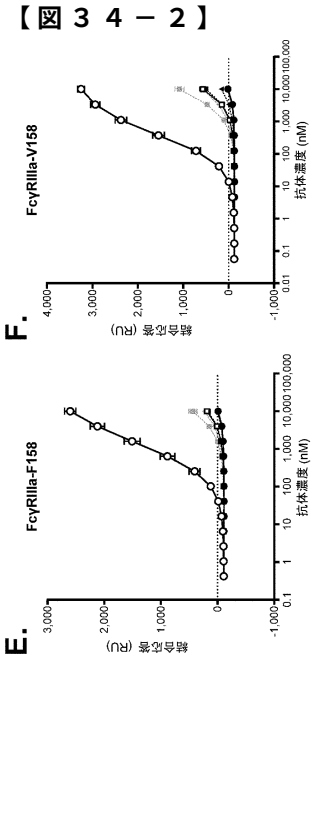
【図３３－２】



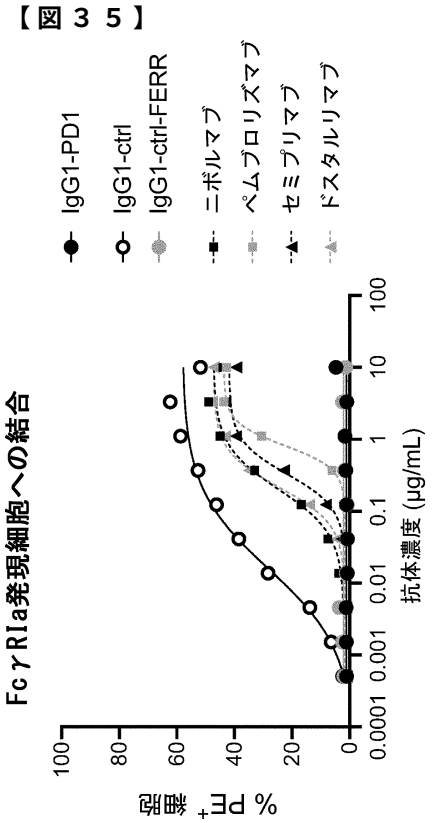
【図３４－１】



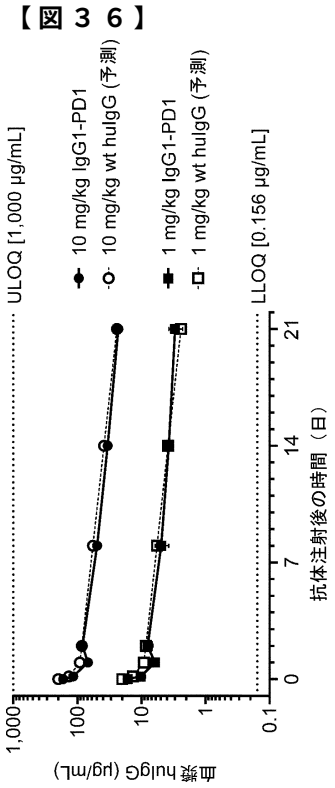
【図３４－２】



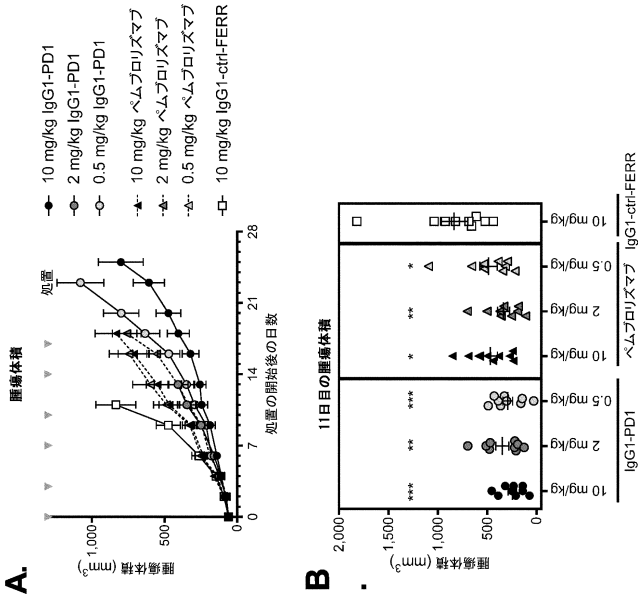
【図３５】



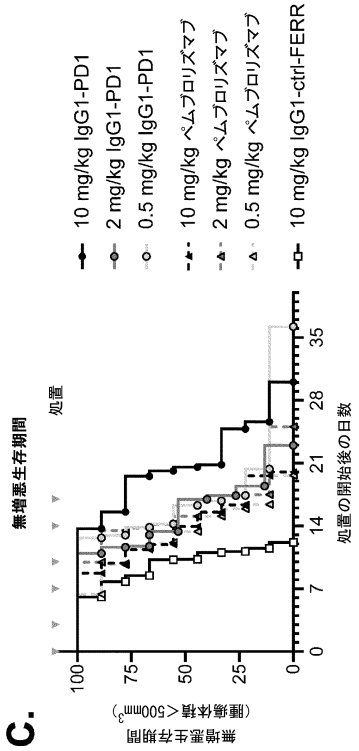
【図３６】



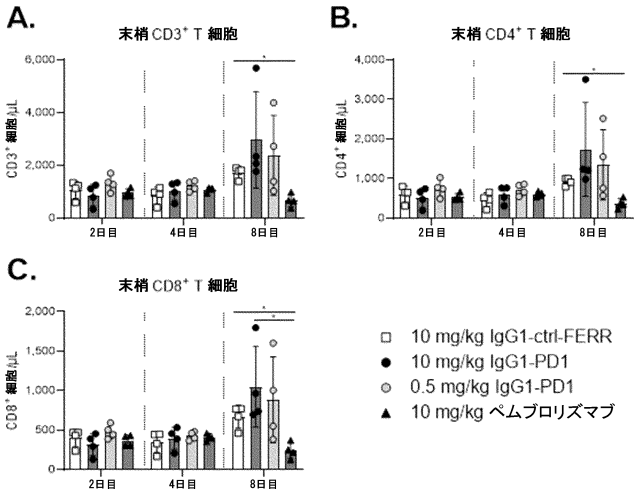
【図３７－１】



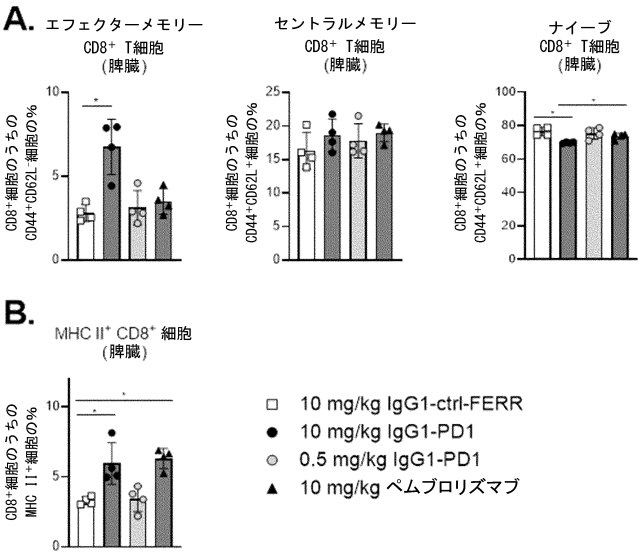
【図３７－２】



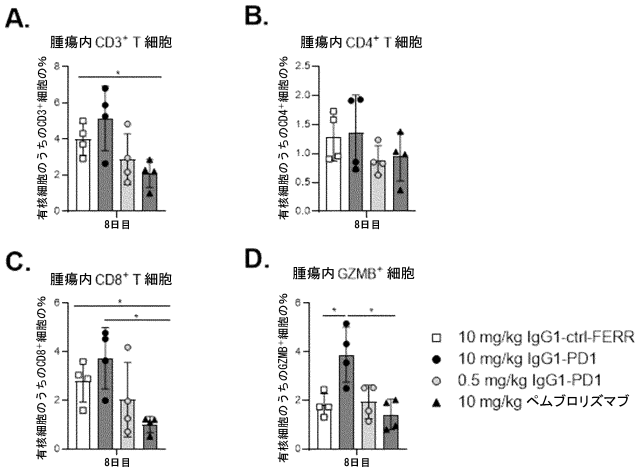
【図３８】



