



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2170959 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.02.17
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2013.10.02
(86)	Europeisk søknadsnr	08768485.8
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.06.13
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2010.04.07
(30)	Prioritet	2007.06.18, US, 944583 P
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
	Utpekte samarbeidende stater	AL BA MK RS
(73)	Innehaver	Merck Sharp & Dohme B.V., Waarderweg 39, 2031 BN Haarlem, NL-Nederland
(72)	Oppfinner	CARVEN, Gregory John, 89 Brooks Street, Maynard, Massachusetts 01754, US-USA VAN EENENNAAM, Hans, Schoolstraat 28A, NL-6512 JH Nijmegen, NL-Nederland DULOS, Gradus Johannes, Overste Kamp 3, NL-6662 SN Elst, NL-Nederland
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	ANTISTOFFER MOT HUMAN PROGRAMMERT DØDSRESEPTOR PD-1
(56)	Anførte publikasjoner	US-A1- 2006 210 567 US-B1- 6 808 710 WO-A-2006/121168 BLANK CHRISTIAN ET AL: "Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion" CANCER IMMUNOLOGY IMMUNOTHERAPY, vol. 56, no. 5, May 2007 (2007-05), pages 739-745, XP002497527 ISSN: 0340-7004 DAVIES J ET AL: "Affinity improvement of single antibody VH domains: residues in all three hypervariable regions affect antigen binding" IMMUNOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, NL, vol. 2, no. 3, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 169-179, XP004070292 ISSN: 1380-2933 DEL RIO MARIA-LUISA ET AL: "Antibody-mediated signaling through PD-1 costimulates T cells and enhances CD28-dependent proliferation" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 35, no. 12, December 2005 (2005-12), pages 3545-3560, XP002497526 ISSN: 0014-2980 DONG HAIDONG ET AL: "Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 8, no. 8, 24 June 2002 (2002-06-24), pages 793-800, XP002397368 ISSN: 1078-8956 EIZ-VESPER BRITTA ET AL: "Tetanus toxoid provides efficient T-cell help for the induction of HA-1(H) cytotoxic T cells." TRANSFUSION JUL 2006, vol. 46, no. 7, July 2006 (2006-07), pages 1210-1220, XP002497529 ISSN: 0041-1132

FLEISCHER B ET AL: "T cell stimulation by staphylococcal enterotoxins. Clonally variable response and requirement for major histocompatibility complex class II molecules on accessory or target cells." THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE 1 MAY 1988, vol. 167, no. 5, 1 May 1988 (1988-05-01), pages 1697-1707, XP002497528 ISSN: 0022-1007

IWAI YOSHIKO ET AL: "Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC.; US, vol. 99, no. 19, 17 September 2002 (2002-09-17), pages 12293-12297, XP002398159 ISSN: 0027-8424

KABILAN L ET AL: "DETECTION OF INTRACELLULAR EXPRESSION AND SECRETION OF INTERFERON-GAMMA AT THE SINGLE-CELL LEVEL AFTER ACTIVATION OF HUMAN T CELLS WITH TETANUS TOXOID IN VITRO" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WILEY - V C H VERLAG GMBH & CO. KGAA, DE, vol. 20, 1 January 1990 (1990-01-01), pages 1085-1089, XP008051762 ISSN: 0014-2980

RUDIKOFF S ET AL: "Single amino acid substitution altering antigen-binding specificity", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 79, no. 6, 1 March 1982 (1982-03-01), pages 1979-1983, XP002986051, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.79.6.1979

VAUGHAN T J ET AL: "Human Antibodies with Sub-nanomolar Affinities Isolated from a Large Non-immunized Phage Display Library" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 14, 1 March 1996 (1996-03-01), pages 309-314, XP000196144 ISSN: 1087-0156

WALDMANN THOMAS A: "Effective cancer therapy through immunomodulation" ANNUAL REVIEW OF MEDICINE : SELECTED TOPICS IN THE CLINICALSCIENCES, ANNUAL REVIEWS INC., PALO ALTO, CA, vol. 57, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 65-81, XP002466285 ISSN: 0066-4219

WONG RAYMOND M ET AL: "Programmed death-1 blockade enhances expansion and functional capacity of human melanoma antigen-specific CTLs" INTERNATIONAL IMMUNOLOGY, vol. 19, no. 10, October 2007 (2007-10), pages 1223-1234, XP002497525 ISSN: 0953-8178

ZEHAVI-WILLNER T ET AL: "THE MITOGENIC ACTIVITY OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN B A MONOVALENT T CELL MITOGEN THAT STIMULATES CYTOLYTIC T LYMPHOCYTES BUT CANNOT MEDIATE THEIR LYTIC INTERACTION" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 137, no. 8, 1 January 1986 (1986-01-01), pages 2682-2687, XP002164878 ISSN: 0022-1767

Beskrivelse

OPPFINNELSENS BAKGRUNN

[0001] Programmert dødsreseptor 1 (PD-1) er et immuninhibitorisk reseptor som primært uttrykkes på aktiverte T- og B-celler. Interaksjon med dets ligander har vist seg å dempe T-celle-responser både *in vitro* og *in vivo*. Blokkering av interaksjonen mellom PD-1 og én av dets ligander, PD-L1, har vist seg å øke tumor-spesifikke CD8⁺-T-celleimmunitet og kan derfor være nyttig ved utskillelse av tumorceller ved hjelp av immunsystemet.

[0002] PD-1 (kodet for av genet *Pdcd1*) er et immunglobulinsuperfamiliemedlem relatert til CD28 og CTLA-4. PD-1 har vist seg å negativ regulere antigenreseptor-signalisering ved inngrep av dets ligander (PD-L1 og/eller PD-L2). Strukturen til murin PD-1 er blitt løst, samt den ko-krystallinske strukturen til muse-PD-1 med human PD-L1 (Zhang, X. et al., *Immunity* 20: 337-347 (2004); Lin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 3011-6 (2008)). PD-1 og lignende familiemedlemmer er type I-transmembrane glykoproteiner som inneholder et Ig-variabelt type (V-type) domene som er ansvarlig for ligandbindingen og en cytoplasmatisk hale som er ansvarlig for bindingen av signaleringsmolekylene. Den cytoplasmatiske halen til PD-1 inneholder to tyrosin-baserte signaliseringsmotiver, et ITIM (immunreseptortyrosinbasert inhiberingsmotiv) og et ITSM (immunreseptortyrosinbasert brytermotiv).

[0003] Etter T-cellestimulering rekrutterer PD-1 tyrosinfosfatase SHP-2 til ITSM-motivet i dets cytoplasmatiske hale, som fører til defosforylering av effektormolekyler, slik som CD3 zeta, PKC theta og ZAP70 som er involvert i CD3-T-cellesignaliseringskaskaden. Mekanismen hvorved PD-1 nedmodulerer T-celleresponser er lignende, men forskjellig fra den til CTLA-4, der begge molekylene regulerer et overlappende sett av signaliseringsproteiner (Parry et al. *Mol. Cell Biol.* 25: 9543-9553.). Bennett og medarbeidere har vist at PD-1-mediert inhibering av T-cellesignalisering ikke bare er effektivt når både aktiverende og inhiberende signaler er på den samme overflaten, noe som indikerer at PD-1-signaliseringsmekanismen er spatiotemporært bestemt (Bennett F. et al., *J Immunol.* 170:711-8 (2003)).

[0004] PD-1 viste seg å bli uttrykket på aktiverte lymfocytter (perifere CD4⁺- og CD8⁺-T-celler, -B-celler og -monocytter) og har også blitt vist å uttrykkes under tymisk utvikling på CD4⁺CD8⁻ (dobbelt negative) T-celler, så vel som NK-T-celler.

[0005] Ligandene for PD-1 (PD-L1 og PD-L2) uttrykkes konstitutivt eller kan induseres i en rekke celletyper, inkludert ikke-hematopoietiske vev, så vel som forskjellige tumortyper. PD-L1 uttrykkes på B-, T-, myeloid- og dendrittceller (DC-er), men også på perifere celler, som mikrovaskulære endotelceller og ikke-lymfoide organer som hjerte, lunger osv. I motsetning til dette er PD-L2 bare funnet på makrofager og DC-er. Ekspresjonsmønsteret til PD-1-ligander antyder en rolle for PD-

1 ved å opprettholde perifer toleranse og kan tjene til å regulere selv-reaktive T- og B-celleresponser i periferien. Begge ligandene er type I-transmembranreseptorer som inneholder både IgV- og IgC-lignende domener i det ekstracellulære området. Begge ligandene inneholder korte cytoplasmatiske områder uten kjente signaliseringsmotiver.

5 **[0006]** Hittil har mange studier vist at interaksjonen mellom PD-1 med dets ligander fører til inhiberingen av lymfocyttoproliferasjon *in vitro* og *in vivo*. Forstyrrelse av PD-1/PD-L1-interaksjonen har blitt vist å øke T-celleproliferasjon og cytokinproduksjon og blokkprogresjonen av cellyklusen. Innledende analyse av *Pdcd1*^{-/-}-mus identifiserte ikke noen drastisk immunologisk fenotype. Men aldrende mus utviklet imidlertid spontane autoimmune sykdommer som var forskjellig i henhold til stammen hvorved *Pdcd1*-mangelen ble tilbakekrysset. Disse inkluderer lupuslignende proliferativ artritt (C57BL/6) (Nishimura H. et al., Int. Immunol. 10: 1563-1572 (1998)), fatal cardiomyopathy (BALB/c) (Nishimura H. et al., Science 291: 319-322 (2001)) og type-I-diabetes (NOD) (Wang J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 102: 11823-11828 (2005)). Generelt hadde analyse av knockout-dyr ført til forståelsen at PD-1 virker hovedsakelig ved å indusere og regulere perifer toleranse. Således kan terapeutisk blokkering av PD-1-reaksjonsveien være nyttig for å overvinne immuntoleranse. En slik selektiv blokkering kan anvendelse ved behandling av kreft eller infeksjon, samt ved forsterking (eng.: boosting) av immunitet under vaksinerings (enten profylaktisk eller terapeutisk).

20 **[0007]** Rollen til PD-1 ved kreft er etablert i litteraturen. Det er kjent at tumormikromiljøet kan beskytte tumorceller fra effektiv immunødeleggelse. PD-L1 har nylig blitt vist å uttrykkes på en rekke muse- og humane tumorer (og er induserbar ved IFN-gamma på majoriteten av PD-L1-negative tumorcellelinjer) og er antatt å mediere immununnavvikelse (Iwai Y. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 12293-12297 (2002); Strome S.E. et al., Cancer Res., 63: 6501-6505 (2003)).

25 **[0008]** Hos mennesker har ekspresjon av PD-1 (på tumorinfiltrerende lymfocytter) og/eller PD-L1 (på tumorceller) blitt funnet i et antall primære tumorbiopsier analysert ved immunhistokjemi. Slike vev inkluderer kreft i lunge, lever, eggstokk, cervix, hud, tykktarm, gliomer, blærer, bryst, nyre, spiserør, mage, orale skvamøse celler, urotelialcelle, og bukspyttkjertel samt tumorer i hode og hals (Brown J.A. et al., J. Immunol. 170: 1257-1266 (2003); Dong H. et al., Nat. Med. 8: 793-800 (2002); Wintterle et al., Cancer Res. 63: 7462-7467 (2003); Strome S.E. et al., Cancer Res., 63: 6501-6505 (2003); Thompson R.H. et al., Cancer Res. 66: 3381-5 (2006); Thompson et al., Clin. Cancer Res. 13: 1757-61 (2007); Nomi T. et al., Clin. Cancer Res. 13: 2151-7. (2007)). Mer påfallende har PD-ligandekspresjon på tumorceller blitt korrelert med dårlig prognose av kreftpasienter på tvers av flere krefttyper (oppsummert i Okazaki og Honjo, Int. Immunol. 19: 813-824 (2007)).

[0009] Blokkering av PD-1/PD-L1-samspeillet kan føre til økt tumor-spesifikk T-celleimmunitet, og er derfor nyttig ved utskillelse av tumorceller fra immunsystemet. For å løse dette problemet ble en rekke studier utført. I en murin modell av aggressiv pankreaskreft viste T. Nomi et al. (Clin. Cancer Res. 13: 2151-2157 (2007)) den terapeutiske effisiensen av PD-1/PD-L1-blokkering. Administrering av enten PD-1- eller PD-L1-rettet antistoff inhiberte signifikant tumorvekst. Antistoffblokkering fremmet effektivt tumorreaktive CD8⁺-T-celleinfiltrasjon inn i tumoren, noe som resulterer i oppregulering av anti-tumor-effektorer, inkludert IFN-gamma, granzym B og perforin. I tillegg viste forfatterne at PD-1-blokkering effektivt kan kombineres med kjemoterapi for å gi en synergistisk effekt. I en annen studie, ved å anvende en modell av skvamøse cellekarsinomer i mus, inhiberte antistoffblokkering av PD-1 eller PD-L1 signifikant tumorvekst (Tsushima F. et al., Oral Oncol. 42: 268-274 (2006)).

[0010] I andre studier førte transfeksjon av en murin mastocytomlinje med PD L1 ført til redusert lysering av tumorcellene når de ble dyrket samtidig med en tumorspesifikk CTL-klon. Lysering ble gjenopprettet når anti-PD-L1 mAb ble tilsatt (Iwai Y. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 12293-12297 (2002)). *In vivo* ble blokkering av PD1/PD-L1-interaksjon vist å øke yteevnen av adoptiv T-celleoverføringsterapi i en musetumormodell (Strome S.E. et al., Cancer Res. 63: 6501-6505 (2003)). Ytterligere bevis for rollen til PD-1 ved kreftbehandling kom fra forsøk utført med PD-1 knockout-mus. PD-L1 uttrykkende myelomceller vokste bare i villtypedyrene (som resulterte i tumorvekst og tilhørende dyredød), men ikke i PD-1-manglende mus (Iwai Y. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 12293-12297 (2002)).

In human studies, R.M. Wong et al. (Int. Immunol. 19: 1223-1234 (2007))

[0011] I humane studier viste R.M. Wong et al. (Int. Immunol. 19: 1223-1234 (2007)) at PD-1-blokkering ved hjelp av et fullt ut humant anti-PD-1-antistoff utvidet det absolutte antallet tumorspesifikke CD8⁺-T-celler (CTL-er) i *ex vivo*-stimuleringsanalyser ved anvendelse av vaksineantigener og celler fra vaksinerte individer. I en tilsvarende studie resulterte antistoffblokkering av PD-L1 i økt cytolytisk aktivitet til tumor-assosierte antigen-spesifikke cytotoxiske T-celler og økt cytokinproduksjon ved hjelp av tumorspesifikke T-celler (Blank C. et al., Int. J. Cancer 119: 317-327 (2006)). De samme forfatterne viste at PD-L1-blokkering utvidet tumorspesifikke T-celleresponser *in vitro* når de ble anvendt i kombinasjon med anti-CTLA-4-blokkering.

[0012] Totalt sett er PD-1/PD-L1-reaksjonsveien et godt validert mål for utviklingen av antistofflegemidler for kreftbehandling. Anti-PD-1-antistoffer kan også være nyttige ved kronisk virusinfeksjon. Minne CD8⁺-T-celler som genereres etter en akutt virusinfeksjon er meget funksjonelle og utgjør en viktig komponent ved beskyttende immunitet. I motsetning til dette er kroniske infeksjoner ofte kjennetegnet med varierende grad av funksjonssvikt (utmattelse) til virus-spesifikke T-celleresponser, og

denne mangelen er en viktig årsak til vertens manglende evne til å eliminere det vedvarende patogenet. Selv om funksjonelle effektor-T-celler innledningsvis genereres under de tidlige stadiene av infeksjonen, mister de gradvis funksjon i løpet av en kronisk infeksjon. Barber et al. (Barber et al., Nature 439: 682-687 (2006)), viste at mus infisert med en laboratoriestamme av LCMV utviklet kronisk infeksjon som resulterer i høye nivåer av virus i blodet og annet vev. Disse musene utviklet innledningsvis en robust T-cellerespons, men døde til slutt av infeksjonen etter T-celle-utmattelse. Forfatterne fant at nedgangen i antallet og funksjonen til effektor-T-cellene i kronisk infiserte mus kunne reverseres ved å injisere et antistoff som blokkerte interaksjonen mellom PD-1 og PD-L1.

[0013] Nylig har det blitt vist at PD-1 uttrykkes i stor grad på T-celler fra HIV-infiserte individer, og at reseptorekspresjon korrelerer med nedsatt T-cellefunksjon og sykdomsprogresjon (Day et al., Nature 443:350-4 (2006).; Trautmann L. et al., Nat. Med. 12: 1198-202 (2006)). I begge studiene økte signifikant blokkering av liganden PD-L1 utvidelsen av HIV-spesifikke, IFN-gamma-produserende celler *in vitro*.

[0014] Andre studier impliserer også viktigheten av PD-1-reaksjonsveien ved å kontrollere virusinfeksjoner. PD-1-knockout-mus utviser bedre kontroll på adenovirusinfeksjon enn villtypemus (Iwai et al., J. Exp. Med. 198:39-50 (2003)). Også adoptiv overføring av HBV-spesifikke T-celler til HBV-transgene dyr initierte hepatitt (Isogawa M. et al., Immunity 23:53-63 (2005)). Sykdomstilstanden til disse dyrene oscillerte som følge av antigengjenkjennelse i leveren og PD-1-oppregulering av leverceller.

[0015] WO 2006/121 168 beskriver monoklonale antistoffer, særlig humane monoklonale antistoffer, som spesifikt binder til PD-1 med høy affinitet og deres anvendelse for behandling av sykdommer.

[0016] Også US 2006/210 567 A1 beskriver antistoffer og/eller antagonister til PD-1 og sammensetninger derav. I US 2006/210 567 A1 er det beskrevet at slike sammensetninger for eksempel kan anvendes i behandlingen av autoinflammatoriske sykdommer.

KORT OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

[0017] Oppfinnelsen tilveiebringer isolerte antistoffer og antistofffragmenter som binder til human og cyno PD-1. I noen utførelsesformer blokkerer antistoffet eller antistofffragmentet binding til human PD-L1 og human PD-L2 til human PD-1.

PD-1-antistoffet eller antistofffragmentet ifølge oppfinnelsen inkluderer CDR-ene (antistoffkomplementærbestemmende områder) til SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18, 19 og 20; det inkluderer tungkjede-CDR-ene til SEQ ID NO: 18, 19 og 20, og lettkjede-CDR-ene til SEQ ID NO: 15, 16 og 17. I noen utførelsesformer er antistoffet eller

antistofffragmentet et kimært antistoff, humant antistoff, humanisert antistoff eller et fragment derav.

[0018] Et isolert antistoff eller antigenfragment er beskrevet som binder seg til human PD-1 omfattende: en lettkjede omfattende CDR-ene SEQ ID NO: 9, 10 og 11, eller varianter av sekvensene; og/eller en tungkjede omfattende CDR-ene SEQ ID NO: 12, 13 og 14, eller varianter av sekvensene.

[0019] I én utførelsesform tilveiebringer beskrivelsen et isolert antistoff eller antistofffragment som binder seg til human PD-1 omfattende: en lettkjede omfattende CDR-ene SEQ ID NO: 15, 16 og 17 eller varianter av sekvensene; og/eller en tungkjede som omfatter CDR-ene SEQ ID NO: 18, 19 og 20, eller varianter av sekvensene.

[0020] Det er beskrevet et antistoff- eller antigenbindende fragment som omfatter et tungkjedevariabelt område SEQ ID NO: 5, eller en variant derav; og/eller et lettkjedevariabelt område som omfatter SEQ ID NO: 6 eller en variant derav.

[0021] I en utførelsesform omfatter oppfinnelsen et antistoff- eller antigenbindende fragment som omfatter et tungkjedevariabelt område SEQ ID NO: 7, eller en variant derav og/eller et lettkjedevariabelt område som omfatter SEQ ID NO: 8 eller en variant derav.

[0022] I en utførelsesform omfatter oppfinnelsen et antistoff eller antigen-bindende fragment som omfatter et tungkjedevariabelt område omfattende aminosyrerestene 20 til 139 i SEQ ID NO: 30 eller en variant derav; og/eller et lettkjedevariabelt område omfattende aminosyrerestene 20 til 130 i SEQ ID NO: 32 eller en variant derav.

[0023] I en utførelsesform omfatter oppfinnelsen et antistoff eller antigen-bindende fragment som omfatter et tungkjedevariabelt område omfattende aminosyrerestene 20 til 139 i SEQ ID NO: 30 eller en variant derav, og/eller et lettkjedevariabelt område omfattende aminosyrerestene 20 til 130 i SEQ ID NO: 33 eller en variant derav.

[0024] I en utførelsesform omfatter oppfinnelsen et antistoff- eller antigenbindende fragment som omfatter et tungkjedevariabelt område omfattende aminosyrerestene 20 til 139 av SEQ ID NO: 30 eller en variant derav, og/eller et lettkjedevariabelt område omfattende aminosyrerestene 20 til 130 i SEQ ID NO: 34 eller en variant derav.

[0025] I en utførelsesform omfatter oppfinnelsen et antistoff- eller antigenbindende fragment omfattende et tungkjede-variabelt område som omfatter en aminosyresekvens som har minst 90 % homologi med aminosyrerestene 20-139 i SEQ ID NO: 30; og/eller et lettkjedevariabelt område som omfatter, og en aminosyresekvens som har minst 90 % homologi med aminosyrerestene 20 til 130 i SEQ ID NO: 32, 33 eller 34.

[0026] I en utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen et isolert antistoff eller antistofffragment som binder seg til human PD-1 omfattende: en tungkjede som omfatter aminosyrerestene 20-466 i SEQ ID NO: 31 eller en variant derav, og/eller en

lettkjede som omfatter aminosyrerestene 20-237 i SEQ ID NO: 36 eller en variant derav.

[0027] I en utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen et isolert antistoff eller antistofffragment som binder seg til human PD-1 omfattende: en tungkjede som
5 omfatter aminosyrerestene 20-466 i SEQ ID NO: 31 eller en variant derav, og/eller en lettkjede som omfatter aminosyrerestene 20-237 i SEQ ID NO: 37 eller en variant derav.

[0028] I en utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen et isolert antistoff eller antistofffragment som binder seg til human PD-1 omfattende: en tungkjede som
10 omfatter aminosyrerestene 20-466 i SEQ ID NO: 31 eller en variant derav, og/eller en lettkjede som omfatter aminosyrerestene 20-237 i SEQ ID NO: 38 eller en variant derav.

[0029] I en utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen et isolert antistoff eller antistofffragment som binder seg til human PD-1 omfattende: en tungkjede som
15 omfatter aminosyrerestene 20-469 i SEQ ID NO: 35 eller en variant derav, og/eller en lettkjede som omfatter aminosyrerestene 20-237 i SEQ ID NO: 36 eller en variant derav.

[0030] I en utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen et isolert antistoff eller antistofffragment som binder seg til human PD-1 omfattende: en tungkjede som
20 omfatter aminosyrerestene 20-469 i SEQ ID NO: 35 eller en variant derav, og/eller en lettkjede som omfatter aminosyrerestene 20-237 i SEQ ID NO: 37 eller en variant derav.

[0031] I en utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen et isolert antistoff eller antistofffragment som binder seg til human PD-1 omfattende: en tungkjede som
25 omfatter aminosyrerestene 20 til 469 i SEQ ID NO: 35 eller en variant derav, og/eller en lettkjede som omfatter aminosyrerestene 20-237 i SEQ ID NO: 38 eller en variant derav.

[0032] I enhver av de ovennevnte utførelsesformene kan varianten av antistoffet eller antistofffragmentet ifølge oppfinnelsen omfatte én, to eller tre konservativt
30 modifiserte aminosyresubstitusjoner.

