(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0058149
(43) 공개일자 2024년05월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C07K 16/28* (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
*A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*C07K 16/2827* (2013.01)
*A61P 35/00* (2018.01)
(21) 출원번호 10-2024-7011389
(22) 출원일자(국제) 2022년09월16일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년04월04일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2022/075849
(87) 국제공개번호 WO 2023/041745
국제공개일자 2023년03월23일
(30) 우선권주장
63/244,986 2021년09월16일 미국(US)

(71) 출원인
**허밍버드 바이오사이언스 피티이. 엘티디.**
싱가포르, 싱가포르 117586, 싱가포르 사이언스 파크 II, #04-01/11 더 에리즈
(72) 발명자
**보이드-커크업 제롬**
싱가포르, 싱가포르 117586, 싱가포르 사이언스 파크 II, #04-01/11 더 에리즈, 씨/오 허밍버드 바이오사이언스 피티이. 엘티디.
**구안 시유**
싱가포르, 싱가포르 117586, 싱가포르 사이언스 파크 II, #04-01/11 더 에리즈, 씨/오 허밍버드 바이오사이언스 피티이. 엘티디.
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**특허법인한얼**

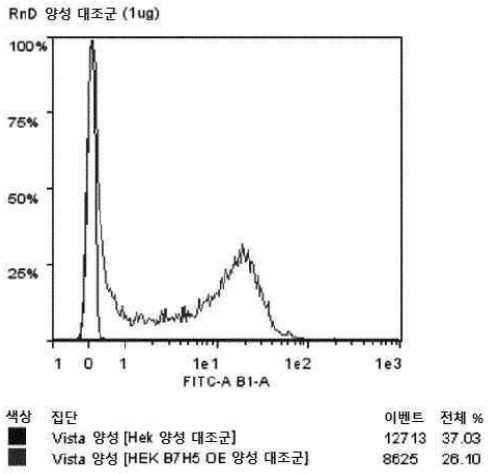
전체 청구항 수 : 총 29 항

(54) 발명의 명칭 **VISTA 항원-결합 분자를 사용한 암의 치료 및 예방**

## (57) 요 약

본 발명은 암을 치료 또는 예방하기 위한 VISTA에 결합하는 항원-결합 분자, 상기 분자를 포함하는 조성물, 및 상기 분자를 사용한 치료학적 및 예방학적 방법을 제공한다.

*대 표 도* - 도1a



(52) CPC특허분류
*A61K 2039/505* (2013.01)
*A61K 2039/545* (2013.01)
*C07K 2317/72* (2013.01)
*C07K 2317/73* (2013.01)
*C07K 2317/76* (2013.01)
(72) 발명자
**파스키에비치 콘래드**
싱가포르, 싱가포르 117586, 싱가포르 사이언스 파크 II, #04-01/11 더 에리즈, 씨/오 허밍버드 바이오사이언스 피티이. 엘티디.
**로윈스키 에릭**
싱가포르, 싱가포르 117586, 싱가포르 사이언스 파크 II, #04-01/11 더 에리즈, 씨/오 허밍버드 바이오사이언스 피티이. 엘티디.
**타카르 딥티**
싱가포르, 싱가포르 117586, 싱가포르 사이언스 파크 II, #04-01/11 더 에리즈, 씨/오 허밍버드 바이오사이언스 피티이. 엘티디.
**다르마디카리 부샨**
싱가포르, 싱가포르 117586, 싱가포르 사이언스 파크 II, #04-01/11 더 에리즈, 씨/오 허밍버드 바이오사이언스 피티이. 엘티디.
**잉그램 피어스**
싱가포르, 싱가포르 117586, 싱가포르 사이언스 파크 II, #04-01/11 더 에리즈, 씨/오 허밍버드 바이오사이언스 피티이. 엘티디.

# *명 세 서*

## *청구범위*

### 청구항 1

Fc-매개된 기능(Fc-mediated function)과는 독립적으로, VISTA에 결합할 수 있고 VISTA-매개된 신호전달(VISTA-mediated signalling)을 억제할 수 있는, 임의 단리된, 항원-결합 분자(antigen-binding molecule).

### 청구항 2

제1항에 있어서, 항원-결합 분자가:

(i) 다음의 CDR을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

서열 번호: 290의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

서열 번호: 291의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

서열 번호: 278의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3; 및

(ii) 다음의 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

서열 번호: 41의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

서열 번호: 309의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

서열 번호: 43의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3을 포함하는, 항원-결합 분자.

### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 항원-결합 분자가:

(i) 다음의 CDR을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

서열 번호: 290의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

서열 번호: 291의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

서열 번호: 278의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3; 및

(ii) 다음의 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

서열 번호: 41의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

서열 번호: 295의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

서열 번호: 43의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3을 포함하는, 항원-결합 분자.

### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 항원-결합 분자가:

서열 번호: 289의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성(sequence identity)을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및

서열 번호: 310의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역을 포함하는, 항원-결합 분자.

### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 항원-결합 분자가:

서열 번호: 289의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및

서열 번호: 297의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역을 포함하는, 항원-결합 분자.

**청구항 6**

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 항원-결합 분자가:

다음의 골격 영역(framework region; FR)을 포함하는 VH 영역:

서열 번호: 63의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR1

서열 번호: 292의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR2

서열 번호: 293의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR3

서열 번호: 281의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR4를 포함하는, 항원-결합 분자.

**청구항 7**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 항원-결합 분자가:

다음의 골격 영역(FR)을 포함하는 VL 영역:

서열 번호: 288의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR1

서열 번호: 298의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR2

서열 번호: 284의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR3

서열 번호: 47의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR4를 포함하는, 항원-결합 분자.

**청구항 8**

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 항원-결합 분자가 서열 번호: 331의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함하는, 항원-결합 분자.

**청구항 9**

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 항원-결합 분자가 서열 번호: 317의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는, 항원-결합 분자.

**청구항 10**

제1항 내지 제9항에 따른 항원-결합 분자를 포함하는 조성물.

**청구항 11**

제10항에 있어서, 조성물이:

(i) 2 mM 내지 200 mM의 히스티딘, 2% 내지 20%(w/v)의 슈크로스, 0.001% 내지 0.1%(w/v)의 폴리소르베이트-80을 포함하고, pH가 4.0 내지 7.0이거나;

(ii) 2 mM 내지 200 mM의 히스티딘, 2% 내지 20%(w/v)의 슈크로스, 0.001% 내지 0.1%(w/v)의 폴리소르베이트-20을 포함하고 pH가 4.0 내지 7.0이거나;

(iii) 2 mM 내지 200 mM의 히스티딘, 1 mM 내지 250 mM의 염화나트륨을 포함하고, pH 4.0 내지 7.0이고, 임의로 0.001% 내지 0.1%(w/v)의 폴리소르베이트-20 또는 폴리소르베이트-80을 포함하거나;

(iv) 2 mM 내지 200 mM의 히스티딘, 0.001% 내지 0.1%(w/v)의 폴리소르베이트-20 또는 폴리소르베이트-80을 포함하고, pH가 4.0 내지 7.0이거나;

(v) 2 mM 내지 200 mM 아세테이트, 2% 내지 20%(w/v)의 슈크로스, 0.001% 내지 0.1%(w/v)의 폴리소르베이트-80을 포함하고, pH가 4.0 내지 7.0이거나;

(vi) 2 mM 내지 200 mM 아세테이트, 2% 내지 20%(w/v)의 슈크로스, 0.001% 내지 0.1%(w/v)의 폴리소르베이트-

20을 포함하고, pH가 4.0 내지 7.0이거나;

(vii) 2 mM 내지 200 mM 석시네이트, 2% 내지 20%(w/v)의 슈크로스, 0.001% 내지 0.1%(w/v)의 폴리소르베이트-80을 포함하고, pH가 4.0 내지 7.0이거나; 또는

(viii) 2 mM 내지 200 mM 석시네이트, 2% 내지 20%(w/v)의 슈크로스, 0.001% 내지 0.1%(w/v)의 폴리소르베이트-20을 포함하고, pH 4.0 내지 7.0인, 조성물.

**청구항 12**

제10항 또는 제11항에 있어서, 조성물이:

(i) 20 mM의 히스티딘, 8%(w/v)의 슈크로스; 0.02%(w/v)의 폴리소르베이트-80를 포함하고 pH가 5.5이거나;

(ii) 20 mM의 히스티딘, 8%(w/v)의 슈크로스; 0.02%(w/v)의 폴리소르베이트-80을 포함하고 pH가 pH 5.8이거나;

(iii) 20 mM의 히스티딘, 4%(w/v)의 슈크로스; 0.02%(w/v)의 폴리소르베이트-80 포함하고 pH가 5.8이거나;

(iv) 20 mM의 히스티딘, 2%(w/v)의 슈크로스; 0.02%(w/v)의 폴리소르베이트-80 포함하고 pH가 5.8이거나;

(v) 20 mM의 히스티딘, 8%(w/v)의 슈크로스; 0.02%(w/v)의 폴리소르베이트-80 포함하고 pH가 6.3이거나;

(vi) 20 mM의 히스티딘, 8%(w/v)의 슈크로스; 0.02%(w/v)의 폴리소르베이트-20을 포함하고 pH가 5.8이거나;

(vii) 20 mM 아세테이트, 8%(w/v)의 슈크로스; 0.02%(w/v)의 폴리소르베이트-80을 포함하고 pH가 5.5이거나;

(viii) 20 mM 석시네이트, 8%(w/v)의 슈크로스; 0.02%(w/v)의 폴리소르베이트-80을 포함하고 pH가 5.5이거나;

(ix) 20 mM의 히스티딘, 0.02%(w/v)의 폴리소르베이트-80을 포함하고 pH가 5.8이거나;

(x) 20 mM의 히스티딘, 150 mM의 염화나트륨을 포함하고 pH가 5.8인, 조성물.

**청구항 13**

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 20 mM의 히스티딘, 8%(w/v)의 슈크로스; 0.02%(w/v)의 폴리소르베이트-80을 포함하고, pH가 5.5인, 조성물.

**청구항 14**

제10항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 약 50 mg/mL의 항원-결합 분자를 포함하는, 조성물.

**청구항 15**

의약(medicament)으로서 사용하기 위한, 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 항원-결합 분자 또는 조성물.

**청구항 16**

대상체(subject)에서 암(cancer)을 치료 또는 예방하는 방법에서 사용하기 위한, 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 항원-결합 분자 또는 조성물.

**청구항 17**

대상체에서 암을 치료 또는 예방하기 위한 의약의 제조에서의, 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 항원-결합 분자 또는 조성물의 용도.

**청구항 18**

대상체에서 암을 치료하거나 또는 예방하는 방법으로서, 이러한 방법이 치료학적 또는 예방학적 유효량의 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 항원-결합 분자 또는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 19**

제16항에 따른 사용하기 위한 항원-결합 분자 또는 조성물, 제17항에 따른 용도, 또는 제18항에 따른 방법으로서, 여기서 암이 VISTA를 발현하는 세포의 존재에 의해 및/또는 VISTA를 포함하는 복합체(complex)에 의해 매개

된 신호전달(signalling)에 의해 특성화되는, 사용하기 위한 항원-결합 분자 또는 조성물, 용도, 또는 방법.

**청구항 20**

제16항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 혈액 암(hematological cancer), 백혈병(leukemia)(예컨대, T 세포 백혈병(T cell leukemia), 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia), 림프종(lymphoma), B 세포 림프종(B cell lymphoma), T 세포 림프종(T cell lymphoma), 다발성 골수종(multiple myeloma), 중피종(mesothelioma), 고형 종양(solid tumor), 폐 암(lung cancer), 비-소 세포 폐 암종(non-small cell lung carcinoma; NSCLC), 위 암(gastric cancer), 위 암종(gastric carcinoma), 결장직장 암(colorectal cancer), 결장직장 암종(colorectal carcinoma), 결장직장 선암종(colorectal adenocarcinoma), 자궁 암(uterine cancer), 자궁체부 자궁내막암종(uterine corpus endometrial carcinoma), 유방암(breast cancer), 삼중 음성 유방암(triple negative breast cancer; TBNC), 삼중 음성 유방 침윤성 암종(triple negative breast invasive carcinoma), 침윤성 관 암종(invasive ductal carcinoma), 간 암(liver cancer), 간세포 암종(hepatocellular carcinoma), 췌장 암(pancreatic cancer), 췌관선암종(pancreatic ductal adenocarcinoma), 갑상선암(thyroid cancer), 흉선종(thymoma), 피부 암(skin cancer), 흑색종(melanoma), 피부 흑색종(cutaneous melanoma), 신장 암(kidney cancer), 신장 세포 암종(renal cell carcinoma), 신장 유두 세포 암종(renal papillary cell carcinoma), 두경부 암(head and neck cancer), 두경부 편평 세포 암종(squamous cell carcinoma of the head and neck; SCCHN), 난소 암(ovarian cancer), 난소 암종(ovarian carcinoma), 난소 장액 낭선암종(ovarian serous cystadenocarcinoma), 방광 암(bladder cancer), 전립선 암(prostate cancer) 및/또는 전립선 선암종(prostate adenocarcinoma)으로부터 선택되는, 사용하기 위한 항원-결합 분자 또는 조성물, 용도, 또는 방법.

**청구항 21**

제16항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 삼중 음성 유방암(triple negative breast cancer; TBNC), 비-소 세포 폐 암종(NSCLC) 및/또는 고형 종양인, 사용하기 위한 항원-결합 분자 또는 조성물, 용도, 또는 방법.

**청구항 22**

제16항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 VISTA를 발현하는 세포의 존재를 검출하는 단계 및/또는 VISTA를 포함하는 복합체에 의해 매개된 신호전달에 의한 단계를 포함하는, 사용하기 위한 항원-결합 방법 또는 조성물, 용도, 또는 방법.

**청구항 23**

제22항에 있어서, 대상체가 VISTA를 발현하는 세포의 존재 및/또는 VISTA를 포함하는 복합체에 의해 매개된 신호전달이 검출되는 경우 대상체가 항원-결합 분자 또는 조성물을 사용한 치료를 위해 선택되는, 사용하기 위한 항원-결합 방법 또는 조성물, 용도, 또는 방법.

**청구항 24**

제16항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 항원-결합 분자가 매주, 2주마다, 또는 3주마다 투여되는, 사용하기 위한 항원-결합 방법 또는 조성물, 용도, 또는 방법.

**청구항 25**

제16항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 항원-결합 분자가 21일의 투여 주기 내에 1회, 2회, 또는 3회 투여되고, 임의로 여기서 투여가 35회 이하의 투여 주기를 포함하는, 사용하기 위한 항원-결합 방법 또는 조성물, 용도, 또는 방법.

**청구항 26**

제16항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 항원-결합 분자가 21일의 투여 주기 내에 1일, 8일 및/또는 15일째에 투여되고, 임의로 여기서 치료가 35회 이하의 투여 주기를 포함하는, 사용하기 위한 항원-결합 방법 또는 조성물, 용도, 또는 방법.

**청구항 27**

제16항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 치료가 투여 당 3.5 mg 내지 2200 mg의 항원-결합 분자를 투여하는 단계를 포함하는, 사용하기 위한 항원-결합 방법 또는 조성물, 용도, 또는 방법.

**청구항 28**

제16항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 치료가: 투여 당 3.5 mg, 7 mg, 10.5 mg, 17.5 mg, 20 mg, 21 mg, 40 mg, 60 mg, 72 mg, 120 mg, 180 mg, 240 mg, 360 mg, 400 mg, 800 mg, 1200 mg, 1600 mg, 1900 mg 또는 2200 mg의 항원-결합 분자 중 적어도 하나를 투여하는 단계를 포함하는, 사용하기 위한 항원-결합 방법 또는 조성물, 용도, 또는 방법.

**청구항 29**

제16항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 치료가 21일의 투여 주기 당 10.5 mg 이하, 21 mg 이하, 31.5 mg 이하, 52.5 mg 이하, 60 mg 이하, 63 mg 이하, 120 mg 이하, 180 mg 이하, 216 mg 이하, 360 mg 이하, 540 mg 이하, 720 mg 이하, 1080 mg 이하, 1200 mg 이하, 2400 mg 이하, 3600 mg 이하, 4800 mg 이하, 5700 mg, 또는 6600 mg 이하의 항원-결합 분자를 투여하는 단계를 포함하는, 사용하기 위한 항원-결합 방법 또는 조성물, 용도, 또는 방법.

## *발명의 설명*

### *기 술 분 야*

[0001] 본 발명은 2021년 9월 16일자로 출원된 제US 63/244,986호로부터의 우선권을 주장하며, 이의 내용 및 구성요소는 모든 목적을 위해 본원에 참고로 포함된다.

[0002] **발명의 분야**

[0003] 본 발명은 분자 생물학, 보다 구체적으로 항체 기술의 분야에 관한 것이다. 본 발명은 또한 의학적 치료 및 예방 방법에 관한 것이다.

### *배 경 기 술*

[0004] **발명의 배경**

[0005] 면역 반응의 골수 유래 억제인자 세포(Myeloid Derived Suppressor Cell; MDSC)-매개된 억제(suppression)는 다수의 고형 종양(solid tumor) 및 림프종(lymphoma)에서 확인되어 왔다. MDSC는 진전된 결장직장 암(advanced colorectal cancer)에서 상승된다(Toor et al, Front Immunol. 2016; 7:560). MDSC는 또한 유방 암(breast cancer)에서 관찰되며, 말초 혈액 속의 MDSC의 퍼센트는 말기 단계 유방 암 환자에서 증가된다(Markowitz et al, Breast Cancer Res Treat. 2013 Jul; 140(1):13-21). MDSC 풍부성은 또한 고형 종양에서 불량한 예후와 관련된다(Charoentong et al, Cell Rep. 2017 Jan 3; 18(1):248-262).

[0006] MDSC는 다중 메카니즘, 예를 들면, 반응성 산소 종(reactive oxygen species), 산화질소, 및 아르기나제의 생산을 통해 T 세포보다도 더 억제를 발휘한다. 이는 궁극적으로 DC, NK 및 T 세포 활성의 억제 및 증가된 종양 버던(tumor burden)을 초래한다(Umansky et al., Vaccines (Basel) (2016) 4(4):36). MDSC는 또한 신생혈관증식(neovascularisation), 침입(invasion), 증식 및 전이를 촉진하는 가용성 인자(soluble factor), 예를 들면, 매트릭스 메탈로프로테이나제(matrix metalloproteinase), VEGF, bFGF, TGF-β 및 S100A8/A9를 통해 종양 발달 및 전이에 기여한다.

[0007] MDSC에서 주로 발현된 면역 체크포인트 분자(immune checkpoint molecule)인, T-세포 활성화의 V-형 면역글로불린 도메인-함유 억제인자(V-type immunoglobulin domain-containing suppressor of T-cell activation; VISTA)를 표적화하는 것은 효과기 면역 세포(effector immune cell) 기능의 MDSC-매개된 억제를 제거하기 위한 매력적인 치료학적 전략이다.

[0008] 제WO 2017/137830 A1호는 항-VISTA 항체 VSTB174를 개시하고 있으며, 이는 예컨대, 절 [00221]에서 항-VISTA 항체 VSTB112의 가변 영역을 포함하는 것으로 개시되어 있다. 절 [00362]는 VSTB123이 VSTB174의 가변 영역을 포함함을 개시하고 있다. 제WO 2017/137830 A1호의 절 [0417]에서의 실시예 25 및 제42A도는 mIgG2a 항체 VSTB123이 MB49 종양 모델에서 종양 성장을 억제할 수 있었음을 개시하고 있다. 절 [0418] 및 제42A도는 대조적으로 IgG2a LALA 방식(format)으로 제공된 동일한 항체인 VSTB124(참고: 절 [0408])가 종양 성장을 억제하지

않았음을 개시하고 있다. 이러한 결과를 기반으로 실시예 25는 절 [0419]에서 항-VISTA 항체 치료를 사용한 효능이 활성 Fc를 요구할 수 있다고 결론짓고 있다. 따라서, 도 47에서 개략적으로 나타낸 항-VISTA 항체에 대해 제안된 작용 메카니즘(참고: 절 [0053]에서 도 47에 대한 범례)은 NK 세포에 의해 발현된 FcγRIII의 Fc-매개된 개입(engagement)을 포함한다.

[0009] 햄스터 모노클로날 항-VISTA 항체 mAb13F3은 문헌: Le Mercier et al. Cancer Res. (2014) 74(7):1933-44에 B16OVA 및 B16-BL6 흑색종(melanoma) 모델에서 종양 성장을 억제하는 것으로 개시되어 있다. 제1942면의, 좌측 및 우측 컬럼에 걸쳐있는 절은 VISTA mAb의 면역원성(immunogenicity) 및 FcR 결합 활성이 최적의 표적 중화(target neutalization) 및 치료학적 효능을 달성하기 위한 중요한 제한 요인이 될 수 있음을 교시하고 있다.

## *발명의 내용*

### *해결하려는 과제*

[0010] **발명의 요약**

[0011] 제1의 양태에서, 본 발명은 Fc-매개된 기능과는 독립적으로, VISTA에 결합하여 VISTA-매개된 신호전달(VISTA-mediated signalling)을 억제할 수 있는, 임의 단리된, 항원-결합 분자(antigen-binding molecule)를 제공한다.

[0012] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[0013] (i) 다음의 CDR을 포함하는 중쇄 가변(heavy chain variable; VH) 영역:

[0014] 서열 번호: 290의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1;

[0015] 서열 번호: 291의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2;

[0016] 서열 번호: 278의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3; 및

[0017] (ii) 다음의 CDR을 포함하는 경쇄 가변(light chain variable; VL) 영역:

[0018] 서열 번호: 41의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1;

[0019] 서열 번호: 309의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2;

[0020] 서열 번호: 43의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3을 포함한다.

[0021] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[0022] (i) 다음의 CDR을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

[0023] 서열 번호: 290의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1;

[0024] 서열 번호: 291의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2;

[0025] 서열 번호: 278의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3; 및

[0026] (ii) 다음의 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

[0027] 서열 번호: 41의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1;

[0028] 서열 번호: 295의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2;

[0029] 서열 번호: 43의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3을 포함한다.

[0030] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[0031] 서열 번호: 289의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및

[0032] 서열 번호: 310의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역을 포함한다.

[0033] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[0034] 서열 번호: 289의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및

[0035] 서열 번호: 297의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역을 포함한다.

[0036] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[0037] 다음의 골격 영역(framework region; FR)을 포함하는 VH 영역:

[0038] 서열 번호: 63의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR1;

[0039] 서열 번호: 292의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR2;

[0040] 서열 번호: 293의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR3;

[0041] 서열 번호: 281의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR4를 포함한다.

[0042] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[0043] 다음의 골격 영역(FR)을 포함하는 VL 영역:

[0044] 서열 번호: 288의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR1;

[0045] 서열 번호: 298의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR2;

[0046] 서열 번호: 284의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR3;

[0047] 서열 번호: 47의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR4를 포함한다.

[0048] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 서열 번호: 331의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함한다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 서열 번호: 317의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0049] 다른 양태에서, 본 발명은 본 개시내용에 따른 항원-결합 분자를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0050] 일부 구현예에서, 조성물은:

[0051] (i) 2 mM 내지 200 mM의 히스티딘, 2% 내지 20%(w/v)의 슈크로스, 0.001% 내지 0.1%(w/v)의 폴리소르베이트-80를 포함하고, pH가 4.0 내지 7.0이거나;

[0052] (ii) 2 mM 내지 200 mM의 히스티딘, 2% 내지 20%(w/v)의 슈크로스, 0.001% 내지 0.1%(w/v)의 폴리소르베이트-20을 포함하고, pH가 4.0 내지 7.0이거나;

[0053] (iii) 2 mM 내지 200 mM의 히스티딘, 1 mM 내지 250 mM의 염화나트륨을 포함하고, pH가 4.0 내지 7.0이고, 임의로 0.001% 내지 0.1%(w/v)의 폴리소르베이트-20 또는 폴리소르베이트-80을 포함하거나;

[0054] (iv) 2 mM 내지 200 mM의 히스티딘, 0.001% 내지 0.1%(w/v)의 폴리소르베이트-20 또는 폴리소르베이트-80을 포함하고, pH가 4.0 내지 7.0이거나;

[0055] (v) 2 mM 내지 200 mM의 아세테이트, 2% 내지 20%(w/v)의 슈크로스, 0.001% 내지 0.1%(w/v)의 폴리소르베이트-80을 포함하고, pH가 4.0 내지 7.0이거나;

[0056] (vi) 2 mM 내지 200 mM의 아세테이트, 2% 내지 20%(w/v)의 슈크로스, 0.001% 내지 0.1%(w/v)의 폴리소르베이트-20을 포함하고, pH가 4.0 내지 7.0이거나;

[0057] (vii) 2 mM 내지 200 mM의 석시네이트, 2% 내지 20%(w/v)의 슈크로스, 0.001% 내지 0.1%(w/v)의 폴리소르베이트-80을 포함하고, pH가 4.0 내지 7.0이거나;

[0058] (viii) 2 mM 내지 200 mM의 석시네이트, 2% 내지 20%(w/v)의 슈크로스, 0.001% 내지 0.1%(w/v)의 폴리소르베이트-20을 포함하고, pH가 4.0 내지 7.0이다.

[0059] 일부 구현예에서, 조성물은:

[0060] (i) 20 mM의 히스티딘, 8%(w/v)의 슈크로스; 0.02%(w/v)의 폴리소르베이트-80을 포함하고, pH가 5.5이거나;

[0061] (ii) 20 mM의 히스티딘, 8%(w/v)의 슈크로스; 0.02%(w/v)의 폴리소르베이트-80을 포함하고, pH가 5.8이거나;

[0062] (iii) 20 mM의 히스티딘, 4%(w/v)의 슈크로스; 0.02%(w/v)의 폴리소르베이트-80을 포함하고, pH가 5.8이거나;

[0063] (iv) 20 mM의 히스티딘, 2%(w/v)의 슈크로스; 0.02%(w/v)의 폴리소르베이트-80을 포함하고, pH가 5.8이거나;

[0064] (v) 20 mM의 히스티딘, 8%(w/v)의 슈크로스; 0.02%(w/v)의 폴리소르베이트-80을 포함하고, pH가 6.3이거나;

[0065] (vi) 20 mM의 히스티딘, 8%(w/v)의 슈크로스; 0.02%(w/v)의 폴리소르베이트-20을 포함하고, pH가 5.8이거나;

[0066] (vii) 20 mM 아세테이트, 8%(w/v)의 슈크로스; 0.02%(w/v)의 폴리소르베이트-80을 포함하고, pH가 5.5이거나;

[0067] (viii) 20 mM 석시네이트, 8%(w/v)의 슈크로스; 0.02%(w/v)의 폴리소르베이트-80을 포함하고, pH가 5.5이거나;

[0068] (ix) 20 mM의 히스티딘, 0.02%(w/v)의 폴리소르베이트-80을 포함하고, pH가 5.8이거나;

[0069] (x) 20 mM의 히스티딘, 150 mM의 염화나트륨을 포함하고, pH가 5.8이다.

[0070] 일부 구현예에서, 조성물은 20 mM의 히스티딘, 8%(w/v)의 슈크로스; 0.02%(w/v)의 폴리소르베이트-80을 포함하고, pH가 5.5이다.

[0071] 일부 구현예에서, 조성물은 약 50 mg/mL(예컨대, 50 mg/m)의 항원-결합 분자를 포함한다.

[0072] 일부 양태에서, 본 개시내용에 따른 항원-결합 분자 또는 조성물은 의약(medicament)으로서 사용하기 위해 제공된다.

[0073] 일부 양태에서, 본 개시내용에 따른 항원-결합 분자 또는 조성물은 대상체(subject)에서 암을 치료 또는 예방하는 방법에서 사용하기 위해 제공된다.

[0074] 일부 양태에서, 대상체에서 암을 치료 또는 예방하기 위한 의약의 제조에서 본 개시내용에 따른 항원-결합 분자 또는 조성물의 용도가 제공된다.

[0075] 일부 양태에서, 대상체에서 암을 치료 또는 예방하는 방법이 제공되며, 이러한 방법은 치료학적- 또는 예방학적 유효량의 본 개시내용에 따른 항원-결합 분자 또는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0076] 일부 구현예에서, 암은 VISTA를 발현하는 세포의 존재에 의해 및/또는 VISTA를 포함하는 복합체(complex)에 의해 매개된 신호전달(signalling)에 의해 특징화된다.

[0077] 일부 구현예에서, 암은: 혈액암(hematological cancer), 백혈병(leukemia)(예컨대, T 세포 림프종(T cell leukemia)), 급성 골수 백혈병(acute myeloid leukemia), 림프종(lymphoma), B 세포 림프종(B cell lymphoma), T 세포 림프종(T cell lymphoma), 다발 골수종(multiple myeloma), 중피종(mesothelioma), 고형 종양, 폐 암(lung cancer), 비-소세포 폐 암종(non-small cell lung carcinoma; NSCLC), 위 암(gastric cancer), 위 암종(gastric carcinoma), 결장직장 암(colorectal cancer), 결장직장 암종(colorectal carcinoma), 결장직장 선암종(colorectal adenocarcinoma), 자궁 암(uterine cancer), 자궁체 내막 암종(uterine corpus endometrial carcinoma), 유방 암, 삼중 음성 유방 암(triple negative breast cancer; TBNC), 삼중 음성 유방 침윤성 암종(triple negative breast invasive carcinoma), 침윤성 관 암종(invasive ductal carcinoma), 간 암(liver cancer), 간세포 암종(hepatocellular carcinoma), 췌장 암(pancreatic cancer), 췌장 관 선암종(pancreatic ductal adenocarcinoma), 갑상선 암(thyroid cancer), 흉선종(thymoma), 피부 암(skin cancer), 흑색종(melanoma), 피부 흑색종(cutaneous melanoma), 신장 암(kidney cancer), 신장 세포 암종(renal cell carcinoma), 신장 유두상 세포 암종(renal papillary cell carcinoma), 두경부 암(head and neck cancer), 두경부의 편평 세포 암종(squamous cell carcinoma of the head and neck; SCCHN), 난소 암(ovarian cancer), 난소 암종(ovarian carcinoma), 난소 장액 낭샘암종(ovarian serous cystadenocarcinoma), 방광 암(bladder cancer), 전립선 암(prostate cancer) 및/또는 전립성 선암종(prostate adenocarcinoma)으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 암은 삼중 음성 유방 암((TBNC), 비-소 세포 폐 암종(NSCLC) 및/또는 고형 종양이다.

[0078] 암을 치료 또은 예방하기 위한 VISTA 외에 면역 체크포인트 분자에 의해 매개된 신호전달을 억제할 수 있는 제제를 투여하는 단계를 추가로 포함하고, 예컨대, 여기서 VISTA 이외의 면역 체크포인트 분자는 PD-1 및/또는 PD-L1이다. 제제는 항-PD-1 또는 항-PD-L1 항체일 수 있다.

[0079] 일부 구현예에서, 치료 또는 예방, 또는 이의 방법은 VISTA를 발현하는 세포의 존재 및/또는 VISTA를 포함하는 복합체에 의해 매개된 신호전달을 검출하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 대상체는 VISTA를 발현하는 세포의 존재 및/또는 VISTA를 포함하는 복합체에 의해 매개된 신호전달이 검출되는 경우 항원-결합 분자 또는 조성물을 사용한 치료를 위해 선택된다.

[0080] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 예컨대, 본 개시내용에 따른 조성물로 매주 투여된다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 21일의 투여 주기 내에 1회, 2회 또는 3회 투여되고, 임의로 여기서 치료는 35회 이하의 투여

주기를 포함한다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 21일의 투여 주기 내에 1, 8 및/또는 15일째에 투여되고, 임의로 여기서 치료는 35회 이하의 투여 주기를 포함한다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 28일의 투여 주기 내에 1, 8, 15 및/또는 22일째에 투여되고, 임의로 여기서 치료는 35회 이하의 투여 주기를 포함한다.

[0081] 일부 구현예에서, 치료 또는 예방, 또는 이의 방법은 투여 당 3.5 mg 내지 2200 mg의 항원-결합 분자를 투여하는 단계를 포함한다.

[0082] 일부 구현예에서, 치료 또는 예방, 또는 이의 방법은 예컨대, 본 개시내용의 투여 스케쥴에 따라, 투여 당 (이하 또는 적어도) 3.5 mg, 7 mg, 10.5 mg, 17.5 mg, 20 mg, 21 mg, 40 mg, 60 mg, 72 mg, 120 mg, 180 mg, 240 mg, 360 mg, 400 mg, 800 mg, 1200 mg, 1600 mg, 1900 mg 또는 2200 mg의 항원-결합 분자(예컨대, 본 개시내용에 따른 조성물)를 투여하는 단계를 포함한다.

[0083] 일부 구현예에서, 치료 또는 예방, 또는 이의 방법은 21일의 투여 주기 당 10.5 mg 이하, 21 mg 이하, 31.5 mg 이하, 52.5 mg 이하, 60 mg 이하, 63 mg 이하, 120 mg 이하, 180 mg 이하, 216 mg 이하, 360 mg 이하, 540 mg 이하, 720 mg 이하, 1080 mg 이하, 1200 mg 이하, 2400 mg 이하, 3600 mg 이하, 4800 mg 이하, 5700 mg, 또는 6600 mg 이하의 항원-결합 분자(예컨대, 본 개시내용에 따른 조성물)를 투여하는 단계를 포함한다.

## *과제의 해결 수단*

[0084] **설명**

[0085] 본 발명은 공지된 항-VISTA 항체와 비교하여 신규의 및/또는 개선된 특성을갖는 신규한 VISTA-결합 분자에 관한 것이다.

[0086] 본 발명자는 VISTA의 세포외 영역(extracellular region) 내 특수한 목적 영역에 결합하는 항원-결합 분자를 생성하였다. 본 발명의 VISTA-결합 분자는 선행 분야에 개시된 VISTA-결합 항원-결합 분자와 비교하여 목적한 생물물리학적 및 기능적 특성의 조합으로 제공된다.

[0087] 특히, 본원에 기술된 VISTA-결합 분자는 Fc-매개된 기능을 요구하지 않는 메카니즘을 통해 VISTA-매개된 신호전달을 길항할 수 있는 것으로 입증되어 있다. 본 발명자는 Fcγ 수용체에 결합하는 능력을 결여한 Fc를 포함하는 본원에 기술된 VISTA-결합 분자 및/또는 C1q가 생체 내(*in vivo*)에서 치료학적 항-암 효과를 제공할 수 있음을 입증한다.

[0088] 본 발명자는 최초로 Fc-매개된 효과기 기능을 요구하지 않는 메카니즘(예컨대, VISTA-발현 세포에 대해 지시된 ADCC/ADCP/CDC)을 통해 직접 VISTA-매개된 신호전달을 길항하는 것이 가능함을 확립한다.

[0089] 본 개시내용의 VISTA-결합 분자는 공지된 항-VISTA 항체에 의해 표적화된 영역과는 상이한 VISTA의 영역을 표적화한다. VISTA의 특수한 영역을 표적화하는 항원-결합 분자는 Fc-매개된 효과인자 기능에 대한 요구없이 VISTA-매개된 신호전달을 길항할 수 있다.

[0090] 따라서, 본원에 개시된 VISTA-결합 분자는 VISTA 발현 세포를 고갈시키지 않고 VISTA-매개된 신호전달을 억제하는데 유용하다. 이는, VISTA가 고갈시키는 것이 바람직하지 않은 세포 상에서 발현되므로, 중요하다. 본원에 개시된 VISTA-결합 분자는 바람직하지 않은 부작용을 최소화시키면서 VISTA-매개된 신호전달을 억제할 수 있다.

[0091] 본원에 개시된 VISTA-결합 분자는 또한 유리하게는 VISTA-매개된 억제인자로부터 T 세포를 방출시킬 수 있는 것으로 밝혀져 있다. 구체적으로, 본원에 개시된 VISTA-결합 분자는 T 세포 증식, 및, VISTA 또는 VISTA-발현 세포의 존재하에서 배양된 T 세포로부터 예컨대, IFNγ 및 TNFa의 생산을 증가시킬 수 있는 것으로 밝혀져 있다.

[0092] VISTA, 결합 파트너(binding partner) 및 VISTA-매개된 신호전달(signalling)

[0093] T-세포 활성화의 V-형 면역글로불린 도메인-함유 억제인자(V-type immunoglobulin domain-containing suppressor; VISTA; 또한, 예컨대, B7-H5, SISP1, PD-1H로서 공지됨)는 서열 번호: 1에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 UniProt Q9H7M9에 의해 확인된 단백질(Q9H7M9-1, v3)이다. VISTA의 구조 및 기능은 예컨대, 이의 전문이 본원에 참고로 포함된, 문헌: Lines et al., Cancer Res. (2014) 74(7): 1924-1932에 기술되어 있다. VISTA는 면역 체크포인트로서 기능하고 *C10orf54* 유전자에 의해 암호화된 ~50 kDa의 단일-패스 제I형 막전위(single-pass type I transmembrane)이다. VISTA의 세포외 도메인은 PD-L1에 대해 상동성(homologous)이다.

[0094] 서열 번호: 1의 N-말단 32개 아미노산은 단일 펩타이드를 구성하므로, VISTA의 성숙형(mature form)(즉, 단일 펩타이드를 제거하기 위한 프로세싱(processing) 후)은 서열 번호: 2에 나타낸 아미노산 서열을 갖는다. 서열

번호: 1의 33 내지 194번 위치는 세포외 도메인(서열 번호: 3)을 형성하고, 195 내지 215번 위치는 막전위 도메인(transmembrane domain)(서열 번호: 4)를 형성하고, 216 내지 311번 위치는 세포질성 도메인(cytoplasmic domain)(서열 번호: 5)을 형성한다. 세포외 도메인은 Ig-유사 V-형 도메인(서열 번호: 6에 나타낸, 서열 번호: 1의 33 내지 168번 위치)을 포함한다.

[0095] 본 명세서에서, "VISTA"는 임의의 종으로부터의 VISTA를 지칭하고 임의의 종으로부터의 VISTA 동형(동형), 단편, 변이체(예를 들면, 돌연변이체) 또는 동족체를 포함한다.

[0096] 본원에 사용된 바와 같이, 단백질의 "단편", "변이체" 또는 "동족체"는 임의로 참고 단백질(예컨대, 참고 동형)의 아미노산 서열에 대해 적어도 60%, 바람직하게는 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 것으로 특성화될 수 있다. 일부 구현예에서, 참고 단백질의 단편, 변이체, 동형 및 동족체는 참고 단백질에 의해 수행된 기능을 수행하는 능력에 의해 특성화될 수 있다.

[0097] "단편"은 일반적으로 참고 단백질의 단편을 지칭한다. "변이체"는 일반적으로 참고 단백질의 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상의 아미노산 치환, 삽입, 결실 또는 다른 변형을 포함하지만, 참고 단백질의 아미노산 서열에 대해 고려할 정도의 서열 동일성(예컨대, 적어도 60%)을 보유하는 아미노산 서열을 갖는 단백질을 지칭한다. "동형"은 일반적으로 참고 단백질의 종과 동일한 종에 의해 발현된 참고 단백질의 변이체를 지칭한다. "동족체"는 일반적으로 참고 단백질의 종과 비교하여 상이한 종에 의해 생산된 참고 단백질의 변이체를 지칭한다. 동족체는 오르솔로그(orthologue)를 포함한다.

[0098] "단편"은, 임의로 참고 단백질(즉, 이로부터 단편이 유래된 단백질)의 길이의 적어도 20%일 수 있고 최대 길이가 참고 단백질의 길이의 (50%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 중 하나일 수 있지만, 임의의 길이(아미노산의 수에 의한)일 수 있다. VISTA의 단편은 최소 길이가 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250 또는 300개의 아미노산 중 하나일 수 있고, 최대 길이가 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250 또는 300개 아미노산 중 하나의 길이일 수 있다.

[0099] 일부 구현예에서, VISTA는 포유동물(예컨대, 영장류(레서스(rhesus), 시노몰구스(cynomolgous), 비-사람 영장류 또는 사람) 및/또는 설치류(rodent)(예컨대, 래트(rat) 또는 뮤린(murine)) VISTA로부터의 VISTA이다. VISTA의 동형, 단편, 변이체 또는 동족체는 임의로 주어진 종, 예컨대, 사람으로부터의 성숙하지 않은 또는 성숙한 VISTA 동형의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 아미노산 서열 동일성 중 하나를 갖는 것으로 특성화될 수 있다.

[0100] 동형, 단편, 변이체 또는 동족체는 임의로 기능적 특성/활성에 대한 적합한 검정으로 분석함에 의해 측정된 것으로서, 참고 VISTA의 기능적 특성/활성을 갖는, 기능적 동형, 단편, 변이체 또는 동족체일 수 있다. 예를 들면, VISTA의 동형, 단편, 변이체 또는 동족체는 예컨대, VSIG-3, LRIG1, VSIG8 및/또는 PSGL-1과의 연합(association)을 나타낼 수 있다.

[0101] 일부 구현예에서, VISTA는 서열 번호: 1 또는 2에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, VISTA의 단편은 서열 번호: 2, 3 또는 6 중 하나에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 이로 이루어진다.

[0102] VISTA는 단백질의 B7 과(family)의 구성원이고, 주로 백혈구, 및 특히 CD14+ 단핵구(예를 들면, 단핵구-유래된 억제인자 세포(monocyte-derived suppressor cell; MDSC)) 및 CD33+ 골수 세포에 의해 주로 발현된다. VISTA는 또한 CD56+ NK 세포, 수지 세포에 의해 발현되고, CD4+ 및 CD8+ T 세포에서 보다 적은 정도로 발현된다. VISTA는 MDSC, 특히 종양-침윤 MDSC(tumor-infiltrating MDSC), 및 또한 종양-침윤 골수 DC(Le Mercier et al, Cancer Res. (2014) 74(7):1933-44)에서 뿐만 아니라, 종양-관련 대식구(tumor-associated macrophage; TAM) 및 호중구에서 고도로 발현된다.

[0103] VISTA가 T 세포 상에서 리간드 및 수용체 둘 다로서 작용하여 T 세포 효과기 기능을 억제하고 말초 내성(peripheral tolerance)을 유지할 수 있다는 증거가 있으며; VISTA를 과발현하도록 가공된 종양은 면역 제어(immune control)를 피하여 VISTA를 과발하지 않는 종양보다 더 신속하게 성장한다(Wang et al., Journal of Experimental Medicine. (2011) 208 (3): 577-92; Lines et al., Cancer Res. (2014) 74(7): 1924-1932). VISTA는 CD4+ T 세포 상의 공-억제성 수용체(co-inhibitory receptor) 또는 T 세포에 대한 공-억제성 리간드인

것으로 밝혀졌다. VISTA$^{-/-}$ CD4+ T 세포는 야생형 CD4+ T 세포보다 더 강력한 항원-특이적인 증식 및 사이토킨 생산을 나타내는 것으로 보고되었고, 이는 VISTA가 CD4+ T 세포에서 억제성 수용체로서 기능함을 시사한다. 모노클로날 항-VISTA 항체를 사용하여 VISTA 기능을 차단하는 것은 종양 미세환경 내에서 종양-반응성 T 세포의 침윤, 증식 및 효과기 기능을 향상시키는 것으로 밝혀졌다(Le Mercier et al, Cancer Res. (2014) 74(7):1933-4).

[0104] VISTA는 VSIG-3(IGSF11)와 상호작용하는 것으로 제안되었다 - 참고: 예컨대, 이의 전문이 본원에 참고로 포함된 문헌: Wang et al., J Immunol (2017), 198 (1 Supplement) 154.1. 활성화된 T 세포 상에서 VISTA를 통한 VSIG-3의 개입은 T 세포 증식을 억제하고, 사이토킨 및 케모킨, 예를 들면, IFN-γ, IL-2, IL-17, CCL5/RANTES, CCL3/MIP-1a, 및 CXCL11/I-TAC의 생산을 감소시킨다.

[0105] VSIG-3은 UniProt Q5DX21로 확인된 단백질이다. 사람 IGSF11 유전자에 의해 암호화된 mRNA의 대안적인 스플라이싱(alternative splicing)은 3개의 상이한 동형: 동형 1(UniProt: Q5DX21-1, v3; 서열 번호: 7); 서열 번호: 7에 대해 1 내지 17번 위치에서 상이한 서열을 포함하는, 동형 2(UniProt: Q5DX21-2; 서열 번호: 8); 및 서열 번호: 7에 대해 1 내지 17번 위치에서 상이한 서열을 포함하고, 또한 서열 번호: 7에 대해 211 내지 235번 위치에서 상이한 서열을 포함하는, 동형 3(UniProt: Q5DX21-3; 서열 번호: 9)을 생성한다.

[0106] 서열 번호: 7, 8 및 9의 N-말단 22개 아미노산은 신호 펩타이드를 구성하므로, VSIG-3 동형 1, 2 및 3의 성숙형(즉, 신호 펩타이드를 제거하기 위한 프로세싱 후)은 서열 번호: 10, 11 및 12 각각에 나타낸 아미노산 서열을 갖는다. 서열 번호: 7 및 8의 23 내지 241번 위치는 VSIG-3 동형 1 및 2의 세포외 도메인(서열 번호: 13)을 형성하고, 서열 번호: 9의 23 내지 216번 위치는 VSIG-3 동형 3의 세포외 도메인(서열 번호: 14)을 형성한다. VSIG-3의 막전위 도메인은 서열 번호: 15에 나타나 있고, 세포질성 도메인은 서열 번호: 16에 나타나 있다. 세포외 도메인은 Ig-유사 V-형 도메인(서열 번호: 17에 나타냄)을 포함하고, VSIG-3 동형 1 및 2의 세포외 도메인은 Ig-유사 C2-형 도메인(서열 번호: 18에 나타냄)을 추가로 포함한다.

[0107] 본 명세서에서, "VSIG-3"은 임의의 종으로부터의 VSIG-3을 지칭하고 임의의 종으로부터의 VSIG-3 동형, 단편, 변이체(예를 들면, 돌연변이체) 또는 동족체를 포함한다.

[0108] VSIG-3의 단편은 최소의 길이가 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 또는 400개의 아미노산 중 하나일 수 있고, 최대 길이가 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 또는 400개의 아미노산 중 하나일 수 있다.

[0109] 일부 구현예에서, VSIG-3은 포유동물(예컨대, 영장류(레서스, 시노몰구스, 비-사람 영장류 또는 사람) 및/또는 설치류(예컨대, 래트 또는 뮤린) VSIG-3)로부터의 VSIG-3이다. VSIG-3의 동형, 단편, 변이체 또는 동족체는 임의로 주어진 종, 예컨대, 사람으로부터의 성숙하지 않은 또는 성숙한 VSIG-3 동형의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 갖는 것으로 특성화될 수 있다.

[0110] 동형, 단편, 변이체 또는 동족체는 기능적 특성/활성에 대한 적합한 검정으로 분석함으로써 측정된 것으로서, 예컨대, 참고 VSIG-3의 기능적 특성/활성을 갖는, 기능적 동형, 단편, 변이체 또는 동족체일 수 있다. 예를 들면, VSIG-3의 동형, 단편, 변이체 또는 동족체는 예컨대, VISTA와의 연합을 나타낼 수 있다.

[0111] 일부 구현예에서, VSIG-3은 서열 번호: 7 내지 12 중 하나에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, VSIG-3의 단편은 서열 번호: 10 내지 14, 17 또는 18 중 하나에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 이로 이루어진다.

[0112] VISTA는 또한 VSIG-8과 상호작용하는 것으로 제안되어 왔다 - 참고: 예컨대, 제WO/2016/090347 A1호. VSIG-8은 UniProt P0DPA2(서열 번호: 19)에 의해 확인된 단백질이다. 서열 번호: 19의 N-말단 21개 아미노산 서열은 신호 펩타이드를 구성하므로, VSIG-8의 성숙형(즉, 신호 펩타이드를 제거하기 위한 프로세싱 후)은 서열 번호: 20에 나타낸 아미노산 서열을 갖는다. 서열 번호: 19의 22 내지 263번 위치는 VSIG-8의 세포외 도메인(서열 번호: 21)을 형성한다. VSIG-8의 막전위 도메인은 서열 번호: 22에 나타나 있고, 세포질성 도메인은 서열 번호: 23에 나타나 있다. 세포외 도메인은 Ig-유사 V-형 도메인 1(서열 번호: 24에 나타냄), 및 Ig-유사 V-형 도메인 2(서열 번호: 25에 나타냄)를 포함한다.

[0113] 본 명세서에서, "VSIG-8"은 임의의 종으로부터의 VSIG-8을 포함하고 임의의 종으로부터의 VSIG-8 동형, 단편, 변이체(예를 들면, 돌연변이체) 또는 동족체를 지칭한다.

[0114] VSIG-8의 단편은 최소의 길이가 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 또는 400개의 아미노산 중 하나일 수 있고, 최대의 길이가 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 또는 400개의 아미노산 중 하나일 수 있다.

[0115] 일부 구현예에서, VSIG-8은 포유동물(예컨대, 영장류(레서스, 시노몰구스, 비-사람 영장류 또는 사람) 및/또는 설치류(예컨대, 래트 또는 뮤린) VSIG-8)로부터의 VSIG-8이다. VSIG-8의 동형, 단편, 변이체 또는 동족체는 임의로 주어진 종, 예컨대, 사람으로부터의 성숙하지 않은 또는 성숙한 VSIG-8 동형의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 갖는 것으로 특성화될 수 있다.

[0116] 동형, 단편, 변이체 또는 동족체는 임의로 기능적 특성/활성에 대한 적합한 검정으로 분석함으로써 측정된 것으로서, 참고 VSIG-8의 기능적 특성/활성을 갖는 기능적 동형, 단편, 변이체 또는 동족체일 수 있다. 예를 들면, VIIG-8의 동형, 단편, 변이체 또는 동족체는 예컨대, VISTA와의 연합을 나타낼 수 있다.

[0117] 일부 구현예에서, VSIG-8은 서열 번호: 19 또는 20에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, VSIG-8의 단편은 서열 번호: 20, 21, 24 또는 25 중 하나에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 이로 이루어진다.

[0118] VISTA는 또한  PSGL-1과 상호작용하는 것으로 제안되어 있다 - 참고: 예컨대, 제WO 2018/132476 A1호. PSGL-1 동형 1은 UniProt Q14242-1(서열 번호: 323)에 의해 확인된 단백질이다. PSGL-1 동형 2는 UniProt Q14242-2(서열 번호: 324)에 의해 확인된 단백질이고, PSGL-1 동형 1과는 이것이 서열 번호: 323의 1번 위치 이후 추가로 16개의 아미노산을 포함한다는 점에서 상이하다.

[0119] 서열 번호: 323의 N-말단 17개 아미노산은 신호 펩타이드를 구성하므로, PSGL-1의 성숙형(즉, 신호 펩타이드를 제거하기 위한 프로세싱 후)은 서열 번호: 325에 나타낸 아미노산 서열을 갖는다. 서열 번호: 323의 18 내지 320번 위치는 PSGL-1(서열 번호: 326)의 세포외 도메인을 형성한다. PSGL-1의 막전위 도메인은 서열 번호: 327에 나타나 있고, 세포질성 도메인은 서열 번호: 328에 나타나 있다. 세포외 도메인은 12, 10개의 아미노산 탄뎀 반복체(amino acid tandem repeat)를 포함하고; 반복체 영역은 서열 번호: 329에 나타나 있다.

[0120] 본 명세서에서, "PSGL-1"은 임의의 종으로부터의 PSGL-1을 지칭하고 임의의 종으로부터의 PSGL-1 동형, 단편, 변이체(예를 들면, 돌연변이체) 또는 동족체를 포함한다.

[0121] PSGL-1의 단편은 최소 길이가 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 또는 400개의 아미노산 중 하나일 수 있고 최대 길이는 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 또는 400개의 아미노산 중 하나일 수 있다.

[0122] 일부 구현예에서, PSGL-1은 포유동물(예컨대, 영장류(레서스, 시노몰구스, 비-사람 영장류 또는 사람) 및/또는 설치류(예컨대, 래트 또는 뮤린) PSGL-1)로부터의 PSGL-1이다. PSGL-1의 동형, 단편, 변이체 또는 동족체는 임의로 주어진 종, 예컨대, 사람으로부터의 성숙하지 않은 또는 성숙한 PSGL-1 동형의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 갖는 것으로 특성화될 수 있다.

[0123] 동형, 단편, 변이체 또는 동족체는 임의로 기능적 특성/활성에 대한 적합한 검정으로 분석함으로써 측정된 것으로서, 예컨대, 참고 PSGL-1의 기능적 특성/활성을 갖는, 기능성 동형, 단편, 변이체 또는 동족체일 수 있다. 예를 들면, PSGL-1의 동형, 단편, 변이체 또는 동족체는 예컨대, VISTA와의 연합을 나타낼 수 있다.

[0124] 일부 구현예에서, PSGL-1은 서열 번호: 323 또는 324에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, PSGL-1의 단편은 서열 번호: 325, 326 또는 329 중 하나에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 이로 이루어진다.

[0125] 표적 분자(target molecule)에서 특히 관심있는 영역

[0126] 본 발명의 항원-결합 분자는 특수한 목적의 VISTA의 영역을 표적화하도록 구체적으로 설계되었다. 2-단계 접근법에서, 표적화될 VISTA 영역을 예측된 항원성, 기능 및 안전성에 대한 분석에 따라 선택하였다. 이후에, VISTA의 표적 영역에 대해 특이적인 항체를 면역원으로서 표적 영역에 상응하는 펩타이드를 사용하여 특이적인 모노클로날 항체를 상승시키고, 후속적으로 스크리닝하여 천연 상태에서 VISTA에 결합할 수 있는 항체를 확인함으로써 제조하였다. 이러한 접근법은 항체 에피토프(epitope)에 걸쳐 정교한 제어를 제공한다.

[0127] 본 발명의 항원-결합 분자는 이들이 결합하는 VISTA의 영역을 참고함으로써 정의될 수 있다. 본 발명의 항원-결합 분자는 VISTA의 특수한 목적 영역에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 아미노산의 연속 서열(contiguous sequence)(즉, 아미노산 1차 서열)로 이루어진, VISTA의 선형 에피토프에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 아미노산 서열의 아미노산의 불연속 서열(discontinuous sequence)로 이루어진, VISTA의 구조적 에피토프에 결합할 수 있다.

[0128] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 VISTA에 결합한다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 VISTA의 세포외 영역(예컨대, 서열 번호: 3에 나타낸 영역)에 결합한다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 VISTA의 Ig-유사 V-형 도메인(예컨대, 서열 번호: 6에 나타낸 영역)에 결합한다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 서열 번호: 1의 61 내지 162번 위치에 상응하는 영역(서열 번호: 31에 나타냄) 내 VISTA에 결합한다.

[0129] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 서열 번호: 322에 나타낸 VISTA의 영역에 결합한다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 서열 번호: 26에 나타낸 VISTA의 영역에 결합한다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 서열 번호: 27에 나타낸 VISTA의 영역에 결합한다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 서열 번호: 28에 나타낸 VISTA의 영역에 결합한다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 서열 번호: 29에 나타낸 VISTA의 영역에 결합한다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 서열 번호: 30에 나타낸 VISTA의 영역에 결합한다.

[0130] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 서열 번호: 271에 나타낸 VISTA의 영역에 결합하지 않는다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 서열 번호: 272에 나타낸 VISTA의 영역에 결합하지 않는다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 서열 번호: 273에 나타낸 VISTA의 영역에 결합하지 않는다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 서열 번호: 274에 나타낸 VISTA의 영역에 결합하지 않는다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 서열 번호: 275에 나타낸 VISTA의 영역에 결합하지 않는다.

[0131] 항체가 결합하는 펩타이드/폴리펩타이드의 영역은 당해 분야에 잘 공지된 다양한 방법, 예를 들면, 항체-항원 복합체의 X-선 공-결정화 분석(X-ray co-crystallography analysis), 펩타이드 스캐닝(펩타이드 scanning), 돌연변이유발 맵핑(mutagenesis mapping), 질량 분광법에 의한 수소-중수소 교환 분석, 경쟁 ELISA 및 단백질분해-기반한 '보호' 방법을 사용하여 숙련가에 의해 측정될 수 있다. 이러한 방법은 예를 들면, 이의 전문이 본원에 참고로 포함된 문헌: Gershoni et al., BioDrugs, 2007, 21(3):145-156에 기술되어 있다.

[0132] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 본원에 기술된 항체 클론 4M2-C12, 4M2-B4, 4M2-C9, 4M2-D9, 4M2-D5, 4M2-A8, V4H1, V4H2, V4-C1, V4-C9, V4-C24, V4-C26, V4-C27, V4-C28, V4-C30, V4-C31, 2M1-B12, 2M1-D2, 1M2-D2, 13D5p, 13D5-1, 13D5-13, 5M1-A11 또는 9M2-C12 중 하나의 VH 및 VL 서열을 포함하는 항체에 의해 결합된 VISTA의 영역에 대해, VISTA의 동일한 영역, 또는 VISTA의 오버랩핑 영역(overlapping region)을 결합시킬 수 있다.

[0133] 본원에 사용된 바와 같은, "펩타이드"는 펩타이드 결합에 의해 연결된 2개 이상의 아미노산 단량체의 쇄를 지칭한다. 펩타이드는 전형적으로 약 2 내지 50개 아미노산의 영역의 길이를 갖는다. "폴리펩타이드"는 2개 이상의 펩타이드의 중합체 쇄이다. 폴리펩타이드는 전형적으로 약 50개 아미노산 초과의 길이를 갖는다.

[0134] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 서열 번호: 1, 2, 3, 6 또는 31 중 하나의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 폴리펩타이드에 결합할 수 있다.

[0135] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 서열 번호: 322의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 펩타이드/폴리펩타이드에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 서열 번호: 26의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 펩타이드/폴리펩타이드에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 서열 번호: 27의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 펩타이드/폴리펩타이드에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 서열 번호: 28의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 펩타이드/폴리펩타이드에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 서열 번호: 29의 아미노산 서열을 포함하

거나, 또는 이로 이루어진 펩타이드/폴리펩타이드에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 서열 번호: 30의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 펩타이드/폴리펩타이드에 결합할 수 있다.

[0136] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 서열 번호: 271의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드에 결합할 수 없다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 서열 번호: 272의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드에 결합할 수 없다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 서열 번호: 273의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드에 결합할 수 없다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 서열 번호: 274의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드에 결합할 수 없다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 서열 번호: 275의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드에 결합할 수 없다.

[0137] 주어진 펩타이드/폴리펩타이드에 결합하는 항원-결합 분자의 능력은 숙련가에게 잘 공지된 방법, 예를 들면, ELISA, 면역블롯(예컨대, 웨스턴 블롯(western blot)), 면역침전, 표면 플라스몬 공명(Surface Plasmon Resonance; SPR; 참고: 예컨대, Hearty et al., Methods Mol Biol (2012) 907:411-442) 또는 생물-측 간섭법(Bio-Layer Interferometry)(참고: 예컨대, Lad et al., (2015) J Biomol Screen 20(4): 498-507)에 의한 분석에 의해 분석될 수 있다.

[0138] 항원 결합 분자가 참고 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드/폴리펩타이드에 결합할 수 있는 구현예에서, 펩타이드/폴리펩타이드는 참고 아미노산 서열의 한쪽 또는 양쪽 끝에서 하나 이상의 추가의 아미노산을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 펩타이드/폴리펩타이드는 참고 아미노산 서열의 한쪽 또는 양쪽 끝에서 예컨대, 1 내지 5개, 1 내지 10개, 1 내지 20개, 1 내지 30개, 1 내지 40개, 1 내지 50개, 5 내지 10개, 5 내지 20개, 5 내지 30개, 5 내지 40개, 5 내지 50개, 10 내지 20개, 10 내지 30개, 10 내지 40개, 10 내지 50개, 20 내지 30개, 20 내지 40개 또는 20 내지 50개의 추가의 아미노산을 포함한다.

[0139] 일부 구현예에서, 참고 서열의 한쪽 또는 양쪽 끝(즉, N-말단 및 C-말단 끝)에 제공된 추가의 아미노산(들)은 VISTA의 아미노산 서열의 맥락에서 참고 서열의 끝에서의 위치에 상응한다. 예로서, 항원-결합 분자가 서열 번호: 26의 서열을 포함하는 펩타이드/폴리펩타이드, 및 서열 번호: 26의 C-말단 끝에서 추가의 2개의 아미노산에 결합할 수 있는 경우, 추가의 2개의 아미노산은 서열 번호: 1의 90 및 91번 위치에 상응하는, 아르기닌 및 아스파라긴일 수 있다.

[0140] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 본원에 기술된 항체 클론 4M2-C12, 4M2-B4, 4M2-C9, 4M2-D9, 4M2-D5, 4M2-A8, V4H1, V4H2, V4-C1, V4-C9, V4-C24, V4-C26, V4-C27, V4-C28, V4-C30, V4-C31, 2M1-B12, 2M1-D2, 1M2-D2, 13D5p, 13D5-1, 13D5-13, 5M1-A11 또는 9M2-C12 중 하나의 VH 및 VL 서열을 포함하는 항체에 의해 결합된 펩타이드/폴리펩타이드에 결합할 수 있다.

[0141] 골수-유래된 억제인자(suppressor) 세포(MDSC)

[0142] 골수-유래된 억제인자 세포(MDSC)는 면역억제성 표현형에 의해 특성화된, 세포의 골수 계통의 면역 세포의 이종 그룹(heterogeneous group)이다. MDSC 생물학은 이의 전문이 본원에 참고로 포함된, 문헌: Kumar et al., Trends Immunol. (2016); 37(3): 208-220에 고찰되어 있다.

[0143] MDSC는 성숙한 골수 세포(즉, 대식구, 수지 세포 및 호중구)로부터 이러한 세포를 구별하는 다수의 생화학적 및 게놈적 특징, 예를 들면: NADPH 옥시다제(Nox2)의 증가된 발현, 반응성 산소 종(reactive oxygen species; ROS)(예를 들면, 슈퍼옥사이드 음이온($O^{2-}$), 과산화수소($H_2O_2$), 및 퍼옥시니트라이트(peroxynitrite)(PNT; $ONOO^-$))의 증가된 생산; 아르기나제 1 및 산화질소 신타제 2(nitric oxide synthase 2; nos2)의 증가된 발현, 및 산화질소(NO)의 증가된 생산; c/EBPβ 및 STAT3의 증가된 발현; IRF8의 감소된 발현; 및 S100A8/9 단백질의 증가된 생산에 의해 특성화된다.

[0144] MDSC의 2개의 유형; 호중구와 형태적으로 및 표현형적으로 유사한, 다형핵(polymorphonuclear) MDSC(PMN-MDSC), 및 단핵구와 보다 유사한 단핵구 MDSC(M-MDSC)가 존재한다. MDSC의 형채적 및 표현형적 특징은 예컨대, 이의 전문이 본원에참고로 포함된, 문헌: Marvel and Gabrilovich J Clin Invest. 2015 Sep 1; 125(9): 3356-3364에 기술되어 있다. 마우스에서, MDSC는 $CD11b^+Gr1^+$ 세포로서 광범위하게 확인되어 있다. $Gr\text{-}1^{hi}$ 세포는 주로 PMN-MDSC이고, $Gr\text{-}1^{lo}$ 세포는 주로 M-MDSC이다. 이러한 서브세트(subset)는 Ly6C 및 Ly6G 마커를 기반으로 보다 정밀하게 확인될 수 있고; M-MDSC는 $CD11b^+Ly6C^{hi}Ly6G^-$이고, PMN-MDSC는 $CD11b^+Ly6C^{lo}Ly6G^+$이다. 사람에서, MDSC는 단핵 분획 내에서 확인된다. PMN-MDSC는 $CD14^-CD11b^+CD33^+CD15^+$ 또는 $CD66b^+$ 세포이고, M-MDSC는 $CD14^+HLA\text{-}DR^-/^{lo}$ 세포이다. $Lin^-HLA\text{-}DR^-CD33^+$ MDSC의 집단은 골수 전구세포(myeloid progenitor)가 농축된 세포의 혼합된 그

룹을 나타낸다.

[0145] MDSC-매개된 면역 억제에 관련된 인자는 아르기나제(ARG1), 유도성 NOS(iNOS), TGF-β, IL-10, 및 COX2의 발현, 시스테인의 격리(sequestration), T 세포에 의한 I-셀렉틴의 감소된 발현, 및 Treg의 유도를 포함한다. M-MDSC 및 PMN-MDSC는 면역 억제의 상이한 메카니즘을 사용한다. M-MDSC는 NO 및 사이토킨의 생산을 통해 항원-특이적인 및 비-특이적인 T 세포 반응 둘 다를 억제하고, PMN-MDSC보다 보다 강력하게 면역억제성이다. PMN-MDSC는 ROS의 생산을 통해 항원-특이적인 방식으로 면역 반응을 억제한다. MDSC는 암 및 감염성 질환의 발달 및 진행에 병리학적으로 연루되어 있다. 사람 질환에서 MDSC의 역할은, 예컨대, 문헌: Kumar et al., Trends Immunol. (2016); 37(3): 208-220(본원에 참고로 포함됨) 및 이의 전문이 본원에 참고로 포함된, 문헌: Greten et al., Int Immunopharmacol. (2011) 11(7):802-807에 고찰되어 있다.

[0146] MDSC는 종양 조직 내에서 풍부하고, 예컨대, 문헌: Umansky et al., Vaccines (Basel) (2016) 4(4):36에 고찰된, 다수의 메카니즘을 통해 암의 발달 및 진행에 기여한다. MDSC는 케모킨 발현을 통해 종양 부위에 보충되며, 종양 미세환경 내 전염증 인자는 MDSC에 의한 면역억제성 기능의 유의적인 상향조절(upregulation)을 야기한다. MDSC는 효과기 면역 세포 기능(예컨대, 효과기 T 세포 및 NK 세포 기능)의 억제, 조절성 T 세포 생산/활성의 촉진, 성장 인자, 예를 들면, VEGF 및 bFGF의 생산, 및 ECM-변형 인자, 예를 들면, 매트릭스 메탈로프로테이나제의 생산을 통해 종양 발달, 신생혈관형성(neovascularization) 및 전이에 기여한다.

[0147] MDSC는 VISTA의 발현에 대해 참고함으로써 특성화할 수 있다. 본 발명의 다양한 양태의 구현예에서, MDSC는 "VISTA-발현 MDSC" 또는 "VISTA+MDSC"일 수 있다. MDSC는 세포 표면에서 VISTA를 발현할 수 있다(즉, VISTA는 세포 막 내에서 또는 세포 막에서 발현될 수 있다).

[0148] 항원-결합 분자

[0149] 본 발명은 VISTA에 결합할 수 있는 항원-결합 분자를 제공한다.

[0150] "항원-결합 분자"는 표적 항원에 결합할 수 있는 분자를 지칭하고, 이것이 관련된 표적 분자(들)에 대한 결합을 나타내는 한, 모노클로날 항체, 일특이적 및 다중특이적 항체(예컨대, 이특이적 항체), 및 항체 단편(예컨대, Fv, scFv, Fab, scFab, $F(ab')_2$, $Fab_2$, 디아보디(diabody), 트리아보디(triabody), scFv-Fc, 미니보디(minibody), 단일 도메인 항체(예컨대, VhH), 등)을 포함한다.

[0151] 본 발명의 항원-결합 분자는 표적 항원(들)에 결합할 수 있는 모이어티(moiety)를 포함한다. 일부 구현예에서, 표적 항원에 결합할 수 있는 모이어티는 표적 항원에 대해 특이적으로 결합할 수 있는 항체의 항체 중쇄 가변 영역(heavy chain variable region; VH) 및 항체 경쇄 가변 영역(light chain variable region; VL)을 포함한다. 일부 구현예에서, 표적 항원에 결합할 수 있는 모이어티는 표적 항원에 결합할 수 있는 압타머, 예컨대, 핵산 압타머(aptamer)를 포함하거나 또는 이로 이루어진다(참고, 예를 들면, 문헌: Zhou and Rossi Nat Rev Drug Discov. 2017 16(3):181-202). 일부 구현예에서, 표적 항원에 결합할 수 있는 모이티는 항원-결합 펩타이드/폴리펩타이드, 예컨대, 펩타이드 압타머, 티오레독신, 모노바디, 안티칼린, 쿠니츠 도메인(Kunitz domain), 아비머(avimer), 노틴(knottin), 피노머(fynomer), 아트리머(atrimer), 아피보디, 나노보디(즉, 단일-도메인 항체(sdAb)) 아필린, 아르마딜로 반복 단백질(armadillo repeat protein; ArmRP), OBody 또는 피브로넥틴을 포함하거나 또는 이로 이루어진다 - 예컨대, 이의 전문이 본원에 참고로 포함된, 문헌: Reverdatto et al., Curr Top Med Chem. 2015; 15(12): 1082-1101(참고: 또한 예컨대, Boersma et al., J Biol Chem (2011) 286:41273-85 및 Emanuel et al., Mabs (2011) 3:38-48)에 고찰되어 있다.

[0152] 본 발명의 항원-결합 분자는 일반적으로 표적 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항체의 VH 및 VL을 포함하는 항원-결합 도메인을 포함한다. VH 및 VL에 의해 형성된 항원-결합 도메인은 또한 본원에서 Fv 영역으로서 지칭될 수 있다.

[0153] 항원-결합 분자는 항원-결합 폴리펩타이드, 또는 항원-결합 폴리펩타이드 복합체일 수 있거나, 또는 이를 포함할 수 있다. 항원-결합 분자는 함께 항원-결합 도메인을 형성하는 하나 이상의 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 폴리펩타이드는 공유결합적으로 또는 비-공유결합적으로 연합될 수 있다. 일부 구현예에서, 폴리펩타이드는 폴리펩타이드를 포함하는 보다 큰 폴리펩타이드의 부분을 형성할 수 있다(예컨대, VH 및 VL을 포함하는 scFv의 경우, 또는 VH-CH1 및 VL-CL을 포함하는 scFab의 경우).

[0154] 항원-결합 분자는 하나 이상의 폴리펩타이드(예컨대, 2, 3, 4, 6, 또는 8개의 폴리펩타이드)의 비-공유결합성 또는 공유결합성 복합체, 예컨대, 2개의 중쇄 폴리펩타이드 및 2개의 경쇄 폴리펩타이드를 포함하는 IgG-유사

항원-결합 분자를 지칭할 수 있다.

[0155] 본 발명의 항원-결합 분자는 VISTA에 결합할 수 있는 모노클로날 항체(mAb)의 서열을 사용하에 설계 및 제조할 수 있다. 항체의 항원-결합 영역, 예컨대, 단일 쇄 가변 단편(scFv), Fab 및 $F(ab')_2$ 단편을 또한 사용/제공할 수 있다. "항원-결합 영역"은 이에 대해 주어진 항체가 특이적인 표적에 결합할 수 있는 항체의 임의의 단편이다.

[0156] 항체는 일반적으로 6개의 상보성-결정 영역을 포함한다: 중쇄 가변(VH) 영역 내에 3개: HC-CDR1, HC-CDR2 및 HC-CDR3, 및 경쇄 가변(VL) 영역 내에 3개: LC-CDR1, LC-CDR2, 및 LC-CDR3. 6개의 CDR은 함께 항체의 파라토프(paratope)를 정의하며, 이는 표적 항원에 결합하는 항체의 부분이다.

[0157] VH 영역 및 VL 영역은 각각의 CDR의 한 측면에 골격 영역(framework region; FR)을 포함하고, 이는 CDR에 대한 스캐폴드(scaffold)를 제공한다. N-말단으로부터 C-말단까지, VH 영역은 다음의 구조: N 말단-[HC-FR1]-[HC-CDR1]-[HC-FR2]-[HC-CDR2]-[HC-FR3]-[HC-CDR3]-[HC-FR4]-C 말단을 포함하고; VL 영역은 다음의 구조: N 말단-[LC-FR1]-[LC-CDR1]-[LC-FR2]-[LC-CDR2]-[LC-FR3]-[LC-CDR3]-[LC-FR4]-C 말단을 포함한다.

[0158] 항체 CDR 및 FR을 정의하기 위한 7개의 상이한 협약, 예를 들면, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)에 기술된 것, 및 Retter et al., Nucl. Acids Res. (2005) 33 (suppl 1): D671-D674에 기술된 바와 같은, VBASE2가 존재한다. 본원에 기술된 항체 클론의 VH 영역 및 VL 영역의 CDR 및 FR은 국제 IMGT(ImMunoGeneTics) 정보 시스템(LeFranc et al., Nucleic Acids Res. (2015) 43 (Database issue):D413-22)에 따라 정의되었고, 이는 Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. (2003) 27:55-77에 기술된 바와 같은 IMGT V-DOMAIN 번호매김 법칙(numbering rule)을 사용한다.

[0159] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 VISTA에 결합할 수 있는 항원-결합 분자의 CDR을 포함한다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 VISTA에 결합할 수 있는 항원-결합 분자의 FR을 포함한다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 VISTA에 결합할 수 있는 항원-결합 분자의 CDR 및 FR을 포함한다. 즉, 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 VISTA에 결합할 수 있는 항원-결합 분자의 VH 영역 및 VL 영역을 포함한다.

[0160] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 본원에 기술된 VISTA-결합 항체(즉, 항-VISTA 항체 클론 4M2-C12, 4M2-B4, 4M2-C9, 4M2-D9, 4M2-D5, 4M2-A8, V4H1, V4H2, V4-C1, V4-C9, V4-C24, V4-C26, V4-C27, V4-C28, V4-C30, V4-C31, 2M1-B12, 2M1-D2, 1M2-D2, 13D5p, 13D5-1, 13D5-13, 5M1-A11 또는 9M2-C12)의 VH/VL 영역이거나, 또는 이로부터 유래된 VH 영역 및 VL 영역을 포함한다.

[0161] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 하기 (1) 내지 (18) 중 하나에 따른 VH 영역을 포함한다:

[0162] (1) 다음의 CDR을 포함하는 (4M2-C12 유래된 컨센서스(consensus)) VH 영역:

[0163] 서열 번호: 305의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[0164] 서열 번호: 306의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[0165] 서열 번호: 307의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3,

[0166] 또는 HC-CDR1, HC-CDR2, 또는 HC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0167] (2) 다음의 CDR을 포함하는 (V4-C24, V4-C26, V4-C27, V4-C28, V4-C30, V4-C31) VH 영역:

[0168] 서열 번호: 290의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[0169] 서열 번호: 291의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[0170] 서열 번호: 278의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3,

[0171] 또는 HC-CDR1, HC-CDR2, 또는 HC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0172] (3) (V4-C1) 다음의 CDR을 포함하는 VH 영역:

[0173] 서열 번호: 33의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[0174] 서열 번호: 277의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[0175] 서열 번호: 278의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3,

[0176] 또는 HC-CDR1, HC-CDR2, 또는 HC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0177] (4) (V4-C9) 다음의 CDR을 포함하는 VH 영역:

[0178] 서열 번호: 33의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[0179] 서열 번호: 286의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[0180] 서열 번호: 278의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3,

[0181] 또는 HC-CDR1, HC-CDR2, 또는 HC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0182] (5) (4M2-C12/V4H1/V4H2 컨센서스) 다음의 CDR을 포함하는 VH 영역:

[0183] 서열 번호: 244의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[0184] 서열 번호: 34의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[0185] 서열 번호: 35의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3,

[0186] 또는 HC-CDR1, HC-CDR2, 또는 HC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0187] (6) (4M2-C12, 4M2-B4, V4H2) 다음의 CDR을 포함하는 VH 영역:

[0188] 서열 번호: 33의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[0189] 서열 번호: 34의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[0190] 서열 번호: 35의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3,

[0191] 또는 HC-CDR1, HC-CDR2, 또는 HC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0192] (7) (V4H1) 다음의 CDR을 포함하는 VH 영역:

[0193] 서열 번호: 53의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[0194] 서열 번호: 34의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[0195] 서열 번호: 35의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3,

[0196] 또는 HC-CDR1, HC-CDR2, 또는 HC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0197] (8) (2M1-B12, 2M1-D2) 다음의 CDR을 포함하는 VH 영역:

[0198] 서열 번호: 72의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[0199] 서열 번호: 73의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[0200] 서열 번호: 74의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3,

[0201] 또는 HC-CDR1, HC-CDR2, 또는 HC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0202] (9) (4M2-C9, 5M1-A11) 다음의 CDR을 포함하는 VH 영역:

[0203] 서열 번호: 88의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[0204] 서열 번호: 89의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[0205] 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3,

[0206] 또는 HC-CDR1, HC-CDR2, 또는 HC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0207] (10) (4M2-D9) 다음의 CDR을 포함하는 VH 영역:

[0208] 서열 번호: 33의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[0209] 서열 번호: 107의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[0210] 서열 번호: 108의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3,

[0211] 또는 HC-CDR1, HC-CDR2, 또는 HC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0212] (11) (1M2-D2) 다음의 CDR을 포함하는 VH 영역:

[0213] 서열 번호: 120의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[0214] 서열 번호: 121의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[0215] 서열 번호: 122의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3,

[0216] 또는 HC-CDR1, HC-CDR2, 또는 HC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0217] (12) (4M2-D5) 다음의 CDR을 포함하는 VH 영역:

[0218] 서열 번호: 144의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[0219] 서열 번호: 145의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[0220] 서열 번호: 146의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3,

[0221] 또는 HC-CDR1, HC-CDR2, 또는 HC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0222] (13) (4M2-A8) 다음의 CDR을 포함하는 VH 영역:

[0223] 서열 번호: 158의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[0224] 서열 번호: 159의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[0225] 서열 번호: 160의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3,

[0226] 또는 HC-CDR1, HC-CDR2, 또는 HC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0227] (14) (9M2-C12) 다음의 CDR을 포함하는 VH 영역:

[0228] 서열 번호: 169의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[0229] 서열 번호: 170의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[0230] 서열 번호: 171의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3,

[0231] 또는 HC-CDR1, HC-CDR2, 또는 HC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0232] (15) (13D5 유래된) 다음의 CDR을 포함하는 VH 영역:

[0233] 서열 번호: 72의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[0234] 서열 번호: 184의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[0235] 서열 번호: 246의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3,

[0236] 또는 HC-CDR1, HC-CDR2, 또는 HC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로

치환된 이의 변이체.

[0237] (16) (13D5p) 다음의 CDR을 포함하는 VH 영역:

[0238] 서열 번호: 72의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[0239] 서열 번호: 184의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[0240] 서열 번호: 185의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3,

[0241] 또는 HC-CDR1, HC-CDR2, 또는 HC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0242] (17) (13D5-1) 다음의 CDR을 포함하는 VH 영역:

[0243] 서열 번호: 72의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[0244] 서열 번호: 184의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[0245] 서열 번호: 195의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3,

[0246] 또는 HC-CDR1, HC-CDR2, 또는 HC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0247] (18) (13D5-13) 다음의 CDR을 포함하는 VH 영역:

[0248] 서열 번호: 72의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[0249] 서열 번호: 184의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[0250] 서열 번호: 200의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3,

[0251] 또는 HC-CDR1, HC-CDR2, 또는 HC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0252] 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 하기 (19) 내지 (35) 중 하나에 따른 VH 영역을 포함한다:

[0253] (19) (V4-C24, V4-C26, V4-C27, V4-C28, V4-C30, V4-C31) 다음의 FR을 포함하는 VH 영역:

[0254] 서열 번호: 63의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR1

[0255] 서열 번호: 292의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR2

[0256] 서열 번호: 293의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR3

[0257] 서열 번호: 281의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR4,

[0258] 또는 HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3, 또는 HC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0259] (20) (V4-C1, V4-C9) 다음의 FR을 포함하는 VH 영역:

[0260] 서열 번호: 63의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR1

[0261] 서열 번호: 279의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR2

[0262] 서열 번호: 280의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR3

[0263] 서열 번호: 281의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR4,

[0264] 또는 HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3, 또는 HC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0265] (21) (4M2-C12) 다음의 FR을 포함하는 VH 영역:

[0266] 서열 번호: 36의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR1

[0267] 서열 번호: 37의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR2

[0268] 서열 번호: 38의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR3

[0269] 서열 번호: 39의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR4,

[0270] 또는 HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3, 또는 HC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0271] (22) (4M2-B4) 다음의 FR을 포함하는 VH 영역:

[0272] 서열 번호: 49의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR1

[0273] 서열 번호: 37의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR2

[0274] 서열 번호: 38의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR3

[0275] 서열 번호: 39의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR4,

[0276] 또는 HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3, 또는 HC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0277] (23) (V4H1) 다음의 FR을 포함하는 VH 영역:

[0278] 서열 번호: 54의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR1

[0279] 서열 번호: 55의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR2

[0280] 서열 번호: 56의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR3

[0281] 서열 번호: 39의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR4,

[0282] 또는 HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3, 또는 HC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0283] (24) (V4H2) 다음의 FR을 포함하는 VH 영역:

[0284] 서열 번호: 63의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR1

[0285] 서열 번호: 64의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR2

[0286] 서열 번호: 65의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR3

[0287] 서열 번호: 39의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR4,

[0288] 또는 HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3, 또는 HC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0289] (25) (2M1-B12) 다음의 FR을 포함하는 VH 영역:

[0290] 서열 번호: 75의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR1

[0291] 서열 번호: 76의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR2

[0292] 서열 번호: 77의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR3

[0293] 서열 번호: 78의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR4,

[0294] 또는 HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3, 또는 HC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0295] (26) (4M2-C9) 다음의 FR을 포함하는 VH 영역:

[0296] 서열 번호: 91의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR1

[0297] 서열 번호: 92의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR2

[0298] 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR3

[0299] 서열 번호: 94의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR4,

[0300] 또는 HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3, 또는 HC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0301] (27) (2M1-D2) 다음의 FR을 포함하는 VH 영역:

[0302] 서열 번호: 103의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR1

[0303] 서열 번호: 76의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR2

[0304] 서열 번호: 77의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR3

[0305] 서열 번호: 78의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR4,

[0306] 또는 HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3, 또는 HC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0307] (28) (4M2-D9) 다음의 FR을 포함하는 VH 영역:

[0308] 서열 번호: 109의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR1

[0309] 서열 번호: 110의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR2

[0310] 서열 번호: 111의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR3

[0311] 서열 번호: 112의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR4,

[0312] 또는 HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3, 또는 HC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0313] (29) (1M2-D2) 다음의 FR을 포함하는 VH 영역:

[0314] 서열 번호: 123의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR1

[0315] 서열 번호: 124의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR2

[0316] 서열 번호: 125의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR3

[0317] 서열 번호: 78의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR4,

[0318] 또는 HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3, 또는 HC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0319] (30) (5M1-A11) 다음의 FR을 포함하는 VH 영역:

[0320] 서열 번호: 134의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR1

[0321] 서열 번호: 92의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR2

[0322] 서열 번호: 93의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR3

[0323] 서열 번호: 135의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR4,

[0324] 또는 HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3, 또는 HC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0325] (31) (4M2-D5) 다음의 FR을 포함하는 VH 영역:

[0326] 서열 번호: 147의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR1

[0327] 서열 번호: 148의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR2

[0328] 서열 번호: 149의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR3

[0329] 서열 번호: 135의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR4,

[0330] 또는 HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3, 또는 HC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0331] (32) (4M2-A8) 다음의 FR을 포함하는 VH 영역:

[0332] 서열 번호: 161의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR1

[0333] 서열 번호: 162의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR2

[0334] 서열 번호: 163의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR3

[0335] 서열 번호: 135의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR4,

[0336] 또는 HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3, 또는 HC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0337] (33) (9M2-C12) 다음의 FR을 포함하는 VH 영역:

[0338] 서열 번호: 172의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR1

[0339] 서열 번호: 173의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR2

[0340] 서열 번호: 174의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR3

[0341] 서열 번호: 175의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR4,

[0342] 또는 HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3, 또는 HC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0343] (34) (13D5p, 13D5-1) 다음의 FR을 포함하는 VH 영역:

[0344] 서열 번호: 103의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR1

[0345] 서열 번호: 186의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR2

[0346] 서열 번호: 187의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR3

[0347] 서열 번호: 86의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR4,

[0348] 또는 HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3, 또는 HC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0349] (35) (13D5-13) 다음의 FR을 포함하는 VH 영역:

[0350] 서열 번호: 103의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR1

[0351] 서열 번호: 186의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR2

[0352] 서열 번호: 201의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR3

[0353] 서열 번호: 86의 아미노산 서열을 갖는 HC-FR4,

[0354] 또는 HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3, 또는 HC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체.

[0355] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 상기 (1) 내지 (18) 중 하나에 따른 CDR, 및 상기 (19) 내지 (35) 중 하나에 따른 FR을 포함하는 VH 영역을 포함한다.

[0356] 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 하기 (36) 내지 (57) 중 하나에 따른 VH 영역을 포함한다:

[0357] (36) (1)에 따른 CDR 및 (19), (20), (21), (22), (23) 또는 (24)에 따른 FR을 포함하는 VH 영역.

[0358] (37) (2)에 따른 CDR 및 (19)에 따른 FR을 포함하는 VH 영역.

[0359] (38) (3)에 따른 CDR 및 (20)에 따른 FR을 포함하는 VH 영역.

[0360] (39) (4)에 따른 CDR 및 (20)에 따른 FR을 포함하는 VH 영역.

[0361] (40) (5)에 따른 CDR 및 (21), (22), (23) 또는 (24)에 따른 FR을 포함하는 VH 영역.

[0362] (41) (6)에 따른 CDR 및 (21)에 따른 FR을 포함하는 VH 영역.

[0363] (42) (6)에 따른 CDR 및 (22)에 따른 FR을 포함하는 VH 영역.

[0364] (43) (6)에 따른 CDR 및 (24)에 따른 FR을 포함하는 VH 영역.

[0365] (44) (7)에 따른 CDR 및 (23)에 따른 FR을 포함하는 VH 영역.

[0366] (45) (8)에 따른 CDR 및 (25)에 따른 FR을 포함하는 VH 영역.

[0367] (46) (8)에 따른 CDR 및 (27)에 따른 FR을 포함하는 VH 영역.

[0368] (47) (9)에 따른 CDR 및 (26)에 따른 FR을 포함하는 VH 영역.

[0369] (48) (9)에 따른 CDR 및 (30)에 따른 FR을 포함하는 VH 영역.

[0370] (49) (10)에 따른 CDR 및 (28)에 따른 FR을 포함하는 VH 영역.

[0371] (50) (11)에 따른 CDR 및 (29)에 따른 FR을 포함하는 VH 영역.

[0372] (51) (12)에 따른 CDR 및 (31)에 따른 FR을 포함하는 VH 영역.

[0373] (52) (13)에 따른 CDR 및 (32)에 따른 FR을 포함하는 VH 영역.

[0374] (53) (14)에 따른 CDR 및 (33)에 따른 FR을 포함하는 VH 영역.

[0375] (54) (15)에 따른 CDR 및 (34) 또는 (35)에 따른 FR을 포함하는 VH 영역.

[0376] (55) (16)에 따른 CDR 및 (34)에 따른 FR을 포함하는 VH 영역.

[0377] (56) (17)에 따른 CDR 및 (34)에 따른 FR을 포함하는 VH 영역.

[0378] (57) (18)에 따른 CDR 및 (35)에 따른 FR을 포함하는 VH 영역.

[0379] 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 하기 (58) 내지 (76) 중 하나에 따른 VH 영역을 포함한다:

[0380] (58) 서열 번호: 276의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역.

[0381] (59) 서열 번호: 285의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역.

[0382] (60) 서열 번호: 289의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역.

[0383] (61) 서열 번호: 32의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역.

[0384] (62) 서열 번호: 48의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역.

[0385] (63) 서열 번호: 52의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역.

[0386] (64) 서열 번호: 62의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역.

[0387] (65) 서열 번호: 71의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동

일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역.

[0388] (66) 서열 번호: 87의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역.

[0389] (67) 서열 번호: 102의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역.

[0390] (68) 서열 번호: 106의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역.

[0391] (69) 서열 번호: 119의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역.

[0392] (70) 서열 번호: 133의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역.

[0393] (71) 서열 번호: 143의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역.

[0394] (72) 서열 번호: 157의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역.

[0395] (73) 서열 번호: 168의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역.

[0396] (74) 서열 번호: 183의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역.

[0397] (75) 서열 번호: 194의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역.

[0398] (76) 서열 번호: 199의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역.

[0399] 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 하기 (77) 내지 (96) 중 하나에 따른 VL 영역을 포함한다:

[0400] (77) (4M2-C12 유래된 컨센서스) 다음의 CDR을 포함하는 VL 영역:

[0401] 서열 번호: 41의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[0402] 서열 번호: 308의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[0403] 서열 번호: 43의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3;

[0404] 또는 LC-CDR1, LC-CDR2 또는 LC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0405] (78) (C24/C26/C27 컨센서스) 다음의 CDR을 포함하는 VL 영역:

[0406] 서열 번호: 41의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[0407] 서열 번호: 309의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[0408] 서열 번호: 43의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3;

[0409] 또는 LC-CDR1, LC-CDR2 또는 LC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0410] (79) (V4-C24, V4-C26) 다음의 CDR을 포함하는 VL 영역:

[0411] 서열 번호: 41의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[0412] 서열 번호: 295의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[0413] 서열 번호: 43의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3;

[0414] 또는 LC-CDR1, LC-CDR2 또는 LC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0415] (80) (V4-C27, V4-C30, V4-C31) 다음의 CDR을 포함하는 VL 영역:

[0416] 서열 번호: 41의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[0417] 서열 번호: 300의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[0418] 서열 번호: 43의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3;

[0419] 또는 LC-CDR1, LC-CDR2 또는 LC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0420] (81) (4M2-C12/V4H1/V4H2 컨센서스) 다음의 CDR을 포함하는 VL 영역:

[0421] 서열 번호: 41의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[0422] 서열 번호: 245의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[0423] 서열 번호: 43의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3;

[0424] 또는 LC-CDR1, LC-CDR2 또는 LC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0425] (82) (4M2-C12, 4M2-B4, V4-C1, V4-C9, V4-C28) 다음의 CDR을 포함하는 VL 영역:

[0426] 서열 번호: 41의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[0427] 서열 번호: 42의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[0428] 서열 번호: 43의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3;

[0429] 또는 LC-CDR1, LC-CDR2 또는 LC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0430] (83) (V4H1) 다음의 CDR을 포함하는 VL 영역:

[0431] 서열 번호: 41의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[0432] 서열 번호: 58의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[0433] 서열 번호: 43의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3;

[0434] 또는 LC-CDR1, LC-CDR2 또는 LC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0435] (84) (V4H2) 다음의 CDR을 포함하는 VL 영역:

[0436] 서열 번호: 41의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[0437] 서열 번호: 67의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[0438] 서열 번호: 43의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3;

[0439] 또는 LC-CDR1, LC-CDR2 또는 LC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0440] (85) (2M1-B12, 2M1-D2) 다음의 CDR을 포함하는 VL 영역:

[0441] 서열 번호: 80의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[0442] 서열 번호: 81의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[0443] 서열 번호: 82의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3;

[0444] 또는 LC-CDR1, LC-CDR2 또는 LC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0445] (86) (4M2-C9) 다음의 CDR을 포함하는 VL 영역:

[0446] 서열 번호: 96의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[0447] 서열 번호: 97의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[0448] 서열 번호: 98의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3;

[0449] 또는 LC-CDR1, LC-CDR2 또는 LC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0450] (87) (4M2-D9) 다음의 CDR을 포함하는 VH 영역:

[0451] 서열 번호: 114의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[0452] 서열 번호: 67의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[0453] 서열 번호: 115의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3,

[0454] 또는 LC-CDR1, LC-CDR2 또는 LC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0455] (88) (1M2-D2) 다음의 CDR을 포함하는 VL 영역:

[0456] 서열 번호: 127의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[0457] 서열 번호: 128의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[0458] 서열 번호: 129의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3;

[0459] 또는 LC-CDR1, LC-CDR2 또는 LC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0460] (89) (5M1-A11) 다음의 CDR을 포함하는 VL 영역:

[0461] 서열 번호: 137의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[0462] 서열 번호: 138의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[0463] 서열 번호: 139의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3;

[0464] 또는 LC-CDR1, LC-CDR2 또는 LC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0465] (90) (4M2-D5) 다음의 CDR을 포함하는 VL 영역:

[0466] 서열 번호: 151의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[0467] 서열 번호: 152의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[0468] 서열 번호: 153의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3;

[0469] 또는 LC-CDR1, LC-CDR2 또는 LC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로

치환된, 이의 변이체.

[0470] (91) (4M2-A8) 다음의 CDR을 포함하는 VL 영역:

[0471] 서열 번호: 165의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[0472] 서열 번호: 152의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[0473] 서열 번호: 153의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3;

[0474] 또는 LC-CDR1, LC-CDR2 또는 LC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0475] (92) (9M2-C12) 다음의 CDR을 포함하는 VL 영역:

[0476] 서열 번호: 177의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[0477] 서열 번호: 178의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[0478] 서열 번호: 179의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3;

[0479] 또는 LC-CDR1, LC-CDR2 또는 LC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0480] (93) (13D5p 유래된) 다음의 CDR을 포함하는 VL 영역:

[0481] 서열 번호: 247의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[0482] 서열 번호: 178의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[0483] 서열 번호: 190의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3;

[0484] 또는 LC-CDR1, LC-CDR2 또는 LC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0485] (94) (13D5p) 다음의 CDR을 포함하는 VL 영역:

[0486] 서열 번호: 189의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[0487] 서열 번호: 178의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[0488] 서열 번호: 190의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3;

[0489] 또는 LC-CDR1, LC-CDR2 또는 LC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0490] (95) (13D5-1) 다음의 CDR을 포함하는 VL 영역:

[0491] 서열 번호: 197의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[0492] 서열 번호: 178의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[0493] 서열 번호: 190의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3;

[0494] 또는 LC-CDR1, LC-CDR2 또는 LC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0495] (96) (13D5-13) 다음의 CDR을 포함하는 VL 영역:

[0496] 서열 번호: 203의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[0497] 서열 번호: 178의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[0498] 서열 번호: 190의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3;

[0499] 또는 LC-CDR1, LC-CDR2 또는 LC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0500] 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 하기 (97) 내지 (120) 중 하나에 따른 VL 영역을 포함한다:

[0501] (97) (V4-C1) 다음의 FR을 포함하는 VL 영역:

[0502] 서열 번호: 59의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR1

[0503] 서열 번호: 283의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR2

[0504] 서열 번호: 284의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR3

[0505] 서열 번호: 47의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR4,

[0506] 또는 LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3, 또는 LC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0507] (98) (V4-C9) 다음의 FR을 포함하는 VL 영역:

[0508] 서열 번호: 288의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR1

[0509] 서열 번호: 283의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR2

[0510] 서열 번호: 284의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR3

[0511] 서열 번호: 47의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR4,

[0512] 또는 LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3, 또는 LC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0513] (99) (V4-C24) 다음의 FR을 포함하는 VL 영역:

[0514] 서열 번호: 288의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR1

[0515] 서열 번호: 283의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR2

[0516] 서열 번호: 296의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR3

[0517] 서열 번호: 47의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR4,

[0518] 또는 LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3, 또는 LC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0519] (100) (V4-C26) 다음의 FR을 포함하는 VL 영역:

[0520] 서열 번호: 288의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR1

[0521] 서열 번호: 298의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR2

[0522] 서열 번호: 284의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR3

[0523] 서열 번호: 47의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR4,

[0524] 또는 LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3, 또는 LC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0525] (101) (V4-C27) 다음의 FR을 포함하는 VL 영역:

[0526] 서열 번호: 288의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR1

[0527] 서열 번호: 283의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR2

[0528] 서열 번호: 284의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR3

[0529] 서열 번호: 47의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR4,

[0530] 또는 LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3, 또는 LC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0531] (102) (V4-C28) 다음의 FR을 포함하는 VL 영역:

[0532] 서열 번호: 288의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR1

[0533] 서열 번호: 283의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR2

[0534] 서열 번호: 296의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR3

[0535] 서열 번호: 47의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR4,

[0536] 또는 LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3, 또는 LC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0537] (103) (V4-C30) 다음의 FR을 포함하는 VL 영역:

[0538] 서열 번호: 288의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR1

[0539] 서열 번호: 283의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR2

[0540] 서열 번호: 296의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR3

[0541] 서열 번호: 47의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR4,

[0542] 또는 LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3, 또는 LC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0543] (104) (V4-C31) 다음의 FR을 포함하는 VL 영역:

[0544] 서열 번호: 288의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR1

[0545] 서열 번호: 283의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR2

[0546] 서열 번호: 304의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR3

[0547] 서열 번호: 47의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR4,

[0548] 또는 LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3, 또는 LC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0549] (105) (4M2-C12) 다음의 FR을 포함하는 VL 영역:

[0550] 서열 번호: 44의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR1

[0551] 서열 번호: 45의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR2

[0552] 서열 번호: 46의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR3

[0553] 서열 번호: 47의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR4,

[0554] 또는 LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3, 또는 LC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0555] (106) (4M2-B4) 다음의 FR을 포함하는 VL 영역:

[0556] 서열 번호: 51의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR1

[0557] 서열 번호: 45의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR2

[0558] 서열 번호: 46의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR3

[0559] 서열 번호: 47의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR4,

[0560] 또는 LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3, 또는 LC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0561] (107) (V4H1) 다음의 FR을 포함하는 VL 영역:

[0562] 서열 번호: 59의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR1

[0563] 서열 번호: 60의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR2

[0564] 서열 번호: 61의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR3

[0565] 서열 번호: 47의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR4,

[0566] 또는 LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3, 또는 LC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0567] (108) (V4H2) 다음의 FR을 포함하는 VL 영역:

[0568] 서열 번호: 68의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR1

[0569] 서열 번호: 69의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR2

[0570] 서열 번호: 70의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR3

[0571] 서열 번호: 47의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR4,

[0572] 또는 LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3, 또는 LC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0573] (109) (2M1-B12) 다음의 FR을 포함하는 VL 영역:

[0574] 서열 번호: 83의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR1

[0575] 서열 번호: 84의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR2

[0576] 서열 번호: 85의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR3

[0577] 서열 번호: 86의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR4,

[0578] 또는 LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3, 또는 LC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0579] (110) (4M2-C9) 다음의 FR을 포함하는 VL 영역:

[0580] 서열 번호: 99의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR1

[0581] 서열 번호: 100의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR2

[0582] 서열 번호: 101의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR3

[0583] 서열 번호: 86의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR4,

[0584] 또는 LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3, 또는 LC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0585] (111) (2M1-D2) 다음의 FR을 포함하는 VL 영역:

[0586] 서열 번호: 105의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR1

[0587] 서열 번호: 84의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR2

[0588] 서열 번호: 85의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR3

[0589] 서열 번호: 86의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR4,

[0590] 또는 LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3, 또는 LC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0591] (112) (4M2-D9) 다음의 FR을 포함하는 VL 영역:

[0592] 서열 번호: 116의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR1

[0593] 서열 번호: 117의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR2

[0594] 서열 번호: 118의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR3

[0595] 서열 번호: 86의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR4,

[0596] 또는 LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3, 또는 LC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0597] (113) (1M2-D2) 다음의 FR을 포함하는 VL 영역:

[0598] 서열 번호: 130의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR1

[0599] 서열 번호: 131의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR2

[0600] 서열 번호: 132의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR3

[0601] 서열 번호: 86의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR4,

[0602] 또는 LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3, 또는 LC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0603] (114) (5M1-A11) 다음의 FR을 포함하는 VL 영역:

[0604] 서열 번호: 140의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR1

[0605] 서열 번호: 141의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR2

[0606] 서열 번호: 142의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR3

[0607] 서열 번호: 86의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR4,

[0608] 또는 LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3, 또는 LC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0609] (115) (4M2-D5) 다음의 FR을 포함하는 VL 영역:

[0610] 서열 번호: 154의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR1

[0611] 서열 번호: 155의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR2

[0612] 서열 번호: 156의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR3

[0613] 서열 번호: 86의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR4,

[0614] 또는 LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3, 또는 LC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0615] (116) (4M2-A8) 다음의 FR을 포함하는 VL 영역:

[0616] 서열 번호: 166의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR1

[0617] 서열 번호: 155의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR2

[0618] 서열 번호: 167의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR3

[0619] 서열 번호: 86의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR4,

[0620] 또는 LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3, 또는 LC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0621] (117) (9M2-C12) 다음의 FR을 포함하는 VL 영역:

[0622] 서열 번호: 180의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR1

[0623] 서열 번호: 181의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR2

[0624] 서열 번호: 182의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR3

[0625] 서열 번호: 86의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR4,

[0626] 또는 LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3, 또는 LC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0627] (118) (13D5p) 다음의 FR을 포함하는 VL 영역:

[0628] 서열 번호: 191의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR1

[0629] 서열 번호: 192의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR2

[0630] 서열 번호: 193의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR3

[0631] 서열 번호: 86의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR4,

[0632] 또는 LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3, 또는 LC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0633] (119) (13D5-1) 다음의 FR을 포함하는 VL 영역:

[0634] 서열 번호: 191의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR1

[0635] 서열 번호: 198의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR2

[0636] 서열 번호: 193의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR3

[0637] 서열 번호: 86의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR4,

[0638] 또는 LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3, 또는 LC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0639] (120) (13D5-13) 다음의 FR을 포함하는 VL 영역:

[0640] 서열 번호: 191의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR1

[0641] 서열 번호: 192의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR2

[0642] 서열 번호: 204의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR3

[0643] 서열 번호: 86의 아미노산 서열을 갖는 LC-FR4,

[0644] 또는 LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3, 또는 LC-FR4 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 이의 변이체.

[0645] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 상기 (77) 내지 (96) 중 하나에 따른 CDR, 및 상기 (97) 내지 (120) 중 하나에 따른 FR을 포함하는 VL 영역을 포함한다.

[0646] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 하기 (121) 내지 (148) 중 하나에 따른 VL 영역을 포함한다:

[0647] (121) (77)에 따른 CDR 및 (97), (98), (99), (100), (101), (102), (103), (104), (105), (106), (107) 또는 (108)에 따른 FR을 포함하는 VL 영역.

[0648] (122) (78)에 따른 CDR 및 (99), (100), (101)에 따른 FR을 포함하는 VL 영역.

[0649] (123) (79)에 따른 CDR 및 (99)에 따른 FR을 포함하는 VL 영역.

[0650] (124) (79)에 따른 CDR 및 (100)에 따른 FR을 포함하는 VL 영역.

[0651] (125) (80)에 따른 CDR 및 (101)에 따른 FR을 포함하는 VL 영역.

[0652] (126) (82)에 따른 CDR 및 (97)에 따른 FR을 포함하는 VL 영역.

[0653] (127) (82)에 따른 CDR 및 (98)에 따른 FR을 포함하는 VL 영역.

[0654] (128) (82)에 따른 CDR 및 (102)에 따른 FR을 포함하는 VL 영역.

[0655] (129) (80)에 따른 CDR 및 (103)에 따른 FR을 포함하는 VL 영역.

[0656] (130) (80)에 따른 CDR 및 (104)에 따른 FR을 포함하는 VL 영역.

[0657] (131) (81)에 따른 CDR 및 (105), (106), (107) 또는 (108)에 따른 FR을 포함하는 VL 영역.

[0658] (132) (82)에 따른 CDR 및 (105)에 따른 FR을 포함하는 VL 영역.

[0659] (133) (82)에 따른 CDR 및 (106)에 따른 FR을 포함하는 VL 영역.

[0660] (134) (83)에 따른 CDR 및 (107)에 따른 FR을 포함하는 VL 영역.

[0661] (135) (84)에 따른 CDR 및 (108)에 따른 FR을 포함하는 VL 영역.

[0662] (136) (85)에 따른 CDR 및 (109)에 따른 FR을 포함하는 VL 영역.

[0663] (137) (85)에 따른 CDR 및 (111)에 따른 FR을 포함하는 VL 영역.

[0664] (138) (86)에 따른 CDR 및 (110)에 따른 FR을 포함하는 VL 영역.

[0665] (139) (87)에 따른 CDR 및 (112)에 따른 FR을 포함하는 VL 영역.

[0666] (140) (88)에 따른 CDR 및 (113)에 따른 FR을 포함하는 VL 영역.

[0667] (141) (89)에 따른 CDR 및 (114)에 따른 FR을 포함하는 VL 영역.

[0668] (142) (90)에 따른 CDR 및 (115)에 따른 FR을 포함하는 VL 영역.

[0669] (143) (91)에 따른 CDR 및 (116)에 따른 FR을 포함하는 VL 영역.

[0670] (144) (92)에 따른 CDR 및 (117)에 따른 FR을 포함하는 VL 영역.

[0671] (145) (93)에 따른 CDR 및 (118), (119) 또는 (120)에 따른 FR을 포함하는 VL 영역.

[0672] (146) (94)에 따른 CDR 및 (118)에 따른 FR을 포함하는 VL 영역.

[0673] (147) (95)에 따른 CDR 및 (119)에 따른 FR을 포함하는 VL 영역.

[0674] (148) (96)에 따른 CDR 및 (120)에 따른 FR을 포함하는 VL 영역.

[0675] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 하기 (149) 내지 (173) 중 하나에 따른 VL 영역을 포함한다:

[0676] (149) 서열 번호: 310의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역.

[0677] (150) 서열 번호: 282의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역.

[0678] (151) 서열 번호: 287의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역.

[0679] (152) 서열 번호: 294의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역.

[0680] (153) 서열 번호: 297의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역.

[0681] (154) 서열 번호: 299의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역.

[0682] (155) 서열 번호: 301의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역.

[0683] (156) 서열 번호: 302의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동

일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역.

[0684] (157) 서열 번호: 303의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역.

[0685] (158) 서열 번호: 40의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역.

[0686] (159) 서열 번호: 50의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역.

[0687] (160) 서열 번호: 57의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역.

[0688] (161) 서열 번호: 66의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역.

[0689] (162) 서열 번호: 79의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역.

[0690] (163) 서열 번호: 95의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역.

[0691] (164) 서열 번호: 104의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역.

[0692] (165) 서열 번호: 113의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역.

[0693] (166) 서열 번호: 126의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역.

[0694] (167) 서열 번호: 136의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역.

[0695] (168) 서열 번호: 150의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역.

[0696] (169) 서열 번호: 164의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역.

[0697] (170) 서열 번호: 176의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역.

[0698] (171) 서열 번호: 188의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%,

85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역.

[0699] (172) 서열 번호: 196의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역.

[0700] (173) 서열 번호: 202의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역.

[0701] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 상기 (1) 내지 (76) 중 어느 하나에 따른 VH 영역, 및 상기 (77) 내지 (173) 중 어느 하나에 따른 VL 영역을 포함한다.

[0702] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[0703] 서열 번호: 289의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및

[0704] 서열 번호: 297의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역을 포함한다.

[0705] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[0706] (i) 서열 번호: 315의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 하나 이상(예컨대, 2개)의 폴리펩타이드; 및

[0707] (ii) 서열 번호: 317의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 하나 이상(예컨대, 2개)의 폴리펩타이드를 포함하거나, 또는 이로 이루어진다.

[0708] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[0709] (i) 서열 번호: 331의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 하나 이상(예컨대, 2개)의 폴리펩타이드; 및

[0710] (ii) 서열 번호: 317의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 중 하나의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 하나 이상(예컨대, 2개)의 폴리펩타이드를 포함하거나, 또는 이로 이루어진다.

[0711] 하나 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 본 발명에 따른 구현예에서, 치환은 예를 들면, 하기 표에 따른 보존적 치환일 수 있다. 일부 구현예에서, 중간 컬럼 내 동일한 블록 내 아미노산은 치환된다. 일부 구현예에서, 최우측 컬럼 내 동일한 라인내 아미노산은 치환된다:

[0712]

| | | |
|---|---|---|
| 지방족 | 비-극성 | GAP |
| | | ILV |
| | 극성 – 하전되지 않음 | CSTM |
| | | NQ |
| | 극성 - 하전됨 | DE |
| | | KR |
| 방향족 | | HFWY |

[0713] 일부 구현예에서, 치환(들)은 기능적으로 보존될 수 있다. 즉, 일부 구현예에서, 치환은 등가의 비치환된 분자와 비교하여 치환을 포함하는 항원-결합 분자의 하나 이상의 기능적 특성(예컨대, 표적 결합)에 영향을 미치지

않을 수 있다(또는 실질적으로 영향을 미치지 않을 수 있다).

[0714] 항체의 항원-결합 영역의 VH 및 VL 영역은 함께 Fv 영역을 구성한다. 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 항원-결합 분자는 VISTA에 결합하는 Fv 영역을 포함하거나, 또는 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, Fv의 VH 및 VL 영역은 링커 영역에 의해 결합(join)된 단일 폴리펩타이드, 즉, 단일 쇄 Fv(scFv)로서 제공된다.

[0715] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 면역글로불린 중쇄 불변 서열의 하나 이상의 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 면역글로불린 중쇄 불변 서열은 IgG(예컨대, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgA(예컨대, IgA1, IgA2), IgD, IgE 또는 IgM의 중쇄 불변 서열이거나, 또는 이로부터 유래된다.

[0716] 일부 구현예에서, 면역글로불린 중쇄 불변 서열은 사람 면역글로불린 G 1 불변(IGHG1; UniProt: P01857-1, v1; 서열 번호: 205)이다. 서열 번호: 205의 1 내지 98번 위치는 CH1 영역(서열 번호: 206)을 형성한다. 서열 번호: 205의 99 내지 110번 위치는 CH1과 CH2 영역 사이에 힌지 영역(hinge region)(서열 번호: 207)을 형성한다. 서열 번호: 205의 111 내지 223번 위치는 CH2 영역(서열 번호: 208)을 형성한다. 서열 번호: 205의 224 내지 330번 위치는 CH3 영역(서열 번호: 209)을 형성한다.

[0717] 예시된 항원-결합 분자는 pFUSE-CHIg-hG1을 사용하여 제조할 수 있고, 이는 CH3 영역 내에 치환 D356E, L358M(EU 번호매김에 따라 번호매김된 위치)을 포함한다. pFUSE-CHIg-hG1에 의해 암호화된 CH3 영역의 아미노산 서열은 서열 번호: 210에 나타나 있다. CH3 영역이 본원에 기술된 바와 같은 항원-결합 분자의 Fc 영역에 대한 변형에 따라 추가의 치환과 함께 제공될 수 있음은 인식될 것이다.

[0718] 일부 구현예에서, CH1 영역은 서열 번호: 206의 서열, 또는 서열 번호: 206의 아미노산 서열에 대해 적어도 60%, 바람직하게는 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 또는 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, CH1-CH2 힌지 영역은 서열 번호: 207의 서열, 또는 서열 번호: 207의 아미노산 서열에 대해 적어도 60%, 바람직하게는 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 또는 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, CH2 영역은 서열 번호: 208, 또는 서열 번호: 208의 아미노산 서열에 대해 적어도 60%, 바람직하게는 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 또는 이로 이루어진다. 일부 구현예에서, CH3 영역은 서열 번호: 209 또는 210, 또는 서열 번호: 209 또는 210의 아미노산 서열에 대해 적어도 60%, 바람직하게는 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 또는 이로 이루어진다.

[0719] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 면역글로불린 경쇄 불변 서열 중 하나 이상의 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 면역글로불린 경쇄 불변 서열은 사람 면역글로불린 카파 불변(IGKC; Cκ; UniProt: P01834-1, v2; 서열 번호: 211)이다. 일부 구현예에서, 면역글로불린 경쇄 불변 서열은 사람 면역글로불린 람다 불변(IGLC; Cλ), 예컨대, IGLC1, IGLC2, IGLC3, IGLC6 또는 IGLC7이다. 일부 구현예에서, CL 영역은 서열 번호: 211의 서열, 또는 서열 번호: 211의 아미노산 서열에 대해 적어도 60%, 바람직하게는 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 또는 이로 이루어진다.

[0720] 항체의 항원-결합 영역의 VL 및 경쇄 불변(CL) 영역, 및 VH 영역 및 중쇄 불변 1(CH1) 영역은 함께 Fab 영역을 구성한다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는VH, CH1, VL 및 CL(예컨대, Cκ 또는 Cλ)을 포함하는 Fab 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, Fab 영역은 VH 및 CH1를 포함하는 폴리펩타이드(예컨대, VH-CH1 융합 폴리펩타이드), 및 VL 및 CL을 포함하는 폴리펩타이드(예컨대, VL-CL 융합 폴리펩타이드)를 포함한다. 일부 구현예에서, Fab 영역은 VH 및 CL을 포함하는 폴리펩타이드(예컨대, VH-CL 융합 폴리펩타이드) 및 VL 및 CH를 포함하는 폴리펩타이드(예컨대, VL-CH1 융합 폴리펩타이드)를 포함하는데; 즉, 일부 구현예에서, Fab 영역은 CrossFab 영역이다. 일부 구현예에서, Fab 또는 CrossFab의 VH, CH1, VL 및 CL 영역은 링커 영역에 의해 결합된 단일 폴리펩타이드로서, 즉, 단일 쇄 Fab(scFab) 또는 단일 쇄 CrossFab(scCrossFab)로서 제공된다.

[0721] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 VISTA에 결합하는 Fab 영역을 포함하거나, 또는 이로 이루어진다.

[0722] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 항원-결합 분자는 VISTA에 결합하는 전체 항체를 포함하거나, 또는 이로 이루어진다. 본원에 사용된 바와 같은, "전체 항체"는 면역글로불린(Ig)의 구조와 실질적으로 유사한 구조를 갖는 항체를 지칭한다. 상이한 종류의 면역글로불린 및 이의 구조는 예컨대, 문헌: Schroeder and Cavacini J

Allergy Clin Immunol. (2010) 125(202): S41-S52에 기술되어 있고, 이는 이의 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0723] G 유형의 면역글로불린(즉, IgG)은 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 ~150 kDa 당단백질이다. N-말단으로부터 C-말단까지, 중쇄는 VH에 이어서 3개의 불변 도메인(CH1, CH2 및 CH3)을 포함하는 중쇄 불변 영역을 포함하고, 유사하게 경쇄는 VL에 이어 CL을 포함한다. 중쇄에 따라, 면역글로불린은 IgG(예컨대, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgA(예컨대, IgA1, IgA2), IgD, IgE, 또는 IgM로서 분류된다. 경쇄는 카파(κ) 또는 람다(λ)일 수 있다.

[0724] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 항원-결합 분자는 VISTA에 결합하는 IgG(예컨대, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgA(예컨대, IgA1, IgA2), IgD, IgE, 또는 IgM을 포함하거나, 또는 이로 이루어진다.

[0725] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 VISTA에 대해 적어도 1가의 결합이다. 결합 원자가는 주어진 항원성 결정인자에 대한 항원-결합 분자 내 결합 부위의 수를 지칭한다. 따라서, 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 VISTA에 대한 적어도 하나의 결합 부위를 포함한다.

[0726] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 VISTA에 대해 하나 이상의 결합 부위, 예컨대, 2, 3 또는 4개의 결합 부위를 포함한다. 결합 부위는 동일하거나 상이할 수 있다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 VISTA에 대해 예컨대, 2가, 3가 또는 4가이다.

[0727] 본 발명의 양태는 다중특이적인(multispecific) 항원-결합 분자에 관한 것이다. "다중특이적"은 항원-결합 분자가 하나 이상의 표적에 대해 특이적인 결합을 나타냄을 의미한다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 이특이적인 항원-결합 분자이다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 적어도 2개의 상이한 항원-결합 도메인(즉, 예컨대, 동일하지 않은 VH 및 VL을 포함하는, 적어도 2개의 항원-결합 도메인)을 포함한다.

[0728] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 VISTA 및 다른 표적(예컨대, VISTA 이외의 항원)에 결합하며, 따라서 적어도 이중특이적이다. 용어 "이중특이적"은 항원-결합 분자가 적어도 2개의 명백한 항원성 결정인자에 특이적으로 결합할 수 있음을 의미한다.

[0729] 본 발명에 따른 항원-결합 분자(예컨대, 다중특이적 항원-결합 분자)는 이에 대해 항원-결합 분자가 특이적인 표적에 결합할 수 있는 항원-결합 분자를 포함할 수 있음이 인식될 것이다. 예를 들면, VISTA에 결합할 수 있는 항원-결합 분자 및 VISTA 이외의 항원은 다음을 포함할 수 있다: (i) VISTA에 결합할 수 있는 항원-결합 분자, 및 (ii) VISTA 이외의 항원에 결합할 수 있는 항원-결합 분자.

[0730] 본 발명에 따른 항원-결합 분자(예컨대, 다중특이적인 항원-결합 분자)는 이에 대해 항원-결합 분자가 특이적인 표적에 결합할 수 있는 항원-결합 폴리펩타이드 또는 항원-결합 폴리펩타이드 복합체를 포함할 수 있음이 또한 인식될 것이다. 예를 들면, 본 발명에 따른 항원-결합 분자는 예컨대, (i) 경쇄 폴리펩타이드(구조 VL-CL을 포함함) 및 중쇄 폴리펩타이드(구조 VH-CH1-CH2-CH3를 포함함)를 포함하는, VISTA에 결합할 수 있는 항원-결합 폴리펩타이드 복합체, 및 (ii) 경쇄 폴리펩타이드(구조 VL-CL을 포함함) 및 중쇄 폴리펩타이드(구조 VH-CH1-CH2-CH3를 포함함)를 포함하는, VISTA 이외의 항원에 결합할 수 있는 항원-결합 폴리펩타이드 복합체를 포함할 수 있다.

[0731] 일부 구현예에서, 보다 큰 항원-결합 분자(예컨대, 다중특이적인 항원-결합 분자)의 구성성분 항원-결합 분자는 예컨대, 보다 큰 항원-결합 분자의 "항원-결합 도메인" 또는 "항원-결합 영역"으로서 지칭될 수 있다.

[0732] 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 VISTA에 결합할 수 있는 항원-결합 분자, 및 VISTA 이외의 항원에 결합할 수 있는 항원-결합 분자를 포함한다. 일부 구현예에서, VISTA 이외의 항원은 면역 세포 표면 분자이다. 일부 구현예에서, VISTA 이외의 항원은 암 세포 항원이다. 일부 구현예에서 VISTA 이외의 항원은 수용체 분자, 예컨대, 세포 표면 수용체이다. 일부 구현예에서 VISTA 이외의 항원은 세포 신호전달 분자, 예컨대, 사이토킨, 케모킨, 인터페론, 인터류킨 또는 림포카인이다. 일부 구현예에서 VISTA 이외의 항원은 성장 인자 또는 호르몬이다.

[0733] 암 세포 항원은 암 세포에 의해 발현되거나 과-발현된 항원이다. 암 세포 항원은 임의의 펩타이드/폴리펩타이드, 당단백질, 지단백질, 글리칸, 당지질, 지질, 또는 이의 단편이다. 암 세포 항원의 발현은 암과 관련될 수 있다. 암 세포 항원은 암 세포에 의해 비정상적으로 발현될 수 있거나(예컨대, 암 세포 항원은 비정상 국재화와 함께 발현될 수 있다), 또는 암 세포에 의해 비정상적인 구조로 발현될 수 있다. 암 세포 항원은 면역 반응을 유발할 수 있다. 일부 구현예에서, 항원은 암 세포의 세포 표면에서 발현된다(즉, 암 세포 항원은 암 세포 표면 항원이다). 일부 구현예에서, 본원에 기술된 항원-결합 분자에 의해 결합된 항원의 일부는

암 세포의 외부 표면 위에 나타난다(즉, 세포외(extracellular)이다). 암 세포 항원은 암-관련된 항원일 수 있다. 일부 구현예에서, 암 세포 항원은 이의 발현이 암의 발달, 진행 또는 증상의 중증도와 관련된 항원이다. 암-관련된 항원은 암의 원인 또는 병리학과 관련될 수 있거나, 암의 결과로서 비정상적으로 발현될 수 있다. 일부 구현예에서, 암 세포 항원은 이의 발현이 비교가능한 비-암성 세포(예컨대, 동일한 조직/세포형으로부터 유래된 비-암성 세포)에 의한 발현의 수준과 비교하여, 암의 세포에 의해 조절되지 않는(예컨대, RNA 및/또는 단백질 수준에서) 항원이다. 일부 구현예에서, 암-관련된 항원은 암 세포에 의해 우선적으로 발현될 수 있고, 비교가능한 비-암성 세포(예컨대, 동일한 조직/세포형으로부터 유래된 비-암성 세포)에 의해 발현되지 않을 수 있다. 일부 구현예에서, 암-관련된 항원은 돌연변이된 종양유전자(oncogene) 또는 돌연변이된 종양 억제인자 유전자의 생성물일 수 있다. 일부 구현예에서, 암-관련된 항원은 과발현된 세포 단백질의 생성물, 종양유전자성 바이러스에 의해 생산된 암 항원, 종양태아 항원, 또는 세포 표면 당지질 또는 당단백질일 수 있다.

[0734] 면역 세포 표면 분자는 면역 세포의 세포 표면에서 또는 세포 표면 상에서 발현된 임의의 펩타이드/폴리펩타이드, 당단백질, 지단백질, 글리칸, 당지질, 지질, 또는 이의 단편일 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자에 의해 결합된 면역 세포 표면 분자의 부분은 면역 세포의 외부 표면 상에 존재한다(즉, 세포 외에 존재한다). 면역 세포 표면 분자는 임의의 면역 세포의 세포 표면에서 발현될 수 있다. 일부 구현예에서, 면역 세포는 조혈 기원의 세포, 예컨대, 호중주, 호산구, 호염기구, 수지 세포, 림프구, 또는 단핵구일 수 있다. 림프구는 예컨대, T 세포, B 세포, 천연 킬러(NK) 세포, NKT 세포 또는 선천성 림프구 세포(ILC), 또는 이의 전구체(예컨대, 흉선 세포 또는 프레-B 세포(pre-B cell))일 수 있다. 일부 구현예에서, 면역 세포 표면 분자는 공자극성 분자(예컨대, CD28, OX40, 4-1BB, ICOS 또는 CD27) 또는 이의 리간드일 수 있다. 일부 구현예에서, 면역 세포 표면 분자는 체크포인트 분자(예컨대, PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, TIGIT 또는 BTLA) 또는 이의 리간드일 수 있다.

[0735] 본 발명에 따른 다중특이적인 항원-결합 분자는 이의 전문이 본원에 참고로 포함된, 문헌: Brinkmann and Kontermann MAbs (2017) 9(2): 182-212에 기술된 양식의 것과 같은 이의의 적합한 양식으로 제공될 수 있다. 적합한 양식은 문헌: Brinkmann and Kontermann MAbs (2017) 9(2): 182-212의 도 2에 나타낸 것: 항체 접합체, 예컨대, $IgG_2$, $F(ab')_2$ 또는 CovX-바디(Body); IgG 또는 IgG-유사 분자, 예컨대, IgG, 키메라 IgG, κλ-바디 일반적인(body common) HC; CH1/CL 융합 단백질, 예컨대, scFv2-CH1/CL, VHH2-CH1/CL; '가변 도메인 만'의 이중특이적인 항원-결합 분자, 예컨대, 탄뎀(tandem) scFv(taFV), 트리플바디(triplebody), 디아바디(diabody)(Db), dsDb, Db(kih), DART, scDB, dsFv-dsFv, tandAbs, 삼중 헤드(triple head), 탄뎀 dAb/VHH, 4가 dAb.VHH; 비-Ig 융합 단백질, 예컨대, $scFv_2$-알부민, scDb-알부민, taFv-알부민, taFv-독소, 미니항체(miniantibody), DNL-$Fab_2$, DNL-$Fab_2$-scFv, DNL-$Fab_2$-IgG-사이토킨$_2$, ImmTAC(TCR-scFv); 변형된 Fc 및 CH3 융합 단백질, 예컨대, scFv-Fc(kih), scFv-Fc(CH3 전하 쌍), scFv-Fc(EW-RVT), scFv-fc(HA-TF), scFv-Fc(SEEDbody), taFv-Fc(kih), scFv-Fc(kih)-Fv, Fab-Fc(kih)-scFv, Fab-scFv-Fc(kih), Fab-scFv-Fc(BEAT), Fab-scFv-Fc(SEEDbody), DART-Fc, scFv-CH3(kih), TriFabs; Fc 융합체, 예컨대, Di-디아바디, scDb-Fc, taFv-Fc, scFv-Fc-scFv, HCAb-VHH, Fab-scFv-Fc, $scFv_4$-Ig, $scFv_2$-Fcab; CH3 융합체, 예컨대, Dia-디아바디, scDb-CH3; IgE/IgM CH2 융합체, 예컨대, scFv-EHD2-scFv, scFvMHD2-scFv; Fab 융합 단백질, 예컨대, Fab-scFv(비바디(bibody)), Fab-$scFv_2$(트리바디(tribody)), Fab-Fv, Fab-dsFv, Fab-VHH, 직교(orthogonal) Fab-Fab; 비-Ig 융합 단백질, 예컨대, DNL-$Fab_3$, DNL-$Fab_2$-scFv, DNL-$Fab_2$-IgG-사이토킨$_2$; 비대칭 IgG 또는 IgG-유사 분자, 예컨대, IgG(kih), IgG(kih) common LC, ZW1 IgG common LC, Biclonics common LC, CrossMab, CrossMab(kih), scFab-IgG(kih), Fab-scFab-IgG(kih), 직교의 Fab IgG(kih), DuetMab, CH3 전하 쌍 + CH1/CL 전하 쌍, 힌지/CH3 전하 쌍, SEED-바디, 듀오바디(Duobody), four-in-one-CrossMab(kih), LUZ-Y common LC; LUZ-Y scFab-IgG, FcFc*; 첨부되고 Fc-변형된(appended and Fc-modified) IgG, 예컨대, IgG(kih)-Fv, IgG HA-TF-Fv, IgG(kih)scFab, scFab-Fc(kih)-scFv2, scFab-Fc(kih)-scFv, half DVD-Ig, DVI-Ig(포-인-원), CrossMab-Fab; 변형된 Fc 및 CH3 융합 단백질, 예컨대, Fab-Fc(kih)-scFv, Fab-scFv-Fc(kih), Fab-scFv-Fc(BEAT), Fab-scFv-Fc-SEEDbody, TriFab; 첨부된 IgGs - HC 융합체, 예컨대, IgG-HC, scFv, IgG-dAb, IgG-taFV, IgG-CrossFab, IgG-직교 Fab, IgG-(CαCβ) Fab, scFv-HC-IgG, 탄뎀 Fab-IgG(직교 Fab) Fab-IgG(CαCβ Fab), Fab-IgG(CR3), Fab-힌지(hinge)-IgG(CR3); 첨부된 IgGs - LC 융합체, 예컨대, IgG-scFv(LC), scFv(LC)-IgG, dAb-IgG; 첨부된 IgGs-HC 및 LC 융합체, 예컨대, DVD-Ig, TVD-Ig, CODV-Ig, $scFv_4$-IgG, Zybody; Fc 융합체, 예컨대, Fab-scFv-Fc, $scFv_4$-Ig; F(ab')2 융합체, 예컨대, $F(ab')_2$-$scFv_2$; CH1/CL 융합 단백질, 예컨대, $scFv_2$-CH1-힌지/CL; 변형

된 IgG, 예컨대, DAF(투-인-원(two-in one)-IgG), DutaMab, Mab$^2$; 및 비-Ig 융합체, 예컨대, DNL-Fab$_4$-IgG를 포함한다.

[0736] 숙련가는 이중특이적인 항원-결합 분자를 설계하고 제조할 수 있다. 이중특이적인 항원-결합 분자를 생산하는 방법은 항원-결합 분자 또는 항체 단편을, 예컨대, 환원성 디설파이드 또는 비-환원성 티오에테르 결합을 사용하여 예를 들면, 이의 전문이 본원에 참고로 포함된, 문헌: Segal and Bast, 2001. Production of Bispecific Antigen-binding molecules. Current Protocols in Immunology. 14:IV:2.13:2.13.1-2.13.16에 기술된 바와 같이, 화학적으로 가교결합시킴을 포함한다. 예를 들면, *N*-석신이미딜-3-(-2-피리딜디티오)-프로피오네이트(SPDP)를 사용하여 힌지 영역 SH- 그룹을 통해 예컨대, Fab 단편을 화학적으로 가교결합시켜, 이황화물-연결된 이중특이적인 F(ab)$_2$ 이종이량체를 생성할 수 있다.

[0737] 이중특이적인 항원-결합 분자를 생산하는 다른 방법은 항체-생산 하이브리도마를 예컨대, 폴리에틸렌 글리콜과 융합시켜, 예를 들면, 문헌: D. M. and Bast, B. J. 2001. Production of Bispecific Antigen-binding molecules. Current Protocols in Immunology. 14:IV:2.13:2.13.1-2.13.16에 기술된 바와 같이, 이중특이적인 항체를 분비할 수 있는 쿼드로마 세포(quadroma cell)를 생산함을 포함한다.

[0738] 본 발명에 따른 이중특이적인 항원-결합 분자는 예컨대, 예를 들면, 이들 둘 다의 전체 내용이 본원에 참고로 포함된, 문헌: Antibody Engineering: Methods and Protocols, Second Edition (Humana Press, 2012), at Chapter 40: Production of Bispecific Antigen-binding molecules: Diabodies and Tandem scFv (Hornig and Färber-Schwarz), 또는 French, How to make bispecific antigen-binding molecules, Methods Mol. Med. 2000; 40:333-339에 기술된 바와 같이, 항원-결합 분자에 대한 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 작제물로부터 발현에 의해 재조합적으로 생산될 수 있다. 예를 들면, 2개의 항원-결합 단편에 대한 경쇄 및 중쇄 가변 도메인(즉, VISTA를 결합시킬 수 있는 항원-결합 단편에 대한 경쇄 및 중쇄 가변 도메인, 및 다른 표적 단백질에 결합할 수 있는 항원-결합 단편에 대한 경쇄 및 중쇄 가변 도메인)을 암호화하고, 항원-결합 단편 사이에 적합한 링커 또는 이량체화 도메인을 암호화하는 서열을 포함하는 DNA 작제물은 분자 클로닝 기술에 의해 제조할 수 있다. 재조합 이중특이적인 항체는 이후에 적합한 숙주 세포(예컨대, 포유동물 숙주 세포) 내에서 발현(예컨대, 시험관 내(in vitro))에 의해 생산한 다음, 발현된 재조합 이중특이적인 항체를 임의로 정제할 수 있다.

[0739] Fc 영역

[0740] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 Fc 영역을 포함한다.

[0741] IgG, IgA 및 IgD 동형에서, Fc 영역은 하나의 폴리펩타이드로부터의 CH2 및 CH3 영역, 및 다른 폴리펩타이드로부터의 CH2 및 CH3 영역으로 구성된다. 2개의 폴리펩타이드로부터의 CH2 및 CH3 영역은 둘 다 Fc 영역을 형성한다. IgM 및 IgE 동형에서 Fc 영역은 3개의 불변 도메인(CH2, CH3 및 CH4), 및 2개의 폴리펩타이드로부터의 CH2 내지 CH4는 함께 Fc 영역을 형성한다.

[0742] Fc 영역은 기능성 효과를 가져오기 위한 Fc 수용체와 면역계의 다른 분자의 상호작용을 제공한다. IgG Fc-매개된 효과기 기능은 예컨대, 문헌: Jefferis et al., Immunol Rev 1998 163:59-76(이의 전문은 본원에 참고로 포함됨)에서 고찰되며, Fc 영역과 면역 세포(예컨대, 대식구, 수지 세포, NK 세포 및 T 세포)에 의해 발현된 Fc 수용체 사이의 상호작용을 통한 면역 세포의 Fc-매개된 보충 및 활성화, 상보체 단백질 C1q에 대한 Fc 영역의 결합을 통한 상보체 경로 구성성분의 보충, 및 후속적인 상보체 캐스케이드(complement cascade)의 활성화를 통해 일어난다.

[0743] Fc-매개된 기능은 Fc 수용체 결합, 항체-의존성 세포 세포독성(ADCC), 항체-의존성 세포-매개된 식세포작용(ADCP), 상보체-의존성 세포독성(CDC), 막 공격 복합체(MAC)의 형성, 세포 탈과립화(cell degranulation), 사이토킨 및/또는 케모킨 생산, 및 항원 프로세싱 및 제시(presentation)을 포함한다.

[0744] Fc-매개된 기능에 영향을 미치는 항체 Fc 영역에 대한 변형은 예컨대, 이의 전문이 본원에 참고로 포함된, 문헌: Wang et al., Protein 세포(2018) 9(1):63-73에 기술된 것과 같이, 당해 분야에 공지되어 있다. 항체 효과기 기능에 영향을 미치는 것으로 공지된 예시적인 Fc 영역 변형은 문헌: Wang et al., Protein 세포(2018) 9(1):63-73의 표 1에 요약되어 있다. 항체 효과기 활성에 영향을 미치는 Fc 영역에 대한 변형은 본원의 아래에 기술되어 있다.

[0745] Fc 영역/CH2/CH3이 참고 치환(들)에 "대해 상응하는" 변형(들)을 포함하는 것으로 기술되어 있는 경우, 상동성 Fc/CH2/CH3 내 등가의 치환(들)이 고려된다. 예시로서, 사람 IgG1내 L234A/L235A 치환(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991에 기술된 바와 같은 EU 번호매김 시스템에 따른 번호매김))은 서열 번호: 256에 따라 번호매김된, 마우스 Ig 감마-2A 쇄 C 영역, A 대립형질의 117 및 118번 위치에서 L의 A로의 치환에 상응한다.

[0746] Fc 영역이 변형을 포함하는 것으로 기술되어 있는 경우, 변형은 함께 FC 영역을 형성하는 폴리펩타이드 쇄 중 하나 또는 둘 다에 위치할 수 있다.

[0747] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 변형을 포함하는 Fc 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 CH2 및/또는 CH3 영역 중 하나 이상 내에 변형을 포함하는 Fc 영역을 포함한다.

[0748] 일부 구현예에서, Fc 영역은 Fc-매개된 기능을 증가시키는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 ADCC를 증가시키는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 ADCP를 증가시키는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 CDC를 증가시키는 변형을 포함한다. Fc-매개된 기능(예컨대, ADCC, ADCP, CDC)을 증가시키는 변형을 포함하는 Fc 영역을 포함하는 항원-결합 분자는 상응하는 변형되지 않은 Fc 영역을 포함하는 항원-결합 분자와 비교하여 증가된 수준의 관련된 효과기 기능을 유도한다.

[0749] 일부 구현예에서, Fc 영역은 Fc 수용체에 대한 결합을 증가시키는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 Fcɣ 수용체에 대한 결합을 증가시키는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 FcɣRI, FcɣRIIa, FcɣRIIb, FcɣRIIc, FcɣRIIIa 및 FcɣRIIIb 중 하나 이상에 대한 결합을 증가시키는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 FcɣRIIIa에 대한 결합을 증가시키는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 FcɣRIIa에 대한 결합을 증가시키는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 FcɣRIIb에 대한 결합을 증가시키는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 FcRn에 대한 결합을 증가시키는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 상보체 단백질에 대한 결합을 증가시키는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 C1q에 대한 결합을 증가시키는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 항원-결합 분자의 육량체화를 촉진시키는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 항원-결합 분자 반감기를 증가시키는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 동시-개입(co-engagement)를 증가시키는 변형을 포함한다.

[0750] 일부 구현예에서, Fc 영역은 문헌: Stavenhagen et al. Cancer Res. (2007)에 기술되어 있는 바와 같은, 치환 F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L의 조합에 상응하는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 문헌: Lazar et al., Proc Natl Acad Sci USA. (2006)103:4005-4010에 기술된 바와 같은 치환 S239D/I332E 또는 S239D/I332E/A330L의 조합에 상응하는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 문헌: Shields et al., J Biol Chem. (2001) 276:6591-6604에 기술된 바와 같은 치환 S298A/E333A/K334A의 조합에 상응하는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 치환 L234Y/L235Q/G236W/S239M/H268D/D270E/S298A의 조합에 상응하는 중쇄 폴리펩타이드 중 하나에 대한 변형, 및 문헌: Mimoto et al., MAbs. (2013): 5:229-236에 기술된 바와 같은, 치환 D270E/K326D/A330M/K334E의 조합에 상응하는 다른 중쇄 폴리펩타이드에 대한 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 문헌: Richards et al., Mol Cancer Ther. (2008) 7:2517-2527에 기술된 바와 같은 치환 G236A/S239D/I332E의 조합에 상응하는 변형을 포함한다.

[0751] 일부 구현예에서, Fc 영역은 문헌: Idusogie et al. J Immunol. (2001) 166(4):2571-5에 기술된 바와 같은 치환 K326W/E333S의 조합에 상응하는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서 Fc 영역은 문헌: Natsume et al., Cancer Res. (2008) 68(10):3863-72에 기술된 바와 같은 치환 S267E/H268F/S324T의 조합에 상응하는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서 Fc 영역은 문헌: Diebolder et al. Science (2014) 343(6176):1260-3에 기술된 바와 같은 변형 E345R/E430G/S440Y의 조합에 상응하는 변형을 포함한다.

[0752] 일부 구현예에서, Fc 영역은 문헌: Dall'Acqua et al. J Immunol. (2002) 169:5171-5180에 기술된 바와 같은 치환 M252Y/S254T/T256E의 조합에 상응하는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서 Fc 영역은 문헌: Zalevsky et al. Nat Biotechnol. (2010) 28:157-159에 기술된 바와 같은 치환 M428L/N434S의 조합에 상응하는 변형을 포함한다.

[0753] 일부 구현예에서, Fc 영역은 문헌: Chu et al., Mol Immunol. (2008) 45:3926-3933에 기술된 바와 같은 치환 S267E/L328F의 조합에 상응하는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서 Fc 영역은 문헌: Shang et al. Biol Chem. (2014) 289:15309-15318에 기술된 바와 같은 치환 N325S/L328F의 조합에 상응하는 변형을 포함한다.

[0754] 일부 구현예에서, Fc 영역은 Fc-매개된 기능을 감소/방지하는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 ADCC를 감소/방지하는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 ADCP를 감소/방지하는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 CDC를 감소/방지하는 변형을 포함한다. Fc-매개된 기능(예컨대, ADCC, ADCP, CDC)을 감소/방지하는 변형을 포함하는 Fc 영역을 포함하는 항원-결합 분자는 상응하는 변형되지 않은 Fc 영역을 포함하는 항원-결합 분자와 비교하여 감소된 수준의 관련된 효과기 기능을 유도한다.

[0755] 일부 구현예에서, Fc 영역은 Fc 수용체에 대한 결합을 감소/방지하는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서 Fc 영역은 Fcɣ 수용체에 대한 결합을 감소/방지하는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서 Fc 영역은 FcɣRI, FcɣRIIa, FcɣRIIb, FcɣRIIc, FcɣRIIIa 및 FcɣRIIIb 중 하나 이상에 대한 결합을 감소/방지하는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서 Fc 영역은 FcɣRIIIa에 대한 결합을 감소/방지하는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서 Fc 영역은 FcɣRIIa에 대한 결합을 감소/방지하는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서 Fc 영역은 FcɣRIIb에 대한 결합을 감소/방지하는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서 Fc 영역은 상보체 단백질에 대한 결합을 감소/방지하는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서 Fc 영역은 C1q에 대한 결합을 감소/방지하는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서 Fc 영역은 N297에 상응하는 아미노산 잔기에 글리코실화를 감소/방지하는 변형을 포함한다.

[0756] 일부 구현예에서, Fc 영역은 하나 이상의 Fc-매개된 기능을 유도할 수 없다(즉, 관련된 Fc-매개된 기능(들)을 유발하는 능력을 결여한다). 따라서, 이러한 Fc 영역을 포함하는 항원-결합 분자는 또한 관련 기능(들)을 유도하는 능력을 결여한다. 이러한 항원-결합 분자는 관련 기능(들)이 고갈된 것으로 기술될 수 있다.

[0757] 일부 구현예에서 Fc 영역은 ADCC를 유도할 수 없다. 일부 구현예에서 Fc 영역은 ADCP를 유도할 수 없다. 일부 구현예에서 Fc 영역은 CDC를 유도할 수 없다. 일부 구현예에서 Fc 영역은 ADCC를 유도할 수 없고/없거나 ADCP를 유도할 수 없고/없거나 CDC를 유도할 수 없다.

[0758] 일부 구현예에서 Fc 영역은 Fc 수용체에 결합할 수 없다. 일부 구현예에서 Fc 영역은 Fcɣ 수용체에 결합할 수 없다. 일부 구현예에서 Fc 영역은 FcɣRI, FcɣRIIa, FcɣRIIb, FcɣRIIc, FcɣRIIIa 및 FcɣRIIIb 중 하나 이상에 결합할 수 없다. 일부 구현예에서 Fc 영역은 FcɣRIIIa에 결합할 수 없다. . 일부 구현예에서 Fc 영역은 FcɣRIIa에 결합할 수 없다. 일부 구현예에서 Fc 영역은 FcɣRIIb에 결합할 수 없다. 일부 구현예에서 Fc 영역은 FcRn에 결합할 수 없다. 일부 구현예에서 Fc 영역은 상보체 단백질에 결합할 수 없다. 일부 구현예에서 Fc 영역은 C1q에 결합할 수 없다. 일부 구현예에서 Fc 영역은 N297에 상응하는 아미노산 잔기에서 글리코실화되지 않는다.

[0759] 일부 구현예에서 Fc 영역은 문헌: Leabman et al., MAbs. (2013) 5:896-903에 기술된 바와 같은 N297A 또는 N297Q 또는 N297G에 상응하는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서 Fc 영역은 문헌: Alegre et al., J Immunol. (1992) 148:3461-3468에 기술된 바와 같은 L235E에 상응하는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서 Fc 영역은 문헌: Xu et al., Cell Immunol. (2000) 200:16-26에 기술된 바와 같은 치환 L234A/L235A 또는 F234A/L235A의 조합에 상응하는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서 Fc 영역은 문헌: Schlothauer et al., Protein Engineering, Design and Selection (2016), 29(10):457-466에 기술된 바와 같은 P329A 또는 P329G에 상응하는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서 Fc 영역은 문헌: Lo et al. J. Biol. Chem (2017) 292(9):3900-3908에 기술된 바와 같은 치환 L234A/L235A/P329G의 조합에 상응하는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서 Fc 영역은 문헌: Rother et al., Nat Biotechnol. (2007) 25:1256-1264에 기술된 치환의 조합에 상응하는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서 Fc 영역은 문헌: Newman et al., Clin. Immunol. (2001) 98:164-174에 기술된 바와 같은 치환 S228P/L235E의 조합에 상응하는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서 Fc 영역은 문헌: An et al., MAbs. (2009) 1:572-579에 기술된 바와 같은 치환 H268Q/V309L/A330S/P331S의 조합에 상응하는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서 Fc 영역은 문헌: Vafa et al., Methods. (2014) 65:114-126에 기술된 바와 같은 치환 V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S의 조합에 상응하는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서 Fc 영역은 제US 2015/0044231 A1호에 기술된 바와 같은 치환 L234A/L235E/G237A/A330S/P331S의 조합에 상응하는 변형을 포함한다.

[0760] 치환 "L234A/L235A"의 조합 및 상응하는 치환(예컨대, 사람 IgG4에서. F234A/L235A와 같은)은 Fcɣ 수용체에 대한 Fc의 결합을 파괴하고 ADCC, ADCP를 억제하며, 또한 C1q 결합을 감소시킴으로써 CDC를 억제함이 알려져 있다(이의 전문이 본원에 참고로 포함된 문헌: Schlothauer et al., Protein Engineering, Design and Selection (2016), 29(10):457-466). 치환 "P329G" 및 "P329A"는 C1q 결합(및 이에 의해 CDC)를 감소시킨다. "N297"의 "A", "G" 또는 "Q"로의 치환은 글리코실화를 제거하고, 이에 의해 C1q 및 Fcɣ 수용체에 대한 Fc 결합을 감소시키고, 따라서 CDC 및 ADCC를 감소시킴이 알려져 있다. 문헌: Lo et al. J. Biol. Chem (2017) 292(9):3900-

3908(이의 전문은 본원에 참고로 포함된다)은 치환 L234A/L235A/P329G의 조합이 뮤린 IgG2a 및 사람 IgG1 둘 다에서 상보체 결합 및 고정 뿐만 아니라 Fc γ 수용체 의존적인, 항체-의존적인, 세포-매개된 세포독성을 제거함을 보고하고 있다.

[0761] IgG1 Fc에서 치환 L234A/L235E/G237A/A330S/P331S의 조합은 제US 2015/0044231 A1호에 식세포작용(phagocytosis), ADCC 및 CDC의 유도를 파괴(abolishment)하는 것으로 개시되어 있다.

[0762] 일부 구현예에서 Fc 영역은 문헌: Silva et al., J Biol Chem. (2015) 290(9):5462-5469에 기술된 바와 같은 치환 S228P에 상응하는 변형을 포함한다. IgG4 Fc 내 치환 S228P는 Fab-아암(arm) 교환을 감소시킨다(Fab 아암 교환은 바람직하지 않다).

[0763] 일부 구현예에서 Fc 영역은 치환 L234A/L235A의 조합에 상응하는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서 Fc 영역은 치환 P329G에 상응하는 변형을 포함한다. 일부 구현예에서 Fc 영역은 치환 N297Q에 상응하는 변형을 포함한다.

[0764] 일부 구현예에서 Fc 영역은 치환 L234A/L235A/P329G의 조합에 상응하는 변형을 포함한다.

[0765] 일부 구현예에서 Fc 영역은 치환 L234A/L235A/P329G/N297Q의 조합에 상응하는 변형을 포함한다.

[0766] 일부 구현예에서 Fc 영역은 치환 L234A/L235E/G237A/A330S/P331S의 조합에 상응하는 변형을 포함한다.

[0767] 일부 구현예에서 Fc 영역은 예컨대, IgG4에서, 치환 S228P에 상응하는 변형을 포함한다.

[0768] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 Fc 영역 내 연합을 촉진하는 CH2 및 CH3 중 하나 이상 내에 변형을 포함하는 Fc 영역을 포함한다. 항원-결합 분자의 구성성분 폴리펩타이드의 재조합-공-발현(co-expression) 및 후속적인 연합은 수개의 가능한 조합을 이끈다. 재조합 생산에서 항원-결합 분자 내 폴리펩타이드의 목적한 조합의 수율을 증진시키기 위하여, 중쇄 폴리펩타이드의 바람직한 조합의 연합을 촉진하는 Fc 영역 변형(들)을 도입시키는 것이 유리하다. 변형은 예컨대, 상이한 폴리펩타이드 쇄의 CH2 및/또는 CH3 영역 사이의 소수성 및/또는 정전기성 상호작용을 촉진할 수 있다. 적합한 변형은 예컨대, 문헌: Ha et al., Front. Immnol (2016) 7:394에 기술되어 있고, 이는 이의 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0769] 일부 구현예에서 본 발명의 항원 항원-결합 분자는 문헌: Ha et al., Front. Immnol (2016) 7:394의 표 1에 나타낸 바와 같은, 다음 양식 중 하나에 따른 Fc 영역의 CH3 영역 내에 쌍을 이룸 치환을 포함하는 Fc 영역을 포함한다: KiH, KiH$_{s-s}$, HA-TF, ZW1, 7.8.60, DD-KK, EW-RVT, EW-RVT$_{s-s}$, SEED 또는 A107.

[0770] 일부 구현예에서, Fc 영역은 예컨대, 문헌: 제 US 7,695,936호 및 Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001)에 기술된 바와 같은, 예컨대, "놉-인투-홀(knob-into-hole)" 또는 "KiH" 변형을 포함한다. 이러한 구현예에서, Fc 영역의 CH3 영역 중 하나는 "놉(knob)" 변형을 포함하고, 다른 CH3 영역은 "홀(hole)" 변형을 포함한다. "놉" 및 "홀" 변형은 각각의 CH3 영역 내에 위치함으로써 "놉"은 "홉" 내에 위치하여 폴리펩타이드의 이종이량체화(heterodimerisation)를 촉진할 수 있고(및 단독이량체화(homodimerisation)를 억제할 수 있다)/있거나 이종이량체를 안정화시킬 수 있다. 놉은 작은 쇄를 가진 아미노산을 보다 큰 측쇄을 가진 것(예컨대, 타이로신 또는 트립토판)으로 치환함으로써 작제된다. 홀은 보다 큰 측쇄를 갖는 아미노산을 보다 작은 측쇄를 가진 것(예컨대, 알라닌 또는 트레오닌)으로 치환시킴으로써 생성된다.

[0771] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자의 Fc 영역의 CH3 영역 중 하나는 치환(본원의 Fc, CH2 및 CH 영역 내 위치/치환의 번호매김은 문헌: Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991에 기술된 바와 같이 EU 번호매김 시스템에 따른다) T366W를 포함하고, Fc 영역의 다른 CH3 영역은 치환 Y407V를 포함한다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자의 Fc 영역의 CH3 영역 중 하나는 치환 T366W를 포함하고, Fc 영역의 다른 CH3 영역은 치환 T366S 및 L368A를 포함한다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자의 Fc 영역의 CH3 영역 중 하나는 치환 T366W를 포함하고, Fc 영역의 다른 CH3 영역은 치환 Y407V, T366S 및 L368A를 포함한다.

[0772] 일부 구현예에서, Fc 영역은 예컨대, 제WO 2014/131694 A1호에 기술된 바와 같은 "DD-KK" 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, CH3 영역 중 하나는 치환 K392D 및 K409D를 포함하고, Fc 영역의 다른 CH3 영역은 치환 E356K 및 D399K를 포함한다. 변형은 CH3 영역 사이에 정전기성 상호작용을 촉진한다.

[0773] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 '듀오바디' 양식으로 지칭된, 문헌: Labrijn et al., Proc Natl Acad Sci U S A. (2013) 110(13):5145-50에 기술된 바와 같이 변형된 Fc 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, CH3 영역 중 하나는 치환 K409R을 포함하고, Fc 영역 중 다른 CH3 영역은 치환 K405L을 포함한다.

[0774] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 문헌: Strop et al., J Mol Biol. (2012) 420(3):204-19에 기술된 바와 같은 "EEE-RRR" 변형을 포함하는 Fc 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, CH3 영역 중 하나는 치환 D221E, P228E 및 L368E를 포함하고, Fc 영역의 다른 CH3 영역은 치환 D221R, P228R 및 K409R을 포함한다.

[0775] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 문헌: Choi et al., Mol Cancer Ther (2013) 12(12):2748-59에 기술된 "EW-RVT" 변형을 포함하는 Fc 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, CH3 영역 중 하나는 치환 K360E 및 K409W를 포함하고, Fc 영역의 다른 CH3 영역은 치환 Q347R, D399V 및 F405T를 포함한다.

[0776] 일부 구현예에서, CH3 영역 중 하나는 치환 S354C를 포함하고, Fc 영역의 다른 CH3 영역은 치환 Y349C를 포함한다. 이러한 시스테인 잔기의 도입은 Fc 영역의 2개의 CH3 영역 사이에 이황화물 브릿지의 형성을 야기하여, 이종이량체를 추가로 안정화시킨다(Carter (2001), J Immunol Methods 248, 7-15).

[0777] 일부 구현예에서, Fc 영역은 "$KiH_{S-S}$" 변형을 포함한다. 일부 구현예에서, CH3 영역 중 하나는 치환 T366W 및 S354C를 포함하고, Fc 영역의 다른 CH3 영역은 치환 T366S, L368A, Y407V 및 Y349C를 포함한다.

[0778] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 문헌: Davis et al., Protein Eng Des Sel (2010) 23(4):195-202에 기술된 바와 같은 "SEED" 변형을 포함하는 Fc 영역을 포함하며, 여기서 사람 IgG1 CH3 및 IgA CH3의 β-쇄 분절(β-strand segment)은 교환된다.

[0779] 일부 구현예에서, CH3 영역 중 하나는 치환 S364H 및 F405A를 포함하고, Fc 영역의 다른 CH3 영역은 치환 Y349T 및 T394F를 포함한다(참고: 예컨대, Moore et al., MAbs (2011) 3(6):546-57).

[0780] 일부 구현예에서, CH3 영역 중 하나는 치환 T350V, L351Y, F405A 및 Y407V를 포함하고, Fc 영역의 다른 CH3 영역은 치환 T350V, T366L, K392L 및 T394W를 포함한다(참고: 예컨대, Von Kreudenstein et al., MAbs (2013) 5(5):646-54).

[0781] 일부 구현예에서, CH3 영역 중 하나는 치환 K360D, D399M 및 Y407A를 포함하고, Fc 영역의 다른 CH3 영역은 치환 E345R, Q347R, T366V 및 K409V를 포함한다(참고: 예컨대, Leaver-Fay et al., Structure (2016) 24(4):641-51).

[0782] 일부 구현예에서, CH3 영역 중 하나는 치환 K370E 및 K409W를 포함하고, Fc 영역의 다른 CH3 영역은 치환 E357N, D399V 및 F405T를 포함한다(참고: 예컨대, Choi et al., PLoS One (2015) 10(12):e0145349).

[0783] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 Fc γ 수용체에 결합하지 않는 Fc 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIc, FcγRIIIa 및 FcγRIIIb 중 하나 이상에 결합하지 않는 Fc 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 FcγRIIa, FcγRIIb 및 FcγRIIIa 중 하나 이상에 결합하지 않는 Fc 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 FcγRIIa 및 FcγRIIb 중 하나 또는 둘 다에 결합하지 않는 Fc 영역을 포함한다.

[0784] 수용체 단백질(예컨대, Fc 수용체)에 결합하는, Fc 영역, 또는 Fc 영역을 포함하는 항원-결합 분자의 능력은 당해 분야에 잘 공지된 방법, 예를 들면, ELISA, 면역블롯, 면역침전, 표면 플라스몬 공명(Surface Plasmon Resonance; SPR; 참고: Hearty et al., Methods Mol Biol (2012) 907:411-442) 또는 바이오-층 간섭(Bio-Layer Interferometry; BLI; see e.g. Lad et al., (2015) J Biomol Screen 20(4): 498-507)에 따라 분석할 수 있다.

[0785] 본원에 사용된 바와 같은, 참고 단백질에 "대해 결합하지 않는" Fc 영역은 예컨대, ELISA, 면역블롯(예컨대, 웨스턴 블롯), 면역침전, SPR 또는 BLI)에 의해 측정된 바와 같이, 실질적으로 참고 단백질에 대한 결합을 나타내지 않을 수 있다. "실질적으로 결합하지 않는"은 주어진 검정에서 다른 하나에 결합하지 않는 단백질에 대해 측정된 상호작용의 수준보다 유의적으로 더 크지 않은 상호작용의 수준일 수 있다. "실질적으로 결합하지 않는"은 주어진 검정에서 다른 하나에 결합하지 않는 단백질에 대해 측정된 상호작용의 수준의 ≤5배, 예컨대, ≤4배, ≤3배, ≤2.5배, ≤2배 또는 ≤1.5배인 관련 활성의 수준일 수 있다.

[0786] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 FcRn에 결합하는 Fc 영역을 포함한다.

[0787] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 FcRn 영역에 결합하는, 및 FcγRIIa, FcγRIIb 및 FcγRIIIa 중 하나 이상에 결합하지 않는 Fc 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 FcRn에 결합하고, FcγRIIa 및 FcγRIIb 중 하나 또는 둘 다에 결합하지 않는 Fc 영역을 포함한다.

[0788] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 ADCC를 유도하지 않는 Fc 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 ADCP를 유도하지 않는 Fc 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 CDC를 유도하지 않는 Fc 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 ADCC, ADCP 또는 CDC를 유도하지 않는 Fc 영역을 포함한다.

[0789] 본원에 사용된 바와 같은, ADCC/ADCP/CDC를 유도하지 않는(즉, 유도할 수 없는) Fc 영역/항원-결합 분자는 관련 활성에 대한 적절한 검정에서 분석함으로써 측정된 바와 같은, ADCC/ADCP/CDC 활성을 실질적으로 유발하지 않는다. "실질적으로 ADCC/ADCP/CDC 활성이 없는"은 주어진 검정에서 적절한 음성 대조군 분자(예컨대, Fc 영역을 결여하는 항원-결합 분자, 또는 '사일런트' Fc 영역을 포함하는 항원-결합 분자(예컨대, 본원의 상기에 참고로 포함된, 문헌: Schlothauer et al., Protein Engineering, Design and Selection (2016), 29(10):457-466에 기술된 바와 같음))보다 유의적으로 보다 더 크지 않은 ADCC/ADCP/CDC의 수준을 지칭한다. "실질적으로 활성이 없는"은 주어진 검정에서 적절한 음성 대조군 분자에 대해 측정된 활성 수준의 ≤5배, 예컨대, ≤4배, ≤3배, ≤2.5배, ≤2배 또는 ≤1.5배인 관련 활성의 수준일 수 있다.

