



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0127292
(43) 공개일자 2023년08월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 47/22 (2017.01) *A61K 47/26* (2017.01)
A61K 9/08 (2006.01) *A61K 9/19* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 39/39591 (2013.01)
A61K 47/22 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-7025806
 (22) 출원일자(국제) 2021년05월08일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2023년07월27일
 (86) 국제출원번호 PCT/CN2021/092485
 (87) 국제공개번호 WO 2022/142053
 국제공개일자 2022년07월07일

(30) 우선권주장
 PCT/CN2020/141601 2020년12월30일 중국(CN)

(71) 출원인
아이-맵 바이오파마 컴파니 리미티드
 중국 상하이 201210 푸둥 상커 로드 88 웨스트타워 1동 8에프 802호

(72) 발명자
주 정
 중국 상하이 201210 푸둥 뉴 에어리어 상커 로드 88 웨스트타워1동 8층 802호
장 쩌루
 중국 상하이 201210 푸둥 뉴 에어리어 상커 로드 88 웨스트타워1동 8층 802호
 (뒷면에 계속)

(74) 대리인
특허법인와이에스장

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **항-CD73 항체의 제제**

(57) 요약

본 발명은 pH 5.6-6.4에서 5-50 mM 히스티딘, 2%-20% (w/v) 트레할로스, 및 0.015%-0.05% (w/v) 폴리소르베이트 80 (PS80)을 포함하는 항-CD73 항체의 안정적인 제제에 관한 것이다. 또한 수성 제제를 건조시켜 얻을 수 있는 동결건조된 조성물 및 질환을 치료하기 위한 방법이 제공된다.

(52) CPC특허분류

A61K 47/26 (2013.01)

A61K 9/08 (2013.01)

A61K 9/19 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 16/2875 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

주 상평

중국 상하이 201210 푸둥 뉴 에어리어 상커 로드
88 웨스트타워1동 8층 802호

위 야리

중국 상하이 201210 푸둥 뉴 에어리어 상커 로드
88 웨스트타워1동 8층 802호

명세서

청구범위

청구항 1

pH 5.6-6.4에서 항-CD73 항체, 5-50 mM 히스티딘, 2%-20% (w/v) 트레할로스, 및 0.015%-0.05% (w/v) 폴리소르베이트 80 (PS80)을 포함하는 조성물로서, 항체는 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH), 및 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고, VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3은 각각 서열 번호: 1-6의 아미노산 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 2

제1 항에 있어서, 10-30 mM 히스티딘을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1 항 또는 제2 항에 있어서, 5%-15% (w/v) 트레할로스 디하이드레이트를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1 항 내지 제3 항 중 어느 한 항에 있어서, 0.015%-0.035% (w/v) PS80을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1 항에 있어서, pH 5.8-6.2에서 10-30 mM 히스티딘, 5%-15% (w/v) 트레할로스, 및 0.015%-0.035% (w/v) PS80을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제1 항에 있어서, pH 5.9-6.1에서 15-25 mM 히스티딘, 6%-10% (w/v) 트레할로스, 0.015%-0.025% (w/v) PS80을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제1 항 내지 제6 항 중 어느 한 항에 있어서, 5-150 mg/mL의 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제1 항 내지 제7 항 중 어느 한 항에 있어서, VH는 서열 번호: 7의 아미노산 서열을 포함하고, VL은 서열 번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제8 항에 있어서, 항체는 서열 번호: 9의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열 번호: 10의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제1 항 내지 제9 항 중 어느 한 항의 조성물을 냉동-건조시켜 얻을 수 있는 동결건조된 조성물.

청구항 11

제10 항의 동결건조된 조성물을 용제에 용해시켜 얻을 수 있는 용액.

청구항 12

제11 항에 있어서, 용제는 물인 것을 특징으로 하는 용액.

청구항 13

암을 치료하기 위한 의약의 제조를 위한 제1 항 내지 제9 항 중 어느 한 항의 조성물의 용도.

청구항 14

필요로 하는 환자에서 암을 치료하는 방법으로서, 제1 항 내지 제9 항 중 어느 한 항의 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 15

제13 항 또는 제14 항에 있어서, 암은 방광암, 유방암, 결장직장암, 자궁내막암, 식도암, 두경부암, 신장암, 백혈병, 간암, 폐암, 림프종, 흑색종, 췌장암, 전립선암, 및 갑상선암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 용도 또는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 pH 5.6-6.4에서 5-50 mM 히스티딘, 2%-20% (w/v) 트레할로스, 및 0.015%-0.05% (w/v) 폴리소르베이트 80 (PS80)을 포함하는 항-CD73 항체의 안정한 제제에 관한 것이다. 또한 수성 제제를 건조시켜 얻을 수 있는 동결건조된 조성물 및 질환을 치료하기 위한 방법이 제공된다.

배경 기술

[0002] 항-CD73 항체는 다양한 증식성 및 염증성 질환을 치료하기 위해 개발 중에 있다. CD73 (분화 클러스터 73)은 AMP를 아데노신으로 전환시키는 역할을 하는 효소이다. CD73은 면역억제 종양 환경에 기여하는 세포의 아데노신의 형성을 촉진한다. CD73은 간질 세포 및 다수의 유형의 종양 세포, 뿐만 아니라 Treg, M2 Mφ 및 골수 유래된 억제자 세포 (MDSC)에서도 과발현된다.

[0003] CD73 억제제는 아데노신-매개된 림프구 억제제를 방지하고, CD8+ 효과기 세포의 활성을 증가시키고, MDSC 및 Treg 들 다를 감소시킨다. 몇몇 항-CD73 항체가 잠재적인 항암제로서 개발 중에 있지만, 아무 것도 임상적 사용에 대해 승인되지 않았다.

[0004] 주사에 의한 전달은 일반적으로 항체 또는 항원 결합 단편으로 암 치료를 위한 선택의 전달 경로이다. 하지만, 불량한 장기간 저장, 오스몰 농도, 가용성, 안정성과 같은 생물학적, 화학적, 및 물리학적 장벽이 포유동물로의 주사에 의한 생물학적으로 활성인 작용제의 전달을 어렵게 만든다. 그러므로, 안정하고 가용성인 항체의 개선된 주사 가능 조제물에 대한 필요성이 존재한다.

발명의 내용

[0005] 본 발명은 pH 5.6-6.4에서 항-CD73 항체, 5-50 mM 히스티딘, 2%-20% (w/v) 트레할로스, 및 0.015%-0.05% (w/v) 폴리소르베이트 80 (PS80)을 포함하는 조성물을 제공하며, 항체는 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH), 및 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하고, VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3은 각각 서열 번호: 1-6의 아미노산 서열을 포함한다.

[0006] 일부 구체예에서, 조성물은 pH 5.8-6.2에서 10-30 mM 히스티딘, 5%-15% (w/v) 트레할로스, 및 0.015%-0.035% (w/v) PS80을 포함한다. 일부 구체예에서, 조성물은 pH 5.9-6.1에서 15-25 mM 히스티딘, 6%-10% (w/v) 트레할로스, 0.015%-0.025% (w/v) PS80을 포함한다. 일부 구체예에서, 조성물은 5-150 mg/mL의 항체를 포함한다.

[0007] 일부 구체예에서, VH는 서열 번호: 7의 아미노산 서열을 포함하고, VL은 서열 번호: 8의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 항체는 서열 번호: 9의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열 번호: 10의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0008] 한 구체예에서, 본 발명의 조성물을 냉동-건조시켜서 얻을 수 있는 동결건조된 조성물이 또한 제공된다. 또한 동결건조된 조성물을 용해시켜 얻을 수 있는 용액 (예를 들어, 물)이 제공된다.

[0009] 방광암, 유방암, 결장직장암, 자궁내막암, 식도암, 두경부암, 신장암, 백혈병, 간암, 폐암, 림프종, 흑색종, 췌

장암, 전립선암, 및 갑상선암과 같은 암을 치료하기 위한 조성물의 용도 및 사용 방법이 또한 제공된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

I. 정의

[0011] 범위를 포함한 모든 수명칭, 예를 들어, pH, 온도, 시간, 농도, 및 분자량은 0.1 또는 10%씩 증가하여 (+) 또는 (-)로 달라지는 근사치이다. 항상 분명하게 언급되는 것은 아니지만, 모든 수명칭은 용어 "약"이 선행된다는 것을 이해해야 한다. 또한, 항상 분명하게 언급되는 것은 아니지만, 본원에서 기재된 시약은 단지 예시이며 이러한 것들의 동등물이 해당 분야에 공지되어 있다는 것을 이해해야 한다.

[0012] "조성물"은 활성제와 불활성 (예를 들어, 검출 가능한 작용제 또는 라벨) 또는 활성인 또 다른 화합물 또는 조성물, 예컨대 보조제의 조합을 의미한다.

[0013] "약학적 조성물"은 활성제와 불활성 또는 활성인 담체의 조합을 포함하여, 조성물을 시험관 내에서(*in vitro*), 생체 내에서(*in vivo*) 또는 생체 외에서(*ex vivo*) 진단적 또는 치료적 사용에 적합하게 만든다.

II. 항체 제제

[0015] 치료적 항체에 적합한 형성물의 개발은 전형적으로, 예를 들어, 단백질 가용성, 안정성, 및 오스몰 농도와 상충되는 요건을 갖는다. 그러므로 허용 가능한 형성물을 생성하기 위해 이러한 요건이 균형을 이룰 수 있는지 여부는 도전적이고 예측 불가능하다. 예를 들어, 실시예 2에서 입증된 바와 같이, 상이한 완충액이 본 발명의 항-CD73 항체로 테스트될 때, 포스페이트 완충액은 다른 완충액보다 더 많은 항체 단편화가 일어날 수 있게 하는 것으로 보였다 (예를 들어, 표 4 참조). 이것은 또한 순도의 더 두드러진 감소로 이어졌다 (표 5). 이들 데이터는 또한 높은 (pH 7.0) 및 낮은 (pH 4.5) pH 조건이 또한 단백질의 순도에 유해할 수 있다는 것을 시사한다 (또한 표 6 참조).

[0016] 모든 이러한 테스트된 완충액 및 조건 중에서, pH 6.0에서 20 nM 히스티딘이 들어있는 제제 F5는 단백질의 안정성을 지지할 수 있는 것으로 보였다. 놀랍게도, 이 완충액 조건은 또한 적어도 80 mg/mL 및 150 mg/mL에 대해 단백질의 높은 가용성을 허용하였다 (표 7).

[0017] 수크로스, 트레할로스, 소르비톨, 만니톨, 및 아르기닌을 포함한 많은 후보 부형제가 실시예 3에서 테스트되었다. 놀랍게도, 냉동-해동 주기 동안에 단백질을 안정화시키는데 중요한 것으로 확인된 부형제인 PS80 (폴리소르베이트 80)의 존재시에도, 냉동-해동 테스트 이후, 단백질 제제에 대해 가장 일반적으로 사용되는 부형제 중 하나인 만니톨을 함유하는 제제에서 가시적 입자가 검출되었다 (표 11-13). 또한, 수크로스가 들어있는 제제가 가장 많은 단편화를 겪었다 (표 17). 또 다른 부형제, 아르기닌의 사용은 또한 단백질 순도의 비교적 큰 (1%) 감소로 이어졌다 (표 18). 또 다른 부형제인 소르비톨은 냉동-해동의 10 주기 동안 단백질 안정성을 충분히 지지하는데 실패했다 (표 23).

[0018] 흥미롭게도, 후보 부형제 중 하나인 트레할로스는 이러한 모든 테스트 조건을 통해 단백질을 충분히 안정하게 유지할 수 있었다. 또한, 트레할로스가 들어있는 제제는 항체의 항원 결합 능력을 유지하였다 (표 24). 그 다음, 실시예 5에서, 제제의 열역학적 안정성이 테스트되었고 테스트 과정 동안 단백질을 안정하게 유지하기 위해 적어도 0.02% PS80가 필요하다는 것이 발견되었다. 그러므로, 시행착오를 통해, 발명자들은 약 pH 6.0에서 히스티딘, 트레할로스, 및 PS80를 포함하는, 항-CD73 항체에 적합한 제제를 확인할 수 있었다.

[0019] 본 발명의 한 구체예에 따르면, 본 발명의 항-CD73 항체 또는 항원-결합 단편, 히스티딘, 트레할로스, 및 폴리소르베이트 80을 포함하는 조성물이 제공된다. 일부 구체예에서, 조성물은 수성 용액이고 용액의 pH는 5.5 내지 6.5이다.

[0020] 일부 구체예에서, 히스티딘 (예를 들어, 히스티딘 HCl)은 약 5-50 mM의 농도로 존재한다. 일부 구체예에서, 히스티딘의 농도는 적어도 약 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, 16 mM, 17 mM, 18 mM, 19 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 또는 45 mM이다. 일부 구체예에서, 히스티딘의 농도는 약 100 mM, 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 45 mM, 40 mM, 35 mM, 30 mM, 29 mM, 28 mM, 27 mM, 26 mM, 25 mM, 24 mM, 23 mM, 22 mM, 21 mM, 20 mM, 19 mM, 18 mM, 17 mM, 16 mM, 또는 15 mM 이하이다. 일부 구체예에서, 히스티딘의 농도는 약 5-40 mM, 5-35 mM, 5-30 mM, 5-25 mM, 5-20 mM, 10-50 mM, 10-45 mM, 10-40 mM, 10-35 mM, 10-30 mM, 10-25 mM, 10-20 mM, 15-50 mM, 15-45 mM, 15-40 mM, 15-35 mM, 15-30 mM, 15-25 mM, 15-20 mM, 20-50 mM, 20-45 mM, 20-40 mM, 20-35 mM, 20-30 mM, 또는 20-25 mM이다.

[0021] 일부 구체예에서, 트레할로스 (예를 들어, 트레할로스 디하이드레이트)는 약 2%-20% (w/v)의 농도로 존재한다. 일부 구체예에서, 트레할로스의 농도는 적어도 약 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 15%, 17% 또는 18% (w/v)이다. 일부 구체예에서, 트레할로스의 농도는 약 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 또는 3% (w/v) 이하이다. 일부 구체예에서, 트레할로스의 농도는 약 2%-20%, 2%-19%, 2%-18%, 2%-17%, 2%-16%, 2%-15%, 2%-14%, 2%-13%, 2%-12%, 2%-11%, 2%-10%, 2%-9%, 2%-8%, 3%-20%, 3%-19%, 3%-18%, 3%-17%, 3%-16%, 3%-15%, 3%-14%, 3%-13%, 3%-13%, 3%-11%, 3%-10%, 3%-9%, 3%-8%, 4%-20%, 4%-19%, 4%-18%, 4%-17%, 4%-16%, 4%-15%, 4%-14%, 4%-13%, 4%-14%, 4%-11%, 4%-10%, 4%-9%, 4%-8%, 5%-20%, 5%-19%, 5%-18%, 5%-17%, 5%-16%, 5%-15%, 5%-14%, 5%-13%, 5%-15%, 5%-11%, 5%-10%, 5%-9%, 5%-8%, 6%-20%, 6%-19%, 6%-18%, 6%-17%, 6%-16%, 6%-16%, 6%-14%, 6%-13%, 6%-16%, 6%-11%, 6%-10%, 6%-9%, 6%-8%, 7%-20%, 7%-19%, 7%-18%, 7%-17%, 7%-17%, 7%-17%, 7%-14%, 7%-13%, 7%-17%, 7%-11%, 7%-10%, 7%-9%, 7%-8%, 8%-20%, 8%-19%, 8%-18%, 8%-18%, 8%-18%, 8%-18%, 8%-14%, 8%-13%, 8%-18%, 8%-11%, 8%-10%, 8%-9%, 9%-20%, 9%-19%, 9%-18%, 9%-19%, 9%-19%, 9%-19%, 9%-14%, 9%-13%, 9%-19%, 9%-11%, 9%-10%, 10%-20%, 10%-19%, 10%-18%, 10%-110%, 10%-110%, 10%-110%, 10%-14%, 10%-13%, 10%-110%, 또는 10%-11% (w/v)이다.

