



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0117166
 (43) 공개일자 2017년10월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *C07K 16/24* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
 (52) CPC특허분류
A61K 39/39591 (2013.01)
C07K 16/241 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2017-7025583
 (22) 출원일자(국제) 2016년02월12일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2017년09월12일
 (86) 국제출원번호 PCT/EP2016/053068
 (87) 국제공개번호 WO 2016/128564
 국제공개일자 2016년08월18일
 (30) 우선권주장
 15305218.8 2015년02월13일
 유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
사노피
 프랑스 75008 파리 튀 라 보에티에 54
 (72) 발명자
부세머, 티
 독일 65926 프랑크푸르트 사노피-아벤티스 도이칠란트 게엠베하 페이턴트 디파트먼트
피퍼, 아네테
 독일 65926 프랑크푸르트 사노피-아벤티스 도이칠란트 게엠베하 페이턴트 디파트먼트
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
양영준, 심미성

전체 청구항 수 : 총 30 항

(54) 발명의 명칭 **단클론 항체를 위한 안정한 액체 제형**

(57) 요약

본 발명은 단클론 항체, 예를 들어 IgG 항체를 위한 안정한 제약 조성물에 관한 것이다. 추가로 본 발명은 본 발명의 제약 조성물을 이용한 치료 및 의약에 관한 것이다. 부가적으로, 본 발명은 본 발명의 제약 조성물들 중 적어도 하나를 포함하는 키트 및 항체의 응집을 감소시키는 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

C07K 16/2866 (2013.01)

C07K 2317/94 (2013.01)

(72) 발명자

사기, 디야나

독일 65926 프랑크푸르트 사노피-아벤티스 도이칠
란트 게엠베하 페이턴트 디파트먼트

스트레브, 니나

독일 65926 프랑크푸르트 사노피-아벤티스 도이칠
란트 게엠베하 페이턴트 디파트먼트

요세프, 아메드

독일 65926 프랑크푸르트 사노피-아벤티스 도이칠
란트 게엠베하 페이턴트 디파트먼트

명세서

청구범위

청구항 1

- a) 항체,
 - b) 아세테이트 및 히스티딘으로 이루어진 균으로부터 선택되는 적어도 하나의 완충제,
 - c) 글리신, 아스파라긴 및 글루타민으로 이루어진 균으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산, 및/또는 트레할로스 및 만니톨로 이루어진 균으로부터 선택되는 적어도 하나의 부형제, 및
 - d) 계면활성제를 포함하며,
- pH가 5.0 내지 6.5인 제약 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 항체는 IgG 항체인 조성물.

청구항 3

제3항에 있어서, 5 내지 15 mM의 적어도 하나의 완충제를 포함하는 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 완충제는 아세테이트인 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 완충제는 히스티딘인 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 1 내지 70 mg/ml의 적어도 하나의 부형제를 포함하는 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 부형제는 만니톨인 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 7 mg/ml 미만의 염화나트륨을 포함하는 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 계면활성제는 폴리소르베이트인 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 0.001% (w/v) 내지 0.15% (w/v)의 계면활성제를 포함하는 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 1 mg/ml 내지 30 mg/ml의 적어도 하나의 아미노산을 포함하는 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 아미노산은 글리신인 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

- a) 40 내지 50 mg/ml의 항체,
- b) 5 내지 15 mM의 아세테이트 완충제 또는 히스티딘 완충제,
- c) 20 mg/ml의 만니톨, 및/또는 15 mg/ml의 글리신, 및
- d) 0.1% (w/v)의 폴리소르베이트 80 또는 0.01% (w/v)의 폴리소르베이트 20을 포함하며, pH가 5.0 내지 6.5인 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

- a) 50 mg/ml의 항체,
- b) 5 내지 15 mM의 아세테이트 완충제 또는 히스티딘 완충제,
- c) 20 mg/ml의 만니톨, 및/또는 15 mg/ml의 글리신, 및
- d) 0.1% (w/v)의 폴리소르베이트 80 또는 0.01% (w/v)의 폴리소르베이트 20을 포함하며, pH가 5.0 내지 6.5인 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

- a) 50 mg/ml의 항체,
- b) 10 mM의 아세테이트 완충제,
- c) 20 mg/ml의 만니톨, 및 15 mg/ml의 글리신, 및
- d) 0.1% (w/v)의 폴리소르베이트 80을 포함하며, pH가 5.5인 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서,

- a) 50 mg/ml의 항체,
- b) 1.17 mg/ml의 아세트산나트륨 3수화물 및 0.08 mg/ml의 아세트산,
- c) 20 mg/ml의 만니톨, 및 15 mg/ml의 글리신, 및
- d) 0.1% (w/v)의 폴리소르베이트 80을 포함하며, pH가 5.5인 조성물.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 정맥내 투여, 근육내, 복강내, 뇌척수내, 피하, 관절내, 활액낭내, 또는 경막내 투여용인 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 기준 조성물과 비교하여 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 특징을 갖는 조성물:

- (a) 크기 배제 크로마토그래피(Size Exclusion Chromatography; SEC)로 측정할 경우 약 55°C에서 1주일 동안 보관한 후 응집물의 양의 감소,

- (b) SEC로 측정할 경우 약 55°C에서 1주일 동안 보관한 후 더 많은 양의 단량체,
- (c) SEC로 측정할 경우 약 55°C에서 1주일 동안 보관한 후 더 적은 단량체.

