



(21) 申請案號：105131771

(22) 申請日：中華民國 105 (2016) 年 09 月 30 日

(51) Int. Cl. : C07K16/18 (2006.01)
C07H21/04 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

(30) 優先權：2015/10/02 歐洲專利局 15188061.4

(71) 申請人：赫孚孟拉羅股份公司 (瑞士) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH)
瑞士

(72) 發明人：班斯 喬治 BENZ, JOERG (DE)；丹格爾 史蒂芬 DENGL, STEFAN (DE)；芬舍貝斯俊 FENN, SEBASTIAN (DE)；費雪 詹斯 FISCHER, JENS (DE)；喬治絲蓋 GEORGES, GUY (BE)；克萊 克里斯汀 KLEIN, CHRISTIAN (DE)；樂菲斯基 維克特 LEVITSKI, VIKTOR (SE)；利夫卡 凡立瑞亞 LIFKE, VALERIA (DE)；席伯 史蒂芬 SEEBER, STEFAN (DE)；偉瑟 芭芭拉 WEISER, BARBARA (DE)；溫斯克 伊迪可 WUENSCHKE, ILDIKO (HU)；茲微克 亞德藍 ZWICK, ADRIAN (DE)

(74) 代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：32 項 圖式數：14 共 185 頁

(54) 名稱

抗 PD1 抗體及使用方法

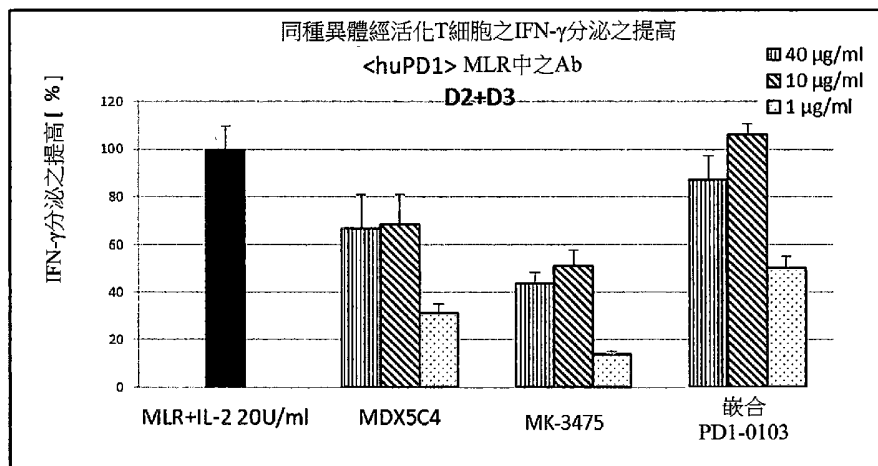
ANTI-PD1 ANTIBODIES AND METHODS OF USE

(57) 摘要

本發明係關於抗 PD1 抗體及其使用方法。

The present invention relates to anti-PD1 antibodies and methods of using the same.

指定代表圖：



【圖1】

【發明說明書】

【中文發明名稱】

抗PD1抗體及使用方法

【英文發明名稱】

ANTI-PD1 ANTIBODIES AND METHODS OF USE

【技術領域】

本發明係關於抗PD1抗體及其使用方法。

【先前技術】

PD-1

共刺激或向T細胞提供兩種不同的信號為淋巴細胞藉由抗原呈現細胞(APC)來活化休眠T淋巴細胞的廣為接受之模型(Lafferty等人, Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 53: 27-42 (1975))。

此模型進一步提供自體與非自體之辨別及免疫耐受性(Bretscher等人, Science 169: 1042-1049 (1970); Bretscher, P.A., P.N.A.S. USA 96: 185-190 (1999); Jenkins等人, J. Exp. Med. 165: 302-319 (1987))。在識別主要組織相容複合物(MHC)之情形中所呈現之外源抗原肽後,經由T細胞受體(TCR)轉導主要信號或抗原特異性信號。第二或共刺激信號藉由抗原呈現細胞(APC)上所表現之共刺激分子遞送至T細胞,且誘導T細胞以促進選殖擴增、細胞激素分泌及效應功能(Lenschow等人, Ann. Rev. Immunol. 14:233 (1996))。在無共刺激之情況下,T細胞可變得對抗原刺激有抗性,無法建立有效免疫反應且可進一步引起外源抗原的耗盡或對外源抗原具有耐受性。

簡單雙信號模型可為過度簡化版本,因為TCR信號之強度實際上對T

細胞活化及辨別具有定量影響(Viola等人, *Science* 273: 104-106 (1996); Sloan-Lancaster, *Nature* 363: 156-159 (1993))。此外, 若TCR信號強度較高, 則即使在無共刺激信號之情況下亦可發生T細胞活化。更加重要的是, T細胞接收正性及負性第二共刺激信號兩者。此類正性及負性信號之調節對於最大化宿主之保護性免疫反應至關重要, 同時保持免疫耐受性且防止自體免疫。

負性第二信號對誘導T細胞耐受性而言似乎必不可少, 而正性信號促進T細胞活化。儘管簡單雙信號模型仍為原生淋巴細胞提供有效的說明, 但宿主之免疫反應為動態過程, 且亦可將共刺激信號提供至暴露抗原之T細胞。

共刺激機制具有治療意義, 此係因為已證實操縱共刺激信號可提供促進或終止基於細胞之免疫反應的手段。近來, 已發現T細胞功能障礙或因應性缺失與抑制受體(漸進式死亡1多肽(PD-1))之經誘導及持久表現同時發生。因此, PD-1之靶向療法為備受關注之領域。

蛋白漸進式死亡1 (PD-1)為受體之CD28家族之抑制成員, 該受體亦包括CD28、CTLA-4、ICOS及BTLA。PD-1表現於經活化之B細胞、T細胞及骨髓細胞上(Agata等人, 同前文獻; Okazaki等人(2002) *Curr. Opin. Immunol.* 14: 391779-82; Bennett等人(2003) *J Immunol* 170:711-8)。在添加單株抗體之後, 藉由關於增強T細胞增殖之功能效應來發現該家族之初始成員, CD28及ICOS (Hutloff等人(1999) *Nature* 397:263-266; Hansen等人(1980) *Immunogenics* 10:247-260)。經由篩分凋亡細胞中之差異性表現來發現PD-1 (Ishida等人(1992) *EMBO J* 11 :3887-95)。經由分別篩分細胞毒性T淋巴細胞及TH1細胞中之差異性表現來發現該家族之

其他成員，CTLA-4及BTLA。CD28、ICOS及CTLA-4皆具有允許均二聚之不成對的半胱胺酸殘基。對比而言，表明PD-1在其他CD28家族成員中以缺乏不成對的半胱胺酸殘基特徵的單體形式存在。

PD-1基因為Ig基因超家族之一部分的55 kDa I型跨膜蛋白(Agata等人(1996) *Immunity* 8:765-72)。PD-1含有膜近端免疫受體酪胺酸抑制基元(ITIM)及遠膜遠端基於酪胺酸之交換基元(ITSM) (Thomas, MX. (1995) *J Exp Med* 181:1953-6; Vivier, E及Daeron, M (1997) *Immunity Today* 18:286-91)。儘管結構上與CTLA-4相似，但PD-1缺乏對B7-1及B7-2結合至關重要的MYPPPY基元。已識別PD-1之兩種配體，PD-L1及PD-L2，其已展示在結合至PD-1後即下調T細胞活性(Freeman等人(2000) *J Exp Med* 192: 1027-34; Latchman等人(2001) *Nat Immunol* 2:261-8; Carter等人(2002) *Eur J Immunol* 32:634-43)。PD-L1及PD-L2兩者均為結合至PD-1，但不結合至其他CD28家族成員之B7同源物。PD-1之一個配體PD-L1，在各種人類癌症中係充足的(Dong等人(2002) *Nat. Med* 8:787-9)。PD-1與PD-L1之間的相互作用引起腫瘤浸潤性淋巴細胞減少、T細胞受體介導之增殖降低及癌細胞之免疫逃避(Dong等人(2003) *J. Mol. Med* 81:281-7; Blank等人(2005) *Cancer Immunol. Immunother.* 54:307-314; Konishi等人(2004) *Clin. Cancer Res.* 10:5094-100)。可藉由抑制PD-1與PD-L1之局部相互作用來逆轉免疫抑制，且當PD-1與PD-L2之相互作用亦經阻斷時，效應增大(Iwai等人(2002) *Proc. Nat. Acad. Sci USA* 99: 12293-7; Brown等人(2003) *J. Immunol.* 170:1257-66)。

PD1為表現於經活化B細胞、T細胞及骨髓細胞上之CD28家族之抑制

成員(Agata等人, 前述; Okazaki等人(2002) *Curr Opin Immunol* 14: 391779-82; Bennett等人(2003) *J Immunol* YWJl 1-8)。PD-I缺陷型動物患有各種自體免疫性表型, 包括自體免疫性心肌症及伴有關節炎及腎炎之狼瘡樣綜合症(Nishimura等人(1999) *Immunity* H: 141-51; Nishimura等人(2001) *Science* 291:319-22)。另外, 已發現PD1對自體免疫性腦脊髓炎、全身性紅斑性狼瘡症、移植物抗宿主病(GVHD)、I型糖尿病及類風濕性關節炎起作用(Salama等人(2003) *J Exp Med* 198:71-78; Prokunina and Alarcon-Riquelme (2004) *Hum Mol Genet* 13_:R143; Nielsen等人(2004) *Lupus* 11:510)。在鼠類B細胞腫瘤系中, 展示PD1之ITSM對阻斷下游效應分子之BCR介導之Ca²⁺-流通及酪胺酸磷酸化為必需的(Okazaki等人(2001) *PNAS* 98: 13866-71)。

各種專利申請案揭示抗PD-1抗體之產生及/或用干擾PD-L1結合及/或PD-1信號傳導之試劑(包括抗PD-1抗體)增強免疫反應之方法, 該等申請案包括以下各者: US2003/0039653、US2004/0213795、US2006/0110383、US2007/0065427、US2007/0122378、US2012/237522、WO2004/072286、WO2006/121168、WO2006/133396、WO2007/005874、WO2008/083174、WO2008/156712、WO2009/024531、WO2009/014708、WO2009/114335、WO2010/027828、WO2010/027423、WO2010/036959、WO2010/029435、WO2010/029434、WO2010/063011、WO2010/089411、WO2011/066342、WO2011/110604、WO2011/110621及WO2012/145493。

【發明內容】

本發明提供抗PD1抗體及其使用方法。

本發明之一個態樣為此類抗PD1抗體，其中該抗體：

- i) 與包含PD1-0103之VH及VL之抗PD1抗體競爭結合至PD-1；及/或
- ii) 結合至人類及獼猴PD-1；及/或
- iii) 在10 $\mu\text{g/ml}$ 之抗體濃度下藉由同種異體受刺激T細胞使干擾素- γ (IFN- γ)分泌提高85%或更多；及/或
- iv) 在10 $\mu\text{g/ml}$ 之抗體濃度下藉由同種異體受刺激T細胞使腫瘤壞死因子 α (TNF α)分泌提高200%或更多。

本發明之另一態樣為結合至人類PD1之抗體，其中該抗體在混合淋巴細胞反應(MLR)分析中在10 $\mu\text{g/ml}$ 之抗體濃度下藉由同種異體受刺激T細胞使干擾素- γ (IFN- γ)分泌提高85%或更多。

本發明之另一態樣為結合至人類PD1之抗體，其中該抗體在混合淋巴細胞反應(MLR)分析中在10 $\mu\text{g/ml}$ 之抗體濃度下藉由同種異體受刺激T細胞使腫瘤壞死因子 α (TNF α)分泌提高200%或更多。

本發明提供一種結合至人類PD1之經分離抗體，其中該抗體包含

A) (a)包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列的HVR-L3；或

B) (a)包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:10之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:11之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ

ID NO:13之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列的HVR-L3；或

C) (a)包含SEQ ID NO:17之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:18之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:20之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列的HVR-L3；或

D) (a)包含SEQ ID NO:25之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:26之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:27之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:28之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:29之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:30之胺基酸序列的HVR-L3；或

E) (a)包含SEQ ID NO:33之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:34之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:35之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:36之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列的HVR-L3；或

F) (a)包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:43之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:44之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:45之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:46之胺基酸序列的HVR-L3；或

G) (a)包含SEQ ID NO:49之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID

NO:50之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:51之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:52之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:53之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:54之胺基酸序列的HVR-L3。

本發明進一步提供一種結合至人類PD1之經分離抗體，其中該抗體包含

A) (a) VH域，其包含(i)包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:3之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含(i)包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列的HVR-L2及(iii)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列的HVR-L3；或

B) (a) VH域，其包含(i)包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:10之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:11之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含(i)包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:13之胺基酸序列的HVR-L2及(iii)包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列的HVR-L3；或

C) (a) VH域，其包含(i)包含SEQ ID NO:17之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:18之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:19之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含(i)包含SEQ ID NO:20之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的HVR-L2及(iii)包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列的HVR-L3；或

D) (a) VH域，其包含(i)包含SEQ ID NO:25之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:26之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ

ID NO:27之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含(i)包含SEQ ID NO:28之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:29之胺基酸序列的HVR-L2及(iii)包含SEQ ID NO:30之胺基酸序列的HVR-L3；或

E) (a) VH域，其包含(i)包含SEQ ID NO:33之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:34之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:35之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含(i)包含SEQ ID NO:36之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的HVR-L2及(iii)包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列的HVR-L3；或

F) (a) VH域，其包含(i)包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:43之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含(i)包含SEQ ID NO:44之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:45之胺基酸序列的HVR-L2及(iii)包含SEQ ID NO:46之胺基酸序列的HVR-L3；或

G) (a) VH域，其包含(i)包含SEQ ID NO:49之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:50之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:51之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含(i)包含SEQ ID NO:52之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:53之胺基酸序列的HVR-L2及(iii)包含SEQ ID NO:54之胺基酸序列的HVR-L3。

本發明進一步提供一種結合至人類PD1之經分離抗體，其中該抗體

A)

i) 包含SEQ ID NO:7之VH序列及SEQ ID NO:8之VL序列；

ii) 或i)下之抗體的VH及VL之人類化變異體；

或B)

i) 包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:58之VL序列；
ii) 包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:59之VL序列；
iii) 包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:60之VL序列；
iv) 包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:61之VL序列；
或C)

i) 包含SEQ ID NO:15之VH序列及SEQ ID NO:16之VL序列；
ii) 或i)下之抗體的VH及VL之人類化變異體；
或D)

i) 包含SEQ ID NO:23之VH序列及SEQ ID NO:24之VL序列；
ii) 或i)下之抗體的VH及VL之人類化變異體；
或E)

i) 包含SEQ ID NO:31之VH序列及SEQ ID NO:32之VL序列；
ii) 或i)下之抗體的VH及VL之人類化變異體；
或F)

i) 包含SEQ ID NO:39之VH序列及SEQ ID NO:40之VL序列；
ii) 或i)下之抗體的VH及VL之人類化變異體；
或G)

i) 包含SEQ ID NO:47之VH序列及SEQ ID NO:48之VL序列；
ii) 或i)下之抗體的VH及VL之人類化變異體；
或H)

i) 包含SEQ ID NO:55之VH序列及SEQ ID NO:56之VL序列；
ii) 或i)下之抗體的VH及VL之人類化變異體。

在一個實施例中，根據本發明之抗PD1抗體為單株抗體。

在一個實施例中，根據本發明之抗PD1抗體為人類、人類化或嵌合抗體。

在一個實施例中，根據本發明之抗PD1抗體為結合至PD1之抗體片段。

在一個實施例中，根據本發明之抗PD1抗體為Fab片段。

本發明提供一種編碼如前所述申請專利範圍中任一項之抗體的經分離核酸。

本發明提供包含此核酸之宿主細胞。

本發明提供產生抗體之方法，該方法包含培養宿主細胞以使得產生抗體。

本發明提供產生抗體之此方法，其進一步包含自宿主細胞回收抗體。

本發明提供包含本文中所描述之抗體及醫藥學上可接受之載劑的醫藥調配物。

本發明提供本文中所描述之用作藥物之抗體。

本發明提供本文中所描述之用於治療癌症之抗體。

本發明提供本文所述之抗體在藥物製造中之用途。在一個實施例中，藥物係用於治療癌症。

本發明提供治療患有癌症之個體的方法，該方法包含向個體投與有效量的本文中所描述之抗體。

【圖式簡單說明】

圖1： 具有嵌合PD1-0103之PD1之阻斷藉由同種異體受刺激第一人類T細胞來強有力地促進IFN- γ 分泌。

圖2：具有嵌合PD1-0103之PD1之阻斷藉由同種異體受刺激第一人類T細胞來強有力地增強干擾素- γ (IFN-g)分泌。

圖3：具有嵌合PD1-0103之PD1之阻斷藉由同種異體受刺激第一人類T細胞來強有力地增強腫瘤壞死因子 α (TNF)分泌。

圖4：4A) CD4 T細胞產生粒酶B之頻率及4B)在增大溶度之不同抗PD-1抗體的存在下在MLR之上清液中藉由吸光度(光密度，O.D.)所偵測之IFN- γ 的量

圖5：5A)在不同抗PD-1抗體之存在下PD1/PD-L1阻斷對重新激活經抑制T細胞受體信號傳導的影響 5B)在不同抗PD-1抗體之存在下PD1/PD-L1阻斷對重新激活經抑制T細胞受體信號傳導的影響

圖6：具有PD1 -0103之Fab的複合物中之PD1-ECD之結構

圖7：具有Fab PD1-0103之PD1-ECD複合物之結構：*PD1*上之ASN58處的糖基化涉及相互作用

圖8：具有Fab PD1-0103之PD1-ECD複合物之PD1-ECD複合物結構之結構：*關於抗原決定基/抗體結合部位的視圖*

圖9：Asn58-Fab PD1-0103重鏈處之接觸PD1核心糖側鏈：藉由5Å之距離截止值來識別接觸

圖10：與抗體相互作用之PD1-ECD殘基-具有具體接觸特性之序列視圖-*PD-1*

圖11：與PD1-ECD相互作用之抗體殘基-具有具體接觸特性之序列視圖-*重鏈*

圖12：與PD1-ECD相互作用之抗體殘基-具有具體接觸特性之序列視圖-*輕鏈*

圖13A：不同抗體至Asn58處經去糖基化之PD1 (左)及Asn58處經糖基化之PD1 (右)之結合(Biacore感測圖)

圖13B：不同抗體至Asn58處經去糖基化之PD1及Asn58處經糖基化之PD1之結合-藉由Biacore測定之締合解離速率單抗

圖14A：與組合有雙特異性CEA-CD3抗體(在高劑量下)的納武單抗(nivolumab)相比較，PD1-0103-0312 (aPD-1)之活體內腫瘤生長抑制

圖14B：與組合有雙特異性CEA-CD3抗體(在高劑量下)的納武單抗相比較，PD1-0103-0312 (aPD-1)之活體內腫瘤生長抑制

【實施方式】

出於本文之目的，「接受體人類構架」為包含源自如下文所定義之人類免疫球蛋白構架或人類共同構架之輕鏈可變域(VL)構架或重鏈可變域(VH)構架之胺基酸序列的構架。「源自」人類免疫球蛋白構架或人類共同構架之接受體人類構架可包含與人類免疫球蛋白構架或人類共同構架相同之胺基酸序列，或其可含有胺基酸序列變化。在一些實施例中，胺基酸變化之數目為10個或更少、9個或更少、8個或更少、7個或更少、6個或更少、5個或更少、4個或更少、3個或更少、或2個或更少。在一些實施例中，VL接受體人類構架之序列與VL人類免疫球蛋白構架序列或人類共同構架序列一致。

當在本文中使用时，術語「PD1」、「人類PD1」、「PD-1」或「人類PD-1」係指人類蛋白PD1 (SEQ ID NO:68) (不具信號序列之蛋白)/(SEQ ID NO:70) (具有信號序列之蛋白)。如本文所使用，「結合至人類PD1 (binding to human PD1)」、「特異性地結合至人類PD1」、「結合至人類PD1 (that binds to human PD1)」之抗體或「抗PD1抗體」係指特異性地

結合至人類PD1抗原或具有 K_D 值為 1.0×10^{-8} mol/l或更小、在一個實施例中 K_D 值為 1.0×10^{-9} mol/l或更小、在一個實施例中 K_D 值為 1.0×10^{-9} mol/l至 1.0×10^{-13} mol/l更小之結合親和力的其細胞外域(ECD)之抗體。藉由諸如表面電漿子共振技術(BIAcore®, GE-Healthcare Uppsala, Sweden)之標準結合分析(例如)使用PD1細胞外域來測定結合親和力。

人類PD1在SEQ ID NO.70之PD-1殘基49、58、74處具有N鍵連糖基化位點(參見(例如) D.Y. Lin等人, PNAS 105 (2008) 3011-3016))。PD-1之位置Asn58處的核心糖鏈(N鍵連糖基化)樹具有關於單醣之以下結構。在一個實施例中, PD1之Asn58處的核心糖鏈係指在Asn58處鏈接至PD1的前5個糖(單醣)。

Asn58-N-GlcNAc(FUC) - GlcNAc - BMA - MAN (參見圖9), 其中使用以下縮寫。

[GlcNAc]=NGA=N-乙醯基- β -D-半乳糖胺=2-(乙醯胺基)-2-去氧- β -D-吡喃半乳糖

[FUC]= α -L-海藻糖

[BMA]= β -D-吡喃甘露糖

[MAN]= α -D-吡喃甘露糖

糖鏈中之第一GlcNAc經海藻糖基化, 簡稱為GlcNAc (FUC)。

在一個實施例中, PD1之Asn58處的核心糖鏈係指在Asn58處連接至PD1之前5個糖(單醣) GlcNAc、FUC、GlcNAc、BMA、MAN。

術語「抗體」在本文中以最廣泛意義使用且涵蓋各種抗體結構, 包括(但不限於)單株抗體、多株抗體、多特異性抗體(例如, 雙特異性抗體)及抗體片段, 只要其展現所需抗原結合活性。

「抗體片段」係指除完整抗體之外包含完整抗體之一部分的分子，該部分結合該完整抗體所結合之抗原。抗體片段之實例包括(但不限於)Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、雙功能抗體、線性抗體、單鏈抗體分子(例如scFv)及由抗體片段形成之多特異性抗體。

作為參考抗體之「結合至相同抗原決定基之抗體」係指在競爭分析中阻斷參考抗體至其抗原之結合50%或更多的抗體，且相反地，在競爭分析中參考抗體阻斷該抗體至其抗原之結合50%或更多。本文提供一種例示性競爭分析。

術語「嵌合」抗體係指重鏈及/或輕鏈之一部分源自特定來源或物種，而重鏈及/或輕鏈之其餘部分源自不同來源或物種之抗體。

抗體之「類別」係指其重鏈所具有之恆定域或恆定區之類型。存在五種主要類別之抗體：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且此等中之若干可進一步分成子類(同型)，例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁及IgA₂。對應於不同類別之免疫球蛋白之重鏈恆定域分別稱作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。

如本文中所使用，術語「細胞毒性劑」係指抑制或預防細胞功能及/或導致細胞死亡或破壞之物質。細胞毒性劑包括(但不限於)放射性同位素(例如At211、I131、I125、Y90、Re186、Re188、Sm153、Bi212、P32、Pb212及Lu之放射性同位素)；化學治療劑或藥物(例如甲胺喋呤(methotrexate)、阿德力黴素(adriamicin)、長春花生物鹼(長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、依託泊苷(etoposide))、阿黴素(doxorubicin)、美法侖(melphalan)、絲裂黴素C (mitomycin C)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、道諾黴素(daunorubicin)或其他插入劑)；生長抑制劑；酶及其片段，諸如溶核酶；抗生素；毒素，諸如小分子毒素或細菌、

真菌、植物或動物來源之酶促活性毒素，包括其片段及/或變異體；以及以下所揭示之各種抗腫瘤或抗癌劑。

試劑(例如醫藥調配物)之「有效量」係指以必需劑量及持續必需時間段有效達成所需治療或防治結果之量。

本文中之術語「Fc區」用於定義含有恆定區之至少一部分的免疫球蛋白重鏈C端區。該術語包括原生序列Fc區及變異Fc區。在一個實施例中，人類IgG重鏈Fc區自Cys226或自Pro230延伸至重鏈之羧基端。然而，Fc區之C端離胺酸(Lys447)可存在或可不存在。除非本文另外說明，否則根據EU編號系統(亦稱為EU索引)編號Fc區或恆定區中之胺基酸殘基，如Kabat, E. A.等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，Public Health Service，National Institutes of Health, Bethesda，MD (1991)，NIH Publication 91-3242中所描述。

「構架」或「FR」係指除高變區(HVR)殘基以外的可變域殘基。可變域之FR一般由四個FR域構成：FR1、FR2、FR3及FR4。因此，HVR及FR序列一般在VH (或VL)中按以下序列出現：FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

術語「全長抗體」、「完整抗體」及「全抗體」在本文中可互換地使用，係指具有基本上類似於天然抗體結構之結構或具有含有如本文所定義之Fc區之重鏈的抗體。

術語「宿主細胞」、「宿主細胞系」及「宿主細胞培養物」可互換地使用且係指已引入外源核酸之細胞，包括此類細胞之子代。宿主細胞包括「轉型體」及「轉型細胞」，其包括第一轉型細胞及源自其之子代(不考慮繼代次數)。子代之核酸含量與親代細胞可能不完全相同，但可含有突

變。本文包括所篩分或選擇之與原始轉型細胞具有相同功能或生物活性的突變型子代。

「人類抗體」為具有對應於由人類或人類細胞產生或源自利用人類抗體譜系或其他人類抗體編碼序列之非人類來源的抗體之胺基酸序列的胺基酸序列之抗體。人類抗體之此定義特定排除包含非人類抗原結合殘基之人類化抗體。

「人類共同構架」為表示所選人類免疫球蛋白VL或VH構架序列中最常出現之胺基酸殘基的構架。一般而言，人類免疫球蛋白VL或VH序列係選自可變域序列之子群。一般而言，序列子群為如Kabat, E.A.等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), 第1至第3卷中之子群。在一個實施例中，對於VL，子群為如Kabat等人(同前文獻)中之子群卡帕(kappa) I。在一個實施例中，對於VH，子群為如Kabat等人(同前文獻)中之子群III。

「人類化」抗體係指包含來自非人類HVR之胺基酸殘基及來自人類FR之胺基酸殘基的嵌合抗體。在某些實施例中，人類化抗體將包含至少一個且通常兩個中之基本上全部的可變域，其中全部或基本上全部的HVR (例如CDR)對應於非人類抗體之HVR，且全部或基本上全部FR對應於人類抗體之FR。人類化抗體視情況可包含源自人類抗體之抗體恆定區之至少一部分。抗體(例如非人類抗體)之「人類化形式」係指已經歷人類化之抗體。

如本文所使用，術語「高變區」或「HVR」係指抗體可變域中序列高變(「互補決定區」或「CDR」)及/或形成結構上定義為環(「高變環」)

及/或含有抗原接觸殘基(「抗原接觸」)之區域中之每一者。一般而言，抗體包含六個HVR：三個在VH中(H1、H2、H3)，且三個在VL中(L1、L2、L3)。在本文中，例示性HVR包括：

