



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년07월16일

(11) 등록번호 10-1878369

(24) 등록일자 2018년07월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
**A61K 9/20** (2006.01) **A61K 38/00** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01) **A61K 47/10** (2017.01)  
**A61K 47/26** (2017.01)  
(21) 출원번호 **10-2012-7024667**  
(22) 출원일자(국제) **2011년03월21일**  
심사청구일자 **2016년03월11일**  
(85) 번역문제출일자 **2012년09월21일**  
(65) 공개번호 **10-2013-0010466**  
(43) 공개일자 **2013년01월28일**  
(86) 국제출원번호 **PCT/US2011/029206**  
(87) 국제공개번호 **WO 2011/119487**  
국제공개일자 **2011년09월29일**  
(30) 우선권주장  
61/316,326 2010년03월22일 미국(US)  
(56) 선행기술조사문헌  
US20030059474 A1\*  
JP01075433 A\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
**제넨테크, 인크.**  
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우쓰 샌프란시스코 디엔 에이 웨이 1  
(72) 발명자  
**지, 준안**  
미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔 에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내  
**리우, 준**  
미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔 에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내  
**왕, 유창 존**  
미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔 에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내  
(74) 대리인  
**양영준, 위혜숙**

전체 청구항 수 : 총 19 항

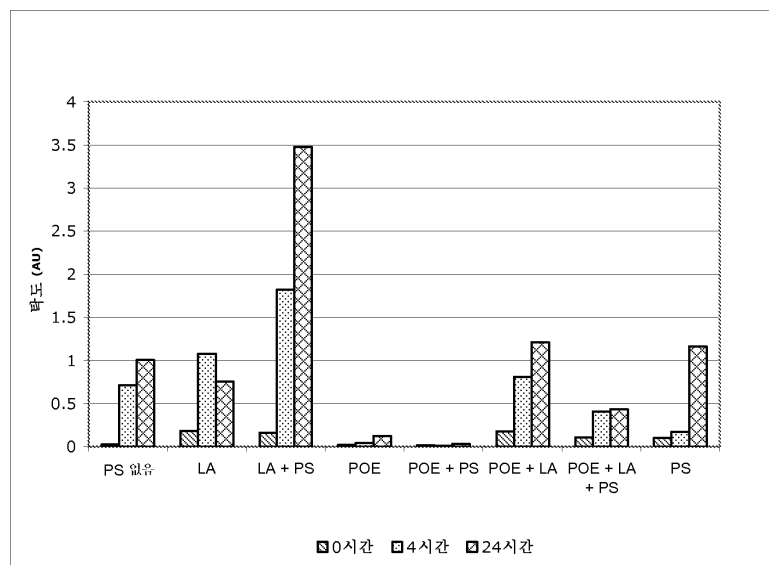
심사관 : 김강필

(54) 발명의 명칭 **단백질-함유 제제의 안정화에 유용한 조성물 및 방법**

### (57) 요약

본 발명은 단백질-함유 제제의 안정화 및 이러한 제제 중에서의 단백질의 응집의 방지를 위한 비-계면활성제 화합물 (예를 들어, 폴리옥시에틸렌 (POE) 소르비탄 및 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 포함)의 용도에 관한 것이다.

**대표도** - 도1



## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

단백질 및 폴리옥시에틸렌(POE) 소르비탄을 포함하고, 폴리소르베이트를 함유하지 않는, 물질의 안정한 수성 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 단백질이 항체인 물질의 조성물.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, POE 소르비탄이 20 ppm 내지 100,000 ppm의 농도로 존재하는 것인 물질의 조성물.

#### 청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, POE 소르비탄이 POE 소르비탄 10, POE 소르비탄 20, POE 소르비탄 40 및 POE 소르비탄 80으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 물질의 조성물.

#### 청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 계면활성제를 함유하지 않는, 물질의 조성물.

#### 청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 추가로 동결건조된 물질의 조성물.

#### 청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 폴리에틸렌 글리콜을 더 포함하는 물질의 조성물.

#### 청구항 8

제1항 또는 제2항의 물질의 조성물을 포함하는 용기를 포함하며, 상기 용기가 병, 바이알, 시린지 또는 시험 튜브인, 제조품.

#### 청구항 9

단백질 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함하고 POE 소르비탄을 더 포함하며, 여기서 폴리에틸렌 글리콜은 10,000 ppm 이하의 농도로 존재하는, 물질의 수성 조성물.

#### 청구항 10

단백질을 POE 소르비탄과 혼합하여 안정화된 단백질-함유 수성 제제를 제공하는 것을 포함하는, 폴리소르베이트를 함유하지 않는 안정화된 단백질-함유 수성 제제의 제조 방법.

#### 청구항 11

제10항에 있어서, 상기 단백질이 항체인 방법.

#### 청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서, POE 소르비탄이 POE 소르비탄 10, POE 소르비탄 20, POE 소르비탄 40 및 POE 소르비탄 80으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

#### 청구항 13

제10항 또는 제11항에 있어서, 상기 안정화된 단백질-함유 제제를 동결건조시키는 단계를 더 포함하는 방법.

#### 청구항 14

단백질을 POE 소르비탄과 혼합하는 것을 포함하며, 여기서 상기 POE 소르비탄은 수용액 중에서의 상기 단백질의 안정성을 증가시키는 것인, 폴리소르베이트를 함유하지 않는 수용액 중에서의 단백질의 안정성을 증가시키는 방법.

#### 청구항 15

제14항에 있어서, 상기 단백질이 항체인 방법.

#### 청구항 16

제14항 또는 제15항에 있어서, POE 소르비탄이 POE 소르비탄 10, POE 소르비탄 20, POE 소르비탄 40 및 POE 소르비탄 80으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

#### 청구항 17

단백질을 POE 소르비탄과 혼합하는 것을 포함하며, 여기서 상기 POE 소르비탄은 수용액 중에서의 상기 단백질의 응집을 방지하거나 또는 감소시키는 것인, 폴리소르베이트를 함유하지 않는 수용액 중에서의 단백질의 응집을 방지하거나 또는 감소시키는 방법.

#### 청구항 18

제17항에 있어서, 상기 단백질이 항체인 방법.

#### 청구항 19

제17항 또는 제18항에 있어서, POE 소르비탄이 POE 소르비탄 10, POE 소르비탄 20, POE 소르비탄 40 및 POE 소르비탄 80으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

#### 청구항 20

삭제

#### 청구항 21

삭제

#### 청구항 22

삭제

#### 청구항 23

삭제

#### 청구항 24

삭제

#### 청구항 25

삭제

#### 청구항 26

삭제

#### 청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

## 발명의 설명

## 기술 분야

[0001] <관련 출원>

[0002] 본 출원은 37 CFR 1.53(b)(1) 하에 출원된 정식 출원으로, 35 USC 119(e) 하에 2010년 3월 22일에 출원된 가출원 번호 61/316326 (그의 내용이 본원에 참고로 포함됨)을 우선권 주장한다.

[0003] <발명의 분야>

[0004] 본 발명은 단백질-함유 제제의 안정화 및 이러한 제제 중에서의 단백질의 응집의 방지를 위한 비-계면활성제 화

합물 (예를 들어, 폴리옥시에틸렌 (POE) 소르비탄 및 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 포함)의 용도에 관한 것이다.

## 배경 기술

- [0005] 단백질 제제를 위한 안정화제가 진탕, 교반, 전단 및 동결 해동 시에 또는 인터페이스에서의 휴지 상태에서 변성으로부터 단백질을 보호하기 위해 필요한 경우, 비이온성 세제 (즉, 계면활성제)가 종종 사용된다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,183,746 참조). 이는 많은 단백질-함유 생성물에서의 폴리소르베이트의 사용에 의해 예시된다. 예를 들어, 폴리소르베이트 20 및 80 (트윈(Tween)<sup>®</sup> 20 및 트윈<sup>®</sup> 80)은 표면 흡착을 방지하기 위한 생물치료 생성물의 제제에, 및 단백질 응집에 대한 안정화제로 둘 다 사용된다 (문헌 [Kerwin, J. Pharm. Sci. 97(8):2924-2936 (2008)]). 폴리소르베이트는 폴리소르베이트 20의 경우 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레이트 및 폴리소르베이트 80의 경우에 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트인 폴리옥시에틸렌 (POE) 소르비탄의 지방산 에스테르로 구성된 양친매성, 비이온성 계면활성제이다.
- [0006] 그러나, 불행히도, 폴리소르베이트는 산화 또는 가수분해를 통해 분해될 수 있다. 폴리소르베이트 분자가 분해되는 경우, 이는 예를 들어 지방산, POE 소르비탄, PEG, PEG 에스테르 및 알킬 산을 비롯한 다양한 분해 부산물을 생성한다. 유리 지방산을 비롯한 특정한 이들 폴리소르베이트 분해 부산물은 단백질-함유 제제 중에서 그의 탁도 및 단백질 응집을 증가시킬 수 있다. 따라서, 폴리소르베이트가 통상적으로 단백질 안정화제로 사용되는 동안, 시간이 경과함에 따라 폴리소르베이트 분해로부터 방출된 지방산 및 다른 분해 부산물은 폴리소르베이트가 단백질-함유 제제에서 나타내는 보호 효과에 역효과를 나타낼 수 있다.
- [0007] 이에 따라, 단백질-함유 수성 제제 중에서의 단백질의 응집을 방지하기에 유용한 추가의 조성물이 요구된다.

## 발명의 내용

- [0008] <발명의 개요>
- [0009] 본 발명은 수성 제제 중에 특정 농도로 존재하는 폴리옥시에틸렌 (POE) 소르비탄 및 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)이 단백질- 및 펩티드-함유 제제의 안정화, 및 이러한 제제 중에서의 단백질 응집의 방지에 유용하다는 신규한 발견을 기반으로 한다.
- [0010] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 항체 또는 다른 단백질 또는 펩티드 및 POE 소르비탄을 포함하는 물질의 조성물에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 폴리옥시에틸렌 소르비탄은 약 20 ppm 내지 약 100,000 ppm의 농도로 존재한다. 또 다른 실시양태에서, 항체 또는 다른 단백질 또는 펩티드 및 POE 소르비탄을 포함하는 물질의 조성물은 비-이온성 계면활성제를 함유하지 않고, 예를 들어 폴리소르베이트를 함유하지 않는다. 임의로, 물질의 조성물은 또한 동결건조보호제, 예컨대 예를 들어 당, 유리 아미노산 및 그의 변이체 등을 함유하지 않을 수 있다. 특정 실시양태에서, 물질의 조성물은 수성 또는 고체 형태일 수 있다.
- [0011] 또 다른 측면에서, 본 발명은 항체 또는 다른 단백질 또는 펩티드 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함하는 물질의 조성물에 관한 것이다. 특정 실시양태에서, 폴리에틸렌 글리콜은 상기 물질의 조성물에 약 10,000 ppm 미만, 바람직하게는 약 20 ppm 내지 약 10,000 ppm의 농도로 존재한다. 또 다른 실시양태에서, 물질의 조성물은 임의로 적어도 하나의 POE 소르비탄을 포함하고, 이는 임의로 상기 물질의 조성물에 약 20 ppm 내지 약 100,000 ppm의 농도로 존재할 수 있다. 물질의 조성물은 또한 임의로 비-이온성 계면활성제를 함유하지 않을 수 있고, 예를 들어 폴리소르베이트를 함유하지 않을 수 있다. 임의로, 물질의 조성물은 또한 동결건조보호제, 예컨대 예를 들어 당, 유리 아미노산 및 그의 변이체 등을 함유하지 않을 수 있다. 특정 실시양태에서, 물질의 조성물은 수성 또는 고체 형태일 수 있다.
- [0012] 또 다른 측면에서, 본 발명은 임의의 본원에 기재된 물질의 조성물을 수용하는 용기를 포함하는 제조품에 관한 것이다.
- [0013] 또 다른 측면에서, 항체 또는 다른 단백질을 POE 소르비탄 또는 PEG와 함께 혼합함으로써 안정화된 항체 (또는 다른 단백질 또는 펩티드) 함유 조성물을 제조하는 방법이 제공된다.
- [0014] 또 다른 측면에서, 본 발명은 항체 또는 다른 단백질 또는 펩티드를 안정화 양의 POE 소르비탄과 혼합하는 것을 포함하며, 여기서 POE 소르비탄은 항체 또는 다른 단백질 또는 펩티드의 안정성을 증가시키는 것인, 수성 제제 중에서의 항체 또는 다른 단백질 또는 펩티드의 안정성을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 한 실시양태에서, POE 소르비탄은 약 20 ppm 내지 약 100,000 ppm의 농도로 존재하고, 이는 임의로 비-이온성 계면활성제, 예를 들어 폴리소르베이트를 함유하지 않을 수 있거나, 또는 동결건조보호제, 예컨대 예를 들어 당, 유리 아미노산

및 그의 변이체 등을 함유하지 않을 수 있다.

[0015] 또 다른 측면에서, 본 발명은 항체 또는 다른 단백질 또는 펩티드를 안정화 양의 폴리에틸렌 글리콜과 혼합하는 것을 포함하며, 여기서 폴리에틸렌 글리콜은 항체 또는 다른 단백질 또는 펩티드의 안정성을 증가시키는 것인, 수성 제제 중에서의 항체 또는 다른 단백질 또는 펩티드의 안정성을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 폴리에틸렌 글리콜은 약 10,000 ppm 미만, 바람직하게는 약 20 ppm 내지 약 10,000 ppm의 농도로 존재한다. 또 다른 실시양태에서, 물질의 조성물은 임의로 적어도 하나의 POE 소르비탄을 포함하고, 이는 임의로 약 20 ppm 내지 약 100,000 ppm의 농도로 존재할 수 있고, 임의로 비-이온성 계면활성제, 예를 들어 폴리소르베이트를 함유하지 않을 수 있거나, 또는 동결건조보호제, 예컨대 예를 들어 당, 유리 아미노산 및 그의 변이체 등을 함유하지 않을 수 있다.

[0016] 또 다른 측면에서, 본 발명은 항체 또는 다른 단백질 또는 펩티드를 POE 소르비탄과 혼합하는 것을 포함하는, 수성 제제 중에서의 항체 또는 다른 단백질 또는 펩티드의 응집을 방지하거나 또는 감소시키는 방법에 관한 것이다. 한 실시양태에서, POE 소르비탄은 약 20 ppm 내지 약 100,000 ppm의 농도로 존재한다. 수성 제제는 임의로 비-이온성 계면활성제, 예를 들어 폴리소르베이트를 함유하지 않거나, 또는 동결건조보호제, 예컨대 예를 들어 당, 유리 아미노산 및 그의 변이체 등을 함유하지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 항체 또는 다른 단백질의 응집은 수용액의 교반에 의해 유도된다.

[0017] 또 다른 측면에서, 본 발명은 항체 또는 다른 단백질 펩티드를 폴리에틸렌 글리콜과 혼합하는 것을 포함하는, 수성 제제 중에서의 항체, 또는 다른 단백질 또는 펩티드의 응집을 방지하거나 또는 감소시키는 방법에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 폴리에틸렌 글리콜은 약 10,000 ppm 미만, 바람직하게는 약 20 ppm 내지 약 10,000 ppm의 농도로 존재한다. 또 다른 실시양태에서, 수성 제제는 임의로 적어도 하나의 POE 소르비탄을 포함하고, 이는 임의로 약 20 ppm 내지 약 100,000 ppm의 농도로 존재할 수 있고, 임의로 비-이온성 계면활성제, 예를 들어 폴리소르베이트를 함유하지 않을 수 있거나, 또는 동결건조보호제, 예컨대 예를 들어 당, 유리 아미노산 및 그의 변이체 등을 함유하지 않을 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 항체 또는 다른 단백질의 응집은 수용액의 교반에 의해 유도된다.

[0018] 재조합 세포 단백질 또는 다른 오염 단백질로부터 단백질, 펩티드 또는 항체를 정제하는 방법에서, 본 발명의 한 실시양태는 정제 과정 동안 단백질, 펩티드 또는 항체에 POE 소르비탄 또는 폴리에틸렌 글리콜을 첨가하는 것을 포함하는 개선과 관련된다.

[0019] 본 발명의 또 다른 측면은 자가-응집 항체 또는 다른 단백질 또는 펩티드를 포함하는 수용액 중에서 적어도 하나의 POE 소르비탄 또는 폴리에틸렌 글리콜을 혼합한 후에 수용액을 농축시킴으로써 다르게는 자가-응집 항체 또는 다른 단백질 또는 펩티드의 비-응집된 수용액을 제조하는 방법이다.

[0020] 본 발명의 다른 특징 및 이점은 하기 상세한 설명 및 실시예로부터 명백해질 것이며, 이들은 제한되는 것으로 간주되지 않아야 한다. 본 출원 전반에 걸쳐 인용된 모든 참고문헌, 특허 및 공개 특허 출원의 내용은 명백하게 본원에 참고로 포함된다.

## 도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 폴리소르베이트 20 (PS), 라우르산 (LA) 또는 POE 소르비탄 20 (POE)을 비롯한 다양한 첨가제와 조합된 항-IL13 항체의 탁도 분석으로부터 수득한 결과를 보여준다.

도 2는 다양한 농도에서 모두, POE 소르비탄 20, PEG 1000 또는 PEG 6000을 비롯한 다양한 첨가제와 조합된 항-IL13 항체의 단백질 농도 분석으로부터 수득한 결과를 보여준다.

도 3은 다양한 농도에서 모두, POE 소르비탄 20, PEG 1000 또는 PEG 6000을 비롯한 다양한 첨가제와 조합된 항-IgE 항체의 단백질 농도 분석으로부터 수득한 결과를 보여준다.

도 4는 다양한 농도에서 모두, POE 소르비탄 20, PEG 1000 또는 PEG 6000을 비롯한 다양한 첨가제와 조합된 항-IL13 항체의 탁도 분석으로부터 수득한 결과를 보여준다.

도 5는 다양한 농도에서 모두, POE 소르비탄 20, PEG 1000 또는 PEG 6000을 비롯한 다양한 첨가제와 조합된 항-IgE 항체의 탁도 분석으로부터 수득한 결과를 보여준다.

도 6은 다양한 농도에서 모두, POE 소르비탄 20, PEG 1000 또는 PEG 6000을 비롯한 다양한 첨가제와 조합된 항-IL13 항체의 입자 크기 분석 (2  $\mu$ m 초과 입자)으로부터 수득한 결과를 보여준다.

도 7은 다양한 농도에서 모두, POE 소르비탄 20, PEG 1000 또는 PEG 6000을 비롯한 다양한 첨가제와 조합된 항-IgE 항체의 입자 크기 분석 (2  $\mu\text{m}$  초과 입자)으로부터 수득한 결과를 보여준다.

도 8은 다양한 농도에서 모두, POE 소르비탄 20, PEG 1000 또는 PEG 6000을 비롯한 다양한 첨가제와 조합된 항-IL13 항체의 입자 크기 분석 (10  $\mu\text{m}$  초과 입자)으로부터 수득한 결과를 보여준다.

