



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년07월09일
(11) 등록번호 10-1875155
(24) 등록일자 2018년06월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/08 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01) A61K 47/14 (2017.01)
A61K 47/26 (2017.01)
(21) 출원번호 10-2013-7031205
(22) 출원일자(국제) 2012년05월02일
심사청구일자 2017년05월02일
(85) 번역문제출일자 2013년11월25일
(65) 공개번호 10-2014-0145952
(43) 공개일자 2014년12월24일
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/036069
(87) 국제공개번호 WO 2012/151247
국제공개일자 2012년11월08일
(30) 우선권주장
61/481,522 2011년05월02일 미국(US)
61/544,054 2011년10월06일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020100038092 A*
(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 30 항

(73) 특허권자
밀레니엄 파머슈티컬스 인코퍼레이티드
미합중국 메사추세츠 02139 캠브리지 랜즈다운 스트리트 40
(72) 발명자
덜루지오, 윌로우
미국 01886 매사추세츠 웨스트포드 페른우드 드라이브 7
구옌, 푸옹 엠.
미국 02141 매사추세츠 캠브리지 고어 스트리트 126 #4
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 남앤드남

심사관 : 최원철

(54) 발명의 명칭 항-α4β7 항체에 대한 제형

(57) 요약

항-α4β7 항체, 항산화제 또는 킬레이터 및 적어도 한 종의 유리 아미노산의 혼합물을 포함하는 항체 제형이 기재된다. 개시된 제형은 개선된 안정성, 감소된 응집물 형성 또는 둘 다를 가질 수 있다. 본 발명은 수행이 용이하고, 생체내에서 항-α4β7 항체의 치료적 유효량을 야기하는 이들 항체 제형의 안전한 투약 요법을 추가로 제공한다.

(72) 발명자

바르가, 사나드 엠.

미국 02140 매사추세츠 캠브리지 잭슨 스트리트 95

팔라니아판, 바이티아나단

미국 01810 매사추세츠 앤도버 스프루스 씨클 7

브라운, 제이슨

미국 01803 매사추세츠 벌링턴 셉템버 레인 10

폭스, 얼빙 에이치.

미국 02482 매사추세츠 웰즐리 리빙스턴 로드 111

솔츠, 캐서린

미국 01801 매사추세츠 워번 내슈아 스트리트 1

젠킨스, 헬렌

영국 씨비248알비 커트넘 캠브리지셔 룩스 스트리트 32

로사리오, 마리아

미국 06355 코네티컷 미스틱 스쿨 스트리트 6 아파
트먼트 19

(56) 선행기술조사문헌

KR1020080079702 A

KR1020090104017 A

KR1020100098697 A

KR1020100119541 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

염증성 장질환을 치료하기 위한 안정적인 액체 약제학적 제형으로서, 상기 제형이 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체, 시트레이트 및 적어도 한 종의 유리 아미노산을 포함하고, 상기 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 서열번호 11을 포함하는 상보성 결정 영역1 (CDR1), 서열번호 12를 포함하는 CDR2 및 서열번호 13을 포함하는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고, 서열번호 8을 포함하는 CDR1, 서열번호 9를 포함하는 CDR2 및 서열번호 10을 포함하는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, 안정적인 액체 약제학적 제형.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 대 시트레이트의 몰 비는 1:4 내지 1:100인, 안정적인 액체 약제학적 제형.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 유리 아미노산은 히스티딘, 알라닌, 알기닌, 글라이신, 글루탐산 및 이들의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는, 안정적인 액체 약제학적 제형.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 계면활성제를 더 포함하는, 안정적인 액체 약제학적 제형.

청구항 5

제4항에 있어서, 시트레이트 대 상기 계면활성제의 몰 비는 3:1 내지 156:1인, 안정적인 액체 약제학적 제형.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 계면활성제는 폴리솔베이트 20, 폴리솔베이트 80, 폴록사머 또는 이들의 조합물인, 안정적인 액체 약제학적 제형.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 계면활성제는 폴리솔베이트 80이고, 폴리솔베이트 80의 농도는 0.01%(w/v) 내지 0.5%(w/v)인, 안정적인 액체 약제학적 제형.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 시트레이트의 농도는 5 mM 내지 50 mM인, 안정적인 액체 약제학적 제형.

청구항 9

염증성 장질환을 치료하기 위한 안정적인 액체 약제학적 제형으로서, 상기 제형이 적어도 60 mg/ml 내지 190 mg/ml의 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체, 항산화제 또는 킬레이터(chelator) 및 적어도 한 종의 유리 아미노산을 포함하고, 상기 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 서열번호 11을 포함하는 상보성 결정 영역1 (CDR1), 서열번호 12를 포함하는 CDR2 및 서열번호 13을 포함하는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고, 서열번호 8을 포함하는 CDR1, 서열번호 9를 포함하는 CDR2 및 서열번호 10을 포함하는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, 안정적인 액체 약제학적 제형.

청구항 10

염증성 장질환을 치료하기 위한 안정적인 액체 약제학적 제형으로서, 상기 제형이 적어도 60 mg/ml 내지 190 mg/ml의 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체, 항산화제 또는 킬레이터(chelator) 및 적어도 한 종의 유리 아미노산을 포함하고, 상기 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 서열번호 11을 포함하는 상보성 결정 영역1 (CDR1), 서열번호 12를 포함하는 CDR2 및 서열번호 13을 포함하는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고, 서열번호 8을 포함하는 CDR1, 서열번호 9를

포함하는 CDR2 및 서열번호 10을 포함하는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 제형은 6.1 내지 7.0의 pH를 갖는, 안정적인 액체 약제학적 제형.

청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서, 150 mg/ml 내지 180 mg/ml의 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 포함하는, 안정적인 액체 약제학적 제형.

청구항 12

제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 항산화제 또는 킬레이터는 시트레이트 또는 EDTA인, 안정적인 액체 약제학적 제형.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 항산화제 또는 킬레이터는 시트레이트인, 안정적인 액체 약제학적 제형.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 시트레이트의 농도는 5 mM 내지 50 mM인, 안정적인 액체 약제학적 제형.

청구항 15

제9항 또는 제10항에 있어서, 계면활성제를 더 포함하는, 안정적인 액체 약제학적 제형.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 계면활성제:항체의 몰 비는 0.7:1 내지 2.0:1인, 안정적인 액체 약제학적 제형.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 항산화제 또는 킬레이터 대 계면활성제의 몰 비는 3:1 내지 156:1인, 안정적인 액체 약제학적 제형.

청구항 18

제15항에 있어서, 상기 계면활성제는 폴리솔베이트 20, 폴리솔베이트 80, 폴록사머 또는 이들의 조합물인, 안정적인 액체 약제학적 제형.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 계면활성제는 폴리솔베이트 80이고, 폴리솔베이트 80의 농도는 0.01%(w/v) 내지 0.5%(w/v)인, 안정적인 액체 약제학적 제형.

청구항 20

제9항 또는 제10항에 있어서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체, 시트레이트, 히스티딘, 알기닌 및 폴리솔베이트 80을 포함하고, 상기 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 서열번호 11을 포함하는 상보성 결정 영역1 (CDR1), 서열번호 12를 포함하는 CDR2 및 서열번호 13을 포함하는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고, 서열번호 8을 포함하는 CDR1, 서열번호 9를 포함하는 CDR2 및 서열번호 10을 포함하는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, 안정적인 액체 약제학적 제형.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 농도는 적어도 140 mg/ml인, 안정적인 액체 약제학적 제형.

청구항 22

제20항에 있어서, 히스티딘의 농도는 10 mM 내지 75 mM인, 안정적인 액체 약제학적 제형.

청구항 23

제20항에 있어서, 알기닌의 농도는 50 mM 내지 150 mM인, 안정적인 액체 약제학적 제형.

청구항 24

제20항에 있어서, 시트레이트의 농도는 5 mM 내지 50 mM인, 안정적인 액체 약제학적 제형.

청구항 25

제1항, 제2항, 제9항 및 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 서열번호 2의 아미노산 20 내지 140을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 4의 아미노산 20 내지 131 또는 서열번호 5의 아미노산 21 내지 132를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 안정적인 액체 약제학적 제형.

청구항 26

제1항, 제2항, 제9항 및 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 베돌리주맙(vedolizumab)인, 안정적인 액체 약제학적 제형.

청구항 27

제1항, 제2항, 제9항 및 제10항 중 어느 한 항의 안정적인 액체 약제학적 제형 및 이의 사용을 위한 설명서를 포함하는 염증성 장질환을 치료하기 위한 사전-충전된(pre-filled) 주사기.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 안정적인 액체 약제학적 제형은 108 mg의 항체를 포함하는, 사전-충전된 주사기.

청구항 29

제1항, 제2항, 제9항 및 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 염증성 장질환은 크론병 또는 궤양성 대장염인, 안정적인 액체 약제학적 제형.

청구항 30

제27항에 있어서, 상기 염증성 장질환은 크론병 또는 궤양성 대장염인, 사전-충전된 주사기.

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

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련출원

[0002] 본 출원은 2011년 10월 6일 출원된 미국 가특허 출원 제61/544,054호 및 2011년 5월 2일 출원된 미국 가특허 출원 제61/481,522호에 대해 우선권을 주장한다. 앞서 언급한 출원의 전문은 본 명세서에 참조로서 포함된다.

[0003] 서열목록

[0004] 본 출원은 EFS-웹(EFS-Web)을 통해 ASCII 형식으로 제출된 서열목록을 포함하며, 이는 본 명세서에 그것의 전문이 참조로서 포함된다. 2012년 4월 30일에 작성된 상기 ASCII 사본은 92596603.txt로 칭해지며, 용량은 16,986 바이트이다.

배경 기술

[0005] 생명공학의 진보는 재조합 DNA 기법을 사용하여 약제학적 적용을 위한 다양한 단백질을 생성하는 것을 가능하게 하였다. 단백질은 전통적인 유기 및 무기 약물보다 더 크고 더 복잡하기 때문에(즉, 3-차원 구조를 복잡하게 하는 것에 추가로 다양한 작용기를 소유함), 이러한 단백질의 제형은 특별한 문제를 가진다. 생물학적 활성을 보유하는 단백질에 대해, 제형은 적어도 단백질 아미노산의 코어 서열의 입체구조적 완전함을 보존하여야 하는 한편, 동시에 단백질의 다양한 작용기가 분해되는 것으로부터 보호하여야 한다. 단백질은 안정성이 결여될 수 있

고, 단클론성 및 다클론성 항체는 특히 상대적으로 불안정할 수 있다(예를 들어, 문헌[Wang, et al., *J. Pharm Sci.* 96:1-26 (2007)] 참조). 다수의 제형 선택사항이 이용가능하며, 하나의 접근 또는 시스템이 모든 단백질에 대해 적합하지는 않다. 고려되는 몇몇 인자는 보고되었다(예를 들어, 문헌[Wang et al.]).

[0006] 수많은 특징이 단백질의 안정성에 영향을 미칠 수 있다. 사실, 정제된 항체의 경우에서조차, 항체 구조는 불균질할 수 있는데, 이는 이러한 시스템의 제형을 더 복잡하게 만든다. 게다가, 항체 제형에 포함된 부형제는 임의의 잠재적인 면역 반응을 바람직하게는 최소화한다.

[0007] 항체의 경우에, 입체구조적 완전함의 보존은 훨씬 더 중요하다. 단백질에 대한 분해 경로는 화학적 불안정성(즉, 새로운 화학적 독립체를 야기하는 결합 형성 또는 절단에 의해 단백질의 변형을 수반하는 어떤 과정) 또는 생리적 불안정성(즉, 더 고차 구조의 단백질에서의 변화)을 수반할 수 있다. 화학적 불안정성은, 예를 들어 탈아미드화, 이성질체화, 가수분해, 산화, 단편화, 글라이칸 베타 제거 또는 이황화물 교환에서 분명해진다. 생리적 불안정성은, 예를 들어 변성, 응집, 침전 또는 흡착으로부터 초래될 수 있다. 4가지의 가장 흔한 단백질 분해 경로는 단백질 단편화, 응집, 탈아미드화 및 산화이다. 치료적 단백질의 화학적 또는 생리적 불안정성의 결과는 효과적인 투여 용량의 저하, 예를 들어 자극 또는 면역학적 반응성에 기인하는 치료의 감소된 안전성 및 짧은 보관수명에 기인하는 더 빈번한 제조를 포함한다.

[0008] 몇몇 간행물은 염증성 장질환을 치료하는 일반적으로 다양한 방법을 개시하였으며, 염증성 장질환을 치료하도록 설계된 작용제(agent)의 투여를 위한 투약 계획을 제공하였다. 예를 들어, WO 96/24673은 MAdCAM을 발현시키는 세포에 백혈구 결합의 결과로서 위장관에 대한 백혈구 보충물과 관련된 질병의 치료 및 점막 혈관 어드레신(addressin)을 개시한다. 미국특허 제2005/0095238호는 점막 조직의 백혈구 침윤과 관련된 질병의 치료 방법 및 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린에 대해 결합 특이성을 갖는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 또는 항원 결합 단편의 유효량의 인간에 투여를 기재한다. 미국특허 제2005/0095238호는 다양한 용량(예를 들어, kg 체중 당 0.15, 약 0.5, 약 1.0, 약 1.5 또는 약 2.0mg 면역글로불린 또는 단편) 및 투약 사이에 다양한 간격(7, 14, 21, 28 또는 30일)을 추가로 기재한다. 그러나, 앞서 언급한 특허 및 간행물은 본 명세서에 기재되고 청구된 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 구체적 제형 또는 구체적 용량 및 투약 요법(dose regimen)을 개시하지 않는다. 중요하게는, 앞서 언급한 특허는 본 명세서에 기재되고 청구된 치료 방법(임상시험 데이터에 의해 뒷받침됨)을 제공하는 제형, 용량 및 투약 요법을 개시하지 않는다.

[0009] 본 발명의 항체 제형은 MAdCAM을 발현시키는 세포에 백혈구 결합을 억제하는데 유용할 수 있고, 따라서 환자에서 염증성 장질환의 치료에 도움을 준다. 따라서, 이들 화합물의 적합한 투약량 및 투약 스케줄을 발견하고, 안정하고 편리한 형태로 장기간의 시간에 걸쳐 꾸준하고, 치료적으로 효과적인 혈액 수준을 생기게 하는 제형, 바람직하게는 피하 제형을 개발할 긴급한 필요가 있다.

발명의 내용

[0010] 본 발명은 항산화제 또는 킬레이터(chelator) 및 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형을 제형화하기 위한 유용한 부형제로서 적어도 한 종의 아미노산의 식별에 관한 것인데, 항체 제형의 불안정성은 탈아미드화, 산화, 이성질체화 및/또는 응집에 민감하게 한다. 제형은 안정성을 개선하며, 응집물 형성을 감소시키고, 그것에서 항체의 분해를 지연시킨다.

[0011] 따라서, 제1 양태에서, 본 발명은 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체, 항산화제 또는 킬레이터 및 적어도 한 종의 유리 아미노산의 혼합물을 포함하는 안정적인 액체 약제학적 제형에 관한 것이다.

[0012] 일부 실시형태에서, 안정적인 액체 약제학적 제형은 실온에서 12개월 후 약 1.0% 미만의 응집물 형성을 가진다. 안정적인 액체 약제학적 제형은 실온에서 12개월 후 약 0.2% 미만의 응집물 형성을 가질 수 있다.

[0013] 일부 실시형태에서, 항산화제 또는 킬레이터는 시트레이트이다. 일부 실시형태에서, 킬레이터는 EDTA이다.

[0014] 일부 실시형태에서, 제형의 유리 아미노산은 히스티딘, 알라닌, 알기닌, 글라이신, 글루탐산, 또는 이들의 임의의 조합이다. 제형은 유리 아미노산의 약 50mM 내지 약 175mM을 포함할 수 있다. 제형은 유리 아미노산의 약 100mM 내지 약 175mM을 포함할 수 있다. 유리 아미노산 대 항체 물 비의 비는 적어도 250:1일 수 있다.

[0015] 제형은 또한 계면활성제를 함유할 수 있다. 계면활성제는 폴리솔베이트 20, 폴리솔베이트 80, 폴록사머 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다.

[0016] 일부 실시형태에서, 항산화제 대 계면활성제의 물 비는 약 3:1 내지 약 156:1이다.

- [0017] 제형은 약 6.3 내지 약 7.0의 pH를 가질 수 있다. 제형의 pH는 약 6.5 내지 약 6.8일 수 있다. 제형은 약 6.1 내지 약 7.0 또는 약 6.2 내지 6.8의 pH를 가질 수 있다.
- [0018] 일부 실시형태에서, 안정적인 액체 약제학적 제형은 적어도 약 60 mg/ml 내지 약 160 mg/ml 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 함유한다. 제형은 적어도 약 160 mg/ml 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 함유할 수 있다. 제형은 약 150 내지 약 180 mg/ml 항체 또는 약 165 mg/ml 항체를 함유할 수 있다.
- [0019] 다른 양태에서, 본 발명은 적어도 약 60 mg/ml 내지 약 160 mg/ml 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체, 완충제 및 적어도 약 10mM 시트레이트를 포함하는 안정적인 액체 약제학적 제형에 관한 것이다. 완충제는 히스티딘 완충제일 수 있다.
- [0020] 다른 양태에서, 본 발명은 적어도 약 60 mg/ml 내지 약 180 mg/ml 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체, 완충제 및 적어도 약 5mM 시트레이트를 포함하는 안정적인 액체 약제학적 제형에 관한 것이다. 완충제는 히스티딘 완충제일 수 있다.
- [0021] 다른 양태에서, 본 발명은 적어도 약 160 mg/ml 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 및 적어도 약 10mM 시트레이트를 포함하는 안정적인 액체 약제학적 제형에 관한 것이다. 제형은 폴리솔베이트 80을 추가로 함유할 수 있다.
- [0022] 다른 양태에서, 본 발명은 약 160 mg/ml 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 및 적어도 약 5mM 시트레이트를 포함하는 안정적인 액체 약제학적 제형에 관한 것이다. 제형은 폴리솔베이트 80을 추가로 함유할 수 있다.
- [0023] 다른 양태에서, 본 발명은 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체, 시트레이트, 히스티딘, 알기닌 및 폴리솔베이트 80의 혼합물을 포함하는 안정적인 액체 약제학적 제형에 관한 것이다. 제형은 용기, 예컨대 바이알, 카트리지, 주사기 또는 자동 주사기(autoinjector)에 존재할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 안정적인 액체 약제학적 제형에서 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 베돌리주맙(vedolizumab)일 수 있다. 본 발명의 제형은 피하, 정맥내 또는 근육내 투여용일 수 있다.
- [0025] 일부 양태에서, 제형은 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 면역원성을 최소화할 수 있다.
- [0026] 다른 양태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 안정적인 액체 약제학적 제형을 치료가 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 염증성 장질환을 치료하는 방법에 관한 것이다. 투여는 피하 투여일 수 있다. 투여는 자기-투여일 수 있다.
- [0027] 또 다른 양태에서, 본 발명은 용기, 본 명세서에 기재된 안정적인 액체 약제학적 제형 및 그것의 사용을 위한 설명서를 포함하는 제조 물품에 관한 것이다.
- [0028] 일 양태에서, 본 발명은 염증성 장질환에 걸린 인간 환자를 치료하기 위한 방법에 관한 것이되, 해당 방법은 염증성 장질환에 걸린 환자에게 인간 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린에 대해 결합 특이성을 갖는 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편을 투여하는 단계를 포함하고, 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편은 다음의 투약 요법에 따라 환자에게 투여되되: (a) 예를 들어, 6회 투약에 대해 2일마다 피하 주사로서 165mg의 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편의 유도 단계 치료 요법으로 초기 투약; (b) 그 다음에, 예를 들어 필요하다면 2주마다 또는 4주마다 피하 주사로서 165mg의 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편의 유지 단계 치료 요법에서 제6주에 제7회 및 후속 투약; 투약 요법은 환자의 염증성 장질환에서 임상적 반응 및 임상적 관해(remission)를 유발하고; 추가로, 인간화된 면역글로불린 또는 항원-결합 단편은 $\alpha 4\beta 7$ 복합체에 대해 결합 특이성을 가지며, 항원-결합 영역은 이하에 제시되는 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역(CDR1, CDR2 및 CDR3) 및 중쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역(CDR1, CDR2 및 CDR3)을 포함한다: 경쇄: CDR1 서열번호 9, CDR2 서열번호 10, CDR3 서열번호 11; 중쇄: CDR1 서열번호 12, CDR2 서열번호 13, CDR3 서열번호 14.
- [0029] 일 양태에서, 본 발명은 염증성 장질환에 걸린 인간 환자를 치료하기 위한 방법에 관한 것이되, 해당 방법은 염증성 장질환에 걸린 환자에게 인간 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린에 대해 결합 특이성을 갖는 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편을 투여하는 단계를 포함하며, 인간화된 면역글로불린 또는 항원-결합 단편은 비인간 유래의 항원-결합 영역 및 인간 유래의 항체의 적어도 일부를 포함하고, 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편은 정맥내 투약의 유도 단계 및 피하 투약의 유지 단계를 포함하는 다음의 투약 요법에 따라 환자에게 투여되며: (a) 정맥내 주입으로서 300mg의 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편의 초기 정맥내 투약; (b) 다음에 초기 투약 대략 2주 정맥내 주입으로서 300mg의 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편의 제2 정맥내 후속 투약; (c) 다음에 6주에 시작해서 필요하다면 1주마다, 2주마다, 3주마다 또는 4주마다 피하 주사로서 165mg의 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편의 제3 및 후속 투약; 투약 요법은 환자의 염증성 장질환에서 임상적 반응 및 임상적 관해를 유발하고; 추가로, 인간화된 면역글로불린 또는 항원-결합 단

편은 $\alpha 4\beta 7$ 복합체에 대해 결합 특이성을 가지되, 항원-결합 영역은 이하에 제시되는 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역(CDR1, CDR2 및 CDR3) 및 중쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역(CDR1, CDR2 및 CDR3)을 포함한다: 경쇄: CDR1 서열번호 9, CDR2 서열번호 10, CDR3 서열번호 11; 중쇄: CDR1 서열번호 12, CDR2 서열번호 13, CDR3 서열번호 14.

[0030] 다른 양태에서, 본 발명은 염증성 장질환의 치료적 처치를 위한 투약 요법에 관한 것이되, 투약 요법은 염증성 장질환에 걸린 환자에게 인간 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린에 대해 결합 특이성을 갖는 인간화된 면역글로블린 또는 그의 항원-결합 단편을 투여하는 단계를 포함하며, 인간화된 면역글로블린 또는 항원-결합 단편은 비인간 유래의 항원-결합 영역 및 인간 유래의 항체의 적어도 일부를 포함하고, 인간화된 면역글로블린 또는 그의 항원-결합 단편은 약 9 내지 약 13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 면역글로블린 또는 그의 항원-결합 단편의 평균 정상상태 트로프 혈청 농도(mean steady state trough serum concentration)를 유지하는 피하 또는 근육내 투약 요법에 따라 환자에게 투여되며; 투약 요법은 환자의 염증성 장질환의 임상적 반응 및 임상적 관해를 유발하고; 추가로, 인간화된 면역글로블린 또는 항원-결합 단편은 $\alpha 4\beta 7$ 복합체에 대한 결합 특이성을 가지되, 항원-결합 영역은 이하에 제시되는 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역(CDR1, CDR2 및 CDR3) 및 중쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역(CDR1, CDR2 및 CDR3)을 포함한다: 경쇄: CDR1 서열번호 9, CDR2 서열번호 10, CDR3 서열번호 11; 중쇄: CDR1 서열번호 12, CDR2 서열번호 13, CDR3 서열번호 14.

[0031] 다른 양태에서, 본 발명은 염증성 장질환의 치료적 처치를 위한 투약 요법에 관한 것이되, 투약 요법은 염증성 장질환에 걸린 환자에게 인간 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린에 대해 결합 특이성을 갖는 인간화된 면역글로블린 또는 그의 항원-결합 단편을 투여하는 단계를 포함하고, 인간화된 면역글로블린 또는 항원-결합 단편은 비인간 유래의 항원-결합 영역 및 인간 유래의 항체의 적어도 일부를 포함하며, 인간화된 면역글로블린 또는 그의 항원-결합 단편은 약 35 내지 약 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 인간화된 면역글로블린 또는 그의 항원-결합 단편의 평균 정상상태 트로프 혈청 농도를 유지하는 피하 또는 근육내 투약 요법에 따라 환자에게 투여되고; 투약 요법은 환자의 염증성 장질환에서 임상적 반응 및 임상적 관해를 유발하며; 추가로, 인간화된 면역글로블린 또는 항원-결합 단편은 $\alpha 4\beta 7$ 복합체에 대해 결합 특이성을 가지되, 항원-결합 영역은 이하에 제시되는 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역(CDR1, CDR2 및 CDR3) 및 중쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역(CDR1, CDR2 및 CDR3)을 포함한다: 경쇄: CDR1 서열번호 9, CDR2 서열번호 10, CDR3 서열번호 11; 중쇄: CDR1 서열번호 12, CDR2 서열번호 13, CDR3 서열번호 14.

[0032] 다른 양태에서, 본 발명은 염증성 장질환에 걸린 인간 환자를 치료하는 방법에 관한 것이되, 해당 방법은 염증성 장질환에 걸린 환자에게 인간 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린에 대해 결합 특이성을 갖는 인간화된 면역글로블린 또는 그의 항원-결합 단편을 투여하는 단계를 포함하고, 인간화된 면역글로블린 또는 항원-결합 단편은 비인간 유래의 항원-결합 영역 및 인간 유래의 항체의 적어도 일부를 포함하며, 인간화된 면역글로블린 또는 그의 항원-결합 단편은 다음의 투약 요법에 따라 환자에게 투여되고: (a) 초기 투약의 대략 제6주까지 약 20 내지 약 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 인간화된 면역글로블린 또는 그의 항원-결합 단편의 평균 트로프 혈청 농도를 달성하기에 충분한 인간화된 면역글로블린 또는 그의 항원-결합 단편의 다수의 유도 단계 투약; (b) 그 다음에 면역글로블린 또는 그의 항원-결합 단편의 약 9 내지 약 13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 약 35 내지 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 평균 정상상태 트로프 혈청 농도를 유지하는데 필요한 인간화된 면역글로블린 또는 그의 항원-결합 단편의 다수의 유지 단계 투약; 투약 요법은 환자의 염증성 장질환에서 임상적 반응 및 임상적 관해를 유도하며; 추가로, 인간화된 면역글로블린 또는 항원-결합 단편은 $\alpha 4\beta 7$ 복합체에 대해 결합 특이성을 가지되, 항원-결합 영역은 이하에 제시되는 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역(CDR1, CDR2 및 CDR3) 및 중쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역(CDR1, CDR2 및 CDR3)을 포함한다: 경쇄: CDR1 서열번호 9, CDR2 서열번호 10, CDR3 서열번호 11; 중쇄: CDR1 서열번호 12, CDR2 서열번호 13, CDR3 서열번호 14.

[0033] 일부 양태에서, 제형, 치료 방법, 용량 및/또는 투약 요법은 환자가 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체에 대해 반응성인 항체를 개발할 최소의 가능성을 보장한다.

[0034] 환자는 면역조절제, 종양 괴사 인자-알파(tumor necrosis factor- α : TNF- α) 길항물질 또는 이들의 조합 중 적어도 하나에 의한 치료에 대해 적절한 반응이 결여되고, 치료에 대한 반응이 손실되거나 또는 치료에 대해 관용이 없을 수 있다

[0035] 염증성 장질환은 크론병 또는 궤양성 대장염일 수 있다. 염증성 장질환은 보통 내지 중증의 활성 궤양성 대장염일 수 있다.

[0036] 투약 요법은 보통 내지 중증의 활성 궤양성 대장염에 걸린 환자의 점막 치유를 야기할 수 있다.

- [0037] 환자는 염증성 장질환에 대해 이전에 적어도 한 종의 코르티코스테로이드로 치료받았을 수 있다. 환자는 염증성 장질환에 대해 적어도 한 종의 코르티코스테로이드와 동시에 치료를 받을 수 있다. 투약 요법은 환자에 의한 코르티코스테로이드 사용의 감소, 제거 또는 감소와 제거를 야기할 수 있다.
- [0038] 일부 양태에서, 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편은 약 1.0 mg/ml 내지 약 1.4 mg/ml의 농도의 최종 투약 형태로 투여된다. 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편은 약 1.2 mg/ml의 최종 투약 형태로 투여될 수 있다.
- [0039] 일부 양태에서, 인간화된 면역글로불린 또는 항원-결합 단편은 약 70 내지 약 250mg, 약 90 내지 약 200mg, 약 150 내지 약 180mg 또는 적어도 160mg의 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 양을 갖는 최종 투약 형태로 투여된다.
- [0040] 일부 양태에서, 투약 요법은 상기 치료를 받는 환자의 뇌척수액에서 CD4 대 CD8의 비를 변경시키지 않는다.
- [0041] 환자는 65세 이상의 사람일 수 있고, 투약 요법의 어떤 조절을 필요로 하지 않는다.
- [0042] 일부 양태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형, 용량 또는 투약 요법에 의한 치료 방법은 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 면역원성을 최소화할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0043] 도 1은 인간화된 항- $\alpha 4\beta 7$ 면역글로불린의 중쇄를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열(서열번호 1) 및 중쇄의 추론된 아미노산 서열(서열번호 2)을 도시한 도면. 뉴클레오타이드 서열은 중쇄의 5' 말단에서 클로닝 부위(소문자), 코작(Kozak) 서열(대문자, 서열번호 1의 뉴클레오타이드 18 내지 23) 및 리더 서열(소문자, 서열번호 1의 뉴클레오타이드 24 내지 86)을 함유한다. 뉴클레오타이드 서열의 오픈 리딩 프레임은 서열번호 1의 뉴클레오타이드 24 내지 1433이다.
- 도 2는 본 명세서에서 베돌리주맙으로서 지칭되는 인간화된 면역글로불린의 경쇄를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열(서열번호 3) 및 경쇄의 추론된 아미노산 서열(서열번호 4)을 도시한 도면. 뉴클레오타이드 서열은 중쇄의 5' 말단에서 클로닝 부위(소문자), 코작 서열(대문자, 서열번호 3의 뉴클레오타이드 18 내지 23) 및 리더 서열(소문자, 서열번호 3의 뉴클레오타이드 24 내지 80)을 함유한다. 뉴클레오타이드 서열의 오픈 리딩 프레임은 서열번호 3의 뉴클레오타이드 24 내지 737이다.
- 도 3은 (A) 본 명세서에서 베돌리주맙으로서 지칭되는 인간화된 면역글로불린의 성숙 인간화된 경쇄(서열번호 4의 아미노산 20 내지 238) 및 (B) 본 명세서에서 LDP-02로서 지칭되는 인간화된 면역글로불린의 성숙 인간화된 경쇄(서열번호 5)의 아미노산 서열의 정렬을 도시한 도면. (LDP-02에 대해서, WO 98/06248 및 문헌[Feagan et al., *N. Eng. J. Med.* 352:2499-2507 (2005)] 참조). 문헌[Feagan et al.]은 LDP-02의 임상 연구를 기재하지만, 논문에서 그들은 LDP-02를 MLN02로서 지칭한다) 정렬은 베돌리주맙과 LDP-02의 경쇄의 아미노산 서열이 성숙 경쇄의 위치 114 및 115에서 다르다는 것을 도시한다.
- 도 4는 (A) 일반적 인간 카파 경쇄 불변 영역(서열번호 6) 및 (B) 일반적 뮤린 카파 경쇄 불변 영역(서열번호 7)의 아미노산 서열의 정렬을 도시한 도면. 아미노산 잔기 Thr 및 Val(성숙 베돌리주맙 경쇄의 위치 114 및 115에서 존재함(서열번호 4의 아미노산 133 및 134))은 인간 카파 경쇄의 불변 영역에 존재하는 반면, 아미노산 잔기 Ala 및 Asp(성숙 LDP-02 경쇄의 위치 114 및 115에 존재함(서열번호 5))는 마우스 카파 경쇄의 불변 영역에 존재한다.
- 도 5는 MLN02의 인간화된 중쇄 및 인간화된 경쇄를 암호화하며, CHO 세포에서 베돌리주맙을 생성하는데 적합한 벡터 pLKTOK38D(또한 pTOK38MLN02-TV로서 지칭됨)의 맵을 도시한 도면. (pLKTOK38을 개시하는 미국특허 공개 제2004/0033561 A1호를 참조. pLKTOK38D는 pLKTOK38의 변이체인데, 맵 상에 표시된 제한 부위는 경쇄 가변 영역을 암호화하는 서열에 축적한다)
- 도 6는 단백질 농도, pH 및 계면활성제:단백질 물 비에 대한 변화 결과로서 SEC 응집물 형성의 기술기(1일 당 %)를 도시한 도면. 6.0 내지 6.5의 pH 범위에서, 응집물의 형성은 0.7 내지 1.5의 폴리솔베이트 80:단백질 물 비를 지니는 제형에 대해 유사하였다.
- 도 7은 폴리솔베이트 80:단백질 물 비가 1.5 초과일 때, 응집물 형성 속도가 pH가 증가함에 따라 증가된다는 것을 나타내는 그래프를 도시한 도면.
- 도 8은 응집물의 형성에 대한 부형제의 효과를 나타내는 그래프를 도시한 도면. 25mM 시트레이트, 5mM 시트레이

트, 5mM EDTA, 25mM 시스테인 또는 5mM 시스테인이 제형에 첨가되었다. 모두 3개의 부형제는 응집물의 형성을 감소시켰다.

도 9는 제형에서 25mM 시트레이트의 존재에 의한 응집물 형성의 감소 및 증가된 단백질 농도와 응집물 형성의 증가된 속도 사이의 상관관계를 나타내는 그래프 세트를 도시한 도면.

도 10은 40℃에서 CEX 중 분해의 결과를 나타내는 그래프를 도시한 도면. 데이터는 CEX 분해에 대한 pH 변화의 영향을 나타낸다.

도 11은 제형의 pH에 대한 온도의 효과를 나타내는 그래프를 도시한 도면. 히스티딘을 함유하는 제형의 pH는 온도에 의해 감소된 반면, 시트레이트 제형의 pH는 온도에 의해 영향받지 않는다.

도 12는 12개월의 기간에 걸쳐 CEX 주요 아이소폼(isoform)의 백분율을 나타내는 그래프를 도시한 도면. 6.0 내지 6.2의 pH를 갖는 제형은 6.3 내지 6.4의 pH를 갖는 제형보다 약 1 내지 2% 더 적은 주요 아이소폼을 나타내었다.

도 13은 점성도가 주로 단백질 농도 및 pH에 의해 영향을 받는다는 것을 증명하는 그래프의 세트를 도시한 도면. 수크로스, 히스티딘 및 알기닌 첨가는 제형의 점성도에 부수적 영향을 갖는 것으로 나타난다.

도 14는 (a) 성숙 인간 GM607'CL 항체 카파 경쇄 가변 영역 및 (b) 인간 21/28'CL 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 도시한 도면.

도 15는 사전-충진된 주사기에서 단백질 생성물의 성분을 도시한 도면.

도 16A 내지 B는 시험한 다양한 주사기의 주입력에 대해 (A) 단백질 농도 및 (B) 점성도의 효과를 도시한 도면.

도 17 (a)는 단백질 농도 및 주사 크기의 작용으로서 초기 활택력(glide force)을 도시한 도면. 도 17 (b)는 각 각의 주사기 제조업자 및 주사 크기에 대한 초기 활택력을 도시한 도면.

도 18는 베톨리주맙의 흡수 프로파일을 도시한 도면. 그래프는 근육내 및 피하 투약이 일반적으로 중복된다는 것을 나타낸다. 이들 투여 경로의 흡수 프로파일에는 명백하게 큰 차이가 없다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 본 발명은 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 포함하는 약제학적 제형에 관한 것이다. 약제학적 제형은 항산화제 또는 킬레이터 (예를 들어, 시트레이트), 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 및 유리 아미노산을 포함하는 혼합물일 수 있다. 약제학적 제형은 고체 또는 액체 형태로 있을 수 있다.

[0045] 정의

[0046] 용어 "약제학적 제형"은 항체의 생물학적 활성이 효과적이 되게 하는 형태로 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 함유하고, 제형이 투여되는 피험체에게 허용가능하지 않게 독성인 추가적인 성분을 함유하지 않는 제제를 지칭한다.

[0047] "안정한" 제형은 저장시 그것에서 항체가 그것의 생리적 안정성 및/또는 그것의 화학적 안정성 및/또는 생물학적 활성을 실질적으로 보유하는 것이다. 일 양태에서, 제형은 저장시 그것의 생리적 및 화학적 안정성뿐만 아니라 그것의 생물학적 활성을 실질적으로 보유한다. 저장 기간은 제형의 의도된 보관수명에 기반하여 일반적으로 선택된다. 단백질 안정성을 측정하기 위한 다양한 분석 기법은 당업계에서 입수가능하며, 문헌[*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 검토되어 있다. 안정성은 선택된 시간 기간 동안 선택된 온도에서 측정될 수 있다. 예를 들어, 액체 제형은 약 40℃에서 적어도 약 3일, 5일, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주 또는 6주 동안 안정하다. 다른 양태에서, 동결건조된 제형은 약 40℃에서 적어도 약 2 내지 4주, 적어도 약 3개월, 적어도 약 6개월, 적어도 약 9개월, 적어도 약 12개월 또는 적어도 약 18개월 동안 안정하다. 다른 양태에서 액체 및/또는 동결건조된 제형은 약 5℃ 및/또는 25℃에서 적어도 약 1개월, 적어도 약 3개월, 적어도 약 6개월, 적어도 약 9개월, 적어도 약 12개월, 적어도 약 18개월, 적어도 약 24개월, 적어도 약 30개월 또는 적어도 약 36개월 동안 안정하며; 및/또는 약 -20℃ 및/또는 -70℃에서 적어도 약 1 개월, 적어도 약 3개월, 적어도 약 6개월, 적어도 약 9개월, 적어도 약 12개월, 적어도 약 18개월, 적어도 약 24개월, 적어도 약 30개월, 적어도 약 36개월, 적어도 약 42개월 또는 적어도 약 48개월 동안 안정하다. 더 나아가, 일부 실시형태에서, 액체 제형은 냉동(예를 들어, -80℃로) 및 해동 후, 예를 들어 냉동 및 해동의 1, 2 또는 3 주기 후 안정하다.

