



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년10월16일

(11) 등록번호 10-2717462

(24) 등록일자 2024년10월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/58 (2006.01)(52) CPC특허분류
G01N 33/6845 (2013.01)
G01N 33/587 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-7016537(분할)

(22) 출원일자(국제) 2017년08월18일

심사청구일자 2023년05월18일

(85) 번역문제출일자 2023년05월16일

(65) 공개번호 10-2023-0074614

(43) 공개일자 2023년05월30일

(62) 원출원 특허 10-2022-7030436

원출원일자(국제) 2017년08월18일

심사청구일자 2022년09월02일

(86) 국제출원번호 PCT/US2017/047630

(87) 국제공개번호 WO 2018/035470

국제공개일자 2018년02월22일

(30) 우선권주장

62/376,788 2016년08월18일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US20160074515 A1*

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 38 항

심사관 : 차명훈

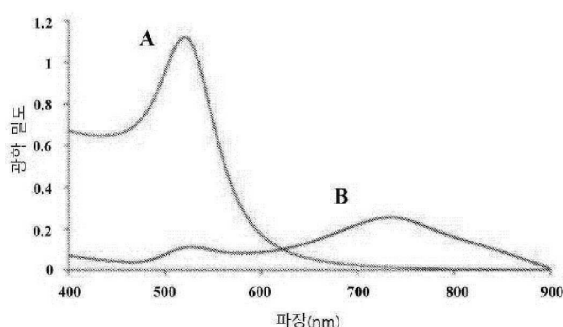
(54) 발명의 명칭 농도-의존적 자가-상호작용 나노입자 분광법을 사용하는 단백질의 자가-결합하는 능력을 결정하기 위한 분석

(57) 요약

요약

높은 안정성을 갖는 고농도 단백질 제형의 제조 방법이 제공된다. 높은 자가-적력성 속성을 갖는 단백질 및 제형 조건을 선택하기 위한 분석이 제조 공정의 초기 단계로서 사용된다. 구체적으로, 단백질 농도-의존적 자가-상호작용 나노입자 분광법이 단백질 콜로이드 상호작용 분석으로서 사용된다.

대표도



(56) 선행기술조사문헌

WO2016115475 A1*

JIEMIN WU et al., 'Discovery of highly soluble antibodies prior to purification using affinity-capture self-interaction nanoparticle spectroscopy', Protein Engineering, Design & Selection, 2015, Vol.*

PAOLO AROSIO et al., 'On the role of salt type and concentration on the stability behavior of a monoclonal antibody solution', Biophysical Chemistry, 2012, Vol. 168-169, pp 19-27. 1부.*

SHANTANU VL SULE et al., 'High-throughput analysis of concentration-dependent antibody self-association', Biophysical Journal, 2011, Vol. 101, pp 1749-1757. 1부.*

STEVEN B. GENG et al., 'Facile preparation of stable antibody-gold conjugates and application to affinity-capture self-interaction nanoparticle spectroscopy', Bioconjugate Chem., (2016.08.05.), Vol. 2*

STEVEN B. GENG et al., 'Measurements of monoclonal antibody self-association are correlated with complex biophysical properties', Mol. Pharmaceutics, 2015, Vol. 13, pp 1636-1645. 1부.*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

단백질을 포함하는 안정화된 바이오제약 조성물로서,

단백질은 가용성 상, 부착성 상 및 응집된 상으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 2개의 상으로 존재하며, 단백질은 항체, 항체 단편 또는 수용체-Fc-융합 단백질이고,

단백질은 바이오제약 조성물이 단백질, 금 나노입자, 완충된 염, 및 1.7을 초과하는 흡광도 세기 비 (A_{490}/A_{450})를 포함할 때 고농도에서 천연 구조의 90% 이상을 유지하는, 안정화된 바이오제약 조성물.

청구항 2

제1 항에 있어서, 완충된 염은 완충액 및 염 또는 완충액인 염인 것을 특징으로 하는 안정화된 바이오제약 조성물.

청구항 3

제1 항에 있어서,

(i) 단백질의 적어도 2가지 상의 첫 번째는 가용성 상이고;

(ii) 단백질의 적어도 2가지 상의 첫 번째는 가용성 상이며, 단백질의 적어도 2가지 상의 두 번째는 부착성 상이고, 단백질은 적어도 2개의 나노입자의 각각의 표면에 부착되고;

(iii) 단백질의 적어도 2가지 상의 첫 번째는 가용성 상이며, 단백질의 적어도 2가지 상의 세 번째는 응집된 상이고, 단백질은 자기-결합하여 응집체를 형성하고, 응집된 단백질 중 하나 이상은 또한 나노입자의 표면에 부착되고;

(iv) 금 나노입자의 각각은 지름이 20 nm이고;

(v) 적어도 2개의 나노입자의 각각은 단백질로 포화되고;

(vi) 나노입자는 혼합물의 밀리리터 당 6×10^{11} 내지 7×10^{11} 개 마이크로입자의 밀도로 존재하고;

(vii) 단백질은 2 $\mu\text{g/mL}$ 내지 512 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 존재하고;

(viii) 완충된 염의 염은 2 mM 내지 300 mM의 농도, 2 mM의 농도, 20 mM의 농도, 또는 200 mM의 농도로 존재하는 것을 특징으로 하는 안정화된 바이오제약 조성물.

청구항 4

제1 항 또는 제2 항에 있어서, 단백질은 항체인 것을 특징으로 하는 안정화된 바이오제약 조성물.

청구항 5

제4 항에 있어서, 항체는 단클론 항체인 것을 특징으로 하는 안정화된 바이오제약 조성물.

청구항 6

제5 항에 있어서, 단클론 항체는 인간화 단클론 항체인 것을 특징으로 하는 안정화된 바이오제약 조성물.

청구항 7

제5 항에 있어서, 단클론 항체는 인간 단클론 항체인 것을 특징으로 하는 안정화된 바이오제약 조성물.

청구항 8

제5 항에 있어서, 단클론 항체는 단일특이적 단클론 항체인 것을 특징으로 하는 안정화된 바이오제약 조성물.

청구항 9

제5 항에 있어서, 단클론 항체는 이중특이적 단클론 항체인 것을 특징으로 하는 안정화된 바이오제약 조성물.

청구항 10

제1 항 또는 제2 항에 있어서, 단백질은 항체 단편인 것을 특징으로 하는 안정화된 바이오제약 조성물.

청구항 11

제1 항 또는 제2 항에 있어서, 단백질은 항체 유도체인 것을 특징으로 하는 안정화된 바이오제약 조성물.

청구항 12

제1 항 또는 제2 항에 있어서, 단백질은 수용체-Fc-융합 단백질인 것을 특징으로 하는 안정화된 바이오제약 조성물.

청구항 13

제12 항에 있어서, 수용체-Fc-융합 단백질은 수세포인 것을 특징으로 하는 안정화된 바이오제약 조성물.

청구항 14

제1 항 또는 제2 항에 있어서, 단백질은 나노바디인 것을 특징으로 하는 안정화된 바이오제약 조성물.

청구항 15

제1 항 또는 제2 항에 있어서, 단백질은 재조합 항체 키메라인 것을 특징으로 하는 안정화된 바이오제약 조성물.

청구항 16

제1 항 또는 제2 항에 있어서, 단백질은 사이토카인인 것을 특징으로 하는 안정화된 바이오제약 조성물.

청구항 17

제1 항 또는 제2 항에 있어서, 단백질은 케모카인인 것을 특징으로 하는 안정화된 바이오제약 조성물.

청구항 18

제1 항 또는 제2 항에 있어서, 단백질은 펩티드 호르몬인 것을 특징으로 하는 안정화된 바이오제약 조성물.

청구항 19

제1 항 또는 제2 항에 있어서, 완충된 염의 염은 NaCl을 포함하는 것을 특징으로 하는 안정화된 바이오제약 조성물.

청구항 20

단백질을 함유하는 저점도 안정화된 바이오제약 조성물을 제조하는 방법으로서,

a. 단백질의 자가-결합 능력을 결정하는 단계로서, 결정하는 단계는:

(i) 저농도의 단백질, 나노입자, 및 완충된 염을 결합시켜 샘플을 형성하는 단계;

(ii) 샘플을 광으로 여기시키는 단계;

(iii) 450 nm 내지 750 nm 범위의 여러 파장에서 샘플을 통하여 투과된 광을 측정하는 단계;

(iv) 샘플의 흡광도 세기 비를 계산하는 단계로서, 흡광도 세기 비는 최대 흡광도에서의 흡광도 세기 (λ 최대) 대 450 nm에서의 초기 흡광도의 비율인, 단계;

(v) 흡광도 세기 비를 측정하는 단계; 및

(vi) 흡광도 세기 비(A_{312}/A_{450})가 1.7을 초과할 때 단백질이 고농도에서 천연 구조의 90% 이상을 유지하는지를 결정하는 단계;를 포함하고,

b. 점도-저감 부형제와 단백질을 결합시키는 단계;

c. 점도-저감 부형제의 존재 하에서 단백질의 자가-결합 능력을 결정하는 단계; 및

d. 점도-저감 부형제가 없는 것보다 적어도 50%만큼 단백질 용액의 점도를 감소시키는 수준으로 단백질을 점도-저감 부형제로 제형화시키는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 21

제20 항에 있어서, 점도-저감 부형제는 파라-아미노벤조산(PABA)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제20 항에 있어서, 단백질의 자가-결합 능력을 결정하는 단계는 고농도일 때 단백질의 자가-결합 능력을 결정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

삭제

청구항 24

제20 항에 있어서,

1. 단백질은 항원-결합 단백질이고;
2. 단백질은 2 $\mu\text{g/mL}$ 내지 512 $\mu\text{g/mL}$ 의 낮은 농도로 샘플에 존재하고;
3. 나노입자는 금 나노입자이며, 금 나노입자는 지름이 20 nm 내지 100 nm이고;
4. 샘플은 mL 당 5×10^{11} 내지 8×10^{11} 개 나노입자를 포함하고; 및/또는
5. 염은 2 mM 내지 250 mM의 농도로 샘플에 존재하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

제20 항에 있어서, 샘플 중의 단백질의 상이한 농도를 사용하여 단계 (i) - (vi)를 반복하는 단계를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

제20 항에 있어서, 샘플 중의 염의 상이한 농도를 사용하여 단계 (i) - (vi)를 반복하는 단계를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

제20 항에 있어서, 샘플의 상이한 pH를 사용하여 단계 (i) - (vi)를 반복하는 단계를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28

제20 항에 있어서,

(vii) 고농도의 단백질을 부형제와 결합시켜 제형화된 의약 물질 또는 의약 제품을 형성하는 단계를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29

제20 항에 있어서, 단백질의 농도는 50 mg/mL 내지 500 mg/mL인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30

제28 항에 있어서, 부형제는 강장제, 완충제, 계면활성제, 안정화제, 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 31

제22 항에 있어서, 단백질은 나노입자를 완전히 커버하는데 필요한 최소 농도를 초과하는 농도로 샘플에 존재하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 32

제22 항에 있어서, 단백질은 수용체-Fc-융합 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 33

제20 항에 있어서, 단백질은 항체 또는 항체 단편인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 34

제25 항에 있어서, 상이한 단백질 농도는 64 $\mu\text{g/mL}$ 내지 512 $\mu\text{g/mL}$ 의 2가지 이상의 단백질 농도를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 35

제22 항에 있어서, 단백질은 50 mg/mL 내지 500 mg/mL의 농도로 바이오제약 조성물에 존재할 때 고농도인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 36

제22 항에 있어서, 단백질은 50 mg/mL 내지 250 mg/mL의 농도로 바이오제약 조성물에 존재할 때 고농도인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 37

제20 항에 있어서, 샘플은 mL 당 6×10^{11} 내지 6.5×10^{11} 개 나노입자를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 38

제20 항에 있어서,

1. 단백질은 2 $\mu\text{g/mL}$ 내지 512 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 샘플에 존재하고;
2. 단백질은 50 mg/mL 내지 500 mg/mL의 농도로 바이오제약 조성물에 존재할 때의 농도인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 39

제20 항에 있어서,

1. 단백질은 항원-결합 단백질, 수용체-Fc-융합 단백질, 항체, 또는 항체 단편이고;
2. 단백질은 2 $\mu\text{g/mL}$ 내지 512 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 샘플에 존재하고;
3. 나노입자는 지름이 20 nm 내지 100 nm인 금 나노입자이고;
4. 샘플은 mL 당 5×10^{11} 내지 8×10^{11} 개 나노입자를 포함하고;
5. 염은 2 mM 내지 250 mM의 농도로 샘플에 존재하고;

6. 단백질은 50 mg/mL 내지 500 mg/mL의 농도로 바이오제약 조성물에 존재할 때 고농도인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 분야

[0002] 본 발명은 일반적으로 개발 및 상업화를 위한 치료용 단백질의 선택에 관한 것이며; 더욱 구체적으로는 낮은 응집체 형성 가능성을 수반하는 고단백질 농도를 용이하게 달성할 가능성이 높은 단백질의 선택에 관한 것이다. 본 발명은 구체적으로 단백질 콜로이드 상호작용을 평가하고 고농도로 제형화할 단백질을 선택하는 것에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 배경

[0004] 큰 생물학적 분자 - "생물약제"-는 중요한 종류의 약물이다. 예를 들어 단클론 항체는 절묘한 치료 특이성, 오랜 생물학적 반감기, 및 높은 안전성 프로파일을 제공한다.

[0005] 생물약제는 크기 및 복잡성을 고려하면 제조 및 제형화하기 어렵다. 대부분의 생물약제는 동결건조된 고체 또는 액체 제형으로 제형화되며, 이들 분자의 안정성은 중요한 문제이다. 안정성은 최종 제품의 유통 기한뿐만 아니라 제조 공정에도 영향을 미친다.

[0006] 정의에 의한 대분자는 큰 분자량을 갖는다. 따라서, 약물의 몇 물은 비교적 큰 질량을 포함한다. 예를 들어, 항체는 몰당 약 150,000 그램의 분자량을 갖는 반면, 아토르바스타틴과 같은 소분자 약물은 몰당 약 560 그램의 분자량을 갖는다. 따라서, 효과적인 용량을 얻기 위해서는, 대량의 단백질 약물이 필요하다. 더 많은 약물이 피하 주사용으로 제형화되면, 그러한 큰 질량은 작은 부피에 적합하여야 한다. 치료 효과 용량을 수용하기 위해, 생물치료 약물의 피하 제형은 점도를 관리 가능한 수준으로 유지하면서 높은 (약 50 mg/mL 이상) 또는 매우 높은 (약 100 - 250 mg/mL) 농도를 달성해야 한다.

[0007] 대분자가 작은 공간으로 쏘이고 단백질 분자 사이의 거리가 감소함에 따라, 콜로이드 상호작용의 빈도, 즉 한 분자의 다른 공간에 대한 공간-통과 효과가 증가한다. 단백질 자가-상호작용(콜로이드 상호작용)은 일반적으로 에너지적으로 약하며, 일반적으로 가역적이며 비특이적이다. 상호작용은 단백질-의존적이며 pH, 염 및 기타 첨가제에 의해 영향을 받는다. 어떤 경우에 상호작용은 순 인력적, 척력적, 또는 중립적일 수 있다. 상호작용의

본질과 크기는 단백질의 농도에 따라 달라질 수 있다.

- [0008] 콜로이드 상호작용은 비리알 계수(virial coefficient)로 정량화된 광범위한 상호작용(포텐셜 에너지)에 걸쳐있다. B_{22} 는 페어와이즈 상호작용을 나타내고, B_{222} 는 3-바디 상호작용을 나타내며, B_{2222} 는 4-바디 상호작용을 나타낸다. 양성 비리알 계수 값은 척력적 상호작용을 나타내며, 음성 비리알 계수는 인력적 상호작용을 나타내며, 영의 비리알 계수는 이상적 상태를 나타낸다.
- [0009] 콜로이드 상호작용은 일반적으로 ~2 mg/mL를 초과하는 단백질 용액에 존재하며 ~40 mg/mL를 초과하는 용액에서 중요하게 된다. 낮은 농도에서, 입체적 및 정전기적인 힘이 지배적인 경향이 있다. 단백질 농도가 증가함에 따라 상황은 더욱 복잡해진다. 생산 및 제형 과정에서 단백질의 농도가 증가함에 따라, 콜로이드 상호작용이 문제가 된다.
- [0010] 콜로이드 상호작용은 단백질 생산 과정에서 다양한 하류 과정에 영향을 미친다. 그러한 힘은 상호작용의 본질과 크기에 따라 유익하거나 해로울 수 있다. 콜로이드 상호작용은 크로마토그래피 성능, 한외여과 및 투석여과(UF/DF), 투석, 점도 및 용액 취급, 그리고 용액 내 단백질의 안정성에 영향을 미친다. 또한 콜로이드 상호작용은 올리고머 및 다량체뿐만 아니라 단백질 응집체가 형성될 수 있는 저장 동안의 장기적 안정성에 영향을 미친다. 따라서 단백질의 비리알 계수의 평가는 특정 단백질 치료제 개발에 필요한 자원을 제공하기 전에 중요한 정보를 제공한다.
- [0011] 비리알 계수 분석은 확립된 매우 활동적인 조사 영역이다. 특정 단백질에 대한 비리알 계수(B_{22} , 또는 밀접하게 관련있는 A_2)를 평가하는 현재의 방법은, 막 삼투압측정법(membrane osmometry), 침강 평형 분석용 초-원심분리(sedimentation equilibrium analytical ultra-centrifugation), 자가-상호작용 크로마토그래피, 정적 광 산란(static light scattering, SLS), 확산 또는 침강 상호작용 파라미터, 및 자가-상호작용 나노입자 분광법(self-interaction nanoparticle spectroscopy, SINS)을 포함한다.
- [0012] 예를 들어, Cohen 및 Benedek (US4080264A, 1978.3.3. 발행)는 항원 또는 항체 응집을 측정하기 위한 준-탄성(quasi-elastic) 광 산란 분광법을 기술하고 있다. Publicover와 Vincze (US7514938B2, 2009.4.7. 발행)는 항체를 포함하여 단백질로 코팅된 마이크론 및 서브-마이크론 규모 입자의 상호작용 및 응집을 조사하기 위해 유전 완화 분광법(dielectric relaxation spectroscopy, DRS)을 사용하는 방법을 기술한다. Holman 등(2007.12.20. 공개된 US20070291265A1)은 거대분자의 응집을 측정하기 위해 광산란 및 농도 신호를 측정하기 위한 두 갈래 광섬유 시스템(bifurcated fiber optic system)을 기술한다. Obrezanova 등 (mAbs, 7(2): 352-363, 2015)은 500 종 이상의 항체의 응집 성향을 체계적으로 측정하기 위해, 크기 배제 고압 액체 크로마토그래피(SE-HPLC) 및 광학 밀도 미세역가 플레이트 항체 포획 분석인 올리고머 검출 분석의 사용법을 기술하고 있다. Geoghegan 등 (mAbs, 8(5): 941-950, 2016)은 단클론 항체 자가-상호작용, 점도 및 안정성을 측정하기 위해, 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC) 체류 시간, 친화-포획 SINS, 및 동적 광 산란의 사용을 기술한다. 콜로이드 단백질 상호작용을 평가하는데 사용되는 현재 방법의 개요는 Geng 등에 의해 제공된다 (J Pharm Sci., 103(11): 3356-3363, 2014).
- [0013] 단클론 항체 자가-결합의 평가를 위한 자가-상호작용 나노입자 분광법(SINS)이 Sule 등에 의해 기술된다 (Biophys. J., 101 : 1749-1757, 2011). 간략하게 말해서, 항체는 금 나노입자 위에 흡착되고, 그 후 96-웰 미세역가 플레이트에서 완충액과 혼합된다. 부착성 항체의 자가-결합으로 인해 나노입자가 응집됨에 따라, 나노입자의 흡광도 스펙트럼이 변한다. 표면 플라즈몬 공명의 이러한 변화는 입자 결합과 관련이 있다. 분석은 흡광도 피크가 이동하거나 진폭이 변화하는지에 따라 "자가-결합" 또는 "자가-결합 없음"의 이진 판독값을 제공한다. Sule 등 (Mol. Pharmaceutics, 10: 1322-1331, 2013)은 친화-포획 자가-상호작용 나노입자 분광법(AC-SINS)으로 불리는 개선된 SINS 방법을 기술한다. 여기에, 인간 다클론 항체가 먼저 나노입자에 고정된 다음, 코팅된 입자를 저농도/저순도 항체 샘플과 접촉시킨 다음, 항-인간 코팅으로 포획한다. AC-SINS는 광범위한 항체 정제를 필요로 하지 않으면서 세포 상정액의 신속한 선별을 가능하게 한다. SINS와 마찬가지로 AC-SINS는 주체 항체의 양성 자가-결합 또는 자가-결합 없음의 이원 평가를 제공한다.
- [0014] 단백질은 복잡한 분자이며 종종 다양한 조건에서 예측할 수 없는 거동을 보여준다. 첨단 기술은 단백질 자가-결합을 관찰하기 위한 몇 가지 수단을 제공하지만, 무수히 다른 조건 하에서 단백질이 자가-결합을 겪을 성향을 결정하기 위한 신속하고 정확한 수단을 제공하지는 못한다. 일부 단백질은 일부 조건에서는 안정하지만 또 다른 조건에서는 불안정하다. 변화하는 조건 하에서 단백질의 인력 및 척력의 동적 범위를 결정하기 위한 분석에 대한 필요성이 해당 업계에 여전히 존재한다.

발명의 내용

[0015] 개요

[0016] 본 발명자들은 역동적인 조건 범위에서 단백질의 자가-결합하는 능력(즉, 단백질의 본질적인 척력 또는 인력)을 결정하는 방법을 개발했다. 결과적으로 상기 방법은 자가-결합된 단백질의 안정성을 결정하는 방법 또는 응집된 단백질의 안정성을 결정하는 방법으로 이해될 수 있다. 여기서 더욱 정교화된 바와 같이, 단백질은 단일 유형의 단백질 또는 상이한 기원의 임의의 단백질의 조합일 수 있다. 농도-의존성 자가-상호작용 나노입자 분광법(CD-SINS)으로 불리는 이 방법은 변화하는 농도와 다양한 이온 강도 및 pH 조건 하에서 단백질의 자가-결합하는 경향을 측정한다. 상기 방법은 높은 또는 매우 높은 농도 조건에서 단백질의 예측을 가능하게 하고, 상업적 개발을 위한 단백질의 선택을 알려준다. 본 방법은 또한 바이오제약 약물(biopharmaceutical drug) 또는 약물들의 결합 없이 긴 저장 수명을 유지하면서 고농도의 1종 이상의 바이오제약 약물을 포함하는 제약 조성물을 제형화하는 방법에 대한 정보를 제공한다. 본 방법은 또한 예컨대 특정 바람직한 투여 경로를 허용하는 적절한 레올로지/점도와 같은 물리적 특성에 대한 요구 사양을 충족시키는 조성물을 제형화하는 방법에 대한 정보를 제공한다. 본 발명은 또한 더 적은 양의 물질을 사용하여 적합한 제형에 도달하기 위한 생물약제의 더욱 신속한 선별 또는 추가 약물 개발을 위한 적합한 후보물질을 선택하는 것을 가능하게 한다.