(a) 出現在胺基酸殘基26-32 (L1)、50-52 (L2)、91-96 (L3)、26-32 (H1)、53-55 (H2)及96-101 (H3)處之高變環(Chothia及Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917(1987))；

(b) 出現在胺基酸殘基24-34 (L1)、50-56 (L2)、89-97 (L3)、31-35b (H1)、50-65 (H2)及95-102 (H3)處之CDR (Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))；

(c) 出現在胺基酸殘基27c-36 (L1)、46-55 (L2)、89-96 (L3)、30-35b (H1)、47-58 (H2)及93-101 (H3)處之抗原接觸(MacCallum等人 *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996))；及

(d) (a)、(b)及/或(c)之組合，包括HVR胺基酸殘基46-56 (L2)、47-56 (L2)、48-56 (L2)、49-56 (L2)、26-35 (H1)、26-35b (H1)、49-65 (H2)、93-102 (H3)及94-102 (H3)。

除非另外指示，否則在本文中根據Kabat等人(同前文獻)對可變域中之HVR殘基及其他殘基(例如，FR殘基)進行編號。

「免疫結合物」為與一或多個異源分子(包括(但不限於)細胞毒性劑)結合之抗體。

「個體(individual)」或「個體(subject)」為哺乳動物。哺乳動物包括(但不限於)馴養動物(例如牛、羊、貓、狗及馬)、靈長類動物(例如人類及非人類靈長類動物，諸如猴)、家兔及嚙齒動物(例如小鼠及大鼠)。在

某些實施例中，該個體(individual)或個體(subject)為人類。

「經分離」抗體為已與其天然環境之組分分離之抗體。在一些實施例中，抗體純化至大於95%或99%之純度，如藉由(例如)電泳(例如SDS-PAGE、等電聚焦(IEF)、毛細管電泳)或層析(例如離子交換或逆相HPLC)所測定。有關用於評定抗體純度之方法之綜述，參見(例如) Flatman, S. 等人, *J. Chromatogr. B* 848 (2007) 79-87。

「經分離」核酸係指已與其天然環境之組分分離的核酸分子。經分離核酸包括通常含有核酸分子之細胞中所含的核酸分子，但該核酸分子存在於染色體外或存在於不同於其天然染色體位置之染色體位置。

「編碼抗PD1抗體之經分離核酸」係指編碼抗體重鏈及輕鏈(或其片段)之一或多種核酸分子，包括單一載體或單獨載體中之此(此等)核酸分子及存在於宿主細胞中之一或多個位置處的此核酸分子。

如本文中所使用，術語「單株抗體」係指自實質上均質抗體之群體獲得之抗體，亦即除可能之變異抗體(例如含有天然存在之突變或在產生單株抗體製劑期間產生之變異抗體，此等變異體一般以較小量存在)之外，構成該群體之個別抗體相同及/或結合相同抗原決定基。相比於通常包括針對不同決定子(抗原決定基)之不同抗體的多株抗體製劑，單株抗體製劑之每一單株抗體係針對抗原上之單一決定子。因此，修飾語「單株」指示抗體之特性為自實質上均質之抗體群體獲得，且不應解釋為需要藉由任何特定方法產生該抗體。舉例而言，根據本發明使用之單株抗體可藉由多種技術製得，包括(但不限於)融合瘤方法、重組DNA方法、噬菌體呈現方法及利用含有全部或部分人類免疫球蛋白基因座之轉殖基因動物的方法、本文所述的製得單株抗體之此類方法及其他例示性方法。

「裸抗體」係指未與異源部分(例如細胞毒性部分)或放射性標記結合之抗體。裸抗體可存在於醫藥調配物中。(若先前技術具有免疫結合物，則包括)。

「天然抗體」係指具有不同結構的天然存在之免疫球蛋白分子。舉例而言，天然IgG抗體為約150,000道爾頓(dalton)之雜四聚體醣蛋白，其由二硫鍵鍵結之兩條相同輕鏈及兩條相同重鏈構成。自N端至C端，每一重鏈具有可變區(VH)，亦稱為可變重鏈域或重鏈可變域，繼之為三個恆定域(CH1、CH2及CH3)。類似地，自N端至C端，每一輕鏈具有可變區(VL)，亦稱為可變輕鏈域或輕鏈可變域，繼之為恆定輕鏈(CL)域。抗體輕鏈可基於其恆定域之胺基酸序列而歸為稱為卡帕 (κ)及拉姆達(lambda) (λ)的兩種類型中之一者。

術語「藥品說明書」用於指通常包括於治療性產品之商業包裝中之說明書，其含有關於適應症、用法、劑量、投與、組合療法、禁忌之資訊及/或與使用該等治療性產品有關之警告。

相對於參考多肽序列之「胺基酸序列一致性百分比(%)」定義為在比對序列且引入空位(若需要)以達到最大序列一致性百分比之後，與參考多肽序列中之胺基酸殘基一致的候選序列中之胺基酸殘基的百分比，且不將任何保守性取代基視為序列一致性之一部分。用於測定胺基酸序列一致性百分比之目的的比對可以此項技術之技能範圍內之各種方式達成，例如使用公開可獲得之電腦軟體，諸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR)軟體。熟習此項技術者可測定用於比對序列之適當參數，包括在所比較序列之全長內達成最大比對所需的任何算法。然而，出於本文之目的，使用序列比較電腦程式ALIGN-2生成胺基酸序列一致性%值。

ALIGN-2序列比較電腦程式由Genentech, Inc.編寫，且源碼已隨使用者文件一起提交於美國版權局(U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559，其在美國版權局註冊於美國版權註冊第TXU510087號下。ALIGN-2程式可公開購自Genentech, Inc., South San Francisco, California或可自源碼編譯。ALIGN-2程式經編譯可用於包括數位UNIX V4.0D之UNIX操作系統。所有序列比較參數由ALIGN-2程式設置且不變化。

在採用ALIGN-2進行胺基酸序列比較之情形下，給定胺基酸序列A相對於、與或針對既定胺基酸序列B之胺基酸序列一致性% (其可替代地表述為，既定胺基酸序列A具有或包含相對於、與或針對既定胺基酸序列B的一定的胺基酸序列一致性%)如下計算：

$$100 \text{ 乘以分率 } X/Y$$

其中X為在A與B之比對程式中藉由序列比對程式ALIGN-2評為一致匹配之胺基酸殘基之數目，且其中Y為B中之胺基酸殘基之總數目。應瞭解，當胺基酸序列A之長度並不等於胺基酸序列B之長度時，A相對於B之胺基酸序列一致性%將不等於B相對於A之胺基酸序列一致性%。除非特定陳述，否則本文所使用之所有胺基酸序列一致性%值如剛剛前段中所述之使用ALIGN-2電腦程式獲得。

術語「醫藥調配物」係指呈准許其中所含活性成分之生物活性有效之形式且不含對將投與調配物之個體有不可接受毒性之額外組分的製劑。

「醫藥學上可接受之載劑」係指醫藥調配物中除活性成分之外對個體無毒的成分。醫藥學上可接受之載劑包括(但不限於)緩衝劑、賦形劑、穩定劑或防腐劑。

如本文所使用，「治療(treatment)」(及其語法變化形式，諸如「治療(treat)」或「治療(treating)」)係指試圖改變受治療個體之自然病程之臨床干預且可出於防治目的或在臨床病理學之病程期間進行。理想治療效果包括(但不限於)預防疾病發生或復發、緩解症狀、減輕疾病之任何直接或間接病理性結果、預防癌轉移、減緩疾病進展速率、改善或緩和疾病病況及緩解或改良預後。在一些實施例中，本發明之抗體用於延遲疾病發展或減慢疾病進展。

術語「可變區」或「可變域」係指涉及將抗體結合至抗原之抗體重鏈或輕鏈域。天然抗體之重鏈及輕鏈(分別為VH及VL)之可變域一般具有相似結構，其中每一域皆包含四個保守構架區(FR)及三個高變區(HVR)。(參見(例如) Kindt, T.J.等人 *Kuby Immunology*, 第6版, W.H. Freeman 及 Co., N.Y. (2007), 第91頁)，單一VH或VL域可足以賦予抗原結合特異性。此外，可使用來自結合抗原之抗體的VH或VL域分離結合特定抗原之抗體以分別篩分互補VL或VH域之庫。參見(例如)，Portolano, S.等人, *J. Immunol.* 150 (1993) 880-887； Clackson, T.等人, *Nature* 352 (1991) 624-628)。

如本文中所使用，術語「載體」係指能夠傳播其所連接之另一核酸的核酸分子。該術語包括作為自體複製核酸結構之載體以及併入其已引入之宿主細胞之基因組中的載體。某些載體能夠引導其以操作方式連接之核酸的表現。此類載體在本文中稱為「表現載體」。

I. 組合物及方法

在一個態樣中，本發明部分基於發現所選擇的本發明之抗PD1抗體結合至PD1之某些抗原決定基，且具有提高不同免疫細胞(例如T細胞、B細

胞、NK細胞、樹突狀細胞(DC)、單核細胞及巨噬細胞)之活性的能力。例如，其提高免疫調節細胞激素(例如干擾素 γ 及粒酶B)釋放(分泌)。經提高或可經提高之其他免疫調節細胞激素為(例如)腫瘤壞死因子 α (TNF α)分泌及IL-12。如本文所使用，術語干擾素- γ (IFN- γ)、腫瘤壞死因子 α (TNF α)分泌、IL-12等係指人類細胞激素。

在某些實施例中，提供結合至PD1之抗體。本發明之抗體適用於(例如)診斷或治療癌症。

A. 例示性抗PD1抗體

在一個態樣中，本發明提供結合至人類PD1之經分離抗體。

在某些實施例中，提供一種抗PD1，其中該抗體：

i) 與包含PD1-0103之VH及VL之抗PD1抗體競爭結合至PD-1；及

ii) 結合至人類及獼猴PD-1；及

iii) 在10 $\mu\text{g/ml}$ 之抗體濃度下藉由同種異體受刺激T細胞使干擾素- γ (IFN- γ)分泌提高85%或更多(在一個較佳實施例中為90%或更多、在一個較佳實施例中為95%或更多) (其中將不藉由抗體之分泌設定為0% (IFN γ 之基本位準)且將藉由20 EU/ml重組人類IL-2之分泌設定為100% (在根據實例3之(同種異體)混合淋巴細胞反應(MLR)分析中)；及/或

iv) 在10 $\mu\text{g/ml}$ 之抗體濃度下藉由同種異體受刺激T細胞使腫瘤壞死因子 α (TNF α)分泌提高200%或更多(在一個較佳實施例中為250%或更多) (其中將不藉由抗體之分泌設定為0% (IFN γ 之基本位準)且將藉由20 EU/ml重組人類IL-2之分泌設定為100% (在根據實例3之(同種異體)混合淋巴細胞反應(MLR)分析中)。

在一個態樣中，本發明提供一種抗PD1抗體，其包含(a)包含SEQ ID

NO:1之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列的HVR-L3。

在另一態樣中，本發明之抗體包含(a) VH域，其包含(i)包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:3之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含(i)包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列的HVR-L2及(iii)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列的HVR-L3。

在一個實施例中，此抗PD1抗體包含

- i) SEQ ID NO:7之VH序列及SEQ ID NO:8之VL序列；
- ii) 或i)下之抗體的VH及VL之人類化變異體。

在一個實施例中，此抗PD1抗體包含

- i) SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:58之VL序列；或
- ii) SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:59之VL序列；或
- iii) SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:60之VL序列；或
- iv) SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:61之VL序列。

在一個實施例中，此抗PD1抗體包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:58之VL序列。

在一個實施例中，此抗PD1抗體包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:59之VL序列。

在一個實施例中，此抗PD1抗體包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ

ID NO:60之VL序列。

在一個實施例中，此抗PD1抗體包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:61之VL序列。

在一個態樣中，本發明提供一種抗PD1抗體，其包含至少一個、兩個、三個、四個、五個或六個選自以下各者之HVR：(a)包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:10之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:11之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:13之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列的HVR-L3。

在一個態樣中，本發明提供一種抗PD1抗體，其包含(a)包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:10之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:11之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:13之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列的HVR-L3。

在另一態樣中，本發明之抗體包含(a) VH域，其包含至少一個、至少兩個或全部三個選自以下各者之VH HVR序列：(i)包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:10之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:11之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含至少一個、至少兩個或全部三個選自以下各者之VL HVR序列：(i)包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:13之胺基酸序列的HVR-L2及(c)包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列的HVR-L3。

在另一態樣中，本發明之抗體包含(a) VH域，其包含(i)包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:10之胺基酸序列的

HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:11之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含(i)包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:13之胺基酸序列的HVR-L2及(iii)包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列的HVR-L3。

在一個實施例中，此抗PD1抗體包含

- i) 包含SEQ ID NO:15之VH序列及SEQ ID NO:16之VL序列；
- ii) 或i)下之抗體的VH及VL之人類化變異體。

在一個態樣中，本發明提供一種抗PD1抗體，其包含至少一個、兩個、三個、四個、五個或六個選自以下各者之HVR：(a)包含SEQ ID NO:17之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:18之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:20之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列的HVR-L3。

在一個態樣中，本發明提供一種抗PD1抗體，其包含(a)包含SEQ ID NO:17之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:18之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:20之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列的HVR-L3。

在另一態樣中，本發明之抗體包含(a) VH域，其包含至少一個、至少兩個或全部三個選自以下各者之VH HVR序列：(i)包含SEQ ID NO:17之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:18之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:19之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含至少一個、至少兩個或全部三個選自以下各者之VL HVR序

列：(i)包含SEQ ID NO:20之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的HVR-L2及(c)包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列的HVR-L3。

在另一態樣中，本發明之抗體包含(a) VH域，其包含(i)包含SEQ ID NO:17之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:18之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:19之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含(i)包含SEQ ID NO:20之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的HVR-L2及(iii)包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列的HVR-L3。

在一個實施例中，此抗PD1抗體包含

- i) 包含SEQ ID NO:23之VH序列及SEQ ID NO:24之VL序列；
- ii) 或i)下之抗體的VH及VL之人類化變異體。

在一個態樣中，本發明提供一種抗PD1抗體，其包含至少一個、兩個、三個、四個、五個或六個選自以下各者之HVR：(a)包含SEQ ID NO:25之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:26之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:27之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:28之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:29之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:30之胺基酸序列的HVR-L3。

在一個態樣中，本發明提供一種抗PD1抗體，其包含(a)包含SEQ ID NO:25之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:26之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:27之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:28之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:29之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:30之胺基酸序列的HVR-L3。

在另一態樣中，本發明之抗體包含(a) VH域，其包含至少一個、至少兩個或全部三個選自以下各者之VH HVR序列：(i)包含SEQ ID NO:25之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:26之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:27之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含至少一個、至少兩個或全部三個選自以下各者之VL HVR序列：(i)包含SEQ ID NO:28之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:29之胺基酸序列的HVR-L2及(c)包含SEQ ID NO:30之胺基酸序列的HVR-L3。

在另一態樣中，本發明之抗體包含(a) VH域，其包含(i)包含SEQ ID NO:25之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:26之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:27之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含(i)包含SEQ ID NO:28之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:29之胺基酸序列的HVR-L2及(iii)包含SEQ ID NO:30之胺基酸序列的HVR-L3。

在一個實施例中，此抗PD1抗體包含

- i) 包含SEQ ID NO:31之VH序列及SEQ ID NO:32之VL序列；
- ii) 或i)下之抗體的VH及VL之人類化變異體。

在一個態樣中，本發明提供一種抗PD1抗體，其包含至少一個、兩個、三個、四個、五個或六個選自以下各者之HVR：(a)包含SEQ ID NO:33之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:34之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:35之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:36之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列的HVR-L3。

在一個態樣中，本發明提供一種抗PD1抗體，其包含(a)包含SEQ ID NO:33之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:34之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:35之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:36之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列的HVR-L3。

在另一態樣中，本發明之抗體包含(a) VH域，其包含至少一個、至少兩個或全部三個選自以下各者之VH HVR序列：(i)包含SEQ ID NO:33之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:34之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:35之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含至少一個、至少兩個或全部三個選自以下各者之VL HVR序列：(i)包含SEQ ID NO:36之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的HVR-L2及(c)包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列的HVR-L3。

在另一態樣中，本發明之抗體包含(a) VH域，其包含(i)包含SEQ ID NO:33之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:34之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:35之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含(i)包含SEQ ID NO:36之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的HVR-L2及(iii)包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列的HVR-L3。

在一個實施例中，此抗PD1抗體包含

- i) 包含SEQ ID NO:39之VH序列及SEQ ID NO:40之VL序列；
- ii) 或i)下之抗體的VH及VL之人類化變異體。

在一個態樣中，本發明提供一種抗PD1抗體，其包含至少一個、兩

個、三個、四個、五個或六個選自以下各者之HVR：(a)包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:43之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:44之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:45之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:46之胺基酸序列的HVR-L3。

在一個態樣中，本發明提供一種抗PD1抗體，其包含(a)包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:43之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:44之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:45之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:46之胺基酸序列的HVR-L3。

在另一態樣中，本發明之抗體包含(a) VH域，其包含至少一個、至少兩個或全部三個選自以下各者之VH HVR序列：(i)包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:43之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含至少一個、至少兩個或全部三個選自以下各者之VL HVR序列：(i)包含SEQ ID NO:44之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:45之胺基酸序列的HVR-L2及(c)包含SEQ ID NO:46之胺基酸序列的HVR-L3。

在另一態樣中，本發明之抗體包含(a) VH域，其包含(i)包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:43之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含(i)包含SEQ ID NO:44之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:45之胺基酸序列的HVR-L2及(iii)包含SEQ ID NO:46之胺基

酸序列的HVR-L3。

在一個實施例中，此抗PD1抗體包含

- i) 包含SEQ ID NO:47之VH序列及SEQ ID NO:48之VL序列；
- ii) 或i)下之抗體的VH及VL之人類化變異體。

在一個態樣中，本發明提供一種抗PD1抗體，其包含至少一個、兩個、三個、四個、五個或六個選自以下各者之HVR：(a)包含SEQ ID NO:49之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:50之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:51之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:52之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:53之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:54之胺基酸序列的HVR-L3。

在一個態樣中，本發明提供一種抗PD1抗體，其包含(a)包含SEQ ID NO:49之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:50之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:51之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:52之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:53之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:54之胺基酸序列的HVR-L3。

在另一態樣中，本發明之抗體包含(a) VH域，其包含至少一個、至少兩個或全部三個選自以下各者之VH HVR序列：(i)包含SEQ ID NO:49之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:50之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:51之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含至少一個、至少兩個或全部三個選自以下各者之VL HVR序列：(i)包含SEQ ID NO:52之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:53之胺基酸序列的HVR-L2及(c)包含SEQ ID NO:54之胺基酸序列的HVR-L3。

在另一態樣中，本發明之抗體包含(a) VH域，其包含(i)包含SEQ ID NO:49之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:50之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:51之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含(i)包含SEQ ID NO:52之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:53之胺基酸序列的HVR-L2及(iii)包含SEQ ID NO:54之胺基酸序列的HVR-L3。

在一個實施例中，此抗PD1抗體包含

- i) 包含SEQ ID NO:47之VH序列及SEQ ID NO:48之VL序列；
- ii) 或i)下之抗體的VH及VL之人類化變異體。

在一個較佳實施例中，提供一種結合至與包含SEQ ID NO:7之VH序列及SEQ ID NO:8之VL序列的抗PD1抗體相同之抗原決定基的抗體。

在一個較佳實施例中，提供一種與包含SEQ ID NO:7之VH序列及SEQ ID NO:8之VL序列之抗PD1抗體競爭結合至人類PD1之抗體(如實例2中所描述之競爭分析中所測定(抗原決定基定位ELISA/結合競爭分析))。

在一個態樣中，本發明提供一種包含以下各者之抗PD1抗體(例如結合至人類PD1之抗體)

A) (a)包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列的HVR-L3；或

在另一態樣中，本發明提供一種包含以下各者之抗PD1抗體(例如結合至人類PD1之抗體)

(a) (a) VH域，其包含(i)包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:3之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含(i)包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列的HVR-L2及(iii)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列的HVR-L3。

在一個態樣中，本發明提供一種結合至人類PD1之抗體，該人類PD1

A)

i) 包含SEQ ID NO:7之VH序列及SEQ ID NO:8之VL序列；

ii) 或i)下之抗體的VH及VL之人類化變異體；

或B)

i) 包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:58之VL序列；

ii) 包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:59之VL序列；

iii) 包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:60之VL序列；

iv) 包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:61之VL序列；

或C)

i) 包含SEQ ID NO:15之VH序列及SEQ ID NO:16之VL序列；

ii) 或i)下之抗體的VH及VL之人類化變異體；

或D)

i) 包含SEQ ID NO:23之VH序列及SEQ ID NO:24之VL序列；

ii) 或i)下之抗體的VH及VL之人類化變異體；

或E)

i) 包含SEQ ID NO:31之VH序列及SEQ ID NO:32之VL序列；

ii) 或i)下之抗體的VH及VL之人類化變異體；

或F)

i) 包含SEQ ID NO:39之VH序列及SEQ ID NO:40之VL序列；

ii) 或i)下之抗體的VH及VL之人類化變異體；

或G)

i) 包含SEQ ID NO:47之VH序列及SEQ ID NO:48之VL序列；

ii) 或i)下之抗體的VH及VL之人類化變異體；

或H)

i) 包含SEQ ID NO:55之VH序列及SEQ ID NO:56之VL序列；

ii) 或i)下之抗體的VH及VL之人類化變異體。

在一個態樣中，本發明提供一種結合至人類PD1之抗體，該人類PD1

i) 包含SEQ ID NO:7之VH序列及SEQ ID NO:8之VL序列；

ii) 或i)下之抗體的VH及VL之人類化變異體。

在一個態樣中，本發明提供一種結合至包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:58之VL序列的人類PD1之抗體。

在一個態樣中，本發明提供一種結合至包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:59之VL序列的人類PD1之抗體。

在一個態樣中，本發明提供一種結合至包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:60之VL序列的人類PD1之抗體。

在一個態樣中，本發明提供一種結合至包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:61之VL序列的人類PD1之抗體。

在另一態樣中，本發明提供一種包含以下各者之抗PD1抗體(例如結合至人類PD1之抗體)

A) (a)包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID

NO:2之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列的HVR-L3；或

B) (a)包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:10之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:11之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:13之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列的HVR-L3；或

C) (a)包含SEQ ID NO:17之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:18之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:20之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列的HVR-L3；或

D) (a)包含SEQ ID NO:25之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:26之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:27之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:28之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:29之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:30之胺基酸序列的HVR-L3；或

E) (a)包含SEQ ID NO:33之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:34之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:35之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:36之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:38之胺基

酸序列的HVR-L3；或

F) (a)包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:43之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:44之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:45之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:46之胺基酸序列的HVR-L3；或

G) (a)包含SEQ ID NO:49之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:50之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:51之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:52之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:53之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:54之胺基酸序列的HVR-L3；

其中該抗體係分別獨立由以下一或多項特性表徵：該抗PD-1抗體

i) 與包含PD1-0103之VH及VL之抗PD-1抗體競爭結合至PD-1；及/或

ii) 結合至人類及獼猴PD-1；及/或

iii) 在10 $\mu\text{g/ml}$ 之抗體濃度下藉由同種異體受刺激T細胞使干擾素- γ (IFN- γ)分泌提高85%或更多(在一個較佳實施例中為90%或更多、在一個較佳實施例中為95%或更多) (其中將不藉由抗體之分泌設定為0% (IFN γ 之基本位準)且將藉由20 EU/ml重組人類IL-2之分泌設定為100% (在根據實例3之(同種異體)混合淋巴細胞反應(MLR)分析中)；及/或

iv) 在10 $\mu\text{g/ml}$ 之抗體濃度下藉由同種異體受刺激T細胞使腫瘤壞死因子 α (TNF α)分泌提高200%或更多(在一個較佳實施例中為250%或更多) (其中將不藉由抗體之分泌設定為0% (IFN γ 之基本位準)且將藉由20

EU/ml重組人類IL-2之分泌設定為100% (在根據實例3之(同種異體)混合淋巴細胞反應(MLR)分析中)。

在另一態樣中，本發明提供一種包含以下各者之抗PD1抗體(例如結合至人類PD1之抗體)

A) (a) VH域，其包含(i)包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:3之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含(i)包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列的HVR-L2及(iii)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列的HVR-L3；或

B) (a) VH域，其包含(i)包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:10之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:11之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含(i)包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:13之胺基酸序列的HVR-L2及(iii)包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列的HVR-L3；或

C) (a) VH域，其包含(i)包含SEQ ID NO:17之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:18之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:19之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含(i)包含SEQ ID NO:20之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的HVR-L2及(iii)包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列的HVR-L3；或

D) (a) VH域，其包含(i)包含SEQ ID NO:25之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:26之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:27之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含(i)包含SEQ ID NO:28之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:29之胺基酸序列的

HVR-L2及(iii)包含SEQ ID NO:30之胺基酸序列的HVR-L3；或

E) (a) VH域，其包含(i)包含SEQ ID NO:33之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:34之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:35之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含(i)包含SEQ ID NO:36之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的HVR-L2及(iii)包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列的HVR-L3；或

F) (a) VH域，其包含(i)包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:43之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含(i)包含SEQ ID NO:44之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:45之胺基酸序列的HVR-L2及(iii)包含SEQ ID NO:46之胺基酸序列的HVR-L3；或

G) (a) VH域，其包含(i)包含SEQ ID NO:49之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:50之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:51之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含(i)包含SEQ ID NO:52之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:53之胺基酸序列的HVR-L2及(iii)包含SEQ ID NO:54之胺基酸序列的HVR-L3；

其中該抗體係分別獨立由以下一或多項特性表徵：該抗PD-1抗體

i) 與包含PD1-0103之VH及VL之抗PD-1抗體競爭結合至PD-1；及
/或

ii) 結合至人類及獼猴PD-1；及/或

iii) 在10 $\mu\text{g/ml}$ 之抗體濃度下藉由同種異體受刺激T細胞使干擾素- γ (IFN- γ)分泌提高85%或更多(在一個較佳實施例中為90%或更多、在一個較佳實施例中為95%或更多) (其中將不藉由抗體之分泌設定為0% (IFN γ

之基本位準)且將藉由20 EU/ml重組人類IL-2之分泌設定為100% (在根據實例3之(同種異體)混合淋巴細胞反應(MLR)分析中); 及/或

iv) 在10 µg/ml之抗體濃度下藉由同種異體受刺激T細胞使腫瘤壞死因子α (TNF α)分泌提高200%或更多(在一個較佳實施例中為250%或更多)(其中將不藉由抗體之分泌設定為0% (IFN γ之基本位準)且將藉由20 EU/ml重組人類IL-2之分泌設定為100% (在根據實例3之(同種異體)混合淋巴細胞反應(MLR)分析中)。

在本發明之再一態樣中, 根據以上實施例中之任一者之抗PD1抗體為包括嵌合、人類化或人類抗體之單株抗體。在一個實施例中, 抗PD1抗體為抗體片段, 例如Fv、Fab、Fab'、scFv、雙功能抗體或F(ab')₂片段。在另一實施例中, 該抗體為全長抗體, 例如完整IgG1或IgG4抗體或如本文所定義之其他抗體類別或同型。