- [0048] 액체 제형의 안정성은 다이머, 멀티머 및/또는 응집물 형성의 평가(예를 들어 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography: SEC), 기질-보조 레이저 탈착-이온화 시간 비행 질량 분석법(matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry: MALDI-TOF MS), 분석 초원심분리, 광 산란(광자 상관 분광법, 동적 광 산란(dynamic light scattering: DLS), 정적 광 산란, 다각 레이저 광 산란(multi-angle laser light scattering: MALLS)), 유동-기반 현미경 영상화, 전자 임피던스(컬터(coulter)) 카운터, 광 차단 또는 다른 액체 입자 계측 시스템을 사용하여, 탁도 측정에 의해 및/또는 시각적 검사에 의해); 양이온 교환 크로마토그래피(cation exchange chromatography: CEX), 정전위점 초점화(isoelectric focusing: IEF), 예를 들어 모세관 기법(capillary technique: cIEF), 또는 모세관 전기영동(capillary zone electrophoresis)을 사용하여 전하 이질성을 평가함으로써; 아미노-말단 또는 카복시-말단 서열 분석; 질량 분광 분석; 단편화, 무결합 및 멀티머(즉, 다이머, 트라이머 등) 항체를 비교하기 위한 SDS-PAGE 또는 SEC 분석; 펩타이드 맵(예를 들어 트립신 또는 LYS-C) 분석; 항체의 생물학적 활성 또는 항원 결합 기능 등을 평가를 포함하는, 다양한 상이한 방법에서 정성적으로 및/또는 정량적으로 평가될 수 있다. 고체-상태 제형의 안정성은 또한 직접 시험, 예컨대 X-레이 분말 회절(X-Ray Powder Diffraction: XRPD)에 의한 결정 구조의 확인; 푸리에 변환 적외분광법(Fourier Transform Infrared Spectroscopy: FTIR)을 사용하여 고체상태에서 항체 구조를 평가; 및 시차주사 열량측정법(Differential Scanning Calorimetry: DSC)을 사용하여 동결건조된 고체에서 열 전이를 측정(용융, 유리 전이 등) 및 카를 피셔(Karl Fisher) 시험에 의해 수분함량을 측정하는 것, 예를 들어 가수분해를 통해 화학적 불안정성의 가능성을 추론하는 것과 같은 간접적 시험을 포함하는, 다양한 상이한 방법으로 정성적으로 및/또는 정량적으로 평가될 수 있다. 불안정성은 응집(예를 들어, 비-공유 가용성 응집, 공유 가용성 응집(예를 들어, 이황화 결합 재정렬/스크램블링(scrambling)), 불용성 응집), 탈아미드화(예를 들어, Asn 탈아미드화), 산화(예를 들어, Met 산화), 이성질체화(예를 들어, Asp 이성질체화), 클리핑(clipping)/가수분해/단편화(예를 들어, 힌지 영역 단편화), 숙신아미드 형성, N-말단 연장, C-말단 처리, 글라이코실화 차이 등 중 어느 하나 이상을 수반할 수 있다.
- [0049] "탈아미드화된" 단클론성 항체는 이것의 하나 이상의 아스파라긴 또는 글루타민 잔기가, 예를 들어 아스파르트산 또는 아이소-아스파르트산으로 유도체화된 것이다.
- [0050] "탈아미드화에 민감한" 항체는 탈아미드화되기 쉬운 것으로 발견된 하나 이상의 잔기를 포함하는 것이다.
- [0051] "산화에 민감한" 항체는 산화되기 쉬운것으로 발견된 하나 이상의 잔기를 포함하는 항체이다.
- [0052] "응집에 민감한" 항체는 특히 냉동, 가열, 건조, 재구성 및/또는 교반 시 다른 항체 분자(들)와 응집되는 것을 발견된 항체이다.
- [0053] "단편화에 민감한" 항체는, 예를 들어 이것의 힌지 영역에서 2이상의 단편으로 절단되는 것으로 발견된 것이다.
- [0054] "탈아미드화, 산화, 응집, 또는 단편화의 감소"는 상이한 pH에서 또는 상이한 완충제에서 제형화된 단클론성 항체에 대해 탈아미드화, 응집, 또는 단편화를 방지하거나 또는 탈아미드화, 응집, 또는 단편화의 양을(예를 들어, 80%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% 또는 10%로) 감소시키는 것을 의미하는 것으로 의도된다.
- [0055] "응집물", "SEC 응집물"또는 "가용성 응집물"은 더 큰 단백체를 형성하기 위해 공유적, 이온성 또는 소수성 상호작용을 통해 함께 결합된 1개 초과이고 10개 이하인 항체 단백질 및/또는 단편이다.
- [0056] "불용성 응집물" 또는 "입자"는 더 큰 단백체를 형성하기 위해 공유적, 이온성 또는 소수성 상호작용을 통해 함께 결합된 10개 초과인 단백질 및/또는 단편이다.
- [0057] 본 명세서에 사용되는 바와 같은, 단클론성 항체의 "생물학적 활성"은 항원에 결합하고, 시험관내 또는 생체내에서 측정될 수 있는 측정가능한 생물학적 반응을 야기하는 항체의 능력을 지칭한다. 이러한 활성은 길항물질적(antagonistic) 또는 작용물질적(agonistic)일 수 있다.
- [0058] 세포 표면 분자 " $\alpha_4\beta_7$ 인테그린" 또는 " $\alpha_4\beta_7$ "은 α_4 쇄(CD49D, ITGA4) 및 β_7 쇄(ITGB7)의 헤테로다이머이다. 각각의쇄는 또 다른 인테그린쇄와 함께 헤테로다이머를 형성하여, 예를 들어 $\alpha_4\beta_1$ 또는 $\alpha_E\beta_7$ 를 형성할 수 있다. 인간 α_4 및 β_7 유전자(각각 젠뱅크(GenBank)(메릴랜드주 베테스타에 소재한 미국 국가생물공학센터(National Center for Biotechnology Information)) RefSeq 등록번호 NM_000885 및 NM_000889)은 B 및 T 림프구, 특히 기억 CD4+ 림프구에 의해 발현된다. 전형적인 다수의 인테그린, 즉, $\alpha_4\beta_7$ 은 남아있거나 또는 활성화된 상태 중 하나로 존재할 수 있다. $\alpha_4\beta_7$ 에 대한 리간드는 혈관 세포 접착 분자(vascular cell adhesion

molecule: VCAM), 피브로넥틴 및 점막 접착(MadCAM, 예를 들어, MAdCAM-1)을 포함한다.

- [0059] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, $\alpha 4\beta 7$ 복합체에 대해 결합 특이성"을 갖는 인간 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편은 $\alpha 4\beta 7$ 에 결합되지만, $\alpha 4\beta 1$ 또는 $\alpha EB7$ 에 결합되지 않는다.
- [0060] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, "등장성" 제형은 실질적으로 인간 혈액과 동일한 삼투압을 가진다. 등장성 제형은 일반적으로 약 250 내지 350mOsm의 삼투압을 가질 것이다. 등장성은, 예를 들어 수증기압 또는 빙냉형 삼투압계를 사용하여 측정될 수 있다.
- [0061] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, "완충제"는 그것의 산-염기 컨주게이트 성분의 작용에 의해 pH의 변화에 저항하는 완충제를 지칭한다. 완충제는 본 발명의 액체 또는 고체 제형에서 존재할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 완충제는 약 5.0 내지 약 7.5, 내지 약 pH 5.5 내지 약 7.5, 내지 약 pH 6.0 내지 약 7.0로 또는 약 6.3 내지 약 6.5의 pH로 제형의 pH를 조절한다. 일 양태에서, 단독으로 또는 조합으로 5.0 내지 7.5 범위에서 pH를 제어하는 완충제의 예는, 아세테이트, 숙시네이트, 글루코네이트, 히스티딘, 시트레이트, 포스페이트, 말리에이트, 카코다일레이트, 2-[N-모폴리노]에탄설폰산(MES), 비스(2-하이드록시에틸)이미노트리스[하이드록시메틸]메탄(비스-트리스), N-[2-아세트아미도]-2-이미노다이아세트산(ADA), 글라이실글라이신 및 다른 유기산 완충제를 포함한다. 다른 양태에서, 본 명세서의 완충제는 히스티딘 또는 시트레이트이다.
- [0062] "히스티딘 완충제"는 히스티딘 이온을 포함하는 완충제이다. 히스티딘 완충제의 예는 히스티딘 클로라이드, 히스티딘 아세테이트, 히스티딘 포스페이트, 히스티딘 설페이트 용액을 포함한다. 히스티딘 완충제 또는 히스티딘-HCl 완충제는 약 pH 5.5 내지 약 7.0, 약 pH 6.1 내지 약 6.9, 또는 약 pH 6.5의 pH를 가진다.
- [0063] "시트레이트 완충제"는 시트레이트 이온을 포함하는 완충제이다. 시트레이트 완충제의 예는 시트르산 나트륨, 시트르산 암모늄, 시트르산 칼슘, 및 시트르산 칼륨 용액을 포함한다. 시트레이트 완충제는 약 3.0 내지 6.2, 약 pH 5.5 내지 6.5, 약 pH 6.1 내지 약 6.5, 약 pH 6.1, 약 pH 6.2, 또는 약 pH 6.5의 pH를 가진다.
- [0064] 본 명세서의 "당류"는 단당류, 이당류, 삼당류, 다당류, 당 알코올, 환원당, 비환원당 등을 포함하는, 화학식 $(CH_2O)_n$ 을 갖는 화합물 및 이것의 유도체이다. 본 명세서의 당류의 예는 글루코스, 수크로스, 트레할로스, 락토스, 프럭토스, 말토스, 텍스트란, 에리트ρί톨, 글라이세롤, 아라비톨, 사일리톨(sylitol), 솔비톨, 만니톨, 멜리비오스, 멜레지토스, 라피노스, 만노트라이오스, 스타키오스, 말토스, 락툴로스, 말톨로스, 글루시톨, 말티톨, 락티톨, 아이소-말톨로스 등을 포함한다. 당류는 동결건조보호제일 수 있다. 일 양태에서, 본 명세서의 당류는 수크로스와 같은 비환원 이당류이다.
- [0065] 본 명세서에서, "계면활성제"는 액체의 표면 장력을 낮추는 작용제를 지칭한다. 일 양태에서, 계면활성제는 비이온성 계면활성제이다. 본 명세서의 계면활성제의 예는 폴리솔베이트(폴리옥시에틸렌 솔비탄 모노라우레이트, 예를 들어, 폴리솔베이트 20 및 폴리솔베이트 80); 트리톤(TRITON)(t-옥틸페녹시폴리에톡시에탄올, 비이온성 세정제, 미시간주 미들랜드에 소재한 다우 케미컬 컴퍼니의 유니온 카바이드(Union Carbide) 자회사); 도데실 황산 나트륨(sodium dodecyl sulfate: SDS); 라우릴 황산 나트륨; 소듐 옥틸 글라이코사이드; 라우릴-, 미리스틸-, 리놀레일- 또는 스테아릴-설포베타인; 라우릴-, 미리스틸-, 리놀레일- 또는 스테아릴-사코신; 리놀레일-, 미리스틸- 또는 세틸-베타인; 라우로아미도프로필-, 코카미도프로필-, 리놀레아미도프로필-, 미리스타미도프로필-, 팔미도프로필-, 또는 아이소스테아르아미도프로필-베타인(예를 들어, 라우로아미도프로필); 미리스타미도프로필-, 팔미도프로필-, 또는 아이소스테아르아미도프로필-다이메틸아민; 소듐 메틸 코코일-, 또는 다이소듐 메틸 올레일-타우레이트; 솔비탄 모노팔미테이트; 및 MONAQUAT 시리즈(뉴저지주 패터슨에 소재한 모나 인터스트리즈 인코포레이티드(Mona Industries, Inc.)); 폴리에틸 글라이콜(polyethyl glycol: PEG), 폴리프로필렌 글라이콜(PPG) 및 폴리옥시에틸렌 및 폴록시프로필렌 글라이콜의 공중합체(예를 들어, 플루로닉스/폴록사머(Pluronic/Poloxamer), PF68 등); 등을 포함한다. 다른 양태에서, 본 명세서의 계면활성제는 폴리솔베이트 80이다.
- [0066] 용어 "킬레이터"는 하나 이상의 결합을 통해 원자에 결합되는 작용제를 지칭한다. 일 양태에서, 본 명세서의 킬레이터의 예는 시트레이트, 에틸렌다이아민테트라아세트산, 에틸렌글라이콜테트라아세트산(ethyleneglycoltetraacetic acid: EGTA), 다이머카프롤, 다이에틸렌트라이아민펜타아세트산 및 N,N-비스(카복시메틸)글라이신을 포함한다. 다른 양태에서, 킬레이터는 시트레이트 또는 EDTA이다.
- [0067] 용어 "항산화제"는 다른 분자의 산화를 억제하는 작용제를 지칭한다. 본 명세서의 항산화제의 예는 시트레이트, 리포산, 요산, 글루타티온, 토코페롤, 카로틴, 라이코펜, 시스테인, 포스포네이트 화합물, 예를 들어, 에티드론

산, 데스페록사민 및 말레이트를 포함한다.

- [0068] 본 명세서의 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되며, 구체적으로는 전장 단클론성 항체, 면역글로불린, 다클론성 항체, 적어도 2개의 전장 항체로부터 형성된 다중특이성 항체(예를 들어, 이중특이성 항체), 예를 들어, 상이한 항원 또는 에피토프, 및 dAbs, scFv, Fab, F(ab')₂, Fab'을 포함하고, 인간, 인간화된 항체 및 비-인간 종으로부터의 항체 및 모노바디(monobody) 및 다이아바디(diabody)와 같은 재조합 항원 결합 형태를 포함하는 개개의 항원 결합 단편에 대해 각각을 포괄한다.
- [0069] 본 명세서에 기재된 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 대 다른 부형체의 몰 량 및 비는 항체에 대해 약 150,000 달톤의 대략의 분자량의 추정에 대해 계산된다. 실제 항체 분자량은 아미노산 조성물 또는 번역 후 변형에 따라서, 예를 들어 항체를 발현시키기 위해 사용되는 세포주에 의존하여 150,000 달톤과 다를 수 있다. 실제 항체 분자량은 150,000 달톤의 +/- 5%일 수 있다.
- [0070] 용어 "인간 항체"는 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유래된 서열을 소유하는 항체, 예컨대 인간 면역글로불린 유전자를 갖는 유전자이식 마우스로부터 유래된 항체(예를 들어, 제노마우스(XENOMOUSE) 유전적으로 유전자 조작된 마우스(캘리포니아주 프레몬트에 소재한 앵제닉스(Abgenix)), 휴맵-마우스(HUMAB-MOUSE)(등록상표), 키린 티씨 마우스(KIRIN TC MOUSE)(상표명) 트랜스염색체(transchromosome) 마우스, 케이엠마우스(KMMOUSE)(등록상표)(뉴저지주 프린스턴에 소재한 메다렉스(MEDAREX))), 인간 파지 디스플레이 라이브러리, 인간 골수종 세포, 또는 인간 B 세포를 포함한다.
- [0071] 본 명세서에서 사용되는 용어 "단클론성 항체"는 실질적으로 동종인 항체의 집단으로부터 얻어진 항체를 지칭하며, 즉, 집단을 포함하는 개개의 항체는 동일하고/하거나 동일 에피토프에 결합되며, 단클론성 항체의 생성 동안 생길 수 있는 가능한 변이체를 제외하고, 이러한 변이체는 일반적으로 부수적 양으로 존재한다. 전형적으로 상이한 결정소(에피토프)에 대해 관련된 상이한 항체를 포함하는 다클론성 항체 준비와 대조적으로, 각각의 단클론성 항체는 항원에 대한 단일 결정소와 관련된다. 변형어 "단클론성"은 항체의 실질적으로 동종인 집단으로부터 얻어지는 항체의 특징을 표시하며, 임의의 특정 방법에 의해 항체의 요구되는 생성으로서 해석되어서는 안 된다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 단클론성 항체는 문헌[Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975)]에 의해 처음 기재된 하이브리도마 방법에 의해 만들어질 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법에 의해 만들어질 수 있다(예를 들어, 미국특허 제4,816,567호 참조). "단클론성 항체"는 또한, 예를 들어 문헌[Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991)] 및 문헌[Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)]에 기재된 기법을 사용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다.
- [0072] 본 명세서의 단클론성 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 종으로부터 유래되거나 또는 특정 항체 분류 또는 하위분류에 속하는 항체에서 대응되는 서열과 동일하거나 또는 상동성인 반면, 쇠(들)의 나머지는 다른 종으로부터 유래되거나 또는 다른 항체 분류 또는 하위분류에 속하는 항체뿐만 아니라 그것들이 원하는 생물학적 활성을 나타낸다면, 이러한 항체의 단편에서 대응되는 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라" 항체를 포함한다(미국특허 제4,816,567호; 및 문헌[Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)]). 본 명세서의 관심의 키메라 항체는 비-인간 영장류(예를 들어, 긴꼬리 원숭이, 유인원 등) 및 인간 불변 영역 서열로부터 유래된 가변 도메인 항원 결합 서열을 포함하는 "영장류화된" 항체를 포함한다.
- [0073] 본 발명의 제형에서 제조된 인간화된 면역글로불린의 "항원 결합 단편"은 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 중쇄 및/또는 경쇄의 적어도 가변 영역을 포함한다. 예를 들어, 베돌리주맙의 항원 결합 단편은 서열번호 4의 인간화된 경쇄 서열의 아미노산 잔기 20 내지 131을 포함한다. 이러한 항원 결합 단편의 예는 당업계에 공지된 인간화된 면역글로불린의 Fab 단편, Fab' 단편, scFv 및 F(ab')₂ 단편을 포함한다. 본 발명의 인간화된 면역글로불린의 항원 결합 단편은 효소 절단에 의해 또는 재조합 기법에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 파파인 또는 펩신 절단은 각각 Fab 또는 F(ab')₂ 단편을 만들기 위해 사용될 수 있다. 항체는 또한 하나 이상의 정지 코돈이 천연 정지 부위의 상류에 도입된 항체 유전자를 사용하여 다양한 절단된 형태로 생성될 수 있다. 예를 들어, F(ab')₂ 단편의 중쇄를 암호화하는 재조합 구성체는 CH₁ 도메인 및 중쇄의 힌지 영역을 암호화하는 DNA 서열을 포함하도록 설계될 수 있다. 일 양태에서, 항원 결합 단편은 그것의 리간드(예를 들어, 점막 어드레신 MAdCAM(예를 들어, MAdCAM-1), 피브로넥틴) 중 하나 이상에 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린의 결합을 억제한다.
- [0074] 항체의 파파인 분해는 각각 단일 항원 결합 부위를 지니는 "Fab" 단편, 및 잔여 "Fc" 단편으로 불리는 2개의 동일한 항원 결합 단편을 생성하는데, 이들 명칭은 그것의 용이하게 결정화되는 능력을 반영한다. 펩신 처리는 2

개의 항원 결합 부위를 가지며, 또한 항원을 가교할 수 있는 $F(ab')_2$ 단편을 수득한다.

- [0075] "Fv"는 비-공유 결합에서 하나의 중쇄 가변 도메인 및 하나의 경쇄 가변 도메인의 다이머로 이루어진 항체 단편이다.
- [0076] Fab 단편은 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인(CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역으로부터 하나 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카복시 말단에서 몇 개의 잔기의 첨가에 의해 Fab 단편과 다르다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 적어도 하나의 유리 티올기를 함유하는 Fab'에 대한 본 명세서의 명칭이다. $F(ab')_2$ 항체 단편은 본래 그 사이에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로서 만들어졌다. 항체 단편의 다른 화학적 결합은 또한 공지되어 있다.
- [0077] "단일쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 V_H 및 V_L 도메인을 포함하되, 이들 도메인은 단일 폴리펩타이드쇄에 존재한다. 일 양태에서, Fv 폴리펩타이드는 scFv가 항원 결합을 위해 원하는 구조를 형성할 수 있게 하는 V_H 와 V_L 도메인 사이에 폴리펩타이드 링커를 추가로 포함한다. scFv의 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.
- [0078] 용어 "다이아바디"는 2개의 항원 결합 부위를 지니는 작은 항체 단편을 지칭하는데, 단편은 동일 폴리펩타이드쇄(V_H - V_L)에서 가변 경쇄 도메인(V_L)과 연결된 가변 중쇄 도메인(V_H)을 포함한다. 동일쇄 상의 두 도메인 사이에 쌍을 이루는데 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 도메인은 다른쇄의 상보성 도메인과 쌍을 이루도록 하며, 2개의 항원 결합 부위를 만든다. 다이아바디는, 예를 들어 EP 404,097; WO 93/11161; 및 문헌[Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)]에서 더 완전하게 기재된다.
- [0079] "전장 항체"는 항원 결합 가변 영역뿐만 아니라 경쇄 불변 도메인(CL) 및 중쇄 불변 도메인, 즉, C_{H1} , C_{H2} 및 C_{H3} 을 포함하는 것이다. 불변 도메인은 천연 서열 불변 도메인(예를 들어, 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 이것의 아미노산 서열 변이체일 수 있다. 일 양태에서, 전장 항체는 하나 이상의 효과기 기능을 가진다.
- [0080] 본 명세서의 "아미노산 서열 변이체" 항체는 주요종 항체와 다른 아미노산 서열을 지니는 항체이다. 본래, 아미노산 서열은 주요종 항체와 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90% 또는 적어도 약 95% 상동성을 가질 것이다. 아미노산 서열 변이체는 치환, 결실 및/또는 첨가 주요종 항체의 아미노산 서열 내에서 또는 서열에 인접하여 특정 위치에서 치환, 결실 및/또는 첨가를 가지지만, 항원 결합 활성을 보유한다. 항체의 불변 영역의 서열에서 변형은 가변 영역에서 변형보다 항원 결합 활성에 대한 효과가 더 적을 것이다. 가변 영역에서, 아미노산 서열 변이체는 주요종 항체와 적어도 약 90% 상동성, 적어도 약 95% 상동성, 적어도 약 97% 상동성, 적어도 약 98% 상동성 또는 적어도 약 99% 상동성이 있을 것이다.
- [0081] "상동성"은 필요하다면 최대 상동성%를 달성하는 서열 및 도입 갭을 정렬한 후 동일한 아미노산 서열 변이체에서 잔기의 백분율로서 정의된다. 정렬을 위한 방법 및 컴퓨터 프로그램은 당업계에 잘 공지되어 있다.
- [0082] "치료적 단클론성 항체"는 인간 피험체의 치료를 위해 사용된 항체이다. 본 명세서에 개시된 치료적 단클론성 항체는 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 포함한다.
- [0083] 본 명세서의 "글라이코실화 변이체" 항체는 주요종 항체에 부착된 하나 이상의 탄수화물 모이어티와 다른 항체에 부착된 하나 이상의 탄수화물 모이어티를 지니는 항체이다. 본 명세서의 글라이코실화 변이체의 예는 G0 올리고당 구조 대신 그것의 Fc 영역에 부착된 G1 또는 G2 올리고당 구조를 지니는 항체, 그것의 하나 이상의 경쇄에 부착된 1 또는 2개의 탄수화물 모이어티를 지니는 항체, 항체 등의 1 또는 2개의 중쇄에 부착된 탄수화물이 없는 항체, 및 글라이코실화 변질(alteration)의 조합물을 포함한다.
- [0084] 항체 "효과기 기능"은 항체의 Fc 영역(천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기인하는 해당 생물학적 활성을 지칭한다. 항체 효과기 기능의 예는 C1q 결합; 보체 의존적 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체-의존적 세포-매개 세포독성(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: ADCC); 식세포 작용; 세포 표면 수용체의 하향 조절(예를 들어, B 세포 수용체(B cell receptor; BCR)) 등을 포함한다.
- [0085] 그것의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라서, 전장 항체는 상이한 "분류"로 지정될 수 있다. 전장 항체의 5가지 주요 분류가 있다: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM, 및 이들 중 몇몇은 "하위분류"(아이스타입), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 및 IgA2로 추가로 나누어질 수 있다. 상이한 분류의 항체에 대응되는 중쇄

불변 도메인은 각각 α , δ , ϵ , γ 및 μ 로 불린다. 상이한 분류의 면역글로불린의 서브유닛 구조 및 3차원 배치는 잘 공지되어 있다.

- [0086] 임의의 척추동물 종으로부터 항체의 "경쇄"는 그것의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기반으로 카파(κ) 및 람다(λ)로 불리는 2개의 명확하게 별개인 유형 중 하나로 지정될 수 있다
- [0087] "항체-의존적 세포-매개 세포독성" 및 "ADCC"는 Fc 수용체(FcR)(예를 들어, 자연 살해(Natural Killer: NK) 세포, 호중구 및 대식세포)를 발현시키는 비특이적 세포독성 세포가 표적 세포 상의 항체에 결합되고, 후속하여 표적 세포의 용해를 야기하는 세포-매개 반응을 지칭한다. ADCC, NK 세포를 매개하기 위한 1차 세포는 Fc γ RIII만을 발현시키는 반면, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII를 발현시킨다. 조혈 세포 상에서 FcR 발현은 문헌[Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991)]의 464 페이지의 표 3에서 요약된다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해, 시험관내 ADCC 분석, 예컨대 미국특허 제5,500,362호 또는 제5,821,337호에 기재된 것이 수행될 수 있다. 이러한 분석을 위한 유용한 효과기 세포는 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cell: PBMC) 및 자연 살해(NK) 세포를 포함한다. 대안적으로 또는 추가적으로, 관심의 분자의 ADCC 활성은 생체내, 예를 들어 문헌[Clynes *et al. PNAS (USA)* 95:652-656 (1998)]에 개시된 것과 같은 동물 모델에서 평가될 수 있다.
- [0088] 용어 "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합되는 수용체를 설명하기 위해 사용된다. 일 양태에서, FcR은 천연 서열 인간 FcR이다. 다른 양태에서, FcR은 IgG 항체(감마 수용체)에 결합되고, 대립유전자 변이체를 포함하여, Fc γ RI, Fc γ RII, 및 Fc γ RIII 하위분류의 수용체 및 대안적으로 이들 수용체의 스플라이싱된 형태를 포함하는 것이다. Fc γ RII 수용체는 Fc γ RIIA("활성 수용체") 및 Fc γ RIIB("억제 수용체")를 포함하는데, 이는 주로 이것의 세포질 도메인에서 다른 유사한 아미노산 서열을 가진다. 활성화 수용체 Fc γ RIIA는 그것의 세포질 도메인에서 면역수용체 티로신-계 활성화 모티프(immunoreceptor tyrosine-based activation motif: ITAM)를 함유한다. 억제 수용체 Fc γ RIIB는 그것의 세포질 도메인에서 면역수용체 티로신-계 억제 모티프(immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif: ITIM)를 함유한다. (문헌[M. Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)]의 검토 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.* 126:33-41 (1995)]에서 검토되어 있다. 장래에 확인되는 것을 포함하는 다른 FcR은 본 명세서의 용어 "FcR"에 의해 포함된다. 해당 용어는 또한, 태아에 모체 IgG의 전달에 책임이 있는 신생아 수용체인 FcRn을 포함한다(문헌[Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976)] 및 문헌[Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)]).
- [0089] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "초가변 영역"은 항원 결합을 초래하는 항체의 아미노산 잔기를 지칭한다. 초가변 영역은 일반적으로 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"(예를 들어, 경쇄 가변 도메인에서 잔기 24-34(L1), 50-56(L2) 및 89-97(L3) 및 중쇄 가변 도메인에서 31-35(H1), 50-65(H2) 및 95-102(H3); 문헌[Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)] 및/또는 "초가변 루프"로부터의 해당 잔기(예를 들어, 경쇄 가변 도메인에서 잔기 26-32(L1), 50-52(L2) 및 91-96(L3) 및 중쇄 가변 도메인에서 26-32(H1), 53-55(H2) 및 96-101(H3); 문헌[Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)]로부터의 아미노산 잔기를 포함한다. "프레임워크 영역" 또는 "FR" 잔기는 본 명세서에 정의된 초가변 영역 잔기 이외의 해당 가변 도메인 잔기이다. 초가변 영역 또는 이것의 CDR은 하나의 항체 체로부터 다른 것에 또는 다른 단백질에 전달되어 결과(복합) 항체 또는 결합 단백질에 항원 결합 특이성을 부여할 수 있다.
- [0090] 비-인간(예를 들어, 설치류) 항체의 "인간화된" 형태는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대개, 인간화된 항체는 수용자의 초가변 영역으로부터의 잔기가 원하는 특이성, 친화도 및 수용력을 갖는 비-인간 중(공여체 항체), 예컨대 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류의 초가변 영역으로부터의 잔기로 대체되는 인간 면역글로불린이다. 일부 예에서, 인간 면역글로불린의 프레임워크(FR) 잔기는 대응되는 비-인간 잔기로 대체된다. 더 나아가, 인간화된 항체는 수용인 항체에서 또는 공여체 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 항체 성능을 추가로 개선시키도록 한다. 일반적으로, 인간화된 항체는 적어도 하나, 전형적으로는 2개의 가변 도메인 중 실질적으로 모두를 포함하는데, 초가변 루프의 모두 또는 실질적으로 모두는 비-인간 면역글로불린의 그것에 대응되고, FR의 모두 또는 실질적으로 모두는 인간 면역글로불린 서열의 그것이다. 인간화된 항체는 면역글로불린 불변 영역(Fc), 전형적으로 인간 면역글로불린의 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 것이다. 추가의 상세한 설명에 대해서는, 문헌[Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); 및 문헌[Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596

(1992)]을 참조하면 된다.

- [0091] "친화도 성숙된" 항체는 해당 변질(들)을 갖지 않는 모 항체와 비교하여, 항원에 대해 항체의 친화도의 개선을 야기하는 이것의 하나 이상의 초가변 영역에서 하나 이상의 변질을 지니는 것이다. 일 양태에서, 친화도 성숙된 항체는 표적 항원에 대해 나노몰 또는 심지어 피코몰의 친화도를 가질 것이다. 친화도 성숙된 항체는 당업계에 공지된 과정에 의해 생성된다. 문헌[Marks *et al.* *Bio/Technology* 10:779-783 (1992)]은 VH 및 VL 도메인 서플링에 의한 친화도 성숙을 기재한다. CDR 및/또는 프레임워크 잔기의 무작위 돌연변이유발은 문헌[Barbas *et al.* *Proc Nat. Acad. Sci.*, USA 91:3809-3813 (1994); Schier *et al.* *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton *et al.* *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); 및 Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992)]에 의해 기재되어 있다.
- [0092] "단리된" 항체는 그것의 천연 환경의 성분으로부터 식별되고, 확인되며/되거나 회수된 것이다. 특정 실시형태에서, 항체는 (1) 로리(Lowry) 방법에 의해 결정된 바와 같이 단백질의 95중량% 초과 및 대안적으로 99중량% 초과로, (2) 스피닝 컵 서열분석기(spinning cup sequenator)의 사용에 의해 N-말단의 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개 잔기를 얻기에 충분한 정도로, (3) 쿠마씨 블루(Coomassie blue) 또는 은 염색을 사용하는 환원성 또는 비환원성 조건 하에 SDS-PAGE에 의해 균질하게 정제될 것이다. 단리된 항체는 항체의 천연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문에 재조합 세포 내에서 인시츄로 항체를 포함한다. 그러나, 보통, 단리된 항체는 적어도 하나의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.
- [0093] "치치"는 치료적 치치와 예방적 또는 방지적 측정을 둘 다 지칭한다. 치료가 필요한 대상은 이미 질병이 있는 대상뿐만 아니라 질병 또는 그것의 재발이 예방되어야 하는 대상을 포함한다. 따라서, 본 명세서에서 치료되는 환자는 질병을 갖는 것을 진단될 수 있거나 또는 질병의 성향이 있거나 또는 질병의 여지가 있을 수 있다. 용어 "환자" 및 "피험체"는 본 명세서에서 상호 호환적으로 사용된다.
- [0094] 조제되는 항체는 실질적으로 순수하고, 원한다면 실질적으로 동종이다(즉, 오염 단백질 등이 없음). "실질적으로 순수한" 항체는 단백질의 전체 중량을 기준으로 적어도 약 90중량%, 대안적으로 적어도 약 95중량% 또는 97중량%를 포함하는 조성물을 의미한다. "실질적으로 동종인" 항체는 단백질을 포함하는 조성물을 의미하되, 단백질의 적어도 약 99중량%는 단백질의 전체 중량을 기준으로 특이적 항체, 예를 들어 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체이다.
- [0095] 궤양성 대장염 피험체에 대해 본 명세서에서 사용되는 "임상적 관해"는 완전 마요(Mayo) 스코어가 2점 미만이고, 개개의 하위스코어가 1점을 초과하지 않는 것을 지칭한다. 크론병 "임상적 관해"는 CDAI 스코어가 150점 이하인 것을 지칭한다.
- [0096] 궤양성 대장염 피험체에 대해 본 명세서에서 사용되는 "임상적 반응"은 1점 이상의 직장 출혈 하위스코어 또는 1점 이하의 절대 직장 출혈 스코어로 수반되는 감소와 함께, 완전 마요 스코어가 3점 이상, 기준으로부터 30% (또는 완전 마요 스코어가 방문시 수행되지 않는다면, 2점 이상의 부분적 마요 스코어 및 기준으로부터 25% 이상)인 감소를 지칭한다. 크론병에 대해 본 명세서에서 사용된 "임상적 반응"은 기준(제0주)으로부터 CDAI 스코어의 70점 이상을 지칭한다.
- [0097] 궤양성 대장염 피험체에 대해 본 명세서에서 사용된 "점막 치유"는 1점 이하의 내시경 하위스코어를 지칭한다.
- [0098] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, "치료 실패"는 질병 악화, 궤양성 대장염 또는 크론병의 치료를 위한 응급 의약 또는 수술적 개입에 대한 필요를 지칭한다. 응급 약물은 (만성 설자의 제어를 위한 항설사약 이외의) 새로운 또는 해결되지 않은 궤양성 대장염 또는 크론병 증상을 치료하기 위해 필요한 임의의 신규 의약 또는 기준 의약 용량의 임의의 증가이다.
- [0099] **제형**
- [0100] 본 명세서에 기재된 바와 같이, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 항산화제 또는 킬레이터와 함께 제형화될 때 더 안정한 것으로 발견되었다. 추가로, 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 응집물 형성을 감소시키기 위해 제형화될 수 있다(예를 들어, 제형에서 폴리솔베이트 80의 양은 감소될 수 있다). 예를 들어, 시트레이트 또는 EDTA 및 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 포함하는 제형은 저장 동안 항체 응집물 형성 속도를 감소시킨다. 제형은 응집물 형성을 감소시키기 위해 산소 없이 저장될 수 있다. 일 실시형태에서, 제형은 12개월 후 25°C에서 약 2.5% 미만의 항체 응집물 형성을 가진다. 일 실시형태에서, 제형은 12개월 후 25°C에서 약 2.0% 미만의 항체 응집물 형성을 가진다. 일 실시형태에서, 제형은 12개월 후 25°C에서 약 1.6% 미만의 항체 응집물 형성을 가진다. 일 실시형태에서, 제형은 12개월 후 25°C에서 약 1.3% 미만의 항체 응집물 형성을 가진다. 일 실시형태에서, 제형은 12개월 후 25°C에서 약 1.0% 미만의 항체 응집물 형성을 가진다. 다른 실시형태에서, 제형은 12개월 후 5°C에서 약

0.5% 미만의 항체 응집물 형성을 가진다. 다른 실시형태에서, 제형은 12개월 후 5℃에서 약 0.3% 미만의 항체 응집물 형성을 가진다.

[0101] 본 발명은, 제1 양태에서, 안정적인 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형을 제공한다. 제형은 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 및 항산화제 또는 킬레이터를 포함한다. 제형은 하나 이상의 유리 아미노산일 수 있는 완충제를 포함한다. 제형은 선택적으로 계면활성제를 추가로 포함할 수 있다. 제형의 항체는 전장 항체 또는 이것의 항원 결합 단편, 예컨대 Fab, Fv, scFv, Fab' 또는 F(ab')₂ 단편일 수 있다.

[0102] 응집물 형성은 제형으로부터 산소를 제거함으로써 감소될 수 있다. 대안적으로, 제형은 항산화제 또는 킬레이터를 함유할 수 있다. 일 양태에서, 제형에 포함될 수 있는 대표적인 항산화제 및 킬레이터는 리포산, 요산, 글루타티온, 토코페롤, 카로텐, 라이코펜, 시스테인, 에틸렌다이아민테트라아세트산(EDTA), 에틸렌글라이콜테트라아세트산(EGTA), 다이머카프롤, 다이에틸렌트라이아민펜타아세트산 및 N,N-비스(카복시메틸)글라이신, 포스포네이트 화합물, 예를 들어, 에디트론산, 데스페루사민, 말레이트 및 시트레이트를 포함한다. 일부 항산화제 및 킬레이터는 제형의 저장 동안 응집물 형성 속도를 감소시킬 수 있다. 다른 양태에서, 킬레이터 및/또는 항산화제는 시트레이트 또는 EDTA이다. 액체 제형에 대한 대표적인 킬레이터 농도는 약 0mM 내지 약 60mM, 약 5mM 내지 약 50mM, 약 5mM 내지 약 15mM, 약 10mM 내지 약 25mM, 내지 약 20 내지 약 30mM의 범위에 있다. 다른 양태에서, 킬레이터 농도는 약 0mM 내지 약 30mM이다. 일 실시형태에서, 킬레이터 및/또는 항산화제는 시트레이트이고, 시트레이트 농도는 약 0mM 내지 약 15mM, 약 0mM 내지 약 10mM, 또는 약 0mM 내지 약 5mM이다.

[0103] 제형은 임의의 원하는 하나의 유리 아미노산을 함유할 수 있는데, 이는 L-형태, D-형태 또는 이들 형태의 임의의 원하는 혼합물일 수 있다. 일 양태에서, 제형에 포함될 수 있는 유리 아미노산은, 예를 들어 히스티딘, 알라닌, 알기닌, 글라이신, 글루탐산, 세린, 리신, 트립토판, 발린, 시스테인 및 이들의 조합을 포함한다. 일부 아미노산은, 예를 들어 수소 결합, 염 브릿지, 항산화제 특성 또는 소수성 상호작용 또는 단백질 표면으로부터의 배제에 의해 제조, 건조, 동결건조 및/또는 저장 동안 분해에 대해 단백질을 안정화시킬 수 있다. 아미노산은 등장성 변형체로서 작용할 수 있고, 제형의 점성도를 감소시키도록 작용할 수 있다. 다른 양태에서, 유리 아미노산, 예컨대 히스티딘 및 알기닌은 동결건조보호체로서 작용할 수 있고, 제형의 성분으로서 동결건조될 때 결정화되지 않는다. 유리 아미노산, 예컨대 글루탐산 및 히스티딘은 단독으로 또는 조합으로 5 내지 7.5의 pH 범위의 수용액 중에서 완충체로서 작용할 수 있다. 추가의 또 다른 양태에서, 제형은 히스티딘, 알기닌, 또는 히스티딘 및 알기닌의 조합물을 함유한다. 추가의 또 다른 양태에서, 액체 제형에 대한 유리 아미노산 농도는 약 9mM 내지 약 0.5 M, 예를 들어, 약 10mM 내지 약 90mM, 약 10mM 내지 약 75mM, 약 10mM 내지 약 40mM, 약 25mM 내지 약 50mM, 약 15mM 내지 약 300mM, 약 20mM 내지 약 200mM, 약 25mM 내지 약 150mM, 약 50mM 내지 약 75mM, 약 50mM 내지 약 120mM, 약 50 내지 약 150mM, 또는 약 50mM 또는 약 125mM의 범위에 있다.

[0104] 제형은 선택적으로, 예를 들어 가용성 및 불용성 응집물 형성을 제어하기 위해 적어도 한 종의 계면활성제를 추가로 함유할 수 있다. 일 양태에서, 계면활성제는 비-이온성 계면활성제이다. 다른 양태에서, 계면활성제는 이온성 계면활성제이다. 제형에 포함될 수 있는 대표적인 계면활성제는, 예를 들어, 폴리솔베이트 20, 폴리솔베이트 80, 폴록사머(플루로닉(Pluronic)(등록상표)) 및 이들의 조합물을 포함한다. 존재할 때, 계면활성제는 실리콘, 충전 바이알, 사전충전된 주사기 및/또는 카트리지의 존재에서, 예를 들어 보틀링(bottling), 냉동, 건조, 동결건조 및/또는 재구성 동안 항체의 불용성 응집물의 형성을 감소시키는 양으로 일반적으로 포함된다. 계면활성제 농도는 일반적으로 약 0.0001% 내지 약 1.0%, 약 0.01% 내지 약 0.5%, 예를 들어, 약 0.05%, 0.1%, 0.15%, 0.20%, 0.3%, 0.4% 또는 0.5%(w/v)이다. 더 높은 농도의 계면활성제, 예를 들어, 폴리솔베이트 80은 더 많은 SEC 응집물 형성을 야기할 수 있다. 폴리솔베이트 80의 농도 감소는 저장 시 SEC 응집물 형성을 감소시킬 수 있다. 일 양태에서, 계면활성제:항체 몰 비는 약 0.7:1 내지 약 2.0:1이다. 다른 양태에서, 계면활성제:항체 몰 비는 1.5:1이다.