[0017] 첫 번째 양상에서, 본 발명은 복수의 나노입자, 단백질, 및 완충된 염을 포함하는 생체분석 혼합물을 제공한다. 단백질은 혼합물에서 적어도 2상: 즉 부착성 상(adherent phase) 및 가용성 상으로 존재한다. 부착성 상은 나노입자에 부착된(즉, 코팅하는) 단백질을 포함한다. 가용성 상은 완충된 염 용액에 용해된 단백질을 포함한다. 일부 구체예에서, 단백질은 응집된 코팅된 나노입자를 포함하여 이량체, 삼량체, 사량체 또는 고차원 다량체로서 자가-결합되는 세 번째 상으로 존재한다.

[0018] 하나의 구체예에서, 나노입자는 금 나노입자이다. 일부 구체예에서, 나노입자는 지름이 약 20 nm 내지 약 100 nm이다. 특정 구체예에서, 나노입자는 지름이 약 20 nm인 금 나노입자이다.

[0019] 하나의 구체예에서, 각 나노입자는 단백질로 코팅된다. 일부 구체예에서, 대부분의 또는 모든 나노입자 표면은 단백질로 포화되며, 이는 표면이 단백질에 의해 완전히 점유되어 단백질이 부착될 헐벗은 표면이 남지 않는다는 것을 의미한다. 일부 구체예에서, 혼합물의 다른 성분, 예를 들어 적합한 염 또는 완충된 염을 첨가하기 전에 대부분의 또는 모든 나노입자 표면이 단백질로 포화된다.

[0020] 하나의 구체예에서, 혼합물은 혼합물의 밀리리터 당 약 6×10^{11} 내지 약 7×10^{11} 개 나노입자를 함유한다. 특정 구체예에서, 혼합물은 mL 당 약 6.3×10^{11} 개 나노입자를 함유한다. 이론에 얽매이지 않으면서 평균 단백질이 10 nm 구로 모델링될 수 있다고 가정하면, 20 nm 구를 코팅하는데 필요한 10 nm 구의 수에 대한 이론적 상한은 약 30 이다. 약 15 내지 20개 항체 분자가 단일 20 nm 나노입자를 결합하는 것으로 추정할 수 있다. 따라서, $\sim 2.5 \mu\text{g/mL}$ 의 항체는 6.3×10^{11} 개 나노입자 (20 nm)/mL를 완전히 커버하는데 필요한 최소 농도로 평가된다. 일부 구체예에서, 혼합물은 약 2 $\mu\text{g/mL}$ 내지 약 512 $\mu\text{g/mL}$ 의 단백질을 포함한다.

[0021] 일부 구체예에서, 혼합물에 포함되는 단백질은 치료용 항체이다. 일부 구체예에서, 단백질은 면역글로불린 Fc 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 단백질은 항원-결합 단백질이다. 항원-결합 단백질은 항체, 항체 단편, 항체 유도체, Fc-융합 단백질 및 수용체-Fc-융합 단백질을 포함한다. 하나의 구체예에서, 단백질은 단클론 항체이다. 더욱 구체적인 구체예에서, 단클론 항체는 인간 또는 인간화 항체이다. 일부 구체예에서, 단클론 항체는 단일특이적 항체 또는 이중특이적 항체일 수 있다.

[0022] 일부 구체예에서, 완충된 염은 완충액 및 염을 포함한다. 일부 구체예에서, 완충액은 이온 강도를 제공한다. 일부 구체예에서, 염은 혼합물을 완충시킨다. 원칙적으로, 염은 당업계에 공지된 임의의 적합한 염일 수 있으며, 예를 들어, 임의의 클로라이드, 브로마이드, 포스페이트, 설페이트 또는 암모늄 염, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 비-한정적인 예는 예컨대 염화 나트륨, 염화 칼륨, 인산 칼륨, 염화 암모늄 등을 포함한다. 하나의 구체예에서, 염은 염화 나트륨을 포함한다. 염(예를 들어, 염화 나트륨)은 약 2 mM 내지 약 300 mM의 농도로 존재할 수 있다. 특정 구체예에서, 염은 혼합물 내에 약 2 mM, 약 20 mM, 또는 약 200 mM의 농도로 존재한다.

[0023] 하나의 구체예에서, 완충액은 2-(N-모르폴리노)에탄설폰산(MES)을 포함한다. 특정 구체예에서, MES는 혼합물 내에 약 10 mM의 농도 및 약 6의 pH로 존재한다.

[0024] 두 번째 양상에서, 본 발명은 단백질의 자가-결합하는 능력을 결정하는 방법을 제공한다. 하나의 구체예에서,

상기 방법은 단백질, 복수의 나노입자, 및 완충된 염을 결합시켜 샘플을 형성하는 단계; 광으로 상기 샘플을 여기시키는 단계; 상기 샘플을 통해 투과된 광을 측정하는 단계; 및 샘플의 제1 흡광도 세기 비를 계산하는 단계를 포함한다. 상기 과정은 적어도 한번 더 반복되며, 각각은 하나 이상의 파라미터를 변경시키고, 제2, 제3 등의 흡광도 비를 얻는다. 주어진 단백질로부터 얻은 다중 흡광도 세기 비를 분석을 위해 플롯할 수 있다. 이러한 파라미터는 염 유형(즉, 중성, 카오트로픽, 코스모트로픽), 염 농도, pH, 단백질 농도, 추가 성분의 포함 또는 배제를 포함한다. 흡광도 세기 비가 임계값을 초과하면, 단백질은 고농도로 분배하기에 유리한 것으로 간주된다. 고농도로 분배하기에 유리한 것으로 간주되는 단백질은 고농도에서 안정하게 유지되고 응집되기 어려운 것으로 예상된다.

- [0025] 일부 구체예에서, 단백질은 치료용 항체이다. 일부 구체예에서, 단백질은 면역글로불린 Fc 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 단백질은 항원-결합 단백질이다. 항원-결합 단백질은 항체, 항체 단편, 항체 유도체, Fc-융합 단백질 및 수용체-Fc-융합 단백질을 포함한다. 하나의 구체예에서, 단백질은 단클론 항체이다. 더욱 구체적인 구체예에서, 단클론 항체는 인간 또는 인간화 항체이다. 일부 구체예에서, 단클론 항체는 단일특이적 항체 또는 이중특이적 항체일 수 있다.
- [0026] 일부 구체예에서, 단백질을 샘플에 약 2 $\mu\text{g/mL}$ 내지 약 512 $\mu\text{g/mL}$ 의 최종 농도까지 첨가한다.
- [0027] 일부 구체예에서, 나노입자는 금 나노입자이다. 일부 구체예에서, 금 나노입자는 지름이 약 20 nm 내지 약 100 nm이다. 하나의 구체예에서, 금 나노입자의 지름은 약 20 nm이다.
- [0028] 일부 구체예에서, 나노입자를 샘플에 mL 당 약 5×10^{11} 내지 약 8×10^{11} 개 나노입자, mL 당 약 6×10^{11} 내지 약 6.5×10^{11} 개 나노입자, 또는 mL 당 약 6.3×10^{11} 개 나노입자의 최종 농도까지 첨가한다.
- [0029] 완충된 염은 완충액, 이온 강도를 제공하는 완충액, 염, 완충 용량을 갖는 염, 또는 염 및 완충액을 함유할 수 있다. 하나의 구체예에서, 염은 염화 나트륨을 포함한다. 염(예를 들어, 염화 나트륨)은 약 2 mM 내지 약 300 mM의 농도로 존재할 수 있다. 일부 특정 구체예에서, 염은 혼합물에
- [0030] 약 2 mM, 약 5 mM, 약 10 mM, 약 20 mM, 약 50 mM, 약 75 mM, 약 100 mM, 약 110 mM, 약 120 mM, 약 150 mM, 약 175 mM, 약 200 mM, 또는 약 300 mM의 농도로 존재한다.
- [0031] 하나의 구체예에서, 완충액은 2-(N-모르폴리노)에탄설폰산(MES)을 포함한다. 특정 구체예에서, MES는 혼합물 내에 약 10 mM의 농도 및 약 6의 pH로 존재한다.
- [0032] 일부 구체예에서, 여기 광은 가시광 스펙트럼에 걸친 파장을 포함하는 백색광이다. 일부 구체예에서, 투과된 광은 약 450 nm 내지 약 750 nm 범위의 여러 파장에서 측정된다.
- [0033] 흡광도 세기 비는 표준 또는 대조군에 대하여 광 흡광도의 상대적 세기를 측정한 것이다. 대조군은 외적으로 또는 내적으로 이루어질 수 있다. 하나의 구체예에서, 흡광도 세기 비는 샘플의 피크 흡광도 파장의 최대 세기(광학 밀도 또는 흡광도)를 관찰된 초기 흡광도 세기로 나눈으로써 계산된다. 하나의 구체예에서, 초기에 관찰된 흡광도 세기는 450 nm에서 관찰된 흡광도 세기이다. 이러한 구체예에서, 흡광도 세기 비는 피크 흡광도(A_{peak})/450 nm에서의 흡광도(A_{450} 또는 A_{init})이다. 이러한 구체예에서, 흡광도 세기 비의 임계값은 약 1.5 내지 약 2이다. 특정 구체예에서, 흡광도 세기 비의 임계값은 약 1.7이다.
- [0034] 하나의 구체예에서, 고농도로 분배하기에 유리한 것으로 간주되는 단백질은 부형제와 결합하여 제형화된 의약품 물질(formulated drug substance, FDS) 또는 의약품 제품(drug product, DP)을 형성한다. 하나의 구체예에서, 단백질은 약 50 mg/mL 내지 약 250 mg/mL의 최종 농도로 제형화된다.
- [0035] 하나의 구체예에서 부형제는 강장제, 완충제, 계면활성제, 안정화제, 또는 이들 중 둘 이상의 임의의 조합을 포함한다. 하나의 구체예에서, 강장제는 염이다. 특정 구체예에서, 염은 염화 나트륨이다. 하나의 구체예에서, 완충제는 약 pH 6 내지 약 pH 7에서 완충한다. 특정 구체예에서, 완충제는 히스티딘이다. 또 다른 특정 구체예에서, 완충제는 포스페이트이다. 하나의 구체예에서, 계면활성제는 폴리소르베이트, 예컨대 폴리소르베이트 20 또는 폴리소르베이트 80이다. 하나의 구체예에서, 안정화제는 당, 예컨대 수크로오스 또는 트레할로오스이다. 또 다른 구체예에서, 안정화제는 아미노산, 예컨대 프롤린 또는 아르기닌이다.
- [0036] 세 번째 양상에서, 본 발명은 치료용 단백질을 제조하는 방법을 제공한다. 하나의 구체예에서, 상기 방법은 다양한 미지의 콜로이드 안정성을 갖는 복수의 상이한 단백질로부터 높은 콜로이드 안정성을 갖는 단백질을 선택

하는 단계; 숙주 세포에서 선택된 단백질을 생산하는 단계; 단백질을 정제하는 단계; 및 상기 단백질을 고농도로 부형제와 결합시켜 상기 단백질이 안정화된 제형화된 의약 물질 또는 의약 제품을 형성하는 단계를 포함한다. 하나의 구체예에서, 제형화된 의약 물질 또는 의약 제품 중 10% 미만의 단백질이 응집된다.

[0037] 하나의 구체예에서, 상기 높은 콜로이드 안정성을 갖는 단백질을 선택하는 단계는 상기 단백질을 나노입자 및 완충된 염과 결합시켜 샘플을 형성하는 단계; 광으로 상기 샘플을 여기시키는 단계; 상기 샘플에 의해 투과된 광을 측정하는 단계; 및 상기 샘플의 흡광도 세기 비를 계산하는 단계를 포함한다. 상기 선택하는 단계는 변하는 하나 이상의 파라미터로 1회 이상 반복된다. 변하는 파라미터는 염 유형, 염 농도, pH, 단백질 농도, 추가 성분의 포함 또는 배제를 포함한다. 흡광도 세기 비가 임계값을 초과하면 단백질은 높은 콜로이드 안정성을 갖는 것으로서 선택된다.

[0038] 일부 구체예에서, 여기 광은 가시광 스펙트럼에 걸친 파장을 포함하는 백색광이다. 일부 구체예에서, 투과된 광은 약 450 nm 내지 약 750 nm 범위의 여러 파장에서 측정된다.

[0039] 흡광도 세기 비는 표준 또는 대조군에 대하여 광 흡광도의 상대적 세기를 측정한 것이다. 대조군은 외부 또는 내부에 의해 이루어질 수 있다. 일부 구체예에서, 흡광도 세기 비는 샘플의 피크 흡광도 파장의 최대 세기(광학 밀도 또는 흡광도)를 (1) 해당 샘플에서 관찰된 초기 흡광도 세기(내적으로) 또는 (2) 단백질이 없는 나노입자의 샘플에서 관찰된 초기 흡광도 세기(외적으로)로 나눔으로써 계산된다. 하나의 구체예에서, 초기에 관찰된 흡광도 세기는 450 nm에서 관찰된 흡광도 세기이다. 이러한 구체예에서, 흡광도 세기 비는 피크 흡광도($A_{\text{피크}}$)/450 nm에서의 흡광도(A_{450} 또는 A_{init})이다. 이러한 구체예에서, 흡광도 세기 비의 임계값은 약 1.5 내지 약 2이다. 특정 구체예에서, 흡광도 세기 비의 임계값은 약 1.7이다.

[0040] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 생물치료 약물(예컨대 단백질 또는 항체)을 고농도로 포함하는 조성물에 관한 것이다. 구체적으로, 조성물은 전체 단백질 종의 약 10% 이하가 생물치료 약물의 농도에서 비가역적 응집체로서 존재하도록 구성된다. 대신에, 조성물은 여기에 기재된 임계값이 예컨대 약 1.5 내지 약 2.0 ($A_{\text{피크}}/A_{450}$)의 범위이도록 구성된다. 또 다른 대안은 임계값이 예컨대 약 1.5, 약 1.6, 약 1.7, 약 1.8, 약 1.9, 또는 약 2.0 ($A_{\text{피크}}/A_{450}$)이다. 일부 구체예에서, 임계값은 약 0.7 내지 약 1.0 ($A_{\text{피크}}/A_{\text{대조군}}$)의 범위이다. 또 다른 대안은 임계값이 예컨대 약 0.7, 약 0.8, 약 0.9, 또는 약 1.0 ($A_{\text{피크}}/A_{\text{대조군}}$)이다. 또 다른 구체예에서, 조성물은 전체 단백질 종의 약 10% 이하가 생물치료 약물의 농도에서 비가역적 응집체로서 존재하도록 구성되고 상기 조성물이 여기에 개시된 임계값을 가지되 임계값이 예컨대 약 1.5 내지 약 2.0 ($A_{\text{피크}}/A_{450}$)의 범위이거나 또는 임계값이 예컨대 약 1.5, 약 1.6, 약 1.7, 약 1.8, 약 1.9, 또는 약 2.0 ($A_{\text{피크}}/A_{450}$)이거나, 및/또는 임계값이 약 0.7 내지 약 1.0 ($A_{\text{피크}}/A_{\text{대조군}}$)의 범위이거나, 또는 임계값이 약 0.7, 약 0.8, 약 0.9, 또는 약 1.0 ($A_{\text{피크}}/A_{\text{대조군}}$)이다. 바이오제약 약물의 농도는 약 50 mg/mL 또는 그 이상일 수 있다. 그 대신에, 바이오제약 약물의 농도는 예컨대 약 50 mg/mL 내지 약 500 mg/mL, 예컨대 약 50 mg/mL 내지 약 250 mg/mL, 예컨대 약 100 mg/mL 내지 약 250 mg/mL의 범위일 수 있다.

[0041] 하나의 구체예에서 본 발명은 여기에 개시된 바와 같이 단백질의 자가-결합하는 능력을 결정하는 방법에 의해 획득가능한 조성물에 관한 것이다.

[0042] 또 다른 양상에서, 본 발명은 의약에 사용하기 위해 생물치료 약물(예컨대 단백질 또는 항체)을 고농도로 포함하는 조성물에 관한 것이다. 약물에 따라, 해당 분야의 통상의 기술자는 조성물을 필요로 하는 대상체에게 상기 조성물을 투여함으로써 치료될 수 있는 임상 상태를 알 것이다. 구체적으로, 조성물은 전체 단백질 종의 약 10% 이하가 생물치료 약물의 농도에서 비가역적 응집체로서 존재하도록 구성된다. 대신에, 조성물은 여기에 기재된 임계값이 예컨대 약 1.5 내지 약 2.0 ($A_{\text{피크}}/A_{450}$)의 범위이도록 구성된다. 또 다른 대안은 임계값이 예컨대 약 1.5, 약 1.6, 약 1.7, 약 1.8, 약 1.9, 또는 약 2.0 ($A_{\text{피크}}/A_{450}$)이다. 일부 구체예에서, 임계값은 약 0.7 내지 약 1.0 ($A_{\text{피크}}/A_{\text{대조군}}$)의 범위이다. 또 다른 대안은 임계값이 예컨대 약 0.7, 약 0.8, 약 0.9, 또는 약 1.0 ($A_{\text{피크}}/A_{\text{대조군}}$)이다. 또 다른 구체예에서, 조성물은 전체 단백질 종의 약 10% 이하가 생물치료 약물의 농도에서 비가역적 응집체로서 존재하도록 구성되고 상기 조성물이 여기에 개시된 임계값을 가지되 임계값이 예컨대 약 1.5 내지 약 2.0 ($A_{\text{피크}}/A_{450}$)의 범위이거나 또는 임계값이 예컨대 약 1.5, 약 1.6, 약 1.7, 약 1.8, 약 1.9, 또는 약 2.0 ($A_{\text{피크}}/A_{450}$)이거나, 및/또는 임계값이 약 0.7 내지 약 1.0 ($A_{\text{피크}}/A_{\text{대조군}}$)의 범위이거나, 또는 임계값이 약

0.7, 약 0.8, 약 0.9, 또는 약 1.0 (A_{415}/A_{280})이다. 바이오제약 약물의 농도는 약 50 mg/mL 또는 그 이상일 수 있다. 그 대신에, 바이오제약 약물의 농도는 예컨대 약 50 mg/mL 내지 약 500 mg/mL, 예컨대 약 50 mg/mL 내지 약 250 mg/mL, 예컨대 약 100 mg/mL 내지 약 250 mg/mL의 범위일 수 있다. 조성물은 치료에서 원하는 결과를 얻기 위해 필요한 것으로 간주되는 단일 용량 또는 다중 용량으로 투여 될 수 있다. 그 대신에, 본 발명은 생물 치료 약물에 의해 처리 또는 치료될 수 있는 질병 또는 질병들의 치료에 있어서 의학의 제조를 위한 고농도의 생물치료 약물(예컨대 단백질 또는 항체)을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0043] 하나의 구체예에서, 본 발명은 생성된 조성물이 적합한 레올로지를 갖도록 바이오제약 조성물(예컨대 단백질 또는 항체)을 제조하는 방법을 제공한다. 구체적으로, 여기에 개시된 바와 같이 단백질의 자가-결합하는 능력을 측정하는 방법은 높은 바이오제약 약물 농도를 포함하는 안정한 조성물의 공급 배열을 결정할 수 있게 한다. 이러한 조성물의 중요한 특성 중 하나는 점도이다. 결과적으로, 본 발명의 방법은 조성물이 원하는 투여 경로 또는 투여 방식을 통해 투여될 수 있도록 바람직한 물리적 특성을 갖는 조성물의 제조를 가능하게 할 것이다. 하나의 예시적인 투여 경로는 주사에 의한 투여일 수 있다. 따라서, 이러한 경우, 예컨대 주사기 및 캐뉼러에 의한 주사를 가능하게 하는 제조된 조성물의 점도를 갖는 것이 중요하다. 이러한 캐뉼러는 예컨대 6G, 8G, 9G, 10G, 11G 12G, 13G, 14G, 16G, 19G, 20G, 21G, 22G, 23G, 24G, 또는 26G의 크기인 캐뉼러일 수 있다. 용어 "점도"는 전단 응력 또는 신장 응력에 의해 변형되는 유체의 저항을 측정하는 동적 또는 절대 점도(20℃ 및 정상 압력에서)를 의미한다. 따라서 "점도"는 유동에 대한 유체의 내부 저항을 의미하며 유체 마찰의 측정으로 간주될 수 있다. 결과적으로, 점성이 작을수록, 그 이동 용이성(유동성)이 크다. 본 문헌에서, 점도의 적절한 범위는 약 10-10,000 mPa·s, 예컨대 약 20-9000 mPa·s, 예컨대 약 30-8000 mPa·s, 예컨대 약 40-7000 mPa·s, 예컨대 약 50-6000 mPa·s, 예컨대 약 70-5000 mPa·s, 예컨대 약 90-4000 mPa·s, 예컨대 약 100-3000 mPa·s 또는 약 10 mPa·s, 또는 약 20 mPa·s, 또는 약 30 mPa·s, 또는 약 40 mPa·s, 또는 약 50 mPa·s 또는 그 대신에 약 1 mPa·s 내지 약 20 mPa·s, 예컨대 약 2 mPa·s, 예컨대 약 3 mPa·s, 예컨대 약 4 mPa·s, 예컨대 약 5 mPa·s 예컨대 약 6 mPa·s, 예컨대 약 7 mPa·s 예컨대 약 10 mPa·s, 약 13 mPa·s, 약 15 mPa·s, 예컨대 약 20 mPa·s이다.

[0044] 점도 측정을 위한 또 다른 단위는 공지되어 있으며, 예를 들어, 1 센티푸아즈는 1mPa·s와 동등하다. 특정 이론에 구속되지 않으면서, 저농도(즉, 10 mg/mL 이하)의 전형적인 단백질은 약 10 cP의 점도를 나타낸다. 이와 같이, 약 10 센티푸아즈 미만(약 10 mPa·s 미만)의 점도를 나타내는, 고도로 농축된 단백질 조성물, 예컨대 항체 조성물은 바이오제약 조성물로서의 용도에 매우 적합하다. 점도가 약 10 내지 약 15 센티푸아즈(약 10 mPa·s 내지 약 15 mPa·s)인 단백질 조성물(고농도)은 제조 및 약물 개발 과정에서 진행하는 것이 안전하다. 점도가 약 15 내지 약 20 센티푸아즈(약 15 mPa·s 내지 약 20 mPa·s)인 단백질 조성물(고농도)은 제조 및 약물 개발 과정에서 주의하여 진행할 것을 알린다. 점도가 약 20 센티푸아즈 초과(약 20 mPa·s 초과)인 단백질 조성물(고농도)은 문제가 있는 제조 및 약물 개발 과정을 나타낸다. 점도는 여기에 개시된 바와 같은 다양한 구성요소 및 성분에 의해 조작될 수 있다. "가용성" 및 "고도 가용성"은 또한 여기에 개시된 임의의 용도, 예컨대 바이오제약 조성물의 제조 및 용도에 적합한 점도를 갖는 단백질을 의미한다.

[0045] 하나의 구체예에서, 단백질은 항원-결합 단백질, 예를 들어 항체, 항체 단편 또는 수용체-Fc-융합 단백질이다.