도 9는 다양한 농도에서 모두, POE 소르비탄 20, PEG 1000 또는 PEG 6000을 비롯한 다양한 첨가제와 조합된 항-IgE 항체의 입자 크기 분석 (10  $\mu\text{m}$  초과 입자)으로부터 수득한 결과를 보여준다.

도 10은 다양한 농도에서 모두, POE 소르비탄 20, PEG 1000 또는 PEG 6000을 비롯한 다양한 첨가제와 조합된 항-IL13 항체의 입자 크기 분석 (50  $\mu\text{m}$  초과 입자)으로부터 수득한 결과를 보여준다.

도 11은 다양한 농도에서 모두, POE 소르비탄 20, PEG 1000 또는 PEG 6000을 비롯한 다양한 첨가제와 조합된 항-IgE 항체의 입자 크기 분석 (50  $\mu\text{m}$  초과 입자)으로부터 수득한 결과를 보여준다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] <바람직한 실시양태의 상세한 설명>

[0023] 본 발명은 하기의 구체적 실시양태의 상세한 설명 및 본원에 포함된 실시예를 참고로 하여 보다 쉽게 이해될 수 있다.

[0024] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 전문 학술 용어는 본 발명이 속한 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것들과 유사하거나 등가인 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에서 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 물질이 하기에 기술된다. 본원에 인용되는 모든 간행물은 그 전체 내용이 본원에 참고로 포함된다.

[0025] 항체 및 다른 단백질의 응집은 주로 결국에는 변성을 초래하는 소수성 상호작용에 의해 유발된다. 부분적으로 또는 완전하게 비폴딩된 단백질의 소수성 영역이 물에 노출되는 경우, 이는 정상적으로 매립된 소수성 내부가 이제 친수성 수성 환경에 노출된다는 사실 때문에 열역학적으로 불리한 상황을 만든다. 결과적으로, 소수성 영역 주변의 물 분자의 구조화로부터의 엔트로피의 감소는 변성된 단백질을 주로 노출된 소수성 영역을 통해 응집시킨다. 따라서, 단백질의 용해도가 또한 절충될 수 있다. 일부 경우에, 단백질 서브유닛 (천연 또는 미스폴딩됨)의 자가-회합은 특정 조건 하에 일어날 수 있고, 이는 침전 및 활성 손실로 이어질 수 있다.

[0026] 용액 중에서 단백질 응집에 영향을 미치는 요인은 일반적으로 단백질 농도, pH, 온도, 다른 부형제 및 기계적 응력을 포함한다. 일부 요인 (예를 들어, 온도)은 정제, 배합, 제조, 저장 및 사용 동안 다른 요인 (예를 들어, 기계적 응력)보다 더 용이하게 제어될 수 있다. 제제 연구는 pH 및 부형제의 적절한 선택(들)이 응집을 유도하지 않을 것이고/거나 실제로 응집의 방지에 도움을 줄 것임을 증명할 것이다. 단백질 농도는 요구되는 치료 용량에 의해 결정되고, 이 농도가 얼마인지에 따라 이후에 용액 중에서 응집을 초래할 수 있는 보다 고도로 회합된 상태 (이량체, 사량체 등)에 대한 잠재성이 존재하는지 여부를 결정할 것이다. 단백질 응집에 영향을 미치는 요인이 무엇인지에 이어 이들 요인이 어떻게 제거 또는 제어될 수 있는지를 결정하기 위해 주의깊은 연구가 제제 개발 동안 수행되어야 한다.

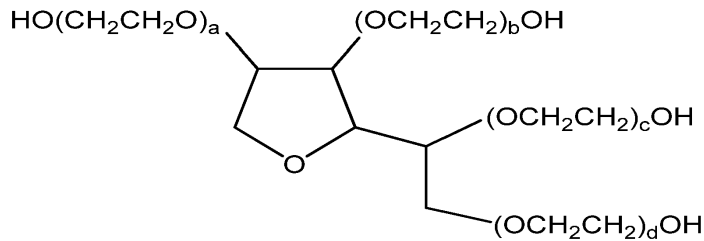
[0027] 비경구 또는 다른 투여에 사용하기 위한 항체 또는 다른 단백질의 안정한 용액 제제를 확인하기 위해 물리적 안정성에 대한 다양한 첨가제의 영향을 평가하기 위한 시험 방법론을 개발할 수 있다. 단백질 응집에 영향을 미치는 공지된 요인 및 이러한 적용의 필요를 기반으로, 물리적 안정성은 단백질 용액의 교반 또는 회전을 포함하는 기계적 절차를 이용하여 평가할 수 있다. 응집을 방지하는 다양한 첨가제의 능력을 확인하기 위한 물리적 응력 시험에 대한 방법론은 수평면에서의 진탕 또는 교반에 대한 노출 또는 수직면에서 n rev/분으로 회전하는 휠의 축으로부터의 회전 x cm를 포함할 수 있다. 응집으로부터 발생하는 탁도는 일반적으로 육안 검사 또는 광산란 분석에 의해 시간의 함수로 결정된다. 대안적으로, 침전으로 인한 가용성 단백질의 감소는 HPLC 검정에 의해 시간의 함수로 정량화될 수 있다.

[0028] 본 발명은 액체 제제 중에서 특정 농도로 존재하는 폴리옥시에틸렌 (POE) 소르비탄 및 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)이 단백질-함유 제제의 안정화, 및 이러한 제제 중에서의 단백질 응집의 방지에 유용하다는 신규한 발견을 기반으로 한다.

[0029] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 항체 또는 다른 단백질 (높은 농도 또는 낮은 농도 모두), 및 POE 소르비탄을 포함하는 물질의 조성물을 기재한다. 본원에 사용된 "폴리옥시에틸렌 소르비탄" 또는 "POE 소르비탄"은 하기



화학 구조를 갖는 비-계면활성제 화합물을 지칭한다:



[0030]

[0031]

여기서 a+b+c+d는 바람직하게는 약 6 내지 약 80, 보다 바람직하게는 약 8 내지 약 60, 보다 더 바람직하게는 약 10 내지 약 40, 보다 더 바람직하게는 약 10 내지 약 20이다. 상기와 관련하여, 당업계에서는 본원에 기재된 POE 소르비탄과 같은 화합물의 화학적 합성이 완전하게 균질한 제제 보다는 어느 정도 불균질한 화합물의 혼합물을 생성하는 것으로 이해된다. 이에 따라, a+b+c+d가 예를 들어 바람직하게는 약 6 내지 80이라고 본원에 기재된 경우, 이 정의는 그의 화학적 합성으로부터 생성된 불균질한 혼합물의 대부분의 성분을 지칭하는 것으로 이해될 것이다.

[0032]

POE 소르비탄은 항체 또는 다른 단백질 안정화제로서 단독으로 사용될 수 있거나, 수용액 중에서 항체 또는 다른 단백질을 안정화시키기 위한 다른 POE 소르비탄과 조합되어 사용될 수 있다. POE 소르비탄은 수용액 중에서 광범위한 농도에 걸쳐 항체 또는 다른 단백질 안정화제 (또는 항-응집제)로서의 용도가 밝혀졌다. 본 발명의 특정 실시양태에서, POE 소르비탄 (단일 안정화제로 사용되는 경우) 또는 POE 소르비탄들 (조합되어 사용되는 경우)은 수성 항체- 또는 다른 단백질-함유 제제 중에 약 20 ppm 내지 약 100,000 ppm, 보다 바람직하게는 100 ppm 내지 약 50,000 ppm, 보다 더 바람직하게는 150 ppm 내지 약 10,000 ppm, 보다 더 바람직하게는 200 ppm 내지 약 5,000 ppm, 보다 더 바람직하게는 200 ppm 내지 약 1,000 ppm의 농도로 존재할 수 있다.

[0033]

또 다른 측면에서, 본 발명은 항체 또는 다른 단백질 (높은 농도 또는 낮은 농도 모두), 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함하는 물질의 조성물을 기재한다.

[0034]

본원에 사용된 "폴리에틸렌 글리콜", "PEG" 및 유사 용어는 폴리에틸렌 글리콜 및 그의 다양한 유도체, 예컨대 메톡시-PEG-아민, 디아민-PEG 등을 포함하는 것으로 의도된다. 보다 구체적으로 및 본 발명의 특정 실시양태에서, 용어 "폴리에틸렌 글리콜" 또는 "PEG"는 하기 화학 구조를 갖는 비-계면활성제 화합물을 지칭한다:



[0035]

[0036]

여기서 n은 약 5 내지 약 240이고, 임의로 어느 정도의 불포화를 함유할 수 있다. 본 발명에 사용하기 위해 포함된 PEG는 분지형 또는 선형, 바람직하게는 선형일 수 있다. 상기와 관련하여, 당업계에서는 본원에 기재된 PEG와 같은 화합물의 화학적 합성이 완전하게 균질한 제제 보다는 어느 정도 불균질한 화합물의 혼합물을 생성하는 것으로 이해된다. 이에 따라, n이 바람직하게는 약 5 내지 240이라고 본원에 기재된 경우, 이 정의는 그의 화학적 합성으로부터 생성된 불균질한 혼합물의 대부분의 성분을 지칭하는 것으로 이해될 것이다.

[0037]

PEG는 항체 또는 다른 단백질 안정화제로서 단독으로 사용될 수 있거나, 또는 수용액 중에서 항체 또는 다른 단백질을 안정화시키기 위한 다른 PEG와 조합되어 사용될 수 있다. PEG는 수용액 중에서 광범위한 농도에 걸쳐 항체 또는 다른 단백질 안정화제 (또는 항-응집제)로서의 용도가 밝혀졌다. 본 발명의 특정 실시양태에서, PEG (단일 안정화제로 사용되는 경우) 또는 PEG들 (조합하여 사용되는 경우)는 수성 항체- 또는 다른 단백질-함유 제제 중에 약 10,000 ppm 미만, 바람직하게는 약 20 ppm 내지 약 10,000 ppm, 보다 바람직하게는 약 200 ppm 내지 약 10,000 ppm, 보다 바람직하게는 약 200 ppm 내지 약 5,000 ppm, 보다 바람직하게는 약 200 ppm 내지 약 1,000 ppm, 보다 바람직하게는 약 200 ppm 내지 약 500 ppm의 농도로 존재할 수 있다.

[0038]

바람직한 PEG는 약 200 내지 12,000의 분자량의 중합체를 포함하지만, 보다 높은 분자량의 중합체가 또한 본 발명의 범위 내에 포함된다. PEG는 선형 및 분지형 중합체, 스타 분자, 및 보다 높은 분자량의 중합체를 형성하기 위한 적어도 2종의 상이한 PEG 중합체의 커플링에 의해 형성된 PEG 블록 공중합체를 포함하고, 이들은 모두 당업계에 주지되어 있다.

[0039]

"폴리펩티드" 또는 "단백질"은쇄 길이가 높은 수준의 3차 및/또는 4차 구조를 생성하기에 충분한 일련의 아미노산을 의미한다. 따라서, 단백질은 또한 이러한 구조를 갖지 않는 아미노산-기재의 분자인 "펩티드"와 구별된



다. 전형적으로, 본원에 사용하기 위한 단백질은 적어도 약 5-20 kD, 대안적으로 적어도 약 15-20 kD, 바람직하게는 적어도 약 20 kD의 분자량을 가질 것이다. "펩티드"는 일반적으로 높은 수준의 3차 및/또는 4차 구조를 나타내지 않는 일련의 아미노산을 의미한다. 펩티드는 일반적으로 약 5 kD 미만의 분자량을 갖는다.

[0040] 본원에서 정의 내에 포함되는 폴리펩티드의 예는 포유동물 단백질, 예컨대 예를 들어 다음을 포함한다: 레닌; 성장 호르몬, 예를 들어 인간 성장 호르몬 및 소 성장 호르몬; 성장 호르몬 방출 인자; 부갑상선 호르몬; 갑상선 자극 호르몬; 지단백질; 알파-1-항트립신; 인슐린 A-쇄; 인슐린 B-쇄; 프로인슐린; 여포 자극 호르몬; 칼시토닌; 황체화 호르몬; 글루카곤, 응고 인자, 예컨대 인자 VIIIC, 인자 IX, 조직 인자 및 폰 빌레브란트 인자; 항-응고 인자, 예컨대 단백질 C; 심방 나트륨이뇨 인자; 폐 계면활성제; 플라스미노겐 활성화제, 예컨대 우로키나제 또는 인간 노 또는 조직-유형 플라스미노겐 활성화제 (t-PA); 붐베신; 트롬빈; 조혈 성장 인자; 종양 괴사 인자-알파 및 -베타; 엔케팔리나제; RANTES (정상적으로 발현 및 분비된 T-세포 활성화에 대한 조절); 인간 대식세포 염증성 단백질 (MIP-1-알파); 혈청 알부민, 예컨대 인간 혈청 알부민; 필러-역제 물질; 텔락신 A-쇄; 텔락신 B-쇄; 프로텔락신; 마우스 고나도트로핀-관련 펩티드; 미생물 단백질, 예컨대 베타-락타마제; DNase; IgE; 세포독성 T-림프구 관련 항원 (CTLA), 예컨대 CTLA-4; 인히빈; 액티빈; 혈관 내피 성장 인자 (VEGF); 호르몬 또는 성장 인자에 대한 수용체; 단백질 A 또는 D; 류마티스 인자; 신경영양 인자, 예컨대 골-유래의 신경영양 인자 (BDNF), 뉴로트로핀-3, -4, -5 또는 -6 (NT-3, NT-4, NT-5 또는 NT-6), 또는 신경 성장 인자, 예컨대 NGF-β; 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF); 섬유모세포 성장 인자, 예컨대 aFGF 및 bFGF; 표피 성장 인자 (EGF); 형질 전환 성장 인자 (TGF), 예컨대 TGF-알파 및 TGF-베타, 예를 들어 TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4 또는 TGF-β5; 인슐린-유사 성장 인자-I 및 -II (IGF-I 및 IGF-II); des(1-3)-IGF-I (또는 IGF-I), 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질 (IGFBP); CD 단백질, 예컨대 CD3, CD4, CD8, CD19 및 CD20; 에리트로포이에틴; 골유도 인자; 면역독소; 골 형태발생 단백질 (BMP); 인터페론, 예컨대 인터페론-알파, -베타 및 -감마; 콜로니 자극 인자 (CSF), 예를 들어, M-CSF, GM-CSF 및 G-CSF; 인터류킨 (IL), 예를 들어 IL-1 내지 IL-10; 수퍼옥사이드 디스무타제; T-세포 수용체; 표면 막 단백질; 붕괴 촉진 인자; 바이러스 항원, 예컨대 예를 들어 AIDS 외피의 일부; 수송 단백질; 귀소 수용체; 어드레신; 조절 단백질; 인테그린, 예컨대 CD11a, CD11b, CD11c, CD18, ICAM, VLA-4 및 VCAM; 종양 관련 항원, 예컨대 CA125 (난소암 항원) 또는 HER2, HER3 또는 HER4 수용체; 이뮤노어드레신; 및 상기-열거된 단백질 중 임의의 것의 단편 및/또는 변이체 뿐만 아니라 상기-열거된 단백질 중 임의의 것에 결합하는 항체, 예를 들어 항체 단편.

[0041] 제제화된 단백질은 바람직하게는 본질적으로 순수하고, 바람직하게는 본질적으로 균질하다 (즉, 오염 단백질이 없음). "본질적으로 순수한" 단백질은 조성물의 총 중량을 기준으로 하여 적어도 약 90 중량%의 단백질, 바람직하게는 적어도 약 95 중량%를 포함하는 조성물을 의미한다. "본질적으로 균질한" 단백질은 조성물의 총 중량을 기준으로 하여 적어도 약 99 중량%의 단백질을 포함하는 조성물을 의미한다.

[0042] 특정 실시양태에서, 단백질은 항체이다. 본원에서의 항체는 관심 "항원"에 대해 지시된다. 바람직하게는, 항원은 생물학적으로 중요한 단백질이고, 질환 또는 장애를 앓고 있는 포유동물에게 항체를 투여하는 것은 이러한 포유동물에서 치료 이점을 나타낼 수 있다. 그러나, 비-단백질 항원 (예컨대 종양-관련 당지질 항원; 미국 특허 5,091,178 참조)에 대해 지시된 항체가 또한 고려된다. 항원이 단백질인 경우, 이는 막횡단 분자 (예를 들어, 수용체) 또는 리간드, 예컨대 성장 인자일 수 있다. 예시적인 항원은 상기 논의된 단백질을 포함한다. 본 발명에 포함되는 항체에 대한 바람직한 분자 표적은 CD 폴리펩티드, 예컨대 CD3, CD4, CD8, CD19, CD20 및 CD34; HER 수용체 패밀리의 구성원, 예컨대 EGF 수용체 (HER1), HER2, HER3 또는 HER4 수용체; 세포 부착 분자, 예컨대 LFA-1, Mac1, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM 및 av/b3 인테그린, 예를 들어 그의 a 또는 b 서브유닛 (예를 들어, 항-CD11a, 항-CD18 또는 항-CD11b 항체); 성장 인자, 예컨대 VEGF; IgE; 혈액형 항원; f1k2/f1t3 수용체; 비만 (OB) 수용체; mpl 수용체; CTLA-4; 폴리펩티드 C 등을 포함한다. 가용성 항원 또는 그의 단편 (임의로 또 다른 분자에 접합됨)이 항체를 생성시키기 위한 면역원으로 사용될 수 있다. 막횡단 분자, 예컨대 수용체에 대해서는, 그의 단편 (예를 들어, 수용체의 세포외 도메인)이 면역원으로 사용될 수 있다. 대안적으로, 막횡단 분자를 발현하는 세포가 면역원으로 사용될 수 있다. 이러한 세포는 천연 공급원 (예를 들어, 암 세포주)으로부터 유래될 수도 있거나, 또는 막횡단 분자를 발현하도록 재조합 기술에 의해 형질전환된 세포일 수도 있다.