[0033] I enhver av de ovennevnte utførelsesformene kan antistoffet eller antistofffragmentet ifølge oppfinnelsen omfatte et humant tungkjedekonstant område, eller en variant derav, hvori varianten omfatter opptil 20 konservativt modifiserte aminosyresubstitusjoner; og/eller et humant lettkjedekonstant område eller en variant
35 derav, hvori varianten omfatter opptil 20 konservativt modifiserte aminosyresubstitusjoner. I noen utførelsesformer kan varianten omfatte opptil 10 konservativt modifiserte aminosyresubstitusjoner. I noen utførelsesformer kan varianten omfatte opptil 5 konservativt modifiserte aminosyresubstitusjoner. I noen utførelsesformer kan varianten omfatte opptil 3 konservativt modifiserte

aminosyresubstitusjoner. I enhver av de ovennevnte utførelsesformene kan det humane tungkjedekonstante området eller varianten derav være av IgG1- eller IgG4-isotypen.

[0034] I enhver av de ovenfor beskrevne utførelsesformene kan antistoffet eller antistofffragmentet ifølge oppfinnelsen binde human PD-1 med en K_D på omtrent 100 pM eller lavere. I en annen utførelsesform kan antistoffet eller antistofffragmentet binde human PD-1 med en K_D på omtrent 30 pM eller lavere. I en annen utførelsesform kan antistoffet eller antistofffragmentet binde human PD-1 med omtrent samme K_D som et antistoff som har en tungkjede som omfatter aminosyresekvensen av SEQ ID NO: 31 og en lett kjede som omfatter aminosyresekvensen av SEQ ID NO: 32. I en annen utførelsesform kan antistoffet eller antistofffragmentet binde human PD-1 med omtrent samme K_D som et antistoff som har en tungkjede som omfatter aminosyresekvensen av SEQ ID NO: 31 og en lett kjede som omfatter aminosyresekvensen av SEQ ID NO: 33.

[0035] I enhver av de ovennevnte beskrevne utførelsesformene kan antistoffet eller antistofffragmentet ifølge oppfinnelsen binde human PD-1 med en k_{assos} på omtrent $7,5 \times 10^5$ 1/M · s eller raskere. I en utførelsesform kan antistoffet eller antistofffragmentet binde human PD-1 med en k_{assos} på omtrent 1×10^6 1/M · s eller raskere.

[0036] I enhver av de ovenfor beskrevne utførelsesformene kan antistoffet eller antistofffragmentet binde human PD-1 med en k_{dissos} på omtrent 2×10^{-5} 1/s eller langsommere. I en utførelsesform kan antistoffet eller antistofffragmentet binde human PD-1 med en k_{dissos} på omtrent $2,7 \times 10^{-5}$ 1/s eller langsommere. I en utførelsesform kan antistoffet eller antistofffragmentet binde human PD-1 med en k_{dissos} på omtrent 3×10^{-5} 1/s eller langsommere.

[0037] K_D -, k_{assos} - og k_{dissos} -verdier kan måles ved anvendelse av en hvilken som helst tilgjengelig fremgangsmåte. I foretrukne utførelsesformer måles dissosiasjonskonstanten ved anvendelse av bio-lysinterferometri (for eksempel ForteBio Octet-fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2). I andre foretrukne utførelsesformer kan disosiasjonskonstanten måles ved anvendelse av overflateplasmonresonans (f.eks. Biacore) eller Kinexa.

[0038] Videre, i en hvilken som helst av de ovenfor beskrevne utførelsesformene, kan antistoffet eller antistofffragmentet ifølge oppfinnelsen videre blokkbindes av human PD-L1 eller human PD-L2 til human PD-1 med en IC_{50} på omtrent 1 nM eller lavere. Blokkeringen av ligandbinding kan måles og IC_{50} beregnes ved hjelp av enhver fremgangsmåte kjent innen teknikken, for eksempel FACS- eller FMAT-fremgangsmåtene beskrevet i eksemplene heri.

[0039] Oppfinnelsen omfatter også et antistoff eller antistofffragment som konkurrerer om en bindingsepitop på human PD-1 med en hvilken som helst av antistoffene beskrevet ovenfor, og som blokkerer bindingen av human PD-L1 eller human PD-L2 til human PD-1 med en IC_{50} på omtrent 1 nM eller lavere.

[0040] Oppfinnelsen omfatter også et antistoff eller antistofffragment som konkurrerer om en bindingsepitop på human PD-1 med en hvilken som helst av antistoffene beskrevet ovenfor, og som binder human PD-1 med en K_D på omtrent 100 pM eller lavere. I en utførelsesform binder antistoffet eller antistofffragmentet human PD-1 med

5 en K_D på omtrent 30 pM eller lavere.

[0041] Oppfinnelsen omfatter også et antistoff eller antistofffragment som konkurrerer om en bindingsepitop på human PD-1 med en hvilken som helst av antistoffene som er beskrevet ovenfor, og som binder human PD-1 med omtrent samme K_D som et antistoff som har en tungkjede som omfatter aminosyresekvensen av SEQ ID NO: 31 og en

10 lettkjede som omfatter aminosyresekvensen av SEQ ID NO: 32.

[0042] Oppfinnelsen omfatter også et antistoff eller antistofffragment som konkurrerer om en bindingsepitop på human PD-1 med en hvilken som helst av antistoffene beskrevet ovenfor, og som binder human PD-1 med omtrent samme K_D som et antistoff som har en tungkjede som omfatter aminosyresekvensen av SEQ ID NO: 31 og en

15 lettkjede som omfatter aminosyresekvensen av SEQ ID NO: 33.

[0043] Oppfinnelsen omfatter også et antistoff eller antistofffragment som konkurrerer om en bindingsepitop på human PD-1 med en hvilken som av antistoffene beskrevet ovenfor, og som binder human PD-1 med en k_{assos} på omtrent $7,5 \times 10^5$ 1/M · s eller raskere. I en utførelsesform kan antistoffet eller antistofffragmentet binde human PD-1

20 med en k_{assos} på omtrent 1×10^6 1/M · s eller raskere.

[0044] Oppfinnelsen omfatter også et antistoff eller antistofffragment som konkurrerer om en bindingsepitop på human PD-1 med en hvilken som helst av antistoffene beskrevet ovenfor, og som binder human PD-1 med en k_{dissos} på omtrent 2×10^{-5} 1/s eller langsommere. I en utførelsesform kan antistoffet eller antistofffragmentet binde

25 human PD-1 med en k_{dissos} på omtrent $2,7 \times 10^{-5}$ 1/s eller langsommere. I en utførelsesform kan antistoffet eller antistofffragmentet binde human PD-1 med en k_{dissos} på omtrent 3×10^{-5} 1/s eller langsommere.

[0045] I noen utførelsesformer er antistoffet eller antistofffragmentene ifølge oppfinnelsen kimære antistoffer eller fragmenter av kimære antistoffer.

30 **[0046]** I noen utførelsesformer er antistoffet eller antistofffragmentene ifølge oppfinnelsen humane antistoffer eller fragmenter av humane antistoffer.

[0047] I noen utførelsesformer er antistoffet eller antistofffragmentene ifølge oppfinnelsen humaniserte antistoffer eller fragmenter av humaniserte antistoffer.

[0048] I noen utførelsesformer er antistofffragmentene ifølge oppfinnelsen Fab-, Fab'-, Fab'-SH-, Fv-, scFv- eller F(ab')₂-fragmenter.

35

[0049] I noen utførelsesformer er antistofffragmentene ifølge oppfinnelsen dialegemer.

[0050] Oppfinnelsen omfatter også bispesifikke antistoffer som omfatter et hvilket som helst av antistoffet eller antistofffragmentene beskrevet ovenfor som binder seg til human PD-1.

[0051] I noen utførelsesformer øker de isolerte anti-PD-1-antistoffene og antistofffragmentene ifølge den foreliggende oppfinnelsen T-celleaktivering som målt ved vanlige metoder kjent for fagfolk innen teknikken (inkludert, men ikke begrenset til, økt immuncelleproliferasjon, økt cytokinsekresjon eller ekspresjon av

5 aktiveringsmarkører, slik som CD25 og/eller CD69).

[0052] I hvilken som helst av de ovenfor beskrevne utførelsesformene kan antistoffet eller antistofffragmentet ifølge oppfinnelsen øke immunresponsen etter stimulering med Staphylococcus enterotoksin B eller tetanustoksoid ex vivo eller in vivo. Den økte immunaktiveringen kan bestemmes ved hjelp av fremgangsmåter kjent for enhver

10 fagperson på området, for eksempel, å kvantifisere proliferasjonen av immunceller (slik som T-celler) eller cytokinproduksjon av immunceller (for eksempel produksjon av IFN γ - eller IL-2 ved hjelp av T-celler).

[0053] Oppfinnelsen omfatter også nukleinsyrer som koder for anti-PD-1- antistoffer og antistofffragmenter ifølge oppfinnelsen. Inkludert i oppfinnelsen er nukleinsyrer som

15 koder for en hvilket som helst av aminosyresekvensene beskrevet i SEQ ID NO: 7 til 8, 15 til 20 og 30 til 38 (med eller uten ledersekvensene). Også inkludert i oppfinnelsen er nukleinsyre som omfatter SEQ ID NO: 3 til 4 og 21 til 29 (med eller uten nukleinsyrene som koder for ledersekvensene).

[0054] Oppfinnelsen omfatter også celler og ekspresjonsvektorer som omfatter

20 nukleinsyrer som koder for antistoffene eller antistofffragmentene ifølge oppfinnelsen. Videre omfatter oppfinnelsen en fremgangsmåte for fremstilling av et antistoff eller antistofffragment ifølge oppfinnelsen omfattende: (a) dyrking av vertscellen som omfatter en nukleinsyre som koder for et antistoff eller antistofffragment ifølge oppfinnelsen i dyrkningsmediet under betingelser hvori

25 nukleinsyresekvensen uttrykkes, for derved å fremstille polypeptider som omfatter lette- og tungkjedevariable områder; og (b) utvinning av polypeptidene fra vertscellen eller dyrkningsmediet.

[0055] Oppfinnelsen omfatter også sammensetninger som omfatter et antistoff eller antistofffragment ifølge oppfinnelsen i kombinasjon med en farmasøytisk akseptabel

30 bærer eller fortynningsmiddel.

[0056] Oppfinnelsen omfatter også en fremgangsmåte for å øke aktiviteten av en immuncelle, som omfatter administrering til et individ som trenger det av en terapeutisk effektiv mengde av et antistoff eller antistofffragment ifølge oppfinnelsen. I en utførelsesform kan fremgangsmåten anvendes for å behandle kreft. I en annen

35 utførelsesform kan fremgangsmåten anvendes for å behandle en infeksjon eller smittsomme sykdommer. I enda en annen utførelsesform kan fremgangsmåten anvendes som en vaksineadjuvans. I noen utførelsesformer omfatter fremgangsmåten ytterligere administrering av et/en andre terapeutisk middel eller behandlingsform.

[0057] I noen utførelsesformer omfatter oppfinnelsen en fremgangsmåte for å øke aktiviteten til en immuncelle, som omfatter administrering til et individ som trenger det av en terapeutisk effektiv mengde av et antistoff eller antistofffragment ifølge oppfinnelsen, og ytterligere omfattende måling av T-celleaktivering *ex vivo* i en prøve avledet fra individet, hvori en økning i T-celleaktiviteten indikerer at behandlingen bør fortsettes. I andre utførelsesformer omfatter oppfinnelsen en fremgangsmåte for å øke aktiviteten til en immuncelle, som omfatter administrering til et individ som trenger det av en terapeutisk effektiv mengde av et antistoff eller antistofffragment ifølge oppfinnelsen, og ytterligere omfattende måling av T-celleaktivering *ex vivo* i en prøve avledet fra individet, hvori en økning i T-celleaktivitet forutser sannsynligheten for at behandlingen vil være vellykket. I en utførelsesform bestemmes økningen i T-celleaktivitet ved: (i) måling av SEB-indusert produksjon av én eller flere cytokiner utvalgt fra gruppen bestående av: IL-2, TNF α , IL-17, IFN γ , GM-CSF, RANTES, IL-6, IL-8, IL-5 og IL-13; eller (ii) måling av TT-indusert produksjon av et cytokin utvalgt fra gruppen bestående av: IL-2, TNF α , IL-17, IFN γ , GM-CSF, RANTES, IL-6, IL-8, IL-5 og IL-13.

[0058] Oppfinnelsen omfatter også anvendelsen av et anti-PD-1-antistoff eller antistofffragment ifølge oppfinnelsen for fremstilling av et medikament for å øke immunresponsen.

[0059] Oppfinnelsen omfatter også anvendelsen av et anti-PD-1-antistoff eller antistofffragment ifølge oppfinnelsen for fremstilling av et medikament for å behandle kreft.

[0060] Oppfinnelsen omfatter også anvendelsen av et anti-PD-1-antistoff eller antistofffragment ifølge oppfinnelsen som en vaksineadjuvans.

[0061] Oppfinnelsen omfatter også et immunkonjugat som omfatter et anti-PD-1-antistoff eller antistofffragment ifølge oppfinnelsen, koblet til et terapeutisk middel, slik som et bakterielt toksin eller et radiotoksin. Ikke-begrensede eksempler på cytotoksiske midler inkluderer taksol, cytokalasin B, mitomycin, etoposid og vinkristin eller andre antimetabolitter, alkylerende midler, antibiotika og antimitotiske midler.

[0062] Oppfinnelsen omfatter også en fremgangsmåte for å øke aktiviteten, eller redusere nedmoduleringen av en immuncelle som omfatter å bringe immunceller i kontakt med en hvilken som helst én av antistoffene eller antistofffragmentene ifølge oppfinnelsen. Denne fremgangsmåten kan anvendes for å behandle kreft- eller infeksjonssykdommer (slik som kroniske virusinfeksjoner), eller kan anvendes som en adjuvans i en profylaktisk eller terapeutisk vaksine.

[0063] Oppfinnelsen omfatter også en fremgangsmåte for å øke en immunrespons mot et antigen, som omfatter å bringe en immuncelle i kontakt med et antigen, og et anti-PD-1-antistoff eller et antistofffragment, slik at en immunrespons mot antigenet økes eller forsterkes. Denne fremgangsmåten kan utføres *in vivo* (i et individ) eller *ex vivo*.

[0064] I noen utførelsesformer kan anti-PD-1-antistoffet eller antistofffragmentet kombineres med et andre terapeutisk middel eller behandlingsmodalitet. I en utførelsesform kan en anti-PD-1-antistoff eller antistofffragment kombineres med kreftbehandlinger som involverer anvendelsen av rekombinante cytokiner eller utskilte immunfaktorer. Ikke-begrensede eksempler på kombinasjoner inkluderer å kombinere
5 anti-PD-1-antistoffer med rekombinant IL-2 eller rekombinant IFN α 2 for behandling av melanom eller nyrecellekarsinom. Rekombinant IL-2 øker T-celleutvekst hos kreftpasienter. Rekombinant IFN α 2 inhiberer kreftcellevekst, men øker også ekspresjon av de inhibitoriske ligandene for PD-1 på kreftceller, antigen-presenterende
10 celler og andre somatiske celler hos de behandlede pasientene. Anti-PD-1 kan kombineres med andre cytokiner som kan vurderes som nyttige for behandlingen av kreft eller smittsomme sykdommer.

[0065] I noen utførelsesformer kan anti-PD-1-antistoffer eller antistofffragmenter kombineres med en vaksine for å forebygge eller behandle kreft eller smittsomme
15 sykdommer. Som et ikke-begrensede eksempel kan anti-PD-1 kombineres med et protein, peptid eller en DNA-vaksine som inneholder én eller flere antigener som er relevante for kreften eller infeksjonen som skal behandles, eller en vaksine bestående av dendritiske celler pulset med slikt a) antigen. En annen utførelsesform omfatter anvendelse av anti-PD-1 med (svekket) kreftcelle- eller helvirusvaksiner. En
20 utførelsesform innebærer en kombinasjon av anti-PD-1-behandling med en helcellekreftvaksine som er konstruert for å skille ut GM-CSF.

[0066] I noen utførelsesformer kan anti-PD-1-antistoffer eller antistofffragmenter kombineres med behandling som er vurdert å være standard ved behandling av kreft eller smittsomme sykdommer. Begrunnelsen for slike kombinasjoner er at samtidig økt
25 immunaktivering ved hjelp av anti-PD-1 vil indusere eller fremme innledende klinisk respons på standard ivaretakende behandling, indusere varig klinisk respons og langsiktig immunkontroll av sykdommen.

[0067] I en utførelsesform kan behandling med anti-PD-1-antistoffer eller antistofffragmenter kombineres med kjemoterapi. Kjemoterapi ved anvendelse av
30 cytotoksiske midler vil resultere i kreftcelledød og dermed øke frigjøringen av tumorantigener. Slik økt tilgjengelighet av tumorantigenet kan føre til synergi med anti-PD-1-behandling. Et ikke-begrensede eksempel er gitt ved anvendelsen av dekarbazin eller temozolomid for behandling av melanom og gemcitabin, for bukspyttkjertelkreft.

[0068] I en utførelsesform kan behandling med anti-PD-1-antistoffer eller antistofffragmenter kombineres med radioterapi. Radioterapi induserer kreftcelledød og
35 øker tilgjengeligheten av tumorantigener for presentasjon og aktivering av immunceller.

[0069] I en annen utførelsesform kan behandling med anti-PD-1-antistoffer eller antistoffragmenter kombineres med kirurgi for å fjerne kreftceller fra et individ.

[0070] I andre utførelsesformer kan anti-PD-1-antistoffer eller antistoffragmenter kombineres med terapier som kan resultere i synergi med PD-1-blokkering inkludert målrettede midler som anvendes for hormonmangel eller inhibering av angiogenese eller målretting av proteiner som er aktive i tumorceller, som alle resulterer i økt tumorcelledød og tilgjengelighet av immunstimulerende tumorantigener.

I kombinasjon med et anti-PD-1-antistoff eller antistoffragment, kan økt T-celleaktivering resultere i varig immunkontroll av kreft.

[0071] I noen utførelsesformer kan et anti-PD-1-antistoff eller antistoffragment kombineres med et annet terapeutisk antistoff anvendbart for behandling av kreft eller smittsomme sykdommer. Et ikke-begrensende eksempel er gitt ved kombinasjonen av anti-PD-1 med et antistoff rettet mot Her2/neu eller rettet mot EGF-reseptoren. I et annet ikke-begrensende eksempel, er et anti-PD-1-antistoff eller antistoffragment kombinert med behandlingsrettende VEGF eller dens reseptorer. I en annen utførelsesform er et anti-PD-1-antistoff eller antistoffragment kombinert med anti-CTLA-4. I enda et ikke-begrensende eksempel er anti-PD-1 kombinert med et antistoff som er rettet mot RSV.

KORT BESKRIVELSE AV FIGURENE

[0072]

Figur 1A og 1B viser resultatene av forsøkene som viser at antistoffer immobilisert fra hybridomsupernatanter er i stand til å redusere IL-2-sekresjon fra Jurkat E6.2.11-celler stimulert med immobilisert anti-CD3 og løselig anti-CD28.

Figur 2 viser resultatene av forsøkene som viser at antistoffer mot human PD-1 binder til PD-1. Figur 2A er en grafisk fremstilling som viser doseavhengig binding av anti-PD-1-antistoffer mot rensset PD-1/Fc i et protein-ELISA. Figur 2B er en grafisk fremstilling som viser doseavhengig binding av anti-PD-1-antistoffer til PD-1 uttrykt på overflaten av CHO-celler transfektert med hPD-1 i en CELISA.

Figur 3 viser resultatet av FMAT-forsøk som viser at antistoffene mot PD-1 konkurrerer om binding av PD-L1 og PD-L2 til CHO-celler transfektert med human PD-1. Figur 3A er en grafisk fremstilling som viser doseavhengig inhibering av binding av PD-L1 ved hjelp av hPD-1.08A og hPD-1.09A og i mindre grad av J116. Figur 3B er en grafisk fremstilling som viser doseavhengig inhibering av PD-L2.

Figur 4 er et søylediagram som viser resultatene av forsøkene som viser at SEB-stimulert IL-2-produksjon ved hjelp av friske donorblodceller økes i nærvær av anti-PD-1-, anti-PD-L1- eller anti-CTLA-4-antistoffer. Søylene viser den gjennomsnittlige ganger økning i IL-2 over donorer ($\pm$ SEM). Tallene inni hver søyle angir antallet donorer representert. Mus (m) IgG1 er isotypen kontroll for anti-PD-1.08A (08A), anti-PD-1.09A (09A) og anti-PD-L1. Mus (m) IgG2a er isotypekontrollen for anti-CTLA-4. Hver IL-2-verdi ble sammenlignet med dets egen kontroll for å bestemme ganger endring (ganger endring IL-2 på 4 betyr 400 % økning i IL-2-produksjon sammenlignet med SEB alene). Ingen = SEB alene.

Figur 5 viser resultater av forsøkene som viser at anti-PD-1-antistoffer fremmer T-celleproliferasjon og cytokinsekresjon (IL-2 og IFN γ) når stimulert med det tilbakekalte (eng. the recalled) tetanustoksoidantigenet. Figur 5 viser konsentrasjonsavhengig IFN γ -sekresjon.

Figur 6 er en grafisk fremstilling som viser k_{assos} - og k_{dissos} -ratene for anti-PD-1-antistoffer som målt ved bio-lys-interferometri. Diagonale linjer indikerer teoretisk beregnede K_D -verdier. Antistoffene er oppført på høyre side med K_D i stigende rekkefølge.

Figur 7 er et søylediagram som viser resultatene av forsøkene som demonstrerer at SEB-stimulert IL-2-produksjon med friske donorblodceller økes i nærvær av 25 $\mu\text{g/ml}$ murine (09A) eller humaniserte anti-PD-1-antistoffer (h409A11, h409A16 og h409A17). Søylene viser gjennomsnittlig ganger økning i IL-2 over tre donorer (+ SEM). Mus (m) IgG1 er isotypekontroll for anti-PD-1.09A (09A). Human (h) IgG4 er isotypekontrollen for h409A11-, h409A16- og h409A17-antistoffer. Hver IL-2 verdi er sammenlignet med sin egen kontroll for å bestemme antall ganger endring. Ingen = SEB alene.