[0790] ADCC를 유도하는, Fc 영역, 또는 Fc 영역을 포함하는 항원-결합 분자의 능력은, 예컨대, 문헌: Yamashita et al., Scientific Reports (2016) 6:19772 (이의 전문은 본원에 참고로 포함된다)에 기술된 방법에 따라, 또는 예컨대, 문헌: Jedema et al., Blood (2004) 103: 2677-82(이의 전문은 본원에 참고로 포함된다)에 기술된 바와 같은 $^{51}Cr$ 방출 검정에 의해 분석할 수 있다. ADCP를 유도하는, Fc 영역, 또는 Fc 영역을 포함하는 항원-결합 분자의 능력은 예컨대, 문헌: Kamen et al., J Immunol (2017) 198 (1 Supplement) 157.17(이의 전문은 본원에 참고로 포함된다)에 기술된 방법에 따라 분석할 수 있다. CDC를 유도하는, Fc 영역, 또는 Fc 영역을 포함하는 항원-결합 분자의 능력은 예컨대, 문헌: Schlothauer et al., Protein Engineering, Design and Selection (2016), 29(10):457-466(본원의 상기에 참고로 포함된다)에 기술된 바와 같은, C1q 결합 검정을 사용하여 분석할 수 있다.

[0791] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 서열 번호: 254에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함하는 Fc 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 서열 번호: 257에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함하는 Fc 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 서열 번호: 259에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함하는 Fc 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 서열 번호: 260에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함하는 Fc 영역을 포함한다.

[0792] 일부 구현예에서 본 발명의 항원-결합 분자는 Fc 영역을 결여한다.

[0793] Fc 수용체

[0794] Fc 수용체는 면역글로불린의 Fc 영역에 결합하는 폴리펩타이드이다. Fc 수용체 구조 및 기능은 예컨대, 둘 다 이의 전문이 본원에 참고로 포함된, 문헌: Masuda et al., Inflamm Allergy Drug Targets (2009) 8(1): 80-86, 및 Bruhns, Blood (2012) 119:5640-5649에서 고찰된다.

[0795] Fc 수용체는 조혈 세포, 예를 들면, 대식구, 호중구, 수지 세포, 호산수, 호염기구, 비만 세포, 및 NK 세포의 표면에서 발현된다. 이는 IgG-결합 Fc γ 수용체, IgE에 대한 고-친화성 수용체(FcεRI), IgA 수용체, 및 IgA 및 IgM에 대한 중합체성 Ig 수용체를 포함한다. 신생아의 Fc 수용체(FcRn)는 IgG에 대한 추가의 Fc 수용체이고 상피 장벽(epithelial barrier)을 가로지르는 IgG 수송(통과세포외배출(transcytosis)), 분해로부터 IgG의 보호, 및 항원 제시와 관련된다. 사람은 Fc γ 수용체의 6개의 상이한 부류를 갖는다(마우스 오르솔로그는 괄호 안에 나타낸다): FcγRI(mFcγRI), FcγRIIa(mFcγRIII), FcγRIIb(mFcγRIIb), FcγRIIc, FcγRIIIa(mFcγRIV) 및 FcγRIIIb.

[0796] FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIc 및 FcγRIIIa는 이의 세포내 도메인에 면역수용체 타이로신-기반 활성화 모티프(immunoreceptor tyrosine-based activation motif; ITAM)를 포함하고, Fc에 의한 연결은 수용체를 발현하는 세포의 활성화를 이끈다. FcγRIIb는 이의 세포내 도메인 내에 면역수용체 타이로신-기반 억제성 모티프(immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif; ITIM)를 포함하고, 세포 활성화 및 탈과립화, 세포 증식,

세포내이입(endocytosis), 및 Fc에 의한 연결시 식세포작용을 조절한다.

[0797] 본 명세서에서, "Fcɣ 수용체"는 어떠한 종으로부터 유래될 수 있고, 임의의 종으로부터의 동형, 단편, 변이체(예를 들면, 돌연변이체) 또는 동족체를 포함한다. 유사하게, "FcɣRI", "FcɣRIIa", "FcɣRIIb", "FcɣRIIc", "FcɣRIIIa" 및 "FcɣRIIIb"는 각각 임의의 종으로부터의 FcɣRI/FcɣRIIa/FcɣRIIb/FcɣRIIc/FcɣRIIIa/FcɣRIIIb를 지칭하고, 임의의 종으로부터의 동형, 단편, 변이체(예를 들면, 돌연변이체) 또는 동족체를 포함한다.

[0798] 일부 구현예에서, Fcɣ 수용체(예컨대, FcɣRI/FcɣRIIa/FcɣRIIb/FcɣRIIc/FcɣRIIIa/FcɣRIIIb)는 포유동물(예컨대, 영장류(레서스, 시노몰구스, 비-사람 영장류 또는 사람) 및/또는 설치류(예컨대, 래트 또는 마우스)로부터 유래된다. 동형, 단편, 변이체 또는 동족체는 주어진 종, 예컨대, 사람으로부터의 Fcɣ 수용체의 성숙하지 않은 또는 성숙한 동형(예컨대, FcɣRI/FcɣRIIa/FcɣRIIb/FcɣRIIc/FcɣRIIIa/FcɣRIIIb)의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 갖는 것으로 임의로 특성화될 수 있다.

[0799] 동형, 단편, 변이체 또는 동족체는 임의로 기능적 특성/활성에 대한 적합한 검정으로 분석함으로써 측정된 바와 같은, 참고 Fcɣ 수용체의 기능적 특성/활성을 갖는, 기능성 동형, 단편, 변이체 또는 동족체일 수 있다. 예를 들면, FcɣRI의 동형, 단편, 변이체 또는 동족체는 예컨대, 사람 IgG1 Fc와의 연합을 나타낼 수 있다.

[0800] 본 명세서에서, "FcRn 수용체"는 임의의 종으로부터 유래될 수 있고, 임의의 종으로부터의 동형, 단편, 변이체(예를 들면, 돌연변이체) 또는 동족체를 포함한다.

[0801] 일부 구현예에서, FcRn 수용체는 포유동물(예컨대, 영장류(레서스, 시노몰구스, 비-사람 영장류 또는 사람) 및/또는 설치류(예컨대, 래트 또는 마우스)로부터 유래된다. 동형, 단편, 변이체 또는 동족체는 주어진 종, 예컨대, 사람으로부터의 FcRn 수용체의 성숙하지 않은 또는 성숙한 동형의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 갖는 것으로 임의로 트정화될 수 있다.

[0802] 동형, 단편, 변이체 또는 동족체는 임의로 예컨대, 기능적 특성/활성에 대한 적합한 검정으로 분석함으로써 측정된 바와 같은, 참고 FcRn의 기능적 특성/활성을 갖는, 기능적 동형, 단편, 변이체 또는 동족체일 수 있다. 예를 들면, FcRn의 동형, 단편, 변이체 또는 동족체는 예컨대, 사람 IgG1 Fc와의 연합을 나타낼 수 있다.

[0803] 폴리펩타이드

[0804] 본 발명은 또한 항원-결합 분자의 폴리펩타이드 구성성분을 제공한다. 폴리펩타이드는 단리되거나 또는 실질적으로 정제된 형태로 제공될 수 있다.

[0805] 본 발명의 항원-결합 분자는 폴리펩타이드의 복합체일 수 있거나, 또는 이를 포함할 수 있다.

[0806] 본 명세서에서 폴리펩타이드가 하나 이상의 도메인 또는 영역을 포함하는 경우, 복수의 도메인/영역이 바람직하게는 동일한 폴리펩타이드 쇄 내에 존재함이 익숙할 것이다. 즉, 폴리펩타이드는 하나 이상의 도메인을 포함하거나 또는 영역은 도메인/영역을 포함하는 융합 폴리펩타이드이다.

[0807] 일부 구현예에서 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 본원에 기술된 바와 같은 VH를 포함하거나, 또는 이로 이루어진다. 일부 구현예에서 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 본원에 기술된 바와 같은 VL을 포함하거나, 또는 이로 이루어진다.

[0808] 일부 구현예에서, 폴리펩타이드는 하나 이상의 항체 중쇄 불변 영역(CH)을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리펩타이드는 하나 이상의 항원 경쇄 불변 영역(CL)을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리펩타이드는 면역글로불린(Ig)의 CH1, CH2 영역 및/또는 CH3 영역을 포함한다.

[0809] 일부 구현예에서 폴리펩타이드는 면역글로불린 중쇄 불변 서열의 하나 이상의 영역을 포함한다. 일부 구현예에서 폴리펩타이드는 본원에 기술된 바와 같은 CH1 영역을 포함한다. 일부 구현예에서 폴리펩타이드는 본원에 기술된 바와 같은 CH1-CH2 힌지 영역을 포함한다. 일부 구현예에서 폴리펩타이드는 본원에 기술된 바와 같은 CH2 영역을 포함한다. 일부 구현예에서 폴리펩타이드는 본원에 기술된 바와 같은 CH3 영역을 포함한다.

[0810] 일부 구현예에서 폴리펩타이드는 아미노산 치환의 다음의 아미노산 치환/조합 중 어느 하나를 포함하는 CH2 및/또는 CH3 영역을 포함한다: F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L; S239D/I332E; S239D/I332E/A330L; S298A/E333A/K334A; L234Y/L235Q/G236W/S239M/H268D/D270E/S298A; D270E/K326D/A330M/K334E; G236A/S239D/I332E; K326W/E333S; S267E/H268F/S324T; E345R/E430G/S440Y; M252Y/S254T/T256E; M428L/N434S;

S267E/L328F; N325S/L328F; N297A; N297Q; N297G; L235E; L234A/L235A; F234A/L235A; P329A; P329G; L234A/L235A/P329G; H268Q/V309L/A330S/P331S; 및 V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S.

[0811] 일부 구현예에서 폴리펩타이드는 다음의 아미노산 치환/아미노산 치환의 조합 중 어느 하나를 포함하는 CH3 영역을 포함한다(예컨대, 본원의 상기에 참고로 포함된 문헌: Ha et al., Front. Immnol (2016) 7:394의 표 1에 나타냄): T366W; T366S, L368A 및 Y407V; T366W 및 S354C; T366S, L368A, Y407V 및 Y349C; S364H 및 F405A; Y349T 및 T394F; T350V, L351Y, F405A 및 Y407V; T350V, T366L, K392L 및 T394W; K360D, D399M 및 Y407A; E345R, Q347R, T366V 및 K409V; K409D 및 K392D; D399K 및 E356K; K360E 및 K409W; Q347R, D399V 및 F405T; K360E, K409W 및 Y349C; Q347R, D399V, F405T 및 S354C; K370E 및 K409W; 및 E357N, D399V 및 F405T.

[0812] 일부 구현예에서 폴리펩타이드의 CH2 및/또는 CH3 영역은 폴리펩타이드와 CH2 및/또는 CH3 영역을 포함하는 다른 폴리펩타이드의 연합을 촉진하기 위한 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다.

[0813] 일부 구현예에서 폴리펩타이드는 면역글로불린 경쇄 불변 서열의 하나 이상의 영역을 포함한다. 일부 구현예에서 폴리펩타이드는 본원에 기술된 바와 같은 CL 영역을 포함한다.

[0814] 일부 구현예에서 폴리펩타이드는 면역글로불린 중쇄 불변 서열의 하나 이상의 영역을 결여한다. 일부 구현예에서 폴리펩타이드는 CH2 영역을 결여한다. 일부 구현예에서 폴리펩타이드는 CH3 영역을 결여한다. 일부 구현예에서 폴리펩타이드는 CH2 영역을 결여하고 또한 CH3 영역을 결여한다.

[0815] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 폴리펩타이드는 N-으로부터 C-말단까지 다음 중 하나에 따른 구조를 포함한다:

[0816] (i) VH

[0817] (ii) VL

[0818] (iii) VH-CH1

[0819] (iv) VL-CL

[0820] (v) VL-CH1

[0821] (vi) VH-CL

[0822] (vii) VH-CH1-CH2-CH3

[0823] (viii) VL-CL-CH2-CH3

[0824] (ix) VL-CH1-CH2-CH3

[0825] (x) VH-CL-CH2-CH3

[0826] 또한 본 발명에 의해 본 발명의 폴리펩타이드로 구성된 항원-결합 분자가 제공된다. 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 다음의 폴리펩타이드의 조합 중 하나를 포함한다:

[0827] (A) VH + VL

[0828] (B) VH-CH1 + VL-CL

[0829] (C) VL-CH1 + VH-CL

[0830] (D) VH-CH1-CH2-CH3 + VL-CL

[0831] (E) VH-CL-CH2-CH3 + VL-CH1

[0832] (F) VL-CH1-CH2-CH3 + VH-CL

[0833] (G) VL-CL-CH2-CH3 + VH-CH1

[0834] (H) VH-CH1-CH2-CH3 + VL-CL-CH2-CH3

[0835] (I) VH-CL-CH2-CH3 + VL-CH1-CH2-CH3

[0836] 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 상기 (A) 내지 (I)에 나타낸 조합의 폴리펩타이드 중 하나 이상을 포함한다. 예로서, 상기 (D)를 참고로, 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 구조 VH-CH1-CH2-CH3를 포함하는 2개의 폴리펩

타이드, 및 구조 VL-CL를 포함하는 2개의 폴리펩타이드를 포함한다.

[0837] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 다음의 폴리펩타이드의 조합 중 하나를 포함한다:

[0838] (J) VH (항-VISTA) + VL (항-VISTA)

[0839] (K) VH (항-VISTA)-CH1 + VL (항-VISTA)-CL

[0840] (L) VL (항-VISTA)-CH1 + VH (항-VISTA)-CL

[0841] (M) VH (항-VISTA)-CH1-CH2-CH3 + VL (항-VISTA)-CL

[0842] (N) VH (항-VISTA)-CL-CH2-CH3 + VL (항-VISTA)-CH1

[0843] (O) VL (항-VISTA)-CH1-CH2-CH3 + VH (항-VISTA)-CL

[0844] (P) VL (항-VISTA)-CL-CH2-CH3 + VH (항-VISTA)-CH1

[0845] (Q) VH (항-VISTA)-CH1-CH2-CH3 + VL (항-VISTA)-CL-CH2-CH3

[0846] (R) VH (항-VISTA)-CL-CH2-CH3 + VL (항-VISTA)-CH1-CH2-CH3

[0847] 여기서: "VH (항-VISTA)"는 본원에 기술된 바와 같은, 예컨대, (1) 내지 (76)에 정의된 바와 같은 VISTA에 결합할 수 있는 항원-결합 분자의 VH를 지칭하고; "VL (항-VISTA)"는 본원에 기술된 바와 같은, 예컨대, (77) 내지 (173) 중 하나에 정의된 바와 같은, VISTA에 결합할 수 있는 항원-결합 분자의 VL을 지칭한다.

[0848] 일부 구현예에서 폴리펩타이드는 서열 번호: 212 내지 243, 248 내지 250, 258, 266 또는 311 내지 321 중 하나의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 이로 이루어진다.

[0849] 링커 및 추가의 서열

[0850] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자 및 폴리펩타이드는 힌지 영역을 포함한다. 일부 구현예에서 힌지 영역은 CH1 영역과 CH2 영역 사이에 제공된다. 일부 구현예에서, 힌지 영역은 CL 영역과 CH2 영역 사이에 제공된다. 일부 구현예에서, 힌지 영역은 서열 번호: 207의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진다.

[0851] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자 및 폴리펩타이드는 아미노산 서열 사이의 하나 이상의 링커를 포함한다. 링커 서열은 항원-결합 분자/폴리펩타이드의 VH, VL, CH1-CH2 힌지 영역, CH2 영역 및 CH3 영역 중 하나 이상의 한쪽 또는 양쪽 말단에서 제공될 수 있다.

[0852] 링커 서열은 기술자에게 공지되어 있고, 예를 들면, 이의 전문이 본원에 참고로 포함된, 문헌: Chen et al., Adv Drug Deliv Rev (2013) 65(10): 1357-1369에 기술되어 있다. 일부 구현예에서, 링커 서열은 가요성 링커 (flexible linker) 서열일 수 있다. 가요성 링커 서열은 링커 서열에 의해 연결된 아미노산의 상대적인 이동을 허용한다. 가요성 링커는 기술자에게 공지되어 있고, 수개는 문헌: Chen et al., Adv Drug Deliv Rev (2013) 65(10): 1357-1369에 확인되어 있다. 가요성 링커 서열은 흔히 고 비율의 글리신 및/또는 세린 잔기를 포함한다.

[0853] 일부 구현예에서, 링커 서열은 적어도 하나의 글리신 잔기 및/또는 적어도 하나의 세린 잔기를 포함한다. 일부 구현예에서 링커 서열은 글리신 및 세린 잔기로 이루어진다. 일부 구현예에서, 링커 서열은 1 내지 2개, 1 내지 3개, 1 내지 4개, 1 내지 5개 또는 1 내지 10개의 아미노산의 길이를 갖는다.

[0854] 본 발명의 항원-결합 분자 및 폴리펩타이드는 추가의 아미노산 또는 아미노산의 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 항원-결합 분자 및 폴리펩타이드는 항원-결합 분자/폴리펩타이드의 발현, 폴딩, 트래피킹(trafficking), 프로세싱, 정제 또는 검출을 촉진시키는 아미노산 서열(들)을 포함할 수 있다. 예를 들면, 항원-결합 분자/폴리펩타이드는 임의로 항원-결합 분자/폴리펩타이드의 N- 또는 C- 말단에서 His, (예컨대, 6XHis), Myc, GST, MBP, FLAG, HA, E, 또는 바이오틴 태그(Biotin tag)를 암호화하는 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자/폴리펩타이드는 검출가능한 모이어티, 예컨대, 형광성, 발광성, 면역-검출성, 방사선, 화학적, 핵산 또는 효소 표지를 포함한다.

[0855] 본 발명의 항원-결합 분자 및 폴리펩타이드는 신호 펩타이드(또한 리더 서열 또는 신호 서열로서 공지됨)를 추가로 포함할 수 있다. 신호 펩타이드는 일반적으로 5 내지 30개의 소수성 아미노산의 서열로 이루어지고, 이는 단일 알파 나선을 형성한다. 분비된 단백질 및 세포 표면에서 발현된 단백질은 흔히 신호 펩타이드를 포함한다.

[0856] 신호 펩타이드는 항원-결합 분자/폴리펩타이드의 N-말단에 존재할 수 있고, 새로이 합성된 항원-결합 분자/폴리펩타이드 내에 존재할 수 있다. 신호 펩타이드는 항원-결합 분자/폴리펩타이드의 효율적인 트래피킹(trafficking) 및 분비를 제공한다. 신호 펩타이드는 흔히 절단에 의해 제거되므로, 항원-결합 분자/폴리펩타이드를 발현하는 세포로부터 분비된 성숙한 항원-결합 분자/폴리펩타이드에 포함되지 않는다.

[0857] 신호 펩타이드는 많은 단백질에 대해 공지되어 있고, GenBank, UniProt, Swiss-Prot, TrEMBL, Protein Information Resource, Protein Data Bank, Ensembl, 및 InterPro와 같은 데이타베이스에 기록되어 있고/있거나, 예컨대, 아미노산 서열 분석 도구, 예를 들면, SignalP(Petersen et al., 2011 Nature Methods 8: 785-786) 또는 Signal-BLAST(Frank and Sippl, 2008 Bioinformatics 24: 2172-2176)를 사용하여 확인/예측할 수 있다.

[0858] 표지(label) 및 접합체(conjugate)

[0859] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 검출가능한 모이어티를 추가로 포함한다.

[0860] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 검출가능한 모이어티, 예컨대, 형광성 표지, 인광성 표지, 발광성 표지, 면역-검출가능한 표지(예컨대, 에피토프 태그), 방사선표지, 화학적, 핵산 또는 효소 표지를 포함한다. 항원-결합 분자는 검출가능한 모이어티와 공유결합적으로 또는 비-공유결합적으로 표지될 수 있다.

[0861] 형광성 표지는 예컨대, 플루오레세신, 로다민, 알로피코시아닌, 에오신 및 NDB, 희토류, 예를 들면, 유로퓸(Eu), 테르븀(Tb) 및 사마륨(Sm)의 녹색 형광성 단백질(GFP) 킬레이트, 테트라메틸 로다민, 텍사스 레드(Texas Red), 4-메틸 움벨리페론, 7-아미노-4-메틸 코우마린, Cy3, 및 Cy5를 포함한다. 방사선표지는 방사선동위원소, 예를 들면, 요도드$^{123}$, 요도드$^{125}$, 요도드$^{126}$, 요오드$^{131}$, 요오드$^{133}$, 브롬$^{77}$, 테크네튬$^{99m}$, 인듐$^{111}$, 인듐$^{113m}$, 갈륨$^{67}$, 갈륨$^{68}$, 루테늄$^{95}$, 루테늄$^{97}$, 루테늄$^{103}$, 루테늄$^{105}$, 수은$^{207}$, 수은$^{203}$, 레늄$^{99m}$, 레늄$^{101}$, 레늄$^{105}$, 스칸듐$^{47}$, 텔루륨$^{121m}$, 텔루륨$^{122m}$, 텔루륨$^{125m}$, 툴륨$^{165}$, 툴륨$^{167}$, 툴륨$^{168}$, 구리$^{67}$, 불소$^{18}$, 이트륨$^{90}$, 팔라듐$^{100}$, 비스무쓰$^{217}$ 및 안티모니$^{211}$를 포함한다. 발광성 표지는 방사선발관성, 화학발광성(예컨대, 아크리디늄 에스테르, 루미놀, 이소루미놀) 및 생물발광성 표지를 포함한다. 면역-검출가능한 표지는 합텐, 펩타이드/폴리펩타이드, 항체, 수용체 및 리간드, 예를 들면, 바이오틴, 아비딘, 스트렙타비딘 또는 디곡시게닌을 포함한다. 핵산 표지는 압타머(aptamer)를 포함한다. 효소 표지는 예컨대, 퍼옥시다제, 알칼린 포스파타제, 글루코스 옥시타제, 베타-갈락토시다제 및 루시페라제를 포함한다.

[0862] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 화학적 모이어티에 접합된다. 화학적 모이어티는 치료학적 효과를 제공하기 위한 모이어티일 수 있다. 항체-약물 접합체는 예컨대, 문헌: Parslow et al., Biomedicines. 2016 Sep; 4(3):14에서 고찰된다. 일부 구현예에서, 화학적 모이어티는 약물 모이어티(예컨대, 세포독성제)일 수 있다. 일부 구현예에서, 약물 모이어티는 화학치료제일 수 있다. 일부 구현예에서, 약물 모이어티는 칼리체아미신, DM1, DM4, 모노메틸라우리스타틴 E(MMAE), 모노메틸라우리스타틴 F(MMAF), SN-38, 독소루비신, 두오카르마이신, D6.5 및 PBD로부터 선택된다.

[0863] 항원-결합 분자의 특수한 예시적인 구현예

[0864] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[0865] (i) 서열 번호: 331의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 하나 이상(예컨대, 2개)의 폴리펩타이드; 및

[0866] (ii) 서열 번호: 317의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 하나 이상(예컨대, 2개)의 폴리펩타이드를 포함하거나, 또는 이로 이루어진다.

[0867] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[0868] (i) 서열 번호: 212의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%,

94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드; 및

[0869] (ii) 서열 번호: 213의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드를 포함하거나, 또는 이로 이루어진다.

[0870] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[0871] (i) 서열 번호: 214의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드; 및

[0872] (ii) 서열 번호: 215의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드를 포함하거나, 또는 이로 이루어진다.

[0873] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[0874] (i) 서열 번호: 216의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드; 및

[0875] (ii) 서열 번호: 217의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드를 포함하거나, 또는 이로 이루어진다.

[0876] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[0877] (i) 서열 번호: 218의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드; 및

[0878] (ii) 서열 번호: 219의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드를 포함하거나, 또는 이로 이루어진다.

[0879] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[0880] (i) 서열 번호: 220의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드; 및

[0881] (ii) 서열 번호: 221의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드를 포함하거나, 또는 이로 이루어진다.

[0882] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[0883] (i) 서열 번호: 222의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드; 및

[0884] (ii) 서열 번호: 223의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드를 포함하거나, 또는 이로 이루어진다.

[0885] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[0886] (i) 서열 번호: 224의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진

2개의 폴리펩타이드; 및

[0887] (ii) 서열 번호: 225의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드를 포함하거나, 또는 이로 이루어진다.

[0888] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[0889] (i) 서열 번호: 226의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드; 및

[0890] (ii) 서열 번호: 227의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드를 포함하거나, 또는 이로 이루어진다.

[0891] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[0892] (i) 서열 번호: 228의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드; 및

[0893] (ii) 서열 번호: 229의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드를 포함하거나, 또는 이로 이루어진다.

[0894] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[0895] (i) 서열 번호: 230의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드; 및

[0896] (ii) 서열 번호: 231의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드를 포함하거나, 또는 이로 이루어진다.

[0897] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[0898] (i) 서열 번호: 232의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드; 및

[0899] (ii) 서열 번호: 233의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드를 포함하거나, 또는 이로 이루어진다.

[0900] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[0901] (i) 서열 번호: 234의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드; 및

[0902] (ii) 서열 번호: 235의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드를 포함하거나, 또는 이로 이루어진다.

[0903] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[0904] (i) 서열 번호: 236의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드; 및

[0905] (ii) 서열 번호: 237의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드를 포함하거나, 또는 이로 이루어진다.

[0906] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[0907] (i) 서열 번호: 238의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드; 및

[0908] (ii) 서열 번호: 239의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드를 포함하거나, 또는 이로 이루어진다.

[0909] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[0910] (i) 서열 번호: 240의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드; 및

[0911] (ii) 서열 번호: 241의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드를 포함하거나, 또는 이로 이루어진다.

[0912] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[0913] (i) 서열 번호: 242의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드; 및

[0914] (ii) 서열 번호: 243의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드를 포함하거나, 또는 이로 이루어진다.

[0915] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[0916] (i) 서열 번호: 248의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드; 및

[0917] (ii) 서열 번호: 250의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드를 포함하거나, 또는 이로 이루어진다.

[0918] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[0919] (i) 서열 번호: 249의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드; 및

[0920] (ii) 서열 번호: 250의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드를 포함하거나, 또는 이로 이루어진다.

[0921] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[0922] (i) 서열 번호: 258의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드; 및

[0923] (ii) 서열 번호: 250의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%,

94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드를 포함하거나, 또는 이로 이루어진다.

[0924] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[0925] (i) 서열 번호: 266의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드; 및

[0926] (ii) 서열 번호: 250의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드를 포함하거나, 또는 이로 이루어진다.

[0927] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[0928] (i) 서열 번호: 330의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드; 및

[0929] (ii) 서열 번호: 213의 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 중 하나의 아미노산 서열 동일성을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 2개의 폴리펩타이드를 포함하거나, 또는 이로 이루어진다.

[0930] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 예컨대, 이의 전문이 본원에 참고로 포함된, 제GB 2108446.2호에 기술된 바와 같이, 2021년 5월 7일자로 ATCC 특허 기탁 번호 PTA-127063으로서 기탁된 세포주의 세포에 의해 생산된다.

[0931] 항원-결합 분자의 기능적 특성

[0932] 본원에 기술된 항원-결합 분자는 특정의 기능적 특성에 대한 참고로 특성화될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 항원-결합 분자는 다음의 특성 중 하나 이상을 지닐 수 있다:

[0933] VISTA(예컨대, 사람, 마우스, 래트 또는 시노몰구스 마카퀴(cynomolgus macaque) VISTA)에 결합하고;

[0934] PD-L1 및/또는 HER3에 결합하지 않고;

[0935] Fcɣ 수용체에 결합하지 않고;

[0936] C1q에 결합하지 않고;

[0937] ADCC를 유도하지 않고;

[0938] ADCP를 유도하지 않고;

[0939] CDC를 유도하지 않고;

[0940] FcRn 수용체에 결합하지 않고;

[0941] VISTA-발현 세포에 결합하고;

[0942] VISTA와 VISTA에 대한 결합 파트너(예컨대, PSGL-1, VSIG-3, VSIG-8 또는 LRIG1) 사이의 상호작용을 억제하고;

[0943] VISTA-매개된 신호전달을 억제하고;

[0944] 독립적으로 Fc-매개된 기능의 VISTA-매개된 신호전달을 억제하고;

[0945] VISTA-발현 세포의 사멸을 증가시키고;

[0946] VISTA-발현 세포의 사멸을 유도/증가시키지 않고;

[0947] VISTA-발현 세포의 수/비율을 감소시키고;

[0948] VISTA-발현 세포의 수/비율을 감소시키지 않고;

[0949] 효과기 면역 세포 수/활성을 증가시키고;

[0950] 억제인자 면역 세포 수/활성을 감소시키고;

[0951] 억제인자 면역 세포 증식을 감소시키고;

[0952] VISTA-발현 세포에 의해 매개된 면역 억제를 감소시키고;

[0953] 항원-제시 세포에 의한 항원 제시를 증가시키고;

[0954] 면역 세포에 의한 IL-6의 생산을 증가시키고;

[0955] 혼합된 림프구 반응(mixed lymphocyte reaction; MLR) 검정에서 IFN-γ, IL-2 및/또는 IL-17의 생산을 증가시키고;

[0956] T 세포 증식, IFN-γ 생산 및/또는 TNFa 생산을 증가시키고;

[0957] 생체 내(*in vivo*)에서 암의 발달 및/또는 진행을 억제하고,

[0958] 생체 내에서 사이토킨 방출 증후군(cytokine release syndrome)을 유도하지 않는다.

[0959] 주어진 항원-결합 분자가 선행 절에 인용된 특성들 중 하나 이상을 나타낼 수 있음은 인식될 것이다. 주어진 항원-결합 분자는 적합한 검정을 사용하여 앞서의 절에서 인용된 특성에 대해 평가될 수 있다. 검정은 예컨대, 시험관 내 검정일 수 있고, 이는 세포-유리된 또는 세포-기반 검정일 수 있다. 대안적으로, 검정은 즉, 비-사람 동물에서 수행된 생체 내 검정일 수 있다.

[0960] 검정이 세포-기반 검정인 경우, 이는 세포를 주어진 항원-결합 분자와 접촉시켜 항원-결합 분자가 인용된 특성 중 하나 이상을 나타내는지의 여부를 측정하는 단계를 포함할 수 있다. 검정은 검출가능할 실체로 표지된 종을 사용함으로써 이의 검출을 촉진할 수 있다. 검정은 세포를 항원-결합 분자의 양/농도의 범위(예컨대, 희석 시리즈)로 별도로 처리한 후 인용된 특성을 평가할 수 있다. 세포가 바람직하게는 VISTA를 발현하는 세포, 예컨대, MDSC임은 인식될 것이다.

[0961] 이러한 검정의 결과의 분석은 상대 활성의 최대 수준의 50%가 달성된 농도를 측정하는 단계를 포함할 수 있다. 관련 활성의 최대 수준의 50%가 획득된 항원-결합 분자의 농도는 관련 활성과 관련하여 항원-결합 분자의 "최대 유효 농도의 1/2'로서 지칭될 수 있고, 이는 또한 '$EC_{50}$'로서 지칭될 수 있다. 예시로서, VISTA에 대한 결합을 위한 주어진 항원-결합 분자의 $EC_{50}$은 관련 종에 대한 결합의 최대 수준의 50%가 달성되는 농도일 수 있다.

[0962] 특성에 따라, $EC_{50}$은 또한 '최대 억제 농도의 1/2' 또는 '$IC_{50}$'로서 지칭될 수 있고, 이는 주어진 특성의 억제의 최대 수준의 50%가 관찰된 항원-결합 분자의 농도이다. 예시로서, VISTA와 VISTA에 대한 상호작용 파트너(예컨대, LRIG1, PSGL-1, VSIG3 또는 VSIG8) 사이의 상호작용을 억제하기 위한 주어진 항원-결합 분자의$IC_{50}$은 억제의 최대 수준의 50%가 달성되는 농도일 수 있다.

[0963] 본원에 기술된 항원-결합 분자는 바람직하게는 VISTA에 대해 특이적인 결합을 나타낸다. 본원에 사용된 바와 같은, "특이적인 결합"은 항원에 대해 선택적이고, 비-표적 항원에 대한 비-특이적인 결합으로부터 구별될 수 있는 결합을 지칭한다. 표적 분자에 특이적으로 결합하는 항원-결합 분자는 바람직하게는 보다 큰 친화성으로 및/또는 이것이 다른 비-표적 분자에 결합하는 것보다 더 긴 기간으로 표적에 결합한다.

[0964] 주어진 분자에 특이적으로 결합하는 주어진 폴리펩타이드의 능력은 당해 분야에 공지된 방법, 예를 들면, ELISA, 표면 플라스몬 공명(SPR; 참고: 예컨대, Hearty et al., Methods Mol Biol (2012) 907:411-442), 바이오-층 간섭법(Bio-Layer Interferometry)(참고: 예컨대, Lad et al., (2015) J Biomol Screen 20(4): 498-507), 유동 세포분석법, 또는 방사선표지된 항원-결합 검정(RIA) 효소-연결된 면역흡착성 검정에 따른 분석으로 측정할 수 있다. 이러한 분석을 통해 주어진 분자에 대한 결합을 측정 및 정량화할 수 있다. 일부 구현예에서, 결합은 주어진 검정에서 검출된 반응일 수 있다.

[0965] 일부 구현예에서, 비-표적 분자에 대한 항원-결합 분자의 결합 정도는 예컨대, ELISA, SPR, 바이오-층 간섭법 또는 RIA에 의해 측정된 것으로서, 표적 분자에 대한 항체의 결합의 약 10% 미만이다. 대안적으로, 결합 특이성은 결합 친화성 측면에서 반영될 수 있고 여기서 항원-결합 분자는 비-표적 분자에 대한 항원-결합 분자의 해리 상수($K_D$)보다 적어도 0.1 자리 수인(즉, 0.1 x $10^n$, 여기서 n은 자리 수를 나타내는 정수이다) $K_D$로 결합한다. 이는 임의로 적어도 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5, 또는 2.0 중 하나일 수 있다.

[0966] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 사람 VISTA, 뮤린(예컨대, 마우스) VISTA 및/또는 시노몰구스 마카퀴(마카카 파스키쿨라리스(*Macaca fascicularis*)) VISTA에 대한 결합을 나타낸다. 즉, 일부 구현예에서 항원-결합 분자

는 사람 VISTA 및 뮤린 VISTA 및/또는 시노몰구스 마카퀴 VISTA에 대해 교차-반응성이다. 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 비-사람 영장류의 VISTA와 교차-반응성을 나타낸다. 모델 종에서 VISTA에 대한 교차-반응성은 대리(surrogate) 분자에 의존하지 않고 동계 모델(syngeneic model)에서 효능의 생체 내 탐구를 허용한다.

[0967] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 PD-L1(예컨대, 사람 PD-L1)에 대해 특이적인 결합을 나타내지 않는다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 HER3(예컨대, 사람 HER3)에 대해 특이적인 결합을 나타내지 않는다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 단백질의 B7 계열의 다른 구성원에 대해 특이적인 결합을 나타내지 않는다(즉, 이와 교차-반응하지 않는다). 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 PD-L1, PD-L2 CD80, CD86, ICOSLG, CD276, VTCN1, NCR3LG1, HHLA2 및/또는 CTLA4에 대해 특이적인 결합을 나타내지 않는다.

[0968] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 PD-1, PD-L1, B7H3, VTCN1(B7H4), NCR3LG1(B7H6), HHLA2(B7H7) 및/또는 CTLA4에 대해 특이적인 결합을 나타내지 않는다.

[0969] 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 하나 이상의 Fc-매개된 기능을 유도할 수 없다(즉, 관련된 Fc-매개된 기능(들)을 유발하는 능력을 결여한다). 이러한 항원-결합 분자는 관련 기능(들)이 결여된 것으로 기술될 수 있다.

[0970] 본원의 상기에 설명된 바와 같이, ADCC/ADCP/CDC를 유도하지 않는(즉, 유도할 수 없는) Fc 영역/항원-결합 분자는 예컨대, 관련 활성에 대한 적절한 검정에서 분석함으로써 측정된 바와 같은, ADCC/ADCP/CDC 활성을 실질적으로 나타내지 않는다. 유사하게, 참고 단백질에 "에 대해 결합하지 않는" 항원-결합 분자(예컨대, 주어진 Fc 수용체 또는 상보체 단백질)는 적절한 검정에서 실질적으로 참고 단백질에 대한 결합을 나타내지 않을 수 있다.

[0971] 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 ADCC를 유도할 수 없다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 ADCP를 유도할 수 없다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 CDC를 유도할 수 없다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 ADCC를 유도할 수 없고/없거나 ADCP를 유도할 수 없고/없거나 CDC를 유도할 수 없다.

[0972] 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 Fc 수용체에 결합할 수 없다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 Fcɣ 수용체에 결합할 수 없다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 FcɣRI, FcɣRIIa, FcɣRIIb, FcɣRIIc, FcɣRIIIa 및 FcɣRIIIb 중 하나 이상에 결합할 수 없다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 FcɣRIIIa에 결합할 수 없다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 FcɣRIIa에 결합할 수 없다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 FcɣRIIb에 결합할 수 없다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 FcRn에 결합한다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 상보체 단백질에 결합할 수 없다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 C1q에 결합할 수 없다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 N297에 상응하는 아미노산 잔기에서 글리코실화되지 않는다.

[0973] 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 사람 VISTA, 뮤린 VISTA 및/또는 시노몰구스 마카퀴 VISTA에 결합하고; PD-L1, PD-1, B7H3, VTCN1(B7H4), NCR3LG1(B7H6), HHLA2(B7H7) 및/또는 CTLA4(예컨대, 사람 PD-L1/PD-1/B7H3/VTCN1/NCR3LG1/HHLA2/CTLA4)에 결합하지 않는다.

[0974] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 PD-L1(예컨대, 사람 PD-L1)에 대해 특이적인 결합을 나타내지 않는다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 HER3(예컨대, 사람 HER3)에 대해 특이적인 결합을 나타내지 않는다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 단백질의 B7 계열의 다른 구성원에 대해 특이적인 결합을 나타내지 않는다(즉, 이와 교차반응하지 않는다). 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 PD-L1, PD-L2 CD80, CD86, ICOSLG, CD276, VTCN1, NCR3LG1, HHLA2 및/또는 CTLA4에 대해 특이적인 결합을 나타내지 않는다.

[0975] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 PD-1, PD-L1, B7H3, VTCN1 (B7H4), NCR3LG1 (B7H6), HHLA2 (B7H7) 및/또는 CTLA4에 대해 특이적인 결합을 나타내지 않는다.

[0976] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 항원-결합 분자는 VISTA에 마이크로몰 범위의 친화성, 즉, $K_D$ = 9.9 x $10^{-4}$ 내지 1 x $10^{-6}$ M로 결합한다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 VISTA에 서브-마이크로몰 친화성(sub-micromolar affinity), 즉, $K_D$ < 1 x $10^{-6}$ M로 결합한다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 VISTA에 나노몰 범위의 친화성, 즉, $K_D$ = 9.9 x $10^{-7}$ 내지 1 x $10^{-9}$ M로 결합한다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 VISTA에 서브-나노몰 친화성, 즉, $K_D$ < 1 x $10^{-9}$ M로 결합한다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 VISTA에 피코몰 범위의 친화성, 즉, $K_D$ = 9.9 x $10^{-10}$ 내지 1 x $10^{-12}$ M로 결합한다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 VISTA에 서

브-피코몰 친화성, 즉, $K_D < 1 \times 10^{-12}$ M로 결합한다.

[0977] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 항원-결합 분자는 VISTA(예컨대, 사람 VISTA, 마우스 VISTA)에 10 μM 미만, 바람직하게는 ≤5 μM, ≤2 μM, ≤1 μM, ≤500 nM, ≤100 nM, ≤75 nM, ≤50 nM, ≤40 nM, ≤30 nM, ≤20 nM, ≤15 nM, ≤12.5 nM, ≤10 nM, ≤9 nM, ≤8 nM, ≤7 nM, ≤6 nM, ≤5 nM, ≤4 nM ≤3 nM, ≤2 nM, ≤1 nM 또는 ≤500 pM 중 하나의 $K_D$로 결합한다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 VISTA(예컨대, 사람 VISTA, 마우스 VISTA)에 $K_D$ = ≤10 nM, ≤9 nM, ≤8 nM, ≤7 nM 또는 ≤6 nM, ≤5 nM, ≤4 nM, ≤3 nM, ≤2 nM 또는 ≤1 nM의 친화성으로 결합한다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 VISTA(예컨대, 사람 VISTA, 마우스 VISTA)에 $K_D$ = ≤500 pM, ≤100 pM, ≤90 pM, ≤80 pM, ≤70 pM 또는 ≤60 pM, ≤50 pM, ≤40 pM, ≤30 pM, ≤20 pM, ≤10 pM, ≤9 pM, ≤8 pM, ≤7 pM 또는 ≤6 pM, ≤5 pM, ≤4 pM, ≤3 pM, ≤2 pM 또는 ≤1 pM의 친화성으로 결합한다. 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항원-결합 분자는 VISTA에 ≤1nM(예컨대, ≤900 pM, ≤800 pM, ≤700 pM, ≤600 pM, ≤500 pM, ≤400 pM, ≤300 pM)의 $K_D$(예컨대, SPR Biocore) 분석, 예컨대, 본 개시내용의 실시예에 기술된 바와 같은 SPR 분석에 의해 측정된 바와 같은)로 결합한다.

[0978] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 항원-결합 분자는 사람 VISTA에 ≤1 nM(예컨대, ≤900 pM, ≤800 pM, ≤700 pM, ≤600 pM, ≤500 pM 중 하나)의 $K_D$(예컨대, SPR(Biocore) 분석, 예컨대, 본 개시내용의 실시예에 기술된 바와 같은 SPR 분석에 의해 측정됨)로 결합한다. 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항원-결합 분자는 시노몰구스 마카퀴 VISTA에 ≤1 nM(예컨대, ≤900 pM, ≤800 pM, ≤700 pM, ≤600 pM, ≤500 pM, ≤400 pM 중 하나)의 $K_D$(예컨대, SPR(Biocore) 분석, 예컨대, 본 개시내용의 실시예에 기술된 바와 같은 SPR 분석에 의해 측정됨)로 결합한다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항원-결합 분자는 래트 VISTA에 ≤1 nM(예컨대, ≤900 pM, ≤800 pM, ≤700 pM, ≤600 pM, ≤500 pM, ≤400 pM 중 하나)의 $K_D$(예컨대, SPR(Biocore) 분석, 예컨대, 본 개시내용의 실시예에 기술된 바와 같은 SPR 분석에 의해 측정됨)로 결합한다. 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항원-결합 분자는 마우스 VISTA에 ≤1 nM(예컨대, ≤900 pM, ≤800 pM, ≤700 pM, ≤600 pM 중 하나)의 $K_D$(예컨대, SPR(Biocore) 분석, 예컨대, 본 개시내용의 실시예에 기술된 바와 같은 SPR 분석에 의해 측정됨)로 결합한다.

[0979] 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항원-결합 분자는 VISTA에 1 μM 이하, 예컨대, ≤500 nM, ≤100 nM, ≤50 nM, ≤40 nM, ≤30 nM, ≤20 nM, ≤10 nM, ≤5 nM, ≤4 nM ≤3 nM, ≤2 nM, ≤1 nM, ≤500 pM, ≤400 pM, ≤300 pM, ≤200 pM, ≤100 pM, ≤50 pM, ≤40 pM, ≤30 pM, ≤20 pM, ≤15 pM, ≤10 pM, ≤5 pM 또는 ≤1pM의 $EC_{50}$(예컨대, ELISA, 예컨대, 본 개시내용의 실시예에 기술된 ELISA에 의해 측정됨)으로 결합한다.

[0980] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 사람 VISTA, 뮤린(예컨대, 마우스) VISTA, 래트 VISTA, 및/또는 시노몰구스 마카퀴(마카카 파스시쿨라리스) VISTA에 대한 결합을 나타낸다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 사람 VISTA 및 마우스 VISTA 및 래트 VISTA 및 시노몰구스 마카퀴 VISTA에 결합한다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 사람 VISTA 및 마우스 VISTA 및 래트 VISTA 및 시노몰구스 마카퀴 VISTA에 대해 교차-반응성(cross-reactivity)이다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항원-결합 분자는 비-사람 영장류의 VISTA와 교차-반응성을 나타낸다. 모델 종에서 VISTA에 대한 교차-반응성은 대리(surrogate) 분자에 의존하지 않고 동계 모델에서 효능의 생체 내 탐구를 허용한다.

[0981] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 항원-결합 분자는 사람 VISTA에 ≤20 pM(예컨대, ≤15 pM, ≤12.5 pM, ≤10 pM, ≤7.5 pM 중 하나)의 $EC_{50}$(예컨대, ELISA, 예컨대, 본 개시내용의 실시예에 기술된 바와 같은 ELISA에 의해 측정됨)으로 결합한다. 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항원-결합 분자는 시노몰구스 마카퀴 VISTA에 ≤50 pM(예컨대, ≤25 pM, ≤20 pM, ≤15 pM 중 하나)의 $EC_{50}$(예컨대, ELISA, 예컨대, 본 개시내용의 실시예에 기술된 바와 같은 ELISA에 의해 측정됨)으로 결합한다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항원-결합 분자는 래트 VISTA에 ≤20 pM(예컨대, ≤15 pM, ≤12.5 pM, ≤10 pM, ≤7.5 pM 중 하나)의 $EC_{50}$(예컨대, ELISA, 예컨대, 본 개시내용의 실시예에 기술된 바와 같은 ELISA에 의해 측정됨)으로 결합한다. 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항원-결합 분자는 마우스 VISTA에 ≤20 pM(예컨대, ≤15 pM, ≤12.5 pM, ≤10 pM, ≤7.5 pM 중 하나)의 $EC_{50}$(예컨대, ELISA, 예컨대, 본 개시내용의 실시예에 기술된 바와 같은 ELISA에 의해 측정됨)으로 결합한다.

[0982] 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항원-결합 분자는 VISTA(예컨대, 사람 VISTA)에 pH 5.5 내지 pH 7.5에서

유사한 치화성으로 결합한다. 예를 들면, 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 pH 5.5에서 VISTA에 대해 pH 7.5에서 VISTA에 대한 친화성과 유사한 친화성을 나타낸다.

[0983] 본원에서, 참고 결합 친화성과 '유사한' 결합 친화성은 비교가능한 조건 하에 측정된 것으로서, 참고 결합 친화성의 50% 이내, 예컨대, 40%, 45%, 30%, 25%, 20% 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 또는 1% 중 하나 이내인 결합 친화성을 의미한다.

[0984] VISTA(예컨대, 사람 VISTA)에 대한 결합에 대한 $K_D$는 pH 5.5 내지 pH 7.5에서 유사할 수 있다. VISTA(예컨대, 사람 VISTA)에 대한 결합에 대한 $EC_{50}$은 pH 5.5 내지 pH 7.5에서 유사할 수 있다.

[0985] 본원에서, 참고 값에 대한 '유사한' $K_D$ 또는 $EC_{50}$ 값은 참고 값에 대해 ≥ 0.5배 내지 ≤2배, 예컨대, ≥ 0.7배 내지 ≤ 1.5배, ≥ 0.75배 내지 ≤ 1.25배, ≥ 0.8배 내지 ≤ 1.2배, ≥ 0.85배 내지 ≤ 1.15배, ≥ 0.9배 내지 ≤ 1.1배, ≥ 0.91배 내지 ≤ 1.09배, ≥ 0.92배 내지 ≤ 1.08배, ≥ 0.93배 내지 ≤ 1.07배, ≥ 0.94배 내지 ≤ 1.06배, ≥ 0.95배 내지 ≤ 1.05배, ≥ 0.96배 내지 ≤ 1.04배, ≥ 0.97배 내지 ≤ 1.03배, ≥ 0.98배 내지 ≤ 1.02배, 또는 ≥ 0.99배 내지 ≤ 1.01배 중 하나일 수 있다.

[0986] 본 발명의 항원-결합 분자는 VISTA의 목적한 특수 영역에 결합할 수 있다. 본 도메인에 따른 항원-결합 분자의 항원-결합 영역은 아미노산의 연속 서열(즉, 아미노산 1차 서열)로 이루어진, VISTA의 선형 에피토프에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 항원-결합 영역 분자는 아미노산 서열의 아미노산의 비연속 서열로 이루어진, VISTA의 구조적 에피토프에 결합할 수 있다.

[0987] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 VISTA에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 VISTA의 세포외 영역 내에서 VISTA에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 Ig-유사 V-유형 도메인(예컨대, 서열 번호: 6에 나타낸 영역) 내에서 VISTA에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자은 서열 번호: 31에 나타낸 영역 내에서 VISTA에 결합할 수 있다.

[0988] 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 서열 번호: 6에 나타낸 아미노산을 포함하거나 또는 이로 이루어진 폴리펩타이드에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 서열 번호: 31에 나타낸 아미노산을 포함하거나 또는 이로 이루어진 폴리펩타이드에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 서열 번호: 322에 나타낸 아미노산을 포함하거나 또는 이로 이루어진 펩타이드 또는 폴리펩타이드에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 서열 번호: 26에 나타낸 아미노산을 포함하거나 또는 이로 이루어진 펩타이드 또는 폴리펩타이드에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 서열 번호: 27에 나타낸 아미노산을 포함하거나 또는 이로 이루어진 펩타이드 또는 폴리펩타이드에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 서열 번호: 28에 나타낸 아미노산을 포함하거나 또는 이로 이루어진 펩타이드 또는 폴리펩타이드에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 서열 번호: 29에 나타낸 아미노산을 포함하거나 또는 이로 이루어진 펩타이드 또는 폴리펩타이드에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 서열 번호: 30에 나타낸 아미노산을 포함하거나 또는 이로 이루어진 펩타이드 또는 폴리펩타이드에 결합할 수 있다.

[0989] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 IGN175A(예컨대, 제WO 2014/197849 A2호에 기술됨)에 의해 결합된 VISTA의 영역에 결합하지 않는다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 서열 번호: 267의 서열로 이루어진 폴리펩타이드 및 서열 번호: 268의 서열로 이루어진 폴리펩타이드를 포함한 항원-결합 분자에 의해 결합된 VISTA의 영역에 결합하지 않는다.

[0990] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 VISTA에 대한 결합에 대해 IGN175A(예컨대, 제WO 2014/197849 A2호에 기술됨)와 경쟁하지 않는다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 VISTA에 대한 결합에 대해 서열 번호: 267의 서열로 이루어진 폴리펩타이드 및 서열 번호: 268의 서열로 이루어진 폴리펩타이드를 포함하는 항원-결합 분자와 경쟁하지 않는다.

[0991] VISTA에 대한 결합에 대해 IGN175A 또는 서열 번호: 267의 서열로 이루어진 폴리펩타이드 및 서열 번호: 268의 서열로 이루어진 폴리펩타이드를 포함한 항원-결합 분자와 경쟁하는 주어진 항원-결합 분자의 능력은 예컨대, 경쟁 ELISA에 의해, 또는 문헌: Abdiche et al., J Immunol Methods (2012) 382(--2):101-116(이의 전문은 본원에 의해 참고로 포함된다)에 기술된 바와 같은 에피토프 결합에 의해 분석할 수 있다. 에피토프 결합은 예컨대, 본 출원의 실시예 8에 기술된 바와 같이, 예컨대, BLI 분석에 의해 수행될 수 있다.

[0992] 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 서열 번호: 275에 나타낸 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드에 결합할 수 없다.

[0993] 본원에 사용된 바와 같은, "펩타이드"는 펩타이드 결합에 의해 연결된 2개 이상의 아미노산 단량체의 쇄를 지칭한다. 펩타이드는 전형적으로 약 2 내지 50개의 아미노산의 영역의 길이를 갖는다. "폴리펩타이드"는 2개 이상의 펩타이드의 중합체 쇄이다. 폴리펩타이드는 전형적으로 약 50개 아미노산보다 큰 길이를 갖는다.

[0994] 주어진 펩타이드/폴리펩타이드에 결합하는 항원-결합 분자의 능력은 숙련가에게 잘 공지된 방법, 예를 들면, ELISA, 면역블롯(예컨대, 웨스턴 블롯), 면역침전, 표면 플라스몬 공명 및 바이오층 간섭법에 의한 분석에 의해 분석될 수 있다.

[0995] 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 VISTA의 동일한 영역, 또는 VISTA의 오버랩핑 영역을, 클론 4M2-C12, 4M2-B4, 4M2-C9, 4M2-D9, 4M2-D5, 4M2-A8, V4H1, V4H2, V4-C1, V4-C9, V4-C24, V4-C26, V4-C27, V4-C28, V4-C30, V4-C31, 2M1-B12, 2M1-D2, 1M2-D2, 13D5p, 13D5-1, 13D5-13, 5M1-A11 또는 9M2-C12 중 하나의 VH 및 VL 서열을 포함하는 항체에 의해 결합된 VISTA의 영역에 결합시킬 수 있다.

[0996] 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 IGN175A(예컨대, 제WO 2014/197849 A2호에 기술됨)에 의해 결합된 VISTA의 영역과는 상이한 VISTA의 영역에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 서열 번호: 267의 서열로 이루어진 폴리펩타이드 및 서열 번호: 268의 서열로 이루어진 폴리펩타이드를 포함한 항원-결합 분자에 의해 결합된 VISTA의 영역과는 상이한 VISTA의 영역에 결합할 수 있다.

[0997] 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 IGN175A(예컨대, 제WO 2014/197849 A2호에 기술됨)에 의해 결합된 VISTA의 영역을 오버랩하지 않는 VISTA의 영역에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 서열 번호: 267의 서열로 이루어진 폴리펩타이드 및 서열 번호: 268의 서열로 이루어진 폴리펩타이드를 포함한 항원-결합 분자에 의해 결합된 VISTA의 영역과 오버랩되지 않는 VISTA의 영역에 결합할 수 있다.

[0998] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 VSTB112(예컨대, 제WO 2015/097536 A2호에 기술됨)에 의해 접촉된 VISTA의 잔기와 동일하지 않은 VISTA의 잔기와의 접촉을 통해 VISTA에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 서열 번호: 269의 서열로 이루어진 폴리펩타이드 및 서열 번호: 270의 서열로 이루어진 폴리펩타이드를 포함한 항원-결합 분자에 의해 접촉된 VISTA의 잔기와 동일하지 않는 VISTA의 잔기와의 접촉을 통해 VISTA에 결합한다.

[0999] 일부 구현예에서 항원-결합 분자에 대한 에피토프는 VSTB112에 대한 에피토프와 동일하지 않다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자에 대한 에피토프는 서열 번호: 269의 서열로 이루어진 폴리펩타이드 및 서열 번호: 270의 서열로 이루어진 폴리펩타이드를 포함한 항원-결합 분자에 대한 에피토프와 동일하지 않다.

[1000] 항체가 결합하는 펩타이드/폴리펩타이드의 영역은 당해 분야에 잘 공지된 다양한 방법, 예를 들면, 항체-항원 복합체의 X-선 공-결정학 분석, 펩타이드 스캐닌, 돌연변이유발 맵핑, 질량 분광법에 의한 수소-중수소 교환 분석, 파아지 디스플레이, 경쟁 ELISA 및 단백질분해-기반한 '보호' 방법을 사용하여 숙련가에 의해 측정될 수 있다. 이러한 방법은 예를 들면, 이의 전문이 본원에 참고로 포함된, 문헌: Gershoni et al., BioDrugs, 2007, 21(3):145-156에 기술되어 있다.

[1001] 일부 구현예에서 본 발명의 항원-결합 분자는 VISTA가 세포 표면(즉, 세포 막 내 또는 세포막)에서 발현되는 경우 항원-결합 분자(즉, 세포내 항원-결합 분자)에 접근가능한 영역내에서 VISTA에 결합한다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 VISTA를 발현하는 세포의 세포 표면에서 발현된 VISTA에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 VISTA-발현 세포(예컨대, CD14+ 단핵구(예를 들면, 단핵구-유래된 억제인자 세포(monocyte-derived suppressor cell; MDSC)) 및/또는 CD33+ 골수 세포, 종양 관련 대식구(tumor associated macrophage; TAM), 및 호중구)에 결합할 수 있다.

[1002] 주어진 세포 유형에 결합하는 항원-결합 분자의 능력은 세포를 항원-결합 분자와 접촉시키고, 예컨대, 결합하지 않은 항원-결합 분자를 제거하기 위한 세척 단계 후, 세포에 결합된 항원-결합 분자를 검출함으로써 분석할 수 있다. 면역 세포 표면 분자-발현 세포 및/또는 암 세포 항원-발현 세포에 결합하는 항원-결합 분자의 능력은 유동 세포분석법 및 면역형광 현미경검사법(immunofluorescence microscopy)에 의해 분석할 수 있다.

[1003] 본 발명의 항원-결합 분자는 VISTA의 길항제일 수 있다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 VISTA 및/또는 VISTA에 대한 결합 파트너(예컨대, PSGL-1, VSIG-3, VSIG-8, LRIG1)에 의해 매개된 기능 또는 공정(예컨대, 상호작용, 신호전달 또는 다른 활성)을 억제할 수 있다. 여기서, '억제'는 대조 조건에 대한 축소, 감소 또는 저하를 지칭한다. 주어진 상호작용/활성/공정을 억제하는 항원-결합 분자는 상호작용/활성/공정의 억제제 또는 길항제로서 지칭될 수 있고, 상호작용/활성/공정을 '차단' 또는 '중화'시키는 것으로 일컬어질 수 있다.

[1004] 본원에 기술된 VISTA-결합 항원-결합 분자는 Fc-매개된 기능, 예를 들면, ADCC, ADCP 및 CDC를 요구하지 않는 메카니즘에 의한 VISTA-매개된 기능/공정을 억제할 수 있다. 즉, 본원에 기술된 VISTA-결합 항원-결합 분자는 ADCC, ADCP 및/또는 CDC를 유발할 필요가 없이 VISTA-발현 세포의 면역억제 활성을 억제할 수 있다.

[1005] 특히, 본원에 기술된 VISTA-결합 항원-결합 분자는 Fcɣ 수용체에 대한 결합 및/또는 C1q에 대한 결합을 요구하지 않는 메카니즘을 통해 VISTA에 결합할 수 있다.

[1006] 일부 구현예에서 본 발명의 항원-결합 분자는 VISTA와 VISTA에 대한 결합/상호작용 파트너(예컨대, PSGL-1, VSIG-3, VSIG-8, LRIG1) 사이의 상호작용을 억제할 수 있다. 일부 구현예에서 본 발명의 항원-결합 분자는 VISTA와 PSGL-1 사이의 상호작용을 억제할 수 있다. 일부 구현예에서 본 발명의 항원-결합 분자는 VISTA와 VSIG-3 사이의 상호작용을 억제할 수 있다. 일부 구현예에서 본 발명의 항원-결합 분자는 VISTA와 LRIG1 사이의 상호작용을 억제할 수 있다.

[1007] 2개의 인자 사이의 상호작용을 억제하는 항원-결합 분자의 능력은 예를 들면, 항체/단편의 존재하에서, 또는 상호작용 파트너 중 하나 또는 둘 다와 항체/단편의 항온처리 후, 상호작용의 분석에 의해 측정할 수 있다. 주어진 항원-결합 분자가 2개의 상호작용 파트너 사이의 상호작용을 억제할 수 있는지의 여부를 측정하기 위한 검정은 경쟁 ELISA 검정 및 SPR에 의한 분석을 포함한다.

[1008] 주어진 상호작용(예컨대, VISTA와 VISTA에 대한 결합 파트너 사이)을 억제할 수 있는 항원-결합 분자는 항원-결합 분자의 부재(또는 적절한 대조군 항원-결합 분자의 존재) 하에서 상호작용의 수준과 비교한 것으로서, 항원-결합 분자의 존재 또는 상호작용 파트너 중 하나 또는 둘 다와 항원-결합 분자의 항온처리 후 상호작용 파트너 사이의 상호작용의 수준에서의 축소/감소의 관찰에 의해 확인된다. 적합한 분석은 예컨대, 재조합 상호작용 파트너를 사용하거나 상호작용 파트너를 발현하는 세포를 사용하여, 시험관 내에서 수행할 수 있다. 상호작용 파트너를 발현하는 세포는 내인성적으로 수행하거나, 또는 세포 내로 도입된 핵산으로부터 수행할 수 있다. 이러한 검정의 목적을 위해, 상호작용 파트너 및/또는 항원-결합 분자 중 한 또는 둘 다를 표지하거나 또는 상호작용의 수준을 검출하고/하거나 측정할 목적을 위한 검출가능한 실체와 함께 사용할 수 있다.

[1009] 2개의 결합 파트너 사이의 상호작용을 억제하는 항원-결합 분자의 능력은 또한 이러한 상호작용의 하부(downstream) 기능적 결과의 분석에 의해 측정될 수 있다. 예를 들면, VISTA와 VISTA에 대한 결합 파트너 사이의 상호작용의 하부 기능적 결과는 VISTA-매개된 신호전달을 포함할 수 있다. 예를 들면, VISTA 또는 VISTA에 대한 결합 파트너의 상호작용을 억제하는 항원-결합 분자의 능력은 MLR 검정에서 IL-2, IFN-ɣ 및/또는 IL-17의 생산의 분석으로 측정할 수 있다.

[1010] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 VISTA와 VISTA에 대한 결합 파트너(예컨대, PSGL-1, VSIG-3, VSIG-8, LRIG1) 사이의 상호작용을 항원-결합 분자의 부재(또는 적절한 대조군 항원-결합 분자의 존재)하에서 VISTA와 VISTA에 대한 결합 파트너 사이의 수준의 1배, 예컨대, ≤0.99배, ≤0.95배, ≤0.9배, ≤0.85배, ≤0.8배, ≤0.75배, ≤0.7배, ≤0.65배, ≤0.6배, ≤0.55배, ≤0.5배, ≤0.45배, ≤0.4배, ≤0.35배, ≤0.3배, ≤0.25배, ≤0.2배, ≤0.15배, ≤0.1배, ≤0.05배, 또는 ≤0.01배 미만 이하까지 억제할 수 있다.

[1011] 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 VISTA-매개된 신호전달을 억제한다. 일부 구현예에서, VISTA-매개된 신호전달은 VISTA를 포함하는 폴리펩타이드 복합체에 의해 매개된 신호전달일 수 있다. 일부 구현예에서, VISTA-매개된 신호전달은 VISTA 및 VISTA에 대한 상호작용 파트너(예컨대, LRIG1, VSIG3, PSGL-1, VSIG8)를 포함하는 폴리펩타이드 복합체에 의해 매개된 신호전달일 수 있다. VISTA-매개된 신호전달은 예컨대, 효과기 면역 세포 수/활성의 검정, 예를 들면, 본원의 실시예에 기술된 바와 같은 MLR 검정을 사용하여 분석할 수 있다. VISTA-매개된 신호전달의 억제는 예컨대, IL-2, IFN-ɣ 및/또는 IL-17의 생산에서의 증가에 의해 측정된 바와 같이, 효과기 면역 세포의 수 및/또는 활성에서의 증가를 검출함으로써 확인할 수 있다.

[1012] VISTA와 VISTA에 대한 상호작용 파트너 사이의 상호작용을 억제하는 항원-결합 분자의 능력은 예를 들면, 항원-결합 분자의 존재하에서, 또는 상호작용 파트너 중 하나 또는 둘다와 항원-결합 분자의 항온처리 후 상호작용의 분석에의해 측정할 수 있다. 주어진 항원-결합 분자가 VISTA와 VISTA에 대한 상호작용 파트너 사이의 상호작용을 억제할 수 있는지의 여부를 측정하기 위한 검정은 경쟁 ELISA 검정 및 SPR에 의한 분석을 포함한다.

[1013] VISTA와 VISTA에 대한 상호작용 파트너 사이의 상호작용을 억제할 수 있는 항원-결합 분자는 항원-결합 분자의 부재(또는 이러한 상호작용을 억제하는 것으로 알려지지 않은 적절한 대조군 항원-결합 분자의 존재) 하에서의 상호작용의 수준과 비교하여, 항원-결합 분자의 존재 또는 상호작용 파트너 중 하나 또는 둘 다와 항원-결합 분자의 항온처리 후 상호작용 파트너 사이의 상호작용의 수준에서의 축소/감소를 관찰함으로써 확인할 수 있다.

적합한 분석은 예컨대, 재조합 상호작용 파트너를 사용하거나 상호작용 파트너를 발현하는 세포를 사용하여, 시험관 내에서 수행할 수 있다. 상호작용 파트너를 발현하는 세포는 내인성적으로 수행할 수 있거나, 또는 세포 내로 도입된 핵산으로부터 수행할 수 있다. 이러한 검정의 목적을 위해서, 상호작용 파트너 및/또는 항원-결합 분자 중 한 또는 둘 다를 표지하거나 또는 상호작용의 수준을 검출하고/하거나 측정할 목적을 위해 검출가능한 실체와 함께 사용할 수 있다.

[1014] 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 Fc-매개된 기능을 요구하지 않거나 또는 이를 포함하는 메카니즘에 의해 VISTA-매개된 신호전달을 억제할 수 있다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 Fc-매개된 기능과는 독립적으로 VISTA-매개된 신호전달을 억제할 수 있다. 즉, 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 Fc 영역-독립된 방식으로 VISTA-매개된 신호전달을 또한 억제한다.

[1015] Fc-매개된 기능을 요구/포함하지 않는 메카니즘에 의해 VISTA-매개된 신호전달을 억제하는 항원-결합 분자의 능력은 예컨대, VISTA-매개된 신호전달을 억제하는 양식으로 제공된 항원-결합 분자의 능력을 분석함으로써 평가할 수 있다. 예를 들면, VISTA-매개된 신호전달에서의 효과는 '사일런트(silent)' Fc 영역을 포함하는 항원-결합 분자(예컨대, LALA PG 치환을 포함함)를 사용하거나, 또는 Fc 영역을 결여하는 양식으로 제공된 항원-결합 분자(예컨대, scFv, Fab 등)를 사용하여 시험할 수 있다.

[1016] 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 ADCC를 포함하지 않는 메카니즘에 의해 VISTA-매개된 신호전달을 억제할 수 있다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 ADCP를 포함하지 않는 메카니즘에 의해 VISTA-매개된 신호전달을 억제할 수 있다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 CDC를 포함하지 않는 메카니즘에 의해 VISTA-매개된 신호전달을 억제할 수 있다.

[1017] 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 Fc 수용체에 대한 항원-결합 분자의 결합을 요구하지 않는 메카니즘에 의해 VISTA-매개된 신호전달을 억제할 수 있다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 FcγR 수용체에 대한 항원-결합 분자의 결합을 요구하지 않는 메카니즘에 의해 VISTA-매개된 신호전달을 억제할 수 있다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIc, FcγRIIIa 및 FcγRIIIb 중 하나 이상에 대한 항원-결합 분자의 결합을 요구하지 않는 메카니즘에 의해 VISTA-매개된 신호전달을 억제할 수 있다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 FcγRIIIa에 대한 항원-결합 분자의 결합을 요구하지 않는 메카니즘에 의해 VISTA-매개된 신호전달을 억제할 수 있다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 FcγRIIa에 대한 항원-결합 분자의 결합을 요구하지 않는 메카니즘에 의해 VISTA-매개된 신호전달을 억제할 수 있다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 FcγRIIb에 대한 항원-결합 분자의 결합을 요구하지 않는 메카니즘에 의해 VISTA-매개된 신호전달을 억제할 수 있다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 상보체 단백질에 대한 결합을 요구하지 않는 메카니즘에 의해 VISTA-매개된 신호전달을 억제할 수 있다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 C1q에 대한 결합을 요구하지 않는 메카니즘에 의해 VISTA-매개된 신호전달을 억제할 수 있다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 N297 글리코실화를 요구하지 않는 메카니즘에 의해 VISTA-매개된 신호전달을 억제할 수 있다.

[1018] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 VISTA-발현 세포의 사멸을 증가시킬 수 있다. VISTA-발현 세포의 사멸은 항원-결합 분자의 효과기 기능을 통해 증가시킬 수 있다. 항원-결합 분자가 Fc 영역을 포함하는 구현예에서 항원-결합 분자는 상보체 의존적 세포독성(CDC), 항체-의존적 세포-매개된 세포독성(ADCC) 및 항체-의존적 세포 식세포작용(ADCP) 중 하나 이상을 통해 VISTA-발현 세포의 사멸을 증가시킬 수 있다.

[1019] VISTA-발현 세포의 사멸을 증가시킬 수 있는 항원-결합 분자는 적절한 검정에서 항원-결합 분자의 부재(또는 적절한 대조군 항원-결합 분자의 존재) 하에서 검출된 세포 사멸의 수준과 비교하여, 항원-결합 분자의 존재 또는 VISTA-발현 세포와 항원-결합 분자의 항온처리 후 VISTA-발현 세포의 사멸의 증가된 수준을 관찰함으로써 확인할 수 있다. CDC, ADCC 및 ADCP의 검정은 숙련가에게 잘 공지되어 있다. VISTA-발현 세포의 사멸 수준은 또한 상이한 치료 조건에 대한 노출 후 생존가능한 및/또는 생존가능하지 않은 VISTA-발현 세포의 수/비율을 측정함으로써 측정할 수 있다.

[1020] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 VISTA-발현 세포(예컨대, VISTA-발현 MDSC)의 사멸을 항원-결합 분자의 부재(또는 적절한 대조군 항원-결합 분자의 존재) 하에서 관찰된 사멸 수준의 1배 이상, 예컨대, ≥1.01배, ≥1.02배, ≥1.03배, ≥1.04배, ≥1.05배, ≥1.1배, ≥1.2배, ≥1.3배, ≥1.4배, ≥1.5배, ≥1.6배, ≥1.7배, ≥1.8배, ≥1.9배, ≥2배, ≥3배, ≥4배, ≥5배, ≥6배, ≥7배, ≥8배, ≥9배 또는 ≥10배까지 증가시킬 수 있다.

[1021] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 VISTA-발현 세포(예컨대, VISTA-발현 MDSC)의 수를, 비교 검정에

서 항원-결합 분자의 부재 하에 항온처리 후(또는 적절한 대조군 항원-결합 분자의 존재하에서 항온처리 후) 검출된 VISTA-발현 세포(예컨대, VISTA-발현 MDSC, TAM, 호중구)의 수의 1배 미만, 예컨대, ≤0.99배, ≤0.95배, ≤0.9배, ≤0.85배, ≤0.8배, ≤0.75배, ≤0.7배, ≤0.65배, ≤0.6배, ≤0.55배, ≤0.5배, ≤0.45배, ≤0.4배, ≤0.35배, ≤0.3배, ≤0.25배, ≤0.2배, ≤0.15배, ≤0.1배, ≤0.05배, 또는 ≤0.01배 이하까지 축소시킬 수 있다.

[1022] 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 비-고갈 항원-결합 분자이다. 즉, 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 VISTA-발현 세포의 실질적인 고갈을 유발하지 않는다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 VISTA-발현 세포에 대한 ADCC, ADCP 및/또는 CDC를 유발/증가시키지 않는다.

[1023] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는예컨대, 항원-결합 분자가 Fc 영역을 결여하는 구현예에서, 또는 항원-결합 분자가 Fc-매개된 항체 효과기 기능을 유도할 수 없는 Fc 영역을 포함하는 구현예에서, VISTA-발현 세포의 사멸을 유도/증가시키지 않는다. 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 VISTA-발현 세포의 수/비율을 축소시키지 않는다.

[1024] 일부 구현예에서 본 발명의 항원-결합 분자는 (i) VISTA-매개된 신호전달을 억제하고 (ii) VISTA-발현 세포의 사열을 유도/증가시키지 않는다. 일부 구현예에서 본 발명의 항원-결합 분자는 (i) VISTA-매개된 신호전달을 억제하고 (ii) VISTA-발현 세포의 수/비율을 축소시키지 않는다.

[1025] 이는, VISTA가 고갈되는 것이 바람직하지 않은 세포에 의해 발현되므로, 특히 유리할 수 있다. 예를 들면, VISTA는 사멸시키거나 이의 수/비율을 축소시키는 것이 바람직하지 않는 면역 세포(예컨대, T 세포 및 수지 세포의 특정 유형)에 의해 낮은 수준에서 발현된다.

[1026] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 예컨대, 적절한 시험관 내 검정, 또는 생체 내에서 음성 대조군 조건과 비교하여 효과기 면역 세포의 수 및/또는 활성을 증가시킬 수 있다. 설명하면, 본 발명의 항원-결합 분자는 효과기 면역 세포 증식 및 기능의 MDSC-매개된 억제로부터 효과기 면역 세포를 방출할 수 있다. 일부 구현예에서 효과기 면역 세포는 예컨대, CD8+ T 세포, CD8+ 세포독성 T 림프구(CD8+ CTLs), CD4+ T 세포, CD4+ T 헬퍼 세포, NK 세포, IFNɣ-생산 세포, 기억 T 세포, 중심 기억 T 세포, 항원-경험(antigen-experienced) T 세포 또는 CD45RO+ T 세포일 수 있다.

[1027] 세포 수 및 비율은 예컨대, 유동 세포분석법 분석에 의해 세포 유형의 검출을 허용하는 항체를 사용하여 측정할 수 있다. 세포 분열은 예를 들면, $^{3}$H-티미딘의 혼입의 시험관 내 분석에 의해 또는 예컨대, 이의 전문이 본원에 참고로 포함된, 문헌: Fulcher and Wong, Immunol Cell Biol (1999) 77(6): 559-564에 기술된 바와 같은 CFSE 희석 검정에 의해 분석될 수 있다. 효과기(effector) 면역 세포 활성은 이러한 활성의 상관관계를 측정함으로써 분석할 수 있다. 일부 구현예에서 효과기 면역 세포 활성은 예컨대, IL-2, IFN-ɣ 및/또는 IL-17의 생산의 분석에 의해 측정할 수 있다.

[1028] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 효과기 면역 세포 유형의 수를 항원-결합 분자의 부재(또는 적절한 대조군 항원-결합 분자의 존재) 하에 관찰된 수의 1배, 예컨대, ≥1.01배, ≥1.02배, ≥1.03배, ≥1.04배, ≥1.05배, ≥1.1배, ≥1.2배, ≥1.3배, ≥1.4배, ≥1.5배, ≥1.6배, ≥1.7배, ≥1.8배, ≥1.9배, ≥2배, ≥3배, ≥4배, ≥5배, ≥6배, ≥7배, ≥8배, ≥9배 또는 ≥10배 이상까지 증가시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 효과기 면역 세포 활성의 상관관계의 수준을 항원-결합 분자의 부재(또는 적절한 대조군 항원-결합 분자의 존재) 하에 관찰된 수준의 1배 이상, 예컨대, ≥1.01배, ≥1.02배, ≥1.03배, ≥1.04배, ≥1.05배, ≥1.1배, ≥1.2배, ≥1.3배, ≥1.4배, ≥1.5배, ≥1.6배, ≥1.7배, ≥1.8배, ≥1.9배, ≥2배, ≥3배, ≥4배, ≥5배, ≥6배, ≥7배, ≥8배, ≥9배 또는 ≥10배까지 증가시킬 수 있다.

[1029] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 VISTA-발현 세포에 의해 매개된 면역 억제의 수준을 감소시킬 수 있다. 면역 억제의 수준에서의 변화는 아르기나제 1의 발현 및/또는 반응성 산소 종(reactive oxygen species; ROS)의 생산을 측정하기 위한 방법을 사용하여 VISTA-발현 세포에 의해, 예를 들면 문헌: Ochoa et al., Ann Surg. 2001 Mar; 233(3): 393-399 및 Dikalov and Harrison Antioxid Redox Signal. 2014 Jan 10; 20(2): 372-382에 기술된 바와 같이 측정할 수 있다.

[1030] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 예컨대, 항원 제시의 적합한 검정을 사용하여 측정된 바와 같이, 항원-제시 세포에 의해 항원 제시를 증가시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 예컨대, 식세포작용의 수준의 적합한 검정을 사용하여 측정된 바와 같이, 식세포(예컨대, 호중구, 단핵구, 대식구, 비만

세포, 및/또는 수지 세포)에 의해 식세포작용을 증가시킬 수 있다.

[1031] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항원-결합 분자는 예컨대, 적절한 시험관 내 검정, 또는 생체 내(예컨대, 종양 내)에서, 음성 대조군 조건과 비교하여 항원-제시 세포(예컨대, CD11b+ MHCII+ 세포)의 수 및/또는 활성을 증가시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 예컨대, 적절한 시험관 내 검정, 또는 생체 내(예컨대, 종양) 내에서, 음성 대조군과 비교하여 대식세포(예컨대, CD11b+ F4/80+ 세포)의 수 및/또는 활성을 증가시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 예컨대, 적절한 시험관 내 검정, 또는 생체 내(예컨대, 종양 내)에서, 음성 대조군 조건과 비교하여 수지 세포의 수 및/또는 활성을 증가시킬 수 있다.

[1032] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항원-결합 분자는 앞서의 절에서 인용된 세포 유형의 수를 항원-결합 분자의 부재(또는 적절한 대조군 항원-결합 분자의 존재) 하에서 관찰된 수의 1배 이상, 예컨대, ≥1.01배, ≥1.02배, ≥1.03배, ≥1.04배, ≥1.05배, ≥1.1배, ≥1.2배, ≥1.3배, ≥1.4배, ≥1.5배, ≥1.6배, ≥1.7배, ≥1.8배, ≥1.9배, ≥2배, ≥3배, ≥4배, ≥5배, ≥6배, ≥7배, ≥8배, ≥9배 또는 ≥10배까지 증가시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항원-결합 분자는 앞서의 절에서 인용된 세포 유형의 활성의 상관관계의 수준을 항원-결합 분자의 부재(또는 적절한 대조군 항원-결합 분자의 존재) 하에서 관찰된 수준의 1배 이상, 예컨대, ≥1.01배, ≥1.02배, ≥1.03배, ≥1.04배, ≥1.05배, ≥1.1배, ≥1.2배, ≥1.3배, ≥1.4배, ≥1.5배, ≥1.6배, ≥1.7배, ≥1.8배, ≥1.9배, ≥2배, ≥3배, ≥4배, ≥5배, ≥6배, ≥7배, ≥8배, ≥9배 또는 ≥10배까지 증가시킬 수 있다.

[1033] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 면역 세포에 의한 IL-6의 생산을 증가시킬 수 있다. 면역 세포는 예컨대, PBMC, 림프구, T 세포, B 세포, NK 세포, 또는 단핵구일 수 있다. 일부 구현예에서 면역 세포는 단핵구일 수 있다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 자극, 예컨대, LPS를 사용한 자극 후 면역 세포에 의한 IL-6의 생산을 증가시킬 수 있다. 면역 세포에 의해 IL-6의 생산을 증가시키는 항원-결합 분자의 능력은 예컨대, 본원의 실시예 10에 기술된 바와 같이, 시험관 내 검정에서 분석할 수 있다. 이러한 방법은 단핵구(예컨대, THP1 세포)를 LPS로 자극시키는 단계, 및 자극된 세포를 항원-결합 분자와 항온처리하는 단계를 포함할 수 있다.

[1034] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 면역 세포(예컨대, LPS-자극된 THP1 세포)에 의한 IL-6 생산을 항원-결합 분자의 부재(또는 적절한 대조군 항원-결합 분자의 존재) 하에 관찰된 수준의 1배 이상, 예컨대, ≥1.01배, ≥1.02배, ≥1.03배, ≥1.04배, ≥1.05배, ≥1.1배, ≥1.2배, ≥1.3배, ≥1.4배, ≥1.5배, ≥1.6배, ≥1.7배, ≥1.8배, ≥1.9배, ≥2배, ≥3배, ≥4배, ≥5배, ≥6배, ≥7배, ≥8배, ≥9배 또는 ≥10배까지 증가시킬 수 있다.

[1035] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항원-결합 분자는 Th1/Th17 세포의 수 및/또는 활성을 증가시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 Th1/Th17 반응을 상향조절할 수 있다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 Th2 반응보다 Th1/Th17 반응에 유리하다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항원-결합 분자는 혼합된 림프구 반응(Mixed Lymphocyte Reaction; MLR) 검정에서 T 세포 증식, IL-2 생산, IFN-γ 생산, TNFα 생산 및/또는 IL-17A 생산을 증가시킬 수 있다. MLR은 문헌: Bromelow et al J.Immunol Methods, 2001 Jan 1;247(1-2):1-8(이의 전문은 본원에 참고로 포함됨)에 기술된 바와 같이, 또는 본원의 실시예에 기술된 바와 같이 수행할 수 있다. IL-2, IFNγ 및/또는 IL-17 생산은 예컨대, 숙련가에게 잘 공지된 항체-기반 방법, 예를 들면, 웨스턴 블롯, 면역조직화학, 유동 세포분석법, ELISA, ELISPOT, 또는 리포터-기반 방법(reporter-based method)에 의해 분석할 수 있다.

[1036] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 혼합된 림프구 반응(MLR) 검정에서 T 세포(예컨대, Th1/Th17 세포) 증식, IL-2 생산, IFN-γ 생산 및/또는 IL-17 생산을 증가시킬 수 있다. MLR 검정은 문헌: Bromelow et al J.Immunol Methods, 2001 Jan 1;247(1-2):1-8(이의 전문은 본원에 참고로 포함됨)에 기술된 바와 같이, 또는 본원의 실시예에 기술된 바와 같이 수행할 수 있다. IL-2, IFNγ 및/또는 IL-17 생산은 예컨대, 숙련가에게 잘 공지된 항체-기반 방법, 예를 들면, 웨스턴 블롯, 면역조직화학, 면역세포화학, 유동 세포분석법, ELISA, ELISPOT, 또는 리포터-기반 방법에 의해 분석할 수 있다.

[1037] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 MLR 검정에서 T 세포 증식, IL-2 생산, IFN-γ 생산 및/또는 IL-17 생산을 항원-결합 분자의 부재(또는 적절한 대조군 항원-결합 분자의 존재) 하에 관찰된 수준의 1배 이상, 예컨대, ≥1.01배, ≥1.02배, ≥1.03배, ≥1.04배, ≥1.05배, ≥1.1배, ≥1.2배, ≥1.3배, ≥1.4배, ≥1.5배, ≥1.6배, ≥1.7배, ≥1.8배, ≥1.9배, ≥2배, ≥3배, ≥4배, ≥5배, ≥6배, ≥7배, ≥8배, ≥9배 또는 ≥10배까지 증가시킬 수 있다.

[1038] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 예컨대, VISTA/VISTA 발현 세포의 존재하에서 T 세포 증식, IFN-γ 생산 및/또는 TNFa 생산을 증가시킬 수 있다. 항원-결합 분자는 예컨대, 본원의 실시예에 기술된 바와 같은 시험관 내 검정에서 이러한 특성에 대해 평가될 수 있다.

[1039] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 T 세포(예컨대, Th1/Th17 세포) 증식, IFN-γ 생산 및/또는 TNFa 생산(예컨대, VISTA/VISTA 발현 세포의 존재하에서)을 항원-결합 분자의 부재(또는 적절한 대조군 항원-결합 분자의 존재) 하에 관찰된 수준의 1배 이상, 예컨대, ≥1.01배, ≥1.02배, ≥1.03배, ≥1.04배, ≥1.05배, ≥1.1배, ≥1.2배, ≥1.3배, ≥1.4배, ≥1.5배, ≥1.6배, ≥1.7배, ≥1.8배, ≥1.9배, ≥2배, ≥3배, ≥4배, ≥5배, ≥6배, ≥7배, ≥8배, ≥9배 또는 ≥10배까지 증가시킬 수 있다.

[1040] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 T 세포(예컨대, CD4+ T 세포 및/또는 CD8+ T 세포, 예컨대, Th1/Th17 세포) 증식을 선행 분야에 개시된 VISTA-결합 항체(예컨대, 예컨대, 제WO 2015/097536 A2호에 기술된 VSTB112의 존재 하에)를 증가시킬 수 있다. T 세포 증식은 예컨대, 본원의 실시예 9에 기술된 바와 같이 시험관 내 검정에서 평가할 수 있고, 효능제 항-CD3 항체의 존재하에서 배양함으로써 T 세포 증식을 자극시킴을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 이러한 검정에서 T 세포 증식을 선행 분야의 VISTA-결합 항체(예컨대, VSTB112)에 의해 유도된 증식 수준의 1배 이상, 예컨대, ≥1.01배, ≥1.02배, ≥1.03배, ≥1.04배, ≥1.05배, ≥1.1배, ≥1.2배, ≥1.3배, ≥1.4배, ≥1.5배, ≥1.6배, ≥1.7배, ≥1.8배, ≥1.9배, ≥2배, ≥3배, ≥4배, ≥5배, ≥6배, ≥7배, ≥8배, ≥9배 또는 ≥10배까지 증가시킬 수 있다.

[1041] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항원-결합 분자는 암 세포의 T 세포-매개된 분해를 항원-결합 분자의 부재(또는 적절한 대조군 항원-결합 분자의 존재) 하에 관찰된 수준의 1배 이상, 예컨대, ≥1.01배, ≥1.02배, ≥1.03배, ≥1.04배, ≥1.05배, ≥1.1배, ≥1.2배, ≥1.3배, ≥1.4배, ≥1.5배, ≥1.6배, ≥1.7배, ≥1.8배, ≥1.9배, ≥2배, ≥3배, ≥4배, ≥5배, ≥6배, ≥7배, ≥8배, ≥9배 또는 ≥10배까지 증가시킬 수 있다.

[1042] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항원-결합 분자는 예컨대, VISTA/VISTA 발현 세포의 존재하에서 암 세포의 T 세포-매개된 분해를 증가시킬 수 있다. 항원-결합 분자는 예컨대, 본원의 실시예에 기술된 바와 같은 시험관 내 검정에서 이러한 특성에 대해 평가될 수 있다.

[1043] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항원-결합 분자는 T 세포-매개된 분해(예컨대, VISTA/VISTA 발현 세포의 존재하에서)를 항원-결합 분자의 부재(또는 적절한 대조군 항원-결합 분자의 존재) 하에 관찰된 수준의 1배 이상, 예컨대, ≥1.01배, ≥1.02배, ≥1.03배, ≥1.04배, ≥1.05배, ≥1.1배, ≥1.2배, ≥1.3배, ≥1.4배, ≥1.5배, ≥1.6배, ≥1.7배, ≥1.8배, ≥1.9배, ≥2배, ≥3배, ≥4배, ≥5배, ≥6배, ≥7배, ≥8배, ≥9배 또는 ≥10배까지 증가시킬 수 있다.

[1044] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 선행 분야에 개시된 VISTA-결합 항체(예컨대, 제WO 2015/097536 A2호에 기술된 VSTB112)보다 더 높은 정도까지 THP1 세포에 의한 IL-6 생산을 증가시킬 수 있다. THP1 세포에 의한 IL-6 생산은 예컨대, 본원의 실시예 10에 기술된 바와 같이, 시험관 내 검정에서 평가할 수 있고, THP1 세포를 LPS로 자극시키는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 이러한 검정에서 IL-6 생산을 선행 분야의 VISTA-결합 항체(예컨대, VSTB112)에 의해 유도된 수준의 1배 이상, 예컨대, ≥1.01배, ≥1.02배, ≥1.03배, ≥1.04배, ≥1.05배, ≥1.1배, ≥1.2배, ≥1.3배, ≥1.4배, ≥1.5배, ≥1.6배, ≥1.7배, ≥1.8배, ≥1.9배, ≥2배, ≥3배, ≥4배, ≥5배, ≥6배, ≥7배, ≥8배, ≥9배 또는 ≥10배까지 증가시킬 수 있다.

[1045] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 예컨대, 적절한 시험관 내 검정, 또는 생체 내에서 측정된 바와 같이, 대조군 조건과 비교하여 억제인자 면역 세포의 수 및/또는 활성을 축소시키고/시키거나, 억제인자 면역 세포의 증식을 억제하고/하거나, 세포(예컨대, CD45+ 세포, 예컨대, 종양으로부터 수득된 CD45+ 세포)의 집단 내에서 억제인자 면역 세포의 비율을 축소시킬 수 있다.

[1046] 억제인자 면역 세포는 예컨대, VISTA-발현 세포, Arg1-발현 세포, MDSC, 과립구 MDSC(g-MDSC) 또는 단핵구 MDSC(m-MDSC)일 수 있다. 일부 구현예에서, 억제인자 면역 세포는 CD11b+ GR1+ MHCII- 세포이다.

[1047] 일부 구현예에서, 수/활성/증식/특성에서의 축소는 항원-결합 분자의 부재(또는 적절한 대조군 항원-결합 분자의 존재) 하에 관찰된 수/활성,증식/비율의 1배 미만, 예컨대, ≤0.99배, ≤0.95배, ≤0.9배, ≤0.85배, ≤0.8배, ≤0.75배, ≤0.7배, ≤0.65배, ≤0.6배, ≤0.55배, ≤0.5배, ≤0.45배, ≤0.4배, ≤0.35배, ≤0.3배, ≤0.25배, ≤0.2배, ≤0.15배, ≤0.1배, ≤0.05배, 또는 ≤0.01배이다.

[1048] 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 Fc-매개된 기능을 포함하지 않는 메카니즘에 의해 억제인자 면역 세포의 수/

활성/증식/비율을 축소시킬 수 있다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 Fc-매개된 기능과는 독립적으로(즉, Fc 영역-독립된 방식으로) 억제인자 면역 세포의 수/활성/증식/비율을 축소시킬 수 있다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 ADCC, ADCP 및/또는 CDC를 포함하지 않는 메카니즘에 의한 억제인자 면역 세포의 수/활성/증식/비율을 축소시킬 수 있다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 VISTA-발현 세포의 고갈을 포함하지 않는 메카니즘에 의한 억제인자 면역 세포의 수/활성/증식/비율을 축소시킬 수 있다.

[1049] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 생체 내에서 암의 발달 및/또는 진행을 억제한다.

[1050] 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 예컨대, 효과기 면역 세포에 의한 암 세포의 사멸에서의 증가를 유발한다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 예컨대, 적절한 대조군 조건과 비교하여, 생체 내에서 암 세포의 수에서의 감소를 유발한다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 예컨대, 시간에 걸쳐 종양 크기/용적을 측정함으로써 측정된 바와 같이, 종양 성장을 억제한다.

[1051] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 항원-결합 분자로 치료한 마우스에서 IFN-γ 및/또는 IL-23의 혈청 수준을 증가시킬 수 있다. IFN-γ 및/또는 IL-23의 혈청 수준은 예컨대, 마우스로부터 수득된 혈액 샘플로부터 유래된 혈청의 ELISA에 의해 분석할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자의 투여는 IFN-γ 및/또는 IL-23의 혈청 수준을 항원-결합 분자의 투여의 부재 하에 관찰된 수준(또는 적절한 대조군 항원-결합 분자의 투여 후 관찰된 수준)의 1배 이상, 예컨대, ≥1.01배, ≥1.02배, ≥1.03배, ≥1.04배, ≥1.05배, ≥1.1배, ≥1.2배, ≥1.3배, ≥1.4배, ≥1.5배, ≥1.6배, ≥1.7배, ≥1.8배, ≥1.9배, ≥2배, ≥3배, ≥4배, ≥5배, ≥6배, ≥7배, ≥8배, ≥9배 또는 ≥10배까지 증가시킬 수 있다.

[1052] 본 발명의 항원-결합 분자는 적절한 생체 내 모델, 예컨대, 세포주-유래된 이종이식체 모델, 예를 들면, CT26 세포-유래된 모델, 4T-1 세포-유래된 모델, LL2 세포-유래된 모델, B16 세포-유래된 모델, 또는 EL4 세포-유래된 모델에서 암의 발달 및/또는 진행을 억제하는 능력에 대해 분석될 수 있다. 암은 VISTA-발현 세포 및/또는 MDSC(예컨대, VISTA-발현 MDSC, TAM, 호중구)가 병리학적으로 관련된 암일 수 있다. MDSC가 '병리학적으로 관련된' MDSC는 MDSC, 또는 MDSC의 증가된 수/비율이 암의 발생, 발달 또는 진행, 및/또는 암의 하나 이상의 증상의 중증도, 또는 이에 대해 MDSC, 또는 MDSC의 증가된 수/비율이 암의 발생, 발달  또는 진행에 대한 위험 인자인 암과 양으로 관련된다. 암은 질환에 의해 영향받은 기관/조직(예컨대, 질환/상태의 증상이 만연한 기관/조직) 또는 종양 내 MDSC를 포함할 수 있다.

[1053] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 항원-결합 분자의 투여는 다음 중 하나 이상을 유발할 수 있다: 예컨대, CT26 세포,  4T-1 세포, LL2 세포, B16 세포, 또는 EL4 세포-유래된 이종이식체 모델에서 측정된 바와 같이, 암의 발달/진행의 억제, 암의 발생에 대한 지연/예방, 종양 성장에서 축소/이에 대한 지연/이의 예방, 전이에서의 축소/이에 대한 지연/이의 예방, 암의 증상의 중증도에서의 축소, 암 세포의 수에서의 축소, 종양 크기/용적에서의 축소, 및/또는 생존(예컨대, 진행과 관련없는 생존(progression free survival)에서의 증가.

[1054] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자의 투여는 항원-결합 분자의 투여의 부재 하(또는 적절한 대조군 항원-결합 분자의 투여 후)에 관찰된 종양 성장의 5% 이상, 예컨대, ≥10%, ≥15%, ≥20%, ≥25%, ≥30%, ≥35%, ≥40%, ≥45%, ≥50%, ≥55%, ≥60%, ≥65%, ≥70%, ≥75%, ≥80%, ≥85%, ≥90% 또는 ≥95%까지 억제할 수 있다.

[1055] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 실시예의 CT26 세포-유래된 모델에서 실시예에 기술된 용량 및 주기에서 항원-결합 분자의 투여는 항원-결합 분자의 투여의 부재 하(또는 적절한 대조군 항원-결합 분자의 투여 후)에 관찰된 종양 성장의 5% 이상, 예컨대, ≥10%, ≥15%, ≥20%, ≥25%, ≥30%, ≥35%, ≥40%, ≥45%, ≥50%, ≥55%, ≥60%, ≥65%, ≥70%, ≥75% 또는 ≥80%까지 억제한다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 실시예의 4T-1 세포-유래된 모델에서 실시예에 기술된 용량 및 주기에서 항원-결합 분자의 투여는 항원-결합 분자의 투여의 부재 하(또는 적절한 대조군 항원-결합 분자의 투여 후)에 관찰된 종양 성장의 5% 이상, 예컨대, ≥0%, ≥15%, ≥20%, ≥25%, ≥30%, ≥35%, ≥40%, ≥45%, ≥50%까지 증가시킬 수 있다.

[1056] 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항원-결합 분자의 투여는 사이토킨 방출 증후군과 관련되지 않는다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자의 투여는 백혈구(예컨대, B 세포, T 세포, NK 세포, 대식구, 수지 세포 및/또는 단핵구)의 전신계 활성화와 관련되지 않는다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자의 투여는 백혈구에 의한 염증성 사이토킨 및/또는 케모킨(예컨대, IL-6, IFN-γ, IL-8, IL-10, GM-CSF, MIP-1α/β, MCP-1, CXCL9 및/또는 CXCL10)의 발현의 전신계 상향조절과 관련되지 않는다.

[1057] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 항원-결합 분자 또는 다른 물품(article)(예컨대, 조성물, 핵산 등)을 사용한

대상체(subject)의 치료(예컨대, 여기서 항원-결합 분자/물품은 투여량 및/또는 본원에 기술된 투여량 스케쥴에 따라 대상체에게 투여된다)는 다음의 결과 중 하나 이상과 관련될 수 있다:

[1058] · 부작용(adverse event; AE)의 부재;

[1059] · 중증 부작용(serious adverse event; SAE)의 부재;

[1060] · 예컨대, 다른 항-VISTA 치료학적 항체와 비교한 것으로서, 부작용(AE)의 최소의 또는 감소된 빈도;

[1061] · 예컨대, 다른 항-VISTA 치료학적 항체와 비교한 것으로서 중증 부작용(SAE)의 최소의 또는 감소된 빈도;

[1062] · 용량을 제한하는 독성(dose limiting toxicity; DLT)의 부재;

[1063] · 다른 항-VISTA 치료학적 항체, 예를 들면, WO180 및 CA-170과 비교한 것으로서, 용량을 제한하는 독성(DLT)의 최소의 또는 감소된 빈도;

[1064] · 예컨대, 치료 전 동일한 대상체와 비교하여, 치료 후 순환하는 종양 마커(예컨대, 세포-유리된(cell-free; cf) DNA 변경 대립형질 분획화/종양 분획화, ctDNA)의 감소;

[1065] · 예컨대, 다른 항-VISTA 치료학적 항체, 예를 들면, WO180 및 CA-170과 비교한 것으로서, 주입 관련된 반응, 예컨대, 사이토킨 방출 증후군 및 관련된 사이토킨 증가의 부재, 최소의, 또는 감소된 빈도;

[1066] · 다른 항-VISTA 치료학적 항체, 예를 들면, WO180 및 CA-170와 비교하여 위장 독성의 부재, 최소의, 또는 감소된 빈도;

[1067] · 예컨대, 다른 항-VISTA 치료학적 항체, 예를 들면, WO180 및 CA-170와 비교한 것으로서, 발진(rash) 또는 피부염(dermatitis)의 부재, 최소의, 또는 감소된 빈도;

[1068] · 예컨대, 다른 항-VISTA 치료학적 항체, 예를 들면, WO180 및 CA-170와 비교한 것으로서, 혈액학적 변화의 부재, 최소의, 또는 감소된 빈도;

[1069] · 예컨대, 다른 항-VISTA 치료학적 항체, 예를 들면, WO180 및 CA-170와 비교한 것으로서, 심장독성(cardiotoxicity)의 부재, 최소의, 또는 감소된 빈도; 및/또는

[1070] · 예컨대, 다른 항-VISTA 치료학적 항체, 예를 들면, WO180 및 CA-170와 비교한 것으로서, 알부민 증가의 부재, 최소의, 또는 감소된 빈도;

[1071] 부작용(AE)은 시험 의약 생성물(investigational medicinal product; IMP), 경쟁인자 생성물 또는 승인된 약물을 투여받은 환자에서 어떠한 원치않는, 바람직하지 않은 또는 계획되지 않은 의학적 발생으로서 정의될 수 있다. AE는 IMP 또는 경쟁인자과 관련될 수 있거나 또는 관련되지 않을 수 있는 신호, 증상, 질환, 및/또는 실험적 또는 생리학적 관찰일 수 있다. AE는 다음의 목록에서의 것을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[1072] · 기존 상태의 임상적으로 유의적인 악화. 이는 완전히 해결될 수 있고 이후 다시 비정상적으로 되는 상태를 포함한다.

[1073] · 우발적인 또는 의도적인 것에 상관없이 IMP의 과용량으로부터 발생하는 AE.

[1074] · 예를 들면, 시험자가 약물 배치가 유효하지 않는 것으로 예측한 경우 또는 시험자가 IMP가 질환 진행에 기여한다고 예측한 경우에, IMP의 효능의 결여로부터 발생하는 AE.

[1075] 중증 부작용(SAE)은 용량, 인과관계 또는 예측과 상관없이 다음을 야기하는 임의의 AE이다:

[1076] · 사망을 야기하고;

[1077] · 생명을 위협하고, 즉, 환자가 부작용이 발생하는 시점에서 또는 환자의 사망을 야기하였을 수 있는 장치 또는 다른 의학 생성물의 지속된 사용으로 사망할 실질적인 위험에 있는 경우의 이벤트;

[1078] · 환자 입원(in-patient hospitalisation)을 요구하거나 또는 기존의 환자 입원을 연장시키고(일부 입원, 예컨대, 환자가 임상 시험에 참여하기 전에 계획된 병원 입원; 수혈(blood transfusion)과 같은 계획된 절차를 위한 1일밤 머묾은 SAE 보고으로부터 제외된다);

[1079] · 지속적인 또는 유의적인 무능력(incapacity) 또는 불능(disability)을 야기하고;

[1080] · 선천적 기형 또는 선천적 결함이고;

[1081] · 임의의 다른 의학적으로 중요한 이벤트, 즉, 환자를 위험에 빠뜨릴 수 있거나 상기 나열된 결과 중 하나를 예방하기 위한 개입(intervention)을 요구할 수 있는 임의의 이벤트.

[1082] 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 치료에 대한 반응은 종양/병변 반응에 대한 참고로 특성화될 수 있다. 일부 구현예에서, 종양/병변 반응은 고형 종양에서 반응 평가 기준(response evaluation criteria in solid tumours; RECIST) 범주, 예컨대, 이의 전문이 본원에 참고로 포함된 문헌: Eisenhauer et al., Eur J Cancer. 2009 Jan;45(2):228-47에 기술된 바와 같은 RECIST 1.1 범주에 따라 평가한다.

[1083] 일부 구현예에서 본원에 기술된 항원-결합 분자 또는 물품을 사용한 대상체의 치료(예컨대, 여기서 항원-결합 분자/물품은 본원에 기술된 투여량에서 및/또는 투여량 스케쥴에 따라서 대상체에게 투여된다)는 적절하게는 예컨대, 치료의 시작으로부터 12 및/또는 24개월째에, 다음의 결과(적절하게는 RECIST 1.1 범주에 따라 평가된 것으로서, 평가의 세부사항 및 방법에 대해서는 실시예 19.9를 참고한다) 중 하나 이상과 관련될 수 있다:

[1084] · 항-종양 반응;

[1085] · 완전한 반응(complete response; CR). CR은 모든 표적 및/또는 비-표적 종양의 완전한 현미경적 사라짐을 지칭한다. CR은 종양 마커 수준의 표준화를 포함할 수 있다;

[1086] · 예컨대, 항원-결합 분자를 제공받지 않은 대상체, 또는 상이한 항-VISTA 항원-결합 분자로 치료한 대상체에 대한, 항원-결합 분자로 치료하지 않은 동일한 대상체에서 CR의 경향성과 비교한 것으로서, 완전한 반응(CR)의 증가된 경향성;

[1087] · 예컨대, 항원-결합 분자로 치료받지 않은, 또는 항-VISTA 항원-결합 분자로 치료받은 완전한 반응(CR)을 나타내는 대상체의 비율과 비교한 것으로서, CR을 나타내는 대상체의 증가된 비율;

[1088] · 전반적인 생존(overall survival; OS). OS는 임의의 원인으로 인해 치료 시작으로부터 사망까지의 시간으로 정의된다;

[1089] · 예컨대, 항원-결합 분자를 제공받지 않는 대상체, 또는 상이한 항-VISTA 항원-결합 분자로 치료받은 대상체에 대해, 항원-결합 분자를 사용한 치료의 부재하에 동일한 대상체에서 전반적인 생존(OS)의 경향성과 비교한 것으로서, OS의 증가된 경향성;

[1090] · 예컨대, 항원-결합 분자로 치료받지 않거나, 또는 상이한 항-VISTA 항원-결합 분자로 치료받은 전반적인 생존(OS)을 나타내는 대상체의 비율과 비교한 것으로서, OS를 증명하는 대상체의 증가된 비율;

[1091] · 진행이 없는 생존(progression-free survival; PFS). PFS는 치료의 시작으로부터 질환 진행 또는 사망까지의 시간을 지칭한다.

[1092] · 예컨대, 항원-결합 분자를 제공받지 않은 대상체, 또는 상이한 항-VISTA 항원-결합 분자로 치료받은 대상체에 대해, 항원-결합 분자를 사용한 치료없이 동일한 대상체에서 진행이 없는 생존(PFS)의 경향성을 비교한 것으로서, PFS의 증가된 경향성;

[1093] · 예컨대, 항원-결합 분자로 치료받지 않거나, 또는 상이한 항-VISTA 항원-결합 분자로 치료받은 진행이 없는 생존(PFS)을 나타내는 대상체의 비율과 비교한 것으로서, PFS를 입증하는 대상체의 증가된 비율;

[1094] · 6개월째에 진행이 없는 생존(PFS6). PFS6은 치료 시작 후 6개월(26주)째에 생존하고 진행이 없는 환자의 퍼센트를 지칭한다.

[1095] · 항원-결합 분자를 제공받지 않은 대상체, 또는 상이한 항-VISTA 항원-결합 분자로 치료받은 대상체에 대해, 항원-결합 분자를 사용한 치료의 부재하의 동일한  대상체에서 6개월째에 진행이 없는 생존(PFS6)의 경향성과 비교한 것으로서, PFS6의 증가된 경향성;

[1096] · 예컨대, 항원-결합 분자로 치료받지 않거나, 또는 상이한 항-VISTA 항원-결합 분자로 치료받은 6개월째에 진행이 없는 생존(PFS6)의 경향성을 나타내는 대상체의 퍼센트와 비교한 것으로서, PFS6를 입증하는 대상체의 증가된 퍼센트;

[1097] · 부분 반응(partial response; PR). PR은 치료 전에 계산된 기본선 합 면적과 비교하여 모든 표적 종양 면적의 합에서 적어도 30%의 축소를 지칭한다;

[1098] · 예컨대, 항원-결합 분자를 제공받지 않거나, 또는 상이한 항-VISTA 항원-결합 분자로 치료받은 대상체에 대

해, 항원-결합 분자를 사용한 치료의 부재하의 동일한 대상체에서 부분 반응(PR)의 경향성과 비교한 것으로서, PR의 증가된 경향성;

[1099] · 예컨대, 항원-결합 분자로 치료받지 않거나, 또는 상이한 항-VISTA 항원-결합 분자로 치료받은 부분 반응(PR)을 나타내는 대상체의 비율과 비교한 것으로서, PR을 입증하는 대상체의 증가된 비율;

[1100] · 혼합된 반응(mixed response; MR). MR은 PR에 대한 기준을 충족하는 하나 이상의 종양 병변 및 진행성 질환에 대한 기준(가장 작은 종양 크기 및/또는 신규 종양 병변의 외관으로부터 모든 종양 직경의 합에서 적어도 20% 증가)을 충족하는 다른 종양 병변(들)을 지칭한다;

[1101] · 예컨대, 항원-결합 분자를 제공받지 않거나, 또는 상이한 항-VISTA 항원-결합 분자로 치료받은 대상체에 대해, 항원-결합 분자를 사용한 치료의 부재하의 동일한 대상체에서 혼합된 반응(MR)의 경향성과 비교한 것으로서, MR의 증가된 경향성;

[1102] · 예컨대, 항원-결합 분자로 치료받지 않거나, 또는 상이한 항-VISTA 항원-결합 분자로 치료받은 혼합된 반응(MR)을 나타내는 대상체의 비율과 비교한 것으로서, MR을 입증하는 대상체의 증가된 비율;

[1103] · 안정한 질환(stable disease; SD). SD는 치료 시작시 종양 버딘과 비교한 부분 반응 또는 진행성 질환이 없음을 지칭한다;

[1104] · 예컨대, 항원-결합 분자를 제공받지 않거나, 또는 상이한 항-VISTA 항원-결합 분자로 치료받은 대상체에 대해, 항원-결합 분자를 사용한 치료의 부재하의 동일한 대상체에서 안정한 질환반응(SD)의 경향성과 비교한 것으로서, SD의 증가된 경향성;

[1105] · 예컨대, 항원-결합 분자로 치료받지 않거나, 또는 상이한 항-VISTA 항원-결합 분자로 치료받은 안정한 질환(SD)을 나타내는 대상체의 비율과 비교한 것으로서, SD를 입증하는 대상체의 증가된 비율;

[1106] · 예컨대, 항원-결합 분자를 제공받지 않거나, 또는 상이한 항-VISTA 항원-결합 분자로 치료받은 대상체에 대해, 항원-결합 분자를 사용한 치료의 부재하의 동일한 대상체에서 반응의 기간(duration of response; DoR)과 비교한 것으로서, 증가된 DoR 또는 CR의 증가된 기간. 반응의 기간(DoR)은 PR 또는 CR에 대해 처음 충족하는 측정 기준일로부터 진행성 질환(progressive disease; PD)에 대해 처음 충족하는 측정 기준일까지의 시간으로서 정의된다. CR의 기간(duration of CR; DoCR)은 측정 기준이 CR을 충족하는 일자로부터 PD를 처음 충족하는 측정 기준일까지의 시간으로서 정의된다;

[1107] · 예컨대, 항원-결합 분자로 치료받지 않거나, 또는 상이한 항-VISTA 항원-결합 분자로 치료받은 대상체의 반응의 기간(DoR) 또는 CR의 증가된 기간(DoCR)과 비교한 것으로서, 반응의 증가된 기간(DoR) 또는 CR의 증가된 기간을 입증하는 대상체의 증가된 비율;

[1108] · 전반적인 반응(overall response; OR). OR은 완전한 반응(Complete Response; CR) 또는 부분 반응(Partial Response; PR)을 달성하는 것으로 정의된다;

[1109] · 전반적인 반응 속도(overall response rate; ORR). ORR은 완전한 반응(CR) 또는 부분 반응(PR)을 달성한 환자의 비율로서 정의된다;

[1110] ·예컨대, 항원-결합 분자로 치료받지 않거나, 또는 상이한 항-VISTA 항원-결합 분자로 치료받은 OR을 나타내는 대상체의 비율과 비교한 것으로서, 증가된 ORR;

[1111] 종양 반응은 종양 및 이의 위치에 따른 적절한 영상화 기술, 예컨대, CT 스캔, MRI 스캔 및 FDG-PET를 사용하여 달성할 수 있다. 적절한 기술은 숙련가에게 친숙할 것이고 Eisenhauer et al, *supra*, 및/또는 본원의 실시예 19.9에 기술되어 있다.

[1112] 대상체는 예컨대, 본 개시내용에 따른 암(cancer) 또는 고형 종양을 갖는, 또는 갖는 것으로 측정된, 본원에 정의된 대상체일 수 있다.

[1113] 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor; CAR)

[1114] 본 발명은 또한 본 발명의 항원-결합 분자 또는 폴리펩타이드를 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 제공한다.

[1115] CAR은 항원-결합 및 T 세포 활성화 기능 둘 다를 제공하는 재조합 수용체이다. CAR 구조 및 가공은 예를 들면, 이의 전문이 본원에 참고로 포함된, 문헌: Dotti et al., Immunol Rev (2014) 257(1)에서 고찰된다. CAR은 세포 막 앵커 영역(cell membrane anchor region)및 신호전달 영역에 연결된 항원-결합 영역을 포함한다. 임의의

힌지 영역은 항원-결합 영역과 세포 막 앵커 영역 사이에 분리를 제공할 수 있고, 가요성 링커로서 작용할 수 있다.

[1116] 본 발명의 CAR은 본 발명의 항원-결합 분자를 포함하거나 또는 이로 이루어진, 또는 본 발명에 따른 폴리펩타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진 항원-결합 영역을 포함한다.

[1117] 세포 막 앵커 영역은 CAR의 항원-결합 영역과 신호전달 영역 사이에 제공되고 CAR을 발현하는 세포의 세포막에 CAR을 앵커링하기 위해, 세포외 공간 내 항원-결합 영역, 및 세포 내에 신호전달 영역을 제공한다. 일부 구현예에서, CAR은 CD3-ζ, CD4, CD8 또는 CD28 중 하나에 대한 막전위 영역 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어지거나, 또는 이로부터 유래된 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진 세포막 앵커 영역을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 참고 아미노산 서열로부터 유래된' 영역은 참고 서열에 대해 적어도 60%, 예컨대, 적어도 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성 중 하나를 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[1118] CAR의 신호전달 영역은 T 세포의 활성화를 허용한다. CAR 신호전달 영역은 CD3-ζ의 세포내 도메인의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 이는 CAR-발현 T 세포의 포스포릴화 및 활성화를 위한 면역수용체 타이로신-기반 활성화 모티프(immunoreceptor tyrosine-based activation motif; ITAM)를 제공한다. 다른 ITAM-함유 단백질, 예를 들면, FcεRI의 서열을 포함하는 신호전달 영역을 또한 CAR에서 사용하였다(Haynes et al., 2001 J Immunol 166(1):182-187). CAR의 신호전달 영역은 또한 공-자극성 분자의 신호전달 영역으로부터 유래된 공-자극성 서열을 포함함으로써, 표적 단백질에 대한 결합시 CAR-발현 T 세포의 활성화를 촉진할 수 있다. 적합한 공-자극성 분자는 CD28, OX40, 4-1BB, ICOS 및 CD27을 포함한다. 일부 경우에, CAR은 상이한 세포내 경로의 공-자극을 제공하도록 가공된다. 예를 들면, DC28 공자극과 관련된 신호전달은 포스파티딜이노시톨 3-키나제(phosphatidylinositol 3-kinase; P13K)를 우선적으로 활성화시키지만, 4-1BB-매개된 신호전달은 TNF 수용체 관련된 인자(TNF receptor associated factor; TRAF) 어댑터(adaptor) 단백질을 통한다. 따라서, CAR의 신호전달 영역은 때때로 하나 이상의 공-자극성 분자의 신호전달 영역으로부터 유래된 공-자극성 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 CAR은 CD28, OX40, 4-1BB, ICOS 및 CD27 중 하나 이상의 세포내 도메인의 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어지거나, 또는 이로부터 유래된 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 이루어진 하나 이상의 공-자극성 서열을 포함한다.

[1119] 임의의 힌지 영역은 항원-결합 도메인과 막전위 도메인 사이의 분리를 제공할 수 있고, 가요성 링커로서 작용할 수 있다. 힌지 영역은 IgG1으로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 CAR은 IgG1의 힌지 영역의 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어지거나, 또는 이로부터 유래된 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 이루어진 힌지 영역을 포함한다.

[1120] 또한, 본 발명에 따른 CAR을 포함하는 세포가 제공된다. 본 발명에 따른 CAR을 사용하여 CAR-발현 면역 세포, 예컨대, CAR-T 또는 CAR-NK 세포를 생성시킬 수 있다. 면역 세포 내로 CAR의 가공은 시험관 내에서, 배양 동안 수행될 수 있다.

[1121] 본 발명의 CAR의 항원-결합 영역은 임의의 적합한 양식, 예컨대, scFv, scFab 등을 제공할 수 있다.

[1122] 핵산 및 벡터

[1123] 본 발명은 본 발명에 따른 항원-결합 분자, 폴리펩타이드 또는 CAR을 암호화하는, 핵산, 또는 다수의 핵산을 제공한다.

[1124] 일부 구현예에서, 핵산은 다른 핵산, 또는 천연적으로 발생하는 생물학적 물질로부터 정제되거나 또는 단리된다. 일부 구현예에서 핵산(들)은 DNA 및/또는 RNA를 포함하거나 또는 이로 이루어진다.

[1125] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 핵산 또는 다수의 핵산을 포함하는 벡터, 또는 다수의 벡터를 제공한다.

[1126] 뉴클레오타이드 서열은 벡터, 예컨대, 발현 벡터 내에 함유될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 "벡터"는 외인성 핵산을 세포 내로 이전시키기 위한 벡터로서 사용된 핵산 분자이다. 벡터는 세포 내에서 핵산의 발현을 위한 벡터일 수 있다. 이러한 벡터는 발현될 서열을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결된 프로모터 서열을 포함할 수 있다. 벡터는 또한 말단 코돈 및 발현 인핸서(enhancer)를 포함할 수 있다. 당해 분야에 공지된 임의의 적합한 벡터, 프로모터, 인핸서 및 종결 코돈을 사용하여 본 발명에 따른 벡터로부터 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 발현시킬 수 있다.

[1127] 용어 "작동적으로 연결된"은 선택된 핵산 서열 및 조절성 핵산 서열(예컨대, 프로모터 및/또는 인핸서)가 조절

서열의 영향 또는 제어하에 핵산 서열의 발현을 위치시키는(이에 의해 발현 카세트를 형성하는) 방식으로 공유 결합으로 연결된다. 따라서, 조절 서열은 조절 서열이 핵산 서열의 전사를 시행할 수 있는 경우 선택된 핵산 서열에 작동적으로 연결된다. 수득되는 전사체(들)은 이후 목적한 펩타이드(들)/폴리펩타이드(들)로 해독될 수 있다.

[1128] 적합한 벡터는 플라스미드, 이원 벡터(binary vector), DNA 벡터, mRNA 벡터, 바이러스 벡터(예컨대, 감마레트로바이러스 벡터(예컨대, 뮤린 백혈병 바이러스(MLV)-유래된 벡터), 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스 벡터, 박시니아 바이러스 벡터 및 헤르페스바이러스 벡터), 트랜스포손(transposon)-기반 벡터, 및 인공 염색체(예컨대, 효모 인공 염색체)를 포함한다.

[1129] 일부 구현예에서, 벡터는 진핵세포 벡터, 예컨대, 진핵 세포 내에서서의 벡터로부터의 단배질의 발현에 필수적인 성분을 포함하는 벡터일 수 있다. 일부 구현예에서, 벡터는 예컨대, 단백질 발현을 구동하는 사이토메갈로바이러스(CMV) 또는 SV40 프로모터를 포함하는 포유동물 벡터일 수 있다.

[1130] 본 발명에 따른 항원-결합 분자의 구성적 폴리펩타이드는 다수의 핵산의 상이한 핵산에 의해, 또는 다수의 벡터의 상이한 벡터에 의해 암호화될 수 있다.

[1131] 항원-결합 분자 및 폴리펩타이드를 포함하는/발현하는 세포

[1132] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 항원-결합 분자, 폴리펩타이드 또는 CAR을 포함하거나 이를 발현하는 세포를 제공한다. 또한 본 발명에 따른 핵산, 다수의 핵산, 벡터 또는 다수의 벡터를 포함하거나 이를 발현하는 세포가 제공된다.

[1133] 세포는 진핵 세포, 예컨대, 포유동물 세포일 수 있다. 포유동물은 영장류(레서스, 시노몰구스, 비-사람 영장류 또는 사람) 또는 비-사람 포유동물(예컨대,토끼, 기니아 피크(guinea pig), 래트, 마우스 또는 다른 설치류(예를 들면, 로덴티아(Rodentia) 목의 임의의 동물), 고양이, 개, 돼지. 양, 염소, 소(암소, 예컨대, 젖소, 또는 보스(Bos) 목의 임의의 동물), 말(예를 들면, 데퀴다에(Equidae) 목의 임의의 동물), 당나귀 및 비-사람 영장류)일 수 있다.

[1134] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 핵산, 다수의 핵산, 벡터 또는 다수의 벡터를 세포 내로 도입시킴을 포함하여, 본 발명에 따른 핵산(들) 또는 벡터(들)을 포함하는 세포를 생산하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 단리된 핵산(들) 또는 벡터(들)을 세포 내로 도입하는 것은 형질전환, 형질감염, 전기천공(electroporation) 또는 형질도입(예컨대, 레트로바이러스 형질도입)을 포함한다.

[1135] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 핵산, 다수의 핵산, 벡터 또는 다수의 벡터를 세포 내에 도입시킴을 포함하여, 본 발명에 따른 항원-결합 분자, 폴리펩타이드 또는 CAR을 발현/포함하는 세포를 생산하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 방법은 세포에 의해 핵산(들) 또는 벡터(들)의 발현에 적합한 조건 하에서 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 시험관 내에서 수행된다.

[1136] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 방법에 의해 수득되거나 수득가능한 세포를 제공한다.

[1137] 항원-결합 분자 및 폴리펩타이드의 생산

[1138] 본 발명에 따른 항원-결합 분자 및 폴리펩타이드는 숙련가에게 공지된 폴리펩타이드의 생산 방법에 따라 제조할 수 있다.

[1139] 폴리펩타이드는 화학적 합성, 예컨대, 액체 또는 고체 상 합성에 의해 제조할 수 있다. 예를 들면, 펩타이드/폴리펩타이드는 예를 들면, 이의 전문이 본원에 참고로 포함된, 문헌: Chandrudu et al., Molecules (2013), 18: 4373-4388에  기술된 방법을 사용하여 합성할 수 있다.

[1140] 대안적으로, 항원-결합 분자 및 폴리펩타이드는 재조합 발현에 의해 생산될 수 있다. 폴리펩타이드의 재조합 생산에 적합한 분자 생물학 기술은 예를 들면, 둘 다 이의 전문이 본원에 참고로 포함된 문헌: Green and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (4th Edition), Cold Spring Harbor Press, 2012, 및 Nat Methods. (2008); 5(2): 135-146에 나타낸 것과 같이, 당해 분야에 잘 공지되어 있다. 항원-결합 분자의 재조합 생산 방법은 또한, 이들 둘 다 이의 전문이 본원에 참고로 포함된 문헌: Frenzel et al., Front Immunol. (2013); 4: 217 및 Kunert and Reinhart, Appl Microbiol Biotechnol. (2016) 100: 3451-3461에 기술되어 있다.

[1141] 일부 경우에, 본 발명의 항원-결합 분자는 하나 이상의 폴리펩타이드 쇄로 구성된다. 이러한 경우에, 항원-결합

분자의 생산은 하나 이상의 폴리펩타이드의 전사 및 해독, 및 항원-결합 분자를 형성하는 폴리펩타이드 쇄의 후속적인 연합을 포함할 수 있다.

[1142] 본 발명에 따른 재조합 생산을 위해, 폴리펩타이드의 발현에 적합한 임의의 세포를 사용할 수 있다. 세포는 원핵세포 또는 진핵세포일 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 원핵 세포, 예를 들면, 아르카에아(archaea) 또는 세균의 세포이다. 일부 구현예에서, 세균은 그램-음성 세균, 예를 들면, 엔테로박테리아세아에(Enterobacteriaceae) 과의 세균, 예를 들면, 에스케리키아 콜라이(Escherichia coli)일 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 진핵 세포, 예를 들면, 효모 세포, 식물 세포, 곤충 세포 또는 포유동물 세포, 예컨대, CHO, HEK (예컨대, HEK293), HeLa 또는 COS 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 폴리펩타이드를 일시적으로 또는 안정하게 발현하는 CHO 세포이다.

[1143] 일부 경우에 일부 원핵 세포는 진핵 세포와 같이 동일한 폴딩(folding) 또는 해독 후 변형을 허용하지 않으므로 원핵 세포가 아니다. 또한, 매우 높은 발현 수준이 진핵 세포에서 가능하며 단백질은 적절한 태그를 사용하여 진핵세포로부터 정제하기에 보다 용이하다. 배지 내로 단백질의 분비를 향상시키는 구체적인 플라스미드를 또한 활용할 수 있다.

[1144] 일부 구현예에서, 폴리펩타이드는 예컨대, 이의 전문이 본원에 참고로 포함된 문헌: Zemella et al. Chembiochem (2015) 16(17): 2420-2431에 기술된 시스템을 사용하여, 세포-유리된-단백질 합성(cell-free-protein synthesis)(CFPS)에 의해 제조할 수 있다.

[1145] 생산은 목적한 폴리펩타이드(들)을 발현하기 위해 변형된 진핵 세포의 배양 또는 발효를 포함할 수 있다. 배양 또는 발효는 영양물, 공기/산소 및/또는 성장 인자의 적절한 공급으로 제공된 생물반응기 속에서 수행할 수 있다. 분비된 단백질은 세포로부터 배지/발효 브로쓰(broth)를 분할하고, 단백질 성분을 추출하고, 개개 단백질을 분리하여 분비된 폴리펩타이드(들)을 단리함으로써 수집할 수 있다. 배양, 발효 및 분비 기술은 당해 분야의 기술자에 잘 공지되어 있고, 예를 들면, 문헌: Green and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (4th Edition; 상기 본원에 참고로 포함됨)에 기술되어 있다.

[1146] 생물반응기는 세포가 배양될 수 있는 하나 이상의 용기(vessel)를 포함한다. 생물반응기 내 배양은 반응기 내로 반응물의 연속 유동(continuous flow)으로, 및 반응기로부터 배양된 세포의 연속 유동으로, 연속적으로 일어날 수 있다. 대안적으로, 배양은 배치식(batch)으로 일어날 수 있다. 생물반응기는 용기 내부 및 외부로의 pH, 산소, 유동 속도, 및 용기 내에서 교반과 같은 환경 조건을 모니터링 및 제어함으로써 최적 조건을 배양되는 세포에게 제공한다.

[1147] 항원-결합 분자/폴리펩타이드(들)을 발현하는 세포를 배양한 후, 목적한 폴리펩타이드(들)을 단리할 수 있다. 당해 분야에 공지된 세포로부터 단백질을 분리하는 임의의 적합한 방법을 사용할 수 있다. 폴리펩타이드를 단리하기 위하여, 영양물 배지로부터 세포를 단리하는 것이 필수적일 수 있다. 폴리펩타이드(들)이 세포로부터 분리되는 경우, 세포는 목적한 분비된 폴리펩타이드(들)을 함유하는 배양 배지로부터 원심분리에 의해 분리할 수 있다. 목적한 폴리펩타이드(들)를 세포 내에서 수집한 경우, 단백질 단리는 세포 배양 배지로부터 세포를 분리하기 위한 원심분리, 용해 완충액을 사용한 세포 펠렛의 처리, 및 예컨대, 초음파처리, 신속한 동결-해동 또는 삼투압 분해에 의한 세포 파괴를 포함할 수 있다.

[1148] 이후에, 상층액 또는 배양 배지로부터 목적한 폴리펩타이드(들)를 단리하는 것이 바람직할 수 있고, 이는 다른 단백질 및 비-단백질 구성성분을 함유할 수 있다. 상층액 또는 배양 배지로부터 단백질 구성성분을 분리하기 위한 일반적인 접근법은 침전에 의한다. 상이한 용질의 단백질은 황산암모늄과 같은 침전제의 상이한 농도에서 침전시킨다. 예를 들면, 저 농도의 침전제에서, 수용성 단백질이 추출된다. 따라서, 상이한 증가하는 농도의 침전제를 가함으로써, 상이한 용해도의 단백질을 구별할 수 있다. 투석을 후속적으로 사용하여 분리된 단백질로부터 황산암모늄을 제거할 수 있다.

[1149] 상이한 단백질을 구별하기 위한 다른 방법, 예를 들면, 이온 교환 크로마토그래피 및 크기 크로마토그래피가 당해 분야에 공지되어 이다. 이는 침전에 대한 대안으로서 사용될 수 있거나, 후속적으로 침전에 대해 수행될 수 있다.

[1150] 목적한 폴리펩타이드(들)가 배양물로부터 단리되면, 폴리펩타이드(들)를 농축시키는 것이 바람직하거나 필수적일 수 있다. 단백질을 농축시키는 다수의 방법, 예를 들면, 한외여과 또는 동결건조는 당해 분야에 공지되어 있다.

[1151] 조성물

[1152] 본 발명은 본원에 기술된 항원-결합 분자, 폴리펩타이드, CAR, 핵산, 발현 벡터 및 세포를 포함하는 조성물을 제공한다.

[1153] 본원에 기술된 항원-결합 분자, 폴리펩타이드, CAR, 핵산, 발현 벡터 및 세포는 임상 용도를 위해 약제학적 조성물 또는 의약으로서 제형화될 수 있고 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 보조제(adjuvant)를 포함할 수 있다. 조성물은 주사 또는 주입을 포함할 수 있는 국소, 비경구, 전신계, 강내(intracavitary), 정맥내, 동맥내, 근육내, 척추강내, 안내, 결막내, 종양내, 피하, 피내, 수막내, 경구 또는 경피 투여 경로를 위해 제형화될 수 있다.

[1154] 적합한 제형은 멸균 또는 등장성 매질 속에 항원-결합 분자를 포함할 수 있다. 의약 및 약제학적 조성물은 유체, 예를 들면, 겔 형으로 제형화될 수 있다. 유체 제형은 사람 또는 동물 체의 선택된 영역에 주사 또는 주입(예컨대, 카테터(catheter)를 통해)에 의한 투여용으로 제형화될 수 있다.

[1155] 일부 구현예에서, 제형은 예컨대, 혈관 또는 종양 내로 주사 또는 주입하기 위해 제형화된다.

[1156] 본원에 기술된 본 발명에 따라서, 약제학적으로 유용한 조성물의 생산을 위한 방법이 또한 제공되고, 이러한 생산 방법은 다음으로부터 선택된 하나 이상의 단계를 포함할 수 있다: 본원에 기술된 항원-결합 분자, 폴리펩타이드, CAR, 핵산(또는 이의 다수), 발현 벡터(또는 이의 다수) 또는 세포를 생산하는 단계; 본원에 기술된 항원-결합 분자, 폴리펩타이드, CAR, 핵산(또는 이의 다수), 발현 벡터(또는 이의 다수) 또는 세포를 단리하는 단계; 및/또는 본원에 기술된 항원-결합 분자, 폴리펩타이드, CAR, 핵산(또는 이의 다수), 발현 벡터(또는 이의 다수) 또는 세포를 약제학적으로 허용되는 담체, 보조제, 부형제 또는 희석제와 혼합하는 단계.

[1157] 예를 들면, 추가의 양태에서, 본원에 기술된 발명은 질환/상태(예컨대, 암)의 치료에 사용하기 위한 의약 또는 약제학적 조성물의 제형화 또는 생산 방법에 관한 것이고, 이러한 방법은 본원에 기술된 항원-결합 분자, 폴리펩타이드, CAR, 핵산(또는 이의 다수), 발현 벡터(또는 이의 다수) 또는 세포를 약제학적으로 허용되는 담체, 보조제, 부형제 또는 희석제와 혼합함으로써 약제학적 조성물 또는 의약을 제형화하는 단계를 포함한다.

[1158] 본 개시내용의 양태 및 구현예에서, 항원-결합 분자는 명시된 농도/비율로 특수한 화학적 구성성분을 포함하는 조성물로 제공될 수 있다.

[1159] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 완충제 속에 제공된다. 본원에 사용된 바와 같은 "완충제"는 이의 산-염기 접합체 구성성분의 작용에 의해 pH 속에서 변화를 지속하는 완충된 용액을 지칭한다. 본 개시내용의 완충제는 바람직하게는 pH가 약 4.5 내지 약 7.0, 바람직하게는 약 5.0 내지 약 6.5의 범위이다. 이러한 범위 내에서 pH를 제어할 완충제의 예는 아세테이트, 석시네이트, 히스티딘, 히스티딘-아르기닌, 히스티딘-메티오닌 및 다른 유기산 완충제를 포함한다.

[1160] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자를 포함하는 조성물은 pH가 4.0 내지 7.0, 예컨대, pH 4.5 내지 pH 6.8, pH 4.6 내지 pH 6.5, pH 4.8 내지 pH 6.3, 또는 pH 5.0 내지 pH 6.3 중 하나이다. 일부 구현예에서, 조성물은 pH가 ~ 5.5이다. 일부 구현예에서, 조성물은 pH가 ~ 5.8이다. 일부 구현예에서, 조성물은 pH가 ~ 6.3이다.

[1161] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 아세테이트 완충제, 즉, 아세테이트 이온을 포함하는 완충제 속에 제공된다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 2 mM 내지 200 mM의 아세테이트, 예컨대, 5 mM 내지 100 mM, 10 mM 내지 40 mM, 12 mM 내지 30 mM, 15 내지 25 mM, 또는 18 내지 22 mM 중 하나의 최종 농도에서 아세테이트를 포함하는 조성물로 제공된다. 일부 구현예에서, 조성물은 ~20 mM의 아세테이트를 포함할 수 있다. 완충제는 아세트산나트륨을 포함할 수 있다.

[1162] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 히스티딘 완충제, 즉, 히스티딘 이온을 포함하는 완충제 속에 제공된다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 2 mM 내지 200 mM의 히스티딘, 예컨대, 5 mM 내지 100 mM, 10 mM 내지 40 mM, 12 mM 내지 30 mM, 15 내지 25 mM, 또는 18 내지 22 mM 중 하나의 최종 농도에서 히스티딘을 포함하는 조성물로 제공된다. 일부 구현예에서, 조성물은 ~20 mM의 히스티딘을 포함할 수 있다.

[1163] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 석시네이트 완충제, 즉, 석시네이트 이온을 포함하는 완충제 속에 제공된다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 2 mM 내지 200 mM의 석시네이트, 예컨대, 5 mM 내지 100 mM, 10 mM 내지 40 mM, 12 mM 내지 30 mM, 15 내지 25 mM, 또는 18 내지 22 mM 중 하나의 최종 농도에서 석시네이트를 포함하는 조성물 속에 제공된다. 일부 구현예에서, 조성물은 ~20 mM의 석시네이트를 포함할 수 있다. 완충제는

석신산나트륨을 포함할 수 있다.

[1164] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 인산나트륨 완충제, 즉, 나트륨 및 포스페이트 이온을 포함하는 완충제 속에 제공된다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 2 mM 내지 200 mM의 인산나트륨, 예컨대, 5 mM 내지 100 mM, 10 mM 내지 40 mM, 12 mM 내지 30 mM, 15 내지 25 mM, 또는 18 내지 22 mM 중 하나의 최종 농도에서 인산나트륨을 포함하는 조성물로 제공된다. 일부 구현예에서, 조성물은 ~20 mM의 인산나트륨을 포함할 수 있다.

[1165] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 아세트산나트륨 완충제, 즉, 아세테이트 이온을 포함하는 완충제 속에 제공된다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 2 mM 내지 200 mM의 아세트산나트륨, 예컨대, 5 mM 내지 100 mM, 10 mM 내지 40 mM, 12 mM 내지 30 mM, 15 내지 25 mM, 또는 18 내지 22 mM 중 하나의 최종 농도에서 아세트산나트륨을 포함하는 조성물로 제공된다. 일부 구현예에서, 조성물은 ~20 mM의 아세트산나트륨을 포함할 수 있다.

[1166] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 아르기닌 완충제, 즉, 아르기닌 이온을 포함하는 완충제 속에 제공된다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 1 mM 내지 250 mM의 아르기닌, 예컨대, 5 mM 내지 100 mM, 10 mM 내지 40 mM, 12 mM 내지 30 mM, 15 내지 25 mM, 또는 18 내지 22 mM 중 하나의 최종 농도에서 아르기닌을 포함하는 조성물로 제공된다. 일부 구현예에서, 조성물은 ~20 mM의 아르기닌을 포함할 수 있다.

[1167] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 히스티딘0아르기닌 완충제, 즉, 히스티딘 및 아르기닌 이온을 포함하는 완충제 속에 제공된다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 2 mM 내지 200 mM의 히스티딘, 예컨대, 5 mM 내지 100 mM, 10 mM 내지 40 mM, 12 mM 내지 30 mM, 15 내지 25 mM, 또는 18 내지 22 mM 중 하나의 최종 농도에서의 히스티딘, 및 1 mM 내지 300 mM의 아르기닌, 예컨대, 10 mM 내지 250 mM, 50 mM 내지 200 mM, 75 mM 내지 200 mM, 100 mM 내지 180 mM, 또는 125 내지 175 mM중 하나의 최종 농도에서의 아르기닌을 포함하는 조성물로 제공된다. 일부 구현예에서, 조성물은 ~20 mM의 히스티딘 및 ~150 mM의 아르기닌을 포함할 수 있다.

[1168] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자를 포함하는 조성물은 등장성 제제를 포함한다. 등장성 제제는 등장성 제형을 제공하기 위해 사용될 수 있다. 등장성 제제의 예는 예컨대, 염(예컨대, 염화나트륨, 염화칼륨) 및 당(예컨대, 슈크로스, 글루코스, 트레할로스)를 포함할 수 있다.

[1169] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 염화나트륨, 즉, 나트륨 이온 및 클로라이드 이온을 포함하는 조성물로 제공된다. 조성물의 염화나트륨 구성성분은 1 mM 내지 250 mM의 염화나트륨, 예컨대, 10 mM 내지 250 mM, 50 mM 내지 200 mM, 75 mM 내지 200 mM, 100 mM 내지 180 mM, 또는 125 내지 175 mM 중 하나의 최종 농도에서 제공된다. 일부 구현예에서, 조성물은 ~150 mM의 염화나트륨을 포함할 수 있다.

[1170] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 메티오닌을 포함하는 조성물로 제공된다. 조성물의 메티오닌 구성성분은 1 mM 내지 250 mM의 메티오닌, 예컨대, 10 mM 내지 250 mM, 50 mM 내지 200 mM, 75 mM 내지 200 mM, 100 mM 내지 180 mM, 또는 125 내지 175 mM의 최종 농도에서 제공된다. 일부 구현예에서, 조성물은 ~150 mM의 메티오닌을 포함할 수 있다.

[1171] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 슈크로스를 포함하는 조성물로 제공된다. 조성물의 슈크로스 구성성분은 2% 내지 20%, 예컨대, 2% 내지 15%, 3% 내지 12%, 또는 4% 내지 10% 중 하나의 최종 농도(용적당 중량)에서 제공될 수 있다. 일부 구현예에서, 조성물은 ~2, ~4, ~6, 또는 ~8%(w/v)의 슈크로스를 포함할 수 있다. 조성물의 슈크로스 구성성분은 200 내지 300 nM, 예컨대, ~240 mM의 최종 농도에서 제공될 수 있다.

[1172] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자를 포함하는 조성물은 계면활성제를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같은, "계면활성제"는 계면 장력을 저하시키는 제제를 지칭한다. 계면활성제는 바람직하게는 비-이온성 계면활성제이다. 계면활성제의 예는 폴리소르베이트(폴리소르베이트-20, 폴리소르베이트-80), 폴록사머(폴록사머-188) 및 트리톤 X-100을 포함한다. 계면활성제는 바람직하게는 조성물 속에 약 0.001% (w/v) 내지 약 0.5% (w/v)의 범위로 존재한다.

[1173] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 폴리소르베이트-20을 포함하는 조성물로 제공된다. 조성물의 폴리소르베이트-20 구성성분은 0.001% 내지 0.1%, 예컨대, 0.002% 내지 0.08%, 0.006% 내지 0.05%, 또는 0.008% 내지 0.04% 중 하나의 최종 농도(용적당 중량)에서 제공될 수 있다. 일부 구현예에서, 조성물은 ~0.02%(w/v)의 폴리소르베이트-20을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 조성물은 ~0.05%(w/v)의 폴리소르베이트-20을 포함할 수 있다.

[1174] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 폴리소르베이트-80을 포함하는 조성물로 제공된다. 조성물의 폴리소르베이트-80 구성성분은 0.001% 내지 0.1%, 예컨대, 0.002% 내지 0.08%, 0.006% 내지 0.05%, 또는 0.008% 내지 0.04% 중 하나의 최종 농도(용적당 중량)에서 제공될 수 있다. 일부 구현예에서, 조성물은 ~0.01%(w/v)의 폴리소르베

이트-80을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 조성물은 ~0.02%(w/v)의 폴리소르베이트-80을 포함할 수 있다.

[1175] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[1176] 2 mM 내지 200 mM(예컨대, 5 mM 내지 100 mM, 10 mM 내지 40 mM, 12 mM 내지 30 mM, 15 내지 25 mM, 또는 18 내지 22 mM 중 하나)의 히스티딘, 보다 바람직하게는 ~20 mM의 히스티딘;

[1177] 2% 내지 20%(예컨대, 2% 내지 15%, 3% 내지 12%, 또는 4% 내지 10% 중 하나)의 슈크로스 (w/v), 보다 바람직하게는 ~8%(w/v)의 슈크로스;

[1178] 0.001% 내지 0.1%(예컨대, 0.002% 내지 0.08%, 0.006% 내지 0.05%, 또는 0.008% 내지 0.04% 중 하나)의 폴리소르베이트-80 (w/v), 보다 바람직하게는 ~0.02%(w/v)의 폴리소르베이트-80; 및

[1179] pH 4.0 내지 7.0(예컨대, pH 4.5 내지 pH 6.8, pH 4.6 내지 pH 6.4, pH 4.8 내지 pH 6.2, 또는 pH 5.0 내지 pH 6.2 중 하나), 보다 바람직하게는 pH ~5.5를 퐁마하는 조성물로 제공된다.

[1180] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[1181] 2 mM 내지 200 mM(예컨대, 5 mM 내지 100 mM, 10 mM 내지 40 mM, 12 mM 내지 30 mM, 15 내지 25 mM, 또는 18 내지 22 mM 중 하나)의 히스티딘, 보다 바람직하게는 ~20 mM의 히스티딘;

[1182] 2% 내지 20%(예컨대, 2% 내지 15%, 3% 내지 12%, 또는 4% 내지 10% 중 하나)의 슈크로스 (w/v), 보다 바람직하게는 ~8%(w/v)의 슈크로스;

[1183] 0.001% 내지 0.1% (예컨대, 0.002% 내지 0.08%, 0.006% 내지 0.05%, 또는 0.008% 내지 0.04% 중 하나)의 폴리소르베이트-80 (w/v), 보다 바람직하게는 ~0.02%(w/v)의 폴리소르베이트-80; 및

[1184] pH 4.0 내지 7.0(예컨대, pH 4.5 내지 pH 6.8, pH 4.6 내지 pH 6.4, pH 4.8 내지 pH 6.2, 또는 pH 5.0 내지 pH 6.2 중 하나), 보다 바람직하게는 pH ~5.8를 포함하는 조성물로 제공된다.

[1185] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[1186] 2 mM 내지 200 mM(예컨대, 5 mM 내지 100 mM, 10 mM 내지 40 mM, 12 mM 내지 30 mM, 15 내지 25 mM, 또는 18 내지 22 mM 중 하나)의 히스티딘, 보다 바람직하게는 ~20 mM의 히스티딘;

[1187] 2% 내지 20%(예컨대, 1% 내지 15%, 2% 내지 10%, 또는 3% 내지 8%) 슈크로스 (w/v), 보다 바람직하게는 ~4%(w/v 중 하나)의 슈크로스;

[1188] 0.001% 내지 0.1%(예컨대, 0.002% 내지 0.08%, 0.006% 내지 0.05%, 또는 0.008% 내지 0.04% 중 하나)의 폴리소르베이트-80 (w/v), 보다 바람직하게는 ~0.02%(w/v)의 폴리소르베이트-80; 및

[1189] pH 4.0 내지 7.0(예컨대, pH 4.5 내지 pH 6.8, pH 4.6 내지 pH 6.4, pH 4.8 내지 pH 6.2, 또는 pH 5.0 내지 pH 6.2 중 하나), 보다 바람직하게는 pH ~5.8을 포함하는 조성물로 제공된다.

[1190] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[1191] 2 mM 내지 200 mM(예컨대, 5 mM 내지 100 mM, 10 mM 내지 40 mM, 12 mM 내지 30 mM, 15 내지 25 mM, 또는 18 내지 22 mM 중 하나)의 히스티딘, 보다 바람직하게는 ~20 mM의 히스티딘;

[1192] 0.2% 내지 20%(예컨대, 0.5% 내지 15%, 0.75% 내지 10%, 또는 1% 내지 5%) 슈크로스 (w/v), 보다 바람직하게는 ~2%(w/v 중 하나)의 슈크로스;

[1193] 0.001% 내지 0.1%(예컨대, 0.002% 내지 0.08%, 0.006% 내지 0.05%, 또는 0.008% 내지 0.04% 중 하나)의 폴리소르베이트-80 (w/v), 보다 바람직하게는 ~0.02%(w/v)의 폴리소르베이트-80; 및

[1194] pH 4.0 내지 7.0(예컨대, pH 4.5 내지 pH 6.8, pH 4.6 내지 pH 6.4, pH 4.8 내지 pH 6.2, 또는 pH 5.0 내지 pH 6.2 중 하나), 보다 바람직하게는 pH ~5.8을 포함하는 조성물로 제공된다.

[1195] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[1196] 2 mM 내지 200 mM(예컨대, 5 mM 내지 100 mM, 10 mM 내지 40 mM, 12 mM 내지 30 mM, 15 내지 25 mM, 또는 18 내지 22 mM 중 하나)의 히스티딘, 보다 바람직하게는 ~20 mM의 히스티딘;

[1197] 2% 내지 20%(예컨대, 2% 내지 15%, 3% 내지 12%, 또는 4% 내지 10% 중 하나)의 슈크로스 (w/v), 보다 바람직하

게는 ~8%(w/v)의 슈크로스;

[1198] 0.001% 내지 0.1%(예컨대, 0.002% 내지 0.08%, 0.006% 내지 0.05%, 또는 0.008% 내지 0.04% 중 하나)의 폴리소르베이트-80 (w/v), 보다 바람직하게는 ~0.02%(w/v)의 폴리소르베이트-80; 및

[1199] pH 4.0 내지 7.0(예컨대, pH 4.5 내지 pH 6.8, pH 4.6 내지 pH 6.4, pH 4.8 내지 pH 6.2, 또는 pH 5.0 내지 pH 6.2 중 하나), 보다 바람직하게는 pH ~6.3을 포함하는 조성물로 제공된다.

[1200] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[1201] 2 mM 내지 200 mM(예컨대, 5 mM 내지 100 mM, 10 mM 내지 40 mM, 12 mM 내지 30 mM, 15 내지 25 mM, 또는 18 내지 22 mM 중 하나)의 히스티딘, 보다 바람직하게는 ~20 mM의 히스티딘;

[1202] 2% 내지 20%(예컨대, 2% 내지 15%, 3% 내지 12%, 또는 4% 내지 10% 중 하나)의 슈크로스 (w/v), 보다 바람직하게는 ~8%(w/v)의 슈크로스;

[1203] 0.001% 내지 0.1%(예컨대, 0.002% 내지 0.08%, 0.006% 내지 0.05%, 또는 0.008% 내지 0.04% 중 하나)의 폴리소르베이트-20 (w/v), 보다 바람직하게는 ~0.02%(w/v)의 폴리소르베이트-20; 및

[1204] pH 4.0 내지 7.0(예컨대, pH 4.5 내지 pH 6.8, pH 4.6 내지 pH 6.4, pH 4.8 내지 pH 6.2, 또는 pH 5.0 내지 pH 6.2 중 하나), 보다 바람직하게는 pH ~5.8을 포함하는 조성물로 제공된다.

[1205] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[1206] 2 mM 내지 200 mM(예컨대, 5 mM 내지 100 mM, 10 mM 내지 40 mM, 12 mM 내지 30 mM, 15 내지 25 mM, 또는 18 내지 22 mM 중 하나)의 아세테이트, 예컨대, 아세트산나트륨, 보다 바람직하게는 ~20 mM 아세테이트;

[1207] 2% 내지 20%(예컨대, 2% 내지 15%, 3% 내지 12%, 또는 4% 내지 10% 중 하나)의 슈크로스(w/v), 보다 바람직하게는 ~8%(w/v)의 슈크로스;

[1208] 0.001% 내지 0.1%(예컨대, 0.002% 내지 0.08%, 0.006% 내지 0.05%, 또는 0.008% 내지 0.04% 중 하나)의 폴리소르베이트-80(w/v), 보다 바람직하게는 ~0.02%(w/v)의 폴리소르베이트-80; 및

[1209] pH 4.0 내지 7.0(예컨대, pH 4.5 내지 pH 6.8, pH 4.6 내지 pH 6.4, pH 4.8 내지 pH 6.2, 또는 pH 5.0 내지 pH 6.2 중 하나), 보다 바람직하게는 pH ~5.5를 포함하는 조성물로 제공된다.

[1210] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[1211] 2 mM 내지 200 mM(예컨대, 5 mM 내지 100 mM, 10 mM 내지 40 mM, 12 mM 내지 30 mM, 15 내지 25 mM, 또는 18 내지 22 mM 중 하나)의 석시네이트, 예컨대, 석신산나트륨, 보다 바람직하게는 ~20 mM의 석시네이트;

[1212] 2% 내지 20%(예컨대, 2% 내지 15%, 3% 내지 12%, 또는 4% 내지 10% 중 하나)의 슈크로스 (w/v), 보다 바람직하게는 ~8%(w/v)의 슈크로스;

[1213] 0.001% 내지 0.1%(예컨대, 0.002% 내지 0.08%, 0.006% 내지 0.05%, 또는 0.008% 내지 0.04% 중 하나)의 폴리소르베이트-80(w/v), 보다 바람직하게는 ~0.02%(w/v)의 폴리소르베이트-80; 및

[1214] pH 4.0 내지 7.0(예컨대, pH 4.5 내지 pH 6.8, pH 4.6 내지 pH 6.4, pH 4.8 내지 pH 6.2, 또는 pH 5.0 내지 pH 6.2 중 하나), 보다 바람직하게는 pH ~5.5를 포함하는 조성물로 제공된다.

[1215] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[1216] 2 mM 내지 200 mM(예컨대, 5 mM 내지 100 mM, 10 mM 내지 40 mM, 12 mM 내지 30 mM, 15 내지 25 mM, 또는 18 내지 22 mM 중 하나)의 히스티딘, 보다 바람직하게는 ~20 mM의 히스티딘;

[1217] 0.001% 내지 0.1%(예컨대, 0.002% 내지 0.08%, 0.006% 내지 0.05%, 또는 0.008% 내지 0.04% 중 하나)의 폴리소르베이트-80 (w/v), 보다 바람직하게는 ~0.02%(w/v)의 폴리소르베이트-80; 및

[1218] pH 4.0 내지 7.0(예컨대, pH 4.5 내지 pH 6.8, pH 4.6 내지 pH 6.4, pH 4.8 내지 pH 6.2, 또는 pH 5.0 내지 pH 6.2 중 하나), 보다 바람직하게는 pH ~5.8을 포함하는 조성물로 제공된다.

[1219] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는:

[1220] 2 mM 내지 200 mM(예컨대, 5 mM 내지 100 mM, 10 mM 내지 40 mM, 12 mM 내지 30 mM, 15 내지 25 mM, 또는 18

내지 22 mM 중 하나)의 히스티딘, 보다 바람직하게는 ~20 mM의 히스티딘;

[1221] 1 mM 내지 250 mM(예컨대, 10 mM 내지 250 mM, 50 mM 내지 200 mM, 75 mM 내지 200 mM, 100 mM 내지 180 mM, 또는 125 내지 175 mM 중 하나)의 염화나트륨, 보다 바람직하게는 ~150 mM의 염화나트륨; 및

[1222] pH 4.0 내지 7.0(예컨대, pH 4.5 내지 pH 6.8, pH 4.6 내지 pH 6.4, pH 4.8 내지 pH 6.2, 또는 pH 5.0 내지 pH 6.2 중 하나), 보다 바람직하게는 pH ~5.8을 포함하는 조성물로 제공된다.

[1223] 조성물은 약 0.025 mg/mL 내지 약 100 mg/mL 항원-결합 분자를 포함할 수 있다. 조성물은 약 0.05 mg/mL 내지 약 80 mg/mL의 항원-결합 분자를 포함할 수 있다. 조성물은 약 0.06 mg/mL 내지 약 70 mg/mL의 항원-결합 분자를 포함할 수 있다. 조성물은 약 0.07 mg/mL 내지 약 60 mg/mL의 항원-결합 분자를 포함할 수 있다. 조성물은 약 0.07 mg/mL 내지 약 50 mg/mL 항원-결합 분자를 포함할 수 있다.

[1224] 항원-결합 분자는 예컨대, 본 개시내용에 따른 조성물 속에 약 30 mg/mL, 약 35 mg/mL, 약 40 mg/mL, 약 45 mg/mL, 약 50 mg/mL, 약 55 mg/mL, 약 60 mg/mL, 약 65 mg/mL, 또는 약 70 mg/mL, 또는 여기의 임의의 범위의 농도에서 제형화될 수 있다. 항원-결합 분자는 예컨대, 본 개시내용에 따른 조성물 속에 약 50 mg/mL의 농도에서 제형화될 수 있다.

[1225] 본원에 사용된 바와 같은, "약"은 명시된 농도, 및 이러한 농도의 플러스 또는 마이너스 10%를 지칭한다. 예를 들면, "약 50 mg/mL"의 농도는 50 mg/mL의 농도를 포함한, 45 mg/mL 내지 55 mg/mL의 범위의 농도를 지칭한다.

[1226] 항원-결합 분자는 예컨대, 본 개시내용에 따라 조성물 속에 적어도 0.05 mg/mL, 적어도 0.1 mg/mL, 적어도 0.15 mg/mL, 적어도 0.2 mg/mL, 적어도 0.25 mg/mL, 적어도 0.3 mg/mL, 적어도 0.35 mg/mL, 적어도 0.4 mg/mL, 적어도 0.5 mg/mL, 적어도 0.8 mg/mL, 적어도 1 mg/mL, 적어도 1.4 mg/mL, 적어도 2 mg/mL, 적어도 2.4 mg/mL, 적어도 4 mg/mL, 적어도 6 mg/mL, 적어도 8 mg/mL, 적어도 10 mg/mL, 적어도 12 mg/mL, 적어도 14 mg/mL, 또는 적어도 16 mg/mL의 농도에서 제형화된다.

[1227] 50 mg/mL의 항원-결합 분자 용액은 임의의 적합한 부형제를 사용한 투여 전에 희석시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 50 mg/mL의 항원-결합 분자 용액은 투여를 위해 5% 덱스트로스 속에 희석된다. 일부 구현예에서, 50 mg/mL의 항원-결합 분자 용액은 투여를 위해 예컨대, 50 mL의 용적 중 적어도 0.07 mg/mL, 적어도 0.14 mg/mL, 적어도 0.21 mg/mL, 적어도 0.35 mg/mL, 적어도 0.42 mg/mL, 적어도 0.8 mg/mL, 적어도 1.4 mg/mL, 적어도 2.4 mg/mL의 농도로 희석된다. 일부 구현예에서, 50 mg/mL의 항원-결합 분자 용액은 투여를 위해, 예컨대, 100 mL의 용적 속에 적어도 2.4 mg/mL, 적어도 4 mg/mL, 적어도 8 mg/mL, 적어도 12 mg/mL, 또는 적어도 16 mg/mL의 농도로 희석된다. 일부 구현예에서, 희석된 항원-결합 분자 용액은 대상체에게 예컫대, 정맥내 투여를 통해, 예컨대, 본 개시내용에 따른 용량/투여 요법을 사용하여 투여되어 예컨대, 본 개시내용에 따른 질환/상태를 치료한다. 일부 구현예에서, 희석된 항원-결합 분자 용액은 대상체에게 초기 희석 단계로부터 48시간 내에 투여된다.

[1228] 예컨대, 본원에 기술된 용량 및/또는 투여 요법을 사용한, 본 개시내용에 따른 항원-결합 분자는 PD-1에 의해 매개된 신호전달을 억제할 수 있는 제제와 함께 투여될 수 있다. PD-1에 의해 매개된 신호전달을 억제할 수 있는 제제는 PD-1- 또는 PD-L1-표적화된 제제일 수 있다. PD-1에 의해 매개된 신호전달을 억제할 수 있는 제제는 예컨대, PD-1 또는 PD-L1에 결합할 수 있고 PD-1-매개된 신호전달을 억제할 수 있는 항체일 수 있다. 일부 구현예에서 제제는 길항제 항-PD-1 항체이다. 일부 구현예에서 제제는 길항제 항-PD-L1 항체이다. 일부 구현예에서 제제는 펨브롤리주맙(키트루다(Keytruda)), 니볼루맙(옵디보(Opdivo)), 세미플리맙(리브타요Libtayo)), 아테졸리주맙(테센트리크(Tecentriq)), 아벨루맙(바벤시오(Bavencio)), 또는 두르발루맙(임핀지(Imfinzi))이다. 이러한 제제는 제제(들)과 함께 제공된 약물 제제에 따라 제조 및 투여될 수 있다.

[1229] 치료학적 및 예방학적 적용

[1230] 본원에 기술된 항원-결합 분자, 폴리펩타이드, CAR, 핵산, 발현 벡터, 세포 및 조성물은 치료학적 및 예방학적 방법에서의 용도가 발견된다.

[1231] 본 발명은 의학적 치료 또는 예방 방법에서 사용하기 위한 본원에 기술된 항원-결합 분자, 폴리펩타이드, CAR, 핵산(또는 이의 다수), 발현 벡터(또는 이의 다수), 세포 또는 조성물을 제공한다. 또한 질환 또는 상태를 치료 또는 예방하기 위한 의약의 제조시 본원에 기술된 항원-결합 분자, 폴리펩타이드, CAR, 핵산(또는 이의 다수), 발현 벡터(또는 이의 다수), 세포 또는 조성물이 제공된다. 또한 대상체에게 치료학적 유효량의 본원에 기술된 항원-결합 분자, 폴리펩타이드, CAR, 핵산(또는 이의 다수), 발현 벡터(또는 이의 다수), 세포 또는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 본원에 기술된 모든 치료학적 및 예방학적 방법이 대상체에서 수행될 수 있다.

[1232] 방법은 질환/상태의 발달 또는 진행, 질환/상태의 증상의 완화 또는 질환/상태의 병리학에서의 감소에 효과적일 수 있다. 방법은 질환/상태의 진행을 예방하는데, 예컨대, 질환/상태의 악화를 예방하거나 질환/상태의 발달 속도를 지연시키는데 효과적일 수 있다. 일부 구현예에서, 방법은 질환/상태에서의 개선, 예컨대, 질환/상태의 증상에서의 감소(reduction) 또는 질환/상태의 중증도/활성의 일부 다른 관련성에서의 감소를 초래할 수 있다. 일부 구현예에서, 방법은 이후 단계(예컨대, 만성 단계 또는 전이)의 질환/상태의 발달을 예방할 수 있다.

