



(12) SØKNAD

(19) NO

(21) 20170138

(13) A1

NORGE

(51) Int Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20170138	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2006.05.02 PCT/JP2006/309606
(22)	Inng.dag	2017.01.30	(85)	Videreføringsdag	2017.01.30
(24)	Løpedag	2006.05.02	(30)	Prioritet	2005.05.09, US, 60/679,466 2005.11.21, US, 60/738,434 2005.12.08, US, 60/748,919
(41)	Alm.tilgj	2008.02.11			
(62)	Avdelt fra	20075697, med inndato 2007.11.07			
(71)	Innehaver	Ono Pharmaceutical Co Ltd, 1-5, Doshomachi 2-chome, Chuo-ku, JP-541-8526 OSAKA-SHI, OSAKA, Japan			
(72)	Oppfinner	E. R. Squibb & Sons L.L.C., Route 206 & Province Line Road, US-NJ08540 PRINCETON, USA Mohan Srinivasan, 21073 Red Fir Court, US-CA95014 CUPERTINO, USA Josephine M Cardarelli, 126 Leslie Drive, US-CA94070 SAN CARLOS, USA Haichun Huang, 4329 Crestwood Street, US-CA94538 FREMONT, USA Mark J Selby, 136 Galewood Circle, US-CA94131 SAN FRANCISCO, USA Bingliang Chen, 118 Lawrence Road, US-CA94502 ALAMEDA, USA Alan Korman, 301 El Cerrito Avenue, US-CA94611 PIEDMONT, USA			
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Humane monoklonale antistoffer mot programmert død 1 (PD-1) og fremgangsmåter for å behandle cancer ved anvendelse av anti-PD-1 antistoffer alene eller i kombinasjon med andre immunterapeutika			
(57)	Sammendrag				

Den foreliggende oppfinnelse vedrører isolerte monoklonale antistoffer, særlig humane monoklonale antistoffer, som spesifikt binder til PD-1 med høy affinitet. Nukleinsyremolekyler som koder for antistoffene ifølge oppfinnelsen, ekspresjonsvektorer, vertsceller og fremgangsmåter for å uttrykke antistoffene ifølge oppfinnelsen er også tilveiebragt. Immunokonjugater, bispesifikke molekyler og farmasøytiske sammensetninger som omfatter antistoffene ifølge oppfinnelsen er også tilveiebragt. Oppfinnelsen tilveiebringer også fremgangsmåter for å detektere PD-1, såvel som fremgangsmåter for å behandle forskjellige sykdommer som inkluderer cancer og infeksjonssykdommer, ved anvendelse av anti-PD-1 antistoffer. Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer videre fremgangsmåter for å anvende en kombinasjonsterapi, slik som kombinasjon av anti-CTLA-4 og anti-PD-1 antistoffer, for å behandle hyperproliferativ sykdom, slik som cancer. Oppfinnelsen tilveiebringer også fremgangsmåter for å endre negative hendelser relatert til behandling med slike antistoffer individuelt.

**HUMANE MONOKLONALE ANTISTOFFER MOT PROGRAMMERT DØD 1 (PD-1)
OG FREMGANGSMÅTER FOR Å BEHANDLE CANCER VED ANVENDELSE AV
ANTI-PD-1 ANTISTOFFER ALENE ELLER I KOMBINASJON MED ANDRE
IMMUNTERAPEUTIKA**

5

Teknisk område

Den foreliggende oppfinnelse vedrører generelt immunterapi i
behandlingen av human sykdom og reduksjon av negative
10 hendelser i denne forbindelse. Mere spesifikt vedrører den
foreliggende oppfinnelse anvendelse av anti-PD-1 antistoffer
og anvendelsen av kombinasjons-immunterapi som inkluderer
kombinasjonen av anti-CTLA-4 og anti-PD-1 antistoffer for å
behandle cancer og/eller for å nedsette skadeomfanget av
15 negative hendelser forbundet med behandling med slike anti-
stoffer individuelt.

Bakgrunn for oppfinnelsen

20 Proteinet programmert død 1 (PD-1) er et inhiberende medlem
av CD28 familien av reseptorer, som også inkluderer CD28,
CTLA-4, ICOS og BTLA. PD-1 uttrykkes på aktiverte B celler,
T-celler og myeloide celler (Agata et al., supra; Okazaki et
al. (2002) Curr. Opin. Immunol. 14: 391779-82; Bennett et al.
25 (2003) J Immunol 170:711-8). De initiale medlemmer av
familien, CD28 og ICOS, ble oppdaget ved funksjonelle
effekter på økning av T-celleproliferasjon etter tilsetning
av monoklonale antistoffer (Hutloff et al. (1999) Nature
397:263-266; Hansen et al. (1980) Immunogenics 10:247-260).
30 PD-1 ble oppdaget gjennom screening for differensial
ekspresjon i apoptotiske celler (Ishida et al. (1992) EMBO J
11:3887-95). De andre medlemmer av familien, CTLA-4 og BTLA
ble oppdaget gjennom screening for differensial ekspresjon i
henholdsvis cytotoxiske T lymfocytter og TH1 celler. CD28,
35 ICOS og CTLA-4 har alle en uparet cysteinrest som tillater
homodimerisering. I motsetning er PD-1 foreslått til å
eksistere som en monomer som mangler den uparede cystein-
resten som er karakteristisk i andre CD28 familiemedlemmer.

PD-1 genet er et 55 kDa type I transmembranprotein som er del av Ig gen superfamilien (Agata et al. (1996) *Int Immunol* 8:765-72). PD-1 inneholder et membran proksimalt "immunoreceptor tyrosine inhibitory motif" (ITIM) og et

5 membran distalt tyrosinbasert switch-motiv (ITSM) (Thomas, M.L. (1995) *J Exp Med* 181:1953-6; Vivier, E og Daeron, M (1997) *Immunol Today* 18:286-91). Skjønt strukturelt lignende til CTLA-4, mangler PD-1 MYPPPY motivet som er kritisk for B7-1 og B7-2 binding. To ligander for PD-1 er blitt identi-

10 fisert, PD-L1 og PD-L2, som er blitt vist til å nedregulere T-celleaktivering ved binding til PD-1 (Freeman et al. (2000) *J Exp Med* 192:1027-34; Latchman et al. (2001) *Nat Immunol* 2:261-8; Carter et al. (2002) *Eur J Immunol* 32:634-43). Både PD-L1 og PD-L2 er B7 homologer som binder til PD-1, men

15 binder ikke til andre CD28 familiemedlemmer. En ligand for PD-1, PD-L1, er rikelig i en rekke humane cancere (Dong et al. (2002) *Nat. Med.* 8:787-9). Interaksjonen mellom PD-1 og PD-L1 resulterer i en nedgang i tumorinfiltrerende lymfocytter, en nedgang i T-cellereseptormediert

20 proliferasjon og immunevasjon ved de cancerøse cellene (Dong et al. (2003) *J. Mol. Med.* 81:281-7; Blank et al. (2005) *Cancer Immunol. Immunother.* 54:307-314; Konishi et al. (2004) *Clin. Cancer Res.* 10:5094-100). Immunsuppresjon kan reverseres ved å inhibere den lokale interaksjon av PD-1 med

25 PD-L1, og effekten er additiv når interaksjonen av PD-1 med PD-L2 likeledes blokkeres (Iwai et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:12293-7; Brown et al. (2003) *J. Immunol.* 170:1257-66).

30 PD-1 er et inhiberende medlem av CD28 familien uttrykt på aktiverte B celler, T-celler og myeloide celler (Agata et al., supra; Okazaki et al. (2002) *Curr Opin Immunol* 14:391779-82; Bennett et al. (2003) *J Immunol* 170:711-8). Dyr med PD-1 mangel utvikler forskjellige autoimmune fenotyper

35 som inkluderer autoimmun kardiomyopati og et lupus-lignende syndrom med artritt og nefritt (Nishimura et al. (1999) *Immunity* 11:141-51; Nishimura et al. (2001) *Science* 291:319-22). I tillegg er PD-1 blitt funnet til å spille en rolle i autoimmun encefalomyelitt, systemisk lupus erythematosus,

- graft-versus-host sykdom (GVHD), type I diabetes, og revmatoid artritt (Salama et al. (2003) J Exp Med 198:71-78; Prokunina og Alarcon-Riquelme (2004) Hum Mol Genet 13:R143; Nielsen et al. (2004) Lupus 13:510). I en murin B celle
- 5 tumorlinje ble ITSM av PD-1 vist til å være vesentlig for å blokkere BCR-mediert Ca^{2+} -fluks og tyrosinfosforylering av nedstrøms effektormolekyler (Okazaki et al. (2001) PNAS 98:13866-71).
- 10 Følgelig er midler som gjenkjenner PD-1 og fremgangsmåter for å anvende slike midler ønskelig.

Oppsummering av oppfinnelsen

- 15 Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer isolerte monoklonale antistoffer, særlig humane monoklonale antistoffer, som binder til PD-1 og som utviser en rekke ønskelige egenskaper. Disse egenskaper inkluderer f.eks. høyaffinitetsbinding til humant PD-1, men mangler vesentlig kryss-reaktivitet med
- 20 enten humant CD28, CTLA-4 eller ICOS. Videre er antistoffer ifølge oppfinnelsen blitt vist til å modulere immunrespons. Følgelig vedrører andre aspekter av oppfinnelsen fremgangsmåter for å modulere immunresponser ved å anvende anti-PD-1 antistoffer. Spesielt tilveiebringer oppfinnelsen
- 25 en fremgangsmåte for å inhibere vekst av tumorceller *in vivo* ved anvendelse av anti-PD-1 antistoffer.

- I ett aspekt vedrører oppfinnelsen et isolert monoklonalt antistoff, eller en antigenbindende del derav, hvor anti-
- 30 stoffet utviser minst en av de etterfølgende egenskaper:
- (a) binder til humant PD-1 med en K_D på 1×10^{-7} M eller mindre;
 - (b) binder ikke vesentlig til humant CD28, CTLA-4 eller ICOS;
 - (c) øker T-celleproliferasjon i en "Mixed Lymphocyte
 - 35 Reaction" (MLR) analyse;
 - (d) øker interferon-gamma produksjon i en MLR analyse;
 - (e) øker IL-2 sekresjon i en MLR analyse;
 - (f) binder til humant PD-1 og cynomolgus ape PD-1;
 - (g) inhiberer binding av PD-L1 og/eller PD-L2 til PD-1;

- (h) stimulerer antigen-spesifikke hukommelsesresponser;
- (i) stimulerer antistoffresponser;
- (j) inhiberer tumorcellevekst *in vivo*.

- 5 Antistoffet er foretrukket et humant antistoff, skjønt i alternative utførelsesformer kan antistoffet f.eks. være et murint antistoff, et kimært antistoff eller humanisert antistoff.
- 10 I mere foretrukne utførelsesformer binder antistoffet til humant PD-1 med en K_D på 5×10^{-8} M eller mindre, binder til humant PD-1 med en K_D på 1×10^{-8} M eller mindre, binder til humant PD-1 med en K_D på 5×10^{-9} M eller mindre, eller binder til humant PD-1 med en K_D på mellom 1×10^{-8} M og 1×10^{-10} M.
- 15 I en annen utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen et isolert monoklonalt antistoff eller antigen-bindende del derav, hvor antistoffet kryss-konkurrerer for binding til PD-1 med et referanseantistoff omfattende:
- 20 (a) en human tung kjede variabel region som omfatter en aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6 og 7; og
- (b) et lett kjede variabel region omfattende en aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO:
- 25 8, 9, 10, 11, 12, 13 og 14.

I forskjellige utførelsesformer omfatter referanseantistoffet:

- (a) en tung kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 1; og
- 30 (b) en lett kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 8; eller referanseantistoffet omfatter:
- (a) en tung kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 2; og
- 35 (b) en lett kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 9; eller referanseantistoffet omfatter:

(a) en tung kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 3; og

b) en lett kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 10; eller referanseantistoffet

5 omfatter:

(a) en tung kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 4; og

(b) en lett kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 11; eller referanseantistoffet

10 omfatter:

(a) en tung kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 5; og

(b) en lett kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 12; eller referanseantistoffet

15 omfatter:

(a) en tung kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 6; og

(b) en lett kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 13; eller referanseantistoffet

20 omfatter:

(a) en tung kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensene SEQ ID NO: 7; og

(b) en lett kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 14.

25

I et annet aspekt vedrører oppfinnelsen et isolert monoklonalt antistoff eller en antigen-bindende del derav som omfatter et tung kjede variabel region som er produktet av eller avledet fra et humant V_H 3-33 gen, hvor antistoffet

30 spesifikt binder PD-1. Oppfinnelsen tilveiebringer videre et monoklonalt antistoff, eller en antigen-bindende del derav, som omfatter et tung kjede variabel region som er produktet av eller avledet fra et humant V_H 4-39 gen, hvor antistoffet spesifikt binder PD-1. Oppfinnelsen tilveiebringer videre et

35 isolert monoklonalt antistoff, eller en antigen-bindende del derav som omfatter et lett kjede variabel region som er produktet av eller avledet fra et humant V_K L6 gen, hvor antistoffet spesifikt binder PD-1. Oppfinnelsen tilveiebringer videre et isolert monoklonalt antistoff, eller en antigen-

bindende del derav som omfatter et lett kjede variabel region som er produktet av eller avledet fra et humant V_K L15 gen, hvor antistoffet spesifikt binder PD-1.

- 5 I en foretrukket utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen et isolert monoklonalt antistoff eller en antigen-bindende del derav som omfatter:
- (a) en tung kjede variabel region av et humant V_H 3-33 gen; og
 - 10 (b) en lett kjede variabel region av et humant V_K L6 gen; hvori antistoffet spesifikt binder til PD-1.

- I en annen foretrukket utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen et isolert monoklonalt antistoff eller en
- 15 antigen-bindende del derav som omfatter:
- (a) en tung kjede variabel region av et humant V_H 4-39 gen; og
 - (b) en lett kjede variabel region av et humant V_K L15 gen; hvori antistoffet spesifikt binder til PD-1.

- 20 I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et isolert monoklonalt antistoff eller antigen-bindende del derav som omfatter:
- et tung kjede variabel region som omfatter CDR1, CDR2 og CDR3
 - 25 sekvenser, og
 - et lett kjede variabel region som omfatter CDR1, CDR2 og CDR3 sekvenser, hvor
 - (a) tung kjede variabel region CDR3 sekvensen omfatter en aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO:
 - 30 29, 30, 31, 32, 33, 34 og 35, og konservative modifikasjoner derav;
 - (b) lett kjede variabel region CDR3 sekvensen omfatter en aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO:
 - 50, 51, 52, 53, 54, 55 og 56, og konservative modifikasjoner
 - 35 derav; og
 - (c) antistoffet binder spesifikt til humant PD-1.

Tung kjede variabel region CDR2 sekvensen omfatter foretrukket en aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av

- aminosyresekvenser av SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27 og 28, og konservative modifikasjoner derav, og lett kjede variabel region CDR2 sekvensen omfatter en aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av aminosyresekvens SEQ ID NO:
- 5 43, 44, 45, 46, 47, 48 og 49, og konservative modifikasjoner derav. Tung kjede variabel region CDR1 sekvensen omfatter foretrukket en aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av aminosyresekvenser SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18, 19, 20 og 21, og konservative modifikasjoner derav, og lett kjede
- 10 variabel region CDR1 sekvensen omfatter en aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av aminosyresekvenser SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41 og 42, og konservative modifikasjoner derav.
- 15 I et ytterligere aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et isolert monoklonalt antistoff, eller antigen-bindende del derav, som omfatter et tung kjede variabel region og et lett kjede variabel region, hvor:
- (a) tung kjede variabel regionen omfatter en aminosyresekvens
- 20 som er minst 80% homolog med en aminosyresekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6 og 7;
- (b) lett kjede variabel regionen omfatter en aminosyresekvens som er minst 80% homolog med en aminosyresekvens valgt fra gruppen bestående av SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13 og 14;
- 25 (c) antistoffet binder til humant PD-1 med en K_D på 1×10^{-7} M eller mindre; og
- (d) antistoffet binder ikke vesentlig til humant CD28, CTLA-4 eller ICOS.
- 30 I en foretrukket utførelsesform omfatter antistoffene i tillegg minst en av de etterfølgende egenskaper:
- (a) antistoffet øker T-celleproliferasjon i en MLR analyse;
- (b) antistoffet øker interferon-gammaproduksjon i en MLR analyse; eller
- 35 (c) antistoffet øker IL-2 sekresjon i en MLR analyse.

I tillegg eller alternativt kan antistoffet omfatte en eller flere av de andre trekk som er angitt ovenfor.

I foretrukne utførelsesformer tilveiebringer oppfinnelsen et isolert monoklonalt antistoff eller antigen-bindende del derav som omfatter;

- (a) et tung kjede variabel region CDR1 som omfatter en
5 aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO:
15, 16, 17, 18, 19, 20 og 21;
 - (b) et tung kjede variabel region CDR2 som omfatter en
aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO:
22, 23, 24, 25, 26, 27 og 28;
 - 10 (c) et tung kjede variabel region CDR3 som omfatter en
aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO:
29, 30, 31, 32, 33, 34 og 35;
 - (d) et lett kjede variabel region CDR1 som omfatter en
aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO:
15 36, 37, 38, 39, 40, 41 og 42;
 - (e) et lett kjede variabel region CDR2 som omfatter en
aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO:
43, 44, 45, 46, 47, 48 og 49; og
 - (f) et lett kjede variabel region CDR3 som omfatter en
20 aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO:
50, 51, 52, 53, 54, 55 og 56;
- hvor antistoffet spesifikt binder PD-1.

En foretrukket kombinasjon omfatter:

- 25 (a) et tung kjede variabel region CDR1 som omfatter SEQ ID
NO: 15;
- (b) et tung kjede variabel region CDR2 som omfatter SEQ ID
NO: 22;
- (c) et tung kjede variabel region CDR3 som omfatter SEQ ID
30 NO: 29;
- (d) et lett kjede variabel region CDR1 som omfatter SEQ ID
NO: 36;
- (e) et lett kjede variabel region CDR2 som omfatter SEQ ID
NO: 43; og
- 35 (f) et lett kjede variabel region CDR3 som omfatter SEQ ID
NO: 50.

En annen foretrukket kombinasjon omfatter:

(a) et tung kjede variabel region CDR1 som omfatter SEQ ID NO: 16;

(b) et tung kjede variabel region CDR2 som omfatter SEQ ID NO: 23;

5 (c) et tung kjede variabel region CDR3 som omfatter SEQ ID NO: 30;

(d) et lett kjede variabel region CDR1 som omfatter SEQ ID NO: 37;

(e) et lett kjede variabel region CDR2 som omfatter SEQ ID
10 NO: 44; og

(f) et lett kjede variabel region CDR3 som omfatter SEQ ID NO: 51.

En annen foretrukket kombinasjon omfatter:

15 (a) et tung kjede variabel region CDR1 som omfatter SEQ ID NO: 17;

(b) et tung kjede variabel region CDR2 som omfatter SEQ ID NO: 24;

(c) et tung kjede variabel region CDR3 som omfatter SEQ ID
20 NO: 31;

(d) et lett kjede variabel region CDR1 som omfatter SEQ ID NO: 38

(e) et lett kjede variabel region CDR2 som omfatter SEQ ID NO: 45; og

25 (f) et lett kjede variabel region CDR3 som omfatter SEQ ID NO: 52.

En annen foretrukket kombinasjon omfatter:

(a) et tung kjede variabel region CDR1 som omfatter SEQ ID
30 NO: 18;

(b) et tung kjede variabel region CDR2 som omfatter SEQ ID NO: 25;

(c) et tung kjede variabel region CDR3 som omfatter SEQ ID NO: 32;

35 (d) et lett kjede variabel region CDR1 som omfatter SEQ ID NO: 39;

(e) et lett kjede variabel region CDR2 som omfatter SEQ ID NO: 46; og

(f) et lett kjede variabel region CDR3 som omfatter SEQ ID NO: 53.

En annen foretrukket kombinasjon omfatter:

- 5 (a) et tung kjede variabel region CDR1 som omfatter SEQ ID NO: 19;
(b) et tung kjede variabel region CDR2 som omfatter SEQ ID NO: 26;
(c) et tung kjede variabel region CDR3 som omfatter SEQ ID
10 NO: 33;
(d) et lett kjede variabel region CDR1 som omfatter SEQ ID NO: 40;
(e) et lett kjede variabel region CDR2 som omfatter SEQ ID NO: 47; og
15 (f) et lett kjede variabel region CDR3 som omfatter SEQ ID NO: 54.

En annen foretrukket kombinasjon omfatter:

- (a) et tung kjede variabel region CDR1 som omfatter SEQ ID
20 NO: 20;
(b) et tung kjede variabel region CDR2 som omfatter SEQ ID NO: 27;
(c) et tung kjede variabel region CDR3 som omfatter SEQ ID NO: 34;
25 (d) et lett kjede variabel region CDR1 som omfatter SEQ ID NO: 41;
(e) et lett kjede variabel region CDR2 som omfatter SEQ ID NO: 48; og
(f) et lett kjede variabel region CDR3 som omfatter SEQ ID
30 NO: 55.

En annen foretrukket kombinasjon omfatter:

- (a) et tung kjede variabel region CDR1 som omfatter SEQ ID NO: 21;
35 (b) et tung kjede variabel region CDR2 som omfatter SEQ ID NO: 28;
(c) et tung kjede variabel region CDR3 som omfatter SEQ ID NO: 35;

(d) et lett kjede variabel region CDR1 som omfatter SEQ ID NO: 42;

(e) et lett kjede variabel region CDR2 som omfatter SEQ ID NO: 49; og

5 (f) et lett kjede variabel region CDR3 som omfatter SEQ ID NO: 56.

Andre foretrukne antistoffer ifølge oppfinnelsen eller
10 antigen-bindende deler derav omfatter:

(a) et tung kjede variabel region som omfatter en aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av gruppen SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6 og 7; og

(b) et lett kjede variabel region som omfatter en
15 aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av gruppen SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13 og 14;
hvor antistoffet spesifikt binder PD-1.

En foretrukket kombinasjon omfatter:

20 (a) en tung kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 1; og

(b) en lett kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 8.

25 En annen foretrukket kombinasjon omfatter:

(a) en tung kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 2; og

(b) en lett kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 9.

30

En annen foretrukket kombinasjon omfatter:

(a) en tung kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 3; og

(b) en lett kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 10.
35

En annen foretrukket kombinasjon omfatter:

(a) en tung kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 4; og

(b) et lett kjede variabel region som omfatter en aminosyresekvensen SEQ ID NO: 11.

En annen foretrukket kombinasjon omfatter:

- 5 (a) en lett kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 5; og
(b) en lett kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 12.

10 En annen foretrukket kombinasjon omfatter:

- (a) en lett kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 6; og
(b) en lett kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 13.

15

En annen foretrukket kombinasjon omfatter:

- (a) en lett kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 7; og
(b) en lett kjede variabel region som omfatter en aminosyresekvensen SEQ ID NO: 14.

20

Antistoffene ifølge oppfinnelsen kan f.eks. være full-lengde antistoffer, f.eks. av en IgG1 eller IgG4 isotype. Alternativt kan antistoffene være antistoff-fragmenter, slik som
25 Fab eller Fab'2 fragmenter, eller enkeltkjede antistoffer.

Oppfinnelsen tilveiebringer også et immunokonjugat som omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen, eller antigenbindende del derav, koblet til et terapeutisk middel, slik
30 som et cytotoxin eller en radioaktiv isotop. Oppfinnelsen tilveiebringer også et bispesifikt molekyl omfattende et antistoff, eller antigen-bindende del derav, ifølge oppfinnelsen, koblet til en andre funksjonell enhet med en forskjellig bindingsspesifisitet enn det nevnte antistoff,
35 eller antigen-bindende del derav.

Sammensetninger omfattende et antistoff, eller antigenbindende del derav, eller immunokonjugat eller spesifikt

molekyl ifølge oppfinnelsen, og en farmasøytisk akseptert bærer, er også tilveiebragt.

Nukleinsyremolekyler som koder for antistoffene, eller
5 antigen-bindende deler derav, ifølge oppfinnelsen er også
omfattet av oppfinnelsen, såvel som ekspresjonsvektorer
omfattende slik nukleinsyrer og vertsceller omfattende slike
ekspresjonsvektorer. Dessuten tilveiebringer oppfinnelsen en
transgen mus som omfatter humane immunoglobulin tung og lett
10 kjede transgener, hvor musene uttrykker et antistoff ifølge
oppfinnelsen, såvel som hybridomer fremstilt fra en slik mus,
hvor hybridomet produserer antistoffet ifølge oppfinnelsen.

I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangs-
15 måte for å modulere en immunrespons i et individ som omfatter
administrering til individet av antistoffet, eller antigen-
bindende del derav, ifølge oppfinnelsen slik at immunres-
ponsen i individet moduleres. Antistoffet ifølge oppfinnelsen
vil foretrukket forsterke, stimulere eller øke immun-
20 responsen i individet.

I et ytterligere aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en frem-
gangsmåte for å inhibere vekst av tumorceller i et individ
som omfatter at det til individet administreres en tera-
25 peutisk effektiv mengde av et anti-PD-1 antistoff, eller
antigen-bindende del derav. Antistoffene ifølge oppfinnelsen
er foretrukket for anvendelse i fremgangsmåten skjønt andre
anti-PD-1 antistoffer i stedet kan anvendes (eller i kombi-
nasjon med et anti-PD-1 antistoff ifølge oppfinnelsen). Et
30 kimært, humanisert eller fullstendig humant anti-PD-1 anti-
stoff kan f.eks. anvendes i fremgangsmåten for å inhibere
tumorvekst.

I et ytterligere aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en frem-
35 gangsmåte for å behandle en infeksjonssykdom i et individ som
omfatter at det til individet administreres en terapeutisk
effektiv mengde av et anti-PD-1 antistoff, eller antigen-
bindende del derav. Antistoffene ifølge oppfinnelsen er
foretrukket for anvendelse i fremgangsmåten skjønt andre

anti-PD-1 antistoffer kan anvendes i stedet (eller i kombinasjon med et anti-PD-1 antistoff ifølge oppfinnelsen). Et kimært, humanisert eller fullstendig humant anti-PD-1 antistoff kan f.eks. anvendes i fremgangsmåten for å behandle en
5 infeksjonssykdom.

Videre tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å forsterke en immunrespons mot et antigen i et individ som omfatter at det til individet administreres: (i) antigenet;
10 og (ii) et anti-PD-1 antistoff, eller antigen-bindende del derav, slik at en immunrespons mot antigenet i individet forsterkes. Antigenet kan f.eks. være et humant gen, et viralt antigen, et bakterielt antigen eller et antigen fra et patogen. Antigenet ifølge oppfinnelsen er foretrukket for
15 anvendelse i fremgangsmåten skjønt andre anti-PD-1 antistoffer kan anvendes i stedet (eller i kombinasjon med et anti-PD-1 antistoff ifølge oppfinnelsen). Et kimært, humanisert eller fullstendig humant anti-PD-1 antistoff kan f.eks. anvendes i fremgangsmåten for å forsterke en immunrespons mot
20 et antigen i et individ.

Oppfinnelsen tilveiebringer også fremgangsmåter for å fremstille "andre generasjon" anti-PD-1 antistoffer basert på sekvensene til anti-PD-1 antistoffene tilveiebragt heri.
25 Oppfinnelsen tilveiebringer f.eks. en fremgangsmåte for å fremstille et anti-PD-1 antistoff som omfatter:

(a) å tilveiebringe: (i) et tung kjede variabel region antistoffsekvens omfattende en CDR1 sekvens som er valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18, 19, 20 og
30 21, og/eller en CDR2 sekvens som er valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27 og 28; og/eller en CDR3 sekvens som er valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34 og 35; eller (ii) en lett kjede variabel region antistoffsekvens som omfatter en CDR1 sekvens
35 som består av gruppen SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41 og 42, og/eller en CDR2 sekvens som er valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO: 43, 44, 45, 46, 47, 48 og 49, og/eller en CDR3 sekvens som er valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO: 50, 51, 52, 53, 54, 55 og 56;

- (b) endre minst en aminosyrerest innen minst en variabel region antistoffsekvens hvor nevnte sekvens er valgt fra tung kjede variabel region antistoffsekvensen og lett kjede variabel region antistoffsekvensen for å danne minst en
- 5 endret antistoffsekvens: og
- (c) uttrykke den endrede antistoffsekvens som et protein.

Andre trekk og fordeler med den foreliggende oppfinnelse vil klart fremgå fra den etterfølgende detaljerte beskrivelse og

10 eksempler som ikke bør betraktes som begrensende. Innholdet i alle referanser, GenBank deponeringer, patenter og publiserte patentsøknader som angitt i denne søknad er uttrykt heri ved referanse.

15 **Kort beskrivelse av tegningene**

Figur 1A viser nukleotidsekvensen (SEQ ID NO: 57) og aminosyresekvensen (SEQ ID NO: 1) av tung kjede variabel regionen av det 17D8 humane monoklonale antistoffet. CDR1 (SEQ ID NO: 15), CDR2 (SEQ ID NO: 22) og CDR3 (SEQ ID NO: 29) regionene

20 er skissert og V, D og J kimlinje avstamningene er indikert.

Figur 1B viser nukleotidsekvensen (SEQ ID NO: 64) og aminosyresekvensene (SEQ ID NO: 8) av lett kjede variabel regionen av det 17D8 humane monoklonale antistoffet. CDR1 (SEQ ID NO: 36), CDR2 (SEQ ID NO: 43) og CDR3 (SEQ ID NO: 50) regionene

25 er skissert og V og J kimlinje avstamningene er indikert.

Figur 2A viser nukleotidsekvensen (SEQ ID NO: 58) og aminosyresekvensen (SEQ ID NO: 2) av tung kjede variabel regionen av det 2D3 humane monoklonale antistoffet. CDR1 (SEQ ID NO: 16), CDR2 (SEQ ID NO: 23) og CDR3 (SEQ ID NO: 30) regionene

30 er skissert og V og J kimlinje avstamningene er indikert.

Figur 2B viser nukleotidsekvensen (SEQ ID NO: 65) og aminosyresekvensen (SEQ ID NO: 9) av lett kjede variabel regionen av det 2D3 humane monoklonale antistoffet. CDR1 (SEQ ID NO: 37), CDR2 (SEQ ID NO: 44) og CDR3 (SEQ ID NO: 51) regionene

35 er skissert og V og J kimlinje avstamningene er indikert.

Figur 3A viser nukleotidsekvensen (SEQ ID NO: 59) og aminosyresekvensen (SEQ ID NO: 3) av tung kjede variabel regionen av det 4H1 humane monoklonale antistoffet. CDR1 (SEQ ID NO: 17), CDR2 (SEQ ID NO: 24) og CDR3 (SEQ ID NO: 31) regionene er skissert og V og J kimlinje avstamningene er indikert.

Figur 3B viser nukleotidsekvensen (SEQ ID NO: 66) og aminosyresekvensen (SEQ ID NO: 10) av lett kjede variabel regionen av det 4H1 humane monoklonale antistoffet. CDR1 (SEQ ID NO: 38), CDR2 (SEQ ID NO: 45) og CDR3 (SEQ ID NO: 52) regionene er skissert og V og J kimlinje avstamningene er indikert.

Figur 4A viser nukleotidsekvensen (SEQ ID NO: 60) og aminosyresekvensen (SEQ ID NO: 4) av tung kjede variabel regionen av det 5C4 humane monoklonale antistoffet. CDR1 (SEQ ID NO: 18), CDR2 (SEQ ID NO: 25) og CDR3 (SEQ ID NO: 32) regionene er skissert og V og J kimlinje avstamningene er indikert.

Figur 4B viser nukleotidsekvensen (SEQ ID NO: 67) og aminosyresekvensen (SEQ ID NO: 11) for lett kjede variabel regionen av det 5C4 humane monoklonale antistoffet. CDR1 (SEQ ID NO: 39), CDR2 (SEQ ID NO: 46) og CDR3 (SEQ ID NO: 53) regionene er skissert og V og J kimlinje avstamningene er indikert.

Figur 5A viser nukleotidsekvensen (SEQ ID NO: 61) og aminosyresekvensen (SEQ ID NO: 5) av tung kjede variabel regionen av det 4A11 humane monoklonale antistoffet. CDR1 (SEQ ID NO: 19), CDR2 (SEQ ID NO: 26) og CDR3 (SEQ ID NO: 33) regionene er skissert og V og J kimlinje avstamningene er indikert.

Figur 5B viser nukleotidsekvensen (SEQ ID NO: 68) og aminosyresekvensen (SEQ ID NO: 12) av lett kjede variabel regionen av det 4A11 humane monoklonale antistoffet. CDR1 (SEQ ID NO: 40), CDR2 (SEQ ID NO: 47) og CDR3 (SEQ ID NO: 54) regionene er skissert og V og J kimlinje avstamningene er indikert.

Figur 6A viser nukleotidsekvensen (SEQ ID NO: 62) og aminosyresekvensen (SEQ ID NO: 6) av tung kjede variabel regionen

av det 7D3 humane monoklonale antistoffet. CDR1 (SEQ ID NO: 20), CDR2 (SEQ ID NO: 27) og CDR3 (SEQ ID NO: 34) regionene er skissert og V og J kimlinje avstamningene er indikert.

5 Figur 6B viser nukleotidsekvensen (SEQ ID NO: 69) og aminosyresekvensen (SEQ ID NO: 13) av lett kjede variabel regionen av det 7D3 humane monoklonale antistoffet. CDR1 (SEQ ID NO: 41), CDR2 (SEQ ID NO: 48) og CDR3 (SEQ ID NO: 55) regionene er skissert og V og J kimlinje avstamningene er indikert.

10

Figur 7A viser nukleotidsekvensen (SEQ ID NO: 63) og aminosyresekvensen (SEQ ID NO: 7) av tung kjede variabel regionen av det 5F4 humane monoklonale antistoffet. CDR1 (SEQ ID NO: 21), CDR2 (SEQ ID NO: 28) og CDR3 (SEQ ID NO: 35) regionene
15 er skissert og V og J kimlinje avstamningene er indikert.

Figur 7B viser nukleotidsekvensen (SEQ ID NO: 70) og aminosyresekvensen (SEQ ID NO: 14) av lett kjede variabel regionen av det 5F4 humane monoklonale antistoffet. CDR1 (SEQ ID NO: 42), CDR2 (SEQ ID NO: 49) og CDR3 (SEQ ID NO: 56) regionene
20 er skissert og V og J kimlinje avstamningene er indikert.

Figur 8 viser oppstillingen av aminosyresekvensen av tung kjede variabel regionen av 17D8, 2D3, 4H1, 5C4 og 7D3 med den
25 humane kimlinje V_H 3-33 aminosyresekvensen (SEQ ID NO: 71).

Figur 9 viser oppstillingen av aminosyresekvensen av lett kjede variabel regionen av 17D8, 2D3 og 7D3 med den humane kimlinje V_k L6 aminosyresekvensen (SEQ ID NO: 73).

30

Figur 10 viser oppstillingen av aminosyresekvensen av lett kjede variabel regionen av 4H1 og 5C4 med den humane kimlinje V_k L6 aminosyresekvensen (SEQ ID NO: 73).

35 Figur 11 viser oppstillingen av aminosyresekvensen av tung kjede variabel regionen av 4A11 og 5F4 med den humane kimlinje V_H 4-39 aminosyresekvensen (SEQ ID NO: 72).

Figur 12 viser oppstillingen av aminosyresekvensen av lett kjede variabel regionen av 4A11 og 5F4 med den humane kimlinje V_k L15 aminosyresekvensen (SEQ ID NO: 74).

5 Figurer 13A-13B viser resultatene av flowcytometriforsøk som viser at de humane monoklonale antistoffene 5C4 og 4H1, rettet mot humant PD-1, binder celleoverflaten av CHO celler transfektert med full-lengde humant PD-1. Figur 13A viser flowcytometri-plottet for 5C4. Figur 13B viser flowcytome-
10 tri-plottet for 4H1. Den tynne linjen representerer bindingen til CHO celler og den tykke linjen representerer bindingen til CHO hPD-1 celler.

Figur 14 viser et diagram som viser at de humane monoklonale
15 antistoffer 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, og 4A11, rettet mot humant PD-1, binder spesifikt til PD-1, og ikke til andre medlemmer av CD28 familien.

Figurer 15A-15C viser resultatene av flowcytometriforsøk som
20 viser at de humane monoklonale antistoffene 4H1 og 5C4, rettet mot humant PD-1, binder til PD-1 på celleoverflaten. Figur 15A viser binding til aktiverte humane T-celler. Figur 15B viser bindingen til cynomolgus ape T-celler. Figur 15C viser bindingen til CHO transfekterte celler som uttrykker
25 PD-1.

Figurer 16A-16C viser resultatene fra forsøk som viser at humane monoklonale antistoffer mot humant PD-1 fremmer T-celleproliferasjon, IFN-gammasekresjon og IL-2 sekresjon i en
30 blandet lymfocytreaksjonsanalyse. Figur 16A er et stolpediagram som viser konsentrasjonsavhengig T-celleproliferasjon; Figur 16B er et stolpediagram som viser konsentrasjonsavhengig IFN-gamma sekresjon; Figur 16C er et stolpediagram som viser konsentrasjonsavhengig IL-2
35 sekresjon.

Figurer 17A-17B viser resultatene av flowcytometriforsøk som viser at humane monoklonale antistoffer mot humant PD-1 blokkerer bindingen av PD-L1 og PD-L2 til CHO transfekterte

celler som uttrykker PD-1. Figur 17A er en kurve som viser inhibering av PD-L1; Figur 17B er en kurve som viser inhibering av binding av PD-L2.

- 5 Figur 18 viser resultatene av flowcytometriforsøk som viser at humane monoklonale antistoffer mot humant PD-1 ikke fremmer T-celleapoptose.

Figur 19 viser resultatene fra forsøk som viser at anti-PD-
 10 HuMabs har en konsentrasjonsavhengig effekt på IFN-gamma-sekresjon ved PBMC'er fra CMV-positive donorer når PBMC'er ble stimulert med et CMV lysat og anti-PD-1.

Figur 20 viser resultatene av tumorvekstforsøk i et muse-
 15 modellsystem som viser at behandling *in vivo* av musetumorer med anti-PD-1 antistoffer inhiberer veksten av tumorer.

Figurer 21A til 21D viser tumorvolum over tid i individuelle mus som ble implantert med MC38 kolontumorceller (PD-L1⁺) og
 20 behandlet på den samme dag med en av de etterfølgende terapier: (A) mus IgG (kontroll), (B) anti-CTLA-4 antistoff, (C) anti-PD-1 antistoff, og (D) anti-CTLA-4 antistoff og anti-PD-1 antistoff. Musene mottok deretter antistoff-behandlinger på dager 3, 6 og 10 som beskrevet i eksempel 13
 25 og tumorvolum ble målt over 60 dager.

Figur 22 viser gjennomsnittlig tumorvolum hos musene vist i figur 21.

30 Figur 23 viser median tumorvolumet for musene vist i figur 21.

Figurer 24A til 24D viser tumorvolumet over tid i individuelle mus som ble implantert med MC38 kolontumorceller (PD-L1⁺)
 35) og en uke senere behandlet med en av de etterfølgende terapier: (A) mus IgG (kontroll), (B) anti-CTLA-4 antistoff, (C) anti-PD-1 antistoff og (D) anti-CTLA-4 antistoff og anti-PD-1 antistoff. Tumorvolumet på den første behandlingsdagen

var omtrent 315 mm³. Musene mottok deretter antistoffbehandling på dager 3, 6 og 10 som beskrevet i eksempel 14.

Figur 25 viser gjennomsnittlig tumorvolum for musene vist i figur 24.

Figur 26 viser median tumorvolumet for musene vist i figur 24.

Figur 27 viser gjennomsnittlig tumorvolum over tid i individuelle mus som ble implantert med MC38 kolon tumorceller (PD-L1⁻) (dag -7) og deretter behandlet på dager 0, 3, 6 og 10 etter implantasjon (som beskrevet i eksempel 15) med en av de etterfølgende terapier: (A) mus IgG som en kontroll (20 mg/kg, X₂₀) (B) anti-PD-1 antistoff (10 mg/kg) og mus IgG (10 mg/kg) (P₁₀X₁₀), (C) anti-CTLA-4 antistoff (10 mg/kg) og mus IgG (10 mg/kg) (C₁₀X₁₀), (D) anti-CTLA-4 antistoff og anti-PD-1 antistoff (10 mg/kg hver) (C₁₀P₁₀), (E) anti-CTLA-4 antistoff og anti-PD-1 antistoff (3 mg/kg hver) (C₃P₃), og (F) anti-CTLA-4 antistoff og anti-PD-1 antistoff (1 mg/kg hver) (C₁P₁). To grupper av mus ble behandlet med hvert antistoff påfølgende som følger: (G) anti-CTLA-4 antistoff (10 mg/kg, dag 0), anti-CTLA-4 antistoff (10 mg/kg, dag 3), anti-PD-1 antistoff (10 mg/kg, dag 6), og anti-PD-1 antistoff (10 mg/kg, dag 10) (C₁₀C₁₀P₁₀P₁₀); og (H) anti-PD-1 antistoff (10 mg/kg, dag 0), anti-PD-1 antistoff (10 mg/kg, dag 3), anti-CTLA-4 antistoff (10 mg/kg, dag 6), og anti-CTLA-4 antistoff (10 mg/kg, dag 10) (10 mg/kg, dag 10) (P₁₀P₁₀C₁₀C₁₀).

Figur 28 viser gjennomsnittlig tumorvolum for musene vist i figur 27.

Figur 29 viser median tumorvolumet for musene vist i figur 27.

35

Figurer 30A til 30F viser tumorvolumet over tid i individuelle mus som ble implantert med SA1/N fibrosarkomceller (PD-L1⁻) og som en dag senere ble behandlet med en av de etterfølgende terapier: (A) PBS (vehikkelkontroll), (B) mus IgG

(antistoffkontroll, 10 mg/kg), (C) anti-PD-1 antistoff (10 mg/kg), (D) anti-CTLA-4 antistoff (10 mg/kg), (E) anti-CTLA-4 antistoff (0,2 mg/kg), and (F) anti-PD-1 antistoff (10 mg/kg) og anti-CTLA-4 antistoff (0,2 mg/kg). Musene mottok

5 påfølgende antistoffbehandlinger på dager 4, 7 og 11 som beskrevet i eksempel 16 og tumorvolum ble målt over 41 dager.

Figur 32 viser gjennomsnittlig tumorvolum for musene vist i figur 29.

10

Figur 31 viser median tumorvolumet for musene vist i figur 29.

Figurer 33A til 33J viser tumorvolumet over tid i individuelle mus som ble implantert med SA1/N fibrosarkomceller (PD-L1⁻) og deretter behandlet på dager 7, 10, 13 og 17 etter implantasjon (som beskrevet i eksempel 17) med en av de etterfølgende terapier: (A) PBS (vehikkelkontroll), (B) mus IgG (antistoffkontroll, 10 mg/kg), (C) anti-CTLA-4 antistoff (0,25 mg/kg), (D) anti-CTLA-4 antistoff (0,5 mg/kg), (E) anti-CTLA-4 antistoff (5 mg/kg), (F) anti-PD-1 antistoff (3 mg/kg), (G) anti-PD-1 antistoff (10 mg/kg), (H) anti-PD-1 antistoff (10 mg/kg) og anti-CTLA-4 antistoff (0,25 mg/kg), (I) anti-PD-1 antistoff (10 mg/kg) og anti-CTLA-4 antistoff (0,5 mg/kg), og (J) anti-PD-1 antistoff (3 mg/kg) og anti-CTLA-4 antistoff (0,5 mg/kg). Tumorvolumet på den første dag av behandlingen var omtrent 110 mm³.

15

20

25

Figur 34 viser gjennomsnittlig tumorvolum for musene vist i figur 33.

30

Figur 35 viser median tumorvolumet for musene vist i figur 33.

Figurer 36A og 36B viser tumorvolumet over tid i indivuelle mus som ble implantert med SA1/N fibrosarkomceller (PD-L1⁻) og deretter behandlet på dager 10, 13, 16 og 19 etter implantasjon (som beskrevet i eksempel 17) med en av de etterfølgende terapier: (A) mus IgG (antistoffkontroll, 10

35

mg/kg) eller (B) anti-PD-1 antistoff (10 mg/kg) og anti-CTLA-4 antistoff (1 mg/kg). Tumorvolumet på den første dag av behandlingen var omtrent 250 mm³.

- 5 Figur 37 viser gjennomsnittlig tumorvolum for musene vist i figur 36.

Figur 38 viser median tumorvolumet for musene vist i figur 36.

10

Figur 39 viser gjennomsnittlig og median prosent tumor-inhibering beregnet fra tumorvolumene vist i figurer 33 og 36.

- 15 Figurer 40A til 40D viser tumorvolumet i BALB/c mus som var implantert subkutan med RENCA renale adenokarsinomceller (PD-L1⁺) (Murphy and Hrushesky (1973) J. Nat'l. Cancer Res. 50:1013-1025) (dag -12) og deretter behandlet intraperitonealt på dager 0, 3, 6 og 9 etter implantasjon med en av de
20 etterfølgende terapier: (A) mus IgG (antistofkontroll, 20 mg/kg), (B) anti-PD-1 antistoff (10 mg/kg), (C) anti-CTLA-4 antistoff (10 mg/kg), og (D) anti-PD-1 antistoff (10 mg/kg) i kombinasjon med anti-CTLA-4 antistoff (10 mg/kg).
Tumorvolumet på den første dag av behandlingen var omtrent
25 115 mm³.

- Figur 41 viser at binding av mus PD-L2-Fc fusjonsprotein til mus PD-1 (mPD-1) er blokkert ved anti-mPD-1 antistoff 4H2 på en doseavhengig måte. Bindingen detekteres ved å måle
30 fluorescens av FITC-merket esel-anti-rotte IgG ved ELISA. Desto større MFI (gjennomsnittlig fluorescensintensitet), desto større binding.

- Figur 42 viser bindingskurver av anti-mPD-1 antistoffer til
35 immobilisert mPD-1-Fc fusjonsprotein ved ELISA.

Figur 43 viser bindingskurven for rotte anti-mPD-1 antistoff 4H2.B3 til mPD-1-uttrykkende CHO celler. Binding ble

detektert med esel-anti-rotte IgG, FITC konjugert og målt ved FACS (MFI).

Figur 44 viser bindingskurven for mPD-L1-hFc fusjonsprotein til mPD-1-uttrykkende CHO celler i nærvær av økende konsentrasjon av anti-mPD-1 antistoff 4H2.B3. Binding ble detektert med geit-anti-human IgG, FITC konjugert og målt ved FACS (MFI).

Figur 45 viser bindingskurver for rotte anti-mPD-1 antistoff 4H2.B3 til mPD-1-uttrykkende CHO celler sammenlignet med kimært rotte:mus anti-mPD-1 antistoff 4H2.

Figur 46 viser bindingskurvene for mPD-L1-hFc fusjonsprotein til mPD-1-uttrykkende CHO celler i nærvær av økende konsentrasjon av enten rotte anti-mPD-1 antistoff 4H2.B3 eller kimært rotte:mus anti-mPD-1 antistoff 4H2.

Figur 47 viser gjennomsnittlig tumorvolum av tumorfrie mus som på forhånd er behandlet med anti-PD1 antistoff og re-eksponert med SA1/N fibrosarkomceller (PD-L1⁻). Også vist er gjennomsnittlig tumorvolum av "naïve" mus (kontroll, ikke tidligere eksponert eller behandlet) implantert med SA1/N fibrosarkomceller.

Figur 48 viser tumorvolumet over tid i individuelle mus som overlevde tumorfrie etter implantasjon av MC38 kolontumorer (PD-L1⁻) og behandling med anti-PD1 antistoff eller en kombinasjon av anti-PD1 antistoff med anti-CTLA-4 antistoff, re-eksponert med 10x mere MC38 kolontumorer enn den initiale behandling. Også vist er det gjennomsnittlige tumorvolum for "naïve" mus (kontroll, ikke tidligere eksponert eller behandlet) implantert med MC38 kolontumorer

Figur 49 viser gjennomsnittlig tumorvolum for musene vist i figur 48.

Figur 50 viser gjennomsnittlig tumorvolum over tid i individuelle mus som ble implantert med CT26 kolontumorer.

Figurer 51A-B viser resultatene fra forsøk som viser at humane monoklonale antistoffer mot humant PD-1 fremmer T-celleproliferasjon og IFN-gammasekresjon i kulturer inne-

5 holdende T regulerende celler. Figur 50A er et stolpediagram som viser konsentrasjonsavhengig T-celleproliferasjon ved å anvende HuMAb 5C4; Figur 50B er et stolpediagram som viser konsentrasjonsavhengig IFN-gammasekresjon ved anvendelse av HuMAb 5C4.

10

Figurer 52A-B viser resultatene fra forsøk som viser at humane monoklonale antistoffer mot humant PD-1 fremmer T-celleproliferasjon og IFN-gammasekresjon i kulturer inne-

15 holdende aktiverte T-celler. Figur 51A er et stolpediagram som viser konsentrasjonsavhengig T-celleproliferasjon ved å anvende HuMAb 5C4; Figur 51B er et stolpediagram som viser konsentrasjonsavhengig IFN-gammasekresjon ved anvendelse av HuMAb 5C4.

20

Figur 53 viser resultatene av en antistoffavhengig cellulær cytotoxissitet (ADCC) analyse som viser at humane monoklonale anti-PD-1 antistoffer dreper humane aktiverte T-celler på en ADCC konsentrasjonsavhengig måte i forhold til Fc regionen av

25 anti-PD-1 antistoffet.

Figur 54 viser resultatene fra en komplementavhengig cytotoxissitet (CDC) analyse som viser at humane monoklonale anti-PD-1 antistoffer ikke dreper humane aktiverte T-celler på en

30 CDC konsentrasjonsavhengig måte.

Særlig utførelse av den foreliggende oppfinnelse

I ett aspekt vedrører den foreliggende oppfinnelse isolerte

35 monoklonale antistoffer, særlig humane monoklonale antistoffer, som binder spesifikt til PD-1. I visse utførelsesformer utviser antistoffene ifølge oppfinnelsen en eller flere ønskelige funksjonelle egenskaper, slik som høy affinitetsbinding til PD-1, mangel på kryssreaktivitet til andre

CD28 familiemedlemmer, evnen til å stimulere T-celleproliferasjon, IFN- γ og/eller IL-2 sekresjon i blandede lymfocyttreaksjoner, evnen til å inhibere binding av en eller flere PD-1 ligander (f.eks. PD-L1 og/eller PD-L2), evnen til å kryssreagere med cynomolgus ape PD-1, evnen til å stimulere antigen-spesifikke minneresponser, evnen til å stimulere antistoffresponser og/eller evnen til å inhibere vekst av tumorceller *in vivo*. I tillegg eller alternativt er antistoffene ifølge oppfinnelsen avledet fra spesielt tung og lett kjede kimlinje sekvenser og/eller omfatter spesielt strukturelle trekk slik som CDR regioner som omfatter spesielle aminosyresekvenser. I et annet aspekt vedrører oppfinnelsen den kombinerte bruk av monoklonale antistoffer som spesifikt binder til PD-1 og monoklonale antistoffer som spesifikt binder til CTLA-4.

Oppfinnelsen tilveiebringer f.eks. isolerte antistoffer, fremgangsmåter for å fremstille slike antistoffer, immunkonjugater og bispesifikke molekyler som omfatter slike antistoffer og farmasøytiske sammensetninger som inneholder antistoffene, immunkonjugatene eller bispesifikke molekyler ifølge oppfinnelsen.

I et annet aspekt vedrører oppfinnelsen fremgangsmåter for å inhibere vekst av tumorceller i et individ ved anvendelse av anti-PD-1 antistoffer. Som demonstrert heri er anti-PD-1 antistoffer i stand til å inhibere tumorcellevekst *in vivo*. Oppfinnelsen vedrører også fremgangsmåter for å anvende antistoffene for å modifisere en immunrespons, såvel som for å behandle sykdommer slik som cancer eller infeksjonssykdom, eller for å stimulere en beskyttende immunrespons eller for å stimulere antigenspesifikke immunresponser (f.eks. ved ko-administrering av anti-PD-1 med et antigen av interesse).

For at den foreliggende oppfinnelse skal bli lettere forstått, skal bestemte betegnelser først defineres. Ytterligere definisjoner er angitt gjennom den detaljerte beskrivelsen.

Betegnelsen "Programmert død 1," "Programmert celledød 1," "Protein PD-1," "PD-1," "PD1," "PDCD1," "hPD-1" og "hPD-I" anvendes om hverandre og inkluderer varianter, isoformer, spesiehomologer av humant PD-1, og analoger med minst en felles epitop med PD-1. Den fullstendige PD-1 sekvensen kan man finne under GenBank deponeringsnr. U64863.

Betegnelsene "cytotoksisk T lymfocytt-assosiert antigen-4," "CTLA-4," "CTLA4," "CTLA-4 antigen" og "CD152" (se f.eks., Murata, Am. J. Pathol. (1999) 155:453-460) anvendes om hverandre og inkluderer varianter, isoformer, specieshomologer av humant CTLA-4, og analoger med minst en felles epitop med CTLA-4 (se f.eks. Balzano (1992) Int. J. Cancer Suppl. 7:28-32). Den fullstendige CTLA-4 nukleinsyresekvensen finner man under GenBank deponeringsnr. L15006.

Betegnelsen "immunrespons" refererer til virkningen av f.eks. lymfocytter, antigenpresenterende celler fagocytiske celler, granulocytter og oppløselige makrofager produsert ved hjelp av de ovennevnte celler eller leveren (inkluderende anti-stoffer, cytokiner og komplement) som resulterer i selektiv skade på, destruksjon av eller eliminering fra menneskekroppen av innvaderende patogener, celler eller vev infisert med patogener, cancerceller, eller, i tilfeller av autoimmunitet eller patologisk inflammasjon, normale humane celler eller vev.

Et "signaltransduksjonsspor" refererer til den biokjemiske sammenheng mellom en rekke signaltransduksjonsmolekyler som spiller en rolle i transmisjonen av et signal fra en del av en celle til en annen del av en celle. Som anvendt heri inkluderer betegnelsen "celleoverflatereseptor" f.eks. molekyler og komplekser av molekyler i stand til å motta et signal og transmisjonen av et slikt signal over plasmamembranen til en celle. Et eksempel på en "celleoverflatereseptor" ifølge oppfinnelsen er PD-1 reseptoren.

Betegnelsen "antistoff" som omtalt heri inkluderer hele antistoffer og et hvilket som helst antigen-bindende fragment

(dvs. "antigen-bindende del") eller enkeltkjeder derav. Et "antistoff" refererer til et glykoprotein som omfatter minst to tunge (H) kjeder og to lette (L) kjeder som er interforbundet ved hjelp av disulfidbindinger, eller en antigen-bindende del derav. Hver tunge kjede omfatter et tung kjede variabel region (forkortet heri som V_H) og en tung kjede konstant region. Tung kjede konstant regionen omfatter tre domener, C_{H1} , C_{H2} og C_{H3} . Hver lette kjede omfatter et lett kjede variabel region (forkortet heri som V_L) og en lett kjede konstant region. Lett kjede konstant regionen omfatter ett domene, C_L . V_H og V_L regionene kan videre sub-oppdeles i regioner med hypervariabilitet, betegnet hypervariable områder ("complementary determining regions" (CDR)), avbrutt med regioner som er mer konserverte, betegnet rammeregioner (FR). Hver V_H og V_L består av tre CDR'er og fire FR'er, ordnet fra amino-terminus til karboksy-terminus i følgende rekkefølge: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. De variable regionene av de tunge og lette kjeder inneholder et bindingsdomene som interagerer med et antigen. De konstante regionene av antistoffene kan mediere bindingen av immunoglobulinet til vevsvev eller faktorer, som inkluderer forskjellige celler i immunsystemet (f.eks. effektorceller) og den første komponenten ($C1q$) av det klassiske komplementsystemet.

25

Betegnelsen "antigen-bindende del" for et antistoff (eller simpelthen "antistoffdel"), som anvendt heri, refererer til ett eller flere fragmenter av et antistoff som bibeholder evnen til spesifikt å binde til et antigen (f.eks. PD-1). Det er blitt vist at den antigen-bindende funksjon til et antistoff kan gjennomføres ved fragmenter av et full-lengde antistoff. Eksempler på bindingsfragmenter som omfattes av betegnelsen "antigen-bindende del" av et antistoff inkluderer (i) et Fab fragment, et monovalent fragment bestående av V_L , V_H , C_L og C_{H1} domener; (ii) et $F(ab')_2$ fragment, et bivalent fragment omfattende to Fab fragmenter koblet ved hjelp av disulfidbro i hengselregionen; (iii) et Fd fragment bestående av V_H og C_{H1} domener; (iv) et Fv fragment bestående av V_L og V_H domenene av en enkelt arm av et antistoff; (v) et

35

dAb fragment (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), som består av et V_H domene; og (vi) et isolert hypervariabelt område (CDR). Videre, skjønt de to domenene av Fv fragmentet, V_L og V_H, er kodet for av separate gener, kan de forenes ved anvendelse av rekombinante metoder ved hjelp av en syntetisk linker som gjør det mulig å fremstille dem som en enkelt proteinkjede hvori V_L og V_H regionene parer for å danne monovalente molekyler (kjent som enkeltkjede Fv (scFv); se f.eks. Bird et al. (1988) Science 242:423-426; og Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Slike enkeltkjede antistoffer skal også være omfattet av betegnelsen "antigen-bindende del" av et antistoff. Disse antistofffragmenter oppnås ved å anvende konvensjonelle teknikker som er kjent av de fagkyndige på området, og fragmentene screenes for anvendbarhet på samme måte som intakte antistoffer.

Et "isolert antistoff" som anvendt heri skal referere til et antistoff som er i alt vesentlig fritt for andre antistoffer med forskjellige antigene spesifisiteter (f.eks. et isolert antistoff som spesifikt binder PD-1 er i alt vesentlig fritt for antistoffer som spesifikt binder antigener annet enn PD-1). Et isolert antistoff som spesifikt binder PD-1 kan imidlertid ha kryssreaktivitet til andre antigener slik som PD-1 molekyler fra andre arter. Dessuten kan et isolert antistoff være i alt vesentlig fritt for annet cellulært materiale og/eller kjemikalier.

Betegnelsen "monoklonalt antistoff" eller "monoklonal antistoffsammensetning" som anvendt heri refererer til et preparat av antistoffmolekyler av enkelt molekylær sammensetning. En monoklonal antistoffsammensetning utviser en enkelt bindingsspesifisitet og en affinitet for en spesiell epitop.

Betegnelsen "humant antistoff", som anvendt heri, skal inkludere antistoffer med variable regioner hvori både rammeregioner og CDR regioner er avledet fra humane kimlinje immunoglobulinsekvenser. Videre, dersom antistoffet inneholder en konstant region, er den konstante regionen også avledet fra

humane kimlinje immunoglobulinsekvenser. De humane antistoffene ifølge oppfinnelsen kan inkludere aminosyrerester som ikke er kodet for av humane kimlinje immunoglobulinsekvenser (f.eks. mutasjoner introdusert ved random eller
5 sete-spesifikk mutagenese *in vitro* eller ved somatisk mutasjon *in vivo*). Betegnelsen "humant antistoff", som anvendt heri, skal imidlertid ikke inkludere antistoffer hvori CDR sekvenser avledet fra kimlinje til en annen pattedyrart, slik som en mus, er blitt podet på humane rammesekvenser.

10

Betegnelsen "humant monoklonalt antistoff" refererer til antistoffer som utviser en enkelt bindingsspesifisitet som har variable regioner hvori både ramme- og CDR regionene er avledet fra humane kimlinje immunoglobulinsekvenser. I en
15 utførelsesform er de humane monoklonale antistoffene fremstilt ved hjelp av et hybridom som inkluderer en B celle oppnådd fra et transgent ikke-humant dyr f.eks. en transgen mus, som har et genom omfattende et human tung kjede transgen og et lett kjede transgen fusjonert til en immortalisert
20 celle.

Betegnelsen "rekombinant humant antistoff", som anvendt heri, inkluderer alle humane antistoffer som er fremstilt, uttrykt, dannet eller isolert ved rekombinante midler, slik som (a)
25 antistoffer isolert fra et dyr (f.eks. en mus) som er transgent eller transkromosomalt for humane immunoglobulingener eller et hybridom fremstilt derfra (beskrevet ytterligere nedenfor), (b) antistoffer isolert fra en vertscelle transformert til å uttrykke det humane antistoff, f.eks. fra et
30 transfektom, (c) antistoffer isolert fra et rekombinant, kombinatorisk humant antistoffbibliotek, og (d) antistoffer fremstilt, uttrykt, dannet eller isolert ved hvilke som helst andre midler som involverer spleising av humane immunoglobulinsekvenser til andre DNA sekvenser. Slike rekombinante
35 humane antistoffer har variable regioner hvori ramme- og CDR regionene er avledet fra humane kimlinje immunoglobulinsekvenser. I bestemte utførelsesformer kan imidlertid slike rekombinante humane antistoffer underkastes *in vitro* mutagenese (eller, når et dyr som er transgent for humane Ig

sekvenser anvendes, *in vivo* somatisk mutagenese) og således er aminosyresekvensen av V_H og V_L regionene av de rekombinante antistoffer sekvenser som, mens avledet fra og relatert til humane kimlinje V_H og V_L sekvenser, kan da ikke eksistere

5 naturlig innenfor det humane antistoff kimlinje repertoaret *in vivo*.

Som anvendt heri refererer "isotype" til antistoffklassen (f.eks. IgM og IgG1) som er kodet for av tung kjede konstant

10 region genene.

Betegnelsen "et antistoff som gjenkjenner et antigen" og "et antistoff som er spesifikt for et antigen" anvendes heri om hverandre med betegnelsen "et antistoff som binder spesifikt

15 til et antigen".

Betegnelsen "humane antistoffderivater" refererer til en hvilken som helst modifisert form av det humane antistoff, f.eks. et konjugat av antistoffet og annet middel eller

20 antistoff.

Betegnelsen "humanisert antistoff" skal referere til antistoffer hvori CDR sekvenser avledet fra kimlinje til en annen pattedyrart, slik som en mus, er blitt podet på humane

25 rammesekvenser. Ytterligere rammeregionmodifikasjoner kan gjennomføres innenfor de humane rammesekvensene.

Betegnelsen "kimært antistoff" skal referere til antistoffer hvori variabel region sekvensene er avledet fra en art og

30 konstant region sekvensene er avledet fra en annen art, slik som et antistoff hvori variabel region sekvensene er avledet fra et museantistoff og konstant region sekvensene avledet fra et humant antistoff.

Som anvendt heri skal et antistoff som "spesifikt binder til humant PD-1" referere til et antistoff som binder til humant PD-1 med en K_D på 1×10^{-7} M eller mindre, mere foretrukket 5×10^{-8} M eller mindre, mere foretrukket 1×10^{-8} M eller

35 mindre, mere foretrukket 5×10^{-9} M eller mindre.

Betegnelsen " K_{assoc} " eller " K_a ", som anvendt heri skal referere til assosiasjonsgraden av en spesiell antistoff-antigen interaksjon, mens betegnelsen " K_{dis} " eller " K_d ," som

5 anvendt heri skal referere til disassosiasjonsgraden av en spesiell antistoff-antigen interaksjon. Betegnelsen " K_D ", som anvendt heri, skal referere til disassosiasjonskonstanten, som er oppnådd fra forholdet K_d til K_a (dvs. K_d/K_a) og er uttrykt som en molar konsentrasjon (M). K_D verdier for
10 antistoffer kan bestemmes ved å anvende en metode som er velkjent innen teknikken. En foretrukket metode for å bestemme K_D for et antistoff er ved å anvende overflateplasmonresonans, foretrukket ved å anvende et biosensorsystem slik som et Biacore system.