청구항 19

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 특징을 갖는 조성물:

- (a) 조성물은 55°C에서의 1주일의 열적 스트레스에 대하여 안정함,
- (b) 조성물은 55°C에서의 3시간 동안의 교반의 기계적 스트레스에 대하여 안정함, 및/또는
- (c) 조성물은 냉동 및 해동에서 생기는 스트레스에 대하여 안정함 (여기서, 냉동 및 해동은 조성물을 -80°C에서 24시간 동안 냉동시키고, 이어서 실온에서 90분 동안 해동시키는 것을 나타내며, 상기 사이클은 5회 반복으로 반복되고, 제5 사이클에서 온도는 -80°C에서 72시간 동안 유지됨).

청구항 20

제19항에 있어서, 안정하다는 것은 하기 특성 중 적어도 하나를 나타내는 조성물:

- i) 조성물은 SEC로 측정할 때 모든 피크의 총 면적과 비교하여 90% 초과와 %의 단량체 함량을 가짐,
- ii) 조성물은 SEC로 측정할 때 모든 피크의 총 면적과 비교하여 3% 미만의 %의 응집물 함량을 가짐, 및/또는
- iii) 조성물은 SEC로 측정할 때 모든 피크의 총 면적과 비교하여 3% 미만의 %의 단량체 함량을 가짐.

청구항 21

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 특징을 갖는 조성물:

- (a) 광 차단/광 차폐(Light obscuration; LO)로 측정할 경우 약 40°C에서 1개월 내지 6개월 동안 보관한 후 응집물의 양의 감소, 및
- (b) 동적 광 산란(Dynamic Light Scattering; DLS)으로 측정할 경우 약 40°C에서 3개월 동안 보관한 후 더 많은 양의 단량체.

청구항 22

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 40°C에서의 1개월 내지 6개월의 열적 스트레스에 대하여 안정한 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, 안정하다는 것은 하기 특성 중 적어도 하나를 나타내는 조성물:

- i) 조성물은 DLS로 측정할 경우 부피로 분석될 때 90% 초과와 %의 단량체 함량을 가짐,
- ii) 조성물은 DLS로 측정할 경우 강도로 분석될 때 90% 초과와 %의 단량체 함량을 가짐,
- iii) 조성물은 LO로 측정될 때 10 μm 초과인 입자가 6000개 미만, 25 μm 초과인 입자가 600개 미만, 그리고 1 μm 초과인 입자가 10000개 미만임.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 및 서열 번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 경쇄를 포함하는 조성물.

청구항 25

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 아달리무맙(Adalimumab)인 제약 조성물.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 제약 조성물의 의약으로서의 용도.

청구항 27

의약으로 사용하기 위한 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 제약 조성물.

청구항 28

질환 또는 장애의 치료 또는 예방 방법으로서, 이를 필요로 하는 대상체에게 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따라 정의된 바와 같은 제약 조성물의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 29

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따라 정의된 바와 같은 제약 조성물을 포함하는 적어도 하나의 용기 및 주사 장치를 포함하는 키트.

청구항 30

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따라 정의된 바와 같은 조성물을 이용하여 치료용 단클론 항체의 응집 및/또는 단편화를 감소시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 단클론 항체, 예를 들어 IgG 항체를 위한 안정한 제약 조성물에 관한 것이다. 추가로 본 발명은 본 발명의 제약 조성물을 이용한 치료 및 의약에 관한 것이다. 부가적으로, 본 발명은 본 발명의 제약 조성물들 중 적어도 하나를 포함하는 키트 및 항체의 응집을 감소시키는 방법에 관한 것이다.
- [0002] 항체의 불안정성은 항체 약물의 상업적 개발에 대한 주된 장애물이다. 예를 들어, 특정한 종래의 액체 항체 제제는 보관 수명이 짧으며, 항체는 생물학적 활성을 상실할 수 있고, 이는 보관 동안의 화학적 및 물리적 불안정성으로부터 생긴다. 화학적 불안정성은 탈아미드화, 라세미화, 가수분해, 산화, 베타 제거 또는 디설피드 교환에 의해 야기될 수 있으며, 물리적 불안정성은 항체의 변성, 응집, 침전 또는 흡착에 의해 야기될 수 있다. 이들 중, 응집, 탈아미드화 및 산화가 항체 열화의 가장 일반적인 원인인 것으로 공지되어 있다 (문헌[Cleland et al., 1993, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 10(4): 307-377]). 따라서, 관심 대상의 항원에 결합하는 항체의 안정한 조성물에 대한 필요성이 존재하며, 그러한 안정한 조성물은 예를 들어 증가된 안정성, 낮은 수준 내지 검출불가능한 수준의 응집 및 낮은 수준 내지 검출불가능한 수준의 항체 단편화/열화를 나타낸다. 더욱이, 상기 안정한 조성물의 향상된 물리적 및 화학적 안정성 때문에, 이것은 추가로 심지어 장기간의 보관 동안에도 항체의 생물학적 활성의 거의 없는 내지는 전혀 없는 손실을 갖는다.
- [0003] 아달리무맙(Adalimumab)으로 표기되는 인간 항-TNF알파 단클론 항체 D2E7은 국제 공개 제199729131호에 기술된 바와 같이 예를 들어, 류마티스 관절염 및 크론병(crohn's disease)을 치료하기 위하여 개발되었다. 아달리무맙은 애브비(Abbvie)에 의해 후미라(Humira)[®]라는 명칭의 상업적 제형으로 판매되는 IgG1 클래스(class)의 단클론 항체이다. 이 항체는 현재 판상 건선, 크론병, 궤양성 대장염, 건선성 관절염, 강직성 척추염, 류마티스 관절염, 다관절형 소아 특발성 관절염의 치료에 일반적으로 사용된다.
- [0004] 후미라[®]라는 상업적 제형은 국제 공개 제2004/016286호 및 EMA에 의해 승인된 판매 허가(marketing authorisation)의 부록 I에 기술되었다. 이것은 항-TNF알파 항체, 만니톨, 시트르산 1수화물, 시트르산나트륨, 제일인산나트륨 데하이드레이트, 염화나트륨, 폴리소르베이트(polysorbate) 80 및 수산화나트륨을 함유한다.
- [0005] 본 발명자는 후미라[®]의 시장 제형이 기계적 스트레스에 대하여 제한된 안정성을 가짐을 발견하였다.
- [0006] 본 발명자는 아달리무맙의 바이오시밀러(biosimilar)를 포함하는 새로운 조성물을 개발하였으며, 본 발명의 조성물이 기계적인 그리고 열적인 스트레스에 대한 항-TNF알파 항체의 안정성을 향상시킴을 보여주었다.
- [0007] 아세테이트 또는 히스티딘 완충제, 글리신 및/또는 만니톨 및 계면활성제, 예컨대 폴리소르베이트를 포함하는 본 발명의 조성물은 항체의 응집물 및 미립자의 형성을 최소화시킨다는 것이 추가로 밝혀졌다. 본 발명의 조성물은, 본 조성물을 예를 들어 55°C에서 1주일 동안 보관했을 때 시장 제형 (국제 공개 제2004/016286호에 기술