[1233] 본 발명의 물품을 VISTA를 발현하는 세포(예컨대, MDSC)의 수 및/또는 활성에서의 감소로부터 치료학적 또는 예방학적 이점을 구동시킬 수 있는 임의의 질환/상태의 치료/예방을 위해 사용될 수 있음은 인식될 것이다. 본 발명의 치료학적 및 예방학적 활용도가 MDSC 및/또는 VISTA를 발현하는 다른 세포, 예컨대, 종양-관련 대식구(tumor-associated macrophage; TAM) 및 호중구를 발현하는 다른 세포의 수 또는 활성에서의 감소로부터 유리할 수 있음이 또한 명확할 것이다. VISTA의 길항작용은 MDSC 및/또는 VISTA를 발현하는 다른 세포에의한 억제로부터 효과기 면역 세포를 효과적으로 방출한다.

[1234] 예를 들면, 질환/상태는 VISTA를 발현하는 세포(예컨대, MDSC)가 병리학적으로 관련된 질환/상태, 예컨대, VISTA를 발현하는 세포(예컨대, MDSC)의 증가된 수/비율이 질환/상태의 발병, 발달 또는 진행, 및/또는 질환/상태의 하나 이상의 증상의 중증도에 긍정적으로 관련되고/되거나, 또는 이에 대해 IVSTA를 발현하는 세포(예컨대, MDSC)의 증가된 수/비율이 질환/상태의 발생, 발달 또는 진행에 위험 인자인 질환/상태일 수 있다.

[1235] 일부 구현예에서, 본 발명에 따라 치료될/예방될 질환/상태는 예컨대, 질환/상태의 부재하에서 VISTA를 발현하는 세포(예컨대, MDSC)의 수/비율/활성과 비교한 것으로서, VISTA를 발현하는 세포(예컨대, MDSC)의 수/비율/활성에 있어서의 증가에 의해 특성화된 질환/상태이다.

[1236] 일부 구현예에서, 대상체는 본원에 기술된 치료를 위해, 예컨대, 말초에서, 또는 질환/상태에 의해 영향받는 기관/조직(예컨대, 질환/상태의 증상이 만연하는 기관/조직)에서 VISTA를 발현하는 세포(예컨대, MDSC)의 수/비율/활성에서의 증가의 검출을 기준으로, 또는 종양 내에서 VISTA를 발현하는 세포(예컨대, MDSC 또는 종양-관련 대식구)의 존재에 의해 선택될 수 있다. 질환/상태는 임의의 조직 또는 기관 또는 기관계에 영향을 미칠 수 있다. 일부 구현예에서 질환/상태는 수개의 조직/기관/기관계에 영향을 미칠 수 있다.

[1237] 일부 구현예에서 대상체는 본 발명에 따른 치료요법/예방을 위해 대상체가 건강한 대상체에서 VISTA를 발현하는 세포(예컨대, MDSC)의 수/비율/활성에 비해 말초에서 또는 기관/조직에서 이러한 세포의 수/비율/활성에서의 증가를 갖는지에 대한 측정을 기준으로, 또는 대상체가 VISTA를 발현하는 세포(예컨대, MDSC)를 포함하는 종양을 가지고 있는지의 측정을 기준으로 선택할 수 있다.

[1238] 일부 구현예에서 치료/예방될 질환/상태는 암이다.

[1239] 본 발명의 항원-결합 분자가 MDSC-매개된 억제 또는 VISTA를 발현하는 세포에 의한 억제로부터 효과기 면역 세포를 방출시킴으로써, 항암 면역 반응을 향상시키는데 유용하므로 항원-결합 분자가 일반적으로, 암의 치료에 유용함은 인식될 것이다.

[1240] 암은 임의의 원치않는 세포 증식(또는 원치않는 세포 증식에 의해 자체적으로 나타나는 임의의 질환), 신생물 또는 종양일 수 있다. 암은 양성 또는 악성일 수 있고 1차 또는 2차(전이성)일 수 있다. 신생물 또는 종양은 세포의 임의의 비정상적인 성장 또는 증식일 수 있고 임의의 조직 내에 위치할 수 있다. 암은 예컨대, 부신, 부신 수질, 항문, 맹장, 방광, 혈액, 골, 골수, 뇌, 유방, 맹장, 중추 신경계(뇌를 포함하거나 제외함), 소뇌, 자궁경부, 결장, 십이지장, 자궁내막, 상피 세포(예컨대, 신장 상피), 방광, 식도, 교질 세포, 심장, 회장, 공장, 신장, 눈물선, 후두, 간, 폐, 림프, 림프절, 림프아세포, 턱, 종격, 장간막, 자궁근층, 비인두, 장막, 구강, 난소, 췌장, 귀밑 샘, 말초 신경계, 복막, 흉막, 전립선, 타액선, 구불 결장(sigmoid colon), 피부, 소장, 연 조직, 비장, 위장, 고환, 흉선, 전립선, 혀, 편도선, 기관, 자궁, 음문, 및/또는 백혈 세포로부터 유래된 조직/세포일 수 있다.

[1241] 치료될 종양은 신경 또는 비-신경계 종양일 수 있다. 신경계 종양은 중추 또는 말초 신경계로부터 기원할 수 있는데, 예컨대, 신경교종(glioma), 수모세포종(medulloblastoma), 수막종(meningioma), 신경섬유종(neurofibroma), 뇌질피복 세포종(ependymoma), 슈반세포종(Schwannoma), 신경섬유육종(neurofibrosarcoma), 성상세포종(astrocytoma) 및 희소돌기아교세포종(oligodendroglioma)이다. 비-신경계 암/종양은 임의의 다른 비-신경 조직에서 기원할 수 있고, 예를 들면, 흑색종(melanoma), 중피종(mesothelioma), 림프종(lymphoma), 골수종(myeloma), 백혈병(leukemia), 비-호지킨 림프종(Non-Hodgkin's lymphoma)(NHL), 호지킨 림프종(Hodgkin's

lymphoma), 만성 골수성 백혈병(chronic myelogenous leukemia)(CML), 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia)(AML), 골수이형성 증후군(myelodysplastic syndrome)(MDS), 피부 T-세포 림프종(cutaneous T-cell lymphoma)(CTCL), 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia)(CLL), 간종양(hepatoma), 포피모양 암종(epidermoid carcinoma), 전립선 암종(prostate carcinoma), 유방 암(breast cancer), 폐암(lung cancer), 결장 암(colon cancer), 난소 암(ovarian cancer), 췌장 암(pancreatic cancer), 흉성 암종(thymic carcinoma), NSCLC, 혈액 암(hematologic cancer) 및 육종(sarcoma)을 포함한다.

[1242] MDSC는 진전된 결장직장 암(advanced colorectal cancer)에서 상승되어 있다(Toor et al, Front Immunol. 2016; 7:560). MDSC는 또한 유방 암에서 관찰되고, 말초 혈액 내 MDSC의 퍼센트는 보다 말기 단계의 유방 암을 지닌 환자에서 증가되어 있다(Markowitz et al, Breast Cancer Res Treat. 2013 Jul; 140(1):13-21). MDSC 풍부성은 또한 고형 종양에서 불량한 예후과 관련되어 있고(Charoentong et al, Cell Rep. 2017 Jan 3; 18(1):248-262), MDSC는 간 암 모델에서 농축되어 있다(Connolly et al., J Leukoc Biol. (2010) 87(4):713-25). 전립선 및 유방 암종(Prostate and breast carcinoma), 흑색종(melanoma), 결장직장 암 및 루이스 폐 암종(Lewis lung carcinoma)은 MDSC를 끌어들여 면역 억제에 기여하는 케모킨을 생산하는 것으로 보고되었고(Umansky et al., Vaccines (Basel) (2016) 4(4):36)), 췌장 암 환자에서 MDSC는 종양 버딘과 긍정적으로 관련되었다(Xu et al., Hepatobiliary Pancreat Dis Int. (2016) 15(1):99-105). VISTA는 또한 난소 암(ovarian cancer)(참고: 예컨대, US 9,631,018 B2) 및 림프종(lymphoma)(참고: 예컨대, WO 2017/023749 A1)의 치료를 위한 표적인 것으로 보고되었다.

[1243] 문헌: Blando et al. Proc Natl Acad Sci U S A. (2019) 116(5):1692-1697은 최근에 췌장 암에서 VISTA-발현 골수 세포의 유의적인 침윤을 보고하였고, VIST-발현 골수 세포의 확장은 전립선 암에서 CTLA4 길항제를 사용한 치료 후, 및 흑색종에서 PD-DL1 길항제를 사용한 치료-전 및 치료-후 둘 다에서 관찰되었다.

[1244] 일부 구현예에서, 암은 VISTA를 발현하는 세포를 포함하는 암, VISTA를 발현하는 세포의 침윤을 포함하는 암, VISTA를 발현하는 암 세포를 포함하는 암, 혈액 암(hematological cancer), 백혈병(leukemia), 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia), 림프종(lymphoma), B 세포 림프종(B cell lymphoma), T 세포 림프종(T cell lymphoma), 다발성 골수종(multiple myeloma), 중피종(mesothelioma), 고형 종양(solid tumor), 폐 암(lung cancer), 비소세포폐암종(non-small cell lung carcinoma; NSCLC), 위 암(gastric cancer), 위 암종(gastric carcinoma), 결장직장 암(colorectal cancer), 결장직장 암종(colorectal carcinoma), 결장직장 선암종(colorectal adenocarcinoma), 자궁 암(uterine cancer), 자궁체부 자궁내막암종(uterine corpus endometrial carcinoma), 유방암(breast cancer), 삼중음성 유방암(triple negative breast cancer; TBNC), 삼중음성 유방 침윤성 암종(triple negative breast invasive carcinoma), 침윤성 관암종(invasive ductal carcinoma), 간 암(liver cancer), 간세포 암종(hepatocellular carcinoma), 췌장 암(pancreatic cancer), 췌관선암종(pancreatic ductal adenocarcinoma), 갑상선암(thyroid cancer), 흉선종(thymoma), 피부암(skin cancer), 흑색종(melanoma), 피부 흑색종(cutaneous melanoma), 신장 암(kidney cancer), 신장 세포 암종(renal cell carcinoma), 신장 유두 세포 암종(renal papillary cell carcinoma), 두경부 암(head and neck cancer), 두경부 편평 세포 암종(squamous cell carcinoma of the head and neck; SCCHN), 난소 암(ovarian cancer), 난소 암종(ovarian carcinoma), 난소 장액 낭선암종(ovarian serous cystadenocarcinoma), 방광 암(bladder cancer), 전립선 암(prostate cancer) 및/또는 전립선 선암종(prostate adenocarcinoma)으로부터 선택된다.

[1245] 일부 구현예에서 암은 결장직장 암(예컨대, 결장 암종(colon carcinoma), 결장 선암종(colon adenocarcinoma)), 췌장 암(pancreatic cancer), 유방 암(예컨대, 삼중 음성 유방 암(triple negative breast cancer; TBNC), 침윤성 관 암종, 간 암, 전립선 암(prostate cancer), 난소 암, 두경부 암, 백혈병(예컨대, T 세포 백혈병(T cell leukemia)), 림프종(lymphoma), 흑색종, 흉선종(thymoma), 폐 암, 비-소세포 폐 암(NSCLC), 중피종, 방광 암, 자궁 암, 및/또는 고형 종양이다.

[1246] 일부 구현예에서 암은 진전된, 절제불가능한 또는 전이성 암이다.

[1247] 일부 구현예에서 암은 전이성 삼중-음성 유방 암(metastatic triple-negative breast cancer; TBNC)이다. TBNC는 에스트로겐 수용체(estrogen receptor; ER)-음성, 프로게스테론 수용체(progesterone receptor; PR)-음성), 및 사람 상피 성장 인자(human epidermal growth factor 2; HER2)-음성; 또는 ER-음성, PR-음성 및 HER2-양성으로 정의된다. 암은 에스트로겐 수용체(ER) 발현≤10% 및 프로게스테론 수용체(PR) 발현 ≤10%로서 정의된다.

[1248] 일부 구현예에서 암은 전이성 및/또는 진전된 비-소세포 폐 암(NSCLC), 예컨대, 국소적으로 진전되고 절제불가능하다. 일부 구현예에서 암, 예컨대, NSCLC는 상피 성장 인자 수용체(EGFR) 또는 신생물 림프종 키나제

(anaplastic lymphoma kinase; ALK)를 포함하지 않는다. 치료/예방은 다음 중 하나 이상을 목표로 할 수 있다: 암의 증상의 발생/진행의 지연/예방, 암의 증상의 중증도의 감소, 암의 세포의 생존/성장/침입/전이의 감소, 암의 세포의 수의 감소 및/또는 대상체의 생존의 증가.

[1249] 본 개시내용의 물품(article)(즉, 항원-결합 분자, 조성물 등)은 VISTA를 발현하는 세포의 존재에 의해 특징화된 질환/상태(예컨대, 암) 및/또는 VISTA를 포함하는 복합체에 의해 매개된 신호전달에 의해 특성화된 질환/상태(예컨대, 암)의 치료/예방을 위해 특히 유용하다.

[1250] VISTA를 발현하는 세포의 존재에 의해 특징화된 암은 VISTA를 발현하는 암성 세포를 포함할 수 있다. 즉, 암의 세포는 VISTA를 발현할 수 있다. 본원의 구현예에서, 명시된 특성을 갖는 세포를 포함하는 암은 이러한 특성을 갖는 세포를 포함하는 종양일 수 있거나 또는 이를 포함할 수 있다.

[1251] 대안적으로, 또는 추가로, VISTA를 발현하는 세포'의 존재'에 의해 특징화된 암은 암의 세포의 인근(즉, 이에 근접한)의 세포의 존재에 의해 특성화될 수 있다. 암은 VISTA를 발현하는 세포의 침윤을 포함할 수 있다. 암은 VISTA를 발현하는 세포의 침윤을 나타내는 종양을 포함한다. 이러한 구현예와 관련하여, VISTA를 발현하는 세포는 필수적으로 암의 세포가 아니고, 예컨대, 비-암성 세포일 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 면역 세포이다. VISTA를 발현하는 면역 세포는 조혈 기원, 예컨대, 호중구, 호산구, 호염기구, 수지 세포, 림프구, 또는 단핵구의 세포일 수 있거나 또는 이를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, VISTA를 발현하는 면역 세포는 림프구, 예컨대, T 세포, B 세포, NK 세포, NKT 세포, 초기 림프 세포(innate lymphoid cell; ILC), 또는 이의 전구체일 수 있거나 또는 이를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, VISTA를 발현하는 면역 세포는 효과기 면역 세포(예컨대, CD8+ T 세포, CD8+ 세포독성 T 림프구(CD8+ CTL), CD4+ T 세포, CD4+ T 헬퍼 세포, NK 세포, IFNγ-생산 세포, 기억 T 세포, 중심 기억 T 세포, 항원-경험한 T 세포(antigen-experienced T cell) 및/또는 CD45RO+ T 세포)일 수 있다. 일부 구현예에서, VISTA를 발현하는 면역 세포는 항원-제시 세포(antigen-presenting cell; APC), 대식구, 수지 세포, T 세포(예컨대, CD8+ T 세포) 및/또는 MDSC일 수 있다. 암이 VIST를 발현하는 면역 세포의 침윤을 포함하거나, 또는 암이 이러한 면역 세포의 침윤을 나타내는 종양을 포함하는 구현예에서, 면역 세포는 종양-침윤 면역 세포로서 지칭될 수 있다.

[1252] 예를 들면, VISTA를 발현하는 세포의 존재에 의해 특징화된 암은 VISTA를 발현하는 세포(예컨대, 비-암성 세포, 예컨대, 종양-침윤 면역 세포)를 포함하는 종양을 포함할 수 있다.

[1253] VISTA를 발현하는 암, 암 세포 및/또는 종양은 VISTA-양성, 또는 VISTA IHC+로서 기술될 수 있다.

[1254] 암의 세포'의 인근' 또는 '에 근접한'인 것으로 일컬러지는 세포는 예컨대, 이러한 암을 가진 대상체 내 생체 내에서, 암의 세포에 대해 물리적으로 매우 근접하게 제공된다. 일부 구현예에서, 암의 세포의 인근/에 인접하게 있는 세포는 암의 세포와 동일한 기관/조직 내에 포함된다. 일부 구현예에서, 암의 세포의 인근/에 근접하게 있는 세포는 암의 종양 내에 포함된다. 일부 구현예에서, 암의 세포의 인근/에 근접하게 있는 세포는 암의 세포와 접촉되어 있다.

[1255] 일부 구현예에서, 치료/예방될 암은 VISTA를 발현하는 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 치료/예방될 암은 VISTA를 발현하는 암 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, VISTA를 발현하는 세포는 MDSC(예컨대, g-MDSC 및/또는 m-MDSC)이다. 일부 구현예에서, 암은 VISTA를 발현하는 세포(예컨대, MDSC)를 포함하는 종양을 포함한다. 일부 구현예에서, 치료/예방될 암은 MDSC를 포함하는 종양을 포함한다. 일부 구현예에서, 치료/예방될 암은 VISTA를 발현하는 세포(예컨대, MDSC)의 침윤을 포함한다. 일부 구현예에서, 치료/예방될 암은 VISTA를 발현하는 세포(예컨대, MDSC)의 침윤을 나타내는 종양을 포함한다.

[1256] 일부 구현예에서, 치료/예방될 암은 1% 초과, 예컨대, ≥2%, ≥5%, ≥10%, ≥15%, ≥20%, ≥25% 또는 ≥30%의 MDSC(예컨대, 종양의 면역프로파일링(immunoprofiling)에 의해 측정된 것으로서)를 포함하는 CD45+ 세포의 집단을 포함하는 종양을 포함한다.

[1257] 본원에 기술된 VISTA-결합 항원-결합 분자는 VISTA와 VISTA에 대한 상호작용 파트너(예컨대, LRIG1, VSIG3, PSGL-1, VSIG8) 사이의 결합을 억제할 수 있다. 본원에 기술된 항원-결합 분자를 사용한 VISTA와 이의 상호작용 파트너 사이의 상호작용의 억제(inhibition)는 더욱이 이의 활성의 MDSC-매개된 억제(suppression)로부터 효과기 면역 세포를 방출하기 위해 입증된다.

[1258] 따라서, 본 개시내용의 물품(즉, 항원-결합 분자, 조성물 등)은 VISTA에 대한 상호작용 파트너(예컨대, LRIG1, VSIG3, PSGL-1, VSIG8)를 발현하는 세포의 존재에 의해 특징화된 질환/상태, 및/또는 VISTA 및 VISTA에 대한 상호작용 파트너(예컨대, LRIG1, VSIG3, PSGL-1, VSIG8)를 포함하는 복합체에 의해 매개된 신호전달을 특징으로

하는 질환/상태(예컨대, 암)의 치료/예방을 위해 특히 유용하다.

[1259] VISTA에 대한 상호작용 파트너(예컨대, LRIG1, VSIG3, PSGL-1, VSIG8)를 발현하는 세포의 존재에 의해 특징화된 암은 VISTA에 대한 상호작용 파트너를 발현하는 암성 세포를 포함할 수 있다. 즉, 암의 세포는 VISTA에 대한 상호작용 파트너를 발현할 수 있다.

[1260] 대안적으로, 또는 추가로, VISTA에 대한 상호작용 파트너(예컨대, LRIG1, VSIG3, PSGL-1, VSIG8)를 발현하는 세포'의 존재'에 의해 특징화된 암은 암의 세포의 인근(즉, 이에 근접한) VISTA에 대한 상호작용 파트너를 발현하는 세포에 의해 특징화될 수 있다. 암은 VISTA에 대한 상호작용 파트너를 발현하는 세포의 침윤을 포함할 수 있다. 암은 VISTA에 대한 상호작용 파트너를 발현하는 세포의 침윤을 나타내는 종양을 포함할 수 있다. 이러한 구현예와 관련하여, VISTA에 대한 상호작용 파트너를 발현하는 세포는 필수적으로 암의 세포가 아니고, 예컨대, 비-암성 세포일 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 면역 세포이다. VISTA에 대한 상호작용 파트너(예컨대, LRIG1, VSIG3, PSGL-1, VSIG8)를 발현하는 면역 세포는 조혈 기원의 세포, 예컨대, 호중구, 호산구, 호염기구, 수지 세포, 림프구, 또는 단핵구일 수 있거나, 또는 이를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, VISTA에 대한 상호작용 파트너를 발현하는 면역 세포는 림프구, 예컨대, T 세포, B 세포, NK 세포, NKT 세포, 선천성 림프 세포(innate lymphoid cell; ILC), 또는 이의 전구체일 수 있거나 또는 이를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, VISTA에 대한 상호작용 파트너를 발현하는 면역 세포는 효과기 면역 세포(예컨대, CD8+ T 세포, CD8+ 세포독성 T 림프구(CD8+ CTL), CD4+ T 세포, CD4+ T 헬퍼 세포, NK 세포, IFNγ-생산 세포, 기억 T 세포, 중심 기억 T 세포, 항원-경험한 T 세포 및/또는 CD45RO+ T 세포)일 수 있거나 또는 이를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, VISTA에 대한 상호작용 파트너를 발현하는 면역 세포는 항원-제시 세포(APC), 대식구, 수지 세포, T 세포(예컨대, CD8+ T 세포) 및/또는 MDSC이다. 암이 VISTA에 대한 상호작용 파트너를 발현하는 면역 세포의 침윤을 포함하거나, 또는 암이 이러한 면역 세포의 침윤을 나타내는 종양을 포함하는 구현예에서, 면역 세포는 종양-침윤 면역 세포로서 지칭될 수 있다.

[1261] 예를 들면, VISTA에 대한 상호작용 파트너(예컨대, LRIG1, VSIG3, PSGL-1, VSIG8)를 발현하는 세포의 존재에 의해 특징화된 암은 VISTA에 대한 상호작용 파트너를 발현하는 세포(예컨대, 비-암성 세포, 예컨대, 종양-침윤 면역 세포)의 침윤을 포함하는 종양을 포함할 수 있다.

[1262] 본원의 구현예에서, 명시된 특성을 갖는 세포를 포함하는 암은 이러한 특성을 갖는 세포를 포함하는 종양일 수 있거나 또는 종양을 포함할 수 있음이 인식될 것이다. 일부 구현예에서, 치료/예방될 암은 VISTA에 대한 상호작용 파트너를 발현하는 세포(이는 예컨대, 비-암성 세포, 에컨대, 종양-침윤 면역 세포일 수 있다)의 존재에 의해 특징화된 종양을 포함한다. 일부 구현예에서, 치료/예방될 암은 VISTA에 대한 상호작용 파트너를 발현하는 세포를 포함하는 종양을 포함한다. 일부 구현예에서, 치료/예방될 암은 VISTA에 대한 상호작용 파트너를 발현하는 세포의 침윤을 포함한다. 일부 구현예에서, 치료/예방될 암은 VISTA에 대한 상호작용 파트너를 발현하는 세포의 침윤을 나타내는 종양을 포함한다.

[1263] 일부 구현예에서, VISTA에 대한 상호작용 파트너를 발현하는 세포는 예컨대, 비-병리학적 조건 하에서 동일한 유형(예컨대, 동일한 기관/조직으로부터)의 세포에 의한 발현의 참고 수준에 비해, 상호작용 파트너의 증가된 발현을 나타낼 수 있다. 일부 구현예에서, VISTA에 대한 상호작용 파트너를 발현하는 세포는 VISTA에 대한 상호작용 파트너를 과발현할 수 있다. 이러한 세포는 등가의 비-암성 세포/비-종양 조직에 의한 발현 수준보다 더 높은 수준에서 관련 분자를 발현할 수 있다. 일부 구현예에서, 치료/예방될 암은 VISTA 및 VISTA에 대한 상호작용 파트너를 포함하는 복합체에 의해 매개된 신호전달에 의해 특징화된다. 일부 구현예에서, 치료/예방될 암은 즉, 암의 부재하에서 관련 복합체에 의한 신호전달의 수준과 비교한 것으로서, VISTA 및 VISTA에 대한 상호작용 파트너를 포함하는 복합체에 의해 매개된 신호전달의 증가된 수준에 의해 특징화된다.

[1264] 일부 구현예에서, 치료/예방될 암은 (i) VISTA를 발현하는 세포, 및 (ii) VISTA에 대한 상호작용 파트너를 발현하는 세포의 존재에 의해 특징화된다. 일부 구현예에서, 치료/예방될 암은 (i) VISTA를 발현하는 세포, 및 (ii) VISTA에 대한 상호작용 파트너를 발현하는 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 치료/예방될 암은 (i) VISTA를 발현하는 세포, 및 (ii) VISTA에 대한 상호작용 파트너를 발현하는 세포의 존재에 의해 특징화된 종양을 포함한다. 일부 구현예에서, 치료/예방될 암은 (i) VISTA를 발현하는 세포, 및 (ii) VISTA에 대한 상호작용 파트너를 발현하는 세포를 포함하는 종양을 포함한다. 일부 구현예에서, 치료/예방될 암은 (i) VISTA를 발현하는 세포, 및 (ii) VISTA에 대한 상호작용 파트너를 발현하는 세포의 침윤을 포함한다. 일부 구현예에서, 치료/예방될 암은 (i) VISTA를 발현하는 세포, 및 (ii) VISTA에 대한 상호작용 파트너를 발현하는 세포의 침윤을 나타내는 종양을 포함한다. 일부 구현예에서, 치료/예방될 암은 VISTA 및 VISTA에 대한 상호작용 파트너를 포함하는 복합체

에 의해 매개된 신호전달에 의해 특성화된 암이다. 일부 구현예에서, 치료/예방될 암은 예컨대, 암의 부재하에서 관련된 세포 유형/조직/기관 내에서 복합체에 의한 신호전달의 수준과 비교한 것으로서, VISTA 및 VISTA에 대한 상호작용 파트너를 포함하는 복합체에 의해 매개된 신호전달의 상승된 수준에 의해 특징화된 암이다.

[1265] 일부 구현예에서, 대상체는 예컨대, 상술한 바와 같은 암/종양을 특성화하기 위해, 예컨대, 대상체로부터 수득한 샘플 속에서 VISTA를 발현하는 세포/VISTA에 대한 상호작용 파트너(예컨대, MDSC)를 포함하는 암의 검출, 또는 VISTA를 발현하는 세포/VISTA에 대한 상호작용 파트너(예컨대, MDSC)를 포함하는 종양의 검출을 기준으로 본원에 기술된 치료를 위해 선택될 수 있다.

[1266] 일부 구현예에서 VISTA-발현 세포가 생리학적으로 관련된 질환/상태는 감염성 질환, 예컨대, 세균, 바이러스, 진균, 또는 기생충 감염이다. 일부 구현예에서 만성/지속성 감염을 치료하는 것이 특히 바람직할 수 있는데, 예컨대, 여기서 이러한 감염은 T 세포 기능이상 또는 T 세포 고갈과 연관된다. T 세포 고갈은 만성 감염(바이러스, 세균 및 기생충 포함) 동안 뿐만 아니라, 암에서 발생하는 T 세포 기능이상의 상태이다(Wherry Nature Immunology Vol.12, No.6, p492-499, June 2011).

[1267] 치료될 수 있는 세균 감염의 예는 바실러스 종(Bacillus spp.), 보르데텔라 페르투씨스(Bordetella pertussis), 클로스트리디움 종(Clostridium spp.), 코리네박테리움 종(Corynebacterium spp.), 비브리오 콜레라에(Vibrio chloerae), 스타필로코쿠스 종(Staphylococcus spp.), 스트렙토코수스 종(Streptococcus spp.), 에스케리키아(Escherichia), 클렙시엘라(Klebsiella), 프로테우스(Proteus), 예스시니아(Yersinia), 에르위니아(Erwina), 살모넬라(Salmonella), 리스테리아 종(Listeria sp), 헬리코박터 필로리(Helicobacter pylori), 마이코박테리아(mycobacteria)(예컨대, 마이코박테리움 투베르쿨로시스(Mycobacterium tuberculosis)) 및 슈도모나스 아에루기노사(Pseudomonas aeruginosa)를 포함한다. 예를 들면, 세균 감염은 패혈증(sepsis) 또는 결핵(tuberculosis)일 수 있다. 치료될 수 있는 바이러스 감염의 예는 인플루엔자 바이러스, 홍역 바이러스, B 형 간염 바이러스(hepatitis B virus; HBV), C형 간염 바이러스(hepatitis C virus; HCV), 사람 면역결핍성 바이러스(human immunodeficiency virus; HIV), 림프구성 맥락수막염 바이러스(lymphocytic choriomeningitis virus; LCMV), 헤르페스 단성 바이러스(Herpes simplex virus) 및 사람 파릴로바 바이러스(human papilloma virus; HPV)에 의한 감염을 포함한다. 치료될 수 있는 진균 감염의 예는 알테나리아 종(Alternaria sp), 아스퍼길러스 종(Aspergillus sp), 칸디다 종(Candida sp) 및 히스토플라스마 종(Histoplasma sp)에 의한 감염을 포함한다. 진균 감염은 진균 패혈증(fungal sepsis) 또는 히스토플라스증(histoplasmosis)일 수 있다. 치료될 수 있는 기생충 감염의 예는 슐라스모디움 종(Plasmodium species)(예컨대, 플라스모디움 팔시파룸(Plasmodium falciparum), 플라스모디움 요엘리(Plasmodium yoeli), 플라스모디움 오발레(Plasmodium ovale), 플라스모디움 비박스(Plasmodium vivax), 또는 플라스모디움 차바우디 차바우디(Plasmodium chabaudi chabaudi))에 의한 감염을 포함한다. 기생충 감염은 말라리아(malaria), 레이슈마니아증(leishmaniasis) 및 톡소플라스마증(toxoplasmosis)일 수 있다.

[1268] 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 Fc 영역-매개된 효과기 기능(예컨대, ADCC, ADCP, CDC)을 포함하지 않는 분자 메카니즘을 통해 이의 치료학적/예방학적 효과를 발휘한다. 일부 구현예에서 분자 메카니즘은 Fcɣ 수용체(예컨대, FcɣRI, FcɣRIIa, FcɣRIIb, FcɣRIIc, FcɣRIIIa 및 FcɣRIIIb 중 하나 이상)에 대한 항원-결합 분자의 결합을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서 분자 메카니즘은 상보체 단백질(예컨대, C1q)에 대한 항원-결합 분자의 결합을 포함하지 않는다.

[1269] 일부 구현예(예컨대, 항원-결합 분자가 Fc 영역을 결여한 구현예, 또는 항원-결합 분자가 Fc-매개된 항체 효과기 기능을 유도할 수 없는 Fc 영역을 포함하는 구현예)에서, 치료는 VISTA-발현 세포의 사멸을 유도/증가하지 않는다. 일부 구현예에서 치료는 VISTA-발현 세포의 수/비율을 감소시키지 않는다.

[1270] 일부 구현예에서 치료는 (i) VISTA-매개된 신호전달을 억제학고, (ii) VISTA-발현 세포의 사멸을 유도/증가시키지 않는다. 일부 구현예에서 치료는 (i) VISTA-매개된 신호전달을 억제하고 (ii) VISTA-발현 세포의 수/비율을 감소시키지 않는다.

[1271] 본 발명의 물품의 투여는 바람직하게는 "치료학적으로 유효한" 또는 "예방학적으로 유효한" 양이며, 이는 대상체에게 치료학적 또는 예방학적 이점을 나타내기에 충분하다. 투여된 실제 양, 및 투여 속도 및 경과 시간(time-course)은 질환/상태의 특성 및 중증도 및 투여된 특수한 물품에 의존할 것이다. 치료의 처방, 예컨대, 투여량에 대한 판단 등은 일반 숙련의 및 다른 의사의 책임 내에 있으며, 전형적으로 치료될 질환/장애, 개개 대상체의 상태, 전달 부위, 투여 방법 및 숙련의에게 알려진 다른 요인을 고려한다. 상기 언급된 기술 및 프로토콜의 예는 문헌: Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th Edition, 2000, pub. Lippincott, Williams &

Wilkins에서 찾을 수 있다.

[1272] 투여는 단독으로 또는 다른 치료와 함께, 치료될 상태에 따라 동시에 또는 순차적으로 이루어질 수 있다. 본원에 기술된 항원-결합 분자 또는 조성물 및 치료제는 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다.

[1273] 일부 구현예에서, 방법은 예컨대, 암의 치료/예방을 위한, 치료학적 또는 예방학적 개입을 포함한다. 일부 구현예에서, 치료학적 또는 예방학적 개입은 화학치료요법, 면역치료요법, 방사선치료요법, 수술, 백신화 및/또는 호르몬 치료요법으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 치료학적 또는 예방학적 개입은 백혈구분리술(leukapheresis)을 포함한다. 일부 구현예에서 치료학적 또는 예방학적 개입은 줄기 세포 이식을 포함한다.

[1274] 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 VISTA 외에 면역 체크포인트 분자에 의해 매개된 신호전달을 억제할 수 있는 제제와 함께 투여된다. 일부 구현예에서 면역 체크포인트 분자는 예컨대, PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, TIGIT 또는 BTLA이다. 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 공자극성 수용체에 의해 매개된 신호전달을 촉진할 수 있는 제제와 함께 투여된다. 일부 구현예에서 공자극성 수용체는 예컨대, CD28, CD80, CD40L, CD86, OX40, 4-1BB, CD27 또는 ICOS이다.

[1275] 따라서, 본 발명은 본 발명에 따른 물품(예컨대, 본 발명에 따른 항원-결합 분자) 및 VISTA 외에 면역 체크포인트 분자에 의해 매개된 신호전달을 억제할 수 있는 제제를 포함하는 조성물을 제공한다. 또한 본 발명의 물품 및 공자극성 수용체에 의해 매개된 신호전달을 촉진할 수 있는 제제를 포함하는 조성물이 제공된다. 또한 본원에 기술된 질환/상태의 치료 및 예방의 방법에서 이러한 조성물의 용도가 제공된다.

[1276] 또한 본 발명에 따른 물품(예컨대, 본 발명에 따른 항원-결합 분자) 및 VISTA 외에 면역 체크포인트 분자에 의해 매개된 신호전달을 억제할 수 있는 제제를 투여함을 포함하는 본원에 기술된 질환/항태를 치료/예방하기위한 방법이 제공된다. 또한 본 발명에 따른 물품(예컨대, 본 발명에 따른 항원-결합 분자) 및 공자극성 수용체에 의해 매개된 신호전달을 촉진할 수 있는 제제를 투여함을 포함하여 본원에 기술된 질환/상태를 치료/예방하기 위한 방법이 제공된다.

[1277] 면역 체크포인트 분자에 의해 매개된 신호전달을 억제할 수 있는 제제(agent)는 당해 분야에 공지되어 있고 예컨대, 면역 체크포인트 분자 또는 이의 리간드를 억제하고, 면역 체크포인트 분자에 의해 매개된 신호전달을 억제할 수 있는 물품을 포함한다. 면역 체크포인트 분자에 의해 매개된 신호전달을 억제할 수 있는 다른 제제는 면역 체크포인트 분자 또는 면역 체크포인트 분자에 대한 리간드의 유전자/단백질 발현을 감소시킬 수 있는 제제(예컨대, 면역 체크포인트 분자/리간드를 암호화하는 유전자(들)의 전사를 억제하거나, 면역 체크포인트 분자/리간드를 암호화하는RNA의 전사-후 프로세싱을 억제하거나, 면역 체크포인트 분자/리간드를 암호화하는 RNA의 안정성을 감소시키거나, 면역 체크포인트 분자/리간드를 암호화하는 RNA의 분해를 촉진하거나, 면역 체크포인트 분자/리간드의 해독-후 공정을 억제하거나, 면역 체크포인트 분자/리간드의 안정성을 감소시키거나, 또는 면역 체크포인트 분자/리간드의 분해를 촉진함을 통해), 및 소 분자 억제제를 포함한다.

[1278] 공자극성 수용체에 의해 매개된 신호전달을 촉진할 수 있는 제제는 당해 분야에 공지되어 있고, 예컨대, 공자극성 수용체에 결합할 수 있고 공자극성 수용체에 의해 매개된 신호전달을 개시(triggter) 또는 증가시킬 수 있는 효능제 항체를 포함한다. 공자극성 수용체에 의해 매개된 신호전달을 촉진할 수 있는 다른 제제는 공자극성 수용체 또는 공자극성 수용체/리간드에 대한 리간드의 유전자/단백질 발현을 증가시킬 수 있는 제제((예컨대, 공자극성 수용체/리간드를 암호화하는 유전자(들)의 전사를 촉진하거나, 공자극성 수용체/리간드를 암호화하는 RNA의 전사0-후 프로세싱을 촉진하거나, 공자극성 수용체/리간드를 암호화하는 RNA의 안정성을 증가시키거나, 공자극성 수용체/리간드를 암호화하는 RNA의 분해를 억제하거나, 공자극성 수용체/리간드의 해독-후 프로세싱을 촉진하거나, 공자극성 수용체/리간드의 안정성을 증가시키거나, 또는 공자극성 수용체/리간드의 분해를 억제함을 통해), 및 소 분자 효능제를 포함한다.

[1279] VISTA-발현 MDSC에 의한 면역 억제는 면역 체크포인트 분자에 의해 매개된 신호전달을 억제할 수 있는 제제를 사용한 치료의 실패, 및 이에 대한 내성의 발달과 관련되었다. 문헌: Gao et al., Nature Medicine (2017) 23: 551-555은 최근에 VISTA가 이플리무맙(즉 항-CTLA-4 항체) 치료요법 후 전립선 종양에서 상보성 억제 경로일 수 있음을 제시하였다.

[1280] 특수한 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 PD-1에 의해 매개된 신호전달을 억제할 수 있는 제제와 함께 투여된다. PD-1에 의해 매개된 신호전달을 억제할 수 있는 제제는 PD-1- 또는 PD-L1-표적화된 제제일 수 있다. PD-1에 의해 매개된 신호전달을 억제할 수 있는 제제는 예컨대, PD-1 또는 PD-L1에 결합하여 PD-1-매개된 신호전달을 억제할수 있는 항체일 수 있다. 일부 구현예에서 제제는 길항제 항-PD-1 항체이다. 일부 구현예에서 제

제는 길항제 항-PD-L1 항체이다.

[1281] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 CTLA-4에 의해 매개된 신호전달을 억제할 수 있는 제제와 함께 투여된다. CTLA-4에 의해 매개된 신호전달을 억제할 수 있는 제제는 CTLA-4-표적화된 제제, 또는 CTLA-4에 대한 리간드, 예를 들면, CD80 또는 CD86에 대한 리간드에 대해 표적화된 제제일 수 있다. 일부 구현예에서, CTLA-4에 의해 매개된 신호전달을 억제할 수 있는 제제는 에컨대, CTLA-4, CD80 또는 CD86에 결합하여 CTLA-4-매개된 신호전달을 억제할 수 있는 항체일 수 있다.

[1282] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 LAG-3에 의해 매개된 신호전달을 억제할 수 있는 제제와 함께 투여된다. LAG-3에 의해 매개된 신호전달을 억제할 수 있는 제제는 LAG-3-표적화된 제제, 또는 LAG-3에 대한 리간드, 예를 들면, MHC 제II 부류에 대해 표적화된 제제이다. 일부 구현예에서, LAG-3에 의해 매개된 신호전달을 억제할 수 있는 제제는 예컨대, LAG-3 또는 MHC 제II 부류에 결합하여 LAG-3-매개된 신호전달을 억제할 수 있는 항체일 수 있다.

[1283] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 TIM-3에 의해 매개된 신호전달을 억제할 수 있는 제제와 함께 투여된다. TIM-3에 의해 매개된 신호전달을 억제할 수 있는 제제는 TIM-3-표적화된 제제, 또는 TIM-3에 대한 리간드, 예를 들면, 갈렉틴 9에 대해 표적화된 제제이다. 일부 구현예에서, TIM-3에 의해 매개된 신호전달을 억제할 수 있는 제제는 예컨대, TIM-3 또는 갈렉틴 9에 결합하여 TIM-3-매개된 신호전달을 억제할 수 있는 항체일 수 있다.

[1284] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 TIGIT에 의해 매개된 신호전달을 억제할 수 있는 제제와 함께 투여된다. TIGIT에 의해 매개된 신호전달을 억제할 수 있는 제제는 TIGIT-표적화된 제제, 또는 TIGIT에 대한 리간드, 예를 들면, CD113, CD112 또는 CD155에 대해 표적화된 제제이다. 일부 구현예에서, TIGIT에 의해 매개된 신호전달을 억제할 수 있는 제제는 예컨대, TIGIT, CD113, CD112 또는 CD155에 결합하여 TIGIT-3-매개된 신호전달을 억제할 수 있는 항체일 수 있다.

[1285] 일부 구현예에서, 본 발명의 항원-결합 분자는 BTLA에 의해 매개된 신호전달을 억제할 수 있는 제제와 함께 투여된다. BTLA에 의해 매개된 신호전달을 억제할 수 있는 제제는 BTLA-표적화된 제제, 또는 BTLA에 대한 리간드, 예를 들면, HVEM에 대해 표적화된 제제이다. 일부 구현예에서, BTLA에 의해 매개된 신호전달을 억제할 수 있는 제제는 예컨대, BTLA 또는 HVEM에 결합하여 BTLA-매개된 신호전달을 억제할 수 있는 항체일 수 있다.

[1286] 일부 구현예에서 본 발명의 항원-결합 분자 및 면역 체크포인트 분자(예컨대, PD-1 및/또는 PD-L1)에 의해 매개된 신호전달을 억제할 수 있는 제제의 조합을 사용한 방법은 어느 하나의 제제가 단독치료요법으로서 사용된 경우 관찰된 효과와 비교하여 개선된 치료 효과를 제공한다. 일부 구현예에서 본 발명의 항원-결합 분자 및 면역 체크포인트 분자(예컨대, PD-1 및/또는 PD-L1)에 의해 매개된 신호전달을 억제할 수 있는 제제의 조합은 상승적(synergistic)(즉, 초-부가적(super-additive)) 치료 효과를 제공한다.

[1287] 일부 구현예에서, (i) 본 발명의 항원-결합 분자 및 (ii) 면역 체크포인트 분자(immune checkpoint molecule)(예컨대, PD-1 및/또는 PD-L1)에 의해 매개된 신호전달을 억제할 수 있는 제제를 포함하는 조합물을 사용한 치료는 다음 중 하나 이상과 관련될 수 있다:

[1288] · 단독으로 사용된 조합의 구성성분으로 관찰된 치료 효과와 비교하여 개선된 치료 효과;

[1289] · 단독으로 사용된 조합의 구성성분으로 관찰된 치료 효과와 비교하여 상승적(즉, 초-부가적)인 치료 효과;

[1290] · 단독으로 사용된 조합의 어느 하나의 구성성분에 의한 종양의 억제와 비교하여 종양 성장의 증가된 억제;

[1291] · 단독으로 사용된 조합의 구성성분으로 관찰된 종양 성장의 억제와 비교하여 상승적(즉, 초-부가적)인 종양 성장의 억제;

[1292] · 단독으로 사용된 조합의 구성성분 어느 하나에 의한 억제인자 면역 세포의 수/활성의 감소와 비교하여 억제인자 면역 세포의 수/활성에서의 보다 큰 감소;

[1293] · 단독으로 사용된 조합의 구성성분 어느 하나에 의한 억제인자 면역 세포의 수/활성의 감소와 비교하여 상승적(즉, 초-부가적)인 억제인자 면역 세포의 수/활성에서의 감소;

[1294] · 단독으로 사용된 조합의 구성성분 어느 하나에 의한 억제인자 면역 세포의 증식의 감소와 비교하여 억제인자 면역 세포의 증식의 보다 큰 감소;

[1295] · 단독으로 사용된 조합의 구성성분 어느 하나에 의한 억제인자 면역 세포의 증식의 감소와 비교하여 상승적(즉, 초-부가적)인 억제인자 면역 세포의 증식의 감소;

[1296] · 단독으로 사용된 조합의 구성성분 어느 하나에 의한 억제인자 면역 세포의 감소와 비교하여 세포(예컨대, CD45+ 세포, 예컨대, 종양으로부터 수득된 CD45+ 세포)의 집단 내 억제인자 면역 세포의 비율에서의 보다 큰 감소; 및

[1297] · 단독으로 사용된 조합의 구성성분 어느 하나에 의한 억제인자 면역 세포의 집단의 감소와 비교하여 상승적(즉, 초-부가적)인 세포(예컨대, CD45+ 세포, 예컨대, 종양으로부터 수득된 CD45+ 세포)의 집단 내 억제인자 면역 세포의 비율에서의 감소.

[1298] 일부 구현예에서 면역 체크포인트 분자(예컨대, PD-1 및/또는 PD-L1)에 의해 매개된 신호전달을 억제할 수 있는 제제는 펨브롤리주맙(키트루다; MK-3475, 람브롤리주맙), 니볼루맙(옵디보), 세미플리맙(리브타요), 아테졸리주맙(테센트리크), 아벨루맙(바벤시오), 또는 두르발루맙(임핀지)이다.

[1299] 동시 투여는 예를 들면, 제제 둘 다를 함유하는 약제학적 조성물(혼합 제조)로서, 또는 서로 및 임의로 동일한 투여 경로를 통해, 예컨대, 동일한 동맥, 정맥 또는 다른 혈관으로의 직 후, 항원-결합 분자, 폴리펩타이드, CAR, 핵산(또는 이의 다수), 발현 벡터(또는 이의 다수), 세포 또는 조성물 및 치료제의 투여를 지칭한다. 순차적인 투여는 항원-결합 분자/조성물 또는 치료제 중 하나의 투여에 이어, 주어진 기간 후 다른 제제의 별개의 투여를 지칭한다. 일부 구현예에서 이러한 경우가 있지만 2개의 제제가 동일한 경로에 의해 투여될 필요가 없다. 시간 간격은 임의의 시간 간격일 수 있다.

[1300] 화학치료요법 및 방사선치료요법 각각은 약물 또는 이온화 조사(예컨대, X-선 또는 γ-선을 사용한 방사선치료요법)를 사용한 암의 치료를 지칭한다. 약물은 화학적 실체, 예컨대, 소 분자 약제, 항생제, DNA 인터컬레이터(intercalator), 단백질 억제제(예컨대, 키나제 억제제), 또는 생물학적 제제, 예컨대, 항체, 항체 단편, 압타머(aptamer), 핵산(예컨대, DNA, RNA), 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 단백질일 수 있다. 약물은 약제학적 조성물 또는 의약으로서 제형화될 수 있다. 제형은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 희석제, 부형제 또는 담체와 함께 하나 이상의 약물(예컨대, 하나 이상의 활성제)을 포함할 수 있다.

[1301] 치료는 하나 이상의 약물의 투여를 포함할 수 있다. 약물은 치료될 상태에 따라 단독으로 또는 다른 치료와 함께, 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 예를 들면, 화학치료요법은 2개의 약물의 투여를 포함하는 공-치료요법(co-therapy)일 수 있고, 약물 중 하나 이상은 암을 치료하기 위해 의도될 수 있다.

[1302] 화학치료요법은 투여의 하나 이상의 경로, 예컨대, 비경구, 정맥내 주사, 경구, 피하, 피내 또는 종양내에 의해 투여될 수 있다.

[1303] 화학치료요법은 치료 요법에 따라 투여될 수 있다. 치료 요법은 의사 또는 개업의가 준비할 수 있고 치료가 필요한 환자에게 적합하도록 맞춤화될 수 있는 예정된 시간표, 계획, 방식 또는 화학요법 투여 일정일 수 있다. 치료 요법은 다음 중 하나 또는 그 이상을 나타낼 수 있다: 환자에게 투여할 화학요법의 유형; 각각의 약물 또는 방사선의 용량; 투여 사이의 시간 간격; 각 치료 기간; 임의의 치료 휴일의 수와 특성(있는 경우) 등. 공-치료요법의 경우, 각 약물의 투여될 방법을 나타내는 단일 치료 요법이 제공될 수 있다.

[1304] 화학치료 약물은 다음으로부터 선택될 수 있다: 아베마시클립, 아비라테론 아세테이트, 아비트렉세이트(메토트렉세이트), 아브락산(파클리탁셀 알부민-안정화된 나노입자 제형), ABVD, ABVE, ABVE-PC, AC, 아칼라브루티닙, AC-T, 아드세트리스(브렌툭시맙, 베도틴), ADE, 아도-트라스투주맙 엠탄신, 아드리아마이신(독소루비신 하이드로클로라이드), 아파니닙 디말레에이트, 아피니토르(에베롤리무스), 아킨제오(네투피탄트 및 팔로노세트론 하이드로클로라이드), 알다라(이미퀴모드), 알데스류킨, 알레센사(알렉티닙), 알렉티닙, 알레무주맙, 알림타(페메트렉세드 이나트륨), 알리쿠파(코파늘리십 하이드로클로라이드), 주사용 알케란(멜팔란 하이드로클로라이드), 알케란 정제(멜팔란), 알록시(팔로노세트론 하이드로클로라이드), 알룬브릭(브리가티닙), 암보클로린(클로람부실), 암보클로린(클로람부실), 아미포스틴, 아미놀레불린산, 아나스트로졸, 아프레피탄트, 아레디아(파미드로네이트 이나트륨), 아리미덱스(아나스트로졸), 아로마신(엑세메스탄), 아라논(넬라라빈), 아르세닉 트리옥사이드, 아르제라(오파투무맙), 아스파라기나제 에르위니아 크리산테미, 아테졸리주맙, 아바스틴(베바시주맙), 아벨루맙, 악기캅타겐, 실로류셀, 악시티닙, 아자시티딘, 바벤시오(아벨루맙), BEACOPP, 베세눔(카르무스틴), 벨레오닥(벨리노스타트), 벨리노스타트, 벤다무스틴 하이드로클로라이드, BEP, 베스폰사(이노투주맙 오조가미신), 베바시주맙, 벡사로텐, 벡사르(토시투모맙 및 요오드 I 131 토시투모맙), 비칼루타미드, BiCNU(카르무스틴), 블레오마이신, 블리나투모맙, 블린사이토(블리나투모맙), 보르테조밉, 보설리프(보수티닙), 모수티

닙, 브렌툭시맙 베도틴, 브리가티닙, 부멜(BuMel), 부설판, 부설퐥스(부설판), 카바지탁셀, 카보메타익스(카보잔티닙-S-말레이트), 카보잔티닙-S-말레이트, CAF, 말퀜스(아칼라브루티닙), 캄패쓰(알렘투주맙), 캄프토사르(이리노테칸 하이드로클로라이드), 카페시타빈, CAPOX, 카락(플루오로우라실--국소), 카르보플라틴, 카르보플라틴-탁솔(CARBOPLATIN-TAXOL), 카르필조밉, 카르무브리스(카르무스틴), 카르무스틴, 카르무스틴 임플란트, 카소덱스(비칼루타미드), CEM, 세리티닙, 세루비딘(다우노루비신 하이드로클로라이드), 세르바릭스(재조합 HPV 2가 백신), 세툭시맙, CEV, 클로람부실, 클로람부실-프레드니손(CHLORAMBUCIL-PREDNISONE), CHOP, 시스플라틴, 글라드리빈, 클라퓌(사이클로포스파미드), 클로파라빈, 클로파렉스(클로파라빈), 클로라르(클로파라빈), CMF, 코비메티닙, 코메트리크(카보잔티닙-S-말레이트), 코파늘리십 하이드로클로라이드, COPDAC, COPP, COPP-ABV, 코스메겐(닥티노마이신), 코텔릭(코비메티닙), 크리조티닙, CVP, 사이클로포스파미드, 사이포스(이포스파미드), 사이람자(라무시루맙), 사이타라빈, 사이타라빈 리포솜, 사이토사르-U(사이타라빈), 사이톡산(사이클로포스파미드), 다브라페닙, 아카르바진, 다코겐(덱시타빈), 닥티노마이신, 다라투무맙, 다르잘렉스(다라투무맙), 다사티닙, 아우노루비신 하이드로클로라이드, 다우노루비신 하이드로클로라이드 및 사이타라빈 리포좀, 데시타빈, 데피브로티드 나트륨, 데피텔리오(데피브로티드 나트륨), 데가렐릭스, 데닐류킨 디프티톡스, 데노수맙, 데포시트(사이타라빈 리포좀), 덱사메타손, 덱스라족산 하이드로클로라이드, 디누툭시맙, 도세탁셀, 독실(독소루비신 하이드로클로라이드 리포좀), 독소루비신 하이드로클로라이드, 독소루비신 하이드로클로라이드 리포좀, Dox-SL(독소루비신 하이드로클로라이드 리포좀), DTIC-도메(다카르바진), 두르발루맙, 에푸덱스(플루오로우라실--국소), 엘리테크(라스부리카제), 엘렌스(에피루비신 하이드로클로라이드), 엘로투주맙, 엘록사틴(옥살리플라틴), 엘트롬보파그 올라민, 에멘드(아프레티탄트), 엠플리시티(엘로투주맙), 에나시데닙 메실레이트, 엔잘루타미드, 에피루비신 하이드로클로라이드, EPOCH, 에르비툭스(세툭시맙), 에리불린 메실레이트, 에리베쥬(비스모데깁), 에를로티닙 하이드로클로라이드, 에르위나제(아스파라기나제 에르위니아 크리산테미), 에티올(아미포스틴), 에토포포스(에토포시드 포스페이트), 에토포시드, 에토포시드 포스페이트, 에바세트(독소루비신 하이드로클로라이드 리포좀), 에베롤리무스, 에비스타(랄록시펜 하이드로클로라이드), 에보멜라(멜팔란 하이드로클로라이드), 엑세메스탄, 5-FU(플루오로우라실 주사), 5-FU(플루오로우라실--국소), 파레스톤(토레미펜), 파리닥(파노비노스타트), 파슬로텍스(풀베스트란트), FEC, 페마라(레트로졸), 필그라스팀, 플루다라(플루다라빈 포스페이트), 플루다라빈 포스페이트, 플루오로플렉스(플루오로우라실--국소), 플루오로우라실 주사, 플루오로우라실--국소, 플루타미드, 폴렉스(메토트렉세이트), 폴렉스 PFS(메토트렉세이트), 폴리피리(FOLFIRI), 폴리피리-베바시주맙(FOLFIRI-BEVACIZUMAB), 폴피리-세툭시맙(FOLFIRI-CETUXIMAB), 폴리피녹스(FOLFIRINOX), 폴폭스(FOLFOX), 폴로틴(프랄라트렉세이트), FU-LV, 풀베스트란트, 가르다실(재조합 HPV 4가 백신), 가르다실9(재조합 HPV 비가(Nonavalent) 백신), 가자바(오비누투주맙), 게피티닙, 겜시타빈 하이드로클로라이드, 겜시타빈-시스플라틴(GEMCITABINE-CISPLATIN), 겜시타빈-옥살리플라틴(GEMCITABINE-OXALIPLATIN), 겜투주맙 오조가미신, 겜자르(겜시타빈 하이드로클로라이드), 길로트리프(아파티닙 디말레에이트), 글리벡(이마티닙 메실레이트), 글리다델(카르무스틴 임플란트), 글리아델 와이퍼(Gliadel wafer)(카르무스틴 임플란트), 글루카르피다제, 고세렐린 아세테이트, 할라벤(에리불린 메실레이트), 헤만게올(프로프로파놀롤 하이드로클로라이드), 헤르셉틴(트라스투주맙), HPV 2가 백신, 재조합, HPV 비가 백신, 재조합, HPV 4가 백신, 재조합, 하이캄틴(토포테칸 하이드로클로라이드), 하이드레아(하이드록시우레아), 하이드록시우레아, 하이퍼(Hyper)-CVAD, 이브란스(팔보시크립), 이브리투모맙 티욱세탄, 이브루티닙, ICE, 이클루시그(포나티닙 하이드로클로라이드), 이다마이신(이다루비신 하이드로클로라이드), 이다루비신 하이드로클로라이드, 이델랄리십, 이드히파(에나시데닙 메실레이트), 이펙스(이포스파미드), 이포스파미드, 이포스파미둠(이포스파미드), IL-2(알데스류킨), 이마티닙 메실레이트, 임브루비카(이브루티닙, 임핀지(두르발루맙), 이미퀴모드, 이믈리긱(탈리모겐 라헤르파렙벡), 인라이타(악시티닙), 이노투주맙 오조가미신, 인터페론 알파-2b, 재조합, 인터류킨-2(알데스류킨), 인트론 A(재조합 인터페론 알파-2b), 요오드 I 131 토시투모맙 및 토시투모맙, 이필리무맙, 이레싸(게피니닙), 이리노테칸 하이드로클로라이드, 이리노테칸 하이드로클로라이드 리포좀, 이스토닥스(모미뎁신), 익사베필론, 익사조밉 시트레이트, 익셈프라(익사베필론), 자카피(룩솔리티닙 포스페이트), JEB, 제브타나(카바지탁셀), 아드실라(아도-트라스투주맙 엠탄신), 케옥시펜(랄록시펜 하이드로클로라이드), 케피반스(팔리페르민), 키트루다(펨블롤리주맙), 키스콸리(리보시클립), 밈리아흐(티사겐레클류셀), 키프롤리스(카르필조밉), 란레오티드 아세테이트, 라파티닙 디토실레리트, 라르트루보(올라라투맙), 레날리돔드, 렌바티닙 메실레이트, 렌비마(렌바티닙 메실레이트), 레트로졸, 류코보린 칼슘, 류케란(클로람부실), 류프롤리드 아세테이트, 류스타틴(클라드리빈), 레불란(아미노레불린산), 린폴리진(클로람부실), 리포독스(독소루비신 하이드로클로라이드 리포좀), 로무스틴, 론수르프(트리플루리딘 및 티피라실 하이드로클로라이드), 루프론(류프롤리드 아세테이트), 루프론 데포트(류프롤리드 아세테이트), 루프론 데포트-페드(류프롤리드 아세테이트), 린파르자(올라파립), 마르퀴보(빈크리스틴 하이드로클로라이드 설페이트 리포좀), 마툴란(프로카르바진 하이드로클로라이드), 메클로르에타민 하이드로클로라이드,

메게스트롤 아세테이트, 메키니스트(트라메티닙), 멜팔란, 멜팔란 하이드로클로라이드, 머캅토푸린, 메스나, 메스넥스(메스나), 메카졸라스톤(테모졸로미드), 메토트렉세이트, 메토트렉세이트 LPF(메토트렉세이트), 메틸날프렉손 브로마이드, 멕세이트(메토트렉세이트), 멕세이트-AQ(메토트렉세이트), 미도스타우린, 미토마이신 C, 미톡산트론 하이드로클로라이드, 미토지트렉스(미토마이신 C), MOPP, 모조빌(플레릭사포르), 무스타르겐(메클로르에타민 하이드로클로라이드), 무타마이신(미타마이신 C), 마일레란(부설판), 마일로사르(아자시티딘), 마일로타르그(겜투주맙 오조가미신), 나노입자 파클리탁셀(파클리탁셀 알부민-안정화된 나노입자 제형), 나벨빈(비노렐빈 타르트레이트), 네시투무맙, 넬라라빈, 네오사르(사이클로포스파미드), 네라티닙 말레에이트, 네를린스(네라티닙 말레에이트), 네투피탄트 및 팔로세트론 하이드로클로라이드, 네울라스타(페그필그라스팀), 뉴포겐(필그라스팀), 넥사바르(소라피닙 토실레이트), 닐란드론(닐루타미드), 닐로티닙, 닐루타미드, 니늘라로(익사조밉 시트레이트, 니라파립 토실레이트 일수화물, 니볼루맙, 놀바덱스(카목시펜 시트레이트), 엔플레이트(Nplate)(로미플로스팀), 오비누투주맙, 오돔조(소니데깁), OEPA, 오파투무맙, OFF, 올라파립, 올라라투맙, 오마세탁신 메페석시네이트, 온카르파르(페가스파르가제), 온단세트론 하이드로클로라이드, 오니바이드(이리노테칸 하이드로클로라이드 리포좀), 온탁(데니류킨 디프티톡스), 옵디보(니볼루맙), OPPA, 오시메르티닙, 옥살리플라틴, 파클리탁셀, 파클리탁셀 알부민-안정화된 나노입자 제형, PAD, 팔보시클립, 팔리페르민, 팔로노세트론 하이드로클로라이드, 팔로노세트론 하이드로클로라이드 및 네투피탄트, 파미드로네이트 이나트륨, 파니투무맙, 페노비노스타트, 파라플라트(카르보플라틴), 파라플라틴(카르보플라틴), 파조파닙 하이드로클로라이드, PCV, PEB, 페가스파르가제, 페그필그라스팀, 페그인터페론 알파-2b, PEG-인트론(페그인터페론 알파-2b), 펨브롤리주맙, 페메트렉세드 이나트륨, 데르제타(페르투주맙), 페르투주맙, 플라티놀(시스플라틴), 플라티놀-AQ(시스플라틴), 플레식사포르, 포말리도미드, 포말리스트(포말리도미드), 포나티닙 하이드로클로라이드, 포르트라짜(네시투무맙), 프랄라트렉세이트, 프레드니손, 프로카르바진 하이드로클로라이드, 프롤류킨(알데스류킨), 프롤리아(데노수맙), 프로막타(엘트롬보팩 올라민), 프로프로판올롤 하이드로클로라이드, 프로벤지(시풀류셀-T), 푸리네톨(머캅토푸린), 푸릭산(머캅토푸린), [항목 없음], 라듐 223 디클로라이드, 랄곡시펜 하이드로클로라이드, 라무시루맙, 라스부리카제, R-CHOP, R-CVP, 재조합 사람 파필로마바이러스(HPV) 2가 백신, 재조합 사람 파필로마바이러스(HPV) 비가 백신, 재조합 사람 파필로마바이러스(HPV) 4가 백신, 재조합 인터페론 알파-2b, 레고라페닙, 렐리스토르(메틸날트렉손 브로마이드), R-EPOCH, 레블리미드(레날리도미드), 류마트렉스(메토트렉세이트), 리보시클립, R-ICE, 리툭산(리툭시맙), 리툭산 하이셀라(리툭시맙 및 하이알루로니다제 사람), 리툭시맙, 리툭시맙 및 하이알루로니다제 사람, 롤라피탄트 하이드로클로라이드, 로미뎁신, 로미플로스팀, 루비도마이신(다우노루비신 하이드로클로라이드), 루브라카(루카프립 캄실레이트), 루카파립 캄실레이트, 룩솔리티닙 포스페이트, 라이답트(미도스타우린), 스클로솔 흉막내 에어로졸(탈크), 실툭시맙, 시풀류셀-T, 소마툴린 데포트(란레오티드 아세테이트), 소니데깁, 소라페닙 토실레이트, 스프리셀(다사티닙), STANFORD V, 멸균 활석 분말(활석(Talc)), 스테리탈크(Steritalc)(활석), 스티베르가(레고라페닙), 소니티닙 말레이트, 수텐트(수니티닙 말레이트), 실라트론(페그인터페론 알파-2b), 실반트(실툭시맙), 신리보(오마세탁신 메페석시네이트), 타블로이드(티오구아닌), TAC, 타피늘라르(아브라페닙), 타그리쏘(오시메르티닙), 활석, 탈리모겐 라헤르파렙벡, 타목시펜 시트레이트, 타라빈 PFS(사이타라빈), 타르세바(에를로티닙 하이드로클로라이드), 타르그레틴(벡사로텐), 타시그나(닐로티닙), 탁솔(파클리탁셀), 탁소테레(도세탁셀), 테센트리크(아테졸리주맙), 테모다르(테모졸로미드), 테모졸로미드, 템시롤리무스, 탈리도미드, 탈로미드(탈리도미드), 티오구아닌, 티오테파, 티사겐레클류셀, 톨락(플루오로우라실--국소), 토포테칸 하이드로클로라이드, 토레미펜, 토리셀(템시롤리무스), 토시투모맙 및 요오드 I 131 토시투모맙, 토텍트(덱스라족산 하이드로클로라이드), TPF, 트라벡테딘, 트라메티닙, 트라스투주맙, 트레안다(벤다무스틴 하이드로클로라이드), 트리플루리딘 및 티피라실 하이드로클로라이드, 트리세녹스(아르세닉 트리옥사이드), 타이게르브(라파티닙 디토실레이트), 우니톡신(디누톡시맙), 우리딘 트리아세테이트, VAC, 말루비신, 발스타르(발루비신), 반데타닙, VAMP, 바루디(롤라피탄트 하이드로클로라이드), 벡티빅(파니누무맙), VeIP, 벨반(빈블라스틴 설페이트), 벨카데(보르테조밉), 벨사르(빈블라스틴 설페이트), 베무라페닙, 벤클렉타(베테토클락스), 베네토클락스, 베르제니오(아베마시클립), 비아두르(류프롤리드 아세테이트), 비다자(아자시티딘), 빈블라스틴 설페이트, 빈카사르 PFS(빈크리스틴 설페이트), 빈크리스틴 설페이트, 빈크리스틴 설페이트 리포좀, 비놀렐빈 타르트레이트, VIP, 비스모데깁, 비스토가르드(우리딘 트리아세테이트), 보락사제(글루카르피다제), 보리노스타트, 모트리엔트(파조파닙 하이드로클로라이드), 바익세오스(다우노루비신 하이드로클로라이드 및 사아타라빈 리포좀), 웰코보린(류코보린 칼슘), 크살코리(크리조티닙), 크셀로다(카펙시타빈), XELIRI, XELOX, 엑스게바(Xgeva)(데노수맙), 엑소피고(Xofigo)(라듐 223 디클로라이드), 엑스탄디(Xtandi)(엔잘루타미드), 예르보이(이필리무맙), 예스카르타(악시카르바겐 실로류셀), 욘델리스(트라벡테딘), 잘트랩(지브-아플리베르셉트), 자륵시오(필그라스팀), 제줄라(니라파립 토실레이트 일수화물), 젤보라프(베무라페닙), 제발린(이브리투모맙 티욱세탄), 지네카르드(덱사라족산 하이드로클로라이드), 지브-아플리베르셉트, 조프란(온단세트론 하이드로클

로라이드), 졸라덱스(고세렐린 아세테이트), 졸레드론산, 졸린자(보리노스타트), 조메타(졸레드론산), 자이델리그(이델랄리십), 자이카디아(세르티닙)및 자이티가(아비라테론 아세테이트).

[1305] 용량/투여량 요법(Dose/dosage regimes)

[1306] 다중 용량의 항원-결합 분자, 폴리펩타이드, CAR, 핵산(또는 이의 다수), 발현 벡터(또는 이의 다수), 세포 또는 조성물이 제공될 수 있다. 다음의 절에서 "항원-결합 분자"에 대한 참고는 또한 본 개시내용에 따른 하나 이상의 다른 물품(폴리펩타이드, CAR, 핵산(또는 이의 다수), 발현 벡터(또는 이의 다수), 세포 또는 조성물), 및 이의 역을 포함한다. 용량 중 하나 이상, 또는 각각은 다른 치료제의 동시 또는 순차적 투여에 의해 달성된다.

[1307] 다중 용량은 예정된 시간 간격에 의해 분리될 수 있고, 이는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 또는 31일, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개월 중 하나가 되도록 선택될 수 있다. 예로서, 용량은 7, 14, 21 또는 28일(플러스 또는 마이너스 3, 2, 또는 1일: 예를 들면, 4, 5, 6, 8, 9 또는 10일; 11, 12, 13, 15, 16 또는 17일; 18, 19, 20, 22, 23, 또는 24일; 또는 25, 26, 27, 29, 30 또는 31일) 마다 1회 제공될 수 있다. 즉, 7일마다, 14일마다, 21일마다, 또는 28일마다 1회 치료 이벤트가 존재할 수 있다. 약 7일(플러스 또는 마이너스 3, 2, 또는 1일), 약 14일(플러스 또는 마이너스 3, 2, 또는 1일), 약 21일(플러스 또는 마이너스 3, 2, 또는 1일), 또는 약 28일(플러스 또는 마이너스 3, 2, 또는 1일) 각각의 용량/투여 사이에 치료 휴일이 존재할 수 있다.

[1308] 본 개시내용의 일부 양태에서, 항원-결합 분자는 매주 1회(예컨대, 7일 플러스 또는 마이너스 3, 2, 또는 1일마다 1회) 투여된다. 즉, 매주 1회의 치료 이벤트/투여가 존재할 수 있다.

[1309] 본 개시내용의 일부 양태에서, 항원-결합 분자는 2주마다 1회(예컨대, 14일 플러스 또는 마이너스 3, 2, 또는 1일 마다 1회) 투여된다. 즉, 2주마다 1회의 치료 이벤트/투여가 존재할 수 있다.

[1310] 본 개시내용의 일부 양태에서, 항원-결합 분자는 3주마다 1회(예컨대, 21일 플러스 또는 마이너스 3, 2, 또는 1일 마다 1회) 투여된다. 즉, 3주마다 1회의 치료 이벤트/투여가 존재할 수 있다.

[1311] 본 개시내용의 일부 양태에서, 항원-결합 분자는 3주/21일(플러스/마이너스 3, 2, 또는 1일)의 하나 이사의 기간 내에 투여된다. 2주/21일의 각각의 기간은 1회 투여 '주기'로서 지칭될 수 있는데, 즉, 1회 주기는 3주/21일(플러스/마이너스 3, 2, 또는 1일)일 수 있다. 투여는 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30주 이상, 105주까지 지속될 수 있다. 투여는 1, 2, 3, 4, 5, 6개 이상의 주기, 35개 주기까지(예컨대, 각각의 주기는 21일/3주를 포함함) 지속될 수 있다. 투여는 1, 2, 3, 4, 5, 6개월 이상, 24개월까지(예컨대, 각각의 주기는 21일/3주를 포함함) 지속될 수 있다. 21일의 주기/기간은 지속적/연속적일 수 있거나, 예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7일, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6주 이상 떨어질 수 있다.

[1312] 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 3주/21일(플러스/마이너스 3, 2, 또는 1일)의 기간 동안 1회, 2회 또는 3회 투여된다. 즉, 3주/21일 주기당 투여된 1, 2 또는 3회 용량이 존재할 수 있다.

[1313] 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 3주의 기간 동안 주당 1회 투여된다. 항원-결합 분자는 1, 2, 3, 4, 5, 6개 이상의 주기 동안 주마다 1회(즉, 21일의 1, 2, 3, 4, 5, 6개의 기간 동안 주당 1회, 또는 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30주 이상 동안 주마다 1회) 투여될 수 있다. 일부 구현예에서 항원 결합 분자는 21일/3주 기간의 1, 8 및 15일(플러스/마이너스 3, 2, 또는 1일)에 투여된다. 각각의 용량 사이에 ~7일(플러스 또는 마이너스 3, 2, 또는 1일)의 치료 휴일이 존재할 수 있다.

[1314] 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 3주/21일(플러스/마이너스 3, 2, 또는 1일)의 기간 동안 2번(2회) 투여된다. 즉, 3주/21일 주기 당 투여된 2회 용량이 존재한다. 일부 구현예에서 2개의 용량은 3주/21일의 주기 내에, 7일(플러스/마이너스 3, 2, 또는 1일) 떨어져서 투여된다. 항원-결합 분자는 1, 2, 3, 4 5, 6개 이상의 주기마다 2회(즉, 3주/21일의 1, 2, 3, 4, 5, 6개 이상의 주기마다 2회, 또는 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30주 이상 동안 3주/21일 마다 2회) 투여된다. 일부 구현예에서 항원 결합 분자는 21일/3주 주기의 1일 및 8일째(플러스/마이너스 3, 2, 또는 1일)에 투여된다. 상이한 주기내 용량 사이(예컨대, 주기 1의 8일째 용량과 주기 2의 1일째 용량 사이)에 ~14일(플러스 또는 마이너스 3, 2, 또는 1일)의 치료 휴일이 존재할 수 있다.

[1315] 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 3주/21일(플러스/마이너스 3, 2, 또는 1일)의 기간 동안 1번(1회) 투여된다. 즉, 3주/21일 주기 당 투여된 1회 용량이 존재할 수 있다. 항원-결합 분자는 1, 2, 3, 4, 5, 6개 이상의 주기마다 1회(즉, 3주/21일의 1, 2, 3, 4, 5, 6개 이상의 주기마다 1회, 또는 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30주 이상 동안 3주/21일마다 1회) 투여될 수 있다. 일부 구현예에서 항원 결합 분자는 21일/3주 기간 각각의 1

일(플러스/마이너스 3, 2, 또는 1일)에 투여된다. 상이한 주기 사이의 용량 사이(예컨대, 주기 1의 1일째 용량과 주기 2의 1일째 용량 사이)에 ~21일(플러스 또는 마이너스 3, 2, 또는 1일)의 치료 휴일이 존재할 수 있다.

[1316] 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 4주/28일(플러스/마이너스 3, 2, 또는 1일)의 기간 동안 1, 2, 3, 또는 4회 투여된다. 즉, 4-주/28-일 주기 당 1, 2, 3 또는 4회 용량이 존재할 수 있다. 즉, 투여 주기는 4주/28일, 플러스/마이너스 3, 2, 또는 1일일 수 있다). 항원-결합 분자는 1, 2, 3, 4, 5, 6개 이상의 주기 마다 1, 2, 3회 또는 4회 투여될 수 있다(즉, 4주/28일의 1, 2, 3, 4, 5, 6개 이상의 주기마다 1회, 또는 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32주 이상 동안 4주/28일마다 1, 2, 3 또는 4회). 일부 구현예에서 항원 결합 분자는 28-일/4주 주기마다 1, 8, 15 및/또는 22일(각각 플러스/마이너스 3, 2, 또는 1일) 중 하나 이상에서 투여된다.

[1317] 일부 구현예에서 항원-결합 분자는 4주/28일(플러스/마이너스 3, 2, 또는 1일)의 기간 동안 2번(2회) 투여된다. 즉, 4-주/28일 주기 당 투여된 2회 용량이 존재할 수 있다. 일부 구현예에서 2개 용량은 4주/28일의 기간 내에 7일 떨어지거나 14일 떨어져서(플러스/마이너스 3, 2, 또는 1일) 투여된다. 항원-결합 분자는 1, 2, 3, 4, 5, 6개 이상의 주기 마다 2회(즉, 4주/28일의 1, 2, 3, 4, 5, 6회 이상의 기간 마다 2회, 또는 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40주 이상 동안 4주/28일 마다 2회) 투여될 수 있다. 일부 구현예에서 항원 결합 분자는 28-일/4주 주기마다 1 및 15일(플러스/마이너스 3, 2, 또는 1일)에 투여된다. 동일한 주기의 용량 사이(예컨대, 주기 1의 1일째 용량과 주기 1의 51일째 용량 사이)에 ~14일(플러스 또는 마이너스 3, 2, 또는 1일)의 치료 휴일이 존재할 수 있다. 상이한 주기내 용량 사이(예컨대, 주기 1의 15일째 용량과 주기 2의 1일째 용량 사이)에 ~14일(플러스 또는 마이너스 3, 2, 또는 1일)의 치료 휴일이 존재할 수 있다.

[1318] 일부 구현예에서, 투여는 예컨대, 투여 당 적어도 2 mg, 적어도 3, 적어도 5 mg, 적어도 7 mg, 적어도 10 mg, 적어도 11 mg, 적어도 12 mg, 적어도 13 mg, 적어도 14 mg, 적어도 15 mg, 적어도 16 mg, 적어도 17 mg, 적어도 18 mg, 적어도 19 mg, 적어도 20 mg, 적어도 21 mg, 적어도 22 mg, 적어도 23 mg, 적어도 24 mg, 또는 적어도 25 mg의 투여를 포함한다.

[1319] 일부 구현예에서, 투여(예컨대, 상기 스케쥴)는 예컨대, 투여 당 약 7 mg의 항원-결합 분자를 투여함을 포함한다. 일부 구현예에서, 투여(예컨대, 상기 스케쥴)는 예컨대, 투여 당 약 10 mg의 항원-결합 분자를 투여함을 포함한다. 일부 구현예에서, 투여(예컨대, 상기 스케쥴)는 예컨대, 투여 당 약 20 mg의 항원-결합 분자를 투여함을 포함한다. 일부 구현예에서, 투여(예컨대, 상기 스케쥴)는 예컨대, 투여 당 약 2.2 mg의 항원-결합 분자를 투여함을 포함한다. 일부 구현예에서, 투여(예컨대, 상기 스케쥴)는 예컨대, 투여 당 약 3.3 mg의 항원-결합 분자를 투여함을 포함한다. 일부 구현예에서, 투여(예컨대, 상기 스케쥴)는 예컨대, 투여 당 약 3.5 mg의 항원-결합 분자를 투여함을 포함한다.

[1320] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 예컨대, 본원에 기술된 바와 같이, 투여 당 또는 투여 주기 당 3.5 mg 내지 1600 mg의 용량에서 투여된다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 예컨대, 본원에 기술된 바와 같이, 투여 당 또는 투여 주기 당 3.5 mg 내지 20 mg의 용량에서 투여된다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 예컨대, 본원에 기술된 바와 같이, 투여 당 또는 투여 주기 당 20 mg 내지 80 mg의 용량에서 투여된다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 예컨대, 본원에 기술된 바와 같이, 투여 당 또는 투여 주기 당 60 mg 내지 400 mg의 용량에서 투여된다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 예컨대, 본원에 기술된 바와 같이, 투여 당 또는 투여 주기 당 100 mg 내지 250 mg의 용량에서 투여된다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 예컨대, 본원에 기술된 바와 같이, 투여 당 또는 투여 주기 당 300 mg 내지 800 mg의 용량에서 투여된다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 예컨대, 본원에 기술된 바와 같이, 투여 당 또는 투여 주기 당 800 mg 내지 1800 mg의 용량에서 투여된다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 예컨대, 본원에 기술된 바와 같이, 투여 당 또는 투여 주기 당 1000 mg 내지 1600 mg의 용량에서 투여된다.

[1321] 일부 구현예에서, 투여(예컨대, 상기 스케쥴에서)는 투여 당 또는 투여 주기 당, 예컨대, 3주/21일 또는 4주/28일의 기간 당 적어도 3.5 mg, 적어도 5 mg, 적어도 7.5 mg, 적어도 10 mg, 적어도 12.5 mg, 적어도 15 mg, 적어도 17.5 mg, 적어도 20 mg, 적어도 22.5 mg, 적어도 25 mg, 적어도 27.5 mg, 적어도 30 mg, 적어도 32.5 mg, 적어도 35 mg, 적어도 37.5 mg, 적어도 40 mg, 적어도 42.5 mg, 적어도 45 mg, 적어도 47.5 mg, 적어도 50 mg, 적어도 52.5 mg, 적어도 55 mg, 적어도 57.5 mg, 적어도 60 mg, 적어도 62.5 mg, 적어도 65 mg, 적어도 67.5 mg, 또는 적어도 70 mg의 항원-결합 분자를 투여함을 포함한다.

[1322] 일부 구현예에서, 투여(예컨대, 상기 스케쥴에서)는 투여 당 또는 투여 주기 당, 예컨대, 3주/21일 또는 4주/28일의 기간 당 적어도 80 mg, 적어도 90 mg, 적어도 100 mg, 적어도 110 mg, 적어도 120 mg, 적어도 130 mg, 적어도 140 mg, 적어도 150 mg, 적어도 160 mg, 적어도 170 mg, 적어도 180 mg, 적어도 190 mg, 적어도 200 mg,

적어도 210 mg, 적어도 220 mg, 적어도 230 mg, 적어도 240 mg, 적어도 250 mg, 적어도 260 mg, 적어도 270 mg, 적어도 280 mg, 적어도 290 mg, 적어도 300 mg, 적어도 310 mg, 적어도 320 mg, 적어도 330 mg, 적어도 340 mg, 적어도 350 mg, 적어도 360 mg, 적어도 370 mg, 적어도 380 mg, 적어도 390 mg, 적어도 400 mg, 적어도 410 mg, 적어도 420 mg, 적어도 430 mg, 적어도 440 mg, 적어도 450 mg, 적어도 460 mg, 적어도 470 mg, 적어도 480 mg, 적어도 490 mg, 적어도 500 mg, 적어도 510 mg, 적어도 520 mg, 적어도 530 mg, 적어도 540 mg, 적어도 550 mg, 적어도 560 mg, 적어도 570 mg, 적어도 580 mg, 적어도 590 mg, 적어도 600 mg, 적어도 610 mg, 적어도 620 mg, 적어도 630 mg, 적어도 640 mg, 적어도 650 mg, 적어도 660 mg, 적어도 670 mg, 적어도 680 mg, 적어도 690 mg, 적어도 700 mg, 적어도 710 mg, 적어도 720 mg, 적어도 730 mg, 적어도 740 mg, 적어도 750 mg, 적어도 760 mg, 적어도 770 mg, 적어도 780 mg, 적어도 790 mg, 적어도 800 mg, 적어도 810 mg, 적어도 820 mg, 적어도 830 mg, 적어도 840 mg, 적어도 850 mg, 적어도 860 mg, 적어도 870 mg, 적어도 880 mg, 적어도 890 mg, 적어도 900 mg, 적어도 910 mg, 적어도 920 mg, 적어도 930 mg, 적어도 940 mg, 적어도 950 mg, 적어도 960 mg, 적어도 970 mg, 적어도 980 mg, 적어도 990 mg, 적어도 1000 mg, 적어도 1050 mg, 적어도 1100 mg, 적어도 1150 mg, 적어도 1200 mg, 적어도 1250 mg, 적어도 1300 mg, 적어도 1350 mg, 적어도 1400 mg, 적어도 1450 mg, 적어도 1500 mg, 적어도 1550 mg, 적어도 1600 mg, 적어도 1650 mg, 적어도 1700 mg, 적어도 1750 mg, 적어도 1800 mg, 적어도 1850 mg, 적어도 1900 mg, 적어도 1950 mg, 또는 적어도 2000 mg의 항원-결합 분자를 투여함을 포함한다.

[1323] 일부 구현예에서, 투여(예컨대, 상기 스케쥴에서)는 투여 당 또는 투여 주기 당, 예컨대, 3주/21일 또는 4주/28일의 기간 당 3.5 mg, 7 mg, 10.5 mg, 17.5 mg, 20 mg, 21 mg, 40 mg, 60 mg, 72 mg, 120 mg, 180 mg, 240 mg, 360 mg, 400 mg, 800 mg, 1200 mg, 1600 mg, 1900 mg, 2200 mg, 또는 2500 mg의 항원-결합 분자를 투여함을 포함한다.

[1324] 일부 구현예에서, 투여(예컨대, 상기 스케쥴에서)는 투여 당 또는 투여 주기 당, 60-90 mg, 90-120 mg, 120-180 mg, 180-240 mg 또는 240-360 mg의 항원-결합 분자를 투여함을 포한한다.

[1325] 일부 구현예에서, 투여(예컨대, 상기 스케쥴에서)는 투여 당 또는 투여 주기 당, 예컨대, 3주/21일 또는 4주/28일의 기간 당 약 0.05 mg/kg, 약 0.1 mg/kg, 약 0.15 mg/kg, 약 0.25 mg/kg, 약 0.3 mg/kg, 약 0.5 mg/kg, 약 0.9 mg/kg, 약 1 mg/kg, 약 1.5 mg/kg, 약 2 mg/kg, 약 2.5 mg/kg, 약 3 mg/kg, 약 5 mg/kg, 약 7.5 mg/kg, 약 10 mg/kg, 약 12.5 mg/kg, 약 15 mg/kg, 약 17.5 mg/kg, 약 20 mg/kg, 약 22.5 mg/kg 또는 약 25 mg/kg(또는 나열된 용량 중 적어도 하나)을 투여함을 포함한다.

[1326] 일부 구현예에서, 투여(예컨대, 상기 스케쥴에서)는 투여 당 또는 투여 주기 당, 예컨대, 3주/21일 또는 4주/28일의 기간 당 10.5 mg 이하, 21 mg 이하, 31.5 mg 이하, 52.5 mg 이하, 60 mg 이하, 63 mg 이하, 120 mg 이하, 216 mg 이하, 180 mg 이하, 360 mg 이하, 540 mg 이하, 720 mg 이하, 1080 mg 이하, 1200 mg 이하, 2400 mg 이하, 3600 mg 이하, 4800 mg 이하, 5000 mg 이하, 5500 mg 이하, 5700 mg 이하, 6000 mg 이하, 6600 mg 이하 또는 7500 mg 이하의 항원-결합 분자를 투여함을 포함한다. 일부 구현예에서, 투여(예컨대, 상기 스케쥴에서)는 투여 당 또는 투여 주기 당, 예컨대, 3주/21일 또는 4주/28일의 기간 당 10.5 mg 내지 7500 mg의 항원-결합 분자를 투여함을 포함한다. 일부 구현예에서, 투여(예컨대, 상기 스케쥴에서)는 투여 당 또는 투여 주기 당, 예컨대, 3주/21일의 기간 당 10.5 mg 내지 31.5 mg, 31.5 mg 내지 66 mg, 66 mg 내지 120 mg, 120 mg 내지 216 mg, 216 mg 내지 360 mg, 360 mg 내지 720 mg, 720 mg 내지 1080 mg, 1080 mg 내지 1200 mg, 1200 mg 내지 2400 mg, 2400 mg 내지 3600 mg, 3600 mg 내지 4800 mg, 4800 mg 내지 6000 mg, 또는 6000 mg 내지 7500 mg의 항원-결합 분자를 투여함을 포함한다.

[1327] 일부 구현예에서, 투여(예컨대, 상기 스케쥴에서)는 투여 당 또는 투여 주기 당, 예컨대, 4주/28일의 기간 당 14 mg 이하, 28 mg 이하, 42 mg 이하, 70 mg 이하, 80 mg 이하, 84 mg 이하, 160 mg 이하, 240 mg 이하, 288 mg 이하, 480 mg 이하, 720 mg 이하, 960 mg 이하, 1440 mg 이하, 1600 mg 이하, 3200 mg 이하, 4800 mg 이하, 6400 mg 이하, 6600 mg 이하, 7200 mg 이하, 7600 mg 이하, 8000 mg 이하, 8800 mg 이하 또는 10000 mg 이하의 항원-결합 분자를 투여함을 포함한다. 일부 구현예에서, 투여(예컨대, 상기 스케쥴에서)는 투여 당 또는 투여 주기 당, 예컨대, 4주/28일의 기간 당 14 mg 내지 1000 mg의 항원-결합 분자를 투여함을 포함한다. 일부 구현예에서, 투여(예컨대, 상기 스케쥴에서)는 투여 당 또는 투여 주기 당, 예컨대, 4주/28일의 기간 당 14 mg 내지 42 mg, 42 mg 내지 80 mg, 80 mg 내지 120 mg, 120 mg 내지 160 mg, 160 mg 내지 240 mg, 240 mg 내지 480 mg, 480 mg, to 720 mg, 720 mg 내지 960 mg, 960 mg 내지 1600 mg, 1600 mg 내지 3200 mg, 3200 mg 내지 4800 mg, 4800 mg 내지 6400 mg, 6400 mg 내지 7200 mg, 7200 mg 내지 8000 mg, 또는 8000 내지 10000 mg의 항

원-결합 분자를 투여함을 포함한다.

[1328] 항원-결합 분자, 폴리펩타이드, CAR, 핵산(또는 이의 다수), 발현 벡터(또는 이의 다수), 세포 또는 조성물은 제2의 치료제와 함께 본원에 기술된 1회 이상의 용량 또는 투여 스케쥴에서 투여된다. 제2의 제제는 PD-1에 의해 매개된 신호전달을 할 수 있다. PD-1에 의해 매개된 신호전달을 억제할 수 있는 제제는, 예컨대, PD-1 또는 PD-L1에 대한 결합을 억제하고 PD-1-매개된 신호전달을 억제할 수 있는 항체이다. 일부 구현예에서 제제는 길항제 항-PD-1 항체이다. 일부 구현예에서 제제는 길항제 항-PD-L1 항체이다. 제제는 펨브롤리주맙(키투르다; MK-3475, 람브롤리주맙), 니볼루맙(옵디보), 세미플리맙(립타요), 아테졸리주맙(테센트리크), 아벨루맙(바벤시오), 또는 두르발루맙(임핀지)이다. 이러한 각각의 항체의 용량 및 투여 요법은 당해 분야에서 이용가능하다.

[1329] 일부 구현예에서, 제2의 치료제, 예컨대, PD-1에 의해 매개된 신호전달을 억제할 수 있는 제제는 3주/21일(플러스/마이너스 3, 2, 1일)의 기간 동안 1번(1회) 약 200 mg의 용량에서 투여된다.

[1330] 본원에 사용된 바와 같은, "약"은 명시된 용량, 및 이러한 용량의 플러스 또는 마이너스 10%를 지칭한다. 예를 들면, "약 3.5 mg"의 용량은 3.5 mg의 용량을 포함하는, 3.15 mg 내지 3.85 mg의 용량을 지칭한다.

[1331] 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 60-분 IV 주입(-5분/+10분)으로서 투여된다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 30-분 IV 주입(-5분/+10분)으로서 투여된다. 일부 구현예에서, 항원-결합 분자는 45-분 IV 주입(-5분/+10분)으로서 투여된다. 항원-결합 분자는 예컨대, 본 개시내용에 따른 조성물 속에서 IV 주입을 위해 제형화될 수 있다.

[1332] 항원-결합 분자는 적절한 지지 보호제, 예컨대, 조혈 성장 인자, 코르티코스테로이드, 항-우울제, 디펜하이드라민, 아세트아미노펜, 혈전생성제(즉, 로미플로스팀, 엘트롬보팍) 또는 과립구 콜로니 자극 인자(G-CSF) 제제(즉, 필그라스팀, 페그 필그라스팀), 항-구토제 항-설사제, 식욕 자극제, 자극제(즉, 모다피닐), 항-악액질 치료요법(즉, 어유 보충제), 항-우울제, 아편성 및 비-아편성 진통제, 항생제, 코르티코스테로이드의 선택적 사용, 혈소판/호중구 성장 인자, 비설포네이트 치료요법, 핵 인자 카파 β 리간즈 치료요법(예컨대, 데노수맙), 고나도트로핀 방출 호르몬(GnRH) 효능제 및/또는 LHRH 효능제와 함께 공-투여될 수 있다.

[1333] 항원-결합 분자는 사이토킨 방출 증후군을 치료 또는 예방하기 위한 하나 이상의 제제, 예컨대, 코르티코스테로이드, 항-IL-6 치료요법(예컨대, 토실리주맙), 비스테로이드성 소염제, 에피네프린, IV 유액, 항히스타민제, NSAID, 아세트아미노펜, 마약, 산소 및/또는 혈관수축제와 함께 공-투여될 수 있다.

[1334] 검출 방법

[1335] 본 발명은 또한 VISTA, 또는 VISTA를 발현하는 세포(예컨대, MDSC)를 검출, 국재화 또는 영상화하기 위한 방법에서 사용하기 위한 본 발명의 물품을 제공한다. 본원에 기술된 항원-결합 분자는 VISTA에 대한 항원-결합 분자를 포함하는 방법에서 사용될 수 있다. 이러한 방법은 항원-결합 분자 및 VISTA의 결합된 복합체의 검출을 포함할 수 있다.

[1336] 특히, VISTA의 검출은 VISTA를 발현하는 세포(예컨대, MDSC)가 병리학적으로 연관된 질환/상태를 진단/예후하고, 이러한 질환/상태로 발전할 위험이 있는 대상체를 확인하는 방법에서 유용할 수 있고/있거나 치료학적 개입에 대한 대상체의 반응을 예측하는 방법에서 유용할 수 있다.

[1337] 따라서, VISTA를 함유하거나, 또는 함유하는 것으로 예측된 샘플을 본원에 기술된 바와 같은 항원-결합 분자와 접촉시키는 단계, 및 항원-결합 분자와 VISTA의 복합체의 형성을 검출하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 또한, VISTA를 발현하는 세포를 함유하거나, 또는 함유하는 것으로 예측된 샘플을 본원에 기술된 바와 같은 항원-결합 분자와 접촉시키는 단계 및 항원-결합 분자와 VISTA를 발현하는 세포의 복합체의 형성을 검출하는 단계를 포함하는 방법이 또한 제공된다.

[1338] 샘플은 임의의 조직 또는 체액으로부터 취할 수 있다. 샘플은 다음을 포함하거나 이로부터 유래될 수 있다: 혈액의 양; 피브린 응괴 및 혈액 세포의 제거 후 수득된 혈액의 유체 일부를 포함할 수 있는 개체의 혈액으로부터 유래된 혈청의 양; 조직 샘플 또는 생검; 흉수액(pleural fluid); 뇌척수액(CSF); 또는 상기 개체로부터 단리된 세포. 일부 구현예에서, 샘플은 질환/상태에 의해 영향받은 조직 또는 조직들(예컨대, 질환의 증상이 만연하거나, 질환/상태의 병리학에 포함된 조직 또는 조직들)로부터 수득되거나 이로부터 유래될 수 있다.

[1339] 적합한 방법 양식, 예를 들면, 면역검정, 예를 들면, 샌드위치 검정, 예컨대, ELISA는 당해 분야에 잘 공지되어 있다. 이러한 방법은 항원-결합 분자, 또는 표적(들), 또는 둘 다를 검출가능한 모이어티, 예컨대, 본원에 기술된 바와 같은 형광성 표지, 인광성 표지, 발광성 표지, 면역-검출가능한 표지, 방사선표지, 화학물질, 핵산 또

는 효소 표지로 표지하는 단계를 포함할 수 있다. 검출 기술은 당해 분야의 숙련가에게 잘 공지되어 있고 표지제와 상응하도록 선택할 수 있다.

[1340] 이러한 종류의 방법은 질환 또는 상태, 예컨대, 암의 진단적 및/또는 예후적 평가를 위한 방법의 기반을 제공할 수 있다. 이러한 방법은 환자 샘플 상에서, 또는 환자 샘플의 프로세싱 후 시험관 내에서 수행할 수 있다. 샘플이 수집되면, 환자는 수행될 시험관 내 방법을 위해 존재할 필요가 없으므로, 이러한 방법은 사람 또는 동물 체상에서 실시되지 않는 것일 수 있다. 일부 구현예에서, 방법은 생체 내에서 수행된다.

[1341] 샘플 속에서 검출은 질환/상태(예컨대, 암)의 진단 목적, 질환/상태의 소인의 진단 목적, 또는 질환/상태, 예컨대, 본원에 기술된 질환/상태에 대한 예후를 제공하기 위해(예측하기 위해)을 위해 사용될 수 있다. 진단 또는 예후는 존재하는(이미 진단된) 질환/상태에 관한 것일 수 있다.

[1342] 본 발명은 또한 VISTA-표적화된 제제를 사용한 치료를 위해 대상체를 선택/계층화하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 대상체는 예컨대, 개체로부터 수득된 샘플에서 VISTA, 또는 VISTA를 발현하는 세포의 검출/정량화를 기반으로, 본 발명에 따른 치료/예방을 위해 선택되거나, 이러한 치료/예방으로부터 유리할 수 있는 대상체로서 확인된다.

[1343] 이러한 방법은 예컨대, 환자 샘플 속에서 VISTA 또는 VISTA를 발현하는 세포(예컨대, MDSC)를 검출 또는 정량화하는 단계를 포함할 수 있다. 이러한 방법이 관련된 인자를 정량화하는 단계를 포함하는 경우, 이러한 방법은 진단 또는 예후 평가의 부분으로서 표준 또는 참고 값에 대해 측정된 양을 비교하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 다른 진단/예후 시험은 진단 또는 예후의 정밀성을 향상시키거나 본원에 기술된 시험을 사용함으로서 수득된 결과를 확인하기 위해 본원에 기술된 것과 함께 사용될 수 있다.

[1344] VISTA의 증가된 수준이 검출된 경우, 또는 -VISTA를 발현하는 세포(예컨대, MDSC)의 증가된 수/비율이 대상체로부터 수득된 샘플 속에서 검출된 경우, 대상체는 질환/상태를 가진 것으로 진단될 수 있고 여기서 MDSC는 병리학적으로 연관되거나, 이러한 질환/상태로 발달할 위험에 있다. 이러한 방법에서, 세포의 발현 또는 수/비율의 "증가된" 수준은 적절한 대조군 조건에 대해 측정된 수준/수/비율, 예를 들면, 예컨대, 건강한 대상체로부터 수득된, 비교가능한 샘플(예컨대, 동일한 유체, 조직, 기관 등으로부터 수득된, 예컨대, 동일한 종류의 샘플)에서 검출된 수준/수/비율보다 더 큰 수준/수/비율을 지칭한다.

[1345] VISTA의 증가된 수준이 검출된 경우, 또는 -VISTA를 발현하는 세포(예컨대, MDSC)의 증가된 수/비율의 존재가 대상체로부터 수득된 샘플 속에서 검출된 경우, 대상체는 비교가능한 샘플(예컨대, 동일한 유체, 조직, 기관 등으로부터 수득된, 예컨대, 동일한 종류의 샘플)에서 VISTA의 보다 낮은 수준, 또는 VISTA를 발현하는 세포(예컨대, MDSC)의 감소된 수/비율을 가진 것으로 측정된 대상체와 비교하여 보다 불량한 예후를 가진 것으로 측정될 수 있다.

[1346] 본 발명의 항원-결합 분자는 면역치료요법에 대한 반응을 예측하기 위한 방법에서 유용하다. "면역치료요법"은 일반적으로 질환/상태를 치료하기 위해 면역계를 강화시키는 목적의 치료학적 개입을 지칭한다. 면역치료요법은 대상체에서 효과기 면역 세포(예컨대, 효과기 T 세포(예컨대, 항원-특이적인 T 세포, CAR-T 세포), NK 세포) 효과기의 수/비율/활성을 증가시키기 위한 치료학적 개입을 포함한다. 효과기 면역 세포의 수/비율/활성을 증가시키기 위한 면역치료요법은 효과기 면역 세포의 증식 및/또는 생존을 촉진시키고, 면역 체크포인트 분자에 의해 매개된 신호전달을 억제하고, 공자극성 수용체에 의해 매개된 신호전달을 촉진하고, 항원-제시 세포에 의한 항원 제시를 향상시키기 위한 개입 등을 포함한다. 효과기 면역 세포의 수/비율/활성을 증가시키기 위한 면역치료요법은 또한 예컨대, 입양 세포 전달(adoptive cell transfer; ACT)을 통해 대상체에서 목적한 특이성 또는 활성을 갖는 효과기 면역 세포의 빈도를 증가시키기 위한 개입을 포함한다. ACT는 전형적으로 면역 세포가 이로부터 단리된 혈액 샘플을 채취함으로써, 대상체로부터 면역 세포를 수득하는 단계를 포함한다. 세포는 이후에 전형적으로 일부 방식으로 치료하거나 변경시킨 다음 동일한 대상체 또는 상이한 대상체에게 투여된다. ACT는 전형적으로 특정의 목적한 특성을 지닌 면역 세포 집단을 대상체에게 제공하거나, 또는 대상체 내에서 이러한 특성을 지닌 면역 세포의 빈도를 증가시키는 것을 목표로 한다. 일부 구현예에서 ACT는 예컨대, 표적 항원 또는 목적한 세포 유형에 대해 특이적인 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 세포일 수 있다. 면역치료요법은 또한 대상체에서 억제인자 면역 세포(예컨대, 조절성 T 세포, MDSC)의 수/비율/활성을 저하시키는 치료학적 개입을 포함한다. 억제인자 면역 세포의 수/비율/활성을 저하시키는 면역치료요법은 억제인자 면역 세포의 세포 사멸을 유발하거나 강화시키기 위한, 및 면역 체크포인트 분자에 의해 매개된 신호전달을 억제하기 위한 개입을 포함한다.

[1347] VISTA의 증가된 수준이 검출된 경우, 또는 -VISTA를 발현하는 세포(예컨대, MDSC)의 존재 또는 이의 증가된 수/비율이 대상체로부터 수득된 샘플에서 검출되는 경우, 대상체는 비교가능한 샘플(예컨대, 동일한 유체, 조직, 기관 등으로부터 수득된, 예컨대, 동일한 종류의 샘플) 속에서 VISTA의 보다 낮은 수준, 또는 VISTA를 발현하는 세포(예컨대, MDSC)의 감소된 수/비율을 가진 것으로 측정된 대상체와 비교한 것으로서 대상체에서 효과기 면역 세포의 수/비율/활성을 증가시키기 위해 면역 치료요법에 대해 보다 불량한 반응을 갖는 것으로 예측될 수 있다. VISTA의 증가된 수준이 검출된 경우, 또는 -VISTA를 발현하는 세포(예컨대, MDSC)의 존재 또는 이의 증가된 수/비율이 대상체로부터 수득된 샘플에서 검출되는 경우, 대상체는 비교가능한 샘플(예컨대, 동일한 유체, 조직, 기관 등으로부터 수득된, 예컨대, 동일한 종류의 샘플) 속에서 VISTA의 보다 낮은 수준, 또는 VISTA를 발현하는 세포(예컨대, MDSC)의 감소된 수/비율을 가진 것으로 측정된 대상체와 비교한 것으로서 대상체에서 효과기 면역 세포의 수/비율/활성을 감소시키는 것을 목표로 하는 면역치료요법에 대해 개선된 반응을 갖는 것으로 예측될 수 있다.

[1348] 일부 구현예에서 방법은 억제인자 면역 세포 구획 및 효과기 면역 세포 구획의 상대적인 크기/활성을 측정하는 단계를 포함한다. 예를 들면, 일부 구현예에서 방법은 VISTA-발현 세포(예컨대, MDSC, TAMs, 호중구) 대 효과기 면역 세포의 비를 측정하기 위한 방법에서 본원에 기술된 항원-결합 분자를 사용한다. 증가된 비를 갖는 대상체는 억제인자 면역 세포의 수/비율/활성을 목표로 하는 면역치료요법에 대해 개선된 반응을 갖는 것으로 예측되고/되거나, 보다 낮은 비를 갖는 것으로 예측된 대상체와 비교하여 효과기 면역 세포의 수/비율/활성을 증가시키기 위한 면역치료요법에 대해 보다 불량한 반응을 갖는 것으로 예측될 수 있다.

[1349] 본 발명의 진단 및 예후 방법은 질환 및/또는 치료의 과정을 통해 다수의 시점에서 대상체로부터 수득된 샘플에서 수행될 수 있고, 예컨대, 대상체에게 투여된 치료에 대한 반응시 시간에 걸쳐 질환/상태의 발달을 모니터링하는데 사용될 수 있다. 방법에 따른 특성화의 결과는 대상체에게 투여하는 치료요법의 시기 및 종류로서 임상 결정을 통지하는데 사용될 수 있다.

[1350] 진단 또는 예후 방법은 시험관 내에서 대상체로부터 수득된 샘플에서, 또는 대상체로부터 수득된 샘플의 진행 후 수행될 수 있다. 샘플이 수집되면, 환자는 수행될 진단 또는 예후의 시험관 내 방법을 위해 존재할 필요가 없으므로 방법은 사람 또는 동물 체에서 실시되지 않는 것일 수 있다.

[1351] 대상체

[1352] 본원에 기술된 본 발명의 양태에 따른 대상체는 임의의 동물 또는 사람일 수 있다. 대상체는 바람직하게는 포유동물, 보다 바람직하게는 사람이다. 대상체는 비-사람 포유동물일 수 있지만, 보다 바람직하게는 사람이다. 대상체는 남성 또는 여성일 수 있다. 대상체는 환자일 수 있다. 대상체는 치료를 필요로 하는 질환 또는 상태(예컨대, 암)으로 진단되었을 수 있거나, 이러한 질환/상태를 가진 것으로 추측될 수 있거나, 이러한 질환/상태로 발달할/걸릴 위험이 있을 수 있다.

[1353] 본 발명에 따른 구현예에서, 대상체는 바람직하게는 사람 대상체이다. 일부 구현예에서, 본원의 발명의 치료학적 또는 예방학적 방법에 따라 치료될 대상체는 암을 가지거나, 이로 발달할 위험을 갖는 대상체이다. 본 발명에 따른 구현예에서, 대상체는 이러한 질환/상태의 특정 마커에 대한 특성을 기반으로 하는 방법에 따른 치료를 위해 선택될 수 있다.

[1354] 본 개시내용에 따른 대상체는 예컨대, 본원에 기술된 바와 같은 VISTA/VISTA에 대한 상호작용 파트너를 발현하거나 또는 과-발현하는 세포, 예컨대, 면역 세포 및/또는 종양 세포를 포함할 수 있다.

[1355] 대상체는 예컨대, 조직학적으로(예컨대, 종양 생검에서 면역조직화학을 통해) 확인된, 진전된 또는 전이성 암, 예를 들면, 고형 암을 포함할 수 있다. 암은 통상의 치료에 대해 내성이거나 또는 난치성일 수 있거나, 또는 통상의 치료요법이 존재하지 않을 수 있다. 대상체는 면역 체크포인트 표적화된 치료요법, 예컨대, 항-CTLA4 및/또는 항-PD-1/PD-L1 치료요법에 대해 내성인 암을 가질 수 있다.

[1356] 대상체는 예컨대, 진전된, 전이성, 내성 또는 난치성인, 삼중 음성 유방 암(TBNC)을 가질 수 있고 예컨대, 치료학적 이점이 거의 없거나 없는 또는 치료 동안/후에 질환 진행을 입증하는, TNBC에 대한 사전 치료를 가질 수 있다.

[1357] 대상체는 비-소 세포 폐 암(NSCLC), 예컨대, 진전된, 전이성, 내성 또는 난치성 TBNC를 가질 수 있고, 예컨대, 치료학적 이점이 거의 없거나 없는 또는 치료 동안/후에 질환 진행을 입증하는, NSCLC에 대한 사전 치료를 이미 가질 수 있다. 대상체는 ROS 재배열, BRAF V600E 돌연변이를 포함할 수 있고/있거나, 엔손 14 시키핑 돌연변이

(exon 14 skipping mutation)를 충족할 수 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 상피 성장 인자 수용체(EGFR) 또는 역형성 림프종 키나제(anaplastic lymphoma kinase; ALK)의 활성화 돌연변이를 지니지 않은 세포를 포함한다.

[1358] 대상체는 항-PD-1 또는 항-PD-L1 치료요법, 예컨대, 항-PD-1 또는 항-PD-L1 항체를 사용한 사전 치료를 제공받았었을 수 있다. 대상체는 예컨대, 치료학적 이점이 거의 없거나 없는 또는 치료 동안/치료후 질환 진행을 입증하는, 예컨대, 화학치료요법과 함께, 아테졸리주맙을 사용한 사전 치료를 가질 수 있다.

[1359] 일부 구현예에서, 대상체는 예컨대, 대상체로부터 수득된 샘플 속에서 VISTA 및/또는 VISTA에 대한 상호작용 파트너를 발현/과발현하는 세포의 검출, 또는 VISTA 및/또는 VISTA에 대한 상호작용 파트너를 발현/과발현하는 세포를 포함하는 암/종양의 검출을 기반으로 본원에 기술된 치료를 위해 선택될 수 있다. 암 또는 세포는 VISTA IHC+로서 기술될 수 있다. 본 개시내용에 따른 방법은 예컨대, 대상체로부터 수득된 샘플 속에서, 예컨대, 본원에 기술된 바와 같이, 대상체에서 VISTA 및/또는 VISTA에 대한 상호작용 파트너를 발현/과발현하는 세포를 포함하는 암 또는 종양을 검출하는 단계를 포함할 수 있다.

[1360] 일부 구현예에서, 대상체는 예컨대, 대상체로부터 수득된 샘플 속에서 PD-1 및/또는 PD-L1을 발현/과발현하는 세포의 검출을 기준으로 본원에 기술된 치료를 위해 선택될 수 있다. 암 또는 세포는 PD-1 및/또는 PD-L1 IHC+로서 기술될 수 있다.

[1361] 본 개시내용에 따른 방법은 생물마커, 예컨대, 세포 유리된 DNA; cfDNA) 변경 대립형질 분획/종양 분획(예컨대, 종양-유래된 cfDNA, 예를 들면, ctDNA)을 포함하는 순환하는 종양 마커를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 방법은 사이토킨, 예컨대, IL-2, IL-6, IL-8 및/또는 TNFα를 검출하는 단계를 포함한다. 본 발명에 따른 방법은 예컨대, VISTA 및/또는 PD-1/PD-L1 발현을 위해 면역 및 암 세포에서 프로테오믹 분석(proteomic analysis)을 포함할 수 있다. 방법은 종양-침윤 백혈구, 면역-관련된 mRNA 발현 특징, 및 VISTA 및 PD-1/PD-L1 발현의 존재 및/또는 변화를 검출하는 단계를 포함할 수 있다.

[1362] 하나 이상의 대상체의 암/종양 유형에 대해 적절한 것으로서, 종양 혈청 마커(또는 마커의 패널), 예컨대, 그러나 이에 한정되지 않는 난소 암에서 CA-125, HE4 및 OVA1; 결장직장 암에서 CEA; 췌장 및 위 암에서 CA19-9; 전립선 암에서 PSA, PAP, PCA3, 종양형 DX GPS 특징 및 프롤라리스 특징(Prolaris signature); BTA, 방광 암에서 FGFR2 및/또는 FGFR3 유전자 돌연변이, NMP22, 및 염색체 3, 7, 17, 및 9p21; NSCLC에서 ALK 유전자 재배열 및 과발현, EGFR 유전자 돌연변이, NSE, PD-L1 및 ROS1 유전자 재배열; 난소 및 유방 암에서 BRCA1 및/또는 BRCA2; 예컨대, 결장직장 암 및 NSCLC에서 BRAF V600(예컨대, BRAF V600E/) 및 KRAS 돌연변이; 유방 암에서 CA15-3/CA27.29, ER/PR , uPA, PAI-1 및 맘마프린트 특징(Mammaprint signature); 폐 암에서 사이토케라틴(cytokeratin) 단편 21-1; 유방, 결장직장, 위 및 췌장 암에서 HCC내 DCP, DPD 돌연변이; 갑상선 암에서 티로글로불린; 및 임의의 고형 종양에서 NTRK 유전자 융합을 대상체가 치료를 제공받기 전, 동안 및 후에 평가할 수 있다.

[1363] 본원에 기술된 어떠한 생물마커도 본원에 개시된 방법을 사용한 치료 전, 동안 및/또는 후에 검출함으로써 예컨대, 치료를 위한 적합한 대상체를 선택하고/하거나 치료의 과정 또는 성공을 모니터링할 수 있다. 치료 후 생물마커의 검출은 치료 전 생물마커의 검출과 비교할 수 있다.

[1364] 키트

[1365] 본원에 기술된 본 발명의 일부 양태에서, 부분의 키트(kit of parts)가 제공된다. 일부 구현예에서, 키트는 예정된 양의 본원에 기술된 항원-결합 분자, 폴리펩타이드, CAR, 핵산(또는 이의 다수), 발현 벡터(또는 이의 다수), 세포 또는 조성물을 갖는 적어도 하나의 용기(container)를 가질 수 있다.

[1366] 일부 구현예에서 키트는 예컨대, 본 개시내용에 따른 조성물 속에 50 mg/mL의 항원-결합 분자의 용액을 포함한다. 일부 구현예에서 키트는 pH 5.5에서 20 mM의 히스티딘, 8%(w/v)의 슈크로스, 0.02%(w/v)의 폴리소르베이트 80을 포함하는 조성물 속에 50 mg/mL의 항원 결합 분자를 포함한다.

[1367] 50 mg/mL의 항원-결합 분자를 포함하는 조성물은 사용 전에 희석시킬 수 있다. 키트는 희석을 위한 설명서를 포함할 수 있다. 키트는 예컨대, 본원에 기술된 바와 같이, 예컨대, 정맥내 투여에 적합한 조성물에 도달하기 위해, 조성물을 희석하는데 사용하기 위한 5%의 덱스트로스를 포함할 수 있다. 키트는 항원-결합 분자를 적어도 0.07 mg/mL의 농도, 또는 예컨대, 자체로, 또는 덱스트로스를 사용한 희석 후 본 개시내용에 따른 다른 농도에서 포함하는 조성물을 포함할 수 있다.

[1368] 본 개시내용의 항원-결합 분자 또는 다른 물품은 동결건조될 수 있다(즉, 용기는 동결건조된 항원-결합 분자 또는 다른 물품을 포함할 수 있다). 동결건조된 제제는 예컨대, 본 개시내용에 따라서 조성물 완충제 속에 재구성될 수 있다. 키트는 항원-결합 분자/다른 물품을 재구성하기 위한 설명서를 포함할 수 있다.

[1369] 용기는 임의의 적합한 용기, 예컨대, 유리 바이알(glass vial)일 수 있다.

[1370] 일부 구현예에서, 키트는 본원에 기술된 항원-결합 분자, 폴리펩타이드, CAR, 핵산)또는 이의 다수), 발현 벡터(또는 이의 다수), 세포 또는 조성물을 생산하기 위한 물질을 포함할 수 있다.

[1371] 키트는 예컨대, 본원에 기술된 바와 같은 용량/투여량 요법을 사용하여 명시된 질환/상태를 치료하고/하거나 본원에 기술된 바와 같은 질환/상태를 치료하기 위해, 환자에게 투여하기 위한 설명서와 함께 항원-결합 분자, 폴리펩타이드, CAR, 핵산(또는 이의 다수), 발현 벡터(또는 이의 다수), 세포 또는 조성물을 제공할 수 있다.

[1372] 일부 구현예에서 키트는 예정된 양의 다른 치료제(예컨대, 항-감염제 또는 화학치료제)를 갖는 적어도 하나의 용기를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 구현예에서, 키트는 또한 제2의 의약 또는 약제학적 조성물을 포함함으로써 2개의 의약 또는 약제학적 조성물이 동시에 또는 별도로 투여됨으로써 이들이 구체적인 질환 또는 상태에 대해 조합된 치료를 제공하도록 할 수 있다. 치료제는 또한 종양에 또는 혈액에 주사 또는 주입하기에 적합하도록 제형화될 수 있다. 치료제는 본원에 기술된 바와 같은 이러한 제제일 수 있다. 치료제는 항-PD-1/항-PD-L1 제제, 예컨대, 항체일 수 있다. 치료제는 길항제 항-PD-1 항체 또는 길항제 항-PD-L1 항체일 수 있다.

[1373] 서열 동일성

[1374] 본원에 사용된 바와 같은, "서열 동일성"은 서열들을 정렬하고, 필요한 경우, 갭을 도입하여, 서열들 사이에 최대의 서열 동일성 퍼센트를 달성한 후, 참고 서열 내 뉴클레오타이드/아미노산 잔기에 대해 동일한 대상체 서열 내 뉴클레오타이드/아미노산 잔기의 퍼센트를 지칭한다. 2개 이상의 아미노산 또는 핵산 서열 사이에 서열 동일성 퍼센트를 측정할 목적을 위한 쌍식(pairwise) 및 다중 서열 정렬은 당해 분야의 숙련가에게 공지된 다양한 방식, 예를 들면, 공공 이용가능한 소프트웨어, 예를 들면, ClustalOmega(Söding, J. 2005, Bioinformatics 21, 951-960), T-coffee(Notredame et al. 2000, J. Mol. Biol. (2000) 302, 205-217), Kalign(Lassmann and Sonnhammer 2005, BMC Bioinformatics, 6(298)) 및 MAFFT(Katoh and Standley 2013, Molecular Biology and Evolution, 30(4) 772-780) 소프트웨어를 사용하여 달성할 수 있다. 이러한 소프트웨어를 사용하는 경우, 디폴트 매개변수(default parameter), 예컨대, 갭 페널티(gap penalty) 및 연장 페널티(extension penalty)가 바람직하게 사용된다.

[1375] 서열

| 서열 번호: | 설명 | 서열 |
|---|---|---|
| 1 | 사람 VISTA (Q9H7M9-1, v3) | MGVPTALEAGSWRWGSLLFALFLAASLGPVAAFKVATPYSLYVCPEGQNVTLTCRLLGPVDKGH DVTFYKTWYRSSRGEVQTCSERRPIRNLTFQDLHLHHGGHQAANTSHDLAQRHGLESASDHHG NFSITMRNLTLLDSGLYCCLVVEIRHHHSEHRVHGAMELQVQTGKDAPSNCVVYPSSSQDSENIT AAALATGACIVGILCLPLILLLVYKQRQAASNRRAQELVRMDSNIQGIENPGFEASPPAQGIPEAKV RHPLSYVAQRQPSESGRHLLSEPSTPLSPPGPGDVFFPSLDPVPDSPNFEVI |
| 2 | 성숙한 사람 VISTA (Q9H7M9-1, v3 33 내지 311 번 위치) | FKVATPYSLYVCPEGQNVTLTCRLLGPVDKGHDVTFYKTWYRSSRGEVQTCSERRPIRNLTFQDL HLHHGGHQAANTSHDLAQRHGLESASDHHGNFSITMRNLTLLDSGLYCCLVVEIRHHHSEHRVH GAMELQVQTGKDAPSNCVVYPSSSQDSENITAAALATGACIVGILCLPLILLLVYKQRQAASNRRA QELVRMDSNIQGIENPGFEASPPAQGIPEAKVRHPLSYVAQRQPSESGRHLLSEPSTPLSPPGPG DVFFPSLDPVPDSPNFEVI |
| 3 | 세포외 도메인 사람 VISTA (Q9H7M9-1, v3 33 내지 194 번 위치) | FKVATPYSLYVCPEGQNVTLTCRLLGPVDKGHDVTFYKTWYRSSRGEVQTCSERRPIRNLTFQDL HLHHGGHQAANTSHDLAQRHGLESASDHHGNFSITMRNLTLLDSGLYCCLVVEIRHHHSEHRVH GAMELQVQTGKDAPSNCVVYPSSSQDSENITAA |
| 4 | 막전이 도메인 사람 VISTA (Q9H7M9-1, v3 195 내지 215 번 위치) | ALATGACIVGILCLPLILLLV |
| 5 | 세포질 도메인 사람 VISTA (Q9H7M9-1, v3 216 내지 311 번 위치) | YKQRQAASNRRAQELVRMDSNIQGIENPGFEASPPAQGIPEAKVRHPLSYVAQRQPSESGRHLL SEPSTPLSPPGPGDVFFPSLDPVPDSPNFEVI |
| 6 | Ig-유사 V-형 도메인 사람 VISTA (Q9H7M9-1, v3 33 내지 168 번 위치) | FKVATPYSLYVCPEGQNVTLTCRLLGPVDKGHDVTFYKTWYRSSRGEVQTCSERRPIRNLTFQDL HLHHGGHQAANTSHDLAQRHGLESASDHHGNFSITMRNLTLLDSGLYCCLVVEIRHHHSEHRVH GAMELQV |
| 7 | 사람 VSIG-3 동형 1 (Q5DX21-1, v3) | MTSQRSPLAPLLLLSLHGVAASLEVSESPGSIQVARGQPAVLPCTFTTSAALINLNVIWMVTPLSNA NQPEQVILYQGGQMFDGAPRFHGRVGFTGTMPATNVSIFINNTQLSDTGTYQCLVNNLPDIGGRN IGVTGLTVLVPPSAPHCQIQGSQDIGSDVILLCSSEEGIPRPTYLWEKLDNTLKLPPTATQDQVQGT VTIRNISALSSGLYQCVASNAIGTSTCLLDLQVISPQPRNIGLIAGAIGTGAVIIIFCIALILGAFFYWRS KNKEEEEEEIPNEIREDDLPPKCSSAKAFHTEISSSDNNTLTSSNAYNSRYWSNNPKVHRNTESVS HFSDLGQSFSFHSGNANIPSIYANGTHLVPGQHKTLVVTANRGSSPQVMSRSNGSVSRKPRPPH THSYTISHATLERIGAVPVMVPAQSRAGSLV |
| 8 | 사람 VSIG-3 동형 2 (Q5DX21-2) | MSLVELLLWWNCFSRTGVAASLEVSESPGSIQVARGQPAVLPCTFTTSAALINLNVIWMVTPLSNA NQPEQVILYQGGQMFDGAPRFHGRVGFTGTMPATNVSIFINNTQLSDTGTYQCLVNNLPDIGGRN IGVTGLTVLVPPSAPHCQIQGSQDIGSDVILLCSSEEGIPRPTYLWEKLDNTLKLPPTATQDQVQGT VTIRNISALSSGLYQCVASNAIGTSTCLLDLQVISPQPRNIGLIAGAIGTGAVIIIFCIALILGAFFYWRS KNKEEEEEEIPNEIREDDLPPKCSSAKAFHTEISSSDNNTLTSSNAYNSRYWSNNPKVHRNTESVS HFSDLGQSFSFHSGNANIPSIYANGTHLVPGQHKTLVVTANRGSSPQVMSRSNGSVSRKPRPPH THSYTISHATLERIGAVPVMVPAQSRAGSLV |
| 9 | 사람 VSIG-3 동형 3 (Q5DX21-3) | MSLVELLLWWNCFSRTGVAASLEVSESPGSIQVARGQPAVLPCTFTTSAALINLNVIWMVTPLSNA NQPEQVILYQGGQMFDGAPRFHGRVGFTGTMPATNVSIFINNTQLSDTGTYQCLVNNLPDIGGRN IGVTGLTVLVPPSAPHCQIQGSQDIGSDVILLCSSEEGIPRPTYLWEKLDNTLKLPPTATQDQVQGT VTIRNISALSSAQPRNIGLIAGAIGTGAVIIIFCIALILGAFFYWRSKNKEEEEEEIPNEIREDDLPPKCS SAKAFHTEISSSDNNTLTSSNAYNSRYWSNNPKVHRNTESVSHFSDLGQSFSFHSGNANIPSIYA NGTHLVPGQHKTLVVTANRGSSPQVMSRSNGSVSRKPRPPHTHSYTISHATLERIGAVPVMVPA QSRAGSLV |
| 10 | 성숙한 사람 VSIG-3 동형 1 (Q5DX21-1, v3 23 내지 431 번 위치) | LEVSESPGSIQVARGQPAVLPCTFTTSAALINLNVIWMVTPLSNANQPEQVILYQGGQMFDGAPRF HGRVGFTGTMPATNVSIFINNTQLSDTGTYQCLVNNLPDIGGRNIGVTGLTVLVPPSAPHCQIQGS QDIGSDVILLCSSEEGIPRPTYLWEKLDNTLKLPPTATQDQVQGTVTIRNISALSSGLYQCVASNAI GTSTCLLDLQVISPQPRNIGLIAGAIGTGAVIIIFCIALILGAFFYWRSKNKEEEEEEIPNEIREDDLPP KCSSAKAFHTEISSSDNNTLTSSNAYNSRYWSNNPKVHRNTESVSHFSDLGQSFSFHSGNANIPS IYANGTHLVPGQHKTLVVTANRGSSPQVMSRSNGSVSRKPRPPHTHSYTISHATLERIGAVPVMV PAQSRAGSLV |
| 11 | 성숙한 사람 VSIG-3 동형 2 (Q5DX21-2 23 내지 431 번 | LEVSESPGSIQVARGQPAVLPCTFTTSAALINLNVIWMVTPLSNANQPEQVILYQGGQMFDGAPRF HGRVGFTGTMPATNVSIFINNTQLSDTGTYQCLVNNLPDIGGRNIGVTGLTVLVPPSAPHCQIQGS QDIGSDVILLCSSEEGIPRPTYLWEKLDNTLKLPPTATQDQVQGTVTIRNISALSSGLYQCVASNAI GTSTCLLDLQVISPQPRNIGLIAGAIGTGAVIIIFCIALILGAFFYWRSKNKEEEEEEIPNEIREDDLPP KCSSAKAFHTEISSSDNNTLTSSNAYNSRYWSNNPKVHRNTESVSHFSDLGQSFSFHSGNANIPS |

[1376]

[1377]

| | | |
|---|---|---|
| | 위치) | IYANGTHLVPGQHKTLVVTANRGSSPQVMSRSNGSVSRKPRPPHTHSYTISHATLERIGAVPVMV PAQSRAGSLV |
| 12 | 성숙한 사람 VSIG-3 동형 3 (Q5DX21-3 23 내지 407 번 위치) | LEVSESPGSIQVARGQPAVLPCTFTTSAALINLNVIWMVTPLSNANQPEQVILYQGGQMFDGAPRF HGRVGFTGTMPATNVSIFINNTQLSDTGTYQCLVNNLPDIGGRNIGVTGLTVLVPPSAPHCQIQGS QDIGSDVILLCSSEEGIPRPTYLWEKLDNTLKLPPTATQDQVQGTVTIRNISALSSAQPRNIGLIAGAI GTGAVIIIFCIALILGAFFYWRSKNKEEEEEEIPNEIREDDLPPKCSSAKAFHTEISSSDNNTLTSSNA YNSRYWSNNPKVHRNTESVSHFSDLGQSFSFHSGNANIPSIYANGTHLVPGQHKTLVVTANRGS SPQVMSRSNGSVSRKPRPPHTHSYTISHATLERIGAVPVMVPAQSRAGSLV |
| 13 | 세포외 도메인 사람 VSIG-3 동형 1 및 2 | LEVSESPGSIQVARGQPAVLPCTFTTSAALINLNVIWMVTPLSNANQPEQVILYQGGQMFDGAPRF HGRVGFTGTMPATNVSIFINNTQLSDTGTYQCLVNNLPDIGGRNIGVTGLTVLVPPSAPHCQIQGS QDIGSDVILLCSSEEGIPRPTYLWEKLDNTLKLPPTATQDQVQGTVTIRNISALSSGLYQCVASNAI GTSTCLLDLQVISPQPRNIG |
| 14 | 세포외 도메인 사람 VSIG-3 동형 3 | LEVSESPGSIQVARGQPAVLPCTFTTSAALINLNVIWMVTPLSNANQPEQVILYQGGQMFDGAPRF HGRVGFTGTMPATNVSIFINNTQLSDTGTYQCLVNNLPDIGGRNIGVTGLTVLVPPSAPHCQIQGS QDIGSDVILLCSSEEGIPRPTYLWEKLDNTLKLPPTATQDQVQGTVTIRNISALSSAQPRNIG |
| 15 | 막전이 도메인 사람 VSIG-3 | LIAGAIGTGAVIIIFCIALIL |
| 16 | 세포질 도메인 사람 VSIG-3 | GAFFYWRSKNKEEEEEEIPNEIREDDLPPKCSSAKAFHTEISSSDNNTLTSSNAYNSRYWSNNPK VHRNTESVSHFSDLGQSFSFHSGNANIPSIYANGTHLVPGQHKTLVVTANRGSSPQVMSRSNGS VSRKPRPPHTHSYTISHATLERIGAVPVMVPAQSRAGSLV |
| 17 | Ig-유사 V-형 도메인 사람 VSIG-3 | LEVSESPGSIQVARGQPAVLPCTFTTSAALINLNVIWMVTPLSNANQPEQVILYQGGQMFDGAPRF HGRVGFTGTMPATNVSIFINNTQLSDTGTYQCLVNNLPDIGGRNIGVT |
| 18 | Ig-I 유사 C2-형 도메인 사람 VSIG-3 | PSAPHCQIQGSQDIGSDVILLCSSEEGIPRPTYLWEKLDNTLKLPPTATQDQVQGTVTIRNISALSS GLYQCVASNAIGTSTCLLDLQVIS |
| 19 | 사람 VSIG-8 (P0DPA2-1, v1) | MRVGGAFHLLLVCLSPALLSAVRINGDGQEVLYLAEGDNVRLGCPYVLDPEDYGPNGLDIEWMQ VNSDPAHHRENVFLSYQDKRINHGSLPHLQQRVRFAASDPSQYDASINLMNLQVSDTATYECRV KKTTMATRKVIVTVQARPAVPMCWTEGHMTYGNDVVLKCYASGGSQPLSYKWAKISGHHYPYR AGSYTSQHSYHSELSYQESFHSSINQGLNNGDLVLKDISRADDGLYQCTVANNVGYSVCVVEVKV SDSRRIGVIIGIVLGSLLALGCLAVGIWGLVCCCCGGSGAGGARGAFGYGNGGGVGGGACGDLA SEIREDAVAPGCKASGRGSRVTHLLGYPTQNVSRSLRRKYAPPPCGGPEDVALAPCTAAAACEA GPSPVYVKVKSAEPADCAEGPVQCKNGLLV |
| 20 | 성숙한 사람 VSIG-8 (P0DPA2-1, v1 22 내지 414 번 위치) | VRINGDGQEVLYLAEGDNVRLGCPYVLDPEDYGPNGLDIEWMQVNSDPAHHRENVFLSYQDKRI NHGSLPHLQQRVRFAASDPSQYDASINLMNLQVSDTATYECRVKKTTMATRKVIVTVQARPAVPM CWTEGHMTYGNDVVLKCYASGGSQPLSYKWAKISGHHYPYRAGSYTSQHSYHSELSYQESFHS SINQGLNNGDLVLKDISRADDGLYQCTVANNVGYSVCVVEVKVSDSRRIGVIIGIVLGSLLALGCLA VGIWGLVCCCCGGSGAGGARGAFGYGNGGGVGGGACGDLASEIREDAVAPGCKASGRGSRVT HLLGYPTQNVSRSLRRKYAPPPCGGPEDVALAPCTAAAACEAGPSPVYVKVKSAEPADCAEGPV QCKNGLLV |
| 21 | 세포외 도메인 사람 VSIG-8 (P0DPA2-1, v1 22 내지 263 번 위치) | VRINGDGQEVLYLAEGDNVRLGCPYVLDPEDYGPNGLDIEWMQVNSDPAHHRENVFLSYQDKRI NHGSLPHLQQRVRFAASDPSQYDASINLMNLQVSDTATYECRVKKTTMATRKVIVTVQARPAVPM CWTEGHMTYGNDVVLKCYASGGSQPLSYKWAKISGHHYPYRAGSYTSQHSYHSELSYQESFHS SINQGLNNGDLVLKDISRADDGLYQCTVANNVGYSVCVVEVKVSDSRRIG |
| 22 | 막전이 도메인 사람 VSIG-8 (P0DPA2-1, v1 264 내지 284 번 위치) | VIIGIVLGSLLALGCLAVGIW |
| 23 | 세포질 도메인 사람 VSIG-8 (P0DPA2-1, v1 285 내지 414 번 위치) | GLVCCCCGGSGAGGARGAFGYGNGGGVGGGACGDLASEIREDAVAPGCKASGRGSRVTHLLG YPTQNVSRSLRRKYAPPPCGGPEDVALAPCTAAAACEAGPSPVYVKVKSAEPADCAEGPVQCKN GLLV |
| 24 | Ig-유사 V-형 도메인 1 사람 VSIG-8 (P0DPA2-1, v1 22 내지 141 번 위치) | VRINGDGQEVLYLAEGDNVRLGCPYVLDPEDYGPNGLDIEWMQVNSDPAHHRENVFLSYQDKRI NHGSLPHLQQRVRFAASDPSQYDASINLMNLQVSDTATYECRVKKTTMATRKVIVT |
| 25 | Ig-유사 V-형 도메인 2 사람 VSIG-8 (P0DPA2-1, v1 146 내지 257 번 위치) | PAVPMCWTEGHMTYGNDVVLKCYASGGSQPLSYKWAKISGHHYPYRAGSYTSQHSYHSELSYQ ESFHSSINQGLNNGDLVLKDISRADDGLYQCTVANNVGYSVCVVEVKVS |

| | | |
|---|---|---|
| 26 | 항-VISTA 항체 클론 4M2-C12, 4M2-B4, 4M2-C9, 4M2-D9, 4M2-D5, 4M2-A8, V4H1, V4H2, V4-C1, V4-C9, V4-C24, V4-C26, V4-C27, V4-C28, V4-C30 및 V4-C31 에 의해 이식된 에피토프 | SRGEVQTCSERRPI |
| 27 | 항 -VISTA 항체 클론 2M1-B12 및 2M1-D2 에 의해 이식된 에피토프 | FQDLHLHHGGHQAA |
| 28 | 항-VISTA 항체 클론 1M2-D2, 13D5p, 13D5-1 및 13D5-13 에 의해 이식된 에피토프 | CLVVEIRHHHSEHR |
| 29 | 항-VISTA 항체 클론 5M1-A11 에 의해 인식된 에피토프 | DKGHDVTFYKT |
| 30 | 항-VISTA 항체 클론 9M2-C12 에 의해 인식된 에피토프 | RHHHSEHRVHG |
| 31 | 사람 VISTA 의 61 내지 162 번 위치 (Q9H7M9-1, v3) | DKGHDVTFYKTWYRSSRGEVQTCSERRPIRNLTFQDLHLHHGGHQAANTSHDLAQRHGLESAS DHHGNFSITMRNLTLLDSGLYCCLVVEIRHHHSEHRVHG |
| 32 | 4M2-C12 중쇄 가변 영역 | EVKLVESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYITYSGNISYNPSLR SRISITRDTSKNQFFLQLNSVTPEDTATYSCARSLYYPWYFDVWGAGTTVTVSS |
| 33 | 4M2-C12, 4M2-B4, V4H2, 4M2-D9, V4-C1, V4-C9 중쇄 CDR1 | GYSITSDYA |
| 34 | 4M2-C12, 4M2-B4, V4H1, V4H2 중쇄 CDR2 | ITYSGNI |
| 35 | 4M2-C12, 4M2-B4, V4H1, V4H2 중쇄 CDR3 | ARSLYYPWYFDV |
| 36 | 4M2-C12 중쇄 FR1 | EVKLVESGPGLVKPSQSLSLTCTVT |
| 37 | 4M2-C12, 4M2-B4 중쇄 FR2 | WNWIRQFPGNKLEWMGY |
| 38 | 4M2-C12, 4M2-B4 중쇄 FR3 | SYNPSLRSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTPEDTATYSC |
| 39 | 4M2-C12, 4M2-B4, V4H1, V4H2, 13D5p, 13D5-1, 13D5-13 중쇄 FR4 | WGAGTTVTVSS |
| 40 | 4M2-C12 경쇄 가변 영역 | DIVITQTPAILSTSPGEKVTMTCRASSSVGYIHWYQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGS GTSNSLTITRVEAEDAATYYCQQWSSYPPITFGGGTKLEVK |
| 41 | 4M2-C12, 4M2-B4, V4H1, V4H2, V4- | SSVGY |

[1378]

| | | |
|---|---|---|
| | C1, V4-C9, V4-C24, V4-C26, V4-C27, V4-C28, V4-C30, V4-C31 경쇄 CDR1 | |
| 42 | 4M2-C12, 4M2-B4, V4-C1, V4-C9, V4-C28 경쇄 CDR2 | ATS |
| 43 | 4M2-C12, 4M2-B4, V4H1, V4H2, V4-C1 V4-C9, V4-C24, V4-C26, V4-C27, V4-C28, V4-C30, V4-C31 경쇄 CDR3 | QQWSSYPPIT |
| 44 | 4M2-C12 경쇄 FR1 | DIVITQTPAILSTSPGEKVTMTCRAS |
| 45 | 4M2-C12, 4M2-B4 경쇄 FR2 | IHWYQQKPGSSPKPWIY |
| 46 | 4M2-C12, 4M2-B4 경쇄 FR3 | NLASGVPARFSGSGSGTSNSLTITRVEAEDAATYYC |
| 47 | 4M2-C12, 4M2-B4, V4H1, V4H2, V4-C1, V4-C9, V4-C24, V4-C26, V4-C27, V4-C28, V4-C30, V4-C31 경쇄 FR4 | FGGGTKLEVK |
| 48 | 4M2-B4 중쇄 가변 영역 | EVMLVESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYITYSGNISYNPSLR SRISITRDTSKNQFFLQLNSVTPEDTATYSCARSLYYPWYFDVWGAGTTVTVSS |
| 49 | 4M2-B4 중쇄 FR1 | EVMLVESGPGLVKPSQSLSLTCTVT |
| 50 | 4M2-B4 경쇄 가변 영역 | DIVLTQTTAILSTSPGEKVTMTCRASSSVGYIHWYQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSG SGTSNSLTITRVEAEDAATYYCQQWSSYPPITFGGGTKLEVK |
| 51 | 4M2-B4 경쇄 FR1 | DIVLTQTTAILSTSPGEKVTMTCRA |
| 52 | V4H1 중쇄 가변 영역 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTITSDYAMSWVRQAPGKGLEWVSVITYSGNISYADSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSLYYPWYFDVWGAGTTVTVSS |
| 53 | V4H1 중쇄 CDR1 | GYTITSDYA |
| 54 | V4H1 중쇄 FR1 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS |
| 55 | V4H1 중쇄 FR2 | MSWVRQAPGKGLEWVSV |
| 56 | V4H1 중쇄 FR3 | SYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC |
| 57 | V4H1 경쇄 가변 영역 | EIVITQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVGYLAWYQQKPGQAPRPLIYDTSNRATGIPARFSGSGS GTDNTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSSYPPITFGGGTKLEVK |
| 58 | V4H1 경쇄 CDR2 | DTS |
| 59 | V4H1, V4-C1 경쇄 FR1 | EIVITQSPATLSLSPGERATLSCRAS |
| 60 | V4H1 경쇄 FR2 | LAWYQQKPGQAPRPLIY |
| 61 | V4H1 경쇄 FR3 | NRATGIPARFSGSGSGTDNTLTISSLEPEDFAVYYC |
| 62 | V4H2 중쇄 가변 영역 | QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGYSITSDYAWSWIRQPPGKGLEWIGYITYSGNISYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYDCARSLYYPWYFDVWGAGTTVTVSS |
| 63 | V4H2, V4-C1, V4-C9, V4-C24, V4-C26, V4-C27, V4-C28, V4-C30, V4-C31 중쇄 FR1 | QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCTVS |
| 64 | V4H2 중쇄 FR2 | WSWIRQPPGKGLEWIGY |
| 65 | V4H2 중쇄 FR3 | SYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYDC |
| 66 | V4H2 경쇄 가변 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVGYLNWYQQKPGKAPKPLIYAASSLQSGVPSRFSGSG |

[1379]

| | | |
|---|---|---|
| | 영역 | SGTDNTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSYPPITFGGGTKLEVK |
| 67 | V4H2, 4M2-D9 경쇄 CDR2 | AAS |
| 68 | V4H2 경쇄 FR1 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA |
| 69 | V4H2 경쇄 FR2 | LNWYQQKPGKAPKPLIY |
| 70 | V4H2 경쇄 FR3 | SLQSGVPSRFSGSGSGTDNTLTISSLQPEDFATYYC |
| 71 | 2M1-B12 중쇄 가변 영역 | EVQLQQSGAELVRPGTSVKTSCKASGYTFTNYWLGWVKERAGHGLEWIGEIFPGGGHTNYKEKF KGKATLTADTSSSTAYMKLSSLTSEDSAVYFCAQIPLYYGHYRSAYWGQGTLVTVSA |
| 72 | 2M1-B12, 2M1-D2, 13D5p, 13D5-1, 13D5-13 중쇄 CDR1 | GYTFTNYW |
| 73 | 2M1-B12, 2M1-D2 중쇄 CDR2 | IFPGGGHT |
| 74 | 2M1-B12, 2M1-D2 중쇄 CDR3 | AQIPLYYGHYRSAY |
| 75 | 2M1-B12 중쇄 FR1 | EVQLQQSGAELVRPGTSVKTSCKAS |
| 76 | 2M1-B12, 2M1-D2 중쇄 FR2 | LGWVKERAGHGLEWIGE |
| 77 | 2M1-B12, 2M1-D2 중쇄 FR3 | NYKEKFKGKATLTADTSSSTAYMKLSSLTSEDSAVYFC |
| 78 | 2M1-B12, 2M1-D2, 1M2-D2 중쇄 FR4 | WGQGTLVTVSA |
| 79 | 2M1-B12 경쇄 가변 영역 | DIQMMQSPASLSASVGETVAITCGASENIYGALNWYQRKQGKSPQLLIYGATNLADGMSSRFSGS GSGRQYSLKISSLHPDDVATYYCQNVLSTPYTFGGGTKLEIK |
| 80 | 2M1-B12, 2M1-D2 경쇄 CDR1 | ENIYGA |
| 81 | 2M1-B12, 2M1-D2 경쇄 CDR2 | GAT |
| 82 | 2M1-B12, 2M1-D2 경쇄 CDR3 | QNVLSTPYT |
| 83 | 2M1-B12 경쇄 FR1 | DIQMMQSPASLSASVGETVAITCGAS |
| 84 | 2M1-B12, 2M1-D2 경쇄 FR2 | LNWYQRKQGKSPQLLIY |
| 85 | 2M1-B12, 2M1-D2 경쇄 FR3 | NLADGMSSRFSGSGSGRQYSLKISSLHPDDVATYYC |
| 86 | 2M1-B12, 4M2-C9, 2M1-D2, 4M2-D9, 1M2-D2, 5M1-A11, 4M2-D5, 4M2-A8, 9M2-C12, 13D5p, 13D5-1, 13d5-13 경쇄 FR4 | FGGGTKLEIK |
| 87 | 4M2-C9 중쇄 가변 영역 | QVTLKECGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSL KSRLTISKDSSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARRLDGYNDPYYFDYWGQGTTLTVSS |
| 88 | 4M2-C9, 5M1-A11 중쇄 CDR1 | GFSLSTSGMG |
| 89 | 4M2-C9, 5M1-A11 중쇄 CDR2 | IYWDDDK |
| 90 | 4M2-C9, 5M1-A11 중쇄 CDR3 | ARRLDGYNDPYYFDY |
| 91 | 4M2-C9 중쇄 FR1 | QVTLKECGPGILQPSQTLSLTCSFS |
| 92 | 4M2-C9, 5M1-A11 | VSWIRQPSGKGLEWLAH |

[1380]

| | | |
|---|---|---|
| | 중쇄 FR2 | |
| 93 | 4M2-C9, 5M1-A11 중쇄 FR3 | RYNPSLKSRLTISKDSSSNQVFLKITSVDTADTATYYC |
| 94 | 4M2-C9 중쇄 FR4 | WGQGTTLTVSS |
| 95 | 4M2-C9 경쇄 가변 영역 | DIVMTQSPSSLSASLGDTVTITCHASQNVNVWLSWYQQKPGNIPKLLIYKASNLHAGVPSRFSGS GSGTGFTLTISSLQPEDIATYYCQQGQSYPLTFGGGTKLEIK |
| 96 | 4M2-C9 경쇄 CDR1 | QNVNVW |
| 97 | 4M2-C9 경쇄 CDR2 | KAS |
| 98 | 4M2-C9 경쇄 CDR3 | QQGQSYPLT |
| 99 | 4M2-C9 경쇄 FR1 | DIVMTQSPSSLSASLGDTVTITCHAS |
| 100 | 4M2-C9 경쇄 FR2 | LSWYQQKPGNIPKLLIY |
| 101 | 4M2-C9 경쇄 FR3 | NLHAGVPSRFSGSGSGTGFTLTISSLQPEDIATYYC |
| 102 | 2M1-D2 중쇄 가변 영역 | QVQLQQSGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKERAGHGLEWIGEIFPGGGHTNYKEKF KGKATLTADTSSSTAYMKLSSLTSEDSAVYFCAQIPLYYGHYRSAYWGQGTLVTVSA |
| 103 | 2M1-D2, 13D5p, 13D5-1, 13D5-13 중쇄 FR1 | QVQLQQSGAELVRPGTSVKISCKAS |
| 104 | 2M1-D2 경쇄 가변 영역 | DIVMTQSPASLSASVGETVAITCGASENIYGALNWYQRKQGKSPQLLIYGATNLADGMSSRFSGS GSGRQYSLKISSLHPDDVATYYCQNVLSTPYTFGGGTKLEIK |
| 105 | 2M1-D2 경쇄 FR1 | DIVMTQSPASLSASVGETVAITCGAS |
| 106 | 4M2-D9 중쇄 가변 영역 | EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGNRLEWMGFISYSGFTTYSPSLE SRISITRDTSKNQFFLQLISVTTEDTATYYCARNHYGGSYWYFDVWGAGTSVTVSS |
| 107 | 4M2-D9 중쇄 CDR2 | ISYSGFT |
| 108 | 4M2-D9 중쇄 CDR3 | ARNHYGGSYWYFDV |
| 109 | 4M2-D9 중쇄 FR1 | EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVT |
| 110 | 4M2-D9 중쇄 FR2 | WNWIRQFPGNRLEWMGF |
| 111 | 4M2-D9 중쇄 FR3 | TYSPSLESRISITRDTSKNQFFLQLISVTTEDTATYYC |
| 112 | 4M2-D9 중쇄 FR4 | WGAGTSVTVSS |
| 113 | 4M2-D9 경쇄 가변 영역 | DIVMTQSPGSLAVSLGQRATISCRASESVEYYGTSLMQWYLQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPDR FRGSGSGTDFSLNIHPVEEDDIAMYFCQQSRKVPWTFGGGTKLEIK |
| 114 | 4M2-D9 경쇄 CDR1 | ESVEYYGTSL |
| 115 | 4M2-D9 경쇄 CDR3 | QQSRKVPWT |
| 116 | 4M2-D9 경쇄 FR1 | DIVMTQSPGSLAVSLGQRATISCRAS |
| 117 | 4M2-D9 경쇄 FR2 | MQWYLQKPGQPPKLLIY |
| 118 | 4M2-D9 경쇄 FR3 | NVESGVPDRFRGSGSGTDFSLNIHPVEEDDIAMYFC |
| 119 | 1M2-D2 중쇄 가변 영역 | EVKVEESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDWVHQSPEKGLEWVAEIRSKANNHATYYV ESVEGRFTISRDDSKSSVFLQVNSLRPEDTGIYYCTRRDGYYFAYWGQGTLVTVSA |
| 120 | 1M2-D2 중쇄 CDR1 | GFTFSDAW |
| 121 | 1M2-D2 중쇄 CDR2 | IRSKANNHAT |
| 122 | 1M2-D2 중쇄 CDR3 | TRRDGYYFAY |
| 123 | 1M2-D2 중쇄 FR1 | EVKVEESGGGLVQPGGSMKLSCAAS |
| 124 | 1M2-D2 중쇄 FR2 | MDWVHQSPEKGLEWVAE |
| 125 | 1M2-D2 중쇄 FR3 | YYVESVEGRFTISRDDSKSSVFLQVNSLRPEDTGIYYC |
| 126 | 1M2-D2 경쇄 가변 영역 | DIVLTQSPAIMSASLGEEITLTCSASSSVRDMHWYQQKSGTSPKVLIYNTFNLASGVPSRFSGSGS GTFYSLTISSVEAGDAAAYYCHQWSSYPTFGGGTKLEIK |
| 127 | 1M2-D2 경쇄 CDR1 | SSSVRD |

[1381]

| | | |
|---|---|---|
| 128 | 1M2-D2 경쇄 CDR2 | NTF |
| 129 | 1M2-D2 경쇄 CDR3 | HQWSSYPT |
| 130 | 1M2-D2 경쇄 FR1 | DIVLTQSPAIMSASLGEEITLTCSA |
| 131 | 1M2-D2 경쇄 FR2 | MHWYQQKSGTSPKVLIY |
| 132 | 1M2-D2 경쇄 FR3 | NLASGVPSRFSGSGSGTFYSLTISSVEAGDAAAYYC |
| 133 | 5M1-A11 중쇄 가변 영역 | QVTLKVSGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSL KSRLTISKDSSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARRLDGYNDPYYFDYWGQGTTLTVSS |
| 134 | 5M1-A11 중쇄 FR1 | QVTLKVSGPGILQPSQTLSLTCSFS |
| 135 | 5M1-A11, 4M2-D5, 4M2-A8 중쇄 FR4 | WGQGTTLTVSS |
| 136 | 5M1-A11 경쇄 가변 영역 | DVVMTQTPALMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPRSSPKPWIYLTSNLASGVPARFSG SGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWNSNPYTFGGGTKLEIK |
| 137 | 5M1-A11 경쇄 CDR1 | SSVSY |
| 138 | 5M1-A11 경쇄 CDR2 | LTS |
| 139 | 5M1-A11 경쇄 CDR3 | QQWNSNPYT |
| 140 | 5M1-A11 경쇄 FR1 | DVVMTQTPALMSASPGEKVTMTCSAS |
| 141 | 5M1-A11 경쇄 FR2 | MYWYQQKPRSSPKPWIY |
| 142 | 5M1-A11 경쇄 FR3 | NLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC |
| 143 | 4M2-D5 중쇄 가변 영역 | QVQLQQSGAELARPGASVRMSCKASGYTFTSYTMNWVKQRPGQGLEWIGFINPDSDYTTYDQK FKDKATLTADSSSSTAYMQLSSLTYDDSAVYYCTRHSYGNYGDYWGQGTTLTVSS |
| 144 | 4M2-D5 중쇄 CDR1 | GYTFTSYT |
| 145 | 4M2-D5 중쇄 CDR2 | INPDSDYT |
| 146 | 4M2-D5 중쇄 CDR3 | TRHSYGNYGDY |
| 147 | 4M2-D5 중쇄 FR1 | QVQLQQSGAELARPGASVRMSCKAS |
| 148 | 4M2-D5 중쇄 FR2 | MNWVKQRPGQGLEWIGF |
| 149 | 4M2-D5 중쇄 FR3 | TYDQKFKDKATLTADSSSSTAYMQLSSLTYDDSAVYYC |
| 150 | 4M2-D5 경쇄 가변 영역 | DIVLTQSPKFLLVSAGDRVTITCKASQSVTNDVAWYQQKPGQSPKLLIYYASSRYTGVPDRFTGS GFGTDFTFTINTVQAEDLAVYFCQQDYSSPYTFGGGTKLEIK |
| 151 | 4M2-D5 경쇄 CDR1 | QSVTND |
| 152 | 4M2-D5, 4M2-A8 경쇄 CDR2 | YAS |
| 153 | 4M2-D5, 4M2-A8 경쇄 CDR3 | QQDYSSPYT |
| 154 | 4M2-D5 경쇄 FR1 | DIVLTQSPKFLLVSAGDRVTITCKAS |
| 155 | 4M2-D5, 4M2-A8 경쇄 FR2 | VAWYQQKPGQSPKLLIY |
| 156 | 4M2-D5 경쇄 FR3 | SRYTGVPDRFTGSGFGTDFTFTINTVQAEDLAVYFC |
| 157 | 4M2-A8 중쇄 가변 영역 | QVQLQQSGADLARPGASVKMSCKASGYTFIDYTVHWVKQRPGQGLEWIGFINPSNDYTSYNQKF KDKASLTADTSSTTAYMQLSSLTSDDSAVYYCARHSYGNYGDYWGQGTTLTVSS |
| 158 | 4M2-A8 중쇄 CDR1 | GYTFIDYT |
| 159 | 4M2-A8 중쇄 CDR2 | INPSNDYT |
| 160 | 4M2-A8 중쇄 CDR3 | ARHSYGNYGDY |
| 161 | 4M2-A8 중쇄 FR1 | QVQLQQSGADLARPGASVKMSCKAS |
| 162 | 4M2-A8 중쇄 FR2 | VHWVKQRPGQGLEWIGF |

[1382]

| | | |
|---|---|---|
| 163 | 4M2-A8 중쇄 FR3 | SYNQKFKDKASLTADTSSTTAYMQLSSLTSDDSAVYYC |
| 164 | 4M2-A8 경쇄 가변 영역 | DIVMTQAPKFLLVSAGDRVTITCKASQSVTNGVAWYQQKPGQSPKLLIYYASNRYTGVPDRFTGS GFGTDFTFTISTVQAEDLAVYFCQQDYSSPYTFGGGTKLEIK |
| 165 | 4M2-A8 경쇄 CDR1 | QSVTNG |
| 166 | 4M2-A8 경쇄 FR1 | DIVMTQAPKFLLVSAGDRVTITCKAS |
| 167 | 4M2-A8 경쇄 FR3 | NRYTGVPDRFTGSGFGTDFTFTISTVQAEDLAVYFC |
| 168 | 9M2-C12 중쇄 가변 영역 | QVQLQQSGAELVKPGASVRLSCKASGYTFTSYWMHWVRQRPGLGLEWIGEIDPSDSYTNCNQR FKGKATLTVDKSSSTAYTQLSSLTSEDSAVYYCARWAYGPYAMDYWGQGTSVTVSS |
| 169 | 9M2-C12 중쇄 CDR1 | GYTFTSYW |
| 170 | 9M2-C12 중쇄 CDR2 | IDPSDSYT |
| 171 | 9M2-C12 중쇄 CDR3 | ARWAYGPYAMDY |
| 172 | 9M2-C12 중쇄 FR1 | QVQLQQSGAELVKPGASVRLSCKAS |
| 173 | 9M2-C12 중쇄 FR2 | MHWVRQRPGLGLEWIGE |
| 174 | 9M2-C12 중쇄 FR3 | NCNQRFKGKATLTVDKSSSTAYTQLSSLTSEDSAVYYC |
| 175 | 9M2-C12 중쇄 FR4 | WGQGTSVTVSS |
| 176 | 9M2-C12 경쇄 가변 영역 | DIVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPD RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIK |
| 177 | 9M2-C12 경쇄 CDR1 | QSLVHSNGNTY |
| 178 | 9M2-C12, 13D5p, 13D5-1, 13D5-13 경쇄 CDR2 | KVS |
| 179 | 9M2-C12 경쇄 CDR3 | SQSTHVPWT |
| 180 | 9M2-C12 경쇄 FR1 | DIVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS |
| 181 | 9M2-C12 경쇄 FR2 | LHWYLQKPGQSPKLLIY |
| 182 | 9M2-C12 경쇄 FR3 | NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC |
| 183 | 13D5p 중쇄 가변 영역 | QVQLQQSGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDIYPGGGYTNYNEKF KGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGGYYYGSSWYFDVWGAGTTVTVSS |
| 184 | 13D5p, 13D5-1, 13D5-13 중쇄 CDR2 | IYPGGGYT |
| 185 | 13D5p 중쇄 CDR3 | ARGGYYYGSSWYFDV |
| 186 | 13D5p, 13D5-1, 13D5-13 중쇄 FR2 | LGWVKQRPGHGLEWIGD |
| 187 | 13D5p, 13D5-1 중쇄 FR3 | NYNEKFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFC |
| 188 | 13D5p 경쇄 가변 영역 | DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPD RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPPTFGGGTKLEIK |
| 189 | 13D5p 경쇄 CDR1 | QSIVHSNGNTY |
| 190 | 13D5p, 13D5-1, 13D5-13 경쇄 CDR3 | FQGSHVPPT |
| 191 | 13D5p, 13D5-1, 13D5-13 경쇄 FR1 | DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS |
| 192 | 13D5p, 13D5-13 경쇄 FR2 | LEWYLQKPGQSPKLLIY |
| 193 | 13D5p, 13D5-1 | NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC |

[1383]

