



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0129548
(43) 공개일자 2022년09월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2818 (2013.01)
A61K 9/0019 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7024058
(22) 출원일자(국제) 2020년12월10일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년07월13일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/064241
(87) 국제공개번호 WO 2021/126657
국제공개일자 2021년06월24일
(30) 우선권주장
62/949,696 2019년12월18일 미국(US)
62/950,595 2019년12월19일 미국(US)

(71) 출원인
테사로, 인코포레이티드
미국 19808 델라웨어주 윌밍톤 리틀 폴스 드라이브 251
(72) 발명자
닐론, 켈리
미국 02451 매사추세츠주 월섬 윈터 스트리트 노스 1000 스위트 3300
장, 밍쉬엔
미국 02451 매사추세츠주 월섬 윈터 스트리트 노스 1000 스위트 3300
(74) 대리인
장덕순, 이상남

전체 청구항 수 : 총 52 항

(54) 발명의 명칭 생물제약 조성물 및 관련 방법

(57) 요약

본원에 기재된 본 발명은 항-PD-1 항체를 포함하는 조성물, 및 암 및 PD-1 길항작용에 반응성인 다른 장애를 치료하는 관련 방법을 제공한다.

(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/40 (2013.01)

C07K 2317/41 (2013.01)

C07K 2317/73 (2013.01)

C12N 2501/999 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

서열식별번호: 1의 CDRH1, 서열식별번호: 2의 CDRH2, 및 서열식별번호: 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 4의 CDRL1, 서열식별번호: 5의 CDRL2, 및 서열식별번호: 6의 CDRL3을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항-PD-1 항체의 산화된 변이체를 포함하는 조성물이며; $\leq 65\%$ 의 산화된 변이체를 포함하는 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 산화된 변이체가 서열식별번호: 1-6 중 어느 하나의 메티오닌 및/또는 트립토판 잔기에서 산화를 포함하는 것인 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 산화된 변이체가 CDRH1의 M34, CDRH3의 M103 및/또는 CDRL2의 W50에서의 산화 중 하나 또는 그의 조합을 포함하는 것인 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, CDRH1의 M34에서 $\leq 21\%$ 의 산화, CDRH3의 M103에서 $\leq 64\%$ 의 산화, 및/또는 CDRL2의 W50에서 $\leq 34\%$ 의 산화 중 하나 또는 그의 조합을 포함하는 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 서열식별번호: 7의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일한 중쇄 가변 영역 및/또는 서열식별번호: 8의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일한 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 서열식별번호: 9의 중쇄 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일하고/거나 서열식별번호: 10의 경쇄 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일한 것인 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 서열식별번호: 9의 M248에서 $\leq 65\%$ 의 산화, 서열식별번호: 9의 M354에서 $\leq 65\%$ 의 산화 및/또는 서열식별번호: 9의 M424에서 $\leq 65\%$ 의 산화 중 하나 또는 그의 조합을 포함하는 조성물.

청구항 9

서열식별번호: 1의 CDRH1, 서열식별번호: 2의 CDRH2, 및 서열식별번호: 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 서열 및 서열식별번호: 4의 CDRL1, 서열식별번호: 5의 CDRL2, 및 서열식별번호: 6의 CDRL3을 포함하는 경쇄 서열을 포함하는 항-PD-1 항체의 응집된 변이체를 포함하는 조성물이며; $\leq 36\%$ 의 응집된 변이체를 포함하는 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 항체가 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 11

서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 갖는 항체를 포함하는 조성물이며, (i) $\leq 65\%$ 의 산화된 변이체; 및/또는 (ii) $\leq 36\%$ 의 응집된 변이체를 포함하는 조성물.

청구항 12

서열식별번호: 1의 CDRH1, 서열식별번호: 2의 CDRH2, 및 서열식별번호: 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 4의 CDRL1, 서열식별번호: 5의 CDRL2, 및 서열식별번호: 6의 CDRL3을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항-PD-1 항체의 하전된 변이체를 포함하는 조성물이며; $\leq 100\%$ 의 산성 변이체; 및/또는 $\leq 35\%$ 의 염기성 변이체; 및/또는 $\geq 1\%$ 의 주요 이소형을 포함하는 조성물.

청구항 13

서열식별번호: 1의 CDRH1, 서열식별번호: 2의 CDRH2, 및 서열식별번호: 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 4의 CDRL1, 서열식별번호: 5의 CDRL2, 및 서열식별번호: 6의 CDRL3을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항-PD-1 항체의 하전된 변이체를 포함하는 조성물이며; 10-97%의 산성 변이체; 및/또는 0.1-35%의 염기성 변이체; 및/또는 2-80%의 주요 이소형을 포함하는 조성물.

청구항 14

서열식별번호: 1의 CDRH1, 서열식별번호: 2의 CDRH2, 및 서열식별번호: 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 4의 CDRL1, 서열식별번호: 5의 CDRL2, 및 서열식별번호: 6의 CDRL3을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항-PD-1 항체의 하전된 변이체를 포함하는 조성물이며; $\leq 35\%$ 의 산성 변이체; 및/또는 $\leq 5\%$ 의 염기성 변이체; 및/또는 $\geq 55\%$ 의 주요 이소형을 포함하는 조성물.

청구항 15

제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물의 퍼센트 산성 변이체, 퍼센트 염기성 변이체 및 퍼센트 주요 이소형이 모세관 등전 포커싱을 사용하여 결정된 것인 조성물.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 탈아미드화된 변이체를 포함하는 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 탈아미드화된 변이체가 아스파르트산 잔기, 숙신이미드-아스파르트산 잔기, 또는 이소-아스파르트산 잔기로부터 선택된 탈아미드화된 잔기를 포함하는 것인 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 탈아미드화된 변이체가 서열식별번호: 9의 N380 및/또는 N385에서 최대 100%의 탈아미드화를 포함하는 것인 조성물.

청구항 19

제17항 또는 제18항에 있어서, 탈아미드화된 변이체가 서열식별번호: 11, 서열식별번호: 12 또는 서열식별번호: 13의 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 이성질체화된 변이체를 포함하는 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 서열식별번호: 9의 D147에서 최대 100%의 이성질체화를 포함하는 조성물.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 최대 100%의 중쇄 N-말단 피로-글루타메이트 변이체 및/또는 최대 100%의 중쇄 C-말단 리신 절단된 변이체를 포함하는 조성물.

청구항 23

서열식별번호: 9, 서열식별번호: 11, 서열식별번호: 12 및/또는 서열식별번호: 13으로부터 선택된 서열 중 하나 또는 그의 조합을 갖는 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 포함하는 항체를 포함하는 조성물이며, $\leq 64\%$ 의 산화된 변이체를 포함하는 조성물.

청구항 24

서열식별번호: 9, 서열식별번호: 11, 서열식별번호: 12 및/또는 서열식별번호: 13으로부터 선택된 서열 중 하나 또는 그의 조합을 갖는 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 포함하는 항체를 포함하는 조성물이며, $\leq 36\%$ 의 응집된 변이체를 포함하는 조성물.

청구항 25

서열식별번호: 1의 CDRH1, 서열식별번호: 2의 CDRH2, 및 서열식별번호: 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 4의 CDRL1, 서열식별번호: 5의 CDRL2, 및 서열식별번호: 6의 CDRL3을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항-PD-1 항체의 변이체를 포함하는 조성물이며; 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열, 10-97%의 산성 변이체, 0.1-35%의 염기성 변이체, 2-80%의 주요 이소형, 4.8% 이하의 경쇄 W50 산화된 변이체, 1% 이하의 중쇄 M34 산화된 변이체, 1.2% 이하의 중쇄 M103 산화된 변이체, 15.2% 이하의 응집된 변이체, 16.7% 이하의 중쇄 M354 산화된 변이체, 29.0% 이하의 중쇄 M424 산화된 변이체, 47.1% 이하의 중쇄 M248 산화된 변이체, 20.8% 이하의 중쇄 D147 이성질체화된 변이체, 13.1% 이하의 중쇄 D151 또는 D167 이성질체화된 변이체, 3.1% 이하의 중쇄 D261, D266 또는 D276 이성질체화 변이체, 4.6% 이하의 단편화된 변이체, 27.8% 이하의 중쇄 N380 탈아미드화된 변이체, 27.2% 이하의 중쇄 N385 탈아미드화된 변이체, 약 7.4% 이하의 중쇄 N311 탈아미드화된 변이체, 약 2.0% 이하의 중쇄 N430 탈아미드화된 변이체, 90% 이상의 중쇄 C-말단 리신 결실된 변이체 ($\Delta K443$), 및 1% 이하의 중쇄 N-말단 피로-글루타메이트 변이체를 포함하는 조성물의 효력의 적어도 60%를 갖는 조성물.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 전장 항체인 조성물.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 인간화된 것인 조성물.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 항체의 제조 또는 저장 동안 형성된 조성물.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 따른 조성물 및 적어도 1종의 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물.

청구항 30

약 20 mg/mL 내지 약 125 mg/mL의 항체 및 pH 약 5.5 내지 약 6.5의 완충제를 포함하는, 제29항에 따른 제약 조성물을 포함하는 제제.

청구항 31

제30항에 있어서, 완충제가 시트레이트 완충제 또는 히스티딘 완충제로부터 선택된 것인 제제.

청구항 32

제30항 또는 제31항에 있어서, 완충제가 pH 약 6.0의 시트레이트 완충제인 제제.

청구항 33

제30항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 아르기닌 및/또는 트레할로스를 추가적으로 포함하는 제제.

청구항 34

제30항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리소르베이트 80을 추가적으로 포함하는 제제.

청구항 35

제30항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 제제의 오스몰랄농도를 약 290-325 mOsm/kg으로 조정하는 농도로 염화나트륨을 추가적으로 포함하는 제제.

청구항 36

(a) 약 20 mg/mL 내지 약 125 mg/mL의 항체, (b) 약 10 mM 내지 약 40 mM의 시트레이트 완충제 또는 히스티딘 완충제, (c) 약 80 mM 내지 약 120 mM의 아르기닌 또는 약 2 내지 약 10% w/v의 트레할로스, (d) 약 20 mM 내지 약 40 mM의 염화나트륨, 및 (e) 약 0.01% 내지 약 0.1% w/v의 폴리소르베이트 80을 포함하는 pH 약 5.5 내지 약 6.5의, 제29항에 따른 제약 조성물을 포함하는 제제.

청구항 37

제36항에 있어서, 약 20 mg/mL의 항체, 약 25 mM 시트레이트 완충제, 약 100 mM 아르기닌, 약 31 mM 염화나트륨, 및 약 0.02% w/v 폴리소르베이트 80을 포함하는 약 pH 6의 제제.

청구항 38

제36항에 있어서, 약 50 mg/mL의 항체, 약 25 mM 시트레이트 완충제, 약 100 mM 아르기닌, 약 31 mM 염화나트륨, 및 약 0.02% (w/v) 폴리소르베이트 80을 포함하는 약 pH 6의 제제.

청구항 39

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 따른 조성물, 제29항에 따른 제약 조성물 또는 제30항 내지 제38항 중 어느 한 항에 따른 제제를 포함하는 주사 장치.

청구항 40

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는 세포 배양 배지.

청구항 41

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는 용리액.

청구항 42

암의 치료를 필요로 하는 대상체에게 치료 유효량의 제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 따른 조성물, 제29항에 따른 제약 조성물, 또는 제30항 내지 제38항 중 어느 한 항에 따른 제제를 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 조성물이 약 500 mg의 용량으로 투여되는 것인 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 조성물이 3주마다 1회 투여되는 것인 방법.

청구항 45

제43항 또는 제44항에 있어서, 조성물이 4 주기 동안 투여되는 것인 방법.

청구항 46

제42항에 있어서, 조성물이 4 주기 동안 3주마다 1회 약 500 mg의 제1 용량으로 투여되고, 이어서 6주 마다 1회

이상 약 1000 mg의 제2 용량으로 투여되는 것인 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 임상 이익을 유지하기 위해 6주마다 1회 이상 약 1000 mg의 제2 용량이 계속되는 것인 방법.

청구항 48

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 요법에 사용하기 위한 조성물, 제약 조성물 또는 제제.

청구항 49

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 암의 치료에 사용하기 위한 조성물, 제약 조성물 또는 제제.

청구항 50

암의 치료에 사용하기 위한 의약의 제조에서의 제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 따른 조성물, 제29항에 따른 제약 조성물, 또는 제30항 내지 제38항 중 어느 한 항에 따른 제제의 용도.

청구항 51

자가면역 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에게 치료 유효량의 제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 따른 조성물, 제29항에 따른 제약 조성물, 또는 제30항 내지 제38항 중 어느 한 항에 따른 제제를 투여하는 것을 포함하는, 자가면역 질환을 치료하는 방법.

청구항 52

감염성 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에게 치료 유효량의 제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 따른 조성물, 제29항에 따른 제약 조성물, 또는 제30항 내지 제38항 중 어느 한 항에 따른 제제를 투여하는 것을 포함하는, 감염성 질환을 치료하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

서열 목록

[0002]

본 출원은 ASCII 포맷으로 전자 제출된 서열 목록을 함유하며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003]

발명의 분야

[0004]

본 개시내용은 항-PD-1 항체를 포함하는 조성물, 및 암 또는 감염성 상태 및 장애를 치료하는 관련 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005]

프로그래밍된 사멸 1 (PD-1) (또한 프로그래밍된 세포 사멸 1로도 공지됨)은 원래, 아토피시스를 겪은 마우스 T 세포주의 차감 혼성화에 의해 확인된 268개의 아미노산의 유형 I 막횡단 단백질이다. PD-1은 T-세포 조절인자의 CD28/CTLA-4 패밀리의 구성원이고, 활성화된 T-세포, B-세포, 및 골수 계열 세포 상에서 발현된다.

[0006]

PD-1에 대한 2종의 리간드, PD 리간드 1 (PD-L1) 및 PD 리간드 2 (PD-L2)가 확인되었으며, 이들 둘 다는 B7 단백질 슈퍼패밀리에 속한다. PD-L1은 폐, 심장, 흉선, 비장, 및 신장의 세포를 포함한 다양한 세포 유형에서 발현된다. PD-L1 발현은 리포폴리사카라이드 (LPS) 및 GM-CSF 처리에 반응하여 대식세포 및 수지상 세포 (DC) 상에서, 및 T-세포 및 B-세포 수용체를 통한 신호전달 시에 T-세포 및 B-세포 상에서 상향조절된다. 이는 또한 다양한 무린 종양 세포주에서 발현된다. 대조적으로, PD-L2는 보다 제한된 발현 패턴을 나타내고, 주로 항원 제시 세포 (예를 들어 수지상 세포 및 대식세포), 및 일부 종양 세포주에 의해 발현된다. 종양에서의 높은 PD-L1 발현은, 종양 세포, 기질, 또는 종양 미세환경 내의 다른 세포 상에서든지 관계없이, 아마도 종양에서 이펙터 T 세포를 억제하고 조절 T 세포 (Treg)를 상향조절하는 것에 의해, 불량한 임상 예후와 상관된다.

[0007]

PD-1은 T-세포 활성화를 음성적으로 조절하고, 이러한 억제 기능은 세포질 도메인 내의 면역수용체 티로신-기반 스위치 모티프 (ITSM)에 연결된다. PD-1 결핍은 또한 자가면역으로 이어질 수 있다. 인간에서, PD-1 유전자에

서의 단일 뉴클레오타이드 다형성은 전신 홍반성 루푸스, 제1형 당뇨병, 류마티스 관절염의 보다 높은 발생률, 및 다발성 경화증의 진행과 연관된다. 비정상적 PD-1 발현은 또한 여러 병리상태, 예컨대 종양 면역 회피 및 만성 바이러스 감염에서의 T-세포 기능장애에 연루되어 왔다.

[0008] 이전 연구는 PD-1에 의해 유도된 T-세포 억제제가 또한 항종양 면역의 억제에서 소정의 역할을 한다는 것을 입증한다. 예를 들어, PD-L1은 다양한 인간 및 마우스 종양 상에서 발현되고, 종양 상의 PD-L1에 대한 PD-1의 결합은 T-세포 억제 및 종양 면역 회피 및 보호를 발생시킨다. 종양 세포에 의한 PD-L1의 발현은 시험관내 항종양 T-세포에 의한 용해에 대한 그의 저항성과 직접적으로 연관되었다. PD-1 녹아웃 마우스는 종양 챌린지에 대해 저항성이고, PD-1 녹아웃 마우스로부터의 T-세포는 종양-보유 마우스에게 입양 전달 시 종양 거부에 있어서 고도로 효과적이다. 모노클로날 항체를 사용하여 PD-1 억제 신호를 차단하는 것은 마우스에서 숙주 항종양 면역을 강화시킬 수 있고, 종양에서의 높은 수준의 PD-L1 발현은 많은 인간 암 유형에 대한 불량한 예후와 연관된다.

[0009] 상기를 고려하여, 다양한 유형의 암을 치료하기 위해 및 면역강화를 위해 (예를 들어, 감염성 질환을 치료하기 위해) PD-1 활성을 억제하는 전략이 개발되었다. 이와 관련하여, PD-1을 표적화하는 모노클로날 항체가 암의 치료를 위해 개발되었다. 예를 들어, 니볼루맵 (또한 오피비오(OPDIVO)로도 공지됨)은 PD-1에 대해 지시되고, 흑색종, 비소세포 폐암 또는 신장 (신세포)암을 치료하기 위해 시판되는 인간 IgG4 모노클로날 항체이다. 또 다른 예로서, 펌브롤리주맵 (키트루다(KEYTRUDA))은 PD-1에 대해 지시되고, 비소세포 폐암, 두경부암, 흑색종 및 호지킨 림프종을 포함한 다양한 암을 치료하기 위해 시판되는 인간화 IgG4 모노클로날 항체이다. 또한, 최근의 증거는 PD-1을 표적화하는 요법이 병원체, 예컨대 HIV에 대한 면역 반응을 증진시킬 수 있음을 시사한다. 항-PD-1 항체는 W02014/179664, W02018/085468 및 W02018/129559에 기재되어 있다.

발명의 내용

[0010] 본 발명의 한 측면에 따르면, 서열식별번호(SEQ ID NO): 1의 CDRH1, 서열식별번호: 2의 CDRH2, 및 서열식별번호: 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 4의 CDRL1, 서열식별번호: 5의 CDRL2, 및 서열식별번호: 6의 CDRL3을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항-PD-1 항체의 산화된 변이체를 포함하는 조성물이 제공되며; 여기서 조성물은 $\leq 65\%$ 의 산화된 변이체를 포함한다.

[0011] 본 발명의 추가 측면에 따르면, 서열식별번호: 1의 CDRH1, 서열식별번호: 2의 CDRH2, 및 서열식별번호: 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 서열 및 서열식별번호: 4의 CDRL1, 서열식별번호: 5의 CDRL2, 및 서열식별번호: 6의 CDRL3을 포함하는 경쇄 서열을 포함하는 항-PD-1 항체의 응집된 변이체를 포함하는 조성물이 제공되며; 여기서 조성물은 $\leq 36\%$ 의 응집된 변이체를 포함한다.

[0012] 본 발명의 추가 측면에 따르면, 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 갖는 항체를 포함하는 조성물이 제공되며, 여기서 조성물은 (i) $\leq 65\%$ 의 산화된 변이체; 및/또는 (ii) $\leq 36\%$ 의 응집된 변이체를 포함한다.

[0013] 본 발명의 추가 측면에 따르면, 서열식별번호: 1의 CDRH1, 서열식별번호: 2의 CDRH2, 및 서열식별번호: 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 4의 CDRL1, 서열식별번호: 5의 CDRL2, 및 서열식별번호: 6의 CDRL3을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항-PD-1 항체의 하전된 변이체를 포함하는 조성물이 제공되며; 여기서 조성물은 $\leq 100\%$ 의 산성 변이체; 및/또는 $\leq 35\%$ 의 염기성 변이체; 및/또는 $\geq 1\%$ 의 주요 이소형을 포함한다.

[0014] 본 발명의 추가 측면에 따르면, 서열식별번호: 1의 CDRH1, 서열식별번호: 2의 CDRH2, 및 서열식별번호: 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 4의 CDRL1, 서열식별번호: 5의 CDRL2, 및 서열식별번호: 6의 CDRL3을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항-PD-1 항체의 하전된 변이체를 포함하는 조성물이 제공되며; 여기서 조성물은 10-97%의 산성 변이체; 및/또는 0.1-35%의 염기성 변이체; 및/또는 2-80%의 주요 이소형을 포함한다.

[0015] 본 발명의 추가 측면에 따르면, 서열식별번호: 1의 CDRH1, 서열식별번호: 2의 CDRH2, 및 서열식별번호: 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 4의 CDRL1, 서열식별번호: 5의 CDRL2, 및 서열식별번호: 6의 CDRL3을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항-PD-1 항체의 하전된 변이체를 포함하는 조성물이 제공되며, 여기서 조성물은 $\leq 35\%$ 의 산성 변이체; 및/또는 $\leq 5\%$ 의 염기성 변이체; 및/또는 $\geq 55\%$ 의 주요 이소형을 포함한다.

- [0016] 본 발명의 추가 측면에 따르면, 서열식별번호: 9, 서열식별번호: 11, 서열식별번호: 12 및/또는 서열식별번호: 13으로부터 선택된 서열 중 하나 또는 그의 조합을 갖는 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 포함하는 항체를 포함하는 조성물이 제공되며, 여기서 조성물은 $\leq 64\%$ 의 산화된 변이체를 포함한다.
- [0017] 본 발명의 추가 측면에 따르면, 서열식별번호: 9, 서열식별번호: 11, 서열식별번호: 12 및/또는 서열식별번호: 13으로부터 선택된 서열 중 하나 또는 그의 조합을 갖는 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 포함하는 항체를 포함하는 조성물이 제공되며, 여기서 조성물은 $\leq 36\%$ 의 응집된 변이체를 포함한다.
- [0018] 본 발명의 추가 측면에 따르면, 서열식별번호: 1의 CDRH1, 서열식별번호: 2의 CDRH2, 및 서열식별번호: 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 4의 CDRL1, 서열식별번호: 5의 CDRL2, 및 서열식별번호: 6의 CDRL3을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항-PD-1 항체의 변이체를 포함하는 조성물이 제공되며; 여기서 조성물은 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열, 10-97%의 산성 변이체, 0.1-35%의 염기성 변이체, 2-80%의 주요 이소형, 4.8% 이하의 경쇄 W50 산화된 변이체, 1% 이하의 중쇄 M34 산화된 변이체, 1.2% 이하의 중쇄 M103 산화된 변이체, 15.2% 이하의 응집된 변이체, 16.7% 이하의 중쇄 M354 산화된 변이체, 29.0% 이하의 중쇄 M424 산화된 변이체, 47.1% 이하의 중쇄 M248 산화된 변이체, 20.8% 이하의 중쇄 D147 이성질체화된 변이체, 13.1% 이하의 중쇄 D151 또는 D167 이성질체화된 변이체, 3.1% 이하의 중쇄 D261, D266 또는 D276 이성질체화 변이체, 4.6% 이하의 단편화된 변이체, 27.8% 이하의 중쇄 N380 탈아미드화된 변이체, 27.2% 이하의 중쇄 N385 탈아미드화된 변이체, 약 7.4% 이하의 중쇄 N311 탈아미드화된 변이체, 약 2.0% 이하의 중쇄 N430 탈아미드화된 변이체, 90% 이상의 중쇄 C-말단 리신 결실된 변이체 ($\Delta K443$), 및 1% 이하의 중쇄 N-말단 피로-글루타메이트 변이체를 포함하는 조성물의 효력의 적어도 60%를 갖는다.
- [0019] 본 발명의 추가 측면에 따르면, 본원에 기재된 조성물 및 적어도 1종의 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물이 제공된다.
- [0020] 본 발명의 추가 측면에 따르면, 약 20 mg/mL 내지 약 125 mg/mL의 항체 및 pH 약 5.5 내지 약 6.5의 완충제를 포함하는, 본원에 기재된 제약 조성물을 포함하는 제제가 제공된다.
- [0021] 본 발명의 추가 측면에 따르면, (a) 약 20 mg/mL 내지 약 125 mg/mL의 항체, (b) 약 10 mM 내지 약 40 mM의 시트레이트 완충제 또는 히스티딘 완충제, (c) 약 80 mM 내지 약 120 mM의 아르기닌 또는 약 2 내지 약 10% w/v의 트레할로스, (d) 약 20 mM 내지 약 40 mM의 염화나트륨, 및 (e) 약 0.01% 내지 약 0.1% w/v의 폴리소르베이트 80을 포함하는 pH 약 5.5 내지 약 6.5의, 본원에 기재된 바와 같은 제약 조성물을 포함하는 제제가 제공된다.
- [0022] 본 발명의 추가 측면에 따르면, 본원에 기재된 바와 같은 조성물을 포함하는 주사 장치가 제공된다. 본 발명의 추가 측면에 따르면, 본원에 기재된 바와 같은 제약 조성물을 포함하는 주사 장치가 제공된다. 본 발명의 추가 측면에 따르면, 본원에 기재된 바와 같은 제제를 포함하는 주사 장치가 제공된다.
- [0023] 본 발명의 추가 측면에 따르면, 본원에 기재된 조성물을 포함하는 세포 배양 배지가 제공된다.
- [0024] 본 발명의 추가 측면에 따르면, 본원에 기재된 바와 같은 조성물을 포함하는 용리액이 제공된다.
- [0025] 본 발명의 추가 측면에 따르면, 암의 치료를 필요로 하는 대상체에게 치료 유효량의 본원에 기재된 바와 같은 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법이 제공된다. 본 발명의 추가 측면에 따르면, 암의 치료를 필요로 하는 대상체에게 치료 유효량의 본원에 기재된 바와 같은 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법이 제공된다. 본 발명의 추가 측면에 따르면, 암의 치료를 필요로 하는 대상체에게 치료 유효량의 본원에 기재된 바와 같은 제제를 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법이 제공된다.
- [0026] 본 발명의 추가 측면에 따르면, 요법에 사용하기 위한 본원에 기재된 조성물이 제공된다. 본 발명의 추가 측면에 따르면, 요법에 사용하기 위한 본원에 기재된 제약 조성물이 제공된다. 본 발명의 추가 측면에 따르면, 요법에 사용하기 위한 본원에 기재된 제제가 제공된다.
- [0027] 본 발명의 추가 측면에 따르면, 암의 치료에 사용하기 위한 본원에 기재된 조성물이 제공된다. 본 발명의 추가 측면에 따르면, 암의 치료에 사용하기 위한 본원에 기재된 제약 조성물이 제공된다. 본 발명의 추가 측면에 따르면, 암의 치료에 사용하기 위한 본원에 기재된 제제가 제공된다.
- [0028] 본 발명의 추가 측면에 따르면, 암의 치료에 사용하기 위한 의약의 제조에서의 본원에 기재된 조성물의 용도가 제공된다. 본 발명의 추가 측면에 따르면, 암의 치료에 사용하기 위한 의약의 제조에서의 본원에 기재된 제약 조성물의 용도가 제공된다. 본 발명의 추가 측면에 따르면, 암의 치료에 사용하기 위한 의약의 제조에서의 본

원에 기재된 제제의 용도가 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1: 도스탈리맵에 대한 대표적인 cIEF 전기영동도 (a: 전체 규모, 및 b: 확대 규모).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 일반적 정의

[0031] 본원에 기재된 본 발명은 항-프로그램화된 사멸 1 (PD-1) 항체를 포함하는 조성물 및 PD-1 활성화의 억제를 통한 관련 치료 방법을 제공한다. "프로그램화된 사멸 1 (PD-1) 항체"는 프로그램화된 사멸 1 단백질 (PD-1)에 특이적으로 결합하는 항체를 의미한다. 본원에 기재된 바와 같은 항-PD-1 항체를 포함하는 조성물은 또한 본원에 기재된 바와 같은 항-PD-1 항체의 집단으로 지칭될 수 있으며: 어구는 상호교환가능하다는 것이 이해될 것이다. 한 실시양태에서, PD-1 항체는 서열식별번호: 9에 제시된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열식별번호: 10에 제시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다.

[0032] 본원에 사용된 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 이뮤노글로불린-유사 도메인 (예를 들어 IgG, IgM, IgA, IgD 또는 IgE)을 갖는 분자를 지칭하고, 이러한 유형의 모노클로날, 재조합, 폴리클로날, 키메라, 인간, 및 인간화 분자를 포함한다.

[0033] 본원에서 상호교환가능하게 사용되는 용어 전장, 전체 또는 무손상 항체는 대략 150,000 달톤의 분자량을 갖는 이중사량체 당단백질을 지칭한다. 무손상 항체는 공유 디설피드 결합에 의해 연결된 2개의 동일한 중쇄 (HC) 및 2개의 동일한 경쇄 (LC)로 구성된다. 이러한 H2L2 구조는 폴딩되어 'Fab' 단편으로 공지된 2개의 항원-결합 단편 및 'Fc' 결정화가능한 단편을 포함하는 3개의 기능적 도메인을 형성한다. Fab 단편은 아미노-말단의 가변 영역, 가변 중쇄 (VH) 또는 가변 경쇄 (VL), 및 카르복실 말단의 불변 영역, CH1 (중쇄) 및 CL (경쇄)로 구성된다. Fc 단편은 쌍 형성된 CH2 및 CH3 영역의 이량체화에 의해 형성된 2개의 도메인으로 구성된다. Fc는 면역 세포 상의 수용체와의 결합에 의해 또는 전형적 보체 경로의 제1 성분인 C1q와의 결합에 의해 이펙터 기능을 도출할 수 있다. 5가지 부류의 항체 IgM, IgA, IgG, IgE 및 IgD는 각각 μ , α , γ , ϵ 및 δ 로 불리는 별개의 중쇄 아미노산 서열에 의해 규정되고, 각각의 중쇄는 K 또는 λ 경쇄와 쌍형성할 수 있다. 혈청 중 대다수의 항체는 IgG 부류에 속하며, 인간 IgG의 4종의 이소형, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4가 존재하고, 그의 서열은 주로 그의 힌지 영역에서 상이하다.

[0034] 완전 인간 항체는 다양한 방법을 사용하여, 예를 들어 인간 항체의 레퍼토리를 생산할 수 있는 효모-기반 라이브러리 또는 트랜스제닉 동물 (예를 들어 마우스)을 사용하여 수득될 수 있다. 관심 항원에 결합하는 인간 항체를 그의 표면 상에 제시하는 효모는 FACS (형광-활성화 세포 분류) 기반 방법을 사용하여 또는 표지된 항원을 사용한 비드 상에서의 포획에 의해 선택될 수 있다. 인간 이뮤노글로불린 유전자를 발현하도록 변형된 트랜스제닉 동물은 B-세포 분류 기술을 사용하여 단리된 관심 항원 및 항원-특이적 인간 항체로 면역화될 수 있다. 이어서, 이들 기술을 사용하여 생산된 인간 항체는 목적하는 특성, 예컨대 친화도, 개발가능성 및 선택성에 대해 특징화될 수 있다.

[0035] 모노클로날 항체는 항체를 발현하는 진행 세포 클론 또는 원핵 세포 클론에 의해 생산될 수 있다. 모노클로날 항체는 또한 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 핵산 서열을 세포 내로 도입하는 것에 의해 이들을 재조합적으로 발현할 수 있는 진행 세포주에 의해 생산될 수 있다. 상이한 진행 세포주, 예컨대 차이나이즈 햄스터 난소 세포, 하이브리도마 또는 동물 (예를 들어 인간)로부터 유래된 불멸화 항체 세포로부터 항체를 생산하는 예시적인 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다.

[0036] 항체는, 예를 들어 래트, 마우스, 영장류 (예를 들어 시노물구스, 구세계 원숭이 또는 대형 유인원), 인간 또는 다른 공급원, 예컨대 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 분자 생물학 기술을 사용하여 생성된 항체 분자를 코딩하는 핵산으로부터 유래될 수 있다.

[0037] 항체는 임의의 이소형 또는 하위부류의 것일 수 있는 불변 영역을 포함할 수 있다. 불변 영역은 IgG 이소형, 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 또는 그의 변이체의 것일 수 있다. 한 실시양태에서, 항체는 IgG4로부터 유래된 불변 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 단일 세린의 프롤린으로의 점 돌연변이가 힌지 안정화의 목적으로 IgG4 중쇄의 힌지 영역에 존재한다. 이러한 돌연변이는 순차적으로 넘버링된 바와 같은 (서열식별번호: 9) 전장 중쇄 서열 내의 잔기 224에 상응하는 정규 S228 위치 (카바트 넘버링)에 있다.

- [0038] 항체는 완전 인간, 인간화, 또는 키메라 항체일 수 있다. 한 실시양태에서, 항체는 인간화 항체이다. 한 실시양태에서, 항체는 모노클로날 항체이다.
- [0039] 항체는 항체가 증진된 이펙터 기능/ADCC 및/또는 보체 활성화를 갖도록, 예를 들어 돌연변이된 불변 도메인을 포함하여 1개 이상의 변형을 포함할 수 있다.
- [0040] 항체는 2개의 이뮤노글로불린 (Ig) 중쇄 ("HC") 및 2개의 Ig 경쇄 ("LC")를 포함할 수 있다. 기본 항체 구조 단위는 예를 들어 서브유닛의 사량체를 포함할 수 있다. 각각의 사량체는 2쌍의 폴리펩티드 쇄를 포함할 수 있고, 각각의 쌍은 1개의 "경쇄" (약 25 kDa) 및 1개의 "중쇄" (약 50-70 kDa)를 갖는다. 각각의 쇄의 아미노-말단 부분은 주로 항원 인식을 담당하는 약 100 내지 110개 또는 그 초과 아미노산의 가변 영역을 포함할 수 있다. 이러한 가변 영역은 초기에 절단가능한 신호 펩티드에 연결되어 발현될 수 있다. 신호 펩티드가 없는 가변 영역은 성숙 가변 영역으로 지칭될 수 있다. 따라서, 한 예에서, 경쇄 성숙 가변 영역은 경쇄 신호 펩티드가 없는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 각각의 쇄의 카르복시-말단 부분은 불변 영역을 규정할 수 있다. 한 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물의 항체는 전장 항체이다.
- [0041] 용어 "VH" 및 "VL"은 각각 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 지칭하는 것으로 본원에 사용된다.
- [0042] 각각의 경쇄/중쇄 쌍의 성숙 가변 영역은 항체 결합 부위 (또한 항원 결합 부위로도 지칭됨)를 형성할 수 있다. "항원 결합 부위"는 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 상의 부위를 지칭하며, 이는 단일 가변 도메인일 수 있거나, 또는 표준 항체 상에서 발견될 수 있는 바와 같은 쌍형성된 VH/VL 도메인일 수 있다. 따라서, 무손상 항체는 예를 들어 2개의 결합 부위를 가질 수 있다. 이중기능적 또는 이중특이적 항체를 제외하고는, 2개의 결합 부위는 동일할 수 있다. 쇄는 모두 상보성 결정 영역 또는 "CDR"로도 불리는 3개의 초가변 영역에 의해 연결된 비교적 보존된 프레임워크 영역 (FR)의 동일한 일반 구조를 나타낼 수 있다. 각각의 쌍의 2개의 쇄로부터의 CDR은 프레임워크 영역에 의해 정렬될 수 있으며, 이는 특이적 에피토프에 대한 결합을 가능하게 한다. 따라서, 한 예에서, N-말단에서 C-말단으로, 경쇄 및 중쇄 둘 다는 도메인 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4를 포함한다.
- [0043] 허용되는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 프레임워크 1, 프레임워크 2 및 프레임워크 3 영역은 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 인식된다. 허용되는 중쇄 불변 영역 (힌지 영역 포함) 및 경쇄 불변 영역도 또한 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 인식된다. 허용되는 항체 이소형은 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 유사하게 용이하게 인식된다.
- [0044] "CDR"은 항체의 상보성 결정 영역 아미노산 서열로서 정의된다. 이들은 이뮤노글로불린 중쇄 및 경쇄의 초가변 영역이다. 이뮤노글로불린의 가변 부분에는 3개의 중쇄 및 3개의 경쇄 CDR (또는 CDR 영역)이 존재한다. 따라서, 본원에 사용된 "CDR"은 모든 3개의 중쇄 CDR, 모든 3개의 경쇄 CDR, 모든 중쇄 및 경쇄 CDR, 또는 적어도 2개의 CDR을 지칭한다.
- [0045] 본 명세서 전반에 걸쳐, 용어 "CDR", "CDRL1", "CDRL2", "CDRL3", "CDRH1", "CDRH2", "CDRH3"은 카바트 넘버링 규정을 따른다. 가변 영역 서열 및 전장 항체 서열 내의 아미노산 잔기는 임의의 항체 변이체 위치 또는 번역 후 변형 변이체 위치, 예컨대 산화된 변이체 (예를 들어 W50), 탈아미드화된 변이체 (예를 들어 N380) 또는 이성질체화된 변이체 (예를 들어 D147)를 나타내기 위해 순차적으로 넘버링된다.
- [0046] 가변 영역 서열 및 전장 항체 서열 내의 아미노산 잔기에 대한 대안적 넘버링 규정이 존재한다는 것은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 또한, CDR 서열에 대한 대안적 넘버링 규정, 예를 들어 문헌 [Chothia et al., (1989) Nature 342: 877-883]에 따라 제시되는 것이 존재한다. 항체의 구조 및 단백질 폴딩은 다른 잔기가 CDR 서열의 일부로 간주된다는 것을 의미할 수 있고, 통상의 기술자에 의해 그렇게 이해될 것이다. 통상의 기술자에게 이용가능한 CDR 서열에 대한 다른 넘버링 규정은 "AbM" (유니버시티 오브 배스 (University of Bath)) 및 "접촉" (유니버시티 칼리지 런던 (University College London)) 방법을 포함한다. 하기 표 1은 각각의 CDR 또는 결합 단위에 대한 각각의 넘버링 규정을 사용한 하나의 정의를 나타낸다. 가변 영역 아미노산 서열을 넘버링하기 위해 카바트 넘버링 스킴이 표 1에 사용된다. CDR 정의 중 일부는 사용된 개별 공개에 따라 달라질 수 있음을 주목해야 한다.

[0047] 표 1:

	카바트 CDR	코티아 CDR	AbM CDR	접촉 CDR
H1	31-35/35A/ 35B	26-32/33/34	26-35/35A/35B	30-35/35A/35B
H2	50-65	52-56	50-58	47-58
H3	95-102	95-102	95-102	93-101
L1	24-34	24-34	24-34	30-36
L2	50-56	50-56	50-56	46-55
L3	89-97	89-97	89-97	89-96

[0048]

[0049]

용어 "변이체", "항체 변이체", "CDR 변이체" 및 "변역후 변형 변이체"는 항체 서열에 대해 적어도 1개의 아미노산 서열이, 예를 들어 변역후 변형, 화학적 변화 또는 적어도 1개의 결실, 치환 또는 부가를 통한 서열 변화를 통해 변화된 변이체 항체 서열을 지칭한다. 일부 변역후 변형은 서열을 변화시키지 않는 화학적 변화를 발생시키는 반면에 (예를 들어 Met 및 산화된 Met; 또는 Asp 및 이성질체화/이소-Asp; 또는 응집), 다른 것은 서열 변화, 예컨대 하나의 아미노산 잔기의 또 다른 것으로의 전환을 발생시킨다 (예를 들어 탈아미드화를 통한 Asn의 Asp로의 전환; 또는 리신 결실). 추가의 변역후 변형 변이체가 하기 기재된다. 서열 변화를 포함하는 변이체 항체 서열은 설계된 서열 변화 또는 변역후 변형의 결과일 수 있다.

[0050]

아미노산 대체 또는 치환은 보존적, 반-보존적, 또는 비-보존적일 수 있다. 아미노산은 광범위하게 "방향족" 또는 "지방족"으로 그룹화된다. 방향족 아미노산은 방향족 고리를 포함한다 (예를 들어 히스티딘, 페닐알라닌, 티로신, 및 트립토판). 비-방향족 아미노산은 광범위하게 "지방족"으로 그룹화된다.

[0051]

한 실시양태에서, 치환은 보존적 치환이다. 특정 아미노산 치환은 "보존적"인 것으로 간주된다는 것이 관련 기술분야에 널리 인식되어 있다. 아미노산은 공통 측쇄 특성에 기초하여 군으로 추가로 나뉠 수 있고, 항체의 모든 또는 실질적으로 모든 결합 친화도를 유지하는 군 내에서의 치환은 보존적 치환으로 간주된다. 예를 들어, 아미노산의 군은 소수성 측쇄를 갖는 아미노산 잔기, 예컨대 메티오닌, 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신; 중성, 친수성 측쇄를 갖는 아미노산, 예컨대 시스테인, 세린 및 트레오닌; 산성 측쇄를 갖는 아미노산, 예컨대 아스파르트산 및 글루탐산; 염기성 측쇄를 갖는 아미노산, 예컨대 아스파라긴, 글루타민, 히스티딘, 리신 및 아르기닌; 쇠 배향에 영향을 미치는 잔기를 갖는 아미노산, 예컨대 글리신 및 프롤린; 및 방향족 측쇄를 갖는 아미노산, 예컨대 트립토판, 티로신 및 페닐알라닌을 포함한다. 본원에 개시된 항체는 이러한 "보존적" 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 대안적 실시양태에서, 항체 변이체는 항체의 정규를 유지하면서 적어도 1개의 치환을 포함한다.

[0052]

"반-보존적 돌연변이"는 넓은 군 (즉, 방향족 또는 지방족) 내의 것이지만 동일한 측쇄 하위군 내의 것은 아닌 아미노산의 아미노산 치환을 포함한다. 예를 들어, 아스파르트산의 아스파라긴으로의 치환, 또는 아스파라긴의 리신으로의 치환은 동일한 군 (즉, 지방족)이지만 상이한 하위군 내의 아미노산을 수반한다. "비-보존적 돌연변이"는 상이한 군 사이의 아미노산 치환, 예를 들어 리신의 트립토판으로의, 또는 페닐알라닌의 세린으로의 치환 등을 수반한다.

[0053]

한 실시양태에서, 항체 변이체는 항체 1차 서열과 적어도 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98% 또는 약 99% 동일한 (즉, 서열 동일성을 갖는) 항체이다. 또 다른 실시양태에서, 항체 변이체는 서열식별번호: 9의 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98% 또는 약 99% 동일한 중쇄 아미노산 서열 및/또는 서열식별번호: 10의 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98% 또는 약 99% 동일한 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항체를 포함한다.

[0054]

질의 핵산 서열과 대상 핵산 서열 사이의 "퍼센트 동일성"은 쌍별 글로벌 서열 정렬을 적합한 알고리즘 또는 소프트웨어, 예컨대 블라스트N(BLASTN), 파스타(FASTA), 클러스탈W(ClustalW), 머슬(MUSCLE), 마프트(MAFFT), 엠보스 니들(EMBOSS Needle), 티-커피(T-Coffee), 및 디엔에이스타 레이저진(DNASTAR Lasergene)을 사용하여 수행한 후, 질의 서열의 전체 길이에 걸쳐 적합한 알고리즘 또는 소프트웨어, 예컨대 블라스트N, 파스타, 디엔에이스타 레이저진, 진독(GeneDoc), 바이오에디트(Bioedit), 엠보스 니들 또는 엠보스 인포얼라인(EMBOSS infoalign)을 사용하여 계산한, 백분율로 표현되는 "동일성" 값이다. 중요하게는, 질의 서열은 본원의 1개 이상의 청구항에서 확인되는 핵산 서열에 의해 기재될 수 있다.