[0046] 하나의 구체예에서, 단백질이 제조되는 숙주 세포는 중국 햄스터 난소(Chinese hamster ovary, CHO) 세포 또는 CHO 세포의 유도체, 예컨대 CHO-K1 세포 또는 EESYR® 세포이다(참조 Chen 등, US771997B2, 2010.8.10. 발행).

[0047] 하나의 구체예에서, 단백질을 정제하는 단계는 단백질을 (1) 친화 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 혼합 모드 크로마토그래피, 및 하이드록시아파타이트 크로마토그래피 중 하나 이상의 단계; 및 (2) 환외여과 및 투석여과 둘 중 하나;로 처리하는 단계를 포함한다.

[0048] 하나의 구체예에서, 단백질은 적어도 50 mg/mL인 최종 농도로 제형화된다. 하나의 구체예에서, 단백질의 농도는 약 50 mg/mL 내지 약 250 mg/mL이다.

[0049] 하나의 구체예에서 단백질이 결합되어 제형화된 의학 물질 또는 의학 제품을 형성하는 부형제는 강장제, 완충제, 계면활성제, 및 안정화제 중 하나 이상을 포함한다. 하나의 구체예에서, 강장제는 염이다. 특정 구체예에서, 염은 염화 나트륨이다. 하나의 구체예에서, 완충제는 약 pH 6 내지 약 pH 7에서 완충한다. 특정 구체예에서, 완충제는 히스티딘이다. 또 다른 특정 구체예에서, 완충제는 포스페이트이다. 하나의 구체예에서, 계면활성제는 폴리소르베이트, 예컨대 폴리소르베이트 20 또는 폴리소르베이트 80이다. 하나의 구체예에서, 안정화제는 당, 예컨대 수크로오스 또는 트레할로오스이다. 또 다른 구체예에서, 안정화제는 아미노산, 예컨대 프롤린 또는

아르기닌이다.

도면의 간단한 설명

도면

도 1은 분산된 20 nm 금 나노입자(라인 A) 및 응집된 20 nm 금 나노입자(라인 B)의 흡광도 프로파일을 도시한다. Y-축은 임의 흡광도 단위의 광학 밀도를 나타낸다. X-축은 나노미터(nm) 단위의 투과광 파장을 나타낸다.

도 2는 2 mM 염(원), 20 mM 염(사각형) 및 200 mM 염(삼각형)에서 상이한 농도의 단클론 항체 2(mAb2) 및 20 nm 금 나노입자의 흡광도 세기 비의 산점도를 도시한다. Y-축은 각 샘플 상태의 피크 흡광도 세기/초기 흡광도 세기의 비율을 도시한다. X-축은 마이크로그램/밀리리터의 mAb2의 농도를 도시한다.

도 3은 2 mM 염(사각형), 20 mM 염(삼각형) 및 200 mM 염(원)에서 20 nm 금 나노입자의 존재에서 상이한 농도의 단클론 항체(mAb) 1(개방 기호) 및 mAb5 (폐쇄 기호)의 흡광도 세기 비의 산점도를 도시한다. Y-축은 각 샘플 상태의 피크 흡광도 세기/초기 흡광도 세기의 비율을 도시한다. X-축은 마이크로그램/밀리리터의 mAb1의 농도를 도시한다. 좌측 박스 영역(A)은 높은 선택 값을 갖는 더 높은 콜로이드 척력적 조건의 상태를 나타내며,中间的 박스 영역(B)은 조심스러운 또는 혼합된 선택 값을 갖는 혼합된 척력적 및 인력적 조건의 상태를 나타내고, 우측 박스 영역(C)은 문제가 있거나 낮은 선택 값을 갖는 인력적의 상태를 나타낸다.

도 4는 다양한 농도(곡선의 최우측 [750 nm] 부분에서 위에서 아래 순서로 3.125 μ g/mL, 6.25 μ g/mL, 12.5 μ g/mL, 25 μ g/mL, 50 μ g/mL, 100 μ g/mL, 200 μ g/mL 및 400 μ g/mL)의 인간 혈청 알부민(HSA)과 결합된 분산된 20 nm 금 나노입자의 다중 흡광도 프로파일의 오버레이를 도시한다. Y-축은 임의 단위의 임의 흡광도를 도시한다. X-축은 나노미터(nm) 단위의 투과광 파장을 나타낸다.

도 5는 2 mM 염(원), 20 mM 염(사각형) 및 200 mM 염(삼각형)에서 상이한 농도의 도 4에 도시된 원시 흡광도 스펙트럼으로부터 유래된 HSA 및 20 nm 금 나노입자의 흡광도 세기 비의 산점도를 도시한다. Y-축은 각 샘플 상태의 피크 흡광도 세기/초기 흡광도 세기의 비율을 도시한다. X-축은 마이크로그램/밀리리터의 HSA의 농도를 도시한다.

도 6은 2 mM 염(원), 20 mM 염(사각형) 및 200 mM 염(삼각형)에서 상이한 농도의 단클론 항체 1(mAb1) 및 20 nm 금 나노입자의 흡광도 세기 비의 산점도를 도시한다. Y-축은 각 샘플 상태의 피크 흡광도 세기/초기 흡광도 세기의 비율을 도시한다. X-축은 마이크로그램/밀리리터의 mAb1의 농도를 도시한다.

도 7은 상이한 농도 및 이온 염 농도: 2 mM NaCl (원), 20 mM NaCl (사각형), 및 200 mM NaCl (삼각형)에서의 mAb1 용액의 산란 광 세기의 산점도를 도시한다. Y-축은 임의의 흡광도 단위에서 광산란 세기를 나타낸다. X-축은 그램/리터의 mAb1의 농도를 나타낸다. 실선은 비교가능한 지름의 이상적인 단단한 구를 나타낸다.

도 8은 2 mM 염(원), 20 mM 염(사각형) 및 200 mM 염(삼각형)에서 상이한 농도의 단클론 항체 6(mAb6) 및 20 nm 금 나노입자의 흡광도 세기 비의 산점도를 도시한다. Y-축은 각 샘플 상태의 피크 흡광도 세기/초기 흡광도 세기의 비율을 도시한다. X-축은 마이크로그램/밀리리터의 mAb6의 농도를 도시한다.

도 9은 상이한 농도 및 이온 염 농도: 2 mM NaCl (원), 20 mM NaCl (사각형), 및 200 mM NaCl (삼각형)에서의 mAb6 용액의 산란 광 세기의 산점도를 도시한다. Y-축은 임의의 흡광도 단위에서 광산란 세기를 나타낸다. X-축은 그램/리터의 mAb6의 농도를 나타낸다. 실선은 비교가능한 지름의 이상적인 단단한 구를 나타낸다.

도 10은 2 mM 염(원), 20 mM 염(사각형) 및 200 mM 염(삼각형)에서 상이한 농도의 단클론 항체 3(mAb3) 및 20 nm 금 나노입자의 흡광도 세기 비의 산점도를 도시한다. Y-축은 각 샘플 상태의 피크 흡광도 세기/초기 흡광도 세기의 비율을 도시한다. X-축은 마이크로그램/밀리리터의 mAb3의 농도를 도시한다.

도 11은 2 mM 염(원), 20 mM 염(사각형) 및 200 mM 염(삼각형)에서 상이한 농도의 단클론 항체 4(mAb4) 및 20 nm 금 나노입자의 흡광도 세기 비의 산점도를 도시한다. Y-축은 각 샘플 상태의 피크 흡광도 세기/초기 흡광도 세기의 비율을 도시한다. X-축은 마이크로그램/밀리리터의 mAb4의 농도를 도시한다.

도 12는 2 mM 염(원), 20 mM 염(사각형) 및 200 mM 염(삼각형)에서 상이한 농도의 단클론 항체 5(mAb5) 및 20 nm 금 나노입자의 흡광도 세기 비의 산점도를 도시한다. Y-축은 각 샘플 상태의 피크 흡광도 세기/초기 흡광도 세기의 비율을 도시한다. X-축은 마이크로그램/밀리리터의 mAb5의 농도를 도시한다.

도 13은 상이한 완충액, pH, 및 이온 강도에서 제형화된 상이한 농도의 단클론 항체 7(mAb7)의 흡광도 세기 비의 CD-SINS 산점도를 도시한다. 각각의 기호는 다양한 mAb7 농도(X-축)의 상이한 완충액, pH 및 이온 강도 제형을 나타낸다.

도 14는 상이한 당, 당의 농도, 및/또는 아미노산의 존재에서 제형화된 상이한 농도의 단클론 항체 7(mAb7)의 흡광도 세기 비의 CD-SINS 산점도를 도시한다. 각각의 기호는 다양한 mAb7 농도(X-축)의 상이한 당/아미노산 제형을 나타낸다.

도 15는 상이한 벤조이트 화합물과 결합된 상이한 농도의 단클론 항체 7(mAb7) (8 μ g/mL, 32 μ g/mL, 128 μ g/mL, 및 512 μ g/mL mAb7)의 흡광도 세기 비의 CD-SINS 산점도를 도시한다. p- 아미노벤조산과 결합할 때 [PABA (-o-), 개방 원], mAb7은 흡광도 세기 비(Y-축)가 1.6을 초과하는 바람직한 동적 콜로이드 상호작용 프로파일을 나타냈다.

도 16은 다양한 농도의 p-아미노벤조산(PABA)의 존재에서 상이한 농도의 단클론 항체 7(mAb7)의 흡광도 세기 비의 CD-SINS 산점도를 도시한다. X-축은 마이크로그램/밀리리터의 mAb7의 농도의 log2를 도시한다. Y-축은 흡광도 세기 비를 도시한다. 개방 원(-○-)은 PABA 없음을 나타내고, 개방 사각형(-□-)은 12 mM PABA를 나타내고, 개방 삼각형(-△-)은 18 mM PABA를 나타내고, 폐쇄 원(-●-)은 24 mM PABA를 나타내고, 폐쇄 사각형(-■-)은 30 mM PABA를 나타내고, 폐쇄 삼각형(-▲-)은 36 mM PABA를 나타낸다.

도 17은 PABA를 포함하지 않거나(폐쇄 원[-●-]) 또는 20 mM PABA를 포함하는(폐쇄 삼각형 [-▲-]) mAb7 용액의 정상 전단 점도(mPa · s)의 점 도표를 g/L에서 mAb7 농도의 함수로서 도시한다. 개방 기호는 100 g/L mAb7을 함유할 것으로 예상되는 용액의 외삽된 점도를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0051] 상세한 설명

[0052] 본 발명이 개시되기 전에, 본 발명은 개시된 특정 방법 및 실험 조건에 제한되지 않으며, 그러한 방법 및 조건은 다양할 수 있음을 이해해야 한다. 또한, 본 명세서에서 사용된 용어는 특정 실시예만을 설명하기 위한 것이며, 본 발명의 범위가 첨부된 청구항에 의해서만 한정되기 때문에, 제한하려는 의도가 아니라는 것을 이해해야 한다.

[0053] 다른 정의가 없는 한, 본 명세서에 사용된 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 본 명세서에 사용된 용어 "약"은, 특정 인용된 수치에 관하여 사용될 때, 그 값이 인용된 값과 15% 이하로 다를 수 있음을 의미한다. 예를 들어, 본 명세서에 사용된 바와 같이, 표현 "약 100"은 85와 115 및 그 사이의 모든 정수 및 비정수 값 (예컨대, 86, 86.001, 87, 88, 88.3, 89 등)을 포함한다.

[0054] 부형제, 성분, 및 기타 물질의 절대량과 상대량은 질량, 또는 몰(mole)로 표현될 수 있다. 질량의 단위는 그램, 밀리그램, 마이크로그램 등으로 표현될 수 있다. "중량/부피" 즉 "w/v"에서 용어 "중량"은 "질량"을 의미한다. 상대량은 백분율 중량(즉, 중량%)으로 표현될 수 있으며, 여기서 일(1) 백분율 중량 대 부피(w/v)는 100 밀리리터 부피 당 1 그램의 물질을 의미한다. 또한, 예를 들어, 일(1) 중량부의 성분 "B" 당 일(1) 중량부의 성분 "A"는 예컨대 일(1) 그램의 성분 "A"마다에 대해 일(1) 그램의 성분 "B"가 존재한다는 것을 의미한다. 또한 예를 들어, 일 중량%(1 중량%)의 성분 "A"는 예컨대 100 그램의 입자 전체 질량마다에 대해 일(1) 그램의 성분 "A"가 존재한다는 것을 의미한다. 성분의 상대량은 또한 주어진 부피 당 몰 또는 분자 수, 예컨대 리터 당 밀리몰(밀리몰(mM)), 또는 또 다른 성분에 대하여 표현될 수 있으며, 예컨대, Y 몰부의 성분 "B" 당 X 몰부의 성분 "A"는 X 몰의 "A"마다에 대해 Y 몰의 "B"가 존재한다는 것을 의미한다.

[0055] 본 명세서에 개시된 것과 유사하거나 균등한 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 테스트에서 사용될 수 있지만, 예시적인 방법 및 물질이 이제 개시된다. 본 명세서에 언급된 모든 공개문헌은 그 전체가 참조로 여기에 수록된다.

[0056] 동적 콜로이드 안정성을 결정하기 위한 분석: 농도-의존성 자가-상호작용 나노입자 분광법 (CD-SINS)

[0057] 단백질의 동적 비리알 범위를 결정하기 위한 즉각적인 SINS-기반 분석이 제공된다. 단백질은 복잡한 거동을 나타내며, 이는 단백질의 화학 물리적 환경에 매우 민감하다. 그러므로, 특정 환경 조건 하에서 단백질의 비리알 계수를 평가하는 것은 다른 환경에서 그 단백질의 비리알 계수를 결정하기에는 불충분하다. 무수한 조건에서 주

어진 단백질에 대해 여러 가지 비리알을 얻는 것은 힘들고 시간 소모적이다. 본 발명자들은 본 명세서에서 단백질의 동적 콜로이드 안정성을 결정하기 위한 고처리량 분석(high through put assay)을 개시하며, 이는 응집과 관련된 문제를 갖지 않거나 또는 적어도 최소한의 잠재적 응집 문제를 가지면서 고농도로 제형화되거나 또는 기타 유지될 수 있는 단백질의 선택을 제공한다.

[0058] 이러한 분석은 다양한 단백질 농도, 다양한 이온 강도, 다양한 pH, 및 기타 조건들의 조건 하에서 나노입자 응집을 평가함으로써 SINS를 새로운 방식으로 사용한다. 전술한 바와 같이 그리고 Sules(2011)에서 설명한 바와 같이, 금 나노입자는 단백질로 코팅되어 완충된 용액에 놓여진다. 나노입자가 단백질 자가-결합으로 인해 응집함에 따라, 입자의 표면 플라즈몬 공명이 변하며: 최대 흡광도가 더 높은 파장으로 이동하고(적색 이동); 흡광도는 보다 낮은 세기가 되는데, 즉 흡광도 프로파일이 넓어지고 왼쪽으로 이동한다(도 1). 코팅되지 않은 20 nm의 금 나노입자는 약 520 내지 530 nm에서 피크 흡광도를 갖는다.

[0059] 기존의 SINS와 B₂₂ 또는 A₂를 측정하는 잘-정립된 정적 광 산란(static light scattering, SLS) 방법을 비교한 결과는 시험된 대부분의 항체에 대하여 일반적인 일치를 나타낸다. 표 1은 SLS에 의해 결정된 동일한 단백질에 대한 A₂ 비리알의 SINS 분석 하에서 특정한 상이한 단클론 항체 및 인간 혈청 알부민(HSA)으로 코팅된 비드(beads)의 피크 분광도를 비교한다. 표 1에 제시된 바와 같이, SINS 분석은 인력적(음성 A₂) 계와 척력적(양성 A₂) 계를 쉽게 구분한다. 그러나, 종래의 SINS 및 SLS 분석은 척력적 조건에 대한 동적 범위를 나타내지 않는다. 또한, 종래의 SINS와 SLS의 작은 차이는 일부 단백질의 복잡한 거동을 나타낸다.

[0060] 표 1

단백질	계의 성질	2 mM NaCl		20 mM NaCl		200 mM NaCl	
		SINS	A ₂	SINS	A ₂	SINS	A ₂
HSA	척력적	526	1.17E-4	526	9.68E-5	528	7.85E-5*
mAb1	척력적	530	1.72E-4	531	6.70E-5	532	1.34E-5
mAb2	혼합	583	-2.36E-5	536	-1.44E-5	534	1.47E-5
mAb3	인력적	556	-3.39E-5	555	-4.68E-5	565	NP
mAb4	척력적	531	-5.90E-5	533	-1.06E-5	535	1.38E-5
mAb5	혼합	562	-1.09E-5	535	-2.14E-5	530	-7.67E-6

[0061]

[0062] 본 발명자들은 일부 단백질이 고농도에서 안정할 수 있지만, 음성 A₂ 또는 적색-이동된 최대 흡광도 스펙트럼($\lambda_{\text{최대}}$)을 나타내는 것을 관찰하였다. 예를 들어, mAb5는 약 ~200 g/L의 농도를 쉽게 얻을 수 있고 안정한 상태를 유지하지만, 그 A₂는 음성이며 그 최대값은 낮은 이온 강도에서 적색-이동된다. 유사하게, mAb2는 약 ~175 g/L의 농도를 쉽게 얻을 수 있고 안정한 상태를 유지하지만, 그 A₂는 낮은 염 농도에서 음성이고 그 최대값은 낮은 이온 강도에서 적색-이동된다.

[0063] 여기서, SINS의 개선된 방법이 개시된다. 이 방법은 다량의 단백질에 대한 필요성을 회피하면서, 개발 초기 단계에서 단백질-특이적 현상을 평가하기 위해 단백질에 대한 동적 콜로이드 안정성 데이터를 제공한다. 이 방법은 나노입자를 코팅하는데 필요한 양을 초과하여 용액 중에 다양한 양의 단백질이 존재할 때 코팅된 나노입자 표면 플라즈몬 공명을 사용한다. 흡광도 프로파일이 관찰되며, 각 변이체 샘플에 대해 흡광도 세기 비를 계산하고, 결정된 동적 콜로이드 안정성을 결정하기 위해 플롯팅한다.

[0064] 하나의 구체예에서, 주어진 대상 단백질에 대한 다수의 개별 흡광도 세기 비 값을 결정하는데 사용되는 다수의 샘플 중의 각 샘플에 대해, 나노입자를 상기 입자를 완전히 코팅하는데 필요한 최소량의 단백질을 초과하는 다양한 양의 단백질과 결합시킨다. 사용되는 최소 단백질의 양은 단백질의 분자량(즉, 그 유체역학 반경), 나노입자의 크기(표면적), 및 나노입자의 농도에 의존한다. 예를 들어, 20 nm 금 나노입자가 mL 당 약 6 내지 6.5 x 10¹¹ 개 입자로 사용되면, 약 2.5 μ g/mL의 약 50 내지 150 kDa의 단백질이 나노입자를 완전히 코팅하기에 충분하다. 따라서, 2.5 μ g/mL를 초과하는 단백질이 상기 조건 하에서 다수의 샘플의 각 샘플에 대해 사용된다. 여기

서, 예를 들어 단백질은 샘플에 약 2.6 $\mu\text{g/mL}$ - 약 512 $\mu\text{g/mL}$ 이상, 약 $3 \pm 1 \mu\text{g/mL}$, 약 $4 \pm 1 \mu\text{g/mL}$, 약 $5 \pm 1 \mu\text{g/mL}$, 약 $6 \pm 1 \mu\text{g/mL}$, 약 $7 \pm 1 \mu\text{g/mL}$, 약 $8 \pm 1 \mu\text{g/mL}$, 약 $9 \pm 1 \mu\text{g/mL}$, 약 $10 \pm 1 \mu\text{g/mL}$, 약 $15 \pm 5 \mu\text{g/mL}$, 약 $20 \pm 5 \mu\text{g/mL}$, 약 $25 \pm 5 \mu\text{g/mL}$, 약 $30 \pm 5 \mu\text{g/mL}$, 약 $40 \pm 5 \mu\text{g/mL}$, 약 $50 \pm 10 \mu\text{g/mL}$, 약 $60 \pm 10 \mu\text{g/mL}$, 약 $70 \pm 10 \mu\text{g/mL}$, 약 $80 \pm 10 \mu\text{g/mL}$, 약 $90 \pm 10 \mu\text{g/mL}$, 약 $100 \pm 10 \mu\text{g/mL}$, 약 $125 \pm 15 \mu\text{g/mL}$, 약 $150 \pm 25 \mu\text{g/mL}$, $175 \pm 25 \mu\text{g/mL}$, $200 \pm 25 \mu\text{g/mL}$, $225 \pm 25 \mu\text{g/mL}$, $250 \pm 25 \mu\text{g/mL}$, $300 \pm 50 \mu\text{g/mL}$, $350 \pm 50 \mu\text{g/mL}$, $400 \pm 50 \mu\text{g/mL}$, $450 \pm 50 \mu\text{g/mL}$, $500 \pm 50 \mu\text{g/mL}$ 또는 $512 \pm 50 \mu\text{g/mL}$ 로 포함된다. 일부 구체예에서, 다수의 샘플은 상이한 단백질 농도를 함유하는 2 개의 샘플, 3 개의 샘플, 4 개의 샘플, 5 개의 샘플, 6 개의 샘플, 7 개의 샘플, 8 개의 샘플, 9 개의 샘플, 10 개의 샘플 또는 그 이상의 것을 포함한다.

[0065] 예를 들어, 다수의 샘플은 하나의 구체예에서 6.3×10^{11} 입자/mL 20 nm 금 나노입자와 약 3.125 $\mu\text{g/mL}$ 의 제1 농도, 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 의 제2 농도, 약 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 제3 농도, 약 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 제4 농도, 약 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 제5 농도, 약 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 제6 농도, 약 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 제7 농도 및 약 400 $\mu\text{g/mL}$ 의 제8 농도의 항체를 포함한다.

[0066] 하나의 구체예에서, 주어진 대상 단백질에 대한 다수의 개별 흡광도 세기 비 값을 결정하기 위해 사용된 다수의 샘플 중의 각 샘플에 대해, 각각의 나노입자/단백질 결합은 다양한 염 농도와 결합된다. 예를 들어, 샘플은 염화 나트륨과 같은 중성 염 단백질을 약 1 μM , 약 10 μM , 약 100 μM , 약 1 mM, 약 2 mM, 약 4 mM, 약 6 mM, 약 8 mM, 약 10 mM, 약 20 mM, 약 30 mM, 약 40 mM, 약 50 mM, 약 60 mM, 약 70 mM, 약 80 mM, 약 90 mM, 약 100 mM, 약 150 mM, 약 175 mM, 약 200 mM, 약 250 mM 또는 약 300 mM 또는 그 이상의 농도로 함유할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 염은 구아니디늄 클로라이드, 과염소산 리튬, 아세트산 리튬, 염화 마그네슘 등과 같은 카오토로픽 염일 수 있다. 샘플은 또한 카오토로픽 염에 부가하여 또는 대신하여 부탄올, 에탄올, 페놀, 프로판올, 도데실 황산 나트륨, 티오우레아 또는 우레아와 같은 또 다른 카오토로픽 제를 함유할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 샘플은 코스모트로픽 염 예컨대 카보네이트, 설페이트, 또는 포스페이트의 염, 예를 들어 암모늄 설페이트를 함유할 수도 있다.