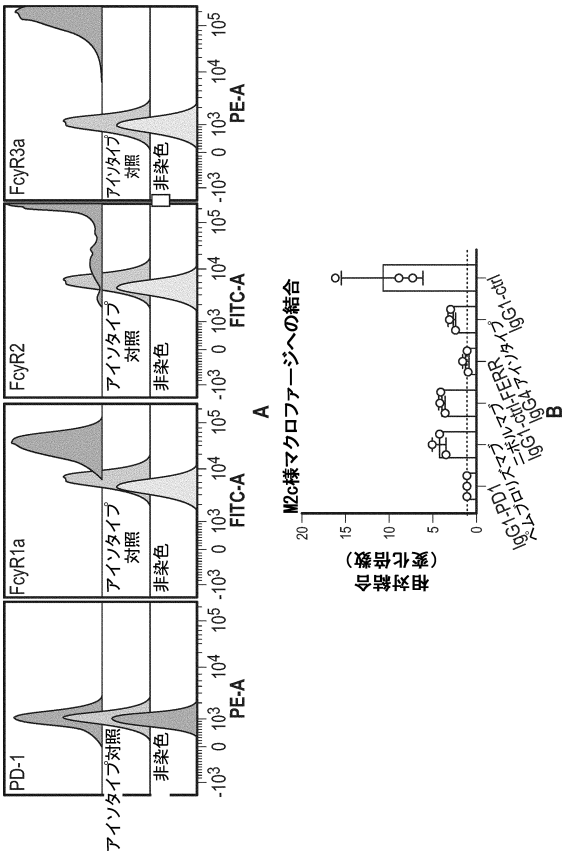
【図３９】



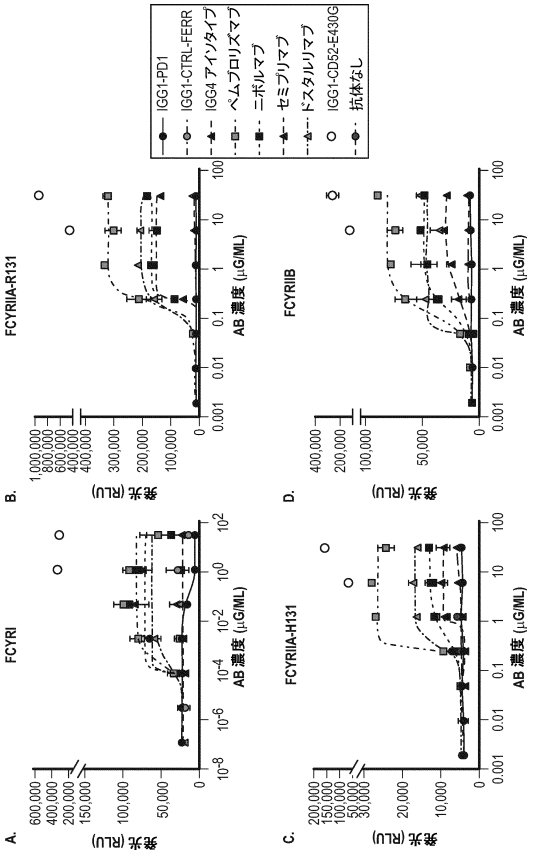
【図４０】



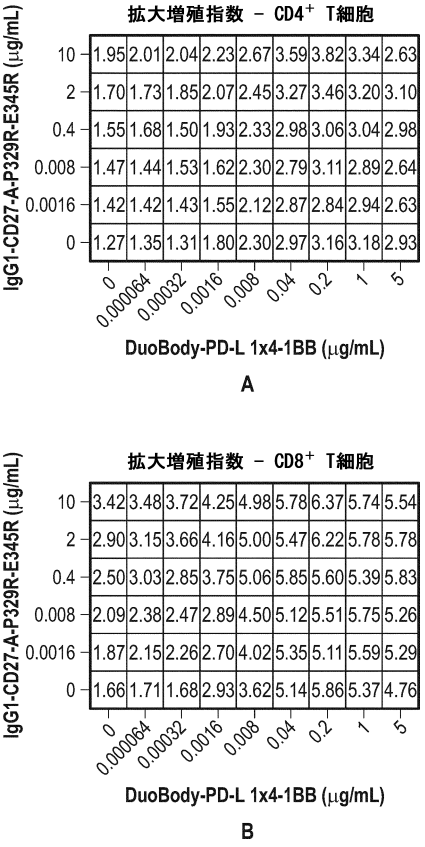
【図４１】



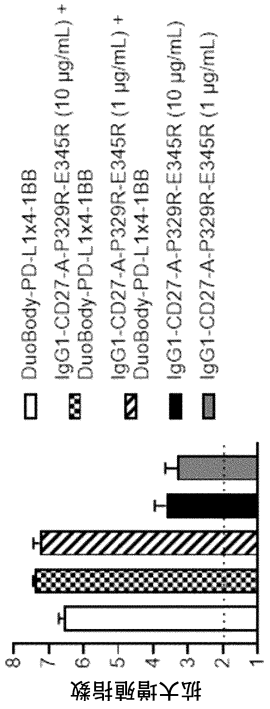
【図４２】



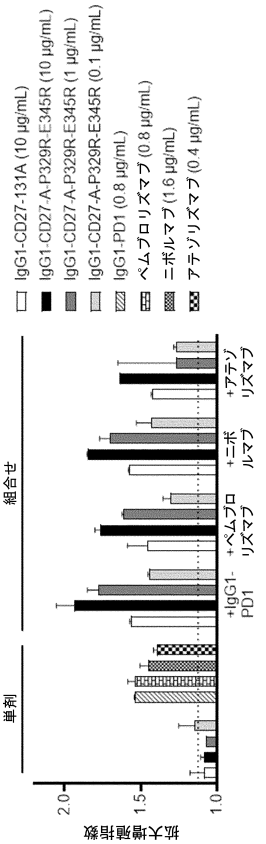
【図４３】



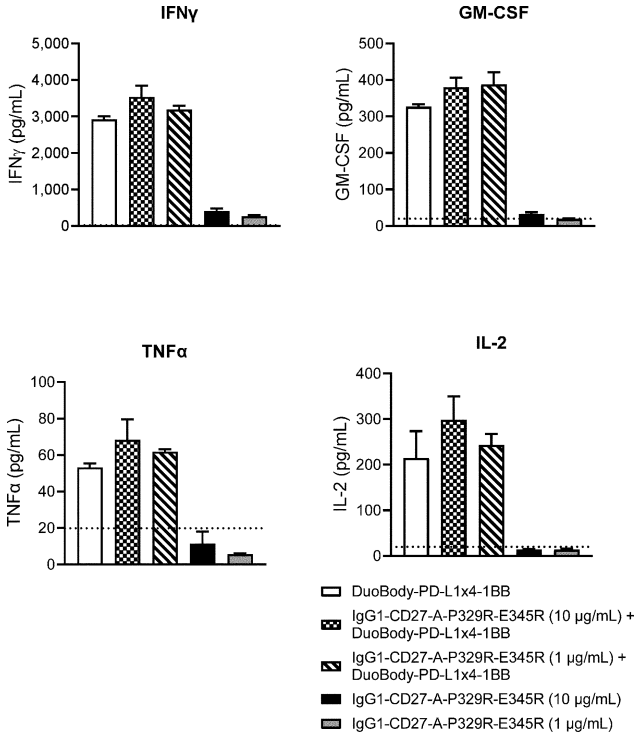
【図４４Ａ】



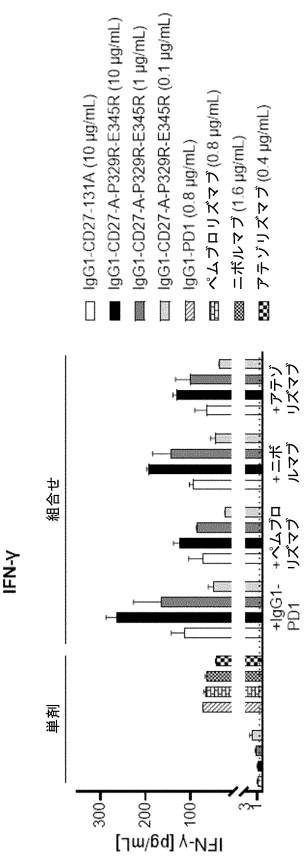
【図４４Ｂ】



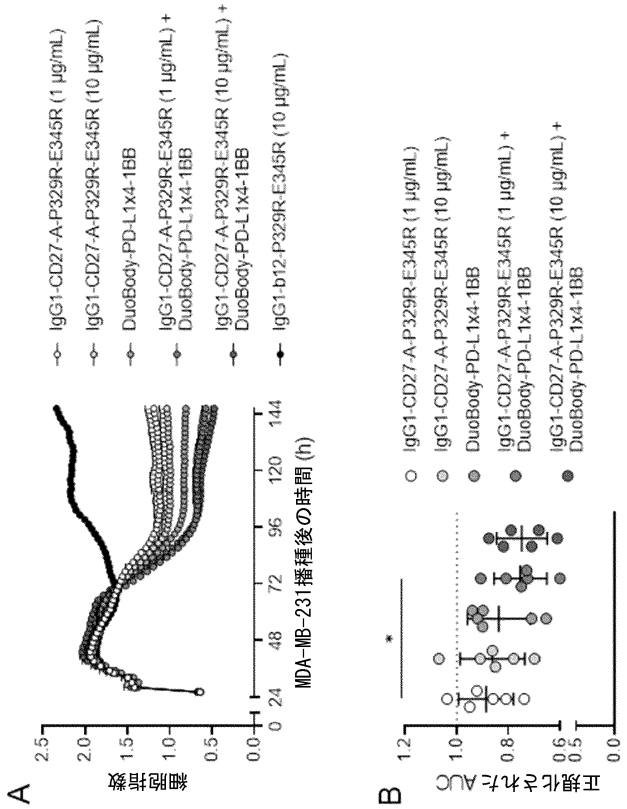
【図４５Ａ】