在另一態樣中, 根據以上實施例中之任一者之抗PD1抗體可以單一或組合之方式合併如以下部分1至7中所述之該等特徵中之任一者:

1. 抗體親和力

在某些實施例中, 本文所提供之抗體之解離常數KD ≤ 1 µM、≤ 100 nM、≤ 10 nM、≤ 1 nM、≤ 0.1 nM、≤ 0.01 nM或≤ 0.001 nM (例如10⁻⁸ M或更小, 例如自10⁻⁸ M至10⁻¹³ M, 例如自10⁻⁹ M至10⁻¹³ M)。

在一個較佳實施例中, 使用表面電漿子共振分析(使用BIAcore®)在25°C下用約10個反應單位(RU)之固定化抗原CM5晶片量測KD。簡言之, 根據供應商說明書, 用N-乙基-N'-(3-二甲胺基丙基)-碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC)及N-羥基丁二醯亞胺(NHS)來活化羧基甲基化葡聚糖生物感測器晶片(CM5, BIAcore, Inc.)。用10 mM乙酸鈉(pH 4.8)將抗原稀釋

至5 $\mu\text{g/ml}$ (約0.2 μM)之後，以5 $\mu\text{l/分鐘}$ 之流動速率注射以獲得10個反應單位(RU)之偶合蛋白達成約。在注射抗原後，注射1 M乙醇胺以阻斷未反應之基團。對於動力學量測，在25°C下以約25 $\mu\text{l/min}$ 之流動速率將Fab (0.78 nM至500 nM)之兩倍連續稀釋液注射於具有0.05%聚山梨醇酯20 (TWEEN-20TM)界面活性劑(PBST)之PBS中。使用簡單的一比一朗格繆爾結合模型(one-to-one Langmuir binding model) (BIAcore[®] 評估軟體3.2版)藉由同時擬合締合及解離感測圖譜來計算締合速率(k_{on} 或 k_a)及解離速率(k_{off} 或 k_d)。平衡解離常數KD經計算為 k_d/k_a 之比率($k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$)。參見(例如) Chen, Y.等人, J. Mol. Biol. 293 (1999) 865-881。若藉由上文的表面電漿子共振分析測定之締合速率超過 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ，則締合速率可使用螢光淬滅技術量測，該技術在如光譜儀(諸如具有攪拌式光析槽之止流裝備型分光光度計(Aviv Instruments)或8000-系列SLM-AMINCOTM分光光度計(ThermoSpectronic))中所量測之濃度提高之抗原存在下、在25°C下量測PBS (pH 7.2)中之20 nM抗-抗原抗體(Fab形式)之螢光發射強度(激發= 295 nm；發射= 340 nm，16 nm帶通)之提高或減少。

2. 抗體片段

在某些實施例中，本文所提供之抗體為抗體片段。抗體片段包括(但不限於) Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv及scFv片段，及下文所描述之其他片段。有關某些抗體片段之綜述，參見Hudson, P.J.等人, Nat. Med. 9 (2003) 129-134。有關scFv片段之綜述，參見(例如) Plueckthun, A., In; The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 第113卷，Rosenburg and Moore (編), Springer-Verlag, New York (1994), 第269至第315頁；亦參

見WO 93/16185；及美國專利第5,571,894號及第5,587,458號。有關包含救助受體結合抗原決定基殘基及具有延長之活體內半衰期之Fab及F(ab')₂片段的論述，參見美國專利第5,869,046號。

雙功能抗體為具有可為二價或雙特異性之兩個抗原結合位點之抗體片段。參見(例如) EP 0 404 097；WO 1993/01161；Hudson, P.J.等人, Nat. Med. 9 (2003) 129-134；及Holliger, P.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448。三功能抗體及四功能抗體亦描述於Hudson, P.J.等人, Nat. Med. 9 (2003) 129-134)中。

單域抗體為包含抗體之全部或部分重鏈可變域或全部或部分輕鏈可變域的抗體片段。在某些實施例中，單域抗體為人類單域抗體(Domantis, Inc., Waltham, MA；參見(例如)美國專利第6,248,516 B1號)。

抗體片段可藉由各種技術製得，包括(但不限於)如本文中所描述之蛋白分解消化完整抗體以及藉由重組宿主細胞(例如大腸桿菌或噬菌體)產生。

3. 嵌合及人類化抗體

在某些實施例中，本文所提供之抗體為嵌合抗體。某些嵌合抗體描述於(例如)美國專利第4,816,567號；及Morrison, S.L.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855中。在一個實例中，嵌合抗體包含非人類可變區(例如，源自小鼠、大鼠、倉鼠、兔或非人類靈長類動物(諸如猴)之可變區)及人類恆定區。在另一實例中，嵌合抗體為「類別轉換」抗體，其中類別或子類已自親本抗體之類別或子類變化。嵌合抗體包括其抗原結合片段。

在某些實施例中，嵌合抗體為人類化抗體。通常，對非人類抗體進

行人類化以降低對人類之免疫原性，同時保留親本非人類抗體之特異性及親和力。一般而言，人類化抗體包含一或多個可變域，其中HVR (例如CDR) (或其部分)源自非人類抗體，且FR (或其部分)源自人類抗體序列。人類化抗體視情況亦將包含人類恆定區之至少一部分。在一些實施例中，人類化抗體中之一些FR殘基經來自非人類抗體(例如，HVR殘基所衍生之抗體)之相應殘基取代以(例如)恢復或改良抗體特異性或親和力。

人類化抗體及其製造方法綜述於(例如) Almagro, J.C.及Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633中，且進一步描述於(例如) Riechmann, I.等人, *Nature* 332 (1988) 323-329；Queen, C.等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 10029-10033；美國專利第5,821,337號、第7,527,791號、第6,982,321號及第7,087,409號；Kashmiri, S.V.等人, *Methods* 36 (2005) 25-34 (描述SDR (a-CDR)移植)；Padlan, E.A., *Mol. Immunol.* 28 (1991) 489-498 (描述「表面再塑」)；Dall'Acqua, W.F.等人, *Methods* 36 (2005) 43-60 (描述「FR改組」)；及Osbourn, J.等人, *Methods* 36 (2005) 61-68及Klimka, A.等人, *Br. J. Cancer* 83 (2000) 252-260 (描述FR改組之「導引選擇」方法)中。

可用於人類化之人類構架區包括(但不限於)：使用「最適合」方法選擇之構架區(參見(例如) Sims, M.J. 等人, *J. Immunol.* 151 (1993) 2296-2308)；源自具有輕鏈或重鏈可變區之特定子群之人類抗體共同序列的構架區(參見(例如) Carter, P.等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289；及Presta, L.G.等人, *J. Immunol.* 151 (1993) 2623-2632)；人類成熟(體細胞突變)構架區或人類生殖系構架區(參見(例如) Almagro,

J.C.及Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633); 及源自篩分FR庫之構架區(參見(例如) Baca, M.等人, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 10678-10684及Rosok, M.J.等人, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 22611-22618))。

4. 人類抗體

在某些實施例中，本文所提供之抗體為人類抗體。可使用此項技術中已知之各種技術產生人類抗體。人類抗體一般描述於van Dijk, M.A.及van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Pharmacol.* 5 (2001) 368-374及Lonberg, N., *Curr. Opin. Immunol.* 20 (2008) 450-459中。

人類抗體可藉由將免疫原投與已經修飾以回應於抗原攻擊而產生完整人類抗體或具有人類可變區之完整抗體的轉殖基因動物來製備。此類動物通常含有人類免疫球蛋白基因座的全部或一部分，其置換內源性免疫球蛋白基因座，或其存在於染色體外或隨機整合至動物染色體中。在此類轉殖基因小鼠中，內源性免疫球蛋白基因座一般已失活。有關用於自轉殖基因動物獲得人類抗體之方法之綜述，參見Lonberg, N., *Nat. Biotech.* 23 (2005) 1117-1125。亦參見(例如)描述XENOMOUSE™技術之美國專利第6,075,181號及第6,150,584號；描述HUMAB®技術之美國專利第5,770,429號；描述K-M MOUSE®技術之美國專利第7,041,870號；及描述VELOCIMOUSE®技術之美國專利申請公開案第US 2007/0061900號。可(例如)藉由與不同人類恆定區組合來進一步修飾由此類動物產生之完整抗體之人類可變區。

人類抗體亦可藉由基於融合瘤之方法製得。已描述用於產生人類單株抗體之人類骨髓瘤及小鼠-人類融合骨髓瘤細胞系。(參見(例如) Kozbor, D., *J. Immunol.* 133 (1984) 3001-3005; Brodeur, B.R. 等人，

Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York (1987), 第51頁至第63頁；及Boerner, P.等人, J. Immunol. 147 (1991) 86-95)；藉助於人類B細胞融合瘤技術生成之人類抗體亦描述於Li, J.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103 (2006) 3557-3562中。額外方法包括描述於(例如)美國專利第7,189,826號(描述自融合瘤細胞系產生單株人類IgM抗體)及Ni, J., Xiandai Mianyixue 26 (2006) 265-268 (描述人類-人類融合瘤)中之彼等方法。人類融合瘤技術(三源融合瘤技術)亦描述於Vollmers, H.P.及Brandlein, S., Histology and Histopathology 20 (2005) 927-937及Vollmers, H.P.及Brandlein, S., Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology 27 (2005) 185-191中。

人類抗體亦可藉由分離選自人源噬菌體呈現庫之Fv選殖可變域序列產生。此類可變域序列接著可與所需人類恆定域組合。下文描述用於自抗體庫選擇人類抗體之技術。

5. 庫源抗體

本發明之抗體可藉由針對具有所需活性之抗體的篩分組合庫來分離。舉例而言，用於生成噬菌體呈現文庫及篩分具有所需結合特徵之抗體的此類文庫之各種方法在此項技術中係已知的。此類方法綜述於(例如) Hoogenboom, H.R.等人, Methods in Molecular Biology 178 (2001) 1-37 中，且進一步描述於(例如) McCafferty, J.等人, Nature 348 (1990) 552-554；Clackson, T.等人, Nature 352 (1991) 624-628；Marks, J.D.等人, J. Mol. Biol. 222 (1992) 581-597；Marks, J.D.及Bradbury, A., Methods in Molecular Biology 248 (2003) 161-175；Sidhu, S.S.等人, J. Mol. Biol.

338 (2004) 299-310 ; Lee, C.V.等人, J. Mol. Biol. 340 (2004) 1073-1093 ; Fellouse, F.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (2004) 12467-12472 ; 及Lee, C.V.等人, J. Immunol. Methods 284 (2004) 119-132中。

在某些噬菌體呈現方法中，VH及VL基因之譜系藉由聚合酶鏈式反應(PCR)單獨選殖且在噬菌體庫中隨機重組，其可接著如Winter, G.等人, Ann. Rev. Immunol. 12 (1994) 433-455中所述篩分抗原結合噬菌體。噬菌體通常以單鏈Fv (scFv)片段或以Fab片段之形式顯示抗體片段。來自經免疫來源之庫向免疫原提供高親和力抗體而無需構築融合瘤。替代地，可選殖原初譜系(例如自人類)以提供多種非自體抗原以及自體抗原之抗體之單一來源而無需任何免疫接種，如Griffiths, A.D.等人, EMBO J. 12 (1993) 725-734所述。最後，亦可藉由自幹細胞選殖未重排之V基因區段且使用含有隨機序列之PCR引子編碼高可變CDR3區並完成活體外重排來以合成方式製造原初庫，如藉由Hoogenboom, H.R.及Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388所描述。描述人類抗體噬菌體庫之專利公開案包括(例如)：美國專利第5,750,373號及美國專利公開案第2005/0079574號、第2005/0119455號、第2005/0266000號、第2007/0117126號、第2007/0160598號、第2007/0237764號、第2007/0292936號及第2009/0002360號。

自人類抗體庫分離之抗體或抗體片段在本文中視為人類抗體或人類抗體片段。

6. 多特異性抗體

在某些實施例中，本文所提供之抗體為多特異性抗體，例如雙特異性抗體。多特異性抗體為對至少兩個不同位點具有結合特異性之單株抗

體。在某些實施例中，結合特異性中之一者係針對PD1且另一者係針對任何其他抗原。在某些實施例中，雙特異性抗體可結合至PD1之兩個不同抗原決定基。雙特異性抗體亦可用於使細胞毒素劑定位至表現PD1之細胞中。雙特異性抗體可製備為全長抗體或抗體片段。

用於製造多特異性抗體之技術包括(但不限於)：重組具有不同特異性之兩個免疫球蛋白重鏈-輕鏈對的協同表現(參見Milstein, C.及Cuello, A.C., *Nature* 305 (1983) 537-540, WO 93/08829, 及Traunecker, A.等人, *EMBO J.* 10 (1991) 3655-3659), 及「杵臼」工程改造(參見(例如)美國專利第5,731,168號)。多特異性抗體亦可藉由以下製程製得：製造抗體Fc-雜二聚分子之工程改造靜電轉向效應(WO 2009/089004)；交聯兩種或多於兩種之抗體或片段(參見(例如)美國專利第4,676,980號及Brennan, M.等人, *Science* 229 (1985) 81-83)；使用白胺酸拉鏈產生雙特異性抗體(參見(例如) Kostelny, S.A.等人, *J. Immunol.* 148 (1992) 1547-1553)；使用製造雙特異性抗體片段之「雙功能抗體」技術(參見(例如) Holliger, P.等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 6444-6448)；及使用單鏈Fv (scFv)二聚體(參見(例如) Gruber, M等人, *J. Immunol.* 152 (1994) 5368-5374)；及如(例如) Tutt, A.等人 *J. Immunol.* 147 (1991) 60-69中所述製備三特異性抗體。

本文中亦包括具有三個或更多個包括「章魚抗體(Octopus antibody)」之功能性抗原結合位點之工程改造抗體(參見(例如) US 2006/0025576)。

本文之抗體或片段亦包括「雙作用Fab」或「DAF」，其包含結合至PD1以及另一不同抗原之抗原結合位點(參見(例如) US 2008/0069820)。

本文中之抗體或片段亦包括描述於以下各者中之多特異性抗體：WO 2009/080251、WO 2009/080252、WO 2009/080253、WO 2009/080254、WO 2010/112193、WO 2010/115589、WO 2010/136172、WO 2010/145792及WO 2010/145793、WO2011/117330、WO2012/025525、WO2012/025530、WO2013/026835、WO2013/026831、WO2013/164325或WO 2013/174873。

7. 抗體變異體

在某些實施例中，涵蓋本文所提供之抗體之胺基酸序列變異體。舉例而言，可能需要改進抗體之結合親和力及/或其他生物特性。抗體之胺基酸序列變異體可藉由將適當修飾引入編碼該抗體之核苷酸序列中或藉由肽合成來製備。此類修飾包括(例如)抗體之胺基酸序列內的殘基缺失及/或插入及/或取代。可進行缺失、插入及取代之任一組合以獲得最終構築體，其限制條件為最終構築體具有所需特徵，例如抗原結合。

a) 取代、插入及缺失變異體

在某些實施例中，提供具有一或多個胺基酸取代之抗體變異體。用於取代型突變誘發之相關位點包括HVR及FR。例示性變化提供於表1中之標題「例示性取代」下，且參考胺基酸側鏈類別如下文進一步描述。保守取代展示於表1中之標題「較佳取代」下。可將胺基酸取代引入相關抗體中且針對所需活性篩分產物，例如保留/改良之抗原結合、降低之免疫原性或改良之ADCC或CDC的產物。

表1

原始殘基	例示性 取代	較佳 取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正白胺酸	Leu
Leu (L)	正白胺酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正白胺酸	Leu

胺基酸可根據共有側鏈特性進行分組：

- (1) 疏水性：正白胺酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (3) 酸性：Asp、Glu；
- (4) 鹼性：His、Lys、Arg；
- (5) 影響鏈定向之殘基：Gly、Pro；
- (6) 芳族：Trp、Tyr、Phe。

非保守取代將必然伴有將此等類別中之一者之成員換成另一個類別。

一種類型之取代型變異體涉及取代親本抗體(例如人類化或人類抗體)之一或多個高變區殘基。一般而言，選用於進一步研究之一或多個所得變異體相對於親本抗體將在某些生物特性方面具有修飾(例如改良)(例如親和力提高、免疫原性降低)及/或將實質上保持親本抗體之某些生物特性。一種例示性取代型變異體為親和力成熟抗體，其可(例如)使用基於噬菌體呈現之親和力成熟技術(諸如本文所述之技術)便利地生成。簡言之，使一個或多個HVR殘基突變且在噬菌體上呈現變異抗體且針對特定生物活性(例如結合親和力)進行篩分。

可在HVR中進行更改(例如，取代)以(例如)改良抗體親和力。此類更改可在HVR「熱點」，亦即藉由密碼子編碼之殘基中(該等殘基在體細胞成熟過程中經歷高頻突變(參見(例如) Chowdhury, P.S., *Methods Mol. Biol.* 207 (2008) 179-196))，及/或SDR (a-CDR)中進行，且測試所得變異VH或VL之結合親和力。藉由自第二庫構築及再選擇之親和力成熟已描述於(例如) Hoogenboom, H.R.等人 *Methods in Molecular Biology* 178 (2002) 1-37中。在親和力成熟之一些實施例中，藉由各種方法(例如，易錯PCR、鏈改組或寡核苷酸導引之突變誘發)中之任一者將多樣性引入選用於成熟之可變基因中。隨後產生第二庫。隨後篩分該庫以識別具有所需親和力之任何抗體變異體。另一種引入多樣性之方法涉及將若干HVR殘基(例如，一次4個至6個殘基)隨機分組之HVR引導方法。可例如使用丙胺酸掃描突變誘發或建立模型來特異性地識別抗原結合所涉及之HVR殘基。特定言之，通常靶向CDR-H3及CDR-L3。

在某些實施例中，取代、插入或缺失可發生在一或多個HVR內，只要此等更改不實質上降低抗體結合抗原之能力即可。舉例而言，可在HVR中進行不實質上降低結合親和力之保守更改(例如本文所提供之保守取代)。此類更改可在HVR「熱點」或SDR外。在上文所提供之變異VH及VL序列之某些實施例中，每一HVR未改變或含有不超過一個、兩個或三個胺基酸取代。

一種適用於識別可經靶向以用於突變誘發之抗體之殘基或區域的方法稱為「丙胺酸掃描誘變」，如藉由Cunningham, B.C.及Wells, J.A., *Science* 244 (1989) 1081-1085所描述。在此方法中，識別靶向殘基之殘基或基團(例如帶電殘基，諸如arg、asp、his、lys及glu)且經中性或帶負電胺基酸(例如丙胺酸或聚丙胺酸)置換以測定抗體與抗原之相互作用是否受影響。可在對初始取代展現功能敏感性之胺基酸位置處引入其他取代。或者或另外，抗原-抗體複合物之晶體結構用於識別抗體與抗原之間的觸點。此類接觸殘基及鄰近殘基可作為取代候選物之標靶或排除在取代候選物之外。可篩分變異體以測定其是否含有所需特性。

胺基酸序列插入包括長度在一個殘基至含有一百個或多於一百個殘基之多肽範圍內的胺基端及/或羧基端融合，以及單個或多個胺基酸殘基之序列內插入。末端插入之實例包括具有N端甲硫胺醯基殘基之抗體。抗體分子之其他插入變異體包括抗體之N端或C端與酶(例如對於ADEPT而言)或延長抗體之血清半衰期之多肽的融合物。

b) Fc區變異體

在某些實施例中，可將一或多個胺基酸修飾引入至本文所提供之抗體的Fc區中，從而產生Fc區變異體。Fc區變異體可包含人類Fc區序列(例

如人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc區)，其在一或多個胺基酸位置處包含胺基酸修飾(例如取代)。

效應功能降低之抗體包括具有Fc區殘基238、265、269、270、297、327及329中之一或多者之取代的彼等抗體(美國專利第6,737,056號)。此類Fc突變體包括其中胺基酸位置265、269、270、297及327中之兩者或更多者處之取代的Fc突變體，包括殘基265及297取代為丙胺酸的所謂「DANA」Fc突變體(美國專利第7,332,581號)。

描述具有提高或降低之FcR結合之某些抗體變異體。(參見，(例如)美國專利第6,737,056號；WO 2004/056312及Shields, R.L. 等人，J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604)

在本發明之一個實施例中，此抗體為具有突變體L234A及L235A或具有突變體L234A、L235A及P329G之IgG1。在另一實施例或具有突變S228P及L235E或S228P、L235E或/及P329G之IgG4中(根據Kabat等人之EU索引編號，Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991)。

半衰期延長且負責將母體IgG轉移至胎兒之新生兒Fc受體(FcRn)(Guyer, R.L.等人, J. Immunol. 117 (1976) 587-593；及Kim, J.K.等人, J. Immunol. 24 (1994) 2429-2434)之結合得以改良之抗體描述於US 2005/0014934中。彼等抗體包含具有一或多個取代之Fc區，其中該等抗體改良Fc區至FcRn之結合。此類Fc變異體包括在以下Fc區殘基中之一或多者處具有取代之彼等變異體：238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、

382、413、424或434，例如Fc區殘基434之取代(美國專利第7,371,826號)。

關於Fc區變異體之其他實例，亦參見Duncan, A.R.及Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740；US 5,648,260；US 5,624,821；及WO 94/29351。

c) 半胱胺酸工程改造之抗體變異體

在某些實施例中，可能需要產生半胱胺酸工程改造之抗體，例如「thioMAb」，其中抗體之一或多個殘基經半胱胺酸殘基取代。在特定實施例中，經取代之殘基出現在抗體之可達位點處。藉由用半胱胺酸取代彼等殘基，反應性硫醇基從而定位於抗體之可達位點處且可用於使抗體與其他部分(諸如藥物部分或連接子-藥物部分)結合以產生如本文中進一步描述之免疫結合物。在某些實施例中，以下殘基中之任一者或多者可經半胱胺酸取代：輕鏈之V205 (Kabat編號)；重鏈之A118 (EU編號)；及重鏈Fc區之S400 (EU編號)。可如(例如)美國專利第7,521,541號中所描述產生半胱胺酸工程改造之抗體。

d) 抗體衍生物

在某些實施例中，本文中所提供之抗體可經進一步修飾以含有此項技術中已知且可易於獲得之額外非蛋白部分。適合於抗體衍生作用之部分包括(但不限於)水溶性聚合物。水溶性聚合物之非限制性實例包括(但不限於)聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纖維素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯啶酮、聚-1,3-二氧雜環戊烷、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/順丁烯二酸酐共聚物、聚胺基酸(均聚物或無規共聚物)及葡聚糖或聚(正乙烯吡咯啶酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚氧化丙烯/氧化乙烯共聚

物、聚氧乙烯多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛由於其在水中之穩定性而可在製造中具有優勢。聚合物可具有任何分子量，且可為分支鏈或未分支鏈。連接至抗體上之聚合物的數目可變化，且若附接多於一個之聚合物，則聚合物可為相同或不同分子。一般而言，用於衍生作用之聚合物的數目及/或類型可基於包括(但不限於)待改良抗體之特殊特性或功能，抗體衍生物是否將用於指定條件下之療法等考慮因素來測定。

在另一實施例中，提供抗體與可藉由曝露於輻射而選擇性地加熱之非蛋白部分的結合物。在一個實施例中，非蛋白部分為奈米碳管(Kam, N.W.等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (2005) 11600-11605)。輻射可具有任何波長，且包括(但不限於)不損害普通細胞但將非蛋白部分加熱至殺死抗體-非蛋白部分近側之細胞之溫度的波長。

B. 重組方法及組合物

可使用(例如)如美國專利第4,816,567號中所述之重組方法及組合物來產生抗體。在一個實施例中，提供編碼本文所述之抗PD1抗體之經分離核酸。此核酸可編碼包含VL之胺基酸序列及/或包含抗體之VH之胺基酸序列(例如抗體之輕鏈及/或重鏈)。在另一實施例中，提供包含此核酸之一或多種載體(例如表現載體)。在另一實施例中，提供包含此核酸之宿主細胞。在一個此實施例中，宿主細胞包含(例如已藉由以下各者轉型)：(1)包含編碼包含抗體VL的胺基酸序列及包含抗體VH的胺基酸序列之核酸的載體；或(2)包含編碼包含抗體VL之胺基酸序列之核酸的第一載體及包含編碼包含抗體VH之胺基酸序列之核酸的第二載體。在一個實施例中，宿主細胞為真核細胞，例如中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或淋巴細胞(例如Y0、

NS0、Sp20細胞)。在一個實施例中，提供一種製造抗PD1抗體之方法，其中該方法包含在適合於表現抗體之條件下培養如上文所提供之包含編碼抗體之核酸的宿主細胞且視情況自宿主細胞(或宿主細胞培養基)回收抗體。

為重組產生抗PD1抗體，將編碼(例如)如上文所述之抗體之核酸分離並插入至宿主細胞中以用於進一步選殖及/或表現之一或多種載體。此核酸可容易地使用習知程序(例如藉由使用能夠特異性地結合至編碼抗體重鏈及輕鏈之基因的寡核苷酸探針)分離及測序。

適合用於選殖或表現編碼抗體之載體的宿主細胞包括本文所描述之原核或真核細胞。舉例而言，抗體可於細菌中產生，尤其當不需要糖基化及Fc效應功能時。有關抗體片段及多肽在細菌中之表現，參見(例如) US 5,648,237、US 5,789,199及US 5,840,523。(亦參見Charlton, K.A., In: *Methods in Molecular Biology*, 第248卷，Lo, B.K.C. (編), Humana Press, Totowa, NJ (2003)，第245頁至第254頁，描述抗體片段在大腸桿菌中之表現)在表現之後，可自呈可溶性級分之細菌細胞糊狀物分離抗體且可進一步純化該抗體。

除原核生物外，諸如絲狀真菌或酵母之真核微生物為適合用於編碼抗體之載體的選殖或表現宿主，包括糖基化路徑已經「人類化」，從而使得所產生之抗體具有部分或完全人類糖基化型態的真菌及酵母菌株。參見 Gerngross, T.U., *Nat. Biotech.* 22 (2004) 1409-1414；及Li, H.等人, *Nat. Biotech.* 24 (2006) 210-215。

適合用於表現經糖基化之抗體的宿主細胞亦源自多細胞生物體(無脊椎動物及脊椎動物)。無脊椎動物細胞之實例包括植物及昆蟲細胞。已識

別出眾多可與昆蟲細胞結合使用，尤其用於轉染草地黏蟲(*Spodoptera frugiperda*)細胞之桿狀病毒株。

植物細胞培養物亦可用作宿主。參見(例如)美國專利第5,959,177號、第6,040,498號、第6,420,548號、第7,125,978號及第6,417,429號(描述用於在轉殖基因植物中產生抗體之PLANTIBODIES™技術)。