- [0055] 질의 아미노산 서열과 대상 아미노산 서열 사이의 "퍼센트 동일성"은 쌍별 글로벌 서열 정렬을 적합한 알고리즘/소프트웨어, 예컨대 블라스트P(BLASTP), 파스타, 클러스탈W, 머슬, 마프트, 엠보스 니들, 티-커피, 및 디엔에이스타 레이저진을 사용하여 수행한 후, 질의 서열의 전체 길이에 걸쳐 적합한 알고리즘 또는 소프트웨어, 예컨대 블라스트P, 파스타, 디엔에이스타 레이저진, 진독, 바이오에디트, 엠보스 니들 또는 엠보스 인포얼라인을 사용하여 계산한, 백분율로 표현되는 "동일성" 값이다. 중요하게는, 질의 서열은 본원의 1개 이상의 청구항에서 확인되는 아미노산 서열에 의해 기재될 수 있다.
- [0056] 질의 서열은 대상 서열과 100% 동일할 수 있거나, 또는 % 동일성이 100% 미만이라도 대상 서열과 비교하여 최대 특정 정수까지의 아미노산 또는 뉴클레오티드 변경을 포함할 수 있다. 예를 들어, 질의 서열은 대상 서열과 적어도 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 동일하다. 이러한 변경은 적어도 1개의 아미노산 결실, 치환 (보존적 및 비-보존적 치환 포함), 또는 삽입을 포함하고, 여기서 상기 변경은 질의 서열의 아미노- 또는 카르복시-말단 위치에서 또는 그러한 말단 위치 사이의 임의의 위치에서, 질의 서열 내의 아미노산 또는 뉴클레오티드 사이에서 개별적으로 또는 질의 서열 내의 1개 이상의 인접한 군 내에서 산재되어 발생할 수 있다.
- [0057] % 동일성은 CDR을 포함한 질의 서열의 전체 길이에 걸쳐 결정될 수 있다. 대안적으로, % 동일성은 CDR 중 1개 이상 또는 모두를 배제할 수 있으며, 예를 들어 모든 CDR은 대상 서열과 100% 동일하고, % 동일성 변이는 질의 서열의 나머지 부분, 예를 들어 프레임워크 서열에 존재하여, CDR 서열은 고정되고 무손상이다.
- [0058] 본 개시내용의 조성물 및 관련 방법에 유용하고 포함될 수 있는 아미노산 서열은 본 개시내용에서 확인된 아미노산 서열에 대해 (예를 들어, 항체 중쇄 또는 항체 경쇄에 대해) 약 85% 내지 약 100%, 약 90% 내지 약 100%, 약 95% 내지 약 100%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 및 약 100% 동일성을 가질 수 있다. 본 개시내용에서, 기재된 아미노산 서열 사이의 퍼센트 동일성은 상기 언급된 퍼센트 동일성 범위의 임의의 별개의 하위범위 (예를 들어 특정한 범위 내의 정수 값 또는 특정한 범위 내의 별개의 하위-값의 임의의 범위)를 포함할 수 있다.
- [0059] 항체는 표적 항원인 인간 PD-1에 특이적으로 결합한다. 예시적인 항-PD-1 항체 및 그의 제조 방법은 국제 공개 번호 W02014/179664에 개시되어 있고, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 추가의 예시적인 항-PD-1 항체는 W02018/085468 및 W02018/129559에 기재된 것을 포함하며, 이들 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0060] 항체와 관련하여 본원에 사용된 용어 "특이적으로 결합하다" 또는 "특이적으로 결합한다"는, 다른 (예를 들어, 비관련) 단백질에 대한 결합은 없거나 또는 유의하지 않으면서, 항체가 표적 항원뿐만 아니라 표적 항원 내의 별개의 도메인 또는 별개의 아미노산 서열에 결합하는 것을 의미한다. 그러나, 이러한 용어는 항체가 또한 밀접하게 관련된 분자 (예를 들어, 고도의 서열 동일성을 갖는 것 또는 또 다른 속 또는 종으로부터의 것)와 교차-반응성일 수 있다는 사실을 배제하지 않는다. 본원에 기재된 항체는 밀접하게 관련된 분자에 결합하는 것보다 적어도 2, 5, 10, 50, 100, 또는 1000-배 더 큰 친화도로 인간 PD-1에 결합할 수 있다.
- [0061] "결합 친화도"로도 지칭되는 친화도는 단일 상호작용 부위에서의, 즉 하나의 분자, 예를 들어 항체의 또 다른 분자, 예를 들어 그의 표적 항원에 대한 단일 결합 부위에서 결합의 강도이다. 항체의 그의 표적에 대한 결합 친화도는 평형 방법 (예를 들어 효소-연결된 면역흡착 검정 (ELISA) 또는 방사성면역검정 (RIA)), 또는 동역학 (예를 들어 비아코어(BIACORE) 또는 유사한 기기를 사용한 표면 플라즈몬 공명 분석)에 의해 결정될 수 있다.
- [0062] 항체-표적 항원 상호작용의 결합 친화도 (K_D)는 예를 들어 약 1 피코몰 (pM) 내지 약 100 마이크로몰 (μ M) (예를 들어 약 1 피코몰 (pM) 내지 약 1 나노몰 (nM), 약 1 nM 내지 약 1 마이크로몰 (μ M), 또는 약 1 μ M 내지 약 100 μ M)일 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-PD-1 항체는 PD-1 단백질에 1 나노몰 이하 (예를 들어 0.9 nM, 0.8 nM, 0.7 nM, 0.6 nM, 0.5 nM, 0.4 nM, 0.3 nM, 0.2 nM, 0.1 nM, 0.05 nM, 0.025 nM, 0.01 nM, 0.001 nM, 또는 상기 값 중 임의의 2개에 의해 규정되는 범위)의 K_D 로 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-PD-1 항체는 PD-1에 200 pM 이하 (예를 들어, 190 pM, 175 pM, 150 pM, 125 pM, 110 pM, 100 pM, 90 pM, 80 pM, 75 pM, 60 pM, 50 pM, 40 pM, 30 pM, 25 pM, 20 pM, 15 pM, 10 pM, 5 pM, 1 pM, 또는 상기 값 중 임의의 2개에 의해 규정되는 범위)의 K_D 로 결합할 수 있다.
- [0063] 대안적으로, K_D 는 1 pM 내지 1000 pM, 예컨대 10 pM 내지 500 pM, 예를 들어 약 300 pM일 수 있다. 항체의 결합 친화도는 회합 상수 (K_a) 및 해리 상수 (K_d)에 의해 결정된다 ($K_D = K_d/K_a$). 결합 친화도는 비아코어 (표면 플라즈몬 공명)에 의해, 예를 들어 단백질-A 코팅된 센서 표면 상에의 시험 항체의 포획 및 이러한 표면 상에서

의 표적 항원의 유동에 의해 측정될 수 있다. 대안적으로, 결합 친화도는 포르테바이오(FORTEBIO)에 의해, 예를 들어 단백질-A 코팅된 니들 상에 포획된 시험 항체 수용체 및 이러한 표면 상에서의 유동 표적 항원을 사용하여 측정될 수 있다.

[0064] K_d 는 $1 \times 10^{-3} \text{ Ms}^{-1}$ 이하일 수 있다. K_d 는 $1 \times 10^{-5} \text{ Ms}^{-1}$ 내지 $1 \times 10^{-3} \text{ Ms}^{-1}$; 또는 $1 \times 10^{-4} \text{ Ms}^{-1}$ 내지 $1 \times 10^{-3} \text{ Ms}^{-1}$ 일 수 있다. 느린 K_d 는 항체-표적 항원 복합체의 느린 해리 및 표적 항원의 개선된 중화를 발생시킬 수 있다.

[0065] 본원에 사용된 용어 "특이적 항원 결합 활성"은 표면 플라즈몬 공명 (SPR)에 의해 측정된 바와 같은 항원 결합 활성을 의미한다. PD-1 특이적 결합 활성은, 예를 들어 결합 모드로 수행되는 비아코어 기기를 사용하여 SPR에 의해 결정될 수 있다. 이는 샘플 내의 총 단백질 (예를 들어 도스탈리맵) 함량으로 나눈 결합 활성이다. 본원에 사용된 용어 "FcRn 결합 활성"은 표면 플라즈몬 공명 (SPR)에 의해 측정된 바와 같은 신생아 Fc (FcRn) 수용체 결합 활성을 의미한다. FcRn 결합은 비아코어 기기를 사용하여 결정될 수 있다. 이는 샘플의 총 단백질 농도로 나눈 FcRn 수용체에 대한 결합 활성이다.

[0066] 특이적 항원 결합 및 FcRn 결합에 대한 SPR 방법은 도스탈리맵의 참조 표준물을 사용한다. 도스탈리맵 참조 표준물은 방법이 적절하게 수행되고 있음을 보장하기 위해, 시스템 적합성 및 샘플 비교가능성 데이터를 수득하기 위해 검정에서 사용될 수 있다. 참조 표준물은 보정 곡선의 확립을 가능하게 할 수 있고, 샘플의 농도는 곡선으로부터 내삽된다.

[0067] 본원에서 효력은 PD-1에 대한 리간드 (PD-L1) 결합을 억제하는 본원에 기재된 바와 같은 항-PD-1 항체 또는 조성물의 억제 활성으로서 정의된다. 이는 항원 PD-1에 대한 특이적 결합에 의해, 효력 검정 (예를 들어 MSD 검정)에 의해, 또는 효력 생물검정 (예를 들어 세포-기반 검정)에 의해 측정될 수 있다. 효력 검정은 세포에 의해 구성적으로 발현된 PD-1에 대한 PD-L1 리간드 결합을 억제하는 항체 또는 조성물의 용량-의존성 능력을 측정하는 세포-기반 경쟁적 결합 검정일 수 있다. 효력 생물검정은 PD-1에 대한 PD-L1 리간드 결합을 억제하여 T-세포 수용체 (TCR) 활성화 및 활성화된 T-세포 반응 요소의 핵 인자 (NFAT-RE) 활성화를 발생시키는 항체 또는 조성물의 용량 의존성 능력을 측정하는 세포-기반 세포내 신호전달 생물검정일 수 있다. 결과는 참조 물질 (예를 들어 대조군 샘플) 대비 퍼센트 효력으로서 보고될 수 있다.

[0068] PD-1 단백질을 구성적으로 발현하는 조작된 CHO K1 세포를 포함하는 메소 스케일 디스커버리 (MSD) 효력 검정이 사용될 수 있다. 항체 또는 조성물의 활성은 CHO K1 세포 상의 PD-1에 대한 리간드 결합을 억제하는 항체의 용량-의존성 능력을 측정하는 경쟁적 결합을 사용하여 평가될 수 있다. 리간드 (PD-L1)를 검정에서 리간드로서 사용한다 (PD-L1-mFc). 판독은 정량화될 수 있는 전기화학발광 (ECL) 신호를 방출하는 특이적 검출 항체 혼합물을 사용하여 측정될 수 있다. 결과는 참조 물질 (예를 들어 대조군 샘플) 대비 퍼센트 효력으로서 보고될 수 있다.

[0069] 프로메가 PD-1/PD-L1 차단 생물검정 (카탈로그 # J1250 또는 J1255)을 사용하여 개발된 세포 기반 효력 생물검정이 사용될 수 있다. 구체적으로, 인간 PD-1 및 활성화된 T-세포 반응 요소의 핵 인자 (NFAT-RE)에 의해 구동되는 루시페라제 리포터 유전자를 발현하는 PD-1 이펙터 세포 (Jurkat T 세포 (프로메가 # J1155))를 PD-L1을 발현하는 PD-L1 인공 항원 제시 세포 (aAPC) (CHO-K1 세포 (프로메가 # J1095))와 공동-배양할 수 있다. 2가지 세포 유형이 공동-배양된 경우에, PD-1/PD-L1 상호작용은 TCR 신호전달 및 결과적으로 NFAT-RE 발광을 억제한다. 항체 또는 조성물의 첨가는 억제 신호를 방출하고, TCR 활성화 및 NFAT-RE-매개 발광을 발생시킨다. 억제 신호의 이러한 차단은 용량-의존성이고, 생성된 발광은 플레이트 판독기를 사용하여 정량화될 수 있다. 신호 반응으로부터, y-축 상에 상대 루시페라제 단위 (RLU) vs. x 축 상에 $\log_2$ 변환된 농도를 플롯팅함으로써 참조 물질 및 항체/조성물 샘플 둘 다에 대해 4-파라미터 곡선을 생성할 수 있다. 중앙 유효 농도 (EC50) 값을 내삽하고, 이를 사용하여 참조 물질 (예를 들어 대조군 샘플)의 효력 대비 항체/조성물 샘플의 효력을 계산할 수 있다.

[0070] 용어 "펩티드", "폴리펩티드", "단백질" 및 "펩티드 쇠"는 각각 2개 이상의 아미노산 잔기를 포함하는 분자를 지칭한다. 펩티드는 단량체 또는 중합체일 수 있다.

[0071] 측정가능한 값, 예컨대 양, 시간 기간 등을 언급할 때 본원에 사용된 "약"에 대한 언급은 명시된 값으로부터 $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, 및 $\pm 0.1\%$ 를 포함한 $\pm 20\%$ 또는 $\pm 10\%$ 의 변동을 포괄하는 것으로 의도되며, 이는 이러한 변동이 개시된 방법을 수행하는데 적절하기 때문이다.

- [0072] 항-PD-1 항체
- [0073] 조성물은 본원에 기재된 본 발명에 따른 1개 이상의 CDR, 또는 본원에 기재된 본 발명에 따른 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 중 하나 또는 둘 다, 또는 본원에 기재된 본 발명에 따른 중쇄 또는 경쇄 중 하나 또는 둘 다를 포함하는 항-PD-1 항체를 포함할 수 있다.
- [0074] 한 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 1의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH1, 서열식별번호: 2의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH2, 및 서열식별번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH3을 포함하는 중쇄 서열 및 서열식별번호: 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL1, 서열식별번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL2, 및 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL3을 포함하는 경쇄 서열을 갖는 항체를 포함한다.
- [0075] 한 실시양태에서, 항-PD-1 항체는 서열식별번호: 1에 제시된 아미노산 서열에 대해 1 또는 2개의 아미노산 변이(들)를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1 ("CDRH1") ("CDR 변이체")을 포함한다.
- [0076] 한 실시양태에서, 항-PD-1 항체는 서열식별번호: 2에 제시된 아미노산 서열에 대해 5개 이하, 예컨대 4개 이하, 3개 이하, 2개 이하, 또는 1개의 아미노산 변이(들)를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2 ("CDRH2")("CDR 변이체")를 포함한다. 추가 실시양태에서, CDRH1은 서열식별번호: 2에 제시된 아미노산 서열에 대해 1 또는 2개의 아미노산 변이(들)를 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0077] 한 실시양태에서, 항-PD-1 항체는 서열식별번호: 3에 제시된 아미노산 서열에 대해 1 또는 2개의 아미노산 변이(들)를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3 ("CDRH3") ("CDR 변이체")을 포함한다.
- [0078] 한 실시양태에서, 항-PD-1 항체는 서열식별번호: 4에 제시된 아미노산 서열에 대해 3개 이하, 예컨대 1 또는 2개의 아미노산 변이(들)를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1 ("CDRL1") ("CDR 변이체")을 포함한다.
- [0079] 한 실시양태에서, 항-PD-1 항체는 서열식별번호: 5에 제시된 아미노산 서열에 대해 1 또는 2개의 아미노산 변이(들)를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2 ("CDRL2") ("CDR 변이체")를 포함한다.
- [0080] 한 실시양태에서, 항-PD-1 항체는 서열식별번호: 6에 제시된 아미노산 서열에 대해 3개 이하, 예컨대 1 또는 2개의 아미노산 변이(들)를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3 ("CDRL3") ("CDR 변이체")을 포함한다.
- [0081] 한 실시양태에서, 항-PD-1 항체는 서열식별번호: 1에 제시된 아미노산 서열에 대해 최대 1개의 아미노산 변이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 CDRH1; 서열식별번호: 2에 제시된 아미노산 서열에 대해 최대 5개의 아미노산 변이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 CDRH2; 서열식별번호: 3에 제시된 아미노산 서열에 대해 최대 1개의 아미노산 변이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 CDRH3; 서열식별번호: 4에 제시된 아미노산 서열에 대해 최대 3개의 아미노산 변이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 CDRL1; 서열식별번호: 5에 제시된 아미노산 서열에 대해 최대 1개의 아미노산 변이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 CDRL2; 및/또는 서열식별번호: 6에 제시된 아미노산 서열에 대해 최대 3개의 아미노산 변이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 CDRL3을 포함한다.
- [0082] 한 실시양태에서, 항-PD-1 항체는 서열식별번호: 7에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 ("VH")을 포함한다. 한 실시양태에서, VH는 서열식별번호: 7에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 1개의 아미노산 변이, 예컨대 서열식별번호: 7에 제시된 아미노산 서열에 대해 1 내지 5개, 예컨대 1 내지 3개, 특히 최대 2개의 아미노산 변이를 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0083] 한 실시양태에서, 항-PD-1 항체는 서열식별번호: 8에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 ("VL")을 포함한다. 한 실시양태에서, VL은 서열식별번호: 8에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 1개의 아미노산 변이, 예컨대 서열식별번호: 8에 제시된 아미노산 서열에 대해 1 내지 5개, 예컨대 1 내지 3개, 특히 최대 2개의 아미노산 변이를 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0084] 한 실시양태에서, 항-PD-1 항체는 서열식별번호: 7에 제시된 아미노산 서열을 갖는 VH; 및 서열식별번호: 8에 제시된 아미노산 서열을 갖는 VL을 포함한다.
- [0085] 한 실시양태에서, 항-PD-1 항체는 서열식별번호: 7에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH; 및 서열식별

번호: 8에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함한다.

[0086] 한 실시양태에서, 항-PD-1 항체는 서열식별번호: 9에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 서열 ("HC")을 포함한다. 한 실시양태에서, HC는 서열식별번호: 9에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 1개의 아미노산 변이, 예컨대 서열식별번호: 9에 제시된 아미노산 서열에 대해 1 내지 10개, 예컨대 1 내지 7개, 특히 최대 6개의 아미노산 변이를 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 추가 실시양태에서, HC는 서열식별번호: 9에 제시된 아미노산 서열에 대해 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7개의 아미노산 변이를 포함한다.

[0087] 한 실시양태에서, 항-PD-1 항체는 서열식별번호: 10에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 영역 ("LC")을 포함한다. 한 실시양태에서, LC는 서열식별번호: 10에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 1개의 아미노산 변이, 예컨대 서열식별번호: 10에 제시된 아미노산 서열에 대해 1 내지 10개, 예컨대 1 내지 5개, 특히 최대 3개의 아미노산 변이를 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 추가 실시양태에서, LC는 서열식별번호: 10에 제시된 아미노산 서열에 대해 1, 2 또는 3개의 아미노산 변이를 포함한다.

[0088] 한 실시양태에서, 항-PD-1 항체는 서열식별번호: 9에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 HC; 및 서열식별번호: 10에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 LC를 포함한다. 따라서, 항체는 서열식별번호: 9의 중쇄 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일한 중쇄 및/또는 서열식별번호: 10의 경쇄 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일한 경쇄를 갖는 항체이다.

[0089] 한 실시양태에서, 항체는 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 항체는 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 포함하는 도스탈리맵이다.

[0090] 번역후 변형 생성물

[0091] 통상의 기술자는 항체의 생산 시, 번역후 변형 생성물을 생산하는 번역후 변형이 발생할 수 있다는 것을 인지할 것이다. 본원에 기재된 항체의 "번역후 변형 변이체"는 조성물의 전부 또는 일부가 "번역후 변형"을 포함하는 항체 조성물이다. 번역후 변형은 숙주 세포에서의 항체의 생산, 상류 및/또는 하류 제조 공정, 및/또는 저장 길이 및 저장 조건 (예를 들어, 광, 온도, pH, 물에 대한 노출 또는 부형제와의 반응에 의한 효과 및/또는 즉시 용기 폐쇄 시스템)으로부터 초래될 수 있는 항체에 대한 화학 변화이다. 따라서, 본 발명의 조성물은 본 발명의 항체의 제조 또는 저장으로부터 형성될 수 있다. 예시적인 번역후 변형은 항체 서열 변화 (상기 기재된 바와 같은 "항체 변이체"), 특정 리더 서열의 절단, 비-효소적 글리코실화 또는 당화를 포함한 다양한 글리코실화 패턴으로의 다양한 당 모이어티의 부가; 탈아미드화; 산화; 디설피드 결합 스크램블링 및 다른 시스템 변이체, 예컨대 유리 술폰히드릴, 라세미화 디설피드, 티오에테르 및 트리설피드 결합; 이성질체화; C-말단 리신 절단 또는 클리핑; 및/또는 N-말단 글루타민 고리화를 포함한다.

[0092] 한 예에서, 번역후 변형 생성물은 감소된 기능 및/또는 활성을 발생시키는 화학 변화를 포함하는 "생성물 관련 불순물"을 포함한다. 또 다른 예에서, 번역후 변형 생성물은 감소된 기능 및/또는 활성을 발생시키지 않는 화학 변화를 포함하는 "생성물 관련 물질"을 포함한다. 본원에 기재된 항-PD-1 항체에 대한 생성물 관련 불순물은 산화된 변이체 및 응집된 변이체를 포함한다. 본원에 기재된 항-PD-1 항체에 대한 생성물 관련 물질은 탈아미드화된 변이체, 이성질체화된 변이체, C-말단 절단된 변이체 및 N-말단 피로-글루타메이트 변이체를 포함한다.

[0093] 한 실시양태에서, 항-PD-1 항체는 그의 모든 기능적 번역후 변형을 포함하는, 서열식별번호: 9에 제시된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열식별번호: 10에 제시된 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 도스탈리맵이다.

[0094] 본원에 제공된 퍼센트 변이체는 조성물 (예를 들어 항체의 "집단") 중 항체의 총량의 백분율로서 표현된다. 예를 들어, 65% 이하의 산화된 변이체는 조성물 중 총 항체가 100%인 맥락에서, 그 중 65% 이하가 산화된 것이고; 산화될 수 있거나 또는 산화되지 않을 수 있는, 조성물 중에 존재하는 임의의 다른 비-항체 물질은 포함하지 않는다.

[0095] 항체 변이체는 항체의 조성이 전하 기반-분리 기술, 예컨대 등전 포커싱 (IEF) 겔 전기영동, 모세관 등전 포커싱 (cIEF) 겔 전기영동, 양이온 교환 크로마토그래피 (CEX) 및 음이온 교환 크로마토그래피 (AEX)에 의해 분석

되는 경우에 통상적으로 관찰된다.

- [0096] 번역후 변형은 항체의 알짜 전하의 증가 또는 감소를 발생시키고, pI 값의 감소 또는 증가를 유발하여, 주요 이소형과 관련하여 산성 변이체 및 염기성 변이체 (집합적으로 "하전된 변이체"로 불림)를 생성할 수 있다. "주요 이소형"은 크로마토그램 상에서 주요 피크로서 용리되는 항체 집단이다. 항체가 IEF 기반 방법을 사용하여 분석되는 경우, 산성 종은 보다 낮은 겔보기 pI를 갖는 변이체이고, 염기성 종은 보다 높은 겔보기 pI를 갖는 변이체이다. 크로마토그래피-기반 방법에 의해 분석되는 경우, 산성 종 및 염기성 종은 주요 피크 대비 그의 체류 시간에 기초하여 정의된다. 산성 종은 CEX로부터의 주요 피크보다 더 빨리 또는 AEX로부터의 주요 피크보다 더 늦게 용리되는 변이체인 한편, 염기성 종은 CEX로부터의 주요 피크보다 더 늦게 또는 AEX로부터의 주요 피크보다 더 빨리 용리되는 변이체이다. 이들 방법은 항체의 주요 이소형을 산성 이소형 (산성 변이체) 및 염기성 이소형 (염기성 변이체)으로부터 분리한다.
- [0097] 하전된 변이체는 다양한 방법, 예컨대 이온 교환 크로마토그래피, 예를 들어 WCX-10 HPLC (약양이온 교환 크로마토그래피) 또는 IEF (등전 포커싱)에 의해 검출될 수 있다. 퍼센트 하전된 변이체는 모세관 등전 포커싱 (cIEF)을 사용하여 결정될 수 있다. 모세관 등전 포커싱 (cIEF)을 사용하여 도스탈리맵 및 별개의 전하 변이체의 pI를 측정하였다 (도 1 참조). 방법은 총 면적 피크의 백분율로서 산성 및 염기성 종을 정량화하는데 사용될 수 있다. 용어 "종", "이소형", "형태" 및 "피크"는 주요 이소형 및 하전된 변이체 (산성 변이체 및 염기성 변이체)를 지칭하기 위해 상호교환가능하게 사용된다.
- [0098] 한 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 1의 CDRH1, 서열식별번호: 2의 CDRH2, 및 서열식별번호: 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 4의 CDRL1, 서열식별번호: 5의 CDRL2, 및 서열식별번호: 6의 CDRL3을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항-PD-1 항체의 산성 변이체를 포함하며; 여기서 조성물은 ≤ 100%의 산성 변이체를 포함한다.
- [0099] 한 실시양태에서, 조성물은 서열식별번호: 7의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일한 중쇄 가변 영역 및/또는 서열식별번호: 8의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일한 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-PD-1 항체의 산성 변이체를 포함하며; 여기서 조성물은 ≤ 100%의 산성 변이체를 포함한다.
- [0100] 또 다른 실시양태에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일한 중쇄 및/또는 서열식별번호: 10의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일한 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-PD-1 항체의 산성 변이체를 포함하며; 여기서 조성물은 ≤ 100%의 산성 변이체를 포함한다. 추가 실시양태에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 포함하는 항-PD-1 항체의 산성 변이체를 포함하며; 여기서 조성물은 ≤ 100%의 산성 변이체를 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 포함하는 도스탈리맵의 산성 변이체를 포함하며; 여기서 조성물은 ≤ 100%의 산성 변이체를 포함한다.
- [0101] 한 측면에서, 조성물은 ≤ 100%의 산성 변이체를 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 ≤ 95%, ≤ 90%, ≤ 80%, ≤ 70%, ≤ 60%, ≤ 50%, ≤ 40%, ≤ 35%, ≤ 30% 또는 ≤ 25%의 산성 변이체를 포함한다. 대안적으로, 조성물은 5-100%, 5-90%, 5-80%, 5-70%, 5-60%, 5-50%, 5-40%, 5-35%, 5-30% 또는 5-25%의 산성 변이체를 포함한다. 대안적으로, 조성물은 10-100%, 10-97%, 10-90%, 10-80%, 10-70%, 10-60%, 10-50%, 10-40%, 10-35%, 10-30% 또는 10-25%의 산성 변이체를 포함한다. 대안적으로, 조성물은 20-100%, 20-97%, 20-90%, 20-80%, 20-70%, 20-60%, 20-50%, 20-40%, 20-35%, 20-30% 또는 20-25%의 산성 변이체를 포함한다. 대안적으로, 조성물은 약 60%, 약 50%, 약 45%, 약 40%, 약 35%, 약 30%, 약 25%, 약 20% 또는 약 10%의 산성 변이체를 포함한다.
- [0102] 한 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 1의 CDRH1, 서열식별번호: 2의 CDRH2, 및 서열식별번호: 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 4의 CDRL1, 서열식별번호: 5의 CDRL2, 및 서열식별번호: 6의 CDRL3을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항-PD-1 항체의 염기성 변이체를 포함하며; 여기서 조성물은 ≤ 35%의 염기성 변이체를 포함한다.
- [0103] 한 실시양태에서, 조성물은 서열식별번호: 7의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일한 중쇄 가변 영역 및/또는 서열식별번호: 8의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일한 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-PD-1 항체의 염기성 변이체를 포함하며; 여기서 조성물은 ≤ 35%의 염기성 변이체를 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 참조 표준물 생물검정 효력 대비 적어도 60% 생물검정 효력을 갖는다.
- [0104] 또 다른 실시양태에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일한 중쇄 및/또는 서열식별번호: 10의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일한 경쇄를 포함하는 항-PD-1 항체의 염기성 변이체를 포함

하며; 여기서 조성물은 $\leq 35\%$ 의 염기성 변이체를 포함한다. 추가 실시양태에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 포함하는 항-PD-1 항체의 염기성 변이체를 포함하며; 여기서 조성물은 $\leq 35\%$ 의 염기성 변이체를 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 포함하는 도스탈리맵의 염기성 변이체를 포함하며; 여기서 조성물은 $\leq 35\%$ 의 염기성 변이체를 포함한다.

[0105] 한 측면에서, 조성물은 $\leq 35\%$ 의 염기성 변이체를 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 $\leq 30\%$, $\leq 25\%$, $\leq 20\%$, $\leq 15\%$, $\leq 10\%$, $\leq 8\%$, $\leq 7.5\%$, $\leq 7\%$, $\leq 6\%$ 또는 $\leq 5\%$ 의 염기성 변이체를 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 0.1-35%, 0.1-30%, 0.1-25%, 0.1-20%, 0.1-15%, 0.1-10%, 0.1-8%, 0.1-7.5%, 0.1-7%, 0.1-6% 또는 0.1-5%의 염기성 변이체를 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 1-35%, 1-30%, 1-25%, 1-20%, 1-15%, 1-10%, 1-8%, 1-7.5%, 1-7%, 1-6% 또는 1-5%의 염기성 변이체를 포함한다. 대안적으로, 조성물은 약 35%, 약 30%, 약 25%, 약 20%, 약 15%, 약 10%, 약 7.5% 또는 약 5%의 염기성 변이체를 포함한다.

[0106] 한 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 1의 CDRH1, 서열식별번호: 2의 CDRH2, 및 서열식별번호: 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 4의 CDRL1, 서열식별번호: 5의 CDRL2, 및 서열식별번호: 6의 CDRL3을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항-PD-1 항체의 주요 이소형을 포함하며; 여기서 조성물은 $\geq 1\%$ 의 주요 이소형을 포함한다.

[0107] 한 실시양태에서, 조성물은 서열식별번호: 7의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일한 중쇄 가변 영역 및/또는 서열식별번호: 8의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일한 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-PD-1 항체의 주요 이소형을 포함하며; 여기서 조성물은 $\geq 1\%$ 의 주요 이소형을 포함한다.

[0108] 또 다른 실시양태에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일한 중쇄 및/또는 서열식별번호: 10의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일한 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-PD-1 항체의 주요 이소형을 포함하며; 여기서 조성물은 $\geq 1\%$ 의 주요 이소형을 포함한다. 추가 실시양태에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 포함하는 항-PD-1 항체의 주요 이소형을 포함하며; 여기서 조성물은 $\geq 1\%$ 의 주요 이소형을 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 포함하는 도스탈리맵의 주요 이소형을 포함하며; 여기서 조성물은 $\geq 1\%$ 의 주요 이소형을 포함한다.

[0109] 한 측면에서, 조성물은 $\geq 1\%$ 의 주요 이소형을 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 $\geq 2.6\%$, $\geq 3\%$, $\geq 5\%$, $\geq 10\%$, $\geq 20\%$, $\geq 30\%$, $\geq 40\%$, $\geq 50\%$, $\geq 55\%$, $\geq 60\%$, $\geq 65\%$, $\geq 70\%$, $\geq 75\%$, $\geq 80\%$ 또는 $\geq 90\%$ 의 주요 이소형을 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 2-90%, 2-80%, 2-75%, 5-90%, 10-90%, 20-90%, 30-90%, 40-90%, 50-90% 또는 60-90%의 주요 이소형을 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 5-80%, 10-80%, 20-80%, 30-80%, 40-80%, 50-80% 또는 60-80%의 주요 이소형을 포함한다. 대안적으로, 조성물은 약 80%, 약 75%, 약 70%, 약 65%, 약 60%, 약 50% 또는 약 55%의 주요 이소형을 포함한다.

[0110] 퍼센트 산성 변이체, 퍼센트 염기성 변이체 및 퍼센트 주요 이소형은 모세관 등전 포커싱 (cIEF)을 사용하여 결정될 수 있다. 이들 이소형/하전된 변이체 실시양태는 본원에 기재된 항체 변이체 중 어느 하나 또는 그의 조합과 조합될 수 있는 것으로 이해된다.

[0111] 한 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 1의 CDRH1, 서열식별번호: 2의 CDRH2, 및 서열식별번호: 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 4의 CDRL1, 서열식별번호: 5의 CDRL2, 및 서열식별번호: 6의 CDRL3을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항-PD-1 항체의 하전된 변이체를 포함하며; 여기서 조성물은 $\leq 100\%$ 의 산성 변이체; 및/또는 $\leq 35\%$ 의 염기성 변이체; 및/또는 $\geq 1\%$ 의 주요 이소형을 포함한다.

[0112] 또 다른 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 1의 CDRH1, 서열식별번호: 2의 CDRH2, 및 서열식별번호: 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 4의 CDRL1, 서열식별번호: 5의 CDRL2, 및 서열식별번호: 6의 CDRL3을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항-PD-1 항체의 하전된 변이체를 포함하며; 여기서 조성물은 10-97%의 산성 변이체; 및/또는 0.1-35%의 염기성 변이체; 및/또는 2-80%의 주요 이소형을 포함한다.

[0113] 또 다른 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 1의 CDRH1, 서열식별번호: 2의 CDRH2, 및 서열식별번호: 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 4의 CDRL1, 서열식별번호: 5의 CDRL2, 및 서열식별번호: 6의 CDRL3을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항-PD-1 항체의 하전된 변이체를 포함하며; 여기서 조성물은 $\leq 35\%$ 의 산성 변이체; 및/또는 $\leq 5\%$ 의 염기성 변이체; 및/또는 $\geq 55\%$ 의 주요 이소형을 포함한다.

[0114] 또 다른 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 1의 CDRH1, 서열식별번호: 2의 CDRH2, 및 서열식별번호: 3의 CDRH3

을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 4의 CDRL1, 서열식별번호: 5의 CDRL2, 및 서열식별번호: 6의 CDRL3을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항-PD-1 항체의 하전된 변이체를 포함하며; 여기서 조성물은 10-30%의 산성 변이체; 및/또는 0.1-10%의 염기성 변이체; 및/또는 60-80%의 주요 이소형을 포함한다.

[0115] 한 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 7의 VH를 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 8의 VL을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항-PD-1 항체의 하전된 변이체를 포함하며; 여기서 조성물은 $\leq 100\%$ 의 산성 변이체; 및/또는 $\leq 35\%$ 의 염기성 변이체; 및/또는 $\geq 1\%$ 의 주요 이소형을 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 10-97%의 산성 변이체; 및/또는 0.1-35%의 염기성 변이체; 및/또는 2-80%의 주요 이소형을 포함한다. 대안적 실시양태에서, 조성물은 10-30%의 산성 변이체; 및/또는 0.1-10%의 염기성 변이체; 및/또는 60-80%의 주요 이소형을 포함한다. 추가 실시양태에서, 조성물은 $\leq 35\%$ 의 산성 변이체; 및/또는 $\leq 5\%$ 의 염기성 변이체; 및/또는 $\geq 55\%$ 의 주요 이소형을 포함한다. 한 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항-PD-1 항체의 하전된 변이체를 포함하며; 여기서 조성물은 $\leq 100\%$ 의 산성 변이체; 및/또는 $\leq 35\%$ 의 염기성 변이체; 및/또는 $\geq 1\%$ 의 주요 이소형을 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 10-97%의 산성 변이체; 및/또는 0.1-35%의 염기성 변이체; 및/또는 2-80%의 주요 이소형을 포함한다. 대안적 실시양태에서, 조성물은 10-30%의 산성 변이체; 및/또는 0.1-10%의 염기성 변이체; 및/또는 60-80%의 주요 이소형을 포함한다. 추가 실시양태에서, 조성물은 $\leq 35\%$ 의 산성 변이체; 및/또는 $\leq 5\%$ 의 염기성 변이체; 및/또는 $\geq 55\%$ 의 주요 이소형을 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 참조 표준물 생물검정 효력과 비교하여 적어도 60% 생물검정 효력을 갖는다.

[0116] 산화는 생산 및/또는 저장 동안 (즉, 산화 조건의 존재 하에) 일어날 수 있고, 반응성 산소 종에 의해 직접적으로 또는 산화성 스트레스의 2차 부산물과의 반응에 의해 간접적으로 유도되는 단백질의 공유 변형을 유발한다. 산화는 주로 메티오닌 잔기에서 발생할 수 있지만, 트립토판 및 유리 시스테인 잔기에서도 일어날 수 있다. 산화는 CDR, Fab (비-CDR) 영역, 또는 Fc 영역에서 일어날 수 있다.

[0117] 한 측면에서, 조성물은 본원에서 "산화된 변이체"로도 지칭되는 산화 변역후 변형 ("산화" 또는 "산화된 것")을 포함하는 항체를 포함한다. 변이체는 중쇄 서열 및/또는 경쇄 서열, 예컨대 중쇄 서열의 CDR 및/또는 경쇄 서열의 CDR 내에 산화된 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 산화된 변이체는 중쇄 또는 경쇄 중 하나 또는 둘 다의 쇄에 존재할 수 있다.

[0118] 한 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 1의 CDRH1, 서열식별번호: 2의 CDRH2, 및 서열식별번호: 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 4의 CDRL1, 서열식별번호: 5의 CDRL2, 및 서열식별번호: 6의 CDRL3을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항-PD-1 항체의 산화된 변이체를 포함하며; 여기서 조성물은 $\leq 65\%$ 의 산화된 변이체를 포함한다.

[0119] 한 측면에서, 조성물은

[0120] 서열식별번호: 1 (CDRH1), 서열식별번호: 2 (CDRH2), 및 서열식별번호: 3 (CDRH3)을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 4 (CDRL1), 서열식별번호: 5 (CDRL2) 및 서열식별번호: 6 (CDRL3)을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 갖는 항체, 및

[0121] 그의 산화된 변이체를 포함하는 항-PD-1 항체의 집단을 포함하며, 여기서 항체 집단의 $\leq 65\%$ 는 산화된 변이체로 구성된다.

[0122] 한 실시양태에서, 산화된 변이체는 중쇄 서열의 CDR 및/또는 경쇄 서열의 CDR 내의 메티오닌 및/또는 트립토판 잔기에서 산화를 포함한다. 한 실시양태에서, 산화된 변이체는 서열식별번호: 1-6 중 어느 하나의 메티오닌 및/또는 트립토판 잔기에서 산화를 포함한다. 추가 실시양태에서, 항체는 중쇄 서열의 CDR, 예컨대 CDRH1 및/또는 CDRH3 내의 메티오닌 잔기에서 산화를 포함한다. 추가 실시양태에서, 항체는 경쇄 서열의 CDR, 예컨대 CDRL2 내의 트립토판 잔기에서 산화를 포함한다. 일부 실시양태에서, 산화된 변이체는 CDRH1의 M34, CDRH3의 M103 및/또는 CDRL2의 W50에서의 산화 중 하나 또는 그의 조합을 포함한다.

[0123] CDR 내의 위치에 대한 언급 (예를 들어 M34, M103 또는 W50)은 전체 항체 서열에 관한 위치 번호 (순차적 넘버링)를 제공하는 것으로 이해될 것이다. 따라서, CDRH1의 M34는 서열식별번호: 1의 제4 잔기, 즉 밑줄친 바와 같은 SYDMS (서열식별번호: 1)를 지칭한다는 것이 이해될 것이다. 동등하게, CDRH3의 M103은 서열식별번호: 3의 제4 잔기, 즉 밑줄친 바와 같은 PYYAMDY (서열식별번호: 3)를 지칭하고, CDRL2의 W50은 서열식별번호: 5의 제1 잔기, 즉 밑줄친 바와 같은 WASTLHT (서열식별번호: 5)를 지칭한다.

[0124] 한 실시양태에서, 항체는 중쇄 서열의 Fc 영역 및/또는 경쇄 서열의 Fc 영역 내의 메티오닌 및/또는 트립토판

잔기에서 산화를 포함한다. 일부 실시양태에서, 산화된 변이체는 중쇄 서열의 Fc 영역의 M248, M354 및/또는 M424에서의 산화 중 하나 또는 그의 조합을 포함한다.

- [0125] 한 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 중쇄 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일하고/거나 서열식별번호: 10의 경쇄 서열과 적어도 약 90% 동일한 항체를 포함하고, 중쇄 서열에서 산화, 예를 들어 CDRH1의 아미노산 M34, CDRH3의 M103, Fc 영역의 M248, Fc 영역의 M354 및/또는 Fc 영역의 M424에서 산화를 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 중쇄 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일하고/거나 서열식별번호: 10의 경쇄 서열과 적어도 약 90% 동일한 항체를 포함하고, 경쇄 서열에서 산화, 예를 들어 CDRL2의 아미노산 W50에서 산화를 포함한다.
- [0126] 한 실시양태에서, 항체는 서열식별번호: 7의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일한 중쇄 가변 영역 및/또는 서열식별번호: 8의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일한 경쇄 가변 영역을 포함한다. 추가 실시양태에서, 항체는 서열식별번호: 9의 중쇄 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일하고/거나 서열식별번호: 10의 경쇄 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일하다. 추가 실시양태에서, 항체는 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 포함한다.
- [0127] 한 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 1의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH1, 서열식별번호: 2의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH2, 및 서열식별번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH3을 포함하는 중쇄 서열 및 서열식별번호: 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL1, 서열식별번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL2, 및 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL3을 포함하는 경쇄 서열을 갖는 항-PD-1 항체를 포함하며; 여기서 조성물은 $\leq 65\%$ 의 산화된 변이체를 포함한다.
- [0128] 한 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 7의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일한 중쇄 가변 영역 및/또는 서열식별번호: 8의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일한 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-PD-1 항체를 포함하며, 여기서 조성물은 $\leq 65\%$ 의 산화된 변이체를 포함한다. 추가 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 7의 중쇄 가변 영역 및/또는 서열식별번호: 8의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-PD-1 항체를 포함하며, 여기서 조성물은 $\leq 65\%$ 의 산화된 변이체를 포함한다.
- [0129] 한 측면에서, 조성물은
- [0130] 서열식별번호: 7에 제시된 바와 같은 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 8에 제시된 바와 같은 경쇄 가변 영역을 갖는 항체, 및
- [0131] 그의 산화된 변이체를 포함하는 항-PD-1 항체의 집단을 포함하며, 여기서 항체 집단의 $\leq 65\%$ 는 산화된 변이체로 구성된다.
- [0132] 한 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일한 중쇄 서열 및/또는 서열식별번호: 10의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일한 경쇄 서열을 포함하는 항-PD-1 항체를 포함하며, 여기서 조성물은 $\leq 65\%$ 의 산화된 변이체를 포함한다.
- [0133] 한 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 포함하는 항-PD-1 항체를 포함하며, 여기서 조성물은 $\leq 65\%$ 의 산화된 변이체를 포함한다.
- [0134] 한 실시양태에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 포함하는 도스탈리맵의 산화된 변이체를 포함하며; 여기서 조성물은 $\leq 65\%$ 의 산화된 변이체를 포함한다.
- [0135] 한 실시양태에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 포함하는 도스탈리맵의 산화된 변이체를 포함하며; 여기서 조성물은 0.1% 내지 65% 범위의 양의 산화된 변이체를 포함한다.
- [0136] 한 측면에서, 조성물은 (a) 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 갖는 항체, 및 (b) 서열식별번호: 9와 적어도 90% 동일한 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10과 적어도 90% 동일한 경쇄 서열을 갖는 항체를 포함하며, 여기서 조성물은 $\leq 65\%$ 의 산화된 변이체를 포함한다.
- [0137] 한 측면에서, 조성물은
- [0138] 서열식별번호: 9에 제시된 바와 같은 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 경쇄 아미노산 서열을 갖는 항체, 및
- [0139] 그의 산화된 변이체를 포함하는 항-PD-1 항체의 집단을 포함하며, 여기서 항체 집단의 $\leq 65\%$ 는 산화된 변이체로

구성된다.