[1384]

| | | |
|---|---|---|
| | 경쇄 FR3 | |
| 194 | 13D5-1 중쇄 가변 영역 | QVQLQQSGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDIYPGGGYTNYNEKF KGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCVRSGYYYGSSWYFDVWGAGTTVTVSS |
| 195 | 13D5-1 중쇄 CDR3 | VRSGYYYGSSWYFDV |
| 196 | 13D5-1 경쇄 가변 영역 | DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSSGNTYLEWYLQKPDQSPKLLIYKVSNRFSGVPDR FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPPTFGGGTKLEIK |
| 197 | 13D5-1 경쇄 CDR1 | QSIVHSSGNTY |
| 198 | 13D5-1 경쇄 FR2 | LEWYLQKPDQSPKLLIY |
| 199 | 13D5-13 중쇄 가변 영역 | QVQLQQSGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDIYPGGGYTNYNEKF KGKATLTADISSSTAYMQLSSLTSEDSADYFCVRGGYYYGSSWYFDVWGAGTTVTVSS |
| 200 | 13D5-13 중쇄 CDR3 | VRGGYYYGSSWYFDV |
| 201 | 13D5-13 중쇄 FR3 | NYNEKFKGKATLTADISSSTAYMQLSSLTSEDSADYFC |
| 202 | 13D5-13 경쇄 가변 영역 | DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSTVHSIGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDR FSGSESGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPPTFGGGTKLEIK |
| 203 | 13D5-13 경쇄 CDR1 | QSTVHSIGNTY |
| 204 | 13D5-13 경쇄 FR3 | NRFSGVPDRFSGSESGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC |
| 205 | 사람 IgG1 불변 영역 (IGHG1; UniProt:P01857-1, v1) | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK |
| 206 | CH1 IgG1 (positions 1-98 of P01857-1, v1) | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV |
| 207 | Hinge IgG1 (positions 99-110 of P01857-1, v1) | EPKSCDKTHTCP |
| 208 | CH2 IgG1 (P01857-1 의 111-223 번 위치, v1) | PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK |
| 209 | CH3 IgG1 (P01857-1 의 224-330 번 위치, v1) | GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 210 | CH3 (D356E, L358M; EU 번호매김에 따라 번호매김된 위치) | GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 211 | Cκ CL (IGCK; UniProt: P01834-1, v2) | RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 212 | 4M2-C12 VH-CH1-CH2-CH3 | EVKLVESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYITYSGNISYNPSLR SRISITRDTSKNQFFLQLNSVTPEDTATYSCARSLYYPWYFDVWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 213 | 4M2-C12 VL-Cκ | DIVITQTPAILSTSPGEKVTMTCRASSSVGYIHWYQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGS GTSNSLTITRVEAEDAATYYCQQWSSYPPITFGGGTKLEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 214 | 4M2-B4 VH-CH1-CH2-CH3 | EVMLVESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYITYSGNISYNPSLR SRISITRDTSKNQFFLQLNSVTPEDTATYSCARSLYYPWYFDVWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT |

| | | |
|---|---|---|
| | | CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 215 | 4M2-B4 VL-Ck | DIVLTQTTAILSTSPGEKVTMTCRASSSVGYIHWYQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSG SGTSNSLTITRVEAEDAATYYCQQWSSYPPITFGGGTKLEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 216 | V4H1 VH-CH1-CH2-CH3 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTITSDYAMSWVRQAPGKGLEWVSVITYSGNISYADSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSLYYPWYFDVWGAGTTVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 217 | V4H1 VL-Ck | EIVITQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVGYLAWYQQKPGQAPRPLIYDTSNRATGIPARFSGSGS GTDNTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSSYPPITFGGGTKLEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 218 | V4H2 VH-CH1-CH2-CH3 | QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGYSITSDYAWSWIRQPPGKGLEWIGYITYSGNISYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYDCARSLYYPWYFDVWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 219 | V4H2 VL-Ck | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVGYLNWYQQKPGKAPKPLIYAASSLQSGVPSRFSGSG SGTDNTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSYPPITFGGGTKLEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 220 | 2M1-B12 VH-CH1-CH2-CH3 | EVQLQQSGAELVRPGTSVKTSCKASGYTFTNYWLGWVKERAGHGLEWIGEIFPGGGHTNYKEKF KGKATLTADTSSSTAYMKLSSLTSEDSAVYFCAQIPLYYGHYRSAYWGQGTLVTVSAASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 221 | 2M1-B12 VL-Ck | DIQMMQSPASLSASVGETVAITCGASENIYGALNWYQRKQGKSPQLLIYGATNLADGMSSRFSGS GSGRQYSLKISSLHPDDVATYYCQNVLSTPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 222 | 4M2-C9 VH-CH1-CH2-CH3 | QVTLKECGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSL KSRLTISKDSSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARRLDGYNDPYYFDYWGQGTTLTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 223 | 4M2-C9 VL-Ck | DIVMTQSPSSLSASLGDTVTITCHASQNVNVWLSWYQQKPGNIPKLLIYKASNLHAGVPSRFSGS GSGTGFTLTISSLQPEDIATYYCQQGQSYPLTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 224 | 2M1-D2 VH-CH1-CH2-CH3 | QVQLQQSGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKERAGHGLEWIGEIFPGGGHTNYKEKF KGKATLTADTSSSTAYMKLSSLTSEDSAVYFCAQIPLYYGHYRSAYWGQGTLVTVSAASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 225 | 2M1-D2 VL-Ck | DIVMTQSPASLSASVGETVAITCGASENIYGALNWYQRKQGKSPQLLIYGATNLADGMSSRFSGS GSGRQYSLKISSLHPDDVATYYCQNVLSTPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 226 | 4M2-D9 VH-CH1-CH2-CH3 | EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGNRLEWMGFISYSGFTTYSPSLE SRISITRDTSKNQFFLQLISVTTEDTATYYCARNHYGGSYWYFDVWGAGTSVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |

[1385]

| | | |
|---|---|---|
| 227 | 4M2-D9 VL-Cκ | DIVMTQSPGSLAVSLGQRATISCRASESVEYYGTSLMQWYLQKPGQPPKLLIYAASNVESGVPDR FRGSGSGTDFSLNIHPVEEDDIAMYFCQQSRKVPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 228 | 1M2-D2 VH-CH1-CH2-CH3 | EVKVEESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDWVHQSPEKGLEWVAEIRSKANNHATYYV ESVEGRFTISRDDSKSSVFLQVNSLRPEDTGIYYCTRRDGYYFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 229 | 1M2-D2 VL-Cκ | DIVLTQSPAIMSASLGEEITLTCSASSSVRDMHWYQQKSGTSPKVLIYNTFNLASGVPSRFSGSGS GTFYSLTISSVEAGDAAAYYCHQWSSYPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC |
| 230 | 5M1-A11 VH-CH1-CH2-CH3 | QVTLKVSGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYNPSL KSRLTISKDSSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARRLDGYNDPYYFDYWGQGTTLTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 231 | 5M1-A11 VL-Cκ | DVVMTQTPALMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPRSSPKPWIYLTSNLASGVPARFSG SGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWNSNPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 232 | 4M2-D5 VH-CH1-CH2-CH3 | QVQLQQSGAELARPGASVRMSCKASGYTFTSYTMNWVKQRPGQGLEWIGFINPDSDYTTYDQK FKDKATLTADSSSSTAYMQLSSLTYDDSAVYYCTRHSYGNYGDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 233 | 4M2-D5 VL-Cκ | DIVLTQSPKFLLVSAGDRVTITCKASQSVTNDVAWYQQKPGQSPKLLIYYASSRYTGVPDRFTGS GFGTDFTFTINTVQAEDLAVYFCQQDYSSPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 234 | 4M2-A8 VH-CH1-CH2-CH3 | QVQLQQSGADLARPGASVKMSCKASGYTFIDYTVHWVKQRPGQGLEWIGFINPSNDYTSYNQKF KDKASLTADTSSTTAYMQLSSLTSDDSAVYYCARHSYGNYGDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 235 | 4M2-A8 VL-Cκ | DIVMTQAPKFLLVSAGDRVTITCKASQSVTNGVAWYQQKPGQSPKLLIYYASNRYTGVPDRFTGS GFGTDFTFTISTVQAEDLAVYFCQQDYSSPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 236 | 9M2-C12 VH-CH1-CH2-CH3 | QVQLQQSGAELVKPGASVRLSCKASGYTFTSYWMHWVRQRPGLGLEWIGEIDPSDSYTNCNQR FKGKATLTVDKSSSTAYTQLSSLTSEDSAVYYCARWAYGPYAMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 237 | 9M2-C12 VL-Cκ | DIVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPD RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 238 | 13D5p VH-CH1-CH2-CH3 | QVQLQQSGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDIYPGGGYTNYNEKF KGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGGYYYGSSWYFDVWGAGTTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 239 | 13D5p VL-Cκ | DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPD RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK |

[1386]

| | | |
|---|---|---|
| | | VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 240 | 13D5-1 VH-CH1-CH2-CH3 | QVQLQQSGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDIYPGGGYTNYNEKF<br>KGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCVRSGYYYGSSWYFDVWGAGTTVTVSSASTKGP<br>SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV<br>PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS<br>RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK<br>EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES<br>NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 241 | 13D5-1 VL-Cκ | DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSSGNTYLEWYLQKPDQSPKLLIYKVSNRFSGVPDR<br>FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS<br>GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV<br>YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 242 | 13D5-13 VH-CH1-CH2-CH3 | QVQLQQSGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDIYPGGGYTNYNEKF<br>KGKATLTADISSSTAYMQLSSLTSEDSADYFCVRGGYYYGSSWYFDVWGAGTTVTVSSASTKGP<br>SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV<br>PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS<br>RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK<br>EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES<br>NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 243 | 13D5-13 VL-Cκ | DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSTVHSIGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDR<br>FSGSESGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS<br>GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV<br>YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 244 | 4M2-C12/V4H1/V4H2 중쇄 CDR1 컨센서스(consensus) | GYX$_1$ITSDYA<br><br>wherein X$_1$ = S or T |
| 245 | 4M2-C12/V4H1/V4H2 경쇄 CDR2 컨센서스 | X$_2$X$_3$S<br><br>wherein X$_2$ = A or D; X$_3$ = T or A |
| 246 | 13D5ρ 유래된 중쇄 CDR3 컨센서스 | X$_4$RX$_5$GYYYGSSWYFDV<br><br>wherein X$_4$ = V or A; X$_5$ = G or S |
| 247 | 13D5ρ 유래된 경쇄 CDR1 컨센서스 | QSX$_6$VHSX$_7$GNTY<br><br>wherein X$_6$ = I or T; X$_7$ = N, S or I |
| 248 | 4M2-C12 mIgG2a HC | EVKLVESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYITYSGNISYNPSLR<br>SRISITRDTSKNQFFLQLNSVTPEDTATYSCARSLYYPWYFDVWGAGTTVTVSSAKTTAPSVYPLA<br>PVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPS<br>QSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCV<br>VVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNK<br>DLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYK<br>NTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK |
| 249 | 4M2-C12 mIgG2a LALA PG HC | EVKLVESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYITYSGNISYNPSLR<br>SRISITRDTSKNQFFLQLNSVTPEDTATYSCARSLYYPWYFDVWGAGTTVTVSSAKTTAPSVYPLA<br>PVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPS<br>QSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCV<br>VVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNK<br>DLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNY<br>KNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK |
| 250 | 4M2-C12 LC | DIVITQTPAILSTSPGEKVTMTCRASSSVGYIHWYQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGS<br>GTSNSLTITRVEAEDAATYYCQQWSSYPPITFGGGTKLEVKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASV<br>VCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEA<br>THKTSTSPIVKSFNRNEC |
| 251 | mIgG2a CH1 | AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLS<br>SSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKI |
| 252 | mIgG2a Hinge | EPRGPTIKPCPPCKCP |
| 253 | mIgG2a CH2 | APNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYN<br>STLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPK |
| 254 | mIgG2a CH2 LALA PG | APNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDY<br>NSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPK |
| 255 | mIgG2a CH3 | GSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSY<br>FMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK |
| 256 | 마우스 Ig 감마- | AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLS<br>SSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKD |

[1387]

| | | |
|---|---|---|
| | 2A 쇄 C 영역, A 대립형질 | VLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWM SGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVE WTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSR TPGK |
| 257 | mIgG2a CH2, CH3 LALA PG | APNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDY NSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKK QVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSC SVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK |
| 258 | 4M2-C12 mIgG2a NQ HC | EVKLVESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYITYSGNISYNPSLR SRISITRDTSKNQFFLQLNSVTPEDTATYSCARSLYYPWYFDVWGAGTTVTVSSAKTTAPSVYPLA PVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPS QSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCV VVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYQSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNN KDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNY KNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK |
| 259 | mIgG2a CH2 NQ | APNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDY QSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPK |
| 260 | mIgG2a CH2, CH3 NQ | APNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDY QSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKK QVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSC SVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK |
| 261 | Mouse IGHG1 | AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLS SSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTITL TPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEF KCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNG QPAENYKNTQPIMNTNGSYFVYSKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK |
| 262 | mIgG1 CH1 | AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLS SSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKI |
| 263 | mIgG1 Hinge | VPRDCGCKPCICT |
| 264 | mIgG1 CH2 | VPEVSSVFIFPPKPKDVLTITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNST FRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTK |
| 265 | mIgG1 CH3 | GRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMNTNGSYF VYSKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK |
| 266 | 4M2-C12 mIgG1 HC | EVKLVESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYITYSGNISYNPSLR SRISITRDTSKNQFFLQLNSVTPEDTATYSCARSLYYPWYFDVWGAGTTVTVSSAKTTPPSVYPLA PGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWP SETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTITLTPKVTCVVVDIS KDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPA PIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQP IMNTNGSYFVYSKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK |
| 267 | IGN175A HC | QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSTHWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGSGSTSYNEKF KGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARWLLYYYAMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 268 | IGN175A LC | DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKLSNRFSGVPDR FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 269 | VSTB112 HC | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSSYGWSYEFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 270 | VSTB112 LC | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDTRLNWYQQKPGKAPKLLIYSASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSAYNPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 271 | VSTB112 주요 에피토프 1 | PVDKGHDVTF |
| 272 | VSTB112 주요 에피토프 2 | RRPIRNLTFQDL |

[1388]

| | | |
|---|---|---|
| 273 | VSTB112 마이너 에피토프(minor epitope) 1 | TWYRSSRGEVQTCS |
| 274 | VSTB112 마이너 에피토프 2 | EIRHHHSEHRVHGAMEL |
| 275 | IGN175A 에피토프 | FKVATPYSLYVCPEGQNVTLTCRLLGPVDKGH |
| 276 | V4-C1 중쇄 가변 영역 | QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGYSITSDYAWNWIRQTPGKGLEWIGYITYSGYISYNPSLRS RVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYSCARALYYPWYFDVWGTGTTVTVSS |
| 277 | V4-C1 중쇄 CDR2 | ITYSGYI |
| 278 | V4-C1, V4-C9, V4-C24, V4-C26, V4-C27, V4-C28, V4-C30, V4-C31 중쇄 CDR3 | ARALYYPWYFDV |
| 279 | V4-C1, V4-C9 중쇄 FR2 | WNWIRQTPGKGLEWIGY |
| 280 | V4-C1, V4-C9 중쇄 FR3 | SYNPSLRSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYSC |
| 281 | V4-C1, V4-C9, V4-C24, V4-C26, V4-C27, V4-C28, V4-C30, V4-C31 중쇄 FR4 | WGTGTTVTVSS |
| 282 | V4-C1 경쇄 가변 영역 | EIVITQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVGYIHWYQQKPGQAPRPLIYATSNRATGIPARFSGSGS GTDNTLTISSLEPEDSAVYYCQQWSSYPPITFGGGTKLEVK |
| 283 | V4-C1, V4-C9, V4-C24, V4-C27, V4-C28, V4-C30, V4-C31 경쇄 FR2 | IHWYQQKPGQAPRPLIY |
| 284 | V4-C1, V4-C9, V4-C26, V4-C27 경쇄 FR3 | NRATGIPARFSGSGSGTDNTLTISSLEPEDSAVYYC |
| 285 | V4-C9 중쇄 가변 영역 | QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGYSITSDYAWNWIRQTPGKGLEWIGYITYSGYVSYNPSLR SRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYSCARALYYPWYFDVWGTGTTVTVSS |
| 286 | V4-C9 중쇄 CDR2 | ITYSGYV |
| 287 | V4-C9 경쇄 가변 영역 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVGYIHWYQQKPGQAPRPLIYATSNRATGIPARFSGSGS GTDNTLTISSLEPEDSAVYYCQQWSSYPPITFGGGTKLEVK |
| 288 | V4-C9, V4-C24, V4-C26, V4-C27, V4-C28, V4-C30, V4-C31 경쇄 FR1 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS |
| 289 | V4-C24, V4-C26, V4-C27, V4-C28, V4-C30, V4-C31 중쇄 가변 영역 | QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGYSITSDYTWNWIRQTPGKGLEWIGHITYSGSVSYNPSLR SRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTATYSCARALYYPWYFDVWGTGTTVTVSS |
| 290 | V4-C24, V4-C26, V4-C27, V4-C28, V4-C30, V4-C31 중쇄 CDR1 | GYSITSDYT |
| 291 | V4-C24, V4-C26, V4-C27, V4-C28, V4-C30, V4-C31 중쇄 CDR2 | ITYSGSV |
| 292 | V4-C24, V4-C26, V4-C27, V4-C28, V4-C30, V4-C31 | WNWIRQTPGKGLEWIGH |

[1389]

| | | |
|---|---|---|
| | 중쇄 FR2 | |
| 293 | V4-C24, V4-C26, V4-C27, V4-C28, V4-C30, V4-C31 중쇄 FR3 | SYNPSLRSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTATYSC |
| 294 | V4-C24 경쇄 가변 영역 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVGYIHWYQQKPGQAPRPLIYTTSYRATGIPARFSGSGS GTDNTLTISSLEPEDSAVYYCQQWSSYPPITFGGGTKLEVK |
| 295 | V4-C24, V4-C26 경쇄 CDR2 | TTS |
| 296 | V4-C24, V4-C28, V4-C30 경쇄 FR3 | YRATGIPARFSGSGSGTDNTLTISSLEPEDSAVYYC |
| 297 | V4-C26 경쇄 가변 영역 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVGYIHWYQQKPGQAPRPIIYTTSNRATGIPARFSGSGS GTDNTLTISSLEPEDSAVYYCQQWSSYPPITFGGGTKLEVK |
| 298 | V4-C26 경쇄 FR2 | IHWYQQKPGQAPRPIIY |
| 299 | V4-C27 경쇄 가변 영역 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVGYIHWYQQKPGQAPRPLIYATYNRATGIPARFSGSGS GTDNTLTISSLEPEDSAVYYCQQWSSYPPITFGGGTKLEVK |
| 300 | V4-C27, V4-C30, V4-C31 경쇄 CDR2 | ATY |
| 301 | V4-C28 경쇄 가변 영역 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVGYIHWYQQKPGQAPRPLIYATSYRATGIPARFSGSGS GTDNTLTISSLEPEDSAVYYCQQWSSYPPITFGGGTKLEVK |
| 302 | V4-C30 경쇄 가변 영역 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVGYIHWYQQKPGQAPRPLIYATYYRATGIPARFSGSGS GTDNTLTISSLEPEDSAVYYCQQWSSYPPITFGGGTKLEVK |
| 303 | V4-C31 경쇄 가변 영역 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVGYIHWYQQKPGQAPRPLIYATYYRTTGIPARFSGSGS GTDNTLTISSLEPEDSAVYYCQQWSSYPPITFGGGTKLEVK |
| 304 | V4-C31 경쇄 FR3 | YRTTGIPARFSGSGSGTDNTLTISSLEPEDSAVYYC |
| 305 | 4M2-C12 유래된 중쇄 CDR1 컨센서스 | GYX$_8$ITSDYX$_9$<br>wherein $X_8$ = S or T; $X_9$ = T or A |
| 306 | 4M2-C12 유래된 중쇄 CDR2 컨센서스 | ITYSGX$_{10}$X$_{11}$<br>wherein $X_{10}$ = S, N or Y; $X_{11}$ = V or I |
| 307 | 4M2-C12 유래된 중쇄 CDR3 컨센서스 | ARX$_{12}$LYYPWYFDV<br>wherein $X_{12}$ = A or S |
| 308 | 4M2-C12 유래된 경쇄 CDR2 컨센서스 | X$_{13}$X$_{14}$X$_{15}$<br>wherein $X_{13}$ = A, T or D; $X_{14}$ = T or A; $X_{15}$ = S or Y |
| 309 | C24/C26/C27 경쇄 CDR2 컨센서스 | X$_{16}$TX$_{17}$<br>wherein $X_{16}$ = T or A; $X_{17}$ = S or Y |
| 310 | C24/C26/C27 경쇄 가변 영역 컨센서스 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVGYIHWYQQKPGQAPRPX$_{17}$IYX$_{18}$TX$_{19}$X$_{20}$YNRATGIPAR FSGSGSGTDNTLTISSLEPEDSAVYYCQQWSSYPPITFGGGTKLEVK<br>wherein $X_{17}$ = L or I; $X_{18}$ = T or A; $X_{19}$ = S or Y; $X_{20}$ = N or Y |
| 311 | V4-C1 VH-CH1-CH2-CH3 | QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGYSITSDYAWNWIRQTPGKGLEWIGYITYSGYISYNPSLRS RVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYSCARALYYPWYFDVWGTGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 312 | V4-C1 VL-Cκ | EIVITQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVGYIHWYQQKPGQAPRPLIYATSNRATGIPARFSGSGS GTDNTLTISSLEPEDSAVYYCQQWSSYPPITFGGGTKLEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV |

[1390]

| | | |
|---|---|---|
| | | VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 313 | V4-C9 VH-CH1-CH2-CH3 | QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGYSITSDYAWNWIRQTPGKGLEWIGYITYSGYVSYNPSLR SRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYSCARALYYPWYFDVWGTGTTVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 314 | V4-C9 VL-Ck | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVGYIHWYQQKPGQAPRPLIYATSNRATGIPARFSGSGS GTDNTLTISSLEPEDSAVYYCQQWSSYPPITFGGGTKLEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 315 | V4-C24/C26/C27/C28/C30/C31 VH-CH1-CH2-CH3 | QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGYSITSDYTWNWIRQTPGKGLEWIGHITYSGSVSYNPSLR SRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTATYSCARALYYPWYFDVWGTGTTVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 316 | V4-C24 VL-Ck | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVGYIHWYQQKPGQAPRPLIYTTSYRATGIPARFSGSGS GTDNTLTISSLEPEDSAVYYCQQWSSYPPITFGGGTKLEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 317 | V4-C26 VL-Ck | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVGYIHWYQQKPGQAPRPIIYTTSNRATGIPARFSGSGS GTDNTLTISSLEPEDSAVYYCQQWSSYPPITFGGGTKLEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 318 | V4-C27 VL-Ck | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVGYIHWYQQKPGQAPRPLIYATYNRATGIPARFSGSGS GTDNTLTISSLEPEDSAVYYCQQWSSYPPITFGGGTKLEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 319 | V4-C28 VL-Ck | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVGYIHWYQQKPGQAPRPLIYATSYRATGIPARFSGSGS GTDNTLTISSLEPEDSAVYYCQQWSSYPPITFGGGTKLEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 320 | V4-C30 VL-Ck | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVGYIHWYQQKPGQAPRPLIYATYYRATGIPARFSGSGS GTDNTLTISSLEPEDSAVYYCQQWSSYPPITFGGGTKLEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 321 | V4-C31 VL-Ck | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVGYIHWYQQKPGQAPRPLIYATYYRTTGIPARFSGSGS GTDNTLTISSLEPEDSAVYYCQQWSSYPPITFGGGTKLEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 322 | 4M2-C12 및 유도체가 결합한 VISTA 서열 | SRGEVQ |
| 323 | 사람 PSGL-1 동형 1 (UniProt: Q14242-1, v1) | MPLQLLLLLLILLGPGNSLQLWDTWADEAEKALGPLLARDRRQATEYEYLDYDFLPETEPPEMLRN STDTTPLTGPGTPESTTVEPAARRSTGLDAGGAVTELTTELANMGNLSTDSAAMEIQTTQPAATE AQTTQPVPTEAQTTPLAATEAQTTRLTATEAQTTPLAATEAQTTPPAATEAQTTQPTGLEAQTTAP AAMEAQTTAPAAMEAQTTPPAAMEAQTTQTTAMEAQTTAPEATEAQTTQPTATEAQTTPLAAME ALSTEPSATEALSMEPTTKRGLFIPFSVSSVTHKGIPMAASNLSVNYPVGAPDHISVKQCLLAILILA LVATIFFVCTVVLAVRLSRKGHMYPVRNYSPTEMVCISSLLPDGGEGPSATANGGLSKAKSPGLTP EPREDREGDDLTLHSFLP |
| 324 | 사람 PSGL-1 동형 2 (UniProt: Q14242-2) | MAVGASGLEGDKMAGAMPLQLLLLLILLGPGNSLQLWDTWADEAEKALGPLLARDRRQATEYEY LDYDFLPETEPPEMLRNSTDTTPLTGPGTPESTTVEPAARRSTGLDAGGAVTELTTELANMGNLS TDSAAMEIQTTQPAATEAQTTQPVPTEAQTTPLAATEAQTTRLTATEAQTTPLAATEAQTTPPAAT EAQTTQPTGLEAQTTAPAAMEAQTTAPAAMEAQTTPPAAMEAQTTQTTAMEAQTTAPEATEAQT TQPTATEAQTTPLAAMEALSTEPSATEALSMEPTTKRGLFIPFSVSSVTHKGIPMAASNLSVNYPV GAPDHISVKQCLLAILILALVATIFFVCTVVLAVRLSRKGHMYPVRNYSPTEMVCISSLLPDGGEGP SATANGGLSKAKSPGLTPEPREDREGDDLTLHSFLP |
| 325 | 성숙한 사람 PSGL-1 동형 1 (Q14242-1, v1 18 내지 412 번 위치) | LQLWDTWADEAEKALGPLLARDRRQATEYEYLDYDFLPETEPPEMLRNSTDTTPLTGPGTPESTT VEPAARRSTGLDAGGAVTELTTELANMGNLSTDSAAMEIQTTQPAATEAQTTQPVPTEAQTTPLA ATEAQTTRLTATEAQTTPLAATEAQTTPPAATEAQTTQPTGLEAQTTAPAAMEAQTTAPAAMEAQ TTPPAAMEAQTTQTTAMEAQTTAPEATEAQTTQPTATEAQTTPLAAMEALSTEPSATEALSMEPT TKRGLFIPFSVSSVTHKGIPMAASNLSVNYPVGAPDHISVKQCLLAILILALVATIFFVCTVVLAVRLS RKGHMYPVRNYSPTEMVCISSLLPDGGEGPSATANGGLSKAKSPGLTPEPREDREGDDLTLHSF LP |

[1391]

| | | |
|---|---|---|
| 326 | PSGL-1 세포외 도메인 (Q14242-1, v1 18 내지 320 번 위치) | LQLWDTWADEAEKALGPLLARDRRQATEYEYLDYDFLPETEPPEMLRNSTDTTPLTGPGTPESTT VEPAARRSTGLDAGGAVTELTTELANMGNLSTDSAAMEIQTTQPAATEAQTTQPVPTEAQTTPLA ATEAQTTRLTATEAQTTPLAATEAQTTPPAATEAQTTQPTGLEAQTTAPAAMEAQTTAPAAMEAQ TTPPAAMEAQTTQTTAMEAQTTAPEATEAQTTQPTATEAQTTPLAAMEALSTEPSATEALSMEPT TKRGLFIPFSVSSVTHKGIPMAASNLSVNYPVGAPDHISVKQC |
| 327 | PSGL-1 막천이 도메인 (Q14242-1, v1 321 내지 341 번 위치) | LLAILILALVATIFFVCTVVL |
| 328 | PSGL-1 세포질 도메인 (Q14242-1, v1 342 내지 412 번 위치) | AVRLSRKGHMYPVRNYSPTEMVCISSLLPDGGEGPSATANGGLSKAKSPGLTPEPREDREGDDL TLHSFLP |
| 329 | PSGL-1 세포외 도메인 반복 영역 (Q14242-1, v1 122 내지 261 번 위치) | QTTQPAATEAQTTQPVPTEAQTTPLAATEAQTTRLTATEAQTTPLAATEAQTTPPAATEAQTTQPT GLEAQTTAPAAMEAQTTAPAAMEAQTTPPAAMEAQTTQTTAMEAQTTAPEATEAQTTQPTATEA QTTPLAAMEA |
| 330 | 4M2-C12 VH-CH1-CH2-CH3 IgG4 | EVKLVESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYITYSGNISYNPSLR SRISITRDTSKNQFFLQLNSVTPEDTATYSCARSLYYPWYFDVWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK |
| 331 | V4-C26 hIgG4(S228P) HC | QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGYSITSDYTWNWIRQTPGKGLEWIGHITYSGSVSYNPSLR SRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTATYSCARALYYPWYFDVWGTGTTVTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK |

[1392]

[1393] 번호매김된 절(numbered paragraph)

[1394] 다음의 번호매김된 절(paras)은 본 발명과 관련여 고려된 특징 및 특징의 조합의 추가의 기술을 제공한다.

[1395] 1. VIST에 결합하여, Fc-매개된 기능과 독립적으로, VISTA-매개된 신호전달을 억제할 수 있는, 임의 단리된, 항원-결합 분자.

[1396] 2. 절 1에 따른 항원-결합 분자로서, Ig-유사 V-형 도메인 내 VISTA에 결합할 수 있는 항원-결합 분자.

[1397] 3. 절 1 또는 절 2에 따른 항원-결합 분자로서, 항원-결합 분자가 서열 번호: 6의 아미노산 서열을 포함하거나

또는 이로 이루어진 폴리펩타이드에 결합할 수 있는, 항원-결합 분자.

[1398] 4. 절 1 내지 3 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자로서, 여기서 항원-결합 분자가 서열 번호: 31의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 이루어진 폴리펩타이드에 결합할 수 있는, 항원-결합 분자.

[1399] 5. 절 1 내지 4 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자로서, 여기서 항원-결합 분자가 VISTA에 대한 결합에 대해 IGN175A와 경쟁하지 않는, 항원-결합 분자.

[1400] 6. 절 1 내지 5 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자로서, 여기서 항원-결합 분자가 서열 번호: 275의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드에 결합할 수 없는, 항원-결합 분자.

[1401] 7. 절 1 내지 6 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자로서, 여기서 항원-결합 분자가:

[1402] (i) 다음의 CDR을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

[1403] 서열 번호: 305의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[1404] 서열 번호: 306의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[1405] 서열 번호: 307의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3; 및

[1406] (ii) 다음의 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

[1407] 서열 번호: 41의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[1408] 서열 번호: 308의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[1409] 서열 번호: 43의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3을 포함하는 항원-결합 분자.

[1410] 8. 절 1 내지 6 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자로서, 여기서 항원-결합 분자가:

[1411] (i) 다음의 CDR을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

[1412] 서열 번호: 290의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[1413] 서열 번호: 291의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[1414] 서열 번호: 278의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3; 및

[1415] (ii) 다음의 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

[1416] 서열 번호: 41의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[1417] 서열 번호: 309의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[1418] 서열 번호: 43의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3을 포함하는 항원-결합 분자.

[1419] 9. 절 1 내지 8 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자로서, 여기서 항원-결합 분자가:

[1420] (i) 다음의 CDR을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

[1421] 서열 번호: 290의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[1422] 서열 번호: 291의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[1423] 서열 번호: 278의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3; 및

[1424] (ii) 다음의 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

[1425] 서열 번호: 41의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[1426] 서열 번호: 295의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[1427] 서열 번호: 43의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3을 포함하는 항원-결합 분자.

[1428] 10. 절 1 내지 8 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자로서, 여기서 항원-결합 분자가:

[1429] (i) 다음의 CDR을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

[1430] 서열 번호: 290의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[1431] 서열 번호: 291의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[1432] 서열 번호: 278의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3; 및

[1433] (ii) 다음의 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

[1434] 서열 번호: 41의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[1435] 서열 번호: 300의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[1436] 서열 번호: 43의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3을 포함하는 항원-결합 분자.

[1437] 11. 절 1 내지 8 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자로서, 여기서 항원-결합 분자가:

[1438] (i) 다음의 CDR을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

[1439] 서열 번호: 33의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[1440] 서열 번호: 277의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[1441] 서열 번호: 278의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3; 및

[1442] (ii) 다음의 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

[1443] 서열 번호: 41의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[1444] 서열 번호: 42의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[1445] 서열 번호: 43의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3을 포함하는 항원-결합 분자.

[1446] 12. 절 1 내지 8 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자로서, 여기서 항원-결합 분자가:

[1447] (i) 다음의 CDR을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

[1448] 서열 번호: 33의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[1449] 서열 번호: 286의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[1450] 서열 번호: 278의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3278; 및

[1451] (ii) 다음의 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

[1452] 서열 번호: 41의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[1453] 서열 번호: 42의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[1454] 서열 번호: 43의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3을 포함하는 항원-결합 분자.

[1455] 13. 절 1 내지 8 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자로서, 여기서 항원-결합 분자가:

[1456] (i) 다음의 CDR을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

[1457] 서열 번호: 290의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[1458] 서열 번호: 291의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[1459] 서열 번호: 278의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3; 및

[1460] (ii) 다음의 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

[1461] 서열 번호: 41의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[1462] 서열 번호: 42의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[1463] 서열 번호: 43의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3을 포함하는 항원-결합 분자.

[1464] 14. 절 1 내지 8 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자로서, 여기서 항원-결합 분자가:

[1465] (i) 다음의 CDR을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

[1466] 서열 번호: 290의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[1467] 서열 번호: 291의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[1468] 서열 번호: 278의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3; 및

[1469] (ii) 다음의 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

[1470] 서열 번호: 41의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[1471] 서열 번호: 300의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[1472] 서열 번호: 43의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3을 포함하는 항원-결합 분자.

[1473] 15. 절 1 내지 7 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자로서, 여기서 항원-결합 분자가:

[1474] (i) 다음의 CDR을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

[1475] 서열 번호: 33의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[1476] 서열 번호: 34의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[1477] 서열 번호: 35의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3; 및

[1478] (ii) 다음의 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

[1479] 서열 번호: 41의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[1480] 서열 번호: 42의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[1481] 서열 번호: 43의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3을 포함하는 항원-결합 분자.

[1482] 16. 절 1 내지 7 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자로서, 여기서 항원-결합 분자가:

[1483] (i) 다음의 CDR을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

[1484] 서열 번호: 33의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[1485] 서열 번호: 34의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[1486] 서열 번호: 35의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3; 및

[1487] (ii) 다음의 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

[1488] 서열 번호: 41의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[1489] 서열 번호: 67의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[1490] 서열 번호: 43의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3을 포함하는 항원-결합 분자.

[1491] 17. 절 1 내지 7 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자로서, 여기서 항원-결합 분자가:

[1492] (i) 다음의 CDR을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

[1493] 서열 번호: 53의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[1494] 서열 번호: 34의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[1495] 서열 번호: 35의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3; 및

[1496] (ii) 다음의 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

[1497] 서열 번호: 41의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[1498] 서열 번호: 58의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[1499] 서열 번호: 43의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3을 포함하는 항원-결합 분자.

[1500] 18. 절 1 내지 8 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자로서, 여기서 항원-결합 분자가:.

[1501] (i) 다음의 CDR을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

[1502] 서열 번호: 72의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[1503] 서열 번호: 73의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[1504] 서열 번호: 74의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3; 및

[1505] (ii) 다음의 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

[1506] 서열 번호: 80의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[1507] 서열 번호: 81의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[1508] 서열 번호: 82의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3을 포함하는 항원-결합 분자.

[1509] 19. 절 1 내지 6 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자로서, 여기서 항원-결합 분자가:

[1510] (i) 다음의 CDR을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

[1511] 서열 번호: 88의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[1512] 서열 번호: 89의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[1513] 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3; 및

[1514] (ii) 다음의 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

[1515] 서열 번호: 96의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[1516] 서열 번호: 97의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[1517] 서열 번호: 98의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3을 포함하는 항원-결합 분자.

[1518] 20. 절 1 내지 6 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자로서, 여기서 항원-결합 분자가:

[1519] (i) 다음의 CDR을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

[1520] 서열 번호: 88의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[1521] 서열 번호: 89의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[1522] 서열 번호: 90의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3; 및

[1523] (ii) 다음의 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

[1524] 서열 번호: 137의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[1525] 서열 번호: 138의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[1526] 서열 번호: 139의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3을 포함하는 항원-결합 분자.

[1527] 21. 절 1 내지 6 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자로서, 여기서 항원-결합 분자가:

[1528] (i) 다음의 CDR을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

[1529] 서열 번호: 33의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[1530] 서열 번호: 107의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[1531] 서열 번호: 108의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3,

[1532] 또는 HC-CDR1, HC-CDR2, 또는 HC-CDR3 중 하나 이상 내 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 이의 변이체; 및

[1533] (ii) 다음의 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

[1534] 서열 번호: 114의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[1535] 서열 번호: 67의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[1536] 서열 번호: 115의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3을 포함하는 항원-결합 분자.

[1537] 22. 절 1 내지 6 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자로서, 여기서 항원-결합 분자가:

[1538] (i) 다음의 CDR을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

[1539] 서열 번호: 120의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[1540] 서열 번호: 121의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[1541] 서열 번호: 122의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3; 및

[1542] (ii) 다음의 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

[1543] 서열 번호: 127의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[1544] 서열 번호: 128의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[1545] 서열 번호: 129의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3을 포함하는 항원-결합 분자.

[1546] 23. 절 1 내지 6 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자로서, 여기서 항원-결합 분자가:.

[1547] (i) 다음의 CDR을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

[1548] 서열 번호: 144의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[1549] 서열 번호: 145의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[1550] 서열 번호: 146의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3; 및

[1551] (ii) 다음의 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

[1552] 서열 번호: 151의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[1553] 서열 번호: 152의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[1554] 서열 번호: 153의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3을 포함하는 항원-결합 분자.

[1555] 24. 절 1 내지 6 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자로서, 여기서 항원-결합 분자가:

[1556] (i) 다음의 CDR을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

[1557] 서열 번호: 158의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[1558] 서열 번호: 159의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[1559] 서열 번호: 160의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3; 및

[1560] (ii) 다음의 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

[1561] 서열 번호: 165의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[1562] 서열 번호: 152의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[1563] 서열 번호: 153의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3을 포함하는 항원-결합 분자.

[1564] 25. 절 1 내지 6 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자로서, 여기서 항원-결합 분자가:

[1565] (i) 다음의 CDR을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

[1566] 서열 번호: 169의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[1567] 서열 번호: 170의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[1568] 서열 번호: 171의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3; 및

[1569] (ii) 다음의 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

[1570] 서열 번호: 177의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[1571] 서열 번호: 178의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[1572] 서열 번호: 179의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3을 포함하는 항원-결합 분자.

[1573] 26. 절 1 내지 6 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자로서, 여기서 항원-결합 분자가:

[1574] (i) 다음의 CDR을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

[1575] 서열 번호: 72의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[1576] 서열 번호: 184의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[1577] 서열 번호: 246의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3; 및

[1578] (ii) 다음의 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

[1579] 서열 번호: 247의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[1580] 서열 번호: 178의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[1581] 서열 번호: 190의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3을 포함하는 항원-결합 분자.

[1582] 27. 절 1 내지 6 또는 절 26 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자로서, 여기서 항원-결합 분자가:

[1583] (i) 다음의 CDR을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

[1584] 서열 번호: 72의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[1585] 서열 번호: 184의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[1586] 서열 번호: 185의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3; 및

[1587] (ii) 다음의 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

[1588] 서열 번호: 189의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[1589] 서열 번호: 178의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[1590] 서열 번호: 190의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3을 포함하는 항원-결합 분자.

[1591] 28. 절 1 내지 6 또는 절 26 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자로서, 여기서 항원-결합 분자가:

[1592] (i) 다음의 CDR을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

[1593] 서열 번호: 72의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[1594] 서열 번호: 184의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[1595] 서열 번호: 195의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3; 및

[1596] (ii) 다음의 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

[1597] 서열 번호: 197의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[1598] 서열 번호: 178의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[1599] 서열 번호: 190의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3을 포함하는 항원-결합 분자.

[1600] 29. 절 1 내지 6 또는 절 26 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자로서, 여기서 항원-결합 분자가:

[1601] (i) 다음의 CDR을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역:

[1602] 서열 번호: 72의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR1

[1603] 서열 번호: 184의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR2

[1604] 서열 번호: 200의 아미노산 서열을 갖는 HC-CDR3; 및

[1605] (ii) 다음의 CDR을 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역:

[1606] 서열 번호: 203의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR1

[1607] 서열 번호: 178의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR2

[1608] 서열 번호: 190의 아미노산 서열을 갖는 LC-CDR3을 포함하는 항원-결합 분자.

[1609] 30. 절 1 내지 6 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자로서, 여기서 항원-결합 분자가:

[1610] 서열 번호: 289의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및

[1611] 서열 번호: 310의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;

[1612] 또는

[1613] 서열 번호: 289의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및

[1614] 서열 번호: 294의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;

[1615] 또는

[1616] 서열 번호: 289의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및

[1617] 서열 번호: 297의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;

[1618] 또는

[1619] 서열 번호: 289의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및

[1620] 서열 번호: 299의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;

[1621] 또는

[1622] 서열 번호: 289의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및

[1623] 서열 번호: 301의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;

[1624] 또는

[1625] 서열 번호: 289의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및

[1626] 서열 번호: 302의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;

[1627] 또는

[1628] 서열 번호: 289의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및

[1629] 서열 번호: 303의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;

[1630] 또는

[1631] 서열 번호: 276의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및

[1632] 서열 번호: 282의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;

[1633] 또는

[1634] 서열 번호: 285의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및

[1635] 서열 번호: 287의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;

[1636] 서열 번호: 32의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및

[1637] 서열 번호: 40의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;

[1638] 또는

[1639] 서열 번호: 52의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및

[1640] 서열 번호: 57의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;

[1641] 또는

[1642] 서열 번호: 62의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및

[1643] 서열 번호: 66의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;

[1644] 또는

[1645] 서열 번호: 48의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및

[1646] 서열 번호: 50의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;

[1647] 또는

[1648] 서열 번호: 87의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및

[1649] 서열 번호: 95의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;

[1650] 또는

[1651] 서열 번호: 106의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및

[1652] 서열 번호: 113의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;

[1653] 또는

[1654] 서열 번호: 143의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및

[1655] 서열 번호: 150의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;

[1656] 또는

[1657] 서열 번호: 157의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및

[1658] 서열 번호: 164의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;

[1659] 또는

[1660] 서열 번호: 71의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및

[1661] 서열 번호: 79의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;

[1662] 또는

[1663] 서열 번호: 102의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및

[1664] 서열 번호: 104의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;

[1665] 또는

[1666] 서열 번호: 119의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및

[1667] 서열 번호: 126의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;

[1668] 또는

[1669] 서열 번호: 183의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및

[1670] 서열 번호: 188의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;

[1671] 또는

[1672] 서열 번호: 194의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및

[1673] 서열 번호: 196의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;

[1674] 또는

[1675] 서열 번호: 199의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및

[1676] 서열 번호: 202의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;

[1677] 또는

[1678] 서열 번호: 133의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및

[1679] 서열 번호: 136의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;

[1680] 또는

[1681] 서열 번호: 168의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역; 및

[1682] 서열 번호: 176의 아미노산 서열에 대해 적어도 70% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역을 포함하는 항원-결합 분자.

[1683] 31. 절 1 내지 30 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자로서, 여기서 항원-결합 분자가 사람 VISTA와 마우스 VISTA 및 시노몰구스 마카퀴 VISTA 중 하나 이상에 결합할 수 있는, 항원-결합 분자.

[1684] 32. (i) 절 1 내지 31 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자, 및 (ii) VISTA 외의 항원에 결합할 수 있는 항원-결합 분자를 포함하는, 임의 단리된, 항원-결합 분자.

[1685] 33. 절 1 내지 32 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자로서, 여기서 항원-결합 분자가 세포 표면에서 VISTA를 발현하는 세포에 결합할 수 있는, 항원-결합 분자.

[1686] 34. 절 1 내지 33 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자로서, 여기서 항원-결합 분자가 VISTA와 VISTA에 대한 결합 파트너 사이의 상호작용을 억제할 수 있는, 항원-결합 분자.

[1687] 35. 절 1 내지 34 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자로서, 여기서 항원-결합 분자가 VISTA-매개된 신호전달을 억제할 수 있는, 항원-결합 분자.

[1688] 36. 절 1 내지 35 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자로서, 여기서 항원-결합 분자가 효과기 면역 세포에 의한 증식 및/또는 사이토킨 생산을 증가시킬 수 있는, 항원-결합 분자.

[1689] 37. 절 1 내지 36 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자를 포함하는 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor; CAR).

[1690] 38. 절 1 내지 36 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자 또는 절 37에 따른 CAR을 암호화하는, 임의 단리된, 핵산, 또는 다수의 핵산.

[1691] 39. 절 38에 따른 핵산 또는 다수의 핵산을 포함하는, 발현 벡터, 또는 다수의 발현 벡터.

[1692] 40. 절 1 내지 36 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자, 절 37에 따른 CAR, 절 38에 따른 핵산 또는 다수의 핵산, 또는 절 39에 따른 발현 벡터 또는 다수의 발현 벡터를 포함하는 세포.

[1693] 41. 절 38에 따른 핵산 또는 다수의 핵산, 또는 절 39에 따른 발현 벡터 또는 다수의 발현 벡터를 포함하는 세포를, 핵산(들) 또는 발현 벡터(들)로부터의 항원-결합 분자 또는 CAR의 발현에 적합한 조건 하에서 배양하는 단계를 포함하는 방법.

[1694] 42. 절 1 내지 36 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자, 절 37에 따른 CAR, 절 38에 따른 핵산 또는 다수의 핵산 분자, 절 39에 따른 발현 벡터 또는 다수의 발현 벡터, 또는 절 40에 따른 세포를 포함하는 조성물.

[1695] 43. VIST 외에 다른 면역 체크포인트 분자에 의해 매개된 신호전달을 억제할 수 있는 제제를 추가로 포함하는, 절 42에 따른 조성물로서, 임의로 여기서, VISTA 외에 다른 면역 체크포인트 분자가 PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, TIGIT 및 BTLA로부터 선택된 조성물.

[1696] 44. 의학적 치료 또는 예방 방법에서 사용하기 위한 절 1 내지 36 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자, 절 37에 따른 CAR, 절 38에 따른 핵산 또는 다수의 핵산 분자, 절 39에 따른 발현 벡터 또는 다수의 발현 벡터, 또는 절 40에 따른 세포, 또는 절 42 또는 절 43에 따른 조성물.

[1697] 45. 암 또는 감염성 질환의 치료 또는 예방 방법에서 사용하기 위한 절 1 내지 36 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자, 절 37에 따른 CAR, 절 38에 따른 핵산 또는 다수의 핵산 분자, 절 39에 따른 발현 벡터 또는 다수의 발현 벡터, 또는 절 40에 따른 세포, 또는 절 42 또는 절 43에 따른 조성물.

[1698] 46. 암 또는 감염성 질환의 치료 또는 예방 방법에서 사용하기 위한 의약의 제조시 에서 사용하기 위한 절 1 내지 36 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자, 절 37에 따른 CAR, 절 38에 따른 핵산 또는 다수의 핵산 분자, 절 39에 따른 발현 벡터 또는 다수의 발현 벡터, 또는 절 40에 따른 세포, 또는 절 42 또는 절 43에 따른 조성물의 용도.

[1699] 47. 대상체에게 치료학적 또는 예방학적 유효량의 절 1 내지 36 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자, 절 37에 따른 CAR, 절 38에 따른 핵산 또는 다수의 핵산 분자, 절 39에 따른 발현 벡터 또는 다수의 발현 벡터, 또는 절 40에 따른 세포, 또는 절 42 또는 절 43에 따른 조성물을 투여하는 단계를 포함하여, 암 또는 감염성 질환을 치료 또는 예방하는 방법.

[1700] 48. 절 45에 따른 사용을 위한 항원-결합 분자, CAR, 핵산 또는 다수의 핵산, 발현 벡터 또는 다수의 발현 벡터, 세포 또는 조성물, 절 46에 따른 용도 및 절 47에 따른 방법으로서, 여기서 암이 결장직장 암, 췌장 암, 유방 암, 간 암, 전립선 암, 난소 암, 두경부 암, 백혈병, 림프종, 흑색종, 흉선종, 폐 암, 비-소 세포 폐암(NSCLC) 및 고형 종양으로부터 선택된, 항원-결합 분자, CAR, 핵산 또는 다수의 핵산, 발현 벡터 또는 다수의 발현 벡터, 세포 또는 조성물, 용도 및 방법.

[1701] 49. 골수-유래된 억제인자 세포(MDSC)가 병리학적으로 연관된 질환의 치료 또는 예방 방법에서 사용하기 위한, 절 1 내지 36 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자, 절 37에 따른 CAR, 절 38에 따른 핵산 또는 다수의 핵산 분자, 절 39에 따른 발현 벡터 또는 다수의 발현 벡터, 또는 절 40에 따른 세포, 또는 절 42 또는 절 43에 따른 조성물.

[1702] 50. 골수-유래된 억제인자 세포(MDSC)가 병리학적으로 연관된 질환의 치료 또는 예방 방법에서 사용하기 위한, 절 1 내지 36 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자, 절 37에 따른 CAR, 절 38에 따른 핵산 또는 다수의 핵산 분자, 절 39에 따른 발현 벡터 또는 다수의 발현 벡터, 또는 절 40에 따른 세포, 또는 절 42 또는 절 43에 따른 조성물의 용도.

[1703] 51. 대상체에게 치료학적 또는 예방학적 유효량의 절 1 내지 36 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자, 절 37에 따른 CAR, 절 38에 따른 핵산 또는 다수의 핵산 분자, 절 39에 따른 발현 벡터 또는 다수의 발현 벡터, 또는 절 40에 따른 세포, 또는 절 42 또는 절 43에 따른 조성물을 투여하는 단계를 포함하여, 골수-유래된 억제인자 세포(MDSC)가 병리학적으로 연관된 질환을 치료 또는 예방하는 방법.

[1704] 52. 절 45 내지 51 중 어느 하나에 따른 사용하기 위한 항원-결합 분자, CAR, 핵산 또는 다수의 핵산, 발현 벡터 또는 다수의 발현 벡터, 세포 또는 조성물, 용도, 또는 방법으로서, 여기서 방법이 VISTA 외에 다른 면역 체크포인트 분자에 의해 매개된 신호전달을 억제할 수 있는 제제를 투여하는 단계를 추가로포함하고, 임의로 여기서 VISTA 외에 다른 면역 체크포인트 분자가 PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, TIGIT 또는 BTLA로부터 선택된, 항원-결합 분자, CAR, 핵산 또는 다수의 핵산, 발현 벡터 또는 다수의 발현 벡터, 세포 또는 조성물, 용도, 또는 방법.

[1705] 53. VISTA-발현 세포를 절 1 내지 36 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자와 접촉시키는 단계를 포한하여, VISTA-매개된 신호전달을 억제하는 방법.

[1706] 54. 골수-유래된 억제인자 세포(MDSC)의 활성을 억제하는 방법으로서, 이러한 방법이 MDSC를 절 1 내지 36 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

[1707] 55. 효과기 면역 세포의 수 또는 활성을 증가시키는 방법으로서, 이러한 방법이 VISTA-발현 세포의 활성을 절 1 내지 36 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자를 사용하여 억제하는 단계를 포함하는, 방법.

[1708] 56. VISTA에 결합된 절 1 내지 36 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자를 포함하는, 임의 단리된, 시험관 내 복합체.

[1709] 57. VISTA를 함유하거나, 또는 함유하는 것으로 예측된 샘플을 절 1 내지 36 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자와 접촉시키는 단계, 및 항원-결합 분자와 VISTA의 복합체의 형성을 검출하는 단계를 포함하는 방법.

[1710] 58. VISTA-표적화된 제제를 사용한 치료를 위해 대상체를 선택하거나 또는 계층화하는 방법으로서, 이러한 방법이 시험관 내에서, 대상체로부터의 샘플을 절 1 내지 36 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자와 접촉시키는 단계 및 항원-결합 분자와 VISTA의 복합체의 형성을 검출하는 단계를 포함하는, 방법.

[1711] 59. 시험관 내 또는 생체 내 진단제 또는 예후제로서의, 절 1 내지 36 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자의 용도.

[1712] 60. 암을 검출, 국재화 또는 영상화하는 방법에서 사용하기 위한, 절 1 내지 36 중 어느 하나에 따른 항원-결합 분자의 용도로서, 임의로 여기서 암이 결장직장 암, 췌장 암, 유방 암, 간 암, 전립선 암, 난소 암, 두경부 암, 백혈병, 림프종, 흑색종, 흉선종, 폐 암, 비-소 세포 폐암(NSCLC) 및 고형 종양으로부터 선택된, 용도.

[1713] ***

[1714] 본 발명은 이러한 조합이 명확하게 불투과성이거나 분명하게 피해지는 경우를 제외하고는 기술된 양태 및 바람직한 특징의 조합을 포함한다.

[1715] 본원에 사용된 단락 소제는 단지 구조화 목적을 위한 것이며 기술된 주제를 제한하는 것으로 고려되어서는 안된다.

[1716] 본 발명의 양태 및 구현예를 이제 실시예의 방식으로, 첨부된 도면을 참고하여 나타낼 것이다. 추가의 양태 및 구현예는 당해 분야의 숙련가에게 명백할 것이다. 본 내용에 언급된 모든 문서는 본원에 참고로 포함된다.

[1717] 이어오는 청구범위를 포함하는, 본 명세서 전체에서, 내용이 달리 요구하지 않는 한, 단어 "포함하다(comprise)" 및 "포함하다(comprises)" 및 포함하는(comprising)"과 같은 변화는 기술된 정수 또는 단계 또는 정수 또는 단계의 그룹을 포함하지만, 임의의 다른 정수 또는 단계 또는 정수 또는 단계의 그룹을 배제하지 않음을 내포하는 것으로 이해될 것이다.

[1718] 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 것으로서, 단수 형("a," "an", 및 "the")은 문맥이 명확하게 달리 나타내지 않는 한 복수의 참고를 포함함에 주목하여야 한다. 범위는 본원에서 "약" 하나의 특수한 값, 및/또는 "약" 다른 특수한 값으로서 나타낼 수 있다. 이러한 범위가 나타난 경우, 다른 구현예는 하나의 특수한 값으로부터 및/또는 다른 특수한 값까지를 포함한다. 유사하게, 값이 앞서의 "약"의 사용에 의해, 대략치로 나타난 경우, 특수한 값은 다른 구현예를 형성하는 것으로 이해될 것이다.

[1719] 핵산 서열이 본원에 개시되어 있는 경우, 이의 역 상보체(reverse complement)가 또한 분명하게 고려된다.

[1720] 본원에 기술된 방법은 바람직하게는 시험관 내에서 수행될 수 있다. 용어 "시험관 내"는 배양물 속의 세포를 사용하여 수행된 과정을 포함하는 반면 용어 "생체 내"는 완전한 다-세포 유기체(multi-cellular organism)를 사용하여/상에서의 과정을 포함하는 것으로 의도된다.

## *도면의 간단한 설명*

[1721] 본 발명의 원리를 나타내는 구현예 및 실험이 이제 첨부되는 도면을 참고로 논의될 것이다.

**도 1A 내지 1D.** 유동 세포분석법에 의해 측정된 것으로서 항-VISTA 항체에 의한 세포의 염색을 나타내는 히스토그램(histogram). 히스토그램은 항-VISTA 항체 단독(1A) VSTB112(양성 대조군; 제WO 2015/097536호), (1B) 4-M2-D5, (1C) 9M2-C12 또는 (1D) 4M2-C12(본원에서 또한 "V4"로서 지칭됨)에 의한 HEK293 세포(VISTA를 발현하지 않음), 또는 HEK293 VISTA 과발현 세포(HEK293 VISTA O/E)의 염색을 나타낸다.

**도 2.** 유동 세포분석법에 의해 측정된 것으로서 항-VISTA 항체에 의한 세포의 염색을 나타내는 히스토그램. 히스토그램은 항-VISTA 항체 클론 9M2C12, V4 및 클론 VSTB112, 또는 동형 대조군 항체에 의한 HEK293 세포(VISTA를 발현하지 않음), 또는 HEK293 VISTA 과발현 세포(HEK293 VISTA O/E)의 염색을 나타낸다. 염색되지 않은 세포는 음성 대조군으로서 분석하였다.

**도 3A 내지 3C.** 항-VISTA 항체 클론 V4에 의한 사람, 시노몰구스 원숭이 및 뮤린 VISTA에 대한 결합의 친화성의 분석 결과를 나타내는 대표적인 센소그램(sensorgram). (3A)는 사람 VISTA에 대한 결합을 나타내고, (3B)는 시노몰구스 원숭이 VISTA에 대한 결합을 나타내고, (3C)는 뮤린 VISTA에 대한 결합을 나타낸다. Kon, Koff 및 $K_D$가 나타나 있다.

**도 4A 및 4B.** 상이한 단백질에 대한 항-VISTA 항체의 결합의 분석 결과를 나타내는 그래프. 4A는 ELISA에 의해 측정된 것으로서, 항-VISTA 항체 클론 V4에 의한 사람, 시노몰구스 원숭이 및 뮤린 VISTA, 사람 PD-L1 및 사람 HER3에 개한 결합을 나타낸다. 4B는 사람 VISTA, PD-1, PD-L1, B7H3, B7H4, B7H6, B7H7, CTLA4 및 관련되지 않은 항원에 대한 항-VISTA 항체 클론 V4의 결합을 나타낸다.

**도 5.** VISTA와 VSIG-3 사이의 결합의 분석 결과를 나타내는 센소그램.

**도 6.** 항-VISTA 항체 클론 5M1-A11 및 9M2-C12에 의한 VISTA와 VSIG-3 사이의 결합의 억제의 분석 결과를 나타내는 그래프.

**도 7A 및 7B.** 혼합된 림프구 반응(mixed lymphocyte reaction; MLR) 검정에서 IFN-ɣ, IL-2 및 IL-17A의 생산에 있어 항-VISTA 항체 클론 13D5p을 사용한 처리의 결과의 분석 결과를 나타내는 그래피 및 바 차트(bar chart). (7A)는 검정의 말기에 세포 배양 상층액 속에서 검출된 사이토킨의 수준을 나타내고, (7B)는 나타낸 사이토킨의 수준에서 배-변하(fold-change; "FC")를 나타낸다.

**도 8A 및 8B.** 혼합된 림프구 반응(MLR) 검정에서 IFN-ɣ, IL-2 및 IL-17A의 생산에 있어 항-PD-L1 항체 클론 MIH5(ThermoFisher Scientific)을 사용한 처리의 결과의 분석 결과를 나타내는 그래피 및 바 차트. (8A)는 검

정의 말기에 세포 상층액 속에서 검출된 사이토킨의 수준을 나타내고, (**8B**)는 나타낸 사이토킨의 수준에서 배-변화("FC")를 나타낸다.

**도 9.** 차등 주사 형광측정법 분석에 의한 항-VISTA 항체 클론 V4의 안정성의 분석 결과를 나타내는 그래프.

**도 10.** 크기 배제 크로마토그래피에 의한 항-VISTA 항체 클론의 분석 결과를 나타내는 그래프.

**도 11.** SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯에 의한 항-VISTA 항체 클론 V4의 분석 결과를 나타내는 영상. 레인: M1 = TaKaRa 단백질 마커 제품 번호 3452; M2 = GenScript 단백질 마커 제품 번호 M00521; 1 = 환원 조건; 2 = 비-환원 조건; P = 양성 대조군: 마우스 IgG1, 카파(Sigma 제품 번호 M9269). 웨스턴 블롯을 위해, 사용된 1차 항체는 염소 항-마우스 IgG(H+L) 항체(LI-COR, 제품 번호 926-32210)이었다.

**도 12.** 항체 혈청의 ELISA 분석에 의한 항-VISTA 항체 클론 V4의 약력학적 분석의 결과를 나타내는 그래프 및 표.

**도 13.** 결장 암종의 동계 세포-주 유래된 마우스 모델에서 생체 내에서 항-VISTA 항체 클론 V4의 분석 결과를 나타내는 그래프.

**도 14.** 나타낸 체크포인트 분자를 표적화하는 단독치료요법 또는 조합 치료요법을 사용한 치료 후 결장 암종의 동계 세포주 유래된 마우스 모델에서 15일째에 종양 성장의 억제를 나타내는 바아 차트. 본 연구에 사용된 항체는 다음과 같았다: 항-VISTA = 클론 V4, 항-PD-L1 = 클론 10F.9G2, 항-TIGIT = 클론 1G9, 항-LAG-3 = 클론 C9B7W, 및 항-TIM-3 = 클론 RMT3-23.

**도 15.** 항-VISTA 항체 클론 V4 단독, 항-PD-L1 항체 클론 10F.9G2 단독을 사용한 치료, 항-VISTA 항체 클론 V4 및 항-PD-L1 항체 클론 10F.9G2를 사용한 조합 치료, 또는 PBS(음성 대조군)를 사용한 치료 후 동계 세포주 유래된 마우스 모델의 종양 덩어리(tumor bulk) 내에서 100,000 세포 당 MDSC의 수, 및 CD8+ T 세포의 비: Treg를 나타내는 바아 차트.

**도 16.** 루이스 폐 암종의 동계 세포주 유래된 마우스 모델에서 생체 내에서 항-VISTA 항체 클론 V4의 항-암 활성의 분석 결과를 나타내는 그래프.

**도 17.** 단독치료요법, 또는 항-PD-1 항체 RMP1-14(Bio X Cell)와의 조합으로서, 흑색종의 동계 세포주 유래된 마우스 모델에서 생체 내 항-VISTA 항체 클론 V4의 항-암 활성의 분석 결과를 나타내는 그래프.

**도 18.** 900 μg의 항-VISTA 항체 클론 V4, 또는 음성 대조군으로서 동 용적의 비히클(PBS)의 단일 용량의 투여 후 백혈 세포의 수 또는 상이한 유형을 나타내는 바아 차트.

**도 19A 및 19B.** 900 μg의 항-VISTA 항체 클론 V4, 또는 음성 대조군으로서 동 용적의 비히클(PBS)의 단일 용량의 투여 후 (**19A**) 간 및 (**19B**) 신장 기능의 평가에 의한 간독성 및 신독성의 분석을 나타내는 바아 차트. (**19A**)는 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT) 및 아스파르테이트 트랜스아미나제(AST)의 수준을 나타내고, (**19B**)는 혈액 우레아 질소(BUN) 및 크레아티닌(CREA)의 수준을 나타낸다.

**도 20.** ELISA에 의해 측정된 것으로서, 사람, 시노몰구스 원숭이 및 마우스 VISTA 및 사람 PD-L1에 대한 결합의 분석 결과를 나타내는 그래프.

**도 21.** ELISA에 의해 측정된 것으로서, 항-VISTA 항체 클론 13D5-13에 의한 사람 및 마우스 VISTA에 대한 결합의 분석 결과를 나타내는 그래프.

**도 22.** 단독 또는 항-PD-L1과 함께 결장 암종의 세포주-유래된 마우스 모델에서 생체 내 항-VISTA 항체 클론 13D5-1의 항-암 활성의 분석 결과를 나타내는 그래프.

**도 23.** 유방 암종의 세포주 유래된 마우스 모델에서 생체 내 항-VISTA 항체 클론 13D5-1의 분석 결과를 나타내는 그래프.

**도 24.** 유동 세포분석법에 의해 측정된 것으로서 항-VISTA 항체의 염색을 나타내는 히스토그램. 히스토그램은 항-VISTA 항체 클론 4M2-B4, 2M1-B12, 4M2-C9, 2M1-D2, 4M2-D9, 1M2-D2, 5M1-A11, 4M2-D5, 4M2-A8 및 9M2-C12에 의한 HEK293 세포(VISTA를 발현하지 않음), 또는 HEK293 VISTA 과발현 세포(HEK293 VISTA O/E)의 염색을 나타낸다.

**도 25A 내지 25D.** (**25A**) 마우스 FcɣRIV, (**25B**) 마우스 FcɣRIII, (**25C**) 마우스 FcɣRIIb, 및 (**25D**) 마우스

FcRn에 대한 4M2-C12 mIgG1의 결합의 분석 결과를 나타내는 센소그램.

**도 26A 내지 26D.** **(26A)** 마우스 FcγRIV, **(26B)** 마우스 FcγRIII, **(26C)** 마우스 FcγRIIb, **및 (26D)** 마우스 FcRn에 대한 4M2-C12 mIgG2a의 결합의 분석 결과를 나타내는 센소그램.

**도 27A 내지 27D.** (**27A**) 마우스 FcγRIV, (**27B**) 마우스 FcγRIII, (**27C**) 마우스 FcγRIIb, 및 (**27D**) 마우스 FcRn에 대한 4M2-C12 mIgG2a LALA PG의 결합의 분석 결과를 나타내는 샌소그램.

**도 28A 내지 28D.** (**28A**) 마우스 FcγRIV, (**28B**) 마우스 FcγRIII, (**28C**) 마우스 FcγRIIb, 및 (**28D**) 마우스 FcRn에 대한 4M2-C12 mIgG2a NQ의 결합의 분석 결과를 나타내는 센소그램.

**도 29A 내지 29C.** 마우스 FcγRIV, 마우스 FcγRIII, 마우스 FcγRIIb, 및 마우스 FcRn에 대한 4M2-C12 mIgG1, 4M2-C12 mIgG2a, 4M2-C12 mIgG2a LALA PG 및 4M2-C12 mIgG2a의 결합의 분석 결과를 요약한 표. **29A**는 계산된 $K_{on}$ 값을 나타내고, **29B**는 계산된 $K_{dis}$ **값을 나타내고 29C**는 계산된 $K_D$ 값을 나타낸다.

**도 30A 내지 30C.** T 세포 림프구의 세포-유래된 마우스 모델에서 항-VISTA 항체 클론 4M2-C12 in mIgG2a and mIgG2a LALA PG 양식의 생체 내 항-암 활성의 분석 결과를 나타내는 그래프. **30A**는 상이한 처리 그룹에 대한 데이타를 나타내고, **30B**는 비히클 대조군 및 4M2-C12 mIgG2a 처리 그룹에서 개개 마우스에 대해 수득된 데이타를 나타내고, **30C**는 비히클 대조군 및 4M2-C12 mIgG2a LALA PG 처리 그룹에서 개개 마우스에 대해 수득된 데이타를 나타낸다.

**도 31A 및 31B.** BLI에 의한 사람 VISTA에 대한 결합에 대해 상이한 항-VISTA 항체 사이의 경쟁의 분석 결과를 나타내는 센소그램.

**도 32.** 항-VISTA 항체 4M2-C12에 의한 VISTA와 VSIG-3 사이의 결합의 억제의 분석 결과를 나타내는 그래프.

**도 33A 내지 33D.** CFSE 희석 검정에 의해 측정된 것으로서, VISTA-Ig로 처리한 T 세포에 대한 T 세포 증식을 회복하는 항-VISTA 항체의 능력의 분석 결과를 나타내는 바아 차트. **도 33A 및 33C**는 효능제 항-CD3 항체 및 VISTA-Ig의 1:1 비로 코팅한 웰을 사용한 조건으로부터 수득된 결과를 나타내고, 도 33B 및 33D는 효능제 항-CD3 항체 및 VISTA-Ig의 2;1 비로 코팅한 웰을 사용한 조건으로부터 수득된 결과를 나타낸다. 도 33A 및 33B는 CFSE-low CD4+ T 세포의 퍼센트를 나타내고, 도 33C 및 33D는 CFSE-low CD8+ T 세포의 퍼센트를 나타낸다.

**도 34A 및 34B.** LPS-자극된 THP-1 세포에 의한 IL-6의 생산을 촉진하는 항-VISTA 항체의 능력의 분석 결과를 나타내는 바아 차트. 도 34A는 4M2-C12를 사용하여 수득된 결과를 나타내고, 도 34B는 VSTB112를 사용하여 수득된 결과를 나타낸다.

**도 35.** 투여 2시간 전, 및 투여 후 0.5시간, 6시간, 24 hr 및 96시간 째에 항-VISTA 항체 4M2-C12를 투여한 마우스로부터 수득된 혈액 샘플 속에서 검출된 IL-6의 수준을 나타내는 바아 차트.

**도 36A 및 36B.** 결장 암종의 세포주 유래된 마우스 모델에서 항-cancer activity *in vivo* of 항-VISTA 항체 4M2-C12 mIgG2a (V4), 항-PD-1 항체 (PD1) 또는 4M2-C12 mIgG2a 및 항-PD-1 항체를 사용한 조합 치료의 생체 내 항-암 활성의 분석 결과를 나타내는 그래프. **36A**는 상이한 처리 그룹에 대한 결과를 나타내고, **36B**는 비히클 대조군 및 4M2-C12 mIgG2a + 항-PD-1 처리 그룹에서 개개 마우스에 대해 수득된 데이타를 나타낸다.

**도 37.** PBS(비히클), 항-VISTA 항체 4M2-C12 mIgG2a (V4), 항-PD-1 항체 (항-PD1) 또는 4M2-C12 mIgG2a 및 항-PD-1 항체를 사용한 조합 치료(Combo)로 처리한 마우스로부터 수득된, 결장 암종의 세포주 유래된 마우스 모델의 22일째 종양의 g-MDSC인 종양-침윤 CD45+ 세포의 퍼센트를 나타내는 바아 차트.

**도 38A 내지 38E.** PBS (비히클), 항-VISTA 항체 4M2-C12 mIgG2a (V4), 항-PD-1 항체 (PD1) 또는 4M2-C12 mIgG2a 및 항-PD-1 항체(V4+PD1)를 사용한 조합 치료로 처리한 마우스로부터 수득된, 결장 암종의 세포주 유래된 마우스 모델의 18일째에 수득된 혈청 내 (**38A**) IFNγ, (**38B**) IL-23, (**38C**) IL-10, (**38D**) IL-4, 및 (**38E**) IL-5의 수준을 나타내는 바아 차트.

**도 39.** PBS (비히클), 항-VISTA 항체 4M2-C12 mIgG2a (V4), 항-PD-L1 항체(PDL1) 또는 4M2-C12 mIgG2a 및 항-PD-1 항체(V4 + PDL1)을 사용한 조합 치료로 처리한 마우스로부터 수득된, 결장 암종의 세포주 유래된 마우스 모델의 21일째 종양에서 Arg1 RNA 발현의 수준을 나타내는 바아 차트.

**도 40A 및 40B.** 흑색종의 세포주 유래된 마우스 모델에서, 항-VISTA 항체 4M2-C12 mIgG2a (V4), 항-PD-1 항체 (PD1) 또는 4M2-C12 mIgG2a 및 항-PD-1 항체를 사용한 조합 치료의 생체 내 항-암 활성의 분석 결과를 나타내는

그래프. **40A**는 상이한 처리 그룹에 대한 데이타를 나타내고, **40B**는 비히클 대조군 및 4M2-C12 mIgG2a + 항-PD-1 처리 그룹에서 개게 마우스에 대해 수득된 결과를 나타낸다.

**도 41.** PBS(비히클), 항-VISTA 항체 4M2-C12 mIgG2a(V4), 항-PD-1 항체(항-PD1) 또는 4M2-C12 mIgG2a 및 항-PD-1 항체와의 조합 치료(Combo)로 처리한 마우스로부터 수득한, 흑색종의 세포주 유래된 마우스 모델의 18일째 종양의 g-MDSC인 종양-침윤 CD45+ 세포의 퍼센트를 나타내는 바아 차트.

**도 42.** T 세포 백혈병/림프종의 세포 유래된 마우스 모델에서 항-VISTA 항체 4M2-C12 mIgG2a(V4), 항-PD-1 항체(항-PD1) 또는 4M2-C12 mIgG2a 및 항-PD-1 항체와의 조합 치료(V4 + 항-PD1)의 생체 내 항-암 활성의 분석 결과를 나타내는 그래프.

**도 43.** PBS(비히클), 항-VISTA 항체 4M2-C12 mIgG2a(V4), 항-PD-1 항체(항-PD1) 또는 4M2-C12 mIgG2a 및 항-PD-1 항체와의 조합 치료(Combo)로 처리한 마우스로부터 수득한, T 세포 백혈병/림프종의 세포 유래된 마우스 모델의 16일째 종양의 g-MDSC인 종양-침윤 CD45+ 세포의 퍼센트를 나타내는 바아 차트.

**도 44.** PBS(비히클), 항-VISTA 항체 4M2-C12 mIgG2a(V4), 항-PD-L1 항체(항-PDL1) 또는 4M2-C12 mIgG2a 및 항-PD-1 항체와의 조합 치료(V4 + 항-PDL1)를 사용한 결장 암종의 세포 유래된 마우스 모델의 치료 과정 동안 마우스의 중량을 나타내는 그래프.

**도 45A 내지 45D.** 생물층 간섭계에 의해 측정된 것으로서, 사람 VISTA(45A) 마우스 VISTA **(45B)** 및 사람 PD-L1**(45C)**에 대한 상이한 항-VISTA 항체의 결합의 분석 결과를 나타내는 센소그램 및 표. **45D**는 의 센소그램으로부터 계산된 동역학 및 열역학 상수를 요약한다.

**표 46A 및 46B.** 생물층 간섭계에 의해 측정된 것으로서, 마우스 IVSTA에 대한 상이한 항-VISTA 항체의 결합의 분석 결과를 나타내는 센소그램 및 표. **45B**는 **46A**의 센소그램으로부터 계산된 동역학 및 열역학 상수를 요약한다.

**도 47A 내지 47C.** 생물층 간섭계에 의해 측정된 것으로서, 사람 VISTA(**47A**) 및 마우스 VISTA(**47B**)에 대한 상이한 항-VISTA 항체의 결합의 분석 결과를 나타내는 센소그램 및 표. **47C**는 **47A** 및 **47B**의 센소그램으로부터 계산된 동역학 및 열역학 상수를 요약한다.

**도 48A 및 48B.** 생물층 간섭계에 의해 측정된 것으로서, 사람 VISTA 및 마우스 VISTA에 대한 상이한 항-VISTA 항체의 결합의 분석 결과를 나타내는 센소그램 및 표. **48B**는 48A의 센소그램으로부터 계산된 동역학 및 열역학 상수를 요약한다.

**도 49A 내지 49C.** ELISA에 의해 측정된 것으로서, 사람 VISTA(**49A**) 또는 마우스 VISTA(**49B**)에 대한 상이한 항체의 결합의 분석 결과를 나타내는 농도-반응 그래프 및 표. **49C**는 나타낸 단백질에 대한 상이한 항체의 결합에 대한 EC50 값(nM)을 나타낸다.

**도 50A 내지 50C.** ELISA에 의해 측정된 것으로서, 사람 VISTA(**50A**) 및 마우스 VISTA(**50B**)에 대한 상이한 항체의 결합의 분석 결과를 나타내는 농도-반응 그래프 및 표. **50C**는 나타낸 단백질에 대한 상이한 항체의 결합에 대한 EC50 값(nM)을 나타낸다.

**도 51A 내지 51C.** ELISA에 의해 측정된 것으로서, 사람 VISTA(**51A**) 및 마우스 VISTA(**51B**)에 대한 상이한 항체의 결합의 분석 결과를 나타내는 농도-반응 그래프 및 표. **51C**는 나타낸 단백질에 대한 상이한 항체의 결합에 대한 EC50 값(nM)을 나타낸다.

**도 52A 내지 52J.** 차등 주사 형광측정법 분석(Differential Scanning Fluorimetry analysis)에 의한 상이한 항-VISTA 항체의 안정성의 분석 결과를 나타내는 용융 그래프 및 표. **52A** 내지 **52I**는 시험 항체 제제 및 단백질 대조군이 없는(no protein control; NPC) 제제 각 3개에 대해 수득된 미가공 데이타의 제1 유도체를 나타낸다. **52J**는 **52A 내지 52I**의 결과를 요약한다.

**도 53** 안전성 및 면역원성에 대한 상이한 항-VISTA 항체의 인 실리코(*in silico*) 분석의 결과를 요약하는 표.

**도 54.** 항-VISTA 항체 4M2-C12에 의한 VISTA와 VSIG-3 사이의 결합의 억제의 분석 결과를 나타내는 그래프.

**도 55.** 항-VISTA 항체 클론 4M2-C12(V4)에 의한 VISTA와 PSGL-1 사이의 결합의 억제의 분석 결과를 나타내는 바아 차트.

**도 56A 내지 56G.** ELISA에 의해 측정된 것으로서, 사람 VISTA, PD-L1, B7H3, B7H4, B7H6, B7H7, PD-1 및 CTLA-

4에 대한 (56A) V4, (56B) V4-C24, (56C) V4-C26, (56D) V4-C27, (56E) V4-C28, (56F) V4-C30 및 (56G) V4-C31의 결합의 분석 결과를 나타내는 농도-반응 그래프.

**도 57A 내지 57I.** ELISA에 의해 측정된 것으로서, 사람 VISTA, 마우스 VISTA, 래트 VISTA 및 cyno VISTA에 대한 (57A) V4, (57B) V4-C24, (57C) V4-C26, (57D) V4-C27, (57E) V4-C28, (57F) V4-C30 (57G) V4-C31 및 (57H) 동형-일치된 대조군 항체의 결합의 분석 결과를 나타내는 농도-반응 그래프. 57I는 나타낸 단백질에 대한 상이한 항체의 결합에 대한 EC50 값(M)을 나타낸다.

**도 58A 내지 58C.** 유동 세포분석법에 의해 측정된 것으로서 상이한 항-VISTA 항체 또는 동형 대조군 항체에 의한 세포의 염색을 나타내는 히스토그램. 58A는 야생형, 형질감염되지 않은 HEK293-6E 세포에 대한 항체의 결합을 나타낸다. 58B는 사람 VISTA 단백질을 과발현하는 HEK293-6E 세포에 대한 항체의 결합을 나타낸다. 58C는 마우스 VISTA 단백질을 과발현하는 HEK293-6E 세포에 대한 항체의 결합을 나타낸다. 1 = 항체 없음(염색되지 않음), 2 = 사람 IgG1 동형 대조군 항체, 3 = VSTB112 IgG1, 4 = 4M2-C12 IgG1, 5 = V4-C24 IgG1, 6 = V4-C26 IgG1, 7 = V4-C27 IgG1, 8 = V4-C28 IgG1, 9 = V4-C30 IgG1, 및 10 = V4-C31 IgG1.

**도 59A 및 59B.** 항-VISTA 항체를 사용한 사람 조직의 면역조직화학적 염색을 나타내는 영상. 나타낸 배율에서, 59A는 4M2-C12 mIgG2a에 의한 정상의 사람 비장 조직의 염색을 나타내고, 59B는 4M2-C12 mIgG2a에 의한 정상의 사람 조직의 염색을 나타낸다.

**도 60A 내지 60D.** VISTA-발현 세포에 의한 억제로부터 활성화된 T 세포를 방출하는 항-VISTA 항체 4M2-C12-hIgG1(V4) 또는 VSTB112의 능력의 분석 결과를 나타내는 히스토그램 및 바아 차트. 60A 및 60B는 5일 동안, VISTA-발현 세포 및 나타낸 양의 항-VISTA 항체의 존재하에서 T 세포 증식의 CFSE 희석 분석의 결과를 나타낸다. 60C 및 60D는 5일 후 세포 배양 상층액에서 검출된 IFNγ(60C) 및 TNFa(60D)의 농도를 나타낸다.

**도 61A 내지 61C.** LPS-자극된 THP-1 세포에 의한 사이토킨의 생산을 촉진하는 항-VISTA 항체 4M2-C12-hIgG1(V4) 또는 VSTB112의 능력의 분석 결과를 나타내는 바아 차트. 61A는 세포 배양 상층액 속에서 검출된 IL-6의 농도를 나타내고, 61B는 나타낸 양의 항-VISTA 항체의 존재하에서 24시간 동안 세포의 세포 배양 상층액에서 검출된 TNFa의 농도를 나타낸다. 61C는 THP1 세포가 VISTA-발현 세포임을 나타내고; VISTA를 발현하기 위해 측정된 배양물 속의 세포의 농도가 나타나 있다. 1 = 염색되지 않음, 2 = 동형-일치된 대조군 항체로 염색된 세포, 3 = 20 μg의 V4로 염색된 세포, 4 = 40 μg의 V4로 염색된 세포, 및 5 = 20 μg의 VSTB112로 염색된 세포.

**도 62.** LPS-자극된 THP-1 세포에 의한 IL-6의 생산을 촉진하는 항-VISTA 항체 4M2-C12-hIgG1 또는 4M2-C12-hIgG4의 능력의 분석 결과를 나타내는 바아 차트. 세포 배양 상층액 속에서 검출된 IL-6의 농도가 나타나 있다.

**도 63A 내지 63D.** 항체 혈청의 ELISA 분석에 의한 항-VISTA 항체 4M2-C12-hIgG1 및 4M2-C12-hIgG4의 약동학적 분석의 결과를 나타내는 그래프 및 표. 결과는 다음 (63A) 10 mg/kg, (63B) 25 mg/kg, (63C) 100 mg/kg, 또는 (63D) 250 mg/kg의 항체의 투여를 나타낸다.

**도 64A 내지 64C.** 50 mg/kg 4M2-C12-hIgG1 또는 동 용적의 PBS의 투여 후 96시간 째에 BALB/C 마우스 내에서 대표적인 혈액학적 프로파일을 나타내는 표. 64A는 적혈 세포 구획의 분석 결과를 나타내고, 64B는 혈액 세포 구획의 분석 결과를 나타내고, 64C는 간 및 신장 기능의 상관관계의 분석 결과를 나타낸다. RBC = 적혈 세포, MVC = 평균 미립자 용적(mean corpuscular volume), MCH = 평균 미립자 헤모글로빈, MCHC = 평균 미립자 헤모글로빈 농도, WBC = 적혈 세포, ALT = 알라닌 아미노트랜스퍼라제, ALP = 알칼린 포스파타제, CREA = 크레아티닌, 및 BUN = 혈액 우레아 질소.

**도 65A 내지 65C.** 250 mg/kg 4M2-C12-hIgG1, 250 mg/kg 4M2-C12-hIgG4 또는 동 용적의 PBS의 투여 후 SD 래트의 대표적인 혈액학적 프로파일을 나타내는 표. 65A는 적혈 세포 구획의 분석 결과를 나타내고, 65B는 백혈 세포 구획의 분석 결과를 나타내고, 65C는 간, 신장 및 췌장 기능의 분석 결과, 및 전해질의 수준을 나타낸다. RBC = 적혈 세포, MVC = 평균 미립자 용적, MCH = 평균 미립자 헤모글로빈, MCHC = 평균 미립자 헤모글로빈 농도, WBC = 백혈 세포, ALT = 알라닌 아미노트랜스퍼라제, ALP = 알칼린 포스파타제, CREA = 크레아티닌, BUN = 혈액 우레아 질소, GLU = 글루카곤, AMY = 아밀라제, NA = 나트륨, K = 칼륨, P = 인 및 CA = 칼슘.

**도 66.** 생물 층 간섭계에 의해 측저오딘 것으로서 사람 VISTA 및 마우스 VISTA에 대한 항-VISTA 항체 V4-C26, 13F3 및 VSTB112의 배경을 감한 결합 신호(background-subtracted binding signal)를 나타내는 센소그램.

**도 67A 및 67B.** 결장 암종의 CT26 세포-유래된 마우스 모델이 종양 용적 및 생존에서 V4-C26.hIgG4의 투여 효과

를 나타내는 그래프. (**67A**)는 시간에 걸친 종양 용적을 나타내고, (**67B**)는 항-VISTA 항체 V4-C26 hIgG4 또는 비히클 대조군로 투여한 마우스에 대한 시간에 걸친 생존 퍼센트를 나타낸다.

**도 68A 내지 68H.** 건강한 조직 및 특정 암에서 세포에 의한 VISTA 발현, 및 특정 암에서 VSIG3 발현을 나타내는 산포도(scatterplot) 및 영상. **(68A)** 68,000개의 건강한 PBMC를 포함하는 10X 게놈 데이타의 RNA 단일-세포 분석에 의한 면역 세포 군집 확인. **(68B, 68C)** 상이한 세포 군집에서 VISTA 발현에 대한 단일-세포 RNA-seq 데이타의 UMAP 및 요약 플롯, 여기서 cDC는 본래의(classical) 수지 세포를 지칭하고, pDC는 형질세포형 수지 세포(Plasmacytoid Dendritic Cell)를 지칭하고 HSPC는 조혈 줄기 및 전구 세포를 지칭한다. **(68D)** 4M2-C12-mIgG2a로 0.02 mg/ml에서 염색한 건강한 비장, 골수, 유방 및 폐 TMA(n=99)에 대한 대표적인 면역조직화학적 염색; 배율, 200X. **(68E)** 4M2-C12-mIgG2a로 0.02 mg/ml에서 염색한 삼중 음성 유방 암(TNBC; n=126) 및 비-소세포 폐암(NSCLC; n=140)에서 VISTA에 대한 대표적인 염색, 배율, 200X, 및 **(68F)** VISTA에 대해 음성(0), 저(1), 중간(2) 또는 고(3) 염색 강도를 지닌 TNBC, NSCLC, 간-세포 암종(hepato-cellular carcinoma; HCC) 및 중피종 환자의 %. **(68G)** 항-VSIG3 항체로 0.003 mg/ml에서 염색한 TNBC(n=126) 및 NSCLC(n=140)에서 VSIG3에 대한 대표적인 염색; 비율, 200X, 및 **(68H)** VSIG3에 대해 음성(0), 저(1), 중간(2) 또는 고(3) 염색 강도를 지닌 TNBC, NSCLC, HCC 및 중피종 환자의 %.

**도 69A 및 69B.** ELISA에 의해 평가된 것으로서 **(69A)** FcɣRIII 및 **(69B)** C1q 단백질에 대한 V4-C26 hIgG4(HMBD-002)의 결합 능력을 나타내는 그래프. 나타낸 데이타는 n=3 측정의 평균이고 오차 바아는 SEM이다.

**도 70A 내지 70D.** V4-C26 hIgG4의 결합 특이성을 나타내는 그래프. **(70A)** ELISA에 의해 측정된 것으로서, 나타낸 바와 같은 사람 B7 계열 항원, PD-1 및 CTLA-4에 대한 V4-C26 hIgG4의 결합(나타낸 데이타는 평균 n=2 측정이고 오차 바아는 SEM이다). **(70B)** ELISA에 의해 측정된 것으로서, 사람, 비-사람 영장류(NHP), 래트 또는 마우스 VISTA 오르솔로그에 대한 V4-C26 hIgG4의 결합(나타낸 데이타는 n=3 측정의 평균이고 오차 바아는 SEM이다). **(70C)** 유동 세포분석법에 의해 측정된 것으로서, 사람, 비-사람 영장류(NHP), 래트 또는 마우스 VISTA 오르솔로그를 과발현하는 HEK293T 세포에 대한 V4-C26 hIgG4의 결합(나타낸 데이타는 n=3 측정의 평균이고 오차 바아는 SEM이다). (70**D**) 사람, NHP, 래트 또는 마우스 PBMC로부터 단리된 V4-CD11b+ 골수 세포에 대한 C26 hIgG4의 결합(나타낸 데이타는 n=3 측정의 평균이고 오차 바아는 SEM이다).

**도 71A 및 71B**. V4-C26 hIgG4에 의한 골수 세포에서 VISTA 차단(blockagd)을 나타내는 그래프. **(71A)** ELISA에 의해 측정된 것으로서, V4-C26 hIgG4(HMBD-002), VSTB112 또는 IgG4 동형 대조군의 존재 또는 부재하에서 96시간 후 자가 PBMC와 함께 공-배양된 MDSC로부터 항-CD3 항체-유도된 IFN-ɣ 분비(나타낸 데이타는 n=6 측정의 평균이고 오차 바아는 SEM이고 P-값은 2-원 ANOVA(터키 다중 비교 시험(Tukey's multiple comparison test))으로 수득되었다, ****p <0.0001). **(71B)** C4a로  코팅하고 CellTiter-Glo를 사용하여 측정한 하단 챔버에 대한 호중구 이주의 억제(나타낸 데이타는 n=3 측정의 평균이고 오차 바아는 SEM이다).

**도 72A 내지 72D.** 면역 활성화에서 V4-C26 hIgG4에 의한 VISTA 차단의 효과의 분석. **(72A)** 동종 혼합된 림프구 반응의 상층액으로부터, Luminex에 의해 96시간째에 측정한 나타낸 사이토킨의 수준. V4-C26 hIgG4 및 항 PD-1 항체, 펨브롤리주맙(Pembro로 주석표시됨)의 농도는 μg/ml로 나타낸다. 데이타는 동형 대조군에 대해 표준화하였다. 나타낸 데이타는 n=10의 평균이고 오차 바아는 SEM이다. P-값은 일-원 ANOVA(터키 다중 비교 시험)으로 수득하였다, *p < 0.05, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. **(72B)** MLR 샘플의 대량의 RNA-서열연북의 Speed2 경로 분석(n=10). 데이타는 동형 대조군에 대해 표준화하였고, 평균 + SD로 나타내었고 p-조절된 값은 대량의 RNA seq 분석으로부터 수득하였다, **p<0.01, ***p < 0.001. (**72C**) TLR, TNFα, JAK-STAT 및 IL-17 신호전달 경로와 관련된 유전자 내 전사체 수준의 농축을 나타내는, V4-C26 hIgG4 또는 IgG4 동형 대조군의 존재하에서 96시간 동안 배양한 PBMC로부터 대량의 RNA-seq 데이타의 KEGG 경로 분석의 결과. (**72D**) V4-C26 hIgG4 (HMBD-002), IgG4 동형 대조군 또는 펨브롤리주맙의 존재하에서 수행된 반응에 대한, MLR 샘플의 대량의 RNA-서열분석으로부터 제I형 및 제II형 인터페론 유전자와 관련된 유전자 내 전사체 수준의 농축(n=10; 데이타는 평균 + SD로서 나타내고 p-조절된 값은 *p<0.05, ***p<0.001로서 대량의 RNA seq 서열분석으로부터 수득하였다).

**도 73A 내지 73F.** 세포-유래된 이종이식체(CDX) 모델에서 V4-C26 hIgG4 항-종양 반응을 나타내는 그래프 및 바아 차트. 마우스를 무작위처리하고 나타낸 시점에서 시험 물품의 농도로 투여하였다. 종양 용적은 주당 2회 측정하였다. 각각의 데이타 시점은 n=10마리의 마우스로부터의 평균 종양 용적 +/- SEM을 나타낸다. **(73A)** 암컷 BALB/c 마우스에게 CT26 세포를 피하 이식한 동계 CDX 모델에서의 결과. **(73B)** 암컷 BALB/c 마우스에게 4T-1 세포를 과발현하는 VISTA로 정위적으로(orthotopically) 이식한 동계 CDX 모델에서의 결과. **(73C)** cd34-이식된 사람화된 암컷 HiMice에게 HCT15 세포를 피하 이식한 CDX 모델에서의 결과. **(73D)** CD34-이식된 사람화된 암컷

HiMice에게 A549 세포를 피하 이식한 CDX 모델에서의 결과. **(73E)** CT26 CDX 모델에서 종양 미세환경 내 종양-침윤 백혈구(TIL) 집단을 나타내는, 유동 세포분석법에 의한 세포 프로파일링의 결과(나타낸 데이타는 n=3의 평균이고 오차 바아는 SEM이다). **(73F)** 분해를 측정하기 위한 TIL(CD45+)과 CT26 세포의 시험관 외(ex vivo) 배양물, 또는 ELISA를 사용하여 IFN-γ 분비를 통한 T 세포 활성화를 측정하기 위한 종양-농축된 T 세포(CD4+/CD8+)와 CT26 세포의 배양물에 의해 측정된 CT26 항원 리콜 검정(CT26 recall assay)의 결과(나타낸 데이타는 n=3의 평균이고 오차 바아는 SEM이다. 모든 p-값는 비쌍식 t-시험으로 수득하였다, *p < 0.05, **p < 0.01; 각각의 데이타 점은 마우스를 나타낸다).

**도 74A 내지 74G**. V4-C26 hIgG4의 약동학 및 독성에 관한 그래프. (**74A** 내지 **74C**) 종양을 지닌 및 종양을 지니지 않은 (**74A**) Balb/c 마우스, (**74B**) 스프라그-아울리 래트(Sprague Dawley rat), 및 (**74C**) 시노몰구스 원숭이에서 V4-C26 hIgG4의 혈청 농도. V4-C26 hIgG4는 나타낸 농도에서 단일 용량으로, 복강내 주사를 통해 투여하였다. (**74D** 내지 **74G**) 나타낸 양의 V4-C26 hIgG4, IgG4 동형 대조군, (**74D** 및 **74E**) 스타필로코쿠스 장독소(staphylococcal enterotoxin) B(SEB) 또는 (**74F** 및 **74G**) 항-CD3 항체로 24시간 동안 자극 후 (**74D, 74F**) IL-2 및 (**74E, 74G**) IL-6의 수준을 나타내는, (**74D** 및 **74E**) 사람 전혈, 또는 (**74F** 및 **74G**) 건강한 공여체(n=10)로부터 수득한 단리된 PBMC를 사용하여 수행한 생체 외 사이토킨 방출 검정으로부터의 결과.

**도 75A 내지 75E.** Sensorgrams and calculated  for binding of V4-C26 hIgG4 to **(75A)** 사람 VISTA, **(75B)** 비-사람 영장류 (NHP) VISTA, (75C) 래트 VISTA, 및 **(75D)** 마우스 VISTA의 결합에 대한 V4-C26 hIgG4의 결합에 대한 센소그램 및 계산된 $K_{on}$, $K_{off}$ 및 $K_D$. **(75E)** ELISA에 의해 측정된 것으로서, pH 범위 5.5 내지 7.5에 걸쳐 사람 VISTA에 대한 V4-C26 hIgG4를 나타내는 그래프 및 표(나타낸 데이타는 n=3 측정의 평균이고 오차 바아는 SEM이다).

**도 76A 내지 76H.** 상이한 제형 F1 내지 F10에서 HMBD-002-V4C26에 대한 고온 안전성 연구로부터의 결과를 나타내는 그래프. **(76A)** A280 UV 광 흡수성에 의한 단백질 함량, **(76B)** pH, **(76C)** HPLC-SEC에 의해 측정된 응집, **(76D)** 제형 F1에 대한 HPLC-SEC의 대표적인 결과, **(76E)** HPLC-CEX에 의해 측정된 전하 차이(charge variance), **(76F)** 제형 f1에 대한 HPLC-CEX의 대표적인 결과, **(76G)** ELISA에 의해 측정된 항원 결합, **(76H)** 삼투압.

**도 77.** 상이한 제형 F1 내지 F10에서 HMBD-002-V4C26에 대한 고 농도 안정성 연구의 결과를 나타내는 그래프. 응집은 HPLC-SEC에 의해 측정하였다.

**도 78.** HPLC-SEC에 의해 측정된, 동결-해동 스트레스 연구(Freeze-Thaw Stress Study) 후 HMBD-002 제형의 응집을 나타내는 그래프.

**도 79.** 제형 F1, F2, 및 F5에 대한 pH 및 총 전하 차이 변화의 상관관계를 나타내는 그래프.

**도 80.** 뮤린 동계 종양 모델 CT26 및 B16/BL6에서 항체를 V4-C26 hIgG4 단독치료요법 및 항-mPD-1(RMP1-14) 항체를 사용한 조합 치료요법의 생체 내 효능을 나타내는 그래프. 마우스는 500 μg(~25 mg/kg)의 HMBD-002 단독으로 또는  200 μg(~10 mg/kg)의 RMP1-14와 함께 처리하였다.

**도 81.** 뮤린 종양 모델 CT26에서 V4-C26 hIgG4 단독치료요법의 상이한 용량의 생체 내 효능을 나타내는 그래프.

**도 82A 내지 82C. (82A)** 종양을 지닌 및 종양을 지니지 않은 마우스, **(82B)** 수컷 및 암컷 스프라그-다울리 래트, **(82C)** 수컷 및 암컷 시노몰구스 원숭이에서 V4-C26 hIgG4 단독치료요법의 상이한 용량의 약동학적 프로파일을 나타내는 그래프.

**도 83A 및 83B.** 세포 유래된 이종이식체(CDX) 모델에서 HMBD-002(V4-C26 hIgG4), 항-PD-1 항체(aPD1), 또는 HMBD-002 및 항-PD-1 항체의 조합 치료의 항-종양 반응을 나타내는 그래프. **(83A)** CD34-이식된 사람화된 HiMice에게 A549 세포를 피하 이식한 CDX 모델에서의 결과. **(83B)** 암컷 BALB/c 마우스에게 CT26 세포를 피하 이식한 CDX 모델에서의 결과.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[1722] **실시예**

[1723] 다음의 실시예에서, 본 발명자는 VISTA 분자에서 목적한 영역에 대해 표적화된 신규한 항-VISTA 항체 클론의 생성, 및 이러한 항원-결합 분자의 생리학적 및 기능적 특성 및 치료학적 평가를 설명한다.

[1724] **실시예 1: VISTA 표적 설계 및 항-HER3 항체 하이브리도마 생산**

[1725] 본 발명자는 VISTA-결합 모노클로날 항체를 생성시키기 위해 사람 VISTA(서열 번호: 3)의 세포외 영역내 영역을 선택하였다.

[1726] VISTA의 FG 루프 영역(loop region)은 VISTA의 억제 기능에 중요한 것으로 제안되었으므로 이 FG 루프 영역을 표적화하였다(Vigdorovich et al., Structure. 2013;21(5):707-717). VISTA의 전면을 접한(front-facing) β-쉬이트 영역(sheet region)을 또한 표적화하였다.

[1727] 1.1 하이브리도마 생산

[1728] 대략 6주령의 암컷 BALB/c 마우스를 InVivos(싱가폴)로부터 수득하였다. 동물을 구체적인 병원체-유리된 조건하에 가두고 동물 실험 윤리 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)(IACUC) 가이드라인에 부합하도록 처리하였다.

[1729] 하이브리도마 생산을 위해, 마우스를 항원성 펩타이드, 재조합 표적 단백질 또는 표적 단백질을 발현하는 세포의 등록 혼합물로 면역화하였다.

[1730] 융합을 위해 비장을 수거(harvesting)하기 전에, 마우스를 연속 3일 동안 항원 혼합물로 증강(boost)시켰다. 최종 증강 후 24시간 째에 총 비장세포를 단리하고 골수종 세포주 P3X63.Ag8.653(ATCC, USA)와 함께, PEG로 ClonaCell-HY 하이브리도마 클로닝 키트(Hybridoma Cloning Kit)를 사용하여 제조업자의 설명서(Stemcell Technologies, 캐나다)에 따라 융합시켰다.

[1731] 융합된 세포를 ClonaCell-HY 배지 C(Stemcell Technologies, 캐나다) 속에서 37℃에서 5% $CO_2$ 항온처리기 속에서 배양하였다. 다음 날, 융합된 세포를 원심분리하고 10 ml의 ClonaCell-HY 배지 C 속에 재현탁시킨 다음, 하이브리도마 선택 및 1 단계로의 클로닝을 조합하는, 90 ml의 HAT 구성성분을 함유하는 반고체 메틸셀룰로스-기반 ClonaCell-HY 배지 D(StemCell Technologies, 캐나다)와 온화하게 혼합하였다.

[1732] 이후에 융합된 세포를 96 웰 플레이트 내로 플레이팅하고 37℃에서 5% $CO_2$ 항온처리기 속에서 성장하도록 하였다. 7 내지 10일 후, 단일 하이브리도마 클론을 단리하고 항체 생산 하이브리도마를 상층액을 효소-연결된 면역흡착성 검정(ELISA) 및 형광성-활성화된 세포 분류(FAC)에 의해 상층액을 스크리닝함으로써 선택하였다.

[1733] 1.2 항체 가변 영역 증폭 및 서열분석

[1734] 총 RNA를 하이브리도마 세포로부터 TRIzol 시약(Life Technologies, Inc., 미국)을 사용하여 제조업자의 프로토콜을 사용하여 추출하였다. 이중-가닥 cDNA를 SMARTer RACE 5'/3' 키트(Clontech™, 미국)를 사용하여 제조업자의 설명서에 따라 합성하였다. 요약하면, 1 μg의 총 RNA를 사용하여 완전한-길이의 cDNA를 5'-RACE CDS 프라이머(키트 내에 제공됨)를 사용하여 생성시킨 다음, 5'어댑터(SMARTer II A 프라이머)를 제조업자의 설명서에 따라 각각의 cDNA 내에 포함시켰다. cDNA 합성 반응물은 다음을 함유한다: 5X 제1-가닥 완충제, DTT(20 mM), dNTP 혼합물(10 mM), RNase 억제제(40 U/μl) 및 SMARTScribe 역 트랜스크립타제(100 U/μl).

[1735] 인종-준비된(race-ready) cDNA를 SeqAmp DNA 폴리머라제(Clontech™, 미국)를 사용하여 증폭시켰다. 증폭 반응물은 SeqAmp DNA 폴리머라제, 2X Seq AMP 완충제, 어댑터 서열에 대해 상보성인, 5' SMARTer Race 키트내에 제공된 5' 공통의 프라이머, 및 각각의 중쇄 또는 경쇄 불변 영역 프라이머에 어닐링하는 3' 프라이머를 사용하여 증폭시켰다. 5' 불변 영역을 Krebber et al. J. Immunol. Methods 1997; 201: 35-55, Wang et al. Journal of Immunological Methods 2000, 233; 167-177 또는 Tiller et al. Journal of Immunological Methods 2009; 350:183-193에 의해 이미 보고된 프라이머 혼합물을 기반으로 설계하였다. 다음의 열 프로토콜을 사용하였다: 94℃에서 1분 동안 예비-변성 주기; 94℃, 30초, 55℃, 30초 및 72℃, 45초의 35회 주기; 72℃에서 3분 동안 최종 연장.

[1736] 수득되는 대략 550 bp의 VH 및 VL PCR 생성물을 pJET1.2/blunt 벡터 내로 CloneJET PCR 클로닝 키트(Thermo Scientific, 미국)를 사용하여 클로닝하고 이를 사용하여 고 적격(competent) 이. 콜라이(*E.coli*) DH5α를 형질전환시켰다. 수득되는 형질전환체로부터, 플라스미드 DNA를 Miniprep 키트(Qiagene, 독일)를 사용하여 제조하고 서열분석하였다. DNA 서열분석을 AITbiotech가 수행하였다. 이러한 서열분석 데이타는 국제 IMGT(ImMunoGeneTics) 정보 시스템(LeFranc et al., Nucleic Acids Res. (2015) 43 (Database issue):D413-22)을 사용하여 분석함으로써 개개 CDR 및 골격 서열을 특성화하였다. VH 및 VL의 5' 말단에서 신호 펩타이드를 SignalP(v 4.1; Nielsen, in Kihara, D (ed): Protein Function Prediction (Methods in Molecular Biology

vol. 1611) 59-73, Springer 2017)로 확인하였다.

[1737] 이후에, 모노클로날 항-VISTA 항체 클론을 추가의 개발 및 특성화를 위해 수득하였다. 항체 클론 4M2-C12의 사람화된 버전(또한 본원에서 "V4"로서 지칭함)을 또한 표준 방법에 따라 항체의 CDR을 사람 항체 골격 영역을 포함하는 VH 및 VL 내로 클로닝함으로서 제조하였다.

| 항체 클론 | VH/VL 서열 | 항체를 상승시키는데 사용된 펩타이드 면역원 |
|---|---|---|
| 4M2-C12 (또한 본원에서 "V4"로서 지칭됨) | VH = 서열 번호:32 | 서열 번호:26 |
| | VL = 서열 번호:40 | |
| V4H1 | VH = 서열 번호:52 | |
| | VL = 서열 번호:57 | |
| V4H2 | VH = 서열 번호:62 | |
| | VL = 서열 번호:66 | |
| 4M2-B4 | VH = 서열 번호:48 | |
| | VL = 서열 번호:50 | |
| 4M2-C9 | VH = 서열 번호:87 | |
| | VL = 서열 번호:95 | |
| 4M2-D9 | VH = 서열 번호:106 | |
| | VL = 서열 번호:113 | |
| 4M2-D5 | VH = 서열 번호:143 | |
| | VL = 서열 번호:150 | |
| 4M2-A8 | VH = 서열 번호:157 | |
| | VL = 서열 번호:164 | |
| 2M1-B12 | VH = 서열 번호:71 | 서열 번호:27 |
| | VL = 서열 번호:79 | |
| 2M1-D2 | VH = 서열 번호:102 | |
| | VL = 서열 번호:104 | |
| 1M2-D2 | VH = 서열 번호:119 | 서열 번호:28 |
| | VL = 서열 번호:126 | |
| 13D5p | VH = 서열 번호:183 | |
| | VL = 서열 번호:188 | |
| 13D5-1 | VH = 서열 번호:194 | |
| | VL = 서열 번호:196 | |
| 13D5-13 | VH = 서열 번호:199 | |
| | VL = 서열 번호:202 | |
| 5M1-A11 | VH = 서열 번호:133 | 서열 번호:29 |
| | VL = 서열 번호:136 | |
| 9M2-C12 | VH = 서열 번호:168 | 서열 번호:30 |
| | VL = 서열 번호:176 | |

[1738]

[1739] **실시예 2: 항체 생산 및 정제**

[1740] 2.1 발현 벡터 내로 VH 및 VL의 클로닝:

[1741] 항-VISTA3 항체 클론의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 암호화하는 DNA 서열을 사람-마우스 키메라 항체의 작제를 위해 pmAbDZ_IgG1_CH 및 pmAbDZ_IgG1_CL(InvivoGen, 미국) 진핵세포 발현 벡터 내로 서브클로닝(subcloning)하였다.

[1742] 대안적으로, 항-VISTA 항체 클론의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 암호화하는 DNA 서열을 사람-마우스 키메라 항체의 작제를 위해 pFUSE-CHIg-hG1 및 pFUSE2ss-CLIg-hk(InvivoGen, 미국) 진핵세포 발현 벡터 내로 서브클로닝하였다. pFUSE-CHIg-hG1에 의해 암호화된 사람 IgG1 불변 영역은 사람 IgG1 불변 영역(IGHG1; UniProt:P01857-1, v1; 서열 번호: 210)과 관련하여 CH3 영역내에 치환 D356E, L358M(EU 번호매김에 따라 번호매김된 위치)를 포함한다. pFUSE2ss-CLIg-hk는 사람 IgG1 경쇄 카파 불변 영역(IGCK; UniProt: P01834-1, v2)을 암호화한다.

[1743] 신호 펩타이드와 함께 가변 영역을 클로닝 벡터로부터 SeqAmp 효소(Clontech™, 미국)를 사용하여 제조업자의 프로토콜에 따라서 증폭시켰다. VH 또는 VL 내 적절한 영역과의 15-20bp 오버랩 및 제한 부위로서 5' 말단에 6 bp를 갖는 전방 및 역방 프라이머를 사용하였다. DNA 삽입체 및 pFuse 벡터를 제조업자가 추천한 제한 효소로 분해하여 프레임쉬프트(frameshift)가 도입되지 않도록 하고(예컨대, VH의 경우 EcoRI 및 NheI, VL의 경우 AgeI 및 BsiWI) 이의 각각의 플라스미드 내로 T4 리가제 효소(Thermo Scientific, 미국)를 사용하여 연결시켰다. DNA 삽입체 대 벡터의 3:1 몰 비를 연결을 위해 사용하였다.

[1744] 2.2 포유동물 세포 내에서 항체의 발현

[1745] 항체를 1) Expi293 일시적인 발현 시스템 키트(Transient Expression System Kit)(Life Technologies, 미국), 또는 2) HEK293-6E 일시적인 발현 시스템(CNRC-NRC, 캐나다)을 사용하여 제조업자의 지시에 따라 발현시켰다.

[1746] 1) Expi293 일시적인 발현 시스템:

[1747] 세포주 유지:

[1748] HEK293F 세포(Expi293F)를 Life Technologies, Inc(미국)로부터 입수하였다. 세포를 50 IU/ml의 페니실린 및 50 μg/ml의 스트렙토마이신(Gibco, 미국)이 보충된 혈청이 없고, 단백질이 없는, 화학적으로 정의된 배지(Expi293 발현 배지, Thermo Fisher, 미국) 속에서 37℃에서 진탕 플랫폼(shaking platform)이 장착된 8% $CO_2$ 및 80% 습윤화된 항온처리기 속에서 배양하였다.

[1749] 형질감염:

[1750] Expi293F 세포를 발현 플라스미드로 ExpiFectamine 293 시약 키트(Gibco, 미국)를 사용하여 제조업자의 프로토콜에 따라 형질감염시켰다. 요약하면, 유지 상태의 세포를 배지 교환에 적용시켜 배양물을 회전시킴으로써 항생제를 제거하고, 세포 펠렛을 항생제가 들어있지 않은 신선한 배지 속에 형질감염하기 1일 전에 재-현탁시켰다. 형질감염 당일에, 2.5 x $10^6$/ml의 생존 세포를 각각의 형질감염을 위해 진탕기 플라스크 내에서 씨딩(seeding)하였다. DNA-ExpiFectamine 복합체를 혈청이 감소된 배지, Opti-MEM(Gibco, 미국) 속에서 25분 동안 실온에서 형성시킨 후, 세포에 가하였다. 인핸서(enhancer)를 형질감염된 세포에 형질감염 후 16 내지 18시간째에 가하였다. 동량의 배지를 형질감염 후 4일째에 형질감염제에 채워 세포 응집을 방지하였다. 형질감염체를 7일째에 원심분리로 4000 x *g*에서 15분 동안 원심분리하여 수거하고, 0.22 μm 멸균 여과기 단위를 통해 여과하였다.

[1751] 2) HEK293-6E 일시적인 발현 시스템

[1752] 세포주 유지:

[1753] HEK293-6E 세포를 캐나다 국립 연구 회의(National Research Council Canada)로부터 입수하였다. 세포를 0.1% 콜리포르(Kolliphor)-P188 및 4 mM L-글루타민(Gibco, 미국) 및 25 μg/ml의 G-418이 보충된 혈청이 없고, 단백질이 없는, 화학적으로 정의된 Freestyle F17 배지(Invitrogen, 미국) 속에서 37℃에서 5% $CO_2$ 및 80% 습윤화된 진탕 플랫폼이 장착된 항온처리기 속에서 배양하였다.

[1754] 형질감염:

[1755] HEK293-6E 세포를 PEIproTM(Polyplus, 미국)를 사용하여 제조업자의 프로토콜에 따라 발현 플라스미드로 형질감염시켰다. 요약하면, 유지 단계에서 세포를 배지 교환에 적용시켜 원심분리로 항생제를 제거하고, 세포 펠렛을 항생제가 들어있지 않은 신선한 배지 속에 형질감염하기 1일 전에 재-현탁시켰다. 형질감염 당일에, 1.5 내지 2 x $10^6$/ml의 생존 세포를 각각의 형질감염을 위해 진탕기 플라스크 내에서 씨딩하였다. DNA 및 PEIproTM을 1:1의 비로 혼합하여 복합체가 F17 배지 속에서 5분 동안 RT에서 형성되도록 한 후 세포에 가하였다. 0.5%(w/v)의 트립톤 N1을 형질감염체에 형질감염 24 내지 48시간째에 공급하였다. 형질감염체를 4000 x *g*에서 15분 동안 원심분리함으로써 6 및 7일째에 수거하고 상층액을 0.22 μm 멸균 여과기 단위를 통해 여과하였다.

[1756] 세포를 다음의 폴리펩타이드의 조합을 암호화하는 벡터(vector)로 형질감염시켰다:

| 항원 결합 분자 | 폴리펩타이드 | 항체 |
|---|---|---|
| [1] | 4M2-C12 VH-CH1-CH2-CH3 (서열 번호:212) + 4M2-C12 VL-Cκ (서열 번호:213) | 항-VISTA 클론 4M2-C12 IgG1 |
| [2] | 4M2-B4 VH-CH1-CH2-CH3 (서열 번호:214) + 4M2-B4 VL-Cκ (서열 번호:215) | 항-VISTA 클론 4M2-B4 IgG1 |
| [3] | V4H1 VH-CH1-CH2-CH3 (서열 번호:216) + V4H1 VL-Cκ (서열 번호:217) | 항-VISTA 클론 V4H1 IgG1 |
| [4] | V4H2 VH-CH1-CH2-CH3 (서열 번호:218) + V4H2 VL-Cκ (서열 번호:219) | 항-VISTA 클론 V4H2 IgG1 |
| [5] | 2M1-B12 VH-CH1-CH2-CH3 (서열 번호:220) + 2M1-B12 VL-Cκ (서열 번호:221) | 항-VISTA 클론 2M1-B12 IgG1 |
| [6] | 4M2-C9 VH-CH1-CH2-CH3 (서열 번호:222) + 4M2-C9 VL-Cκ (서열 번호:223) | 항-VISTA 클론 4M2-C9 IgG1 |
| [7] | 2M1-D2 VH-CH1-CH2-CH3 (서열 번호:224) + 2M1-D2 VL-Cκ (서열 번호:225) | 항-VISTA 클론 2M1-D2 IgG1 |
| [8] | 4M2-D9 VH-CH1-CH2-CH3 (서열 번호:226) + 4M2-D9 VL-Cκ (서열 번호:227) | 항-VISTA 클론 4M2-D9 IgG1 |
| [9] | 1M2-D2 VH-CH1-CH2-CH3 (서열 번호:228) + 1M2-D2 VL-Cκ (서열 번호:229) | 항-VISTA 클론 1M2-D2 IgG1 |

[1757]

| | | |
|---|---|---|
| [10] | 5M1-A11 VH-CH1-CH2-CH3 (서열 번호:230) + 5M1-A11 VL-Cκ (서열 번호:231) | 항-VISTA 클론 5M1-A11 IgG1 |
| [11] | 4M2-D5 VH-CH1-CH2-CH3 (서열 번호:232) + 4M2-D5 VL-Cκ (서열 번호:233) | 항-VISTA 클론 4M2-D5 IgG1 |
| [12] | 4M2-A8 VH-CH1-CH2-CH3 (서열 번호:234) + 4M2-A8 VL-Cκ (서열 번호:235) | 항-VISTA 클론 4M2-A8 IgG1 |
| [13] | 9M2-C12 VH-CH1-CH2-CH3 (서열 번호:236) + 9M2-C12 VL-Cκ (서열 번호:237) | 항-VISTA 클론 9M2-C12 IgG1 |
| [14] | 13D5p VH-CH1-CH2-CH3 (서열 번호:238) + 13D5p VL-Cκ (서열 번호:239) | 항-VISTA 클론 13D5p IgG1 |
| [15] | 13D5-1 VH-CH1-CH2-CH3 (서열 번호:240) + 13D5-1 VL-Cκ (서열 번호:241) | 항-VISTA 클론 13D5-1 IgG1 |
| [16] | 13D5-13 VH-CH1-CH2-CH3 (서열 번호:242) + 13D5-13 VL-Cκ (서열 번호:243) | 항-VISTA 클론 13D5-13 IgG1 |

[1758]

[1759] 2.3 항체 정제

[1760] 친화성 정제, 완충제 교환 및 저장:

[1761] 형질감염된 세포에 의해 배양 상층액 내로 분비된 항체를 액체 크로마토그래피 시스템 AKTA Start(GE Healthcare, 영국)을 사용하여 정제하였다. 구체적으로, 상층액을 HiTrap 단백질 G 컬럼(GE Healthcare, 영국) 상에 5 ml/min의 결합 속도로 로딩한 후, 컬럼을 10개 컬럼 용적의 세척 완충제(20 mM 인산나트륨, pH 7.0)로 세척하였다. 결합된 mAb를 용출 완충제(0.1 M 글리신, pH 2.7)로 용출시키고 용출액을 적절한 양의 중화 완충액(1 M 트리스, pH 9)을 함유하는 수집 튜브로 분획화하였다. 정제된 mAb를 함유하는 중화된 용출 완충제를 PBS로 30K MWCO 단백질 농축제(Thermo Fisher, 미국) 또는 3.5K MWCO 투석 카세트(Thermo Fisher, 미국)를 사용하여 분획화하였다. 모노클로날 항체를 0.22 μm 여과기에 통과시켜 멸균시키고, 분취하고 저장을 위해 -80℃에서 스냅-동결(snap-frozen)시켰다.

[1762] 2.4 항체-순도 분석

[1763] 크기 배제 크로마토그래피(SEC):

[1764] 항체 순도를 크기 배제 크로마토그래피(SEC)에 의해 Superdex 200 10/30 GL 컬럼(GE Healthcare, 영국)을 사용하여 PBS 이동 완충제(running buffer) 속에서, AKTA Explorer 액체 크로마토그래피 시스템(GE Healthcare, 영국) 상에서 분석하였다. 500 μl의 PBS pH 7.2 중 150 μg의 항체를 컬럼에 0.75 ml/min의 유동 속도에서 실온에서 주입하였다. 단백질을 이의 분자량에 따라 용출시켰다.

[1765] 항-VISTA 항체 클론 V4(실시예 2.2의 [1])에 대한 결과는 도 10에 나타낸다.

[1766] 나트륨-도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(sodium-Dodecyl Sulfate Polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE):

[1767] 항체 순도를 또한 SDS-PAGE로 환원 및 비-환원 조건 하에 표준 방법에 따라 분석하였다. 요약하면, 4% 내지 20% TGX 단백질 겔(Bio-Rad, 미국)을 사용하여 단백질을 Mini-Protean 전기영동 시스템(Bio-Rad, 미국)을 사용하여 용해하였다. 비-환원 조건의 경우, 단백질 샘플을 2x Laemmli 샘플 완충제(Bio-Rad, 미국)와 혼합함으로써 변성시키고 95℃에서 5 내지 10분 동안 비등시킨 후 겔에 로딩(loading)하였다. 환원 조건을 위해, 5%의 β-머캅토에탄올(βME), 또는 40 mM DTT(디티오트레이톨)을 함유하는 2x 샘플 완충제를 사용하였다. 전기영동을 150V의 일정 전압에서 1시간 동안 SDS 이동 완충제(25 mM 트리스, 192 mM 글리신, 1% SDS, pH 8.3) 속에서 수행하였다.

[1768] 웨스턴 블롯:

[1769] 단백질 샘플(30 μg)을 상술한 바와 같이 SDS-PAGE로 분획화하고 니트로셀룰로스 막으로 이전시켰다. 이후에, 막을 차단하고 항체로 밤새 4℃에서 면역블롯팅(immunoblotting)하였다. PBS-트윈(Tween) 속에서 3회 세척한 다음 막을 1시간 동안 실온에서 서양고추냉이 퍼옥시다제(HRP)-접합된 제2 항체와 함께 항온처리하였다. 결과는 화학발광성 Pierce ECL 기질 웨스턴 블롯 검출 시스템(Substrate Western blot detection system)(Thermo Scientific, 미국)을 통해 가시화하고 자동방사능사진촬영 필름(Kodak XAR 필름)에 노출시켰다.

[1770] 검출을 위해 사용된 1차 항체는 염소 항-마우스 IgG (H+L) 항체(LI-COR, 제품 번호 926-32210)이었다.

[1771] 항-VISTA 항체 클론 V4(실시예 2.2의 [1])의 결과는 도 11에 나타낸다. V4 는 용이하게 발현, 정제 및 고 농도에서 프로세싱되었다.

[1772] **실시예 3: 생리학적 특성**

[1773] 3.1 유동 세포분석법에 의한 세포 표면 항원-결합의 분석

[1774] 야생형 HEK293 세포(이는 고 수준의 VISTA를 발현하지 않는다) 및 사람 VISTA를 암호화하는 벡터로 형질감염된 HEK293 세포(즉, HEK 293 HER O/E 세포)를 20 μg/ml의 항-VIST 항체 또는 동형 대조군 항체와 함께 4℃에서 1시간 동안 항온처리하였다. 항-VISTA 항체 클론 VSTB112(예컨대, 제 WO 2015/097536호에 기술됨)을 양성 대조군으로서 분석에 포함시켰다.

[1775] 세포를 FACS 완충제(5mM EDTa 및 0.5% BSA가 들어있는 PBS)으로 3회 세척하고 FITC-접합된 항-FC 항체(Invitrogen, 미국) 속에 40분 동안 2 내지 8℃에서 재현탁시켰다. 세포를 다시 세척하고 200 μL의 FACS 유동 완충제(5mM EDTA가 들어있는 PBS) 속에서 유동 세포분석적 분석을 위해 MACSQuant 10(Miltenyi Biotec, 독일)

을 사용하여 재현탁시켰다. 획득 후, 모든 미가공 데이타(raw data)를 Flowlogic 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 세포를 전방 및 측방 분산기 프로파일을 사용하여 게이팅(gating)하고 형광성 강도의 중간(Median of Fluorescence Intensity; MFI) 값을 천연 및 과발현 세포 집단에 대해 측정하였다.

[1776] 결과는 도 1A 내지 1D, 도 2 및 도 24에 나타낸다. 항-VISTA 항체는 사람 VISTA에 고 특이성으로 결합하는 것으로 밝혀졌다.

[1777] 별개의 실험에서 13D5p(실시예 2.2의 [14])를 시노몰구스 마카퀴 VISTA 또는 뮤린 VISTA를 암호화하는 벡터로 형질감염시킨 세포에 결합하는 이의 능력에 대해 분석하였다. 13D5p는 시노몰구스 마카퀴 VISTA 및 뮤린 VISTA와 교차-반응성을 나타내는 것으로 밝혀졌다.

[1778] 3.2 Octet QK384 시스템을 사용한 전반적인 친화성 연구

[1779] 생물-층 간섭계(BLI) 실험을 Octet QK384 시스템(ForteBio)을 사용하여 수행하였다. 항-Penta-HIS(HIS1K) 코팅된 바이오센서 팁(biosensor tip)(Pall ForteBio, 미국)을 사용하여 His-태그된 사람, 시노몰구스 마카퀴 또는 뮤린 VISTA(270 nM)를 포획하였다. 모든 측정은 25℃에서 1000 rpm에서 교반하면서 수행하였다. 항원 결합에 대한 동역학적 측정은 항-VISTA 항체를 상이한 농도(도에 나타냄)에서 120초 동안 로딩한 후, 바이오센서를 검정 완충제 함유 웰 내로 이전함으로써 120초 해리 시간에 의해 수행하였다. 센소그램(sensogram)을 완충제 효과를 위해 참고한 다음 Octet QK384 사용자 소프트웨어(Pall ForteBio, 미국)를 사용하여 핏팅(fitting)하였다. 동역학적 반응을 전반적인 핏팅(global fitting)에 1개 부위 결합 모델을 사용하여 적용함으로써 연합(kon), 해리(koff) 속도 상수 및 평형 해리 상수(equilibrium dissociation constant; KD)를 수득하였다. 소프트웨어로 신뢰가능하게 핏팅할 수 있는 커브($R^2$>0.90) 만을 분석에 포함시켰다.

[1780] 항-VISTA 항체 클론 V4(즉, 실시예 2.2의 [1])에 의한 결합의 분석을 위한 대표적인 센소그램을 도 3A 내지 3C에 나타낸다.

[1781] 항-VISTA 항체 클론 V4는 사람 및 시노몰구스 마카퀴 VISTA에 $K_D$ = <1 pM의 친화성으로, 및 뮤린 VISTA에 $K_D$ = 113 nM의 친화성으로 결합하는 것으로 밝혀졌다.

[1782] 3.3 항체 특이성을 측정하기 위한 ELISA

[1783] ELISA를 사용하여 항체의 결합 특이성을 측정하였다. 항-VISTA 항체를 사람 VISTA 폴리펩타이드, 각각의 마우스 및 시노몰구스 마카퀴 동족체, 뿐만 아니라 사람 PD-L1 및 사람 HER3(Sino Biological Inc., 중국)에 대한 결합에 대해 분석하였다.

[1784] ELISA를 표준 프로토콜에 따라 수행하였다. 요약하면, 96-웰 플레이트(Nunc, 덴마크)를 인산염-완충된 염수(PBS) 속에서 0.1 μg/ml의 표적 단백질로 2시간 동안 37℃에서 코팅하였다. 1시간 동안 트리스 완충제 염수(TBS) 중 10% BSA로 실온에서 차단한 후, 시험 항체를 30 μg/ml인 최고 농도로 일련 희석시키고, 플레이트에 가하였다. 실온에서 1시간 항온처리 후, 플레이트를 0.05% 트윈 20(TBS-T)을 함유하는 TBS로 3회 세척한 다음 HRP-접합된 항-마우스 IgG 항체(Life Technologies, Inc., 미국)로 1시간 동안 실온에서 항온처리하였다. 세척 후, 플레이트를 열량계적 검출 기질 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(Turbo-TMB; Pierce, 미국)으로 15분 동안 전개하였다. 반응을 2M $H_2SO_4$로 정지시키고 OD를 450 nM에서 30분 내에 측정하였다.

[1785] 항-VISTA 항체 클론 V4(실시예 2.2의 [1])로 수득된 결과는 도 4A에 나타낸다. 클론 V4는 사람, 시노몰구스 마카퀴 및 뮤린 VISTA에 결합할 수 있는 것으로 밝혀졌지만, 사람 PD-L1 또는 사람 HER3과 교차-반응성을 나타내지 않았다(심지어 매우 고 농도에서도).

[1786] 항-VISTA 항체 클론 13D5-1(실시예 2.2의 [15])로 수득된 결과는 도 20에 나타낸다. 클론 13D5-1은 사람, 시노몰구스 마카퀴 및 마우스 VISTA에 결합할 수 있는 것으로 밝혀졌다.

[1787] 항-VISTA 항체 클론 13D5-13(실시예 2.2의 [16])으로 수득된 결과는 도 21에 나타낸다. 클론 13D5-13은 사람 및 마우스 VISTA에 결합할 수 있는 것으로 밝혀졌다.

[1788] 추가의 실험에서, 항-VISTA 항체 클론 V4(실시예 2.2의 [1])을 ELISA에 의해 사람 VISTA, PD-1, PD-L1, B7H3, B7H4, B7H6, B7H7 및 CTLA4에 결합하는 능력에 대해 분석하였다. 결과는 도 4C에 나타낸다. 클론 V4는 PD-1, PD-L1, B7H3, B7H4, B7H6, B7H7 또는 CTLA4 중 어느 것과도 교차-반응하지 않는 것으로 밝혀졌다.

[1789] 3.4 차등 주사 형광측정법에 의한 열안정성의 분석

[1790] 요약하면, 0.2 mg/mL에서 항체의 3중(triple) 반응 혼합물 및 SYPRO Orange dye(ThermoFisher)를 25 μL의 PBS 속에서 제조하고, MicroAmp 광학(Optical) 96-웰 반응 플레이트(ThermoFisher)의 웰에 이전시키고, MicroAmp 광학 부착성 필름(Optical Adhesive Film)(ThermoFisher)으로 밀봉하였다. 용융 곡선을 7500 신속한 실시간 PCR 시스템(Applied Biosystems) 속에서 리포터로서 TAMRA 및 수동 참고로서 ROX를 선택하여 작동시켰다. 열 프로파일은 25℃에서 2분의 초기 단계 및 99℃에서 2분의 최종 단계와 1.2%의 램프율(ramp rate)을 포함하였다. 미가공 데이타의 제1 유도체를 온도의 함수로서 플롯팅하여 유도체 용융 곡선을 수득하였다. 항체의 용융 온도(Tm)를 유도체 곡선의 피크로부터 추출하였다.

[1791] 항체 클론 V4 IgG1 양식(즉, 실시예 2.2의 [1])의 열안정성의 차등 주사 형광측정법 분석을 위해 수득한 미가공 데이타의 제1 유도체는 도 9에 나타낸다. Tm은 67.5℃인 것으로 측정되었다.

[1792] **실시예 4: 기능적 특성화**

[1793] 4.1 VISTA와 VSIG-3의 상호작용

[1794] 본 발명자는 VSIG-3이 VISTA에 대한 리간드로서 거동하는지의 여부를 생물-층 간섭법(BLI) 분석에 의해 Octet QK384 시스템(ForteBio)을 사용하여 시험하였다. 요약하면, 항-사람 Fc 포획 바이오센서를 사용하여 Fc-태그된 VSIG-3을 100 nM의 농도에서 포획하고, 포획된 VSIG-3와 3000 nM로부터 출발하여 3회 일련 희석까지의 농도에서 적용된 VISTA의 연합을 측정하고, PBS 대조군과 비교하였다.

[1795] 대표적인 센소그램은 도 5에 나타낸다. VSIG-3과 VISTA의 연합의 친화성은 ~$K_D$ = 5.28 μM인 것으로 계산되었다.

[1796] 본 발명자는 다음에 VISTA와 VSIG-3 사이의 상호작용을 억제하는 항-VISTA 항체의 능력을 분석하였다.

[1797] 요약하면, 96-웰 플레이트(Nunc, 덴마크)를 1x PBS 속에서 0.1 μg/ml의 태그되지 않거나 또는 Fc-태그된 VSIG-3 단백질(R&D Systems, 미국)로 16시간 동안 4℃에서 코팅하였다. 1시간 동안 PBS 중 1% BSA로 실온에서 차단시킨 후, 15μg/ml의 VISTA/사람 His-태그된 융합 단백질(Sinobiological Inc, 중국)을 증가하는 농도의 항-VISTA 항체의 존재 또는 부재하에 가하고, 1시간 동안 실온에서 항온처리하였다. 플레이트를 TBS-T로 3회 연속적으로 세척한 다음 HRP-접합된 항-hi 제2 항체와 함께 1시간 동안 실온에서 항온처리하였다. 세척 후, 플레이트를 비색 측정 기질(colorimetric detection substrate) Turbo-TMB(Pierce, 미국)로 전개시켰다. 반응을 2M $H_2SO_4$로 정지시키고 OD를 450 nM에서 측정하였다.

[1798] 항-VISTA 항체 클론 5M1-A11 및 9M2-C12(실시예 2.2의 [10] 및 [13])에 대해 수득된 결과를 도 6에 나타낸다. 항-VISTA 항체는 VISTA와 VSIG-3 사이에 상호작용의 용량-의존적 억제를 나타내었다.

[1799] 추가의 실험에서, VISTA와 VSIG-3 사이의 상호작용의 4M2-C12 IgG1(실시예 2.2의 [1])에 의한 억제를 분석하였다. 비관련 표적 항원에 특이적인 항체 및 사람 IgG1 동형 대조군에 의한 VISTA:VSIG-3 상호작용의 억제를 대조군 조건으로서 또한 분석하였다. 결과는 도 32에 나타낸다. 4M2-C12 IgG1은 VISTA:VSIG-3 상호작용을 용량-의존적 방식으로 억제하는 것으로 밝혀졌다.

[1800] 추가의 실험에서, VISTA와 VSIG-3 사이의 상호작용의 4M2-C12 IgG1(실시예 2.2의 [1])에 의한 억제를 검정에서 분석하였고 여기서 VISTA-Fc를 포획제로서 사용하였다. 요약하면, 384-웰 플레이트의 웰을 30 μl의 0.5 μg/ml의 VISTA-Fc로 1시간 동안 실온에서 코팅하였다. 플레이트를 PBS-T로 세척하고 1시간 동안 TBS 중 1%로 실온에서 차단시켰다. 4M2-C12 IgG1 또는 사람 IgG1 동형 대조군 항체의 일련 희석물을 플레이트에, 0.3 μg/ml의 VISG3-His와 함께 가하였다. 실온에서 1시간 항온처리 후 플레이트를 PBS-T로 5회 세척하고, 염소 항-HIS-HRP와 함께 1시간 동안 실온에서 항온처리하였다. 플레이트를 PBS-T로 5회 세척하고, Turbo-TMB로 전개시켰다. 반응을 2M $H_2SO_4$로 중지시키고, OD를 450 nM에서 측정하였다.

[1801] 결과는 도 54에 나타낸다. 4M2-C12 IgG1은 VISTA:VSIG-3 상호작용을 용량-의존적 방식으로 억제하는 것으로 밝혀졌다.

[1802] 4.2 VISTA와 PSGL-1 사이의 상호작용

[1803] 본 발명자는 PSGL-1이 VISTA에 대한 리간드로서 거동하는지의 여부를 유동 세포분석법-기반 검정에서 시험하였다.

[1804] 요약하면, 사람 VISTA 단백질(사람 VISTA를 암호화하는 작제물을 사용한 형질감염에 의해)을 과발현하도록 변형

시킨 100,000개의 HEK293T 세포를 4M2-C12-hIgG1 (실시예 2.2의 [1]) 또는 동형-일치된 대조군 항체와 20 μg/ml, 40 μg/ml 또는 80 μg/ml의 농도에서 15분 동안 4℃에서, HBSS, 0.5% BSA 및 2mM EDTA를 포함하는 완충제 pH 6.0 속에서 공-항온처리하였다. 이후에, 15 μg/ml의 Fc-태그된 사람 PSGL1(R&D Systems, 제품 번호: 3345-PS) 또는 동일한 양의 Fc-태그된 비관련 항원을 세포에 가하고, 이를 이후에 추가로 45분 동안 4℃에서 항온처리하였다. 세포를 후속적으로 완충제로 3회 세척한 다음, FITC-접합된 항-PSGL1 항체(Miltenyi Biotec 제품 번호: 130-104-706)를 (1:11)의 희석 인자에서 가하거나 Alex488-접합된 항-Fc 항체를 1:200의 희석 인자에서 가하고, 세포를 15분 동안 4℃에서 항온처리하였다. 이후에, 세포를 완충제로 3회 세척하고 유동 세포분석법으로 분석하였다.

[1805] 결과는 도 55에 나타낸다. 4M2-C12-hIgG1은 PSGL-1의 VISTA에 대한 결합을 용량-의존적 방식으로 억제함이 밝혀졌다.

[1806] 4.3 VISTA-매개된 신호전달의 억제

[1807] 본 발명자는 항-VISTA 항체 클론 13D5p가 VISTA-매개된 신호전달을 억제할 수 있는지의 여부를 혼합된 림프구 반응(MLR) 검정을 사용한 분석에 의해 시험하였다.

[1808] 요약하면, PBMC를 관련되지 않는 공여체(자극인자 및 효과기 집단을 수득하기 ㅜ이함)로부터 Septamate 키트(Stemcell Technologies, 캐나다)를 사용하여, 제조업자의 설명서에 따라 단리하였다. 자극인자 세포를 50 μg/mL의 미토마이신 C(Sigma Aldrich, 미국)로 20분 동안 37℃에서 처리하고 1x PBS로 5회 세척 후 사용하였다. 자극인자 집단을 0.5 x $10^5$개의 세포/웰에서 씨딩하고 반응인자 집단을 20 μg/ml의 최고 농도에서 출발하여, 증가하는 농도의 시험 항체의 존재 또는 부재하에 웰당 1.0 x $10^5$개의 세포에서 씨딩하였다. 5일 후, 상층액을 수거하고 IL-17, IL-2A 및 IFN-γ의 수준을 ELISA로 표준 프로토콜에 따라 측정하였다.

[1809] 결과는 도 7A 및 7B에 나타낸다. 항-VISTA 항체 13D5p는 IL-17, IL-2 및 IFN-γ의 수준에서의 증가를 야기하는 것으로 밝혀졌다. 도 8A 및 8B는 항-PD-L1 항체 클론 MIH5(ThermoFisher Scientific)를 사용하는 동일한 검정에서 수득된 결과를 나타낸다.

[1810] **실시예 5: 생체 내 분석**

[1811] 생체 내 연구를 위해, 4M2-C12를 마우스 IgG2a 양식으로 생산하였다. 분자는 서열 번호: 248에 나타낸 서열을 가진 중쇄 폴리펩타이드, 및 서열 번호: 250에 나타낸 서열을 갖는 경쇄 폴리펩타이드의 헤테로머이다. 4M2-C12 mIgG2a는 CHO 세포 내에서 중쇄 및 경쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산의 공-발현에 의해 생산하고, 후속적으로 정제하였다.

[1812]

| 항원 결합 분자 | 폴리펩타이드 | 항체 |
|---|---|---|
| [17] | 4M2-C12 mIgG2a HC (서열 번호:248)<br>+<br>4M2-C12 CL (서열 번호:250) | 4M2-C12 mIgG2a |

[1813] 5.1 약동학적 분석

[1814] 대략 6 내지 8주령의 C57BL/6 마우스를 특이적인 병원체가 없는 조건 하에서 가두고 동물 실험 윤리 위원회(IACUC) 가이드라인에 부합하도록 처리하였다.

[1815] 600 μg의 항-VISTA 항체를 투여하고 혈액을 투여 후 기본선(- 2시간), 0.5시간, 6시간, 24시간, 96시간, 168시간 및 336시간째에 심장 천자(cardiac puncture)에 의해 3마리의 마우스로부터 수득하였다. 혈청 중 항체를 ELISA로 정량화하였다.

[1816] 약동학적 분석을 위한 매개변수는 비-구획 모델(non-compartmental model)로부터 유도하였다: 최대 농도($C_{max}$), AUC(0-336hr), AUC(0-무한), 반감기($t_{½}$), 제거(Clearance)(CL), 정체 상에서 분포 용적(Volume of distribution at steady state)($V_{ss}$).

[1817] 항-VISTA 항체 클론 V4(실시예 5의 [17])에 대해 수득된 결과는 도 12에 나타낸다. 이러한 항체 클론은 11.7일의 반감기를 갖는 것으로 밝혀졌다.

[1818] 5.2 생체 내에서 암을 치료하기 위한 효능의 분석

[1819] 대략 6 내지 8주령의 암컷 BALB/c 또는 C57BL/6 마우스를 InVivos(Singapore)로부터 구입하였다. 동물을 구체적인 병원체가 없는 조건 하에서 가두고 동물 실험 윤리 위원회(IACUC) 가이드라인에 부합하도록 처리하였다.

[1820] 사용된 세포주는 ATCC로부터 수득된 LL2 세포(루이스 폐 암종), 4T1 세포(유방 암), CT26 세포(결장 암종), 클론-M3 세포(흑색종) 및 EL4 세포(T 세포 백혈병/림프종)를 포함하였다. B16-BL6 세포(흑색종)는 Creative Bioarray로부터 수득하였다. 세포주를 공급업자의 설명서에 따라 유지시키고; LL2 세포, B16-BL6 세포 및 EL4 세포를 10% 소 태아 혈청(FBS) 및 1% Pen/Strep가 보충된 DMEM 속에서 배양하고, 4T1 세포 및 CT26 세포를 10% FBS 및 1 및 1% Pen/Strep가 보충된 RPMI-1640 속에서 배양하였다. 클론-M3 세포를 2.5% FBS, 15% 말 혈청 및 1% Pen/Strep가 보충된 F12-K 배지 속에서 성장시켰다. 모든 세포는 37℃에서 5 % $CO_2$ 항온처리기 속에서 배양하였다.

[1821] 동계 종양 모델은 LL2($2x10^5$), 4T1($5x10^5$), CT26($1x10^5$-$1x10^6$), 클론-M3($5x10^5$), EL4($2x10^5$) 또는 B16-BL6($1x10^5$) 세포를 마우스의 우측 옆구리에 피하 주사함으로써 생성시켰다.

[1822] 이식 3일 후, 항-VISTA 항체를 총 6회 용량에 대해 3일마다 복강내 투여하였다. 대조군 그룹에게는 동일한 용량 간격에서 비히클 치료를 제공하였다.

[1823] 종양 용적을 디지탈 캘리퍼(digital caliper)를 사용하여 주당 3회 측정하고 식 [L x W2/2]를 사용하여 계산하였다. 연구 종점은 대조군 아암의 종양이 길이가 >1.5 cm로 측정되면 도달한 것으로 고려하였다.

[1824] 5.2.1 CT26 세포 모델

[1825] 도 13은 실험에서 수득된 결과를 나타내고 여기서 항-VISTA 항체 클론 V4(실시예 5의 [17])의 항-암 효과를 CT26 세포주 유래된 동계 마우스 결장 암종 모델에서 항-PD-L1 항체 클론 10F.9G2의 것과 비교하였다. 모델은 100,000개의 CT26 세포를 Balb/c 마우스(n = 처리 그룹 당 8마리의 마우스)의 우측 옆구리 내로 피하 주사함으로써 확립하였다.

[1826] V4 또는 항-PD-L1 항체를 3일째로부터 3일마다 용량 당 300 μg에서 투여하였다. 용량 당 300 μg V4 + 300 μg 항-PD-L1 항체의 조합 치료를 또한 분석에 포함시켰다.

[1827] 항-VISTA 항체 클론 V4는 이러한 모델에서 매우 강력하고 종양 성장을 ~60%까지 억제할 수 있는 것으로 밝혀졌다.

[1828] 21일째에 종양을 수거하고 RNA-seq 분석에 의해 Arg1 RNA 발현에 대해, 문헌: Newman et al. Nat Methods. (2015) 12(5):453-457에 기술된 방법에 따라 평가하였다. 결과는 도 39에 나타낸다. 4M2-C12를 사용한 처리는 21일째에 종양에서 Arg1 발현에서의 유의적인 감소와 관련되었다.

[1829] 다른 실험에서, CT26 세포주 유래된 동계 마우스 결장 암종 모델을 100,000개의 CT26 세포를 Balb/c 마우스(n = 처리 그룹 당 8마리의 마우스)의 우측 옆구리 내로 피하 주사함으로써 확립하고, 마우스를 3일째로부터 3일마다 300 μg의 동형 대조군 항체, 항-PD-L1 항체 클론 10F.9G2, 항-VISTA 항체 클론 V4(실시예 5의 [17]), 항-TIGIT 항체 클론 1G9, 항-LAG-3 항체 클론 C9B7W, 항-TIM-3 항체 클론 RMT3-23의 투여로 처리하거나, 또는 용량 당 300 μg의 항-PD-L1 항체 클론 10F.9G2과 300 μg의 각각의 다른 항체의 조합 치료를 또한 분석에 포함시켰다.

[1830] 15일째에 검출된 종양 성장의 계산된 억제의 결과를 도 14에 나타낸다. 당해 실험에서 항-VISTA 항체 클론 V4는 면역 체크포인트 분자에 대해 지시된 임의의 다른 단독치료요법보다 더 강력한 종양 성장의 억제제인 것으로 밝혀졌고, 항-PD-L1 치료요법과 함께 더 잘 수행하는 것으로 밝혀졌다.

[1831] 본 발명자는 추가의 실험을 수행하였고 여기서 CT26 종양을 동일한 방법으로 확립한 다음, 마우스에게 격주로 300 μg의 항-VISTA 항체 클론 V4, 200 μg의 항-PD-L1 항체 클론 10F.9G2, 300 μg의 항-VISTA 항체 클론 V4 + 200 μg 항-PD-L1 항체 클론 10F.9G2, 또는 대조군 조건으로서 PBS를 투여하였다. 실험 종료시, 종양을 RNA-Seq로 분석하여 MDSCs, CD8+ T 세포 및 Treg의 상대적인 수를, 본원에 이의 전문이 참고로 포함된 문헌: Newman

et al. Nat Methods. (2015) 12(5):453-457에 기술된 방법에 따라 분석하였다.

[1832] 결과는 도 15에 나타낸다. 항-VISTA 항체 클론 V4(단독으로 또는 항-PD-L1 치료와 함께)는 MDSC의 수를 감소시키고, CD8 T 세포 : Treg 비를 증가시키는 것으로 밝혀졌다. 항-VISTA 항체 치료와 관련된 종양 미세환경에서 유전자 발현에서의 변화의 분석은 또한 식세포 공정(예컨대, 액틴 필라멘트-기반 운동)에 포함된 유전자 발현의 상향조절, 및 아르기나제의 발현의 하향조절(면역억제 환경을 거의 야기하지 않음)을 나타내었다.

[1833] 추가의 실험에서, CT26 세포 유래된 동계 마우스 결장 암종 모델을 상술한 바와 같이 Balb/C 마우스에서 확립시키고, 마우스에게 3일째로부터 3일마다: (i) 600 μg의 항-VISTA 항체 클론 13D5-1, (ii) 200 μg의 항-PD-L1 항체 클론 10F.9G2, (iii) 600 μg의 항-VISTA 항체 클론 13D5-1 + 200 μg 항-PD-L1 항체 클론 10F.9G2, 또는 (iv) 동 용적의 PBS(음성 대조군으로서)를 투여하였다.

[1834] 결과는 도 22에 나타낸다. 항-VISTA 항체 클론 13D5-1(단독으로 또는 항-PD-L1과 함께)은 당해 모델에서 종양 성장을 억제할 수 있는 것으로 밝혀졌다.

[1835] 5.2.2 LL2 세포 모델

[1836] LL2 모델은 200,000개의 LL2 세포를 Balb/c 마우스(n = 처리 그룹 당 8마리의 마우스)의 우측 옆구리로 피하 주사함으로써 확립하고, 후속적으로 마우스에게 격주로 600 μg의 항-VISTA 항체 클론 V4(실시예 5의 [17]) 또는 음성 대조군으로서 동 용적의 비히클을 투여하였다.

[1837] 실험 결과는 도 16에 나타낸다. 항-VISTA 항체 클론 V4는 당해 모델에서 매우 강력 - 종양 성장을 ~44%까지 억제할 수 있는 것으로 밝혀졌다.

[1838] 5.2.3 B16-BL6 세포 모델

[1839] B16-BL6 모델은 200,000개의 B16-BL6 세포를 C57BL/6 마우스(n = 처리 그룹 당 8마리의 마우스)의 우측 옆구리에 피하 주사함으로써 확립하고, 후속적으로 마우스에게 격주로(총 6회 용량) 600 μg의 항-VISTA 항체 클론 V4(실시예 5의 [17]), 200 μg의 항-PD-1 항체 RMP1-14 (Bio X Cell), 600 μg의 항-VISTA 항체 클론 V4 + 200 μg의 항-PD-1 항체, 또는 음성 대조군으로서 동 용적의 비히클을 투여하였다.

[1840] 실험 결과는 도 17에 나타낸다. 항-VISTA 항체 클론 V4는 당해 모델에서 항-PD-1 항체 처리와 함께 매우 강력한 것으로 밝혀졌다.

[1841] 5.2.4 4T1 세포 모델

[1842] 4T1 세포주 유래된 동계 마우스 유방 암종 모델을 Balb/c 마우스에서 250,000개의 4T1 세포를 우측 옆구리에 피하 주사함으로써 확립하였다.

[1843] 후속적으로 마우스에게 3일째로부터 3일마다(총 6회 용량) 300 또는 600 μg의 항-VISTA 항체 클론 13D5-1, 동형 대조군 항체 또는 음성 대조군으로서 동 용적의 비히클을 투여하였다.

[1844] 실험의 결과를 도 23에 나타낸다. 항-VISTA 항체 클론 13D5-1은 당해 모델에서 매우 강력한 것으로 - 종양 성장을 ~70%까지 억제하는 것으로 밝혀졌다.

[1845] 5.3 안전성 약리학, 독성 및 면역독성

[1846] 항-VISTA 항체 클론 V4 및 사람화된 버젼 V4H1 및 V4H2를 안전성 및 면역원성에 대해 인 실리고에서 IMGT DomainGapAlign(Ehrenmann et al., Nucleic Acids Res., 38, D301-307 (2010)) 및 IEDB 탈면역화(Dhanda et al., Immunology. (2018) 153(1):118-132) 도구를 사용하여 분석하였다.

[1847] 항-VISTA 항체 클론 V4H1 및 V4H2은 사람화된 것으로 고려된 사람 중쇄 및 경쇄에 대해 충분히 상동성(즉, >85%)을 가지고, 안전한 것으로 고려하기에 충분한 잠재적인 면역원성 펩타이드의 수를 가지고, 잠재적으로 발달가능성 문제를 유발할 수 있는 임의의 다른 특성을 지니지 않았다.

[1848] 본 발명자는 또한 실시예 5.2에 기술된 실험의 과정 동안 마우스를 칭량하고 육안적 부검의 신호를 분석하였고; 항-VISTA 항체 클론 V4로 처리한 마우스는 PBS-처리된 대조군 마우스로부터 어떠한 차이도 나타내지 않았다. 도 44는 실시예 5.2.1에 기술된 연구의 과정 동안 수득된 결과를 나타낸다.

[1849] 본 발명자는 실험에서 혈액독성을 시험하였고 여기서 마우스에게 단일 용량의 900 μg의 항-VISTA 항체 클론 V4 또는 동 용적의 PBS를 투여하였다.

[1850] 혈액 샘플을 수집하여 상이한 유형의 백혈 세포의 수에 대해 HM5 혈액학 분석기(Hematology Analyser)를 사용하여 분석하였다. 결과는 도 18에 나타내고; 상이한 세포 유형의 수는 찰스 리버 참고 범위(Charles River reference range) 내에 있었고 V4와 PBS-처리된 그룹에서 상이하지 않았고, 임상 신호, 육안적 부검 또는 중량에서의 차이가 상이한 그룹 사이에서 검출되지 않았다.

[1851] 마우스를 또한 간독성 및 신독성의 상관관계에 대해 분석하고, 결과를 도 19에 나타낸다. 검출된 수준은 찰스 리버 참고 범위 내에 있었고 V4와 PBS-처리된 그룹 사이에서 차이가 없었다.

[1852] 5.4 진전된 고형 종양의 치료

[1853] 사람에서 1차

[1854] 질환이 진행되거나 또는 표준 치료요법을 사용한 치료 후 치료 불내약성(intolerance)을 지니고 적절한 기관 기능 및 ECOG 상태를 지닌 진전된 또는 전이성 고형 종양 환자를 항-VISTA 항체 V4(실시예 2.2의 [1]), V4H1(실시예 2.2의 [3]) 또는 V4H2(실시예 2.2의 [4])를 안전성-조정된 '최소 예상 생물학적 효과 수준(Minimal Anticipated Biological Effect Level)'(MABEL) 접근법에 따라 정맥 주사하였다. 환자를 투여 후 28일 동안 모니터링하였다.

[1855] 이후에 환자를 부작용에 대한 일반적인 기술용어 범주(Common Terminology Criteria for Adverse Event; CTCAE)에 따라 계산된 용량에서 치료하여, 치료의 안전성 및 내약성을 측정하고, 분자의 약동학을 측정하였다.

[1856] 항-VISTA 항체를 사용한 치료는 안전하고 견딜 수 있는 것으로 밝혀졌다.

[1857] 용량 증량(escalation) - 단독치료요법

[1858] 표준 치료요법을 사용한 치료 후 질환 진행 또는 치료 불내약성을 지니고 적절한 기관 기능 및 ECOG 상태를 지닌 진전된 또는 전이성 고형 종양 환자(n = 18-24)를 항-VISTA 항체 V4(실시예 2.2의 [1]), V4H1(실시예 2.2의 [3]) 또는 V4H2(실시예 2.2의 [4])를, 3+3 모델 기반한 과다 용량 대조군을 사용한 증량(escalation with overdose control; EWOC) 용량 증량에 따라 정맥내주사함으로써 치료한다.

[1859] 이후에, 환자를 부작용에 대한 일반적인 기술용어 범주(CTCAE)에 따라 평가하여 치료의 안전성 및 내약성을 측정하고, 분자의 약동학 및 치료의 효능을 평가한다. 최대로 견딘 용량(maximum tolerated dose; MTD) 및 최대로 투여된 용량(maximum administered dose; MAD)을 또한 측정한다.

[1860] 용량 증량 - 조합 치료요법

[1861] 표준 치료요법을 사용한 치료 후 질환 진행 또는 치료 불내약성을 지니고 적절한 기관 기능 및 ECOG 상태를 지닌 진전된 또는 전이성 고형 종양 환자(n = 9)를 항-VISTA 항체 V4(실시예 2.2의 [1]), V4H1(실시예 2.2의 [3]) 또는 V4H2(실시예 2.2의 [4])로, 항-PD-1 또는 항-PD-L1 항체(3 mg/kg)를 사용한 3+3 모델 기반한 증량에 따라 치료하였다.

[1862] 이후에, 환자를 부작용에 대한 일반적인 기술용어 범주(CTCAE)에 따라 평가하여 치료의 안전성 및 내약성을 측정하고, 분자의 약동학 및 치료의 효능을 평가한다.

[1863] 용량 확장

[1864] 치료된 환자를 전체 반응 속도, 종양 마커의 발현, 순환하는 종양 세포, 진전이 없는 생존, 전체적인 생존, 안전성 및 내약성에 대해 분석한다.

[1865] 항-VISTA 항체는 안전하고 내약성이며, 암 세포의 수/비율을 감소시킬 수 있고, 종양 세포 마커 발현을 감소시키고, 진행이 없는 생존을 증가시키고 전체 생존을 증가시킴이 밝혀졌다.

[1866] 5.5 림프종의 치료

[1867] 시람에서 1차

[1868] 1차 화학치료요법으로부터 유리하지 않았고, 동종 줄기 세포 이식을 받지 않고, 리툭시맙(NHL) 및 니볼루맙 또는 펨브롤리주맙(HL)에 대해 반응하는 경향이 있는 림프종(NHL 및 HL) 환자를 항-VISTA 항체 V4(실시예 2.2의 [1]), V4H1(실시예 2.2의 [3]) 또는 V4H2(실시예 2.2의 [4])로, 안전성-조정된 '최소 예상 생물학적 효과 수준'(MABEL) 접근법에 따라서 계산된 용량에서 정맥 주사로 치료하였다. 환자를 투여 후 28일 동안 모니터링하였다.

[1869] 이후에, 환자를 부작용에 대한 일반적인 기술용어 범주(CTCAE)에 따라 평가하여 치료의 안전성 및 내약성을 측정하고, 분자의 약동학을 평가한다.

[1870] 항-VISTA 항체를 사용한 치료는 안전하고 내약성인 것으로 밝혀졌다.

[1871] 용량 증량 - 단독치료요법

[1872] 1차 화학치료요법으로부터 유리하지 않았고, 동종 줄기 세포 이식을 받지 않고, 리툭시맙(NHL) 및 니볼루맙 또는 펩브롤리주맙(HL)에 대해 반응하는 경향이 있는 림프종(NHL 및 HL) 환자를 항-VISTA 항체 V4(실시예 2.2의 [1]), V4H1(실시예 2.2의 [3]) 또는 V4H2(실시예 2.2의 [4])로, 3+3 모델 기반한 과다 용량 대조군을 사용한 증량(EWOC) 용량 증량에 따라, 정맥 주사로 치료하였다.

[1873] 이후에, 환자를 부작용에 대한 일반적인 기술용어 범주(CTCAE)에 따라 평가하여 치료의 안전성 및 내약성을 측정하고, 분자의 약동학 및 치료의 효능을 평가한다. 최대로 견딘 용량(MTD) 및 최대로 투여된 용량(MAD)을 또한 측정하였다.

[1874] 용량 증량 - 조합 치료요법

[1875] 1차 화학치료요법으로부터 유리하지 않았고, 동종 줄기 세포 이식을 받지 않고, 리툭시맙(NHL) 및 니볼루맙 또는 펩브롤리주맙(HL)에 대해 반응하는 경향이 있는 림프종(NHL 및 HL) 환자를 항-VISTA 항체 V4(실시예 2.2의 [1]), V4H1(실시예 2.2의 [3]) 또는 V4H2(실시예 2.2의 [4])로, 항-PD-L1 항체를 사용한 3+3 모델 기반한 증량에 따라, 정맥 주사로 치료하였다.

[1876] 이후에, 환자를 부작용에 대한 일반적인 기술용어 범주(CTCAE)에 따라 평가하여 치료의 안전성 및 내약성을 측정하고, 분자의 약동학 및 치료의 효능을 평가한다.

[1877] 용량 확장

[1878] 치료된 환자를 전체 반응 속도, 종양 마커의 발현, 순환하는 종양 세포, 진전이 없는 생존, 전체적인 생존, 안전성 및 내약성에 대해 분석한다.

[1879] 항-VISTA 항체는 안전하고 내약성이며, 암 세포의 수/비율을 감소시킬 수 있고, 종양 세포 마커 발현을 감소시키고, 진행이 없는 생존을 증가시키고 전체 생존을 증가시킴이 밝혀졌다.

[1880] **실시예 6: 상이한 Fc 영역을 포함하는 VISTA-결합 항체의 생산 및 특성화**

[1881] 6.1 상이한 Fc 영역을 포함하는 VISTA-결합 항체의 생산 및 특성화

[1882] 4M2-C12를 마우스 IgG2a LALA PG 양식으로 생산하였다. 분자는 서열 번호: 249에 나타낸 서열을 갖는 중쇄 폴리펩타이드, 및 서열 번호: 250에 나타낸 서열을 갖는 경쇄 폴리펩타이드의 헤테로머이다. 중쇄 서열을 서열 번호: 253에 따라 번호매김된 4 및 5번 위치에서, CH2 영역 내에 루이신(L)의 알라닌(A)으로의 치환, 및 서열 번호: 253에 따라 번호매김된 99번 위치에서 프롤린(P)의 글리신(G)으로의 치환을 포함한다. 이러한 치환은 문헌에서 L234A, L235A 및 P329G로 지칭되며, 예컨대, 이의 전문이 본원에 참고로 포함된 문헌: Lo et al. J. Biol. Chem (2017) 292(9):3900-3908에서 마우스 IgG2a Fc에 기술되어 있다. 4M2-C12 mIgG2a LALA PG는 CHO 세포 내에서 중쇄 및 경쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산의 공-발현에 의해 생산하였고, 후속적으로 정제하였다.