脊椎動物細胞亦可用作宿主。舉例而言，適於在懸浮液中生長之哺乳動物細胞系可為適用的。適用之哺乳動物宿主細胞系之其他實例為經SV40 (COS-7)轉型之猴腎CV1系；人類胚腎系(如(例如) Graham, F.L.等人, J. Gen Virol. 36 (1977) 59-74中所述之293或293細胞)；幼倉鼠腎細胞(BHK)；小鼠塞特利氏細胞(mouse sertoli cell) (如(例如) Mather, J.P., Biol. Reprod. 23 (1980) 243-252中所述之TM4細胞)；猴腎細胞(CV1)；非洲綠猴腎細胞(VERO-76)；人類子宮頸癌細胞(HELA)；犬腎細胞(MDCK)；布法羅大鼠肝細胞(buffalo rat liver cell) (BRL 3A)；人類肺細胞(W138)；人類肝細胞(Hep G2)；小鼠乳房瘤(MMT 060562)；如(例如) Mather, J.P.等人, Annals N.Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44-68中所述之TRI細胞；MRC 5細胞；及FS4細胞。其他適用之哺乳動物宿主細胞系包括中國倉鼠卵巢(CHO)細胞，其包括DHFR⁻ CHO細胞(Urlaub, G.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216-4220)；及骨髓瘤細胞系，諸如Y0、NS0及Sp2/0。有關適於產生抗體之某些哺乳動物宿主細胞系之綜述，參見(例如) Yazaki, P.及Wu, A.M., Methods in Molecular Biology,第248卷, Lo, B.K.C. (編), Humana Press, Totowa, NJ (2004),第255頁至第268頁。

C. 分析

可藉由此項技術中已知之各種分析對本文中所提供之抗PD1抗體針對其物理/化學特性及/或生物活性進行識別、篩分或表徵。

1. 結合分析及其他分析

在一個態樣中，(例如)藉由諸如ELISA、蛋白印跡法(Western blot)等已知方法來測試本發明之抗體的抗原結合活性。

在另一態樣中，競爭分析可用於識別與PD1-0103 (包含SEQ ID NO:7之VH序列及SEQ ID NO:8之VL序列)競爭結合至PD1 (或替代性地具有人類化PD1-0103變異抗體PD1-0103-0312、PD1-0103-0313、PD1-0103-0314、PD1-0103-0315，其中5至6個HVR一致)之抗體。本發明的一個實施例為與包含SEQ ID NO:7之VH序列之全部3個HVR及SEQ ID NO:8之VL序列之全部3個HVR的抗PD1抗體競爭結合至人類PD1之抗體。本發明的一個實施例為與包含SEQ ID NO:57之VH序列之全部3個HVR及SEQ ID NO:58之VL序列之全部3個HVR的抗PD1抗體競爭結合至人類PD1之抗體。在某些實施例中，此競爭抗體結合至由抗PD1抗體PD1-0103所結合之相同的抗原決定基(例如線性或構形抗原決定基)。用於定位抗體所結合之抗原決定基之詳細例示性方法提供於Morris, G.E. (編), *Epitope Mapping Protocols, Methods in Molecular Biology*, 第66卷, Humana Press, Totowa, NJ (1996)中。

在一例示性競爭分析中，在溶液中培育固定化PD1(-ECD)，該溶液包含結合至PD1 (例如，抗PD1抗體PD1-0103或人類化抗體PD1-0103-0312)之第一經標記抗體及其與第一抗體競爭以結合至PD1之能力待測試的第二未標記抗體。第二抗體可存在於融合瘤上清液中。作為對照組，在包含第一經標記抗體但無第二未標記抗體之溶液中培育固定化PD1。在允

許第一抗體至PD1之結合之條件下培育之後，移除過量未結合抗體，且量測與固定化PD1締合之標記的量。若測試樣本中與固定化PD1締合之標記的量相對於對照樣本實質上減少，則其表明第二抗體與第一抗體競爭以結合至PD1。參見Harlow, E.及Lane, D., *Antibodies: A Laboratory Manual*, 第14章, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1988)。另一例示性競爭分析參見實例2 (抗原決定基定位ELISA/結合競爭分析)。

2. 活性分析

在一個態樣中，提供用於識別具有生物活性之抗PD1抗體的分析。生物活性可包括(例如)促進活化及/或增殖不同免疫細胞(尤其T細胞)的能力(例如)其促進免疫調節細胞激素(例如干擾素- γ (IFN- γ)及/或腫瘤壞死因子 α (TNF α))之分泌。可促進或可經促進之其他免疫調節細胞激素為(例如)IL12、粒酶B等。生物活性除結合至不同細胞類型之外亦可包括獼猴結合交叉反應性。亦提供在活體內及/或活體外具有此生物活性之抗體。

在某些實施例中，如(例如)以下實例中所描述之測試本發明抗體之此生物活性。

D. 免疫結合物(僅癌症或針對靶修改)

本發明亦提供包含與一或多種細胞毒性劑結合之本文中之抗PD1抗體的免疫結合物，該一或多種細胞毒性劑為諸如化學治療劑或藥物、生長抑制劑、毒素(例如蛋白毒素、細菌、真菌、植物或動物來源之酶促活性毒素或其片段)或放射性同位素。

在一個實施例中，免疫結合物為抗體-藥物結合物(ADC)，其中抗體與一或多種藥物結合，該等藥物包括(但不限於)類美登素(maytansinoid)

(參見US 5,208,020、US 5,416,064及EP 0 425 235 B1)；奧瑞他汀(auristatin)，諸如單甲基奧瑞他汀藥物部分DE及DF (MMAE及MMAF) (參見US 5,635,483、US 5,780,588及US 7,498,298)；海兔毒素(dolastatin)；卡奇黴素(calicheamicin)或其衍生物(參見US 5,712,374、US 5,714,586、US 5,739,116、US 5,767,285、US 5,770,701、US 5,770,710、US 5,773,001及US 5,877,296；Hinman, L. M.等人, *Cancer Res.* 53 (1993) 3336-3342；及Lode, H.N.等人, *Cancer Res.* 58 (1998) 2925-2928)；蒽環黴素(anthracycline)，諸如道諾黴素(daunomycin)或阿黴素(參見Kratz, F.等人, *Curr. Med. Chem.* 13 (2006) 477-523；Jeffrey, S. C.等人, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 358-362；Torgov, M.Y.等人, *Bioconjug. Chem.* 16 (2005) 717-721；Nagy, A.等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 829-834；Dubowchik, G.M.等人, *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12 (2002) 1529-1532；King, H.D.等人, *J. Med. Chem.* 45 (2002) 4336-4343；及美國專利第6,630,579號)；甲胺喋呤；長春地辛(vindesine)；紫杉烷(taxane)，諸如多西他賽(docetaxel)、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、拉洛他賽(larotaxel)、替司他賽(tesetaxel)及奧他賽(ortataxel)；單端孢黴烯族毒素(trichothecene)；及CC1065。

在另一實施例中，免疫結合物包含與酶促活性毒素或其片段結合之如本文所述之抗體，該酶促活性毒素或其片段包括(但不限於)白喉A鏈(diphtheria A chain)、白喉毒素(diphtheria toxin)之非結合活性片段、外毒素A鏈(來自綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素A鏈(ricin A chain)、相思子毒素A鏈(abrin A chain)、莫迪素A鏈(modeccin A chain)、 α -帚麴菌素(alpha-sarcin)、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白、康乃馨

(dianthin)蛋白、洋商陸(*Phytolaca americana*)蛋白(PAPI、PAPII及PAP-S)、苦瓜(*momordica charantia*)抑制劑、麻瘋樹毒蛋白(*curcin*)、巴豆毒素(*crotin*)、肥皂草(*sapaonaria officinalis*)抑制劑、白樹素(*gelonin*)、有絲分裂素(*mitogellin*)、侷限麴菌素(*restrictocin*)、酚黴素(*phenomycin*)、伊諾黴素(*enomycin*)及單端孢黴烯族毒素。

在另一實施例中，免疫結合物包含與放射性原子結合以形成放射性結合物之如本文所描述之抗體。各種放射性同位素可用於製造放射性結合物。實例包括 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 及Lu之放射性同位素。當將放射性結合物用於偵測時，其可包含用於閃爍顯像研究之放射性原子，例如 Tc^{99m} 或 I^{123} ；或用於核磁共振(NMR)成像(亦稱磁共振成像，MRI)之自旋標記，又諸如碘-123、碘-131、銻-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、釷、錳或鐵。

可使用多種雙功能蛋白偶合劑製得抗體與細胞毒性劑之結合物，該等雙功能蛋白偶合劑為諸如N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶二硫基)丙酸酯(SPDP)、琥珀醯亞胺基-4-(N-馬來醯亞胺基甲基)環己烷-1-羧酸酯(SMCC)、亞胺基硫雜環戊烷(IT)、亞胺基酯之雙功能衍生物(諸如二亞胺代己二酸二甲酯HCl)、活性酯(諸如辛二酸二丁二醯亞胺酯)、醛(諸如戊二醛)、雙疊氮基化合物(諸如雙(對疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙重氮衍生物(諸如雙(對重氮苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如2,6-二異氰酸甲苯酯)及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。舉例而言，蓖麻毒素免疫毒素可如Vitetta, E.S.等人, *Science* 238 (1987) 1098-1104中所描述來製備。碳-14標記之1-異硫氰醯基苯甲基-3-甲基二伸乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)為用於使放射性核苷酸與抗體結合之例示性螯合劑。參見WO 94/11026。

連接子可為促進細胞毒性藥物在細胞中釋放之「可裂解連接子」。舉例而言，可使用酸不穩定連接子、肽酶敏感連接子、光不穩定連接子、二甲基連接子或含二硫鍵連接子(Chari, R.V.等人, *Cancer Res.* 52 (1992) 127-131；美國專利第5,208,020號)。

本文之免疫結合物或ADC明確涵蓋(但不限於)用交聯試劑製備之此類結合物，該等交聯試劑包括(但不限於) BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、磺基-EMCS、磺基-GMBS、磺基-KMUS、磺基-MBS、磺基-SIAB、磺基-SMCC及磺基-SMPB，及SVSB (丁二醯亞胺基-(4-乙烯基磺)苯甲酸酯)，該等交聯試劑可商購(例如購自Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A)。

E. 用於診斷及偵測之方法及組合物

在某些實施例中，本文所提供之抗PD1抗體中之任一者適用於偵測生物樣本中PD1之存在。如本文所使用，術語「偵測」涵蓋定量或定性偵測。在某些實施例中，生物樣本包含細胞或組織，諸如免疫細胞或T細胞浸潤。

在一個實施例中，提供在診斷或偵測方法中使用之抗PD1抗體。在另一態樣中，提供一種偵測生物樣本中PD1存在之方法。在某些實施例中，該方法包含使生物樣本與如本文所述之抗PD1抗體在允許抗PD1抗體至PD1之結合之條件下接觸，並偵測在抗PD1抗體與PD1之間是否形成複合物。此方法可為活體外或活體內方法。在一個實施例中，使用抗PD1抗體來選擇適於用抗PD1抗體治療之個體，例如其中PD1為用於選擇患者之生物標記。

在某些實施例中，提供經標記之抗PD1抗體。標記包括(但不限於)直接偵測之標記或部分(諸如螢光、發色、電子密度、化學發光及放射性標記)，以及例如經由酶反應或分子相互作用間接偵測之部分(諸如酶或配體)。例示性標記包括(但不限於)放射性同位素³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H及¹³¹I；螢光團，諸如稀土螯合物或螢光素及其衍生物；若丹明(rhodamine)及其衍生物；丹醯基(dansyl)；傘酮；螢光素酶，例如螢火蟲螢光素酶及細菌螢光素酶(美國專利第4,737,456號)；螢光素；2,3-二氫酞嗪二酮；辣根過氧化酶(HRP)；鹼性磷酸酶；β-半乳糖苷酶；葡糖澱粉酶；溶菌酶；醣氧化酶，例如葡糖氧化酶、半乳糖氧化酶及葡糖-6-磷酸去氫酶；雜環氧化酶，諸如尿酸酶及黃嘌呤氧化酶，其與採用過氧化氫氧化染料前驅體之酶(諸如HRP、乳過氧化酶或微過氧化酶)偶合；生物素/抗生素蛋白；自旋標記；噬菌體標記；穩定自由基及其類似物。

F. 醫藥調配物

如本文中所描述之抗PD1抗體之醫藥調配物係藉由將具有所需純度之此抗體與一或多種視情況選用之醫藥學上可接受之載劑混合(Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版, Osol, A. (編) (1980))成凍乾調配物或水溶液形式來製備。醫藥學上可接受之載劑在所採用之劑量及濃度上對接受者一般為無毒的，且其包括(但不限於)：緩衝液(諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸)；包括抗壞血酸及甲硫胺酸之抗氧化劑；防腐劑(諸如十八烷基二甲基苄基氯銨、氯化六羥季銨、苯紮氯銨、苄索氯銨、酚、丁基或苄醇，烷基對羥苯甲酸酯(諸如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯)、兒茶酚、間苯二酚、環己醇、3-戊醇及間甲酚)；低分子量(小於約10殘基)多肽；蛋白(諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白)；諸如聚(乙烯吡

咯啉酮)之親水性聚合物；胺基酸(諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、組胺酸、精胺酸或離胺酸)；單醣、雙醣及包括葡糖、甘露糖或糊精之其他化合物；諸如EDTA之螯合劑；諸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇之糖；諸如鈉之成鹽抗衡離子；金屬複合物(例如，Zn-蛋白複合物)；及/或諸如聚乙二醇(PEG)之非離子界面活性劑。本文中之例示性醫藥學上可接受之載劑進一步包括間質性藥物分散劑，諸如可溶性中性活性玻尿酸酶糖蛋白(sHASEGP)，例如，人類可溶性PH-20 玻尿酸酶糖蛋白，諸如 rhuPH20 (HYLENEX[®], Baxter International, Inc.)。某些例示性 sHASEGP (包括rHuPH20)及使用方法描述於美國專利公開案第 2005/0260186號及第2006/0104968號中。在一個態樣中，sHASEGP與一或多種額外葡糖胺聚糖酶(諸如軟骨素酶)組合。

例示性凍乾抗體調配物描述於美國專利第6,267,958號中。水性抗體調配物包括美國專利第6,171,586號及WO2006/044908中所描述之彼等水性抗體調配物，後者之調配物包括組胺酸-乙酸鹽緩衝液。

本文之調配物亦可含有多於一種為所治療之特定適應症所必需之活性成分，較佳為具有不會對彼此產生不利影響之互補活性的活性成分。舉例而言，可能需要進一步提供。此類活性成分宜以有效達成預期目的之量的組合存在。

可(例如)藉由凝聚技術或藉由界面聚合將活性成分包覆於所製備之微囊中，例如分別在膠狀藥物遞送系統(例如，脂質體、白蛋白微球體、微乳液、奈米粒子及奈米囊劑)或巨乳液中之羥甲基纖維素或明膠微囊及聚-(甲基丙烯酸甲酯)微囊。此類技術揭示於Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版, Osol, A. (編) (1980)中。

可製備持續釋放型製劑。持續釋放型製劑之適合實例包括含有抗體之固體疏水性聚合物之半滲透基質，該等基質呈成形物品形式，例如膜或微囊。

用於活體內投與之調配物一般為無菌的。無菌性可容易地(例如)藉由經由無菌過濾膜過濾來實現。

G. 治療方法及組合物

本文中所提供之任何抗PD1抗體(或抗原結合蛋白)可用於治療方法中。

在一個態樣中，提供一種用作藥物之抗PD1抗體。在其他態樣中，提供一種抗PD1抗體或在治療癌症中之用途。在某些實施例中，提供一種用於治療方法之抗PD1抗體。在某些實施例中，本發明提供一種用於治療患有癌症之個體的方法的抗PD1抗體，該方法包含向個體投與有效量的抗PD1抗體。

在其他實施例中，本發明提供一種用作免疫刺激劑試劑/或刺激干擾素- γ (IFN- γ)分泌之抗PD1抗體。在某些實施例中，本發明提供用於免疫刺激/或刺激個體內之干擾素- γ (IFN- γ)分泌之方法的抗PD1抗體，該方法包含向個體投與對免疫刺激/或刺激干擾素- γ (IFN- γ)分泌有效之抗PD1抗體。

在其他實施例中，本發明提供一種用作免疫刺激劑試劑/或刺激腫瘤壞死因子 α (TNF α)分泌之抗PD1抗體。在某些實施例中，本發明提供一種用於免疫刺激/或刺激個體內之腫瘤壞死因子 α (TNF α)分泌之方法的抗PD1抗體，該方法包含向個體投與對免疫刺激/或刺激腫瘤壞死因子 α (TNF α)分泌有效之抗PD1抗體。

根據以上實施例中之任一者之「個體」較佳為人類。在另一態樣中，本發明提供抗PD1抗體在製造或製備藥物中之用途。在一個實施例中，藥物用於治療癌症。在另一實施例中，藥物用於治療癌症之方法中，該方法包含向患有癌症之個體投與有效量之藥物。在另一實施例中，藥物用於誘導介導癌細胞裂解之細胞。在另一實施例中，藥物用於誘導介導患有癌症之個體內之癌細胞裂解的細胞的方法，該方法包含向個體投與有效量之藥物以在癌細胞中引起細胞凋亡/或以抑制癌細胞增殖。根據以上實施例中之任一者之「個體」可為人類。

在另一態樣中，本發明提供用於治療癌症之方法。在一個實施例中，該方法包含向患有癌症之個體投與有效量之抗PD1。根據以上實施例中之任一者之「個體」可為人類。

在另一態樣中，本發明提供用於誘導介導患有癌症之個體內的癌細胞裂解之細胞。在一個實施例中，該方法包含向個體投與有效量的抗PD1以誘導介導患有癌症之個體內的癌細胞裂解之細胞。在一個實施例中，「個體」為人類。

在另一態樣中，本發明提供包含本文所提供之抗PD1抗體中之任一者的醫藥調配物，其(例如)用於以上治療方法中之任一者。在一個實施例中，醫藥調配物包含本文所提供之抗PD1抗體中之任一者及醫藥學上可接受之載劑。

本發明之抗體(及任何額外治療劑)可藉由任何適合方式投與，包括非經腸、肺內及鼻內投與及(必要時針對局部治療)病灶內投與。非經腸輸注包括肌肉內、靜脈內、動脈內、腹膜內或皮下投與。可藉由任何適當途徑(例如藉由注射，諸如靜脈內或皮下注射)給藥，部分取決於投與為短期或

長期。本文涵蓋各種給藥時程，包括(但不限於)單次投與或經各個時間點多次投與、快速投與及脈動輸注。

本發明之抗體將以與良好醫療實務一致之方式調配、給藥及投與。在此情形中考慮之因素包括所治療之特定病症、所治療之特定哺乳動物、個別患者之臨床病狀、病症起因、試劑遞送部位、投與方法、投與時程及醫學從業者已知之其他因素。抗體並非必須，而視情況與一或多種當前用於預防或治療所述病症之試劑一起調配。此類其他試劑之有效量視存在於調配物中之抗體之量、病症或治療之類型及如上文所論述之其他因素而定。此等藥物一般以與本文所述相同之劑量且用如本文中所描述之投與途徑使用，或以本文所述劑量之約1%至99%使用，或以任何劑量且憑經驗/臨床上測定為適當之任何途徑使用。

為預防或治療疾病，本發明之抗體的適當劑量(當單獨或與一或多種其他額外治療劑組合使用時)將視以下而定：待治療疾病之類型、抗體之類型、疾病之嚴重程度及病程、出於預防或出於治療目的所投與之抗體、先前療法、患者之臨床病史及對抗體之反應及主治醫師之判斷。一次性或歷經一系列治療向患者適當地投與抗體。視病症之類型及嚴重程度，無論(例如)藉由一或多個獨立投與或藉由連續輸注，約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至15 mg/kg (例如0.5 mg/kg 至10 mg/kg)之抗體可為用於向患者投與之最初候選劑量。視上文所提及之因素而定，一種典型的日劑量可在約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至100 mg/kg 或更多之範圍內。對於歷經數日或更長時間之重複投與，治療一般將視病況而定持續至疾病症狀之所需抑制發生為止。抗體之一種例示性劑量將在約0.05 mg/kg 至約10 mg/kg 之範圍內。因此，可向患者投與約0.5 mg/kg 、2.0 mg/kg 、4.0 mg/kg 或10 mg/kg (或其任何組合)之一或多種劑量。此類

劑量可間歇地投與，例如每週或每三週投與(例如，以使得患者接受自約二至約二十或(例如)約六劑抗體)。最初可投與較高起始劑量，隨後可投與一或多種較低劑量。例示性給藥方案包含投與約4 mg/kg之最初起始劑量，隨後每週投與約2 mg/kg之抗體的維持劑量。然而，其他給藥方案可為適用的。此療法之進程容易藉由習知技術及分析來監測。

應理解，代替抗PD1抗體或除抗PD1抗體之外，可使用本發明之免疫結合物進行以上調配或治療方法中之任一者。

應理解，代替抗PD1抗體或除抗PD1抗體之外，可使用本發明之免疫結合物進行以上調配或治療方法中之任一者。

II. 製品

在本發明之另一態樣中，提供含有適用於治療、預防及/或診斷上文所描述之病症之物質的製品。製品包含容器及附於或連於容器之標籤或藥品說明書。適合之容器包括(例如)瓶子、小瓶、注射器、IV溶液袋等。容器可由各種材料形成，諸如玻璃或塑膠。容器容納組合物本身或組合物與有效治療、預防及/或診斷病況之另一種組合物之組合，且可具有無菌接取口(例如，該容器可為具有可由皮下注射針刺穿之塞子的靜脈內溶液袋或小瓶)。組合物中之至少一種活性劑為本發明之抗體。標籤或藥品說明書指示組合物用於治療所選病況。此外，製品可包含(a)其中含有組合物之第一容器，其中該組合物包含本發明之抗體；及(b)其中含有組合物之第二容器，其中該組合物包含另一細胞毒性劑或其他治療劑。本發明之此實施例中之製品可進一步包含指示組合物可用於治療特定病狀之藥品說明書。替代地或另外，製品可進一步包含第二(或第三)容器，其包含醫藥學上可接受之緩衝液，諸如注射用抑菌水(BWFI)、磷酸鹽緩衝鹽水、林格

氏(Ringer's)溶液及右旋糖溶液。其可進一步包括對商業及使用者觀點而言所需的其他物質，包括其他緩衝液、稀釋劑、過濾器、針及注射器。

應理解，代替抗PD1抗體或除抗PD1抗體之外，以上製品中之任一者可包括本發明之免疫結合物。

胺基酸序列之描述

SEQ ID NO:1	重鏈HVR-H1，PD1-0103
SEQ ID NO:2	重鏈HVR-H2，PD1-0103
SEQ ID NO:3	重鏈HVR-H3，PD1-0103
SEQ ID NO:4	輕鏈HVR-L1，PD1-0103
SEQ ID NO:5	輕鏈HVR-L2，PD1-0103
SEQ ID NO:6	輕鏈HVR-L3，PD1-0103
SEQ ID NO:7	重鏈可變域VH，PD1-0103
SEQ ID NO:8	輕鏈可變域VL，PD1-0103
SEQ ID NO:9	重鏈HVR-H1，PD1-0098
SEQ ID NO:10	重鏈HVR-H2，PD1-0098
SEQ ID NO:11	重鏈HVR-H3，PD1-0098
SEQ ID NO:12	輕鏈HVR-L1，PD1-0098
SEQ ID NO:13	輕鏈HVR-L2，PD1-0098
SEQ ID NO:14	輕鏈HVR-L3，PD1-0098
SEQ ID NO:15	重鏈可變域VH，PD1-0098
SEQ ID NO:16	輕鏈可變域VL，PD1-0098
SEQ ID NO:17	重鏈HVR-H1，PD1-0050
SEQ ID NO:18	重鏈HVR-H2，PD1-0050

SEQ ID NO:19 重鏈HVR-H3 , PD1-0050
SEQ ID NO:20 輕鏈HVR-L1 , PD1-0050
SEQ ID NO:21 輕鏈HVR-L2 , PD1-0050
SEQ ID NO:22 輕鏈HVR-L3 , PD1-0050
SEQ ID NO:23 重鏈可變域VH , PD1-0050
SEQ ID NO:24 輕鏈可變域VL , PD1-0050
SEQ ID NO:25 重鏈HVR-H1 , PD1-0069
SEQ ID NO:26 重鏈HVR-H2 , PD1-0069
SEQ ID NO:27 重鏈HVR-H3 , PD1-0069
SEQ ID NO:28 輕鏈HVR-L1 , PD1-0069
SEQ ID NO:29 輕鏈HVR-L2 , PD1-0069
SEQ ID NO:30 輕鏈HVR-L3 , PD1-0069
SEQ ID NO:31 重鏈可變域VH , PD1-0069
SEQ ID NO:32 輕鏈可變域VL , PD1-0069
SEQ ID NO:33 重鏈HVR-H1 , PD1-0073
SEQ ID NO:34 重鏈HVR-H2 , PD1-0073
SEQ ID NO:35 重鏈HVR-H3 , PD1-0073
SEQ ID NO:36 輕鏈HVR-L1 , PD1-0073
SEQ ID NO:37 輕鏈HVR-L2 , PD1-0073
SEQ ID NO:38 輕鏈HVR-L3 , PD1-0073
SEQ ID NO:39 重鏈可變域VH , PD1-0073
SEQ ID NO:40 輕鏈可變域VL , PD1-0073
SEQ ID NO:41 重鏈HVR-H1 , PD1-0078

- SEQ ID NO:42 重鏈HVR-H2，PD1-0078
- SEQ ID NO:43 重鏈HVR-H3，PD1-0078
- SEQ ID NO:44 輕鏈HVR-L1，PD1-0078
- SEQ ID NO:45 輕鏈HVR-L2，PD1-0078
- SEQ ID NO:46 輕鏈HVR-L3，PD1-0078
- SEQ ID NO:47 重鏈可變域VH，PD1-0078
- SEQ ID NO:48 輕鏈可變域VL，PD1-0078
- SEQ ID NO:49 重鏈HVR-H1，PD1-0102
- SEQ ID NO:50 重鏈HVR-H2，PD1-0102
- SEQ ID NO:51 重鏈HVR-H3，PD1-0102
- SEQ ID NO:52 輕鏈HVR-L1，PD1-0102
- SEQ ID NO:53 輕鏈HVR-L2，PD1-0102
- SEQ ID NO:54 輕鏈HVR-L3，PD1-0102
- SEQ ID NO:55 重鏈可變域VH，PD1-0102
- SEQ ID NO:56 輕鏈可變域VL，PD1-0102
- SEQ ID NO:57 人類化變異體-PD1-0103_01之重鏈可變域VH
- SEQ ID NO:58 人類化變異體-PD1-0103_01之輕鏈可變域VL
- SEQ ID NO:59 人類化變異體-PD1-0103_02之輕鏈可變域VL
- SEQ ID NO:60 人類化變異體PD1-0103_03之-輕鏈可變域VL
- SEQ ID NO:61 人類化變異體PD1-0103_04之-輕鏈可變域VL
- SEQ ID NO:62 人類κ輕鏈恆定區
- SEQ ID NO:63 人類λ輕鏈恆定區
- SEQ ID NO:64 源自IgG1之人類重鏈恆定區