[0043] 본원에서 정제될 항체의 예는 다음을 포함하나 이에 제한되지 않는다: HER2 항체, 예를 들어 트라스투주맵 (헤르셉틴(HERCEPTIN)<sup>®</sup>) (문헌 [Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285-4289 (1992)], 미국 특허 번호 5,725,856) 및 페르투주맵 (옵니타르그(OMNITARG)<sup>™</sup>) (WO01/00245); CD20 항체 (하기 참조); IL-8 항체

(문헌 [St John et al., Chest, 103:932 (1993)], 및 국제 공보 번호 WO 95/23865); VEGF 또는 VEGF 수용체 항체, 예를 들어 인간화 및/또는 친화도 성숙 VEGF 항체, 예컨대 인간화 VEGF 항체 huA4.6.1 베바시주맵 (아바스틴(AVASTIN)<sup>®</sup>) 및 라니비주맵 (루센티스(LUCENTIS)<sup>®</sup>) (문헌 [Kim et al., Growth Factors, 7:53-64 (1992)], 국제 공보 번호 WO 96/30046, 및 WO 98/45331 (1998년 10월 15일에 공개됨)); PSCA 항체 (WO01/40309); CD11a 항체, 예를 들어 에팔리주맵 (랍티바(RAPTIVA)<sup>®</sup>) (미국 특허 번호 6,037,454, 미국 특허 번호 5,622,700, WO 98/23761, 문헌 [Stoppa et al., Transplant Intl. 4:3-7 (1991), 및 Hourmant et al., Transplantation 58:377-380 (1994)]); IgE에 결합하는 항체, 예를 들어 오말리주맵 (졸레어(XOLAIR)<sup>®</sup>) (문헌 [Presta et al., J. Immunol. 151:2623-2632 (1993)], 및 국제 공보 번호 WO 95/19181; 미국 특허 번호 5,714,338 (1998년 2월 3일에 허여됨), 또는 미국 특허 번호 5,091,313 (1992년 2월 25일에 허여됨), WO 93/04173 (1993년 3월 4일에 공개됨), 또는 국제 출원 번호 PCT/US98/13410 (1998년 6월 30일에 출원됨), 미국 특허 번호 5,714,338); CD18 항체 (미국 특허 번호 5,622,700 (1997년 4월 22일에 허여됨), 또는 WO 97/26912 (1997년 7월 31일에 공개됨) 에서와 같음); Apo-2 수용체 항체(들) (WO 98/51793 (1998년 11월 19일에 공개됨)); 조직 인자 (TF) 항체 (유럽 특허 번호 0 420 937 B1 (1994년 11월 9일에 양도됨));  $\alpha_4$ - $\alpha_7$  인테그린 항체 (WO 98/06248 (1998년 2월 19일에 공개됨)); EGFR 항체 (예를 들어, 키메라화 또는 인간화 225 항체, 세특시맵, 에르비투스<sup>®</sup>, WO 96/40210 (1996년 12월 19일에 공개됨)에서와 같음); CD3 항체, 예컨대 OKT3 (미국 특허 번호 4,515,893 (1985년 5월 7일에 허여됨)); CD25 또는 Tac 항체, 예컨대 CHI-621 (시물렉트(SIMULECT)<sup>®</sup>) 및 제나팍스(ZENAPAX)<sup>®</sup> (미국 특허 번호 5,693,762 (1997년 12월 2일에 허여됨) 참조); CD4 항체, 예컨대 cM-7412 항체 (문헌 [Choy et al., Arthritis Rheum 39(1):52-56 (1996)]); CD52 항체, 예컨대 CAMPATH-1H (일렉스(ILEX)/버렉스(Berlex)) (문헌 [Riechmann et al., Nature 332:323-337 (1988)]); Fc 수용체 항체, 예컨대 Fc  $\gamma$  RI에 대해 지시된 M22 항체 (문헌 [Graziano et al., J. Immunol. 155(10):4996-5002 (1995)]에서와 같음); 암배아성 항원 (CEA) 항체, 예컨대 hMN-14 (문헌 [Sharkey et al., Cancer Res. 55(23Suppl): 5935s-5945s (1995)]); 유방 상피 세포에 대해 지시된 항체, 예를 들어 huBrE-3, hu-Mc3 및 CHL6 (문헌 [Ceriani et al., Cancer Res. 55(23): 5852s-5856s (1995); 및 Richman et al., Cancer Res. 55(23 Supp): 5916s-5920s (1995)]); 결장 암종 세포에 결합하는 항체, 예컨대 C242 (문헌 [Litton et al., Eur J. Immunol. 26(1):1-9 (1996)]); CD38 항체, 예를 들어 AT 13/5 (문헌 [Ellis et al., J. Immunol. 155(2):925-937 (1995)]); CD33 항체, 예컨대 Hu M195 (문헌 [Jurcic et al., Cancer Res 55(23 Suppl):5908s-5910s (1995)]) 및 CMA-676 또는 CDP771; EpCAM 항체, 예컨대 17-1A (파노렉스(PANOREX)<sup>®</sup>); GpIIb/IIIa 항체, 예컨대 압식시맵 또는 c7E3 Fab (레오프로(REOPRO)<sup>®</sup>); RSV 항체, 예컨대 MEDI-493 (시나기스(SYNAGIS)<sup>®</sup>); CMV 항체, 예컨대 프로토티르(PROTOVIR)<sup>®</sup>; HIV 항체, 예컨대 PRO542; 간염 항체, 예컨대 Hep B 항체 오스타비르(OSTAVIR)<sup>®</sup>; CA125 항체, 예를 들어 항-MUC16 (WO2007/001851; 문헌 [Yin, BWT and Lloyd, KO, J. Biol. Chem. 276:27371-27375 (2001)]) 및 오바렉스; 이디오타입 GD3 에피토프 항체 BEC2;  $\alpha$ v $\beta$ 3 항체 (예를 들어, 비탁신(VITAXIN)<sup>®</sup>; 메드임문(Medimmune)); 인간 신세포 암종 항체, 예컨대 ch-G250; ING-1; 항-인간 17-1A $\alpha$  항체 (3622W94); 항-인간 결장직장 종양 항체 (A33); GD3 ganglioside에 대해 지시된 항-인간 흑색종 항체 R24; 항-인간 편평-세포 암종 (SF-25); 인간 백혈구 항원 (HLA) 항체, 예컨대 스마트 ID10 및 항-HLA DR 항체 온콜림 (Lym-1); CD37 항체, 예컨대 TRU 016 (트루비온(Trubion)); IL-21 항체 (지모제네틱스(Zymogenetics)/노보 노르디스크(Novo Nordisk)); 항-B 세포 항체 (임페론(Impheron)); B 세포 표적화 MAb (이뮤노젠(Immunogen)/아벤티스(Aventis)); 1D09C3 (모르포시스(Morphosys)/GPC); 림포라드(LymphoRad) 131 (HGS); Lym-1 항체, 예컨대 Lym-1Y-90 (USC) 또는 항-Lym-1 온콜림 (USC/페레그린(Peregrine)); LIF 226 (인헨스드 라이프사이.(Enhanced Lifesci.)); BAFF 항체 (예를 들어, WO 03/33658); BAFF 수용체 항체 (예를 들어, WO 02/24909 참조); BR3 항체; Blys 항체, 예컨대 벨리무맵; 림포스타트(LYMPHOSTAT)-B<sup>TM</sup>; ISF 154 (UCSD/로슈(Roche)/트라젠(Tragen)); 고밀릭시마 (Idex 152; 비오젠 아이덱(Biogen Idec)); IL-6 수용체 항체, 예컨대 아틀리주맵 (악템라(ACTEMRA)<sup>TM</sup>; चुगाई(Chugai)/로슈); IL-15 항체, 예컨대 HuMax-IL-15 (젠맵(Genmab)/암젠(Amgen)); 케모카인 수용체 항체, 예컨대 CCR2 항체 (예를 들어, MLN1202; 밀레늄(Millienium)); 항-보체 항체, 예컨대 C5 항체 (예를 들어, 에쿨리주맵, 5G1.1; 알렉시온(Alexion)); 인간 이뮤노글로불린의 경구 제제 (예를 들어, IgPO; 프로테인 테라퓨틱스(Protein Therapeutics)); IL-12 항체, 예컨대 ABT-874 (CAT/에보트(Abbott)); 테넬릭시맵 (BMS-224818; BMS); CD40 항체, 예를 들어 S2C6 및 그의 인간화 변이체 (WO00/75348) 및 TNX 100 (키론(Chiron)/타녹스(Tanox)); TNF- $\alpha$  항체, 예를 들어 cA2 또는 인플릭시맵 (레미

카데(REMICADE)<sup>®</sup>), CDP571, MAK-195, 아달리무맙 (휴미라(HUMIRA))<sup>™</sup>, peg화 TNF- $\alpha$  항체 단편, 예컨대 CDP-870 (셀테크(Celltech)), D2E7 (크놀(Knoll)), 항-TNF- $\alpha$  폴리클로날 항체 (예를 들어, PassTNF; 베리젠(Verigen)); CD22 항체, 예컨대 LL2 또는 에프라투주맙 (림포시드(LYMPHOCIDE)<sup>®</sup>; 이뮤노메딕스(Immunomedics)), 예를 들어 에프라투주맙 Y-90 및 에프라투주맙 I-131, 아비오젠(Abiogen)의 CD22 항체 (아비오젠, 이탈리아), CMC 544 (와이어쓰(Wyeth)/셀테크), 콤보톡스 (UT 사우스웨스턴(UT Southwestern)), BL22 (NIH), 및 림포스캔 Tc99 (이뮤노메딕스).

[0044] CD20 항체의 예는 다음을 포함한다: "C2B8", 현재 "리툽시맙" ("리툽산(RITUXAN)<sup>®</sup>")으로 불림 (미국 특허 번호 5,736,137); 아이텍 파마슈티칼스, 인크.(IDEC Pharmaceuticals, Inc.)로부터 상업적으로 입수가능한 "Y2B8" 또는 "이브리투모맙 티옥세탄" (제발린(ZEVALIN)<sup>®</sup>)으로 지정된 이트림-[90]-표지된 2B8 뮤린 항체 (미국 특허 번호 5,736,137; 1993년 6월 22일에 등록 번호 HB11388 하에 ATCC에 기탁된 2B8); 코릭사(Corixa)로부터 상업적으로 입수가능한 <sup>131</sup>I로 임의로 표지되어 "131I-B1" 또는 "아이오딘 I131 토시투모맙" 항체 (벡사르(BEXXAR)<sup>™</sup>)를 생성하는 뮤린 IgG2a "B1" (또한 "토시투모맙"으로 불림) (또한, 미국 특허 번호 5,595,721 참조); 뮤린 모노클로날 항체 "1F5" (문헌 [Press et al., Blood 69(2):584-591 (1987)]) 및 그의 변이체, 예를 들어 "프레임워크 패치드" 또는 인간화 1F5 (WO 2003/002607, Leung, S.; ATCC 기탁물 HB-96450); 뮤린 2H7 및 키메라 2H7 항체 (미국 특허 번호 5,677,180); 인간화 2H7 (WO 2004/056312, Lowman et al.); 2F2 (HuMax-CD20), B-세포의 세포 막 내의 CD20 분자에서 표적화된 완전 인간 고친화도 항체 (젠맙(Genmab), 덴마크; 예를 들어, 문헌 [Glennie and van de Winkel, Drug Discovery Today 8: 503-510 (2003) 및 Cragg et al., Blood 101: 1045-1052 (2003)]; WO 2004/035607; US2004/0167319 참조); WO 2004/035607 및 US2004/0167319 (Teeling et al.)에 열거된 인간 모노클로날 항체; US 2004/0093621 (Shitara et al.)에 기재된 Fc 영역에 결합된 복합 N-글리코시드-연결된 당쇄를 갖는 항체; CD20에 결합하는 모노클로날 항체 및 항원-결합 단편 (WO 2005/000901, Tedder et al.) 예컨대 HB20-3, HB20-4, HB20-25, 및 MB20-11; CD20 결합 분자, 예컨대 AME 시리즈의 항체, 예를 들어 WO 2004/103404 및 US2005/0025764 (Watkins et al., 일라이 릴리(Eli Lilly)/어플라이드 몰레큘라 에볼루션(Applied Molecular Evolution), AME)에 열거된 바와 같은 AME 33 항체; US 2005/0025764 (Watkins et al.)에 기재된 것과 같은 CD20 결합 분자; A20 항체 또는 그의 변이체, 예컨대 키메라 또는 인간화 A20 항체 (각각 cA20, hA20) 또는 IMM-106 (US 2003/0219433, 이뮤노메딕스); US 2005/0069545A1 및 WO 2005/16969 (Carr et al.)에서와 같이 IL-2로 임의로 접합된 CD20-결합 항체 (에피토프-고갈된 Leu-16, 1H4 또는 2B8 포함); CD22 및 CD20에 결합하는 이중특이적 항체, 예를 들어 hLL2xhA20 (WO2005/14618, Chang et al.); 인터내셔널 류코사이드 타이핑 워크샵(International Leukocyte Typing Workshop)으로부터 이용가능한 모노클로날 항체 L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 또는 NU-B2 (문헌 [Valentine et al., In: Leukocyte Typing III (McMichael, Ed., p. 440, Oxford University Press (1987))]; 1H4 (문헌 [Haisma et al., Blood 92:184 (1998)]); 항-CD20 아우리스타틴 E 접합체 (시애틀 제네틱스(Seattle Genetics)); 항-CD20-IL2 (EMD/바이오베이션(Biovation)/시티 오브 홉(City of Hope)); 항-CD20 MAb 요법 (에피사이트(EpiCyte)); 항-CD20 항체 TRU 015 (트루비온).

[0045] 본원에 사용된 용어 "항체"는 모노클로날 항체 (이뮤노글로불린 Fc 영역을 갖는 전장 항체 포함), 다중에피토프 특이성을 갖는 항체 조성물, 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체), 디아바디 및 단일쇄 분자 뿐만 아니라 항체 단편 (예를 들어, Fab, F(ab')<sub>2</sub> 및 Fv)을 포함한다. 용어 "이뮤노글로불린" (Ig)은 본원에서 항체와 교환가능하게 사용된다.

[0046] 기본 4-쇄 항체 단위는 2개의 동일한 경쇄 (L) 및 2개의 동일한 중쇄 (H)로 이루어진 이중사량체 당단백질이다. IgM 항체는 J쇄로 불리는 추가의 폴리펩티드와 함께 5개의 기본 이중사량체 단위로 이루어지고 10개의 항원 결합 부위를 함유하는 한편, IgA 항체는 중합하여 J쇄와의 조합으로 다가 어셈블리를 형성할 수 있는 2-5개의 기본 4-쇄 단위를 포함한다. IgG의 경우, 4-쇄 단위는 일반적으로 약 150,000 달톤이다. 각각의 L쇄는 1개의 공유 디설피드 결합에 의해 H쇄에 연결되지만, 2개의 H쇄는 H쇄 이소형에 따라 1개 이상의 디설피드 결합에 의해 서로 연결된다. 또한, 각각의 H쇄 및 L쇄에는 일정한 간격을 두고 이격된 사슬내 디설피드 브릿지가 존재한다. 각각의 H쇄는 N-말단에 가변 도메인 (V<sub>H</sub>)을 갖고, 이어서  $\alpha$  및  $\gamma$ 쇄 각각의 경우에는 3개의 불변 도메인 (C<sub>H</sub>), 및  $\mu$  및  $\epsilon$  이소형의 경우에는 4개의 C<sub>H</sub> 도메인을 갖는다. 각각의 L쇄는 N-말단에서 가변 도메인 (V<sub>L</sub>)을 갖고, 이어서 그의 다른 말단에서 불변 도메인을 갖는다. V<sub>L</sub>은 V<sub>H</sub>와 정렬되고, C<sub>L</sub>은 중쇄의 제1 불변

도메인 ( $C_H1$ )과 정렬된다. 특정한 아미노산 잔기는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 사이의 인터페이스를 형성한다고 여겨진다.  $V_H$  및  $V_L$ 의 쌍 형성은 함께 단일 항원-결합 부위를 형성한다. 상이한 클래스의 항체의 구조 및 특성에 대해서는 예를 들어 문헌 [Basic and Clinical Immunology, 8th Edition, Daniel P. Sties, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds), Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994, page 71 and Chapter 6]을 참조한다.

[0047] 임의의 척추동물 종의 L쇄는 이들의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기반으로 하여 카파 및 람다라고 불리는 명백히 상이한 2가지 유형 중 하나에 배정될 수 있다. 이뮤노글로불린은 중쇄의 불변 도메인 (CH)의 아미노산 서열에 따라 상이한 클래스 또는 이소형으로 배정될 수 있다. 5가지 클래스의 이뮤노글로불린: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재하고, 각각은  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  및  $\mu$ 로 지칭되는 중쇄를 갖는다.  $\gamma$  및  $\alpha$  클래스는 CH 서열 및 기능에 있어서의 상대적으로 작은 차이점을 기반으로 하여 서브클래스로 더 분류되는데, 예를 들어 인간은 서브클래스: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2를 발현한다.

[0048] 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 절편의 서열이 항체마다 크게 상이하다는 사실을 나타낸다. V 도메인은 항원 결합을 매개하고, 그의 특정 항원에 대한 특정 항체의 특이성을 규정한다. 그러나, 가변성은 가변 도메인의 전체 범위에 걸쳐 균등하게 분포되지 않는다. 대신, V 영역은 "초가변 영역" 또는 때때로 "상보성 결정 영역" (CDR)이라 불리는 극단적인 가변성의 더 짧은 영역 (각각 대략 9-12개 아미노산 잔기 길이)으로 분리된 프레임 워크 영역 (FR) (약 15-30개 아미노산 잔기)이라 불리는 비교적 불변성의 스트레치로 이루어진다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 3개의 초가변 영역에 의해 연결되고 주로  $\beta$ -시트 형태를 취하는 4개의 FR을 각각 포함하며, 이들 초가변 영역은  $\beta$ -시트 구조를 연결하고 일부 경우에는 그의 일부를 형성하는 루프를 형성한다. 각각의 쇄의 초가변 영역은 FR에 의해 근접하게 위치하고, 다른 쇄의 초가변 영역과 함께 항체의 항원 결합 부위의 형성에 기여한다 (문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)] 참조). 불변 도메인은 항원에 대한 항체 결합에 직접 관여하지는 않지만, 다양한 이펙터 기능, 예컨대 항체 의존성 세포 세포독성 (ADCC)의 참여를 나타낸다.

[0049] 본원에 사용된 경우 용어 "초가변 영역" (또한 "상보성 결정 영역" 또는 CDR로 공지됨)은 항원-결합 부위를 형성하는 이뮤노글로불린의 V-영역 도메인 내에 있고 (일반적으로 극단적인 서열 변이성의 3 또는 4개의 짧은 영역), 항원 특이성의 주요 결정인자인 항체의 아미노산 잔기를 지칭한다. CDR 잔기를 확인하기 위한 적어도 2가지 방법이 존재한다: (1) 교차-종 서열 변이성을 기반으로 하는 접근법 (즉, 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health, Bethesda, M S 1991)]); 및 (2) 항원-항체 복합체의 결정학적 연구를 기반으로 하는 접근법 (문헌 [Chothia, C. et al., J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)]). 그러나, 2가지 잔기 확인 기술이 중첩되는 영역이지만 동일하지는 않은 영역을 규정하는 정도로 하이브리드 CDR을 규정하기 위해 조합될 수 있다.