15 Som anvendt heri refererer betegnelsen "høy affinitet" for et IgG antistoff til et antistoff med K_D på 10^{-8} M eller mindre, mere foretrukket 10^{-9} M eller mindre og enda mere foretrukket 10^{-10} M eller mindre for et målantigen. "Høyaffinitets-
20 binding" kan imidlertid variere for andre antistoff isotyper. "Høyaffinitetsbinding" for en IgM isotype refererer f.eks. til et antistoff med en K_D på 10^{-7} M eller mindre, mere foretrukket 10^{-8} M eller mindre, enda mere foretrukket 10^{-9} M eller mindre.

25 Betegnelsen "behandling" eller "terapi" refererer til administrering av et aktivt middel med det formål å helbrede, lege, lette, lindre, endre, kurere, forandre, forbedre eller påvirke en tilstand (f.eks. en sykdom), tilstandssymptomer,
30 eller for å forhindre eller utsette inntreden av symptomene, komplikasjoner, biokjemiske indikasjoner på en sykdom eller på annen måte stanse eller inhibere ytterligere utvikling av sykdommen, tilstanden, eller lidelsen på en statistisk signifikant måte.

35 En negativ hendelse "adverse event" (AE) som anvendt heri er et hvilket som helst ugunstig og generelt utilsiktet, eller til og med uønsket, tegn (som inkluderer et unormalt laboratoriefunn), symptom, eller sykdom assosiert med bruk av en

medisinsk behandling. En negativ hendelse kan f.eks. være forbundet med aktivering av immunsystemet eller ekspansjon av immunsystemceller (f.eks. T-celler) som svar på en behandling. En medisinsk behandling kan ha en eller flere

5 assosierte AE'er og hver AE kan ha samme eller ulik grad av alvorlighet. Henvisning til metoder i stand til å "endre negative hendelser" betyr et behandlingsregime som nedsetter forekomsten og/eller alvorligheten av en eller flere AE'er assosiert med bruk av et forskjellig behandlingsregime.

10

Som anvendt heri refererer "hyperproliferativ sykdom" til tilstander hvor cellevekst er økt over normale nivåer.

Hyperproliferative sykdommer eller lidelser inkluderer f.eks. maligne sykdommer (f.eks. øsofagial cancer, koloncancer,

15 biliær cancer) og ikke-maligne sykdommer (f.eks. aterosklerose, benign hyperplasi, benign prostatahypertrofi).

Som anvendt heri betyr "subterapeutisk dose" en dose av en terapeutisk forbindelse (f.eks. en dose av et antistoff) som

20 er lavere enn den vanlige eller typiske dosen av den terapeutiske forbindelsen når administrert alene for behandling av en hyperproliferativ sykdom (f.eks. cancer). En subterapeutisk dose av CTLA-4 antistoff er f.eks. en enkelt-dose av antistoffet som er minst omtrent 3 mg/kg, dvs. den
25 kjente dosen av anti-CTLA-4 antistoff.

Anvendelse av alternativet (f.eks. "eller") bør forstås til å bety enten en, begge eller en hvilken som helst kombinasjon av alternativene. Som anvendt heri skal den ubestemte

30 artikkelen "en/ei/et" forstås til å referere til "en eller flere" av en hvilken som helst angitt eller nevnt komponent.

Som anvendt heri betyr "omtrent" eller "bestående i alt vesentlig av" innenfor en akseptabel feilgrense for den

35 spesielle verdi som bestemt av en fagkyndig på området, som delvis vil avhenge av hvordan verdien måles eller bestemmes, dvs. begrensningene i målesystemet.

"Omtrent" eller "bestå i alt vesentlig av" kan f.eks. bety innenfor 1 eller mere enn 1 standardavvik per kjent praksis.

Alternativt kan "omtrent" eller "bestå i alt vesentlig av" bety et område opptil 20%. Videre, særlig med hensyn til biologiske systemer eller prosesser kan betegnelsene bety opptil en størrelsesorden eller opptil 5-ganger av en verdi.

- 5 Når spesielle verdier er tilveiebragt i søknaden og kravene, og dersom annet ikke er angitt, bør betydningen for "omtrent" eller "bestå i alt vesentlig av" antas å være innenfor en godtagbar feilgrense for den spesielle verdien.
- 10 Som beskrevet heri skal et hvilket som helst konsentrasjonsområde, prosentområde, forholdsområde eller heltallområde forstås til å inkludere verdien av et hvilket som helst heltall innenfor det angitte området og, når passende, fraksjon derav (slik som en tidel og en hundredel av
- 15 heltallet), dersom annet ikke er indikert.

Som anvendt heri inkluderer betegnelsen "individ" et hvilket som helst humant dyr eller ikke-humant dyr. Betegnelsen "ikke-humant dyr" inkluderer alle vertebrater, f.eks.

- 20 pattedyr og ikke-pattedyr, slik som ikke-humane primater, sauer, hunder, katter, hester, kyr, høner, amfibier, reptiler, osv.

Unntatt når spesifikt angitt, blir betegnelsen "pasient" eller "individ" anvendt om hverandre.

25

Forskjellige aspekter av oppfinnelsen er beskrevet mere detaljert i de etterfølgende underavsnitt.

Anti-PD-1 Antistoffer

30

Antistoffene ifølge oppfinnelsen er kjennetegnet ved spesielle funksjonelle trekk eller egenskaper hos antistoffene. Antistoffene binder f.eks. spesifikt til PD-1 (f.eks. binder til humant PD-1 og kan kryssreagere med PD-1 fra andre arter, slik som cynomolgus ape). Et antistoff ifølge oppfinnelsen

35 binder foretrukket til PD-1 med høy affinitet, f.eks. med en K_D på 1×10^{-7} M eller mindre. Anti-PD-1 antistoffene ifølge oppfinnelsen utviser foretrukket en eller flere av de etterfølgende egenskaper:

- (a) binder til humant PD-1 med en K_D på 1×10^{-7} M eller mindre;
- (b) binder i alt vesentlig ikke til humant CD28, CTLA-4 eller ICOS;
- 5 (c) øker T-celleproliferasjon i en "Mixed Lymphocyte Reaction" (MLR) analyse;
- (d) øker interferon-gamma produksjon i en MLR analyse;
- (e) øker IL-2 sekresjon i en MLR analyse;
- (f) binder til humant PD-1 og cynomolgus ape PD-1;
- 10 (g) inhiberer bindingen av PD-L1 og/eller PD-L2 til PD-1;
- (h) stimulerer antigenspesifikke minneresponser;
- (i) stimulerer antistoffresponser;
- (j) inhiberer tumorcellevekst *in vivo*.

- 15 Antistoffet binder foretrukket til humant PD-1 med en K_D på 5×10^{-8} M eller mindre, binder til humant PD-1 med en K_D på 1×10^{-8} M eller mindre, binder til humant PD-1 med en K_D på 5×10^{-9} M eller mindre, eller binder til humant PD-1 med en K_D på mellom 1×10^{-8} M og 1×10^{-10} M eller mindre.

20

Et antistoff ifølge oppfinnelsen kan utvise en hvilken helst kombinasjon av de ovenfor angitte trekk slik som to, tre, fire, fem eller flere av de ovenfor angitte trekk.

- 25 Standard analyser for å evaluere bindingsevnen hos antistoffene overfor PD-1 er kjent innen teknikken og inkluderer f.eks. ELISA'er, Western blots og RIA'er. Bindingskinetikene (f.eks. bindingsaffinitet) for antistoffene kan også bestemmes ved standard analyser som er kjent innen teknikken,
- 30 slik som ved Biacore analyse. Passende analyser for å evaluere en hvilken som helst av de angitte karakteristikker er beskrevet detaljert i eksemplene.

Monoklonale antistoffer 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 og 5F4

35

Foretrukne antistoffer ifølge oppfinnelsen er humane monoklonale antistoffer 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 og 5F4 isolert og strukturelt karakterisert som beskrevet i eksempler 1 og 2. V_H aminosyresekvensen til 17D8, 2D3, 4H1,

5C4, 4A11, 7D3 og 5F4 er henholdsvis vist i SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6 og 7. V_L aminosyresekvensen til 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 og 5F4 er henholdsvis vist i SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13 og 14.

5

Gitt at hver av disse antistoffene kan binde til PD-1, kan V_H og V_L sekvensen "blandes og matches" for å danne andre anti-PD-1 bindingsmolekyler ifølge oppfinnelsen. PD-1 binding av slike "blandede og matchede" antistoffer kan testes ved å
 10 anvende bindingsanalysene som beskrevet over og i eksemplene (f.eks. ELISA'er). Når V_H og V_L kjeder blandes og matches, erstattes foretrukket en V_H sekvens fra en spesiell V_H/V_L paring med en strukturelt tilsvarende V_H sekvens. Likeledes, blir foretrukket en V_L sekvens fra en spesiell V_H/V_L paring
 15 erstattet med en strukturelt tilsvarende V_L sekvens.

I ett aspekt tilveiebringer følgelig oppfinnelsen et isolert monoklonalt antistoff, eller antigen-bindende del derav som omfatter:

- 20 (a) en tung kjede variabel region omfattende en aminosyre-sekvens valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6 og 7; og
 (b) en lett kjede variabel region omfattende en aminosyre-sekvens valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO: 8, 9, 10,
 25 11, 12, 13 og 14;
 hvor antistoffet spesifikt binder PD-1, foretrukket humant PD-1.

Foretrukne tung og lett kjede kombinasjoner inkluderer:

- 30 (a) en tung kjede variabel region omfattende aminosyre-sekvensen SEQ ID NO: 1; og (b) en lett kjede variabel region omfattende aminosyresekvensen SEQ ID NO: 8; eller
 (a) en tung kjede variabel region omfattende aminosyre-sekvensen SEQ ID NO: 2; og (b) en lett kjede variabel
 35 region omfattende aminosyresekvensen SEQ ID NO: 9; eller
 (a) en tung kjede variabel regionomfattende aminosyre-sekvensen SEQ ID NO: 3; og (b) en lett kjede variabel region omfattende aminosyresekvensen SEQ ID NO: 10; eller

- (a) en tung kjede variabel region omfattende aminosyre-sekvensenen SEQ ID NO: 4; og (b) en lett kjede variabel region omfattende aminosyresekvensen SEQ ID NO: 11; eller
- 5 (a) en tung kjede variabel region omfattende aminosyre-sekvensenen SEQ ID NO: 5; og (b) en lett kjede variabel region omfattende aminosyresekvensen SEQ ID NO: 12; eller
- (a) en tung kjede variabel region omfattende aminosyre-sekvensenen SEQ ID NO: 6; og (b) en lett kjede variabel region omfattende aminosyresekvensen SEQ ID NO: 13; eller
- 10 (a) en tung kjede variabel region omfattende aminosyre-sekvensene SEQ ID NO: 7; og (b) en lett kjede variabel region omfattende aminosyresekvensen SEQ ID NO: 14.

I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen antistoffer som

15 omfatter tung kjede og lett kjede CDR1'ene, CDR2'ene og CDR3'ene av 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 og 5F4, eller kombinasjoner derav. Aminosyresekvensene for V_H CDR1'ene av 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 og 5F4 er henholdsvis vist i SEQ ID NO:15, 16, 17, 18, 19, 20 og 21. Aminosyresekvensene

20 av V_H CDR2'ene av 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 og 5F4 er henholdsvis vist i SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27 og 28. Aminosyresekvensene av V_H CDR3'ene av 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 og 5F4 er henholdsvis vist i SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34 og 35. Aminosyresekvensene av V_K CDR1'ene av

25 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 og 5F4 er henholdsvis vist i SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41 og 42. Aminosyresekvensene av V_K CDR2'ene av 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 og 5F4 er henholdsvis vist i SEQ ID NO: 43, 44, 45, 46, 47, 48 og 49. Aminosyresekvensene av V_K CDR3'ene av 17D8, 2D3, 4H1, 5C4,

30 4A11, 7D3 og 5F4 er henholdsvis vist i SEQ ID NO: 50, 51, 52, 53, 54, 55 og 56. CDR regionene er beskrevet ved anvendelse av Kabat systemet (Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No.

35 91-3242).

Gitt at hver av disse antistoffene kan binde til PD-1 og at antigen-bindingsspesifisitet primært tilveiebringes ved CDR1, CDR2 og CDR3 regionene, da kan V_H CDR1, CDR2 og CDR3

sekvensene og V_k CDR1, CDR2 og CDR3 sekvensene "blandes og matches" (dvs. CDR'er fra ulike antistoffer kan blandes og matches, skjønt hvert antistoff må inneholde et V_H CDR1, CDR2 og CDR3 og et V_k CDR1, CDR2 og CDR3) for å danne andre anti-
 5 PD-1 bindingsmolekyler ifølge oppfinnelsen. PD-1 binding av slike "blandede og matchede" antistoffer kan testes ved å anvende bindingsanalysene som beskrevet ovenfor og i eksemplene (f.eks. ELISA'er, Biacore analyse). Når V_H CDR sekvensene blandes og matches, blir CDR1, CDR2 og/eller CDR3
 10 sekvensen fra en spesiell V_H sekvens foretrukket erstattet med en eller flere strukturelt tilsvarende CDR sekvenser. Likeledes når V_k CDR sekvenser blandes og matches, blir CDR1, CDR2 og/eller CDR3 sekvensen fra en spesiell V_k sekvens foretrukket erstattet med en eller flere strukturelt
 15 tilsvarende CDR sekvenser. Det vil lett forstås av en fagkyndig på området at nye V_H and V_L sekvenser kan dannes ved å substituere en eller flere V_H og/eller V_L CDR region sekvenser med strukturelt tilsvarende sekvenser fra CDR sekvensene angitt heri for monoklonale antistoffer 17D8, 2D3,
 20 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 og 5F4.

Følgelig, i et annet aspekt, tilveiebringer oppfinnelsen et isolert monoklonalt antistoff, eller antigen-bindende del derav som omfatter:

- 25 (a) et tung kjede variabel region CDR1 omfattende en aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18, 19, 20 og 21;
- (b) et tung kjede variabel region CDR2 omfattende en aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO:
 30 22, 23, 24, 25, 26, 27 og 28;
- (c) et tung kjede variabel region CDR3 omfattende en aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34 og 35;
- (d) et lett kjede variabel region CDR1 omfattende en
 35 aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41 og 42;
- (e) et lett kjede variabel region CDR2 omfattende en aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO: 43, 44, 45, 46, 47, 48 og 49; og

(f) et lett kjede variabel region CDR3 omfattende en aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO: 50, 51, 52, 53, 54, 55 og 56;

hvor antistoffet spesifikt binder PD-1, foretrukket humant

5 PD-1.

I en foretrukket kombinasjon omfatter antistoffet:

(a) et tung kjede variabel region CDR1 omfattende SEQ ID NO: 15;

10 (b) et tung kjede variabel region CDR2 omfattende SEQ ID NO: 22;

(c) et tung kjede variabel region CDR3 omfattende SEQ ID NO: 29;

(d) et lett kjede variabel region CDR1 omfattende SEQ ID NO: 15 36;

(e) et lett kjede variabel region CDR2 omfattende SEQ ID NO: 43; og

(f) et lett kjede variabel region CDR3 omfattende SEQ IDNO: 50.

20

I en annen foretrukket utførelsesform omfatter antistoffet:

(a) et tung kjede variabel region CDR1 omfattende SEQ ID NO: 16;

(b) et tung kjede variabel region CDR2 omfattende SEQ ID NO: 25 23;

(c) et tung kjede variabel region CDR3 omfattende SEQ ID NO: 30;

(d) et lett kjede variabel region CDR1 omfattende SEQ ID NO: 37;

30 (e) et lett kjede variabel region CDR2 omfattende SEQ ID NO: 44; og

(f) et lett kjede variabel region CDR3 omfattende SEQ ID NO: 51.

35 I en annen foretrukket kombinasjon omfatter antistoffet:

(a) et tung kjede variabel region CDR1 omfattende SEQ ID NO: 17;

(b) et tung kjede variabel region CDR2 omfattende SEQ ID NO: 24;

(c) et tung kjede variabel region CDR3 omfattende SEQ ID NO: 31;

(d) et lett kjede variabel region CDR1 omfattende SEQ ID NO: 38

5 (e) et lett kjede variabel region CDR2 omfattende SEQ ID NO: 45; og

(f) et lett kjede variabel region CDR3 omfattende SEQ ID NO: 52.

10 I en annen foretrukket kombinasjon omfatter antistoffet:

(a) et tung kjede variabel region CDR1 omfattende SEQ ID NO: 18;

(b) et tung kjede variabel region CDR2 omfattende SEQ ID NO: 25;

15 (c) et tung kjede variabel region CDR3 omfattende SEQ ID NO: 32;

(d) et lett kjede variabel region CDR1 omfattende SEQ ID NO: 39;

(e) et lett kjede variabel region CDR2 omfattende SEQ ID NO: 20 46; og

(f) et lett kjede variabel region CDR3 omfattende SEQ ID NO: 53.

I en annen foretrukket kombinasjon omfatter antistoffet:

25 (a) et tung kjede variabel region CDR1 omfattende SEQ ID NO: 19;

(b) et tung kjede variabel region CDR2 omfattende SEQ ID NO: 26;

(c) et tung kjede variabel region CDR3 omfattende SEQ ID NO: 30 33;

(d) et lett kjede variabel region CDR1 omfattende SEQ ID NO: 40;

(e) et lett kjede variabel region CDR2 omfattende SEQ ID NO: 47; og

35 (f) et lett kjede variabel region CDR3 omfattende SEQ ID NO: 54.

Antistoffer med spesielle kimlinje sekvenser

I bestemte utførelsesformer omfatter antistoffet ifølge oppfinnelsen et tung kjede variabel region fra et spesielt kimlinje tung kjede immunoglobulingen og/eller en lett kjede region fra et spesielt kimlinje lett kjede immunoglobulingen.

5

- I en foretrukket utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen f.eks. et isolert monoklonalt antistoff, eller en antigen-bindende del derav som omfatter et tung kjede variabel region som er produktet av eller avledet fra et humant V_H 3-33 gen, hvor antistoffet spesifikt binder PD-1, foretrukket humant PD-1. I en annen foretrukket utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen et isolert monoklonalt antistoff, eller en antigen-bindende del derav, som omfatter et tung kjede variabel region som er produktet av eller avledet fra et humant V_H 4-39 gen, hvor antistoffet spesifikt binder PD-1, foretrukket humant PD-1. I en annen foretrukket utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen et isolert monoklonalt antistoff eller en antigen-bindende del derav som omfatter en lett kjede variabel region som er produktet av eller avledet fra et humant V_K L6 gen, hvor antistoffet spesifikt binder PD-1, foretrukket humant PD-1. I en ytterligere foretrukket utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen et isolert monoklonalt antistoff eller en antigen-bindende del derav som omfatter et lett kjede variabel region som er produktet av eller avledet fra et humant V_K L15 gen, hvor antistoffet spesifikt binder PD-1, foretrukket humant PD-1. I en ytterligere foretrukket utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen et isolert monoklonalt antistoff eller antigen-bindende del derav, hvor antistoffet:
- (a) omfatter en tung kjede variabel region som er produktet av eller avledet fra et humant V_H 3-33 eller 4-39 gen (hvilket gen koder for aminosyresekvensen som angitt i henholdsvis SEQ ID NO: 71 eller 73);
 - (b) omfatter en lett kjede variabel region som er produktet av eller avledet fra et humant V_K L6 eller L15 gen (hvilket gen koder for aminosyresekvensen som angitt i henholdsvis SEQ ID NO: 72 eller 74); og
 - (c) spesifikt binder til PD-1.

35

Eksempler på antistoffer med V_H og V_K av henholdsvis V_H 3-33 og V_K L6, er 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, og 7D3. Eksempler på antistoffer med V_H og V_K av henholdsvis V_H 4-39 og V_K L15, er 4A11 og 5F4.

5

Som anvendt heri omfatter et humant antistoff tung eller lett kjede variable regioner som er "produktet av" eller "avledet fra" en spesiell kimlinje sekvens dersom de variable regionene av antistoffet er oppnådd fra et system som anvender humane kimlinje immunoglobulingener. Slike systemer inkluderer immunisering av en transgen mus som bærer humane immunoglobulingener med antigenet av interesse eller screening av et humant immunoglobulin genbibliotek vist på fag med antigenet av interesse. Et humant antistoff som er "produktet av" eller "avledet fra" en human kimlinje immunoglobulinsekvens kan indentifiseres som sådan ved å sammenligne aminosyresekvensene av det humane antistoff med aminosyresekvensene av humane kimlinje immunoglobuliner og velge den humane kimlinje immunoglobulinsekvensen som er nærmest i sekvens (dvs. størst % identitet) med sekvensen til det humane antistoff. Et humant antistoff som er "produktet av" eller "avledet fra" en spesiell human immunoglobulinsekvens kan inneholde aminosyreforskjeller sammenlignet med kimlinje sekvensen som f.eks. skyldes naturlig forekommende somatiske mutasjoner eller forsettlig introduksjon av seterettet mutasjon. Et valgt humant antistoff er imidlertid typisk minst 90% identisk i aminosyresekvens med en aminosyresekvens kodet for av et humant kimlinje immunoglobulingen og inneholder aminosyrerester som identifiserer det humane antistoffet til å være humant når sammenlignet med kimlinje immunoglobulin-aminosyresekvensene til andre arter (f.eks. murine kimlinje sekvenser). I bestemte tilfeller kan et humant antistoff være minst 95%, eller til og med minst 96%, 97%, 98% eller 99% identisk i aminosyresekvens med aminosyresekvensen kodet for av kimlinje immunoglobulingenet. Et humant antistoff avledet fra en spesiell human kimlinje sekvens vil typisk utvise høyst 10 aminosyreforskjeller fra aminosyresekvensen kodet for av det humane kimlinje immunoglobulingenet. I bestemte tilfeller kan det humane antistoff

utvise høyst 5 eller til og med høyst 4, 3, 2 eller 1 aminosyreforskjell fra aminosyresekvensen kodet for av kimlinje immunoglobulingenet.

5 Homologe antistoffer

I en annen utførelsesform omfatter et antistoff ifølge oppfinnelsen tung og lett kjede variable regioner omfattende aminosyresekvenser som er homologe med aminosyresekvensene til de foretrukne antistoffer beskrevet heri, og hvor antistoffene bibeholder de ønskede funksjonelle egenskaper for anti-PD-1 antistoffene ifølge oppfinnelsen.

Oppfinnelsen tilveiebringer f.eks. et isolert monoklonalt antistoff, eller antigen-bindende del derav, som omfatter et tung kjede variabel region og et lett kjede variabel region, hvor:

(a) tung kjede variabel regionen omfatter en aminosyresekvens som er minst 80% homolog med en aminosyresekvens valgt fra

gruppen som består av SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6 og 7; og

(b) lett kjede variabel regionen omfatter en aminosyresekvens som er minst 80% homolog med en aminosyresekvens valgt fra

gruppen som består av SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13 og 14;

og

antistoffet utviser en eller flere av de etterfølgende egenskaper:

(c) antistoffet binder til humant PD-1 med en K_D på 1×10^{-7} M eller mindre;

(d) antistoffet binder i alt vesentlig ikke til humant CD28, CTLA-4 eller ICOS;

(e) antistoffet øker T-celleproliferasjon i en MLR analyse;

(f) antistoffet øker interferon-gamma produksjon i en MLR analyse;

(g) antistoffet øker IL-2 sekresjon i en MLR analyse;

(h) antistoffet binder til humant PD-1 og cynomolgus ape PD-1;

(i) antistoffet inhiberer bindingen av PD-L1 og/eller PD-L2 til PD-1;

(j) antistoffet stimulerer antigen-spesifikke minneresponser;

(k) antistoffet stimulerer antistoffresponser;

(l) antistoffet inhiberer tumorcellevekst *in vivo*.

5

I andre utførelsesformer kan V_H og/eller V_L aminosyresekvensene være 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% eller 99% homologe med sekvensene som er angitt ovenfor. Et antistoff med V_H og V_L regioner med høy (dvs. 80% eller større) homologi med V_H og V_L regionene til sekvensene som angitt ovenfor, kan oppnås ved mutagenese (f.eks. seterettet eller PCR-mediert mutagenese) av nukleinsyremolekyler som koder for SEQ ID NO: 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 og 70, etterfulgt av testing av det kodede endrede antistoff for bibeholdt funksjon (dvs. funksjonene som angitt i (c) til og med (l) ovenfor) ved å anvende funksjonell analyse som beskrevet heri.

Som anvendt heri er prosent homologi mellom to aminosyresekvenser ekvivalent med prosent identitet mellom de to sekvensene. Prosent identitet mellom de to sekvensene er funksjon av antallet identiske posisjoner som deles av sekvensene (dvs. %homologi = antall identiske posisjoner / totalt antall posisjoner x 100), idet man tar hensyn til antallet gap, og lengden av hvert gap, som må introduseres for optimal sammenstilling av de to sekvensene. Sammenligningen av sekvenser og bestemmelse av prosent identitet mellom to sekvenser kan gjennomføres ved å anvende en matematisk algoritme, som beskrevet i de ikke-begrensede eksemplene nedenfor.

Prosent identitet mellom to aminosyresekvenser kan bestemmes ved å anvende algoritmen av E. Meyers and W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)) som er blitt innlemmet i ALIGN programmet (versjon 2.0), ved å anvende en PAM120 vektrest tabell, en gaplengde-straff på 12 og en gap-straff på 4. I tillegg kan prosent identitet mellom to aminosyresekvenser bestemmes ved å anvende Needleman og Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)) algoritmen som er blitt innlemmet i gap

programmet i GCG software pakken (tilgjengelig på www.gcg.com), ved anvendelse av enten en Blossum 62 matrise eller en PAM250 matrise, og en gapvekt på 16, 14, 12, 10, 8, 6, eller 4 og en lengdevekt på 1, 2, 3, 4, 5, eller 6.

5

I tillegg eller alternativt kan proteinsekvensene ifølge oppfinnelsen ytterligere anvendes som en "query sekvens" for å gjennomføre et søk mot offentlige databaser for f.eks. å identifisere beslektede sekvenser. Slike søk kan gjennom-
 10 føres ved å anvende XBLAST programmet (versjon 2.0) til Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. BLAST proteinsøk kan gjennomføres med XBLAST programmet, score = 50, ordlengde = 3 for å oppnå aminosyresekvenser som er homologe med antistoffmolekylene ifølge oppfinnelsen. For å
 15 oppnå sammenstillinger med gap for sammenligningsforhold, kan Gapped BLAST anvendes som beskrevet i Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. Når BLAST og Gapped BLAST programmer anvendes, kan standard parameterne til de respektive programmer (f.eks. XBLAST og NBLAST) anvendes (Se
 20 www.ncbi.nlm.nih.gov).

Antistoffer med moderate konservative modifikasjoner

I bestemt utførelsesformer omfatter et antistoff ifølge
 25 oppfinnelsen et tung kjede variabel region omfattende CDR1, CDR2 og CDR3 sekvenser og et lett kjede variabel region omfattende CDR1, CDR2 og CDR3 sekvenser, hvor en eller flere av disse CDR sekvenser omfatter spesifiserte aminosyre-
 30 sekvenser basert på de foretrukne antistoffene som beskrevet heri (f.eks. 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 eller 5F4), eller moderate modifikasjoner derav, og hvor antistoffene bibeholder de ønskede egenskapene til anti-PD-1 antistoffene ifølge oppfinnelsen. Følgelig tilveiebringer oppfinnelsen er
 35 isolert monoklonalt antistoff, eller antigen-bindende del derav, som omfatter et tung kjede variabel region omfattende CDR1, CDR2 og CDR3 sekvenser og et lett kjede variabel region omfattende CDR1, CDR2 og CDR3 sekvenser, hvori:
 (a) tung kjede variabel region CDR3 sekvensen omfatter en aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av

aminosyresekvenser SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34 og 35, og moderate modifikasjoner derav;

(b) lett kjede variabel region CDR3 sekvensen omfatter en aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av

5 aminosyresekvenser SEQ ID NO: 50, 51, 52, 53, 54, 55 og 56, og moderate modifikasjoner derav; og

antistoffet utviser en eller flere av etterfølgende egenskaper:

(c) antistoffet binder til humant PD-1 med en K_D på 1×10^{-7} M eller mindre;

(d) antistoffet binder i alt vesentlig ikke til humant CD28, CTLA-4 eller ICOS;

(e) antistoffet øker T-celleproliferasjon i en MLR analyse;

(f) antistoffet øker interferon-gamma produksjon i en MLR analyse;

(g) antistoffet øker IL-2 sekresjon i en MLR analyse;

(h) antistoffet binder til humant PD-1 og cynomolgus ape PD-1;

(i) antistoffet inhiberer bindingen av PD-L1 og/eller PD-L2 til PD-1;

(j) antistoffet stimulerer antigen-spesifikke minneresponser;

(k) antistoffet stimulerer antistoffresponser;

(l) antistoffet inhiberer tumorcellevekst *in vivo*.

25

I en foretrukket utførelsesform omfatter tung kjede variabel region CDR2 sekvensen en aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av aminosyresekvenser med SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27 og 28, og moderate modifikasjoner derav; og lett

30 kjede variabel region CDR2 sekvensen omfatter en aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av aminosyresekvensene SEQ ID NO: 43, 44, 45, 46, 47, 48 og 49, og moderate modifikasjoner derav. I en annen foretrukket utførelsesform

omfatter tung kjede variabel region CDR1 sekvensen en aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av aminosyresekvensene SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18, 19, 20 og 21, og moderate modifikasjoner derav, og lett kjede variabel region

35 CDR1 sekvensen omfatter en aminosyresekvens valgt fra gruppen

som består av aminosyresekvenser SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41 og 42, og moderate modifikasjoner derav.

Som anvendt heri skal betegnelsen "moderate sekvensmodifikasjoner" referere til aminosyremodifikasjoner som ikke signifikant påvirker eller endrer bindingsegenskapene til antistoffet som inneholder aminosyresekvensen. Slike moderate modifikasjoner inkluderer aminosubstitusjoner, addisjoner og delesjoner. Modifikasjoner kan innføres i et antistoff ifølge oppfinnelsen ved hjelp av standard teknikker kjent innen teknikkens stand, slik som seterettet mutagenese og PCR-mediert mutagenese. Moderate aminosyresubstitusjoner er dem hvori aminosyrerestene erstattes med en aminosyrerest med en tilsvarende sidekjede. Familier av aminosyrerester med tilsvarende sidekjeder er blitt definert innen teknikken. Disse familier inkluderer aminosyrer med basiske sidekjeder (f.eks. lysin, arginin, histidin), sure sidekjeder (f.eks. asparaginsyre, glutaminsyre), ikke-ladete polare sidekjeder (f.eks. glysin, asparagin, glutamin, serin, treonin, tyrosin, cystein, tryptofan), ikke-polare sidekjeder (f.eks. alanin, valin, leucin, isoleucin, prolin, fenylalanin, metionin), beta-forgrenede sidekjeder (f.eks. treonin, valin, isoleucin) og aromatiske sidekjeder (f.eks. tyrosin, fenylalanin, tryptofan, histidin). Således kan en eller flere aminosyrerester innen CDR regionen til et antistoff ifølge oppfinnelsen erstattes med andre aminosyrerester fra den samme sidekjedefamilien og det endrede antistoffet kan testes for bibeholdt funksjon (dvs. funksjonene angitt i (c) til (l) ovenfor) ved å anvende de funksjonelle analysene som beskrevet heri.

Antistoffer som binder til den samme epitopen som anti-PD-1 antistoffer ifølge oppfinnelsen

I en utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen antistoffer som binder til den samme epitopen på humant PD-1 som hvilket som helst av de PD-1 monoklonale antistoffene ifølge oppfinnelsen (dvs. antistoffer som har en evne til å konkurrere for binding til PD-1 med hvilket som helst av de

monoklonale antistoffene ifølge oppfinnelsen). I foretrukne utførelsesformer kan referanseantistoffet for kryss-konkurransestudier være det monoklonale antistoff 17D8 (med V_H og V_L sekvenser som vist i henholdsvis SEQ ID NO: 1 og 8),

5 eller det monoklonale antistoff 2D3 (med V_H and V_L sekvenser som vist i henholdsvis SEQ ID NO: 2 og 9) eller det monoklonale antistoff 4H1 (med V_H and V_L sekvenser som vist i henholdsvis SEQ ID NO: 3 og 10), eller det monoklonale antistoff 5C4 (med V_H og V_L sekvenser som vist i henholdsvis SEQ

10 ID NO: 4 og 11), eller det monoklonale antistoff 4A11 (med V_H og V_L sekvenser som vist i henholdsvis SEQ ID NO: 5 og 12), eller det monoklonale antistoff 7D3 (med V_H og V_L sekvenser som vist i henholdsvis SEQ ID NO: 6 og 13), eller det monoklonale antistoff 5F4 (med V_H og V_L sekvenser som vist i hen-

15 holdsvis SEQ ID NO: 7 og 14). Slike kryss-konkurrerende antistoffer kan identifiseres på grunnlag av deres evne til å kryss-konkurrere med 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 eller 5F4 i standard PD-1 bindingsanalyser. BIAcore analyse, ELISA analyser eller flowcytometri kan f.eks. anvendes for å

20 demonstrere kryss-konkurrering med antistoffene ifølge den foreliggende oppfinnelse. Evnen hos et testantistoff til å inhibere bindingen av f.eks. 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 eller 5F4, til humant PD-1 viser at testantistoffet kan konkurrere med 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 eller 5F4 for

25 binding til humant PD-1 og binder således til den samme epitopen på humant PD-1 som 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, eller 4A11. I en foretrukket utførelsesform, er antistoffet som binder til den samme epitopen på humant PD-1 som 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 eller 5F4 et humant monoklonalt antistoff.

30 Slike humane monoklonale antistoffer kan fremstilles og isoleres som beskrevet i eksemplene.

Modellerte og modifiserte antistoffer

35 Et antistoff ifølge oppfinnelsen kan fremstilles ved å anvende et antistoff med en eller flere av V_H og/eller V_L sekvensene omtalt heri som utgangsmaterial for å modellere et modifisert antistoff, hvilket modifiserte antistoff kan ha endrede egenskaper fra utgangsantistoffet. Et antistoff kan

modelleres ved å modifisere en eller flere rester innen en eller begge variable regioner (dvs. V_H og/eller V_L), f.eks. innen en eller flere CDR regioner og/eller innen en eller flere rammeregioner. I tillegg eller alternativt, kan et
 5 antistoff modelleres ved å modifisere rester innen en eller flere konstante regioner, f.eks. for å endre en eller flere av effektorfunksjonene til antistoffet.

En type av variabel regionmodellering som kan gjennomføres er
 10 CDR poding. Antistoffet interagerer med targetantigenene hovedsakelig gjennom aminosyrerester som er lokalisert i de seks tung og lett kjede hypervariable områdene (CDR'er). På grunn av dette er aminosyresekvensene innen CDR'ene mere forskjellige mellom individuelle antistoffer enn sekvenser
 15 utenfor CDR'er. Fordi CDR sekvenser er ansvarlige for de fleste antistoff-antigeninteraksjoner, er det mulig å uttrykke rekombinante antistoffer som etterligner egenskapene til spesifikke naturlig forekommende antistoffer ved å konstruere ekspresjonsvektorer som inkluderer CDR sekvenser
 20 fra det spesifikke naturlig forekommende antistoff podet på rammesekvenser fra et forskjellig antistoff med forskjellige egenskaper (se f.eks. Riechmann, L. et al. (1998) Nature 332:323-327; Jones, P. et al. (1986) Nature 321:522-525; Queen, C. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.
 25 86:10029-10033; U.S. Patent nr. 5 225 539 til Winter, og U.S. Patent nr. 5 530 101; 5 585 089; 5 693 762 og 6 180 370 til Queen et al.)

Følgelig, vedrører en annen utførelsesform av oppfinnelsen
 30 et isolert monoklonalt antistoff, eller antigen-bindende del derav, som omfatter et tung kjede variabel region omfattende CDR1, CDR2 og CDR3 sekvenser omfattende en aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av henholdsvis SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18, 19, 20 og 21, SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27
 35 og 28 og SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34 og 35, og et lett kjede variabel region omfattende CDR1, CDR2 og CDR3 sekvenser omfattende en aminosyresekvens valgt fra gruppen som henholdsvis består av SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41 og 42, SEQ ID NO: 43, 44, 45, 46, 47, 48 og 49 og SEQ ID NO: 50,

51, 52, 53, 54, 55 og 56. Således inneholder slike anti-stoffer V_H og V_L CDR sekvenser av monoklonale antistoffer 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 eller 5F4, men kan likevel inneholde forskjellige rammesekvenser fra disse antistoffene.

5

Slike rammesekvenser kan oppnås fra offentlige DNA databaser eller publiserte referenser som inkluderer kimlinje antistoff gensekvenser. Kimlinje DNA sekvenser for humane tung og lett kjede variabel region gener finner man f.eks. i "VBase" human kimlinje sekvens databasen (tilgjengelig på Internet på www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), såvel som i Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., et al. (1992) "The Repertoire of Human Kimlinje V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" J. Mol. Biol. 227:776-798; og Cox, J. P. L. et al. (1994) "A Directory of Human Kimlinje V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" Eur. J. Immunol. 24:827-836; hvis innhold er uttrykkelig innlemmet heri ved referanse. Som et annet eksempel, kan kimlinje DNA sekvenser for human tung og lett kjede variabel region gener bli funnet i GenBank databasen. De etterfølgende tung kjede kimlinje sekvenser funnet i HCo7 HuMAb musen er f.eks. tilgjengelige i de ledsagende GenBank deponeringsnummere: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 og BC070333), 3-33 (NG_0010109 og NT_024637) og 3-7 (NG_0010109 og NT_024637). Som et annet eksempel, er de etterfølgende tung kjede kimlinje sekvenser funnet i HCo12 HuMAb musen tilgjengelige i de ledsagende GenBank deponeringsnummere: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 og BC070333), 5-51 (NG_0010109 og NT_024637), 4-34 (NG_0010109 og NT_024637), 3-30.3 (AJ556644) og 3-23 (AJ406678).

Foretrukne rammesekvenser for anvendelse i antistoffene ifølge oppfinnelsen er dem som er strukturelt tilsvarende rammeverkssekvensene anvendt ved valgte antistoffer ifølge oppfinnelsen, f.eks. tilsvarende V_H 3-33 rammesekvensene (SEQ ID NO: 71) og/eller V_H 4-39 rammesekvensene (SEQ ID NO: 73) og/eller V_K L6 rammesekvensene (SEQ ID NO: 72) og/eller V_K

- L15 rammesekvensene (SEQ ID NO: 74) anvendt ved foretrukne monoklonale antistoffer ifølge oppfinnelsen. V_H CDR1, CDR2 og CDR3 sekvensene, og V_K CDR1, CDR2 og CDR3 sekvensene kan kodes på rammeregioner som har den identiske sekvensen som
- 5 den funnet i kimlinje immunoglobulingenet hvorfra rammesekvensen er avledet, eller CDR sekvensene kan podes på rammeregioner som inneholder en eller flere mutasjoner sammenlignet kimlinje sekvensene. Det er f.eks. blitt funnet at i bestemte tilfeller er det fordelaktig å mutere rester
- 10 innenfor rammeregionene for å opprettholde eller øke den antigen-bindende evnen hos antistoffet (se f.eks. U.S. Patent nr. 5 530 101; 5 585 089; 5 693 762 og 6 180 370 for Queen et al).
- 15 En annen type av variabel region modifikasjon er å mutere aminosyrerester innenfor V_H og/eller V_K CDR1, CDR2 og/eller CDR3 regionene for derved å forbedre en eller flere bindingsegenskaper (f.eks. affinitet) hos antistoffet av interesse. Seterettet mutagenese eller PCR-mediert mutagenese
- 20 kan gjennomføres for å introdusere mutasjonen/mutasjonene og effekten på antistoffbinding eller annen funksjonell egenskap av interesse kan evalueres i *in vitro* eller *in vivo* analyser som beskrevet heri og tilveiebragt i eksemplene. Foretrukne moderate modifikasjoner (som omtalt ovenfor) introduseres.
- 25 Mutasjonene kan være aminosyresubstitusjoner, addisjoner eller delesjoner, men er foretrukket substitusjoner. Dessuten blir typisk høyst en, to, tre, fire eller fem rester innenfor en CDR region endret.
- 30 Følgelig, i en annen utførelsesform, tilveiebringer oppfinnelsen isolerte anti-PD-1 monoklonale antistoffer, eller antigen-bindende deler derav, som omfatter et tung kjede variabel region omfattende: (a) en V_H CDR1 region omfattende en aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av SEQ ID
- 35 NO: 15, 16, 17, 18, 19, 20 og 21, eller en aminosyresekvens med en, to, tre, fire eller fem aminosyresubstitusjoner, delesjoner eller addisjoner sammenlignet med SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18, 19, 20 og 21; (b) en V_H CDR2 region omfattende en aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO:

22, 23, 24, 25, 26, 27 og 28, eller en aminosyresekvens med en, to, tre, fire eller fem aminosyresubstitusjoner, delesjoner eller addisjoner sammenlignet med SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27 og 28; (c) en V_H CDR3 region omfattende

5 en aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34 og 35, eller en aminosyresekvens med en, to, tre, fire eller fem aminosyresubstitusjoner, delesjoner eller addisjoner sammenlignet med SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34 og 35; (d) en V_K CDR1 region omfattende en

10 aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41 og 42, eller en aminosyresekvens med en, to, tre, fire eller fem aminosyresubstitusjoner, delesjoner eller addisjoner sammenlignet med SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41 og 42; (e) en V_K CDR2 region omfattende en

15 aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO: 43, 44, 45, 46, 47, 48 og 49, eller en aminosyresekvens med en, to, tre, fire eller fem aminosyresubstitusjoner, delesjoner eller addisjoner sammenlignet med SEQ ID NO: 43, 44, 45, 46, 47, 48 og 49; og (f) en V_K CDR3 region omfattende en

20 aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO: 50, 51, 52, 53, 54, 55 og 56, eller en aminosyresekvens med en, to, tre, fire eller fem aminosyresubstitusjoner, delesjoner eller addisjoner sammenlignet med SEQ ID NO: 50, 51, 52, 53, 54, 55 og 56.

25

Modellerte antistoffer ifølge oppfinnelsen inkluderer dem hvori modifikasjoner er blitt utført på rammeverkrester innenfor V_H og/eller V_K , f.eks. for å forbedre egenskapene til antistoffet. Slike rammemodifikasjoner gjennomføres

30 typisk for å nedsette immunogeniteten til antistoffet. En måte er f.eks. å "tilbakemutere" en eller flere rammerester til den tilsvarende kimlinje sekvensen. Mere spesifikt, kan et antistoff som har gjennomgått somatisk mutasjon inneholde rammerester som er forskjellige fra kimlinje sekvensen

35 hvorfra antistoffet er avledet. Slike rester kan identifiseres ved å sammenligne antistoff-rammesekvenser med gernlinesekvensene hvorfra antistoffet er avledet.

Tabell 1 nedenfor viser f.eks. en rekke aminosyreforandringer i rammeregionene til anti-PD-1 antistoffene 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 og 5F4 som avviker fra tung kjede opphav-kimlinje sekvensen. For å returnere en eller flere av aminosyrene i rammeregionsekvansene til deres kimlinje konfigurasjon, kan de somatiske mutasjonene "tilbakemuteres" til kimlinje sekvensen ved f.eks. seterettet mutagenese eller PCR-mediert mutagenese.

10 Aminosyreforandringer kan forekomme i rammeregionene til anti-PD-1 antistoffene som er forskjellige fra lett kjede opphav-kimlinje sekvensen. For 17D8 er f.eks. aminosyrerest nr. 47 (innenfor FR2) av V_K et isoleucin mens denne resten i den tilsvarende V_K L6 kimlinje sekvensen er et leucin. For å returnere rammeregionsekvansene til deres kimlinje konfigurasjon kan de somatiske mutasjonene "tilbakemuteres" til kimlinje sekvensen ved (f.eks. seterettet mutagenese nr. 13 av FR2) av V_K i 17D8 kan "tilbakemuteres" fra isoleucin til leucin).

20

For 4A11, som et annet eksempel, er aminosyrerest nr. 20 (innenfor FR1) av V_K et serin mens en rest i den tilsvarende V_K L15 kimlinje sekvensen er et treonin. For å returnere rammeregionsekvansene til deres kimlinje konfigurasjon kan f.eks. rest nr. 20 av V_K av 4A11 "tilbakemuteres" fra serin til treonin. Slike "tilbakemuterte" antistoffer skal også være omfattet av den foreliggende oppfinnelse.

Sammenstillingen av V_H regionene for 17D8, 2D3, 4H1, 5C4 og 7D3 mot opphav-kimlinje V_H 3-33 sekvensen er vist i figur 8. Sammenstillingen av V_H regionene for 4A11 og 5F4 mot opphav-kimlinje V_H 4-39 sekvensen er vist i figur 11.

35 **Tabell 1. Modifikasjoner hos antistoffer 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 og 5F4 fra tung kjede kimlinje konfigurasjonen.**

Anti-PD-1 antistoff	Aminosyre- posisjon	Aminosyre av anti- stoff	Opprinnelig amino- syre av kimlinje konfigurasjon
17D8	10	D	G
	16	G	R
	27	V	F
	28	A	T
	78	M	T
	93	M	V
2D3	10	D	G
	27	L	F
	30	T	S
	85	N	S
	98	T	R
4H1	3	Y	Q
	84	T	N
	88	V	A
	98	S	R
5C4	21	D	S
	23	K	A
	27	I	F
	80	F	Y
	98	T	R
4A11	29	L	I
	79	Q	H
	98	V	A
7D3	23	T	A
	24	T	A
	27	I	F
	70	L	I
	74	D	N
	97	V	A
	98	T	R
5F4	23	S	T
	29	L	I
	51	A	G
	77	R	K

En annen type av rammemodifikasjon involverer mutasjon av en eller flere rester innenfor rammeregionen, eller til og med innenfor en eller flere CDR regioner, for å fjerne T-celle-
5 epitoper for derved å redusere den potensielle immunogeni-
teten til antistoffet. Denne måte omtales også som
"deimmunisering" og er beskrevet mer detaljert i U.S. Patent
publikasjonsnr. 20030153043 av Carr et al.

I tillegg eller alternativt til modifikasjoner gjennomført innenfor rammen eller CDR regionene, kan antistoffet ifølge oppfinnelsen modelleres til å inkludere modifikasjoner innenfor Fc regionen, typisk for å endre en eller flere funksjonelle egenskaper til antistoffet, slik som serumhalveringstid, komplementfiksering, Fc reseptorbinding og/eller antigen-avhengig cellulær cytotoxicitet. Videre kan et antistoff ifølge oppfinnelsen modifiseres kjemisk (f.eks. en eller flere kjemiske enheter kan festes til antistoffet) eller kan modifiseres for å endre dets glykosylering, igjen for å endre en eller flere funksjonelle egenskaper til antistoffet. Hver av disse utførelsesformer er beskrevet ytterligere detaljert nedenfor. Nummereringen av rester i Fc regionen er den i EU indeksen til Kabat.

15

I en utførelsesform er hengselregionen av CH1 modifisert slik at antallet cysteinrester i hengselregionen forandret, f.eks. økt eller nedsatt. Denne måte er ytterligere beskrevet i U.S. Patent nr. 5 677 425 av Bodmer et al. Antallet cysteinrester i hengselregionen til CH1 forandres for, f.eks., å forenkle sammensetning av de lette og tunge kjeder for å øke eller nedsette antistoffets stabilitet.

20

I en annen utførelsesform blir Fc hengselregionen til et antistoff mutert for å nedsette antistoffets biologiske halveringstid. Mere spesifikt innføres en eller flere aminosyremutasjoner i CH2-CH3 domene grenseflatere regionen av Fc-hengselfragmentet slik at antistoffet har svekket Stafylokokk protein A (SpA) binding i forhold tilativ Fc-hengseldomene SpA binding. Denne måte er beskrevet mere detaljer i U.S. Patent nr. 6 165 745 av Ward et al.

25

30

I en annen utførelsesform modifiseres antistoffet for å øke dets biologiske halveringstid. Forskjellige måter er mulig. En eller flere av de etterfølgende mutasjoner kan f.eks. introduseres: T252L, T254S, T256F, som beskrevet i U.S. Patent nr. 6 277 375 til Ward. Alternativt, for å øke den biologiske halveringstid, kan antistoffet endres innenfor CH1 eller CL regionen til å inneholde en redningsreseptor-bind-

35

ingsepitop tatt fra to sløyfer av et CH2 domene av en Fc region av et IgG, som beskrevet i U.S. Patent nr. 5 869 046 og 6 121 022 av Presta et al.

- 5 I ytterligere utførelsesformer endres Fc regionen ved å erstatte minst en aminosyrerest med en forskjellig aminosyre-rest for å endre en eller flere av vektorfunksjonene til antistoffet. En eller flere aminosyrer som f.eks. er valgt fra aminosyrerester 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 og 322
10 kan erstattes med en forskjellig aminosyrerest slik at antistoffet har en endret affinitet for en effektorligand men bibeholder den antigen-bindende evnen til moderantistoffet. Effektorliganden hvortil affiniteten er endret kan f.eks. være en Fc reseptor eller C1 komponenten av komplement.
15 Denne måte er beskrevet mere detaljert i U.S. Patent nr. 5 624 821 og 5 648 260, begge av Winter et al.

I et annet eksempel kan en eller flere aminosyrer valgt fra aminosyrerster 329, 331 og 322 erstattes med en forskjellig
20 aminosyrerest slik at antistoffet har endret Clq binding og/eller redusert eller opphevet komplementavhengig cytotoksitet (CDC). Denne måte er beskrevet mere detaljert i U.S. Patent nr. 6 194 551 av Idusogie et al.

- 25 I et annet eksempel endres en eller flere aminosyrerester innenfor aminosyreposisjoner 231 og 239 for derved å endre antistoffets evne til å fikserer komplement. Denne måte er beskrevet ytterligere i PCT publikasjon WO 94/29351 av Bodmer et al.

30

- I et annet eksempel modifiseres Fc regionen for å øke antistoffets evne til å mediere antistoffavhengig cellulær cytotoksitet (ADCC) og/eller for å øke antistoffets affinitet for en Fcγ reseptor ved å modifisere en eller flere amino-
35 syrer i de etterfølgende posisjoner: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373,

376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 eller 439. Denne måte er ytterligere beskrevet i PCT publikasjon WO 00/42072 av Presta. Dessuten er bindingssetene på humant IgG1 for FcγR1, FcγRII, FcγRIII og FcRn blitt
 5 kartlagt og varianter med forbedret binding er blitt beskrevet (se Shields, R.L. et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604). Spesifikke mutasjoner i posisjoner 256, 290, 298, 333, 334 og 339 ble vist til å forbedre binding til FcγRIII. I tillegg ble de etterfølgende kombinasjonsmutanter
 10 vist til å forbedre FcγRIII binding: T256A/S298A, S298A/-E333A, S298A/K224A og S298A/E333A/K334A.

I en ytterligere utførelsesform er glykosyleringen av et antistoff modifisert. Et aglykosylert antistoff kan f.eks.
 15 fremstilles (dvs. antistoffet mangler glykosylering). Glykosylering kan f.eks. endres ved å øke antistoffets affinitet for antigen. Slike karbohydratmodifikasjoner kan f.eks. gjennomføres ved å endre ett eller flere glykosyleringsseter innenfor antistoffsekvensen. En eller flere
 20 aminosyresubstitusjoner kan f.eks. gjennomføres som resulterer i eliminering av en eller flere variabel region ramme-glykosyleringsseter for derved å eliminere glykosylering i dette setet. Slik aglykosylering kan øke antistoffets affinitet for antigen. En slik metode er beskrevet mere
 25 detaljert i U.S. Patent nr. 5 714 350 og 6 350 861 av Co et al.

I tillegg eller alternativt kan et antistoff dannes som har en endret type av glykosylering, slik som et hypofukosylert
 30 antistoff med reduserte mengder fukosylrester eller et antistoff med økt todelte GlcNac strukturer. Slike endrede glykosyleringsmønstre er blitt vist til å øke ADCC evnen hos antistoffene. Slike karbohydratmodifikasjoner kan f.eks. gjennomføres ved å uttrykke antistoffet i en vertscelle med
 35 endret glykosyleringsmaskineri. Celler med endret glykosyleringsmaskineri er blitt beskrevet innen teknikken og kan anvendes som vertsceller for å uttrykke rekombinante antistoffer ifølge oppfinnelsen deri for derved å produsere et antistoff med endret glykosylering. Cellelinjene Ms704,

Ms705 og Ms709 mangler f.eks. fukosyltransferasegenet, FUT8 (alpha (1,6) fukosyltransferase), slik at antistoffer uttrykt i Ms704, Ms705 og Ms709 cellelinjene mangler fukose på deres karbohydrater. Ms704, Ms705 og Ms709 FUT8^{-/-} cellelinjene ble
5 dannet ved den targeterte ødeleggelse av FUT8 genet i CHO/- DG44 celler ved å anvende to erstatningsvektorer (se U.S. Patent publikasjonsnr. 20040110704 av Yamane et al. og Yamane-Ohnuki et al. (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22). Som et annet eksempel beskriver EP 1 176 195 av Hanai et al.
10 en cellelinje med et funksjonelt splittet ("disrupted") FUT8 gen, som koder for en fukosyltransferase, slik at antistoffet uttrykt i en slik cellelinje utviser hypofukosylering ved å redusere eller eliminere det alfa-1,6- bindingsrelaterte enzymet. Hanai et al. beskriver også cellelinjer med en lav
15 enzymaktivitet for addisjon av fukose til N- acetylglukosaminet som binder til Fc regionen av et antistoff eller som ikke har enzymaktiviteten, f.eks. rottemyelom cellelinjen YB2/0 (ATCC CRL 1662). PCT publikasjon WO 03/035835 av Presta beskriver en variant CHO cellelinje, Lec13 celler, med
20 redusert evne til å feste fukose til Asn(297)-koblede karbohydrater, som også resulterer i hypofukosylering av antistoffer uttrykt i denne vertscelle (se også Shields, R.L. et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). PCT publikasjon WO 99/54342 av Umana et al. beskriver cellelinjer som er
25 modulert til å uttrykke glykoprotein-modifiserende glykosyltransferase (f.eks. beta(1,4)-N-acetylglukosaminyltransferase III (GnTIII)) slik at antistoffet uttrykt i den modellerte cellelinjen uttrykker økte todelende GlcNac strukturer som resulterer i økt ADCC aktivitet hos antistoffene (se også
30 Umana et al. (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180). Alternativt kan fukoserestene av antistoffet spaltes av ved å anvende et fukosidaseenzym. Fukosidasen alpha-L-fukosidase fjerner f.eks. fukosylrester fra antistoffer (Tarentino, A.L. et al. (1975) *Biochem.* 14:5516-23).

35

En annen modifikasjon av antistoffene heri som er omfattet av oppfinnelsen er pegylering. Et antistoff kan pegyleres for, f.eks., å øke den biologiske (f.eks. serum) halveringstiden til antistoffet. For å pegylere et antistoff reageres anti-

stoffet, eller fragment derav, typisk med polyetylenglykol (PEG), slik som en reaktiv ester eller aldehydderivat av PEG, under betingelser hvori en eller flere PEG grupper festes til antistoffet eller antistoff-fragmentet. Pegyleringen gjennom-

5 føres foretrukket via en acyleringsreaksjon eller alkyleringsreaksjon med et reaktivt PEG molekyl (eller en analog reaktiv vannoppløselig polymer). Som anvendt heri skal betegnelsen "polyetylenglykol" omfatte hvilken som helst av formene av PEG som er blitt anvendt for å derivatisere andre

10 proteiner, slik som mono (C1-C10) alkoksy- eller aryloksy-polyetylenglykol eller polyetylenglykolmaleimid. I visse utførelsesformer er antistoffet som skal pegyleres et aglykosylert antistoff. Fremgangsmåter for pegylering av proteiner er kjent innen teknikken og kan anvendes på antistoffene

15 ifølge oppfinnelsen. Se f.eks. EP 0 154 316 av Nishimura et al. og EP 0 401 384 av Ishikawa et al.

Metoder for å modellere antistoffer

20 Som omtalt ovenfor kan anti-PD-1 antistoffene med V_H og V_K sekvenser omtalt heri anvendes for å danne nye anti-PD-1 antistoffer ved å modifisere V_H og/eller V_K sekvensene, eller den eller de konstante regionene festet dertil. Således, i et annet aspekt av oppfinnelsen, anvendes de strukturelle

25 trekkene til et anti-PD-1 antistoff ifølge oppfinnelsen, f.eks. 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 eller 5F4, for å danne strukturelt relaterte anti-PD-1 antistoffer som bibeholder i det minste en funksjonell egenskap hos antistoffene ifølge oppfinnelsen, slik som binding til humant PD-1. En eller

30 flere CDR regioner av 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 eller 5F4, eller mutasjoner derav, kan f.eks. kombineres rekombinant med kjente rammeregioner og/eller andre CDR'er for å danne ytterligere, rekombinant modellerte, anti-PD-1 antistoffer ifølge oppfinnelsen som angitt over. Andre typer av

35 modifikasjoner inkluderer dem som beskrevet i den foregående del. Utgangsmaterialet for modelleringsmetoden er en eller flere av V_H og/eller V_K sekvensene tilveiebragt heri, eller en eller flere CDR regioner derav. For å danne det modellerte antistoffet, er det ikke nødvendig og i realiteten

fremstille (f.eks. uttrykke som protein) et antistoff med en eller flere av V_H og/eller V_K sekvensene tilveiebragt heri, eller en eller flere CDR regioner derav. Heller blir informasjonen inneholdt i sekvensen/sekvensene anvendt som ut-

- 5 gangsmaterialet for å danne en "andre generasjon" av sekvens/sekvenser avledet fra den eller de opprinnelige sekvenser og deretter fremstilles "andre generasjon" sekvensen/sekvensene og uttrykkes som et protein.
- 10 Følgelig, i en annen utførelsesform, tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å fremstille et anti-PD-1 antistoff som omfatter:
 - (a) å tilveiebringe: (i) et tung kjede variabel region antistoffsekvens omfattende en CDR1 sekvens valgt fra gruppen som
 - 15 består av SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18, 19, 20 og 21, en CDR2 sekvens valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27 og 28; og/eller en CDR3 sekvens valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34 og 35; og/eller (ii) et lett kjede variabel region antistoff-
 - 20 sekvens omfattende en CDR1 sekvens valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41 og 42, en CDR2 sekvens valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO: 43, 44, 45, 46, 47, 48 og 49, og/eller en CDR3 sekvens valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO: 50, 51, 52, 53, 54, 55 og
 - 25 56;
 - (b) å endre minst en aminosyrerest innen tung kjede variabel region antistoffsekvensen og/eller lett kjede variabel region antistoffsekvensen for å danne minst en endret antistoffsekvens: og
 - 30 (c) uttrykke den endrede antistoffsekvens som et protein.

Standard teknikker for molekylær biologi kan anvendes for å fremstille og uttrykke den endrede antistoffsekvensen.

- 35 Antistoffet som kodet for av den eller de endrede antistoffsekvensen er foretrukket ett som bibeholder en, noen eller alle de funksjonelle egenskapene til anti-PD-1 antistoffene som beskrevet heri, hvor funksjonelle egenskaper inkluderer, men er ikke begrenset til:

- (a) antistoffet binder til humant PD-1 med en K_D på 1×10^{-7} M eller mindre;
- (b) antistoffet binder i alt vesentlig ikke til humant CD28, CTLA-4 eller ICOS;
- 5 (c) antistoffet øker T-celleproliferasjon i en MLR analyse;
- (d) antistoffet øker interferon-gamma produksjon i en MLR analyse;
- (e) antistoffet øker IL-2 sekresjon i en MLR analyse;
- (f) antistoffet binder til humant PD-1 og cynomolgus ape PD-1;
- 10 (g) antistoffet inhiberer bindingen av PD-L1 og/eller PD-L2 til PD-1;
- (h) antistoffet stimulerer antigen-spesifikke minneresponser;
- (i) antistoffet stimulerer antistoffresponser;
- 15 (j) antistoffet inhiberer tumorcellevekst *in vivo*.

De funksjonelle egenskapene til de endrede antistoffer kan fastsettes ved å anvende standard analyser som er tilgjengelige innen teknikken og/eller beskrevet heri, slik som dem
 20 som angitt i eksemplene (f.eks. flowcytometri, bindingsanalyser).

I bestemt utførelsesformer av metodene for å modellere antistoffer ifølge oppfinnelsen, kan mutasjoner innføres tilfeldig eller selektivt langs hele eller en del av en anti-PD-1 antistoff kodesekvens og de resulterende modifiserte antistoffer kan screenes for bindingsaktivitet og/eller funksjonelle egenskaper som beskrevet heri. Mutasjonsmetoder er blitt beskrevet innen teknikken. PCT publikasjon WO 02/092780
 30 av Short beskriver f.eks. metoder for å danne og screene antistoffmutasjoner ved å anvende metningsmutagenese, syntetisk ligerings-sammensetting, eller en kombinasjon derav. Alternativt beskriver PCT publikasjon WO 03/074679 av Lazar et al. metoder med anvendelse av datamaskinbaserte screening-
 35 metoder for å optimalisere fysiokjemiske egenskaper hos antistoffer.

Nukleinsyremolekyler som koder for antistoffer ifølge oppfinnelsen

Et annet aspekt av oppfinnelsen vedrører nukleinsyremolekyler som koder for antistoffene ifølge oppfinnelsen. Nukleinsyrene kan være tilstede i hele celler, i et cellelysat eller i en delvis rensset eller i alt vesentlig ren form. En nukleinsyre "isoleret" eller "gjøres i alt vesentlig ren" når rensset bort fra andre cellulære komponenter eller andre kontaminanter, f.eks. andre cellulære nukleinsyrer eller proteiner, ved standard teknikker som inkluderer alkalisk/SDS behandling, CsCl gruppering ("banding"), kolonnekromatografi, agarosegelelektroforese og andre som er vel kjent innen teknikken. Se f.eks. Ausubel, et al., ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing og Wiley Interscience, New York. En nukleinsyre ifølge oppfinnelsen kan f.eks. være DNA eller RNA og kan inneholde intron-sekvenser. I en foretrukket utførelsesform er nukleinsyren et cDNA molekyl.

Nukleinsyrer ifølge oppfinnelsen kan oppnås ved anvendelse av standard teknikker innen molekylær biologi. For antistoffer uttrykt ved hjelp av hybridomer (f.eks. hybridomer fremstilt fra transgene mus som bærer humane immunoglobuliner som beskrevet ytterligere nedenfor), kan cDNA'er som koder for lette og tunge kjeder i antistoffet dannet ved hybridomet oppnås ved hjelp av standard PCR amplifikasjon eller cDNA kloningsteknikker. For antistoffer oppnådd fra et immunoglobulin genbibliotek (f.eks. ved å anvende fag-display teknikker), kan nukleinsyre som koder for antistoffet utvinnes fra biblioteket.

Fortrukne nukleinsyremolekyler ifølge oppfinnelsen er dem som koder for ved V_H og V_L sekvensene 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 eller 5F4 monoklonale antistoffene. DNA sekvenser som koder for V_H sekvensene av 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 og 5F4 er vist i henholdsvis SEQ ID NO: 57, 58, 59, 60, 61, 62 og 63. DNA sekvenser som koder for V_L sekvensene av 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 og 5F4 er henholdsvis vist i SEQ ID NO: 64, 65, 66, 67, 68, 69 og 70.