- SEQ ID NO:65 源自具有突變體L234A及L235A之IgG1之人類重鏈恆定區
- SEQ ID NO:66 源自具有突變體L234A、L235A及P329G之IgG1之人類重鏈恆定區
- SEQ ID NO:67 源自IgG4之人類重鏈恆定區
- SEQ ID NO:68 例示性人類PD1序列(無信號序列)
- SEQ ID NO:69 人類PD1細胞外域(ECD)
- SEQ ID NO:70 例示性人類PD1序列(包括信號序列)
- SEQ ID NO:71: PD1-0103及PD1-0103人類化變異體PD1-0103-0312、PD1-0103-0313、PD1-0103-0314及PD1-0103-0315之最小HVR1
- SEQ ID NO:72: PD1-0103及PD1-0103人類化變異體PD1-0103-0312、PD1-0103-0313、PD1-0103-0314及PD1-0103-0315之最小HVR2
- SEQ ID NO:73: PD1-0103及PD1-0103人類化變異體PD1-0103-0312、PD1-0103-0313、PD1-0103-0314及PD1-0103-0315之最小HVR3
- SEQ ID NO:74: PD1-0103及PD1-0103人類化變異體PD1-0103-0312、PD1-0103-0313、PD1-0103-0314及PD1-0103-0315之最小LVR1
- SEQ ID NO:75: PD1-0103及PD1-0103人類化變異體PD1-0103-0312、PD1-0103-0313、PD1-0103-0314及PD1-0103-0315之最小LVR2

SEQ ID NO:76: PD1-0103及PD1-0103人類化變異體PD1-0103-0312、PD1-0103-0313、PD1-0103-0314及PD1-0103-0315之最小LVR3

SEQ ID NO:77: 在根據Kabat編號的位置71、72、73處包含胺基酸序列RDN之FR-H3片段

在下文中列出包括抗PD1抗體PD1-0016 (及其人類化形式PD1-0103-0312、PD1-0103-0313、PD1-0103-0314及PD1-0103-0315)、PD1-0098、PD1-0050、PD1-0069、PD1-0073、PD1-0078及PD1-0102之經標記HVR (用粗體、帶下劃線的字母表示之HVR)的VH及VL域之胺基酸序列：

抗PD1 PD1-0103：

VH PD1-0103：

EVILVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFSFSSYTMSWVRQTPEKRLDWVATISGGGRDIYYPDSVKGR
FTISRDNKNTLYLEMSSLSMSEDTALYYCVLLTGRVYFALDSWGQTSVTVSS

VL PD1-0103：

KIVLTQSPASLPVSLGQRATISCRASESVDTSDNSFIHWYQQRPGQSPKLLIYRSSTLESVGPARGF
GSGSRTDFTLTIDPVEADDVATYYCQNYDVPWTFGGGKLEIK

人類化抗PD1 PD1-0103形式PD1-0103-0312、PD1-0103-0313、PD1-0103-0314及PD1-0103-0315：

VH PD1-0103-0312= VH PD1-0103-0313= VH PD1-0103-0314=

VH PD1-0103-0315：

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRDIYYPDSVKGR
FTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQTLVTVSS

VL PD1-0103-0312：

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVDTSDNSFIHWYQQKPGQSPKLLIYRSSTLESVGPDRFS
GSGSGTDFTLTISSLAEDVAVYYCQNYDVPWTFGGGKVEIK

VL PD1-0103-0313：

DVVMTQSP~~LSL~~PVTLGQPASISCRASESVDTSDNSFIHWYQORPGQSP~~RLLIYRS~~TLESGVPDRFS
GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVVYQCQNYDVPWTFGGTKVEIK

VL PD1-0103-0314 :

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDTSDNSFIHWYQKPGQSP~~RLLIYRS~~TLESGIPARFS
GSGSGTDFTLT~~ISSLEPEDFAV~~YVYQCQNYDVPWTFGGTKVEIK

VL PD1-0103-0315 :

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDTSDNSFIHWYQKPGQSP~~RLLIYRS~~TLESGIPARFS
GSGSGTDFTLT~~ISSLEPEDFAV~~YVYQCQNYDVPWTFGGTKVEIK

抗PD1 PD1-0098 :**VH PD1-0098 :**

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWN~~WIRQFPGDKLEWLGYITYSGFTN~~YNPSLKSR
ISISRDTSKNQFFLQLNSVATEDTATYYCAR~~WHGSAPWYFDY~~WGRGTTLVSS

VL PD1-0098 :

DVLMTQTP~~LSL~~PVSLGDAQASISCRSSQNI~~VHSDGNTYLEWYLQKPGQSPNLLIYKVS~~RRFSGVPDRF
GSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVVYCFQGS~~HFP~~PLTFGAGTKLELK

VH : 0050

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWN~~WIRQFPGNKLEWMGYITYTGR~~TSYNPSLKSR
ISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCARE~~MDYYGSTLDYWGQ~~GTTLVSS

VL : 0050

KIVLTQSPASLAVSLRQRATISCRASESVDRYGN~~SFIHWYQKPGQPPKVLIIYRAS~~NLESGFPARFS
GSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQ~~NNEDPY~~TFGSGTKLEIK

VH : 0069

QVQLQQSGPELVRPGVSVKISCKGSGY~~TFTDYAMHWVKQSHARTLEWIGVISTYSG~~DTNYNQKFKDK
ATMTVDKSSSTAYLELARMTSEDSAIYYCARL~~GITTFAYWGQ~~TLTVSA

VL : 0069

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKGVSTSSYS~~FMHWYQKPRQPPKLLIKYASYLE~~SGVPARFS
GSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCH~~HSREFP~~WTFGGGTKLEIK

VH : 0073

EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASG~~FTFSNYGMSWIRQTPEKGLEWVATISGGGR~~DYYPDSVKGR
FTISRDNVKNL~~YLQMS~~SLRSEDTAFYYCAS~~Y~~YGGIDYWGQGSVTVSS

VL : 0073

DIVMTQPHKFMSTSVGDRVRITCKASQ~~DVTTAVAWYQKPGQSPKLLIYWASTR~~HRTGVPDRFTGSGS
GTEFTLT~~ISSVQAEDLALYYCQ~~QHYSIPWTFGGGTKLEIK

VH : 0078

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSTW~~HW~~VKQRPGGLEWIGALDPSDSYTTYNQKFKGK
ATLTVDTSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRSPFDYWGQGTTLTVSS

VL : 0078

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQOKPGQSPKLLIYSASRYRTGVPDRFTGSGS
GTDFTFAISSVQAEDLAVYYCQOHYSHPF~~TF~~FGSGTKLEIK

VH : 0102

DVQLQESGPDLVKPSQSLTCTVTGYSITSGYSWHWIRQFPGNKLEWGMGFTHSSGDTNYPNPSLKSR
ISFTRDTSKNQFFLQLSSLTDEDATATYYCATYRNWYFDVWGAGTTVTVSS

VL : 0102

DIVMTQSPSSLT~~VT~~TAGEKVTMRCKSSQSL~~LN~~SGTQKNYLTWYQOKPGQPPKLLIYWASTRESGVPNR
FTGSGSGTDFTLT~~IS~~SVQAEDLSVYYCQSDYTFPLTFGGGTKLELK

在下文中列出本發明之特定實施例：

1. 一種結合至人類PD1之經分離抗體，其中該抗體結合至在Asn58處經糖基化之SEQ ID NO:70之經糖基化人類PD1之Asn58處的(核心)糖鏈。
2. 如請求項1之抗體，其中該抗體另外結合至人類PD1之位置60至64、68、78至84、126至134之一或多個胺基酸。
3. 如請求項1或2中任一項之抗體，其中該抗體藉由其重鏈在Asn58處結合至糖鏈。
4. 如請求項2至3中任一項之抗體，其中該抗體結合至人類PD1之位置61、62、64、83、126、128、132、134之一或多個胺基酸。
5. 如請求項2至3中任一項之抗體，其中該抗體結合至人類PD1之位置61、62、64、83、126、128、132、134之胺基酸。
6. 如請求項2至3中任一項之抗體，其中該抗體結合至人類PD1之位置60、61、62、63、64、68、78、82、83、84、126、127、128、130、131、132、133、134之胺基酸。
7. 如請求項1至6中任一項之抗體，其中該抗體結合至人類PD1，其中該抗體結合至在Asn58處經糖基化之SEQ ID NO:70之經糖基化人類

PD1之Asn58處的(核心)糖鏈內之第一及第二Glnac、FUC、BMA及MAN

8. 如請求項1至7中任一項之抗體，其中相較於至在Asn58處經糖基化之人類PD1之結合，該抗體展示至在Asn58處未經糖基化之SEQ ID NO:70之人類PD1之經降低結合。

9. 一種結合至人類PD1之經分離抗體，其中該抗體包含

(a)包含SEQ ID NO:71之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:72之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:73之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:74之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:75之胺基酸序列的HVR-L2；(f)包含SEQ ID NO:76之胺基酸序列的HVR-L3，及(g)在根據Kabat編號的位置71、72及73處包含(RDN之) SEQ ID NO:77之胺基酸序列的FR-H3。

10. 如請求項9之結合至人類PD1之經分離抗體，其中該抗體

A)

i) 包含SEQ ID NO:7之VH序列及SEQ ID NO:8之VL序列；

ii) 或i)下之抗體的VH及VL之人類化變異體；

或B)

i) 包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:58之VL序列；

ii) 包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:59之VL序列；

iii) 包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:60之VL序列；

iv) 包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:61之VL序列。

在下文中列出本發明之特定實施例：

1. 一種結合至人類PD1之經分離抗體，其中該抗體包含

A) (a)包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID

NO:2之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列的HVR-L3；或

B) (a)包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:10之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:11之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:13之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列的HVR-L3；或

C) (a)包含SEQ ID NO:17之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:18之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:20之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列的HVR-L3；或

D) (a)包含SEQ ID NO:25之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:26之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:27之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:28之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:29之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:30之胺基酸序列的HVR-L3；或

E) (a)包含SEQ ID NO:33之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:34之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:35之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:36之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:38之胺基

酸序列的HVR-L3；或

F) (a)包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:43之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:44之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:45之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:46之胺基酸序列的HVR-L3；或

G) (a)包含SEQ ID NO:49之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:50之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:51之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:52之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:53之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:54之胺基酸序列的HVR-L3。

2. 一種結合至人類PD1之經分離抗體，其中該抗體包含

A) (a) VH域，其包含(i)包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:3之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含(i)包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列的HVR-L2及(iii)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列的HVR-L3；或

B) (a) VH域，其包含(i)包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:10之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:11之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含(i)包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:13之胺基酸序列的HVR-L2及(iii)包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列的HVR-L3；或

C) (a) VH域，其包含(i)包含SEQ ID NO:17之胺基酸序列的HVR-

H1、(ii)包含SEQ ID NO:18之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:19之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含(i)包含SEQ ID NO:20之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的HVR-L2及(iii)包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列的HVR-L3；或

D) (a) VH域，其包含(i)包含SEQ ID NO:25之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:26之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:27之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含(i)包含SEQ ID NO:28之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:29之胺基酸序列的HVR-L2及(iii)包含SEQ ID NO:30之胺基酸序列的HVR-L3；或

E) (a) VH域，其包含(i)包含SEQ ID NO:33之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:34之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:35之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含(i)包含SEQ ID NO:36之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的HVR-L2及(iii)包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列的HVR-L3；或

F) (a) VH域，其包含(i)包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:43之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含(i)包含SEQ ID NO:44之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:45之胺基酸序列的HVR-L2及(iii)包含SEQ ID NO:46之胺基酸序列的HVR-L3；或

G) (a) VH域，其包含(i)包含SEQ ID NO:49之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:50之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:51之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含(i)包含SEQ ID NO:52之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:53之胺基酸序列的

HVR-L2及(iii)包含SEQ ID NO:54之胺基酸序列的HVR-L3。

3. 一種結合至人類PD1之經分離抗體，其中該抗體

A)

i) 包含SEQ ID NO:7之VH序列及SEQ ID NO:8之VL序列；

ii) 或i)下之抗體的VH及VL之人類化變異體；

或B)

i) 包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:58之VL序列；

ii) 包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:59之VL序列；

iii) 包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:60之VL序列；

iv) 包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:61之VL序列；

或C)

i) 包含SEQ ID NO:15之VH序列及SEQ ID NO:16之VL序列；

ii) 或i)下之抗體的VH及VL之人類化變異體；

或D)

i) 包含SEQ ID NO:23之VH序列及SEQ ID NO:24之VL序列；

ii) 或i)下之抗體的VH及VL之人類化變異體；

或E)

i) 包含SEQ ID NO:31之VH序列及SEQ ID NO:32之VL序列；

ii) 或i)下之抗體的VH及VL之人類化變異體；

或F)

i) 包含SEQ ID NO:39之VH序列及SEQ ID NO:40之VL序列；

ii) 或i)下之抗體的VH及VL之人類化變異體；

或G)

- i) 包含SEQ ID NO:47之VH序列及SEQ ID NO:48之VL序列；
 - ii) 或i)下之抗體的VH及VL之人類化變異體；
- 或H)
- i) 包含SEQ ID NO:55之VH序列及SEQ ID NO:56之VL序列；
 - ii) 或i)下之抗體的VH及VL之人類化變異體。
4. 一種結合至人類PD1之經分離抗體，其中該抗體
- i) 包含SEQ ID NO:7之VH序列及SEQ ID NO:8之VL序列；
 - ii) 或i)下之抗體的VH及VL之人類化變異體。
5. 一種結合至人類PD1之經分離抗體，其中該抗體包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:58之VL序列。
6. 一種結合至人類PD1之經分離抗體，其中該抗體包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:59之VL序列。
7. 一種結合至人類PD1之經分離抗體，其中該抗體包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:60之VL序列。
8. 一種結合至人類PD1之經分離抗體，其中該抗體包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:61之VL序列。
9. 根據前述實施例中的任一者之抗PD1抗體
- 其中該抗體係分別獨立由以下一或多項特性表徵：該抗PD-1抗體
- i) 與包含具有SEQ ID NO:7之胺基酸序列的VH及具有SEQ ID NO:8之胺基酸序列的VL之抗PD-1抗體競爭結合至PD-1；及/或
 - ii) 結合至人類及獼猴PD-1；及/或
 - iii) 在10 $\mu\text{g/ml}$ 之抗體濃度下藉由同種異體受刺激T細胞使干擾素- γ (IFN- γ)分泌提高85%或更多；及/或

iv) 在10 $\mu\text{g/ml}$ 之抗體濃度下藉由同種異體受刺激T細胞使腫瘤壞死因子 α (TNF α)分泌提高200%或更多。

10. 一種結合至PD1之經分離抗體，其中該抗體在混合淋巴細胞反應 (MLR)分析中在10 $\mu\text{g/ml}$ 之抗體濃度下藉由同種異體受刺激T細胞使腫瘤壞死因子 α (TNF α)分泌提高200%或更多(在一個較佳實施例中，為250%或更多)。

11. 一種結合至PD1之經分離抗體，其中該抗體在混合淋巴細胞反應 (MLR)分析中在10 $\mu\text{g/ml}$ 之抗體濃度下藉由同種異體受刺激T細胞使干擾素- γ (IFN- γ)分泌提高85%或更多(在一個較佳實施例中，為90%或更多，在一個較佳實施例中，為95%或更多)。

12. 一種結合至人類PD-1之經分離抗體，其中該抗體：

i) 與包含具有SEQ ID NO:7之胺基酸序列的VH及具有SEQ ID NO:8之胺基酸序列的VL之抗PD1抗體競爭結合至PD-1；及/或

ii) 結合至人類及獼猴PD-1；及

iii) 在10 $\mu\text{g/ml}$ 之抗體濃度下藉由同種異體受刺激T細胞使干擾素- γ (IFN- γ)分泌提高85%或更多；及

iv) 在10 $\mu\text{g/ml}$ 之抗體濃度下藉由同種異體受刺激T細胞使腫瘤壞死因子 α (TNF α)分泌提高200%或更多。

13. 根據前述實施例中的任一者之抗體，其為單株抗體。

14. 根據前述實施例中的任一者之抗體，其為人類、人類化或嵌合抗體。

15. 根據前述實施例中的任一者之抗體，其為結合至PD1之抗體片段。

16. 根據前述實施例中的任一者之抗體，其為全長IgG1抗體。

17. 根據前述實施例中的任一者之抗體，其為具有突變體L234A、L235A及P329G (根據Kabat之EU索引編號)之全長IgG1抗體。
18. 一種經分離核酸，其編碼根據前述實施例中的任一者之抗體。
19. 一種宿主細胞，其包含根據實施例19之核酸。
20. 一種產生抗體之方法，其包含培養根據實施例20之宿主細胞以使得產生抗體。
21. 根據實施例21之方法，其進一步包含自宿主細胞回收抗體。
22. 一種醫藥調配物，其包含根據實施例1至18中的任一者之抗體及醫藥學上可接受之載劑。
23. 根據實施例1至18中的任一者之抗體，其用作藥物。
24. 根據實施例1至18中的任一者之抗體，其用於治療癌症。
25. 一種根據實施例1至18中的任一者之抗體的用途，其係用在製作藥物中。
26. 根據實施例26之用途，其中該藥物用於治療癌症。
27. 一種治療患有癌症之個體之方法，其包含向個體投與有效量的實施例1之抗體。

III. 實例

以下為本發明之方法及組合物之實例。應理解，考慮到上文提供之一般說明，可實踐各種其他實施例。

儘管出於清楚理解之目的，已藉助於說明及實例相當詳細地描述前述之本發明，但該等描述及實例不應解釋為限制本發明之範疇。本文中所引用之所有專利及科學文獻之揭示內容均以全文引用的方式明確併入本文中。

實例1：

抗PD-1抗體之產生

小鼠之免疫接種

使用用於全長人類PD-1之質體表現載體編碼藉由皮內施用100 ug載體DNA (質體15300_hPD1-fl)，繼之以電穿孔(2個1000 V/cm之方形脈衝，持續時間0.1 ms，時間間隔0.125 s；繼之以4個287.5 V/cm之方形脈衝，持續時間10 ms，時間間隔0.125 s)對NMRI小鼠進行基因免疫接種。小鼠在第0天、第14天、第28天、第42天、第56天、第70天及第84天接受6次連續免疫。在第36天、第78天及第92天獲取血液且製備血清，其用於藉由ELISA進行效價測定(參見下文)。選擇具有最高效價之動物在第96天藉由靜脈內注射50 ug重組人類PD1人類Fc嵌合體來增強免疫，且藉由融合瘤技術藉由在增強免疫之後3天使脾細胞融合至骨髓瘤細胞系來分離單株抗體。測定血清效價(ELISA)。

在PBS中以0.3 ug/ml，100微升/孔將人類重組PD1人類Fc嵌合體固定在96孔NUNC Maxisorp培養盤上，繼之以：用含2% Crotein C的PBS阻斷培養盤，200微升/孔；在含0.5% Crotein C之PBS中對抗血清施加兩次重複地連續稀釋，100微升/孔；用結合HRP之山羊抗小鼠抗體偵測(Jackson Immunoresearch/Dianova 115-036-071；1/16 000)。對於所有步驟，在37°C下培育培養盤1小時。在所有步驟之間，用含0.05% Tween 20之PBS洗滌培養盤3次。藉由以100微升/孔添加BM Blue POD可溶性受質(Roche)來顯現信號；且藉由添加1 M HCl，100微升/孔來終止。在450 nm下，以690 nm作為參考，讀出吸光度。將效價定義為產生半最大信號之抗血清之稀釋度。

實例2：

表徵抗PD1抗體

抗PD1抗體至人類PD1之結合

hu PD1之ELISA

用25微升/孔經生物素標記之PD1-ECD-AviHis來塗覆已塗覆Nunc maxisorp抗生物素蛋白鏈菌素之培養盤(MicroCoat #11974998001)並在4°C下培育隔夜。在洗滌(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)之後，添加25 µl抗PD1樣本或參考抗體(人類抗PD1；Roche/小鼠抗PD1；Biolegend；目錄號：329912)並在室溫下培育1小時。在洗滌(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)之後，以1:2000/1:1000之稀釋度添加25微升/孔山羊抗人類H+L-POD (JIR，JIR109-036-088)/綿羊抗小鼠-POD (GE Healthcare; NA9310)並在室溫下之振盪器上培育1小時。在洗滌(3×90微升/孔的PBST緩衝液)之後，添加25微升/孔TMB受質(Roche目錄號11835033001)並培育直至OD 2至3。在370 nm/492 nm下進行量測。

ELISA結果以EC50值[ng/ml]列於以下綜合列表2及表3中。

PD1之細胞ELISA

以 0.01×10^6 個細胞/孔之濃度，取經過編碼全長人類PD1之質體15311_hPD1-fl_pUC_Neo穩定轉染且藉由G418 (質體上之新黴素抗性標記)選拔之黏著性CHO-K1細胞系接種至384孔平底培養盤中並培養隔夜。

次日，添加25微升/孔的PD1樣本或人類抗PD1 (Roche)/小鼠抗PD1 (Biolegend；目錄號：329912)參考抗體並在4°C下培育2小時(以避免內化)。在小心地洗滌(1×90 微升/孔PBST)之後，藉由添加於1xPBS緩衝液中稀釋之30 微升/孔0.05%之戊二醛(Sigma，目錄號：G5882，25%)來固定細胞並在室溫下培育10分鐘。在洗滌(3×90微升/孔PBST)之後，添加25

微升/孔的第二抗體用於偵測：山羊抗人類H+L-POD (JIR, JIR109-036-088)/綿羊抗小鼠-POD (GE NA9310)，隨後在室溫下之振盪器上培育1小時。在洗滌(3×90微升/孔PBST)之後，添加25微升/孔TMB受質溶液 (Roche 11835033001)並培育直至OD 1.0至2.0。在370 nm/492 nm下量測培養盤。

細胞ELISA結果以「EC50 CHO-PD1」值[ng/ml]列於以下綜合列表表3中。

獼猴PD1之ELISA

用25微升/孔經生物素標記之獼猴PD1-ECD-生物素來塗覆已塗覆Nunc maxisorp抗生物素蛋白鏈菌素之培養盤(MicroCoat #11974998001)並在4°C下培育隔夜。在(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)洗滌之後，添加25 µl抗PD1樣本或參考抗體(人類抗PD1；Roche)並在室溫下之振盪器上培育1小時。在(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)洗滌之後，以1:1000之稀釋度添加25微升/孔山羊抗人類H+L-POD (JIR, JIR109-036-088)並在室溫下之振盪器上培育1小時。在(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)洗滌之後，添加25微升/孔TMB受質(Roche, 11835033001)並培育直至OD 2至3。在370 nm/492 nm下進行量測。

ELISA結果以EC50值[ng/ml]列於以下綜合列表2及表3中。

PD配體1替換分析

用25微升/孔經生物素標記之PD1-ECD-AviHis來塗覆已塗覆Nunc maxisorp抗生物素蛋白鏈菌素之培養盤(MicroCoat #11974998001)並在4°C下培育隔夜。在(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)洗滌之後，添加25 µl抗PD1樣本或參考抗體(小鼠抗PD1；Biolegend；目錄號：329912)並在室溫

下之振盪器上培育1小時。在(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)洗滌之後，添加25微升/孔的PD-L1 (重組人類B7-H1/PD-L1 Fc嵌合體；156-B7，R&D)並在室溫下之振盪器上培育1小時。在(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)洗滌之後，以1:1000之稀釋度添加25微升/孔山羊抗人類H+L-POD (JIR，109-036-088)並在室溫下之振盪器上培育1小時。在(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)洗滌之後，添加25微升/孔TMB受質(Roche，11835033001)並培育直至OD 2至3。在370 nm/492 nm下進行量測。

ELISA結果以IC₅₀值[ng/ml]列於以下綜合列表2中。

PD配體2替換分析

用25微升/孔經生物素標記之PD1-ECD-AviHis來塗覆已塗覆Nunc maxisorp抗生物素蛋白鏈菌素之培養盤(MicroCoat #11974998001)並在4℃下培育隔夜。在(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)洗滌之後，添加25 μl抗PD1樣本或參考抗體(小鼠抗huPD1；Roche)並在室溫下之振盪器上培育1小時。在(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)洗滌之後，添加25微升/孔PD-L2 (重組人類B7-DC/PD-L2 Fc嵌合體；1224-PL-100，R&D)並在室溫下之振盪器上培育1小時。在(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)洗滌之後，以1:2000之稀釋度添加25微升/孔山羊抗人類H+L-POD (JIR，109-036-088)並在室溫下之振盪器上培育1小時。在(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)洗滌之後，添加25微升/孔TMB受質(Roche，11835033001)並培育直至OD 2至3。在370 nm/492 nm下進行量測。

ELISA結果以IC₅₀值[ng/ml]列於以下綜合列表2中。

抗原決定基定位ELISA/結合競爭分析

用25微升/孔捕捉抗體(山羊抗小鼠IgG；JIR；115-006-071)塗覆

Nunc maxisorp培養盤(Nunc #464718)並在室溫下之振盪器上培育1小時。在(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)洗滌之後，在室溫下用含有PBS緩衝液之2% BSA在振盪器上阻斷培養盤1小時。在(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)洗滌之後，添加25 μl小鼠抗PD1樣本並在室溫下之振盪器上培育1小時。在(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)洗滌之後，在室溫下藉由30微升/孔小鼠IgG (JIR；015-000-003)在振盪器上阻斷捕捉抗體1小時。同時，在室溫下用第二樣本抗體在振盪器上預培育經生物素標記之PD1-ECD-AviHis 1小時。在(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)洗滌分析培養盤之後，將PD1抗體混合物轉移至分析培養盤並在室溫下之振盪器上1小時。在(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)洗滌之後，以1:4000之稀釋度添加25微升/孔抗生物素蛋白鏈菌素POD (Roche，#11089153001)並在室溫下之振盪器上培育1小時。在(用PBST緩衝液，3×90微升/孔)洗滌之後，添加25微升/孔TMB受質(Roche，#11089153001)並培育直至OD 1.5至2.5。在370 nm/492 nm下進行量測。藉由針對參考抗體之層級聚類定義抗原決定基組。

表2：例示性抗體之結合、PD-L1抑制及抗原決定基區組(ELISA)

抗體	ELISA huPD1 EC50 [ng/ml]	ELISA cyPD1 EC50 [ng/ml]	ELISA PD-L1抑制 IC50 [ng/ml]	ELISA PD-L2抑制 IC50 [ng/ml]	藉由競爭分析之抗原決定基區組
PD1-0050	17.9	9.8	128	34	1
PD1-0069	45.7	22.7	225	89	6
PD1-0073	15.1	8.3	124	65	5
PD1-0078	26.3	22.4	x	86	2
PD1-0098	50.8	54.6	174	45	5
PD1-0102	34.2	52.7	>35.5 μg/ml	140	4
PD1-0103	33.7	36.9	182	51	5

表3：源自親本小鼠抗體PD1-0103之人類化PD1抗體之生物化及細胞結合(ELISA)。

人類化抗體	ELISA huPD1 EC50 [ng/ml]	ELISA cyPD1 EC50 [ng/ml]	ELISA CHO-PD1 EC50 [ng/ml]
PD1-0103-0312	11	8.3	10.1
PD1-0103-0313	15	11	10.8
PD1-0103-0314	11	8.3	7.7
PD1-0103-0315	10	7.9	7.3

人類化抗PD-1抗體之Biacore特徵

已使用基於表面電漿子共振(SPR)之分析來測定若干鼠類PD1結合子與市售人類PD1結合參考之間的結合動力學參數。因此，抗人類IgG藉由偶合至(Biacore) CM5感測器晶片表面之胺來固定。接著捕捉樣本且使huPD1-ECD與其結合。在每一分析週期之後更新感測器晶片表面。藉由將資料擬合至1:1朗格繆爾相互作用模型(langmuir interaction model)來最終獲得平衡常數及動力學速率常數。