[0105] 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형의 실시형태는 고농도의 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 함유한다. 예를 들어, 일 실시형태에서, 액체 제형은 적어도 약 60 mg/ml, 적어도 약 70 mg/ml, 적어도 약 80 mg/ml, 적어도 약 90 mg/ml, 적어도 약 100 mg/ml, 적어도 약 110 mg/ml, 적어도 약 120 mg/ml, 적어도 약 130 mg/ml, 적어도 약 140 mg/ml, 적어도 약 150 mg/ml, 적어도 약 160 mg/ml, 적어도 약 170 mg/ml, 적어도 약 180 mg/ml, 적어도 약 190 mg/ml, 적어도 약 200 mg/ml, 적어도 약 250 mg/ml, 적어도 약 300 mg/ml, 약 60 mg/ml 내지 약 190 mg/ml, 약 60 mg/ml 내지 약 170 mg/ml 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체, 약 150 mg/ml 내지 약 180 mg/ml, 또는 약 160 mg/ml 또는 약 165 mg/ml 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 포함할 수 있다. 대안적으로, 다른 양태에서, 액체 제형은 적어도 약 154 mg/ml, 적어도 약 176 mg/ml를 포함할 수 있다.

- [0106] 제형은 액체 또는 고체일 수 있다. 액체 제형은 수용액 또는 현탁액이며, 적합한 수성 용매, 예컨대 물 또는 수성/유성 혼합물, 예컨대 물 알코올 혼합물에서 제조된다. 액체 제형은 약 5.5 내지 약 7.5, 약 6.0 내지 7.3, 약 6.0 내지 약 7.0, 약 6.0 내지 6.5, 약 6.0 내지 6.3, 약 6.3 내지 7.1 또는 약 6.4 내지 7.0, 또는 6.3 내지 6.8, 예컨대 약 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8 또는 6.9의 pH를 가진다. 액체 제형은 저장 동안 실온, 냉장(예를 들어, 2 내지 8℃) 또는 냉동(예를 들어, -20℃ 또는 -70℃)에서 유지될 수 있다.
- [0107] 고체 제형은 임의의 적합한 방법으로 제조될 수 있고, 예를 들어, 동결건조보호제의 첨가에 의해 케이크 또는 분말의 형태일 수 있다. 일 양태에서, 고체 제형은 본 명세서에서 기재된 바와 같은 액체 제형을 건조시킴으로써, 예를 들어 동결건조 또는 분무 건조에 의해 제조된다. 제형이 고체 제형일 때, 제형은 약 5% 이하, 약 4.5% 이하, 약 4% 이하, 약 3.5% 이하, 약 3% 이하, 약 2.5% 이하, 약 2% 이하, 약 1.5% 이하, 약 1% 이하의 수분 함량을 가질 수 있거나, 또는 실질적으로 무수물일 수 있다. 고체 제형은 투여에 적합한 액체가 되는 적합한 배지 또는 용매에서 용해될 수 있고, 즉 재구성될 수 있다. 고체 제형을 재구성하기 위한 적합한 용매는 물, 등장성 식염수, 완충제, 예를 들어, 인산염-완충 식염수, 링거(락테이트화 또는 텍스트로스) 용액, 최소 필수 배지, 알코올/수성 용액, 텍스트로스 용액 등을 포함한다. 용매의 양은 건조 전 농도보다 더 높거나, 동일하거나 또는 더 낮은 치료적 단백질 농도를 야기할 수 있다. 다른 양태에서, 재구성된 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 농도는 사전-건조 액체 제형에서와 동일한 농도이다.
- [0108] 제형은 멸균일 수 있고, 이는 제형의 제조 전 또는 후 인간 피험체에게 투여에 적합한 멸균의 약제학적 제형을 만들기 위해 당업자에게 공지된 절차에 따라서 달성될 수 있다. 제형은 작은 기공을 통한 여과에 의해, 무균 가공을 통해 또는 초음파 방사선에 노출에 의해, 예를 들어 건조 전 및/또는 재구성 후 액체로서 멸균될 수 있다. 필터 기공 크기는 필터 미생물유기체에 대해 0.1 μ m 또는 0.2 μ m 또는 필터 바이러스 입자에 대해 10 내지 20nm일 수 있다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 건조된 제형은, 예를 들어 감마 방사선에 노출에 의해 멸균될 수 있다. 일 양태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 액체 제형은 건조 전 여과에 의해 멸균된다.
- [0109] 일 양태에서, 제형은 저장 시 안정하다. 다양한 안정성 분석은 제형의 안정성을 확인하기 위해 당업자에게 이용 가능하다. 예를 들어, 액체 제형에서 항체는 적어도 약 4주, 적어도 약 2개월, 적어도 약 3개월, 또는 적어도 약 6개월, 또는 적어도 약 9개월, 또는 적어도 약 12개월; 약 2 내지 8℃ 적어도 약 3개월, 적어도 약 1년, 적어도 약 2년, 적어도 약 3년 이상 동안 약 25℃에서 저장 시 안정적일 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 제형의 항체는 적어도 약 4주, 적어도 약 3개월, 적어도 약 6개월, 적어도 약 9개월, 적어도 약 1년 이상 동안 약 15℃에서 저장 시 안정적일 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 제형의 항체는 적어도 약 4주; 적어도 약 3개월, 적어도 약 6개월, 적어도 약 9개월, 적어도 약 1년, 적어도 약 2년, 적어도 약 3년, 적어도 약 4년 이상 동안 약 -20℃ 또는 -70℃에서 저장 시 안정적일 수 있다.
- [0110] 안정성은 제형화 시간뿐만 아니라 주목한 온도에서 다음의 저장 내내 제형 내 항체의 생리적 안정성, 화학적 안정성, 및/또는 생물학적 활성을 평가함으로써 시험될 수 있다. 액체 제형 또는 재구성된 건조 분말의 생리적 및/또는 화학적 안정성은 가용성 및 불용성 응집물 형성(예를 들어, 크기 배제 크로마토그래피, 분석 초원심분리, MALDI-TOF MS, 광 산란(dynamic (DLS) 또는 MALLS), 유동-기반 현미경 영상화, 또는 다른 액체 입자 계측 시스템을 사용하여, 탁도 측정에 의해, 밀도 구배 원심분리에 의해 및/또는 시각적 검사에 의해); 양이온 교환 크로마토그래피(또한 문헌[Vlasak and Ionescu, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 9:468-481 (2008)] 및 문헌[Harris *et al. J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 752:233-245 (2001)] 참조), 정전위점 초점화 또는 모세관 전기영동을 사용하여 전하 이질성을 평가함으로써; 아미노-말단 또는 카복시 말단 서열 분석; 질량 분광 분석; 단편화, 무결합 및 멀티머(즉, 다이머, 트라이머 등) 항체를 비교하기 위한 SDS-PAGE 분석; 펩타이드 맵(예를 들어 트립신 또는 LYS-등)의 평가를 포함하여, 다양한 상이한 방법으로 정성적으로 및/또는 정량적으로 평가될 수 있다 (예를 들어, 문헌[*Analytical Techniques for Biopharmaceutical Development*, Rodriguez-Diaz *et al.* eds. Informa Healthcare (2005)] 참조). 불안정성은 응집, 탈아미드화(예를 들어, Asn 탈아미드화), 산화(예를 들어, Met 산화), 이성질체화(예를 들어, Asp 이성질체화), 변성, 클리핑/가수분해/단편화(예를 들어, 힌지 영역 단편화), 숙신이미드 형성, 짝지어지지 않은 시스테인(들), N-말단 확장, C-말단 처리, 글라이코실화 차이 등을 야기할 수 있다. 생물학적 활성 또는 항원 결합 기능, 예를 들어, MAdCAM(예를 들어, MAdCAM-1)에 대한 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 결합 또는 MAdCAM(예를 들어, MAdCAM-1)에 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린을 발현시키는 세포 결합의 억제, 예를 들어, 고정된 MAdCAM(예를 들어, MAdCAM-1)은 당업자에게 이용가능한 다양한 기법을 사용하여 평가될 수 있다 (예를 들어, 문헌[Soler *et al.*, *J. Pharmacol. Exper. Ther.* 330:864-875 (2009)] 참조). 건조 제형의 수분 함량 측정은 제형이 화학적 또는 생리적 분해를 겪을 가능성이 있는 방법을 표시할 수 있는데, 더 높은 수분은 더 많은 분해를 야기한다.

- [0111] 안정한 제형은 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 낮은 면역원성에 기인할 수 있다. 면역원성 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 인간 피험체 또는 환자에서 인간-항-인간 항체(human-anti-human antibody: HAHA) 반응을 야기할 수 있다. 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체에 대한 HAHA 반응이 발생한 환자는 치료시 이상반응(예를 들어, 부위 주입 반응)이 있을 수 있거나 또는 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 빠르게 제거할 수 있는데, 이는 치료에 의해 계획된 것보다 더 낮은 용량을 야기한다. 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 처리의 초기 연구 보고(Feagen et al. (2005) N. Engl. J. Med. 352:2499-2507)는 인간 항인간 항체가 치료된 환자의 44%에서 8주까지 발생한다는 것을 표시하였다. 이 연구에서 항체는 액체로서 저장되었고, 어떤 폴리솔베이트를 함유하지 않는다.
- [0112] 일부 실시형태에서, 제형은 덜 안정한 제형의 HAHA 결과와 비교하여 환자의 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80% 또는 적어도 90%에 대해 HAHA 음성 환자의 비율을 증가시킬 수 있다.
- [0113] 일부 실시형태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형은 $\geq 50\%$ 주요 하전 아이소폼, $\geq 55\%$ 주요 하전 아이소폼, 또는 65 내지 70% 주요 하전 아이소폼을 가진다. 다른 양태에서, 안정한 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형은 $\leq 45\%$ 산성 하전 아이소폼, $\leq 40\%$ 산성 하전 아이소폼, $\leq 30\%$ 산성 하전 아이소폼 또는 22 내지 28% 산성 아이소폼을 가진다. 또 다른 양태에서, 안정한 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형은 $\leq 25\%$ 염기성 아이소폼, $\leq 20\%$ 염기성 아이소폼, $\leq 15\%$ 염기성 아이소폼, 약 5% 염기성 아이소폼 또는 약 10% 염기성 아이소폼을 가진다. 일 양태에서, 안정한 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형은, 예를 들어 CEX에서 결정되는 바와 같이 $\geq 55\%$ 주요 아이소폼, $\leq 30\%$ 산성 아이소폼 및/또는 $\leq 20\%$ 염기성 아이소폼을 가진다. 다른 양태에서, 안정한 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형은, 예를 들어 cIEF에 의해 결정되는 바와 같이 $\geq 50\%$ 주요 아이소폼, $\leq 45\%$ 산성 아이소폼 및/또는 $< 10\%$ 염기성 아이소폼을 가진다.
- [0114] 일부 양태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 건조, 고체 제형은 $\leq 10\%$ 수분 함량, $\leq 5\%$ 수분 함량 또는 $< 2.5\%$ 수분 함량을 가진다. 재구성에 필요한 시간은 ≤ 60 분, ≤ 50 분 또는 ≤ 40 분 또는 ≤ 30 분 또는 ≤ 20 분이다.
- [0115] 모노머 함량 및/또는 응집물 함량(예를 들어, 다이머, 트라이머, 테트라머, 펜타머, 올리고머 및 더 고차의 응집물로서)(즉, 액체 제형에서, 또는 재구성된 제형에서)는 SEC, 분석 초원심분리, 광 산란(DLS 또는 MALLS), MALDI-TOF MS 또는 나노규모 측정, 예컨대 나노입자 트래킹 분석 NTA, 영국 윌트셔에 소재한 나노사이트 리미티드(NanoSight Ltd))에 의해 측정될 수 있다. 응집물의 분해능, 특징 및 정량화는 SEC 컬럼 분리의 길이를 증가시키는 것을 포함하는 다수의 방법으로, 예를 들어 더 긴 컬럼에 의해 또는 처음의 분석 SEC 컬럼과 연결된 제2 또는 그 이상의 SEC 컬럼(들)의 직렬 부착에 의해, 광 산란에 의해 모노머의 SEC 정량화를 보충하여, 또는 NTA를 사용함으로써 달성될 수 있다.
- [0116] 일 실시형태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형은 $\geq 90\%$ 모노머 항체, $\geq 95\%$ 모노머 항체, 또는 97 내지 99% 모노머 항체를 가진다. 다른 실시형태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형에서 대다수의 물질은 $\leq 20\text{nm}$, $\leq 15\text{nm}$, $\leq 10\text{nm}$, 또는 약 5 내지 약 7nm의 평균 반경을 가진다. 일 양태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형은 단백질 분석에 의해 $\geq 80\%$ 량의 중쇄 + 경쇄를 가진다. 일 양태에서, $\geq 90\%$ 중쇄 + 경쇄가 있다. 다른 양태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형은 $\leq 10\%$ 응집물, $\leq 5\%$ 응집물, $\leq 2.5\%$ 응집물, $\leq 1.5\%$ 응집물, $\leq 1.0\%$ 응집물 또는 $\leq 0.5\%$ 응집물을 가진다. 다른 양태에서, 안정한 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형은 $\geq 96\%$ 모노머 및/또는 $\leq 2.5\%$ 응집물을 가진다. 또 다른 양태에서, 안정한 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형은 약 99% 모노머 및/또는 약 $< 1\%$ 응집물을 가진다.
- [0117] 예를 들어, 응집물 또는 미용해 부형제의, 즉, 액체 제형에서 또는 재구성된 제형에서 1 내지 2 마이크로론 초과 입자 크기는 광 오퍼(obscurtion)(예를 들어, 하크 울트라 애널리틱스(Hach Ultra Analytics)(오레곤주 그랜즈 패스에 소재)에 의한 액체 입자 계측 시스템(HIAC)), 현미경 검사, 쿨터 카운터(coulter counter) 또는 디지털(예를 들어, 유동-기반) 현미경 이미징 기반 시스템, 예컨대 브라이트웰(캘리포니아주 오타와에 소재)에 의한 마이크로플루이드릭스 이미징(microfluidics imaging: MFI) 또는 플루이드 이미징 테크놀로지스(메인주 야머스 에 소재)에 의한 플로우캠(FLOWCAM(등록상표)) 이미지 입자 분석기에 의해 측정될 수 있다. 일 양태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제제의 입자 크기는 약 $30 \mu\text{m}$, 약 $25 \mu\text{m}$, 약 $10 \mu\text{m}$, 약 $5 \mu\text{m}$, 약 $2 \mu\text{m}$ 또는 $1 \mu\text{m}$ 이하이다. 입자의 양은 항체 제형에서 최소화되어야 한다. 일 양태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형의 입자의 양은 1 용량에서 $\geq 10 \mu\text{m}$ 직경의 < 6000 개 입자이고/이거나 $\geq 25 \mu\text{m}$ 직경의 < 600 개 입자이다(미국약전(U.S. Pharmacopoeia) Chp. 788, 광 오퍼 계측 방법; 현미경 정량화 방법에 의한 절반의 해당량). 다른 양태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형의 용량에서 입자의 양은 $\geq 10 \mu\text{m}$ 의 약 1000개 입자 및 $\geq 25 \mu\text{m}$ 의 약 0 내지 100개 입자이다(MFI 방법). 또 다른 양태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형의 용량에서, 예를 들어 MFI 측정에 의해 밀리리터 당 입자의 양은 mL 당 약 500 내지 약 2000개의 2 내지 $10 \mu\text{m}$ 입자, mL 당 약 50 내지 약 350개의 $\geq 10 \mu\text{m}$ 입자 및 mL 당 약 0 내지 약 50개의 $\geq 25 \mu\text{m}$ 입자이다. 또 다른 양태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형의 용량에서 입자의 양은 mL 당 약 500 내지 약 100,000개, 약 1000개 내지 약 5000개 또는 약 1500 내지 약 3000개의 약 2 내지 $10 \mu\text{m}$ 입자이다.

- [0118] 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형의 점성도는 피하 또는 근육내 투여를 위해 제어될 수 있다. 점성도는 단백질 농도 및 pH에 의해 영향받을 수 있다. 예를 들어, 단백질 농도가 증가함에 따라, 점성도는 증가할 수 있다. pH의 증가는 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형의 점성도를 감소시킬 수 있다. 일부 단백질 제형에서, 염화나트륨은 제형의 점성도를 감소시키기 위해 첨가된다. 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형의 점성도에 영향을 미칠 수 있는 추가적인 성분은 히스티딘 및 알기닌과 같은 아미노산이다.
- [0119] 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형은, 예를 들어 피하 또는 근육내 투여에 대해 등장성(예를 들어, 250-350mOsm) 또는 고장성(예를 들어, 350mOsm 초과, 450mOsm 초과, 550mOsm 초과 또는 650mOsm 초과)일 수 있다. 일 양태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형은 저장성이 아니며, 예를 들어 250mOsm 미만이다. 다른 양태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형은 약 350 내지 약 400mOsm, 약 400 내지 약 450mOsm 또는 약 350 내지 약 450mOsm이다.
- [0120] 변성을 야기하는 불안정성은 시차주사 열량측정법(differential scanning calorimetry: DSC)에 의해 평가될 수 있다. 항체는 DSC의 2개의 용융온도(T_m), 예를 들어, T_{m1} 및 T_{m2} 를 가진다. 특정 부형제는 천연 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 안정성에 영향을 미친다. DSC에 의해 제형을 비교할 때 더 높은 용융 온도의 발견은 더 높은 T_m 에 의해 더 안정한 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형을 나타낼 수 있다. 예를 들어, pH 5.7에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형의 T_m 은 낮으며, 따라서 pH 6.5에서보다 덜 안정하다. 일 양태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형의 T_{m1} 은 $>60^\circ\text{C}$ 이다. 다른 양태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형의 T_{m1} 은 약 65°C 내지 약 70°C 또는 약 69°C 이다. 일 양태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형의 T_{m2} 는 $>80^\circ\text{C}$ 이다. 다른 양태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형의 T_{m2} 는 약 82°C 내지 약 88°C 또는 약 86°C 이다.
- [0121] 일 실시형태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형은 기준 표준 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 약 60% 내지 약 140%의 결합 친화도 또는 EC50 값을 가진다. 일 양태에서, 본 명세서에 기재된 제형에서 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 기준 표준의 약 80% 내지 약 120%의 값에서, 예를 들어 세포 상에서 $\alpha 4\beta 7$ 에 결합된다(W098/06248 또는 미국특허 제7,147,851호). 다른 실시형태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형은 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린을 MAdCAM(예를 들어, MAdCAM-1), 예를 들어, MAdCAM-Ig 키메라로 발현시키는 세포의 결합의 적어도 50% 또는 적어도 60%를 억제하는 능력을 가진다(또한 기준 표준 실시예에 대해 미국특허 출원 공개 제20070122404호).
- [0122] 상기 논의한 바와 같이, 제형의 냉동은 본 명세서에서 구체적으로 고려된다. 따라서, 제형은 냉동 및 해동 시 안정성에 대해 시험될 수 있다. 따라서, 액체 제형의 항체는 제형의 냉동 및 해동 시 안정적인 수 있고, 예를 들어 항체는 1, 2, 3, 4, 5 이상의 냉동/해동 주기 후 안정적인 수 있다.
- [0123] 일부 실시형태에서, 약제학적 제형은 적어도 약 60 mg/ml 내지 약 170 mg/ml 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체, 완충제(예를 들어, 히스티딘) 및 적어도 약 5mM 시트레이트를 포함하는 액체 제형이다. 다른 실시형태에서, 제형은 적어도 약 60 mg/ml 내지 약 170 mg/ml 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체, 완충제(예를 들어, 시트레이트), 아미노산(예를 들어, 알기닌) 및 계면활성제(예를 들어, 폴리솔베이트 80)를 포함하는 액체 제형이다.
- [0124] 다른 실시형태에서, 제형은 적어도 약 140 mg/ml 또는 약 150 mg/ml 내지 약 170 mg/ml, 예를 들어, 약 160 mg/ml의 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체, 완충제(예를 들어, 히스티딘), 적어도 약 5mM 시트레이트 및 유리 아미노산(예를 들어, 알기닌)을 포함한다.
- [0125] 또 다른 실시형태에서, 제형은 적어도 약 160 mg/ml의 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체, 완충제(예를 들어, 히스티딘), 적어도 약 5mM 시트레이트, 0.2% 폴리솔베이트 80 및 유리 아미노산(예를 들어, 알기닌)을 포함한다. 실시형태에서, 제형의 완충제 농도는 약 15 내지 약 75mM, 약 25 내지 약 65mM, 또는 약 50mM이다. 제형의 유리 아미노산 농도는 약 50 내지 약 250mM, 약 75 내지 약 200mM, 약 100 내지 약 150mM 또는 약 125mM이고; 지형의 폴리솔베이트 80 농도는 약 0.05% 내지 0.4%, 약 0.1% 내지 0.4%, 약 0.1% 내지 0.3%, 약 0.1% 내지 0.25%, 약 0.1% 내지 0.2%, 또는 약 0.2%이다.
- [0126] 일부 실시형태에서, 제형은 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체, 시트레이트, 히스티딘, 알기닌, 폴리솔베이트 80 및 동결건조보호제 또는 당류, 예컨대 비-환원 당의 혼합물을 포함하는 고체 제형(예를 들어, 동결건조된 제형)이다. 당류는 0% 내지 20%, 또는 약 6% 내지 약 10%의 농도에 도달되도록 액체 제형에 포함될 수 있다.
- [0127] 일 실시형태에서, 제형은 하나의 용기, 예를 들어 바이알, 주사기, 카트리지 및/또는 자동 주사기 내에 단일 용량으로서 동결건조되고, 저장된다. 용기는 치료가 필요한 피험체에게 투여될 때까지 약 2 내지 8°C 또는 25°C 로 저장될 수 있다. 바이알은, 예를 들어 5, 10 또는 20cc 바이알(예를 들어, 160 mg/ml 용량에 대해)일 수 있다. 바이알은 적어도 약 20mg, 적어도 약 50mg, 적어도 약 70mg, 적어도 약 80mg, 적어도 약 100mg, 적어도 약 120mg, 적어도 약 155mg, 적어도 약 180mg, 적어도 약 200mg, 적어도 약 240mg, 적어도 약 300mg, 적어도 약 360mg, 적어도 약 400mg, 적어도 약 540mg 또는 적어도 약 900mg의 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 함유할 수 있다. 일 양태

에서, 용기는 약 165mg의 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 함유한다.

[0128] 다른 실시형태에서, 제형은 액체이며, 1 또는 2개의 바이알, 카트리지, 주사기 또는 자동 주사기에서 단일 용량으로서 저장된다. 바이알, 카트리지 또는 자동 주사기는 그것의 내용물, 예를 들어 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체가 치료가 필요한 피험체에게 투여될 때까지 약 2 내지 8°C에 저장될 수 있다. 바이알은, 예를 들어 5, 10 또는 20cc 바이알(예를 들어 160 mg/ml 용량에 대해)일 수 있다. 바이알은 적어도 약 20mg, 적어도 약 50mg, 적어도 약 70mg, 적어도 약 80mg, 적어도 약 100mg, 적어도 약 120mg, 적어도 약 155mg, 적어도 약 180mg, 적어도 약 200mg, 적어도 약 240mg, 적어도 약 300mg, 적어도 약 360mg, 적어도 약 400mg, 적어도 약 540mg 또는 적어도 약 900mg의 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 함유할 수 있다. 일 양태에서, 바이알은 약 165mg의 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 함유한다. 주사기 또는 카트리지는, 예를 들어 더 높은 용량에 대해(적어도 320mg 또는 400mg 이상) 1ml 또는 2ml 용기(예를 들어 160 mg/ml 용량에 대해) 또는 2ml 초과일 수 있다. 주사기 또는 카트리지는 적어도 약 20mg, 적어도 약 50mg, 적어도 약 70mg, 적어도 약 80mg, 적어도 약 100mg, 적어도 약 120mg, 적어도 약 155mg, 적어도 약 180mg, 적어도 약 200mg, 적어도 약 240mg, 적어도 약 300mg, 적어도 약 360mg, 적어도 약 400mg 또는 적어도 약 500mg의 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 함유할 수 있다.

[0129] 하나 이상의 다른 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정제, 예컨대 문헌[*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21st Edition, Hendrickson, R. Ed. (2005)]에 기재된 것은 제형에 포함될 수 있는데, 단, 제형의 원하는 특징에 부정적으로 영향을 미치지 않는다. 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정제는 사용되는 투약량 및 농도에서 수용인에게 무해하고, 추가적인 완충제; 공용매; 시트레이트 및 시스테인을 포함하는 항산화제; EDTA와 같은 킬레이트제; 금속 착물(예를 들어, Zn-단백질 복합체); 폴리에스터와 같은 생분해성 중합체; 보존제; 주입의 용이함을 위한 용기벽 윤활제, 예를 들어, 실리콘, 광유, 글라이세린 또는 트라이보글라이드(TRIBOGLIDE(등록상표))(트라이보 필름 리서치 인코포레이티드(Tribo Film Research, Inc.)) 퍼플루오로폴리에터 유도체, 및/또는 나트륨과 같은 염-형성 반대이온을 포함한다.

[0130] $\alpha 4\beta 7$ 항체

[0131] 제형에서 사용에 적합한 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 임의의 원하는 공급원으로부터의 항체, 예컨대 완전 인간 항체, 무린 항체, 토끼 항체 등 및 임의의 원하는 유전자조작된 항체, 예컨대 키메라 항체, 인간화된 항체 등을 포함한다. 이들 유형의 항체 중 어떤 것의 항원-결합 단편, 예컨대 Fab, Fv, scFv, Fab' 및 F(ab')₂ 단편은 또한 제형에서 사용에 적합하다.

[0132] 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 $\alpha 4$ 쇄 상의(예를 들어, 인간화된 MAb 21.6(Bendig 등의 미국특허 제5,840,299호)), $\beta 7$ 쇄 상의(예를 들어, FIB504 또는 인간화된 유도체(예를 들어, Fong 등의 미국특허 제7,528,236호)) 에피토프에, 또는 $\alpha 4$ 쇄와 $\beta 7$ 쇄의 결합에 의해 형성된 조합 에피토프에 결합될 수 있다. 일 양태에서, 항체는 $\alpha 4\beta 7$ 복합체 상의 조합 에피토프에 결합되지만, 달리쇄가 서로 결합되지 않는다면, $\alpha 4$ 쇄 또는 $\beta 7$ 쇄 상의 에피토프에 결합되지 않는다. $\alpha 4$ 인테그린과 $\beta 7$ 인테그린의 결합은 에피토프를 함께 포함하는쇄 둘다에 존재하는 근위 잔기로 이동시킴으로써 또는 하나의쇄, 예를 들어 $\alpha 4$ 인테그린쇄 또는 $\beta 7$ 인테그린쇄 상에 적절한인테그린 상대가 없거나 또는 인테그린 활성화가 없는 항체 결합에 접근가능하지 않은 에피토프 결합 부위를 입체구조적으로 노출시킴으로써 만들 수 있다. 다른 양태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 $\alpha 4$ 인테그린쇄와 $\beta 7$ 인테그린쇄 둘다에 결합되며, 따라서, $\alpha 4\beta 7$ 인테그린 복합체에 특이적이다. 이러한 항체는 $\alpha 4\beta 7$ 에 결합될 수 있지만, $\alpha 4\beta 1$ 에 결합되지 않고/않거나, 예를 들어 $\alpha_E\beta 7$ 에 결합되지 않는다. 다른 양태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 Act-1 항체와 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 에피토프에 결합된다(Lazarovits, A. I. et al., *J. Immunol.*, 133(4): 1857-1862 (1984), Schweighoffer et al., *J. Immunol.*, 151(2): 717-729, 1993; Bednarczyk et al., *J. Biol. Chem.*, 269(11): 8348-8354, 1994). 무린 Act-1 단클론성 항체를 생성하는 무린 ACT-1 하이브리도마 세포주는 미국 매사추세츠주 02139 캠프릿지 랜즈다운 스트리트 40에 소재한 밀레니엄 파마슈티컬스 인코포레이티드(Millennium Pharmaceuticals, Inc.)를 대신하여 2001년 8월 22일의 부다페스트 조약 조항 하에서 미국 버지니아주 매너서스 20110-2209 유니버시티 불러바드 10801 미국 미생물 보존센터(American Type Culture Collection)에서 등록번호 PTA-3663 하에 기탁되었다. 다른 양태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 미국 출원 공개 제 2010/0254975호에 제공된 CDR를 사용하는 인간 항체 또는 $\alpha 4\beta 7$ 결합 단백질이다.

[0133] 일 양태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 하나 이상의 그것의 리간드(예를 들어, 점막 어드레신, 예를 들어, MAdCAM(예를 들어, MAdCAM-1), 피브로넥틴, 및/또는 혈관 어드레신(VCAM)) 중 하나 이상에 $\alpha 4\beta 7$ 의 결합을 억제한다. 영양류 MAdCAM(예를 들어, MAdCAM-1)은 국제특허출원 공개 WO 96/24673호에 기재되어 있으며, 그의 전체 교시는 전문이 본 명세서에 참조로서 포함된다. 다른 양태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 VCAM의 결합을 억제하지 않고 MAdCAM

(예를 들어, MAdCAM-1) 및/또는 피브로넥틴에 $\alpha 4\beta 7$ 의 결합을 억제한다.

[0134] 일 양태에서, 제형에서 사용을 위한 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 마우스 Act-1 항체의 인간화된 형태이다. 인간화된 항체를 제조하기 위한 적합한 방법은 당업계에 잘 공지되어 있다. 일반적으로, 인간화된 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 마우스 Act-1 항체 및 적합한 인간 중쇄 프레임워크 영역의 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR, CDR1, 서열번호 8, CDR2, 서열번호 9 및 CDR3, 서열번호 10)을 함유하는 중쇄를 함유할 것이며; 또한, 마우스 Act-1 항체 및 적합한 인간 경쇄 프레임워크 영역의 3개의 경쇄 CDR(CDR1, 서열번호 11, CDR2, 서열번호 12 및 CDR3, 서열번호 13)을 함유하는 경쇄를 함유한다. 인간화된 Act-1 항체는 아미노산 치환이 있거나 또는 없는 컨센서스 프레임워크 영역을 포함하는 임의의 적합한 인간 프레임워크 영역을 함유할 수 있다. 예를 들어, 프레임워크 아미노산 중 하나 이상은 다른 아미노산, 예컨대 마우스 Act-1 항체에서 대응되는 위치에서 아미노산으로 대체될 수 있다. 인간 불변 영역 또는 이것의 일부는, 존재한다면, 대립유전자 변이체를 포함하는 κ 또는 λ 경쇄, 및/또는 γ (예를 들어, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$), μ , α (예를 들어, $\alpha 1$, $\alpha 2$), δ 또는 ϵ 중쇄의 인간 항체로부터 유래될 수 있다. 특히 불변 영역(예를 들어, IgG1), 이것의 변이체 또는 일부는 효과기 기능을 맞추기 위해서 선택될 수 있다. 예를 들어, 돌연변이된 불변 영역(변이체)은 Fc 수용체에 대한 결합 및/또는 보체를 고정하는 능력을 최소화하도록 융합 단백질에 포함될 수 있다(예를 들어, 1994년 12월 22일의 Winter 등의 GB 제2,209,757B호; Morrison 등의 WO 89/07142호; Morgan 등의 WO 94/29351 참조). Act-1 항체의 인간화된 형태는 국제특허 공개 W098/06248호 및 W007/61679호에서 기재되어 있으며, 그의 각각의 전체 교시는 본 명세서에 참조로서 포함된다.

[0135] 다른 양태에서, 제형에서 사용을 위한 항- $\alpha 4\beta 7$ 인간화된 항체는 서열번호 2의 아미노산 20 내지 140을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 4의 아미노산 20 내지 131 또는 서열번호 5의 아미노산 21 내지 132를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 원한다면, 적합한 인간 불변 영역(들)이 존재할 수 있다. 예를 들어, 인간화된 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 서열번호 2의 아미노산 20 내지 470을 포함하는 중쇄 및 서열번호 5의 아미노산 21 내지 239를 포함하는 경쇄를 포함할 수 있다. 다른 예에서, 인간화된 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 서열번호 2의 아미노산 20 내지 470을 포함하는 중쇄 및 서열번호 4의 아미노산 20 내지 238을 포함하는 경쇄를 포함할 수 있다. 도 4는 뮤린 항체를 지니는 인간 항체의 유전적 경쇄와 비교되는 정렬을 나타낸다. 정렬은 인간 잔기에 대해 전환된 2개의 마우스 잔기를 지니는 베돌리주맵의 인간화된 경쇄(예를 들어, 화학 초록 서비스(Chemical Abstract Service: CAS, 미국 화학 협회) 등록 번호 943609-66-3)는 LDP-02의 경쇄보다 더 인간화된다는 것을 도시한다(도 3). 추가로, LDP-02는 다소 소수성, 가요성 알라닌(114) 및 베돌리주맵에서 약간 친수성인 하이드록실-함유 트레오닌(114) 및 소수성의, 잠재적으로 안쪽으로 접하는 발린(115) 잔기로 대체된 친수성 부위(아스파테이트(115))를 가진다.

[0136] 항체 서열에 대한 추가 치환은, 예를 들어 중쇄 및 경쇄 프레임워크 영역으로 돌연변이, 예컨대 서열번호 14의 잔기 2 상에서 아이소류신의 발린으로 돌연변이; 서열번호 14의 잔기 4 상에서 메티오닌의 발린으로 돌연변이; 서열번호 15의 잔기 24 상에서 알라닌의 글라이신으로 돌연변이; 서열번호 15의 잔기 38 상에서 알기닌의 리신으로 돌연변이; 서열번호 15의 잔기 40 상에서 알라닌의 알기닌으로 돌연변이; 서열번호 15의 잔기 48 상에서 메티오닌의 아이소류신으로 돌연변이; 서열번호 15의 잔기 69 상에서 아이소류신의 류신으로 돌연변이; 서열번호 15의 잔기 71 상에서 알기닌의 발린으로 돌연변이; 서열번호 15의 잔기 73 상에서 트레오닌의 아이소류신으로 돌연변이; 이들의 임의의 조합; 및 중쇄 CDR의 마우스 Act-1 항체의 CDR(CDR1, 서열번호 8, CDR2, 서열번호 9 및 CDR3, 서열번호 10)로 치환; 및 경쇄 CDR의 마우스 Act-1 항체의 경쇄 CDR(CDR1, 서열번호 11, CDR2, 서열번호 12 및 CDR3, 서열번호 13)로 치환될 수 있다.

[0137] 일부 실시형태에서, 제형에서 사용을 위한 항- $\alpha 4\beta 7$ 인간화된 항체는 서열번호 2의 아미노산 20 내지 140에 대해 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 4의 아미노산 20 내지 131 또는 서열번호 5의 아미노산 21 내지 132에 대해 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 포함한다. 아미노산 서열 동일성은 디폴트 변수를 사용하여 레이저진 시스템(Lasergene system)(위스콘신주 매디슨에 소재한 DNA스타 인코포레이티드(DNASTAR, Inc.))과 같은 적합한 서열 정렬 알고리즘을 사용하여 결정될 수 있다. 실시형태에서, 제형에서 사용을 위한 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 베돌리주맵이다(CAS, 미국 화학 협회, 등록 번호 943609-66-3).

[0138] 다른 $\alpha 4\beta 7$ 항체는 또한 본 명세서에 기재된 제형 및 투약 요법에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 전문이 참조로서 포함된 미국특허 제2010/0254975호(암젠 인코포레이티드(Amgen, Inc.))에 기재된 $\alpha 4\beta 7$ 항체는 제형 및 개체에서 염증성 장질환을 치료하는 방법에서 사용에 적합하다.

[0139] 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 살아있는 세포, 예를 들어 배양물 내 세포에서 각각의쇄를 암호화하는 핵산 서열의 발현에

의해 생성될 수 있다. 다양한 숙주-발현 벡터 시스템은 본 발명의 항체 분자를 발현시키기 위해 이용될 수 있다. 이러한 숙주-발현 시스템은 관심의 암호 서열이 생성되고, 실질적으로 정제되는 비히클을 나타내지만, 또한 적절한 뉴클레오타이드 암호 서열로 형질전환되거나 또는 형질감염될 때 인시츄로 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 발현시킬 수 있는 세포를 나타낸다. 이들은, 이하에 제한되는 것은 아니지만, 미생물유기체, 예컨대 항체 암호 서열을 함유하는 재조합 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환된 박테리아(예를 들어, 이콜라이(*E. coli*), 바실러스 서브틸리스(*B. subtilis*)); 항체 암호 서열을 함유하는 재조합 효모 발현 벡터로 형질전환된 효모(예를 들어, 사카로마이세스(*Saccharomyces*), 피키아(*Pichia*)); 항체 암호 서열을 함유하는 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들어, 바콜로바이러스)로 감염된 곤충 세포 시스템; 항체 암호 서열을 함유하는 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들어, 꽃양배추모자이크바이러스(cauliflower mosaic virus: CaMV); 담배 모자이크 바이러스(tobacco mosaic virus: TMV))로 감염되거나 또는 재조합 플라스미드 발현 벡터(예를 들어, Ti 플라스미드)로 형질전환된 식물 세포 시스템; 또는 포유류 세포의 계놈으로부터 유래된 프로모터(예를 들어, 메탈로티오네인 프로모터) 또는 포유류 바이러스로부터 유래된 프로모터(예를 들어, 아데노바이러스 후기 프로모터; 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터)를 함유하는 포유류 세포 시스템(예를 들어, COS, CHO, BHK, 293, 3T3, NS0 세포)은 재조합 발현 구성체를 포함한다. 예를 들어, 포유류 세포, 예컨대 중국 햄스터 난소 세포(Chinese hamster ovary cell: CHO)는 인간 거대세포바이러스로부터의 주요 중간체 조기 유전자 프로모터 구성 요소와 같은 벡터와 함께 항체에 대한 효과적인 발현 시스템이다(Foecking *et al.*, *Gene* 45:101 (1986); Cockett *et al.*, *Bio/Technology* 8:2 (1990)).

[0140] 박테리아 시스템에서, 다수의 발현 벡터는 발현되는 항체 분자에 대해 의도되는 용도에 따라서 유리하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 항체 분자의 약제학적 조성물의 생성에 대해 다량의 이러한 단백질이 생성될 때, 용이하게 정제되는 융합 단백질 생성물의 고수준의 발현을 지시하는 벡터가 바람직할 수 있다. 이러한 벡터는, 이하에 제한되는 것은 아니지만, 이콜라이 발현 벡터 pUR278(Ruther *et al.*, *EMBO J.* 2:1791 (1983))(여기서, 항체 암호 서열은 lac Z 암호 영역을 지니는 프레임에서 벡터에 개별적으로 결합될 수 있고, 따라서 융합 단백질이 생성됨); pIN 벡터(Inouye & Inouye, *Nucleic Acids Res.* 13:3101-3109 (1985); Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 24:5503-5509 (1989)) 등을 포함한다. pGEX 벡터는 또한 글루타티온 S-트랜스퍼라제(glutathione S-transferase: GST)와 함께 융합 단백질로서 외래 폴리펩타이드를 발현시키기 위해 사용될 수 있다. 일반적으로, 이러한 융합 단백질은 가용성이며, 매트릭스 글루타티온-아가로스 비드에 흡착 및 결합 다음에 유리 글루타티온의 존재에서 용리에 의해 용해된 세포로부터 용이하게 정제될 수 있다. pGEX 벡터는 트롬빈 또는 인자 Xa 프로테아제 절단 부위를 포함하도록 설계되며, 따라서 클로닝된 표적 유전자 생성물은 GST 모이어티로부터 방출될 수 있다.