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Forkortelser og definisjoner

[0073] Gjennom den detaljerte beskrivelsen og eksemplene på oppfinnelsen vil de følgende forkortelsene anvendes:

hPD-1.08A	Murint monoklonalt anti-hPD-1-antistoff
hPD-1.09A	Murint monoklonalt anti-hPD-1-antistoff
08A-VH	VH isolert fra hPD-1.08A-hybridom
08A-VK	VK isolert fra hPD-1.08A-hybridom
09A-VH	VH isolert fra hPD-1.09A-hybridom
09A-VK	VK isolert fra hPD-1.09A-hybridom
c109A	Kimær IgG1-versjon av hPD1.09A-antistoff

	c109A-VH	Kimær tungkjede, som består av murin 09A-VH smeltet til IgG1-konstant område
	c109A-VK	Kimær lettkjede, som består av murin 09A-VK fusjonert til humant kappakonstant område
5	109A-H	Humanisert IgG1 09A tungkjedesekvens med null tilbakemutasjoner.
	409A-H	Humanisert IgG4-09A-tungkjedesekvens med null-FWR-tilbakemutasjoner
	K09A-L-11	Humanisert 09A-kappasekvens der rammeverket opprinnelig har CDR1-lengde på 11 AA-er
10	K09A-L-16	Humanisert 09A-kappasekvens der rammeverket opprinnelig har CDR1-lengde på 16 AA-er
	K09A-L-17	Humanisert 09A-kappasekvens der rammeverket opprinnelig har CDR1-lengde på 17 AA-er
15	h409A11	Humanisert IgG4-versjon av 09A-antistoff omfattende en tungkjede som omfatter sekvensen 409A-H, og en lettkjede som omfatter sekvensen av K09A-L-11
	h409A16	Humanisert IgG4-versjon av 09A-antistoff omfattende en tungkjede som omfatter sekvensen til 409A-H, og en lettkjede som omfatter sekvensen til K09A-L-16
20	h409A17	Humanisert IgG4-versjon av 09A-antistoff omfattende en tungkjede som omfatter sekvensen til 409A-H, og en lettkjede som omfatter sekvensen til K09A-L-17
	hPD-1	humant PD-1-protein
25	CDR	Komplementaritetsbestemmende område i immunglobulinvariable områder, definert ved hjelp av Kabat-nummereringssystemet
	EC50	Konsentrasjon som resulterer i 50 % effisiens eller binding
	ELISA	Enzym-bundet immunosorbentanalyse
	FW	Antistofframmeverkområde: immunglobulinvariable områder der CDR-områdene er ekskludert
30	HRP	Pepperrotperoksidase
	IL-2	interleukin 2
	IFN	interferon
	IC50	Konsentrasjon som resulterer i 50 % inhibering
	IgG	Immunglobulin G
35	Kabat	Et immunglobulinoppstillings- og nummereringssystem utviklet av Elvin A Kabat
	mAn	Monoklonalt antistoff
	MES	2-(N-morfolino)etansulfonsyre
	NHS	Normalt humant serum

PCR	Polymerasekjedereaksjon
SAM	Sau-anti-mus (IgG) polyklonalt antistoff
V-område	Segmentet av IgG-kjeder som er variable i sekvens mellom ulike antistoffer. Det strekker seg til Kabat-resten 109 i lett kjeden og 113 i tungkjeden.
VH	Immunoglobulintungkjedevariabelt område
VK	Immunoglobulin-kappa-lettkjedevariabelt område

[0074] "Antistoff" refererer til en hvilken som helst form for antistoff som utviser den ønskede biologiske aktiviteten, slik som inhibering av binding av en ligand til dets reseptor eller ved å inhibere ligand-indusert signalering med en reseptor. Således anvendes "antistoff" i videste forstand, og dekker spesifikt, men er ikke begrenset til, monoklonale antistoffer (inkludert full-lengdemonoklonale antistoffer), polyklonale antistoffer og flerspesifikke antistoffer (for eksempel bispesifikke antistoffer).

[0075] "Antistofffragment" og "antistoffbindende fragment" betyr antigenbindende fragmenter og analoger av et antistoff, som vanligvis inkluderer minst én del av de antigenbindende eller variable områdene (for eksempel én eller flere CDR-er) til det parentale antistoffet. Et antistofffragment bevarer minst noe av bindingsspesifisiteten til det parentale antistoffet. Vanligvis bevarer et antistofffragment minst 10 % av den parentale bindingsaktiviteten når aktiviteten uttrykkes på et molart grunnlag. Fortrinnsvis opprettholder et antistofffragment minst 20 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % eller 100 % eller mer av den parentale antistoffbindingsaffiniteten for målet. Eksempler på antistofffragmenter inkluderer, men er ikke begrenset til, Fab-, Fab'-, F(ab')₂- og Fv-fragmenter; dialegemer; lineære antistoffer; enkeltkjede-antistoffmolekyler, for eksempel, sc-Fv, unilegemer (teknologi fra Genmab); nanolegemer (teknologi fra Domantis); domeneantistoffer (teknologi fra Ablynx); og flerspesifikke antistoffer dannet fra antistofffragmenter. Konstruerte antistoffvarianter er gjennomgått i Holliger and Hudson (2005) Nat. Biotechnol. 23:1126-1136.

[0076] Et "Fab-fragment" består av en lett kjede, og C_H1 og variable områder av en tungkjede. Tungkjeden til et Fab-molekyl kan ikke danne en disulfidbinding med et annet tungkjedemolekyl.

[0077] Et "Fc"-område inneholder to tungkjedefragmenter som består av C_H1- og C_H2-domenene til et antistoff. De to tungkjedefragmentene holdes sammen av to eller flere disulfidbindinger og av hydrofobe interaksjoner av CH3-domenene.

[0078] Et "Fab'-fragment" inneholder en lett kjede og en del av en tungkjede som inneholder V_H-domenet og C_H1-domenet og også området mellom C_H1- og C_H2-domenene, slik at en interkjededisulfidbinding kan dannes mellom de to tungkjedene av to Fab'-fragmenter for å danne et F(ab')₂-molekyl.

[0079] Et "F(ab')₂-fragment" inneholder to lett kjeder og to tungkjeder inneholdende en del av det konstante området mellom C_H1- og C_H2-domenene, slik at en interkjededisulfidbinding dannes mellom de to tungkjedene. Et F(ab')₂-fragment er således sammensatt av to Fab'-fragmenter som holdes sammen ved hjelp av en

5 disulfidbinding mellom de to tungkjedene.

[0080] "Fv-området" omfatter de variable områdene fra både tung- og lett kjedene, men mangler de konstante områdene.

[0081] Et "enkeltkjede-Fv-antistoff" (eller "scFv-antistoff") refererer til antistofffragmenter som omfatter V_H- og V_L-domenene til et antistoff, hvori disse

10 domenene er til stede i en enkelt polypeptidkjede. Generelt omfatter Fv-polypeptidet ytterligere en polypeptidlinker mellom V_H- og V_L-domenene som gjør det mulig for scFv å danne den ønskede strukturen for antigenbinding. For en gjennomgang av scFv, se Pluckthun (1994) THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES, vol. 113, Rosenberg and Moore utg. Springer-Verlag, New York, s. 269-315. Se også

15 International patentsøknadspublikasjonsnr. WO 88/01649 og U.S. Pat. nr. 4 946 778 og 5 260 203.

[0082] Et "dialegame" er et lite antistofffragment med to antigenbindingssteder.

Fragmentene omfatter et tungkjedevariabelt domene (V_H) forbundet til et lett kjedevariabelt domene (V_L) i den samme polypeptidkjeden (V_H-V_L eller V_L-V_H).

20 Ved å anvende en linker som er for kort til å tillate paring mellom de to domenene på samme kjede tvinges domenene til å pare seg med de komplementære domenene i en annen kjede for å skape to antigenbindingssteder. Dialegame er beskrevet mer fullstendig i f.eks. EP 404,097; WO 93/11161; og Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448.

25 **[0083]** Et "domeneantistofffragment" er et immunologisk funksjonelt immunglobulinfragment inneholdende kun det variable området av en tungkjede eller det variable området av en lett kjede. I noen tilfeller er to eller flere V_H-områder kovalent bundet sammen med en peptidlinker for å skape et toverdig domeneantistofffragment. De to V_H-områdene til et toverdig domeneantistofffragmentet

30 kan være rettet mot de samme eller de forskjellige antigenene.

[0084] Et antistofffragment ifølge oppfinnelsen kan omfatte en tilstrekkelig del av det konstante området for å muliggjøre dimerisering (eller multimerisering) av tungkjedene som har redusert disulfidbindingsevne, for eksempel der minst ett av hengsels-

35 cysteinene som vanligvis er involvert i inter-tungkjededisulfidbinding er endret, som beskrevet i dette dokumentet. I en annen utførelsesform bevarer et antistofffragment, for eksempel et som omfatter Fc-området, minst én av de biologiske funksjonene som normalt forbindes med Fc-området når det er til stede i et intakt antistoff, slik som FcRn-binding, antistoffhalveringstidmodulering, ADCC-funksjon, og/eller

komplementbinding (for eksempel når antistoffet har en glykosyleringsprofil nødvendig for ADCC-funksjon eller komplementbinding).

[0085] Begrepet "kimært" antistoff refererer til antistoffer hvori en del av tung- og/eller lett kjeden er identisk med eller homolog til tilsvarende sekvenser i antistoffer avledet fra en bestemt art, eller som tilhører en bestemt antistoffklasse eller underklasse, mens resten av kjeden(e) er identiske med eller homologe til tilsvarende sekvenser i antistoffer avledet fra en annen art eller tilhørende en annen antistoffklasse eller underklasse, så vel som fragmenter av slike antistoffer, så lenge de fremviser den ønskede biologiske aktiviteten (se f.eks. US patent nr. 4 816 567 og Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855).

[0086] "Humaniserte" former av ikke-humane (for eksempel murine) antistoffer er kimære antistoffer som inneholder minialsekvens avledet fra ikke-humant immunglobulin. For det meste er humaniserte antistoffer humane immunglobuliner (mottakerantistoff) hvori restene fra et hypervariabelt område til mottakeren er erstattet med rester fra et hypervariabelt område fra en ikke-human art (donorantistoff) slik som mus, rotte, kanin eller ikke-humane primater som har den ønskede spesifisiteten, affiniteten og evnen. I noen tilfeller er Fv-rammeverkområde (FR)-restene til det humane immunglobulinet erstattet med tilsvarende ikke-humane rester. Videre kan humaniserte antistoffer omfatte rester som ikke finnes i mottakerantistoffet eller i donorantistoffet. Disse endringene er gjort for å ytterligere avgrense antistoff- ytelsen. Generelt vil det humaniserte antistoffet omfatte i det vesentlige alt av minst ett, og typisk to variable domener, hvorved alle eller i det vesentlige alle de hypervariable løkkene tilsvarer de til et ikke-humant immunglobulin, og alle eller i det vesentlig alle FR-områdene er de fra en human immunglobulinsekvens. Det humaniserte antistoffet vil også eventuelt omfatte minst en del av et immunglobulinkonstant område (Fc), typisk det fra et humant immunglobulin. For ytterligere detaljer se. Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); og Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992).

[0087] Begrepet "hypervariabelt område" som anvendt i dette dokumentet, refererer til aminosyrerestene til et antistoff som er ansvarlig for antigenbinding. Det hypervariable området omfatter aminosyrerester fra et "komplementaritetsbestemmende område" eller "CDR", definert av sekvensoppstillingen, for eksempel restene 24-34 (L1), 50-56 (L2) og 89-97 (L3) i det lett kjedevariable domenet og 31-35 (H1), 50-65 (H2) og 95-102 (H3) i det tungkjedevariable domenet; se Kabat et al., 1991, Sequences of proteins of Immunological Interest, 5. utg. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. og/eller restene fra en "hypervariabel løkke" (HVL), som definert strukturelt, for eksempel restene 26-32 (L1), 50-52 (L2) og 91-96 (L3) i det lett kjedevariable domenet og 26-32 (H1), 53-55 (H2) og 96-101 (H3) i det tungkjedevariable domenet; se Chothia and Leskl, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917.

"Rammeverk"- eller "FR"-rester er de variable domenerestene som er forskjellig fra de hypervariable områderestene som er definert i dette dokumentet.

[0088] Et "humant antistoff" er et antistoff som besitter en aminosyresekvens som tilsvarende til et antistoff fremstilt av et menneske og/eller er blitt laget ved hjelp av en hvilken som helst av metodene for å lage humane antistoffer som er beskrevet i dette dokumentet. Denne definisjonen utelukker spesifikt et humanisert antistoff som omfatter ikke-humane antigenbindingsrester.

[0089] Et "isolert" antistoff er et som har blitt identifisert og separert og/eller gjenvunnet fra en komponent fra dets naturlige miljø. Kontaminantkomponenter fra dets naturlige miljø er materialer som vil komme i konflikt med diagnostiske eller terapeutiske anvendelser av antistoffet, og kan omfatte enzymer, hormoner og andre proteinholdige eller ikke-proteinholdige løsninger. I noen utførelsesformer vil antistoffet være rensset (1) til mer enn 95 vekt-% av antistoffet som bestemt ved Lowry-fremgangsmåten, og mest foretrukket mer enn 99 vekt-%, (2) til en grad tilstrekkelig til å oppnå minst 15 rester N-terminale eller interne aminosyresekvenser ved anvendelse av en roterende koppsekvenator, eller (3) til homogenitet med SDS-PAGE under reduserende eller ikke-reduserende betingelser ved hjelp av Coomassie blått eller, fortrinnsvis sølvfarge. Isolert antistoff omfatter antistoffet *in situ* i rekombinante celler ettersom minst én komponent av antistoffets naturlige miljø ikke vil være til stede. Vanligvis vil imidlertid isolert antistoff fremstilles ved minst ett rensetrinn.

[0090] Et "isolert" nukleinsyremolekyl er et nukleinsyremolekyl som er identifisert og separert fra minst ett kontaminant nukleinsyremolekyl som det vanligvis er forbundet med i den naturlige kilden av antistoffnukleinsyren. Et isolert nukleinsyremolekyl er ulikt i form eller sammenheng når det er funnet i naturen. Isolerte nukleinsyremolekyler er derfor adskilt fra nukleinsyremolekylet slik de eksisterer i naturlige celler. Imidlertid innbefatter et isolert nukleinsyremolekyl et nukleinsyremolekyl som finnes i celler som vanligvis uttrykker antistoffet der, for eksempel, nukleinsyremolekylet er i en kromosomal plassering forskjellig fra den i naturlige celler.

[0091] Begrepet "monoklonalt antistoff" som anvendt i dette dokumentet refererer til et antistoff oppnådd fra en populasjon av vesentlig homogene antistoffer, dvs. at de individuelle antistoffene som omfatter populasjonen er identiske med unntak av mulige naturlig forekommende mutasjoner som kan være til stede i små mengder.

Monoklonale antistoffer er svært spesifikke, rettet mot en enkelt antigen set. Videre, i motsetning til konvensjonelle (polyklonale) antistoffpreparater som vanligvis inkluderer forskjellige antistoffer rettet mot forskjellige determinanter (epitoper), blir hvert monoklonalt antistoff rettet mot en enkelt determinant på antigenet. Det modifierende midlet "monoklonal" indikerer at karakteren til antistoffet som oppnås fra en i det vesentlige homogen populasjon av antistoffer, og ikke skal tolkes som å kreve produksjon av antistoffet ved noen bestemt fremgangsmåte. For eksempel kan de

monoklonale antistoffene som skal anvendes ifølge den foreliggende oppfinnelsen fremstilles ved hybridoma-fremgangsmåten først beskrevet av Kohler et al., 1975, Nature 256:495, eller kan fremstilles ved hjelp av rekombinante DNA-fremgangsmåter (se for eksempel U.S. pat. nr. 4 816 567). De "monoklonale antistoffene" kan også
 5 isoleres fra fagantistoffbiblioteker ved anvendelse av metodene beskrevet i Clackson et al., 1991, Nature 352:624-628 and Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222:581-597, for eksempel. De monoklonale antistoffene i dette dokumentet omfatter spesifikt "kimære" antistoffer.

[0092] Slik det anvendes i dette dokumentet inkluderer begrepet "immuncelle" celler
 10 som er av hematopoietisk opprinnelse, og som spiller en rolle i immunresponsen. Immunceller inkluderer lymfocytter, slik som B-celler og T-celler; naturlige dreperceller; myeloide celler, slik som monocytter, makrofager, eosinofiler, mastceller, basofiler og granulocytter.

[0093] Som anvendt i dette dokumentet refererer et "immunkonjugat" til et anti-PD-1-
 15 antistoff, eller et fragment derav, konjugert til en terapeutisk rest, slik som et bakterietoksin, et cytotoxisk medikament eller et radiotoksin. Giftige rester kan konjugeres til antistoffene ifølge oppfinnelsen ved hjelp av fremgangsmåtene som er tilgjengelige innen teknikken.

[0094] De følgende flertydighetskodene for nukleinsyrene er anvendt i dette
 20 dokumentet: R = A eller G; Y = C eller T; M = A eller C; K = G eller T; S = G eller C; og W = A eller T.

[0095] Som anvendt i dette dokumentet refererer en sekvens "variant" til en sekvens som avviker fra den beskrevne sekvensen i én eller flere aminosyrerester, men som bevarer den biologiske aktiviteten i det resulterende molekylet.

[0096] "Konservativt modifiserte varianter" eller "konservativ aminosyresubstitusjon"
 25 som refererer til substitusjoner av aminosyrer som er kjent for fagfolk innen teknikken og kan lages generelt uten å endre den biologiske aktiviteten til det resulterende molekylet. Fagfolk innen teknikken erkjenner at, generelt, enkle aminosyre-substitusjoner i ikke-essensielle områder til et polypeptid ikke vesentlig endrer biologisk aktivitet (se for eksempel Watson, et al., Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub. Co., s. 224 (4. utgave 1987)). Slike eksempler på
 30 erstatninger er fortrinnsvis gjort i overensstemmelse med de som er angitt nedenfor som følger:

Eksempler på konservative aminosyresubstitusjoner

Originalrester	Konservativ substitusjon
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln; His
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu, Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg, His
Met (M) Phe (F)	Leu; Ile; Tyr Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

[0097] Som anvendt i dette dokumentet refererer "% identitet" mellom to sekvenser til en funksjon av antallet identiske posisjoner delt mellom sekvensene (dvs. % homologi = $\frac{\text{\# identiske stillinger}}{\text{totalt \# av stillinger}} \times 100$), idet det tas hensyn til antall åpninger, og lengden av hver åpning, som må innføres for optimal oppstilling av de to sekvensene. Sammenligningen av sekvensene og bestemmelse av prosent identitet mellom to sekvenser kan oppnås ved hjelp av en matematisk algoritme. For eksempel kan den prosentvise identiteten mellom to aminosyresekvenser bestemmes ved anvendelse av algoritmen til E. Meyers og W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)) som har blitt inkorporert i ALIGN-programmet (versjon 2.0), ved anvendelse av en PAM120-vektresttabell, en åpningslengdestraff på 12 og en åpningsstraff på fire. I tillegg kan den prosentvise identiteten mellom to aminosyresekvenser bestemmes ved anvendelse av Needleman og Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970))-

algoritmen som har blitt inkorporert inn i GAP-programmet i GCG-programvarepakken (tilgjengelig på www.gcg.com), ved anvendelse av enten en Blossum 62-matrise eller en PAM250-matrise, og en åpningsvekt på 16, 14, 12, 10, 8, 6 eller 4 og en lengdevekt på 1, 2, 3, 4, 5 eller 6.

[0098] Som anvendt i dette dokumentet refererer begrepet "omtrent" til en verdi som ligger innenfor et akseptabelt feilområde for den spesielle verdien som bestemmes av en fagmann innen teknikken, som vil blant annet avhenge av hvordan verdien måles eller bestemmes, dvs. begrensningene i målingssystemet. For eksempel kan "omtrent" bety innenfor ett eller flere enn ett standardavvik per praksis innen teknikken.

Alternativt kan "omtrent" eller "omfattende i det vesentlige bety en rekkevidde på opptil 20 %. Videre, særlig med hensyn til biologiske systemer eller prosesser, kan begrepene bety opptil en størrelsesorden eller opptil 5 ganger av en verdi. Når bestemte verdier er gitt i søknaden og kravene, med mindre annet er angitt, skal betydningen av "omtrent" eller "i det vesentlige omfattende vurderes å være innenfor et akseptabelt feilområde for den bestemte verdien.

[0099] "Spesifikt" binder, når det refereres til en ligand/reseptor, antistoff/antigen eller et annet bindingspar, indikerer en bindingsreaksjon som er bestemmende for tilstedeværelsen av proteinet, *f.eks.* PD-1, i en heterogen populasjon av proteiner og/eller andre biologiske midler. Således, under angitte betingelser, binder en/et bestemt ligand/antigen til en/et bestemt reseptor/antistoff og binder seg ikke i en betydelig mengde til andre proteiner som er til stede i prøven.

[0100] "Administrering" og "behandling", når det gjelder for et dyr, menneske, forsøksperson, celle, vev, organ eller biologisk væske, refererer til kontakt med et eksogent farmasøytisk, terapeutisk, diagnostisk middel eller sammensetning til dyret, mennesket, individet, cellen, vevet, organet eller den biologiske væsken.

"Administrering" og "behandling" kan referere, *f.eks.* til terapeutiske, farmakokinetiske, diagnostiske, forsknings og eksperimentelle fremgangsmåter. Behandling av en celle omfatter å bringe reagensen i kontakt med cellen, så vel som å bringe en reagens i kontakt med en væske, der væsken er i kontakt med cellen.

"Administrering" og "behandling" betyr også *in vitro*- og *ex vivo*-behandlinger, *f.eks.* i en celle, med en reagens, diagnostisk, bindingssammensetning eller av en annen celle.

[0101] "Effektiv mengde" omfatter en mengde som er tilstrekkelig til å lindre eller forebygge et symptom eller tegn på den medisinske tilstanden. Effektiv mengde betyr også en mengde som er tilstrekkelig til å tillate eller lette diagnose. En effektiv mengde for et bestemt individ kan variere avhengig av faktorer, for eksempel tilstanden som blir behandlet, den generelle helsetilstanden til pasienten, fremgangsmåteveien og administrasjonsdosen og alvorlighetsgraden til bivirkningene. En effektiv mengde kan være den maksimale dosen eller doseringsprotokollen som unngår signifikante bivirkninger eller toksiske effekter. Effekten vil resultere i en forbedring av et

diagnostisk mål eller parameter med minst 5 %, vanligvis med minst 10 %, mer vanlig minst 20 %, mest vanlig minst 30 %, fortrinnsvis minst 40 %, mer foretrukket minst 50 %, mest foretrukket minst 60 %, ideelt minst 70 %, mer ideelt minst 80 %, og aller mest ideelt minst 90 %, der 100 % er definert som det diagnostiske parameteret vist av et normalt individ (se f.eks. Maynard, et al. (1996) A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, FL; Dent (2001) Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch Publ., London, UK).

Monoklonale antistoffer

[0102] Monoklonale antistoffer mot PD-1 kan fremstilles i henhold til kunnskap og ferdigheter innen teknikken ved å injisere testpersonene med PD-1-antigen og deretter isolere hybridomene som uttrykker antistoffer som har den ønskede sekvensen, eller funksjonelle egenskaper.

[0103] DNA som koder for de monoklonale antistoffene isoleres lett og sekvenseres ved å anvende konvensjonelle prosedyrer (for eksempel ved å anvende oligonukleotidprober som er i stand til å binde spesifikt til gener som koder for tung- og lettkjedene av de monoklonale antistoffene). Hybridomcellene tjener som en foretrukket kilde for slikt DNA. Når de er isolert kan DNA plasseres i ekspresjonsvektorer, som deretter transfekteres inn i vertsceller, slik som *E. coli*-celler, COS-celler fra ape, kinesiske hamsterovarieceller (CHO-celler) eller myelomceller som ikke på annen måte fremstiller immunoglobulinprotein, for å oppnå syntesen av monoklonale antistoffer i de rekombinante vertscellene. Rekombinant produksjon av antistoffer vil bli beskrevet i mer detalj nedenfor.

[0104] I en ytterligere utførelsesform kan antistoffer eller antistoffragmenter isoleres fra antistoffagbiblioteker generert ved anvendelse av metodene beskrevet i McCafferty et al., 1990, *Nature*, 348:552-554. Clackson et al., 1991, *Nature*, 352:624-628, og Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 som beskriver isolering av henholdsvis murine og humane antistoffer, ved anvendelse av fagbiblioteker. Senere publikasjoner beskriver produksjonen av høyaffinitets (nM) humane antistoffer ved hjelp av kjedestokking (Marks et al., 1992, *Bio/technology*, 10:779-783), så vel som kombinatorisk infeksjon og *in vivo*-rekombinasjon som en strategi for å konstruere svært store fagbiblioteker (Waterhouse et al., 1993, *Nuc. Acids. Res.* 21:2265-2266). Således er disse metodene gjennomførbare alternativer til tradisjonelle monoklonale antistoffhybridometoder for isolering av monoklonale antistoffer.