[0050] 본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 균질한 항체들의 집단으로부터 수득한 항체를 지칭하고, 즉, 이러한 집단을 구성하는 개별 항체는 소량으로 존재할 수도 있는, 가능한 자연 발생 돌연변이 및/또는 번역 후 변형 (예를 들어, 이성질체화, 아미드화)을 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 단일 항원 부위에 대해 지시되며 고도로 특이적이다. 추가로, 전형적으로 상이한 결정자 (에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 포함하는 통상의 (폴리클로날) 항체 제제와는 반대로, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단결정자에 대해 지시된다. 이러한 특이성 이외에도, 모노클로날 항체는 하이브리도마 배양에 의해 합성되고, 다른 이뮤노글로불린에 의해 오염되지 않는다는 점에서 유리하다. 수식어 "모노클로날"은 항체의 특징을 실질적으로 균질한 항체들의 집단으로부터 수득하였다는 것으로 나타나고, 임의의 특정한 방법을 통한 항체 생성이 필요하다는 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975)]에 처음 기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조할 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567 참조)에 의해 제조할 수 있다. "모노클로날 항체"는 또한 예를 들어 문헌 [Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) 및 Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)]에 기재된 기술을 이용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리될 수도 있다.

[0051] 구체적으로, 본원에서의 모노클로날 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정한 종으로부터 유래되거나 특정한 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이고, 쇄(들)의 나머지 부분은 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라" 항체 (이뮤노글로불린) 뿐만 아니라 바람직한 생물학적 활성을 나타내는 한은 이러



한 항체의 단편을 포함한다 (미국 특허 번호 4,816,567; 문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)]). 본원에서 관심 키메라 항체는 비-인간 영장류 (예를 들어, 구세계 원숭이, 유인원 등)로부터 유래된 가변 도메인 항원-결합 서열 및 인간 불변 영역 서열을 포함하는 "영장류화" 항체를 포함한다.

[0052] "무손상" 항체는 항원 결합 부위 뿐만 아니라 CL 및 적어도 중쇄 불변 도메인 C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2 및 C<sub>H</sub>3을 포함하는 항체이다. 불변 도메인은 천연 서열 불변 도메인 (예를 들어, 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 그의 아미노산 서열 변이체일 수 있다. 바람직하게는, 무손상 항체는 하나 이상의 이펙터 기능을 갖는다.

[0053] "항체 단편"은 무손상 항체의 일부, 바람직하게는 무손상 항체의 항원 결합 및/또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체 (미국 특허 번호 5,641,870, 실시예 2; 문헌 [Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]] 참조); 단일-쇄 항체 분자 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.

[0054] 항체를 파파인 소화시키면 "Fab" 단편이라 불리는 2개의 동일한 항원-결합 단편, 및 나머지 "Fc" 단편 (이 명칭은 쉽게 결정되는 능력을 반영함)을 생성시킨다. Fab 단편은 H 쇠의 가변 영역 도메인 (V<sub>H</sub>) 및 1개 중쇄의 제1 불변 도메인 (C<sub>H</sub>1)과 함께 L 쇠 전체로 이루어진다. 각각의 Fab 단편은 항원 결합에 대해 1가이고, 즉 단일 항원-결합 부위를 갖는다. 항체를 펩신 처리하면 상이한 항원-결합 활성을 갖는 2개의 디설피드 연결된 Fab 단편에 대략 상응하는 단일의 큰 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 생성시키고, 여전히 항원에 가교될 수 있다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 포함하는 C<sub>H</sub>1 도메인의 카르복시 말단에서 몇 개의 잔기가 추가된 점에서 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 본원에서 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 유리 티올 기를 보유하는 Fab'를 나타낸다. F(ab')<sub>2</sub> 항체 단편은 본래 가운데에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로 생성된다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링이 또한 공지되어 있다.

[0055] Fc 단편은 디설피드에 의해 함께 결합되어 있는 H 쇠 둘 다의 카르복시-말단 부분을 포함한다. 항체의 이펙터 기능은 Fc 영역 내의 서열에 의해 결정되고, 이 영역은 또한 특정 유형의 세포 상에서 발견되는 Fc 수용체 (FcR)에 의해 인식된다.

[0056] "Fv"는 완전한 항원-인식 및 항원-결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 이 단편은 1개의 중쇄 가변 영역 도메인 및 1개의 경쇄 가변 영역 도메인이 단단하게 비-공유 회합된 이량체로 이루어진다. 이들 2개의 도메인이 폴딩되어 6개의 초가변 루프 (H 쇠 및 L 쇠로부터 각각 3개의 루프)가 형성되고, 이들은 항원 결합을 위한 아미노산 잔기에 기여하고 항체에 대한 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 3개의 CDR만을 포함하는 Fv의 절반)일지라도 전체 결합 부위보다 친화도가 낮긴 하지만 항원을 인식하고 결합하는 능력을 갖는다.

[0057] "단일-쇄 Fv" ("sFv" 또는 "scFv"로도 약칭됨)는 단일 폴리펩티드 쇠 내로 연결된 V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub> 항체 도메인을 포함하는 항체 단편이다. 바람직하게는, sFv 폴리펩티드는 sFv가 항원 결합을 위한 바람직한 구조를 형성할 수 있도록 하는, V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub> 도메인 사이의 폴리펩티드 링커를 더 포함한다. sFv의 검토를 위해, 문헌 [Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조한다.

[0058] 용어 "디아바디"는 V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub> 도메인 사이의 짧은 링커 (약 5-10개 잔기)로 sFv 단편 (상기 단락 참조)을 구축함으로써 V 도메인의 사슬내 쌍형성이 아닌 사슬간 쌍 형성을 달성하여 2가 단편, 즉 2개의 항원-결합 부위를 갖는 단편을 생성하도록 하여 제조된 작은 항체 단편을 지칭한다. 이중특이적 디아바디는 2개 항체의 V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub> 도메인이 상이한 폴리펩티드 쇠에 존재하는 2개의 "가교" sFv 단편으로 이루어진 이종이량체이다. 디아바디는 예를 들어, EP 404,097; WO 93/11161; 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)]에 보다 상세하게 기재되어 있다.

[0059] 특정한 폴리펩티드 또는 특정한 폴리펩티드 상의 에피토프에 "특이적으로 결합하는" 또는 "특이적인" 항체는 임의의 다른 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 에피토프에 실질적으로 결합하지 않으면서 특정한 폴리펩티드 또는 특정한 폴리펩티드 상의 에피토프에만 결합하는 것이다.

[0060] 용어 "고체 상"은 본 발명의 항체가 부착될 수 있는 비-수성 매트릭스를 기재한다. 본원에 포함되는 고체 상의

예는 부분적으로 또는 전적으로 유리 (예를 들어, 공극이 제어된 유리), 폴리스카라이드 (예를 들어, 아가로스), 폴리아크릴아미드, 폴리스티렌, 폴리비닐 알콜 및 실리콘으로 형성된 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 문맥에 따라, 고체 상은 검정 플레이트의 웰을 포함할 수 있으며; 다른 실시양태에서 고체 상은 정제 칼럼 (예를 들어, 친화성 크로마토그래피 칼럼)이다. 이 용어는 또한 미국 특허 번호 4,275,149에 기재된 것과 같은 별도의 입자의 불연속적 고체 상을 포함한다.

[0061] "인간화" 형태의 비-인간 (예를 들어, 뮤린) 항체는 비-인간 이뮤노글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 대부분의 인간 서열의 키메라 이뮤노글로불린, 이뮤노글로불린 쇄 또는 그의 단편 (예컨대, Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> 또는 항체의 다른 항원-결합 하위서열)이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는 수용자의 추가 변 영역 (또한, CDR)으로부터의 잔기가 바람직한 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 마우스, 래트 또는 토끼와 같은 비-인간 종 (공여자 항체)의 추가 변 영역으로부터의 잔기로 대체된 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)이다. 일부 경우에, 인간 이뮤노글로불린의 Fv 프레임워크 영역 (FR) 잔기는 상응하는 비-인간 잔기에 의해 대체된다. 또한, 본원에 사용된 "인간화 항체"는 또한 수용자 항체에서도 공여자 항체에서도 발견되지 않은 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 항체 성능을 추가로 정밀화하고 최적화하기 위해 이루어진다. 또한, 인간화 항체는 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부, 전형적으로 인간 이뮤노글로불린의 일부를 최적으로 포함할 것이다. 추가의 상세한 내용에 대해, 문헌 [Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332:323-329 (1988); 및 Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992)]을 참조한다.

[0062] "중-의존성 항체", 예를 들어 포유동물 항-인간 IgE 항체는 제1 포유동물 종으로부터의 항원에 대한 결합 친화성이 제2 포유동물 종으로부터의 항원의 상동체에 대한 결합 친화성 보다 더 강한 항체이다. 통상적으로, 중-의존성 항체는 인간 항원에 "특이적으로 결합" (즉, 결합 친화도 (Kd) 값이 약  $1 \times 10^{-7}$  M 이하, 대안적으로 약  $1 \times 10^{-8}$  M 이하, 대안적으로 약  $1 \times 10^{-9}$  M 이하임)하지만, 제2 비-인간 포유동물 종으로부터의 항원의 상동체에 대한 결합 친화도는 비-인간 항원에 대한 그의 결합 친화도보다 적어도 약 50배, 적어도 약 500배, 또는 적어도 약 1000배 더 약하다. 중-의존성 항체는 상기 정의된 바와 같은 임의의 다양한 유형의 항체일 수 있으나, 바람직하게는 인간화 또는 인간 항체이다.

[0063] 항체 "이펙터 기능"은 항체의 Fc 영역 (천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기인한 생물학적 활성을 지칭하고, 항체 이소형에 따라 달라진다. 항체 이펙터 기능의 예는 C1q 결합 및 보체 의존성 세포 독성; Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC); 식세포작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어, B 세포 수용체)의 하향 조절; 및 B 세포 활성화를 포함한다.

[0064] "항체-의존성 세포-매개 세포독성" 또는 ADCC는 특정 세포독성의 세포 (예를 들어, 자연 킬러 (NK) 세포, 호중구 및 대식세포)에 존재하는 Fc 수용체 (FcR)에 결합된 분비된 Ig가, 상기 세포독성의 이펙터 세포가 항원-보유 표적 세포에 특이적으로 결합한 후, 표적 세포를 세포독소로 사멸시키도록 만드는 세포독성의 한 형태를 지칭한다. 항체는 세포독성 세포를 "무장"시키고, 이 메커니즘으로 표적 세포를 사멸시키는데 필요하다. ADCC를 매개하는 주요 세포인 NK 세포는 Fc $\gamma$ RIII만을 발현하는 반면, 단핵구는 Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RRII 및 Fc $\gamma$ RIII를 발현한다. 조혈세포 상의 Fc 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991)]의 464 페이지 표 3에 요약되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해, 시험관내 ADCC 검정, 예컨대 미국 특허 번호 5,500,362 또는 5,821,337에 기재된 검정을 수행할 수 있다. 이러한 검정에 유용한 이펙터 세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및 자연 킬러 (NK) 세포를 포함한다. 대안적으로 또는 추가로, 관심 분자의 ADCC 활성은 생체 내에서, 예를 들어 문헌 [Clynes et al., PNAS USA 95:652-656 (1998)]에 개시된 동물 모델에서 평가할 수 있다.

[0065] "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 기재한다. 바람직한 FcR은 천연 서열 인간 FcR이다. 또한, 바람직한 FcR은 IgG 항체 (감마 수용체)에 결합하는 것이고, Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RRII 및 Fc $\gamma$ RIII 서브클래스의 수용체의 대립유전자 변이체 및 대안적으로 스포라싱된 형태를 비롯한 상기 수용체를 포함하며, Fc $\gamma$ RRII 수용체는 Fc $\gamma$ RIIA ("활성화 수용체") 및 Fc $\gamma$ RIIB ("억제 수용체")를 포함하고, 이들은 그의 세포질 도메인에서 주로 상이한 유사한 아미노산 서열을 갖는다. 활성화 수용체 Fc $\gamma$ RIIA는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기계의 활성화 모티프 (ITAM)를 함유한다. 억제 수용체 Fc $\gamma$ RIIB는 그의 세포질 도메인 내에 면역수용체 티로신-기계의 억제 모티프 (ITIM)를 함유한다. (문헌 [M. Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)] 참조). FcR은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods 4: 25-34 (1994); 및 de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995)]에서 검토된다. 추후로 확인될 것을 포함하여 다른 FcR이 본원의 용어 "FcR"에 포함된다. 이 용어는 또한 모체 IgG의 태아로의



전달을 담당하는 신생아 수용체인 FcRn을 포함한다. 문헌 [Guyer et al., J. Immunol. 117: 587 (1976) 및 Kim et al., J. Immunol. 24: 249 (1994)].

[0066] "인간 이펙터 세포"는 하나 이상의 FcR을 발현하고 이펙터 기능을 수행하는 백혈구이다. 바람직하게는, 세포는 적어도 Fc $\gamma$ RIII를 발현하고, ADCC 이펙터 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 자연 킬러 (NK) 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포 및 호중구를 포함하고, PBMC 및 MNK 세포가 바람직하다. 이펙터 세포는 천연 공급원, 예를 들어 혈액으로부터 분리할 수 있다.

[0067] "보체 의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 보체의 존재 하의 표적 세포의 용해를 지칭한다. 고전적 보체 경로의 활성화는 동족 항원에 결합된 항체 (적절한 서브클래스의 항체)에 대한 보체 시스템 제1 성분 (C1q)의 결합으로 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996)]에 기재되어 있는 바와 같은 CDC 검정을 수행할 수 있다.

[0068] 본원에 개시된 다양한 폴리펩티드 및 항체를 기재하기 위해 사용되는 경우, "단리된"은 그의 생성 환경의 성분으로부터 확인, 분리 및/또는 회수된 폴리펩티드 또는 항체를 의미한다. 바람직하게는, 단리된 폴리펩티드에는 그의 생성 환경의 다른 모든 성분과의 회합이 일어나지 않는다. 그의 생성 환경의 오염 성분, 예컨대 재조합 형질감염된 세포로부터 생성되는 것은 전형적으로 폴리펩티드에 대한 진단 또는 치료 용도를 방해할 물질이고, 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비-단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 폴리펩티드는 (1) 스피닝 캡 시퀀네이터를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개의 잔기를 얻기에 충분한 정도로, 또는 (2) 쿠마시 블루 또는 바람직하게는 은 염색을 이용하여 비-환원 또는 환원 조건하에 SDS-PAGE에 의해 균질한 것으로 나타날 정도로 정제될 것이다. 그러나, 통상적으로, 단리된 폴리펩티드 또는 항체는 적어도 하나의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

[0069] 본원의 폴리펩티드 및 항체를 코딩하는 "단리된" 핵산 분자는 그것이 생성되는 환경에서 그와 통상적으로 회합되는 적어도 하나의 오염 핵산 분자로부터 확인되고 분리된 핵산 분자이다. 바람직하게는, 단리된 핵산은 생성 환경과 관련된 모든 성분과의 회합이 존재하지 않는다. 본 발명의 폴리펩티드 및 항체를 코딩하는 단리된 핵산 분자는 자연에서 발견되는 형태 또는 세팅이 아닌 형태이다. 따라서, 단리된 핵산 분자는 세포에서 자연적으로 존재하는 본원의 폴리펩티드 및 항체를 코딩하는 핵산과는 구별된다.

[0070] 용어 "제어 서열"은 특정한 숙주 유기체 내에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필요한 DNA 서열을 나타낸다. 원핵생물에 적합한 제어 서열은 예를 들어 프로모터, 임의로는 오퍼레이터 서열 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵 세포는 프로모터, 폴리아데닐화 신호 및 인핸서를 이용하는 것으로 공지되어 있다.

[0071] 핵산은 또 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치되는 경우 "작동가능하게 연결"된다. 예를 들어, 프리서열 또는 분비 리더의 DNA는 폴리펩티드에 대한 DNA가 상기 폴리펩티드의 분비에 수반되는 프리단백질로서 발현되는 경우에 상기 폴리펩티드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결된 것이고; 프로모터 또는 인핸서는 코딩 서열의 전사에 영향을 미칠 경우에 상기 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 것이며; 또는 리보솜 결합 부위는 코딩 서열의 번역을 용이하게 하도록 배치될 경우에 상기 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 것이다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결될 DNA 서열들이 인접하여 위치함을 의미하며, 분비 리더의 경우에는 인접하여 위치하고 리딩 상 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나, 인핸서는 인접하여 위치할 필요가 없다. 연결은 편리한 제한 부위에서의 라이게이션을 통해 달성된다. 이러한 부위가 존재하지 않는 경우에는 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 또는 링커를 통상적인 관행에 따라 사용한다.

[0072] 본원에 사용된 경우 용어 "에피토프 태그가 부착된"은 "태그 폴리펩티드"에 융합된 본원에 기재된 폴리펩티드 또는 항체를 포함하는 키메라 폴리펩티드를 지칭한다. 태그 폴리펩티드는 항체가 생성될 수 있는 에피토프를 제공할 만큼 충분한 잔기를 갖지만 그와 융합될 폴리펩티드의 활성을 방해하지 않을 정도로 충분히 짧다. 또한, 태그 폴리펩티드는 항체가 다른 에피토프와는 실질적으로 교차반응하지 않도록 아주 특징적인 것이 바람직하다. 일반적으로, 적합한 태그 폴리펩티드는 적어도 6개의 아미노산 잔기, 통상적으로는 약 8 내지 50개의 아미노산 잔기 (바람직하게는, 약 10 내지 20개의 아미노산 잔기)를 갖는다.

[0073] 본원에 사용된 용어 "이뮤노어드헤신"은 이종 단백질 ("어드헤신")의 결합 특이성을 이뮤노글로불린 불변 도메인의 이펙터 기능과 조합한 항체-유사 분자를 지칭한다. 구조적으로, 이뮤노어드헤신은 항체의 항원 인식 및 결합 부위가 아닌 (즉, "이종") 바람직한 결합 특이성을 갖는 아미노산 서열 및 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열의 융합체를 포함한다. 이뮤노어드헤신 분자의 어드헤신 부분은 전형적으로 적어도 수용체 또는 리간드의 결합 부위를 포함하는 인접한 아미노산 서열이다. 이뮤노어드헤신 내의 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열은 임의

의 이뮤노글로불린, 예컨대 IgG-1, IgG-2, IgG-3 또는 IgG-4 하위유형, IgA (IgA-1 및 IgA-2 포함), IgE, IgD 또는 IgM으로부터 수득될 수 있다. Ig 융합체는 바람직하게는 Ig 분자 내의 적어도 하나의 가변 영역 대신 본원에 기재된 폴리펩티드 또는 항체 도메인의 치환을 포함한다. 특히 바람직한 실시양태에서, 이뮤노글로불린 융합체는 힌지, CH2 및 CH3, 또는 IgG1분자의 힌지, CH1, CH2 및 CH3 영역을 포함한다. 이뮤노글로불린 융합체의 생성을 위해, 또한 미국 특허 번호 5,428,130 (1995년 6월 27일에 허여됨)을 참조한다.