Når DNA fragmenter som koder for V_H og V_L segmenter er oppnådd, kan disse DNA fragmenter videre manipuleres ved standard rekombinante DNA teknikker, f.eks. for å omdanne variabel region genene til full-lengde antistoffkjedegener, til Fab-fragment gener eller til et scFv gen. I disse manipulasjonene er et V_L eller V_H kodende DNA fragment operabelt koblet til et annet DNA fragment som koder for et annet protein, slik som en antistoff konstant region eller en fleksibel linker. Betegnelsen "operabelt koblet" som anvendt i denne sammenheng skal bety at de to DNA fragmentene er forenet slik at aminosyresekvensene som kodet for av de to DNA fragmentene forblir i-ramme. Det isolerte DNA som koder for V_H regionen kan omdannes til et full-lengde tung kjede gen ved operativ kobling av det V_H -kodende DNA til et annet DNA molekyl som koder for tung kjede konstant regioner (CH1, CH2 og CH3). Sekvensen for human tung kjede konstant region gener er kjent innen teknikken (se f.eks. Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH publikasjon nr. 91-3242) og DNA fragmenter som omfatter disse regioner kan oppnås ved standard PCR amplifikasjon. Tung kjede konstant regionen kan være en IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM eller IgD konstant region, men er mest foretrukket en IgG1 eller IgG4 konstant region. For et Fab-fragment tung kjede gen, kan det V_H -kodende DNA være operativt koblet til et annet DNA molekyl som koder for kun tung kjede CH1 konstant regionen.

Det isolerte DNA som koder for V_L regionen kan omdannes til et full-kengde lett kjede gen (såvel som et Fab lett kjede gen) ved operativ kobling av det V_L -kodende DNA til et annet DNA molekyl som koder for lett kjede konstant regionen, CL. Sekvensene av human lett kjede region gener er kjent innen teknikken (se f.eks. Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH publikasjon nr. 91-3242) og DNA fragmenter som omfatter disse regioner kan oppnås ved standard PCR amplifikasjon. Lett kjede konstant

regionen kan være en kappa eller lambda konstant region, men er mest foretrukket en kappa konstant region.

For å danne et scFv gen, blir de V_H og V_L -kodende DNA fragmenter operativt koblet til et annet fragment som koder for en fleksibel linker, f.eks. som koder for aminosyresekvens $(Gly_4 - Ser)_3$, slik at V_H og V_L sekvensene kan uttrykkes som et tilgrensende enkeltkjedeprotein med V_L og V_H regionene forenet ved hjelp av den fleksible linker (se f.eks. Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., (1990) Nature 348:552-554).

Fremstilling av monoklonale antistoffer ifølge oppfinnelsen

Monoklonale antistoffer (mAb'er) ifølge oppfinnelsen kan fremstilles ved en rekke teknikker som inkluderer konvensjonell monoklonal antistoffmetodologi, f.eks. standard somatisk-cellehybridiseringsteknikken av Kohler og Milstein (1975) Nature 256: 495. Skjønt somatisk-celle hybridiseringsprosedyrer er foretrukne, kan prinsipielt andre teknikker for å fremstille monoklonalt antistoff anvendes, f.eks. viral eller onkogen transformasjon av B lymfocytter.

Det foretrukne animalske system for fremstilling av hybridomer er det murine system. Hybridomproduksjon i musen er en svært godt etablert prosedyre. Immuniseringsprotokoll-teknikker for isolering av immuniserte splenocytter for fusjon er kjent innen teknikken. Fusjonspartner (f.eks. murine myelomceller) og fusjonsprosedyrer er også kjente.

Kimære eller humaniserte antistoffer ifølge oppfinnelsen kan fremstilles på grunnlag av sekvensen av et murint monoklonalt antistoff fremstilt som beskrevet ovenfor. DNA som koder for tung og lett kjede immunoglobulinene kan oppnås fra det murine hybridom av interesse og moduleres til å inneholde ikke-murine (f.eks. humane) immunoglobulinsekvenser ved å anvende standard teknikker innen molekylær biologi. For å danne et kimært antistoff kan f.eks. de murine variable

regioner kobles til humane konstant regioner ved anvendelse av en metode som er kjent innen teknikken (se f.eks. U.S. Patent nr. 4 816 567 til Cabilly et al.). For å danne et humanisert antistoff kan de murine CDR regionene inserteres
 5 inn i en human ramme ved å anvende metoder som er kjent innen teknikken (se f.eks. U.S. Patent No. 5,225,539 til Winter, og U.S. Patent nr. 5 530 101; 5 585 089; 5 693 762 og 6 180 370 til Queen et al.).

10 I en foretrukket utførelsesform er antistoffene ifølge oppfinnelsen humane monoklonale antistoffer. Slike humane monoklonale antistoffer rettet mot PD-1 kan genereres ved å anvende transgene eller transkromosom-mus som bærer deler av det humane immunsystemet i stedet for musesystemet. Disse
 15 transgene og transkromosome musene inkluderer mus omtalt heri som henholdsvis HuMAb mus og KM mus, og omtales samlet heri som "humane Ig mus".

HuMAb musen (Medarex, Inc.) inneholder humane immunoglobulin-gen-miniloci som koder for urearrangerte human tung (μ og γ) og κ lett kjede immunoglobuliner sammen med målrettede mutasjoner som inaktiverer de endogene μ og κ kjede loci (se f.eks. Lonberg, et al. (1994) *Nature* 368(6474): 856-859). Følgelig utviser musene redusert ekspresjon av mus IgM eller
 25 κ , og som svar på immunisering gjennomgår de introduserte humane tung og lett kjede transgener klasse switching og somatisk mutasjon for å generere høyaffinitets humant IgG κ monoklonalt (Lonberg, N. et al. (1994), supra; gjennomgått i Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology*
 30 113:49-101; Lonberg, N. og Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, og Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546). Fremstillingen og anvendelse av HuMAb mus, og genomiske modifikasjoner gjennomført ved hjelp av slike mus er ytterligere beskrevet i Taylor, L.
 35 et al. (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. et al. (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuailon et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi et al. (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. et al. (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuailon et al. (1994) *J.*

Immunol. 152:2912-2920; Taylor, L. et al. (1994) International Immunology 6: 579-591; og Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851, hvis innhold heri er innlemmet spesifikt i sin helhet ved referanse. Videre vises
 5 det til U.S. patenter nr. 5 545 806; 5 569 825; 5 625 126; 5 633 425; 5 789 650; 5 877 397; 5 661 016; 5 814 318; 5 874 299; og 5 770 429; alle til Lonberg og Kay; U.S. patent nr. 5,545,807 til Surani et al.; PCT publikasjoner nr. WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884
 10 og WO 99/45962, alle til Lonberg og Kay; og PCT publikasjon WO 01/14424 til Korman et al.

I en annen utførelsesform kan humane antistoffer ifølge oppfinnelsen frembringes ved å anvende en mus som bærer humane
 15 immnoglulinsekvenser på transgener og transkromosomer, slik som en mus som bærer et humant tung kjede transgen og et human lett kjede transkromosom. Slike mus, omtalt heri, som "KM mus", er beskrevet detaljert i PCT publikasjon WO 02/43478 til Ishida et al.

20

Videre er alternative transgene animalske systemer som uttrykker humane immunoglobuliner tilgjengelige innen teknikken og kan anvendes for å frembringe anti-PD-1 antistoffer ifølge oppfinnelsen. Et alternativt transgenisk system omtalt som Xenomouse (Abgenix, Inc.) kan f.eks. anvendes, og
 25 slike mus er beskrevet i f.eks. U.S. patenter nr. 5,939,598; 6 075 181; 6 114 598; 6 150 584 og 6 162 963 til Kucherlapati et al.

30 Dessuten er alternative transkromosome animalske systemer som uttrykker humane immunoglobuliner tilgjengelig innen teknikken og kan anvendes å frembringe anti-PD-1 antistoffer ifølge oppfinnelsen. Mus som bære både et human tung kjede transkromosom og en humant lett kjede transkromosom, omtalt
 35 som "TC mus" kan avendes, og slike mus er beskrevet i Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727. Videre er kuer som bære human tung og lett kjede transkromosomer blitt beskrevet innen teknikken (Kuroiwa et al. (2002)

Nature Biotechnology 20:889-894) og kan anvendes og frembringe anti-PD-1 antistoffer ifølge oppfinnelsen.

Humane monoklonale antistoffer ifølge oppfinnelsen kan også fremstilles ved å anvende fag-display metoder for å screene biblioteker av humane immunoglobuliner. Slike fag-display metoder for å isolere humane antistoffer er etablert innen teknikken Se f.eks. U.S. patenter nr. 5,223,409; 5,403,484; og 5,571,698 til Ladner et al.; U.S. patenter nr. 5 427 908 og 5 580 717 til Dower et al.; U.S. patenter nr. 5 969 108 og 6 172 197 til McCafferty et al.; og U.S. patenter nr. 5 885 793; 6 521 404; 6 544 731; 6 555 313; 6 582 915 og 6 593 081 til Griffiths et al.

Humane monoklonale antistoffer ifølge oppfinnelsen kan også fremstilles ved å anvende SCID mus inn i hvilke humane immun-celler er blitt rekonstituert slik at en human antistoff-respons kan genereres ved immunisering. Slike mus er f.eks. beskrevet i U.S. patenter nr. 5 476 996 og 5 698 767 til Wilson et al.

Immunisering av humane Ig mus

Når humane Ig mus anvendes for å frembringe antistoffer ifølge oppfinnelsen kan slik mus immuniseres med et rensset eller anrikt preparat av PD-1 antigen og/eller rekombinant PD-1, eller et PD-1 fusjonsprotein, som beskrevet av Lonberg, N. et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851; og PCT publikasjoner WO 98/24884 og WO 01/14424. Musene vil foretrukket være 6-16 uker gamle ved den første infusjon. Et rensset rekombinant preparat (5-50 µg) av PD-1 antigen kan f.eks. anvendes for å immunisere de humane Ig musene intraperitonealt.

35

Detaljerte prosedyrer for å danne fullstendig monoklonale antistoffer mot PD-1 er beskrevet i eksempel 1 nedenfor. Kumulativ erfaring med forskjellige antigener har vist at de transgene mus responderer når de er initialt immunisert

intraperitonealt (IP) med antigen i Freunds komplette adjuvans, etterfulgt av IP immuniseringer hver annen uke (opp til totalt 6) med antigen i Freunds inkomplette adjuvans.

Adjuvanser andre enn Freunds er imidlertid også funnet til å
 5 være effektiv. I tillegg er hele celler i fravær av adjuvans funnet til å være svært immunogene. Immunresponsen kan måles i løpet av immuniseringsprotokollen med plasmaprøver som oppnås ved retroorbitale blodtappinger. Plasmaet kan
 10 screenes ved hjelp av ELISA (som beskrevet nedenfor), og mus med tilstrekkelige titere av anti-PD-1 humant immunoglobulin kan anvendes for funksjoner. Mus kan boostes intravenøst med antigen 3 dager før avliving og fjerning av milten. Det forventes av 2-3 fusjoner for hver immunisering kan måtte gjennomføres. Mellom 6 og 24 mus immuniseres typisk for hvert
 15 antigen. Vanligvis anvendes både HCo7 og HCo12 stammer. I tillegg kan både HCo7 og HCo12 transgenales sammen til en enkelt mus med to forskjellige human tungkjede transgener (HCo7/HCo12). Alternativt eller i tillegg kan KM musestammen anvendes som beskrevet i eksempel 1.

20

Generering av hybridomer som produserer humane monoklonale antistoffer ifølge oppfinnelsen

For å generere hybridomer som produserer humane monoklonale
 25 antistoffer ifølge oppfinnelsen, kan splenocytter og/eller lymfeknuteceller fra immuniserte mus isoleres og fusjoneres til en passende immortalisert cellelinje, slik som en musemyelom-cellelinje. De resulterende hybridomer kan screenes for fremstillingen av antigenspesifikke antistoffer. Enkelt-
 30 celle-suspensjoner av milt-lymfocytter fra immuniserte mus kan f.eks. fusjoneres til en sjattedels antall av P3X63-Ag8.653 ikke-utskillende musemyelomceller (ATCC, CRL 1580) med 50% PEG. Alternativt kan enkeltcelle-suspensjoner av milt-lymfocytter fra immuniserte mus fusjoneres ved anvend-
 35 else av en elektrisk felt-basert elektrofusjonsmetode ved anvendelse av en Cyto Pulse cellefusjonselektroporator med stort kammer (Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD). Celler utplates ved omtrent 2×10^5 på en flatbunnet mikrotiterplate etterfulgt av to ukers inkubasjon i et selektivt

medium inneholdende 20% føtalt Clone Serum, 18% "653" komdisjonerte medier, 5% origen (IGEN), 4 mM L-glutamin, 1 mM natriumpyruvat, 5mM HEPES, 0,055 mM 2-merkapttoetanol, 50 enheter/ml penicillin, 50 mg/ml streptomycin, 50 mg/ml gentamycin og 1X HAT (Sigma; HAT tilsettes 24 timer etter fusjonen). Etter omtrent to uker kan celler dyrkes i medium hvori HAT er erstattet med HT. Individuelle brønner kan deretter screenes ved hjelp av ELISA for humane monoklonale IgM og IgG antistoffer. Straks omfattende hybridomvekst forekommer, kan mediet observeres, vanligvis etter 10-14 dager. Antistoffet som utskiller hybridomer kan utplates igjen, screenes igjen og dersom det fremdeles er positivt for humant IgG, kan de monoklononale antistoffer subklones minst to ganger ved begrensende fortynning. De stabile subkloner kan deretter dyrkes in vitro for å generere små mengder antistoff i vevsdyrkingsmedium for karakterisering.

For å rense humane monoklonale antistoffer, kan valgte hybridomer dyrkes i to liters sentrifugeflasker for rensing av monoklonalt antistoff. Supernatanter kan filtreres og konsentreres før affinitetskromatografi med protein A-sefarose (Pharmacia, Piscataway, N.J.). Eluert IgG kan undersøkes ved gelelektroforese og høytytelsesvæskeskromatografi for å sikre renhet. Bufferopløsningen kan byttes til PBS, og konsentrasjonen kan bestemmes ved OD₂₈₀ ved anvendelse av 1,43 ekstinksjonskoeffisient. De monoklonale antistoffene kan deles i like deler og lagres ved -80°C.

Dannelse av transfektomaer som produserer monoklonale antistoffer ifølge oppfinnelsen

Antistoffer ifølge oppfinnelsen kan fremstilles i en vertscelle-transfektoma ved å anvende f.eks. en kombinasjon av rekombinante DNA teknikker og gentransfeksjonsmetoder som er vel kjent innen teknikken (f.eks. Morrison, S. (1985) Science 229:1202).

For å uttrykke antistoffene eller antistoff-fragmenter derav, kan f.eks. DNA'er som koder for delvis eller full-lengde

lette og tunge kjeder oppnås ved hjelp av standard teknikker innen molekylær biologi (f.eks. PCR amplifikasjon eller cDNA kloning ved anvendelse av et hybridom som uttrykker antistoffet av interesse) og DNA'ene kan inserteres inn i ekspresjonsvektorer slik at genene er operabelt koblet til transkripsjons- og translasjons-kontrollsekvenser. I denne sammenheng skal betegnelsen "operativ koblet" bety at et antistoffgen er ligert inn i en vektor slik at transkripsjons- og translasjons-kontrollsekvenser inne i vektoren tjener deres tilsiktede funksjon med regulering av transkripsjon og translasjon av antistoffgenet. Ekspresjonsvektoren og ekspresjonskontrollsekvensene er valgt til å være kompatible med den ekspresjons-vertscellen som anvendes. Antistoff lett kjede genet og antistoff tung kjede genet kan inserteres inn i separate vektorer eller mere typisk inserteres begge gener i den samme ekspresjonsvektor. Antistoffgenene inserteres inn i ekspresjonsvektoren ved hjelp av standard metoder (f.eks. ligering av komplementære restriksjonssteder på antistoff-genfragmentet og vektoren, eller buttende-ligering dersom ingen restriksjonssteder er tilstede). Lett og tung kjede variable regioner av antistoffene som beskrevet heri kan anvendes for å danne full-lengde antistoffgener av en hvilken som helst antistoff isotype ved å insertere dem inn i ekspresjonsvektorer som allerede koder for tung kjede konstant og lett kjede konstant regioner av den ønskede isotypen slik at V_H segmentet er operativt koblet til C_H segmentet/segmentene i vektoren og V_K segmentet er operativt koblet til C_L segmentet i vektoren. I tillegg eller alternativt kan den rekombinante ekspresjonsvektoren kode for et signalpeptid som forenkler sekresjon av antistoffkjeden fra en vertscelle. Antistoffkjede-genet kan klones inn i vektoren slik at signalpeptidet er koblet i-rammen til aminoterminusen av antistoffkjede-genet. Signalpeptidet kan være et immunoglobulin-signalpeptid eller et heterologt signalpeptid (dvs. et signalpeptid fra et ikke-immunoglobulinprotein).

I tillegg til antistoffkjede-genet, bærer de rekombinante ekspresjonsvektorene ifølge oppfinnelsen regulerende

sekvenser som kontrollerer ekspresjonen av antistoffkjedegenene i en vertscelle. Betegnelsen "regulerende sekvenser" skal inkludere promotere, enhancere og andre ekspresjonskontrollelementer (f.eks. polyadenyleringssignaler) som kontrollerer transkripsjonen eller translasjonen av antistoffkjedegenene. Slike regulerende sekvenser er beskrevet i f.eks. Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Det vil forstås av fagkyndige på området at design av ekspresjonsvektoren, som inkluderer valg av regulerende sekvenser, kan avhenge av slike faktorer som valget av vertscellen som transformeres, nivået av ønsket proteinekspresjon osv. Foretrukne regulerende sekvenser for pattedyr-vertscelleekspresjon inkluderer virale elementer som styrer høye nivåer av proteinekspresjon i pattedyrceller, slik som promotere og/eller enhancere avledet fra cytomegalovirus (CMV), Simian Virus 40 (SV40), adenovirus, (f.eks. "adenovirus major late promoter" (AdMLP)) og polyoma. Alternativt kan ikke-virale sekvenser anvendes, slik som ubikvitin-promoteren eller β -globinpromoteren.

Ytterligere regulerende elementer sammensatt av sekvenser fra forskjellige kilder, slik som SR α promotersystemet, som inneholder sekvenser fra SV40 tidlig promoterer og "long terminal repeat" av human T-celle levkemivirus type 1 (Takebe, Y. et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472).

25

I tillegg til antistoffkjedegenene og de regulerende sekvenser, kan de rekombinante ekspresjonsvektorene ifølge oppfinnelsen bære ytterligere sekvenser slik som sekvenser som regulerer replikasjon av vektoren i vertsceller (f.eks. replikasjonsorigi) og selekterbare markørgener. Det selekterbare markørgenet forenkler seleksjon av vertsceller inn i hvilke vektoren er blitt introdusert (se f.eks. U.S. pat. nr. 4 399 216, 4 634 665 og 5 179 017, alle ved Axel et al.). Det selekterbare markørgen gir f.eks. typisk resistens til legemidler, slik som G418, hygromycin eller metotreksat, på en vertscelle inn i hvilken vektoren er blitt introdusert. Foretrukne selekterbare markørgener inkluderer dihydrofolatreduktase (DHFR) genet (for anvendelse i dhfr-vertsceller med

metotrekstaseleksjon/amplifikasjon) og neo-genet (for G418 seleksjon).

For ekspresjon av de lette og tunge kjeder blir ekspresjons-
 5 vektoren/vektorene som koder for de lette og tunge kjeder
 transfektert inn i en vertscelle ved hjelp av standard
 teknikker. De forskjellige former av betegnelsen
 "transfeksjon" skal omfatte en rekke teknikker som er vanlig
 anvendt for introduksjon av eksogent DNA inn i en prokaryo-
 10 tisk eller eukaryotisk vertscelle, f.eks. elektroporering,
 kalsium-fosfat-presipitering, DEAE-dekstran transfeksjon og
 lignende. Skjønt det er teoretisk mulig å uttrykke anti-
 stoffene ifølge oppfinnelsen i enten prokaryotiske eller
 eukaryotiske vertsceller, er ekspresjon av antistoffer i
 15 eukaryotiske celler, mest foretrukket pattedyr-vertsceller,
 mest foretrukket fordi slike eukaryotiske celler og særlig
 pattedyrceller er mere tilbøyelig enn prokaryotiske celler
 til å samle seg og utskille et korrekt foldet og immunologisk
 aktivt antistoff. Prokaryotisk ekspresjon av antistoffgener
 20 er blitt rapportert til å være ineffektiv for produksjon av
 høye utbytter av aktivt antistoff (Boss, M. A. og Wood, C. R.
 (1985) *Immunology Today* 6:12-13).

Foretrukne pattedyr-vertsceller for ekspresjon av de rekom-
 25 binante antistoffene ifølge oppfinnelsen inkluderer "Chinese
 Hamster Ovary" (CHO celler) (som inkluderer dhfr-CHO celler,
 beskrevet i Urlaub og Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci.*
USA 77:4216-4220, anvendt med en DHFR selekterbar markør,
 f.eks. beskrevet i R. J. Kaufman og P. A. Sharp (1982) *Mol.*
 30 *Biol.* 159:601-621), NSO myelomceller, COS celler og SP2
 celler. Særlig for anvendelse med NSO myelomceller, er et
 annet foretrukket ekspresjonssystem GS genekspresjonssystemet
 omtalt i WO 87/04462, WO 89/01036 og EP 338,841. Når rekom-
 binante ekspresjonsvektorer som koder for antistoffgener inn-
 35 føres i pattedyr-vertsceller, produseres antistoffene ved å
 dyrke vertscellene i en tidsperiode som er tilstrekkelig til
 å tillate ekspresjon av antistoffet i vertscellen eller mere
 foretrukket sekresjon av antistoffet inn i dyrkingsmediet

hvori vertscellene dyrkes. Antistoffene kan utvinnes fra dyrkingsmediet ved å anvende standard proteinrensemetoder.

Karakterisering av antistoffbinding til antigen

5

Antistoffer ifølge oppfinnelsen kan testes for binding til PD-1 ved f.eks. standard ELISA. Kort blir mikrotiterplater belagt med renset PD-1 ved 0,25 µg/ml i PBS og deretter blokkert med 5% bovint serumalbumin i PBS. Fortynninger av antistoff (f.eks. fortynning av plasma fra PD-1-immuniserte mus) tilsettes til hver brønn og inkuberes i 1-2 timer ved 37°C. Platene vaskes med PBS/Tween og inkuberes deretter med et annet reagens (f.eks. for humane antistoffer, et geit-anti-humant IgG Fc-spesifikt polyklonalt reagens) konjugert til alkalisk fosfatase i 1 time ved 37°C. Etter vasking utvikles platene med pNPP substrat (1mg/ml) og analyseres ved OD 405-650. Mus som utvikler de høyeste titere vil foretrukket anvendes for fusjoner.

20 En ELISA analyse som beskrevet over kan også anvendes for å screene for hybridomer som viser positiv reaktivitet med PD-1 immunogen. Hybridomer som binder med høy aviditet til PD-1 subklones og karakteriseres ytterligere. Ett klon fra hvert hybridom, som bibeholder reaktiviteten til modercellene (ved ELISA), kan velges for å danne en 5-10 rørs cellebank lagret ved -140°C, og for antistoffrensing.

For å rense anti-PD-1 antistoffer, kan valgte hybridomer dyrkes i to-liters sentrifugeflasker for rensing av monoklonalt antistoff. Supernatanter kan filtreres og konsentreres før affinitetskromatografi med protein A-sefaroze (Pharmacia, Piscataway, NJ). Eluert IgG kan undersøkes ved gelelektroforese og høytytelsesvæskeskromatografi for å sikre renhet. Bufferopløsningen kan byttes til PBS, og konsentrasjonen kan bestemmes ved OD₂₈₀ ved anvendelse av 1,43 ekstinksjonskoeffisient. De monoklonale antistoffene kan deles i like deler og lagres ved -80°C.

For å bestemme om de selekterte anti-PD-1 monoklonale antistoffer binder til unike epitoper, kan hvert antistoff biotinyleres ved å anvende kommersielt tilgjengelige reagenser (Pierce, Rockford, IL). Konkurransetestudier ved å anvende

5 umerkede monoklonale antistoffer og biotinylerte monoklonale antistoffer kan gjennomføres ved å anvende PD-1 belagte ELISA plater som beskrevet over. Biotinylert mAb binding kan detekteres ved en strep-avidin-alkalisk fosfatase probe.

- 10 For å bestemme isotypen av rensing av antistoffer, kan isotype ELISA gjennomføres ved å anvende reagenser som er spesifikke for antistoffer av en spesiell isotype. For å bestemme isotypen av et humant monoklonalt antistoff kan f.eks. brønner i mikrotiterplater belegges med 1 µg/ml anti-humant
- 15 immunoglobulin over natten ved 4°C. Etter blokkering med 1% BSA, reageres platen med 1 µg/ml eller mindre av monoklonale testantistoffer eller rensede isotypekontroller ved omgivelsestemperatur i en til to timer. Brønnene kan deretter reageres med enten humane IgG eller humane IgM-spesifikke alkalisk fosfatase-konjugerte prober. Plater utvikles
- 20 og analyseres som beskrevet over.

- Anti-PD-1 humane IgG'er kan videre testes for reaktivitet med PD-1 antigen ved hjelp av Western blotting. Kort kan PD-
- 25 1 fremstilles og underkastes natriumdodecylsulfat-polyakrylamidgelelektroforese. Etter elektroforese overføres de separerte antigenene til nitrocellulosemembraner, blokkeres med 10% føtalt kalveserum og probes med de monoklonale antistoffene som skal testes. Human IgG binding kan detekteres
- 30 ved å anvende anti-human IgG alkalisk fosfatase og utvikles med BCIP/NBT substrattabletter (Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.).

Immunokonjugater

35

I et annet aspekt vedrører oppfinnelsen et anti-PD-1 antistoff, eller et fragment derav, konjugert til en terapeutisk enhet, slik som et cytotoxin, et legemiddel (f.eks. et immunsuppresjonsmiddel) eller et radiotoksin. Slike konju-

gater er omtalt heri som "immunokonjugater". Immunokonjugater som inkluderer en eller flere cytotoxiner er omtalt som "immunotoxiner". Et cytotoxin eller cytotoxisk middel inkluderer et hvilket som helst middel som er skadelig for

5 (f.eks. dreper) celler. Eksempler inkluderer taksol, cytochalasin B, gramicidin D, etidiumbromid, emetin, mitomycin, etoposid, tenoposid, vinkristin, vinblastin, kolkisin, doksorubicin, daunorubicin, dihydroksyantracindion, mitoksantron, mitramycin, aktinomycin D, 1-dehydrotosterone,

10 tosterone, glukokortikoider, prokain, tetrakain, lidokain, propranolol og puromycin og analoger eller homologer derav. Terapeutiske midler inkluderer også f.eks. antimetabolitter (f.eks. metotraksat, 6-merkaptopurin, 6-tioguanin, cytarabin, 5-fluoruracildekarbazin), alkyliseringsmidler (f.eks.

15 mekloretoamin, tioepakloambucil, melfalan, karmustin (BSNU) og lomustin (CCNU), cyklofosfamid, busulfan, dibromomannitol, streptozotocin, mitomycin C, og cis-diklordiamin platina (II) (DDP) cisplatin, antracykliner (f.eks. daunorubicin (tidligere daunomycin) og doksorubicin), antibiotika (f.eks.

20 daktinomycin (tidligere aktinomycin), bleomycin, mitramycin og antramycin (AMC)), og anti-mitotiske midler (f.eks. vinkristin og vinblastin).

Andre foretrukne eksempler på terapeutiske cytotoxiner som

25 kan være konjugert til et antistoff ifølge oppfinnelsen inkluderer duokarmycin, calicheamiciner, maytansiner og auristatiner, og derivater derav. Et eksempel på et calicheamicin-antistoffkonjugat som er kommersielt tilgjengelig er (Mylotarg; Wyeth-Ayerst).

30

Cytotoxiner kan konjugeres til antistoffer ifølge oppfinnelsen ved å anvende linkerteknologi som er tilgjengelig innen teknikken. Eksempler på linkertyper som er blitt anvendt for å konjugere et cytotoxin til et antistoff inkluderer,

35 derer, men er ikke begrenset, hydrazoner, tioetere, estere, disulfider og peptid-inneholdende linkere. En linker kan velges som f.eks. er tilbøyelig til å spalte ved lav pH innen den lysosomale kompartment eller som er tilbøyelig til å spalte ved hjelp av proteaser, slik som proteaser som

foretrukket uttrykkes i tumorvev slik som cathepsiner (f.eks. cathepsiner B, C, D).

For ytterligere omtale av typer av cytotoxiner, linkere og metoder for å konjugere terapeutiske midler til antistoffer, se også Saito, G. et al. (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail, P.A. et al. (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. og Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter, P.D. og Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264.

Antistoffer ifølge oppfinnelsen kan også konjugeres til en radioaktiv isotop og generere cytotoxiske radiofarmasøytika, også omtalt som radioimmunokonjugater. Eksempler på radioaktive isotoper som kan konjugeres til antistoffer for diagnostisk eller terapeutisk anvendelse inkluderer, men er ikke begrenset til, jod¹³¹, indium¹¹¹, yttrium⁹⁰ og lutetium¹⁷⁷. Fremgangsmåte for fremstilling av radioimmunokonjugater er etablert innen teknikken. Eksempler på radioimmunokonjugater som er kommersielt tilgjengelige inkluderer Zevalin (IDEC Pharmaceuticals) og Bexxar (Corixa Pharmaceuticals), og tilsvarende metoder kan anvendes for å fremstille radioimmunokonjugater ved å anvende antistoffene ifølge oppfinnelsen.

Antistoffkonjugatene ifølge oppfinnelsen kan anvendes for å modifisere en gitt biologisk respons, og legemiddelenheten skal ikke tolkes som begrenset til klassiske kjemiske terapeutiske midler. Legemiddelenheten kan f.eks. være et protein eller polypeptid som har en ønsket biologisk aktivitet. Slike proteiner kan f.eks. inkludere et enzymatisk aktivt toksin, eller aktivt fragment derav, slik som abrin, ricin A, pseudomonas eksotoxin eller diphteria toksin; et protein slik som tumornekrosefaktor eller interferon- γ ; eller biologisk respons modifikatorer slik som f.eks. lymfokiner, interleukin-1 ("IL-1"), interleukin-2 ("IL-2"), interleukin-6 ("IL-6"), granulocyt makrofag kolonistimulerende faktor

("GM-CSF"), granulocytisk kolonistimulerende faktor ("G-CSF") eller andre vekstfaktorer.

Teknikker for å konjugere slik terapeutisk enhet til anti-
 5 stoffer er vel kjent, se f.eks. Arnon et al., "Monoclonal
 Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy",
 i Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al.
 (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et
 al., "Antibodies For Drug Delivery", i Controlled Drug
 10 Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53
 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of
 Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", i Monoclonal
 Antibodies '84: Biological And Clinical Applications,
 Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis,
 15 Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of
 Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", i Monoclonal
 Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al.
 (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), og Thorpe et al.,
 "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin
 20 Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-58 (1982).

Bispesifikke molekyler

I et annet aspekt vedrører den foreliggende oppfinnelse
 25 bispesifikke molekyler som omfatter et anti-PD-1 antistoff,
 eller et fragment derav, ifølge oppfinnelsen. Et antistoff
 ifølge oppfinnelsen eller antigen-bindende deler derav, kan
 derivatiseres eller kobles til et annet funksjonelt molekyll,
 f.eks. annet peptid eller protein (f.eks. annet antistoff
 30 eller ligand for en reseptor) for å generere et bispesifikt
 molekyll som binder til minst to forskjellige bindingssteder
 eller targemolekyler. Antistoffet ifølge oppfinnelsen kan
 faktisk derivatiseres eller kobles til mere enn ett annet
 funksjonelt molekyll for å generere multispesifikke molekyler
 35 som binder til mere enn to forskjellige bindingssteder og/-
 eller targetmolekyler, idet slike multispesifikke molekyler
 også skal være omfattet av betegnelsen "bispesifikt molekyll"
 som anvendt heri. For å danne et bispesifikt molekyll ifølge
 oppfinnelsen, kan et antistoff ifølge oppfinnelsen kobles

funksjonelt (f.eks. ved kjemisk kobling, genetisk fusjon, ikke-kovalent assosiering eller annet) til ett eller flere andre bindingsmolekyler, slik som et annet antistoff, antistoff-fragment, et peptid eller bindings-mimetika, slik
 5 at det oppnås et bispesifikt molekyl.

Følgelig inkluderer den foreliggende oppfinnelse bispesifikke molekyler som omfatter minst en første bindingsspesifisitet for PD-1 og en andre bindingsspesifisitet for en andre
 10 target-epitop. I en særlig utførelsesform av oppfinnelsen er den andre targetepitop en Fc reseptor, f.eks. human FcγRI (CD64) eller en human Fcα reseptor (CD89). Derfor inkluderer oppfinnelsen bispesifikke molekyler i stand til å binde både til FcγR eller FcαR uttrykkende effektorceller (f.eks. mono-
 15 cytter, makrofager eller polymorfonukleære celler (PMN'er)), og til målceller som uttrykker PD-1. Disse bispesifikke molekyler targeterer PD-1 uttrykkende celler til effektorceller og trigger Fc reseptor-mediert effektorcelleaktiviteter, slik som fagocytose av PD-1 uttrykkende celler,
 20 antistoffavhengig celle-mediert cytotoxiskitet (ADCC), cytokinfrigivelse eller dannelselse av superoksydanion.

I en utførelsesform av oppfinnelsen hvori det bispesifikke molekyl er multispesifikt, kan molekylet videre inkludere en
 25 tredje bindingsspesifisitet, i tillegg til en anti-Fc bindingsspesifisitet og en anti-PD-1 bindingsspesifisitet. I en utførelsesform er den tredje bindingsspesifisitet en "anti-enhancement factor" (EF) del, f.eks. et molekyl som binder til et overflateprotein involvert i cytotoxisk aktivitet og
 30 som derved øker immunresponsen mot targetcellen. "Antienhancement factor" delen kan være et antistoff, funksjonelt antistoff fragment eller en ligand som binder til en gitt molekyl, f.eks. et antigen eller en reseptor, og resulterer derved i en økning av effekten av bindingsdeterminantene for
 35 Fc reseptoren eller targetcelleantigenet. "Anti-enhancement factor" delen kan binde en Fc reseptor eller targetcelleantigen. Alternativt kan "anti-enhancement factor" delen binde til en entitet som er forskjellig fra entiteten hvortil de første og andre bindingsspesifisiteter binder. "Anti-

enhancement factor" delen kan f.eks. binde en cytotoksisk T-cell (f.eks. via CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 eller annen immuncelle som resulterer i en økt immunrespons mot targetcellen).

5

I en utførelsesform omfatter de bispesifikke molekyler ifølge oppfinnelsen, som en bindingsspesifisitet, minst ett anti-stoff eller et antistoff fragment derav som inkluderer f.eks. et Fab, Fab', F(ab')₂, Fv eller et enkeltkjede Fv. Anti-
 10 stoffet kan også være en lett kjede eller tung kjede dimer, eller et hvilket som helst minimalt fragment derav slik som et Fv eller enkeltkjede-konstrukt som beskrevet i Ladner et al. U.S. patent nr. 4 946 778, hvis innhold er innlemmet heri ved referanse.

15

I en utførelsesform er bindingsspesifisiteten for en Fcγ reseptor tilveiebrakt ved hjelp av et monoklonalt antistoff, idet bindingen derav ikke er blokkert ved humant immunoglobulin G (IgG). Som anvendt heri refererer betegnelsen "IgG
 20 reseptor" til hvilke som helst av de åtte γ-kjede genene lokalisert på kromosom 1. Disse gener koder for totalt tolv transmembran eller oppløselig reseptor isoformer som er gruppert i tre Fcγ reseptorklasser: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) og FcγRIII (CD16). I en foretrukket utførelsesform er Fcγ
 25 reseptoren en human høyaffinitet FcγRI. Den humane FcγRI er et 72 kDa molekyll, som viser høy affinitet for monomerisk IgG ($10^8 - 10^9 \text{ M}^{-1}$).

Produksjon og karakterisering av bestemte foretrukne anti-Fcγ monoklonale antistoffer er beskrevet av Fanger et al. i PCT publikasjon WO 88/00052 og i U.S. patent nr. 4 954 617, hvis lære er innlemmet heri ved referanse. Disse antistoffer binder til en epitop av FcγRI, FcγRII eller FcγRIII i et sete som er fjernt fra Fcγ bindingssetet av reseptoren og deres
 35 binding er således ikke vesentlig blokkert ved fysiologiske nivåer av IgG. Spesifikke anti-FcγRI antistoffer som er anvendbare i denne oppfinnelse er mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 og mAb 197. Hybridomet som produserer mAb 32 er tilgjengelig fra the American Type Culture Collection, ATCC

deponeringsnr. HB9469. I andre utførelsesformer er anti-Fc γ reseptor antistoffet en humanisert form av monoklonalt antibody 22 (H22). Produksjon og karakterisering av H22 antistoffet er beskrevet i Graziano, R.F. et al. (1995) J. Immunol 155 (10): 4996-5002 og PCT publikasjon WO 94/10332. Den H22 antistoffproduserende cellelinjen ble deponert ved the American Type Culture Collection under betegnelsen HA022CL1 og har deponeringsnr. CRL 11177.

- 10 I andre ytterligere foretrukne utførelsesformer er bindings-spesifisiteten for en Fc reseptor tilveiebrakt ved et anti-stoff som binder til en human IgA reseptor, f.eks. en Fc-alfa reseptor (Fc α RI (CD89)), idet bindingen derav foretrukket ikke blokkeres ved humant immunoglobulin A (IgA). Betegnelsen
- 15 "IgA receptor" skal inkludere genproduktet av ett α -gen (Fc α RI) lokalisert på kromosom 19. Dette gen er kjent til å kode for flere alternativt spleisede transmembran isoformer av 55 til 110 kDa. Fc α RI (CD89) uttrykkes konstitutivt på monocytter/ makrofager, eosinofile og nøytrofile granulo-
- 20 cytter, men ikke på ikke-effektorcellepopulasjoner. Fc α RI har medium affinitet ($\approx 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) for både IgA1 og IgA2, som økes ved eksponering for cytokiner slik som G-CSF eller GM-CSF (Morton, H.C. et al. (1996) Critical Reviews in Immunology 16:423-440). Fire Fc α RI-spesifikke monoklonale
- 25 antistoffer, identifisert som A3, A59, A62 og A77, som binder Fc α RI utenfor IgA ligand bindingsdomenet, er blitt beskrevet (Monteiro, R.C. et al. (1992) J. Immunol. 148:1764).

- Fc α RI og Fc γ RI er foretrukne trigger-reseptorer for anvend-
- 30 else i de bispesifikke molekylerne ifølge oppfinnelsen fordi de er (1) uttrykt primært på immun-effektorceller, f.eks. monocytter, PMN'er, makrofager og dendrittiske celler; (2) uttrykkes ved høye nivåer (f.eks. 5 000-100 000 per celle); (3) mediatorer av cytotoxiske aktiviteter (f.eks. ADCC, fagocytose); (4) medierer økt antigenpresentasjon av anti-
- 35 gener, inkluderende selv-antigener, targetert mot dem.

Mens humane monoklonale antistoffer er foretrukne, er andre antistoffer som kan anvendes i de bispesifikke molekylerne

ifølge oppfinnelsen murine, kimære og humaniserte monoklonale antistoffer.

De bispesifikke molekylerne ifølge oppfinnelsen kan fremstilles ved konjugering av de konstitutive bindingsspesifisiteter, f.eks. anti-FcR og anti-PD-1 bindingsspesifisitetene, ved anvendelse av metoder som er kjent innen teknikken. Hver bindingsspesifisitet av det bispesifikke molekyl kan f.eks. genereres separat og deretter konjugeres til hverandre. Når bindingsspesifisiteter er proteiner eller peptider, kan en rekke koplingsmidler eller kryssbindingsmidler anvendes for kovalent konjugering. Eksempler på kryssbindingsmidler inkluderer protein A, karbodiimid, N-succinimidyl-S-acetyltioacetat (SATA), 5, 5'-ditiobis(2-nitrobenzosyre) (DTNB), o-fenylendimaleimid (oPDM), N-succinimidyl-3-(2-pyridylditio)propionat (SPDP) og sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidometyl)-cykloheksan-1-karboksylat (sulfo-SMCC) (se f.eks. Karpovsky et al. (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648). Andre metoder inkluderer dem som er beskrevet i Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan et al. (1985) Science 229:81-83), and Glennie et al. (1987) J. Immunol. 139: 2367-2375). Foretrukne konjugeringsmidler er SATA og sulfo-SMCC, begge tilgjengelig fra Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Når bindingsspesifisitetene er antistoffer, kan de konjugeres via sulfhydryl-binding av C-terminus hengselregionene av de to tunge kjedene. I en spesielt foretrukket utførelsesform er hengselregionen modifisert til å inneholde et ulike antall sulfhydryl-rester, foretrukket en, før konjugering.

Alternativt kan begge bindingsspesifisiteter kodes i den samme vektor og uttrykkes og samles i den samme vertscellen. Denne metoden er særlig anvendbar der hvor de bispesifikke molekylet er et mAb x mAb x mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ eller ligand x Fab fusjonsprotein. Et bispesifikt molekyl ifølge oppfinnelsen kan være et enkeltkjedemolekyl omfattende ett enkeltkjedeantistoff eller en bindingsdeterminant, eller et enkeltkjede-bispesifikt molekyl omfattende to bindingsdeter-

minanter. Bispesifikke molekyler kan omfatte minst to enkelkjede-molekyler. Metoder for å fremstille bispesifikke molekyler er f.eks. beskrevet i U.S. patent nr. 5 260 203; U.S. patent nr. 5 455 030; U.S. patent nr. 4 881 175; U.S. patent nr. 5 132 405; U.S. patent nr. 5 091 513; U.S. patent nr. 5 476 786; U.S. patent nr. 5 013 653; U.S. patent nr. 5 258 498; og U.S. patent nr. 5 482 858.

Binding av de bispesifikke molekyler til deres spesifikke targeter kan bekreftes ved f.eks. "enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA), radioimmunoassay (RIA), FACS analyse, bioassay (f.eks. vekstinhibering), eller Western Blot analyse. Hver av disse analyser detekterer generelt tilstedeværelsen av protein-antistoff komplekser av spesiell interesse ved anvendelse av et merket reagens (f.eks. et antistoff) som er spesifikt for komplekset av interesse. FcR-antistoffkompleksene kan f.eks. detekteres ved å anvende f.eks. et enzym-koblet antistoff eller antistoff-fragment som gjenkjenner og som spesifikt binder til antistoff-FcR kompleksene. Alternativt kan kompleksene detekteres ved å anvende en rekke andre immunoassayer. Antistoffet kan f.eks. merkes radioaktivt og anvendes i en radioimmunoassay (RIA) (se f.eks. Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986, som er innlemmet ved referanse heri). Den radioaktive isotopen kan detekteres ved hjelp av slike midler som ved bruk av en γ teller eller en scintillasjonsteller eller ved autoradiografi.

30 **Farmasøytiske sammensetninger**

I et annet aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse en sammensetning, f.eks. en farmasøytisk sammensetning, som inneholder ett eller en kombinasjon av monoklonale antistoffer, eller en eller flere antigen-bindende deler derav, ifølge oppfinnelsen, som er formulert sammen med en farmasøytisk akseptert bærer. Slike sammensetninger kan inkludere ett eller en kombinasjon av (f.eks. to eller flere forskjellige) antistoffer, eller immunokonjugater eller

bispesifikke molekyler ifølge oppfinnelsen. En farmasøytisk sammensetning ifølge oppfinnelsen kan f.eks. omfatte en kombinasjon av antistoffer (eller immunokonjugater eller bispesifikke) molekyler som binder til forskjellige epitoper på targetantigenet eller som har komplementære aktiviteter.

Farmasøytiske sammensetninger ifølge oppfinnelsen kan også administreres i kombinasjonsterapi, dvs. kombinert med andre midler. Kombinasjonsterapien kan f.eks. inkludere et anti-PD-1 antistoff ifølge oppfinnelsen kombinert med minst ett annet anti-inflammatorisk eller immunsupprimerende middel. Eksempler på terapeutiske midler som kan anvendes i kombinasjonsterapi er beskrevet mere detaljert nedenfor i avsnittet som vedrører bruk av antistoffene ifølge oppfinnelsen.

Som anvendt heri inkluderer "farmasøytisk aksepterbær bærer" hvilket som helst og alle løsningsmidler, dispersjonsmedier, belegg, antibakterielle midler og antisoppmidler, isotoniske midler og midler for utsatt absorpsjon og lignende som er fysiologisk kompatible. Bæreren er foretrukket egnet for intravenøs, intramuskulær, subkutan, parenteral, spinal eller epidermal administrering (f.eks. ved injeksjon eller infusjon). Avhengig av administreringsruten, kan den aktive forbindelsen, dvs. antistoff, immunokonjugat eller bispesifikt molekyl, være kledd i et material for å beskytte forbindelsen fra virkningen av syrer og andre naturlige forhold som kan inaktivere forbindelsen.

De farmasøytiske forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan inkludere ett eller flere farmasøytiske aksepterbare salter. Et "farmasøytisk aksepterbart salt" refererer til et salt som bibeholder den ønskede biologiske aktiviteten til moderforbindelsen og som ikke gir noen uønskede toksikologiske effekter (se f.eks. Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19). Eksempler på slike salter inkluderer syreaddisjonssalter og baseaddisjonssalter. Syreaddisjonssalter inkluderer dem avledet fra ikke-toksiske uorganiske syrer, slik som saltsyre, salpetersyre, fosforsyre, svovelsyre,

hydrobromsyre, hydrojodsyre, fosforsyrning og lignende, så vel som fra ikke-toksiske organiske syrer slik som alifatiske mono- og dikarboksylysyrer, fenyl-substituerte alkansyrer, hydroksey-alkansyre, aromatiske syrer, alifatiske og aromatiske sulfonsyrer og lignende. Baseaddisjonssalter inkluderer dem avledet fra jordalkalimetaller slik som natrium, kalium, magnesium, kalsium og lignende, så vel som fra ikke-toksiske organiske aminer slik som N, N'-dibenzyletylendiamin, N-metylglukamin, klorprokain, cholin, dietanolamin, etylendiamin, prokain og lignende.

En farmasøytisk sammensetning ifølge oppfinnelsen kan også inkludere en farmasøytisk akseptert anti-oksidant. Eksempler på farmasøytisk akseptert anti-oksidanter inkluderer: (1) vannoppløselige antioksidanter, slik som askorbinsyre, cysteinhydroklorid, natriumbisulfat, natriummetabisulfitt, natriumsulfitt og lignende; (2) oljeoppløselige antioksidanter, slik som askorbylpalmitat, butylert hydroksyanisol (BHA), butylert hydroksytoluen (BHT), lecitin, propylgallat, alfa-tokoferol og lignende; og (3) metall-chelatdannede midler, slik som sitronsyre, etylendiamintetradiksyre (EDTA), sorbitol, vinsyre, fosforsyre og lignende.

Eksempler på passende vandige og ikke-vandige bærere som kan anvendes i de farmasøytiske sammensetninger ifølge oppfinnelsen inkluderer vann, etanol, polyoler (slik som glyserol, propylenglykol, polyetylen glykol og lignende) og passende blandinger derav, vegetabiliske oljer, slik som olivenolje, og injiserbare organiske estere, slik som etyloleat. Passende fluiditet kan f.eks. opprettholdes ved bruk av belegningsmaterialer slik som lecitin, ved opprettholdelse av den påkrevde partikkelstørrelsen i tilfellet av dispersjoner, og ved bruk av surfaktanter.

Disse sammensetninger kan også inneholde adjuvanter slik som konserveringsmidler, fuktemidler, emulgeringsmidler og dispergeringsmidler. Forebygging av tilstedeværelse av mikroorganismer kan sikres både ved steriliseringsprosedyrer, supra, og ved inklusjon av forskjellige antibakterielle

midler og antisopp-midler, f.eks. paraben, klorbutanol, fenol-sorbinsyre og lignende. Det kan også være ønskelig å inkludere isotoniske midler, slik som sukkere, natriumklorid og lignende i sammensetningene. I tillegg kan forlenget
 5 absorpsjon av den injiserbare farmasøytiske form frembringes ved inkludering av midler som utsetter absorpsjon slik som aluminiummonostearat og gelatin.

Farmasøytiske aksepterbare bærere inkluderer sterile vandige
 10 oppløsninger eller dispersjoner og sterile pulvere for den ektemporære fremstilling av sterile injiserbare oppløsninger eller dispersjoner. Bruk av slike medier og midler for farmasøytisk aktive substanser er kjent innen teknikken. Unntatt i den grad eventuelle konvensjonelle medier eller midler
 15 er inkompatible med den aktive forbindelsen, er bruk derav i de farmasøytiske sammensetninger ifølge oppfinnelsen omfattet. Ytterligere aktive forbindelser kan også være innlemmet i sammensetningene.

20 Terapeutiske sammensetninger må typisk være sterile og stabile under betingelsene med produksjon og lagring. Sammensetningen kan formuleres som en oppløsning, mikroemulsjon, liposom eller annen ordnet struktur som er egnet for høy legemiddelkonsentrasjon. Bæreren kan være et
 25 løsningsmiddel eller dispersjonsmedium inneholdende f.eks. vann, etanol, polyol (f.eks. glyserol, propylenglykol og flytende polyetylglykol, og lignende), og passende blandinger derav. Den korrekte fluiditet kan f.eks. opprettholdes ved bruk av et belegg slik som lecitin, ved opprettholdelse
 30 av ønsket partikkelstørrelse i tilfellet av dispersjon og ved bruk av surfaktanter. I mange tilfeller vil det være foretrukket å inkludere isotoniske midler, f.eks. sukkere, polyalkoholer slik som mannitol, sorbitol eller natriumklorid i sammensetningen. Forlenget absorpsjon av de injiserbare
 35 sammensetninger kan frembringes ved å inkludere, i sammensetningen, et middel som utsetter absorpsjon, f.eks. monostearatsalter og gelatin.

Sterile injiserbare oppløsninger kan fremstilles ved å innlemme den aktive forbindelsen i den ønskede mengden i et passende løsningsmiddel med en eller en kombinasjon av bestanddeler som er nevnt ovenfor, som passende, etterfulgt av steriliserings-mikrofiltrering. Generelt fremstilles dispersjoner å innlemme den aktive forbindelsen i en steril vehikkel som inneholder et basisdispersjonsmedium og de nødvendige andre bestanddeler fra dem som er nevnt ovenfor. I tilfellet av sterile pulvere for fremstillingen av sterile injiserbare oppløsninger, er de foretrukne fremstillingsmetoder vakuumbørking og frysetørking som gir et pulver av den aktive bestanddel pluss en hvilken som helst ytterligere ønsket bestanddel fra en på forhånd sterilfiltrert oppløsning derav.

Mengden av aktiv bestanddel som kan kombineres med et bærer-material for å fremstille en enkelt-doseringsform vil variere avhengig av det individ som behandles og særlig administreringsmåten. Mengden av aktiv bestanddel som kan kombineres med et bærermaterial for å fremstille en enkelt-doseringsform vil generelt være den mengden av sammensetningen som gir en terapeutisk effekt. Generelt, ut av ett hundre prosent, vil denne mengden strekke seg fra omtrent 0,01 prosent til omtrent nittini prosent av aktiv bestanddel, foretrukket fra omtrent 0,1 prosent til omtrent 70 prosent, mest foretrukket fra omtrent 1 prosent til omtrent 30 prosent av aktiv bestanddel i kombinasjon med en farmasøytisk akseptbar bærer. Doseringsregimer innstilles for å tilveiebringe den optimale ønskede respons (f.eks. en terapeutisk respons). En enkelt bolus kan f.eks. administreres, flere oppdelte doser kan administreres over tid eller dosen kan reduseres eller økes proporsjonalt som indikert ved alvorligheten av den terapeutiske situasjon. Det er særlig fordelaktig å formulere parenterale sammensetninger i doserings-enhetsformer for enkel administrering og for homogen dosering. Doserings-enhetsformer som anvendt heri refererer til fysisk adskilte enheter passende som enhetsdoseringer for individer som skal behandles, idet hver enhet inneholder en forhåndsbestemt mengde av aktiv forbindelse som er beregnet til å produsere

den ønskede terapeutiske effekten i assosiasjon med den påkrevde farmasøytiske bærer. Spesifiseringen av doseringsenhetsformene ifølge oppfinnelsen er diktert ved og direkte avhengig av (a) de unike egenskapene til den aktive bestanddel og den spesielle terapeutiske effekten som skal oppnås, og (b) begrensningene som man finner innen området med å sette sammen en slik aktiv forbindelse for behandling av sensitivitet i individer.

- 10 For administrering av antistoffet varierer doseringene fra omtrent 0,0001 til 100 mg/kg, og mere vanligvis fra 0,01 til 5 mg/kg av vertens kroppsvekt. Doseringer kan f.eks. være 0,3 mg/kg kroppsvekt, 1 mg/kg kroppsvekt, 3 mg/kg kroppsvekt, 5 mg/kg kroppsvekt eller 10 mg/kg kroppsvekt eller innen
- 15 området 1-10 mg/kg. Et eksempel på et behandlingsregime omfatter administrering en gang per uke, en gang hver annen uke, en gang hver tredje uke, en gang hver fjerde uke, en gang i måneden, en gang hver 3 måned, en gang hver tredje til 6 måned. Foretrukne doseringskurer for et anti-PD-1 anti-
- 20 stoff ifølge oppfinnelsen inkluderer 1 mg/kg kroppsvekt eller 3 mg/kg kroppsvekt via intravenøs administrering, hvor antistoffet gis ved anvendelse av en av de etterfølgende doseringsplaner: (i) seks doseringer hver fjerde uke, deretter hver tredje måned; (ii) hver tredje uke; (iii) 3 mg/kg
- 25 kroppsvekt en gang etterfulgt av 1 mg/kg kroppsvekt hver tredje uke.

- I forbindelse med enkelte metoder blir to eller flere monoklonale antistoffer med forskjellige bindingsspesifisiteter
- 30 administrert samtidig, i hvilket tilfelle doseringen av hvert antistoff som administreres faller innenfor de indikerte områdene. Antistoff administreres vanligvis flere ganger. Intervaller mellom enkeltdoseringer kan f.eks. være ukentlig, hver måned, hver tredje måned eller årlig. Intervaller kan også være irregulære som indikert ved å måle blod-
- 35 nivåene for antistoff mot targetantigenet i pasienten. I enkelte metoder innstilles dosering for å oppnå en plasma-antistoffkonsentrasjon på omtrent 1-1000 µg/ml og ved enkelte metoder omtrent 25-300 µg/ml.

Alternativt kan antistoff administreres som en formulering ved vedvarende frigivelse, og i dette tilfellet kreves mindre hyppig administrering. Dosering og hyppighet varierer

5 avhengig av antistoffets halveringstid i pasienten. Generelt viser humane antistoffer den lengste halveringstid, etterfulgt av humaniserte antistoffer, kimære antistoffer og ikke-humane antistoffer. Doseringen og hyppighet for administrering kan variere avhengig av om behandlingen er profylaktisk
10 eller terapeutisk. Ved profylaktiske anvendelser administreres en relativt lav dose ved relativt infrekvente intervaller over en lang tidsperiode. Enkelte pasienter fortsetter å motta behandling for resten av livet. Ved terapeutiske anvendelser er en relativt høy dose ved relativt
15 korte intervaller noen ganger nødvendig inntil sykdommens progresjon er redusert eller terminert, og foretrukket inntil pasienten viser delvis eller fullstendig bedring av symptomer på sykdom. Deretter kan pasienten få administrert en profylaktisk regime.

20

Aktuelle doseringsnivåer av de aktive bestanddelene i de farmasøytiske sammensetningene ifølge oppfinnelsen kan varieres for å oppnå en mengde av den aktive bestanddel som er effektiv til å oppnå den ønskede terapeutiske respons for
25 en spesiell pasient, sammensetning og administreringsmåte, uten å være toksisk for pasienten. Det valgte doseringsnivået vil avhenge av en rekke farmakokinetiske faktorer som inkluderer aktiviteten til de spesielle sammensetninger ifølge oppfinnelsen som anvendes, eller esteren, saltet eller
30 amidet derav, administreringsruten, administreringstiden, utskillelseshastighet for den spesielle forbindelse som anvendes, varigheten av behandlingen, andre legemidler, forbindelser og/eller materialer som anvendes i kombinasjon med de spesielle sammensetninger som anvendes, alder, kjønn,
35 vekt, tilstand, generell helse og tidligere medisinsk historie til pasienter som behandles, og lignende faktorer som er vel kjent innen det medisinske området.

En "terapeutisk effektiv dosering" av et anti-PD-1 antistoff ifølge oppfinnelsen resulterer foretrukket i en nedgang i alvorligheten av sykdomssymptomer, en økning i hyppighet og varighet av sykdomssymptomfrie perioder, eller en forebygging av svekking eller disabilitet som skyldes sykdomsplagen. For behandling av tumorer, vil en "terapeutisk effektiv dosering" foretrukket f.eks. inhibere cellevekst eller tumorvekst med minst omtrent 20%, mere foretrukket minst omtrent 40%, enda mere foretrukket minst omtrent 60% og ytterligere foretrukket minst omtrent 80% i forhold til ubehandlede individer. En forbindelses evne til å inhibere tumorvekst kan evalueres i et dyremodellsystem som varsler effektiviteten i humane tumorer. Alternativt kan denne egenskap hos en sammensetning evalueres ved å undersøke evnen hos forbindelsen til å inhibere slik inhibering in vitro ved analyser kjent for en fagkyndig. En terapeutisk effektiv mengde av en terapeutisk forbindelse kan nedsette tumorstørrelse eller på annen måte forbedre symptomer i et individ. En fagkyndig på området vil kunne bestemme slike mengder basert på slike faktorer som individets størrelse, alvorligheten av individets symptomer og den spesielle sammensetning eller administreringsrute som velges.

I et annet aspekt tilveiebringer den foreliggende søknad et farmasøytisk kit av deler som omfatter et anti-PD-1 antistoff og et anti-CTLA-4 antistoff som beskrevet heri. Kitet kan også videre omfatte instruksjoner for bruk i behandling av en hyperproliferativ sykdom (slik som cancer som beskrevet heri). I en annen utførelsesform kan anti-PD-1 og anti-CTLA-4 antistoffene være ko-emballert i enhetsdoseringsform.

I bestemte utførelsesformer blir to eller flere monoklonale antistoffer med forskjellige bindingsspesifisiteter (f.eks. anti-PD-1 og anti-CTLA-4) administrert samtidig, i hvilket tilfelle doseringen av hvert antistoff som administreres faller innenfor de indikerte områdene. Antistoff kan administreres som en enkelt dose eller mere vanlig kan det administreres ved flere anledninger. Intervaller mellom enkeltdose kan f.eks. være hver uke, hver måned, hver tredje

måned eller årlig. Intervaller kan også være irregulære som indikert ved å måle blodnivåer av antistoff mot targetantigenet i pasienten. I enkelte metoder justeres dosering for å oppnå en plasmaantistoffkonsentrasjon på omtrent 1-1000 µg/ml og i enkelte metoder omtrent 25-300 µg/ml.

En sammensetning ifølge den foreliggende oppfinnelse kan administreres via en eller flere administreringsruter ved anvendelse av en eller flere av en rekke metoder som er kjent innen teknikken. Som det vil forstås av en fagkyndig på området, vil administreringsruten og/eller administreringsmåten variere avhengig av de ønskede resultatene. Foretrukne ruter for administrering av antistoffer ifølge oppfinnelsen inkluderer intravenøs, intramuskulær, intradermal, intraperitoneal, subkutan, spinal eller andre parenterale ruter for administrering, f.eks. ved injeksjon eller infusjon.

Uttrykket "parenteral administrering" som anvendt heri betyr administreringsmåter annet enn enteral og topisk administrering, vanligvis ved injeksjon og inkluderer, uten begrensning, intravenøs, intramuskulær, intraarteriell, intratekal, intrakapsulær, intraorbital, intrakardial, intradermal, intraperitoneal, transtrakeal, subkutan, subkutikulær, intraartikulær, subkapsulær, subaraknoid, intraspinal, epidural og intrasternal injeksjon og infusjon.

Alternativt kan et antistoff ifølge oppfinnelsen administreres via en ikke-parenteral rute, slik som en topisk, epidermal eller mukosal administreringsrute, f.eks. intranasalt, oralt, vaginalt, rektalt, sublingvalt eller topisk.

De aktive forbindelser kan fremstilles med bærere som vil beskytte forbindelsen mot rask frigivelse, slik som en formulering med kontrollert frigivelse som inkluderer implantater, transdermale plastere og mikroinnkapslede avlerings-systemer. Bionedbrytbare, biokompatible polymerer kan anvendes, slik som etylenvinylacetat, polyanhydrider, polyglykolsyre, kollagen, polyortoestere og polymelkestyre. En rekke metoder for fremstilling av slike formuleringer er patentert eller generelt kjent for de fagkyndige på området.

Se f.eks., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

5 Terapeutiske sammensetninger kan administreres med medisinske innretninger som er kjent innen teknikken. I en foretrukket utførelsesform kan f.eks. en terapeutisk sammensetning ifølge oppfinnelsen administreres med en nål-løs hypodermisk injeksjonsinnretning, slik som innretningene omtalt i U.S.

10 patenter nr. 5 399 163; 5 383 851; 5 312 335; 5 064 413; 4 941 880; 4 790 824 eller 4 596 556. Eksempler på vel kjente implantater og moduler som er anvendbare i den foreliggende oppfinnelse inkluderer: U.S. patent nr. 4 487 603, som omhandler en implanterbar mikro-infusjonspumpe for å dispensere

15 medikament ved en regulert hastighet; U.S. patent nr. 4 486 194, som omhandler en terapeutisk innretning for å administrere medikamenter gjennom huden; U.S. patent nr. 4 447 233, som omhandler en medikament-infusjonspumpe for å avlevere medikament ved en nøyaktig infusjonshastighet; U.S. patent

20 nr. 4 447 224, som omhandler et implanterbart infusjonsapparat med variabel strømming for kontinuerlig legemiddelavlevering; U.S. patent nr. 4 439 196, som omhandler et osmotisk legemiddelavleveringssystem med flerkammerrom; og U.S. patent nr. 4 475 196, som omhandler et osmotisk legemiddelavleveringssystem. Disse patenter er innlemmet heri

25 ved referanse. Mange andre slike implantater, avleverings-systemer og moduler er kjent for de fagkyndige på området.

I bestemte utførelsesformer kan de humane monoklonale anti-

30 stoffer ifølge oppfinnelsen formuleres for å sikre korrekt fordeling in vivo. Blod-hjernebarrieren (BBB) ekskluderer f.eks. mange svært hydrofile forbindelser. For sikre at de terapeutiske forbindelsene ifølge oppfinnelsen krysser BBB (om ønsket), kan de formuleres i f.eks. liposomer. For frem-

35 gangsmåter for fremstilling av liposomer, se f.eks. U.S. patenter 4 522 811; 5 374 548; og 5 399 331. Liposomene kan omfatte en eller flere enheter som transporteres selektivt inn i spesifikke celler eller organer, og øker således målrettet legemiddelavlevering (se. f.eks. V.V. Ranade (1989) J.

Clin. Pharmacol. 29:685). Eksempler på enheter for målretting inkluderer folat eller biotin (se f.eks. U.S. patent 5 416 016 til Low et al.); mannosider (Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); antistoffer (P.G. 5 Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); surfaktantprotein A reseptor (Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233:134); p120 (Schreier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090); se også K. Keinänen; M.L. Laukkanen (1994) 10 FEBS Lett. 346:123; J.J. Killian; I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273.