된 바와 같이 후미라[®] 제형)과 비교하여 예를 들어 더 높은 함량의 단량체형 항체, 더 적은 응집물 및 단편을 나타낸다 (실시예 섹션(section)의 표 15 및 23 참조).

- [0008] 특히, 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography; SEC) 분석은, 55°C에서 1주일 후, 테스트된 조성물이 총 피크 면적의 95% 초과인 항체 단량체의 함량을 갖고, 반면에 후미라[®] 제형 중 항체 단량체의 함량은 총 피크 면적의 단지 89%임을 입증하였다.
- [0009] 추가로, 본 발명자는 장기 연구에서 적어도 하나의 아세테이트 또는 히스티딘 완충제, 글리신 및/또는 만니톨 및 계면활성제, 예컨대 폴리소르베이트를 포함하는 조성물이 40°C에서 3개월 후 심지어 총 피크 면적의 90% 초과인 양의 단량체를 가지며 따라서 테스트한 조건 하에서 안정하다는 것을 입증하였다. 게다가, 본 발명자는 안정성 연구에서 본 발명의 조성물이 200 rpm에서 3시간과 같은 기계적 스트레스에 노출 후 총 피크 면적의 99% 보다 훨씬 더 많은 양의 단량체를 가지며, 따라서 테스트된 조건 하에서 안정하다는 것을 보여주었다.
- [0010] 더욱이, 본 조성물은 테스트된 조건 하에서 냉동 및 해동에서 생기는 스트레스에 대하여 저항성을 가지며, 따라서, 심지어 제5 사이클 후에도 단량체의 양은 총 피크 면적의 99%보다 훨씬 더 많고 따라서 테스트된 조건 하에서 안정하다.
- [0011] 또 다른 실시예에서, 실시예 6, 표 24에 나타난 바와 같이, 본 발명의 조성물은, 시장 제형 (국제 공개 제 2004/016286호에 기술된 후미라[®] 제형)과 비교하여 예를 들어 입자 형성과 관련하여 더 높은 기계적 안정성을 나타내며, 예를 들어, 더 적은 양의, 현미경을 사용하지 않으면 안 보이는(sub-visible) 입자 크기의 작은 응집물이 관찰된다 (1 μm 초과, 10 μm 미만). 실시예에 추가로 나타난 바와 같이, 효과는 특히 완충제의 선택 (아세테이트 또는 히스티딘), pH 범위, 만니톨 또는 글리신의 첨가 및 세제, 예컨대 폴리소르베이트의 첨가와 관련된다. 추가로 본 발명자는 아스파라긴 및 글루타민이 글리신에 의해 달성되는 안정화 효과와 비견되는 안정화 효과를 가짐을 보여주었다.
- [0012] 이와 같이 본 발명은 항체, 아세테이트 또는 히스티딘 완충제, 글리신, 아스파라긴 및 글루타민, 예를 들어 글리신 및 아스파라긴으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 및/또는 트레할로스 및 만니톨로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 부형제 및 계면활성제, 예컨대 폴리소르베이트를 포함하는, 항체, 예컨대 IgG 항체, 예를 들어 항-hTNF알파 항체에 적합한 제약 조성물을 규정한다.