- [0074] 용어 "제약 제제"는, 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적하도록 하는 형태로 존재하며 제제가 투여될 대상체에 게 허용될 수 없게 독성인 추가의 성분을 함유하지 않는 제제를 지칭한다.
- [0075] 시험관내 또는 생체내에서 항체가 항원에 결합하여 측정가능한 생물학적 반응을 생성하는 능력에 의해 결정시, 주어진 시간에서의 항체의 생물학적 활성이 제약 제제가 제조되는 시점에서 나타난 생물학적 활성의 약 10% 내에 (검정의 오차 내에 있음) 포함된다면, 항체는 제약 제제 중에서 "생물학적 활성"을 보유한다.
- [0076] "안정한" 또는 "안정화된" 제제는 저장시에 내부의 단백질이 그의 물리적 안정성 및/또는 화학적 안정성을 본질적으로 유지하는 제제이다. 안정성은 선택된 기간 동안 선택된 온도에서 측정될 수 있다. 바람직하게는 제제는 실온 (약 30℃) 또는 40℃에서 적어도 1개월 동안 안정하고/거나 약 2-8℃에서 적어도 1년 동안, 바람직하게는 적어도 2년 동안 안정하다. 예를 들어, 저장 동안 응집의 정도는 단백질 안정성의 지표로서 사용될 수 있다. 따라서, "안정한" 제제는 제제 중에 약 10% 미만, 바람직하게는 약 5% 미만의 단백질이 응집체로서 존재하는 것일 수 있다. 단백질 안정성을 측정하기 위한 다양한 분석 기술들이 당업계에서 이용가능하고, 예를 들어 [Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) 및 Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993)]에서 검토된다.
- [0077] 단백질-함유 제제의 "안정성"을 증가시키는 것은 그 제제 중에서의 단백질 응집체의 형성을 감소 (처리되지 않은 단백질-함유 제제와 비교함) 또는 방지하는 것을 지칭한다.
- [0078] 용어 "수용액"은 물이 용해 매질 또는 용매인 용액을 지칭한다. 물질이 액체에 용해되는 경우, 혼합물은 용액으로 지칭된다. 용해되는 물질은 용질이고, 용해시키는 액체 (이 경우에는 물)는 용매이다.
- [0079] 본원에 사용된 용어 "안정화 작용제" 또는 "안정화제"는 안정하거나 또는 변하지 않는 상태에서 그를 유지하기 위해 용액 또는 혼합물 또는 현탁액 또는 조성물 또는 치료 조성물에 첨가된 화학 물질 또는 화합물이거나; 또는 그것이 보다 안정하거나 또는 변하지 않는 상태로 이어지는 원자 또는 분자의 변화에 영향을 미치는 반응을 생성하기 때문에 사용되는 것이다.
- [0080] 본원에 사용된 용어 "응집체" 또는 "응집"은 예를 들어 펩티드, 폴리펩티드, 항체 또는 그의 변이체의 응집체와 같이 덩어리로 또는 전체로 함께 모이거나 또는 수집되는 것을 의미한다. 응집체는 다른 요인, 예를 들어 응집제, 침전제, 교반, 또는 펩티드, 폴리펩티드, 항체 또는 그의 변이체를 함께 모이게 하는 다른 수단 및 방법으로 인해 자가-응집 또는 응집될 수 있다.
- [0081] 교반-유도된 응집은 교반에 의해 유발된 단백질-함유 용액 중에서의 응집체의 형성이며, 여기서 교반은 진탕 또는 교반에 의해 움직이는 것이다.
- [0082] "응집되기 쉬운" 항체는 특히 교반시에, 다른 항체 분자(들)와 응집되는 것으로 관찰된 것이다.
- [0083] 교반-유도된 응집을 "억제하는" 것은 적어도 하나의 교반-유도된 응집의 억제제를 포함하지 않는 단백질-함유 용액에 존재하는 응집체의 양과 적어도 하나의 교반-유도된 응집의 억제제를 포함하는 단백질-함유 용액에 존재하는 응집체의 양을 비교하여 측정시, 교반-유도된 응집을 방지, 감소 또는 저하시키는 것을 의도한다.
- [0084] 교반-유도된 응집 억제량은 교반-유도된 응집을 억제하는 양이다.
- [0085] 교반-유도된 응집을 측정하기 위한 본 발명에서의 용도를 발견할 수 있는 방법은 겔 전기영동, 등전 포커싱, 모세관 전기영동, 크로마토그래피, 예컨대 크기 배제 크로마토그래피, 이온-교환 크로마토그래피 및 역상 고성능 액체 크로마토그래피, 펩티드 맵핑, 올리고사카라이드 맵핑, 질량 분광측정법, 자외선 흡광도 분광분석법, 형광 분광분석법, 원편광 이색성 분광분석법, 등은 적정 열량측정법, 시차 주사 열량측정법, 분석 초원심분리, 동적 광 산란, 단백질분해, 및 가교, 탁도 측정, 필터 지연 검정, 면역학적 검정, 형광 염료 결합 검정, 단백질-염색 검정, 현미경검사, 및 ELISA 또는 다른 결합 검정을 통한 응집체의 검출을 포함한다.
- [0086] "등장성" 제제는 본질적으로 인간 혈액과 동일한 삼투압을 갖는 것이다. 등장성 제제는 일반적으로 약 250 내지 350 mOsm의 삼투압을 가질 것이다. 용어 "저장성"은 인간 혈액의 삼투압 미만의 삼투압을 갖는 제제를 기재

한다. 따라서, 용어 "고장성"은 인간 혈액의 삼투압을 초과하는 삼투압을 갖는 제제를 기재하는데 사용된다. 예를 들어, 증기압 또는 빙냉 유형 삼투압계를 사용하여 등장성을 측정할 수 있다. 본 발명의 제제는 염 및/또는 완충제를 첨가한 결과로서 고장성이다.

[0087] "재구성된" 제제는 단백질이 재구성된 제제 내에 분산되도록 동결건조된 단백질 또는 항체 제제를 희석제에 용해시킴으로써 제조된 것이다. 재구성된 제제는 관심 단백질로 치료될 환자에게 투여 (예를 들어, 비경구 투여)하기에 적합하고, 본 발명의 특정 실시양태에서, 피하 투여에 적합한 것일 수 있다.

[0088] "계면활성제"는 친수성 및 소수성 기를 둘 다 함유하는 그의 화학적 조성물 때문에 고체-고체, 고체-액체, 액체-액체 및 액체-공기의 표면에 그의 효과를 발휘할 수 있는 표면 활성제이다. 이들 물질은 단백질이 흡착되고 잠재적으로 응집될 수 있는 공기-물 및/또는 물-고체 인터페이스에서 희석 용액 중의 단백질의 농도를 감소시킨다. 계면활성제는 단백질 제제에서 소수성 인터페이스에 결합할 수 있다. 물의 표면 상의 단백질은 특히 교반하였을 때 단백질 단층의 비폴딩 및 이후의 응집 때문에 응집될 것이다.

[0089] "계면활성제"는 단백질을 변성시킬 수 있지만, 또한 표면 변성에 대해 이들을 안정화시킬 수 있다. 일반적으로, 이온성 계면활성제는 단백질을 변성시킬 수 있다. 그러나, 비이온성 계면활성제는 심지어는 상대적으로 높은 농도 (1% w/v)에서도 단백질을 변성시키지 않는다. 가장 비경구 허용되는 비이온성 계면활성제는 폴리소르베이트 또는 폴리에테르 기에서 유래한다. 폴리소르베이트 20 및 80은 시판되는 단백질 제제에서 동시 계면활성제 안정화제이다. 그러나, 단백질 제제에 사용된 다른 계면활성제는 플루로닉(Pluronic) F-68 및 "브리즈(Brij)" 클래스의 구성원을 포함한다. 비-이온성 계면활성제는 당 기재의 것일 수 있다. 당 기재의 계면활성제는 알킬 글리코시드일 수 있다. 알킬 글리코시드의 일반적인 구조는  $R_1-O-(CH_2)_x-R$ 이며, 여기서 R은 독립적으로  $CH_3$  또는 시클로헥실 ( $C_6H_{11}$ )이고,  $R_1$ 은 독립적으로 글루코스 또는 말토스이다. 예시적인 알킬 글리코시드는  $R_1$ 이 글루코스이고, R이  $CH_3$ 이고, x가 5 (n-헥실-β-D-글루코피라노시드)이고, x가 6 (n-헵틸-β-D-글루코피라노시드)이고, x가 7 (n-옥틸-β-D-글루코피라노시드)이고, x는 8 (n-노닐-β-D-글루코피라노시드)이고, x가 9 (n-데실-β-D-글루코피라노시드)이고, x가 11 (n-도데실-β-D-글루코피라노시드)인 것을 포함한다. 때때로 글루코피라노시드는 글루코시드로 불린다. 예시적인 알킬 글리코시드는 추가로  $R_1$ 이 말토스이고, R이  $CH_3$ 이고, x가 5 (n-헥실-β-D-말토피라노시드)이고, x가 7 (n-옥틸-β-D-말토피라노시드)이고, x가 8 (n-노닐-β-D-말토피라노시드)이고, x가 9 (n-데실-β-D-말토피라노시드)이고, x가 10 (n-운데실-β-D-말토피라노시드)이고, x가 11 (n-도데실-β-D-말토피라노시드)이고, x가 12 (n-트리데실-β-D-말토피라노시드)이고, x가 13 (n-테트라데실-β-D-말토피라노시드)이고, x가 15 (n-헥사데실-β-D-말토피라노시드)인 것을 포함한다. 때때로 말토피라노시드는 말토시드로 불린다. 예시적인 알킬 글리코시드는 추가로  $R_1$ 이 글루코스이고, x가 3이고, R이 시클로헥실 (3-시클로헥실-1-프로필-β-D-글루코시드)인 것; 및  $R_1$ 이 말토스이고, x가 4이고, R이 시클로헥실 (4-시클로헥실-1-부틸-β-D-말토시드)인 것을 포함한다.

[0090] "제약상 허용되는 산"은 제제화된 농도 및 방식에서 비독성인 무기 및 유기 산을 포함한다. 예를 들어, 적합한 무기 산은 염산, 과염소산, 브로민화수소산, 아이오딘화수소산, 질산, 황산, 술폰산, 술피산, 술파닐산, 인산, 탄산 등을 포함한다. 적합한 유기 산은 직쇄 및 분지쇄 알킬, 방향족, 시클릭, 시클로지방족, 아릴지방족, 헤테로시클릭, 포화, 불포화, 모노, 디- 및 트리-카르복실산을 포함하고, 예를 들어 포름산, 아세트산, 2-히드록시아세트산, 트리플루오로아세트산, 페닐아세트산, 트리메틸아세트산, t-부틸 아세트산, 안트라닐산, 프로판산, 2-히드록시프로판산, 2-옥소프로판산, 프로판디온산, 시클로펜탄프로피온산, 시클로펜탄 프로피온산, 3-페닐프로피온산, 부탄산, 부탄디온산, 벤조산, 3-(4-히드록시벤조일)벤조산, 2-아세톡시-벤조산, 아스코르브산, 신남산, 라우릴 황산, 스테아르산, myristic acid, 만델산, 숙신산, 엠본산, 푸마르산, 말산, 말레산, 히드록시말레산, 말론산, 락트산, 시트르산, 타르타르산, 글리콜산, 글리콘산, 글루콘산, 피루브산, 글리옥살산, 옥살산, 메실산, 숙신산, 살리실산, 프탈산, 팔모산, 팔메산, 티오시안산, 메탄술폰산, 에탄술폰산, 1,2-에탄디술폰산, 2-히드록시에탄술폰산, 벤젠술폰산, 4-클로로벤젠술폰산, 나프탈렌-2-술폰산, p-톨루엔술폰산, 캄포르술폰산, 4-메틸비시클로[2.2.2]-옥트-2-엔-1-카르복실산, 글루코헵톤산, 4,4'-메틸렌비스-3-(히드록시-2-엔-1-카르복실산), 히드록시나프토산을 포함한다.

[0091] "제약상 허용되는 염기"는 이들이 제제화되는 농도 및 방식에서 비독성인 무기 염기 및 유기 염기를 포함한다. 예를 들어, 적합한 염기는 무기 염기 형성 금속, 예컨대 리튬, 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘, 암모늄, 철, 아연, 구리, 망가니즈, 알루미늄, N-메틸글루카민, 모르폴린, 피페리딘, 및 1급, 2급 및 3급 아민, 치환된 아민, 시클릭 아민 및 염기성 이온 교환 수지 [예를 들어,  $N(R')_4^+$  (여기서, R'는 독립적으로 H 또는  $C_{1-4}$ 알킬, 예를

들어 암모늄, 트리스임)]를 비롯한 유기 비독성 염기, 예를 들어 이소프로필아민, 트리메틸아민, 디에틸아민, 트리에틸아민, 트리프로필아민, 에탄올아민, 2-디에틸아미노에탄올, 트리메타민, 디시클로헥실아민, 리신, 아르기닌, 히스티딘, 카페인, 프로카인, 히드라바민, 콜린, 베타인, 에틸렌디아민, 글루코사민, 메틸글루카민, 테오브로민, 퓨린, 피페라진, 피페리딘, N-에틸피페리딘, 폴리아민 수지 등으로부터 형성된 것을 포함한다. 특히 바람직한 유기 비독성 염기는 이소프로필아민, 디에틸아민, 에탄올아민, 트리메타민, 디시클로헥실아민, 콜린 및 카페인이다.

[0092] 본 발명에서 사용할 수 있는 추가의 제약상 허용되는 산 및 염기는 아미노산, 예를 들어 히스티딘, 글리신, 페닐알라닌, 아스파르트산, 글루탐산, 리신 및 아스파라긴으로부터 유래된 것을 포함한다.

[0093] "제약상 허용되는" 완충제 및 염은 상기 지정된 산 및 염기의 산 및 염기 부가 염 둘 다로부터 유래된 것을 포함한다. 구체적인 완충제 및/또는 염은 히스티딘, 숙시네이트 및 아세테이트를 포함한다.

[0094] "동결건조보호제"는 관심 단백질과 조합되는 경우 동결건조 및 이후의 저장 시에 단백질의 물리화학적 불안정성을 유의하게 방지하거나 또는 감소시키는 분자이다. 예시적인 동결건조보호제는 당 및 그의 상응하는 당 알콜; 아미노산, 예컨대 일나트륨 글루타메이트 또는 히스티딘; 메틸아민, 예컨대 베타인; 친액성 염, 예컨대 황산마그네슘; 폴리올, 예컨대 3가 또는 보다 높은 분자량의 당 알콜, 예를 들어 글리세린, 텍스트란, 에리트ρί톨, 글리세롤, 아라비톨, 크실리톨, 소르비톨 및 만니톨; 프로필렌 글리콜; 폴리에틸렌 글리콜; 플루로닉스®; 및 그의 조합을 포함한다. 추가의 예시적인 동결건조보호제는 글리세린 및 젤라틴, 및 당 멜리비오스, 멜레지토스, 라피노스, 만노트리오스 및 스타키오스를 포함한다. 환원 당의 예는 글루코스, 말토스, 락토스, 말톨로스, 이소-말톨로스 및 락톨로스를 포함한다. 비-환원 당의 예는 당 알콜 및 다른 직쇄 폴리알콜로부터 선택된 폴리히드록시 화합물의 비-환원 글리코시드를 포함한다. 바람직한 당 알콜은 모노글리코시드, 특히 락토스, 말토스, 락톨로스 및 말톨로스와 같은 디사카라이드의 환원에 의해 수득되는 화합물이다. 글리코시드 측기는 글루코시드 또는 갈락토시드일 수 있다. 당 알콜의 추가적인 예는 글루시톨, 말티톨, 락티톨 및 이소-말톨로스이다. 바람직한 동결건조보호제는 비-환원 당 트레할로스 또는 수크로스이다.

[0095] 동결건조보호제는 동결건조보호량의 동결건조보호제의 존재 하에 단백질의 동결건조 후에 단백질이 동결건조 및 저장 시에 그의 물리화학적 안정성을 본질적으로 유지한다는 것을 의미하는 "동결건조보호량"으로 사전-동결건조된 제제에 첨가된다.

[0096] "제약상 허용되는 당"은 관심 단백질과 조합되는 경우, 저장 시에 단백질의 물리화학적 불안정성을 유의하게 방지하거나 또는 감소시키는 분자이다. 제제가 동결건조된 후에 재구성되는 경우, "제약상 허용되는 당"은 "동결건조보호제"로 공지되어 있을 수도 있다. 예시적인 당 및 그의 상응하는 당 알콜은 아미노산, 예컨대 일나트륨 글루타메이트 또는 히스티딘; 메틸아민, 예컨대 베타인; 친액성 염, 예컨대 황산마그네슘; 폴리올, 예컨대 3가 또는 보다 높은 분자량의 당 알콜, 예를 들어 글리세린, 텍스트란, 에리트ρί톨, 글리세롤, 아라비톨, 크실리톨, 소르비톨 및 만니톨; 프로필렌 글리콜; 폴리에틸렌 글리콜; 플루로닉스®; 및 그의 조합을 포함한다. 추가의 예시적인 동결건조보호제는 글리세린 및 젤라틴, 및 당 멜리비오스, 멜레지토스, 라피노스, 만노트리오스 및 스타키오스를 포함한다. 환원 당의 예는 글루코스, 말토스, 락토스, 말톨로스, 이소-말톨로스 및 락톨로스를 포함한다. 비-환원 당의 예는 당 알콜 및 다른 직쇄 폴리알콜로부터 선택된 폴리히드록시 화합물의 비-환원 글리코시드를 포함한다. 바람직한 당 알콜은 모노글리코시드, 특히 락토스, 말토스, 락톨로스 및 말톨로스와 같은 디사카라이드의 환원에 의해 수득되는 화합물이다. 글리코시드 측기는 글루코시드 또는 갈락토시드일 수 있다. 당 알콜의 추가적인 예는 글루시톨, 말티톨, 락티톨 및 이소-말톨로스이다. 바람직한 제약상 허용되는 당은 비-환원 당 트레할로스 또는 수크로스이다.

[0097] 제약상 허용되는 당은 단백질이 저장 동안 (예를 들어, 재구성 및 저장 후에) 그의 물리화학적 안정성을 본질적으로 유지하는 것을 의미하는 "보호량"으로 (예를 들어, 사전-동결건조된) 제제에 첨가된다.

[0098] 본원에서 관심 "희석제"는 제약상 허용되고 (인간에의 투여에 안전하고 비독성임) 액체 제제, 예컨대 동결건조 후에 재구성된 제제의 제조에 유용한 것이다. 예시적인 희석제는 멸균수, 정균 주사용수 (BWFI), pH 완충 용액 (예를 들어, 포스페이트-완충 염수), 멸균 염수 용액, 링거액 또는 텍스트로스 용액을 포함한다. 대안적 실시양태에서, 희석제는 염 및/또는 완충제의 수용액을 포함할 수 있다.