Kimære antistoffer

[0105] Antistoff-DNA-et kan også modifiseres, for eksempel ved å erstatte den kodende sekvensen for humane tung- og lettkjedekonstante domener i stedet for de homologe murine sekvensene (U.S. pat. nr. 4,816,567; Morrison, et al., 1984, *Proc.*

Natl Acad. Sci. USA, 81:6851), eller ved kovalent sammenføyning til den immunglobulin-kodende sekvensen som fullt ut eller delvis er del av den kodende sekvensen av ikke-immunglobulinmateriale (f.eks. proteindomener). Vanligvis er slikt ikke-immunglobulinmateriale substituert for de konstante domenene av et antistoff, eller er substituert for de variable domenene av et antigen-kombinerende sete til et antistoff for å skape et kimært bivalent antistoff som omfatter et antigen-kombinerende sete som har spesifisitet for et antigen og et annen antigen-kombinerende sete som har spesifisitet for et annet antigen.

Humaniserte og humane antistoffer

[0106] Et humanisert antistoff har én eller flere aminosyrerester fra en kilde som er ikke-human. De ikke-humane aminosyrerestene blir ofte referert til som "import"-rester, og er vanligvis tatt fra et "import"-variabelt domene. Humanisering kan utføres generelt ved å følge fremgangsmåten til Winter og medarbeidere (Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Riechmann et al., 1988, Nature, 332:323-327; Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534-1536), ved å erstatte gnager-CDR-ene eller CDR-sekvensene for de tilsvarende sekvensene til et humant antistoff. Følgelig er slike "humaniserte" antistoffer kimære antistoffer (U.S. patent nr. 4 816 567), hvori i det vesentlige mindre enn et intakt humant variabelt domene har blitt erstattet med den tilsvarende sekvensen fra en ikke-human art. I praksis er humaniserte antistoffer typisk humane antistoffer hvori noen CDR-rester og muligens noen FR-rester er substituert med rester fra analoge seter i ikke-humane, for eksempel gnagerantistoffer.

[0107] Valget av humane variable domener, både lette og tunge, som skal anvendes ved fremstilling av de humaniserte antistoffene er svært viktig for å redusere antigenisitet. Ifølge den såkalte "best-fit"-fremgangsmåten screenes sekvensen av det variable domenet av et gnagerantistoff mot hele biblioteket av kjente humane variable domenesekvenser. Den humane sekvensen som er nærmest til gnagerens aksepteres deretter som det humane rammeverket (FR) for det humaniserte antistoffet (Sims et al., 1987, J. Immunol. 151:2296; Chothia et al., 1987, J. Mol. Biol. 196:901). En annen fremgangsmåte anvender et bestemt rammeverk avledet fra konsensussekvensen til alle humane antistoffer av en bestemt undergruppe av lette eller tungkjeder. Det samme rammeverket kan anvendes for flere forskjellige humaniserte antistoffer (Carter et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285; Presta et al., 1993, J. Immunol. 151:2623).

[0108] Det er videre viktig at antistoffer humaniseres med høy retensjonsaffinitet for antigenet og andre fordelaktige biologiske egenskaper. For å oppnå dette målet, fremstilles, ifølge en foretrukket fremgangsmåte, humaniserte antistoffer ved hjelp av en prosess med analyse av opphavssekvensene og ulike konseptuelle humaniserte produkter ved hjelp av tre-dimensjonale modeller for parentale og humaniserte sekvenser. Tredimensjonale immunglobulinmodeller er allment tilgjengelig og er kjent

for fagfolk innen teknikken. Dataprogrammer er tilgjengelig som illustrerer og fremviser sannsynlige tredimensjonelle konformasjonsstrukturer av utvalgte kandidatimmunglobulinsekvenser. Inspeksjon av disse visningene tillater analyse av den sannsynlige rollen til restene med hensyn til funksjon av kandidatimmun-

5 globulinsekvensen, dvs. analysen av rester som påvirker evnen til kandidatimmunglobulinet til å binde til sitt antigen. På denne måten kan FR-rester velges og kombineres fra mottaker- og importsekvensene slik at den ønskede antistoffegenskapen, slik som økt affinitet for målantigenet(ene) oppnås. Generelt er CDR-rester direkte og mest vesentlig involvert i påvirkning av antigenbinding.

10 **[0109]** Humanisering av antistoffer er en grei proteinkonstruksjonsoppgave. Nesten alle murine antistoffer kan humaniseres ved hjelp av CDR-poding, noe som resulterer i retensjon av antigenbinding. Se Lo, Benny, K.C., utgiver, i *Antibody Engineering: Methods and Protocols*, volum 248, Humana Press, New Jersey, 2004.

[0110] Alternativt er det nå mulig å fremstille transgene dyr (for eksempel mus) som

15 er i stand til, ved immunisering, å fremstille et fullstendig repertoar av humane antistoffer i fravær av endogen immunglobulinproduksjon. For eksempel har det blitt beskrevet at den homozygote delesjonen av antistoff-tung-kjedesammenføyningsområde (JH)-genet i kimære og kimlinjemuterte mus resulterer i fullstendig inhibering av endogen antistoffproduksjon. Overføring av den humane kimlinjeimmunglobulin-

20 genoppstillingen i slike kimlinjemutante mus vil resultere i produksjon av humane antistoffer ved antigenutfordring. Se f.eks. Jakobovits et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551; Jakobovits et al, 1993, *Nature* 362:255-258; Bruggermann et al., 1993, *Year in Immunology* 7:33; og Duchosal et al., 1992, *Nature* 355:258. Humane antistoffer kan også avledes fra fagdisplaybiblioteker (Hoogenboom et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 227:381; Marks et al., *J. Mol. Biol.* 1991, 222:581-597; Vaughan et al.,

25 1996, *Nature Biotech* 14:309).

Antistoffrensing

[0111] Ved anvendelse av rekombinante metoder kan antistoffet fremstilles

30 intracellulært, i det periplasmiske rommet, eller direkte skilles ut i mediet. Dersom antistoffet fremstilles intracellulært, fjernes, som et første trinn, de partikkelformede restene, enten vertsceller eller lyserte fragmenter, for eksempel ved sentrifugering eller ultrafiltrering. Carter et al., 1992, *Bio/Technology* 10:163-167 beskriver en fremgangsmåte for isolering av antistoffer som skiller seg ut i det periplasmiske

35 rommet i *E. coli*. I korthet tines cellepasta i nærvær av natriumacetat (pH 3,5), EDTA, og fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF) i løpet av omtrent 30 min. Cellerestene kan fjernes ved sentrifugering. Når antistoffet er skilt ut i mediet, konsentreres først supernatantene fra slike ekspresjonssystemer ved å anvende et kommersielt tilgjengelig proteinkonsentrasjonsfilter, for eksempel en Amicon- eller Millipore Pellicon-

ultrafiltreringsenhet. En proteaseinhibitor, slik som PMSF, kan være inkludert i et hvilken som helst av de foregående trinnene for å inhibere proteolyse og antibiotika kan inkluderes for å forebygge veksten av tilkommende forurensninger.

[0112] Antistoffsammensetningen fremstilt fra cellene kan renses ved hjelp av, for eksempel, hydroksylapatitkromatografi, gelelektroforese, dialyse og affinitets-

kromatografi, med affinitetskromatografi som den foretrukne rensemetoden. Egnetheten til protein A som en affinitetsligand avhenger av arten og isotypen av et hvilket som helst immunglobulin Fc-område som er til stede i antistoffet. Protein A kan anvendes for å rense antistoffer som er basert på human gamma.1-, gamma.2- eller gamma.4-tungkjeder (Lindmark et al., 1983, J. Immunol. Meth. 62:1-13). Protein G anbefales for alle museisotyper og for human.gamma.3 (Guss et al., 1986, EMBO J 5:15671575). Matrisen som affinitetsliganden er festet til er som oftest agarose, men andre matriser er tilgjengelige. Mekanisk stabile matriser, slik som kontrollert poreglass eller poly(styrendiviny)benzen tillater raskere strømningsrater og kortere prosesseringstider enn det som kan oppnås med agarose. Når antistoffet omfatter et CH3-domene er Bakerbond ABXTM harpiksen (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ), nyttig for rensing. Andre metoder for proteinrensing som fraksjonering på en ionebytterkolonne, etanolutfelling, reversfase-HPLC, kromatografi på silika, kromatografi på heparin SEPHAROSETM-kromatografi på en anion- eller kationbytterharpiks (for eksempel en polyasparaginsyrekolonne), kromatofokusering, SDS-PAGE og ammoniumsulfatutfelling er også tilgjengelig avhengig av antistoffet som skal utvinnes.

[0113] I en utførelsesform kan glykoproteinet renses ved hjelp av adsorpsjon på et lectinsubstrat (for eksempel en lektinaffinitetskolonne) for å fjerne fukoseholdig glykoprotein fra fremstillingen og derved berike for fukosefritt glykoprotein.

Farmasøytiske formuleringer

[0114] Oppfinnelsen omfatter farmasøytiske formuleringer av et PD-1-antistoff eller antistofffragment ifølge oppfinnelsen. For å fremstille farmasøytiske eller sterile sammensetninger, blandes antistoffet eller fragmentet derav med en farmasøytisk akseptabel bærer eller eksipiens, se f.eks. Remington's Pharmaceutical Sciences and U.S. Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984). Formuleringer av terapeutiske og diagnostiske midler kan fremstilles ved å blande med fysiologisk akseptable bærere, eksipienser eller stabilisatorer i form av for eksempel lyofiliserte pulvere, oppslemminger, vandige løsninger eller suspensjoner (se f.eks. Hardman, et al. (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, NY; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, NY; Avis, et al. (utg.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel

Dekker, NY; Lieberman, et al. (utg.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (utg.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety; Marcel Dekker, Inc., New York, NY).

5 **[0115]** Toksisitet og terapeutisk effisiens av antistoffsammensetningene, administrert alene eller i kombinasjon med et immunosuppressivt middel kan bestemmes ved hjelp av standard farmasøytiske prosedyrer i cellekulturer eller forsøksdyr, *for eksempel* for å bestemme LD₅₀ (dosen som er dødelig for 50 % av befolkningen) og ED₅₀ (dosen som er terapeutisk effektiv i 50 % av populasjonen). Doseforholdet mellom toksiske og
10 terapeutiske effekter er den terapeutiske indeksen og det kan uttrykkes som forholdet mellom ID₅₀ og ED₅₀. Resultatene oppnådd fra disse cellekulturanalysene og dyrestudiene kan anvendes for å formulere en rekke doser for anvendelse i mennesker. Dosen av slike forbindelser ligger fortrinnsvis innenfor et område av sirkulerende konsentrasjoner som inkluderer ED₅₀ med liten eller ingen toksisitet. Doseringen kan
15 variere innen dette området avhengig av doseringsformen som anvendes og administrasjonsveien som anvendes.

[0116] Egnede administreringsveier inkluderer parenteral administrering, slik som intramuskulær, intravenøs eller subkutan administrering og oral administrering. Administrering av antistoff som anvendes i den farmasøytiske sammensetningen eller
20 for å praktisere fremgangsmåten ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan utføres på en rekke konvensjonelle måter, slik som oralt inntak, inhalering, topisk applikasjon eller kutan, subkutan, intraperitoneal, parenteral, intraarteriell eller intravenøs injeksjon. I én utførelsesform administreres bindingsforbindelsen ifølge oppfinnelsen intravenøst. I en annen utførelsesform administreres bindingsforbindelsen ifølge oppfinnelsen
25 subkutan.

[0117] Alternativt kan man administrere antistoffet på en lokal fremfor systemisk måte, for eksempel via injeksjon av antistoffet direkte til virkningsstedet, ofte i en depot- eller vedvarende frigjørende formulering. Videre kan man administrere antistoffet i et målrettet medikamentleveringssystem.

30 **[0118]** Veilednings ved utvelgelse av egnede doser av antistoffer, cytokiner og små molekyler er tilgjengelig (se f.eks. Wawrzynczak (1996) Antibody Therapy, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (utg.) (1991) Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, New York, NY; Bach (utg.) (1993) Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker,
35 New York, NY; Baert, et al. (2003) New Engl. J. Med. 348:601-608; Milgrom, et al. (1999) New Engl. J. Med. 341:1966-1973; Slamon, et al. (2001) New Engl. J. Med. 344:783-792; Beniaminovitz, et al. (2000) New Engl. J. Med. 342:613-619; Ghosh, et al. (2003) New Engl. J. Med 348:24-32; Lipsky, et al. (2000) New Engl. J. Med. 343:1594-1602).

[0119] Bestemmelse av den egnede dosen foretas av klinikeren, f.eks. ved å anvende parametere eller faktorer kjent eller forventet innen teknikken for å påvirke behandlingen eller forutsagt for å påvirke behandlingen. Vanligvis begynner dosen med en mengde som er noe mindre enn den optimale dosen og den økes med små trinnvise mengder deretter inntil den ønskede eller optimale effekten oppnås i forhold til alle negative bivirkninger. Viktige diagnostiske mål inkluderer de til symptomer på f.eks. inflammasjon eller nivå av fremstilte inflammatoriske cytokiner.

[0120] Antistoffer, antistoffragmenter og cytokiner kan gis ved kontinuerlig infusjon, eller ved doser i intervaller på for eksempel en dag, en uke, eller 1-7 ganger per uke. Dosene kan gis intravenøst, subkuttant, intraperitonealt, kutant, topisk, oralt, nasalt, rektalt, intramuskulært, intracerebralt, intraspinalt eller ved inhalering. En foretrukket doseprotokoll er en som involverer den maksimale dosen eller dosefrekvens som unngår vesentlige uønskede bivirkninger. En total ukentlig dose er vanligvis minst 0,05 µg/kg kroppsvekt, mer generelt minst 0,2 µg/kg, mest generelt minst 0,5 µg/kg, typisk minst 1 µg/kg, mer typisk minst 10 µg/kg, mest typisk minst 100 µg/kg, fortrinnsvis minst 0,2 mg/kg, mer foretrukket minst 1,0 mg/kg, mest foretrukket minst 2,0 mg/kg, optimalt minst 10 mg/kg, mer optimalt minst 25 mg/kg og mest optimalt minst 50 mg/kg (se f.eks. Yang, et al. (2003) New Engl. J. Med. 349:427-434; Herold, et al. (2002) New Engl. J. Med. 346:1692-1698; Liu, et al. (1999) J. Neurol. Neurosurg. Psych. 67:451-456; Portielji, et al. (20003) Cancer Immunol. Immunother. 52:133-144). Den ønskede dosen av et lite molekylterapeutisk middel, for eksempel en peptidetterligning, naturlig produkt eller organisk kjemikalium er omtrent det samme som for antistoffet eller polypeptidet på en mol/kg basis.

[0121] Som anvendt i dette dokumentet inkluderer "inhibere" eller "behandle" eller "behandling" en utsettelse av utvikling av symptomer forbundet med sykdom og/eller en reduksjon i alvorligheten av slike symptomer som vil eller ventes å utvikle seg med sykdommen. Begrepene inkluderer videre lindring av eksisterende symptomer, forebyggelse av ytterligere symptomer, og lindring eller forebyggelse av de underliggende årsakene til slike symptomer. Således angir begrepene at et gunstig resultat har blitt tillagt et vertebratindivid med en sykdom.

[0122] Slik det anvendes i dette dokumentet refererer begrepet "terapeutisk effektiv mengde" eller "effektiv mengde" til en mengde av et anti-PD-1-antistoff eller fragment derav, som, når den administreres alene eller i kombinasjon med et ytterligere terapeutisk middel til en celle, vev, eller individet, er effektivt til å forebygge eller lindre sykdommen eller tilstanden som skal behandles. En terapeutisk effektiv dose refererer ytterligere til mengden av forbindelsen som er tilstrekkelig til å resultere i lindring av symptomer, f. eks. behandling, helbredelse, forebyggelse eller lindring av den relevante medisinske tilstanden eller en økning i graden av behandling, helbredelse, forebyggelse eller lindring av slike forhold. Når anvendt på en individuell

aktiv bestanddel administrert alene, refererer en terapeutisk effektiv dose til denne bestanddelen alene. Når anvendt i en kombinasjon refererer en terapeutisk effektiv dose til kombinerte mengder av de aktive bestanddelene som resulterer i den terapeutiske effekten, enten administrert i kombinasjon, serielt eller samtidig. En effektiv mengde
 5 av terapeutisk middel vil redusere symptomene med typisk minst 10 %, vanligvis med minst 20 %, fortrinnsvis med minst omtrent 30 %, mer foretrukket med minst 40 %, og mest foretrukket med minst 50 %.

[0123] Fremgangsmåter for samtidig administrering eller behandling med et andre terapeutisk middel er godt kjent innen teknikken, se f.eks. Hardman, et al. (utg.) (2001)
 10 Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10. utg., McGraw-Hill, New York, NY; Poole and Peterson (utg.) (2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA; Chabner and Longo (utg.) (2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA.

[0124] Den farmasøytiske sammensetningen ifølge oppfinnelsen kan også inneholde andre midler, inkludert, men ikke begrenset til, en cytotoxisk, cytostatisk, anti-angiogent eller antimetabolittmiddel, et tumormålt middel, et immunstimulerende eller immunmodulerende middel, eller et antistoff konjugert til et cytotoxisk, cytostatisk eller på annen måte toksisk middel. Den farmasøytiske sammensetningen
 20 kan også anvendes med andre terapeutiske modaliteter, slik som kirurgi, kjemoterapi og stråling.

[0125] Typisk inkluderer veterinær-, eksperimentelle- eller forskningsindivider aper, hunder, katter, rotter, mus, kaniner, marsvin, hester og mennesker.

Terapeutiske anvendelser av antistoffet og antistofffragmenter ifølge oppfinnelsen

[0126] De antistoff- eller antigenbindende fragmentene ifølge oppfinnelsen, som spesifikt binder til humant PD-1, kan anvendes til å øke, forsterke, stimulere eller oppregulere en immunrespons. Antistoffene og antistofffragmentene ifølge oppfinnelsen er særlig egnet for behandling av individer som har en lidelse som kan behandles ved å
 30 øke T-celle-mediert immunrespons. Foretrukne individer omfatter humane pasienter som har behov for forsterkning av en immunrespons.

Kreft

[0127] De antistoff- eller antigenbindende fragmentene ifølge oppfinnelsen kan
 35 anvendes for å behandle kreft (dvs. til å inhibere veksten eller overlevelsen av tumorceller). Foretrukne kreftformer hvis vekst kan inhiberes ved hjelp av antistoffene ifølge oppfinnelsen inkluderer kreftformer som typisk er mottakelige for immunterapi, men også kreftformer som hittil ikke har blitt forbundet med immunterapi. Ikke-begrensede eksempler på foretrukne kreftformer for behandling inkluderer melanom

(f.eks. metastatisk ondartet melanom), nyrekreft (f.eks. klart cellekarsinom) (eng.: clear cell carcinoma), prostatakreft (f.eks. hormonrefraktær prostataadenokarsinom), pankreatisk adenokarsinom, brystkreft, tykktarmskreft, lungekreft (f.eks. ikke-småcellet lungekreft), spiserørskreft, skvamøs cellekarsinom i hode og nakke, leverkreft, eggstokkreft, livmorhalskreft, skjoldbruskkjertelkreft, glioblastom, gliom, leukemi, lymfom og andre neoplastiske maligniteter. I tillegg innbefatter oppfinnelsen refraktære eller tilbakevendende maligniteter hvis vekst kan inhiberes ved hjelp av antistoffene ifølge oppfinnelsen.

[0128] Antistoffet eller antistofffragmentene ifølge oppfinnelsen kan anvendes alene eller i kombinasjon med: andre anti-neoplastiske midler eller immunogene midler (f.eks. avkortede kreftceller, tumorantigener (inkludert rekombinante proteiner, peptider og karbohydratmolekyler), antigenpresenterende celler, slik som dendrittceller pulset med tumoravledet antigen eller nukleinsyrer, immunstimulerende cytokiner (for eksempel IL-2, IFN α 2, GM-CSF), og celler transfektert med gener som koder for immun-stimulerende cytokiner, som for eksempel, men ikke begrenset til, GM-CSF); standard kreftbehandlinger (f.eks. kjemoterapi, strålebehandling eller kirurgi); eller andre antistoffer (inkludert, men ikke begrenset til antistoffer mot VEGF, EGFR, HER2/neu, VEGF-reseptorer, andre vekstfaktorreseptorer, CD20, CD40, CTLA-4, OX-40, 4-1BB, og ICOS).

Smittsomme sykdommer

[0129] Antistoffet eller antistofffragmentene ifølge oppfinnelsen kan også anvendes for å forebygge eller behandle infeksjoner og infeksjonssykdom. Antistoffet eller antistofffragmentene kan anvendes alene, eller i kombinasjon med vaksiner, for å stimulere immunresponsen mot patogener, toksiner, og selv-antigener. Antistoffene eller antigenbindende fragment derav kan anvendes til å stimulere immunresponsen mot virus som er infeksiose overfor mennesker, slik som, men ikke begrenset til, humant immunsviktvirus, hepatittvirusklasse A, B og C, Eppstein Barr-virus, hyncytomegalovirus, humane papillomvirus, herpesvirus. Antistoffene eller antigenbindende fragment derav kan anvendes til å stimulere immunresponsen mot infeksjon med bakterielle eller soppasitter, og andre patogener.

Vaksinasjonsadjuvans

[0130] Antistoffet eller antistofffragmentene ifølge oppfinnelsen kan anvendes i forbindelse med andre rekombinante proteiner og/eller peptider (for eksempel tumorantigener eller kreftceller), for å øke en immunrespons mot disse proteinene (dvs. i en vaksinasjonsprotokoll).

[0131] For eksempel kan anti-PD-1-antistoffer og antistoffragmenter derav anvendes til å stimulere antigen-spesifikke immunresponser ved samtidig administrering av et anti-PD-1-antistoff med et antigen av interesse (f.eks. en vaksine). Følgelig, i et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å fremme en immunrespons mot et antigen hos et individ, omfattende administrering til individet: (i) antigenet; og (ii) et anti-PD-1-antistoff ifølge oppfinnelsen eller antigen-bindende del derav, slik som en immunrespons mot antigenet hos individet forsterkes. Antigenet kan for eksempel være et tumorantigen, et virusantigen, et bakterielt antigen eller et antigen fra et patogen. Ikke-begrensede eksempler på slike antigener inkluderer, men er ikke begrenset til, tumorantigener, eller antigener fra virus, bakterier eller andre patogener.

Th2-medierte sykdommer

[0132] Anti-PD-1-antistoffer og antistoffragmenter ifølge oppfinnelsen kan også anvendes for å behandle Th2-medierte sykdommer, slik som astma og allergi. Dette er basert på det funn at antistoffene ifølge oppfinnelsen kan bidra til å indusere en Th2-respons. Således kan antistoffene ifølge oppfinnelsen anvendes i Th2-medierte sykdommer for å generere en mer balansert immunrespons.

Ex-vivo-aktivering av T-celler

[0133] Antistoffene og antigenfragmentene ifølge oppfinnelsen kan også anvendes for *ex vivo*-aktivering og ekspansjon av antigenspesifikke T-celler og adoptiv overføring av disse cellene inn i mottakerne for å øke antigen-spesifikke T-celler mot tumor. Disse fremgangsmåtene kan også anvendes for å aktivere T-celleresponser mot infeksiose midler slik som CMV. *Ex vivo*-aktivering i nærværet av anti-PD-1-antistoffer kan forventes å øke frekvensen og aktiviteten til de adoptivt overførte T-cellene.

Andre kombinasjonsbehandlinger

[0134] Som tidligere beskrevet kan anti-PD-1-antistoffer ifølge oppfinnelsen administreres sammen med ett eller flere andre terapeutiske midler, for eksempel et cytotoksisk middel, et radiotoksisk middel eller et immunsuppressivt middel. Antistoffet kan kobles til midlet (som et immunkompleks) eller kan administreres separat fra midlet. I det sistnevnte tilfellet (separat administrering), kan antistoffet administreres før, etter eller samtidig med midlet eller kan administreres sammen med andre kjente terapier.

[0135] Antistoffer og antibindingsfragmenter ifølge oppfinnelsen kan også anvendes til å øke effektiviteten av donorinnpodede tumorspesifikke T-celler.