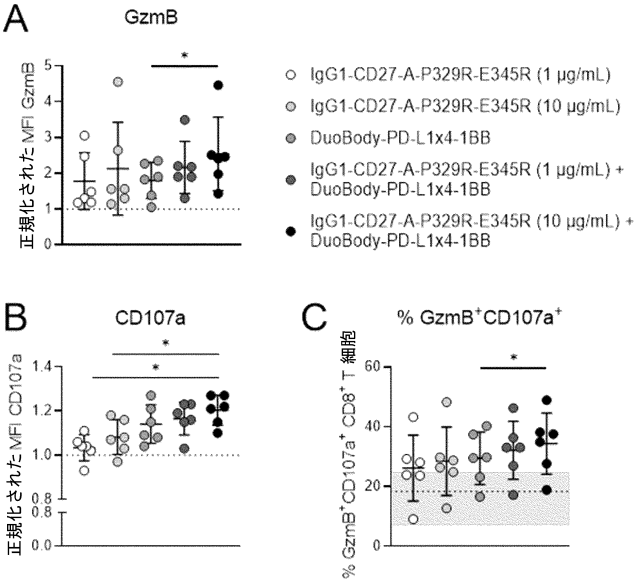
【図４５Ｂ】



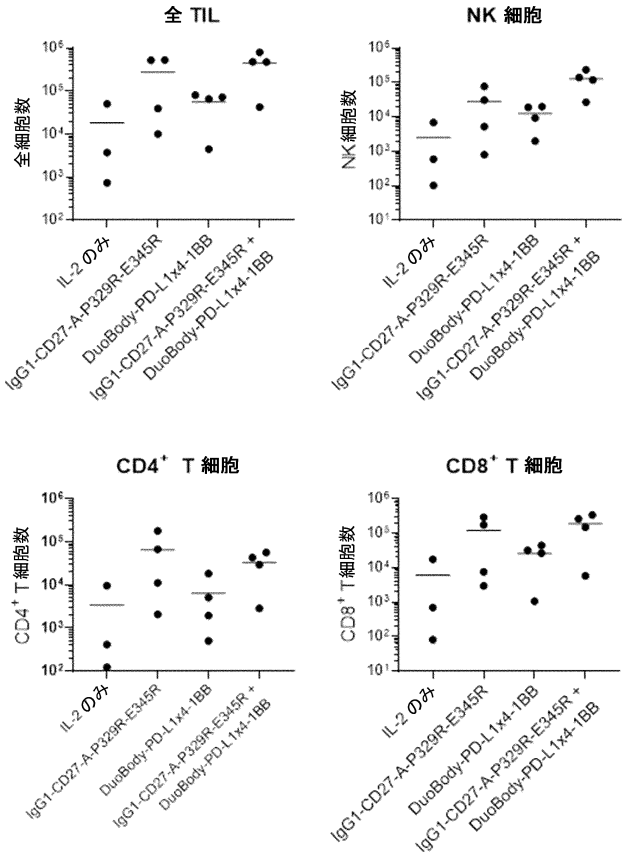
【図４６】



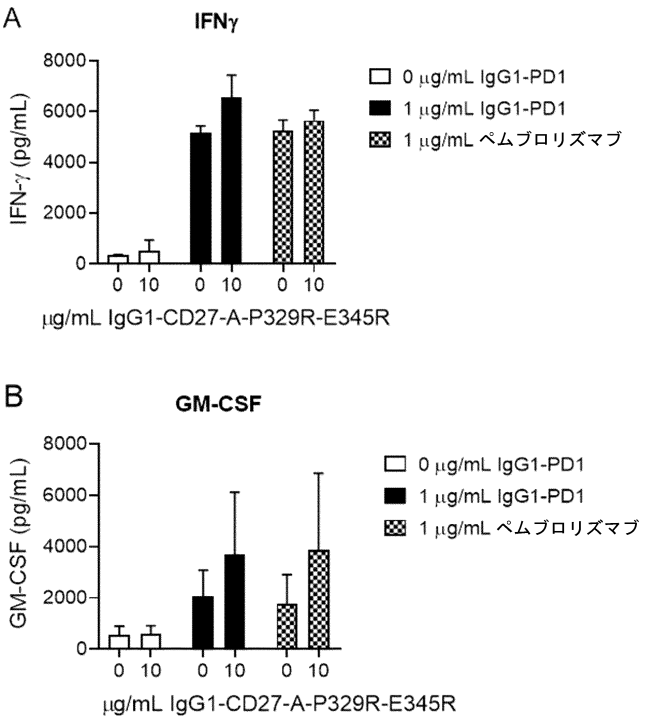
【図４７】



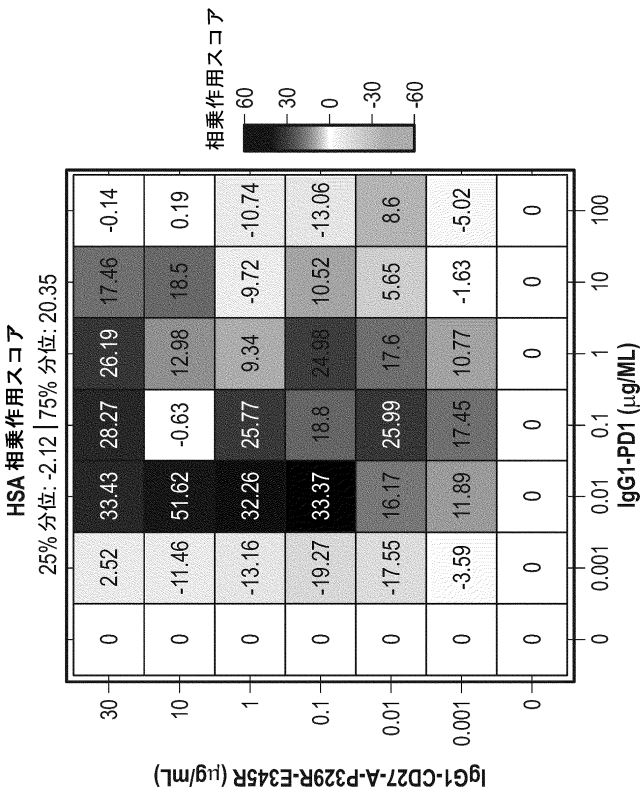
【図４８】



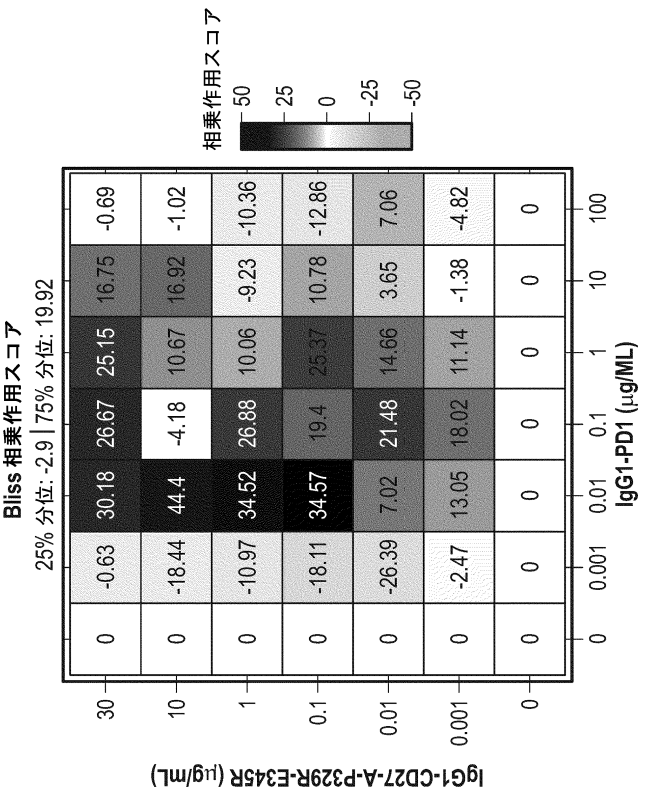
【図４９】



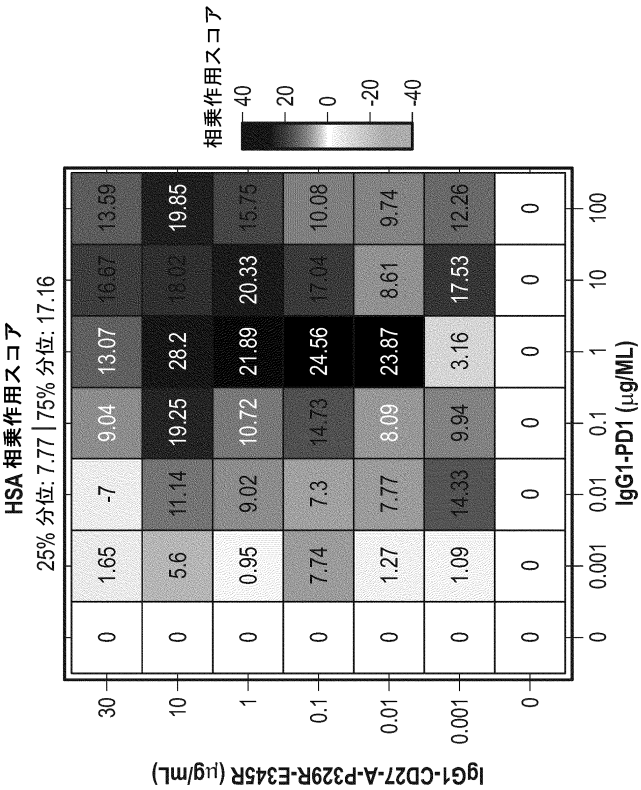
【図５０Ａ－１】



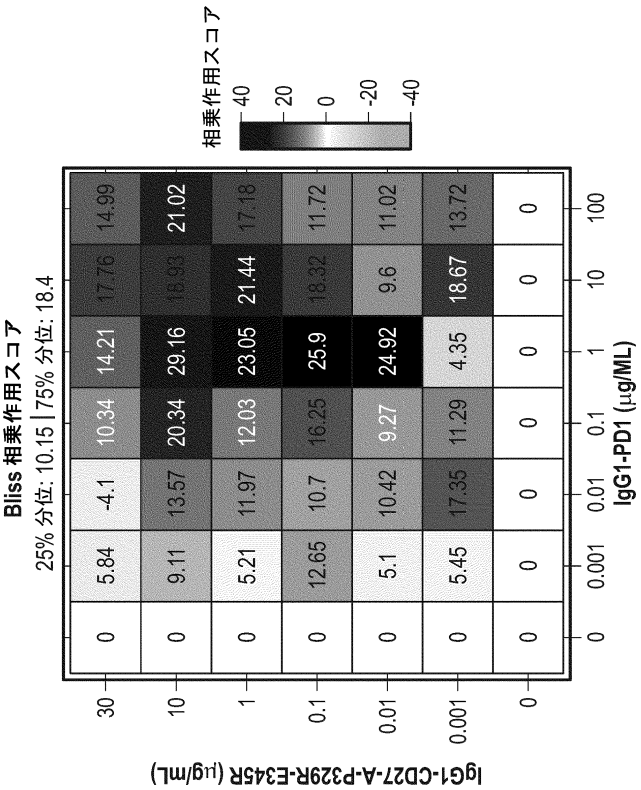
【図５０Ａ－２】



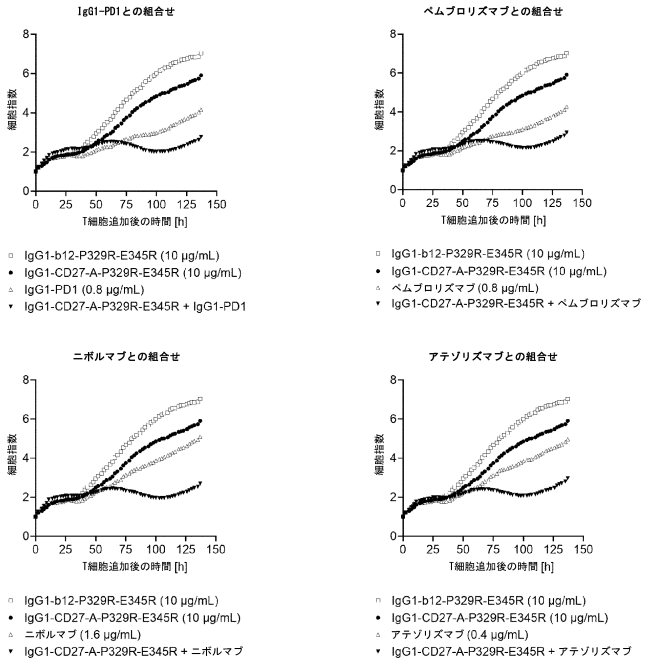
【図５０Ｂ－１】



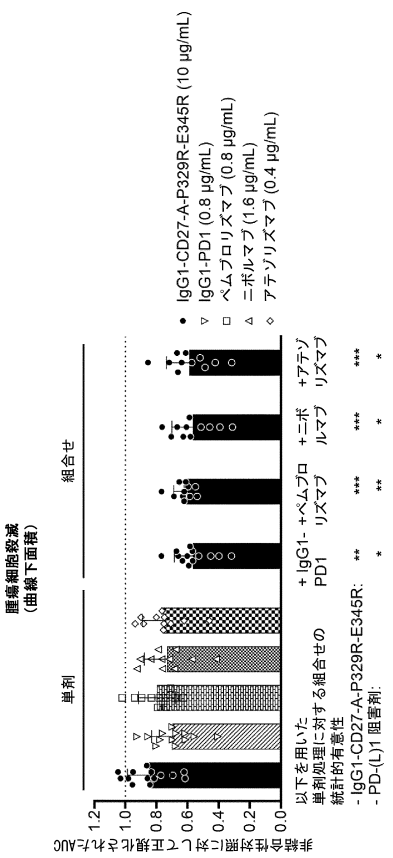