[0141] 곤충 시스템에서, 아우토그라파 캘리포니카 핵다면체바이러스(*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: AcNPV)는 외래 유전자를 발현시키기 위해 벡터로서 사용된다. 바이러스는 스포도페라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) 세포에서 성장한다. 항체 암호 서열은 바이러스의 비-필수 영역(예를 들어, 폴리헤드린 유전자)에 개별적으로 클로닝될 수 있고, AcNPV 프로모터(예를 들어, 폴리헤드린 프로모터)의 제어 하에 놓인다.

[0142] 포유류 숙주 세포에서, 다수의 바이러스-계 발현 시스템이 이용될 수 있다. 아데노바이러스가 발현 벡터로서 사용되는 경우, 관심의 항체 암호 서열은 아데노바이러스 전사/번역 제어 복합체, 예를 들어 후기 프로모터 및 3 부(tripartite) 리더 서열에 결합될 수 있다. 이 키메라 유전자는 그 다음에 시험관내 또는 생체내 재조합에 의해 아데노바이러스 계놈에 삽입될 수 있다. 바이러스 계놈의 비-필수 영역의 삽입(예를 들어, 영역 E1 또는 E3)은 살아있을 수 있고, 감염된 숙주에서 항체 분자를 발현시킬 수 있는 재조합 바이러스를 야기할 것이다(예를 들어, 문헌[Logan & Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:355-359 (1984)]). 특이적 개시 신호는 또한 삽입된 암호 서열의 효율적인 번역에 필요할 수 있다. 이들 신호는 ATG 개시 코돈 및 인접한 서열을 포함한다. 더 나아가, 개시 코돈은 전체 삽입물의 번역을 보장하기 위해 원하는 암호 서열의 리딩 프레임과 일치하여야 한다. 이들 외인성 번역 제어 신호 및 개시 코돈은 다수의 유래, 천연과 합성 둘 다를 가질 수 있다. 발현 효율은 적절한 전사 인핸서 구성요소, 전사 종결자 등의 포함에 의해 향상될 수 있다(문헌[Bittner *et al.*, *Methods in Enzymol.* 153:51-544 (1987) 참조]).

[0143] 추가로, 삽입된 서열의 발현을 조절하거나, 또는 원하는 구체적 형식에서 유전자 생성물을 변형하고 처리하는 숙주 세포 군주가 선택될 수 있다. 단백질 생성물의 이러한 변형(예를 들어, 글라이코실화) 및 처리(예를 들어, 절단)는 단백질의 기능에 중요할 수 있다. 상이한 숙주 세포는 단백질의 번역후 처리 및 변형 및 유전자 생성물에 대해 특징적이며 구체적인 메커니즘을 가진다. 적절한 세포주 또는 숙주 시스템은 발현되는 외래 단백질의

정확한 변형 및 처리를 보장하도록 선택될 수 있다. 이를 위하여, 유전자 생성물의 1차 전사, 글라이코실화 및 인산화반응의 적절한 처리를 위한 세포 기구를 소유하는 진핵 숙주 세포가 사용될 수 있다. 이러한 포유류 숙주 세포는, 이하에 제한되는 것은 아니지만, 중국 햄스터 난소(CHO), NS0, HeLa, VERY, 새끼 햄스터 신장(baby hamster kidney: BHK), 원숭이 신장(COS), MDCK, 293, 3T3, WI38, 인간 간세포암 세포(예를 들어, Hep G2), 유방암 세포주, 예를 들어, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 및 T47D, 및 정상 유선 세포주, 예를 들어, CRL7030 및 Hs578Bst를 포함한다.

[0144] 상이한 세포유형의 글라이코실화 기구는 박테리아 세포와 마찬가지로 다른 세포 유형에서보다 상이한 글라이코실화 조성물을 지니는 또는 글라이코실화가 없는 항체를 생성할 수 있다. 일 양태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 생성을 위한 세포 유형은 포유류 세포, 예컨대 NS0 또는 CHO 세포이다. 일 양태에서, 포유류 세포는 세포 대사에 수반된 효소의 결실을 포함할 수 있고, 관심의 외인성 유전자는, 예를 들어 세포에 도입을 위한 작제물 또는 벡터에서, 예를 들어 형질전환 또는 형질감염에 의해 대체 효소에 작동가능하게(operably) 연결될 수 있다. 외인성 유전자를 지니는 작제물 또는 벡터는 외인성 유전자에 의해 암호화된 폴리펩타이드의 생성을 조장하는 선별 이점을 작제물 또는 벡터의 숙주가 되는 세포에 부여한다. 일 실시형태에서, CHO 세포는 다이하이드로폴레이트 환원효소 유전자의 결실 또는 불활성화를 포함하는 DG44 세포(Chasin and Urlaub (1980) *PNAS USA* 77:4216)이다. 다른 실시형태에서, CHO 세포는 글루타민 신타제 유전자의 결실 또는 불활성화를 포함하는 CHO K1 세포이다(예를 들어, 미국특허 제5,122,464호 또는 제5,827,739호 참조).

[0145] 고체 제형

[0146] 본 발명의 고체 제형은 일반적으로 액체 제형을 건조시킴으로써 제조된다. 임의의 적합한 건조 방법, 예컨대 동결건조 또는 분무 건조가 사용될 수 있다. 일 양태에서, 동결건조보호제는 동결건조 전에 제형에 첨가된다. 동결건조는 보통 제형을 저장하고, 출하하며 유통시키기 위해 사용될 용기(예를 들어, 바이알, 주사기(예를 들어 단일- 또는 이중-챔버 주사기) 또는 카트리지(예를 들어, 단일- 또는 이중-챔버 카트리지)에서 액체 제형을 냉동시키는 단계를 수반한다(예를 들어, 문헌[Gatlin and Nail in *Protein Purification Process Engineering*, ed. Roger G. Harrison, Marcel Dekker Inc., 317-367 (1994)] 참조). 일단 제형이 냉동되면, 대기압은 감소되고, 온도는, 예를 들어 승화를 통해 냉동된 용매를 제거하도록 조절된다. 이 동결건조 과정의 단계는 때때로 1차 건조로서 지칭된다. 원한다면, 그 다음에 온도는 상승되어 또한 증발에 의해 건조 제형에 결합된 어떤 용매를 제거할 수 있다. 이 단계의 동결건조 과정은 때때로 2차 건조로서 지칭된다. 제형은 원하는 정도의 건조에 도달될 때까지, 건조 과정이 끝나며, 용기는 밀봉된다. 최종 고체 제형은 때때로 "동결건조된 제형" 또는 "케이크"로서 지칭된다. 동결건조 과정은 임의의 적합한 도구를 사용하여 수행될 수 있다. 적합한 동결건조 도구는 다수의 상업적 공급원으로부터 입수가 가능하다(예를 들어, 뉴욕주 스톤 락지에 소재한 에스피 사이언티픽(SP Scientific)).

[0147] 고체(예를 들어, 동결건조된) 제형을 생성하기 위해 다수의 적합한 장치가 건조 액체 제형에 사용될 수 있다. 일반적으로, 동결건조된 제형은 건조되는 액체 제형의 바이알이 위치되는 칸을 포함하는 밀봉된 챔버를 사용하여 당업자에 의해 제조된다. 칸의 온도뿐만 아니라 냉각 및 가열 속도는 챔버 내부의 압력과 같이 제어될 수 있다. 본 명세서에서 논의되는 다양한 과정 변수는 이런 유형의 장치를 사용하여 수행되는 과정을 지칭하는 것으로 이해될 것이다. 당업자는 원한다면 다른 유형의 건조 장치에 본 명세서에 기재된 변수를 용이하게 적용할 수 있다.

[0148] 1차 및 2차 건조를 위한 적합한 온도 및 진공의 양은 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 일반적으로 제형은 약 -30°C 이하, 예컨대 -40°C 또는 -50°C 의 온도에서 냉동된다. 냉각속도는 매트릭스 내 얼음 결정의 양 및 크기에 영향을 미칠 수 있다. 1차 건조는 냉동 온도보다 약 10°C , 약 20°C , 약 30°C , 약 40°C 또는 약 50°C 더 따뜻한 온도에서 일반적으로 수행된다. 일 양태에서, 1차 건조 조건은 제형의 유리 전이 온도 또는 붕괴 온도 미만에서 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 유지하도록 설정될 수 있다. 단백질 분자는 강성의 고체 매트릭스에 의해 둘러싸이지 않을 수 있고, 단백질 분자가 붕괴된 매트릭스에서 안정하지 않을 수 있는 것의 결과로서 붕괴 온도 초과에서, 무정형 냉동 매트릭스는 유동(붕괴)될 수 있다. 또한, 제형은 붕괴가 일어난다면, 완전히 건조되기 어려울 수 있다. 얻어진 제형 내 다량의 수분은 더 높은 단백질 분해 속도 및 품질이 허용가능한 수준으로 감소되기 전 동결건조된 생성물이 저장될 수 있는 시간 양의 감소를 야기할 수 있다. 일 양태에서, 보관 온도 및 챔버 압력은 1차 건조 동안 붕괴 온도 미만으로 생성물 온도를 유지하도록 선택된다. 냉동된 제형의 유리 전이 온도는, 예를 들어 시차 주사 열량측정법(DSC)에 의해 당업계에 공지된 방법에 의해 측정될 수 있다. 붕괴 온도는 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 냉동-건조 현미경 검사, 광학 간섭성 단층촬영에 의해 측정될 수 있다. 건조 단계는 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70% 이상의 용매를 제거할 수 있다. 일 양태에서, 1차 건조 단계는 항- $\alpha 4$

$\beta 7$ 항체 제형으로부터 용매의 80% 초과를 제거한다.

[0149] 바이알 크기는 칸 및 동결건조 동안 진공에 노출될 표면적을 기준으로 선택될 수 있다. 건조 시간은 케이크 높이에 직접 비례하며, 따라서 바이알 크기는 합리적인 케이크 높이가 되는 것으로 결정되는 것을 기준으로 선택될 수 있다. 용적에 대해 거대 직경을 지니는 바이알은 동결건조 주기 동안 효율적인 열 전달을 위해 칸과 다량의 접촉을 제공할 수 있다. 고용적의 액체 내 희석 항체 용액은 건조 동안 더 많은 시간을 필요로 할 것이다. 제형 용적에 대한 바이알 크기의 균형이 파괴될 필요가 있는데, 더 큰 바이알은 저장하고 출하하는데 더 비용이 들 수 있고, 더 큰 공간부분 대 제형 비를 가질 수 있으며, 장기간의 저장 동안 수분의 분해 효과에 대해 높은 비율의 제형을 노출시킬 수 있기 때문이다. 165mg 용량에 대해, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형의 바이알 크기는 3ml, 5ml 또는 10ml일 수 있다. 일 양태에서, 바이알 크기는 160 mg/ml 용액에 대해 5ml이다.

[0150] 동결건조를 위한 카트리지 또는 주사기 크기를 선택하기 위한 원칙은 바이알에 대한 원칙과 유사하다. 케이크 높이의 깊이는 또한 높이가 증가함에 따라 건조 시간을 증가시킬 것이다. 주사기 또는 카트리지의 직경 및 크기는 최종 제형 용적에 의해 상쇄되어야 한다. 더 큰 직경은 동결건조된 케이크에서 수분 흡수 속도를 증가시킬 수 있고, 따라서, 저장 동안 수분의 분해 효과를 증가시킨다. 165mg 용량에 대해, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형 용적은 1ml 또는 2ml일 수 있다. 일 양태에서, 주사기 또는 카트리지 크기는 160 mg/ml 용액에 대해 1ml 초과이다.

[0151] 동결건조 후, 바이알, 주사기 또는 카트리지는 밀봉될 수 있고, 예를 들어 진공 하에 마개로 막을 수 있다. 대안적으로, 기체, 예를 들어 건조 공기 또는 질소는 밀봉 전 용기에 허용될 수 있다. 산화에 관해서, 동결건조 챔버 내로 허용된 기체는 동결건조된 생성물의 산화를 지연시키거나 방지하는 기체를 포함할 수 있다. 일 양태에서, 기체는 비-산화 기체, 예를 들어 질소, 또는 비활성 기체, 예를 들어 헬륨, 네온, 아르곤, 크립톤 또는 제논이다. 다른 양태에서, 기체는 질소 또는 아르곤이다.

[0152] 항체 제형에 의한 처리

[0153] 일 양태에서, 본 발명은, 예를 들어 인간에서 질병 또는 장애를 치료하기에 효과적인 양으로 본 명세서에 기재된 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형을 피험체에 투여하는 단계를 포함하는, 피험체에서 질병 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 인간 피험체는 성인(예를 들어 18세 이상), 청소년 또는 어린이일 수 있다. 인간 피험체는 65세 이상의 사람일 수 있다. 대안적인 치료적 투약 요법과 대조적으로, 65세 이상의 인간 피험체는 본 명세서에 기재된 투약 요법의 임의의 변형을 필요로 하지 않으며, 본 명세서에 기재된 통상적인 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형이 투여될 수 있다.

[0154] 피험체는 면역조절제, TNF- α 길항물질 또는 이들의 조합에 의한 치료에 대한 적절한 반응의 결여이 있을 수 있거나, 또는 이들에 대해 불내성(intolerant)이다. 환자는 염증성 장질환에 대해 적어도 한 종의 코르티코스테로이드(예를 들어, 프레드니손)에 의한 이전에 수용된 치료를 가질 수 있다. 코르티코스테로이드에 대한 부적절한 반응은 2주동안 매일 경구로 또는 1주 동안 정맥내로 프레드니손 30mg과 동등한 용량을 포함한 적어도 하나의 4-주 유발 요법의 이력에도 불구하고, 지속적으로 활성인 질병의 징후 및 증상을 지칭한다. 코르티코스테로이드에 대한 반응의 상실은 매일 경구로 프레드니손 10mg과 동등한 용량 미만으로 코르티코스테로이드를 점점 줄이는 2회의 실패한 시도를 지칭한다. 코르티코스테로이드의 불내성은 쿠싱 증후군, 골감소증/골다공증, 고혈당증, 불면증 및/또는 감염의 이력을 포함한다.

[0155] 면역조절제는, 예를 들어 경구 아자티오프린, 6-머캅토피린 또는 메토트렉세이트일 수 있다. 면역조절제에 대한 부적절한 반응은 적어도 하나의 8주 요법 또는 경구 아자티오프린(≥ 1.5 mg/kg), 6-머캅토피린(≥ 0.75 mg/kg), 또는 메토트렉세이트(≥ 12.5 mg/주)의 이력에도 불구하고 지속적으로 활성인 질병의 징후 및 증상을 지칭한다. 면역조절제의 불내성은, 이하에 제한되는 것은 아니지만, 구역/구토, 복부 통증, 체장염, LFT 이상, 림프구감소증, TPMT 유전적 돌연변이 및/또는 감염을 포함한다.

[0156] TNF- α 길항물질은, 예를 들어, TNF- α 의 생물학적 활성을 억제하며, 바람직하게는 TNF- α , 예컨대 단클론성 항체, 예를 들어, 레미케이드(REMICADE)(인플릭시맵), 휴미라(HUMIRA)(아달리무맵), 심지아(CIMZIA)(세툴리주맵 페골), 심포니(SIMPONI)(골리무맵) 또는 순환 수용체 융합 단백질, 예컨대 엔브렐(ENBREL)(에타너셉트)에 결합되는 작용제이다. TNF- α 길항물질에 대한 부적절한 반응은 적어도 한 번의 4주 유도 요법의 인플릭시맵 5 mg/kg IV, 적어도 2주 간격으로 2회 투약; 적어도 2주 간격으로 아달리무맵의 1회 80mg 피하 투약 후, 1회 40mg 용량; 또는 피하로 세툴리주맵 페골의 400mg, 적어도 2주 간격으로 2회 투약의 이력에도 불구하고 지속적으로 활성인 질병의 징후 및 증상을 지칭한다. TNF- α 길항물질에 대한 반응의 손실은 사전 임상적 이점 다음에 유지 투약 동안 증상의 재발을 지칭한다. TNF- α 길항물질의 불내성은, 이하에 제한되는 것은 아니지만, 주입 관련

반응, 탈수조, 울혈성심부전 및/또는 감염을 포함한다.

- [0157] 궤양성 대장염 피험체에 대해 본 명세서에 사용된 바와 같은 관해의 유지 손실은 적어도 3점의 마요 스코어 및 적어도 2의 변형 바론 스코어(Modified Baron Score)의 증가를 지칭한다.
- [0158] 다른 양태에서, 본 발명은 (1) 시험관내 및/또는 생체내 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린에 결합할 수 있고; (2) $\alpha 4\beta 7$ 인테그린의 활성 또는 기능, 예컨대 (a) 결합 기능(예를 들어, MAdCAM(예를 들어, MAdCAM-1), 피브로넥틴 및/또는 VCAM-1에 결합되는 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린의 능력) 및/또는 (b) 조직에서 백혈구의 채택 및/또는 축적을 포함하는 백혈구 침윤 기능(예를 들어, 장 점막 조직에 대한 림프구 이동을 억제하는 능력)을 조절할 수 있는 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형을 제공한다. 일 실시형태에서, 제형에서 항체는 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린에 결합될 수 있고, 그것의 리간드(예를 들어, MAdCAM (예를 들어, MAdCAM-1), VCAM-1, 피브로넥틴) 중 하나 이상에 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린의 결합을 억제할 수 있고, 이에 의해 조직의 백혈구 침윤(조직에서 백혈구의 채택 및/또는 축적을 포함)을 억제한다. 다른 실시형태에서, 제형에서 항체는 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린에 결합될 수 있고, 그것의 리간드(예를 들어, MAdCAM(예를 들어, MAdCAM-1), VCAM-1, 피브로넥틴) 중 하나 이상에 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린의 결합을 선택적으로 억제할 수 있으며, 이에 의해, 조직의 백혈구 침윤(조직에서 백혈구의 채택 및/또는 축적을 포함)을 억제한다. 이러한 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형은 시험관내 및/또는 생체내에서 장-결합 조직, 림프 조직 기관 또는 백혈구(특히 T 또는 B 세포와 같은 림프구)를 포함하는 점막 조직에서 혈관 내피 세포에 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린을 함유하는 세포의 세포 부착을 억제할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형은 $\alpha 4\beta 7$ 과 MAdCAM(예를 들어, MAdCAM-1) 및/또는 피브로넥틴의 상호작용을 억제할 수 있다. 또한 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형은, 예를 들어 $\alpha 4\beta 7$ 과 VCAM의 상호작용을 억제하지 않고 $\alpha 4\beta 7$ 의 MAdCAM(예를 들어, MAdCAM-1)과 상호작용을 억제할 수 있다.
- [0159] 본 발명의 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형은 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린의 결합 기능 및/또는 백혈구(예를 들어, 림프구, 단핵구) 침윤 기능을 조절하기 위해(예를 들어 억제(감소 또는 방지)하기 위함) 사용될 수 있다. 예를 들어, 리간드(즉, 하나 이상의 리간드)에 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린의 결합을 억제하는 인간화된 면역글로불린은 조직의, 특히 분자 MAdCAM(예를 들어, MAdCAM-1)을 발현시키는 조직의 백혈구(예를 들어, 림프구, 단핵구) 침윤(조직에서 백혈구의 채택 및/또는 축적을 포함)과 관련된 질병의 치료 방법에 따라서 투여될 수 있다.
- [0160] 본 발명의 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형(즉, 하나 이상)의 유효량은 이러한 질병을 치료하기 위해서 개체(예를 들어, 포유류, 예컨대 인간 또는 다른 영장류)에게 투여된다. 예를 들어, 위장관(장-관련 내피를 포함), 다른 점막 조직 또는 분자 MAdCAM(예를 들어, MAdCAM-1)을 발현시키는 조직(예를 들어, 장-관련 조직, 예컨대 소장 및 대장의 점막고유층(lamina propria)의 세정막; 및 유선(예를 들어, 수유성 유선))의 백혈구 침윤과 관련된 질병을 포함하는, 염증 질병이 본 방법에 따라 치료될 수 있다. 유사하게, MAdCAM(예를 들어, MAdCAM-1)을 발현시키는 세포에 백혈구 결합의 결과로서 조직의 백혈구 침윤과 관련된 질병을 갖는 개체는 본 발명에 따라 치료될 수 있다.
- [0161] 일 실시형태에서, 따라서 치료될 수 있는 질병은 염증성 장질환(IBD), 예컨대 궤양성 대장염, 크론병, 회장염, 셀리악병, 비열대성 스프루, 혈청음성 척추관절염과 관련된 장병증, 미세형 또는 교원성 대장염, 호산구성 위장염, 또는 직장결장절제술 후 생긴 맹장염, 및 회장 문합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 염증성 장질환은 크론병 또는 궤양성 대장염이다. 궤양성 대장염은 보통 내지 중증의 활성 궤양성 대장염일 수 있다. 치료는 보통 내지 중증의 활성 궤양성 대장염에 걸린 환자에서 점막 치유를 야기할 수 있다. 치료는 또한 환자에 의한 코르티코스테로이드 사용의 감소, 제거 또는 감소와 제거를 야기할 수 있다.
- [0162] 췌장염 및 인슐린 의존성 당뇨병은 본 발명의 제형을 사용하여 치료될 수 있는 다른 질병이다. MAdCAM(예를 들어, MAdCAM-1)은 NOD(비비만성 당뇨병) 마우스뿐만 아니라 BALB/c 및 SJL 마우스로부터의 외분비 췌장에서 일부 혈관에 의해 발현된다는 것이 보고되었다. MAdCAM(예를 들어, MAdCAM-1)의 발현은 보고에 의하면 NOD 마우스의 췌장의 염증이 생긴 섬 내 내피 상에서 유발되며, MAdCAM(예를 들어, MAdCAM-1)은 초기 단계의 소도염에서 NOD 섬 내피에 의해 발현되는 우세한 어드레신이었다(Hanninen, A., *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 92: 2509-2515 (1993)). 항-MAdCAM 또는 항- $\beta 7$ 항체 중 하나에 의한 NOD 마우스의 처리는 당뇨병의 발생을 방지하였다(Yang *et al.*, *Diabetes*, 46:1542-1547 (1997)). 추가로, 섬 내에서 $\alpha 4\beta 7$ 를 발현시키는 림프구의 축적이 관찰되었고, MAdCAM-1은 염증이 생긴 섬으로부터 혈관에 대해(Hanninen, A., *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 92: 2509-2515 (1993)) 또는 외투세포 림프종에서 위장관에 대해 $\alpha 4\beta 7$ 를 통해 림프종 세포의 결합에 연루되었다(Geissmann *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 153:1701-1705 (1998)).
- [0163] 본 발명의 제형을 사용하여 치료될 수 있는 점막 조직과 관련된 염증성 질병의 예는, 예를 들어, 장 또는 담도 주위(담관 또는 간의 주변 조직)의 담낭염, 담관염(Adams and Eksteen *Nature Reviews* 6:244-251 (2006) Grant

et al., *Hepatology* 33:1065-1072 (2001)), 예를 들어, 원발경화성 담관염, 베체트병, 및 이식편대 숙주반응 (예를 들어, 위장관에서(예를 들어, 골수 이식 후)(Petrovic et al. *Blood* 103:1542-1547 (2004))을 포함한다. 크론병에서 알 수 있는 바와 같이, 염증은 종종 점막면 위로 연장되고, 따라서 만성 염증 질병, 예컨대 유육종증, 만성 위염, 예를 들어, 자가면역 위염(Kataikai et al., *Int. Immunol.*, 14:167-175 (2002)) 및 다른 특발성 질환은 치료될 수 있다.

[0164] 본 발명은 또한 점막 조직의 백혈구 침윤을 억제하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 암(예를 들어, $\alpha 4\beta 7$ 양성 종양, 예컨대 림프종)을 치료하기 위한 방법에 관한 것이다. 본 발명의 제형을 사용하여 치료될 수 있는 점막 조직과 관련된 염증 질병의 다른 예는 유방염(유선) 및 과민성 대장 증후군을 포함한다.

[0165] 병인이 $\alpha 4\beta 7$ 과 MAdCAM(예를 들어, MAdCAM-1)의 상호작용을 이용하는 질병 또는 병원균은 본 명세서에 기재된 제형에서 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체로 처리될 수 있다. 이러한 질병의 예는 인간 면역결핍 바이러스에 의해 야기되는 것과 같은 면역결핍 장애를 포함한다(예를 들어, WO2008140602호 참조).

[0166] 본 발명의 제형은 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린을 이것의 리간드에 대한 결합을 억제하는데 유효한 양으로 투여된다. 치료를 위해, 유효량은 원하는 치료적(예방적을 포함) 효과(예컨대 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린-매개 결합 및/또는 신호처리를 감소시키거나 또는 방지하기에 충분한 양, 이에 의해 백혈구 접착 및 침윤 및/또는 관련된 세포 반응을 억제함)를 달성하기에 충분한 것이다. 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 유효량, 예를 들어, $\alpha 4\beta 7$ 인테그린의 포화, 예를 들어 중화를 유지하기에 충분한 효과적인 역가는 염증성 장질환에서 임상적 반응 또는 관해를 포함할 수 있다. 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 유효량은 궤양성 대장염 또는 크론병에서 점막 치유를 야기할 수 있다. 본 발명의 제형은 1회 용량 또는 다회 용량으로 투여될 수 있다. 투약량은 당업계에 공지된 방법에 의해 결정될 수 있고, 예를 들어 개체의 연령, 민감성, 관용 및 전반적인 웰빙에 의존할 것이다. 투여 방식의 예는 국소 경로, 예컨대 비강 또는 흡입 또는 경피 투여, 장 경로, 예컨대 공급관 또는 좌약을 통해, 및 비경구 경로, 예컨대 정맥내, 근육내, 피하, 동맥내, 복강내 또는 유리체내 투여를 포함한다. 항체에 대한 적합한 투약량은 치료 당 약 0.1 mg/kg 체중 내지 약 10.0 mg/kg 체중, 예를 들어 약 2 mg/kg 내지 약 7 mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 또는 약 3.5 내지 약 5 mg/kg일 수 있다. 특정 실시형태에서, 투여되는 용량은 약 0.3 mg/kg, 약 0.5 mg/kg, 약 1 mg/kg, 약 2 mg/kg, 약 3 mg/kg, 약 4 mg/kg, 약 5 mg/kg, 약 6 mg/kg, 약 7 mg/kg, 약 8 mg/kg, 약 9 mg/kg, 또는 약 10 mg/kg이다. 전체 용량은 약 22mg, 약 50mg, 약 72mg, 약 125mg, 약 165mg, 또는 약 432mg일 수 있다. 전체 용량은 적어도 77mg, 적어도 125mg 또는 적어도 356mg일 수 있다. 일 실시형태에서, 전체 용량은 165mg이다. 다른 실시형태에서, 전체 용량은 108mg이다. 다른 실시형태에서, 전체 용량은 216mg이다.

[0167] 투여 후 시간에 걸쳐 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 이용가능성의 연구로부터 약동학적(pharmacokinetic, PK) 데이터를 사용하는 모델링 및 시뮬레이션(버클리 마돈나(BERKELEY MADONNA)(상표명) 소프트웨어, 유니버시티 오브 캘리포니아)은 피하 또는 근육내 투여를 위한 잠재적인 투약 요법을 평가할 수 있다. PK 데이터는 유도에 대해 및 유지 요법에 대해 평가될 수 있다. 다른 모델링 접근은 집단 약동학적/약력학적 분석이다(NONMEM(등록상표) 비선형 혼합 효과 모델링 툴, 아일랜드 더블린에 소재한 아이콘 클리니컬(ICON plc)). 노출 수준과 트로프 수준은 둘 다 분석될 수 있다.

[0168] 전형적으로, 표적, 예를 들어 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린 포화가 도달될 후, 혈액 내 항체 농도는 투여된 용량에 대해 선형 관계를 가진다. 피하 또는 근육내 경로에 의해 투여되는 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 정맥내 경로에 의해 투여되는 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 생체이용가능성의 약 60% 내지 약 90%를 가진다. 이 관계의 예에서, IV 용량이 100% 생체이용가능성을 가지고, 피하 용량이 69.5% 생체이용가능성을 가지는 것으로 발견된다면, 300mg 정맥내 투약은 피하 투여에 의해 432mg 용량과 매칭될 수 있다. 따라서, 150mg 정맥내 투약은 69.5% 상대적 생체이용가능성에서 216mg 피하 용량에 의해 매칭될 수 있다. 유사하게, 피하 용량이 75% 생체이용가능성을 가지는 것으로 발견되고, 근육내 용량이 80% 생체이용가능성을 가지는 것으로 발견된다면, 300mg 정맥내 투약을 매칭하기 위해, 피하 용량은 400mg일 수 있고, 근육내 용량은 375mg일 수 있다. 실시예의 표 40 내지 43은 이들 관계를 도시하며, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 유효한 용량 및 투약 요법을 제공한다.

[0169] 일부 양태에서, 투약 요법은 2 단계, 즉, 유도 단계 및 유지 단계를 가진다. 유도 단계에서, 항체 또는 이것의 항원-결합 단편에 면역 반응을 유발하는 것 또는 임상적 반응을 유도하고, 염증성 장질환 증상을 개선시키기 위한 것과 같은 특정 목적에 적합한 항체 또는 이것의 항원 결합 단편의 유효량을 빠르게 제공하는 방법으로 투여된다. 환자는 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체에 의해 우선 치료될 때, 치료로부터 긴 부재 후, 예를 들어, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 치료로부터 3개월 초과, 4개월 초과, 6개월 초과, 9개월 초과, 1년 초과, 8개월 초과 또는 2년 초과 후 치료될 때 유도 단계 치료로 또는 염증성 장질환 증상의 복귀가 있다면 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 치료의 유지 단계, 예를 들어 질병

의 관해의 재발 동안 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 유도 단계 요법은 유지 요법 동안 유지된 평균 정상 상태 트로프 혈청 농도보다 더 높은 평균 트로프 혈청 농도, 예를 들어 다음 투약 바로 전 농도를 야기한다.

[0170] 유지 단계에서, 항체 또는 이것의 항원-결합 단편은 항체 또는 이것의 항원-결합 단편의 안정한 수준에 의한 유도 치료에 의해 달성된 반응을 지속하는 방법으로 투여된다. 유지 요법은 염증성 장질환의 증상의 복귀 또는 재발을 예방할 수 있다. 유지 요법은 환자에게 편리함을 제공할 수 있으며, 예를 들어 단순한 투약 요법이거나 또는 치료를 위한 덜 빈번한 이동을 필요로 한다. 일부 실시형태에서, 유지 요법은, 예를 들어 본 명세서에 기재된 제형에서 저용량, 덜 빈번한 투여, 자기-투여 및 앞서 언급한 것 중 어떤 것의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 전략에 의해 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 또는 이것의 항원-결합 단편의 투여를 포함할 수 있다.

[0171] 일 실시형태에서, 예를 들어, 치료의 유도 단계 동안, 투약 요법은 인간 환자에서 염증성 장질환의 관해를 유도하기 위해 본 명세서에 기재된 제형에서 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 또는 항원-결합 단편의 유효량을 제공한다. 일부 실시형태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 유효량은 유도 단계의 마지막까지 약 $5 \mu\text{g/ml}$ 내지 약 $60 \mu\text{g/ml}$, 약 $15 \mu\text{g/ml}$ 내지 약 $45 \mu\text{g/ml}$, 약 $20 \mu\text{g/ml}$ 내지 약 $30 \mu\text{g/ml}$, 또는 약 $25 \mu\text{g/ml}$ 내지 약 $35 \mu\text{g/ml}$ 평균 트로프 혈청 농도의 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 달성하기에 충분하다. 유도 단계의 지속기간은 약 4주, 약 5주, 약 6주, 약 7주, 또는 약 8주의 치료일 수 있다. 일부 실시형태에서, 유도 요법은, 예를 들어 본 명세서에 기재된 제형에서 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 또는 이것의 항원-결합 단편의 고용량, 빈번한 투여 및 고용량과 빈번한 투여의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 전략을 이용할 수 있다. 유도 투약은, 1회 또는 1회 이상의 다회 투약, 예를 들어 2회 투약일 수 있다. 유도 단계 동안, 투약은 1일 당, 2일마다 1회, 1주당 2회, 1주당 1회, 10일마다 1회, 2주마다 1회 또는 3주마다 1회 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 유도 투약은 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체에 의한 치료의 처음 2주 내에 투여된다. 일 실시형태에서, 유도 투약은 치료의 개시시(제0일) 1회 및 치료의 개시 후 약 2주에 1회일 수 있다. 다른 실시형태에서, 유도 단계 지속기간은 6주이다. 다른 실시형태에서, 유도 단계 지속기간은 6주이고, 다회의 유도 투약이 처음 2주 동안 투여된다.

[0172] 일부 실시형태에서, 예를 들어, 중증의 염증성 장질환을 지니는 환자의 치료를 개시할 때(예를 들어, 항-TNF α 치료가 실패한 환자에서), 유도 단계는 경증 또는 보통의 질병을 지니는 환자에 대해 더 긴 지속기간을 가질 필요가 있다. 일부 실시형태에서, 중증의 질병을 지니는 환자에 대한 유도 단계는 적어도 6주, 적어도 8주, 적어도 10주, 적어도 12주 또는 적어도 14주의 지속기간을 가질 수 있다. 일 실시형태에서, 중증의 질병을 지니는 환자에 대한 유도 투약 요법은 제0주의 투약(치료의 개시), 제2주의 투약 및 제6주의 투약을 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 중증의 질병을 지니는 환자에 대한 유도 투약 요법은 제0주의 용량(치료의 개시), 제2주의 투약, 제6주의 투약 및 제10주의 투약을 포함할 수 있다.

[0173] 일 실시형태에서, 예를 들어, 치료의 유지 단계 동안, 투약 요법은 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 약 5 내지 약 $25 \mu\text{g/ml}$, 약 7 내지 약 $20 \mu\text{g/ml}$, 약 5 내지 약 $10 \mu\text{g/ml}$, 약 10 내지 약 $20 \mu\text{g/ml}$, 약 15 내지 약 $25 \mu\text{g/ml}$ 또는 약 9 내지 약 $13 \mu\text{g/ml}$ 의 평균 정상 상태 트로프 혈청 농도, 예를 들어, 다음 투약 바로 전의 안정기 농도를 유지한다. 다른 실시형태에서, 예를 들어 치료의 유지 단계 동안 투약 요법은 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 약 20 내지 약 $30 \mu\text{g/ml}$, 약 20 내지 약 $55 \mu\text{g/ml}$, 약 30 내지 약 $45 \mu\text{g/ml}$, 약 45 내지 약 $55 \mu\text{g/ml}$ 또는 약 35 내지 약 $40 \mu\text{g/ml}$ 의 평균 정상 상태 트로프 혈청 농도를 유지한다. 다른 실시형태에서, 예를 들어, 치료의 유지 단계 동안 투약 요법은 장기간 평균 혈청 농도, 예를 들어 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 약 15 내지 약 $40 \mu\text{g/ml}$, 약 10 내지 약 $50 \mu\text{g/ml}$, 약 18 내지 약 $26 \mu\text{g/ml}$, 또는 약 22 내지 약 $33 \mu\text{g/ml}$ 의 노출(예를 들어 곡선-농도-시간하 면적)을 유지한다. 또 다른 실시형태에서, 예를 들어 유지 치료 동안 투약 요법은 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 약 35 내지 약 $90 \mu\text{g/ml}$, 약 45 내지 약 $75 \mu\text{g/ml}$, 약 52 내지 약 $60 \mu\text{g/ml}$ 또는 약 50 내지 약 $65 \mu\text{g/ml}$ 의 장기간 평균 혈청 농도, 예를 들어, 노출(예를 들어, 곡선-농도-시간 하면적)을 유지한다.

[0174] 최종 투약 형태는 약 0.5ml , 약 1ml , 약 1.5ml , 약 2ml , 약 2.5ml , 약 3ml 의 항체 제형의 전체 용량을 포함할 수 있다.

[0175] 정맥내 투여를 위한 최종 투약 형태는 약 1.0 mg/ml 내지 약 1.4 mg/ml , 약 1.0 mg/ml 내지 약 1.3 mg/ml , 약 1.0 mg/ml 내지 약 1.2 mg/ml , 약 1.0 mg/ml 내지 약 1.1 mg/ml , 약 1.1 mg/ml 내지 약 1.4 mg/ml , 약 1.1 mg/ml 내지 약 1.3 mg/ml , 약 1.1 mg/ml 내지 약 1.2 mg/ml , 약 1.2 mg/ml 내지 약 1.4 mg/ml , 약 1.2 mg/ml 내지 약 1.3 mg/ml , 또는 약 1.3 mg/ml 내지 약 1.4 mg/ml 의 농도일 수 있다. 최종 투약 형태는 약 0.6 mg/ml , 0.8 mg/ml , 1.0 mg/ml , 1.1 mg/ml , 약 1.2 mg/ml , 약 1.3 mg/ml , 약 1.4 mg/ml , 약 1.5 mg/ml , 약 1.6 mg/ml , 약 1.8 mg/ml 또는 약 2.0 mg/ml 의 농도일 수 있다.

[0176] 용량은 1주당 1회, 2주마다 1회, 3주마다 1회, 4주마다 1회, 6주마다 1회, 8주마다 1회 또는 10주마다 1회 투여

될 수 있다. 더 높거나 또는 더 빈번한 용량, 예를 들어, 2일마다, 1주마다 1회, 2주마다 1회, 3주마다 1회 또는 4주마다 1회는 활성 질병의 관해를 유도하기 위해 또는 새로운 환자를 치료하기 위해, 예를 들어 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체에 대한 관용을 유도하기 위해 유용할 수 있다. 2주마다 1회, 3주마다 1회, 4주마다 1회, 5주마다 1회, 6주마다 1회, 8주마다 1회 또는 10주마다 1회 용량이 예방적 치료를 위해, 예를 들어 만성 질병을 지니는 환자의 관해를 유지하기 위해 유용할 수 있다. 일 양태에서, 치료 요법은 제0일, 약 2주, 약 6주 및 그 후에 1주마다 또는 2주마다의 치료이다. 다른 양태에서, 유도 치료 요법은 전체 6회 치료 동안 2일마다의 치료이다.

[0177] 투약 요법은 환자의 염증성 장질환의 임상적 반응 및 임상적 관해를 유도하기 위해 최적화될 수 있다. 일부 실시형태에서, 투약 요법은 환자 수용 치료의 뇌척수액에서 CD4 대 CD8의 비를 변경시키지 않는다.

[0178] 일부 양태에서, 지속적 임상적 관해, 예를 들어, 치료 시작 후 6개월 또는 1년 기간 내에 담당의에 의한 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4회 방법을 통해 계속된 임상적 관해는 최적화된 투약 요법에 의해 달성될 수 있다.

[0179] 일부 양태에서, 지속적 임상적 반응, 예를 들어, 치료의 시작 후 적어도 6개월, 적어도 9개월, 적어도 1년 동안 계속된 임상적 관해는 최적화된 투약 요법에 의해 달성될 수 있다.