[0067] 다수의 샘플은 상이한 염 농도를 갖는 샘플의 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 또는 그 이상의 서브세트를 포함할 수 있다. 따라서 예를 들어, 다수의 샘플은 총 30 개의 샘플에 대해 3 가지 상이한 염 농도에서 10 가지 상이한 단백질 농도를 포함할 수 있다. 특정 구체예에서, 다수의 샘플 중 하나의 서브세트는 약 2 mM의 염화 나트륨을 함유하고, 다수의 샘플의 또 다른 세트는 약 20 mM의 염화 나트륨을 함유하고, 다수의 샘플의 또 다른 세트는 약 200 mM의 염화 나트륨을 함유한다. 2 mM 염은 낮은 이온 강도로 간주되며 200 mM은 높은 이온 농도로 간주된다. 단백질의 대부분의 치료용 제형과는 관련이 없지만, 최대 300 mM 염의 높은 강장도는 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC) 컬럼을 통한 정제 과정을 거치는 단백질 제조와 관련하여 사용된다. 따라서 본 발명은 고농도 염 조건에서 고농도 단백질이 HIC 정제 등에 적합한지 여부를 결정하는데 유용하다.

[0068] 백색광을 각 시료에 가하고, 그 흡광도 스펙트럼을 얻는다. 흡광도 세기 비는 다수의 각 시료로부터 계산되어 플롯팅된다. 나노입자가 응집되지 않거나 응집이 적은 샘플에서, 즉 단백질이 척력성 또는 낮은 응집 포텐셜을 나타내는 경우, 흡광도 피크 파장 및 흡광도 세기는 대조군 비코팅 나노입자와 유사하다. 나노입자가 응집된 샘플에서, 즉 단백질이 인력성 또는 높은 응집 포텐셜을 나타내는 경우, 흡광도 피크 파장이 적색쪽으로 이동하고 대조군 비코팅 나노입자에 비해 피크 흡광도 세기가 감소함에 따라 흡광도 프로파일이 평탄화된다. 주어진 단백질에 대한 다수의 샘플의 각 샘플은 상이한 흡광도 프로파일(즉, 상이한 흡광도 세기 비)을 나타낼 수 있으며, 일부 경우에는 인력성을 나타내고 또 다른 경우에는 척력성을 나타낸다. 이들 단백질은 동적 범위의 콜로이드 안정성을 가지며 특정 조건 하에서 콜로이드적으로 안정할 수 있다. 일부 단백질의 경우, 단백질은 모든 파라미터(샘플)에 걸쳐 척력성을 나타낼 수 있다. 이러한 단백질은 견고한 것으로 간주되거나 견고한 동적 콜로이드 안정성을 가지고 있는 것으로 간주된다. 다른 단백질의 경우, 단백질은 모든 테스트된 조건 하에서 인력성을 나타낼 수 있다. 이러한 단백질은 콜로이드적으로 불안정한 것으로 간주된다.

[0069] 적어도 하나의 시험된 조건 하에서 (적어도 하나의 샘플에서) 척력성을 나타내는 이러한 단백질은 안정한 약물 물질로서 대규모 생산 및 제형화를 위해 선택될 수 있다. 이러한 단백질은 생산 및 저장 중에 응집체를 형성할 가능성이 적다. 또한, 단백질이 척력성을 나타내는 이러한 조건은 생산 단계 및 제형화 부형제에 단백질을 의약 물질로서 제공할 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 개시된 바와 같이 농도-의존성 SINS(CD-SINS)를 이용하는 것은 단백질의 제조가능성을 예컨대 하류 한외여과 및 투석여과 단계에서 결정할 수 있다. 대규모 제조를 위한 저점도 단백질 용액의 선택은 바이오프로세싱에서 효율성을 높이고 비용을 절감할 수 있다(Shire SJ, 2009, "Formulation and manufacturability of biologics." *Curr Opin Biotechnol.* 20(6):708-14). CD-SINS는 또한

광범위한 부형제(전통적이든 비전통적이든)에 일반적으로 적합하다. CD-SINS는 단백질 의약 물질을 제형화하는데 사용되는 상이한 화학 계열 간의 구조-활성 관계를 도출하는데 이용될 수 있으며, 자가-결합을 역전시키는 부형제를 선택하는데 이용될 수 있다(실시에 11 및 도 13 및 13 참조).

[0070] 수용가능한 콜로이드 안정성 동력학을 갖는 분자 및 조건을 선택하기 위한 일반적인 기준이 도 3에 도시되어 있는데, 이는 3 가지 이온 강도 조건 하에서 2개의 단백질, 즉 mAb1 및 mAb5의 흡광도 세기 비를 나타낸다. 세 가지 버킷이 제공된다: (A) 진행하기에 안전함, 이는 고농도에서 안정할 것으로 예상되는 견고한 분자를 포함함; (B) 조심하여 진행, 이는 일부 조건에서 임계값을 초과하는 흡광도 세기 비(예컨대, 1.7 이상의 A_{450}/A_{450})를 나타내는 분자를 포함함; 및 (C) 잠재적으로 문제 있음, 이는 모든 조건에서 임계 흡광도 세기 비 값을 획득하는데 실패한 분자를 포함함. 예를 들어, mAb1(개방 기호)은 콜로이드 안정성과 관련하여 견고하며, 낮은 염 조건(2 mM NaCl, 개방 사각형; 20 mM NaCl, 개방 삼각형)에서 "진행하기에 안전함" 버킷에 속하고, 높은 염 조건(200 mM NaCl, 개방 원)에서 "조심하여 진행" 카테고리에 속한다. 반대로, mAb5(폐쇄 기호)는 덜 견고하며, 낮은 염 조건에서 "잠재적으로 문제 있음" 카테고리에 속하고, 높은 염 조건에서 "조심하여 진행" 버킷에 속한다.

[0071] 농도-의존성 SINS(CD-SINS)는 단백질 농도가 증가함에 따라 단백질/용매 계가 어떻게 진화하는지를 제시한다. 이는 고 단백질 농도에서 상이한 단백질이 나타내는 무수히 많은 콜로이드 상호작용을 포착한다: 척력성 대 이상적(중립적); 인력성 대 이상적; 이상적 대 인력성; 및 둔감. 이는 전하 매개 척력성 또는 인력성과 같은 콜로이드 상호작용의 상이한 측면을 포착하고, 정전기 선별을 추적하며 상당히 넓은 동적 범위를 정성적으로 제공한다. CD-SINS는 가능한 소수성 매개 문제를 밝혀 내고 일반적으로 문제가 되는 분자를 표시한다. 이 방법은 현저히 적은 단백질 요구량으로 고 단백질 농도의 현상성을 평가할 수 있는 분석 도구를 제공하며 자동화에 적합하다.

[0072] 인력성 또는 혼합 콜로이드 단백질의 점도 감소

[0073] 바람직하지 않은 동적 콜로이드 상호작용 프로파일을 갖는, 즉 자가-결합하는 경향이 있는 단백질은 일반적으로 고농도에서 높은 점도를 가질 수 있다. 고농도에서의 이러한 높은 점도는 단백질을 비경구 주사에 대해 바람직하지 않게 만들 수 있다. 여기에 개시된 CD-SINS 분석은 점도-저감 부형제를 선별하는데 유용하다. 하나의 양상에서, 감소된 점도의 단백질 제형을 제조하는 방법이 제공된다. 하나의 구체예에서, 잠재적 점도-저감 부형제

[0074] 일부 구체예에서, 점도-저감 부형제는 점도-저감 부형제가 없는 단백질 용액의 점도에 비하여 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 2.5-배, 3-배, 3.5-배, 4-배, 4.5-배, 5-배, 또는 >5-배 만큼 단백질 용액의 점도를 감소시킨다.

[0075] 일부 구체예에서, 점도-저감 부형제는 아미노산 또는 아미노산의 염이다. 일부 구체예에서, 점도-저감 부형제는 탄화수소, 알칸, 알켄, 및 알킨, 지방산, 지방산 테일(fatty acid tail), 벤젠-함유 구조체, 벤조산, 치환된 탄화수소, 치환된 알칸, 치환된 알켄, 치환된 알킨, 치환된 지방산, 치환된 지방산 테일, 치환된 벤젠-함유 구조체, 치환된 벤조산, 설폰산, 아미노벤조산, 알킬화된 벤조산, 하이드록시벤조산, 또는 벤조산의 암모늄 염이다. 하나의 구체예에서, 점도-저감 부형제는 파라-아미노 벤조산(PABA)이다. 하나의 구체예에서, PABA는 단백질 제형에 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, 21 mM, 22 mM, 23 mM, 24 mM, 또는 25 mM의 농도로 포함된다. 하나의 구체예에서, 점도-저감 부형제는 단백질 용액 중에 >12 mM의 농도 또는 20 mM의 농도에서 결합된 PABA이다.

[0076] 정의

[0077] 본 명세서에서 사용되듯이, "자가-결합하는 경향성" 또는 "응집하는 경향성"과 상호 교환적으로 사용될 수 있는 용어 "콜로이드 안정성"은, 단백질의 인력적, 중립적, 또는 척력적 상호작용 능력을 야기할 수 있는, 공간-관통 분자 힘, 예를 들어 정전기, 반 데르 발스 등의 순(전체) 효과를 의미한다.

[0078] 본 명세서에서 사용되듯이, 용어 "흡광도 세기 비"는 샘플의 피크 흡광도 세기 대 기준 흡광도 세기의 비율을 의미한다. 기준 세기는 예상된 흡광도 파장보다 충분히 짧거나 긴 임의의 파장에서 샘플의 흡광도로부터 획득될 수 있다. 일부 구체예에서, 20 nm 금 나노입자에 대한 예상된 흡광도 파장은 약 500 내지 600 nm이고, 약 530 nm에서 피크를 이룬다. 따라서, 기준 흡광도 세기는 500 미만 또는 600 초과의 파장에서 샘플의 흡광도 세기일 수 있다. 예를 들어, 기준 흡광도 세기는 450 nm에서 샘플의 흡광도 세기일 수 있다. 여기서, 흡광도 세기 비는 450 nm에서의 흡광도 세기(A_{450} 또는 A_{initial})로 나눈 샘플의 피크 흡수 파장에서의 흡광도 세기($A_{\text{피크}}$)이다.

- [0079] 또 다른 구체예에서, 기준 흡광도 세기는 비코팅 나노입자(대조군 나노입자)의 피크 흡광도의 세기일 수 있다. 여기서, 단백질이 없는 나노입자는 실험의 코팅된 나노입자가 샘플링된 동일한 완충된 염에서, 흡광도 분석을 받게 된다. 비코팅 대조군 나노입자의 피크 흡광도 세기($A_{\text{대조군}}$)가 기준 흡광도 세기로 제공된다. 여기서, 흡광도 세기 비는 $A_{\text{피크}}/A_{\text{대조군}}$ 으로 계산된다.
- [0080] 흡광도는 일반적으로 임의의 단위로 표시되며, 비율이 계산될 때 삭제된다. 흡광도는 샘플을 통해 백색 광원을 통과시켜 측정된다. 샘플은 샘플의 광학 특성에 따라 특정 강도에서 특정 파장의 빛을 흡수한다. 샘플을 통과하는 빛의 세기, 즉 "투과광"은 여러 파장에서 측정되고 "흡수광"의 세기가 계산된다.
- [0081] 금 나노입자의 흡광 스펙트럼은 입자 표면 플라즈몬 공명에 의해 결정된다. 입수 광의 전기장은 금 입자 표면의 자유 전자와 상호작용하여 가시 영역에서 강한 흡수를 나타낸다. 이러한 광학 특성은 나노입자의 크기, 모양 및 응집 상태에 따라 달라진다. 예를 들어, 작은 입자(20 nm의 지름)가 큰 입자에 비하여 더 작은 파장(~522 nm)에서 흡수되며 더 좁고 더 강력한 피크($A = \sim 0.6$)를 나타낸다(예컨대, 250 nm 입자는 570-660 nm에서 가장 강하게 흡수되며 20 nm 입자의 세기의 약 40% 세기이다). 불규칙한 모양의 입자는 구형 입자에 비해 적색-이동된 더 낮은 세기의 더 넓은 피크를 나타낸다. 유사하게, 응집된 입자는 불연속 분산된 구형 입자에 비해 적색-이동된 더 낮은 세기의 더 넓은 피크를 나타낸다(도 1).
- [0082] 본 명세서에서 사용되듯이, 용어 "임계값"은 그 이상에서 단백질이 용액에서 안정한 고농도를 달성하기에 적합한 것으로 간주되는 흡광도 세기 비를 의미한다. 임계값 미만의 흡광도 비를 갖는 단백질 샘플은 단백질이 적어도 pH, 이온 강도, 및 단백질 밀도의 실험 조건에서 용액에서 안정한 고농도를 달성하기에 적합하지 않을 수 있음을 나타낸다. 단백질이 용액에서 고농도를 달성하는 이러한 가능성은 단백질의 "인력성" 또는 자가-결합에 대한 능력과 반비례하며, 단백질의 "척력성"과 정비례한다. 일부 구체예에서, 임계값은 약 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 또는 2 ($A_{\text{피크}}/A_{450}$)이다. 일부 구체예에서, 임계값은 약 0.7, 0.8, 0.9, 또는 1 ($A_{\text{피크}}/A_{\text{대조군}}$)이다.
- [0083] 본 명세서에서 사용되듯이, 용어 "동적 범위(dynamic range)"는 일정 범위의 조건에서 자가-결합을 할 수 있는 단백질의 능력을 의미한다. 자가-상호작용 나노입자 분광법(SINS)을 사용하는 종래 기술의 자가-결합 분석은 단지 단일 세트의 조건 하에서 단백질의 자가-결합 능력을 측정한다. 이러한 단일 관점 분석에서 "인력성"으로 보여지는 단백질은 거부될 수 있으며, 반면에 이러한 분석에서 "척력성"으로 보여지는 단백질은 고농도 제형 및 생산에 적합한 것으로 유지될 수 있다. 여기서, 일련의 흡광도 세기 비는 다양한 실험 조건에서 얻어지고 플롯되어, 특정 단백질에 대한 "동적 범위" 프로파일을 생성한다. 일부 조건 하에서, 단백질은 임계값 미만의 흡광도 세기 비를 가질 수 있지만, 다른 조건에서는 단백질은 임계값 초과와 흡광도 세기 비를 가질 수 있다. 그러한 단백질은 그러한 조건 하에서 허용가능한 정도의 척력성을 가지며, 이는 단백질 제조 공정 및 제형 부형제 및 농도의 선택을 제공할 수 있다. 예를 들어, 단클론 항체 2(mAb2)는 고농도/높은 이온 강도(예컨대, 200 mM NaCl) 조건 하에서 허용가능한 척력성 정도를 나타내지만, 낮은 이온 강도 조건 하에서는 허용불가능한 인력성을 나타낸다(도 2).
- [0084] 단백질의 동적 범위를 결정하기 위해 사용되는 실험 조건은 단백질의 농도; 나노입자의 크기, 모양, 수; 나노입자가 제조되는 물질; 나노입자를 단백질로 코팅하는 방법; 완충액 또는 용매 중의 성분의 성질 및 양; pH; 그리고 용액의 이온 강도를 포함한다. 예를 들어, 완충액의 pH는 단백질의 등전점(pI)에 따라 단백질의 전체 전하에 영향을 줄 수 있으며, 이에 따라 전하는 단백질의 2차 비리알 계수에 영향을 미칠 수 있다(음성 B_{22} 는 인력성이며, 양성 B_{22} 는 척력성이다). 이온 강도(즉, 염 함량)는 일반적으로 단백질 자가-인력성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, 이온 강도가 증가하면 단백질을 전하-기반 척력성으로부터 차폐하고 인력성을 촉진시킨다.
- [0085] 일부 구체예에서, 데이터 포인트(즉, 흡광도 세기 비)는 상이한 염 농도에서 또는 전혀 염 없이 획득된다. 예를 들어, 염, 예컨대, 염화 나트륨은 흔적량 내지 과포화 범위의 임의의 농도로 포함될 수 있다. 일부 구체예에서, 염화 나트륨은 "완충된 염"에 약 0.1 mM 내지 약 1 M, 1 mM 내지 500 mM, 또는 2 mM 내지 300 mM의 농도로 포함된다. 일부 구체예에서, 데이터 포인트는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 이상의 상이한 염 농도 조건에서 획득된다. 하나의 구체예에서, 적어도 3가지 염 농도 조건, 예를 들어 2 mM, 20 mM 및 200 mM 염화 나트륨이 사용된다. 또 다른 구체예에서, 적어도 5가지 염 농도 조건이 사용된다. 5가지 염 농도 조건의 비제한적인 예는 다음을 포함할 수 있다: 1 mM, 2 mM, 20 mM, 200 mM 및 300 mM 염화 나트륨, 또는 1 mM, 5 mM, 20 mM, 100 mM 및 300 mM 염화 나트륨. 통상의 기술자는 해당 단백질의 실험적 또는 치료적 용도에 기초하여 상이한 염 및/또는 염 조건을 사용하여 분석을 용이하게 적용시킬 수 있다.

- [0086] 본 명세서에서 사용되듯이, 용어 "완충된 염"은 완충액 및 염을 함유하는 수용액을 의미한다. 상기 염은 임의의 농도일 수 있고, 상기 완충액은 임의의 pH 범위의 완충 용량을 가질 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 염 및 완충액은 예컨대 탄산 칼슘과 같은 하나의 동일한 물질일 수 있다. 염은 단백질 상호작용에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며 종종 단백질을 침전시키고, 단백질 폴딩에 영향을 미치고, 약학 제형을 안정화시키고, 강장성을 제공하고, 그리고 크로마토그래피 동안 단백질 거동을 조절하는데 사용된다. 염은 코스모트로픽(수소 결합의 양의 자유 에너지) 또는 카오토트로픽(수소 결합의 음의 자유 에너지) 시약일 수 있다. 코스모트로픽은 물-물 상호작용을 촉진하고 단백질을 염-제거(salt-out)하는데 일반적으로 사용된다. 코스모트로픽 이온의 예로는 탄산염, 황산염, 인산염, 마그네슘, 리튬, 아연 및 알루미늄을 포함한다. 카오토트로픽은 수소 결합을 파괴하고 소수성 효과를 약화시켜, 단백질 변성을 촉진시킨다. 카오토트로픽 염의 예는 구아니디늄 클로라이드, 과염소산 리튬, 아세트산 리튬 및 염화 마그네슘을 포함한다. 염화 나트륨과 같은 염류는 호프마이스터 계열(Hofmeister series)의 중간 근처에 있으며, 이는 염-추가(salting-in) 및 염-제거(salting-out)에 영향이 없다. 단백질 자가-결합 분석의 목적에 따라, 완충된 염의 염은 염-추가, 염-제거 또는 생리학적 농도에서 효과적으로 중성으로 유지하는 이들의 능력을 위해 선택될 수 있다.
- [0087] "완충제"는 pH를 제어하기 위해 포함되며, 이는 단백질의 전하 특성, 및 그에 따른 구조 및 기능에 영향을 미친다. 단백질 자가-결합 분석의 목적에 따라, 완충제는 예를 들어 단백질 정제를 향상시키거나, 장기적인 단백질 안정성을 증진시키거나 또는 치료용 단백질의 투여 중에 환자의 편의를 가능하게 하는
- [0088] 능력을 위해 선택될 수 있다. 유용한 완충제는 해당 업계에 잘 알려져 있으며 MES, TRIS, PIPES, MOPS, 포스페이트, 시트레이트-포스페이트, 시트레이트, 아세테이트, 카보네이트-바이카보네이트, 히스티딘, 이미다졸 등을 포함한다. 하나의 특정 구체예에서, 단백질 자가-결합 분석에 완충되는 완충제는 약 pH 5.5 내지 6.7 범위의 유용한 완충액 범위를 갖는 MES (2-(N- 모르폴리노)에탄선폰산)이다. 특정 구체예에서, MES는 약 10 mM, pH6의 완충된 염에 포함된다.
- [0089] 완충제는 분석 시스템의 완충된 염 성분 및 시약에 사용된다. 완충제는 또한 분석에 추가하여 단백질을 함유하는 용액의 pH를 조절하는데 사용된다. 완충제는 단백질 생산에 사용되는 세포 배양 생산 배지에서 사용된다. 완충제는 또한 단백질 정제 및 그 안에 배치된 다양한 단위 조작 동안 사용되는 용액에서 사용된다. 완충제는 제형화된 의약품 물질 및 최종 의약품 제형에 사용된다.
- [0090] 단백질의 제형화에 유용한 완충제는 해당 기술 분야에 잘 알려져 있으며 히스티딘, 석시네이트, 시트레이트, 아세테이트, 포스페이트 등을 포함한다. 완충제는 제형화된 의약품 물질(FDS) 또는 의약품 제형(DP)에 1 mM 내지 100 mM의 농도로 포함될 수 있다. 일부 특정 구체예에서, 완충제는 약 10 mM로 포함된다. 특정 구체예에서, 완충제는 5 mM $\pm$ 0.75 mM 내지 15 mM $\pm$ 2.25 mM; 6 mM $\pm$ 0.9 mM 내지 14 mM $\pm$ 2.1 mM; 7 mM $\pm$ 1.05 mM 내지 13 mM $\pm$ 1.95 mM; 8 mM $\pm$ 1.2 mM 내지 12 mM $\pm$ 1.8 mM; 9 mM $\pm$ 1.35 mM 내지 11 mM $\pm$ 1.65 mM; 10 mM $\pm$ 1.5 mM; 또는 약 10 mM의 농도로 존재한다. 일부 특정 구체예에서, FDS 또는 DP의 완충제는 히스티딘, 포스페이트, 및/또는 아세테이트를 10 mM $\pm$ 1.5 mM로 포함한다.
- [0091] 일부 구체예에서, 상기 완충제는 약 3 내지 약 9의 pH 범위, 또는 약 3.7 내지 약 8.0의 pH 범위 내에서 완충될 수 있는 화합물로부터 선택된다. 예를 들어, 예비-동결건조된 용액은 pH가 약 3.4, 약 3.6, 약 3.8, 약 4.0, 약 4.2, 약 4.4, 약 4.6, 약 4.8, 약 5.0, 약 5.2, 약 5.4, 약 5.6, 약 5.8, 약 6.0, 약 6.2, 약 6.4, 약 6.6, 약 6.8, 약 7.0, 약 7.2, 약 7.4, 약 7.6, 약 7.8, 또는 약 8.0일 수 있다.
- [0092] 완충제는 개별 완충제의 조합, 예컨대 히스티딘과 아세테이트의 조합(히스-아세테이트 완충제)일 수 있다. 하나의 구체예에서, 완충제는 아세테이트에 의해 완충되는 범위와 같은, 약 3.5 내지 약 6, 또는 약 3.7 내지 약 5.6의 완충 범위를 갖는다. 하나의 구체예에서, 완충제는 포스페이트에 의해 완충되는 범위와 같은, 약 5.5 내지 약 8.5, 또는 약 5.8 내지 약 8.0의 완충 범위를 갖는다. 하나의 구체예에서, 완충제는 히스티딘에 의해 완충되는 범위와 같은, 약 5.0 내지 약 8.0, 또는 약 5.5 내지 약 7.4의 완충 범위를 갖는다.
- [0093] 본 명세서에서 사용되듯이, 용어 "나노입자"는 지름이 10^{-9} M (0.001 마이크로미터) 내지 10^{-6} M (1 마이크로미터) 규모인 구형, 거의 구형 또는 타원형 입자를 의미한다. 나노입자는 유기 폴리머, 금속, 반도체 재료, 자성 재료 및 이들 재료의 조합을 포함하는 임의의 재료를 포함할 수 있다. 금속 나노입자는 표면 플라즈몬 공명-기반 분석에 특히 적합한데, 왜냐하면 금속 구체는 입사광으로부터의 전기장과 상호작용할 수 있는 자유 전자를 그 표면에 가지고 있어 강한 흡광 스펙트럼을 생성하기 때문이다. 금 나노입자 및 은 나노입자는 플라즈몬 공명의 변화를 측정하는데 유용한 금속 나노입자의 예이다. 나노입자의 크기, 모양 및 재료는 최대 흡광도의 세기 및 파장에

영향을 미친다. 지름이 20 nm 내지 400 nm인 금 나노입자가 유용하다. 일부 구체예에서, 자가-결합 동적 범위 분석에 사용되는 나노입자는 지름이 약 20 nm, 30 nm, 40 nm, 50 nm, 60 nm, 80 nm 또는 100 nm인 금 나노입자 (AuNP)이다.