- [0140] 한 측면에서, 조성물은 (a) 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 갖는 항체, 및 (b) 서열식별번호: 9와 적어도 90% 동일한 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10과 적어도 90% 동일한 경쇄 서열을 갖는 항체; 및 (c) (a) 및/또는 (b)의 항체의 산화된 변이체를 포함하며, 여기서 산화된 변이체는 경쇄의 W50에서 $\leq 34\%$ 의 산화, 중쇄의 M34에서 $\leq 21\%$ 의 산화, 및/또는 중쇄의 M103에서 $\leq 64\%$ 의 산화 중 어느 하나 또는 그의 조합으로부터 선택된다.
- [0141] 한 측면에서, 조성물은 $\leq 65\%$ 의 산화된 변이체를 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 $\leq 65\%$, $\leq 60\%$, $\leq 50\%$, $\leq 40\%$, $\leq 30\%$, $\leq 20\%$, $\leq 15\%$, $\leq 10\%$, $\leq 5\%$, $\leq 4\%$, 또는 $\leq 3\%$ 의 산화된 변이체를 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 0.01-65%, 0.01-60%, 0.01-50%, 0.01-40%, 0.01-30%, 0.01-20%, 0.01-15%, 0.01-10%, 0.01-5%, 0.01-4%, 또는 0.01-3%의 산화된 변이체를 포함한다. 대안적으로, 조성물은 0.05-65%, 0.05-60%, 0.05-50%, 0.05-40%, 0.05-30%, 0.05-20%, 0.05-15%, 0.05-10%, 0.05-5%, 0.05-4%, 또는 0.05-3%의 산화된 변이체를 포함한다. 대안적으로, 조성물은 0.5-65%, 0.5-60%, 0.5-50%, 0.5-40%, 0.5-30%, 0.5-20%, 0.5-15%, 0.5-10%, 0.5-5%, 0.5-4%, 또는 0.5-3%의 산화된 변이체를 포함한다. 대안적으로, 조성물은 1-65%, 1-60%, 1-50%, 1-40%, 1-30%, 1-20%, 1-15%, 1-10%, 1-5%, 1-4%, 1-3%, 2-4%, 또는 2-3%의 산화된 변이체를 포함한다. 대안적으로, 조성물은 약 10%, 약 5%, 약 4%, 약 3%, 약 2%, 또는 약 1%의 산화된 변이체를 포함한다. 이들 산화된 변이체 실시양태는 본원에 기재된 항체 변이체 중 어느 하나와 조합될 수 있는 것으로 이해될 것이다.
- [0142] 한 실시양태에서, 조성물은 CDRH1의 M34에서 $\leq 21\%$ 의 산화, CDRH3의 M103에서 $\leq 64\%$ 의 산화, 및/또는 CDRL2의 W50에서 $\leq 34\%$ 의 산화 중 하나 또는 그의 조합을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 조성물은 CDRH1의 M34에서 $\leq 16\%$ 의 산화, CDRH3의 M103에서 $\leq 47\%$ 의 산화, 및/또는 CDRL2의 W50에서 $\leq 25\%$ 의 산화 중 하나 또는 그의 조합을 포함한다.
- [0143] 한 측면에서, 조성물은 (a) 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 갖는 항체, 및 (b) 경쇄의 W50에서 $\leq 34\%$ 의 산화, 중쇄의 M34에서 $\leq 21\%$ 의 산화, 및/또는 중쇄의 M103에서 $\leq 64\%$ 의 산화 중 어느 하나 또는 그의 조합으로부터 선택된 항체의 산화된 변이체를 포함한다.
- [0144] 한 실시양태에서, 조성물은 경쇄 서열의 W50에서 $\leq 34\%$ 의 산화를 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 경쇄 서열의 W50에서 $\leq 34\%$, $\leq 30\%$, $\leq 25\%$, $\leq 20\%$, $\leq 15\%$, $\leq 10\%$, $\leq 7.5\%$, $\leq 5\%$, $\leq 4\%$, $\leq 3\%$, $\leq 2\%$, 또는 $\leq 1\%$ 의 산화를 포함한다. 대안적으로, 조성물은 경쇄 서열의 W50에서 0-34%, 0-30%, 0-25%, 0-20%, 0-15%, 0-10%, 0-7.5%, 0-5%, 0-4%, 0-3%, 0-2% 또는 0-1%의 산화를 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 경쇄 서열의 W50에서 0.01-34%, 0.01-30%, 0.01-25%, 0.01-20%, 0.01-15%, 0.01-10%, 0.01-7.5%, 0.01-5%, 0.01-4%, 0.01-3%, 0.01-2%, 또는 0.01-1%의 산화를 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 경쇄 서열의 W50에서 0.05-34%, 0.05-30%, 0.05-25%, 0.05-20%, 0.05-15%, 0.05-10%, 0.05-7.5%, 0.05-5%, 0.05-4%, 0.05-3%, 0.05-2%, 또는 0.05-1%의 산화를 포함한다. 대안적으로, 조성물은 경쇄 서열의 W50에서 0.5-34%, 0.5-30%, 0.5-25%, 0.5-20%, 0.5-15%, 0.5-10%, 0.5-7.5%, 0.5-5%, 0.5-4%, 또는 0.5-3%, 0.5-2% 또는 0.5-1%의 산화를 포함한다. 대안적으로, 조성물은 경쇄 서열의 W50에서 0.1% 이상 및 34% 이하의 산화를 포함한다. 대안적으로, 조성물은 경쇄 서열의 W50에서 약 10%, 약 5%, 약 4%, 약 3%, 약 2%, 또는 약 1%의 산화를 포함한다. 본원에 제시된 데이터에 의해 나타난 바와 같이, W50에서 최대 4.8%의 산화를 생성하는 광분해 강제 분해는 생물검정에서 90% 효력을 제공하고 (즉, 검정 가변성 내 - 전체 기능), W50에서 최대 38.9%의 산화를 생성하는 2,2'-아조비스(2-아미디노프 로판) 디히드로클로라이드 (AAPH) 강제 분해는 44% 효력 (생물검정)을 유도한다. LC Trp 50에서의 산화에 대한 AAPH 강제 분해 데이터로부터 외삽하면, 최대 34%의 산화는 적어도 60% 효력을 발생시킬 수 있고, 최대 25%의 산화는 적어도 70% 효력을 발생시킬 수 있다. 이는 $<1\%$ (대조군), $<1\%$ (T0), 38.9% (1일), 74.3% (3일) 및 86.8% (5일) AAPH 산화 샘플에 대한 선형 기울기를 사용하여 계산되며, 이들은 각각 98%, 102%, 44%, 14% 및 5% 효력 (생물검정)을 갖는다.
- [0145] 한 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 갖는 항체를 포함하며, 여기서 조성물은 경쇄 서열의 W50에서 $\leq 34\%$ 의 산화를 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 포함하는 도스탈리맵의 산화된 변이체를 포함하며; 여기서 조성물은 경쇄 서열의 W50에서 $\leq 34\%$ 의 산화를 포함한다.
- [0146] 한 실시양태에서, 조성물은 중쇄 서열의 M34에서 $\leq 21\%$ 의 산화를 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 중쇄 서열의 M34에서 $\leq 21\%$, $\leq 20\%$, $\leq 16\%$, $\leq 15\%$, $\leq 12.5\%$, $\leq 10\%$, $\leq 7.5\%$, $\leq 5\%$, $\leq 4\%$, $\leq 3\%$, $\leq 2\%$, 또는 $\leq 1\%$ 의 산화를 포함한다. 대안적으로, 조성물은 중쇄 서열의 M34에서 0-21%, 0-20%, 0-16%, 0-15%, 0-12.5%, 0-10%,

0-7.5%, 0-5%, 0-4%, 0-3%, 0-2% 또는 0-1%의 산화를 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 중쇄 서열의 M34에서 0.01-21%, 0.01-20%, 0.01-16%, 0.01-15%, 0.01-12.5%, 0.01-10%, 0.01-7.5%, 0.01-5%, 0.01-4%, 0.01-3%, 0.01-2%, 또는 0.01-1%의 산화를 포함한다. 대안적으로, 조성물은 중쇄 서열의 M34에서 0.5-21%, 0.5-20%, 0.5-16%, 0.5-15%, 0.5-12.5%, 0.5-10%, 0.5-7.5%, 0.5-5%, 0.5-4%, 0.5-3%, 0.5-2% 또는 0.5-1%의 산화를 포함한다. 대안적으로, 조성물은 중쇄 서열의 M34에서 0.1% 이상 및 21% 이하의 산화를 포함한다. 대안적으로, 조성물은 중쇄 서열의 M34에서 약 10%, 약 5%, 약 4%, 약 3%, 약 2%, 또는 약 1%의 산화를 포함한다. 본원에 제시된 데이터에 의해 나타난 바와 같이, M34에서 최대 28.8%의 산화를 생성하는 H₂O₂ 강제 분해는 생물검정에서 47% 효력을 제공한다. HC Met 34에서의 산화에 대한 H₂O₂ 강제 분해 데이터로부터 외삽하면, 최대 21%의 산화는 적어도 60% 효력을 발생시킬 수 있고, 최대 16%의 산화는 적어도 70% 효력을 발생시킬 수 있다. 이는 <1% (대조군), <1% (T0) 및 28.8% (H₂O₂, 2주) H₂O₂ 산화 샘플에 대한 선형 기울기를 사용하여 계산되며, 이들은 각각 98%, 94% 및 47% 효력 (생물검정)을 갖는다. 한 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 갖는 항체를 포함하며, 여기서 조성물은 중쇄 서열의 M34에서 ≤21%의 산화를 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 포함하는 도스탈리탐의 산화된 변이체를 포함하며; 여기서 조성물은 중쇄 서열의 M34에서 ≤21%의 산화를 포함한다.

[0147] 한 실시양태에서, 조성물은 중쇄 서열의 M103에서 ≤64%의 산화를 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 중쇄 서열의 M103에서 ≤64%, ≤60%, ≤50%, ≤47%, ≤40%, ≤30%, ≤20%, ≤15%, ≤10%, ≤5%, ≤2%, 또는 ≤1%의 산화를 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 중쇄 서열의 M103에서 0-64%, 0-60%, 0-50%, 0-47%, 0-40%, 0-30%, 0-20%, 0-15%, 0-10%, 0-5%, 0-4%, 0-3%, 0-2%, 또는 0-1%의 산화를 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 중쇄 서열의 M103에서 0.01-64%, 0.01-60%, 0.01-50%, 0.01-47%, 0.01-40%, 0.01-30%, 0.01-20%, 0.01-15%, 0.01-10%, 0.01-5%, 0.01-4%, 0.01-3%, 0.01-2%, 또는 0.01-1%의 산화를 포함한다. 대안적으로, 조성물은 중쇄 서열의 M103에서 0.5-64%, 0.5-60%, 0.5-50%, 0.5-47%, 0.5-40%, 0.5-30%, 0.5-20%, 0.5-15%, 0.5-10%, 0.5-5%, 0.5-4%, 0.5-3%, 0.5-2% 또는 0.5-1%의 산화를 포함한다. 대안적으로, 조성물은 중쇄 서열의 M103에서 0.1% 이상 64% 이하의 산화를 포함한다. 대안적으로, 조성물은 중쇄 서열의 M103에서 약 10%, 약 5%, 약 4%, 약 3%, 약 2%, 또는 약 1%의 산화를 포함한다. 본원에 제시된 데이터에 의해 나타난 바와 같이, M103에서 최대 86.1%의 산화를 생성하는 H₂O₂ 강제 분해는 생물검정에서 47% 효력을 제공한다. HC Met 103에서의 산화에 대한 H₂O₂ 강제 분해 데이터로부터 외삽하면, 최대 64%의 산화는 적어도 60% 효력을 발생시킬 수 있고, 최대 47%의 산화는 적어도 70% 효력을 발생시킬 수 있다. 이는 <1% (대조군), 1.2% (T0) 및 86.1% (H₂O₂, 2주) H₂O₂ 산화 샘플에 대한 선형 기울기를 사용하여 계산되며, 이들은 각각 98%, 94% 및 47% 효력 (생물검정)을 갖는다.

[0148] 한 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 갖는 항체를 포함하며, 여기서 조성물은 중쇄 서열의 M103에서 ≤64%의 산화를 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 포함하는 도스탈리탐의 산화된 변이체를 포함하며; 여기서 조성물은 중쇄 서열의 M103에서 ≤64%의 산화를 포함한다.

[0149] 한 실시양태에서, 조성물은 중쇄 서열의 M248에서 ≤65%의 산화를 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 중쇄 서열의 M248에서 ≤65%, ≤60%, ≤50%, ≤45%, ≤40%, ≤35%, ≤30%, ≤20%, ≤15%, ≤10%, ≤5%, ≤4%, 또는 ≤3%의 산화를 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 중쇄 서열의 M248에서 0.01-65%, 0.01-60%, 0.01-50%, 0.01-40%, 0.01-30%, 0.01-20%, 0.01-15%, 0.01-10%, 0.01-5%, 0.01-4%, 0.01-3%, 0.01-2% 또는 0.01-1%의 산화를 포함한다. 대안적으로, 조성물은 중쇄 서열의 M248에서 0.5-65%, 0.5-60%, 0.5-50%, 0.5-40%, 0.5-30%, 0.5-20%, 0.5-15%, 0.5-10%, 0.5-5%, 0.5-4%, 또는 0.5-3%의 산화를 포함한다. 대안적으로, 조성물은 중쇄 서열의 M248에서 1-65%, 1-60%, 1-50%, 1-40%, 1-30%, 1-20%, 1-15%, 1-10%, 1-5%, 1-4%, 1-3%, 2-4%, 또는 2-3%의 산화를 포함한다. 대안적으로, 조성물은 중쇄 서열의 M248에서 1% 이상 및 65% 이하의 산화를 포함한다. 대안적으로, 조성물은 중쇄 서열의 M248에서 약 10%, 약 5%, 약 4%, 약 3%, 약 2%, 또는 약 1%의 산화를 포함한다. 본원에 제시된 데이터에 의해 나타난 바와 같이, M248에서 최대 47.1%의 산화를 생성하는 H₂O₂ 강제 분해는 생물검정에서 94% 효력을 제공하고 (즉, 검정 가변성 내 - 전체 기능), M248에서 최대 33.4%의 산화를 생성하는 광분해 강제 분해는 생물검정에서 90% 효력을 제공한다 (즉, 검정 가변성 내 - 전체 기능). 따라서, M248에서의 산화는 상대 효력 또는 FcRn 결합에 대한 어떠한 영향 없이 47.1%를 초과할 수 있는 것으로 예상된다.

[0150] 한 실시양태에서, 조성물은 중쇄 서열의 M354에서 ≤65%의 산화를 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 중쇄

서열의 M354에서 $\leq 65\%$, $\leq 60\%$, $\leq 50\%$, $\leq 40\%$, $\leq 30\%$, $\leq 20\%$, $\leq 15\%$, $\leq 10\%$, $\leq 5\%$, $\leq 2\%$, 또는 $\leq 1\%$ 의 산화를 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 중쇄 서열의 M354에서 0.01-65%, 0.01-60%, 0.01-50%, 0.01-40%, 0.01-30%, 0.01-20%, 0.01-15%, 0.01-10%, 0.01-5%, 0.01-4%, 0.01-3%, 0.01-2% 또는 0.01-1%의 산화를 포함한다. 대안적으로, 조성물은 중쇄 서열의 M354에서 0.5-65%, 0.5-60%, 0.5-50%, 0.5-40%, 0.5-30%, 0.5-20%, 0.5-15%, 0.5-10%, 0.5-5%, 0.5-4%, 또는 0.5-3%의 산화를 포함한다. 대안적으로, 조성물은 중쇄 서열의 M354에서 0.1% 이상 및 65% 이하의 산화를 포함한다. 대안적으로, 조성물은 중쇄 서열의 M354에서 약 10%, 약 5%, 약 4%, 약 3%, 약 2%, 또는 약 1%의 산화를 포함한다. 본원에 제시된 데이터에 의해 나타난 바와 같이, M354에서 최대 16.7%의 산화를 생성하는 H_2O_2 강제 분해는 생물검정에서 94% 효력을 제공하고 (즉, 검정 가변성 내 - 전체 기능), M354에서 최대 10.9%의 산화를 생성하는 광분해 강제 분해는 생물검정에서 90% 효력을 제공한다 (즉, 검정 가변성 내 - 전체 기능). 따라서, M354에서의 산화는 상대 효력 또는 FcRn 결합에 대한 어떠한 영향 없이 16.7%를 초과할 수 있는 것으로 예상된다.

[0151] 한 실시양태에서, 조성물은 중쇄 서열의 M424에서 $\leq 65\%$ 의 산화를 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 중쇄 서열의 M424에서 $\leq 65\%$, $\leq 60\%$, $\leq 50\%$, $\leq 40\%$, $\leq 30\%$, $\leq 20\%$, $\leq 15\%$, $\leq 10\%$, $\leq 5\%$, $\leq 2\%$, 또는 $\leq 1\%$ 의 산화를 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 중쇄 서열의 M424에서 0.01-65%, 0.01-60%, 0.01-50%, 0.01-40%, 0.01-30%, 0.01-20%, 0.01-15%, 0.01-10%, 0.01-5%, 0.01-4%, 0.01-3%, 0.01-2% 또는 0.01-1%의 산화를 포함한다. 대안적으로, 조성물은 중쇄 서열의 M424에서 0-65%, 0-60%, 0-50%, 0-40%, 0-30%, 0-20%, 0-15%, 0-10%, 0-5%, 0-4%, 또는 0-3% 산화를 포함한다. 대안적으로, 조성물은 중쇄 서열의 M424에서 0.1% 이상 및 65% 이하의 산화를 포함한다. 대안적으로, 조성물은 중쇄 서열의 M424에서 약 10%, 약 5%, 약 4%, 약 3%, 약 2%, 또는 약 1%의 산화를 포함한다. 본원에 제시된 데이터에 의해 나타난 바와 같이, M424에서 최대 29.0%의 산화를 생성하는 H_2O_2 강제 분해는 생물검정에서 94% 효력을 제공하고 (즉, 검정 가변성 내 - 전체 기능), M424에서 최대 27.0%의 산화를 생성하는 광분해 강제 분해는 생물검정에서 90% 효력을 제공한다 (즉, 검정 가변성 내 - 전체 기능). 따라서, M424에서의 산화는 상대 효력 또는 FcRn 결합에 대한 어떠한 영향 없이 29.0%를 초과할 수 있는 것으로 예상된다.

[0152] 한 실시양태에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 포함하는 도스탈 리맵의 산화된 변이체를 포함하며; 여기서 조성물은 중쇄 서열의 M248 및/또는 M354 및/또는 M424에서 $\leq 65\%$ 의 산화를 포함한다.

[0153] 한 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 1의 CDRH1, 서열식별번호: 2의 CDRH2, 및 서열식별번호: 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 4의 CDRL1, 서열식별번호: 5의 CDRL2, 및 서열식별번호: 6의 CDRL3을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항-PD-1 항체를 포함하며; 여기서 조성물은 $\leq 100\%$ 의 산성 변이체; 및/또는 $\leq 35\%$ 의 염기성 변이체; 및/또는 $\geq 1\%$ 의 주요 이소형; 및/또는 $\leq 65\%$ 의 산화된 변이체를 포함한다.

[0154] 또 다른 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 1의 CDRH1, 서열식별번호: 2의 CDRH2, 및 서열식별번호: 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 4의 CDRL1, 서열식별번호: 5의 CDRL2, 및 서열식별번호: 6의 CDRL3을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항-PD-1 항체를 포함하며; 여기서 조성물은 5-60%의 산성 변이체; 및/또는 0.1-35%의 염기성 변이체; 및/또는 20-90%의 주요 이소형; 및/또는 $\leq 65\%$ 의 산화된 변이체를 포함한다.

[0155] 한 예에서, 산화는 트립신 펩티드 맵핑 탠덤 질량 분광측정법 (펩티드 맵핑 LC-MS/MS)을 사용하여 결정될 수 있다. 한 예에서, 본원에 기재된 조성물을 포함하는 샘플은 구아니딘 히드로클로라이드로 변성되고, 디티오프로이톨 (DTT)로 환원되고, 아이오도아세트아미드로 알킬화되고, 엔도프로테이나제 Lys-C (Lys-C) 또는 트립신으로 소화될 수 있다. Lys-C 또는 트립신으로의 효소적 소화는 37°C에서 4시간 동안 달성될 수 있다. 샘플 소화는 액체 크로마토그래피와 탠덤 질량 분광측정법 (LC-MS/MS) 분석 전에 트리플루오로아세트산으로 켄칭될 수 있다. LC-MS/MS 분석 시스템은 C18 칼럼을 갖는 역상 초고성능 액체 크로마토그래피 (UHPLC), 214 nm에서의 UV 검출, 및 전기분무 이온화 질량 분광측정법 (ESI-MS)을 사용할 수 있다. 이어서, 펩티드를 UV 검출기 및 질량 분광계 (예를 들어 써모 사이언티픽 LTQ 오비트랩 XL)로 검출할 수 있다. 비변형된 펩티드 및 변형된 펩티드의 추출된 이온 크로마토그램을 사용하여, 변형된 펩티드의 곡선하 면적을 변형된 펩티드 및 비변형된 펩티드 둘 다에 대한 곡선하 총 면적으로 나누어 산화 수준을 계산한다.

[0156] 한 측면에서, 조성물은 본원에서 또한 "응집된 변이체"로도 지칭되는 응집된 항체 (고분자량 (HMW) 중)인 항체를 포함한다. 응집된 항체는 이량체, 또는 항체 단량체 및 그의 서브유닛으로 형성된 보다 고차의 구조를 포함

할 수 있다. 따라서, 고분자량 (HMW) 중은 이량체화된 항체, 및 추가의 서브유닛을 갖는 단량체 (예컨대 2개의 경쇄 서브유닛을 갖는 단량체, 또는 단량체에 비-공유 결합된 LC-LC 이량체)로 구성될 수 있다. 응집된 변이체는, 예를 들어 본원에 개시된 항체의 공유 또는 비-공유, 환원성 또는 비-환원성, 및 육안으로 보이는 또는 육안으로 보이지 않는 응집체일 수 있다. 응집된 변이체 또는 단편화된 변이체는 특징화될 수 있고, 그의 크기에 기초하여 항체와 구별될 수 있다. 예를 들어, 항체 조성물의 크기 분포는 크기 배제 크로마토그래피 (SEC), 예컨대 SE-HPLC를 사용하여 검출될 수 있다. 한 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 1의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH1, 서열식별번호: 2의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH2, 및 서열식별번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH3을 포함하는 중쇄 서열 및 서열식별번호: 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL1, 서열식별번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL2, 및 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL3을 포함하는 경쇄 서열을 갖는 항-PD-1 항체를 포함하며; 여기서 조성물은 $\leq 36\%$ 의 응집된 변이체를 포함한다. 이들 응집된 변이체 실시양태는 본원에 기재된 항체 변이체 중 임의의 것과 조합될 수 있는 것으로 이해될 것이다.

- [0157] 한 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 1의 CDRH1, 서열식별번호: 2의 CDRH2, 및 서열식별번호: 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 서열 및 서열식별번호: 4의 CDRL1, 서열식별번호: 5의 CDRL2, 및 서열식별번호: 6의 CDRL3을 포함하는 경쇄 서열을 포함하는 항-PD-1 항체의 응집된 변이체를 포함하며; 여기서 조성물은 $\leq 36\%$ 의 응집된 변이체를 포함한다.
- [0158] 한 측면에서, 조성물은
- [0159] 서열식별번호: 1 (CDRH1), 서열식별번호: 2 (CDRH2), 및 서열식별번호: 3 (CDRH3)을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 4 (CDRL1), 서열식별번호: 5 (CDRL2) 및 서열식별번호: 6 (CDRL3)을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 갖는 항체, 및
- [0160] 그의 응집된 변이체를 포함하는 항-PD-1 항체의 집단을 포함하며, 여기서 항체 집단의 $\leq 36\%$ 는 응집된 변이체로 구성된다.
- [0161] 한 실시양태에서, 항체는 서열식별번호: 7의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일한 중쇄 가변 영역 및/또는 서열식별번호: 8의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일한 경쇄 가변 영역을 포함한다. 추가 실시양태에서, 항체는 서열식별번호: 9의 중쇄 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일하고/거나 서열식별번호: 10의 경쇄 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일하다. 추가 실시양태에서, 항체는 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 포함한다.
- [0162] 한 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 7의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일한 중쇄 가변 영역 및/또는 서열식별번호: 8의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일한 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-PD-1 항체를 포함하며, 여기서 조성물은 $\leq 36\%$ 의 응집된 변이체를 포함한다. 추가 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 7의 중쇄 가변 영역 및/또는 서열식별번호: 8의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-PD-1 항체를 포함하며, 여기서 조성물은 $\leq 36\%$ 의 응집된 변이체를 포함한다.
- [0163] 한 측면에서, 조성물은
- [0164] 서열식별번호: 7에 제시된 바와 같은 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 8에 제시된 바와 같은 경쇄 가변 영역을 갖는 항체, 및
- [0165] 그의 응집된 변이체를 포함하는 항-PD-1 항체의 집단을 포함하며, 여기서 항체 집단의 $\leq 36\%$ 는 응집된 변이체로 구성된다.
- [0166] 한 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일한 중쇄 서열 및/또는 서열식별번호: 10의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일한 경쇄 서열을 포함하는 항-PD-1 항체를 포함하며, 여기서 조성물은 $\leq 36\%$ 의 응집된 변이체를 포함한다.
- [0167] 한 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 갖는 항체, 및 서열식별번호: 9의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일한 중쇄 서열 및/또는 서열식별번호: 10의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일한 경쇄 서열을 갖는 항체를 포함하며, 여기서 조성물은 $\leq 36\%$ 의 응집된 변이체를 포함한다.
- [0168] 한 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 포함하는 항-PD-1 항체를 포함하며, 여기서 조성물은 $\leq 36\%$ 의 응집된 변이체를 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 포함하는 도스탈리랍의 응집된 변이체를 포함하며; 여기서 조성물은 $\leq 36\%$ 의 응집된 변이체를 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 중

쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 포함하는 도스탈리맵의 응집된 변이체를 포함하며; 여기서 조성물은 0.01% 내지 36% 범위의 응집된 변이체를 포함한다.

- [0169] 한 측면에서, 조성물은
- [0170] 서열식별번호: 9에 제시된 바와 같은 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 경쇄 아미노산 서열을 갖는 항체, 및
- [0171] 그의 응집된 변이체를 포함하는 항-PD-1 항체의 집단을 포함하며, 여기서 항체 집단의 $\leq 36\%$ 는 응집된 변이체로 구성된다.
- [0172] 항체 조성물은 $\leq 36\%$ 의 응집된 변이체, 예컨대 $\leq 35\%$, $\leq 30\%$, $\leq 26\%$, $\leq 25\%$, $\leq 20\%$, $\leq 10\%$, $\leq 5\%$, $\leq 4\%$, $\leq 3\%$, $\leq 2\%$, 또는 $\leq 1\%$ 의 응집된 변이체를 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 조성물은 0.01-36%, 0.01-35%, 0.01-30%, 0.01-26%, 0.01-25%, 0.01-20%, 0.01-10%, 0.01-5%, 0.01-4%, 0.01-3%, 0.01-2%, 또는 0.01-1%의 응집된 변이체를 포함할 수 있다. 대안적으로, 조성물은 1% 초과 및 36% 미만의 응집된 변이체를 포함한다. 대안적으로, 조성물은 약 10%, 약 5%, 약 4%, 약 3%, 약 2%, 또는 약 1%의 응집된 변이체를 포함할 수 있다. 본원에 제시된 데이터에 의해 나타난 바와 같이, 응집된 항체를 포함하는 조성물의 최대 11.2%를 생성하는 열 강제 분해는 생물검정에서 86% 효력을 제공한다 (즉, 검정 가변성 내 - 전체 기능). 응집된 항체를 포함하는 조성물의 최대 15.2%를 생성하는 산 처리된 샘플은 생물검정에서 125% 효력 또는 MSD에서 88% 효력을 제공한다 (즉, 검정 가변성 내 - 전체 기능). 응집된 변이체에 대한 열 강제 분해 데이터로부터 외삽하면, 최대 36%는 적어도 60% 효력을 발생시킬 수 있고, 최대 26%는 적어도 70% 효력을 발생시킬 수 있다. 이는 0.9% (대조군), 1.4% (40°C, 3주) 및 11.2% (50°C, 3주) 응집된 변이체 열 처리된 샘플에 대한 선형 기울기를 사용하여 계산되며, 이들은 각각 98%, 94% 및 86% 효력 (생물검정)을 갖는다.
- [0173] 한 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 1의 CDRH1, 서열식별번호: 2의 CDRH2, 및 서열식별번호: 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 4의 CDRL1, 서열식별번호: 5의 CDRL2, 및 서열식별번호: 6의 CDRL3을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항-PD-1 항체를 포함하며; 여기서 조성물은 $\leq 100\%$ 의 산성 변이체; 및/또는 $\leq 35\%$ 의 염기성 변이체; 및/또는 $\geq 1\%$ 의 주요 이소형; 및/또는 $\leq 65\%$ 의 산화된 변이체; 및/또는 $\leq 36\%$ 의 응집된 변이체를 포함한다.
- [0174] 또 다른 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 1의 CDRH1, 서열식별번호: 2의 CDRH2, 및 서열식별번호: 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 4의 CDRL1, 서열식별번호: 5의 CDRL2, 및 서열식별번호: 6의 CDRL3을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항-PD-1 항체를 포함하며; 여기서 조성물은 5-60%의 산성 변이체; 및/또는 0.1-35%의 염기성 변이체; 및/또는 20-90%의 주요 이소형; 및/또는 $\leq 65\%$ 의 산화된 변이체; 및/또는 $\leq 36\%$ 의 응집된 변이체를 포함한다.
- [0175] 단편화된 변이체 ("단편 변이체")는 전장 항체의 일부를 포함하는 변이체이다. 예를 들어, 이러한 단편은 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편, 디아바디, 선형 항체, 단일-쇄 항체 분자 및 이뮤노글로불린 단일 가변 도메인을 포함한다. 항체 조성물은 $\leq 10\%$ 의 단편화된 항체, 예컨대 $\leq 5\%$, $\leq 4.6\%$, $\leq 4.5\%$, $\leq 4.4\%$, $\leq 4.3\%$, $\leq 4.2\%$, $\leq 4.1\%$, $\leq 4\%$, $\leq 3.5\%$, $\leq 3\%$, $\leq 2.5\%$, $\leq 2\%$, $\leq 1.5\%$, $\leq 1\%$, $\leq 0.5\%$ 또는 $\leq 0.05\%$ 의 단편화된 항체를 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 조성물은 0.01-10%, 0.01-5%, 0.01-4.6%, 0.01-4.5%, 0.01-4%, 0.01-3.5%, 0.01-3%, 0.01-2.5%, 0.01-2%, 0.01-1.5%, 0.01-1%, 0.01-0.5%, 0.01-0.1%, 또는 0.01-0.05%의 단편화된 항체를 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 조성물은 0.5-10%, 0.5-5%, 0.5-4.6%, 0.5-4.5%, 0.5-4%, 0.5-3.5%, 0.5-3%, 0.5-2.5%, 0.5-2%, 0.5-1.5%, 0.5-1%, 0.6-1.5%, 또는 0.6-1.0%의 단편화된 항체를 포함할 수 있다. 대안적으로, 조성물은 약 10%, 약 5%, 약 4%, 약 3%, 약 2%, 약 1%, 또는 약 0.5%의 단편화된 항체를 포함할 수 있다. 이들 단편화된 변이체 실시양태는 본원에 기재된 항체 변이체 중 어느 하나와 조합될 수 있는 것으로 이해될 것이다.
- [0176] 예를 들어 생산 및/또는 저장 동안 발생할 수 있는 탈아미드화는 효소적 반응 또는 화학적 반응일 수 있다. 탈아미드화는 쇠 내의 다음 아미노산의 아미드 질소가 아미드를 친핵성 공격하여 (N+1이 N을 공격함); 숙신이미드 중간체를 형성하는 분자내 고리화를 통한 단순한 화학 반응을 통해 발생할 수 있다. 탈아미드화는 주로 아스파라긴 (N)을 이소-아스파르트산 (이소-아스파르테이트) 및 아스파르트산 (아스파르테이트) (D)으로 대략 3:1 비로 전환시킬 수 있다. 따라서, 이러한 탈아미드화 반응은 아스파르테이트 (D)의 이소-아스파르테이트로의 이성질체화와 관련될 수 있다. 아스파라긴의 탈아미드화 및 아스파르테이트의 이성질체화는 둘 다 중간체 숙신이미드를 수반할 수 있다. 훨씬 더 적은 정도로, 탈아미드화는 글루타민 잔기를 사용하여 유사한 방식으로 발생할

수 있다. 탈아미드화는 CDR, Fab (비-CDR 영역), 또는 Fc 영역에서 발생할 수 있다. 이성질체화는 아스파르테이트 (D)의 이소-아스파르테이트로의 전환으로, 이는 중간체 숙신이미드 (숙신이미드-아스파르트산 잔기)를 수반한다.

- [0177] 한 측면에서, 조성물은 본원에서 "탈아미드화된 변이체"로도 지칭되는 탈아미드화 번역후 변형 ("탈아미드화" 또는 "탈아미드화된 것")을 포함하는 항체를 포함한다.
- [0178] 한 실시양태에서, 항체는 중쇄 서열의 CDR 및/또는 경쇄 서열의 CDR 내의 아스파라긴 잔기의 탈아미드화를 포함한다. 추가 실시양태에서, 항체는 중쇄 서열의 CDR 내의 아스파라긴 잔기의 탈아미드화를 포함한다. 한 실시양태에서, 항체는 중쇄 서열의 Fc 영역 및/또는 경쇄 서열의 Fc 영역 내의 아스파라긴 잔기의 탈아미드화를 포함한다. 탈아미드화된 변이체는 중쇄 또는 경쇄 중 하나 또는 둘 다의 쇠에 존재할 수 있다. 이들 탈아미드화된 변이체 실시양태는 본원에 기재된 항체 변이체 중 어느 하나와 조합될 수 있는 것으로 이해될 것이다. 일부 실시양태에서, 탈아미드화된 변이체는 중쇄 서열의 Fc 영역의 N380 및/또는 N385에서의 탈아미드화 중 하나 또는 그 조합을 포함한다.
- [0179] 한 실시양태에서, 탈아미드화된 변이체는 아스파르트산 잔기, 숙신이미드-아스파르트산 잔기, 또는 이소 아스파르트산 잔기로부터 선택된 탈아미드화된 잔기를 포함한다.
- [0180] 한 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 중쇄 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일한 서열을 포함하는 (및 임의로 서열식별번호: 10의 경쇄 서열과 적어도 약 90% 동일한 서열을 포함하는) 항체를 포함하고, 중쇄 서열에서 탈아미드화, 예를 들어 Fc 영역의 아미노산 잔기 N380 및/또는 N385에서 탈아미드화를 포함한다. 일부 실시양태에서, 탈아미드화된 변이체는 서열식별번호: 9의 N380 및/또는 N385에서 최대 100%의 탈아미드화를 포함한다.
- [0181] 탈아미드화는 아스파라긴 잔기 (N)가 아스파르트산 잔기 (D)로 전환되는 서열 변화를 발생시킬 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 탈아미드화된 변이체는 서열식별번호: 11의 중쇄 서열 (즉, N380D를 갖는 중쇄 서열)을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 탈아미드화된 변이체는 서열식별번호: 12의 중쇄 서열 (즉, N385D를 갖는 중쇄 서열)을 포함한다. 추가의 대안적 실시양태에서, 탈아미드화된 변이체는 서열식별번호: 13의 중쇄 서열 (즉, N380D 및 N385D를 갖는 중쇄 서열)을 포함한다.
- [0182] 조성물은 최대 100%의 탈아미드화된 변이체를 포함할 수 있다. 한 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 갖는 항체를 포함하며, 여기서 조성물은 최대 100%의 탈아미드화된 변이체를 포함한다.
- [0183] 한 실시양태에서, 조성물은 중쇄 서열의 N380 및/또는 N385에서 최대 100%의 탈아미드화를 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 N380에서 0-100%, 0-90%, 0-80%, 0-70%, 0-60%, 0-50%, 0-40%, 0-30%, 0-20%, 또는 0-10%의 탈아미드화를 포함한다. 대안적으로, 조성물은 N380에서 0.1-100%, 0.1-90%, 0.1-80%, 0.1-70%, 0.1-60%, 0.1-50%, 0.1-40%, 0.1-30%, 0.1-20%, 또는 0.1-10%의 탈아미드화를 포함한다. 대안적으로, 조성물은 N380에서 1-100%, 1-90%, 1-80%, 1-70%, 1-60%, 1-50%, 1-40%, 1-30%, 1-20%, 또는 1-10%의 탈아미드화를 포함한다. 대안적으로, 조성물은 N380에서 2-100%, 3-100%, 4-100%, 5-100%, 6-100%, 7-100%, 8-100%, 9-100%, 2-30%, 3-30%, 4-30%, 5-30%, 2-40%, 3-40%, 4-40%, 5-40%, 2-10%, 3-10%, 4-10%, 또는 5-9%의 탈아미드화를 포함한다. 대안적으로, 조성물은 N380에서 1% 이상, 2% 이상, 3% 이상, 4% 이상, 5% 이상, 6% 이상, 7% 이상, 8% 이상, 9% 이상, 또는 10% 이상의 탈아미드화를 포함한다. 본원에 제시된 데이터에 나타난 바와 같이, N380에서 최대 27.8%의 탈아미드화를 생성하는 염기 처리된 샘플은 생물검정에서 96% 효력을 제공하고 (즉, 검정 가변성 내 - 전체 기능), 따라서 N380에서의 탈아미드화는 상대 효력 또는 FcRn 결합에 대해 어떠한 영향도 미치지 않으면서 27.8%의 보고된 수준보다 더 높아질 수 있을 것으로 예상된다.
- [0184] 한 실시양태에서, 조성물은 N385에서 0-100%, 0-90%, 0-80%, 0-70%, 0-60%, 0-50%, 0-40%, 0-30%, 0-20%, 또는 0-10%의 탈아미드화를 포함한다. 대안적으로, 조성물은 N385에서 0.1-100%, 0.1-90%, 0.1-80%, 0.1-70%, 0.1-60%, 0.1-50%, 0.1-40%, 0.1-30%, 0.1-20%, 또는 0.1-10%의 탈아미드화를 포함한다. 대안적으로, 조성물은 N385에서 1-100%, 1-90%, 1-80%, 1-70%, 1-60%, 1-50%, 1-40%, 1-30%, 1-20%, 또는 1-10%의 탈아미드화를 포함한다. 대안적으로, 조성물은 N385에서 0.5% 이상, 1% 이상, 또는 2% 이상의 탈아미드화를 포함한다. 본원에 제시된 데이터에 나타난 바와 같이, N385에서 최대 27.2%의 탈아미드화를 생성하는 염기 처리된 샘플은 생물검정에서 96% 효력을 제공하고 (즉, 검정 가변성 내 - 전체 기능), 따라서 N385에서의 탈아미드화는 상대 효력 또는 FcRn 결합에 대해 어떠한 영향도 미치지 않으면서 27.2%의 보고된 수준보다 더 높아질 수 있을 것으로 예상된다.

- [0185] 한 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 갖는 항체를 포함하며, 여기서 조성물은 중쇄의 N380 및/또는 N385에서 최대 100%의 탈아미드화를 포함한다.
- [0186] 일부 실시양태에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 N84에서 약 0.5-2%, 약 0.5%, 약 1%, 약 1.5% 또는 약 2%의 탈아미드화를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 N137에서 약 0.5-2%, 약 0.5%, 약 1%, 약 1.5% 또는 약 2%의 탈아미드화를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 N311에서 약 5-8%, 약 5%, 약 6%, 약 7%, 또는 약 8%의 탈아미드화를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 N430에서 약 0.5-3%, 약 0.5%, 약 1%, 약 1.5%, 약 2%, 약 2.5% 또는 약 3%의 탈아미드화를 포함한다.
- [0187] 한 예에서, 탈아미드화는 상기 기재된 바와 같은 Lys-C 및/또는 트립신 펩티드 맵핑 탠덤 질량 분광측정법 (펩티드 맵핑 LC-MS/MS)을 사용하여 결정될 수 있다.
- [0188] 한 측면에서, 조성물은 본원에서 "이성질체화된 변이체"로도 지칭되는 이성질체화 번역후 변형 ("이성질체화" 또는 "이성질체화된 것")을 포함하는 항체를 포함한다. 변이체는 중쇄 서열 및/또는 경쇄 서열, 예컨대 중쇄 서열의 CDR 및/또는 경쇄 서열의 CDR 내에 이성질체화된 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 이성질체화된 변이체는 중쇄 및/또는 경쇄 중 하나 또는 둘 다의 쇄에 존재할 수 있다. 이성질체화 번역후 변형은 이소-아스파르트산 및/또는 숙신이미드-아스파르트산 잔기를 발생시킬 수 있다. 한 예에서, 아스파르트산 (Asp) 이성질체화는 상기 기재된 바와 같은 Lys-C 및/또는 트립신 펩티드 맵핑 탠덤 질량 분광측정법 (펩티드 맵핑 LC-MS/MS)을 사용하여 결정될 수 있다. 이들 이성질체화된 변이체 실시양태는 본원에 기재된 항체 변이체 중 어느 하나와 조합될 수 있는 것으로 이해될 것이다.
- [0189] 한 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 갖는 항체를 포함하며, 여기서 조성물은 최대 100%의 이성질체화된 변이체를 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 포함하는 도스탈리만의 이성질체화된 변이체를 포함하며; 여기서 조성물은 $\leq 100\%$ 의 이성질체화된 변이체를 포함한다.
- [0190] 일부 실시양태에서, 조성물은 이성질체화된 변이체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 최대 100%의 이성질체화된 변이체를 포함한다. 조성물은 0-100%, 0-90%, 0-80%, 0-70%, 0-60%, 0-50%, 0-40%, 0-30%, 0-15%, 0-20%, 또는 0-10%의 이성질체화된 변이체를 포함할 수 있다. 대안적으로, 조성물은 0.1-100%, 0.1-90%, 0.1-80%, 0.1-70%, 0.1-60%, 0.1-50%, 0.1-40%, 0.1-30%, 0.1-20%, 0.1-15% 또는 0.1-10%의 이성질체화된 변이체를 포함할 수 있다. 대안적으로, 조성물은 1-100%, 1-90%, 1-80%, 1-70%, 1-60%, 1-50%, 1-40%, 1-30%, 1-20%, 1-15% 또는 1-10%의 이성질체화된 변이체를 포함할 수 있다.
- [0191] 한 실시양태에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 D147에서 최대 100%의 이성질체화를 포함한다. 조성물은 중쇄 서열의 D147에서 0-100%, 0-90%, 0-80%, 0-70%, 0-60%, 0-50%, 0-40%, 0-30%, 0-20%, 0-15% 또는 0-10%의 이성질체화를 포함할 수 있다. 대안적으로, 조성물은 중쇄 서열의 D147에서 0.1-100%, 0.1-90%, 0.1-80%, 0.1-70%, 0.1-60%, 0.1-50%, 0.1-40%, 0.1-30%, 0.1-20%, 0-15% 또는 0.1-10%의 이성질체화를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물은 중쇄 서열의 D147에서 1% 이상의 이성질체화를 포함한다. 본원에 제시된 데이터에 나타난 바와 같이, D147에서 최대 20.8%의 이성질체화를 생성하는 염기 처리된 샘플은 생물검정에서 96% 효력을 제공하고 (즉, 검정 가변성 내 - 전체 기능), 따라서 D147에서의 이성질체화는 상대 효력 또는 FcRn 결합에 대해 어떠한 영향도 미치지 않으면서 20.8%의 보고된 수준보다 더 높아질 수 있을 것으로 예상된다.
- [0192] 한 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 갖는 항체를 포함하며, 여기서 조성물은 중쇄의 D147에서 최대 100%의 이성질체화를 포함한다.
- [0193] 일부 실시양태에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 D151, D167, D261, D266, D276, D395, D397 및/또는 409에서 0-15%, 0.1-15%, 1-15%, 1% 이상, 1.5% 이상, 또는 2% 이상의 이성질체화를 포함한다. 예를 들어, 조성물은 서열식별번호: 9의 D62에서 약 2.3%의 이성질체화를 포함한다. 예를 들어, 조성물은 서열식별번호: 9의 D261/266/276에서 약 13.1%의 이성질체화를 포함한다. 예를 들어, 조성물은 서열식별번호: 9의 D151/167에서 약 3.1%의 이성질체화를 포함한다. 예를 들어, 조성물은 서열식별번호: 9의 D395/397/409에서 약 2.7%의 이성질체화를 포함한다.
- [0194] 항체 조성물은 (i) 항체 (본원에 기재된 바와 같은 것, 예를 들어 서열식별번호: 9의 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항체); 및 (ii) 아미노산 서열 변이체 (예를 들어, 탈아미드화된 또는 C-말단 리신 클리핑된 변이체), 산화된 변이체, 이성질체화된 변이체, 응집된 변이체, 및/또는 단편

화된 변이체 중 하나 이상 또는 그의 조합을 포함하는 항체 변이체를 포함할 수 있다.

- [0195] 따라서, 한 측면에서, 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 갖는 항체를 포함하는 조성물이 제공되며, 여기서 조성물은 (i) $\leq 65\%$ 의 산화된 변이체; 및/또는 (ii) $\leq 36\%$ 의 응집된 변이체를 포함한다.
- [0196] 한 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 9, 서열식별번호: 11, 서열식별번호: 12 및/또는 서열식별번호: 13으로부터 선택된 서열 중 하나 또는 그의 조합을 갖는 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 포함하는 항체를 포함하며, 여기서 조성물은 $\leq 65\%$ 의 산화된 변이체를 포함한다.
- [0197] 한 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 9, 서열식별번호: 11, 서열식별번호: 12 및/또는 서열식별번호: 13으로부터 선택된 서열 중 하나 또는 그의 조합을 갖는 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 포함하는 항체를 포함하며, 여기서 조성물은 $\leq 36\%$ 의 응집된 변이체를 포함한다.
- [0198] 또 다른 실시양태에서 변이체를 포함하는 조성물은 100% 효력을 갖는 참조 표준물의 효력의 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%를 갖는다. 한 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 1의 CDRH1, 서열식별번호: 2의 CDRH2, 및 서열식별번호: 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 4의 CDRL1, 서열식별번호: 5의 CDRL2, 및 서열식별번호: 6의 CDRL3을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항-PD-1 항체의 변이체를 포함하며; 여기서 조성물은 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열, 10-97%의 산성 변이체, 0.1-35%의 염기성 변이체, 2-80%의 주요 이소형, 4.8% 이하의 LC W50 산화된 변이체, 1% 이하의 HC M34 산화된 변이체, 1.2% 이하의 HC M103 산화된 변이체, 15.2% 이하의 응집된 변이체, 16.7% 이하의 HC M354 산화된 변이체, 29.0% 이하의 HC M424 산화된 변이체, 47.1% 이하의 HC M248 산화된 변이체, 20.8% 이하의 HC D147 이성질체화된 변이체, 13.1% 이하의 HC D151 또는 D167 이성질체화된 변이체, 3.1% 이하의 HC D261, D266 또는 D276 이성질체화 변이체, 4.6% 이하의 단편화된 변이체, 27.8% 이하의 HC N380 탈아미드화된 변이체, 27.2% 이하의 HC N385 탈아미드화된 변이체, 약 7.4% 이하의 HC N311 탈아미드화된 변이체, 약 2.0% 이하의 N430 탈아미드화된 변이체, 90% 이상의 중쇄 (HC) C-말단 리신 결실된 변이체 ($\Delta K443$), 및 1% 이하의 HC N-말단 피로-글루타메이트 변이체를 포함하는 조성물의 효력의 적어도 60%를 갖는다. 효력은 본원에 기재된 바와 같은 생물검정을 사용하여 결정될 수 있다.
- [0199] 당화는 환원당, 예컨대 글루코스와 단백질의 유리 아민 기 사이의 비-효소적 화학 반응을 포함하는 번역후 변형이고, 전형적으로 리신 측쇄의 엡실론 아민에서 또는 단백질의 N-말단에서 관찰된다. 당화는 환원당의 존재 하에서의 생산 및/또는 저장 동안 발생할 수 있다.
- [0200] 디설피드 결합 스캐프olding은 생산 및/또는 저장 조건 동안 발생할 수 있다. 특정 상황 하에, 디설피드 결합은 파괴되거나 또는 부정확하게 형성되어, 쌍형성되지 않은 시스테인 잔기 (-SH)를 생성할 수 있다. 이들 유리 (쌍형성되지 않은) 설피드 (-SH)는 서플링을 촉진할 수 있다.
- [0201] 티오에테르의 형성 및 디설피드 결합의 라세미화는 염기성 조건 하에, 생산 또는 저장 시, 데히드로알라닌 및 퍼설피드 중간체를 통한 시스테인 잔기로의 디설피드 가교의 베타 제거를 통해 발생할 수 있다. 데히드로알라닌 및 시스테인의 후속 가교는 티오에테르 결합의 형성을 발생시킬 수 있거나, 또는 유리 시스테인 잔기는 D- 및 L-시스테인의 혼합물과 디설피드 결합을 재형성할 수 있다.
- [0202] 트리설피드는 디설피드 결합 내로의 황 원자의 삽입 (Cys-SS-S-Cys)으로부터 생성될 수 있고, 생산 세포 배양물 내의 황화수소의 존재로 인해 형성될 수 있다.
- [0203] 중쇄 및/또는 경쇄 내의 N-말단 글루타민 (Q, Gln) 및 글루타메이트 (글루탐산) (E, Glu)는 고리화를 통해 피로 글루타메이트 (pGlu)를 형성할 수 있다. pGlu 형성은 생산 생물반응기에서 형성될 수 있지만, 이는 또한 가공 및 저장 조건의 pH 및 온도에 따라, 예를 들어 비-효소적으로 형성될 수 있다. N-말단 Q 또는 E의 고리화는 천연 인간 항체에서 통상적으로 관찰된다.
- [0204] C-말단 리신 클리핑 (또한 C-말단 리신 절단으로도 지칭됨)은 카르복시펩티다제에 의해 촉매되는 효소적 반응이고, 재조합 및 천연 인간 항체에서 통상적으로 관찰된다. 이러한 과정의 변이체는 재조합 숙주 세포로부터의 세포 효소로 인한 하나 또는 둘 다의 중쇄로부터의 리신의 제거를 포함한다. 인간 대상체/환자에 대한 투여는 임의의 잔류 C-말단 리신의 제거를 발생시킬 가능성이 있다.
- [0205] 한 실시양태에서, 번역후 변형은 항체 변이체 (예를 들어 서열 변이체)이다. 예시적인 번역후 변형 항체 변이

체는 아스파라긴 (N, Asn)에서 아스파르트산 (D, Asp)으로의 스위치 ("탈아미드화"), N-말단 피로-글루타메이트, 및/또는 C-말단 리신 절단을 포함한다. 한 예에서, 항체 변이체, 예를 들어 중쇄 서열 내의 N380D 또는 N385D는 상기 기재된 바와 같은 Lys-C 및/또는 트립신 펩티드 맵핑 탠덤 질량 분광측정법 (펩티드 맵핑 LC-MS/MS)을 사용하여 결정될 수 있다. 비변형된 펩티드 및 변형된 펩티드의 추출된 이온 크로마토그램을 사용하여, 변형된 펩티드의 곡선하 면적을 변형된 펩티드 및 비변형된 펩티드 둘 다에 대한 곡선하 총 면적으로 나누어 항체 변이체, 예를 들어 N380D 또는 N385D의 수준을 계산한다.