[0180] 제형은 1회 또는 다회 주사로 피하에 투여될 수 있다. 예를 들어, 1회 주사의 용적은 약 0.5ml 내지 약 3 ml의 범위에 있을 수 있다. 실시형태에서, 1회 주사의 용적은 약 0.6ml 내지 약 1.1ml 또는 약 1ml 내지 약 3ml일 수 있다. 일 양태에서, 1회 주사의 용적은 약 1ml이다. 피하로 제형을 투여하기 위해 사용되는 바늘의 게이지는 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29 또는 약 30G일 수 있다.

[0181] 제형은 1회 또는 다회 주사로 근육내로 투여될 수 있다. 예를 들어, 1회 주사의 용적은 약 0.5 ml 내지 약 5 ml의 범위에 있을 수 있다. 실시형태에서, 1회 주사의 용적은 약 2 ml 내지 약 5ml, 약 0.6 ml 내지 약 1.1 ml 또는 약 1 ml 내지 약 3 ml일 수 있다. 일 양태에서, 1회 주사의 용적은 약 1ml, 약 2ml, 약 3ml, 약 4ml, 또는 약 5ml이다. 근육내로 제형을 투여하기 위해 사용된 바늘은 약 5/8", 약 7/8", 약 1", 약 1.25", 약 1.5", 약 2", 또는 약 3"일 수 있다. 바늘의 게이지는 근육내 투여를 위해 20 내지 22G일 수 있다.

[0182] 일 양태에서, 본 발명은 염증성 장질환에 걸린 인간 환자를 치료하기 위한 방법에 관한 것이되, 해당 방법은 염증성 장질환에 걸린 환자에게 인간 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린에 대해 결합 특이성을 갖는 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편을 투여하는 단계를 포함하고, 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편은 다음의 투약 요법에 따라 환자에게 투여되며: (a) 6회 투약에 대해 2일마다 피하 주사로서 165mg의 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편의 초기 투약; (b) 필요하다면 2주마다 또는 4주마다 피하 주사로서 165mg의 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편의 제7회 및 후속 투약; 투약 요법은 환자의 염증성 장질환에서 임상적 반응 및 임상적 관해를 유발하고; 추가로, 인간화된 면역글로불린 또는 항원-결합 단편은 $\alpha 4\beta 7$ 복합체에 대해 결합 특이성을 가지며, 항원-결합 영역은 이하에 제시되는 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역(CDR1, CDR2 및 CDR3) 및 중쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역(CDR1, CDR2 및 CDR3)을 포함한다: 경쇄: CDR1 서열번호 9, CDR2 서열번호 10, CDR3 서열번호 11; 중쇄: CDR1 서열번호 12, CDR2 서열번호 13, CDR3 서열번호 14.

[0183] 일 양태에서, 본 발명은 염증성 장질환에 걸린 인간 환자를 치료하기 위한 방법에 관한 것이되, 해당 방법은 염증성 장질환에 걸린 환자에게 인간 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린에 대해 결합 특이성을 갖는 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편을 투여하는 단계를 포함하며, 인간화된 면역글로불린 또는 항원-결합 단편은 비인간 유래의 항원-결합 영역 및 인간 유래의 항체의 적어도 일부를 포함하고, 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편은 다음의 투약 요법에 따라 환자에게 투여되며: (a) 정맥내 주입으로서 300mg의 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편의 초기 정맥내 투약; (b) 다음에 초기 투약 대략 2주 후 정맥내 주입으로서 300mg의 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편의 제2 정맥내 후속 투약; (c) 다음에 6주에 시작해서 필요하다면 1주마다, 2주마다, 3주마다 또는 4주마다 피하 주사로서 165mg의 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편의 제3 및 후속 투약; 투약 요법은 환자의 염증성 장질환에서 임상적 반응 및 임상적 관해를 유발하고; 추가로, 인간화된 면역글로불린 또는 항원-결합 단편은 $\alpha 4\beta 7$ 복합체에 대해 결합 특이성을 가지되, 항원-결합 영역은 이하에 제시되는 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역(CDR1, CDR2 및 CDR3) 및 중쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역(CDR1, CDR2 및 CDR3)을 포함한다: 경쇄: CDR1 서열번호 9, CDR2 서열번호 10, CDR3 서열번호 11; 중쇄: CDR1 서열번호 12, CDR2 서열번호 13, CDR3 서열번호 14.

[0184] 다른 양태에서, 본 발명은 염증성 장질환의 치료적 처치를 위한 투약 요법에 관한 것이되, 투약 요법은 염증성 장질환에 걸린 환자에게 인간 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린에 대해 결합 특이성을 갖는 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항

원-결합 단편을 투여하는 단계를 포함하며, 인간화된 면역글로불린 또는 항원-결합 단편은 비인간 유래의 항원-결합 영역 및 인간 유래의 항체의 적어도 일부를 포함하고, 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편은 약 9 내지 약 13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편의 평균 정상상태 혈청 트로프 농도를 유지하는 피하 또는 근육내 투약 요법에 따라 환자에게 투여되며; 투약 요법은 환자의 염증성 장질환의 임상적 반응 및 임상적 관해를 유발하고; 추가로, 인간화된 면역글로불린 또는 항원-결합 단편은 $\alpha 4\beta 7$ 복합체에 대한 결합 특이성을 가지되, 항원-결합 영역은 이하에 제시되는 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역(CDR1, CDR2 및 CDR3) 및 중쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역(CDR1, CDR2 및 CDR3)을 포함한다: 경쇄: CDR1 서열번호 9, CDR2 서열번호 10, CDR3 서열번호 11; 중쇄: CDR1 서열번호 12, CDR2 서열번호 13, CDR3 서열번호 14.

[0185] 다른 양태에서, 본 발명은 염증성 장질환의 치료적 처치를 위한 투약 요법에 관한 것이되, 투약 요법은 염증성 장질환에 걸린 환자에게 인간 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린에 대해 결합 특이성을 갖는 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편을 투여하는 단계를 포함하고, 인간화된 면역글로불린 또는 항원-결합 단편은 비인간 유래의 항원-결합 영역 및 인간 유래의 항체의 적어도 일부를 포함하며, 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편은 약 35 내지 약 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편의 평균 정상 상태 트로프 혈청 농도를 유지하는 피하 또는 근육내 투약 요법에 따라 환자에게 투여되고; 투약 요법은 환자의 염증성 장질환에서 임상적 반응 및 임상적 관해를 유발하며; 추가로, 인간화된 면역글로불린 또는 항원-결합 단편은 $\alpha 4\beta 7$ 복합체에 대해 결합 특이성을 가지되, 항원-결합 영역은 이하에 제시되는 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역(CDR1, CDR2 및 CDR3) 및 중쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역(CDR1, CDR2 및 CDR3)을 포함한다: 경쇄: CDR1 서열번호 9, CDR2 서열번호 10, CDR3 서열번호 11; 중쇄: CDR1 서열번호 12, CDR2 서열번호 13, CDR3 서열번호 14.

[0186] 일부 실시형태에서, 치료 방법, 용량 또는 투약 요법은 환자가 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체에 대해 HAHA 반응을 나타낼 가능성을 감소시킨다. 예를 들어 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체에 대해 항체에 의해 측정되는 바와 같은 HAHA의 발생은 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 클리어언스를 감소시킬 수 있고, 예를 들어, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 혈청 농도를 감소시키며, 예를 들어, $\alpha 4\beta 7$ 인테그린에 결합된 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 수를 낮추고, 따라서 치료를 덜 효과적으로 만든다. 일부 실시형태에서, HAHA를 방지하기 위해, 환자는 유도 요법 후 유지 요법으로 치료될 수 있다. 일부 실시형태에서, 유도 요법과 유지 요법 사이에 휴지기는 없다. 일부 실시형태에서, 유도 요법은 환자에게 다수 용량의 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 투여하는 단계를 포함한다. HAHA를 방지하기 위해, 환자는 높은 초기 투약, 예를 들어, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체에 의한 치료를 시작할 때 표준 용량의 적어도 1.5 mg/kg, 적어도 2 mg/kg, 적어도 2.5 mg/kg, 적어도 3 mg/kg, 적어도 5 mg/kg, 적어도 8 mg/kg, 적어도 10 mg/kg 또는 약 2 내지 약 6 mg/kg, 또는 빈번한 초기 투여, 예를 들어, 1주 당 약 1회, 2주마다 약 1회 또는 3주마다 약 1회로 처리될 수 있다. 일부 실시형태에서, 치료방법은 HAHA-음성으로서 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 환자를 유지한다. 다른 실시형태에서, 치료 방법은 치료의 지속기간 동안 적어도 6주, 적어도 10주 적어도 15 주, 적어도 6개월, 적어도 1년, 적어도 2년동안 또는 치료의 지속기간 동안 HAHA-음성으로서 환자를 유지한다. 일부 실시형태에서, HAHA가 발생한 환자 또는 환자의 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50% 또는 적어도 60%는 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 낮은 역가, 예를 들어, ≤ 125 를 유지한다. 실시형태에서, 치료 방법은 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체에 의한 치료의 시작 후 적어도 12주 동안 HAHA-음성으로서 환자의 적어도 70%를 유지한다.

[0187] 제형은 단독으로 또는 다른 작용제와 함께 개체(예를 들어, 인간)에게 투여될 수 있다. 본 발명의 제형은 추가적인 작용제의 투여 전, 투여와 함께 또는 투여에 후속하여 투여될 수 있다. 일 실시형태에서, $\alpha 4\beta 7$ 인테그린의 그것에 리간드에 대한 결합을 억제하는 하나 이상의 제형이 투여된다. 이러한 실시형태에서, 작용제, 예를 들어 단클론성 항체, 예컨대 항-MAdCAM 또는 항-VCAM-1 단클론성 항체가 투여될 수 있다. 다른 실시형태에서, 추가적인 작용제는 $\alpha 4\beta 7$ 경로와 상이한 경로로 내피 리간드에 백혈구의 결합을 억제한다. 이러한 작용제는 이러한 작용제는 흥선 발현된 케모카인(TECK 또는 CCL25)에 대한 케모카인(C-C motif) 수용체 9 (CCR9)-발현 림프구의 결합을 억제할 수 있거나 또는 세포내 접착 분자(intercellular adhesion molecule: ICAM)에 대한 LFA-1의 결합을 방지하는 작용제이다. 예를 들어, 항-TECK 또는 항-CCR9 항체 또는 소분자 CCR9 억제제, 예컨대 국제특허출원 WO03/099773 또는 WO04/046092에 개시된 억제제, 또는 항-ICAM-1 항체 또는 ICAM의 발현을 방지하는 올리고뉴클레오타이드가 본 발명의 제형에 추가로 투여된다. 또 다른 실시형태에서, 추가적인 활성 성분(예를 들어, 항-염증 화합물, 예컨대 설파살라진, 아자티오프린, 6-머캅토피린, 5-아미노살리실산 함유 항-염증요소, 다른 비-스테로이드성 항-염증 화합물, 스테로이드성 항-염증 화합물 또는 IBD의 제어를 위해 보통 투여되는 항생제(예를 들어, 시프로플록사신, 메트로니다졸), 또는 다른 생물학적 작용제(예를 들어, TNF 알파 길항물

질)이 본 발명의 제형과 함께 투여될 수 있다.

- [0188] 실시형태에서, 공동-투여된 의약의 용량은 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 포함하는 제형에 의한 치료 기간 동안 시간에 걸쳐 감소될 수 있다. 예를 들어, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형으로 처리 시작 시 또는 처리 전 스테로이드(예를 들어, 프레드니손, 프레드니솔론)로 처리한 환자는 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형에 의한 처리 6주만큼 빨리 스테로이드 시작의 감소된 용량의 요법을 겪는다. 스테로이드 용량은 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형으로 처리 동안 테이퍼링(tapering) 개시의 4 내지 8주 내에 약 25%만큼, 테이퍼링의 약 8 내지 12주에 50% 및 약 12 내지 16주에 75%만큼 감소될 것이다. 일 양태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형에 의한 치료의 약 16 내지 24주까지, 스테로이드 용량은 제거될 수 있다. 다른 예에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형에 의한 처리의 시작시, 또는 처리 전 6-머캅토피린과 같은 항-염증 화합물로 처리된 환자는 상기 주목한 스테로이드 투약에 대한 테이퍼링 요법과 유사한 항-염증 화합물의 감소된 용량의 요법을 겪는다.
- [0189] 일 실시형태에서, 해당 방법은 환자에게 본 발명의 제형의 유효량을 피하로 투여하거나 또는 근육내로 투여하는 단계를 포함한다. 다른 실시형태에서, 제형은 자기-투여를 위해 제조될 수 있다.
- [0190] 제형이 고체, 예를 들어 건조 상태라면, 투여 과정은 제형을 액체 상태로 전환시키는 단계를 포함할 수 있다. 일 양태에서, 건조 제형은, 예를 들어 주사에서 사용을 위해, 예를 들어 정맥내, 근육내 또는 피하 주사를 위해 상기 기재한 바와 같은 액체에 의해 재구성될 수 있다. 다른 양태에서, 고체 또는 건조 제형은 국소로, 예를 들어 패치, 크림, 에어로졸 또는 좌약으로 투여될 수 있다.
- [0191] 본 발명은 또한 분자 MAdCAM(예를 들어, MAdCAM-1)을 발현시키는 조직의 백혈구 침윤과 관련된 질병을 치료하기 위한 방법에 관한 것이다. 해당 방법은 본 발명의 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형의 유효량을 치료가 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 실시형태에서, 질병은 이식편대 숙주반응이다. 일부 실시형태에서, 질병은 분자 MAdCAM(예를 들어, MAdCAM-1)를 발현시키는 장-관련 내피에 대해 백혈구 발현 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린의 결합의 결과로서 조직의 백혈구 침윤과 관련된 질병이다. 다른 실시형태에서, 질병은 위염(예를 들어, 호산구성 위염 또는 자가면역 위염), 궤양염 또는 인슐린 의존성 당뇨병이다. 또 다른 실시형태에서, 질병은 담낭염, 담관염 또는 담도주위염이다.
- [0192] 본 발명은 또한 환자에서 염증성 장질환을 치료하기 위한 방법에 관한 것이다. 일 실시형태에서, 해당 방법은 본 발명의 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형의 유효량을 환자에게 피하로 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 염증성 장질환은 궤양성 대장염 또는 크론병이다. 다른 실시형태에서, 염증성 장질환은 셀리악병, 혈청음성 척추관절염과 관련된 장병증, 미세형 또는 교원성 대장염, 위장염(예를 들어, 호산구성 위장염), 또는 맹장염이다.
- [0193] 일부 실시형태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체에 의한 치료는 CD4:CD8의 비를 변경시키지 않는다. CD4:CD8 비는 혈액, 림프절 흡인물 및 뇌척수액(cerebro-spinal fluid: CSF)에서 측정될 수 있다. 건강한 개체에서 CSF CD4+:CD8+ 림프구 비는 전형적으로 약 1 이상이다. (Svenningsson et al., J. Neuroimmunol. 1995;63:39-46; Svenningsson et al., Ann Neurol. 1993; 34:155-161). 면역조절제는 CD4:CD8 비를 1미만으로 변경시킬 수 있다.
- [0194] **제조 물품**
- [0195] 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 약제학적 제형을 함유하고 그것의 사용을 위한 설명서를 제공하는 제조물품이다. 제조물품은 용기를 포함한다. 적합한 용기는, 예를 들어, 보틀, 바이알(예를 들어, 이중 챔버 바이알, 바늘이 있거나 또는 없는 액체 제형의 바이알, 바늘이 있거나 또는 없는 재구성 액체의 바이알이 있거나 또는 없는 고체 제형의 바이알), 주사기(예컨대, 이중 챔버 주사기, 사전장전된 주사기, 자동-주입기), 카트리지와 시험관을 포함한다. 용기는 다양한 재료, 예컨대 유리, 금속 또는 플라스틱으로부터 형성될 수 있다. 용기는 제형을 보유하며, 용기 상에 또는 용기와 결합된 라벨은 사용을 위한 지침을 표시할 수 있다. 다른 실시형태에서, 제형은 자기-투여를 위해 제조될 수 있고/있거나 자기-투여를 위한 설명서를 함유할 수 있다. 일 양태에서, 제형을 보유하는 용기는 1회용 바이알일 수 있다. 다른 양태에서, 제형을 보유하는 용기는, 예를 들어 재구성된 제형의 1부분 이상을 사용하여 제형의 반복 투여(예를 들어, 2 내지 6회 투여)를 허용하는 다회 용량 바이알일 수 있다. 제조물품은 앞의 부문에서 주목한 바와 같이 사용을 위한 설명서와 함께 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘, 주사기 및 포장 삽입물을 포함하는 상업적 및 사용자 견지에서 바람직한 다른 재료를 추가로 포함할 수 있다.
- [0196] 일 실시형태에서, 제조물품은 바늘이 있는 주사기이다. 바늘의 게이지는 25G, 26G, 27G, 29G, 30G일 수 있다. 썬 월(thin wall) 바늘, 예를 들어, 19G 또는 23G 또는 초과는 고정성도 제형의 주사를 용이하게 할 수 있다. 일 양태에서, 바늘 게이지는 27G 이상이다. 바늘 길이는 피하 투여에 적합할 수 있고, 약 1/2 인치, 약 5/8 인

치 또는 1 인치 길이일 수 있다. 일부 실시형태에서, 주사기는 사전-충전된 주사기이다.

[0197] **사전-충전된 주사기 제품 개발**

[0198] 일부 양태에서, 사전-충전된 주사기(pre-filled syringe: PFS)에서 단백질 생성물(예를 들어, 항- $\alpha 4 \beta 7$ 항체)에 대해(예를 들어 피하 또는 근육내 전달을 위한 제형의 투여에서 사용을 위해) 바람직한 몇몇 제품 속성이 있다. 경쟁적 효과를 완화시키는 속성의 일부를 유지하는데 도움을 줄 수 있다. 예를 들어, 낮은 주사 용적이 바람직할 때, 제형에 대해 높은 단백질 농도가 바람직할 수 있다. 그러나, 높은 단백질 농도의 경우에, 불순물 형성(주사기로부터 제형 내로 스며 나오는 응집된 불순물) 속도가 더 높아질 수 있고, 주사기를 작동시키는데 필요한 조작력이 더 커질 수 있다. 주사 부위에서 환자의 편안함을 위해 사용되는 작은 바늘 크기는 주사기를 작동시키기 위해 큰 힘을 필요로 할 수 있다. 제품 안정성 및 성능이 제형과 주사기 변수, 예컨대 단백질 농도, pH 및 바늘 내부 직경 둘 다에 의해 영향받는 방법의 이해는 단백질 생성물(예를 들어, 사전-충전된 주사기에서 항- $\alpha 4 \beta 7$ 항체)의 발생에 도움을 준다.

[0199] 일 양태에서, 사전-충전된 주사기에서 사용을 위한 단백질 생성물(예를 들어, 항- $\alpha 4 \beta 7$ 항체)의 발생 방법은, 예를 들어 조직화(coordinate) 방식으로 또는 동시에 주사기 변수 및 제형 변수를 달리하는 단계를 포함한다. 이는 각 양태가 개별적으로 또는 연속해서 다르게 된다면, 사전-충전된 주사기에서 단백질로부터 예상될 수 있는 단백질 안정성의 범위 및 제품 성능의 더 양호한 이해를 야기할 수 있다.

[0200] 사전-충전된 주사기 생성물(예를 들어, 항- $\alpha 4 \beta 7$ 항체)의 발생은 일부 시점에 사전-충전된 주사기의 몇몇 성분과 접촉된 액체 제형이 있다는 이해에 관한 것이다(도 15). 예를 들어, 제형은 주사기 배럴(barrel)과 접촉될 수 있는데, 이 주사기 배럴은 유리(예를 들어, I형 보로실리케이트 유리) 또는 플라스틱(예를 들어, 사이클릭 올레핀 중합체(cyclic olefin polymer: COP), 사이클릭 올레핀 공중합체(cyclic olefin copolymer: COC), 폴리프로필렌 또는 폴리테트라플루오로에틸렌)으로 구성될 수 있다. 제형은 주사기, 플런저 및/또는 팁 캡(tip cap)과 접촉될 수 있는데, 이는 탄성(예를 들어, 동일 또는 상이한 재료의(예를 들어, 플라스틱, 예컨대 폴리에틸렌, 폴리스타이렌 또는 폴리프로필렌 또는 탄성, 예컨대 고무(천연, 합성, 뷰틸) 또는 실리콘))일 수 있다. 제형은 플런저 움직임의 용이함을 위해 배럴의 내부면에 첨가되는 윤활제와 접촉될 수 있다. 윤활제는, 예를 들어 실리콘 오일, 광유 또는 글라이세린일 수 있다. 고정된 바늘 주사기의 실시형태에서, 금속 합금 바늘(예를 들어, 스테인리스 스틸 바늘 및 바늘을 적소에 붙이기 위해 사용된 접착제)이 있을 수 있다. 사전-충전된 주사기에서 단백질 생성물에 대한 고려는 액체 단백질 용액이 제품의 보관 수명 내내 이들 주사기 성분 중 하나 이상과 직접 접촉된다는 것이다. 제형과 주사기 성분 둘 다는 제품의 안정성에 영향을 가질 수 있다.

[0201] 사전 충전된 주사기 제품 안정성에 영향을 미칠 수 있는 제형 변수는 단백질 농도, pH, 완충제 유형, 완충제 농도, 이온 강도, 안정제 유형 및 안정제 농도를 포함한다. 단백질 제형에 대한 안정제의 예는, 예를 들어 앞 부분에서 기재된 바와 같은 이온 염, 다당류, 아미노산, 항산화제, 킬레이터 및 계면활성제를 포함한다.

[0202] 사전-충전된 주사기 제품 안정성에 영향을 미칠 수 있는 주사기 성분은, 예를 들어, 윤활제, 플런저 및 팁 캡의 조성물, 및 불순물을 포함한다. 윤활제(예를 들어, 주사기 배럴 상의 실리콘 오일)의 양은 제품 안정성에 영향을 미칠 수 있다. 이들 성분의 산소 투과성에 영향을 미칠 수 있고, 이들 성분으로부터 단백질 생성물(예를 들어, 항- $\alpha 4 \beta 7$ 항체 제형) 내로 침출물을 도입할 수 있는, 플런저 및 팁 캡의 조성물은 또한 생성물 안정성에 영향을 미칠 수 있다. 제품 안정성에 영향을 미칠 수 있는 다른 주사기 변수는(예를 들어, 배럴(예를 들어, 유리 배럴) 및/또는 바늘(예를 들어, 스테인리스 스틸 바늘)에서부터) 제품 제형에 침출될 수 있는 불순물(예를 들어, 중금속(예를 들어, 텅스텐))의 유형 및/또는 양을 포함한다(또한 문헌[Ludwig et al. *J.Pharm. Sci.* 99:1721-1733 (2010); Nashed-Samuel et al., *American Pharmaceutical Review* Jan/Feb:74-80 (2011); Badkar et al. *AAPS PharmSciTech* 12:564-572] 참조).

[0203] 사전-충전된 주사기는 수동으로 주사될 수 있거나 또는 자동-주사기 장치와 함께 사용될 수 있다. 사전-충전된 주사기의 기능적 시험은 벗어나는(break loose) 힘, 플런저의 이동을 시작하기 위해 필요한 힘, 및 활택력, 일정한 속도로 주사기의 내용물을 주사하기 위해 필요한 힘을 측정하는 단계를 포함한다. 사전-충전된 주사기의 기계적 성능은 몇몇 제형 및 주사기 변수, 예컨대 지형의 점성도 및 주사기 내 윤활제(예를 들어, 실리콘 오일)의 양에 의존할 수 있다.

[0204] 사전-충전된 주사기 및 제형 또는 해당 제품 속성에 영향을 미칠 수 있는 주사기 인자에서 단백질 생성물의 몇몇 속성은 표 1에 나타난다. 다수의 제품 속성은 몇몇 제형 및 주사기 변수의 복잡한 기능이 있을 수 있다. 점성도는 몇몇 인자, 예컨대 단백질 농도, 안정제 농도 및 pH에 의존할 수 있지만, 예를 들어, 주사기 활택력은

제형 점성도의 작용이다.

표 1

[0205]

사전 충전된 주사기에서 단백질 생성물에 대한 제품 속성 및 이들 속성에 영향을 미칠 수 있는 잠재적 제형 및 주사기 변수		
제품 속성	제품 속성에 영향을 미칠 수 있는 단백질 제형 변수	제품 속성에 영향을 미칠 수 있는 주사기 변수
삼투압	안정제 농도, pH, 단백질 농도	없음
점성도	안정제 농도, pH, 단백질 농도	없음
주사기의 벗어나는 힘 및 활택력	점성도, 단백질 농도, 계면활성제 농도	주사 속도, 바늘 길이, 바늘 ID, 실리콘 오일 양, 펄런저 형성 및 형상
단백질 탈아미드화 비율	안정제 농도, pH, 단백질 농도	없음
단백질 산화 비율	안정제/항산화제 농도, pH, 단백질 농도, 계면활성제 농도, 용해된 산소	펄런저 및 팁 캡 제형(산소 투과성), 중금속 불순물 수준, 기포의 크기
가용성 응집물 제형의 비율	안정제 농도, pH, 단백질 농도, 계면활성제 농도, 용액 중에 용해된 산소	실리콘 오일 양, 중금속 불순물 수준, 기포의 크기
현미경으로 보이는 및 가시적인 단백질 미립자 형성의 비율	안정제 농도, pH, 단백질 농도, 계면활성제 농도	실리콘 오일 양, 중금속 불순물 수준, 기포의 크기, 주사기 내부 표면적

[0206]

일 양태에서, 계면활성제, 예컨대 폴리솔베이트 20 또는 폴리솔베이트 80은 사전-충전된 주사기에서 단백질 제형에 첨가될 수 있다(예를 들어, 액체/공기 및/또는 액체/유탄제(예를 들어, 실리콘 오일) 계면에서 단백질이 흡착되고 변성되는 것을 방지함). 단백질 분자의 표면 흡착 및 변성은 현미경으로 보이는 단백질 입자 및 가시적인 단백질 입자의 핵생성을 위한 하나의 메커니즘일 수 있다. 따라서, 사전-충전된 주사기에 계면활성제의 첨가는 사전-충전된 주사기 제품에서 현미경으로 보이는 및 가시적인 입자의 형성을 감소시킬 수 있다. 일 실시형태에서, 소량의 계면활성제는 유탄제(예를 들어, 용액 내 실리콘 오일 점적, 이에 의해 현미경으로 보이는 및 가시적인 유탄제(예를 들어, 실리콘 오일 점적)의 형성을 감소시킴)를 에멀전화할 수 있다(문헌[Ludwig et al.], 상기 참조). 다른 실시형태에서, 제형 내 계면활성제의 양은 단백질 제형 상에서 다량의 계면활성제의 잠재적인 해로운 효과에 기인하여 최소화된다. 폴리솔베이트에 존재하는 과산화물 불순물은 증가된 단백질 산화를 야기할 수 있다(Wang and Wang *J. Pharm. Sci.* 91:2252-2264 (2002)). 다량의 계면활성제는 주사기의 벽으로부터 상당한 양의 실리콘 오일을 에멀전화할 수 있고, 보관수명에 걸쳐 기능적 활택력의 증가를 야기할 수 있다. 제품 개발 연구는 제품 안정성과 주사기 성능 둘 다에 대해 계면활성제 수준을 다르게 하는 효과를 시험하도록 설계되어야 한다.

[0207]

단백질/PES 시스템에서 제형과 주사기 변수 사이의 복잡한 상호작용은 설계기반 품질(Quality by Design: QbD) 또는 실험 설계(Design of Experiments: DOE) 접근을 사용하여 이들 시스템의 시험을 처리할 수 있다. 연구는 이들 복잡한 시스템의 더 양호한 이해를 얻기 위해 제형 및 주사기 변수를 동시에 달리하도록 설계될 수 있다. 이는 사전-충전된 주사기 제품의 개발에 대해 종합적인 접근을 야기한다. 표 2는 입력 변수 및 사전-충전된 주사기 제품에 대한 실험 설계를 시작할 수 있는 수준 및 사용되는 분석 시험의 예를 나타낸다. QbD 연구를 위해 사용되는 실험 설계의 유형에 의존하여, 실험의 수는 스크리닝 설계에 대해 9로부터 전체-인자 설계에 대해 81 (모든 가능한 조합)로 다를 수 있었다. 실험의 수가 더 많으면, 해결될 수 있는 제품 변수 사이의 상호작용 수가 많다. 이 분석을 위해 설계된 소프트웨어, 예를 들어, JMP(등록상표) 통계적 발견 소프트웨어(노스캐롤라이나주 캐리에 소재)는 QbD 연구에 대해 도움이 될 수 있다. 이 분석은 제형 및 주사기 변수가 제품 속성에 영향을 미치도록 상호작용하는 방법의 정량적 이해를 만든다.

표 2

[0208]

사전-충전된 주사기에서 액체 단백질 생성물에 대한 실험 설계의 예		
제형 입력 변수	수준	분석 시험

단백질 농도	50, 100, 150 mg/ml	• 크기배제크로마토그래피 및 이온 교환 크로마토그래피에 의한 단백질 안정성 • 힘 시험을 사용하여 시간에 걸쳐 벗어나는 힘 및 활택력 • 미세유동 이미징 또는/쿨터 카운터를 사용하여 시간에 걸쳐 현미경으로 보이는 단백질 입자 및 실리콘 오일 점적의 형성
pH	5.5, 6.5, 7.5	
계면활성제 농도	0.01, 0.08, 0.15%	
주사기 내 실리콘 오일의 양	0.2, 0.5, 0.8 mg/주사기	

[0209] 표 2에서 나타낸 실시예 실험으로부터 얻을 수 있는 예측 모델의 예는 이하에 주어지며, C_n 은 수치적 상수이다.

[0210] 시간에 따른 가용성 응집물 형성 = $C_0 + C_1[\text{단백질 농도}] + C_2[\text{단백질 농도}]^2 + C_3[\text{pH}] + C_4[\text{계면활성제 농도}] + C_5[\text{윤활제 양}]$

[0211] 수많은 주사기 변수는 제품 안정성 및 성능에 영향을 미칠 수 있고, 따라서 실시형태는 주사기 변수에서 허용되는 관용이 제품 안정성 및 성능에 영향을 미치는 방법의 특징을 포함한다. 주사기 배럴 상에서 윤활제(예를 들어, 실리콘 오일)의 양은 주사기마다 50 내지 100% 다를 수 있다. 이 양의 변화는 표 1에서 나타낸 바와 같은 몇몇 제품 특징에 영향을 미칠 수 있다. 주사기 배럴의 내부 직경은 주사기마다 다를 수 있는데, 이는 주입력에 영향을 미친다. 고정된-바늘 주사기에 대해, 바늘 내부 직경은 로트(lot)마다 또는 제조업자마다 다를 수 있는데, 이는 주입력에 영향을 미칠 것이다. 주사기 변수가 성능에 영향을 미치는 방법을 시험하기 위한 QbD 접근을 사용함으로써, 예측 모델은 주사기 변수 내 허용가능한 관용이 제품 성능에 영향을 미칠 수 있는 방법을 추정하도록 사용될 수 있다는 것이 얻어질 수 있다. QbD 접근을 사용하여 얻어지는 예측 모델은 제형 및 바람직한 제품 속성을 충족시키는 주사기 변수를 선택하기 위해 그리고 제품 안정성 및 성능을 예측하기 위해 사용될 수 있다.

[0212] 사전-충진된 주사기는 단백질 제형에 실리콘 에멀전 또는 텅스텐의 첨가를 포함할 수 있다. 사전-충진된 주사기에서 존재할 수 있는 실리콘의 대표적인 양은 약 0.3mg 내지 약 0.8mg의 범위에 있다. 일 양태에서, 사전-충진된 주사기에서 존재할 수 있는 실리콘의 양은 약 0.3mg, 약 0.4mg, 약 0.5mg, 약 0.6mg, 약 0.7mg, 또는 약 0.8mg이다. 다른 양태에서, 제형의 점성도는 2 내지 60 cP의 범위에 있을 것이며, 이는 200 mm/분의 속도로 5N 내지 80N의 주입력을 야기한다. 또 다른 양태에서, 제형의 점성도는 4 내지 27 cP의 범위에 있을 것이며, 이는 200 mm/분의 속도에서 10N 내지 40N의 주입력을 야기한다.

[0213] 본 발명은 다음의 실시예에 대한 참조에 의해 더 완전하게 이해될 것이다. 그러나, 그것은 본 발명의 범주의 제한으로서 해석되어서는 안 된다. 모든 문헌 및 특허 인용은 본 명세서에 참조로서 포함된다.

[0214] 제형 제조를 위한 프로토콜

[0215] 항- $\alpha 4 \beta 7$ 항체의 용액은 시트레이트, 히스티딘, 알기닌 완충제에서 특정된 농도에 도달되도록 접선 유동 여과 시스템에서 정용여과된 다음, 풀링되고(pooled), 시트레이트, 히스티딘, 알기닌 완충제 중에서 폴리솔베이트 80과 혼합된다. 용액은 2ℓ 또는 5ℓ 보틀 중 하나에서 -70℃에서 저장된다. 그 다음에 용액은 해동되고 0.2 μm 필터를 통해 2회 여과된다. 대략 1.0 ml는 멸균 주사기 내로 충전되고, 멸균된 플런저(마개)로 밀폐된다. 제형은 저장되고, 최종 약물 제품은 2 내지 8℃에서 주사기 내로 출하된다.

[0216] 실시예

[0217] 실시예 1

[0218] 제형 제조

[0219] 인자

[0220] 부형제 농도

[0221] 항체 제형 내 응집물의 형성을 시험하였다. SEC 응집물 모델을 단백질 농도, pH 및 계면활성제:단백질 몰 비를

시험한 실험 데이터로부터 진행하였다. pH 범위 6.0 내지 6.5에서, 응집물의 형성은 폴리솔베이트 80 대 단백질 물 비 범위 0.7 대 1.5와 유사하였다(도 6). 일반적으로, 1.5 초과 PS80:단백질 비에서, 응집물 형성 속도는 pH가 증가함에 따라 증가된다(도 7).

[0222] 공기의 존재에서 SEC 응집물의 형성을 시험하는 실험을 수행하였다. 다른 조성물의 11가지 상이한 제형을 보로 실리카이트 바이알 내에 넣었고, 에어 헤드스페이스(air headspace)를 지니는 탄성 마개로 캡핑하였다. 동일한 제형의 세트를 만들었고, 에어 헤드스페이스를 아르곤으로 바꾸었다. 이들 샘플을 2주 동안 40℃에서 안정하게 두었다. 에어 헤드스페이스를 지니는 모든 샘플은 아르곤 헤드스페이스를 지니는 동일 제형과 비교하여 실험의 마지막에 다량의 응집물을 만들었다.

표 3

[0223]

샘플	단백질 농도 (mg/ml)	수크로스(%)	히스티딘(mM)	알기닌 (mM)	PS 80 (%)	pH	응집물 공기 샘플 (%)	응집물 아르곤 샘플(%)
1	60	2	25	75	0.05	6.2	0.64	0.48
2	60	4	25	75	0.05	7	0.62	0.42
3	160	4	50	75	0.14	6.2	0.92	0.73
4	160	2	50	75	0.14	7	1.16	0.74
5	60	2	50	125	0.05	7	1.28	0.33
6	60	4	50	125	0.05	6.6	0.48	0.36
7	160	4	25	125	0.14	7	1.04	0.70
8	160	2	25	125	0.14	6.2	1.06	0.75
9	160	3	25	75	0.14	6.6	1.09	0.78
10	110	3	50	125	0.10	6.2	0.65	0.47
11	110	2	25	75	0.10	6.6	0.90	0.62

[0224] 이들 실험을 기반으로, SEC 응집물을 산화에 의해 또는 이황화 결합 형성에 의해 형성하기 위한 가설을 세웠다. 항산화제 및/또는 킬레이터의 첨가를 조사하였다. pH 6.6에서 1.5의 폴리솔베이트 80 대 단백질 물 비를 지니는 40mM 히스티딘, 90mM 알기닌 및 160 mg/ml 단백질을 함유하는 제형을 만들었다. 제형에 대해, 25mM 시트레이트, 5mM 시트레이트, 5mM EDTA, 25mM 시스테인 또는 5mM 시스테인을 첨가하였다. 모두 3가지의 추가적인 부형제는 응집물의 형성을 감소시켰다(도 8). 항산화제 및/또는 킬레이터의 첨가를 시트레이트>EDTA>시스테인의 성능 순서로 랭크시켰다. 5 또는 25mM 시트레이트 중 하나는 대조군 제형과 비교하여 SEC 응집물의 형성을 감소시켰다.

[0225] pH, 단백질 농도, 시트레이트 농도, 히스티딘 농도 및 폴리솔베이트 80 대 단백질 물 비의 효과를 결정하기 위해 실험을 수행하였다. pH를 6.0 내지 6.3으로 달리하였고, 단백질 농도는 60 내지 160 mg/ml로 달리하였으며, 시트레이트 농도를 0 내지 25mM로 달리하였고, 히스티딘 농도를 25 내지 50mM로 달리하였으며, 폴리솔베이트 80 대 단백질 물 비를 0.7 내지 1.5로 달리하였다. 제형을 1ml 길이, 27G1/2" 주사기(0.55 +/- 0.2mg 실리콘)에 채웠다. 모든 제형은 대략 125mM 알기닌을 함유하였다.

[0226] 안정성을 CEX 및 SEC를 사용하여 2주 동안 40℃에서 시험하였다. 결과(도 9 및 표 4)는 제형에서 25mM 시트레이트의 존재에 의해 응집물 형성의 감소를 나타낸 반면, 단백질 농도의 증가는 응집물 형성 속도를 증가시켰다. 모노머의 양은 25℃ 및 40℃에서 응집물 형성에 대해 반대의 경향을 나타낸 반면, 5℃에서 모노머의 양은 24개월까지 동안 본질적으로 변화되지 않는다(표 5).

[0227] 제형의 다른 설정은 40℃, 25℃, 5℃에서 40 내지 63mM 시트레이트의 존재에서 그러나 히스티딘이 없는 SEC 응집물의 형성 속도를 조사하였다. 이들 제형에서 응집물의 형성 속도는 40℃에서 히스티딘을 지니는 제형보다 약간 더 높았다. 그러나, 5℃에서, 시트레이트는 있고, 히스티딘은 없는 제형에서 응집물의 형성 속도는 시트레이트와 히스티딘을 함유하는 제형과 비슷하였다(표 6). 또한 5℃에서, 모노머의 양은 24개월까지 동안 본질적으로 변하지 않는다(표 7).