[1883]

| 항원-결합 분자 | 폴리펩타이드 | 항체 |
|---|---|---|
| [18] | 4M2-C12 mIgG2a LALA PG HC (서열 번호:249)<br>+<br>4M2-C12 CL (서열 번호:250) | 4M2-C12 mIgG2a LALA PG |

[1884] 4M2-C12를 또한 마우스 IgG2a NQ 양식으로 생산하였다. 분자는 서열 번호: 258에 나타낸 서열을 갖는 중쇄 폴리펩타이드, 및 서열 번호: 250에 나타낸 서열을 갖는 경쇄 폴리펩타이드의 헤테로머이다. 중쇄 서열을 서열

번호: 253에 따라 67번 위치에서, CH2 영역 내에 아스라파긴(N)의 글루타민(Q)으로의 치환을 포함한다. 이러한 치환은 문헌에서 N297Q로 지칭되며, 예컨대, Lo et al. J. Biol. Chem (2017) 292(9):3900-3908에서 마우스 IgG2a Fc에 기술되어 있다. 4M2-C12 mIgG2a NQ는 CHO 세포 내에서 중쇄 및 경쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산의 공-발현에 의해 생산하였고, 후속적으로 정제하였다.

| 항원-결합 분자 | 폴리펩타이드 | 항체 |
|---|---|---|
| [19] | 4M2-C12 mIgG2a NQ HC (서열 번호:258)<br>+<br>4M2-C12 CL (서열 번호:250) | 4M2-C12 mIgG2a NQ |

[1885]

[1886] 4M2-C12를 또한 마우스 IgG1 양식으로 생산하였다. 분자는 서열 번호: 266에 나타낸 서열을 갖는 중쇄 폴리펩타이드, 및 서열 번호: 250에 나타낸 서열을 갖는 경쇄 폴리펩타이드의 헤테로머이다. 4M2-C12 mIgG1은 CHO 세포 내에서 중쇄 및 경쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산의 공-발현에 의해 생산하였고, 후속적으로 정제하였다.

| 항원-결합 분자 | 폴리펩타이드 | 항체 |
|---|---|---|
| [20] | 4M2-C12 mIgG1 HC (서열 번호:266)<br>+<br>4M2-C12 CL (서열 번호:250) | 4M2-C12 mIgG1 |

[1887]

[1888] 6.2 Fc 수용체에 대한 상이한 Fc 영역을 포함하는 VISTA-결합 항체의 결합의 분석

[1889] 사람, 시모몰구스 및 뮤린 VISTA 단백질에 대한 상이한 항체 양식의 4M2-C12의 결합을 ELISA를 통해 분석하고, 마우스 Fcγ 수용체 및 마우스 FcRn에 대한 결합을 BLI에 의해 Pall ForteBio Octet QK 384 시스템을 사용하여 평가하였다.

[1890] 히스티딘-태그된(histidine-tagged) mFcγRIV(50036-M08H), mFcγRIII(50326-M08H), mFcγRIIb(50030-M08H), 및 mFcRn(CT009-H08H)을 Sino Biological로부터 수득하였다. 항-Penta-HIS(HIS1K) 바이오센서는 Forte Bio(18-5120)로부터 구입하였다.

[1891] 역학적 실험을 위해, 항-Penta-HIS 바이오센서를 60초 동안 PBS 완충제(pH 7.2) 속에서 항온처리하여 제1의 기본선(baseline)을 수득하고, 후속적으로 120초 동안 PBS(pH 7.2) 중 200 nM mFcγRIV(hFcγRIIIa의 오르솔로그), 160 nM mFcγRIII(hFcγRIIa의 오르솔로그), 75 nM mFcγRIIb(hFcγRIIb의 오르솔로그) 또는 120 nM mFcRn로 로딩하였다. 로딩 후, 바이오센서를 60초 동안 PBS 완충제(Fcγ 수용체의 경우 pH 7.2 및 FcRn의 경우 pH 5.8) 속에서 항온처리하여 제2의 기본선을 수득하고, 60초 동안 시험 항체의 6점 2-배 일련 희석물(mFcγ 수용체 결합의 경우 2000 nM - 62.5 nM 및 FcRn 결합의 경우 500 nM - 15.6 nM)과 함께 PBS(Fcγ 수용체의 경우 pH 7.2 및 FcRn의 경우 pH 5.8)과 함께 항온처리하여 연합 곡선을 수득하였다. 최종적으로, 바이오센서를 120초 동안 PBS(mFcγR의 경우 pH 7.2 및 mFcRn의 경우 pH 5.8) 속에서 항온처리하여 해리 곡선을 수득하였다. 동역학 및 친화성 상수를 연합 및 해리 데이타를 1:1 결합 모델에 전반적으로 핏팅하여 계산하였다.

[1892] 상이한 마우스 Fcγ 수용체 및 마우스 FcRn에 대한 4M2-C12-mIgG1의 결합의 분석 결과는 도 25A 내지 25D에 나타낸다.

[1893] 상이한 마우스 Fcγ 수용체 및 마우스 FcRn에 대한 4M2-C12-mIgG2a의 결합의 분석 결과는 도 26A 내지 26D에 나타낸다. 2개의 별개의 실험을 수행하였고(1 및 2; 참고: 도 29A 내지 29C); 도 26A 내지 26D는 실험 2에서 수득된 결과를 나타낸다. 상이한 Fcγ 수용체에 대해 검출된 결합의 수준은 과학 문헌에 보고된 수준과 비교가능하였다.

[1894] 상이한 마우스 Fcγ 수용체 및 마우스 FcRn에 대한 4M2-C12-mIgG2a LALA PG의 결합에 대한 분석 결과는 도 27A

내지 27D에 나타낸다. mFcγRIV, mFcγRIII 및 mFcγRIIb에 대한 결합의 수준은 무시할만/검출불가능 하였고, mFcRn에 대한 결합의 수준은 4M2-C12-mIgG2a에 의한 mFcRn에 대한 결합의 수준의 유사하였다.

[1895] 상이한 Fcγ에 대한 4M2-C12-mIgG2a NQ의 결합의 분석 결과는 도 28A 내지 28D에 나타낸다.

[1896] 4M2-C12-mIgG1, 4M2-C12-mIgG2a, 4M2-C12-mIgG2a LALA PG 및 4M2-C12-mIgG2a NQ에 대해 측정된 상이한 fC 수용체에 대한 $K_{on}$, $K_{dis}$ 및 $K_D$ 값은 도 29A 내지 29C의 표에서 요약한다.

[1897] **실시예 7: 상이한 Fc 영역을 포함하는 VISTA-결합 항체의 생체 내 분석**

[1898] 4M2-C12-mIgG2a 및 4M2-C12-mIgG2a LALA PG(참고: 실시예 6.1)를 동계 EL4 T-세포 백혈병/림프종 모델에서 생체 내에서 암을 치료하는 효능에 대해 평가하였다.

[1899] EL4 세포를 10% 말 혈청(FBS) 및 1% Pen/Strep가 보충된 DMEM 속에서 배양하였다. 세포를 37℃에서 5% $CO_2$ 항온처리기 속에서 배양하였다.

[1900] 대략 6주령의 C57BL/6 마우스를 InVivos(싱가폴)로부터 수득하였다. 동물을 구체적인 병원체-유리된 조건 하에 가두고 동물 실험 윤리 위원회(IACUC) 가이드라인에 부합하도록 처리하였다. C57BL/6 마우스를 2 X $10^5$ EL4 T-세포 백혈병/림프종 세포와 함께 우측 옆구리에 접종하였다. 종양 이식 후, 종양이 크기가 350 내지 400 $mm^3$에 도달하면, 마우스를 다음의 치료 그룹으로 무작위 처리하였다: 25 mg/kg의 용량에서, a) 비히클 대조군(PBS), b) 4M2-C12 mIgG2a(실시예 5의 [17]), 또는 c) 4M2-C12 mIgG2a-LALA PG(실시예 6의 [18]). 치료는 총 5회 용량에 대해 3일마다 복강내 투여하였다.

[1901] 종양 용적을 디지탈 캘리퍼(digital caliper)를 사용하여 주당 3회 측정하고 식 [L x W2/2]를 사용하여 계산하였다. 연구 종점은 비히클 대조군 처리 그룹의 종양이 길이가 >1.5 cm로 측정되면 도달한 것으로 고려하였다.

[1902] 결과는 도 30A 내지 30C에 나타낸다. 연구의 마지막 날(이식 후 23일째)까지, 4M2-C12 IgG2a 및 4M2-C12 IgG2a LALA PG 치료 그룹 둘 다에서 평균 종양 용적은 신뢰가능한 측정에 대한 크기 미만(<30$mm^3$)이었다. 대조적으로, 비히클(PBS) 처리 그룹에서 마우스 내 평균 종양 용적은 18일째까지 2000$mm^3$를 초과하였고 모든 동물은 안락사시켰다.

[1903] 따라서, 4M2-C12는 IgG2a 및 IgG2a LALA PG 양식 둘 다에서 종양 성장의 강력한 억제를 나타내는 것으로 밝혀졌다.

[1904] 고도로 확립된 EL4 종양을 지닌 마우스를 항-VISTA 항체 4M2-C12로 처리하는 것은 단독치료요법으로서 매우 효과적인 것으로 밝혀졌고, 종양 제거를 야기하였다.

[1905] 4M2-C12의 생물학적 활성은 뮤린(murine) Fcγ 수용체의 개입에 의존적이지 않은 것으로 밝혀졌고, 4M2-C12가 VISTA-매개된 신호전달의 억제를 통해 이의 생물학적 활성을 발휘함을 강력하게 시사한다.

[1906] **실시예 8: 항체에 의해 결합된 VISTA의 에피토프의 분석**

[1907] 항-VISTA 항체를 평가하여 이들이 VISTA에 대한 결합에 대해 서로 경쟁하는지의 여부를 측정하였다.

[1908] VSTB112는 몇가지 영역에서 VISTA에 결합하는 것으로 이미 제시되었다. 주요 에피토프는 서열 번호 59 내지 68번 위치 및 86 내지 97번 위치(즉, 서열 번호: 271 및 272)에 상응하는 것으로 제시되었다. 마이너 에피토프는 서열 번호: 1의 71 내지 84번 위치 및 150 내지 166번 위치(즉, 서열 번호: 273 및 274)에 상응하는 것으로 제시되었다; 참고: 예컨대, 제WO 2017/137830 A1호, 예컨대 절 [0302]에서. VSTB112는 예컨대, 이의 전문이 본원에 참고로 포함된 제WO 2015/097536 A2호에 기술되어 있다.

[1909] IGN175A는 성숙한 아미노산의 처음 32개 아미노산(즉, 서열 번호: 1의 33 내지 64번 위치(즉, 서열 번호: 275))에 상응하는 것으로 제시되었다. IGN175A는 예컨대, 이의 전문이 본원에 참고로 포함된 제WO 2014/197849 A2호에 기술되어 있다.

[1910] 에피토프 비닝 실험(epitope binning experiment)을 BLI에 의해 Octet QK384 시스템(ForteBio)을 사용하여 수행하였다. 요약하면, PBS 중 사람 VISTA-His 재조합 단백질(4.7 μg/ml)을 항-펜타(Penta) His 센서(HIS1K, ForteBio)에 5분 동안 고정시켰다. PBS 속에서 기본선 신호를 30초 동안 PBS 중 400 nM의 포화된 항체를 10분 동안, 및 1000 rpm의 진탕 속도에서 로딩한 다음, PBS를 사용한 120초의 해리 단계 수행하기 전에 측정하였다.

바이오센서를 후속적으로 PBS 중 300 nM의 경쟁 항체로 5분 동안 1000 rpm의 진탕 속도에서 처리하고, PBS를 사용한 120초의 해리 단계를 수행하였다.

[1911] 다음의 항원-결합 분자를 실험에서 분석하였다:

[1912] · IgG1 양식의 4M2-C12 (V4)(실시예 2.2의 [1])

[1913] · IgG1 양식의 4M2-C12(V4-C1)의 사람화된 및 친화성-성숙된 변이체(실시예 13의 [21])

[1914] · IGN175A IgG1(IGN175A HC(서열 번호: 267) + IGN175A LC(서열 번호: 268)를 포함함)

[1915] · VSTB112 IgG1(VSTB112 HC(서열 번호: 269) + VSTB112 LC(서열 번호: 270)를 포함함)

[1916] 다음의 항원/포화 항체/경쟁 항체 조합을 시험하였다:

| 항원 | 포화 항체 | 경쟁 항체 |
|---|---|---|
| 사람 VISTA | V4-C1 IgG1 | IGN175A IgG1 |
| 사람 VISTA | V4-C1 IgG1 | V4-C1 IgG1 |
| 사람 VISTA | V4-C1 IgG1 | VSTB112 IgG1 |
| 사람 VISTA | VSTB112 IgG1 | IGN175A IgG1 |
| 사람 VISTA | IGN175A IgG1 | V4-C1 IgG1 |
| 사람 VISTA | VSTB112 IgG1 | V4-C1 IgG1 |
| 사람 VISTA | IGN175A IgG1 | IGN175A IgG1 |
| 없음 (PBS) | V4-C1 IgG1 | IGN175A IgG1 |

[1917]

[1918] 결과는 도 31A 및 31B에 나타낸다.

[1919] V4 및 V4-C1 IgG1은 VISTA에 대한 결합에 대해 IGN175A와 경쟁하지 않는 것으로 밝혀졌다. VSTB112는 VISTA에 대한 결합에 대해 V4, V4-C1 및 IGN175A와 부분적으로 경쟁하는 것으로 밝혀졌다. 경쟁 항체의 첨가 시 반응에서의 변화(nm)를 하기에 나타낸다.

| 포화 항체 | | 경쟁 항체 | | |
|---|---|---|---|---|
| | | IGN175A | V4-C1 IgG1 | VSTB112 |
| | IGN175A | 0.0454 | 1.4362 | - |
| | V4-C1 IgG1 | 1.0661 | -0,0158 | -0.0124 |
| | VSTB112 | 0.1392 | 0.1579 | - |

[1920]

[1921] 결과는 4M2-C12 및 IGN175A가 VISTA의 국소적으로 먼 영역에 결합하고, VSTB112가 4M2-C12 및 IGN175A에 인접한 영역 내에서 VISTA에 결합함을 나타낸다.

[1922] VSTB112가 VISTA에 대한 결합에 대해 IGN175A와 경쟁한다는 관찰과 함께 V1-C1 및 IGN175A가 VISTA에 대한 결합에 대해 경쟁하지 않는다는 사실은 4M2-C12의 CDR을 포함하는 항체가 IGN175A에 의해 결합된 VISTA의 에피토프와 동일하지 않고 VSTB112에 의해 결합된 VISTA의 에피토프와 또한 동일하지 않은 VISTA의 에피토프에 결합한다는 것을 나타낸다.

[1923] VISTA의 서열, 4M2-C12를 생성하는 데 사용되는 면역원 및 종 교차 반응성 데이터의 분석으로부터, 본 발명자는 4M2-C12 및 이의 유도체가 서열 번호: 322에 나타낸 서열(이는 서열 번호: 1의 76번 위치에 상응한다)에 결합한다고 결론내었다.

[1924] **실시예 9: T 세포 증식의 VISTA-매개된 억제를 구제하는 VISTA-결합 항체의 능력의 분석**

[1925] VISTA 매개 신호전달의 억제 효과를 구제하는 항-VISTA 항체의 능력을 시험관내 분석에서 분석하였다.

[1926] 요약하면, 96-웰 플레이트를 항-CD3 및 VISTA-Ig 또는 대조군-Ig로 1:1(2.5 μg/ml의 항-CD3:2.5 μg/ml의 VISTA/대조군 Ig) 또는 2:1(2.5 μg/ml의 항-CD3: 1.25 μg/ml의 VISTA/대조군 Ig)의 농도 비에서 코팅하였다. 비관련 항원-Ig를 대조군 조건으로서 사용하였다. 플레이트를 밤새 4℃에서 항온처리하였다.

[1927] PBMC를 새로이 수집한 혈액 샘플로부터 정제하고 T 세포에 대해 사람 Pan T 세포 단리된 키트(Miltenyi Biotec)를 사용하여 추가로 농축시켰다. 농축된 T 세포 집단을 이후에 CFSE로 표지하였다.

[1928] 웰(well)을 PBS로 3회 세척하고, 100,000개의 CFSE 표지된 T 세포를 10% FBS가 보충된 완전 RPMI 1640 배지에, 4M2-C12 IgG1(실시예 2.2의 [1])의 존재 하에 20 μg/ml 또는 50 μg/ml의 최종 농도에서, 또는 VSTB 1 12의 존재하에 20 μg/ml의 최종 농도에서, 또는 첨가된 항체의 부재 하에 각각의 웰에 가하였다.

[1929] 5일 후, 세포를 수거하고, 형광 접합된 항-CD4 및 항-CD8 항체로 표지하고, Macsquant Analyzer 10을 사용하여 유동 세포분석법로 분석하였다.

[1930] 실험 결과는 도 33A 내지 33D에 나타낸다. 4M2-C12는 증식시키는 CD4+ T 세포와 CD8+ T 세포 둘 다의 능력을 회복시키는 것으로 밝혀졌다.

[1931] 중요하게도, 4M2-C12는 VSTB112보다 T 세포의 증식을 회복하는데 보다 효과적임이 밝혀졌다.

[1932] **실시예 10: LPS에 대한 반응에서 THP1 세포에 의한 IL-6의 생산을 촉진하는 VISTA-결합 항체의 능력의 분석**

[1933] LPS 자극에 대한 반응에서 THP-1 세포에 의한 IL-6 생산을 촉진하는 항-VISTA 항체의 능력을 시험관내 분석으로 분석하였다.

[1934] 요약하면, 미분화 THP1 세포를 FBS 또는 pen/strep의 부재하에 RPMI 배지 속에서 96 웰 플레이트에 이중(100,000개의 세포/웰)으로 씨딩하였다. 이어서 세포를 2000 μg/ml 내지 7.8 μg/ml의 범위의 상이한 농도의 4M2-C12 IgG1(실시예 2.2의 [1]), 또는 1000 μg/ml 내지 7.8 μg/ml 범위의 VSTB112의 상이한 농도의 존재 하에서 LPS(100 μg/ml의 최종 농도) 및 $MnCl_2$(100 μM)로 처리하였다. 3일 후, 세포 배양 상층액을 수집하고 ELISA로 분석하여 IL-6 사람 ELISA Kit(Invitrogen)를 사용하여 IL-6의 수준을 측정하였다.

[1935] 결과는 도 34A 및 34B에 나타낸다. 4M2-C12는 VSTB112보다 LPS-자극된 THP1 세포에 의해 보다 많은 IL-6의 생산을 촉진하는 것으로 밝혀졌다.

[1936] **실시예 11: 생체 내에서 IL-6의 생산을 촉진하는 VISTA-결합 항체의 능력의 분석**

[1937] 4M2-C12를 사용한 처리에 대한 반응시 IL-6 생산을 생체 내에서 시험하였다.

[1938] 요약하면, C57BL/6 마우스(n=3)에게 단일의 600 μg 용량의 4M2-C12 mIgG2a(실시예 5의 [17])를 투여하고, 혈액 샘플을 투여 전 2시간 째에, 및 투여 후 0.5시간, 6시간, 24시간, 96시간, 168시간 및 336시간 째에 마우스로부터 수거하였다.

[1939] 혈청을 IL-6 함량에 대해 마우스 IL-6 ELISA 키트(Abcam, ab100712)를 사용하여 분석하였다.

[1940] 결과는 도 35에 나타낸다. IL-6은 4M2-C12 mIgG2a의 투여 후 0.5시간째에 혈청 속에서 검출되었다.

[1941] **실시예 12: 단독으로 또는 항-PD-1/PD-L1 항체와 조합된 VISTA-결합 항체의 생체 내 분석**

[1942] 12.1 CT26 세포 모델

[1943] T 세포 백혈병/림프종의 동계 모델을 $1x10^5$개의 CT26 세포를 Balb/c 마우스의 우측 옆구리 내로 피하 주사함으로써 생성시켰다.

[1944] 마우스(처리 그룹 당 7마리)에게 다음을 총 7회 용량에 대해 3일마다 복강내 투여하였다:

[1945] · 600 μg의 4M2-C12 IgG2a(실시예 5의 [17])

[1946] · 200 μg의 항-PD-1 항체(클론 RMP1-14 (Bioxcell))

[1947] · 600 μg의 4M2-C12 IgG2a + 200 μg의 항-PD-1 항체

[1948] · PBS 단독

[1949] 종양 용적을 디지털 캘리퍼를 사용하여 주당 3회 측정하고 식 [L x W2/2]을 사용하여 계산하였다. 연구 종점은

대조군의 종양이 길이가 >1.5cm로 측정되면 도달한 것으로 간주하였다.

[1950] 결과는 도 36A 및 36B에 나타내었다. 항-VISTA 항체 4M2-C12와 항-PD-1의 조합 치료요법은 단독으로 사용된 어느 약제보다 종양 성장을 더 큰 정도로 억제하였다.

[1951] 종양 침윤 CD45+ 세포의 면역프로파일링(immuneprofiling)을 수행하였다. 요약하면, 실험 22일째에 종양을 수확하여, 단일 세포 현탁액 내로 가공하고 면역 세포 표면 단백질(CD45, CD4, CD8, CD25, CD11b, Ly6G 및 Ly6C)에 대해 특이적인 항체로 염색하였다.

[1952] 샘플을 유동 세포분석법으로 분석하였고, 다음과 같이 상이한 면역 세포 표면 단백질에 대한 이의 염색을 기준으로 다음의 면역 세포 서브세트(subset)로 분류하였다:

[1953] · CD4 세포: $CD45^{+}CD4^{+}$;

[1954] · CD8 T 세포: $CD45^{+}CD8^{+}$;

[1955] · Treg 세포: $CD45^{+}CD4^{+}CD25^{+}$;

[1956] · 과립구 MDSC(g-MDSC): $CD45^{+}CD11b^{+}Ly6G^{+}Ly6C^{lo/-}$

[1957] · 단핵구 MDSC(m-MDSC): $CD45^{+}CD11b^{+}Ly6G^{-}Ly6C^{hi/+}$

[1958] 나타낸 표현형을 갖는 종양 침윤 CD45+ 세포의 퍼센트는 하기에 요약된다:

[1959]

| 처리 그룹 | CD4 세포 | CD8 세포 | Treg | g-MDSC | m-MDSC |
|---|---|---|---|---|---|
| PBS | 1.03% | 5.99% | 0.09% | 33.08% | 9.8% |
| 4M2-C12 IgG2a | 1.66% | 6.51% | 0.11% | 26.4% | 8.34% |
| 항-PD-1 항체 | 1.05% | 7.21% | 0.14% | 46.2% | 15.25% |
| 4M2-C12 IgG2a + 항-PD-1 항체 | 1.55% | 9.98% | 0.22% | 15.66% | 14.04% |

[1960] g-MDSC인 종양 침윤 CD45+ 세포의 퍼센트는 도 37에 나타낸다. 4M2-C12(단독, 또는 항-PD-1과 함께)를 사용한 처리는 종양-침윤 CD45+ 세포 중에서 g-MDSC의 비율을 유의적으로 감소시켰다.

[1961] 혈액을 18일째에 마우스로부터 수득하고, 혈청을 마우스용 MACSPlex 사이토킨 10 키트(Miltenyi Biotec)를 사용한 분석에 의해 매우 상이한 사이토킨의 수준에 대해 분석하였다.

[1962] 결과는 도 38A 내지 38E에 나타낸다.

[1963] 12.2 B16-BL6 세포 모델

[1964] 도 40A 및 40B는 18일까지 연장된, 상기 실시예 5.2.3에 기술된 연구의 결과(도 17에 나타낸 결과)를 나타낸다. 항-VISTA 종결자 4M2-C12와 항-PD-1의 조합 치료요법은 단독으로 사용된 두 약제보다 종양 성장을 더 큰 정도로 억제하였다.

[1965] 종양 침윤 CD45+ 세포의 면역프로파일링을 수행하였다. 요약하면, 실험 18일째에 종양을 수거하고, 단일 세포 현탁액으로 가공하고, 항체로 및 면역 세포 표면에 특이적으로 염색하고, 유동 세포분석법으로 분석하고, 세포를 상기 실시예 12.1에 기술된 바와 같이 면역 세포 서브세트로 분류하였다.

[1966] 나타낸 표현형을 갖는 종양-침윤 CD45+ 세포의 퍼센트를 하기에 요약한다:

| 처리 그룹 | CD4 세포 | CD8 세포 | Treg | g-MDSC | m-MDSC |
|---|---|---|---|---|---|
| PBS | 2.72% | 8.79% | 1.42% | 2.06% | 6.68% |
| 4M2-C12 IgG2a | 2.84% | 10.7% | 1.58% | 1.65% | 13.94% |
| 항-PD-1 항체 | 0.95% | 3.43% | 0.51% | 36.65% | 14.12% |
| 4M2-C12 IgG2a + 항-PD-1 항체 | 3.58% | 10.6% | 0.82% | 5.45% | 14.44% |

[1967]

[1968] g-MDSC인 종양-침윤 CD45+ 세포의 퍼센트를 도 41에 나타낸다.

[1969] 12.3 EL4 세포 모델

[1970] T 세포 백혈병/림프종의 동계 모델을 $2x10^5$개의 EL4 세포를 C57BL/6 마우스의 우측 옆구리에 피하 주사함으로써 확립하였다.

[1971] 마우스(치료 그룹 당 7마리)에게 다음을 총 5회 용량에 대해 3일마다 복강내 투여하였다:

[1972] · 600 μg의 4M2-C12 IgG2a(실시예 5의 [17])

[1973] · 200 μg의 항-PD-1 항체(클론 RMP1-14 (Bioxcell))

[1974] · 600 μg의 4M2-C12 IgG2a + 200 μg의 항-PD-1 항체

[1975] · PBS 단독

[1976] 종양 용적을 디지털 캘리퍼를 사용하여 주당 3회 3배 측정하고 식 [L x W2/2]를 사용하여 계산하였다. 연구 종점은 대조군의 종양이 길이가 >1.5cm로 측정되면 도달한 것으로 간주하였다.

[1977] 결과는 도 42에 제시되어 있다. 항-VISTA 항체 4M2-C12 및 항-PD-1을 사용한 조합 치료요법은 단독으로 사용된 어느 제제보다 종양 성장을 더 큰 정도로 억제하였다.

[1978] 종양 침윤 CD45+ 세포의 면역프로파일링을 수행하였다. 요약하면, 실험 16일째에 종양을 수거하고, 단일 세포 현탁액내로 가공하고, 항체로 및 면역 세포 표면에 특이적으로 염색하고, 유동 세포분석법으로 분석하고, 세포를 상기 실시예 12.1에 기술된 바와 같이 면역 세포 서브세트로 분류하였다.

[1979] 나타낸 표현형을 갖는 종양-침윤 CD45+ 세포의 퍼센트를 하기에 요약한다:

| 처리 그룹 | CD4 세포 | CD8 세포 | Treg | g-MDSC | m-MDSC |
|---|---|---|---|---|---|
| PBS | 3.71% | 0.55% | 0.18% | 19.41% | 0.88% |
| 4M2-C12 IgG2a | 7.4% | 1.84% | 0.19% | 14.51% | 0.94% |
| 항-PD-1 항체 | 4.35% | 3.04% | 0.09% | 20.91% | 0.81% |
| 4M2-C12 IgG2a + 항-PD-1 항체 | 6.53% | 2.18% | 0.35% | 10.16% | 0.33% |

[1980]

[1981] g-MDSC인 종양 침윤 CD45+ 세포의 퍼센트는 도 43에 나타낸다. 4M2-C12(단독, 또는 항-PD-1과의 조합)를 사용한 처리는 종양-침윤 CD45+ 세포 중에서 g-MDSC의 비율을 유의적으로 감소시켰다.

[1982] 12.4 결론

[1983] PD-1/PD-L1 신호 전달의 억제는 CT26, B16-BL6 및 EL4 모델에서 종양-침윤 CD45+ 세포 중 g-MDSC의 비율을 증가시키지만, 4M2-C12를 사용한 치료는 g-MDSC 확장을 억제한다.

[1984] **실시예 13: VISTA-결합 항체의 추가의 특성화**

[1985] 추가의 VISTA-결합 항원-결합 분자를 생산하였다:

| 항원-결합 분자 | 폴리펩타이드 | 항체 |
|---|---|---|
| [21] | V4-C1 VH-CH1-CH2-CH3 (서열 번호:311)<br>+<br>V4-C1 VL-Cκ (서열 번호:312) | 항-VISTA 클론 V4-C1 IgG1 |
| [22] | V4-C9 VH-CH1-CH2-CH3 (서열 번호:313)<br>+<br>V4-C9 VL-Cκ (서열 번호:314) | 항-VISTA 클론 V4-C9 IgG1 |
| [23] | V4-C24/C26/C27/C28/C30/C31 VH-CH1-CH2-CH3 (서열 번호:315)<br>+<br>V4-C24 VL-Cκ (서열 번호:316) | 항-VISTA 클론 V4-C24 IgG1 |
| [24] | V4-C24/C26/C27/C28/C30/C31 VH-CH1-CH2-CH3 (서열 번호:315)<br>+<br>V4-C26 VL-Cκ (서열 번호:317) | 항-VISTA 클론 V4-C26 IgG1 |
| [25] | V4-C24/C26/C27/C28/C30/C31 VH-CH1-CH2-CH3 (서열 번호:315)<br>+<br>V4-C27 VL-Cκ (서열 번호:318) | 항-VISTA 클론 V4-C27 IgG1 |
| [26] | V4-C24/C26/C27/C28/C30/C31 VH-CH1-CH2-CH3 (서열 번호:315)<br>+<br>V4-C28 VL-Cκ (서열 번호:319) | 항-VISTA 클론 V4-C28 IgG1 |
| [27] | V4-C24/C26/C27/C28/C30/C31 VH-CH1-CH2-CH3 (서열 번호:315)<br>+<br>V4-C30 VL-Cκ (서열 번호:320) | 항-VISTA 클론 V4-C30 IgG1 |
| [28] | V4-C24/C26/C27/C28/C30/C31 VH-CH1-CH2-CH3 (서열 번호:315)<br>+<br>V4-C31 VL-Cκ (서열 번호:321) | 항-VISTA 클론 V4-C31 IgG1 |

[1986]

[1987] V4-C1, V4-C9, V4-C24, V4-C26, V4-C27, V4-C28, V4-C30 및 V4-C31를 안전성 및 면역원성에 대해 인 실리코로 IMGT DomainGapAlign(Ehrenmann et al., Nucleic Acids Res., 38, D301-307 (2010)) 및 IEDB 탈면역화(Dhanda et al., Immunology. (2018) 153(1):118-132) 도구를 사용하여 분석하였다.

[1988] V4-C1, V4-C9, V4-C24, V4-C26, V4-C27, V4-C28, V4-C30 및 V4-C31은 사람 중쇄 및 경쇄에 대해 사람화된 것으로 고려될 만큼 충분한 상동성을 가졌고(즉 >85%), 안전한 것으로 고려하기에 충분한 잠재적으로 면역원성 펩타이드의 수가 적었고(참고: 도 53), 잠재적인 개발가능성 문제를 유발할 수 있는 어떠한 다른 특성을 보유하지 않았다.

[1989] 13.1 BLI에 의한 결합 친화성의 분석

[1990] 사람 및 마우스 VISTA 단백질 및 사람 PD-L1에 대한 V4-C1, V4-C9, V4-C24, V4-C26, V4-C27, V4-C28, V4-C30 및 V4-C31(즉, [21] 내지 [28])의 결합을 BLI에 의해 Pall ForteBio Octet QK 384 시스템을 사용하여 평가하였다.

[1991] 요약하면, 항-펜타-HIS 바이오센서를 60초 동안 PBS 완충제(pH 7.2) 속에서 항온처리하여 제1의 기본선을 수득하고, 후속적으로 120초 동안 PBS(pH 7.2) 중 180 nM hVISTA, 180 nM mVISTA 또는 250 nM hPD-L1로 로딩하였다. 로딩 후, 바이오센서를 60초 동안 PBS 완충제 pH 7.2 속에서 항온처리하여 제2의 기본선을 수득하고, PBS pH 7.2 중 120초 또는 190초 동안 6점의, 1배 희석 시리즈의 시험 항체(500 nM - 15.6 nM)와 항온처리하여 연합 곡선을 수득하였다. 최종적으로, 바이오센서를 120초 동안 PBS pH 7.2 속에서 항온처리하여 해리 곡

선을 수득하였다. 동역학 및 친화성 상수를 1:1 결합 모델에 대해 연합 및 해리 데이타의 전반적인 핏팅으로 계산하였다.

[1992] V4-C1, V4-C9, V4-C24, V4-C26, V4-C27, V4-C28, V4-C30 또는 V4-C31 중 어느 것도 사람 PD-L1에 대해 유의적일 결합을 나타내지 않았다(도 45C).

[1993] 본 실험에서 사람 VISTA 및 마우스 VISTA에 대한 V4-C1, V4-C9, V4-C24, V4-C26, V4-C27, V4-C28, V4-C30 및 V4-C31의 결합에 대해 계산된 동력학적 및 열역학적 상수를 도 45D에 나타낸다.

[1994] V4-C1, V4-C9, V4-C24, V4-C26, V4-C27, V4-C28, V4-C30 및 V4-C31에 의한 마우스 VISTA 단백질에 대한 결합은 VSTB112 IgG1(VSTB112 HC(서열 번호: 269) + VSTB112 LC(서열 번호: 270)를 포함함)의 평가를 포함하는 별개의 실험에서 분석하였다.

[1995] VSTB112는 마우스 VISTA 단백질에 대한 유의한 결합을 나타내지 않았다(도 46A). 이 실험에서 마우스 VISTA에 대한 V4-C1, V4-C9, V4-C24, V4-C26, V4-C27, V4-C28, V4-C30 및 V4-C31의 결합에 대해 계산된 동력학적 및 열역학적 상수를 도 46B에 나타낸다.

[1996] 추가의 실험에서, 사람 VISTA 및 마우스 VISTA에 대한 V4-C1, V4-C9, V4-C24, V4-C26, V4-C27 및 VSTB112 IgG1의 결합을 분석하고, 계산된 동역학적 및 열역학적 상수를 도 47C에 나타낸다.

[1997] 다른 실험에서, 사람 VISTA, 마우스 VISTA 및 사람 CD47에 대한 V4(실시예 2.2의 [1]) 및 VSTB112 IgG1(VSTB112 HC(서열 번호: 269) + VSTB112 LC(서열 번호: 270)를 포함함)의 결합을 분석하였다. 항-펜타-HIS 바이오센서를 PBS 완충제(pH 7.2) 속에서 60초 동안 항온처리하여 제1의 기본선을 수득하고, 후속적으로 PBS(pH 7.2) 속에서 180nM hVISTA, 180nM mVISTA 또는 300nM hCD47과 함께 120초 동안 로딩하였다. 로딩 후, 바이오센서를 PBS 완충액 pH 7.2에서 60초 동안 항온처리하여 제2의 기준선을 수득하고, PBS pH 7.2에서 시험 항체의 희석 시리즈(1500nM - 46.9nM)과 함께 120초 동안 항온처리하여 연합 곡선을 수득하였다. 최종적으로, 바이오센서를 PBS pH 7.2에서 120초 동안 항온처리하여 해리 곡선을 수득하였다. 동력학 및 친화도 상수는 결합 및 해리 데이터를 1:1 결합 모델에 전반적으로 핏팅하여 계산하였다.

[1998] V4와 VSTB112 모두 사람 CD47에 대한 결합을 나타내지 않았다. VSTB112는 마우스 VISTA 단백질에 대해 유의적인 결합을 나타내지 않았지만, V4는 유의적인 결합을 나타내었다. 계산된 동력학적 및 열역학적 상수는 도 48B에 나타낸다.

[1999] 13.2 ELISA에 의한 결합 친화성의 분석

[2000] ELISA를 사용하여 사람 VISTA 및 마우스 VISTA에 대한 상이한 항체의 결합을 평가하였다. ELISA는 상기 실시예 3.3에 기술된 바와 같이 수행하였다.

[2001] 다음의 항체를 실험에서 분석하였다:

[2002] · 4M2-C12 IgG1 (실시예 2.2의 [1]; 도에서 "V4pr"로서 지칭됨)

[2003] · V4-C1 IgG1 (실시예 13의 [21])

[2004] · V4-C9 IgG1 (실시예 13의 [22])

[2005] · V4-C24 IgG1 (실시예 13의 [23])

[2006] · V4-C26 IgG1 (실시예 13의 [24])

[2007] · V4-C27 IgG1 (실시예 13의 [25])

[2008] · V4-C28 IgG1 (실시예 13의 [26])

[2009] · V4-C30 IgG1 (실시예 13의 [27])

[2010] · V4-C31 IgG1 (실시예 13의 [28])

[2011] · VSTB112 IgG1 (VSTB112 HC(서열 번호: 269) + VSTB112 LC(서열 번호: 270)를 포함함)

[2012] · 아테졸리주맙

[2013] · 사람 IgG1 동형 대조군

[2014] 수득된 결과는 도 49A 및 49B에 나타내고, 나타낸 단백질에 대한 항체의 결합에 대해 ELISA로부터 계산된 EC50(nM) 값은 도 49C에 요약한다.

[2015] 추가의 실험을 수행하였고 여기서 사람 VISTA 또는 마우스 VISTA에 대한 V4-C1, V4-C9, V4-C24, V4-C26, V4-C27, V4-C28, V4-C30, V4-C31, VSTB112 및 동형 대조군 항체의 결합을 분석하는 추가의 실험 VISTA 또는 마우스 VISTA를 분석하였다. 결과는 도 50A 및 50B에 나타내고, 나타낸된 단백질에 대한 항체의 결합에 대해 ELISA로부터 계산된 EC50(nM) 값을 도 50C에 요약한다.

[2016] 추가의 실험을 수행하였고 여기서 사람 VISTA 또는 마우스 VISTA에 대한 V4-C1, V4-C9, V4-C24, V4-C26, V4-C27, VSTB112 및 동형 대조군 항체의 결합을 분석하였다. 결과는 도 51A 및 51B에 나타내고, 나타낸 단백질에 대한 항체의 결합에 대해 ELISA로부터 계산된 EC50(nM) 값을 도 51C에 요약한다.

[2017] 추가의 실험을 수행하였고 여기서 사람 VISTA, PD-L1, B7H3, B7H4, B7H6, B7H7, PD-1 및 CTLA-4에 대한 V4, V4-C24, V4-C26, V4-C27, V4-C28, V4-C30 및 V4-C31의 결합을 분석하였다. 결과를 도 56A 내지 56G에 나타낸다. V4-C24, V4-C26, V4-C27, V4-C28, V4-C30 및 V4-C31 각각은 사람 VISTA에 강한 결합을 나타냈고, 단백질의 B7 계열의 다른 구성원에 대한 교차 반응성은 나타내지 않았다.

[2018] 추가의 실험에서, V4(도 57에서는 "V4P"로 지칭됨), V4-C24, V4-C26, V4-C27, V4-C28, V4-C30 및 V4-C31을 사람 VISTA, 마우스 VISTA, 래트 VISTA 및 cyno VISTA에 대한 결합에 대해 분석하였다. 수득된 결과는 도 57A 내지 57H에 나타내고, 나타낸 단백질에 대한 항체의 결합에 대해 ELISA로부터 계산된 EC50(M) 값은 도 57I에 요약한다.

[2019] V4 및 모든 V4 유래된 클론 V4-C24, V4-C26, V4-C27, V4-C28, V4-C30 및 V4-C31 모두는 사람 VISTA, 마우스 VISTA, 래트 VISTA 및 cyno VISTA에 결합하는 것으로 밝혀졌다.

[2020] 13.3 유동 세포분석법에 의한 VISTA-발현 세포에 대한 결합의 분석

[2021] 항-VISTA 항체를 필수적으로 상기 실시예 3.1에 기술된 바와 같이 VISTA-발현세포에 결합하는 이의 능력에 대해 분석하였다.

[2022] 요약하면, 사람 VISTA 또는 마우스 VISTA를 암호화하는 벡터로 형질감염시킨 세포, 또는 HEK293 세포를 1 μg/ml의 항-VISTA 항체 또는 동형 대조군 항체와 4℃에서 1시간 동안 항온처리하였다. 이후에, 세포를 세척하고, 10 μg/ml의 FITC-접합된 항-사람 Fc 항체와 함께 4℃에서 1시간 동안 항온처리하였다. 세포를 다시 세척한 후, 유동 세포분석번으로 분석하였다.

[2023] 다음의 항체를 실험에 사용하였다:

[2024] · 4M2-C12 IgG1 (실시예 2.2의 [1]; 도에서 "V4P"로 지칭됨)

[2025] · V4-C24 IgG1 (실시예 13의 [23])

[2026] · V4-C26 IgG1 (실시예 13의 [24])

[2027] · V4-C27 IgG1 (실시예 13의 [25])

[2028] · V4-C28 IgG1 (실시예 13의 [26])

[2029] · V4-C30 IgG1 (실시예 13의 [27])

[2030] · V4-C31 IgG1 (실시예 13의 [28])

[2031] · VSTB112 IgG1 (VSTB112 HC(서열 번호: 269) + VSTB112 LC(서열 번호: 270)를 포함함)

[2032] · 인간 IgG1 동형 대조군

[2033] 결과는 도 58A 내지 58C에 나타낸다.

[2034] 13.4 차등 주사 형광측정법에 의한 열안정성의 분석

[2035] 상이한 항체의 열안정성을 상기 실시예 3.4에 기술된 바와 같이, 차등 주사 형광측정법 분석으로 평가하였다.

[2036] V4-C1, V4-C9, V4-C24, V4-C26, V4-C27, V4-C28, V4-C30, V4-C31(즉, [21] 내지 [28]) 및 VSTB112(3개)의 열안정성에 대한 시차 주사 형광분석법 분석을 위해 얻은 미가공 데이터의 1차 유도체를 도 52A 내지 52I에 나타

내고, 그 결과를 도 52J에 요약한다.

[2037] V4-C1, V4-C9, V4-C24, V4-C26, V4-C27, V4-C28, V4-C30 및 V4-C31은 V4(67.5℃)에 비해 Fab 영역에 대해 더 높은 용융 온도(Tm)를 가지고 따라서 개선된 열 안정성을 갖는 것으로 밝혀졌다.

[2038] **실시예 14: 면역조직화학에서 VISTA-결합 항체의 용도**

[2039] 항-VISTA 항체 4M2-C12 mIgG2a(실시예 5의 [17])를 사람 VISTA 단백질 검출을 위한 면역조직화학에서 사용될 능력에 대해 평가하였다.

[2040] 절편(section)과의 가공은 Bond 시약(Leica Biosystems)을 사용하여 수행하였다. 정상의 사람 비장 또는 정상의 사람 난소로부터의 상업용 파라핀 절편을 Bond Dewax 용액 속에서 탈-파라핀화하고, 이를 사용하여 재수화하였다. 이후에, 절편을 각 단계 사이에 1x Bond 세척액의 4-5회 세정으로 처리하였다: (i) Bond Epitope Retrieval 용액으로 100℃에서 40분 동안 처리함에 의한 항원 노출, (ii) 실온에서 3.5% (v/v) $H_2O_2$로 15분 동안 처리함에 의한 내인성 퍼옥시다제 차단, (iii) 실온에서 30분 동안 10% 염소 혈청으로 처리함에 의한 차단, (iv) 4℃에서 9.37 mg 용액의 1:50 희석에서 4M2-C12 mIgG2a와 함께 밤새 항온처리, (v) 실온에서 5분 동안 HRP-중합체 접합된 염소 항-마우스 항체와 함께 항온처리, 및 (vi) 실온에서 7분 동안 Bond Mixed DAB Refine으로 전개한 다음, 물로 탈이온화하여 반응을 정지시킴.

[2041] 절편을 실온에서 5분 동안 헤마톡실린으로 역염색하고 탈이온수와 1x Bond Wash 용액으로 세정한 다음, 탈수하고, 합성의 탑재 매체(synthetic mounting media)에 탑재하고 고해상도로 스캔하였다.

[2042] 결과는 도 59A 및 59B에 나타낸다. 항-VISTA 항체는 비장의 세포의 세포질을 염색하지만, 정상의 난소 절편에서의 세포(대조군)는 염색하지 않는다.

[2043] **실시예 15: T 세포 증식 및 전염증성 사이토킨의 생산의 VISTA-매개된 억제를 구제하는 VISTA-결합 항체의 능력의 추가의 분석**

[2044] 항-VISTA 항체를 VISTA-매개된 억제로부터 T 세포를 방출하는 능력에 대해 특성화하였다.

[2045] 96-웰 플레이트를 2.5 μg/ml의 농도에서 항-CD3으로 코팅하고 4℃에서 밤새 항온처리하였다. PBMC를 혈액 샘플로부터 단리한 다음, T 세포를 PBMC로부터 농축시키고 위와 같이 CSFE로 표지한 다음, CFSE-표지된 T 세포를 2% FBS가 보충된 RPMI 1640 배지 속에서 사람 VISTA를 암호화하는 작제물로 형질감염된 HEK293-6E 세포와 2:1의 비율에서 공-배양하였다.

[2046] 이후에, 세포를 4M2-C12-hIgG1(실시예 2.2의 [1]) 또는 VSTB112로 0 μg/ml(대조군), 20 μg/ml 또는 50 μg/ml의 농도에서 처리하였다.

[2047] 5일 후, 세포를 수거하고 유동 세포분석법으로 분석하여 CSFE 희석 프로파일에 의한 세포 증식을 측정하였다. 세포 배양 상층액을 도한 수거하고, INFγ 및 TNFα 수준을 ELISA로 분석하였다.

[2048] 결과를 도 60A 내지 60D에 나타낸다. 도 60A 및 60B는 4M2-C12-hIgG1이 증식의 VISTA-매개된 억제로부터 T 세포를 용량 의존적 방식으로 방출하였음을 나타낸다. 도 60C 및 60D는 4M2-C12-hIgG1이 INFγ 및 TNFα 생산의 VISTA-매개된 억제로부터 T 세포를 방출하였음을 나타낸다.

[2049] 추가 실험에서, 미분화 THP1 세포를 FBS 또는 pen/strep(100,000개의 세포/웰)이 없는 RPMI 배지 속에서, 96웰 플레이트의 웰에 이중으로 씨딩하고, 세포를 LPS(100μg/ml)로 일련 희석된 농도의 4M2-C12-hIgG1(예 2.2의 [1])의 존재하에서, 2000μg/ml 내지 7.8μg/ml 범위의 농도에서 자극시켰다.

[2050] 24시간 후, 세포 배양 상층액을 수집하고 IL-6 및 TNFα에 대해 ELISA로 분석하였다. 또한 세포를 고정하고 투과하고, 유동 세포분석법을 통해 VISTA의 존재를 분석하였다.

[2051] 결과는 도 61A 내지 61C에 나타낸다. 4M2-C12-hIgG1은 LPS-자극된 THP1 세포로부터 IL-6 및 TNFα 생산을 용량-의존적 방식으로, 및 VSTB112보다 훨씬 더 큰 정도로 증가시키는 것으로 밝혀졌다.

[2052] 추가 실험에서, 미분화된 THP1 세포를 FBS 또는 pen/strep(100,000개의 세포/웰)이 없는 RPMI 배지 속에서, 96웰 플레이트의 웰에 이중으로 씨딩하고, 세포를 LPS(100μg/ml) 및 $MnCl_2$(100 μM)로 4M2-C12-hIgG1(예 2.2의 [1]) 또는 4M2-C12-hIgG4(아래에 표시된 [29])의 존재하에, 2000 μg/ml 내지 7.8 μg/ml의 범위의 농도에서 자극시켰다. 24시간 후 세포 배양 상층액을 수집하고 IL-6에 대해 ELISA로 분석하였다.

| 항원 결합 분자 | 폴리펩타이드 | 항체 |
|---|---|---|
| [29] | 4M2-C12 VH-CH1-CH2-CH3 IgG4 (서열 번호:330)<br>+<br>4M2-C12 VL-Cκ (서열 번호:213) | 항-VISTA 클론 4M2-C12 IgG4 |

[2053]

[2054] 결과는 도 62에 나타낸다. LPS-자극된 THP1 세포에 의한 IL-6의 증가된 생산은 Fc-독립적인 것과 무관한 것으로 밝혀졌는데, 이는 유의적인 차이가 사람 iGg1 또는 iGg4 양식의 4M2-C12를 사용한 처리에 의해 유도된 IL6 수준 사이에서 관찰되지 않았기 때문이다.

[2055] **실시예 16: 약리학, 독성 및 면역독성의 추가의 분석**

[2056] 급성 용량 연구에서, 래트에게 10mg/kg, 25mg/kg, 100mg/kg 또는 250mg/kg의 4M2-C12-hIgG1(실시예 2.2의 [1]) 또는 4M2-C12-hIgG4(실시예 15의 [29])의 단일 용량을 투여하였다.

[2057] 혈액을 투여 후 기준선(~2시간), 0.5시간, 6시간, 24시간, 96시간, 168시간 및 336시간 째에 래트로부터 채취하였다. 혈청 내 항체를 ELISA로 정량화하였다.

[2058] 약동학적 분석을 위한 매개변수를 비구획 모델에서 유도시켰다:

[2059] 최대 농도(Cmax), AUC(0-336시간), AUC(0-무한), 반감기(t½), 제거(CL), 정체 상태에서 분포 용적(Vss).

[2060] 결과는 도 63A 내지 63D에 나타낸다.

[2061] 별개의 실험에서 BALB/C 마우스에게 50mg/kg의 4M2-C12-hIgG1(실시예 2.2의 [1]) 또는 동일한 용적의 PBS를 단일 용량으로 투여하였다. 혈액 샘플을 96시간 후에 채취하고, HM5 혈액학 분석기(HM5 Hematology Analyser)를 사용하여 상이한 유형의 백혈구의 수를 분석하였다. 혈액 샘플을 또한 간독성과 신독성의 상관관계에 대해 분석하였다.

[2062] 대표적인 결과를 도 64A 내지 64C의 표에 나타낸다.

[2063] 추가의 실험에서, 스프라그 다울리 래트에게 250mg/kg의 4M2-C12-hIgG1(실시예 2.2의 [1]) 또는 동일한 용적의 PBS를 단일 용량으로 투여하였다. 혈액 샘플을 6시간, 24시간, 96시간, 168시간째에 채취하여 HM5 혈액학 분석기를 사용하여 다양한 유형의 백혈구 수를 분석하였다. 혈액 샘플을 또한 간독성, 신독성 및 췌장 독성의 상관관계에 대해 분석하였다.

[2064] 대표적인 결과를 도 65A 내지 65C의 표에 나타낸다.

[2065] 4M2-C12-hIgG1의 투여는 유의적인 독성과 관련된 것으로 밝혀지지 않았고, 혈액 내 세포 유형의 수를 유의적으로 변경하지 않았다.

[2066] **실시예 17: V4-C26 항체의 분석**

[2067] 17.1 V4-C26, VSTB112 및 mAb 13F3에 대한 사람 및 마우스 VISTA에 대한 결합의 분석

[2068] 사람 VISTA 및 마우스 VISTA에 대한 결합을 항-VISTA 항체 V4-C26(즉, 실시예 13의 분자 [24]), VSTB112 IgG1(VSB112 HC(서열 번호: 269) + VSTB112 LC(서열 번호: 270) 및 mAb 13F3 (BioXCell 제품 번호 BE0310)에 대해 분석하였다.

[2069] 생물층 간섭계(Bio-Layer Interferometry; BLI) 실험을 Octet QK384 시스템(ForteBio)을 사용하여 수행하였다. 모든 측정은 25℃에서 측정되었다.

[2070] 요약하면, 항-Penta-HIS(HIS1K) 코팅된 바이오센서 팁(Pall ForteBio, USA)을 PBS 완충제(pH 7.2) 속에서 60초 동안 항온처리하여 제1의 기본선을 수득한 다음, 팁에 PBS(pH 7.2) 중 270nM HIS-태그된 사람 VISTA 또는 마우스 VISTA로 120초 동안 로딩하였다.

[2071] 로딩 후, 바이오센서를 PBS 완충제 pH 7.2에서 60초 동안 항온처리하여 제2의 기준선을 수득한 다음, PBS pH

7.2 중 시험 항체의 4점, 2배 희석 시리즈(농도: 250nM, 125nM, 62.5nM 및 31.3nM)와 함께 120초 동안 항온처리하여 연합 곡선을 수득하였다. 최종적으로, 바이오센서를 PBS pH 7.2에서 120초 동안 배양하여 해리 곡선을 수득하였다.

[2072] 결과는 도 66에 나타낸다. V4-C26은 사람 VISTA 및 마우스 VISTA 둘 다에 대해 결합을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 대조적으로, mAb 13F3은 마우스 VISTA에 대한 결합을 나타내었지만 사람 VISTA에 대한 결합은 나타내지 않았고, VSTB112는 마우스 VISTA에 대한 결합을 나타내었지만 마우스 VISTA에 대한 결합은 나타내지 않았다.

[2073] 17.2 V4-C26 hIgG4에 의한 종양 성장 억제

[2074] 서열 번호: 331의 중쇄 및 서열 번호: 317의 경쇄를 포함하는 항체-결합 항체 V4-C26 hIgG4를 결장 암종의 동계 세포주 유래된 마우스 모델에서 생체 내 종양 성장을 억제하는 능력에 대해 평가하였다.

[2075] CT26 세포를 ATCC로부터 수득하였고, 10% 소 태아 혈청 및 1% Pen/Strep이 보충된 RPMI-1640 속에서, 37℃, 5% $CO_2$ 항온처리기 속에서 배양하였다.

[2076] CT26 세포-유래된 종양은 약 6 내지 8주령의 암컷 BALB/c 마우스의 우측 옆구리내로 $1x10^5$개의 CT26 세포를 피하 주사함으로써 확립하였다.

[2077] 이식 후 3일째에, 및 이후 격주로, 마우스에게 25mg/kg의 V4-C26 hIgG4, 또는 대조군 조건으로서 동일한 용적의 비히클을 복강내 주사로 투여하였다(치료 그룹 당 8마리의 마우스).

[2078] 종양 용적을 디지털 캘리퍼를 이용하여 주 당 3회 측정하였고, 식 [L x W2/2]를 사용하여 계산하였다. 대조군의 종양이 길이가 >1.5 cm으로 측정되면 연구 종점에 도달한 것으로 고려하였다.

[2079] 결과는 도 67A 및 67B에 나타낸다. V4-C26 hIgG4를 투여받은 마우스는 비히클을 투여받은 마우스에 비해 종양 성장의 유의적인 억제 및 개선된 생존율을 나타내었다.

[2080] 17.3 VISTA 발현의 분포

[2081] *17.3.1 VISTA는 건강한 조직에서 골수-유래된 세포 상에 주로 발현된다*

[2082] VISTA 발현의 분포를 VISTA 길항제에 대한 최적의 전략을 평가하기 위해 건강한 조직에서 연구하였다. 68,000개의 PBMC를 포함하는 10X Genomics로부터의 단일 세포(sc) RNA-seq 데이타세트[www.10xgenomics.com/single-cell-gene-expression/datasets]를 분석하였다. 이는 14개의 주요 세포 군집의 존재를 나타내었다(도 68A). 낮은 수준의 VISTA 전사체가 많은 세포 집단에서 확인되었지만, 높은 발현은 건강한 공여체의 골수 유래된 단핵구 및 수지 세포에 국한되었으며, T 세포에서는 발현이 제한되었다(도 68B, 68C).

[2083] 건강한 사람 조직에서 VISTA 단백질 발현을 포르말린 고정된 파라핀 봉매된(formalin fixed paraffin embedded; FFPE) 조직 미세배열(tissue microarray; TMA) 절편에에서 면역조직화학(IHC)을 사용하여 추가로 특성화하였다(도 68D). 가장 높은 VISTA 수준이 림프 기관(예컨대, 비장 및 골수)및 백혈구에 의한 유의적인 침윤이 있는 조직(예컨대, 유방 및 폐)에서 검출되었다. 건강한 조직과 다양한 면역 세포 전반에 걸친 VISTA의 분포는 최적의 치료 효과와 허용 가능한 안전성을 위해 VISTA 발현 세포를 고갈시키지 않고 VISTA에 길항시켜야 할 필요성을 강력히 뒷받침한다.

[2084] *17.3.2 TNBC 및 NSCLC를 포함하는 고형 종양은 VISTA 및 VSIG3의 유의적인 발현을 나타낸다*

[2085] VISTA 및 VSIG3의 발현을 삼중 음성 유방 암(TNBC), 비-소세포 폐암(NSCLC), 간-세포 폐암(NSCLC), 간 세포 암종(HCC) 및 중피종을 포함하는, 4개 고형 암의 포르말린 고정된 파라핀 봉매된(FFPE) 조직 미세배열(TMA) 절편에서 면역조직화학을 통해 평가하였다. 면역조직화학은 4M2-C12-mIgG2a(서열 번호: 248 및 250의 폴리폴리펩티드로 형성됨) 또는 항-VSIG3 항체를 사용하였다.

[2086] TNBC 및 NSCLC 환자는 가장 높은 VISTA 발현을 나타내었고, 코어의 89% 및 85%는 각각 중간-높은 염색 강도를 나타내었다(도 68E, 68F). VSIG3의 발현을 추가로 평가하였다. VSIG3은 중피종(90%), NSCLC(84%) 및 TNBC(74%)에서 중간 내지 높은 염색을 나타내었다(도 68G, 68H). TNBC 및 NSCLC에서 VISTA 및 VSIG3 둘 다의 관찰된 높은 발현은 VISTA의 공-억제 기능이 T 세포 기능을 억제하는 VISTA-VSIG3 상호작용을 통해 매개될 수 있다는 보고와 일치하고(Wang et al., Immunology (2019) 156: 74-85) 이것이 VISTA 길항작용의 이점을 조사하기 위한 우선순위 지표가 될 수 있음을 시사한다.

[2087] 17.4 V4-C26 hIgG4의 특성의 비교

[2088] V4-C26을 서열 번호: 331의 중쇄 및 서열 번호: 317의 경쇄를 포함하는 IgG4 동형으로서 개발하였다.

[2089] *17.4.1 ADCC 및 CDC 기능성의 비교*

[2090] V4-C26 hIgG4가 ADCC 및 CDC 반응을 일으킬 가능성을 배제하기 위해, 각각의 FcγRIII 및 C1q 단백질에 대한 이의 결합 친화성을 평가하였다. ELISA에 의해 FcγRIII와 C1q 단백질 사이에는 결합이 관찰되지 않았고(도 69A 및 69B), 이는 VISTA 발현 세포를 고갈시키는 ADCC 또는 CDC 메커니즘을 배제할 수 있다.

[2091] 이러한 특징은 V4-C26 hIgG4가 ADCC 및 CDC에 의한 세포 고갈을 개시하는 것으로 알려진, IgG1 Fc 동형을 사용한 이전에 개발된 VISTA 표적화 항체와 구별되도록 한다.

[2092] *17.4.2 V4-C26 hIgG4의 생물물리학적 특성*

[2093] VISTA에 대한 V4-C26 hIgG4의 결합 특이성을 ELISA로 측정하였다.

[2094] 도 70A는 V4-C26 hIgG4가 B7 계열의 다른 관련 구성원(B7H1/PDL-1, B7H3, B7H4, B7H6, B7H7) 뿐만 아니라, PD-1 및 CTLA-4 중에서 VISTA에 대해 고도의 특이적인 결합을 나타냄을 나타낸다.

[2095] 효능, 안전성 및 PK 모델을 위한 설치류 및 비-인간 영장류(NHP) 종의 사용을 뒷받침하기 위해, VISTA 오르솔로그에 결합하는 V4-C26 hIgG4의 능력을 ELISA 및 SPR(Biacore)을 사용하여 평가하였다.

[2096] 도 70B는 V4-C26 hIgG4가 ELISA에 의해 사람, NHP, 래트 및 마우스 VISTA-HIS 단백질에 대한 용량 의존적 결합을 5.117 pM, 12.15 pM, 6.689 pM 및 3.549 pM 각각의 $EC_{50}$으로 입증함을 나타낸다. V4-C26 hIgG4는 또한 SPR(Biacore)을 사용하여 407 pM, 367 pM, 382 pM 및 549 pM 각각의 유사한 피코몰 친화성(Kd)으로 사람, NHP, 래트 및 마우스 VISTA 오르솔로그에 결합하는 것으로 관찰되었다 - 참고: 도 75A 참조 75D.

[2097] 재조합 VISTA 오르솔로그를 발현하는 HEK293T 세포 뿐만 아니라, 관련 전임상 종의 PBMC 내의 골수 세포에 대한 V4-C26 hIgG4의 세포 표면 결합을 FACS에 의해 추가로 확인하였다.

[2098] 도 70C는 V4-C26 hIgG4가 시험된 모든 종의 VISTA 오르솔로그에 대한 용량 의존적 결합을 나타내었고, 비교가능한 $EC_{50}$ 값은 사람, NHP, 래트 및 마우스 VISTA 발현 HEK293T 세포에 대해 3.738 nM, 2.571 nM, 4.133 nM 및 8.94 nM이다. VISTA를 발현하지 않는, 야생형 HEK293T 세포에 대해 비-특이적 결합은 관찰되지 않았다.

[2099] 도 70D는 V4-C26 hIgG4가 또한 시험된 모든 전-임상 종의 골수 세포 상에서 발현된 내인성 VISTA에 대해 비교가능한 용량 의존적 결합을 나타내었고, 사람 NHP, NHP, 래트, 및 마우스 VISTA 각각에 대한 EC50은 108 nM, 67.6 nM, 48.6 nM 및 111 nM이었다.

[2100] 일부 종양 환경은 비교적 낮은 pH를 특징으로 하는, 저산소성인 것으로 보고되었다. VISTA는 양성자화되기 쉽고 항체 결합에 영향을 미칠 수 있는 많은 노출된 히스티딘 잔기를 함유하므로, 본 발명자는 V4-C26 hIgG4 결합에 대한 pH의 효과를 평가하였다. 도 75E는 ELISA로 평가한 바와 같이, V4-C26 hIgG4가 pH 5.5 내지 7.5에서 비교가능한 친화성으로 VISTA에 결합하는 것으로 관찰되었음을 나타내고, 이는 V4-C26 hIgG4가 생리학적으로 관련된 pH 범위에 걸쳐 VISTA에 결합하고, 결합 부위가 히스티딘이 풍부한 영역과 구별됨을 나타낸다.

[2101] 따라서, V4-C26 hIgG4의 결합은 매우 선택적이고 종양 미세환경의 조건을 나타낼 수 있는 낮은 pH 조건에서도 유지된다.

[2102] 17.5 VISTA 기능성(functionality)을 차단하는 V4-C26 hIgG4의 능력

[2103] *17.5.1 V4-C26 hIgG4는 골수 기능을 조절한다.*

[2104] 최고 수준의 VISTA를 발현하는 골수 세포에 대한 VISTA 차단의 효과를 조사하기 위하여, V4-C26 hIgG4 처리를 골수 기능의 수개의 시험관 내 모델에서 평가하였다.

[2105] 우선, V4-C26 hIgG4에 의한 VISTA 차단이 사람 단핵구 MDSC의 기능에 대한 이의 영향을 평가하였다. 이전 연구는 MDSC가 TME에서 T 세포 기능의 억제에 유의적으로 기여함을 보고하였다(L. Wang, et al., Oncoimmunology 7, e1469594 (2018)). GM-CSF 및 IL-6를 사용하여 7일 동안 MDSC로 분화된 단핵구를 자가 PBMC와 함께 공-배양하였다. 이후에, T 세포를 항-CD3 항체로 자극하고 배양 상층액 속의 IFN-γ 수준을 ELISA로 측정하였다.

[2106] 도 71A는 VSTB112가 아닌 V4-C26 hIgG4의 첨가가 향상된 수준의 IFN-γ에 의해 나타난 바와 같이 항-CD3 자극에

대한 반응시 MDSC-매개된 T 세포 억제를 성공적으로 역전시켰음을 나타낸다.

[2107] 호중구와 같은 과립구는 선천성 면역 반응의 필수적인 부분이지만 암 진행에 부정적인 영향을 미칠 수 있다. 시험관 내에서 과립구(g)-MDSC의 기능을 모델링하는 것은 어려운 일이지만, g-MDSC는 종양 미세환경에 침윤된 호중구로부터 발생할 수 있는 것으로 알려져 있다(G. E. Kaiko, et al., Immunology 123, 326-338(2008)). 호중구 주화성(chemotaxis)에 대한 V4-C26 hIgG4-매개된 VISTA 차단의 효과를 트랜스웰 분석(transwell assay)을 사용하여 조사하였다. 이러한 검정에서, 호중구는 생리학적으로 관련된 화학유인물질인, C5a를 향해 챔버 사이를 이주하고, 하부 챔버로 이주한 세포의 퍼센트를 발광 판독을 통해 정량화한다.

[2108] 도 71B는 V4-C26 hIgG4가 용량 의존적 방식으로 호중구 이주를 강력하게 억제하였음을 나타낸다. 대조적으로, VSTB112는 훨씬 더 높은 농도에서 호중구 이주를 억제할 수 있었다.

[2109] 종합적으로, 이러한 결과는 V4-C26 hIgG4가 골수 세포에서 VISTA를 강력하게 중화시켜 전-염증성 사이토킨의 분비를 증가시키고 호중구의 이주 감소시킴을 입증한다.

[2110] *17.5.2 V4-C26 hIgG4는 면역 세포 환경을 $T_H1/T_H17$ 면역 반응 쪽으로 편광시킨다*

[2111] 면역 활성화의 보다 복잡한 시험관 내 모델에서 V4-C26 hIgG4에 의한 VISTA 차단의 기능적 효과를 시험하기 위하여, 동종 혼합된 림프구 반응(MLR) 검정을 사용하였다. 요약하면, 5명의 독립된 건강한 사람 공여체로부터의 PBMC를 쌍식으로 혼합하여 자가/항-자가 면역 반응을 모델링한 다음 V4-C26 hIgG4의 존재 또는 부재 하에 96시간 까지 배양한 후 상층액을 사이토킨 수준에 대해 분석하였다. 세포의 전사체(transcriptome)을 또한 대량(bulk) RNA-seq을 사용하여 분석하였다. 상층액 속의 사이토킨 수준을 Luminex 검정으로 정량화하였다.

[2112] 도 72A는 V4-C26 hIgG4가 96시간째에 IFN-γ, TNF-α 및 IL-17A 수준의 유의적인 용량 의존적 증가를 유도하였음을 나타내고, 이는 항-PD-1 항체인, 펨브롤리주맙에 의한 PD-1/PD-L1 차단으로 관찰된 효과와 비교가능하지만, IL-4, IL-10 및 IL-13(Th2 사이토킨) 또는 IL-6 수준에는 유의적인 변화가 없다. 사이토킨 수준의 이러한 변화는 Th1/Th17 반응으로의 이동을 나타낸다.

[2113] 이러한 결론은 Th1 관련된 유전자, 예를 들면, IFN-γ, TNF-α 및 IL-12A의 Th1 관련된 유전자의 전사체 수준에서의 증가 및 Th2 관련 유전자 IL-4, IL-10, IL-13 및 IL-9의 전사체 수준에서의 감소와 함께(도 72D), TLR, TNF-α, IL-1, JAK-STAT 및 IL-17 신호전달 경로(도 72B, 72C)와 관련된 유전자 내 전사 수준의 강화를 강조한 대량의 RNA-seq에 의해 추가로 뒷받침되었다.

[2114] 종합적으로, 이들 결과는 VISTA의 V4-C26 hIgG4 차단이 면역 세포 환경을 강화된 Th1/Th17 면역 반응 쪽으로 편광시킬 수 있음을 나타낸다. 이는 이전에 Th1/Th17 반응에 의해 특징화되는 것으로 보고된 건선 및 실험적 자가면역 뇌척수염(EAE)을 초래하는 뮤린 VISTA 녹아웃 모델과 일치한다(N. Li et al., Sci Rep-uk 7, 1485 (2017)).

[2115] 17.6 V4-C26 hIgG4 처리는 고형 종양의 다수의 면역 적격성 뮤린 CDX 모델에서 강력한 항-종양 반응을 유도한다

[2116] 생체 내에서 V4-C26 hIgG4의 전-염증 및 항-종양 유발 효과를 탐구하기 위하여, 종양 성장 억제 연구를 결장암(CT26)의 동계 뮤린 세포 유래된 이종이식편(CDX) 피하 모델, 유방암(4T1)을 발현하는 VISTA의 체크포인트 억제 인자-내성 동소(orthotopic) CDX 모델 및 사람 폐 암(A549) 및 대장 암(HCT15)의 CD34 이식된 사람화 마우스 모델을 포함하는 다중 고형 종양 모델에서 수행하였다.

[2117] 먼저, Balb/c 마우스에게 CT26 종양을 피하 이식하고(우측 옆구리) 이식 후 3일째로부터 격주로 500μg(~25mg/kg)의 V4-C26 hIgG4(복강내)를 처리하였다.

[2118] 도 73A는 V4-C26 hIgG4가 비히클에 비해 종양 성장(TGI)의 84% 억제로 유의적인 단일 제제 효능을 입증하였음을 나타낸다.

[2119] 둘째로, 유방 암의 뮤린 동소 모델을 Balb/c 마우스의 유방 지방 패드에서 VISTA를 과발현하는 4T1 세포를 이식함으로써 확립하였다. 마우스에게 이식 후 7, 9, 12, 14, 16일째에 V4-C26 hIgG4 또는 항-마우스 VISTA 혼합 13F3 50μg을 종양 내 처리하였다. 13F3은 항-VISTA 항체의 생체내 효능을 연구하기 위한 마우스 대용물로 흔히 사용된다.

[2120] 도 73B는 V4-C26 hIgG4가 유의적인 TGI(53%)를 나타내었음을 다시 나타내며, 이는 2개의 항체가 공통 작용 메커니즘을 공유할 수 있음을 시사하는 13F3의 TGI와 유사하였다.

[2121] 최종적으로, V4-C26 hIgG4의 효능을 CD34+ 제대혈 조혈 줄기 세포가 이식된 사람화된 마우스에서 시험하였다. 이러한 사람화된 마우스에게 종양 이식 2일 전에, 기관 및 혈액 내 T, B 및 골수 세포와 같은 다중의 사람 세포 계통을 안정적으로 재구성하는 GM-CSF/IL3 부스트(boost)를 제공받았다(표 S1). 3 내지 4개월 동안 재구성시킨 후, 마우스에게 사람 HCT15 대장 암 세포 또는 사람 A549 폐 암 세포를 피하 이식하고 격주로 치료하였다(이식 후 5일째부터 시작하여, V4-C26 hIgG4 또는 비히클 500μg(~25mg/kg)을 사용하여 복강내로).

[2122] 도 73C 및 73D는 동계 모델에서 관찰된 바와 같이, V4-C26 hIgG4가 이러한 HCT15 결장직장 및 A549 폐 사람화된 CDX 모델 각각에서 각각 65% 및 62% TGI의 유의적인 단일 제제 항종양 효능을 나타내었음을 나타낸다.

[2123] 따라서, V4-C26 hIgG4는 고형 종양의 다중 CDX 모델에서 단일 제제로서 강력한 항-종양 반응을 입증한다. 완전한 면역 적격성 뮤린 종양 모델 및 사람 면역 구획을 재현하는 뮤린 종양 모델 둘 다의 V4-C26 hIgG4 치료 후에 관찰된 유사한 종양 억제는 마우스 및 사람 항-종양 면역 사이에 공유된 보존되고, 잠재적으로 번역 가능한, 작용 메커니즘을 시사한다.

[2124] 17.7 V4-C26 hIgG4 처리는 뮤린 CDX 모델의 종양 미세환경을 리모델링하여, 활성화된 효과기 면역 세포를 증가시키고 억제 세포를 감소시킨다

[2125] 뮤린 모델에서 V4-C26 hIgG4에 대해 관찰된 항-종양 효능의 메커니즘을 이해하기 위하여, 동계 CT26 결장암 모델로부터의 종양을 FACS를 사용하여 추가로 프로파일링하였다.

[2126] 도 73E는 V4-C26 hIgG4 처리가 종양 미세환경에서 CD11b+ MHCII+(항원 제시 세포), CD11b+ F4/80+(대식세포) 및 CD11c+(DC)의 퍼센트를 유의적으로 증가시키는 것으로 관찰되었음을 나타낸다. CD8+ T 세포의 증가가 또한 관찰되었지만, 이는 통계적으로 유의적이지 않았다. 대조적으로, 광범위하게 억제성인 MDSC(CD11b+ GR1+ MHCII-)의 빈도는 비히클 대조군과 비교하여 치료된 마우스의 종양에서 유의하게 더 낮았다.

[2127] 면역 세포 수에서의 이러한 변화가 종양 침윤 림프구(TIL)의 기능 상태와 관련되었던 메커니즘을 추가로 평가하기 위하여, 본 발명자는 시험관 내 CDX 모델로부터 CT26 세포 및 단리된 TIL을 공-배양함으로써 항원 회상 검정(antigen recall assay)을 수행하였다.

[2128] 도 73F는 공동배양 72시간 후, V4-C26 hIgG4로 처리된 종양으로부터 단리된 TIL은 CT26 세포의 유의적으로 더 높은 용해를 나타내었음을 나타낸다. 이러한 증가된 활성은 T 세포를 CT26 세포로 침윤시키는 생체 외 공-배양 검정을 사용하여 추가로 확인하였고, 여기서 처리된 마우스로부터의 T 세포는 처리되지 않은 마우스와 비교하여, ELISA로 측정한 바와 같이, 유의적으로 더 높은 IFN-γ 수준을 나타내었다.

[2129] 이러한 결과는 V4-C26 hIgG4에 의한 VISTA 차단이 종양 미세환경에서 면역억제성 MDSC의 감소와 동시에 염증 효과기 세포의 수준을 증가시키고 TIL의 항원-특이적인 세포독성 활성을 향상시켜, V4-C26 hIgG4의 항-종양 효능에 기여할 가능성이 있음을 시사한다. V4-C26 hIgG4는 종양 미세환경을 항종양원성, 전-염증성 표현형으로 리모델링할 수 있으며, 이는 고도로 VISTA-양성인 골수 구획을 조작하는 1차 작용 기전과 일치한다.

[2130] 17.8 V4-C26 hIgG4는 다수 종에서 유리한 약동학적 프로파일을 나타낸다

[2131] 치료학적 항체는 적절한 투여 요법과 적합한 혈장 내 반감기를 가질 수 있다. 이전의 항-VISTA 항체는 신속한 혈청 제거를 특징으로 하는 불량한 PK를 입증하였고(R. J. Johnston et al., Nature 574, 565-570 (2019)), 이는 특히 호중구의 ADCC와 같은 Fc-효과기 기능으로 설명될 수 있고, 이는 VISTA 발현 세포의 신속한 세포 회전율을 초래하고 유의적인 항체 싱크(antibody sink)를 유발한다. 따라서 V4-C26 hIgG4의 약동학적 프로파일을 건강한 및 종양-보유 마우스, 건강한 래트 및 NHP에서 평가하였다.

[2132] 도 74A는 증가하는 용량의 V4-C26 hIgG4(5 내지 20 mg/kg)를 복강내 투여받은 종양을 지닌 및 종양을 지니지 않은 Balb/c 마우스에 대한 대표적인 약동학적 프로파일을 나타낸다. 종양을 지니지 않은 마우스는 선형 PK를 입증하였지만, 종양 보유 마우스에서의 프로파일은 비선형이었고, 이는 보다 높은 수준의 표적 및 증가된 표적 매개된 약물 배치(target mediated drug disposition; TMDD)에 기인할 수 있다. 종양을 지닌 마우스에서 V4-C26 hIgG4 혈청 반감기는 용량 전반에 걸쳐 26.9 내지 57.2시간으로 계산되었지만, 종양이 없는 마우스에서의 혈청 반감기는 61.1 내지 80.8시간이었다.

[2133] 스프라그-다울리 랫트 및 시노몰구스 원숭이에서, PK 프로파일을 수컷 및 암컷 동물 둘 다에서의 측정으로부터 측정하였다. V4-C26 hIgG4를 랫트에서 꼬리 정맥 내 정맥내(IV) 볼루스 주입(bolus infusion)으로, 및 원숭이에서 말초 정맥 내로 IV 볼루스 주입으로서, 1mg/kg, 10mg/kg 및 100mg/kg의 단일 용량으로 투여하였다. 종 둘 다에서, V4-C26 hIgG4의 PK 프로파일은 성별 사이에서 상이하지 않으며 노출시 용량 비례 증가는 모든 용량에 걸

쳐 Cmax 값에 대해 관찰되었다. V4-C26 hIgG4에 대한 혈청 반감기는 각각의 투여 그룹에 따라 증가하였다. 래트에서 성별 둘 다에 걸쳐 관찰된 평균 반감기는 1, 10, 및 100 mg/kg에 대해 각각 6.3, 25.5, 67.5시간이지만, 시노몰구스 원숭이에서 성별 둘 다에 걸쳐 관찰된 평균 반감기는 1, 10, 및 100mg/kg에 대해 각각 8.6, 41.3, 및 34.9시간이었다(도 74B, 74C).

[2134] 이러한 결과는 함께 V4-C26 hIgG4가 고갈되는 IgG1 Fc 도메인을 갖는 다른 항-VISTA 항체에 대해 언급된 신속한 제거없이 다수의 종에서 유리한 PK 프로파일을 갖는다는 것을 입증한다.

[2135] 최적의 치료학적 항체는 정상 조직에 대한 최소의 독성을 입증하고 사이토킨 방출 증후군(cytokine release syndrome)과 같은 유해한 부작용을 피해야 한다(서브 치료학적 용량에서 다른 IgG1 동형 항-VISTA 고갈 항체에 대해 보고된 바와 같음(NCT02671955)). V4-C26 hIgG4는 VISTA 오르솔로그의 종 보존된 결합을 나타내므로, 상기 PK 연구로부터의 동물을 또한 동시 내약성 연구의 일부로서, V4-C26 hIgG4 투여의 부작용에 대해 모니터링하였다. 스프라그-다울리 래트 및 시노몰구스 원숭이에게 단일 IV 주사 후, 종 둘 다는 치료 관련된 이환율(morbidity)/사망률(mortality) 또는 임상 신호를 나타내지 않았고, 28일의 관찰 기간 동안 지속된 체중, 사료 소비, 임상 화학, 또는 혈액학적 매개변수에서치료 관련된 변화가 없었다.

[2136] 추가로, 생체 외 사이토킨 방출 검정을 건강한 공여체로부터의 사람 전혈 및 단리된 PBMC를 사용하여 수행함으로써, 세포 계측 비드 어레이 접근법을 사용하여 세포 상층액 속의 IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α 및 IFN-γ의 수준을 평가함으로써 V4-C26 hIgG4의 잠재적인 면역독성을 평가하였다. 사이토킨 수준은 V4-C26 hIgG4, 양성 대조군(항-CD3 또는 스타필로코쿠스 장독소 B), 또는 가용성 자극 양식의 음성 동형 대조군으로 24시간 동안 자극한 후 측정하였다. V4-C26 hIgG4는 혈액 또는 정제된 PBMC에서 혈액 내 어떤 유의적인 사이토킨 방출도 유도하지 않았다(도 74D 내지 74G).

[2137] 이러한 결과는 함께 V4-C26 hIgG4가 래트 및 시노몰구스 원숭이에서 잘 견대어짐을 입증하고, 사이토킨 방출에 의해 유발된 잠재적인 면역독성에 대한 위험이 낮음을 추가로 시사한다.

[2138] 17.9 V4-C26 hIgG4 및 항-PD-1에 의한 종양 성장 억제

[2139] A549 세포 모델

[2140] A549 세포를 ATCC로부터 수득하였다. 세포를 70 내지 80% 합치성(confluency)에서 수거하고, 15 ml의 PBS로 3회 세척하고, 혈구 계산기를 사용하여 계수하고 PBS 속에서 5 x $10^7$개의 세포/ml의 농도로 재구성하였다.

[2141] A549 세포 유래된 종양을 6 내지 8주령의 CD34 이식된 사람화된 HiMice 마우스의 우측 옆구리에 5 x $10^6$개의 A549 세포(총 0.1ml의 용적)를 피하 이식하여 확립하였다.

[2142] 이식 3일째에, 및 이후로 6 내지 7주 동안 격주로, 마우스에게 다음의 용량을 복강내 투여하였다:

[2143] · 총 용적 0.2ml 중 500㎍의 V4-C26 hIgG4(HMBD-002)(25mg/kg와 동등함).

[2144] · 총 용적 0.2ml 중 200㎍의 항-인간 PD-1 항체(10mg/kg와 동등함).

[2145] · 총 용적 0.2 ml 중 500 ㎍의 V4-C26 hIgG4 + 200 ㎍의 항-사람 PD-1 항체.

[2146] 종양 용적을 치료 과정에 걸쳐 측정하였다.

[2147] 결과를 도 83A에 나타낸다. 항-VISTA 통합 V4-C26 hIgG4(HMBD-002) 및 항-PD-1을 사용한 조합 치료요법은 제제를 단독으로 사용할 때보다 종양 성장을 더 큰 정도로 억제하였다.

[2148] CT26 세포 모델

[2149] CT26 세포를 ATCC로부터 입수하였다. 세포를 70 내지 80% 합치성에서 수거하고, 15 ml의 PBS로 3회 세척하고, 혈구계산기를 사용하여 계수하고 PBS 중 5 x $10^6$개의 세포/ml의 농도로 재구성하였다.

[2150] CT26 세포 유래된 종양을 6 내지 8주령의 Balb/c 마우스의 우쪽 옆구리 내로 1 x $10^5$개의 CT26 세포(총 0.1ml의 용적)를 피하 이식함으로써 확립하였다.

[2151] 이식 3일 후, 및 이후 4 내지 5주 동안 격주로, 마우스에게 다음의 용량을 경피 투여하였다:

[2152] · 총 용적 0.2ml 중 500㎍의 V4-C26 hIgG4(HMBD-002)(25mg/kg와 동등함).

[2153] · 총 용적 0.2 ml 중 200 μg의 항-마우스 PD-1 용액(10 mg/kg와 동등함).

[2154] · 총 용적 0.2 ml 중 500 μg의 V4-C26 hIgG4 + 200 μg의 항-마우스 PD-1 항체.

[2155] 종양 용적을 치료 과정에 걸쳐 측정하였다.

[2156] 결과를 도 83B에 나타낸다. 항-VISTA 항체 V4-C26 hIgG4(HMBD-002) 및 항-PD-1을 사용한 조합 치료요법은 제제를 단독으로 사용할 때보다 종양 성장을 더 큰 정도로 억제하였다.

[2157] 17.10 실시예 17에 대한 물질 및 방법

[2158] **ELISA 결합 검정**

[2159] 384-웰 플레이트를 PBS 속에 희석된 1 μg/ml의 표적 항원으로 4℃에서 16시간 동안 코팅하였다. 실온에서 트리스-완충된 염수(TBS) 중 1% BSA로 1시간 동안 차단한 후, V4-C26 hIgG4 또는 사람 IgG4 동형 대조군(Biolegend #403702)을 중성 pH 7에서 1x PBS로 만든 1% BSA를 사용하여 일련 희석하고 플레이트에 가하였다. 다양한 pH에서 시험 물품의 결합을 시험하기 위해, pH 7.5, 6.5, 6, 5.5 또는 5에서 1x PBS를 사용하여 1% BSA를 제조하였다. 실온에서 1시간 항온처리한 후, 플레이트를 0.05% 트윈 20(TBS0T)를 함유하는 TBS로 3회 세척하고 1:7000의 염소 항-사람 IgG Fc-HRP(Abcam #ab97225)와 함께 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 세척 후, 플레이트를 비색 검출 기질 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(Turbo-TMB; Pierce)을 사용하여 10분 동안 전개하였다. 반응을 2M H2SO4를 사용하여 중단시키고, OD를 BioTek Synergy HT 상에서 450 nm에서 측정하였다.

[2160] **유동 세포분석법 및 분석**

[2161] PBMC, 또는 VISTA를 발현하도록 조작된 HEK293T 세포에서 VISTA를 발현하는 세포 표면에 대한 V4-C26 hIgG4 결합을 유동 세포분석법으로 측정하였다. 야생형 HEK293T 세포를 제조업자의 프로토콜에 따라, 리포펙타민 2000(ThermoFisher Scientific #11668019)을 사용하여 사람, NHP, 래트 및 마우스 VISTA(Sinobiological)를 암호화하는 VISTA cDNA 발현 플라스미드로 일시적으로 형질감염시켰다. 사람, NHP, 래트 및 마우스로부터의 PBMC는 상업용 공급업체(Accegen)에서 구입하였고 염색 전에 Fc 블록(사람 TruStain FcX, Biolegend #422302, 마우스 TruStain Fcx, Biolegend #101320, 항-래트 CD32, BD Pharmingen #550270 및 레서스(Rhesus) FcR 결합 억제제, ThermoFisher #14-9165-42))으로 차단하였다. V4-C26 hIgG4 또는 동형 대조군 항체는 제조업체 프로토콜에 따라 APC와 접합시켰다.

[2162] FACS의 경우, 세포를 도에 나타낸 바와 같이 다양한 농도의 APC 태그된 V4-C26 hIgG4 또는 동형 대조군과 함께 4℃에서 40분 동안 항온처리하였다. 골수 세포를 확인하기 위하여, PBMC를 CD45 FITC 및 CD11b PE와 함께 추가로 항온처리하였다. 세포를 다시 세척하고 MACSQuant 10(Miltenyi)을 사용한 유동 세포분석법 분석을 위해 200 μL의 FACS 유동 완충제(5mM EDTA가 포함된 PBS)에 재현탁시켰다. 획득 후, 모든 미가공 데이터를 Flowlogic 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 전방 및 측면 산란을 사용하여 세포를 게이팅(gating)하고 양성 세포의 퍼센트를 측정하였다.

[2163] **면역조직화학**

[2164] 포르말린 고정된 파라핀 봉매된(FFPE) 조직을 포함하는 TNBC, NSCLC, 중피종 및 간암 환자(USBiomax, 카탈로그 #BR1301, #LC1401, #MS481d, #LV8013a)의 조직 미세배열(TMA)을 VISTA(4M2-C12-mIgG2a)에 대해 염색하고 VSIG3(LS Biosciences #LS-C338858; 희석 1:300) 및 정상 TMA(USBiomax, 카탈로그 #FDA999q)를 또한 VISTA(4M2-C12-mIgG2a)에 대해 염색하였다. 슬라이드를 건조기(desiccator) 속에서 $15mins^{-1}$ hr 동안 건조시키고 항원 검색을 위해 EnVision® FLEX Target Retrieval Solution, 낮은 pH(Dako, K8005/DM829)에 97℃에서 20분 동안 두었다. 슬라이드를 염색을 위해 Omnis 기구로 옮기기 전에 Envision Flex 완충제(1X) 속에 10분 동안 두었다. 슬라이드를 키트 기반 프로토콜을 사용하여 Envision Flex+ 검출 시스템(키트 K800)으로 Dako Link Omnis에서 염색 및 역염색한 다음, 세정, 탈수 및 커버슬립핑(coverslipping)을 수행하였다. TMA를 광학 현미경으로 반-정량적으로 점수를 매겨 염색의 상대 강도(0-3+ 강도 규모), 정상 조직과 종양 조직에서 VISTA 및 VSIG3 단백질 발현의 분포 및 국재화를 측정하였다.

[2165] **VISTA-VSIG3의 V4-C26 hIgG4 차단 후 사이토킨 방출**

[2166] PBMC를 1:0(2 μg/ml의 αCD3 단독) 및 1:2(2 μg의 αCD3 : 4 μg/ml의 VSIG3-Fc)의 비율로 αCD3 모노클로날 항체(eBioscience #16-0037) 및 VSIG3-Fc(R&D #9229-VS)로 코팅된 플레이트에서 배양하였다. 이후에, 세포를 나타낸 농도의 V4-C26 hIgG4, VSTB112 또는 IgG4 동형 대조군(Biolegend #403702)으로 처리하고 플레이트를 37

℃에서 항온처리하였다. 24시간 후 상층액을 수거하고 IFN-γ 수준을 사람 IFN-γ 코팅되지 않은 ELISA 키트(Invitrogen #88-7316)를 사용하여 측정하였다.

[2167] **MDSC-T 세포 공-배양(co-culture)**

[2168] 단핵구를 전통적인 단핵구 단리 키트(Miltenyi, Germany, #130-117-337)를 사용하여 음성 농축을 통해 새로운 사람 PBMC로부터 분리하였다. 후속적으로, 단핵구를 GM-CSF(10ng/ml)(PeproTech, USA, #300-03) 및 IL-6(10ng/ml)(PeproTech, USA, #200-6)의 존재 하에 7일 동안 MDSC로 분화시켰다. MDSC를 수거하고 사람 항-CD3 항체(OKT3, 1μg/ml)(BioLegend, USA, #317326)의 존재 및 시험 물품의 존재 또는 부재 하에 3:1 비율로 새로 단리된 자가 PBMC와 함께 배양하였다. 상층액을 96시간 후에 수거하고 IFN-γ 수준을 ELISA(ThermoFisher, USA, #88-7316-88)를 통해 측정하였다.

[2169] **호중구 화학주성 검정**

[2170] 호중구를 MACSxpress® 전혈 호중구 단리 키트(Miltenyi #130-104-434)를 사용하여 전혈로부터 단리하고 나타된 농도에서 V4-C26 hIgG4, VSTB112 또는 동형 대조군과 함께 37℃에서 60분 동안 항온처리하였다. 항온처리 후, 호중구를 24 웰 트랜스웰 플레이트(Thermo Fisher #1406287)의 상부 챔버(300μl/웰)에 씨딩하고 C5a가 있거나 또는 없는 배지를 50ng/ml(Acro Biosystem #C5A-H5116)에서 하부 챔버(600 μl)에 가하였다. 세포를 트랜스 웰 속에서 37℃에서 1시간 동안 항온처리한 후, CellTiter-Glo(Promega #G7571)를 사용하여 하부 챔버에서 이주된 호중구의 ATP 수준을 측정하고 발광을 Victor Nova(Perkin Elmer)를 사용하여 측정하였다.

[2171] **사람 동종 혼합된 림프구성 반응(Mixed Lymphocytic Reaction; MLR)**

[2172] 새로운 PBMC를 제조업체의 프로토콜에 따라 Lymphoprep(Stemcell Technologies, #07861)을 사용하여 사람 전혈(총 5명의 공여체)로부터 단리하고 CellGenix GMP DC 배지에 5×106개의 세포/ml로 재현탁시켰다. 50μl의 DC 배지를 96-웰 환저 플레이트의 각 웰에 가한 후 2명의 공여체로부터의 50 μl의 PBMC를 50μl의 V4-C26 hIgG4 또는 동형 대조군 hIgG4(InvivoGen # bgal-mab114)의 존재하에 1:1 비율에서 30, 10 및 1μg/mL에서 가하였다. 총 10개의 공여체 쌍을 사용하였다. 세포를 37℃에서 96시간 동안 항온처리하였다. 상층액을 96시간째에 수집하고 상층액 사이토킨 수준을 Luminex(R&D #LXSAHM-04/07)에 의해 검출하였다. 데이타를 시험 샘플로부터 동형 대조군 값을 감함으로써 hIg4 동형 대조군에 대해 표준화하였다.

[2173] **동물 실험**

[2174] Balb/c 마우스를 InVivos 또는 Jackson Labs에서 구입하고, CD34 이식된 사람화된 HiMice 마우스를 Invivocue에서 구입하였다. 모든 동물은 AALAC 인증 시설의 특정 병원균이 없는 조건 하에서 사육되었으며 동물 실험 윤리 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee) 가이드라인에 부합하도록 엄격하게 처리하였다.

[2175] **생체 내 종양 성장 검정**

[2176] 마우스에게 종양 세포(CT26의 경우 $10^5$개, HCT15의 경우 $10^6$개, A549의 경우 $5x10^6$개)를 우측 옆구리에 피하 이식하거나, 또는 정위 유방 모델의 경우, 종양 세포를 유방 지방 패드($2x10^4$ 개의 4T1 세포)내에 이식하였다. 이식 후 3 내지 6일째에, 마우스에게 나타된 용량과 간격으로 시험 물품을 주 당에 2회 처리하였다. 치료는 모든 피하 모델의 경우 복강 내로 투여하였고, 정위 모델의 경우 종양 내로 투여하였다. 종양 용적은 문헌: Thakkar et al., Mol Cancer Ther (2020) 19: 490-501)에 기술된 바와 같이 캘리퍼를 사용하여 측정하였다.

[2177] **통계적 분석**

[2178] 통계적 분석을 GraphPad Prism을 사용하여 수행하였다. 2개의 변수를 사용하여 획득한 데이타(용량 적정)를 2-원 ANOVA에 이어 터키의 다중 비교 시험으로 분석하였다. 2개 그룹 사이의 비교를 위해, 비쌍식 t-시험을 수행하였다. *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001, ****p ≤ 0.0001의 값을 유의적인 것으로 고려하였다.

[2179] **종-간(cross-species) 항체 결합 친화성 측정**

[2180] V4-C26 hIgG4의 친화성을 Biacore를 사용하여 표면 플라스몬 공명(SPR)에 의해 측정하였다. 검정을 CM5 센서 칩(Cytiva #29104988)을 사용하여 수행하였다. Biacore HIS 캡처 키트(GE Healthcare #28-9950-56)를 사용하여 사람, NHP, 래트 및 마우스 VISTA-HIS 온-칩 표면(on-chip surface)을 고정하거나 배경 신호 보정을 위해 그대로 두었습니다. 요약하면, VISTA-HIS를 5 μl/min의 유속에서 60초의 접촉 시간 동안 포획하였다. V4-C26 hIgG4를 사람, NHP 및 래트 VISTA의 경우 $50E^{-9}$M내지 $390E^{-12}$M, 마우스 VISTA의 경우 $12.5^{E-9}$M 내지 $390E^{-12}$M의 2배 연

속 희석물로 RT에서 90초 결합 및 3000초 해리를 위해 30 μl/min의 유속에서 유동시켰다. 수득된 센소그램을 Biacore T200 소프트웨어를 사용하여 분석하였고 KD를 1:1 결합 동력학 모델에 핏팅함으로써 계산하였다.

[2181] **항체-의존적 세포 세포독성 및 상보체-의존성 세포독성**

[2182] 96웰 플레이트를 4℃에서 PBS 중 1μg/웰의 사람 C1q 단백질 또는 0.5ug/웰의 사람 CD16a로 코팅하였다. 밤새 항온처리한 후, 플레이트를 3회 세척하고 실온에서 차단 완충액으로 1시간 동안 차단하였다. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 V4-C26 hIgG4 또는 동형 대조군과 함께 항온처리하고 실온에서 1시간 동안 HRP-접합된 항-사람 Fc 항체의 1:7000 희석과 함께 항온처리하였다. 비색 반응을 상기 ELISA에 대해 기술된 바와 같이 표준 프로토콜을 사용하여 전개하였다.

[2183] **sc-RNA-seq**

[2184] VISTA 전사체가 가장 많이 발현된 세포 유형을 확인하기 위하여, 공개적으로 이용가능한 68k PBMC 데이터세트를 10X Genomics 웹사이트(Stuart et al., Biorxiv(2018), 460147)에서 검색하고 Seurat v3.2(Stuart et al., Cell(2019) 177: 1888-1902.e21)를 사용하여 가공하였다. 6% 이상의 미토콘드리아 전사체를 지닌 세포, 또는 200개 미만의 개별 전사체는 제외하였다. 데이터는 20,000개의 특징이 있는 VST 방법을 사용하여 식별된 기본 매개변수 및 가변 특징을 사용하여 표준화하였다. 이후에 데이터를 확장한 다음 15개의 주요 구성성분을 사용하여 PCA 분해를 실행하였다. UMAP 투영은 기본 매개변수를 사용하여 수행하였고 FindClusters 기능은 0.8의 해상도로 실행하였다. 클러스터를 표지하기 위하여 SeuratData 패키지로부터의 PBMC3k 데이터 세트(Hafemeister 및 Satija, Biorxiv(2019), 576827)를 참고로서 사용하여 세포 실체를 맵핑하였다.

[2185] **대량의(Bulk) RNA-seq**

[2186] 조건(V4-C26, V9, 항-PD1 및 IgG4)당 10개의 샘플을 처리 96시간 후 MLR 검정으로부터 취하였다. 이는 NEBNext Ultra II RNA 라이브러리 제조 키트(NEB #E7770S)를 사용하여 RNA-seq용으로 제조하였으며 v1.5 화학 기능을 갖춘 Illumina NovaSeq S4 flowcell에서 실행하였다. 어댑터 트리밍(adaptor-trimming) 및 필터링된 데이터는 FASTQC 및 MultiQC(Ewels et al., Bioinformatics (2016) 32: 3047-3048)를 사용하여 평가하였고 판독물은 Kallisto v0.46(Bray et al., Nat Biotechnol (2016) 34: 525-527)을 사용하여 GRC37 사람 참조 전사체에 정렬하였다. 데이타를 TxImport를 사용하여 R로 도입하였다(Soneson et al., F1000research (2015) 4: 1521). DESeq2(Love et al., Genome Biol (2014) 15: 550)를 사용하여 표준화된 유전자 수 및 유전자-수준 차등적 발현을 수득하였다. 경로 활성을 디폴트 매개변수(default parameter)를 사용하는 SPEED2(Rydenfelt et al., Nucleic Acids Res (2020) 48: W307-W312) 패키지를 사용하여 평가하였다.

[2187] **CT26 종양 프로파일링**

[2188] 단일 세포 현탁액을 0.1 mg/ml의 DNase I(Sigma, USA, #11284932001) 및 1 mg/ml의 콜라게나제(Sigma, USA, #1108866001)를 사용하여 37℃에서 45분간 잘게 절단된 종양 조직을 분해함으로써 생성시켰다. Fc 수용체를 사람 TruStain FcX(BioLegend, USA, #422302)로 차단하였다. 세포를 면역 세포의 마커에 대한 형광단 접합된 항체로 염색하고(표 S4), 세척하고 완충제(1xPBS + 0.5% BSA + 1mM EDTA) 속에 재현탁시켰다. 면역 세포 집단의 빈도를 유동 세포분석법을 통해 측정하였다. 데이터를 MACSQuant 10(Milteny Biotec, 독일, #130-096-343)에서 획득하고 FlowLogic 소프트웨어 V7을 사용하여 분석하였다.

[2189] **CT26 항원 회수(recall) 검정**

[2190] 단일 세포 종양 현탁액을 앞서 기술한 바와 같이 생성하였다. TIL(CD45+) 또는 T 세포(CD4+/CD8+)를 CD45 MicroBeads(Milteny Biotec, 독일, #130-110-618), 또는 CD4/CD8 MicroBeads(Milteny Biotec, 독일, #130-116-480)을 사용하여 제조업자의 프로토콜에 따라 세포 현탁액으로부터 농축시켰다. 24시간 전에 씨딩된, CT26 세포(T:표적 세포)를 종양으로부터의 농축된 TIL 또는 종양의 T 세포(E:효과기 세포)와 함께 나타낸 바와 같은 효과기 대 표적(E:T) 세포 비율로 72시간 동안 공-배양하였다. 모든 조건은 3회 이루어졌다. 세포 생존율을 CellTiter Glo(Promega, USA, #G7571)에 의해 측정하였다. 상층액 중 IFN-γ 수준은 ELISA(Invitrogen, 미국, #BMS606)으로 측정하였다. 분해는 분해% = ((T - E:T)/T)*100으로 계산하였다.

[2191] **약동학**

[2192] V4-C26 hIgG4의 단일 용량 약동학 프로파일을 수컷 및 암컷 Balb/c 마우스, 스프라그 다울리 래트 및 시노몰구스 원숭이에서 평가하였다. V4-C26 hIgG4를 마우스에서 복강내 주사를 통해, 래트의 꼬리 정맥으로의 IV 볼루스 주입, 및 원숭이에서 말초 정맥내의 IV 볼루스 주입을 통해 표시된 농도에서 단일 용량으로 투여하였다. 혈액을

투여 후 상이한 시점에서 채취하고 혈청 내 항체 농도를 ELISA로 정량화하였다. 약동학 분석을 위한 매개변수를 비구획 모델로부터 유도시켰다: 최대 농도(Cmax), AUC(0-336hr), AUC(0-무한), 반감기(t½), 제거(CL) 및 정체 상에서 분포 용적(Vss).

[2193] 실시예 18: 항체 제형 개발

[2194] V4-C26 가변 영역, 사람 IgG4 중쇄 불변 영역 및 카파 경쇄를 포함하고, 서열 번호: 331의 중쇄 및 서열 번호: 317의 경쇄를 포함하는 항원-결합 분자에 대한 제형 개발을 수행하였다. 항체-결합 분자는 2021년 5월 7일에 ATCC 특허 기탁 번호 제PTA-127063호로 기탁된 세포주의 세포에 의해 생단된다. 이러한 항원-결합 분자는 본 실시예에서 'HMDB-002'로 지칭될 수 있다.

[2195] 18.1 제형

[2196] HMDB-002의 제품 안정성을 다양한 액체 제제에서 평가하였다. 제형 개발에는 고온 및 2 내지 8℃에서 1개월 안정성, 동결-해동 스트레스 연구 및 고농도 스트레스 연구를 포함한다. 분석 시험은 크기 변이체, 전하 변이체 및 결합 효능과 관련하여 가장 우수한 분자 안정성을 나타내는 제형을 식별하도록 설계되었다.

[2197] Superdex 및 Capto Q로 추가로 정제된, 정제된 물질(MabSelect SuRe LX(LX; 3L 생물반응기 실행 1)를 Slide-A-Lyzer, 20k MWCO(제품 번호 66030, Thermo Scientific)를 사용하여 상이한 제형 완충제에 대해 투석하였다. 샘플은 먼저 목표 농도(약 1 내지 1.25배)를 초과하여 과농축시킨 다음 제형 완충제로 희석하여 목표 농도로 다시 조정하였다. 가공된 샘플을 0.1um 멸균 필터(제품 번호 16553, Sartorius)를 통해 여과한 후 1.8mL의 냉동보존 바이알(제품 번호 NNC#368632, Thermo Scientific)에 생물 안전 캐비닛에 1mL의 충전 용적으로 분재하였다.

[2198] 시험한 제형 완충제는 다음의 조성을 가졌다:

| 제형 번호 | pH | 완충제 시스템 (20 mM) | 슈크로스 (%, w/v) | NaCl (mM) | 폴리소르베이트 20 (%) | 폴리소르베이트 80 (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| F1 | 5.5 | 히스티딘 | 8 | 0 | 0 | 0.02 |
| F2 | 5.8 | 히스티딘 | 8 | 0 | 0 | 0.02 |
| F3 | 5.8 | 히스티딘 | 4 | 0 | 0 | 0.02 |
| F4 | 5.8 | 히스티딘 | 2 | 0 | 0 | 0.02 |
| F5 | 6.3 | 히스티딘 | 8 | 0 | 0 | 0.02 |
| F6 | 5.8 | 히스티딘 | 8 | 0 | 0.02 | 0 |
| F7 | 5.5 | 아세트산나트륨 | 8 | 0 | 0 | 0.02 |
| F8 | 5.5 | 석신산나트륨 | 8 | 0 | 0 | 0.02 |
| F9 | 5.8 | 히스티딘 | 0 | 0 | 0 | 0.02 |
| F10 | 5.8 | 히스티딘 | 0 | 150 | 0 | 0 |

[2199]

[2200] 18.2 스트레스 조건(stressed condition)

[2201] 10개의 제형을 고 온, 고 농도 및 동결-융해 스트레스에 적용시켰다. 총 4개의 바이알(2개의 바이알 크기 포함: 고 농도의 경우 4mL/바이알, 나머지 조건의 경우 1mL/바이알)을 각 제형에 대해 제조하였다. 1개 농도(10 mg/mL)의 10개의 제형, 2 내지 8℃에서 1명의 대조군을 사용하는 3개 스트레스 조건을 시험하고, 이중 에서 정의된 기간에 걸쳐 안정성 시험을 40℃ 및 2 내지 8℃의 저장 조건에 대해 수행하였다.

[2202] 제형 스트레스 조건:

[2203] · 동결-해동: -80℃에서 동결하고 실온에서 해동하는 6회 주기를 수행하였다. 각 주기 사이에, 바이알을 해동될 때까지 급속 냉동을 위해 -80℃에서 유지시켰다. 각각의 바이알은 냉동 또는 해동 동안 서로 약 5cm 떨어져 있었다. 약 80 μL의 작은 분취량을 바이알에서 취하여 분석할 때까지 2 내지 8℃에 보관하고, 바이알을 10개 제형에 대한 샘플링을 수행한 후 -80~로 되돌렸다.

[2204] · 고온: 각 제형으로부터의 1개의 바이알을 예정된 시점에서, 온도 설정 온도가 40℃인 (Infors HT Multitron) 항온처리기 속에 보관하였다. 오염을 방지하기 위해 대략 150μL를 생물안전성 캐비닛 내부에 취하였다. 이후에, 분취된 샘플을 분석할 때까지 2 내지 8℃에 보관하고, 나머지 바이알은 항온처리기에 다시 넣었다.

[2205] · 고농도: 샘플을 벤치 탑 원심분리기 속에서 20K Da MWCO Amicon 단백질 농축기(제품 번호 UFC905096, Millipore)를 사용하여 4000g, 4℃에서 농축시켰다. 각각의 표적화된 농도가 초과할 때까지, 농도를 20분마다 모니터링하였다. 그런 다음 샘플 농도를 이의 가장 가까운 목표 농도로 다시 조정하였다.

[2206] 분취된 샘플을 육안 검사로 침전에 대해 분석하고, 미세전극이 장착된 pH 측정기로 pH를 분석하고, Nanodrop Lite 2000에 의해 농도를 분석하고, HLPC-SEC에 의해 응집을 분석하고, HPLC-CEX에 의해 전하 분산를 분석하고, Nova Flex에 의해 항원 결합 ELISA에 의한 효능 및 삼투압을 분석하였다. 스트레스 조건 및 분석 분석은 하기에 나타낸다.

| 스트레스 조건 | 육안 검사 | pH | 농도 | HPLC-SEC | HPLC-CEX | 항원 결합 | 삼투압 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 37-43°C | X | X | X | X | X | X | X |
| 2-8°C | X | X | X | X | X | X | X |
| 고 농도 | X | | X | X | | | |
| 동결-해동 | | | | X | | | |

[2207]

[2208] 18.3 안정성 연구

[2209] 10개 제형 중 10mg/mL에서 HMBD-002 안정성을 40℃ ± 3℃에서 1개월, 5℃ ± 3℃에서 6개월의 총 기간 동안 평가하였다. 샘플을 하류 공정(downstream process)에서 방출tl t=0에서 분석하였다. 10일, 20일, 30일, 60일, 90일, 180일 시점에서, 샘플을 본원에 기술된 분석을 사용하여 분석하였다.

[2210] 18.4 분석 기술

[2211] · A280에 의한 단백질 함량: UV 광 흡광도의 측정을 통한 단백질 함량 측정은 단백질 속에 존재하는 트립토판, 티로신 및 시스테인의 풍부함이라는 특정의 특성을 기준으로 하였다. HMBD-002의 이론적인 흡광계수는 1.64 mL·mg-1·cm-1이다.

[2212] · 육안 검사: 샘플을 가시적인 입자 및 침전에 대해 검사하였다.

[2213] · HPLC-SEC에 의한 순도 및 응집체 함량: 항체의 순도를 분석 컬럼을 XBridge BEH200 SEC 3.5μ 7.8x300mm 컬럼(제품 번호 176003596, Waters)으로 변경시키는 주요 변경을 적용한 HMBD-002 SEC SOP v1.0을 기준으로 하는, 고 성능 액체 크로마토그래피를 사용하여 측정하였다.

[2214] · HPLC-CEX에 의한 전하 이질성: 항체의 하전된 분포를 HMBD-002 CEX SOP v1.0을 기준으로, 고 성능 액체 크로마토그래피 시스템에서 이온-교환을 통해 항체의 수행하였다.

[2215] · pH: pH 측정을 pH 7.0, pH 4.0, pH 10.0의 시판 표준 용액을 사용하여 pH 측정기를 3점 교정 후 수행하였다.

[2216] · 오스몰농도(osmolality): 오스몰농도를 Nova Flex로 측정하고 동결 점 강하 방법을 사용하여 측정한다.

[2217] · 결합 ELISA: HMBD-002-V4C26 ELISA(항원 결합) SOP v1.0을 사용한다.

[2218] 18.5 결과

[2219] 고온 안정성 연구로부터의 결과를 도 76A 내지 76B에 나타낸다.

[2220] 도 76A는 모든 제형에 대해 단백질 농도가 40℃ ± 3℃에서 1개월 동안 안정함이 밝혀졌음을 나타낸다.

[2221] 도 76B는 pH 변동이 모든 제형에 대해 장기간 보관 동안 일반적으로 허용되는 0.3 미만인 것으로 확인되었음을 나타낸다. 제형 F5, F6 및 F9(검은색 원으로 강조함)에 대한 10일째에서의 3개 측정 지점은 20일째 및 30일째로부터 취한 측정값이 모두 표적 pH에 대해 훨씬 작은 변화를 나타내므로 아웃라이너(outliner)로 고려한다.

[2222] 도 76C는 HPLC-SEC 응집을 나타낸다. 단백질 샘플은 40℃ 챔버에 넣기 전에 약 5.5%의 응집을 가졌다. 20일째의 응집 측정은 30일째의 응집 측정 값보다 높았지만 F5-F8 및 F10은 다른 제형에 비해 고 온에서 장기 보관하는 동안 응집체를 형성하기 더 쉽다는 분명한 경향이 있다. 도 76D는 40℃에서 30일째에 제제 F1 내 HMBD-002의 대표적인 결과를 나타낸다.

[2223] 도 76E는 HPLC-CEX로 측정한 바와 같이, 산성 변이체가 일반적으로 주 동형이 54% 내지 60%의 범위에서 변동하면서 약간 증가하는 경향을 나타냄을 나타낸다. 항체 서열은 탈아미드화, 이성체화, 당화(glycation),

라세미화, 숙신이미드 형성, 원치 않는 글리코실화에 대한 낮은 취약성을 나타내므로, 모든 제형에서 약물 물질의 화학 안정성이 보존될 가능성이 있다. 일반적으로 HMBD-002 약물 물질에 대한 기본-1 피크의 일부에 상응하는 응집 피크는 추가의 증가를 나타내지 않았으며, 이는 이러한 10가지 제형의 공통 요인이 응집 형성을 방지하는 데 기여하였음을 입증한다(HPLC-SEC 데이터에서 관찰된 바와 같음).

[2224] 도 76F는 40℃에서 30일째에 제형 F1 내 HMBD-002의 대표적인 HPLC-CEX 결과를 나타낸다. 6개의 산성 피크, 단일 주형 피크 및 5개의 기본 피크가 대략 8분의 분석 윈도우(analysis window)에 잘 분산되어 있고, 이는 방법이 안정성을 입증하기에 충분히 민감함을 나타낸다.

[2225] 도 76G는 40℃에서 20일째부터 모든 제형에서 이의 사람 표적(VISTA)에 대한 HMBD-002의 친화성의 증가를 나타낸다. 30일째에, 친화성은 최대 1.65배(F2)까지 추가로 증가한다. 항원 결합 ELISA 연구의 EC50 데이터는 하기에 제공한다.

[2226]

| 제형 | $EC_{50}$ 농도 (M) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 0일 | 10일 + 40℃ | 20일 + 40℃ | 30일 + 40℃ |
| F1 | 4.00E-11 | 3.06E-11 | 1.72E-11 | 2.15E-11 |
| F2 | 3.39E-11 | 3.22E-11 | 1.97E-11 | 2.02E-11 |
| F3 | 3.08E-11 | 3.48E-11 | 1.89E-11 | 2.27E-11 |
| F4 | 3.57E-11 | 3.25E-11 | 2.05E-11 | 2.27E-11 |
| F5 | 3.10E-11 | 3.41E-11 | 2.39E-11 | 2.23E-11 |
| F6 | 2.94E-11 | 3.06E-11 | 1.86E-11 | 2.18E-11 |
| F7 | 2.89E-11 | 3.39E-11 | 2.06E-11 | 2.17E-11 |
| F8 | 3.95E-11 | 2.80E-11 | 2.48E-11 | 2.27E-11 |
| F9 | 3.15E-11 | 3.05E-11 | 2.23E-11 | 2.37E-11 |
| F10 | 3.21E-11 | 2.81E-11 | 2.35E-11 | 2.70E-11 |
| 참고 | 3.07E-11 | 2.53E-11 | 3.55E-11 | 5.27E-11 |

[2227] 도 76H는 모든 제형이 40℃에서 1개월 저장의 경우 삼투압에서 최도의 변화를 나타내었음을 나타낸다.

[2228] HMBD-002를 고농도에서 제형화한 경우, 육안 검사는 HMBD-002가 아래 나타낸 200mg/mL 농도가지 8개 제형에서 우양호한 용해도를 나타내었음을 나타낸다. 그러나 제형 F5 및 F9는 100mg/mL를 초과하는 우수한 용해도를 뒷받침하지 않았다.

[2229]

| 제형 | 농도 (mg/mL) | | | | 주목 |
|---|---|---|---|---|---|
| | 10 | 50 | 100 | 200 | |
| F1 | 9.88 | 50.00 | 107.89 | 214.40 | 투명, 선명 |
| F2 | 10.07 | 50.74 | 116.95 | 213.37 | 투명, 선명 |
| F3 | 9.94 | 50.23 | 111.11 | 205.41 | 투명, 선명 |
| F4 | 10.34 | 52.83 | 116.33 | 211.05 | 투명, 선명 |
| F5 | 9.88 | 50.74 | 136.96 | 201.08 | 매우 혼탁 및 점성 |
| F6 | 9.89 | 51.18 | 106.36 | 215.51 | 투명, 선명 |
| F7 | 9.95 | 50.16 | 118.36 | 209.02 | 투명, 선명 |
| F8 | 10.01 | 50.78 | 108.42 | 208.25 | 투명, 선명 |
| F9 | 10.08 | 50.77 | 102.15 | 201.96 | 비교적 혼탁 및 점성 |
| F10 | 9.81 | 50.29 | 100.25 | 158.60 | 투명, 선명 |

[2230] 도 77은 제형 F1, F2, F3, F4 및 F10이 가용성 응집(HPLC-SEC로 측정)의 변화를 최소화하면서 고농도로 제제화하는 데 있어 양호한 잠재력을 나타내었음을 나타낸다. F5 및 F9의 경우, 불용성 응집체를 원심분리로 제거하고 0.22um 필터로 추가로 여과하였으며, 가용성 부분만 HPLC-SEC에 대해 분석하였다.

[2231] 동결-해동 스트레스를 받은 HMBD-002 제형을 HPLC-SEC로 응집 성향에 대해 분석하였다. 도 78은 HMBD-002가 6회 주기의 동결 및 해동 후에 9개의 제형에서 양호한 안정성을 나타내었음을 나타낸다. 제형 F10은 동결-해동 후 응집 경향을 나타내었다.

[2232] 하기 표는 안정성 분석의 주요 결과가 요약한다. 담 회색 결과는 단백질 안정성이 양호함을 나타내고, 중 회색 결과는 단백질 안정성이 좋지 않음을 나타낸다.

| 제형 번호 | 농도(30일) | pH | | 응집% (30일) | 산성 변이체 | | 염기성 변이체 | | 최고로 안정한 농도 | 30일째에 hVISTA ELISA ($EC_{50}$)[1] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 기본선 | 30일 | | 기본선 | 30일 | 기본선 | 30일 | | |
| F1 | 10.06 | 5.5 | 5.56 | 5.505 | 15.87 | 18.42 | 28.06 | 26.63 | 214.40 | 2.15E-11 |
| F2 | 10.05 | 5.8 | 5.86 | 5.585 | 15.97 | 18.31 | 28.05 | 26.26 | 213.37 | 2.02E-11 |
| F3 | 10.01 | 5.8 | 5.88 | 5.545 | 16.96 | 18.57 | 27.61 | 26.33 | 205.41 | 2.27E-11 |
| F4 | 10.07 | 5.8 | 5.86 | 5.605 | 16.69 | 18.65 | 27.38 | 26.50 | 211.05 | 2.27E-11 |
| F5 | 10.02 | 6.3 | 6.51 | 5.695 | 17.03 | 19.34 | 28.22 | 26.09 | 136.96 | 2.23E-11 |
| F6 | 10.06 | 5.8 | 5.95 | 5.605 | 16.85 | 18.87 | 28.41 | 26.19 | 215.51 | 2.18E-11 |
| F7 | 10.10 | 5.5 | 5.64 | 5.665 | 16.43 | 18.65 | 28.50 | 26.52 | 209.02 | 2.17E-11 |
| F8 | 10.14 | 5.5 | 5.57 | 5.660 | 14.93 | 18.60 | 29.21 | 26.54 | 208.25 | 2.27E-11 |
| F9 | 10.08 | 5.8 | 6.03 | 5.490 | 16.05 | 18.84 | 27.21 | 26.25 | 102.15 | 2.37E-11 |
| F10 | 10.01 | 5.8 | 5.78 | 5.270 | 17.67 | 21.11 | 26.95 | 25.06 | 158.60 | 2.70E-11 |

[2233] [1]: *참고 표준: 5.27E-11 M*

[2234] 하기 표는 전하 변이체 프로파일의 pH 평가를 나타낸다.

| 평가 | 비교 그룹 | 산성 변이체 (D0) | 산성 변이체 (D30) | 델타 (산성) | 염기성 변이체 (D0) | 염기성 변이체 (D30) | 델타 (염기성) | 총 변화 (절대 값) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pH | F1 (5.5) | 15.865 | 18.42 | 2.55 | 28.06 | 26.63 | -1.44 | 3.99 |
| | F2 (5.8) | 15.965 | 18.31 | 2.34 | 28.05 | 26.26 | -1.80 | 4.14 |
| | F5 (6.3) | 17.030 | 19.34 | 2.31 | 28.22 | 26.09 | -2.13 | 4.44 |

[2235]

[2236] 도 79는 제형 F1, F2, 및 F5에 대한 pH 와 총 전하 변화의 상관관계를 나타낸다.

[2237] 18.6 결론

[2238] 제형 F1, F2, F3 및 F4는 제조 동안 주요 품질 기여와 관련하여 분자 안정성을 보존하는 데 있어 다른 제형 후보에 비해 더 우수한 성능을 나타내었다. 또한, 40℃에서 장기간 보관하는 동안 pH 변화 대 전하 변이체 프로파일 변화에 대한 평가는 pH 감소와 전하 변이체 절대 값 감소 사이에 양호한 상관관계를 나타낸다.

[2239] 전체적으로, 제형 F1(20mM의 히스티딘+8% 슈크로스+0.02% 폴리소르베이트 80, pH 5.5)은 시험한 모든 조건에서 항체의 무결성과 안정성을 가장 잘 보존하는 것으로 나타내었고 임상 물질에 대한 주요 제형으로 선택한다. 또한, 고농도 연구에서 비교적 높은 슈크로스 함량(8% w/v)과 단백질 안정성을 고려하여, 임상 물질에 대해 수득된 최종 약물 물질은 50mg/mL로 제형화될 수 있다.

[2240] 18.7 약물 물질의 안정성

[2241] 상기 제형 F1에서 50mg/mL에서 제형화된, HMBD-002 임상 약물 물질을 장기 보관 조건(-80℃), 가속화된 저장 조건(5℃), 스트레스 저장 조건(25℃)에서, 및 6회 주기의 동결/해동 조건 하에서 이의 안정성에 대해 평가하였다. 결과는 아래에 제공한다.

[2242] -80℃에서 HMBD-002 약물 물질:

| 속성(attribute) | 검정 | 허용 범주 | 시점 | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | T0[1] | 1M | 3M |
| 색상 | 육안 방법 | ≤ Y3 | < Y6[2] | < Y6 | < Y6 |
| 일반적 | pH | 5.0 내지 6.0 | 5.7 | 5.6 | 5.6 |
| 함량 | 단백질 함량 | 42.5 내지 57.5 mg/mL | 52.7 mg/mL | 53.5 mg/mL | 54.5 mg/mL |
| 효능 | 결합 검정 | 60% 내지 140% 상대 효능 | 92% 상대 효능 | 101% 상대 효능 | 90% 상대 효능 |
| 순도 | SE-HPLC[3] | 주요 피크%: ≥ 92% | 주요 피크%: 95% | 주요 피크%: 95% | 주요 피크%: 95% |
| | CE-SDS[4] (환원됨) | LC+HC[5] % : ≥ 95% | LC+HC[5] % : 98% | LC+HC[5] % : 98% | LC+HC[5] % : 99% |
| | CE-SDS[4] (비-환원됨) | 주요 피크%: ≥ 90% | 주요 피크%: 96% | 주요 피크%: 95% | 주요 피크%: 95% |
| | CEX-HPLC[6] | 주요 피크%: 보고서 결과 | 주요 피크%: 58% | 주요 피크%: 57% | 주요 피크%: 59% |
| | | 산성 피크%: 보고서 결과 | 산성 피크%: 18% | 산성 피크%: 17% | 산성 피크%: 17% |
| | | 염기성 피크%: 보고서 결과 | 염기성 피크%: 24% | 염기성 피크%: 26% | 염기성 피크%: 24% |

[1] 달리 명시하지 않는 한 시간 0(T0)는 배치 방출 데이타를 지정한다
[2] -80°C 에서 1M로부터의 데이타
[3] 크기 배제 - 고압 액체 크로마토그래피
[4] 모세관 전기영동 - 나트륨 도데실 설페이트
[5] 경쇄 + 중쇄
[6] 양이온 교환 - 고압 액체 크로마토그래피

[2243]

[2244] 5℃에서 HMBD-002 약물 물질:

| 속성 | 검정 | 허용 범주 | 시점 | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | T0[1] | 1M | 3M |
| 색상 | 육안 방법 | ≤ Y3 | < Y6[2] | < Y6 | < Y6 |
| 일반적 | pH | 5.0 내지 6.0 | 5.7 | 5.7 | 5.6 |
| 함량 | 단백질 함량 | 42.5 내지 57.5 mg/mL | 52.7 mg/mL | 54.5 mg/mL | 53.9 mg/mL |
| 효능 | 결합 검정 | 60% 내지 140% 상대 효능 | 92% 상대 효능 | 105% 상대 효능 | 89% 상대 효능 |
| 순도 | SE-HPLC[3] | 주요 피크%: ≥ 92% | 주요 피크%: 95% | 주요 피크%: 95% | 주요 피크%: 95% |
| | CE-SDS[4] (환원됨) | LC+HC[5] %: ≥ 95% | LC+HC[5] %: 98% | LC+HC[5] %: 98% | LC+HC[5] %: 99% |
| | CE-SDS[4] (비-환원됨) | 주요 피크%: ≥ 90% | 주요 피크%: 96% | 주요 피크%: 95% | 주요 피크%: 95% |
| | CEX-HPLC[6] | 주요 피크%: 보고서 결과 | 주요 피크%: 58% | 주요 피크%: 58% | 주요 피크%: 59% |
| | | 산성 피크%: 보고서 결과 | 산성 피크%: 18% | 산성 피크%: 18% | 산성 피크%: 17% |
| | | 염기성 피크%: 보고서 결과 | 염기성 피크%: 24% | 염기성 피크%: 25% | 염기성 피크%: 24% |

[1] 달리 명시하지 않는 한 시간 0(T0)는 배치 방출 데이타를 지칭한다
[2] -80°C 에서 1M로부터의 데이타
[3] 크기 배제 - 고압 액체 크로마토그래피
[4] 모세관 전기영동 - 나트륨 도데실 설페이트
[5] 경쇄 + 중쇄
[6] 양이온 교환 - 고압 액체 크로마토그래피

[2245]

[2246] 25℃, 60% 상대 습도에서 HMBD-002 약물 물질:

| 속성 | 검정 | 허용 범주 | 시점 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | T0[1] | 1D | 3D | 7D |
| 색상 | 육안 방법 | ≤ Y3 | < Y6[2] | < Y6 | < Y6 | < Y6 |
| 일반적 | pH | 5.0 내지 6.0 | 5.7 | 5.7 | 5.7 | 5.7 |
| 함량 | 단백질 함량 | 42.5 내지 57.5 mg/mL | 52.7 mg/mL | 52.0 mg/mL | 54.5 mg/mL | |
| 효능 | 결합 검정 | 60% 내지 140% 상대 효능 | 92% 상대 효능 | 87% 상대 효능 | 94% 상대 효능 | 90% 상대 효능 |
| 순도 | SE-HPLC[3] | 주요 피크%: ≥ 92% | 주요 피크%: 95% | 주요 피크%: 95% | 주요 피크%: 95% | 주요 피크%: 95% |
| | CE-SDS[4] (환원됨) | LC+HC[5] %: ≥ 95% | LC+HC[5] %: 98% | LC+HC[5] %: 99% | LC+HC[5] %: 98% | LC+HC[5] %: 98% |
| | CE-SDS[4] (비-환원됨) | 주요 피크%: ≥ 90% | 주요 피크%: 96% | 주요 피크%: 95% | 주요 피크%: 95% | 주요 피크%: 95% |
| | CEX-HPLC[2] | 주요 피크%: 보고서 결과 | 주요 피크%: 58% | 주요 피크%: 57% | 주요 피크%: 58% | 주요 피크%: 59% |
| | | 산성 피크%: 보고서 결과 | 산성 피크%: 18% | 산성 피크%: 18% | 산성 피크%: 17% | 산성 피크%: 17% |
| | | 염기성 피크%: 보고서 결과 | 염기성 피크%: 24% | 염기성 피크%: 25% | 염기성 피크%: 25% | 염기성 피크%: 24% |

[1] 달리 명시하지 않는 한 시간 0(T0)는 배치 방출 데이타를 지칭한다
[2] -80°C 에서 1M로부터의 데이타
[3] 크기 배제 - 고압 액체 크로마토그래피
[4] 모세관 전기영동 - 나트륨 도데실 설페이트
[5] 경쇄 + 중쇄
[6] 양이온 교환 - 고압 액체 크로마토그래피

[2247]

[2248] 동결/해동 조건에 적용된 HMBD-002 약물 물질:

| 속성 | 검정 | 허용 범주 | T0[1] | 동결 및 해동 -80°C 내지 25°C에서 6회 주기 |
|---|---|---|---|---|
| 색상 | 육안 방법 | ≤ Y3 | < Y6 | < Y6 |
| 일반적 | pH | 5.0 to 6.0 | 5.7 | 5.7 |
| 함량 | 단백질 함량 | 42.5 내지 57.5 mg/mL | 52.7 mg/mL | 54.1 mg/mL |
| 효능 | 결합 검정 | 60% 내지 140% 상대 효능 | 92% 상대 효능 | 79% 상대 효능 |
| 순도 | SE-HPLC[2] | 주요 피크%: ≥ 92% | 주요 피크%: 95% | 주요 피크%: 95% |
| | CE-SDS[3] (환원됨) | LC+HC[4] %: ≥ 95% | LC+HC[4] %: 98% | LC+HC[4] %: 98% |
| | CE-SDS[3] (비-환원됨) | 주요 피크%: ≥ 90% | 주요 피크%: 96% | 주요 피크%: 95% |
| | CEX-HPLC[5] | 주요 피크%: 보고서 결과 | 주요 피크%: 58% | 주요 피크%: 59% |
| | | 산성 피크%: 보고서 결과 | 산성 피크%: 18% | 산성 피크%: 17% |
| | | 염기성 피크%: 보고서 결과 | 염기성 피크%: 24% | 염기성 피크%: 24% |

[1] 달리 명시하지 않는 한 시간 0(T0)는 배치 방출 데이타를 지칭한다
[2] -80°C 에서 1M로부터의 데이타
[3] 크기 배제 - 고압 액체 크로마토그래피
[4] 모세관 전기영동 - 나트륨 도데실 설페이트
[5] 경쇄 + 중쇄
[6] 양이온 교환 - 고압 액체 크로마토그래피

[2249]

[2250] 생성된 결과는 약물 물질이 권장 보관 조건에서 6개월까지 안정적으로 유지됨을 입증한다. 안정성 결과에 따라 할당된 만료 기간은 12개월일 것이다.

[2251] 18.8 약물 생성물의 안정성

[2252] 상기 제형 F1으로 50mg/mL에서 제형화된, HMBD-002 임상 약물 생성물을 장기간 보관 조건(-20℃), 가속화된 저장 조건(5℃), 스트레스 저장 조건(25℃), 및 동결/해동 조건의 6회 주기하에서 이의 안정성에 대해 평가하였다. 결과는 하기에 제공한다.

[2253] -20℃에서 HMBD-002 약물 생성물:

| 속성 | 검정 | 허용 범주 | 시점 | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | T0[1] | 1M | 3M |
| 외관 | 육안 방법 | 액체, 입자로부터 실제적으로 유리됨 | 액체, 입자로부터 실제적으로 유리됨 | 액체, 입자로부터 실제적으로 유리됨 | 액체, 입자로부터 실제적으로 유리됨 |
| 색상 | 육안 방법 | ≤ Y3 | < Y6 | < Y6 | < Y6 |
| 선명도 | 혼탁도 방법 | ≤ 참고 IV | < 참고 III | < 참고 III | < 참고 III |
| 일반적 | pH | 5.0 내지 6.0 | 5.6 | 5.7 | 5.8 |
| | 액체 입자화 물질 | ≥10 μm: ≤ 6000/용기 | ≥ 10 μm: 용기 당 25 | ≥ 10 μm: 용기 당 22 | ≥ 10 μm: 용기 당 11 |
| | | ≥ 25 μm: ≤ 600 /용기 | ≥ 25 μm: 용기 당 1 | ≥ 25 μm: 용기 당 0 | ≥ 25 μm: 용기 당 0 |
| 함량 | 단백질 함량 | 42.5 내지57.5mg/mL | 54.5 mg/mL | 51.9 mg/mL | 52.4 mg/mL |
| 효능 | 결합 검정 | 60% 내지 140% 상대 효능 | 84% 상대 효능 | 102% 상대 효능 | 95% 상대 효능 |
| 순도 | SE-HPLC[2] | 주요 피크%: ≥ 92% | 주요 피크%: 95% | 주요 피크%: 95% | 주요 피크%: 95% |
| | CE-SDS[3] (환원됨) | LC+HC[4] % ≥ 95% | LC+HC[4] %: 98% | LC+HC[4] %: 98% | LC+HC[4] %: 99% |
| | CE-SDS[3] (비-환원됨) | 주요 피크%: ≥90% | 주요 피크%: 95% | 주요 피크%: 95% | 주요 피크%: 96% |
| | CEX-HPLC[5] | 주요 피크%: 보고서 결과 | 주요 피크%: 58% | 주요 피크%: 57% | 주요 피크%: 58% |
| | | 산성 피크%: 보고서 결과 | 산성 피크%: 17% | 산성 피크%: 17% | 산성 피크%: 17% |
| | | 염기성 피크%: 보고서 결과 | 염기성 피크%: 25% | 염기성 피크%: 25% | 염기성 피크%: 24% |
| 안전성 | 멸균성/용기 폐쇄 온전성 (CCI) | 멸균성: 멸균 CCI: 통과[6] | 멸균성: 멸균 | 시험되지 않음 | 시험되지 않음 |

[2254]

[1] 달리 명시하지 않는 한 시간 0(T0)는 배치 방출 데이타를 지칭한다
-80°C 에서 1M로부터의 데이타
[2] 크기 배제 - 고압 액체 크로마토그래피
[3] 모세관 전기영동 - 나트륨 도데실 설페이트
[4] 경쇄 + 중쇄
[5] 양이온 교환 - 고압 액체 크로마토그래피
[6] 통과는 샘플이 염료 진입을 나타내지 않음을 표시한다.

[2255]

[2256] 5℃, 수직 배향에서 HMBD-002 약물 생성물:

| 속성 | 검정 | 허용 범주 | 시점 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | T0[1] | 14D | 1M | 3M |
| 외관 | 육안 방법 | 액체, 입자로부터 실제적으로 유리됨 | 액체, 입자로부터 실제적으로 유리됨 | 액체, 입자로부터 실제적으로 유리됨 | 액체, 입자로부터 실제적으로 유리됨 | 액체, 입자로부터 실제적으로 유리됨 |
| 색상 | 육안 방법 | ≤ Y3 | < Y6 | < Y6 | < Y6 | < Y6 |
| 선명도 | 혼탁도 방법 | ≤ 참고 IV | < 참고 III | < 참고 III | < 참고 III | < 참고 III |
| 일반적 | pH | 5.0 내지 6.0 | 5.6 | 5.6 | 5.6 | 5.8 |
| | 액체 입자화 물질 | ≥10 μm: ≤ 6000/용기 | ≥ 10 μm: 용기 당 25 | ≥ 10 μm: 용기 당 13 | ≥ 10 μm: 용기 당 28 | ≥ 10 μm: 용기 당 20 |
| | | ≥ 25 μm: ≤ 600 /용기 | ≥ 25 μm: 용기 당 1 | ≥ 25 μm: 용기 당 0 | ≥ 25 μm: 용기 당 1 | ≥ 25 μm: 용기 당 0 |
| 함량 | 단백질 함량 | 42.5 내지57.5mg/mL | 54.5 mg/mL | 53.8 mg/mL | 52.0 mg/mL | 51.7 mg/mL |
| 효능 | 결합 검정 | 60% 내지 140% 상대 효능 | 84% 상대 효능 | 93% 상대 효능 | 103% 상대 효능 | 98% 상대 효능 |
| 순도 | SE-HPLC[2] | 주요 피크%: ≥ 92% | 주요 피크%: 95% | 주요 피크%: 95% | 주요 피크%: 95% | 주요 피크%: 95% |
| | CE-SDS[3] (환원됨) | LC+HC[4] % ≥ 95% | LC+HC[4] %: 98% | LC+HC[4] %: 98% | LC+HC[4] %: 98% | LC+HC[4] %: 98% |
| | CE-SDS[3] (비-환원됨) | 주요 피크%: ≥ 90% | 주요 피크%: 95% | 주요 피크%: 95% | 주요 피크%: 95% | 주요 피크%: : 96% |
| | CEX-HPLC[5] | 주요 피크%: 보고서 결과 | 주요 피크%: 58% | 주요 피크%: 57% | 주요 피크%: 57% | 주요 피크%: 58% |
| | | 산성 피크%: 보고서 결과 | 산성 피크%: 17% | 산성 피크%: 17% | 산성 피크%: 17% | 산성 피크%: 17% |
| | | 염기성 피크%: 보고서 결과 | 염기성 피크%: 25% | 염기성 피크%: 26% | 염기성 피크%: 26% | 염기성 피크%: 25% |
| 안전성 | 멸균성/용기 폐쇄 온전성 (CCI) | 멸균성: 멸균 CCI: 통과[6] | 멸균성: 멸균 | 시험되지 않음 | 시험되지 않음 | 시험되지 않음 |

[2257]

[1] 달리 명시하지 않는 한 시간 0(T0)는 배치 방출 데이타를 지칭한다
-80°C 에서 1M로부터의 데이타
[2] 크기 배제 - 고압 액체 크로마토그래피
[3] 모세관 전기영동 - 나트륨 도데실 설페이트
[4] 경쇄 + 중쇄
[5] 양이온 교환 - 고압 액체 크로마토그래피
[6] 통과는 샘플이 염료 진입을 나타내지 않음을 표시한다.

[2258]

[2259] 5℃, 역위 배향에서 HMBD-002 약물 생성물:

| 속성 | 검정 | 허용 범주 | 시점 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | T0[1] | 14D | 1M | 3M |
| 외관 | 육안 방법 | 액체, 입자로부터 실제적으로 유리됨 | 액체, 입자로부터 실제적으로 유리됨 | 액체, 입자로부터 실제적으로 유리됨 | 액체, 입자로부터 실제적으로 유리됨 | 액체, 입자로부터 실제적으로 유리됨 |
| 색상 | 육안 방법 | ≤ Y3 | < Y6 | < Y6 | < Y6 | < Y6 |
| 선명도 | 혼탁도 방법 | ≤ 참고 IV | < 참고 III | < 참고 III | < 참고 III | < 참고 III |
| 일반적 | pH | 5.0 내지 6.0 | 5.6 | 5.7 | 5.6 | 5.8 |
| | 액체 입자화 물질 | ≥10 μm: ≤ 6000/용기 | ≥ 10 μm: 용기 당 25 | ≥ 10 μm: 용기당 8 | ≥ 10 μm: 용기당 18 | ≥ 10 μm: 용기당 10 |
| | | ≥ 25 μm: ≤ 600 /용기 | ≥ 25 μm: 용기 당 1 | ≥ 25 μm: 용기 당 0 | ≥ 25 μm: 용기 당 0 | ≥ 25 μm: 용기 당 0 |
| 함량 | 단백질 함량 | 42.5 내지57.5mg/mL | 54.5 mg/mL | 54.2 mg/mL | 52.4 mg/mL | 53.4 mg/mL |
| 효능 | 결합 검정 | 60% 내지 140% 상대 효능 | 84% 상대 효능 | 105% 상대 효능 | 87% 상대 효능 | 84% 상대 효능 |
| 순도 | SE-HPLC[2] | 주요 피크%: ≥ 92% | 주요 피크%: 95% | 주요 피크%: 95% | 주요 피크%: 95% | 주요 피크%: 95% |
| | CE-SDS[3] (환원됨) | LC+HC[4] % ≥ 95% | LC+HC[4] %: 98% | LC+HC[4] %: 98% | LC+HC[4] %: 98% | LC+HC[4] %: 98% |
| | CE-SDS[3] (비-환원됨) | 주요 피크%: ≥ 90% | 주요 피크%: 95% | 주요 피크%: 95% | 주요 피크%: 95% | 주요 피크%: : 96% |
| | CEX-HPLC[5] | 주요 피크%: 보고서 결과 | 주요 피크%: 58% | 주요 피크%: 57% | 주요 피크%: 58% | 주요 피크%: 57% |
| | | 산성 피크%: 보고서 결과 | 산성 피크%: 17% | 산성 피크%: 17% | 산성 피크%: 17% | 산성 피크%: 18% |
| | | 염기성 피크%: 보고서 결과 | 염기성 피크%: 25% | 염기성 피크%: 26% | 염기성 피크%: 25% | 염기성 피크%: 25% |
| 안전성 | 멸균성/용기 폐쇄 온전성 (CCI) | 멸균성: 멸균 CCI: 통과[6] | 멸균 | 시험되지 않음 | 시험되지 않음 | 시험되지 않음 |

[2260]

[1] 달리 명시하지 않는 한 시간 0(T0)는 배치 방출 데이타를 지칭한다
-80°C 에서 1M로부터의 데이타
[2] 크기 배제 - 고압 액체 크로마토그래피
[3] 모세관 전기영동 - 나트륨 도데실 설페이트
[4] 경쇄 + 중쇄
[5] 양이온 교환 - 고압 액체 크로마토그래피
[6] 통과는 샘플이 염료 진입을 나타내지 않음을 표시한다.

[2261]

[2262] 25℃, 60% 상대 습도에서 HMBD-002 약물 생성물:

| 속성 | 검정 | 허용 범주 | 시점 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | T0[1] | 1D | 3D | 1M | 3M |
| 외관 | 육안 방법 | 액체, 입자로부터 실제적으로 유리됨 | 액체, 입자로부터 실제적으로 유리됨 | 액체, 입자로부터 실제적으로 유리됨 | 액체, 입자로부터 실제적으로 유리됨 | 액체, 입자로부터 실제적으로 유리됨 | 액체, 입자로부터 실제적으로 유리됨 |
| 색상 | 육안 방법 | ≤ Y3 | < Y6 | < Y6 | < Y6 | < Y6 | < Y6 |
| 선명도 | 혼탁도 방법 | ≤ 참고 IV | < 참고 III | < 참고 III | < 참고 III | < 참고 III | < 참고 III |
| 일반적 | pH | 5.0 to 6.0 | 5.6 | 5.7 | 5.6 | 5.6 | 5.8 |
| | 액체 입자화 물질 | ≥10 μm: ≤ 6000/용기 | ≥ 10 μm: 용기 당 25 | ≥ 10 μm: 용기당 13 | ≥ 10 μm: 용기당 15 | ≥ 10 μm: 용기당 45 | ≥ 10 μm: 용기당 42 |
| | | ≥ 25 μm: ≤ 600 /용기 | ≥ 25 μm: 용기 당 1 | ≥ 25 μm: 용기 당 0 | ≥ 25 μm: 용기 당 0 | ≥ 25 μm: 용기 당 1 | ≥ 25 μm: 용기 당 0 |
| 함량 | 단백질 함량 | 42.5 내지57.5 mg/mL | 54.5 mg/mL | 53.9 mg/mL | 54.3 mg/mL | 52.2 mg/mL | 52.3 mg/mL |
| 효능 | 결합 검정 | 60% 내지 140% 상대 효능 | 84% 상대 효능 | 100% 상대 효능 | 96% 상대 효능 | 95% 상대 효능 | 91% 상대 효능 |
| 순도 | SE-HPLC[2] | 주요 피크%: ≥ 92% | 주요 피크%: 95% | 주요 피크%: 94% | 주요 피크%: 94% | 주요 피크%: 94% | 주요 피크%: 94% |
| | CE-SDS[3] (환원됨) | LC+HC[4] % ≥ 95% | LC+HC[4] %: 98% | LC+HC[4] %: 98% | LC+HC[4] %: 98% | LC+HC[4] %: 98% | LC+HC[4] %: 98% |
| | CE-SDS[3] (비-환원됨) | 주요 피크%: ≥ 90% | 주요 피크%: 95% | 주요 피크%: 95% | 주요 피크%: 95% | 주요 피크%: 95% | 주요 피크%: 95% |
| | CEX-HPLC[5] | 주요 피크%: 보고서 결과 | 주요 피크%: 58% | 주요 피크%: 58% | 주요 피크%: 58% | 주요 피크%: 58% | 주요 피크%: 56% |
| | | 산성 피크%: 보고서 결과 | 산성 피크%: 17% | 산성 피크%: 17% | 산성 피크%: 17% | 산성 피크%: 16% | 산성 피크%: 19% |
| | | 염기성 피크%: 보고서 결과 | 염기성 피크%: 25% | 염기성 피크%: 25% | 염기성 피크%: 25% | 염기성 피크%: 26% | 염기성 피크%: 25% |
| 안전성 | 멸균성 | 멸균 | 멸균 | 시험되지 않음 | 시험되지 않음 | 시험되지 않음 | 시험되지 않음 |

[2263]

[1] 달리 명시하지 않는 한 시간 0(T0)는 배치 방출 데이타를 지칭한다
[2] 크기 배제 - 고압 액체 크로마토그래피
[3] 모세관 전기영동 - 나트륨 도데실 설페이트
[4] 경쇄 + 중쇄
[5] 양이온 교환 - 고압 액체 크로마토그래피

[2264]

[2265] 40℃, 75% 상대 습도에서 HMBD-002 약물 생성물:

| 속성 | 검정 | 허용 범주 | 시점 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | T0[1] | 7D | 14D | 1M |
| 외관 | 육안 방법 | 액체, 입자로부터 실제적으로 유리됨 | 액체, 입자로부터 실제적으로 유리됨 | 액체, 입자로부터 실제적으로 유리됨 | 액체, 입자로부터 실제적으로 유리됨 | 액체, 입자로부터 실제적으로 유리됨 |
| 색상 | 육안 방법 | ≤ Y3 | < Y6 | < Y6 | < Y6 | < Y6 |
| 선명도 | 혼탁도 방법 | ≤ 참고 IV | < 참고 III | < 참고 III | < 참고 III | < 참고 III |
| 일반적 | pH | 5.0 내지 6.0 | 5.6 | 5.7 | 5.7 | 5.7 |
| | 액체 입자화 물질 | ≥10 μm: ≤ 6000/용기 | ≥ 10 μm: 용기 당 25 | ≥ 10 μm: 용기당 15 | ≥ 10 μm: 용기 당 49 | ≥ 10 μm: 용기 62 |
| | | ≥ 25 μm: ≤ 600 /용기 | ≥ 25 μm: 용기 당 1 | ≥ 25 μm: 용기 당 0 | ≥ 25 μm: 용기 당 0 | ≥ 25 μm: 용기 당 1 |
| 함량 | 단백질 함량 | 42.5 내지57.5 mg/mL | 54.5 mg/mL | 53.2 mg/mL | 54.0 mg/mL | 51.9 mg/mL |
| 효능 | 결합 검정 | 60% 내지 140% 상대 효능 | 84% 상대 효능 | 99% 상대 효능 | 98% 상대 효능 | 87% 상대 효능 |
| 순도 | SE-HPLC[2] | 주요 피크%: ≥ 92% | 주요 피크%: 95% | 주요 피크%: 93% | 주요 피크%: 93% | 주요 피크%: 93% |
| | CE-SDS[3] (환원됨) | LC+HC[4] % ≥ 95% | LC+HC[4] %: 98% | LC+HC[4] %: 98% | LC+HC[4] %: 97% | LC+HC[4] %: 97% |
| | CE-SDS[3] (비-환원됨) | 주요 피크%: ≥ 90% | 주요 피크%: 95% | 주요 피크%: 95% | 주요 피크%: 94% | 주요 피크%: 93% |
| | CEX-HPLC[5] | 주요 피크%: 보고서 결과 | 주요 피크%: 58% | 주요 피크%: 57% | 주요 피크%: 56% | 주요 피크%: 45% |
| | | 산성 피크%: 보고서 결과 | 산성 피크%: 17% | % Acidic peaks: 15% | 산성 피크%: 16% | 산성 피크%: 27% |
| | | 염기성 피크%: 보고서 결과 | 염기성 피크%: 25% | 염기성 피크%: 28% | 염기성 피크%: 28% | 염기성 피크%: 28% |
| 안전성 | 멸균성 | 멸균 | 멸균 | 시험되지 않음 | 시험되지 않음 | 멸균 |

[2266]

[1] 달리 명시하지 않는 한 시간 0(T0)는 배치 방출 데이타를 지칭한다
[2] 크기 배제 - 고압 액체 크로마토그래피
[3] 모세관 전기영동 - 나트륨 도데실 설페이트
[4] 경쇄 + 중쇄
[5] 양이온 교환 - 고압 액체 크로마토그래피

[2267]

[2268] 동결/해동 조건에 적용시킨 HMBD-002 약물 생성물:

| 속성 | 검정 | 허용 범주 | T0[1] | 동결 및 해동<br>6회 주기, -20°C 내지 25°C |
|---|---|---|---|---|
| 외관 | 육안 방법 | 액체, 입자로부터<br>실제적으로 유리됨 | 액체, 입자로부터<br>실제적으로 유리됨 | 액체, 입자로부터<br>실제적으로 유리됨 |
| 색상 | 육안 방법 | ≤ Y3 | < Y6 | < Y6 |
| 선명도 | 혼탁도 방법 | ≤ 참고 IV | < 참고 III | < 참고 III |
| 일반적 | pH | 5.0 내지 6.0 | 5.6 | 5.7 |
| | 액체 입자화 물질 | ≥10 μm: ≤ 6000/용기 | ≥ 10 μm:<br>용기 당 25 | ≥ 10 μm:<br>용기 당 12 |
| | | ≥ 25 μm: ≤ 600/용기 | ≥ 25 μm:<br>용기 당 1 | ≥ 25 μm:<br>용기 당 0 |
| 함량 | 단백질 함량 | 42.5 내지57.5 mg/mL | 54.5 mg/mL | 53.5 mg/mL |
| 효능 | 결합 검정 | 60% 내지 140%<br>상대 효능 | 84% 상대 효능 | 86% 상대 효능 |
| 순도 | SE-HPLC[2] | 주요 피크%: ≥ 92% | 주요 피크%: 95% | 주요 피크%: 95% |
| | CE-SDS[3] (환원됨) | % LC+HC[4] ≥ 95% | % LC+HC[4]: 98% | % LC+HC[4]: 98% |
| | CE-SDS[3]<br>(비-환원됨) | 주요 피크%: ≥ 90% | 주요 피크%: 95% | 주요 피크%: 95% |
| | CEX-HPLC[5] | 주요 피크%:<br>보고서 결과 | 주요 피크%: 58% | 주요 피크%: 57% |
| | | 산성 피크%:<br>보고서 결과 | 산성 피크%: 17% | 산성 피크%: 17% |
| | | 염기성 피크%:<br>보고서 결과 | 염기성 피크%:<br>25% | 염기성 피크%: 26% |
| 안전성 | 멸균성 | 멸균 | 멸균 | 멸균 |

[2269]

[1] 달리 명시하지 않는 한 시간 0(T0)는 배치 방출 데이타를 지칭한다
[2] 크기 배제 - 고압 액체 크로마토그래피
[3] 모세관 전기영동 - 나트륨 도데실 설페이트
[4] 경쇄 + 중쇄
[5] 양이온 교환 - 고압 액체 크로마토그래피

[2270]

[2271] 생성된 결과는 약물 생성물이 권장된 저장 조건에서 6개월까지 안정적으로 남아있음을 입증한다. 각각의 제제/조건에 대해 6개월 및 9개월 시점에서 위와 유사한 결과가 또한 관찰되었다. 9개월 시점까지 생성된 모든 안정성 데이터는 확립된 허용 범주 내에서 유지되었다. 안정성 결과를 기준으로 할당된 만료 기간은 12개월일 것이다.

[2272] 실시예 19: 진전된 고형 악성종양 환자에서, VISTA를 표적화하는 모노클로날(monoclonal) 항체, HMBD-002-V4C26의 제1상 연구

[2273] 본원의 하기에 사용된 바와 같이, HMDB-002 또는 HMBD-002-V4C26은 사람 IgG4/Vκ 양식의 V4-C26 가변 영역을 포함하고 서열 번호: 331의 중쇄 및 서열 번호: 317의 경쇄를 포함하는 IgG4 사람화된 모노클로날 항원-결합 분자를 지칭한다.

[2274] 19.1 도입

[2275] VISTA는 음성 면역 체크포인트 조절인자로서 기능하는 B7 단백질 계열의 막전이 면역조절성 당단백질이다. 이의 가장 가까운 동족체는 PD-L1이며, 이는 24%의 서열 상동성을 공유한다.[1] VISTA는 Ig 상과(superfamily)의 다른 구성원과만는 단지 먼 관련이 있다.[1,2]

[2276] 최근 확인된 VISTA의 결정 구조는 B7 계열 구성원 중에서 VISTA IgV-유사 폴딩 유니크(folding unique)를 만드는 특징을 강조하였다. 이는 10개의 베타 가닥(표준 9개 대신), 베타 샌드위치 형태로 정렬된 3개의 알파 나선, 확장된 루프를 형성하는 가닥 C와 C' 사이의 독특한 21개- 잔기 회전을 포함한다. 결정 구조는 또한 VISTA가 결정화된 다른 모든 B7 계열 단백질 내에 존재하는, IgC 도메인을 결여함을 나타낸다. 마지막으로 VISTA는 2개의

비정규적이고 보존된 C51/C113 이황화물을 포함하며, 그 중 하나는 임상적으로 관련된 단백질-단백질 상호 작용에서 역할을 할 수 있는 독특하고, 돌출된 위치에 확장된 C-C' 루프를 보유하는 경향이 있다.[3]

[2277] 초기 전임상 연구는 재조합 VISTA 치료 또는 항원 제시 세포(APC)에 대한 VISTA 발현이 PD-1 경로와는 독립적으로, T 세포 증식을 억제하는 데 충분함을 나타내었다.[1] 또한, 다수의 연구는 VISTA가 건선(psoriasis), 자가-면역뇌염(auto-immune encephalitis), 루푸스(lupus), 이식편-대-숙주 질환(graft-versus-host disease)을 포함하는 많은 전-임상 모델에서 자가면역성을 구속함을 나타내었다.[1,2,5,6,7,8] VISTA 유전자를 결여한 마우스는 PD-1 경로 조절-저하(de-regulation)와 유사한 표현형인, 기관 및 피부 자가면역성을 발달시킨다.[5,9,10,11] 이러한 데이터는 VISTA가 림프구 및 골수 세포, 특히 나이브(naïve) T 세포에 대한 작용을 통해, 면역 반응을 억제하는 기능을 함을 나타낸다.[12,13] 따라서, VISTA는 음성 면역 체크포인트 조절인자로 기능하는 막전이 당단백질이다.

[2278] VISTA는 골수 및 과립구 세포, 특히 MDSC 및 종양 관련 대식세포(TAM)에서 주로 발현된다. VISTA는 또한 CD4+ T 조절 세포, 나이브e T 세포 및 일부 종양 세포에서 발현되는 것으로 보고되었다.[14,15,16] MDSC에 의한 면역억제 및 VISTA의 상향조절은 고형 암 및 급성 골수 백혈병(acute myeloid leukemia)에서 항-세포독성 T-림프구-관련된 단백질(CTLA4) 및 항-PD-1/PD-L1 치료요법에 대해 획득된 내성과 연관되었다.[17,18,19] VISTA 녹다운(knockdown)은 MDSC-매개된 CD8 T 세포 활성을 잠재적으로 감소시키는 것으로 보고되었다.[19] 또한 VISTA는 나이브 T 세포 정지 및 말초 면역 내성을 유지하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다.[15] 이러한 세포에서 VISTA의 손실은 전사 및 후생유전적 수준에서 나이브 T 세포의 정지 표현형(quiescence phenotype)을 감소시켜, T 세포 수용체(TCR) 및 사이토킨 경로 활성 둘 다를 향상시켰다.

[2279] 나이브 T 세포에서 VISTA의 발현은 CTLA4 및 PD-1과 같이, T 세포 활성화의 다른 잘 확립된 음성 체크포인트 조절인자의 발현을 선행한다.[13] CTLA4는 T 세포 활성화 후 세포 표면에서 발현되고 프라이밍 단계(priming stage)에서 공-자극을 제한함으로써 T 세포 활성화를 억제한다. PD-1은 프라이밍 동안 나중에 발현되어 효과기 단계에서 T 세포를 억제하며, VISTA는 말초 T 세포 내성의 가장 이른 체크포인트 조절자로서 기능한다.[13]

[2280] VISTA 유전자 기능과 PD-L1 경로 사이의 유사성을 기준으로, 종양 면역성에서 VISTA의 역할이 보다 잘 이해되고 있다. 초기 연구는 종양 세포에서 VISTA 과-발현이 마우스에서 항-종양 면역성에 대해 보호하는데 충분하였다는 것을 나타내었다.[1] 이후에 뮤린 VISTA에 대한 차단 항체를 개발하고 활용하여 VISTA 차단이 종양 미세환경(TME)에 대한 작용을 통해 항-종양 면역성을 촉진할 수 있음을 입증하였다.[18] VISTA 기능을 차단하는 항체는 PD-1 차단과 시너지 효과를 나타내었고, 이는 다시 VISTA 및 PD-1이 독립적으로 기능함을 내포한다.[10] VISTA 차단에 대한 항-종양 반응은 림프종, 방광 암, 흑색종, 결장직장 암, 난소암, 두경부 편평 세포 암종 및 기타 악성 종양의 전-임상 뮤린 모델에서 입증되었고, 이는 이러한 접근법이 광범위한 유용성을 가질 수 있음을 나타낸다. 또한 흑색종, 췌장 암, 중피종, NSCLC, 자궁, 유방 및 전립선을 포함한 사람 종양은 종양 세포 자체 또는 면역 침윤 세포에서 VISTA를 발현한다.[1,12,14,15,18,19,21-34] 이러한 정보의 세트를 기준으로, VISTA가 다수의 사람 악성 종양에 걸쳐 실행가능한 표적이 될 수 있다고 추론하는 데 도움을 준다.

[2281] VISTA의 생리학적으로 관련된 결합 파트너는 아직 결론적으로 측정되지 않았지만, 2 개의 독립된 시험관 내 연구는 V-Set 및 3(VSIG3, 또는 IGSF11)을 파트너로서 포함하는 면역글로불린 도메인을 입증하였다.[3,20] VSIG3은 암 세포에서 발현되고, 다수의 악성종양, 예를 들면, 결장직장 암, 간세포 암, 장형 위 암(intestinal-type gastric cancer)에서 발현이 증가하는 것으로 보고되었다.[20]

[2282] 추가로, VISTA-VSIG3 상호작용은 T 세포 증식뿐만 아니라, 전-염증성 사이토킨 및 케모카인 방출을 억제하는 것으로 밝혀졌다.[20] VISTA는 또한 자체[9], 류신이 풍부한 반복부(leucine-rich repeat) 및 면역글로불린-유사 도메인 1(LRIG1)[35] 및 산성 pH에서 P-셀렉틴 당단백질-1(PSGL-1)에 결합하는 것으로 보고되었다.[4,37]

[2283] 다수의 고형 종양에 대한 광범위한 활성제로서의 면역 체크포인트 억제제의 개념을 기준으로, 최근에 VISTA-표적화 치료법을 임상 영역으로 전환하는 데 노력이 집중되었다. VISTA를 표적으로 하지만 HMBD-002와는 다른 약

물 메커니즘을 사용하는 3개의 임상-단계의 시험 치료제가 존재한다. 온바틸리맙(CI-8993)은, IgG1 동형을 갖는 임상 1상 항-VISTA 결합제로서, 정상 조혈세포를 포함한 VISTA+ 세포의 고갈을 유발할 것으로 예상된다. 이러한 화합물은 현재 Immunext와 협력하여 Curis, Inc.에 의해 개발되고 있다. 2016년에, Janssen Research & Development는 Immunext와 협력하여, 온바틸리맙의 안전성을 평가하기 위한 비무작위의, 공개-라벨(open-label) 제1상 연구를 시작하였다.[39] 이 연구는 12명의 환자를 등록한 다음 프로그램이 Curis, Inc.가 온바틸리맙의 안전성 및 내약성을 평가하기 위한 제1상 연구를 다시 시작할 때인, 2020년 6월까지 중단되었다.[40] 공개적으로 이용 가능한 정보는 환자 모집이 진행 중임을 제시한다.