【図５０Ｂ－２】



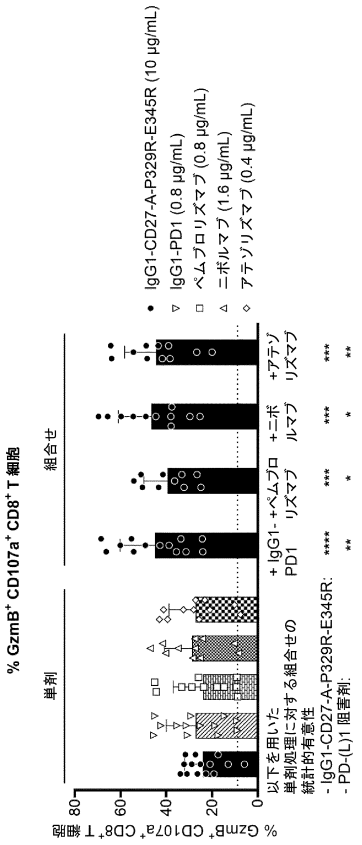
【図５１Ａ】



【図５１Ｂ】



【図５２】



【配列表】

<u>2025516631000001.xml</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2023/062793

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

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

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

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

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

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

3. Additional comments:

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/062793

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28 A61K39/395
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SARAH L. BUCHAN ET AL: CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 24, no. 10, 7 March 2018 (2018-03-07) , pages 2383-2394, XP055612508, US ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3057	1,7-16, 22, 30-34, 37-42, 49-54, 70-74, 83, 119-153
Y	abstract page 2385, right-hand column, paragraph 4 - page 2392, left-hand column, paragraph 2	2-6, 17-21, 23-29, 35,36, 43-48, 55-69, 75-82, 84-118

-/--

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

* Special categories of cited documents :