표 4

[0228]

제형 #	단백질 농도 (mg/ml)	pH	히스티딘 농도 (mM)	시트레이트 농도 (mM)	알기닌 농도 (mM)	PS80:단백질 물비	응집물의 초기량 (%)	5℃에서 12개월 후 응집물의 변화	5℃에서 24개월 후 응집물의 변화	25℃에서 12개월 후 응집물의 변화	40℃에서 1개월 후 응집물의 변화
1	62	6.4	50	25	125	0.7	0.4	0.1	0.1	0.7	0.2
2	60	6.4	50	0	125	1.5	0.4	0.5	1.1	1.5	0.4
3	157	6.4	50	25	125	1.5	0.4	0.2	0.3	1.3	0.5
4	161	6.3	50	0	125	0.7	0.4	0.6	0.7	2.5	0.8
5	60	6.2	50	25	125	1.5	0.4	0.2	0.2	0.5	0.2
6	110	6.0	50	0	125	0.7	0.4	0.4	0.6	1.7	0.7
7	162	6.2	50	25	125	0.7	0.4	0.3	0.3	1.1	0.5
8	160	6.0	50	0	125	1.5	0.4	0.4	0.6	2.2	0.9
9	169	6.3	25	25	125	0.7	0.5	--	0.3	--	0.6
10	158	6.3	25	25	123	1.0	0.5	--	--	--	0.6

표 5

[0229]

제형 #	단백질 농도 (mg/ml)	pH	히스티딘 농도 (mM)	시트레이트 농도 (mM)	알기닌 농도 (mM)	PS80:단백질 물비	모노머의 초기량(%)	5℃에서 12개월 후 모노머의 변화	5℃에서 24개월 후 모노머의 변화	25℃에서 12개월 후 모노머의 변화	40℃에서 1개월 후 모노머의 변화
1	62	6.4	50	25	125	0.7	98.3	0.4	0.1	-2.5	-1.3
2	60	6.4	50	0	125	1.5	98.3	-0.2	-1.0	-3.9	-2.0
3	157	6.4	50	25	125	1.5	98.2	0.2	0.0	-3.1	-1.6
4	161	6.3	50	0	125	0.7	98.2	0.0	-0.4	-4.5	-2.1
5	60	6.2	50	25	125	1.5	98.3	0.3	0.2	-2.2	-1.4
6	110	6.0	50	0	125	0.7	98.3	0.1	-0.3	-3.6	-2.1
7	162	6.2	50	25	125	0.7	98.3	0.2	-0.1	-2.8	-1.7
8	160	6.0	50	0	125	1.5	98.3	-0.1	-0.4	-4.2	-2.3
9	169	6.3	25	25	125	0.7	98.2	--	-0.1	--	-1.8
10	158	6.3	25	25	123	1.0	98.1	--	--	--	-1.7

표 6

제형#	단백질 농도 (mg/ml)	pH	히스티딘 농도 (mM)	시트레이트 농도 (mM)	알기닌 농도 (mM)	PS80:단백질 물비	응집물의 초기량(%)	5℃에서 12개월 후 응집물의 변화	5℃에서 24개월 후 응집물의 변화	25℃에서 12개월 후 응집물의 변화	40℃에서 1개월 후 응집물의 변화
11	160	6.3	0	40	125	0.7	0.5	--	0.4	--	0.9
12	165	6.3	0	40	125	1.5	0.6	0.3	--	--	0.9
13	62	6.2	0	40	125	1.5	0.5	--	--	1.7	0.4
14	170	6.1	0	40	125	1.5	0.5	--	--	--	0.9
15	165	6.5	0	63	125	1.5	0.5	--	--	--	1.0
16	160	6.3	0	40	125	1.0	0.6	0.3	--	--	0.9

[0230]

표 7

제형 #	단백질 농도 (mg/ml)	pH	히스티딘 농도 (mM)	시트레이트 농도 (mM)	알기닌 농도 (mM)	PS80: 단백질 물 비	모노머의 초기량(%)	5℃에서 12개월 후 모노머의 변화	5℃에서 24개월 후 모노머의 변화	25℃에서 12개월 후 모노머의 변화	40℃에서 1개월 후 모노머의 변화
11	160	6.3	0	40	125	0.7	98.3	---	-0.3	---	-2.2
12	165	6.3	0	40	125	1.5	98.2	0.1	---	-3.4	-2.1
13	62	6.2	0	40	125	1.5	98.1	---	---	---	-1.4
14	170	6.1	0	40	125	1.5	98.1	---	---	---	-2.0
15	165	6.5	0	63	125	1.5	98.2	---	---	---	-2.3
16	160	6.3	0	40	125	1.0	98.2	0.1	---	---	-2.0

[0231]

[0232] pH

[0233] 몇몇 pH 실험을 5℃에서 CEX 분해에 대한 pH의 효과를 결정하기 위해 행하였다. 베들리주맵 항체 제형은 160 mg/ml의 항-α4β7 항체, 125mM 알기닌, 50mM 히스티딘 및 25mM 시트레이트를 포함하였다. 몇몇 상이한 pH 수준 6.3, 6.5, 6.7 및 6.9를 40℃, 25℃ 및 5℃에서 안정성에 대해 시험하였다.

[0234] 40℃에서 CEX 모델(도 10)은 pH가 CEX 분해에 가장 영향을 미친다는 것을 나타낸다. 히스티딘을 함유하는 제형의 pH는 온도가 증가함에 따라 감소되었지만, 시트레이트 제형의 pH는 온도에 의해 영향을 받지 않는 것으로 나타났다(도 11). 히스티딘/시트레이트 제형은 1주 후 40℃에서 6.8, 6개월 후 25℃에서 6.3 내지 6.5 및 6개월 후 5℃에서 6.3 내지 6.5의 pH에서 양호한 안정성을 가지는 것으로 결정하였다. 추가적인 연구를 기반으로, 제형의 안정성은 6.2 내지 6.9의 pH에 대해 25℃ 및 5℃에서 유사하였다(표 8 및 9).

표 8

단백질 농도 (mg/ml)	pH	히스티딘 농도(mM)	시트레이트 농도(mM)	아르기닌 농도(mM)	PS80:단백질 물비	산성 종의 초기 양(%)	염기성 종의 초기 양(%)	주요 아이소폼의 초기 양(%)	25 ° C에서 시간에 따른 상대적 변적도의 차이					
									6 개월 후 CEX 산성의 변화	12 개월 후 CEX 산성의 변화	6 개월 후 CEX 염기성의 변화	12 개월 후 CEX 염기성의 변화	6 개월 후 CEX 주요종의 변화	12 개월 후 CEX 주요종의 변화
157	6.4	50	25	125	1.5	23.9	6.8	69.3	8.5	17.4	7.1	3.4	-15.6	-20.8
162	6.2	50	25	125	0.7	24.0	6.9	69.1	4.4	12.8	10.8	8.6	-15.2	-21.4
158	6.3	50	25	125	1.5	24.8	5.5	69.7	7.2	---	4.9	---	-14.4	---
160	6.4	42	25	125	1.5	24.9	5.5	69.7	9.5	---	1.0	---	-14.4	---
147	6.7	45	25	125	2.1	24.9	4.7	70.4	14.8	---	3.6	---	-16.5	---
147	6.9	45	25	125	2.2	25.0	4.9	70.1	14.5	---	3.2	---	-17.9	---
153	6.7	46	25	125	1.5	24.8	5.5	69.7	14.7	---	0.3	---	-17.3	---
154	6.9	46	25	125	1.5	24.9	5.3	69.8	19.7	---	0.5	---	-20.2	---
170	6.5	50	25	125	1.0	25.7	4.6	69.7	10.8	---	4.4	---	-15.2	---
170	6.5	50	25	125	1.5	25.7	4.6	69.7	11.1	---	5.2	---	-16.4	---
160	6.5	50	25	125	1.5	26.3	7.0	66.7	11.8	---	-2.6	---	-11.9	---

[0235]

표 9

단백질 농도 (mg/ml)	pH	히스티딘 농도 (mM)	시트레이트 농도 (mM)	알기닌 농도 (mM)	PS80:단백질 몰 비	5 ° C에서 시간에 따른 상대적 변적%의 차이					
						6 개월 후 CEX 산성의 변화	24 개월 후 CEX 산성의 변화	6 개월 후 CEX 염기성의 변화	24 개월 후 CEX 염기성의 변화	6 개월 후 CEX 주요 종의 변화	24 개월 후 CEX 주요 종의 변화
157	6.4	50	25	125	1.5	0.2	0.6	2.3	-0.9	-2.5	0.3
162	6.2	50	25	125	0.7	-0.2	-0.7	4.3	2.2	-4.1	-1.5
158	6.3	50	25	125	1.5	0.0	---	1.9	---	-1.9	---
160	6.4	42	25	125	1.5	0.1	---	1.7	---	-1.8	---
147	6.7	45	25	125	2.1	1.7	---	1.7	---	-3.4	---
147	6.9	45	25	125	2.2	1.6	---	1.1	---	-2.7	---
153	6.7	46	25	125	1.5	1.7	---	0.4	---	-2.1	---
154	6.9	46	25	125	1.5	2.1	---	0.4	---	-2.4	---
170	6.5	50	25	125	1.0	0.9	---	1.6	---	-2.5	---

[0236]

[0237] 실시예 2

[0238] 안정성

[0239] 4가지 상이한 항-α4β7 항체 제형을 12개월의 과정에 걸쳐 안정성에 대해 시험하였다. 6.0 내지 6.2의 pH를 갖는 제형은 6.3 내지 6.4의 pH를 갖는 제형보다 주요종을 대략 1 내지 2% 적게 나타내었다(도 12). 6.3 내지 6.4의 pH를 갖는 제형은 5°C에서 염기성 또는 주요 종에서 1% 더 적은 변화를 나타내었다.

[0240] 10가지 상이한 항-α4β7 항체 제형을 12개월의 과정에 걸쳐 SEC에 의해 안정성에 대해 시험하였다(표 10). 60 mg/ml 단백질 농도를 지니고, 25mM 시트레이트를 함유하는 제형은 1년 후 0.1 내지 0.2%의 응집물에서 변화된 반면, 160 mg/ml 단백질 및 25mM 시트레이트를 함유하는 제형은 1년에 걸쳐 0.2 내지 0.3%로 응집물을 증가시켰다. 시트레이트가 없는 60, 110 또는 160 mg/ml 단백질을 함유하는 제형에 대해 0.4 내지 0.6% 응집물의 증가가 있었다.

표 10

[0241]

제형 #	단백질 농도(mg/ml)	pH	히스티딘 농도(mM)	시트레이트 농도(mM)	알기닌 농도(mM)	PS80 몰 비	1년 후 5°C에서 응집물의 변화%
1	62	6.41	50	25	125	0.7	0.11
2	60	6.35	50	0	125	1.5	0.50
3	157	6.44	50	25	125	1.5	0.23
4	161	6.3	50	0	125	0.7	0.56
5	60	6.19	50	25	125	1.5	0.16
6	110	6.03	50	0	125	0.7	0.39
7	162	6.19	50	25	125	0.7	0.26
8	160	6	50	0	125	1.5	0.44
9	165	6.28	0	40	125	1.5	0.30
10	160	6.3	0	40	125	1.0	0.33

[0242] 실시예 3

[0243] 점성도

[0244] 약제학적 제형을 투여하기 위해 필요한 주입력은 제형의 점성도와 관련된다. 다양한 pH 및 다양한 농도의 단백질, 알기닌, 히스티딘, 시트레이트, 수크로스 및 폴리솔베이트 80을 지니는 제형을 만들었다. 이들 제형의 점성도를 시험하였다. Ln(점성도)의 통계학적 모델을 개발하였다. 모델은 점성도가 단백질 농도 및 pH에 의해 주로 영향을 받는다는 것을 나타내었다(도 13). 수크로스, 히스티딘 및 알기닌은 또한 점성도에 대해 부수적인 효과를 가질 수 있다. 일부 단백질 제형에서, 염화나트륨을 첨가하여 제형의 점성도를 감소시킨다. 그러나, 점성도에 대한 염화나트륨의 효과는 단백질 및 제형 의존적인 것으로 알려져 있다.

- [0245] 염화나트륨을 1.5 폴리술베이트 80 대 단백질 물 비 및 6.4의 pH에서 140 mg/ml 베돌리주맵, 125mM 알기닌, 25mM 히스티딘, 25mM 시트레이트 및 폴리술베이트 80을 함유하는 제형에 첨가하였다. NaCl은 제형의 점성도에 대해 어떤 효과도 가지지 않았다.
- [0246] 시험한 다양한 주사기의 주입력에 대한 점성도의 효과는 도 16a 및 16b에 나타낸다.
- [0247] 실시예 4
- [0248] 방법
- [0249] 양이온 교환 크로마토그래피(Cation Exchange Chromatography: CEX)
- [0250] 약한 양이온 교환 컬럼에 대한 포스페이트/염화 나트륨 구배를 고성능 액체 크로마토그래피 시스템에서 사용하여 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형 내 하전된 종을 분리시키고, 항체 종의 하전 조성을 결정한다. 주요 아이소폼 전에 산성 아이소폼을 용리시키고, 주요 아이소폼 후 염기성 아이소폼을 용리시킨다.
- [0251] CEX 분석을 사용하여 만든 베돌리주맵 제형에 대한 안정성 데이터는 주요 아이소폼%가 55.0% 초과였다는 것을 나타내었다.
- [0252] 모세관 등전 집중(Capillary Isoelectric Focusing: cIEF)
- [0253] cIEF는 iCE280 전체 컬럼 검출 cIEF 시스템(온타리오주 토론토에 소재한 컨버전트 바이오사이언스(Convergent Biosciences))를 사용하여 수행한다. 양쪽성 전해질의 선택은 제조업자에 의해 추천된 바와 같을 수 있거나 또는 상업적으로 입수가능한 양쪽성 전해질의 조합일 수 있다. 유용한 조합은 3-10 및 5-8 파말라이트(PHARMALYTE)(상표명)(뉴저지주 피츠카타웨이에 소재한 GE 헬스케어(GE Healthcare))의 혼합물이다.
- [0254] cIEF 분석을 사용하여 만든 베돌리주맵 제형에 대한 안정성 데이터는 주요 아이소폼%가 53%이고, 산성 종%는 약 42%이며, 염기성 종%는 약 5%라는 것을 나타내었다.
- [0255] 크기 배제 크로마토그래피(Size Exclusion Chromatography: SEC)
- [0256] SEC는 분석적 SEC 컬럼을 사용하여 수행한다(필라델피아주 킹 오브 프리시아에 소재한 토소 바이오사이언스 엘엘씨(Tosoh Bioscience, LLC)). 이동상은 인산염-완충 식염수 용액이고, 흡광도는 280nm에서 모니터링한다.
- [0257] SEC 분석을 사용하여 만든 베돌리주맵 제형에 대한 안정성 데이터는 모노머%가 99.0%였고, 응집물%가 <0.5%였으며, 저분자량 물질%는 <1.0%였다.
- [0258] SDS-PAGE 분석
- [0259] SDS-PAGE는 인비트로젠(캘리포니아주 칼스베드에 소재) 트리스-글라이신 겔을, 환원 조건을 위해 4 내지 20% 및 비-환원 조건을 위해 4 내지 12%를 사용하여 수행한다. 재구성된 항체 제형 샘플을 액체 제형에서 희석시킨 다음 10% 2-머캅토에탄올과 함께(환원성 샘플 완충제) 또는 2-머캅토에탄올 없이(비-환원성 샘플 완충제) 트리스-글라이신 SDS 샘플 완충제(2X, 인비트로젠(Invitrogen))에 의해 1 내지 2회 희석시켰다. 샘플을 간단히 가열시키고, 분자량 마커(인비트로젠(Invitrogen))와 비교하여 로딩한다. 겔을 제조업자의 설명서에 따라서 콜로이드 쿠마씨 블루(인비트로젠(Invitrogen))로 염색한다. 단백질 밴드를 환원된 겔에 대해 중쇄 및 경쇄를 그리고 비-환원 겔에 대해 IgG%를 확인하기 위해 덴시토메트리(densitometry)에 의해 분석한다.
- [0260] 결합 효능
- [0261] HuT78 세포(인간 T 세포 림프종 세포, 버지니아주 매너서스에 소재한 미국 미생물 보존센터(American Type Culture Collection))를 PBS 중의 1% BSA 중에서 현탁시켰고, 0.01% 아자이드 나트륨을 1차 시험 항체의 단계 희석물과 접촉시킨다. 얼음 상에서 인큐베이션 후, 세포를 세척하고, 형광으로 표지한 2차 항체로 처리한다. 추가 세척 후, 세포를 고정시키고, 유세포 분석기(뉴저지주 프랭클린 레이크스에 소재한 벡톤 디킨슨(Becton Dickinson)); 또한 미국 특허 제7,147,851호 참조)에 의한 분석을 위해 FACS 시약 중에서 현탁시킨다.
- [0262] 카를 피셔에 의한 수분
- [0263] 제형을 전량 분석 카를 피셔(Karl Fischer) 수분 결정을 위해 메탄올로 적정한다.
- [0264] 실시예 5
- [0265] 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형에 의한 사전 충전된 주사기 제품으로부터 실리콘의 효과

[0266] L-히스티딘, L-알기닌 염산염, 시트레이트 및 폴리솔베이트 80을 함유하는 완충제 중에서 60-160 mg/ml의 항- α 4 β 7 단백질로 이루어진 피하 제형을 사용하여 단백질 제형의 안정성 및 용기/마개 속성에 대한 실리콘의 효과를 연구한다. 연구는 0.5 ml를 채우는 것으로 수행한다.

[0267] 단백질 농도, 폴리솔베이트 80 대 단백질 물 비, 주사기 배럴에 분무된 실리콘의 양을 포함하는 변수를 조사한다. 입력 변수 각각의 범위를 표 11에 나타낸다.

표 11

입력 변수 범위		
변수	낮음	높음
단백질 농도(mg/ml)	100	160
폴리솔베이트 80:단백질 비	0	2
실리콘 양(mg)	0.4	0.8

[0269] 실험 설계를 사용하여 연구에 대한 제형 세트를 결정한다. 합리적인 수의 제형은 6 내지 8개 제형의 범위에 있다. 시험하는 제형의 예를 표 12에 나타낸다.

표 12

실험	단백질 농도 (mg/ml)	PS80:단백질 비	PS80 농도 (%)	실리콘 수준 (mg)
1	100	1	0.087	0.8
2	100	2	0.174	0.8
3	160	0	0	0.8
4	160	2	0.279	0.4
5	100	0	0	0.4
6	160	2	0.279	0.8
7	100	1	0.087	0.4
8	160	0	0	0.4
9	100	0	0	0
10	100	2	0.174	0
11	160	0	0	0
12	160	2	0.279	0

[0271] 일부 대조군을 제형 세트에 첨가할 수 있고, 몇몇 선택 시점에 시험하였다.

[0272] 이들 제형을 몇몇 상이한 온도(예를 들어, 5℃, 25℃/60% RH, 40℃/75% RH)에서 안정하게 두고, 시험을 위해 다양한 시점(예를 들어, 제0주, 제1주, 제2주, 제4주, 제8주, 제12주, 6개월 및 12개월)에 덜어내었다. 대조군을 제0주, 제12주, 6개월 및 12개월에 시험한다.

[0273] 각각의 안정성 시간에 수행한 시험은 SEC, CEX, 인스트론(Instron), MFI 및 실리콘 정량화를 포함한다. 1 주사기를 인스트론(Instron)에 대해 시험하고, 배출된 물질을 SEC, CEX, 주입력 측정 및 미세유동 이미징(microflow imaging: MFI) 및 실리콘 정량화를 위해 사용한다.

[0274] 실시예 6

[0275] 항- α 4 β 7 항체 제형으로 채운 사전-충전한 주사기 성분의 분석

[0276] 이 연구는 다양한 주사기 제조업자, 플런저(마개) 탄성 재료 및 제형 내 PS80의 양이 시스템의 기계적 특성 및 제형의 안정성에 영향을 미치는 방법을 조사하였다.

[0277] 3가지의 상이한 주사기 제조업자, 2가지의 상이한 플런저(마개) 재료 유형 및 2가지의 상이한 PS80 대 단백질 물 비를 조사하는 실험 설계를 만들었다. 나머지 제형을 170 mg/ml의 단백질, 125mM 알기닌, 50mM 히스티딘, 25mM 시트레이트, 및 6.5의 pH에서 일정하게 유지하였다. 이들 사전-충전한 주사기에 대한 바늘 크기는 27G ½' 또는 29G ½"의 썬 윌이었다. 수행한 실험을 표 15에서 상술한다.

[0278] 실험의 활성 부분에 대한 실험 설계 입력 값을 이하의 표 13에서 나타내는 한편, 상수를 표 14에서 나타낸다.

표 13에 나타난 입력 값을 이용하여 실험 설계를 만들었다.

실험의 열거를 표 10에 나타낸다.

표 13

활성 제형에 의한 DOE 변수 및 수준			
변수	값		
PS80: 단백질 물 비	1.0		1.5
주사기 제조업자	A	B	C
플런저(마개) 유형	4432		4023 코팅됨

표 14

활성 제형에 대한 상수	
상수	값
단백질 농도(mg/ml)	170
알기닌 농도(mM)	125
히스티딘 농도(mM)	50
시트레이트 농도(mM)	25
pH	6.5

표 15

실험의 세부사항			
실행 #	주사기 유형	플런저(마개)	PS80
1	C	4432	1
2	B	4432	1
3	A	4023	1
4	C	4023	1
5	B	4023	1
6	A	4023	1.5
7	C	4023	1.5
8	B	4023	1.5

농축한 제형 항-α4β7 제형에 폴리솔베이트 80을 첨가하고, 170 mg/ml로 희석시킨다. 출발 제형의 조성을 이하의 표 16에 나타낸다.

표 16

출발 제형 완충제 세부사항				
단백질(mg/ml)	전체 His(mM)	전체 시트레이트(mM)	Arg (mM)	pH
183	50	25	125	6.48

원하는 제형 조성물에 대한 물질의 희석을 위해, 25mM 시트레이트, 50mM 히스티딘, 125mM 알기닌, pH 6.48 중에서 PS80의 저장 용액을 만든다.

표 17

저장 용액 세부사항	
부형제	농도
PS 80(%)	5

제형에 대한 희석 계획을 표 18에 상술한다.

표 18

[0288]

회석 세부사항			
출발 제형(uL)	His/Arg/시트레이트 중의 PS80(uL)	50mM 히스티딘, 125mM 알기닌, 25mM 시트레이트 pH 6.48 완충제	전체 용적(uL)
27868.9	890.8	1240.3	30000.0
18579.2	890.8	530.0	20000.0

[0289]

회석 계획을 기반으로 조제를 수행하고, 출발 제형을 칭량하여야 하는 한편, 다른 저장 용액을 용적 측정으로 피펫팅할 수 있다. 제형을 초과시킨다. 0.5mL의 제형을 가능한 1mL만큼 긴 주사기 내로 알리쿼팅시킨다. 주사기를 2 내지 4mm 거품을 지니는 자동밀봉 기계(stoppering machine)에 의해 밀봉시킨다. 각 시점에, 하나의 주사기는 바늘을 아래쪽으로 보관하고, 하나의 주사기는 옆쪽으로 보관한다. 여분의 주사기는 바늘을 아래쪽으로 보관한다.

[0290]

주사기를 2주에 5, 25 및 40°C에서 및 1개월에 시험한다. 분석 시험(외관, 인스트론(Instron), pH, 삼투압, 밀도, 점성도, SEC, CEX 및 브라이트웰(Brightwell))을 처음에 수행한 다음, 다시 25 및 40°C에서 2주 및 25°C에서 4주 수행한다.

[0291]

실시예 7

[0292]

항-α4β7 항체 제형으로 사전-충전한 27G 썬 월 바늘 주사기에서 사용한 피하 용기 마개의 분석

[0293]

이 연구는 27G 썬 월 바늘 및 다양한 플런저(마개) 제조업자 및 모델에 의한 다양한 주사기 모델이 시간에 걸쳐 시스템의 기계적 특성 및 제형의 안정성에 영향을 미치는 법을 조사한다.

[0294]

이 연구는 사전충전된 주사기에서 항-α4β7 피하 액체 제형의 안정성 및 주사기의 기계적 특성이 27GTW 바늘을 지니는 주사기에 대해 주사기 제조업자 및 플런저(마개) 모델에 의해 영향받는 법을 조사한다. 이 연구로부터 만든 데이터는 액체 피하 항-α4β7 제형에 대한 용기/마개 성분을 결정할 수 있다.

[0295]

실험 설계 입력 값을 이하의 표 19에서 나타내는 한편, 상수를 표 20에서 나타낸다. 표 19에서 나타낸 입력 값을 이용하여 실험 설계를 만들었다.

[0296]

수행하는 실험의 목록을 표 21에 나타낸다.

표 19

[0297]

활성 제형에 의한 DOE 변수 및 수준				
변수	값			
주사기 제조업자	A	B	C	
플런저(마개) 유형	4432	4023 코팅됨	D	E

표 20

[0298]

활성 제형에 대한 상수	
상수	값
단백질 농도(mg/mL)	160
알기닌 농도(mM)	125
히스티딘 농도(mM)	50
시트레이트 농도(mM)	25
PS80(%)	0.2
pH	6.5

표 21

[0299]

실험 세부사항		
실험#	주사기	플런저(마개)

1	B	D
2	B	4432
3	A	4432
4	B	4023 코팅됨
5	A	D
6	C	4023 코팅됨
7	A	4023 코팅됨
8	C	D
9	C	4432
10	C	E

[0300] 농축한 항- $\alpha 4\beta 7$ 제형에 폴리술베이트 80을 첨가하고 160 mg/ml로 희석시킨다. 출발 제형의 조성을 이하의 표 22에서 나타낸다.

표 22

[0301]

출발 제형 완충제 세부사항				
단백질(mg/ml)	전체 His (mM)	전체 시트레이트(mM)	Arg(mM)	pH
180	50	25	125	6.3

[0302] 원하는 제형 조제물로 물질의 희석을 위해, 25mM 시트레이트, 50mM 히스티딘 및 125mM 알기닌, pH 6.3 중에서 PS80의 저장 용액을 만든다.

표 23

[0303]

저장 용액 세부사항	
부형제	농도
His/ Arg/ 시트레이트 완충제 pH 6.3 중에서 PS80(%)	1.68

[0304] 제형에 대한 희석 계획을 표 24에서 상술한다.

표 24

[0305]

희석 세부사항		
His Arg 시트레이트 완충제(ml) 중의 출발 제형	His/Arg/시트레이트 완충제(ml) 중의 PS80	전체 용적(ml)
78	10 (1.68%)	88

[0306] 희석 계획을 기반으로 조제를 수행하고, 출발 제형을 칭량하여야 하는 한편, 다른 저장 용액을 용적 측정으로 피펫팅할 수 있다. 제형을 여과시킨다. 0.5 ml의 제형을 가능한 1 ml만큼 긴 주사기 내로 알리퀀팅 시킨다. 주사기를 2 내지 4mm 거품을 지니는 자동밀봉 기계에 의해 밀봉시킨다. 각 시점에, 하나의 주사기는 바늘을 아래 쪽으로(수평 위치) 저장한다.

[0307] 주사기를 1 개월, 3개월, 6개월, 9개월(선택적), 12개월, 18개월 및 24개월에 5℃, 25℃/60% RH 및 40℃/75% RH에서 시험한다.

[0308] 액체 제형을 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24개월(5℃); 1, 3, 6, 9, 12, 18개월(25℃); 1, 3, 6, 9, 12개월(40℃); 및 1, 3개월(40℃)에 분석적으로 시험한다(농도, 삼투압, pH, 인스트론(Instron), MFI, SEC, 및/또는 CEX).

[0309] 실시예 8

[0310] 플라스틱 사전충전 주사기에서 피하 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형의 분석

[0311] 이 연구를 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 피하 제형에 대해 용기/마개 시스템으로서 플라스틱 주사기의 사용을 연구하기 위해 개시한다. 후보 플라스틱 사전충전 주사기 내 대표적인 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 피하 제형의 안정성을 연구한다. 이 연

구로부터 만든 데이터는 액체 피하 항-α4β7 항체 제형을 위한 플라스틱 주사기를 사용하는 것의 적용가능성을 판단하는데 도움을 준다.

안정성 시험 샘플을 이하에 나타내는 바와 같이 제조한다. 안정성 시험을 40℃/75% RH, 25℃/60% RH 및 5℃의 저장 조건 하에 수행한다.

표 25에서 두 유형의 플라스틱 주사기 및 하나의 유리 주사기를 표 26에 나타내는 액체 피하 항-α4β7 항체 제형으로 시험한다. 표 27은 실험에서 시험되는 샘플의 각 설정의 세부사항을 나타낸다.

표 25

플라스틱 주사기				
		샘플 #1 플라스틱 주사기 1	샘플 #2 플라스틱 주사기 2	샘플 #3 유리 주사기 (대조군)
주사기	판매자	F	B	A
	부품	주사기: 중합체 바늘: 27G(TW) 강성 바 늘 쉴드	주사기: 중합체 바늘: 26G(RW) 루어락(Luer lock) 팁 캡	주사기: 유리 바늘: 27G(TW) 강성 바늘 쉴드
	규소 코팅	없음	Not free	있음
플런저	판매자	F	F	←
	제품 설명	1ml 재료 A	1ml 재료 B	←
	규소 코팅	없음	있음	←

표 26

항-α4β7 항체 피하 제형(pH 6.5)	
성분	조성
항-α4β7 항체	160 mg/ml
알기닌	125mM
히스티딘	50mM
시트레이트	25mM
PS80(단백질 물 비)	1.5 (0.2w/v%)

표 27

샘플 세부사항									
샘플#	플라스틱 주사기 판매자	단백질 (MW:150000)		Arg (MW:174.20) (mM)	His (MW:155.15) (mM)	시트레이트 (MW:210.14) (mM)	PS 80 (MW:1309.68)		pH
		(mg/ ml)	(mM)				(w/v%)	단백질 물 비	
1	F	160	1.067	125	50	25	0.21	1.5	6.5
2	B	160	1.067	125	50	25	0.21	1.5	6.5
3 (농도)	A	160	1.067	125	50	25	0.21	1.5	6.5

앞서 제조한 액체 피하 항-α4β7 제형을 이 조사를 위해 사용한다. 제형을 여과시킨다. "충전 전" 샘플로서 품질 시험(외관, MFI, DLS)을 위해 여과한 용액의 샘플링. 0.5ml의 제형을 1ml 플라스틱 주사기 내로 알리퀀팅한다. 주사기를 진공 밀봉 기계에 의해 밀봉한다. 주사기는 바늘을 아래쪽으로 보관한다.

pH, 삼투압, 밀도, 점성도 및 단백질 농도를 측정하기 위해 처음의 확인을 수행한다. 분석학적 시험(외관, SEC (응집물, 모노머, LMW), CEX(산성, 주요, 염기성), 활택력, MFI, DLS, 및/또는 중량)를 40℃에서 1주, 40℃에서 2주, 5, 25 및 40℃에서 1개월, 5 및 25℃에서 3개월, 5 및 25℃에서 6개월, 5 및 25℃에서 9개월 및 5 및 25℃에서 12개월 후 수행한다.

[0319] 샘플을 5 및 25℃에서 1개월, 3개월, 6개월, 9개월 및 12개월에 취한다. 샘플을 40℃에서 1주, 2주 및 1개월에 취한다.

[0320] 실시예 9:

[0321] 샘플을 0, 1, 3, 6 및 12개월을 포함할 수 있는 다양한 시점에 5℃ 및 25℃에서 외관, 주입력, SEC, CEX 및 미세-유동 이미징에 대해 분석한다. SEC 및 CEX에 의해 측정된 바와 같은 제형의 안정성은 실시예 1 및 2에서 논의한 것과 유사하였다. 주입력 시험을 위해, 활택력을 측정하였다(표 28). 통계적 모델로 활택력에 영향을 미치는 유일한 유의한 인자는 제조업자라는 것을 결정하였는데, A는 B보다 더 높은 활택력을 가졌고, B는 C보다 더 컸다(도 17). 5℃에서 12개월 및 25℃에서 6개월에 걸쳐 주사기의 활택력의 변화는 10N 미만이었지만, 대부분 5N 미만이었다.

표 28

실행 #	주사기 제조업자	바늘 크기	플런저(마개) 유형	PS80:단백질 물 비	초기 활택력(N)
1	C	27G	D	1	19.2
2	B	27G	D	1	22.9
3	A	29GTW	E	1	25.0
4	C	27G	E	1	18.5
5	B	27G	E	1	22.7
6	A	29GTW	E	1.5	28.8
7	C	27G	E	1.5	18.7
8	B	27G	E	1.5	23.7

[0323] 실시예 10

[0324] 항-α4β7 항체 제형으로 충전한 27G 쉘 월 바늘 주사기에서 사용한 사전-충전한 주사기 성분의 분석

[0325] 이 연구는 27G 쉘 월 바늘의 다양한 주사기 제조업자 및 다양한 플런저(마개) 제조업자 및 탄성 재료가 시간에 걸쳐 사전-충전한 주사기 시스템의 기계적 특성 및 제형의 안정성에 영향을 미치는 방법을 조사하였다.

[0326] 3개의 상이한 주사기 제조업자 및 4개의 상이한 플런저(마개) 모델을 27G ½" 쉘 월 바늘 및 6.5의 pH에서 160 mg/ml 단백질, 125mM 알기닌, 50mM 히스티딘, 25mM 시트레이트, 0.2% PS80을 함유하는 제형으로 시험하였다. 모든 샘플을 만들었고, 시험을 표 29에서 나타낸다.

표 29

실험적 세부사항		
실행 #	주사기	플런저(마개)
1	B	F
2	B	D
3	A	D
4	B	E
5	A	F
6	C	E
7	A	E
8	C	F
9	C	D
10	C	G

[0328] 5℃, 25℃ 및 40℃에서 0, 1, 3, 6 및 12개월을 포함할 수 있는 다양한 시점에 외관, 주입력, SEC, CEX 및 미세-유동 이미징에 대해 샘플을 분석하였다. SEC 및 CEX에 의해 측정된 바와 같은 제형의 안정성은 실시예 1 및 2에서 논의한 것과 유사하였다. 주입력 시험을 위해, 벗어나는 힘 및 활택력을 측정하였다. 초기 시점에 결과를 표 30에서 나타낸다.

표 30

[0329]

실행 #	주사기 제조업자	플런저 (마개) 유형	초기 활택력 (N)	초기의 벗어나는 힘(N)	12개월에 5℃에서 벗어나는 힘(N)	12개월에 25℃에서 벗어나는 힘(N)	12개월에 40℃에서 벗어나는 힘(N)
1	B	F	12.0	4.0	3.8	12.9	28.7
2	B	D	11.9	3.9	4.6	12.4	36.0
3	A	D	7.0	4.0	6.5	5.1	6.4
4	B	E	13.9	4.5	4.7	5.8	17.2
5	A	F	5.7	4.1	3.0	17.5	23.9
6	C	E	6.7	4.1	5.0	5.8	11.4
7	A	E	7.9	7.6	4.3	10.4	6.1
8	C	F	6.3	4.2	4.1	15.0	33.3
9	C	D	5.9	4.8	3.9	4.4	10.0
10	C	G	7.2	4.6	6.1	9.8	13.0

[0330]

통계적 모델은 주사기 제조업자 A 및 C가 유사하고, 제조업자 B보다 더 낮은 활택력을 가지는 한편, 플런저(마개) E가 다른 플런저(마개)보다 약간 더 높은 활택력을 가진다는 것을 나타내었다.

[0331]

일반적으로, 초기의 벗어나는 힘은 시험한 모든 샘플 간에 유사하였다.

[0332]

5℃, 25℃ 및 40℃에서 12개월에 걸쳐, 활택력은 유의하게 변하지 않았다. 그러나, 플런저(마개) F를 지니는 주사기에 대해 벗어나는 힘은 25℃ 및 40℃에서 12개월만큼 증가되었다.

[0333]

실시에 11

[0334]

사전충전된 주사기에서 항-α4β7 항체 제형의 분석

[0335]

이 연구는 다양한 수준의 단백질 농도, 폴리솔베이트 80 농도, 시트레이트 농도 및 pH가 사전 충전된 주사기 형식에서 항-α4β7 항체 제형에 영향을 미치는 방법을 결정한다.

[0336]

실험 설계의 부분을 2 수준의 단백질 농도(60 내지 160 mg/ml), pH(6.0 내지 6.3), 폴리솔베이트 80:단백질 물비(0.723 내지 1.5) 및 시트레이트 농도(0 내지 25mM)의 분획 인자를 지니는 JMP에서 만든다. 이들 제형은 히스티딘 농도(50mM) 및 알기닌(125mM)(제형 1 내지 8)의 상수 값을 가진다. 25mM 히스티딘을 지니는 이들 제형의 변화를 추가하였다(제형 9 내지 10).

[0337]

추가적인 설정의 제형을 진행하여 히스티딘이 존재하지 않고, 완충제로서 시트레이트만이 작용하는 제형을 조사한다(제형 11 내지 16). 조사하는 모든 제형에 대한 입력 값 수준을 표 31에 나타낸다. 모든 제형에 대해 사용한 상수를 표 32에 나타낸다.

표 31

[0338]

DOE 변수 및 수준		
변수	공칭값	
	낮음	높음
단백질 농도(mg/ml)	60	160
pH	6.0	6.3
PS80: 단백질 물 비	0.723	1.5
시트레이트 농도(mM)	0	40
히스티딘 농도(mM)	0	50

표 32

[0339]

상수	
상수	값
알기닌 농도(mM)	125

표 33

[0340]

시험하는 제형의 목록									
제형 세부사항									
제형 #	단백질 (mg/ml)	단백질 (mM)	His (mM)	Arg (mM)	PS 80%	pH	PS80:단백질 물 비	항산화제	항산화제 농도(mM)
1	60	0.400	50	125	0.038	6.3	0.723	시트르산	25
2	60	0.400	50	125	0.079	6.3	1.5	시트르산	0
3	157	1.047	50	125	0.206	6.3	1.5	시트르산	25
4	160	1.067	50	125	0.101	6.3	0.723	시트르산	0
5	60	0.400	50	125	0.079	6.0	1.5	시트르산	25
6	110	0.733	50	125	0.069	6.0	0.723	시트르산	0
7	160	1.067	50	125	0.101	6.0	0.723	시트르산	25
8	160	1.067	50	125	0.210	6.0	1.5	시트르산	0
9*	160	1.067	25	125	0.101	6.0	0.723	시트르산	25
10*	160	1.067	25	125	0.140	6.0	1	시트르산	25
11	160	1.067	0	125	0.101	6.3	0.723	시트르산	40
12	160	1.067	0	125	0.210	6.3	1.5	시트르산	40
13	60	0.400	0	125	0.079	6.3	1.5	시트르산	40
14*	160	1.067	0	125	0.210	6.1	1.5	시트르산	40
15*	160	1.067	0	125	0.210	6.6	1.5	시트르산	40
16*	160	1.067	0	125	0.140	6.3	1	시트르산	40

[0341]

각각의 제형을 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 함유하는 출발 저장 제형으로부터 만들고, 다양한 부형제 저장 용액으로 희석시킨다. 합리적 희석 용적을 달성하기 위해서, 사용한 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 저장 용액을 표 34에 나타낸다. 2가지의 상이한 TFF 작업을 수행하여 제형 TFF 1 및 2를 이루었다. TFF 1의 일부를 투석에서 사용하여 "투석"으로 표지한 제형을 이루었다.

표 34

[0342]

출발 제형 완충제 세부사항					
출발 제형	단백질(mg/ml)	전체 His (mM)	전체 시트레이트(mM)	Arg (mM)	pH
TFF 1	192.1	50	0	125	6.1
TFF 2	206.1	0	40	125	6.3
투석	169.65	25	25	125	6.0

[0343]

원하는 제형 조성물에 대해 재료의 희석을 위해, 수중에서 각 부형제의 저장 용액을 표 35에 의해 구체화된 농도에서 만든다.

표 35

[0344]

저장 용액 세부사항	
부형제	농도
히스티딘(mM)	220
알기닌 염산염(mM)	625
PS 80 (%)	2.5
히스티딘 염산염(mM)	600
시트르산(mM) (pH 6.3)	1500
시트르산(mM) (pH 6.0)	1500
시트레이트(mM)	600
시트르산 나트륨(mM)	800

[0345]

제형에 대한 희석 계획을 표 36 및 표 37에서 상술한다.