Ikke-terapeutiske anvendelser for antistoffet og antistofffragmentene ifølge oppfinnelsen

[0136] Et marked for anti-PD-1-antistoffer for ikke-terapeutiske anvendelser eksisterer allerede, som vist ved hjelp av det kommersielle salget av J116- og J105-monoklonale anti-HPD-1-antistoffer solgt av eBioscience i San Diego, California, USA, for anvendelse i strømningscytometrisk analyse, immunhistokjemi og *in vitro*-funksjonelle analyser; og mab1086, et monoklonalt anti-hPD-1-antistoff solgt av R&D Systems of Minneapolis, MN, USA, for anvendelse i strømningscytometri, Western blott og ELISA. Antistoffer ifølge oppfinnelsen kan anvendes for et hvilken som helst ikke-terapeutisk formål nå betjent av J116, J105 og/eller Mab1086.

[0137] Antistoffet ifølge oppfinnelsen kan anvendes som et affinitetsrenningsmiddel.

[0138] Antistoffet kan også være nyttig i diagnostiske analyser, for eksempel for å detektere ekspresjon av PD-1 i spesifikke celler, vev eller serum. For diagnostiske anvendelser, vil antistoffet typisk merkes (enten direkte eller indirekte) med en detekterbar rest. Mange merkinger er tilgjengelig som generelt kan grupperes i følgende kategorier: biotin, fluorkromer, radionukleotider, enzymer, jod og biosyntetiske merkinger.

[0139] Antistoffet ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan anvendes i enhver kjent analysefremgangsmåte, slik som konkurrerende bindingsanalyser, direkte og indirekte sandwich-analyser, og immunopresipiteringsanalyser. Zola, Monoclonal Antibodies. A Manual of Techniques, s.147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

[0140] Antistoffet kan også anvendes for *in vivo*-diagnostiske analyser. Generelt blir antistoffet merket med et radionuklid (slik som ¹¹¹In, ⁹⁹Tc, ¹²⁵I, ³²P, ³⁵S eller ¹⁸F) slik at antigenet, eller celler som uttrykker dette kan lokaliseres ved hjelp av immunoscintigrafi eller positronemisjontomografi.

Deponering av materialet

[0141] DNA-konstruksjoner som koder for de variable områdene av tung- og lett kjedene av humanisert antistoffer h409A11, h409A16 og h409A17 har blitt deponert med American Type Culture Collection Patent Depository (10801 University Blvd., Manassas, VA). Det plasmidholdige DNA-et som koder for tungkjeden av h409A-11, ble h409A-16 og h409A-17 ble deponert 9. juni 2008 og identifisert som 081469_SPD-H. Plasmidet inneholdende DNA-et som koder for lett kjeden av h409A11 ble deponert 9. juni 2008 og identifisert som 0801470_SPD-L-11. Plasmidet inneholdende DNA-et som koder for lett kjeden av h409A16 ble deponert 9. juni 2008 og identifisert som 0801471_SPD-L-16. Plasmidet inneholdende DNA-et som koder for lett kjeden av h409A17 ble deponert 9. juni 2008, og ble betegnet 0801472_SPD-L-17. Deponeringene ble gjort i henhold til bestemmelsene i Budapest-konvensjonen om

internasjonal anerkjennelse av deponeringen av mikroorganismer for hensikten med patentprosedyre og reguleringer derunder (Budapest-konvensjonen).

[0142] Den foregående skrevne spesifikasjonen er ansett å være tilstrekkelig til å muliggjøre en fagmann på området til å praktisere oppfinnelsen. Den foreliggende oppfinnelsen er ikke begrenset i omfang av den deponerte kulturen, ettersom den deponerte utførelsesformen bare er ment som en enkelt illustrering av et aspekt av oppfinnelsen og en hvilken som helst kultur som er funksjonelt ekvivalent er innenfor omfanget av oppfinnelsen. Deponeringen av materialet i dette dokumentet utgjør ikke en innrømmelse om at den skriftlige beskrivelsen i dette dokumentet er utilstrekkelig til å muliggjøre praktiseringen av et hvilken som helst aspekt ved oppfinnelsen, inkludert den beste modusen av denne, og skal heller ikke tolkes som begrensende for omfanget av kravene til den spesifikke illustrasjonen den representerer. Faktisk vil forskjellige modifikasjoner av oppfinnelsen i tillegg til de som er vist og beskrevet i dette dokumentet bli åpenbare for fagfolk innen teknikken fra den foregående beskrivelsen, og faller innenfor omfanget av de vedlagte kravene.

[0143] Oppfinnelsen vil bli mer fullstendig forstått ved henvisning til de følgende eksemplene. De bør imidlertid ikke anses som begrensende for omfanget av denne oppfinnelsen.

20 EKSEMPLER

Eksempel 1: Immunisering og utvelgelse av anti-PD-1-antistoffer

Immunisering av mus med hPD-1-cDNA

[0144] For å generere antistoffer mot den humane PD-1 ('hPD-1')-reseptoren, ble et cDNA som koder for den åpne leserammen til hPD-1-reseptoren oppnådd ved hjelp av PCR og subklonet inn i vektor pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Deretter ble CHO-K1-celler stabilt transfektert med hPD-1 og ekspresjon ble overvåket ved anvendelse av strømningscytometri. CHO-K1-kloner ble isolert som uttrykket humant PD-1 på sine membraner og kalt CHO-hPD1.

[0145] Mus ble immunisert ved genkanonimmunisering ved hjelp av en Helios-genkanon (BioRad) og DNA-belagte gullkuler (BioRad) etter produsentens instruksjoner. Kort fortalt ble 1 µm gullpartikler belagt med hPD-1 cDNA (klonet inn i pcDNA3.1) og, når angitt, kommersielle ekspresjonsvektorer for mus Flt3L og mus-GM-CSF i et 2:1:1-forhold (begge fra Aldevron, Fargo ND). Totalt 1 µg plasmid-DNA ble anvendt til å belegge 500 µg gullkuler.

[0146] Nærmere bestemt ble 7-8 uker gamle BALB/C-hunnmus immunisert i øret med genkanon som mottok 2, 3 eller 4 sykluser med et skudd i begge ørene (se tabell I). En mus mottok en endelig forsterker med 5×10^6 CHO-hPD1-celler i bukhulen. Omtrent en 1:1000-anti-hPD-1 titer ble detekterbar i museserum etter to DNA-immuniseringer

ved celle-ELISA ved anvendelse av CHO-hPD-1-versus CHO-K1-parentale cellene. Fire dager etter den endelige immuniseringen ble musene avlivet, og erytrocytt-utarmede miltcellepopulasjoner ble fremstilt som tidligere beskrevet (Steenbakkers et al., 1992, J. Immunol. Meth. 152:69-77; Steenbakkers et al., 1994, Mol. Biol. Rep. 19:125-134) og frosset ved -140 °C.

Tabell I. Immuniseringsplan anvendt for å indusere hPD-1-spesifikke antistofftitere i Balb/c-mus.

	Uke 1	Uke 4	Uke 7	Uke 8	Uke 9	Uke 10	Uke 11
Mus 730	2 skudd hPD1 pCDNA3.1	2 skudd hPD1 pCDNA3.1		2 skudd hPD1 pCDNA3.1	Innhøsting av miltceller		
Mus 731	2 skudd hPD1 pCDNA3.1	4 skudd hPD1 pCDNA3.1.			5 millioner CHO-HPD1	Innhøsting av miltceller	
Mus 738	2 skudd hPD1 pCDNA3.1 (mFlt3L + MGM-CSF)	2 skudd hPD1 pCDNA3.1 (mFlt3L + MGM-CSF)	2 skudd hPD1 pCDNA3.1 (mFlt3L + MGM- CSF)			2 skudd hPD1 pCDNA3.1 (mFlt3L + MGM-CSF)	Innhøsting av miltceller

Utvalg av anti-PD-1-antistoffproduserende B-celler

[0147] For å velge B-cellekloner som fremstilte anti-humane-PD-1-antistoffer ble 2×10^7 erytrocytt-utarmede miltceller fra hPD-1 DNA-immuniserte mus, dvs. mus 730, 731 og 738 (se tabell I) samlet for en B-cellekultur. Miltceller ble inkubert i DMEM/HAM's F12/10 % kalveserum (Hyclone, Logan, UT, USA) i en time ved 37 °C i en plastikkdyrkningsflaske for å fjerne monocytter. Ikke-adherente celler ble utsatt for en runde med negativ panning på CHO-K1-celler, etterfulgt av positiv panning på CHO-hPD1-celler. Begge utvalgsprosedyrene ble utført i en time ved 37 °C med konfluent dyrkede kulturer i 21 cm² petriskåler eller T25-dyrkningsflasker (cellekulturer ble bestrålt før anvendelse, til en total dose på 2000 RAD). Etter den positive panningen ble ubundne celler fjernet ved vasking ti ganger med PBS supplert med 0,132 % CaCl₂ · 2H₂O og 0,1 % MgCl₂ · 6H₂O. Til slutt ble bundne B-celler høstet ved trypsinbehandling.

[0148] Utvalgte B-celler ble dyrket og udødeliggjort som beskrevet i Steenbakkers et al., 1994, Mol. Biol. Rep. 19:125-134. Kort fortalt ble utvalgte B-celler blandet med 7,5 % (v/v) T-cellesupernatant og 50 000 bestrålte (2 500 RAD) EL-4 B5-nursingceller i et sluttvolum på 200 µl DMEM/HAM's F12/10% bovint kalveserum, i 96-brønners

flatbunnede vevskulturplater. På dag åtte ble supernatanter screenet for deres anti-hPD-1-reaktivitet ved hjelp av CHO-hPD-1-celle-ELISA ved anvendelse av følgende prosedyre. CHO-K1- og CHO-hPD1- I-celler ble dyrket til konfluens i flatbunnede 96-brønners plater i 50 µl DMEM/HAM'S F12, 10 % FBS. Deretter ble 50 µl

5 immunglobulinholdig supernatant tilsatt i 1 time ved 37 °C. Etter tre vaskinger med PBS-Tween, 100 µl (1:1000 fortynnet) ble geite-anti-musepepperrotperoksidase (HRP, Southern, Birmingham, AL, USA) i DMEM/HAM'S F12/10 % FBS tilsatt i 1 time ved 37 °C. Etter tre vaskinger med PBS-Tween ble immobiliserte immunglobuliner visualisert med UPO/TMB (Biomerieux, Boxtel, Nederland).

10 **[0149]** Fra denne B-cellekulturen ble 13 hPD-1 reaktive supernatanter identifisert og vist å inhibere Jurkat T-celleaktivering når de ble immobilisert på plastikk og B-cellekloner fra positive brønner ble udødeliggjort ved hjelp av mini-elektrofusjon der publiserte prosedyrer ble fulgt (Steenbakkens et al., 1992, J. Immunol. Meth. 152:69-77; Steenbakkens et al., 1994, Mol. Biol. Rep. 19:125-134). Nærmere bestemt ble

15 B-celler blandet med 10⁶ NS-1-myelomceller og serum ble fjernet ved vasking med DMEM/HAM's F12. Deretter ble cellene behandlet med pronase-løsning i tre minutter og deretter vasket med fusjonsmedium. Elektrofusjon ble utført i et 50 µl fusjonskammeret ved hjelp av et vekslende elektrisk felt i 30 s, 2 MHz, 400 V/cm etterfulgt av en kvadratisk høy feltpuls på 10 µs, 3 kV/cm og igjen et vekslende

20 elektrisk felt på 30 s, 2 MHz, 400 V/cm. Til slutt ble innholdet i fusjonskammeret overført til hybridomseleksjonsmedium og utplatet i en 96-brønners plate under begrensende fortynningsforhold. På dag 14 etter fusjonen ble kulturene undersøkt for hybridomvekst og screenet for tilstedeværelse av antistoffreaktivitet overfor hPD-1. Denne prosedyren ga fem forskjellige anti-HPD-1-hybridomer, kalt hPD-1.05A,

25 hPD-1.06B, hPD-1.08A, hPD-1.09A og hPD-1.13A, som ble subklonet ved begrensende fortynning for å ivareta deres integritet og ytterligere dyrket for å fremstille antistoff. Supernatantene oppnådd fra disse hybridomene inhiberte sterkt IL-2-produksjon fra Jurkat-E6.2.11-celler etter anti-CD3/anti-CD28-stimulering (se figur 1 og teksten nedenfor).

30 **[0150]** Jurkat E6.1-celler (American Type Culture Collection) ble subklonet ved begrensende fortynning ved anvendelse av standard fremgangsmåter og subkloner ble testet for økt evne for å fremstille IL-2 etter kryssbinding av CD3 og CD28. En høy IL-2-produserende subklon ble oppnådd og deretter kalt Jurkat E6.2.1 og anvendt i ytterligere analyser. Costar 3370 96-brønners analyseplater ble belagt over natten ved

35 4 °C med 5 µg/ml saueanti-mus-Ig (SAM). Overskudd av SAM ble fjernet og platene ble blokkert i 1 time ved romtemperatur med 200 µl/brønn PBS/10 % føtalt bovineserum. Etter tre vaskinger med PBS ble brønnene belagt med 100 µl/brønn anti-CD3 (OKT3; 10 eller 60 ng/ml) i 1 time ved 37 °C. Etter tre vaskinger med PBS ble 50 µl/brønn PBS/10 % føtalt bovineserum og 50 µl/brønn B-celle- eller

hybridomsupernatant tilsatt i 30 minutter ved 37 °C. Etter tre vaskinger med PBS, 120 µl/brønn av cellesuspensjon ble Jurkat E6.2.11-celler (2×10^5 celler/brønn + 0,5 µg/ml anti-CD28 (Sanquin # M1650, Central Laboratory for Bloodtransfusion, Amsterdam, NL) i DMEM/F12/10 % føtalt bovineserum) tilsatt. Etter en 6 timers

5 dyrking ble supernatant undersøkt for IL-2-produksjon ved hjelp av en standard sandwich-ELISA med anti-hIL-2 innfangning og biotinyleret deteksjon av antistoffparene fra Pharmingen og streptavidin-pepperrot-peroksidase (Southern Biotech) som en deteksjonsreagens. For å bestemme potensen til disse antistoffene sammenlignet med PD-L1 ble en liten gruppe av mAb-er fremstilt i en større skala. mAb-ene ble rensset

10 ved anvendelse av protein G-affinitetskromatografi (se eksempel 2). Rensede antistoffer, hPD-L1/Fc (rekombinant humant B7-H1/Fc-kimær R&D systems) eller mus IgG1 kappa (fra Sigma) som en negativ kontroll ble belagt ved identiske konsentrasjoner på plater med anti-CD3 som beskrevet ovenfor. Jurkat-E6.2.11-celler og anti-CD28 ble tilsatt i seks timer og T-celleaktivering ble målt ved hjelp av IL-2

15 fremstilt i supernatanten. To antistoffer (hPD1.08A og hPD1.09A) viste en 8-10 ganger mer potent inhibering sammenlignet med immobilisert PD-L1/Fc.

Eksempel 2: Rensing og karakterisering av murine anti-PD-1-antistoffer

Stabilisering av anti-PD-1-produserende hybridomer og rensing av anti-PD-1-antistoffer

[0151] Klonale cellepopulasjoner ble oppnådd for hver av hybridomene ved å utsette dem for flere runder (> 4) med begrenset fortynning. Stabile hybridomceller ble deretter dyrket i henhold til serumfrie betingelser ved hjelp av CELLline-bioreaktorer (Integra-Biosciences) i seks til åtte dager. Cellene ble utsådd i det indre kammeret i

25 serumfrie medier i en tetthet på 3×10^6 c/ml i 15 ml og utvidet til omtrent 4×10^7 c/ml i løpet av åtte dager. Det ytre kammeret ble fylt med mediet supplert med opptil 10 % BCS (bovint kalveserum). På dag seks til åtte ble den indre kammerkulturen høstet, vasket med 15 ml SF medium og re-inokulert med hybridomceller.

Bioreaktorsupernatant og vask ble kombinert og klargjort ved sentrifugering. Den resulterende supernatanten ble filtrert gjennom en 0,22 µM filtermembran. For antistoffrensing ble supernatantene fortynnet 1:1 i høysaltbindingsbuffer (1M glycin/2M NaCl, pH 9,0), og mAb-ene ble rensset ved hjelp av protein G HiTrap 5 ml kolonne (GE Healthcare). Etter vasking med PBS, ble bundede antistoffer eluert ved anvendelse av 0,1 M glysin pH = 2,7, etterfulgt av pH-nøytraliseringen ved

35 anvendelse av 3 M Tris. Til slutt ble bufferen byttet ut med PBS ved hjelp av PD-10 gelfiltreringskolonner (GE Healthcare), og antistoffene ble konsentrert ved hjelp av Ultra-15 sentrifugale konsentratorer (Amicon) og kvantifisert ved hjelp av spektrofotometri.

Kommersielle antistoffer

[0152] De følgende kommersielle antistoffene ble anvendt i forskjellige studier beskrevet i dette dokumentet: Anti-PD-1-antistoffklon J116 (#14-9989) ble ervervet fra eBioscience. Anti-CTLA-4 klon 14D3 (MTB 16-1529) ble ervervet fra eBioscience.
 5 Anti-PD-1-klon 192106 (mAb1086) ble ervervet fra R&D Systems (#mAb1086). Isotypekontrollantistoff mIgG1, kappa, klon MOPC21 ble ervervet fra Sigma (# M9269). Isotypekontroller mIgG1-kappa (mAb 16-4714) og IgG2a-kappa (mAb 16-4724) ble ervervet fra eBioscience.

10 Bindingsanalyser

[0153] Protein-baserte og celle-baserte ELISA ('CELISA')-forsøk ble anvendt for å bestemme tilsynelatende bindingsaffiniteter (rapportert som EC₅₀-verdier). I noen tilfeller ble bindingen av de anti-PD-1-antistoffene sammenlignet med den til kommersielle anti-PD-1-antistoffene J116 (eBiosciences) og Mab1086 (R&D systems).

15 [0154] Et protein ELISA ble anvendt for bestemmelse av den relative bindingen av antistoffer til human PD-1/Fc. hPD-1/Fc (R&D Systems) ble immobilisert på MaxiSorp 96-brønners plater (Nunc) ved inkubasjon i 4 timer ved romtemperatur (eller over natten ved 4 °C). Uspesifikke bindings seter ble blokkert ved inkubering med 3 % BSA i PBST i en time ved romtemperatur. Etter belegging ble platene vasket tre
 20 ganger med PBST. Fortynninger av anti-PD-1-antistoffer ble fremstilt i bindingsbuffer (PBS inneholdende 0,1 % Tween 20 og 0,3 % BSA) og inkubert med det immobiliserte fusjonsproteinet i en time ved 25 °C. Etter binding ble platene vasket tre ganger med PBST, inkubert i en time ved 25 °C med peroksidase-merket geite-anti-mus-IgG (Southern Biotech) fortynnet 1/4 000 i bindingsbuffer, vasket igjen, og utviklet ved
 25 anvendelse av TMB. ELISA-resultatene er vist i figur 2. Konsentrasjonen av en halv-maksimal binding ble rapportert som et mål på relativ bindingsaffinitet (tabell II).

[0154] Binding til CHO-hPD-1-celler ble også vurdert ved CELISA. For CELISA ble CHO-hPD-1-celler dyrket til 80 til 100 prosent konfluens i 50 µl kulturmedium (DMEM/HAM'S F12, 10 % FBS). Deretter ble det tilsatt 50 µl medium inneholdende
 30 forskjellige konsentrasjoner av rensset mAb i en time ved 37 °C. Etter tre vaskinger med PBS-Tween ble 100 µl geite-anti-mus-HRP (Southern Biotech kat.# 1030-05) (fortynnet 1:1000 i kulturmedium) tilsatt i en time ved 37 °C. Etter tre ytterligere vaskinger med PBS-Tween ble immobiliserte immunglobuliner visualisert med kolorimetrisk peroksidasesubstrat TMB (BD Biosciences). Absorbansøkning som følge
 35 av peroksidaseaktivitet (450 nm) ble målt i en mikroliterplateleser. Figur 2 viser doseresponsssammenhengen mellom konsentrasjon og binding av antistoffer hPD-1.08A og hPD-1.09A. Resultatene av protein- og cellebindingsstudiene er oppsummert i tabell II.

Kinetisk analyse ved hjelp av bio-lysinterferometri (ForteBio)

[0156] For ytterligere å karakterisere bindingsegenskapene til antistoffene ble hver profilert ved hjelp av bio-lysinterferometri på Octet-systemet (ForteBio, Menlo Park, CA) for å belyse bindingskinetikk og beregne likevektsbindingskonstanter. Denne analysen ble utført ved kobling av PD-1-Fc-fusjonsproteinet (R&D Systems) til amin-reaktive biosensorer (ForteBio) ved hjelp av standard aminkjemi. Anti-PD-1 mAb binding til og dissosiasjon fra biosensorene ble deretter observert ved forskjellige antistoffkonsentrasjoner. Nærmere bestemt ble amin-reaktive biosensorer pre-fuktet ved å dyppe dem i brønner inneholdende 0,1 M MES pH = 5,5 i 5 minutter.

Biosensorene ble deretter aktivert ved hjelp av en 0,1 M NHS/0,4 M EDC-blanding i 5 minutter. PD-1/Fc-fusjonsprotein (R&D systems) ble koblet ved å dyppe biosensorene i en oppløsning av 12 µg/ml PD-1/Fc i 0,1 M MES i 7,5 minutter. Biosensoroverflaten ble stoppet ved hjelp av en oppløsning av 1 M etanolamin i 5 minutter. Biosensorer ble ekvilibrert i PBS i 5 minutter. Assosiering av anti-PD-1-mAb-er ble observert ved å plassere biosensorene i brønner inneholdende forskjellige antistoffkonsentrasjoner (10-80 nM rensset antistoff > 99 % ved SDS-PAGE i PBS) og overvåking av interferometri i 30 minutter. Dissosiasjon ble målt etter overføring av biosensorene til PBS og overvåking av interferometrisignalet i 60 minutter. De observerte på- og av-verdiene (k_{obs} og k_d) ble tilpasset ved anvendelse av en 1:1-binding global fit-modell som omfatter alle konsentrasjonene som ble testet, og likevektsbindingskonstanten K_D ble beregnet. Resultatene fra de kinetiske studiene er presentert i tabell II, og figur 6 nedenfor.

Tabell II. Biokjemisk karakteriseringsoppsummering av murine anti-PD-1-mAb-er.

mAb	Bindingsanalyse		Ligandblokkering			Kinetisk analyse		
	ELISA	CELISA	FACS	FMAT		ForteBio Octet		
	EC50 (pM)	EC50 (pM)	IC50 (pM)	IC50 (pM)		k_{assos}	k_{dissos}	K_D
	hPD-1/Fc	hPD-1/CHO	PD-L1	PD-L1	PD-L2	1/s	1/MS	M
05A	338		15			1,62E +05	1,11E-04	6,90E-10
068	135		160			8,32E +04	9,74E-05	1,17E-09
08A	76	79	0,9	0,73	2,1	1,25E +06	3,03E-05	2,41E-11
09A	123	113	0,8	0,90	1,7	1,64E +06	3,60E-05	2,20E-11
13A	485		64			1,46E +05	4,16E-04	2,85E-09
J116	410	349	106	> 100	44	8,24E +04	1,50E-04	1,82E-09
mAb1086	59	> 10 000	> 10000	> 10 000	> 10 000	2,45E +05	1,68E-04	6,86E-10

[0157] To av de monoklonale antistoffene hPD-1.08A og hPD-1.09A, bandt betydelig tettere enn noe annet mAb testet ved hjelp av denne analysen, med K_D bestemt til å være 24 og 22 pM for henholdsvis hPD-1.08A og hPD-1.09A. Sammenlignet med de andre anti-PD-1-antistoffer testet, skyldtes den økte affinitet en langsommere off-rate og en betydelig raskere on-rate målt for hPD-1.08A og hPD-1.09A.