藉由使用GE Healthcare供應之胺偶合套組在pH 5.0下將約2000個反應單位(RU)之20 $\mu\text{g/ml}$ 抗人類IgG (GE Healthcare #BR-1008-39)偶合至Biacore T200中之CM5感測器晶片之流動細胞1及2(替代性地：3及4)上。

該樣本及操作緩衝液為HBS-EP+ (0.01 M HEPES、0.15 M NaCl、3 mM EDTA、0.05% v/v界面活性劑P20，pH 7.4)。流動細胞溫度經設定為25°C且樣本腔室溫度設定為12°C。用操作緩衝液預塗佈系統。

持續注射濃度為10 nM之樣本20秒並與第二流動細胞結合。隨後將一整組濃度(144 nM、48 nM、16 nM、5.33 nM、1.78 nM、0.59 nM、0.20 nM及0 nM)的人類PD1-ECD注射至每一樣本上持續120秒，繼之以30/300秒之解離時間及具有3 M MgCl_2 之兩個20秒的再生步驟，兩個再生

步驟中之後者含有用操作緩衝液「在注射之後進行額外的洗滌」。

最終，用Biacore T200評估軟體將雙重參考資料擬合至1:1朗格繆爾相互作用模型。所得 K_D 、 k_a 及 k_d 值展示於表4中。

表4：藉由Biacore測定之嵌合PD1-0103及人類化PD1-Ab之動力學比率常數及平衡常數(參見下頁)。

配體	k_a [$M^{-1}s^{-1}$]	k_d [s^{-1}]	K_D [nM]
嵌合PD1-0103	3.86E+05	3.07E-04	0.8
PD1-0103-0312	1.95E+05	3.45E-04	1.8
PD1-0103-0313	1.60E+05	3.67E-04	2.3
PD1-0103-0314	1.87E+05	2.79E-04	1.5
PD1-0103-0315	1.89E+05	2.91E-04	1.5

如表4中所示，嵌合PD1-0103 (生成參見實例6)之全部人類化形式呈現與親本抗體(嵌合PD1-0103)相似之動力學特性。

動力學

根據製造商之說明書，將CM5感測器系列S安裝於Biacore 4000系統中且以水動力方式定址偵測點。

以10000個Ru將多株家兔IgG抗體<IgGFC γ M>R (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.)固定在流動細胞1、2、3及4中之偵測點1及5上。根據製造商之說明書藉助於EDC/NHS化學法完成偶合。流動細胞中之剩餘點充當參考。該樣本緩衝液為補充有1 mg/ml羧甲基葡聚糖之系統緩衝液。

在一個實施例中，在25°C下促進該分析。在另一實施例中，在37°C下驅動該分析。藉由以10 μ l/min的1分鐘注射在感測器表面上捕捉50 nM之每一鼠類單株抗體。隨後以100 nM、2 \times 33 nM、11 nM、4 nM、1 nM及系統緩衝液0 nM之濃度系列以30 μ l/min注射對應抗原持續4分鐘的締合

階段時間。再監測解離4分鐘。以30 $\mu\text{l}/\text{min}$ 使用3分鐘的10 mM甘胺酸(pH 1.5)之注射來更新捕捉系統。根據製造商的說明書使用Biacore評估軟體計算相關動力學資料。

抗原決定基定位

用Biacore CAP感測器安裝Biacore 4000儀器且如製造商所建議之來製備。儀器緩衝液為HBS-ET (10 mM HEPES pH 7.4、150 mM NaCl、3 mM EDTA、0.005% w/v Tween 20)。在25°C下運行儀器。

將全部樣本稀釋於系統緩衝液中。藉由在流動細胞1、2、3及4中在點1及5中以30 $\mu\text{l}/\text{min}$ 注射1 min來在200個RU下在CAP感測器表面上捕捉35kDa經生物素標記之抗原PD1-ECD-AviHis。點2、3及4充當參考。在另一實施例中，以同樣的方式在200個RU下在CAP感測器上捕捉35 kDa經生物素標記之抗原PD1-ECD-AviHis。

隨後以30 $\mu\text{l}/\text{min}$ 注射100 nM第一抗體3分鐘，繼之以30 $\mu\text{l}/\text{min}$ 注射100 nM第二抗體3分鐘。注射第一抗體直至呈現抗原之表面充分飽和。在第一及第二抗體注射階段末端，設定報告點「結合後期」(BL)以監測對應抗體之結合反應。計算莫耳比，第二抗體結合反應「BL2」與第一抗體反應「BL1」之間的商。當已藉由第一抗體來錯合抗原時，將莫耳比用作第二抗體之抗原可接近性之指標。

藉由如製造商所建議之以30 $\mu\text{l}/\text{min}$ 注射2 M鹽酸胍250 nM NaOH再生緩衝液2分鐘，繼之以30 $\mu\text{l}/\text{min}$ 注射系統緩衝液1分鐘來自感測器表面完全移除複合物。

實例3：

混合淋巴細胞反應(MLR)中不同抗PD-1抗體對細胞激素產生之作用

3A) 混合淋巴細胞反應(MLR)為量測一個個體(供體X)之淋巴細胞與另一個體(供體Y)之淋巴細胞的活性的免疫細胞分析。混合淋巴細胞反應用以顯示阻斷PD1至淋巴細胞效應細胞之路徑的作用。在存在或不存在抗PD1 mAb之情況下測試分析中之T細胞之活化及其IFN- γ 分泌。

為進行同種異體MLR，使用Leukosep (Greiner Bio One, 227 288)藉由密度梯度離心來分離來自未知HLA類型之至少四個健康供體的周邊血液單核細胞(PBMC)。簡言之，用三倍體積之PBS稀釋肝素化血液樣本且將稀釋之血液的25 ml等分試樣以層狀放置於50 ml Leukosep管中。在室溫下在800 x g下離心15 min (有或無破裂)之後，收集含有片段之淋巴細胞，在PBS中洗滌且直接用於功能性分析中或再懸浮於 $1.0E+07$ 個細胞/毫升的冷凍培養基(10% DMSO、90% FCS)中，且儲存於液氮中。藉由以1:1之刺激者/反應者細胞比率混合來自兩種不同供體之PBMC來設置個體雙向MLR反應，且在存在或有/無不同濃度範圍之經純化抗PD1單株抗體PD1-0050、PD1-0069、PD1-0073、PD1-0078、PD1-0098、PD1-0102、PD1-0103之情況下，在37°C，5%之CO₂下至少一式兩份地在平底96孔培養盤中進行共培養6天。作為參考抗PD1抗體，用人類IgG1 (具有突變L234A、L235A及P329G (Kabat之EU索引))之主鏈來合成及選殖包含納武單抗(亦稱為MDX-5C4或MDX-1106)或派姆單抗(pembrolizumab) (亦稱為MK-3475或Org 1.09A)之VH及VL域之抗體。不將抗體或同型對照抗體用作陰性對照且將recom hu IL-2 (20 EU/ml)用作陽性對照。在第6天之後，自用於細胞激素量測之每一培養物取出100 μ l培養基。使用OptEIA ELISA套組(BD Biosciences)量測IFN- γ 之含量。

結果展示於表5中(IFN-g分泌/釋放)。抗PD1單株抗體以濃度依賴性

方式促進T細胞活化及IFN- γ 分泌。參考添加/不添加任何阻斷mAb (誘導如E-c之IFNg值的基本同種異體刺激)之MLR及添加20 EU/ml rec hu IL-2 (陽性對照=100%之如E+c的IFNg值)之MLR的IFN-g產物來計算IFNg分泌之提高%之值且根據下式計算： $\text{Rel.Stimulation}[\%] = ((\text{Esampel} - \text{E-c})/(\text{E+c} - \text{E-c}))*100$

表5：相較於作為正對照之重組人類IL-2治療(20 EU/ml) (=100%提高)之作用，在同種異體刺激及用抗PD-1抗體治療之後的IFN γ 分泌之百分比

	濃度($\mu\text{g/ml}$)	1:12	1:120	1:1200	MLR中之作用
PD1-0050	44	136	96	33	+++
PD1-0069	60	76	71	55	+++
PD1-0073	43	103	63	38	++
PD1-0078	64	99	72	21	++

若干PD1阻斷抗體PD1-0050、PD1-0069、PD1-0073、PD1-0078、PD1-0098、PD1-0102、PD1-0103藉由促進干擾素 γ (IFN-g)之分泌來顯示強大的免疫調整活性(資料未展示全部抗體)。

3B) 在另一實驗中，評估嵌合PD1-0103 (具有突變L234A、L235A及P329G (Kabat之EU索引)之人類IgG1同型)。具有嵌合PD1-0103之PD1之阻斷藉由同種異體受刺激第一人類T細胞來強有力地促進IFN- γ 分泌。嵌合PD1-0103比參考抗PD1抗體更強效(參見圖1)。

為作比對，使用用人類IgG1 (具有突變L234A、L235A及P329G (Kabat之EU索引))之主鏈合成及選殖之包含納武單抗(亦稱為MDX5C4或MDX-1106)及派姆單抗(亦稱為MK-3475或Org 1.09A)之VH及VL域的參考抗PD1抗體。

3C) 在額外的實驗中，抗PD-1抗體PD1-0103之人類化變異體(圖2及圖3中之人類化抗體PD1-0103-0312、PD1-0103-0314，亦參見下文中之

實例6)之免疫調整活性，a) IFN釋放(分泌) b) TNF- α 釋放(分泌)如上文所述在MLR中得以評估。將嵌合PD1-0103抗體及其人類化形式之效應與具有人類IgG1之主鏈(具有突變L234A、L235A及P329G (Kabat之EU索引))之包含納武單抗(亦稱為MDX5C4或MDX-1106)及派姆單抗(亦稱為MK-3475或Org 1.09A)之VH及VL域的參考抗PD1抗體作比較。在6天的MLR培養之後，採集50 μ l之上清液並使用Bio-Plex Pro™人類細胞激素Th1/Th2分析(Bio-Rad Laboratories Inc.)在單一培養基中量測多個細胞激素。(資料未展示全部細胞激素)。

在促進T細胞活化及IFN- γ 分泌方面嵌合PD1-0103抗體及其人類化形式(PD1-0103_0312及PD1-0103_0314)比參考抗PD1抗體更強效(參見圖2)。

此外，嵌合PD1-0103抗體及其人類化變異體藉由抗原呈現細胞提高腫瘤壞死因子 α (TNF α) (參見圖3)及IL-12 (資料未展示)分泌且增強單核細胞/巨噬細胞或抗原呈現細胞刺激T細胞之能力。

實例4：

抗PD-1藉由與同種異體成熟樹突狀細胞共培養之人類CD4 T細胞阻斷細胞毒性粒酶B釋放及IFN- γ 分泌之效果

為進一步在同種異體背景下研究抗PD-1治療之作用，吾等研發一種分析，其中在衍生出單核細胞之同種異體成熟樹突狀細胞(mDC)的存在下共培養剛經純化之CD4 T細胞5天。提前一週經由塑性黏附自新鮮PBMC分離單核細胞，繼之以移除非黏附細胞。吾等隨後藉由在含有GM-CSF (50 ng/ml)及IL-4 (100 ng/ml)之培養基中培養其5天來自單核細胞生成不成熟的DC。為誘導iDC成熟，吾等添加TNF- α 、IL-1 β 及IL-6 (每一者50

ng/ml)至培養基持續額外2天。吾等隨後藉由經由流式細胞測量術(LSRFortessa, BD Biosciences)量測主要組織相容複合物II類(MHCII)、CD80、CD83及CD86之其表面表現來評定DC成熟。

當混合淋巴細胞反應(mMLR)最小時，藉助於自不相關供體獲得之108 PBMC的微珠套組(Miltenyi Biotec)來富集CD4 T細胞。培養之前，用5 μ M之羧基螢光素琥珀醯亞胺酯(CFSE)標記CD4 T細胞。隨後在存在或不存在阻斷抗PD1抗體(PD1-0103，嵌合PD1-0103或人類化抗體PD1-0103-0312、PD1-0103-0313、PD1-0103-0314、PD1-0103-0315，在圖4A及圖4B中簡稱為0312、0313、0314、0315)之情況下，以10 μ g/ml之濃度(若圖式中未另外指定)將105 CD4 T細胞連同成熟同種異體-DC (5:1)塗覆於96孔板中。

五天後吾等彙集細胞培養上清液，稍後用以藉由ELISA (R&D系統)來量測IFN- γ 含量，並在存在Golgi Plug (布雷菲爾德菌素(Brefeldin) A)及Golgi Stop (莫能菌素(Monensin))之情況下在37°C下靜置細胞額外5小時。隨後在具有抗人類CD4抗體及存活/死亡可固定染料Aqua (Invitrogen)之表面上洗滌、沾染該等細胞，之後用固定/電燙緩衝液(BD Bioscience)將其固定/滲透。吾等進行粒酶B (BD Bioscience)、IFN- γ 及IL-2 (兩者來自eBioscience)之胞內染色。結果展示於圖4A及圖4B中。

吾等亦測試不同濃度之人類化變異體PD1-0103 (人類化抗體PD1-0103-0312、PD1-0103-0313、PD1-0103-0314、PD1-0103-0315，在圖式中簡稱為0312、0313、0314、0315，亦參見下文之實例6)且發現其在促進粒酶B及干擾素 γ 方面應同樣良好。DP47在Fc部分中為具有LALA突變之非結合人類IgG以避免經Fc γ R識別且用作負對照。

實例5：**嵌合抗體衍生物**

藉由藉助於PCR擴增抗PD1小鼠抗體PD1-0098、PD1-0103之重鏈及輕鏈可變區並將其選殖至作為具有有消除作用功能之突變L234A、L235A及P329G (Kabat之EU索引) (白胺酸234至丙胺酸、白胺酸235至丙胺酸、脯胺酸329至甘胺酸)之人類IgG1主鏈/人類CH1-鉸鏈-CH2-CH3之融合蛋白的重鏈表現載體及作為人類C- κ 之融合蛋白的輕鏈表現載體中來生成嵌合PD1抗體。隨後將LC及HC質體共轉染至HEK293中且在7天之後藉由抗體純化之標準方法自上清液純化。將嵌合PD1抗體重新命名為嵌合chiPD1-0098 (chiPD1-0098)及嵌合PD1-0103 (chiPD1-0103)。為作比對，使用用人類IgG1 (具有突變L234A、L235A及P329G (Kabat之EU索引))之主鏈合成及選殖之包含納武單抗(亦稱為MDX-5C4或MDX-1106)及派姆單抗(亦稱為MK-3475或Org 1.09A)之VH及VL域的參考抗PD1抗體。

實例6：

抗PD1抗體PD-0103 (huMab PD-0103)之人類化變異體及特徵之生成、表現及純化特徵

鼠類抗PD1抗體0103之VH及VL域之人類化

基於鼠類抗PD1抗體0103之鼠類VH及VL域之胺基酸序列(SEQ ID NO:7及SEQ ID NO:8)生成人類化抗PD1抗體變異體。

人類化VH變異體係基於與具有若干突變之人類J-要素生殖系IGHJ5-01組合之人類生殖系IMGT_hVH_3_23。(產生SEQ ID NO:57)。

VL之人類化變異體係基於與人類J-要素生殖系IGKJ1-01組合之人類

生殖系IMGT_hVK_4_1、IMGT_hVK_2_30、IMGT_hVK_3_11及IMGT_hVK_1_39。不同突變產生SEQ ID NO:58至SEQ ID NO:61之人類化變異體。

將PD1-0103之重鏈及輕鏈可變區之人類化胺基酸序列回譯至DNA中並合成所得cNDA (GenArt)且接著將其選殖至作為具有有消除效應功能之LALA及PG突變(白胺酸234至丙胺酸、白胺酸235至丙胺酸、脯胺酸329至甘胺酸)之人類IgG1主鏈/人類CH1-鉸鏈-CH2-CH3之融合蛋白的重鏈表現載體或作為人類C- κ 之融合蛋白的輕鏈表現載體中。隨後將LC及HC質體共轉染至HEK293中且在7天之後藉由抗體純化之標準方法自上清液純化。所得人類化PD1抗體命名如下：

表6：PD1-0103之人類化變異體抗體之VH及VL序列

PD1-0103之人類化抗體	VH之人類化變異體/SEQ ID NO:	VL之人類化變異體/SEQ ID NO:
PD1-0103-0312	SEQ ID NO:57	SEQ ID NO:58
PD1-0103-0313	SEQ ID NO:57	SEQ ID NO:59
PD1-0103-0314	SEQ ID NO:57	SEQ ID NO:60
PD1-0103-0315	SEQ ID NO:57	SEQ ID NO:61

表7：PD1-0103之人類化變異體抗體之HVR序列

PD1-0103之人類化抗體	人類化變異體之HVR-H1、HVR-H2及HVR-H3/SEQ ID NO:	人類化變異體之HVR-L1、HVR-L2及HVR-L3/SEQ ID NO:
PD-0103-0312	SEQ ID NOS: 1、2及3	SEQ ID NOS: 4、5及6
PD-0103-0313	SEQ ID NOS: 1、2及3	SEQ ID NOS: 4、5及6
PD-0103-0314	SEQ ID NOS: 1、2及3	SEQ ID NOS: 4、5及6
PD-0103-0315	SEQ ID NOS: 1、2及3	SEQ ID NOS: 4、5及6

如上述表徵人類化PD1-0103抗體變異體及親本嵌合PD1-0103。結果展示於表8中。

表8：人類化PD1-0103抗體變異體及親本嵌合PD1-0103之結果的概述

分析	嵌合PD1-0103	PD-0103-0312	PD-0103-0313	PD-0103-0314	PD-0103-0315
親和力 K_{D37^c} [nM] *)	2.0 / 0.8	1.5 / 1.8	1.9 / 2.3	1.6 / 1.5	1.7 / 1.5
ELISA EC50 [nM]	0.2	0.1	0.07	0.07	0.06
CHO-PD1 EC50	+	+	+	+	+
IC50 PD-L1, 2 [nM]	1.35	tbd	tbd	tbd	tbd
混合淋巴細胞反應分析	+++	+++	+++	++++	++
獼猴交叉反應性 (EC50 [nm])	+	0.08	0.06	0.05	0.04

實例7：

中和效能PD-1抗體

為了在仿效復原活體外經抑制T細胞反應中測試生成PD-1抗體之內部中和效能，使用可商購之PD1/PD-L1報導基因分析(Promega)。此系統由PD1+NFAT Jurkat細胞及PD-L1+CHO對應體構成，其亦提供活化信號。大體上，該報導基因系統係基於三個步驟：(1)介導TCR之NFAT活化、(2)在活化後即藉由PD-1/PD-L1軸抑制NFAT信號及(3)藉由PD-1阻斷抗體回收NFAT信號。

材料及方法

- PD-L1培養基：PAN Biotech (#P04-03609)；FBS (10%)及L-Gln (4 mM)
- 分析培養基：RPMI 1640 (#31870; Invitrogen)、25 mM HEPES、2 mM L-Gln、FBS (2%)
- 用於此分析之細胞(均購自Promega之細胞類型)：
PD-L1+CHO細胞(批號#139147)：2-3×10⁴細胞/96孔

PD-1+NFAT Jurkat細胞(批號#133024)：3.5×10⁴細胞/孔

在第1天，在上文所提及之培養基中以指定細胞濃度解凍、接種PD-L1+細胞且在37°C及5% CO₂下培養隔夜。次日，移除培養基且將PD-L1+細胞以指定濃度與經製備之抗體一起培育(在分析培養基中)。同時，解凍PD-1+NFAT Jurkat細胞且將上文所提及之細胞成員轉移至PD-L1+細胞並與PD-L1+細胞一起共培養。在37°C及5%的CO₂下培育6小時之後，將Bio-Glo受質升溫至室溫(添加之前1至2小時)。根據套組製造商的建議，在每孔添加80 µl Bio-Glo溶液之前，自培育箱移除細胞培養盤並調整至室溫(10分鐘)，在以Tecan無限讀取器量測螢光之前培育5至10分鐘。結果可見於圖5A及圖5B中，其中展示在TCR刺激後即復原介導由不同PD-1抗體抑制之NFAT信號的PD-1/PD-L1：圖5A：當與參考抗體比較時，嵌合PD1_0103展示可再生產地優良作用。作為參考，用人類IgG1 (具有突變L234A、L235A及P329G (Kabat之EU索引))之主鏈合成及選殖包含納武單抗(亦稱為MDX-5C4或MDX-1106)之VH及VL域的抗PD1抗體。圖5B：PD1_0103之四個人類化變異體顯示出與先導抗體相似之活體外效能且亦略微優於參考抗體。

實例8：

具有PD-1胞外域之Fab PD1-0103之結晶：

針對複合物形成物，將Fab PD1-0103混合於1.1莫耳之過量PD-1胞外域中。在冰上培育1小時之後，該複合物藉由PNGase步驟去糖基化以移除不包含於複合物形成物中之聚糖。在15 mg/ml之濃度下對具有PD-1 ECD之Fab片段PD1-0103 (具有人類CH1及CL)之複合物晶體進行結晶篩分。在蒸汽擴散沈滴實驗中，藉由使0.1 µl蛋白溶液與0.1 µl儲槽溶液混合

來將結晶液滴設定在21°C下。晶體自含有PEG作為沈澱劑之各種條件中出現。晶體用以測定在4天內自30% PEG1500呈現的結構且在7天內生長至 $0.03 \times 0.06 \times 0.02 \mu\text{m}$ 之最終大小。

將晶體轉移至補充有20%甘油作為低溫保護劑之儲槽溶液中，且隨後在液態N₂中迅速冷卻。用Pilatus 6M偵測器在100 K之溫度下在Swiss Light Source之光束線X10SA下彙集繞射影像且用XDS封裝處理[Kabsch, W. *Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. J. Appl. Cryst.* 26, 795-800 (1993)]。合併來自一種晶體之資料以在具有每一晶體不對稱單元兩個複合物分子之空間群P1中獲得1.9 Å解析度資料集(參見表1)。

將來自PDB-ID 3UTZ之Fab片段之座標用作搜索模型藉由分子替換來測定結構。當搜索座標用於PD-1 ECD時，使用PDB-ID 3RRQ。將Fab分成恆定及可變域且進行CCP4程式PHASER CCP4中之獨立探索兩者[CCP4 (Collaborative Computational Project, N. *The CCP4 suite: programs for protein crystallography. Acta Crystallogr. D*, 760-763 (1994)]以便考慮可能的彎管角度變化。在COOT中重建模型(Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, WG. & Cowtan, K. *Features and development of COOT. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60, 486-501 (2010))並用CCP4程式REFMAC優化。藉由程式BUSTER進行最終優化步驟(Bricogne G., Blanc E., Brandl M., Flensburg C., Keller P., Paciorek W., Roversi P, Sharff A., Smart O.S., Vonrhein C., Womack T.O. (2016). *BUSTER version 2.11.6. Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd.*)。

表9：Fab PD1-0103-PD-1 ECD晶體之資料彙集及結構優化統計

資料彙集	
波長 (Å)	1.0
解析度 ¹ (Å)	48.27至1.90 (1.99至1.90)
空間群	P1
單位晶胞 (Å, °)	66.37 69.82 86.09 99.17 98.01 119.40
總反射	170515 (20750)
唯一反射	97997 (12250)
多樣性	1.72 (1.66)
完整性 (%)	0.97 (0.96)
均值I/σ(I)	8.02 (0.86)
威爾遜B因子(Wilson B-factor)	30.30
R量測	0.093 (0.610)
CC1/2	0.999 (0.290)
優化	
優化中所用之反射	97986 (6792)
用於R-空間之反射	4754 (355)
R-工作 ³	0.1899 (0.2290)
R-空間 ⁴	0.2291 (0.2628)
非氫原子數目	9235
巨分子	8199
碳水化合物	162
蛋白殘基	1068
RMS鍵(Å)	0.013
RMS角(°)	1.81
有利的拉氏構象(Ramachandran) (%)	97
所允許的拉氏構象 (%)	2.9
拉氏構象離群值 (%)	0.38
旋轉異構體離群值 (%)	2.1
不一致評分	2.60
平均B-因子 (Å ²)	36.98
巨分子	36.01
碳水化合物	49.62
溶劑	38.12

¹ 圓括號中之值係指最高解析度位元。

² $R_{\text{融合}} = \frac{\sum |I - \langle I \rangle|}{\sum I}$ ，其中I為強度。

³ $R_{\text{工作}} = \frac{\sum |F_o - \langle F_c \rangle|}{\sum F_o}$ ，其中 F_o 為所觀測到的結構因子振幅且 F_c 為所計算的結構因子振幅。

⁴ 按優化期間所省略的總資料之5%計算 $R_{\text{空閒}}$ 。

具有PD-1胞外域之複合物中的Fab PD1-0103之結構測定

為了詳細表徵抗原決定基及互補位，吾等用解析度為1.9 Å之Fab PD1-0103測定複合物中之PD-1胞外域之晶體結構。該結構揭示Fab PD1-0103以識別由BC及FG環區及由PD-1 V型Ig域之前部β-層之β-鏈CC'FG之殘基所形成的抗原決定基。另外，抗原決定基包括位置Asn58處之N-連接糖基化樹，該位置為PD-1之BC環的一部分。Fab PD1-0103之輕鏈之全部CDR (除CDR2外)促成互補位。

藉由具有由重鏈提供之743 Å²及由輕鏈提供之320 Å²的Fab PD1-0103覆蓋PD-1之1063 Å²之表面區域。用程式PISA分析結合界面揭示藉助於6個氫鍵及凡得瓦爾力(Van der Waals force)的Fab PD1-0103與PD-1 ECD之相互作用型態。側鏈氫鍵形成於具有PD-1之BC環之Glu61及Ser62之重鏈CDR1 (Thr33)及CDR2 (Ser52、Arg56、Asp57)的殘基之間。凡得瓦爾力接觸主要藉由輕鏈及重鏈之CDR3，尤其HCDR3之Phe105，及藉由與BC環之殘基Val64、Pro83及與FG環之Ile126及Leu128保持近距離的HCDR1之Tyr32驅動。在具有Fab PD1-0103之重鏈之CDR2及輕鏈之CDR3的FG環殘基Pro130、Ala132、Ile134之間觀測另一凡得瓦爾力接觸。Fab PD1-0103之輕鏈排他性地接觸PD-1之FG環。用於形成複合物的輕鏈之CDR2並不提供接觸。

PD-1之位置Asn58處的N-連接糖基化樹為抗原決定基的一部分且單獨與Fab PD1-0103之重鏈之殘基相互作用。

PD-1之位置Asn58處的核心糖鏈(N-連接糖基化)樹具有關於單糖之以下結構

Asn58-N-GlcNAc(FUC) - GlcNAc- - BMA - MAN(參見圖9)，其中使用以下縮寫。

[GlcNAc]= NGA = N-乙醯基- β -D-半乳糖胺 = 2-(乙醯胺基)-2-去氧- β -D-吡喃半乳糖

[FUC] = α -L-海藻糖

[BMA] = β -D-吡喃甘露糖

[MAN] = α -D-吡喃甘露糖

糖鏈中之第一GlcNAc經海藻糖基化，簡稱為GlcNAc (FUC)。

在該結構中，明確界定除一個甘露糖單元外之核心聚糖之電子密度。海藻糖部分指向由具有CDR1及CDR2之PD-1所形成的親水性凹穴。藉由具有CDR1之Ser30及Ser31以及PD-1之Glu61及Gln99的氫結合網路來協調海藻糖之結合。藉由第一GlcNAc至Arg56及構架殘基Arg72、Asp73、Asn74至Man之氫結合提供另外的接觸。