발명의 내용

- [0013] 이와 같이 본 발명은
- [0014] a) 항체,
- [0015] b) 아세테이트 및 히스티딘으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 완충제,
- [0016] c) 글리신, 아스파라긴 및 글루타민, 예를 들어 글리신 및 아스파라긴으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산, 및/또는 트레할로스 및 만니톨로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 부형제, 및
- [0017] d) 계면활성제
- [0018] 를 포함하는 제약 조성물에 관한 것이며, 여기서, 조성물의 pH는 5.0 내지 6.5이다.
- [0019] 일 실시 양태에서, 상기 적어도 하나의 부형제는 만니톨이다.
- [0020] 추가의 실시 양태에서, 상기 적어도 하나의 아미노산은 글리신이다.
- [0021] 항체는 치료용 항체이다. 일 실시 양태에서, 치료용 항체는 IgG 항체이다. 추가의 실시 양태에서, IgG 항체는 항-hTNF알파 항체이다.
- [0022] 본 발명은 pH 값이 5.0 내지 6.5이고, 아세테이트 또는 히스티딘 완충제, 글리신 및/또는 만니톨 및 계면활성제, 예컨대 폴리소르베이트를 포함하는 제약 조성물이 항체의 안정성을 향상시킨다는 놀라운 발견을 기반으로 한다. 더욱이, 본 발명자는 염화나트륨의 첨가가 항-hTNF 항체의 안정성에 유리하지 않음을 보여주었다. 염화나트륨의 첨가는 항체의 변성 온도(T_m)에 대하여 심지어 부정적인 영향을 준다.
- [0023] 따라서, 일 실시 양태에서, 본 발명의 조성물은 10 mg/ml 미만의 염화나트륨, 예를 들어, 7 mg/ml 미만의 염화나트륨을 포함한다. 일 실시 양태에서, 본 조성물은 2 mg/ml 이하의 염화나트륨을 포함한다. 또 다른 실시 양태

에서, 본 조성물은 염화나트륨을 포함하지 않는다.

- [0024] 일 실시 양태에서, 계면활성제는 폴리소르베이트, 예를 들어 폴리소르베이트 80 또는 20이다. 본 조성물은 0.01% (w/v) 내지 1% (w/v)의 계면활성제 (조성물의 총 부피에 대한 중량)를 포함할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 조성물은 예를 들어 0.01% (w/v)의 폴리소르베이트 20을 포함할 수 있다. 또 다른 실시예에서, 본 조성물은 0.1% (w/v)의 폴리소르베이트 80을 포함할 수 있다.
- [0026] 일 실시 양태에서, 본 조성물은 1 내지 100 mM, 예를 들어 5 내지 50 mM, 5 내지 20 mM, 예를 들어 5 내지 15 mM, 예를 들어 10 mM의 적어도 하나의 완충제를 포함할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 조성물은 30 내지 70 mg/ml, 예를 들어 50 mg/ml의 항체를 포함할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 조성물은 1 내지 30 mg/ml의 적어도 하나의 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0029] 일 실시 양태에서, 상기 적어도 하나의 아미노산은 글리신이다. 본 조성물은 5 내지 30 mg/ml의 글리신, 예를 들어 15 mg/ml의 글리신을 포함할 수 있다.
- [0030] 또 다른 실시 양태에서, 상기 적어도 하나의 아미노산은 아스파라긴이다. 본 조성물은 1 내지 10 mg/ml의 아스파라긴, 예를 들어 2 mg/ml의 아스파라긴을 포함할 수 있다.
- [0031] 일 실시 양태에서, 상기 적어도 하나의 부형제는 트레할로스이다. 본 조성물은 1 내지 70 mg/ml의 트레할로스, 예를 들어 50 mg/ml의 트레할로스를 포함할 수 있다.
- [0032] 또 다른 실시 양태에서, 상기 적어도 하나의 부형제는 만니톨이다. 본 조성물은 1 내지 60 mg/ml의 만니톨, 예를 들어 20 mg/ml의 만니톨을 포함할 수 있다.
- [0033] 일 실시 양태에서, 본 발명은
- [0034] a) 40 내지 50 mg/ml의 항체,
- [0035] b) 5 내지 15 mM의 아세테이트 완충제 또는 히스티딘 완충제,
- [0036] c) 15 내지 25 mg/ml의 만니톨 및/또는 10 내지 20 mg/ml의 글리신, 및
- [0037] d) 0.08 내지 0.12% (w/v)의 폴리소르베이트 80 또는 0.008 내지 0.012% (w/v)의 폴리소르베이트 20
- [0038] 을 포함하는 제약 조성물에 관한 것이며,
- [0039] 여기서, 조성물의 pH는 5.0 내지 6.5이다.
- [0040] 추가의 실시 양태에서, 본 발명은
- [0041] a) 50 mg/ml의 항체,
- [0042] b) 5 내지 15 mM의 아세테이트 완충제 또는 히스티딘 완충제,
- [0043] c) 15 내지 25 mg/ml의 만니톨 및/또는 10 내지 20 mg/ml의 글리신, 및
- [0044] d) 0.08 내지 0.12% (w/v)의 폴리소르베이트 80 또는 0.008 내지 0.012% (w/v)의 폴리소르베이트 20
- [0045] 을 포함하는 제약 조성물에 관한 것이며,
- [0046] 여기서, 조성물의 pH는 5.0 내지 6.5이다.
- [0047] 일 실시 양태에서, 본 발명은
- [0048] a) 40 내지 50 mg/ml의 항체,
- [0049] b) 5 내지 15 mM의 아세테이트 완충제 또는 히스티딘 완충제,
- [0050] c) 20 mg/ml의 만니톨 및/또는 15 mg/ml의 글리신, 및
- [0051] d) 0.1% (w/v)의 폴리소르베이트 80 또는 0.01% (w/v)의 폴리소르베이트 20
- [0052] 을 포함하는 제약 조성물에 관한 것이며,
- [0053] 여기서, 조성물의 pH는 5.0 내지 6.5이다.