[0022] 일부 구체예에서, 폴리소르베이트 80 (PS80)은 약 0.015%-0.05% (w/v)의 농도로 존재한다. 일부 구체예에서, PS80은 적어도 약 0.015%, 0.016%, 0.017%, 0.018%, 0.019%, 0.02%, 0.021%, 0.022%, 0.023%, 0.024%, 0.025%, 0.026%, 0.027%, 0.028%, 0.029%, 또는 0.03% (w/v)의 농도로 존재한다. 일부 구체예에서, PS80은 0.05%, 0.049%, 0.048%, 0.047%, 0.046%, 0.045%, 0.044%, 0.043%, 0.042%, 0.041%, 0.04%, 0.039%, 0.038%, 0.037%, 0.036%, 0.035%, 0.034%, 0.033%, 0.032%, 0.031%, 0.03%, 0.029%, 0.028%, 0.027%, 0.026%, 0.025%, 0.024%, 0.023%, 0.022%, 0.021%, 또는 0.02% (w/v) 이하의 농도로 존재한다.

[0023] 일부 구체예에서, 조성물은 5.6-6.4의 pH를 갖는다. 일부 구체예에서, pH는 5.6, 5.7, 5.8, 5.85, 5.9, 5.95, 6, 6.05, 6.1, 6.15, 또는 6.2 이상이다. 일부 구체예에서, pH는 6.4, 6.3, 6.2, 6.15, 6.1, 6.05, 6, 5.95, 5.9, 5.85, 또는 5.8 이하이다. 일부 구체예에서, pH는 약 5.7-6.3, 5.8-6.2, 5.85-6.15, 5.9-6.1, 5.95-6.05, 또는 약 5.9, 5.95, 6, 6.05, 또는 6.1이다.

[0024] 일부 구체예에서, 조성물은 하나 이상의 증량제를 더 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "증량제"는 동결건조된 제제에 부피를 제공하는 성분을 나타낸다. 증량제의 예는, 제한 없이, 만니톨, 트레할로스, 락토스, 수크로스, 폴리비닐 피롤리돈, 수크로스, 글루코스, 글리신, 사이클로덱스트린, 텍스트란, 고흥 PEG 및 이것들의 유도체 및 혼합물을 포함한다. 한 구체예에서, 본 발명의 제제는 선택적으로 증량제를 포함한다.

[0025] 일부 구체예에서, 조성물은 하나 이상의 장성 조절제를 더 포함한다. 용어 "장성 조절제"는 본원에서 사용된 바와 같이 제제의 장성을 조절하는데 사용되는 약학적으로 허용 가능한 작용제를 나타낸다. 등장성은 일반적으로 용액에 관한, 보통은 인간 혈청에 관한 삼투압과 관련이 있다. 제제는 고장성, 등장성 또는 저장성일 수 있다. 한 양태에서, 제제는 등장성이다. 등장성 제제는 액체 또는 고흥, 예를 들어, 동결건조된 형태로부터 복원된 액체이고, 생리학적 염 용액 및 혈청과 같이, 비교되는 일부 다른 용액과 동일한 장성을 가진 용액을 나타낸다. 적합한 등장화제는 염화나트륨, 염화칼륨, 글리세린 및 본원에서 정의된 아미노산, 당의 균의 임의의 구성요소, 뿐만 아니라 이들의 조합을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 일부 구체예에서, 조성물은 하나 이상의 계면활성제를 더 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "계면활성제"는 양친매성 구조를 가진 약학적으로 허용 가능한 유기 물질을 나타내며; 즉, 그것은 반대 가용성 성향의 기, 전형적으로 유용성 탄화수소 사슬 및 수용성 이온 기로 구성된다. 계면활성제는 표면 활성 모이어티의 전하에 따라 음이온성, 양이온성, 및 비이온성 계면활성제로 분류될 수 있다. 계면활성제는 종종 생물학적 재료의 다양한 약학적 조성물 및 조제물에 대한 습윤제, 에멀전화제, 가용화제, 및 분산제로서 사용된다. 본원에서 기재된 약학적 제제의 일부 구체예에서, 계면활성제의 양은 중량/부피 퍼센트 (w/v %)로 표현되는 퍼센트로 기재된다. 적합한 약학적으로 허용 가능한 계면활성제는 폴리옥시에틸렌소르비탄 지방산 에스터 (Tween), 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르 (Brij), 알킬페닐폴리옥시에틸렌 에테르 (Triton-X), 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 코폴리머 (Poloxamer, Pluronic), 또는 나트륨 도데실 설페이트 (SDS)의 균을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 폴리옥시에틸렌소르비탄-지방산 에스터는 폴리소르베이트 20, (상표명 Tween 20TM으로 판매됨) 및 폴리소르베이트 80 (상표명 Tween 80TM으로 판매됨)을 포함한다. 폴리에틸렌-폴리프로필렌 코폴리머는 명칭 Pluronic® F68 또는 Poloxamer 188TM으로 판매되는 것들을 포함한다. 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르는 상표명 BrijTM으로 판매되는 것들을 포함한다. 알킬페닐폴리옥시에틸렌 에테르는 상표명 Triton-X로 판매되는 것들을 포함한다.

[0027] 일부 구체예에서, 조성물은 하나 이상의 동결건조보호제를 더 포함한다. "동결건조보호제"는 동결건조 (고진공

에서 빠른 냉동 및 건조의 공정) 동안에 단백질을 안정화시키는 약학적으로 허용 가능한 물질을 나타낸다. 동결 건조보호제의 예는, 제한 없이, 수크로스, 트레할로스 또는 만니톨을 포함한다.

[0028] 일부 구체예에서, 조성물은 하나 이상의 항산화제를 더 포함한다. "항산화제"는 다른 분자의 산화를 둔화시키거나 방지할 수 있는 분자를 나타낸다. 산화는 전자를 물질에서 산화제로 전달하는 화학 반응이다 산화 반응은 자유 라디칼을 생산할 수 있으며, 이것은 단백질 치료제를 탈안정화시키고 궁극적으로는 생성물 활성에 영향을 미치는 연쇄 반응을 시작한다. 항산화제는 자유 라디칼 중간물을 제거함으로써 이들 연쇄 반응을 종결시키고, 스스로 산화됨으로써 다른 산화 반응을 억제한다. 결과로서, 항산화제는 종종 환원제, 킬레이트화제 및 산소 제거제, 예컨대 시트레이트, EDTA, DPTA, 티올, 아스코르브산 또는 폴리페놀이다. 항산화제의 비-제한적 예는 아스코르브산 (AA, E300), 티오설페이트, 메티오닌, 토코페롤 (E306), 프로필 갈레이트 (PG, E310), 3차 부틸하이드로퀴논 (TBHQ), 부틸화된 하이드록시아니솔 (BHA, E320) 및 부틸화된 하이드록시톨루엔 (BHT, E321)을 포함한다.

[0029] 일부 구체예에서, 조성물은 하나 이상의 보존제를 더 포함한다. "보존제"는 미생물 성장에 의한 또는 원치않는 화학적 변화에 의한 분해를 방지하기 위해 식품, 약제, 페인트, 생물학적 샘플, 목재, 등과 같은 생성물에 추가되는 천연 또는 합성 화학물질이다. 보존제 첨가제는 단독으로 또는 다른 보존 방법과 함께 사용될 수 있다. 보존제는 박테리아 및 균류의 성장을 억제하는 항균성 보존제, 또는 구성 성분의 산화를 억제하는 항산화제, 예컨대 산소 흡수제일 수 있다. 일반적인 항균성 보존제는 벤즈알코늄 클로라이드, 벤조산, 콜로로헥시딘, 글리세린, 페놀, 칼륨 소르베이트, 티메로살, 설파이트 (이산화황, 나트륨 바이설파이트, 칼륨 수소 설파이트, 등) 및 이나트륨 EDTA를 포함한다. 다른 보존제는 벤질 알콜, 페놀, m-크레솔, 클로로부탄올 또는 메틸파라벤과 같은 비경구 단백질에서 일반적으로 사용되는 것들을 포함한다.

[0030] 항-CD73 항체는, 본원에서 개시된 바와 같이, 중쇄 가변 (VH) 영역 및 경쇄 가변 (VL) 영역을 갖는다. VH는 3개의 상보성 결정 영역 (CDR), CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고 VL은 또한 3개의 CDR, CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다. VH CDR1, CDR2 및 CDR3 그리고 VL CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 서열 번호: 1-6의 아미노산 서열을 포함한다. 예시의 VH 및 VL 서열은 각각 서열 번호: 7 및 8을 포함한다. 항체는 또한 중쇄 및 경쇄 불변 영역을 포함할 수 있다. 예시의 중쇄 및 경쇄 서열은 각각 서열 번호: 9 및 10을 포함한다.

[0031] 일부 구체예에서, 조성물은 pH 5.6-6.4에서 5-150 mg/mL의 본 발명의 항-CD73 항체 또는 항원-결합 단편, 5-50 mM 히스티딘, 2%-20% (w/v) 트레할로스, 0.015%-0.05% (w/v) PS80을 포함한다.

[0032] 일부 구체예에서, 조성물은 pH 5.8-6.2에서 10-120 mg/mL의 본 발명의 항-CD73 항체 또는 항원-결합 단편, 10-30 mM 히스티딘, 5%-15% (w/v) 트레할로스, 0.015%-0.035% (w/v) PS80을 포함한다.

[0033] 일부 구체예에서, 조성물은 pH 5.9-6.1에서 10-120 mg/mL의 본 발명의 항-CD73 항체 또는 항원-결합 단편, 15-25 mM 히스티딘, 6%-10% (w/v) 트레할로스, 0.015%-0.025% (w/v) PS80을 포함한다.

[0034] 일부 구체예에서, 본원에서 개시된 바와 같이 수용액을 냉동-건조시킴으로써 제조될 수 있는 동결건조된 조성물이 또한 제공된다. 일부 구체예에서, 물과 같은 용체에 동결건조된 조성물을 용해시킴으로써 제조될 수 있는 용액이다.

[0035] **III. 제제를 사용하는 방법**

[0036] 본원에서 기재된 바와 같이, 본 발명의 조성물은 특정 치료 및 진단 방법에서 사용될 수 있다. 본 발명은 본원에서 기재된 장애 또는 병태 중 하나 이상을 치료하기 위해 환자, 예컨대 동물, 포유동물, 및 인간에게 본 발명의 조성물을 투여하는 단계를 수반하는 항체-기반 요법과 더 관련이 있다.

[0037] 본 발명의 조성물은 또한 암을 치료하거나 억제하는데 사용될 수 있다. 상기 제공된 바와 같이, CD73은 종양 세포에서 과발현될 수 있다. 종양-유래된 CD73은 세포의 아데노신을 생산하기 위해 엑토-효소(ecto-enzyme)로 기능할 수 있으며, 이것은 아데노신 수용체 신호전달을 통해 항종양 T-세포 면역력을 제한함으로써 종양 성장을 억제한다. 쥐 종양 모델에서 소분자 억제자, 또는 CD73을 표적화하는 단클론성 항체로의 결과는 표적화된 CD73 요법이 종양 성장의 효과적인 제어에 대한 중요한 대안적 및 현실적 접근법이라는 것을 나타낸다. 특히, 그것은 적응성 면역 반응 기작을 향상시킴으로써 T-세포-기반 요법을 도우며, 이것은 종양-침윤 T 림프구의 기능을 증가시키고, 암 환자에서 생존을 개선할 수 있다.

[0038] 따라서, 일부 구체예에서, 필요로 하는 환자에서 암을 치료하기 위한 방법이 제공된다. 한 구체예에서, 방법은 본 발명의 조성물의 유효량을 환자에게 투여하는 단계를 수반한다. 일부 구체예에서, 환자에서 암 세포 중 적어

도 하나 (예를 들어, 간질 세포)가 CD73을 과발현시킨다.