表10：接觸PD1-Fab PD1-0103重鏈之列表

藉由5 Å之距離截止值來識別接觸

PD1	PD-103之HC
Ser60	Asp57、Tyr59
Glu61	Thr33、Ser52、Gly53、Gly54、Arg56、Asp57
Ser62	Thr33、Ser52、Asp57、Phe105

Phe63	Phe105
Val64	Gly101、Arg102、Phe105
Tyr68	Tyr104
Lys78	Arg102
Phe82	Ser31
Pro83	Ser31、Tyr32
Glu84	Tyr32
Ile126	Gly101、Tyr104、Phe105
Ser127	Phe105
Leu128	Tyr59、Leu99、Phe105
Pro130	Tyr59
Ile134	Tyr104

表11：接觸PD1-Fab PD1-0103輕鏈之列表

藉由5 Å之距離截止值來識別接觸

PD-1	PD-103之LC
Ile126	Phe36
Leu128	Asn95、Trp100
Pro130	Asn95、Tyr96、Asp97、Val98
Lys131	Tyr96、Asp97
Ala132	Asn95、Tyr96、Asp97、Thr31、Phe36
Gln133	Thr31
Ile134	Thr31、Ser32、Asn34、Phe36

表12：Asn58-Fab PD1-0103重鏈處之核心糖鏈之接觸PD1之列表
藉由5 Å之距離截止值來識別接觸

Asn58處之PD1-N-糖基化(核心糖鏈)	PD-103之HC
第一GlcNAc	Arg56、Asp57
FUC	Ser30、Ser31、Tyr32、Gly53、Gly54
第二GlcNAc	Gly54、Gly55、Arg56
BMA	Gly54、Asn74
MAN	Gly53、Gly54、Gly55、Arg72、Asp73、Asn74

概述

- PD1上之抗原決定基類似於平坦表面
- > 主要藉由PD1之前部b層及CDR3來結合
- 相互作用涉及極性及凡得瓦爾力接觸
- 具有Fab之重鏈的PD1之較大相互作用表面區域
- 位置Asn58處之糖基化參與PD1至Fab片段之結合
- 海藻糖單元佔據由PD1及Fab PD1-0103之重鏈所形成之凹穴

實例9：

相較於在Asn58處經糖基化之人類PD-1之結合，至在Asn58處未經糖基化之人類PD1之抗體結合降低(經糖基化及非經糖基化重組PD1之抗PD-1抗體之Biacore特徵)

基於表面電漿子共振(SPR)之分析已用於測定經糖基化PD1與非經糖基化重組人類PD1之間的結合動力學參數。因此，抗人類IgG藉由偶合至(Biacore) CM5感測器晶片表面之胺來固定。接著捕捉樣本且使hu PD1-

ECD與其結合。在每一分析週期之後更新感測器晶片表面。藉由將資料擬合至1:1朗格繆爾相互作用模型來最終獲得平衡常數及動力學速率常數。

藉由使用GE Healthcare供應之胺類偶合套組在pH 5.0下將約2000個反應單位(RU)之20 $\mu\text{g/ml}$ 的抗人類IgG (GE Healthcare #BR-1008-39)偶合至Biacore T200中之CM5感測器晶片之流動細胞1及2(替代性地：3及4)上。

該樣本及操作緩衝液為HBS-EP+ (0.01 M HEPES、0.15 M NaCl、3 mM EDTA、0.05% v/v界面活性劑P20，pH 7.4)。流動細胞溫度經設定為25°C且樣本腔室溫度設定為12°C。用操作緩衝液預塗佈系統。

持續注射濃度為10 nM之樣本20秒並與第二流動細胞結合。隨後將一整組濃度(200 nM、66.6 nM、22.2 nM、7.4 nM、2.46 nM及0 nM)的經糖基化或非經糖基化之人類PD1-ECD注射至每一樣本上持續200秒，繼之以0/2000秒之解離時間(66.6 nM&22.2 nM)及具有3 M MgCl_2 之兩個20秒的再生步驟，兩個再生步驟中之後者含有用操作緩衝液「在注射之後進行額外的洗滌」。

最終，用Biacore T200評估軟體將雙重參考資料擬合至1:1朗格繆爾相互作用模型。所得 K_D 、 k_a 及 k_d 值展示於表13中。

表13：藉由Biacore來測定動力學比率常數及平衡常數。

配體	樣本	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
PD1-0103-0312	在Asn58處經去糖基化之PD1	3.36E+05	2.70E-02	8.02E-08
PD1-0103-0312	在Asn58處經糖基化之PD1	7.77E+05	7.46E-05	9.61E-11
派姆單抗	在Asn58處經去糖基化之PD1	1.51E+06	2.46E-03	1.63E-09
派姆單抗	在Asn58處經糖基化之PD1	1.87E+06	4.50E-03	2.41E-09
納武單抗	在Asn58處經去糖基化之PD1	5.49E+05	3.66E-03	6.66E-09
納武單抗	在Asn58處經糖基化之PD1	4.44E+05	1.63E-03	3.68E-09

與派姆單抗及納武單抗相比，在PD-103-0312至經去糖基化及經糖基化之PD-1之結合之間存在明顯的區別(亦參見圖13A及圖13B)。

實例10：

針對CEA之與T細胞雙特異性抗體組合的PD1抗體之活體內抗腫瘤療效

藉由用人類造血幹細胞之後續過繼轉移調節NOG小鼠來產生人類化動物。所得小鼠呈現在人類衍生細胞之20%至85%範圍內的人類與小鼠白細胞之間的嵌合比。在此類模型中，T細胞為功能性的且可經活化以藉由結合至CEA及CD3之雙特異性抗體(其描述於WO2014/131712中)殺死腫瘤細胞。隨後在側面位置向此類人類化動物皮下注射一百萬個CEA陽性腫瘤細胞，MKN45胃癌瘤。可藉由用操作員定向卡尺每週3次量測腫瘤之三維軸來評定腫瘤生長(圖14A及圖14B)。在注射腫瘤之後的第9天，小鼠基於腫瘤大小隨機分組以具有同源動物組且開始療法治療。除媒劑組之外(圖xA及圖XB，圓形)，全部小鼠組一週兩次經靜脈內投與劑量為2.5 mh/Kg之CEACD3TCB。另外，亦用一種組合搭配物治療每一小鼠組：腹膜內每週一次0.15 mg/Kg (圖14A，方形)或每週一次1.5 mg/Kg (圖14B，方形)之抗PD1 (PD1-0103-0312)；腹膜內每週一次0.15 mg/Kg (圖14A，菱形)或每週一次1.5 mg/Kg (圖14B，菱形)之納武單抗。隨時間推移展示一個治療組內的腫瘤大小之平均值。組由每組9至10隻小鼠組成且繼續量測直至每組存在至少3隻小鼠。已計算標準化曲線下面積(sAUC)且使用單向ANOVA分析計算統計顯著性。

【序列表】

<110> 瑞士商赫孚孟拉羅股份公司

<120> 抗PD1抗體及使用的方法

<130> P33103-FT

<150> EP15188061.4

<151> 2015-10-02

<160> 77

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 1

Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr
1 5

<210> 2

<211> 3

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 2

Gly Gly Arg
1

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 3

Thr Gly Arg Val Tyr Phe Ala Leu Asp
1 5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 4

Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser Asp Asn Ser Phe
 1 5 10

<210> 5
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 5

Arg Ser Ser
 1

<210> 6
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 6

Asn Tyr Asp Val Pro Trp
 1 5

<210> 7
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 7

Glu Val Ile Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Asp Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Val Leu Leu Thr Gly Arg Val Tyr Phe Ala Leu Asp Ser Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 8
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 8

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser
 20 25 30

Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro
 35 40 45

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

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

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr
 85 90 95

Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 9
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 9

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr
 1 5

<210> 10
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 10

Tyr Ser Gly
 1

<210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 11

His Gly Ser Ala Pro Trp Tyr Phe Asp
 1 5

<210> 12
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 12

Ser Gln Asn Ile Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr
 1 5 10

<210> 13
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 13

Lys Val Ser
 1

<210> 14
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 14

Gly Ser His Phe Pro Leu
 1 5

<210> 15
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 15

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asp Lys Leu Glu Trp
 35 40 45

Leu Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Phe Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80

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

Ala Arg Trp His Gly Ser Ala Pro Trp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Arg
 100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 16
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 16

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser
 20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Arg Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

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

<210> 17
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 17

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr
 1 5

<210> 18
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 18

Tyr Thr Gly
 1

<210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 19

Met Asp Tyr Tyr Gly Ser Thr Leu Asp
 1 5

<210> 20
 <211> 11

<212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 20

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

<210> 21
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 21

Arg Ala Ser
 1

<210> 22
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 22

Asn Asn Glu Asp Pro Tyr
 1 5

<210> 23
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 23

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45

Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Thr Gly Arg Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe

<400> 25

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
1 5

<210> 26

<211> 3

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 26

Tyr Ser Gly
1

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 27

Gly Ile Thr Thr Gly Phe Ala
1 5

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 28

Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Ser Tyr Ser Phe
1 5 10

<210> 29

<211> 3

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 29

Tyr Ala Ser
1

<210> 30

<211> 6

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 30

Ser Arg Glu Phe Pro Trp
1 5

<210> 31

<211> 118

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 31

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

<210> 32

<211> 111

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 32

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

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

Ser Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Lys Tyr 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 His His Ser Arg
 85 90 95

Glu Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 33
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 33

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 1 5

<210> 34
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 34

Gly Gly Arg
 1

<210> 35
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 35

Tyr Tyr Gly Ile Asp

1 5

<210> 36
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 36

Ser Gln Asp Val Thr Thr Ala
 1 5

<210> 37
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 37

Trp Ala Ser
 1

<210> 38
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 38

His Tyr Ser Ile Pro Trp
 1 5

<210> 39
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 39

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Asn Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Ser Tyr Tyr Tyr Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 40
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 40

Asp Ile Val Met Thr Gln Pro His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Ile Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 41
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 41

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Thr
 1 5

<210> 42
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 42

Ser Asp Ser
 1

<210> 43
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 43

Pro Phe Asp
 1

<210> 44
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 44

Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 1 5

<210> 45
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 45

Ser Ala Ser
 1

<210> 46
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 46

His Tyr Ser His Pro Phe
 1 5

<210> 47
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 47

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

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

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

Gly Ala Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Thr 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 Ser Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
 100 105 110

Ser Ser

<210> 48
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 48

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Ala Ile Ser Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser His Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 49

<211> 8

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 49

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr
 1 5

<210> 50

<211> 3

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 50

Ser Ser Gly
 1

<210> 51

<211> 6

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 51

Arg Asn Trp Tyr Phe Asp
1 5

<210> 52

<211> 13

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 52

Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Thr Gln Lys Asn Tyr
1 5 10

<210> 53

<211> 3

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 53

Trp Ala Ser
1

<210> 54

<211> 6

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 54

Asp Tyr Thr Phe Pro Leu
1 5

<210> 55

<211> 117

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 55

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Ser Trp His Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45

Met Gly Phe Ile His Ser Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Phe Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80

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

Ala Thr Tyr Arg Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 56
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 56

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

Glu Lys Val Thr Met Arg Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Gly Thr Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

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

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

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

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

Lys

<210> 57
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> PD1-0103_01之人類化變異體-重鏈可變域VH

<400> 57

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Val Leu Leu Thr Gly Arg Val Tyr Phe Ala Leu Asp Ser Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 58
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>

<223> PD1-0103_01之人類化變異體-輕鏈可變域VL

<400> 58

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser
 20 25 30

Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

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

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

Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 59

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> PD1-0103_02之人類化變異體-輕鏈可變域VL

<400> 59

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

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

Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro
 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

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

Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr
 85 90 95

Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 60
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> PD1-0103_03之人類化變異體-輕鏈可變域VL

<400> 60

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser
 20 25 30

Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr
 85 90 95

Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 61
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> PD1-0103_04之人類化變異體-輕鏈可變域VL

<400> 61

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser
 20 25 30

Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr
 85 90 95

Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 62
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 62

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

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 63
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 63

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

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105

<210> 64
 <211> 330

<212> PRT

<213> 智人

<400> 64

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 65
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 65

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275

280

285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 66
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 66

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130

135

140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 67
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 67

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 68
 <211> 268
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 68

Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr
 1 5 10 15

Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe
 20 25 30

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
 35 40 45

Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
 50 55 60

Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu
65 70 75 80

Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn
85 90 95

Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala
100 105 110

Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg
115 120 125

Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly
130 135 140

Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly Leu Leu Gly Ser
145 150 155 160

Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys Ser Arg Ala Ala
165 170 175

Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Lys Glu Asp
180 185 190

Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly Glu Leu Asp Phe
195 200 205

Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro Cys Val Pro Glu
210 215 220

Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly Met Gly Thr Ser
225 230 235 240

Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg Ser Ala Gln Pro
245 250 255

Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
260 265

<210> 69
<211> 150
<212> PRT

<213> 智人

<400> 69

Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr
 1 5 10 15

Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe
 20 25 30

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
 35 40 45

Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
 50 55 60

Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu
 65 70 75 80

Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn
 85 90 95

Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala
 100 105 110

Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg
 115 120 125

Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly
 130 135 140

Gln Phe Gln Thr Leu Val
 145 150

<210> 70

<211> 288

<212> PRT

<213> 智人

<400> 70

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
 1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
 20 25 30

Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
 35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
 50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
 65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
 85 90 95

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
 100 105 110

Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
 115 120 125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
 130 135 140

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
 145 150 155 160

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
 165 170 175

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
 180 185 190

Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
 195 200 205

Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
 210 215 220

Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
 225 230 235 240

Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
 245 250 255

Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
 260 265 270

Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
 275 280 285

<210> 71
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> PD1-0103及PD1-0103人類化變異體PD1-0103-0312、PD1-0103-0313、PD1-0103-0314及
 PD1-0103-0315之最小HVR1

<400> 71

Ser Ser Tyr Thr
 1

<210> 72
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> PD1-0103及PD1-0103人類化變異體PD1-0103-0312、PD1-0103-0313、PD1-0103-0314及
 PD1-0103-0315之最小HVR2

<400> 72

Ser Gly Gly Gly Arg Asp Ile Tyr
 1 5

<210> 73
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> PD1-0103及PD1-0103人類化變異體PD1-0103-0312、PD1-0103-0313、PD1-0103-0314及
 PD1-0103-0315之最小HVR3

<400> 73

Gly Arg Val Tyr Phe

1

5

<210> 74
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>

<223> PD1-0103及PD1-0103人類化變異體PD1-0103-0312、PD1-0103-0313、PD1-0103-0314及PD1-0103-0315之最小LVR1

<400> 74

Thr Ser Asp Asn Ser Phe
 1 5

<210> 75
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>

<223> PD1-0103及PD1-0103人類化變異體PD1-0103-0312、PD1-0103-0313、PD1-0103-0314及PD1-0103-0315之最小LVR2

<400> 75

Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser
 1 5

<210> 76
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>

<223> PD1-0103及PD1-0103人類化變異體PD1-0103-0312、PD1-0103-0313、PD1-0103-0314及PD1-0103-0315之最小LVR3

<400> 76

Asn Tyr Asp Val Pro Trp
 1 5

<210> 77
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>

<223> 在根據Kabat編號的位置71、72、73處包含胺基酸序列RDN之FR-H3片段

201726727

<400> 77

Arg Asp Asn
1

201726727

【發明摘要】

G07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G07H 21/04 (2006.01)

【中文發明名稱】

抗PD1抗體及使用方法

【英文發明名稱】

ANTI-PD1 ANTIBODIES AND METHODS OF USE

【中文】

本發明係關於抗PD1抗體及其使用方法。

【英文】

The present invention relates to anti-PD1 antibodies and methods of using the same.

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種結合至人類PD1之經分離抗體，其中該抗體結合至在Asn58處經糖基化之SEQ ID NO:70之經糖基化人類PD1之Asn58處的(核心)糖鏈。

【第2項】

如請求項1之抗體，其中該抗體另外結合至人類PD1之位置60至64、68、78至84、126至134之一或多個胺基酸。

【第3項】

如請求項1或2之抗體，其中該抗體藉由其重鏈結合至Asn58處之該糖鏈。

【第4項】

如請求項2之抗體，其中該抗體結合至人類PD1之位置61、62、64、83、126、128、132、134之一或多個胺基酸。

【第5項】

如請求項2之抗體，其中該抗體結合至人類PD1之位置61、62、64、83、126、128、132、134之胺基酸。

【第6項】

如請求項2之抗體，其中該抗體結合至人類PD1之位置60、61、62、63、64、68、78、82、83、84、126、127、128、130、131、132、133、134之胺基酸。

【第7項】

如請求項1或2之抗體，其中該抗體結合至人類PD1，其中該抗體結合至在Asn58處經糖基化之SEQ ID NO:70之經糖基化人類PD1之Asn58處

之該(核心)糖鏈內的第一及第二G1Nac、FUC、BMA及MAN。

【第8項】

如請求項1或2之抗體，其中相較於與在Asn58處經糖基化之人類PD1之結合，該抗體與在Asn58處未經糖基化之SEQ ID NO:70之人類PD1展現降低的結合性。

【第9項】

一種結合至人類PD1之經分離抗體，其中該抗體包含

(a)包含SEQ ID NO:71之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:72之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:73之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:74之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:75之胺基酸序列的HVR-L2；(f)包含SEQ ID NO:76之胺基酸序列的HVR-L3；及(g)在根據Kabat編號的位置71、72及73處包含(RDN之)SEQ ID NO:77之胺基酸序列的FR-H3。

【第10項】

如請求項9之結合至人類PD1之經分離抗體，其中該抗體

A)

- i) 包含SEQ ID NO:7之VH序列及SEQ ID NO:8之VL序列；
- ii) 或i)項抗體的VH及VL之人類化變異體；

或B)

- i) 包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:58之VL序列；
- ii) 包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:59之VL序列；
- iii) 包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:60之VL序列；
- iv) 包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:61之VL序列。

【第11項】

一種結合至人類PD1之經分離抗體，其中該抗體包含

A) (a)包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列的HVR-L3；或

B) (a)包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:10之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:11之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:13之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列的HVR-L3；或

C) (a)包含SEQ ID NO:17之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:18之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:20之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列的HVR-L3；或

D) (a)包含SEQ ID NO:25之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:26之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:27之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:28之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:29之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:30之胺基酸序列的HVR-L3；或

E) (a)包含SEQ ID NO:33之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ

ID NO:34之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:35之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:36之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列的HVR-L3；或

F) (a)包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:43之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:44之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:45之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:46之胺基酸序列的HVR-L3；或

G) (a)包含SEQ ID NO:49之胺基酸序列的HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:50之胺基酸序列的HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:51之胺基酸序列的HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:52之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:53之胺基酸序列的HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:54之胺基酸序列的HVR-L3。

【第12項】

一種結合至人類PD1之經分離抗體，其中該抗體包含

A) (a) VH域，其包含(i)包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:3之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含(i)包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列的HVR-L2及(iii)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列的HVR-L3；或

B) (a) VH域，其包含(i)包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:10之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ

ID NO:11之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含(i)包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:13之胺基酸序列的HVR-L2及(iii)包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列的HVR-L3；或

C) (a) VH域，其包含(i)包含SEQ ID NO:17之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:18之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:19之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含(i)包含SEQ ID NO:20之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的HVR-L2及(iii)包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列的HVR-L3；或

D) (a) VH域，其包含(i)包含SEQ ID NO:25之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:26之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:27之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含(i)包含SEQ ID NO:28之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:29之該胺基酸序列的HVR-L2及(iii)包含SEQ ID NO:30之該胺基酸序列的HVR-L3；或

E) (a) VH域，其包含(i)包含SEQ ID NO:33之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:34之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:35之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含(i)包含SEQ ID NO:36之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的HVR-L2及(iii)包含SEQ ID NO:38之該胺基酸序列的HVR-L3；或

F) (a) VH域，其包含(i)包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:43之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含(i)包含SEQ ID NO:44之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:45之胺基酸序列的HVR-L2及(iii)包含SEQ ID NO:46之胺基酸序列的HVR-L3；或

G) (a) VH域，其包含(i)包含SEQ ID NO:49之胺基酸序列的HVR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:50之胺基酸序列的HVR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO:51之胺基酸序列的HVR-H3；及(b) VL域，其包含(i)包含SEQ ID NO:52之胺基酸序列的HVR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:53之胺基酸序列的HVR-L2及(iii)包含SEQ ID NO:54之胺基酸序列的HVR-L3。

【第13項】

一種結合至人類PD1之經分離抗體，其中該抗體

A)

i) 包含SEQ ID NO:7之VH序列及SEQ ID NO:8之VL序列；

ii) 或 i)項抗體的VH及VL之人類化變異體；

或B)

i) 包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:58之VL序列；

ii) 包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:59之VL序列；

iii) 包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:60之VL序列；

iv) 包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:61之VL序列；

或C)

i) 包含SEQ ID NO:15之VH序列及SEQ ID NO:16之VL序列；

ii) 或i)項抗體的VH及VL之人類化變異體；

或D)

i) 包含SEQ ID NO:23之VH序列及SEQ ID NO:24之VL序列；

ii) 或i)項抗體的VH及VL之人類化變異體；

或E)

i) 包含SEQ ID NO:31之VH序列及SEQ ID NO:32之VL序列；

ii) 或i)項抗體的VH及VL之人類化變異體；

或F)

i) 包含SEQ ID NO:39之VH序列及SEQ ID NO:40之VL序列；

ii) 或i)項抗體的VH及VL之人類化變異體；

或G)

i) 包含SEQ ID NO:47之VH序列及SEQ ID NO:48之VL序列；

ii) 或i)項抗體的VH及VL之人類化變異體；

或H)

i) 包含SEQ ID NO:55之VH序列及SEQ ID NO:56之VL序列；

ii) 或i)項抗體的VH及VL之人類化變異體。

【第14項】

一種結合至人類PD1之經分離抗體，其中該抗體

i) 包含SEQ ID NO:7之VH序列及SEQ ID NO:8之VL序列；

ii) 或i)項抗體的VH及VL之人類化變異體。

【第15項】

一種結合至人類PD1之經分離抗體，其中該抗體包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:58之VL序列。

【第16項】

一種結合至人類PD1之經分離抗體，其中該抗體包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:59之VL序列。

【第17項】

一種結合至人類PD1之經分離抗體，其中該抗體包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:60之VL序列。

【第18項】

一種結合至人類PD1之經分離抗體，其中該抗體包含SEQ ID NO:57之VH序列及SEQ ID NO:61之VL序列。

【第19項】

如請求項1、2及9至18中任一項之抗PD1抗體，

其中該抗體係分別獨立由以下一或多項特性表徵：該抗PD-1抗體

i) 與包含具有SEQ ID NO:7之胺基酸序列的VH及具有SEQ ID NO:8之胺基酸序列的VL之抗PD-1抗體競爭結合至PD-1；及/或

ii) 結合至人類及獼猴PD-1；及/或

iii) 在10 $\mu\text{g/ml}$ 之抗體濃度下藉由同種異體刺激之T細胞使干擾素- γ (IFN- γ)分泌提高85%或更多；及/或

iv) 在10 $\mu\text{g/ml}$ 之抗體濃度下藉由同種異體刺激之T細胞使腫瘤壞死因子 α (TNF α)分泌提高200%或更多。

【第20項】

一種結合至PD1之經分離抗體，其中在混合淋巴細胞反應(MLR)分析中，該抗體在10 $\mu\text{g/ml}$ 之抗體濃度下藉由同種異體刺激之T細胞使腫瘤壞死因子 α (TNF α)分泌提高200%或更多。

【第21項】

一種結合至PD1之經分離抗體，其中在混合淋巴細胞反應(MLR)分析中，該抗體在10 $\mu\text{g/ml}$ 之抗體濃度下藉由同種異體刺激之T細胞使干擾素- γ (IFN- γ)分泌提高85%或更多。

【第22項】

一種結合至人類PD-1之經分離抗體，其中該抗體：

- i) 與包含具有SEQ ID NO:7之胺基酸序列的VH及具有SEQ ID NO:8之胺基酸序列的VL之抗PD1抗體競爭結合至PD-1；及/或
- ii) 結合至人類及獼猴PD-1；及
- iii) 在10 $\mu\text{g/ml}$ 之抗體濃度下藉由同種異體刺激之T細胞使干擾素- γ (IFN- γ)分泌提高85%或更多；及
- iv) 在10 $\mu\text{g/ml}$ 之抗體濃度下藉由同種異體刺激之T細胞使腫瘤壞死因子 α (TNF α)分泌提高200%或更多。