- [0054] 특정 실시 양태에서, 본 발명은
- [0055] a) 50 mg/ml의 항체, 및
- [0056] b) 5 내지 15 mM의 아세테이트 완충제 또는 히스티딘 완충제, 및
- [0057] c) 20 mg/ml의 만니톨, 및/또는 15 mg/ml의 글리신, 및
- [0058] d) 0.1% (w/v)의 폴리소르베이트 80 또는 0.01% (w/v)의 폴리소르베이트 20
- [0059] 을 포함하는 제약 조성물에 관한 것이며,
- [0060] 여기서, 조성물의 pH는 5.0 내지 6.5이다.

[0061] 본 발명자는 후미라[®]의 시장 제형에 존재할 때의 항-TNF알파 항체보다 향상된 안정성을 갖는 항-TNF알파 항체의 제약 조성물을 개발하였다. 따라서, 일 실시 양태에서, 제약 조성물은 항-TNF알파 항체의 기준 조성물과 비교하여 향상된 안정성을 갖는 항-TNF알파 항체를 제공한다.

[0062] 예를 들어 향상된 안정성은 기계적 스트레스, 열적 스트레스 및/또는 냉동 및 해동 스트레스일 수 있는 스트레스에 노출될 때 증가된 물리적 및/또는 화학적 안정성을 나타낸다. 이와 같이 본 발명의 새롭게 개발된 제약 조성물은 기준 조성물보다 더 우수하게 스트레스 조건, 특히 열적 스트레스 및/또는 기계적 스트레스를 견딜 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063] 항체

[0064] "항체"는 2개의 중쇄가 디설피드 결합에 의해 서로 연결되어 있고 각각의 중쇄가 디설피드 결합에 의해 경쇄에 연결되어 있는 천연 항체 또는 통상적인 항체일 수 있다. 2가지 유형의 경쇄, 람다(λ) 및 카파(k)가 있다. 항체 분자의 기능적 활성을 결정하는 하기 5가지의 주요 중쇄 클래스 (또는 이소타입)가 있다: IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE. 각각의 사슬은 특유한 서열 도메인을 포함한다. 경쇄는 2개의 도메인 또는 영역, 가변 도메인(VL) 및 불변 도메인(CL)을 포함한다. 중쇄는 4개의 도메인, 가변 도메인(VH) 및 3개의 불변 도메인(CH1, CH2 및 CH3, CH로 총칭됨)을 포함한다. 경쇄 가변 영역(VL) 및 중쇄 가변 영역(VH) 둘 모두는 항원에 대한 결합 인식 및 특이성을 결정한다. 하위클래스(subclass) IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE는 중쇄 불변 영역에서 아미노산 서열의 차이를 갖는다. 하나의 주어진 클래스 내의 모든 면역글로불린은 매우 유사한 중쇄 불변 영역을 가질 것이다. 경쇄 불변 영역 도메인(CL) 및 중쇄 불변 영역 도메인(CH)은 항체 사슬 회합, 분비, 태반-통과 이동성, 보체 결합성, 및 Fc 수용체(FcR)에의 결합성과 같은 중요한 생물학적 특성을 부여한다. Fv 단편은 면역글로불린의 Fab 단편의 N-말단이며, 하나의 경쇄 및 하나의 중쇄의 가변 부분으로 이루어진다. 항체의 특이성은 항체 조합 부위와 항원 결정자 사이의 구조적 상보성에 있다. 항체 조합 부위는 주로 초가변 영역 또는 상보성 결정 영역(complementarity determining region; CDR)으로부터의 것인 잔기로 구성된다. 가끔, 비초가변 영역 또는 프레임워크 영역(framework region; FR)으로부터의 잔기가 전체 도메인 구조에 영향을 주고 그에 따라 조합 부위에 영향을 준다.

[0065] 본원에서 사용되는 바와 같이, "항체"라는 용어는 통상적인 항체 및 이의 단편과, 단일 도메인 항체 및 이의 단편, 예를 들어 단일 도메인 항체의 가변 중쇄, 및 키메라, 인간화, 2특이성(bispecific) 또는 다중특이성 항체를 나타낸다.

[0066] 본 발명자는 본 발명의 제약 조성물이 스트레스 조건, 예컨대 기계적 스트레스 및/또는 열적 스트레스에서 항-hTNF알파 항체를 안정화시킨다는 것을 보여주었다. 실시예에서 사용되는 항-hTNF알파 항체는 IgG 항체이다. 따라서, 일 실시 양태에서, 치료용 항체는 단클론 항체, 예를 들어 IgG 항체이다.

[0067] "IgG 항체"라는 용어는 특히, 상이한 IgG 하위클래스들(예를 들어 IgG1, 2, 3, 및 4)을 포함한다. IgG 항체는 중쇄의 불변 영역의 아미노산 서열의 작은 차이를 기반으로 하여 하위클래스로 나눌 수 있다. IgG 항체는 4개의 펩티드 사슬로 구성된 약 150 kDa의 분자이다. 이것은 약 50 kDa의 2개의 동일한 클래스의 감마 중쇄와, 약 25 kDa의 2개의 동일한 경쇄를 포함하며, 따라서 사랑체형 사차 구조를 포함한다. 상기 2개의 중쇄는 디설피드 결합에 의해 각각 하나의 경쇄에 그리고 서로 연결되어 있다. 생성된 사랑체는 2개의 동일한 절반체(half)를 가지며, 이들은 함께 포크(fork), 또는 Y자-유사(Y-like) 형상을 형성한다. 포크의 각각의 말단은 동일한 항원 결합 부위를 포함한다.