[2284] 2020년 11월에, 피에르 파브르(Pierre Fabre)는 표준 치료법에 대해 난치성인, 국소적으로 진전되거나 또는 전이성인 고형 종양 환자에서 단독 요법으로서, 항-VISTA mAb, W0180(또한 IgG1 동형) 및 퀌브롤리주맙과의 조합의 제1상 임상 연구[41]를 시작하였다. 본 연구에서는 모집은 진행 중이다.

[2285] VISTA를 표적으로 하는 다른 임상-단계 치료제인, CA-170은 PD-L1과 VISTA에 결합하는 것으로 보고된 소 분자이다.[34] 다중-표적 길항작용을 갖는 경구 소 분자로서, 이 화합물은 HMBD-002와 비교하여 상이한 작용 메커니즘을 가지고, 이는 VISTA 단백질에만 높은 특이성을 갖는다. CA-170은 Aurigene에 의해 처음 발견되었으며 개발이 중단될 때까지 Curis, Inc.에 의해 개발되었다. 2019년 ACS Medicinal Chemistry Letters에 보고된 제3자 연구는 VISTA에 대한 화합물의 결합을 재현할 수 없었고, 이는 화합물에 대한 대체 작용 메커니즘을 시사한다.[35] Curis, Inc.에서 수행된 제1상 용량-증량 연구에서[42], 약물은 대부분 면역-관련된 부작용과 함께 잘-견디어졌다.[36]

[2286] 종합하면, VISTA를 표적화하는데 있어서 사람의 경험은 제한적이며, 현재 접근법은 HMBD-002에 비해 실질적으로 상이한 작용 메커니즘을 나타낸다.

[2287] 19.2 연구 이유(study rationale)

[2288] *19.2.1 연구 설계를 위한 이유*

[2289] 새로운 치료법에 대한 임상적으로 충족되지 않은 요구가 있으며 VISTA는 이의 강력한 억제 활성으로 인해 매력적인 면역요법 표적으로서 제공된다. VISTA를 표적화하기 위한 이유는 전임상 연구 결과에 의해 더욱 강화되었으며, 이는 항-PD-1 mAb를 사용한 이전 치료가 잠재적으로 VISTA를 더 중요한 표적으로 만든다는 것을 나타낸다. 다른 항-VISTA mAb와는 대조적으로, HMBD-002는 IgG4 구조물이므로 T 세포에 결합한 후 ADCC를 유도할 것으로 예상되지 않을 수 있고, 이것이 다른 IgG1 항체에서 관찰된 CRS 및/또는 관련된 신경독성에 대한 추정 이유이다. 동계 VISTA 발현 종양 모델에서, HMBD-002 치료는 종양 성장을 근본적으로 억제하고/하거나 종양 퇴행을 야기하였다.

[2290] 이러한 HMBD-002의 FIH 연구의 제1 부분(1부, 용량 증량)은 HMBD-002의 안전성과 내약성을 평가하고 제2 부분(용량 확장) 및 후속적인 질환-지시된 제2상 연구에 대한 용량을 권장하도록 설계되어 있다. 이 연구는 또한 HMBD-002의 PK 거동을 특성화하고 HMBD-002 ADA를 검출할 뿐만 아니라 VISTA 발현의 발생(incidence)이 높은 악성 종양의 확장이 있는 고형 악성 종양, 예를 들면, 진전된 삼중 음성 유방 암(TNBC), 비-소세포폐암(NSCLC) 및 다양한 다른 암 환자에서 항암 활성의 예비 증거를 추구한다. 이 연구는 또한 치료 전후에 샘플링된 종양 및 혈액의 면역 효과기 세포에 대한 HMBD-002의 효과를 탐구할 것이다.

[2291] 적절한 FIH 시작 용량을 확인하고 뒷받침하기 위해 이용 가능한 시험관 내, 약리학적 활성 용량(PAD), 모델화되고 예상되는 수용체 점유(RO) 및 독성학 데이터를 포함하는 통합된, 데이터 기반 접근법이 사용되었다. 약 20mg(~0.3mg/kg)의 FIH 시작 용량과 33% 또는 7mg(0.1mg/kg)의 의도된 '시험' 용량이 제안된다. 시험 용량은 여성과 남성에서 각각 2.2ug/mL의 최대 농도(Cmax)와 16.4 내지 18.3%의 수용체 점유율(occupancy)을 달성할 것으로 예상된다.

[2292] 시작 용량은 27.2㎍/mL의 평균 혈청 농도(매주 2회 투여되는 5mg/kg의 최저 최소 유효 용량으로 치료한 동계 종양 보유 마우스의 PK 데이터에서 획득됨, 참고: 실시예 19.2.4), 53mL/일의 *예측된 총 사람 제거율(CL)*(GLP 독성학 연구로부터시노몰구스 원숭이 매개변수의 상대성장 척도(allometric scaling)를 사용하여 계산됨) 및, 약물이 정맥 내로 전달될 것이므로, 1의 추정된 생체이용률을 사용하여 측정된, PAD를 기준으로 한다. PAD 접근법은 약 10mg(0.17mg/kg)의 시작 용량을 지원한다.

[2293] 시작 용량은 또한 기능적 동종 혼합 림프구 반응(MLR) 혼합 검정에서 시험된 최저 농도 1ug/mL를 기준으로

하며, 여기서 사이토킨에서는 동형 대조군과 비교하여 최소의 변화 내지 변화가 없음이 관찰된다. 동종 MLR 검정은 본 발명자가 혼합한 다음 항체 HMBD-002 또는 hIgG4 동형 대조군으로 처리한 단일 공여체 공급된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 10쌍을 사용하였다. HMBD-002는 IFN-γ, TNF-α 및 IL-17A의 수준에서 유의적인 용량 의존적 증가를 유도하였지만, 96시간 째에 IL-4, IL-10 및 IL-13(Th2 사이토킨) 또는 IL-6의 수준에서는 동형 대조군과 비교하여 유의적인 변화가 없었다. 예측(상대성장 척도)된 사람 중심 분포 용적은 3.52L이고 예측된 $C_{max}$와 같은 1ug/mL의 사용은 3.5mg(~0.05mg/kg)의 시작 용량을 시사한다.

[2294] 제안된 용량은 또한 1개월간 IV 래트 및 원숭이 반복 용량 독성 연구에 의해서 뒷받침된다. 대략 16.7 mg/kg의 예측된 사람 등가 용량(HED)과 비교하여, 제안된 FIH 시작 용량은 100mg/kg에서 원숭이와 래트 각각의 경우 NOAEL/HNSTD 및 NOAEL/STD10에 비해 유의적인(167배) 안전 한계를 제공할 것으로 예상된다.

[2295] 7mg(시험) 용량과 함께 20 mg의 제안된 FIH 시작 용량은 사람에서 HMBD-002의 PK, PD, 안전성 및 효능에 대한 적절한 평가를 보증할 것이다. 용량 증량 단계의 코호트 1에 있는 모든 환자에게는 1일째에 "시험" 용량으로서 의도된 용량 수준의 33%(예컨대, 코호트 주기 1의 1일째에 7 mg)와 의도된 코호트 용량으로서 투여된 후속적인 용량(예컨대, 8 및 15일째에 20 mg[주기 1] 뿐만 아니라, 1, 8, 및 15일째에 20 mg[주기 2+]).

[2296] 19.2.2 임상적 징후(clinical indication)에 대한 이유

[2297] 이는 진전된(즉, 국소적으로 진전된 및 절제불가능한, 또는 전이성) 고형 종양 환자에서 다중 용량 및 정맥내(IV) 투여된 HMBD-002의 스케쥴을 평가하는 1상의, 사람에서 최초(first-in-human; FIH)인, 2-단계(부분 1: 용량 증량 및 부분 2: 용량 확장) 연구이다.

[2298] 사람 암에서 VISTA 발현과 암 면역성에서 이의 역할, 예컨대, 종양 미세환경 내 면역-억제성 인자로서 이의 역활 사이의 유사성을 기준으로, 2개의 우선 징후를 초기 임상 단계 시험을 위해 선택하였다: 삼중 음성 유방암(triple negative breast cancer; TBNC) 및 비-소세포 폐암(NSCLC).

[2299] TNBC는 이러한 유형의 암에서 VISTA의 충족하지 않은 필요성 및 광범위한 발현을 기준으로 HMBD-002의 임상 시험에 대한 주요 암 유형으로서 확인되었다.[35,39] 당해 분야의 TNBC 치료의 상태는 아테졸리주맙과 화학치료요법의 승인된 조합이며, 이는 PD-L1을 발현하는 종양을 지닌 국소 또는 전이성 암 환자에게 처방된다. 그러나, TNBC 환자의 40% 만이 PD-L1을 발현하는 악성종양을 가져서, 전전된 TNBC 환자의 대부분이 이러한 선택사항을 추구할 수 없다.[40]

[2300] 침습성 관 암종을 지닌 900명 이상의 환자의 IHC 연구는 사례의 ~30%에서 면역 세포 상의 VISTA의 고 수준 발현을 나타내었다.[39] 사례의 8%에서, VISTA는 암 세포 자체에서 발현되었다. 추가로, VISTA의 발현은 유방 암의 일부 서브세트에 농축되어 있다. ER-, PR-, 및 HER2+ 유방 암은 ER+ 및/또는 PR+ 발현 유방 암보다 VISTA를 보다 흔히 발현하는 것으로 밝혀졌다. VISTA 발현에 대해 가장 크게 농축된 서브세트는 TNBC이었고, 환자의 45% 이상이 VISTA-양성 암으로 기록되었다.[39] 별개의 연구에서, TNBC 사례의 20%는 암 세포 및 침윤하는 면역 세포에서 VISTA 단백질에 대해 중간 내지 높은 염색 강도를 나타내었다.[35] 주목하게도, 전이로부터 샘플링된 모든 TNBC는 균일하게 높은 수준의 VISTA를 발현하였다.[35] TNBC 조작 미세배열의 Hummingbird○의 내부 분석은 또한 분석된 119개의 코어 중, 89%가 VISTA를 발현하였고, 이들 중, 50%는 중간 내지 고 염색 강도를 나타내었음을 나타내었다. TNBC 환자 샘플, 특히 전이성 TNBC에서 VISTA의 면역 조절 역활에 대한 증거 및 상승된 VISTA 수준의 증거를 고려할 때, 이는 합리적인 우선 징후이다.

[2301] 유사하게, NSCLC에서, 면역 체크포인트 억제제, 예를 들면, CTLA-4 및 PD-1/PD-L1에 대한 mAb는 풍부한 항-종양 활성 및 임성 이점을 입증하였지만; 대안의 면역 체크포인트를 극복하는데 요구될 수 있는 유의적인 개선을 위한 여지가 여전히 남아있다.[41] NSCLC에서 고 수준의 VISTA 발현은 잘 문서화되어 왔다. 636개의 절개된 NSCLC 종양 샘플의 연구에서, VISTA 단백질이 사례의 99%에서 검출되었다(주로, 기질 세포에서).[27] 종양 면역 침윤물에서 공간적 패턴의 실험으로, VISTA는 PD-L1, PD-1, CD8+ T 세포 및 CD68+ 대식구와 양정적으로 관련되어 있다.[27] 이를 뒷받침하기 위한, NSCLC 조직 미세배열의 분석은 또한 분석된 69개의 코어 중에서, 85%가 VISTA를 발현함을 나타내었다. VISTA가 MDSC에서 이의 발현을 통해 NSCLC 치료 애성에 기여할 수 있다는 가설이 세워졌으며, MDSC의 수준은 NSCLC 환자의 종양 및 말초 혈액에서 상승하여, VISTA를 표적으로 하는 잠재적 이점을 추가로 지원한다.

[2302] 현재의 사람 최초 연구에서, VISTA를 HMBD-002로 표적화하는 것은 광범위하고 강력한 치료 활성을 유도할 수 있다. 이 연구는 먼저 고형 종양에 초점을 맞추고 VISTA를 발현하는 것으로 알려진 진전된 TNBC, NSCLC 및 다양한 진전된 암 환자를 표적으로 한다. 이러한 FIH 연구에 등록할 자격이 있는 잠재적인 환자는 악성 고형 종양의 증거가 있어야 하며 전이성 또는 국소적으로 진전되고 절제불가능한 암으로 정의되는, 진전된 질환을 가져야만 한다. 환자는 또한 이용 가능한 치료법이 긍정적으로 영향을 미치고 임상적 이점을 제공할 가능성이 없는 질환을 가져야만 한다.

[2303] *19.2.3 HMBD-002의 비-임상 연구*

[2304] 시험관 내 및 생체 내 약리학 및 예비 내약성 연구를 VISTA-발현 악성종양 환자의 치료를 위한 HMBD-002의 잠재적인 치료학적 이점과 독성 위험 프로파일을 조사하기 위해 수행하였다. VISTA에 대한 HMBD-002의 친화성과 특이성을 입증하고 리간드 억제 및 사이토킨 유도를 통한 작용 메커니즘을 확립하기 위한 연구는 완료되었다. 이러한 연구는 HMBD-002가 FcγRIII 및 C1q에 결합하지 않음을 나타내었고, HMBD-002가 다수의 뮤린 동계 종양(CDX) 모델에서 단독치료요법 또는 다양한 체크포인트 억제제와 조합하여 주목할만한 항종양 활성을 가짐을 입증하였다.

[2305] 전임상 독성학 종의 VISTA 오르솔로그(ortholog)와 비교가능한 친화성을 지닌, HMBD-002의 종간 결합을 통해, 래트 및 비-사람 영장류(NHP)에서 PK 및 내약성 연구와 함께 마우스에서 단일 용량 PK 연구를 완료하였다. 이러한 연구로부터의 데이터는 안전성을 예비적으로 표시하고 본 FIH 연구의 잠재적인 빈도와 용량을 계산하는 데 사용되었다.

[2306] *19.2.4 전임상 효능*

[2307] 건강한 공여자 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 이용하여 사람 면역 활성화의 시험관 모델에서의 효능을 평가하였다. 자가/항-자가 면역 반응을 모델링하기 위해 별개의 공여체로부터의 PBMC를 쌍으로 혼합한 동종 혼합 림프구 반응(allogeneic Mixed Lymphocyte Reaction; MLR) 검정을 사용하였다. HMBD-002는 감마 인터페론(IFNγ) 및 종양괴사인자-α(TNFα)를 포함한 사이토킨 방출로 측정된 것으로서, 전 염증성 신호의 활성화를 향상시키는 것으로 입증되었다.

[2308] HMBD-002의 생체내 효능을 평가하기 위해, 뮤린 동계 종양 모델 CT26(결장 암종) 및 B16/BL6(흑색종)을 단독 요법으로서 및 기능성 항-뮤린 PD-1 mAb와 함께 HMBD-002를 사용하여 치료하였다. 마우스를 500μg(~25mg/kg)의 HMBD-002 단독 또는 200μg(~10mg/kg)의 항-mPD-1(RMP1-14)과 함께 치료하였다. 도 80에서 알 수 있는 바와 같이, CT26 단독요법 연구에서, HMBD-002는 종양 성장을 유의하게 억제하고 생존율을 개선시켰다(연구 종료 시 종양 용적이 200$mm^3$ 미만인 마우스가 8마리 중 1마리인 비히클 아암과 비교하여, HMBD-002 치료된 아암의 경우에는 종양 용적이 200$mm^3$ 미만인 마우스가 8마리 중 6마리이었다).

[2309] B16/BL6 모델에서, 항-PD-1 치료와 조합된 HMBD-002는 종양 성장을 유의적으로 억제하였다(연구 종료 시 종양 용적이 200$mm^3$ 미만인 마우스가 8마리 중 1마리인 비히클 아암과 비교하여, 조합 치료된 아암의 경우 종양 용적이 200$mm^3$ 미만인 마우스는 8마리 중 7마리이었다).

[2310] HMBD-002의 최소의 유효 용량을 밝히기 위해, CT26 종양 모델을 선택하고 마우스를 다양한 용량의 HMBD-002로 치료하였다. 도 81에서 알 수 있는 바와 같이, HMBD-002는 100μg(~5mg/kg)의 용량에서 뿐만 아니라, 더 높은 용량에서도 효능을 나타낸다. 이러한 결과는 약리학적으로 활성인 시작 용량 계산을 뒷받침하는 데 사용될 수 있다.

[2311] *19.2.5 독성학 및 약리학*

[2312] HMBD-002의 임상 평가를 뒷받침하기 위해, HMBD-002의 독성을 일련의 비-임상 시험관 내 검정, 및 스프라그-다울리 래트 및 시노몰구스 원숭이에서의 생체 내 연구에서 평가하였다. 래트 및 원숭이는 사람과 비교하여 사람 VISTA 단백질 서열에 대한 상동성 및 래트 및 원숭이 VISTA에 대한 HMBD-002의 유사한 결합 친화성 때문에 약리학적으로 관련된 종으로서 선택하였다.

[2313] 마우스에서, PK 프로파일은 HMBD-002의 상이한 용량을 사용하여 종양 보유 및 비-종양 보유 마우스에서의 측정으로부터 측정하였다. 도 82A는 종양 보유 마우스에서 HMBD-002의 PK 프로파일이 비-선형이지만 비-종양 보유 마우스는 선형 PK를 입증하였음을 나타낸다.

[2314] Cmax 및 AUCinf로 측정한 것으로서, 비-종양 보유 마우스에서 근사 용량-비례적 노출(near dose-proportional exposure)이 관찰되었다. 이는 또한 종양-보유 마우스의 Cmax에서도 관찰되었으나, 종양-보유 마우스의 AUCinf는 노출시 용량 비례적 증가보다 약간 더 큰 것으로 입증되었다. 종양-보유 마우스에서 HMBD-002 혈청 반감기는 용량에 따라 29.6 내지 58.6시간으로 계산된 반면, 비-종양 보유 마우스에서는, 혈청 반감기가 60.9 내지 178시간이었다.

[2315] 래트의 경우, 5회 용량의 경우 매주 10mg/kg, 30mg/kg, 및 100mg/kg 용량에서 HMBD-002를 사용한 연구에서 수컷 및 암컷 스프라그-다울리 래트의 측정으로부터 PK 프로파일을 측정하였다. HMBD-002의 PK 프로파일은 성별 사이에서 상이하지 않았다. 도 82B는 투여량이 10에서 100mg/kg/용량으로 증가함에 따라, 1일째에 성별 둘 다 및 29일째에 암컷 모두에서 전신 노출이 용량을 비례적으로 증가하였지만, 29일째에는 이것이 수컷에서 용량보다 더 비례적으로 증가하였음을 나타낸다. HMBD-002에 대한 뚜렷한 약물 축적은 어떠한 용량 수준에서도 관찰되지 않았다.

[2316] 시노몰구스 원숭이의 경우, 총 5회 용량에 대해 매주 10mg/kg, 30mg/kg 및 100mg/kg 용량의 HMBD-002를 사용한 연구에서 수컷 및 암컷 원숭이의 측정으로부터 PK 프로파일을 측정하였다. 도 82C는 HMBD-002의 PK 프로파일이 성별 간에 상이하지 않았음을 나타낸다.

[2317] 22일째에 검출된 항-약물 항체(ADA) 역가로 인하여, 22일째의 결과는 주의해서 해석하여야 한다. 총 5회 용량에 대해 수컷 및 암컷 원숭이에게 10, 30, 또는 100 mg/kg/용량에서 HMBD-002-V4C26의 주당 1회 IV 주사 후 HMBD-002-V4C26의 모든 PK 매개변수에 대한 평균 ± SD는 표 5에 나타낸다.

[2318] ADA의 존재 및 더 낮은 용량에서의 노출에 대한 이의 영향으로 인하여, $AUC_{0-168h}$는 22일째에 성별 둘 다에서 비례적으로 용량보다 더 많이 증가하였다. HMBD-002-V4C26의 단일(1일째) 또는 반복(22일째) IV 주사를 수컷 및 암컷 원숭이에게 투여한 후, HMBD-002-V4C26에 대한 중앙 $T_{1/2}$ 값은 1일째에 59.6 내지 177.3시간, 22일째에 7.1 내지 138.0시간으로 추정되었고 이는 ADA의 영향으로 인한 것일 수 있다(표 1) . $T_{1/2}$ 값은 29일째에 ADA 양성 수컷 및 암컷의 경우 각각 35.3시간 및 70.6시간으로 추정되었고(표 2), 29일째에 ADA 음성 수컷 및 암컷의 경우 각각 285.1시간 및 186.1시간으로 추정되었다(표 3).

[2319] 중간 반감기 값(median half-life value)은 1일째에 59.6 내지 177.3시간, 22일째에 7.1 내지 250시간으로 추정되었으며 이는 ADA의 영향에 기인할 수 있다.

[2320] [표 1]

모든 연구 동물에서 다중 용량 후 HMBD-002-V4C26의 TK 매개변수의 요약

| 용량 (mg/kg/일 용량) | 연구 | 성별 | $C_{max}$ (ug/mL) | $T_{1/2}$ (h) | $AUC_{all}$ (h*ug/mL) | DNAUC$_{all}$ ((h*ug/mL)/(mg/kg/용량) | $AUC_{0-last}$ (h*ug/mL) | $AUC_{0-inf}$ (h*ug/mL) | CL (mL/h/kg) | Vss (mL/kg) | $T_{max}$ (h) | $T_{last}$ (h) | $C_{last}$ (ug/mL) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 10 | 1 | 수컷 | 243 ± 11.3 | 65.7 (58.4 - 73.5) | 14200 ± 978 | 1420 ± 97.8 | 14200 ± 978 | 16900 ± 764 | 0.593 ± 0.0270 | 54.8 ± 6.21 | 1.0 (1.0 - 1.0) | 168.0 (168.0 - 168.0) | 28.4 ± 26.1 |
| | | 암컷 | 258 ± 19.4 | 59.6 (55.2 - 59.7) | 13100 ± 1210 | 1310 ± 121 | 13100 ± 1210 | 15100 ± 1470 | 0.666 ± 0.0621 | 55.0 ± 3.44 | 1.0 (1.0 - 1.0) | 168.0 (168.0 - 168.0) | 23.9 ± 2.95 |
| | 22 | 수컷 | 181 ± 49.2 | 7.1 (6.4 - 22.6) | 3040 ± 2540 | 304 ± 254 | 2930 ± 2640 | 2990 ± 2620 | 5.16 ± 3.20 | 68.6 ± 17.3 | 1.0 (1.0 - 1.0) | 72.0 (24.0 - 168.0) | 4.77 ± 7.23 |
| | | 암컷 | 168 ± 37.6 | 9.3 (5.5 - 14.0) | 2130 ± 1060 | 213 ± 106 | 2060 ± 1140 | 2080 ± 1110 | 5.97 ± 3.42 | 69.5 ± 16.1 | 1.0 (1.0 - 1.0) | 72.0 (24.0 - 168.0) | 2.64 ± 3.96 |
| 30 | 1 | 수컷 | 667 ± 67.9 | 150.1 (147.9 - 155.3) | 49700 ± 1050 | 1660 ± 35.0 | 49700 ± 1050 | 91900 ± 2660 | 0.327 ± 0.00946 | 70.3 ± 1.63 | 1.0 (1.0 - 1.0) | 168.0 (168.0 - 168.0) | 193 ± 5.51 |
| | | 암컷 | 723 ± 54.9 | 110.7 (99.5 - 125.4) | 50800 ± 4350 | 1690 ± 145 | 50800 ± 4350 | 78300 ± 10500 | 0.388 ± 0.0565 | 61.2 ± 3.70 | 1.0 (1.0 - 1.0) | 168.0 (168.0 - 168.0) | 169 ± 24.3 |
| | 22 | 수컷 | 627 ± 64.5 | 20.0 (14.6 - 46.4) | 19600 ± 12200 | 653 ± 407 | 19600 ± 12200 | 20600 ± 13900 | 1.94 ± 1.14 | 56.9 ± 2.14 | 1.0 (1.0 - 1.0) | 168.0 (168.0 - 168.0) | 15.2 ± 24.6 |
| | | 암컷 | 722 ± 84.3 | 20.2 (9.5 - 66.0) | 28600 ± 19800 | 953 ± 660 | 28600 ± 19800 | 32000 ± 25400 | 1.49 ± 1.15 | 42.5 ± 3.87 | 1.0 (1.0 - 1.0) | 168.0 (72.0 - 168.0) | 37.3 ± 59.5 |
| 100 | 1 | 수컷 | 2090 ± 285 | 177.3 (106.7 - 183.7) | 164000 ± 16400 | 1640 ± 164 | 164000 ± 16400 | 312000 ± 77600 | 0.334 ± 0.0874 | 71.3 ± 10.4 | 1.0 (1.0 - 1.0) | 168.0 (168.0 - 168.0) | 675 ± 120 |
| | | 암컷 | 2230 ± 50.0 | 150.1 (103.3 - 209.4) | 183000 ± 11300 | 1830 ± 113 | 183000 ± 11300 | 367000 ± 67100 | 0.279 ± 0.0554 | 61.3 ± 8.58 | 1.0 (1.0 - 1.0) | 168.0 (168.0 - 168.0) | 799 ± 59.3 |
| | 22 | 수컷 | 3280 ± 810 | 68.2 (46.0 - 380.7) | 262000 ± 139000 | 2620 ± 1390 | 262000 ± 139000 | 614000 ± 819000 | 0.510 ± 0.410 | 49.7 ± 12.5 | 1.0 (1.0 - 1.0) | 168.0 (168.0 - 168.0) | 1130 ± 884 |
| | | 암컷 | 3870 ± 354 | 138.0 (126.3 - 223.1) | 307000 ± 15800 | 3070 ± 158 | 307000 ± 15800 | 590000 ± 90200 | 0.173 ± 0.0264 | 38.7 ± 4.26 | 1.0 (1.0 - 1.0) | 168.0 (168.0 - 168.0) | 1200 ± 131 |
| | 29 | 수컷 | 3260 | 177.9 | 714000 | 7140 | 714000 | 764000 | 0.199 | 37.1 | 1.0 | 840.0 | 114 |
| | | 암컷 | 3520 | 110.7 | 623000 | 6230 | 623000 | 633000 | 0.161 | 31.3 | 1.0 | 924.0 | 39.0 |

[2321]

[2322] 데이타는 $C_{max}$, $C_{last}$, DNAUC, CI, $V_{ss}$ 및 AUC 값의 경우 평균 또는 평균±SD로서 나타내고, $T_{1/2}$, $T_{max}$ 및 $T_{last}$의 경우 평균 또는 중간(범위)로서 나타낸다.

[2323] $AUC_{all}$: 1일째 및 22일째의 경우 $AUC_{0-168h}$ 및 29일째의 경우 $AUC_{0-1008h}$

[2324] 100mg/kg/용량에서는 뚜렷한 약물 축적이 관찰되지 않았다. 그러나, ADA 존재와 전체 노출에 대한 이의 영향으로 인하여, 일반적으로 10 및 30mg/kg/용량에서 전신 노출 감소가 관찰되었다.

[2325] $C_{max}$ 및 $AUC_{0-24h}$ 및 $AUC_{0-72h}$는 표 2에 요약되었다.

[2326] [표 2]

ADA 양성 연구 동물에서 다중 용량 후 HMBD-002-V4C26의 TK 매개변수의 요약

| 용량 (mg/kg/용량) | 연구 일수 | 성별 | $C_{max}$ (ug/mL) | $T_{1/2}$ (h) | $AUC_{all}$ (h*ug/mL) | $DNAUC_{all}$ (h*ug/mL)/(mg/kg/용량) | $AUC_{0-last}$ (h*ug/mL) | $AUC_{0-inf}$ (h*ug/mL) | CL (mL/h/kg) | $V_{ss}$ (mL/kg) | $T_{max}$ (h) | $T_{last}$ (h) | $C_{last}$ (ug/mL) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 10 | 1 | 수컷 | 237 | 65.7 | 13600 | 1360 | 13600 | 16100 | 0.621 | 56.6 | 1.0 | 168.0 | 26.5 |
| | 22 | 수컷 | 181 ± 49.2 | 7.1 (6.4 - 22.6) | 3040 ± 2540 | 304 ± 254 | 2930 ± 2640 | 2990 ± 2620 | 5.16 ± 3.20 | 68.6 ± 17.3 | 1.0 (1.0 - 1.0) | 72.0 (24.0 - 168.0) | 4.77 ± 7.23 |
| | | 암컷 | 168 ± 37.6 | 9.3 (5.5 - 14.0) | 2130 ± 1060 | 213 ± 106 | 2060 ± 1140 | 2080 ± 1110 | 5.97 ± 3.42 | 69.5 ± 16.1 | 1.0 (1.0 - 1.0) | 72.0 (24.0 - 168.0) | 2.64 ± 3.96 |
| 30 | 1 | 암컷 | 691 | 112.45 | 49000 | 1630 | 49000 | 75500 | 0.4035 | 63.3 | 1.0 | 168.0 | 161 |
| | 22 | 수컷 | 627 ± 64.5 | 20.0 (14.6 - 46.4) | 19600 ± 12200 | 653 ± 407 | 19600 ± 12200 | 20600 ± 13900 | 1.94 ± 1.14 | 56.9 ± 2.14 | 1.0 (1.0 - 1.0) | 168.0 (168.0 - 168.0) | 15.2 ± 24.6 |
| | | 암컷 | 722 ± 84.3 | 20.2 (9.5 - 66.0) | 28600 ± 19800 | 953 ± 660 | 28600 ± 19800 | 32000 ± 25400 | 1.49 ± 1.15 | 42.5 ± 3.87 | 1.0 (1.0 - 1.0) | 168.0 (72.0 - 168.0) | 37.3 ± 59.5 |
| 100 | 22 | 수컷 | 2700 ± 250 | 57.1 | 170000 ± 84700 | 1700 ± 847 | 170000 ± 84700 | 142000 | 0.734 | 56.9 | 1.0 | 168.0 | 577 |
| | | 암컷 | 3660 ± 215 | 183.9 (126.3 - 223.1) | 302000 ± 8540 | 3020 ± 85.4 | 302000 ± 8540 | 617000 ± 109000 | 0.166 ± 0.0316 | 40.4 ± 4.47 | 1.0 | 168.0 | 1210 |
| | 29 | 수컷 | 2470 | 70.6 | 317000 | 3170 | 317000 | 317000 | 0.316 | 42.5 | 1.0 | 672.0 | 1.85 |
| | | 암컷 | 3750 | 35.3 | 549000 | 5490 | 549000 | 549000 | 0.182 | 24.7 | 1.0 | 840.0 | 0.152 |

[2327]

[2328] 데이타는 $C_{max}$, $C_{last}$, DNAUC, CI, $V_{ss}$ 및 AUC 값의 경우 평균 또는 개개 값 또는 평균±SD로서 나타내고, $T_{1/2}$, $T_{max}$ 및 $T_{last}$의 경우 평균 또는 개개 값 또는 중간(범위)로서 나타낸다.

[2329] $AUC_{all}$: 1일째 및 22일째의 경우 $AUC_{0-168h}$ 및 29일째의 경우 $AUC_{0-1008h}$

[2330] [표 3]

ADA 음성 연구 동물에서 다중 용량 후 HMBD-002-V4C26의 TK 매개변수의 요약

| 용량 (mg/kg/용량) | 연구 일수 | 성별 | $C_{max}$ (ug/mL) | $T_{1/2}$ (h) | $AUC_{all}$ (h*ug/mL) | $DNAUC_{all}$ (h*ug/mL)/(mg/kg/용량) | $AUC_{0-last}$ (h*ug/mL) | $AUC_{0-inf}$ (h*ug/mL) | CL (mL/h/kg) | $V_{ss}$ (mL/kg) | $T_{max}$ (h) | $T_{last}$ (h) | $C_{last}$ (ug/mL) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 10 | 1 | 수컷 | 246 | 65.95 | 14500 | 1450 | 14500 | 17300 | 0.5785 | 53.9 | 1.0 | 168.0 | 29.4 |
| | | 암컷 | 258 ± 19.4 | 59.6 (55.2 - 59.7) | 13100 ± 1210 | 1310 ± 121 | 13100 ± 1210 | 15100 ± 1470 | 0.666 ± 0.0621 | 55.0 ± 3.44 | 1.0 (1.0 - 1.0) | 168.0 (168.0 - 168.0) | 23.9 ± 2.95 |
| 30 | 1 | 수컷 | 667 ± 67.9 | 150.1 (147.9 - 155.3) | 49700 ± 1050 | 1660 ± 35.0 | 49700 ± 1050 | 91900 ± 2660 | 0.327 ± 0.00946 | 70.3 ± 1.63 | 1.0 (1.0 - 1.0) | 168.0 (168.0 - 168.0) | 193 ± 5.51 |
| | | 암컷 | 786 | 110.7 | 54300 | 1810 | 54300 | 83900 | 0.358 | 57.0 | 1.0 | 168.0 | 185 |
| 100 | 1 | 수컷 | 2090 ± 285 | 177.3 (106.7 - 183.7) | 164000 ± 16400 | 1640 ± 164 | 164000 ± 16400 | 312000 ± 77600 | 0.334 ± 0.0874 | 71.3 ± 10.4 | 1.0 (1.0 - 1.0) | 168.0 (168.0 - 168.0) | 675 ± 120 |
| | | 암컷 | 2230 ± 50.0 | 150.1 (103.3 - 209.4) | 183000 ± 11300 | 1830 ± 113 | 183000 ± 11300 | 367000 ± 67100 | 0.279 ± 0.0554 | 61.3 ± 8.58 | 1.0 (1.0 - 1.0) | 168.0 (168.0 - 168.0) | 799 ± 59.3 |
| | 22 | 수컷 | 4150 | 380.7 | 400000 | 4000 | 400000 | 1560000 | 0.0641 | 35.2 | 1.0 | 168.0 | 1960 |
| | | 암컷 | 4200 | 137.3 | 314000 | 3140 | 314000 | 550000 | 0.183 | 36.05 | 1.0 | 168.0 | 1200 |
| | 29 | 수컷 | 4050 | 285.1 | 1110000 | 11100 | 1110000 | 1210000 | 0.0829 | 31.7 | 1.0 | 1008.0 | 227 |
| | | 암컷 | 3290 | 186.1 | 696000 | 6960 | 696000 | 717000 | 0.140 | 37.9 | 1.0 | 1008.0 | 77.8 |

[2331]

[2332] 데이타는 $C_{max}$, $C_{last}$, DNAUC, CI, $V_{ss}$ 및 AUC 값의 경우 평균 또는 개개 값 또는 평균±SD로서 나타내고, $T_{1/2}$, $T_{max}$ 및 $T_{last}$의 경우 평균 또는 개개 값 또는 중간(범위)로서 나타낸다.

[2333] $AUC_{all}$: 1일째 및 22일째의 경우 $AUC_{0-168h}$ 및 29일째의 경우 $AUC_{0-1008h}$

[2334] 10mg/kg/용량에서 100mg/kg/용량으로 용량을 증가시키면서, HMBD-002-V4C26에 대한 전신 노출($AUC_{all}$ 및/또는 $C_{max}$)를 1일째에 성별 둘 다에서 용량-비례적으로 증가하였지만 22일째에는 보다 적은 용량을 사용한 노출에서 ADA 존재 및 이의 영향으로 인하여 성별 둘 다에서 용량 이상으로 비례적으로 증가하였다.

[2335] 10, 30, 또는 100mg/kg/용량에서 HMBD-002-V4C26을 반복적인 IV의 주사 후, 100mg/kg/용량에서 $AUC_{0-168h}$로

HMBD-002-V4C26에 대한 뚜렷한 약물 축적이 관찰되지 않았다. 그러나 ADA 존재 및 이의 노출 영향으로 인하여, 일반적으로 10 및 30mg/kg/용량(22일째/1일째)에서 전신 노출 감소가 관찰되었다.

[2336] 19.3 시험 목적

[2337] 1차 목적:

[2338] ***부분 1- 용량 증량 단계***

[2339] 용량 증량 단계의 1차 목적은 HMBD-002의 최대 허용 용량(MTD), 또는 최대 시험 용량을 확인하고 후속 질환 지시된 연구를 위한 용량을 권장하는 것이다(즉, 권장 제2상 용량[RP2D]).

[2340] ***부분 2- 용량 확장 단계***

[2341] 확장 단계의 제1 목적은 삼중 음성 유방 암(TNBC), 비-소 세포 폐 암(NSCLC) 및 다른 VISTA-발현 악성종양을 지닌 이미 치료받은 환자에서 RP2D에서 단독치료요법으로서 HMBD-002의 항-암 활성을 평가하는 것이다.

[2342] **제2 목적:**

[2343] 제2 목적은 다음과 같다:

[2344] · HMBD-002의 약동학적(PK) 특성의 특성화.

[2345] · MTD 또는 최대 시험 용량에서 HMBD-002의 안전성 프로필의 추가의 특성화.

[2346] · 항-HMBD-002 항-약물 항체(ADA) 형성의 발생률 및 지속성과 HMBD-002의 PK 프로파일에서 이의 영향의 평가.

[2347] **탐구 목적:**

[2348] 탐구 목적은 다음과 같다:

[2349] · 치료 전, 치료 중, 치료 후 고형 악성종양 검체에서 VISTA 및 프로그램된 사망-리간드 1(programmed death-ligand 1; PD-L1) 수용체의 발현에서 HMBD-002를 사용한 치료의 효과 및 항-암 활성을 사용한 결과의 관련성 비교.

[2350] · 혈액 및 종양 조직 내 골수 유래된 억제인자 세포(MDSC) 및 T 세포를 포함한 다양한 면역학적 효과기 세포에서 HMBD-002의 정량적, 정성적 효과의 평가.

[2351] 19.4 연구 종점

[2352] 안전성 종점은 다음을 포함한다:

[2353] · DLT 평가 기간 동안 NCI CTCAE 버전 5.0에 따라 등급이 지정된 용량 제한 독성(DLT)의 발생률.

[2354] · AE 및 SAE의 특성, 빈도 및 중증도, 독성으로 인한 치료 중단 및 임상 실험실 이상(laboratory abnormality);

[2355] · 신체 검사 및 ECG 소견;

[2356] · VS 측정;

[2357] · ECOG 성능 상태 점수.

[2358] 용량-발견 종점(dose-finding endpoint)은 MTD 또는 최대 시험 용량, 및 RP2D을 포함한다.

[2359] 제2 종점:

[2360] HMBD-002 치료 동안 다양한 시점에서 평가된 약동학적 종점은 다음과 같다:

[2361] · 최대 혈청 농도(Cmax);

[2362] · 혈청 농도-시간 곡선하 면적(Area under the serum concentration-time curve; AUC);

[2363] · 제거 반감기($t_{½}$);

[2364] · 제거(Clearance; CL);

[2365] · 분포량($V_d$);

[2366] · ADA.

[2367] HMBD-002의 항종양 활성은 다음에 의해 측정될 것이다(참고: 또한 실시예 19.9):

[2368] · 전체 반응률(ORR)은 RECIST v1.1.37에 따라 완전 반응(CR) 또는 부분 반응(PR) 중 최상의 반응을 달성한 환자의 비율로 정의된다.

[2369] · 반응 지속 기간(DoR)은 PR 또는 CR에 대해 처음 충족된 측정 기준 일로부터 진행성 질환(PD)에 대해 처음 충족된 측정 기준일까지의 시간으로 정의된다.

[2370] · CR의 지속기간(DoCR)은 CR에 대해 측정 기준이 만족된 날짜부터 PD에 대해 측정 기준이 최초로 만족된 날까지의 시간으로 정의된다.

[2371] · 무-진행 생존(progression-free survival; PFS)은 연구 치료요법 개시일부터 PD 또는 임의 원인으로 인한 사망에 대한 측정 기준이 처음 충족되는 날짜 중 먼저 발생하는 날짜까지의 시간으로 정의된다.

[2372] · 6개월째에 무-진행 생존율(PFS6)은 연구 치료요법 시작 후 6개월(26주)째에 생존하고 무-진행인 환자의 비율로 정의된다.

[2373] · 전체 생존(OS)은 연구 치료요법 시작일부터 어떠한 원인으로 인한 사망일까지의 시간으로 정의된다. ORR 및 PFS6에 대한 시험은 15%의 단측 제1종 오류율(1-sided type I error rate)을 사용한 단일-샘플 이항 시험(one-sample binomial test)에 의할 것이다.

[2374] PFS, DoR, DoCR 및 OS에 대한 분포는 카플란-마이어 방법론(Kaplan-Meier methodology)에 따라 추정될 것이다. 효능 매개변수는 임의의 약물의 적어도 1회 전체 용량을 투여받은 모든 환자를 포함하는 수정된 치료-의향 집단(modified intent-to-treat population)을 기준으로 할 것이다.

[2375] 19.5 시험 약물 생성물

[2376] HMBD-002는 VISTA 단백질과 이의 리간드 사이의 상호작용을 차단하는 사람화된 IgG4 mAb이다. VISTA는 면역 세포 둘 다, 주로 골수 구획(즉, 골수 유래 억제 세포) 및 다양한 암 세포에서 발현되는 면역 체크포인트 수용체이다.

[2377] HMBD-002는 사람 VISTA에 대해 높은 친화성과 특이성으로 결합하고 예측된 역-구조 결합 부위를 차단하도록 설계된 mAb이다. 표적 잔기는 사람, 마우스, 래트 및 사이노몰구스 원숭이 사이에 보존되어 있다. HMBD-002는 FcRn 결합을 가능하게 하고 순환 중 항체 반감기를 증가시키기 위해 hIgG4 Fc 도메인으로 설계되었다. 이러한 설계 전략은 HMBD-002가 이러한 면역 효과기 기능을 매개하는 FcγRIII 및 C1q 단백질에 대한 IgG4 작제물의 친화력 결여로 인한 항체 의존성 세포 독성(ADCC) 및 상보체 의존성 세포독성(CDC) 활성을 피하도록 한다. HMBD-002는 사람 및 시노몰구스 VISTA에 대해 Kd <1 nM의 높은 친화성을 나타내며, 뮤린 VISTA에 대해서는 비교가능한 결합을 나타낸다. 또한, HMBD-002는 HEK293 발현 시스템의 다른 세포 표면 분자 및 재조합 B7 계열 구성원에 대한 결합 비교를 기준으로 매우 특이적인 VISTA 결합을 나타낸다.

[2378] HMBD-002는 항종양 효능에 대해 다양한 전-임상 모델에서 시험되어 왔다. 마우스 결장 선암종의 동계 CT26 모델에서, 이러한 mAb는 피하 옆구리 이식체의 종양 성장을 지연시키고 생존을 증가시킴으로써 단독치료요법 항-종양 활성을 입증하였다. 마우스 흑색종의 B16-BL6 동계 모델에서, HMBD-002는 PD-1 차단 항체와 조합한 경우에만 활성을 나타내었으나, 단리시 PD-1 차단 또는 VISTA 차단은 효과적이지 않았다. 이러한 결과는 VISTA 및 PD-1 체크포인트가 면역 반응을 억제하는 이의 능력에 있어 상호보완적일 수 있음을 시사한다. HMBD-002 공-치료는 종양 MDSC 침윤을 감소시켰고, 이는 항-종양 면역성을 증가시키는 중요한 수단 중 하나일 수 있다. 더욱이,결장 직장 암, 림프종 및 흑색종의 생체내 동계 세포주 유래된 모델을 사용하는 항-PD-1 mAb와 함께, HMBD-002는 항-PD-1치료요법 단독에 비해 종양 성장 억제를 실질적으로 증가시켰다.

[2379] HMBD-002는 50mg/mL가 들어 있는 바이알에 IV 주입을 위해 의도된 무균의, 일회용, 무방부제 용액으로 공급된다. HMBD-002는 20mM의 히스티딘, 8%(w/v)의 슈크로스, 0.02%(w/v)의 폴리소르베이트 80(트윈n 80), pH 5.5로 제형화된다.

[2380] 최종 용기는 4R USP 제I형 유리 바이알이고 4 mL의 HMBD-002를 함유한다.

[2381] 약물 생성물에 대한 권장 저장 조건은 빛으로부터 보호되는, -20 ± 5℃(-13 내지 5 °F)이다. HMBD-002와 주입액 및 주입 세트의 호환성이 입증되었다. 연구 결과는 HMBD-002가 임상 현장에서 사용될 주입 용액 및 주입 세

트와 상용성임을 나타낸다.

[2382] 19.6 투여, 용량 및 투여량 요법

[2383] *19.6.1 전반적인 설계 및 계획*

[2384] 계획된 연구인, HMBD-002-V4C26-01은 진전된 고형 악성종양(즉, 국소적으로 진전되고 절제불가능하거나, 또는 전이성인) 및 임상적 이익의 합당한 가능성을 부여할 수 있는 이용가능한 치료요법이 없는 환자에서 IV 투여된 HMBD-002의 다중 용량 및 스케쥴을 평가하는 제1상, FIH, 오픈-라벨, 다기관(multicenter), 2-단계(용량 증량 및 용량 확장) 연구이다.

[2385] HMBD-002는 단독요법으로서 3주 치료 주기(21일 주기) 중 1일, 8일, 15일에 60분간 IV 주입으로 투여된다. 내약성이 좋으면 HMBD-002의 후속 주입을 30분에 걸쳐 투여할 수 있다.

[2386] 연구는 2단계로 수행될 것이다: 부분 1(용량 증량) 및 부분 2(용량 확장). 부분 1에서, 안전성, 내약성, PK 및 PD를 특성화하고 최대 허용 용량(MTD) 또는 최대 시험된 용량 및 권장 제2상 용량(RP2D)을 확인하기 위해 증가하는 용량의 HMBD-002가 투여된다.

[2387] HMBD-002의 단독요법 시작 용량 요법(즉, 코호트 1, 주기 1의 용량 요법)은 1일째에 7mg(33% [시험] 용량) 및 8일 및 15일째에 20mg에, 이어서 3주 주기 중 1일, 8일, 15일째에 20mg이다. 치료 주기는 21일이며, HMBD-002를 사용한 매주 x 3회 치료로 구성된다.

[2388] 환자가 동의하고 치료를 견디고 잠재적인 임상적 이점이 있는 경우, 환자는 6 주기까지 연구 치료를 지속할 수 있다. 허용할 수 없는 독성, PD, 환자의 자발적인 연구 철회, 다른 중단 기준이 충족되는 경우, 또는 연구 종료의 경우 연구 치료는 중단될 것이다. 주기의 최대 수는 35로 설정된다.

[2389] 부분 1(용량 증량)에서, 대략 약 25 내지 30명의 환자가 등록되어 표준 "3+3" 설계의 단독치료요법으로 HBMD-002를 사용하여 치료된다.

[2390] HMBD-002의 MTD 및/또는 RP2D가 부분 1에서 확립된 후(RP2D는 MTD와 동일할 수 있지만 여러 주기에 걸쳐 허용 가능한 용량을 반영할 수 있다), 연구의 부분 2(용량 확장)는 진전된 TNBC 및 NSCLC를 포함한 특정 악성 종양이 있는 환자, 및 다양한 고형 악성종양이 있는 환자에서 HMBD-002의 예비 항-종양 활성을 평가한다. 부분 2는 HMBD-002의 안전성, 내약성, PK 및 약력학도 추가로 평가할 것이다.

[2391] 부분 2(용량 확장)에서, 4개의 질환-지시된 확장 코호트: TNBC(중간 n=15) 및 NSCLC(중간 n=15)에 대한 임시 Go/No-Go 결정을 기준으로 190명까지의 환자가 등록될 것이고, 코호트 각각은 중간 분석에서 충분한 신호가 있는 경우 HMBD-002의 항-종양 활성을 보다 정확하게 추정하기 위해 35명까지 증가시킬 수 있다. 또한, HMBD-002로 치료받은 다른 고형 악성종양 환자를 위한 하나의 추가 확장 코호트(각각 n=50)가 존재할 것이다.

[2392] DLT, AE 및 SAE, 독성으로 인한 치료 중단, 임상 실험실 이상, 신체 검사, ECG 발견, VS 측정 및 ECOG 성능 상태 점수의 문서화에 의해 연구 동안 안전성 종점을 평가할 것이다. B-종양 활성의 평가는 주로 RECIST v1.1(실시예 19.9 참조)에 따라 정의된 바와 같은 범주형 객관적 반응에 중점을 둘 것이다.

[2393] *19.6.2 부분 1: 용량 증량*

[2394] 용량 증량은 단일-제제 HMBD-002로 개시된다. 단독치료요법 hmdb-002로 치료된 환자의 적어도 2개의 코호트를 평가하고 필요한 내약성을 입증한 후, 용량 증량을 매주 HMBD-002으로 3회 개시할 수 있다.

[2395] 용량 증량 단계에서, HMBD-002는 처음 21-일 주기의 1, 8, 및 15일째에 투여될 것이다. 코호트에 등록된 모든 환자로부터의 모든 안전성 데이타는 임의의 DLT가 실험되고 다음 코호트로의 등록이 일어날 수 있는 경우를 확인하기 위해 고찰된다. 용량 증량 단계에서, DLT 평가 기간(1주기) 동안 이의 스케쥴된 HMBD-002 용량 중 모든 3회(1일, 8일, 15일)를 제공받아야 하며 환자가 DLT 또는 약물 관련 독성을 경험하여 치료를 생략하게 된 경우를 제외하고는 이 기간이 끝날 때까지 추적 관찰을 받아야 하며, 이러한 경우 환자는 DLT에 대해 평가를 받을 것이다.

[2396] 연구 동안, HMBD-002의 PK 및 안전성 프로파일은 3주마다 1일째 및 8일째 스케쥴 또는 3주마다 1일째 스케쥴과 같이 덜 집중적인 스케쥴이기는 하지만, 제제가 대체 투여를 위해 더 수행됨을 나타낼 수 있다. HMBD-002 치료 스케쥴이 3주마다 1일째 및 8일째로 수정되는 경우 또는 3주마다 1일째 치료 스케쥴로 변경되는 경우, 환자는 주기 1(3주마다 1일 및 8일째 스케쥴)에서 1일째 및 8일째 용량의 HMBD-002 또는 1일째(3주마다 1일째 스케쥴)

에 단일 용량의 HMDB-002 둘 다를 투여받아야 하고, 환자가 DLT 또는 약물-관련 독성을 경험하여, 치료를 생략하지 않는 한, DLT 평가 기간 종료(주기 1의 21일째)까지 후속 조치를 취하여 DLT 평가 자격을 갖추어야 한다.

[2397] DLT가 추가 환자의 코호트로의 등록을 필요로 하는 경우, 추가 환자가 DLT 평가 기간을 완료한 후 해당 코호트에 대한 모든 안전성 데이터를 검토하였다. 데이터 평가를 기준으로, 이러한 프로토콜에 지정되지 않은 중간 HMBD-002 용량 수준에서의 등록은 명시된 것보다 더 보수적일 것이며, 다음의 더 높은 용량은 중간 용량이 될 것임이 결정될 수 있다.

[2398] 코호트 내의 적어도 3명의 환자 중 0명 또는 적어도 6명의 환자 중 1명이 DLT를 경험하는 경우, 안전성 검토 위원회(Safety Review Committee; SRC)의 합의에 따라 다음으로 더 높은 용량의 코호트내 등록이 시작될 수 있다. SRC는 Hummingbird Bioscience의 의료 총 책임자, 또는 지정자, 의료 추적자(medical monitor), 또는 지정자, 및 책임연구원 중 적어도 1명을포함하는 적어도 3명의 구성원으로 이루어진다. 위원회는 다음 용량-수준 코호트에 대한 용량 증량을 결정하기 전에 현재 코호트와 이전 코호트의 안전성 데이터를 검토한다. 용량 증량은 특정의 주어진 코호트의 각 환자가 주기 1의 21일에 도달한 후에만 발생할 수 있으며, SRC는 용량 증량이 발생할 수 있다는 데 동의하였다.

[2399] *19.6.3 용량 증량 공정*

[2400] HMBD-002의 작용 메커니즘으로 인한 사이토카인 방출 증후군(*cytokine release syndrome;* CRS)의 가능성이 있고, 관련되지 않은 다른 VISTA mAb와 함께 CRS가 발생한다는 점을 고려하면, HMBD-002의 용량 증량 동안 다음 조치가 취해질 것이다:

[2401] · 코호트 1에서 투여되는 제1 용량은 주기 1의 1일째에 전체 용량의 33%에서 "단계" 또는 "시험 용량"이 될 것이다. 각각의 후속 용량 수준(예컨대, "X mg" 용량 수준)에 대해, 모든 환자는 주기 1의 1일째에 "단계" 또는 "시험 용량"으로서 용량의 50%를 투여받을 것이다. 환자는 이의 제1 ("단계" 또는 "시험") 용량을 투여받은 후 적어도 6시간 동안 진료소에서 관찰되어야 한다. 24시간 이내에 진료소를 후속 방문해야 할 수 있다.

[2402] · 제1의 전체 용량(Xmg)의 경우, 일주일 후인, 주기 1의 8일째에, 환자는 치료를 받은 후 대략 24시간 동안 입원해야 하며 48시간(9일)과 72시간(10일)째에 외래환자로서 평가되어야 한다.

[2403] · 주기 1의 15일째에 두 번째 전체 용량(X mg)의 경우, 치료 후 적어도 6시간 동안 병원에서 환자를 관찰하여야 한다.

[2404] · 주기 2+ 동안 모든 후속 투여에 대해, 환자는 전체 용량을 투여받아야 하며 치료 후 적어도 1시간 동안 관찰되어야 한다.

[2405] · 임의의 추가 용량 주입에 대해 임의의 등급, 등급 2 CRS/주입-관련 반응(infusion-related reaction: IRR)의 신경독성을 경험하는 환자는 병원에서 증상 해결을 위해 적절하게 모니터링되어야 한다. 등급 3 CRS/IRR 또는 등급 3 신경독성을 경험하는 모든 환자는 연구를 중단하여야 한다.

[2406] · 3등급 CRS/IRR이 관찰되는 경우, 연구에 추가된 모든 추가의 환자는 HMBD-002를 사용한 치료 전 6시간 및 12시간째에 덱사메타손 20mg을 경구 또는 IV로 투여받을 것이다.

[2407] · 환자는 이전 치료 동안 등급 1 내지 2의 발열(fever), 경직(rigor), 근육통(myalgia)/관절통(arthralgia) 및/또는 관련 AE의 발생에 따라 다음과 같은 사전 투약(pre-medication)으로 치료될 수 있다: HMBD-002 치료 전 30 내지 60분  내에 디펜하이드라민 25-50mg IV/po 및/또는 아세트아미노펜. 이러한 AE가 흔한 것으로 관찰되는 경우, 이러한 사전-투약 요법은 모든 환자에게 의무화될 수 있다.

[2408] 적어도 3명의 환자는 단일-제제 HMBD-002의 평가에서 시작 용량 수준(20mg)으로 HMBD-002로 치료받게 될 것이다. 3+3 설계가 활용될 것이다. 각각의 새로운 용량 증량 코호트에 등록된 첫 번째 환자는 코호트에 추가 환자가 발생하기 전에 전체 주기 1을 완료하여야 한다. 용량 증량 동안, 각각의 새로운 용량 수준에서 처음 3명의 환자는 적어도 7일까지 시차를 둔 치료를 받아야 한다.

[2409] 다음의 일반적인 용량 증량 계획이 이어질 것이다:

[2410] · HMBD-002의 용량을 증량하는 경우, 적어도 3명의 환자는 시작 용량 수준인 20mg으로 치료받아야 하며, 3명의 환자 각각은 주기 1의 1일째에 7mg의 "시험 용량"을 투여받는다.

[2411] · 투약 코호트에서 처음 3명의 DLT 평가-가능한 환자 중 어느 누구도 DLT를 경험하지 않는 경우, 다음의 더 높

은 용량 코호트의 등록이 시작될 수 있으며, 각 코호트의 모든 신규 환자는 주기 1의 1일째에 50%의 시험 용량을 받는다.

[2412] · 코호트에서 단일 DLT-평가 가능 환자가 DLT를 경험하는 경우, 최대 6명의 안전성-평가가능한 환자가 해당 용량 수준에 등록되도록 한다. 6명의 환자 중 1명 미만이 DLT를 경험하는 경우, 다음으로 더 높은 용량의 코호트 내 등록이 시작될 수 있다.

[2413] · 처음 3명의 환자 중 어느 누구에게도 DLT가 없거나 처음 6명의 신규 환자 중 1명 미만에게 DLT가 있는 경우, 다음의 더 높은 용량 코호트내 등록은 현재 용량 코호트에 등록된 마지막 환자가 DLT 평가 기간을 완료한 경우에만 시작할 수 있다.

[2414] · 제2의 DLT가 코호트의 임의의 처음 6명의 환자에서 발생하는 경우, MTD가 초과되고 이전의 낮은 용량 수준이 MTD로 간주될 것이고, 단, DLT는 처음 6명의 DLT-평가가능한 환자 중 1명 미만에서 발생하지 않는다.

[2415] · 주기 2 치료는 독성 또는 임의의 다른 이유로 인해 DLT 관찰 기간 이후 21일까지 유지될 수 있으며, 그 이후에는 환자는 치료를 중단해야 합니다.

[2416] · 15명 이하의 환자가 MTD(또는 MTD가 확인되지 않은 경우 최대 시험된 용량), 또는 HMBD-002의 안전성, PK 및 약력학의 추가의 특성화를 제공하기 위한 추가의 선호되는 위험/이익 프로파일을 제시하는 증거가 존재하는 경우 MTD 이하의 용량에서 치료될 수 있다. 이러한 환자에게는 50% 시험 용량이 요구되지 않을 것이다.

[2417] 용량 증량에 관한 결정은 DLT 평가 기간의 데이터 검토를 기준으로 이루어질 것이지만, 안전성 데이타가 또한 치료를 계속하는 모든 환자로부터 수집되어 정기적으로 검토될 것이다. 임의의 검출된 누적 독성은 추후 용량 감소, 용량-스케쥴 변경, 또는 MTD의 추가 개선을 포함하는, 적절한 다른 조치가 요구될 수 있다.

[2418] 추가 용량 증량을 방지할 수 있는 DLT가 발생하고 이러한 DLT가 심각하지만 생명을 위협하지는 않는 상황(예: 지속적인 등급 3 발열, 불쾌감)의 경우, 특정 용량 코호트의 재-평가를 의료 추적자와 논의 후 초기 HMDB-002 치료요법과 함께, 적절한 지지 보호제(예를 들면, 이에 제한되지 않는 조혈 성장 인자, 코르티코스테로이드, 항-우울제)의 공-투여를 사용하여 고려할 수 있다.

[2419] HMBD-002의 용량 조정은 연구의 용량 증량 단계의 주기 1(DLT 평가 기간) 동안 허용되지 않는다. 주기 1 동안 DLT를 경험한 환자는 용량 증량 과정 동안 및 의료 추적자와 논의한 후 용량이 안전한 것으로 입증된 경우 감소된 용량으로 연구를 지속할 수 있다. 논의는 의료 추적자 및 연구 코디네이터에 의해 문서화된다. DLT 평가 기간 이후, 용량 증량 단계에 참여하는 환자의 경우 주기 2+에서, 및 용량 확장 단계에 있는 환자의 경우 모든 주기에서 특정의 독성 및/또는 실험실 이상에 대해 용량을 유지 또는 조정할 수 있다.

[2420] 용량 증량 단계 동안 각각의 새로운 코호트에서 처음 3명의 환자 각각에 대한 치료는 코호트 내로 추가의 환자가 발생하기 전에 7일씩 시차를 두어야 한다. 용량 증량은 표 4에 제시된 단순화된 계획에 따라 일어날 것이다.

[2421] [표 4]

용량 증량 계획

| 경우 | 이후에 |
|---|---|
| 3 명의 환자 중 0 명이 DLT 평가 기간에 용량 수준 X 에서 DLT 가 없음<br>6 명의 환자 중 ≤1 명이 DLT 를 지님 | 용량 수준 X+1 로 증량됨 |
| 3 명의 환자 중 1 명이 DLT 를 지님 | 용량 수준 X 에서 6 명의 환자를 평가함 |
| 6 명의 환자 중 ≥2 이 DLT 를 지님 | 용량 수준 X-1 은 MTD 이다[a] |

약어: DLT, 용량을 제한하는 독성; MTD, 최대로 견디는 용량

[a]1 명 이하의 환자가 DLT 를 경험하고, 단, 적어도 6 명의 새로운 환자가 이러한 용량 수준에서 치료를 받고 DLT-평가가능한 경우, 이러한 용량은 MTD 로 고려될 것이다. 용량은 전체 용량(X)에서 모든 다른 용량과 함께 주기 1 의 1 일째에 시험 용량의 50%(50% X)로 정의될 것이다.

[2422]

[2423] *19.6.4 HMBD-002에 적용가능한 용량 증량*

[2424] HMBD-002의 용량 증량과 관련하여, 양호한 실험실 실시(Good Laboratory Practice; GLP) 독성학 연구 결과를 기준으로, 코호트 1 환자는 HMBD-002를 처음 21일 주기(주기 1)의 1일째에 7mg, 8일째 및 15일째에 20mg의 시작

용량으로 투여받을 것이다. 첫 번째 21일 주기(1주기). 모든 후속 주기의 1, 8, 15일째에 20 mg의 용량을 투여할 것이다. 다음 계획된 코호트에 대한 HMBD-002의 최대 용량은 표 5에 제시된 바와 같이 현재 코호트로부터의 안전성 결과에 의존한다.

[2425] [표 5]

출발 용량을 능가하는 최대 용량

| 경우 | 이후에 |
|---|---|
| 용량 수준 X (≤ 80 mg)에서 AE > 등급 1 를 지니지 않는 환자가 0 명인 경우 [a] | 다음 코호트는 ≤ 3.0 x 현재 용량의 용량 수준을 제공받을 것이다 |
| 용량 수준 X (>80 mg)에서 AE > 등급 1 를 지니지 않는 환자가 0 명인 경우 [a] | 다음 코호트는 ≤ 2.0 x 현재 용량의 용량 수준을 제공받을 것이다 |
| 등급 2 비-DLT AE(≤ 80 mg)를 경험한 환자가 ≥1 명인 경우 | 다음 코호트는 ≤ 2.0 x 현재 용량의 용량 수준을 제공받을 것이다 |
| 등급 2 비-DLT AE(> 80 mg)를 경험한 환자가 ≥1 명인 경우 | 다음 코호트는 ≤ 1.5 x 현재 용량의 용량 수준을 제공받을 것이다 |
| ≥등급 3 비-DLT 를 경험한 환자가 ≥1 명인 경우 | 다음 코호트는 ≤ 1.5 x 현재 용량의 용량 수준을 제공받을 것이다 |
| 환자 6 명 중 1 명이 DLT 를 경험한 경우 | 다음 코호트는 ≤ 1.33 x 현재 용량의 용량 수준을 제공받을 것이다 |
| 코호트 1 에서 **특정의 등급 DLT** 를 경험한 환자가 ≥2 명인 경우 [b] | 다음 코호트(코호트 -1)는 코호트 1 으로부터 50% 감소된 용량 수준을 제공받을 것이다: 0.45 mg/m² |
| 코호트 1 에서 **특정의 등급 DLT** 를 경험한 환자가 ≥2 명인 경우 [b] | 다음 코호트(코호트 -2)는 코호트 1 으로부터 33% 감소된 용량 수준을 제공받을 것이다 |

약어: AE=부작용; DLT=용량을 제한하는 독성

a. 용량 수준 X 는 현재의 용량 수준을 지칭한다.

b. DLT 는 연구 약물 이외의 원인에 명확하게 기여할 수 없는 현상이어야만 한다.

[2426]

[2427] 다음 계획된 코호트에 대한 HMBD-002의 최대 용량은 다음과 같이, 현재의 코호트에서의 안전성 발견에 의존한다. "X"는 이전 코호트에서 평가된 용량 mg이다:

[2428] · 등급 > 1 HMBD-002-관련된 AE(외인성 원인[예컨대, 암, PD]에 명확하게 기여할 수 없는 임의의 등급 1> AE)를 경험한 환자가 없고, 현재의 용량 수준이 ≤80 mg: **≤ 3.0(X)** mg인 경우.

[2429] · 등급 > 1 HMBD-002-관련된 AE(외인성 원인[예컨대, 암, PD]에 명확하게 기여할 수 없는 임의의 등급 1> AE)를 경험한 환자가 없고, 현재의 용량 수준이 >80 mg: **≤ 2.0(X)** mg인 경우.

[2430] · DLT가 아닌 경우에서, 적어도 1명의 환자가 등급 2 HMBD-002-관련된 AE를 경험하고, 현재의 용량 수준이 ≤ 80 mg: **≤ 2.0(X)** mg인 경우.

[2431] · DLT가 아닌 경우에서, 적어도 1명의 환자가 등급 2 HMBD-002-관련된 AE를 경험하고, 현재의 용량 수준이 >80 mg: **≤ 1.5(X)** mg인 경우.

[2432] · DLT가 아닌 경우에서, 적어도 1명의 환자가 등급 3 HMBD-002-관련된 비-DLT: **≤1.5(X)** mg를 경험한 경우.

[2433] · 6명의 환자 중 1명이 DLT: **≤1.33(X)** mg를 경험한 경우.

[2434] · 보다 적은 용량 증가(즉, 25% 증가)가 비-DLT AE의 빈도 및 중증도를 기준으로 고려될 수 있는 경다.

[2435] · 25% 또는 33% 용량 증량 후, 등급 ≥3 HMBD-002-관련된 비-DLT AE가 2개의 후속적인(연속적인) 코호트에서 발생하는 경우 보다 높은 용량 증량 증분(50% 증가까지) 재-시행될 수 있다.

[2436] · DLT가 코호트 1로 치료된 2명의 환자에서 발생하는 경우, 후속적인 코호트(코호트-1)는 HMBD-002을 코호트 1에서 50%까지 감소된 용량(코호트-1 = 주기 1의 1일째에 투여된 용량으로서 3.3 mg과 함께 10mg)으로 제공받을 것이다.

[2437] · DLT가 코호트-1으로 치료한 2명의 환자에서 발생하는 경우, 후속적인 코호트(코호트-2)는 HMBD-002를 코호트-1으로부터 ~33%까지 감소된 용량: (코호트 -2 = 주기 1의 1일째에 투여된 용량으로서 2.2 mg과 함께 7mg)으로

제공받을 것이다.

[2438] · 3주마다의 스케쥴의 1, 8, 15일(매주)에 용량 강도가 너무 높고, 임상 안전성 및 PK 데이타를 기준으로 한 약간의 용량 강도에 대한 지원(예컨대, 3주마다 1일 및 8일째 또는 3주마다 1일째)이 있는 경우, 3주마다 1 및 8일째 또는 3주마다 1일째를 사용한 신규 환자 코호트가 새로운 환자의 누적으로 인해 생성될 것이다.

[2439] ○ 3주마다 매주 2회(1일 및 8일) 일정은 33% 감소를 나타내고 3주마다 1일의 스케쥴은 3주마다 1일, 8일 및 15일째와 비교하여 HMBD-002 용량 강도에서 66% 감소를 나타내기 때문에, 제1의 환자 코호트는 3주마다 1, 8, 15일째의 스케쥴에 안전하다고 결정된 것과 동일한 HMBD-002 용량(즉, MTD 이하)을 제공받아야 한다. 용량 증량은 3주마다 1, 8, 15일째에 대해 기술된 계획에 따라 수행될 것이다. 이러한 스케쥴은 주기 1의 1일째에 50% 시험 용량을 포함한다.

[2440] · 추가의 환자, 특히 연속적인 종양 생검(절차가 유의적인 절대 사망률 위험을 부여하지 않거나 또는 환자의 임상 셋팅에서 및 절차를 완료하는 기관에서 주요 이환율이 2% 이상인 것으로 평가된 생검)에 순응하고 이에 동의하는 환자는 DLT에 대해 완전히 평가할 수 있고 다음 더 높은 용량 수준에서의 투여와 관련하여 제거된 용량 수준에서 치료될 수 있다.

[2441] · DLT가 추가 환자의 코호트내로의 등록을 요구하는 경우, 추가 환자가 DLT 평가 기간을 완료한 후 해당 코호트에 대한 모든 안전성 데이터가 검토될 것이다. 데이터 평가를 기준으로, SRC 및/또는 후원자는 이 프로토콜에 지정되지 않았지만 계획된 용량 수준 사이에 있게 될 중간 HMBD-002 용량 수준에서 환자를 등록하는 것을 결정할 수 있다.

[2442] · 주기 2 치료는 독성 및 임의의 다른 이유로 DLT 관찰 기간 후 21일까지 유지될 수 있고, 이후에 환자는 치료를 중지하여야 한다.

[2443] HMBD-002는 조합 치료요법, 예컨대, 항-PD-1 또는 항-PD-L1 치료요법과 함께 이의 안전성 및 효능에 대해 평가될 수 있다.

[2444] *19.6.5 부분 2: 용량 확장*

[2445] MTD를 나타낼 수 있는 HMBD-002의 MTD/RP2D 수준 또는 반복 주기에 대한 내성(즉, 누적 독성의 증거)과 같은 요인을 기준으로 한 더 낮은 용량을 측정한 후, PK 연구 결과(즉, 생물학적 활성을 나타내는 PK 매개변수를 초과하는 용량 수준), 약력학적 연구 결과(즉, 표적 약력학적 효과의 포화), 및/또는 항암 활성, 별개의 질환으로 정의된 환자 코호트가 HMBD-002로 치료된다.

[2446] 확장 단계에 등록된 모든 환자의 경우, 종양 생검은 주기 2가 끝나갈 무렵 또는 PD 시점에(더 빠른 경우) 예비 치료가 요구된다. 종양 생검 과정은 사망율의 관련된 절대적인 위험으로서 정의되거나 또는 환자의 임상 셋팅 및 절차를 완료하는 기관에서 주요 이환율이 2% 이상으로 추정된 유의적인 위험을 지니지 않아야 한다. VISTA+ 면역조직화학의(IHC)의 입증은 치료 개시 전에 요구되지 않는다.

[2447] 다음의 명백한 용량-확장 코호트를 평가할 것이다:

[2448] · TNBC - 충분히 양성 신호가 관찰되면 추가 확장할 가능성을 지닌, 단독치료요법으로서 HMBD-002로 치료받은 진전된 TNBC를 지닌 15명의 이미 치료된 환자.

[2449] · NSCLC - 충분히 양성 신호가 관찰되면 추가 확장할 가능성을 지닌, 단독치료요법으로서 HMBD-002로 치료받은 진전된 NSCLD를 지닌 15명의 이미 치료된 환자.

[2450] · HMBD-002으로 치료된 일련의 생검(즉, 생검 절차는 유의적인 위험 과정이 아니다(즉, 환자의 임상 셋팅에서 및 기관이 절차를 완료시 ≥ 2%의 추정된 주요 이환율 또는 사망률))으로 처리할 수 있는 다양한 악성종양을 지닌 50명의 환자.

[2451] 190명 이하의 환자를 용량 확장 단계에서 치료할 수 있다. 확장 코호트 중 어느 것도 충분한 수준의 활성(≥1의 목적한 반응)이 첫번째 중간 평가(15명의 환자)에서 주목된 경우 각각 35명의 환자에게 확장될 수 있다.

[2452] 용량은 치료-관련된 독성에 대한 반응시 변경될 수 있다.

[2453] *19.6.6 용량을 제한하는 독성의 정의*

[2454] DLT 평가기간은 21일(주기 = 21일)이다. 부분 1(용량 증량)에 등록하고 HMBD-002 단독치료요법을 받고 있는 환자는 DLT 평가 기간 동안 이의 스케쥴된 HMBD-002 용량을 총 3회(1일, 8일, 15일째)를 제공받아야 하며 완전한

추적 데이터는 DLT 평가 자격을 갖추기 위한(즉, DLT 평가 가능) 21일까지 이용 가능하여야 한다. DLT 또는 다른 약물-관련 독성을 경험하여 DLT 평가 기간 동안 치료를 생략하게 된 환자도 또한 DLT 평가 자격이 될 것이다.

[2455] 독성은 국립암연구소(National Cancer Institute; NCI)의 부작용에 대한 공통 기술용어 기준(Common Terminology Criteria for Adverse Event; CTCAE), 버젼 5.0을 사용하여 조사자가 평가할 것이다. HMBD-002에 대한 AE의 관계(즉, 기여도)가 평가되어야 한다.

[2456] AE가 외부 원인(예컨대, 암, PD)에 명확하고 논란의 여지가 없이 기여될 수 있는 경우를 제외하고는, DLT는 HMBD-002에 대한 조사자의 기여와 관계없이, DLT 평가 기간 동안 발생하는 다음 AE 중 하나로 정의된다.

[2457] **혈액학적 DLT:**

[2458] · *등급* 3 또는 4의 열성 호중구 감소증(febrile neutropenia)

[2459] o 생명을 위협하는 결과 및 나타낸 위급한 개입의 존재 또는 부재하에 >38.3℃(101°F)의 단일 온도 또는 ≥ 38.3℃(100.4 °F)의 지속된 온도를 1시간 이상 동안 사용한 절대 호중구 수(absolute neutrophil count; ANC) <1000/$mm^3$로 정의됨.

[2460] · 연속일 지속되는 등급 4 호중구 감소증(ANC<500/μL)(완전한 혈액 카운트[CBC] + 차이(differential)는 등급 ≤1로의 ANC 회복까지 2 내지 3일마다 측정되어야만 한다.

[2461] · 종양에 의한 증명가능한 골수 포함없이 환자에서 >7일 지속되는 등급 4의 호중구 감소증(혈소판 <25,000/μL) 또는 등급 3 혈소판감소증(thrombocytopenia)(혈소판 <50,000/μL); 또는 임상적으로 유의적인 출혈과 관련된 주기 3 또는 4 혈소판감소증.

[2462] **비혈액학적 DLT:**

[2463] · NCI CTCAE, 버젼 5.0에 따른 임의의 비혈액학적 AE≥등급 3:

[2464] *o* 예외는 오심(nausea), 구토(vomiting), 설사(diarrhea), 전해질/대사/혈당 이상(electrolyte/metabolic/glucose abnormality), 변비(constipation), 발열(fever), 또는 피로(fatigue)이며, 여기서 72시간 내에 등급 ≤1까지 해결되는 준최적 예방 및 관리예방 및 관리가 존재한 경우.

[2465] o 예외는 Hy의 법칙(Hy's law)을 충족하지 않는 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제(AST) 및/또는 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT)의 등급 3 상승이다. Hy의 법칙을 충족하는 등급 3 AST 및/또는 ALT 상승은 담즙정체 소견이 없는 경우(>2 x ULN까지 알칼린 포스파타제의 상승) 정상 상한치(limit of normal; ULN)의 >2 X의 총 빌리루빈의 첨가를 요구하고 ALT/AST 증가와 총 빌리루빈의 조합을 설명하는 다른 이유가 발견될 수 있다. Hy의 법칙에서 예외인 등급 3 트랜스아미나제 상승은 Hy의 법칙 기준이 또한 충족되지 않는 경우, 7일 이내에 ≤= 등급 1까지의 해결이 요구된다.

[2466] · NCI CTCAE 버전 5.0에 정의된 것으로서, CRS/면역 효과기 세포-관련 신경독성 증후군(immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome; ICANS)의 등급 3 발현. HMBD-002 치료로 인해 등급 3 또는 등급 4의 CRS 또는 ICANS를 경험한 이러한 환자는 연구를 중단하여야 한다.

[2467] · 등급 3 IRR 또는 등급 3 면역 관련 독성. 이러한 환자는 연구를 중지할 수 있다.

[2468] **혈액학적 및 비-혈액학적 DLT 둘 다:**

[2469] · 주기 1 동안 8일 또는 15일째, 또는 스케쥴이 3주마다 1일 및 8일째 스케쥴로 수정된 경우, 8일째의 용량을 생략하게 되는 모든 가능한 약물-관련된 독성.

[2470] · 회복 기준을 충족하지 못하여 주기 2의 투여를 >21일까지 지연시키는 독성.

[2471] · 주기 1 동안 치료 중단을 유발하는 모든 치료 관련 독성.

[2472] · 모든 등급 5 독성.

[2473] · 조사자와 후원자의 의료 담당자가 DLT로 간주하는 임의의 다른 유의적인 독성.

[2474] 마지막 투여 후 30일까지의 응급 치료 AE는 MedDRA™ 버전 13.1(또는 그 이상) 시스템 기관 분류 및 선호 용어로 요약될 것이다. 각각의 AE 선호 용어를 경험하는 환자의 발생률 및 퍼센트는 기술 통계로 요약될 것이다. AE는

또한 NCI-CTCAE, v5 등급 및 인과성(연구 치료에 대한 속성)에 의해 요약될 것이다. DLT, 등급 3-4 AE, SAE 및 용량 조절을 초래하는 AE 또는 치료 중단도 선호하는 용어로 또한 요약될 것이다.

[2475] *19.6.8 투여 및 재치료를 위한 기준*

[2476] 치료 주기 내에서, 지난 24시간 동안, 환자가 다음 사건 중 하나를 경험한 경우, 스케쥴된 치료일에 HMBD-002 투여를 보류하여야 한다:

[2477] a. 최적의 항-설사 치료요법에도 불구하고 등급 2 설사

[2478] b. 최적의 GKD-구토 치료요법에도 불구하고 ≥등급 2 구토

[2479] c. 휴식으로도 완화되지 않고 일상생활의 자기관리 활동을 제한하는 ≥등급 3 피로

[2480] d. ≥등급 3 트랜스아미나제 상승

[2481] e. 혈소판 수 <50 x $10^9$/L

[2482] f. 호중구 수 <0.5 x 109/L

[2483] 주기 2 이상에서 치료를 개시하기 위해서는, 환자는 다음의 기준을 충족하여야만 한다:

[2484] a. ANC ≥1.00 x $10^9$/L

[2485] b. 헤모글로빈 ≥8 mg/dL

[2486] c. 혈소판 수 ≥75 x $10^9$/L

[2487] d. 계산된 크레아티닌 제거율 >35 mL/min

[2488] e. 총 빌리루빈 ≤1.8 x 기관(institutional) ULN

[2489] f. AST 및 ALT ≤ 4 x 기관 ULN 또는 환가가 간 전이(hepatic metassis)를 갖는 경우 ALT 및 AST ≤ 5 x 기관 ULN.

[2490] 치료 주기 내 연구 치료제(HMBD-002)의 용량 조정은 부분 1(용량 증량)의 주기 1(DLT 평가 기간) 동안 허용되지 않는다. 환자가 DLT에 해당하는 사건을 경험한 경우, 환자는 동일한 또는 더 낮은 용량으로 연구 치료를 다시 시작할 수 있다.

[2491] 용량 조정은 트랜스아미나제 상승, 혈소판 감소증 및/또는 호중구 감소증을 기준으로 이루어질 수 있다.

[2492] HMBD-002의 주사 시, 환자는 일시적인 발열, 오한(*chills*), 메스꺼움, 피로, 구토, 두통 및 간 효소 증가를 경험할 수 있다. 이들은 또한 CRS의 증상, 예를 들면, 발열, 경직(rigors), 권태감(malaise), 피로, 식욕부진(anorexia), 근육통(myalgias), 관절통(arthralgias), 오심, 구토, 두통, 설사, 빈맥(tachycardia), 저혈압(hypotension), 심박출량 변화(change in cardiac output), 맥압 증가(widened pulse pressure), 발진(rash), 빈호흡(tachypnea), 상승된 D-이량체(elevated D-dimer)상승, 경사막염(transaminitis), 질소혈증(azotemia), 저산소혈증(hypoxemia), 저피브리노겐혈증(hypofibrino-genemia) ± 출혈(bleeding), 고빌리루빈혈증(hyperbili-rubinemia), 정신 상태 변화(mental status changes), 혼돈(confusion), 섬망(delirium), 실어증(aphasia), 환각(hallucinations), 떨림(tremor), 측정 장애(dysmetria), 보행 변화(altered gait) 및/또는 발작(seizures)을 경험할 수 있다. CRS는 NCI CTCAE 버전 5 기준에 따라 등급이 매겨질 수 있다.

[2493] **경증 CRS**: 경증(등급 1, 체질적 증상이 있거나 없는 발열) 초기 반응은 일반적으로 개입이 필요하지 않다. 아세트아미노펜 또는 유사한 소염제(비스테로이드성 소염제; NSAID)를 필요한 경우 발열 및 관련 체질 발현을 치료하기 위해 투여될 수 있다. CRS로 인한 중증 AE의 경우, 중재는 혈압 지원, 및 코르티코스테로이드, 항-인터루킨-6(IL6) mAb 토실리주맙을 사용한 치료 및/또는 과민증 발현의 관리를 포함한다.

[2494] **중간 중등(moderately severe)의 CRS**: CRS 등급 2 이상인 경우, CRS의 다양한 관련성 및 잠재적으로 심각한 증상을 치료하기 위해 코르티코스테로이드의 존재 또는 부재하에 토실리주맙을 투여할 수 있다. 토실리주맙의 권장 용량은 체중이 30kg 미만인 환자의 경우 12mg/kg IV이고, 체중이 30kg 이상인 환자의 경우 8mg/kg이다. 제제는 60분에 걸쳐 IV 주입으로 투여되어야 한다. 24 내지 48시간 이내에 임상적 호전이 나타나지 않으면 토실리주맙을 재투여할 수 있다. CRS 등급 ≥2 또는 그 이상은 기준선(스케쥴 실험실)과 사건 발생 시점 및 퇴원 전에

IL6, CRP 및 페리틴을 측정하여 확인하여야 한다. 후속 치료를 위해, 필요한 경우 아세트아미노펜, 비스테로이드성 소염제를 사용한 사전-투약이 허용된다. 저-용량 코르티코스테로이드는 HMBD-002에 대해 반응이 발생하는 경우, 반응의 중증도를 감소시키기 위한 사전-투약으로 사용될 수 있지만, 의료 추적자와 논의한 후에만 가능하다.

[2495] **중증 CRS(등급 3):** CRS로 인한 심각한 AE의 경우, 중재는 혈압 지원, 코르티코스테로이드를 사용한 치료, 항-인터루킨-6(IL6) mAb 토실리주맙(참고: 상기) 및/또는 과민증(hypersensitivity) 증상 관리를 포함한다.

[2496] CRS에 대한 표준 지지 요법(standard supportive care)이 시행될 수 있다.

[2497] HMBD-002와 관련된 AE는 면역-관련 반응(irAE)을 나타낼 수 있다. 중증의 생명을 위협하는 irAE는 IV 코르티코스테로이드로 치료한 후 경구용 스테로이드(예컨대, 1 내지 2 mg/kg의 프레드니손 또는 동일한 초기 용량)로 치료할 수 있다. irAE가 코르티코스테로이드로 제어되지 않는 경우, 다른 면역억제 치료를 시작하여야 한다. 코르티코스테로이드 감량(taper)은 irAE가 ≤등급 1일 때 시작하여 4주 동안 지속되어야 한다. 추가적인 적절한 의학적 치료요법는 에피네프린, IV 유액, 항히스타민제, NSAID, 아세트아미노펜, 마약, 산소, 승압제 및/또는 코르티코스테로이드를 포함할 수 있지만, 이에 한정되지는 않는다.

[2498] *19.6.9 사전 및 동시 투약(medication)*

[2499] ***허용된 투약/치료요법***

[2500] DLT 평가 기간 외에, 혈소판감소증 또는 호중구감소증 설정 시, 혈소판 형성제(예: 로미플로스팀, 엘트롬보팍) 또는 과립구 콜로니 자극인자(G-CSF) 제제(예: 필그라스팀, 페그 필그라스팀)의 투여가 기관 또는 미국혈액학회(American Society of Hematology; ASH)/ASCO 가이드라인에 따라 허용된다. 위에서 언급한 가이드라인에 따라 에리스로포이에틴 유사체도 또한 허용된다. DLT와 일치하는 심각한 혈구감소증이 확인되지 않는 한 DLT 평가 기간 동안 이러한 제제를 사용하지 않아야 한다. DLT 평가 기간 동안 호중구 감소증의 개선을 위해 사용되는 경우 G-CSF 제제를 중단할 때까지 HMBD-002 치료를 중단하여야 한다.

[2501] 종합적인 지지된 보호, 예를 들면, 그러나 이에 한정되지 않는, 상기 나타낸 바와 같은, 항-구토제 및 항-설사제, 식욕 자극제, 각성제(stimulant)(즉, 모다피닐), 항-악액질 치료요법(즉, 어유 보충제), 항-우울제, 아편성 및 비아편성 진통제, 항생제, 코르티코스테로이드의 선택적 사용, 혈소판/호중구 성장 인자가 허용된다.

[2502] 지속적인 비스포스포네이트 치료요법 또는 핵인자 카파 β 리간드 치료요법(예컨대, 데노수맙)의 항-수용체 활성화제를 받고 있는 연구에 참가하는 환자는 연구 참여 기간 동안 이러한 제제를 계속 투여받을 수 있다. 의학적 거세로 고나도트로핀 방출 호르몬(gonadotrophin releasing hormone; GnRH) 작용제를 투여받고 있는 내성 전립선암(resistant prostate cancer) 환자는 연구 기간 동안 GnRH 작용제를 계속 투여받아야 한다. LHRH 효능제를 투여받고 있는 진전된 전립선 암 환자는 연구 참여가 허용되며 연구 치료 기간 동안 이러한 제제를 계속 사용하여야 한다.

[2503] ***금지된 투약/치료요법***

[2504] 등록된 환자는 이러한 프로토콜*(예컨대, 항-PD-1/PD-L-1 항체)*에 따라 지시된 경우를 제외하고는, 세포독성 화학치료제, 항암 티로신 키나제 억제제, 면역치료요법, 또는 치료용 mAb를 포함한 연구 또는 승인된 항암제를 받지 못할 수 있다. 완화적 방사선은 기존의 비진전된 전이/증상에 대해 수행되고 좁은 방사선 포트(예컨대, 고립성 골 병변(solitary bone lesion)를 수반하지 않는 한 연구 등록 동안 허용되지 않는다. 생 또는 약독화 생 백신은 연구 치료의 첫 번째 투여 전 30일 이내에 및 연구에 참여하는 동안 허용되지 않는다. 전신 글루코코르티코이드는 다음의 목적으로만 허용된다: 구토 예방을 위해 필요에 따라, 면역학적 병인이 의심되는 AE의 증상을 조절, IV 조영제 알레르기(allergy)에 대한 사전-투약, COPD 악화의 경우, 또는 10mg/일의 프레드니손 등가물을 초과하지 않는 만성 전신 대체의 경우 에 대한 >10mg/일 용량에서 프레드니솔론 등가물의 단기 경구 또는 IV 사용.

[2505] 환자는 매일 프레드니손 10mg에 상응하는 용량보다 높은 용량으로 지속적인 전신 스테로이드 치료를 받아서는 안된다. 매일 프레드니손 10mg에 상응하는 용량보다 높은 용량의 지속적인 전신 스테로이드 치료가 요구되는 경우, E 스테로이드가 기준선으로 다시 줄어들 때까지 HMBD-002를 투여하지 않아야 한다.

[2506] 19.7 환자 집단

[2507] 용량 증량 단계 동안, 대략 40-50명의 환자를 치료한다. 이 추정치는 HMBD-002로 치료되는 현재 이용가능한 치

료법에 대해 재발성/난치성인 고형 악성 종양을 지닌 25 내지 30명 및 15 내지 20명의 환자를 포함한다.

[2508] 확장 단계는 단독요법으로서 HMBD-002으로 치료받은 삼중 음성 유방 암(TNBC) 및 비-소 세포 폐 암(NSCLC) 환자 각각 15 내지 30명(35명 이하), 및 HMBD-002로 치료된 다른 악성 종양을 지닌 50명 이하의 환자의 치료를 포함한다. 어떤 NSCLC 또는 TNBC 코호트에서 충분한 활성이 관찰된 경우, 코호트는 35명의 환자로 확장될 수 있다.

[2509] 모든 환자는 치료 전(연구 치료요법 투여 전) 흉부/복부/골반에 대한 영상(컴퓨터 단층촬영(computed tomography; [CT]) 스캔, 또는 필요한 경우, 자기 공명 영상(magnetic resonance imaging; MRI)을 받아야 하고; 이의 제1의 연구 치료요법 용량 전 21일 이내에 종양 생검이 요청된다(환자가 확장 단계에 등록되어야 하는 경우). 의료 모니터가 허용한 경우에만 연속적인 종양 생검을 받지 않고 환자가 등록되는 상황이 있을 수 있다. 피부, 피하 또는 림프절 전이가 있는 환자는 신체 검사의 수단에 의해 종양 평가(자를 사용한 측정 포함)를 받을 수 있다. 종양 측정 및 질환 반응 평가는 또한 주기 2의 말기에 수행되어야 하고, 이후 PD가 발생할 때까지 2주기마다 수행된다. 종양 측정 및 질환 반응 평가도 또한 EOT 방문 시 수행되어야 한다. 또한, 종양 마커의 측정은 마커가 주어진 악성종양 환자의 임상 관리에 사용되고 환자가 주어진 마커의 상승을 알고 있는 상황에서 강력히 권장된다. 용량 증량 단계에서 MTD 근처 또는 MTD에서 HMBD-002 용량에 등록된 모든 환자, 및 확장 단계에 등록된 모든 환자는 주기 1 치료 전 및 주기 2 종료 시 또는 이른 경우, 환자가 절차 관련된 사망률의 절대적인 위험 및 환자의 임상 셋팅에서 및 기관에서 절차를 완료시에 주요 이환율이 2% 이상인 것으로 추정된 경우이지 않는 한, PD의 시점에 연속 종양 생검을 수행하도록 요청될 것이다. 그렇지 않으면, 보관된 종양 표본을 제출하여야 한다.

[2510] *19.7.1 포함 기준*

[2511] 1. 환자는 악성 고형 암에 대한 조직학적 또는 세포학적 증거(임의의 조직학)를 가져야 하며, 임상적 이점을 부여하는 것으로 알려진 치료요법이 이용가능하지 않은 진전된 또는 전이성 질환을 가져야 한다.

[2512] 2. 용량 증량 단계에 등록된 환자는 이용가능한 표준 전신계 치료요법에 대해 내성이거나 또는 이후 재발되거나, 또는 이에 대해 표준 전신계 치료요법 또는 의사의 판단에서 임상적 이점을 야기하는 경향이 있는 충분한 치료요법이 존재하지 않거나 또는 이러한 치료요법이 환자에 의해 거부된 질환을 가져야 한다. 임상적 이점을 야기할 수 있는 표준 치료요법을 제공받지 않은 환자에 대해서는 이유의 문서가 제공되어야 한다.

[2513] 3. 종양 조직(최소 10개에서 15개 이하의 염색되지 않은 슬라이드), 또는 이상적으로는 환자의 가장 최근 생검으로부터의 파라핀 블록은 연구 센터로 전달할 계획에 따라 위치하여야 하거나 또는 연구 요법의 첫 번째 투여 전에 이용가능하여야 한다. 신선한 종양 생검은 보관된 샘플을 사용하는 것보다 바람직하며, 생검 절차가 사망률이 없는 것으로 정의된 유의미한 위험 절차가 아니거나 환자의 임상 셋팅 및 기관이 절차를 완료 시 주요 이환율이 2% 이상인 것으로 추정되는 한 보관된 샘플이 이용가능하지 않는 경우 수득될 것이다. 생검 위험에 대한 문서를 검토하고 새로운 생검에 대한 요구 사항을 면제하기 위해서는 의료 추적자와 접촉하여야 한다.

[2514] a. 확장 단계에 등록된 환자는 스크리닝 주기 동안 및 주기 2의 종료시(16일 내지 21일; ± 2일) 또는 보다 이른 경우, 절차가 상기 정의한 바와 같은 유의적인 위헌 절차가 아닌 경우, PD의 시기에 종양 생검을 진행하는 것이 요청될 것이다.

[2515] 4. 환자는 고형 종양에서 반응 평가 기준(RECIST) 버전 1.1(부록 A)로 측정할 수 있는 질환을 가져야 한다. 이전에 방사선 치료요법을 받은 환자의 경우, 측정 가능한 병변이 방사선 후 해당 부위에서 질환 진행이 기록되지 않는 한, 이전 방사선 필드(field)(들) 외부에 있어야 한다.

[2516] 5. 환자는 동의서에 서명할 당시 ≥18세이다.

[2517] 6. 환자는 ECOG PS가 ≤1이다.

[2518] 7 환자는 다음에 의해 문서화된 것으로서, 적절한 기본선 기관 기능을 갖는다:

[2519] a. 콕크로프타-다우트 식(Cockcroft-Gault formula)으로 계산한 것으로서, 크레아티닌 제거율(CrCL) ≥30Ml/분:

[2520] i. CrCl(남성) = ([140-연령] x 체중 kg)/(혈청 크레아티닌 x 72)

[2521] ii. CrCl(여성) = CrCl(남성) x 0.85

[2522] b. 비리루빈 ≤.5 x 기관의 ULN.

[2523] c. AST 및 ALT ≤2.5 x 기관의 ULN. 환자가 간 전이를 갖는 경우, 환자는 ALT 및 AST <5 x 기관의 ULN을 가질 수 있다.

[2524] 8. 와파린 또는 다른 경구 항응고제를 복용하지 않는 환자의경우: 국제 표준화 비율(international normalized ratio; INR) ≤1.5 또는 프로트롬빈 시간(PT) ≤1.5 x ULN; 및 부분 트롬보플라스틴 시간 또는 활성화된 부분 트롬보플라스틴 시간(PTT 또는 aPTT) ≤1.5 x ULN. 와파린을 복용하는 환자는 안정한 INR <3.5를 야기하는 안정한 용량이어야 한다. 다른 경구 항응고제 치료를 받고 있는 환자 중에서, PT 또는 aPTT는 항응고제의 의도된 치료 범위 내에 있어야 하고/하거나 SC 치료요법은 기관별로 표준으로 모니터링되어야 한다.

[2525] 9. 환자는 다음에 의해 입증되는 것으로서, 적절한 기본선 혈액학적 기능을 갖는다:

[2526] a. ANC $\geq 1.5x10^9/L$.

[2527] b. 헤모글로빈 ≥9g/dL 및 이전 14일 동안 적혈 세포(RBC) 수혈이 없음.

[2528] c. 혈소판 수 ≥ $100x10^9/L$ 및 이전 14일 동안 혈소판 수혈이 없음.

[2529] 10. 환자는 심장초음파검사(echocardiography; ECHO) 또는 다중 게이트 획득(multi-gated acquisition; MUGA) 스캐닝으로 측정한 것으로서 ≥45%의 *좌심실 박출률(left ventricular ejection fraction; LVEF)을 갖는다.*

[2530] 11. 여성 참가자는 임신 중이 아니고 수유 중이 아니며, 다음 조건 중 하나에 해당하는 경우 참가할 수 있다:

[2531] a. 가임 여성(WOCBP)이 아님.

[2532] b. 치료 기간 및 연구 치료의 마지막 용량 후 적어도 120일 동안 피임 지침을 따르는 데 동의한 WOCBP.

[2533] c. 환자가 WOCBP인 경우, 치료 전 72시간 이내에 혈청 또는 소변 임신 검사 결과가 음성이었다.

[2534] 12. 남성 환자는 연구 기간 동안 및 연구 치료의 마지막 투여 후 120일 동안 피임 지침을 따르는 데 동의하는 경우 참여할 자격이 있다.

[2535] 19.7.2 HMBD-002 확장 코호트에 대한 포함 기준:

[2536] **TNBC**

[2537] 1. 환자는 전이성인 TNBC에 대한 조직학적 또는 세포학적 증거를 가져야 한다. TNBC는 임상의의 평가에 따라 정의되며 2018년 미국 임상 종양학회(American Society of Clinical Oncology; ASCO)/미국병리학회(College of American Pathologists; CAP) 기준에 의해 사람 표피 성장 인자 수용체 2(HER2) 음성, 에스트로겐 수용체(ER) ≤ 10% 및 프로게스테론 수용체를(PR) ≤10%를 포함할 수 있다.

[2538] 2. 치료를 시작하기 위해 VISTA IHC+ 종양에 대한 문서가 요구되지는 않지만, 환자는 스크리닝 기간 동안 및 주기 2의 종료시(16 내지 21일; ± 2일) 또는 보다 이른 경우, 절차가 이에 대해 사망률의 절차 관련된 절대 위험 또는 환자의 임상 셋팅에서 및 기관이 절차를 완료시에 주요 이환율이 2% 이상인 것으로 추정된 것으로 정의된 것으로서 유의적인 위험 절차가 아닌 경우, PD의 시기에 종양 생검을 가질 것이다. 그렇지 않으면, 환자는 보관된 종양 표본을 제출할 것이다.

[2539] 3. 환자는 TNBC에 대해 적어도 하나의 이전 요법을 사용한 적절한 치료를 받았어야 하며 임상적 이점을 부여하는 것으로 알려진 이용가능한 치료요법이 없어야 한다.

[2540] **NSCLC**

[2541] 1. 환자는 진전된 질환인 NSCLC의 조직학적 또는 세포학적 증거를 가져야 한다.

[2542] 2. 치료를 시작하기 위해 VISTA IHC+ 종양에 대한 문서가 요구되지는 않지만, 환자는 스크리닝 기간 동안 및 주기 2의 종료시(16 내지 21일; ± 2일) 또는 보다 이른 경우, 절차가 이에 대해 사망률의 절차 관련된 절대 위험 또는 환자의 임상 셋팅에서 및 기관이 절차를 완료시에 주요 이환율이 2% 이상인 것으로 추정된 것으로 정의된 것으로서 유의적인 위험 절차가 아닌 경우, PD의 시기에 종양 생검을 가질 것이다. 그렇지 않으면, 환자는 보관된 종양 표본을 제출할 것이다.

[2543] 3. 환자는 상피 성장 인자 수용체(EGFR) 또는 역형성 림프종 키나제(ALK)의 활성화 돌연변이를 가지지 않아야 한다.

[2544] 4. 환자가 이에 대한 FDA-승인된 표적 치료요법이 가능한 다른 게놈 이상(예, ROS 재배열, BRAF V600E 돌연변이, met 엑손 14 스키핑(skipping) 돌연변이)을 지닌 경우 환자는 FDA-승인 표적화된 치료요법을 받았야 하지만, 이전 치료를 받은 이러한 환자는 이러한 치료를 사용하여 문서화된 전체 생존율에서의 개선에 대해 사전 동의를 받은 경우 자격이 있다.

[2545] 5. 환자는 NSCLC에 대해 FDA-승인된 또는 비교가능한 표준 치료법 중 하나에서 질병 진전을 가져야 한다.

[2546] 6. 환자는 프로그램된 사멸 수용체-1(*programmed death receptor-1;* PD-1) 또는 PD-l1에 대한 mAb로 적절한 사전 치료를 받아야 하지만, 사전 치료를 받지 않은 이러한 환자는, 이들이 전반적인 생존에서의 개선이 이러한 치료료 입증되었음을 이들에게 통지하는 적절한 동의서(사전 동의서)를 제공하는 한, HMBD-002 단독요법을 받을 자격이 있다.

[2547] **다수의 다른 암**

[2548] 1. 환자는 임상 이점을 부여하는 것으로 알려진 이용가능한 치료요법이 없는 TNBC 및 NSCLS 외에, 진전된, 절제불가능한 또는 전이성 암의 조직학적 또는 세포학적 증거를 가져야 한다.

[2549] 2. 치료를 시작하기 위해 VISTA IHC+ 종양에 대한 문서가 요구되지는 않지만, 환자는 스크리닝 기간 동안 및 주기 2의 종료시(16 내지 21일; ± 2일) 또는 보다 이른 경우, 절차가 이에 대해 사망률의 절차 관련된 절대 위험 또는 환자의 임상 셋팅에서 및 기관이 절차를 완료시에 주요 이환율이 2% 이상인 것으로 추정된 것으로 정의된 것으로서 유의적인 위험 절차가 아닌 경우, PD의 시기에 종양 생검을 가질 것이다. 그렇지 않으면, 환자는 보관된 종양 표본을 제출할 것이다.

[2550] 3. 환자는 이의 암에 대한 적절한 치료를 받았거나 이용가능한 치료요법이 이용가능하지 않아야 한다.

[2551] *19.7.3 배제 기준*

[2552] 1. 환자는 항-PD-1, 항-PD-L1, 또는 항 PD L2 제제 또는 다른 자극성 또는 공-억제성 T-세포 수용체(예컨대, CTLA-4, OX 40, CD137)에 대해 지시된 제제로 치료를 받은 적이 있고, 등급 3 또는 그 이상의 면역-관련 부작용(irAE)으로 인해 해당 치료를 중단하였다. 이는 세포 치료법을 사용한 사전 치료로 인한 irAE에 적용되지 않는다.

[2553] 2. 환자는 치료 2주 이내에 이전 방사선 치료를 받았다. 참가자는 모든 방사선-관련된 독성으로부터 회복되었고, 코르티코스테로이드가 필요하지 않으며, 방사선 폐렴(*pneumonitis*)을 가지지 않았다. 비-중추신경계(CNS) 질환에 대한 ≤2주의 방사선치료요법의 제한된 포트를 사용한 완화 방사선의 경우 1주간의 휴약이 허용된다.

[2554] 3. 환자는 연구 투약의 첫 번째 투여 6개월 이내에 >30 Gray(Gy)인 폐에 대한 방사선 치료를 받았다.

[2555] 4. 환자는 연구 치료요법 투여 전 14일 이내, 또는 5일의 반감기(어느 쪽이든 보다 짧은(니트로소우레차 또는 미토마이신-C의 경우 42일; 황체화 호르몬 방출 호르몬(LHRH) 효능제를 제공받은 진전된 전립선 암 환자는 연구에 허용되며 연구 치료 동안 이러한 제제의 사용은 지속될 수 있다))*에 세포 독성 화학치료요법, 모노클로날 항체 및/또는 소 분자 타이로신 키나제 억제제, 또는 5-반감기 를 포함한 항암 치료요법으로 치료를 받았다.*

[2556] 5. 환자는 동종 조직/고형 기관 이식을 받았다.

[2557] 6. 환자는 제1 연구 개입 전 30일 이내에 생 또는 약독화 생백신을 접종받았다. 사 백신과 RNA 백신(예컨대, COVID-19)의 투여는 허용된다.

[2558] 7. 환자는 HMBD-002를 사용한 치료 또는 VISTA를 표적화하는 다른 시험 제제를 제공받았다.

[2559] 8. 참가자가 대수술을 받은 경우, 참가자는 연구 개입을 시작하기 전에 절차 및/또는 수술로 인한 합병증으로부터 적절하게 회복되어야 한다.

[2560] 9. 환자는 시험 제제의 연구에 참여하고 있거나 참여했거나 또는 연구 치료의 제1 투여 이전 4주 이내에 임상시험용 장치를 사용하였다.

[2561] 10. 환자는 이전 치료법으로 인해 모든 AE에서 ≤ 등급 1 또는 기준선으로 회복되어야 한다. 등급 2 탈모증(*alopecia*) 및/또는 신경병증(*neuropathy*)이 있는 참가자는 자격이 있을 수 있다. 치료 또는 호르몬 대체가 요구되는 내분비0관련 AE 등급 ≤2인 참가자는 자격이 될 수 있다. 실험실 이상을 야기한 이전 독성은 포함 기준

에 의해 더 높은 등급의 이상이 허용되지 않는 한 등급 ≤1로 해결되어야 한다. 실험실 이상 치료를 위해 의학적 치료가 요구되는 경우, 용량과 실험실 값(들)은 안정적이어야 한다.

[2562] 11. 환자는 과거에 전신 치료를 요구했던 활성 자가면역 질환을 갖는다. 적어도 2년 동안 전신 치료가 요구되지 않은 환자는 의학 추적자와 논의 후 허가를 받으면 등록될 수 있다(대체 치료요법, 예컨대, 티록신, 인슐린, 또는 부신 또는 뇌하수체 부전을 위한 생리학적 코르티코스테로이드 대체 치료요법은 전신계 치료의 형태에 고려되지 않고 허용된다).

[2563] 12. 환자는 제어되지 않는 엔도크린 장애를 갖는다.

[2564] 13. 환자는 임상적으로 유의적인 심혈관 질환(cardiovascular disease)(예컨대, 제어되지 않거나 또는 임의의 뉴욕 심장 협회(New York Heart Association) 부류 3 또는 4 심부전(heart failure), 제어되지 않는 협심증(uncontrolled angina), 심근경색의 병력(history of myocardial infarction), 불안정한 협심증(unstable angina) 또는 연구 시작 전 6개월 이내에 뇌졸중(stroke), 제어되지 않는 고혈압(uncontrolled hypertension) 또는 투약으로 제어되지 않는 임상적으로 유의적인 부정맥(arrhythmias))을 갖는다.

[2565] 14. 환자는 (비-감염성) 폐렴의 병력이 있거나 스테로이드가 요구된 간질성 폐 질환(interstitial pulmonary disease) 또는 현재 폐렴 또는 간질성 폐 질환을 갖는다.

[2566] 15. 환자는 연구자의 의견으로 연구 기간 동안 환자를 폐 합병증(*pulmonary complication*)의 유의적인 위험에 빠질 수 있는 제어되지 않는, 임상적으로 유의적인 폐 질환(예컨대, 만성 폐쇄성 폐 질환(*chronic obstructive pulmonary disease*), 폐 고혈압(*pulmonary hypertension*))을 갖는다.

[2567] 16. 환자는 펨브롤리주맙 및/또는 임의의 이의 부형제에 대해 중증의 과민성 반응(등급 3)을 나타내었다.

[2568] 17. 환자는 면역결핍증(*immunodeficiency*) 진단을 받거나 만성의 전신 스테로이드 치료요법(프레드니손 등가물을 매일 10mg을 초과하여 투여) 또는 연구 약물의 제1 투여 전 7일 이내에 임의의 다른 형태의 면역억제 치료요법을 받는다. 흡입된 또는 국소 스테로이드는 활성의 자가면역 질환이 없는 경우 허용된다.

[2569] 18. 환자는 치료요법이 요구되는 제어되지 않는 감염, 파종성 혈관 내 응고(*disseminated intravascular coagulation*), 정신병(*psychiatric illness*), 약물 남용(*drug abuse*) 또는 연구 요건사항 준수를 제한하는 사회적 상황을 포함하나, 이에 한정되지 않는 제어되지 않는 병발성 질병(uncontrolled intercurrent illness)을 갖는다.

[2570] 19. *치료 조사관의 의견으로,* 연구 결과를 혼란스럽게 할 수 있는 임의의 상태, 치료요법, 또는 실험실 이상에 대한 병력 또는 현재 증거를 갖거나, 연구 전체 기간 동안 참가자의 참여를 방해하거나, 또는 참여하는 것이 참가자에게 최선의 이익이 되지 않는 *경우.*

[2571] 20. 환자는 사람 면역결핍 바이러스(HIV)에 대해 양성 상태인 것으로 알려져 있다. 지역 보건 당국이 지시하지 않는 한 HIV 검사는 필요하지 않다.

[2572] 21. B형 간염(HBsAg 반응성으로 정의됨) 또는 공지된 활성 C형 간염 바이러스(HCV RNA 검출로 정의됨) 감염의 공지된 병력을 갖는다. B형 간염과 C형 간염에 대한 검사는 지역 보건 당국에서 의무화하지 않는 한 요구되지 않는다.

[2573] 22. 환자는 산소 의존성이다.

[2574] 23. 환자는 연구자의 견해로 환자에게 독성에 대한 허용불가능한 높은 위험을 초래하는 임의의 의학적 상태를 갖는다.

[2575] 24. 환자가 백신 접종을 완전히 받지 않은 경우, 환자는 연구 치료 1주 이내에 음성 COVID 시험을 가져야 한다.

[2576] 25. 환자는 진행 중인 추가적인 활성의 악성 종양을 갖거나 또는 지난 3년 이내에 활성 치료를 요구하였다. 실질적인 재발 가능성이 있는 과거 암 병력이 있는 환자는 연구 도입 전에 의료 추적자와 논의하여야 한다. 다음의 동반 신생물 진단된 환자가 자격이 있다: 비-흑색종 피부암(non-melanoma skin cancer), 상피내 암종(carcinoma in situ)(예를 들면, 이행 세포 암종(transitional cell carcinoma), 자궁경부 상피내 종양(cervical intraepithelial neoplasia), 유방 암, 및 상피내 흑색종(melanoma in situ)), 진행성 질환의 증거가 없는 장기 국한 전립선 암(organ-confined prostate cancer with no evidence of progressive disease).

[2577] 26. 환자는 활성 CNS 전이 및/또는 암종성 수막염(carcinomatous meningitis)을 앓고 있는 것으로 알려져

있다. 이전에 치료받은 뇌 전이가 있는 참가자는 방사선학적으로 안정한 경우, 즉 반복된 영상화에 의해 적어도 4주 동안 진행의 증거가 없고, 임상적으로 안정하고 연구 치료의 제1 투여 전 적어도 14일 동안 스테로이드 치료가 필요하지 않은 경우 참여할 수 있다. CNS 침범 병력이 있는 환자의 경우, 연구 스크리닝 동안에 반복 영상화를 수행할 수 있다. 그러나, CNS 침범에 대한 임상적 의심이 없는 한 연구 시작 전에 CNS 영상화는 요구되지 않는다.

[2578] 27. 환자는 임신 또는 수유 중이다.

[2579] *19.7.4 안전성 연구 및 부작용*

[2580] 안전성은 AE, 임상 실험실 시험, 신체 검사, 활력 징후(VS) 측정, 심전도(ECG) 및 동부 종양학 협력 그룹(*Eastern Cooperative Oncology Group;* ECOG) 수행 상태(PS)의 문서화에 의한 연구 동안 평가될 것이다.

[2581] ***안전성 평가***

[2582] 안전성 평가는 DLT, AE, 심각한 AE(SAE), 신체 검사, VS 측정, ECOG PS, 임상 실험실 평가 및 독성으로 인한 치료 중단 이유를 포함한다. AE 보고 기간은 환자 또는 위임 대리인이 ICF에 서명한 시점부터 시작되어 90일까지 지속된다. 프로토콜에 명시된 AE 보고 기간 동안 치료받은 환자에게 발생하는 모든 AE는, 사건이 HMBD-002와 관련된 것으로 간주되는지 여부에 관계없이, 보고되어야 한다. 연구자가 HMBD-002와 관련하여 평가하는 AE 보고 기간 이후에 발생하는 어떠한 공지된 불리한 사건도 또한 AE로 보고되어야 한다.

[2583] ***효능 평가***

[2584] 효능 평가는 질환 반응 및 진행, 반응 기간 및 생존을 포함한다.

[2585] ***생물학적/표적/상관관계 연구***

[2586] 연구의 용량 증가 단계에 있는 환자의 경우, 환자의 가장 최근 생검에서 수득한 종양 조직(염색되지 않은 슬라이드, 또는 파라핀 블록)은 연구 치료요법으로 치료하기 전에 이용 가능하여야 한다. *새로운 생검으로부터의 슬라이드가 선호되지만,* 보관된 조직이 없고 생검이 환자의 최선의 이익이 아니라고 연구자가 간주하는 경우(즉, 사망율의 절대 위험과 관련된 것으로 정의된 유의적인 위험 절차가 필요하거나 또는 환자의 임상 셋팅 및 기관이 절차의 완료시 주요 이환율이 2% 또는 그 이상인 경우), 의료 추구자는 이러한 요건을 면제할 수 있다.

[2587] TNBC, NSCLC 및 기타 암 환자의 경우, 연구자는 연구에 대한 사전 동의를 한 후 스크리닝 기간에 생검을 수득하여야 한다. VISTA IHC+ 종양에 대한 문서화는 치료를 시작하는 데 요구되지 않지만, 생검 절차는 이에 대해 사망율의 절차 관련된 절대 위험 또는 환자의 임상 셋팅 및 기관이 절차를 완료시 주요 이환율이 2% 또는 그 이상인 것으로 추정된 것으로 정의된 바와 같은, 유의적인 위험 절차가 아니어야 한다. 달리는, 환자는 보관된 종양 표본을 제출할 것이다. 앞서 기술된 바와 같이, 모든 생검 절차에 적합한 환자는 주기 2의 종료 전 주(16 내지 21일; ± 3일)에, 또는 PD가 보다 이른 경우 PD에 수행된 후속 종양 생검을 가질 것이다.

[2588] 치료 전 및 치료 후 생검은, 이것이 위에 정의된 바와 같이 유의적인 절차 위험을 지니지 않는 경우, VISTA 및 PD-L1 발현을 평가할 뿐 아니라, 치료 전, 치료 동안, 및 치료 후 VISTA 및 PD-L1의 발현에서 HMBD-002를 사용한 치료의 효과를 연구하고, 측정을 항-종양 활성과 연관시키기 위해 사용될 것이다. 또한, 순환하는 면역 세포 및 종양 미세환경(TME) 내 면역 세포에 대한 HMBD-002의 정량적 및 정성적 효과를 조사할 것이다. VISTA IHC+ 면역 세포에 대한 치료 효과에 중점이 이루어질 것이다.

[2589] AE는 의약 생성물을 투여받은 임상 연구 환자에서 임의의 원치않는 의학적 사건으로 정의되며, 이는 반드시 이러한 치료와 인과 관계가 각지 않는다. 따라서 AE는 의약(시험) 생성물과 관련이 있는지 여부에 관계없이, 의약(시험) 생성물의 사용과 일시적으로 관련된 모든 바람직하지 않고 의도하지 않은 신호(예를 들면, 비정상적인 실험실 소견), 증상, 또는 질환일 수 있다. 이는 기존 상태 또는 사건*의 악화*, 병발 질병, 약물 상호작용 또는 특정 효능 평가에 따라 eCRF에 있어서 다른 곳에서는 기록되지 않은 조사 중인 징조의 유의적인 악화를 포함한다.

[2590] 연구 하에 암의 진행은 이것이 입원 또는 사망을 야기하지 않는 한 AE로 고려되지 않는다.

[2591] AE 사건은 연구 투약과 명확하게 관련되지 않는 한 연구 투약에 관련된 것으로 고려될 것이다.

[2592] AE의 중증도는 NCI CTCAE 버전 5에 따라 등급이 지정될 것이다. AE의 중증도에 변화가 있는 경우, 이는 별개의 사건으로 기록되어야 한다. NCI CTCAE에 포함된 것으로 나열되지 않은 AE의 경우, 중증도는 다음과 같이 측정될

수 있다:

| | |
|---|---|
| **등급 1 (경증)** | 연구 치료의 지속시 사라지거나 용이하게 견디어지는 부작용. |
| **등급 2 (중간)** | 일상적인 업무 활동을 방해하기에 충분히 불편한 부작용. |
| **등급 3 (중증)** | 작업을 할 수 없거나 일상 활동을 수행할 수 없는 무능력을 초래하는 부작용. |
| **등급 4 (생명-위협)** | 잠재적으로 삶을 위협하는 부작용. |
| **등급 5 (사망)** | 부작용과 관련된 사망. |

[2593]

[2594] 19.8 약동학, 약력학 및 생물학적 평가

[2595] PK 및 약력학적 분석을 위한 일련의 혈액 샘플을 모든 환자로부터 수집할 것이다.

[2596] HMBD-002의 혈청 농도에 대해 약동학을 특성화하고 비구획 방법을 사용하여 분석할 것이다. 계산할 약동학적 매개변수(추정에 적절한 데이터가 있는 경우)는 $C_{max}$, AUC, $t_{½}$, CL 및 $V_d$를 포함하나 이에 한정되지는 않는다. HMBD-002의 농도 및 PK 매개변수는 기술된 통계를 사용하여 각각의 용량-수준 코호트에 대해 요약될 것이다.

[2597] 용량 증량 단계:

[2598] · HMBD-002:

[2599] o HMBD-002의 혈청 농도를 측정하기 위한 집중 스케쥴이 주기 1 및 2에서 수행될 것이다. 주기 1에서 혈액은 치료 후 1 및 8일째에 샘플링될 것이다(예비 치료; 주입 종료 시, 및 다음 주입 후 다음 시간 - 1, 6, 24, 48 및 72시간 및 단독치료요법 코호트에서만 8 및 15일째), 뿐만 아니라, 예비치료 및 15일째 주입 종류시 및 주기 2에서 다음 시간: 1일째(예비치료; 주입 종료시, 및 다음의 주입 후 시간에 - 1, 6, 24, 48, 및 72시간 및 8 및 15일째(예비치료 및 주입 종료시). 임상 데이터가 허용되는 경우 72시간 PK 시점은 제거될 수 있다. 필수적으로, PK는 모든 환자에서 2개의 용량 수준, 즉 1일째(33% 또는 50% 용량) 및 8일째(100% 용량)에 수행될 것이다. 치료 스케쥴이 (3주마다 1, 8일째) 또는 3주마다 1일째로 수정되는 경우, 동일한 HMBD-002 PK 샘플링 스케쥴이 사용될 것이다. 둘 다의 경우, PK 샘플링은 8일 및 15일째에 수행될 것이다(약물 치료를 수행하지 않는 경우 치료 후 샘플링은 없을 것이다).

[2600] o 혈액은 또한 후속적인 주기(예비치료 및 주기 3 내지 6, 8, 10, 15에서 1일째에 주입 말기)에서 별개로 샘플링될 것이다.

[2601] 용량 확장 단계:

[2602] · HMBD-002:

[2603] o 제한된 혈액 샘플링은 표 1, 표 2, 표 3, 표 4에 나타낸 제한된 시점에서 HMDB-002의 혈청 농도를 평가하기 위해 수행될 것이다.

[2604] o 시간 경과에 따른 혈청 농도 데이터를 사용하여 HMBD-002의 PK 성향을 특성화하고, 초기 투여와 정체 상태 사이, 및 치료의 주기 사이에서 HMBD-002의 PK 특성의 모든 변화를 평가하고, HMBD-002의 PK 특성을 독성 및 항암 활성과 관련시킬 것이다.

[2605] 생물마커는 연구 전체에서 평가될 것이다.

[2606] 생체시료(혈액 성분, 종양 물질 등)는 세포, 순환하는 분자 및 기타 생물마커(예컨대, 단백질, 데옥시리보핵산[DNA], 리보핵산[RNA], 대사산물)의 분석을 지원하기 위해 수집될 것이다. 다양한 혈액 및 종양 생물마커의 변화는 생물학적 활성에 대한 증거를 제공할 수 있으며 HMBD-002의 사용을 안내할 수 있는 통찰력으로 이어질 수 있다.

[2607] 순환하는 혈청 사이토킨, 예컨대, IL-2, IL-6, IL-8 및/또는 TNFα를 측정할 수 있다. 혈청 사이토킨은 주기 1의 1, 8, 15일째 및 주기 2의 1일째에 측정될 수 있다.

[2608] 임상 평가는 크레아티닌, 혈액 우레아 질소(BUN), 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제(AST 또는 SGOT), 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT 또는 SGPT), 알칼리성 포스파타제(AP), 총 빌리루빈, 혈청 알부민, 혈청 총 단백질(TP), 중탄산나트륨, 칼륨, 클로라이드, 글루코스, 포스페이트, 칼슘, 트리글리세리드, C-반응성 단백질, 페리

틴, 헤모글로빈, 헤마토크릿, 백혈 세포(WBC) 수(총 및 차등), 적혈 세포(RBC) 수 , 혈소판 수, 평균 미립자 용적(MCV), 평균 미립자 헤모글로빈(MCH) 및 평균 미립자 헤모글로빈 농도(MCHC)의 혈청/혈액 수준의 측정을 포함한다.

[2609] 종양 조직 및 혈액 샘플은 VISTA 표적화제에 대한 주요 분자 변화를 이해하기 위해 게놈 기술(예컨대, 차세대 서열분석 및 기타 기술)을 사용하여 특성화할 수 있다. 관련 유전자 특징을 정의하기 위해 전체 게놈-와이드(wide) 및 표적화된 전령 RNA(mRNA) 발현 프로파일링과 종양 조직 및 혈액 내에서의 서열 분석을 두 다를 수행할 수 있다. 임상시험 집단 내에서 배선 유전 분석(germline genetic analysis)(즉, 단일 뉴클레오타이드 다형성 분석, 전체 엑솜 서열분석, 전체 게놈 서열분석)이 또한 수행될 수 있다.

[2610] 본 연구로부터의 혈액 및 종양 샘플은 면역 프로파일링 및 단백질체학 분석을 거칠 수 있다. 본 연구로부터의 종양 샘플은 면역 세포와 암 세포에 대한 단백질체학 분석(예컨대, VISTA, PD-L1 IHC)을 거칠 수 있다. 이러한 조직 샘플은 디지털 병리학 분석 및 다중 면역형광법을 겪을 수 있다. 또한, 종양-침윤 백혈구의 존재와 변화, 면역-관련된 mRNA 발현 특징, 및 VISTA와 PD-L1 발현을 또한 평가할 수 있다.

[2611] 종양 조직 및 혈액 샘플(혈액 유래된 단백질을 포함함)은 면역검정, 유동 세포분석법, 액체 크로마토그래피/질량 분석법을 포함하나 이에 한정되지 않는 다양한 플랫폼을 사용하여 단백질체학 분석에 적용할 수 있다. 효소결합 면역검정과 같은 검정은 혈청 내 이러한 단백질을 측정한다.

[2612] 또한, 위에 요약된 종양 및 혈액 프로파일링, 추가의 조사를 스크리닝 및 치료 후 취한 생체 시료의 구성성분을 사용하여 수행할 수 있다. 환자로부터의 단백질 또는 세포는 추가적인 생체외 연구(예컨대, 세포 증식, 세포 독성 등)를 위해 실험실 시약과 조합될 수 있다.

[2613] ***항-약물 항체의 평가***

[2614] 모든 환자는 용량 증량 및 용량 확장 단계에서 ADA의 HMBD-002로의 개발 및 정량화에 대해 평가될 것이다. 혈액 샘플링은 주기 1 내지 6의 예비치료에서 수행되고, 그 이후에는 2개 주기마다 및 연구 종료 시(EOS) 수행될 것이다.

[2615] 19.9 항-종양 활성의 평가

[2616] 종양 측정은 예컨대, 하기 설명된 바와 같이, 연구 전체에서 이루어질 것이다.

[2617] 질환 진행 및/또는 치료 효능은 고형 종양에서 반응 평가 기준(Response Evaluation Criteria in Solid Tumours; RECIST) v1.1에 따라 측정된다.

[2618] 전체 반응률(ORR)은 RECIST v.1.1에 따라 완전한 반응(complete response; CR) 또는 부분 반응(partial response; PR)을 달성한 환자의 비율로 정의된다. 반응 기간(DoR)은 PR에 대한 측정 기준이 처음 충족된 날짜부터 PD에 대한 측정 기준이 처음 충족된 날짜까지의 시간으로 정의된다. CR의 지속기간(DoCR)은 CR의 측정기준이 충족된 날짜부터 PD에 대한 측정기준이 처음 충족된 날까지의 시간으로 정의된다. 무진행 생존(PFS)은 연구 치료요법의 개시일부터 PD 또는 임의 원인으로 인한 사망에 대한 측정 기준이 처음 충족되는 날짜 중 먼저 발생하는 날짜까지의 시간으로 정의된다. PFS6은 연구 치료요법 시작 후 6개월(26주)째에 생존하고 무진행인 환자의 퍼센트로 정의된다. 전체 생존(OS)은 연구 치료요법 시작일부터 임의의 원인으로 인한 사망일까지의 시간으로 정의된다.

[2619] ORR 및 PFS6에 대한 시험은 15%의 1-측 제1형 오류율(1-sided type I error rate)을 사용하는 단일-샘플 이항 시험(one-sample binomial test)을 통해 이루어질 것이다. PFS, DoR, DoCR, 및 OS에 대한 분포는 카플란-마이어 방법론에 의해 평가될 것이다.

[2620] **고형 종양에서 새로운 반응 평가 기준(RECIST 기준): 개정된 RECIST 가이드라인(버전 1.1)**. E.A. Eisenhaueret al. (2009). European Journal of Cancer 45: 228-247(이는 이의 전문내용이 본원에 참고로 포함됨).

[2621] 1. 기본선에서 종양의 측정능

[2622] 1.1. 정의

[2623] 기본선에서, 종양 병변/림프절은 다음과 같이 측정가능한 또는 측정불가능한 것으로 분류될 것이다:

[2624] 1.1.1. 측정가능

[2625] 종양 병변: 다음과 같은 최소 크기로 적어도 하나의 직경(측정 평면의 가장 긴 직경을 기록하여야 한다)에서 정

밀하게 측정되어야 한다:

[2626] · CT 스캔으로 10㎜(CT 스캔 슬라이스 두께는 5㎜ 이하, 영상 안내에 대한 부록 II 참조).

[2627] · 임상검사에 의한 10㎜ 캘리퍼 측정(캘리퍼로 정확하게 측정할 수 없는 병변은 측정불가능으로 기록하여야 함).

[2628] · 심장 X-선으로 20 ㎜.

[2629] 악성 림프절: 병리학적으로 확대되고 측정가능한 것으로 고려되기 위해서, CT 스캔으로 평가할 때 림프절이 단축으로 15㎜이여야 한다(CT 스캔 슬라이드 두께는 5㎜ 이하인 것으로 권장됨). 기준선과 후속 조치에서, 짧은 축만이 측정되고 추적된다.

[2630] 1.1.2. 측정불가능

[2631] 작은 병변(가장 긴 직경 <10㎜ 또는 단축이 10 내지 <15㎜인 병리학적 림프절)뿐만 아니라 실제로 측정할 수 없는 병변을 포함한 다른 모든 병변. 실제로 측정불가능한 것으로 고려된 병변은 다음을 포함한다: 연수막 질환(leptomeningeal disease), 복수, 흉막 또는 심막 삼출(pleural or pericardial effusion), 염증성 유방 질환(inflammatory breast disease), 피부 또는 폐의 림프관염 침범(lymphangitic involvement of skin 또는 lung), 재현 가능한 영상 기법으로 측정할 수 없는 신체 검사로 확인된 복부 종괴(abdominal masses)/복부 기관비대(abdominal organomegaly).

[2632] 1.1.3. 병변 측정 가능성에 관한 특별 고려 사항

[2633] 골 병변, 낭포성 병변, 및 이전에 국소 요법으로 치료한 병변은 특별한 설명이 요구된다:

[2634] 골 병변:

[2635] · 골 스캔, PET 스캔 또는 일반 필름은 골 병변을 측정하는 데 적절한 영상 기술로 고려되지 않는다. 그러나, 이러한 기술은 골 병변의 존재 또는 소멸을 확인하는 데 사용될 수 있다.

[2636] · 용질성 골 병변(lytic bone lesion) 또는 식별 가능한 연조직 구성성분이 있고, CT 또는 MRI와 같은 단면 영상 기술로 평가할 수 있는 혼합된 용질-모세포 병변(mixed lytic-blastic lesion)은 연 조직 구성성분이 위에서 기술딘 측정가능성의 정의를 충족하는 경우 측정 가능한 병변으로 고려될 수 있다.

[2637] · 출아형 골 병변(blastic bone lesion)은 측정불가능하다.

[2638] 낭성 병변:

[2639] · 방사선학적으로 정의된 단순 낭종에 대한 기준을 충족하는 병변은 정의에 따라 단순 낭종(simple cyst)이므로 악성 병변(측정 가능하지도 측정 불가능하지도 않음)으로 고려되어서는 않아야 한다.

[2640] · 낭성 전이를 나타내는 것으로 생각되는 '낭성 병변'은 위에서 기술된 측정가능성의 정의를 충족하는 경우 측정 가능한 병변으로 고려될 수 있다. 그러나, 동일한 환자에서 비-낭성 병변이 존재하는 경우, 이는 표적 병변으로서의 선택에 바람직하다.

[2641] 사전 국소 치료를 받은 병변:

[2642] · 이전에 조사된 부위, 또는 다른 국소 부위 치료요법를 받은 부위에 위치한 종양 병변은 병변에 진행이 입증되지 않는 한, 일반적으로 측정가능한 것으로 고려되지 않는다. 시험 프로토콜은 그러한 병변이 측정가능한 것으로 고려될 수 있는 조건을 자세히 설명하여야 한다.

[2643] 1.2. 측정 방법에 의한 명세

[2644] 1.2.1. 병변의 측정

[2645] 모든 측정값은 임상적으로 평가된 경우 캘리퍼를 사용하여 미터법으로 기록하여야 한다. 모든 기본선 평가는 가능한 한 치료 시작과 가까운 시점에 및 치료 시작 전 4주 이하에 수행되어야 한다.

[2646] 1.2.2. 평가 방법

[2647] 동일한 평가 방법과 동일한 기술을 사용하여 기준선 및 추적 관찰 동안에 용이하게 식별되고 보고된 각 병변을 특성화하여야 한다. 추적 중인 병변(들)을 영상화할 수 없지만 임상 검사로 평가할 수 있는 경우를 제외하고는

임상 검사보다는 영상 기반 평가가 항상 수행되어야 한다.

[2648] 임상 병변:

[2649] 임상 병변은 캘리퍼를 사용하여 평가할 때 표면에 있고 직경이 ≥10 mm인 경우(예컨대, 피부 혹(skin nodule)) 에만 측정 가능한 것으로 고려될 것이다. 피부 병변의 경우, 병변의 크기를 추정하기 위해 자를 포함한 컬러 사진으로 문서화하는 것이 제시된다. 위에서 주목한 바와 같이, 임상 검사와 영상 검사 둘 다에 의해 병변을 평가할 수 있는 경우, 영상 평가가 보다 객관적이고 임상 시험 종료 시 검토될 수도 있으므로 영상 평가를 수행하여야 한다.

[2650] 흉부 X-선:

[2651] 특히 진행이 중요한 종점인 경우, 특히 새로운 병변을 확인하는데 있어서 CT가 X선보다 더 민감하기 때문에, 흉부 CT이 흉부 X-선보다 바람직하다. 그러나, 흉부 X-선에서 병변이 명확하게 정의되고 공기 공급된 폐로 둘러싸여 있는 경우, 이는 측정 가능한 것으로 고려될 수 있다.

[2652] CT, MRI:

[2653] CT는 반응 평가를 위해 선택된 병변을 측정하기 위해 현재 이용가능하고 재현 가능한 가장 좋은 방법이다. 이러한 가이드라인은 CT 슬라이스 두께가 5mm 이하이라는 가정을 기준으로 CT 스캔에서 병변의 측정가능성을 정의하였다. CT 스캔의이 5mm보다 큰 슬라이스 두께를 갖는 경우, 측정 가능한 병변의 최소 크기는 슬라이스 두께의 2배이어야 한다. 특정 상황에서는 MRI도 허용된다(예컨대, 신체 스캔의 경우). 객관적인 종양 반응 평가를 위한 CT와 MRI의 사용에 관한 보다 상세한 내용은 문헌:Eisenhauer et al.을 참고한다.

[2654] 초음파:

[2655] 초음파는 병변 크기를 평가하는 데 유용하지 않으며 측정의 방법으로서 사용할 수 없다. 초음파 검사는 나중에 독립적인 검토를 위해 이의 실체로 재현할 수 없으며, 시술자 의존적이므로, 이는 한 평가에서 다음 평가까지 동일한 기술과 측정이 수행된다는 것을 보장할 수 없다(자세한 내용은 부록 II에 기술됨). 새로운 병변이 시험 과정에서 초음파에 의해 확인된 경우, CT 또는 MRI로 확인하는 것이 추천된다. CT에서 방사선 노출이 우려되는 경우, 선택된 예에서 CT 대신 MRI를 사용할 수 있다.

[2656] 내시경, 복강경 검사:

[2657] 객관적인 종양 평가를 위해 이러한 기술을 활용하는 것은 권장되지 않는다. 그러나, 생검을 수득할 때 완전한 병리학적 반응을 확인하거나 또는 완전 반응 후 또는 재발 또는 수술적 절제가 종말점인 시험에서 재발을 측정하기 위해 유용할 수 있다.

[2658] 종양 마커:

[2659] 종양 마커 단독으로는 객관적인 종양 반응을 평가하는 데 사용할 수 없다. 그러나, 마커가 초기에 정상 상한선을 초과하는 경우, 이는 환자가 완전한 반응에서 고려되기 위해 정상화되어야 한다.

[2660] 세포학, 조직학:

[2661] 이러한 기술은 프로토콜에 의해 필요한 경우 드은 경우에 PR과 CR을 구별하는 데 사용될 수 있다(예를 들면, 알려진 잔류 양성 종양이 남아 있을 수 있는 생식 세포 종양(germ cell tumour)과 같은 종양 유형의 잔류 병변). 삼출이 치료의 잠재적인 부작용인 것으로 알려진 경우(특정의 탁산 화합물 또는 혈관생성 억제제의 사용 시), 측정 가능한 종양이 기준을 충족하는 경우, 치료 동안 나타나거나 악화되는 임의의 삼출의 신생물 기원의 세포학적 확인을 고려하여 반응(또는 안정한 질환)과 진행성 질환을 구별할 수 있다.

[2662] 2. 종양 반응 평가

[2663] 2.1 전반적인 종양 버던(tumour burden) 및 측정가능한 질환의 평가

[2664] 객관적인 반응 또는 향후 진행을 평가하기 위하여, 기준선에서 전체 종양 버던을 추정하고 이를 후속 측정을 위한 비교 기준으로 사용하는 것이 필요하다. 측정 가능한 질환은 적어도 하나의 측정 가능한 병변(위에서 자세히 설명함)의 존재로 정의된다.

[2665] 2.2. '표적' 및 '비표적' 병변의 기본 문서(baseline documentation)

[2666] 기준선에 하나 이상의 측정 가능한 병변이 있는 경우, 모든 관련 기관을 대표하는 최대 총 5개까지의 병변(및

기관당 최대 2개의 병변)의 모든 병변을 표적 병변으로 확인할 수 있고 기준선에서 기록하고 측정하여야 한다.

[2667] 이는 환자가 1개 또는 2개의 기관 부위만 포함하는 경우 각각 최대 2개(1개 부위) 및 4개의 병변(2개 부위)이 기록될 것이라는 의미이다. 이러한 기관의 다른 병변은 측정 불가능한 병변으로 기록될 것이다(이의 크기가 CT 스캔으로 10㎜를 초과하는 경우에서도).

[2668] 표적 병변은 크기(직경이 가장 긴 병변)를 기준으로 선택되어야 하며, 관련된 모든 기관을 대표해야 하지만, 또한, 자체적으로 재현 가능한 반복 측정이 가능한 것이어야 한다. 때때로, 재현 가능하게 측정될 수 있는 다음으로 최대의 병변이 선택되어야 하는 상황에서 가장 큰 병변이 자체적으로 재현 가능한 측정에 적합하지 않은 경우가 있을 수 있다.

[2669] 림프절은 종양과 관련되지 않는 경우에서도 영상에 의해 볼 수 있는 정상적인 해부학적 구조이므로 특별히 언급할 가치가 있다. 측정 가능하다고 정의되고 표적 병변으로 식별될 수 있는 병리학적 결절은 CT 스캔에 의해 15㎜의 단축 기준을 충족하여야 한다. 이러한 결절(node)의 단축 만이 기준선 합계에 기여할 것이다. 결절의 단축은 결절이 고형 종양과 관련되어 있는지를 판단하기 위해 방사선 전문의가 일반적으로 사용하는 직경이다. 결절 크기는 일반적으로 영상이 수득되는 평면에서 2차원으로 보고된다(CT 스캔의 경우 이는 거의 항상 축 평면이고, MRI의 경우 획득 평면은 축, 시상 또는 관상일 수 있다). 이들 측정값 중 더 작은 것이 단축이다. 예를 들면, 20㎜ x 30㎜로 보고된 복부 결절은 20㎜의 단축을 가지며 악성의, 측정 가능한 결절로 분류된다. 본 실시예에서, 노드 측정값으로 20㎜가 기록되어야 한다. 다른 모든 병리학적 결절(단축이 10㎜ 그러나 <15㎜)은 비-표적 병변으로 고려되어야 한다. 단축이 <10㎜인 결절은 비-병리학적인 것으로 고려되어 기록하거나 추적하지 않아야 한다.

[2670] 모든 표적 병변에 대한 직경의 합(비-결절 병변의 경우 가장 길고, 결절 병변의 경우 단축)을 계산하여 기준선 직경 합계로 보고될 것이다. 림프절이 합계에 포함되어야 하는 경우, 위에서 언급한 바와 같이, 단축만 합계에 추가된다. 기준선 합 직경은 질환의 측정 가능한 차원에서 임의의 객관적인 종양 퇴행을 추가로 특성화하기 위한 참고로서 사용될 것이다.

[2671] 병리학적 림프절을 포함한 다른 모든 병변(또는 질환 부위)은 비-표적 병변으로 확인되어야 하며 기준선에서 또한 기록되어야 한다. 측정은 요구되지 않으며 이러한 병변은 "있음", "없음", 또는 드른 경우에 "명백한 진행"으로 수반되어야 한다. 또한, 증례 보고서 양식에는 동일한 기관을 포함한 다수의 비-표적 병변을 단일 항목으로 기록하는 것이 가능하다(즉, "다발성 골반 림프절 비대(multiple enlarged pelvic lymph nodes)" 또는 "다발성 간 전이(multiple liver metastasis)").

[2672] 2.3. 반응 기준

[2673] 2.3.1. 표적 병변의 평가

[2674] · 완전한 반응(CR): 모든 표적 병변의 소멸. 임의의 병리학적 림프절(표적 또는 비-표적)은 단축이 <10㎜로 감소하여야 한다.

[2675] · 부분 반응(PR): 기준선 직경 합계를 참고로, 표적 병변의 직경 합에서 적어도 30% 감소.

[2676] · 진행성 질환(PD): 연구에서 가장 작은 합을 참고로, 표적 병변 직경의 합에서 적어도 20% 증가(이는 연구에서 가장 작은 경우 기준선 합계를 포함한다). 20%의 상대적 증가 외에, 합은 적어도 5㎜의 절대 증가를 입증하여야 한다. (주목: 하나 이상의 새로운 병변이 출현은 또한 진행으로 간주된다).

[2677] · 안정한 질환(SD): 연구 동안 가장 작은 총 직경을 참고로, PR 자격을 갖추기에 충분한 수축도 없고 PD 자격을 갖추기에 충분한 증가도 없다.

[2678] 2.3.2. 표적 병변의 평가시 특수한 주목사항

[2679] 림프절: 표적 병변으로 확인된 림프절은 연구에서 림프절이 10㎜ 미만으로 회귀하는 경우에도, 항상 실제 단축 측정값을 가져야 한다(기본 검사와 동일한 해부학적 평면에서 측정). 이는 림프절이 표적 병변으로서 포함되는 경우, 정상 림프절은 <10㎜의 단축을 갖는 것으로 정의되기 때문에, CR 기준을 충족하는 경우에도 병변의 "합"이 0이 아닐 수 있음을 의미한다. 따라서 전자 사례 보고서 양식(eCRF) 또는 따라서 다른 데이터 수집 방법을 별개의 섹션에서 표적 결절 병변을 기록하도록 설계될 수 있으며, 여기서 CR 자격을 얻으려면, 각 결절은 단축 <10㎜를 달성하여야 한다. PR, SD, PD의 경우, 결절의 실제 단축 측정값은 표적 병변의 합에 포함된다.

[2680] "측정하기에 너무 작은" 표적 병변: 연구 중에, 기준선에 기록된 모든 병변(결절 및 비-결절)은 매우 작은 경우

에도, 각각의 후속 평가에서 이의 실제 측정값을 기록하여야 한다(예컨대, 2㎜). 그러나, 때로는 기준선에서 표적 병변으로 기록된 병변 또는 림프절이 CT 스캔에서 너무 희미해져서 방사선과 전문의가 정확한 척도를 지정하는 것이 불편할 수 있고 "측정하기에는 너무 작다"고 보고할 수도 있다. 이것이 발생하면 eCRF에 값을 기록하는 것이 중요하다.

[2681] · 병변이 사라졌을 가능성이 있다고 방사선과 전문의가 판단하는 경우, 측정값은 0㎜으로 기록하여야 한다. 병변이 존재한다고 여겨지고 희미하게 보이지만 측정하기에는 너무 작은 경우, 5㎜의 기본 값을 지정하고 "측정 가능 한계 미만"(below measurable limit; BML)을 선택하여야 한다(주목: 림프절은 일반적으로 정상일 때 정의할 수 있는 크기를 갖고 후복막에서와 같이 지방으로 둘러싸여 있는 경우가 많기 때문에 림프절에 사용될 것이지만, 림프절이 존재한다고 여겨지고 희미하게 보이지만 측정하기에는 너무 작은 경우에는 5㎜의 디폴트 값을 또한 이러한 상황에서 할당해야 하며 BML을 또한 선택하여야 한다.

[2682] 이러한 디폴트 값(default value)은 5㎜ CT 슬라이스 두께에서 유도된다(그러나, CT 슬라이스 두께에 따라 변경되지 않아야 한다). 이러한 병변의 측정은 잠재적으로 재현-불가능하므로, 이 기본값을 제공하는 것은 잘못된 응답 또는 측정 오류를 기준으로 한 진행을 방지할 수 있다.

[2683] 치료 시 분할 또는 합체되는 병변: 비-결절성 병변이 "단편화"될 때, 단편화된 부위의 가장 긴 직경을 함께 추가하여 목표 병변 합을 계산하여야 한다. 유사하게, 병변이 합쳐질 때, 각각의 개개 병변의 최대 직경 측정을 수득하는데 도움이 되는 그들 사이의 평면이 유지될 수 있다. 병변이 더 이상 분리할 수 없을 정도로 실제로 유착된 경우, 이 경우에서의 가장 긴 직경의 벡터는 "유합된 병변"에 대한 최대의 가장 긴 직경이어야 한다.

[2684] 2.3.3. 비-표적 병변의 평가

[2685] 일부 비-표적 병변은 실제로 측정 가능할 수 있지만, 측정할 필요는 없으며 대신 프로토콜에 지정된 시점에서 정성적으로만 평가할 수 있다.

[2686] 완전한 반응: 모든 비-표적 병변의 소멸 및 종양 마커 수준의 표준화. 모든 림프절은 크기가 비-병리학적이어야 한다(단축 < 10㎜).

[2687] 비-CR/비-PD: 하나 이상의 비-표적 병변(들)의 지속성 및/또는 정상 한계를 초과하는 종양 마커 수준의 유지.

[2688] 진행성 질환: 기존 비-표적 병변의 명백한 진행. (주목: 하나 이상의 새로운 병변의 출현은 또한 진행으로 고려된다).

[2689] 2.3.4. 비-표적 질환의 진행 평가에 관한 특별한 주목사항

[2690] 비-표적 질환의 진행의 개념은 다음과 같은 추가적인 설명을 요구한다:

[2691] 환자가 또한 측정가능한 질환을 갖는 경우:

[2692] 이러한 셋팅에서, 비-표적 질환을 기준으로 한 '명백한 진행'을 달성하기 위해, 비-표적 질환에 SD 또는 PR이 존재하는 경우에도, 종양 버덴이 치료를 중단할 만큼 충분히 증가하도록, 비-표적 질환에서 실질적으로 악화되는 전반적인 수준이 있어야만 한다. 하나 이상의 비-표적 병변의 크기에서 적당한 '증가'는 일반적으로 명확한 진행 상태에 대해 보증하기에 충분하지 않다. 따라서 표적 질환의 SD 또는 PR에 직면한 비-표적 질환에서의 변화만을 기준으로 전체 진행을 단독으로 지정하는 것은 극히 드물다.

[2693] 환자가 비-측정가능한 질환 만을 갖는 경우:

[2694] 이러한 상황은 측정 가능한 질환이 있다는 것이 임상시험 참가의 기준이 아닌 경우 일부 제3상 시험에서 발생한다. 위에서 주목한 바와 같은 동일한 일반적 개념이 여기에 적용되지만, 이 경우 측정 불가능한 질환 버덴에서 증가의 해석을 고려하는 인자에 대해 측정 가능한 질환 평가는 존재하지 않는다. 비-표적 질환에서 악화는 쉽게 정량화할 수 없기 때문에(정의에 따라: 모든 병변이 실제로 측정 불가능한 경우), 환자를 명확한 진행에 대해 평가할 때 적용할 수 있는 유용한 시험은 비-측정가능한 질환에서의 변화를 기준으로 전반적인 질환 버덴에서의 증가가 측정가능한 질환에 대한 PD를 선언하는데 요구될 수 있는 증가: 즉, '용적'에서 추가로 73% 증가(이는 측정가능한 병변에서 직경의 20% 증가와 동일하다)를 나타내는 종양 버덴에서의 증가까지 크기 면에서 비교가능한 경우를 고려하는 것이다. 예는 흉막삼출에 있어서 '미량'에서 '대형'으로 증가, 림프관 질환에서 국소에서 광범위로의 증가를 포함하거나, 또는 프로토콜에서는 '치료요법에서의 변경이 요구되기에 충분'한 것으로 기술될 수 있다. '명백한 진행'이 보이는 경우, 환자는 그 시점에서 전반적인 PD를 갖고 있는 것으로 고려되어야 한다. 비-측정가능한 질환에 적용되는 객관적인 기준을 갖는 것이 이상적일 수 있지만, 해당 질환의 특성은 이렇

게 하는 것을 불가능하도록 하므로; 증가는 실질적이어야만 한다.

[2695] 2.3.5. 새로운 병변

[2696] 새로운 악성 병변의 출현은 질병의 진행을 나타내며; 따라서, 새로운 병변의 검출 대한 일부 의견은 중요하다. 새로운 방사선학적 병변의 확인을 위한 구체적인 기준은 존재하지 않지만; 새로운 병변의 발견은 명백하여야 하는데: 즉, 스캐닝 기술에의 차이, 영상화 양식의 변화, 또는 종양 이외의 다른 것을 나타내는 것으로 생각되는 발견(예를 들면, 일부 '새로운' 골 병변은 단순히 치유될 수 있거나 또는 기존 병변의 신호일 수 있다)에 기인하지 않아야 한다. 이는 환자의 기본선 변경이 부분적인 또는 완전한 반응을 나타내는 경우 특히 중요하다. 예를 들면, 간 병변의 괴사는 CT 스캔 리포트에서 '신규한" 낭성 병변으로서 기록될 수 있지만, 이는 그렇지 않다.

[2697] 기존 새로운 병변이 모호한 경우, 예를 들어 작은 크기 때문에, 지속적인 치료요법과 후속 평가는 그것이 실제로 신규 질환을 나타내는지를 명확하게 할 것이다. 반복 스캔이 새로운 병변이 명확하게 존재하는 것을 확인하는 경우, 초기 스캔 날짜를 사용하여 진행을 선언하여야 한다.

[2698] (18)F-플루오로데옥시글루코스 양전자 방출 단층촬영(Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography; FDG-PET): 본 연구의 목적을 위해, 진행성 질환은 FDG-PET 결과만으로 이루어질 수 없다. 진행성 질환을 제시하는 모든 FDG-PET 소견은 전용 해부학적 영상(CT 또는 MRI)을 통해 확인되어야 한다. RECIST v1.1에 대한 다음 수정이 이 연구에 적용될 것이다:

[2699] · 기준선에서 음성 FDG-PET, 추적 관찰 시 양성 FDG-PET는 새로운 병변에 기초한 PD의 신호이다. *프로토콜에 따라 CT 또는 MRI 스캔에 의한 새로운 병변의 확인.

[2700] · 기준선에서 FDG-PET가 없고 후속 조치에서는 FDG-PET가 양성임;

[2701] o 추적 조사에서 양성 FDG-PET가 CT에 의해 확인된 질환의 새로운 신호에 상응하는 경우, 이는 PD이다.

[2702] o 추적 관찰 시 양성 FDG-PET가 CT에서 질환의 새로운 부위로 확인되지 않은 경우, 해당 부위에서 실제로 진행이 발생하는지 확인하기 위해 추가의 추적 CT 스캔이 필요하다(그렇다면, PD 날짜는 최초의 비정상 *CT 스캔의 날짜가 될 것이다)

[2703] o 추적 관찰 시 양성 FDG-PET가 CT에서 질환의 새로운 부위로 확인되지 않은 경우, 해당 부위에서 실제로 진행이 발생하는지 확인하기 위해 추가 추적 CT 스캔이 필요하다(그렇다면 PD 날짜는 최초 비정상 *CT 스캔 날짜가 될 것이다).

[2704] o 추적 관찰 시 양성 FDG-PET가 해부학적 영상을 기준으로 진행되지 않는 CT에서의 기존 질환의 부위에 상응하는 경우, 이는 PD가 아니다.

[2705] *는 RECIST v.1.1에 대한 연구-특이적인 변형을 반영한다.

[2706] 2.3.6. 최상의 전반적인 반응의 평가

[2707] 최상의 전체 반응은 임의의 확인 요건을 고려하여 연구 치료 시작부터 치료 종료까지 기록된 최상의 반응이다. 경우에 따라 치료요법이 종료될 때까지 반응이 문서화되지 않을 수 있으므로 최상의 전체 반응을 결정하기 위해 치료 후 평가를 고려하는 경우려면 프로토콜이 명확하여야 한다. 프로토콜은 진행 전에 도입된 새로운 치료요법이 가장우수한 반응 지정에 영향을 미칠 방법을 명시하여야 한다. 환자의 가장 우수한 전체 반응 할당은 표적 질환과 비-표적 질환 둘 다의 발견에 의존할 것이고 새로운 병변의 출현도 또한 고려될 것이다. 또한 연구의 특성 및 프로토콜 요건에 따라, 확증적인 측정이 또한 요구될 수 있다. 구체적으로, 반응이 1차 종점인 비무작위 시험에서, 어느 하나를 '가장 우수한 전체 반응'으로 간주하기 위해 PR 또는 CR의 확인이 필요하다. 이에 대해서는 아래에서 추가로 기술된다.

[2708] 19.10 실시예 19에 대한 참고문헌

[2709] 모든 참고문헌은 이의 전문이 본원에 참고로 포함된다.

1. Wang L, Rubinstein R, Lines JL, Wasiuk A, Ahonen C, Guo Y, Lu LF, Gondek D, Wang Y, Fava RA, Fiser A, Almo S, Noelle RJ: VISTA, a novel mouse Ig superfamily ligand that negatively regulates T cell responses. J Exp Med 208:577-92, 2011.

2. Flies DB, Wang S, Xu H, Chen L: Cutting edge: A monoclonal antibody specific for the programmed death-1 homolog prevents graft-versus-host disease in mouse models. J Immunol 187:1537-41, 2011.

3. Mehta N, Maddineni S, Mathews II, Sperberg APR, Huang PS, Cochran JR: Structure and Functional Binding Epitope of V-도메인 Ig Suppressor of T Cell Activation. Cell Rep 28:2509-2516 e5, 2019.

4. Johnston RJ, Su LJ, Pinckney J, Critton D, Boyer E, Krishnakumar A, Corbett M, Rankin AL, Dibella R, Campbell L, Martin GH, Lemar H, Cayton T, Huang RY, Deng X, Nayeem A, Chen H, Ergel B, Rizzo JM, Yamniuk AP, Dutta S, Ngo J, Shorts AO, Ramakrishnan R, Kozhich A, Holloway J, Fang H, Wang YK, Yang Z, Thiam K, Rakestraw G, Rajpal A, Sheppard P, Quigley M, Bahjat KS, Korman AJ: VISTA is an acidic pH-selective ligand for PSGL-1. Nature 574:565-570, 2019.

5. Li N, Xu W, Yuan Y, Ayithan N, Imai Y, Wu X, Miller H, Olson M, Feng Y, Huang YH, Jo Turk M, Hwang ST, Malarkannan S, Wang L: Immune-checkpoint protein VISTA critically regulates the IL-23/IL-17 inflammatory axis. Sci Rep 7:1485, 2017.

6. Borggrewe M, Grit C, Den Dunnen WFA, Burm SM, Bajramovic JJ, Noelle RJ, Eggen BJL, Laman JD: VISTA expression by microglia decreases during inflammation and is differentially regulated in CNS diseases. Glia 66:2645-2658, 2018.

7. Han X, Vesely MD, Yang W, Sanmamed MF, Badri T, Alawa J, Lopez-Giraldez F, Gaule P, Lee SW, Zhang JP, Nie X, Nassar A, Boto A, Flies DB, Zheng L, Kim TK, Moeckel GW, McNiff JM, Chen L: PD-1H (VISTA)-mediated suppression of autoimmunity in systemic and cutaneous lupus erythematosus. Sci Transl Med 11, 2019.

[2710]

8. Sergent PA, Plummer SF, Pettus J, Mabaera R, DeLong JK, Pechenick DA, Burns CM, Noelle RJ, Ceeraz S: Blocking the VISTA pathway enhances disease progression in (NZB x NZW) F1 female mice. Lupus 27:210-216, 2018.

9. Yoon KW, Byun S, Kwon E, Hwang SY, Chu K, Hiraki M, Jo SH, Weins A, Hakroush S, Cebulla A, Sykes DB, Greka A, Mundel P, Fisher DE, Mandinova A, Lee SW: Control of signaling-mediated clearance of apoptotic cells by the tumor suppressor p53. Science 349:1261669, 2015.

10. Liu J, Yuan Y, Chen W, Putra J, Suriawinata AA, Schenk AD, Miller HE, Guleria I, Barth RJ, Huang YH, Wang L: Immune-checkpoint proteins VISTA and PD-1 nonredundantly regulate murine T-cell responses. Proc Natl Acad Sci U S A 112:6682-7, 2015.

11. Keir ME, Freeman GJ, Sharpe AH: PD-1 regulates self-reactive CD8+ T cell responses to antigen in lymph nodes and tissues. J Immunol 179:5064-70, 2007.

12. Wang G, Tai R, Wu Y, Yang S, Wang J, Yu X, Lei L, Shan Z, Li N: The expression and immunoregulation of immune checkpoint molecule VISTA in autoimmune diseases and cancers. Cytokine Growth Factor Rev, 2020.

13. El Tanbouly MA, Zhao Y, Nowak E, Li J, Schaafsma E, Le Mercier I, Ceeraz S, Lines JL, Peng C, Carriere C, Huang X, Day M, Koehn B, Lee SW, Silva Morales M, Hogquist KA, Jameson SC, Mueller D, Rothstein J, Blazar BR, Cheng C, Noelle RJ: VISTA is a checkpoint regulator for naive T cell quiescence and peripheral tolerance. Science 367, 2020.

14. Le Mercier I, Chen W, Lines JL, Day M, Li J, Sergent P, Noelle RJ, Wang L: VISTA Regulates the Development of Protective Antitumor Immunity. Cancer Res 74:1933-44, 2014.

15. Borggrewe M, Kooistra SM, Noelle RJ, Eggen BJL, Laman JD: Exploring the VISTA of microglia: immune checkpoints in CNS inflammation. J Mol Med (Berl). 2020 Aug 27. doi: 10.1007/s00109-020-01968-x. Online ahead of print.

16. Li Wang 1, Rotem Rubinstein, Janet L Lines, Anna Wasiuk, Cory Ahonen, Yanxia Guo, Li-Fan Lu, David Gondek, Yan Wang, Roy A Fava, Andras Fiser, Steve Almo, Randolph J Noelle. VISTA, a novel mouse Ig superfamily ligand that negatively regulates T cell responses. J Exp Med 208(3):577-92, 2011.

17. Gao J, Ward JF, Pettaway CA, Shi LZ, Subudhi SK, Vence LM, Zhao H, Chen J, Chen H, Efstathiou E, Troncoso P, Allison JP, Logothetis CJ, Wistuba, II, Sepulveda MA, Sun J, Wargo J, Blando J, Sharma P: VISTA is an inhibitory immune checkpoint that is increased after ipilimumab therapy in patients with prostate cancer. Nat Med 23:551-555, 2017.

18. Kakavand H, Jackett LA, Menzies AM, Gide TN, Carlino MS, Saw RPM, Thompson JF, Wilmott JS, Long GV, Scolyer RA: Negative immune checkpoint regulation by VISTA: a mechanism of acquired resistance to항-PD-1 therapy in metastatic melanoma patients. Mod Pathol 30:1666-1676, 2017.

19. Xu W, Hiếu T, Malarkannan S, Wang L. The structure, expression, and multifaceted role of immune-checkpoint protein VISTA as a critical regulator of항-tumor immunity, autoimmunity, and inflammation. Cell Mol Immunol. 15(5):438-446, 2018.