Anvendelser og fremgangsmåter ifølge oppfinnelsen

Antistoffene, antistoffsammensetningene og fremgangsmåtene 15 ifølge oppfinnelsen har en rekke in vitro og in vivo anvendbarheter som f.eks. involverer deteksjon av PD-1 eller økning av immunrespons ved blokkade av PD-1. I en foretrukket utførelsesform er antistoffene ifølge oppfinnelsen humane antistoffer. Disse molekyler kan f.eks. administreres 20 til celler i kultur, in vitro eller ex vivo, eller til mennesker, f.eks. in vivo, for å øke immunitet i en rekke situasjoner. Følgelig, i ett aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å modifisere en immunrespons i et individ som omfatter administrering til 25 individet av antistoffet, eller antigen-bindende del derav, ifølge oppfinnelsen slik at immunresponsen i individet modifiseres. Responsen vil foretrukket økes, stimuleres eller oppreguleres.

30 Som anvent heri skal betegnelsen "individ" inkludere humane og ikke-humane dyr. Ikke-humane dyr inkluderer alle vertebrater, f.eks. pattedyr og ikke-pattedyr, slik som ikke-humane primater, sauer, hunder, katter, kyr, hester, høner, amfibier og reptiler, skjønt pattedyr er foretrukne, slik som 35 ikke-humane primater, sauer, hunder, katter, kyr og hester. Foretrukne individer inkluderer mennesker med behov for å øke en immunrespons. Fremgangsmåtene er særlig egnet for å behandle humane pasienter med en lidelse som kan behandles for å øke T-cellemediert immunrespons. I en særlig

utførelsesform er fremgangsmåtene spesielt egnet for behandling av cancerceller in vivo. For å oppnå antigenspesifikk økning av immunitet, kan anti-PD-1 antistoffene administreres sammen med et antigen av interesse. Når antistoffer mot PD-1 administreres sammen med et annet middel, kan to administreres, enten i rekkefølge eller samtidig.

Oppfinnelsen tilveiebringer videre fremgangsmåter for å detektere tilstedeværelsen av humant PD-1 antigen i en prøve, eller for å måle mengden av humant PD-1 antigen, som omfatter at prøven, og en kontrollprøve, bringes i kontakt med et humant monoklonalt antistoff, eller en antigen-bindende del derav, som spesifikt binder til humant PD-1, under betingelser som tillater dannelse av et kompleks mellom antistoffet eller delen derav og humant PD-1. Dannelsen av et kompleks detekteres deretter, hvori en ulik kompleksdannelse mellom prøven sammenlignet med kontrollprøven er en indikasjon på tilstedeværelsen av humant PD-1 antigen i prøven.

Gitt den spesifikke binding av antistoffene ifølge oppfinnelsen for PD-1, sammenlignet med CD28, ICOS og CTLA-4, kan antistoffene ifølge oppfinnelsen anvendes for spesifikt å detektere PD-1 ekspresjon på overflaten av celler og dessuten kan de anvendes for å rense PD-1 via immunaffinitetsrensing.

Cancer

Blokkade av PD-1 ved hjelp av antistoffer kan øke immunresponsen mot cancerøse celler i pasienten. Liganden for PD-1, PD-L1, er ikke uttrykt i normale humane celler, men er rikelig i en rekke humane cancere (Dong et al. (2002) Nat Med 8:787-9). Interaksjon mellom PD-1 og PD-L1 resulterer i en nedgang i tumorinfiltrerende lymfocytter, en nedgang i T-celle reseptormediert proliferasjon og immun-evasjon ved de cancerøse cellene (Dong et al. (2003) J Mol Med 81:281-7; Blank et al. (2005) Cancer Immunol. Immunother. 54:307-314; Konishi et al. (2004) Clin. Cancer Res. 10:5094-100). Immunsuppresjon kan reverseres ved å inhibere den lokale interaksjon av PD-1 til PD-L1 og effekten er additiv når

interaksjonen av PD-1 til PD-L2 også blokkeres (Iwai et al. (2002) PNAS 99:12293-7; Brown et al. (2003) J. Immunol. 170:1257-66). Mens tidligere studier har vist at T-celle proliferasjon kan gjenopprettes ved å inhibere interaksjonen av PD-1 til PD-L1, er der ingen rapporter om en direkte effekt på cancer-tumorvekst in vivo ved å blokkere PD-1/PD-L1 interaksjon. I ett aspekt vedrører den foreliggende oppfinnelse behandling av et individ in vivo ved anvendelse av et anti-PD-1 antistoff slik at vekst av cancerøse tumorer inhiberes. Et anti-PD-1 antistoff kan anvendes alene for å inhibere veksten av cancerøse tumorer. Alternativt kan et anti-PD-1 antistoff anvendes sammen med andre immunogene midler, standard cancerbehandlinger eller andre antistoffer, som beskrevet nedenfor.

Følgelig, i en utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å inhibere veksten av tumorceller i et individ, som omfatter administrering til individet av en terapeutisk effektiv mengde av et anti-PD-1 antistoff, eller antigen-bindende del derav. Antistoffet er foretrukket et humant anti-PD-1 antistoff (slik som et hvilket som helst av de humane anti-humane PD-1 antistoffene beskrevet heri). I tillegg eller alternativ kan antistoffet være en kimært eller humanisert anti-PD-1 antistoff.

Foretrukne cancere hvis vekst kan inhiberes ved å anvende antistoffene ifølge oppfinnelsen inkluderer cancere som typisk responderer på immunterapi. Ikke-begrensede eksempler på foretrukne cancere for behandling inkluderer melanom (f.eks. metastatisk malignt melanom), renal cancer (f.eks. klarcelle-karcinom), prostatacancer (f.eks. hormon-refraktorisk prostata-adenokarcinom), brystcancer, koloncancer, og lungecancer (f.eks. ikke-småcellet lungecancer). I tillegg inkluderer oppfinnelsen refraktoriske eller tilbakevendende maligniteter hvis vekst kan inhiberes ved å anvende antistoffene ifølge oppfinnelsen.

Eksempler på andre cancere som kan behandles ved å anvende fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen inkluderer bencancer,

pankreascancer, hudcancer, cancer i hodet eller hals, kutan
 eller intraokkulær malignt melanom, uterincancer,
 ovariecancer, rektal cancer, cancer i analregionen,
 magecancer, testikkelcancer, karcinom i de fallopiske rør,
 5 edometrie-karcinom, cervix karcinom, vagina karsinom,
 karsinom i vulva, Hodgkins sykdom, ikke-Hodgkins lymfom,
 øsofagus-cancer, cancer i tynntarm, cancer i det endokrine
 system, thyreoideacancer, parathyreoideacancer, binyrecancer,
 sarkom i mykt vev, uretracancer, peniscancer, kronisk eller
 10 akutt leukemi som inkluderer akutt myeloid leukemi, kronisk
 myeloid leukemi, akutt lymfoblastisk leukemi, kronisk
 lymfocytisk leukemi, faste tumorer i barndom, lymfocytisk
 lymfom, blærecancer, cancer i nyre eller ureter, karsinom i
 nyrebekken, neoplasme i sentralnervesystemet (CNS), primær
 15 CNS lymfom, tumor angiogenese, spinalkanaltumor, hjerne-
 stammegliom, pituitær adenom, Kaposi sarkom, epidermoid
 cancer, skvamøs-celle-cancer, T-celle-lymfom, miljøinduserte
 cancere som inkluderer dem indusert ved asbest og kombina-
 sjoner av de nevnte cancere. Den foreliggende oppfinnelse er
 20 også anvendbar for å behandle metastatiske cancere, særlig
 metastatiske cancere som uttrykker PD-L1 (Iwai et al. (2005)
Int. Immunol. 17:133-144).

Eventuelt kan antistoffer mot PD-1 kombineres med et immuno-
 25 gent middel slik som cancerøse celler, rensede tumorantigener
 (inkluderende rekombinante proteiner, peptider og karbohy-
 dratmolekyler) celler og celler transfektert med gener som
 koder for immunstimulerende cytokiner (He et al (2004) *J.*
Immunol. 173:4919-28). Ikke-begrensede eksempler på tumor-
 30 vaksiner som kan anvendes inkluderer peptider av melanom-
 antigener, slik som peptider av gp 100, MAGE antigener, Trp-
 2, MART1 og/eller tyrosinase, eller tumorceller transfektert
 til å uttrykke cytokinet GM-CSF (omtalt videre nedenfor).

35 I mennesker er enkelte tumorer blitt vist til å være immuno-
 gene slik som melanomer. Det forventes at ved å øke
 grenseverdien for T-celle-aktivering ved PD-1 blokkade, kan
 man forvente å aktivere tumorresponser i verten.

PD-1 blokkade er sannsynlig mest effektiv når kombinert med en vaksinasjonsprotokoll. En rekke eksperimentelle strategier for vaksinasjon mot tumorer er funnet opp (Rosenberg, S., 2000, Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C., 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D. 2000, ASCO Educational Book Spring: 414-428; Foon, K. 2000, ASCO Educational Book Spring: 730-738; se også Restifo, N. og Sznol, M., Cancer Vaccines, Ch. 61, pp. 3023-3043 i DeVita, V. et al. (eds.), 1997, Cancer: Principles and Practice of Oncology. Fifth Edition). I en av disse strategiene, fremstilles en vaksine ved å anvende autologe eller allogene tumorceller. Disse cellulære vaksiner er blitt vist til å være mest effektive når tumorcellene transduseres til å uttrykke GM-CSF. GM-CSF er blitt vist til å være en potent aktivator av antigen presentasjon for tumorvaksinasjon (Dranoff et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 90: 3539-43).

Studiet av genekspresjon og stor skala genekspresjonsmønstre i forskjellige tumorer har ført til definisjonen av såkalte tumorspesifikke antigener (Rosenberg, SA (1999) *Immunity* 10: 281-7). I mange tilfeller er disse tumorspesifikke antigener differensieringsantigener uttrykt i tumorene og i cellen hvorfra tumoren oppstår, f.eks. melanocytantigener gp100, MAGE antigener og Trp-2. Viktigere, kan mange av disse antigener bli vist til å være targeter for tumorspesifikke T-celler funnet i verten. PD-1 blokkade kan anvendes sammen med en samling av rekombinante proteiner og/eller peptider uttrykt i en tumor for å generere en immunrespons mot disse proteiner. Disse proteiner blir normalt sett på av immunsystemet som selv-antigener og er derfor tolerante overfor dem. Tumorantigenet kan også inkludere proteinet telomerase som kreves for syntesen av telomerer av kromosomer og som er uttrykt i mer enn 85% av humane cancere og i kun et begrenset antall somatiske vev (Kim, N et al. (1994) *Science* 266: 2011-2013). (Disse somatiske vev kan beskyttes mot immunangrep med forskjellige midler). Tumorantigen kan også være "neo-antigener" uttrykt i cancerceller på grunn av somatiske

mutasjoner som forandrer proteinsekvens eller danner fusjonsproteiner mellom to ikke-relatert sekvenser (dvs. bcr-abl i Philadelphia kromosomet), eller idiotype fra B-celle-tumorer.

5

Andre tumorvaksiner kan inkludere proteinene fra viruser implisert i humane cancere slik som Human Pappilloma Viruser (HPV), Hepatitt Viruser (HBV og HCV) og Kaposi Herpes Sarkom Virus (KHSV). En annen form av tumorspesifikt antigen som kan anvendes sammen med PD-1 blokkade er rensede varmesjokk-proteiner (HSP) isolert fra selve tumorvevet. Disse varmesjokkproteiner inneholder fragmenter av proteiner fra tumor-cellene og disse HSP'er er svært effektive ved avlevering til antigenpresenterende celler for å utløse tumorimmunitet (Suot, R & Srivastava, P (1995) *Science* 269:1585-1588; Tamura, Y. et al. (1997) *Science* 278:117-120).

Dendrittiske celler (DC) er potente antigenpresenterende celler som kan anvendes for å prime antigen-spesifikke responser. DC'er kan produseres ex vivo og lastes med forskjellige protein- og peptidantigener så vel som tumorcelleekstrakter (Nestle, F. et al. (1998) *Nature Medicine* 4: 328-332). DC'er kan også transduseres ved hjelp av genetiske midler til likeledes å uttrykke disse tumorantigener. DC'er er også blitt fusjonert direkte til tumorceller for immuniseringsformål (Kugler, A. et al. (2000) *Nature Medicine* 6:332-336). Som en vaksinasjonsmetode kan DC immunisering effektivt kombineres med PD-1 blokkade for å aktive mere potente anti-tumor responser.

30

PD-1 blokkade kan også kombineres med standard cancerbehandling. PD-1 blokkade kan effektivt kombineres med kjemoterapeutiske regimer. I disse tilfeller kan det være mulig å redusere dosen av administrert kjemoterapeutisk reagens (Mokyr, M. et al. (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304). Et eksempel på en slik kombinasjon er et anti-PD-1 antistoff i kombinasjon med dekarbazin for behandling av melanom. Et annet eksempel på en slik kombinasjon er et anti-PD-1 antistoff i kombinasjon med interleukin-2 (IL-2) for

35

behandling av melanom. Den vitenskapelige forklaring bak den kombinerte bruk av PD-1 blokade og kjemoterapi er at celledød, som er en konsekvens av den cytotoksiske virkning av fleste kjemoterapeutiske midler, bør resultere i økte nivåer av tumorantigen i det antigenpresenterende spor. Andre kombinasjonsterapier som kan resultere i synergi med PD-1 blokade gjennom celledød er stråling, kirurgi og hormon deprivasjon. Hver av disse protokoller danner en kilde av tumorantigen i verten. Angiogeneseinhibitorer kan også kombineres med PD-1 blokkade. Inhibering av angiogenese fører til tumorcelledød som kan mate tumorantigen inn i vertsansigen-presentasjonsspor.

PD-1 blokkerende antistoffer kan også anvendes i kombinasjon med bispesifikke antistoffer som targeterer Fc alfa eller Fc gamma reseptor-uttrykkende effektorceller mot tumorceller (se f.eks. U.S. patenter nr. 5 922 845 og 5 837 243). Bispesifikke antistoffer kan anvendes for å targetere to separate antigener. For eksempel er anti-Fc reseptor/anti-tumorantigen (f.eks. Her-2/neu) bispesifikke antistoffer blitt anvendt for å targetere makrofager mot tumorseter. Denne targetering kan mere effektivt aktivere tumorspesifikke responser. T-celle-armen av disse responser vil økes ved bruk av PD-1 blokkade. Alternativt kan antigen avleveres direkte til DC'er ved anvendelse av bispesifikke antistoffer som binder til tumorantigen og en dendrittisk cellespesifikk celleoverflatemarkør.

Tumorer unngår verts-immuneovervåkning ved en rekke mekanismer. Mange av disse mekanismer kan overvinnes ved inaktivering av proteiner som uttrykkes ved hjelp av tumorene og som er immunsuppressive. Disse inkluderer, blant andre TGF-beta (Kehrl, J. et al. (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050), IL-10 (Howard, M. & O'Garra, A. (1992) *Immunology Today* 13: 198-200), og Fas ligand (Hahne, M. et al. (1996) *Science* 274: 1363-1365). Antistoffer mot hver av disse entiteter kan anvendes i kombinasjon med anti-PD-1 for å motvirke effektene av det immunsuppressive middel og favorisere tumorimmunresponser ved verten.

Andre antistoffer som kan anvendes for å aktivere vertens immun-responderbarhet kan anvendes i kombinasjon med anti-PD-1. Disse inkluderer molekyler på overflaten av dendrittiske celler som aktiverer DC funksjon og antigen presentasjon. Anti-CD40 antistoffer er i stand til å substituere effektivt for T-celle hjelperaktivitet (Ridge, J. et al. (1998) *Nature* 393: 474-478) og kan anvendes sammen med PD-1 antistoffer (Ito, N. et al. (2000) *Immunobiology* 201 (5) 527-40).

Aktivering av antistoffer mot T-celle kostimulerende molekyler slik som CTLA-4 (f.eks. US patent nr. 5,811,097), OX-40 (Weinberg, A. et al. (2000) *Immunol* 164: 2160-2169), 4-1BB (Melero, I. et al. (1997) *Nature Medicine* 3: 682-685 (1997), og ICOS (Hutloff, A. et al. (1999) *Nature* 397: 262-266) kan også tilveiebringe økte nivåer av T-celle aktivering.

Benmargstransplantasjon anvendes for tiden for å behandle en rekke tumorer av hematopoetisk opprinnelse. Mens "graft-versus-host" sykdom er en konsekvens av denne behandling, kan terapeutisk nytte oppnås fra "graft-versus-tumor" responser. PD-1 blokkade kan anvendes for å øke effektiviteten av donor-podede tumorspesifikke T-celler.

Der er også en rekke eksperimentelle behandlingsprotokoller som involverer ex vivo aktivering og ekspansjon av antigenspesifikke T-celler og adoptiv overføring av disse celler til resipienter for å antigen-spesifikke T-celler overfor tumor (Greenberg, R. & Riddell, S. (1999) *Science* 285: 546-51). Disse metoder kan også anvendes for å aktivere T-celle responser mot infeksiose midler slik som CMV. Ex vivo aktivering i nærvær av anti-PD-1 antistoffer kan forventes til å øke hyppighet og aktivitet av de adoptivt overførte T-celler.

35

Infeksiøse sykdommer

Andre metoder ifølge oppfinnelsen anvendes for å behandle pasienter som er blitt eksponert for spesielle toksiner eller patogener. Følgelig tilveiebringer et annet aspekt av

oppfinnelsen en fremgangsmåte for å behandle en infeksjons sykdom i et individ som omfatter administrering til individet av et anti-PD-1 antistoff, eller antigen-bindende del derav, slik at individet behandles for den infeksjøs sykdommen.

- 5 Antistoffet er foretrukket et humant anti-humant PD-1 antistoff (slik som hvilke som helst av de humane anti-PD-1 antistoffene beskrevet heri). I tillegg eller alternativt kan antistoffet være et kimært eller humanisert antistoff.
- 10 Tilsvarende anvendelsen derav mot tumorer som omtalt over kan antistoffmediert PD-1 blokkade anvendes alene, eller som et hjelpestoff, i kombinasjon med vaksiner, for å stimulere immunresponsen mot patogener, toksiner og selv-antigener. Eksempler på patogener for hvilke denne terapeutiske
- 15 tilnærming kan være særlig anvendbar, inkluderer patogener for hvilke der for tiden ikke er noen effektiv vaksine, eller patogener for hvilke konvensjonelle vaksiner er mindre enn fullstendig effektive. Disse inkluderer, men er ikke begrenset til, HIV, hepatitt (A, B & C), influensa, herpes,
- 20 giardia, malaria, leishmania, stafylococcus aureus, pseudomonas aeruginosa. PD-1 blokkade er særlig anvendbar overfor etablerte infeksjoner ved midler slik som HIV som fremviser endrede antigener i løpet av infeksjoner. Disse nye epitoper gjenkjennes som fremmede på tidspunktet med
- 25 anti-human PD-1 administrering, og fremkaller således en sterk T-celle respons som ikke dempes ved negative signaler gjennom PD-1.

- Enkelte eksempler på patogene virus som bevirker infeksjon
- 30 som kan behandles ved hjelp av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen inkluderer HIV, hepatitt (A, B eller C), herpes virus (f.eks. VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II og CMV, Epstein Barr virus), adenovirus, influensavirus, flavivirus, ekovirus, rhinovirus, coxsackie-virus, coronavirus, respiratorisk
 - 35 syncytialvirus, kusmavirus, rotavirus, meslingevirus, rubellavirus, parvovirus, vacciniavirus, HTLV virus, denguevirus, papillomavirus, molluscum-virus, poliovirus, rabiesvirus, JC virus og arboviral encefalitt virus.

Enkelte eksempler på patogene bakterier som bevirker infeksjoner som kan behandles ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen inkluderer klamydia, rickettsia bakterier, mykobakterier, stafylokokker, streptokokker, pneumokokker, meningokokker og gonokokker, klebsiella, proteus, serratia, pseudomonas, legionella, difteri, salmonella, bacilli, kolera, tetanus, botulisme, antraks, pest, leptospirose og Lymes sykdomsbakterie.

- 10 Enkelte eksempler på patogene sopp som bevirker infeksjoner som behandles ved fremgangsmåter ifølge oppfinnelsen inkluderer *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis*, osv.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger*, osv.), Genus *Mucorales* (*mucor*, *absidia*, *rhizopus*),
 15 *Sporothrix schenkii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* og *Histoplasma capsulatum*.

- Enkelte eksempler på patogene parasitter som bevirker infeksjoner som kan behandles ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen inkluderer *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* sp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* sp., *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*,
 25 *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondi* og *Nippostrongylus brasiliensis*.

- I alle de ovennevnte metodene kan PD-1 blokkade kombineres med andre former av immunoterapi slik som cytokinbehandling
 30 (f.eks. interferoner, GM-CSF, G-CSF, IL-2), eller bispesifikk antistoffterapi, som tilveiebringer økt presentasjon av tumorantigener (se f.eks. Holliger (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak (1994) *Structure* 2:1121-1123).

35 **Autoimmune reaksjoner**

Anti-PD-1 antistoffer kan fremkalle og forsterke autoimmune responser. Induksjon av anti-tumorresponser ved å anvende tumorcelle- og peptidvaksiner viser faktisk at en rekke anti-tumorresponser involverer anti-selvreaktiviteter (depigmen-

- tasjon observert i anti-CTLA-4 + BM-CSF-modifisert B16 melanom i van Elsas et al. supra; depigmentasjon i Trp-2 vaksinerende mus (Overwijk, W. et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 2982-2987); autoimmun prostatitt fremkalt ved
- 5 TRAMP tumorcellevaksiner (Hurwitz, A. (2000) *supra*); melanom-peptidantigen vaksinasjon og vitiligo observert i humane kliniske forsøk (Rosenberg, SA og White, DE (1996) *J. Immunother Emphasis Tumor Immunol* 19 (1): 81-4).
- 10 Det er derfor mulig å betrakte anvendelse av anti-PD-1 blokkade sammen med forskjellige selv-proteiner for å planlegge vaksinasjonsprotokoller for effektiv generering av immunresponser mot disse selv-proteiner for sykdomsbehandling. Alzheimers sykdom involverer f.eks. upassende akkumuler
- 15 lering av A β peptid i amyloid-avsetninger i hjernen idet antistoffresponser mot amyloid er i stand til å rense vekk disse amyloidavsetninger (Schenk et al., (1999) *Nature* 400:173-177).
- 20 Andre selv-proteiner kan også anvendes som targeter slik som IgE for behandling av allergi og astma, og TNF α for revmatoid artritt. Endelig kan antistoffresponser på forskjellige hormoner induseres ved bruk av anti-PD-1 antistoff. Nøytraliserende antistoffresponser mot reproduktive hormoner kan
- 25 anvendes for prevensjon. Nøytraliserende antistoffresponser mot hormoner og andre oppløselige faktorer som er nødvendige for vekst av spesielle tumorer kan også betraktes som mulige vaksinasjonstargeter.
- 30 Analoge metoder som beskrevet ovenfor for anvendelsen av anti-PD-1 antistoff kan anvendes for induksjon av terapeutiske immunresponser for å behandle pasienter med en upassende akkumulering av andre selv-antigener, slik som amyloid avsetninger, som inkluderer A β i Alzheimers sykdom, cytokiner
- 35 slik som TNF α og IgE.

Vaksiner

Anti-PD-1 antistoffer kan anvendes for å stimulere antigen-spesifikke immunresponser ved ko-administrering av et anti-PD-1 antistoff med et antigen av interesse (f.eks. en vaksine). Følgelig, i et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å øke en immunrespons mot et antigen i et individ som omfatter administrering til individet av: (i) antigenet; og (ii) et anti-PD-1 antistoff, eller antigen-bindende del derav, slik at en immunrespons mot antigenet i individet økes. Antistoffet er foretrukket et humant anti-humant PD-1 antistoff (slik som hvilken som helst av de humane anti-PD-1 antistoffene beskrevet heri). I tillegg eller alternativt kan antistoffet være et kimært eller humanisert antistoff. Antigenet kan f.eks. være et tumorantigen, et viralt antigen, et bakterielt antigen eller et antigen fra et patogen. Ikke-begrensede eksempler på slike antigener inkluderer dem som er omtalt i avsnittene ovenfor, slik som tumorantigenene (eller tumorvaksiner) omtalt ovenfor, eller antigener fra virusser, bakterier eller andre patogener beskrevet ovenfor.

Passende ruter for administrering av antistoffsammensetningene (f.eks. humane monoklonale antistoffer, multispesifikke og bispesifikke molekyler og immunokonjugater) ifølge oppfinnelsen *in vivo* og *in vitro* er vel kjent innen teknikken og kan velges av de fagkyndige på området. Antistoffsammensetningene kan f.eks. administreres ved injeksjon (f.eks. intravenøs eller subkutan). Passende doseringer av molekylerne som anvendes vil avhenge av alder og vekt av individet og konsentrasjonen og/eller formuleringen av antistoffsammensetningen.

Som beskrevet tidligere kan humane anti-PD-1 antistoffer ifølge oppfinnelsen ko-administreres med ett eller flere andre terapeutiske midler, f.eks. et cytotoksisk middel, et radiotoksisk middel eller et immunsuppresjonsmiddel. Antistoffet kan være koblet til middelet (som et immunkompleks) eller kan administreres separat fra middelet. I det sistnevnte tilfellet (separat administrering), kan antistoffet administreres før, etter eller samtidig med middelet eller

det kan ko-administreres med andre kjente terapier, f.eks. en anti-cancerterapi, f.eks. stråling. Slike terapeutiske midler inkluderer, blant andre, anti-neoplastiske midler slik som doksorubicin (adriamycin), cisplatin, bleomycinsulfat, karmustin, klorambucil, dekarbazin og cyklofosfamidhydroksy-
 5 urea som, selv, kun er effektive ved nivåer som er toksiske eller subtoksiske for en pasient. Cisplatin administreres intravenøst som en 100 mg/dose en gang hver fjerde uke og adriamycin administreres intravenøst som en 60-75 mg/ml dose
 10 en gang hver 21 døgn. Ko-administrering av de humane anti-PD-1 antistoffer, eller antigen-bindende fragmenter derav, ifølge oppfinnelsen med kjemoterapeutiske midler tilveiebringer to anti-cancermidler som opererer via forskjellige mekanismer som gir en cytotoksisk effekt mot humane tumor-
 15 celler. Slik ko-administrering kan løse problemer som skyldes utvikling av resistens mot legemidler eller en forandring i antigenisiteten til tumorcellene som vil gjøre dem ureaktive med antistoffet.

20 Innenfor rammen for den foreliggende oppfinnelse er også kit som omfatter antistoffsammensetningene ifølge oppfinnelsen (f.eks. humane antistoffer, bispesifikke eller multispesifikke molekyler, eller immunokonjugater) og instruksjoner for bruk. Kitet kan videre inneholde minst ett ytterligere
 25 reagens, eller ett eller flere ytterligere humane antistoffer ifølge oppfinnelsen (f.eks. et humant antistoff med en komplementær aktivitet som binder til en epitop i PD-1 antigen fjernt fra det første humane antistoff). Kit inkluderer typisk en merkelapp som indikerer den tiltenkte bruken av
 30 innholdet i kitet. Betegnelsen merkelapp inkluderer et hvilket som helst skrevet eller opptegnet material som er supplert på eller med kitet, eller som på annen måte følger med kitet.

35 **Kombinasjonsterapi**

Den foreliggende oppfinnelse er delvis basert på de etterfølgende eksperimentelle data. Musetumormodeller (MC38 koloncancer og SA1/N fibrosarkom) ble anvendt for å undersøke

in vivo effekten av behandling av en tumor ved å kombinere immunstimulerende terapeutiske antistoff-anti-CTLA-4 og anti-PD-1. Den immunoterapeutiske kombinasjon ble enten tilveiebragt samtidig med implantasjon av tumorceller (eksempler 5 14 og 17) eller etter at tumorcellene ble implantert i en tid som er tilstrekkelig til å bli en etablert tumor (eksempler 15, 16 og 18). Uavhengig av tidspunktet for antistoffbehandling, ble det funnet at anti-CTLA-4 antistoffbehandling alene og anti-PD-1 antistoff (kimært antistoff hvori et rotte anti-10 mus PD-1 var modifisert med en museimmunoglobulin Fc region, se eksempel 1) behandling alene hadde en beskjeden effekt på reduksjon av tumorvekst i MC38 tumormodellen (se f.eks. figurer 21, 24 og 27). Anti-CTLA-4 antistoffet alene var ganske effektivt i SA1/N tumormodellen (se figur30D), som 15 krevde en lavere anti-CTLA-4 antistoffdose for kombinasjonsstudiene i denne modell. Uansett viste kombinasjonsbehandlingen av anti-CTLA-4 antistoff og anti-PD-1 antistoff en uventet, signifikant større effekt på reduksjon av tumorvekst sammenlignet med behandling med hvert antistoff alene (f.eks. 20 figurer 21D, 24D, 30D og 33H-J). I tillegg viser resultatene i eksempel 14, 16 og 18 at kombinasjonsbehandlingen av anti-CTLA-4 antistoff og anti-PD-1 antistoff hadde en signifikant (synergistisk) effekt på tumorvekst selv ved suboptimale terapeutiske doser sammenlignet med behandling med 25 hvert antistoff alene (dvs. kombinasjonsterapien var overraskende mere effektiv ved sub-terapeutiske doser enn hver monoterapi). Uten at man ønsker å bli bundet av noen teori, er det mulig at ved å øke grenseverdien av T celleaktivering ved PD-1 og CTLA-4 blokade, kan anti-tumorresponser aktiveres 30 i en vertscelle.

I en utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for å behandle en hyperproliferativ sykdom som omfatter administrering av et PD-1 antistoff og et 35 CTLA-4 antistoff til et individ. I ytterligere utførelsesformer administreres anti-PD-1 antistoffet ved en sub-terapeutisk dose, anti-CTLA-4 antistoffet administreres ved en sub-terapeutisk dose, eller begge administreres ved en sub-terapeutisk dose. I en annen utførelsesform tilveiebringer

den foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for å endre et ugunstig utfall forbundet med behandling av en hyperproliferativ sykdom med et immunstimulerende middel som omfatter administrering av et anti-PD-1 antistoff og en sub-terapeutisk dose av anti-CTLA-4 antistoff til et individ. I visse utførelsesformer er individet et menneske. I visse utførelsesformer er anti-CTLA-4 antistoffet humant sekvens monoklonalt antistoff 10D1 og anti-PD-1 antistoffet er humant sekvens monoklonalt antistoff, slik som 17D8, 2D3, 4H1, 5C4 og 4A11. Human sekvens monoklonale antistoffer 17D8, 2D3, 4H1, 5C4 og 4A11 er blitt isolert og strukturelt karakterisert som beskrevet i U.S. Provisional Patent nr. 60/679 466.

Anti-CTLA-4 antistoff og anti-PD-1 monoklonale antistoffer (mAb'er) og human sekvens antistoffene ifølge oppfinnelsen kan fremstilles ved en rekke teknikker som inkluderer konvensjonell monoklonal antistoffmetodologi, f.eks. standard somatisk-cellehybridiseringsteknikken ifølge Kohler og Milstein (1975) *Nature* 256:495. En hvilken som helst teknikk for å fremstille monoklonalt antistoff kan anvendes, f.eks. viral eller onkogen transformasjon av B lymfocytter. Ett animalsk system for å fremstille hybridomer er det murine system. Hybridomproduksjon i mus er en svært godt etablert prosedyre. Immuniseringsprotokoller og teknikker for å isolere immuniserte splenocytter for fusjon er kjent innen teknikken. Fusjonspartnere (f.eks. murine myelomceller) og fusjonsprosedyrer er også kjent (se f.eks. Harlow og Lane (1988) *Antistoffer, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York).

Anti-CTLA-4 antistoffer ifølge oppfinnelsen kan binde til en epitop på human CTLA-4 for å inhibere CTLA-4 fra å interagere med en human B7 mot-reseptor. På grunn av at interaksjon av human CTLA-4 med human B7 transduserer et signal som fører til inaktivering av T-celler som bærer den humane CTLA-4 reseptor, vil antagonisme av interaksjon effektivt inducere, øke eller forlenge aktiveringen av T-celler som bærer den humane CTLA-4 reseptor, og for derved å forlenge eller øke en immunrespons. Anti-CTLA-4 antistoffer er beskrevet i U.S.

patent nr. 5 811 097; 5 855 887; 6 051 227; i PCT søknader med publikasjonsnr. WO 01/14424 og WO 00/37504; og i U.S. patentpublikasjon nr. 2002/0039581. Hver av disse referanser er spesifikt innlemmet heri ved referanse for formål å

5 beskrive anti-CTLA-4 antistoffer. Et eksempel på et klinisk anti-CTLA-4 antistoff er humant monoklonalt antistoff 10D1 som omtalt i WO 01/14424 og U.S. patentsøknad nr. 09/644 668. Antistoff 10D1 er blitt administrert i enkeltdoser og multiple doser, alene eller i kombinasjon med en vaksine,

10 kjemoterapi eller interleukin-2 til mere enn 500 pasienter som er diagnostisert med metastatisk melanom, prostatacancer, lymfom, renalcellecancer, brystcancer, ovariecancer og HIV. Andre anti-CTLA-4 antistoffer omfattet av fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen inkluderer f.eks. dem som er omtalt i: WO

15 98/42752; WO 00/37504; U.S. patent nr. 6 207 156; Hurwitz et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(17):10067-10071; Camacho et al. (2004) J. Clin. Oncology 22(145): Abstract No. 2505 (antistoff CP-675206); og Mokyr et al. (1998) Cancer Res. 58:5301-5304. I bestemte utførelsesformer omfatter

20 fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen anvendelsen av et anti-CTLA-4 antistoff som er et human sekvens antistoff, foretrukket et monoklonalt antistoff og i en annen utførelsesform er det et monoklonalt antistoff 10D1.

25 I visse utførelsesformer binder anti-CTLA-4 antistoff til humant CTLA-4 med en K_D of 5×10^{-8} M eller mindre, binder til humant CTLA-4 med en K_D av 1×10^{-8} M eller mindre, eller binder til humant CTLA-4 med en K_D på mellom 1×10^{-8} M og 1×10^{-10} M eller mindre.

30

Kombinasjonen av antistoffer er anvendbar for å øke en immunrespons mot en hyperproliferativ sykdom ved blokade av PD-1 og CTLA-4. I en foretrukket utførelsesform er antistoffene ifølge oppfinnelsen humane antistoffer. Disse molekyler kan

35 f.eks. administreres til celler i kultur, *in vitro* eller *ex vivo*, eller til mennesker, f.eks. *in vivo*, for øke immuniteten i en rekke situasjoner. Følgelig, i ett aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å modifisere en immunrespons i et individ som omfatter at det til individet

administreres en antistoffkombinasjon, eller en kombinasjon av antigenbindende deler derav, ifølge oppfinnelsen slik at immunresponsen i individet modifiseres. Responsen er foretrukket økt, stimulert eller oppregulert. I en annen utførelsesform tilveiebringer den foreliggende søknad en fremgangsmåte for å endre negative hendelser assosiert med behandling av en hyperproliferativ sykdom med et immunstimulerende terapeutisk middel som omfatter administrering av et anti-PD-1 antistoff og en sub-terapeutisk dose av et anti-CTLA-4 antistoff til et individ.

Blokade PD-1 og CTLA-4 ved antistoffer kan øke immunresponsen mot cancerøse celler i pasienten. Cancere hvis vekst kan inhiberes ved å anvende antistoffene ifølge den foreliggende søknad inkluderer cancere som typisk responser på en immunterapi. Representative eksempler på cancere for behandling med kombinasjonsterapien ifølge den foreliggende beskrivelse inkluderer melanom (f.eks. metastatisk malignt melanom), renal cancer, prostatacancer, brystcancer, koloncancer og lungecancer. Eksempler på andre cancere som kan behandles ved å anvende fremgangsmåten ifølge foreliggende beskrivelse inkluderer bencancer, pankreascancer, hudcancer, cancer i hodet eller hals, kutan eller intraokkulær malignt melanom, uterincancer, ovariecancer, rektal cancer, cancer i analregionen, magecancer, testikkelcancer, karcinom i de fallopiske rør, edometrie-karcinom, cervix karcinom, vagina karsinom, karsinom i vulva, Hodgkins sykdom, ikke-Hodgkins lymfom, øsofagus cancer, cancer i tynntarm, cancer i det endokrine system, thyreoideacancer, parathyreoideacancer, binyrecancer, sarkom i mykt vev, uretracancer, peniscancer, kronisk eller akutt leukemi som inkluderer akutt myeloid leukemi, kronisk myeloid leukemi, akutt lymfoblastisk leukemi, kronisk lymfocytisk leukemi, faste tumorer i barndom, lymfocytisk lymfom, blærecancer, cancer i nyre eller ureter, karsinom i nyrebekken, neoplasme i sentralnervesystemet (CNS), primær CNS lymfom, tumor angiogenese, spinalkanaltumor, hjernestammegliom, pituitær adenom, Kaposi sarkom, epidermoid cancer, skvamøs-celle-cancer, T-celle-lymfom, miljøinduserte cancere som inkluderer dem indusert

ved asbest og kombinasjoner av de nevnte cancere. Den foreliggende oppfinnelse er også anvendbar for behandling av metastatiske cancere.

- 5 I bestemte utførelsesformer kan kombinasjonen av terapeutiske antistoffer som omtalt heri administreres samtidig som en enkelt sammensetning i en farmasøytisk akseptert bærer, eller parallelt som separate sammensetninger med hvert antistoff i en farmasøytisk akseptert bærer. I en annen
- 10 utførelsesform kan kombinasjonen av terapeutiske antistoffer administreres påfølgende. Et anti-CTLA-4 antistoff og et anti-PD-1 antistoff kan f.eks. administreres påfølgende, slik som at anti-CTLA-4 administreres først og anti-PD-1 deretter, eller anti-PD-1 administreres først og anti-CTLA-4 deretter.
- 15 Videre, dersom mere enn en dose av kombinasjonsterapien administreres påfølgende, kan rekkefølgen av den påfølgende administrering reverseres eller holdes i den samme rekkefølge på hvert tidspunkt av administreringen, påfølgende administreringer kan kombineres med parallelle administreringer,
- 20 eller en hvilken som helst kombinasjon derav. Den første administrering av en kombinasjon av anti-CTLA-4 antistoff og anti-PD-1 antistoff kan f.eks. være samtidig, den andre administrering kan være påfølgende med anti-CTLA-4 først og anti-PD-1 deretter, og den tredje administrering kan være
- 25 påfølgende med anti-PD-1 først og anti-CTLA-4 deretter osv. Et annet representativt doseringsskjema kan involvere en første administrering som er påfølgende med anti-PD-1 først og anti-CTLA-4 deretter, og hvor påfølgende administreringer kan være parallelle.
- 30 Eventuelt kan kombinasjonen av anti-PD-1 og anti-CTLA-4 antistoffer videre kombineres med et immunogent middel, slik som cancerøse celler, rensede tumorantigener (som inkluderer rekombinante proteiner, peptider og karbohydratmolekyler),
- 35 celler, og celler transfektert med gener som koder for immunstimulerende cytokiner (He et al. (2004) J. Immunol. 173:4919-28). Ikke-begrensede eksempler på tumorvaksiner som kan anvendes inkluderer peptider av melanomantigener, slik som peptider av gp100, MAGE antigener, Trp-2, MART1

og/eller tyrosinase, eller tumorceller transfektert til å uttrykke cytokinet GM-CSF (omtalt videre nedenfor).

En kombinert PD-1 og CTLA-4 blokade kan videre kombineres med
 5 en vaksinasjonsprotokoll. En rekke eksperimentelle strategier for vaksinasjon mot tumorer er blitt tenkt ut (se Rosenberg, S. (2000) Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C., 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D. (2000) ASCO
 10 Educational Book Spring: 414-428; Foon, K. (2000) ASCO Educational Book Spring: 730-738; se også Restifo and Sznol, Cancer Vaccines, Ch. 61, pp. 3023-3043 i DeVita et al. (eds.), 1997, Cancer: Principles and Practice of Oncology. Fifth Edition). I en av disse strategiene fremstilles en
 15 vaksine ved å anvende autologe eller allogene tumorceller. Disse cellulære vaksiner er blitt vist til å være mest effektive når tumorcellene er transdusert til å uttrykke GM-CSF. GM-CSF er blitt vist til å være en potent aktivator av antipresentasjon for tumorvaksinasjon (Dranoff et al.
 20 (1993) Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 90: 3539-43).

Studiet av genekspresjon og stor-skala genekspresjonsmønstre i forskjellige tumorer har ført til definisjonen av såkalte tumorspesifikke antigener (Rosenberg (1999) Immunity 10:281-
 25 7). I en rekke tilfeller er disse tumorspesifikke antigener differensieringsantigener uttrykt i tumorene og i cellen hvorfra tumoren oppstår, f.eks. melanocytantigener gp100, MAGE antigener og Trp-2. Viktigere, kan mange av disse antigener bli vist til å være targetene for tumorspesifikke T
 30 celler funnet i verten. I bestemte utførelsesformer kan en kombinert PD-1 og CTLA-4 blokade ved å anvende antistoff-sammensetninger beskrevet heri anvendes sammen med en samling av rekombinante proteiner og/eller peptider uttrykt i en tumor for å generere en immunrespons mot disse proteiner.
 35 Disse proteiner betraktes normalt av immunsystemet som selv-antigener og er derfor tolerante for dem. Tumorantigenet kan også inkludere proteinet telomerase, som kreves for syntesen og telomerer av kromosomer og som uttrykkes i mere enn 85% av humane cancere og i kun et begrenset antall somatisk vev (Kim

et al. (1994) *Science* 266: 2011-2013). (Disse somatiske vev kan beskyttes mot immunangrep ved forskjellige midler).

Tumorantigen kan også være "neo-antigen" uttrykt i cancer-celler på grunn av somatiske mutasjoner som forandrer proteinsekvens eller danner fusjonsproteiner mellom to ikke-relaterte sekvenser (dvs. bcr-abl i Philadelphia kromosomet), eller idiotype fra B celle tumorer.

Andre tumorvaksiner kan inkludere proteiner fra virus

innblandet i humane cancere slik som Humane Papilloma Viruser (HPV), Hepatitt Viruser (HBV og HCV) og Kaposi Herpes Sarkom Virus (KHSV). En annen form av tumorspesifikt antigen som kan anvendes sammen med PD-1 blokade er rensede varmesjokkproteiner (HSP) isolert fra selve tumorvevet. Disse varmesjokkproteiner inneholder fragmenter av proteiner fra tumorcellen og disse HSP'er er svært effektive ved avlevering til genpresenterende celler for å utløse tumorimmunitet (Suot & Srivastava (1995) *Science* 269:1585-1588; Tamura et al. (1997) *Science* 278:117-120).

Dendrittiske celler (DC) er potente antigenpresenterende

celler som kan anvendes for å prime antigen-spesifikke responser. DC'er kan fremstilles *ex vivo* og lastes med forskjellige protein- og peptidantigener såvel som tumorcelleekstrakter (Nestle et al. (1998) *Nature Medicine* 4: 328-332). DC'er kan likeledes også transduseres ved hjelp av genetiske midler til å uttrykke disse tumorantigener. DC'er er også blitt fusjonert direkte til tumorceller for immuniseringsformål (Kugler et al. (2000) *Nature Medicine* 6:332-336). Som en vaksinasjonsmetode kan DC immunisering effektivt videre kombineres med en kombinert PD-1 og CTLA-4 blokade for å aktivere mere potente anti-tumor responser.

En kombinert PD-1 og CTLA-4 blokade kan videre også kombi-

neres med standard cancerbehandling. F.eks. kan en kombinert PD-1 og CTLA-4 blokade effektivt kombineres med kjemoterapeutiske regimer. I disse tilfeller, som observert med kombinasjon av anti-PD-1 og anti-CTLA-4 antistoffer, kan det være mulig å redusere dosen av annet kjemoterapeutisk middel

administrert med kombinasjonen ifølge den foreliggende beskrivelse (Mokyr et al. (1998) Cancer Research 58: 5301-5304). Et eksempel på en slik kombinasjon er en kombinasjon av anti-PD-1 og anti-CTLA-4 antistoffer som videre er i

5 kombinasjon med dekarbazin for behandling av melanom. Et annet eksempel er en kombinasjon av anti-PD-1 og anti-CTLA-4 antistoffer som videre er i kombinasjon med interleukin-2 (IL-2) for behandlingen av melanom. Den vitenskapelige begrunnelse bak den kombinerte bruken av PD-1 og CTLA-4

10 blokade med kjemoterapi er at celledød, som er en følge av den cytotoxiske virkningen av de fleste kjemoterapeutiske forbindelser, bør resultere i økte nivåer av tumorantigen i det antigenpresenterende sporet. Andre kombinasjonsterapier som kan resultere i synergi med en kombinert PD-1 og CTLA-4

15 blokade gjennom celledød inkluderer stråling, kirurgi eller hormoneprivasjon. Hver av disse protokoller danner en kilde av tumorantigen i verten. Angiogeneseinhibitorer kan også kombineres med en kombinert PD-1 og CTLA-4 blokade. Inkubering av angiogenese fører til tumorcelledød, som også kan være

20 en tumorantigenkilde for innføring i vertsantigen-presentasjonsspor.

En kombinasjon av PD-1 og CTLA-4 blokkerende antistoffer kan også anvendes i kombinasjon med bispesifikke antistoffer som

25 targeterer Fc α eller Fc γ reseptoruttrykkende effektorceller mot tumorceller (se f.eks. U.S. patenter nr. 5 922 845 og 5,837,243). Bispesifikke antistoffer kan anvendes for å targetere to separate antigener. Anti-Fc reseptor/antitumorantigen (f.eks. Her-2/neu) bispesifikke antistoffer er f.eks.

30 blitt anvendt for å targetere makrofager mot tumorseter. Denne targetering kan mere effektivt aktivere tumorspesifikke responser. T-celle armen av disse responser vil økes ved bruk av en kombinert PD-1 og CTLA-4 blokade. Alternativt kan antigen avleveres direkte til DC'er ved anvendelse av

35 bispesifikke antistoffer som binder til tumorantigen og en dendrittisk celle-spesifikk celleroverflatemarkør.

I et annet eksempel kan en kombinasjon av anti-PD-1 og anti-CTLA-4 antistoffer anvendes sammen med anti-neoplastiske

antistoffer slik som Rituxan (rituximab), Herceptin (trastuzumab), Bexxar (tositumomab), Zevalin (ibritumomab), Campath (alemtuzumab), Lymphocide (eprtezumab), Avastin (bevacizumab) og Tarceva (erlotinib), og lignende. Som et
 5 eksempel og i det man ikke ønsker å bli bundet av noen teori, kan behandling med et anti-cancerantistoff eller et anti-cancerantistoff konjugert til et toksin føre til cancercelledød (f.eks. tumorceller) som vil forsterke en immunrespons mediert ved CTLA-4 eller PD-1. I et eksempel på
 10 en utførelsesform, kan en behandling av en hyperproliferativ sykdom (f.eks. cancertumor) inkludere et anti-cancerantistoff i kombinasjon med anti-PD-1 og anti-CTLA-4 antistoffer, samtidig eller påfølgende eller en hvilken som helst kombinasjon derav, som kan forsterke en anti-tumorimmunrespons ved
 15 verten.

Tumorer unngår vertens immunovervåkning ved en rekke mekanismer. Mange av disse mekanismer kan overvinnes ved inaktivering
 20 ingen av proteiner, som uttrykkes ved tumorene og som er immunsuppressive. Disse inkluderer, blant andre, TGF- β (Kehrl, J. et al. (1986) J. Exp. Med. 163: 1037-1050), IL-10 (Howard, M. & O'Garra, A. (1992) Immunology Today 13: 198-200), og Fas ligand (Hahne, M. et al. (1996) Science 274: 1363-1365). I et annet eksempel kan antistoffer mot hver av
 25 disse entiteter kombineres med en anti-PD-1 og anti-CTLA-4 kombinasjon for å virke mot effektene av de immunsupprimerende midler og favoriserer anti-tumorimmunresponser ved verten.

30 Andre antistoffer som kan anvendes for å aktivere vertens immun-responderbarhet kan videre anvendes i kombinasjon med en anti-PD-1 og anti-CTLA-4 kombinasjon. Disse inkluderer molekyler på overflaten av dendritiske celler som aktiverer DC funksjon og antigenpresentasjon. Anti-CD40 antistoffer er
 35 i stand til å substituere effektivt for T-celle hjelpeaktivitet (Ridge, J. et al. (1998) Nature 393: 474-478) og kan anvendes sammen med en anti-PD-1 og anti-CTLA-4 kombinasjon (Ito, N. et al. (2000) Immunobiology 201 (5) 527-40).
 Aktivisering av antistoffer mot T-celle ko-stimulerende

molekyler, slik som OX-40 (Weinberg, A. et al. (2000) *Immunol* 164: 2160-2169), 4-1BB (Melero, I. et al. (1997) *Nature Medicine* 3: 682-685 (1997), og ICOS (Hutloff, A. et al. (1999) *Nature* 397: 262-266) kan også sørge for økte nivåer av
5 T-celle asktivering.

Benmargtransplantasjon anvendes for tiden for å behandle en rekke tumorer av hematopoetisk opprinnelse. Mens "graft-versus-host" sykdom er en følge av denne behandling, kan
10 terapeutisk fordel oppnås fra "graft-versus-tumor" responser. En kombinert PD-1 og CTLA-4 blokada kan anvendes for å øke effektiviteten av donor-podede tumorspesifikke T-celler.

Der er også en rekke eksperimentelle behandlingsprotokoller
15 som involverer *ex vivo* aktivering og ekspansjon av antigen-spesifikke T-celler og adoptiv overføring av disse celler inn i resipienter for å antigen-spesifikke T-celler mot tumor (Greenberg, R. & Riddell, S. (1999) *Science* 285: 546-51). Disse metoder kan også anvendes for å aktivere T-celleres-
20 ponser mot infeksiose midler slik som CMV. *Ex vivo* aktivering i nærvær av anti-PD-1 og anti-CTLA-4 antistoffer kan forventes å øke hyppigheten og aktiviteten av de adoptivt overførte T-celler.

25 Som angitt heri kan organer utvise immunrelaterte negative hendelser etter immunstimulerende terapeutisk antistoff-terapi, slik som GI kanalen (diaré og kolitt) og huden (utslett og pruritt) etter behandling med anti-CTLA-4 antistoff. Ikke-kolon gastrointestinale immunrelaterte negative
30 hendelser er f.eks. også blitt observert i øsofagus (øsofagitt), duodenum (duodenitt), og ileum (ileitt) etter anti-CTLA-4 antistoffbehandling.

I bestemte utførelsesformer tilveiebringer den foreliggende
35 oppfinnelsen en fremgangsmåte for å endre en negativ hendelse forbundet med behandling av en hyperproliferativ sykdom med et immunstimulerende middel, som omfatter administrering av et anti-PD-1 antistoff og en subterapeutisk dose av anti-CTLA-4 antistoff til et individ. Fremgangsmåten ifølge

oppfinnelsen tilveiebringer f.eks. en fremgangsmåte for å redusere forekomsten av immunstimulerende terapeutisk anti-indusert kolitt eller diaré ved å administrere et ikke-absorberbart steroid til pasienten. Fordi enhver pasient som vil motta et immunstimulerende terapeutisk antistoff har risiko for å utvikle kolitt eller diaré indusert ved et slikt antistoff, er hele denne pasientpopulasjon egnet for terapi i henhold til fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen. Skjønt steroider er blitt administrert for å behandle inflammatorisk tarmsykdom (IBD) og forhindre eksacerbasjonen av IBD, er de ikke blitt anvendt for å forhindre (nedsette forekomsten av) IBD i pasienter som ikke er blitt diagnostisert med IBD. De signifikante bivirkninger forbundet med steroider, selv ikke-absorberbare steroider, har virket mot profylaktisk bruk.

15

I ytterligere utførelsesformer kan en kombinasjons PD-1 og CTLA-4 blokkade (dvs. immunstimulerende terapeutiske anti-stoffer anti-PD-1 og anti-CTLA-4) videre kombineres med bruken av et hvilket som helst ikke-absorberbart steroid. Som anvendt heri er et "ikke-absorberbart steroid" et glukokortikoid som utviser omfattende første passeringsmetabolisme slik at, etter metabolisme i lever, er biotilgjengeligheten av steroidet lav, dvs. mindre enn omtrent 20%. I en utførelsesform av oppfinnelsen er det ikke-absorberbare steroidet budesonid. Budesonid er et lokalt virkende glukokortikosteroid som metaboliseres i stor utstrekning, primært ved leveren, etter oral administrering. ENTOCORT EC (AstraZeneca) er en pH og tidsavhengig oral formulering av budesonid utviklet for å optimalisere legemiddelavlevering til ileum og gjennom kolon. ENTOCORT EC er godkjent i USA for behandling av mild til moderat Crohns sykdom som involverer ileum og/eller ascenderende kolon. Den vanlige orale dosering av ENTOCORT EC for behandling av Crohns sykdom er 6 til 9 mg/døgn. ENTOCORT EC frigis i tarmene før den absorberes og bibeholdes i tarmmukosa. Straks den passerer gjennom tarmmukosa-targetvevet, blir ENTOCORT EC omfattende metabolisert ved hjelp av cytokrom P450 systemet i leveren til metabolitter med neglisjerbar glukokortikoidaktivitet. Biotilgjengeligheten er derfor lav (omtrent 10%). Den lave

biotilgjengelighet av budesonid resulterer i et forbedret terapeutisk forhold sammenlignet med andre glukokortikoider med mindre omfattende første-passeringsmetabolisme.

Budesonid resulterer i færre negative effekter, som inkluderer mindre hypotalamisk-pituitær suppresjon, enn systemisk virkende kortikosteroider. Den kroniske administrering av ENTOCORT EC kan imidlertid resultere systemiske glukokortikoideffekter slik som hyperkortisisme og adrenal suppresjon. Se PDR 58th ed. 2004; 608-610.

10

I ytterligere utførelsesformer kan en kombinasjons PD-1 og CTLA-4 blokkade (dvs. immunstimulerende terapeutiske antistoffer anti-PD-1 og anti-CTLA-4) sammen med et ikke-absorberbart steroid videre kombineres med et salicylat. Salicylater inkluderer 5-ASA midler slik som f.eks.: sulfasalazin (AZULFIDINE, Pharmacia & UpJohn); olsalazin (DIPENTUM, Pharmacia & UpJohn); balsalazid (COLAZAL, Salix Pharmaceuticals, Inc.); og mesalamin (ASACOL, Procter & Gamble Pharmaceuticals; PENTASA, Shire US; CANASA, Axcan Scandipharm, Inc.; ROWASA, Solvay).

20

I overensstemmelse med fremgangsmåtene for den foreliggende oppfinnelse kan et salicylat administrert i kombinasjon med anti-PD-1 og anti-CTLA-4 antistoffer og et ikke-absorberbart steroid inkludere en hvilken som helst overlappende eller sekvensiell administrering av salicylatet og det ikke-absorberbare steroid for å nedsette forekomst av kolitt induert ved de immunstimulerende antistoffer. Således omfatter f.eks. fremgangsmåter for å redusere forekomst av kolitt induert ved de immunstimulerende antistoffer ifølge den foreliggende oppfinnelse, administrering av et salicylat og et ikke-absorberbart steroid samtidig eller sekvensielt (f.eks. et salicylat administrert 6 timer etter et ikke-absorberbart steroid), eller enhver kombinasjon derav.

25

30

35

Videre, ifølge den foreliggende oppfinnelse, kan et salicylat og et ikke-absorberbart steroid administreres ved hjelp av den samme rute (f.eks. begge administreres oralt) eller ved forskjellige ruter (f.eks. et salicylat administreres oralt og et ikke-absorberbart steroid administreres rektalt), som

kan avvike fra den eller de ruter som anvendes for å administrere anti-PD-1 og anti-CTLA-4 antistoffene.

Den foreliggende oppfinnelse er videre illustrert ved hjelp av de etterfølgende eksempler som ikke skal anses som begrensende. Innholdet i figurer og alle referanser, patenter og publiserte patentsøknader som angitt gjennom denne søknad er uttrykkelig innlemmet heri ved referanse.

10

EKSEMPLER

Eksempel 1: Dannelse av humane monoklonale antistoffer overfor PD-1

15 Antigen

Immuniseringsprotokoller som anvendes som antigen er både (i) et rekombinant fusjonsprotein omfattende den ekstracellulære del av PD-1 og (ii) membranbundet full-lengde PD-1. Begge antigener ble dannet ved rekombinante transfeksjonsmetoder i en CHO cellelinje.

20

Transgene HuMab og KM mus

Fullstendige humane monoklonale antistoffer mot PD-1 ble fremstilt ved å anvende HCo7 stammen av HuMab transgene mus og KM stammen av transgene transkromosome mus, som hver uttrykker humane antistoffgener. I hver av disse musestammer, er det endogene mus kappa-lettkjedegenet blitt homozygotisk spaltet som beskrevet i Chen et al. (1993) EMBO J. 12:811-820 og det endogene mus tungkjedegenet er blitt homozygotisk spaltet som beskrevet i eksempel i PCT publikasjon WO 01/09187. Hver av disse musestammene bærer et humant kappa lettkjede-transgen, KCo5, som beskrevet i Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851. HCo7 stammen bærer HCo7 humant tungkjede-transgenet som beskrevet i U.S. patenter nr. 5 545 806; 5 625 825; og 5 545 807. KM stammen inneholder SC20 transkromosomet som beskrevet i PCT publikasjon WO 02/43478.

35

HuMab og KM immuniseringer:

For å generere fullstendig humane monoklonale antistoffer mot PD-1, ble HuMab mus og KM mus immunisert med rensset rekombinant PD-1 funksjonsprotein og PD-1 transfekterte CHO celler som antigen. Generelle immuniseringsskjemaer for HuMab mus er

5 beskrevet i Lonberg, N. et al (1994) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851 og PCT publikasjon WO 98/24884. Musene var 6-16 uker gamle ved den første infusjon av antigen. Et rensset rekombinant preparat (5-50 µg) av PD-1 fusjonsproteinantigen og 5

10 - 10×10^6 celler ble anvendt for å immunisere HuMab mus og KM mus intraperitonealt, subkutan (Sc) eller via fotputeinjeksjon.

Transgene mus ble immunisert to ganger med antigen i komplett

15 Freund's adjuvans eller Ribi adjuvans IP, etterfulgt av 3-21 døgns IP (opp til totalt 11 immuniseringer) med antigenet i Freund's inkomplette eller Ribi adjuvans. Immunresponsen ble målt ved retroorbitale blødninger. Plasmaet ble screenet ved hjelp av ELISA (som beskrevet nedenfor), og mus med tilstrekkelige titere av anti-PD-1 humant immunoglobulin ble anvendt

20 for fusjoner. Mus ble boosted intravenøst med antigenet 3 døgn før avliving og fjerning av milten. 10-35 fusjoner for hvert antigen ble typisk gjennomført. Flere dusin mus ble immunisert for hvert antigen.

25

Seleksjon av HuMab eller KM mus som produserer anti-PD-1 antistoffer

For å velge HuMab eller KM mus som produserer antistoffer som bandt PD-1, ble serum fra immuniserte mus testet ved hjelp av

30 ELISA som beskrevet by Fishwild, D. et al. (1996). Kort, ble mikrotiterplater belagt med rensset rekombinant PD-1 fusjonsprotein fra transfekterte CHO celler ved 1-2 µg /ml i PBS, 100 µl/brønn ble inkubert ved 4°C over natten og deretter blokkert med 200 µl/brønn 5% føtalt bovint serum i PBD/Tween

35 (0,05%). Fortynninger av serum fra PD-1 immuniserte mus ble tilsatt til hver brønn og inkubert i 1-2 timer ved omgivelsestemperatur. Platene ble vasket med PBS/Tween og deretter inkubert med et geit-anti-humant IgG polyklonalt antistoff konjugert med pepperrot-peroksidase (HRP) i 1 time ved

romtemperatur. Etter vask ble platene utviklet med ABTS substrat (Sigma, A-1888, 0,22 mg/ml) og analysert ved spektrofotometer ved OD 415-495. Mus som utviklet de høyeste titere av anti-PD-1 antistoffer ble anvendt for fusjoner.

- 5 Fusjoner ble gjennomført som beskrevet nedenfor og hybridom-supernatanter ble testet for anti-PD-1 aktivitet ved ELISA.

Generering av hybridomer som produserer humane monoklonale antistoffer mot PD-1

- 10 Musesplenocytterne, isolert fra HuMab eller KM musene, ble fusjonert til en musemyelom-cellelinje enten ved anvendelse av PEG basert på standard protokoller eller elektrisk felt-basert elektrofusjon ved å anvende en Cyto Pulse stort-kammer cellefusjonselektroporator (Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen
15 Burnie, MD). De resulterende hybridomer ble deretter screenet for produksjon av antigenspesifikke antistoffer. Enkelt celle-suspensjoner av splenocytter fra immuniserte mus ble fusjonert til en fjerdedel av antallet av SP2/0 ikke-utskillende musemyelomceller (ATCC, CRL 1581) med 50% PEG
20 (Sigma). Celler ble utplatet ved omtrent 1×10^5 /brønn i en flatbunnet mikrotiterplate, etterfulgt av en omtrent to ukers inkubasjon i selektivt medium inneholdende 10% føtalt bovint serum, 10% P388D1 (ATCC, CRL TIB-63) kondisjonert medium, 3-5% origen (IGEN) i DMEM (Mediatech, CRL 10013, med høyt
25 glukoseinnhold, L-glutamin og natriumpyruvat) pluss 5 mM HEPES, 0,055 mM 2-merkapttoetanol, 50 mg/ml gentamycin og 1x HAT (Sigma, CRL P-7185). Etter 1-2 uker ble celler dyrket i medium hvori HAT ble erstattet med HT. Individuelle brønner ble deretter screenet ved ELISA (beskrevet ovenfor) for
30 humane anti-PD-1 monoklonale IgG antistoffer. Straks omfattende hybridomvekst forekom, ble medium målt, vanligvis etter 10-14 døgn. Antistoff-utskillende hybridomer ble platet ut igjen, screenet igjen og dersom fremdeles positive for humant IgG, ble anti-PD-1 monoklonale antistoffer sub-
35 klonet minst to ganger ved begrensende fortykning. De stabile subklonene ble deretter dyrket in vitro for å generere små mengder antistoff i vevskulturmedium for ytterligere karakterisering.

Hybridomkloner 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 og 5F4 ble valgt for ytterligere analyse.

EKSEMPEL 2: Strukturell karakterisering av humane monoklo-

5 nale antistoffer 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 og 5F4

cDNA sekvensene som koder for tung og lett kjede variabel regionene av de 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 og 5F4 monoklonale antistoffer ble oppnådd fra henholdsvis 17D8, 2D3,
10 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 og 5F4 hybridomene ved å anvende standard PCR teknikker og ble sekvensert ved å anvende standard DNA sekvenseringsteknikker.

Nukleotid- og aminosyresekvensene til tung kjede variabel
15 regionen av 17D8 er vist i henholdsvis figur 1A og i SEQ ID NO: 57 og 1.

Nukleotid- og aminosyresekvensene til lett kjede variabel regionen av 17D8 er vist i henholdsvis figur 1B og i SEQ ID
20 NO: 64 og 8.

Sammenligning av 17D8 tung kjede immunoglobulinsekvensen med de kjente humane kimlinje immunoglobulin tung kjede sekvensene viser at 17D8 tung kjede anvender et VH segment
25 fra human kimlinje VH3-33, et udefinert D segment, og et JH segment fra human kimlinje JH 4b. Sammenstillingen av 17D8 VH sekvensen i forhold til kimlinje VH3-33 sekvensen er vist i figur 8. Ytterligere analyse av 17D8 VH sekvensen ved å anvende Kabat systemet for CDR region bestemmelse førte til
30 beskrivelsen av tung kjede CDR1, CDR2 og CD3 regionene som vist i henholdsvis figurer 1A og 8, og i SEQ ID NO: 15, 22 og 29.