- [0068] "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"은 천연 면역글로블린 결합 부위의 천연 Fv 영역의 결합 친화성 및 특이성을 함께 규정하는 아미노산 서열을 나타낸다. 면역글로블린의 경쇄 및 중쇄 각각은 각각 CDR1-L, CDR2-L, CDR3-L 및 CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H로 표기되는 3개의 CDR을 갖는다. 따라서 통상적인 항체의 항원-결합 부위는 6개의 CDR을 포함하며, 이는 각각의 중쇄 및 경쇄 V 영역으로부터의 CDR 세트를 포함한다.
- [0069] "프레임워크 영역"(FR)은 CDR들 사이에 개재된 아미노산 서열, 즉, 단일 종에서 상이한 면역글로블린들 중에서 상대적으로 보존된 면역글로블린 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 부분을 나타낸다. 면역글로블린의 경쇄 및 중쇄 각각은 각각 FR1-L, FR2-L, FR3-L, FR4-L, 및 FR1-H, FR2-H, FR3-H, FR4-H로 표기되는 4개의 FR을 갖는다.
- [0070] 일 실시 양태에서, 본 발명의 맥락에서 항체는 치료용 항체이다.
- [0071] 본원에서 사용되는 바와 같이, "치료용 항체" 또는 "치료적 항체" 또는 "치료적 사용을 위한 항체"라는 용어는 인간, 인간화, 키메라 및 쥐과 항체를 포함한다. 이것은 인간, 포유동물, 척추동물 또는 척삭동물로부터 단리된 천연 항체와, 돌연변이 유발된 항체 또는 유전자 엔지니어링된(genetically engineered) 항체를 추가로 포함한다.
- [0072] 일 실시 양태에서, 항체는 인간 TNF알파(hTNF알파)에 결합하는 항체를 나타낸다. 본 발명의 맥락에서 항체는 추가로, hTNF알파에는 결합하지만 hTNF베타(림포독신(lymphotoxin))에는 결합하지 않으며 인간 TNF알파에 더하여 다른 영장류 TNF알파 및 비-영장류 TNF알파에 결합하는 능력을 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0073] 본원에서 사용되는 바와 같이, "인간 TNF알파" (본원에서 hTNF알파, 또는 단순히 hTNF로 약칭됨)라는 용어는 17 kD의 분비형 및 26 kD의 막 결부형(membrane associated form)으로 존재하는 인간 사이토카인을 나타내는 것으로 의도되며, 이의 생물학적 활성 형태는 비공유적으로 결합된 17 kD 분자들의 삼량체로 구성된다. hTNF알파의 구조는 예를 들어 문헌[Pennica, D. et al., 1984 (Nature 312:724-729)], 문헌[Davis, J.M., et al. 1987(Biochemistry 26: 1322-1326)] 및 문헌[Jones, E.Y., et al., 1989(Nature 338:225-228)]에 추가로 기술되어 있다. TNF 알파의 적어도 하나의 에피토프의 단순한 결합은 수용체 결합 반응을 저해하며 이에 따라 하기에 언급된 장애를 치료하는 기작을 시작한다. 일 실시 양태에서, 항체는 해로운 hTNF알파 활성을 저해하거나 감소시킨다.
- [0074] 일 실시 양태에서, 본 발명의 틀 내에서 사용될 항체는 D2E7 또는 아달리무맙 (에브비)로 칭해지는 항-TNF알파 항체, 또는 리서피싱(resurfacing) 기술을 통하여 획득되는 이의 유도체일 수 있다. 상기에 언급된 항체의 단백질 서열은 공개적으로 입수가능하며, 예를 들어 국제 공개 제2004/016286호 (아달리무맙/D2E7) 또는 국제 공개 제97/29131호 (D2E7)에 인용되어 있다.
- [0075] 추가의 실시 양태에서, 상기에 약술된 제약 조성물은 표적인 CXCR5, LAMP 1 또는 VLA-2에 결합하는 치료용 항체를 포함한다.
- [0076] 본원에서 사용되는 바와 같이, "CXCR5"라는 용어는 비-무차별성 수용체(non-promiscuous receptor)를 나타낸다. CXCL 13은 CXCR5의 리간드이며, 기질 세포(stromal cell), 예컨대 여포 수지상 세포 상에서, 그리고 림프계 조직에서 구성적으로 발현된다. 게다가, 활성화된 T 세포는 CXCR5 발현을 유도하거나 상호조절한다. CXCR5는 류마티스 관절염의 병인과 연관된 성숙 B 세포 상에서 선택적으로 발현되기 때문에, 이 수용체의 차단은 병에 걸린 개체에서 관절염 유발 응답(arthritogenic response)을 조절할 것이다.
- [0077] 특정 실시 양태에서, 본 발명의 틀 내에서 사용될 항체는 항-CXCR5 항체, 예컨대 국제 공개 제2009/032661호에 개시된 항-CXCR5 항체, 또는 리서피싱 기술을 통하여 획득되는 이의 유도체일 수 있다. 그러한 항체의 단백질 서열은 공개적으로 입수가능하며, 예를 들어 국제 공개 제2009/032661호에 인용되어 있다.
- [0078] 본원에서 사용되는 바와 같이, "리서피싱 기술"이라는 용어는 비-인간 기원의 표면-비노출 잔기를 유지하는 반면, 표면 잔기를 인간 잔기로 변경시키는 인간화 기술을 나타낸다. 리서피싱 기술에서는 분자 모델링, 통계 분석, 및 항체의 전 항원 결합 친화성 및 특이성을 유지하면서 표적 숙주의 공지된 항체의 표면과 유사해지도록 항체 가변 영역의 비-CDR 표면을 변경시키는 돌연변이 유발의 조합이 이용된다. 표적 숙주가 인간일 때, 리서피싱 기술은 이에 따라 인간 내로 도입하기 위한 쥐과 항체와 같은 이종(xenogenic) 항체의 면역원성을 감소시킨다. 항체의 리서피싱을 위한 전략 및 방법과, 상이한 숙주 내에서 항체의 면역원성을 감소시키는 다른 방법이 미국 특허 제5,639,641호에 개시되어 있다. 간략하게는, 바람직한 방법에서, (1) 항체 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 풀의 위치 정렬을 생성하여 중쇄 및 경쇄 가변 영역 프레임워크 표면 노출 위치들의 세트를 제공하고 (여기서, 모든 가변 영역의 정렬 위치는 적어도 약 98% 동일함); (2) 중쇄 및 경쇄 가변 영역 프레임워크 표면 노출