[0094] 본 명세서에서 사용되듯이, 용어 "광"은 전자기 복사(EMR)를 의미한다. 광은 단일 파장, 좁은 범위의 파장, 예컨대 "백색광"과 같은 넓은 범위의 파장, 파장의 조합일 수 있다. 광은 레이저 빔 형태 또는 확산 광 형태일 수 있다. 자가-응집 분석은 샘플이 광에 미치는 영향을 측정하는 분광광도계 분석이다. 따라서, 광이 샘플에 인가되며(즉, "입사광"), 샘플은 예컨대 플라즈몬을 생성하고 특정 파장의 광(즉, 흡수광)을 흡수하는 것과 같이 광과 상호작용하고, 광의 서브세트가 샘플을 통과하여 검출기까지 투과된다(즉, "투과광"). 일부 구체예에서, 입사광은 400 nm 내지 800 nm의 파장을 갖는 EMR을 포함하는 백색광이다. 일부 구체예에서, 투과광은 400 nm 내지 800 nm에 걸친 파장에서 검출되고 측정되며, 이로부터 흡광도 세기가 결정된다.

[0095] 본 명세서에서 사용되듯이, 용어 "자가-결합(self-associate)"은 특정 단백질이 동일한 종의 다른 단백질에 비특이적으로 결합하는 것을 의미한다. 비특이적이라면 비-생물학적으로 간주되는 약한 힘에 의한 결합을 의미한다. 비-특이적은 특이적 상호작용과 구별하기 위해, 두 개의 동일한 항체 절반을 결합하여 무손상 항체를 형성하는 것이 특이적 상호작용으로 간주된다. 반대로, 반 데르 발스(van der Waals) 또는 소수성 상호작용을 통해 두 개 이상의 동일한 무손상 항체가 결합되어 가역성 또는 비가역성인 이량체, 삼량체 또는 고차 다량체를 형성하는 것은 "비-특이적"이다.

[0096] 본 명세서에서 사용되듯이, 용어 "안정한" 또는 "안정성"은 단백질 또는 다른 생물학적 거대분자의 허용가능한 정도의 물리적 구조(열역학적 안정성), 화학 구조(동역학적 안정성) 또는 생물학적 기능(기능적 안정성)을 시간 경과에 걸쳐 유지하는 것을 의미한다. 단백질은 일정 시간 동안 저장 후 물리적 구조, 화학 구조 또는 생물학적 기능의 100%를 유지하지 않더라도 안정적일 수 있다. 특정 환경에서, 특정 시간 동안 저장 후 단백질의 구조 또는 기능의 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98% 또는 약 99%의 유지는 "안정한" 것으로 간주될 수 있다.

[0097] 안정성은 샘플에 남아있는 천연 단백질의 비율을 결정하여 측정될 수 있다. 천연 형태를 유지하는 단백질의 백분율은 단백질의 고분자량 응집체를 저분자량 천연 단백질로부터 분리하는 크기 배제 크로마토그래피에 의해 결정될 수 있다. 안정한 단백질은 시간이 지남에 따라 천연 구조의 90% 이상을 유지할 것이다. 안정한 단백질은 비가역성 응집체로서 총 단백질 종의 10% 이하를 함유한다.

[0098] 안정한 단백질은 응집체 형성 속도가 느리다. 안정한 단백질은 고분자량 종의 형성, 즉 응집의 증가를 겪는데, 즉 약 5°C 내지 약 25°C에서 최대 7 개월, 최대 8 개월, 최대 9 개월, 최대 10 개월, 최대 11 개월, 최대 12 개월, 최대 13 개월, 최대 14 개월, 최대 15 개월, 최대 16 개월, 최대 17 개월, 최대 18 개월, 최대 19 개월, 최대 20 개월, 최대 21 개월, 최대 22 개월, 최대 23 개월, 또는 최대 24 개월 동안의 저장 동안 15% 미만, 14% 미만, 13% 미만, 12% 미만, 11% 미만, 10% 미만, 9% 미만, 8% 미만, 7% 미만, 6% 미만, 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 2% 미만, 1% 미만, 0.5% 미만의 증가를 겪는다. 또 다른 방법, 예컨대, 열 안정성을 결정하기 위한 시차 주사 열량계(DSC), 기계적 안정성을 결정하기 위한 조절된 교반, 및 용액 탁도를 결정하기 위한 약 350 nm 또는 약 405 nm에서의 흡광도가 단백질의 안정성을 분석하기 위해 사용될 수도 있다. 하나의 구체예에서, 약 5°C 내지 약 25°C 6 개월 이상 동안 저장한 후, 제형의 OD405의 변화가 0 시간에서의 OD405으로부터 약 0.05 미만 (예컨대, 0.04, 0.03, 0.02, 0.01, 또는 그 미만)이면, 단백질은 안정한 것으로 간주될 수 있다.

[0099] 본 명세서에서 사용되듯이, 용어 "단백질"은 아마이드 결합을 통해 공유결합된 약 50개 초과와 아미노산을 갖는 임의의 아미노산 폴리머를 의미한다. 단백질은 해당 업계에 "폴리펩티드(polypeptide)"로 알려진 하나 이상의 아미노산 폴리머 사슬을 함유한다. 단백질은 단일 작용성 생체분자를 형성하기 위해 하나 이상의 폴리펩티드를 함유할 수 있다. "폴리펩티드"는 일반적으로 50개 초과와 아미노산을 함유하는 반면, "펩티드"는 일반적으로 50개 이하의 아미노산을 함유한다. 단백질은 하나 이상의 공유 및 비공유 변형을 포함할 수 있다. 디설파이드 브릿지(즉, 시스테인 잔기 사이에서 시스틴을 형성)가 일부 단백질에 존재할 수 있다. 이들 공유 결합은 단일 폴리펩티드 사슬 내, 또는 2개의 개별 폴리펩티드 사슬 사이에 존재할 수 있다. 예를 들어, 디설파이드 결합은 인슐린, 면역글로불린, 프로타민 등의 적절한 구조 및 기능에 필수적이다. 최근의 디설파이드 결합 형성에 관한 검토는 Oka 및 Bulleid, "Forming disulfides in the endoplasmic reticulum," 1833(11) Biochim Biophys Acta 2425-9 (2013)를 참조하라.

[0100] 디설파이드 결합 형성에 더하여, 단백질은 또 다른 번역-후 변형을 겪을 수 있다. 이러한 변형은 지질화(예컨대, 미리스토일화, 팔미토일화, 파메소일화, 게라닐게라닐화, 및 글리코실포스파티딜이노시톨(GPI) 앵커 형성), 알킬화(예컨대, 메틸화), 아실화, 아미드화, 글리코실화(예컨대, 아르기닌, 아스파라긴, 시스테인,

하이드록시 리신, 세린, 트레오닌, 티로신, 및/또는 트립토판에서의 글리코실 그룹의 첨가), 및 인산화(즉, 세린, 트레오닌, 티로신, 및/또는 히스티딘에 대한 인산기의 첨가)를 포함한다. 진핵생물에서 생산된 단백질의 번역-후 변형에 대한 최근의 검토에 대해, Mowen과 David, "Unconventional post-translational modifications in immunological signaling," 15(6) Nat Immunol 512-20 (2014); 및 Blixt와 Westerlind, "Arraying the post-translational glycoproteome (PTG)," 18 Curr Opin Chem Biol. 62-9 (2014)를 참조하라.

[0101] 단백질의 예는 치료용 단백질, 연구 또는 치료에 사용되는 재조합 단백질, 트랩 단백질 및 기타 수용체 Fc-융합 단백질, 키메라 단백질, 항체, 단클론 항체, 인간 항체, 이중특이성 항체, 항체 단편, 나노바디, 재조합 항체 키메라, 사이토카인, 케모카인, 펩티드 호르몬 등을 포함한다. 단백질은 곤충 바큇털 바이러스 시스템, 효모 시스템(예컨대, 피키아 종.), 포유동물 시스템(예컨대, CHO 세포 및 CHO-K1 세포와 같은 CHO 유도체)과 같은 재조합 세포-기반 생산 시스템을 사용하여 생산될 수 있다. 치료용 단백질과 그 생산을 논의하는 최근의 검토를 위해, Ghaderi et al., "Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation," 28 Biotechnol Genet Eng Rev. 147-75 (2012)를 참조하라.

[0102] 명세서에서 사용되듯이, 용어 "항원-결합 단백질"은 또 다른 분자단에 결합하는 임의의 단백질을 의미한다. 분자단(molecular entity)은 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 에피토프, 합텐, 항원 또는 생물학적 분자일 수 있다. 예를 들어, 항원-결합 단백질은 리간드에 결합하는 수용체 분자를 포함하며, 여기서 리간드는 항원이다. 항원-결합 단백질은 항체, 항체 단편(예컨대, Fab), 단쇄 항체, ScFv 분자, 수용체 및 수용체 부분을 포함하는 재조합 단백질, 리간드 분자, 리간드 또는 리간드 부분을 포함하는 재조합 단백질, 다수의 수용체 또는 수용체 단편을 포함하는 재조합 분자(예컨대, 수용체-Fc-융합 단백질) 등을 포함한다.

[0103] "항체" 또는 "면역글로불린 분자"는 항원-결합 단백질의 서브세트 또는 서브타입이다. 표준 면역글로불린 단백질(예컨대, IgG)은 4개의 폴리펩티드 사슬, 즉 디설파이드 결합에 의해 상호 연결된 2개의 중쇄(H) 및 2개의 경쇄(L)를 포함한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(본 명세서에서는 HCVR 또는 VH로 약칭함) 및 중쇄 불변 영역을 포함한다. 중쇄 불변 영역은 3가지 도메인, 즉 CH1, CH2 및 CH3를 포함한다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(본 명세서에서는 LCVR 또는 VL로 약칭함) 및 경쇄 불변 영역을 포함한다. 경쇄 불변 영역은 1가지 도메인, CL을 포함한다. VH 및 VL 영역은 프레임워크 영역(FR)으로 불리는 더욱 보존적인 영역으로 산재된, 상보성 결정 영역(CDR)이라 불리는, 초가변성 영역으로 더욱 세분화될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 아미노-말단으로부터 카르복시-말단으로 다음의 순서로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (중쇄 CDR은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3로 약칭될 수 있으며; 경쇄 CDR은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3로 약칭될 수 있다). 본 명세서에서 사용되듯이, "단클론 항체"는 단일 분자단의 항체를 의미하며, 일반적으로 단일 항체를 생성하는 모세포의 클론에 의해 생성된다. 단클론 항체는 다클론 항체가 상이한 세포에 의해 만들어지는 항체의 수집을 대표한다는 사실에 의해 다클론 항체와 구별된다. 단클론 항체는 두 개의 항체 절반 모두가 서로 동일하고 동일한 에피토프에 결합하는 것을 의미하는 1가 친화도, 또는 하나의 항체 절반이 나머지 항체 절반과 달리 상이한 에피토프에 결합하는 것을 의미하는, 2가 친화도, 즉 "이중특이적 항체"를 가질 수 있다.

[0104] "이중특이적 항체"는 둘 이상의 에피토프를 선택적으로 결합할 수 있는 임의의 항체를 포함한다. 이중특이적 항체는 일반적으로 2개의 상이한 중쇄를 포함하며, 각각의 중쇄는 2개의 상이한 분자(예컨대, 항원) 또는 동일한 분자(예컨대, 동일한 항원)에서, 상이한 에피토프에 특이적으로 결합한다. 이중특이적 항체가 2개의 상이한 에피토프(제1 에피토프 및 제2 에피토프)에 선택적으로 결합할 수 있는 경우, 제1 에피토프에 대한 제1 중쇄의 친화도는 일반적으로 제2 에피토프에 대한 제1 중쇄의 친화도보다 적어도 10^1 내지 10^2 또는 10^3 또는 10^4 만큼 더 작으며, 그 반대도 마찬가지이다. 이중특이적 항체에 의해 인식되는 에피토프는 동일하거나 상이한 표적(예를 들어, 동일하거나 상이한 단백질) 상에 있을 수 있다. 이중특이적 항체는, 예를 들어 동일한 항원의 상이한 에피토프를 인식하는 중쇄를 결합함으로써 만들어 질 수 있다. 예를 들어, 동일한 항원의 상이한 에피토프를 인식하는 중쇄 가변 서열을 인코딩하는 핵산 서열은 상이한 중쇄 불변 영역을 인코딩하는 핵산 서열에 융합될 수 있으며, 이러한 서열은 면역글로불린 경쇄를 발현하는 세포 내에서 발현될 수 있다. 전형적인 이중특이적 항체는 각각 3개의 중쇄 CDR을 갖는 2개의 중쇄를 가지며, 그 다음에 (N-말단에서 C-말단으로) CH1 도메인, 힌지(hinge), CH2 도메인, 및 CH3 도메인이 뒤따르고, 그리고 면역글로불린 경쇄는 항원-결합 특이성을 부여하지는 않지만 각 중쇄와 결합할 수 있거나, 또는 중쇄와 결합할 수 있고 중쇄 항원-결합 영역에 의해 결합된 하나 이상의 에피토프에 결합할 수 있거나, 또는 각 중쇄와 결합할 수 있고 중쇄 중 하나 또는 둘 모두를 하나 또는 두 에피토프에 결합시킬 수 있다.

[0105] "중쇄" 또는 "면역글로불린 중쇄"라는 문구는 임의 유기체로부터의 면역글로불린 중쇄 불변 영역 서열, 및 달리

명시되지 않는 한 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 중쇄 가변 도메인은 달리 명시되지 않는 한 3개의 중쇄 CDR 및 4개의 FR 영역을 포함한다. 중쇄의 단편은 CDR, CDR 및 FR, 및 이들의 조합을 포함한다. 전형적인 중쇄는 가변 도메인(N-말단부터 C-말단까지)에 후속하여, CH1 도메인, 힌지, CH2 도메인, 및 CH3 도메인을 갖는다. 중쇄의 기능적 단편은 항원을 특이적으로 인식할 수 있는 단편을 포함하며(예컨대, 마이크로몰, 나노몰, 또는 피코몰 범위의 KD로 항원을 인식함), 이는 세포로부터 발현 및 분비할 수 있으며, 적어도 하나의 CDR을 포함한다.

[0106] "경쇄"라는 문구는 임의 유기체로부터의 면역글로불린 경쇄 불변 영역 서열을 포함하며, 달리 명시되지 않는 한 인간 카파 및 람다 경쇄를 포함한다. 경쇄 가변 도메인(VL)은 달리 명시되지 않는 한 전형적으로 3개의 경쇄 CDR 및 4개의 프레임워크(FR) 영역을 포함한다. 일반적으로, 전체-길이 경쇄는 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, 및 경쇄 불가변 도메인을 포함하는 VL 도메인을 아미노 말단으로부터 카르복실 말단까지 포함한다. 본 발명에서 사용될 수 있는 경쇄는 예컨대, 항원-결합 단백질에 의해 선택적으로 결합된 제1 항원 또는 제2 항원에 선택적으로 결합하지 않는 것들을 포함한다. 적절한 경쇄는 기존 항체 라이브러리(습식 라이브러리 또는 실리코)에서 가장 일반적으로 사용되는 경쇄를 스크리닝함으로써 확인될 수 있는 경쇄를 포함하며, 여기서 상기 경쇄는 항원-결합 단백질의 항원-결합 도메인의 친화도 및/또는 선택성을 실질적으로 방해하지 않는다.

[0107] 적절한 경쇄는 항원-결합 단백질의 항원-결합 영역에 의해 결합된 에피토프 중 하나 또는 둘 모두에 결합할 수 있는 것들을 포함한다. "가변 도메인"이라는 문구는 N-말단부터 C-말단으로의 서열에서(달리 명시하지 않는 한), 다음과 같은 아미노산 영역을 포함하는 면역글로불린 경쇄 또는 중쇄(원하는대로 변형됨)의 아미노산 서열을 포함한다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. "가변 도메인"은 베타 시트가 제1 베타 시트의 잔기와 제2 베타 시트의 잔기 사이의 디설파이드 결합에 의해 연결되어 있는 이중 베타 시트 구조를 갖는 표준 도메인(VH 또는 VL)으로 폴딩(folding)될 수 있는 아미노산 서열을 포함한다.

[0108] 문구 "상보성 결정 영역" 또는 용어 "CDR"은 면역글로불린 분자(예컨대, 항체 또는 T 세포 수용체)의 경쇄 또는 중쇄의 가변 영역에서 2개의 프레임워크 영역 사이에서 일반적으로 나타나는 (예컨대, 야생형-동물에서) 유기체의 면역글로불린 유전자의 핵산 서열에 의해 인코딩되는 아미노산 서열을 포함한다. CDR은 생식세포 서열 또는 재배열된 또는 재배열되지 않은 서열에 의해 인코딩될 수 있으며, 그리고 예를 들어, 순진하거나 성숙한 B 세포 또는 T 세포에 의해 인코딩될 수 있다. 일부 상황에서(예컨대, CDR3에 대하여), 예컨대 서열을 접합하거나 연결시킨 결과로서(예컨대, 중쇄 CDR3를 형성하기 위한 V-D-J 재조합), CDR은 (예컨대, 재배열되지 않은 핵산 서열에서) 인접하지 않지만 B 세포 핵산 서열에서 인접하는 두 개 이상의 서열(예컨대, 생식세포 서열)에 의해 인코딩될 수 있다.

[0109] Fc-함유 단백질은 항체, 이중특이적 항체, 면역부착소, "수용체-Fc-융합 단백질" 그리고 면역 글로불린 CH2 및 CH3 영역의 적어도 기능적 부분을 포함하는 또 다른 결합 단백질을 포함한다. "기능적 부분"은 Fc 수용체(예컨대, FcγR; 또는 FcRn, 즉 신생아 Fc 수용체)에 결합할 수 있고, 및/또는 보체의 활성화에 참여할 수 있는 CH2 및 CH3 영역을 의미한다. CH2 및 CH3 영역이 임의의 Fc 수용체에 결합할 수 없게 하고 또한 보체를 활성화시키지 못하게 하는 결실, 치환 및/또는 삽입 또는 또 다른 변형을 함유하는 경우, CH2 및 CH3 영역은 기능적이지 않다.

[0110] Fc-함유 단백질은 면역글로불린 도메인에서의 변형을 포함할 수 있으며, 이는 변형이 결합 단백질의 하나 이상의 작동자 기능(effector function)에 영향을 미치는 것을 포함한다(예컨대, FcγR 결합, FcRn 결합, 및 이에 따른 반감기, 및/또는 CDC 활성화에 영향을 주는 변형). 이러한 변형은, 비제한적으로, 면역글로불린 불변 영역의 EU 번호부여를 참조하여, 하기의 변형 및 그 조합을 포함한다: 238, 239, 248, 249, 250, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 340, 342, 344, 356, 358, 359, 360, 361, 362, 373, 375, 376, 378, 380, 382, 383, 384, 386, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 428, 430, 433, 434, 435, 437, 438, 및 439.

[0111] 예를 들어, 제한하는 것은 아니지만, 결합 단백질은 Fc-함유 단백질이고 (언급된 변형이 없는 동일한 Fc-함유 단백질과 비교하여) 향상된 혈청 반감기를 나타내며, 250 위치(예컨대, E 또는 Q); 250 및 428 위치(예컨대, L 또는 F); 252 위치(예컨대, L/Y/F/W 또는 T), 254 위치(예컨대, S 또는 T), 및 256 위치(예컨대, S/R/Q/E/D 또는 T)에서의 변형; 또는 428 및/또는 433 위치(예컨대, L/R/SI/P/Q 또는 K) 및/또는 434 위치(예컨대, H/F 또는 Y)에서의 변형; 또는 250 및/또는 428 위치에서의 변형; 또는 307 또는 308 위치(예컨대, 308F, V308F), 및 434 위치에서의 변형을 갖는다. 또 다른 예에서, 변형은 428L (예컨대, M428L) 및 434S (예컨대, N434S) 변형; 428L, 259I (예컨대, V259I), 및 308F (예컨대, V308F) 변형; 433K (예컨대, H433K) 및 434 (예컨대, 434Y) 변

형; 252, 254, 및 256 (예컨대, 252Y, 254T, 및 256E) 변형; 250Q 및 428L 변형(예컨대, T250Q 및 M428L); 307 및/또는 308 변형(예컨대, 308F 또는 308P)을 포함할 수 있다.

[0112] 일부 제조합 Fc-함유 단백질은 생물학적 시스템에서 동족 결합 파트너를 갖는 수용체 또는 수용체 단편, 리간드 또는 리간드 단편을 함유한다. "수용체 Fc-융합 단백질"은 면역글로불린 Fc 도메인에 융합된 가용성 수용체를 함유하는 제조합 분자를 지칭한다. 일부 수용체 Fc-융합 단백질은 다수의 상이한 수용체의 리간드 결합 도메인을 함유할 수 있다. 그러한 수용체 Fc-융합 단백질은 "트랩" 또는 "트랩 분자"로 알려져 있다. 릴로노셉트(Rilonocept)와 수세포(aflibercept)는 각각 IL1R (US 특허 제7,927,583호 참조) 및 VEGF (US 특허 제7,087,411호 참조)를 길항하는 시판 트랩의 예이다. 또 다른 제조합 Fc-함유 단백질은 Fc 도메인에 융합된 펩티드를 함유하는 제조합 단백질을 포함하며, 예를 들어 센토코(Centocor)의 MIMETIBODY™ 기술이다. 제조합 Fc-함유 단백질은 다음 문헌에 개시되어 있다: C. Huang, "Receptor-Fc fusion therapeutics, traps, and MIMETIBODY technology," 20(6) Curr. Opin. Biotechnol. 692-9 (2009).