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
28 July 2023	09/08/2023

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/062793

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2021/156326 A1 (GENMAB AS [DK]; BIONTECH SE [DE]) 12 August 2021 (2021-08-12) cited in the application page 2, line 22 - page 3, line 2; sequences 1, 5, 8, 12 page 3, lines 14-20; examples 4,6; sequences 1,5,8,12	91-94, 96,112, 117
Y	LIU RENA ET AL: "Fc-Engineering for Modulated Effector Functions-Improving Antibodies for Cancer Treatment", ANTIBODIES, vol. 9, no. 4, 17 December 2020 (2020-12-17), page 64, XP055918764, CH ISSN: 2073-4468, DOI: 10.3390/antib9040064 abstract paragraphs [01.1], [01.2], [002.], [02.3], [05.1]; tables 1,2	17-21, 23-29, 55-69, 75-82, 97-103
X	WO 2019/195452 A1 (BRISTOL MYERS SQUIBB CO [US]) 10 October 2019 (2019-10-10) cited in the application	1,7-16, 22, 30-34, 37-42, 49-54, 70-74, 83, 119-153
Y	page 4, line 24 - page 5, line 3 page 9, lines 7-9 page 10, lines 2-19 page 11, line 13 - page 13, line 2 page 43, line 7 - page 49, line 30	2-6, 17-21, 23-29, 35,36, 43-48, 55-69, 75-82, 84-118
X	WO 2018/058022 A1 (MERCK SHARP & DOHME [US]; MERCK SHARP & DOHME [NL] ET AL.) 29 March 2018 (2018-03-29) cited in the application	1,7-16, 22, 30-34, 37-42, 49-54, 70-74, 83, 119-153
Y	page 70, lines 7-34	2-6, 17-21, 23-29, 35,36, 43-48, 55-69, 75-82, 84-118

-/--

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/062793

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/004367 A1 (ORGANON NV [NL]; STICHTING NL KANKER INST [NL] ET AL.) 12 January 2012 (2012-01-12) cited in the application	1,7-16, 22, 30-34, 37-42, 49-54, 70-74, 83, 119-153
Y	page 1, line 3 - page 3, line 7 page 12, line 2 - page 15, line 16	2-6, 17-21, 23-29, 35,36, 43-48, 55-69, 75-82, 84-118
X	WO 2019/204462 A2 (CELLDEX THERAPEUTICS INC [US]) 24 October 2019 (2019-10-24)	1,7-16, 22, 30-34, 37-42, 49-54, 70-74, 83, 119-153
Y	page 2, line 17 - page 10, line 2 page 32, line 31 - page 35, line 6 page 35, line 8 - page 36, line 5; examples 15,16	84-86, 89-91, 95-114
Y	WO 2022/089377 A1 (TAIZHOU EOC PHARMA CO LTD [CN]; CEDARS SINAI MEDICAL CENTER [US]) 5 May 2022 (2022-05-05) page 1, paragraph 3 - page 6, paragraph 2; sequences 8,12	43-45
Y,P	WO 2023/031473 A1 (GENMAB BV [NL]) 9 March 2023 (2023-03-09) page 4, line 10 - page 6, line 14; sequences 4,8	2-6,35, 36, 46-48, 87,88, 114-118

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2023/062793

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2021156326 A1	12-08-2021	AU 2021215332 A1	18-08-2022
		BR 112022015151 A2	20-12-2022
		CA 3169963 A1	12-08-2021
		CL 2022002093 A1	10-02-2023
		CN 115135344 A	30-09-2022
		EP 4100059 A1	14-12-2022
		IL 294967 A	01-09-2022
		JP 2023513896 A	04-04-2023
		KR 20220137054 A	11-10-2022
		US 2023087164 A1	23-03-2023
		WO 2021156326 A1	12-08-2021
WO 2019195452 A1	10-10-2019	CN 112292399 A	29-01-2021
		EP 3774903 A1	17-02-2021
		JP 2021520201 A	19-08-2021
		KR 20200140315 A	15-12-2020
		US 2021155703 A1	27-05-2021
		WO 2019195452 A1	10-10-2019
WO 2018058022 A1	29-03-2018	AR 109715 A1	16-01-2019
		AU 2017331380 A1	28-03-2019
		AU 2021200984 A1	11-03-2021
		BR 112019005726 A2	23-06-2020
		CA 3036573 A1	29-03-2018
		CL 2019000779 A1	19-07-2019
		CL 2021000088 A1	02-07-2021
		CN 109890846 A	14-06-2019
		CO 2019002671 A2	29-03-2019
		CR 20190140 A	17-05-2019
		DO P2019000077 A	30-06-2019
		EC SP19020740 A	30-04-2019
		EP 3515941 A1	31-07-2019
		GE P20217263 B	10-06-2021
		IL 265434 A	30-05-2019
		JP 6727425 B2	22-07-2020
		JP 7002588 B2	20-01-2022
		JP 2019535235 A	12-12-2019
		JP 2020114241 A	30-07-2020
		JP 2022046684 A	23-03-2022
		KR 20190053949 A	20-05-2019
		KR 20210040465 A	13-04-2021
		MA 46272 A	31-07-2019
		NI 201900024 A	27-05-2019
		PE 20190737 A1	23-05-2019
		PH 12019500628 A1	05-08-2019
		TN 2019000075 A1	15-07-2020
		TW 201815824 A	01-05-2018
		US 2018086841 A1	29-03-2018
		US 2019300618 A1	03-10-2019
		US 2020131272 A1	30-04-2020
		WO 2018058022 A1	29-03-2018
WO 2012004367 A1	12-01-2012	AU 2011275749 A1	10-01-2013
		CA 2804550 A1	12-01-2012
		EP 2591001 A1	15-05-2013
		JP 6023706 B2	09-11-2016
		JP 2013532978 A	22-08-2013
		US 2013183316 A1	18-07-2013

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2023/062793

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2014112942 A1	24-04-2014
		US 2017267771 A1	21-09-2017
		WO 2012004367 A1	12-01-2012
WO 2019204462 A2	24-10-2019	AU 2019256383 A1	26-11-2020
		BR 112020021271 A2	26-01-2021
		CA 3097369 A1	24-10-2019
		CN 112292185 A	29-01-2021
		EP 3781265 A2	24-02-2021
		IL 277968 A	30-11-2020
		JP 2021521793 A	30-08-2021
		KR 20210011919 A	02-02-2021
		SG 11202010011R A	27-11-2020
		US 2020109207 A1	09-04-2020
		US 2021198374 A1	01-07-2021
		US 2022025063 A1	27-01-2022
		US 2022324990 A1	13-10-2022
		WO 2019204462 A2	24-10-2019
WO 2022089377 A1	05-05-2022	NONE	
WO 2023031473 A1	09-03-2023	US 2023109496 A1	06-04-2023
		US 2023212301 A1	06-07-2023
		WO 2023031473 A1	09-03-2023