아미노산 잔기들의 세트를 설치류 항체 (또는 이의 단편)에 대하여 규정하며; (3) 설치류 표면 노출 아미노산 잔기의 세트와 가장 가깝게 동일한 중쇄 및 경쇄 가변 영역 프레임워크 표면 노출 아미노산 잔기의 세트를 확인 하고; (4) 단계 (2)에서 규정된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 프레임워크 표면 노출 아미노산 잔기의 세트를, 설치류 항체의 상보성-결정 영역의 임의의 잔기의 임의의 원자의 5 Å 내에 있는 아미노산 잔기를 제외하고서, 단계 (3)에서 확인된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 프레임워크 표면 노출 아미노산 잔기의 세트로 치환하며; (5) 결합 특 이성을 갖는 인간화 설치류 항체를 생성한다. 이와 같이 일 실시 양태에서 "리서피싱된" 항체는 인간화 항체로 도 칭해질 수 있으며 그 반대도 마찬가지이다.

- [0079] 일 실시 양태에서, 본 발명의 틀 내에서 사용될 항체는 D2E7 또는 아달리무맙 (에브비) 또는 이들의 바이오시밀러와 동일한 중쇄 및 경쇄 서열을 포함하는 항-TFN알파 항체이다.
- [0080] 추가의 실시 양태에서, 본 발명의 틀 내에서 사용될 항체는 아달리무맙의 바이오시밀러이거나 아달리무맙과 관련하여 호환가능하다.
- [0081] 본원에서 사용되는 바와 같이, (승인된 기준 제품/생물학적 약물, 예컨대 단백질 치료제, 항체 등의) "바이오시밀러"는 (a) 생물학적 제품이 임상적 불활성 성분의 사소한 차이에도 불구하고 기준 제품과 고도로 유사함을 입증하는 분석적 연구; 및/또는 (b) 동물 연구 (독성의 평가를 포함함); 및/또는 (c) 임상 연구(들) (약동학적 특성 또는 약력학적 특성 및 면역원성의 평가를 포함함) (기준 제품을 허가하고 사용하고자 하기 위한, 그리고 인가를 생물학적 제품에 대하여 강구하기 위한 하나 이상의 적절한 사용 조건에서의 안전성, 순도, 및 효력을 입증하기에 충분함)로부터 유도되는 데이터를 기반으로 할 경우 기준 제품과 유사한 생물학적 제품을 나타낸다. 일 실시 양태에서, 생물학적 바이오시밀러 제품 및 기준 제품은 제안된 라벨링에 규정되거나, 권고되거나 제안된 사용 조건(들)에 있어서 단지 작용 기작(들)이 기준 제품에 대하여 공지된 정도로 동일 작용 기작(들)을 이용한다. 일 실시 양태에서, 생물학적 제품에 대하여 제안된 라벨링에 규정되거나, 권고되거나 제안된 사용 조건(들)은 이전에 기준 제품에 대하여 인가되었다. 일 실시 양태에서, 생물학적 제품의 투여 경로, 투여 형태, 및/또는 강도는 기준 제품의 것과 동일하다. 일 실시 양태에서, 생물학적 제품을 제조하거나, 가공하거나, 포장하거나, 수용하는 시설은 생물학적 제품이 계속 안전하고, 순수하고, 효력이 있음을 보증하도록 설계된 규격에 부합한다. 기준 제품은 미국, 유럽 또는 일본 중 적어도 하나에서 인가된 것일 수 있다.
- [0082] 일 실시 양태에서, 본 발명의 맥락에서 항체의 중쇄는 아달리무맙의 중쇄 CDR (CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H)을 포함하며, 경쇄는 아달리무맙의 경쇄 CDR (CDR1-L, CDR2-L 및 CDR3-L)을 포함한다.
- [0083] 추가의 실시 양태에서, 본 발명의 맥락에서 항체의 중쇄는 서열 번호 1로 나타난 아미노산 서열에 존재하는 중쇄 CDR (CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H)을 포함하며, 경쇄는 서열 번호 2로 나타난 아미노산 서열에 존재하는 경쇄 CDR (CDR1-L, CDR2-L 및 CDR3-L)을 포함한다.
- [0084] 추가의 실시 양태에서, 본 발명의 맥락에서 항체의 중쇄는 서열 번호 1로 나타난 아미노산 서열에 존재하는 중쇄 가변 도메인을 포함하며, 경쇄는 서열 번호 2로 나타난 아미노산 서열에 존재하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.
- [0085] 추가의 실시 양태에서, 본 발명의 맥락에서 항체는 서열 번호 1로 나타난 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 및 서열 번호 2로 나타난 아미노산 서열로 이루어진 경쇄를 포함한다.
- [0086] 번역글로블린 경쇄 또는 중쇄와 관련된 CDR/FR의 정의는 카바트(Kabat) 정의 (<http://www.bioinf.org.uk/abs/>) 또는 IMGT 정의 (문헌[Lefranc et al. Dev. Comp. Immunol., 2003, 27(1): 55-77]; www.imgt.org)를 기반으로 하여 주어질 수 있다. 상기 둘 모두의 정의는 당업자에게 공지되어 있으며, 따라서 당업자라면 상기 정의를 기반으로 하여 주어진 경쇄 및 중쇄 아미노산 서열의 CDR 및 FR을 결정할 수 있다. 상기에 언급된 항체의 상기에 언급된 단백질 서열은 공개적으로 입수가 가능하며, 예를 들어 국제 공개 제2004/016286호 (아달리무맙/ D2E7) 또는 국제 공개 제97/29131호 (D2E7)에 인용되어 있다.
- [0087] 본원에 개시된 서열과 적어도 85%, 더욱 구체적으로는 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함하는 항체가 본 발명의 맥락에 또한 포함된다.
- [0088] "기준 서열과 적어도 85% 동일한" 서열은 전체 길이의 기준 서열과의 서열 동일성이 전체 길이에서 85% 이상, 예를 들어 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%인 서열이다.
- [0089] "서열 동일성" 백분율은 비교창에서 최적으로 정렬된 두 서열의 비교에 의해 결정될 수 있으며, 여기서, 비교창에서의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열의 부분은 두 서열의 최적의 정렬을 위하여 기준 서열 (부가 또