[0206] 한 측면에서, 조성물은 중쇄 아미노산 서열에 N-말단 피로글루탐산 ("피로글루탐산") 전이후 변형 ("N-말단 피로-글루타메이트 변이체")을 포함하는 항체를 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 중쇄 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일한 서열을 포함하는 (및 임의로 서열식별번호: 10의 경쇄 서열과 적어도 약 90% 동일한 서열을 포함하는) 항체를 포함하고, 중쇄의 N-말단에서 피로글루탐산을 포함한다.

[0207] 한 실시양태에서, 조성물은 최대 100%의 중쇄 N-말단 피로-글루타메이트 변이체를 포함한다. 조성물은 0-100%, 0-90%, 0-80%, 0-70%, 0-60%, 0-50%, 0-40%, 0-30%, 0-20%, 또는 0-10%의 중쇄 N-말단 피로-글루타메이트 변이체를 포함할 수 있다. 대안적으로, 조성물은 0.1-100%, 0.1-90%, 0.1-80%, 0.1-70%, 0.1-60%, 0.1-50%, 0.1-40%, 0.1-30%, 0.1-20%, 또는 0.1-10%의 중쇄 N-말단 피로-글루타메이트 변이체를 포함할 수 있다. 대안적으로, 조성물은 1-100%, 1-90%, 1-80%, 1-70%, 1-60%, 1-50%, 1-40%, 1-30%, 1-20%, 또는 1-10%의 중쇄 N-말단 피로-글루타메이트 변이체를 포함할 수 있다. 대안적으로, 조성물은 $\leq 10\%$, $\leq 9\%$, $\leq 8\%$, $\leq 7\%$, $\leq 6\%$, $\leq 5\%$, $\leq 2\%$ 또는 $\leq 1\%$ 의 중쇄 N-말단 피로-글루타메이트 변이체를 포함할 수 있다.

[0208] 한 측면에서, 조성물은 중쇄 아미노산 서열에서 C-말단 리신 (K443)의 결실을 포함하는 항체를 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 중쇄 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일한 서열을 포함하는 (및 임의로 서열식별번호: 10의 경쇄 서열과 적어도 약 90% 동일한 서열을 포함하는) 항체를 포함하고, 중쇄의 C-말단에서 리신 잔기의 결실 (K443)을 포함한다.

[0209] 한 실시양태에서, 조성물은 최대 100%의 중쇄 C-말단 리신 절단된 변이체를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 조성물은 10% 이상의 중쇄 C-말단 리신 절단된 변이체를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 조성물은 $\geq 10\%$, $\geq 20\%$, $\geq 30\%$, $\geq 40\%$, $\geq 50\%$, $\geq 60\%$, $\geq 70\%$, $\geq 80\%$, $\geq 90\%$ 또는 $\geq 95\%$ 의 중쇄 C-말단 리신 절단된 변이체를 포함한다. 조성물은 1-100%, 10-100%, 20-100%, 30-100%, 40-100%, 50-100%, 60-100%, 70-100%, 80-100% 또는 90-100%의 중쇄 C-말단 리신 절단된 변이체를 포함할 수 있다. 대안적으로, 조성물은 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 95%, 약 95-99%, 약 96-99% 또는 약 97-99%의 중쇄 C-말단 리신 절단된 변이체를 포함할 수 있다.

[0210] 한 실시양태에서, 조성물은 최대 100%의 중쇄 N-말단 피로-글루타메이트 변이체 및 최대 100%의 중쇄 C-말단 리신 절단된 변이체를 포함한다.

[0211] 한 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 갖는 항체를 포함하며, 여기서 조성물은 최대 100%의 중쇄 N-말단 피로-글루타메이트 변이체 및/또는 최대 100%의 중쇄 C-말단 리신 절단된 변이체를 포함한다.

[0212] 한 예에서, N-말단 피로글루탐산 및 C-말단 리신 절단은 상기 기재된 바와 같은 Lys-C 및/또는 트립신 펩티드 맵핑 탠덤 질량 분광측정법 (펩티드 맵핑 LC-MS/MS)을 사용하여 결정될 수 있다.

[0213] 항-PD-1 항체에 대한 신생아 Fc 수용체 (FcRn)의 결합은 표면 플라즈몬 공명 (SPR)을 사용하여 측정될 수 있다. 항체는 니트릴로트리아세트산 (NTA) 센서 칩 상에 고정된 FcRn에 의해 포획될 수 있다. 샘플의 FcRn 결합 농도는 보정 곡선 상의 결합 반응의 내삽에 의해 결정될 수 있다. 특이적 결합 활성 (%)은 FcRn 결합 농도를 총 단백질 농도로 나눔으로써 계산된다.

[0214] 상기 기재된 항체 및 항체 변이체를 포함하는 항체 조성물은 특이적 항원 결합 및/또는 FcRn 결합 및/또는 효력을 보유한다. 예를 들어, 상기 기재된 항체 및 항체 변이체 및 번역후 변형 변이체를 포함하는 항체 조성물은 >0.70 PD-1 특이적 항원 결합; 및/또는 $>70\%$ FcRn 결합 및/또는 $>70\%$ 효력을 갖는다. 따라서, 변이체의 이들 수준 (%)은 기능에 유의하게 영향을 미치지 않으면서 (즉, 감소된 활성을 유발하지 않으면서) 항체 조성물에서 허용될 수 있다. 한 실시양태에서, "감소된 기능" 또는 "감소된 활성"은 PD-1에 대한 결합, 또는 FcRn에 대한 결합, 또는 효력이 참조 표준물과 비교하여 백분율로서 감소되고, 검정 변동성에 비해 유의함을 의미한다. 예를 들어, 감소된 기능 또는 활성 또는 효력은 $\geq 5\%$, $\geq 10\%$, $\geq 15\%$, $\geq 20\%$, $\geq 25\%$, $\geq 30\%$, $\geq 35\%$, $\geq 40\%$, $\geq 45\%$, 또는 $\geq 50\%$ 의 감소로서 기재될 수 있다.

- [0215] 예를 들어, 참조 표준물 (또는 참조 물질 또는 대조군 또는 비스트레스 대조군)은 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 포함하는 조성물이다. 한 측면에서, 참조 표준물은 10-97%의 산성 변이체, 및/또는 0.1-35%의 염기성 변이체, 및/또는 2-80%의 주요 이소형, 및/또는 4.8% 이하의 LC W50 산화된 변이체를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 참조 표준물은 1% 이하의 HC M34 산화된 변이체를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 참조 표준물은 1.2% 이하의 HC M103 산화된 변이체를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 참조 표준물은 10-97%의 산성 변이체, 및/또는 0.1-35%의 염기성 변이체, 및/또는 2-80%의 주요 이소형, 및/또는 4.8% 이하의 LC W50 산화된 변이체, 및/또는 1% 이하의 HC M34 산화된 변이체, 및/또는 1.2% 이하의 HC M103 산화된 변이체를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 참조 표준물은 15.2% 이하의 응집된 변이체를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 참조 표준물은 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열, 10-97%의 산성 변이체, 및/또는 0.1-35%의 염기성 변이체, 및/또는 2-80%의 주요 이소형, 및/또는 4.8% 이하의 LC W50 산화된 변이체, 및/또는 1% 이하의 HC M34 산화된 변이체, 및/또는 1.2% 이하의 HC M103 산화된 변이체, 및/또는 15.2% 이하의 응집된 변이체를 포함한다.
- [0216] 또 다른 실시양태에서, 참조 표준물은 16.7% 이하의 HC M354 산화된 변이체를 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 참조 표준물은 29.0% 이하의 M424 산화된 변이체를 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 참조 표준물은 47.1% 이하의 HC M248 산화된 변이체를 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 참조 표준물은 20.8% 이하의 HC D147 이성질체화된 변이체를 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 참조 표준물은 13.1% 이하의 HC D151 또는 D167 이성질체화된 변이체를 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 참조 표준물은 3.1% 이하의 HC D261, D266 또는 D276 이성질체화 변이체를 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 참조 표준물은 4.6% 이하의 단편화된 변이체를 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 참조 표준물은 27.8% 이하의 HC N380 탈아미드화된 변이체 및/또는 27.2% 이하의 HC N385 탈아미드화된 변이체를 추가로 포함한다. 추가 실시양태에서, 참조 표준물은 약 7.4% 이하의 HC N311 탈아미드화된 변이체 및/또는 약 2.0% 이하의 N430 탈아미드화된 변이체를 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 참조 표준물은 90% 이상의 중쇄 (HC) C-말단 리신 결실된 변이체 (ΔK443), 및 1% 이하의 HC N-말단 피로-글루타메이트 변이체를 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 참조 표준물은 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열, 10-97%의 산성 변이체, 및/또는 0.1-35%의 염기성 변이체, 및/또는 2-80%의 주요 이소형, 및/또는 4.81% 이하의 LC W50 산화된 변이체, 및/또는 1% 이하의 HC M34 산화된 변이체, 및/또는 1.2% 이하의 HC M103 산화된 변이체, 및/또는 15.2% 이하의 응집된 변이체, 16.7% 이하의 HC M354 산화된 변이체, 및/또는 29.0% 이하의 HC M424 산화된 변이체, 및/또는 47.1% 이하의 HC M248 산화된 변이체, 및/또는 20.8% 이하의 HC D147 이성질체화된 변이체, 및/또는 13.1% 이하의 HC D151 또는 D167 이성질체화된 변이체, 및/또는 3.1% 이하의 HC D261, D266 또는 D276 이성질체화 변이체, 및/또는 4.6% 이하의 단편화된 변이체, 및/또는 27.8% 이하의 HC N380 탈아미드화된 변이체, 및/또는 27.2% 이하의 HC N385 탈아미드화된 변이체, 및/또는 약 7.4% 이하의 HC N311 탈아미드화된 변이체, 및/또는 약 2.0% 이하의 N430 탈아미드화된 변이체, 및/또는 90% 이상의 중쇄 (HC) C-말단 리신 결실된 변이체 (ΔK443), 및/또는 1% 이하의 HC N-말단 피로-글루타메이트 변이체를 포함한다.
- [0217] 한 실시양태에서, 참조 표준물은 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열, 10-30%의 산성 변이체; 및/또는 0.1-10%의 염기성 변이체; 및/또는 60-80%의 주요 이소형, 및/또는 약 1% 이하의 LC W50 산화된 변이체, 및/또는 약 1% 이하의 HC M34 산화된 변이체, 및/또는 약 1% 이하의 HC M103 산화된 변이체, 및/또는 약 1%의 응집된 변이체, 약 1% 이하의 HC M354 산화된 변이체, 및/또는 약 1% 이하의 HC M424 산화된 변이체, 및/또는 약 2-3% HC M248 산화된 변이체, 및/또는 약 1% 이하의 HC D147 이성질체화된 변이체, 및/또는 약 1% HC D151 또는 D167 이성질체화된 변이체, 및/또는 약 0.6-1% 단편화된 변이체, 및/또는 5-9% HC N380 탈아미드화된 변이체, 및/또는 약 1% 이하의 HC N385 탈아미드화된 변이체, 및/또는 약 5.8% HC N311 탈아미드화된 변이체, 및/또는 약 1.2% N430 탈아미드화된 변이체, 및/또는 약 97-99% 중쇄 (HC) C-말단 리신 결실된 변이체 (ΔK443), 및/또는 약 1% 이하의 HC N-말단 피로-글루타메이트 변이체를 포함한다.
- [0218] 본원에 정의된 바와 같은 참조 표준물은 항-PD-1 항체를 포함하는 조성물이다.
- [0219] 조성물은 항체 변이체 및 번역후 변형 변이체의 혼합물을 포함할 수 있다. 예를 들어, 항체 조성물은 산성 변이체, 염기성 변이체, 산화 변이체, 탈아미드화 변이체, 이성질체화된 변이체, 응집된 변이체, 단편화된 변이체, N-말단 피로-글루타메이트 변이체, 및 C-말단 리신 절단된 변이체 중 2종 이상을 포함할 수 있다.
- [0220] 한 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 갖는 항체를 포함하며, 여기서 조성물은 (i) 최대 100%의 산성 변이체, (ii) 최대 35%의 염기성 변이체, (iii) 경쇄의 W50에서의 ≤34%의 산화, (iv) 중쇄의 M34에서의 ≤21%의 산화, (v) 중쇄의 M103에서의 ≤64%의 산화, (vi) M248에

서의 ≤65%의 산화, (vii) M354에서의 ≤65%의 산화, (viii) M424에서의 ≤65%의 산화, 및/또는 (ix) ≤36%의 응집된 변이체 중 어느 하나 또는 그의 조합을 포함한다.

[0221] 한 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 갖는 항체를 포함하며, 여기서 조성물은 (i) 최대 100%의 산성 변이체, (ii) 최대 35%의 염기성 변이체, (iii) 중쇄의 M103에서의 ≤64%의 산화, (iv) 경쇄의 W50에서의 ≤34%의 산화, (v) 중쇄의 M34에서의 ≤21%의 산화, (vi) M248에서의 ≤65%의 산화, (vii) M354에서의 ≤65%의 산화, (viii) M424에서의 ≤65%의 산화; (ix) ≤36%의 응집된 변이체, (x) 중쇄의 D147에서의 최대 100%의 이성질체화; (xi) N380에서의 최대 100%의 탈아미드화, (xii) N385에서의 최대 100%의 탈아미드화, (xiii) 최대 100%의 중쇄 N-말단 피로-글루타메이트 변이체, 및/또는 (xiv) 최대 100%의 중쇄 C-말단 리신 절단된 변이체 중 어느 하나 또는 그의 조합을 포함한다.

[0222] 한 측면에서, 조성물은 서열식별번호: 9, 서열식별번호: 11, 서열식별번호: 12 및/또는 서열식별번호: 13으로부터 선택된 서열 중 하나 또는 그의 조합을 갖는 중쇄 서열, 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 갖는 항체를 포함하며, 여기서 조성물은 (i) 최대 100%의 산성 변이체, (ii) 최대 35%의 염기성 변이체, (iii) 경쇄의 W50에서의 ≤34%의 산화, (iv) 중쇄의 M34에서의 ≤21%의 산화, (v) 중쇄의 M103에서의 ≤64%의 산화, (vi) M248에서의 ≤65%의 산화, (vii) M354에서의 ≤65%의 산화, (viii) M424에서의 ≤65%의 산화, 및/또는 (ix) ≤36%의 응집된 변이체 중 어느 하나 또는 그의 조합을 포함한다.

[0223] 본 발명은 본원에 기재된 번역후 변형 중 1개 이상에 적용되었거나 또는 이를 거쳤을 수 있는 항체를 포괄한다. 예시적인 조성물은 1) 본원에 기재된 번역후 변형 (1개 이상, 또는 2개 이상)의 존재 및 부재 하의 항체의 혼합물 또는 블렌드를 포함할 수 있다. 따라서, 조성물은 번역후 변형을 갖는 항체의 집단 및 번역후 변형을 갖지 않는 항체의 집단을 포함할 수 있다.

[0224] 기재된 조성물은 1개 이상의 번역후 변형에 적용되었거나 또는 이를 거쳤을 수 있다. 변형은 CDR, 가변 프레임워크 영역, 또는 불변 영역에서 일어날 수 있다. 변형은 분자의 전하의 변화를 발생시킬 수 있다.

[0225] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 번역후 변형은 생성물-관련 불순물로서 명시되고 기재된 경우를 제외하고, 항원 결합 친화도, 생물학적 활성, 약동학 (PK)/약역학 (PD), 응집, 면역원성, 및/또는 Fc 수용체에 대한 결합에서 유의한 변화를 발생시키지 않는다.

[0226] 생산 방법

[0227] 본원에 기재된 항체 및 조성물은 시험관내 공급원 (예를 들어, 항체를 재조합적으로 생산하는 하이브리도마 또는 세포주) 및 생체내 공급원 (예를 들어, 설치류)을 통하는 것을 포함한 임의의 수단에 의해 수득될 수 있다. 항체를 생성하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들어 W02018/085468에 기재되어 있다.

[0228] 예를 들어, 조성물은 재조합 발현 시스템에서 발현되고 그로부터 정제될 수 있다. 한 실시양태에서, 조성물은 서열식별번호: 9 및 서열식별번호: 10을 포함하는 항체의 발현에 적합한 조건 하에 숙주 세포를 배양하는 방법에 의해 생산되며, 여기서 조성물은 발현되고, 임의로 정제되고, 임의로 제약 조성물 내에 제제화된다.

[0229] 다수의 상이한 발현 시스템 및 정제 요법이 조성물을 생산하는데 사용될 수 있다. 일반적으로, 숙주 세포는 항체를 코딩하는 재조합 발현 벡터로 형질전환된다. 포유동물 기원의 진핵 세포주 (예를 들어 CHO, Perc6, HEK293, HeLa, NS0)를 비롯한 광범위한 숙주 세포가 사용될 수 있다. 적합한 숙주 세포는 포유동물 세포, 예컨대 차이나이즈 햄스터 난소 CHO 세포 (예를 들어 CHOK1 및 CHO-DG44)를 포함한다. 한 실시양태에서, 항체는 차이나이즈 햄스터 난소 세포에 의해 생산된다.

[0230] 숙주 세포는 단리된 숙주 세포일 수 있다. 숙주 세포는 통상적으로 다세포 유기체 (예를 들어 식물 또는 동물)의 일부가 아니다. 숙주 세포는 비-인간 숙주 세포일 수 있다.

[0231] 진핵 또는 포유동물 세포 숙주와 함께 사용하기에 적절한 클로닝 및 발현 벡터 및 클로닝 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다.

[0232] 숙주 세포를 배양하여 항체를 코딩하는 재조합 발현 벡터를 발현시킨다.

[0233] 조성물은 통상적인 단백질 정제 절차에 의해 회수 및 정제될 수 있다. 예를 들어, 조성물은 배양 배지로부터 직접 수거될 수 있다. 세포 배양 배지의 수거는 정화를 통해, 예를 들어 원심분리 및/또는 침출 여과에 의해 이루어질 수 있다. 조성물의 회수 후에 적절한 순도를 보장하기 위해 정제가 이어진다. 따라서, 한 측면에서, 본원에 기재된 조성물을 포함하는 세포 배양 배지가 제공된다. 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 CHO 세포를

포함한다.

- [0234] 조성물은 후속적으로 세포 배양 배지로부터 정제될 수 있다. 이는 세포 배양 상청액을 수거하고, 세포 배양 상청액을 정제 배지 (예를 들어, 항체 분자에 결합하는 단백질 A 수지 또는 단백질 G 수지)와 접촉하도록 두고, 항체 분자를 정제 배지로부터 용리시켜 용리액을 생산하는 것을 포함할 수 있다. 따라서, 한 측면에서, 본원에 기재된 조성물을 포함하는 용리액이 제공된다.
- [0235] 1개 이상의 크로마토그래피 단계, 예를 들어 1개 이상의 크로마토그래피 수지; 및/또는 1개 이상의 여과 단계가 정제에 사용될 수 있다. 예를 들어, 수지, 예컨대 단백질 A, G, 또는 L을 사용하는 친화성 크로마토그래피를 사용하여 조성물을 정제할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 이온-교환 수지, 예컨대 양이온-교환을 사용하여 조성물을 정제할 수 있다.
- [0236] 대안적으로 정제 단계는 친화성 크로마토그래피 수지 단계, 이어서 양이온-교환 수지 단계를 포함한다.
- [0237] 제약 조성물 및 제제
- [0238] 본원에 기재된 조성물은 제약 조성물의 형태일 수 있다.
- [0239] 한 측면에서 조성물 및 적어도 1종의 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물이 제공된다.
- [0240] "제약 조성물"은 본원에 기재된 조성물 (즉, 활성 성분), 및 1종 이상의 제약상 허용되는 부형제를 포함할 수 있다. 부형제(들)는 제제의 다른 성분과 상용성이고/거나, 제약 제제가 가능하고/거나, 그의 수용자에게 유해하지 않고/거나, 활성 성분의 효능을 방해하지 않는다는 관점에서 허용되어야 한다. 따라서, 본 발명의 제약 조성물은 환자에게 투여하기에 적합하다.
- [0241] 본원에 사용된 "제약상 허용되는 부형제"는 완충제, 물, 염수, 포스페이트 완충 염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등, 뿐만 아니라 그의 조합 중 1종 이상을 포함할 수 있다. 다수의 경우에, 등장화제, 예를 들어 폴리올, 당, 폴리알콜, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 또는 염화나트륨, 보존제; 공-용매; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함한 항산화제; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA; 금속 착물 (예를 들어, Zn^{2+} -단백질 착물); 생분해성 중합체; 및/또는 염-형성 반대이온, 예컨대 나트륨 또는 칼륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다.
- [0242] 부형제 또는 다른 물질의 정확한 성질은, 예를 들어 경구, 직장, 비강, 국소 (협착 및 설하 포함), 질, 비경구 (피하, 근육내, 정맥내, 피내, 척수강내, 및 경막외 포함) 및 중앙내일 수 있는 투여 경로에 의존할 수 있다. 바람직한 부형제는, 예를 들어 수용자의 상태 및 치료될 질환에 따라 달라질 수 있다는 것이 인지될 것이다.
- [0243] 각각의 부형제 및 농도의 혼합물은 함께 "제약 제제" (또는 "제제")를 형성한다. 이러한 조성물은 적합하게는 육안으로 보이는 미립자 물질이 없다. 제제는 액체 형태 또는 동결건조 형태일 수 있다. 액체 제제 중의 조성물은 용기에 충전되고 동결될 수 있다. 특정 실시양태에서, 조성물을 포함하는 동결 제제의 분취물이 동결건조될 수 있다. 동결건조물은 물 또는 다른 수용액의 첨가에 의해 재구성되어 조성물을 포함하는 재구성된 제제를 생성할 수 있다.
- [0244] 한 실시양태에서, 조성물은 액체 제제 중에 있다. 일부 실시양태에서, 제제는 약 10 mg/mL 내지 약 125 mg/mL의 항체를 포함한다. 추가 실시양태에서, 제제는 약 20 mg/mL 내지 약 125 mg/mL, 예컨대 약 20 mg/mL 내지 약 100 mg/mL, 특히 약 20 mg/mL 내지 약 50 mg/mL의 항체를 포함한다. 추가 실시양태에서, 제제는 약 20 mg/mL의 항체를 포함한다. 대안적 실시양태에서, 제제는 약 50 mg/mL의 항체를 포함한다.
- [0245] 한 측면에서, 약 20 mg/mL 내지 약 125 mg/mL (예컨대 약 20 mg/mL 내지 약 50 mg/mL)의 항체 및 pH 약 5.5 내지 약 6.5의 완충제를 포함하는 본원에 기재된 제약 조성물을 포함하는 제제가 제공된다. 한 실시양태에서, 조성물은 액체 제제 중에 있다.
- [0246] 일부 실시양태에서, 조성물은 멸균 액체로서 제제화된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 육안으로 보이는 입자가 없다. 일부 실시양태에서, 조성물은 완충제 (예를 들어 시트레이트 완충제) 중에 제제화된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 PD-1 항체, 및 시트레이트 완충제, 히스티딘 완충제, 아르기닌, 트레할로스, 염화나트륨 및 폴리소르베이트 80 중 2종 이상을 포함한다.
- [0247] 특정 실시양태에서, 완충제는 시트레이트 완충제이다. 시트레이트 완충제는, 예를 들어, 짝산/짝염기 시스템 (시트르산나트륨/시트르산)의 사용에 의해 또는 시트르산나트륨 용액의 HCl 적정에 의해 달성될 수 있다. 한 실시양태에서, 시트레이트 완충제의 pH는 약 5.0 내지 약 6.5, 예컨대 약 5.5 내지 약 6.0, 특히 약 5.5 또는

약 6.0이다.

- [0248] 대안적 실시양태에서, 완충제는 히스티딘 완충제이다. 한 실시양태에서, 히스티딘 완충제의 pH는 약 5.5 내지 약 7.0, 약 5.5 내지 약 6.5, 예컨대 약 6.0 내지 약 6.5, 특히 약 6.0 또는 약 6.5이다.
- [0249] 일부 실시양태에서, 제제는 계면활성제를 포함한다. "계면활성제"는 친수성 기 및 소수성 기 둘 다를 함유하는 그의 화학적 조성으로 인해 고체-고체, 고체-액체, 액체-액체, 및 액체-공기 계면의 표면에서 그의 효과를 발휘할 수 있는 표면 활성제이다. 계면활성제는 단백질이 흡착되고 잠재적으로 응집될 수 있는 공기-물 및/또는 물-고체 계면에서 희석 용액 중 단백질의 농도를 감소시킬 수 있다. 계면활성제는 단백질 제제에서 소수성 계면에 결합할 수 있다. 일부 비경구로 허용되는 비-이온성 계면활성제는 폴리소르베이트 또는 폴리테르 기를 포함한다. 폴리소르베이트 20 및 80, 특히 폴리소르베이트 80 (PS80)은 본 발명의 제제에서 적합한 계면활성제 안정화제이다. 한 실시양태에서, 제제는 추가로 PS80을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제제는 약 0.01% 내지 약 0.1%, 예컨대 약 0.01% 내지 약 0.05% 또는 약 0.01 내지 약 0.03% w/v의 PS80 또는 PS20을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제제는 약 0.02% w/v의 PS80 또는 PS20을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 제제는 약 0.02% w/v의 PS80을 포함한다.
- [0250] 일부 실시양태에서, 제제는 제제의 오스몰랄농도를 약 290-325 mOsm/kg, 예컨대 약 290 mOsm/kg으로 조정하는 농도로 염화나트륨을 추가적으로 포함한다. 한 실시양태에서, 제제는 약 20 mM 내지 약 40 mM, 예컨대 약 25 mM 내지 약 35 mM의 염화나트륨을 포함한다. 추가 실시양태에서, 제제는 약 31 mM의 염화나트륨을 포함한다.
- [0251] 제제는 또한 가용화제, 예컨대 아르기닌, 예를 들어 L-아르기닌-HCl을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제제는 약 80 mM 내지 약 120 mM, 예컨대 약 90 mM 내지 약 110 mM, 특히 약 95 mM 내지 약 105 mM 범위의 아르기닌을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제제는 약 100 mM의 아르기닌을 포함한다.
- [0252] 일부 실시양태에서, 제제는 폴리올을 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리올은 당, 바람직하게는 비-환원당이다. 일부 실시양태에서, 비-환원당은 트레할로스이다. 일부 실시양태에서, 제제는 약 2% 내지 약 10% w/v 범위의 트레할로스를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제제는 약 5% w/v의 트레할로스를 포함한다.
- [0253] 일부 실시양태에서, 제제는 아르기닌 및/또는 트레할로스, 예컨대 약 80 mM 내지 약 120 mM (특히 100 mM)의 아르기닌 또는 약 2% 내지 약 10% w/v (특히 5% w/v)의 트레할로스를 포함한다.
- [0254] 한 측면에서, 약 20 mg/mL 내지 약 125 mg/mL의 항체, 약 10 mM 내지 약 40 mM의 시트레이트 완충제 또는 히스티딘 완충제, 약 80 mM 내지 약 120 mM의 아르기닌 또는 약 2% 내지 약 10% w/v의 트레할로스, 약 20 mM 내지 약 40 mM의 염화나트륨, 및 약 0.01% 내지 약 0.03% w/v의 폴리소르베이트 80을 포함하는 제약 조성물을 포함하는, pH 약 5.5 내지 약 6.5의 제제가 제공된다.
- [0255] 한 측면에서, 약 20-125 mg/mL의 항체, 약 25 mM의 시트레이트 완충제, 약 100 mM의 아르기닌 (예를 들어 L-아르기닌-HCl), 약 31 mM의 염화나트륨, 및 약 0.02% (w/v)의 폴리소르베이트 80을 포함하는, 약 pH 6의 제제가 제공된다.
- [0256] 한 측면에서, 약 20 mg/mL의 항체, 약 25 mM의 시트레이트 완충제, 약 100 mM의 아르기닌, 약 31 mM의 염화나트륨, 및 약 0.02% (w/v)의 폴리소르베이트 80을 포함하는, 약 pH 6의 제제가 제공된다.
- [0257] 한 측면에서, 약 50 mg/mL의 항체, 약 25 mM의 시트레이트 완충제, 약 100 mM의 아르기닌, 약 31 mM의 염화나트륨, 및 약 0.02% w/v의 폴리소르베이트 80을 포함하는, 약 pH 6의 제제가 제공된다.
- [0258] "안정한" 제제는 그 안의 단백질이 제조, 수송, 저장, 및 투여 동안 그의 물리적 및/또는 화학적 안정성을 본질적으로 보유하는 것이다. 안정성은 선택된 온도에서 선택된 시간 주기 동안 측정될 수 있다. 예를 들어, 2°C 내지 8°C의 권장 온도에서 저장된 생성물의 경우, 제제는 실온, 약 30°C, 또는 40°C에서 적어도 1개월 동안 안정하고/거나 약 2 내지 8°C에서 적어도 1년 동안, 바람직하게는 적어도 2년 동안 안정하다. 예를 들어, 저장 동안 응집, 산성 변이체, 및/또는 염기성 변이체의 정도는 단백질 안정성의 지표로서 사용될 수 있다. 따라서, "안정한" 제제는 항체의 약 10% 이하, 약 5% 이하, 예를 들어 약 4% 이하의 응집 변이체가 제제 중에 존재하는 것일 수 있다. "안정한" 제제는 항체의 약 60% 이하, 약 50% 이하, 예를 들어 약 35% 이하의 산성 변이체가 제제 중에 존재하는 것일 수 있다. "안정한" 제제는 항체의 약 35% 이하, 약 10% 이하, 예를 들어 약 15% 이하의 염기성 변이체가 제제 중에 존재하는 것일 수 있다.
- [0259] 본 발명의 특정 측면에서, 제제는 조성물이 약 2 내지 8°C에서 적어도 18개월 동안 저장, 동결, 해동, 및/또는 혼합에 대해 안정하게 유지되도록 한다. 한 실시양태에서, "안정한" 제제는 항체의 약 4% 이하의 응집 변이체,

약 35% 이하의 산성 변이체, 및 약 15% 이하의 염기성 변이체가 제제 중에 존재하는 것일 수 있다.

- [0260] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 제제 중의 조성물을 수용하는 용기를 포함하는 제조 물품, 예를 들어 키트에 관한 것이다. 한 측면에서, 제제를 포함하는 주사 장치가 제공된다. 주사 장치는 펜 주사기 장치 또는 자가주사기 장치를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 제제는 사전충전 시린지에 담긴다.
- [0261] 치료 방법 및 사용을 위한 조성물
- [0262] 본 발명은 추가로 PD-1 단백질의 부적절한 발현 (예를 들어, 과다발현) 또는 증가된 활성이 질환의 병리학적 효과를 유발하거나 그에 기여하거나, 또는 PD-1 단백질 수준 또는 활성의 감소가 포유동물, 바람직하게는 인간에서 치료 이익을 갖는, 임의의 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0263] 한 측면에서, 요법에 사용하기 위한 본원에 기재된 조성물이 제공된다. 이러한 요법은 PD-1 단백질의 부적절한 발현 (예를 들어, 과다발현) 또는 증가된 활성이 질환의 병리학적 효과를 유발하거나 그에 기여하거나, 또는 PD-1 단백질 수준 또는 활성의 감소가 포유동물, 바람직하게는 인간에서 치료 이익을 갖는, 임의의 질환 또는 장애에 관한 것일 수 있다.
- [0264] 조성물은 치료 유효 용량의 PD-1 신호전달을 억제할 수 있는 작용제를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 T 세포 활성화 또는 T 세포 이펙터 기능을 증가시키는 방법에 사용될 수 있다. 조성물은 치료 유효 용량의 PD-1 신호전달을 억제할 수 있는 작용제를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 면역 반응을 유도하는 방법에 사용될 수 있다. 조성물은 치료 유효 용량의 PD-1 신호전달을 억제할 수 있는 작용제를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 면역 반응을 증진시키거나 면역 세포의 활성을 증가시키는 방법에 사용될 수 있다.
- [0265] 한 측면에서, 암의 치료에 사용하기 위한 조성물이 제공된다. 대안적으로, 감염성 질환의 치료에 사용하기 위한 조성물이 제공된다.
- [0266] 한 측면에서, 암의 치료에 사용하기 위한 의약의 제조에서의 본원에 기재된 조성물의 용도가 제공된다. 대안적으로, 감염성 질환의 치료에 사용하기 위한 의약의 제조에서의 본원에 기재된 조성물이 제공된다.
- [0267] 본원에 사용된 용어 "치료하는" 및 그의 문법적 변형은 치료 요법을 의미한다. 특정한 상태와 관련하여, 치료는 (1) 상태의 생물학적 징후 중 1종 이상의 상태를 호전시키는 것, (2) a) 상태를 유발하거나 그의 원인이 되는 생물학적 캐스케이드에서의 1개 이상의 지점 또는 b) 상태의 생물학적 징후 중 1종 이상을 방해하는 것, (3) 상태 또는 그의 치료와 연관된 증상, 효과 또는 부작용 중 1종 이상을 완화시키는 것, (4) 상태 또는 상태의 생물학적 징후 중 1종 이상의 진행을 둔화시키는 것 또는 (5) 상태의 생물학적 징후 중 1종 이상의 발병을 예방하는 것을 의미한다.
- [0268] 치료는 치유적, 예방적 또는 방지적일 수 있다. 대상체는 그를 필요로 하는 대상체일 것이다. 치료를 필요로 하는 개체는 미래에 질환이 발생할 수 있는 개체에 더하여, 이미 특정한 의학적 질환을 앓고 있는 개체를 포함할 수 있다.
- [0269] 따라서, 예방 요법이 또한 고려된다. 통상의 기술자는 "예방"이 절대 용어가 아님을 인지할 것이다. 의약에서, "예방"은 상태 또는 그의 생물학적 징후의 가능성 또는 중증도를 실질적으로 감소시키기 위한, 또는 이러한 상태 또는 그의 생물학적 징후의 발병을 지연시키기 위한 약물의 예방적 투여를 지칭하는 것으로 이해된다. 예방 요법은, 예를 들어 대상체가 암 발병 위험이 높은 것으로 간주되는 경우, 예컨대 대상체가 강한 암 가족력을 갖는 경우 또는 대상체가 발암물질에 노출된 경우에 적절하다.
- [0270] 따라서, 본원에 기재된 방법, 항체 및 조성물은 명시된 경우에 예방적 치료 또는 방지적 치료에 사용될 수 있다. 이 경우에, 기재된 방법, 항체 및 조성물은 질환의 1종 이상의 측면 또는 증상의 발병을 방지하거나 지연시키는데 사용될 수 있다. 대상체는 무증상일 수 있다. 대상체는 질환에 대한 유전적 소인을 가질 수 있다. 예방 유효량의 조성물이 이러한 개체에게 투여된다. 예방 유효량은 본원에 기재된 질환의 1종 이상의 측면 또는 증상의 발병을 방지하거나 지연시키는 양이다.
- [0271] 방법, 항체 및 조성물은 실행가능한 치유적 치료를 구성하기 위해 질환의 완전한 치유에 영향을 미치거나, 또는 질환의 모든 증상 또는 징후를 근절할 필요는 없다. 관련 기술분야에서 인식되는 바와 같이, 치료 방법에서 치료제로서 사용되는 약물은 주어진 질환 상태의 중증도를 감소시킬 수 있지만, 유용한 치료제로서 간주되기 위해 질환의 모든 징후를 없앨 필요는 없다. 유사하게, 예방적으로 투여되는 치료는 실행가능한 예방체를 구성하기 위해 질환의 발병을 예방하는데 완전히 효과적일 필요는 없다. 단순히 (예를 들어, 그의 증상의 수 또는 중증도를 감소시킴으로써, 또는 또 다른 치료의 유효성을 증가시킴으로써, 또는 또 다른 유익한 효과를 생성함으로써

써) 질환의 영향을 감소시키거나, 또는 (예를 들어, 질환의 발병을 지연시킴으로써) 대상체에서 질환이 발생하거나 악화될 가능성을 감소시키는 것이면 충분하다.

[0272] 용어 "개체", "대상체" 및 "환자"는 본원에서 상호교환가능하게 사용되고, 치료를 필요로 하는 임의의 사람, 예를 들어 암 치료를 필요로 하는 사람을 포함하는 것으로 광범위하게 정의될 수 있다. 대상체는 전형적으로 인간이다. 대상체는 또한 포유동물, 예컨대 마우스, 래트, 또는 영장류 (예를 들어 마모셋 또는 원숭이)일 수 있다. 대상체는 비-인간 동물일 수 있다. 본 개시내용의 항체, 조성물 및 방법은 또한 수의학적 용도를 갖는다. 치료할 대상체는 농장 동물, 예를 들어 암소 또는 수소, 양, 돼지, 황소, 염소 또는 말일 수 있거나, 또는 가축, 예컨대 개 또는 고양이일 수 있다. 동물은 임의의 연령일 수 있거나, 성숙한 성체 동물일 수 있다.

[0273] 본 발명은 또한 포유동물에서 암, 감염성 질환 또는 자가면역 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[0274] 암 치료

[0275] 본 개시내용은 치료 유효 용량의 PD-1 신호전달을 억제할 수 있는 작용제를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 종양을 감소시키거나 종양 세포의 성장을 억제하는 방법을 제공한다. 방법은 암 또는 감염성 질환을 갖는 포유동물에게 상기 언급된 조성물을 투여하는 것을 포함할 수 있으며, 이때 포유동물에서 암 또는 감염성 질환이 치료된다. 본원에 논의된 바와 같이, PD-1은 다양한 암에서 비정상적으로 발현되고, 일부 암 (예를 들어 신세포 암종) 환자에서의 PD-L1 발현은 종양 공격성과 상관관계가 있다. 방법은 관련 기술분야에 공지된 임의의 유형의 암, 예컨대 예를 들어, 선암종, 폐의 선암종, 급성 골수성 백혈병 ("AML"), 급성 림프모구성 백혈병 ("ALL"), 부신피질 암종, 항문암, 충수암, B-세포 유래 백혈병, B-세포 유래 림프종, 방광암, 뇌암, 유방암 (예를 들어, 삼중 음성 유방암 (TNBC)), 난관(들)암, 고환암, 뇌암, 자궁경부암, 용모막암종, 만성 골수성 백혈병, CNS 종양, 결장 선암종, 결장암, 결장직장암, 미만성 내인성 뇌교 신경교종 (DIPG), 미만성 대 B 세포 림프종 ("DLBCL"), 배아성 횡문근육종 (ERMS), 자궁내막암, 상피암, 식도암, 유잉 육종, 여포성 림프종 ("FL"), 담낭암, 위암, 위장암, 신경교종, 두경부암, 혈액암, 간세포성암, 호지킨 림프종/원발성 종격 B-세포 림프종, 신장암, 신장 투명 세포암, 후두암, 백혈병, 간암, 폐암, 림프종, 흑색종, 메르켈 세포 암종, 중피종, 단핵구성 백혈병, 다발성 골수종, 신경모세포-유래 CNS 종양, 비-호지킨 림프종 (NHL), 비소세포 폐암 (NSCLC), 구강암, 골육종, 난소암, 난소 암종, 췌장암, 복막암, 원발성 복막암, 전립선암, 재발성 또는 불응성 전형적 호지킨 림프종 (cHL), 신세포 암종, 직장암, 타액선암 (예를 들어, 타액선 종양), 육종, 피부암, 소세포 폐암, 소장암, 항문생식기 부위의 편평 세포 암종 (예를 들어, 항문, 음경, 자궁경부, 질 또는 외음부의 편평 세포 암종), 식도의 편평 세포 암종, 두경부의 편평 세포 암종 (SCHNC), 폐의 편평 세포 암종, 위암, T-세포 유래 백혈병, T-세포 유래 림프종, 흉선암, 흉선종, 갑상선암, 포도막 흑색종, 요로상피 세포 암종, 자궁암, 자궁내막암, 자궁 육종, 질암, 외음부암, 또는 윌름스 종양을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0276] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물로 치료될 암은 미소위성체 불안정성 또는 그의 결여를 특징으로 한다. 미소위성체 불안정성 ("MSI")은 미소위성체의 반복부 (DNA의 짧은, 반복 서열)의 수가 그것이 유전된 DNA에 함유된 반복부의 수와 상이한 특정 세포 (예컨대 종양 세포)의 DNA에서의 변화이거나 또는 이를 포함한다. 미소위성체 불안정성은 결함있는 DNA mismatch 복구 (MMR) 시스템으로 인한 복제-연관 오류 복구의 실패로 발생한다. 이러한 실패는 게놈 전체에 걸쳐, 그러나 특히 미소위성체로 공지된 반복 DNA 영역에서 mismatch 돌연변이의 지속을 가능하게 하여, 증가된 돌연변이 로드를 유발한다. MSI-H를 특징으로 하는 적어도 일부 종양은 특정 항-PD-1 작용제에 대해 개선된 반응을 갖는 것으로 입증되었다 (Le et al., (2015) N. Engl. J. Med. 372(26):2509-2520; Westdorp et al., (2016) Cancer Immunol. Immunother. 65(10): 1249-1259).

[0277] 일부 실시양태에서, 암은 높은 미소위성체 불안정성의 미소위성체 불안정성 상태 (예를 들어 MSI-H 상태)를 갖는다. 일부 실시양태에서, 암은 낮은 미소위성체 불안정성의 미소위성체 불안정성 상태 (예를 들어 MSI-L 상태)를 갖는다. 일부 실시양태에서, 암은 미소위성체 안정성의 미소위성체 불안정성 상태 (예를 들어 MSS 상태)를 갖는다. 일부 실시양태에서, 미소위성체 불안정성 상태는 차세대 서열분석 (NGS)-기반 검정, 면역조직화학 (IHC)-기반 검정, 및/또는 PCR-기반 검정에 의해 평가된다. 일부 실시양태에서, 미소위성체 불안정성은 NGS에 의해 검출된다. 일부 실시양태에서, 미소위성체 불안정성은 IHC에 의해 검출된다. 일부 실시양태에서, 미소위성체 불안정성은 PCR에 의해 검출된다.

[0278] 실시양태에서, 암은 높은 종양 돌연변이 부담 (TMB)과 연관된다. 일부 실시양태에서, 암은 높은 TMB 및 MSI-H와 연관된다. 일부 실시양태에서, 암은 높은 TMB 및 MSI-L 또는 MSS와 연관된다. 일부 실시양태에서, 암은 높은 TMB와 연관된 자궁내막암이다. 일부 관련 실시양태에서, 자궁내막암은 높은 TMB 및 MSI-H와 연관된다. 일부 관련 실시양태에서, 자궁내막암은 높은 TMB 및 MSI-L 또는 MSS와 연관된다.