- [0039] 암의 비-제한적 예는 방광암, 유방암, 결장직장암, 자궁내막암, 식도암, 두경부암, 신장암, 백혈병, 간암, 폐암, 림프종, 흑색종, 췌장암, 전립선암, 및 갑상선암을 포함한다.
- [0040] 본 발명의 항체 또는 이것의 변이체, 또는 유도체로 치료, 예방, 진단 및/또는 예측될 수 있는, 세포 생존의 증가와 관련된 추가적인 질환 또는 병태는 악성 종양 및 관련된 장애, 예컨대 백혈병 (급성 백혈병 (예를 들어, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수구성 백혈병 (골수아구성, 전골수구성, 골수단핵구성, 단핵구성, 및 적백혈병 포함)) 및 만성 백혈병 (예를 들어, 만성 골수구성 (과립구성) 백혈병 및 만성 림프구성 백혈병) 포함), 진성 다혈구증, 림프종 (예를 들어, 호지킨 병(Hodgkin's disease) 및 비-호지킨 병(non-Hodgkin's disease)), 다발성 골수종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증(Waldenstrom's macroglobulinemia), 중쇄병, 및 고체 종양, 제한되는 것은 아니지만, 예컨대 육종 및 암종, 예컨대 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 척색종, 혈관육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피육종, 활막종, 증피종, 유잉 종양(Ewing's tumor), 평활근육종, 횡문근육종, 결장 암종, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 편평세포 암종, 기저세포 암종, 선암종, 한선 암종, 피지선 암종, 유두상 암종, 유두상 선암종, 낭선 암종, 수질 암종, 기관지 암종, 신장 세포 암종, 간종양, 담관 암종, 용모막 암종, 정상피종, 배아 암종, 윌름 종양(Wilm's tumor), 자궁경부암, 고환 종양, 폐 암종, 소세포 폐 암종, 방광 암종, 상피 암종, 신경교종, 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 뇌실막세포종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경종, 핍지교종, 수막종, 흑색종, 신경아세포종 및 망막아종의 진행, 및/또는 전이를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0041] 임의의 특정 환자에 대한 특이적 투약량 및 치료 양생법은 특정 항체, 사용된 그것의 변이체 또는 유도체, 환자의 나이, 체중, 일반적인 건강 상태, 성별, 및 식단, 및 투여 시간, 배설률, 약물 조합, 및 치료되는 특정 질환의 심각도를 포함한 다양한 요인에 따라 달라질 것이다. 의학적 보호자에 의한 이러한 요인의 판단은 해당 분야의 기술 범위 내에 있다. 치료되는 개개의 환자, 투여 경로, 제제의 유형, 사용된 화합물의 특성, 질환의 심각도, 및 원하는 효과에 따라 양이 또한 달라질 것이다. 사용된 양은 해당 분야에 널리 공지된 약리학적 및 약동학적 원칙에 의해 결정될 수 있다.
- [0042] 조성물의 투여 방법은 피내, 근육내, 복강내, 정맥내, 및 피하 경로를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 조성물은 임의의 편리한 경로, 예를 들어, 주입 또는 볼루스(bolus) 주사, 상피 또는 점막피부 라이닝(lining) (예를 들어, 구강 점막, 직장 및 장 점막, 등)을 통한 흡수에 의해 투여될 수 있고 다른 생물학적으로 활성인 작용제와 함께 투여될 수 있다. 따라서, 본 발명의 항원-결합 폴리펩타이드를 함유하는 약학적 조성물은 비경구로, 수조내로, 질내로, 복강내로, 국소적으로 (분말, 연고, 액적 또는 경피 패치에 의해), 볼에, 또는 경구 또는 비강 스프레이로서 투여될 수 있다.
- [0043] 용어 "비경구"는 본원에서 사용된 바와 같이 정맥내, 근육내, 복강내, 흉골내, 피하 및 관절내 주사 및 주입을 포함하는 투여 방식을 나타낸다.
- [0044] 투여는 전신성 또는 국소성일 수 있다. 이에 더하여, 본 발명의 항체를 심실내 및 척추강내 주사를 포함한 임의의 적합한 경로에 의해 중추신경계로 도입하는 것이 바람직할 수 있고; 심실내 주사는, 예를 들어, 레저버, 예컨대 옴마야 레저버(Ommaya reservoir)에 부착된 심실내 카테터(catheter)에 의해 용이해질 수 있다. 예를 들어, 흡입기 또는 네블라이저(nebulizer), 및 에어로졸화제가 들어있는 제제의 사용에 의해 폐 투여가 또한 이용될 수 있다.
- [0045] 염증성, 면역성 또는 악성 질환, 장애 또는 병태의 치료, 억제 및 예방에 효과적인 본 발명의 항체의 양은 표준 임상 기술에 의해 결정될 수 있다. 이에 더하여, 최적의 투약량 범위를 확인하는 것을 돕기 위해 시험관 내 검정이 선택적으로 이용될 수 있다. 제제에서 이용되는 정확한 용량은 또한 투여 경로, 및 질환, 장애 또는 병태의 심각도에 따라 달라질 것이고, 의사의 판단 및 각 환자의 상황에 따라 결정되어야 한다. 유효 용량은 시험관 내 또는 동물 모델 테스트 시스템으로부터 유래된 용량-반응 곡선으로부터 추정될 수 있다.
- [0046] 일반적인 제안으로서, 환자에게 투여된 본 발명의 항원-결합 폴리펩타이드의 투약량은 전형적으로 0.1 mg/kg 내지 100 mg/kg 환자 체중, 0.1 mg/kg 내지 20 mg/kg 환자 체중, 또는 1 mg/kg 내지 10 mg/kg 환자 체중이다. 일반적으로, 인간 항체는 외래의 폴리펩타이드에 대한 면역 반응으로 인해 다른 종의 항체보다 인간 신체 내에서 더 긴 반감기를 갖는다. 따라서, 더 작은 투약량의 인간 항체 및 덜 빈번한 투여가 종종 가능하다. 또한, 본 발명의 항체의 투약량 및 투여 빈도는, 예를 들어, 지질화와 같은 변형에 의해 항체의 흡수 및 조직 침투 (예를 들어, 뇌로)를 향상시킴으로써 감소될 수 있다.

- [0047] 본 발명의 조성물의 투여를 포함하는 감염성 또는 악성 질환, 병태 또는 장애를 치료하기 위한 방법은 인간에서 사용하기 전에 원하는 치료적 또는 예방적 활성에 대해 전형적으로 시험관 내에서 테스트된 다음, 허용 가능한 동물 모델에서 생체 내에서 테스트된다. 트랜스제닉(transgenic) 동물을 포함한 적합한 동물 모델은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 본원에서 기재된 항원-결합 폴리펩타이드의 치료적 유용성을 입증하기 위한 시험관 내 검정은 세포주 또는 환자 조직 샘플에 대한 항원-결합 폴리펩타이드의 효과를 포함한다. 세포주 및/또는 조직 샘플에 대한 항원-결합 폴리펩타이드의 효과는 당업자에게 공지된 기술, 예컨대 본원의 다른 곳에서도 개시되어 있는 검정을 이용하여 결정될 수 있다. 본 발명에 따르면, 특이적 항원-결합 폴리펩타이드의 투여가 지시되는지 여부를 결정하기 위해 사용될 수 있는 시험관 내 검정은 환자 조직 샘플이 배양물에서 성장하고, 화합물에 노출되거나 그렇지 않으면 화합물이 투여되고, 조직 샘플에 대한 이러한 화합물의 효과가 관찰되는 시험관 내 세포 배양 검정을 포함한다.
- [0048] 추가의 구체예에서, 본 발명의 조성물은 항신생물제, 항바이러스제, 항균제 또는 항생제 또는 항진균제와 조합으로 투여된다. 해당 분야에 공지된 이들 작용제는 본 발명의 조성물에서 투여될 수 있다.
- [0049] 또 다른 구체예에서, 본 발명의 조성물은 화학치료제와 조합으로 투여된다. 본 발명의 조성물과 함께 투여될 수 있는 화학치료제는 항생제 유도체 (예를 들어, 독소루비신, 블레오마이신, 다우노루비신, 및 닥티노마이신); 항에스트로겐제 (예를 들어, 타목시펜); 대사 길항 물질 (예를 들어, 플루오로우라실, 5-FU, 메토틱세이트, 플록수리딘, 인터페론 알파-2b, 글루탐산, 플리카마이신, 메르캅토피린, 및 6-티오구아닌); 세포독성제 (예를 들어, 카르무스틴, BCNU, 로무스틴, CCNU, 시토신 아라비노사이드, 사이클로포스파미드, 에스트라무스틴, 하이드록시우레아, 프로카르바진, 미토마이신, 부셀판, 씨스(cis)-플라틴, 및 빈크리스틴 설페이트); 호르몬 (예를 들어, 메드록시프로게스테론, 에스트라무스틴 포스페이트 나트륨, 에티닐 에스트라디올, 에스트라디올, 메게스트롤 아세테이트, 메틸테스토스테론, 디에틸stil베스트롤 디포스페이트, 클로로트리아니센, 및 테스토라톤); 질소 머스타드 유도체 (예를 들어, 메팔렌, 코람부실, 메클로르에타민 (질소 머스타드) 및 테오테파); 스테로이드 및 조합 (예를 들어, 베타메타손 나트륨 포스페이트); 및 기타 (예를 들어, 디카르바진, 아스파라기나제, 미토탄, 빈크리스틴 설페이트, 빈블라스틴 설페이트, 및 에토포시드)를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0050] 추가적인 구체예에서, 본 발명의 조성물은 사이토카인과 조합으로 투여된다. 본 발명의 조성물과 함께 투여될 수 있는 사이토카인은 IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, 항-CD40, CD40L, 및 TNF- α 를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0051] 추가적인 구체예에서, 본 발명의 조성물은 다른 치료적 또는 예방적 양생법, 예를 들어, 방사선 요법과 조합으로 투여된다.
- [0052] **실시예**
- [0053] 본 발명은 다음 실시예를 참조하여 더 이해되며, 이는 본 발명을 순수하게 예시하려는 의도이다. 본 발명은 예시된 구체예에 의해 범위가 제한되지 않으며, 이는 단지 본 발명을 단일 양태의 예시로서 의도된다. 기능적으로 동등한 임의의 방법이 본 발명의 범위 내에 있다. 본원에서 기재된 것들에 더하여 본 발명의 다양한 변형은 상기 언급된 설명 및 첨부된 도면으로부터 당업자에게 분명해질 것이다. 이러한 변형은 첨부된 청구범위의 범위 내에 있다.
- [0054] **실시예 1. 항-CD73 항체 IM005의 개발**
- [0055] 인간 CD73 단백질에 결합하여 인간 CD73 단백질의 효소 활성을 억제하는데 있어서 강력한 활성을 나타내는 인간화된 항-CD73 항체 (IM005)를 개발하였다. 이에 더하여, WO2018137598에서 입증된 바와 같이, 항체는 세포 표면 CD73의 내재화를 효과적으로 유도한다. 항체는 또한 AMP 및 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 반응의 종양 세포-매개된 억제를 완전히 반전시킬 수 있고, 종양-유래된 CD73 활성의 억제에 효과적이며, 종양 성장의 억제로 이어진다.
- [0056] 결합 분석은 IM005가 N-말단 도메인에 결합하는 공지된 항-CD-73 항체와는 상이한 CD73 단백질의 C-말단 도메인에 결합한다는 것을 보여주었다. IM005의 고유한 결합 성질은 공지된 항체와 비교하여 우수한 CD73 억제 프로파일에 기여한다. 예를 들어, MEDI-9447 (올레클루맘)은 체장암 및 결합직장암 그리고 다른 암의 치료를 위해 현재 임상 개발 중인 인간 항-CD73 단클론성 항체이다. MEDI-9447에 의한 CD73의 억제는 완전한 MEDI-9447 항체 상의 2개의 결합 부위 모두가 CD73에 결합하는 것을 필요로 하지만 Hu101-28에 의한 1가 결합은 충분하다. 그러므로, MEDI-9447은 가용성 CD73을 억제할 수 없거나, 또는 세포에서 상대적으로 낮은 수준의 CD73을 발현한다. 그에 반해, IM005는 표면 상에서 상이한 수준의 CD73을 발현하는 세포에서 CD73 활성, 및 가용성 CD73의 완전한

억제를 달성할 수 있다.

[0057] IM005는 다음 VH/VL 및 CDR 서열을 갖는다.

[0058] [표 1]

항-CD73 CDR

명칭	서열	서열 번호:
VH CDR1	SGYYWN	1
VH CDR2	YINYGGSNGYNPSLKS	2
VH CDR3	DYDAYYEALDD	3
VL CDR1	RASSRVNYMH	4
VL CDR2	ATSNLAS	5
VL CDR3	QQWSSNPPT	6
VH	EVQLQESGPGLVKPKSETLSLTCAVSGYSIT SGYYWN WIRQPPGK KLEWMG YINYGGSNGYNPSLKSRI TISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYY CARDY DAYYEALDD WGQTTVTVSS	7
VL	EIVLSQSPATLSLSPGERATLS CRASSRVN - YMH WYQQKPGQSPRP WISA TSNLASG VPARFSGSGSGT SY TLTISSLEPEDFAVYY CQQWSSNPPT FGG GTKVEIK	8
중쇄	EVQLQESGPGLVKPKSETLSLTCAVSGYSITSGYYWNWIRQPPGK KLEWMG YINYGGSNGYNPSLKSRI TISR DTSKNQFSLKLSVTAADTAVYY CARDY DAYYEALDDWGQTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	9
경쇄	EIVLSQSPATLSLSPGERATLS CRASSRVNYMH WYQQKPGQSPRP WISAT SNLASGVPARFSGSGSGT SY TLTISSLEPEDFAVYY CQQWSSNPPT FGGG TKVEIK RTVAAPSVPFI PPSDEQLKSGTASV VCLLN NFYP REAK VQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSK DSTYLSSTL TL SKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTK SFNRGEC	10

[0059]

[0060] IM005 항체를 제조하기 위해, VH 및 VK 유전자를 합성으로 생산한 다음, 각각 인간 감마 1 및 인간 카파 불변 도메인을 함유하는 벡터에 클로닝하였다.

[0061] **실시예 2. 완충액 및 pH 선별**

[0062] 이 실시예에서는 단백질을 가장 잘 안정화시키고 IM005의 추후 제제 개발을 지지하는 단백질 가용성을 연구하기 위한 최적의 pH/완충액 조건에 대해 스크리닝하였다.

[0063] **방법**

[0064] 단백질 농도

[0065] 단백질 농도를 Thermo UV 분광광도계로 결정하였다. pH 및 완충액 평가 연구에 사용된 흡광 계수는 1.660 AU* $\text{mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 이며, 이것을 모든 제제 개발 연구에 적용하였다. 모든 측정을 각 시기에 2.5 μL 샘플로 2회 반복하였고 평균을 구했다.

[0066] SEC-HPLC

[0067] TSKGel G3000SWXL 컬럼 (300X7.8 mm, 5 μm)을 구비한 Agilent HPLC 시스템을 사용하여 크기 배제 크로마토그

래피를 수행하였다. 이동상은 50mM PB, 300mM NaCl, pH 6.8±0.2이고 유속을 1.0 mL/min로 설정하였다. 각 샘플에 대해 100 µg 단백질을 주사하고 검출기의 파장을 280 nm로 설정하였다.

[0068] *cIEF*

[0069] FC-코팅된 cIEF 카트리지가 장착된 ProteinSimple iCE 분석기에서 cIEF를 수행하였다. cIEF 방법을 IM005 샘플의 등전점 (pI) 및 전하 변형체를 분석하는데 사용하였다. 로딩 혼합물은 1.0 mg/mL의 농도의 20 µL 샘플, 35 µL 1% 메틸 셀룰로스, 1 µL Pharmalyte 3-10 및 3µL Pharmalyte 8-10.5 담체 양성 전해질, 0.5 µL 저 pI Marker 6.61 또는 6.14, 0.5 µL 고 pI Marker 9.46 또는 9.77, 25 µL 8 mol/L 유레아, 및 최종적으로 로딩 샘플 부피를 100 µL로 만들기 위해 15 µL 정제수를 함유하였다. 자동 샘플러의 온도는 5 °C였고, 샘플 주사 시간은 90초였다. 초점 조정을 2개의 단계로 수행하였다: 1500 V 하에서 1 min 동안 사전 초점 조정 후 이어서, 3000 V에서 8 min 동안 초점 조정. 신호를 전체 컬럼 이미지화 검출 기술을 이용하여 280 nm에서 검출하였다. 데이터를 Chromperfect Analysis Software를 사용하여 분석하였다.

[0070] 탁도 (UV350)

[0071] 탁도 측정을 분광광도계 (Spectra Max)로 수행하였다. 150 µL 샘플을 96웰 플레이트의 웰에 추가하였고, 각각의 완충액 150 µL를 또한 참조로서 상응하는 웰에 추가하였다. 그 다음에 완충액 및 샘플의 흡수를 350 nm에서 테스트하였다. 상응하는 완충액을 빼서 단백질의 UV350 값을 얻었다.