[0113] 본 명세서에서 사용되듯이, 용어 "강장제" 또는 "강장 시약"은 제형 또는 용액에 강장력 또는 삼투압을 제공하는 물질 또는 물질의 조합이다. 제형은 용매 킬로그램 당 약 0.29 오스몰의 용질(290mOsm)인 생리학적인 삼투압을 필요로 할 수 있다. 생리 삼투압을 갖는 제형은 일반적으로 생리학적으로 등장성으로 지칭된다. 제형의 삼투압은 290 mOsm보다 낮거나 (생리학적으로 저삼투압) 290 mOsm보다 높을 수 있다(생리 학적으로 고삼투압). 강장제를 제형에 첨가하여 제형을 적절한 강장력이 되도록 조정한다. 용어 "강장력"은 삼투압 또는 삼투압과 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0114] 강장제는 이온 강도 또는 전도력을 조절하기 위해 첨가되는 염, 및 비-염(non-salt) 강장제를 포함한다. 일반적으로 사용되는 염에는 염화 나트륨, 염화 칼륨, 염화 마그네슘, 및 염화 칼슘이 포함된다. 비-염 강장제는 당, 당 알코올, 단당류, 및 이당류를 포함하며, 예를 들어 소르비톨, 만니톨, 수크로스, 트레할로스, 글리세롤, 말토오스, 및 락토오스가 포함된다.

[0115] 본 명세서에서 사용되듯이, 용어 "계면 활성제"는 계면 표면 장력을 감소시키는 첨가제 또는 부형제를 의미한다. 일부 계면활성제에는 친유성 부분과 친수성 부분을 갖는다. 계면활성제는 단백질-단백질 소수성 상호작용 및 결과적으로 고분자량 중(즉, 응집체)의 형성을 감소시킴으로써 부가적인 안정성을 제공하는 것으로 여겨진다. 하나 이상의 계면활성제가 FDS, DP, 단백질 가공 및 제조 용액, 및 단백질 자가-결합 분석 용액을 비롯하여, 단백질-함유 용액에 포함될 수 있다. 계면활성제는 이온성 또는 비이온성일 수 있다. 비-이온성 계면활성제는 예를 들어, 알킬 폴리(에틸렌 옥사이드), 알킬 폴리글루코시드(예컨대, 옥틸 글루코시드 및 데실 말토시드), 지방 알코올 예컨대 세틸 알코올 및 올레일 알코올, 코카미드 MEA, 코카미드 DEA, 및 코카미드 TEA를 포함한다. 특정 비-이온성 계면활성제는 예컨대, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르(a.k.a. 폴리소르베이트) 예컨대 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 28, 폴리소르베이트 40, 폴리소르베이트 60, 폴리소르베이트 65, 폴리소르베이트 80, 폴리소르베이트 81, 및 폴리소르베이트 85; 폴록사머 예컨대 폴록사머 188, 폴록사머 407; 폴리에틸렌-폴리프로필렌 글리콜; 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함한다. 폴리소르베이트 20은 또한 TWEEN 20으로 알려져 있으며, 소르비탄 모노라우레이트 및 폴리옥시에틸렌소르비탄 모노라우레이트이다. 폴리소르베이트 80은 또한 TWEEN 80으로 알려져 있으며, 소르비탄 모노올레이트 및 폴리옥시에틸렌소르비탄 모노올레이트이다.

[0116] 단백질-함유 용액 내에 함유된 계면활성제의 양은 용액의 바람직한 특성 및 특정 목적에 따라 다를 수 있다. 특정

[0117] 구체예에서, 용액은 약 0.001% (w/v) 내지 약 0.5% (w/v) 계면활성제를 함유할 수 있다(예컨대, 폴리소르베이트 20 또는 폴리소르베이트 80). 예를 들어, 용액을 약 0.001%; 약 0.0015%; 약 0.002%; 약 0.0025%; 약 0.003%; 약 0.0035%; 약 0.004%; 약 0.0045%; 약 0.005%; 약 0.0055%; 약 0.006%; 약 0.0065%; 약 0.007%; 약 0.0075%; 약 0.008%; 약 0.0085%; 약 0.009%; 약 0.0095%; 약 0.01%; 약 0.015%; 약 0.016%; 약 0.017%; 약 0.018%; 약 0.019%; 약 0.02%; 약 0.021%; 약 0.022%; 약 0.023%; 약 0.024%; 약 0.025%; 약 0.026%; 약 0.027%; 약 0.028%; 약 0.029%; 약 0.03%; 약 0.031%; 약 0.032%; 약 0.033%; 약 0.034%; 약 0.035%; 약 0.036%; 약 0.037%; 약 0.038%; 약 0.039%; 약 0.04%; 약 0.041%; 약 0.042%; 약 0.043%; 약 0.044%; 약 0.045%; 약 0.046%; 약 0.047%; 약 0.048%; 약 0.049%; 약 0.05%; 약 0.051%; 약 0.052%; 약 0.053%; 약 0.054%; 약 0.055%; 약 0.056%; 약 0.057%; 약 0.058%; 약 0.059%; 약 0.06%; 약 0.061%; 약 0.062%; 약 0.063%; 약 0.064%; 약 0.065%; 약 0.066%; 약 0.067%; 약 0.068%; 약 0.069%; 약 0.07%; 약 0.071%; 약 0.072%; 약 0.073%; 약 0.074%; 약 0.075%; 약 0.076%; 약 0.077%; 약 0.078%; 약 0.079%; 약 0.08%; 약

0.081%; 약 0.082%; 약 0.083%; 약 0.084%; 약 0.085%; 약 0.086%; 약 0.087%; 약 0.088%; 약 0.089%; 약 0.09%; 약 0.091%; 약 0.092%; 약 0.093%; 약 0.094%; 약 0.095%; 약 0.096%; 약 0.097%; 약 0.098%; 약 0.099%; 약 0.10%; 약 0.15%; 약 0.20%; 약 0.25%; 약 0.30%; 약 0.35%; 약 0.40%; 약 0.45%; 또는 약 0.50% 상청액(예컨대, 폴리소르베이트 20 또는 폴리소르베이트 80)을 함유할 수 있다.

[0118] 본 명세서에서 사용되듯이, 용어 "안정화제"는 단백질의 천연 구조를 안정화시키는 역할을 하는 분자 또는 화합물, 또는 화학 물질의 조합(즉, 하나 이상의 화학 물질)을 의미한다. 안정제는 다음과 같은 메커니즘 중 하나 이상을 통해 용액에서 단백질을 안정화시킨다: (1) 물의 표면 장력 증가, (2) 단백질 주위의 물 층을 형성하는 단백질-부형제 배제, (3) 펩티드 결합의 부정적 상호작용, 및 (4) 단백질 표면과의 반발 상호작용. 특정 메커니즘에 관계없이, 안정화제는 단백질 표면에서 우선적으로 배제되므로, 단백질 표면에서 물이 풍부해진다. 또한, 바람직하지 않은 단백질-형제 상호작용은 변성 중에 단백질의 표면적이 증가하기 때문에 열역학적으로 바람직하지 않은 단백질 전개를 가져온다. 안정화제는 예를 들어 폴리올, 당, 아미노산, 염석 염(salting out salts), 또는 이들의 임의 조합을 포함한다. 유용한 안정화제의 예는 폴리에틸렌 글리콜, 소르비톨, 글리세롤, 만니톨, 트레할로스, 수크로오스, 아르기닌, 알라닌, 프롤린, 글리신, 염화 나트륨, 또는 이들의 임의 조합을 포함한다. 수크로오스 및 트레할로스가 가장 자주 사용되는 당이다.

[0119] 본 발명은 다음의 비-제한적인 항목에 의해 더욱 설명된다.

[0120] 항목 1. 자가-결합하는 단백질의 능력을 결정하는 방법으로, 상기 방법은 다음을 포함함:

[0121] a. 단백질, 나노입자, 및 완충된 염을 결합시켜 샘플을 형성하는 단계;

[0122] b. 상기 샘플을 광으로 여기시키는 단계;

[0123] c. 상기 샘플을 통하여 투과된 광을 측정하는 단계;

[0124] d. 상기 샘플의 흡광도 세기 비를 계산하는 단계,

[0125] 여기서 상기 단백질은 흡광도 세기 비가 임계값을 초과할 때 고농도에서 안정함.

[0126] 항목 2. 항목 1에 있어서, 상기 단백질은 항원-결합 단백질인 방법.

[0127] 항목 3. 항목 2에 있어서, 상기 항원-결합 단백질은 항체, 항체 단편, 또는 수용체-Fc-융합 단백질인 방법.

[0128] 항목 4. 항목 3에 있어서, 상기 항원-결합 단백질은 인간 단클론 항체인 방법.

[0129] 항목 5. 앞선 항목들 중 어느 하나에 있어서, 상기 단백질은 약 2 $\mu\text{g/mL}$ 내지 약 512 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 샘플에 존재하는 방법.

[0130] 항목 6. 앞선 항목들 중 어느 하나에 있어서, 상기 나노입자는 금 나노입자인 방법.

[0131] 항목 7. 항목 6에 있어서, 상기 금 나노입자는 지름이 약 20 nm 내지 약 100 nm인 방법.

[0132] 항목 8. 항목 7에 있어서, 상기 금 나노입자의 지름은 약 20 nm인 방법.

[0133] 항목 9. 앞선 항목들 중 어느 하나에 있어서, 상기 샘플은 mL 당 약 5×10^{11} 내지 약 8×10^{11} 개 나노입자를 포함하는 방법.

[0134] 항목 10. 앞선 항목들 중 어느 하나에 있어서, 샘플은 mL 당 약 $6-6.5 \times 10^{11}$ 나노입자를 포함하는 방법.

[0135] 항목 11. 앞선 항목들 중 어느 하나에 있어서, 상기 염은 약 2 mM 내지 약 250 mM의 농도로 샘플에 존재하는 방법.

[0136] 항목 12. 앞선 항목들 중 어느 하나에 있어서, 상기 염은 염화 나트륨인 방법.

[0137] 항목 13. 앞선 항목들 중 어느 하나에 있어서, 상기 염 농도는 약 2 mM, 약 20 mM, 또는 약 200 mM인 방법.

[0138] 항목 14. 앞선 항목들 중 어느 하나에 있어서, 상기 투과광은 약 450 nm 내지 약 750 nm 범위의 여러 파장에서 측정되는 방법.

[0139] 항목 15. 앞선 항목들 중 어느 하나에 있어서, 상기 흡광도 세기 비는 흡광도 최대치 대 초기 흡광도의 비율인 방법.

- [0140] 항목 16. 앞선 항목들 중 어느 하나에 있어서, 상기 흡광도 세기 비의 임계값은 약 1.7인 방법.
- [0141] 항목 17. 앞선 항목들 중 어느 하나에 있어서, 샘플 중의 단백질의 상이한 농도를 사용하여 단계 (a) - (d)를 반복하는 단계를 더욱 포함하는 방법.
- [0142] 항목 18. 앞선 항목들 중 어느 하나에 있어서, 샘플 중의 염의 상이한 농도를 사용하여 단계 (a) - (d)를 반복하는 단계를 더욱 포함하는 방법.
- [0143] 항목 19. 앞선 항목들 중 어느 하나에 있어서, 샘플의 상이한 pH를 사용하여 단계 (a) - (d)를 반복하는 단계를 더욱 포함하는 방법.
- [0144] 항목 20. 앞선 항목들 중 어느 하나에 있어서, e. 고농도에서 고도 가용성 단백질을 부형제와 결합시켜 제형화된 의약 물질을 형성하는 단계를 더욱 포함하는 방법.
- [0145] 항목 21. 앞선 항목들 중 어느 하나에 있어서, 상기 단백질의 농도는 약 50 mg/mL 내지 약 500 mg/mL인 방법.
- [0146] 항목 22. 항목 20 또는 항목 21 중 어느 하나에 있어서, 상기 부형제는 강장제, 완충제, 계면활성제, 안정화제, 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.
- [0147] 항목 23. 항목 22에 있어서, 상기 강장제는 염인 방법.
- [0148] 항목 24. 앞선 항목들 중 어느 하나에 있어서, 상기 염은 NaCl인 방법.
- [0149] 항목 25. 앞선 청구항 중 어느 하나에 따르는 방법에 의해 획득가능한 생물치료 약물(biotherapeutic drug)을 포함하는 조성물.
- [0150] 항목 26. 항목 25에 있어서, 전체 생물치료 약물의 약 10% 이하가 생물치료 약물의 농도에서 비가역적 응집체로서 존재하는 조성물.
- [0151] 항목 27. 항목 25-26 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물은 상기 임계값이 예컨대 약 1.5 내지 약 2.0 ($A_{\text{파크}}/A_{450}$)이 되도록 구성되는 조성물.
- [0152] 항목 28. 항목 25-27 중 어느 하나에 있어서, 상기 임계값은 약 0.7 내지 약 1.0 ($A_{\text{파크}}/A_{\text{대조군}}$)인 조성물.
- [0153] 항목 29. 항목 25-28 중 어느 하나에 있어서, 바이오제약 약물의 농도는 예컨대 약 50 mg/mL 내지 약 500 mg/mL, 약 50 mg/mL 내지 약 250 mg/mL, 또는 약 100 mg/mL 내지 약 250 mg/mL인 조성물.
- [0154] 항목 30. 의약에서 사용하기 위한 항목 25-29 중 어느 하나에 따라 획득가능한 조성물.
- [0155] 항목 31. 바이오제약 약물을 포함하는 조성물을 제조하기 위한 항목 1-24 중 어느 하나에 따르는 방법에서, 상기 조성물은 약 10- 10,000 mPas, 약 20-9000 mPas, 약 30-8000 mPas, 약 40-7000 mPas, 약 50-6000 mPas, 약 70-5000 mPas, 약 90-4000 mPas, 약 100-3000 mPas 또는 약 10 mPas, 또는 약 20 mPas, 또는 약 30mPas, 또는 약 40 mPas, 또는 약 50mPas or alternatively from 약 1 mPas 내지 약 20 mPas, 약 2 mPas, 약 3 mPas, 약 4 mPas, 약 5 mPas, 약 6 mPas, 약 7 mPas, 약 10 mPas, 13 mPas, 15 mP, 또는 약 20 mPas의 점도를 갖는 방법.
- [0156] 항목 32. 항목 31에 있어서, 상기 바이오제약 약물은 하나 이상의 단백질 또는 하나 이상의 항체 또는 이들의 임의의 조합인 방법.
- [0157] 항목 33. 항목 31-32 중 어느 하나에 있어서, 상기 항체는 단클론 항체, 다클론 항체, 또는 이들의 조합인 방법.
- [0158] 항목 34. 다음을 포함하는 생체분석 혼합물:
- [0159] a. 적어도 2개의 나노입자;
- [0160] b. 적어도 2가지 상(phase)의 단백질; 및
- [0161] c. 염 또는 완충제.
- [0162] 항목 35. 항목 34에 있어서, 상기 단백질의 적어도 2가지 상의 첫 번째는 가용성 상(soluble phase)인 생체분석 혼합물.
- [0163] 항목 36. 항목 34 또는 항목 35에 있어서, 상기 단백질의 적어도 2가지 상의 두 번째는 부착성 상(adherent

phase)이며, 여기서 상기 단백질은 상기 적어도 2개의 나노입자의 각각의 표면에 부착되는 생체분석 혼합물.

- [0164] 항목 37. 앞선 항목 34-36 중 어느 하나에 있어서, 상기 단백질의 적어도 2가지 상의 세 번째는 응집된 상 (aggregated phase)이며, 여기서 상기 단백질은 자가-결합하여 응집체를 형성하는 생체분석 혼합물.
- [0165] 항목 38. 앞선 항목 34-37 중 어느 하나에 있어서, 상기 응집된 단백질 중 하나 이상은 또한 나노입자의 표면에 부착되는 생체분석 혼합물.
- [0166] 항목 39. 앞선 항목 34-38 중 어느 하나에 있어서, 상기 적어도 2개의 나노입자의 각각은 금을 포함하는 생체분석 혼합물.
- [0167] 항목 40. 앞선 항목 34-39 중 어느 하나에 있어서, 상기 적어도 2개의 나노입자의 각각은 지름이 약 20 nm 내지 약 100 nm인 생체분석 혼합물.
- [0168] 항목 41. 앞선 항목 34-40 중 어느 하나에 있어서, 상기 지름은 약 20 nm인 생체분석 혼합물.
- [0169] 항목 42. 앞선 항목 34-41 중 어느 하나에 있어서, 상기 적어도 2개의 나노입자의 각각은 상기 단백질로 포화되는 생체분석 혼합물.
- [0170] 항목 43. 앞선 항목 34-42 중 어느 하나에 있어서, 상기 나노입자는 혼합물의 밀리리터 당 약 6×10^{11} 내지 약 7×10^{11} 개 나노입자의 밀도로 존재하는 생체분석 혼합물.
- [0171] 항목 44. 앞선 항목 34-43 중 어느 하나에 있어서, 상기 단백질은 약 2 $\mu\text{g/mL}$ 내지 약 512 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 존재하는 생체분석 혼합물.
- [0172] 항목 45. 앞선 항목 34-44 중 어느 하나에 있어서, 상기 단백질은 항원-결합 단백질인 생체분석 혼합물.
- [0173] 항목 46. 앞선 항목 34-45 중 어느 하나에 있어서, 상기 항원-결합 단백질은 항체, 항체 단편, 앵타머 및 수용체-Fc-융합 단백질로 구성된 군으로부터 선택되는 생체분석 혼합물.
- [0174] 항목 47. 앞선 항목 34-46 중 어느 하나에 있어서, 상기 항원-결합 단백질은 항체인 생체분석 혼합물.
- [0175] 항목 48. 앞선 항목 34-47 중 어느 하나에 있어서, 상기 항체는 인간 단클론 항체인 생체분석 혼합물.
- [0176] 항목 49. 앞선 항목 34-48 중 어느 하나에 있어서, 상기 염은 약 2 mM 내지 약 300 mM의 농도로 존재하는 생체분석 혼합물.
- [0177] 항목 50. 앞선 항목 34-49 중 어느 하나에 있어서, 상기 염은 약 2 mM, 약 20 mM, 또는 약 200 mM의 농도로 존재하는 생체분석 혼합물.
- [0178] 항목 51. 앞선 항목 34-50 중 어느 하나에 있어서, 상기 염은 NaCl을 포함하는 생체분석 혼합물.

[0179] 실시예

- [0180] 하기 실시예는 본 발명의 방법을 추가로 설명하기 위해 제공된다. 이들 실시예는 단지 예시적인 것이며 어떤 식으로든 본 발명의 범위를 제한하려는 것은 아니다.

[0181] 실시예 1: 재료

- [0182] 단클론 항체(mAb)를 EESYR® 세포에 의해 생성하고 단백질 A 크로마토그래피 및 음이온 교환 또는 소수성 상호작용 크로마토그래피의 연마 단계에 의해 정제하였다. 완충제 성분은 Sigma-Aldrich, VWR 또는 JT-Baker로부터 구입하였고, 이용 가능한 최고 등급이었다. 일러스트라(Illustra) NAP 칼럼(Cat. #17-0853-02) 및 XK26/100 수퍼덱스(Superdex) 200 μg 칼럼(Cat. #90-1002-73)을 GE 헬스케어 라이프 사이언스(GE Healthcare Life Sciences)로부터 구입하였다. 아미콘 원심분리 필터 장치(Amicon Centrifugal Filter Units)(Cat. #UFC905024)를 EMD 밀리포어(Millipore)로부터 구입하였다. 슬라이드-A-라이저(Slide-A-Lyzer)™ G2 투석 카세트(Dialysis Cassettes)(Cat. #87732)를 써모피셔 사이언티픽(ThermoFisher Scientific)으로부터 구입하였다. 20 nm 금 나노입자(Cat. #HD.GC20)를 BBI 솔루션스(solutions)로부터 구입하였다. 써모 사이언티픽(Thermo Scientific)™ Nunc™ 마이크로웰(Microwell)™ 96-웰 마이크로플레이트(Cat. #12-565-66)를 반응 용기로 사용하여 흡광도 스펙트럼을 획득하였다.

[0183] 실시예 2: 고농도 정적 광 산란 (HC-SLS).

- [0184] 농축된 (100 g/L) 단백론 항체(mAb1, mAb2, mAb3, mAb4, mAb5 및 mAb6)를 각각 10 mM MES pH 6.0 50 mM 염화 나트륨에서 XK26/100 수퍼덱스(Superdex) 200 pg 칼럼을 통하여 악타 아방트(Akta avant)(GE 헬스케어 라이프 사이언스(GE Healthcare Life Sciences)) 상에서 정제하였다. 단량체 mAb 단편을 수거하고 비바플로우(VivaFlow) 200 30,000 MWCO HY 막과 함께 이지-로드(Easy-Load) MAsterFlex L/S(콜 파머(Cole Parmer)) 펌프를 사용하여 농축시켰다. 각각의 농축된 항체 150 mL를 3개의 분획으로 나누고 10,000 MWCO 투석 카세트에 로딩하고 2 L의 10 mM MES pH 6.0, 250 mM 염화 나트륨; 10 mM MES pH 6.0, 50 mM 염화 나트륨; 및 10 mM MES pH 6.0, 10 mM 염화 나트륨 용액에 대해 교환시켰다. 용액을 50,000 MWCO를 갖는 원심분리 필터 장치를 사용하여 각각의 완충액에서 약 15 mL의 최종 부피로 농축시켰다. 농도를 SoloVPE(C Technologies, Inc.)를 사용하여 측정하였다. 항체는 10 mM MES pH 6.0, 10 mM 염화 나트륨에서 명목상 60 g/L 이상으로 농축될 수 없었다. 2 개의 다른 염 농도(250 mM 및 50 mM 염화 나트륨)는 명목상 80 g/L로 조정되었다. 3 가지 조건의 분취량을 취하여 10 g/L로 희석하였다. 80 g/L, 10 g/L의 샘플 및 완충액을 CG-MALS 장치(Wyatt Technology)에 부착시키고, 광산란 신호를 mAb 농도의 함수로서 측정하였다.
- [0185] **실시예 3: 표준 자가-상호작용 나노입자 분광법 (SINS).**
- [0186] 상이한 염 조건 하에서 각각의 항체(mAb1, mAb2, mAb3, mAb4, mAb5 및 mAb6)의 서브-분취량을 별도의 15 mL 팔콘 튜브에 첨가하였다. 20 nm의 금 나노입자 용액의 1 광학 밀도(1 O.D.) 5 mL를 용액에 첨가하여 산출된 최종 단백질 농도가 50 µg/mL이 되었다. 흡광도 스펙트럼 및 최대값을 30 분을 기다린 후 SPECTRAMax 340PC(Molecular Devices)에서 기록하였다.
- [0187] 농도-의존성 자가-상호작용 나노입자 분광법 (CD-SINS). 100 mM 완충 용액을 적절한 pH에서 제조하였다. 일러스트라(Illustra) NAP 칼럼을 2.4 mL의 100 mM 완충 용액으로 컨디셔닝 하였다(예컨대 표적 pH에 따라 MES 또는 인산 나트륨). 농축된 (50-75 g/L) mAb 스톱 용액을 컨디셔닝된 탈염 칼럼을 사용하여 완충 교환하였다. 산출된 농도를 SoloVPE를 사용하여 측정하였다. 각각의 항체를 후속하여 100 mM 완충액에서 5.12 mg/mL까지 희석시켰다. 그 다음 mAb를 마이크로웰플레이트의 컬럼 1에 첨가하고 100 mM 완충액에서 0.04 mg/mL까지 연속으로 희석시켰다. 80 µL의 금 나노입자를 96 마이크로웰플레이트의 컬럼 2, 3 및 4에 첨가하였다. 40 µL의 연속으로 희석된 mAb를 컬럼 1로부터 연속 희석을 유지하면서 금 나노입자를 함유하는 각각의 컬럼에 멀티채널 피펫을 사용하여 첨가하였다. 280 mL의 357 mM, 71 mM 및 14 mM 염화 나트륨 염 스톱을 후속하여, 멀티채널 피펫을 사용하여, 컬럼 2, 3 및 4에 각각 첨가하였다. 산출된 용액을 30 분 동안 평형화시키고 그 후 흡광도 스펙트럼을 SPECTRAMax 340PC에서 기록하였다. 최대 흡광도 세기를 450 nm에서의 흡광도와 비교하여 정규화시켰다. 이러한 비율을 항체의 최종 농도의 함수로서 도시한다.
- [0188] **실시예 4: 인간 혈청 알부민(HSA)의 동적 콜로이드 안정성**
- [0189] 밀리리터 당 약 6.3×10^{11} 개 입자에서 20 nm 금 나노입자를 2 mM NaCl, 20 mM NaCl, 또는 200 mM NaCl, pH 6의 10 mM MES 완충액에서 다양한 농도의 인간 혈청 알부민(HAS)과 결합시켰다. 3.125 µg/mL, 6.25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 및 400 µg/mL를 함유하는 개별 샘플을 흡광도 분광법으로 처리하였다. 이러한 스펙트로그램을 도시하였고(도 4, 200 mM NaCl 샘플에 대한 스펙트럼을 도시함) 및 최대 흡광도에서의 흡광도 세기($\lambda_{\text{최대}}$) 대 450 nm에서의 초기 흡광도의 비율을 각 단백질 농도에 대해 계산하고 도시하였다(도 5).
- [0190] HSA는 모든 이온 강도에 대하여 $1.7(A_{\text{피크}}/A_{450})$ 보다 큰 흡광도 세기 비를 나타내며 더 높은 단백질 농도에서, 유리한 동적 콜로이드 상호작용 프로파일을 나타낸다. 정적 광산란(static light scattering) 실험은 CD-SINS 프로파일과 전반적으로 일치하는 양성 비리알(A_2)을 보여준다(표 2).