Sammenligning av 17D8 lett kjede immunoglobulinsekvensen med
35 de kjente humane kimlinje immunoglobulin lett kjede sekvensene viser at 17D8 lettkjeden anvender et VL segment fra human kimlinje VK L6 og et JK segment fra human kimlinje JK 4. Sammenstillingen av 17D8 VL sekvensen i forhold til

kimlinje VK L6 sekvensen er vist i figur 9. Videre analyse av 17D8 VL sekvensen ved anvendelse av Kabat systemet for CDR region bestemmelse førte til beskrivelsen av lett kjede CDR1, CDR2 og CD3 regionene som vist i henholdsvis figurer 1B og 9, og i SEQ ID NO: 36, 43 og 50.

Nukleotid- og aminosyresekvensene for tung kjede variabel regionen av 2D3 er vist i henholdsvis figur 2A og i SEQ ID NO: 58 og 2.

10

Nukleotid- og aminosyresekvensene for lett kjede variabel regionen av 2D3 er vist i henholdsvis figur 2B og i SEQ ID NO: 65 og 9.

15 Sammenligning av 2D3 tung kjede immunoglobulinsekvensen med de kjente humane kimlinje immunoglobulin tung kjede sekvensene viser at 2D3 tungkjeden anvender et VH segment fra human kimlinje VH3-33, et D segment fra human kimlinje 7-27 og et JH segment fra human kimlinje JH 4b. Sammenstillingen av 2D3 VH sekvensen i forhold til kimlinje VH3-33 sekvensen er vist i figur 8. Videre analyse av 2D3 VH sekvensen ved å anvende Kabat systemet for CDR region bestemmelse førte til beskrivelsen av tung kjede CDR1, CDR2 og CD3 regionene som vist i henholdsvis figurer 2A og 8, og i SEQ ID NO: 16, 23 og 25 30.

Sammenligning av 2D3 lett kjede immunoglobulinsekvensen med de kjente humane kimlinje immunoglobulin lett kjede sekvensene viste at 2D3 lett kjeden anvender et VL segment fra human kimlinje VK L6 og et JK segment fra human kimlinje JK 4. Sammenstillingen av 2D3 VL sekvensen i forhold til kimlinje VK L6 sekvensen er vist i figur 9. Videre analyse av 2D3 VL sekvensen ved å anvende Kabat systemet for CDR region bestemmelse førte til beskrivelsen av lett kjede CDR1, CDR2 og CD3 regionene som vist i henholdsvis figurer 2B og 9, og i SEQ ID NO: 37, 44 og 51.

35

Nukleotid- og aminosyresekvensene av tung kjede variabel regioenn av 4H1 er vist i henholdsvis figur 3A og i SEQ ID NO: 59 og 3.

- 5 Nukleotid- og aminosyresekvensene av lett kjede variabel regionen av 4H1 er vist i henholdsvis figur 3B og i SEQ ID NO: 66 og 10.

Sammenligning av 4H1 tung kjede immunoglobulinsekvensen med
 10 de kjente humane kimlinje immunoglobulin tung kjede sekvensene viste at 4H1 tungkjeden anvender et VH segment fra human kimlinje VH3-33, som udefinert D segment, og et JH segement fra human kimlinje JH 4b. Sammenstillingen av 4H1 VH sekvensen i forhold til kimlinje VH3-33 sekvensen er vist
 15 i figur 8. Ytterligere analyse av 4H1 VH sekvensen ved å anvende Kabat systemet for CDR region bestemmelse førte til beskrivelsen av tung kjede CDR1, CDR2 og CD3 regionene som vist i henholdsvis figurer 3A og 8, og i SEQ ID NO: 17, 24 og 31.

20 Sammenligning av 4H1 lett kjede immunoglobulinsekvensen med de kjente humane kimlinje immunoglobulin lett kjede sekvensene viste at 4H1 lett kjeden anvender et VL segment fra human kimlinje VK L6 og et JK segment fra human kimlinje
 25 JK 1. Sammenstillingen av 4H1 VL sekvensen i forhold til kimlinje VK L6 sekvensen er vist i figur 10. Videre analyse av 4H1 VL sekvensen ved å anvende Kabat systemet for CDR region bestemmelse førte til beskrivelsen av lett kjede CDR1, CDR2 og CD3 regionene som vist i henholdsvis figurer 3B og
 30 10, og i SEQ ID NO: 38, 45 og 52.

Nukleotid- og aminosyresekvensene for tung kjede variabel regionen av 5C4 er vist i henholdsvis figur 4A og i SEQ ID NO: 60 og 4.

35 Nukleotid- og aminosyresekvensene av lett kjede variabel regionen av 5C4 er vist i henholdsvis figur 4B og i SEQ ID NO: 67 og 11.

Sammenligning av 5C4 tung kjede immunoglobulinsekvensen med de kjente humane kimlinje immunoglobulin tung kjede sekvensene viste at 5C4 tung kjeden anvender et VH segment fra human kimlinje VH3-33, et udefinert D segment, og et JH segment fra human kimlinje JH 4b. Sammenstillingen av 5C4 VH sekvensen i forhold til kimlinje VH3-33 sekvensen er vist i figur 8. Videre analyse av 5C4 VH sekvensen ved å anvende Kabat systemet for CDR region bestemmelse førte til beskrivelsen av tung kjede CDR1, CDR2 og CD3 regionene som vist i henholdsvis figurer 4A og 8, og i SEQ ID NO: 18, 25 og 32.

Sammenligning av 5C4 lett kjede immunoglobulinsekvensen med de kjente humane kimlinje immunoglobulin lett kjede sekvensene viste at 5C4 lett kjeden anvender et VL segment fra human kimlinje VK L6 og et JK segment fra human kimlinje JK 1. Sammenstillingen av 5C4 VL sekvensen i forhold til kimlinje VK L6 sekvensen er vist i figur 10. Videre analyse av 5C4 VL sekvensen ved å anvende Kabat systemet for CDR region bestemmelse førte til beskrivelsen av lett kjede CDR1, CDR2 og CD3 regionene som vist i henholdsvis figurer 4B og 10, og i SEQ ID NO: 39, 46 og 52.

Nukleotid- og aminosyresekvensene for tung kjede variabel regionen av 4A11 er vist i henholdsvis figur 5A og i SEQ ID NO: 61 og 5.

Nukleotid- og aminosyresekvensene til lett kjede variabel regionen av 4A11 er vist i henholdsvis figur 5B og i SEQ ID NO: 68 og 12.

Sammenligning av 4A11 tung kjede immunoglobulinsekvensen med de kjente humane kimlinje immunoglobulin tung kjede sekvensene viste at 4A11 tungkjeden anvender et VH segment fra human kimlinje VH4-39, et D segment fra human kimlinje 3-9, og et JH segment fra human kimlinje JH 4b. Sammenstillingen av 4A11 VH sekvensen i forhold til kimlinje VH4-39 sekvensen er vist i figur 11. Videre analyse av 4A11 VH sekvensen ved å anvende Kabat systemet for CDR region

bestemmelse førte til beskrivelsen av tung kjede CDR1, CDR2 og CD3 regionene som vist i henholdsvis figurer 5A og 11, og i SEQ ID NO: 19, 26 og 33.

5 Sammenligning av 4A11 lett kjede immunoglobulinsekvensen med de kjente humane kimlinje immunoglobulin lett kjede sekvensene viste at 4A11 lettkjeden anvender et VL segment fra human kimlinje VK L15 og et JK segment fra human kimlinje JK 1. Sammenstillingen av 4A11 VL sekvensen i forhold til
10 kimlinje VK L6 sekvensen er vist i figur 12. Videre analyse av 4A11 VL sekvensen ved å anvende Kabat systemet for CDR region bestemmelse førte til beskrivelsen av lett kjede CDR1, CDR2 og CD3 regionene som vist i henholdsvis figurer 5B og 12, og i SEQ ID NO: 40, 47 og 54.

15

Nukleotid- og aminosyresekvensene for tung kjede variabel regionen av 7D3 er vist i henholdsvis figur 7A og i SEQ ID NO: 62 og 6.

20 Nukleotid- og aminosyresekvensene for lett kjede variabel regionen av 7D3 er vist i henholdsvis figur 7B og i SEQ ID NO: 69 og 13.

Sammenligning av 7D3 tung kjede immunoglobulinsekvensen med
25 de kjente humane kimlinje immunoglobulin tung kjede sekvensene vist at 7D3 tungkjeden anvender et VH segment fra humant kimlinje VH 3-33, et human kimlinje 7-27 D segment, og et JH segment fra human kimlinje JH 4b. Sammenstillingen av 7D3 VH sekvensen i forhold til kimlinje VH 3-33 sekvensen er
30 vidt i figur 8. Videre analyse av 7D3 VH sekvensen ved å anvende Kabat systemet for CDR region bestemmelse førte til beskrivelsen av tung kjede CDR1, CDR2 og CD3 regionene som vist i henholdsvis figurer 6A og 8, og i SEQ ID NO: 20, 27 og 34.

35

Sammenligning av 7D3 lett kjede immunoglobulinsekvensen med de kjente humane kimlinje immunoglobulin lett kjede sekvensene vist at 7D3 lettkjeden anvender et VL segment fra humant kimlinje VK L6 og et JK segment fra human kimlinje JK

4. Sammenstillingen av 7D3 VL sekvensen i forhold til kimlinje VK L6 sekvensen er vist i figur 9. Videre analyse av 7D3 VL sekvensen ved å anvende Kabat systemet for CDR region bestemmelse førte til beskrivelsen av lett kjede CDR1, CDR2 og CD3 regionene som vist i henholdsvis figurer 6B og 9, og i SEQ ID NO: 41, 48 og 55.

Nukleotid- og aminosyresekvensene for tung kjede variabel regionen av 5F4 er vist i henholdsvis figur 7A og i SEQ ID NO: 63 og 7.

Nukleotid- og aminosyresekvensene av lett kjede variabel regionen av 5F4 er vist i henholdsvis figur 7BA og i SEQ ID NO: 70 og 14.

Sammenligning av 5F4 tung kjede immunoglonulinsekvensen med de kjente humane kimlinje immunoglobulin tung kjede sekvensene viste at 5F4 tungkjeden anvender et VH segment fra humant kimlinje VH 4-39, et D segment fra human kimlinje 3-9, og et JH segment fra humant kimlinje JH 4b. Sammenstillingen av 5F4 VH sekvensen i forhold til kimlinje VH 4-39 sekvensen er vist i figur 11. Videre analyse av 5F4 VH sekvensen ved å anvende Kabat systemet for CDR region bestemmelse førte til beskrivelsen av tung kjede CDR1, CDR2 og CD3 regionene som vist i henholdsvis figurer 7A og 11, og i SEQ ID NO: 21, 28 og 35.

Sammenligning av 5F4 lett kjede immunoglonulinsekvensen med de kjente humane kimlinje immunoglobulin lett kjede sekvensene viste at 5F4 lett kjeden anvender et VL segment fra human kimlinje VK L15 og et JK segment fra human kimlinje JK 1. Sammenstillingen av 5F4 VL sekvensen i forhold til kimlinje VK L6 sekvensen er vist i figur 12. Videre analyse av 5F4 VL sekvensen ved å anvende Kabat systemet for CDR region bestemmelse førte til beskrivelsen av lett kjede CDR1, CDR2 og CD3 regionene som vist i henholdsvis figurer 7B og 12, og i SEQ ID NO: 42, 49 og 56.

EKSEMPEL 3: Karakterisering av bindingsspesifisitet og bindingskinetikker for anti-PD-1 humane monoklonale antistoffer

5 I dette eksempel ble bindingsaffinitet og bindingskinetikker for anti-PD-1 antistoffer undersøkt ved hjelp av Biacore analyse. Bindingsspesifisitet og kryss-konkurranse ble undersøkt ved flow-cytometri.

10 Bindingsaffinitet og bindingskinetikker

Anti-PD-1 antistoffer ble karakterisert angående affiniteter og bindingskinetikker ved hjelp fra Biacore analyse (Biacore AB, Uppsala, Sweden). Renset rekombinant humant PD-1 fusjonsprotein ble kovalent koblet til en CM5 chip

15 (karboksymetyldekstran-belagt chip) via primære aminer, ved anvendelse av standard aminkoblingskjemi og kit tilveiebragt fra Biacore. Binding ble målt ved å strømme antistoffene i HBS EP buffer (tilveiebragt fra Biacore AB) ved en konsentrasjon på 267 nM ved en strømningshastighet på 50
20 µl/min. Antigen-antistoff assosiasjonskinetikkene ble fulgt i 3 minutter og dissosiasjonskinetikkene ble fulgt i 7 minutter. Assosiasjons- og disassosiasjonskurvene ble tilpasset til en 1:1 Langmuir bindingsmodell ved å anvende BIAevaluation software (Biacore AB). For å minimalisere
25 effektene av aviditet i estimeringen av bindingskonstantene, ble kun det initiale segment av data svarende til assosiasjons- og dissosiasjonsfaser anvendt for tilpasning. K_D , k_{on} og k_{off} verdier som ble bestemt er vist i tabell 2.

30 **Table 2. Biacore bindingsdata for PD-1 humane monoklonale antistoffer.**

Prøve nr.	Prøve ID	Affinitet $K_D \times 10^{-9}$ (M)	"On rate" $k_{on} \times 10^5$ (1/Ms)	"Off rate" $k_{off} \times 10^{-4}$ (1/s)
1	17D8	0,16	2,56	0,45
2	2D3	1,20	3,77	4,52
3	4H1	5,46	3,15	1,72
4	5C4	0,73	4,32	3,15
5	4A11	0,13	0,76	0,099
6	7D3	2,49	18,2	4,54
7	5F4	2,91	8,74	2,54

Bindingsspesifisitet ved flow-cytometri

"Chinese hamster ovary" (CHO) cellelinjer som uttrykker rekombinant humant PD-1 i celleoverflaten ble utviklet og anvendt for å bestemme spesifisiteten for PD-1 humane monoklonale antistoffer ved hjelp av flow-cytometri. CHO celler ble transfektert med ekspresjonsplasmider inneholdende full-lengde cDNA som koder for transmembranformer av PD-1. Binding av 5C4 og 4H1 anti-PD-1 humane monoklonale antistoffer ble bestemt ved å inkubere de transfekterte celler med anti-PD-1 humane monoklonale antistoffer i en konsentrasjon på 20 µg/ml. Cellene ble vasket og binding ble detektert med et FITC-merket anti-humant IgG Ab. Flow-cytometrianalyser ble gjennomført ved å anvende en FACScan flow-cytometri (Becton Dickinson, San Jose, CA). Resultatene er vist i figurer 13A(5C4) og 13B(4H1). De anti-PD-1 humane monoklonale antistoffene bandt til CHO cellene transfektert med human PD-1 men ikke til CHO celler som ikke var transfektert med human PD-1. Disse data viser spesifisiteten av anti-PD-1 humane monoklonale antistoffer for PD-1.

Bindingsspesifisitet ved ELISA overfor andre CD28 familiemedlemmer

En sammenligning av bindingen av anti-PD-1 antistoffer til CD28 familiemedlemmer ble gjennomført ved standard ELISA ved å anvende fire forskjellige CD28 familiemedlemmer for å undersøke spesifisiteten av binding for PD-1.

Fusjonsproteiner av CD28 familiemedlemmer, ICOS, CTLA-4 og CD28 (R&D Biosystems) ble testet for binding overfor anti-PD-1 humane monoklonale antistoffer 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, og 4A11. Standard ELISA prosedyre ble gjennomført. De anti-PD-1 humane monoklonale antistoffene ble tilsatt ved en konsentrasjon på 20 µg/ml. Geit-anti-humant IgG (kappa-kjede-spesifikt) polyklonalt antistoff konjugert med pepperrot-peroksidase (HRP) ble anvendt som sekundært antistoff. Resultatene er vist i figur 14. Hver av de anti-PD-1 humane monoklonale antistoffer 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 og 5F4 bandt med høy spesifisitet til PD-1, men ikke til de andre CD28 familiemedlemmene.

EKSEMPEL 4: Karakterisering av anti-PD-1 antistoffbinding til PD-1 uttrykt på overflaten av humane celler og apeceller

Anti-PD-1 antistoffer ble testet for binding til celler som uttrykker PD-1 på deres celleoverflate ved hjelp av flow-cytometri.

20

Aktiverte humane T-celler, mononukleære celler fra perifert apeblod (PBMC) og CHO celler transfektert med PD-1 ble hver testet for antistoffbinding. Humane T-celler og cynomolgus PBMC ble aktivert ved hjelp av anti-CD3 antistoff for å indusere PD-1 ekspresjon på T-celler for binding med et humant anti-PD-1 monoklonalt antistoff. Binding av 5C4 og 4H1 anti-PD-1 humane monoklonale antistoffer ble bestemt ved å inkubere de transfekterte cellene med antigen IgG1 eller IgG4 former av de anti-PD-1 humane monoklonale antistoffene ved forskjellige konsentrasjoner. Cellene ble vasket og binding ble detektert med et FITC-merket anti-humant IgG Ab. Flow-cytometrianalyse ble gjennomført ved å anvende en FACScan flow-cytometri (Becton Dickinson, San Jose, CA). Resultatene er vist i figurer 15A (aktiverte humane T-celler), 15B (cynomolgusape PBMC) og 15C (PD-1 transfekterte CHO celler). De anti-PD-1 monoklonale antistoffene 5C4 og 4H1 bandt til aktiverte humane T-celler, aktiverte ape PBMC'er og CHO celler transfektert med humant PD-1, som målt ved

gjennomsnittlig fluorescensintensitet (MFI) av farging. Disse data viser at anti-PD-1 HuMAb'er binder til både humant og cynomolgusape celleoverflate PD-1.

5 EKSEMPEL 5: Effekt av humane anti-PD-1 antistoffer på celleproliferasjon og cytokinproduksjon i en blandet lymfocytreaksjon

10 En blandet lymfocytreaksjon ble anvendt for å demonstrere effekten av blokkering av PD-1 sporet til lymfocytteffektorcellen. T-celler i analysen ble testet for proliferasjon, IFN-gamma sekresjon og IL-2 sekresjon i nærvær eller fravær av et anti-PD-1 HuMAb antistoff.

15 Humane T-celler ble rensset fra PBMC ved å anvende en human CD4+ T-celle anrikt kolonne (R&D systems). Hver kultur inneholdt 10^5 rensede T-celler og 10^4 allogene dendrittiske celler i et totalt volum på 200 μ l. Anti-PD-1 monoklonalt antistoff 5C4, 4H1, 17D8, 2D3 eller en Fab fragmentdel av 5C4
20 ble tilsatt til hver kultur ved forskjellige antistoffkonsentrasjoner. Enten ble ikke noe antistoff eller et iso-type kontrollantistoff anvendt som en negativ kontroll. Cellene ble dyrket i 5 døgn ved 37°C. Etter dag 5 ble 100 μ l medium tatt fra hver kultur for cytokin måling. Nivåene av IFN-
25 gamma og andre cytokiner ble målt ved å anvende OptEIA ELISA kit (BD Biosciences). Cellene ble merket med 3 H-tymidin, dyrket i ytterligere 18 timer og analysert for celleproliferasjon. Resultatene er vist i figurer 16A (T-celleproliferasjon), 16B (IFN- γ sekresjon) og 16C (IL-2 sekresjon). De
30 anti-PD-1 humane monoklonale antistoffer fremmet T-celleproliferasjon, IFN-gamma sekresjon og IL-2 sekresjon på en konsentrasjonsavhengig måte. 5C4-Fab fragmentet fremmet også T-celleproliferasjon, IFN-gamma sekresjon og IL-2 sekresjon på en konsentrasjonsavhengig måte. I motsetning, viste
35 kulturer som inneholdt isotype-kontrollantistoffet ikke en økning i T-celleproliferasjon, IFN-gamma eller IL-2 sekresjon.

EKSEMPEL 6: Blokkering av ligandbinding til PD-1 ved humane anti-PD-1 antistoffer

- 5 Anti-PD-1 HuMAb'er ble testet for evnen til å blokkere binding av ligandene PD-L1 og PD-L2 til PD-1 uttrykt på transfekterte CHO celler ved å anvende en flow-cytometri analyse.
- 10 PD-1 uttrykkende CHO celler ble suspendert i FACS buffer (PBS med 4% føtalt kalveserum). Forskjellige konsentrasjoner av anti-PD-1 HuMAb'er 5C4 og 4H1 ble tilsatt til cellesuspensjonen og inkubert ved 4°C i 30 minutter. Ubundet antistoff ble vasket bort og enten ble FITC-merket PD-L1 fusjonsprotein
- 15 eller FITC-merket PD-L2 fusjonsprotein tilsatt til rørene og inkubert ved 4°C i 30 minutter. Flow-cytometri analyse ble gjennom ved å anvende et FACScan flowcytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA). Resultatene er angitt i figurer 17A (blokkering av PD-L1) og 17B (blokkering av PD-L2). De
- 20 anti-PD-1 monoklonale antistoffene 5C4 og 4H1 blokkerte binding av PD-L1 og PD-L2 til CHO celler transfektert med humant PD-1, som målt ved gjennomsnittlig fluorescensintensitet (MFI) av farging. Disse data viser at anti-PD-1 HuMAb'er blokkerer binding av ligand (både PD-L1 og PD-L2)
- 25 til celleoverflate PD-1.

EKSEMPEL 7: Effekt av humane anti-PD-1 antistoffer på frigivelsen av cytokiner i humant blod

- 30 Anti-PD-1 HuMAb'er ble blandet med ferskt humant fullblod for å bestemme om anti-PD-1 HuMAb'er alene stimulerer frigivelsen av bestemte cytokiner fra humane blodceller.

500 µl heparinisert ferskt humant fullblod ble tilsatt til

35 hver brønn. Enten 10 µg eller 100 µg av et anti-PD-1 HuMAb (4H1 eller 5C4, det sistnevnte enten som en IgG1 eller IgG4 isotype) ble tilsatt til hver brønn. Enkelte brønner ble inkubert med et anti-CD3 antistoff som en positiv kontroll,

eller et humant IgG1 eller et humant IgG4 antistoff som isotype-matched negative kontroller. Cellene ble inkubert ved 37°C i enten 6 eller 24 timer. Cellene ble nedsentrifugert og plasmaet ble samlet for måling av cytokinene IFN-gamma, TNF-alfa, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 og IL-12 ved å anvende en cytokin cytometrisk kule-arrayanalyse (BD Biosciences). Konsentrasjonen av hvert cytokin (pg/ml) er vist i tabeller 3a, med en 6 timers inkubasjon, og 3b med en 24 timers inkubasjon, nedenfor. Resultatene viser at behandling med de humane anti-PD-1 antistoffene 5C4 og 4H1 alene ikke stimulerer humane blodceller til å frigi noen av cytokinene i IFN-gamma, TNF-alfa, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 og IL-12.

Tabell 3a. Cytokinproduksjon etter 6 timers inkubasjon

Ab	IFN-gamma (pg/ml)	TNF-alfa (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	IL-2 (pg/ml)
Uten Ab	12,3	2	3	5	3,6	1,9
10 mg/ml anti- CD3	5000	530	82,6	510,4	37,2	467,9
100 mg/ml anti- CD3	5000	571	91,3	530	43,9	551,5
10 mg/ml hIgG1	7	1,8	2,8	4,4	2,6	1,5
100 mg/ml hIgG1	0	2,2	2,7	6	2,6	1,4
10 mg/ml hIgG4	5,4	1,4	2,5	4,5	2,1	1,3
100 mg/ml hIgG4	6,4	2,3	3	32,6	2,9	1,4
10 mg/ml 4H1	6,2	1,8	2,4	4,1	2,8	1,6
100 mg/ml 4H1	11,8	2	2,6	3,5	2,6	1,7
10 mg/ml 5C4 IgG1	4,2	1,6	2,3	3,9	2,5	1,3
100 mg/ml 5C4	0	1,4	2,2	3,6	2,1	1,2

IgG1						
10 mg/ml 5C4 IgG4	8,3	2,5	1,9	4,8	1,6	1,5
100 mg/ml 5C4 IgG4	3,6	1,7	2,4	3,9	2,3	1,5

Tabell 3b. Cytokinproduksjon etter 24 timers inkubasjon

Ab	IFN-gamma (pg/ml)	TNF-alfa (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	IL-2 (pg/ml)
Uten Ab	11,2	2	6,1	5,9	2,6	1,7
10 mg/ml anti- CD3	5000	565,9	432	5000	64,5	1265, 3
100 mg/ml anti- CD3	5000	535	461	5000	73,8	1334, 9
10 mg/ml hIgG1	0	0	0	0	0	0
100 mg/ml hIgG1	11,5	1,7	7,9	60,8	2,9	1,5
10 mg/ml hIgG4	24,6	3,1	8,3	63,4	3,1	2,3
100 mg/ml hIgG4	11,2	1,8	8	27,7	3,1	2,4
10 mg/ml 4H1	27,3	2,9	8	13,9	5,3	2,6
100 mg/ml 4H1	17,5	2,5	4,4	7	4	2,1
10 mg/ml 5C4 IgG1	9,1	2	7,6	68,5	3,5	1,8
100 mg/ml 5C4	12,9	1,9	6,1	25,3	2,9	1,7

IgG1						
10 mg/ml 5C4 IgG4	14	1,9	4,4	3,3	2,6	1,9
100 mg/ml 5C4 IgG4	0	0	0	0	0	0

EKSEMPEL 8: Effekt av anti-PD-1 antistoffer på apoptosen av T-celler

5

Effekten av anti-PD-1 antistoffer på induksjon av apoptose av T-celler ble målt ved å anvende en annexin V fargingstest.

T-celler ble dyrket i en blandet lymfocytreaksjon, som beskrevet over i eksempel 5. Anti-PD-1 antistoff 5C4 ble tilsatt til røret i en konsentrasjon på 25 µg/ml. Et ikke-spesifikt antistoff ble anvendt som en kontroll. Annexin V og propidiumjodid ble tilsatt i henhold til standard protokollen (BD Biosciences). Blandingen ble inkubert i 15 minutter i mørket ved romtemperatur og deretter analysert ved å anvende et FACScan flowcytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA). Resultatene er vist i figur 18. Anti-PD-1 antistoffet 5C4 har ikke en effekt på T-celle apoptose.

EKSEMPEL 9: Effekt av anti-PD-1 antistoffer på cytokinsekresjon ved viral-stimulerte PBMC celler fra en virus-positiv donor

I dette eksempel ble mononukleære celler fra perifert blod (PBMC) fra en donor som er positiv for CMV isolert og eksponert for et CNV lysat i nærvær eller fravær av anti-PD-1 antistoffer for å undersøke effekten av antistoffene på cytokinsekresjon stimulert ved antigen.

2x10⁵ humane PMBC'er fra en CMV positiv donor ble dyrket i et totalt volum på 200 µl og tilsatt i hver brønn sammen med et lysat av CMV-infiserte celler. Anti-PD-1 HuMAb 5C4 ble tilsatt til hver brønn i forskjellige konsentrasjoner i 4 døgn. Etter dag 4 ble 100 µl medium tatt fra hver kultur for cytokinmåling. Nivået av IFN-gamma ble målt ved å anvende OptEIA ELISA kit (BD Biosciences). Cellene ble merket med ³H-tymidin, dyrket i ytterligere 18 timer og analysert for celleproliferasjon. Celleproliferasjonen ble analysert ved å anvende Cell Titer-Glo reagenset (Promega). Resultatene er vist i figur 19. Anti-PD-1 HuMAb 5C4 økte IFN-gamma sekresjon på en konsentrasjonsavhengig måte. Resultatene viser at anti-PD-1 HuMAb'er kan stimulere IFN-gamma frigivelse i en memory T-celle respons fra PBMC celler tidligere stimulert overfor et antigen.

EKSEMPEL 10: Effekt av anti-PD-1 antistoff på sekundær antistoffrespons mot antigen

Mus ble immunisert og re-eksponert med et T1-antigen (DNP-Ficoll) og også behandlet med et rotte anti-mus-PD-1 antistoff, eller et kontrollantistoff for å undersøke effekten av anti-PD-1 antistoffet på antistofftitere.

C57BL6 hunnmus ble oppdelt i to grupper, med 6 mus/gruppe. En gruppe ble behandlet med et kontroll-rotte IgG og den andre med et rotte anti-mus-PD-1 antistoff. Musene ble immunisert med 5 µg DNP-Ficoll (et T1-antigen) i 50 µl CFA i.p. på dag 0. Enten kontroll-rotte IgG antistoffet eller rotte-mPd-1 antistoffet (200 µg/mus) ble gitt i.p. på dager -1, 0 og 2. Fire uker senere ble mus re-eksponert med 5 µg DNP-Ficoll i 50 µl IFA i.p. på dag 0. Rotte anti-mPD-1 antistoff eller kontrollantistoff (200 µg/mus) ble gitt i.p. på dager 0 og 1. Antistofftitere ble målt ved standard ELISA analyse på dag 7 etter boosten. Resultatene er vist i tabell 4 nedenfor. I musene behandlet med anti-mPD-1 antistoffet, viste både IgM og IgG3 isotyper den største økning i titer etter eksponering med T1-antigenet, sammenlignet med mus behandlet med et kontrollantistoff. Disse resultater viser

at anti-PD-1 behandling kan øke antistofftitere som svar på T1-antigen.

5 **Tabell 4. Murin sekundær respons etter behandling med med anti-PD-1 antistoff**

Antistoff Isotype	Kontrollgruppe	Rotte anti-mus PD-1 antistoff	P verdi
IgM	606	1200	0,026
IgG	9	15,55	0,18
IgG1	1,2	1,1	0,83
IgG2b	5,05	9,26	0,18
IgG3	21,9	81,2	0,03

* Resultater som vist er gjennomsnittlig konsentrasjon av antistoff isotype (µg/ml)

10 **EKSEMPEL 11: Behandling av in vivo tumormodell ved anvendelse av anti-PD-1 antistoffer**

Mus implantert med en cancerøs tumor ble behandlet *in vivo* med anti-PD-1 antistoffer for å undersøke *in vivo* effekten av
15 antistoffene på tumorvekst. Som en positiv kontroll ble et anti-CTLA-4 antistoff anvendt, da slike antistoffer er blitt vist til å inhibere tumorvekst *in vivo*.

I dette forsøk var det anvendte anti-PD-1 antistoffet et
20 kimært rotte anti-mus-PD-1 antistoff dannet ved å anvende kjente laboratorieteknikker. For å generere rotte anti-mus-PD-1 antistoffet, ble rotter immunisert med museceller transfektert til å uttrykke et rekombinant mus-PD-1 fusjonsprotein (R&D Systems Catalog No. 1021-PD) og monoklonale antistoffer
25 ble screenet for binding til mus-PD-1 antigen ved hjelp av ELISA analyse. Rotte anti-PD-1 antistoff V regionene ble deretter rekombinant koblet til en murin IgG1 konstant region ved å anvende standard teknikker innen molekylær biologi og ble re-screenet for binding til mus PD-1 ved hjelp av ELISA
30 og FACS. Det kimære rotte anti-mus-PD-1 antistoffet som anvendt heri omtales som 4H2.

For tumorstudiene, ble AJ hunnmus på mellom 6-8 uker gamle (Harlan Laboratories) randomisert på grunnlag av vekt i 6
35 grupper. Musene ble implantert subkutan i den høyre siden

med 2×10^6 SA1/N fibrosarkomceller oppløst i 200 μ l av DMEM medium på dag 0. Musene ble behandlet med PBS vehikkel, eller antistoffer ved 10 mg/kg. Dyrene ble dosert ved intraperitoneal injeksjon med omtrent 200 μ l PBS inneholdende antistoff eller vehikkel på dager 1, 4, 8 og 11. Hver gruppe inneholdt 10 dyr og gruppene besto av: (i) en vehikkelgruppe, (ii) kontrollmus IgG, (iii) kontroll-hamster IgG, (iv) hamster anti-mus CTLA-4 antistoff og (v) det kimære anti-PD-1 antistoffet 4H2. Musene ble målt to ganger per uke for tumorvekst i omtrent 6 uker. Ved å anvende et elektronisk skyvelær, ble tumorene målt tredimensjonalt (høyde x bredde x lengde) og tumorvolum ble beregnet. Mus ble underkastet eutanasi når tumorene nådde tumorsluttspunkt (1500 mm^3) eller viste mere enn 15% vekttap. Resultatene er vist i figur 20. Anti-PD-1 antistoffet forlenget gjennomsnittstiden for å nå tumor-endepunktvolumet (1500 mm^3) fra ~25 døgn i kontrollgruppen til ~40 døgn. Således har behandling med et anti-PD-1 antistoff en direkte in vivo inhiberende effekt på tumorvekst.

20

EKSEMPEL 12: Generering av kimært (rotte-mus) anti-PD-1 antistoff 4H2

Rotte monoklonalt antistoff mot mus PD-1 antistoffer (rottet anti-mPD-1) ble dannet fra rotter immunisert med mPD-1-hFc fusjonsprotein ved å anvende standard hybridom-produksjonsmetoder (se Kohler og Milstein (1975) *Nature* 256:495; og Harlow og Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York). Åtte hybridomer ble subklonet, antistoffer ble isolert og screenet for deres evne til å blokkere mus PD-L2 (mPD-L2) binding til mPD-1. En rekke anti-mPD-1 antistoffer i stand til å blokkere mPD-L2 binding til mPD-1 ble identifisert (se f.eks. aktivitet av 4H2, figur 41) og bindingsaffiniteten av en rekke av disse antistoffer til mPD-1-Fc fusjonsprotein ble bestemt ved ELISA (figur 42).

35

Antistoff 4H2.B3 ble ytterligere karakterisert, som er omtalt om hverandre heri, som "4H2". CHO celler som uttrykker mus

PD-1 ble konstruert og inkubert med 4H2 anti-mPD-1 antistoff ved en konsentrasjon som varierer fra 200 µg/ml til 0,012 µg/ml for å bestemme bindingsaffiniteten av 4H2 til PD-1. Binding av anti-mPD-1 antistoff til de PD-1 uttrykkende CHO celler ble detektert ved inkubering med esel-anti-rotte IgG, FITC konjugert og målt ved FACS. Anti-mPD-1 antistoffet hadde en EC₅₀ (50% effektiv konsentrasjon) på omtrent 0,38 µg (Figur 43) og en K_D of $4,7 \times 10^{-9}$ M. For å undersøke inhiberingen av PD-L1 binding til PD-1, ble den samme analysen gjennomført unntatt at cellene også ble inkubert med 0,16 µg mPD-L1-hFc fusjonsprotein, deretter ble binding av PD-L1 til PD-1 uttrykkende CHO celler detektert ved inkubering med geit-anti-human IgG (Fc spesifikk), FITC konjugert og bindingssignal ble målt ved FACS (MFI, gjennomsnittlig fluorescensintensitet). Anti-mPD-1 antistoffet hadde en EC₅₀ på omtrent 0,72 µg (figur 44).

For anvendelse i musetumormodellene, måtte 4H2 rotte anti-PD-1 modifiseres slik at museimmunsystemet ikke ville nøytralisere det immunterapeutiske antistoffet (dvs. slik at antistoffet ville ha bedre farmakokinetikker) og for å unngå antistoffavhengig cellulær cytotoxiskitet (ADCC) ved å redusere Fc reseptorinteraksjoner (dvs. slik at blokade ved anti-PD-1 kunne evalueres med uten å være kompromittert ved ADCC effekter). Det opprinnelige rotte anti-mPD-1 antistoff, 4H2, ble bestemt til å være en rotte IgG2a isotype. Følgelig ble Fc delen av 4H2 antistoffet erstattet med en Fc del fra en mus IgG1 isotype. Ved å anvende analysen beskrevet ovenfor, ble bindingsaffiniteten av rotte-mus kimært 4H2 til mPD-1 funnet til å være sammenlignbar med rotte 4H2.B3 anti-mPD-1 antistoffet (figur 45). Likeledes, var inhibering av PD-L1 binding til PD-1 sammenlignbar for begge antistoffer (figur 46). Således ble det rotte-mus kimære 4H2 anti-mPD-1 antistoffet anvendt for å undersøke den terapeutiske effektiviteten av anti-PD-1 i kombinasjon med anti-CTLA-4.

EKSEMPEL 13: In Vivo effektivitet av kombinasjonsterapi (anti-CTLA-4 og anti-PD-1 antistoffer) på tumoretablering og vekst

5 MC38 kolorektale cancerceller (PD-L1⁺) (tilgjengelig fra Dr. N. Restifo, National Cancer Institute, Bethesda, MD; Jeffrey Schlom, National Institutes of Health, Bethesda, MD) ble implantert i C57BL/6 mus (2 x 10⁶ celler/mus). På dag 0 (dvs. den dagen MC38 cellene ble implantert i musene), ble
 10 hver av fire grupper på 10 mus injisert intraperitonealt (IP) med en av de etterfølgende: (1) mus IgG (kontroll), (2) anti-CTLA-4 monoklonalt antistoff 9D9 (mus anti-mus CTLA-4, oppnådd fra J. Allison, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY), (3) anti-PD-1 monoklonalt antistoff
 15 4H2 (kimært antistoff hvori et rotte anti-mus PD-1 var modifisert med en mus Fc region, som beskrevet i eksempel 6), eller (4) anti-CTLA-4 antistoff 9D9 og anti-PD-1 antistoff 4H2. Antistoffinjeksjoner ble deretter videre administrert på dager 3, 6 og 10. De enkelte antistoffbehandlinger ble
 20 dosert ved 10 mg/kg, og kombinasjonen av anti-CTLA-4 antistoff og anti-PD-1 antistoff ble dosert ved 5 mg/kg av hvert antistoff (dvs. 10 mg/kg av totalt antistoff). Ved å anvende et elektronisk skyvelær, ble tumorene målt tredimensjonalt (høyde x bredde x lengde) og tumorvolum ble
 25 beregnet. Mus ble underkastet eutanasi når tumorene nådde et designert tumor-endepunkt. Resultatene er vist i tabell 5 og figur 21.

30 Tabell 5. Prosentandel tumor-frie mus etter anti-PD-1 og/- eller anti-CTLA-behandling

Behandling	Totale mus studert	Tumorfrie mus (%)
mIgG1	10	0
anti-CTLA-4	10	1 (10)
anti-PD-1	10	3 (30)
anti-CTLA-4 + anti-PD-1	10	6 (60)

Åtte mus i IgG gruppen nådde tumor-endepunktet ved omtrent dag 30 og to mus (86066 og 87260) i IgG gruppen hadde ulcererte tumorer (figur 21A). I gruppen med kun anti-CTLA-4 antistoffet, nådde 7 mus tumor-endepunktet ved omtrent dag 60, en mus hadde en ulcerert tumor (84952), en mus hadde en tumor med et volum som var mindre enn 1500 mm³ (85246), og en mus var tumorfri (86057) (figur 21B). I gruppen med anti-PD-1 antistoff alene, nådde seks mus tumor-endepunktet ved omtrent dag 60, en mus hadde en ulcerert tumor (86055), og tre mus var tumorfrie (84955, 85239 og 86750) (figur 21C). I anti-CTLA-4 antistoff og anti-PD-1 antistoffkombinasjonsgruppen nådde fire mus tumor-endepunktet ved omtrent dag 40, og seks mus var tumorfrie (84596, 85240, 86056, 86071, 86082 og 86761) (figur 21D).

15

Figur 22 viser at det gjennomsnittlige volumet målt på dag 21 var omtrent 2955 mm³ for IgG kontrollgruppen, omtrent 655 mm³ for gruppen med kun CTLA-4 antistoffet, omtrent 510 mm³ for gruppen med PD-1 antistoff alene, og omtrent 280 mm³ for anti-CTLA-4 antistoff og anti-PD-1 antistoff kombinasjonsgruppen. Figur 23 viser at median-tumorummet som målt på dag 21 var omtrent 2715 mm³ for IgG gruppen; omtrent 625 mm³ for gruppen med CTLA-4 antistoff alene; omtrent 525 mm³ for gruppen med PD-1 antistoff alene; og omtrent 10 mm³ for CTLA-4 antistoff og PD-1 antistoff kombinasjonsgruppen (og ned til 0 mm³ ved dag 32).

Dette studium indikerer at, i en murin tumormodell, har CTLA-4 antistoffbehandling alene og PD-1 antistoffbehandling alene en beskjeden effekt på tumorvekst, og at kombinasjonsbehandlingen av CTLA-4 antistoff og PD-1 antistoff har en signifikant større effekt på tumorvekst. Det er interessant å merke seg at kombinasjonsbehandlingen med CTLA-4 antistoff og PD-1 antistoff hadde en mere signifikant effekt på tumorvekst i en dose på 5 mg/kg av hvert antistoff sammenlignet med effekten av hvert antistoff alene når hvert antistoff administreres ved en høyere dose på 10 mg/kg.

35

EKSEMPEL 14: In Vivo effektivitet av kombinasjonsterapi (anti-CTLA-4 og anti-PD-1 antistoffer) på etablert tumorvekst

MC38 kolorektale cancerceller (PD-L1⁺) ble implantert i
 5 C57BL/6 mus (2 x 10⁶ celler/mus) i en tid som er tilstrekkelig (omtrent 6-7 dager) for å tillate dannelsen av tumorer. På dag 6 etter implantasjon (dag-1), ble tumormålinger gjennomført og mus ble randomisert på grunnlag av gjennomsnittlig tumorvolum (omtrent 250 mm³) i 11 grupper for
 10 påfølgende antistoffterapi. På dag 0 (dvs. en uke etter at MC38 cellene var implantert), ble musene injisert IP med 1) mus IgG (kontroll), (2) anti-CTLA-4 monoklonalt antistoff 9D9, (3) anti-PD-1 monoklonalt antistoff 4H2, eller (4) anti-CTLA-4 monoklonalt antistoff 9D9 og anti-PD-1 antistoff
 15 monoklonalt antistoff 4H2, i en konsentrasjon på 10 mg/kg per mus. Antistoffinjeksjoner ble også administrert på dager 3, 6 og 10. De monoklonale antistoffsammensetninger som anvendes hadde lave nivåer av endotoksin og aggregerte ikke signifikant. Ved anvendelse av et elektronisk skyvelær ble
 20 tumorene målt tredimensjonalt (høyde x bredde x lengde) og tumorvolum ble beregnet. Tumormålinger ble tatt på dag 0 (tumorer i begynnelsen av behandling hadde et volum på omtrent 125 mm³), og på dager 3, 6, 10, 13, 17 og 20 etter antistoffinjeksjon. Mus ble underkastet eutanasi når
 25 tumorene nådde et bestemt tumor-ende punkt (et spesielt tumorvolum slik som 1500 mm³ og/eller når musene viste mere enn omtrent 15% vekttap).

Alle elleve mus i IgG gruppen nådde tumor-ende punkt på
 30 omtrent dag 17 (figur 24A). I gruppen med kun anti-CTLA-4 antistoff nådde 7 av elleve mus tumor-ende punkt ved omtrent dag 12 (figur 24B). I gruppen med kun anti-PD-1 antistoff nådde fire mus tumor-ende punkt ved omtrent dag 13 og to mus var tumorfrie (figur 24C). I anti-CTLA-4 antistoff og anti-
 35 PD-1 antistoff kombinasjonsgruppen nådde en mus tumor-ende punkt ved omtrent dag 17, en mus nådde tumor-ende punkt ved omtrent dag 45 og ni mus var tumorfrie på dag 45 (figur 24D).

Figur 25 viser at gjennomsnittlig tumorvolum som målt på dag 10 var omtrent 1485 mm³ for IgG kontrollgruppen; omtrent 1010 mm³ for gruppen med CTLA-4 antistoff alene; omtrent 695 mm³ for gruppen med PD-1 antistoff alene og omtrent 80 mm³ for anti-CTLA-4 antistoff og anti-PD-1 antistoff kombinasjonsgruppen. Figur 26 viser at median-tumorvolumet som målt på dag 10 var omtrent 1365 mm³ for IgG gruppen; omtrent 1060 mm³ for gruppen med anti-CTLA-4 antistoff alene; omtrent 480 mm³ for gruppen med anti-PD-1 antistoff alene og omtrent 15 mm³ for anti-CTLA-4 antistoff og anti-PD-1 antistoff kombinasjonsgruppen (som var ned til 0 mm³ ved dag 17).

Dette studium indikerer at, i en murin tumormodell, har behandling med kombinasjonen av CTLA-4 antistoff og PD-1 antistoff en signifikant større effekt på tumorvekst enn hvert antistoff alene, selv når en tumor allerede er godt etablert.

EKSEMPEL 15: Dosetitrering av kombinasjonsterapi (anti-CTLA-4 og anti-PD-1 antistoffer) på etablert tumorvekst

MC38 kolorektale cancerceller (PD-L1⁺) ble implantert i C57BL/6 mus (2 x 10⁶ celler/mus) i en tid som er tilstrekkelig (omtrent 6-7 dager) til å tillate dannelsen av tumorer som beskrevet i eksempel 3. Grupper på 10 mus ble injisert IP på dager 0, 3, 6 og 10 som følger: gruppe (A) mus IgG (kontroll, 20 mg/kg), gruppe (B) anti-PD-1 monoklonalt antistoff 4H2 (10 mg/kg) og mus IgG (10 mg/kg), gruppe (C) anti-CTLA-4 monoklonalt antistoff 9D9 (10 mg/kg) og mus IgG (10 mg/kg), gruppe (D) anti-CTLA-4 monoklonalt antistoff 9D9 (10 mg/kg) og anti-PD-1 antistoff monoklonalt antistoff 4H2 (10 mg/kg), gruppe (E) anti-CTLA-4 monoklonalt antistoff 9D9 (3 mg/kg) og anti-PD-1 antistoff monoklonalt antistoff 4H2 (3 mg/kg), eller gruppe (F) anti-CTLA-4 monoklonalt antistoff 9D9 (1 mg/kg) og anti-PD-1 antistoff monoklonalt antistoff 4H2 (1 mg/kg). Ved å anvende et elektronisk skyvelær ble tumorer målt tredimensjonalt (høyde x bredde x lengde) og tumorvolum ble beregnet. Tumormålinger ble gjennomført på begynnelsen av behandlingen (dvs. på dag 0 hadde tumorer et

gjennomsnittlig volum på omtrent 90 mm³), og på dager 3, 6, 10, 13, 17 og 20 etter antistoffbehandling. Mus ble underkastet eutanasi når tumorene nådde et bestemt tumor-endepunkt (et spesielt tumorvolum slik som 1500 mm³ og/eller når musene
5 viste mere enn omtrent 15% vekttap).

Figur 27A viser at alle 10 kontrollmusene hadde nådd et tumor-endepunkt. Figur 27B viser at gruppen behandlet med 10 mg/kg anti-PD-1 antistoff (gruppe B) hadde 6 mus som nådde
10 tumor-endepunktet og 4 mus med tumorer med et volum på omtrent 750 mm³ eller mindre. Figur 27C viser at gruppen behandlet med 10 mg/kg anti-CTLA-4 antistoff (gruppe C) hadde 3 mus som nådde tumor-endepunktet og 7 mus med tumorer med et volum på 1000 mm³ eller mindre. Figur 27D viser at gruppen
15 behandlet med en kombinasjon av 10 mg/kg anti-PD-1 antistoff med 10 mg/kg anti-CTLA-4 antistoff (gruppe D) hadde 2 mus med tumorer med et volum på omtrent 1000 mm³ eller mindre, og 8 mus var tumorfrie. Figur 27E viser at gruppen behandlet med en kombinasjon av 3 mg/kg anti-PD-1 antistoff med 3 mg/kg
20 anti-CTLA-4 antistoff (gruppe E) hadde en mus som hadde nådd tumor-endepunktet, 7 mus med tumorer med et volum på omtrent 500 mm³ eller mindre og 2 mus som var tumorfrie. Figur 27F viser at gruppen behandlet med en kombinasjon av 1 mg/kg anti-PD-1 antistoff med 1 mg/kg anti-CTLA-4 antistoff (gruppe
25 F) hadde 4 mus som hadde nådd tumor-endepunktet, 5 mus med tumorer med et volum på omtrent 1100 mm³ eller mindre, og en mus som var tumorfri.

Figurer 27G og 27H viser tumorvolumene i mus behandlet
30 påfølgende med anti-PD-1 antistoff først og anti-CTLA-4 antistoff deretter, og vice versa. Musene i figur 27G mottok først 10 mg/kg anti-CTLA-4 på hver av dagene 0 og 3, og mottok deretter 10 mg/kg anti-PD-1 antistoff på hver av dagene 6 og 10. Musene i figur 27H mottok først 10 mg/kg
35 anti-PD-1 antistoff på hver av dagene 0 og 3, og mottok deretter 10 mg/kg anti-CTLA-4 antistoff på hver av dagene 6 og 10. For gruppe G på dag 27, nådde 8 mus tumor-endepunktet, en mus hadde en svært liten tumor, (som etter en signifikant utsettelse, til slutt grodde ut) og en mus var

tumorfri. For gruppe H på dag 27, nådde 8 mus tumor-ende-punktet og 2 var tumorfrie.

Figur 28 viser at det gjennomsnittlige tumorvolum målt på dag 10 var omtrent 1250 mm³ for IgG kontrollgruppen, omtrent 470 mm³ for PD-1 antistoffet med with IgG kontrollen, omtrent 290 mm³ for CTLA-4 antistoffet med IgG kontrollen (målt på dag 6); omtrent 40 mm³ for anti-CTLA-4 antistoff (10 mg/kg) og anti-PD-1 antistoff (10 mg/kg) kombinasjonsgruppen, omtrent 165 mm³ for anti-CTLA-4 antistoff (3 mg/kg) og anti-PD-1 antistoff (3 mg/kg) kombinasjonsgruppen, og omtrent 400 mm³ for anti-CTLA-4 antistoff (1 mg/kg) og anti-PD-1 antistoff (1 mg/kg) kombinasjonsgruppen. Figur 29 viser at median-tumorvolumet målt på dag 13 var omtrent 1680 mm³ for IgG kontrollgruppen, omtrent 400 mm³ for PD-1 antistoffet med IgG kontrollen, omtrent 660 mm³ for CTLA-4 antistoffet med IgG kontrollen, 0 mm³ for anti-CTLA-4 antistoff (10 mg/kg) og anti-PD-1 antistoff (10 mg/kg) kombinasjonsgruppen, omtrent 90 mm³ for anti-CTLA-4 antistoff (3 mg/kg) og anti-PD-1 antistoff (3 mg/kg) kombinasjonsgruppen, og omtrent 650 mm³ for anti-CTLA-4 antistoff (1 mg/kg) og anti-PD-1 antistoff (1 mg/kg) kombinasjonsgruppen. For kombinasjonsbehandlingen av anti-PD-1 antistoff med anti-CTLA-4 antistoffet, var antallet mus per gruppe som var tumorfrie på dag 27 av studiet, 8/10 (10 mg/kg), 2/10 (3 mg/kg) og 1/10 (1 mg/kg) (data ikke vist).

Dette studium indikerer at, i en murin tumormodell, virker behandling med kombinasjonen av CTLA-4 antistoff og PD-1 antistoff på en doseavhengig måte og har en signifikant større effekt på tumorvekst enn begge antistoffer alene, selv ved lavere doser og selv når tumoren allerede er vel etablert. Dessuten kan antistoffene administreres påfølgende (anti-CTLA-4 antistoff først og deretter anti-PD-1 antistoff, eller vice versa) og kombinasjonen er fremdeles overlegen antistoff-monoterapiene.

EKSEMPEL 16: In Vivo effektivitet av kombinasjonsterapi (anti-CTLA-4 og anti-PD-1 antistoffer) på fibrosarkom-etablering og vekst

SA1/N fibrosarkomceller (PD-L1⁻) (Leach et al. (1996) Science 271:1734-1736) ble implantert subkutan i A/J mus (2 x 10⁶ celler/mus) på dag 0. På dager 1, 4, 7 og 11 etter implan-

5 tasjon ble musene injisert IP som følger: gruppe (A) PBS alene (omtalt som "vehikkel"), gruppe (B) mus IgG (kontroll, 10 mg/kg per mus), gruppe (C) anti-PD-1 monoklonalt antistoff 4H2 (10 mg/kg per mus), gruppe (D) anti-CTLA-4 monoklonalt antistoff 9D9 (10 mg/kg eller 0,2 mg/kg per mus), og gruppe

10 (E) anti-PD-1 monoklonalt antistoff 4H2 (10 mg/kg per mus) i kombinasjon med anti-CTLA-4 monoklonalt antistoff 9D9 (0,2 mg/kg per mus). Studiet varte i 41 døgn og tumormålinger ble tatt forskjellige dager gjennom hele studieforløpet (se figur 29). Tumorvolum ble beregnet ved å måle tumorer i tre dimen-

15 sjoner (høyde x bredde x lengde) ved å anvende et elektronisk skyvelær. Mus ble underkastet eutanasi når tumorene nådde et bestemt tumor-endepunktvolum på 1500 mm³ og/eller en ulcerert tumor.

20 Figurer 30A og 30B viser at 19 ut av de 20 kontroll (9/10 i gruppe A og 10/10 i gruppe B) musene hadde hver nådd et tumor-endepunkt og hadde utviklet ulcererte tumorer. Figur 30C viser at gruppen behandlet med 10 mg/kg anti-PD-1 anti-

25 stoff (gruppe C) hadde 6 mus som nådde et tumor-endepunkt (2 med et volum større enn 1500 mm³ og 4 med en ulcerert tumor) og 4 mus som var tumorfrie. Figur 30D viser at gruppen behandlet med 10 mg/kg anti-CTLA-4 antistoff (gruppe D) hadde 5 mus som nådde et tumor-endepunkt (2 med et volum større enn 1500 mm³ og 3 med en ulcerert tumor), en mus med en liten

30 tumor (volum på omtrent 70 mm³) og 4 mus som var tumorfrie. Figur 30E viser at gruppen behandlet med 0,2 mg/kg anti-CTLA-4 antistoff (gruppe E) hadde 10 mus som nådde et tumor-endepunkt (6 med et volum større enn 1500 mm³ og 4 med en ulcerert tumor). Figur 30F viser at gruppen behandlet med en

35 kombinasjon av 10 mg/kg anti-PD-1 antistoff med 0,2 mg/kg anti-CTLA-4 antistoff (gruppe F) hadde 2 mus som nådde et tumor-endepunkt (en med et volum større enn 1500 mm³ og en med en ulcerert tumor) og 8 mus som var tumorfrie.

Figurer 31 og 32 viser henholdsvis gjennomsnittlig tumorvolum og median-tumorvolumet som utviklet seg i behandlede og ubehandlede mus i løpet av studiet. Tumorvekstinhivering i mus behandlet med disse antistoffer, sammenlignet med mus behandlet med kontrollantistoffet mus IgG, er oppsummert i tabell 6.

Table 6. Tumorvekstinhivering og tumorfrie mus etter anti-PD-1 og/eller anti-CTLA-4 behandling

† Gruppe	Median-tumor- volum – mm ³ (dag 15)	TGI* (%) (dag 15)	Median- tumorvolum – mm ³ (dag 19)	TGI (%) (Dag 19)	Antall tumorfrie mus (dag 41)
A	985	–	1140	–	0/10
B	635	–	1060	–	0/10
C	465	27	310	71	4/10
D	235	63	90	91	4/10
E	600	6	805	24	0/10
F	330	48	90	92	8/10

* TGI = tumorvekstinhivering, medianen kan kun beregnes når færre enn 50% nådde tumor-endepunktet.

† Grupper er som definert i figur 30. A = vehikkel (PBS);

B = mus IgG; C = anti-PD-1, 10 mg/kg; D = anti-CTLA-4, 10 mg/kg; E = anti-CTLA-4, 0,2 mg/kg og F = anti-PD-1, 10 mg/kg med anti-CTLA-4, 0,2 mg/kg.

Disse data indikerer videre at kombinasjonsterapien som omfatter anti-PD-1 og anti-CTLA-4 antistoffer er i alt vesentlig mere effektive enn behandling med hvert antistoff alene. Kombinasjonen er faktisk enda mere effektiv enn behandlinger med enkeltantistoff selv når kombinasjonsterapien inneholder en subterapeutisk dose av anti-CTLA-4 antistoff. Disse data indikerer overraskende også at tilstedeværelsen eller fraværet av PD-L1 på tumoren vil ha ingen effekt på effektiviteten av behandling med denne antistoffkombinasjonen, skjønt tilstedeværelsen av PD-L1 kan innvirke på effekten av antistoff-monoterapiene ved at

ekspresjon av PD-L1 på tumoren også kan føre til inhibering av anti-tumor T-celle responser (se figur 40).

EKSEMPEL 17: In Vivo effektivitet og dosetitrering av

5 kombinasjonsterapi (anti-CTLA-4 og anti-PD-1 antistoffer) på PD-L1⁻ fibrosarkomvekst

SA1/N fibrosarkomceller (PD-L1⁻) ble implantert subkutant i A/J mus (2×10^6 celler/mus) på dag 0 i en tid som er tilstrekkelig (omtrent 7 dager) til å tillate etableringen av en tumor. På dager 7, 10, 13 og 16 etter implantasjon, ble ti grupper av 8 mus med et gjennomsnittlig tumorvolum på 110 mm^3 injisert IP som følger: gruppe (A) PBS alene (omtalt som "vehikkel"); gruppe (B) mus IgG (kontroll, 10 mg/kg per mus); gruppe (C) anti-CTLA-4 monoklonalt antistoff 9D9 (0,25 mg/kg); Gruppe (D) anti-CTLA-4 monoklonalt antistoff 9D9 (0,5 mg/kg per mus); gruppe (E) anti-CTLA-4 monoklonalt antistoff 9D9 (5 mg/kg); gruppe (F) anti-PD-1 monoklonalt antistoff 4H2 (3 mg/kg per mus); gruppe (G) anti-PD-1 monoklonalt antistoff 4H2 (10 mg/kg per mus); gruppe (H) anti-PD-1 monoklonalt antistoff 4H2 (10 mg/kg per mus) i kombinasjon med anti-CTLA-4 monoklonalt antistoff 9D9 (0,25 mg/kg per mus); gruppe (I) anti-PD-1 monoklonalt antistoff 4H2 (10 mg/kg per mus) i kombinasjon med anti-CTLA-4 monoklonalt antistoff 9D9 (0,5 mg/kg per mus); og gruppe (J) anti-PD-1 monoklonalt antistoff 4H2 (3 mg/kg per mus) i kombinasjon med anti-CTLA-4 monoklonalt antistoff 9D9 (0,5 mg/kg per mus).

På dager 10, 13, 16 og 19 etter implantasjon, ble to grupper på 6 mus med et gjennomsnittlig tumorvolum på 255 mm^3 injisert IP som følger: gruppe (K) mus IgG (kontroll, 10 mg/kg per mus); og gruppe (L) anti-PD-1 monoklonalt antistoff 4H2 (10 mg/kg per mus) i kombinasjon med anti-CTLA-4 monoklonalt antistoff 9D9 (1 mg/kg per mus). Studiet varte 51 døgner og tumormålinger ble tatt på forskjellige dager under studiet (se figurer 33-38). Tumorvolum ble beregnet ved å måle tumorer i tre dimensjoner (høyde x bredde x lengde) ved å anvende et elektronisk skyvelær. Mus ble underkastet

eutanasi når tumorene nådde et bestemt tumor-ende punkt av et volum på 1500 mm³ og/eller en ulcerert tumor.

Figur 33 viser respons på immunstimulerende antistoffbehandling i mus med tumorer med et initialt volum på omtrent 110 mm³ (dvs. på tidspunktet for den første antistoffbehandling). Figurer 33A og 33B viser at alle kontrollmus (grupper A og B) nådde et tumor-ende punkt (15 med tumorvolum større enn 1500 mm³ og 1 med en ulcerert tumor). Figurer 33C-33E viser at tumorbærende mus responderer på behandling med anti-CTLA-4 antistoff på en doseavhengig måte (f.eks. i gruppe C som mottok 0,25 mg/kg hadde 7/8 mus nådd tumor-ende punkt og en mus hadde et tumorvolum mindre enn 200 mm³, mens gruppe E som mottok 5 mg/kg hadde 6/8 mus som nådde tumor-ende punkt og to mus som var tumorfrie). Figurer 33F og 33G viser at mus responderte omtrent likt uavhengig av anti-PD-1 antistoffdosen (gruppe F mottok 3 mg/kg og gruppe G mottok 10 mg/kg). I motsetning viste mus som mottok en kombinasjonsterapi på 10 eller 3 mg/kg anti-PD-1 antistoff med 0,25 eller 0,5 mg/kg anti-CTLA-4 antistoff (grupper H, I og J) en signifikant reduksjon i tumorvekst. Figur 33J viser f.eks. at gruppen behandlet med en kombinasjon av 3 mg/kg anti-PD-1 antistoff med 0,5 mg/kg anti-CTLA-4 antistoff (gruppe J) hadde 2 mus som hadde ulcererte tumorer, 2 mus med tumorvolum som var mindre enn 500 mm³ og 4 mus som var tumorfrie. Den uventede synergistiske virkningen av et anti-PD-1 antistoff kombinert med et anti-CTLA-4 antistoff er, sammen med den overraskende effektiviteten av subterapeutiske nivåer av anti-CTLA-4 antistoff i kombinasjon, vist i figur 34 (gjennomsnittlig tumorvolum) og 35 (median tumorvolum).

Figur 36 viser responsen på immunstimulerende antistoffbehandling i mus med større tumorer, dem som har et initialt volum på omtrent 250 mm³ (dvs. på tidspunktet for første antistoffbehandling). Figur 36A viser at alle 6 kontrollmus (gruppe K) nådde et tumor-ende punkt (4 med et tumorvolum større enn 1500 mm³ og 2 med en ulcerert tumor). Figur 36B viser at gruppen behandlet med en kombinasjon av 10 mg/kg anti-PD-1 antistoff med 1 mg/kg anti-CTLA-4 antistoff (gruppe

L) hadde en mus med en ulcerert tumor, 4 mus med tumorvolum større enn 1500 mm³, og en mus som var tumorfri. Gjennomsnittlige tumorvolumer og median tumorvolumer er vist i figurer 37 og 38.

5

Tumorvekstinhibering i mus behandlet med disse antistoffer, sammenlig med mus behandlet med kontrollantistoffet mus IgG, er summert i tabell 7 og figur 39.s

Tabell 7. Tumorvekstinhibering etter anti-PD-1 og/eller anti-CTLA-4 behandling

Gruppe	Gjennom- snittlig tumor- volum – mm ³ (dag 23)	TGI* (Gjennom- snitt)	Median tumorvolum mm ³ (dag 23)	TGI (Median)	Tumorfrie mus (dag 51)	Antall mus på tumor- endepunkt
A	700	–	1.380	–	–	–
B	1.710	–	1.360	–	–	–
C	1.050	39%	925	32	–	–
D	770	55%	505	63	–	–
E	155	91%	100	93	2/8	6/8
F	1.050	39%	675	50	–	7/8
G	1.070	37%	1.145	16	–	6/8
H	85	95%	25	98	4/8	3/8
I	75	96%	60	95	4/8	1/8
J	80	95%	5	99	4/8	0/8
K	1.900	–	2.125	–	–	–
L	1.115	41	1.090	49	1/6	–

* TGI = tumorvekstinhibering; medianen kunne bare beregnes når færre enn 50% av musene nådde tumor-endepunktet.