[0072] *Caliper-SDS (환원성 & 비-환원성)*

[0073] Caliper-SDS를 Caliper-마이크로칩-기반 검정에 의해 수행하였다. 비-환원성: 변성 용액을 샘플 완충액 (키트의 것), 10% SDS 및 100 mM N-에틸말레이미드를 20:1:0.7 부피비로 혼합하여 제조하였다. 2 마이크로리터의 샘플 및 7 µL 변성 용액을 잘 혼합하고, 70 °C에서 10 min 동안 인큐베이션하고 스핀 다운 (spin down)하였다. H₂O (35 µL)를 샘플에 추가한 다음, 혼합물 42 µL를 96웰 플레이트로 옮기고 4000 rpm으로 20 min 동안 원심분리하여 기포를 제거하였다. 플레이트를 기구의 플레이트 홀더에 로딩한 후, 샘플을 흡수시키고, 염색하고, 분리하여 탈염색-겔, 형광 염료 및 마커로 채워진 마이크로칩에서 검출하였다. 데이터를 LabChip GX Reviewer로 분석하였다.

[0074] 환원성: 변성 용액을 20:1:0.7의 부피비로 샘플 완충액 (키트의 것), 10% SDS 및 1 M 디티오프레이톨을 혼합하여 제조하는 한편, 참조 표준 또는 샘플을 MQ H₂O로 1 mg/mL로 희석하였다. 2 마이크로리터의 샘플 및 7 µL 변성 용액을 잘 혼합하고, 70 °C에서 10 min 동안 인큐베이션하고 스핀 다운하였다.

[0075] H₂O (35 µL)를 샘플에 추가한 다음, 혼합물 42 µL를 96웰 플레이트에 옮기고 4000 rpm으로 20 min 동안 원심분리하여 기포를 제거하였다. 플레이트를 기구의 플레이트 홀더에 로딩한 후, 샘플을 흡수시키고, 염색하고, 분리하여 탈염색-겔, 형광 염료 및 마커로 채워진 마이크로칩에서 검출하였다. 데이터를 LabChip GX Reviewer로 분석하였다.

[0076] *DSC*

[0077] DSC 분석을 GE DSC System으로 수행하였다. 샘플을 참조 완충액으로 1mg/mL로 희석하였다. 각각의 참조 완충액 400 µL를 96웰 플레이트의 홀수 웰에 추가하고 샘플 400 µL을 동일한 플레이트의 짝수 웰에 추가하였다. 실험 변수를 스캔 온도가 200 °C/h의 속도로 10-110 °C로 상승하도록 설정하였다. 온도기록도의 분석을 MicroCal VP-Capillary DSC 소프트웨어로 수행하였다.

[0078] 점도

[0079] 점도를 BROOKFIELD 점도계를 사용하여 평가하고 콘(cone) 유형은 CPA-40Z였다. 테스트 온도는 25 °C였고 0.5 mL 샘플을 필요로 하였다.

[0080] **결과**

[0081] IM005 (20.4 mg/mL)를 먼저 표 1에서 나타난 바와 같이 9개의 상이한 완충액으로 교환하였다. 단백질을 10 mg/mL로 조정하였다.

표 1

완충액 조건

번호	단백질 농도	완충액	pH
F1	10 mg/mL	20 mM 아세테이트	4.5
F2		20 mM 아세테이트	5.0
F3		20 mM 아세테이트	5.5
F4		20 mM 히스티딘	5.5
F5		20 mM 히스티딘	6.0
F6		20 mM 히스티딘	6.5
F7		20 mM PB	6.0
F8		20 mM PB	6.5
F9		20 mM PB	7.0

[0082]

[0083]

각각의 제제에 대해 4개의 2 mL 유리 바이알을 1 mL 여과물로 채웠다. 바이알을 채운 직후 마개로 막고 크럼핑 하였다(crimped). 크럼핑 외에도, 모든 과정을 생물학적 안정성 후드에서 수행하였다. 바이알을 40 °C 인큐베이터에 배치하고, 바이알을 상이한 시점에 분석을 위해 40 °C 조건에서 제거하였다.

[0084]

DSC

[0085]

각각의 제제의 열역학적 안정성을 DSC를 사용하여 검사하였다. 단백질의 열 유도된 언폴딩(unfolding)의 용융 온도 (T_m)를 입체구조적 안정성의 지표로 간주하였다.

[0086]

표 2에서 나타난 바와 같이, 전이의 시작 온도는 46.18 °C (F1: 아세테이트 pH 4.5) 내지 57.25 °C (F7: PB pH 6.0)의 범위이다. T_{m1}은 54.53 °C (F1 아세테이트 pH 4.5) 내지 76.57 °C (F3: 아세테이트 pH 5.5)의 범위이고, T_{m2}는 77.27 °C (F5: 히스티딘 pH 6.0) 내지 86.54 °C (F9: PB pH 7.0) (예외 F3: 아세테이트 pH 5.5, F6: 히스티딘 pH 6.5 및 F7: PB pH 6.0)의 범위이다. 9개의 제제의 프로파일 중에서 상이한 전이 온도를 관찰하였다.

표 2

pH/완충액 스크리닝 연구의 DSC 결과

pH/완충액	T _M 시작 (°C)	T _{m1} (°C)	T _{m2} (°C)
F1: 20 mM 아세테이트, pH4.5	46.18	54.53	78.43
F2: 20 mM 아세테이트, pH5.0	49.15	60.27	78.05
F3: 20 mM 아세테이트, pH4.5	56.53	76.57	NA
F4: 20 mM 히스티딘, pH5.5	49.58	59.61	77.96
F5: 20 mM 히스티딘, pH4.5	52.80	63.36	77.27
F6: 20 mM 히스티딘, pH4.5	56.33	75.78	NA
F7: 20 mM PB, pH6.0	57.25	74.47	NA
F8: 20 mM PB, pH6.5	56.80	72.37	86.26
F9: 20 mM PB, pH7.0	57.05	69.84	86.54

[0087]

[0088]

외관

[0089]

외관 평가 결과는 표 3에서 나타나있다. 40 °C 조건에서, 2주 후에 F6 (히스티딘 pH 6.5), F7 (PB pH 6.0), F8 (PB pH 6.5) 및 F9 (PB pH 7.0)에서 가시적 입자가 관찰되었다. 그리고 4주 후에 F3 (아세테이트 pH 5.5), F6 (히스티딘 pH 6.5), F7 (PB pH 6.0), F8 (PB pH 6.5) 및 F9 (PB pH 7.0)에서 입자가 관찰되었다. 40 °C에서 인

큐베이션한 후에도 F1 (아세트레이트 pH 4.5), F2 (아세트레이트 pH 5.0), F4 (히스티딘 pH 5.5) 및 F5 (히스티딘 pH 6.0)에서는 가시적 입자가 관찰되지 않았다.

[0090] pH

[0091] 모든 제제의 pH 값을 모든 샘플링 시점에 측정하였다. 결과는 40 °C에서 인큐베이션한 후 pH 값에 큰 변화가 없었다는 것을 보여주었다.

[0092] 단백질 농도

[0093] 모든 제제의 단백질 농도를 모든 샘플링 시점에 nanodrop2000, UV280 방법을 사용하여 측정하였다. 결과가 나타내는 바와 같이, F9 (PB pH 7.0)에서 단백질 농도의 약 10% 감소가 관찰되었고 40 °C 조건에서 인큐베이션 후 F1-F8 중에서 단백질 농도에 큰 변화는 보이지 않았다.

표 3

pH/완충액 스크리닝의 외관, pH, UV280 결과: 40°C

40°C		외관	pH	UV280 (mg/mL)
F1: 20 mM 아세트레이트, pH4.5	T0	투명함, 연노랑, 입자 없음	4.5	10.2
	1W	투명함, 연노랑, 입자 없음	4.6	10.2
	2W	투명함, 연노랑, 입자 없음	4.6	10.2
	4W	투명함, 연노랑, 입자 없음	4.6	10.4
F2: 20 mM 아세트레이트, pH5.0	T0	투명함, 연노랑, 입자 없음	5.0	10.2
	1W	투명함, 연노랑, 입자 없음	5.1	10.2
	2W	투명함, 연노랑, 입자 없음	5.1	10.3
	4W	투명함, 연노랑, 입자 없음	5.1	10.3
F3: 20 mM 아세트레이트, pH5.5	T0	투명함, 연노랑, 입자 없음	5.5	10.1
	1W	투명함, 연노랑, 입자 없음	5.6	10.0
	2W	투명함, 연노랑, 입자 없음	5.6	10.1
	4W	몇 개의 입자	5.6	10.0
F4: 20 mM 히스티딘, pH5.5	T0	투명함, 연노랑, 입자 없음	5.6	10.2
	1W	투명함, 연노랑, 입자 없음	5.5	10.1
	2W	투명함, 연노랑, 입자 없음	5.5	10.2
	4W	투명함, 연노랑, 입자 없음	5.6	10.2
F5: 20 mM 히스티딘, pH6.0	T0	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.2	10.0
	1W	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	10.1
	2W	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	10.1
	4W	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	10.2
F6: 20 mM 히스티딘, pH6.5	T0	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.6	10.2
	1W	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.5	10.1
	2W	몇 개의 입자	6.5	10.2
	4W	몇 개의 입자	6.5	10.2
F7: 20 mM PB, pH6.0	T0	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.0	10.3
	1W	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	10.3
	2W	몇 개의 입자	6.1	10.4
	4W	몇 개의 입자	6.1	10.4
F8: 20 mM PB, pH6.5	T0	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.5	10.5
	1W	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.5	10.5
	2W	몇 개의 입자	6.5	10.4
	4W	몇 개의 입자	6.5	10.3
F9: 20 mM PB, pH7.0	T0	투명함, 연노랑, 입자 없음	7.0	9.8
	1W	투명함, 연노랑, 입자 없음	7.0	9.8
	2W	몇 개의 입자	7.0	9.6
	4W	많은 입자	6.9	8.9

[0094]

[0095] SEC-HPLC

[0096] 40 °C에서의 SEC 결과는 **표 4**에서 나타나있다. 모든 제제에서 응집이 관찰되었고 일부 완충액에서 단편화가 관찰되었다. 열처리 시간이 증가함에 따라 9개 제제 모두의 %주요 피크가 감소하였다. F1 (아세트이트 pH 4.5), F7 (PB pH 6.0), F8 (PB pH 6.5), 및 F9 (PB pH 7.0) 샘플에서 더 큰 감소가 관찰되었다. 이들 결과는 %LMW 및 %HMW 종과 일치하였다.

[0097] SEC-HPLC 결과에 기초하여, F2 내지 F6이 제제 후보로 선별될 수 있다.

표 4

pH/완충액 스크리닝의 SEC-HPLC 결과: 40°C

40°C		SEC_HPLC		
		%HMW	%주요 피크	%LMW
F1: 20 mM 아세트이트, pH4.5	T0	0.6	99.4	NA
	1W	1.3	98.2	0.5
	2W	1.5	97.7	0.8
	4W	2.5	96.4	1.1
F2: 20 mM 아세트이트, pH5.0	T0	0.4	99.6	NA
	1W	0.5	99.1	0.4
	2W	0.6	98.9	0.5
	4W	1.0	98.4	0.6
F3: 20 mM 아세트이트, pH5.5	T0	0.9	99.1	NA
	1W	1.2	98.5	0.3
	2W	1.3	98.4	0.3
	4W	1.6	97.8	0.5
F4: 20 mM 히스티딘, pH5.5	T0	0.7	99.3	NA
	1W	0.8	98.8	0.3
	2W	0.9	98.7	0.4
	4W	1.2	98.2	0.6
F5: 20 mM 히스티딘, pH6.0	T0	0.4	99.6	NA
	1W	0.6	99.1	0.3
	2W	0.6	99.1	0.3
	4W	0.9	98.6	0.5
F6: 20 mM 히스티딘, pH6.5	T0	0.9	99.1	NA
	1W	1.1	98.6	0.3
	2W	1.2	98.3	0.5
	4W	1.6	97.7	0.6
F7: 20 mM PB, pH6.0	T0	0.9	99.1	NA
	1W	1.6	98.1	0.3
	2W	1.9	97.8	0.4
	4W	2.6	96.6	0.8
F8: 20 mM PB, pH6.5	T0	0.7	99.3	NA
	1W	1.8	98.0	0.2
	2W	2.2	97.4	0.4
	4W	3.2	96.0	0.7
F9: 20 mM PB, pH7.0	T0	1.4	98.6	NA
	1W	2.2	97.6	0.2
	2W	2.7	96.9	0.4
	4W	3.2	96.1	0.7

[0098]

[0099] Caliper-SDS (환원성 및 비-환원성)

[0100] Caliper-SDS는 CE 기반 고처리량 분석이며, 이것은 높은 민감도로 단클론성 항체의 단편화를 검출할 수 있다. Caliper-SDS 실험에서, **표 5**에서 F1 (아세트이트 pH 4.5), F7 (PB pH 6.0), F8 (PB pH 6.5), 및 F9 (PB pH 7.0) 비-환원성 샘플에서 더 큰 %순도 감소가 관찰되었다. 이에 더하여, F1, F7, F8, 및 F9 샘플에서 %(LC+HC)

감소가 더 빨랐다. 이들 결과는 SEC 결과와 일치한다.

표 5

pH/완충액 스크리닝의 Caliper-SDS (환원성 및 비-환원성) 결과 (40°C)

40°C		rCaliper-SDS	NrCaliper-SDS
		%LC+%HC	%주요 피크
F1: 20 mM 아세테이트, pH4.5	T0	99.9	98.4
	1W	99.6	97.0
	2W	99.0	95.7
	4W	97.7	93.2
F2: 20 mM 아세테이트, pH5.0	T0	99.9	98.3
	1W	99.8	97.3
	2W	99.5	96.5
	4W	99.0	94.9
F3: 20 mM 아세테이트, pH5.5	T0	99.9	98.3
	1W	99.9	97.8
	2W	99.6	96.8
	4W	99.2	95.2
F4: 20 mM 히스티딘, pH5.5	T0	99.9	98.2
	1W	99.8	97.6
	2W	99.5	96.8
	4W	99.1	95.5
F5: 20 mM 히스티딘, pH6.0	T0	99.9	98.3
	1W	99.9	97.6
	2W	99.5	96.9
	4W	99.2	95.6
F6: 20 mM 히스티딘, pH6.5	T0	99.9	98.3
	1W	99.7	97.7
	2W	99.4	96.8
	4W	99.2	95.1
F7: 20 mM PB, pH6.0	T0	99.9	98.3
	1W	99.7	97.1
	2W	99.3	96.4
	4W	98.9	94.1
F8: 20 mM PB, pH6.5	T0	99.9	98.1
	1W	99.6	97.5
	2W	99.1	95.9
	4W	98.7	92.7
F9: 20 mM PB, pH7.0	T0	99.9	98.4
	1W	99.4	96.1
	2W	98.9	95.3
	4W	98.3	91.7

[0101]

[0102]

Caliper-SDS 결과는 순도가 낮은 pH (pH 4.5) 및 높은 pH (pH 7.0) 조건에서 더 많이 감소하는 다른 검정 결과와 유사한 추세를 나타낸다.