표 36

[0346]

희석 세부사항								
	출발 제형 (uL)	출발 제형 (mg)	His (uL)	His*HC1 (uL)	Arg (uL)	시트레이트 용액 (uL)	PS80 (uL)	WFI (uL)
1	4685.06	4961.01	1612.2	268.4	2063.0	250	227.3	5894.0
2	4685.06	4961.01	1612.2	268.4	2063.0	0	471.6	5899.7
3	12259.2	12981.31	724.1	0.0	548.2	250.0	1234.0	0.0
4	12493.49	13229.36	696.7	0.0	501.3	0	606.2	702.4
5	4685.06	4961.01	1002.8	491.9	2063.0	250	471.6	6035.7
6	8589.28	9095.18	545.0	334.4	1282.1	0	416.7	3832.4
7	12493.49	13229.36	87.2	176.9	501.3	250	606.2	884.9
8	12493.49	13229.36	87.2	176.9	501.3	0	1257.6	483.5
9	12260.8	12941.30	38.2	16.8	147.8	12.3	525.3	0.0
10	12260.8	12941.30	38.2	16.8	147.8	12.3	726.6	0.0

표 37

[0347]

희석 세부사항							
	출발 제형 (uL)	출발 제형 (mg)	시트레이트 (uL)	Na시트레이트 (uL)	Arg (uL)	PS80 (uL)	WFI (uL)
11	9315.87	9944.69	8.3	128.0	536.8	484.9	1526.1
12	9315.87	9944.69	8.3	128.0	536.8	1006.1	1005.0
13	3493.45	3729.26	30.5	402.5	1701.3	377.3	5995.0
14	5822.42	6215.43	22.0	67.4	335.5	628.8	623.9
15	5822.42	6215.43	0.0	300.0	335.5	628.8	413.3
16	5822.42	6215.43	5.2	80.0	335.5	419.2	837.7

[0348]

희석 계획을 기반으로 조제를 수행하고, 출발 제형을 칭량하는 한편, 다른 저장 용액을 용적 측정으로 피펫팅한다. 제형을 여과시킨다. 0.5mL의 제형을 가능한 1mL만큼 긴 주사기에 알리쿼팅한다. 자동밀봉 기계에 의해 주사기를 밀봉한다. 주사기는 바늘을 아래쪽으로 보관한다.

[0349]

액체 제형을 초기에, 40℃에서 1주, 40℃에서 2주, 25 및 40℃에서 1개월, 5 및 25℃에서 2개월, 5 및 25℃에서 3개월, 5 및 25℃에서 6개월, 5 및 25℃에서 9개월 및 5 및 25℃에서 12개월에 분석적으로(외관, pH, 삼투압, 밀도, DLS, SEC, CEX 및/또는 브라이트웰(Brightwell)) 시험한다.

[0350]

표 38에 따라 구체적인 제형 덜어냄(pull)을 또한 수행한다.

표 38

[0351]

구체적인 제형 덜어냄										
제형	온도	1주	2주	1개월	2개월	3개월	6개월	9개월	12개월	추가
1	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
2	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
3	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
4	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
5	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
6	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
7	5	--	--	--	X	X	X	X	X	0
8	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
9	5	--	--	--	--	--	--	--	--	3
10	5	--	--	--	X	X	X	--	X	0
11	5	--	--	--	--	--	--	--	--	5
12	5	--	--	--	X	--	--	--	--	4

13	5	--	--	--	--	--	--	--	--	5
14	5	--	--	--	X	--	--	--	--	1
15	5	--	--	--	--	--	--	--	--	2
16	5	--	--	--	X	--	--	--	--	1
1	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
2	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
3	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
4	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
5	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
6	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
7	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
8	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
9	25	--	--	X	--	--	--	--	--	3
10	25	--	--	X	X	--	X	--	--	0
11	25	--	--	X	--	--	--	--	--	5
12	25	--	--	X	X	--	--	--	--	4
13	25	--	--	X	--	--	--	--	--	6
14	25	--	--	X	X	--	--	--	--	1
15	25	--	--	X	--	--	--	--	--	2
16	25	--	--	X	X	--	--	--	--	1
1	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
2	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
3	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
4	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
5	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
6	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
7	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
8	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
9	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
10	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
11	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
12	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
13	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
14	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
15	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
16	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0

[0352] 실시예 12

[0353] pH 6.5에서 160 mg/ml 단백질, 50mM 히스티딘, 25mM 시트레이트, 125mM 알기닌을 함유하는 제형을 유리 주사기 또는 2개의 상이한 COP 플라스틱 주사기 중 하나에서 안정성에 대해 시험하였다. 12개월 후 5℃ 및 25℃에서, 응집물 및 모노머의 양은 플라스틱과 유리 주사기 간에 비슷하였다.

표 39

제형#	PS80:단백질 물 비	주사기 재료	5℃에서 12개월 후 SEC 응집물의 변화(%)	25℃에서 12 개월 후 SEC 응집물의 변 화(%)	5℃에서 12개월 후 모노머의 양(%)	25℃에서 12개월 후 모노머의 양(%)
1	1.5	COP 제조업자 1	0.2	1.0	98.3	96.8
2	1.5	COP 제조업자 2	0.2	1.6	98.3	96.9
3	1.5	유리	0.2	1.4	98.4	96.8
4	1	유리	0.2	1.6	98.3	96.8

[0355] 실시예 13: 피하 및 근육내 주사에 의해 투여된 베돌리주맙의 생체이용가능성

- [0356] 건강한 남성 피험체에 대해 피하 및 근육내 주사에 의해 투여된 베돌리주맙의 생체이용가능성의 I상 연구를 완료하였다. 전체 42명의 건강한 남성을 연구에 등록하였다. 피험체를 각각 14명 피험체의 3그룹(피하, 근육내 및 정맥내 투여)으로 나누었다. 피험체에게 1일에 180mg의 베돌리주맙을 투여하였다. 용량을 재구성하였다. pH 6.3에서 50mM 히스티딘, 125mM 알기닌, 0.06% 폴리솔베이트 80, 10% 수크로스 중의 60mg/ml 항체의 동결건조된 제형으로부터 용량을 재구성하였다. 근육내 및 피하 피험체에 대해, 용량을 각각 1.5 ml의 2회 주사로 나누었다. 혈액을 샘플링하여 혈장 베돌리주맙 농도를 결정하였고, 각각의 피험체 설정에서 베돌리주맙의 생체이용가능성을 결정하였다.
- [0357] 심각한 부작용 또는 유의한 감염, 임상적으로 유의한 이상, 양성의 주관적/객관적 RAMP 체크리스트도, 임상적으로 유의한 ECG 발견점들도 없다는 것을 보고하였다.
- [0358] 트로프 수준에서 이 원하는 혈청 농도를 유지하기 위해 정맥내 투약과 유사한 노출을 야기한 혈관외 투약의 용량 및 요법을 결정하도록 PK/PD 모델링 및 상황을 완료하였다.
- [0359] 흡수 프로파일(도 18)은 근육내 및 피하 용량의 농도가 일반적으로 중복된다는 것을 나타내었다. 이들 투여 경로의 흡수 프로파일에 명백하게 큰 차이가 없었다. SC 주사 후 베돌리주맙의 절대 생체이용가능성은 대략 75%였고, 다음의 IM 주사는 대략 80%였다.
- [0360] 실시예 14. 피하 투약 요법의 모델링
- [0361] 트로프 수준에서 특정 혈청 농도를 유지하기 위해 정맥내 투약과 유사한 노출을 야기한 혈관외 투약의 용량 및 요법을 결정하도록 PK/PD 모델링 및 시뮬레이션을 완료하였다.
- [0362] 최종 조합 데이터세트(IV, SC 및 IM 데이터)는 클리어런스(clearance: CL) 및 분포의 중심 용적(V2), 분포의 주변 용적(V3), 혈관외 경로 의존적 흡수율 상수(KA) 및 혈관외 투약의 상대적 생체이용가능성(정맥내 투여와 비교함)(F)에 대해 매개변수화한 2구획 선형 모델을 나타내었다. IIV 용어는 상대성장(allometric) 효과를 통해 CL 및 V3에 영향을 미치는 유일한 공변량으로서 체중에 의한 CL, V2 및 V3을 포함하였다.
- [0363] 모델 허용가능성 및 예측 가능성을 부트스트랩 변수 추정, 시각적 예측 확인 및 적합도 플롯을 통해 증명하였다. 모델 분석으로 피험체 사이에 및 대상 성분 내에서 기인하는 PK 내 가변성에 의해 베돌리주맙의 PK에 대한 예측자로서 체중을 확인하였다.
- [0364] 일단 모델은 시뮬레이션에 적합하다는 것을 증명하였고, 투여 경로(IV, IM 또는 SC)의 효과를 평가하고, 정상 상태 트로프 농도에 대해 투약 빈도(1주마다, 2주마다, 4주마다, 및 8주마다)의 효과를 평가하기 위하여 시뮬레이션을 수행하였다. IM 및 SC 투여 후 베돌리주맙의 이들 값 및 상대적 생체이용가능성을 기반으로(F=69.5%), IV 용량으로서 유사한 트로프 농도를 달성하도록 용량을 선택하였다.
- [0365] 정맥내 유도 및 유지 요법을 매칭하기 위한 시뮬레이션 모델링한 용량 및 요법. 표적은 노출(혈청 약물 농도-시간 곡선하 면적(AUC))과 트로프 약물 농도였다. 표 40 내지 43은 시뮬레이션 결과를 제공한다.

표 40

[0366]

제0주 내지 제6주 동안 IV AUC를 매칭하는 유도 요법		
경로	용량	빈도
IV	300mg	제0주 및 제2주
SC	485mg	제0주 및 제2주
SC	160mg	2일마다(6회 투약)
SC	>160mg	1주마다(6회 투약)

표 41

[0367]

IV 트로프 농도를 매칭하는 유도 요법, 제0주 내지 제6주		
경로	용량	빈도
IV	300 mg	제0주 및 제2주
SC	>160 mg	제0주 및 제2주
SC	100 mg	1주마다(6회 투약)
SC	160 mg	2일마다(2주 동안)

표 42

[0368]

4주마다 300mg IV 용량을 매칭하는 유지 요법			
빈도	경로	4주 IV 정상 상태 트로프 농도를 매칭하는 용량	4주 IV AUC를 매칭하는 용량
4주마다 1회	IV	300	300
	IM	432	432
	SC	432	432
2주마다 1회	IV	115	150
	IM	165	216
	SC	165	216
1주마다	IV	50	75
	IM	72	108
	SC	72	108

표 43

[0369]

8주마다 300mg IV 용량을 매칭하는 유지 요법			
빈도	경로	8주 IV 정상 상태 트로프 농도를 매칭하는 용량	8주 IV AUC를 매칭하는 용량
8주마다 1회	IV	300	300
	IM	432	432
	SC	432	432
4주마다 1회	IV	90	150
	IM	125	216
	SC	125	216
2주마다 1회	IV	35	75
	IM	50	108
	SC	50	108
1주마다	IV	15	37.5
	IM	22	54
	SC	22	54

[0370]

실시에 15: 2a상 다회 용량 연구

[0371]

2a상 다회 용량 연구로 피하 투여 경로에 의해 베돌리주맙의 다회 투약 후 베돌리주맙의 안전성, 내약성 및 정상상태 PK를 평가할 수 있고, 정맥내 요법과 비교하여 피하 요법의 상대적 생체이용가능성을 평가할 수 있다. HAHA의 발생 및 중성화 HAHA 및 피하 투여 후 베돌리주맙의 다회 용량의 PD에 대한 효과를 평가할 수 있다.

[0372]

1 내지 12의 부분적 마요 스코어를 갖는 궤양성 대장염 환자 및 150 초과의 CDAI를 갖는 크론병 환자를 연구에 포함시킬 수 있다. 코호트는 제0주 및 제2주에 IV 투여한 베돌리주맙(300mg)의 유도 요법 다음에

[0373]

6 내지 22주에 4주마다 IV 투여한 베돌리주맙(300mg)

[0374]

6 내지 22주에 8주마다 IV 투여한 베돌리주맙(300mg)

[0375]

6 내지 22주에 1주마다 SC 투여한 베돌리주맙(108mg)

[0376]

6 내지 22주에 2주마다 SC 투여한 베돌리주맙(108mg)

[0377]

6 내지 22주에 3주마다 SC 투여한 베돌리주맙(165mg)

[0378]

중 하나의 유지 요법을 수용할 수 있다.

[0379]

제1일에 투약 전 샘플을 수집할 수 있고, 그 다음에 PK 및 PD를 평가하기 위해 제1일(12시간), 제2일, 제3일, 제5일, 제8일, 제15일, 제29일, 제43일, 제127일, 제127일(12시간), 제128일, 제129일, 제131일, 제134일, 제141일 및 제155일에 다시 수집할 수 있다.

- [0380] 실시예 16: IBD의 치료를 위해 베돌리주맵에 의한 장기간 임상 경험
- [0381] 2상 개방-표지 안전성연장 연구를 장기간 약동학적(PK), 약력학적(PD), 안전성 및 베돌리주맵의 효능을 평가하기 위해 완료하였다. 환자는 18세 내지 75세였고, 이전에 궤양성 대장염 환자에서 초기 PK/PD/안전성 연구에 참가하였거나, 스크리닝의 36개월 내에 내시경적으로 및/또는 조직병리학적으로 및/또는 방사선적으로 확인한 적어도 2개월 동안의 IBD 증상을 가졌다.
- [0382] 모든 환자에게 제1일, 제15일 및 제43일에 2 mg/kg 또는 6 mg/kg의 베돌리주맵(5 mg/ml 항체, 20mM 시트레이트/시트르산, 125mM 염화나트륨, 0.05% 폴리솔베이트 80, pH 6.0(장기간 -70℃ 및 3 내지 -20℃까지 저장함)) 다음에 전체 78주까지 8주마다 용량의 정맥내 투약 요법으로 투여하였다. 환자는 더 조기의 임상 시험에 참여한 치료-나이프(naive) 궤양성 대장염 또는 크론병 환자였다.
- [0383] 효능/삶의 질(quality of life: QoL); 부분적 마요 스코어(partial Mayo score: PMS), 크론병 활동 지수(Crohn's disease activity index: CDAI) 및 염증성 장질환 질문지(Inflammatory Bowel Disease Questionnaire: IBDQ)를 사용하여 연구 결과를 평가하였다.
- [0384] PK 결과
- [0385] 평균 사전-주입 베돌리주맵 농도는 용량 비례하였고, 연구 내내 정상 및 검출가능하게 남아있었다.
- [0386] PD 결과
- [0387] 수용체(%ACT-1 + [CD4+CD45RO HIGH] 및 % MADCAM + [CD4+CD45RO HIGH])는 모든 용량 수준에서 연구 기간 내내 거의 완전하게 억제되었다.
- [0388] 부분적 마요 스코어
- [0389] 기준 평균 PMS는 궤양성 대장염 롤오버(rollover) 환자(2.3)에 대해서보다 치료-나이프 궤양성 대장염 환자(5.4)에 대해 더 높았다. 제43일까지, 평균 PMS는 롤오버 및 치료-나이프 궤양성 대장염 환자 둘 다에 대해 뚜렷한 감소를 나타내었다. 제155일까지, 두 그룹의 평균 스코어는 유사하였다. 평균 PMS는 267일 내내 계속해서 감소되었고, 그 후에 변동이 없었다.
- [0390] 크론병 활동 지수
- [0391] CD 환자의 평균 CDAI는 기준의 294.6으로부터 제43일에 237.7로 감소되었고, 155일 내내 계속해서 감소되었다(156.1).
- [0392] IBDQ
- [0393] 궤양성 대장염 롤오버 환자는 기준에서 가장 높은 평균 IBDQ 스코어를 가졌다. 제43일까지, 평균 IBDQ 스코어는 모두 3개의 질병 그룹에서 증가되었다. 평균 IBDQ 스코어는 모두 3개의 질병 그룹에서 시간에 따라 계속해서 증가되었고, 크론병 환자에 대해 제155일에 그리고 치료-나이프 궤양성 대장염 환자 및 궤양성 대장염 롤오버 환자에 대해 제491일에 최대도 도달되었다.
- [0394] C-반응성 단백질
- [0395] 궤양성 대장염 롤오버와 크론병 환자는 둘 다155일 내내 감소된 평균 CRP 수준을 나타내었고, 그 다음에 변동이 없었다. 치료-나이프 궤양성 대장염 환자는 궤양성 대장염 롤오버 환자보다 기준에서 더 낮은 평균 CRP 수준을 가졌다(2.28 대 7.09). 치료-나이프 궤양성 대장염 환자의 평균 CRP 수준은 평가한 모든 시점에 상대적으로 일정하게 남아있었다.
- [0396] 다른 안전성 결과
- [0397] 연구 동안 전신 기회적 감염(PML을 포함)이 없다는 것을 보고하였다. 한 명의 환자는 단일 시점에 JC 바이러스 혈증에 대해 양성으로 시험하였고, 트로프는 모든 다른 시점에 JCV에 대해 음성이었다. 72명 환자 중 3명(4%)은 양성 HAHA 결과를 가졌다(이들 중 2명은 일시적으로 양성이었음). 연구는 간 독성, 림프구증가증 또는 림프구감소증 또는 임의의 다른 약물-관련 실험실 변화의 증거가 없다는 것을 나타내었다.
- [0398] 결론
- [0399] 78주까지 8주마다 1회 2.0 또는 6.0 mg/kg를 투여한 베돌리주맵은 표적 수용체 포화를 이루었고, 질병 활성의 지속적 평균 감소 및 개선된 IBDQ 스코어와 관련되었으며, 일반적으로 안전하였고, 잘 관용되며, 허용가능한 면

역원성을 증명하였다.

- [0400] 실시예 17: 보통 내지 중증의 활성 궤양성 대장염을 지니는 환자에서 반응 및 관해의 유도 및 유지
- [0401] 2 무작위, 이중맹검, 다-기관 연구를 포함하는 단일 시험을 보통 내지 중증의 활성 궤양성 대장염을 지니는 환자에서 반응 및 관해의 유도 및 유지를 평가하기 위해 설계하였다. 인구 통계학적 및 기준 질병 특징은 모든 처리군에 걸쳐서 비슷하였다.
- [0402] 정맥내 투여를 사용하는 유도 연구는 pH 6.3에서 50mM 히스티딘, 125mM 알기닌, 0.06% 폴리솔베이트 80, 10% 수크로스 중의 60 mg/ml 항체의 동결건조된 제형으로부터 재구성된 300mg 용량에서 베돌리주맙에 대한 위약을 2회 투약의 베돌리주맙 후 6주에 종말점과 비교하였다.
- [0403] 유도 연구로서 동일 제형 및 투여 경로를 사용하는 유지 연구를 4주마다 투약한 베돌리주맙에 대한 위약 및 8주마다 투약한 베돌리주맙에 대한 위약과 비교하였다. 이 연구의 종말점은 52주였고, 유도 반응 집단을 분석하였다.
- [0404] 베돌리주맙 농도를 측정하기 위해 연구 동안 혈액 샘플을 수집하였다. 유도 단계의 마지막에 베돌리주맙의 평균 혈청 농도는 20 내지 30 µg/ml였다. 300mg 용량 투여의 30분 IV 주입 후 정상 상태에서 평균 베돌리주맙 트로프 혈청 농도는 8주마다의 요법(8주 요법) 동안 9 내지 13 µg/ml였고, 4주마다의 요법(4주 요법) 동안 35 내지 40 µg/ml였다. 주입의 마지막에, 베돌리주맙 중앙값 혈장 농도는 8주마다의 요법 동안 98 내지 101 µg/ml였고, 4주마다의 요법동안 대략 129 내지 137 µg/ml였다.
- [0405] 유도 및 유지 연구 반응의 요약을 표 44 내지 47에 제공한다. 상당히 더 큰 비율의 베돌리주맙-처리 환자는 위약과 비교하여 6주에 임상적 반응, 관해 및 점막 치유를 달성하였다(표 44). 39%의 유도 단계 치료 의도(intent-to-treat) 집단은 사전의 항-TNF α 부전을 가졌다. 임상적 반응 및 관해율은 사전의 항-TNF 부전을 지니는 환자와 사전의 항-TNF 노출이 없는 환자 둘 다 중에서 위약 환자보다 베돌리주맙이 더 높았다. 6주 내내 예비 분석에서, 부작용(adverse event: AE)의 비율, 심각한 AE 및 연구 중단을 야기하는 부작용은 베돌리주맙 그룹보다 위약 그룹에서 더 높았다. 위약 환자보다 베돌리주맙 환자의 상당히 더 높은 비율은 52주에 임상적 관해, 점막 치유 및 무-코르티코스테로이드 관해 및 지속적 반응 및 관해를 이루었다(표 45). 32%의 유지 연구 집단은 사전의 항-TNF α 부전을 가졌다. 임상적 관해 및 지속적 임상적 반응율은 TNF 부전과 TNF 나이브 환자 둘 다에서 위약보다 베돌리주맙에 의해 더 높았다. 제0주 내지 제52주 동안 안전성 집단(N=895)에서, 부작용(AE)의 비율, 심각한 AE 및 심각한 감염은 베돌리주맙 그룹과 위약 그룹 간에 유사하였다. 기회감염 또는 장 감염 속도의 증가는 베돌리주맙 그룹에서 관찰되지 않았다.

표 44

[0406]

유도 연구 결과- 1차 및 중요한 2차 종말점				
효능 종말점	위약	베돌리주맙	차이/RR	P 값
임상적 반응(%)	25.5%	47.1%	21.7%/1.8	<0.0001
임상적 관해(%)	5.4%	16.9%	11.5%/3.1	0.0010
점막 치유(%)	24.8%	40.9	16.1%/1.6	0.0013

표 45

[0407]

유지 연구 결과- 1차 및 중요한 2차 종말점					
효능 종말점	위약 N=126	VDZ Q8 N=122	VDZ Q4 N=125	차이/RR Q8 대 위약 Q4 대 위약	P 값
임상적 관해(%)	15.9	41.8	44.8	26.1/2.7 29.1/2.8	<0.0001 <0.0001
지속적 반응(%)	23.8	56.6	52.0	32.8/2.4 28.5/2.2	<0.0001 <0.0001
점막 치유(%)	19.8	51.6	56.0	32.0/2.6 36.3/2.8	<0.0001 <0.0001
지속적 관해(%)	8.7	20.5	24.0	11.8/2.4 15.3/2.8	0.0090 0.0011

무-콜티코스테로이드 관해(%)	13.9 n=72	31.4 n=70	45.2 N=73	17.6/2.3 31.4/3.3	0.0133 <0.0001
---------------------	--------------	--------------	--------------	----------------------	-------------------

표 46

[0408]

유도 연구: 사전 항-TNF- α 길항물질 부전을 지니는 환자 및 항-TNF 노출이 없는 환자, ITT 집단에서 6주에 임상적 반응 및 관해				
사전 항-TNF- α 길항물질 부전을 지니는 환자(39%)				
종말점	위약 N=63	베돌리주맵 N=82	차이	95% CI
임상적 반응 (%)	20.6	39.0	18.4	3.9, 32.9
임상적 관해 (%)	3.2	9.8	6.6	-9.8, 22.8
항-TNF- α 길항물질 노출이 없는 환자(55%)				
	위약 N=76	베돌리주맵 N=130	차이	95% CI
임상적 반응 (%)	26.3	53.1	26.8	13.7, 39.9
임상적 관해 (%)	6.6	23.1	16.5	2.4, 30.2

표 47

[0409]

52주에 임상적 관해 및 지속적 임상적 반응: 사전 항-TNF- α 길항물질 부전이 있거나 또는 항-TNF- α 길항물질 노출이 없는 환자, ITT 집단					
사전 항-TNF- α 길항물질 부전이 있는 환자(32%)					
종말점	위약 N=38	8주마다 VDZ N=43	4주마다 VDZ N=40	8주마다 대 위약 4주마다 대 위약 차이	95% CI
임상적 관해(%)	5.3	37.2	35.0	31.9 29.7	10.3, 51.4 7.4, 49.4
지속적 임상적 반응(%)	15.8	46.5	42.5	30.7 26.7	11.8, 49.6 7.5, 45.9
항-TNF- α 길항물질 노출이 없는 환자(60%)					
	위약 N=79	8주마다 VDZ N=72	4주마다 VDZ N=73	8주마다 대 위약 4주마다 대 위약 차이	95% CI
임상적 관해(%)	19.0	45.8	47.9	26.8 29.0	12.4, 41.2 14.6, 43.3
지속적 임상적 반응(%)	26.6	65.3	56.2	38.7 29.6	24.0, 53.4 14.6, 44.6

[0410]

실시에 18: 보통 내지 중증의 활성 크론병을 지니는 환자에서 반응 및 관해의 유도 및 유지

[0411]

보통 내지 중증의 활성 크론병을 지니는 환자에서 반응 및 관해의 유도 및 유지를 평가하기 위해 2 무작위, 이중맹검, 다기관 연구를 포함한 단일 시험을 설계하였다. 인구통계학적 및 기준 질병 특징은 모든 치료군에 걸쳐서 유사하였다.

[0412]

유도 연구에서, 정맥내 투여를 사용하여 베돌리주맵의 2회 투약 후 6주에 종말점으로 pH 6.3에서 50mM 히스티딘, 125mM 알기닌, 0.06% 폴리솔베이트 80, 10% 수크로스 중에서 60 mg/ml 항체의 동결건조된 제형으로부터 재구성된 300mg의 용량으로 베돌리주맵에 대해 위약을 비교하였다.

[0413]

유도 연구로서 동일 제형 및 투여 경로를 사용하는 유지 연구를 4주마다 투약한 베돌리주맵에 대해 위약을 그리고 8주마다 투약한 베돌리주맵에 대해 위약을 비교하였다. 이 연구의 종말점은 52주였고, 유도 반응자 집단을

분석하였다.

[0414] 놀랍게도, 이 연구는 Q4 및 Q8주 그룹이 매우 유사한 결과를 얻었다는 것을 나타내었다. 유도 및 유지 연구 반응의 용약을 표 48 내지 51에 제공한다. 상당히 더 큰 비율의 베돌리주맙-처리 환자는 위약과 비교하여 임상적 관해 및 향상된 반응을 이루었다(표 48). 임상적 관해 및 향상된 반응 속도는 사전 항-TNF 부전을 지니는 환자와 사전 항-TNF 노출이 없는 환자 둘 다에서 위약 환자보다 베돌리주맙에서 더 높았다. 부작용 비율(AE), 심각한 AE 및 심각한 감염은 베돌리주맙과 위약 그룹 간에 유사하였다. 베돌리주맙 그룹에서 기회감염 또는 장 감염 속도 증가는 관찰되지 않았다.

표 48

유도 연구 결과 - 1차 및 2차 종말점				
종말점	위약 N=148	베돌리주맙	조절된 차이/RR	P 값
임상적 관해(%)	6.8%	14.5%	7.8%/2.1	0.0206
향상된 반응(%)	25.7%	31.4%	5.7%/1.2	0.2322
평균 CRP 변화($\mu\text{g/ml}$)	-3.6 N=147	-2.9 N=220		0.9288

표 49

유지 연구 결과 - 1차 및 중요한 2차 종말점					
효능 종말점	위약 N=153	VDZ Q8 N=154	VDZ Q4 N=154	조절된 차이/RR Q8 대 Pb Q4 대 Pb	P 값
임상적 관해(%)	21.6	39.0	36.4	17.4/1.8 14.7/1.7	0.0007 0.0042
향상된 반응(%)	30.1	43.5	45.5	13.4/1.4 15.3/1.5	0.0132 0.0053
무 코르티코스테로이드 관해(%)	15.9 N=82	31.7 N=82	28.8 N=80	15.9/2.0 12.9/1.8	0.0154 0.0450
지속적 관해(%)	14.4	21.4	16.2	7.2/1.5 2.0/1.1	0.1036 0.6413

표 50

사전 항-TNF- α 길항물질 부전을 지니는 환자와 항-TNF 노출이 없는 환자에서 6주에 임상적 관해 및 향상된 반응, ITT 집단				
사전 항-TNF- α 길항물질 부전을 지니는 환자(48%)				
종말점	위약 N=70	베돌리주맙 N=105	차이	95% CI
임상적 관해 (%)	4.3	10.5	6.2	(-9.1, 21.3)
향상된 반응(%)	22.9	23.8	1.0	(-11.8, 13.7)
항-TNF- α 길항물질 노출이 없는 환자(50%)				
	위약 N=76	베돌리주맙 N=130	차이	95% CI
임상적 관해 (%)	9.2	17.4	8.2	(-1.4, 17.9)
향상된 반응 (%)	30.3	42.2	11.9	(-1.9, 25.8)

표 51

[0418]

52주에 임상적 관해 및 향상된 반응: 사전 항-TNF- α 길항물질 부전을 지니는 환자 또는 항-TNF- α 길항물질 노출이 없는 환자, ITT 집단					
사전 항-TNF- α 길항물질 부전을 지니는 환자(51%)					
종말점	위약 N=78	8주마다 VDZ N=82	4주마다 VDZ N=77	위약에 대해 8주마다 위약에 대해 4주마다 차이	95% CI
임상적 관해(%)	12.8	28.0	27.3	15.2 14.5	(3.0, 27.5) (2.0, 26.9)
향상된 반응(%)	20.5	29.3	37.7	8.8 17.1	(-4.6, 22.1) (3.1, 31.2)
항-TNF- α 길항물질 노출이 없는 환자(45%)					
	위약 N=71	8주마다 VDZ N=66	4주마다 VDZ N=71	위약에 대해 8주마다 위약에 대해 4주마다 차이	95% CI
임상적 관해(%)	26.8	51.1	46.5	24.8 19.7	(8.9, 40.6) (4.2, 35.2)
향상된 반응(%)	38.0	60.6	53.5	22.6 15.5	(6.3, 38.9) (-0.7, 31.7)

[0419]

실시에 19: 보통 내지 중증의 활성 크론병을 지니는 환자에서 반응 및 관해의 유도

[0420]

6주(2회 투약--제0주 및 제2주 후) 및 10주에(3회 투약 후) TNF α 길항물질 부전 환자에서 300mg 용량에서 베돌리주맵(pH 6.3에서 50mM 히스티딘, 125mM 알기닌, 0.06% 폴리솔베이트 80, 10% 수크로스 중의 60 mg/ml 항체 제형으로부터 재구성, 동결건조됨)의 유도 효과를 평가하기 위해 무작위, 이중맹검, 위약 제어 다기관 연구를 완료하였다. 연구는 416명의 환자로 이루어지는데, 이들 중 75%는 TNF α 길항물질 부전이고, 이들 중 25%는 TNF α 나이드였다. 인구통계학적 및 협잡물(concomitant) IBD 의약은 치료군에 걸쳐 균형 잡혀 있었다. 기준 질병 특징은 기준 질병 활성을 제외하고 치료군에 걸쳐 균형 잡혀 있었다.

[0421]

연구를 위해 지정한 1차 종말점은 항-TNF- α 길항물질 부전 집단에서 6주 관해(%)였다. 평가한 중요한 2차 종말점(순차적 시험 절차)은 전체 집단에서 6주 관해(%), 항-TNF- α 길항물질 부전 및 전체 집단에서 10주 관해(호크버그(Hochberg) 과정 사용), 항-TNF- α 길항물질 부전 및 전체 집단에서 6주 및 10주 지연된 관해(%) (호크버그 과정 사용) 및 항-TNF- α 길항물질 부전 집단에서 6주 향상된 반응(%)이었다.

표 52

[0422]

기준 CDAI:			
	위약	베돌리주맵	p-값
TNF ITT: 평균(표준 편차)	306.1 (55.43)	316.1 (52.63)	0.0945
전체 ITT: 평균(표준 편차)	301.3 (54.97)	313.9 (53.17)	0.0153

표 53

[0423]

유도 연구 결과: 1차 및 중요한 2차 종말점								
종말점	TNF ITT (N=315)				전반적 ITT (N=416)			
	PLA N=157	VDZ N=158	차이 (RR)	P-값	PLA N=207	VDZ N=209	차이(RR)	P-값
1차 Wk6 관해	12.1%	15.2%	3.0% (1.2)	0.4332				
제1 2차 6주 관해					12.1%	19.1%	6.9% (1.6)	0.0478
제2 2차 10주 관 해	12.1%	26.6%	14.4% (2.2)	0.0012	13%	28.7%	15.5% (2.2)	<0.0001
지연된 관해(6주 와 10주 둘 다)	8.3%	12.0%	3.7% (1.4)	0.2755	8.2%	15.3%	7% (1.9)	0.0249

항상된 (CDAI100)	반응	22.3%	39.2%	16.9% (1.8)	0.0011	
------------------	----	-------	-------	----------------	--------	--

표 54

항-TNF- α 길항물질 나이브 환자에서 결과(n=101, 전체의 24%)				
	위약%	베돌리주맙%	차이%	95% CI
관해 6주	12	31.4	19.1	(3.3, 35.0)
관해 10주	16	35.3	19.2	(2.4, 35.8)

표 55

연구 결과: 제6주 및 제10주에 임상적 관해, 중요한 하위 그룹- 이전의 Tx 부전, ITT 전체					
하위 그룹	변수	위약	VDZ	차이	95% CI
임의의 사전 항-TNF 부전(ITT의 75%)	N	156	155		
	6주마다 관해(%)	12.8	14.8	2	(-5.7, 9.7)
	10주마다 관해 (%)	12.8	26.5	13.6	(4.9, 22.3)
사전 면역조절제 부전 그러나 항-TNF 부전 없음(21% ITT)	N	45	44		
	6주마다 관해(%)	11.1	31.8	20.7	(-0.5, 39.7)
	10주마다 관해 (%)	15.6	31.8	16.3	(-1.1, 33.6)
사전 코르티코스테로이드 부전 단독(3% ITT)	N	5	9		
	6주마다 관해 (%)	0	33.3	33.3	(-23.9, 75.7)
	10주마다 관해 (%)	0	44.4	44.4	(-13.4, 85.3)

연구는 TNF- α 길항물질 부전 환자는 관해의 유도를 위해 3회 투약을 필요로 한다는 것을 나타내었다. TNF- α 길항물질 부전 환자에서만뿐만 아니라 베돌리주맙 그룹에서 관해 비율은 제6주 내지 제10주 사이에 증가되었다(위약 없음). TNF- α 길항물질 나이브 환자에 대한 관해 비율은 제6주 내지 제10주 사이에 실질적으로 증가되지 않았다. 높은 정도의 질량 증중도를 지니는 TNF- α 길항물질 부전 집단 중에서, 43%는 TNF- α 길항물질에 반응하지 않았지만, 45%는 반응이 상실되지 않았다.

실시예 20: 안정성

다양한 상이한 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형을 5°C에서 6 내지 24개월의 과정에 걸쳐서 안정성에 대해 시험하였다(표 6 및 7). 6.0 내지 6.2의 pH를 갖는 제형은 6개월 및 24개월 후 대략 4% 미만의 주요 중 분해를 나타내었다.

다양한 상이한 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형을 24개월까지 동안 SEC에 의해 안정성에 대해 시험하였다(표 4 및 5). 60 mg/ml 단백질 농도를 지니고 25mM 시트레이트를 함유하는 제형은 2년 후 0.1 내지 0.2%의 응집물 변화를 가졌던 반면, 160 mg/ml 단백질 및 25mM 시트레이트를 함유하는 제형은 2년에 걸쳐 대략 0.3%의 응집물 증가를 가졌다. 시트레이트 없이 60, 110 또는 160 mg/ml 단백질을 함유하는 제형에 대해 0.6 내지 1.1% 응집물의 증가가 있었다. 시트레이트를 함유하지만 히스티딘이 없는 시험 제형에 대해, 12개월 및 24개월 후, 응집물의 대략 0.3 내지 0.4% 성장이 있었다.

실시예 21: CD4:CD8 비에 대한 베돌리주맙 효과의 결정

건강한 18세 내지 45세 피험체를 10% 수크로스의 동결건조된 제형으로부터 재구성한 단일 450mg 용량의 베돌리주맙으로 처리하였고, 0.9% 식염수의 주입 시스템으로 희석시켰다. 뇌척수액(Cerebrospinal fluid: CSF)을 단일 450-mg 베돌리주맙의 (기준) 전 및 5주 후 요추천자에 의해 수집하였다. 각각의 피험체는 그녀/그 자신의 대조군으로서 작용한다.

나탈리주맙으로 처리한 MS를 지니는 환자가 CSF CD4+:CD8+ 림프구 비 상의 효과 및 단지 1회 투약 후 다수의 뇌 병변의 감소를 증명한다는 것을 나타낸 이전의 연구를 기반으로 5-주 시점을 선택하였고(Stuve et al. *Arch Neurol*.2006;63:1383-1387; Stuve et al. *Ann Neurol*. 2006;59:743-747. Miller et al. *N Engl J Med*. 2003;348(1):15-23); 또한 5주이기 때문에, 베돌리주맙의 450-mg 용량은 표적을 포화시키는 것에 충분하며, 4주마다 300mg의 3상 투약 요법과 관련된 추정된 정상-상태 트로프 수준을 초과한 혈청 농도를 제공한다.

면역 표현형검사(immunophenotyping)를 위해 대략 15ml CSF를 각 피험체로부터 얻었다. CSF 샘플을 그것이 다음

의 기준을 충족시킨다면 분석을 포함시켰다: 샘플 당 ≤ 10 RBC/ μl (말초 혈액 오염을 최소화하기 위함); 음성 CSF 배양 결과; 각각의 유세포분석 샘플에서 적절한 T-림프구 수; 및 베돌리주맙에 대해 혈청 항체의 검출 없음.

[0434] 5주 중앙값($34.80 \mu\text{g}/\text{ml}$) 및 개개의 피험체 혈청 베돌리주맙 농도(24.9 내지 $47.9 \mu\text{g}/\text{ml}$ 범위)는 3상 투약 요법에 대해 예상된 정상-상태 트로프 농도($\sim 24 \mu\text{g}/\text{ml}$)보다 더 높았다. MAdCAM-1-Fc에 의해 측정된 바와 같이 제5주에 높은 정도($>90\%$)의 $\alpha 4\beta 7$ 수용체 포화를 관찰하였고, 이는 종말점 평가 시점에 그것의 표적의 베돌리주맙 포화를 나타낸다.

[0435] 베돌리주맙은 어떤 CSF 샘플에서도 검출되지 않았다(검출 한계 = $0.125 \mu\text{g}/\text{ml}$).

[0436] CD4+ 및 CD8+ T 림프구 수 및 비에 대한 효과

[0437] 베돌리주맙은 CD4+:CD8+ 비를 유의하게 감소시키지 않았다(표 56). 피험체 중 누구도 투약후 CD4+:CD8+ 비 <1 를 가지지 않았다($p < 0.0001$ (1-측 t-검정)). 베돌리주맙은 CSF에서 CD4+ 또는 CD8+ T 림프구의 수를 유의하게 감소시키지 않았다. 추가로, CSF % CD4+ 및 % CD8+ T 림프구에서 유의한 변화가 없었다(표 57). 또한, 말초혈액 WBC, CD4+ 및 CD8+ 기억 T 림프구에서 유의한 변화(표 58)는 관찰되지 않았다.