† Grupper er som definert i figurer 33 og 36. For mindre initial tumor: A = vehikkel (PBS); B = mus IgG, 10 mg/kg; C = anti-CTLA-4, 0,25 mg/kg; D = anti-CTLA-4, 0,5 mg/kg; E = anti-CTLA-4, 5 mg/kg; F = anti-PD-1, 3 mg/kg; G = anti-PD-1, 10 mg/kg; H = anti-PD-1, 10 mg/kg med anti-CTLA-4, 0,25 mg/kg; I = anti-PD-1, 10 mg/kg med anti-CTLA-4, 0,5 mg/kg; og J = anti-PD-1, 3 mg/kg med anti-CTLA-4, 0,5 mg/kg. For større initial tumor: K = mus IgG, 10 mg/kg; og L = anti-PD-1, 10 mg/kg med anti-CTLA-4, 0,25 mg/kg.

15

Sammen indikerer disse data at kombinasjonsterapien omfattende anti-PD-1 og anti-CTLA-4 antistoffer er vesentlig mere effektiv enn behandling med hvert antistoff alene. I tillegg kan overraskende dosen av hvert antistoff reduseres uten at man påvirker den synergistiske effektiviteten av denne kombinasjon av immunstimulerende terapeutiske antistoffer. Kombinasjonsterapien synes fremdeles å være effektiv selv når tumormassen er moden (dvs. større).

20

EKSEMPEL 18: Tumorimmunitet i mus etter anti-PD-1 antistoff-behandling og re-eksponering med PD-L1⁺ fibrosarkomceller

5 Musene som overlevde tumorfritt fra en eksponering med tumor-
celler og behandling med anti-PD-1 antistoff (dvs. behandling
tilsvarende effektivitetsstudier beskrevet i eksempler 5 og
6) ble deretter re-eksponert med tumorceller for å undersøke
immunitet mot tumordannelse etter en slik behandling. Kort,
10 i den initiale eksponering, ble SA1/N fibrosarkomceller (PD-
L1⁺) implantert subkutan i A/J mus (1×10^6 celler/mus) på
dag 0. På dager 1, 4, 7, 10, 14, 17 og 20 etter implantasjon
ble grupper av mus injisert IP med enten mus IgG (kontroll,
10 mg/kg per mus) eller med en av forskjellige doser av anti-
15 PD-1 monoklonalt antistoff 4H2 (30, 10, 3, 1 og 0,3 mg/kg per
mus). Tumordannelse og volum ble målt med et elektronisk
presisjons-skyvelær to ganger per uke inntil studiet var
ferdig. En gruppe på 8 mus var tumorfrie etter anti-PD1
antistoffbehandlingen (4 som var behandlet med 30 mg/kg, 2
20 med 3 mg/kg, en med 1 mg/kg og en med 0,3 mg/kg).

De åtte behandlede tumorfrie A/J mus ble re-eksponert ved
subkutan implantasjon av 1×10^6 SA1/N fibrosarkomceller/mus.
Som en kontroll ble ni naïve mus implantert subkutan med $1 \times$
25 10^6 SA1/N fibrosarkomceller/mus. Tumordannelse og volum ble
målt med et elektronisk presisjons-skyvelær to ganger per uke
inntil dag 62 etter implantasjon. Alle ni naïve (kontroll)
musene nådde tumor-endepunktet ved dag 22 etter implantasjon
av fibrosarkomcellene. I motsetning, utviklet de åtte tumor-
30 frie mus som var re-eksponert med fibrosarkomceller ikke
tumorer opp til 62 dager etter implantasjon. Figur 47 viser
det gjennomsnittlige tumorvolumet for de naïve og re-ekspo-
nerte musene. Disse resultatene viser at behandling med et
immunstimulerende antistoff, slik som anti-PD-1, gir det
35 behandlede individ immunitet mot ytterligere tumordannelse,
selv i nærvær av celler som er i stand til å danne en tumor.

EKSEMPEL 19: Tumorimmunitet i mus etter enkelt-antistoff-terapi (anti-PD-1) eller kombinasjonsantistoff-terapi

**(anti-CTLA-4 og anti-PD-1) re-eksponert med PD-L1⁻
kolorektale cancerceller**

Mus som overlevde tumorfritt fra en eksponering med tumor-
 5 celler og behandling med enten anti-PD-1 antistoff alene
 eller anti-PD-1 antistoff kombinert med anti-CTLA-4 antistoff
 (dvs. behandling tilsvarende effektivitetsstudiene beskrevet
 i eksempler 2-4) ble deretter re-eksponert med tumorceller
 for å undersøke immunitet mot tumordannelse etter slike
 10 behandlinger. Kort, i den initiale eksponering, ble MC38
 kolorektale cancerceller (PD-L1⁻) implantert i C57BL/6 mus (2×10^6 celler/mus) på dag 0. På dager 0,3,6 og 10 etter
 implantasjon ble grupper av mus injisert IP med en av de
 etterfølgende behandlinger: (1) mus IgG (kontroll, 10 mg/kg
 15 per mus), anti-PD-1 monoklonalt antistoff 4H2, eller (3)
 anti-PD-1 monoklonalt antistoff 4H2 i kombinasjon med
 anti-CTLA-4 monoklonalt antistoff 9D9. Tumorvekst ble målt
 med et elektronisk presisjons-skyvelær som beskrevet i
 eksempel 15. En gruppe på 11 mus som var tumorfrie etter
 20 anti-PD1 antistoffbehandling (2 totalt) eller den kombi-
 nerte anti-PD-1/anti-CTLA-4 antistoffbehandling (9 totalt).

De 11 behandlede tumorfrie C57BL/6 mus ble re-eksponert ved
 implantasjon av 2×10^7 MC38 kolorektale cancerceller/mus
 25 (dvs. en dose av celler 10 x større enn den initiale
 eksponering). Som en kontroll ble syv naive mus implantert
 med 2×10^7 MC38 kolorektale cancerceller/mus. Tumordannelse
 og volum ble målt med et elektronisk presisjons-skyvelær
 under re-eksponeringsforsøket (minst 20 dager). Figur 48
 30 viser at alle syv naive kontrollmusene utviklet en tumor og
 nådde tumor-endepunktet på dag 18 etter implantasjon av de
 kolorektale cancercellene. I motsetning utviklet alle 11
 tumorfrie mus som var re-eksponert med kolorektale cancer-
 celler ikke tumorer opp til 18 dager etter implantasjon.
 35 Figur 49 viser at det gjennomsnittlige tumorvolum for de
 naive og de re-eksponerte musene. Disse data indikerer at,
 tilsvarende antistoffmonoterapien, danner kombinasjons-
 antistoffterapien resulterende i PD-1 og CTLA-4 blokade en
 persistent immunitet moy tumortilbakefall.

EKSEMPEL 20: *In Vivo* effektivitet av kombinasjonsterapi (anti-CTLA-4 og anti-PD-1 antistoffer) på etablert tumorvekst.

5

CT26 kolorektale cancerceller ble implantert i BALB/C mus (2×10^6 celler/mus) i en tid som er tilstrekkelig (omtrent 10 døgn) til å tillate dannelsen av tumorer. På dag 10 etter implantasjon ble tumormålinger gjennomført og mus ble randomisert basert på gjennomsnittlig tumorvolum (omtrent 250 mm³) i 5 grupper for påfølgende antistoffterapi. På dag 0 (dvs. 10 dager etter at CT26 cellene var implantert) ble mus injisert IP med (1) mus IgG (kontroll), (2) anti-CTLA-4 monoklonalt antistoff 9D9, (3) anti-PD-1 monoklonalt antistoff 4H2 eller (4) anti-CTLA-4 monoklonalt antistoff 9D9 og anti-PD-1 antistoff monoklonalt antistoff 4H2, ved en konsentrasjon på 10 mg/kg per mus. Antistoffinjeksjoner ble også administrert på dager 3, 6 og 10. De monoklonale antistoffsammensetninger som anvendes hadde lave nivåer av endotoksin og aggregerte ikke signifikant. Ved å anvende et elektronisk skyvelær ble tumorene målt tredimensjonalt (høyde x bredde x lengde) og tumorvolum ble beregnet. Tumormålinger ble tatt på dag 0 (tumorer på begynnelsen av behandlingene hadde et volum på omtrent 125 mm³), og på dager 3, 6, 10, 13, 17 og 20 etter antistoffinjeksjon. Mus ble underkaste eutanasi når tumorene nådde et bestemt tumor-endepunkt (et spesielt tumorvolum slik som 1500 mm³ og/eller når musene viste mere enn omtrent 15% vekttap). Resultatene er vist i figur 50. Dette studie indikerer at, i en murin tumormodell, har behandling med kombinasjonen av CTLA-4 antistoff og PD-1 antistoff en signifikant større effekt på tumorvekst enn hvert antistoff alene, selv når tumor allerede er vel etablert.

35 EKSEMPEL 21: Effekt av humant anti-PD-1 antistoff på funksjon av T-regulerende celler

T-regulerende celler er lymfocytter som undertrykker immun-responsen. I dette eksempel ble T-regulerende celler testet for den inhiberende virkning på proliferasjon og IFN-gamma-sekresjon av CD4+CD25-T-celler i nærvær eller fravær anti-PD-1 humant monoklonalt antistoff.

T-regulerende celler ble rensset fra PBMC ved å anvende et CD4+CD25+ regulerende T-celleisolasjonskit (Miltenyi Biotec). T-regulerende celler ble tilsatt til en blandet lymfocytreaksjon (se over) inneholdende rensede CD4+CD25- T-celler og allogene dendrittiske celler i et 2:1 forhold av CD4+CD25- til T-regulerende celler. Anti-PD-1 monoklonalt antistoff 5C4 ble tilsatt i en konsentrasjon på 10 µg/ml. Som en negativ kontroll ble enten ikke noe antistoff eller et isotype kontrollantistoff anvendt. Kultursupernatanter ble høstet på dag 5 for cytokinmålinger ved anvendelse av et Beadlyte cytokindeteksjonssystem (Upstate). Cellene ble merket med ³H-tymidin, dyrket i ytterligere 18 timer og analysert for celleproliferasjon. Resultatene er vist i figurer 51AS (T-celleproliferasjon) og 51B (IFN-gamma-sekresjon). Tilsetningen av anti-PD-1 humant monoklonalt antistoff 5C4 opphevet delvis inhibering innført ved T-reg celler på proliferasjon og IFN-gamma sekresjon av CD4+CD25-T-celler, som indikerer at anti-PD-1 antistoffer har en effekt på T-regulerende celler.

EKSEMPEL 22: Effekt av humant anti-PD-1 antistoff på T-celleaktivering

I dette eksempel ble effekt av blokade av PD-1 spor ved anti-PD-1 antistoff 5C4 på T-celleaktivering undersøkt. Rensede humane CD4+ T-celler (DynaL CD4 T-cellerensekit) ble aktivert med 1µg/ml oppløselig anti-CD3 antistoff (BD) i nærvær av autologe monocytter eller monocytt-avledede dendrittiske celler (DC'er). Monocytter ble rensset ved å anvende Miltenyi CD14 monocytt-rensekit, og DC'er ble generert in vitro etter dyrking av monocytter med GM-CSF og IL-4 (PeproTech) i 7 døgn. Etter tre døgns aktivering i

nærvær eller fravær av titrert anti-PD-1 antistoff eller irrelevant isotype kontroll mAb, ble kultursupernatanter høstet for ELISA analys eav IFN-gamma sekresjon mens tritiert tymidin ble tilsatt under de siste 18 timene av analysen for
 5 å måle T-celleproliferasjon. Resultatene vist i figurer 52A og 52B viser at PD-1 blokade ved anti-PD-1 antistoff resulterte i økt T-celleproliferasjon og IGFN-gamma sekresjon. Synergistisk effekt ved anti-PD-1 antistoff og anti-CTLA-4 antistoff på T-celleaktivering (spesifikt på IFN-
 10 gamma sekresjon) i nærvær av monocytter ble også observert.

EKSEMPEL 23: Bestemmelse av ADCC aktivitet på anti-PD-1 antistoff

15 I dette eksempel ble en antistoffavhengig cellulær cytotox-
 sisitet (ADCC) analyse gjennomført for å evaluere om anti-PD-
 1 antistoff kunne indusere ADCC mot targetceller. To
 versjoner av 5C4, en med Fc region av humant IgG1 (5C4-IgG1)
 og den andre med en Fc region av humant IgG4 (5C4-IgG4) ble
 20 testet i analysen. "Delfia Cell Cytotoxicity Kit" fra Perkin
 Elmer ble anvendt for analysen. Kort ble rensede humane CD4
 T-celler (Dyna1 CD4 T-celle rensekit) aktivert ved
 platebundet anti-CD3 antistoff (BD) for å indusere PD-1
 ekspresjon. Target-aktiverte CD4 T-celler ble deretter
 25 merket med BATDA reagens. Merkede CD4 T-celler ble tilsatt
 til en V-bunn 96-brønns plate etterfulgt av tilsetning av
 human PBMC (et effektor-til-target(E/T) celleforhold på 50:1)
 og designet antistoff. Etter inkubasjon i 1 time ved 37°C
 ble platen nedsentrifugert. Supernatant ble overført til en
 30 flatbunnet 96-brønns plate og platen ble avlest ved
 anvendelse av en RubyStar plateavleser. Resultatet viste at
 5C4-IgG4 ikke medierte ADCC på aktiverte CD4 T-celler, mens
 5C4-IgG1 medierte ADCC på aktiverte CD4 T-celler (figur 53),
 som indikerer at ADCC aktivitet er relatert til Fc regionen
 35 av anti-PD-1 antistoffet.

EKSEMPEL 24: Måling av komplementavhengig cytotoxsisitet av anti-PD-1 antistoff

I dette eksempel ble komplementavhengig cytotoxisitet (CDC) av anti-PD-1 antistoff undersøkt. To versjoner av 5C4, et med Fc region av humant IgG1 (5C4-IgG1) og det andre med Fc region av humant IgG4 (5C4-IgG4) ble testet i analysen. Kort ble rensede humane CD4 celler (Dynal CD4 T-cellerensekit) aktivert ved plate-bunnet anti-CD3 antistoff (BD) for å indusere PD-1 ekspresjon. Seriefortynninger av anti-PD-1 antistoff (5C4) og kontrollantistoffer fra 50 µg/ml til 640 pg/ml ble testet for CDC i nærvær av humant komplement (Quidel-A113). Alamar-blått (Biosource International) ble anvendt for å måle cytotoxisiteten. Platen ble avlest på en fluorescerende plateavleser (EX530 EM590). Antall levedyktige celler er proporsjonal med fluorescensenheter. Resultater viste av hverken 5C4-IgG1 eller 5C4-IgG4 medierte CDC på aktiverte CD4 T-celler, mens det positive kontrollantistoff (anti-HLA-ABC antistoff) gjorde dette (figur 54).

EKSEMPEL 25: Bestemmelse av PD-1 ekspresjon på humane T-celler

I dette eksempel ble humane PBMC'er fra forskjellige donorer undersøkt for PD-1 ekspresjon på forskjellige celle-undergrupper ved hjelp av FACS. Biotinyllert anti-PD-1 antistoff, som har utvist en mye høyere sensitivitet enn kommersielt tilgjengelig anti-PD-1 antistoff på deteksjon av PD-1 molekyler på celleoverflate, ble anvendt i analysen. Bundet antistoff ble detektert ved å anvende et PE-konjugert streptavidin. Flow-cytometriske analyser ble gjennomført ved å anvende et FACScan flow-cytometer (Becton Dickinson) og Flowjo software (Tree Star). PD-1 ekspresjon ble detektert på enkelte perifere humane T-celler, men ikke på B celler eller monocytter. Ytterligere undersøkelse av T-celle undergrupper indikerer at PD-1 er uttrykt på CD4 og CD8 memory og effektor T-celler, men er fraværende på naive CD4 eller CD8 T-celler.

Den foreliggende oppfinnelse skal ikke begrenses ved rammen av de spesifikke utførelsesformer som er beskrevet heri. Forskjellige modifikasjoner av oppfinnelsen i tillegg til dem

som er beskrevet heri vil klart fremgå for de fagkyndige ut
fra den foregående beskrivelse og de vedlagte tegninger.
Slike modifikasjoner skal falle innenfor rammen av de
vedlagte kravene. Oppfinnelsen skal derfor kun begrenses ved
5 uttrykkene i de vedlagte kravene sammen med alle de
ekvivalenter som er tilhørende i kravene.

Patentkrav for behandling

- 5 1. Isolert humant monoklonalt antistoff, eller en antigen-
bindende del derav,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t antistoffet binder til
PD-1 og hvor antistoffet utviser minst en av de etterfølgende
egenskaper:
- 10 a) binder til humant PD-1 med a K_D på $1 \times 10^{-7}M$ eller mindre;
b) binder i alt vesentlig ikke til human CD28, CTLA-4 eller
ICOS;
c) øker T-celleproliferasjon i en "Mixed Lymphocyte
Reaction" (MLR) analyse;
- 15 d) øker interferon-gamma produksjon i en MLR analyse;
e) øker interleukin-2(IL-2) sekresjon i en MLR analyse.
2. Isolert monoklonalt antistoff, eller en antigen-bindende
del derav,
- 20 k a r a k t e r i s e r t v e d a t antistoffet kryss-
konkurrerer for binding til PD-1 med et referanseantistoff,
hvor referanseantistoffet er valgt fra gruppen som består av:
- a) et antistoff som omfatter en human tung kjede variabel
region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 1 og en
- 25 human lett kjede variabel region som omfatter aminosyre-
sekvensen SEQ ID NO: 8;
- b) et antistoff som omfatter en human tung kjede variabel
region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 2 og en
human lett kjede variabel region som omfatter aminosyre-
- 30 sekvensen SEQ ID NO: 9;
- c) et antistoff som omfatter en human tung kjede variabel
region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 3 og en
human lett kjede variabel region som omfatter aminosyre-
- 35 d) et antistoff som omfatter en human tung kjede variabel
region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 4 og en
human lett kjede variabel region som omfatter aminosyre-
sekvensen SEQ ID NO: 11;

- e) et antistoff som omfatter en human tung kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 5 og en human lett kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 12;
- 5 f) et antistoff som omfatter en human tung kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 6 og en human lett kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 13; og
- g) et antistoff som omfatter en human tung kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 7 og en
- 10 human lett kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 14.
3. Isolert monoklonalt antistoff, eller antigen-bindende
- 15 del derav,
- k a r a k t e r i s e r t v e d a t antistoffet er valgt fra gruppen som består av:
- a) et antistoff som omfatter
- 20 et tung kjede variabel region CDR1 som omfatter SEQ ID NO: 15;
- et tung kjede variabel region CDR2 som omfatter SEQ ID NO: 22;
- et tung kjede variabel region CDR3 som omfatter SEQ ID NO: 29;
- 25 et lett kjede variabel region CDR1 som omfatter SEQ ID NO: 36;
- et lett kjede variabel region CDR2 som omfatter SEQ ID NO: 43; og
- et lett kjede variabel region CDR3 som omfatter SEQ ID
- 30 NO: 50;
- b) et antistoff som omfatter
- et tung kjede variabel region CDR1 som omfatter SEQ ID NO: 16;
- et tung kjede variabel region CDR2 som omfatter SEQ ID
- 35 NO: 23;
- et tung kjede variabel region CDR3 som omfatter SEQ ID NO: 30;
- et lett kjede variabel region CDR1 som omfatter SEQ ID NO: 37;

- et lett kjede variabel region CDR2 som omfatter SEQ ID
NO: 44; og
- et lett kjede variabel region CDR3 som omfatter SEQ ID
NO: 51;
- 5 c) et antistoff som omfatter
- et tung kjede variabel region CDR1 som omfatter SEQ ID
NO: 17;
- et tung kjede variabel region CDR2 som omfatter SEQ ID
NO: 24;
- 10 et tung kjede variabel region CDR3 som omfatter SEQ ID
NO: 31;
- et lett kjede variabel region CDR1 som omfatter SEQ ID
NO: 38;
- et lett kjede variabel region CDR2 som omfatter SEQ ID
15 NO: 45; og
- et lett kjede variabel region CDR3 som omfatter SEQ ID
NO: 52;
- d) et antistoff som omfatter
- et tung kjede variabel region CDR1 som omfatter SEQ ID
20 NO: 18;
- et tung kjede variabel region CDR2 som omfatter SEQ ID
NO: 25;
- et tung kjede variabel region CDR3 som omfatter SEQ ID
NO: 32;
- 25 et lett kjede variabel region CDR1 som omfatter SEQ ID
NO: 39;
- et lett kjede variabel region CDR2 som omfatter SEQ ID
NO: 46; og
- et lett kjede variabel region CDR3 som omfatter SEQ ID
30 NO: 53;
- e) et antistoff som omfatter
- et tung kjede variabel region CDR1 som omfatter SEQ ID
NO: 19;
- et tung kjede variabel region CDR2 som omfatter SEQ ID
35 NO: 26;
- et tung kjede variabel region CDR3 som omfatter SEQ ID
NO: 33;
- et lett kjede variabel region CDR1 som omfatter SEQ ID
NO: 40;

- et lett kjede variabel region CDR2 som omfatter SEQ ID NO: 47; og
 et lett kjede variabel region CDR3 som omfatter SEQ ID NO: 54;
- 5 f) et antistoff som omfatter
 et tung kjede variabel region CDR1 som omfatter SEQ ID NO: 20;
 et tung kjede variabel region CDR2 som omfatter SEQ ID NO: 27;
- 10 et tung kjede variabel region CDR3 som omfatter SEQ ID NO: 34;
 et lett kjede variabel region CDR1 som omfatter SEQ ID NO: 41;
 et lett kjede variabel region CDR2 som omfatter SEQ ID
- 15 NO: 48; og
 et lett kjede variabel region CDR3 som omfatter SEQ ID NO: 55; og
- g) et antistoff som omfatter
 et tung kjede variabel region CDR1 som omfatter SEQ ID
- 20 NO: 21;
 et tung kjede variabel region CDR2 som omfatter SEQ ID NO: 28;
 et tung kjede variabel region CDR3 som omfatter SEQ ID NO: 35;
- 25 et lett kjede variabel region CDR1 som omfatter SEQ ID NO: 42;
 et lett kjede variabel region CDR2 som omfatter SEQ ID NO: 49; og
 et lett kjede variabel region CDR3 som omfatter SEQ ID
- 30 NO: 56;
- hvor antistoffet spesifikt binder PD-1.

4. Isolert monoklonalt antistoff, eller antigen-bindende del derav,

- 35 k a r a k t e r i s e r t v e d a t antistoffet er valgt fra gruppen som består av:

a) et antistoff som omfatter en tung kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 1; og en lett

kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 8;

b) et antistoff som omfatter en tung kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 2; og en lett

5 kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 9;

c) et antistoff som omfatter en tung kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 3; og en lett

10 kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 10;

d) et antistoff som omfatter en tung kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 4; og en lett

kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 11;

15 e) et antistoff som omfatter en tung kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 5; og en lett

kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 12; eller

f) et antistoff som omfatter en tung kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 6; og en lett

20 kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 13; pg

g) et antistoff som omfatter en tung kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 7; og en lett

25 kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 14;

hvor antistoffet spesifikt binder PD-1.

5. Sammensetning,

30 k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter anti-stoffet, eller antigen-bindende del derav, som angitt i krav 1, og en farmasøytisk akseptert bærer.

6. Immunokonjugat,

35 k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter anti-stoffet, eller antigen-bindende del derav, som angitt i krav 1, koblet til et terapeutisk middel.

7. Bispesifikt molekyl,

k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter anti-
stoffet, eller antigen-bindende del derav, som angitt i krav
1, koblet til en andre funksjonell enhet med en forskjellig
bindingsspesifisitet enn nevnte antistoff, eller antigen-
5 bindende del derav.

8. Isolert nukleinsyremolekyl,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det koder for anti-
stoffet, eller antigen-bindende del derav som angitt i krav
10 1.

9. Ekspresjonsvektor,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter nuklein-
syremolekylet som angitt i krav 8.
15

10. Vertscelle,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter ekspre-
sjonsvektoren som angitt i krav 9.

20 11. Transgen mus,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter human
immunoglobulin tung og lett kjede transgener hvor musene
uttrykker antistoffet som angitt i krav 1.

25 12. Hybridom,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det er fremstilt fra
musen som er angitt i krav 11, hvor hybridomet produserer
nevnte antistoff.

30 13. Fremgangsmåte for å modulere en immunrespons i et
individ,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter admini-
strering til individet av antistoffet, eller antigen-bindende
del derav, som angitt i krav 1, slik at immunresponsen i
35 individet moduleres.

14. Fremgangsmåte for å inhibere vekst av tumorceller i et
individ,

k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter admini-
strering til et individ av antistoffet, eller antigen-
bindende del derav, som angitt i krav 1 i en mengde som er
effektiv til å inhibere vekst av tumorcellene.

5

15. Fremgangsmåte som angitt i krav 14, hvor tumorcellene er
av en cancer valgt fra gruppen som består av melanom, renal
cancer, prostatacancer, brystcancer, koloncancer og lunge-
cancer.

10

16. Fremgangsmåte for å behandle en infeksjonssykdom i et
individ,

k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter admini-
strering til individet av antistoffet, eller antigen-bindende
15 del derav, som angitt i krav 1 slik at individet behandles
for infeksjonssykdommer.

17. Fremgangsmåte for å øke en immunrespons mot et antigen i
et individ,

20

k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter admini-
strering til individet av: (i) antigenet; og (ii) antistoffet,
eller antigen-bindende del derav, som angitt i krav 1 slik at
en immunrespons mot antigenet i individet økes.

25

18. Fremgangsmåte som angitt i krav 17, hvor antigenet er et
tumorantigen, et viralt antigen, et bakterielt antigen eller
et antigen fra et patogen.

19. Fremgangsmåte for å behandle en hyperproliferativ
30 sykdom,

k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter :

(a) administrering av et anti-PD-1 antistoff til et individ,
og

(b) administrering av et anti-CTLA-4 antistoff til

35

individet.

20. Fremgangsmåte som angitt i krav 19, hvor anti-PD-1 anti-
stoffet administreres ved en subterapeutisk dose.

21. Fremgangsmåte som angitt i krav 19, hvor anti-CTLA-4 antistoffet administreres ved en subterapeutisk dose.

22. Fremgangsmåte som angitt i krav 19, hvor anti-PD-1 antistoffet og anti-CTLA-4 antistoffet hver administreres ved en
5 subterapeutisk dose.

23. Fremgangsmåte som angitt i krav 19, hvor den hyperproliferative sykdom er cancer.

10 24. Fremgangsmåte som angitt i krav 23, hvor canceren er koloncancer.

25. Fremgangsmåte som angitt i krav 19, hvor det anti-PD-1 humane sekvens monoklonale antistoffet er valgt fra gruppen
15 som består av:

a) et antistoff som omfatter en tung kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 1; og en lett kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 8;

20 b) et antistoff som omfatter en tung kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 2; og en lett kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 9;

c) et antistoff som omfatter en tung kjede variabel region
25 som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 3; og en lett kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 10;

d) et antistoff som omfatter en tung kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 4; og en lett
30 kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 11;

e) et antistoff som omfatter en tung kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 5; og en lett kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID
35 NO: 12; eller

f) et antistoff som omfatter en tung kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 6; og en lett kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 13; og

g) et antistoff som omfatter en tung kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 7; og en lett kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 14.

5

26. Fremgangsmåte for å endre en negativ hendelse assosiert med behandling av en hyperproliferativ sykdom med et immunstimulerende middel,

k a r a k t e r i s e r t v e d a t den omfatter:

- 10 (a) administrering av et anti-PD-1 antistoff til et individ, og
(b) administrering av en subterapeutisk dose av anti-CTLA-4 antistoff til individet.

- 15 27. Fremgangsmåte som angitt i krav 26, hvor anti-PD-1 antistoffet administreres i en subterapeutisk dose.

28 . Fremgangsmåte som angitt i krav 26, hvor den hyperproliferative sykdom er cancer.

20

29. Fremgangsmåte som angitt i krav 28, hvor canceren er koloncancer.

30. Fremgangsmåte som angitt i krav 26, hvor det anti-PD-1 humane sekvens monoklonale antistoffet er valgt fra gruppen som består av:

- 25 a) et antistoff som omfatter en tung kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 1; og en lett kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID
30 NO: 8;

b) et antistoff som omfatter en tung kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 2; og en lett kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 9;

- 35 c) et antistoff som omfatter en tung kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 3; og en lett kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 10;

- d) et antistoff som omfatter en tung kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 4; og en lett kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 11;
- 5 e) et antistoff som omfatter en tung kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 5; og en lett kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 12; eller
- f) et antistoff som omfatter en tung kjede variabel region
10 som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 6; og en lett kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 13; og
- g) et antistoff som omfatter en tung kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 7; og en lett
15 kjede variabel region som omfatter aminosyresekvensen SEQ ID NO: 14.

31. Fremgangsmåte for fremstilling av et anti-PD-1 antistoff, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter:
- 20 (a) å tilveiebringe: (i) en tung kjede variabel region antistoffsekvens som omfatter en CDR1 sekvens som er valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18, 19, 20 og 21, en CDR2 sekvens som er valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27 og 28, og en CDR3 sekvens
25 som er valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34 og 35; eller (ii) en lett kjede variabel region antistoffsekvens som omfatter CDR1 sekvens som er valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41 og 42, en CDR2 sekvens som er valgt fra gruppen som består av SEQ ID
30 NO: 43, 44, 45, 46, 47, 48 og 49 og en CDR3 sekvens som er valgt fra gruppen som består av SEQ ID NO: 50, 51, 52, 53, 54, 55 og 56;
- (b) å endre minst en aminosyrerest innen minst en variabel region antistoffsekvens, hvor nevnte sekvens er valgt fra
35 tung kjede variabel region antistoffsekvensen og lett kjede variabel region antistoffsekvensen, for å danne minst en endret antistoffsekvens; og
- (c) å uttrykke den endrede antistoffsekvensen som et protein.

SEKVENSLISTE

<110> Medarex, Inc.

<110> Ono Pharmaceutical Co., LTD.

<120> HUMAN MONOCLONAL ANTIBODIES TO PROGRAMMED DEATH 1 (PD-1) AND METHODS FOR TREATING CANCER USING ANTI-PD-1 ANTIBODIES ALONE OR IN COMBINATION WITH OTHER IMMUNOTHERAPEUTICS

<130> GEOP-50

<150> US 60/679,466

<151> 2005-05-09

<150> US 60/738,434

<151> 2005-11-21

<150> US 60/748,919

<151> 2005-12-08

<160> 74

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

<210> 2

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Asp	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1			5					10					15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Leu	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr

			20					25				30					
Gly	Phe	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		
		35					40					45					
Ala	Val	Ile	Trp	Tyr	Asp	Gly	Ser	Lys	Lys	Tyr	Tyr	Ala	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	Asn	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
			85						90					95			
Ala	Thr	Gly	Asp	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser		
			100					105					110				

Ser

<210> 3
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

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

Ser

<210> 4
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

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

Ser

<210> 5
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser
 20 25 30
 Ser Phe Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Val Arg Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Asp Glu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 6
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Ile Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Phe His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Arg Asp Asp 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 Thr Gly Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Ser

<210> 7
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser

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

<210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400>	8															
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	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Tyr	
			20					25					30			
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Ile	Ile	
		35					40					45				
Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	
	50					55					60					
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro	
65					70					75				80		
Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Ser	Asn	Trp	Pro	Leu	
				85					90					95		
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys						
			100					105								

<210> 9
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400>	9															
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	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Tyr	
			20					25					30			
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	
		35					40					45				
Tyr	Asp	Thr	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	
	50					55					60					
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro	
65					70					75				80		
Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Ser	Asn	Trp	Pro	Leu	
				85					90					95		
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys						
			100					105								

<210> 10
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 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 Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 11
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 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 Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 12
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50		55		60														
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro			
65					70					75					80			
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Pro	Arg			
				85					90					95				
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys								
			100					105										

<210> 13
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13																		
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	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Tyr			
			20					25					30					
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile			
		35					40					45						
Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly			
	50					55					60							
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro			
65					70					75				80				
Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Ser	Asn	Trp	Pro	Leu			
				85					90					95				
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys								
			100					105										

<210> 14
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14																		
Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly			
1				5					10					15				
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Trp			
			20					25					30					
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Glu	Lys	Ala	Pro	Lys	Ser	Leu	Ile			
		35					40					45						
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly			
	50					55					60							
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro			
65					70					75				80				
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Pro	Arg			
				85					90					95				
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys								
			100					105										

<210> 15
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15

Asn Tyr Gly Met His
1 5

<210> 16
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16
Asn Tyr Gly Phe His
1 5

<210> 17
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17
Asn Tyr Gly Met His
1 5

<210> 18
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18
Asn Ser Gly Met His
1 5

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19
Arg Ser Ser Phe Phe Trp Gly
1 5

<210> 20
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20
Ser Tyr Gly Phe His
1 5

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21
 Arg Ser Ser Tyr Phe Trp Gly
 1 5

<210> 22
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 23
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23
 Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 24
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24
 Leu Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 25
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25
 Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 26
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26
 Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 27
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 28
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28
 Ser Ile Phe Tyr Ser Gly Glu Thr Tyr Phe Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 29
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 29
 Asn Asp Asp Tyr
 1

<210> 30
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30
 Gly Asp Asp Tyr
 1

<210> 31
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 31
 Asn Val Asp His
 1

<210> 32
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 32
 Asn Asp Asp Tyr
 1

<210> 33
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 33
 Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Asp Glu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 34
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 34
 Gly Asp Asp Tyr
 1

<210> 35
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 35
 Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Asp Glu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 36
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 36
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 37
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 37
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 38
 <211> 11
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 39

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 41

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 44

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 44
 Asp Thr Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

<210> 45
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 45
 Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

<210> 46
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 46
 Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

<210> 47
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 47
 Ala Ala Ser Asn Leu Arg Ser
 1 5

<210> 48
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 48
 Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

<210> 49
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 49
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

<210> 50
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 50
 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
 1 5

<210> 51
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 51
 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
 1 5

<210> 52
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 52
 Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg Thr
 1 5

<210> 53
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 53
 Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg Thr
 1 5

<210> 54
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 54
 Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Arg Thr
 1 5

<210> 55
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 55
 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr

1 5
 <210> 56
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 56
 Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Arg Thr
 1 5

<210> 57
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(339)

<400> 57
 cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gac gtg gtc cag cct ggg ggg 48
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Val Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga gtc gcc ttc agt aac tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Ala Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct ccc ggc aag ggg ctg gag tgg gtg 144
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

gca gtt atc tgg tat gat gga agt aat aaa tac tat gca gac tcc gtg 192
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac atg ctc tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Met Leu Tyr
 65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct atg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gcg agg aac gat gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc 336
 Ala Arg Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110

tca 339
 Ser

<210> 58
 <211> 339
 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(339)

<400> 58

cag gtg cag ctg gtg gaa tct ggg gga gac gtg gtc cag cct ggg agg 48
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga tta acc ttc act aac tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

ggc ttc cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg 144
Gly Phe His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

gct gtt ata tgg tat gat gga agt aag aaa tat tat gca gac tcc gtg 192
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

ctg caa atg aac aac ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcg act ggg gat gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc 336
Ala Thr Gly Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

tca 339
Ser

<210> 59

<211> 339

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(339)

<400> 59

cag gtg tac ttg gta gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg 48
Gln Val Tyr Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc acc ttc agt aac tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg 144

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 gca ctt ata tgg tat gat gga agt aat aaa tac tat gca gac tcc gtg 192
 Ala Leu Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 ctg caa atg acc agt ctg aga gtc gag gac acg gct gtg tat tat tgt 288
 Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gcg agc aac gtt gac cat tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc 336
 Ala Ser Asn Val Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 tca 339
 Ser

<210> 60
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(339)

<400> 60
 cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg 48
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 tcc ctg aga ctc gac tgt aaa gcg tct gga atc acc ttc agt aac tct 96
 Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
 20 25 30
 ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg 144
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 gca gtt att tgg tat gat gga agt aaa aga tac tat gca gac tcc gtg 192
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg ttt 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80
 ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gcg aca aac gac gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc 336

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

tca 339
 Ser

<210> 61
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(363)

<400> 61
 cag ctg cag ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aag cct tcg gag 48
 Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct ggt ggc tcc ctc agc agg agt 96
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser
 20 25 30

agt ttc ttc tgg ggc tgg atc cgt cag ccc cca ggg aag gga ctg gag 144
 Ser Phe Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

tgg att ggg agt atc tat tat agt ggg agc acc tac tac aac ccg tcc 192
 Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

ctc aag agt cga gtc acc ata tcc gta gac acg tcc aag aac cag ttc 240
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gcc gca gac acg gct gtg tat tac 288
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

tgt gtg aga gat tac gat att ttg act ggc gac gag gac tac tgg ggc 336
 Cys Val Arg Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Asp Glu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

cag gga acc ctg gtc acc gtg tcc tca 363
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 62
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(339)

<400> 62
 cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg 48
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 tcc ctg aga ctc tcc tgt aca acg tct gga atc acc ttc agt agc tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Ile Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 ggc ttt cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg 144
 Gly Phe His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 gca gtg ata tgg tat gat gga agt aaa aaa tac tat gca gac tcc gtg 192
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 aag ggc cga ttc acc ctc tcc aga gac gat tcc aag aac acg ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gtt act ggg gat gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc 336
 Val Thr Gly Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 tca 339
 Ser

<210> 63
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(363)

<400> 63
 cag ctg cag ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aag cct tcg gag 48
 Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 acc ctg tcc ctc acc tgc tct gtc tct ggt ggc tcc ctc agc agg agt 96
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser
 20 25 30
 agt tac ttc tgg ggc tgg atc cgc cag ccc cca ggg aag ggg ctg gag 144
 Ser Tyr Phe Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 tgg att gcg agt atc ttt tat agt ggg gaa acc tac ttc aat ccg tcc 192
 Trp Ile Ala Ser Ile Phe Tyr Ser Gly Glu Thr Tyr Phe Asn Pro Ser

```

50              55              60
ctc aag agt cga gtc acc ata tcc gta gac acg tcc agg aac cag ttc 240
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Arg Asn Gln Phe
65              70              75              80

tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gcc gca gac acg gct gtg tat tac 288
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85              90              95

tgt gcg aga gat tac gat att ttg act ggc gac gag gac tac tgg ggc 336
Cys Ala Arg Asp Tyr Asp Ile Leu Thr Gly Asp Glu Asp Tyr Trp Gly
100            105            110

cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca 363
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115            120

<210> 64
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(321)

<400> 64
gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1              5              10              15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac 96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20            25            30

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc atc atc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Ile Ile
35            40            45

tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc 192
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50            55            60

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65            70            75            80

gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg cct ctc 288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85            90            95

act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 321
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100            105

```

<210> 65
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(321)

<400> 65
 gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 gaa aga gcc acc ctg tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac 96
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 tat gat aca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc 192
 Tyr Asp Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg ccg ctc 288
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
 85 90 95
 act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 321
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 66
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(321)

<400> 66
 gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agt agt tac 96
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144

<210> 68
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(321)

<400> 68
 gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct gtg gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 gac aga gtc tcc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agc agc tgg 96
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct aag tcc ctg atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 tat gct gca tcc aat tta cga agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192
 Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 gaa gat ttt gca act tat tac tgc caa cag tat tat agt tac cct agg 288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Arg
 85 90 95
 acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 321
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 69
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(321)

<400> 69
 gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac 96
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

```

    tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc
144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
    35          40          45

    tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc    192
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50          55          60

    agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct    240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
    65          70          75          80

    gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg cct ctc    288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
    85          90          95

    act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa    321
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
    100          105

<210> 70
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(321)

<400> 70
gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct gta gga    48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1          5          10          15

gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agc agc tgg    96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
    20          25          30

    tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct aag tcc ctg atc    144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
    35          40          45

    tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc    192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50          55          60

    agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct    240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
    65          70          75          80

    gaa gat ttt gca act tat tac tgc caa cag tat tat agt tac cct agg    288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Arg
    85          90          95

    acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa    321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

```

100

105

<210> 71
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 71
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala 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
 Ala Arg

<210> 72
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 72
 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 Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Ile Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro
 85 90 95

<210> 73
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 73
 Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
 20 25 30
 Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn His Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg

<210> 74
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 74
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro
 85 90 95

Anti-PD1 17D8 VH

V segment: 3-33

D segment: ukjent

J segment: JH4b

```

      Q  V  Q  L  V  E  S  G  G  D  V  V  Q  P  G  G  S  L
1  CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GAC GTG GTC CAG CCT GGG GGG TCC CTG

                                     CDR1
                                     -----
      R  L  S  C  A  A  S  G  V  A  F  S  N  Y  G  M  H  W
55  AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA GTC GCC TTC AGT AAC TAT GGC ATG CAC TGG

                                     CDR2
                                     -----
      V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  A  V  I  W  Y  D
109 GTC CGC CAG GCT CCC GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATC TGG TAT GAT

      CDR2
      -----
      G  S  N  K  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R  F  T  I  S  R
163 GGA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC AGA

      D  N  S  K  N  M  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D
217 GAC AAT TCC AAG AAC ATG CTC TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

      CDR3
      -----
      T  A  M  Y  Y  C  A  R  N  D  D  Y  W  G  Q  G  T  L
271 ACG GCT ATG TAT TAC TGT GCG AGG AAC GAT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG

      L → JH4b

      V  T  V  S  S
325 GTC ACC GTC TCC TCA
```

Figur 1A

Anti-PD1 17D8 VK

V segment: L6

J segment: JK4

```
      E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
1  GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

      CDR1
      -----
      A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
55  GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

      CDR2
      -----
      Q Q K P G Q A P R L I I Y D A S N R
109 CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC ATC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

      CDR2
      -----
      A T G I P A R F S G S G S G T D F T
163 GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

      CDR3
      -----
      L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

      CDR3
      -----
      R S N W P L T F G G G T K V E I K
271 CGT AGC AAC TGG CCT CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
```



Figur 1B

Anti-PD-1 2D3 VH

V segment: 3-33

D segment: 7-27

J segment: JH4b

```

      Q  V  Q  L  V  E  S  G  G  D  V  V  Q  P  G  R  S  L
1  CAG GTG CAG CTG GTG GAA TCT GGG GGA GAC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

                                CDR1
                                -----
      R  L  S  C  A  A  S  G  L  T  F  T  N  Y  G  F  H  W
55  AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTA ACC TTC ACT AAC TAT GGC TTC CAC TGG

                                CDR2
                                -----
      V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  A  V  I  W  Y  D
109 GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCT GTT ATA TGG TAT GAT

                                CDR2
                                -----
      G  S  K  K  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R  F  T  I  S  R
163 GGA AGT AAG AAA TAT TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

      D  N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  N  L  R  A  E  D
217 GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AAC CTG AGA GCC GAG GAC

                                CDR3
                                -----
      T  A  V  Y  Y  C  A  T  G  D  D  Y  W  G  Q  G  T  L
271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG ACT GGG GAT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG

      V  T  V  S  S
325 GTC ACC GTC TCC TCA
```

Figur 2A

Anti-PD-1 2D3 VK

V segment: L6

J segment: JK4

```

      E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
1  GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
                                -----
      A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
55  GCC ACC CTG TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

                                CDR2
                                -----
      Q Q K P G Q A P R L L I Y D T S N R
109 CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT ACA TCC AAC AGG

      CDR2
      -----
      A T G I P A R F S G S G S G T D F T
163  GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

                                CDR3
                                -----
      L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

      CDR3
      -----
      R S N W P L T F G G G T K V E I K
271 CGT AGC AAC TGG CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
```

Figur 2B

Anti-PD-1 4H1 VH

V segment: 3-33

D segment: ikke fastslått

J segment: JH4b

```

      Q V Y L V E S G G G V V Q P G R S L
1  CAG GTG TAC TTG GTA GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

                                CDR1
                                -----
      R L S C A A S G F T F S N Y G M H W
55  AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC TAT GGC ATG CAC TGG

                                CDR2
                                -----
      V R Q A P G K G L E W V A L I W Y D
109 GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA CTT ATA TGG TAT GAT

                                CDR2
                                -----
      G S N K Y Y A D S V K G R F T I S R
163 GGA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

      D N S K N T L Y L Q M T S L R V E D
217 GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG ACC AGT CTG AGA GTC GAG GAC

                                CDR3
                                -----
      T A V Y Y C A S N V D H W G Q G T L
271 ACG GCT GTG TAT TAT TGT GCG AGC AAC GTT GAC CAT TGG GGC CAG GGA ACC CTG

      V T V S S
325 GTC ACC GTC TCC TCA
```

Figur 3A

Anti-PD-1 4H1 VK

V segment: L6

J segment: JK1

```

      E   I   V   L   T   Q   S   P   A   T   L   S   L   S   P   G   E   R
1  GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
                                -----
      A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   Y   L   A   W   Y
55  GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGT AGT TAC TTA GCC TGG TAC

                                CDR2
                                -----
      Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   D   A   S   N   R
109 CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

      CDR2
      -----
      A   T   G   I   P   A   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F   T
163 GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

                                CDR3
                                -----
      L   T   I   S   S   L   E   P   E   D   F   A   V   Y   Y   C   Q   Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

      CDR3
      -----
      S   S   N   W   P   R   T   F   G   Q   G   T   K   V   E   I   K
271 AGT AGC AAC TGG CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
```

Figur 3B

V segment: 3-33
D segment: ukjent
J segment: JH4b

Figur 4A

Anti-PD1 5C4 VK

V segment: L6

J segment: JK1

```

      E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
1  GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

      CDR1
      -----
      A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
55  GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGT AGT TAC TTA GCC TGG TAC

      CDR2
      -----
      Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
109 CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

      CDR2
      -----
      A T G I P A R F S G S G S G T D F T
163 GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

      CDR3
      -----
      L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

      CDR3
      -----
      S S N W P R T F G Q G T K V E I K
271 AGT AGC AAC TGG CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

```



Figur 4B

Anti-PD-1 4A11 VH

V segment: 4-39

D segment: 3-9

J segment: JH4b

```

1      Q   L   Q   L   Q   E   S   G   P   G   L   V   K   P   S   E   T   L
      CAG CTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG

                                         CDR1
                                         -----
55     S   L   T   C   T   V   S   G   G   S   L   S   R   S   S   F   F   W
      TCC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC CTC AGC AGG AGT AGT TTC TTC TGG

CDR1                                     CDR2
-----                                     -----
109    G   W   I   R   Q   P   P   G   K   G   L   E   W   I   G   S   I   Y
      GGC TGG ATC CGT CAG CCC CCA GGG AAG GGA CTG GAG TGG ATT GGG AGT ATC TAT

                                         CDR2
                                         -----
163    Y   S   G   S   T   Y   Y   N   P   S   L   K   S   R   V   T   I   S
      TAT AGT GGG AGC ACC TAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCC

                                         CDR3
                                         -----
217    V   D   T   S   K   N   Q   F   S   L   K   L   S   S   V   T   A   A
      GTA GAC ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACC GCC GCA

                                         CDR3
                                         -----
271    D   T   A   V   Y   Y   C   V   R   D   Y   D   I   L   T   G   D   E
      GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GTG AGA GAT TAC GAT ATT TTG ACT GGC GAC GAG

CDR3
-----
325    D   Y   W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S
      GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTG TCC TCA
```

Figur 5A

Anti-PD-1 4A11 VK

V segment: L15

J segment: JK1

```

1      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R
      GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTG GGA GAC AGA

                                CDR1
                                -----
55     V S I T C R A S Q G I S S W L A W Y
      GTC TCC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
                                -----
109    Q Q K P E K A P K S L I Y A A S N L
      CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AAT TTA

      CDR2
      -----
163    R S G V P S R F S G S G S G T D F T
      CGA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
                                -----
217    L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
      CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

      CDR3
      -----
271    Y Y S Y P R T F G Q G T K V E I K
      TAT TAT AGT TAC CCT AGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
```

Figur 5B

Anti-PD-1 7D3 VH

V segment: 3-33

D segment: 7-27

J segment: JH4b

```

1      Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L
      CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

                                     CDR1
                                     -----
55     R L S C T T S G I T F S S Y G F H W
      AGA CTC TCC TGT ACA ACG TCT GGA ATC ACC TTC AGT AGC TAT GGC TTT CAC TGG

                                     CDR2
                                     -----
109    V R Q A P G K G L E W V A V I W Y D
      GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTG ATA TGG TAT GAT

      CDR2
      -----
163    G S K K Y Y A D S V K G R F T L S R
      GGA AGT AAA AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC CTC TCC AGA

217    D D S K N T L Y L Q M N S L R A E D
      GAC GAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

      CDR3
      -----
271    T A V Y Y C V T G D D Y W G Q G T L
      ACG GCT GTG TAT TAC TGT GTT ACT GGG GAT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG

325    V T V S S
      GTC ACC GTC TCC TCA
```

Figur 6A

Anti-PD-1 7D3 VK

V segment: L6

J segment: JK4

```

      E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
1  GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

      CDR1
      -----
      A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
55  GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

      CDR2
      -----
      Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
109 CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

      CDR2
      -----
      A T G I P A R F S G S G S G T D F T
163 GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

      CDR3
      -----
      L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

      CDR3
      -----
      R S N W P L T F G G G T K V E I K
271 CGT AGC AAC TGG CCT CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
```

Figur 6B

Anti-PD-1 5F4 VH

V segment: 4-39

D segment: 3-9

J segment: JH4b

```

1      Q   L   Q   L   Q   E   S   G   P   G   L   V   K   P   S   E   T   L
      CAG CTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG

                                         CDR1
                                         -----
55      S   L   T   C   S   V   S   G   G   S   L   S   R   S   S   Y   F   W
      TCC CTC ACC TGC TCT GTC TCT GGT GGC TCC CTC AGC AGG AGT AGT TAC TTC TGG

      CDR1                                     CDR2
      ---                                     -----
109     G   W   I   R   Q   P   P   G   K   G   L   E   W   I   A   S   I   F
      GGC TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GCG AGT ATC TTT

                                         CDR2
                                         -----
163     Y   S   G   E   T   Y   F   N   P   S   L   K   S   R   V   T   I   S
      TAT AGT GGG GAA ACC TAC TTC AAT CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCC

                                         CDR3
                                         -----
217     V   D   T   S   R   N   Q   F   S   L   K   L   S   S   V   T   A   A
      GTA GAC ACG TCC AGG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACC GCC GCA

                                         CDR3
                                         -----
271     D   T   A   V   Y   Y   C   A   R   D   Y   D   I   L   T   G   D   E
      GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT TAC GAT ATT TTG ACT GGC GAC GAG

      CDR3
      -----
325     D   Y   W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S
      GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
```

Figur 7A

Anti-PD-1 5F4 VK

V segment: L15

J segment: JK1

```

1      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R
      GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                CDR1
                                -----
55     V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y
      GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
                                -----
109    Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L
      CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

      CDR2
      -----
163    Q S G V P S R F S G S G S G T D F T
      CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
                                -----
217    L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
      CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

      CDR3
      -----
271    Y Y S Y P R T F G Q G T K V E I K
      TAT TAT AGT TAC CCT AGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
```

Figur 7B

Anti-PD1 17D8, 2D3, 4H1, 5C4 og 7D3 VH region

	Q	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	V	V	Q	P	G	R	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	G	M	H	W	V	R	Q
33-33 germline:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	A	-	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-
17D8 VH:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	-	2D3	VH:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	T	N	-	-	-	F	-	-	-	-
4H1 VH:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4H1	VH:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	
5C4 VH:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5C4	VH:	-	-	-	-	D	-	K	-	-	I	-	-	-	N	S	-	-	-	-	-	-	-
7D3 VH:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7D3	VH:	-	-	-	-	-	T	T	-	-	I	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	

3-33 germline:	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	V	I	W	Y	D	G	S	N	K	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T
17D8 VH:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	
2D3 VH:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
4H1 VH:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
5C4 VH:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
7D3 VH:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-	-	-	D	-	-			

	CDR3																			
	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	
3-33 germline:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
JH4b germline:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
17D8 VH:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	D Y W G Q G T L V T V S S (JH4b)
2D3 VH:	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	G	-	- (JH4b)
4H1 VH:	-	-	-	-	-	-	T	-	-	V	-	-	-	-	-	-	S	V	H	- (JH4b)
5C4 VH:	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	N	D	- (JH4b)
7D3 VH:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	T	G	D - (JH4b)

Anti-PD-1 17D8, 2D3 og 7D3 VK region

[illegible][illegible][illegible]

JK4 germline:K V E I K	(JK4)
17D8 VK:	- - - -
2C3 VK:	- - - -
7D3 VK:	- - - -

6 प्रति.५

Anti-PD-1 4H1 og 5C4 VK region

[illegible][illegible][illegible]

JK1 germline:K V E I K
4H1 VK: - - - - (JK1)
5C4 VK: - - - - (JK1)

Figur 10

Anti-PD-1 4A11 og 5F4 VH regioner

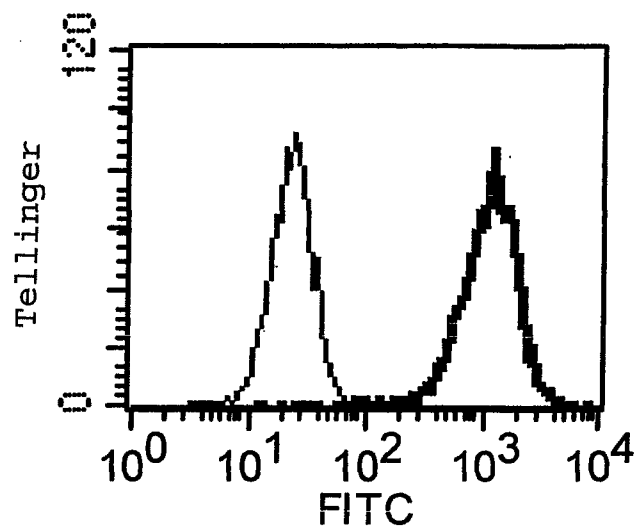
[illegible][illegible][illegible][illegible]

Figur 11

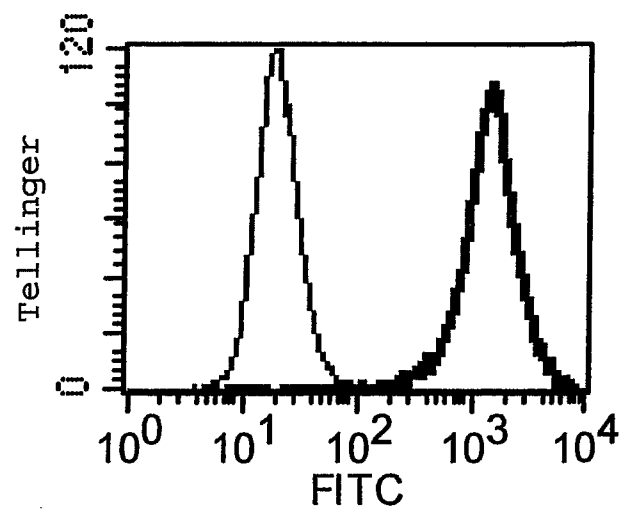
Anti-PD-1 4A11 og 5F4 VK region

[illegible][illegible][illegible][illegible]

Figur 12

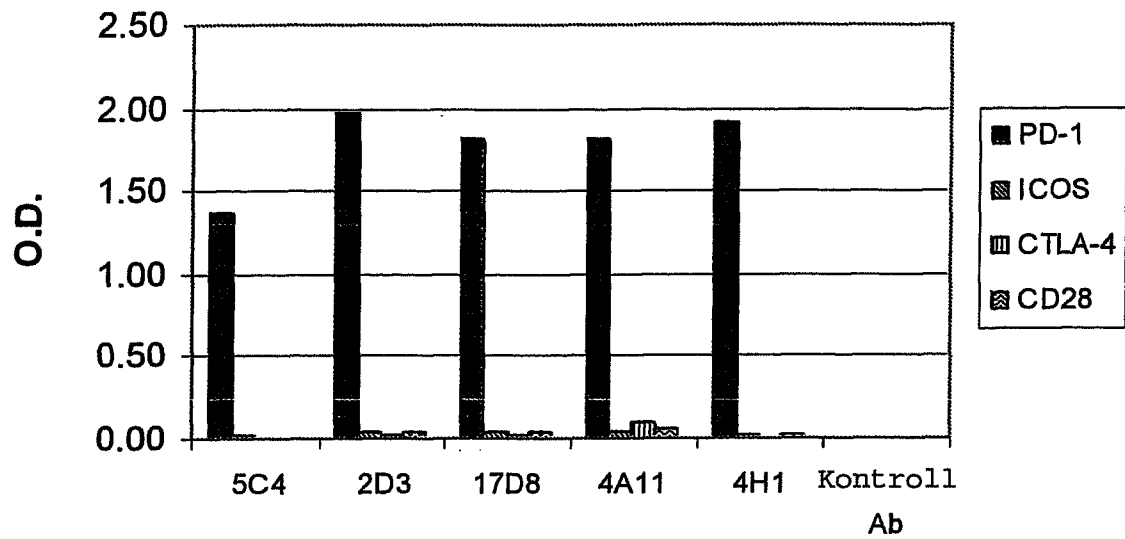


Figur 13A



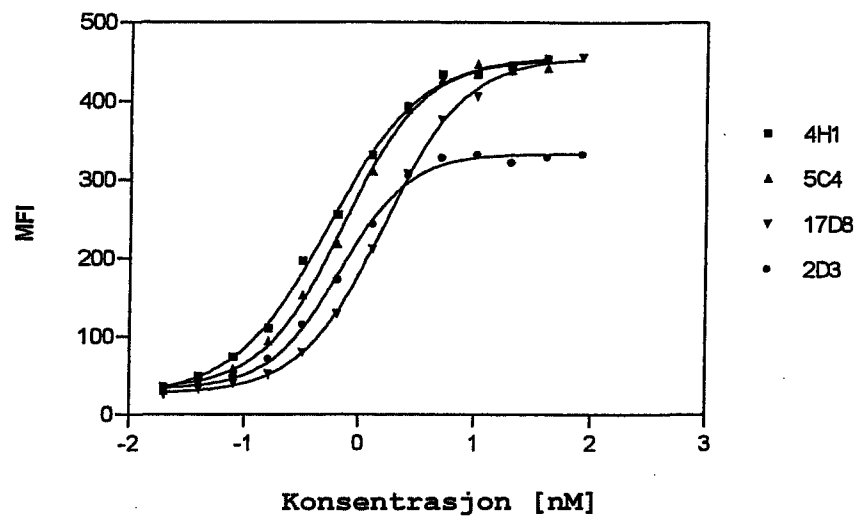
Figur 13B

Bindingsspesifisitet hos HuMab anti-PD-1 antistoffer til
PD-1, ICOS, CTLA-4 og CD28