[0103]

cIEF

[0104]

40 °C에서 인큐베이션 4주 후, cIEF 데이터를 얻었고 표 6에서 제공된다. 결과는 SEC-HPLC와 유사한 추세를 나타냈으며, F1 (아세테이트 pH 4.5), F7 (PB pH 6.0), F8 (PB pH 6.5), 및 F9 (PB pH 7.0) 샘플에서 %주요 피크 감소가 더 컸다. 각각의 완충액 유형에서 %염기성 피크는 pH가 증가함에 따라 감소하였지만 %산성 피크는 pH가 증가함에 따라 증가하였다.

표 6

pH/완충액 스크리닝의 cIEF 결과, 40°C

40°C		cIEF		
		%산성 피크	%주요 피크	%염기성 피크
F1: 20 mM 아세테이트, pH4.5	T0	23.0	55.8	21.2
	1W	22.6	47.8	29.6
	2W	25.3	38.1	36.6
	4W	26.2	33.3	40.5
F2: 20 mM 아세테이트, pH5.0	T0	23.4	54.4	22.2
	1W	20.6	52.6	26.8
	2W	26.9	43.2	29.9
	4W	30.2	38.0	31.8
F3: 20 mM 아세테이트, pH5.5	T0	19.5	58.6	21.9
	1W	24.1	52.3	23.5
	2W	29.2	46.0	24.8
	4W	32.9	41.0	26.1
F4: 20 mM 히스티딘, pH5.5	T0	23.1	55.9	20.9
	1W	21.6	54.4	24.0
	2W	27.2	44.5	28.3
	4W	30.5	40.2	29.3
F5: 20 mM 히스티딘, pH6.0	T0	22.9	56.1	21.0
	1W	23.2	54.2	22.5
	2W	28.3	47.2	24.5
	4W	34.1	42.4	23.5
F6: 20 mM 히스티딘, pH6.5	T0	22.5	56.8	20.7
	1W	25.5	54.5	20.0
	2W	30.2	48.1	21.7
	4W	39.6	41.1	19.2
F7: 20 mM PB, pH6.0	T0	22.1	57.3	20.6
	1W	25.4	53.8	20.8
	2W	33.1	44.1	22.8
	4W	41.5	38.3	20.2
F8: 20 mM PB, pH6.5	T0	21.8	56.1	22.0
	1W	28.0	52.1	19.9
	2W	38.6	42.9	18.5
	4W	49.7	34.3	16.0
F9: 20 mM PB, pH7.0	T0	22.3	56.6	21.2
	1W	34.1	47.6	18.3
	2W	45.5	37.7	16.8
	4W	59.1	28.8	12.1

[0105]

[0106]

이들 결과는 가장 큰 전하 변형체 변화가 F9 (PB pH 7.0)에서 관찰되었고 가장 작은 전하 변형체 변화가 F5 (히스티딘 pH 6.0)에서 관찰되었다는 것을 보여준다.

[0107]

요약하면, pH/완충액 스크리닝 연구에서, 40 °C에서 인큐베이션한 후 F3 (아세테이트 pH 5.5), F6 (히스티딘 pH 6.5), F7 (PB pH 6.0), F8 (PB pH 6.5) 및 F9 (PB pH 7.0)에서 가시적 입자가 관찰되었다. 40 °C에서, F1 (아세테이트, pH 4.5) 및 F7, F8, F9 (포스페이트 완충액)는 Caliper-SDS (환원성 및 비-환원성) 및 SEC 결과에서 가장 큰 순도 감소를 나타냈을 뿐만 아니라, cIEF에서 가장 큰 전하 변형체 변화가 목격되었다. 그리고 40 °C에서 인큐베이션한 후 F9에서 10% 농도 감소가 관찰되었다.

[0108]

그러므로, 이들 결과는 IM005이 포스페이트 완충액에서 덜 안정하고 완충액 pH가 너무 낮을 때 단백질이 불안정할 수 있다는 것을 나타낸다. F2, F4 및 F5에 대해, 40 °C에서 4주 인큐베이션 후 Caliper-SDS 환원성 결과에서 큰 변화가 관찰되지 않았지만, Caliper-SDS 비-환원성의 % 순도의 감소가 관찰되었다. F5는 Caliper-SDS 비-환원성 및 SEC 순도 결과 둘 다에서 다른 것들보다 덜 감소하였다. 그러므로, 추가의 개발을 위해 F5 (20mM 히스

티딘 pH 6.0 완충액)를 선별하였다.

[0109] **실시예 3. 가용성 연구**

[0110] 이 실시예는 선별된 완충 시스템에서 IM005의 가용성을 평가하였다.

[0111] IM005를 20 mM 히스티딘, pH 6.0 완충액으로 교환하고 농도를 80 mg/mL 및 150 mg/mL로 조정하였다. 샘플을 0.22 μm PVDF 막 여과기로 무균성으로 여과하였다. 각각의 농도에 대해, 3개의 2-mL 유리 바이알을 생물학적 안전성 후드에서 DS 1 mL로 채웠다. 바이알을 채운 직후 마개로 막고 크림핑하였다.

[0112] 총 6개의 바이알을 상이한 인큐베이터 (2-8 °C 및 25 °C)에 배치하고, 분석을 위해 1개의 바이알을 각각의 조건으로부터 제거했다.

[0113] 외관, 농도 (UV280) 및 탁도 (UV350)를 모든 샘플링 시점에 측정하였다 (표 7의 결과). 결과는 48시간 동안 2~8 °C 및 25 °C에서 인큐베이션한 후 큰 변화가 없다는 것을 보여주었다.

표 7

가용성 연구의 외관, 농도 및 탁도 결과, 2-8°C 및 25°C

pH/완충액	단백질	시점	외관	UV280 (mg/ml)	탁도	점도 (cP)
20 mM 히스티딘, pH6.0	80 mg/mL	T0	투명함, 연노랑, 입자 없음	80	0.071	NA
		2-8°C 48H		80	0.075	
		25°C 48H		80	0.068	
	150 mg/mL	T0		146	0.120	24.5
		2-8°C 48H		146	0.110	
		25°C 48H		148	0.093	

[0114]

[0115] IM005를 20 mM 히스티딘, pH 6.0 완충액에서 80 mg/mL 및 150 mg/mL의 표적 농도로 성공적으로 농축시켰다. 단기간 안정성 결과는 48시간 동안 2~8 °C 및 25 °C에서 저장 후 큰 변화가 관찰되지 않았다는 것을 보여주었다. 그것은 IM005이 20 mM 히스티딘, pH 6.0 완충액에서 80 mg/mL 또는 150 mg/mL로 단기간 저장 후 안정하다는 것을 나타냈다.

[0116] pH/완충액 스크리닝 연구는 스트레스 조건 (40 °C) 하에서 9가지 pH/완충액 유형을 조사하였고, 결과는 IM005의 안정성이 pH 및 완충액 유형 둘 다와 밀접하게 관련이 있다는 것을 보여주었다. 낮은 pH, 높은 pH 조건, 및 포스페이트 완충액 하에서 불량한 단백질 안정성이 관찰되었다. 선별된 완충액은 20 mM 히스티딘, pH 6.0 완충액 (F5)이었다.

[0117] 가용성 연구에서, 48시간 동안 2~8 °C 및 25 °C에서 명백한 변화가 관찰되지 않았으며, IM005가 단기간 동안 80 mg/mL 및 150 mg/mL 농도에서 안정하다는 것을 나타낸다. pH/완충액 스크리닝 연구 및 가용성 연구의 결과에 기초하여, 20 mM 히스티딘, pH 6.0 완충액이 생성물에 대한 다음 제제 개발 연구에 사용될 것이다.

[0118] **실시예 4. 부형제의 스크리닝**

[0119] 이 실시예에서는 20 mM 히스티딘, pH 6.0 완충액 시스템에서 IM005 단백질을 안정화시킬 수 있는 후보 부형제를 검사하였다.

[0120] IM005 항체 스톡(stock) 용액을 20 mM 히스티딘 pH 6.0 완충액 시스템으로 교환하였다. 그 다음에, 표 8에서 나열된 부형제를 각각 이 용액에 추가하였다. 단백질 농도를 50 mg/mL로 조정하였다.

표 8

제제 레시피의 후보

번호	단백질 농도	완충액	부형제	계면활성제	pH
F1	50 mg/mL	20 mM 히스티딘	80 g/L 수크로스	0.02% PS 80	6.0
F2			80 g/L 트레할로스		
F3			40 g/L 소르비톨		
F4			40 g/L 만니톨		
F5			140 mM 아르기닌 하이드로클로라이드		
F6			80 g/L 수크로스	NA	

[0121]

[0122] 생물학적 안전성 후드에서 모든 제제 샘플을 결국 0.22 μm PVDF 막 여과기로 여과하고, 2 mL 유리 바이알 (1 mL/바이알)에 채우고, 마개로 막고 밀봉하였다. T0 샘플을 제외하고, 바이알을 25 °C, 40 °C 인큐베이터 및 -40 °C 냉동고에 배치하고, 바이알을 분석을 위해 이들 조건으로부터 제거하였다.

[0123] Advanced 2020 Multi-Sample 삼투압계를 6개의 제제의 오스몰 농도 측정에 사용하였다. 결과는 표 9에서 나타난다.

표 9

부형제 스크리닝 연구의 오스몰 농도 결과: T0

번호	제제 조성	오스몰 농도 (mOsmol/kg)
F1	20 mM 히스티딘, 8% 수크로스, 0.02% PS80, pH 6.0	334
F2	20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, 0.02% PS80, pH 6.0	327
F3	20 mM 히스티딘, 4% 소르비톨, 0.02% PS80, pH 6.0	327
F4	20 mM 히스티딘, 4% 만니톨, 0.02% PS80, pH 6.0	303
F5	20 mM 히스티딘, 140 mM 아르기닌·HCl, 0.02% PS80, pH 6.0	344
F6	20 mM 히스티딘, 8% 수크로스, pH 6.0	332

[0124]

[0125] DSC

[0126] 각각의 제제의 열역학적 안정성을 DSC를 사용하여 검사하였다. 용융 온도 (Tm)는 단백질의 언폴딩의 시작 온도를 유도하고 입체구조적 안정성의 지표로 간주한다.

[0127] 표 10에서 나타난 바와 같이, 전이의 시작 온도는 50.9 °C (F5: 아르기닌·HCl, pH 6.0) 내지 58.6 °C (F2: 트레할로스, pH 6.0)의 범위이다. Tm1은 59.3 °C (F5: 아르기닌·HCl, pH 6.0) 내지 65.2 °C (F1: 수크로스, pH 6.0)의 범위이고, Tm2는 76.7 °C (F5: 아르기닌·HCl, pH 6.0) 내지 78.5 °C (F1: 수크로스, pH 6.0)의 범위이다. 6개 제제 중에서 Tm_{시작}, Tm1 및 Tm2의 최대 차이 값은 각각 7.7 °C, 5.8 °C 및 1.9 °C이다.

표 10

부형제 스크리닝 연구의 DSC 결과

번호	제제 조성	Tm 시작 (°C)	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)
F1	20 mM 히스티딘, 8% 수크로스, 0.02% PS80, pH 6.0	56.2	65.2	78.5
F2	20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, 0.02% PS80, pH 6.0	58.6	64.7	78.1
F3	20 mM 히스티딘, 4% 소르비톨, 0.02% PS80, pH 6.0	57.5	64.2	78.1
F4	20 mM 히스티딘, 4% 만니톨, 0.02% PS80, pH 6.0	58.3	63.9	77.8
F5	20 mM 히스티딘, 140 mM 아르기닌·HCl, 0.02% PS80, pH 6.0	50.9	59.3	76.7
F6	20 mM 히스티딘, 8% 수크로스, pH 6.0	58.2	65.0	78.3

[0128]

[0129] 외관

[0130] 표 11-13에서 나타난 바와 같이, 2 및 4주 동안 40 °C에서 인큐베이션한 후, F6 (PS80 없음)을 제외한 모든 제제에서 가시적 입자가 관찰되지 않았다. 25 °C에서 4주 동안 인큐베이션 한 후, 6개의 제제 모두에서 가시적 입자가 관찰되지 않았다. 냉동-해동 (-40 °C에서 RT까지) 조건 하에서, 냉동-해동의 10 주기 후 F4 (만니톨, pH 6.0)에서 가시적 입자가 관찰되었지만, 다른 5개의 제제에서는 관찰되지 않았다.

[0131] pH

[0132] 6개의 제제의 pH 값을 표 11-13에서 나타난 바와 같이 모든 샘플링 시점에 측정하였다. 결과는 25 °C, 40 °C에서 4주 동안 인큐베이션 후 또는 5 주기 / 10 주기 동안 반복된 냉동-해동 후 pH 값에 큰 변화가 없다는 것을 보

여주었다.

[0133] 단백질 농도 (A280)

[0134] 6개 제제의 단백질 농도를 표 11-13에서 나타난 바와 같이 nanodrop2000, UV280 방법을 사용하여 모든 샘플링 시점에 측정하였다. 결과에서 나타난 바와 같이, 25 °C, 40 °C에서 4주 동안 인큐베이션 후 또는 5 주기 /10 주기 동안 반복된 냉동-해동 후 단백질 농도에 큰 변화가 없었다.

표 11

부형제 스크리닝 연구의 외관, pH, UV280 결과: 40°C

40°C	외관	pH	UV280 (mg/mL)	
F1: 20 mM 히스티딘, 8% 수크로스, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.0	50.6
	2W	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	51.1
	4W	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.2	52.7
F2: 20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	52.0
	2W	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	51.8
	4W	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.2	52.9
F3: 20 mM 히스티딘, 4% 소르비톨, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	50.9
	2W	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	50.6
	4W	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.2	51.5
F4: 20mM 히스티딘, 4% 만니톨, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	51.5
	2W	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	49.9
	4W	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.2	50.7
F5: 20 mM 히스티딘, 140 mM 아르기닌·HCl, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	50.5
	2W	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	50.6
	4W	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.0	51.7
F6: 20 mM 히스티딘, 8% 수크로스, pH 6.0	T0	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	50.8
	2W	흰색입자	6.1	50.9
	4W	흰색입자	6.1	51.5

[0135]

표 12

부형제 스크리닝 연구의 외관, pH, UV280 결과: 25°C

25°C	외관	pH	UV280 (mg/mL)	
F1: 20 mM 히스티딘, 8% 수크로스, 0.02% PS80, H6.0	T0	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.0	50.6
	4W	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	51.9
F2: 20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	52.0
	4W	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.2	52.6
F3: 20 mM 히스티딘, 4% 소르비톨, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	50.9
	4W	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.2	51.6
F4: 20 mM 히스티딘, 4% 만니톨, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	51.5
	4W	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	50.1
F5: 20 mM 히스티딘, 140 mM 아르기닌·HCl, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	50.5
	4W	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	51.8
F6: 20 mM 히스티딘, 8% 수크로스, pH 6.0	T0	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	50.8
	4W	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	51.6

[0136]

표 13

부형제 스크리닝 연구의 외관, pH, UV280 결과: 냉동 해동

냉동 해동: -40°C 에서 RT 까지	외관	pH	UV280 (mg/mL)	
F1: 20 mM 히스티딘, 8% 수크로스, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.0	50.6
	5FT	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	51.5
	10FT	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	52.3
F2: 20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	52.0
	5FT	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	51.9
	10FT	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	52.3
F3: 20 mM 히스티딘, 4%	T0	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	50.9
소르비톨, 0.02% PS80, pH 6.0	5FT	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	50.6
	10FT	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	51.3
F4: 20 mM 히스티딘, 4% 만니톨, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	51.5
	5FT	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	49.5
	10FT	흰색 입자	6.1	49.5
F5: 20 mM 히스티딘, 140 mM 아르기닌·HCl, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	50.5
	5FT	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	51.5
	10FT	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	51.4
F6: 20 mM 히스티딘, 8% 수크로스, pH 6.0	T0	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	50.8
	5FT	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	51.3
	10FT	투명함, 연노랑, 입자 없음	6.1	51.9

[0137]

[0138]

SEC-HPLC

[0139]

40 °C에서의 SEC-HPLC 결과는 표 14에 나타나있다. F1 내지 F6, %주요 피크는 각각 3.3%, 3.2%, 3.4%, 2.8%, 2.7% 및 2.2% 만큼 감소하였다. 그리고 %HMW는 각각 2.3%, 2.2%, 2.5%, 1.8%, 1.7% 및 1.3% 만큼 증가하였다. 한편, %LMW는 각각 1.0%, 0.9%, 0.9%, 1.0%, 1.0% 및 1.0% 만큼 증가하였다.