- [0279] 일부 실시양태에서, 암은 미스매치 복구 결핍 (dMMR) 암이다. 미소위성체 불안정성은 결합있는 DNA 미스매치 복구 (MMR) 시스템으로 인한 복제-연관 오류 복구의 실패로 발생할 수 있다. 이러한 실패는 게놈 전체에 걸쳐, 그러나 특히 미소위성체로 공지된 반복 DNA의 영역에서 미스매치 돌연변이의 지속을 가능하게 하여, 특정 항-PD-1 작용제에 대한 반응을 개선시킬 수 있는 증가된 돌연변이 로드를 유발한다.
- [0280] 일부 실시양태에서, 암은 과다돌연변이된 암이다. 일부 실시양태에서, 암은 폴리머라제 엡실론 (POLE)에서의 돌연변이를 보유한다. 일부 실시양태에서, 암은 폴리머라제 델타 (POLD)에서의 돌연변이를 보유한다.
- [0281] 일부 실시양태에서, 암은 자궁내막암 (예를 들어 MSI-H 또는 MSS/MSI-L 자궁내막암)이다. 일부 실시양태에서, 암은 POLE 또는 POLD에서의 돌연변이를 포함하는 MSI-H 암 (예를 들어, POLE 또는 POLD에서의 돌연변이를 포함하는 MSI-H 비-자궁내막암)이다.
- [0282] 한 측면에서, 암의 치료를 필요로 하는 대상체에게 치료 유효량의 본원에 기재된 조성물 (제약 조성물 또는 제제 포함)을 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법이 제공된다.
- [0283] 본원에 사용된 용어 "암" 및 "종양"은 상호교환가능하게 사용되고, 단수 또는 복수 형태로, 숙주 유기체를 병리학적으로 만드는 형질전환, 예컨대 악성 형질전환을 겪은 세포를 지칭한다. 원발성 암 세포는 널리 확립된 기술, 특히 조직학적 검사에 의해 비-암성 세포와 용이하게 구별될 수 있다. 본원에 사용된 암 세포의 정의는 원발성 암 세포뿐만 아니라 암 세포 선조로부터 유래된 임의의 세포를 포함한다. 이는 전이된 암 세포, 및 암 세포로부터 유래된 시험관내 배양물 및 세포주를 포함한다. 통상적으로 고형 종양으로서 나타나는 암의 유형을 지칭하는 경우에, "임상적으로 검출가능한" 종양은 종양 덩이에 기초하여; 예를 들어 신체 검사 시 컴퓨터 단층촬영 (CT) 스캔, 자기 공명 영상화 (MRI), X선, 초음파 또는 촉진과 같은 절차에 의해 검출가능하고/거나, 환자로 부터 수득가능한 샘플에서 1종 이상의 암-특이적 항원의 발현으로 인해 검출가능한 것이다.
- [0284] 실시양태에서, 암은 두경부암, 폐암 (예를 들어 비소세포 폐암 (NSCLC)), 신암, 방광암, 흑색종, 메르켈 세포 암종 (예를 들어 문헌 [Bhatia et al., Curr. Oncol. Rep., 13(6): 488-497 (2011)] 참조), 자궁경부암, 질암, 외음부암, 자궁암, 자궁내막암, 난소암, 난관암, 유방암, 전립선암, 타액선 종양, 흉선종, 부신피질 암종, 식도암, 위암, 결장직장암, 충수암, 요로상피 세포 암종, 또는 편평 세포 암종 (예를 들어 폐; 항문생식기 부위, 예컨대 항문, 음경, 자궁경부, 질, 또는 외음부; 또는 식도)이다.
- [0285] 일부 실시양태에서, 암은 혈액암이다. 일부 실시양태에서, 혈액암은 미만성 대 B 세포 림프종 ("DLBCL"), 호지킨 림프종 ("HL"), 비-호지킨 림프종 ("NHL"), 여포성 림프종 ("FL"), 급성 골수성 백혈병 ("AML"), 급성 림프모구성 백혈병 ("ALL"), 또는 다발성 골수종 ("MM")으로부터 선택된다. 실시양태에서, 암은 혈액계 암, 예컨대 급성 림프모구성 백혈병 ("ALL"), 급성 림프모구성 B-세포 백혈병, 급성 림프모구성 T-세포 백혈병, 급성 골수모구성 백혈병 ("AML"), 급성 전골수구성 백혈병 ("APL"), 급성 단핵모구성 백혈병, 급성 적백혈병성 백혈병, 급성 거핵모구성 백혈병, 급성 골수단핵구성 백혈병, 급성 비-림프구성 백혈병, 급성 미분화 백혈병, 만성 골수구성 백혈병 ("CML"), 만성 림프구성 백혈병 ("CLL"), 모발상 세포 백혈병 및 다발성 골수종; 급성 및 만성 백혈병, 예컨대 림프모구성, 골수, 림프구성, 및 골수구성 백혈병이다.
- [0286] 일부 실시양태에서, 암은 림프종, 예컨대 호지킨병, 비-호지킨 림프종, 다발성 골수종, 발텐스트룀 마크로글로불린혈증, 중쇄 질환 및 진성 다혈구혈증이다.
- [0287] 일부 실시양태에서, 암은 편평 세포 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 폐의 편평 세포 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 식도의 편평 세포 암종이다. 일부 실시양태에서, 암은 두경부 편평 세포 암종 (HNSCC)이다. 일부 실시양태에서, 암은 항문생식기 부위 (예를 들어, 항문, 음경, 자궁경부, 질, 또는 외음부)의 편평 세포 암종이다.
- [0288] 일부 실시양태에서, 암은 방광암, 유방암 (예를 들어 삼중 음성 유방암 (TNBC)), 난관(들)암, 담관암종, 결장선암종, 자궁내막암, 식도암, 유잉 육종, 위암, 신장 투명 세포암, 폐암 (예를 들어 폐 선암종 또는 폐 편평 세포암), 중피종, 난소암, 췌장암, 복막암, 전립선암, 자궁내막암, 또는 포도막 흑색종이다. 일부 실시양태에서, 암은 난소암, 난관(들)암, 또는 복막암이다. 일부 실시양태에서, 암은 유방암 (예를 들어 TNBC)이다. 일부 실시양태에서, 암은 폐암 (예를 들어 비소세포 폐암)이다. 일부 실시양태에서, 암은 전립선암이다.
- [0289] 일부 실시양태에서, 암은 CNS 또는 뇌암, 예컨대 신경모세포종 (NB), 신경교종, 미만성 내인성 뇌교 신경교종 (DIPG), 모양세포성 성상세포종, 성상세포종, 역형성 성상세포종, 다형성 교모세포종, 수모세포종, 두개인두종, 상의세포종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경종, 핍지교종, 수막종, 전정 슈반세포종, 선종, 전이성 뇌 종양,

수막종, 척수 종양, 또는 수모세포종이다. 실시양태에서, 암은 CNS 종양이다.

[0290] 일부 실시양태에서, 암은 고형 종양이다. 실시양태에서, 암은 고형 종양, 예컨대 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골원성 육종, 척삭종, 혈관육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피육종, 활막종, 중피종, 유잉종양, 평활근육종, 횡문근육종, 골육종, 결장암, 결장직장암, 신장암, 췌장암, 골암, 유방암, 난소암, 전립선암, 식도암, 위암, 구강암, 비강암, 인후암, 편평 세포 암종, 기저 세포 암종, 선암종, 한선 암종, 피지선 암종, 유두상 암종, 유두상 선암종, 낭선암종, 수질 암종, 기관지원성 암종, 신세포 암종, 간세포암, 담관암종, 용모막암종, 정상피종, 배아성 암종, 윌름스 종양, 자궁경부암, 자궁암, 고환암, 비소세포 폐암 (NSCLC), 소세포 폐 암종, 방광 암종, 폐암, 상피 암종, 피부암, 흑색종, 신경모세포종 (NB), 또는 망막모세포종이다. 일부 실시양태에서, 종양은 진행성 병기의 고형 종양이다. 일부 실시양태에서, 종양은 전이성 고형 종양이다.

[0291] 일부 실시양태에서, 암은 부인과 암 (즉, 여성 생식기계암, 예컨대 난소암, 난관암, 자궁경부암, 질암, 외음부암, 자궁암, 또는 원발성 복막암, 또는 유방암)이다. 일부 실시양태에서, 여성 생식기계암은 난소암, 난관(들)암, 복막암, 및 유방암을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0292] 일부 실시양태에서, 암은 난소암 (예를 들어 장액성 또는 투명 세포 난소암)이다. 일부 실시양태에서, 암은 난관암 (예를 들어 장액성 또는 투명 세포 난관암)이다. 일부 실시양태에서, 암은 원발성 복막암 (예를 들어 장액성 또는 투명 세포 원발성 복막암)이다.

[0293] 일부 실시양태에서, 난소암은 상피 암종이다. 상피 암종은 난소암의 85% 내지 90%를 차지한다. 조직학적으로 난소의 표면 상에서 시작되는 것으로 간주되지만, 새로운 증거는 적어도 일부 난소암은 난관 부분의 특수 세포에서 개시됨을 시사한다. 난관은 여성의 난소를 여성의 생식기계의 일부인 자궁에 연결하는 작은 관이다. 정상 여성 생식기계에는, 자궁의 각 측면에 하나씩 위치하는 2개의 난관이 있다. 난관에서 시작된 암 세포는 초기에 난소의 표면으로 이동할 수 있다. 용어 "난소암"은 종종 난소에서, 난관에서, 및 복막으로 불리는 복강 내벽으로부터 시작된 상피암을 기재하기 위해 사용된다. 일부 실시양태에서, 암은 배세포 종양이거나 또는 이를 포함한다. 배세포 종양은 난소의 난자-생산 세포에서 발생하는 난소암의 유형이다. 일부 실시양태에서, 암은 기질 종양이거나 또는 이를 포함한다. 기질 종양은 때때로 에스트로겐으로 불리는 여성 호르몬을 제조하는 조직인, 난소를 함께 지탱하는 결합 조직 세포에서 발생한다. 일부 실시양태에서, 암은 과립막 세포 종양이거나 또는 이를 포함한다. 과립막 세포 종양은 에스트로겐을 분비하여 진단 시점에 비정상적인 질 출혈을 일으킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 부인과암은 상동 재조합 복구 결핍/상동 복구 결핍 ("HRD") 및/또는 BRCA1/2 돌연변이(들)와 연관된다. 일부 실시양태에서, 부인과암은 백금-감수성이다. 일부 실시양태에서, 부인과암은 백금-기반 요법에 반응하였다. 일부 실시양태에서, 부인과암은 백금-기반 요법에 대한 저항성이 발생하였다. 일부 실시양태에서, 부인과암은 백금-기반 요법에 대한 부분 반응 또는 완전 반응 (예를 들어 마지막 백금-기반 요법 또는 끝에서 두 번째 백금-기반 요법에 대한 부분 반응 또는 완전 반응)을 한 번에 나타내었다. 일부 실시양태에서, 부인과암은 현재 백금-기반 요법에 대해 저항성이다.

[0294] 일부 실시양태에서, 암은 유방암이다. 통상적으로 유방암은 소엽으로 공지된 젖 생산선 세포에서 또는 관에서 시작된다. 덜 흔하게는 유방암은 기질 조직에서 시작될 수 있다. 이들은 유방의 지방성 및 섬유성 결합 조직을 포함한다. 시간이 지남에 따라 유방암 세포는 전이로 공지된 과정에서 거드랑이 림프절 또는 폐와 같은 인근 조직을 침습할 수 있다. 유방암의 병기, 종양의 크기 및 그의 성장 속도는 제공되는 치료의 유형을 결정하는 모든 인자이다. 치료 옵션은 종양을 제거하기 위한 수술, 화학요법 및 호르몬 요법을 포함한 약물 치료, 방사선 요법 및 면역요법을 포함한다. 예후 및 생존율은 광범위하게 다양하고; 5년 상대 생존율은 발생한 유방암의 유형에 따라 98% 내지 23%로 다양하다. 유방암은 2012년에 대략 170만건의 새로운 사례를 갖는 세계에서 두 번째로 가장 흔한 암이고, 대략 521,000건의 사망을 나타내는 암으로 인한 사망의 다섯 번째로 가장 흔한 원인이다. 이들 사례 중에서, 대략 15%는 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체 (PR) 또는 HER2를 발현하지 않는 삼중-음성이다. 일부 실시양태에서, 삼중 음성 유방암 (TNBC)은 에스트로겐 수용체 발현 음성 (세포의 <1%), 프로게스테론 수용체 발현 음성 (세포의 <1%), 및 HER2-음성인 유방암 세포를 특징으로 한다.

[0295] 일부 실시양태에서, 암은 ER-양성 유방암, ER-음성 유방암, PR-양성 유방암, PR-음성 유방암, HER2-양성 유방암, HER2-음성 유방암, BRCA1/2-양성 유방암, BRCA1/2-음성 암, 또는 TNBC이다. 실시양태에서, 암은 TNBC이다.

[0296] 일부 실시양태에서, 유방암은 전이성 유방암이다. 일부 실시양태에서, 유방암은 진행성 유방암이다. 일부 실시양태에서, 암은 II기, III기 또는 IV기 유방암이다. 일부 실시양태에서, 암은 IV기 유방암이다.

- [0297] 일부 실시양태에서, 암은 자궁내막암 ("EC")이다. 일부 실시양태에서, 자궁내막암은 전이성 자궁내막암이다.
- [0298] 자궁내막 암종은 여성 생식관의 가장 흔한 암이다. 자궁내막암 (EC)의 연간 새로운 사례의 수는 전세계적으로 약 325,000건으로 추정된다. 추가로, EC는 폐경후 여성에서 가장 흔히 발생하는 암이다. 자궁내막암 사례의 약 53%는 선진국에서 발생한다. 2015년에, 대략 55,000건의 EC 사례가 미국에서 진단되었고, EC에 사용하기 위해 현재 승인된 표적화된 요법은 없다. 1차 (1L) 및 2차 (2L) 요법 세팅에서 진행성 및 재발성 EC에 대한 생존을 개선시키는 작용제 및 요법에 대한 필요가 존재한다. 가장 흔한 조직학적 형태는 자궁내막암 선암종이며, 진단된 사례의 약 75-80%를 나타낸다. 다른 조직학적 형태는 자궁 유두상 장액성 (10% 미만), 투명 세포 4%, 점액성 1%, 편평 1% 미만, 및 혼합형 약 10%를 포함한다.
- [0299] 병인론적 관점에서, EC는 2종의 상이한 유형, 소위 유형 I 및 II에 속한다. 제I형 종양은 저등급 및 에스트로겐-관련 자궁내막암 암종 (EEC)인 반면, 제II형은 비-자궁내막암 (NEEC) (주로 장액성 및 투명 세포) 암종이다. 세계 보건 기구는 EC의 병리학적 분류를 최근에 업데이트하여, EC의 9가지 상이한 하위유형을 인식하였지만, EEC 및 장액성 암종 (SC)이 대부분의 사례를 차지한다. EEC는 에스트로겐-관련 암종이며, 이는 폐경전후 환자에서 발생하고, 전구체 병변 (자궁내막 증식증/자궁내막암 상피내 신생물)이 선행된다. 현미경적으로, 저등급 EEC (EEC 1-2)는 관상 선을 함유하고, 증식성 자궁내막과 다소 닮았으며, 선과 사상 패턴이 융합된 구조적 복잡성을 갖는다. 고등급 EEC는 고형 성장 패턴을 나타낸다. 대조적으로, SC는 과다-에스트로겐증의 부재 하에 폐경후 환자에서 발생한다. 현미경에서, SC는 종양 세포가 현저히 계층화된 두꺼운 섬유화 또는 부종성 돌기, 세포 발아, 및 큰 호산구성 세포질을 갖는 역형성 세포를 나타낸다. 대부분의 EEC는 저등급 종양 (등급 1 및 2)이고, 이것이 자궁으로 국한될 때 양호한 예후와 연관된다. 등급 3 EEC (EEC3)는 림프절 전이의 증가된 빈도를 갖는 공격성 종양이다. SC는 매우 공격성이고, 에스트로겐 자극과 무관하며, 주로 고령 여성에서 발생한다. EEC3 및 SC는 고등급 종양으로 간주된다. SC 및 EEC3을 1988년부터 2001년까지 감시, 역학 및 최종 결과 (SEER) 프로그램 데이터를 사용하여 비교하였다. 이들은 각각 EC의 10% 및 15%를 나타내었으나, 각각 암 사망의 39% 및 27%를 차지하였다.
- [0300] 일부 실시양태에서, 암은 폐암이다. 일부 실시양태에서, 폐암은 폐의 편평 세포 암종이다. 일부 실시양태에서, 폐암은 소세포 폐암 (SCLC)이다. 일부 실시양태에서, 폐암은 비소세포 폐암 (NSCLC), 예컨대 편평 NSCLC이다. 일부 실시양태에서, 폐암은 ALK-전위된 폐암 (예를 들어 ALK-전위된 NSCLC)이다. 일부 실시양태에서, 폐암은 EGFR-돌연변이체 폐암 (예를 들어 EGFR-돌연변이체 NSCLC)이다.
- [0301] 일부 실시양태에서, 암은 전이성 암이다.
- [0302] 일부 실시양태에서, 암은 재발성 암 (예를 들어 재발성 부인과암, 예컨대 재발성 상피 난소암, 재발성 난관암, 재발성 원발성 복막암, 또는 재발성 자궁내막암)이다.
- [0303] 암 치료를 필요로 하는 대상체는 새로이 진단된, 재발성, 불응성, 진행성 질환, 완화 등을 비롯한 다양한 병기로부터의 환자를 포함할 수 있다. 암 치료를 필요로 하는 대상체는 또한 줄기 세포 이식을 받았거나 또는 이식 부적절한 것으로 간주되는 환자를 포함할 수 있다.
- [0304] 감염의 치료
- [0305] 방법은 임의의 유형의 감염성 질환 (즉, 박테리아, 바이러스, 진균, 또는 기생충에 의해 유발된 질환 또는 장애)을 치료하는데 사용될 수 있다. 방법에 의해 치료될 수 있는 감염성 질환의 예는 인간 면역결핍 바이러스 (HIV), 호흡기 세포융합 바이러스 (RSV), 인플루엔자 바이러스, 뎅기 바이러스, B형 간염 바이러스 (HBV), 또는 C형 간염 바이러스 (HCV)에 의해 유발된 질환을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0306] 조성물의 투여는 포유동물에서 암 또는 감염성 질환에 대한 면역 반응을 유도할 수 있다. "면역 반응"은, 예를 들어 항체 생산 및/또는 면역 이펙터 세포 (예를 들어 T-세포)의 활성화를 수반할 수 있다.
- [0307] 자가면역 질환의 치료
- [0308] 방법은 예를 들어 문헌 [MacKay I.R. and Rose N.R., eds., The Autoimmune Diseases, Fifth Edition, Academic Press, Waltham, MA (2014)]에 기재된 바와 같이, 임의의 유형의 자가면역 질환 (즉, 신체가 그 자신의 조직을 공격하고 손상시키는 면역계 과다-활성에 의해 유발된 질환 또는 장애)을 치료하는데 사용될 수 있다. 조성물에 의해 치료될 수 있는 자가면역 질환의 예는 다발성 경화증, 제1형 당뇨병, 류마티스 관절염, 경피증, 크론병, 건선, 전신 홍반성 루푸스 (SLE), 및 케양성 결장염을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 방법이 자가면역 질환을 치료하는 경우에, 항-TIM-3 항체 작용제는, 예를 들어 코르티코스테로이드 (예를 들어 프

레드니손 및 플루티카손) 및 비-스테로이드성 항염증 약물 (NSAID) (예를 들어 아스피린, 이부프로펜, 및 나프록센)을 포함한 항염증제와 조합되어 사용될 수 있다.

- [0309] 투여 경로
- [0310] 대상체는 본 발명의 조성물로 치료받기 전에 적어도 1종의 선행 암 요법을 받았을 수 있다. 한 실시양태에서, 대상체는 본 발명의 조성물로 치료받기 전에 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 또는 적어도 7종의 선행 암 요법으로 치료받았다. 또 다른 실시양태에서, 대상체는 새로이 진단된 암을 갖고, 본 발명의 조성물로 치료받기 전에 0종의 선행 요법을 받았다.
- [0311] 본 발명의 조성물은 임의의 적절한 경로에 의해 투여될 수 있다. 일부 조성물의 경우에, 적합한 경로는 경구, 직장, 비강, 국소 (협측 및 설하 포함), 질, 비경구 (피하, 근육내, 정맥내, 피내, 척수강내, 및 경막외 포함), 및 중앙내를 포함한다. 바람직한 경로는, 예를 들어 수용자의 상태 및 치료될 암에 따라 달라질 수 있다는 것이 인지될 것이다.
- [0312] 일부 실시양태에서, 조성물은 정맥내로 (예를 들어 정맥내 (IV) 주입에 의해) 투여된다. 추가 실시양태에서, 조성물은 30분 IV 주입을 통해 투여된다.
- [0313] 일부 실시양태에서, 조성물은 주사에 의해 투여된다. 따라서, 한 측면에서, 본 발명의 조성물, 제약 조성물 또는 제제를 포함하는 주사 장치가 제공된다. 주사 장치는 펜 주사기 장치 또는 자가주사기 장치를 포함할 수 있다.
- [0314] 한 실시양태에서, 조성물은 사전충전 시린지에 담긴다.
- [0315] 목적하는 투여량은 조성물의 단일 볼루스 투여에 의해, 조성물의 다중 볼루스 투여에 의해, 또는 조성물의 연속 주입 투여에 의해 전달될 수 있다.
- [0316] 특정 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 제약 조성물로서 투여된다.
- [0317] 본원에 사용된 용어 "투여하는"은 치료 목적을 달성하기 위한 본원에 기재된 조성물의 전달을 지칭하는 것으로 의도된다. 조성물은 임상 이익을 달성하기에 충분한 기간 동안 투여 간격으로 투여될 수 있다.
- [0318] 조성물은 요법을 특정 부위에 표적화하는 방식으로 대상체에게 투여될 수 있다.
- [0319] 특정 실시양태에서, 조성물은 1종 이상의 추가의 치료제와 함께 대상체에게 공투여될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 조성물은 1종 이상의 추가의 암 치료제와 함께 대상체에게 공투여될 수 있다. 추가의 암 치료제는 다른 면역조정 약물, 치료 항체, CAR-T 치료제, BiTE, HDAC 억제제, 프로테아솜 억제제, 항염증 화합물, 및 면역조정 이미드 약물 (IMiD)을 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.
- [0320] "공투여된"은 동일한 제약 조성물로 또는 개별 제약 조성물로 조합되어 대상체에게 투여되는 2종 이상의 상이한 제약 조성물 또는 치료 (예를 들어, 방사선 치료)의 투여를 의미한다. 따라서, 공투여는 2종 이상의 제약 작용제를 포함하는 단일 제약 조성물을 동시에 투여하는 것 또는 2종 이상의 상이한 조성물을 동일한 대상체에게 동일하거나 상이한 시간에 투여하는 것을 수반한다.
- [0321] 예를 들어, 항-PD-1 항체는 본원에 개시된 질환의 치료 또는 예방을 위한 다른 작용제, 예컨대 암 세포에 세포독성이거나, 암 세포의 면역원성을 조정하거나, 또는 암 세포에 대한 면역 반응을 촉진하는 작용제와 조합되어 투여될 수 있다. 이와 관련하여, 예를 들어 조성물은, 예를 들어 관련 기술분야에 공지된 임의의 화학요법제, 이온화 방사선, 소분자 항암제, 암 백신, 생물학적 요법 (예를 들어 다른 모노클로날 항체, 암-사멸 바이러스, 유전자 요법, 및 입양 T-세포 전달), 및/또는 수술을 포함한 적어도 1종의 다른 항암제와 조합되어 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-PD-1 항체를 사용한 치료를 위한 대상체 (예를 들어 포유동물, 예를 들어 인간)는 화학요법 (예를 들어 백금-기반 화학요법)으로 치료받은 적이 있거나 또는 치료받을 것이다. 일부 실시양태에서, 화학요법제는 악티노마이신, 올-트랜스 레티노산, 아자시티딘, 아자티오프린, 블레오마이신, 보르테조미, 카르보플라틴, 카페시타빈, 시스플라틴, 클로람부실, 시클로포스파미드, 시타라빈, 다우노루비신, 도세탁셀, 독시플루리딘, 독소루비신, 에피루비신, 에토틸론, 에토포시드, 플루오로우라실, 겐시타빈, 히드록시우레아, 이다루비신, 이마티닙, 이리노테칸, 메클로레타민, 메르캅토프린, 메토트렉세이트, 미톡산트론, 옥살리플라틴, 파클리탁셀, 페메트렉세드, 테니포시드, 티오구아닌, 토포테칸, 발루비신, 베무라페닙, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신 또는 비노렐빈이다. 일부 이러한 실시양태에서, 화학요법제는 백금-기반 화학요법제, 예컨대 시스플라틴, 카르보플라틴, 옥살리플라틴, 네다플라틴, 트리플라틴 테트라니트레이트, 페난트리플라틴, 피코플라틴, 또는 사

트라플라틴이다. 일부 이러한 실시양태에서, 화학요법제는 플레이트 항대사물, 예컨대 페메트렉세이드이다. 일부 실시양태에서, 항-PD-1 항체를 사용한 치료를 위한 대상체 (예를 들어 포유동물, 예를 들어 인간)는 항혈관 신생제, 예를 들어 베바시주맙, 이트라코나졸, 카르복시아미도트리아졸, TNP-470, 푸마길린, CM101, IL-12, 혈소판 인자-4, 수라민, SU5416, 트롬보스폰딘, 혈관신생억제 스테로이드, 헤파린, 연골-유래 혈관신생 억제 인자 (예를 들어 췌티드 트로포닌 I 및 콘드로모듈린 I), 매트릭스 메탈로프로테이나제 억제제, 안지오테닌, 엔도스타틴, 2-메톡시에스트라디올, 테코갈란, 테트라티오몰리브데이트, 트롬보스폰딘, 탈리도미드, 프로락틴, α v β 3 억제제, 레날리도미드, 리노미드, 라무시루맙, 타스퀴니모드, 라니비주맙, 소라페닙, 수니티닙, 파조파닙, 에베롤리무스, 메탈로프로테아제의 조직 억제제 (TIMP1 및 TIMP2), bFGF가용성 수용체, 형질전환 성장 인자 베타, 인터페론 알파, 인터페론 베타, 가용성 KDR 및 FLT-1 수용체, 태반 프로리페린-관련 단백질, 파조파닙, 수니티닙, 소라페닙, 악시티닙, 포나티닙, 카보잔티닙, 레고라페닙, 반데타닙, 렌바티닙, 세막사닙, SU6668, 바탈라닙, 티보자닙, 세디라닙, 프로타민, 헤파린, 스테로이드, 아스코르브산 에테르, 황산화 폴리사카라이드 DS 4152, AGM 12470, 네오바스타트, R04929097, MRK-003, MK-0752, PF03084014, MEDI0639, 쿠르쿠민, 3,3'-디인돌릴메탄 (DIM), 레스베라트롤, 3,5-비스(2,4-디플루오로벤질리덴)-4-피페리돈 (DiFiD) 및 에피갈로카테킨-3-갈레이트 (EGCG), 호노키올, Flt2-11, CBO-P11, Je-11, V1, 및 그의 임의의 조합으로 치료받은 적이 있거나 또는 치료받을 것이다. 일부 실시양태에서, 조성물은, 예를 들어 코르티코스테로이드 (예를 들어 프레드니손 및 플루티카손) 및 비-스테로이드성 항염증 약물 (NSAID) (예를 들어 아스피린, 이부프로펜, 및 나프록센)을 포함한 항염증제와 조합되어 사용될 수 있다.

[0322] 일부 실시양태에서, 조성물은 감염성 질환을 치료하는데 사용된다. 본 발명의 방법이 감염성 질환을 치료하는 경우에, 항-PD-1 항체 작용제는 적어도 1종의 항박테리아제 또는 적어도 1종의 항바이러스제와 조합되어 투여될 수 있다. 이와 관련하여, 항박테리아제는 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 항생제일 수 있다. 항바이러스제는 특정한 바이러스를 특이적으로 표적화하는 임의의 적합한 유형의 임의의 백신 (예를 들어, 생-약독화 백신, 서브유닛 백신, 재조합 박터 백신, 및 소분자 항바이러스 요법 (예를 들어, 바이러스 복제 억제제 및 뉴클레오시드 유사체)일 수 있다.

[0323] 일부 실시양태에서, 조성물은 면역 체크포인트 경로를 억제하는 다른 작용제와 조합되어 투여될 수 있다. 예를 들어, 조성물은 CTLA-4, TIM-3 또는 LAG-3 경로를 억제 또는 길항하는 작용제와 조합되어 투여될 수 있다. 이들 면역 체크포인트 경로 중 2가지 이상을 동시에 표적화하는 조합 치료는 개선되고 잠재적으로 상승작용적인 항종양 활성을 입증하였다. 일부 실시양태에서, 조성물은 TIM-3에 결합하는 항체 및/또는 LAG-3에 결합하는 항체와 조합되어 투여된다. 이와 관련하여, 포유동물에서 암 또는 감염성 질환을 치료하는 본 발명의 방법은 포유동물에게 (i) TIM-3 단백질에 결합하는 항체 및/또는 (ii) LAG-3 단백질에 결합하는 항체를 포함하는 조성물을, 임의로 제약상 허용되는 담체와 조합하여 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다. LAG-3 및 TIM-3에 특이적인 예시적인 항체 작용제는 각각 W02016/126858 및 W02016/161270에 기재되어 있으며, 이들 둘 다는 본원에 참조로 포함된다. 일부 실시양태에서, 항-TIM-3 항체 작용제는, 예를 들어 코르티코스테로이드 (예를 들어 프레드니손 및 플루티카손) 및 비-스테로이드성 항염증 약물 (NSAID) (예를 들어 아스피린, 이부프로펜, 및 나프록센)을 포함한 항염증제와 조합되어 사용될 수 있다.

[0324] 일부 실시양태에서, 대상체는 1종 이상의 추가의 요법을 항-PD-1 항체 작용제와 조합하여 받고 있거나 받을 것이다. 일부 실시양태에서, 추가의 요법은 PARP 억제제이다. PARP 억제제는, 예를 들어 ABT-767, AZD 2461, BGB-290, BGP 15, CEP 8983, CEP 9722, DR 2313, E7016, E7449, 플루조파립 (SHR 3162), IMP 4297, INO1001, JPI 289, JPI 547, 모노클로날 항체 B3-LysPE40 접합체, MP 124, 니라파립 (제줄라) (MK-4827), NU 1025, NU 1064, NU 1076, NU1085, 올라파립 (AZD2281), ONO2231, PD 128763, R 503, R 554, 루카파립 (루브라카) (AG-014699, PF-01367338), SBP 101, SC 101914, 심미파립, 탈라조파립 (BMN-673), 벨리파립 (ABT-888), WW 46, 2-(4-(트리플루오로메틸)페닐)-7,8-디히드로-5H-티오피라노[4,3-d]피리미딘-4-올, 및 그의 염 또는 유도체로부터 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, PARP 억제제는 니라파립, 올라파립, 루카파립, 탈라조파립, 및 벨리파립으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, PARP 억제제는 니라파립 (예를 들어, 니라파립 유리염기, 니라파립 토실레이트, 또는 니라파립 토실레이트 1수화물, 또는 그의 임의의 조합)이다.

[0325] 일부 실시양태에서, 추가의 요법은 TIM-3 또는 LAG-3을 억제하는 작용제를 전달하는 조성물을 사용한 치료 및 PARP 억제제를 사용한 치료를 포함하여, 대상체는 모든 3가지를 사용한 치료를 받는다. 일부 실시양태에서, 추가의 요법은 TIM-3을 억제하는 작용제를 전달하는 조성물을 사용한 치료, LAG-3을 억제하는 작용제를 전달하는 조성물을 사용한 치료, 및 PARP 억제제를 사용한 치료를 포함하여, 대상체는 모든 4가지를 사용한 치료를 받는다.

- [0326] 일부 실시양태에서, 방법은 조성물을 니라파립과 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 이러한 방법은 임의로 항혈관신생제, 예컨대 베바시주맙의 투여를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 조합물은 난소암, 두경부암, 폐암 (예를 들어 비소세포 폐암 (NSCLC)), 신암, 방광암, 흑색종, 메르켈 세포 암종, 자궁경부암, 질암, 외음부암, 자궁암, 자궁내막암, 난관암, 유방암, 전립선암, 타액선 종양, 흉선종, 부신피질 암종, 식도암, 위암, 결장직장암, 충수암, 요로상피 세포 암종, 또는 편평 세포 암종 (예를 들어 폐; 항문생식기 부위, 예컨대 항문, 음경, 자궁경부, 질, 또는 외음부; 또는 식도)을 갖는 환자에게 투여하기 위한 것이다. 추가 실시양태에서, 암은 난소암 또는 폐암 (예를 들어 NSCLC)으로부터 선택된다.
- [0327] 일부 실시양태에서, 방법은 조성물을 니라파립과 조합하여, 특히 재발성 및/또는 백금 감수성 암을 갖는 환자에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 재발성 및/또는 백금 감수성 암은 난소암, 두경부암, 폐암 (예를 들어 비소세포 폐암 (NSCLC)), 신암, 방광암, 흑색종, 메르켈 세포 암종, 자궁경부암, 질암, 외음부암, 자궁암, 자궁내막암, 난관암, 유방암, 전립선암, 타액선 종양, 흉선종, 부신피질 암종, 식도암, 위암, 결장직장암, 충수암, 요로상피 세포 암종, 또는 편평 세포 암종 (예를 들어 폐; 항문생식기 부위, 예컨대 항문, 음경, 자궁경부, 질, 또는 외음부; 또는 식도)이다. 일부 특정 실시양태에서, 재발성 및/또는 백금 감수성 암은 난소암, 항문암, 난관암, 또는 폐암이다. 일부 특정 실시양태에서, 재발성 및/또는 백금 감수성 암은 자궁내막암, 삼중 음성 유방암, 난소암, 비소세포 폐암 (NSCLC), 폐의 편평 세포 암종 또는 항문생식기 부위의 편평 세포 암종 (예를 들어 항문, 음경, 자궁경부, 질, 또는 외음부의 편평 세포 암종)이다. 추가 실시양태에서, 재발성 및/또는 백금 감수성 암은 난소암이다. 이러한 방법은 임의로 항혈관신생제, 예컨대 베바시주맙의 투여를 포함할 수 있다.
- [0328] 투여량
- [0329] 본원에 기재된 조성물은 치료 유효량으로 투여될 수 있다.
- [0330] 본원에 사용된 용어 조성물의 "치료 유효량" 또는 "치료 유효 용량"은 치료될 상태의 1종 이상의 증상의 치료 또는 관리에 있어서 치료 이익을 제공하는 작용제 (예컨대 항체 또는 제약 조성물)의 양을 지칭한다.
- [0331] 치료 유효량 및 치료 요법은 일반적으로 실험적으로 결정되며, 환자의 연령, 체중, 및 건강 상태, 및 치료될 질환 또는 장애와 같은 인자에 좌우될 수 있다. 이러한 인자는 담당 의사의 권한 내에 있다.
- [0332] 임의의 유형의 본원에 제공된 범위는 기재된 특정한 범위 내의 모든 값 및 특정한 범위에 대한 중점 주위의 값을 포함한다.
- [0333] 일부 실시양태에서, 치료 유효 용량은 약 100 - 2000 mg의 균일 용량 (예를 들어 약 100 mg의 균일 용량; 약 200 mg의 균일 용량; 약 300 mg의 균일 용량; 약 400 mg의 균일 용량; 약 500 mg의 균일 용량; 약 600 mg의 균일 용량; 약 700 mg의 균일 용량; 약 800 mg의 균일 용량; 약 900 mg의 균일 용량; 약 1000 mg의 균일 용량; 약 1100 mg의 균일 용량; 약 1200 mg의 균일 용량; 약 1300 mg의 균일 용량; 약 1400 mg의 균일 용량; 약 1500 mg의 균일 용량; 약 1600 mg의 균일 용량; 약 1700 mg의 균일 용량; 약 1800 mg의 균일 용량; 약 1900 mg의 균일 용량; 또는 약 2000 mg의 균일 용량)이다. 일부 실시양태에서, 치료 유효 용량은 약 1 mg/kg이다. 일부 실시양태에서, 치료 유효 용량은 약 3 mg/kg이다. 일부 실시양태에서, 치료 유효 용량은 약 10 mg/kg이다. 일부 실시양태에서, 치료 유효 용량은 약 500 mg의 균일 용량이다. 일부 실시양태에서, 치료 유효 용량은 약 800 mg이다. 일부 실시양태에서, 치료 유효 용량은 약 1000 mg이다.
- [0334] 한 실시양태에서, 조성물은 2-6주 (예를 들어 2, 3 또는 4주, 특히 3주)마다 1회 투여된다.
- [0335] 한 실시양태에서, 조성물은 2-6 투여 주기 (예를 들어, 처음 3, 4, 또는 5 투여 주기, 특히 처음 4 투여 주기) 동안 3주마다 1회 투여된다.
- [0336] 한 실시양태에서, 조성물은 4회 용량 동안 3주마다 500 mg으로 투여되고, 이어서 질환 진행까지 6주마다 1000 mg으로 투여된다.
- [0337] 원하는 경우에, (치료) 조성물의 유효 1일 용량은 임의로 단위 투여 형태로, 하루에 걸쳐 적절한 간격으로 개별적으로 투여되는 2, 3, 4, 5, 6회 또는 그 초과 용량으로 투여될 수 있다.
- [0338] 본 개시내용은 암의 치료를 필요로 하는 환자에게 조성물을 제1 기간 동안 제1 간격으로 제1 용량으로 투여하고; 환자에게 조성물을 제2 기간 동안 제2 간격으로 제2 용량으로 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공한다.

- [0339] 일부 실시양태에서, 제1 용량 및 제2 용량은 상이하다. 일부 실시양태에서, 제1 용량은 약 500 mg이고, 제2 용량은 약 1000 mg이다.
- [0340] 일부 실시양태에서, 제1 간격 및 제2 간격은 상이하다. 일부 실시양태에서, 제1 간격은 3주마다 1회이고, 제2 간격은 6주마다 1회이다. 일부 실시양태에서, 조성물은 2-6 투여 주기 (예를 들어, 처음 3, 4, 또는 5 투여 주기, 특히 처음 4 투여 주기)의 제1 기간 동안 3주마다 1회 500 mg의 제1 용량으로 투여되고, (예를 들어, 질환 진행, 유해 사건으로 인해, 또는 의사에 의해 결정된 바와 같이) 요법이 중단될 때까지 6주마다 1회 1000 mg의 제2 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 처음 3 투여 주기 동안 3주마다 1회 500 mg의 제1 용량으로 투여되고, (예를 들어, 질환 진행, 유해 사건으로 인해, 또는 의사에 의해 결정된 바와 같이) 요법이 중단될 때까지 6주마다 1회 이상 1000 mg의 제2 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 처음 4 투여 주기 동안 3주마다 1회 500 mg의 제1 용량으로 투여되고, (예를 들어, 질환 진행, 유해 사건으로 인해, 또는 의사에 의해 결정된 바와 같이) 요법이 중단될 때까지 6주마다 1회 이상 1000 mg의 제2 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 처음 5 투여 주기 동안 3주마다 1회 500 mg의 제1 용량으로 투여되고, (예를 들어, 질환 진행, 유해 사건으로 인해, 또는 의사에 의해 결정된 바와 같이) 요법이 중단될 때까지 6주마다 1회 이상 1000 mg의 제2 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 제2 용량은 6주마다 1회 투여된다.
- [0341] 일부 실시양태에서, 조성물은 1주 1회 (Q1W), 2주마다 1회 (Q2W), 3주마다 1회 (Q3W), 4주마다 1회 (Q4W), 5주마다 1회 (Q5W), 또는 6주마다 1회 (Q6W)의 투여 간격 (또는 치료 주기)으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 1주 1회 (Q1W)의 투여 간격 (또는 치료 주기)으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 2주마다 1회 (Q2W)의 투여 간격 (또는 치료 주기)으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 3주마다 1회 (Q3W)의 투여 간격 (또는 치료 주기)으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 4주마다 1회 (Q4W)의 투여 간격 (또는 치료 주기)으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 5주마다 1회 (Q5W)의 투여 간격 (또는 치료 주기)으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 6주마다 1회 (Q6W)의 투여 간격 (또는 치료 주기)으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 적어도 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 주, 또는 그 초과 기간 동안 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 치료 주기의 제1일에 또는 치료 주기의 제1일의 1, 2, 또는 3일 내에 투여된다.
- [0342] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물은 환자의 임상 이익을 달성하는 것으로 입증된 투여 요법에 따라 투여된다. 일부 실시양태에서, 임상 이익은 안정 질환 ("SD"), 부분 반응 ("PR") 및/또는 완전 반응 ("CR")이다. 일부 실시양태에서, 임상 이익은 안정 질환 ("SD")이다. 일부 실시양태에서, 임상 이익은 부분 반응 ("PR")이다. 일부 실시양태에서, 임상 이익은 완전 반응 ("CR")이다. 일부 실시양태에서, PR 또는 CR은 고형 종양의 반응 평가 기준 (RECIST)에 따라 결정된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 임상 이익을 유지하기 위해 보다 긴 기간 동안 투여된다.
- [0343] 본원에 개시된 모든 특허 및 참고 문헌은 명백하게 및 전적으로 본원에 참조로 포함된다.
- [0344] 실시예
- [0345] 도스탈리맵은 각각의 중쇄 상에 단일 N-연결된 글리코실화 부위를 갖는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄로 구성된 IgG4 카파 이소형의 인간화 모노클로날 항체 (mAb)이다.
- [0346] 상업적 공정 및 규모로 제조된 도스탈리맵 약물 물질 (DS) 배치 (2개의 배치)를 사용하여 도스탈리맵 항체의 집단을 완전히 특징화하였다. 물리화학적 특성, 불균질성, 생물학적 활성, 면역화학적 특성 및 분해 경로와 함께, 1차, 2차, 및 보다 고차의 구조를 평가하였다. 결과는 임상 참조 표준 물질 (CRS)에 대한 이전의 특징화 결과와 일치한다. 특징화 데이터의 요약은 하기에 제시한다. 특징화 방법은 이것이 처음 언급된 섹션에 간략하게 기재되어 있다.
- [0347] 1. 펩티드 맵에 의한 아미노산 서열 확인
- [0348] 단백질 특징화를 위한 특정 펩티드 맵핑 방법을 사용하여 아미노산 서열을 확인하였다. 도스탈리맵 샘플을 구아니딘 히드로클로라이드로 변성시키고, 디티오프레이톨 (DTT)로 환원시키고, 아이오도아세트아미드로 알킬화시키고, 엔도프로테아제 Lys-C (Lys-C) 또는 트립신으로 소화시켰다. Lys-C 또는 트립신으로의 효소적 소화는 37°C에서 4시간 동안 달성하였다. 샘플 소화는 액체 크로마토그래피와 탠덤 질량 분광측정법 (LC-MS/MS) 분석 전에 트리플루오로아세트산으로 컨칭하였다. LC-MS/MS 분석 시스템은 C18 칼럼을 갖는 역상 초고성능 액체 크로마토그래피 (UHPLC), 214 nm에서의 UV 검출, 및 전기분무 이온화 질량 분광측정법 (ESI-MS)을 사용하였다.

[0349] Lys-C 펩티드 맵의 결과는 경쇄 및 중쇄의 예측되는 전체 아미노산 서열의 98.3%를 확인시켜주었다. 여러 소형 펩티드 (LL12: H189-K190, LH9: V210-K212, LH17: C317-K318, LH18: V319-K322)는 확인되지 않았고, 이는 MS 신호 데이터 수집 전의 조기 용리로 인한 것일 가능성이 있다. 이들 소형 펩티드를 확인하기 위해, 도스탈리맵의 트립신 소화물을 LC-MS/MS 분석에 의해 분석하였다. 오절단된 트립신 펩티드 (TL16-17: H189-K207, TH13-15: T196-R213, TH24-25: C317-K322)가 확인되었고, Lys-C 펩티드 맵에서 그러한 누락 펩티드에 대한 서열 커버리지를 완료하였다.

[0350] 조합된 Lys-C 및 트립신 펩티드 맵 데이터는 예측되는 아미노산 서열의 100%를 확인시켜주었다.

[0351] 1.1 말단 아미노산 서열

[0352] N-말단 및 C-말단 아미노산 서열을 트립신 펩티드 맵을 사용하여 확인하였다. 도스탈리맵 샘플을 LC-MS/MS 분석 전에 변성시키고, 환원시키고, 알킬화시키고, 트립신으로 소화시켰다.

[0353] 펩티드 상의 N-말단 또는 C-말단 아미노산은 MS/MS에 의해 검출되지 않았다. 이는 말단 아미노산 서열의 확인에 영향을 미치지 않는다. MS/MS 데이터에서의 단편화 패턴 및 측정된 분자량 (MW)의 조합은 말단 아미노산의 다른 치환을 제거하기에 충분하다. 따라서, 도스탈리맵 경쇄 및 중쇄의 N-말단 및 C-말단 서열은 이론적 서열과 일치한다.

[0354] 2. 번역후 변형

[0355] 2.1 글리칸 분석

[0356] Lys-C 펩티드 맵에서의 펩티드 LH14-15: T285-K313을 그의 탈글리코실화된 형태와 비교함으로써 도스탈리맵의 단일 글리코실화 부위를 결정하였다. PNGase F를 사용한 탈글리코실화 시, LH14-15: T285-K313 펩티드 피크가 신호에서 증가하였고, MS 데이터는 피크 및 글리코실화 부위를 식별한 것이 아스파라긴 293임을 확인시켜주었다. N-글리칸의 존재 및 부재 하의 LH14-15: T285-K313 펩티드의 피크 면적 (추출된 이온)을 사용하여 99%의 글리코실화 점유율을 계산하였다.

[0357] 2.2 다른 번역후 변형

[0358] Lys-C 및 트립신 펩티드 맵으로부터의 추출된 이온 피크 면적을 사용하여 도스탈리맵 단백질에 대한 번역후 변형 (PTM)을 정량화하였다.

[0359] 3. 불균질성 분석

[0360] 3.1 크기 불균질성 특징화

[0361] 도스탈리맵에 대한 크기 변이체를 정제용 크기-배제 HPLC (SE-HPLC)에 의해 평가하였다. 분석용 SE-HPLC, 환원 및 비-환원 모세관 전기영동 (환원 CE-SDS 및 비-환원 CE-SDS), 모세관 등전 포커싱 (cIEF), MSD 결합 검정, 광산란 방법, 및 분석용 초원심분리 침강 속도 (AUC-SV)를 사용하여 SE-HPLC 분석의 특징화를 수행하였다. 결과를 하기에 요약한다.

[0362] 3.1.1 크기 배제 크로마토그래피

[0363] SE-HPLC 분석에 의해, 도스탈리맵은 단량체로서 우세하게 용리되는 한편, 단량체 피크보다 더 빨리 용리되는 낮은 수준의 고분자량 중 (HMW)을 또한 관찰하였다 (표 2). 단량체 피크보다 나중에 용리되는 저분자량 중 (LMW)은 방법 정량화 한계 미만이었다.