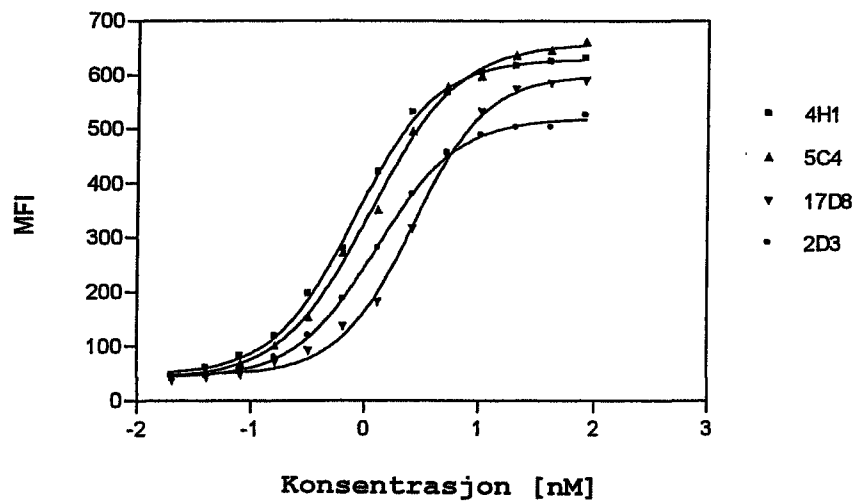
Figur 14

Binding av HuMab anti-hPD-1 Abs til aktiverte humane T celler



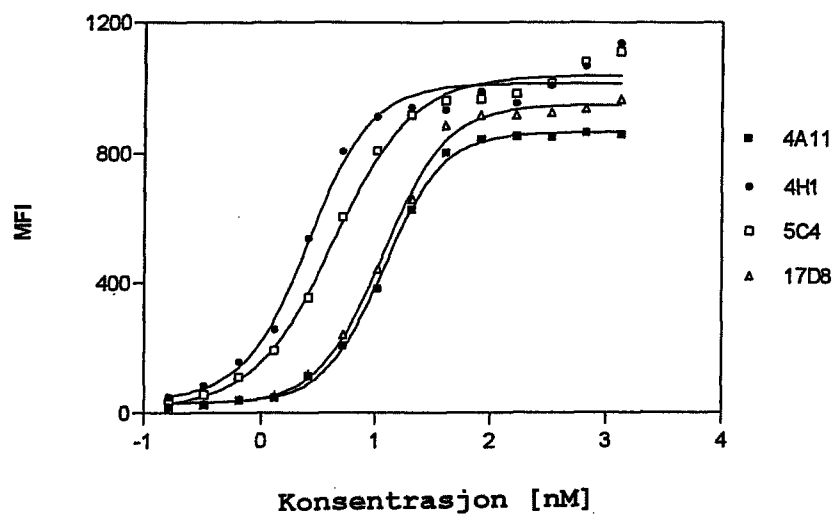
Figur 15A

Binding av HuMab anti-hPD-1 Abs til aktiverte cynomolgus ape PBMC



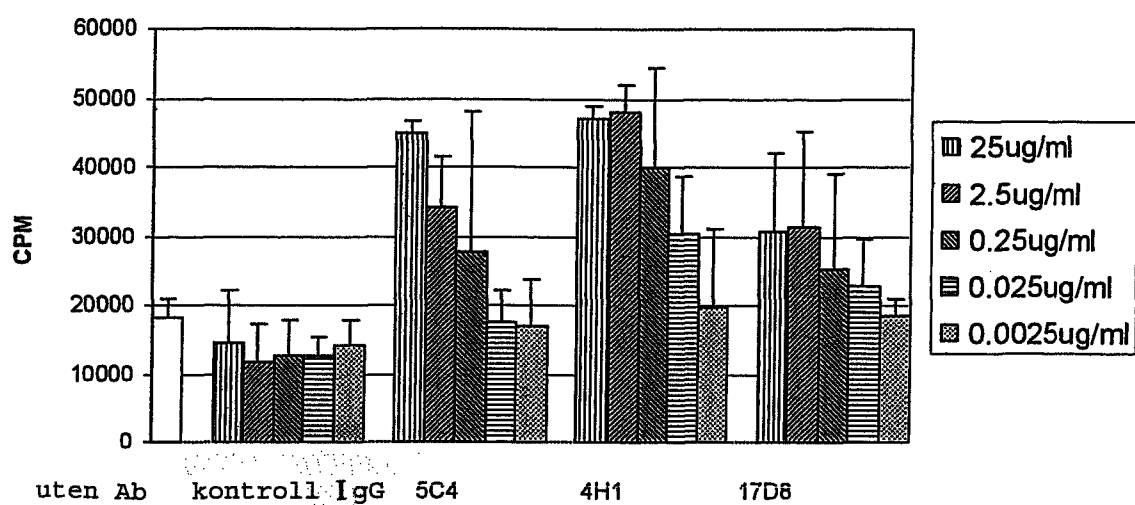
Figur 15B

Binding av HuMab anti-hPD-1 Abs til PD-1 uttrykkende CHO celler



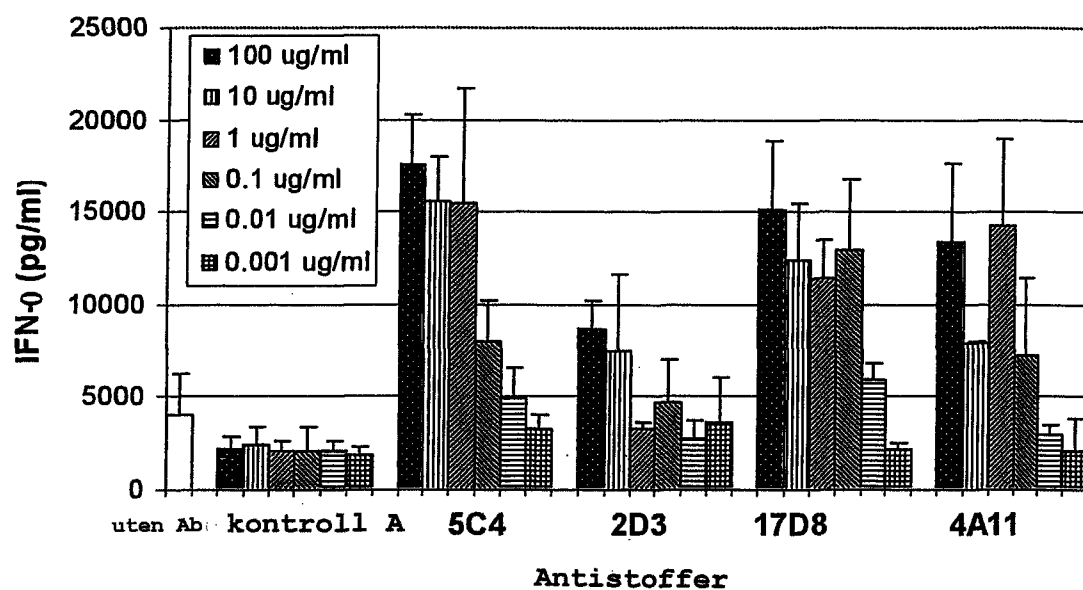
Figur 15C

Anti-PD-1 Abs fremmer T celle proliferasjon i MLR

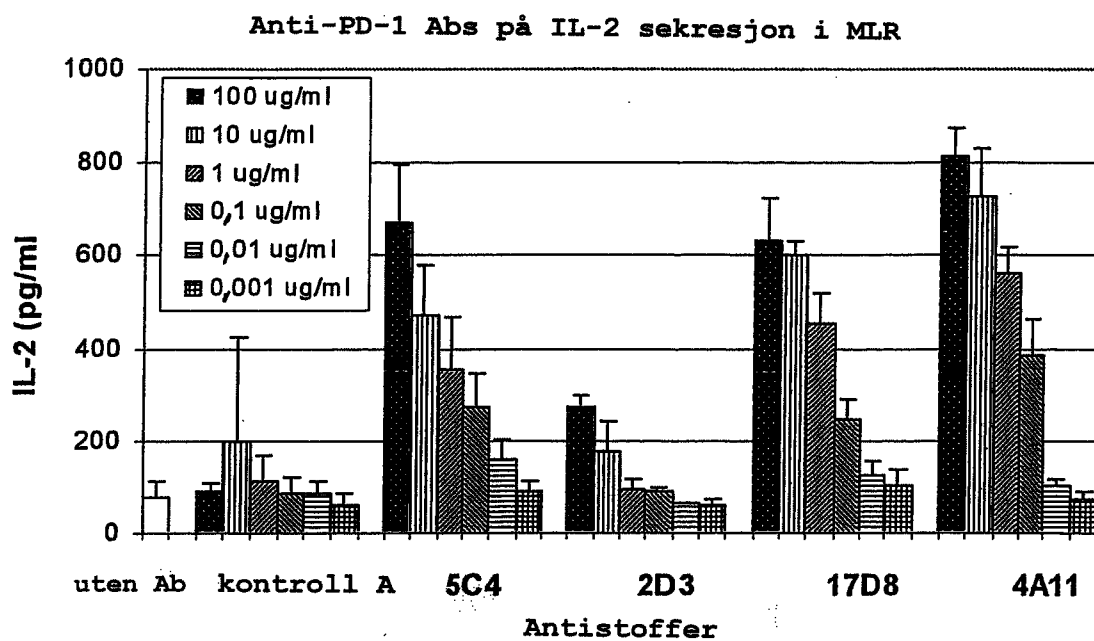


Figur 16A

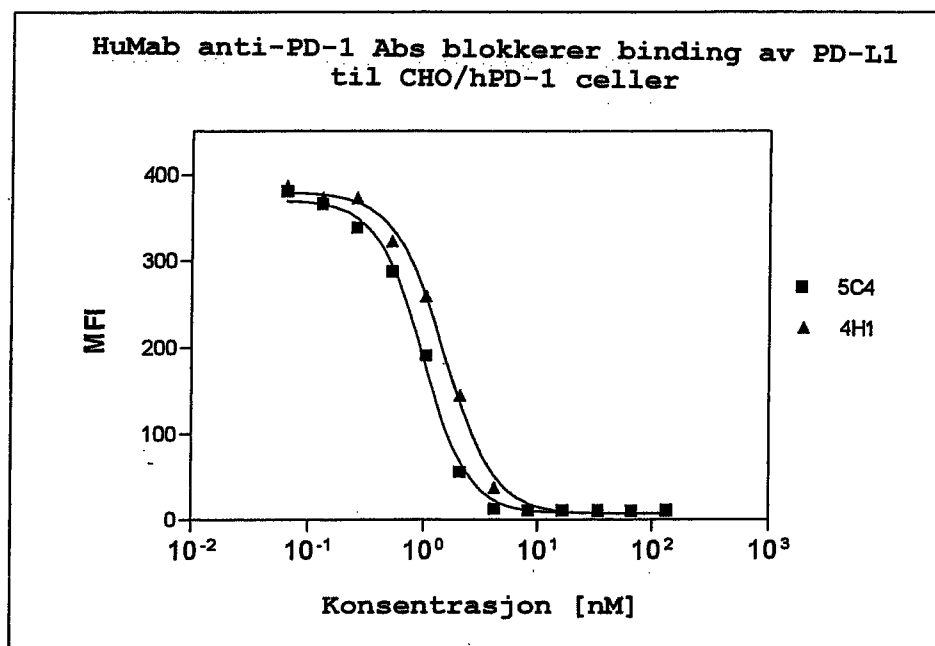
Anti-PD-1 Abs på IFN-0 sekresjon i MLR



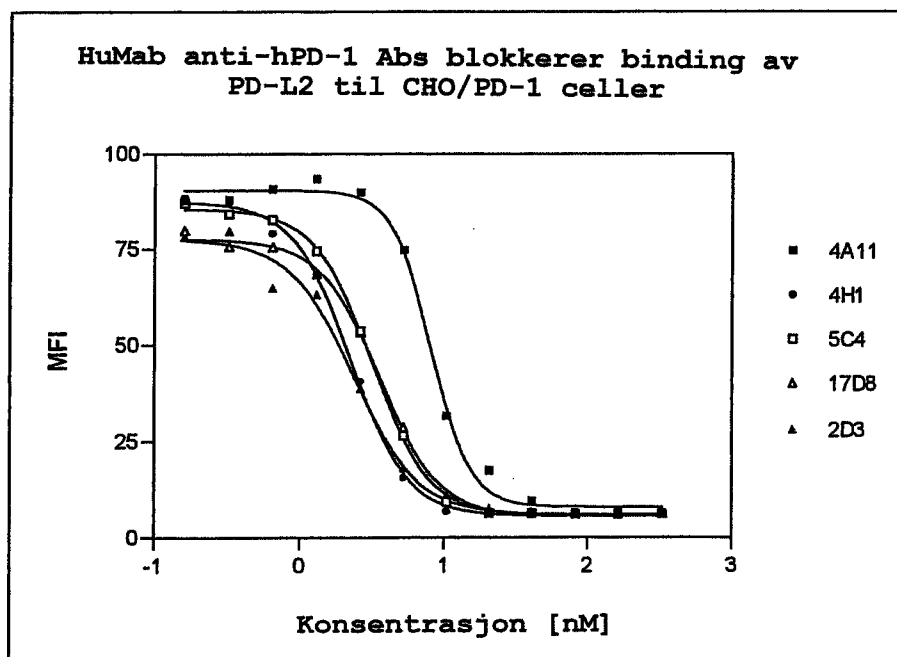
Figur 16B



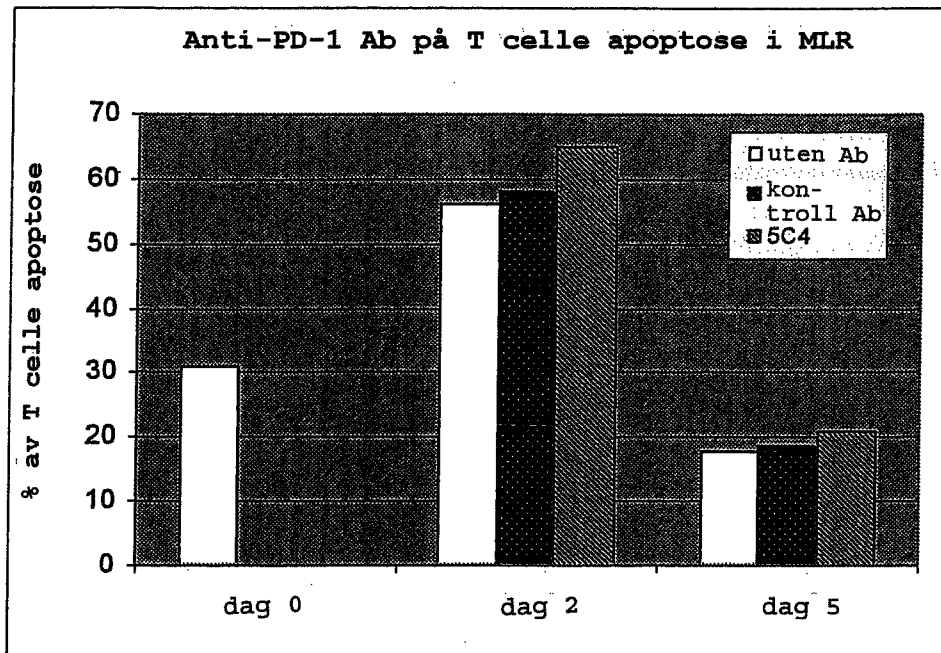
Figur 16C



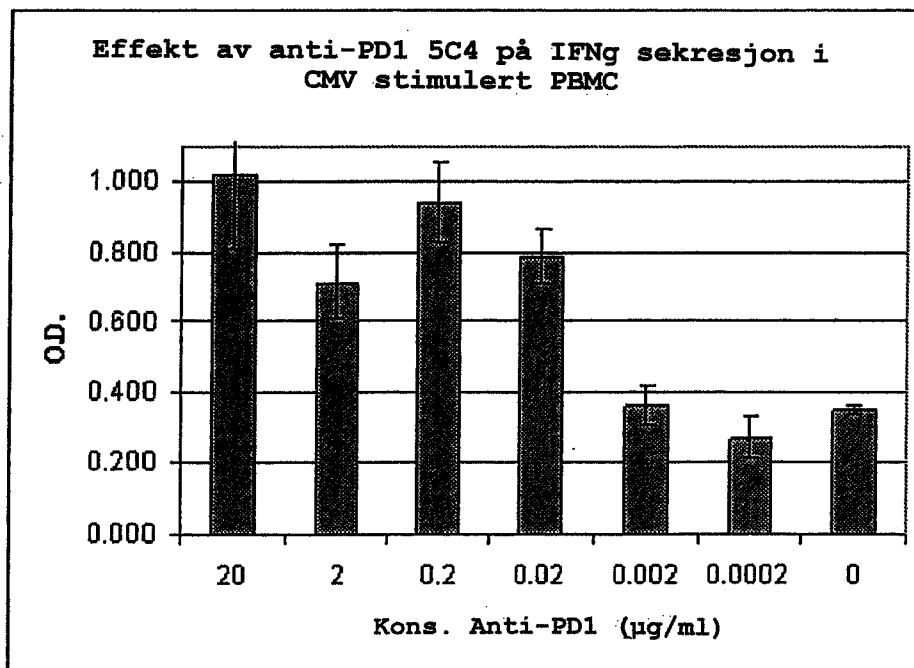
Figur 17A



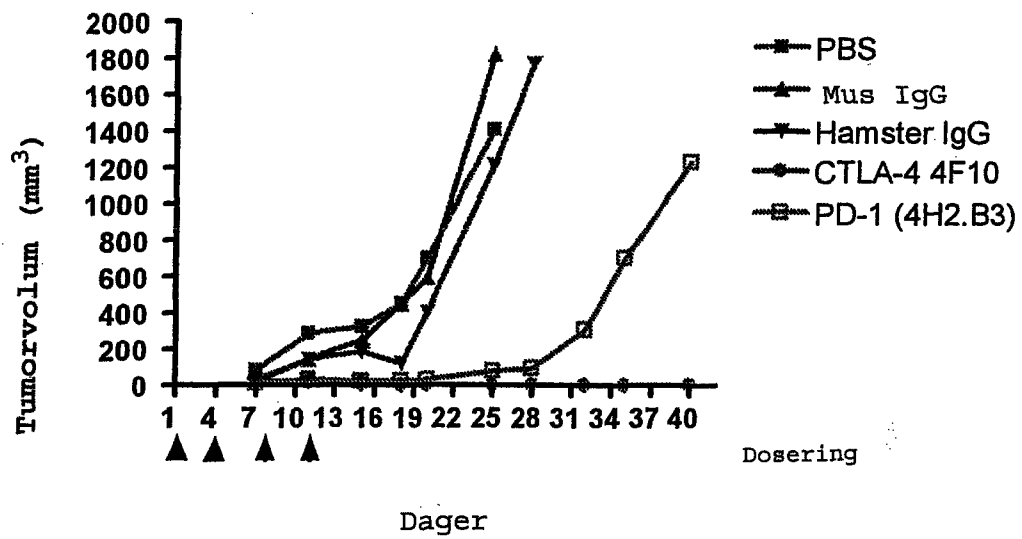
Figur 17B



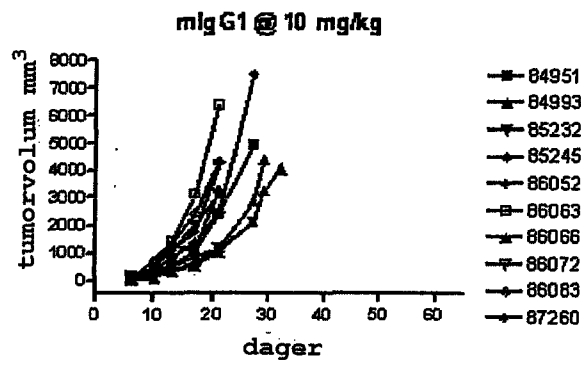
Figur 18



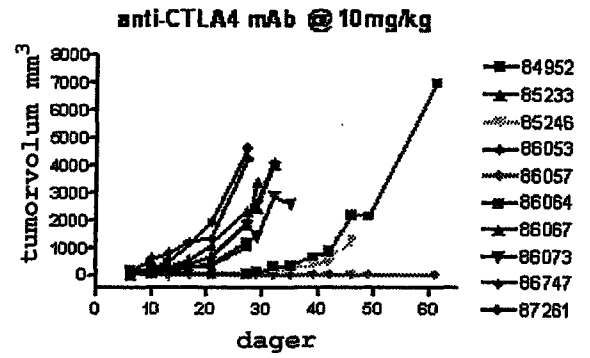
Figur 19



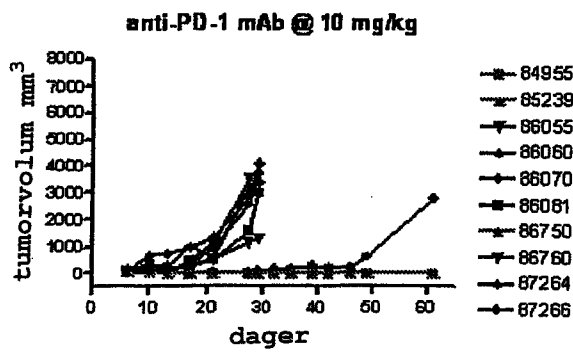
Figur 20



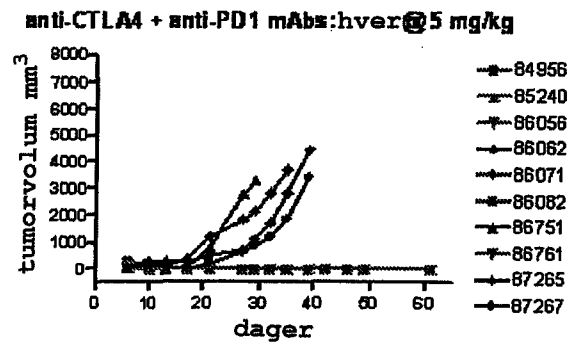
Figur 21A



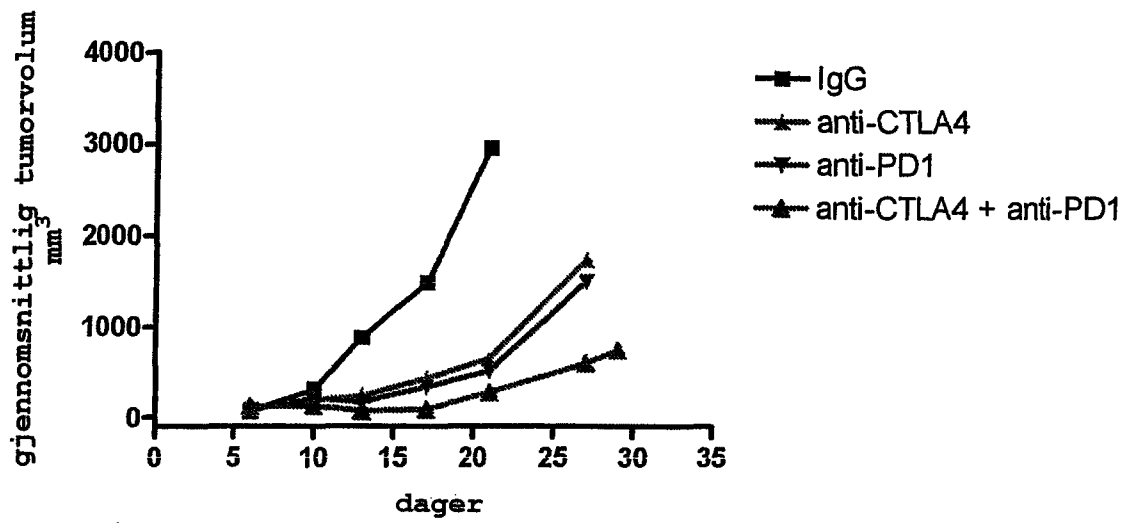
Figur 21B



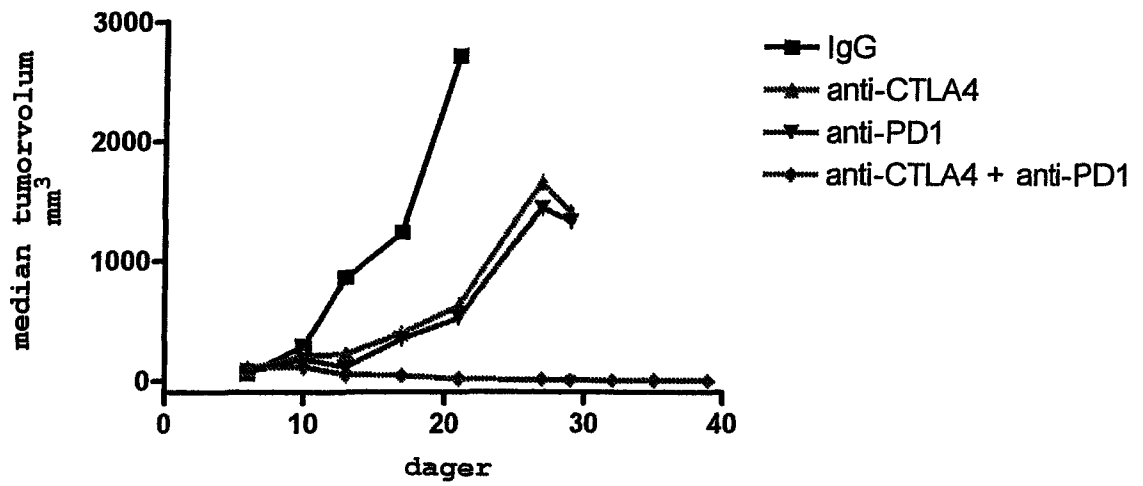
Figur 21C



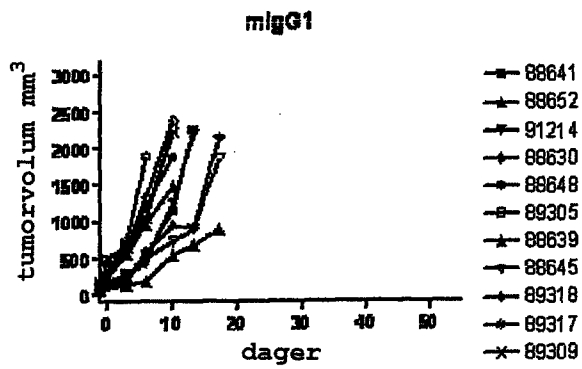
Figur 21D



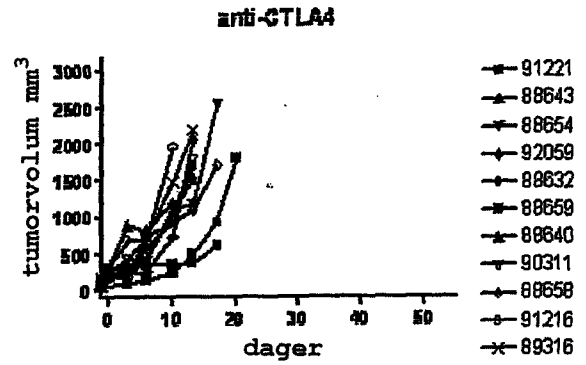
Figur 22



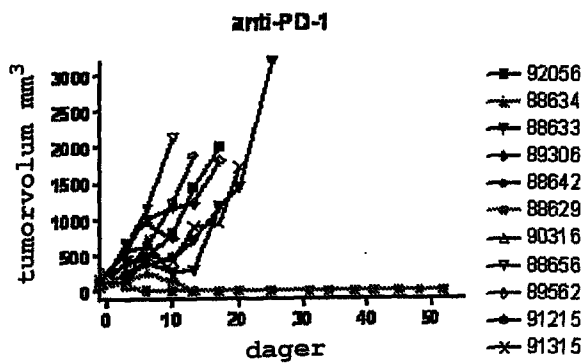
Figur 23



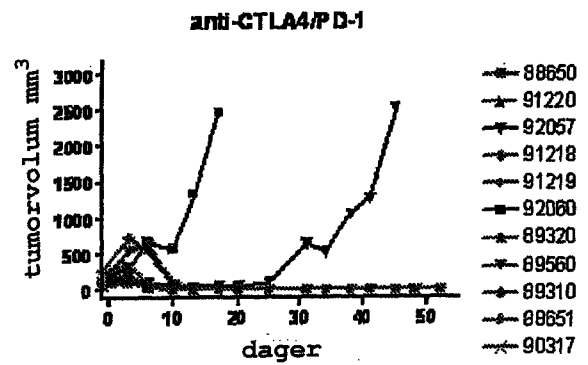
Figur 24A



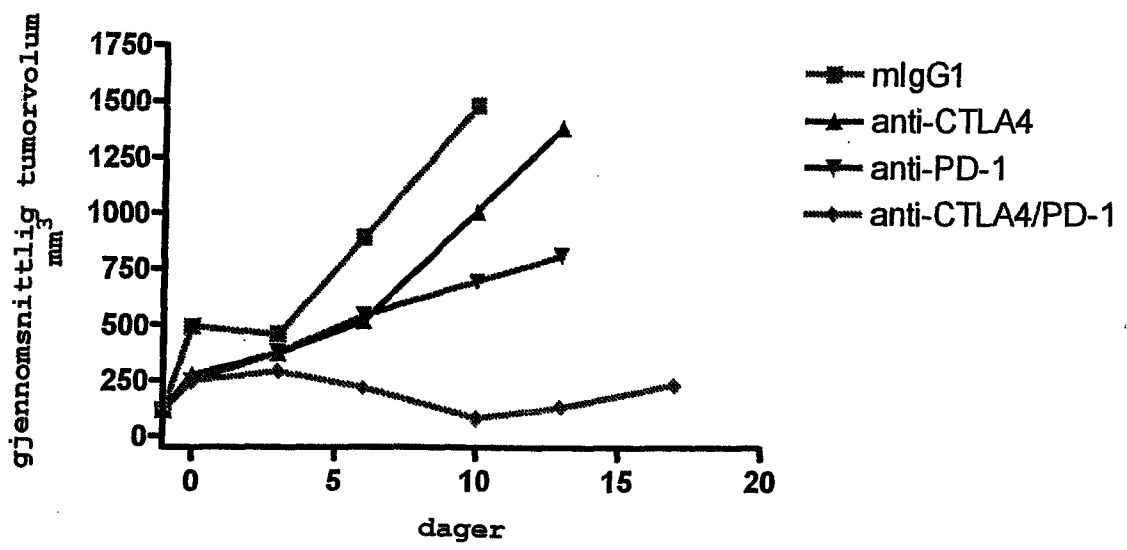
Figur 24B



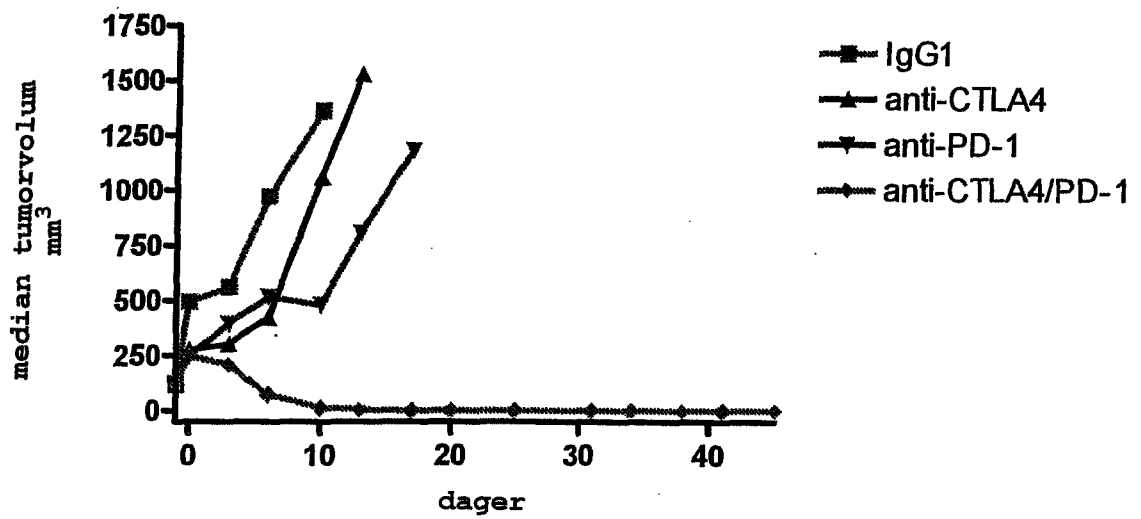
Figur 24C



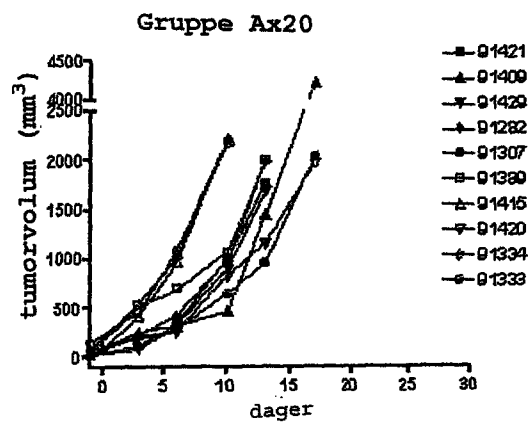
Figur 24D



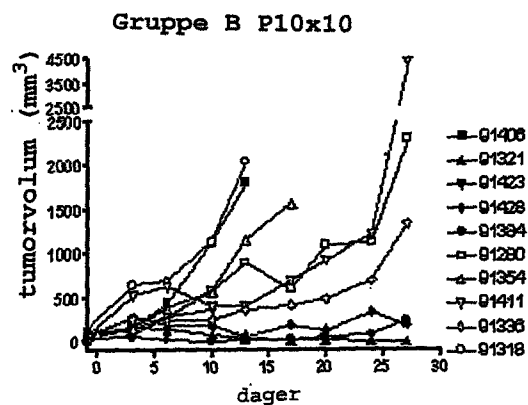
Figur 25



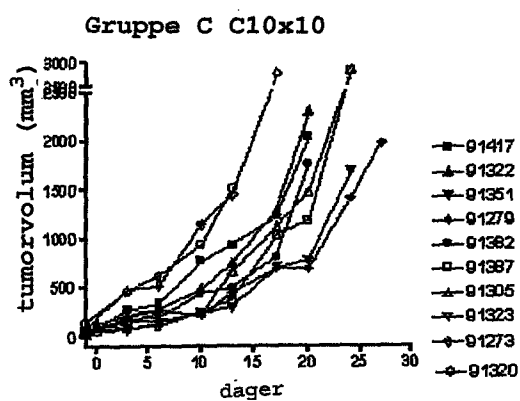
Figur 26



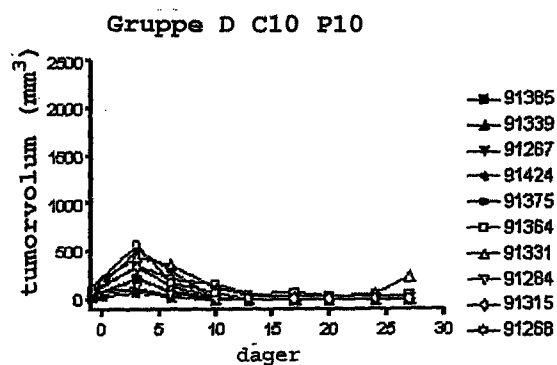
Figur 27A



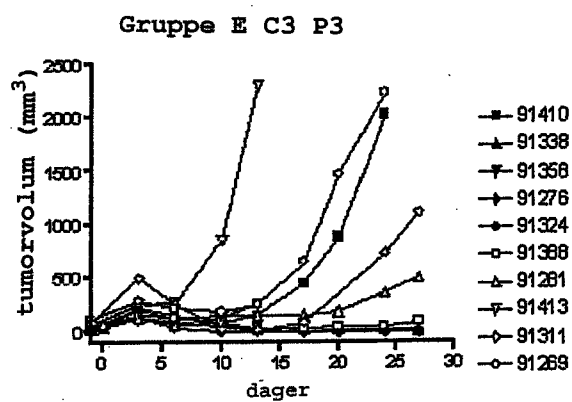
Figur 27B



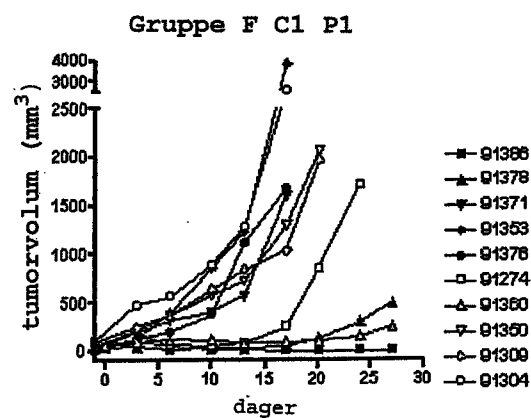
Figur 27C



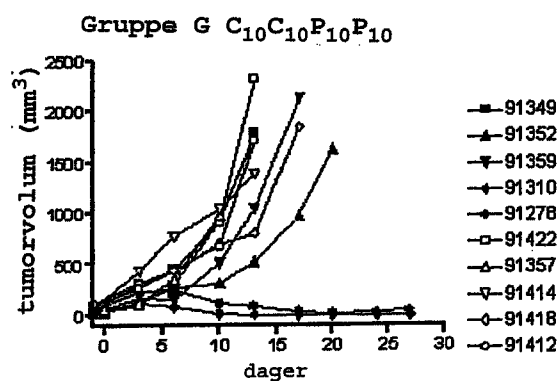
Figur 27D



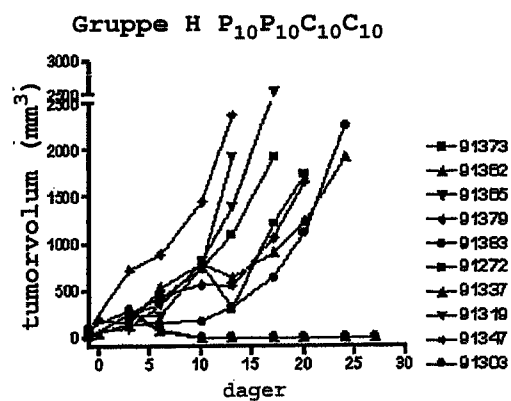
Figur 27E



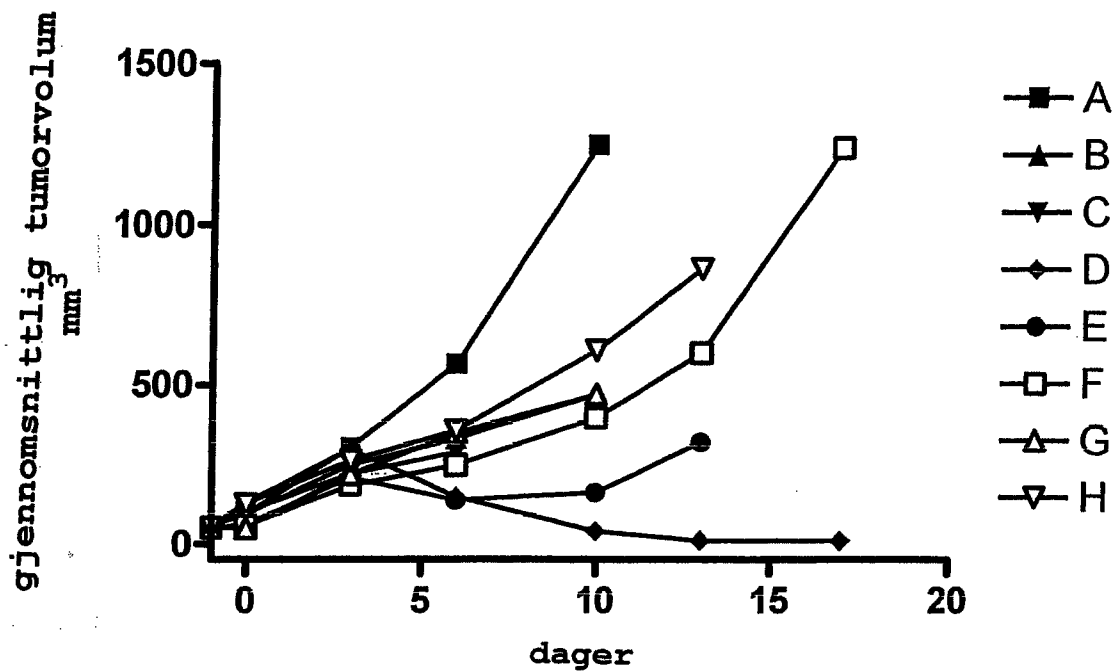
Figur 27F



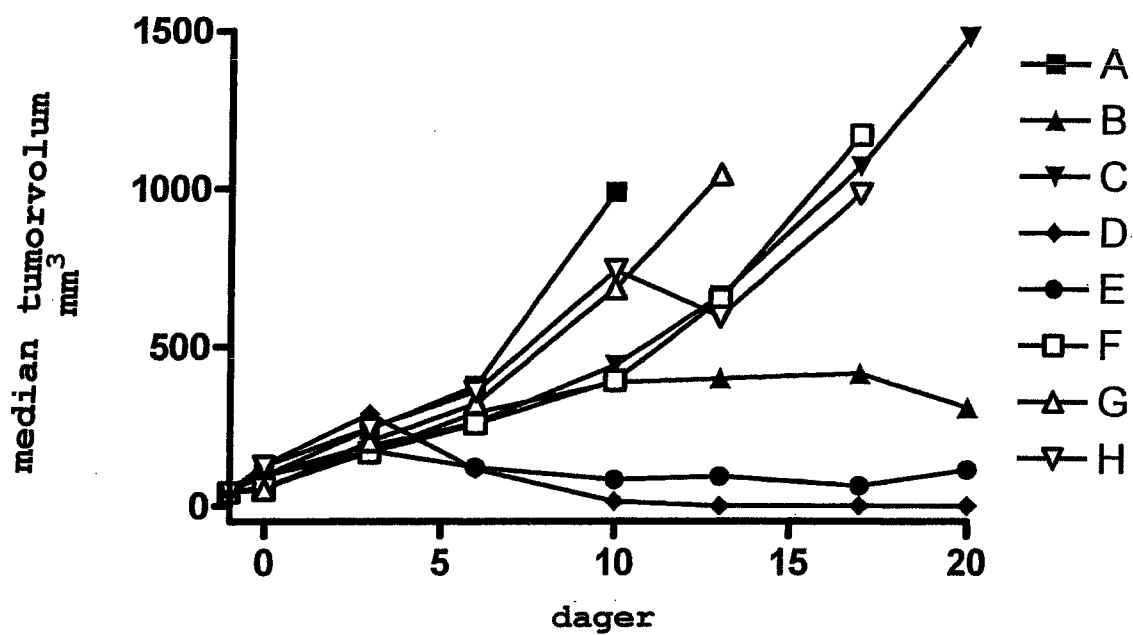
Figur 27G



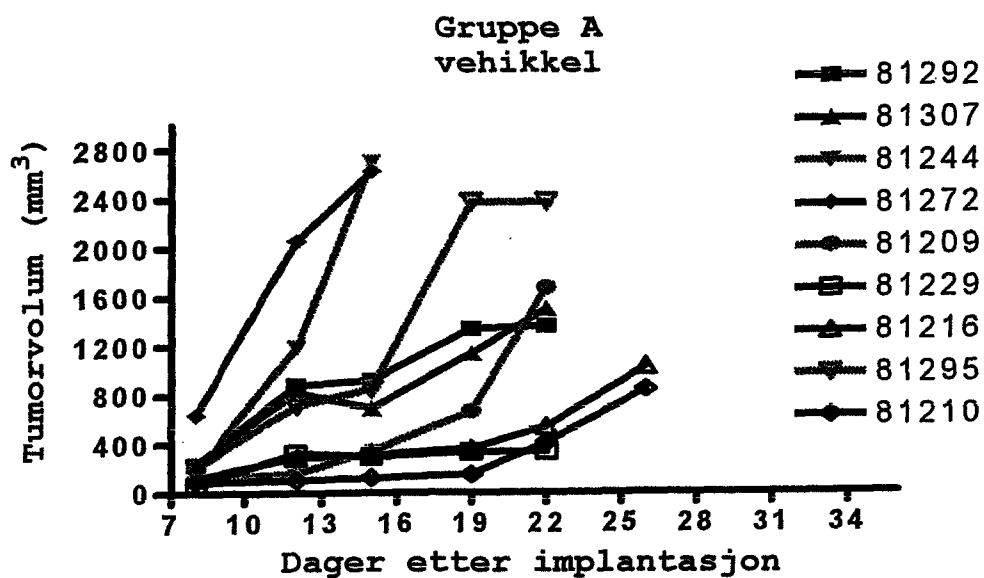
Figur 27H



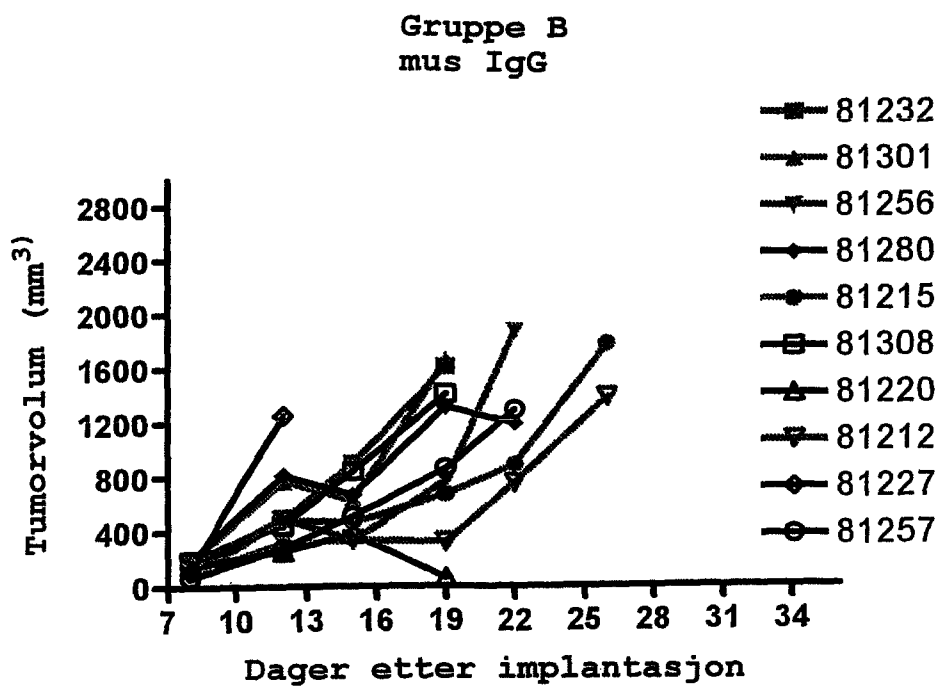
Figur 28



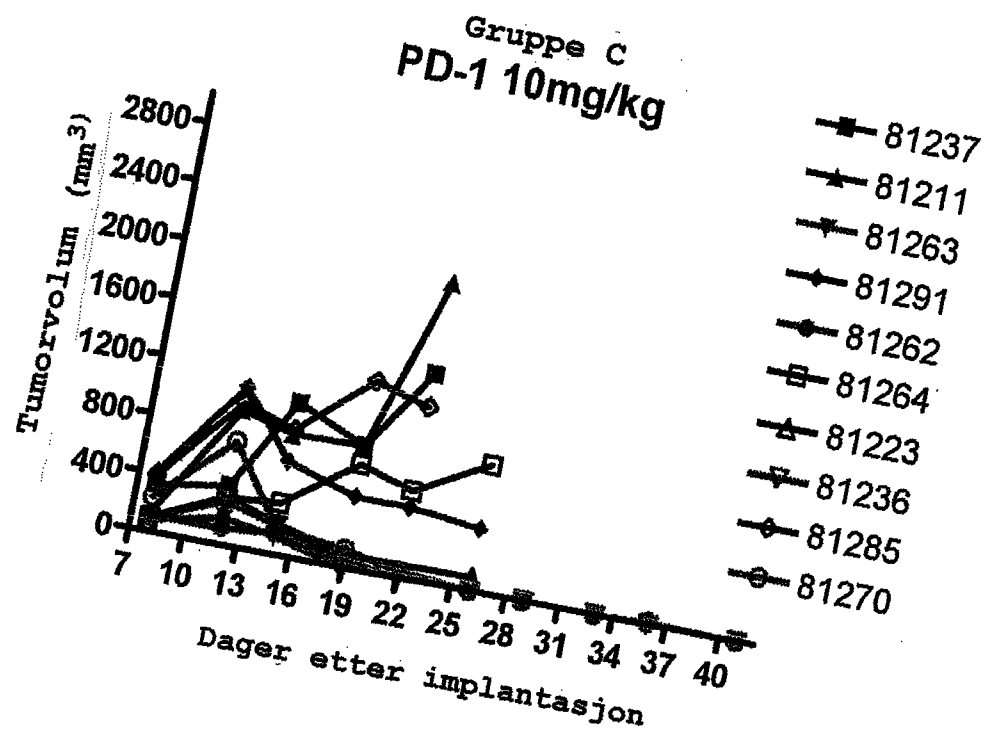
Figur 29



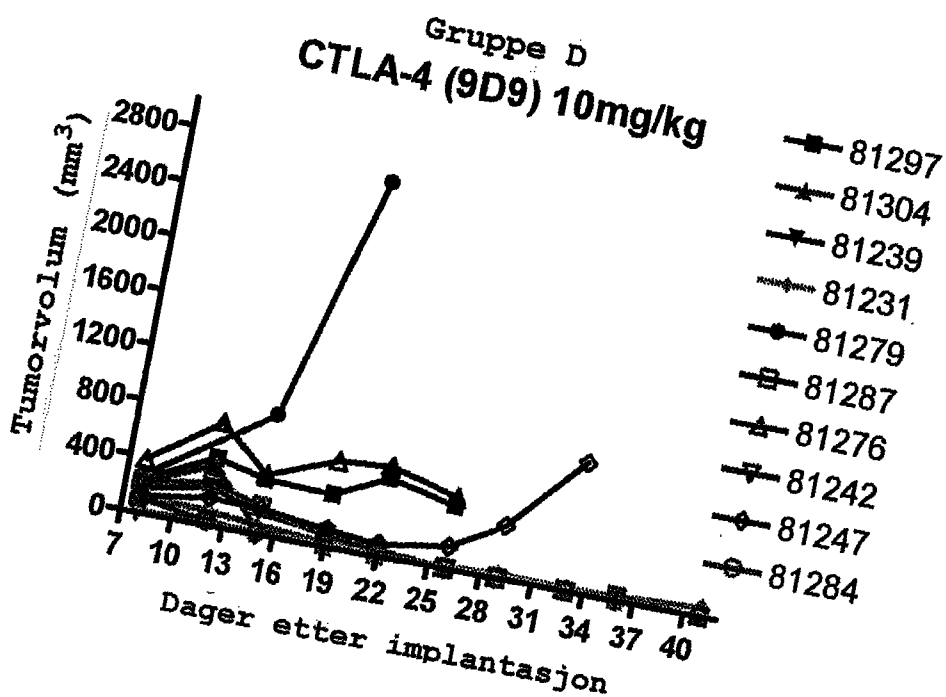
Figur 30A



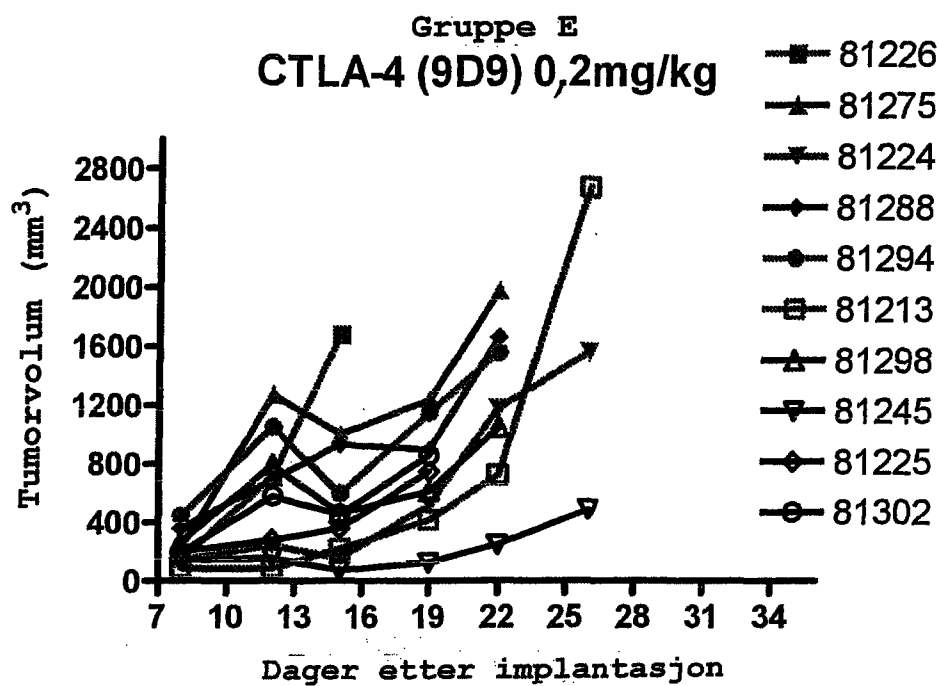
Figur 30B



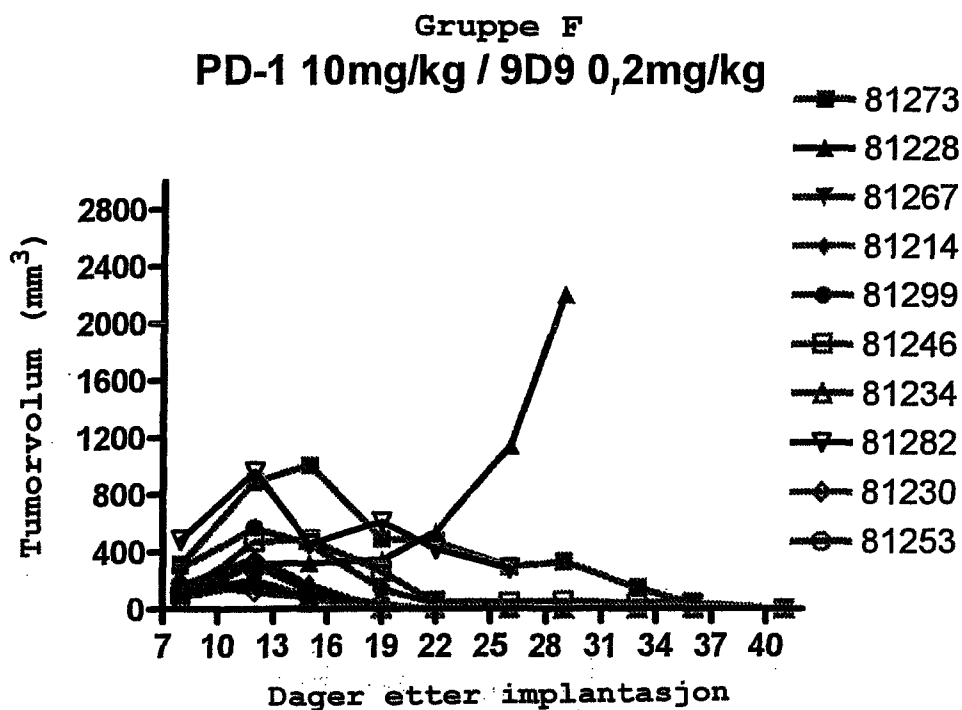
Figur 30C