[0099] "보존제"는 박테리아 활성을 감소시키기 위해 본원의 제제에 첨가될 수 있는 화합물이다. 보존제의 첨가는 예를 들어, 다용도 (다용량) 제제의 생성을 용이하게 할 수 있다. 가능한 보존제의 예는 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드, 헥사메토늄 클로라이드, 벤즈알코늄 클로라이드 (알킬기가 장쇄 화합물인 알킬벤질디메틸암



모늄 클로라이드의 혼합물) 및 벤제토늄 클로라이드를 포함한다. 다른 유형의 보존제는 방향족 알콜, 예컨대 페놀, 부틸 및 벤질 알콜, 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤, 카테콜, 레조르시놀, 시클로헥산을, 3-펜탄올 및 m-크레졸을 포함한다. 본원에서 가장 바람직한 보존제는 벤질 알콜이다.

- [0100] "치료"는 치유적 치료, 및 예방적 또는 방지적 조치를 둘 다 지칭한다. 치료를 필요로 하는 대상체는 이미 장애가 있는 대상체 뿐만 아니라 장애를 예방하고자 하는 대상체를 포함한다.
- [0101] 치료의 목적을 위한 "포유동물"은 인간, 가축 및 농장 동물, 및 동물원, 스포츠, 또는 애완 동물, 예컨대 개, 말, 토끼, 소, 돼지, 햄스터, 저빌, 마우스, 페릿, 래트, 고양이 등을 비롯한 포유동물로 분류된 임의의 동물을 지칭한다. 바람직하게는, 포유동물은 인간이다.
- [0102] "장애"는 단백질로의 치료로부터 이익을 얻을 임의의 상태이다. 이는 만성 및 급성 장애 또는 질환 (포유동물이 해당 장애에 걸리기 쉬운 병리학적 상태 포함)을 포함한다. 본원에서 치료될 장애의 비-제한적인 예는 암종 및 염증을 포함한다.
- [0103] "치료 유효량"은 적어도 특정한 장애의 측정가능한 개선 또는 방지에 효과적일도록 요구되는 최소 농도이다. 공지된 단백질의 치료 유효량은 당업계에 주지되어 있는 한편, 이후에 발견되는 단백질의 유효량은 당업자, 예컨대 보편적인 전문의의 기술 범위 내에 있는 표준 기술에 의해 결정될 수 있다.
- [0104] 본원에 기재된 바와 같이 제제화될 수 있는 항체 (독소에 접합된 항체 포함) 및 다른 단백질의 제조 방법은 당업계에 주지되어 있고, 예를 들어 W02007/001851에 상세하게 기재되어 있다.
- [0105] 항체 및 다른 단백질은 수성 또는 동결건조 형태로 본 발명에 따라 제제화될 수 있고, 후자는 수성 형태로 재구성된다면 가능하다.
- [0106] 본원에 기재된 제제는 재구성된 동결건조 제제로서 제조될 수 있다. 본원에 기재된 단백질 또는 항체는 동결건조된 후에 재구성되어 본 발명의 액체 제제를 생성한다. 이 특정한 실시양태에서, 상기 기재된 바와 같이 관심 단백질을 제조한 후에, "사전-동결건조된 제제"가 생성된다. 사전-동결건조된 제제에 존재하는 단백질의 양은 바람직한 용량 부피, 투여 방식(들) 등을 고려하여 결정된다. 예를 들어, 무손상 항체의 개시 농도는 약 2 mg/ml 내지 약 50 mg/ml, 바람직하게는 약 5 mg/ml 내지 약 40 mg/ml, 가장 바람직하게는 약 20-30 mg/ml일 수 있다.
- [0107] 제제화될 단백질은 일반적으로 용액에 존재한다. 예를 들어, 본 발명의 액체 제제에서, 단백질은 약 4-8, 바람직하게는 약 5-7의 pH에서 pH-완충 용액에 존재할 수 있다. 완충제 농도는 예를 들어 완충제 및 제제 (예를 들어, 재구성된 제제)의 바람직한 등장성에 따라 약 1 mM 내지 약 20 mM, 대안적으로 약 3 mM 내지 약 15 mM일 수 있다. 예시적인 완충제 및/또는 염은 제약상 허용되는 것이고, 적합한 산, 염기 및 그의 염, 예컨대 "제약상 허용되는" 산, 염기 또는 완충제 하에 규정된 것으로부터 생성될 수 있다.
- [0108] 한 실시양태에서, 동결건조보호제는 사전-동결건조된 제제에 첨가된다. 사전-동결건조된 제제에서 동결건조보호제의 양은 일반적으로 재구성시에 생성된 제제가 등장성이도록 하는 양이다. 그러나, 고장성 재구성된 제제가 또한 적합할 수 있다. 또한, 동결건조보호제의 양이 너무 낮아 허용되지 않는 양의 단백질의 분해/응집이 동결건조시에 발생하도록 하지 않아야 한다. 그러나, 사전-동결건조된 제제에서 예시적인 동결건조보호제 농도는 약 10 mM 내지 약 400 mM, 대안적으로 약 30 mM 내지 약 300 mM, 대안적으로 약 50 mM 내지 약 100 mM이다. 예시적인 동결건조보호제는 당 및 당 알콜, 예컨대 수크로스, 만노스, 트레할로스, 글루코스, 소르비톨, 만니톨을 포함한다. 그러나, 특정한 환경 하에, 특정 동결건조보호제는 또한 제제의 점도를 증가시키는데 기여할 수 있다. 이에 따라, 이 효과를 최소화하거나 또는 중화시키는 특정한 동결건조보호제를 선택하도록 주의를 기울여야 한다. 추가적인 동결건조보호제는 "동결건조보호제"의 정의 하에 상기 기재되어 있고, 또한 본원에서 "제약상 허용되는 당"으로 지칭된다.
- [0109] 동결건조보호제에 대한 단백질의 비는 각각의 특정한 단백질 또는 항체 및 동결건조보호제 조합에 대해 달라질 수 있다. 높은 단백질 농도를 갖는 등장성 재구성된 제제를 생성하기 위한 선택 단백질로서의 항체 및 동결건조보호제로서의 당 (예를 들어, 수크로스 또는 트레할로스)의 경우에, 항체에 대한 동결건조보호제의 몰비는 1 mol 항체에 대해 약 100 내지 약 1500 mol 동결건조보호제, 바람직하게는 1 mol 항체에 대해 약 200 내지 약 1000 mol 동결건조보호제, 예를 들어 1 mol 항체에 대해 약 200 내지 약 600 mol 동결건조보호제일 수 있다.
- [0110] 동결건조보호제 (예컨대 수크로스 또는 트레할로스) 및 벌킹제 (예를 들어, 만니톨 또는 글리신)의 혼합물이 사전-동결건조 제제의 제조에 사용될 수 있다. 벌킹제는 내부에 과도한 포켓 등이 없이 균일한 동결건조된 케이

크의 생성을 허용할 수 있다. 다른 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제, 예컨대 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 기재된 것이 사전-동결건조된 제제 (및/또는 동결건조된 제제 및/또는 재구성된 제제)에 포함될 수 있으나, 단 이들은 제제의 바람직한 특징에 역효과를 나타내지 않아야 한다. 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 추가적인 완충제; 보존제; 공용매; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA; 금속 착체 (예를 들어, Zn-단백질 착체); 생분해성 중합체, 예컨대 폴리에스테르; 및/또는 염-형성 반대이온, 예컨대 나트륨을 포함한다.

[0111] 본원에서 제제는 또한 치료될 특정한 적응증에 필요한 하나 초과와 단백질, 바람직하게는 다른 단백질에 역효과를 미치지 않는 보완적 활성을 갖는 것을 함유할 수 있다. 예를 들어, 단일 제제에서 바람직한 표적 (예를 들어, 수용체 또는 항원)에 결합하는 2개 이상의 항체를 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 단백질은 적합한 하계는 조합물 중에 의도된 목적에 유효한 양으로 존재한다.

[0112] 생체내 투여에 사용될 제제는 멸균되어야 한다. 이는 동결건조 및 재구성 이전 또는 이후에 멸균 여과 막을 통해 여과시킴으로써 용이하게 달성된다. 대안적으로, 전체 혼합물의 멸균은 예를 들어 약 120°C에서 약 30분 동안 단백질을 제외한 성분들을 고온멸균시킴으로써 달성될 수 있다.

[0113] 단백질, 임의의 동결건조보호제 및 다른 임의의 성분을 함께 혼합한 후에, 제제는 동결건조된다. 다수의 상이한 동결-건조제, 예컨대 Hu150<sup>TM</sup> (홀(Hu11), 미국) 또는 GT20<sup>TM</sup> (레이볼드-헤라우스(Leybold-Heraeus), 독일) 동결-건조제가 이 목적을 위해 이용가능하다. 동결-건조는 제제를 동결시킨 후에 일차 건조에 적합한 온도에서 동결된 내용물로부터 얼음을 승화시켜 달성된다. 이 조건 하에, 생성물 온도는 제제의 공용점 또는 붕괴 온도 아래이다. 전형적으로, 일차 저장을 위한 유통 온도는 전형적으로 약 50 내지 250 mTorr 범위의 적합한 압력에서 약 -30 내지 25°C (단 생성물은 일차 건조 동안 동결된 상태로 남아있음) 범위일 것이다. 제제, 샘플을 수용하는 용기 (예를 들어, 유리 바이알)의 크기 및 유형, 및 액체의 부피는 주로 건조에 필요한 시간을 결정할 것이며, 이는 수 시간 내지 수일 (예를 들어, 40-60시간)의 범위일 수 있다. 임의로, 이차 건조 단계는 또한 생성물에서 바람직한 잔류 수분 수준에 따라 수행될 수 있다. 이차 건조를 수행하는 온도는 주로 용기의 유형 및 크기 및 사용되는 단백질의 유형에 따라 약 0-40°C 범위이다. 예를 들어, 동결건조의 전체 물 제거 단계에 걸친 유통 온도는 약 15-30°C (예를 들어, 약 20°C)일 수 있다. 이차 건조에 필요한 시간 및 압력은 예를 들어 온도 및 다른 파라미터에 따라 적합한 동결건조된 케이크를 생성하는 것일 것이다. 이차 건조 시간은 생성물에서 바람직한 잔류 수분 수준에 의해 결정되고, 전형적으로 적어도 약 5시간 (예를 들어, 10-15시간) 소요된다. 압력은 일차 건조 단계 동안 사용되는 것과 동일할 수 있다. 동결-건조 조건은 제제 및 바이알 크기에 따라 달라질 수 있다.

[0114] 환자에게 투여하기 전에, 동결건조된 제제는 제약상 허용되는 희석제로, 재구성된 제제 중의 단백질 농도가 적어도 약 50 mg/ml, 예를 들어 약 50 mg/ml 내지 약 400 mg/ml, 대안적으로 약 80 mg/ml 내지 약 300 mg/ml, 대안적으로 약 90 mg/ml 내지 약 150 mg/ml가 되도록 재구성된다. 재구성된 제제 중에서 이러한 높은 단백질 농도는 재구성된 제제의 피하 전달이 의도되는 경우에 특히 유용한 것으로 여겨진다. 그러나, 다른 투여 경로, 예컨대 정맥내 투여의 경우, 재구성된 제제 중에서 단백질의 보다 낮은 농도가 바람직할 수 있다 (예를 들어, 재구성된 제제 중에서 약 5-50 mg/ml, 또는 약 10-40 mg/ml 단백질). 특정 실시양태에서, 재구성된 제제 중의 단백질 농도는 사전-동결건조된 제제에서 보다 유의하게 더 높다. 예를 들어, 재구성된 제제 중의 단백질 농도는 사전-동결건조된 제제보다 약 2-40배, 대안적으로 3-10배, 대안적으로 3-6배 (예를 들어, 적어도 3배 또는 적어도 4배)일 수 있다.

[0115] 재구성은 일반적으로, 완전한 수화를 보장하기 위해 약 25°C의 온도에서 일어나지만, 경우에 따라 다른 온도를 이용할 수도 있다. 재구성에 요구되는 시간은, 예를 들어 희석제의 유형, 부형제(들)의 양 및 단백질에 따라 달라질 것이다. 예시적인 희석제는 멸균수, 정균 주사용수 (BWWFI), pH 완충 용액 (예를 들어, 포스페이트-완충 염수), 멸균 염수 용액, 링거액 또는 텍스트로스 용액을 포함한다. 희석제는 임의로 보존제를 함유한다. 예시적인 보존제는 바람직한 보존제인 방향족 알콜, 예컨대 벤질 또는 페놀 알콜과 상기 기재되어 있다. 사용된 보존제의 양은 단백질과의 상용성에 대해 상이한 보존제 농도를 평가하고 보존제 효능을 시험함으로써 결정한다. 예를 들어, 보존제가 방향족 알콜 (예컨대, 벤질 알콜)인 경우, 이는 약 0.1-2.0%, 바람직하게는 약 0.5-1.5%, 가장 바람직하게는 약 1.0-1.2%의 양으로 존재할 수 있다.

[0116] 바람직하게는, 재구성된 제제는 크기가  $\geq 10 \mu\text{m}$ 인 바이알 당 6000개 미만의 입자를 갖는다.

[0117] 치료 제제는 바람직한 정도의 순도를 갖는 활성 성분을 임의의 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제와



혼합함으로써 저장용으로 제조된다 (문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 18th edition, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18042 [1990]]). 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 완충제, 항산화제, 예를 들어 아스코르브산, 메티오닌, 비타민 E, 메타중아황산 나트륨; 보존제, 등장화제, 안정화제, 금속 착체 (예를 들어, Zn-단백질 착체), 및/또는 킬레이트화제, 예컨대 EDTA를 포함한다.

[0118] 치료제가 항체 단편인 경우, 표적 단백질의 결합 도메인에 특이적으로 결합하는 최소 단편이 바람직하다. 예를 들어, 항체의 가변 영역 서열을 기반으로 하여, 표적 단백질 서열에 결합하는 능력을 보유한 항체 단편 또는 심지어 펩티드 분자를 설계할 수 있다. 이러한 펩티드는 화학적으로 합성할 수 있고/거나 재조합 DNA 기술에 의해 생성할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7889-7893 [1993]] 참조).

[0119] 완충제를 이용하여, 특히 안정성이 pH 의존성인 경우 치료 유효성을 최적화하는 범위로 pH를 조절한다. 완충제는 바람직하게는 약 50 mM 내지 약 250 mM 범위의 농도로 존재한다. 본 발명에 사용하기 위한 적합한 완충제는 유기 산 및 무기 산 둘 다 및 그의 염을 포함한다. 예를 들어, 시트레이트, 포스페이트, 숙시네이트, 타르트레이트, 푸마레이트, 글루코네이트, 옥살레이트, 락테이트, 아세테이트가 있다. 추가로, 완충제는 히스티딘 및 트리메틸아민 염, 예를 들어 트리스로 구성될 수 있다.

[0120] 보존제는 미생물 성장을 지연시키기 위하여 첨가되고, 전형적으로 0.2%-1.0% (w/v) 범위로 존재한다. 본 발명에 사용하기 위한 적합한 보존제는 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 할라이드 (예를 들어, 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드), 벤제토늄 클로라이드; 티메로살, 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올, 3-펜탄올 및 m-크레졸을 포함한다.

[0121] 때때로 "안정화제"로 공지된 등장화제는 액체 조성물의 등장성을 조정하거나 유지하기 위해 존재한다. 단백질 및 항체와 같은 크고 대전된 생체분자를 이용하는 경우, 이들은 아미노산 측쇄의 대전된 기와 상호작용하여 분자간 및 분자내 상호작용에 대한 잠재성을 줄일 수 있기 때문에 종종 "안정화제"로 지칭된다. 등장화제는 다른 성분의 상대적인 양을 고려하여, 0.1 내지 25 중량%, 바람직하게는 1 내지 5 중량%의 임의의 양으로 존재할 수 있다. 바람직한 등장화제는 다가 당 알콜, 바람직하게는 3가 이상의 당 알콜, 예컨대 글리세린, 에리트리톨, 아라비톨, 크실리톨, 소르비톨 및 만니톨을 포함한다.

[0122] 추가의 부형제는 다음 중 하나 이상의 역할을 할 수 있는 작용제를 포함한다: (1) 벌킹제, (2) 용해도 증진제, (3) 안정화제 및 (4) 및 변성 또는 용기 벽으로의 부착을 방지하는 작용제. 이러한 부형제는 다음을 포함한다: 다가 당 알콜 (상기 열거됨); 아미노산, 예컨대 알라닌, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 리신, 오르니틴, 류신, 2-페닐알라닌, 글루탐산, 트레오닌 등; 유기 당 또는 당 알콜, 예컨대 수크로스, 락토스, 락티톨, 트레할로스, 스타키오스, 만노스, 소르보스, 크실로스, 리보스, 리비톨, 미오이니시토스, 미오이니시톨, 갈락토스, 갈락티톨, 글리세롤, 시클리톨 (예를 들어, 이노시톨), 폴리에틸렌 글리콜; 황 함유 환원제, 예컨대 우레아, 글루타티온, 티옥트산, 나트륨 티오글리콜레이트, 티오글리세롤, α-모노티오글리세롤 및 나트륨 티오 술페이트; 저분자량 단백질, 예컨대 인간 혈청 알부민, 소 혈청 알부민, 젤라틴 또는 다른 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 모노사카라이드 (예를 들어, 크실로스, 만노스, 프룩토스, 글루코스; 디사카라이드 (예를 들어, 락토스, 말토스, 수크로스); 트리사카라이드, 예컨대 라피노스; 및 폴리사카라이드, 예컨대 덱스트린 또는 덱스트란.

[0123] 제제를 생체내 투여용으로 사용하기 위하여서는, 제제는 멸균 상태이어야 한다. 제제는 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 멸균될 수 있다. 본원의 치료 조성물은 일반적으로 멸균 접근 포트를 갖는 용기, 예를 들어 피하 주사 바늘에 의해 뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥주사액 또는 바이알에 둔다.

[0124] 투여 경로는 공지되고 허용되는 방법에 따르고, 예컨대 단일 또는 다중 볼루스 또는 장시간에 걸친 주입으로 적합한 방식, 예를 들어 피하, 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 병변내 또는 관절내 경로에 의한 주사 또는 주입, 국소 투여, 흡입에 의해서 또는 지속 방출 또는 연장-방출 방식이다.

[0125] 본원에서의 제제는 또한 치료될 특정한 적응증에 필요하다면 하나 초과와 활성 화합물, 바람직하게는 서로에게 역효과를 일으키지 않는 보완적인 활성이 있는 것을 함유할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 조성물은 세포 독성제, 시토키인 또는 성장억제제를 포함할 수 있다. 이러한 분자는 의도된 목적에 유효한 양으로 조합되어 적합하게 존재한다.