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

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
A61P	*43/00*	*(2006.01)*	A61P	35/00		
A61P	*11/00*	*(2006.01)*	A61P	43/00	121	
A61P	*35/04*	*(2006.01)*	A61K	39/395	U	
			A61P	11/00		
			A61P	35/04		
			A61P	43/00	111	

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

弁理士　刑部 俊
(74)代理人　100142929
弁理士　井上 隆一
(74)代理人　100148699
弁理士　佐藤 利光
(74)代理人　100188433
弁理士　梅村 幸輔
(74)代理人　100128048
弁理士　新見 浩一
(74)代理人　100129506
弁理士　小林 智彦
(74)代理人　100114340
弁理士　大関 雅人
(74)代理人　100214396
弁理士　塩田 真紀
(74)代理人　100121072
弁理士　川本 和弥
(74)代理人　100221741
弁理士　酒井 直子
(74)代理人　100114926
弁理士　枝松 義恵
(72)発明者　ブレイ エステル シー． ダブリュ．
オランダ王国 ユトレヒト ３５８４ シーティー ウプサララーン １５ ジェンマブ ビー．ブイ．内
(72)発明者　サヒン ウグル
ドイツ連邦共和国 ５５１１６ マインツ アン デア ゴルトグルーベ １２ ビオンテック エスエー内
(72)発明者　アルティンタシュ イシル
オランダ王国 ユトレヒト ３５８４ シーティー ウプサララーン １５ ジェンマブ ビー．ブイ．内
(72)発明者　ガリード カストロ パトリシア
オランダ王国 ユトレヒト ３５８４ シーティー ウプサララーン １５ ジェンマブ ビー．ブイ．内
(72)発明者　ブルーム ジョーダン
オランダ王国 ユトレヒト ３５８４ シーティー ウプサララーン １５ ジェンマブ ビー．ブイ．内
(72)発明者　ヴォイトゥシュキェヴィッチ アナ
オランダ王国 ユトレヒト ３５８４ シーティー ウプサララーン １５ ジェンマブ ビー．ブイ．内
(72)発明者　ギュレン ラース
オランダ王国 ユトレヒト ３５８４ シーティー ウプサララーン １５ ジェンマブ ビー．ブイ．内
(72)発明者　ネイセン ヨースト ジェイ．
オランダ王国 ユトレヒト ３５８４ シーティー ウプサララーン １５ ジェンマブ ビー．ブイ．内

(72)発明者　イオアン アンドレア
オランダ王国 ユトレヒト ３５８４ シーティー ウプサララーン １５ ジェンマブ ビー．ブイ．内
(72)発明者　ビュルスケンス フランク
オランダ王国 ユトレヒト ３５８４ シーティー ウプサララーン １５ ジェンマブ ビー．ブイ．内
(72)発明者　デ ヨング ロブ エヌ．
オランダ王国 ユトレヒト ３５８４ シーティー ウプサララーン １５ ジェンマブ ビー．ブイ．内
(72)発明者　スフールマン ジャニーヌ
オランダ王国 ユトレヒト ３５８４ シーティー ウプサララーン １５ ジェンマブ ビー．ブイ．内
(72)発明者　ド フーイェ ポーリン リンダ
オランダ王国 ユトレヒト ３５８４ シーティー ウプサララーン １５ ジェンマブ ビー．ブイ．内
(72)発明者　サテイン ダヴィッド
オランダ王国 ユトレヒト ３５８４ シーティー ウプサララーン １５ ジェンマブ ビー．ブイ．内
(72)発明者　ボロシュ ペーテル
オランダ王国 ユトレヒト ３５８４ シーティー ウプサララーン １５ ジェンマブ ビー．ブイ．内
(72)発明者　デ クルーク バート－ヤン
オランダ王国 ユトレヒト ３５８４ シーティー ウプサララーン １５ ジェンマブ ビー．ブイ．内
(72)発明者　ヒベルト リシャルト
オランダ王国 ユトレヒト ３５８４ シーティー ウプサララーン １５ ジェンマブ ビー．ブイ．内
(72)発明者　ラブレイン アラン エフ．
オランダ王国 ユトレヒト ３５８４ シーティー ウプサララーン １５ ジェンマブ ビー．ブイ．内
(72)発明者　ニュルンベルガー クリスティーナ
ドイツ連邦共和国 ５５１１６ マインツ アン デア ゴルトグルーベ １２ ビオンテック エスエー内
(72)発明者　フェラーマイヤー－コプフ ジーナ
ドイツ連邦共和国 ５５１１６ マインツ アン デア ゴルトグルーベ １２ ビオンテック エスエー内
(72)発明者　ギーゼケ フリーデリケ
ドイツ連邦共和国 ５５１１６ マインツ アン デア ゴルトグルーベ １２ ビオンテック エスエー内
(72)発明者　ムイク アレクサンダー
ドイツ連邦共和国 ５５１１６ マインツ アン デア ゴルトグルーベ １２ ビオンテック エスエー内
(72)発明者　ベックマン カーステン
ドイツ連邦共和国 ５５１１６ マインツ アン デア ゴルトグルーベ １２ ビオンテック エスエー内
(72)発明者　ポールマン クラウディア
ドイツ連邦共和国 ５５１１６ マインツ アン デア ゴルトグルーベ １２ ビオンテック エスエー内
(72)発明者　クズマノフ イヴァン
ドイツ連邦共和国 ５５１１６ マインツ アン デア ゴルトグルーベ １２ ビオンテック エスエー内

Ｆターム（参考）　4C084　AA19 MA02 MA66 NA05 ZA591 ZA592 ZB261 ZB262 ZC412 ZC75
4C085　AA13 AA14 BB11 BB36 CC01 DD62 EE03 GG02
4H045　AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 EA20 FA74
GA26