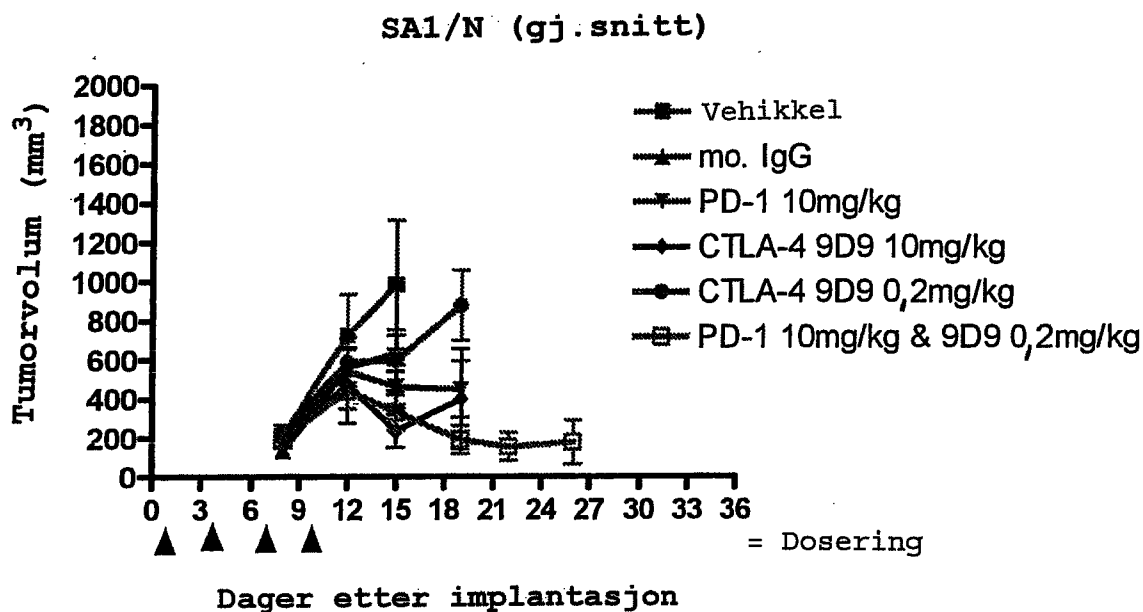
Figur 30D



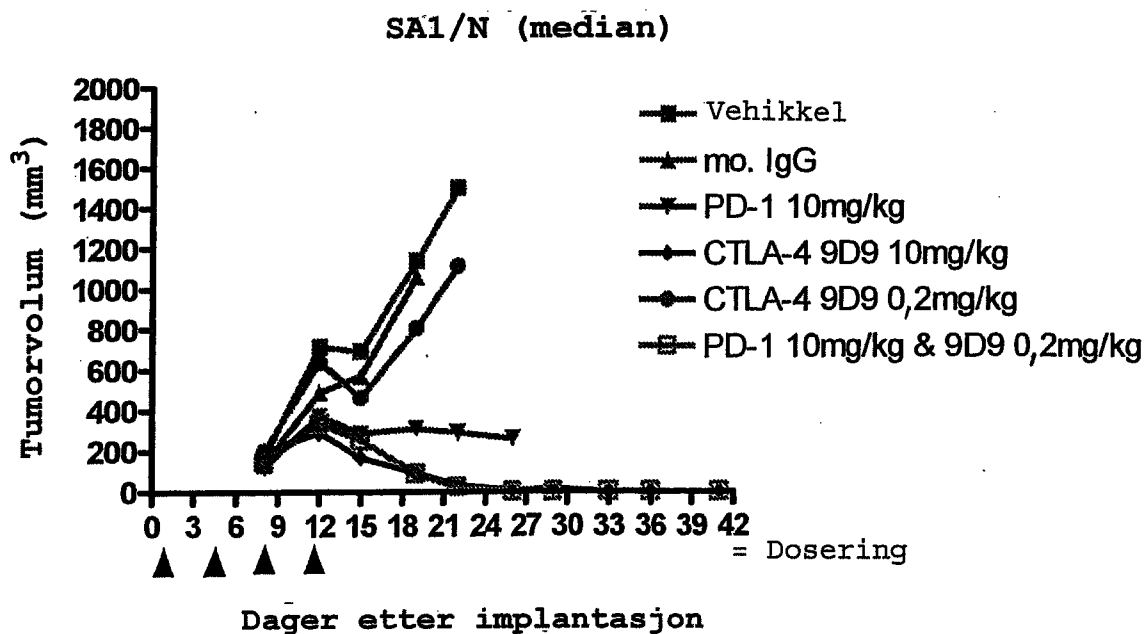
Figur 30E



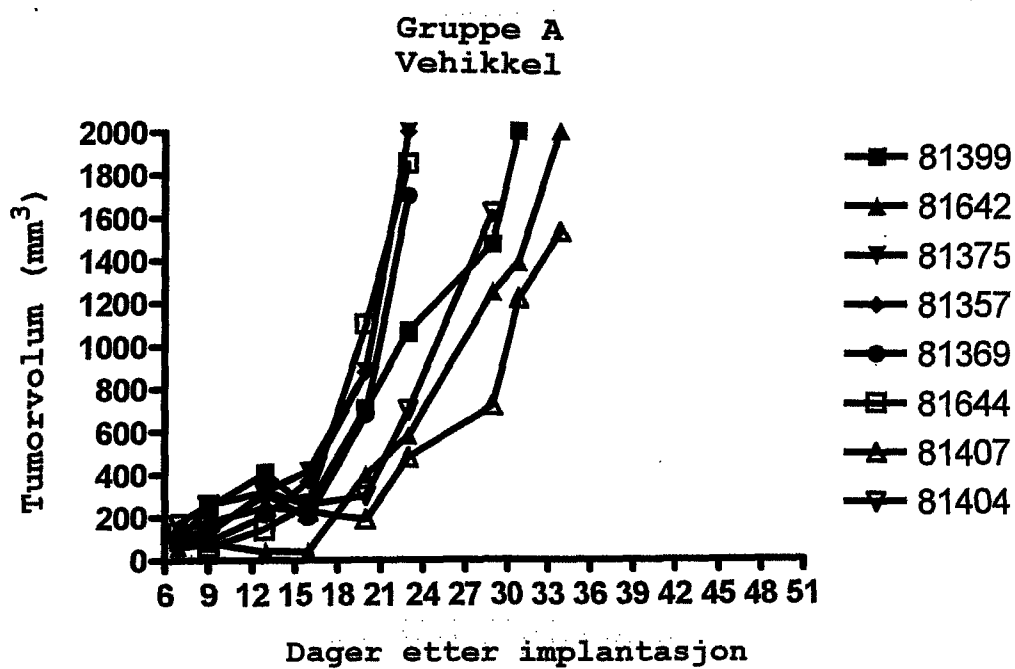
Figur 30F



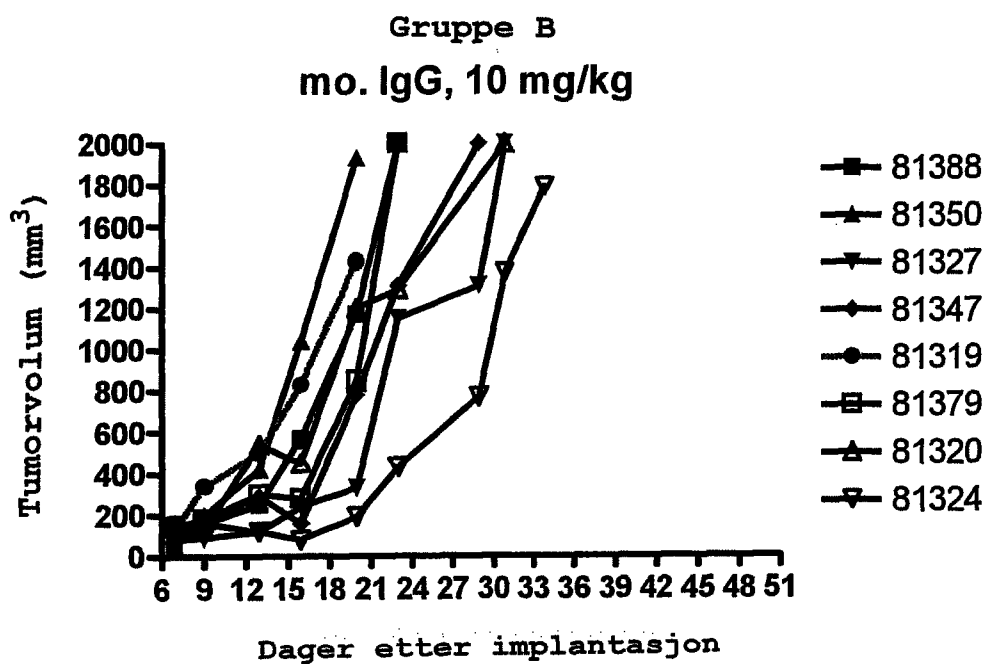
Figur 31



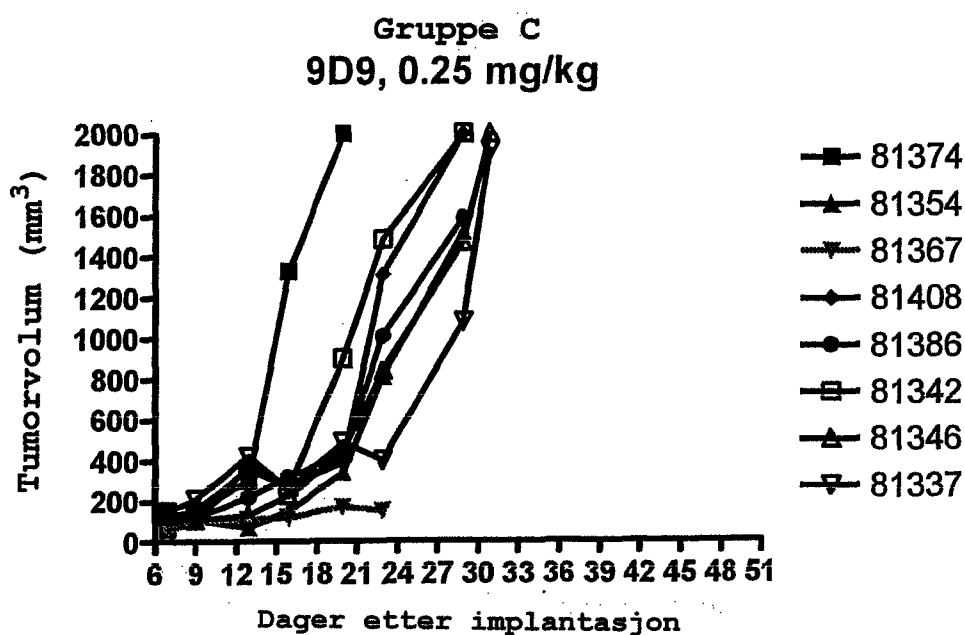
Figur 32



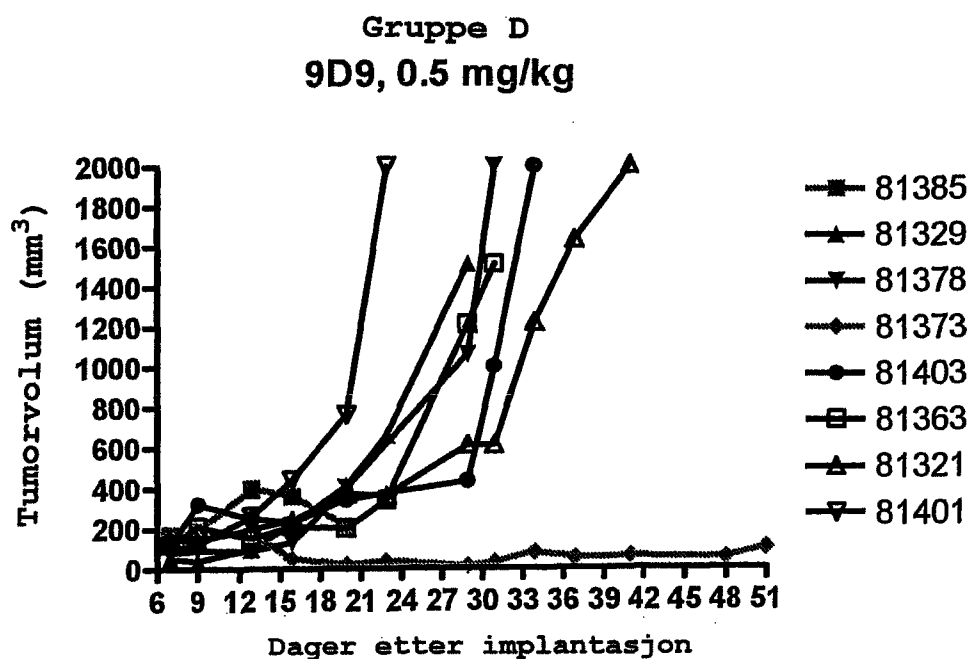
Figur 33A



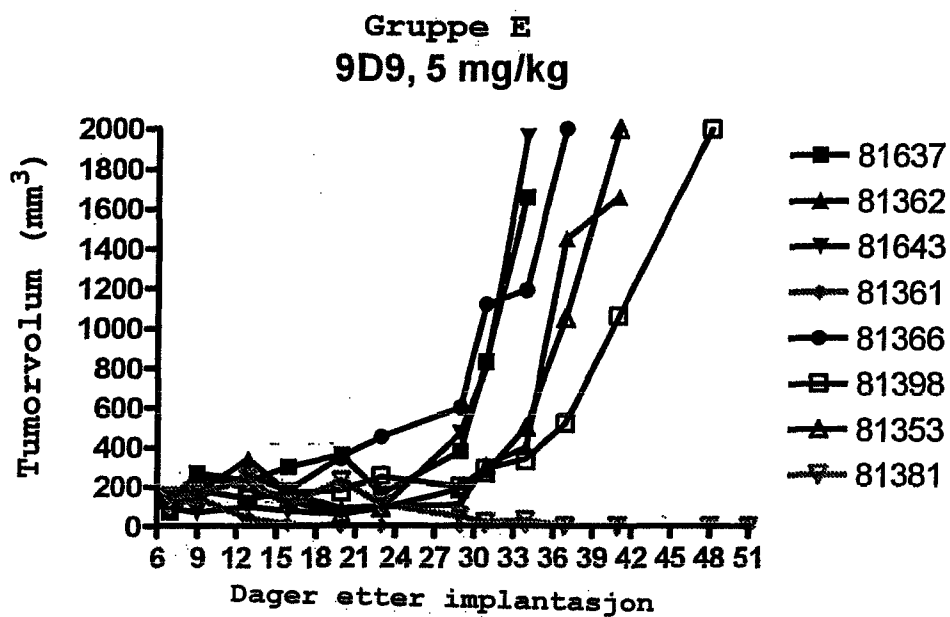
Figur 33B



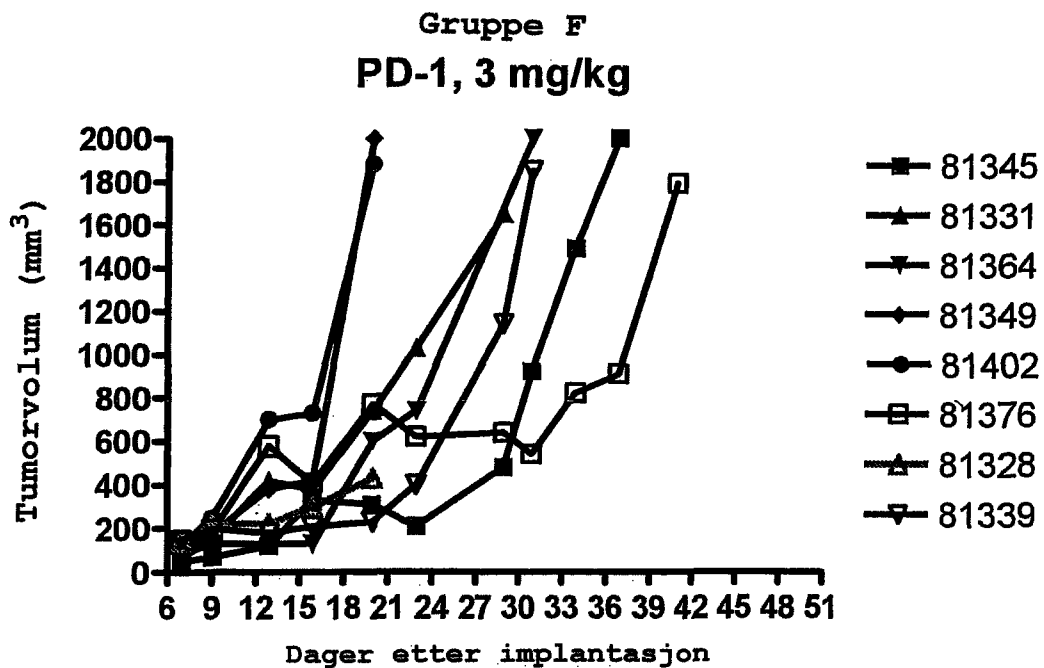
Figur 33C



Figur 33D

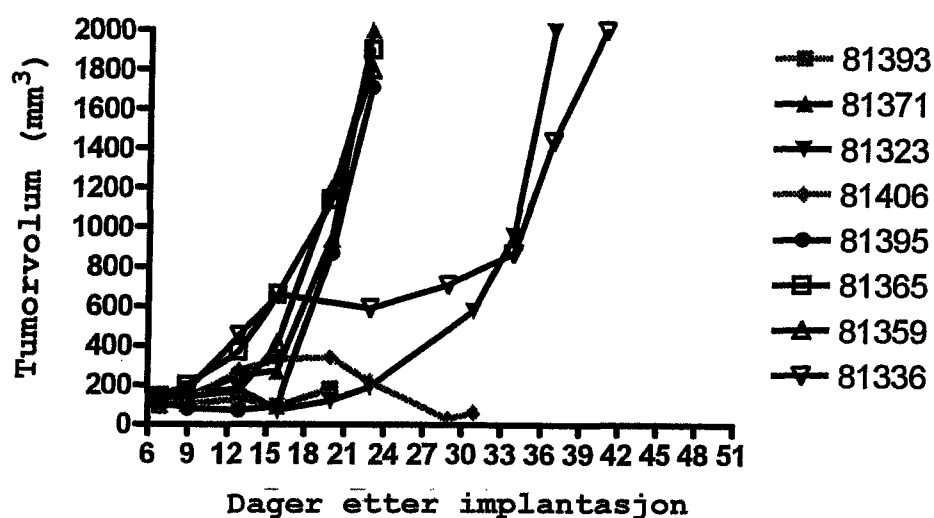


Figur 33E



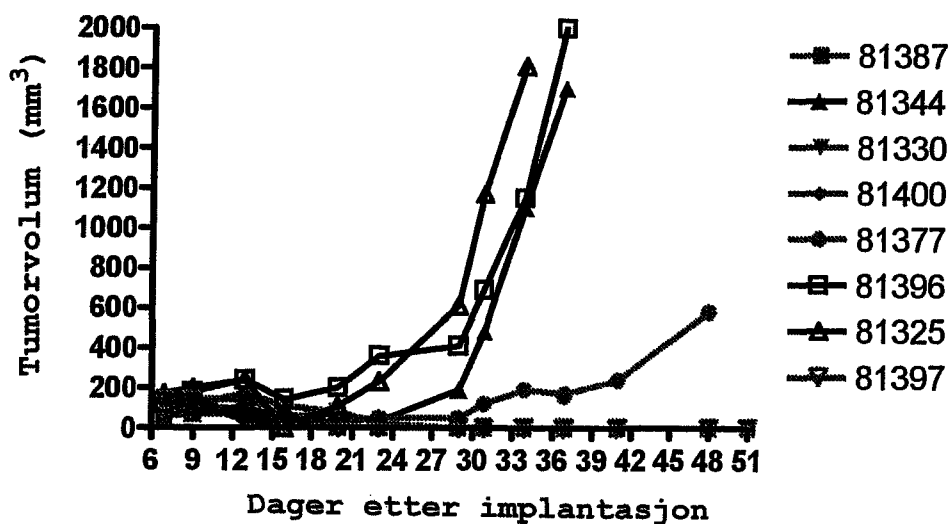
Figur 33F

Gruppe G
PD-1, 10 mg/kg



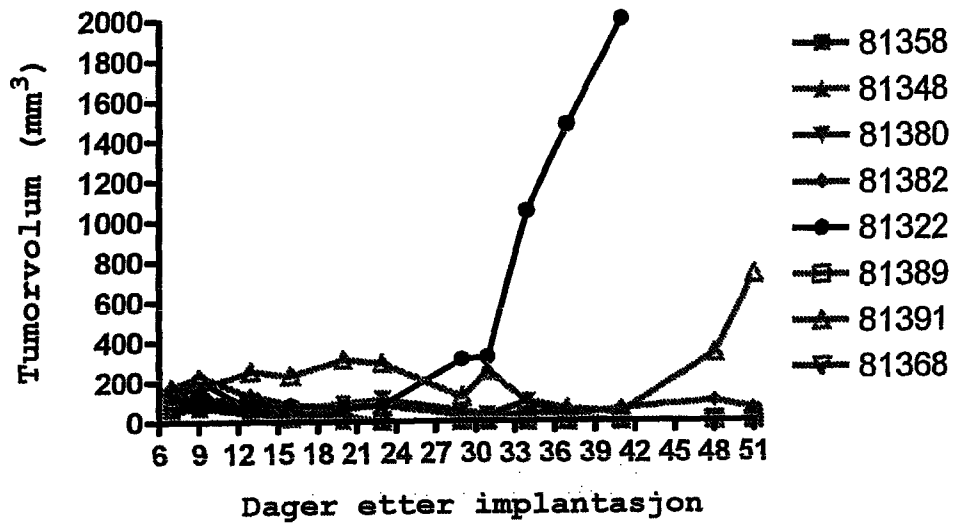
Figur 33G

Gruppe H
PD-1+9D9, 10+0,25 mg/kg



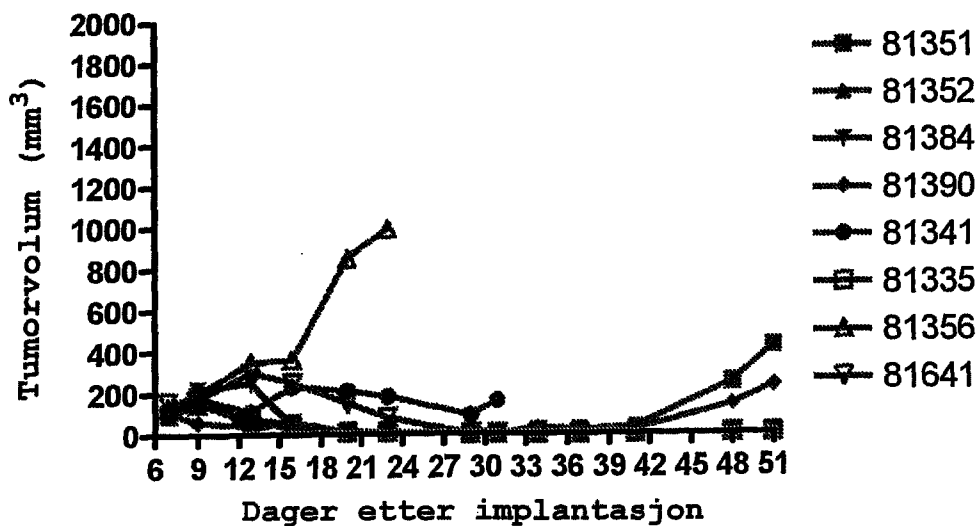
Figur 33H

Gruppe I
PD-1+9D9, 10+0,5 mg/kg

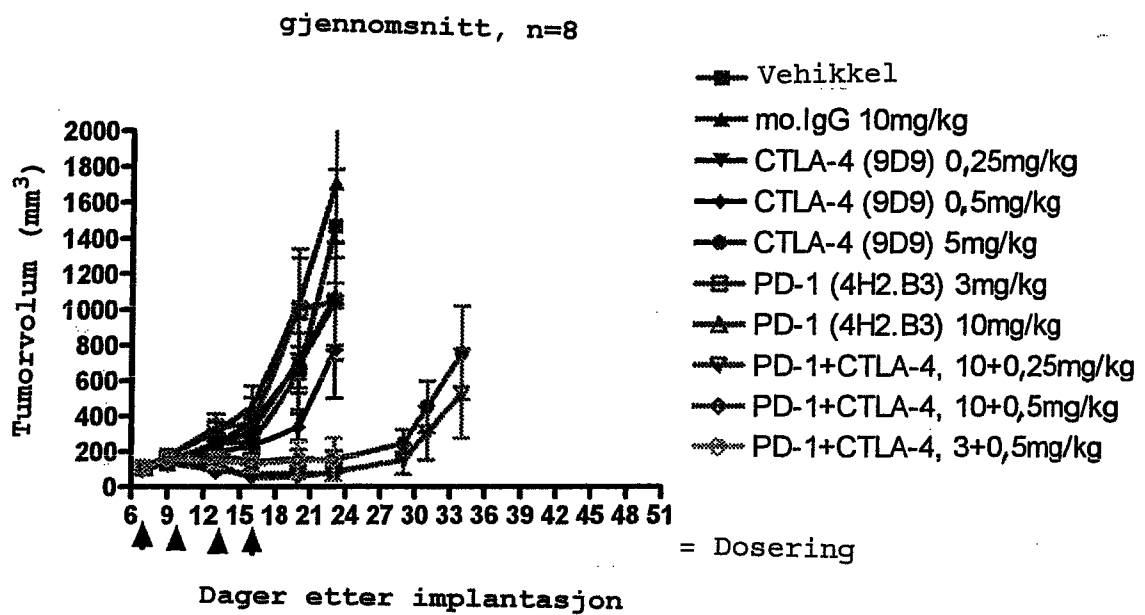


Figur 33I

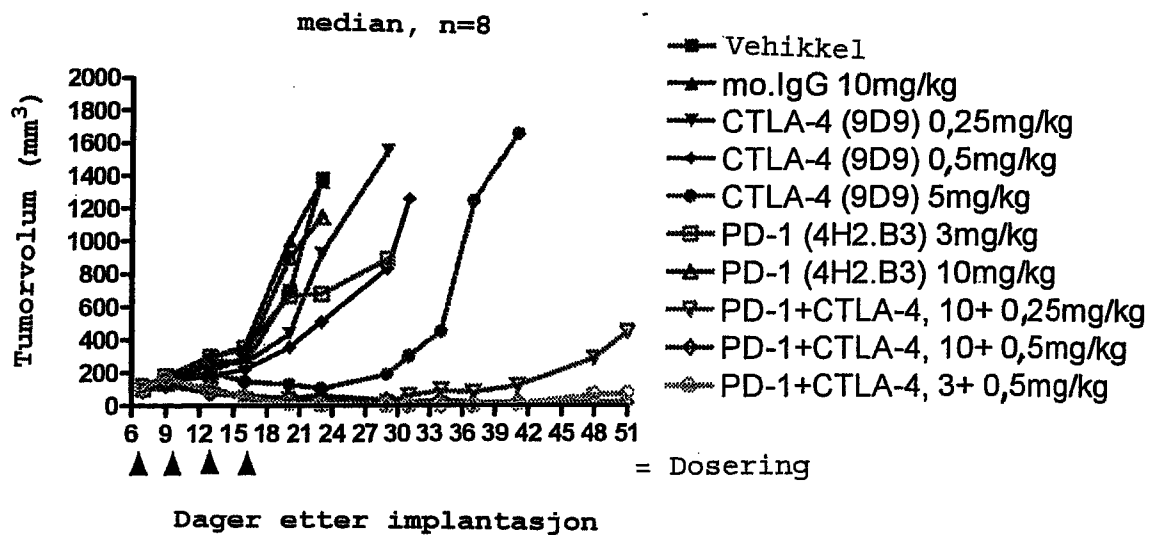
Gruppe J
PD-1+9D9, 3+0,5 mg/kg



Figur 33J

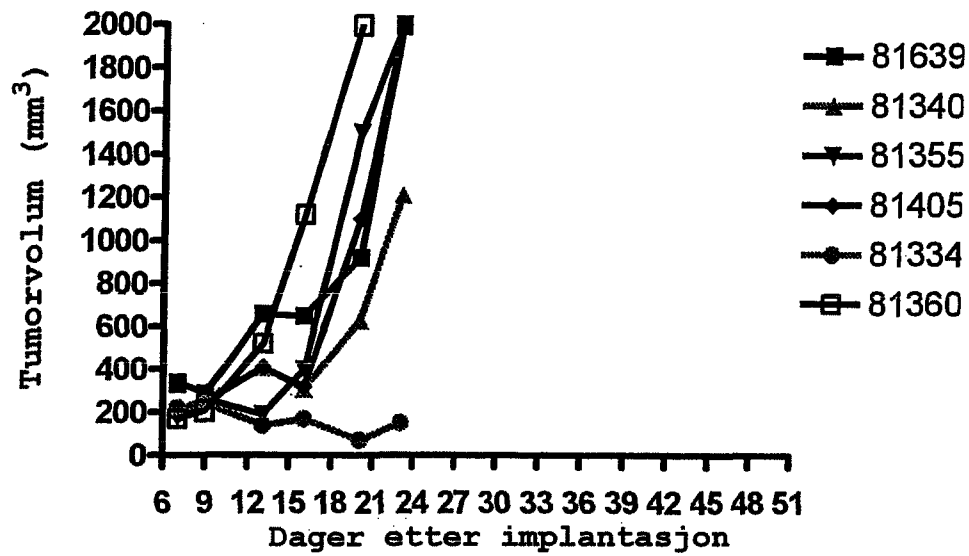


Figur 34



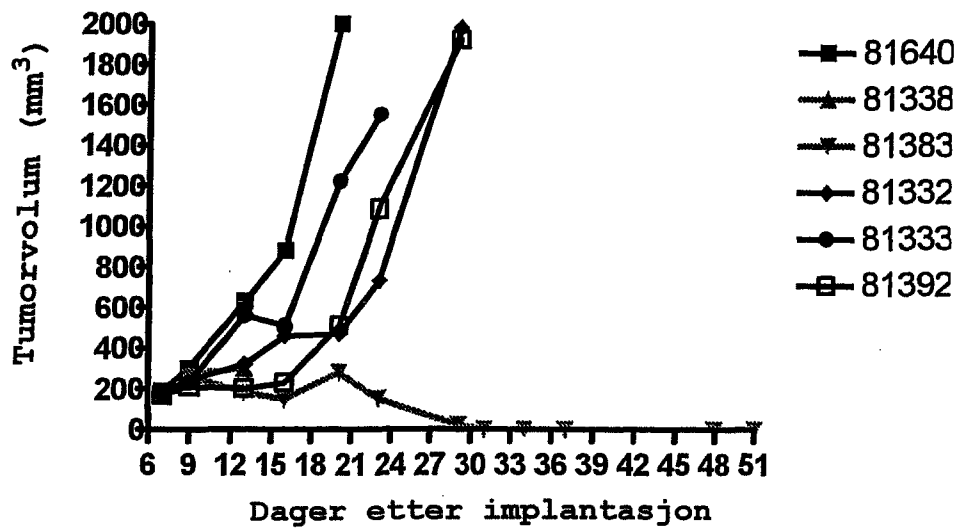
Figur 35

Gruppe K
mo. IgG, 10 mg/kg

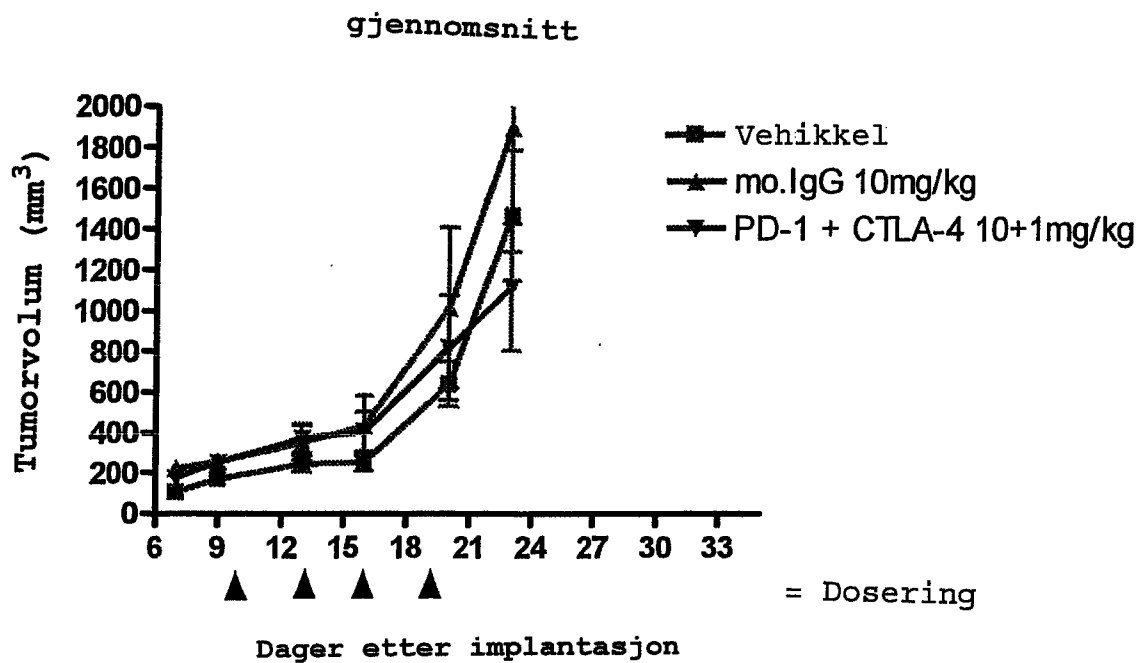


Figur 36A

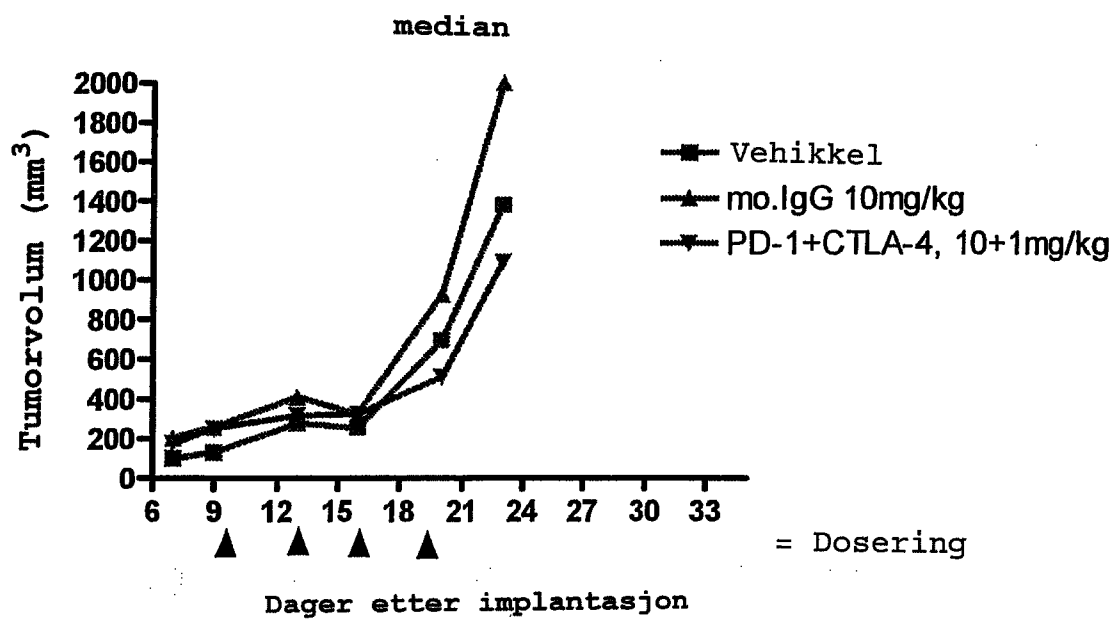
Gruppe L
PD-1+9D9, 10+1 mg/kg



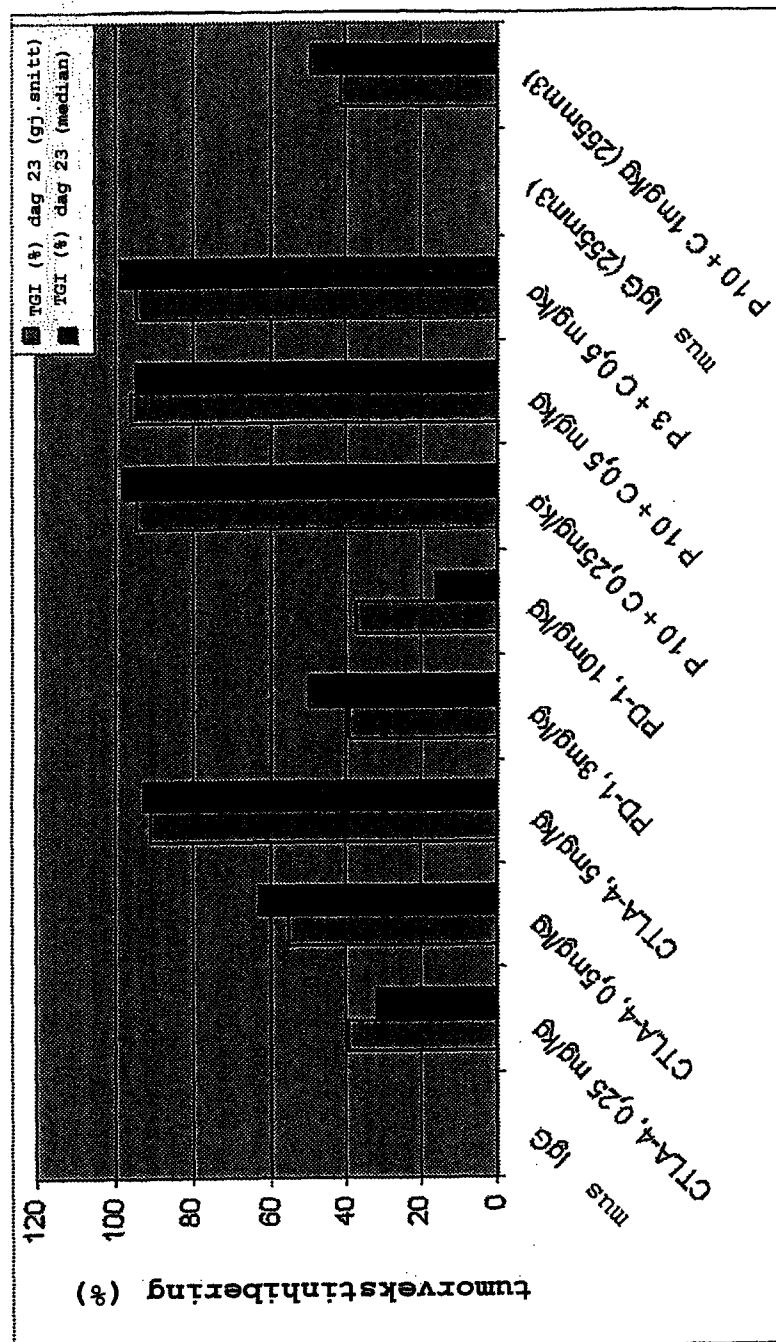
Figur 36B



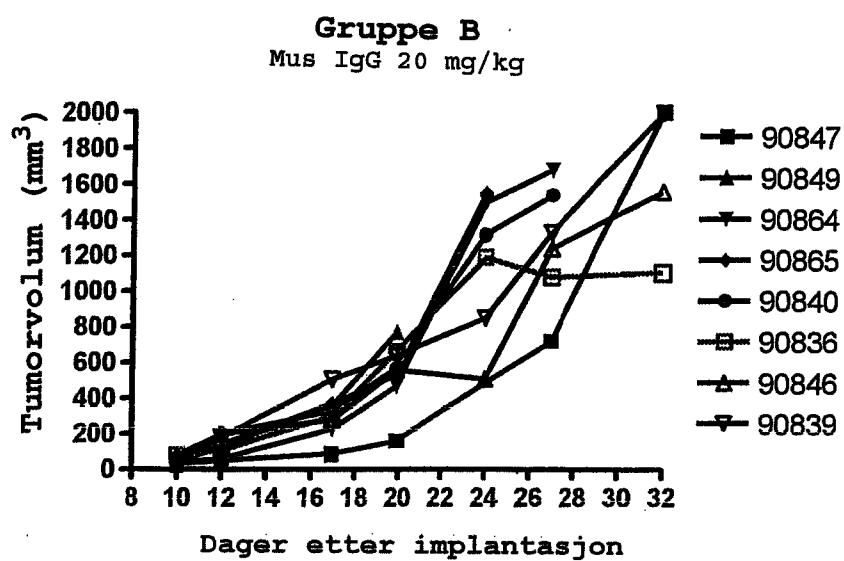
Figur 37



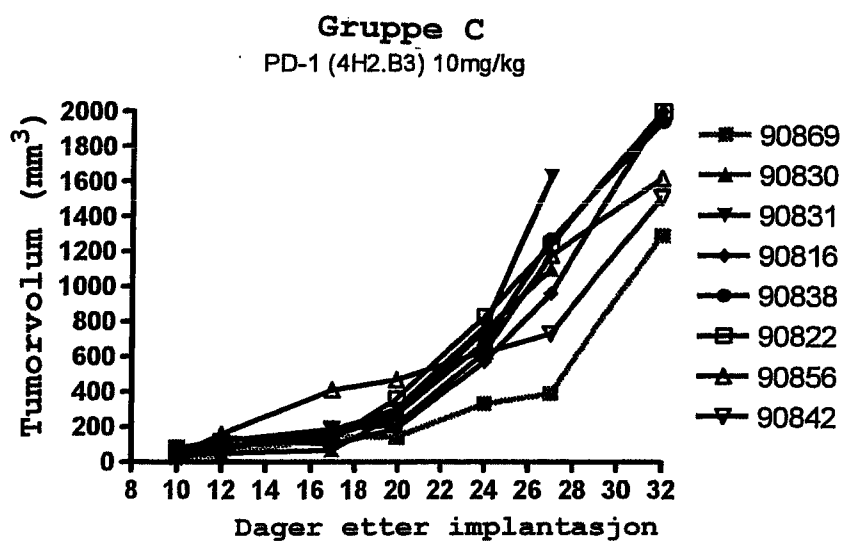
Figur 38



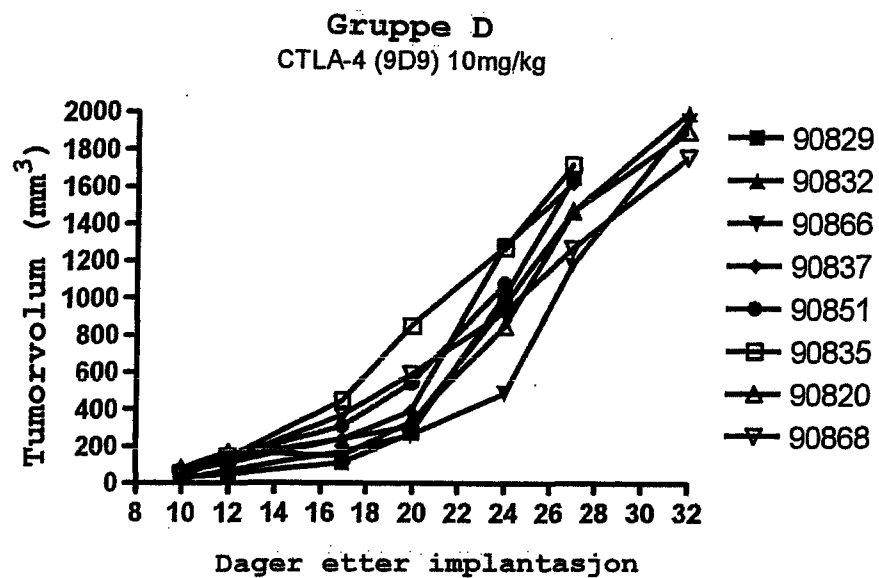
Figur 39



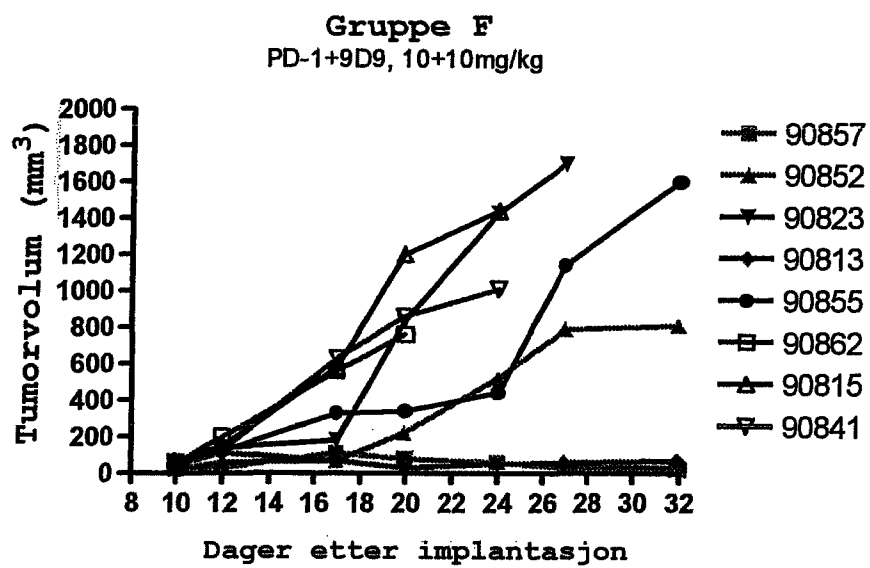
Figur 40A



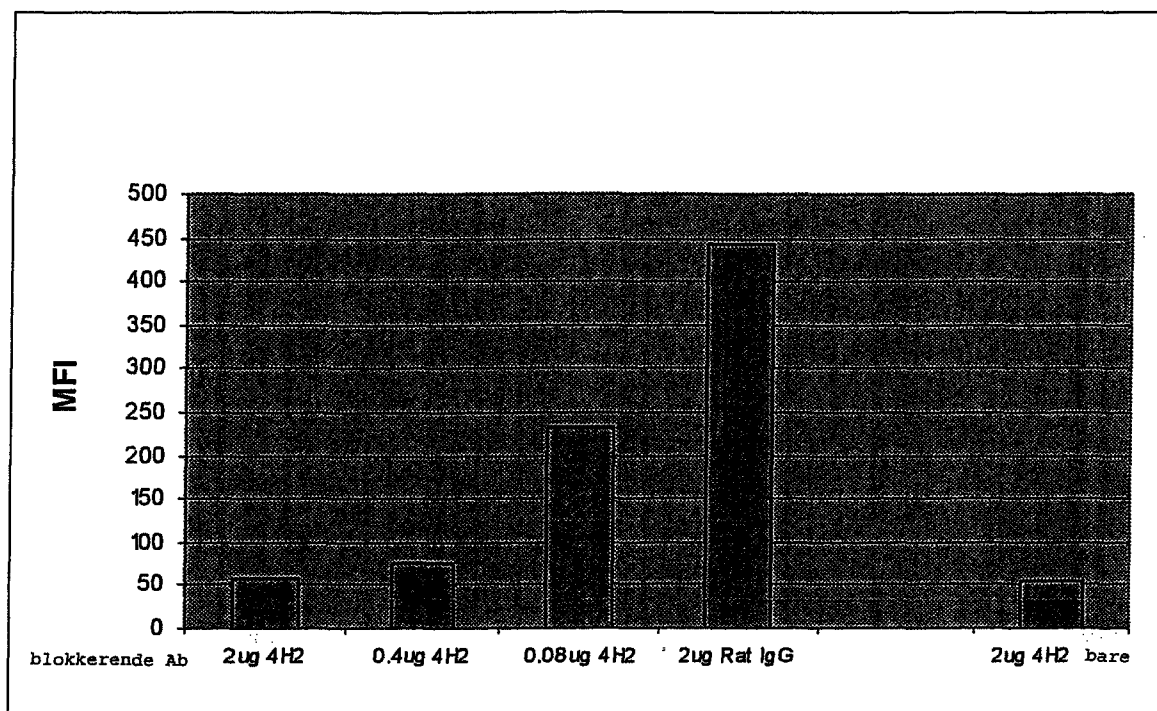
Figur 40B



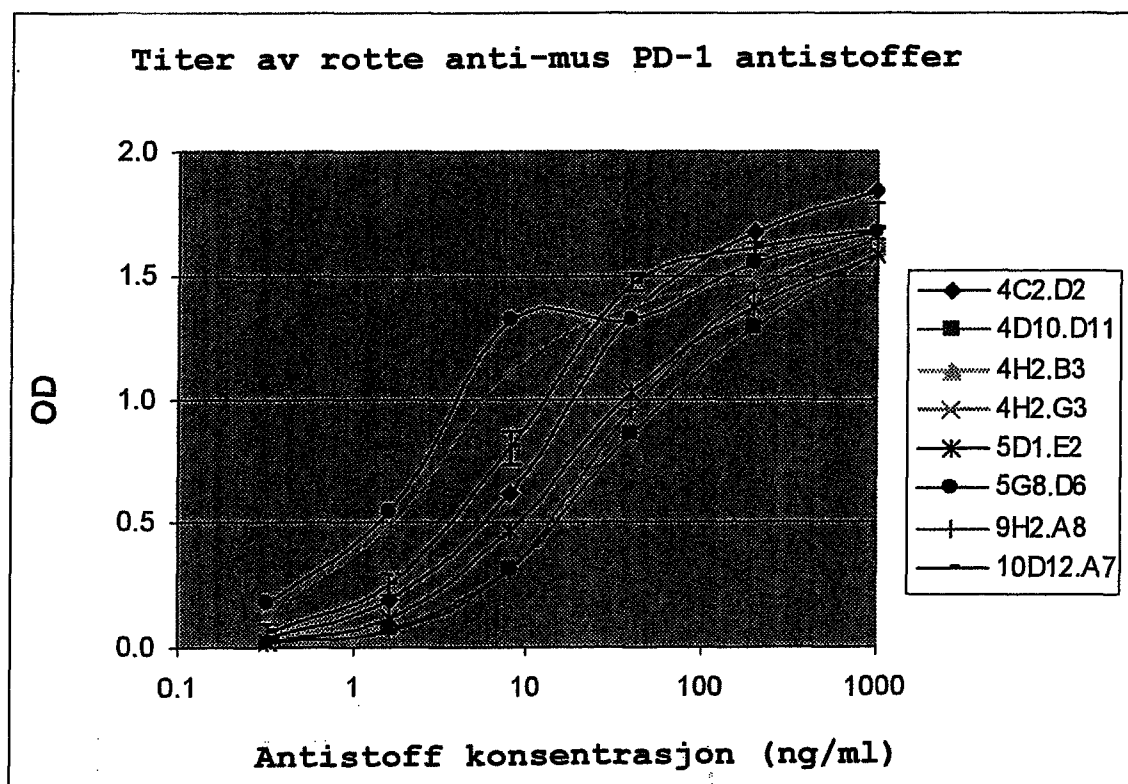
Figur 40C



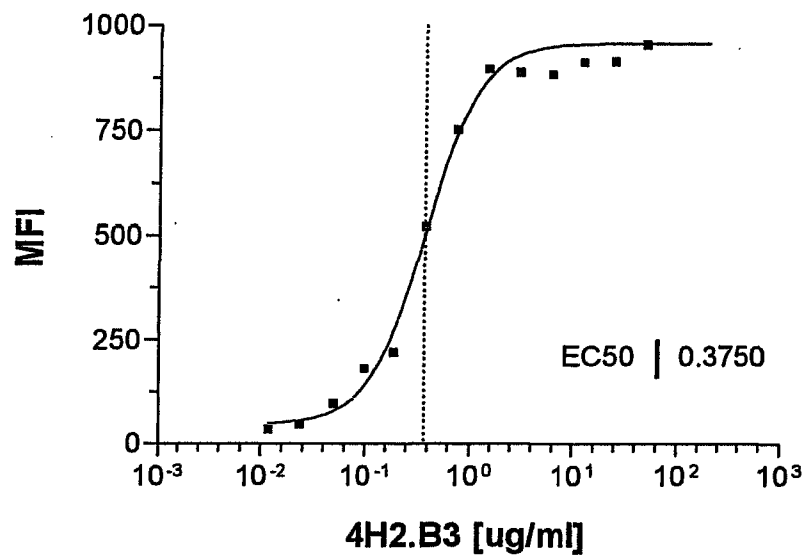
Figur 40D



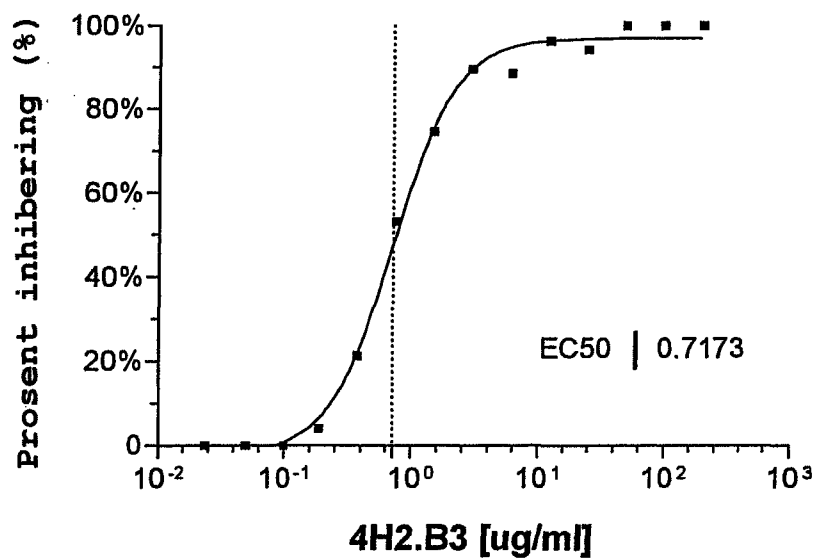
Figur 41



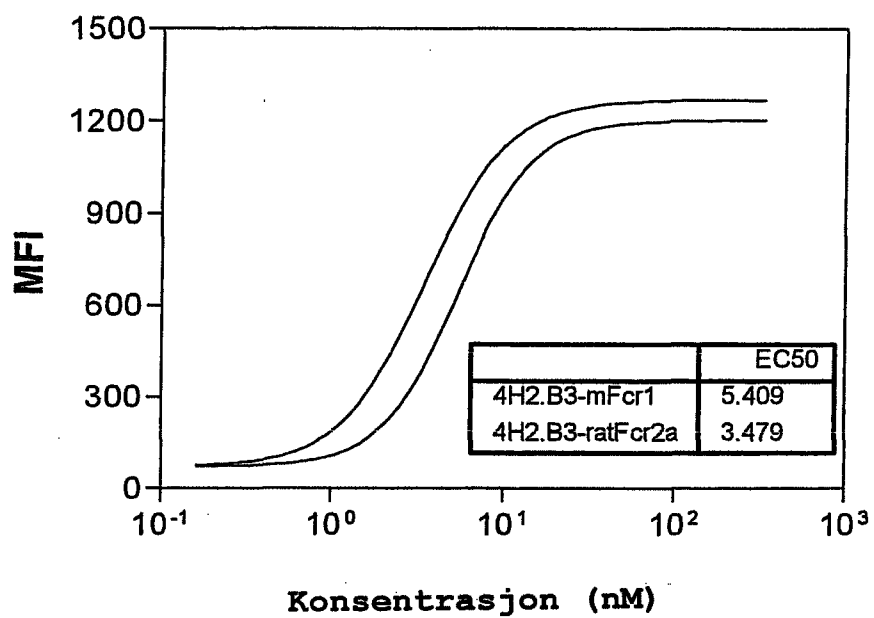
Figur 42



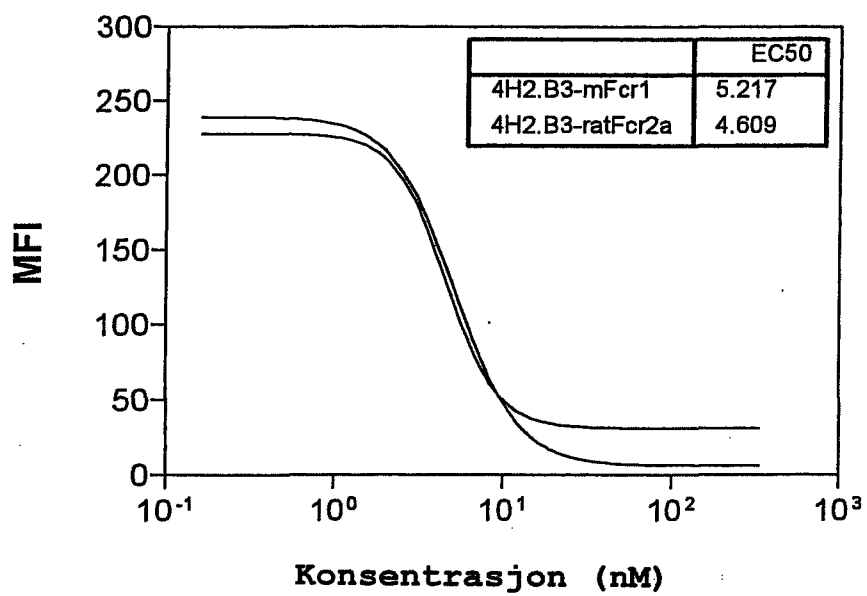
Figur 43



Figur 44

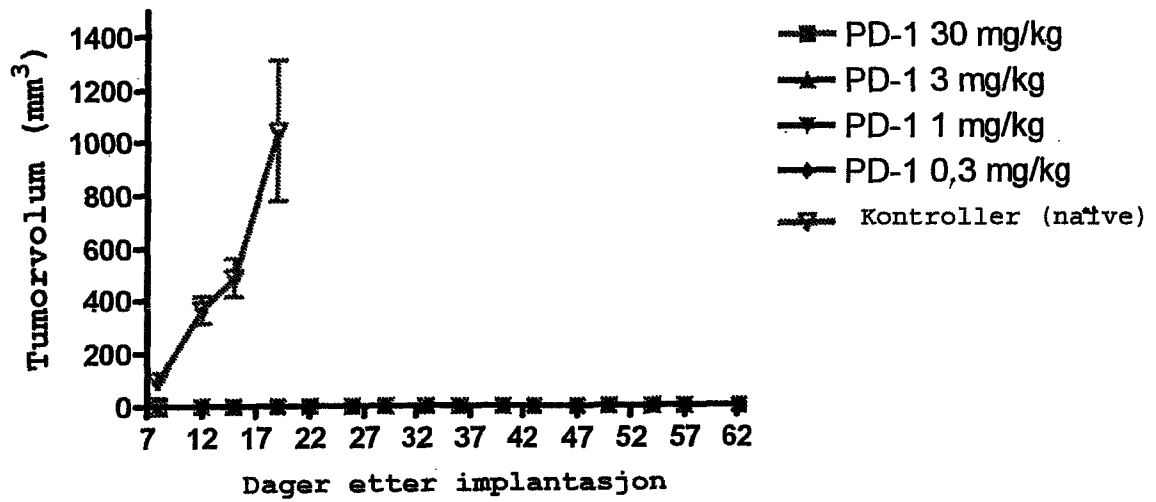


Figur 45

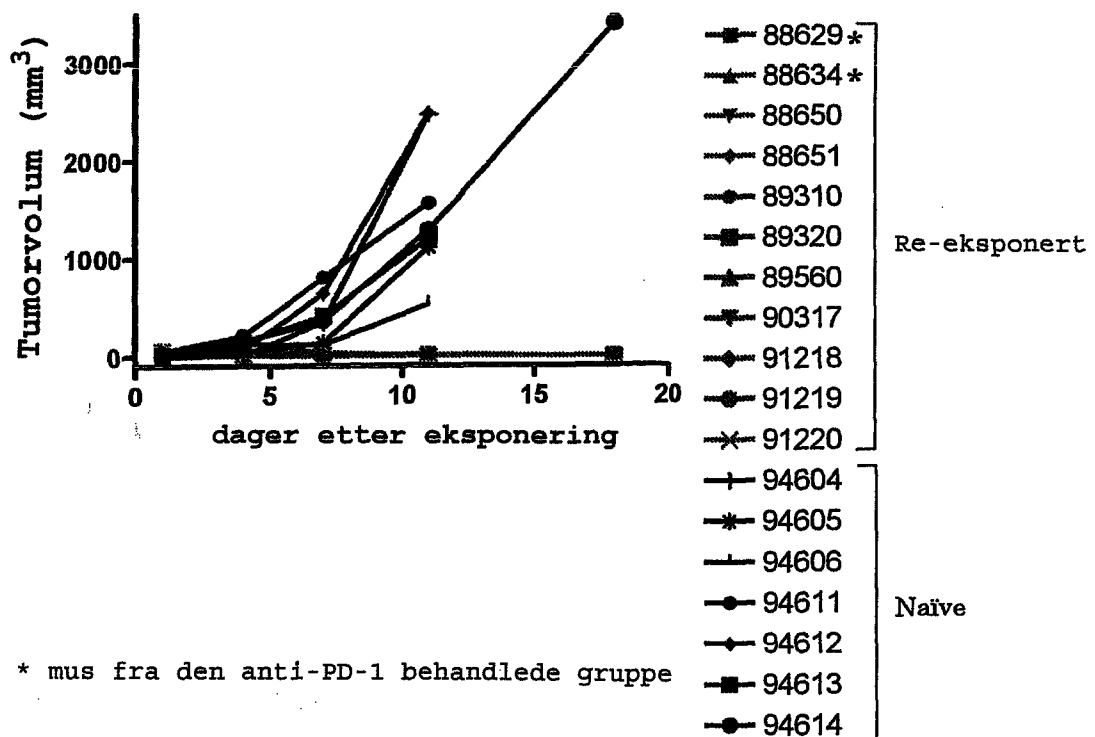


Figur 46

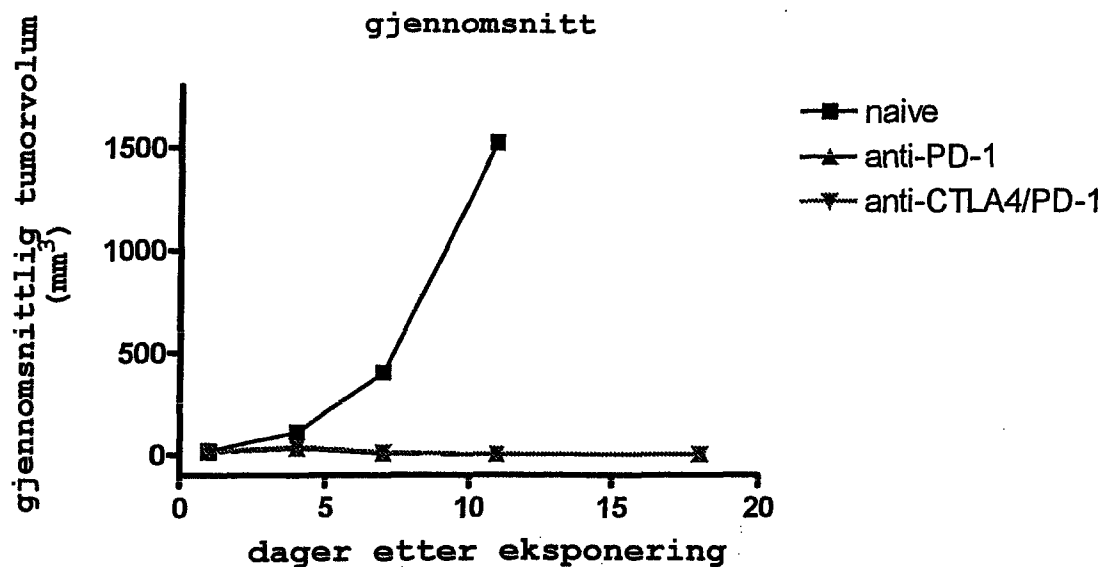
gjennomsnitt



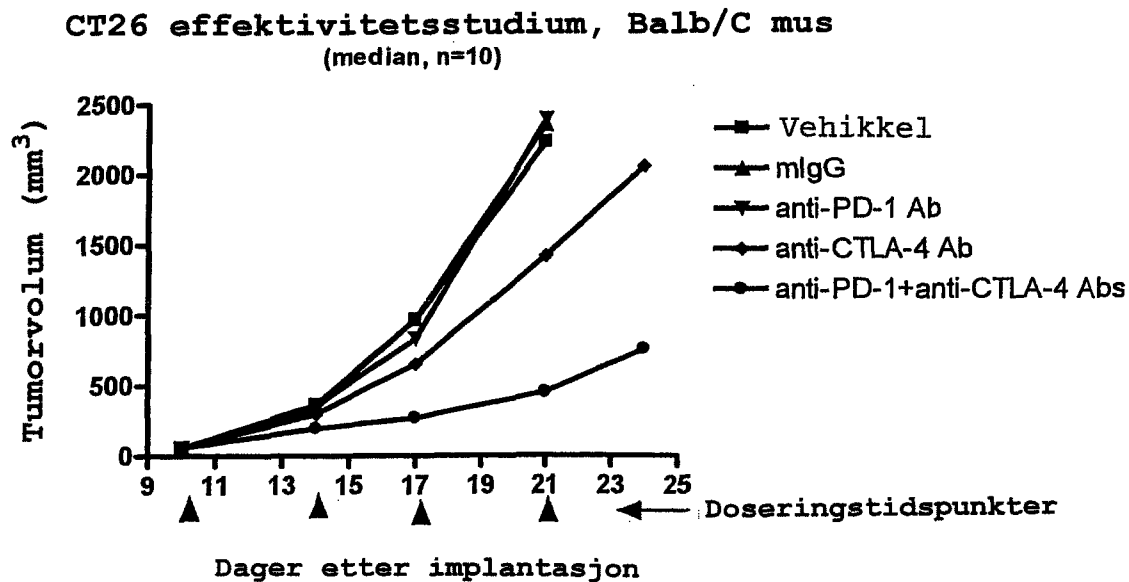
Figur 47



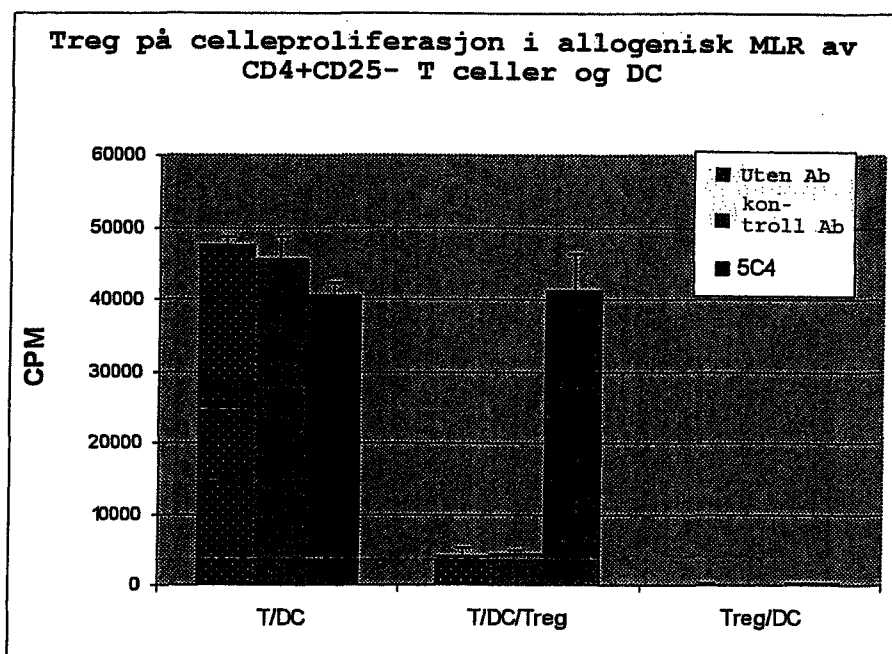
Figur 48



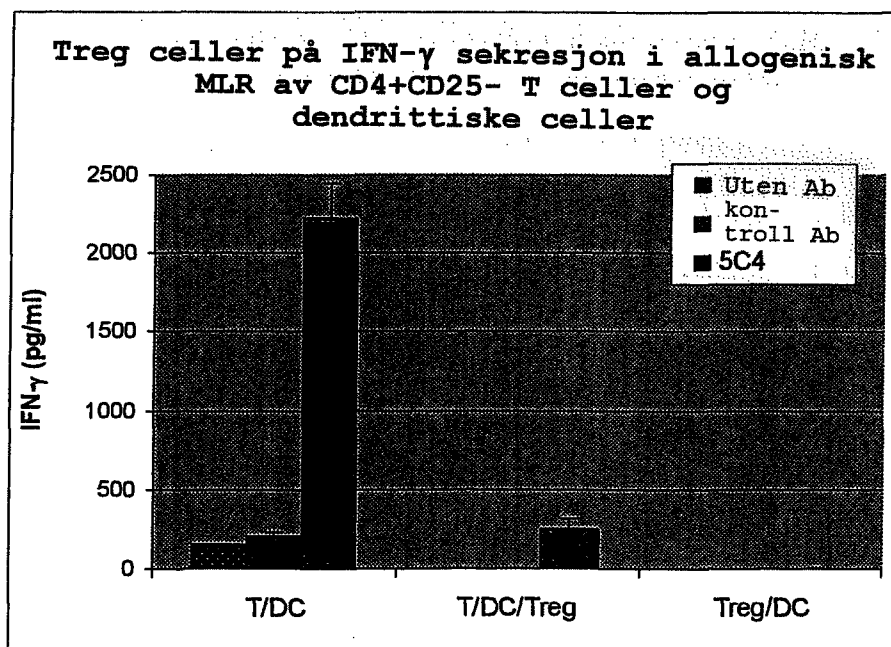
Figur 49



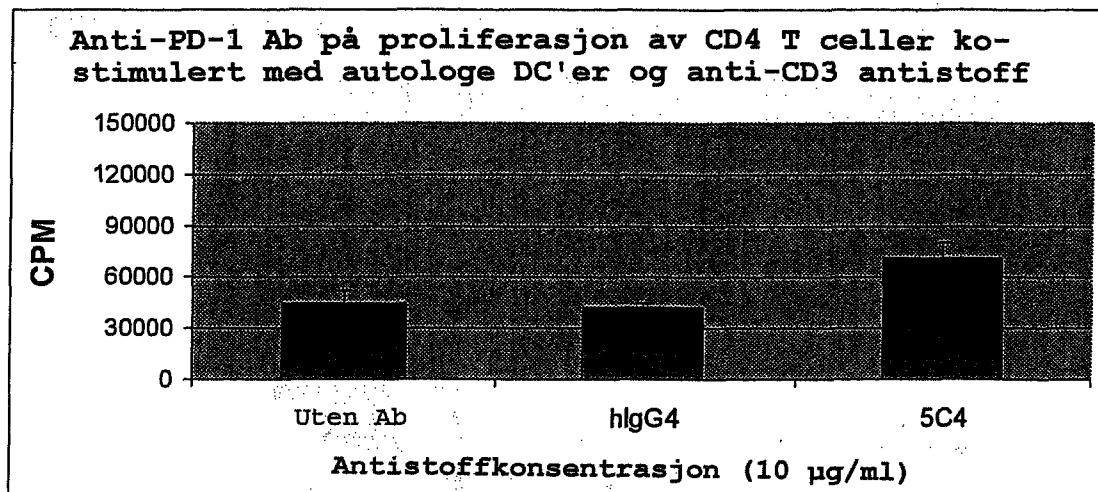
Figur 50



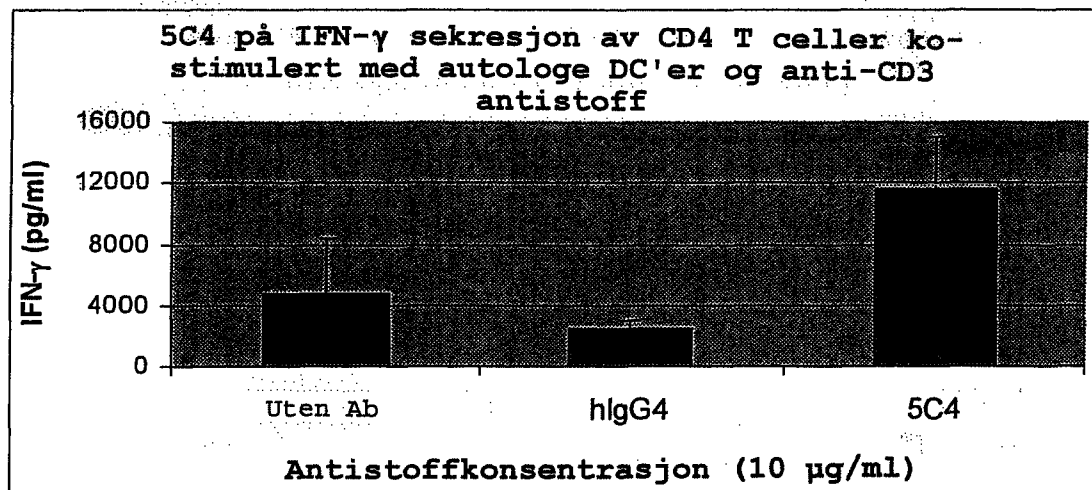
Figur 51A



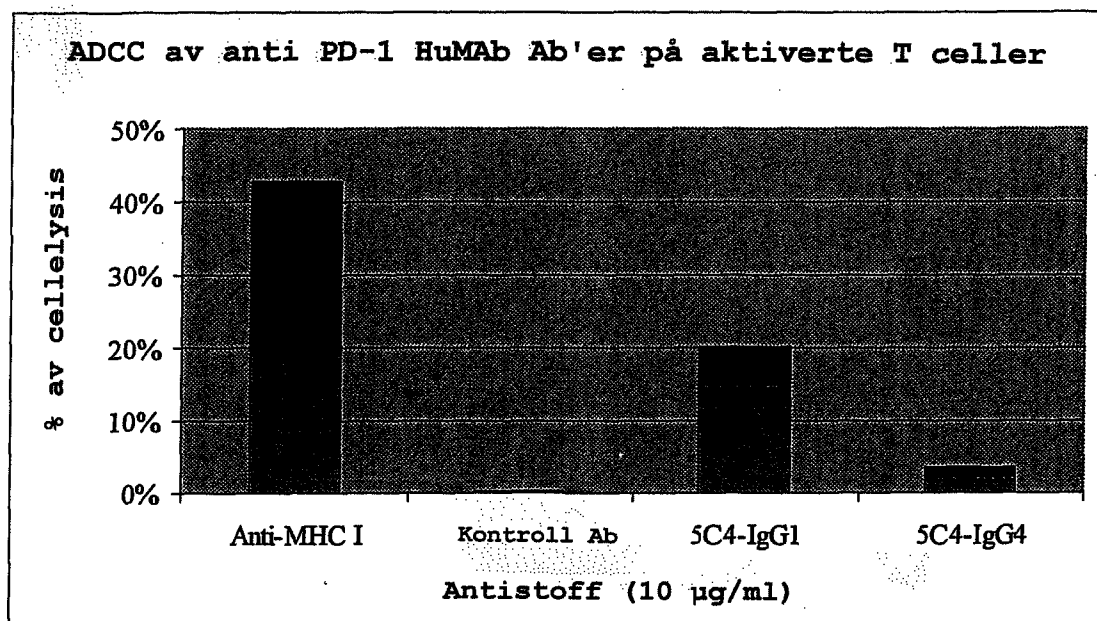
Figur 51B



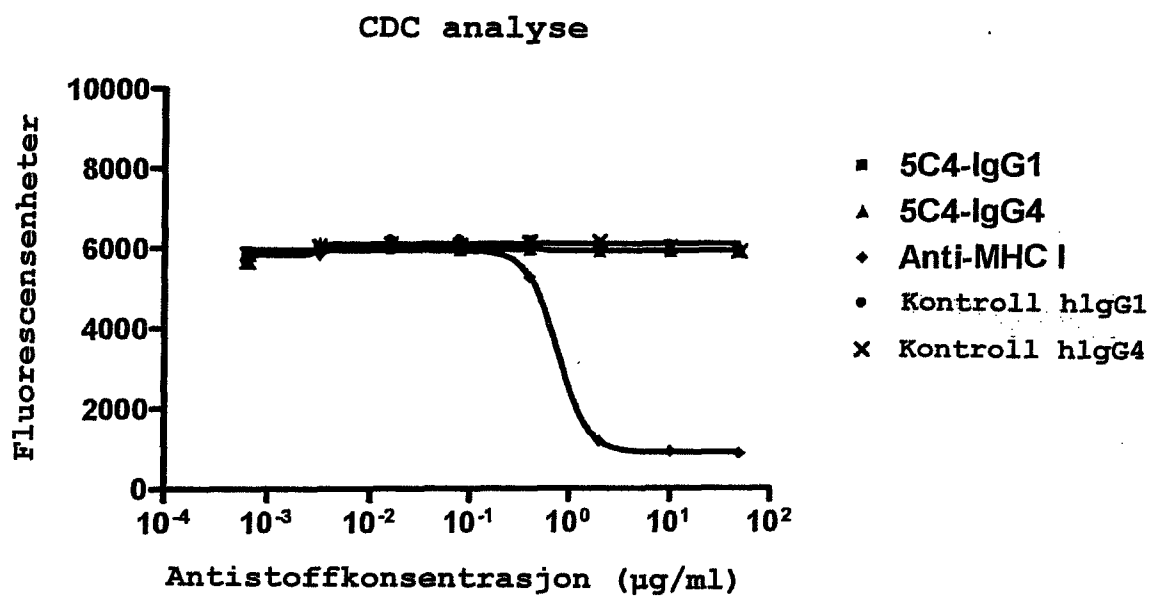
Figur 52A



Figur 52B



Figur 53



Figur 54