[0191] 표 2

NaCl mM	SLS (A_2)
2	1.17E-4
20	9.68E-5
120	7.85E-5

[0192]

[0193] **실시예 5: 단클론 항체 No. 1 (mAb1)**

[0194] 밀리리터 당 약 6.3×10^{11} 개 입자에서 20 nm 금 나노입자를 2 mM NaCl, 20 mM NaCl, 또는 200 mM NaCl, pH 6의 10 mM MES 완충액에서 다양한 농도의 인간 mAb1과 결합시켰다. 3.125 $\mu\text{g/mL}$, 6.25 $\mu\text{g/mL}$, 12.5 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$, 및 400 $\mu\text{g/mL}$ 를 함유하는 개별 샘플을 흡광도 분광법으로 처리하였다. 이러한 스펙트로그램을 도시하였고 및 최대 흡광도에서의 흡광도 세기($\lambda_{\text{최대}}$) 대 450 nm에서의 초기 흡광도의 비율을 각 단백질 농도에 대해 계산하고 도시하였다(도 6).

[0195] mAb1은 모든 이온 강도에 대하여 $1.7(A_{\text{피크}}/A_{450})$ 보다 큰 흡광도 세기 비를 나타내며 더 높은 단백질 농도에서, 유리한 동적 콜로이드 상호작용 프로파일을 나타낸다. 고농도 정적 광산란(static light scattering) 실험은 CD-SINS 프로파일과 전반적으로 일치하는 양성 비리알(A_2)을 보여준다(표 3, 도 7).

[0196] 표 3

NaCl mM	SLS (A_2)
2	1.72E-4
20	6.70E-5
200	1.34E-5

[0197]

[0198] **실시예 6: 단클론 항체 No. 6 (mAb6)**

[0199] 밀리리터 당 약 6.3×10^{11} 개 입자에서 20 nm 금 나노입자를 2 mM NaCl, 20 mM NaCl, 또는 200 mM NaCl, pH 6의 10 mM MES 완충액에서 다양한 농도의 인간 mAb6과 결합시켰다. 3.125 $\mu\text{g/mL}$, 6.25 $\mu\text{g/mL}$, 12.5 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$, 및 400 $\mu\text{g/mL}$ 를 함유하는 개별 샘플을 흡광도 분광법으로 처리하였다. 이러한 스펙트로그램을 도시하였고 및 최대 흡광도에서의 흡광도 세기($\lambda_{\text{최대}}$) 대 450 nm에서의 초기 흡광도의 비율을 각 단백질 농도에 대해 계산하고 도시하였다(도 8).

[0200] mAb6은 낮은 이온 강도에서 $1.7(A_{\text{피크}}/A_{450})$ 보다 큰 흡광도 세기 비를 나타내며 더 높은 단백질 농도에서, 이러한 조건 하에서 유리한 동적 콜로이드 상호작용 프로파일을 나타낸다. mAb6은 이온 강도를 증가시키면 인력적 상호작용의 증가를 나타낸다. 고농도 정적 광산란(static light scattering) 실험은 CD-SINS 프로파일과 전반적으로 일치하는 다양한 비리알(A_2)을 보여준다(도 9).

[0201] **실시예 7: 단클론 항체 No. 2 (mAb2)**

[0202] 밀리리터 당 약 6.3×10^{11} 개 입자에서 20 nm 금 나노입자를 2 mM NaCl, 20 mM NaCl, 또는 200 mM NaCl, pH 6의 10 mM MES 완충액에서 다양한 농도의 인간 mAb2와 결합시켰다. 3.125 $\mu\text{g/mL}$, 6.25 $\mu\text{g/mL}$, 12.5 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$, 및 400 $\mu\text{g/mL}$ 를 함유하는 개별 샘플을 흡광도 분광법으로 처리하였다. 이러한 스펙트로그램을 도시하였고 및 최대 흡광도에서의 흡광도 세기($\lambda_{\text{최대}}$) 대 450 nm에서의 초기 흡

광도의 비율을 각 단백질 농도에 대해 계산하고 도시하였다(도 2).

[0203] mAb2는 다양한 조건 하에서 순 단백질 상호작용에서 중대한 변화를 보여준다. 낮은 이온 강도에서, mAb2는 인력적 상호작용의 증가를 나타낸다. 이온 강도가 증가함에 따라 분자는 전반적으로 척력성이 된다. 200 mM NaCl에서, 항체는 유리한 콜로이드 안정성을 갖는다. 고농도 정적 광 산란 실험은 최대 흡광도의 기존 SINS 파장과 전반적으로 일치하는 다양한 비리얼(A_2)을 보여준다(표 1).

[0204] **실시예 8: 단클론 항체 No. 3 (mAb3)**

[0205] 밀리리터 당 약 6.3×10^{11} 개 입자에서 20 nm 금 나노입자를 2 mM NaCl, 20 mM NaCl, 또는 200 mM NaCl, pH 6의 10 mM MES 완충액에서 다양한 농도의 인간 mAb3과 결합시켰다. 3.125 $\mu\text{g/mL}$, 6.25 $\mu\text{g/mL}$, 12.5 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$, 및 400 $\mu\text{g/mL}$ 를 함유하는 개별 샘플을 흡광도 분광법으로 처리하였다. 이러한 스펙트로그램을 도시하였고 및 최대 흡광도에서의 흡광도 세기($\lambda_{\text{최대}}$) 대 450 nm에서의 초기 흡광도의 비율을 각 단백질 농도에 대해 계산하고 도시하였다(도 10).

[0206] mAb3은 문제가 있는 고농도의 제형 및 제조를 나타내는 콜로이드적으로 불안정한 단백질의 한 예이다. 모든 이온 강도 및 단백질 농도에서, mAb3은 인력적 상호작용을 나타낸다. 고농도 정적 광 산란 실험은 최대 흡광도의 기존 SINS 파장과 전반적으로 일치하는 음성 비리얼(A_2)을 보여준다(표 1).

[0207] **실시예 9: 단클론 항체 No. 4 (mAb4)**

[0208] 밀리리터 당 약 6.3×10^{11} 개 입자에서 20 nm 금 나노입자를 2 mM NaCl, 20 mM NaCl, 또는 200 mM NaCl, pH 6의 10 mM MES 완충액에서 다양한 농도의 인간 mAb4와 결합시켰다. 3.125 $\mu\text{g/mL}$, 6.25 $\mu\text{g/mL}$, 12.5 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$, 및 400 $\mu\text{g/mL}$ 를 함유하는 개별 샘플을 흡광도 분광법으로 처리하였다. 이러한 스펙트로그램을 도시하였고 및 최대 흡광도에서의 흡광도 세기($\lambda_{\text{최대}}$) 대 450 nm에서의 초기 흡광도의 비율을 각 단백질 농도에 대해 계산하고 도시하였다(도 11).

[0209] mAb4는 낮은 이온 강도에서 콜로이드적으로 안정한 단백질의 예이지만, 낮은 이온 농도에서 높은 단백질 농도에서 낮은 용해도를 나타낸다. 혼합 비리얼(낮은 이온 강도에서 음성, 높은 이온 강도에서 양성)을 나타내는 정적 광산란 실험은 CD-SINS 생성 데이터와의 불일치를 보여주며, 이는 mAb4에 대한 척력성 프로파일을 보여준다(표 1).

[0210] **실시예 10: 단클론 항체 No. 5 (mAb5)**

[0211] 밀리리터 당 약 6.3×10^{11} 개 입자에서 20 nm 금 나노입자를 2 mM NaCl, 20 mM NaCl, 또는 200 mM NaCl, pH 6의 10 mM MES 완충액에서 다양한 농도의 인간 mAb5와 결합시켰다. 3.125 $\mu\text{g/mL}$, 6.25 $\mu\text{g/mL}$, 12.5 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$, 및 400 $\mu\text{g/mL}$ 를 함유하는 개별 샘플을 흡광도 분광법으로 처리하였다. 이러한 스펙트로그램을 도시하였고 및 최대 흡광도에서의 흡광도 세기($\lambda_{\text{최대}}$) 대 450 nm에서의 초기 흡광도의 비율을 각 단백질 농도에 대해 계산하고 도시하였다(도 12).

[0212] mAb5는 낮은 이온 강도에서 인력성을 나타내고 이온 강도가 증가함에 따라 높은 단백질 농도 거동의 개선을 나타내는 콜로이드적으로 혼합된 단백질의 예이다. 단지 음성 비리얼을 나타내는 정적 광산란 실험은 CD-SINS 생성 데이터와의 불일치를 보여주며, 이는 mAb4에 대한 혼합 프로파일을 보여준다(표 1).

[0213] **실시예 11: 부형제 선별 및 선택**

[0214] 일부 제형 조건 하에서 바람직하지 않은 동적 콜로이드 상호작용 프로파일을 갖는 고점도 제형화된 항체(mAb7)를 사용하여 항체의 CG-SINS 프로파일을 향상시키는 이들의 능력을 위한 추가 부형제를 선별하였다. 상이한 완충액 및 이온 강도(도 13), 그리고 당 및/또는 아미노산 부형제(도 14)를 함유하는 다양한 용액에서 제형화된 단클론 항체 7(mAb7)의 CG-SINS 프로파일은 고농도에서의 분산에 유리한 흡광도_{최대}/흡광도₀ 임계값 미만으로 유지되었다(예컨대, 1.7 미만). 약 100 mg/mL로 제형화된 mAb7의 점도는 ~100 cP에서 관찰되었다.

[0215] CD-SINS 분석은 mAb7에 대한 다양한 치환된 벤조에이트 화합물의 콜로이드 안정화 효과를 선별하는데 사용되었다. 치환된 벤조산은 m-하이드록시벤조산, p-하이드록시벤조산, m-메틸벤조산, p-메틸벤조산, m-에틸벤조산, p-에틸벤조산, m-아미노벤조산, p-아미노벤조산, 설펜산, 및 암모늄 벤조에이트를 포함한다. 도 15는 치환된 벤조산 각각으로 제형화된 mAb7의 CD-SINS 흡광도 비 산점도를 나타낸다. p-아미노벤조산(PABA, 도 15의 개방 원)을

제형화된 mAb7과 결합시켰을 때, mAb7은 바람직한 콜로이드 안정성을 나타냈으며, 이는 고농도에서의 분산에 바람직한 입계값 이상의 흡광도 비, 즉 도 15에 도시된 바와 같이 >1.6 또는 1.7에 의해 입증되었다.

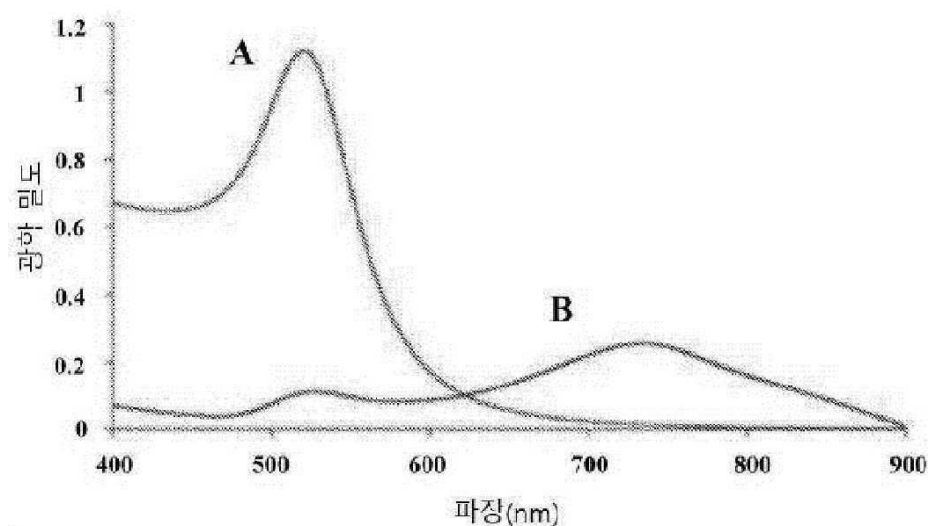
[0216] PABA를 mAb7과 용량 의존적으로 결합시키고 CD-SINS 분석을 실시하였다. mAb7에 >12 mM PABA(예컨대, 18 mM, 24 mM, 30 mM 및 36 mM PABA)를 포함시키면 유리한(즉, 척력성) 콜로이드 상호작용 프로파일이 생성되었다(도 16). mAb7의 콜로이드 상호작용 프로파일에 대한 PABA의 효과는 약 20 mM PABA에서 포화되는 것으로 나타났다.

[0217] 20 mM PABA를 5 g/L, 10 g/L, 30 g/L, 50 g/L, 70 g/L 및 80 g/L의 mAb7과 혼합하고, 비틀림 레오미터(torsional rheometer)를 사용하는 원뿔 및 플레이트 법을 사용하여 점도 분석을 실시하였다(Pathak 등, Biophys. J. 104(4): 913-923, 2013 Feb 19). 결과를 도 17에 나타낸다. Krieger-Dougherty 알고리즘을 사용하는 100 g/L mAb7에 대한 이들 결과의 외삽(예컨대 Lukham 및 Ukeje, J. Colloid Interface Sci., 220(2): 347-356, 1999 Dec 15 참조)은 20 mM PABA를 함유하는 mAb7 제형에서의 정상 전단 점도의 약 3 배 감소를 나타냈다.