- [0126] 활성 성분은 또한 예를 들어 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐에, 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로구체, 마이크로에멀전, 나노-입자 및 나노캡슐)에, 또는 매크로에멀전에 포획될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 18th edition, 상기 문헌]에 개시되어 있다.
- [0127] 지속-방출 제제를 제조할 수 있다. 지속-방출 제제의 적합한 예는 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하고, 이러한 매트릭스는 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다. 지속-방출 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드 (미국 특허 번호 3,773,919), L-글루탐산 및  $\gamma$  에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예컨대 루프론 데포(LUPRON DEPOT)<sup>TM</sup> (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 이루어진 주사가 가능한 마이크로구체), 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산을 포함한다. 지속 방출을 위한 제조합 단백질의 마이크로캡슐화는 인간 성장 호르몬 (rhGH), 인터페론- (rhIFN-), 인터류킨-2, 및 MN rpg 120으로 성공적으로 수행되었다. 문헌 [Johnson et al., Nat. Med. 2: 795-799 (1996); Yasuda et al., Biomed. Ther. 27: 1221-1223 (1993); Hora et al., Bio/Technology 8: 755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems," in Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell and Newman, eds., (Plenum Press: New York, 1995), pp. 439-462]; WO 97/03692; WO 96/40072; WO 96/07399; 및 미국 특허 번호 5,654,010.
- [0128] 폴리락트산-코글리콜산 (PLGA) 중합체의 생체적합성 및 광범위한 생분해성 특성으로 인해 이를 사용하여 이러한 단백질들의 지속-방출 제제를 개발할 수 있다. PLGA의 분해 생성물인 락트산 및 글리콜산은 인체 내에서 신속하게 소거될 수 있다. 또한, 이러한 중합체의 분해성은 그의 분자량 및 조성에 따라 수개월 내지 수년까지 조정될 수 있다. 문헌 [Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer", in Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (Marcel Dekker; New York, 1990), M. Chasin and R. Langer (Eds.) pp. 1-41].
- [0129] 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산과 같은 중합체는 100일을 초과하여 분자를 방출할 수 있는 반면, 특정 히드로겔은 단백질을 더 짧은 기간 동안 방출한다. 캡슐화된 항체가 신체 내에서 장기간 동안 유지되는 경우, 37°C에서 수분에 노출된 결과로 항체가 변성되거나 응집되어, 생물학적 활성의 손실 및 면역원성의 가능한 변화가 초래될 수 있다. 수반된 메카니즘에 따라 안정화를 위한 합리적인 전략이 고안될 수 있다. 예를 들어, 응집 메카니즘이 티오-디설파이드 교환을 통한 분자간 S-S 결합 형성인 것으로 밝혀진다면, 술폰히드릴 잔기를 변형시키는 것, 산성 용액으로부터 동결건조시키는 것, 수분 함량을 제어하는 것, 적절한 첨가제를 사용하는 것, 및 특정 중합체 매트릭스 조성물을 개발하는 것에 의해 안정화를 달성할 수 있다.
- [0130] 리포솜 또는 프로테노이드 조성물은 또한 본원에 개시된 단백질 또는 항체를 제제화하는데 사용될 수 있다. 미국 특허 번호 4,925,673 및 5,013,556을 참조한다.
- [0131] 본원에 기재된 단백질 및 항체의 안정성은 비독성 "수용성 다가 금속 염"의 사용을 통하여 증진될 수 있다. 예는  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{Sn}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{2+}$  및  $\text{Al}^{3+}$ 를 포함한다. 상기 다가 금속 양이온과 수용성 염을 형성할 수 있는 음이온의 예는 무기 산 및/또는 유기 산으로부터 형성된 것을 포함한다. 이러한 수용성 염은 물 (20°C) 중에서 적어도 약 20 mg/ml, 대안적으로 적어도 약 100 mg/ml, 대안적으로 적어도 약 200 mg/ml의 용해도를 갖는다.
- [0132] "수용성 다가 금속 염"을 형성하는데 사용될 수 있는 적합한 무기 산은 염산, 아세트산, 황산, 질산, 티오시안산 및 인산을 포함한다. 사용될 수 있는 적합한 유기 산은 지방족 카르복실산 및 방향족 산을 포함한다. 이러한 정의 내의 지방족 산은 포화 또는 불포화  $\text{C}_{2-9}$  카르복실산 (예를 들어, 지방족 모노-, 디- 및 트리-카르복실산)으로 정의될 수 있다. 예를 들어, 이러한 정의 내의 예시적인 모노카르복실산은 포화  $\text{C}_{2-9}$  모노카르복실산, 아세트산, 프로피온산, 부티르산, 발레르산, 카프로산, 에난트산, 카프릴산, 펠라르곤산 및 카프리콘산, 및 불포화  $\text{C}_{2-9}$  모노카르복실산, 아크릴산, 프로프릴올산, 메타크릴산, 크로톤산 및 이소크로톤산을 포함한다. 예시적인 디카르복실산은 포화  $\text{C}_{2-9}$  디카르복실산, 말론산, 숙신산, 글루타르산, 아디프산 및 피멜산을 포함하고, 불포화  $\text{C}_{2-9}$  디카르복실산은 말레산, 푸마르산, 시트라콘산 및 메사콘산을 포함한다. 예시적인 트리카르복실산

은 포화 C<sub>2-9</sub> 트리카르복실산, 트리카르발릴산 및 1,2,3-부탄트리카르복실산을 포함한다. 추가로, 이러한 정의의 카르복실산은 또한 1 또는 2개의 히드록실 기를 포함하여 히드록시 카르복실산을 형성할 수 있다. 예시적인 히드록시 카르복실산은 글리콜산, 락트산, 글리세르산, 타르트론산, 말산, 타르타르산 및 시트르산을 포함한다. 이러한 정의 내의 방향족 산은 벤조산 및 살리실산을 포함한다.

[0133] 본 발명의 캡슐화된 폴리펩티드를 안정화하는 것을 돕기 위해 사용될 수 있는, 통상적으로 이용되는 수용성 다가가 금속 염은 예를 들어 다음을 포함한다: (1) 할라이드 (예를 들어, 염화아연, 염화칼슘), 술페이트, 니트레이트, 포스페이트 및 티오시아네이트의 무기 산 금속 염; (2) 지방족 카르복실산 금속 염 (예를 들어, 칼슘 아세테이트, 아연 아세테이트, 칼슘 프로프리오네이트, 아연 글리콜레이트, 칼슘 락테이트, 아연 락테이트 및 아연 타르트레이트); 및 (3) 벤조에이트 (예를 들어, 아연 벤조에이트) 및 살리실레이트의 지방족 카르복실산 금속 염.

[0134] 질환의 예방 또는 치료를 위하여, 활성제의 적절한 투여량은 상기 정의한 바와 같은 치료될 질환의 유형, 질환의 중증도 및 경과, 상기 작용제가 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지의 여부, 선행 요법, 환자의 임상 병력 및 작용제에 대한 반응, 및 담당의의 판단에 의존할 것이다. 상기 작용제는 적합하게는 환자에게 1회 이상의 일련의 치료로서 투여된다.

[0135] 본 발명의 방법은 조합된 또는 추가의 치료 단계 또는 치료 제제의 추가의 성분으로서, 장애에 대한 공지된 치료 방법과 조합될 수 있다.

[0136] 본 발명의 제약 조성물의 투여량 및 바람직한 약물 농도는 고려되는 특정한 용도에 따라 달라질 수 있다. 적절한 투여량 및 투여 경로의 결정은 당업자의 기술 범위 내에 있다. 동물 실험은 인간 요법에 대한 유효 용량의 결정을 위한 신뢰할 수 있는 지침을 제공한다. 유효 용량에 대한 중간 스케일링은 문헌 [Mordenti, J. and Chappell, W. "The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics," In Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobi et al., Eds, Pergamon Press, New York 1989, pp. 42-46]에 제시된 원칙에 따라 수행될 수 있다.

[0137] 본원에 기재된 폴리펩티드 또는 항체의 생체내 투여가 이용되는 경우, 정상 투여량은 투여 경로에 따라서 하루에 포유동물 체중을 기준으로 약 10 ng/kg 내지 약 100 mg/kg 또는 그 초과, 바람직하게는 약 1 mg/kg/일 내지 10 mg/kg/일로 다양할 수 있다. 특정한 투여량 및 전달 방법에 관한 지침은 문헌에 제공되어 있고; 예를 들어, 미국 특허 번호 4,657,760; 5,206,344; 또는 5,225,212를 참조한다. 상이한 제제가 상이한 치료법 및 상이한 장애에 효과적일 수 있으며, 특정 기관 또는 조직을 치료하기 위한 투여가 다른 기관 또는 조직에 대한 것과 상이한 방식으로의 전달을 필요로 할 수 있다는 것은 본 발명의 범위 내에 있다. 또한, 투여량은 1회 이상의 별도의 투여에 의해서, 또는 연속 주입에 의해 투여될 수 있다. 수일 이상에 걸친 반복 투여의 경우, 상태에 따라 바람직한 질환 증상이 억제될 때까지 치료를 지속한다. 그러나, 다른 투여 요법이 유용할 수 있다. 이러한 요법의 진행은 통상적인 기술 및 감정에 의해 용이하게 모니터링된다.

[0138] 재구성된 제제를 포함하나 이로 제한되지 않는 본 발명의 제제는 단백질로의 치료를 필요로 하는 포유동물, 바람직하게는 인간에게, 공지된 방법에 따라서, 예컨대 볼러스와 같은 정맥내 투여, 또는 일정 기간에 걸친 연속 주입에 의해서, 근육내, 복강내, 뇌척수액내, 피하, 관절내, 활액막내, 경막내, 경구, 국소 또는 흡입 경로에 의해서 투여된다.

[0139] 바람직한 실시양태에서, 제제는 포유동물에게 피하 (즉, 피부 아래) 투여에 의해 투여된다. 이러한 목적을 위하여, 제제는 시린지를 이용하여 주사될 수 있다. 그러나, 제제를 투여하기 위한 다른 장치, 예컨대 주사 장치 (예를 들어, 인젝트-이지(Inject-ease)<sup>TM</sup> 및 젠젝트(Genject)<sup>TM</sup> 장치); 주사기 펜 (예컨대, 젠펜(GenPen)<sup>TM</sup>); 자동-주사기 장치, 바늘없는 장치 (예를 들어, 메디젝터(MediJector)<sup>TM</sup> 및 바이오젝터(BioJector)<sup>TM</sup>); 및 피하 패치 전달 시스템을 이용할 수 있다.

[0140] 구체적 실시양태에서, 본 발명은 단일 용량-투여 단위를 위한 키트에 관한 것이다. 이러한 키트는 단일 또는 다중-챔버의 예비-충진된 시린지를 비롯한, 치료 단백질 또는 항체의 수성 제제의 용기를 포함한다. 예시적인 예비-충진된 시린지는 베테 게엠베하 (Vetter GmbH, 독일 라벤스부르크)로부터 입수가 가능하다.

[0141] 단백질의 적절한 투여량 ("치료 유효량")은 예를 들어 치료할 상태, 상태의 중증도 및 경과, 단백질이 치료 또는 예방 목적으로 투여되는지의 여부, 선행 요법, 환자의 임상 병력 및 단백질에 대한 반응, 사용되는 단백질의 유형, 및 담당의의 판단에 따라 달라질 것이다. 단백질은 적합하게는 환자에게 1회 또는 일련의 치료로 투여되

고, 환자에게 진단 이후 임의의 시점에 투여될 수 있다. 단백질은 단독 치료법으로서 투여하거나 또는 해당 상태를 치료하는 데에 유용한 다른 약물 또는 요법과 함께 투여할 수 있다.

- [0142] 선택 단백질이 항체인 경우, 예를 들어 1회 이상의 개별 투여에 의한 약 0.1-20 mg/kg가 환자에 투여하기 위한 초기 후보 투여량이다. 그러나, 다른 투여 요법이 유용할 수 있다. 이 요법의 진행은 통상의 기술에 의해 용이하게 모니터링된다.
- [0143] 본 발명의 다른 실시양태에서, 상기 제제를 함유하는 제조품이 제공되고, 바람직하게는 이는 그의 사용 지침서를 제공한다. 제조품은 용기를 포함한다. 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알 (예를 들어, 이중 챔버 바이알), 시린지 (예를 들어, 단일 또는 이중 챔버 시린지) 및 시험 튜브를 포함한다. 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 물질로 형성될 수 있다. 제제를 수용하는 용기 상의 또는 용기에 부착된 라벨은 재구성 및/또는 사용을 위한 지침을 나타낼 수 있다. 라벨은 추가로 제제가 피하 투여에 유용하거나 피하 투여를 의도함을 나타낼 수 있다. 제제를 수용하는 용기는 다중-사용 바이알일 수 있고, 이에 따라 재구성된 제제를 반복해서 투여할 수 있다 (예를 들어, 2-6회 투여). 제조품은 추가로 적합한 희석제 (예를 들어, BWF1)를 포함하는 제2 용기를 포함할 수 있다. 희석제 및 동결건조된 제제를 혼합하는 경우, 재구성된 제제 중의 최종 단백질 농도는 일반적으로 적어도 50 mg/ml일 것이다. 제조품은 추가로 상업적 및 사용자 입장에서 바람직한 다른 물질, 예를 들어 다른 완충제, 희석제, 필터, 마늘, 시린지, 및 사용 지침서가 있는 포장 삽입물을 포함할 수 있다.
- [0144] 하기 실시예를 참조하여 보다 충분하게 본 발명을 이해할 수 있을 것이다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 본 명세서 전체에서 모든 인용문은 본원에 명백하게 참고로 포함된다.
- [0145] 실시예 1 - 단백질 응집에 대한 지방산, 폴리소르베이트 및 POE-소르비탄의 효과의 조사
- [0146] 본 실시예는 폴리소르베이트, 지방산 및 POE 소르비탄이 수용액 중에서의 단백질 응집에 어떻게 영향을 미치는지 설명한다.
- [0147] 용액 중에서의 항-IL13 모노클로날 항체의 교반-유도된 응집에 대한 POE 소르비탄의 보호 작용을 교반-유도된 단백질 응집 분석을 이용하여 평가하였다. 구체적으로, 본 연구에서, 1 mg/ml의 항-IL13 모노클로날 항체를 함유하는 완충 용액 (20 mM His-OAc, pH 5.7)을 하기 잠재적인 안정화 첨가제와 조합하여 제조하였다:
- [0148] (i) 첨가제 없음, 대조군;
- [0149] (ii) 라우르산 (29 ppm);
- [0150] (iii) 라우르산 (29 ppm) 및 폴리소르베이트 20 (24 ppm);
- [0151] (iv) POE 소르비탄 20 "(a+b+c+d = 20)" (150 ppm);
- [0152] (v) POE 소르비탄 20 "(a+b+c+d = 20)" (150 ppm) 및 폴리소르베이트 20 (24 ppm);
- [0153] (vi) POE 소르비탄 20 "(a+b+c+d = 20)" (150 ppm) 및 라우르산 (29 ppm);
- [0154] (vii) POE 소르비탄 20 "(a+b+c+d = 20)" (150 ppm), 라우르산 (29 ppm) 및 폴리소르베이트 20 (24 ppm);
- [0155] (viii) 폴리소르베이트 20 (24 ppm).
- [0156] 9 ml의 모노클로날 항체-함유 제제를 별도의 15 ml 포르마 비트리움(Forma Vitrium) 바이알에 넣고 (3별), 바이알을 밀봉하고, 이어서 실온에서 0시간, 4시간 또는 24시간 동안 벤치탑 진탕기 (70 rpm) 상에서 교반하였다. 완료 시에, 각각의 바이알의 내용물에 대해 바로 UV 분광측정법 분석 (340-360 nm)을 수행하여 용액의 탁도를 측정하였다. 탁도는 25°C에서 1 cm 경로 길이 셀 및 애질런트(Agilent) 8453 UV 분광측정계를 이용하여 측정하였다. 340, 345, 350, 355 및 360 nm에서의 흡광도 값의 평균을 구하였으며, 여기서 단백질 제제 발색단 중 어느 것도 흡수하지 않았고, 불용성 단백질 응집체의 산란 효과를 결정할 수 있었다. 상기 과정에서 평균 흡광도 값은 샘플의 탁도를 나타낸다. 이와 관련하여, 단백질-함유 용액의 탁도가 용액 중에서의 단백질 응집의 양과 직접적이고 정량적으로 관련이 있다는 것이 당업계에 주지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Dani et al., J. Pharm. Sci., 96(6):1504-1517 (2007)] 참조). 이들 분석으로부터의 결과는 도 1에 제시하였다.
- [0157] 도 1에 제시된 데이터는 특정 폴리소르베이트 분해물 (지방산, 라우르산 포함)이 수용액 중에서의 단백질의 안정성에 대해 역효과를 갖고, 교반 시에 단백질 응집을 유발한다는 것을 입증하였다. 대조적으로, 항체-함유 수용액에 POE 소르비탄을 첨가하면 교반 시에 용액 중에서의 단백질 응집체의 형성을 방지하였다. 따라서, 이들



데이터는 POE 소르비탄이 교반 시에 단백질의 응집을 방지하는 효과를 갖고, 이에 따라 용액 중에서의 치료 단백질의 안정성을 증진시킨다는 것을 입증하였다.

[0158] 실시예 2 - 단백질 응집에 대한 POE-소르비탄 및 PEG의 효과의 조사

[0159] 본 실시예는 단백질의 응집을 방지하거나 또는 감소시키기 위한 안정화제로서의 POE 소르비탄 및 PEG의 용도를 설명한다.

[0160] 용액 중에서의 2개의 모노클로날 항체, 항-IL13 및 항-IgE의 교반-유도된 응집에 대한 다양한 POE 소르비탄 및 PEG의 보호 작용을 교반-유도된 단백질 응집 분석을 이용하여 평가하였다.

[0161] 본 연구 세트에서, 1 mg/ml의 항-IL13 항체 (20 mM His-OAc, pH 5.7) 또는 항-IgE 항체 (His-HisCl, pH 6.0)를 함유하는 완충 용액을 하기 첨가제로 제조하였다:

[0162] (i) 첨가제 없음, 대조군;

[0163] (ii) 200 ppm 농도의 POE 소르비탄 20 "(a+b+c+d = 20)";

[0164] (iii) 1000 ppm 농도의 POE 소르비탄 20 "(a+b+c+d = 20)";

[0165] (iv) 5000 ppm 농도의 POE 소르비탄 20 "(a+b+c+d = 20)";

[0166] (v) 200 ppm 농도의 PEG 1000;

[0167] (vi) 1000 ppm 농도의 PEG 1000;

[0168] (vii) 5000 ppm 농도의 PEG 1000;

[0169] (viii) 200 ppm 농도의 PEG 6000;

[0170] (ix) 1000 ppm 농도의 PEG 6000;

[0171] (x) 5000 ppm 농도의 PEG 6000.

[0172] 9 ml의 각각의 항체-함유 제제를 별도의 15 ml 포르마 비트리움 바이알에 넣고 (3별), 바이알을 밀봉하고, 이어서 실온에서 0시간, 4시간 또는 24시간 동안 벤치탑 진탕기 (70 rpm) 상에서 교반하였다. 완료 시에, 각각의 바이알의 내용물에 대해 즉시 하기 분석을 각각 수행하였다: (a) 여과 후에 단백질 농도를 측정하기 위한 UV 분광측정법 분석, (b) 용액의 탁도를 측정하기 위한 UV 분광측정법 분석 (340-360 nm), 및 (c) 단백질 입자 크기 및 분포의 결정을 위한 차광.