[0364] 표 2: 도스탈리맵에 대한 SE-HPLC 결과

샘플	단량체 %	HMW %	LMW % ^a
도스탈리맵	99.2	0.8	<0.05

[0365]

[0366]^a 방법 실용 정량화 한계 (PQL) = 0.05%.

[0367] 3.1.2 SEC-MALS

[0368] 도스탈리맵을 SE-HPLC 및 다중각도 광-산란 (SEC-MALS)에 의해 분석하였다. 측정된 MW는 HMW 종이 이량체화된 도스탈리맵 단백질 및 그에 부착된 여분의 50 kDa 분자를 갖는 단량체 (아마도 2개의 경쇄 (LC) 서브유닛을 갖

는 단량체, 또는 단량체에 비-공유 결합된 LC-LC 이량체)로 구성되었음을 나타낸다.

[0369] 3.1.3 cIEF

[0370] 모세관 등전 포커싱 (cIEF)을 사용하여 도스탈리맵 및 별개의 전하 변이체의 pI를 측정하였다. 방법은 총 면적 피크의 백분율로서 산성 및 염기성 종을 정량화한다. 대표적인 전기영동도 및 전하 변이체 분포를 각각 도 1 및 표 3에 제시한다.

[0371] 표 3: 도스탈리맵에 대한 cIEF 결과

샘플	주요 피크의 pI	산성 피크%	주요 피크%	염기성 피크% ^a
도스탈리맵	7.51	21.5	74.2	< 5.0

[0372] a 방법 PQL = 5.0%

[0373] 4. 기능적 활성 (효력)

[0374] 도스탈리맵은 프로그램화된 세포 사멸 단백질 1 (PD-1)과 그의 리간드 프로그램화된 세포 사멸-리간드 1 (PD-L1) 및 프로그램화된 세포 사멸-리간드 2 (PD-L2) 사이의 상호작용을 차단하는 IgG4 mAb이다. PD-1은 PD-L1, 및 보다 적은 정도로 PD-L2에 대한 결합을 통해 T-세포 활성화를 제한하는, T 세포 상에서 발현되는 세포 표면 수용체이다. PD-1은 또한 T 세포 항원 수용체 및 공동-자극 수용체로부터의 티로신 키나제 신호전달을 제한한다. PD-1/PD-L1 체크포인트는 국부 염증 반응을 제어하고 자기-관용을 유지하는 것을 돕는 T 세포 활성의 음성 조절제로서 기능한다. 도스탈리맵의 생물활성 및 결합 특성을 하기 기재된 바와 같이 MSD 효력 검정, 세포-기반 효력 검정 (생물검정) 및 Fc 수용체 (FcRn) 결합을 포함한 다양한 분석 방법을 사용하여 평가하였다.

[0375] 4.1 MSD 결합

[0376] 메소 스케일 디스커버리 (MSD) 효력 검정은 PD-1 단백질을 구성적으로 발현하는 조작된 CHO K1 세포를 사용한다. 도스탈리맵의 활성은 CHO K1 세포 상의 PD-1에 대한 리간드 결합을 억제하는 도스탈리맵의 용량-의존성 능력을 측정하는 경쟁적 결합을 사용하여 평가한다. 리간드 (PD-L1)를 검정에서 리간드로서 사용한다 (PD-L1-mFc). 판독은 정량화될 수 있는 전기화학발광 (ECL) 신호를 방출하는 특이적 검출 항체 혼합물을 사용하여 측정한다. 결과는 참조 물질 (예를 들어 대조군 샘플) 대비 퍼센트 효력으로서 보고한다.

[0377] 4.2 세포-기반 생물검정

[0378] 도스탈리맵의 작용 메커니즘을 밀접하게 모방하는 프로메가 PD-1/PD-L1 차단 생물검정 (카탈로그 번호 J1250 또는 J1255)을 사용하여 세포 기반 효력 생물검정을 개발하였다. 구체적으로, 인간 PD-1 및 활성화된 T-세포 반응 요소의 핵 인자 (NFAT-RE)에 의해 구동되는 루시페라제 리포터 유전자를 발현하는 PD-1 이펙터 세포 (Jurkat T 세포 (프로메가 # J1155))를 PD-L1을 발현하는 PD-L1 aAPC (인공 항원 제시 세포) (CHO-K1 세포 (프로메가 # J1095))와 공동-배양한다. 2가지 세포 유형을 공동-배양하는 경우에, PD-1/PD-L1 상호작용은 TCR 신호전달 및 결과적으로 NFAT-RE-매개 발광을 억제한다. 도스탈리맵 (PD-1/PD-L1 상호작용을 차단하는 항-PD-1 항체)의 첨가는 억제 신호를 방출하여, TCR 활성화 및 NFAT-RE-매개 발광을 발생시킨다. 억제 신호의 이러한 도스탈리맵 차단은 용량-의존성이고, 생성된 발광은 플레이트 판독기를 사용하여 정량화될 수 있다. 신호 반응으로부터, y-축 상에 상대 루시페라제 단위 (RLU) vs. x 축 상에 log₂ 변환된 농도를 플롯팅함으로써 참조 물질 및 도스탈리맵 샘플 둘 다에 대해 4-파라미터 곡선을 생성한다. 중앙 유효 농도 (EC50) 값을 내삽하고, 이를 사용하여 참조 물질의 효력과 비교하여 도스탈리맵 샘플의 효력을 계산한다.

[0379] 4.2.1 FcRn 결합

[0380] 신생아 FcRn 결합은 신체 내 IgG 분자의 대사 운명에서 소정의 역할을 한다. FcRn에 대한 IgG의 약한 결합은 혈청에서 혈전 감소된 지속성을 발생시킨다.

[0381] FcRn 결합을 비아코어 분석을 통해 평가하였다. 도스탈리맵 참조 물질, 및 헤르셉틴 (IgG1)을 각각 센서 칩 상에 고정시켰다. 회합 및 해리 특성의 분석을 위해 다양한 농도의 분석물 (FcRn)을 주입하였다. 분석된 3가지 샘플에 대한 FcRn 결합 강도는 IgG1 및 IgG4에 대해 예상된 바와 같이 유사하였다 (표 4 참조).

[0383] 표 4: FcRn 결합 결과

리간드	분석물	K _D (M)
도스탈리맵	FcRn	1.75 × 10 ⁻⁶
참조 물질	FcRn	1.69 × 10 ⁻⁶
헤르셉틴	FcRn	1.80 × 10 ⁻⁶

[0384]

[0385] 5. 분해 생성물 및 경로

[0386] 도스탈리맵에 대한 분해 경로를 평가하기 위해 상업적 규모 (배치 #1)로 제조된 DS에 대해 강제 분해 연구를 수행하였다. 분해된 샘플을 SE-HPLC, cIEF, 환원 CE-SDS 및 비-환원 CE-SDS에 의해 순도에 대해 평가하였다. 추가적으로, 샘플을 MSD 결합 검정, 세포-기반 생물검정 및 FcRn 결합 검정에 의해 기능에 대해 평가하였다. PTM을 환원된 Lys-C 또는 트립신 펩티드 맵에 의해 평가하였다. 연구 결과를 하기 섹션에 요약한다.

[0387] 5.1 열 분해 조건

[0388] 도스탈리맵 샘플을 40°C 또는 50°C에서 최대 3주 동안 인큐베이션하였다. 샘플을 시험 시간까지 동결 상태로 유지시켰다.

[0389] SE-HPLC 결과는 샘플을 40°C에서 3주 동안 인큐베이션한 후에 HMW 종의 약간의 증가를 보여주었다 (표 5).

[0390] 환원 CE-SDS 및 비-환원 CE-SDS 둘 다는 40°C 조건에서 분석 가변성을 벗어난 변화를 보여주지 않았다. 이는 환원 CE-SDS에서의 LMW, 중간 분자량 (MMW), 및 HMW; 및 비-환원 CE-SDS에서의 "프리-피크" 및 "포스트-피크" 영역을 포함한다 (데이터는 제시되지 않음).

[0391] cIEF 데이터는 50°C에서 최대 3주 동안 인큐베이션된 샘플에 대해 비스트레스 대조군과 비교하여 산성 종의 증가 (최대 59.1%)를 보여주었다 (표 6).

[0392] 펩티드 맵 데이터는 Asp 261/266/276에서의 약간 상승된 이성질체화 (이성질체화의 특이적 부위는 확인되지 않았음), Asn 380 및 Asn 385에서의 탈아미드화, 및 40°C 조건에서 Met 248 및 Met 354에서의 산화를 나타내었다 (표 7). 이들 미미한 변화는 여전히 분석 가변성 내에 있지만, 50°C 데이터에 의해 경향이 확인되었다. 50°C에서 3주 동안의 열 분해는 40°C 조건에 의해 나타난 동일한 경향을 보여주었지만, 변화는 보다 현저하였다. 보다 빠른 속도로 증가하는 응집체 및 단편이 또한 관찰되었다 (데이터는 제시되지 않음).

[0393] 50°C 조건 하에 관찰된 HMW 종은 주로 보다 고차의 응집체이며, 이는 비스트레스 및 40°C 조건 샘플에서 관찰된 이량체화와는 상이하다. 환원 또는 비-환원 CE-SDS는 HMW 수준의 변화를 보여주지 않았지만, 단편의 약간의 증가가 관찰되었다 (데이터는 제시되지 않음).

[0394] 상기 기재된 바와 같이, 50°C 조건의 경우, 펩티드 맵 데이터는 HC Asp 261/266/276에서의 증가된 이성질체화, HC Asn 380 및 HC Asn 385에서의 탈아미드화, 및 HC Met 248, HC Met 354 및 HC Met 424에서의 산화를 나타내었다. 이들 PTM의 증가는 퍼센트 산성 종의 상응하는 증가를 발생시켰고, 이는 염기 가수분해 및 산화 조건으로부터의 강제 분해 결과와 일치한다. 모든 다른 번역후 변형 수준은 분석 가변성 내에 있었다.

[0395] 상대 효력 및 FcRn 결합은 최대 3주 동안 40°C 및 50°C 열 분해 조건에서 관찰된 변화에 의해 영향을 받지 않았다 (표 8). 관찰된 미미한 차이는 예상된 분석 가변성 내에 있었다.

[0396] 표 5: 열 분해된 도스탈리맵에 대한 SE-HPLC 결과

조건	단량체 %	HMW %	LMW % ^a
비스트레스 대조군	99.1	0.9	ND
40°C, 1주	98.9	1.0	< 0.05
40°C, 2주	98.9	1.1	< 0.05
40°C, 3주	98.5	1.4	0.08
50°C, 1주	94.8	4.3	0.9
50°C, 2주	91.1	7.7	1.3
50°C, 3주	87.4	11.2	1.5

[0397]

[0398] 약어: ND = 검출되지 않음

[0399] ^a 방법 PQL = 0.05%

[0400] 표 6: 열 분해된 도스탈리맘에 대한 cIEF 결과

조건	주요 피크의 pI	산성 피크%	주요 피크%	염기성 피크% ^a
비스트레스 대조군	7.50	21.8	73.9	< 5.0
40°C, 1주	7.50	25.2	69.9	< 5.0
40°C, 2주	7.50	30.0	65.4	< 5.0
40°C, 3주	7.50	33.8	62.1	< 5.0
50°C, 1주	7.50	38.7	54.0	7.3
50°C, 2주	7.50	50.3	41.3	8.3
50°C, 3주	7.50	59.1	33.4	7.5

[0401]

[0402] ^a 방법 PQL = 5.0%

[0403] 표 7: 열 분해된 도스탈리맘에 대한 PTM 존재비

펩티드	영역	PTM	PTM 존재비 (%) ^a		
			비스트레스 대조군	40°C, 3주	50°C, 3주
LH: D245-K284	Fc	HC: Met 248 산화	3.0	5.4	7.6
TH: T252-K284	Fc	HC: Asp 261/266/276 이성질체화 ^b	1.0	2.8	13.1
TH: V298-K313	Fc	HC: Asn 311 탈아미드화	6.0	6.5	7.4
LH: G337-K356	Fc	HC: Met 354 산화	< 1.0	1.9	4.2
LH: G367-K388	Fc	HC: Asn 380 탈아미드화	8.4	10.0	14.7
LH: G367-K388	Fc	HC: Asn 385 탈아미드화	< 1.0	2.1	5.9
LH: T389-K410	Fc	HC: Asp 395/397/409 이성질체화 ^b	< 1.0	< 1.0	2.2
LH: S411-K435	Fc	HC: Met 424 산화	< 1.0	1.7	3.5
LH: S411-K435	Fc	HC: Asn 430 탈아미드화	1.2	1.2	2.0
LH: S436-K443	C-말단	HC: Lys 443 클리핑	97.8	97.8	97.8
LL: V150-K169	Fab, 비-CDR	LC: Asp 151/167 이성질체화 ^b	< 1.0	1.1	2.5

[0404]

[0405] 약어: LH = Lys-C 소화로부터의 중쇄 펩티드, LL = Lys-C 소화로부터의 경쇄 펩티드, TH = 트립신 소화로부터의 중쇄 펩티드, TL = 트립신 소화로부터의 경쇄 펩티드

[0406] ^a PTM 수준이 모든 샘플에서 <1.0%인 경우, 변화는 비유의한 것으로 간주되었고, 결과는 열거되지 않음.

[0407] ^b 변형 부위는 MS/MS에 의해 확인되지 않음

[0408] 표 8: 열 분해된 도스탈리맵에 대한 상대 효력 결과 (MSD 결합, 세포-기반 생물검정 및 FcRn 결합)

조건	상대 효력		FcRn 결합 (KD, M)
	MSD 결합	세포-기반 생물검정	
비스트레스 대조군	88%	98%	2.14×10^{-6}
40°C, 3주	88%	94%	2.25×10^{-6}
50°C, 3주	76%	86%	2.29×10^{-6}

[0409] 요약하면, 열 분해 조건 하에 관찰된 분해 생성물은 HMW 중, 단편, Asp 261/266/276에서의 이성질체화, Asn 380 및 Asn 385에서의 탈아미드화, 및 Met 248, Met 354 및 Met 424에서의 산화이다. 하기 속성의 조합은 도스탈리맵의 상대 효력 (MSD 결합 (76%) 및 생물검정 (86%)) 및 FcRn 결합에 부정적인 영향을 미치지 않는다:

[0411] • 최대 11.2%의 HMW (SE-HPLC로부터)

[0412] • 4.5 - 4.6%의 단편 수준 (환원 CE-SDS에서 LMW % + MMW % 및 비-환원 CE-SDS에서 프리-피크 %로부터)

[0413] • HC Asp 261/266/276에서 최대 13.1%의 이성질체화 (펩티드 맵으로부터)

[0414] • HC Asn 380에서 최대 14.7% 및 HC Asn 385에서 최대 5.9%의 탈아미드화 (펩티드 맵으로부터)

[0415] • HC Met 248에서 최대 7.6%, HC Met 354에서 최대 4.2% 및 HC Met 424에서 최대 3.5%의 산화 (펩티드 맵으로부터)

[0416] • 최대 59.1%의 산성 중 (cIEF로부터)

[0417] 최대 7.1%의 HC N-말단 피로-글루타메이트. HMW 및 효력 (생물검정)에 대한 데이터로부터 외삽하면, 최대 36%의 HMW는 적어도 60% 효력 (생물검정)을 발생시킬 수 있다. 최대 26%의 HMW는 적어도 70% 효력 (생물검정)을 발생시킬 수 있다. 이는 0.9% (대조군), 1.4% (40°C, 3주) 및 11.2% (50°C, 3주) HMW 샘플에 대한 선형 기울기를 사용하여 계산되며, 이들은 각각 98%, 94% 및 86% 효력 (생물검정)을 갖는다.

[0418] 5.2 산 및 염기 가수분해

[0419] 5.2.1 산 가수분해

[0420] 도스탈리맵 샘플을 HCl을 사용하여 pH 4.0으로 적정하고, 25°C에서 최대 3주 동안 인큐베이션하였다. 완료되면, 샘플을 시험 시간까지 동결 상태로 유지시켰다. 초기 시점 샘플 T0을 낮은 pH에 노출시켰지만, 승온에서 인큐베이션하지 않았다. 표적 조건 pH가 샘플에서 확립되면, 이를 즉시 동결시켜 분해를 정지시켰다.

[0421] SE-HPLC 결과는 초기 낮은 pH 노출 시 HMW 종의 증가를 보여주었다 (표 9). HCl을 샘플에 첨가한 경우, 극도로 낮은 pH에 대한 초기 국부 노출이 존재하였고, 이는 도스탈리맵이 더 높은 차수의 응집체를 형성하게 하였다. HMW 종은 3주 인큐베이션 동안 대략 2%만큼 증가하였고, LMW 종은 3-주 인큐베이션 동안 미량으로 유지되었다. 산 가수분해 하에 관찰된 HMW 종은 주로 보다 고차의 응집체이며, 이는 비스트레스 샘플에서 관찰되는 이량체화와는 상이하다.

[0422] cIEF 데이터는 비스트레스 샘플과 pH 4.0에서 최대 3주 동안 인큐베이션된 샘플 사이에서 산성 피크의 백분율에 있어서 어떠한 변화도 보이지 않았다 (표 10). 관찰된 미미한 차이는 예상된 분석 가변성 내에 있었다. 낮은 pH에 대한 초기 노출 시 주요 피크 백분율의 감소가 관찰되었고, 인큐베이션 시간이 연장됨에 따라 경향은 계속되었다. 주요 피크 백분율이 감소함에 따라, 염기성 피크의 백분율은 비례하여 증가하였다. 염기성 종의 주요 성분 중 하나는 단백질 응집체이기 때문에, 이들 산 처리된 샘플의 SE-HPLC 결과에서 입증된 증가된 HMW 수준은 이러한 발견을 지지한다. 환원 및 비-환원 CE-SDS 데이터는 어떠한 변화도 보여주지 않았다 (제시되지 않음). 펩티드 맵 데이터는 산 가수분해와 관련된 PTM 수준에서 어떠한 차이도 보여주지 않았고, 관찰된 미미한 차이는 예상된 분석 가변성 내에 있었다 (표 11).

[0423] 상대 효력 및 FcRn 결합은 최대 3주 동안 pH 4.0에서 관찰된 변화에 의해 영향을 받지 않았고 (표 12), 관찰된 차이는 예상된 분석 가변성 내에 있었다.

[0424] 표 9: 산 분해된 도스탈리맵에 대한 SE-HPLC 결과

조건	단량체 %	HMW %	LMW % ^a
비스트레스 대조군	99.1	0.9	ND
T0 (pH 4.0에 노출시킴, 인큐베이션 없음)	86.5	13.4	< 0.05
pH 4.0, 25°C, 3일	84.6	15.3	0.05
pH 4.0, 25°C, 1주	84.5	15.5	0.06
pH 4.0, 25°C, 2주	84.1	15.9	0.07
pH 4.0, 25°C, 3주	84.7	15.2	0.09

[0425]

[0426] 약어: ND = 검출되지 않음

[0427]^a 방법 PQL = 0.05%

[0428] 표 10: 산 분해된 도스탈리맵에 대한 cIEF 결과

조건	주요 피크의 pI	산성 피크%	주요 피크%	염기성 피크% ^a
비스트레스 대조군	7.50	21.8	73.9	< 5.0
T0 (pH 4.0에 노출시킴, 인큐베이션 없음)	7.50	24.1	62.3	13.6
pH 4.0, 25°C, 3일	7.50	20.1	62.6	17.4
pH 4.0, 25°C, 1주	7.50	22.5	56.0	21.6
pH 4.0, 25°C, 2주	7.50	22.6	49.6	27.8
pH 4.0, 25°C, 3주	7.50	21.7	44.3	34.1

[0429]

[0430]^a 방법 PQL = 5.0%

[0431] 표 11: 산 분해된 도스탈리맵에 대한 PTM 존재비

펩티드	영역	PTM	PTM 존재비 (%) ^a		
			비스트레스 대조군	T0	pH 4.0, 25°C, 3w
LH: D245-K284	Fc	HC: Met 248 산화	3.0	3.8	3.1
TH: T252-K284	Fc	HC: Asp 261/266/276 이성질체화 ^b	1.0	< 1.0	3.0
TH: V298-K313	Fc	HC: Asn 311 탈아미드화	6.0	7.1	7.2
LH: G367-K388	Fc	HC: Asn 380 탈아미드화	8.4	10.1	9.7
LH: G367-K388	Fc	HC: Asn 385 탈아미드화	< 1.0	1.5	1.8
LH: T389-K410	Fc	HC: Asp 395/397/409 이성질체화 ^b	< 1.0	< 1.0	2.7
LH: S411-K435	Fc	HC: Asn 430 탈아미드화	1.2	< 1.0	1.0
LH: S436-K443	C-말단	HC: Lys 443 클리핑	97.8	97.1	97.0
LL: S127-K145	Fab, 비-CDR	LC: Asn 137 탈아미드화	< 1.0	1.2	1.2

[0432]

[0433] 약어: LH = Lys-C 소화로부터의 중쇄 펩티드, TH = 트립신 소화로부터의 중쇄 펩티드, LL = Lys-C 소화로부터의 경쇄 펩티드, TL = 트립신 소화로부터의 경쇄 펩티드

[0434] ^a PTM 수준은 모든 샘플에서 <1.0%일 때 열거되지 않음

[0435] ^b 변형 부위는 MS/MS에 의해 확인되지 않음

[0436] 표 12: 산 분해된 도스탈리맵에 대한 상대 효력 결과 (MSD 결합, 세포-기반 생물검정 및 FcRn 결합)

조건	상대 효력		FcRn 결합 (KD, M)
	MSD 결합	세포-기반 생물검정	
비스트레스 대조군	88%	98%	2.14×10^{-6}
T0 (pH 4.0에 노출시킴, 인큐베이션 없음)	99%	109%	2.06×10^{-6}
pH 4.0, 25°C, 3주	88%	125%	1.98×10^{-6}

[0437]

[0438] 요약하면, 산 가수분해 조건 하에 관찰된 분해 생성물은 HMW 종 (주로 보다 고차의 응집체)이다. 결론적으로, 최대 15.2%의 HMW (SE-HPLC에 의한) 및 최대 34.1%의 염기성 종은 상대 효력 및 FcRn 결합에 부정적인 영향을 미치지 않는다.

[0439] 5.2.2 염기 가수분해

[0440] 도스탈리맵 샘플을 NaOH를 사용하여 pH 9.0으로 적정하고, 40°C에서 최대 3주 동안 인큐베이션하였다. 40°C 조건은 의미있는 수준의 분해가 관찰될 수 있도록 보장하기 위해 초기 조건 스크리닝에 기초하여 선택하였다. 완료되면, 분해를 정지시키기 위해 샘플을 시험 시간까지 동결 상태로 유지시켰다. 초기 샘플 T0을 또한 높은 pH에 노출시켰지만, 승온에서 인큐베이션하지 않았다. 일단 표적 pH가 샘플에서 확립되면 T0 샘플을 즉시 동결시켰다.

[0441] SE-HPLC 결과는 초기 높은 pH 노출 시 HMW 종의 증가를 보여주었다 (표 13). NaOH를 샘플에 첨가한 경우, 극도로 높은 pH에 대한 초기 국부 노출이 존재하였고, 이는 도스탈리맵이 더 높은 차수의 응집체를 형성하게 하였다. HMW 종은 3-주 인큐베이션 동안 대략 4% 증가하였다. 염기 가수분해 하에 관찰된 HMW 종은 주로 보다 고차의 응집체이며, 이는 비스트레스 샘플에서 관찰되는 이량체화와는 상이하다. LMW 종은 약간 상승하였고, 3-주 인큐베이션 동안 1% 미만으로 유지되었다. SE-HPLC 도면에서, 주요 피크로서 제시된 피크는 단량체임을 주목한다.

[0442] cIEF 데이터는 초기 높은 pH 노출 시 주요 피크 백분율의 감소를 보여주었고, 연장된 인큐베이션 시간에 따라 경향은 계속되었다 (표 14). 주요 피크 백분율이 감소하는 동안, 산성 피크의 백분율은 상응하게 증가하였다. 염기성 피크의 백분율이 약간 감소하는 것으로 보였지만, 변화는 여전히 분석 가변성 내에 있었다. 환원 및 비-환원 CE-SDS 데이터 둘 다는 초기 높은 pH 노출 시 어떠한 변화도 나타내지 않았다 (제시되지 않음). 3-주 인큐베이션 후에, 단편 및 HMW 수준의 증가가 관찰되었다. 도스탈리맵을 3주 동안 높은 pH 조건에 노출시킨 후, 펩티드 맵 분석은 HC Asp 147에서의 상승된 이성질체화, HC Asn 380 및 HC Asn 385에서의 탈아미드화, LC Asp 151/167에서의 이성질체화 및 Met 248에서의 산화를 나타내었다 (표 15). 모든 다른 PTM 수준은 분석 가변성 내에 있었다. 응집체, 단편, 이성질체화, 및 탈아미드화의 조합은 우세한 종으로서 산성 종으로의 높은 pH 처리된 도스탈리맵 샘플 이동의 전하 프로파일을 유발하였다.

[0443] 도스탈리맵 전하 프로파일은 이동하였지만, 상대 효력 및 FcRn 결합은 최대 1주 동안 pH 9.0에서 관찰된 변화에 의해 영향을 받지 않았다 (표 16).

[0444] 표 13: 염기 분해된 도스탈리맵에 대한 SE-HPLC 결과

조건	단량체 %	HMW %	LMW %
비스트레스 대조군	99.1	0.9	ND
T0 (pH 9.0에 노출시킴, 인큐베이션 없음)	91.7	8.1	0.2
pH 9.0, 40°C, 3일	90.9	8.7	0.4
pH 9.0, 40°C, 1주	90.4	9.2	0.4
pH 9.0, 40°C, 2주	89.1	10.3	0.7
pH 9.0, 40°C, 3주	88.0	11.1	0.8

[0445]

[0446] 약어: ND = 검출되지 않음

[0447] 표 14: 염기 분해된 도스탈리맵에 대한 cIEF 결과

조건	주요 피크의 pI	산성 피크%	주요 피크%	염기성 피크% ^a
비스트레스 대조군	7.50	21.8	73.9	< 5.0
T0 (pH 9.0에 노출시킴, 인큐베이션 없음)	7.51	27.2	70.0	< 5.0
pH 9.0, 40°C, 3일	7.50	60.3	38.0	< 5.0
pH 9.0, 40°C, 1주	7.50	80.1	18.8	< 5.0
pH 9.0, 40°C, 2주	7.49	91.6	7.3	< 5.0
pH 9.0, 40°C, 3주	7.49	96.8	2.6	< 5.0

[0448]

[0449] ^a 방법 PQL = 5.0%

[0450] 표 15: 염기 분해된 도스탈리맵에 대한 PTM 존재비

펩티드	영역	PTM	PTM 존재비 (%) ^a		
			비스트레스 대조군	T0	pH 9.0, 40°C, 1w
TH: G44-K65	CDR	HC: Asp 62 이성질체화	< 1.0	< 1.0	2.3
TH: N77-R87	Fab, 비-CDR	HC: Asn 84 탈아미드화	< 1.0	< 1.0	1.3
LH: D147-K195	Fab, 비-CDR	HC: Asp 147 이성질체화	< 1.0	< 1.0	20.8
LH: D245-K284	Fc	HC: Met 248 산화	3.0	2.8	7.1
TH: T252-K284	Fc	HC: Asp 261/266/276 이성질체화 ^b	1.0	< 1.0	1.4
TH: V298-K313	Fc	HC: Asn 311 탈아미드화	6.0	6.8	7.1
LH: G337-K356	Fc	HC: Met 354 산화	< 1.0	< 1.0	1.2
LH: G367-K388	Fc	HC: Asn 380 탈아미드화	8.4	10.8	27.8
LH: G367-K388	Fc	HC: Asn 385 탈아미드화	< 1.0	1.8	27.2
LH: N357-K366	Fc	HC: Asn 357/Gln 358 탈아미드화 ^b	< 1.0	<1.0	1.0
LH: S411-K435	Fc	HC: Met 424 산화	< 1.0	< 1.0	2.0
LH: S411-K435	Fc	HC: Asn 430 탈아미드화	1.2	< 1.0	1.2
LH: S436-K443	C-말단	HC: Lys 443 클리핑	97.8	96.9	97.0
LL: S127-K145	Fab, 비-CDR	LC: Asn 137 탈아미드화	< 1.0	1.3	1.7
LL: V150-K169	Fab, 비-CDR	LC: Asp 151/167 이성질체화 ^b	< 1.0	< 1.0	3.1

[0451]

[0452]

약어: LH = Lys-C 소화로부터의 중쇄 펩티드, LL = Lys-C 소화로부터의 경쇄 펩티드, TH = 트립신 소화로부터의 중쇄 펩티드, TL = 트립신 소화로부터의 경쇄 펩티드

[0453]

^a PTM 수준은 모든 샘플에서 <1.0%일 때 열거되지 않음

[0454]

^b 변형 부위는 MS/MS에 의해 확인되지 않음

[0455]

표 16: 염기 분해된 도스탈리맵에 대한 상대 효력 결과 (MSD 결합 검정, 세포-기반 생물검정 및 FcRn 결합)

조건	상대 효력		FcRn 결합 (KD, M)
	MSD 결합	세포-기반 생물검정	
비스트레스 대조군	88%	98%	2.14×10^{-6}
T0 (pH 9.0에 노출시킴, 인큐베이션 없음)	93%	99%	2.26×10^{-6}
pH 9.0, 40°C, 1주	85%	96%	2.34×10^{-6}

[0456]

[0457]

요약하면, 염기 가수분해 조건 하에 관찰된 분해 생성물은 HMW 중, 단편, Asp 147 및 Asp 151/167에서의 이성질체화, Asn 380 및 Asn 385에서의 탈아미드화, 및 Met 248에서의 산화이다. 하기 속성의 조합은 상대 효력 및 FcRn 결합에 부정적인 영향을 미치지 않는다:

- [0458]  최대 9.2%의 HMW 중 (SE-HPLC로부터)
- [0459]  단편 2.0 - 4.2% (환원 CE-SDS에서 LMW %+ MMW % 및 비-환원 CE-SDS에서 프리-피크 %로부터)
- [0460]  HC Asp 147에서 최대 20.8%의 이성질체화 (펩티드 맵으로부터)
- [0461]  HC Asn 380에서 최대 27.8% 및 HC Asn 385에서 최대 27.2%의 탈아미드화 (펩티드 맵으로부터)
- [0462]  LC Asp 151/167에서 최대 3.1%의 이성질체화 (펩티드 맵으로부터)
- [0463]  HC Met 248에서 최대 7.1%의 산화 (펩티드 맵으로부터)
- [0464]  최대 96.8%의 산성 종 (cIEF로부터)
- [0465]  최대 5.2%의 HC N-말단 피로-글루타메이트 변이체
- [0466] HC Asp 147에서의 이성질체화는 상대 효력 또는 FcRn 결합에 대한 어떠한 영향 없이 보고된 수준 20.8%를 초과할 수 있는 것으로 예상된다.
- [0467] HC Asn 380 및 HC Asn 385에서의 탈아미드화는 상대 효력 또는 FcRn 결합에 대한 어떠한 영향 없이 27.8% 및 27.2%의 보고된 수준을 초과할 수 있는 것으로 예상된다.
- [0468] 5.3 산화 조건
- [0469] 5.3.1 H₂O₂ 처리
- [0470] 과산화수소 (H₂O₂)를 도스탈리맵 샘플 내로 0.1% (v:v) H₂O₂의 최종 농도로 스카이킹하였다. H₂O₂ 스카이킹된 샘플을 25℃에서 최대 3주 동안 인큐베이션하였다. 완료되면, H₂O₂ 처리를 메티오닌으로 켄칭하고, 샘플을 시험 시간까지 동결 상태로 유지시켰다. T0 샘플을 H₂O₂에 노출시켰지만, 승온에서 인큐베이션하지 않았다. H₂O₂ 직후에 메티오닌을 T0 샘플에 첨가하여 반응을 켄칭하고 분해를 정지시켰다.
- [0471] H₂O₂ 처리된 샘플의 SE-HPLC 결과는 HMW 및 LMW 종의 수준에서 어떠한 차이도 보여주지 않았다 (표 17). 1주 인큐베이션 시간으로부터 출발하여, cIEF 데이터는 산성 종 백분율의 상응하는 증가와 함께 주요 피크 백분율의 감소를 보여주었다 (표 18). 주요 피크는 또한 H₂O₂ 처리된 샘플에서 전방 솔더를 보여주었다.
- [0472] 모든 처리된 샘플에 대해 환원 CE-SDS 데이터에서 어떠한 차이도 관찰되지 않았다 (제시되지 않음). 비-환원 CE-SDS 데이터는 3일의 인큐베이션 시간으로부터 시작하여 단편의 증가된 수준을 입증하였다 (제시되지 않음). SE-HPLC 도면에서, 주요 피크로서 제시된 피크는 단량체임을 주목한다.
- [0473] cIEF 및 비-환원 CE-SDS 데이터는 H₂O₂에 의해 유발된 단편이 cIEF에서 산성 종으로서 이동하였음을 나타내었다. 펩티드 맵 데이터는 H₂O₂에의 노출 시 HC의 Fc 영역에서 Met 248, Met 354 및 Met 424에서 약간 상승된 산화 수준을 보여주었다. 모든 3개의 Met 부위에서의 산화 수준은 2주 인큐베이션 후에 거의 100%에 도달하였다 (표 19). HC의 CDR에서의 Met 34 및 Met 103에서의 산화는 1주 인큐베이션 후에 증가를 나타내기 시작하였다. 모든 다른 PTM 수준은 분석 가변성 내에 있었다.
- [0474] H₂O₂ 처리된 샘플의 cIEF는 주요 피크의 형상의 변화를 보여주었고, 전하 프로파일은 보다 산성인 종으로 이동하였다. 이는 산화된 종이 산성 피크 영역에 위치하고, cIEF가 도스탈리맵에서의 과도한 산화를 모니터링할 수 있다는 것을 입증하였다.
- [0475] MSD 결합 검정에 의한 도스탈리맵의 상대 효력은 H₂O₂ 처리된 샘플에서 관찰된 변화에 의해 영향을 받지 않았고; 관찰된 차이는 예상된 분석 가변성 내에 있었다 (표 20). 그러나, 세포-기반 생물검정은 2주 후 상대 효력의 50% 미만의 하락을 입증하였다. 이러한 효력의 하락은, 도스탈리맵 결합 영역 (리간드, PD-1)이 CDR 내에 위치하기 때문에, CDR에서의 산화와 관련된다. 또한, 도스탈리맵의 작용 메카니즘은 낮은 것으로 입증된 이펙터 기능을 수반하지 않기 때문에, Fc 영역에서의 산화가 효력에 영향을 미칠 가능성은 없다. 따라서, CDR에서의 변

화가 결합에 가장 영향을 미칠 것이고, 따라서 효력에 영향을 미칠 것이다.

[0476] FcRn 결합 분석은 즉각적 H₂O₂ 노출에 영향을 받지 않았지만, 인큐베이션 시간에 따라 산화 수준이 증가함에 따라 감소되었다 (표 20). 2주 인큐베이션 후, CDR 영역 (HC Met 34에서 ~29% 및 HC Met 103에서 ~86%) 및 Fc 영역 (100%에 근접)에서 산화가 관찰되었다. FcRn 결합은 Fc 영역을 통해 일어나기 때문에, Fc 영역에서의 산화는 관찰된 감소된 FcRn 결합의 원인인 것으로 추론할 수 있다.

[0477] 표 17: H₂O₂ 처리된 도스탈리맵에 대한 SE-HPLC 결과

조건	단량체 %	HMW %	LMW % ^a
비스트레스 대조군	99.1	0.9	ND
T0 (H ₂ O ₂ 에 노출시킴, 인큐베이션 없음)	99.1	0.8	< 0.05
H ₂ O ₂ , 25°C, 1일	99.0	0.9	< 0.05
H ₂ O ₂ , 25°C, 3일	99.1	0.9	0.05
H ₂ O ₂ , 25°C, 1주	99.1	0.9	< 0.05
H ₂ O ₂ , 25°C, 2주	98.9	1.0	0.07
H ₂ O ₂ , 25°C, 3주	98.9	1.1	0.09

[0478]

[0479] 약어: ND = 검출되지 않음

[0479]

^a 방법 PQL = 0.05%

[0480]

[0481] 표 18: H₂O₂ 처리된 도스탈리맵에 대한 cIEF 결과

조건	주요 피크의 pI	산성 피크%	주요 피크%	염기성 피크% ^a
비스트레스 대조군	7.50	21.8	73.9	< 5.0
T0 (H ₂ O ₂ 에 노출시킴, 인큐베이션 없음)	7.50	24.5	71.3	< 5.0
H ₂ O ₂ , 25°C, 1일	7.48	24.1	71.3	< 5.0
H ₂ O ₂ , 25°C, 3일	7.48	24.7	71.0	< 5.0
H ₂ O ₂ , 25°C, 1주	7.48	27.9	67.9	< 5.0
H ₂ O ₂ , 25°C, 2주	7.48	33.5	62.6	< 5.0
H ₂ O ₂ , 25°C, 3주	7.48	39.1	57.2	< 5.0

[0482]

^a 방법 PQL = 5.0%

[0483]

[0484] 표 19: H₂O₂ 처리된 도스탈리맵에서의 PTM 존재비

펩티드	영역	PTM	PTM 존재비 (%) ^a			
			비스트레스 대조군	T0	H ₂ O ₂ , 25°C, 1w	H ₂ O ₂ , 25°C, 2w
LH: E1-K43	CDR	HC: Met 34 산화	<1.0	< 1.0	14.0	28.8
TH: N77-R87	Fab, 비-CDR	HC: Met 83 산화	< 1.0	< 1.0	< 1.0	1.1
TH: A88-K120	CDR	HC: Met 103 산화	<1.0	1.2	64.9	86.1
LH: D245-K284	Fc	HC: Met 248 산화	3.0	47.1	98.6	99.6
TH: T252-K284	Fc	HC: Asp 261/266/276 이성질체화 ^b	1.0	< 1.0	< 1.0	< 1.0
TH: V298-K313	Fc	HC: Asn 311 탈아미드화	6.0	6.8	7.0	7.4
LH: G337-K356	Fc	HC: Met 354 산화	< 1.0	16.7	99.8	99.8
LH: G367-K388	Fc	HC: Asn 380 탈아미드화	8.4	10.7	10.9	10.5
LH: G367-K388	Fc	HC: Asn 385 탈아미드화	< 1.0	1.7	1.8	1.9
LH: S411-K435	Fc	HC: Met 424 산화	< 1.0	29.0	98.0	98.1
LH: S411-K435	Fc	HC: Asn 430 탈아미드화	1.2	< 1.0	< 1.0	< 1.0
LH: S436-K443	C-말단	HC: Lys 443 클리핑	97.8	97.2	98.0	97.7
TL: L46-R61	CDR	LC: Trp 50 산화	< 1.0	< 1.0	< 1.0	1.3
LL: S127-K145	Fab, 비-CDR	LC: Asn 137 탈아미드화	< 1.0	1.3	1.3	1.3

[0485]

[0486] LH: Lys-C 소화로부터의 중쇄 펩티드, TH: 트립신 소화로부터의 중쇄 펩티드, LL: Lys-C 소화로부터의 경쇄 펩티드, TL: 트립신 소화로부터의 경쇄 펩티드

[0487] ^a PTM 수준은 모든 샘플에서 <1.0%일 때 열거되지 않음

[0488] ^b 변형 부위는 MS/MS에 의해 확인되지 않음

[0489] 표 20: H₂O₂ 처리된 도스탈리맵에 대한 상대 효력 결과 (MSD 결합, 세포-기반 생물검정 및 FcRn 결합)

조건	상대 효력		FcRn 결합 (KD, M)
	MSD 결합	세포-기반 생물검정	
비스트레스 대조군	88%	98%	2.14 × 10 ⁻⁶
T0 (H ₂ O ₂ 에 노출시킴, 인큐베이션 없음)	95%	94%	4.38 × 10 ⁻⁶
H ₂ O ₂ , 25°C, 1주	79%	NT	NT
H ₂ O ₂ , 25°C, 2주	74%	47%	1.24 × 10 ⁻⁵

[0490]

[0491] 약어: NT = 시험되지 않음

[0492] 요약하면, H₂O₂ 산화 조건 하에 관찰된 분해 생성물은 단편, Fc 영역 (Met 248, Met 354 및 Met 424) 및 CDR (Met 34 및 Met 103)에서의 산화이다. 하기 속성의 조합은 상대 효력 또는 FcRn 결합에 부정적인 영향을 미치지 않는다:

- [0493] 0.5 - 1.0%의 단편 (환원 CE-SDS에서 LMW+MMW 및 비-환원 CE-SDS에서 프리-피크로부터)
- [0494] HC의 Fc 영역의 산화: Met 248에서 최대 47.1%, Met 354에서 최대 16.7% 및 Met 424에서 최대 29.0% (펩티드 맵으로부터)
- [0495] HC의 CDR 영역의 산화: Met 34에서 1.0% 미만 및 Met 103에서 최대 1.2% (펩티드 맵으로부터).
- [0496] HC Met 34에서의 산화 및 효력 (생물검정)에 대한 데이터로부터 외삽하면, 최대 21%의 산화는 적어도 60% 효력 (생물검정)을 발생시킬 수 있다. Met 34에서의 최대 16%의 산화는 적어도 70% 효력 (생물검정)을 발생시킬 수 있다. 이는 <1% (대조군), <1% (T0) 및 28.8% (H₂O₂, 2주) 산화 샘플에 대한 선형 기울기를 사용하여 계산되며, 이들은 각각 98%, 94% 및 47% 효력 (생물검정)을 갖는다.
- [0497] HC Met 103에서의 산화 및 효력 (생물검정)에 대한 데이터로부터 외삽하면, 최대 64%의 산화는 적어도 60% 효력 (생물검정)을 발생시킬 수 있다. Met 103에서의 최대 47%의 산화는 적어도 70% 효력 (생물검정)을 발생시킬 수 있다. 이는 <1% (대조군), 1.2% (T0) 및 86.1% (H₂O₂, 2주) 산화 샘플에 대한 선형 기울기를 사용하여 계산되며, 이들은 각각 98%, 94% 및 47% 효력 (생물검정)을 갖는다.
- [0498] HC의 Fc 영역의 산화는 상대 효력 또는 FcRn 결합에 대한 어떠한 영향 없이 Met 248에서 최대 47.1%, Met 354에서 최대 16.7% 및 Met 424에서 최대 29.0%의 보고된 수준을 초과할 수 있는 것으로 예상된다.
- [0499] 5.3.2 AAPH 처리
- [0500] H₂O₂ 처리된 도스탈리맵은 CDR 영역에서 Trp 잔기의 산화를 나타내지 않았기 때문에, 2,2'-아조비스(2-아미디노프로판) 디히드로클로라이드 (AAPH)를 사용하여 Trp 산화의 영향을 평가하였다. AAPH를 도스탈리맵 샘플 내로 스파이킹하여 5 mM AAPH의 최종 농도에 도달하였다. AAPH 스파이킹된 샘플을 최대 7일 동안 40℃에서 인큐베이션하였다. 40℃ 조건은 의미있는 수준의 분해가 관찰될 수 있도록 보장하기 위해 초기 조건 스크리닝에 기초하여 선택하였다. 완료되면, AAPH 처리를 메티오닌으로 켄칭하고, 샘플을 시험 시간까지 동결 상태로 유지시켰다. T0 샘플을 승온에서의 인큐베이션 없이 AAPH에 노출시켰다. AAPH 첨가 직후에 메티오닌을 샘플에 첨가하여 반응을 켄칭하고 분해를 정지시켰다.
- [0501] SE-HPLC 결과는 1일 인큐베이션으로부터 시작하여 AAPH 처리된 샘플에서 HMW 종의 증가를 보여주었다. LMW 종은 약간 상승되었지만, 7일 인큐베이션 기간 동안 1% 미만으로 유지되었다 (표 21).
- [0502] cIEF 데이터는 1일 인큐베이션으로부터 시작하여 주요 피크 백분율의 감소를 보여주었고, 인큐베이션 시간이 연장됨에 따라 경향은 계속되었다 (표 22). 주요 피크가 감소함에 따라, 산성 종 및 염기성 종 둘 다 증가하였다. 또한, cIEF에서의 주요 피크도 또한 산성 측으로 약간 이동하였다. 환원 및 비-환원 CE-SDS 데이터 둘 다는 증가된 HMW 종 및 단편을 나타내었고 (제시되지 않음); 변화는 비-환원 CE-SDS 데이터에서 제1일 및 환원 CE-SDS 데이터에서 제3일에 나타났다. 펩티드 맵 데이터는 제1일부터 시작하여 HC Met 248, HC Met 354, HC Met 424 및 LC Trp 50에서 상승된 산화를 나타내었다. Met 103에서의 산화 수준은 또한 제1일에 약간 증가하는 경향을 보여주었고, 이는 제3일 데이터에서 관찰된 증가에 의해 확인되었다 (표 23). 모든 다른 PTM 수준은 분석 가변성 내에 있었다.
- [0503] AAPH 처리된 샘플의 cIEF는 주요 피크의 형상의 변화를 보여주었고, 전하 프로파일은 보다 산성인 종으로 이동하였다. 이는 산화된 종이 산성 피크 영역에 위치하고, cIEF가 도스탈리맵에서의 과도한 산화를 모니터링할 수 있다는 것을 입증하였다.
- [0504] 3-일 인큐베이션 샘플로부터 시작하여, AAPH 처리된 샘플에서 관찰된 변화에 의하면 상대 효력 (MSD 결합 검정)은 감소하였다 (표 24). 상대 효력은 세포 기반 생물검정에 의하면 제1일 인큐베이션 후에 및 MSD 결합 검정에 의하면 제3일 인큐베이션 후에 감소하기 시작하였다. T0 H₂O₂ 샘플과 같이, AAPH (T0)에의 즉각적 노출은 도스탈리맵 샘플에서 효력 하락을 유도하지 않았고; 둘 다의 T0 샘플은 CDR에서 낮은 수준의 산화를 가졌다. 예외적으로, Fc 산화의 수준은 H₂O₂ T0 샘플에서 훨씬 더 높았다. 이러한 발견은 증가된 Fc 산화가 효력에 영향을 미치지 않는다는 것을 확증한다.
- [0505] AAPH 제1일 샘플은 CDR 및 Fc 영역 둘 다에서 T0 H₂O₂ 샘플과 대등한 메티오닌 산화를 가졌다. 그러나, AAPH 제1일 샘플은 효력의 감소를 보여주었다. T0 H₂O₂와 제1일 AAPH 처리된 샘플 사이의 주요 차이는 CDR LC Trp

50 산화의 수준이었다. 따라서, CDR Trp 50 산화의 증가는 상대 효력을 감소시킬 것이다. 퍼옥시드 및 AAPH 처리된 샘플로부터의 효력 결과의 비교를 표 25에 제공한다.