【第23項】

如請求項1、2、9至18及20至22中任一項之抗體，其為具有突變L234A、L235A及P329G (根據Kabat之EU索引編號)之全長IgG1抗體。

【第24項】

一種經分離核酸，其編碼如請求項1至23中任一項之抗體。

【第25項】

一種宿主細胞，其包含如請求項24之核酸。

【第26項】

一種產生抗體之方法，其包含培養如請求項25之宿主細胞，使得產生該抗體。

【第27項】

如請求項26之方法，其進一步包含自該宿主細胞回收該抗體。

【第28項】

一種醫藥調配物，其包含如請求項1至22中任一項之抗體及醫藥學上可接受之載劑。

【第29項】

如請求項1、2、9至18及20至22中任一項之抗體，其用作藥物。

【第30項】

如請求項1、2、9至18及20至22中任一項之抗體，其用於治療癌症。

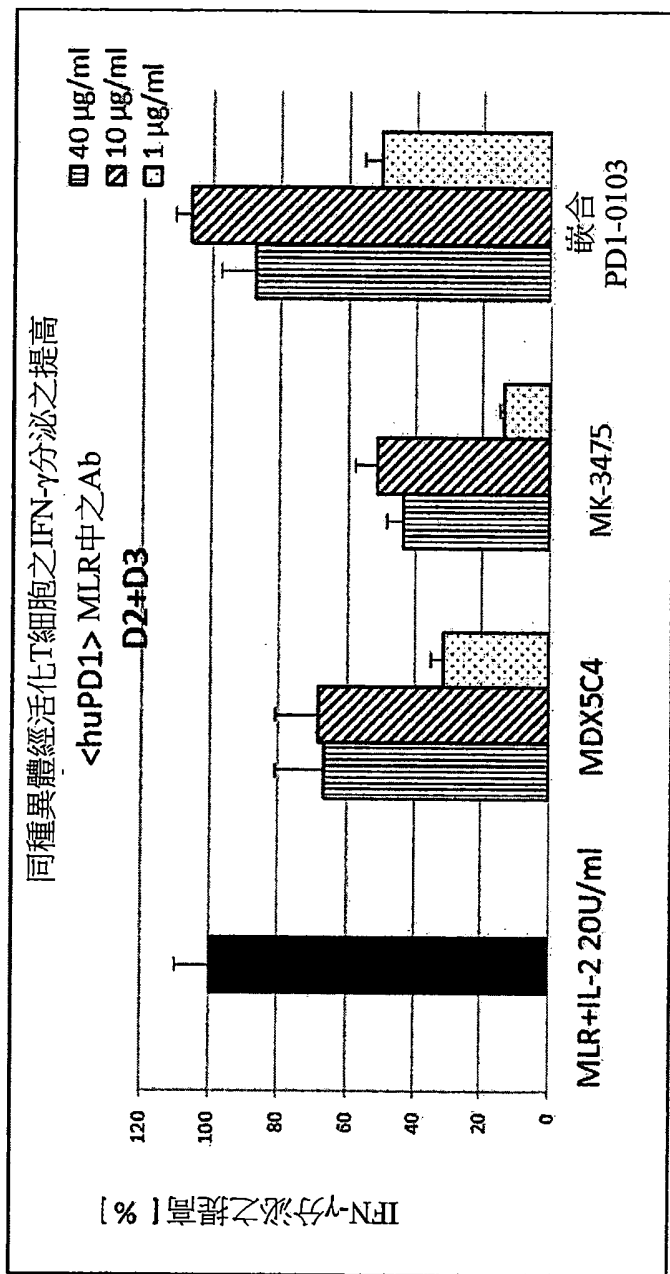
【第31項】

一種如請求項1、2、9至18及20至22中任一項之抗體之用途，其係用於製造藥物。

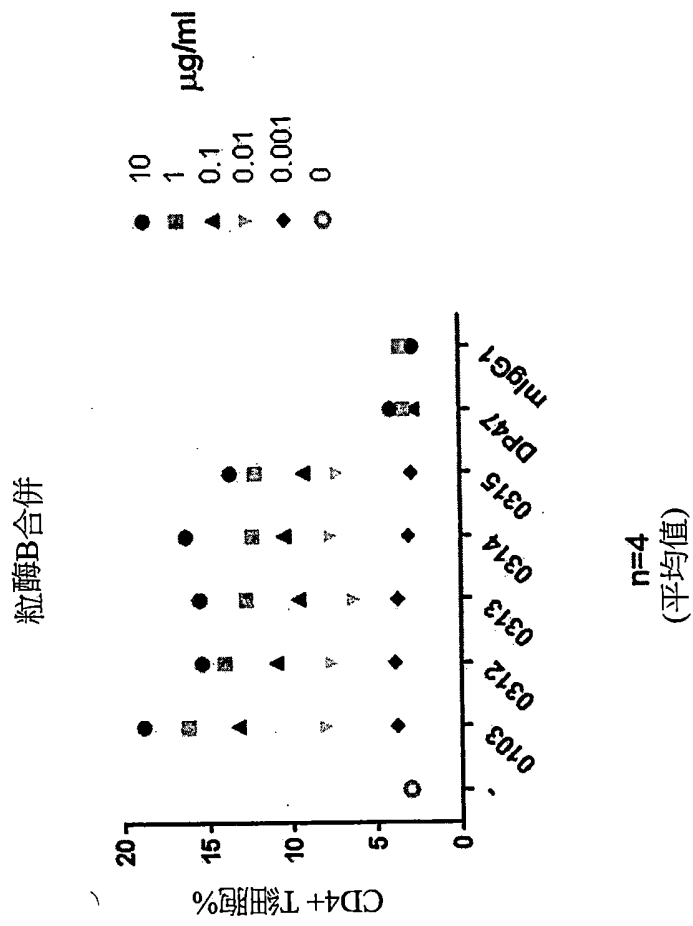
【第32項】

如請求項31之用途，其中該藥物用於治療癌症。

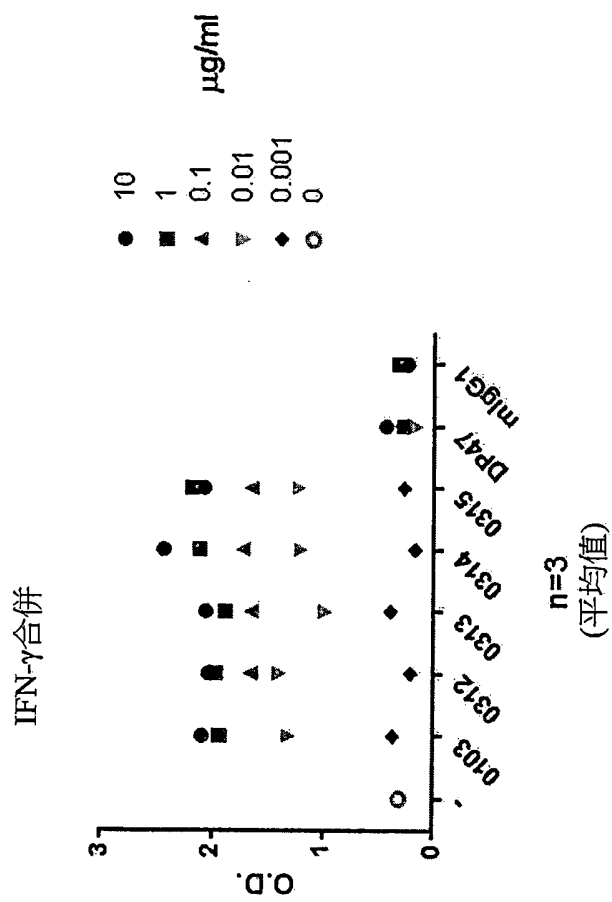
【發明圖式】



【圖1】



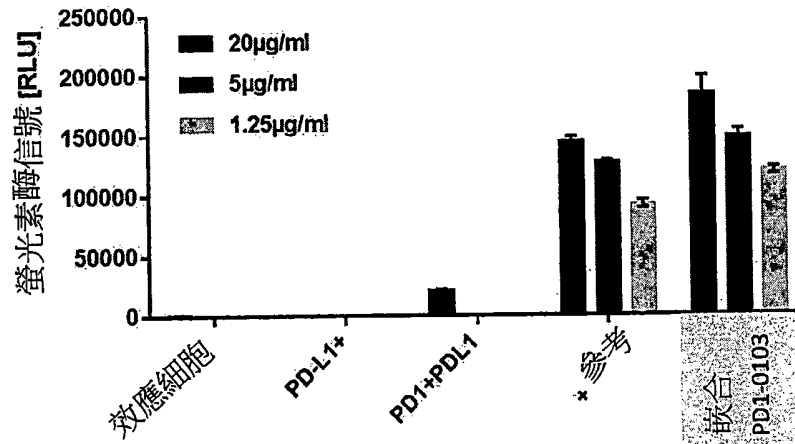
【圖4A】



【圖4B】

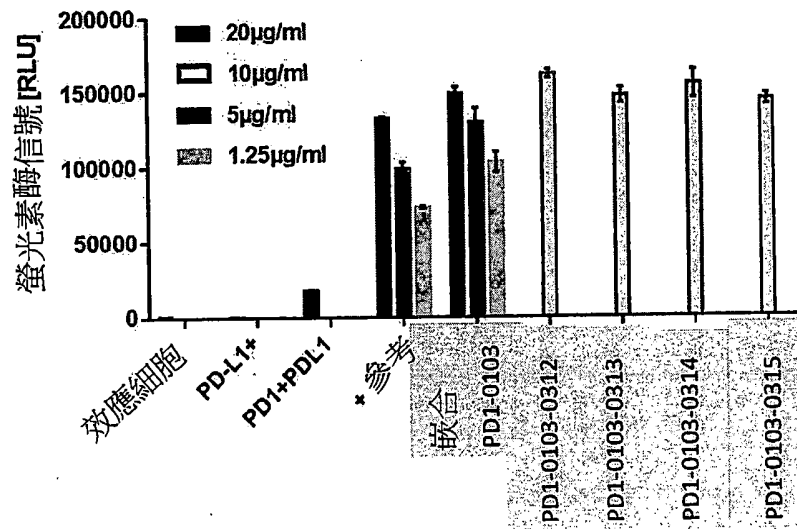
5A

(1) PD1/PD-L1阻斷對經抑制之TCR信號傳導之再活化的影響

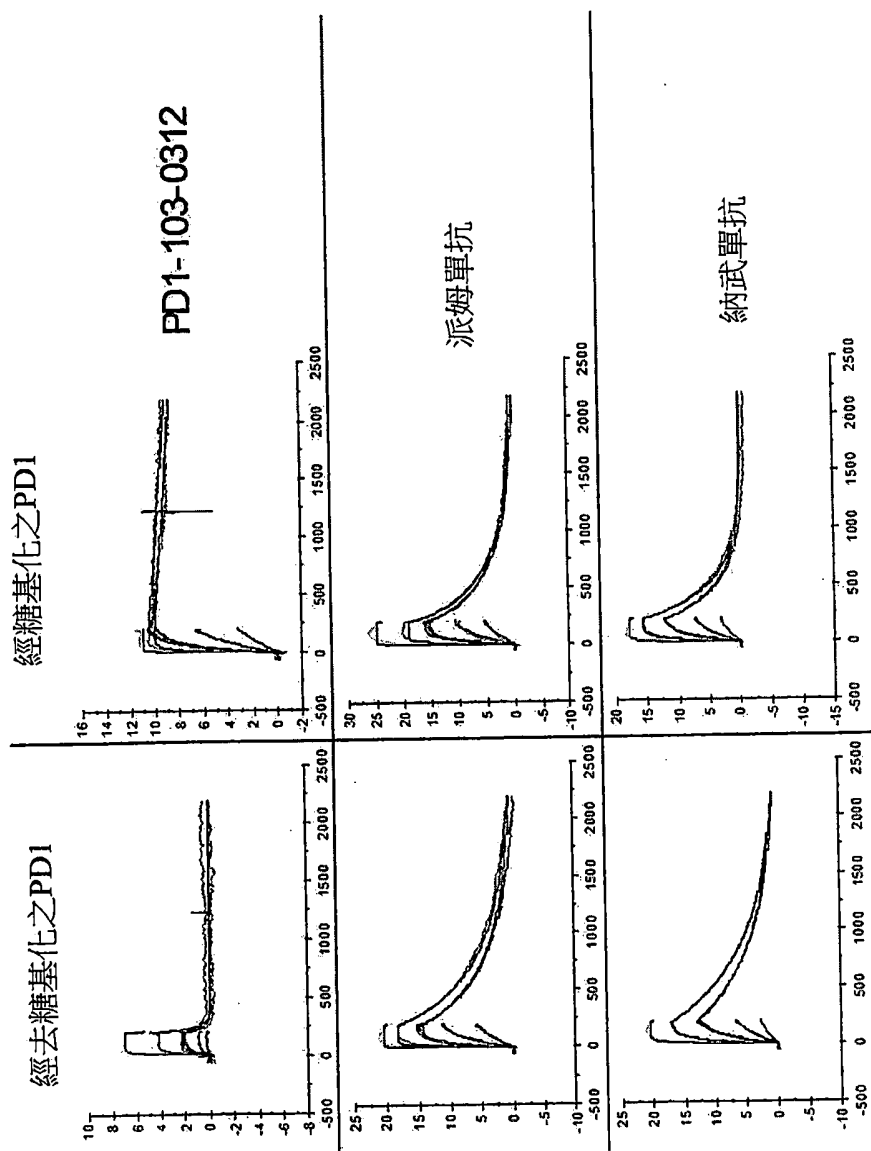


5B

(2) PD1/PD-L1阻斷對經抑制之TCR信號傳導之再活化的影響

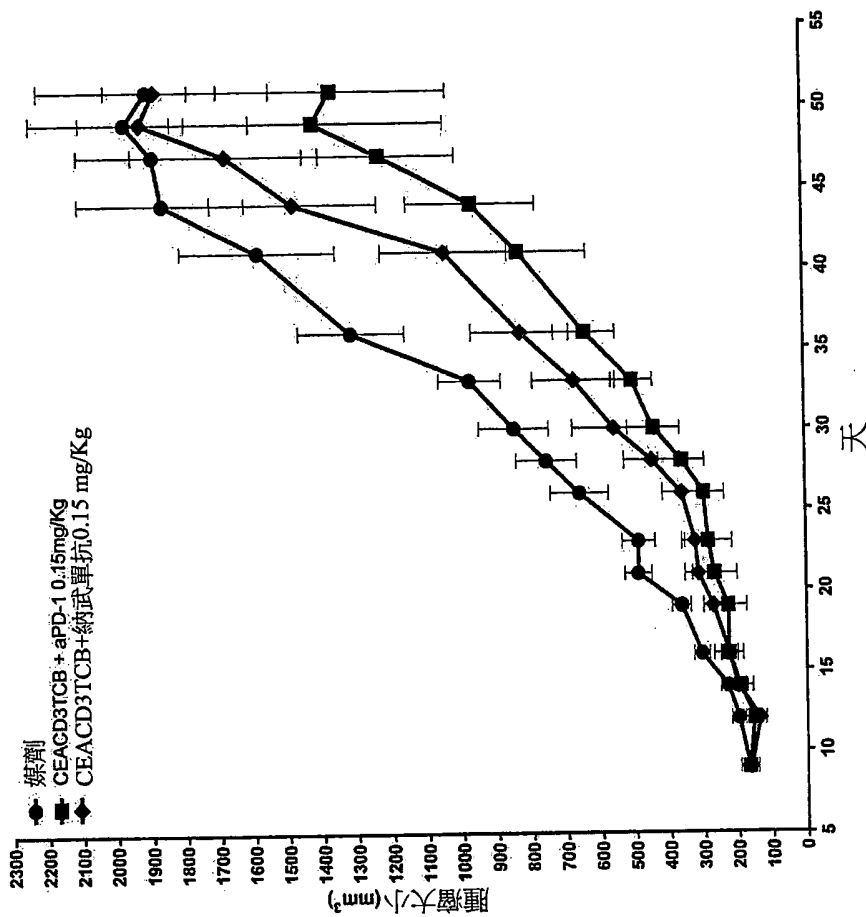


【圖5A及圖5B】



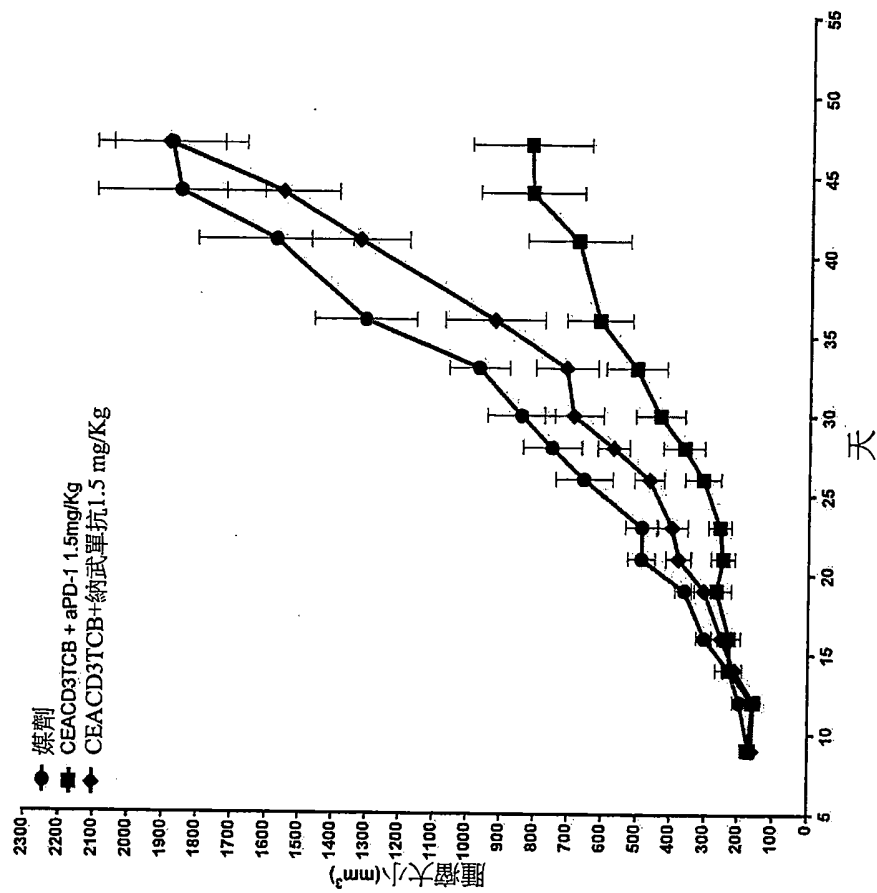
【圖13A】

腫瘤生長低劑量



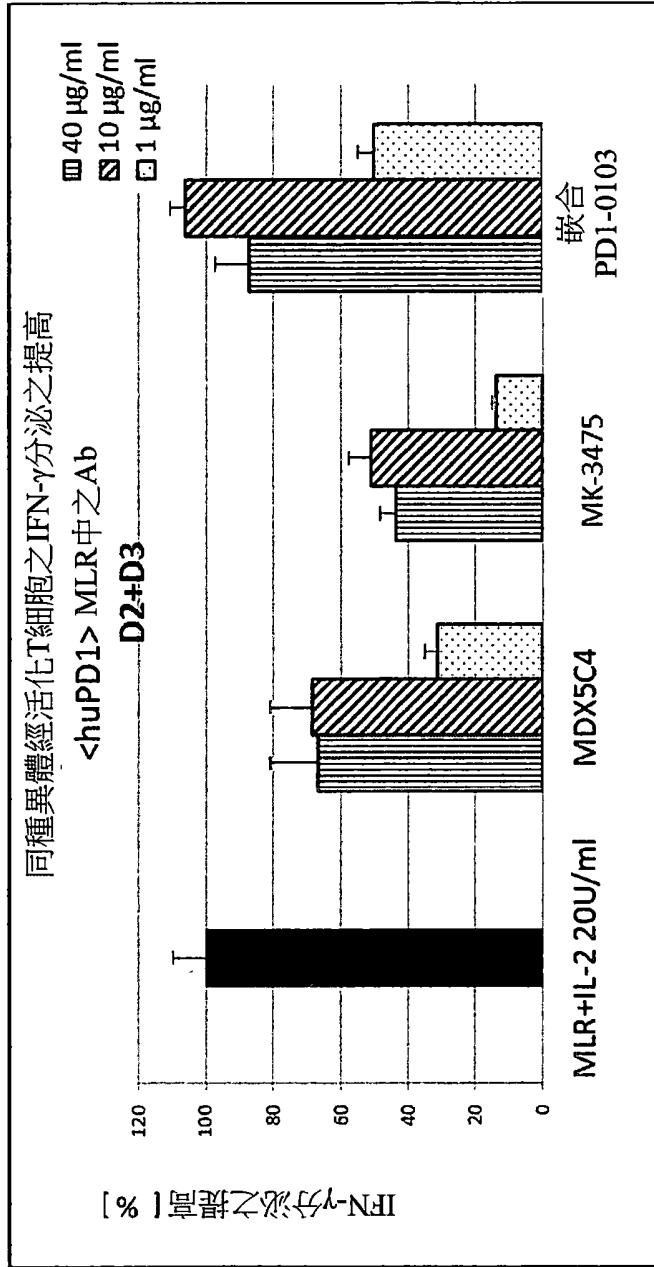
【圖14A】

腫瘤生長高劑量

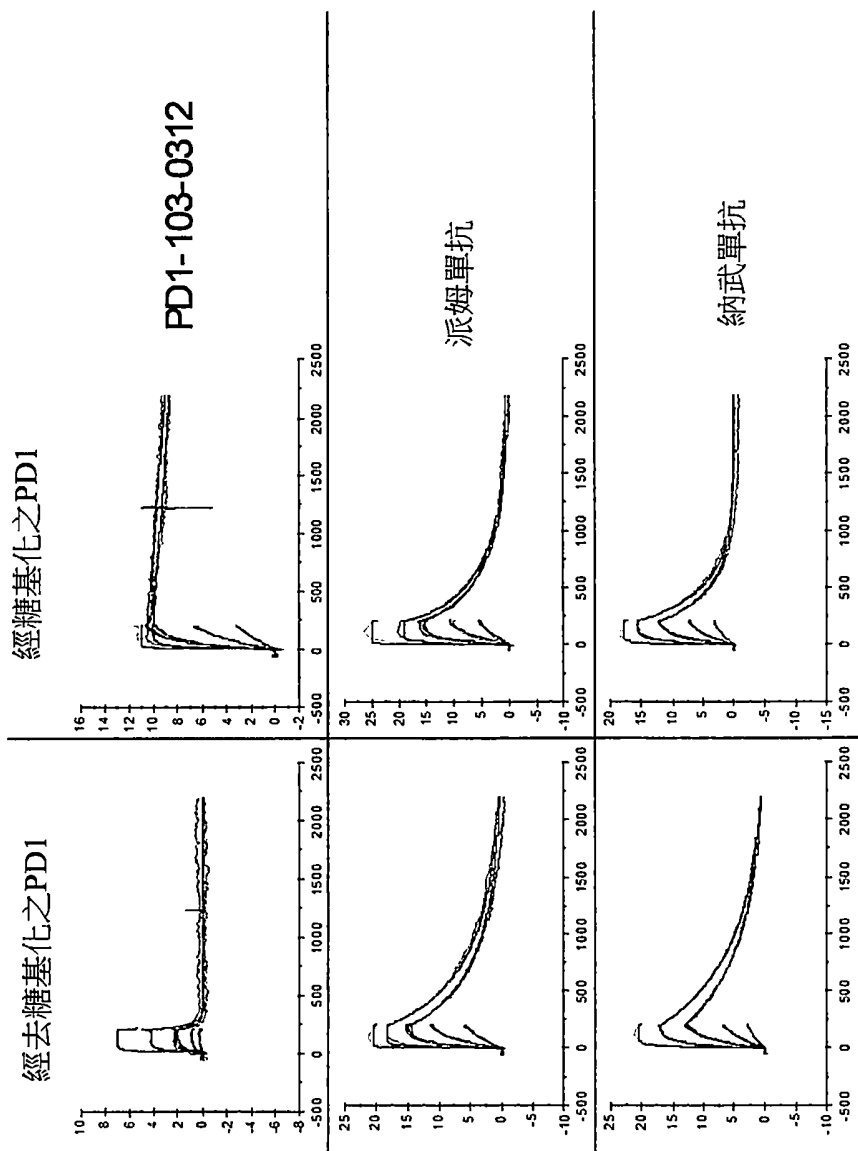


【圖14B】

【發明圖式】

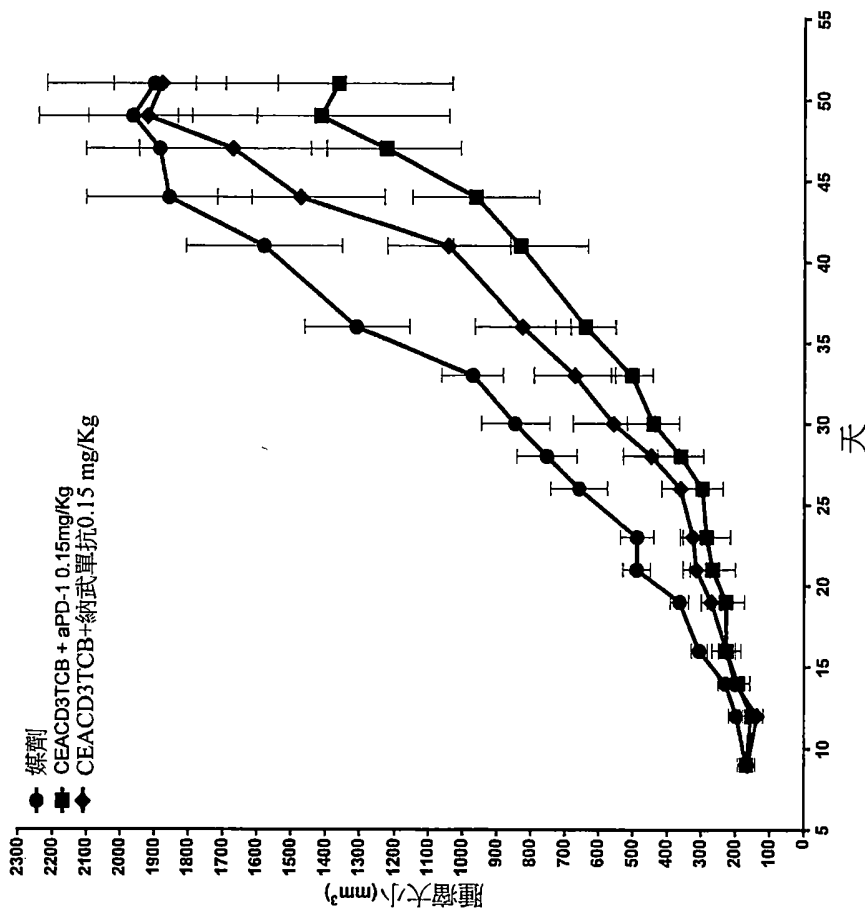


【圖1】



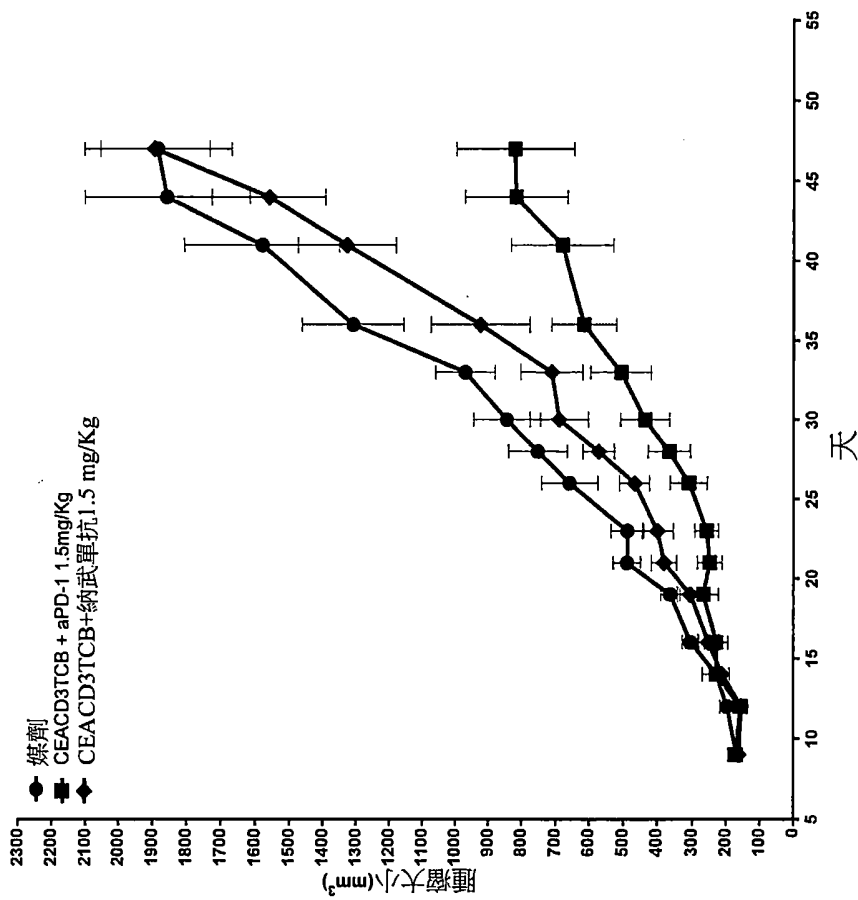
【圖13A】

腫瘤生長低劑量



【圖14A】

腫瘤生長高劑量



【圖14B】