[0173] A. 단백질 농도를 측정하기 위한 UV 분광측정법

[0174] 상기 기재된 바와 같이 진탕을 수행한 직후에, 단백질-함유 용액을 여과하여 단백질 응집체를 제거하고, 이어서 여과물 중의 단백질 농도를 UV 분광측정법에 의해 결정하였다. 단백질 농도 데이터는 25°C에서 0.5 또는 1 cm 경로 길이 셀 및 애질런트 8453 UV 분광측정계를 이용하여 획득하였다. 278 nm에서 1.45 및 1.60 mL mg<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>의 흡광 계수 E를 사용하여 0.2 μm 시린지 필터를 통한 여과 후에 항체 농도를 결정하였다. 320 nm에서의 흡광도 값을 278 nm에서의 흡광도 값에서 감하여 산란 효과를 설명하였다. 이와 관련하여, 단백질-함유 용액 중의 단백질의 농도는 UV 흡광도 분석을 이용하여 정량적으로 결정할 수 있다는 것이 당업계에 주지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Liu et al., J. Pharm. Sci., 94(9):1928-1940 (2005)] 참조). 항-IL13 항체 및 항-IgE 항체에 대해 수득한 데이터의 결과는 각각 도 2 및 3에 제시하였다.

[0175] 도 2 및 3에서의 데이터는 처리되지 않은 대조군 항체 제제의 교반이 여과 시에 측정가능하고 유의한 응집 및 단백질 손실을 유도한다는 것을 입증하였다. 대조적으로, 시험된 모든 다양한 농도의 POE 소르비탄 또는 PEG의 첨가는 교반-유도된 단백질 응집체의 형성을 방지하였고, 이에 따라 교반 시에 단백질 손실을 방지하였다. 이들 데이터는 POE 소르비탄 및 폴리에틸렌 글리콜이 둘 다 수용액 중에서의 단백질 응집체의 형성을 방지하거나 또는 감소시킴으로써 수용액 중에서 단백질의 유효한 안정화제로 기능한다는 것을 입증하였다.

[0176] B. 용액 탁도를 측정하기 위한 UV 분광측정법

[0177] 상기 기재된 바와 같이, 340-360 nm에서의 UV 분광측정법은 용액 중에 존재하는 단백질 응집체의 양을 정량적으로 측정하기에 유효한 수단을 제공하고, 여기서 탁도는 존재하는 응집된 단백질의 양과 직접적으로 관련이

있다. 항-IL13 항체 및 항-IgE 항체에 대한 탁도 분석으로부터 수득한 결과를 각각 도 4 및 5에 제시하였다.

[0178] 도 4 및 5에서의 데이터는 처리되지 않은 대조군 항체 제제의 교반이 그 안에서 측정가능하고 유의한 항체의 응집을 유도한다는 것을 입증하였다. 대조적으로, 시험된 모든 다양한 농도의 POE 소르비탄 또는 PEG의 첨가는 교반-유도된 단백질 응집체의 형성을 방지하고/거나 감소시켰다. 이들 데이터는 POE 소르비탄 및 폴리에틸렌 글리콜이 둘 다 수용액 중에서의 단백질 응집체의 형성을 방지하거나 또는 감소시킴으로써 수용액 중에서 단백질의 유효한 안정화제로 기능한다는 것을 입증하였다.

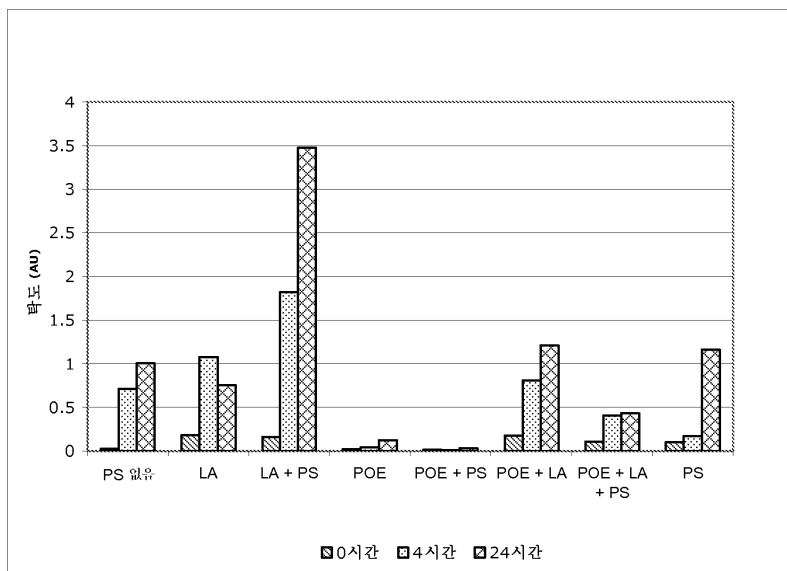
[0179] C. 입자 크기 분포의 결정

[0180] 또한, 상기 기재된 항체-함유 수용액을 분석하여 그 안에 함유된 단백질의 입자 크기 분포를 결정하였다. 구체적으로, 2 내지 50  $\mu\text{m}$ 의 불용성 입자의 수 및 크기를 실온에서 HIAC/Royco 3000A 액체 시린지 샘플러, HRLD-150 센서에 부착된 HIAC/Royco 9703 액체 입자 카운터를 이용하여 측정하고, 퍼시픽스펙(PacificSpec) 버전 2.0 소프트웨어를 이용하여 분석하였다. 검출의 상한은 약 18000개 입자/ml이고, 이 역치를 초과하는 샘플은 측정에 적절하게 희석하였다. 각각의 샘플은 주사 당 1.0 mL의 부피에서 4회 측정하였다. 제1 주사는 제외하고, 마지막 3회 주사로부터 평균 값을 구하였다. 각각의 샘플 분석 사이에, 장치의 2  $\mu\text{m}$  입자 카운트가 < 10 인 지점에서 시스템을 주사용수로 세정하였다. 비가시적 입자  $\geq 2, 5, 10, 15, 25, 35$  및 50  $\mu\text{m}$ 는 누적 카운트/ml로 제시된다.

[0181] 이들 분석으로부터 수득한 결과는 도 6-11에 제시하였다. 도 6-11에서의 데이터는 처리되지 않은 대조군 항체 제제의 교반이 그 안에서 측정가능하고 유의한 항체의 응집을 유도한다는 것을 입증하였다. 대조적으로, 시험된 모든 다양한 농도의 POE 소르비탄 또는 PEG의 첨가는 교반-유도된 단백질 응집체의 형성을 방지하고/거나 감소시켰다. 이들 데이터는 POE 소르비탄 및 폴리에틸렌 글리콜이 둘 다 수용액 중에서의 단백질 응집체의 형성을 방지하거나 또는 감소시킴으로써 수용액 중에서 단백질의 유효한 안정화제로 기능한다는 것을 입증하였다.

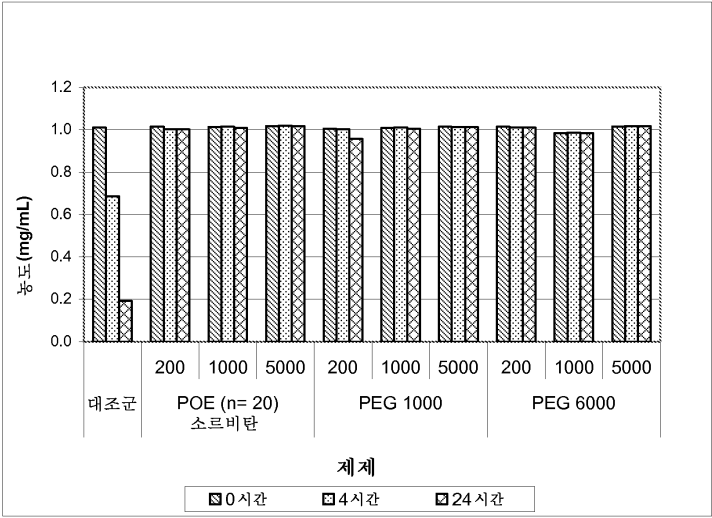
## 도면

### 도면1

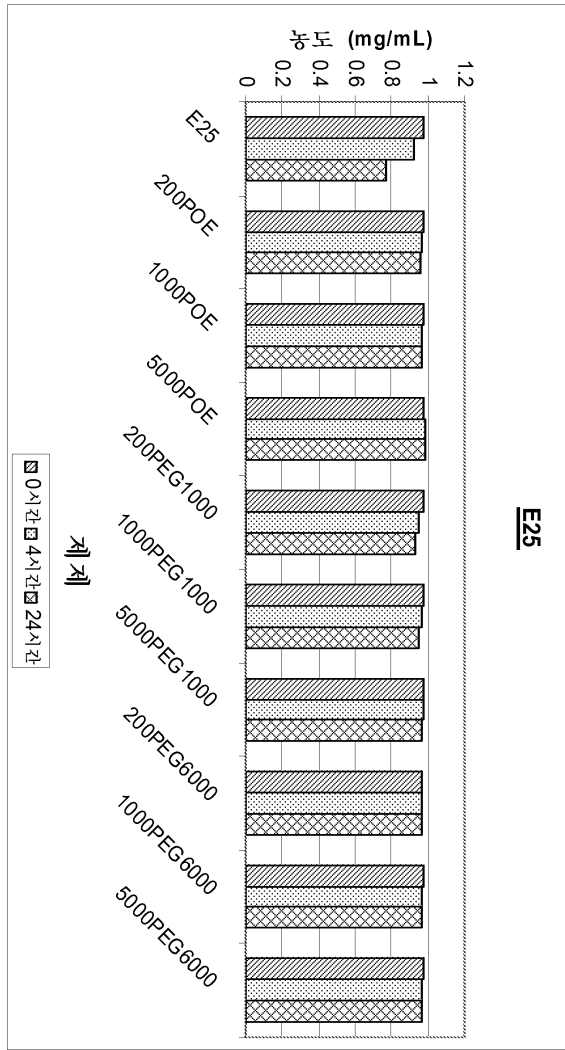




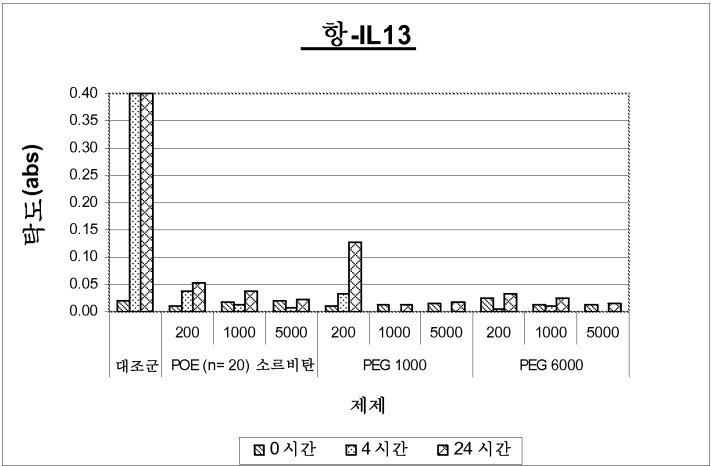
도면2



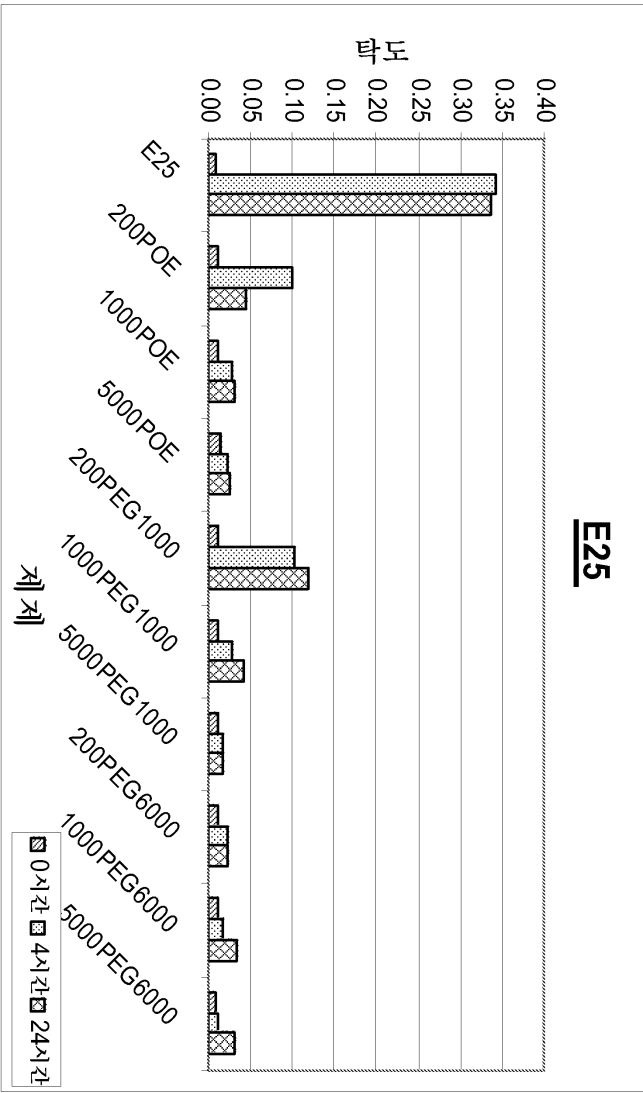
도면3



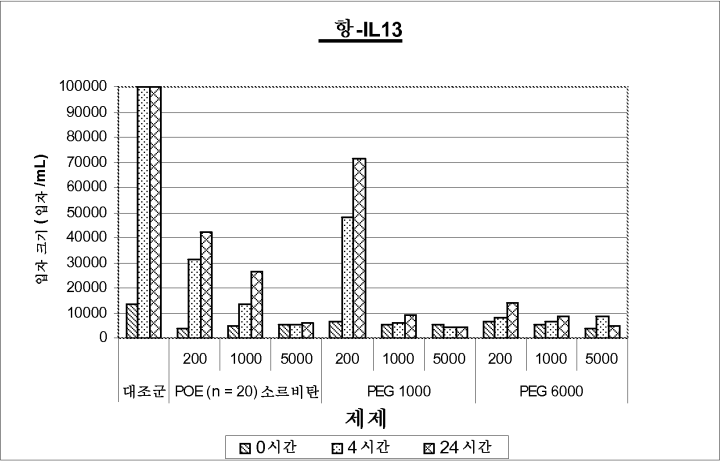
도면4



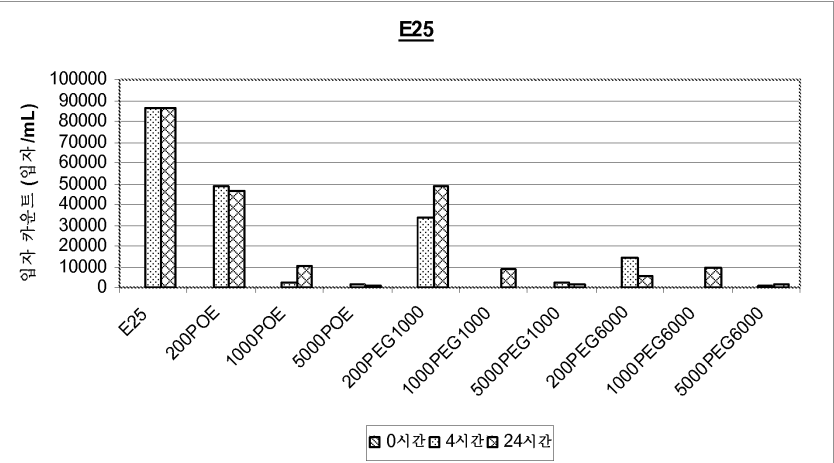
도면5



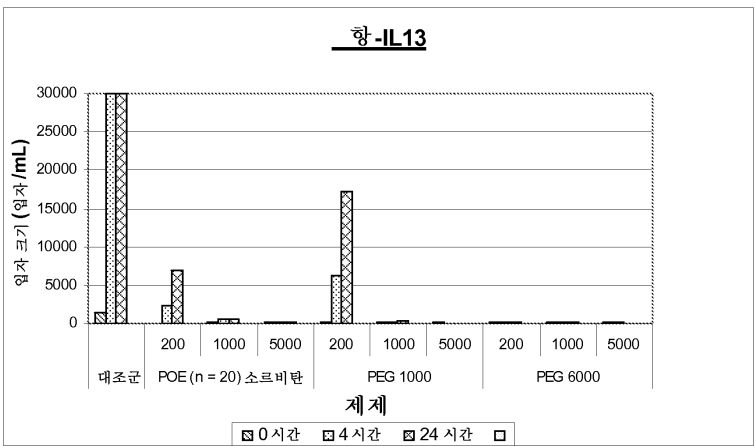
도면6



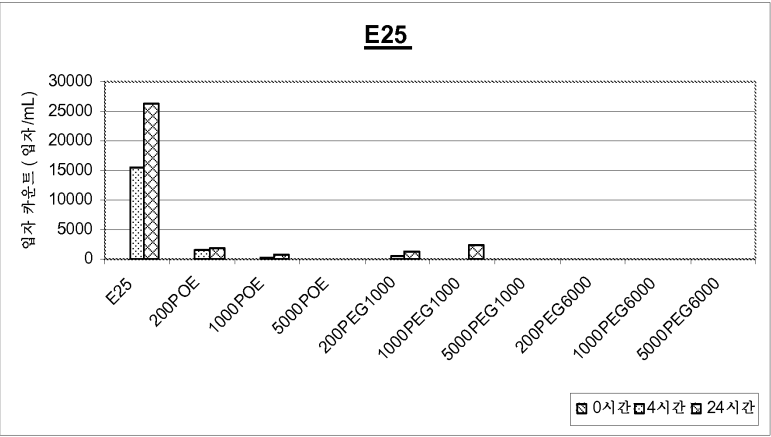
도면7



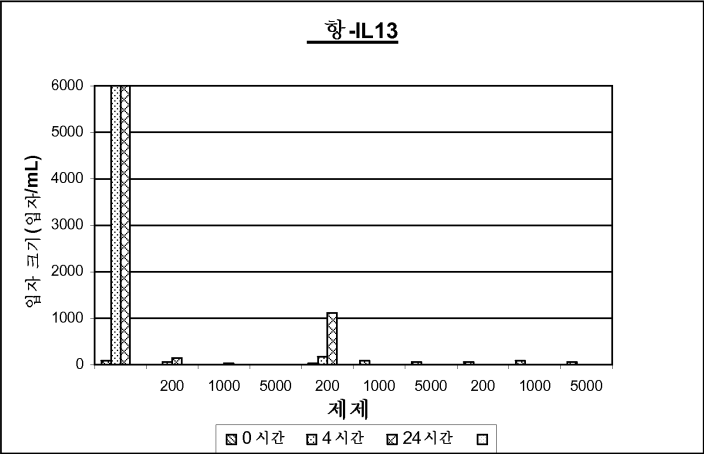
도면8



도면9



도면10



도면11