[0506] 3-일 AAPH 인큐베이션 샘플로부터 시작하여, FcRn 결합은 감소되었다. 따라서, FcRn 결합은 H₂O₂ 처리된 샘플 발견과 일치하게 산화의 증가에 따라 감소한다. 3일 후, CDR 영역 내의 Met (HC Met 103에서 ~7%) 및 Fc 영역 내의 Met (Met 248에서 ~89%, Met 354에서 ~45% 및 Met 424에서 ~78%)이 과도하게 산화되었다. 감소된 FcRn 결합은 FcRn 결합에 수반되는 Fc 영역의 산화로 인한 것일 수 있다.

[0507] 표 21: AAPH 처리된 도스탈리맵에 대한 SE-HPLC 결과

조건	단량체 %	HMW %	LMW %
비스트레스 대조군	99.1	0.9	ND
T0 (AAPH에 노출시킴, 인큐베이션 없음)	99.1	0.9	ND
AAPH, 40°C, 1일	94.9	4.9	0.2
AAPH, 40°C, 3일	87.8	11.8	0.5
AAPH, 40°C, 5일	82.8	16.4	0.8
AAPH, 40°C, 7일	80.4	18.7	0.9

[0508]

[0509] 약어: ND = 검출되지 않음

[0510] 표 22: AAPH 처리된 도스탈리맵에 대한 cIEF 결과

조건	주요 피크의 pI	산성 피크%	주요 피크%	염기성 피크% ^a
비스트레스 대조군	7.50	21.8	73.9	< 5.0
T0 (AAPH에 노출시킴, 인큐베이션 없음)	7.51	22.4	73.4	< 5.0
AAPH, 40°C, 1일	7.50	25.6	66.7	7.7
AAPH, 40°C, 3일	7.49	30.7	61.5	7.9
AAPH, 40°C, 5일	7.48	38.3	51.0	10.7
AAPH, 40°C, 7일	7.48	42.5	46.6	10.9

[0511]

[0512] ^a 방법 PQL = 5.0%

[0513] 표 23: AAPH 처리된 도스탈리맵에서의 PTM 존재비

펩티드	영역	PTM	PTM 존재비 (%) ^a			
			비스트레스 대조군	T0	AAPH, 40°C, 1일	AAPH, 40°C, 3일
TH: A88-K120	CDR	HC: Met 103 산화	<1.0	<1.0	2.5	7.0
LH: D245-K284	Fc	HC: Met 248 산화	3.0	3.3	47.7	88.4
TH: T252-K284	Fc	HC: Asp 261/266/276 이성질체화 ^b	1.0	1.0	< 1.0	1.0
TH: V298-K313	Fc	HC: Asn 311 탈아미드화	6.0	6.3	6.5	6.6
LH: G337-K356	Fc	HC: Met 354 산화	< 1.0	< 1.0	8.2	44.8
LH: G367-K388	Fc	HC: Asn 380 탈아미드화	8.4	9.5	8.6	9.6
LH: G367-K388	Fc	HC: Asn 385 탈아미드화	< 1.0	1.0	1.3	1.2
LH: S411-K435	Fc	HC: Met 424 산화	< 1.0	< 1.0	26.2	78.2
LH: S411-K435	Fc	HC: Asn 430 탈아미드화	1.2	1.3	1.1	< 1.0
LH: S436-K443	C-말단	HC: Lys 443 클리핑	97.8	97.8	96.7	97.7
TL: L46-R61	CDR	LC: Trp 50 산화	< 1.0	< 1.0	38.9	74.2
LL: S127-K145	Fab, 비-CDR	LC: Asn 137 탈아미드화	< 1.0	1.0	1.2	< 1.0

[0514]

[0515] 약어: LH = Lys-C 소화로부터의 중쇄 펩티드, LL = Lys-C 소화로부터의 경쇄 펩티드, TH = 트립신 소화로부터의 중쇄 펩티드, TL = 트립신 소화로부터의 경쇄 펩티드

[0516]

^a PTM 수준은 모든 샘플에서 <1.0%일 때 열거되지 않음

[0517]

^b 변형 부위는 MS/MS에 의해 확인되지 않음

[0518]

표 24: AAPH 처리된 도스탈리맵에 대한 상대 효력 결과 (MSD 결합, 세포-기반 생물검정 및 FcRn 결합)

조건	상대 효력		FcRn 결합 (KD, M)
	MSD 결합	세포-기반 생물검정	
비스트레스 대조군	88%	98%	2.14×10^{-6}
T0 (AAPH에 노출시킴, 인큐베이션 없음)	79%	102%	1.66×10^{-6}
AAPH, 40°C, 1일	76%	44%	2.34×10^{-6}
AAPH, 40°C, 3일	57%	14%	8.33×10^{-6}
AAPH, 40°C, 5일	47%	5%	NT
AAPH, 40°C, 7일	43%	NT	9.69×10^{-6}

[0519]

약어: NT = 시험되지 않음

[0520]

[0521] 표 25: 도스탈리맵의 상대 효력에 대한 부위 특이적 산화의 영향

분자 영역	잔기	퍼센트 산화		
		H ₂ O ₂ T0	AAPH T0	AAPH 제1일
CDR	HC: Met 34	낮음	낮음	낮음
	HC: Met 103	낮음	낮음	낮음
	LC: Trp 50	낮음	낮음	높음
Fc	HC: Met 248	높음	낮음	높음
	HC: Met 354	높음	낮음	높음
	HC: Met 424	높음	낮음	높음
세포-기반 생물검정에 의한 효력		영향 없음	영향 없음	감소됨

[0522]

[0523]

요약하면, AAPH 산화 조건 하에 관찰된 분해 생성물은 HMW 중, 단편, Fc 영역 Met (HC Met 248, HC Met 354 및 HC Met 424), CDR 영역 Met (HC Met 103) 및 LC CDR Trp 50에서의 산화이다. 하기 속성의 조합은 상대 효력 및 FcRn 결합에 부정적인 영향을 미치지 않는다:

[0524]

● 최대 0.9%의 HMW 중 (SE-HPLC로부터)

[0525]

● 단편 0.8 - 1.2% (환원 CE-SDS에서 LMW % + MMW % 및 비-환원 CE-SDS에서 프리-펩크 %로부터);

[0526]

● Fc 영역 HC Met 248에서 최대 3.3%, HC Met 354에서 1.0% 미만 및 HC Met 424에서 1.0% 미만의 산화 (펩티드 맵으로부터);

[0527]

● CDR 영역 HC Met 103에서 1.0% 미만, LC Trp 50에서 1.0% 미만의 산화 (펩티드 맵으로부터).

[0528]

LC Trp 50에서의 산화 및 효력 (생물검정)에 대한 데이터로부터 외삽하면, 최대 34%의 산화는 적어도 60% 효력 (생물검정)을 발생시킬 수 있다. Trp 50에서의 최대 25%의 산화는 적어도 70% 효력 (생물검정)을 발생시킬 수 있다. 이는 <1% (대조군), <1% (T0), 38.9% (1일), 74.3% (3일) 및 86.8% (5일) 산화 샘플에 대한 선형 기울기를 사용하여 계산되며, 이들은 각각 98%, 102%, 44%, 14% 및 5% 효력 (생물검정)을 갖는다.

[0529]

LC Trp 50의 산화가 AAPH 산화 조건 하에서의 우세한 산화된 변이체이기 때문에, H₂O₂ 산화 조건이 CDR 영역 HC Met 34, HC Met 103 및 Fc 영역 HC Met 248, HC Met 354 및 HC Met 424에서의 허용 산화 수준을 보다 잘 반영한다.

[0530]

5.4 광분해

[0531]

도스탈리맵 샘플을 백색광 (가시광, 10000 룩스 시간)에 25°C에서 1주 동안 노출시킨 다음, UV 광에 25°C에서 1주 동안 노출시켰다. 완료되면, 샘플을 시험 시간까지 동결 상태로 유지시켰다.

[0532]

SE-HPLC 결과는 광분해성 조건의 종료 시에 HMW 중의 증가를 보여주었다 (표 26). cIEF 데이터는 산성 중 백분율의 증가 및 감소된 주요 피크 백분율을 보여주었다 (표 27). 환원 CE-SDS 결과는 분석 가변성을 벗어난 어떠한 변화도 보여주지 않았다. 비-환원 CE-SDS 데이터는 주요 피크의 감소, 및 단편 및 HMW 중 둘 다의 약간의 증가를 나타내었다.

[0533]

펩티드 맵 데이터는 광분해 연구의 종료 시에 Fc 영역 Met (HC Met 248, HC Met 354 및 HC Met 424) 및 LC CDR Trp 50에서 상승된 산화를 보여주었다 (표 28). 모든 다른 PTM 수준은 분석 가변성 내에 있었다.

[0534]

상대 효력 및 FcRn 결합은 광분해 조건에 의해 영향을 받지 않았다 (표 29). 따라서, Fc 영역 Met (HC Met 248 < 33%, HC Met 354 < 11%, HC Met 424 < 27%) 및 LC CDR Trp 50 (< 5%)에서 관찰된 중간 정도의 산화 수준은 상대 효력 및 FcRn 결합에 영향을 미치지 않았다.

[0535] 표 26: 광 분해된 도스탈리맵에 대한 SE-HPLC 결과

조건	단량체%	HMW%	LMW% ^a
비스트레스 대조군	99.1	0.9	ND
가시 광선, 25°C, 1주	97.8	2.2	< 0.05
가시 광선, 25°C, 1주 및 UV 광, 25°C, 1주	96.6	3.3	<0.05

[0536]

[0537] ND: 검출되지 않음

[0538]^a 방법 PQL = 0.05%

[0539] 표 27: 광 분해된 도스탈리맵에 대한 cIEF 결과

조건	주요 피크의 pI	산성 피크%	주요 피크%	염기성 피크% ^a
비스트레스 대조군	7.50	21.8	73.9	< 5.0
가시광, 25°C, 1주	7.51	23.9	71.7	< 5.0
가시광, 25°C, 1주 및 UV 광, 25°C, 1주	7.50	28.5	66.9	< 5.0

[0540]

[0541]^a 방법 PQL = 5.0%

[0542] 표 28: 광 분해된 도스탈리맵에서의 PTM 존재비

펩티드	영역	PTM	PTM 존재비 (%) ^a	
			비스트레스 대조군	가시 광선, 25°C, 1주 및 UV 광, 25°C, 1주
LH: D245-K284	Fc	HC: Met 248 산화	3.0	33.4
TH: T252-K284	Fc	HC: Asp 261/266/276 이성질체화 ^b	1.0	1.0
TH: V298-K313	Fc	HC: Asn 311 탈아미드화	6.0	6.4
LH: G337-K356	Fc	HC: Met 354 산화	< 1.0	10.9
LH: G367-K388	Fc	HC: Asn 380 탈아미드화	8.4	9.5
LH: G367-K388	Fc	HC: Asn 385 탈아미드화	< 1.0	1.3
LH: S411-K435	Fc	HC: Met 424 산화	< 1.0	27.0
LH: S411-K435	Fc	HC: Asn 430 탈아미드화	1.2	1.2
LH: S436-K443	C-말단	HC: Lys 443 클리핑	97.8	97.8
TL: L46-R61	CDR	LC: Trp 50 산화	< 1.0	4.8

[0543]

[0544] 약어: LH = Lys-C 소화로부터의 중쇄 펩티드, TH = 트립신 소화로부터의 중쇄 펩티드, LL = Lys-C 소화로부터의 경쇄 펩티드, TL = 트립신 소화로부터의 경쇄 펩티드

[0545]^a PTM 수준은 모든 샘플에서 <1.0%일 때 열거되지 않음

[0546]^b 변형 부위는 MS/MS에 의해 확인되지 않음

[0547] 표 29: 광 분해된 도스탈리맵에 대한 상대 효력 결과 (MSD 결합, 세포-기반 생물검정 및 FcRn 결합)

조건	상대 효력		FcRn 결합 (KD, M)
	MSD 결합	세포-기반 생물검정	
비스트레스 대조군	88%	98%	2.14×10^{-6}
가시 광선, 25°C, 1주 및 UV 광, 25°C, 1주	92%	90%	2.49×10^{-6}

[0548]

- [0549] 요약하면, 광분해 조건 하에 관찰된 분해 생성물은 HMW 중, 단편, Fc 영역 Met (Met 248, Met 354 및 Met 424) 및 LC CDR Trp 50에서의 산화이다. 하기 속성의 조합은 상대 효력 및 FcRn 결합에 부정적인 영향을 미치지 않는다:
- [0550]  최대 3.3%의 HMW 중 (SE-HPLC로부터)
- [0551]  단편 1.1 - 1.5% (환원 CE-SDS에서 LMW%+MMW% 및 비-환원 CE-SDS에서 프리-피크%로부터)
- [0552]  Fc 영역 HC Met 248에서 최대 33.4%, HC Met 354에서 최대 10.9% 및 Met 424에서 최대 27.0%의 산화 (펩티드 맵으로부터)
- [0553]  CDR LC Trp 50에서 최대 4.8%의 산화 (펩티드 맵으로부터)
- [0554] 5.5 지속 교반
- [0555] 도스탈리맵 샘플을 25℃에서 최대 3주 동안 300 분당 회전수 (rpm)의 교반에 노출시켰다. 완료되면, 샘플을 시험 시간까지 동결 상태로 유지시켰다.
- [0556] SE-HPLC, cIEF, 환원 CE-SDS 및 비-환원 CE-SDS에서 어떠한 생성물 품질 변화도 관찰되지 않았다.
- [0557] 상대 효력 및 FcRn 결합은 지속 교반에 의해 영향을 받지 않았다. 펩티드 맵 데이터는 모든 PTM 수준이 분석 가변성 내에 있음을 보여주었다.
- [0558] 요약하면, 지속 교반 조건 하에, 유의한 분해물이 관찰되지 않았고, 상대 효력 및 FcRn 결합에 대한 영향도 확인되지 않았다.
- [0559] 5.6 분해 생성물 요약
- [0560] 도스탈리맵 효력에 영향을 미치지 않는 상이한 강제 분해 조건 하에 관찰된 분해 생성물의 보급률을 하기에 요약한다 (표 30).
- [0561] 표 30: 도스탈리맵의 효력에 영향을 미치지 않는 분해 생성물

조건	분해 수준은 효력에 대해 어떠한 영향도 갖지 않는 것으로 관찰됨					
	HMW	단편	이성질체화	탈아미드화	산화	상대 효력 ^a
비스트레스	0.9%	0.6 - 1.0%	HC Asp 261/266/276 = 1.0%	HC Asn 380 = 8.4% HC Asn 385 < 1.0%	HC Met 248 = 3.0% HC Met 354 < 1.0% HC Met 424 < 1.0%	98%
열 분해	≤ 11.2%	4.5 - 4.6%	HC Asp 261/266/276 ≤ 13.1%	HC Asn 380 ≤ 14.7% HC Asn 385 ≤ 5.9%	HC Met 248 ≤ 7.6% HC Met 354 ≤ 4.2% HC Met 424 ≤ 3.5%	86% (50°C, 3주)
산 가수분해	≤ 15.2%	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	125% (pH 4.0, 3주)
염기 가수분해	≤ 9.2%	2.0 - 4.2%	HC Asp 147 ≤ 20.8% LC Asp 151/167 ≤ 3.1%	HC Asn 380 ≤ 27.8% HC Asn 385 ≤ 27.2%	HC Met 248 ≤ 7.1%	96% (pH 9.0, 1주)
퍼옥시드 (H ₂ O ₂) 산화	변화 없음	0.5 - 1.0%	변화 없음	변화 없음	HC Met 248 ≤ 47.1% HC Met 354 ≤ 16.7% HC Met 424 ≤ 29.0% HC Met 34 < 1.0% HC Met 103 ≤ 1.2%	94% (H ₂ O ₂ , T0)
AAPH 산화	≤ 0.9%	0.8 - 1.2%	변화 없음	변화 없음	HC Met 248 ≤ 3.3% HC Met 354 < 1.0% HC Met 424 < 1.0% HC Met 103 < 1.0% LC Trp 50 < 1.0%	102% (AAPH, T0)

[0562]

조건	분해 수준은 효력에 대해 어떠한 영향도 갖지 않는 것으로 관찰됨					
	HMW	단편	이성질체화	탈아미드화	산화	상대 효력 ^a
광분해	≤ 3.3%	1.1 - 1.5%	변화 없음	변화 없음	HC Met 248 ≤ 33.4% HC Met 354 ≤ 10.9% HC Met 424 ≤ 27.0% LC Trp 50 ≤ 4.8%	90% (광분해, 총 2주)
지속 교반	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	변화 없음	86% (교반, 3주)

[0563]

[0564] ^a 세포-기반 생물검정에 의한 효력

[0565] 6. 제제 연구

[0566] 6.1 분석 방법

[0567] 6.1.1 외관

[0568] 선명도 및 색상을 비롯한 샘플의 외관을 YB-2 라이트 박스를 사용하여 흑색 및 백색 배경 하에 검사하였다.

[0569] 6.1.2 pH

- [0570] pH 값은 세븐 멀티 pH 미터에 의해 측정하였다.
- [0571] 6.1.3 UV 280
- [0572] 나노드롭2000 분광광도계를 사용하여 280 nm에서의 흡광도에 의해 단백질 농도를 결정하였고, 흡광 계수는 1.615이다. 샘플을 중량측정에 의해 희석하였다.
- [0573] 6.1.4 SEC-HPLC
- [0574] 크기 배제 크로마토그래피는 애질런트 1260 인피니티 시스템 및 TSK겔 G3000SWXL 칼럼 (300 x 7.8 mm, 5 μ m) 을 사용하여 수행하였다. 이동상은 50mM 포스페이트 완충제 (PB), 300mM NaCl, pH 7.0 $\pm$ 0.1이었고, 유량은 1.0 ml/분으로 설정하였다. 샘플을 주입을 위해 1 mg/ml로 희석하고, 280 nm에서 검출하였다.
- [0575] 6.1.5 cIEF
- [0576] 20 μ g의 참조 표준물 또는 샘플을 0.5 μ l의 pI 5.85 마커, 0.5 μ l의 pI 8.40 마커, 2 μ l의 파마라이트 3-10, 2 μ l의 파마라이트 5-8, 35 μ l의 1% 메틸 셀룰로스 (MC), 및 정제수와 혼합하여 100 μ l의 최종 부피를 구성하였다. 이어서, 혼합물을 플루오로카본 (FC)-코팅된 전체-칼럼 검출 모세관이 장착된 iCE3 모세관 등전 포커싱 분석기로 분석하였다. 포커싱은 2 단계로 수행하였다: (1) 1분 동안 1.5 kV, 및 (2) 8분 동안 3 kV. 실험 동안, 오토샘플러 트레이를 5°C에서 유지시켰다.
- [0577] 6.1.6 동적 광 산란 (DLS)
- [0578] 마이크로피펫을 사용하여 안전 후드에서 40 μ l의 비희석 샘플의 분취액을 40 μ l 일회용 큐벳으로 옮겼다. 각각의 샘플에 대해 트리플렛 측정을 수행하였다. 데이터를 제타사이저 소프트웨어에 의해 자동-분석하였다.
- [0579] 6.1.7 DSC
- [0580] 모세관 셀 시차 주사 열량측정 (DSC)을 이용하여, 온도의 함수로서 샘플 및 참조물의 온도를 증가시키는데 필요한 열의 양에서의 차이를 검출함으로써 단백질의 열 안정성을 측정하였다. 구체적으로, 이를 사용하여 용액 중 단백질의 상대 안정성의 지표인 열 전이 중간점 (Tm)을 측정하였다. 샘플을 참조 완충제로 약 1 mg/ml로 희석하였다. 참조 완충제 400 μ l를 96-웰 플레이트의 홀수 웰에 첨가하고, 샘플 400 μ l를 96-웰 플레이트의 짝수 웰에 첨가하였다. 샘플을 20-110°C에서 스캐닝하고, 마이크로칼 VP캐피러리(MicroCal VPCapillary) DSC 자동화 데이터 분석 소프트웨어에서 데이터 분석을 수행하였다.
- [0581] 6.2 pH/완충제 스크리닝 연구
- [0582] 각각 3가지의 상이한 pH의 4가지 유형의 완충제 시스템을 제조하였고, 이들은 25 mM 아세테이트 완충제 pH 4.5, 25 mM 아세테이트 완충제 pH 5.0, 25 mM 아세테이트 완충제 pH 5.5, 시트레이트 완충제 pH5.0, 25 mM 시트레이트 완충제 pH 5.5, 25 mM 시트레이트 완충제 pH 6.0, 25 mM 히스티딘 완충제 pH 5.5, 25mM 히스티딘 완충제 pH 6.0, 25 mM 히스티딘 완충제 pH 6.5, 25 mM 포스페이트 완충제 pH 6.5, 25 mM 포스페이트 완충제 pH 7.0, 및 25 mM 포스페이트 완충제 pH 7.5였다 (표 31에 요약됨).
- [0583] 표 31: 시험된 완충제 시스템의 요약

후보	완충제	pH
1	25mM 아세트레이트	4.5
2		5.0
3		5.5
4	25mM 시트레이트	5.0
5		5.5
6		6.0
7	25mM 히스티딘	6.0
8		6.5
9		7.0
10	25mM 포스페이트	6.5
11		7.0
12		7.5

[0584]

[0585] 벌크 약물 물질을 원심 정용여과를 통해 표 21의 12가지 완충제 시스템으로 완충제-교환하였다. 샘플 단백질을 후속적으로 상응하는 완충제를 사용하여 20 mg/ml로 조정하였다. 이어서, 각각의 샘플을 멸균 여과하고, 유리 바이알에 충전하고, 마개를 막고, 즉시 캡핑하였다.

[0586] 샘플을 여전히 40℃에서 저장하고, 30℃에서 250 rpm에서 최대 4주 동안 교반하였다. 샘플을 외관, pH, UV280, SEC-HPLC, cIEF, DLS, 및 미립자 물질에 대해 시험하였다.

[0587] 40℃에서 4주 동안 저장하고, 250 rpm, 30℃에서 2주 동안 진탕시켰을 때, 모든 샘플은 투명 및 무색 또는 약간 유백색 및 무색으로 유지되었다.

[0588] 모든 12가지의 완충제 시스템의 pH 값은 40℃에서의 교반 및 저장 동안 안정한 것으로 보였다.

[0589] 모든 샘플의 단백질 농도는 약 20 mg/ml에서 안정하였다.

[0590] 모든 12가지의 완충제 시스템의 미립자 물질 카운트는 40℃에서의 교반 및 저장 동안 안정하였다.

[0591] SEC-HPLC 결과: 40℃에서 4주 동안 저장하였을 때, 후보 1, 4, 11 및 12는 보다 빠른 주요 피크 함량 감소 속도를 보인 반면, 후보 5, 6, 및 7은 가장 안정한 것으로 보였다. 250 rpm, 30℃에서 4주 동안 교반하였을 때, 후보 10, 11, 및 12는 보다 빠른 주요 피크 감소 속도를 보인 반면, 후보 7 및 8은 가장 안정한 것으로 보였다. 40℃에서 4주 동안 저장하였을 때, 후보 4, 8, 9, 10, 11 및 12는 보다 빠른 산성 피크 형성 속도를 보였고; 30℃에서 4주 동안 250 rpm으로 교반하였을 때, 후보 9, 11, 및 12는 보다 빠른 산성 피크 형성 속도를 보였다.

[0592] DLS 결과: 샘플을 40℃에서 4주 동안 저장하였을 때, 후보 1, 2 및 4는 유체역학적 반경 (Z-평균)의 이동을 보였다. 이는 단백질이 완충제 시스템에서 불안정할 가능성이 있고, 폴딩 및/또는 표면 전위의 변화가 DLS 관독에서 관찰되는 바와 같은 상이한 회합 또는 응집 패턴으로 이어지는 분자간 상호작용의 변화를 유발할 수 있다는 것을 나타낸다. 후보 2, 3 및 12는 샘플을 30℃에서 4주 동안 250 rpm으로 교반하였을 때 Z-평균에서 동일한 불안정한 성능을 보여주었다. 다분산 지수 (PDI) 값은 DLS에 의한 샘플의 안정성 성능을 반영하는 또 다른 지수이다. 후보 6, 7 및 10은 연구 동안 합리적으로 작은 PDI 값을 유지한 반면, 후보 1, 2, 3, 4 및 12는 불안정하고 비교적 더 큰 PDI 값을 보여주었다.

[0593] 따라서, 결과는 pH 5.5 또는 6.0의 시트레이트 완충제 및 pH 6.0 또는 6.5의 히스티딘 완충제가 가장 안정한 완충제 시스템임을 나타낸다.

[0594] 6.3 부형제 스크리닝

[0595] 바람직한 완충제 시스템을 다양한 부형제와 함께 시험하였다 (표 32에 요약된 상이한 후보 제제).

[0596] 표 32: 스크리닝된 부형제의 요약

후보	완충제 및 pH	PS80 (w/v)	부형제					
			소르비톨	수크로스 (w/v)	트레할로스 (w/v)	아르기닌	NaCl	메티오닌 (w/v)
F1	25mM 시트레이트 pH 6.0	0.02%	-	-	-	-	120mM	-
F2			-	-	-	100mM	-	-
F3			-	-	5%	-	-	-
F4			-	5%	-	-	-	-
F5			-	100mM	-	-	-	-
F6	25mM 히스티딘 pH 6.0	0.02%	-	-	-	-	120mM	-
F7			-	-	-	100mM	-	-
F8			-	-	5%	-	-	-
F9			-	5%	-	-	-	-
F10			-	100mM	-	-	-	-
F11			-	5%	-	-	-	0.05%

[0597]

[0598] 주: 각각의 제제의 오스몰랄농도는 필요한 경우에 NaCl을 첨가함으로써 290 mOsm/kg을 충족시키도록 조정됨.

[0599] 샘플을 여전히 40℃에서 저장하고, 30℃에서 250 rpm에서 최대 4주 동안 교반하였다. 샘플을 외관, pH, UV280, SEC-HPLC, cIEF, DLS, 및 미립자 물질에 대해 시험하였다.

[0600] 40℃에서 4주 동안 저장하고, 30℃에서 2주 동안 250 rpm으로 진탕시켰을 때, 모든 샘플은 약간 유백색 및 무색의 액체로 유지되었다.

[0601] 모든 11가지의 제제 (F1-F11)의 pH 값 및 오스몰랄농도는 40℃에서의 교반 및 저장 동안 안정한 것으로 보였다.

[0602] 모든 샘플의 단백질 농도는 약 20 mg/ml에서 안정하였다.

[0603] 모든 11가지의 제제의 미립자 물질 카운트는 40℃에서의 교반 및 저장 동안 안정하였다.

[0604] SEC-HPLC 결과: 40℃에서 4주 동안 저장하고, 30℃에서 4주 동안 250 rpm으로 교반하였을 때, 11가지의 후보 중 후보 F2가 가장 안정한 제제인 것으로 보였다.

[0605] cIEF 결과: 40℃에서 4주 동안 저장하고, 30℃에서 4주 동안 250 rpm으로 교반하였을 때, 후보 F2 및 F3이 11가지 후보 중에서 가장 안정한 제제인 것으로 보였다.

[0606] 모든 11가지의 후보는 샘플을 40℃에서 4주 동안 저장하고 30℃에서 4주 동안 250 rpm으로 교반하였을 때 안정한 유체역학적 반경 (Z-평균)을 유지하였다.

[0607] 후보 4 및 11을 제외하고, 모든 다른 후보는 연구 동안 합리적으로 작은 PDI 값을 유지하였다.

[0608] 6.4 고농도 연구

[0609] 도스탈리맵은 현행 pH 6.0의, 25 mM 시트레이트, 100 mM L-아르기닌-HCl, 31 mM NaCl, 0.02% (w/v) PS80 중 20 또는 50 mg/mL로 제제화된다. 항체 농도를 최대 125 mg/mL까지 농축시키는 연구를 수행하여 고농도 제제에서 단백질의 안정성을 평가하였다. 연구에서 25 mg/mL 단백질 농도의 증분으로 50-125 mg/mL 범위의 5가지 단백질 농도를 평가하였다. 연구 결과는 도스탈리맵이 125 mg/mL로 농축될 수 있고 일반적으로 안정함을 나타내었다.

[0610] 항체는 약물 물질 단계에서 제제화된다. 약물 제품 (DP)은 약물 물질 (DS)과 동일한 농도 및 제제이기 때문에, 상기 기재된 강제 분해 연구는 약물 제품에 적용가능하다.

[0611] 6.5 보관 수명 안정성

[0612] 도스탈리맵 50 mg/mL 약물 제품 (DP)은 권장되는 장기간 저장 조건 하에서 선택된 제제에서 안정하다. 결론은 수행된 연구를 기초로 할 수 있다:

[0613] - 5℃의 장기간 안정성 저장 조건에서 최대 18개월 동안 제품 품질에서 변화가 관찰되지 않음;

[0614] - 25 ± 5℃의 가속 조건에서 6개월의 저장 후에 모든 약물 제품 배치에 대해 제품 품질에서 단지 미미한 변화만이 관찰됨;

[0615] - 도스탈리맵 약물 제품은 주위 광 조건에서 30일과 등가의 광안정성을 입증함.

[0616] 지금까지 안정성 프로그램으로부터 수득된 결과는 도스탈리맵 DP가 (5 ± 3℃)의 권장되는 장기 저장 조건에서

저장되었을 때 안정하고, 최대 18개월 저장 동안 분석 시험을 통해 평가했을 때 식별가능한 어떠한 변화도 관찰되지 않았음을 나타낸다. 최대 6개월 동안 가속 조건 ($25 \pm 2^\circ\text{C}/60 \pm 5\%$ 상대 습도 (RH))에서 저장된 DP의 경향 분석은 제품 품질 속성에 대한 단지 미미한 변화를 보여준다. 이 때의, 실시간, 실온 데이터는 $5 \pm 3^\circ\text{C}$ 에서 최대 18개월 동안의 약물 제품의 권장되는 장기간 저장을 입증하지만, 적절하게 보관 수명을 추가로 연장시키기 위해 안정성 데이터는 계속해서 수집되고 평가될 것이다.

표 33: 도스탈리맵 DP 안정성 사양

시험/속성	분석 방법론	안정성 시험에 대한 수용 기준 ^a
pH	전위차: Ph. Eur. 2.2.3, USP <791>	5.5 - 6.5
순도	CE-SDS, 비-환원	주요 피크: $\geq 95.0\%$
순도	SE-HPLC	단량체: $\geq 95.0\%$ HMW 종: $\leq 4.0\%$ LMW 종: $\leq 1.0\%$
전하 이질성	clIEF	주요 피크: $\geq 55.0\%$ 산성 종: $\leq 35.0\%$ 염기성 종: $\leq 15.0\%$
효력: PDL1 결합의 억제	MSD 결합 검정 ^b	참조 물질 활성의 60% - 140%
단백질 농도	UV 흡광도, 280 nm	45 - 55 mg/mL

^a 등록 전 임상 약물 제품 배치에 적용가능한 시험 및 수용 기준. 추가의 시험은 역사적으로 실행되었을 수 있고, 비교가능성 또는 다른 목적을 위해 특수 프로토콜에 따라 미래에 실행될 수 있다.

^b MSD 결합 검정은 그러한 검정을 사용하여 개시된 진행중인 안정성 배치에 대해 계속 사용될 것이다.

본 발명은 하기 항목을 포함한다:

1. 서열식별번호: 1의 CDRH1, 서열식별번호: 2의 CDRH2, 및 서열식별번호: 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 4의 CDRL1, 서열식별번호: 5의 CDRL2, 및 서열식별번호: 6의 CDRL3을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항-PD-1 항체의 산화된 변이체를 포함하는 조성물이며; $\leq 65\%$, $\leq 60\%$, $\leq 50\%$, $\leq 40\%$, $\leq 30\%$, $\leq 20\%$, $\leq 15\%$, $\leq 10\%$, $\leq 5\%$, $\leq 4\%$, 또는 $\leq 3\%$ 의 산화된 변이체를 포함하는 조성물.

2. 항목 1에 있어서, 조성물 중 산화된 변이체의 양이 산화된 변이체를 확인하는데 사용된 방법의 검출 하한치 내지 65%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4% 또는 3%인 조성물.

3. 항목 1 또는 항목 2에 있어서, 산화된 변이체를

(i) 하기 범위: 0.01-65%, 0.01-60%, 0.01-50%, 0.01-40%, 0.01-30%, 0.01-20%, 0.01-15%, 0.01-10%, 0.01-5%, 0.01-4%, 0.01-3%, 0.05-65%, 0.05-60%, 0.05-50%, 0.05-40%, 0.05-30%, 0.05-20%, 0.05-15%, 0.05-10%, 0.05-5%, 0.05-4%, 0.05-3%, 0.1-65%, 0.1-60%, 0.1-50%, 0.1-40%, 0.1-30%, 0.1-20%, 0.1-15%, 0.1-10%, 0.1-5%, 0.1-4%, 0.1-3%, 0.5-65%, 0.5-60%, 0.5-50%, 0.5-40%, 0.5-30%, 0.5-20%, 0.5-15%, 0.5-10%, 0.5-5%, 0.5-4%, 0.5-3%, 1-65%, 1-60%, 1-50%, 1-40%, 1-30%, 1-20%, 1-15%, 1-10%, 1-5%, 1-4%, 1-3%, 2-4%, 및 2-3% 중 어느 하나로부터 선택되거나; 또는

(ii) 약 10%, 약 5%, 약 4%, 약 3%, 약 2%, 또는 약 1%

의 양으로 포함하는 조성물.

4. 상기 항목 중 어느 하나에 있어서, 산화된 변이체가 서열식별번호: 1-6 중 어느 하나의 메티오닌 및/또는

트립토판 잔기에서 산화를 포함하는 것인 조성물.

- [0629] 5. 상기 항목 중 어느 하나에 있어서, 산화된 변이체가 CDRH1의 M34, CDRH3의 M103 및/또는 CDRL2의 W50에서의 산화 중 하나 또는 그의 조합을 포함하는 것인 조성물.
- [0630] 6. 상기 항목 중 어느 하나에 있어서,
- [0631] (i) CDRH1의 M34에서 $\leq 21\%$, $\leq 20\%$, $\leq 16\%$, $\leq 15\%$, $\leq 12.5\%$, $\leq 10\%$, $\leq 7.5\%$, $\leq 5\%$, $\leq 4\%$, $\leq 3\%$, $\leq 2\%$, 또는 $\leq 1\%$ 의 산화;
- [0632] (ii) CDRH3의 M103에서 $\leq 64\%$, $\leq 60\%$, $\leq 50\%$, $\leq 47\%$, $\leq 40\%$, $\leq 30\%$, $\leq 20\%$, $\leq 15\%$, $\leq 10\%$, $\leq 5\%$, $\leq 2\%$, 또는 $\leq 1\%$ 의 산화; 및/또는
- [0633] (iii) CDRL2의 W50에서 $\leq 30\%$, $\leq 25\%$, $\leq 20\%$, $\leq 15\%$, $\leq 10\%$, $\leq 7.5\%$, $\leq 5\%$, $\leq 4\%$, $\leq 3\%$, $\leq 2\%$, 또는 $\leq 1\%$ 의 산화
- [0634] 를 포함하는 조성물.
- [0635] 7. 상기 항목 중 어느 하나에 있어서, CDRH1의 M34에서의 산화를 확인하는데 사용된 방법의 검출 하한치 내지 21%, 20%, 16%, 15%, 12.5%, 10%, 7.5%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1%의 양으로 CDRH1의 M34에서의 산화를 포함하는 조성물.
- [0636] 8. 상기 항목 중 어느 하나에 있어서, CDRH1의 M34에서의 산화를
- [0637] (i) 하기 범위: 0.01-21%, 0.01-20%, 0.01-16%, 0.01-15%, 0.01-12.5%, 0.01-10%, 0.01-7.5%, 0.01-5%, 0.01-4%, 0.01-3%, 0.01-2%, 0.01-1%, 0.05-21%, 0.05-20%, 0.05-16%, 0.05-15%, 0.05-12.5%, 0.05-10%, 0.05-7.5%, 0.05-5%, 0.05-4%, 0.05-3%, 0.05-2%, 0.05-1%, 0.1-21%, 0.1-20%, 0.1-16%, 0.1-15%, 0.1-12.5%, 0.1-10%, 0.1-7.5%, 0.1-5%, 0.1-4%, 0.1-3%, 0.1-2%, 0.1-1%, 0.5-21%, 0.5-20%, 0.5-16%, 0.5-15%, 0.5-12.5%, 0.5-10%, 0.5-7.5%, 0.5-5%, 0.5-4%, 0.5-3%, 0.5-2%, 및 0.5-1% 중 어느 하나로부터 선택되거나; 또는
- [0638] (ii) 약 10%, 약 5%, 약 4%, 약 3%, 약 2%, 또는 약 1%
- [0639] 의 양으로 포함하는 조성물.
- [0640] 9. 상기 항목 중 어느 하나에 있어서, CDRH3의 M103에서의 산화를 확인하는데 사용된 방법의 검출 하한치 내지 64%, 60%, 50%, 47%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 5%, 2%, 또는 1%의 양으로 CDRH3의 M103에서의 산화를 포함하는 조성물.
- [0641] 10. 상기 항목 중 어느 하나에 있어서, CDRH3의 M103에서의 산화를
- [0642] (i) 하기 범위: 0.01-64%, 0.01-60%, 0.01-50%, 0.01-47%, 0.01-40%, 0.01-30%, 0.01-20%, 0.01-15%, 0.01-10%, 0.01-5%, 0.01-4%, 0.01-3%, 0.01-2%, 0.01-1%, 0.05-64%, 0.05-60%, 0.05-50%, 0.05-47%, 0.05-40%, 0.05-30%, 0.05-20%, 0.05-15%, 0.05-10%, 0.05-5%, 0.05-4%, 0.05-3%, 0.05-2%, 0.05-1%, 0.1-64%, 0.1-60%, 0.1-50%, 0.1-47%, 0.1-40%, 0.1-30%, 0.1-20%, 0.1-15%, 0.1-10%, 0.1-5%, 0.1-4%, 0.1-3%, 0.1-2%, 0.1-1%, 0.5-64%, 0.5-60%, 0.5-50%, 0.5-47%, 0.5-40%, 0.5-30%, 0.5-20%, 0.5-15%, 0.5-10%, 0.5-5%, 0.5-4%, 0.5-3%, 0.5-2% 및 0.5-1% 중 어느 하나로부터 선택되거나; 또는
- [0643] (ii) 약 10%, 약 5%, 약 4%, 약 3%, 약 2%, 또는 약 1%
- [0644] 의 양으로 포함하는 조성물.
- [0645] 11. 상기 항목 중 어느 하나에 있어서, CDRL2의 W50에서의 산화를 확인하는데 사용된 방법의 검출 하한치 내지 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 7.5%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1%의 양으로 CDRL2의 W50에서의 산화를 포함하는 조성물.
- [0646] 12. 상기 항목 중 어느 하나에 있어서, CDRL2의 W50에서의 산화를
- [0647] (i) 하기 범위: 0.01-34%, 0.01-30%, 0.01-25%, 0.01-20%, 0.01-15%, 0.01-10%, 0.01-7.5%, 0.01-5%, 0.01-4%, 0.01-3%, 0.01-2%, 0.01-1%, 0.05-34%, 0.05-30%, 0.05-25%, 0.05-20%, 0.05-15%, 0.05-10%, 0.05-7.5%, 0.05-5%, 0.05-4%, 0.05-3%, 0.05-2%, 0.05-1%, 0.1-34%, 0.1-30%, 0.1-25%, 0.1-20%, 0.1-15%, 0.1-10%, 0.1-7.5%, 0.1-5%, 0.1-4%, 0.1-3%, 0.1-2%, 0.1-1%, 0.5-34%, 0.5-30%, 0.5-25%, 0.5-20%, 0.5-15%, 0.5-10%, 0.5-7.5%, 0.5-5%, 0.5-4%, 또는 0.5-3%, 0.5-2% 및 0.5-1% 중 어느 하나로부터 선택되거나; 또는

- [0648] (ii) 약 10%, 약 5%, 약 4%, 약 3%, 약 2%, 또는 약 1%
- [0649] 의 양으로 포함하는 조성물.
- [0650] 13. 상기 항목 중 어느 하나에 있어서, 항체가 서열식별번호: 7의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일한 중쇄 가변 영역 및/또는 서열식별번호: 8의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일한 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 조성물.
- [0651] 14. 상기 항목 중 어느 하나에 있어서, 항체가 서열식별번호: 9의 중쇄 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일하고/거나 서열식별번호: 10의 경쇄 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일한 것인 조성물.
- [0652] 15. 상기 항목 중 어느 하나에 있어서, 항체가 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 포함하는 것인 조성물.
- [0653] 16. 항목 14 또는 항목 15에 있어서, 서열식별번호: 9의 M248에서의 산화, 서열식별번호: 9의 M354에서의 산화 및/또는 서열식별번호: 9의 M424에서의 산화 중 하나 또는 그의 조합을 포함하는 조성물.
- [0654] 17. 항목 14 내지 16 중 어느 하나에 있어서,
- [0655] (i) 서열식별번호: 9의 M248에서 $\leq 65\%$, 60% , $\leq 50\%$, $\leq 45\%$, $\leq 40\%$, $\leq 35\%$, $\leq 30\%$, $\leq 20\%$, $\leq 15\%$, $\leq 10\%$, $\leq 5\%$, $\leq 4\%$, 또는 $\leq 3\%$ 의 산화,
- [0656] (ii) 서열식별번호: 9의 M354에서 $\leq 65\%$, 60% , $\leq 50\%$, $\leq 45\%$, $\leq 40\%$, $\leq 35\%$, $\leq 30\%$, $\leq 20\%$, $\leq 15\%$, $\leq 10\%$, $\leq 5\%$, $\leq 4\%$, 또는 $\leq 3\%$ 의 산화; 및/또는
- [0657] (iii) 서열식별번호: 9의 M424에서 $\leq 65\%$, 60% , $\leq 50\%$, $\leq 45\%$, $\leq 40\%$, $\leq 35\%$, $\leq 30\%$, $\leq 20\%$, $\leq 15\%$, $\leq 10\%$, $\leq 5\%$, $\leq 4\%$, 또는 $\leq 3\%$ 의 산화
- [0658] 를 포함하는 조성물.
- [0659] 18. 항목 14 내지 17 중 어느 하나에 있어서, 조성물 중 M248에서의 산화의 양이 M248에서의 산화를 확인하는데 사용된 방법의 검출 하한치 내지 65%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4% 또는 3%인 조성물.
- [0660] 19. 항목 14 내지 18 중 어느 하나에 있어서, M248에서의 산화를
- [0661] (i) 하기 범위: 0.01-65%, 0.01-60%, 0.01-50%, 0.01-40%, 0.01-30%, 0.01-20%, 0.01-15%, 0.01-10%, 0.01-5%, 0.01-4%, 0.01-3%, 0.05-65%, 0.05-60%, 0.05-50%, 0.05-40%, 0.05-30%, 0.05-20%, 0.05-15%, 0.05-10%, 0.05-5%, 0.05-4%, 0.05-3%, 0.1-65%, 0.1-60%, 0.1-50%, 0.1-40%, 0.1-30%, 0.1-20%, 0.1-15%, 0.1-10%, 0.1-5%, 0.1-4%, 0.1-3%, 0.5-65%, 0.5-60%, 0.5-50%, 0.5-40%, 0.5-30%, 0.5-20%, 0.5-15%, 0.5-10%, 0.5-5%, 0.5-4%, 0.5-3%, 1-65%, 1-60%, 1-50%, 1-40%, 1-30%, 1-20%, 1-15%, 1-10%, 1-5%, 1-4%, 1-3%, 2-4%, 및 2-3% 중 어느 하나로부터 선택되거나; 또는
- [0662] (ii) 약 10%, 약 5%, 약 4%, 약 3%, 약 2%, 또는 약 1%
- [0663] 의 양으로 포함하는 조성물.
- [0664] 20. 항목 14 내지 19 중 어느 하나에 있어서, 조성물 중 M354에서의 산화의 양이 M354에서의 산화를 확인하는데 사용된 방법의 검출 하한치 내지 65%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4% 또는 3%인 조성물.
- [0665] 21. 항목 14 내지 20 중 어느 하나에 있어서, M354에서의 산화를
- [0666] (i) 하기 범위: 0.01-65%, 0.01-60%, 0.01-50%, 0.01-40%, 0.01-30%, 0.01-20%, 0.01-15%, 0.01-10%, 0.01-5%, 0.01-4%, 0.01-3%, 0.05-65%, 0.05-60%, 0.05-50%, 0.05-40%, 0.05-30%, 0.05-20%, 0.05-15%, 0.05-10%, 0.05-5%, 0.05-4%, 0.05-3%, 0.1-65%, 0.1-60%, 0.1-50%, 0.1-40%, 0.1-30%, 0.1-20%, 0.1-15%, 0.1-10%, 0.1-5%, 0.1-4%, 0.1-3%, 0.5-65%, 0.5-60%, 0.5-50%, 0.5-40%, 0.5-30%, 0.5-20%, 0.5-15%, 0.5-10%, 0.5-5%, 0.5-4%, 0.5-3%, 1-65%, 1-60%, 1-50%, 1-40%, 1-30%, 1-20%, 1-15%, 1-10%, 1-5%, 1-4%, 1-3%, 2-4%, 및 2-3% 중 어느 하나로부터 선택되거나; 또는
- [0667] (ii) 약 10%, 약 5%, 약 4%, 약 3%, 약 2%, 또는 약 1%
- [0668] 의 양으로 포함하는 조성물.
- [0669] 22. 항목 14 내지 21 중 어느 하나에 있어서, 조성물 중 M242에서의 산화의 양이 M424에서의 산화를 확인하는

데 사용된 방법의 검출 하한치 내지 65%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4% 또는 3%인 조성물.