표 14

부형제 스크리닝 연구의 SEC-HPLC 결과: 40°C

40°C		SEC-HPLC		
		%HMW	%주요 피크	%LMW
F1: 20 mM 히스티딘, 8% 수크로스, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	0.6	99.4	NA
	40-2W	2.2	97.3	0.5
	40-4W	2.9	96.1	1.0
F2: 20mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	0.7	99.3	NA
	40-2W	2.3	97.3	0.4
	40-4W	2.9	96.1	0.9
F3: 20 mM 히스티딘, 4% 소르비톨, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	0.6	99.4	NA
	40-2W	2.3	97.3	0.4
	40-4W	3.1	96.0	0.9
F4: 20 mM 히스티딘, 4% 만니톨, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	1.4	98.6	A
	40-2W	2.7	96.9	0.4
	40-4W	3.2	95.8	1.0
F5: 20 mM 히스티딘, 140 mM 아르기닌·HCl, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	0.7	99.3	NA
	40-2W	2.1	97.4	0.5
	40-4W	2.4	96.6	1.0
F6: 20 mM 히스티딘, 8% 수크로스, pH 6.0	T0	0.6	99.4	NA
	40-2W	1.3	98.2	0.5
	40-4W	1.9	97.2	1.0

[0140]

[0141] 25 °C에서의 SEC-HPLC 결과는 표 15에 나타나있다. 이들 결과는 25 °C에서 4주 동안 인큐베이션 후 %주요 피크에 큰 감소가 없다는 것을 나타낸다.

표 15

부형제 스크리닝 연구의 SEC-HPLC 결과: 25°C

25°C		SEC-HPLC		
		%HMW	%주요 피크	%LMW
F1: 20 mM 히스티딘, 8% 수크로스, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	0.6	99.4	NA
	25-4W	1.2	98.6	0.3
F2: 20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	0.7	99.3	NA
	25-4W	1.1	98.7	0.2
F3: 20 mM 히스티딘, 4% 소르비톨, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	0.6	99.4	NA
	25-4W	1.0	98.8	0.2
F4: 20 mM 히스티딘, 4% 만니톨, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	1.4	98.6	NA
	25-4W	1.6	98.2	0.2
F5: 20 mM 히스티딘, 140 mM 아르기닌·HCl, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	0.7	99.3	NA
	25-4W	1.2	98.5	0.3
F6: 20 mM 히스티딘, 8% 수크로스, pH 6.0	T0	0.6	99.4	NA
	25-4W	0.9	99.0	0.2

[0142]

[0143] 냉동-해동 (-40 °C에서 RT까지) 조건 하에서의 SEC-HPLC 결과는 표 16에 나타나있으며 이는 %주요 피크는 4.4% 만큼 감소하지만 %HMW는 4.4% 만큼 증가하는 F4 (만니톨, pH 6.0)를 제외하고, 냉동-해동의 10 주기 후 이들 제에 큰 변화가 없다는 것을 보여준다.

표 16

부형제 스크리닝 연구의 SEC-HPLC 결과: 냉동-해동

냉동 해동: -40°C 에서 RT 까지		SEC-HPLC		
		%HMW	%주요 피크	%LMW
F1: 20 mM 히스티딘, 8% 수크로스, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	0.6	99.4	NA
	5FT	0.6	99.4	NA
	10FT	0.7	99.3	NA
F2: 20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	0.7	99.3	NA
	5FT	0.7	99.3	NA
	10FT	0.7	99.3	NA
F3: 20 mM 히스티딘, 4% 소르비톨, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	0.6	99.4	NA
	5FT	0.7	99.3	NA
	10FT	0.7	99.3	NA
F4: 20 mM 히스티딘, 4% 만니톨, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	1.4	98.6	NA
	5FT	3.9	96.1	NA
	10FT	5.8	94.2	NA
F5: 20 mM 히스티딘, 140 mM 아르기닌·HCl, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	0.7	99.3	NA
	5FT	0.7	99.3	NA
	10FT	0.7	99.3	NA
F6: 20 mM 히스티딘, 8% 수크로스, pH 6.0	T0	0.6	99.4	NA
	5FT	0.6	99.4	NA
	10FT	0.6	99.4	NA

[0144]

[0145] Caliper-SDS (nr)

[0146] Caliper-SDS는 CE-기반 고처리량 분석 방법이며, 이는 높은 민감도로 단클론성 항체의 단편화를 검출하는데 사

용된다. 40 °C에서의 Caliper-SDS (nr) 결과는 표 17에 나타나있다. 6개의 제제 모두에서 %순도 감소가 관찰되었다. F1에서 F6까지, %순도는 각각 5.8%, 3.7%, 4.4%, 4.9%, 4.8% 및 4.6% 만큼 감소되었다. 그것들 중에서, F2 (트레할로스 디하이드레이트, pH 6.0)는 가장 작은 %순도 감소를 보여주었다.

표 17

부형제 스크리닝 연구의 Caliper-SDS (nr) 결과: 40°C

40°C		Caliper-SDS(nr)
		%순도
F1: 20 mM 히스티딘, 8% 수크로스, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	98.3
	40-2W	95.4
	40-4W	92.5
F2: 20mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, 0.02% PS80, pH6.0	T0	98.0
	40-2W	95.8
	40-4W	94.3
F3: 20mM 히스티딘, 4% 소르비톨, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	98.2
	40-2W	95.1
	40-4W	93.8
F4: 20 mM 히스티딘, 4% 만니톨, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	98.2
	40-2W	95.6
	40-4W	93.3
F5: 20 mM 히스티딘, 140 mM 아르기닌·HCl, 0.02%PS80, pH 6.0	T0	98.1
	40-2W	95.4
	40-4W	93.3
F6: 20 mM 히스티딘, 8% 수크로스, pH 6.0	T0	98.1
	40-2W	95.9
	40-4W	93.5

[0147]

[0148]

25 °C에서의 Caliper-SDS (nr) 결과는 표 18에 나타나있다. 결과는 %순도가 1% 만큼 감소된 F5 (아르기닌·HCl, pH 6.0)를 제외하면, 25 °C에서 4주 동안 인큐베이션 후 이들 제제에 큰 변화는 없었다는 것을 나타낸다.

표 18

부형제 스크리닝 연구의 Caliper-SDS (nr) 결과: 25°C

25°C		Caliper-SDS(nr)
		%순도
F1: 20 mM 히스티딘, 8% 수크로스, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	98.3
	40-4W	97.7
F2: 20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	98.0
	40-4W	97.6
F3: 20 mM 히스티딘, 4% 소르비톨, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	98.2
	40-4W	97.7
F4: 20 mM 히스티딘, 4% 만니톨, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	98.2
	40-4W	97.9
F5: 20 mM 히스티딘, 140 mM 아르기닌·HCl, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	98.1
	40-4W	97.1
F6: 20 mM 히스티딘, 8% 수크로스, pH6.0	T0	98.1
	40-4W	97.9

[0149]

[0150]

냉동-해동 (-40 °C에서 RT까지) 조건 하에서의 Caliper-SDS (nr) 결과는 표 19에 나타나있다. 결과는 냉동-해동의 10 주기 후 6개 제제 모두의 %순도에 큰 변화가 없다는 것을 나타낸다.

표 19

부형제 스크리닝 연구의 Caliper-SDS (nr) 결과: 냉동-해동

냉동 해동: -40°C 에서 RT 까지	Caliper-SDS(ru)	
		%순도
F1: 20 mM 히스티딘, 8% 수크로스, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	98.3
	5FT	98.3
	10FT	98.1
F2: 20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	98.0
	5FT	98.1
	10FT	97.9
F3: 20 mM 히스티딘, 4% 소르비톨, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	98.2
	5FT	98.1
	10FT	98.2
F4: 20mM 히스티딘, 4% 만니톨, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	98.2
	5FT	98.1
	10FT	98.0
F5: 20 mM 히스티딘, 140 mM 아르기닌·HCl, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	98.1
	5FT	98.1
	10FT	98.0
F6: 20 mM 히스티딘, 8% 수크로스, pH 6.0	T0	98.1
	5FT	98.1
	10FT	98.2

[0151]

[0152]

cIEF

[0153]

40 °C에서의 cIEF 결과는 표 20에 나타나있다. 산성 피크의 증가 및 주요 피크의 감소가 6개 제제 모두에서 관찰되었다. F1에서 F6까지, %주요 피크는 각각 23.2%, 22.2%, 19.4%, 21.6%, 16.0% 및 19.8% 만큼 감소하였다. 그리고 %산성 피크는 각각 24.8%, 21.6%, 18.6%, 21.0%, 18.0% 및 18.0% 만큼 증가하였다. %염기성 피크의 명백한 변화가 없다는 것에 주목할 필요가 있다.

표 20

부형제 스크리닝 연구의 cIEF 결과: 40°C

40°C		cIEF		
		%산성 피크	%주요 피크	%염기성 피크
F1: 20 mM 히스티딘, 8% 수크로스, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	16.2	60.7	23.1
	40-2W	29.1	48.1	22.8
	40-4W	41.0	37.5	21.5
F2: 20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	17.3	61.6	21.2
	40-2W	29.5	48.8	21.6
	40-4W	38.9	39.4	21.7
F3: 20 mM 히스티딘, 4% 소르비톨, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	17.1	61.3	21.6
	40-2W	29.6	48.0	22.5
	40-4W	35.7	41.9	22.3
F4: 20 mM 히스티딘, 4% 만니톨, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	18.3	60.0	21.7
	40-2W	29.7	48.4	21.9
	40-4W	39.3	38.4	22.3
F5: 20 mM 히스티딘, 140 mM 아르기닌·HCl, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	17.8	60.0	22.1
	40-2W	27.9	50.7	21.4
	40-4W	35.8	44.0	20.2
F6: 20 mM 히스티딘, 8% 수크로스, pH 6.0	T0	17.8	60.9	21.3
	40-2W	26.0	50.6	23.5
	40-4W	35.8	41.1	23.1

[0154]

[0155] 25 °C에서 4주 인큐베이션 후, cIEF 결과는 표 21에 나타나있다. 6개 제제의 %산성 피크는 %주요 피크가 감소함에 따라 증가하였다. F1에서 F6까지, %주요 피크는 각각 5.8%, 5.4%, 7.5%, 5.4%, 5.2% 및 4.3% 만큼 감소하였지만; %산성 피크는 각각 6.8%, 4.2%, 7.3%, 4.5%, 5.8% 및 2.9% 만큼 증가하였다.

표 21

부형제 스크리닝 연구의 cIEF 결과: 25°C

25°C		cIEF		
		% 산성 피크	%주요 피크	%염기성 피크
F1: 20 mM 히스티딘, 8% 수크로스, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	16.2	60.7	23.1
	25-4W	23.0	S4.9	22.2
F2: 20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, 0.02%PS80, pH 6.0	T0	17.3	61.6	21.2
	25-4W	21.5	S6.2	22.3
F3: 20mM 히스티딘, 4% 소르비톨, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	17.1	61.3	21.6
	25-4W	24.4	S3.8	21.8
F4: 20 mM 히스티딘, 4% 만니톨, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	18.3	60.0	21.7
	25-4W	22.8	S4.6	22.6
F5: 20 mM 히스티딘, 140 mM 아르기닌·HCl, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	17.8	60.0	22.1
	25-4W	23.6	S4.8	21.6
F6: 20 mM 히스티딘, 8% 수크로스, pH6.0	T0	17.8	60.9	21.3
	25-4W	20.7	S6.6	22.7

[0156]

[0157] 표 22는 냉동-해동 실험의 cIEF 결과를 보여준다. 결과는 6개 제제의 전하가 냉동-해동의 10 주기 후 크게 변하지 않았다는 것을 나타낸다.

표 22

부형제 스크리닝 연구의 cIEF 결과: 냉동-해동

냉동-해동: -40°C 에서 RT 까지		cIEF		
		%산성 피크	%주요 피크	%염기성 피크
F1: 20 mM 히스티딘, 8% 수크로스, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	16.2	60.7	23.1
	5FT	18.2	59.9	21.9
	10FT	17.2	60.8	22.0
F2: 20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	17.3	61.6	21.2
	5FT	17.2	61.3	21.5
	10FT	18.1	60.3	21.6
F3: 20 mM 히스티딘, 4% 소르비톨, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	17.1	61.3	21.6
	5FT	18.1	60.6	21.3
	10FT	18.3	60.6	21.1
F4: 20mM 히스티딘, 4% 만니톨, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	18.3	60.0	21.7
	5FT	17.3	60.8	21.9
	10FT	17.5	61.3	21.2
F5: 20 mM 히스티딘, 140 mM 아르기닌·HCl, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	17.8	60.0	22.1
	5FT	17.9	60.8	21.3
	10FT	17.8	60.8	21.4
F6: 20 mM 히스티딘, 8% 수크로스, pH 6.0	T0	17.8	60.9	21.3
	5FT	17.5	60.8	21.7
	10FT	17.4	61.0	21.6

[0158]

[0159] MFI

[0160] 각각의 제제의 불용성(Sub-visible) 입자를 표 23에서 나타난 바와 같이 MFI 5200 Flow Microscope를 사용하여 검출하였다. MFI 결과는, F1에서 F5까지, T0에서의 입자 (2 μm 이상의 입자 크기)의 수가 동일한 수준이라는

것을 보여주었다. 하지만, F6 (PS80 없음)에서 테스트된 입자 (2 μm 이상의 입자 크기 및 10 μm 이상의 입자 크기)의 수는 다른 5개의 제제보다 비교적 훨씬 더 많았다.