20. Wang J, Wu G, Manick B, Hernandez V, Renelt M, Erickson C, Guan J, Singh R, Rollins S, Solorz A, Bi M, Li J, Grabowski D, Dirkx J, Tracy C, Stuart T, Ellinghuysen C, Desmond D, Foster C, Kalabokis V: VSIG-3 as a ligand of VISTA inhibits사람 T-cell function. Immunology 156:74-85, 2019.

[2711]

21. Mulati K, Hamanishi J, Matsumura N, Chamoto K, Mise N, Abiko K, Baba T, Yamaguchi K, Horikawa N, Murakami R, Taki M, Budiman K, Zeng X, Hosoe Y, Azuma M, Konishi I, Mandai M: VISTA expressed in tumour cells regulates T cell function. Br J Cancer 120:115-127, 2019.

22. Kondo Y, Ohno T, Nishii N, Harada K, Yagita H, Azuma M: Differential contribution of three immune checkpoint (VISTA, CTLA-4, PD-1) pathways to antitumor responses against squamous cell carcinoma. Oral Oncol 57:54-60, 2016.

23. Blando J, Sharma A, Higa MG, Zhao H, Vence L, Yadav SS, Kim J, Sepulveda AM, Sharp M, Maitra A, Wargo J, Tetzlaff M, Broaddus R, Katz MHG, Varadhachary GR, Overman M, Wang H, Yee C, Bernatchez C, Iacobuzio-Donahue C, Basu S, Allison JP, Sharma P: Comparison of immune infiltrates in melanoma and pancreatic cancer highlights VISTA as a potential target in pancreatic cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 116:1692-1697, 2019.

24. Muller S, Victoria Lai W, Adusumilli PS, Desmeules P, Frosina D, Jungbluth A, Ni A, Eguchi T, Travis WD, Ladanyi M, Zauderer MG, Sauter JL: V-도메인 Ig-containing suppressor of T-cell activation (VISTA), a potentially targetable immune checkpoint molecule, is highly expressed in epithelioid malignant pleural mesothelioma. Mod Pathol 33:303-311, 2020.

25. Chung YS, Kim M, Cha YJ, Kim KA, Shim HS: Expression of V-set immunoregulatory receptor in malignant mesothelioma. Mod Pathol 33:263-270, 2020.

26. Hmeljak J, Sanchez-Vega F, Hoadley KA, Shih J, Stewart C, Heiman D, Tarpey P, Danilova L, Drill E, Gibb EA, Bowlby R, Kanchi R, Osmanbeyoglu HU, Sekido Y, Takeshita J, Newton Y, Graim K, Gupta M, Gay CM, Diao L, Gibbs DL, Thorsson V, Iype L, Kantheti H, Severson DT, Ravegnini G, Desmeules P, Jungbluth AA, Travis WD, Dacic S, Chirieac LR, Galateau-Salle F, Fujimoto J, Husain AN, Silveira HC, Rusch VW, Rintoul RC, Pass H, Kindler H, Zauderer MG, Kwiatkowski DJ, Bueno R, Tsao AS, Creaney J, Lichtenberg T, Leraas K, Bowen J, Network TR, Felau I, Zenklusen JC, Akbani R, Cherniack AD, Byers LA, Noble MS, Fletcher JA, Robertson AG, Shen R, Aburatani H, Robinson BW, Campbell P, Ladanyi M: Integrative Molecular Characterization of Malignant Pleural Mesothelioma. Cancer Discov 8:1548-1565, 2018.

27. Villarroel-Espindola, F., Yu, X., Datar, I., Mani, N., Sanmamed, M. F., Velcheti, V., ... Schalper, K. A. (2017). Spatially resolved and quantitative analysis of VISTA/PD-1H as a novel immunotherapy target in 사람 non-small cell lung cancer. Clinical Cancer Research, 24(7), clincanres.2542.2017

28. Brcic L, Stanzer S, Krenbek D, Gruber-Moesenbacher U, Absenger G, Quehenberger F, Valipour A, Lindenmann J, Stoeger H, Al Effah M, Fediuk M, Balic M, Popper HH: Immune cell landscape in therapy-naive squamous cell and adenocarcinomas of the lung. Virchows Arch 472:589-598, 2018.

29. Xiong D, Pan J, Yin Y, Jiang H, Szabo E, Lubet RA, Wang Y, You M: Novel mutational landscapes and expression signatures of lung squamous cell carcinoma. Oncotarget 9:7424-7441, 2018.

30. Manzoni M, Bolognesi MM, Antoranz A, Mancari R, Carinelli S, Faretta M, Bosisio FM, Cattoretti G: The Adaptive and Innate Immune Cell Landscape of Uterine Leiomyosarcomas. Sci Rep 10:702, 2020.

31. Bang YJ, Sosman J, Daud A, Meric-Bernstam F, Garcia-Corbacho J, Patel M, Lee J, Kim K, Brody J, Rha SY, Martin MG, Aix SP, Hamilton E, Ramchandren R, Ahn M, Spicer J, Pacey S, Falchook G, Wang H, Xu G, Adams L, Ma AWS, Gharavi R, Eves PT, Tuck D, Powderly J: Phase 1 study of CA-170, a first-in-class, orally available, small molecule immune checkpoint inhibitor (ICI) dually targeting VISTA and PDL1, in patients with advanced solid tumors or lymphomas, SITC, 2018

[2712]

32. Radhakrishnan V, Banavali S, Gupta S, Kumar A, Deshmukh C, Nag S, Beniwal S, Gopichand M, Naik R, Lakshmaiah K, Mandavia D, Ramachandra M, Prabhash K: Excellent CBR and prolonged PFS in non-squamous NSCLC with oral CA-170, a dual inhibitor of VISTA and PD-L1, ESMO, 2019

33. Zauderer MG, Brody J, Marron T, Pacey S, Martell RE, Wang H, Spicer J: First-in-Class Small Molecule CA-170 Targeting VISTA: A Report on Efficacy Outcomes from a Cohort of 12 Malignant Pleural Mesothelioma (MPM) Patients in Study CA-170-101, SITC 2019. National Harbor, MD, 2019.

34. Musielak B, Kocik J, Skalniak L, Magiera-Mularz K, Sala D, Czub M, Stec M, Siedlar M, Holak TA, Plewka J: CA-170 - A Potent Small-Molecule PD-L1 Inhibitor or Not? Molecules 24, 2019.

35. Blevins DJ, Hanley R, Bolduc T, et al. In Vitro Assessment of Putative PD-1/PD-L1 Inhibitors: Suggestions of an Alternative Mode of Action. ACS Medicinal Chemistry Letters; 10 (8), 1187-1192, 2019. DOI: 10.1021/acsmedchemlett.9b00221

35. Crawley SC, Hsu JY, Tian H, Compositions and methods for targeting a pathway. Patent Cooperation Treaty (PCT) number PCT/US2015/031539. Information available from: https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2015187359 (2015).

36. Li K, Tian H. Development of small-molecule immune checkpoint inhibitors of PD-1/PD-L1 as a new therapeutic strategy for tumour immunotherapy. J Drug Target. 2019 Mar;27(3):244-256. Review.

37. Mahoney KM, Freeman GJ. Acidity changes immunology: a new VISTA pathway. Nat Immunol. 2020 Jan;21(1):13-16.

38. KEYTRUDA™(pembrolizumab), Merck Sharp & Dohme Corp. US Prescribing Information, 05/2021. https://www.merck.com/product/usa/pi_circulars/k/keytruda/keytruda_pi.pdf

39. ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Identifier NCT02671955, A study of safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics of JNJ-61610588 in participants with advanced cancer; 2016 Feb 2. Available from: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02671955

40. ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Identifier NCT04475523, Phase 1 study of CI-8993 항-VISTA antibody in patients with advanced solid tumor malignancies; 2020 Jul 17. Available from: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02671955

41. ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Identifier NCT04564417, First-in-사람 (FIH) study of w0180 as single agent and in combination with pembrolizumab in adults with locally advanced or metastatic solid tumors; 2020 Sep 25. Available from: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02671955

42. ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Identifier NCT02812875, A study of ca-170 (oral pd-l1, pd-l2 and vista checkpoint antagonist) in patients with advanced tumors and lymphomas; 2016 Jun 24. Available from: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02671955

43. Disis, Mary L. Immune Regulation of Cancer. Journal of Clinical Oncology.2010; 28 (29):4531-4538

44. Dudley, Mark E., Wunderlich, John E.,Yang, James C., Sherry, Richard M., Topalian, Suzzane L., Restifo, Nicholas P., Royal, Richard E., Kammula, Udai, White, Don E., Mavroukakis, Sharon A., et al. Adoptive Cell Transfer Therapy Following Non-Myeloablative but Lymphodepleting Chemotherapy for the Treatment of Patients With Refractory Metastatic Melanoma. Journal of Clinical Oncology.2005; 0732-183

[2713]

45. Hunder NN, Wallen H, Cao J, Hendricks DW, Reilly JZ, Rodmyre R, et al. Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1. N Engl J Med 2008;358(25):2698-703

46. Greenwald, Rebecca J., Freeman, Gordon J., and Sharpe, Arlene H. The B7 Family Revisited. Annual Reviews.2005; 23:515–48

47. Okazaki T, Maeda A, Nishimura H, Kurosaki T, Honjo T. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-도메인-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. Proc Natl Acad Sci U S A 2001;98(24):13866-71.

48. Zhang, PD., Xuewu, Schwartz, Jean-Claude D., Guo, Xiaoling, Bhatia, Sumeena, Cao, Erhu, Chen, Lieping, Zhang, Zhong-Yin, Edidin, Michael A., Nathenson, Stanley G. Almo, Steven C. Structural and Functional Analysis of the Costimulatory Receptor Programmed Death-1. Immunity.2004; 337-347

49. Chemnitz, Jens M., Parry, Richard V., Nichols, Kim E., June, Carl H., Riley, James L., SHP-1 and SHP-2 Associate with Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif of Programmed Death 1 upon Primary 사람 T Cell Stimulation, but Only Receptor Ligation Prevents T Cell Activation. The Journal of Immunology.2004, 173: 945–954

50. Shepard, Kelly-Ann., Fitz, Lori J., Lee, Julie M., Benander, Christina, George, Judith A., Wooter, Joe, Qiu, Yongchang, Jussif, Jason M., Carter, Laura L., Wood, Clive R., Chaudhary, Divya. PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3 signalosome and downstream signaling to PKC. FEBS Letters. 2004; 0014-5793

51. Riley, James L., PD-1 signaling in primary T cells. Immunological Reviews. 2009; 0105-2896

52. Parry, Richard V., Chemnitz, Jens M., Frauwirth, Kenneth A., Lanfranco, Anthony R., Braunstein, Inbal., Kobayashi, Sumire V., Linsley, Peter S., Thompson, 4 Craig B. and Riley, James L. CTLA-4 and PD-1 Receptors Inhibit T-Cell Activation by Distinct Mechanisms. MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, 2005; 0270-7306Pilon-Thomas, S., et al., Blockade of programmed death ligand 1 enhances the therapeutic efficacy of combination immunotherapy against melanoma. J Immunol, 2010. 184(7): p. 3442-9.

53. Francisco, Loise M., Sage, Peter T., and Sharpe, Arlene H. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. Immunological Reviews.2010; 0105-2896

54. Hirano, F., et al., Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. Cancer Res, 2005. 65(3): p. 1089-96.

55. Blank, C., et al., PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8+ T cells. Cancer Res, 2004. 64(3): p. 1140-5.

56. Weber, J., Immune checkpoint proteins: a new therapeutic paradigm for cancer--preclinical background: CTLA-4 and PD-1 blockade. Semin Oncol, 2010. 37(5): p. 430-9.

57. Strome, S.E., et al., B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma. Cancer Res, 2003. 63(19): p. 6501-5.

58. Spranger, S., et al., Mechanism of tumor rejection with doublets of CTLA-4, PD-1/PD-L1, or IDO blockade involves restored IL-2 production and proliferation of CD8(+) T cells directly within the tumor microenvironment. J Immunother Cancer, 2014. 2: p. 3.

[2714]

59. Curran, M.A., et al., PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(9): p. 4275-80.

60. Pilon-Thomas, S., et al., Blockade of programmed death ligand 1 enhances the therapeutic efficacy of combination immunotherapy against melanoma. J Immunol, 2010. 184(7): p. 3442-9.

61. Nomi, T., et al., Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in 사람 pancreatic cancer. Clin Cancer Res, 2007. 13(7): p. 2151-7.

[2715]

## *수탁번호*

[2716]

기탁기관명 : ATCC

수탁번호 : PTA-127062

수탁일자 : 20210507

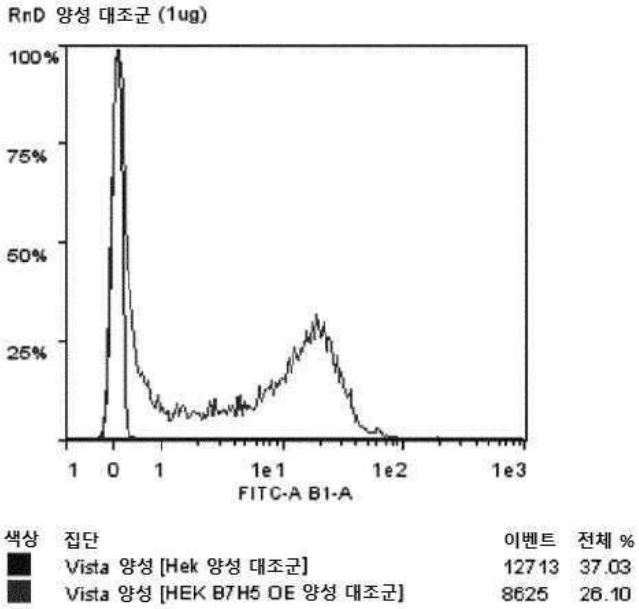
기탁기관명 : ATCC

수탁번호 : PTA-127063

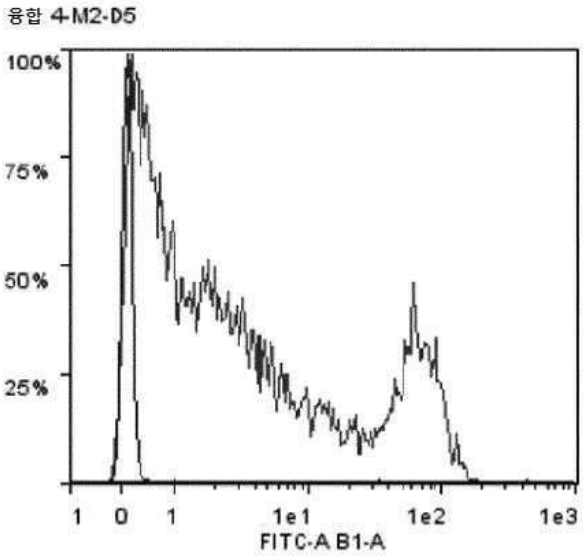
수탁일자 : 20210507

## 도면

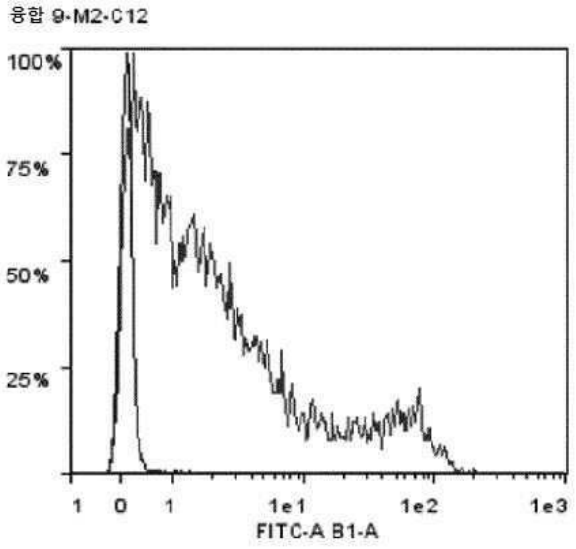
### 도면1a


RnD 양성 대조군 (1ug)
100%
75%
50%
25%
1 0 1 1e1 1e2 1e3
FITC-A B1-A
색상 집단 이벤트 전체 %
Vista 양성 [Hek 양성 대조군] 12713 37.03
Vista 양성 [HEK B7H5 OE 양성 대조군] 8625 26.10

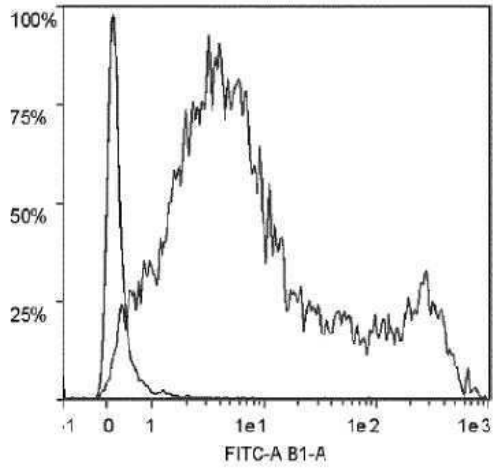
### 도면1b


융합 4-M2-D5
100%
75%
50%
25%
1 0 1 1e1 1e2 1e3
FITC-A B1-A

도면1c

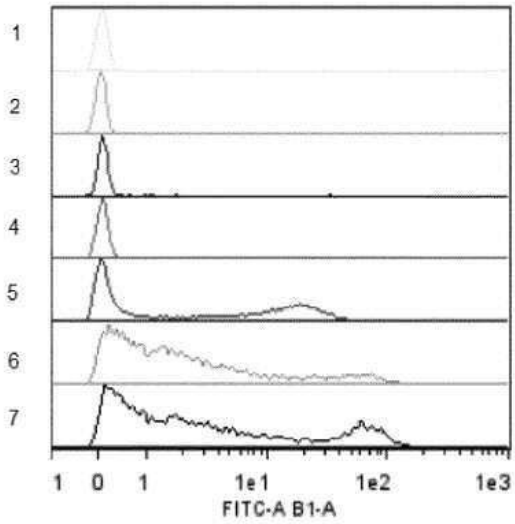



도면1d




| 색상 | 집단 | 항체 | 전체 % |
|---|---|---|---|
| | HEK293 | V4 | 2.25 |
| | HEK293 VISTA O/E | V4 | 61.54 |

도면2




| | 색상 | 집단 | 항체 | 생 세포 | MFI |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | | HEK293 VISTA O/E | 염색되지 않음 | 9604 | 0.12 |
| 2 | | HEK293 VISTA O/E | 동형 | 10088 | 0.06 |
| 3 | | HEK293-WT | 9M2C12 | 8922 | 0.1 |
| 4 | | HEK293-WT | V4 | 9301 | 0.11 |
| 5 | | HEK293 VISTA O/E | VSTB1 12 | 10800 | 8.47 |
| 6 | | HEK293 VISTA O/E | 9M2C12 | 9463 | 8.45 |
| 7 | | HEK293 VISTA O/E | V4 | 9398 | 14.91 |

도면3a



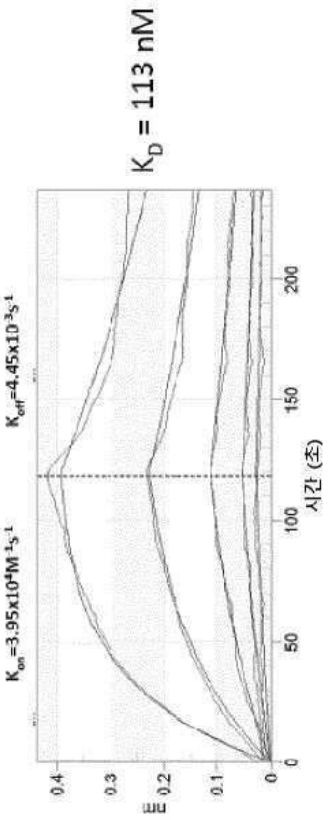

| V4 농도 (nM) | 반응 | KD (M) | KD 오차 | kon(1/Ms) | kon 오차 | kdis(1/s) | RMax | RMax 오차 | kobs(1/s) | Req | Req/Rmax(%) | Full X^2 | Full R^2 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1000 | 1.1009 | <1.0E-12 | 1.73E-09 | 4.54E+04 | 1.20E+03 | <1.0E-07 | 1.0869 | 0.0077 | 4.54E-02 | 1.0869 | 100 | 0.1009 | 0.9961 |
| 500 | 0.881 | <1.0E-12 | 1.73E-09 | 4.54E+04 | 1.20E+03 | <1.0E-07 | 0.9508 | 0.0114 | 2.27E-02 | 0.9508 | 100 | 0.1009 | 0.9961 |
| 250 | 0.699 | <1.0E-12 | 1.73E-09 | 4.54E+04 | 1.20E+03 | <1.0E-07 | 0.975 | 0.0185 | 1.13E-02 | 0.975 | 100 | 0.1009 | 0.9961 |
| 125 | 0.4105 | <1.0E-12 | 1.73E-09 | 4.54E+04 | 1.20E+03 | <1.0E-07 | 0.872 | 0.0228 | 5.67E-03 | 0.872 | 100 | 0.1009 | 0.9961 |
| 62.5 | 0.2962 | <1.0E-12 | 1.73E-09 | 4.54E+04 | 1.20E+03 | <1.0E-07 | 1.094 | 0.0343 | 2.83E-03 | 1.094 | 100 | 0.1009 | 0.9961 |
| 31.3 | 0.0618 | <1.0E-12 | 1.73E-09 | 4.54E+04 | 1.20E+03 | <1.0E-07 | 0.4238 | 0.0342 | 1.42E-03 | 0.4238 | 100 | 0.1009 | 0.9961 |

도면3b



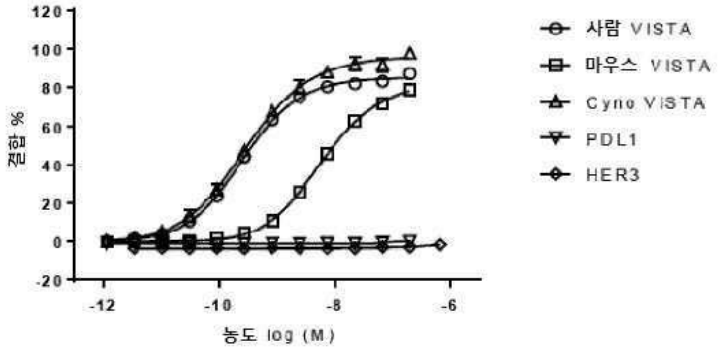

| V4 농도 (nM) | 반응 | KD (M) | KD 오차 | kon(1/Ms) | kon 오차 | kdis(1/s) | RMax | RMax 오차 | kobs(1/s) | Req | Req/Rmax(%) | Full X^2 | Full R^2 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1433 | 0.688 | **<1.0E-12** | 2.10E-09 | **4.02E+04** | 1.12E+03 | **<1.0E-07** | 0.6759 | 0.0047 | 5.76E-02 | 0.6759 | 100 | 0.0332 | **0.9927** |
| 716.5 | 0.6052 | **<1.0E-12** | 2.10E-09 | **4.02E+04** | 1.12E+03 | **<1.0E-07** | 0.6264 | 0.0066 | 2.88E-02 | 0.6264 | 100 | 0.0332 | **0.9927** |
| 358.3 | 0.4609 | **<1.0E-12** | 2.10E-09 | **4.02E+04** | 1.12E+03 | **<1.0E-07** | 0.5714 | 0.0101 | 1.44E-02 | 0.5714 | 100 | 0.0332 | **0.9927** |
| 179.1 | 0.3216 | **<1.0E-12** | 2.10E-09 | **4.02E+04** | 1.12E+03 | **<1.0E-07** | 0.5837 | 0.0147 | 7.20E-03 | 0.5837 | 100 | 0.0332 | **0.9927** |
| 1433 | 0.688 | **<1.0E-12** | 2.10E-09 | **4.02E+04** | 1.12E+03 | **<1.0E-07** | 0.6759 | 0.0047 | 5.76E-02 | 0.6759 | 100 | 0.0332 | **0.9927** |

도면3c



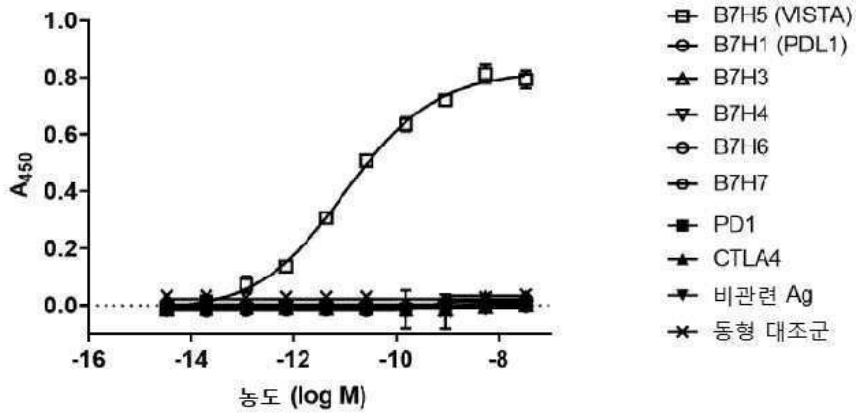

| V4 농도 (nM) | 반응 | KD (M) | KD 오차 | kon(1/Ms) | kon 오차 | kdis(1/s) | kdis 오차 | RMax | RMax 오차 | kobs(1/s) | Req | Req/Rmax(%) | Full X^2 | Full R^2 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 666.5 | 0.4104 | 1.13E-07 | 5.65E-09 | 3.95E+04 | 1.58E+03 | 4.45E-03 | 1.34E-04 | 0.4719 | 0.0083 | 3.08E-02 | 0.4036 | 85.5 | 0.0099 | 0.9948 |
| 333.3 | 0.2261 | 1.13E-07 | 5.65E-09 | 3.95E+04 | 1.58E+03 | 4.45E-03 | 1.34E-04 | 0.3459 | 0.0097 | 1.76E-02 | 0.2584 | 74.7 | 0.0099 | 0.9948 |
| 166.6 | 0.1064 | 1.13E-07 | 5.65E-09 | 3.95E+04 | 1.58E+03 | 4.45E-03 | 1.34E-04 | 0.2573 | 0.0101 | 1.10E-02 | 0.1534 | 59.6 | 0.0099 | 0.9948 |
| 83.3 | 0.0514 | 1.13E-07 | 5.65E-09 | 3.95E+04 | 1.58E+03 | 4.45E-03 | 1.34E-04 | 0.207 | 0.0116 | 7.74E-03 | 0.0879 | 42.5 | 0.0099 | 0.9948 |
| 41.7 | 0.0275 | 1.13E-07 | 5.65E-09 | 3.95E+04 | 1.58E+03 | 4.45E-03 | 1.34E-04 | 0.1952 | 0.0172 | 5.10E-03 | 0.0527 | 27 | 0.0099 | 0.9948 |

도면4a

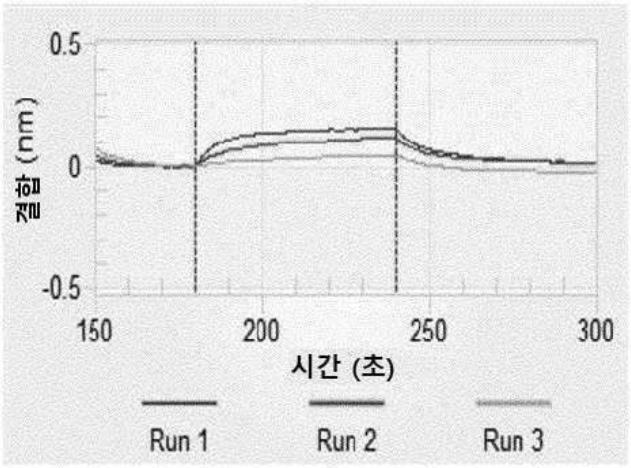



| | 사람 VISTA | 마우스 VISTA | Cyno VISTA | PDL1 | HER3 |
|---|---|---|---|---|---|
| $EC_{50}$ (M) | 2.56E-10 | 5.93E-09 | 2.82E-10 | N/A | N/A |

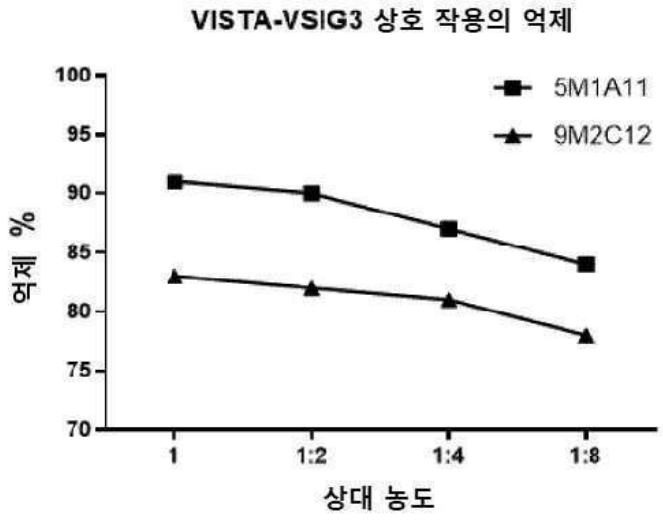
도면4b



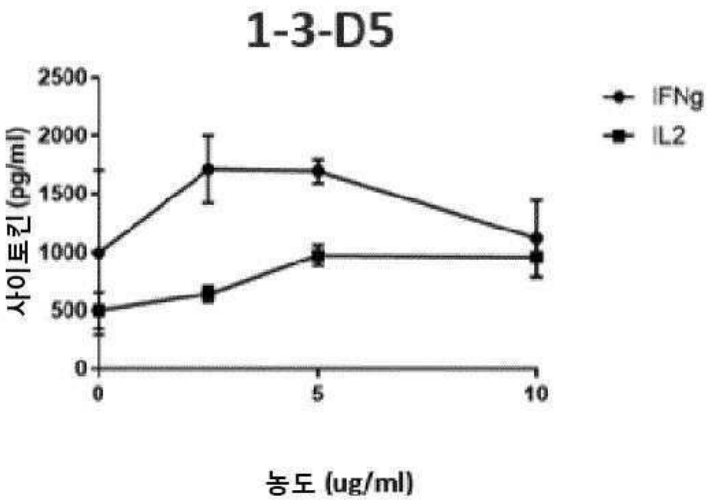

도면5



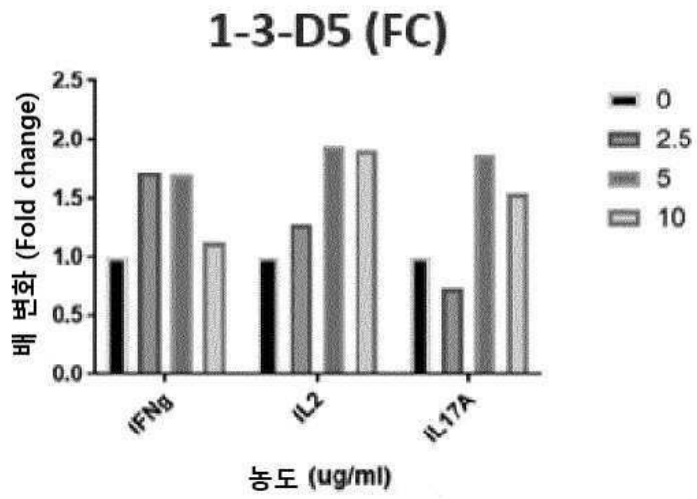
도면6


VISTA-VSIG3 상호 작용의 억제
5M1A11
9M2C12
억제 %
100
95
90
85
80
75
70
1
1:2
1:4
1:8
상대 농도

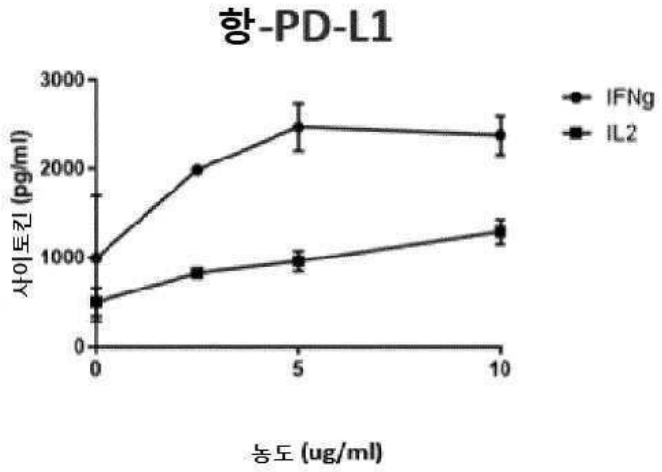
도면7a


1-3-D5
IFNg
IL2
사이토킨 (pg/ml)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
농도 (ug/ml)

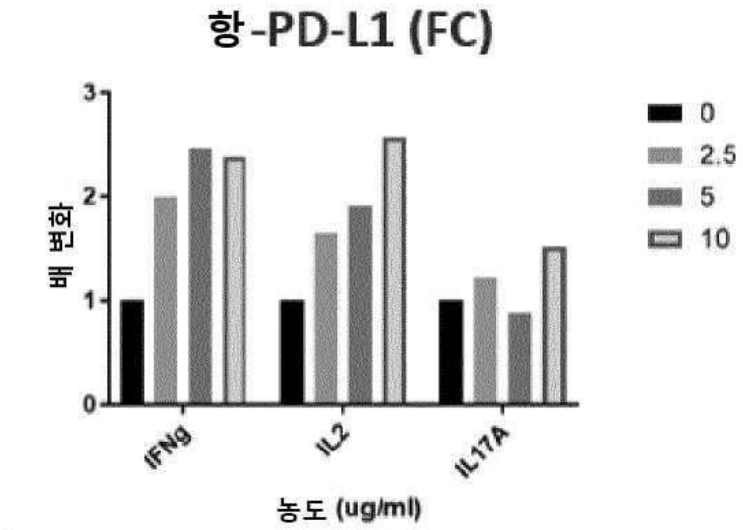
도면7b


1-3-D5 (FC)
배 변화 (Fold change)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
IFNg
IL2
IL17A
농도 (ug/ml)
0
2.5
5
10

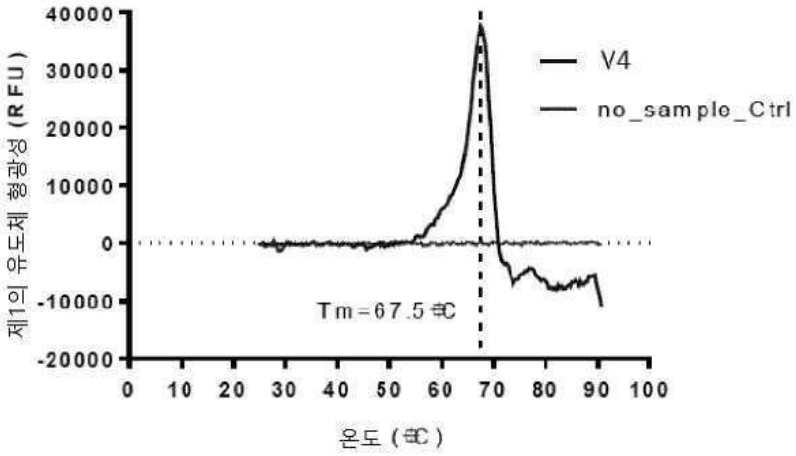
도면8a


항-PD-L1
사이토킨 (pg/ml)
3000
2000
1000
0
0
5
10
농도 (ug/ml)
IFNg
IL2

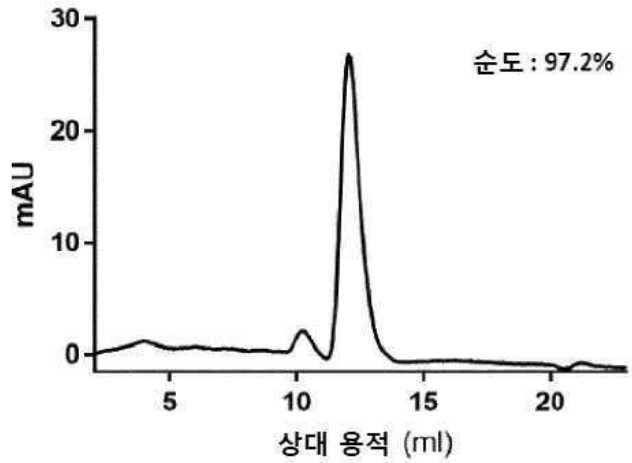
도면8b


항-PD-L1 (FC)
배 변화
3
2
1
0
0
2.5
5
10
IFNg
IL2
IL17A
농도 (ug/ml)

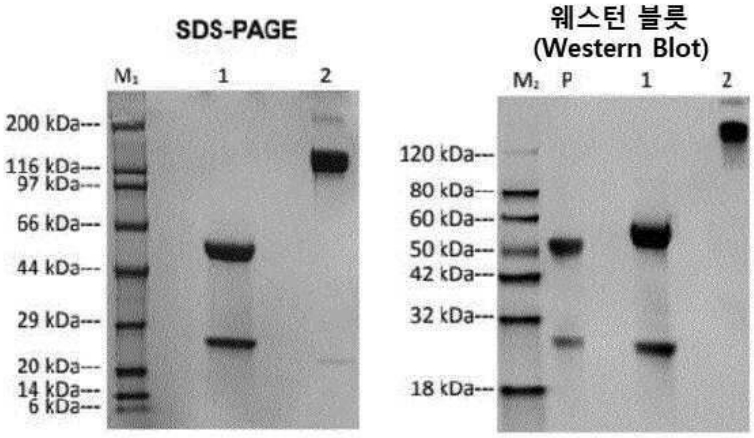
도면9


40000
30000
20000
10000
0
-10000
-20000
제1의 유도체 형광성 (RFU)
V4
no_sample_Ctrl
Tm=67.5℃
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
온도 (℃)

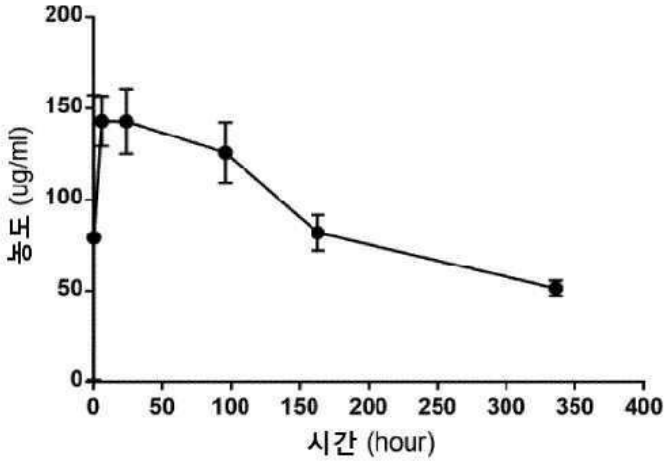
도면10


30
20
10
0
mAU
순도 : 97.2%
5
10
15
20
상대 용적 (ml)

도면11

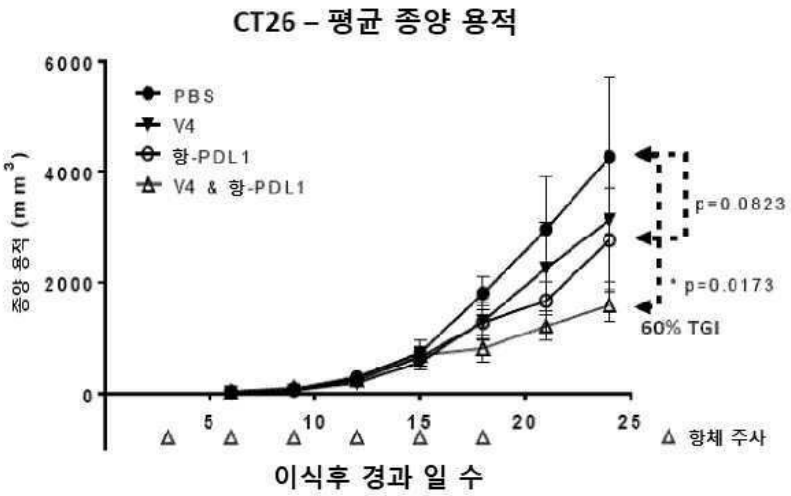

SDS-PAGE
M1
1
2
200 kDa
116 kDa
97 kDa
66 kDa
44 kDa
29 kDa
20 kDa
14 kDa
6 kDa
웨스턴 블릇
(Western Blot)
M2
P
1
2
120 kDa
80 kDa
60 kDa
50 kDa
42 kDa
32 kDa
18 kDa

도면12

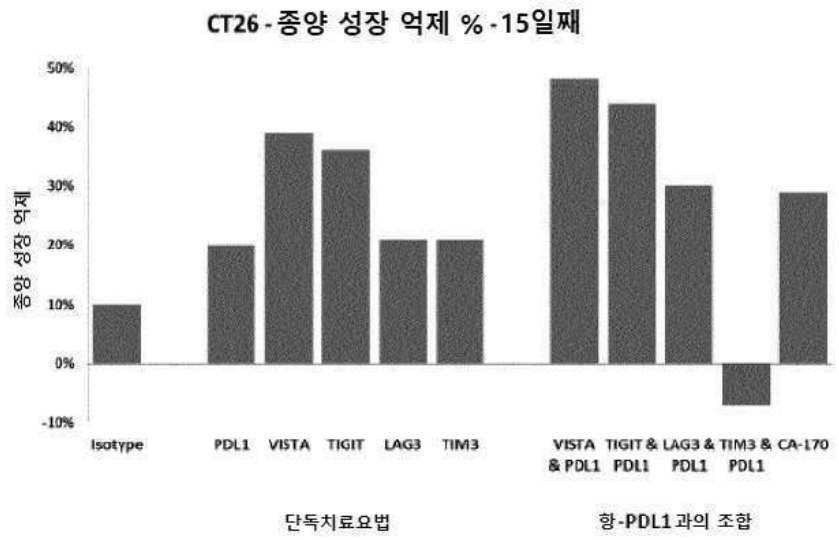



| 아암(Arm) | 용량 | Cmax (ug/ml) | Tmax (hr) | AUC0-336 (ug*h/ml) | AUC0-무한 (ug*h/ml) | T1/2 | CL | Vd |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | (hr) | (ml/h) | (mL/kg) |
| V4P | 25mg/kg | 143.05 | 6.00 | 31382.88 | 47118.67 | 211.79 | 0.01 | 3.84 |

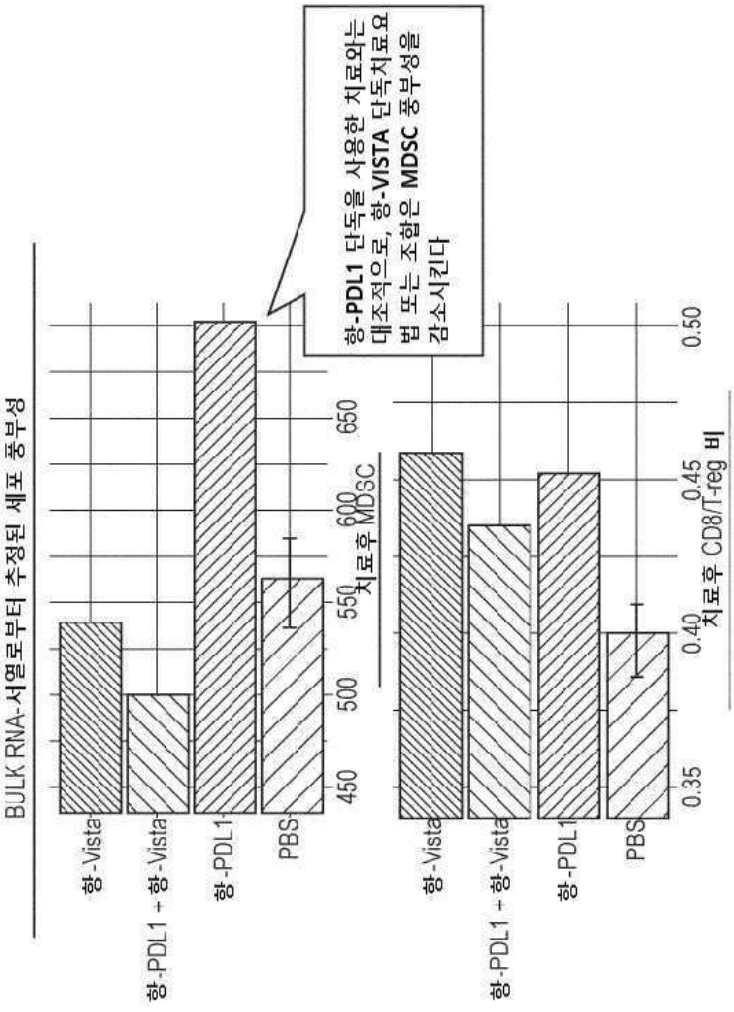
도면13



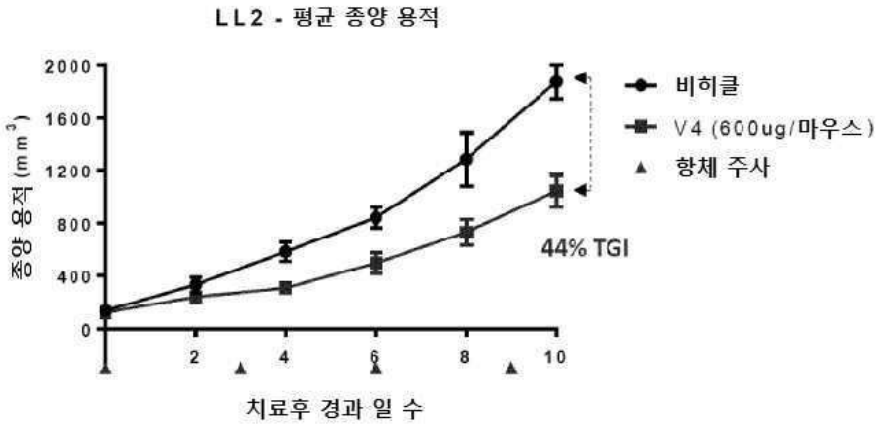
도면14


CT26 - 종양 성장 억제 % - 15일째
종양 성장 억제
50%
40%
30%
20%
10%
0%
-10%
Isotype
PDL1
VISTA
TIGIT
LAG3
TIM3
VISTA & PDL1
TIGIT & PDL1
LAG3 & PDL1
TIM3 & PDL1
CA-170
단독치료요법
항-PDL1 과의 조합

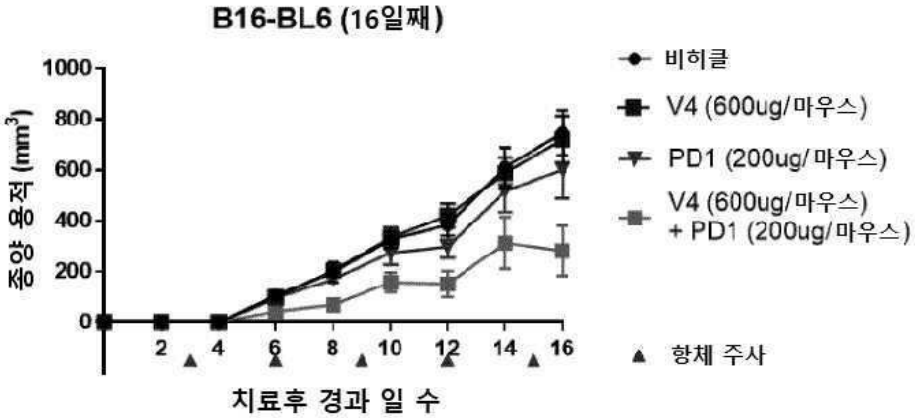
도면15


BULK RNA-서열로부터 추정된 세포 풍부성
항-PDL1 단독을 사용한 치료와는 대조적으로, 항-VISTA 단독치료요법 또는 조합은 MDSC 풍부성을 감소시킨다
치료후 MDSC
650
600
550
500
450
치료후 CD8/Treg 비
0.50
0.45
0.40
0.35
항-Vista
항-PDL1 + 항-Vista
항-PDL1
PBS
항-Vista
항-PDL1 + 항-Vista
항-PDL1
PBS

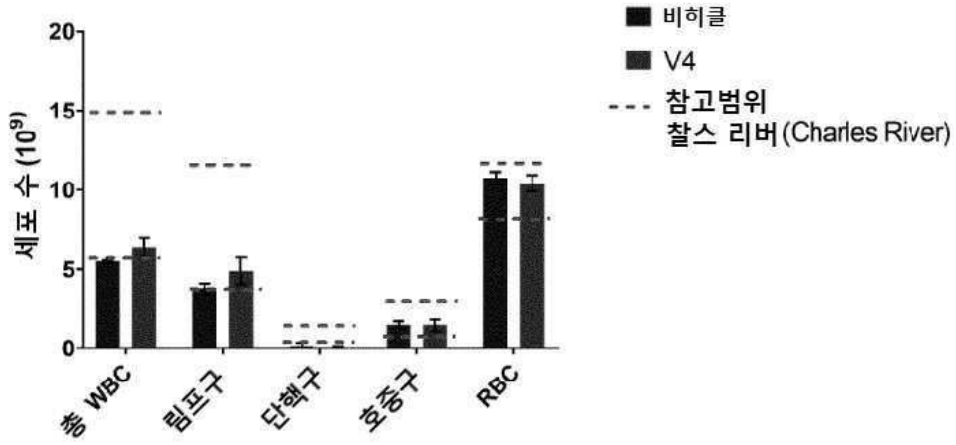
도면16



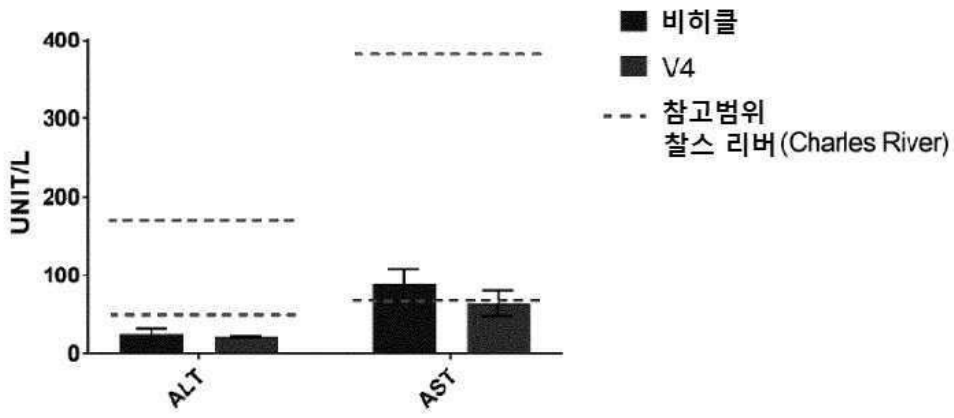

도면17



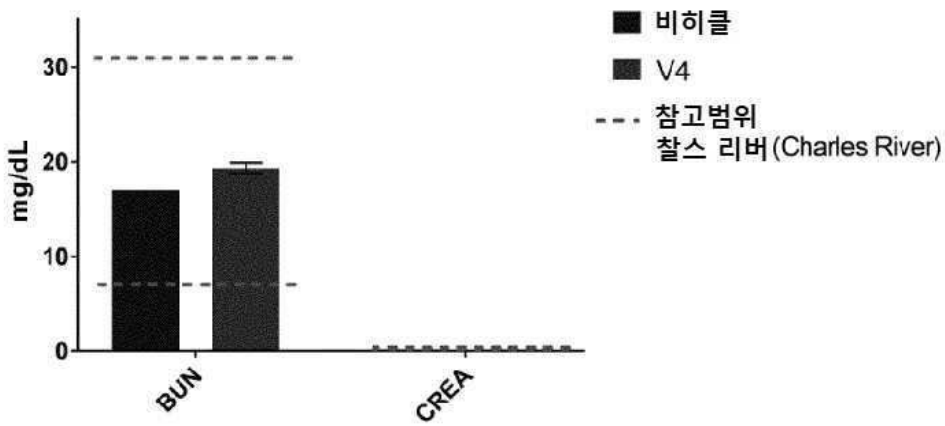

도면18



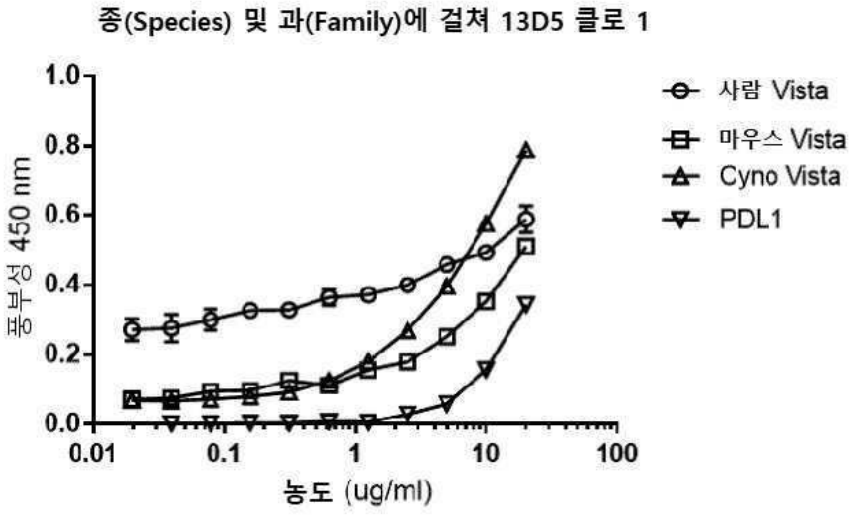
도면19a



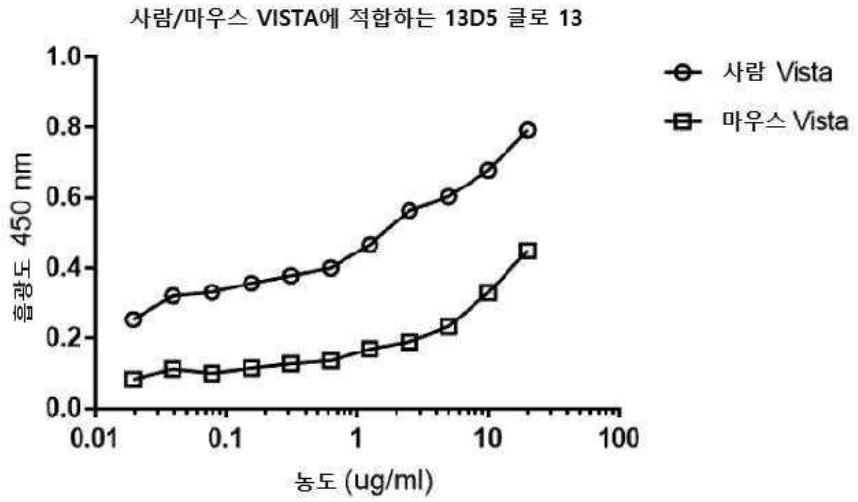

도면19b



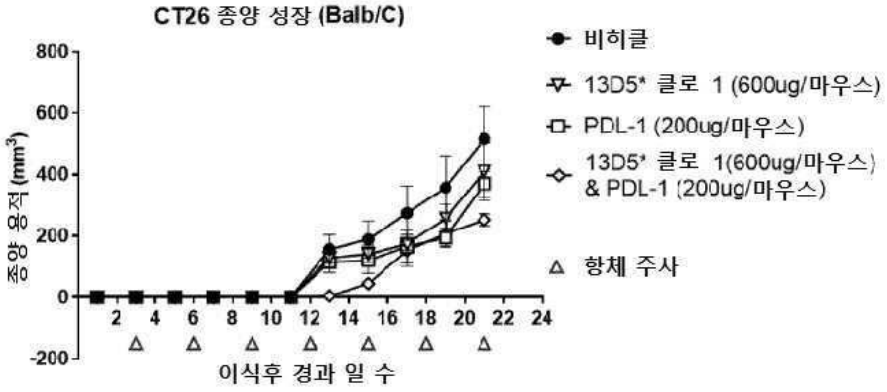

도면20



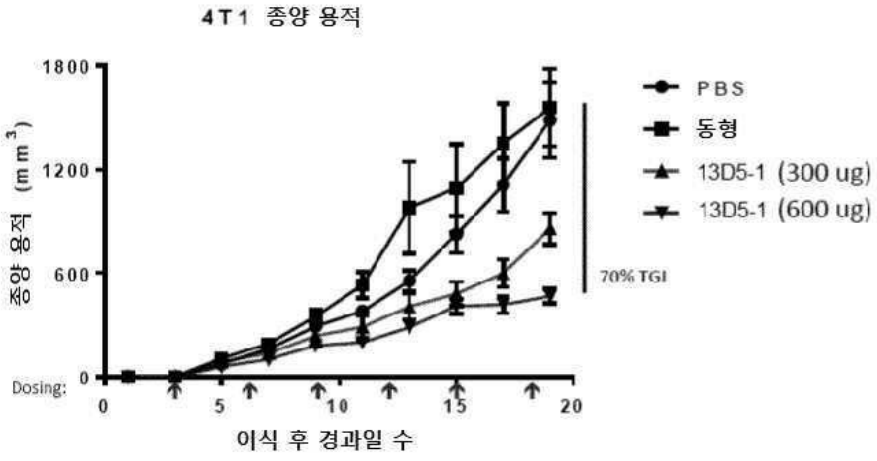
도면21



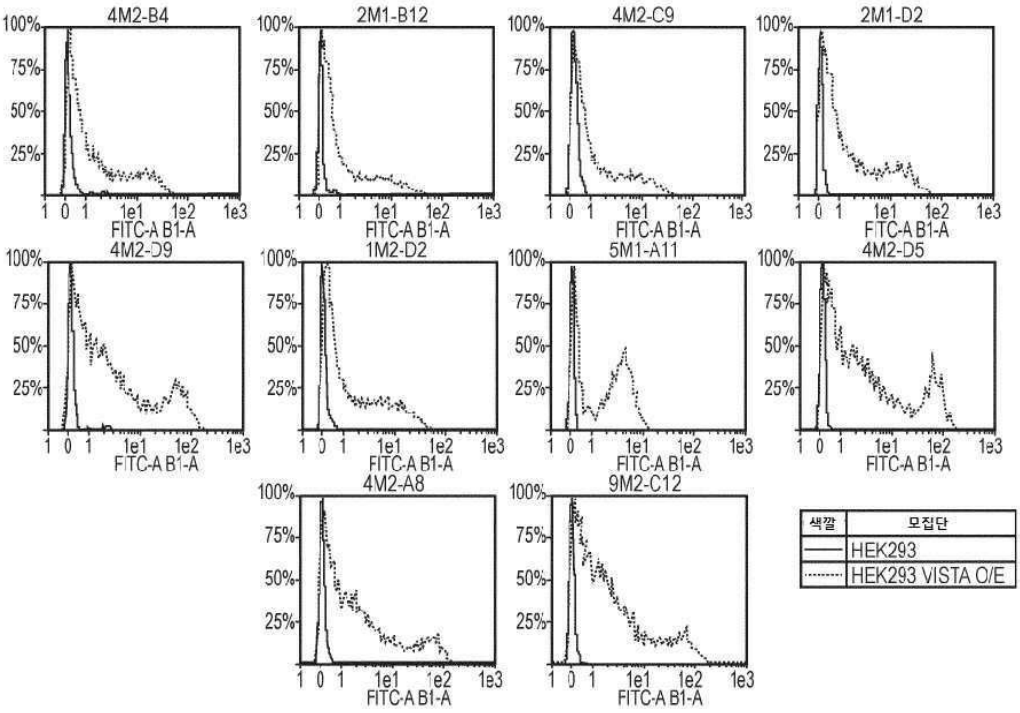

도면22



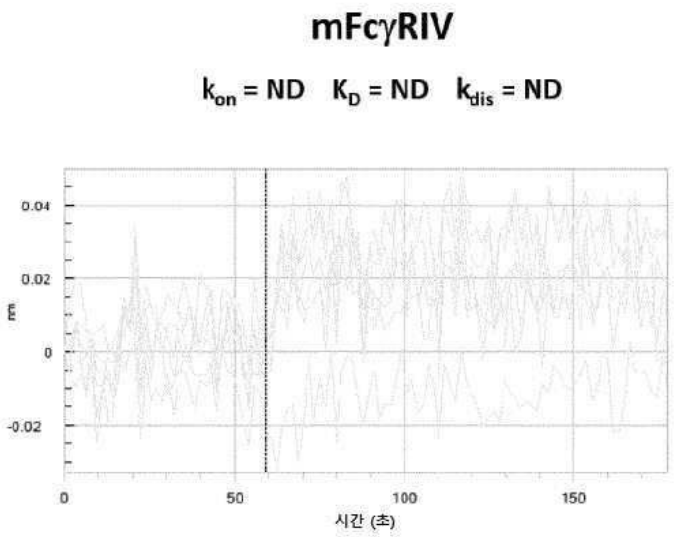

도면23



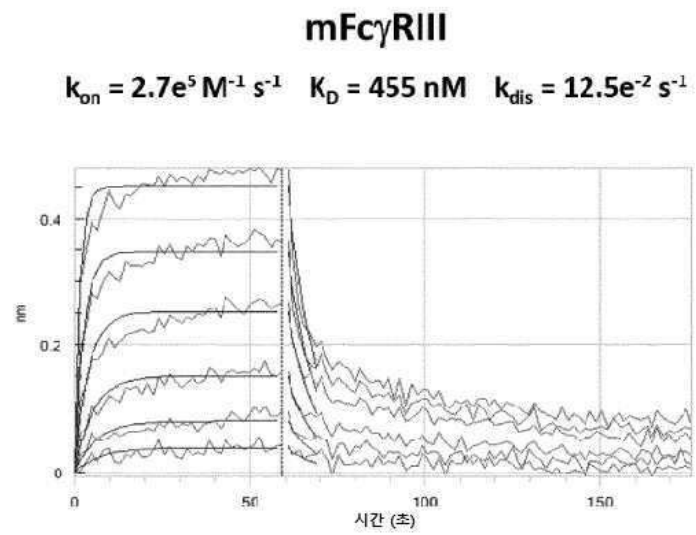
도면24


4M2-B4
2M1-B12
4M2-C9
2M1-D2
4M2-D9
1M2-D2
5M1-A11
4M2-D5
4M2-A8
9M2-C12
100%
75%
50%
25%
1 0 1 1e1 1e2 1e3
FITC-A B1-A
색깔
모집단
HEK293
HEK293 VISTA O/E

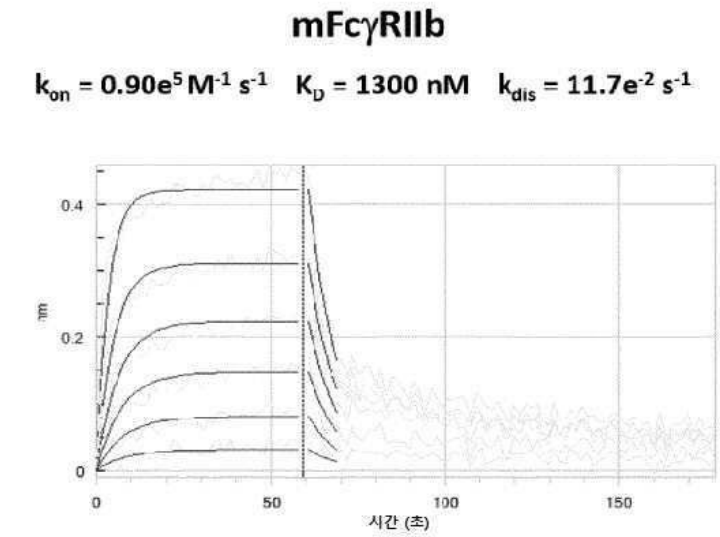
도면25a


mFcγRIV
$k_{on}$ = ND $K_D$ = ND $k_{dis}$ = ND
0.04
0.02
0
-0.02
nm
0
50
100
150
시간 (초)

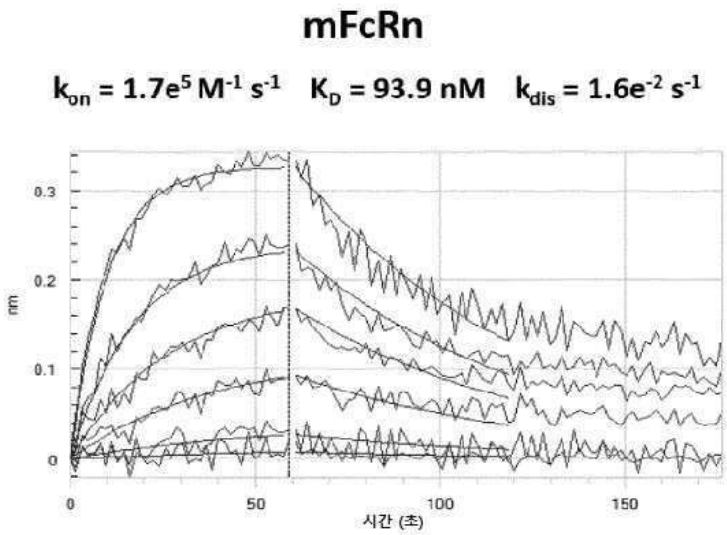
도면25b


mFcγRIII
$k_{on}$ = 2.7e$^5$ M$^{-1}$ s$^{-1}$ $K_D$ = 455 nM $k_{dis}$ = 12.5e$^{-2}$ s$^{-1}$
nm
0.4
0.2
0
0
50
100
150
시간 (초)

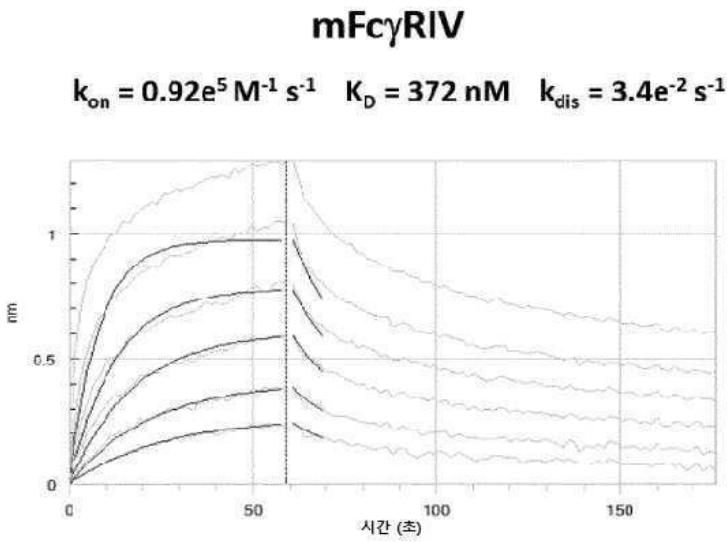
도면25c


mFcγRIIb
$k_{on}$ = 0.90e$^5$ M$^{-1}$ s$^{-1}$ $K_D$ = 1300 nM $k_{dis}$ = 11.7e$^{-2}$ s$^{-1}$
nm
0.4
0.2
0
0
50
100
150
시간 (초)

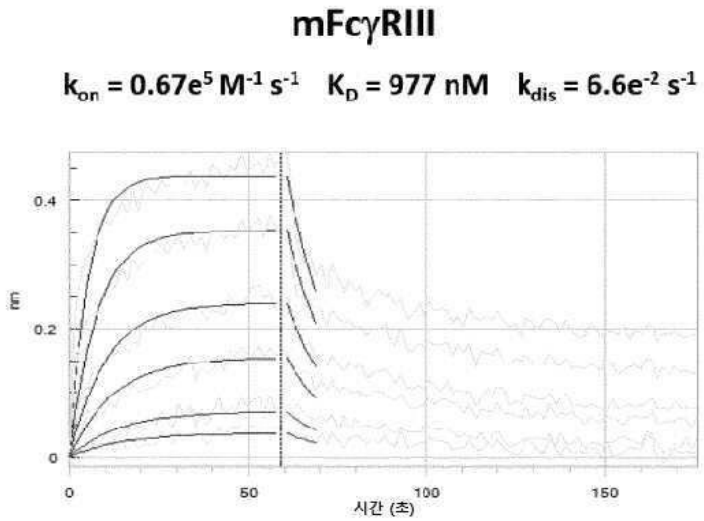
도면25d


mFcRn
$k_{on}$ = 1.7e$^5$ M$^{-1}$ s$^{-1}$ $K_D$ = 93.9 nM $k_{dis}$ = 1.6e$^{-2}$ s$^{-1}$
nm
0.3
0.2
0.1
0
0
50
100
150
시간 (초)

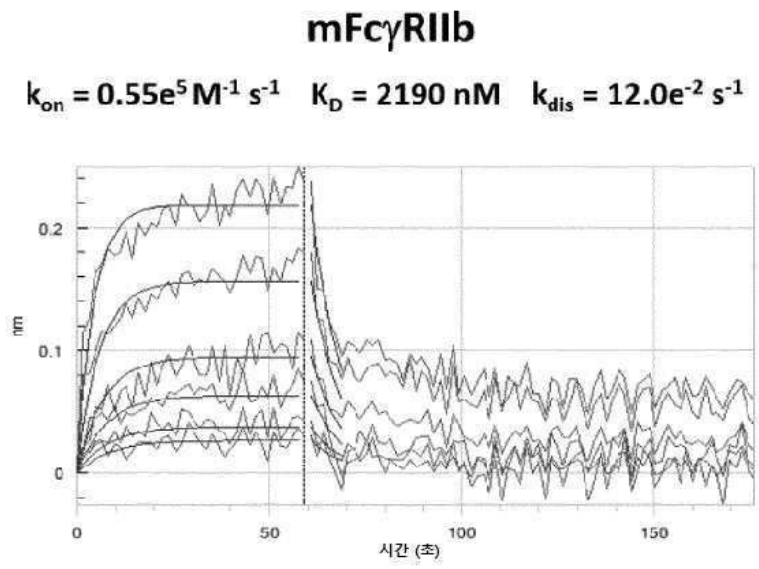
도면26a


mFcγRIV
$k_{on}$ = 0.92e$^5$ M$^{-1}$ s$^{-1}$ $K_D$ = 372 nM $k_{dis}$ = 3.4e$^{-2}$ s$^{-1}$
nm
1
0.5
0
0
50
100
150
시간 (초)

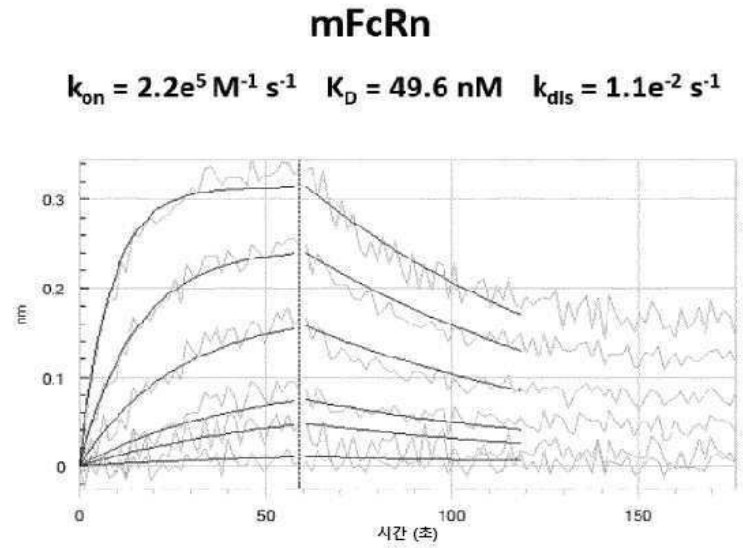
도면26b


mFcγRIII
$k_{on}$ = 0.67e$^5$ M$^{-1}$ s$^{-1}$ $K_D$ = 977 nM $k_{dis}$ = 6.6e$^{-2}$ s$^{-1}$
nm
0.4
0.2
0
0
50
100
150
시간 (초)

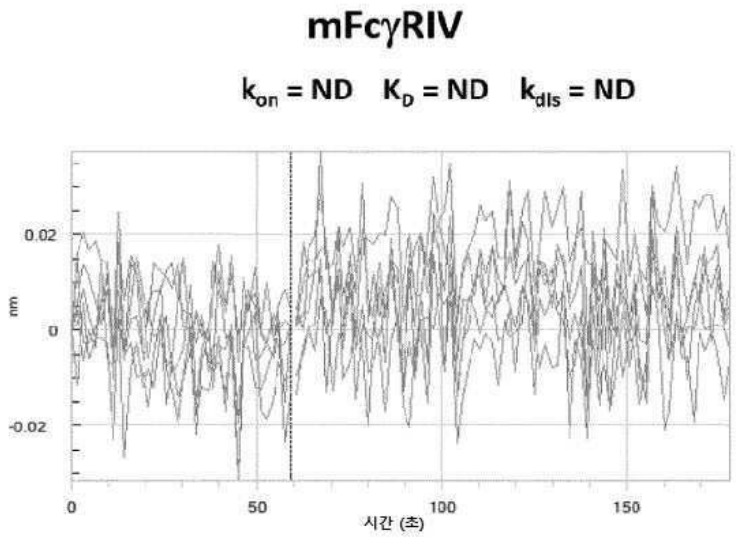
도면26c


mFcγRIIb
$k_{on}$ = 0.55e$^5$ M$^{-1}$ s$^{-1}$ $K_D$ = 2190 nM $k_{dis}$ = 12.0e$^{-2}$ s$^{-1}$
nm
0.2
0.1
0
0
50
100
150
시간 (초)

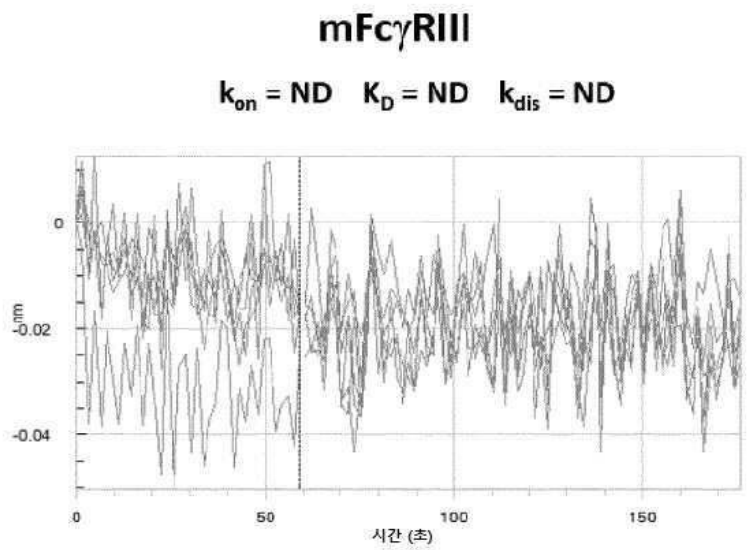
도면26d


mFcRn
$k_{on}$ = 2.2e$^5$ M$^{-1}$ s$^{-1}$ $K_D$ = 49.6 nM $k_{dis}$ = 1.1e$^{-2}$ s$^{-1}$
0.3
0.2
0.1
0
nm
0
50
100
150
시간 (초)

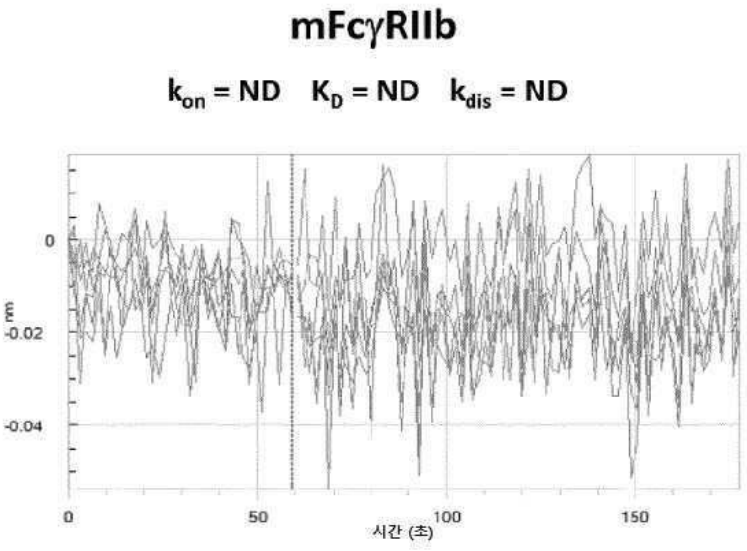
도면27a


mFcγRIV
$k_{on}$ = ND $K_D$ = ND $k_{dis}$ = ND
0.02
0
-0.02
nm
0
50
100
150
시간 (초)

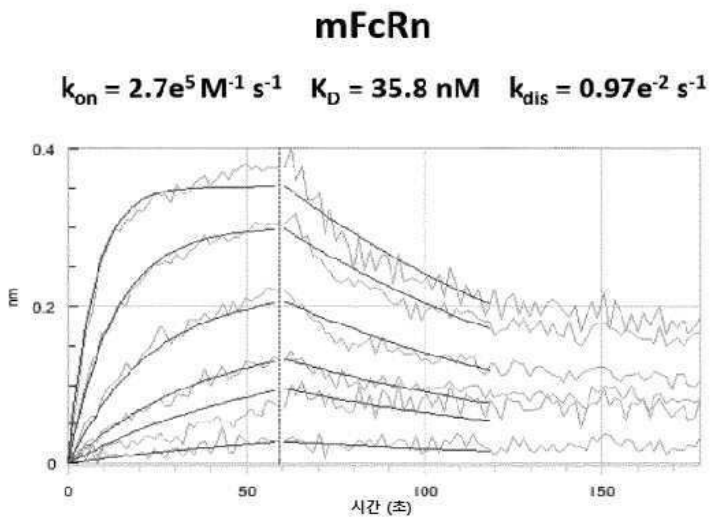
도면27b


mFcγRIII
$k_{on}$ = ND $K_D$ = ND $k_{dis}$ = ND
0
-0.02
-0.04
nm
0
50
100
150
시간 (초)

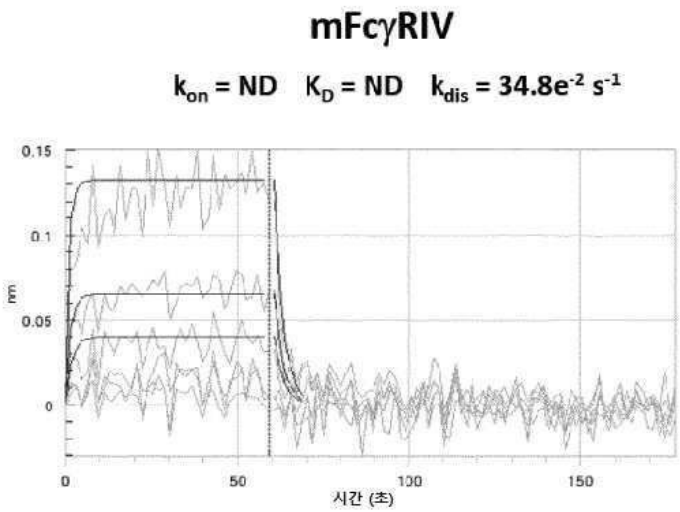
도면27c


mFcγRIIb
$k_{on}$ = ND $K_D$ = ND $k_{dis}$ = ND
0
-0.02
-0.04
nm
0
50
100
150
시간 (초)

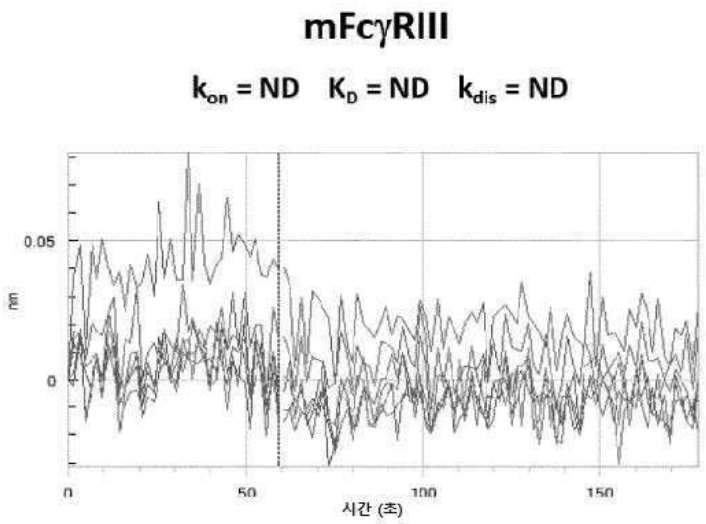
도면27d


mFcRn
$k_{on}$ = 2.7e$^5$ M$^{-1}$ s$^{-1}$ $K_D$ = 35.8 nM $k_{dis}$ = 0.97e$^{-2}$ s$^{-1}$
0.4
0.2
0
nm
0
50
100
150
시간 (초)

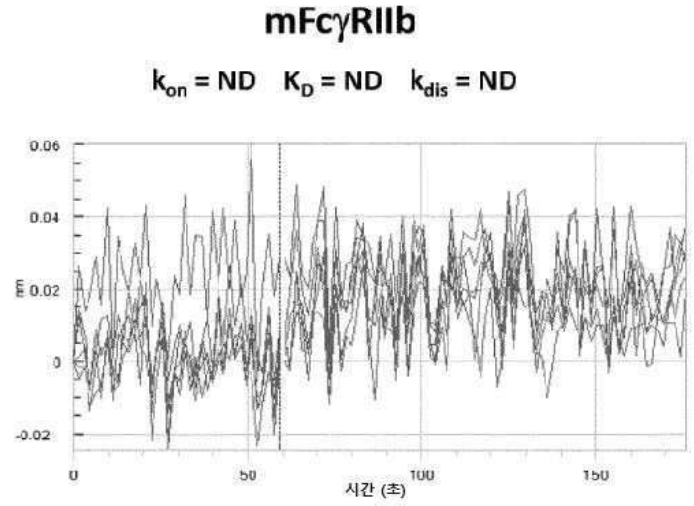
도면28a


mFcγRIV
$k_{on}$ = ND $K_D$ = ND $k_{dis}$ = 34.8e$^{-2}$ s$^{-1}$
0.15
0.1
0.05
0
nm
0
50
100
150
시간 (초)

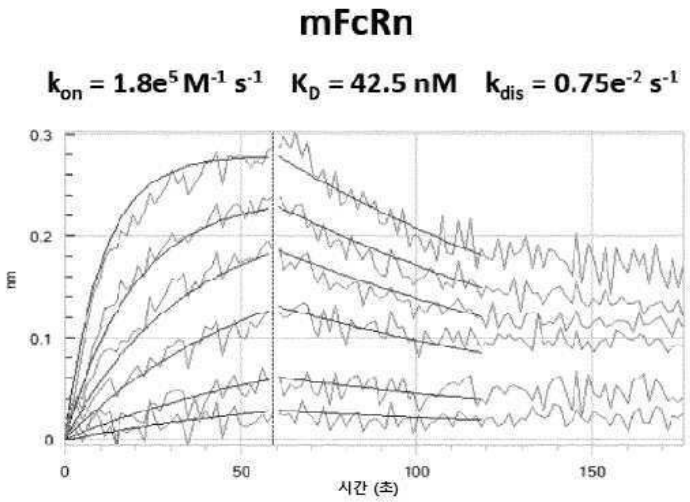
도면28b


mFcγRIII
$k_{on}$ = ND $K_D$ = ND $k_{dis}$ = ND
0.05
0
nm
0
50
100
150
시간 (초)

도면28c


mFcγRIIb
$k_{on}$ = ND $K_D$ = ND $k_{dis}$ = ND
0.06
0.04
0.02
0
-0.02
nm
0
50
100
150
시간 (초)

도면28d




도면29a

계산된 $k_{on}$ ($M^{-1}$ $s^{-1}$)

| Receptor | 4M2-C12 mIgG2a $k_{on}$ ($M^{-1}s^{-1}$) | | 4M2-C12 mIgG1 $k_{on}$ ($M^{-1}s^{-1}$) | 4M2-C12 mIgG2a LALA_PG $k_{on}$ ($M^{-1}s^{-1}$) | 4M2-C12 mIgG2a NQ $k_{on}$ ($M^{-1}s^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | | | |
| mFcRn | 1.9e$^5$ | 2.2e$^5$ | 1.7e$^5$ | 2.7e$^5$ | 1.8e$^5$ |
| mFcgRIV | 0.96e$^5$ | 0.92e$^5$ | ND | ND | ND |
| mFcgRIII | 0.55e$^5$ | 0.67e$^5$ | 2.7e$^5$ | ND | ND |
| mFcgRIIb | 0.51e$^5$ | 0.55e$^5$ | 0.90e$^5$ | ND | ND |

ND = 낮은 결합 친화성으로 인해 측정되지 않음

도면29b

계산된 $k_{dis}$ ($s^{-1}$)

| Receptor | 4M2-C12 mIgG2a $k_{dis}$ ($s^{-1}$) | | 4M2-C12 mIgG1 $k_{dis}$ ($s^{-1}$) | 4M2-C12 mIgG2a LALA_PG $k_{dis}$ ($s^{-1}$) | 4M2-C12 mIgG2a NQ $k_{dis}$ ($s^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | | | |
| mFcRn | 0.59e$^{-2}$ | 1.1e$^{-2}$ | 1.6e$^{-2}$ | 0.97e$^{-2}$ | 0.75e$^{-2}$ |
| mFcgRIV | 2.5e$^{-2}$ | 3.4e$^{-2}$ | ND | ND | 34.8e$^{-2}$ |
| mFcgRIII | 4.4e$^{-2}$ | 6.6e$^{-2}$ | 12.5e$^{-2}$ | ND | ND |
| mFcgRIIb | 4.5e$^{-2}$ | 12.0e$^{-2}$ | 11.7e$^{-2}$ | ND | ND |

ND = 낮은 결합 친화성으로 인해 측정되지 않음

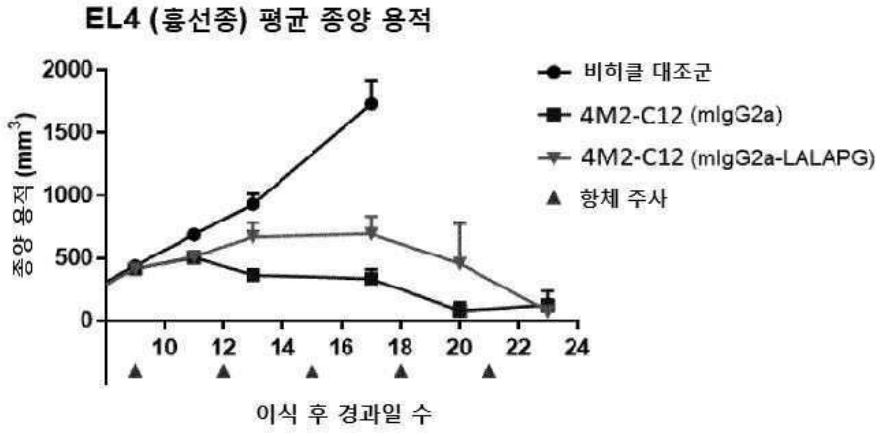
도면29c

계산된 $K_D$ (nM)

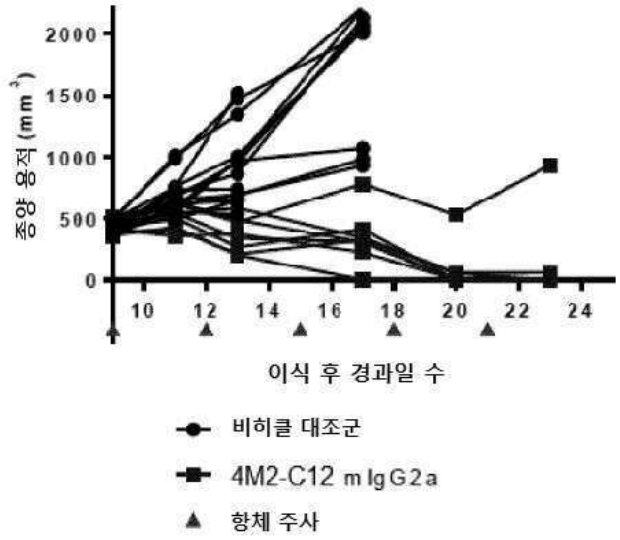
| 수용체 | 유전자 | 기능 | 결합 친화성 | 보고된 $K_D$ (nM) | 4M2-C12 mIgG2a $K_D$ (nM) | | 4M2-C12 mIgG1 $K_D$ (nM) | 4M2-C12 mIgG2a LALA_PG $K_D$ (nM) | 4M2-C12 mIgG2a NQ $K_D$ (nM) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | 1 | 2 | | | |
| mFcRn | FCGRT | 재순환 (증가된 친화성 → ,증가된 반감기) | 중간 | mIgG1: 1157<br>mIgG2a: 490<br>mIgG2b: 545<br>mIgG3: 140 | hIgG1: 72<br>hIgG2: 63<br>hIgG3: 230<br>hIgG4: 116 | 31.5 | 49.5 | 93.9 | 35.8 | 42.5 |
| mFcgRIV | CD16-2 | 세포 활성화 | 높음 | mIgG1: ND<br>mIgG2a: 34.5<br>mIgG2b: 59<br>mIgG3: ND | hIgG1: 280<br>hIgG2: 0<br>hIgG3: 170<br>hIgG4: 26000 | 258 | 372 | ND | ND | ND |
| mFcgRIII | CD16 | 세포 활성화 | 낮음 | mIgG1: 3200<br>mIgG2a: 1460<br>mIgG2b: 1555<br>mIgG3: ND | hIgG1: 9300<br>hIgG2: 9700<br>hIgG3: 1300<br>hIgG4: 21000 | 794 | 977 | 455 | ND | ND |
| mFcgRIIb | CD32 | 세포 억제 | 낮음 | mIgG1: 301<br>mIgG2a: 2390<br>mIgG2b: 448<br>mIgG3: ND | hIgG1: 1100<br>hIgG2: 7900<br>hIgG3: 700<br>hIgG4: 1000 | 876 | 2190 | 1300 | ND | ND |

ND = 낮은 결합 친화성으로 인해 측정되지 않음

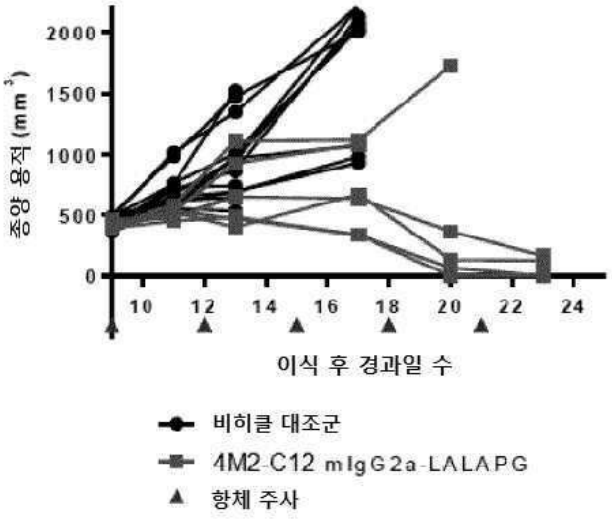
도면30a



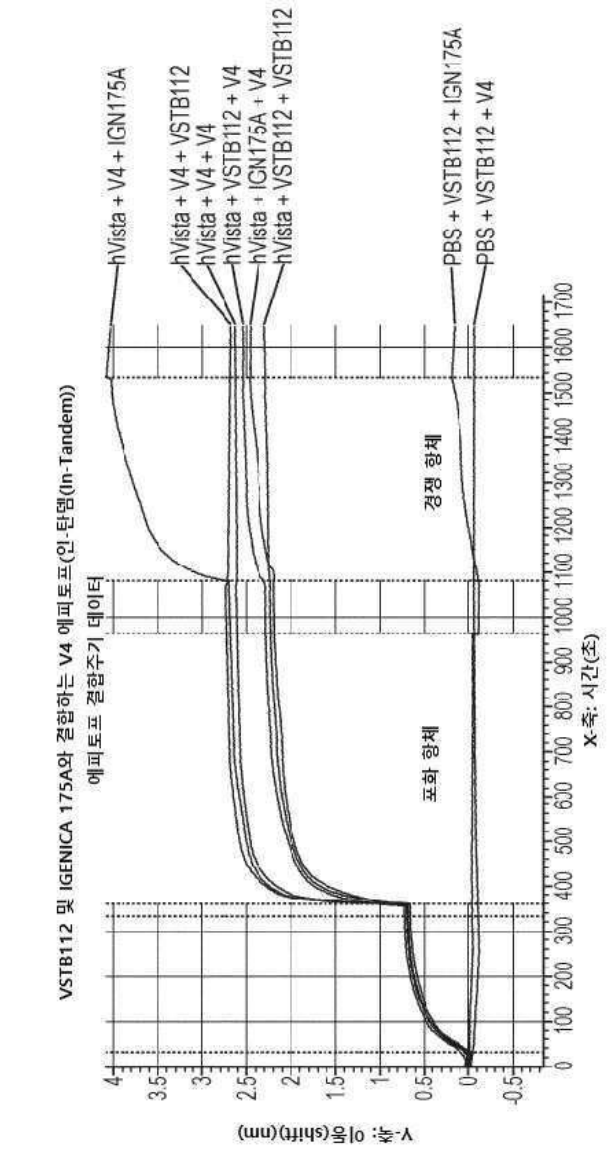
도면30b


종양 용적 (mm³)
2000
1500
1000
500
0
10
12
14
16
18
20
22
24
이식 후 경과일 수
비히클 대조군
4M2-C12 mIgG2a
항체 주사

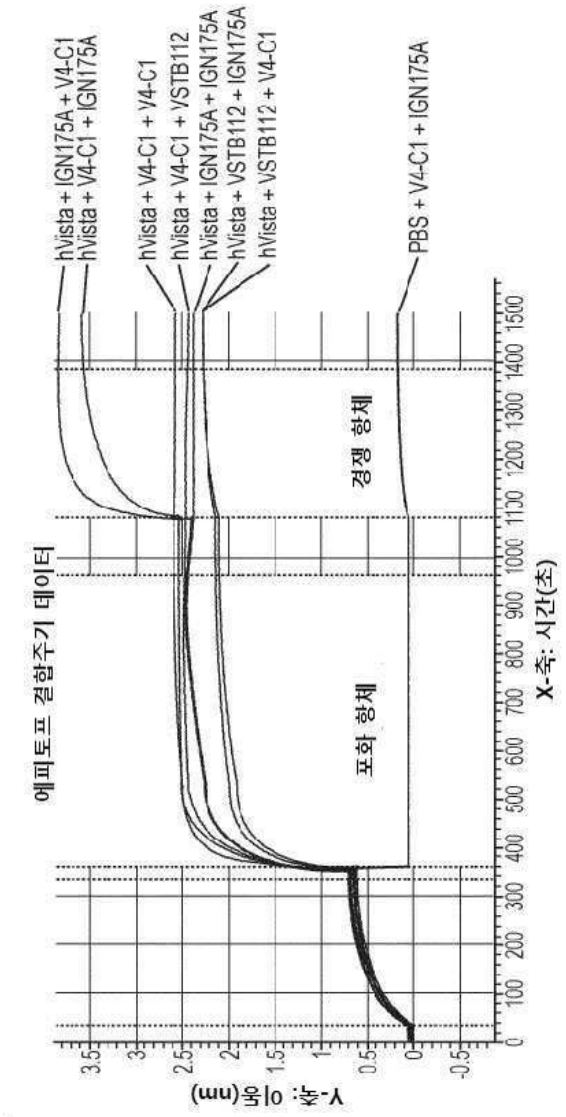
도면30c


종양 용적 (mm³)
2000
1500
1000
500
0
10
12
14
16
18
20
22
24
이식 후 경과일 수
비히클 대조군
4M2-C12 mIgG2a-LALAPG
항체 주사

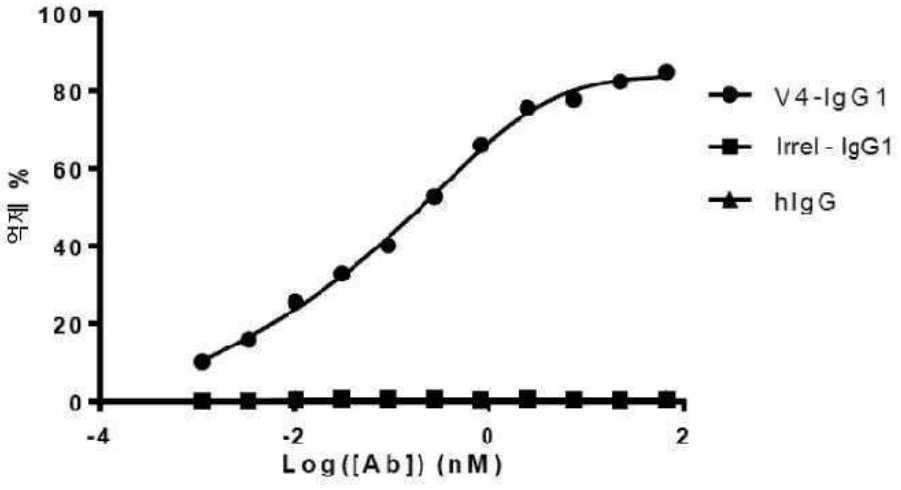
도면31a


VSTB112 및 IGENICA 175A와 결합하는 V4 에피토프(인-탄뎀(In-Tandem))
에피토프 결합주기 데이터
hVista + V4 + IGN175A
hVista + V4 + VSTB112
hVista + V4 + V4
hVista + VSTB112 + V4
hVista + IGN175A + V4
hVista + VSTB112 + VSTB112
PBS + VSTB112 + IGN175A
PBS + VSTB112 + V4
경쟁 항체
포화 항체
Y-축: 이동(shift)(nm)
X-축: 시간(초)

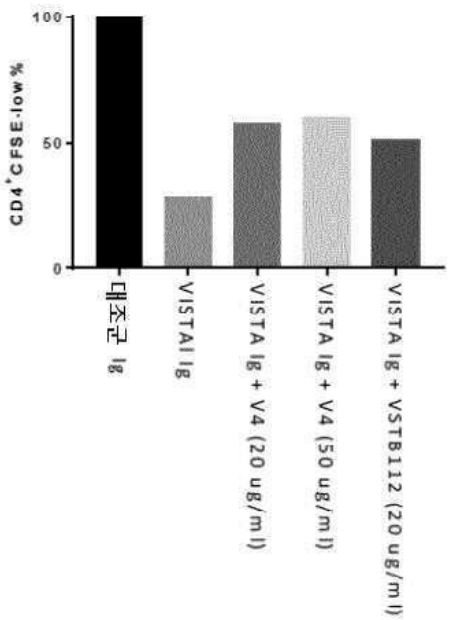
도면31b


hVista + IGN175A + V4-C1
hVista + V4-C1 + IGN175A
hVista + V4-C1 + V4-C1
hVista + V4-C1 + VSTB112
hVista + IGN175A + IGN175A
hVista + VSTB112 + IGN175A
hVista + VSTB112 + V4-C1
PBS + V4-C1 + IGN175A
경쟁 항체
포화 항체
에피토프 결합주기 데이터
X-축: 시간(초)
Y-축: 이동(nm)

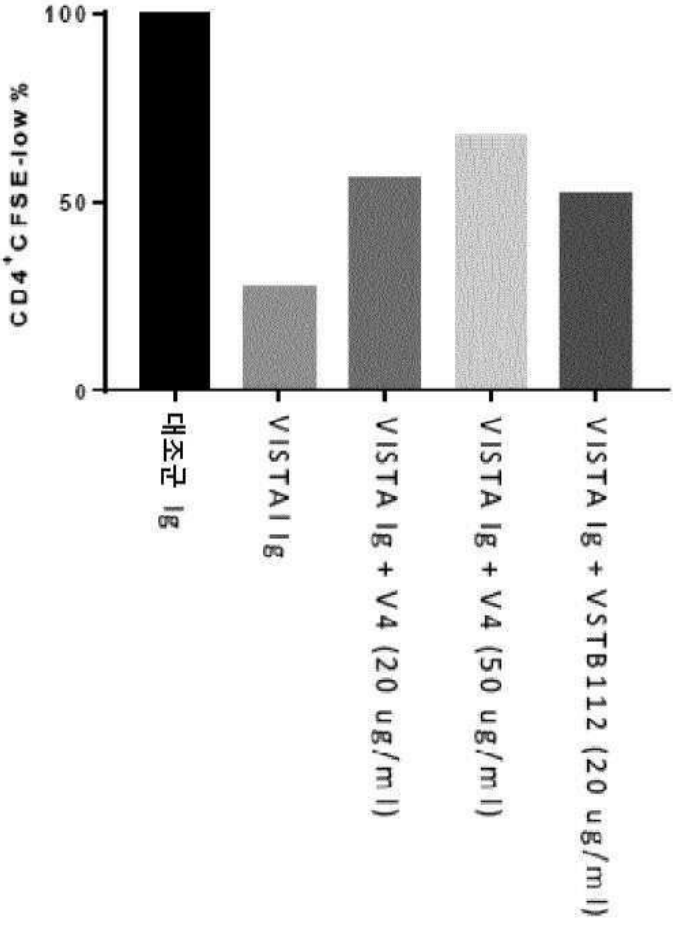
도면32


억제 %
Log([Ab]) (nM)
V4-IgG1
Irrel - IgG1
hIgG

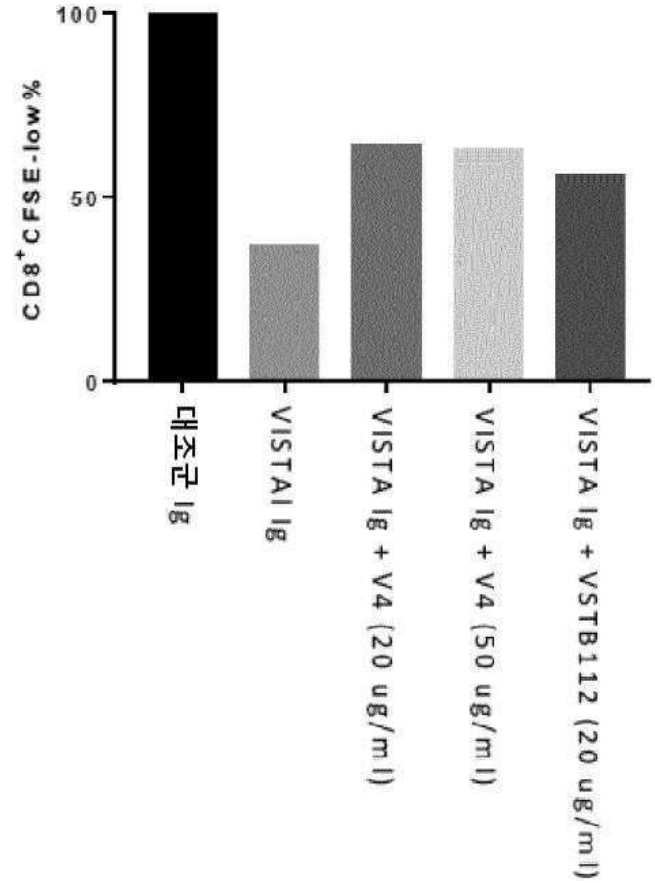
도면33a


100
50
0
CD4+CFSE-low %
대조군 Ig
VISTA Ig
VISTA Ig + V4 (20 ug/ml)
VISTA Ig + V4 (50 ug/ml)
VISTA Ig + VSTB112 (20 ug/ml)

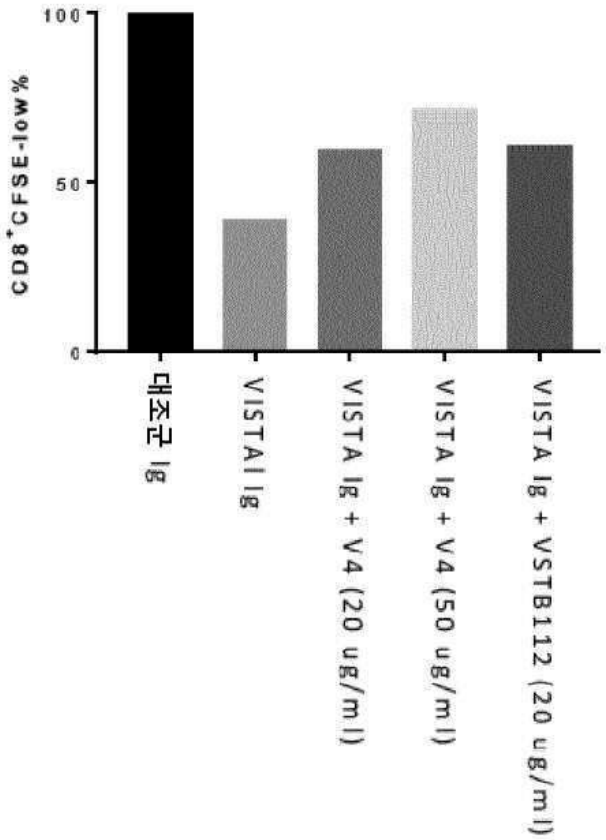
도면33b


100
50
0
CD4+CFSE-low %
대조군 Ig
VISTA Ig
VISTA Ig + V4 (20 ug/ml)
VISTA Ig + V4 (50 ug/ml)
VISTA Ig + VSTB112 (20 ug/ml)

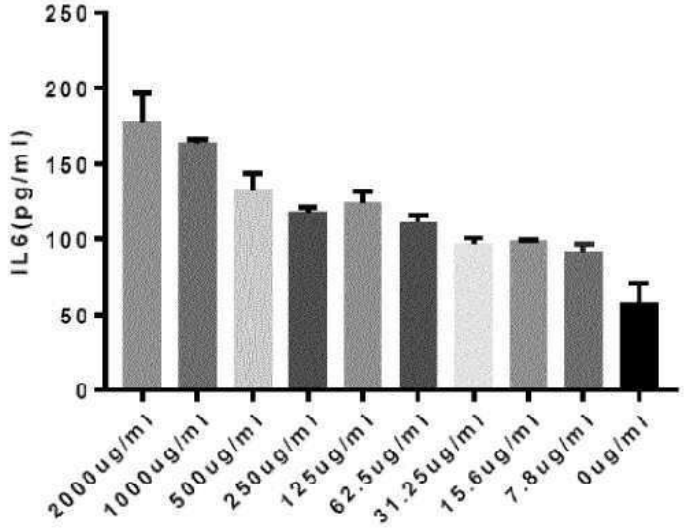
도면33c


100
50
0
CD8+CFSE-low %
대조군 Ig
VISTA Ig
VISTA Ig + V4 (20 ug/ml)
VISTA Ig + V4 (50 ug/ml)
VISTA Ig + VSTB112 (20 ug/ml)

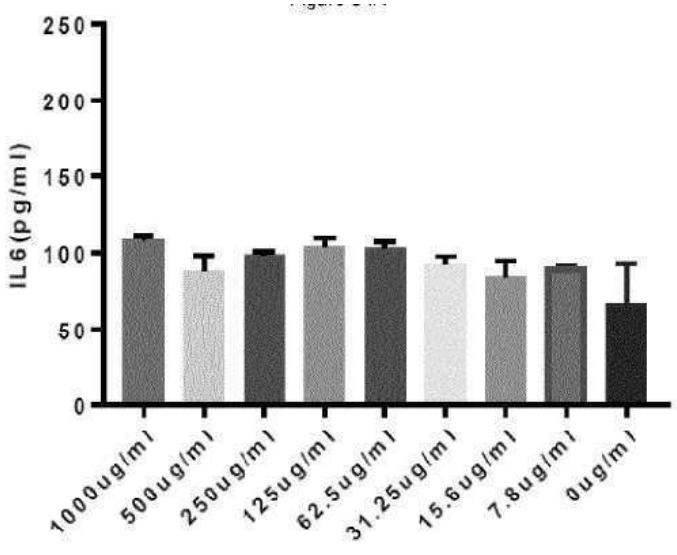
도면33d


CD8+CFSE-low%
100
50
0
대조군 Ig
VISTA Ig
VISTA Ig + V4 (20 ug/ml)
VISTA Ig + V4 (50 ug/ml)
VISTA Ig + VSTB112 (20 ug/ml)

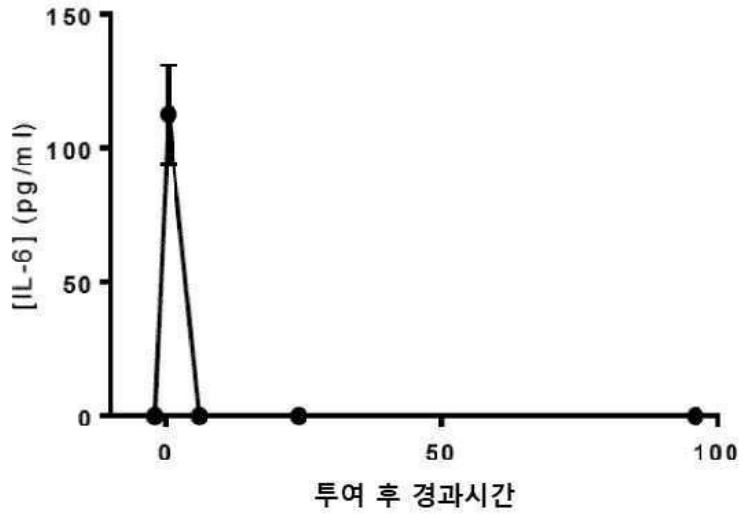
도면34a


IL6(pg/ml)
250
200
150
100
50
0
2000ug/ml
1000ug/ml
500ug/ml
250ug/ml
125ug/ml
62.5ug/ml
31.25ug/ml
15.6ug/ml
7.8ug/ml
0ug/ml

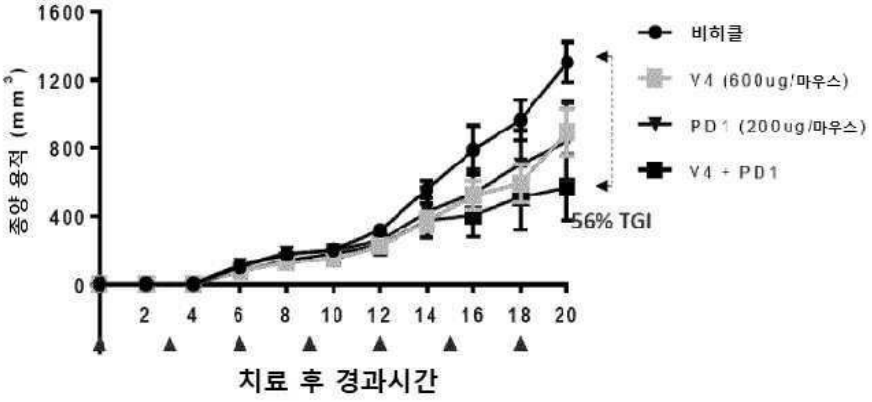
도면34b



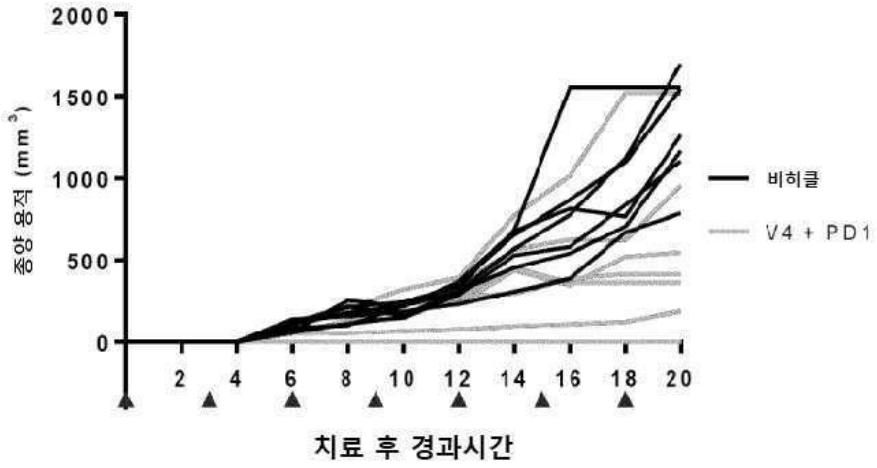

도면35



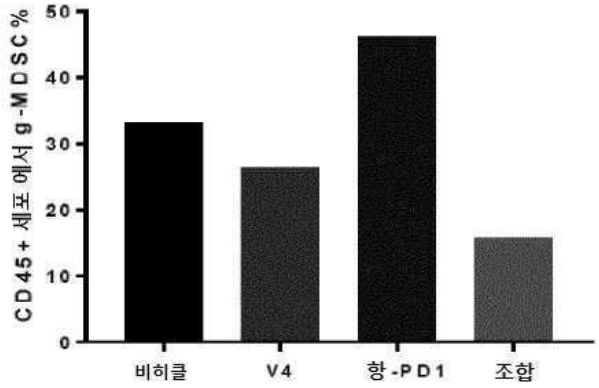

도면36a



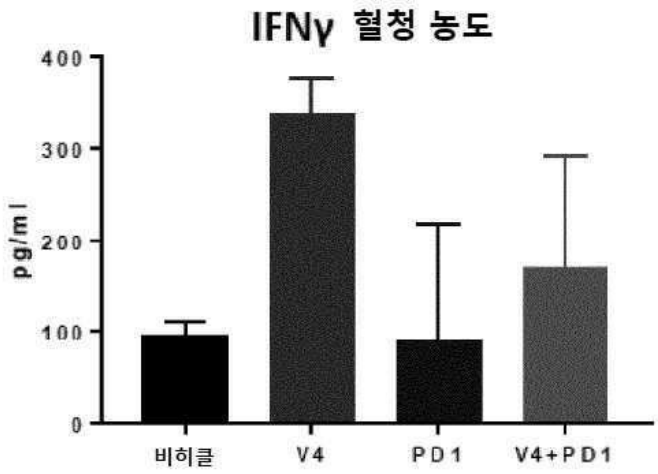
도면36b



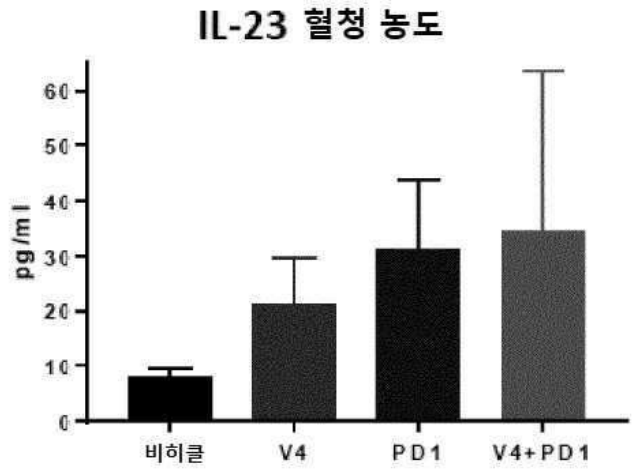

도면37



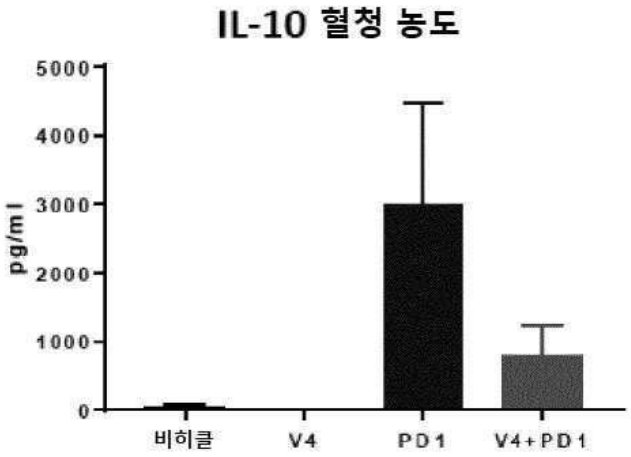

도면38a



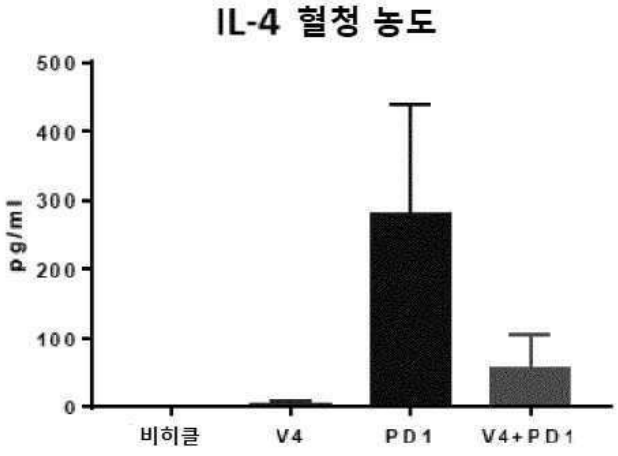
도면38b



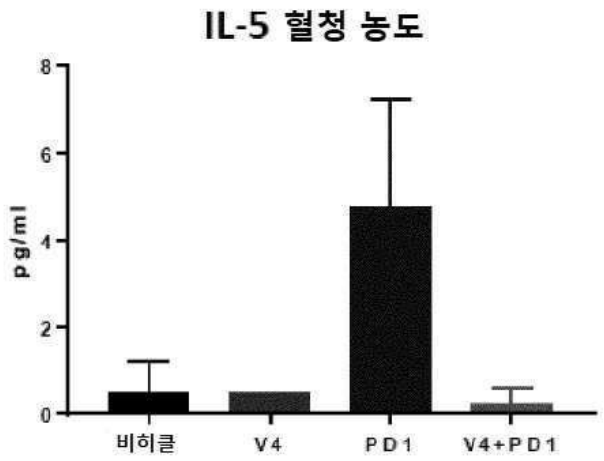

도면38c



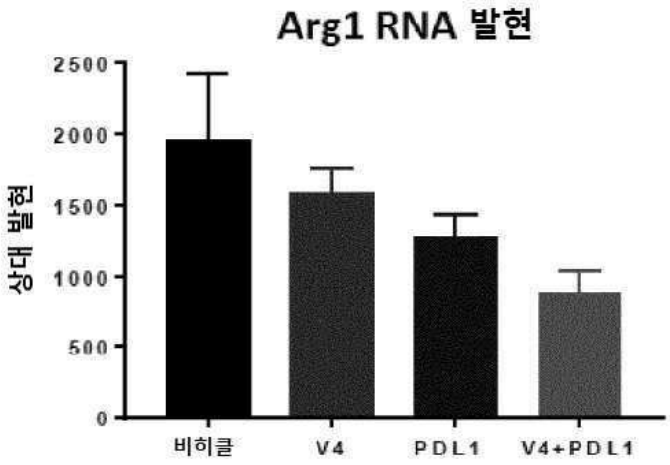

도면38d



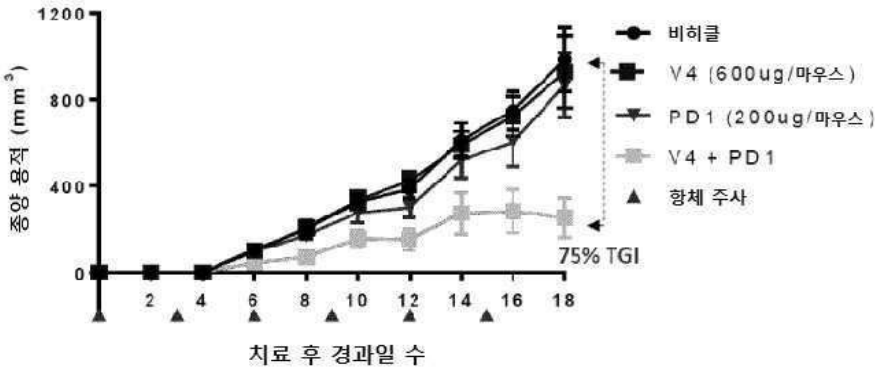
도면38e



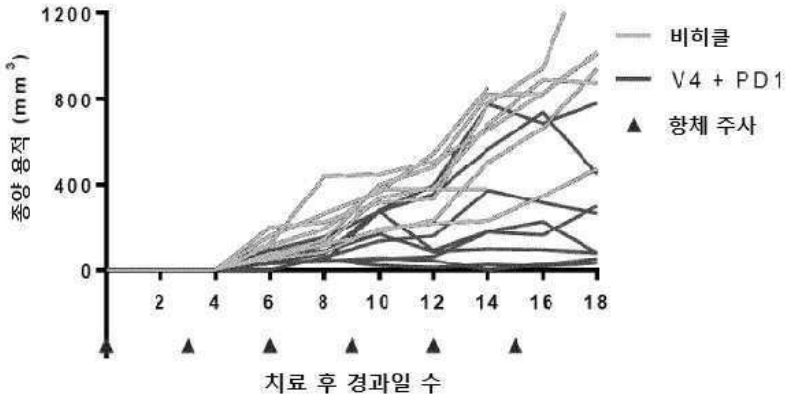

도면39



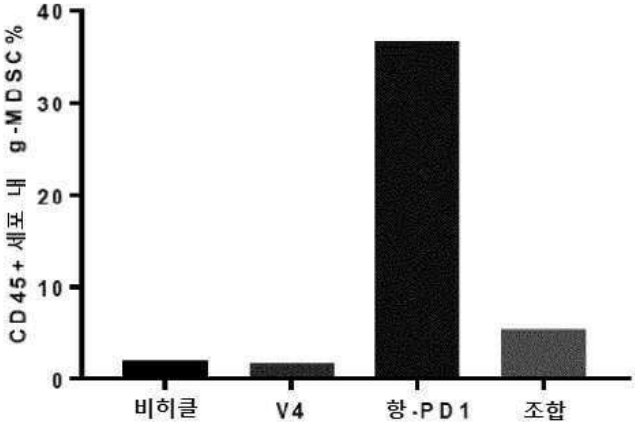

도면40a



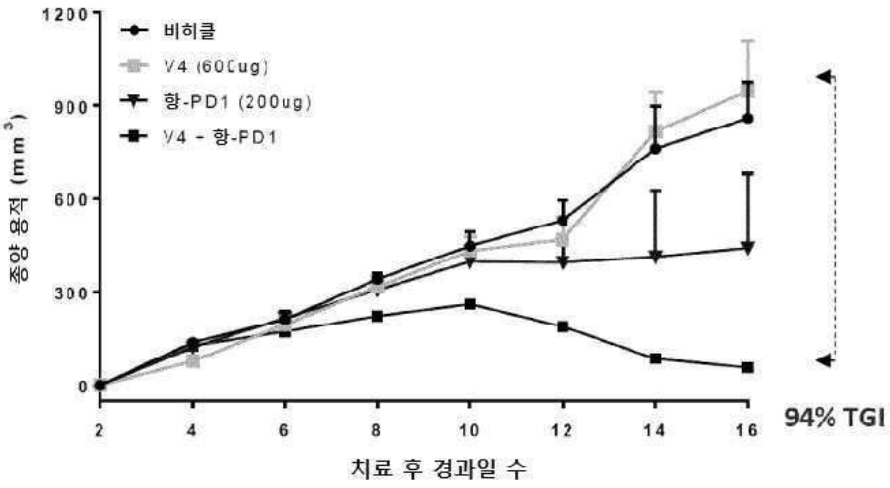
도면40b



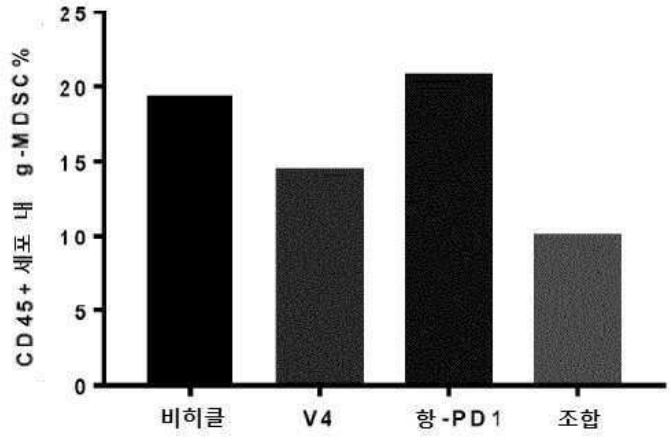

도면41



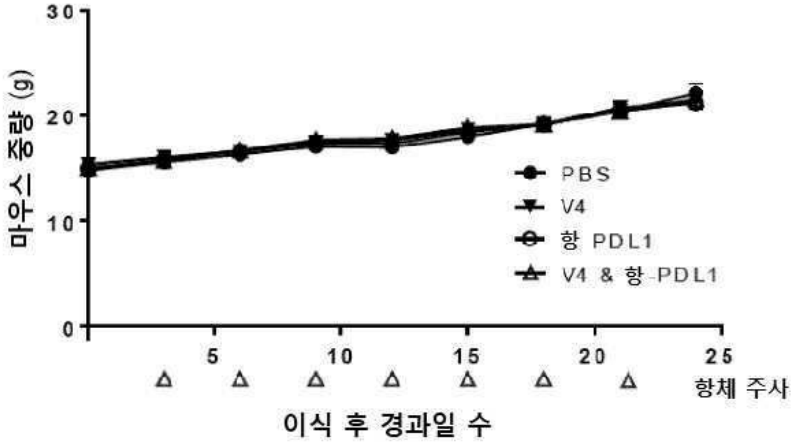

도면42



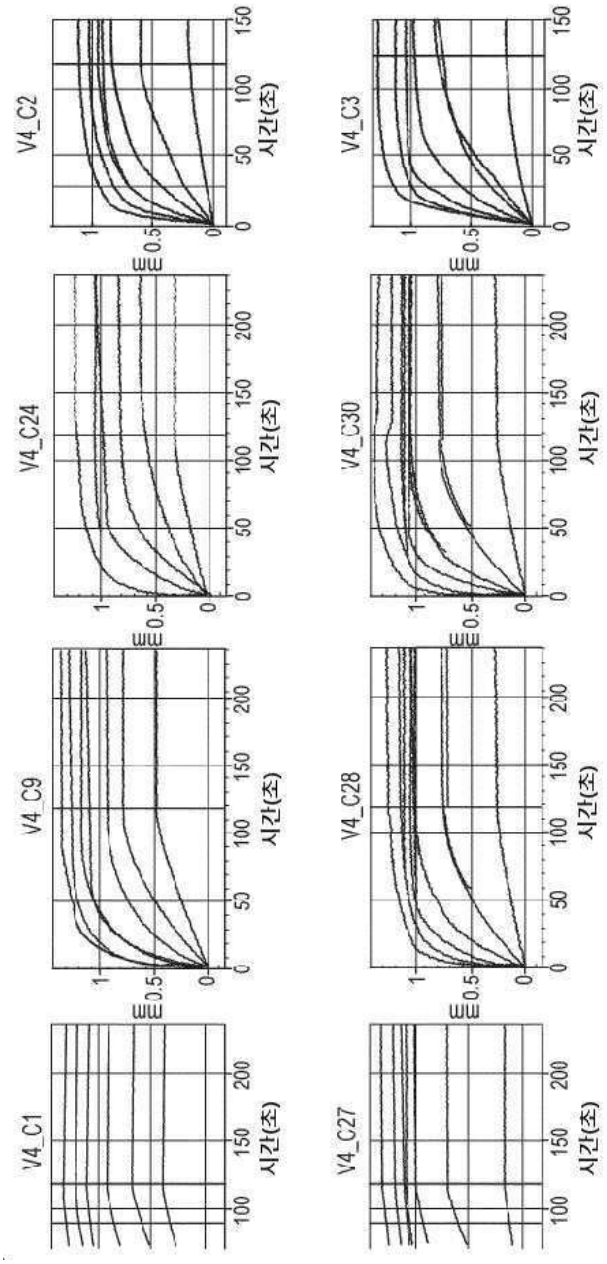
도면43


CD45+ 세포 내 g-MDSC %
25
20
15
10
5
0
비히클
V4
항-PD1
조합

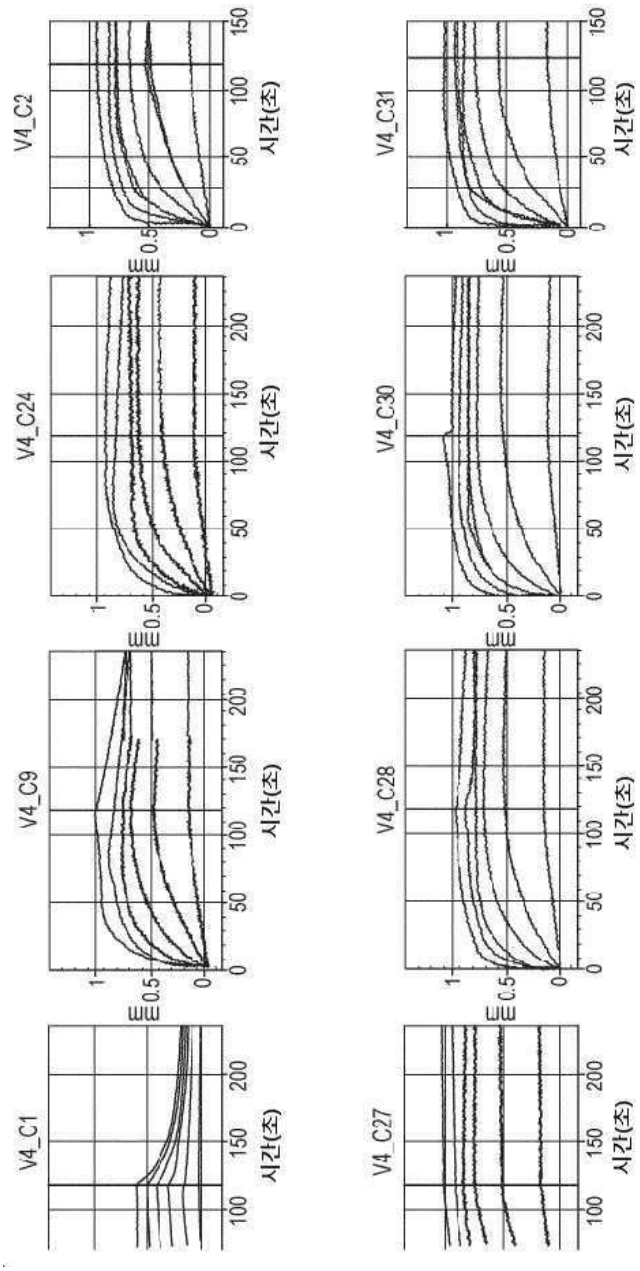
도면44


마우스 중량 (g)
30
20
10
0
5
10
15
20
25
PBS
V4
항 PDL1
V4 & 항-PDL1
항체 주사
이식 후 경과일 수

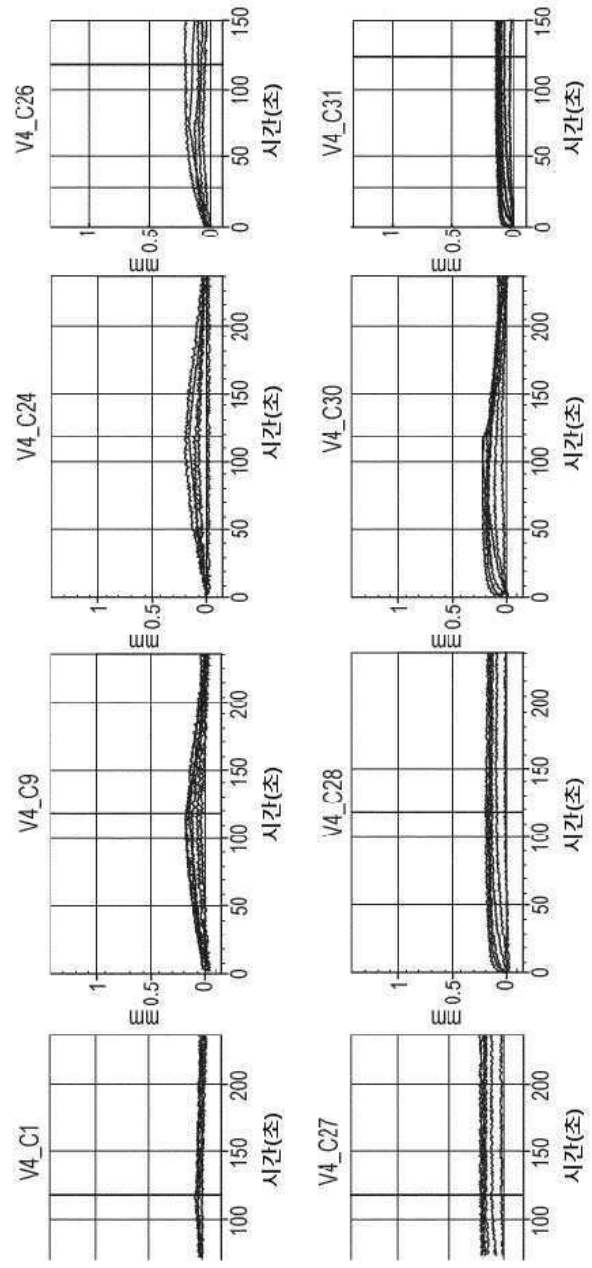
도면45a



도면45b



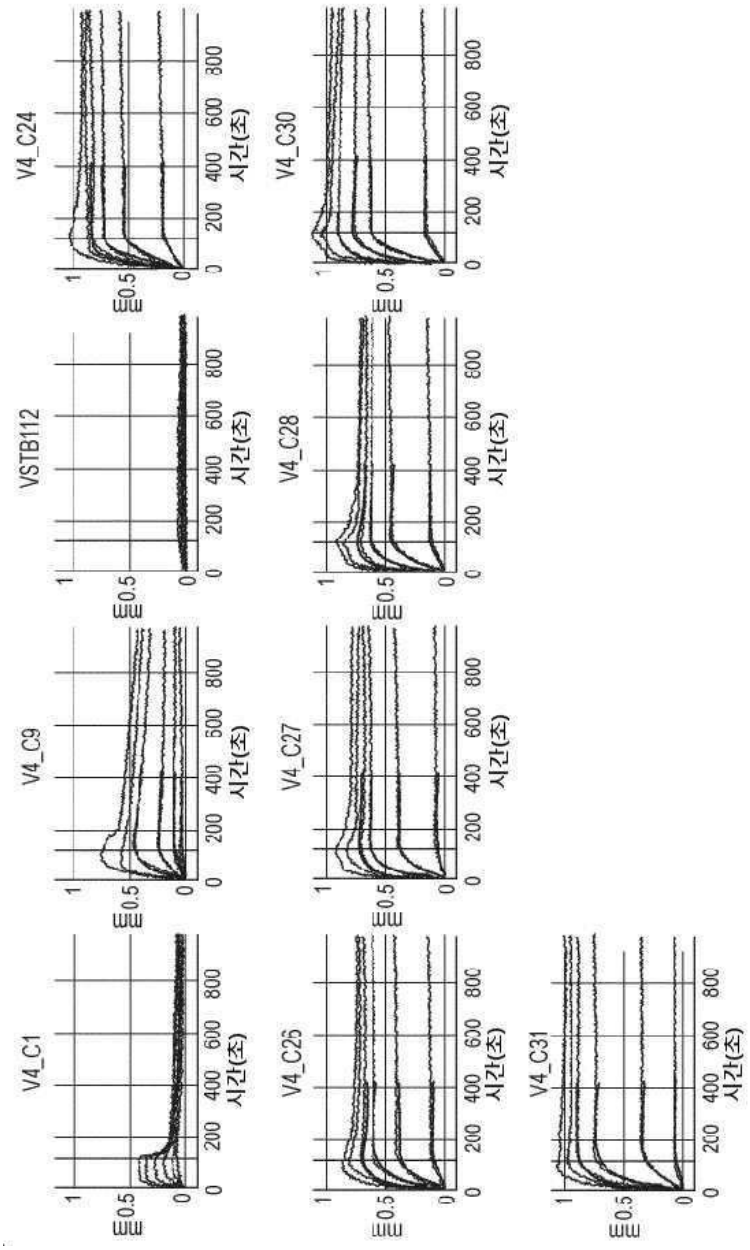
도면45c



도면45d

| 항체 | 마우스 VISTA | | | 사람 VISTA | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $K_D$ (nM) | $K_{on}$ ($M^{-1}s^{-1}$) | $K_{dis}$ ($s^{-1}$) | $K_D$ (nM) | $K_{on}$ ($M^{-1}s^{-1}$) | $K_{dis}$ ($s^{-1}$) |
| V4_C1 | 60.7 | 2.43E+05 | 14.7E-03 | <0.001 | 3.43E+05 | <1.0E-07 |
| V4_C9 | 3.81 | 3.11E+05 | 1.18E-03 | <0.001 | 3.33E+05 | <1.0E-07 |
| V4_C24 | <0.001 | 4.01E+05 | <1.0E-07 | <0.001 | 3.84E+05 | <1.0E-07 |
| V4_C26 | <0.001 | 4.03E+05 | <1.0E-07 | <0.001 | 4.04E+05 | <1.0E-07 |
| V4_C27 | <0.001 | 4.26E+05 | <1.0E-07 | <0.001 | 4.65E+05 | <1.0E-07 |
| V4_C28 | 0.17 | 4.75E+05 | 0.082E-03 | <0.001 | 5.07E+05 | <1.0E-07 |
| V4_C30 | 0.005 | 5.05E+05 | 0.0028E-03 | <0.001 | 5.93E+05 | <1.0E-07 |
| V4_C31 | <0.001 | 5.70E+05 | <1.0E-07 | <0.001 | 6.23E+05 | <1.0E-07 |

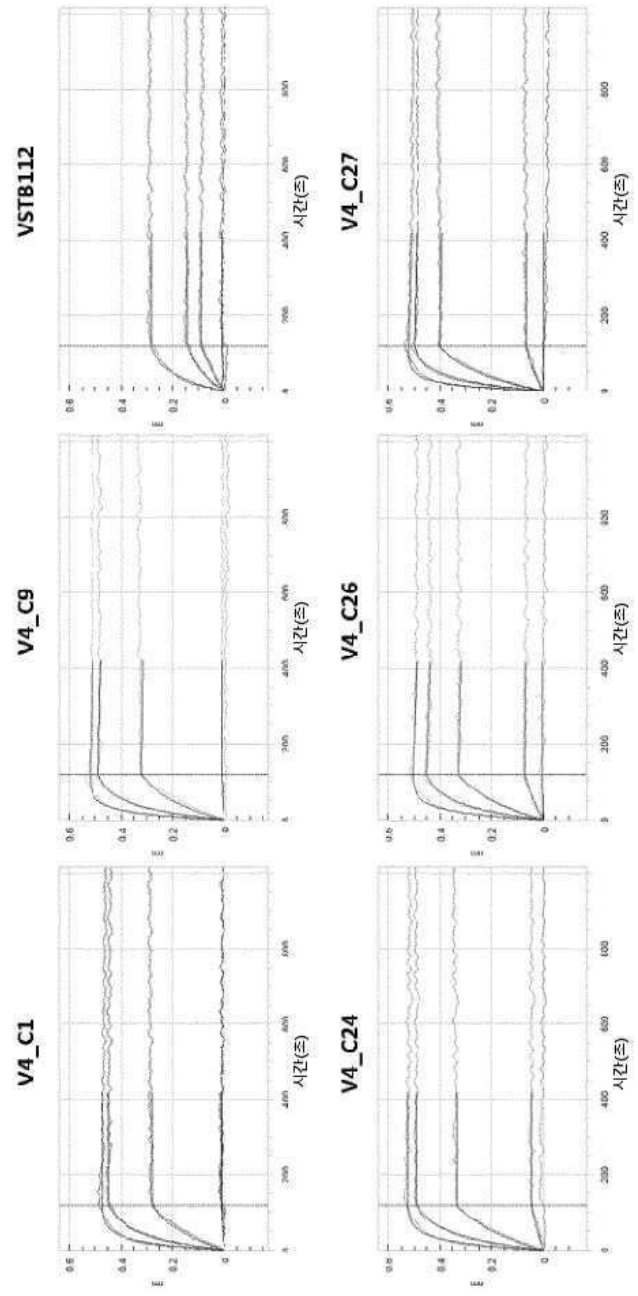
도면46a


V4_C24
VSTB112
V4_C30
V4_C9
V4_C28
V4_C1
V4_C27
V4_C25
V4_C31
E
시간(초)
0
200
400
600
800
0.5
1

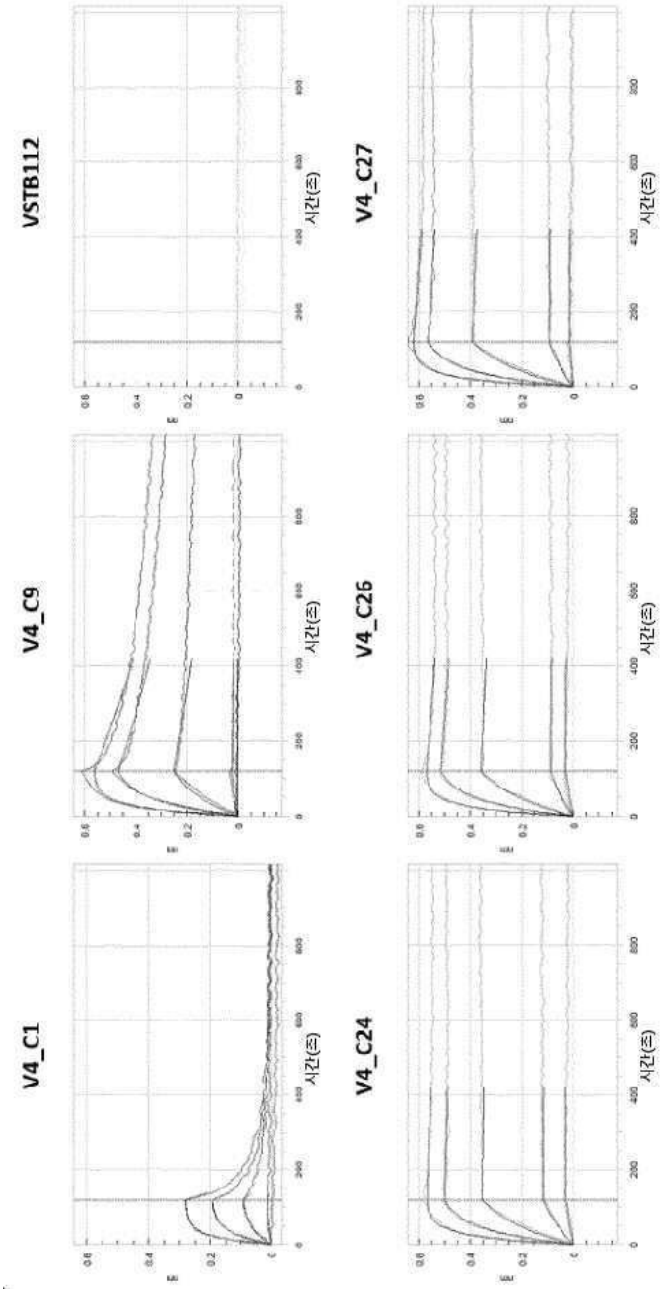
도면46b

| 항체 | 마우스 VISTA | | |
|---|---|---|---|
| | $K_D$ (nM) | $K_{on}$ ($M^{-1}s^{-1}$) | $K_{dis}$ ($s^{-1}$) |
| V4_C1 | 66.7 | 3.30E+05 | 22.0E-03 |
| V4_C9 | 4.26 | 1.57E+05 | 0.67E-03 |
| VSTB112 | NS | NS | NS |
| V4_C24 | <0.001 | 4.62E+05 | <1.0E-07 |
| V4_C26 | 0.183 | 4.13E+05 | 0.076E-03 |
| V4_C27 | 0.137 | 3.98E+05 | 0.055E-03 |
| V4_C28 | 0.489 | 5.20E+05 | 0.25E-03 |
| V4_C30 | <0.001 | 5.33E+05 | <1.0E-07 |
| V4_C31 | <0.001 | 3.44E+05 | <1.0E-07 |

도면47a



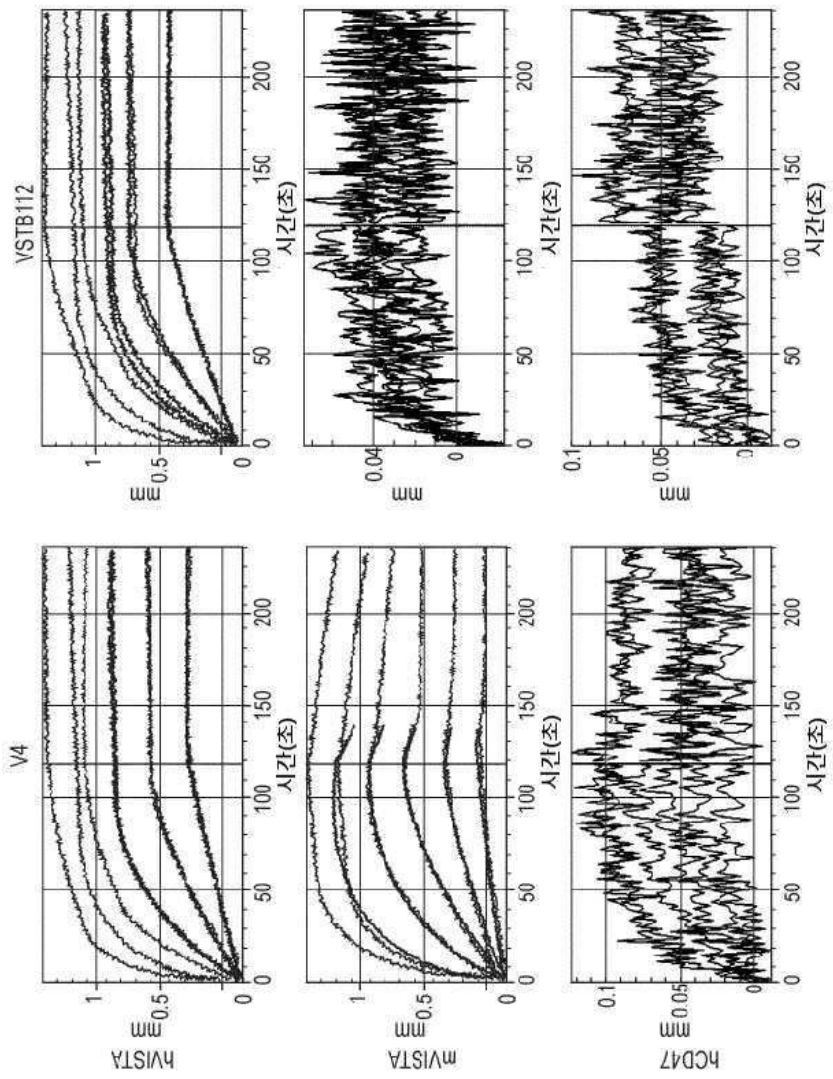
도면47b



도면47c

| 항체 | 사람 VISTA | | | 마우스 VISTA | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $K_D$ (nM) | $K_{on}$ ($M^{-1}s^{-1}$) | $K_{dis}$ ($s^{-1}$) | $K_D$ (nM) | $K_{on}$ ($M^{-1}s^{-1}$) | $K_{dis}$ ($s^{-1}$) |
| V4_C1 | <0.001 | 3.91E+05 | <1.0E-07 | 58.5 | 2.77E+05 | 16.2E-03 |
| V4_C9 | 0.125 | 4.50E+05 | 0.056E-03 | 2.88 | 3.61E+05 | 1.04E-03 |
| VSTB112 | <0.001 | 1.79E+05 | <1.0E-07 | NA | NA | NA |
| V4_C24 | <0.001 | 3.73E+05 | <1.0E-07 | 0.202 | 3.78E+05 | 0.076E-03 |
| V4_C26 | 0.241 | 4.07E+05 | 0.098E-03 | 0.530 | 3.82E+05 | 0.20E-03 |
| V4_C27 | 0.119 | 5.11E+05 | 0.061E-03 | 0.395 | 3.92E+05 | 0.16E-03 |

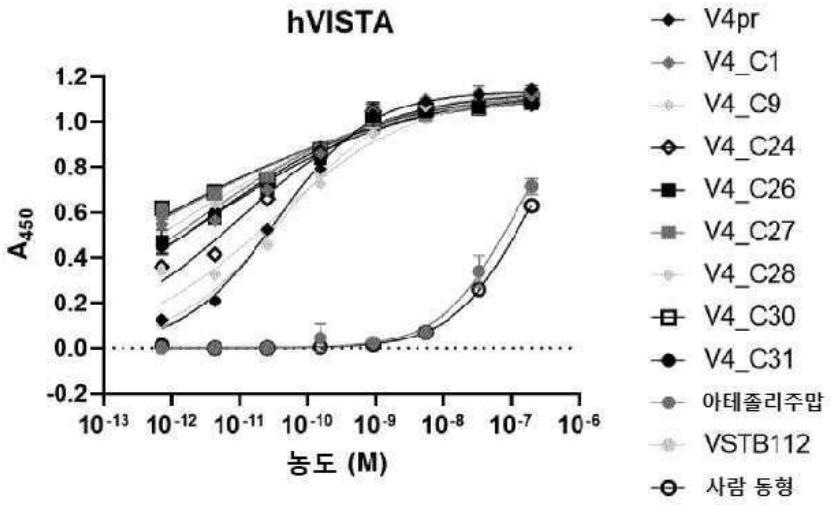
도면48a



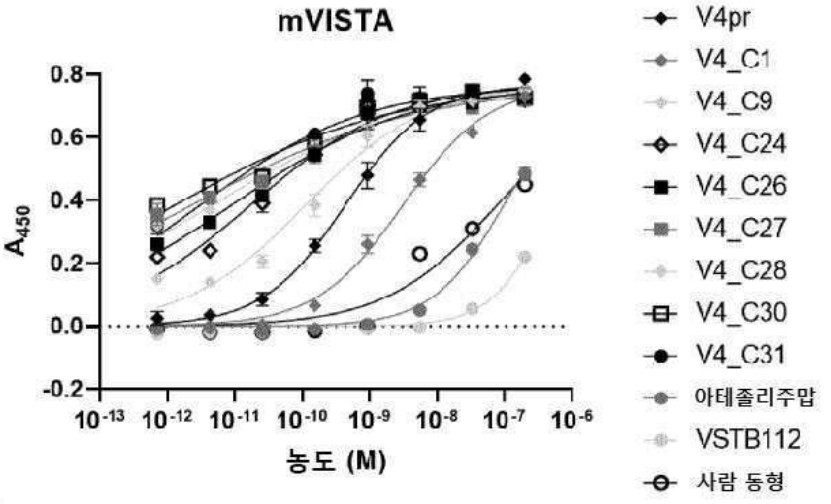
도면48b

| | 사람 VISTA | | | 마우스 VISTA | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 항체 | $K_D$ (nM) | $k_{on}$ ($M^{-1}$ $s^{-1}$) | $k_{dis}$ ($s^{-1}$) | $K_D$ (nM) | $k_{on}$ ($M^{-1}$ $s^{-1}$) | $k_{dis}$ ($s^{-1}$) |
| V4 | <0.001 | $128e^3$ | $<0.01e^{-5}$ | 108 | $60.9e^3$ | $656e^{-5}$ |
| VSTB112 | <0.001 | $210e^3$ | $<0.01e^{-5}$ | NS | NS | NS |

도면49a



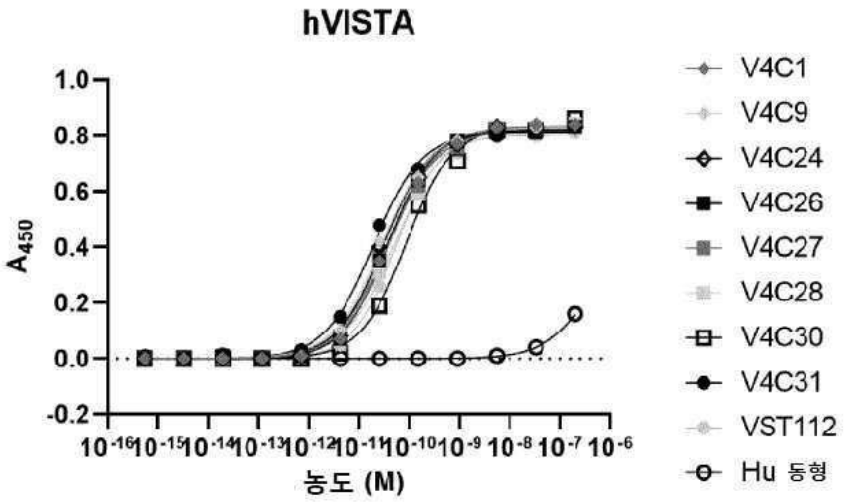

도면49b



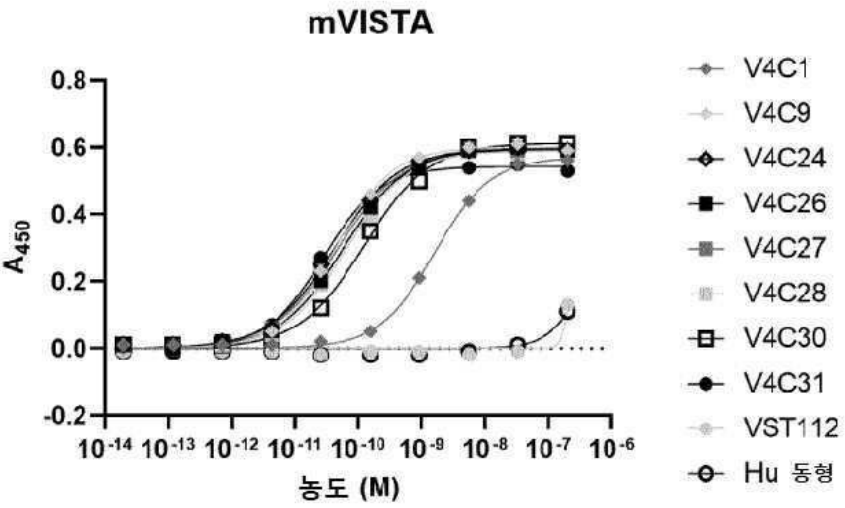

도면49c

| | V4pr | V4_C1 | V4_C9 | V4_C24 | V4_C26 | V4_C27 | V4_C28 | V4_C30 | V4_C31 | ATZ | VSTB112 | 동형 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| hVISTA | 0.036 | 0.0024 | 0.031 | 0.010 | 0.0034 | <0.0007 | 0.0015 | <0.0007 | 0.0032 | 102 | 0.042 | 152 |
| mVISTA | 0.43 | 3.1 | 0.11 | 0.017 | 0.0089 | 0.0023 | 0.0045 | 0.0013 | 0.0030 | 97 | >200 | 77 |

도면50a



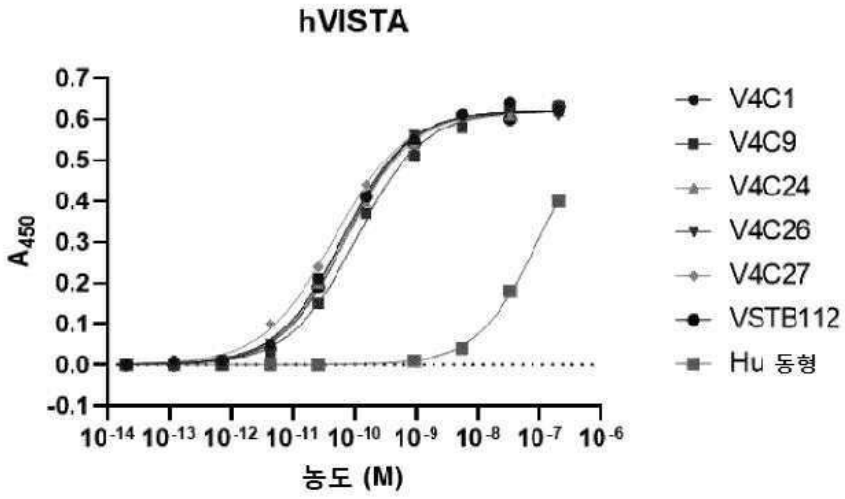

도면50b



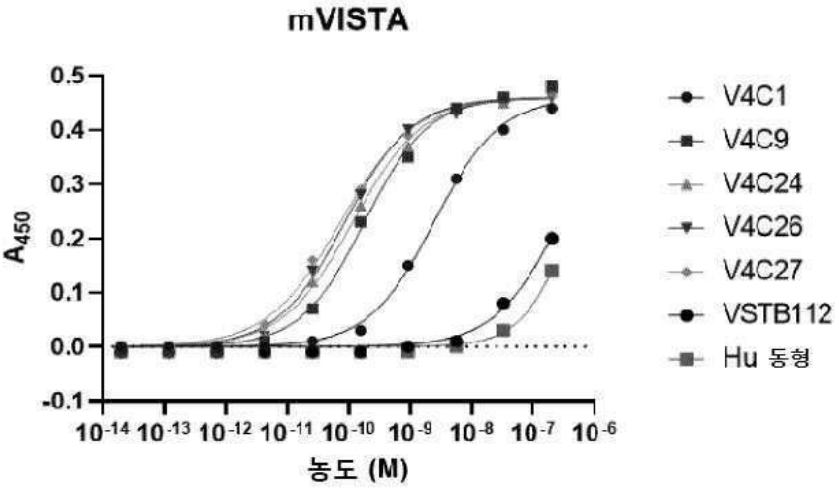

도면50c

| | V4_C1 | V4_C9 | V4_C24 | V4_C26 | V4_C27 | V4_C28 | V4_C30 | V4_C31 | VSTB112 | 동형 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| hVISTA | 0.042 | 0.030 | 0.032 | 0.038 | 0.037 | 0.053 | 0.088 | 0.020 | 0.054 | > 200 |
| mVISTA | 1.60 | 0.044 | 0.042 | 0.058 | 0.047 | 0.064 | 0.123 | 0.028 | > 200 | > 200 |