- [0670] 23. 항목 14 내지 22 중 어느 하나에 있어서, M424에서의 산화를
- [0671] (i) 하기 범위: 0.01-65%, 0.01-60%, 0.01-50%, 0.01-40%, 0.01-30%, 0.01-20%, 0.01-15%, 0.01-10%, 0.01-5%, 0.01-4%, 0.01-3%, 0.05-65%, 0.05-60%, 0.05-50%, 0.05-40%, 0.05-30%, 0.05-20%, 0.05-15%, 0.05-10%, 0.05-5%, 0.05-4%, 0.05-3%, 0.1-65%, 0.1-60%, 0.1-50%, 0.1-40%, 0.1-30%, 0.1-20%, 0.1-15%, 0.1-10%, 0.1-5%, 0.1-4%, 0.1-3%, 0.5-65%, 0.5-60%, 0.5-50%, 0.5-40%, 0.5-30%, 0.5-20%, 0.5-15%, 0.5-10%, 0.5-5%, 0.5-4%, 0.5-3%, 1-65%, 1-60%, 1-50%, 1-40%, 1-30%, 1-20%, 1-15%, 1-10%, 1-5%, 1-4%, 1-3%, 2-4%, 및 2-3% 중 어느 하나로부터 선택되거나; 또는
- [0672] (ii) 약 10%, 약 5%, 약 4%, 약 3%, 약 2%, 또는 약 1%
- [0673] 의 양으로 포함하는 조성물.
- [0674] 24. 항목 2, 7, 9, 11, 18, 20 및 22 중 어느 하나에 있어서, 산화된 변이체 또는 특정 위치에서의 산화를 확인하는데 사용된 방법이 임의로 실시예 1에 제시된 바와 같은 펩티드 맵핑 탠덤 질량 분광측정법인 조성물.
- [0675] 25. 항목 24에 있어서, 방법이
- [0676] (i) 항-PD-1 항체를 변성, 환원, 알킬화 및 소화시키는 단계; 및
- [0677] (ii) 탠덤 질량 분광측정법으로 액체 크로마토그래피를 수행하는 단계
- [0678] 를 포함하는 것인 조성물.
- [0679] 26. 항목 24 또는 항목 25에 있어서, 방법이
- [0680] (i) 항-PD-1 항체를 구아니딘 히드로클로라이드로 변성시키고, 디티오프레이톨로 환원시키고, 아이오도아세트아미드로 알킬화시키고, 엔도프로테이나제 Lys-C 또는 트립신으로 37°C에서 4시간 동안 소화시키고, 트리플루오로아세트산으로 켄칭하는 단계; 및
- [0681] (ii) 탠덤 전기분무 이온화 질량 분광측정법으로 초고성능 액체 크로마토그래피를 수행하는 단계
- [0682] 를 포함하는 것인 조성물.
- [0683] 27. 서열식별번호: 1의 CDRH1, 서열식별번호: 2의 CDRH2, 및 서열식별번호: 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 서열 및 서열식별번호: 4의 CDRL1, 서열식별번호: 5의 CDRL2, 및 서열식별번호: 6의 CDRL3을 포함하는 경쇄 서열을 포함하는 항-PD-1 항체의 응집된 변이체를 포함하는 조성물이며; $\leq 36\%$, $\leq 35\%$, $\leq 30\%$, $\leq 26\%$, $\leq 25\%$, $\leq 20\%$, $\leq 10\%$, $\leq 5\%$, $\leq 4\%$, $\leq 3\%$, $\leq 2\%$, 또는 $\leq 1\%$ 의 응집된 변이체를 포함하는 조성물.
- [0684] 28. 항목 27에 있어서, 조성물 중 응집된 변이체의 양이 응집된 변이체를 확인하는데 사용된 방법의 검출 하한치 내지 36%, 35%, 30%, 26%, 25%, 20%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% 또는 1%인 조성물.
- [0685] 29. 항목 27 또는 항목 28에 있어서, 응집된 변이체를
- [0686] (i) 하기 범위: 0.01-36%, 0.01-35%, 0.01-30%, 0.01-26%, 0.01-25%, 0.01-20%, 0.01-10%, 0.01-5%, 0.01-4%, 0.01-3%, 0.01-2%, 0.01-1%, 0.05-36%, 0.05-35%, 0.05-30%, 0.05-26%, 0.05-25%, 0.05-20%, 0.05-10%, 0.05-5%, 0.05-4%, 0.05-3%, 0.05-2%, 0.05-1%; 0.1-36%, 0.1-35%, 0.1-30%, 0.1-26%, 0.1-25%, 0.1-20%, 0.1-10%, 0.1-5%, 0.1-4%, 0.1-3%, 0.1-2%, 0.1-1%, 0.5-36%, 0.5-35%, 0.5-30%, 0.5-26%, 0.5-25%, 0.5-20%, 0.5-10%, 0.5-5%, 0.5-4%, 0.5-3%, 0.5-2%, 및 0.5-1% 중 어느 하나로부터 선택되거나; 또는
- [0687] (ii) 약 10%, 약 5%, 약 4%, 약 3%, 약 2%, 또는 약 1%
- [0688] 의 양으로 포함하는 조성물.
- [0689] 30. 항목 27 내지 29 중 어느 하나에 있어서, 항체가 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 포함하는 것인 조성물.
- [0690] 31. 항목 27 내지 30 중 어느 하나에 있어서, 응집된 변이체를 확인하는데 사용된 방법이 크기 배제 크로마토그래피인 조성물.
- [0691] 32. 항목 27 내지 31 중 어느 하나에 있어서, 응집된 변이체를 확인하는데 사용된 방법이 임의로 실시예 5.1에

제시된 바와 같은 SE-HPLC인 조성물.

- [0692] 33. 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 갖는 항체를 포함하는 조성물이며, (i) $\leq 65\%$, $\leq 60\%$, $\leq 50\%$, $\leq 40\%$, $\leq 30\%$, $\leq 20\%$, $\leq 15\%$, $\leq 10\%$, $\leq 5\%$, $\leq 4\%$ 또는 $\leq 3\%$ 의 산화된 변이체; 및/또는 (ii) $\leq 36\%$, $\leq 35\%$, $\leq 30\%$, $\leq 26\%$, $\leq 25\%$, $\leq 20\%$, $\leq 10\%$, $\leq 5\%$, $\leq 4\%$, $\leq 3\%$, $\leq 2\%$, 또는 $\leq 1\%$ 의 응집된 변이체를 포함하는 조성물.
- [0693] 34. 항목 33에 있어서, 조성물 중 산화된 변이체의 양이 산화된 변이체를 확인하는데 사용된 방법의 검출 하한치 내지 65%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4% 또는 3%인 조성물.
- [0694] 35. 항목 33 또는 항목 34에 있어서, 산화된 변이체를
- [0695] (i) 하기 범위: 0.01-65%, 0.01-60%, 0.01-50%, 0.01-40%, 0.01-30%, 0.01-20%, 0.01-15%, 0.01-10%, 0.01-5%, 0.01-4%, 0.01-3%, 0.05-65%, 0.05-60%, 0.05-50%, 0.05-40%, 0.05-30%, 0.05-20%, 0.05-15%, 0.05-10%, 0.05-5%, 0.05-4%, 0.05-3%, 0.1-65%, 0.1-60%, 0.1-50%, 0.1-40%, 0.1-30%, 0.1-20%, 0.1-15%, 0.1-10%, 0.1-5%, 0.1-4%, 0.1-3%, 0.5-65%, 0.5-60%, 0.5-50%, 0.5-40%, 0.5-30%, 0.5-20%, 0.5-15%, 0.5-10%, 0.5-5%, 0.5-4%, 0.5-3%, 1-65%, 1-60%, 1-50%, 1-40%, 1-30%, 1-20%, 1-15%, 1-10%, 1-5%, 1-4%, 1-3%, 2-4%, 및 2-3% 중 어느 하나로부터 선택되거나; 또는
- [0696] (ii) 약 10%, 약 5%, 약 4%, 약 3%, 약 2%, 또는 약 1%
- [0697] 의 양으로 포함하는 조성물.
- [0698] 36. 항목 34 또는 항목 35에 있어서, 산화된 변이체를 확인하는데 사용된 방법이 임의로 실시예 1에 제시된 바와 같은 펩티드 맵핑 탠덤 질량 분광측정법인 조성물.
- [0699] 37. 항목 34 내지 36 중 어느 하나에 있어서, 방법이
- [0700] (i) 항-PD-1 항체를 변성, 환원, 알킬화 및 소화시키는 단계; 및
- [0701] (ii) 탠덤 질량 분광측정법으로 액체 크로마토그래피를 수행하는 단계
- [0702] 를 포함하는 것인 조성물.
- [0703] 38. 항목 34 내지 37 중 어느 하나에 있어서, 방법이
- [0704] (i) 항-PD-1 항체를 구아니딘 히드로클로라이드로 변성시키고, 디티오프로테이놀로 환원시키고, 아이오도아세트아미드로 알킬화시키고, 엔도프로테이나제 Lys-C 또는 트립신으로 37°C에서 4시간 동안 소화시키고, 트리플루오로아세트산으로 켄칭하는 단계; 및
- [0705] (ii) 탠덤 전기분무 이온화 질량 분광측정법으로 초고성능 액체 크로마토그래피를 수행하는 단계
- [0706] 를 포함하는 것인 조성물.
- [0707] 39. 항목 33 내지 38 중 어느 하나에 있어서, 조성물 중 응집된 변이체의 양이 응집된 변이체를 확인하는데 사용된 방법의 검출 하한치 내지 36%, 35%, 30%, 26%, 25%, 20%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% 또는 1%인 조성물.
- [0708] 40. 항목 33 내지 39 중 어느 하나에 있어서, 응집된 변이체를
- [0709] (i) 하기 범위: 0.01-36%, 0.01-35%, 0.01-30%, 0.01-26%, 0.01-25%, 0.01-20%, 0.01-10%, 0.01-5%, 0.01-4%, 0.01-3%, 0.01-2%, 0.01-1%, 0.05-36%, 0.05-35%, 0.05-30%, 0.05-26%, 0.05-25%, 0.05-20%, 0.05-10%, 0.05-5%, 0.05-4%, 0.05-3%, 0.05-2%, 0.05-1%; 0.1-36%, 0.1-35%, 0.1-30%, 0.1-26%, 0.1-25%, 0.1-20%, 0.1-10%, 0.1-5%, 0.1-4%, 0.1-3%, 0.1-2%, 0.1-1%, 0.5-36%, 0.5-35%, 0.5-30%, 0.5-26%, 0.5-25%, 0.5-20%, 0.5-10%, 0.5-5%, 0.5-4%, 0.5-3%, 0.5-2%, 및 0.5-1% 중 어느 하나로부터 선택되거나; 또는
- [0710] (ii) 약 10%, 약 5%, 약 4%, 약 3%, 약 2%, 또는 약 1%
- [0711] 의 양으로 포함하는 조성물.
- [0712] 41. 항목 39 또는 항목 40에 있어서, 응집된 변이체를 확인하는데 사용된 방법이 크기 배제 크로마토그래피인 조성물.
- [0713] 42. 항목 39 내지 41 중 어느 하나에 있어서, 응집된 변이체를 확인하는데 사용된 방법이 임의로 실시예 5.1에

제시된 바와 같은 SE-HPLC인 조성물.

- [0714] 43. 서열식별번호: 1의 CDRH1, 서열식별번호: 2의 CDRH2, 및 서열식별번호: 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 4의 CDRL1, 서열식별번호: 5의 CDRL2, 및 서열식별번호: 6의 CDRL3을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항-PD-1 항체의 하전된 변이체를 포함하는 조성물이며,
- [0715] (i) $\leq 100\%$, $\leq 90\%$, $\leq 80\%$, $\leq 70\%$, $\leq 60\%$, $\leq 50\%$, $\leq 40\%$, $\leq 35\%$, $\leq 30\%$ 또는 $\leq 25\%$ 의 산성 변이체; 및/또는
- [0716] (ii) $\leq 35\%$, $\leq 30\%$, $\leq 25\%$, $\leq 20\%$, $\leq 15\%$, $\leq 10\%$, $\leq 8\%$, $\leq 7.5\%$, $\leq 7\%$, $\leq 6\%$ 또는 $\leq 5\%$ 의 염기성 변이체; 및/또는
- [0717] (iii) $\geq 1\%$, $\geq 2.6\%$, $\geq 3\%$, $\geq 5\%$, $\geq 10\%$, $\geq 20\%$, $\geq 30\%$, $\geq 40\%$, $\geq 50\%$, $\geq 55\%$, $\geq 60\%$, $\geq 65\%$, $\geq 70\%$, $\geq 75\%$, $\geq 80\%$ 또는 $\geq 90\%$ 의 주요 이소형
- [0718] 을 포함하는 조성물.
- [0719] 44. 항목 43에 있어서, 조성물 중 산성 변이체의 양이 산성 변이체를 확인하는데 사용된 방법의 검출 하한치 내지 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 35%, 30% 또는 25%인 조성물.
- [0720] 45. 항목 43 또는 44에 있어서, 산성 변이체를
- [0721] (i) 하기 범위: 5-100%, 5-90%, 5-80%, 5-70%, 5-60%, 5-50%, 5-40%, 5-35%, 5-30%, 5-25%, 10-100%, 10-97%, 10-90%, 10-80%, 10-70%, 10-60%, 10-50%, 10-40%, 10-35%, 10-30%, 10-25%, 20-100%, 20-97%, 20-90%, 20-80%, 20-70%, 20-60%, 20-50%, 20-40%, 20-35%, 20-30% 및 20-25% 중 어느 하나로부터 선택되거나; 또는
- [0722] (ii) 약 60%, 약 50%, 약 45%, 약 40%, 약 35%, 약 30%, 약 25%, 약 20% 또는 약 10%
- [0723] 의 양으로 포함하는 조성물.
- [0724] 46. 항목 43 내지 45 중 어느 하나에 있어서, 조성물 중 염기성 변이체의 양이 염기성 변이체를 확인하는데 사용된 방법의 검출 하한치 내지 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 7.5%, 7%, 6% 또는 5%인 조성물.
- [0725] 47. 항목 43 내지 46 중 어느 하나에 있어서, 염기성 변이체를
- [0726] (i) 하기 범위: 0.1-35%, 0.1-30%, 0.1-25%, 0.1-20%, 0.1-15%, 0.1-10%, 0.1-8%, 0.1-7.5%, 0.1-7%, 0.1-6%, 0.1-5%, 1-35%, 1-30%, 1-25%, 1-20%, 1-15%, 1-10%, 1-8%, 1-7.5%, 1-7%, 1-6% 및 1-5% 중 어느 하나로부터 선택되거나; 또는
- [0727] (ii) 약 35%, 약 30%, 약 25%, 약 20%, 약 15%, 약 10%, 약 7.5% 또는 약 5%
- [0728] 의 양으로 포함하는 조성물.
- [0729] 48. 항목 43 내지 47 중 어느 하나에 있어서, 주요 형태를
- [0730] (i) 하기 범위: 2-90%, 2-80%, 2-75%, 5-90%, 10-90%, 20-90%, 30-90%, 40-90%, 50-90%, 60-90%, 5-80%, 10-80%, 20-80%, 30-80%, 40-80%, 50-80% 및 60-80% 중 어느 하나로부터 선택되거나; 또는
- [0731] (ii) 약 80%, 약 75%, 약 70%, 약 65%, 약 60%, 약 50% 또는 약 55%
- [0732] 의 양으로 포함하는 조성물.
- [0733] 49. 서열식별번호: 1의 CDRH1, 서열식별번호: 2의 CDRH2, 및 서열식별번호: 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 4의 CDRL1, 서열식별번호: 5의 CDRL2, 및 서열식별번호: 6의 CDRL3을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항-PD-1 항체의 하전된 변이체를 포함하는 조성물이며; 10-97%의 산성 변이체; 및/또는 0.1-35%의 염기성 변이체; 및/또는 2-80%의 주요 이소형을 포함하는 조성물.
- [0734] 50. 서열식별번호: 1의 CDRH1, 서열식별번호: 2의 CDRH2, 및 서열식별번호: 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 4의 CDRL1, 서열식별번호: 5의 CDRL2, 및 서열식별번호: 6의 CDRL3을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항-PD-1 항체의 하전된 변이체를 포함하는 조성물이며; $\leq 35\%$ 의 산성 변이체; 및/또는 $\leq 5\%$ 의 염기성 변이체; 및/또는 $\geq 55\%$ 의 주요 이소형을 포함하는 조성물.
- [0735] 51. 서열식별번호: 1의 CDRH1, 서열식별번호: 2의 CDRH2, 및 서열식별번호: 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 4의 CDRL1, 서열식별번호: 5의 CDRL2, 및 서열식별번호: 6의 CDRL3을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항-PD-1 항체의 하전된 변이체를 포함하는 조성물이며; 10-30%의 산성 변이체; 및/또

는 0.1-10%의 염기성 변이체; 및/또는 60-80%의 주요 이소형을 포함하는 조성물.

- [0736] 52. 항목 43 내지 51 중 어느 하나에 있어서, 조성물의 퍼센트 산성 변이체, 퍼센트 염기성 변이체 및 퍼센트 주요 이소형이 모세관 등전 포커싱을 사용하여 결정된 것인 조성물.
- [0737] 53. 상기 항목 중 어느 하나에 있어서, 탈아미드화된 변이체를 포함하는 조성물.
- [0738] 54. 항목 53에 있어서, 탈아미드화된 변이체가 아스파르트산 잔기, 숙신이미드-아스파르트산 잔기, 및 이소-아스파르트산 잔기로부터 선택된 탈아미드화된 잔기를 포함하는 것인 조성물.
- [0739] 55. 항목 54에 있어서, 탈아미드화된 변이체가 서열식별번호: 9의 N380 및/또는 N385에서 최대 100%의 탈아미드화를 포함하는 것인 조성물.
- [0740] 56. 항목 54에 있어서, 탈아미드화된 변이체가 N380에서 0.1-100%, 0.1-90%, 0.1-80%, 0.1-70%, 0.1-60%, 0.1-50%, 0.1-40%, 0.1-30%, 0.1-20%, 0.1-10%, 1-100%, 1-90%, 1-80%, 1-70%, 1-60%, 1-50%, 1-40%, 1-30%, 1-20%, 1-10%, 2-100%, 3-100%, 4-100%, 5-100%, 6-100%, 7-100%, 8-100%, 9-100%, 2-30%, 3-30%, 4-30%, 5-30%, 2-40%, 3-40%, 4-40%, 5-40%, 2-10%, 3-10%, 4-10%, 또는 5-9%의 탈아미드화를 포함하는 것인 조성물.
- [0741] 57. 항목 54에 있어서, 탈아미드화된 변이체가 N380에서 1% 이상, 2% 이상, 3% 이상, 4% 이상, 5% 이상, 6% 이상, 7% 이상, 8% 이상, 9% 이상, 또는 10% 이상의 탈아미드화를 포함하는 것인 조성물.
- [0742] 58. 항목 54 내지 57 중 어느 하나에 있어서, 탈아미드화된 변이체가 N385에서 0.1-100%, 0.1-90%, 0.1-80%, 0.1-70%, 0.1-60%, 0.1-50%, 0.1-40%, 0.1-30%, 0.1-20%, 0.1-10%, 1-100%, 1-90%, 1-80%, 1-70%, 1-60%, 1-50%, 1-40%, 1-30%, 1-20%, 1-10%, 2-100%, 3-100%, 4-100%, 5-100%, 6-100%, 7-100%, 8-100%, 9-100%, 2-30%, 3-30%, 4-30%, 5-30%, 2-40%, 3-40%, 4-40%, 5-40%, 2-10%, 3-10%, 4-10%, 또는 5-9%의 탈아미드화를 포함하는 것인 조성물.
- [0743] 59. 항목 54 내지 58 중 어느 하나에 있어서, 탈아미드화된 변이체가 N385에서 0.5% 이상, 1% 이상, 2% 이상, 3% 이상, 4% 이상, 5% 이상, 6% 이상, 7% 이상, 8% 이상, 9% 이상, 또는 10% 이상의 탈아미드화를 포함하는 것인 조성물.
- [0744] 60. 항목 53 내지 59 중 어느 하나에 있어서, 탈아미드화된 변이체가 서열식별번호: 11, 서열식별번호: 12 또는 서열식별번호: 13의 서열을 포함하는 것인 조성물.
- [0745] 61. 상기 항목 중 어느 하나에 있어서, 이성질체화된 변이체를 포함하는 조성물.
- [0746] 62. 항목 61에 있어서, 서열식별번호: 9의 D147에서 최대 100%의 이성질체화를 포함하는 조성물.
- [0747] 63. 항목 61 또는 항목 62에 있어서, 0.1-90%, 0.1-80%, 0.1-70%, 0.1-60%, 0.1-50%, 0.1-40%, 0.1-30%, 0.1-20%, 0.1-15%, 0.1-10%, 1-100%, 1-90%, 1-80%, 1-70%, 1-60%, 1-50%, 1-40%, 1-30%, 1-20%, 1-15% 또는 1-10%의 이성질체화된 변이체를 포함하는 조성물.
- [0748] 64. 상기 항목 중 어느 하나에 있어서, 최대 100%의 중쇄 N-말단 피로-글루타메이트 변이체 및/또는 최대 100%의 중쇄 C-말단 리신 절단된 변이체를 포함하는 조성물.
- [0749] 65. 상기 항목 중 어느 하나에 있어서, 0.1-100%, 0.1-90%, 0.1-80%, 0.1-70%, 0.1-60%, 0.1-50%, 0.1-40%, 0.1-30%, 0.1-20%, 0.1-10%, 0.1-9%, 0.1-8%, 0.1-7%, 0.1-6%, 0.1-5%, 0.1-4%, 0.1-3%, 0.1-2%, 0.1-1%, 1-100%, 1-90%, 1-80%, 1-70%, 1-60%, 1-50%, 1-40%, 1-30%, 1-20%, 1-10%, 1-9%, 1-8%, 1-7%, 1-6%, 1-5%, 1-4%, 1-3%, 또는 1-2%의 중쇄 N-말단 피로-글루타메이트 변이체를 포함하는 조성물.
- [0750] 66. 상기 항목 중 어느 하나에 있어서, $\geq 10\%$, $\geq 20\%$, $\geq 30\%$, $\geq 40\%$, $\geq 50\%$, $\geq 60\%$, $\geq 70\%$, $\geq 80\%$, $\geq 90\%$ 또는 $\geq 95\%$ 의 중쇄 C-말단 리신 절단된 변이체를 포함하는 조성물.
- [0751] 67. 상기 항목 중 어느 하나에 있어서, 1-100%, 10-100%, 20-100%, 30-100%, 40-100%, 50-100%, 60-100%, 70-100%, 80-100%, 90-100%, 95-99%, 96-99% 또는 97-99%의 중쇄 C-말단 리신 절단된 변이체를 포함하는 조성물.
- [0752] 68. 서열식별번호: 9, 서열식별번호: 11, 서열식별번호: 12 및/또는 서열식별번호: 13으로부터 선택된 서열 중 하나 또는 그의 조합을 갖는 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 포함하는 항체를 포함하는 조성물이며, $\leq 64\%$, $\leq 60\%$, $\leq 50\%$, $\leq 40\%$, $\leq 30\%$, $\leq 20\%$, $\leq 15\%$, $\leq 10\%$, $\leq 5\%$, $\leq 4\%$, 또는 $\leq 3\%$ 의 산화된 변이체를 포함하는 조성물.

- [0753] 69. 항목 68에 있어서, 조성물 중 산화된 변이체의 양이 산화된 변이체를 확인하는데 사용된 방법의 검출 하한치 내지 65%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4% 또는 3%인 조성물.
- [0754] 70. 항목 68 또는 항목 69에 있어서, 산화된 변이체를
- [0755] (i) 하기 범위: 0.01-65%, 0.01-60%, 0.01-50%, 0.01-40%, 0.01-30%, 0.01-20%, 0.01-15%, 0.01-10%, 0.01-5%, 0.01-4%, 0.01-3%, 0.05-65%, 0.05-60%, 0.05-50%, 0.05-40%, 0.05-30%, 0.05-20%, 0.05-15%, 0.05-10%, 0.05-5%, 0.05-4%, 0.05-3%, 0.1-65%, 0.1-60%, 0.1-50%, 0.1-40%, 0.1-30%, 0.1-20%, 0.1-15%, 0.1-10%, 0.1-5%, 0.1-4%, 0.1-3%, 0.5-65%, 0.5-60%, 0.5-50%, 0.5-40%, 0.5-30%, 0.5-20%, 0.5-15%, 0.5-10%, 0.5-5%, 0.5-4%, 0.5-3%, 1-65%, 1-60%, 1-50%, 1-40%, 1-30%, 1-20%, 1-15%, 1-10%, 1-5%, 1-4%, 1-3%, 2-4%, 및 2-3% 중 어느 하나로부터 선택되거나; 또는
- [0756] (ii) 약 10%, 약 5%, 약 4%, 약 3%, 약 2%, 또는 약 1%
- [0757] 의 양으로 포함하는 조성물.
- [0758] 71. 항목 68 내지 70 중 어느 하나에 있어서, 산화된 변이체를 확인하는데 사용된 방법이 임의로 실시예 1에 제시된 바와 같은 펩티드 맵핑 탠덤 질량 분광측정법인 조성물.
- [0759] 72. 항목 68 내지 71 중 어느 하나에 있어서, 방법이
- [0760] (i) 항-PD-1 항체를 변성, 환원, 알킬화 및 소화시키는 단계; 및
- [0761] (ii) 탠덤 질량 분광측정법으로 액체 크로마토그래피를 수행하는 단계
- [0762] 를 포함하는 것인 조성물.
- [0763] 73. 항목 68 내지 72 중 어느 하나에 있어서, 방법이
- [0764] (i) 항-PD-1 항체를 구아니딘 히드로클로라이드로 변성시키고, 디티오프레이톨로 환원시키고, 아이오도아세트아미드로 알킬화시키고, 엔도프로테이나제 Lys-C 또는 트립신으로 37℃에서 4시간 동안 소화시키고, 트리플루오로아세트산으로 켄칭하는 단계; 및
- [0765] (ii) 탠덤 전기분무 이온화 질량 분광측정법으로 초고성능 액체 크로마토그래피를 수행하는 단계
- [0766] 를 포함하는 것인 조성물.
- [0767] 74. 서열식별번호: 9, 서열식별번호: 11, 서열식별번호: 12 및/또는 서열식별번호: 13으로부터 선택된 서열 중 하나 또는 그의 조합을 갖는 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열을 포함하는 항체를 포함하는 조성물이며, $\leq 36\%$, $\leq 35\%$, $\leq 30\%$, $\leq 26\%$, $\leq 25\%$, $\leq 20\%$, $\leq 10\%$, $\leq 5\%$, $\leq 4\%$, $\leq 3\%$, $\leq 2\%$, 또는 $\leq 1\%$ 의 응집된 변이체를 포함하는 조성물.
- [0768] 75. 항목 74에 있어서, 조성물 중 응집된 변이체의 양이 응집된 변이체를 확인하는데 사용된 방법의 검출 하한치 내지 36%, 35%, 30%, 26%, 25%, 20%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% 또는 1%인 조성물.
- [0769] 76. 항목 74 또는 항목 75에 있어서, 응집된 변이체를
- [0770] (i) 하기 범위: 0.01-36%, 0.01-35%, 0.01-30%, 0.01-26%, 0.01-25%, 0.01-20%, 0.01-10%, 0.01-5%, 0.01-4%, 0.01-3%, 0.01-2%, 0.01-1%, 0.05-36%, 0.05-35%, 0.05-30%, 0.05-26%, 0.05-25%, 0.05-20%, 0.05-10%, 0.05-5%, 0.05-4%, 0.05-3%, 0.05-2%, 0.05-1%; 0.1-36%, 0.1-35%, 0.1-30%, 0.1-26%, 0.1-25%, 0.1-20%, 0.1-10%, 0.1-5%, 0.1-4%, 0.1-3%, 0.1-2%, 0.1-1%, 0.5-36%, 0.5-35%, 0.5-30%, 0.5-26%, 0.5-25%, 0.5-20%, 0.5-10%, 0.5-5%, 0.5-4%, 0.5-3%, 0.5-2%, 및 0.5-1% 중 어느 하나로부터 선택되거나; 또는
- [0771] (ii) 약 10%, 약 5%, 약 4%, 약 3%, 약 2%, 또는 약 1%
- [0772] 의 양으로 포함하는 조성물.
- [0773] 77. 항목 74 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 응집된 변이체를 확인하는데 사용된 방법이 크기 배제 크로마토그래피인 조성물.
- [0774] 78. 항목 27 내지 31 중 어느 하나에 있어서, 응집된 변이체를 확인하는데 사용된 방법이 임의로 실시예 5.1에 제시된 바와 같은 SE-HPLC인 조성물.

- [0775] 79. 서열식별번호: 1의 CDRH1, 서열식별번호: 2의 CDRH2, 및 서열식별번호: 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 4의 CDRL1, 서열식별번호: 5의 CDRL2, 및 서열식별번호: 6의 CDRL3을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항-PD-1 항체의 변이체를 포함하는 조성물이며; 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열, 10-97%의 산성 변이체, 0.1-35%의 염기성 변이체, 2-80%의 주요 이소형, 4.8% 이하의 경쇄 W50 산화된 변이체, 1% 이하의 중쇄 M34 산화된 변이체, 1.2% 이하의 중쇄 M103 산화된 변이체, 15.2% 이하의 응집된 변이체, 16.7% 이하의 중쇄 M354 산화된 변이체, 29.0% 이하의 중쇄 M424 산화된 변이체, 47.1% 이하의 중쇄 M248 산화된 변이체, 20.8% 이하의 중쇄 D147 이성질체화된 변이체, 13.1% 이하의 중쇄 D151 또는 D167 이성질체화된 변이체, 3.1% 이하의 중쇄 D261, D266 또는 D276 이성질체화 변이체, 4.6% 이하의 단편화된 변이체, 27.8% 이하의 중쇄 N380 탈아미드화된 변이체, 27.2% 이하의 중쇄 N385 탈아미드화된 변이체, 약 7.4% 이하의 중쇄 N311 탈아미드화된 변이체, 약 2.0% 이하의 중쇄 N430 탈아미드화된 변이체, 90% 이상의 중쇄 C-말단 리신 결실된 변이체 (Δ K443), 및 1% 이하의 중쇄 N-말단 피로-글루타메이트 변이체를 포함하는 조성물의 효력의 적어도 60%를 갖는 조성물.
- [0776] 80. 서열식별번호: 1의 CDRH1, 서열식별번호: 2의 CDRH2, 및 서열식별번호: 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 서열식별번호: 4의 CDRL1, 서열식별번호: 5의 CDRL2, 및 서열식별번호: 6의 CDRL3을 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항-PD-1 항체의 변이체를 포함하는 조성물이며; 서열식별번호: 9의 중쇄 서열 및 서열식별번호: 10의 경쇄 서열, 10-97%의 산성 변이체, 0.1-35%의 염기성 변이체, 2-80%의 주요 이소형, 0.01-4.8%의 경쇄 W50 산화된 변이체, 0.01-1%의 중쇄 M34 산화된 변이체, 0.01-1.2%의 중쇄 M103 산화된 변이체, 0.01-15.2%의 응집된 변이체, 0.01-16.7%의 중쇄 M354 산화된 변이체, 0.01-29.0%의 중쇄 M424 산화된 변이체, 0.01-47.1%의 중쇄 M248 산화된 변이체, 0.01-20.8%의 중쇄 D147 이성질체화된 변이체, 0.01-13.1%의 중쇄 D151 또는 D167 이성질체화된 변이체, 0.01-3.1%의 중쇄 D261, D266 또는 D276 이성질체화 변이체, 0.01-4.6%의 단편화된 변이체, 0.01-27.8%의 중쇄 N380 탈아미드화된 변이체, 0.01-27.2%의 중쇄 N385 탈아미드화된 변이체, 약 0.01-7.4%의 중쇄 N311 탈아미드화된 변이체, 약 0.01-2.0%의 중쇄 N430 탈아미드화된 변이체, 90% 이상의 중쇄 C-말단 리신 결실된 변이체 (Δ K443), 및 0.01-1%의 중쇄 N-말단 피로-글루타메이트 변이체를 포함하는 조성물의 효력의 적어도 60%를 갖는 조성물.
- [0777] 81. 상기 항목 중 어느 하나에 있어서, 항체가 전장 항체인 조성물.
- [0778] 82. 상기 항목 중 어느 하나에 있어서, 항체가 인간화된 것인 조성물.
- [0779] 83. 상기 항목 중 어느 하나에 있어서, 항체의 제조 또는 저장 동안 형성된 조성물.
- [0780] 84. 상기 항목 중 어느 하나에 따른 조성물 및 적어도 1종의 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물.
- [0781] 85. 약 20 mg/mL 내지 약 125 mg/mL의 항체 및 pH 약 5.5 내지 약 6.5의 완충제를 포함하는, 항목 82에 따른 제약 조성물을 포함하는 제제.
- [0782] 86. 항목 85에 있어서, 완충제가 시트레이트 완충제 또는 히스티딘 완충제로부터 선택된 것인 제제.
- [0783] 87. 항목 85 또는 항목 86에 있어서, 완충제가 pH 약 6.0의 시트레이트 완충제인 제제.
- [0784] 88. 항목 85 내지 87 중 어느 하나에 있어서, 아르기닌 및/또는 트레할로스를 추가적으로 포함하는 제제.
- [0785] 89. 항목 85 내지 88 중 어느 하나에 있어서, 폴리소르베이트 80을 추가적으로 포함하는 제제.
- [0786] 90. 항목 85 내지 89 중 어느 하나에 있어서, 제제의 오스몰랄농도를 약 290-325 mOsm/kg으로 조정하는 농도로 염화나트륨을 추가적으로 포함하는 제제.
- [0787] 91. (a) 약 20 mg/mL 내지 약 125 mg/mL의 항체, (b) 약 10 mM 내지 약 40 mM의 시트레이트 완충제 또는 히스티딘 완충제, (c) 약 80 mM 내지 약 120 mM의 아르기닌 또는 약 2 내지 약 10% w/v의 트레할로스, (d) 약 20 mM 내지 약 40 mM의 염화나트륨, 및 (e) 약 0.01% 내지 약 0.1% w/v의 폴리소르베이트 80을 포함하는 pH 약 5.5 내지 약 6.5의, 항목 84에 따른 제약 조성물을 포함하는 제제.
- [0788] 92. 항목 91에 있어서, 약 20 mg/mL의 항체, 약 25 mM 시트레이트 완충제, 약 100 mM 아르기닌, 약 31 mM 염화나트륨, 및 약 0.02% w/v 폴리소르베이트 80을 포함하는 약 pH 6의 제제.
- [0789] 93. 항목 91에 있어서, 약 50 mg/mL의 항체, 약 25 mM 시트레이트 완충제, 약 100 mM 아르기닌, 약 31 mM 염화나트륨, 및 약 0.02% (w/v) 폴리소르베이트 80을 포함하는 약 pH 6의 제제.

- [0790] 94. 항목 1 내지 83 중 어느 하나에 따른 조성물, 항목 84에 따른 제약 조성물 또는 항목 85 내지 94 중 어느 하나에 따른 제제를 포함하는 주사 장치.
- [0791] 95. 항목 1 내지 83 중 어느 하나에 따른 조성물을 포함하는 세포 배양 배지.
- [0792] 96. 항목 1-83 중 어느 하나에 따른 조성물을 포함하는 용리액.
- [0793] 97. 암의 치료를 필요로 하는 대상체에게 치료 유효량의 항목 1 내지 83 중 어느 하나에 따른 조성물, 항목 84에 따른 제약 조성물, 또는 항목 85 내지 93 중 어느 하나에 따른 제제를 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법.
- [0794] 98. 항목 97에 있어서, 조성물이 약 500 mg의 용량으로 투여되는 것인 방법.
- [0795] 99. 항목 98에 있어서, 조성물이 3주마다 1회 투여되는 것인 방법.
- [0796] 100. 항목 98 또는 항목 99에 있어서, 조성물이 4 주기 동안 투여되는 것인 방법.
- [0797] 101. 항목 97에 있어서, 조성물이 4 주기 동안 3주마다 1회 약 500 mg의 제1 용량으로 투여되고, 이어서 6주마다 1회 이상 약 1000 mg의 제2 용량으로 투여되는 것인 방법.
- [0798] 102. 항목 101에 있어서, 임상 이익을 유지하기 위해 6주마다 1회 이상 약 1000 mg의 제2 용량이 계속되는 것인 방법.
- [0799] 103. 요법에 사용하기 위한, 항목 1 내지 83 중 어느 하나에 따른 조성물, 항목 84에 따른 제약 조성물, 또는 항목 84 내지 93 중 어느 하나에 따른 제제.
- [0800] 104. 암의 치료에 사용하기 위한, 항목 1 내지 83 중 어느 하나에 따른 조성물, 항목 84에 따른 제약 조성물, 또는 항목 85 내지 93 중 어느 하나에 따른 제제.
- [0801] 105. 암의 치료에 사용하기 위한 의학의 제조에서의 항목 1 내지 83 중 어느 하나에 따른 조성물, 항목 84에 따른 제약 조성물, 또는 항목 85 내지 93 중 어느 하나에 따른 제제의 용도.
- [0802] 서열
- SEQ ID NO: 1 – CDRH1
SYDMS
- SEQ ID NO: 2 – CDRH2
TISGGGSYTTYQDSVKG
- SEQ ID NO: 3 – CDRH3
PYYAMDY
- SEQ ID NO: 4 – CDRL1
KASQDVGTAVA
- SEQ ID NO: 5 – CDRL2
WASTLHT
- [0803] SEQ ID NO: 6 – CDRL3

QHYSSYPWT

SEQ ID NO: 7 – 중쇄 가변 영역 (CDR은 밑줄표시됨)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSTISGGGSYTTY
QDSVKGRFRTISRDNKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCASPYYAMDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 8 – 경쇄 가변 영역 (CDR은 밑줄표시됨)

DIQLTQSPSFLSAYVGDRVITITCKASQDVGTAWAWYQQKPGKAPKLLIYWASTLHTGVPSRF
 SGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQHYSSYPWTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 9 – 전체 중쇄 서열 (CDR은 밑줄표시됨)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSTISGGGSYTTY
QDSVKGRFRTISRDNKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCASPYYAMDYWGQGTTVTVSSASTK
 GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
 SSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPK
 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT
 VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM
 HEALHNHYTQKSLSLGLK

SEQ ID NO: 10 – 전체 경쇄 서열 (CDR은 밑줄표시됨)

DIQLTQSPSFLSAYVGDRVITITCKASQDVGTAWAWYQQKPGKAPKLLIYWASTLHTGVPSRF
 SGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQHYSSYPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
 KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADY
 EKHVKYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 11 – N380D 변형을 갖는 전체 중쇄 서열 (CDR은 밑줄표시됨)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSTISGGGSYTTY
QDSVKGRFRTISRDNKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCASPYYAMDYWGQGTTVTVSSASTK
 GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
 SSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPK
 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT
 VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL

[0804]

VKGFYPSDIAVEWESDGPENNYKTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 12 - N385D 변형을 갖는 전체 중쇄 서열 (CDR은 밑줄표시됨)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSTISGGGSYTTY
QDSVKGRFTISRDN SKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCASPY~~Y~~AMDYWGQGT~~TV~~VSSASTK
GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT~~SV~~WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVTVTPSSSLGKTYTCNV~~DH~~KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPEDNYKTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 13 - N380D 및 N385D 변형을 갖는 전체 중쇄 서열 (CDR은 밑줄표시됨)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVSTISGGGSYTTY
QDSVKGRFTISRDN SKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCASPY~~Y~~AMDYWGQGT~~TV~~VSSASTK
GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT~~SV~~WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVTVTPSSSLGKTYTCNV~~DH~~KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESDGPEDNYKTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSLGK

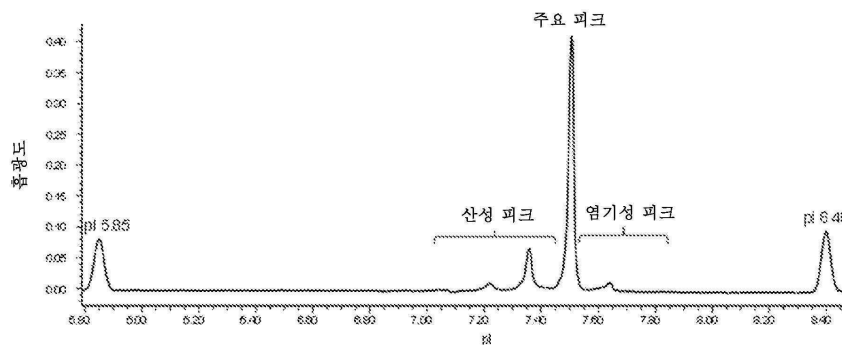
SEQ ID NO: 14 -- CDRL3 대안

QHYN~~S~~YPWT

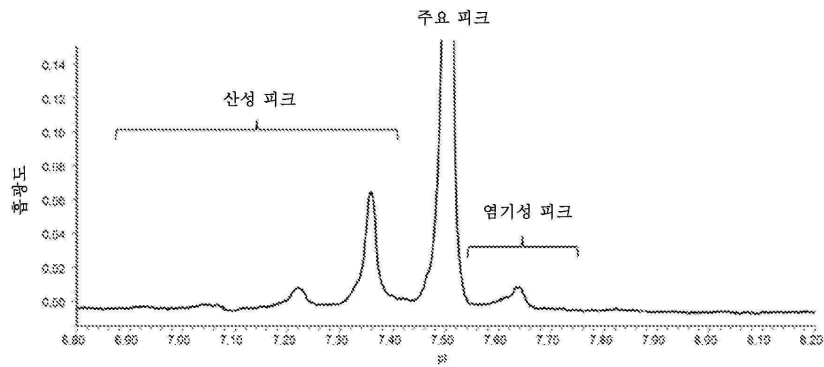
[0805]

도면

도면 1a



도면1b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Tesaro, Inc.

<120> BIOPHARMACEUTICAL COMPOSITIONS AND
RELATED METHODS

<130> TES00048

<150> 62/946696

<151> 2019-12-18

<150> 62/950595

<151> 2019-12-19

<160> 14

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDRH1

<400> 1

Ser Tyr Asp Met Ser

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDRH2

<400> 2

Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Gln Asp Ser Val Lys

1 5 10 15
Gly

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDRH3

<400> 3

Pro Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDRL1

<400> 4

Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDRL2

<400> 5

Trp Ala Ser Thr Leu His Thr

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDRL3

<400> 6

Gln His Tyr Ser Ser Tyr Pro Trp Thr

1 5

<210> 7

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy chain variable region

<400> 7

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Gln 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 Ser Pro Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Light chain variable region

<400> 8

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Tyr Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ser Ser Tyr Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 9

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Full heavy chain sequence

<400> 9

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35	40	45
Ser Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Gln 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 Ser Pro Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val		
100	105	110
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala		
115	120	125
Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu		
130	135	140
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly		
145	150	155
160		
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser		
165	170	175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu		
180	185	190
Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr		
195	200	205
Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro		
210	215	220
Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro		
225	230	235
240		
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr		
245	250	255
Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn		
260	265	270
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg		
275	280	285

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
340 345 350

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 10

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Full light chain sequence

<400> 10

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

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45
Tyr Trp Ala Ser Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ser Ser Tyr Pro Trp

85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 11

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Full heavy chain sequence with N380D modification

<400> 11

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175

 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
 210 215 220
 Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 225 230 235 240

 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 245 250 255
 Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn

260 265 270
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 275 280 285
 Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 290 295 300

 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 305 310 315 320
 Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 325 330 335
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
 340 345 350
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 355 360 365

 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asp Gly Gln Pro Glu
 370 375 380
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 385 390 395 400
 Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
 405 410 415
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430

 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440
 <210> 12
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Full heavy chain sequence with N385D modification
 <400> 12
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Gln 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 Ser Pro Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
 210 215 220
 Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 225 230 235 240
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 245 250 255
 Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn

260 265 270
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 275 280 285
 Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val

 290 295 300
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 305 310 315 320
 Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 325 330 335
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
 340 345 350
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe

 355 360 365
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 370 375 380
 Asp Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 385 390 395 400
 Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
 405 410 415
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

 420 425 430
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440
 <210> 13
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Full heavy chain sequence with N380D and N385D
 modifications
 <400> 13
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

 20 25 30
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Gln 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 Ser Pro Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly

 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro

 210 215 220
 Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 225 230 235 240
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
 260 265 270
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 275 280 285
 Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 290 295 300
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 305 310 315 320
 Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 325 330 335
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
 340 345 350
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 355 360 365
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asp Gly Gln Pro Glu
 370 375 380
 Asp Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 385 390 395 400
 Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
 405 410 415
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440
 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CDRL3
 <400> 14
 Gln His Tyr Asn Ser Tyr Pro Trp Thr

1

5