Ligandblokkering

[0158] Blokkering av ligandbinding studert ved hjelp av strømningscytometri. CHO-celler som uttrykte human PD-1 ble skilt fra adherente dyrkningsflasker og blandet med forskjellige konsentrasjoner av anti-PD-1-antistoff og en konstant konsentrasjon (600 ng/ml) av umerket hPD-L1/Fc eller rekombinant humant PD-L2/Fc-fusjonsprotein (begge fra R&D Systems) i en 96-brønners plate. Blandingen ble bragt til likevekt i 30 minutter på is, vasket tre ganger med FACS-buffer (PBS inneholdende 1% BCS og 0,1 % natriumazid) og inkubert med FITC-merket geite-anti-humant Fc i ytterligere 15 minutter på is. Cellene ble igjen vasket med FACS-buffer og analysert ved strømningscytometri. Data ble analysert med Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) ved anvendelse av ikke-lineær regresjon, og IC_{50} -verdier ble beregnet.

[0159] Beregnede IC_{50} -data er oppsummert i tabell II. Antistoffene 05A, 06B og 13A ble bestemt å vise en K_D mellom 600 pM og 3 nM for binding av hPD-1. Til tross for sterk binding viste hver av disse antistoffene $IC_{50} > 10$ nM for blokkeringen av hPD-L1-binding til hPD-1. Det kommersielt tilgjengelige anti-PD-1-antistoffet J116 (eBiosciences) var svakt sammenlignet med PD-L1 med hensyn til binding og hadde en beregnet IC_{50} utenfor området for dette forsøket (> 100 nM). Kontrollmus IgG1 konkurrerer ikke med PD-L1 med hensyn til PD-1 binding. I motsetning inhiberte høyaffinitetsantistoffene hPD-1.08A og hPD-1.09A PD-L1-binding med IC_{50} -verdier under 1 nM, mens PD-L2-binding ble blokkert med IC_{50} -verdier rundt 1-2 nM (tabell II) PD-L2 ble rapportert tidligere å binde til PD-1 med en to til seks ganger høyere affinitet enn PD-L1 (Youngnak P. et al., 2003, Biochem. Biophys. Res. Commun. 307, 672-677).

[0160] Ligandblokkering ble bekreftet ved anvendelse av en homogen konkurranse-analyse og deteksjon ved hjelp av fluorometrisk mikrovolumanalyseteknologi (FMAT). Kort sagt ble CHO.hPD-1 dissosiert fra adherente kulturflasker, blandet med varierende konsentrasjoner av anti-PD-1-antistoff og en konstant konsentrasjon (600 ng/ml) av hPD-L1/Fc eller hPD-L2/Fc-fusjonsprotein (begge fra R&D Systems), merket med et fluorescerende fargestoff (AlexaFluor 647, Invitrogen) i en 96-brønners plate. Blandingen ble bragt til likevekt i 90 minutter ved 37 °C og avlest ved hjelp av en AB8200 Cellular Detection Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Data ble analysert med Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) ved anvendelse av ikke-lineær regresjon og IC_{50} -verdier ble beregnet. Figur 3 viser resultatene av et dose-

responsforsøk som indikerte at størrelsen av ligandblokkering ble bestemt ved antistoffkonsentrasjon. Binding av både hPD-L1/Fc og hPD-L2/Fc til CHO-hPD-1-celler kan inhiberes fullstendig ved hPD-1.08A, hPD-1.09A og (i mindre utstrekning) med 1116 på en dose-avhengig måte.

- 5 Beregnede IC₅₀-data er oppsummert i tabell II. Bekreftelse av resultatene oppnådd ved anvendelse av strømningscytometri, høyaffinitetsantistoffene hPD-1.08A og hPD-1.09A inhiberte PD-L1-binding med IC₅₀-verdier under 1 nM.

Artskryssreaktivitet

- 10 **[0161]** For å vurdere arts kryssreaktiviteten til antistoffene, ble muse- og cynomolgusmakake-PD-1-reseptorene klonet ved hjelp av PCR, og stabilt transfekterte CHO-K1-celler ble generert. Antistoffene ble testet for binding til cynomolgus-reseptoren ved hjelp av en CELISA. Kommersielt antistoff J116, hPD-1.08A og hPD-1.09A ble funnet å binde med lik affinitet til human og cynomolgus PD-1 og blokkere
15 binding av hPD-L1/Fc og hPD-L2/Fc til cynomolgus PD-1 med tilsvarende effisiens sammenlignet med human PD-1. Dette er ikke overraskende ettersom aminosyrasekvensen til den ekstracellulære delen til cynomolgus-PD-1 ble funnet å være 97 % identisk med den til human PD-1. I tillegg til PD-1 fra cynomolgusmakaker blokkerte hPD-1.08A og hPD-1.09A også funksjonelt PD-1 fra rhesus-makaker i SEB-stimulerte
20 blodcellekulturer beskrevet i eksempel 3. Ingen av antistoffene testet bandt muse PD-1 med påviselig affinitet i noen av de anvendte analysene.

- [0162]** Oppsummert ble fem anti-PD-1-monoklonale antistoffer rensset og karakterisert, som ble isolert basert på deres evne til å modulere Jurkat-funksjon. Disse antistoffene bandt tett til PD-1 (med dissosiasjonskonstanter i området 20 pM til 3 nM),
25 og var i stand til å blokkere interaksjonen med både PD-L1 og PD-L2 med varierende IC₅₀-verdier. Fire av disse anti-hPD-1-mAb-ene var betydelig bedre enn de beste tilgjengelige kommersielle anti-PD-1-mAb-ene. Hver av antistoffene, når de tilsettes i oppløsning, virket som reseptorantagonister, som til slutt fremmet T-celleresponser (se eksempel 3).

30

Eksempel 3: Funksjonell profilering av anti-PD-1-antistoffer

Human T-cellerespons mot SEB forsterkes ved hjelp av hPD-1.08A og hPD-1.09A

- [0163]** Anti-PD-1-antistoffene ble testet for deres evne til å forsterke T-celleaktivitet *in vitro* ved hjelp av blodceller fra friske frivillige. En analyse anvendt for å
35 karakterisere den funksjonelle konsekvensen av blokkering av human PD-1-reseptor ved anvendelse av Staphylococcus enterotoksin B (SEB) for å engasjere og aktivere alle T-celler som uttrykker Vβ3- og Vβ8 T-cellereseptorkjeden. Friskt human donorblod ble oppnådd og fortynnet 1:10 i dyrkningsmediet. Fortynnet helblod ble belagt (150 µl per brønn) i 96-brønners rund-bunnede plater og preinkubert i 30-60 min

med Mab og varierende konsentrasjoner. SEB ble så tilsatt i forskjellige konsentrasjoner varierende fra 10 ng/ml til 10 µg/ml. Supernatantene ble samlet etter 2 til 4 dagers dyrkning og mengden av IL-2-produksjon ble kvantifisert ved anvendelse av ELISA (beskrevet i eksempel 1) eller ved anvendelse av standard

5 multipleksteknologi (Luminex plattform-Biosource-cytokindeteksjonssett). Titrering av SEB fra 100 ng/ml opptil 10 µg/ml stimulerte signifikant IL-2-produksjon ved hjelp av helblodceller. Vanligvis, avhengig av donoren, ble 100-1000 µg/ml IL-2 påvist ved ELISA 2-4 dager etter stimulering med 1 µg/ml SEB. Tilsetning av hPD-1.08A og hPD-1.09A forsterket IL-2-produksjon over kontrollmus IgG1, i gjennomsnitt 2 til 4

10 ganger ved den høyeste antistoffkonsentrasjonen testet (25 µg/ml). Stimuleringsindeksen ble vurdert i gjennomsnitt (eng.: was averaged) for forsøkene utført med et sett uavhengige friske frivillige (figur 4). Disse forsøkene viste at både hPD-1.08A og hPD-1.09A forsterket IL-2-produksjon etter SEB-stimulering av fortynnede helblodceller. Både PD-1 og PD-L1 (men ikke PD-L2)-ekspresjonsnivåer ble

15 oppregulert (kvantifisert ved strømningscytometri) over tid etter SEB-stimulering av helblodceller. Anti-PD-L1-monoklonalt antistoff (klon MIH5, Ebiosciences #16-5982) og anti-CTLA-4 (klon 14D3, eBiosciences # 16-1529) induserte også en økning i IL-2 produksjonen under lignende forhold, et funn som ytterligere validerte anvendelsen av SEB-stimuleringsanalysen for å kvantifisere T-celleaktivitet etter manipulering av

20 kostimulerende reaksjonsveier (figur 4). Den forsterkede IL-2-produksjonen av anti-PD-1-antistoffer ble funnet å være doseavhengige. I tillegg til IL-2 ble, ved hjelp av Luminex-teknologi, nivåer av TNFα, IL-17, IL-7, IL-6 og IFNγ også funnet å være signifikant modulert ved hjelp av hPD-1.08A og hPD-1.09A. Resultatene av disse forsøkene indikerte at hPD-1.08A og hPD-1.09 kan anvendes til å

25 stimulere humane T-celleresponser.

[0164] Anti-PD-1-antistoff, hPD-1.09A, ble ytterligere testet for dets evne til å forsterke T-celleaktivitet *in vitro* ved anvendelse av blodceller avledet fra kreftpasienter. Blod fra pasienter med fremskreden melanom (1 pasient) eller prostatakreft (3 pasienter) ble testet etter den ovennevnte protokollen. Resultatene av

30 cytokinkvantifisering er presentert i tabell III som ganger økning av cytokin fremstilt når cellene ble stimulert i nærvær av 25 µg/ml HPD-1.09A sammenlignet med SEB-stimulering i fravær av antistoff. Oppsummert ble hPD-1.09A funnet å øke SEB-indusert IL-2 produksjon 2 til 3,5 ganger for hver av de 4 pasientene. Samtidig ble produksjonen av TNFα, IL-17 og IFNγ forsterket, og produksjonen av IL-5 og IL-13

35 ble redusert. Disse forsøkene indikerte at hPD-1.09A har evnen til å stimulere T-celleresponser hos kreftpasienter. Videre foreslo disse forsøkene en preferanse mot Th 1-responser.

Tabell III. SEB-stimulert cytokinproduksjon i nærvær av hPD-1.09A

		Ganger endring i cytokint nivå						
Pasient	Krefttype	EL-2	TNF α	IFN γ	IL-5	IL-6	IL-13	E-17
A	prostata	3,4	2,0	1,9	0,7	2,1	0,8	1,8
B	prostata	2,1	1,5	1,2	0,4	2,2	0,6	2,6
C	prostata	2,0	2,4	2	0,9	2,4	1,1	2,4
D	melanom	2,0	1,9	1,5	0,4	1,9	0,5	2,0

Human tilbakekalling T-cellerespons mot TT-utfordringen forsterkes av hPD-1.08A og hPD-1.09A

[0165] En annen analyse anvendt for å profilere den funksjonelle virkningen av anti-humane pD-1-antistoffer som blokkerer reseptorinteraksjon med sine naturlige ligander anvendte tetanustoksoid (TT)-antigen for å stimulere pre-eksisterende minne T-celler i friskt donorblod. For dette formålet ble ferskt fremstilt PBMC (2×10^5 celler) utsådd i 96-brønners rund-bunnede plater i fullstendig RPMI 1640-medium (inneholdende 5 % varme-inaktivert humant serum), pre-inkubert med testantistoffer i varierende konsentrasjoner og stimulert med TT (Astarte Biologics) ved en konsentrasjon på 100 ng/ml. Cellene ble inkubert i 3-7 dager ved 37 °C, 5 % CO₂ hvorefter supernatantene ble høstet. Cytokinkonsentrasjonene ble bestemt ved ELISA (IL-2 og IFN- γ ELISA-deteksjonsantistoffparsett fra eBioscience) og multiplex-analyse (Luminex plattform-Biosource cytokindeteksjonsett). Blokkering av PD-1 fremmet proliferasjon og fremmet betydelig cytokinproduksjon (figur 5) omfattende IFN γ og IL-2 sammenlignet med antigen alene. Luminex-analyse viste at produksjonen av cytokinene GM-CSF, RANTES og IL-6 økes ved PD-1-blokkering.

Farging av human PD-1 på formalinfikserte parafin-innstøpte humane celler

[0166] Ettersom SEB-stimulerte blodceller viste økt ekspresjon av PD-1 ved hjelp av strømningscytometri ble disse cellene anvendt til å avgjøre om hPD-1.09A kunne påvise PD-1 i formalin-fiksert parafinomsluttet vev for histologisk anvendelse.

Humane donorperifere blodmononukleære celler ble stimulert med 0,1 μ g/ml SEB i 3 dager, hvorefter de ikke-adherente cellene (hovedsakelig lymfocytter) ble oppsamlet, vasket to ganger med PBS og sentrifugert (1100 rpm i 5 min.). Cellene ble fiksert i 10 minutter i 4 % formaldehyd, cellepelletten innstøpt i agarose, dehydrert i etanol (deretter 70 %, 80 %, 96 % og 100 %) og xylen, og deretter innstøpt i parafin. Snitt (4 μ m) ble lagt på glassplater og hydrert (xylen, etanol 100 %, 96 %, 80 %, 70 %, PBS-buffer), hvorefter antigengjenfinning i oppvarmet citratbuffer ble utført ved anvendelse av standardmetoder.

Peroksidaseaktivitet ble blokkert ved anvendelse av 100 % metanol inkludert 0,3 % H₂O₂ og platene ble rensset i vann og PBS, 0,1% Tween. Snitt ble inkubert med hPD-1.09A i 1,5 timer ved romtemperatur, rensset med PBS-Tween, etterfulgt av standard deteksjonsmetoder. Plater (eng. slides) ble motfarget (eng.: counterstained) med hematoksylin i 30 sekunder ved romtemperatur, dehydrert med xylene, og montert for mikroskopiundersøkelse. Disse forsøkene viste at lymfocytter avledet fra SEB stimulerte PBMC-kulturene farget sterkt (sammenlignet med isotypekontrollen) med HPD-1.09A, i motsetning til ustimulerte PBMC-kulturer, noe som indikerer at hPD-1.09A er nyttig som en diagnostisk reagens.

Eksempel 4: Anti-PD-1-antistoffsekvenser og etterfølgende humanisering Kloning av immunglobulin cDNA-ene

[0167] Ved hjelp av degenererte primer-PCR-baserte fremgangsmåter ble DNA-sekvensene som koder for de variable områdene av museantistoffer uttrykt av hybridomene hPD-1.08A og hPD-1.09A bestemt. Kort fortalt ble genspesifikke cDNA-er for tung- og lettkjedene generert ved hjelp av iScript Select cDNA-syntesettet (Biorad# 1708896) i henhold til produsentens instruksjoner. PCR-primerne som ble anvendt var basert på Ig-primersettet (Novagen # 69831-3). Degenererte PCR-reaksjoner ble utført med Taq-polymerase ifølge Novagen-primersettprotokollen. PCR-produktene ble analysert ved agarosegelelektroforese. Den forventede amplikonstørrelsen for både det tung- og lettkjedevariable området er omtrent 500 basepar. To µl Taq-amplifisert PCR-produkt fra reaksjonene som ga et egnet bånd ble klonet inn i pCR4 TOPO-vektoren (Invitrogen #K4595-40) og transformert inn i DH5-alfa *E. coli* som anvist av produsenten. Kloner ble screenet ved koloni-PCR ved å anvende universal M13 forover og reverse primere og 2-3 kloner fra hver reaksjon ble valgt ut for DNA-sekvenseringsanalyse.

[0168] Kloner ble sekvensert i begge retninger ved hjelp av universelle primere M13 fremover, M13 reverst, T3 og T7. Resultatene av hver sekvenseringsreaksjon for hver klon ble analysert ved hjelp av Seqman. Konsensussekvenser ble undersøkt mot databaser fra kimlinje og rearrangerte Ig-variable områdesekvenser ved hjelp av NCBI Ig-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/ligblast/>). Blast-resultater for hPD-1.08A identifiserte en produktivt (i-ramme) omorganisert tungkjede uten stoppkodoner introdusert. Lettkjedekloner ble identifisert som kodet for to forskjellige sekvenser; den ene er en produktivt (i-ramme) omorganisert lettkjede uten introduserte stoppkodoner, den andre er en ikke-produktivt rearrangert sekvens inneholdende en ramme-skift som fører til et stoppkodon i FR4-området. Det ikke-produktive sterile transkriptet som ble observert stammer sannsynligvis fra myelomfusjonspartneren (Carroll W. L. et al., Mol. Immunol. 25:991-995 (1988) og ble utelukket.

[0169] Blast-resultater for hPD-1.09A identifiserte produktivt (i-ramme) omorganiserte tung- og lettkjeder uten introduserte stoppkodoner. Aminosyresekvensene til de uttrykte proteinene ble bekreftet ved massespektrometri. Sekvensene er vist i den vedlagte sekvenslisten, og oppført i tabell IV.

5

Tabell IV: Sekvens-ID-nummeret for murine anti-humane PD-1-antistoffer ifølge oppfinnelsen

SEQ ID NO:	Beskrivelse
1	hPD-1.08A-tungkjedevariabelt område (DNA)
2	hPD-1.08A-lettkjedevariabelt område (DNA)
3	hPD-1.09A-tungkjedevariabelt område (DNA)
4	hPD-1.09A-lettkjedevariabelt område (DNA)
5	hPD-1.08A-tungkjedevariabelt område (AA)
6	hPD-1.08A-lettkjedevariabelt område (AA)
7	hPD-1.09A-tungkjedevariabelt område (AA)
8	hPD-1.09A-lettkjedevariabelt område (AA)
9	hPD-1.08A-lettkjede CDR1 (AA)
10	hPD-1.08A-lettkjede CDR2 (AA)
11	hPD-1.08A-lettkjede CDR3 (AA)
12	hPD-1.08A-tungkjede CDR1 (AA)
13	hPD-1.08A-tungkjede CDR2 (AA)
14	hPD-1.08A-tungkjede CDR3 (AA)
15	hPD-1.09A-lettkjede CDR1 (AA)
16	hPD-1.09A-lettkjede CDR2 (AA)
17	hPD-1.09A-lettkjede CDR3 (AA)
18	hPD-1.09A-tungkjede CDR1 (AA)
19	hPD-1.09A-tungkjede CDR2 (AA)
20	hPD-1.09A-tungkjede CDR3 (AA)
21	109A-H-tungkjedevariabelt område (DNA)
22	Kodonoptimalisert 109A-H-tungkjedevariabelt område (DNA)
23	Kodonoptimalisert 409A-H-tungkjedefullengde (DNA)
24	K09A-L-11-lettkjedevariabelt område (DNA)
25	K09A-L-16-lettkjedevariabelt område (DNA)

SEQ ID NO:	Beskrivelse
26	K09A-L-17-lettkjedevariabelt område (DNA)
27	Kodonoptimalisert K09A-L-11-lettkjedevariabelt område (DNA)
28	Kodonoptimalisert K09A-L-16-lettkjedevariabelt område (DNA)
29	Kodonoptimalisert K09A-L-17-lettkjedevariabelt område (DNA)
30	109A-H-tungkjedevariabelt område (AA)
31	409A-H-tungkjedefullengde (AA)
32	K09A-L-11-lettkjedefullengde (AA)
33	K09A-L-16-lettkjedefullengde (AA)
34	K09A-L-17-lettkjedefullengde (AA)
35	109A-H-tungkjedefullengde (AA)
36	K09A-L-11-lettkjedefullengde (AA)
37	K09A-L-16-lettkjedefullengde (AA)
38	K09A-L-17-lettkjedefullengde (AA)

[0170] CDR og rammeverkområdene er kommentert i henhold til. Kabat E. A., et al., 1991, Sequences of proteins of Immunological interest, i: NIH publikasjon nr. 91-3242, US Department of Health and Human Services, Bethesda, MD.

5

Konstruksjon og ekspresjon for kimært c109A-antistoff

[0171] Kimære lett- og tungkjeder ble konstruert ved å knytte de PCR-klonede cDNA-ene fra mus hPD-1.09A V_L- og V_H-områder til henholdsvis human kappa og IgG1-konstante områder. 5'- og 3'-endene av muse-cDNA-sekvensene ble modifisert ved anvendelse av PCR-primerne utformet for å tilsettes en egnet ledersekvens til hver kjede, og restriksjons seter for å muliggjøre kloning inn i eksisterende rekombinante antistoffekspresjonsvektorer.

10

[0172] COS-7 celler (0,7 ml ved 10⁷/ml) ble elektroporert med 10 µg av hver av de kimære tung- og lettkjedeekspresjonsplasmidene. Disse cellene ble deretter dyrket i 8 ml vekstmedium i tre dager. En sandwich-ELISA ble anvendt for å måle antistoffkonsentrasjonene i supernatantene fra COS-7-transfeksjonen. Dette viste at de transfekterte COS-7-cellene skilte ut omtrent 295 ng/ml av det kimære IgG₁-kappa-antistoffet i tre separate transfeksjoner.

15

[0173] Binding av det kimære antistoffet fremstilt fra de transfekterte COS-7-cellene ble målt ved anvendelse av PD-1-bindings-ELISA og CELISA (se eksempel 2), og ble vist å binde til PD-1 med sammenlignbar affinitet til den til det murine antistoffet.

20

Humanisert antistoffoppsett

[0174] hPD-1.09A-antistoffet ble humanisert ved hjelp av MRCT (Cambridge UK) ved hjelp av CDR-podingsteknologi (se f.eks. US-patent nr. 5 225 539). Kort fortalt ble de variable kjedesequensene til det murine antistoffet hPD-1.09A sammenlignet med de som var tilgjengelige i Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB)-proteindatabanken. En homologimodell til hPD-1.09A ble generert basert på de nærmeste VH- og VK-strukturene. Humane sekvenser med høyest identitet til hPD-1.09A ble identifisert og analysert. (Foote and Winter, J. Mol. Biol. 224:487-499 (1992); Morea V. et al., Methods 20:267-279 (2000); Chothia C. et al., J. Mol. Biol. 186:651-663 (1985).) Det mest hensiktsmessige humane rammeverket som de CDR-podede tung- og lett kjedene skulle bygges på ble identifisert.

[0175] For tungkjeden ble rammeverket kodet av GenBank-aksesjons # AB063829 bestemt til å være den mest hensiktsmessige. Analyse av hPD-1.09A VK-sekvensen viser at dens CDR1-lengde (15 rester) ikke finnes i noe humant VK. Av denne grunnen ble rammeverkene av tre forskjellige CDR1-lengder (11, 16 og 17 rester) analysert for å teste hvilken CDR1-lengde som ville reprodusere oppførselen til hPD-1.09A VK. De humane VK-sekvensene med høyest identitet til hPD-1.09A VK i utvalgte rester som var viktige i strukturen og med CDR1-lengdene 11, 16 og 17 ble identifisert.

Rammeverket til GenBank-aksesjon # M29469 ble valgt som grunnlag for K109A-L-11. Rammeverket fra GenBank-aksesjons # AB064135 ble valgt som grunnlag for K09A-L-16 og rammeverket fra GenBank-aksesjons # X72431 ble valgt som grunnlag for K09A-L-17.

[0176] Rette (eng. straight) podinger ble utført for å generere ekspresjons-konstruksjoner for hver kjede. DNA- og proteinsekvensene til 109A-H, K09A-L-11, K09A-L-16 og K09A-L-17 er beskrevet i den vedlagte sekvenslisten (tabell IV).

[0177] En IgG4-versjon av det humaniserte h109A-antistoffet ble fremstilt, med den stabiliserende Adair-mutasjonen (Angal S. et al., Mol. Immunol. 30:105-108 (1993)), der serin 241 (Kabat-nummerering) ble omdannet til prolin. Denne sekvensen er vist i SEQ ID NO: 23 og 31.