[0161] 냉동-해동의 10 주기 후, F3 (소르비톨, pH 6.0)에서 입자 (2 μm 이상의 입자 크기)의 수는 1043/mL에서 28428/mL로 증가하였고, 입자 (10 μm 이상의 입자 크기)의 수는 61/mL에서 672/mL로 각각 증가하였다. 이에 더하여, 다른 제제 샘플에서는 큰 변화가 관찰되지 않았다.

표 23

부형제 스크리닝 연구의 MFI 결과: 냉동-해동

냉동-해동: -40°C 에서 RT 까지		불용성 입자(입자/mL)		
		ECD ≥ 2μm	ECD ≥ 10μm	ECD ≥ 25μm
F1: 20 mM 히스티딘, 8% 수크로스, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	866	9	0
	10FT	328	12	0
F2: 20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	174	38	5
	10FT	238	15	5
F3: 20 mM 히스티딘, 4% 소르비톨, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	1043	61	14
	10FT	28428	672	15
F4: 20 mM 히스티딘, 4% 만니톨, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	976	40	4
	10FT	4090	166	22
F5: 20 mM 히스티딘, 140 mM 아르키닌·HCl, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	2096	68	4
	10FT	1679	25	0
F6: 20 mM 히스티딘, 8% 수크로스, pH 6.0	T0	10448	507	15
	10FT	5313	363	7

[0162]

[0163] 결합 항원

[0164] 결합 항원 방법은 단클론성 항체 결합 활성을 검출하는데 사용되는 ELISA-기반 방법이다. 결과는 표 24에 나타나 있다. 25 °C 및 40 °C에서 인큐베이션 4주 후, F2 (트레할로스 디하이드레이트, pH 6.0)의 결합 항원 활성의 명백한 감소는 없었다.

표 24

F2의 부형제 스크리닝 연구의 결합 항원 결과

제제	조건	결합 항원 효능
F2: 20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	116%
	25°C-4W	115%
	40°C-4W	102%

[0165]

[0166] 40 °C, 25 °C 및 냉동-해동 (-40 °C에서 RT까지) 조건 하에서 6개 제제의 안정성을 이 부형제 스크리닝 연구에서 조사하였다. 40 °C에서 인큐베이션 4주 후, F6 (PS80 없음)에서 가시적 입자가 관찰되었다. 게다가, T0에서 F6에서 테스트된 불용성 입자의 수는 다른 제제에서보다 훨씬 더 많았으며, 이는 PS80이 입자의 응집을 억제하는데 중요한 역할을 한다는 것을 나타낸다. SEC-HPLC 결과는 F3 (소르비톨, pH 6.0)이 %순도의 최대 감소를 보여주었다는 것을 나타냈다. 이에 더하여, caliper-SDS (비-환원성) 결과는 F1 (수크로스, pH 6.0)이 %순도의 가장 큰 감소를 보여주었지만 F2 (트레할로스, pH 6.0)는 가장 작은 감소를 보여주었다는 것을 나타낸다. cIEF 결과에서 나타난 바와 같이, 가장 큰 변화는 F1 (수크로스, pH 6.0)에서 관찰되었다.

[0167] 25 °C에서 인큐베이션 4주 후, 6개 제제 모두에서 가시적 입자가 관찰되지 않았다. SEC-HPLC 결과는 6개 제제에서 명백한 순도 감소가 없다는 것을 보여주었다. Caliper-SDS (비-환원성) 결과는 FS (아르기닌·HCl, pH 6.0)를 제외한 이들 제제에서 큰 변화가 없다는 것을 나타냈다. 그리고 cIEF 결과는 F3 (소르비톨, pH 6.0)의 전하가 가장 많이 변했다는 것을 보여주었다.

[0168] 냉동-해동 (-40 °C에서 RT까지)의 실험에서, 냉동-해동의 10 주기 후 F4 (만니톨, pH 6.0)에서 다수의 가시적

입자가 관찰되었고, SEC-HPLC 결과는 이 제제의 주요 피크가 4.4% 만큼 감소되었다는 것을 보여주었다. 이들 6개 제제 모두의 Caliper-SDS (비-환원성) 및 cIEF 결과에서 큰 변화는 없었다. MFI 결과는 F3 (소르비톨, pH 6.0)의 불용성 입자의 수가 냉동-해동 10주기 후 증가했다는 것을 나타냈다.

[0169] 상기 결과에 기초하여, F1 (수크로스, pH 6.0), F3 (소르비톨, pH 6.0) 및 F4 (만니톨, pH 6.0)는 불량한 성능을 보여주었다. Caliper-SDS (비-환원성) 결과는 F5 (아르기닌·HCl, pH 6.0)의 %순도가 25 °C에서 4주 인큐베이션 후 감소했다는 것을 나타냈다. 그리고 DSC 결과는 F5의 T_{m시작} (°C) 값이 다른 제제보다 적어도 5 °C 더 낮은 것을 보여주었다. 결론적으로, F2 (트레할로스 디하이드레이트, pH 6.0)은 다른 제제보다 더 나은 성능을 나타냈다. 그러므로, F2 (트레할로스 디하이드레이트, pH 6.0)가 추후의 계면활성제 스크리닝 연구에 사용될 것이다.

[0170] **실시예 5. 계면활성제 스크리닝**

[0171] 이 실시예는 IM005 단백질을 안정화시키기 위한 PS80의 최적의 농도에 대해 스크리닝하였다.

[0172] IM005 항체 (20.4 mg/mL)를 20 mM 히스티딘, pH 6.0 완충액으로 교환하였다. 트레할로스 디하이드레이트의 농도를 스톱 용액을 이용하여 8%로 조정하였다. 그 다음에, PS80의 10% 스톱 용액을 추가하여 표 25에서 기재된 바와 같이 최종 PS80 농도를 각각 0, 0.01%, 0.02% 및 0.03%로 만들었다. 단백질의 농도는 50 mg/mL로 조정하였다.

표 25

계면활성제 스크리닝을 위한 제제

번호	단백질	완충액	부형제	계면활성제 (PS 80)	pH
F1	50 mg/mL	20 mM 히스티딘, pH 6.0	8% 트레할로스 디하이드레이트	0	6.0
F2				0.01%	
F3				0.02%	
F4				0.03%	

[0173]

[0174] 제조된 제제를 0.22 μm PVDF 막 여과기로 무균성으로 여과하였다. 각각의 제제에 대해, 샘플 1 mL를 2 mL 유리 바이알에 채웠다. 바이알을 채운 직후 마개로 막고 크림핑하였다. 크림핑 조작을 제외한 모든 과정을 생물학적 안전성 후드에서 수행하였다.

[0175] 바이알을 교반 조건 (300 rpm 및 25 °C)에 배치하였다. 샘플을 명시된 시점에 분석하였다.

[0176] 오스몰 농도

[0177] T0에서 F1-F4의 오스몰 농도를 삼투압계 (Advanced 2020 Multi-Sample)를 사용하여 결정하였다. 오스몰 농도 데이터는 표 26에 나타나있다.

표 26

계면활성제 스크리닝 연구의 T0에서의 오스몰 농도 결과

번호	제제	오스몰 농도 (mOsmol/kg)
F1	20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, pH 6.0	330
F2	20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, 0.01% PS80, pH 6.0	328
F3	20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, 0.02% PS80, pH 6.0	327
F4	20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, 0.03% PS80, pH 6.0	329

[0178]

[0179] DSC

[0180] T0에서 각각의 제제 (F1-F4)의 열역학적 안정성을 DSC를 사용하여 검사하였다. 표 27에서 나타난 바와 같이, 모든 제제의 시작 전이 온도는 56.30 °C 내지 57.39 °C의 범위이다. T_{m1} 값은 64.39 °C 내지 65.23 °C의 범위이고 T_{m2} 값은 78.60 °C 내지 78.90 °C의 범위에 있다. 4개의 제제 중에서 열역학적 전이 프로파일에 큰 차이는 없었

다.

표 27

계면활성제 스크리닝 연구의 DSC 결과

번호	제제	T _m 시작 (0°C)	T _{m1} (0°C)	T _{m2} (0°C)
F1	20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, pH 6.0	57.30	64.57	78.50
F2	20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, 0.01% PS80, pH 6.0	56.30	65.23	78.62
F3	20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, 0.02% PS80, pH 6.0	57.39	65.22	78.60
F4	20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, 0.03% PS80, pH 6.0	56.57	64.39	78.90

[0181]

[0182] 외관, pH, 단백질 농도

[0183] 시각적 점검 결과는 표 28에 나타나있다. 1일 및 3일 동안 교반 (300 rpm, 25 °C) 후 F1 (PS80 없음)에서 많은 가시적 입자가 관찰되었다. 그에 반해, 동일한 교반 조건 하에서 F2 (0.01% PS80), F3 (0.02% PS80) 및 F4 (0.03% PS80)에서는 가시적 입자가 관찰되지 않았다.

[0184] F1-F4의 pH 값을 모든 샘플링 시점에 검사하였다. 표 28에서 나타난 바와 같이, 25 °C에서 3일 동안 교반한 후 pH 값의 큰 변화는 없었다.

[0185] F1-F4의 단백질 농도를 모든 샘플링 시점에 nanodrop2000 (UV280 방법)을 사용하여 측정하였다. 표 28에서 나타난 바와 같이, 25 °C에서 3일 동안 교반한 후 단백질 농도의 큰 변화는 검출되지 않았다.

표 28

계면활성제 스크리닝 연구의 외관, pH 및 농도 결과: 교반

교반: 25°C, 300rpm	외관	pH	UV280 (mg/mL)	
F1: 20mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, pH 6.0	T0	연노랑, 약간 유백색, 가시적인 입자 없음	6.0	51.1
	1D	많은 가시적인 흰색 입자	6.1	49.8
	3D	많은 가시적인 흰색 입자	6.1	50.2
F2: 20mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, 0.01% PS80, pH 6.0	T0	연노랑, 약간 유백색, 가시적인 입자 없음	6.0	50.8
	1D	연노랑, 약간 유백색, 가시적인 입자 없음	6.1	51.6
	3D	연노랑, 약간 유백색, 가시적인 입자 없음	6.1	50.3
F3: 20mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	연노랑, 약간 유백색, 가시적인 입자 없음	6.0	50.1
	1D	연노랑, 약간 유백색, 가시적인 입자 없음	6.1	50.3
	3D	연노랑, 약간 유백색, 가시적인 입자 없음	6.1	50.4
F4: 20mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, 0.03% PS80, pH 6.0	T0	연노랑, 약간 유백색, 가시적인 입자 없음	6.0	49.9
	1D	연노랑, 약간 유백색, 가시적인 입자 없음	6.1	50.6
	3D	연노랑, 약간 유백색, 가시적인 입자 없음	6.1	50.2

[0186]

[0187] SEC-HPLC

[0188] SEC-HPLC 데이터는 표 29에 나타나있다. F1-F4에 대해, 25 °C에서 3일 동안 교반한 후 %주요 피크의 큰 변화는 관찰되지 않았다.

표 29

계면활성제 스크리닝 연구의 SEC-HPLC 결과: 교반

교반: 25°C, 300 rpm		SEC-HPLC		
		%HMW	%주요 피크	%LMW
F1: 20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, pH 6.0	T0	0.6	99.4	NA
	1D	0.6	99.4	NA
	3D	0.7	99.3	NA
F2: 20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, 0.01% PS80, pH6.0	T0	0.7	99.3	NA
	1D	0.7	99.3	NA
	3D	0.7	99.3	NA
F3: 20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	0.7	99.3	NA
	1D	0.7	99.3	NA
	3D	0.7	99.3	NA
F4: 20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, 0.03% PS80, pH 6.0	T0	0.7	99.3	NA
	1D	0.7	99.3	NA
	3D	0.7	99.3	NA

[0189]

[0190] Caliper-SDS (nr)

[0191] Caliper-SDS는 마이크로칩 및 CE 기반 고처리량 분석 방법이며, 이것은 높은 민감도로 단클론성 항체 단편을 검출할 수 있다. Caliper-SDS (nr)의 결과는 표 30에 나타나있다. 모든 제제 (F1-F4)에 대해, 25 °C에서 3일 동안 교반한 후 큰 %순도 감소가 관찰되지 않았다.

표 30

계면활성제 스크리닝 연구의 Caliper-SDS (nr) 결과: 교반

교반: 25°C, 300 rpm		Caliper-SDS (nr)
		%순도
F1: 20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, pH 6.0	T0	99.0
	1D	99.0
	3D	99.0
F2: 20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, 0.01% PS80, pH6.0	T0	99.0
	1D	99.0
	3D	99.0
F3: 20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	99.0
	1D	98.9
	3D	98.9
F4: 20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, 0.03% PS80, pH6.0	T0	99.0
	1D	99.0
	3D	99.0

[0192]

[0193] cIEF

[0194] cIEF 데이터는 표 31에 나타나있다. 모든 제제에 대해, 25 °C에서 3일 동안 교반한 후 전하 변형체의 큰 변화는 관찰되지 않았다.

표 31

계면활성제 스크리닝 연구의 cIEF 결과: 교반

교반: 25°C, 300 rpm		cIEF		
		%산성 피크	%주요 피크	%염기성 피크
F1: 20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, pH6.0	T0	19.2	59.3	21.5
	1D	20.5	57.2	22.3
	3D	20.2	57.6	22.2
F2: 20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, 0.01% PS80, pH 6.0	T0	21.1	57.7	21.1
	1D	19.9	59.3	20.8
	3D	19.6	59.0	21.4
F3: 20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, 0.02% PS80, pH 6.0	T0	20.8	58.2	21.0
	1D	20.4	57.9	21.7
	3D	21.3	57.0	21.7
F4: 20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, 0.03% PS80, pH 6.0	T0	19.2	58.4	22.4
	1D	19.4	58.2	22.3
	3D	20.1	58.6	21.4

[0195]

[0196] MFI

[0197] 불용성 입자 검출을 MicroFlow Image (MFI5200)를 사용하여 수행하였다. MFI 데이터는 표 29에 나타나있다. T0의 샘플링 시점에, 입자 크기가 25 µm 이상인 입자의 수는 F1-F4에 대해 동일한 수준이었다. 하지만, F1 (PS80 없음)에서 입자 크기가 10 µm 이상 및 25 µm 이상인 입자의 수는 다른 제제 (F2, F3 및 F4)보다 훨씬 더 많았다.

[0198] 25 °C에서 3일 동안 교반한 후, F1 (PS80 없음)에 대해, 입자 크기가 2 µm 이상인 입자의 수는 715 입자/mL에서 2585 입자/mL로 증가하였고, 입자 크기가 10 µm 이상인 입자의 수는 53 입자/mL에서 579 입자/mL로 wmdr가 하였고, 입자 크기가 25 µm 이상인 입자의 수는 4 입자/mL에서 392 입자/mL로 각각 증가하였다. 3일 동안 교반한 후 F3 (0.02% PS80) 및 F4 (0.03% PS80)에서 큰 차이가 관찰되지 않았다. F2에서 입자 크기가 2 µm 이상인 입자의 수는 112 입자/mL에서 1266 입자/mL로 증가하였지만, 입자 크기가 10 µm 이상 및 25 µm 이상인 입자의 수는 크게 변하지 않았다.