표 56

[0438]

CSF CD4+:CD8+ 비에 대한 치료 효과(평가가능한 집단, n=13)			
	기준	제5주	CD4+:CD8+ 비 차이 †
CD4+:CD8+ 비 평균(SE) 범위	3.59 (0.273) 1.53-5.67	3.60 (0.265)* 1.42-5.15	0.01 (0.197)
비에 대한 90% 2-측 CI	3.00-4.19	3.132, 4.077	
비에 대한 90% 2-측 차이			-0.337, 0.363
CI=신뢰구간 * $p < 0.0001$ ($H_0: \mu < 1$ vs $H_1: \mu \geq 1$ 에 대한 단측 1 샘플 t-검정). †차이는 5주 비 - 기준 비로서 정의함			

표 57

[0439]

CSF CD4+ 및 CD8+ 계측에 대한 치료 효과(평가가능한 집단, n=13)		
	기준	제5주
림프구의 %로서 CD4+, 평균(SD)	75.160 (7.3831)	74.215 (6.3732)
림프구의 %로서 CD8+, 평균(SD)	22.272 (5.4320)	22.007 (6.1624)

표 58

[0440]

말초혈액 기억 T 림프구(R0+) 계측(평가가능한 집단, n=13)		
	기준	제5주
	평균(SD)	평균(SD)
CD4+CD45RO+	27.85 (4.98)	27.06 (5.02)
CD8+CD45RO+(%)	11.24 (3.40)	10.78 (2.98)

[0441] 요약

[0442] 베돌리주맙은 단일 450mg 투약 후 건강한 지원자에서 CSF CD4+ 및 CD8+ 세포수 또는 CD4+:CD8+ 비에 영향을 미치지 않았다. 피험체 중 누구도 투약후 CSF CD4+:CD8+ 비가 1 미만으로 감소되지 않았다. 베돌리주맙은 CSF에서 검출되지 않았다. 추가로, 말초 혈액에서 전체 WBC 또는 기억 T 림프구 CD4+ 및 CD8+ 서브세트에서 변화가 관찰되지 않았다. 혈액 내 표적($\alpha 4\beta 7$)의 포화는 종말점 평가 시점에 모든 피험체에서 생겼다. CSF CD4+ 및 CD8+ 림프구 수준 및 비는 문헌에서 이전에 보고한 것과 유사하였다.

[0443] 이들 결과는 원숭이의 생리적 CNS 면역 감시와 병리적 CNS 염증 둘 다에 대한 베돌리주맙 효과의 기여와 일치된다.

[0444] 본 발명이 구체적으로 나타나고, 그것의 바람직한 실시형태에 대해 기재되었지만, 형태 및 세부사항의 다양한

변화가 첨부되는 특허청구범위에 의해 포함되는 본 발명의 범주로부터 벗어나지 않고 만들어질 수 있다는 것이 당업자에 의해 이해될 것이다.

표 59

[0445]

서열		
서열번호	나타낸 서열	기재
1	도 1	인간화된 항- $\alpha 4\beta 7$ 면역글로불린의 중쇄를 암호화하는 DNA
2	도 1	인간화된 항- $\alpha 4\beta 7$ 면역글로불린의 중쇄의 아미노산 서열
3	도 2	인간화된 항- $\alpha 4\beta 7$ 면역글로불린의 경쇄를 암호화하는 DNA
4	도 2	인간화된 항- $\alpha 4\beta 7$ 면역글로불린의 경쇄의 아미노산 서열
5	도 3	LDP-02의 성숙 인간화된 경쇄
6	도 4	일반적 인간 카파 경쇄 불변 영역
7	도 4	일반적 무린 카파 경쇄 불변 영역
8	31 페이지에서 언급한 SYWMH	중쇄 마우스 ACT-1 항체의 CDR1
9	31 페이지에서 언급한 EIDPSESNTNYNQKFKG	중쇄 마우스 ACT-1 항체의 CDR2
10	31 페이지에서 언급한 GGYDGWDYAIIDY	중쇄 마우스 ACT-1 항체의 CDR3
11	31 페이지에서 언급한 RSSQSLAKSYGNTYLS	경쇄 마우스 ACT-1 항체의 CDR1
12	31 페이지에서 언급한 GISNRFS	경쇄 마우스 ACT-1 항체의 CDR2
13	31 페이지에서 언급한 LQGTHQPYT	경쇄 마우스 ACT-1 항체의 CDR3
14	도 7	인간 GM607 CL 항체 카파 경쇄 가변 영역
15	도 7	인간 21/28 CL 항체 중쇄 가변 영역

도면

도면1a

새로운 **LDP02** 중 **DNA** -- 클로닝 부위 (소문자), 코작 서열 (대문자) 및 리더 (소문자)를 함유한다

```
gaattctcgagatgatCTCACCatgggatggagctgtatcactctcttcttggtagcaacagctacaggtgtccactcccag
gtgCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTTAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAA
GGTGTCTCTGCAAGGGTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCATTGGG
TGAGGCAGGCGCCTGGCCAACGTCTAGAGTGGATCGGAGAGATTGATCCTTC
TGAGAGTAATACTAACTACAATCAAAAATTCAAGGGACGCGTCACATTGACT
GTAGACATTTCCGCTAGCACAGCCTACATGGAGCTCTCCAGCCTGAGATCTG
AGGACACTGCGGTCTACTATTGTGCAAGAGGGGGTTACGACGGATGGGACTA
TGCTATTGACTACTGGGGTCAAGGCACCTGGTCACCGTCAGCTCAGCCTCCA
CCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG
GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA
CGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGC
TGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT
CCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAG
CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCAC
ACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCGCGGGGGCACCGTCAGTCTTCC
TCTTCCCCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACT
GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG
AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA
GGACTGGCTGAATGGC
```

도면1b

```
AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGA
AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCT
GCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTG
GTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC
AGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTC
CTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG
AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA
GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAtaatctagagca
```

새로운 **LDP02** 중 단백질 (VHL, VH 및 인간 IgG1-FcRmut 사이의 공간)

MGWSCILFLVATATGVHS

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKGSGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLEWIGEIDP
SESNTNYNQKFGRVTLTVDISASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYDGWDY
AIDYWGQGLTVTVSS

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK

도면2

새로운 **LDP02** 경 **DNA** - 클로닝 부위 (소문자), 코작 서열 (대문자) 및 리더 (소문자)를 함유한다

```
gaattctcgagatcgatCTCACCatgggatggagctgtatcatcctcttcttggtagcaacagctacaggtgtccactccgat
GTAGTGATGACTCAAAGTCCACTCTCCCTGCCTGTCACCCCTGGAGAACCAGC
TTCTATCTCTTGCAGGTCTAGTCAGAGTCTTGCAAAGAGTTATGGGAACACCT
ATTTGTCTTGGTACCTGCAGAAGCCTGGCCAGTCTCCACAGCTCCTCATCTAT
GGGATTTCCAACAGATTTTCTGGGGTGCCAGACAGGTTTCAAGTGGCAGTGGTT
CAGGGACAGATTTCACTCAAGATCTCGCGAGTAGAGGCTGAGGACGTGGG
AGTGTATTACTGCTTACAAGGTACACATCAGCCGTACACGTTTCGGACAGGGG
ACCAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC
GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGA
ATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCT
CCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAG
CACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAA
CACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCA
CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTtagctagagcage
```

새로운 **LDP02** 경 단백질 (VKL, VK 및 인간 C 카파 사이의 공간)

```
MGWSCILFLVATATGVHS
DVVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLAKSYGNTYLSWYLQKPGQSPQLLIYGI
SNRFSGVPRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQGTHQPYTFGQGTKVEI
K
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
```

도면3

상별 새로운 MLN02-신호 없음

LDP-02- sig.txt 없음

```
A 1 DVVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLAKSYGNTYLSWYLQKPGQSPQ 50
  |||
B 1 DVVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLAKSYGNTYLSWYLQKPGQSPQ 50
  |||
  51 LLIYGISNRFSGVPRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQGTHQP 100
  |||
  51 LLIYGISNRFSGVPRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQGTHQP 100
  |||
  101 YTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK 150
  |||
  101 YTFGQGTKVEIKRADAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK 150
  |||
  151 VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACE 200
  |||
  151 VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACE 200
  |||
  201 VTHQGLSSPVTKSFNRGEC 219
  |||
  201 VTHQGLSSPVTKSFNRGEC 219
```


도면4

쌍별 흠 (Hum) 카파-상수

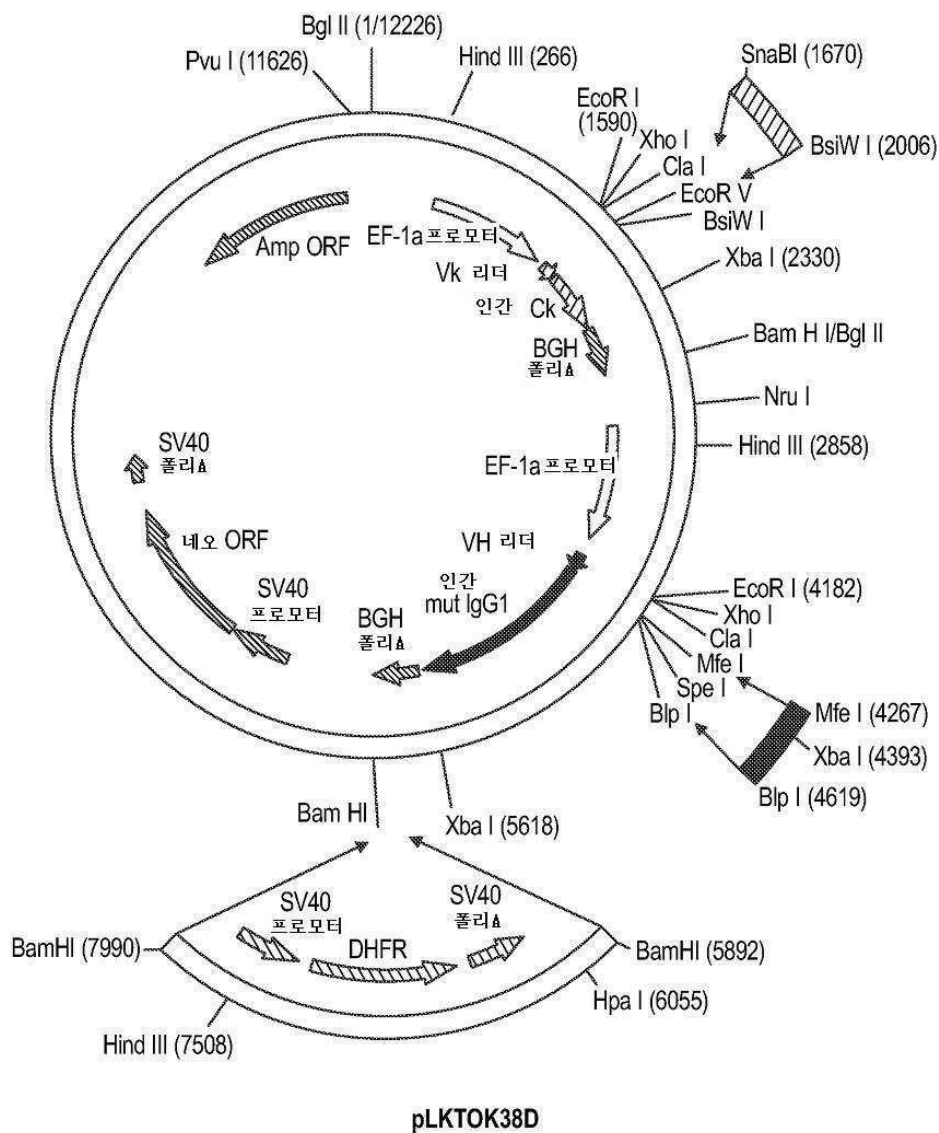
MI:Mur kappa-const.txt

```

A 1  rtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcclnnfypreakvqwkvdnalqsg 50
    |  |||. |  ||||  ||  ||  ||||  |||||::  |.||:|  .  .
B 1  radaaptvsifppsseqltsggasvvcflnnfypkdinvkwkidgserqn 50
    .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .
51  nsqesvteqdskdstyslsstltltskadyekkhkvyacevthqglsspvtk 100
    |  |:|||||||:|||||. |  :||:|  |  ||  ||.  .||:|
51  gvlnswtdqdskdstysmsstltltkdeyerhnsytceathktstspivk 100
    .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .
101 sfnrgec 107
    ||||  ||
101 sfnrnec 107

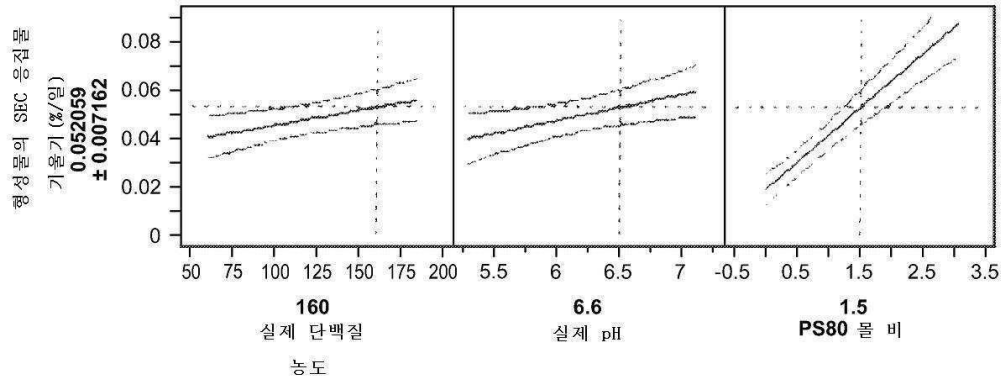
```

도면5

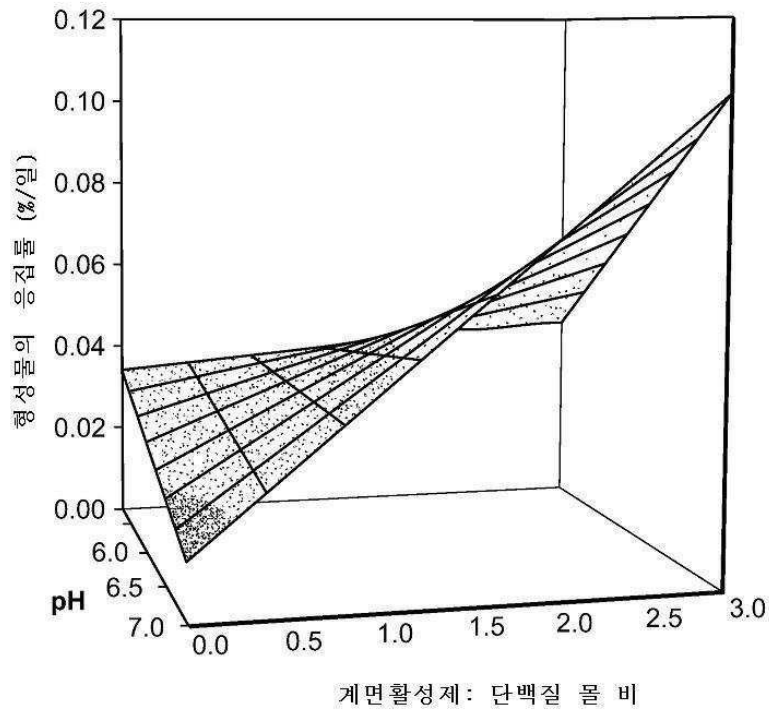


도면6

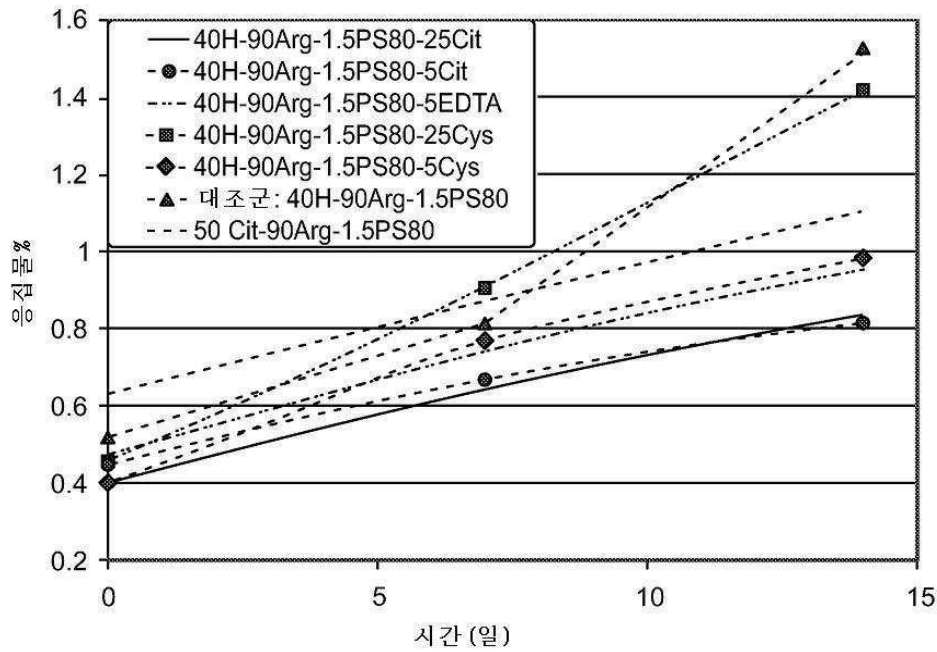
형성물의 SEC 응집물 기울기 (%/일)



도면7

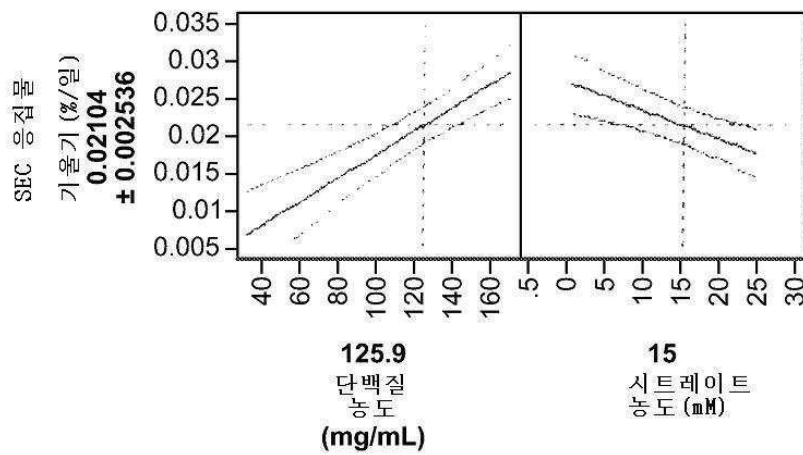


도면8

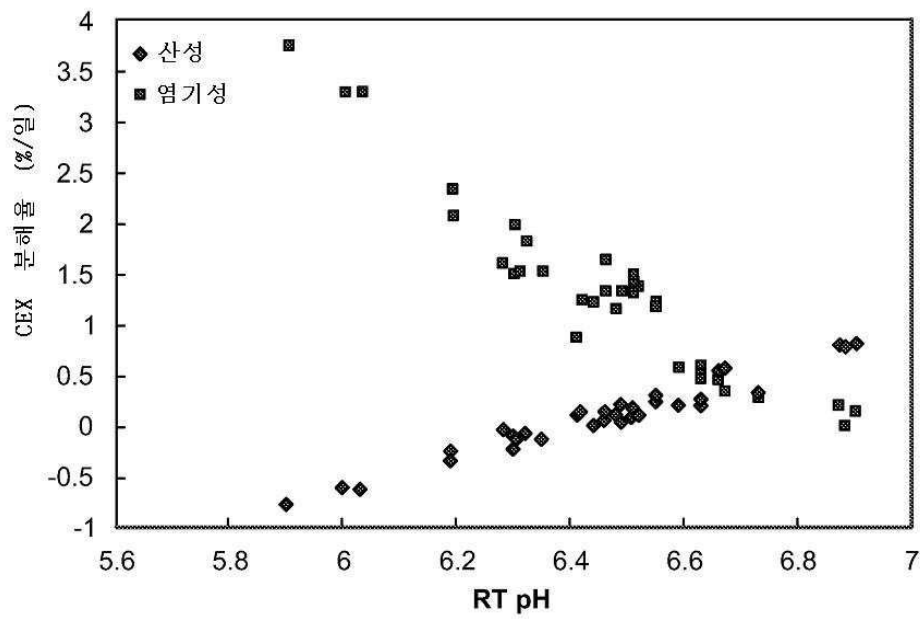


도면9

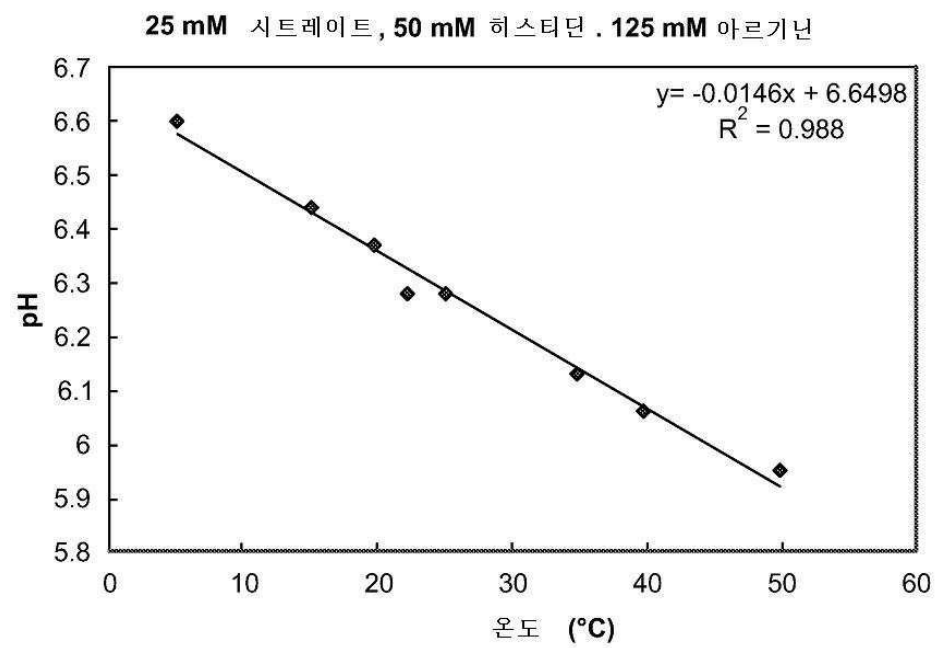
예측 프로파일러



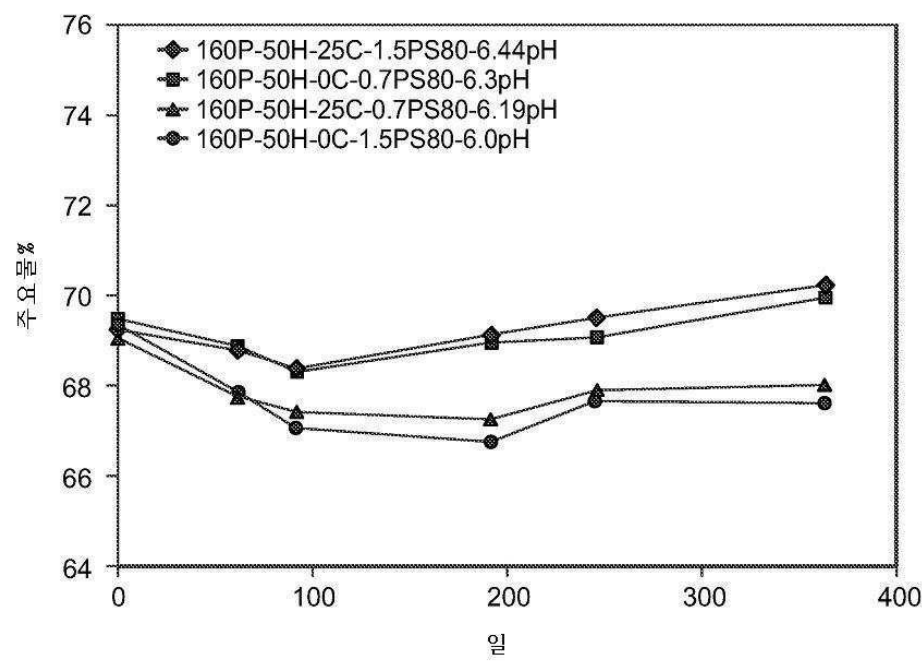
도면10



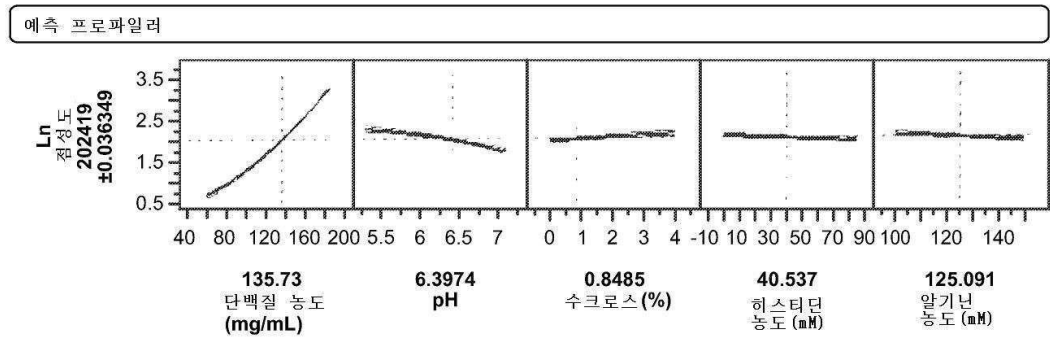
도면11



도면12



도면13



도면14a

GM607'CI 항체 카파 경쇄

가변 영역

서열번호 14

```

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

```

도면14b

21/28'CL 항체 중쇄

가변 영역

서열번호 15

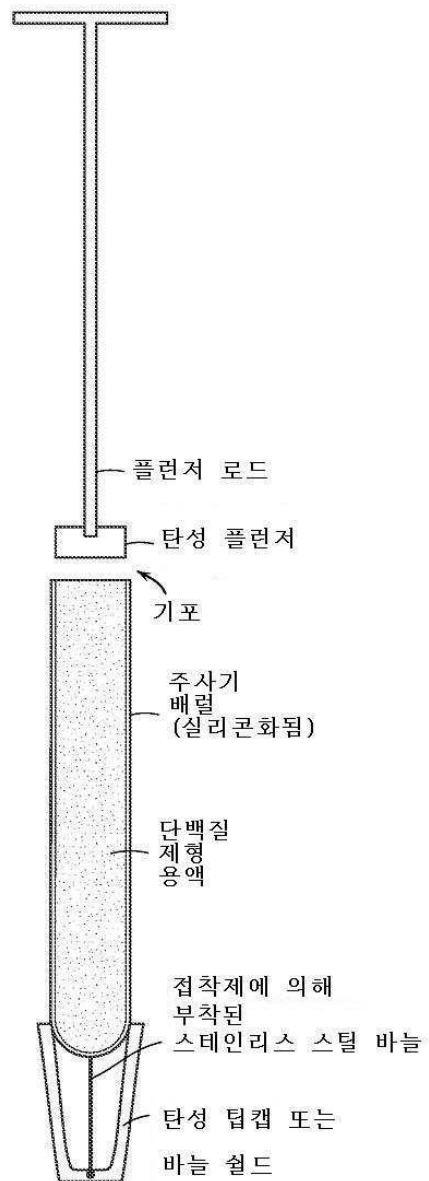
```

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

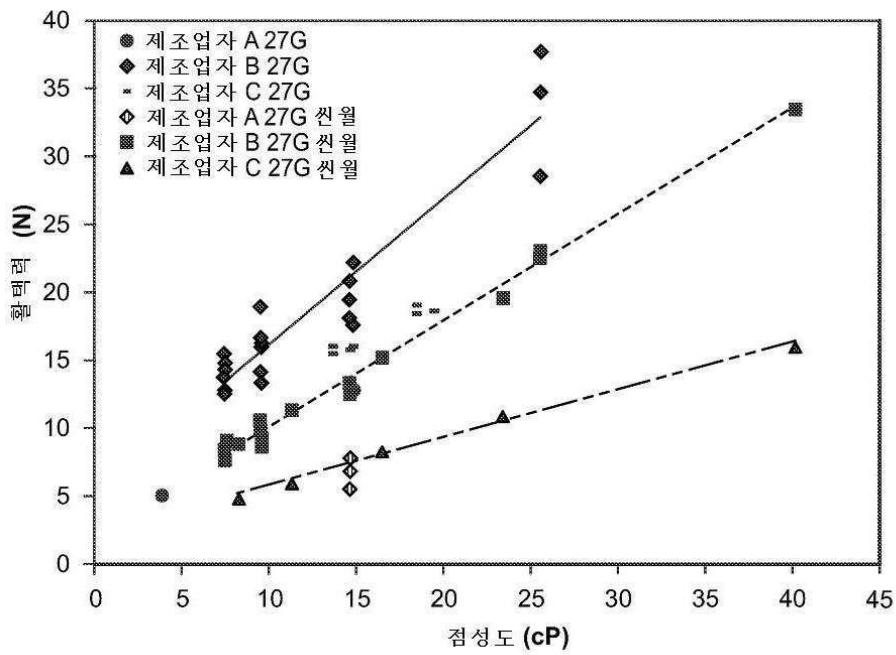
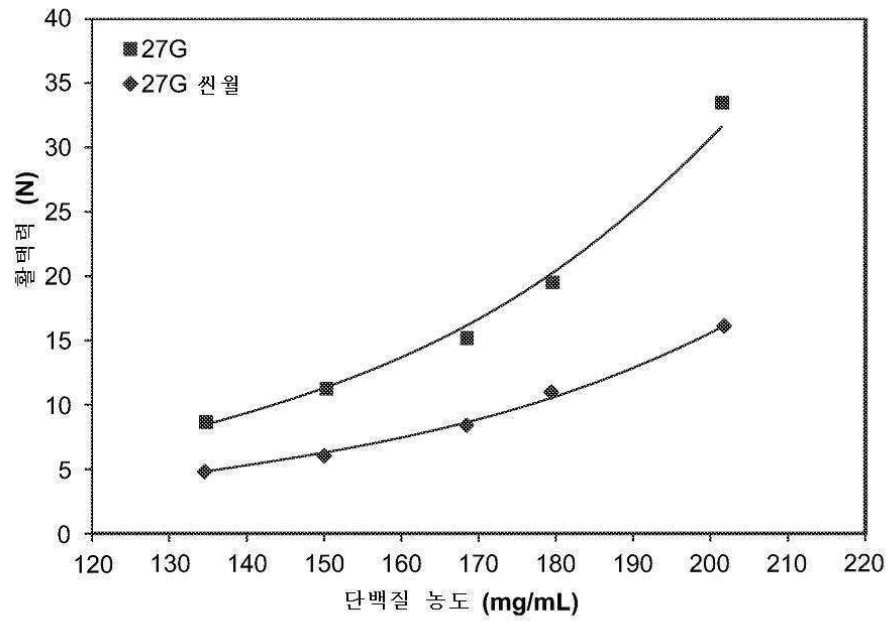
```

도면15

사전 충전된 주사기 내 단백질 생성물의 성분

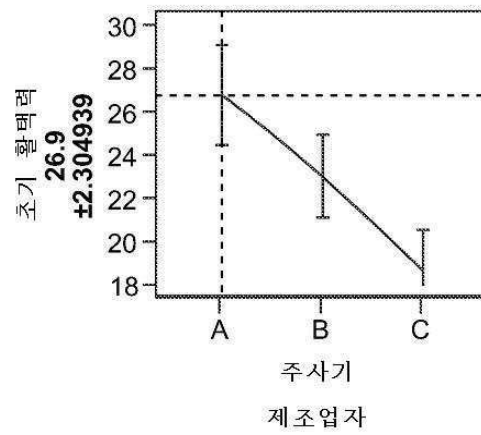


도면16



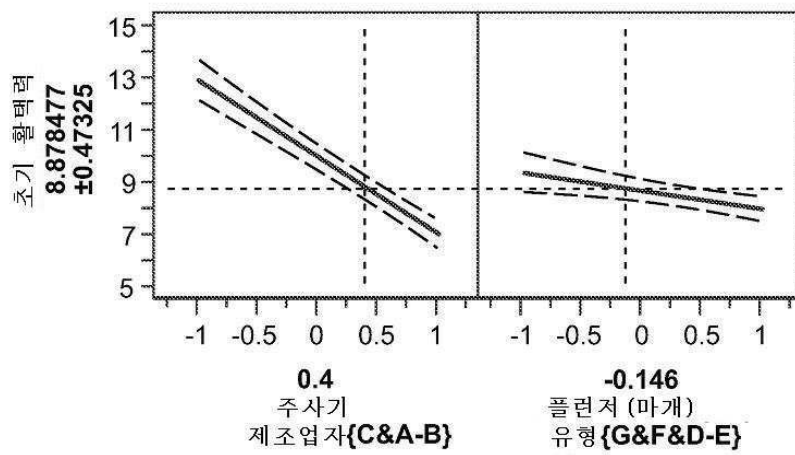
도면17a

예측 프로파일러: 초기 활택력

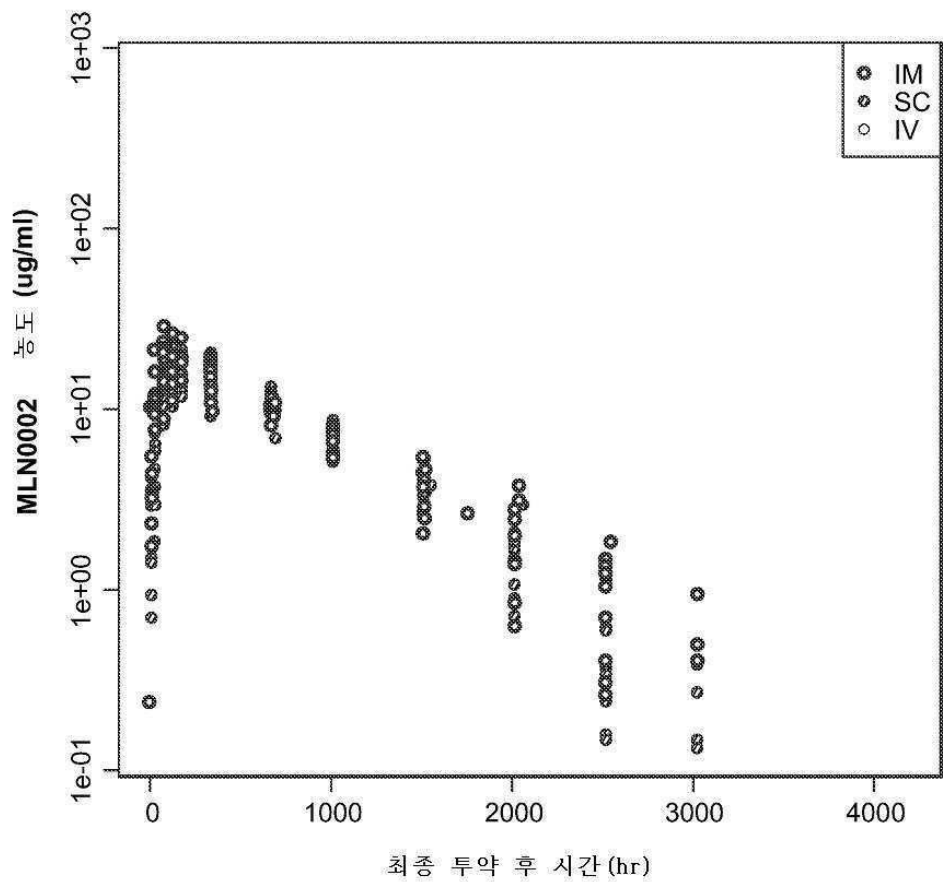


도면17b

예측 프로파일러: 초기 활택력



도면18



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.

<120> FORMULATION FOR ANTI-ALPHA-4-BETA-7 ANTIBODY

<130> 079259-0603

<140><141><150> 61/544,054

<151> 2011-10-06

<150> 61/481,522

<151> 2011-05-02

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1445

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 1

gaattctcga gatcgatctc accatgggat ggagctgtat catcctcttc ttggtagcaa	60
cagctacagg tgtccactcc caggtgcaat tgggtgcagtc tggggctgag gttagaagc	120
ctggggcttc agtgaagggt tcctgcaagg gtcttggtta caccttcacc agctactgga	180
tgcattgggt gaggcaggcg cctggccaac gtctagagtg gatcgagag attgatcctt	240
ctgagagtaa tactaactac aatcaaaaat tcaaggacg cgtcacattg actgtagaca	300
tttccgctag cacagcctac atggagctct ccagcctgag atctgaggac actgcggtct	360
actattgtgc aagagggggt tacgacggat gggactatgc tattgactac tggggtaag	420
gcacctggt caccgtcagc tcagcctcca ccaaggccc atcggtcttc cccctggcac	480
cctctccaa gagcacctct gggggcacag cgccctggg ctgcctggtc aaggactact	540
tccccgaacc ggtgacgggt tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct	600
tcccggtgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag cagcgtgggt accgtgccct	660
ccagcagctt gggcaccag acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca	720
aggtggacaa gaaagttgag cccaaatctt gtacaaaaac tcacacatgc ccacctgcc	780
cagcacctga actcgcgggg gcacctcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca	840
ccctcatgat ctcccgacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag	900
accctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa	960
agccgcggga ggagcaglac aacagcacgt accgtgtggt cagcgtctc accgtcctgc	1020
accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag	1080
ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca	1140
ccctgcccc atcccggtat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcttggtca	1200
aaggcttcta tccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca	1260
actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc	1320
tcacctgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg	1380
aggtctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaataatcta	1440
gagca	1445

<210> 2

<211> 470

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 2

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Ser Glu Ser Asn Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Ile Ser Ala Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Trp Asp Tyr Ala Ile Asp
115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
245 250 255

Leu Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu

450

455

460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys

465

470

<210> 3

<211> 751

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 3

gaattctcga gatcgatctc accatgggat ggagctgtat catcctcttc ttggtagcaa	60
cagctacagg tgtccactcc gatgtagtga tgactcaaag tccactctcc ctgcctgtca	120
cccctggaga accagcttct atctcttgca ggtctagtca gagtcttgca aagagttatg	180
ggaacaccta ttgtcttgg tacctgcaga agcctggcca gtctccacag ctctcatct	240

atgggatttc caacagattt tctggggtgc cagacaggtt cagtggcagt ggttcaggga	300
cagatttcac actcaagatc tcgagtagtag aggctgagga cgtgggagtg tattactgct	360
tacaaggtag acatcagccg tacacgttcg gacaggggac caaggtggag atcaagcgta	420
cggtaggctgc accatctgtc ttcactctcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa	480
ctgcctctgt tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga	540
agggtgataa cgccctcaa tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca	600
aggacagcac ctacagcctc agcagcacc tgaccctgag caaagcagac tacgagaaac	660

acaaagtcta cgctgcgaa gtcacccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct	720
tcaacagggg agagtgttag tctagagcag c	751

<210> 4

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 4

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
20 25 30
Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
35 40 45
Ala Lys Ser Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
50 55 60
Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser
65 70 75 80
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
100 105 110
Leu Gln Gly Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
115 120 125
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
130 135 140
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145 150 155 160
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
165 170 175
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
195 200 205
Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
210 215 220
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235
<210> 5

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 5

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ala Lys Ser

20 25 30

Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly

85 90 95

Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

130 135 140

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

145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

180 185 190

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

195 200 205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

50 55 60
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 7

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15
Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
20 25 30
Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg

35 40 45
Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60
Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu

65 70 75 80
Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
85 90 95
Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
100 105

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 8

Ser Tyr Trp Met His

1 5

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 9

Glu Ile Asp Pro Ser Glu Ser Asn Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 10

Gly Gly Tyr Asp Gly Trp Asp Tyr Ala Ile Asp Tyr

1 5 10

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 11

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ala Lys Ser Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Ser

1 5 10 15

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 12

Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 13

Leu Gln Gly Thr His Gln Pro Tyr Thr

1 5

<210> 14

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95
Leu Gln Thr Pro Gln Thr Phe Gly Gln Gly Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 15

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Asn Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115