Eksempel 5: Bindingsegenskaper og funksjonelle egenskaper til humaniserte anti-PD-1-antistoffer

Produksjon og rensing

[0178] De humaniserte antistoffene h409A11, h409A16 og h409A17 ble fremstilt ved hjelp av transient transfeksjon av CHO-S-celler. Cellene ble dyrket i CD-CHO (Gibco) og C5467-medium (Sigma) i 8 dager i risteflasker. Antistoffene ble rensset fra celledsupernatanter ved hjelp av protein-A-kromatografi, vasket, eluert ved anvendelse av 1 M eddiksyre og nøytralisert ved anvendelse av 3 M Tris. Til slutt ble bufferen byttet ut med 100 mM eddiksyre som hadde blitt justert til pH 5,5 med 1 M Tris-base.

Binding og kinetisk analyse

[0179] Protein-baserte og celle-baserte ELISA-er for å bestemme egnede bindingsaffiniteter (rapportert som EC_{50} -verdier) ble utført som beskrevet i eksempel 2. De humaniserte anti-PD-1-antistoffene bandt hver til PD-1/Fc og cellulært uttrykt PD-1 med sammenlignbare EC_{50} -verdier til det murine opphavelige antistoffet (tabell V).

[0180] Kinetiske bindingsegenskaper til antistoffene ble også utført ved anvendelse av bio-lys-interferometri som beskrevet i eksempel 2 (figur 6). To av de humaniserte antistoffene, h409A11 og h409A16, bandt betydelig mer tett enn andre mAb testet ved anvendelse av denne analysen med K_D bestemt til å være 29 og 27 pM for henholdsvis h409A11 og h409A16 (tabell V). Sammenlignet med de andre anti-PD-1-antistoffene testet, skyldtes den økte affiniteten hovedsakelig en langsommere off-rate. I likhet med de murine parentale antistoffene viste de humaniserte anti-PD-1-antistoffene h409A11, h409A16 binding til cynomologous PD-1 med K_D bestemt til å være under 120 pM.

Ligandblokkering

[0181] Evnen til de humaniserte antistoffene til å blokkere bindingen av PD-L1 og PD-L2 til PD-1 ble målt ved anvendelse av en homogen konkurranseanalyse og deteksjon ved anvendelse av en FMAT-konkurranseanalyse som beskrevet i eksempel 2.

[0182] Binding av både hPD-L1/Fc og hPD-L2/Fc til CHO-HPD-1-celler kan være fullstendig inhibert på en doseavhengig måte ved en hvilken som helst av de humaniserte antistoffene som ble testet. Beregnede IC_{50} data er oppsummert i tabell V. På samme måte som det opphavelige murine antistoffet hPD-1.09A, inhiberte hver av de humaniserte mAb-ene, h409A11, h409A16 og h409A17 PD-L1- og L2 PD-binding med IC_{50} -verdier under 1 nM. I likhet med de murine opphavelige antistoffene viste de humaniserte anti-PD-1-antistoffene h409A11, h409A16 og h409A17 inhibering av ligandbinding til cynomolgous PD-1 med beregnede IC_{50} -verdier under omtrent 1 nM.

Tabell V. Bindingsegenskapene til humaniserte anti-HPD-1-antistoffer ifølge oppfinnelsen

	Bindingsanalyse		Ligandblokkering		Kinetisk analyse		
	ELISA	CELISA	FMAT		Fortebio Octet		
	EC50 (pM)	EC50 (pM)	IC50 (pM)		k _{assos}	k _{dissos}	K _D
MAB	hPD-1/Fc	hPD-1/CHO	PD-L1	PD-L2	1/s	1/Ms	M
h409A11	76	62	625	695	1,04E +06	3,05E-05	2,93E-11
h409A16	90	63	696	810	9,97E +05	2,72E-05	2,73E-11
h409A17	88	83	818	463	1,00E +06	1,91E-04	1,91E-10

Human T-cellerespons mot SEB forsterkes av humaniserte mAb-er

- 5 **[0183]** Humaniserte anti-PD-1-antistoffer ble testet for deres evne til å øke T-celle-aktiviteten *in vitro* ved hjelp av blodceller fra friske frivillige, som beskrevet i eksempel 3. Supernatantene ble samlet inn etter 4 dagers dyrking og mengden IL-2 fremstilt ble kvantifisert ved hjelp av ELISA. De humaniserte PD-1-antistoffene viste evnen til å øke IL-2-produksjonen stimulert av SEB (figur 7). I tillegg økte de
- 10 humaniserte PD-1-antistoffene SEB induisert IL-2-produksjon i kreftpasientblod, i likhet med det som er beskrevet i eksempel 3.

- [0184]** Oppsummert beholdt de humaniserte mAb-ene h409A11, h409A16, og h409A17 all funksjonell aktivitet under humaniseringsprosessen. h409A11 og h409A16 mAb-ene beholdt fullt ut affiniteten til det museopphavelige antistoffet
- 15 hPD109A etter humanisering.

SEKVENSLISTE**[0185]****[0185]**

<110> N.V. Organon Carven, Gregory Van Eenennaam, Hans Dulos, Gradus Johannes

<120> ANTIBODIES TO HPD-1

<130> OR06827

<150> 60/944583

<151> 2007-06-18

<160> 38

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 435

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> hPD-1.08A heavy chain variable region

<400> 1

```

atgrgatgga gctgtatcat kctctttttg gtagcaacag ctacaggtgt ccaactcccag      60
gtccaactgc agcagcctgg ggctgaactg gtgaagcctg gggcttcagt gaagttgtcc      120
tgcaaggcct ctggctacac cttcaccagt tattatctgt actggatgaa acagaggcct      180
ggacaaggcc ttgagtggat tggggggggt aatcctagta atggtggtac taacttcagt      240
gagaagttca agagcaaggc cacactgact gtagacaaat cctccagcac agcctacatg      300
caactcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtacaag aagggattct      360
aactacgacg ggggctttga ctactggggc caaggcacta ctctcacagt ctcctcagcc      420
aaaacgacac cccca                                     435

```

<210> 2

<211> 453

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> hPD-1.08A light chain variable region

<400> 2

```

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt      60
gacattgtgc tgacacagtc tcctaattcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc      120
atctcatgca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct ttagttattt gcactggtac      180
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctttc ttgcatccaa cctagagtct      240
ggggtccttg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat      300
cctgtggagg aggaggacgc tgcaacctat tattgtcagc acagttggga gcttccgctc      360
acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc      420
atcttcccac catccagtaa gcttgggaag ggc                                     453

```

<210> 3

<211> 464

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> hPD-1.09A heavy chain variable region

<400> 3

```

atgraatgca gctgggttat yctctttttg gtagcaacag ctacaggtgt ccactcccag      60
gtccaactgc agcagcctgg ggctgaactg gtgaagcctg ggacttcagt gaagttgtcc      120
tgcaaggctt ctggctacac cttcaccaac tactatatgt actgggtgaa gcagaggcct      180
ggacaaggcc ttgagtggat tggggggatt aatcctagca atgggtggtac taacttcaat      240
gagaagttca agaacaaggc cacactgact gtagacagtt cctccagcac aacctacatg      300
caactcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtacaag aagggattat      360
aggttcgaca tgggctttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctctcagcc      420
aaaacgacac ccccatccgt ytatcccbtg gccctggaa gctt                                     464

```

<210> 4

<211> 438

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> hPD-1.09A light chain variable region

<400> 4

```

atggagwcag acacactsct gytatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggc      60
gacattgtgc tgacacagtc tcctgcttcc ttagctgtat ctctgggaca gagggccgcc      120
atctcatgca gggccagcaa aggtgtcagt acatctggct atagttattt gcactggtac      180
caacagaaac caggacagtc acccaaactc ctcatctatc ttgcatccta cctagaatct      240
ggggtccttg ccagggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat      300
cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acagtaggga ccttccgctc      360
acgttcggta ctgggaccaa gctggagctg aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc      420
atcttccac catccagt                                     438

```

<210> 5

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> hPD-1.08A heavy chain variable region

<400> 5

```

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

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

Tyr Leu Tyr Trp Met Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35           40           45

Gly Gly Val Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Ser Glu Lys Phe
50           55           60

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

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

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

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys
115          120

```

<210> 6

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> hPD-1.08A light chain variable region

<400> 6

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Phe Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Phe Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

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

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
 85 90 95

Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 7

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> hPD-1.09A heavy chain variable region

<400> 7

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

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

Tyr Met Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Ser Ser Ser Ser Thr Thr Tyr
 65 70 75 80

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

Thr Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys
 115 120

<210> 8

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> hPD-1.09A light chain variable region

<400> 8

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

Gln Arg Ala Ala Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

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

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
 85 90 95

Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> hPD-1.08A light chain CDR1

<400> 9

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Phe Ser Tyr Leu His
 1 5 10 15

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> hPD-1.08A light chain CDR2

<400> 10

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> hPD-1-08A light chain CDR3

<400> 11

Gln	His	Ser	Trp	Glu	Leu	Pro	Leu	Thr
1				5				

<210> 12

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> hPD-1.08A heavy chain CDR1

<400> 12

Ser	Tyr	Tyr	Leu	Tyr
1				5

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> hPD-1.08A heavy chain CDR2

<400> 13

Gly	Val	Asn	Pro	Ser	Asn	Gly	Gly	Thr	Asn	Phe	Ser	Glu	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Ser

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> hPD-1.08A heavy chain CDR3

<400> 14

Arg	Asp	Ser	Asn	Tyr	Asp	Gly	Gly	Phe	Asp	Tyr
1				5					10	

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> hPD-1.09A light chain CDR1

<400> 15

Arg	Ala	Ser	Lys	Gly	Val	Ser	Thr	Ser	Gly	Tyr	Ser	Tyr	Leu	His
1				5					10				15	

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> hPD-1.09A light chain CDR2

<400> 16

Leu	Ala	Ser	Tyr	Leu	Glu	Ser
1				5		

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> hPD-1.09A light chain CDR3

<400> 17

Gln	His	Ser	Arg	Asp	Leu	Pro	Leu	Thr
1				5				

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> hPD-1.09A heavy chain CDR1

<400> 18

Asn	Tyr	Tyr	Met	Tyr
1				5

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> hPD-1.09A heavy chain CDR2

<400> 19

Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Asn

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> hPD-1.09A heavy chain CDR3

<400> 20

Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 21

<211> 417

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 109A-H heavy chain variable region

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(57)

<400> 21

```

atggactgga cctggagcat ccttttcttg gtggcagcac caacaggagc ccactcccaa      60
gtgcagctgg tgcagtctgg agttgaagtg aagaagcccg gggcctcagt gaaggtctcc      120
tgcaaggctt ctggctacac ctttaccaac tactatatgt actgggtgcg acaggcccct      180
ggacaagggc ttgagtggat gggagggatt aatcctagca atggtggtac taacttcaat      240
gagaagttca agaacagagt caccttgacc acagactcat ccacgaccac agcctacatg      300
gaactgaaga gcctgcaatt tgacgacacg gccgtttatt actgtgcgag aagggattat      360
aggttcgaca tgggctttga ctactggggc caagggacca cggtcaccgt ctcgagc      417

```

<210> 22

<211> 417

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Codon optimized 109A-H heavy chain variable region

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(57)

<400> 22

atggactgga cctggtctat cctgttcctg gtggccgctc ctaccggcgc tctctcccag	60
gtgcagctgg tgcagtcagg cgtggaggtg aagaagcctg gcgcctccgt caaggtgtcc	120
tgcaaggcct ccggctacac cttcaccaac tactacatgt actgggtgcg gcaggctccc	180
ggccagggac tggagtggat gggcggcatc aacccttcca acggcggcac caacttcaac	240
gagaagttca agaaccgggt gaccctgacc accgactcct ccaccaccac cgcctacatg	300
gagctgaagt ccctgcagtt cgacgacacc gccgtgtact actgcgccag gcgggactac	360
cggttcgaca tgggcttcga ctactggggc cagggcacca ccgtgaccgt gtcctcc	417

<210> 23

<211> 1398

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Codon optimized 409A-H heavy chain full length

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(57)

<400> 23

atggccgtgc tgggcctgct gttctgcctg gtgaccttcc cttcctgcgt gctgtcccag	60
gtgcagctgg tgcagtcagg cgtggaggtg aagaagcctg gcgcctccgt caaggtgtcc	120
tgtaaggcct ccggctacac cttcaccaac tactacatgt actgggtgcg gcaggcccca	180
ggccagggac tggagtggat gggcggcatc aacccttcca acggcggcac caacttcaac	240
gagaagttca agaaccgggt gaccctgacc accgactcct ccaccacaac cgcctacatg	300
gaactgaagt ccctgcagtt cgacgacacc gccgtgtact actgcgccag gcgggactac	360
cggttcgaca tgggcttcga ctactggggc cagggcacca ccgtgaccgt gtcctccgct	420
agcaccaagg gcccttccgt gttccctctg gccccttgct cccgggccac ctccgagtcc	480
accgccgctc tgggctgtct ggtgaaggac tacttccctg agcctgtgac cgtgagctgg	540
aactctggcg ccctgacctc cggcgtgcac accttccctg ccgtgctgca gtcctccggc	600

```

ctgtactccc tgtcctccgt ggtgaccgtg ccttcctcct ccctgggcac caagacctac      660
acctgcaacg tggaccacaa gccttccaac accaagggtg acaagcgggt ggagccaag      720
tacggccctc cttgccctcc ctgccctgcc cctgagttcc tgggcggacc ctccgtgttc      780
ctgttcctc ctaagcctaa ggacaccctg atgatctccc ggaccctga ggtgacctgc      840
gtggtggtgg acgtgtccca ggaagatcct gaggtccagt tcaattggta cgtggatggc      900
gtggaggtgc acaacgcaa gaccaagcct cgggaggaac agttcaactc cacctaccgg      960
gtggtgtctg tgctgaccgt gctgcaccag gactggctga acggcaagga atacaagtgc     1020
aaggtcagca acaagggcct gccctcctcc atcgagaaaa ccatctccaa ggccaagggc     1080
cagcctcgcg agcctcaggt gtacaccctg cctcctagcc aggaagagat gaccaagaat     1140
caggtgtccc tgacatgcct ggtgaagggc ttctaccctt ccgatatcgc cgtggagtgg     1200
gagagcaacg gccagccaga gaacaactac aagaccaccc ctctgtgct ggactccgac     1260
ggctccttct tcctgtactc caggctgacc gtggacaagt cccggtggca ggaaggcaac     1320
gtcttttcct gctccgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagtccctg     1380
tcctgtctc tgggcaag                                     1398

```

<210> 24

<211> 393

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> K09A-L-11 light chain variable region

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(60)

<400> 24

```

atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgtactctt ggctcccaga taccaccgga      60
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc     120
ctctcctgca gggccagcaa aggtgtcagt acatctggct atagttattt gcactggtat     180
caacagaaac ctggccaggc tcccaggctc ctcatctatc ttgcatccta cctagaatct     240
ggcgtcccag ccaggttcag tggtagtggg tctgggacag acttcactct caccatcagc     300
agcctagagc ctgaagattt tgcagtttat tactgtcagc acagcaggga ccttcgcctc     360
acgttcggcg gagggaccaa agtggagatc aaa                                     393

```

<210> 25

<211> 393

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> K09A-L-16 light chain variable region

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(60)

<400> 25

```

atggaaccc cagcgcagct tctcttctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga      60
gaaattgtgc tgactcagtc tccactctcc ctgcccgta cccctggaga gccggcctcc      120
atctctgca gggccagcaa aggtgtcagt acatctggct atagttattt gcattggtac      180
ctccagaagc cagggcagtc tccacagctc ctgatctatc ttgcatccta cctagaatct      240
ggggtccctg acaggttcag tggcagtggg tcaggcacag attttacact gaaaatcagc      300
agagtggagg ctgaggatgt tggggtttat tactgccagc atagtaggga ccttccgctc      360
acgtttggcc aggggaccaa gctggagatc aaa                                393

```

<210> 26

<211> 393

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> K09A-L-17 light chain variable region

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(60)

<400> 26

```

atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct gggctctctgg atccagtggg      60
gatattgtga tgaccagac tccactctcc ctgcccgta cccctggaga gccggcctcc      120
atctctgca gggccagcaa aggtgtcagt acatctggct atagttattt gcattggtat      180
ctgcagaagc cagggcagtc tccacagctc ctgatctatc ttgcatccta cctagaatct      240
ggagtcccag acaggttcag tggcagtggg tcaggcactg ctttcacact gaaaatcagc      300
agggtggagg ctgaggatgt tggactttat tactgccagc atagtaggga ccttccgctc      360
acgtttggcc aggggaccaa gctggagatc aaa                                393

```

<210> 27

<211> 390

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Codon optimized K09A-L-11 light chain variable region

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(57)

<400> 27

```

atggcccctg tgcagctgct gggcctgctg gtgctgttcc tgectgcat gcggtgcgag      60
atcgtgctga cccagtcccc tgccaccctg tccctgagcc ctggcgagcg ggctaccctg      120
agctgcagag cctccaaggg cgtgtccacc tccggtact cctacctgca ctggtatcag      180
cagaagccag gccaggcccc tcggctgctg atctacctgg cctcctacct ggagtccggc      240
gtgcctgccc ggttctccgg ctccgggaagc ggcaccgact tcacctgac catctcctcc      300
ctggagcctg aggacttcgc cgtgtactac tgccagcact cccgggacct gcctctgacc      360
tttggcggcg gaacaaaggt ggagatcaag      390

```

<210> 28

<211> 390

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Codon optimized K09A-L-16 light chain variable region

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(57)

<400> 28

```

atggcccctg tgcagctgct gggcctgctg gtgctgttcc tgectgcat gcggtgcgag      60
atcgtgctga cccagtcccc tctgtccctg cctgtgacct ctggcgagcc tgcctccatc      120
tcttgccggg cctccaaggg cgtgtccacc tccggtact cctacctgca ctggtatctg      180
cagaagcctg gccagtcccc ccagctgctg atctacctgg cctcctacct ggagtccggc      240
gtgcctgacc ggttctccgg ctccggcagc ggcaccgact tcacctgaa gatctcccgg      300
gtggaggccg aggacgtggg cgtgtactac tgccagcact cccgggacct gcctctgacc      360
ttcggccagg gcaccaagct ggagatcaag      390

```

<210> 29

<211> 390

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Codon optimized K09A-L-17 light chain variable region

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(57)

<400> 29

```

atggcccctg tgcagctgct gggcctgctg gtgctgttcc tgcctgccat gcggtgcgac      60
atcgtgatga cccagacccc tctgtccctg cctgtgaccc ctggcgagcc tgcctccatc      120
tcctgccggg cctccaaggg cgtgtccacc tccggctact cctacctgca ctggtatctg      180
cagaagcctg gccagtcctc tcagctgctg atctacctgg cctcctacct ggagtcgggc      240
gtgcctgacc ggttctccgg ctccggaagc ggcaccgctt ttaccctgaa gatctccaga      300
gtggaggccg aggacgtggg cctgtactac tgccagcact cccgggacct gcctctgacc      360
ttcggccagg gcaccaagct ggagatcaag      390

```

<210> 30

<211> 139

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 109A-H heavy chain variable region

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(19)

<400> 30

```

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

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys
      20             25             30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
      35             40             45

Thr Asn Tyr Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50             55             60

Glu Trp Met Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn
65             70             75             80

Glu Lys Phe Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr
      85             90             95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val

```

	100		105		110										
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Arg	Asp	Tyr	Arg	Phe	Asp	Met	Gly	Phe	Asp	Tyr
		115					120					125			
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
	130					135									

<210> 31

<211> 466

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 409A-H heavy chain full length

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(19)

<400> 31

Met	Ala	Val	Leu	Gly	Leu	Leu	Phe	Cys	Leu	Val	Thr	Phe	Pro	Ser	Cys
1				5					10					15	
Val	Leu	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Val	Glu	Val	Lys	Lys
			20					25					30		
Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe
		35					40					45			
Thr	Asn	Tyr	Tyr	Met	Tyr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu
	50					55					60				
Glu	Trp	Met	Gly	Gly	Ile	Asn	Pro	Ser	Asn	Gly	Gly	Thr	Asn	Phe	Asn
65					70					75					80
Glu	Lys	Phe	Lys	Asn	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Thr	Asp	Ser	Ser	Thr	Thr
				85					90					95	
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Lys	Ser	Leu	Gln	Phe	Asp	Asp	Thr	Ala	Val
			100					105					110		
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Arg	Asp	Tyr	Arg	Phe	Asp	Met	Gly	Phe	Asp	Tyr
		115					120					125			
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly
	130					135					140				

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
 145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
 210 215 220

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
 225 230 235 240

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly
 245 250 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 260 265 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
 275 280 285

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 290 295 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
 305 310 315 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 325 330 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
 340 345 350

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 355 360 365

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 370 375 380

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
450 455 460

Gly Lys
465

<210> 32

<211> 130

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> K09A-L-11 light chain variable region

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(19)

<400> 32

Met Ala Pro Val Gln Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Phe Leu Pro Ala
1 5 10 15

Met Arg Cys Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu
20 25 30

Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val
35 40 45

Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
50 55 60

Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly
65 70 75 80

Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
85 90 95

Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
 100 105 110

His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu
 115 120 125

Ile Lys
 130

<210> 33

<211> 130

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> K09A-L-16 light chain variable region

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(19)

<400> 33

Met Ala Pro Val Gln Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Phe Leu Pro Ala
 1 5 10 15

Met Arg Cys Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val
 35 40 45

Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly
 50 55 60

Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly
 65 70 75 80

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 85 90 95

Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln
 100 105 110

His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
 115 120 125

Ile Lys
 130

<210> 34
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> K09A-L-17 light chain variable region

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(19)

<400> 34

Met Ala Pro Val Gln Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Phe Leu Pro Ala
 1 5 10 15

Met Arg Cys Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val
 35 40 45

Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly
 50 55 60

Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly
 65 70 75 80

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu
 85 90 95

Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Leu Tyr Tyr Cys Gln
 100 105 110

His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
 115 120 125

Ile Lys
 130

<210> 35
 <211> 469
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 109A-H heavy chain full length

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(19)

<400> 35

```

Met Ala Val Leu Gly Leu Leu Phe Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys
1,      5      10      15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys
      20      25      30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
      35      40      45

Thr Asn Tyr Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50      55      60

Glu Trp Met Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn
65      70      75      80

Glu Lys Phe Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr
      85      90      95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val
      100      105      110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr
      115      120      125

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
130      135      140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
145      150      155      160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
      165      170      175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
      180      185      190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
      195      200      205

```

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 210 215 220
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 225 230 235 240
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 245 250 255
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 260 265 270
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 275 280 285
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 290 295 300
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 305 310 315 320
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 325 330 335
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 340 345 350
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 355 360 365
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 370 375 380
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 385 390 395 400
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 405 410 415
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 420 425 430
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 435 440 445
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

450

455

460

Leu Ser Pro Gly Lys
465

<210> 36

<211> 237

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> K09A-L-11 light chain full length

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(19)

<400> 36

Met Ala Pro Val Gln Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Phe Leu Pro Ala
1 5 10 15

Met Arg Cys Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu
20 25 30

Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val
35 40 45

Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
50 55 60

Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly
65 70 75 80

Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
85 90 95

Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
100 105 110

His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu
115 120 125

Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
130 135 140

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
145 150 155 160

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
 165 170 175

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
 180 185 190

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
 195 200 205

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
 210 215 220

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 37

<211> 237

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> K09A-L-16 light chain full length

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(19)

<400> 37

Met Ala Pro Val Gln Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Phe Leu Pro Ala
 1 5 10 15

Met Arg Cys Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val
 35 40 45

Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly
 50 55 60

Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly
 65 70 75 80

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 85 90 95

Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln

100					105					110					
His	Ser	Arg	Asp	Leu	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu
		115					120					125			
Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser
	130					135					140				
Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn
145					150					155					160
Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala
				165					170					175	
Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys
			180					185					190		
Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp
		195					200					205			
Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu
	210					215					220				
Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys			
225					230					235					

<210> 38

<211> 237

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> K09A-L-17 light chain full length

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(19)

<400> 38

Met	Ala	Pro	Val	Gln	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Val	Leu	Phe	Leu	Pro	Ala
1				5					10					15	
Met	Arg	Cys	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val
			20					25					30		
Thr	Pro	Gly	Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Lys	Gly	Val
		35					40					45			

Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly
 50 55 60

Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly
 65 70 75 80

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu
 85 90 95

Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Leu Tyr Tyr Cys Gln
 100 105 110

His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
 115 120 125

Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
 130 135 140

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
 145 150 155 160

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
 165 170 175

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
 180 185 190

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
 195 200 205

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
 210 215 220

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

P a t e n t k r a v

1. Antistoff eller antistoffragment som binder til human PD-1, omfattende:
 lettkjede-CDR-ene SEQ ID NO: 15, 16 og 17 og tungkjede-CDR-ene SEQ ID NO: 18,
 5 19 og 20;
 hvori antistoffet eller antistoffragmentet blokker binding av human PD-L1 og human
 PD-L2 til human PD-1.