표 32

계면활성제 스크리닝 연구의 MFI 결과: 교반

교반: 25°C, 300 rpm		불용성 입자(입자/mL)		
		ECD ≥ 2 µm	ECD ≥ 10 µm	ECD ≥ 25 µm
F1: 20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, pH 6.0	T0	715	53	4
	1D	1297	38	15
	3D	2585	579	392
F2: 20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, 0.01% PS80, pH6.0	T0	112	5	4
	1D	369	14	4
	3D	1266	15	2
F3: 20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, 0.02% PS80, pH6.0	T0	217	15	5
	1D	174	9	2
	3D	243	2	7
F4: 20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, 0.03% PS80, pH6.0	T0	60	4	0
	1D	192	0	0
	3D	336	5	2

[0199]

[0200] 모든 제제 후보 (F1-F4)에 대해, 300 rpm으로 25 °C에서 교반한 후 SEC-HPLC, Caliper-SDS (비-환원성) 및 cIEF의 데이터로부터 큰 변화가 관찰되지 않았다. 하지만, 1일 및 3일 교반한 후 시각적 점검을 통해 F1 (PS80

없음)에서 가시적 입자가 관찰되었지만, F2-F4 (상이한 농도로 PS80을 가짐)에서는 가시적 입자가 관찰되지 않았다. MFI 결과에서 나타난 바와 같이, F1 (PS80 없음)에서 불용성 입자의 수는 크게 증가하였고, F2 (0.01% PS80)에서 입자 크기가 2 μm 이상인 불용성 입자의 수가 또한 증가하였지만, F3 (0.02% PS80) 및 F4 (0.03% PS80)에서 명백한 변화는 검출되지 않았다.

[0201] 그러므로 결과는 교반 조건 하에서 입자 생성을 억제하는데 있어서 PS80이 중요한 역할을 한다는 것을 보여주었다. 하지만, PS80은 장기간 저장 동안에 분해될 가능성이 크며, 이것은 단백질 생성물의 안정성을 감소시킬 수 있다. 그러므로, 단백질 보호 능력이 보장될 때 더 낮은 PS80 농도가 권장될 것이다. 종합해보면, 0.02%가 IM005에 대한 PS80의 최종 선별된 농도였다.

[0202] 계면활성제 스크리닝 연구는 PS80가 입자 생성을 억제하는데 있어서 중요한 역할을 하고 0.02% PS80이 최종적으로 선별되었다는 것을 나타냈다. 부형제 및 계면활성제 스크리닝 연구 둘 다의 결과에 기초하여, pH 6.0에서 20 mM 히스티딘, 8% 트레할로스 디하이드레이트, 0.02% PS80이 들어있는 제제가 최종 제제 확인 연구에 사용될 것이다.

[0203] 부형제 스크리닝 연구를 5가지 종류의 부형제를 각각 40 °C, 25 °C 및 냉동-해동 조건 하에서 조사함으로써 실행하였다. 트레할로스 디하이드레이트가 들어있는 제제가 다른 4개의 부형제와 비교하여 가장 좋은 성능을 나타냈으며, 따라서 추후 계면활성제 스크리닝 연구를 위해 선별되었다.

[0204] **실시예 6. 제제 확인**

[0205] 실시예 4에서 결정된 바와 같이 IM005에 대한 선두 제제를 확인하기 위한 연구를 실행하였다. 선두 제제는 pH 6.0에서 20 mM 히스티딘 완충액, 8% (w/v) 트레할로스 디하이드레이트, 0.02% (w/v) PS80을 포함하였다.

[0206] 생물학적 안전성 후드에서 IM005 샘플 (51.7 mg/mL)을 0.22-μm 여과기로 여과하고, 바이알 당 3.3 mL IM005가 들어있는 8 mL 유리 바이알에 무균성으로 채워넣었고, 마개를 막고 밀봉하였다.

[0207] **외관**

[0208] 대부분의 샘플의 외관은 표 33에 요약되어 있다. 모든 샘플은 가시적 입자가 없는 연노랑의 약간의 유백색 액체이다. 40 °C -2W 샘플에서만, 입자가 관찰되었지만, 40 °C-4W 샘플에서는 가시적 입자가 관찰되지 않았다.

표 33

제제 확인의 외관 평가

조건	T0	샘플링 시점 및 검정			
		2W	4W	SW	12W
2-8°C	연노랑, SO, 입자 없음	/	연노랑, SO, 입자 없음	/	연노랑, SO, 입자 없음
25°C		/	연노랑, SO, 입자 없음	연노랑, SO, 입자 없음	/
40°C		연노랑, SO, 1 입자	연노랑, SO, 입자 없음	/	/

SO = 약간 유백색

[0209]

[0210] **불용성 입자 (MFI)**

[0211] 각 샘플에서 불용성 입자의 수는 표 34에 요약되어 있고 불용성 입자는 모든 샘플에서 제어 중에 있었다. 또한 T0 샘플과 비교하여 불용성 입자의 수의 명백한 변화는 없었다.

표 34

제제 확인의 불용성 입자 결과

조건	T0		샘플링 시점 및 검정							
			2W		4W		8W		12W	
	≥ 10 μm	≥ 25 μm	≥ 10 μm	≥ 25 μm	≥ 10 μm	≥ 25 μm	≥ 10 μm	≥ 25 μm	≥ 10 μm	≥ 25 μm
2~8°C	17	2	/	/	2	0	/	/	14	0
25°C			/	/	/	/	20	0	/	/
40°C			/	/	9	1	/	/	/	/

단위 = 개수/mL

[0212]

[0213] pH 및 단백질 농도

[0214] pH 및 단백질 농도 결과는 표 35-36에 요약되어 있다. 모든 샘플의 pH 및 단백질 농도는 안정하였다.

표 35

제제 확인의 pH 결과

조건	T0	샘플링 시점 및 검정			
		2W	4W	8W	12W
2~8°C	6.0	/	6.0	/	6.0
25°C		/	6.0	6.1	/
40°C		6.1	6.0	/	/

[0215]

표 36

제제 확인의 단백질 농도 결과

조건	T0	샘플링 시점 및 검정			
		2W	4W	8W	12W
2~8°C	46.3	/	48.0	I	46.3
25°C		/	48.1	46.5	/
40°C		47.7	46.7	/	/

단위 = mg/mL

[0216]

[0217] SEC-HPLC

[0218] SEC 결과는 표 37에 요약되어 있다. 2-8 °C 샘플의 주요 피크의 명백한 감소는 나타나지 않았다. 25 °C 샘플에 대해, 25 °C-8W의 주요 피크는 T0과 비교하여 1.0% 만큼 감소하였고 HMW는 0.8% 만큼 증가하였다. 40 °C 샘플에 대해, 40 °C-4W의 주요 피크는 T0과 비교하여 4.0% 만큼 감소하였고 HMW는 3.5% 만큼 증가하였다. 이 추세는 이전의 제제 스크리닝 연구의 결과와 일치한다.

표 37

제제 확인의 SEC 결과

조건	T0			샘플링 시점 및 검정					
				2W			4W		
면적	주요 피크 %	HMW %	LMW %	주요 피크 %	HMW %	LMW %	주요 피크 %	HMW %	LMW %
2~8°C	98.5	1.5	0.0	/	/	/	98.4	1.6	0.0
25°C				/	/	/	97.9	2.0	0.1
40°C				96.6	3.0	0.3	94.5	5.0	0.6

조건	T0			샘플링 시점 및 검정					
				8W			12W		
면적	주요 피크 %	HMW %	LMW %	주요 피크 %	HMW %	LMW %	주요 피크 %	HMW %	LMW %
2~8°C	98.5	1.5	0.0	/	/	/	98.2	1.7	0.1
25°C				97.5	2.3	0.2	/	/	/
40°C				/	/	/	/	/	/

[0219]

[0220] CE-SDS (r & nr)

[0221] CE-SDS 환원성 및 비-환원성 결과는 표 38-39에 요약되어 있다. CE-SDS 환원성 결과에 대해, 2-8 °C 샘플의 순도의 명백한 감소는 나타나지 않았다. 25 °C 샘플에 대해, 25 °C-8W의 순도는 T0와 비교하여 0.6% 만큼 감소하였다. 40 °C 샘플에 대해, 40 °C-4W의 순도는 T0와 비교하여 2.3% 만큼 감소하였다. CE-SDS 비-환원성 결과에 대해, 2-8 °C 샘플의 순도의 명백한 감소는 나타나지 않았다. 25 °C 샘플에 대해, 25 °C-8W의 순도는 T0와 비교하여 2.3% 만큼 감소하였다. 40 °C 샘플에 대해, 40 °C-4W의 순도는 T0와 비교하여 5.6% 만큼 감소하였다. 이 추세는 이전의 제제 스크리닝 연구의 결과와 일치한다.

표 38

제제 확인의 CE-SDS (환원성) 결과

조건	T0			샘플링 시점 및 검정					
				2W			4W		
면적	HC %	LC %	순도 %	HC %	LC %	순도 %	HC %	LC %	순도 %
2~8°C	33.5	64.8	98.3	/	/	/	33.6	64.9	98.5
25°C				/	/	/	33.7	64.7	98.3
40°C				33.5	63.6	97.1	33.4	62.6	96.0

조건	T0			샘플링 시점 및 검정					
				8W			12W		
면적	HC %	LC %	순도 %	HC %	LC %	순도 %	HC %	LC %	순도 %
2~8°C	33.5	64.8	98.3	/	/	/	32.8	65.5	98.3
25°C				32.6	65.1	97.7	/	/	/
40°C				/	/	/	/	/	/

[0222]

표 39

제제 확인의 CE-SDS (비-환원성) 결과

조건	T0	샘플링 시점 및 검정			
		2W	4W	8W	12W
2-8°C	98.2%	/	97.8%	/	97.9%
25°C		/	97.5%	95.9%	/
40°C		94.9%	92.6%	/	/

[0223]

[0224]

cIEF

[0225]

cIEF 결과는 표 40에 요약되어 있다. 2-8 °C 샘플의 주요 피크의 명백한 감소는 나타나지 않았다. 25 °C 샘플에 대해, 25 °C-8W의 주요 피크는 T0와 비교하여 6.4% 만큼 감소하였고 산성 피크는 5.5% 만큼 증가하였다. 40 °C 샘플에 대해, 40 °C-4W의 주요 피크는 T0와 비교하여 22.5% 만큼 감소하였고 산성 피크는 16.4% 만큼 증가하였다. 이 추세는 이전의 제제 스크리닝 연구의 결과와 일치한다.

표 40

제제 확인의 cIEF 결과

조건	T0			샘플링 시점 및 검정					
				2W			4W		
면적	주요 피크 %	산성 피크 %	염기성 피크 %	주요 피크 %	산성 피크 %	염기성 피크 %	주요 피크 %	산성 피크 %	염기성 피크 %
2-8°C	65.3	29.8	4.9	I	I	I	66.4	29.1	4.6
25°C				I	I	I	62.6	31.2	6.1
40°C				52.4	38.1	9.5	/42.8	46.2	11.0

조건	T0			샘플링 시점 및 검정					
				8W			12W		
면적	주요 피크 %	산성 피크 %	염기성 피크 %	주요 피크 %	산성 피크 %	염기성 피크 %	주요 피크 %	산성 피크 %	염기성 피크 %
2-8°C	65.3	29.8	4.9	/	/	/	65.9	29.1	5.0
25°C				58.9	35.3	5.9	/	/	/
40°C				/	/	/	/	/	/

[0226]

[0227]

효능 (세포-기반 검정)

[0228]

세포-기반 검정에 의해 테스트된 효능 결과는 표 41에 요약되어 있다. 제제 확인 동안에 모든 테스트된 샘플의 효능 (세포-기반 검정)의 명백한 변화는 나타나지 않았다. 25 °C 및 40 °C 샘플의 산성 피크의 증가는 효능에 영향을 미치지 않았다.

표 41

제제 확인의 효능 결과

조건	T0	샘플링 시점 및 검정			
		2W	4W	8W	12W
2-8°C	108%	/	108%	/	114%
25°C		/	/	107%	/
40°C		/	107%	/	/

[0229]

[0230]

모든 테스트 아이টে에서 2-8 °C 샘플에서 명백한 변화가 발견되지 않았다. 가속화된 조건 25 °C 및 스트레스가 많은 조건 40 °C 하에서, 샘플의 외관, 불용성 입자, pH 및 단백질 농도는 일정하고 안정하게 유지될 수 있다.

이들 샘플의 SEC-HPLC, CE-SDS (r & nr) 및 cIEF 순도는 어느 정도 감소하지만, 감소의 추세는 이전의 제제 개발 연구와 일치한다.

[0231] 따라서 pH 6.0에서 20 mM 히스티딘 완충액, 8% (w/v) 트레할로스 디하이드레이트, 0.02% (w/v) PS80의 제제가 확인되었다.

[0232] * * *

[0233] 본 발명은 기재된 특정 구체예에 의해 범위가 제한되는 것이 아니며 이것은 본 발명의 개개의 양태의 단일 예시로서 의도되고 기능적으로 동등한 임의의 조성물 및 방법이 본 발명의 범위 내에 있다.

[0234] 본 발명의 사상 또는 범위에서 벗어나지 않으면서 본 발명의 방법 및 조성물에서 다양한 변형 및 변화가 이루어질 수 있다는 것이 당업자에게 분명할 것이다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 변형 및 변화를 포함하며 단 그것들은 첨부된 청구범위 및 그것들의 동등물의 범위 내에 있다.

[0235] 본 명세서에서 언급된 모든 간행물 및 특허 출원은 개개의 간행물 또는 특허 출원이 구체적으로 및 개별적으로 참조로 포함되는 것과 동일한 정도로 본원에 참조로 포함된다.

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> I-Mab Biopharma Co., Ltd.

I-Mab Biopharma US Limited

<120> FORMULATIONS OF ANTI-CD73 ANTIBODIES

<130> P21404330WF

<150> PCT/CN2020/141601

<151> 2020-12-30

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 1

Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn

1 5

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 2

Tyr Ile Asn Tyr Gly Gly Ser Asn Gly Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 3

Asp Tyr Asp Ala Tyr Tyr Glu Ala Leu Asp Asp

1 5 10

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 4

Arg Ala Ser Ser Arg Val Asn Tyr Met His

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Synthetic

<400> 5

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 6

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr

1 5
 <210> 7
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 7
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly

 20 25 30
 Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Lys Leu Glu Trp
 35 40 45
 Met Gly Tyr Ile Asn Tyr Gly Gly Ser Asn Gly Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

 85 90 95
 Ala Arg Asp Tyr Asp Ala Tyr Tyr Glu Ala Leu Asp Asp Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 8
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 8
 Glu Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Arg Val Asn Tyr Met

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

 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450
 <210> 10
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 10
 Glu Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Arg Val Asn Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Pro Trp Ile Ser
 35 40 45
 Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80

 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr

115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys

130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu

145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser

165 170 175

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

180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe

195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys

210