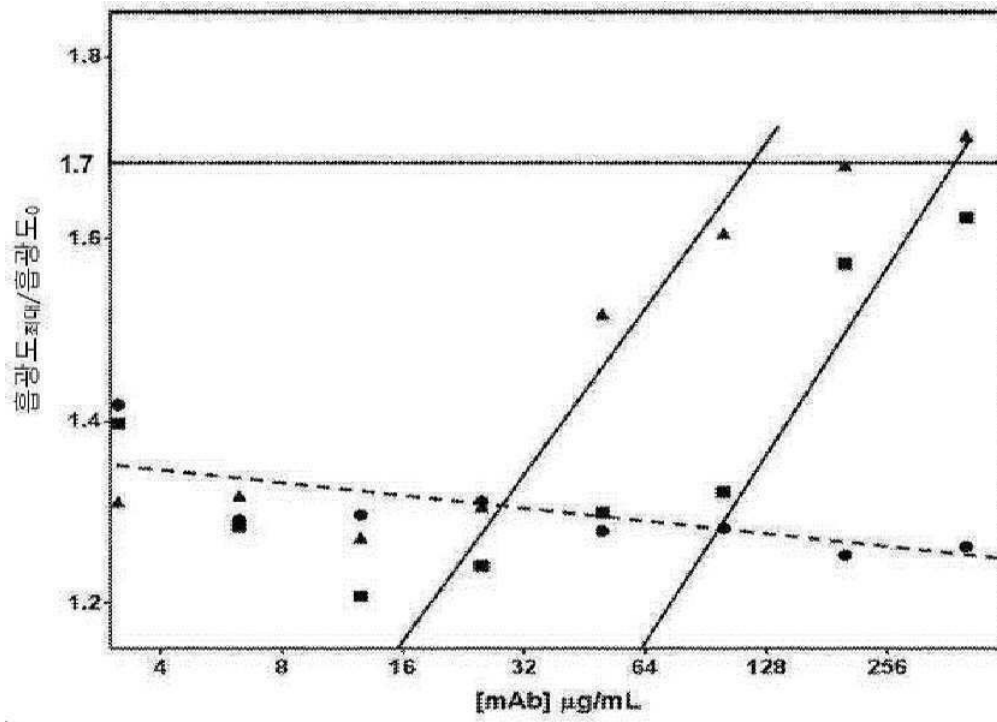
[0218] 삭제

도면

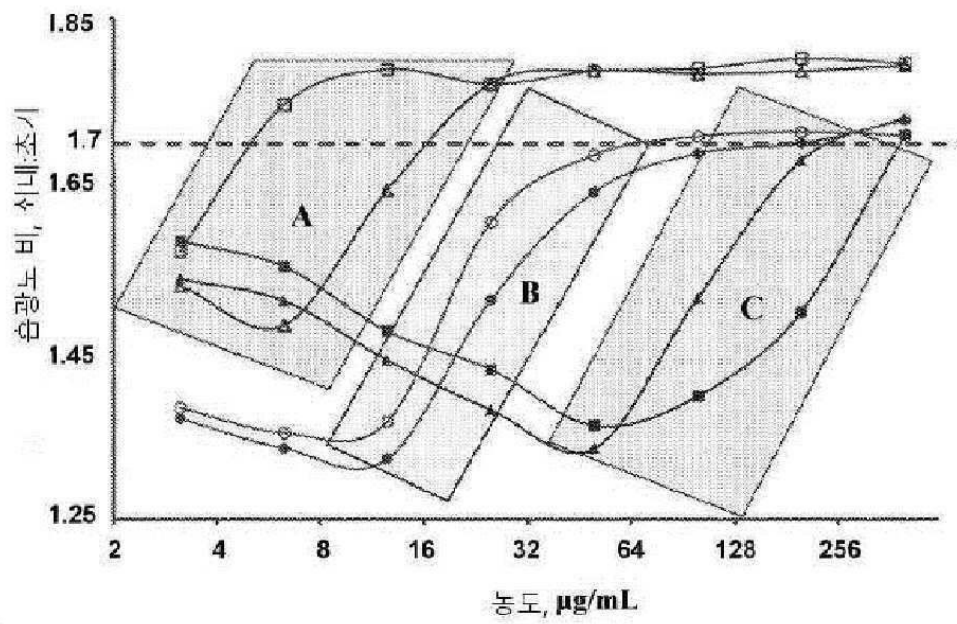
도면1



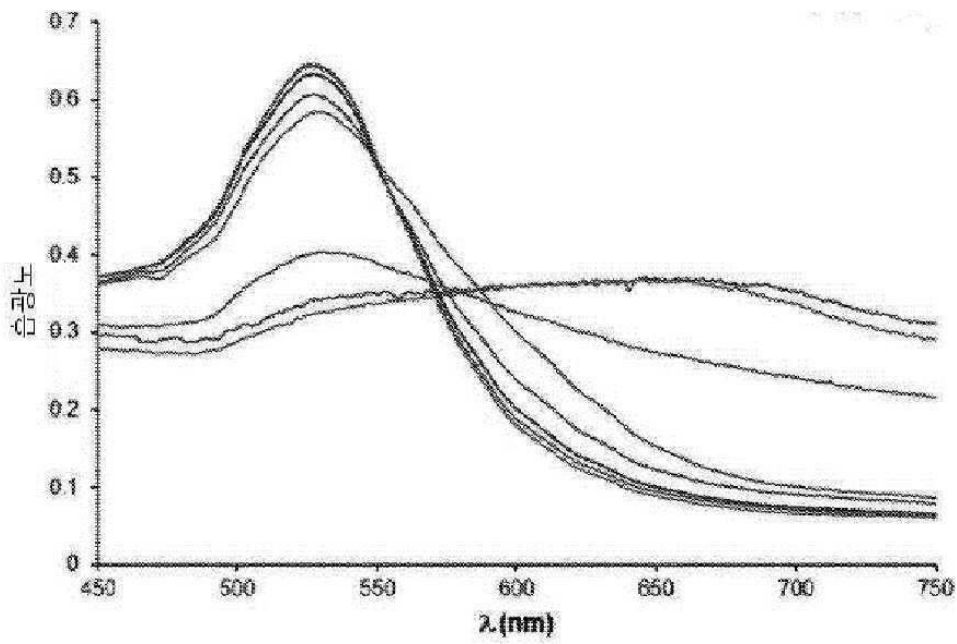
도면2



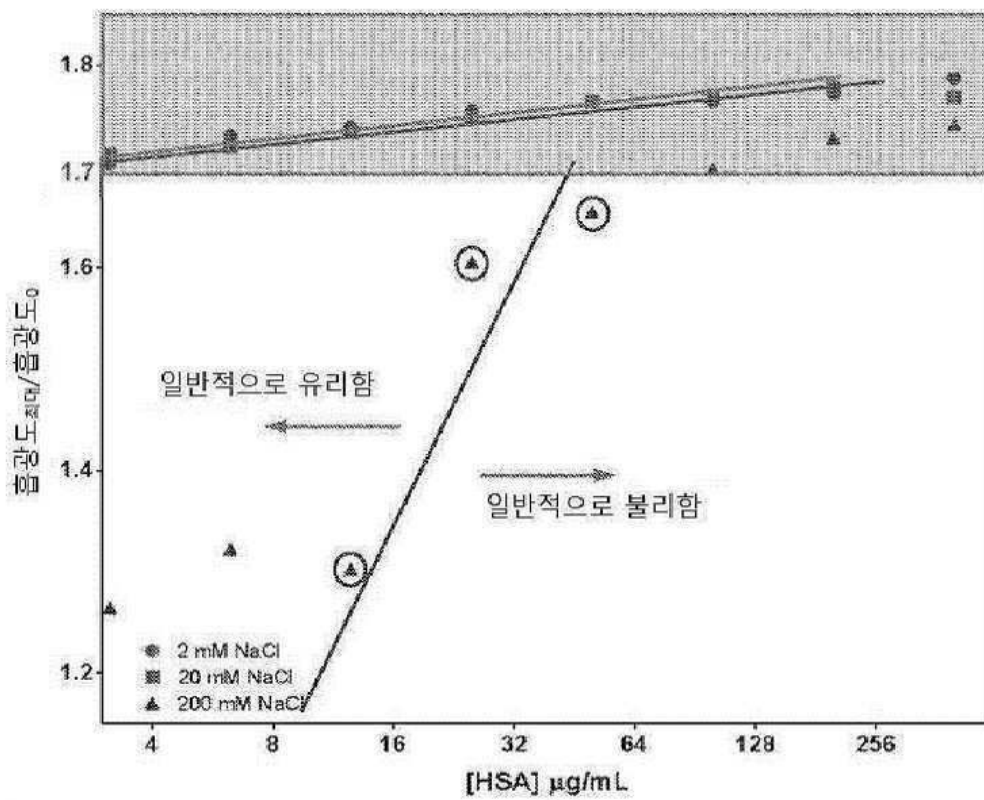
도면3



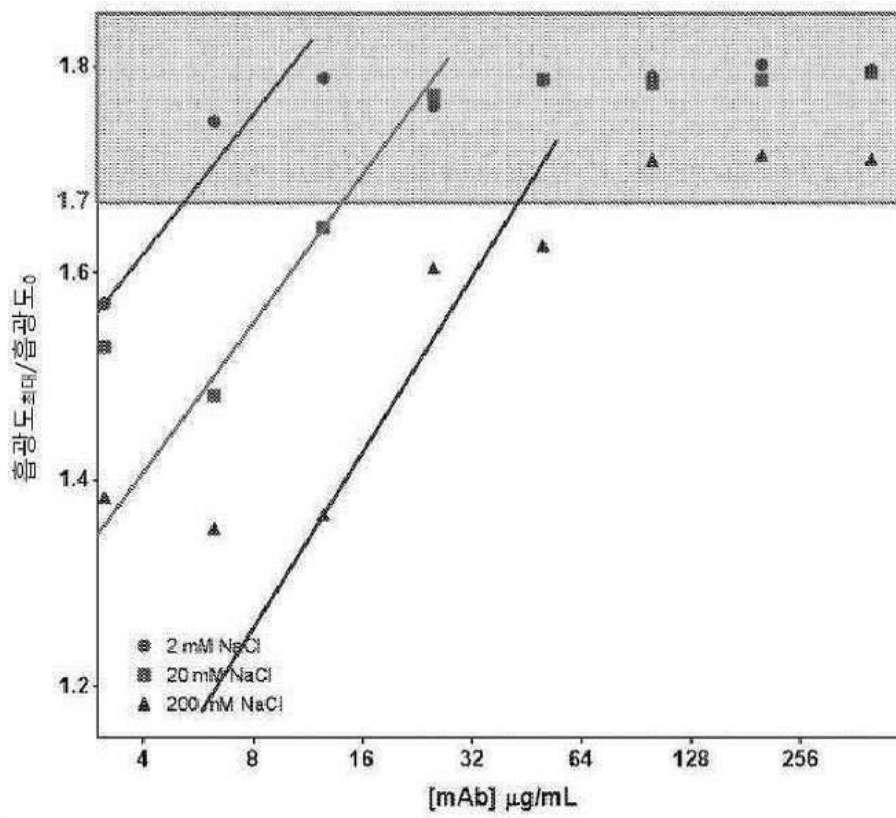
도면4



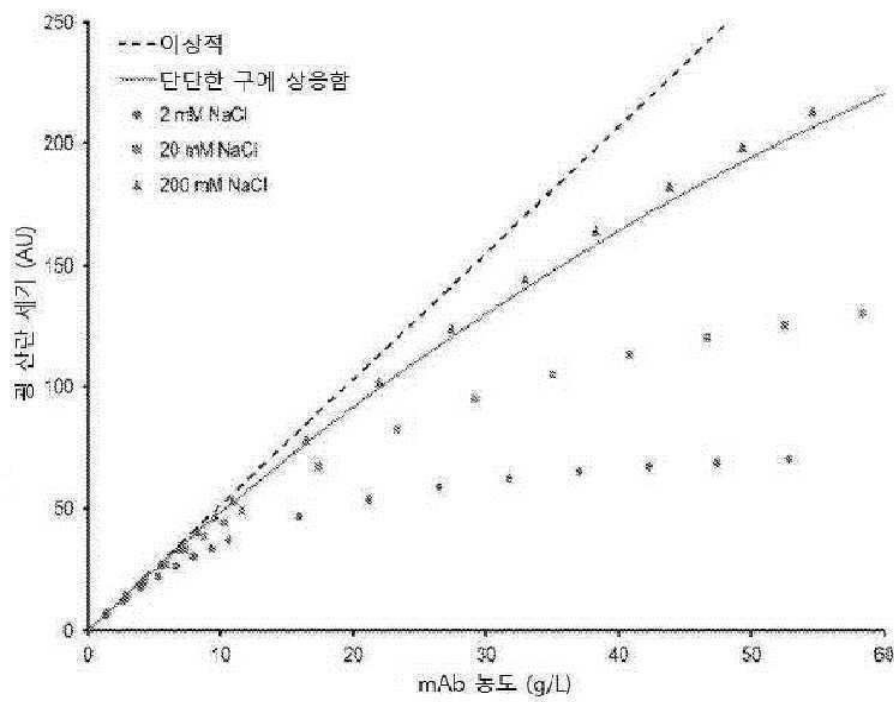
도면5



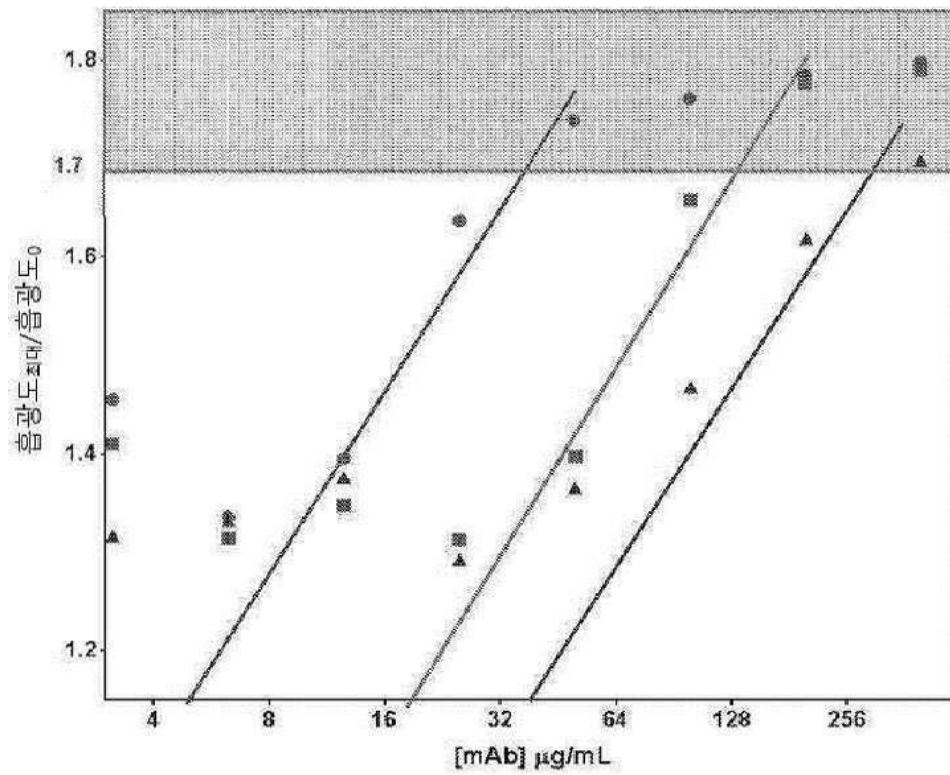
도면6



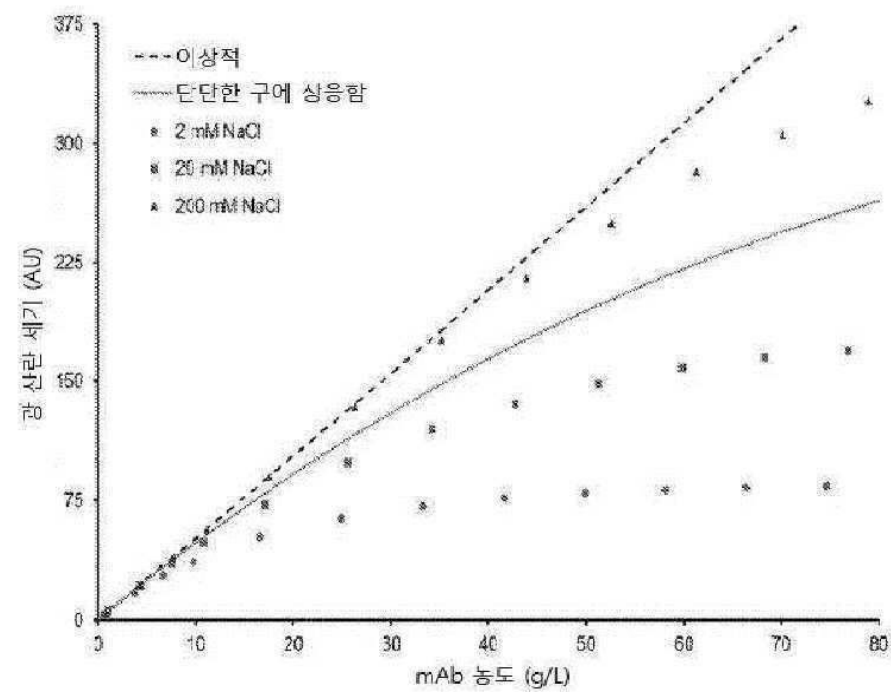
도면7



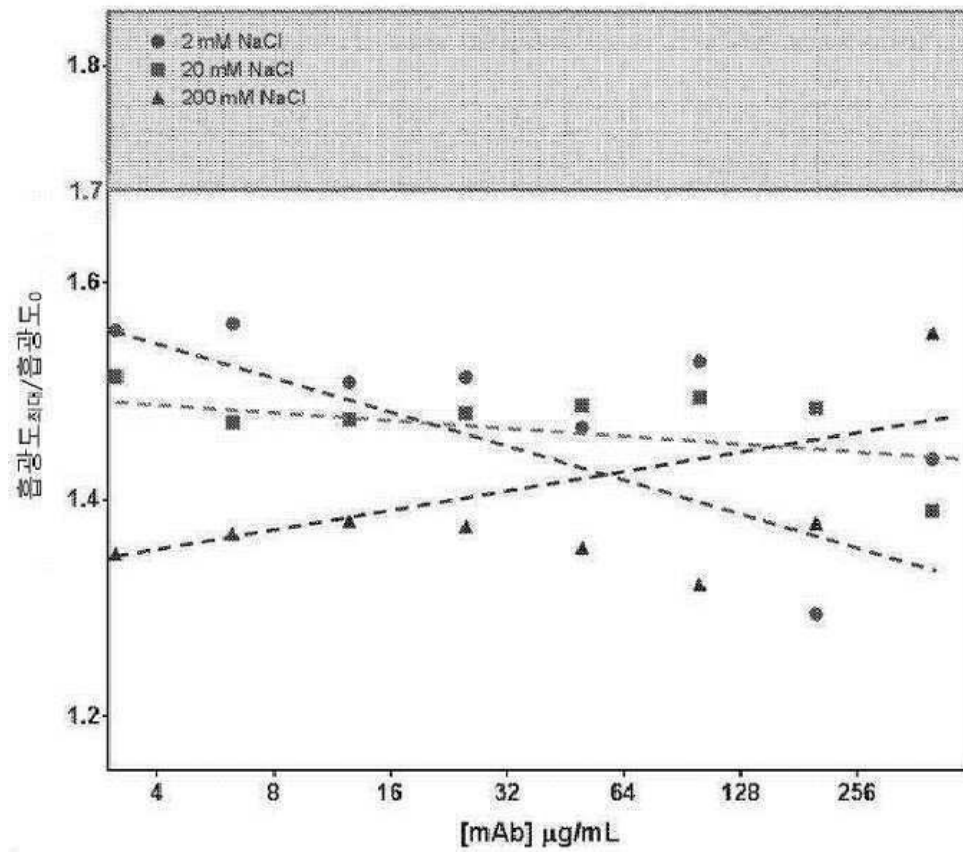
도면8



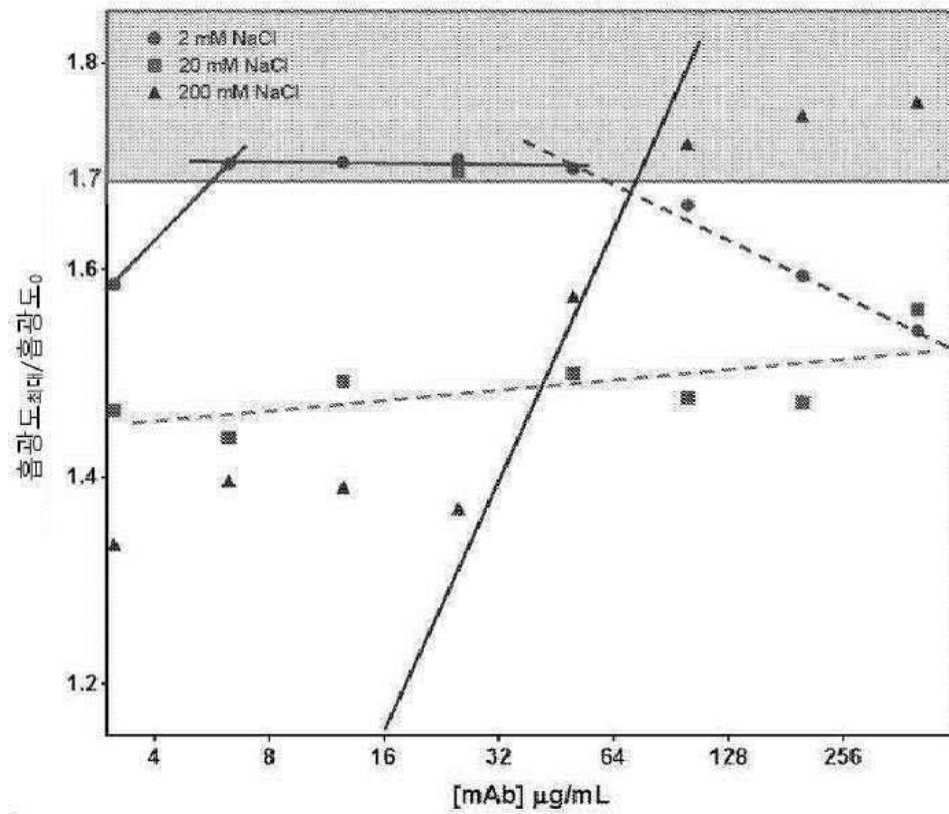
도면9



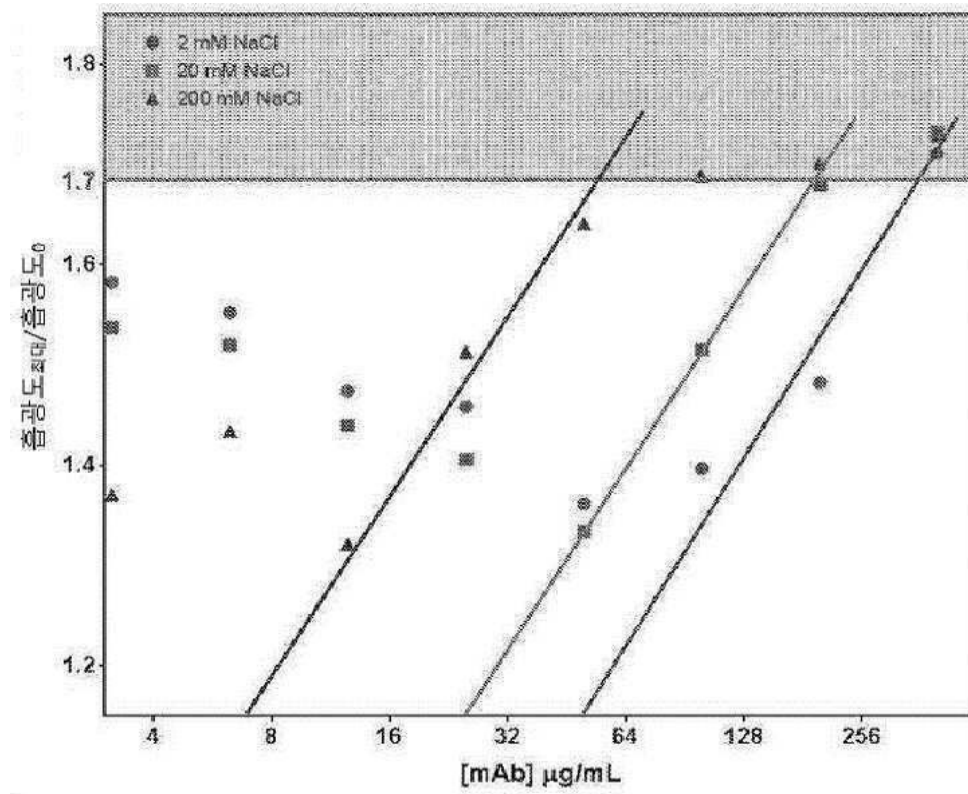
도면10



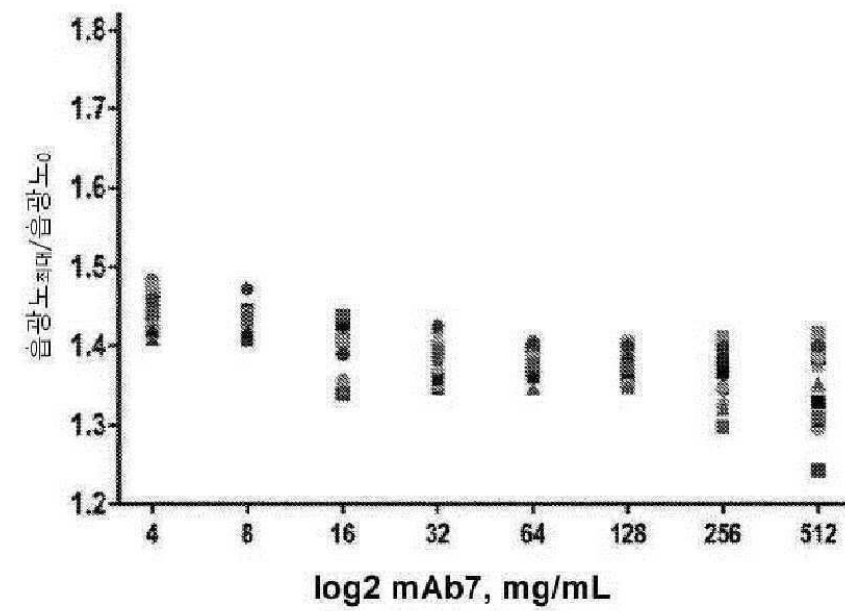
도면11



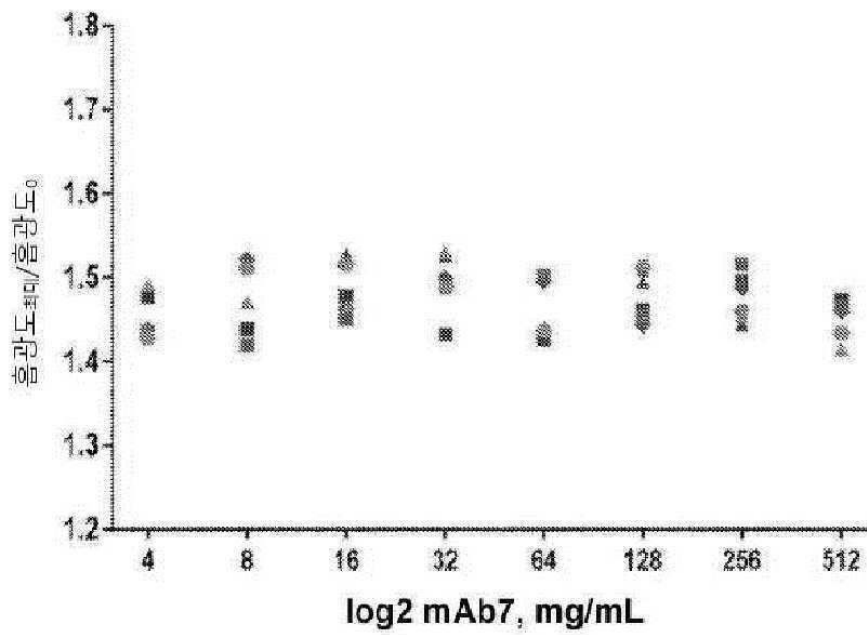
도면12



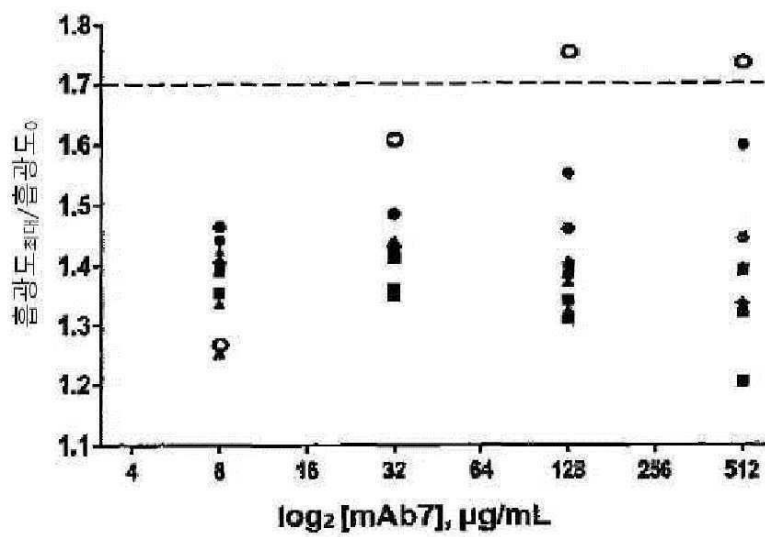
도면13



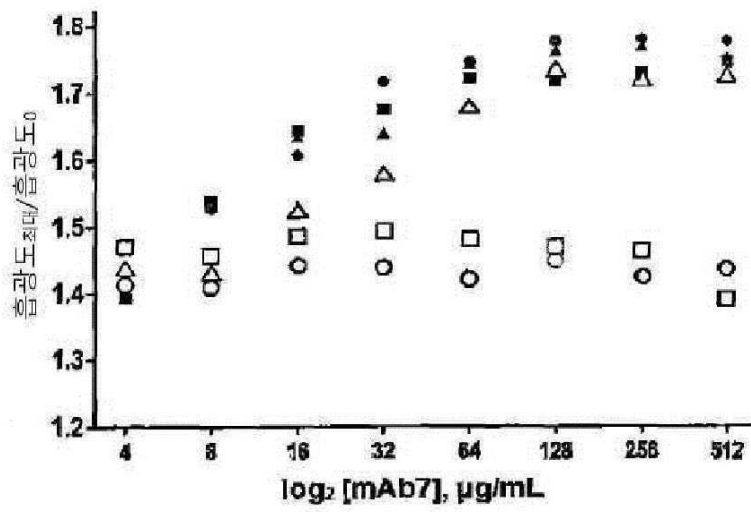
도면14



도면15



도면16



도면17