도면51a



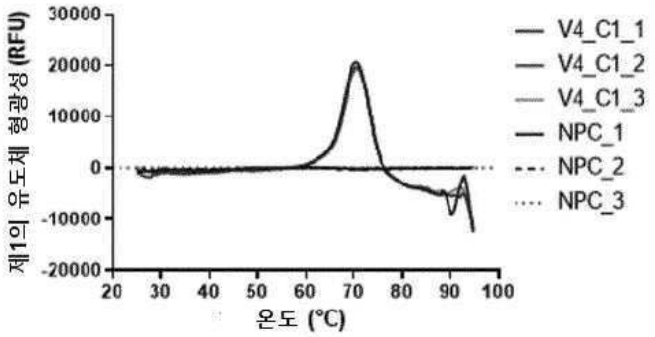

도면51b



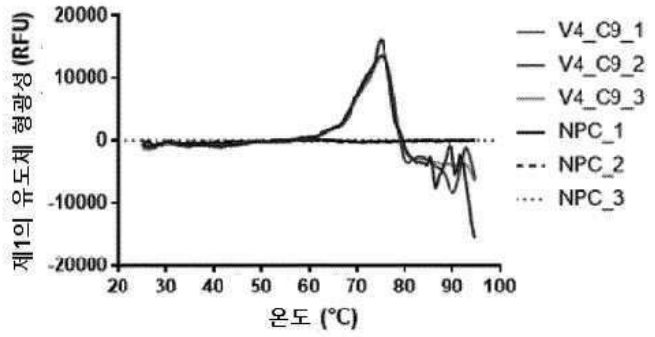

도면51c

| | V4C24 | V4C26 | V4C27 | V4C1 | V4C9 | VSTB112 | Hu 동형 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| hVISTA | 0.073 | 0.064 | 0.047 | 0.065 | 0.107 | 0.072 | 98.5 |
| mVISTA | 0.116 | 0.086 | 0.073 | 2.44 | 0.180 | >200 | >200 |

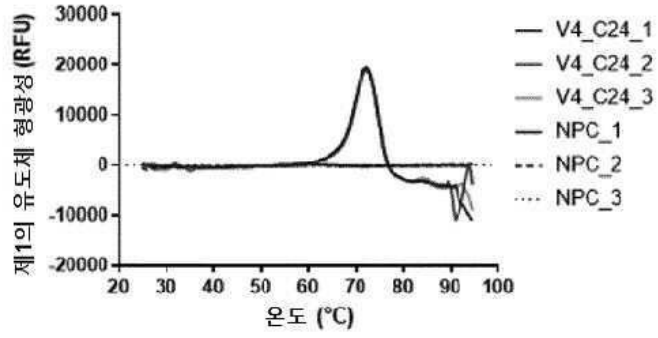
도면52a



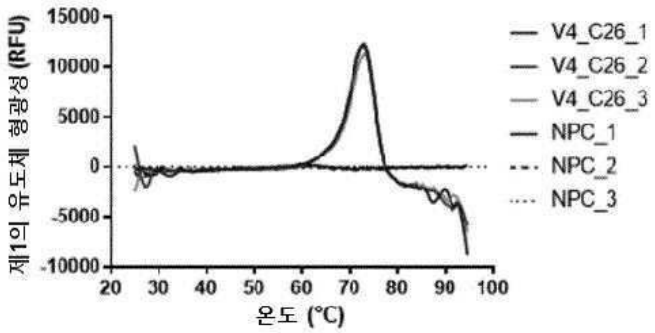

도면52b



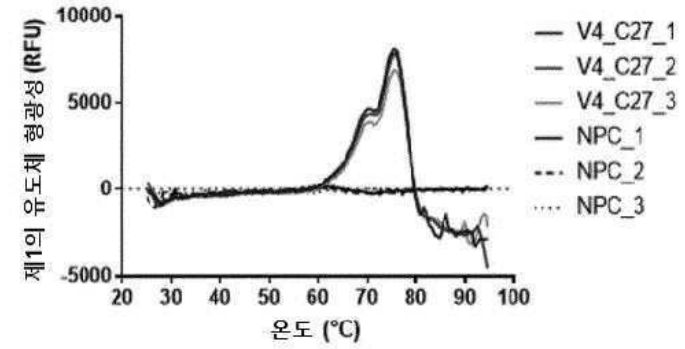

도면52c



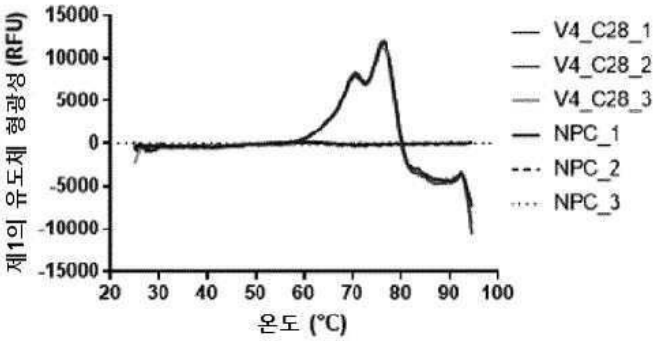
도면52d



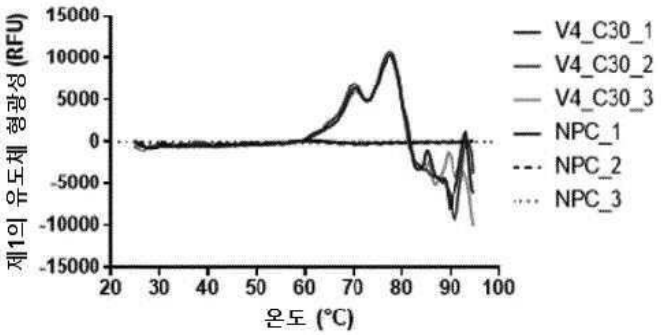

도면52e



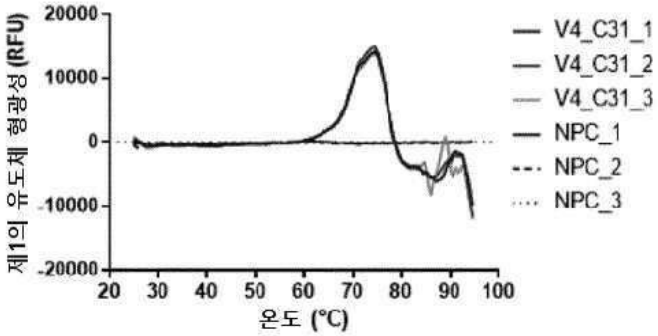

도면52f



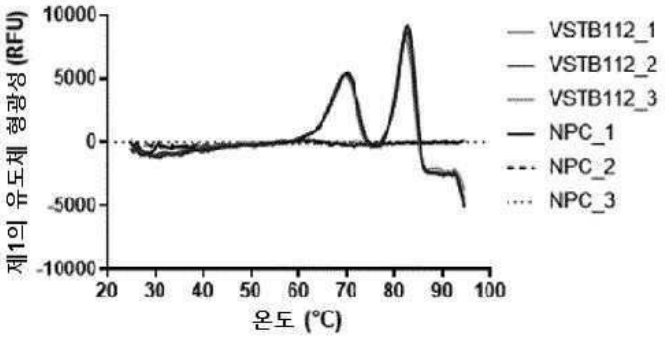
도면52g




도면52h




도면52i



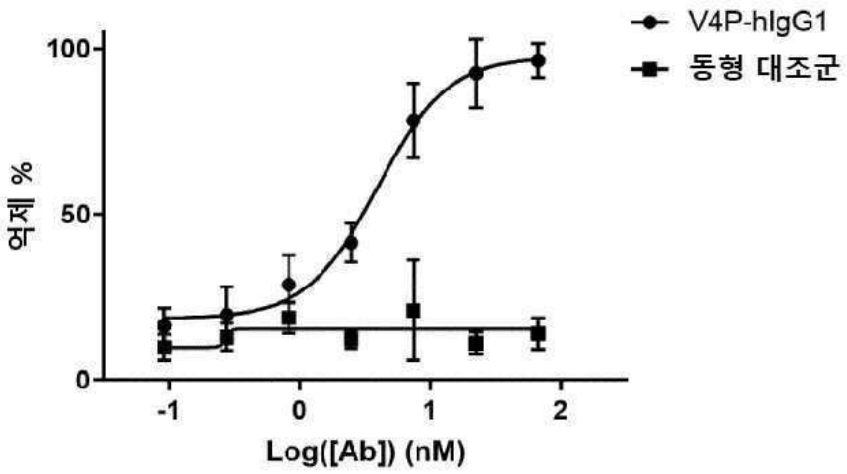
도면52j

| | Tm | | |
|---|---|---|---|
| | Fc | Fab | |
| 항체 | Tm1 (℃) | Tm2 (℃) | 쇼울더 (Shoulder) |
| V4p | 67.5 | | 63에서 쇼울더 |
| V4_C1 | 70.5 | | |
| V4_C9 | 75.1 | | 72C 에서 쇼울더 |
| V4_C24 | 72.3 | | |
| V4_C26 | 72.9 | | |
| V4_C27 | 70.3 | 75.6 | |
| V4_C28 | 70.5 | 76.3 | |
| V4_C30 | 70.2 | 77.5 | |
| V4_C31 | 74.5 | | 71.5C 에서 쇼울더 |
| VSTB112 | 69.9 | 82.3 | |

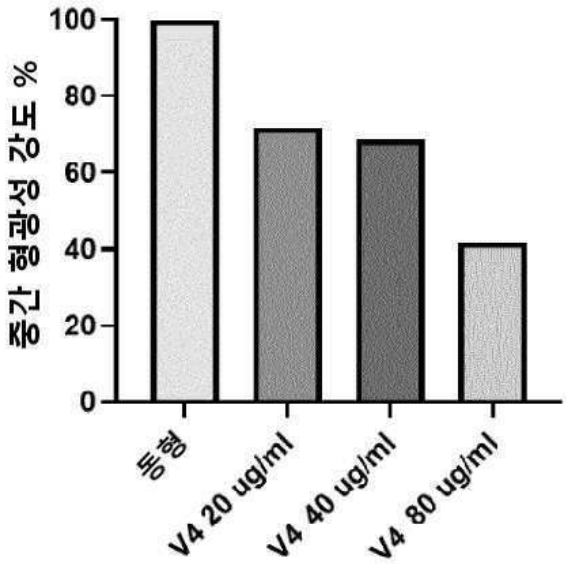
도면53

| 항체 | 동일성 % (사람) | | 잠재적인 면역원성 펩타이드 | |
|---|---|---|---|---|
| | HC | LC | HC | LC |
| V4 | 69.7 | 63.2 | 2 | 3 |
| V4_C1 | 86.9 | 85.3 | 6 | 3 |
| V4_C9 | 86.9 | 86.3 | 4 | 3 |
| V4_C24 | 85.9 | 85.3 | 2 | 3 |
| V4_C26 | 85.9 | 85.3 | 2 | 2 |
| V4_C27 | 85.9 | 85.3 | 2 | 3 |
| V4_C28 | 85.9 | 85.3 | 2 | 3 |
| V4_C30 | 85.9 | 84.2 | 2 | 3 |
| V4_C31 | 85.9 | 83.2 | 2 | 2 |

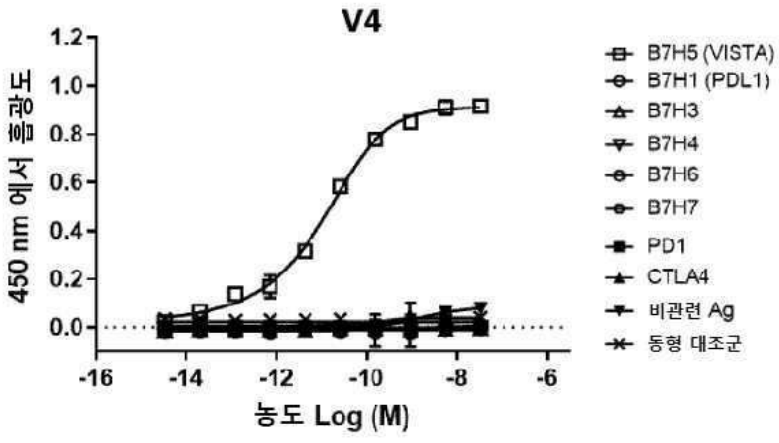
도면54



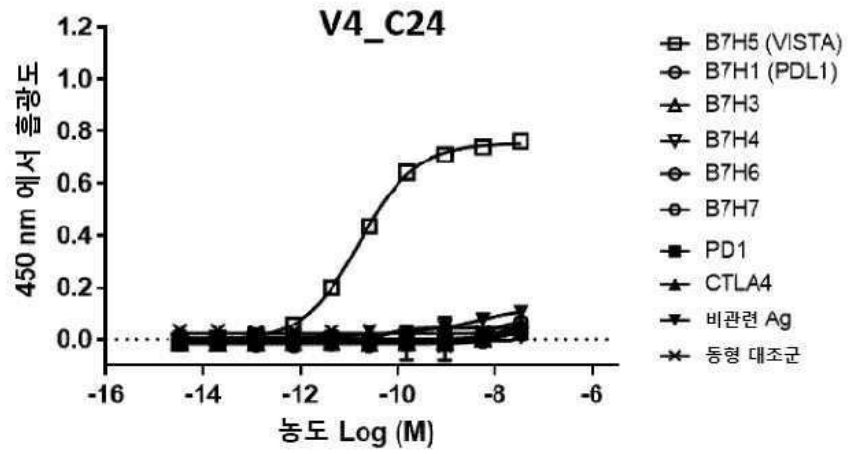

도면55



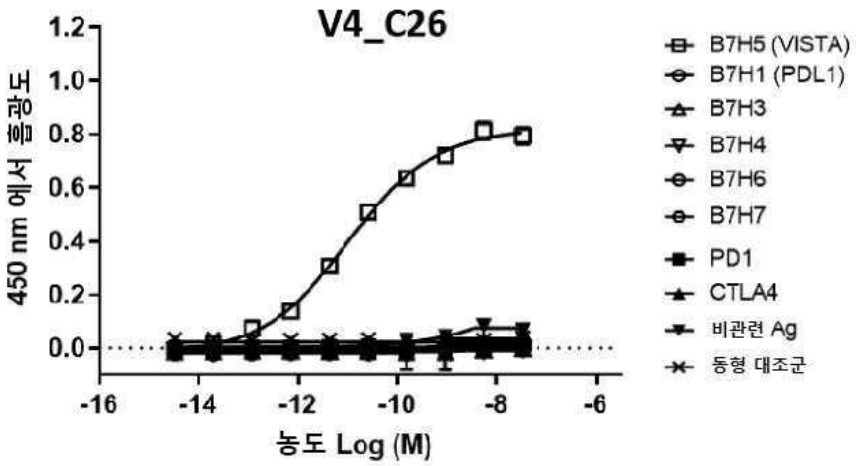

도면56a



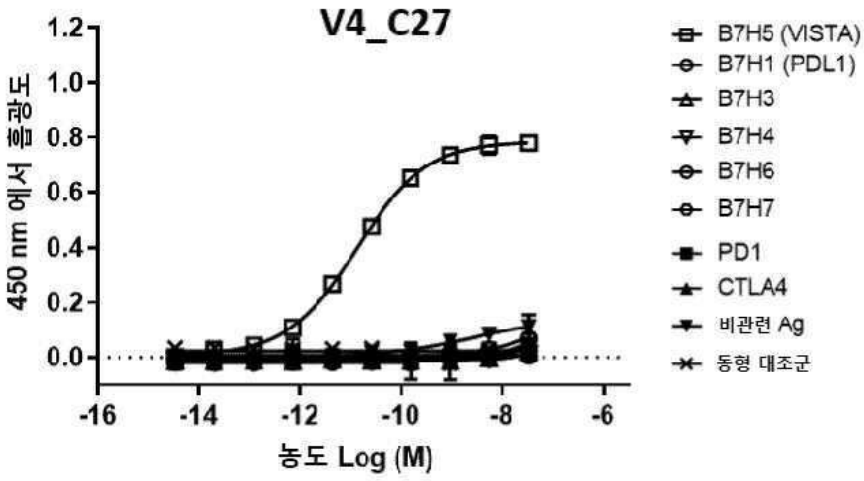
도면56b



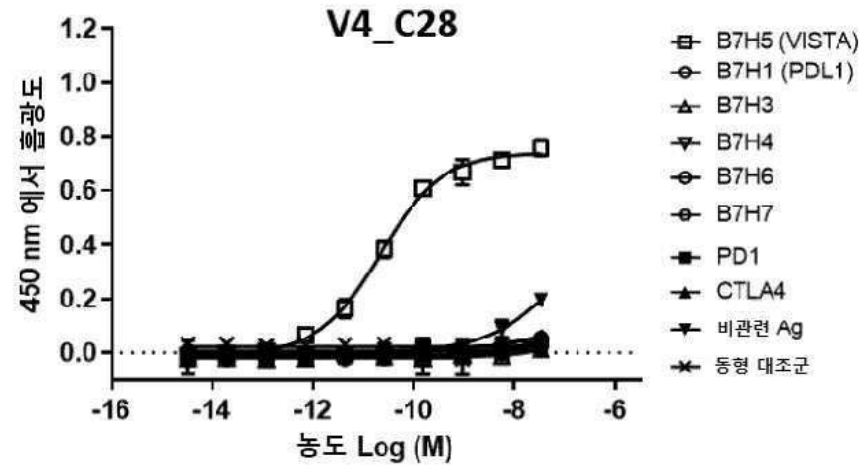

도면56c



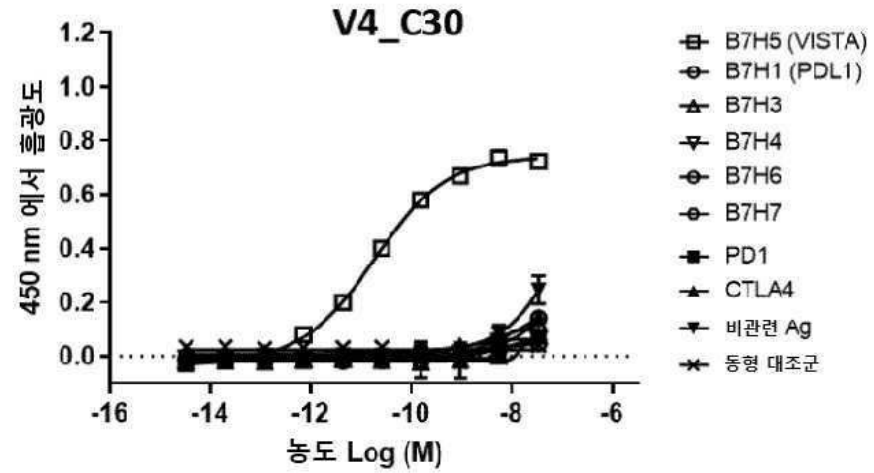

도면56d



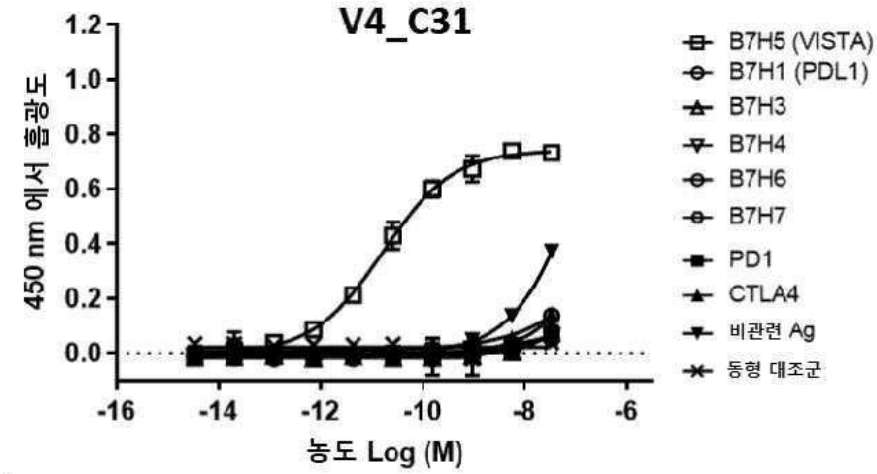
도면56e



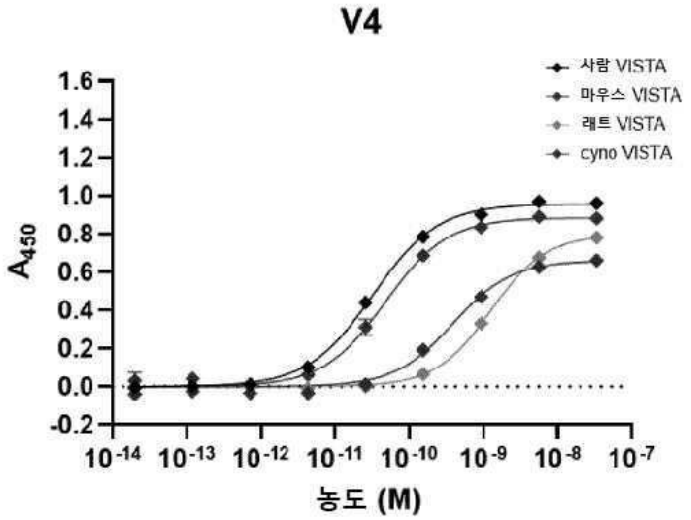

도면56f



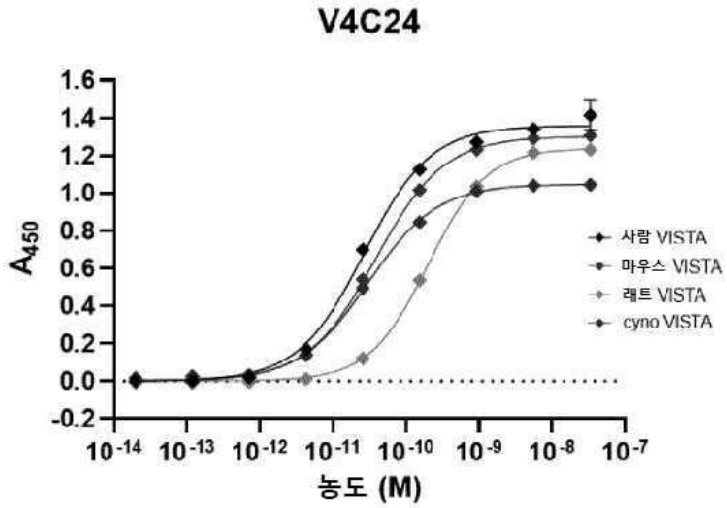

도면56g



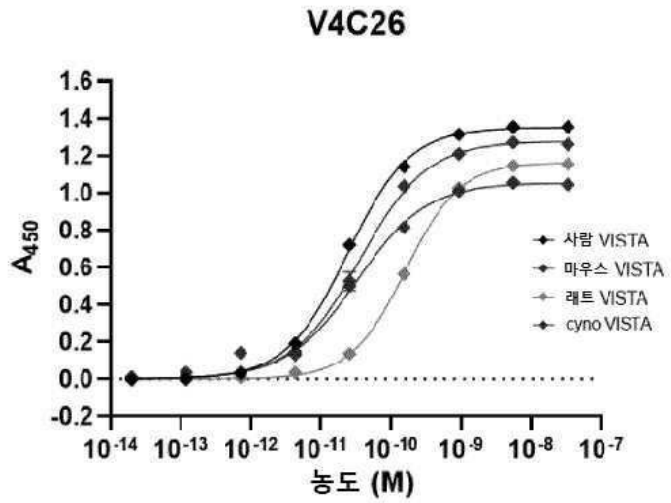
도면57a


V4
사람 VISTA
마우스 VISTA
래트 VISTA
cyno VISTA
A450
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
10-14 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7
농도 (M)

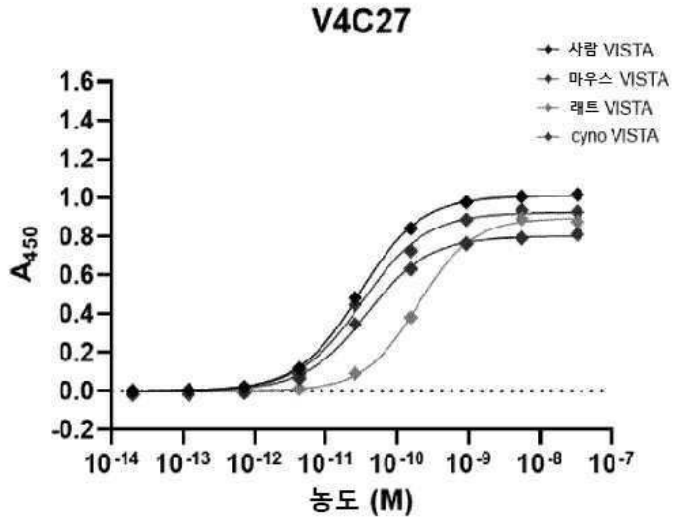
도면57b


V4C24
사람 VISTA
마우스 VISTA
래트 VISTA
cyno VISTA
A450
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
10-14 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7
농도 (M)

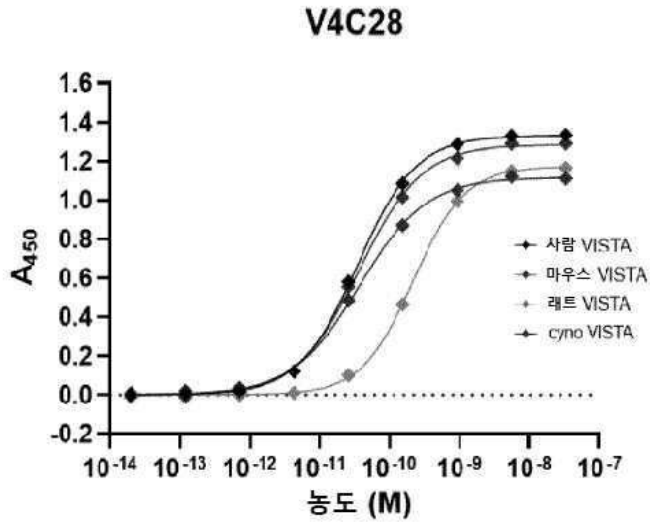
도면57c


V4C26
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
A450
10-14 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7
농도 (M)
사람 VISTA
마우스 VISTA
래트 VISTA
cyno VISTA

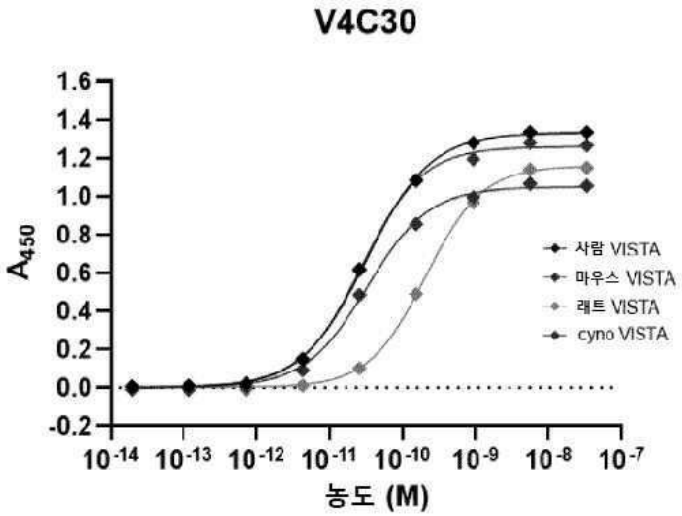
도면57d


V4C27
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
A450
10-14 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7
농도 (M)
사람 VISTA
마우스 VISTA
래트 VISTA
cyno VISTA

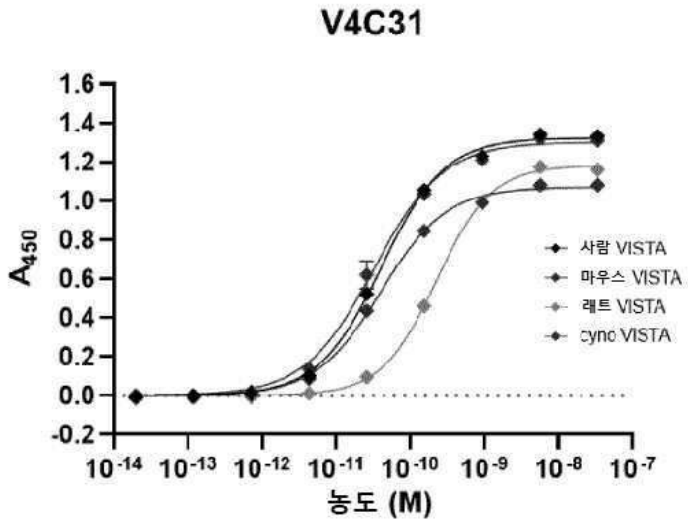
도면57e


V4C28
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
A450
10-14 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7
농도 (M)
사람 VISTA
마우스 VISTA
래트 VISTA
cyno VISTA

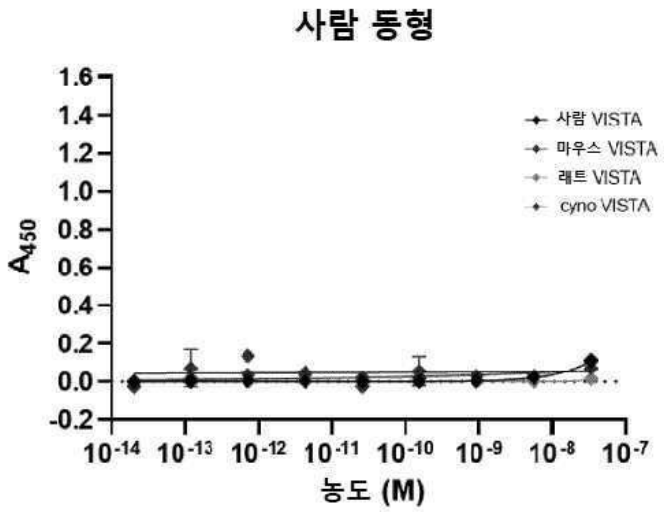
도면57f


V4C30
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
A450
10-14 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7
농도 (M)
사람 VISTA
마우스 VISTA
래트 VISTA
cyno VISTA

도면57g



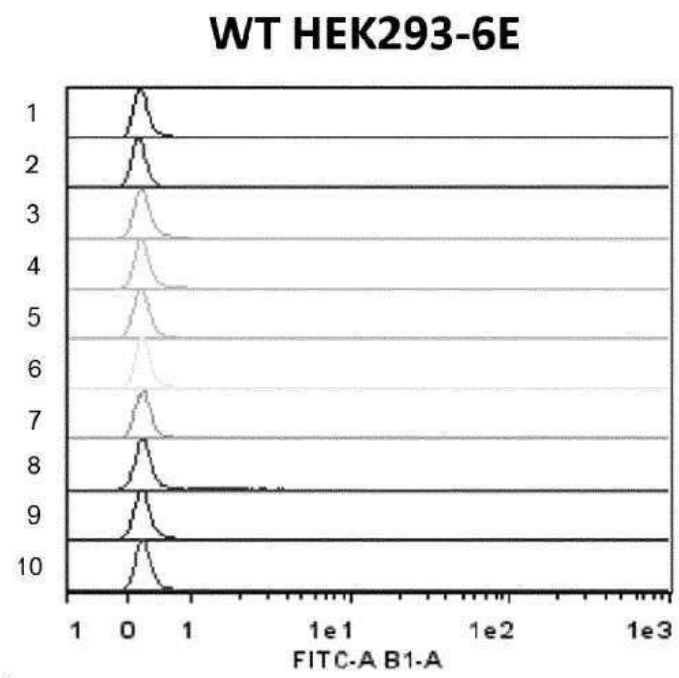

도면57h



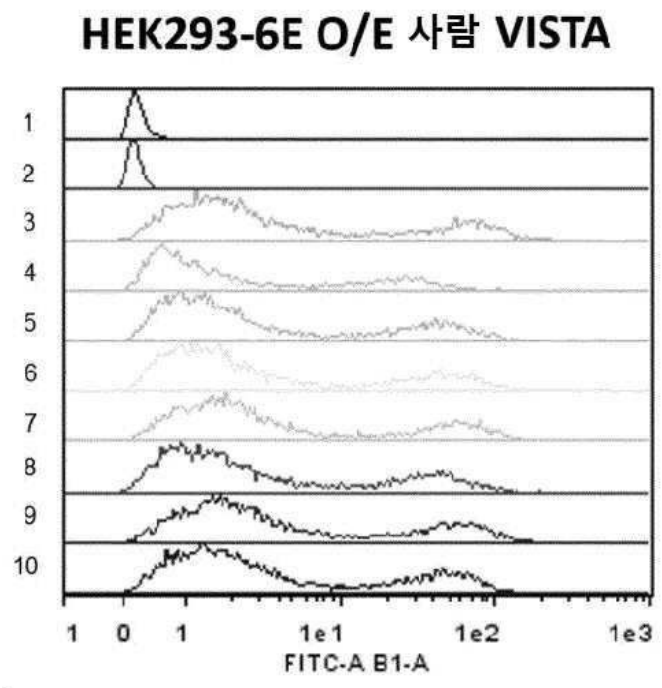

도면57i

| $EC_{50}$ (M) | 사람 VISTA | 마우스 VISTA | 래트 VISTA | Cyno VISTA |
|---|---|---|---|---|
| V4 | 3.19E-11 | 3.87E-10 | 1.25E-09 | 4.72E-11 |
| V4C24 | 2.68E-11 | 3.04E-11 | 2.01E-10 | 3.85E-11 |
| V4C26 | 2.41E-11 | 3.25E-11 | 1.60E-10 | 3.56E-11 |
| V4C27 | 2.95E-11 | 3.74E-11 | 1.96E-10 | 3.24E-11 |
| V4C28 | 3.46E-11 | 3.65E-11 | 2.17E-10 | 3.67E-11 |
| V4C30 | 3.18E-11 | 3.26E-11 | 2.06E-10 | 2.72E-11 |
| V4C31 | 4.08E-11 | 4.00E-11 | 2.24E-10 | 3.21E-11 |
| 동형 | > 3.3e-008 | > 3.3e-008 | > 3.3e-008 | > 3.3e-008 |

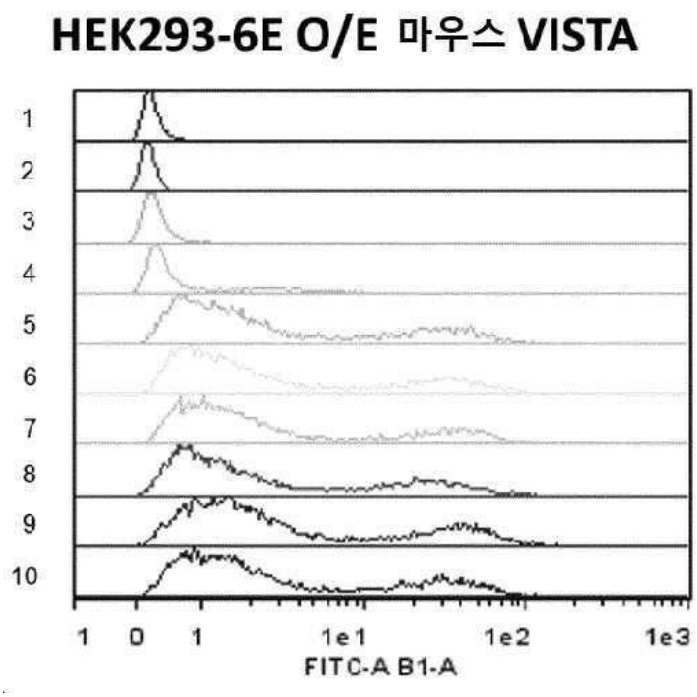
도면58a


WT HEK293-6E
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
1
0
1
1e1
1e2
1e3
FITC-A B1-A

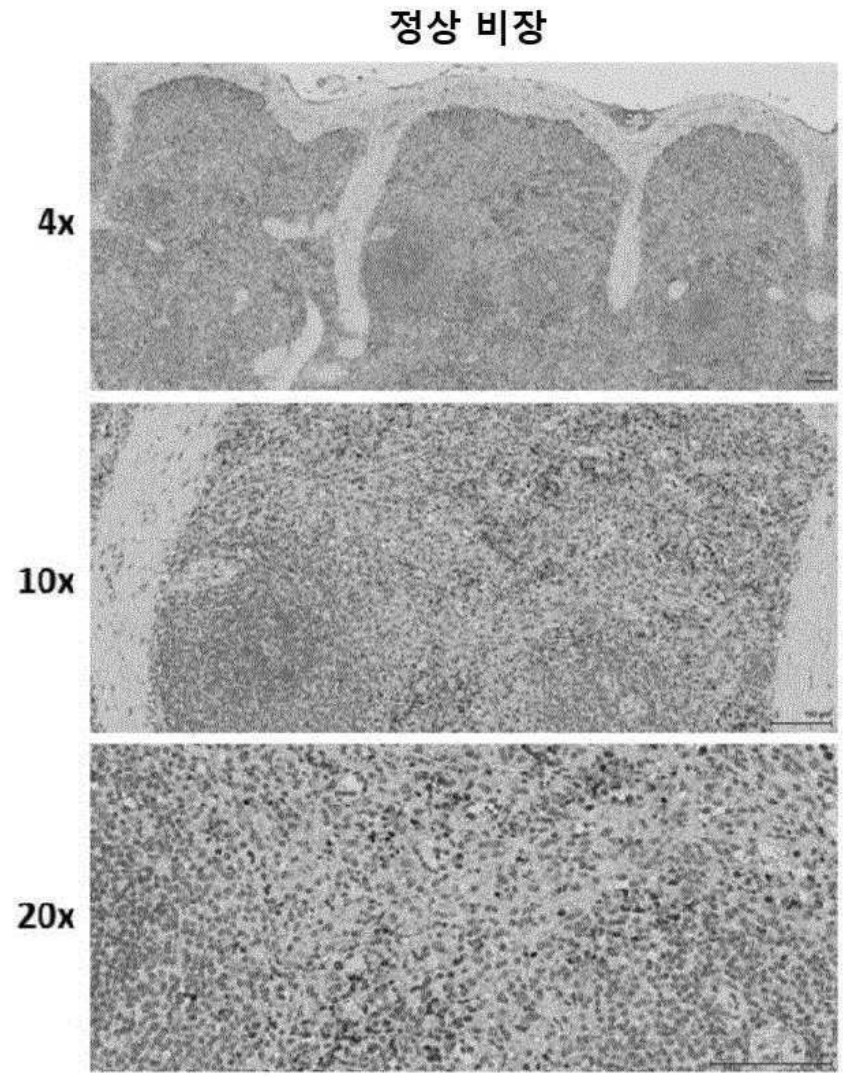
도면58b


HEK293-6E O/E 사람 VISTA
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
1
0
1
1e1
1e2
1e3
FITC-A B1-A

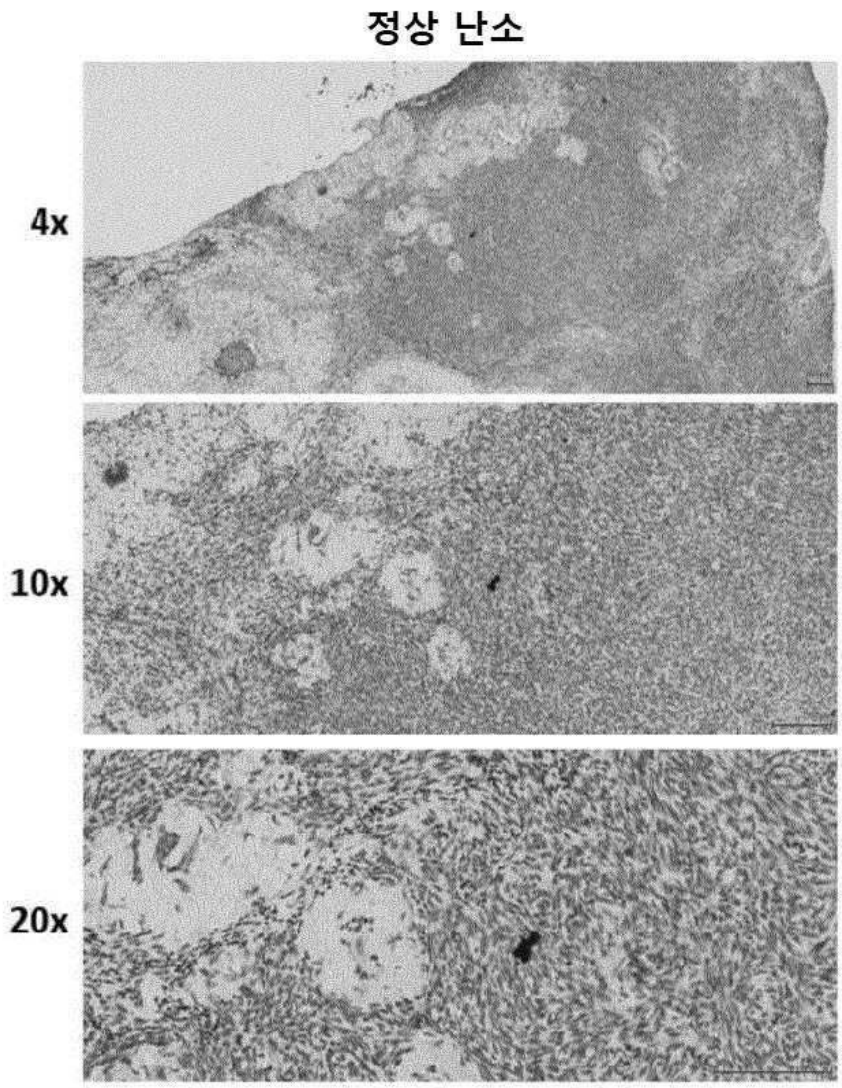
도면58c



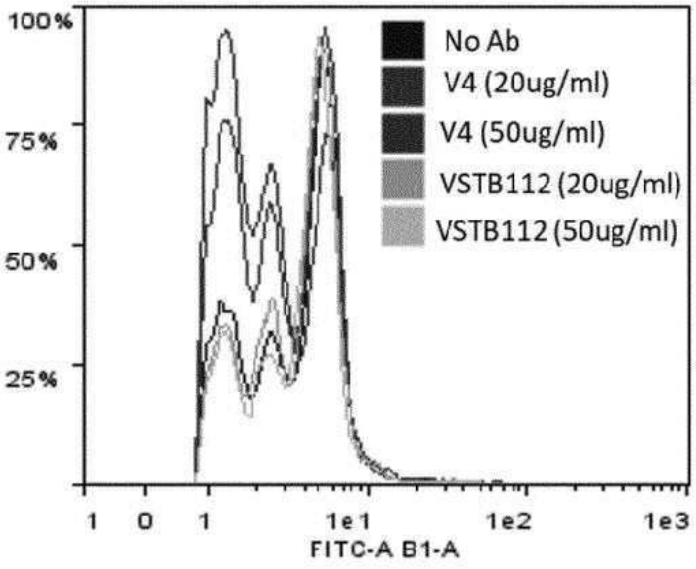
도면59a



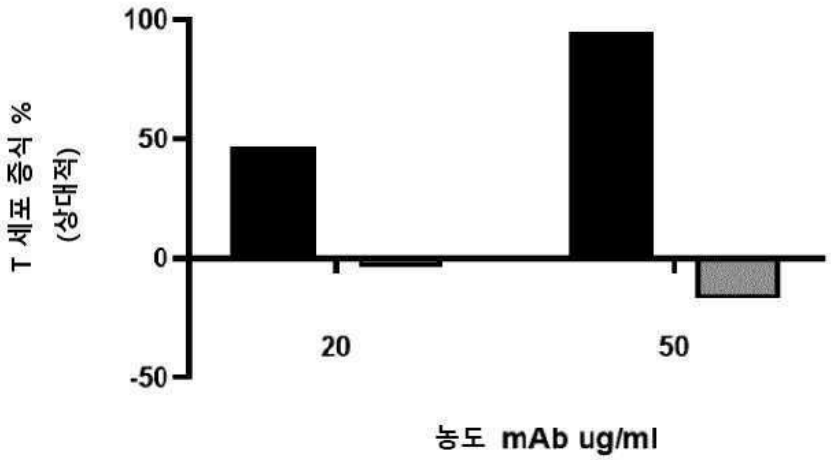
도면59b


정상 난소
4x
10x
20x

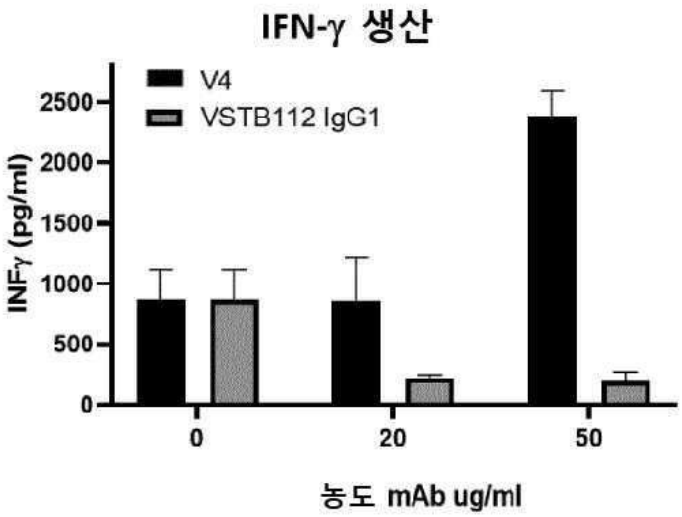
도면60a


100%
75%
50%
25%
No Ab
V4 (20ug/ml)
V4 (50ug/ml)
VSTB112 (20ug/ml)
VSTB112 (50ug/ml)
1 0 1
1e1
1e2
1e3
FITC-A B1-A

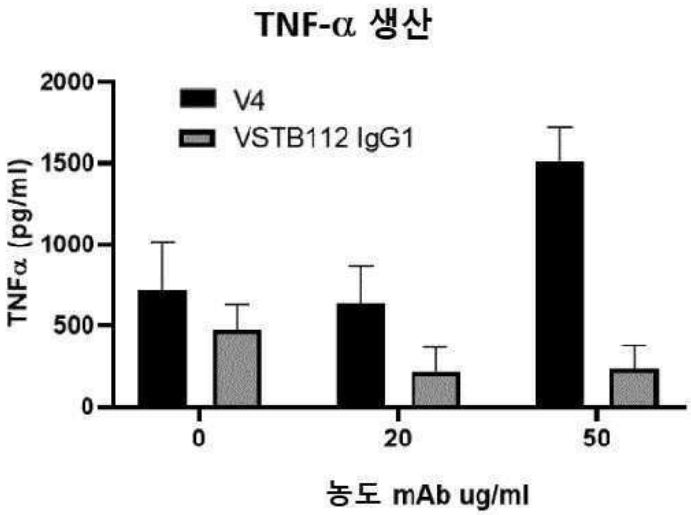
도면60b


100
50
0
-50
T 세포 증식 %
(상대적)
20
50
농도 mAb ug/ml

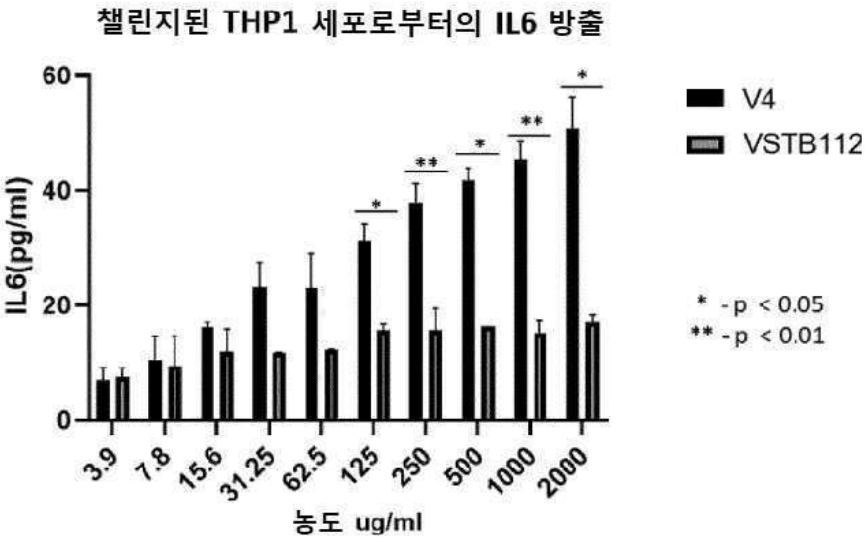
도면60c


IFN-γ 생산
V4
VSTB112 IgG1
2500
2000
1500
1000
500
0
INFγ (pg/ml)
0
20
50
농도 mAb ug/ml

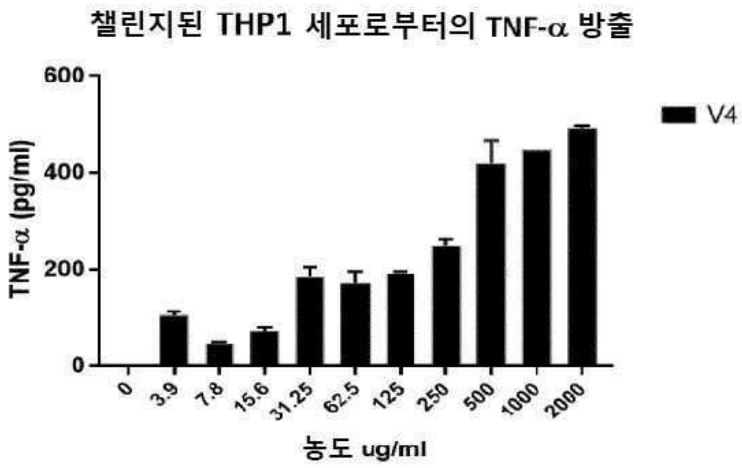
도면60d


TNF-α 생산
V4
VSTB112 IgG1
TNFα (pg/ml)
2000
1500
1000
500
0
0
20
50
농도 mAb ug/ml

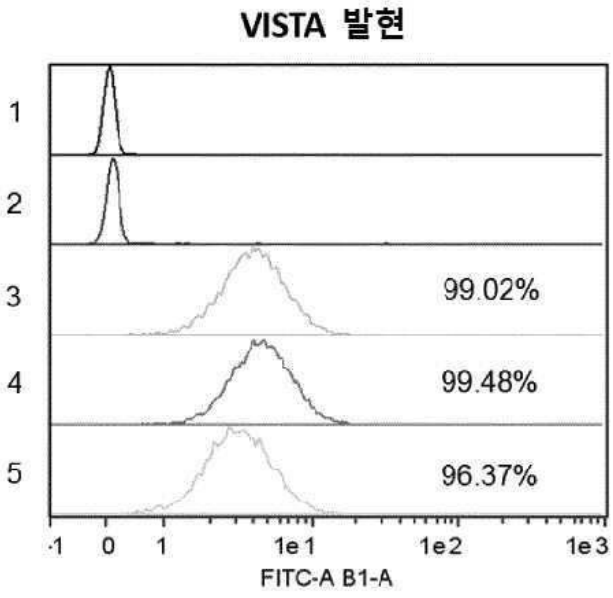
도면61a


챌린지된 THP1 세포로부터의 IL6 방출
IL6(pg/ml)
60
40
20
0
3.9
7.8
15.6
31.25
62.5
125
250
500
1000
2000
농도 ug/ml
V4
VSTB112
* - p < 0.05
** - p < 0.01

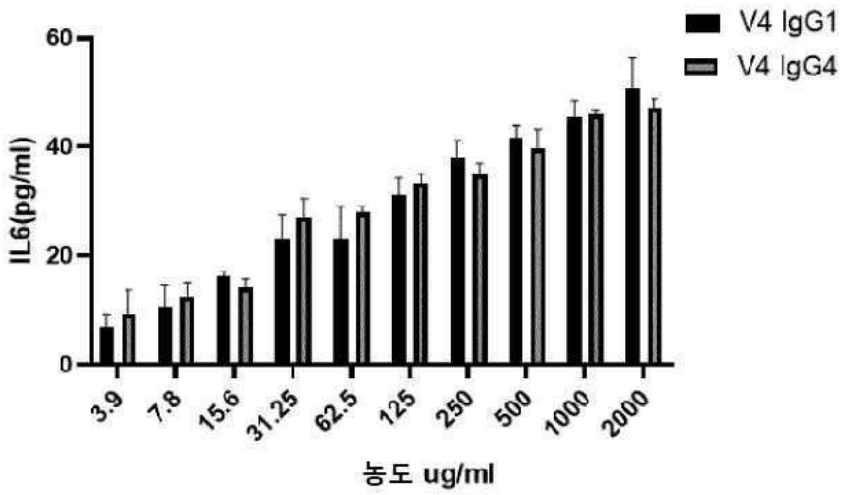
도면61b


챌린지된 THP1 세포로부터의 TNF-α 방출
TNF-α (pg/ml)
600
400
200
0
V4
0
3.9
7.8
15.6
31.25
62.5
125
250
500
1000
2000
농도 ug/ml

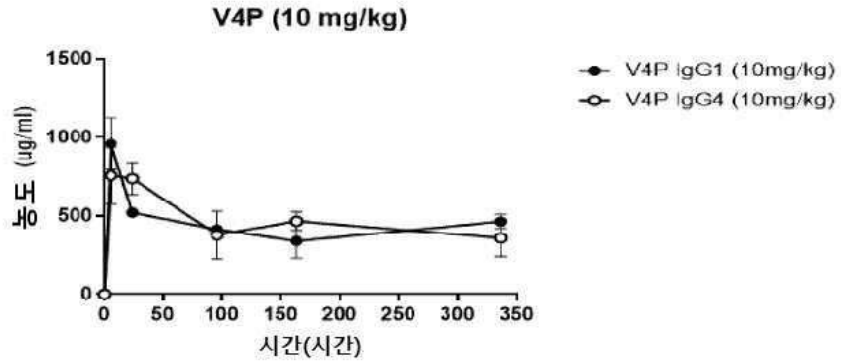
도면61c


VISTA 발현
1
2
3
4
5
99.02%
99.48%
96.37%
-1
0
1
1e1
1e2
1e3
FITC-A B1-A

도면62

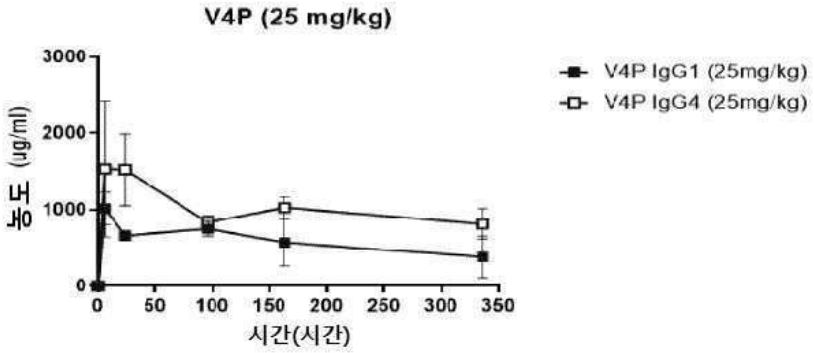



도면63a



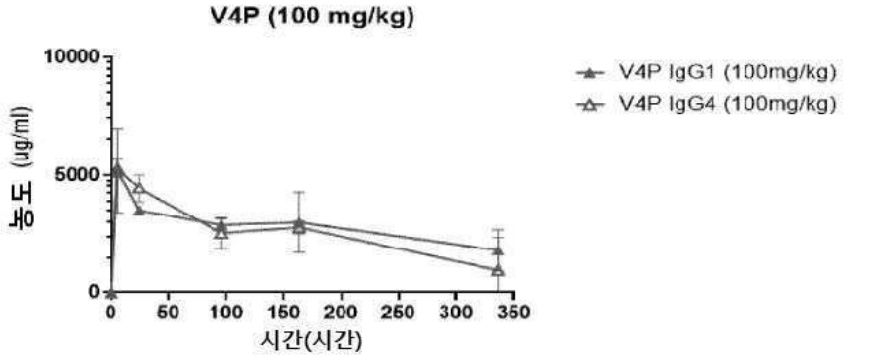

| 아암 | 용량 | Cmax (ug/ml) | Tmax (hr) | AUC0-336 (ug*h/ml) | AUC0-무한 (ug*h/ml) | T1/2 (hr) | CL (ml/h) | Vd (mL/kg) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| V4P hIgG1 | 10 mg/kg | 1264.925 | 6.000 | 163820.857 | 535540.715 | 494.683 | 0.005 | 3.631 |
| V4P hIgG4 | 10 mg/kg | 756.632 | 6.000 | 157719.024 | 325944.397 | 324.881 | 0.008 | 3.726 |

도면63b



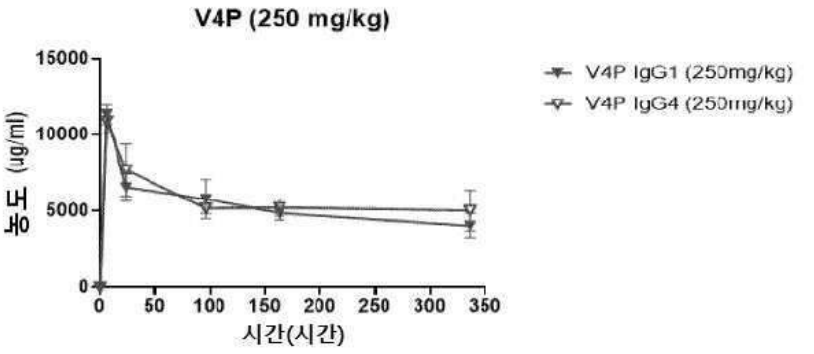

| 아암 | 용량 | Cmax (ug/ml) | Tmax (hr) | AUC0-336 (ug*h/ml) | AUC0-무한 (ug*h/ml) | T1/2 (hr) | CL (ml/h) | Vd (mL/kg) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| V4P hIgG1 | 25 mg/kg | 917.691 | 6.000 | 168137.409 | 624496.133 | 637.687 | 0.010 | 9.622 |
| V4P hIgG4 | 25 mg/kg | 1532.665 | 6.000 | 343433.514 | 790153.226 | 380.006 | 0.008 | 4.467 |

도면63c




| 아암 | 용량 | Cmax (ug/ml) | Tmax (hr) | AUC0-336 (ug*h/ml) | AUC0-무한 (ug*h/ml) | T1/2 (hr) | CL (ml/h) | Vd (mL/kg) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| V4P hIgG1 | 100 mg/kg | 5158.909 | 6.000 | 951642.588 | 1836917.880 | 340.466 | 0.014 | 6.425 |
| V4P hIgG4 | 100 mg/kg | 5286.726 | 6.000 | 876440.678 | 1078777.776 | 144.581 | 0.023 | 4.644 |

도면63d




| 아암 | 용량 | Cmax (ug/ml) | Tmax (hr) | AUC0-336 (ug*h/ml) | AUC0 무한 (ug*h/ml) | T1/2 (hr) | CL (ml/h) | Vd (mL/kg) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| V4P hIgG1 | 250mg/kg | 11293.381 | 6.000 | 1806847.108 | 4415613.763 | 448.196 | 0.014 | 9.049 |
| V4P hIgG4 | 250mg/kg | 1532.665 | 6.000 | 343433.514 | 790153.226 | 380.006 | 0.008 | 4.467 |

도면64a

| 치료 아암 | 용량 | 적혈 세포 | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | 빈혈 매개변수 | | | |
| | | RBC 수 (10^9/L) | 헤모글로빈 (g/dl) | 헤마토크릿 (%) | MCV (fml) | MCH (pg) | MCHC (g/dl) | 혈소판 수 (10^9/L) |
| 비히클 | 0 | 10.73 | 16.3 | 45.67 | 43 | 15.2 | 35.7 | 774 |
| V4P | 50 mg/kg | 11.02 | 17.2 | 47.64 | 43 | 15.6 | 36 | 720 |

도면64b

| 치료 아암 | 용량 | 백혈 세포 | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | WBC 수 (10^9/ L) | 림프구 수 (10^9/ L) | 단핵구 수 (10^9/ L) | 호중구 수 (10^9/ L) |
| 비히클 | 0 | 5.57 | 3.4 | 0.05 | 1.7 |
| V4P | 50 mg/kg | 5.98 | 4.22 | 0.05 | 1.71 |

도면64c

| 치료 아암 | 용량 | 생화학 | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 간 (U/L) | | 신장 (mg/dL) | |
| | | ALT | ALP | CREA | BUN |
| 비히클 | 0 | 29 | 102 | 17 | 0.2 |
| V4P | 50 mg/kg | 23 | 50 | 19 | 0.2 |

도면65a

| 치료 아암 | 시간 (hrs) | 적혈 세포 | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | 빈혈 매개변수 | | | |
| | | RBC 수 (10^9/L) | 헤모글로빈 (g/dl) | 헤마토크릿 (%) | MCV (fml) | MCH (pg) | MCHC (g/dl) | 혈소판 수 (10^9/L) |
| 비히클 | 0 | 7.94 | 14.97 | 45.50 | 57.33 | 18.87 | 32.87 | 223.3 |
| | 6 | 8.58 | 16.15 | 48.57 | 56.50 | 18.90 | 17.30 | 886.5 |
| | 24 | 8.25 | 15.70 | 46.55 | 56.33 | 19.03 | 33.73 | 427.0 |
| | 96 | 7.97 | 15.37 | 45.39 | 56.67 | 16.80 | 29.50 | 229.0 |
| | 168 | 8.27 | 15.87 | 46.96 | 57.00 | 19.20 | 33.80 | 244.7 |
| V4 IgG1 | 0 | 7.65 | 14.30 | 43.82 | 57.33 | 18.60 | 41.73 | 172.3 |
| | 6 | 8.03 | 14.77 | 45.04 | 56.33 | 18.50 | 32.90 | 99.00 |
| | 24 | 8.14 | 14.73 | 45.84 | 56.33 | 18.17 | 32.23 | 305.7 |
| | 96 | 7.97 | 15.93 | 45.02 | 56.33 | 17.50 | 30.97 | 269.3 |
| | 168 | 8.15 | 15.50 | 45.53 | 55.67 | 19.03 | 34.03 | 151.1 |
| V4 IgG4 | 0 | 7.94 | 14.23 | 46.23 | 58.00 | 17.83 | 30.63 | 247.0 |
| | 6 | 10.51 | 20.40 | 61.26 | 58.33 | 19.40 | 33.30 | 427.3 |
| | 24 | 8.04 | 14.90 | 45.31 | 56.00 | 18.50 | 32.83 | 293.3 |
| | 96 | 6.77 | 12.23 | 38.43 | 57.00 | 18.07 | 31.70 | 183.7 |
| | 168 | 7.69 | 15.73 | 43.65 | 57.00 | 17.97 | 31.53 | 303.0 |

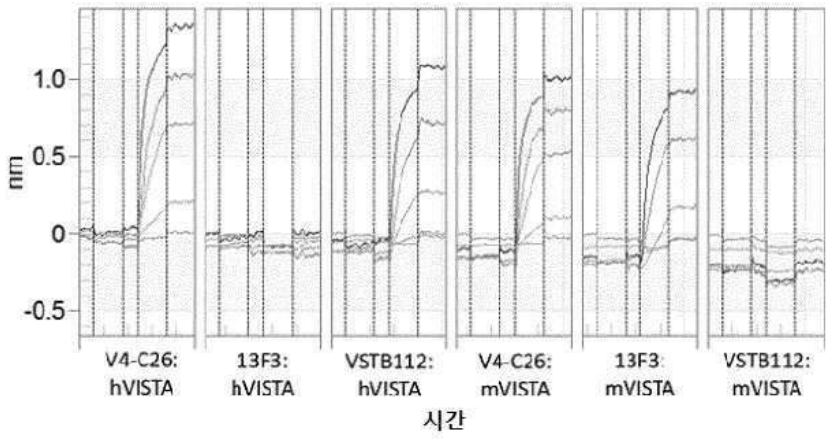
도면65b

| 치료 아암 | 시간 (hrs) | 백혈 세포 | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | WBC 수 (10^9/ L) | 림프구 수 (10^9/ L) | 단핵구 수 (10^9/ L) | 호중구 수 (10^9/ L) |
| 비히클 | 0 | 14.86 | 12.53 | 0.40 | 1.93 |
| | 6 | 10.88 | 8.63 | 0.21 | 2.03 |
| | 24 | 9.85 | 8.15 | 0.20 | 1.50 |
| | 96 | 11.68 | 8.94 | 0.59 | 2.15 |
| | 168 | 15.82 | 12.28 | 1.22 | 2.32 |
| V4 IgG1 | 0 | 9.02 | 7.52 | 0.55 | 0.94 |
| | 6 | 8.79 | 5.84 | 0.35 | 2.60 |
| | 24 | 10.38 | 8.66 | 0.16 | 1.57 |
| | 96 | 10.89 | 8.91 | 0.35 | 1.63 |
| | 168 | 19.90 | 17.23 | 0.82 | 1.73 |
| V4 IgG4 | 0 | 8.42 | 7.38 | 0.08 | 0.95 |
| | 6 | 18.20 | 10.76 | 0.62 | 6.82 |
| | 24 | 7.44 | 5.73 | 0.48 | 1.23 |
| | 96 | 7.32 | 5.56 | 0.15 | 1.61 |
| | 168 | 10.05 | 8.44 | 0.34 | 1.28 |

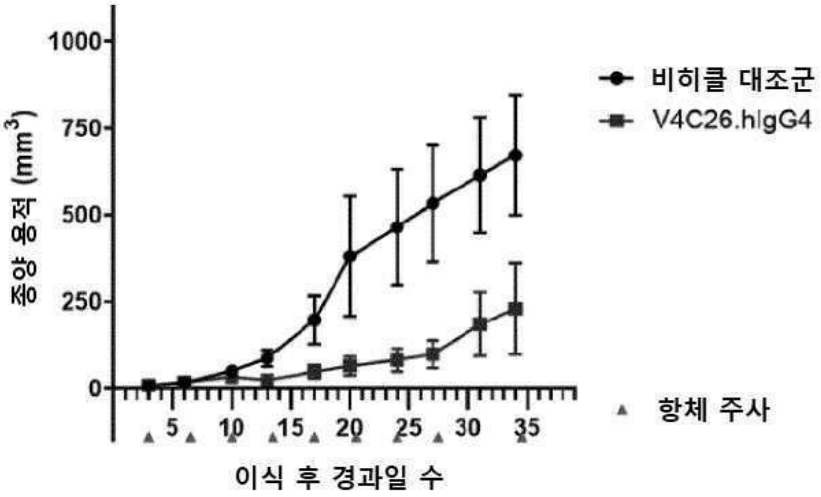
도면65c

| 시간 (hrs) | 생화학 | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 간 (U/L) | | 신장 (mg/dL) | | 췌장 | | 전해액 | | |
| | ALT | ALP | CREA | BUN | GLU (mg/dL) | AMY (U/L) | NA (meq/L) | K (meq/L) | P (mg/dL) |
| 0 | 52.33 | 246.0 | 0.33 | 21.33 | 173.7 | 549.3 | 137.3 | 7.90 | 8.47 |
| 6 | 28.67 | 210.7 | 0.37 | 10.33 | 195.7 | 517.7 | 134.0 | 6.00 | 8.20 |
| 24 | 36.67 | 258.0 | 0.40 | 13.33 | 182.0 | 564.3 | 137.7 | 6.73 | 7.77 |
| 96 | 32.33 | 218.3 | 0.10 | 12.67 | 178.3 | 532.0 | 134.0 | 5.50 | 8.07 |
| 168 | 40.33 | 283.0 | 0.27 | 13.00 | 190.0 | 623.3 | 135.7 | 6.37 | 7.30 |
| 0 | 31.00 | 259.0 | 0.27 | 11.67 | 175.3 | 619.0 | 137.3 | 7.23 | 8.33 |
| 6 | 35.67 | 261.7 | 0.33 | 12.00 | 140.3 | 590.0 | 139.3 | 8.43 | 9.97 |
| 24 | 33.67 | 257.3 | 0.20 | 12.33 | 154.0 | 639.0 | 136.3 | 7.57 | 8.10 |
| 96 | 35.67 | 235.7 | 0.23 | 11.50 | 181.7 | 648.0 | 135.7 | 6.67 | 8.33 |
| 168 | 38.67 | 269.7 | 0.23 | 13.33 | 179.7 | 657.0 | 136.7 | 7.00 | 8.20 |
| 0 | 38.33 | 277.0 | 0.30 | 11.67 | 171.3 | 622.3 | 135.3 | 7.23 | 8.43 |
| 6 | 57.00 | 217.0 | 0.20 | 10.00 | 138.7 | 469.0 | 144.3 | 44.03 | 8.20 |
| 24 | 34.67 | 275.0 | 0.33 | 12.33 | 158.3 | 633.0 | 134.7 | 6.70 | 8.07 |
| 96 | 36.00 | 196.3 | 0.23 | 11.67 | 172.0 | 585.7 | 138.0 | 8.90 | 9.23 |
| 168 | 36.00 | 229.3 | 0.30 | 14.00 | 179.0 | 644.7 | 136.3 | 6.90 | 7.67 |

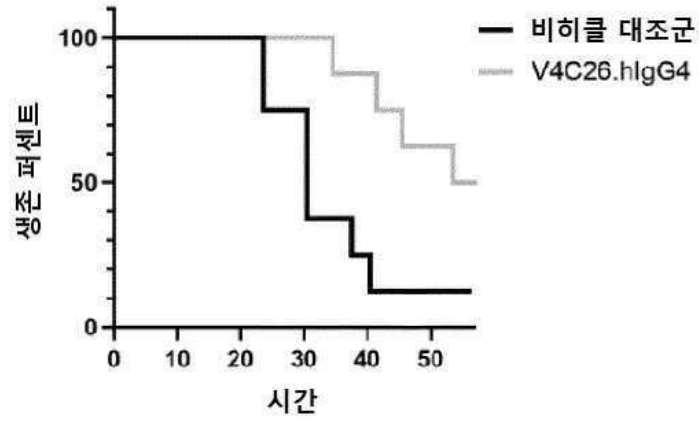
도면66



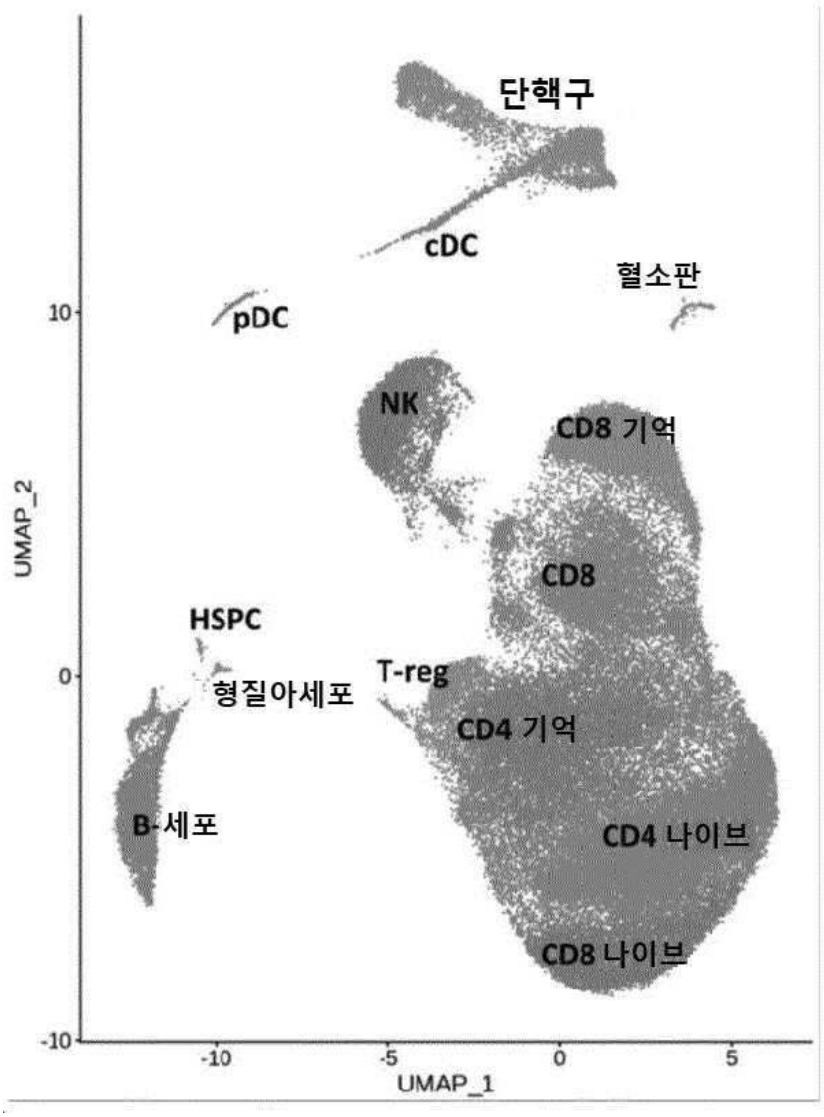

도면67a



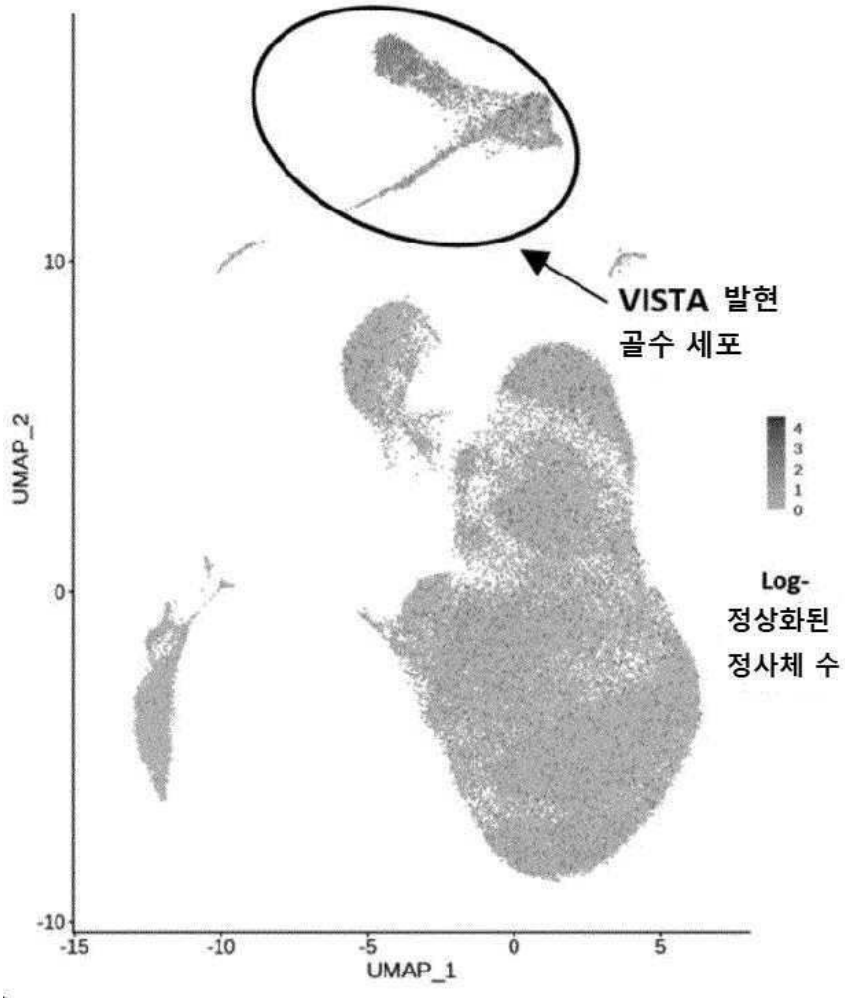

도면67b



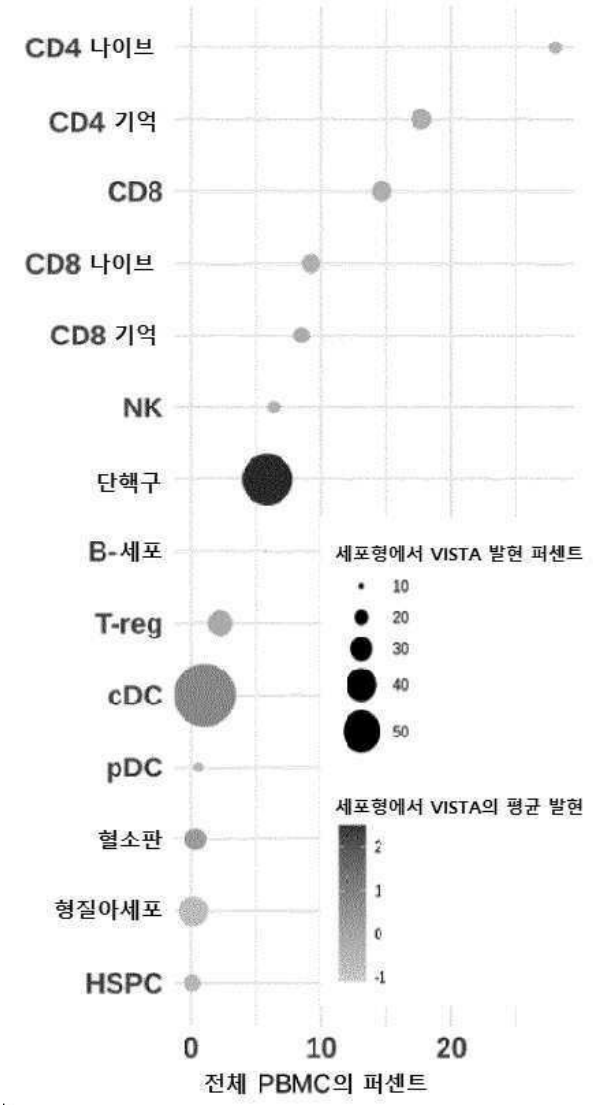
도면68a


단핵구
cDC
혈소판
pDC
NK
CD8 기억
CD8
HSPC
T-reg
형질아세포
CD4 기억
B 세포
CD4 나이브
CD8 나이브
UMAP_2
UMAP_1
10
0
-10
-10
-5
0
5

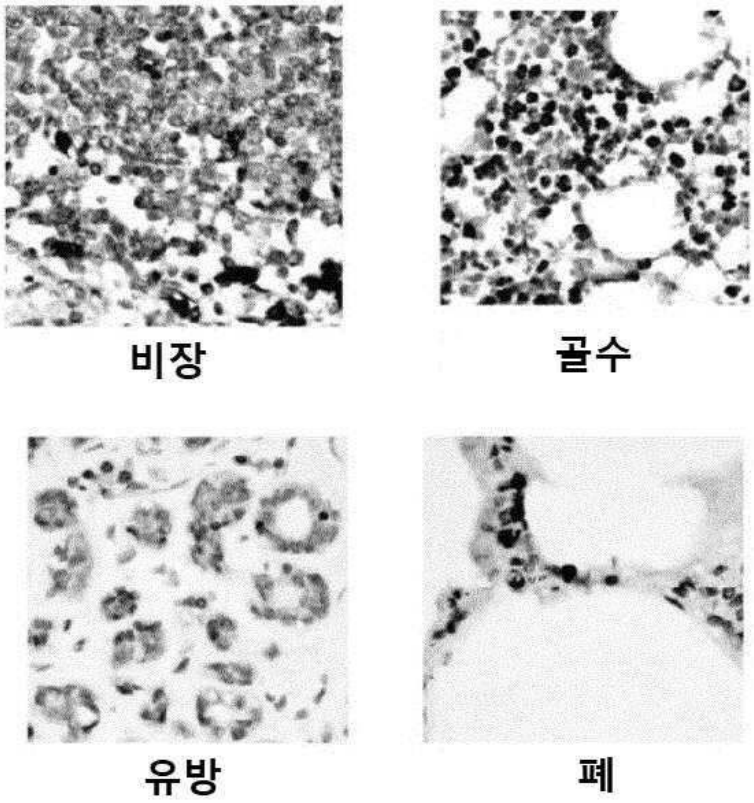
도면68b



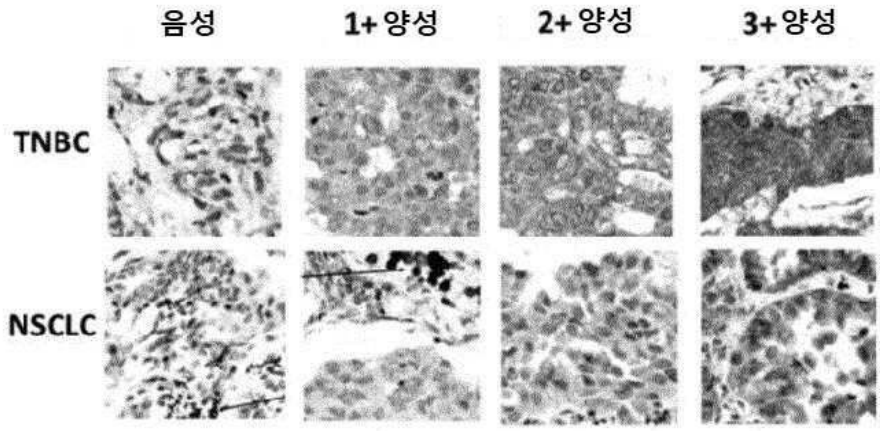
도면68c


CD4 나이브
CD4 기억
CD8
CD8 나이브
CD8 기억
NK
단핵구
B-세포
T-reg
cDC
pDC
혈소판
형질아세포
HSPC
세포형에서 VISTA 발현 퍼센트
10
20
30
40
50
세포형에서 VISTA의 평균 발현
2
1
0
-1
0
10
20
전체 PBMC의 퍼센트

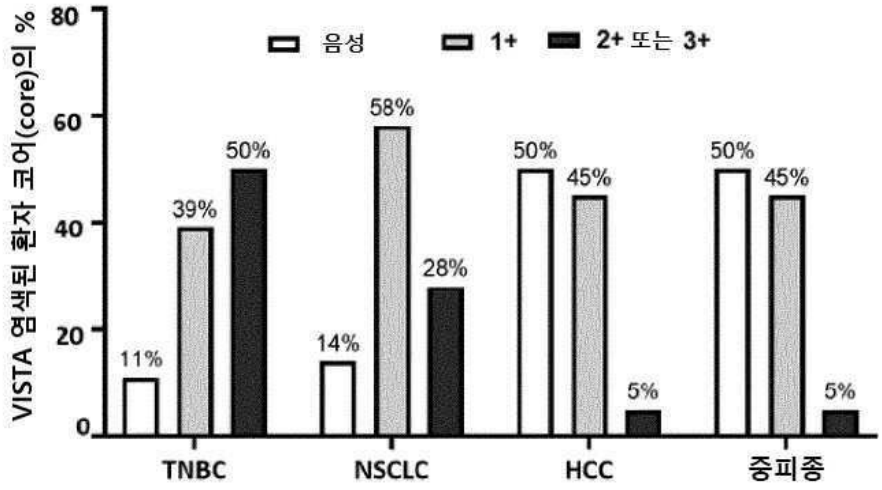
도면68d



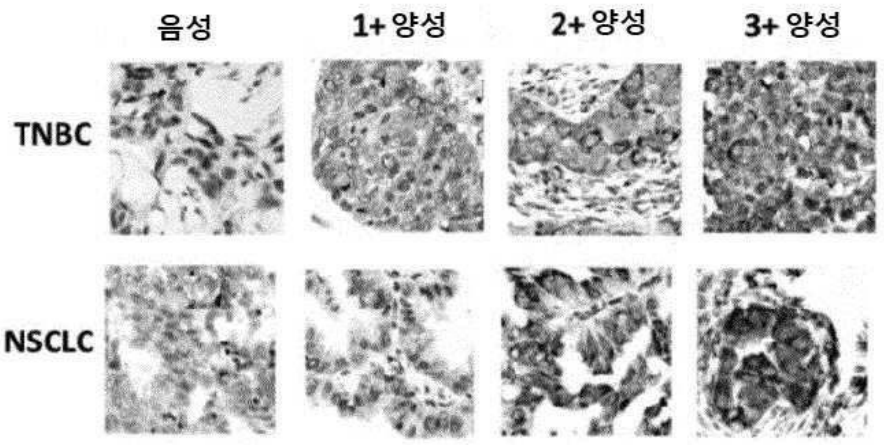

도면68e



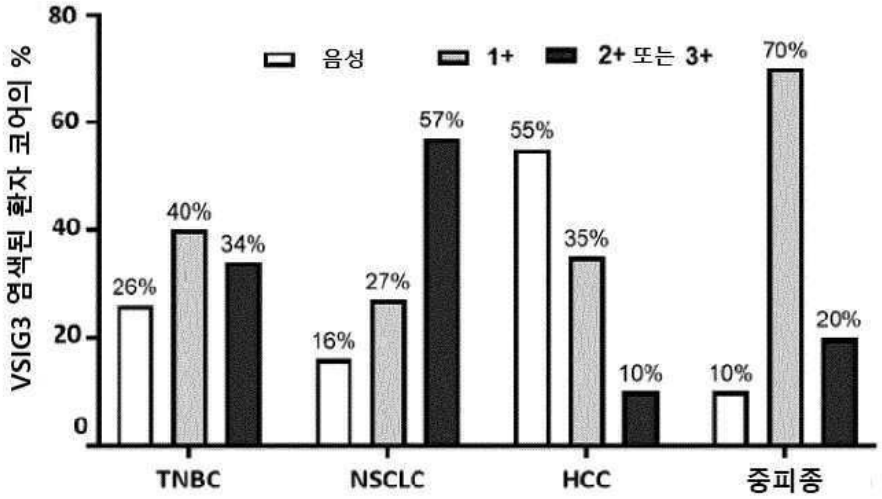
도면68f



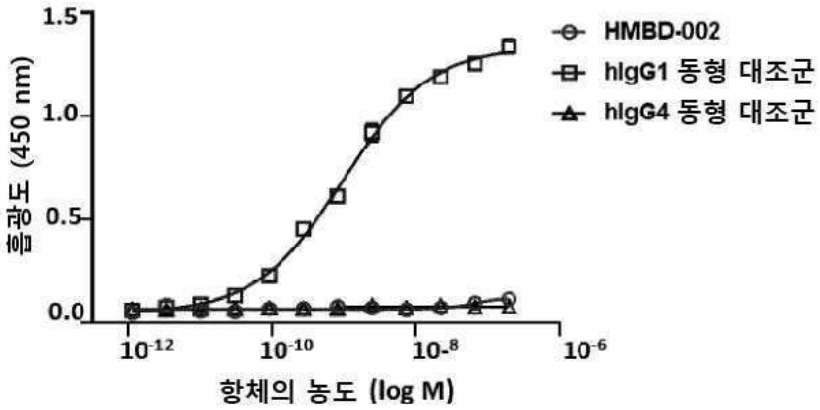

도면68g



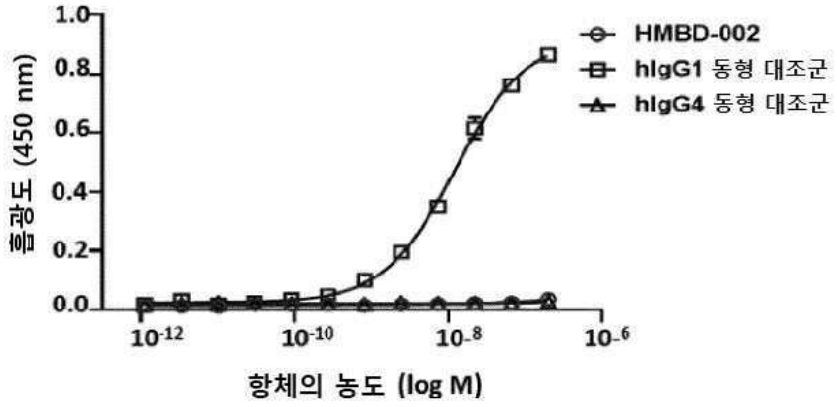

도면68h



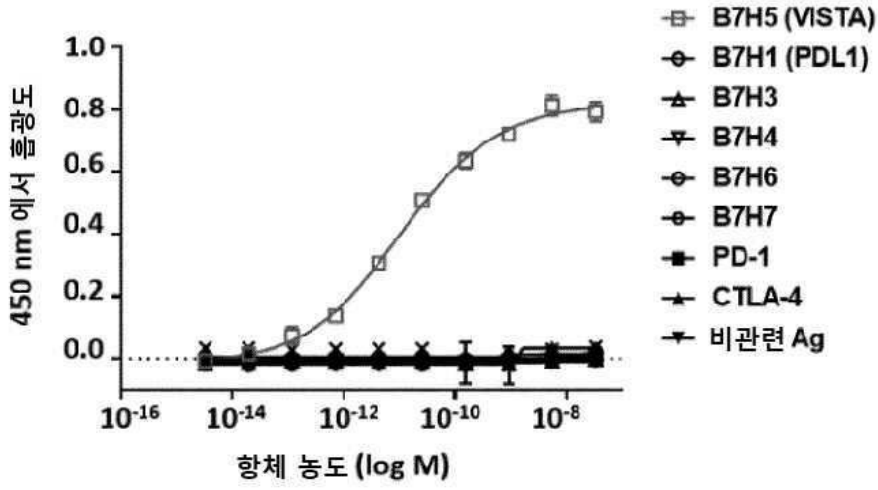
도면69a



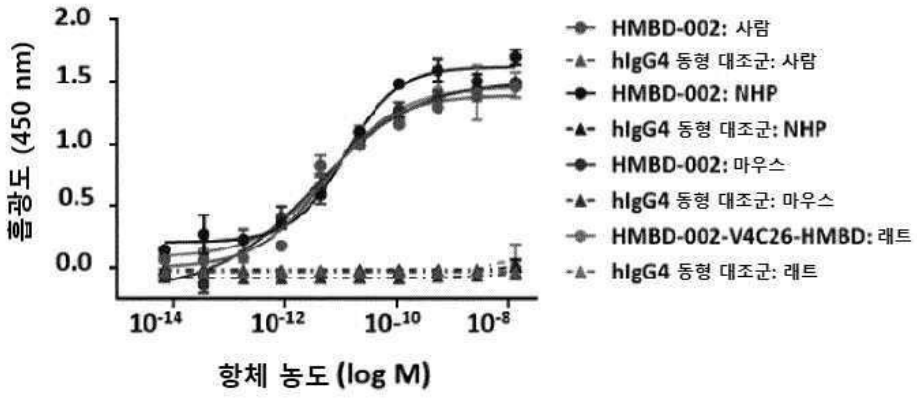

도면69b



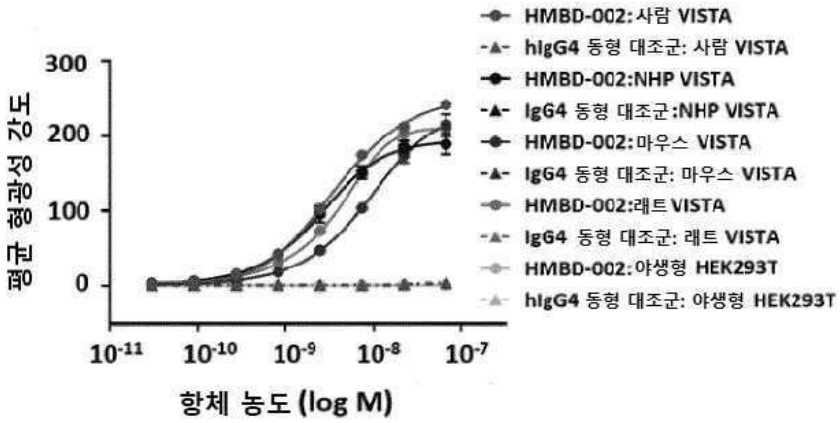

도면70a



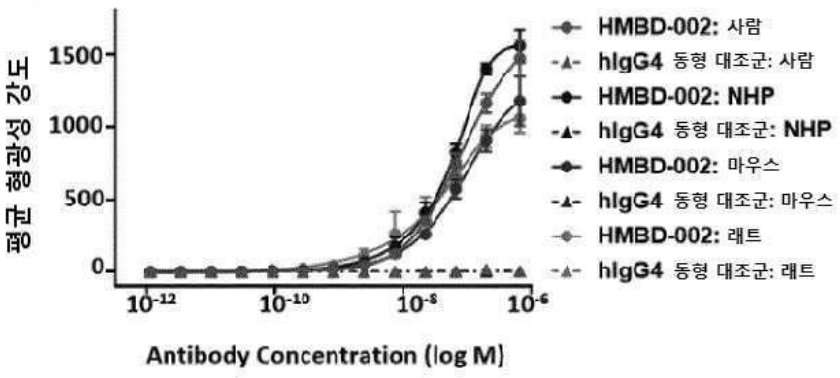
도면70b



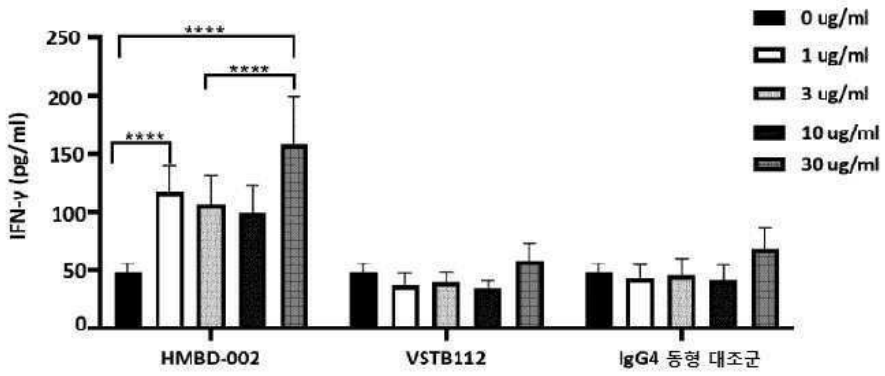

도면70c



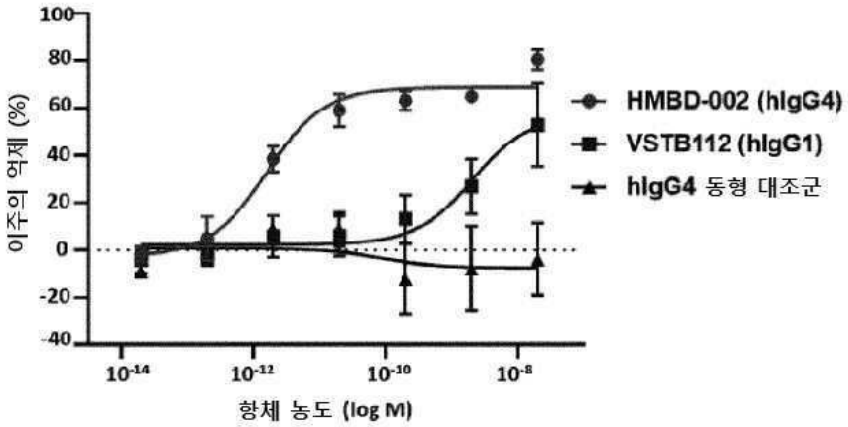

도면70d



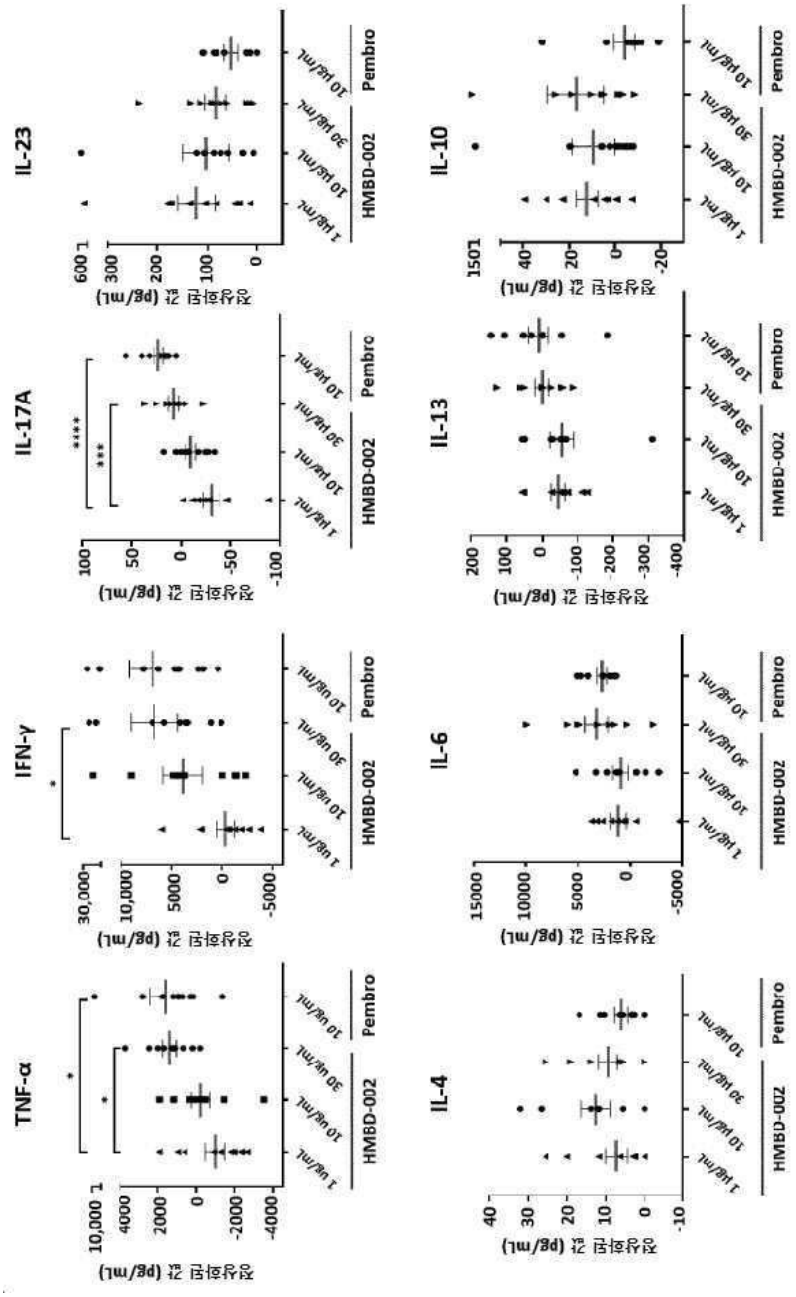
도면71a


0 ug/ml
1 ug/ml
3 ug/ml
10 ug/ml
30 ug/ml
IFN-γ (pg/ml)
250
200
150
100
50
0
****
****
****
HMBD-002
VSTB112
IgG4 동형 대조군

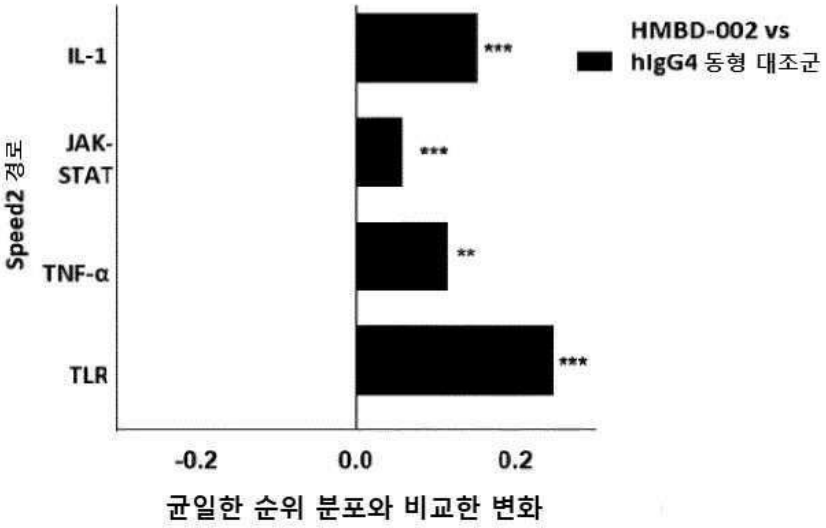
도면71b


HMBD-002 (hIgG4)
VSTB112 (hIgG1)
hIgG4 동형 대조군
이주의 억제 (%)
100
80
60
40
20
0
-20
-40
10-14
10-12
10-10
10-8
항체 농도 (log M)

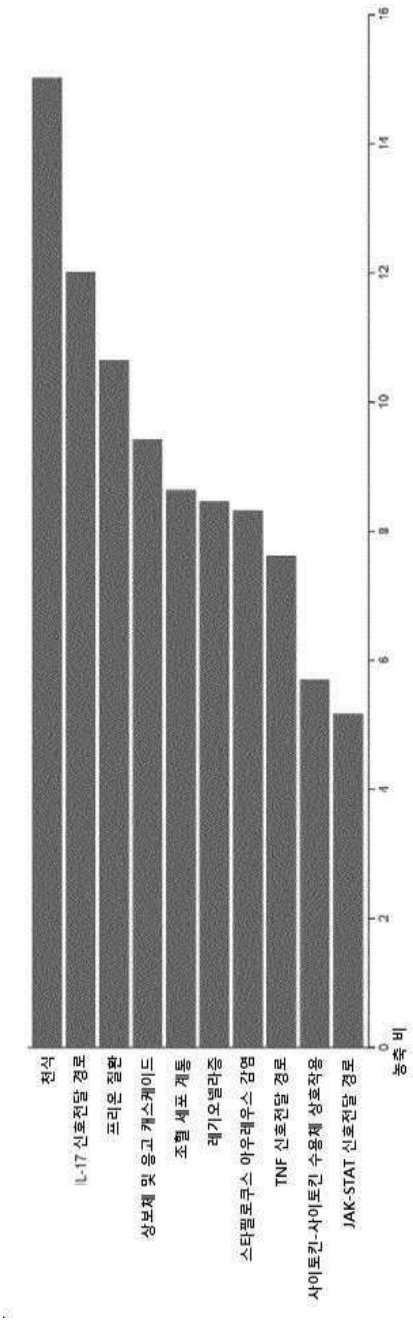
도면72a


IL-23
IL-17A
IFN-γ
TNF-α
IL-10
IL-13
IL-6
IL-4
정상화된 값 (pE/mL)
1 ug/mL
10 ug/mL
30 ug/mL
10 ug/mL
HMBD-002
Pembro

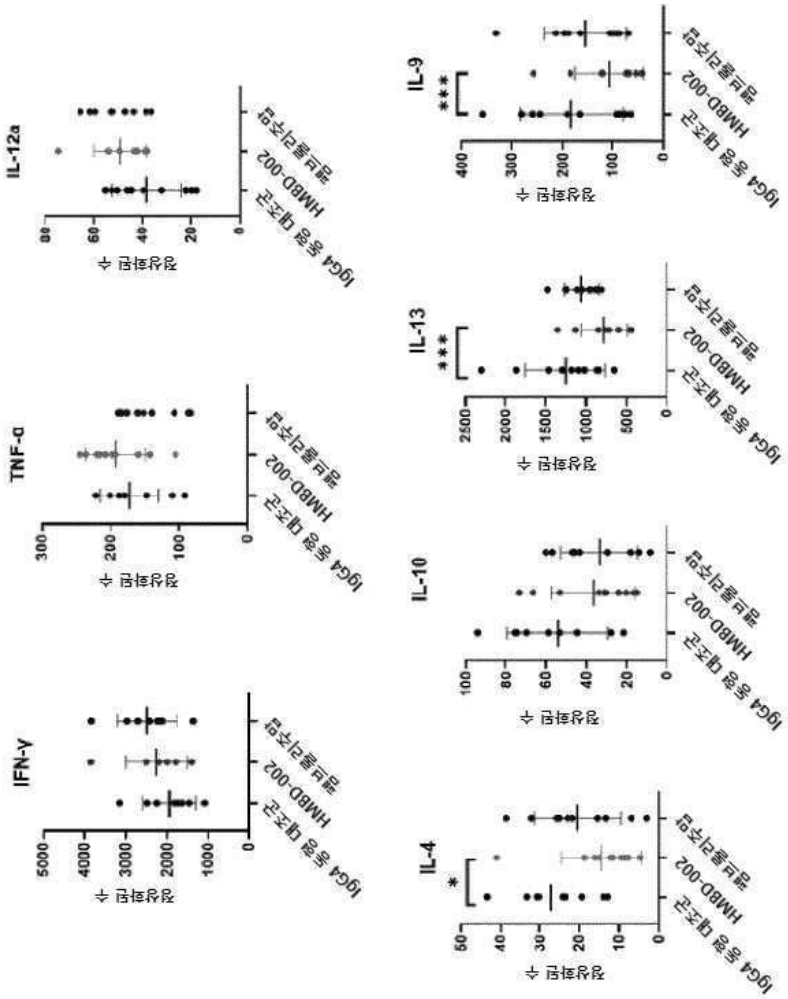
도면72b


HMBD-002 vs
hIgG4 동형 대조군
Speed2 경로
IL-1
JAK-STAT
TNF-α
TLR
***
***
**
***
-0.2
0.0
0.2
균일한 순위 분포와 비교한 변화

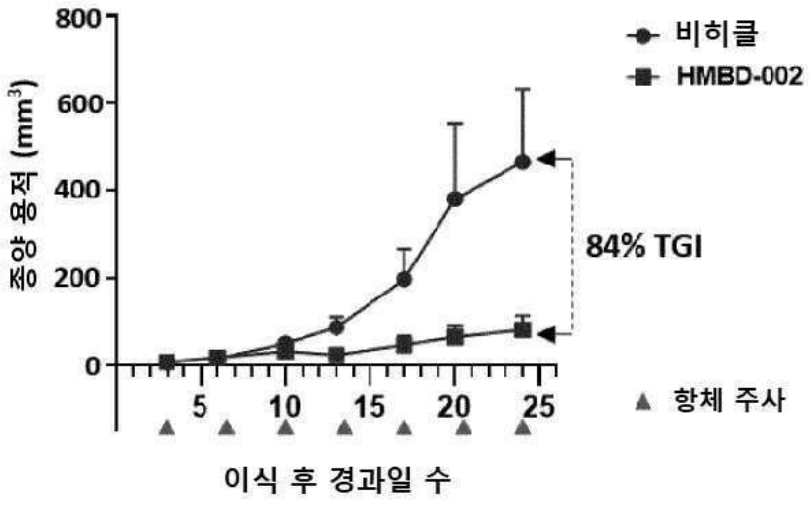
도면72c


전식
IL-17 신호전달 경로
프리온 질환
상보체 및 응고 캐스케이드
조혈 세포 계통
레기오넬라증
스타필로쿠스 아우레우스 감염
TNF 신호전달 경로
사이토킨-사이토킨 수용체 상호작용
JAK-STAT 신호전달 경로
0
2
4
6
8
10
12
14
16
농축 비

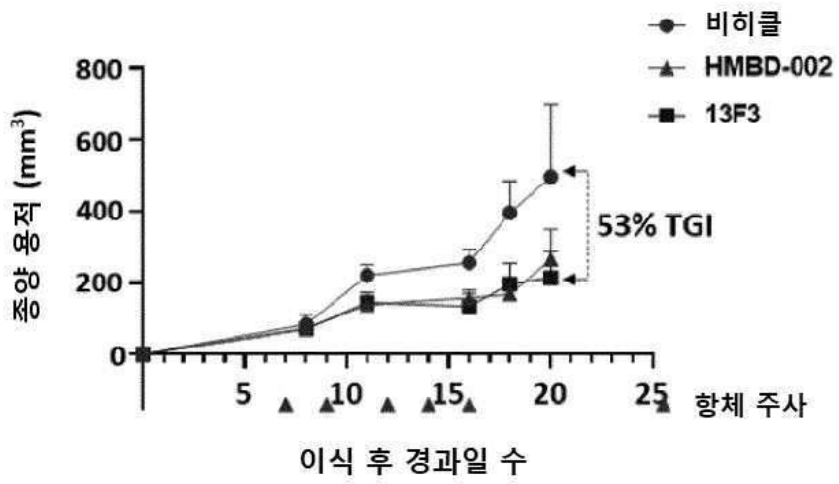
도면72d


IL-12a
IL-9
IL-13
TNF-α
IL-10
IFN-γ
IL-4
정상화된 수
HMBD-002
대조군
IgG4 동형 대조군

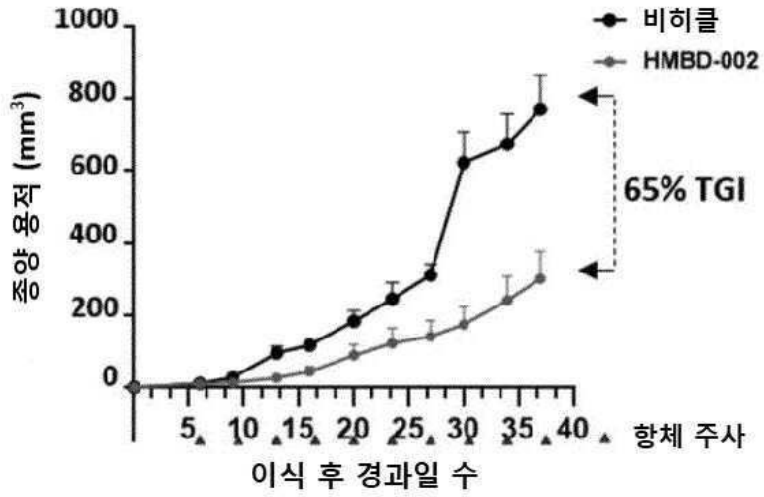
도면73a


800
600
400
200
0
종양 용적 (mm³)
5
10
15
20
25
이식 후 경과일 수
비히클
HMBD-002
84% TGI
항체 주사

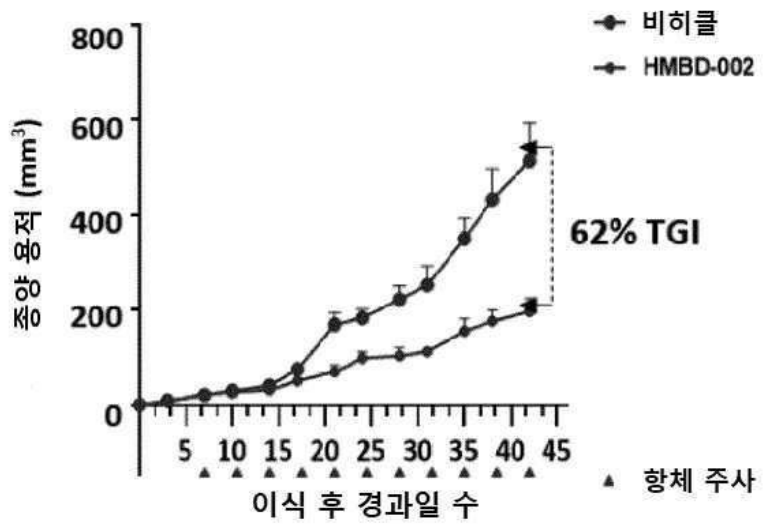
도면73b


비히클
HMBD-002
13F3
종양 용적 (mm³)
800
600
400
200
0
53% TGI
5
10
15
20
25
항체 주사
이식 후 경과일 수

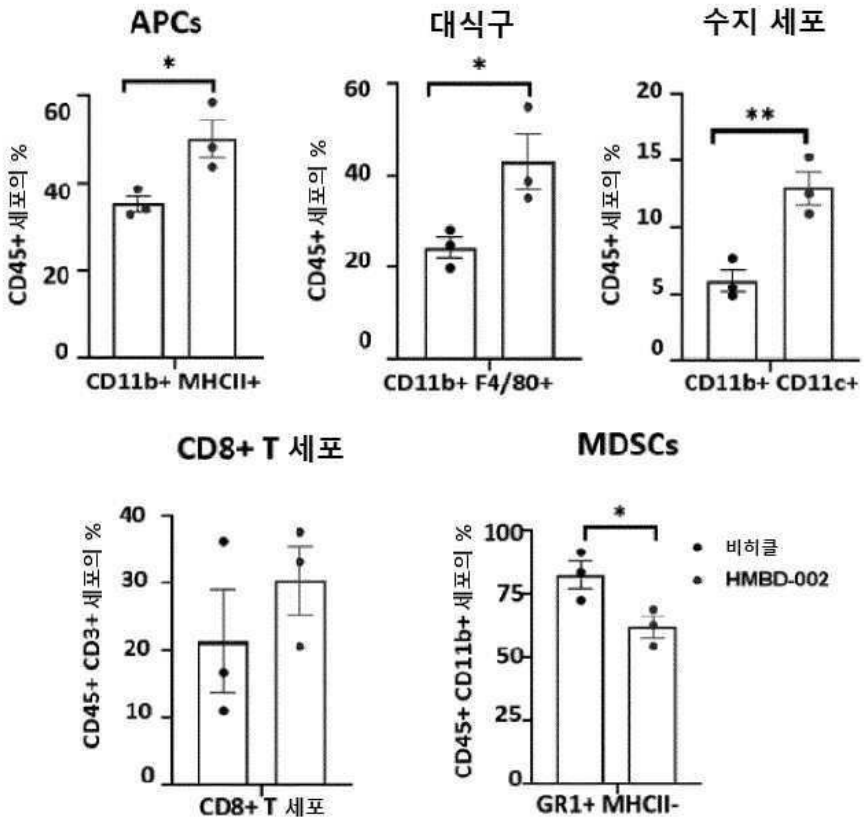
도면73c


비히클
HMBD-002
종양 용적 (mm³)
1000
800
600
400
200
0
65% TGI
5
10
15
20
25
30
35
40
항체 주사
이식 후 경과일 수

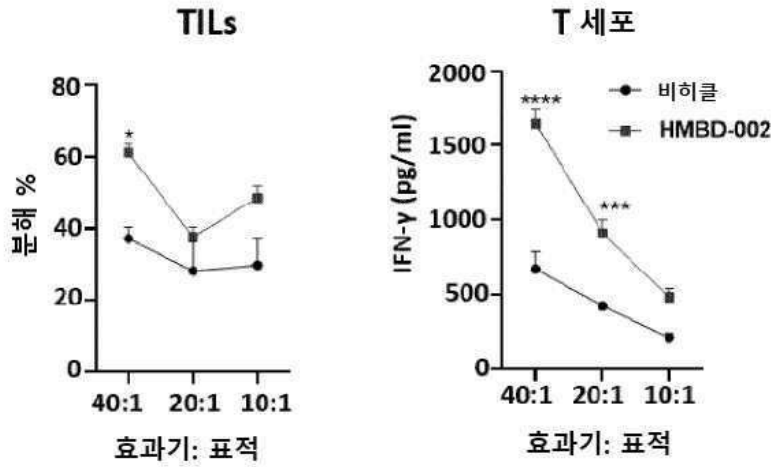
도면73d


비히클
HMBD-002
종양 용적 (mm3)
800
600
400
200
0
62% TGI
5 10 15 20 25 30 35 40 45
이식 후 경과일 수
항체 주사

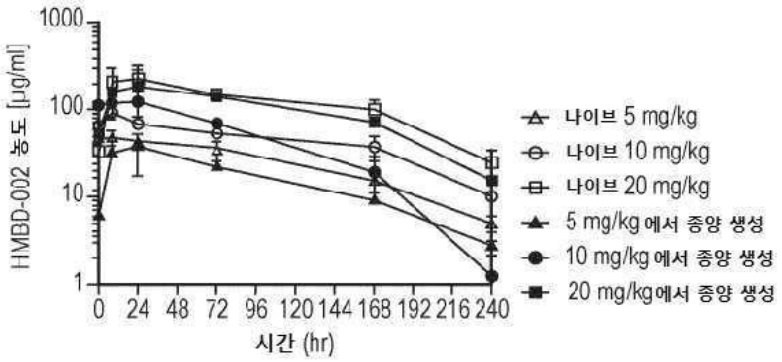
도면73e


APCs
대식구
수지 세포
CD45+ 세포의 %
CD11b+ MHCII+
CD11b+ F4/80+
CD11b+ CD11c+
CD8+ T 세포
MDSCs
CD45+ CD3+ 세포의 %
CD45+ CD11b+ 세포의 %
GR1+ MHCII-
비히클
HMBD-002

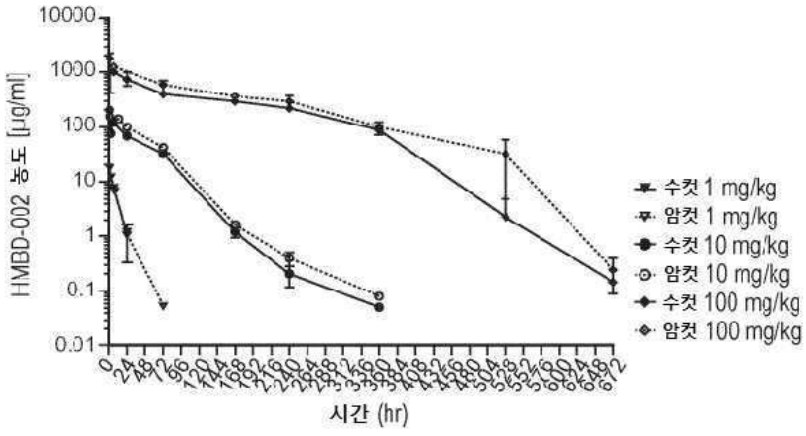
도면73f



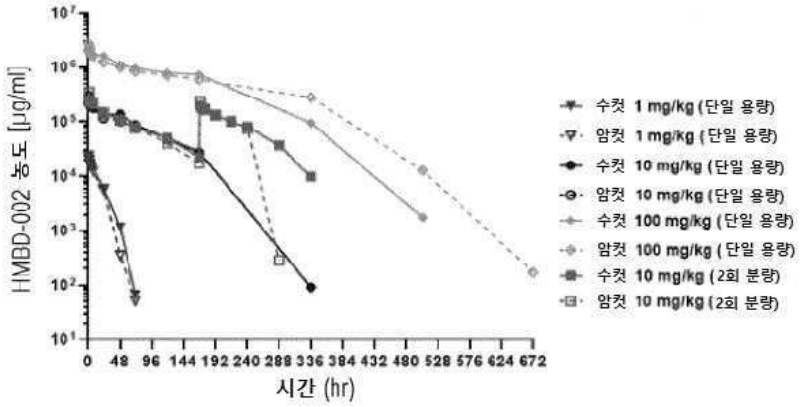

도면74a



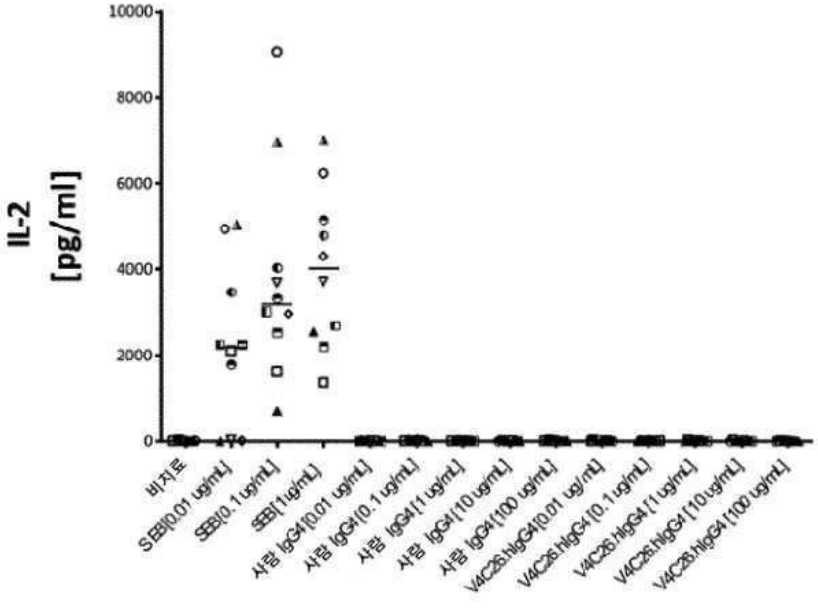

도면74b



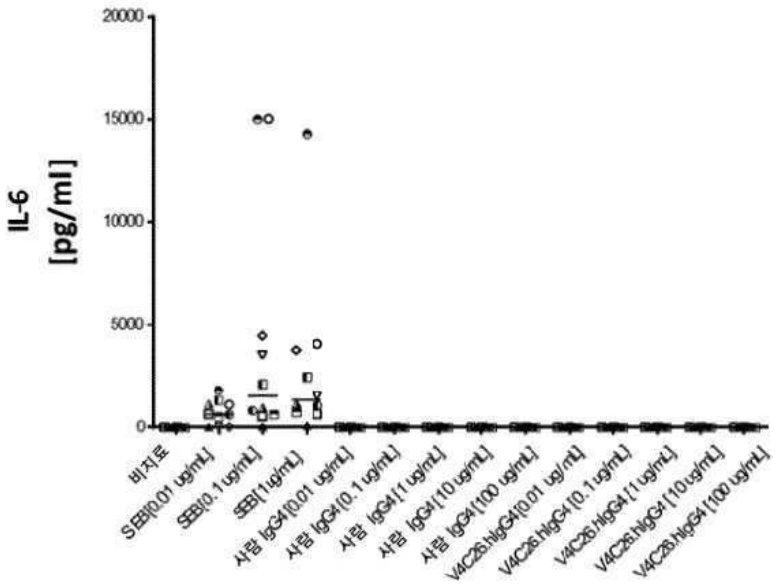
도면74c


HMBD-002 농도 [μg/ml]
시간 (hr)
수컷 1 mg/kg (단일 용량)
암컷 1 mg/kg (단일 용량)
수컷 10 mg/kg (단일 용량)
암컷 10 mg/kg (단일 용량)
수컷 100 mg/kg (단일 용량)
암컷 100 mg/kg (단일 용량)
수컷 10 mg/kg (2회 분량)
암컷 10 mg/kg (2회 분량)

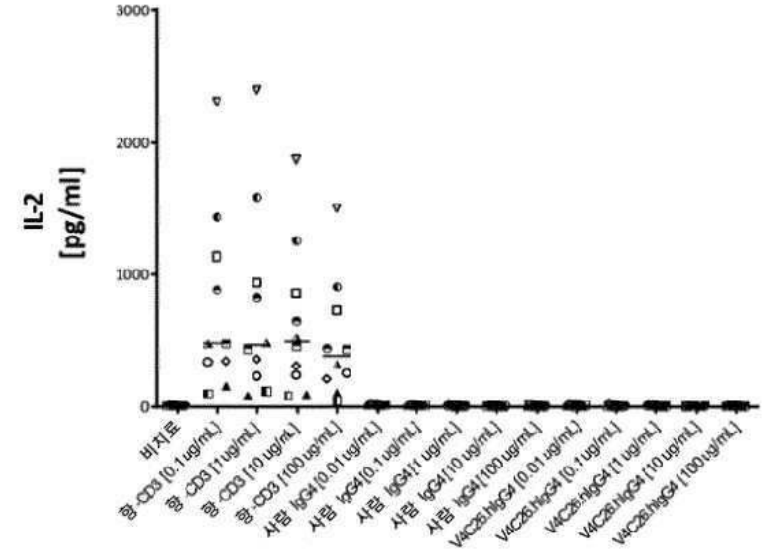
도면74d


IL-2 [pg/ml]
비자토
SEB(0.01 ug/mL)
SEB(0.1 ug/mL)
SEB(1 ug/mL)
사람 IgG4(0.01 ug/mL)
사람 IgG4(0.1 ug/mL)
사람 IgG4(1 ug/mL)
사람 IgG4(10 ug/mL)
사람 IgG4(100 ug/mL)
V4C26.hIgG4(0.01 ug/mL)
V4C26.hIgG4(0.1 ug/mL)
V4C26.hIgG4(1 ug/mL)
V4C26.hIgG4(10 ug/mL)
V4C26.hIgG4(100 ug/mL)

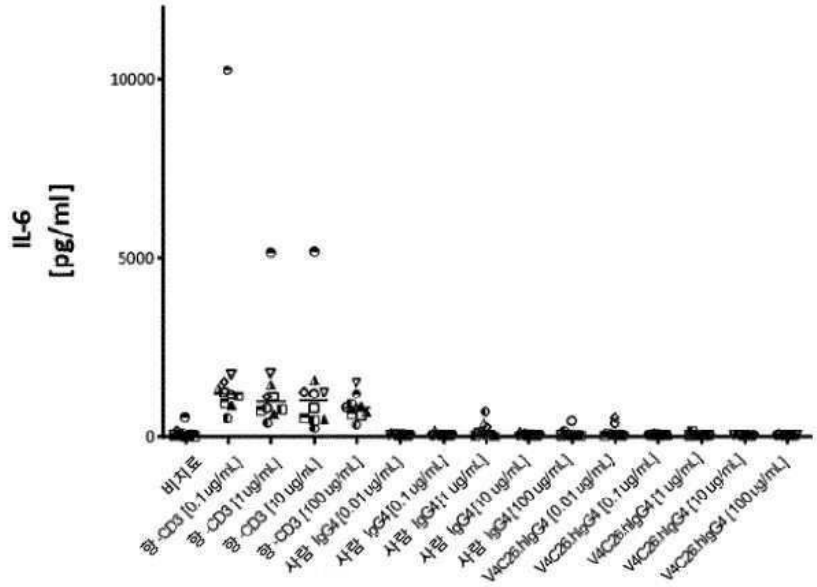
도면74e


IL-6
[pg/ml]
20000
15000
10000
5000
0
비처료
SEB[0.01 ug/mL]
SEB[0.1 ug/mL]
SEB[1ug/mL]
사람 IgG4[0.01 ug/mL]
사람 IgG4[0.1 ug/mL]
사람 IgG4[1 ug/mL]
사람 IgG4[10 ug/mL]
사람 IgG4[100 ug/mL]
V4C26.hIgG4[0.01 ug/mL]
V4C26.hIgG4[0.1 ug/mL]
V4C26.hIgG4[1 ug/mL]
V4C26.hIgG4[10 ug/mL]
V4C26.hIgG4[100 ug/mL]

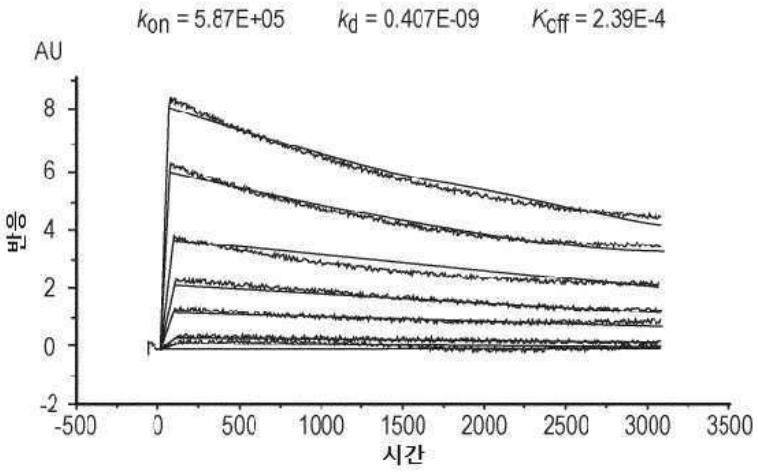
도면74f


IL-2
[pg/ml]
3000
2000
1000
0
비처료
항-CD3 [0.1 ug/mL]
항-CD3 [1 ug/mL]
항-CD3 [10 ug/mL]
항-CD3 [100 ug/mL]
사람 IgG4[0.01 ug/mL]
사람 IgG4[0.1 ug/mL]
사람 IgG4[1 ug/mL]
사람 IgG4[10 ug/mL]
사람 IgG4[100 ug/mL]
V4C26.hIgG4[0.01 ug/mL]
V4C26.hIgG4[0.1 ug/mL]
V4C26.hIgG4[1 ug/mL]
V4C26.hIgG4[10 ug/mL]
V4C26.hIgG4[100 ug/mL]

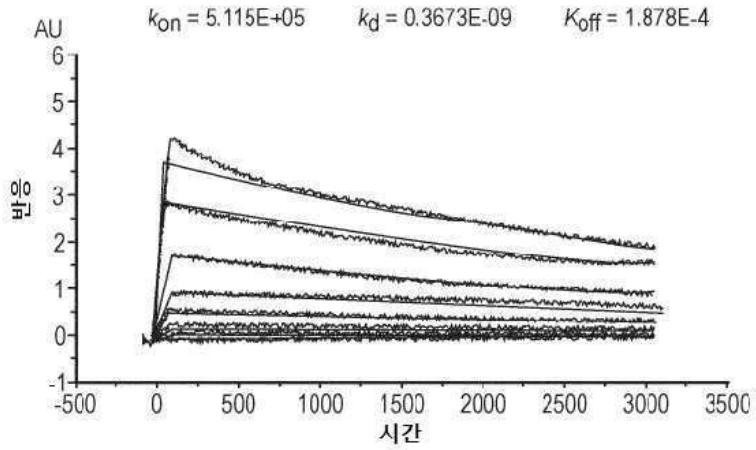
도면74g


IL-6
[pg/ml]
10000
5000
0
비지표
항-CD3 [0.1ug/mL]
항-CD3 [1ug/mL]
항-CD3 [10 ug/mL]
항-CD3 [100 ug/mL]
사람 IgG4 [0.01 ug/mL]
사람 IgG4 [0.1 ug/mL]
사람 IgG4 [1 ug/mL]
사람 IgG4 [10 ug/mL]
사람 IgG4 [100 ug/mL]
V4C26.hIgG4 [0.01 ug/mL]
V4C26.hIgG4 [0.1 ug/mL]
V4C26.hIgG4 [1 ug/mL]
V4C26.hIgG4 [10 ug/mL]
V4C26.hIgG4 [100 ug/mL]

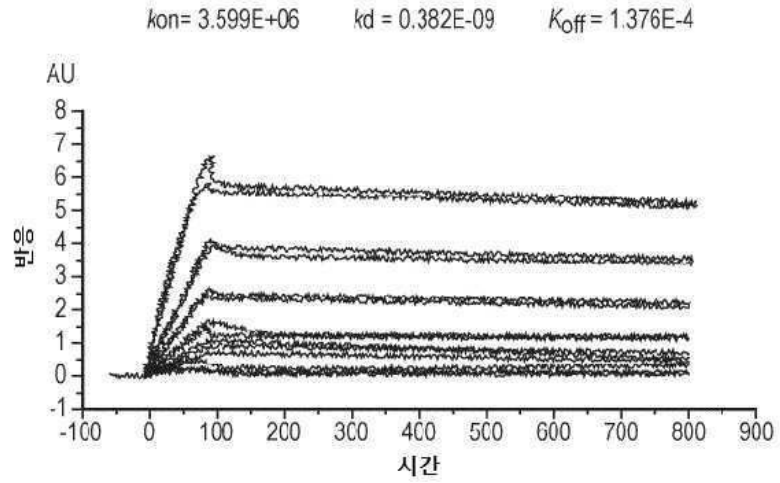
도면75a


$k_{on}$ = 5.87E+05
$k_d$ = 0.407E-09
$K_{Off}$ = 2.39E-4
AU
8
6
4
2
0
-2
반응
-500
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
시간

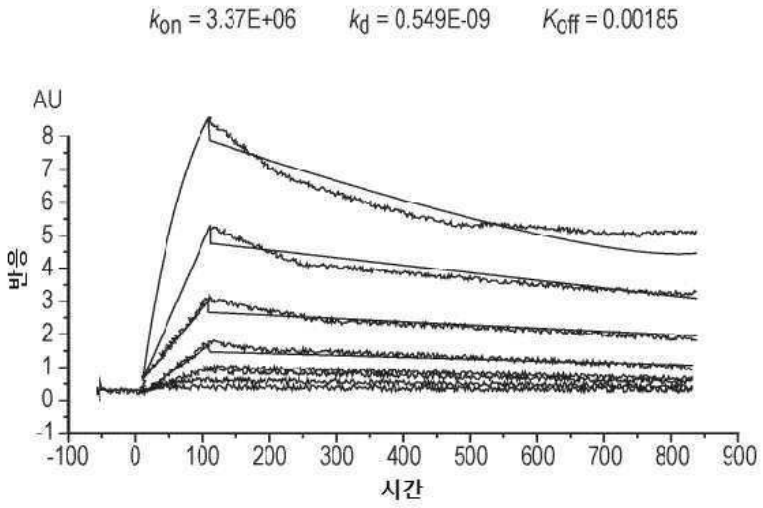
도면75b


kon = 5.115E+05
kd = 0.3673E-09
Koff = 1.878E-4
AU
응답
시간

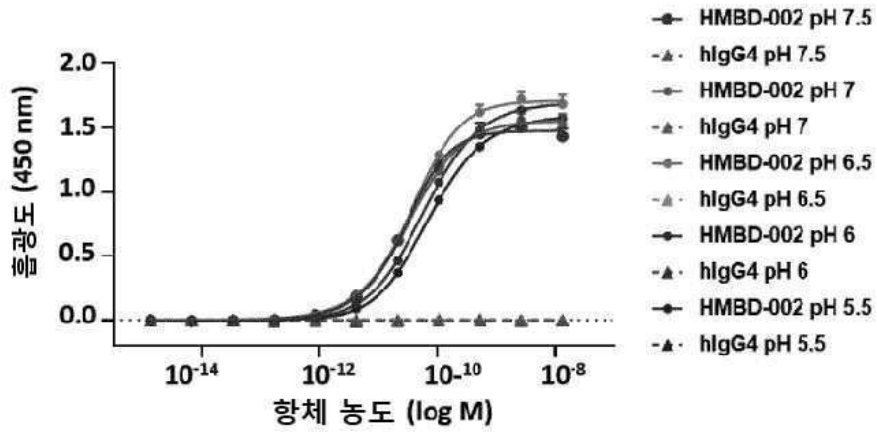
도면75c


kon= 3.599E+06
kd = 0.382E-09
Koff = 1.376E-4
AU
응답
시간

도면75d

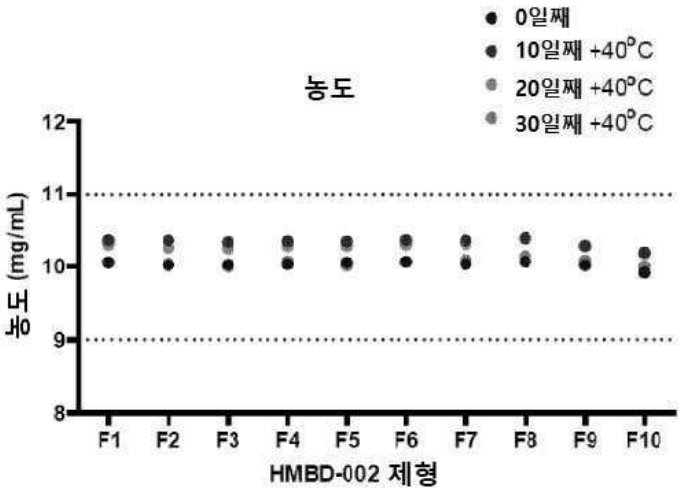



도면75e

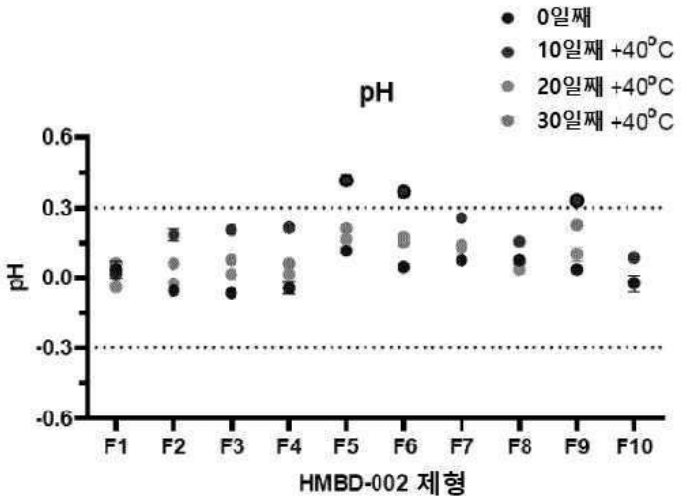



| pH | $EC_{50}$ |
|---|---|
| 7.5 | 2.871e-011 |
| 7 | 3.431e-011 |
| 6.5 | 3.630e-011 |
| 6 | 5.890e-011 |
| 5.5 | 7.308e-011 |

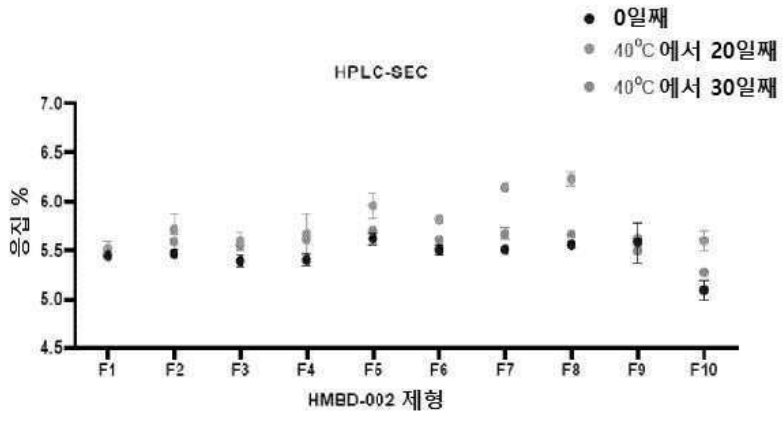
도면76a



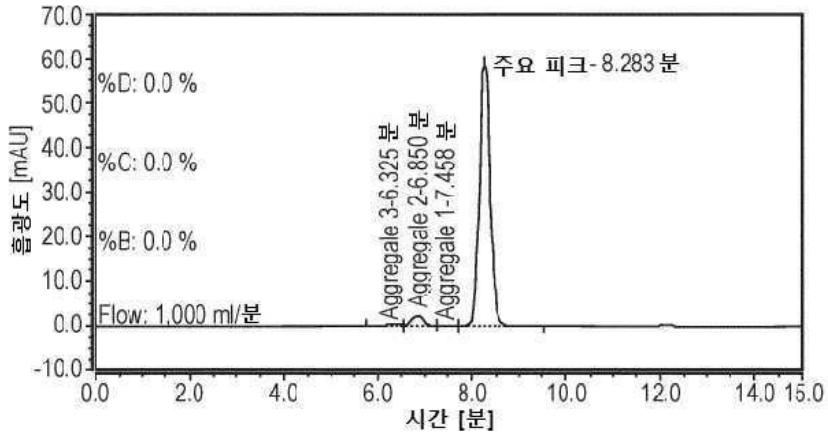

도면76b



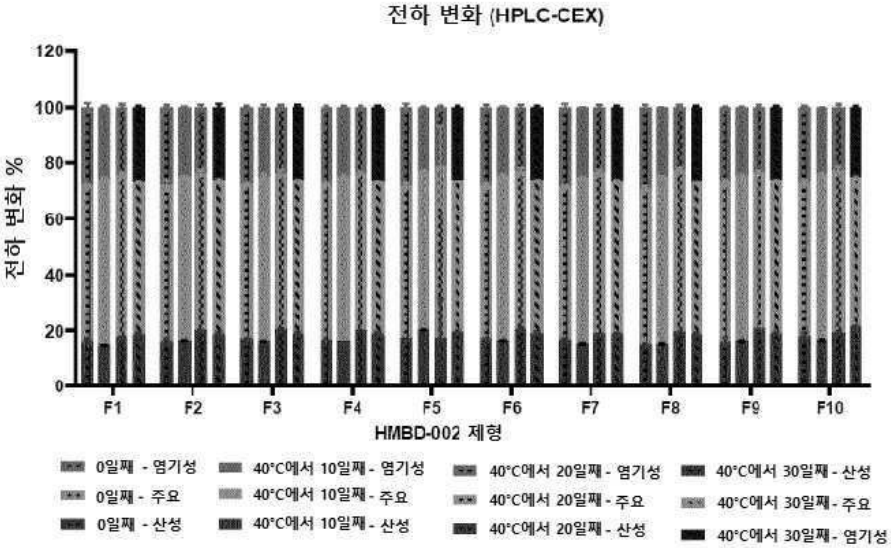

도면76c



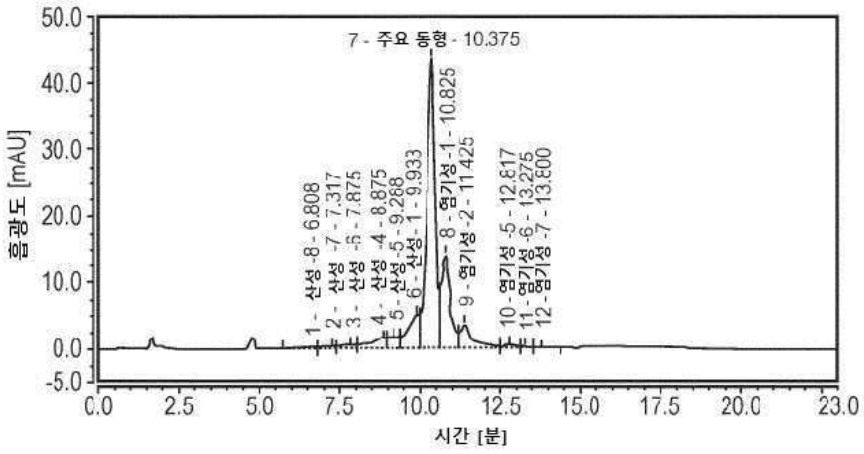
도면76d



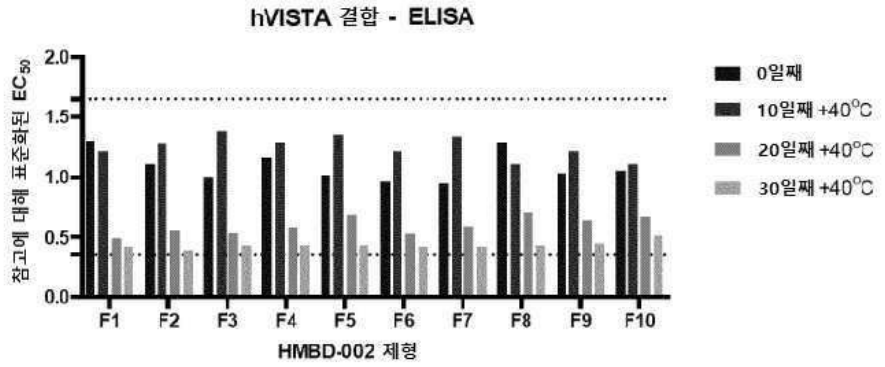

도면76e



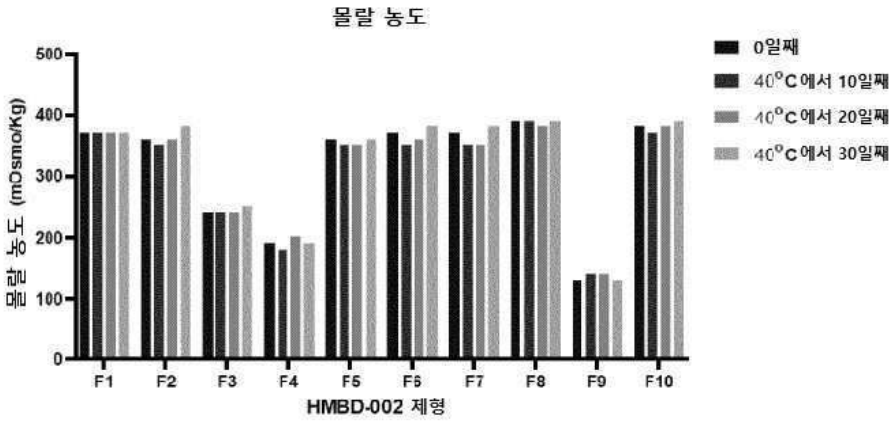

도면76f



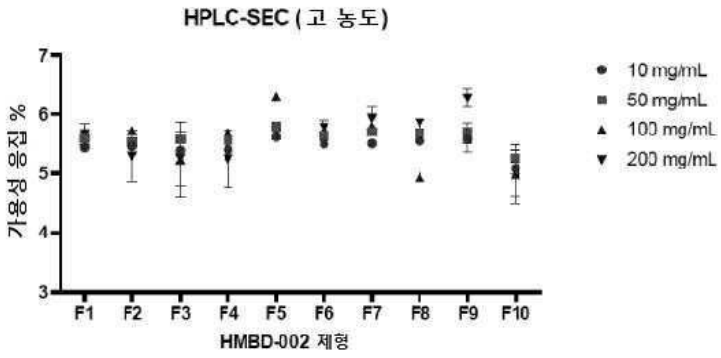
도면76g



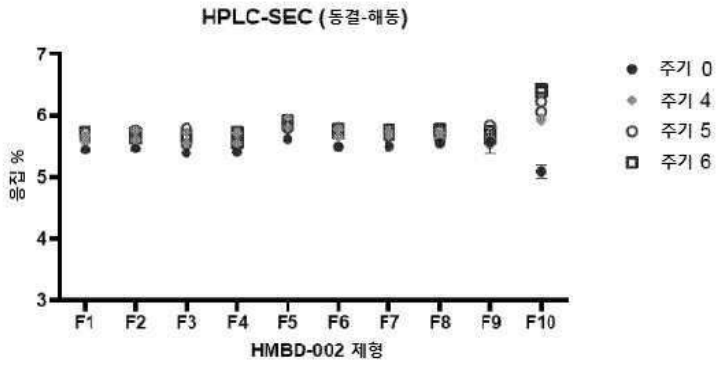

도면76h



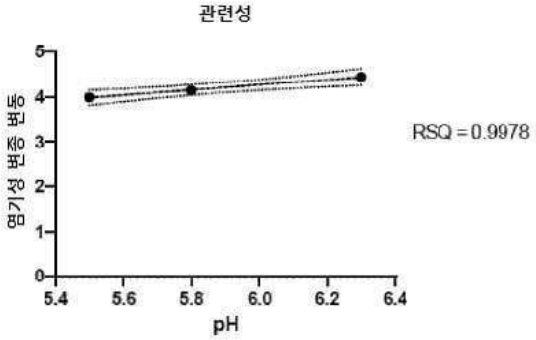

도면77



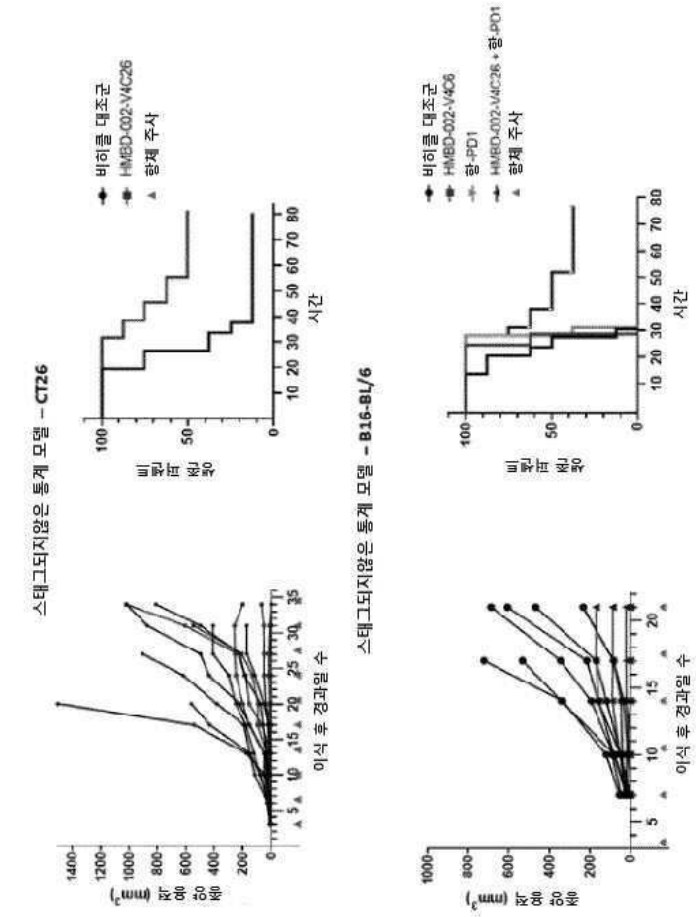
도면78


HPLC-SEC (동결-해동)
응집 %
7
6
5
4
3
F1
F2
F3
F4
F5
F6
F7
F8
F9
F10
HMBD-002 제형
주기 0
주기 4
주기 5
주기 6

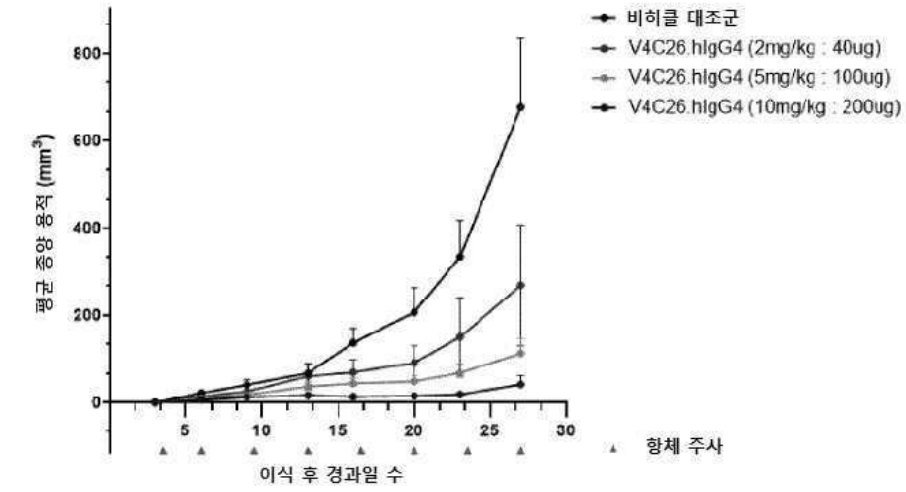
도면79


관련성
염기성 변종 변동
5
4
3
2
1
0
5.4
5.6
5.8
6.0
6.2
6.4
pH
RSQ = 0.9978

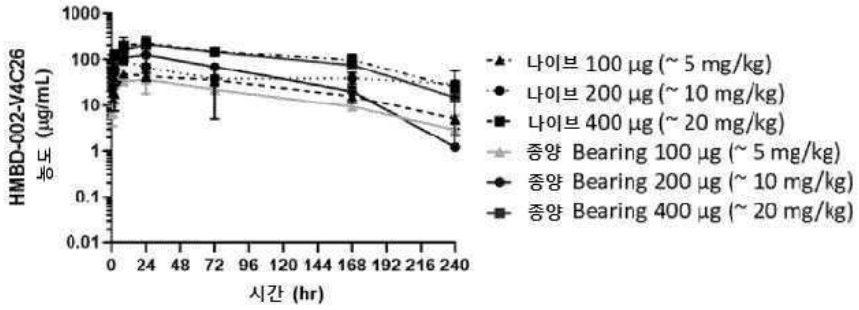
도면80


스테그되지않은 통계 모델 – CT26
비히클 대조군
HMBD-002-V4C26
항체 주사
생존 퍼센트
시간
종양 용적 (mm³)
이식 후 경과일 수
스테그되지않은 통계 모델 – B16-BL/6
비히클 대조군
HMBD-002-V4C6
항-PD1
HMBD-002-V4C26 + 항-PD1
항체 주사
생존 퍼센트
시간
종양 용적 (mm³)
이식 후 경과일 수

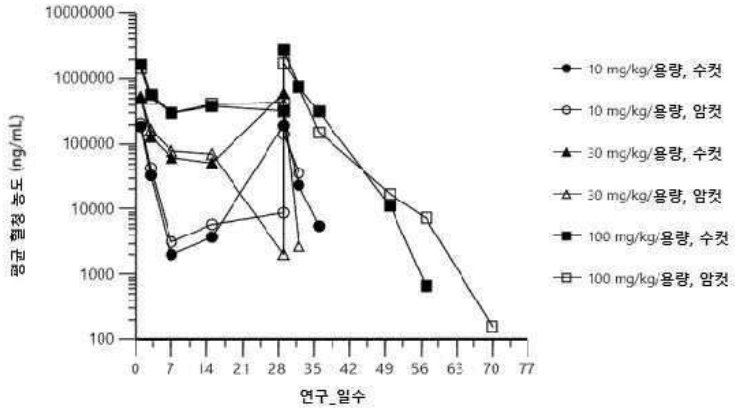
도면81


비히클 대조군
V4C26.hIgG4 (2mg/kg : 40ug)
V4C26.hIgG4 (5mg/kg : 100ug)
V4C26.hIgG4 (10mg/kg : 200ug)
평균 종양 용적 (mm³)
이식 후 경과일 수
항체 주사

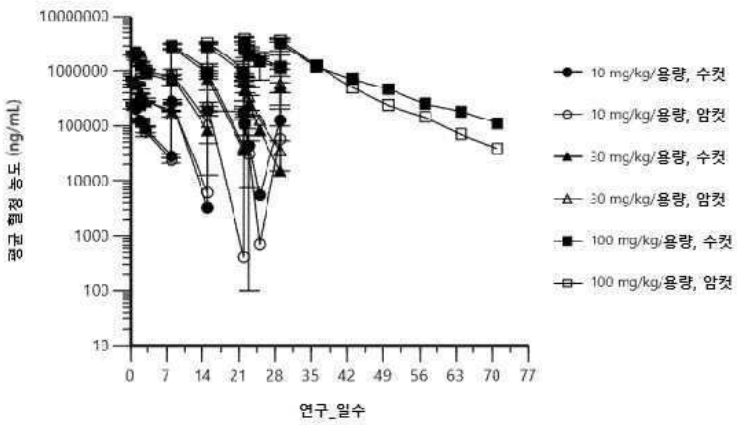
도면82a



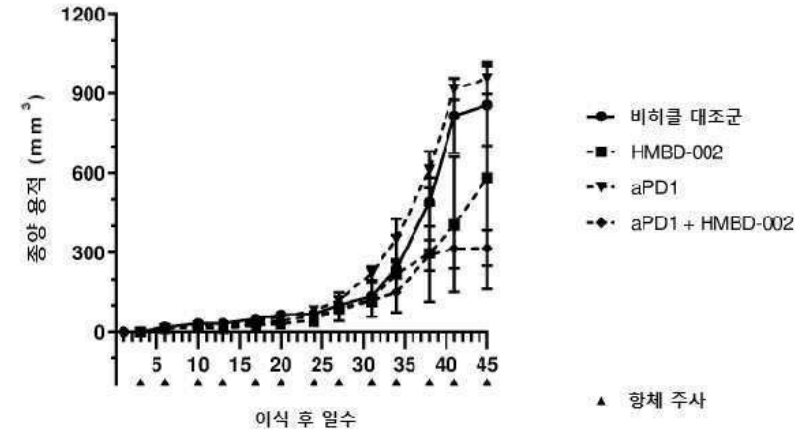

도면82b



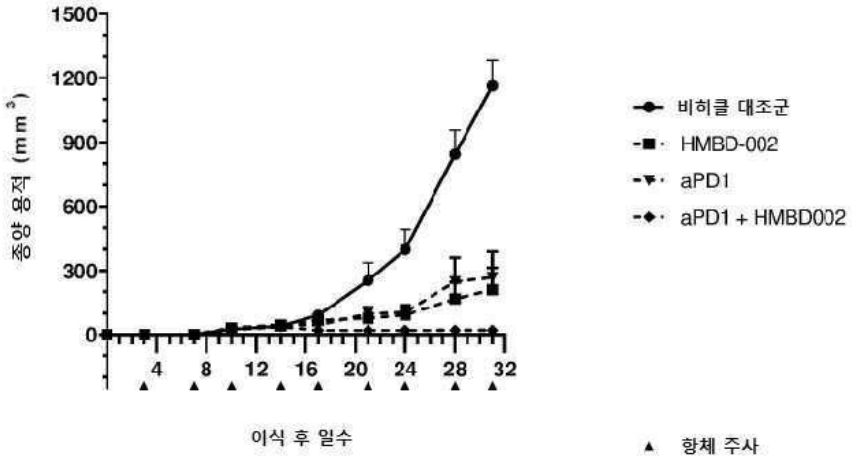

도면82c



도면83a


종양 용적 (mm³)
1200
900
600
300
0
5 10 15 20 25 30 35 40 45
이식 후 일수
비히클 대조군
HMBD-002
aPD1
aPD1 + HMBD-002
항체 주사

도면83b


종양 용적 (mm³)
1500
1200
900
600
300
0
4 8 12 16 20 24 28 32
이식 후 일수
비히클 대조군
HMBD-002
aPD1
aPD1 + HMBD002
항체 주사