2. Antistoffet eller antistoffragmentet ifølge krav 1, hvori antistoffet eller
 10 antistoffragmentet blokkerer bindingen av human PD-L1 og/eller human PD-L2 til
 human PD-1 med en IC_{50} på omtrent 1 nM eller lavere.

3. Antistoffet eller antistoffragmentet ifølge krav 1 eller 2, omfattende:

a. et tungkjedevariabelt område omfattende en aminosyresekvens valgt blant gruppen
 15 bestående av:

i. SEQ ID NO: 7, eller en variant derav, hvori varianten omfatter en, to eller tre
 konservativt modifiserte aminosyresubstitusjoner;

ii. aminosyrerestene 20-139 i SEQ ID NO: 30 eller en variant derav, hvori varianten
 omfatter en, to eller tre konservativt modifiserte aminosyresubstitusjoner; og

20 iii. en aminosyresekvens som har minst 90 % homologi med aminosyrerestene 20-139 i
 SEQ ID NO: 30;

og videre omfattende

b. et lettkjedevariabelt område som omfatter en aminosyresekvens utvalgt blant
 gruppen bestående av:

25 i. SEQ ID NO: 8, eller en variant derav, hvori varianten omfatter en, to eller tre
 konservativt modifiserte aminosyresubstitusjoner;

ii. aminosyrerestene 20-130 i SEQ ID NO: 32 eller en variant derav, hvori varianten
 omfatter en, to eller tre konservativt modifiserte aminosyresubstitusjoner;

30 iii. aminosyrerestene 20-130 i SEQ ID NO: 33 eller en variant derav, hvori varianten
 omfatter en, to eller tre konservativt modifiserte aminosyresubstitusjoner;

iv. aminosyrerestene 20-130 i SEQ ID NO: 34 eller en variant derav, hvori varianten
 omfatter en, to eller tre konservativt modifiserte aminosyresubstitusjoner; og

v. en aminosyresekvens som har minst 90 % homologi med aminosyrerestene 20-130 i
 SEQ ID NO: 32, 33 eller 34.

35 4. Antistoffet ifølge krav 1 eller 2, omfattende:

a. en tungkjede som omfatter en aminosyresekvens utvalgt blant gruppen bestående av:

i. aminosyrerestene 20-466 i SEQ ID NO: 31 eller en variant derav, hvori varianten
 omfatter en, to eller tre konservativt modifiserte aminosyresubstitusjoner, og

ii. aminosyrerestene 20-469 i SEQ ID NO: 35 eller en variant derav, hvori varianten omfatter en, to eller tre konservativt modifiserte aminosyresubstitusjoner;

og

b. en lettkjede som omfatter en aminosyresekvens valgt blant gruppen bestående av:

5 i. aminosyrerestene 20-237 i SEQ ID NO: 36 eller en variant derav, hvori varianten omfatter en, to eller tre konservativt modifiserte aminosyresubstitusjoner;

ii. aminosyrerestene 20-237 i SEQ ID NO: 37 eller en variant derav, hvori varianten omfatter en, to eller tre konservativt modifiserte aminosyresubstitusjoner, og

10 iii. aminosyrerestene 20-237 i SEQ ID NO: 38 eller en variant derav, hvori varianten omfatter en, to eller tre konservativt modifiserte aminosyresubstitusjoner.

5. Antistoff eller antistofffragment som binder til human PD-1, omfattende

a. et tungkjedevariabelt område som omfatter aminosyrerestene 20-139 i SEQ ID NO: 30, og

15 b. et lettkjedevariabelt område som omfatter en aminosyresekvens utvalgt blant gruppen bestående av:

i. aminosyrerestene 20-130 i SEQ ID NO: 32;

ii. aminosyrerestene 20-130 i SEQ ID NO: 33; og

iii. aminosyrerestene 20-130 i SEQ ID NO: 34..

20

6. Antistoff som binder til human PD-1, omfattende

a. en tungkjede som omfatter aminosyrerestene 20-466 i SEQ ID NO: 31, og

b. en lettkjede som omfatter en aminosyresekvens valgt blant gruppen bestående av:

i. aminosyrerestene 20-237 i SEQ ID NO: 36;

25 ii. aminosyrerestene 20-237 i SEQ ID NO: 37, og

iii. aminosyrerestene 20-237 i SEQ ID NO: 38.

7. Antistoffet ifølge krav 6, hvori tungkjeden omfatter aminosyrerestene 20-466 i SEQ ID NO: 31, og lettkjeden omfatter aminosyrerestene 20-237 i SEQ ID NO: 36.

30

8. Antistoffet ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3 og 5, som videre omfatter et tungkjedekonstant område omfattende et γ 4- eller γ 1-humant tungkjedekonstant område.

35 **9.** Antistoffet eller antistofffragment ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori antistoffet eller antistofffragmentet:

a. binder human PD-1 med en K_D på omtrent 100 pM eller lavere;

b. binder human PD-1 med en K_D på omtrent 30 pM eller lavere;

c. binder til human PD-1 med omtrent samme K_D som antistoffet som har en tungkjede som omfatter aminosyresekvensen av SEQ ID NO: 31 og en lettkjede som omfatter aminosyresekvensen av SEQ ID NO:32;

d. binder til human PD-1 med omtrent samme K_D som et antistoff som har en tungkjede som omfatter aminosyresekvensen av SEQ ID NO: 31 og en lettkjede som omfatter aminosyresekvensen av SEQ ID NO: 33;

e. binder til human PD-1 med en k_{assos} på omtrent $7,5 \times 10^5$ $1/M \cdot s$ eller raskere;

f. binder til human PD-1 med en k_{assos} på omtrent 1×10^6 $1/M \cdot s$ eller raskere;

g. binder til human PD-1 med en k_{dissos} på omtrent 2×10^{-5} $1/s$ eller langsommere;

h. binder til human PD-1 med en k_{dissos} på omtrent $2,7 \times 10^{-5}$ $1/s$ eller langsommere;

i. binder til human PD-1 med en k_{dissos} på omtrent 3×10^{-5} $1/s$ eller langsommere; eller

j. blokkerer binding av human PD-L1 og/eller human PD-L2 til human PD-1 med en IC_{50} på omtrent 1 nM eller lavere.

10. Antistoffet eller antistofffragmentet ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori antistoffet eller antistofffragmentet er:

a. et kimært antistoff eller et fragment derav;

b. et humant antistoff eller et fragment derav; eller

c. et humanisert antistoff eller et fragment derav.

11. Antistofffragmentet ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori antistofffragmentet er utvalgt blant gruppen bestående av Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(aV)₂, og et dialegeme.

12. Antistoffet eller antistofffragmentet ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori antistoffet eller antistofffragmentet øker aktivering av T-celler.

13. Isolert polynukleotid som koder for antistoffet eller antistofffragmentet ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 12.

14. Det isolerte polynukleotidet ifølge krav 13, hvori antistoffet omfatter en tungkjede som omfatter aminosyrerestene 20-466 i SEQ ID NO: 31 og en lettkjede som omfatter aminosyrerestene 20-237 i SEQ ID NO: 36.

15. Det isolerte polynukleotidet ifølge krav 13, omfattende SEQ ID NO: 23 og SEQ ID NO: 27 eller SEQ ID NO: 22 og SEQ ID NO: 27.

16. Ekspresjonsvektor omfattende det isolerte polynukleotidet ifølge et hvilket som helst av kravene 13 til 15.

17. Vertscelle som omfatter ekspresjonsvektoren ifølge krav 16.

18. Fremgangsmåte for fremstilling av et antistoff eller antistofffragment ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 12 omfattende:

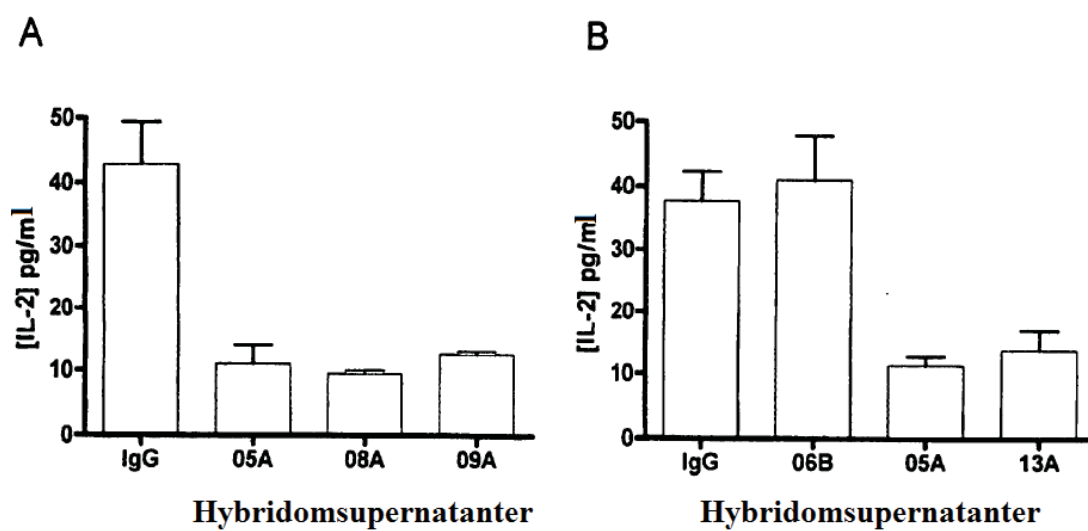
- 5 a. dyrking av vertscellen ifølge krav 17 i kulturmediet under betingelser hvori nukleinsyresekvensen uttrykkes, for dermed å fremstille polypeptider som omfatter de lett- og tungkjedevariable områdene; og
b. gjenvinning av polypeptidene fra vertscellen eller dyrkningsmediet.

10 **19.** Sammensetning som omfatter antistoffet eller antistofffragmentet ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 12, eller kan oppnås ved fremgangsmåten ifølge krav 18, i kombinasjon med en farmasøytisk akseptabel bærer eller fortynningsmiddel.

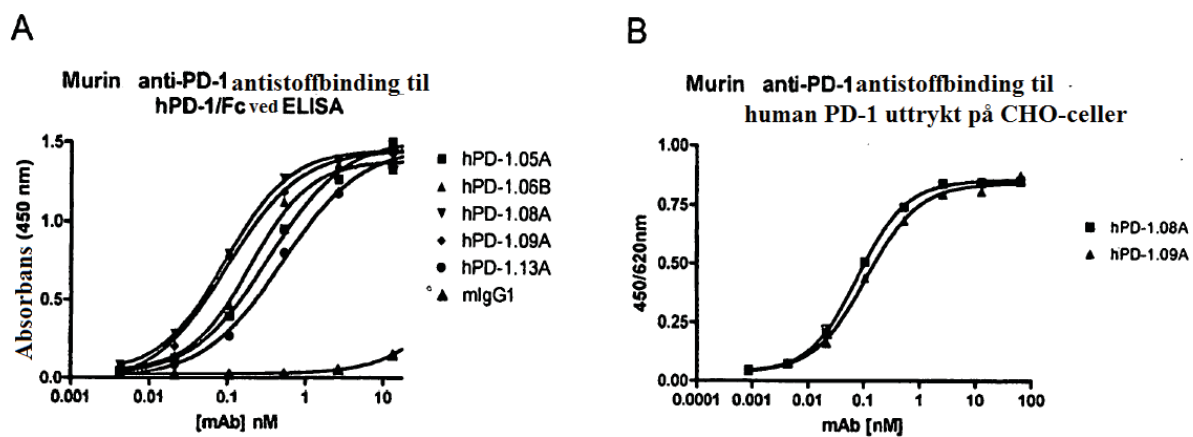
15 **20.** Antistoffet eller antistofffragmentet ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 12, eller som kan oppnås ved hjelp av fremgangsmåten ifølge krav 18 for anvendelse ved behandling av kreft eller en infeksjon eller smittsomme sykdommer.

21. Antistoffet eller antistofffragmentet ifølge kravene 1 til 12 for anvendelse i en fremgangsmåte for behandling av kreft.

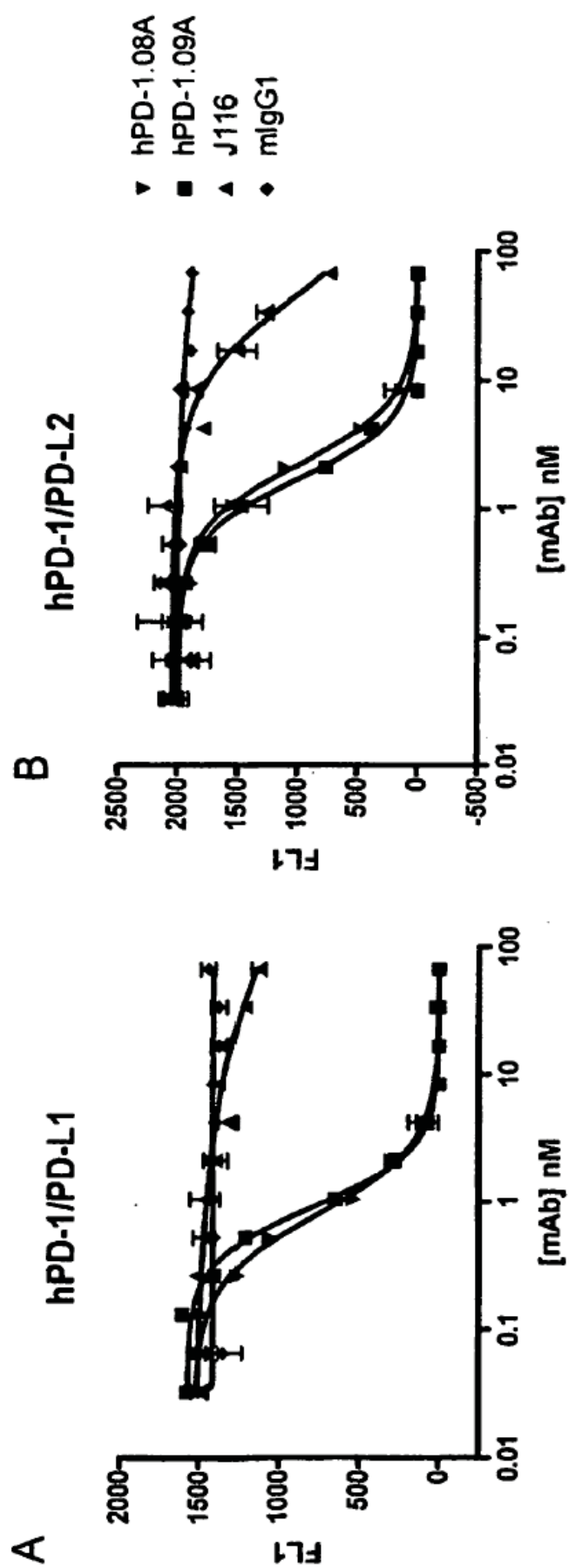
Figur 1



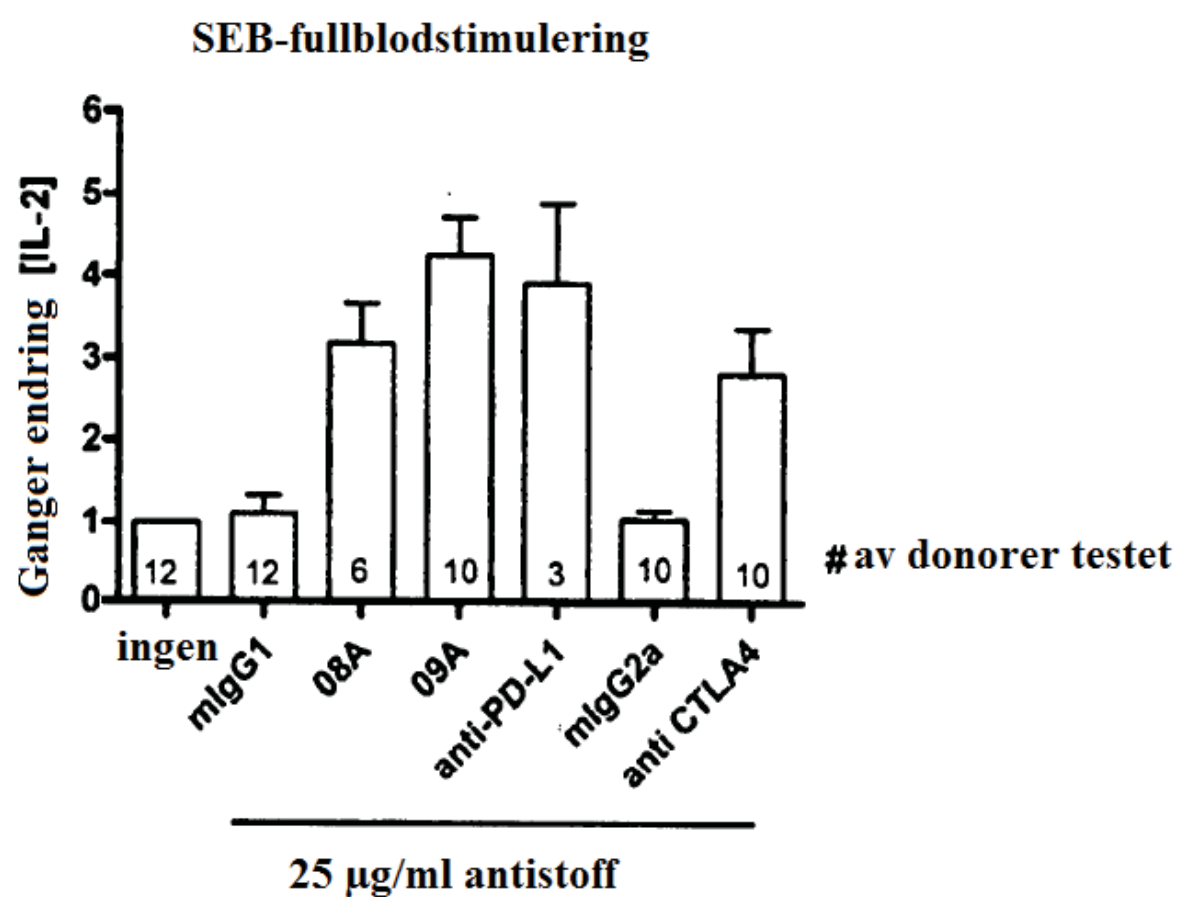
Figur 2



Figur 3

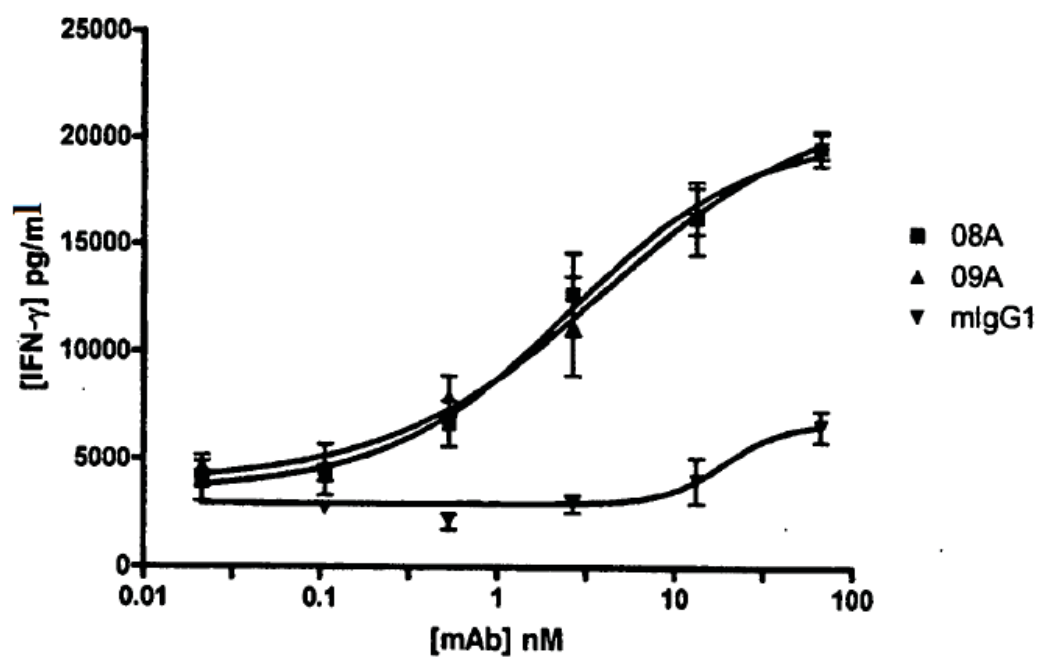


Figur 4



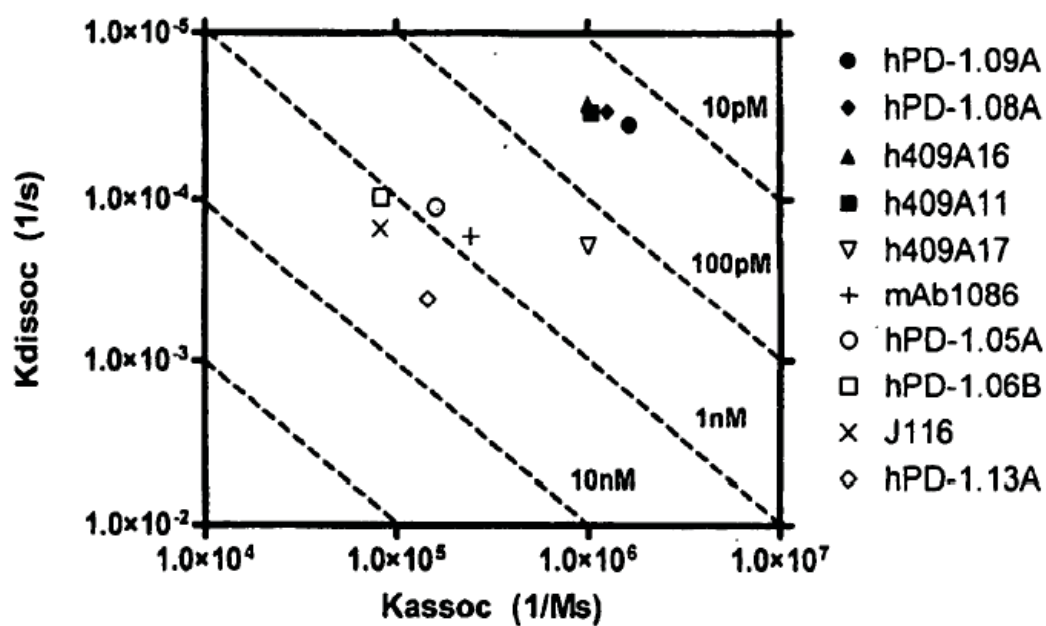
Figur 5

TT-tilbakekallingsrespons



Figur 6

Kinetisk analyse av anti-PD1-mAb-er



Figur 7

SEB-fullblodstimulering