는 결실을 포함하지 않음)과 비교하여 부가 또는 결실(즉, 갭(gap))을 포함할 수 있다. 상기 백분율은 동일한 핵산 염기 또는 아미노산 잔기가 둘 모두의 서열에서 나타나는 위치의 수를 결정하여 매칭된(matched) 위치의 수를 생성하고, 매칭된 위치의 수를 비교창에서의 위치의 총 수로 나누고, 그 결과에 100을 곱하여 서열 동일성의 백분율을 생성함으로써 계산된다. 비교를 위한 서열들의 최적의 정렬은 예를 들어 문헌[Needleman and Wunsch J. Mol. Biol. 48: 443 (1970)]의 알고리즘을 이용하여 포괄적 쌍정렬(global pairwise alignment)에 의해 행해진다. 서열 동일성 백분율은 예를 들어 니들(needle) 프로그램을 사용하여, BLOSUM62 매트릭스(matrix), 및 하기 파라미터를 이용하여 쉽게 결정될 수 있다: 갭-오픈(gap-open)=10, 갭-연장(gap-extend)=0.5.

[0090] 구체적 실시 양태에서, 본 발명에 따라 사용하기 위한 항체는 네이키드(naked) 항체이며, 즉, 이것은 어떠한 약물에도 연결되어 있지 않아서 항체-약물 콘주게이트(conjugate)를 형성하지 않는다.

[0091] 제약 조성물

[0092] 본원에서 사용되는 바와 같이, "제약 조성물"이라는 용어는 활성 성분의 생물학적 활성이 명백히 효과적이게 하는 그러한 형태로 존재하는, 그리고 조성물이 투여되는 대상체에게 유의하게 유독한 추가 성분을 전혀 함유하지 않는 액상 제제를 나타낸다. 그러한 조성물은 살균한 것이다. "제약상 허용가능한" 부형제 (비히클, 첨가제)는 대상체에게 투여하기에 적합한 것이다.

[0093] "제약 제형" 또는 "제형"은 활성 약물을 화학 물질과 조합하여 최종 의약품을 생성하는 공정뿐만 아니라 이 공정의 생성물도 나타내며, 따라서 최종 제형은 캡슐, 환제, 정제, 에멀전 또는 조성물과 같은 의약품을 나타낸다. 따라서, 일 실시 양태에서, 제약 제형은 제약 조성물이다.

[0094] 일 실시 양태에서, 본 발명의 제약 조성물은 안정하다.

[0095] "안정성"은 화학적 안정성 및 물리적 안정성을 나타내며, 본 기술 분야에 개시되고 예를 들어 문헌[Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991)] 및 문헌[Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993)]에 개관된 다양한 분석 기술을 이용하여 정성적으로 및/또는 정량적으로 평가될 수 있다. 상기 방법은 양이온 교환 크로마토그래피 또는 모세관 구역 전기영동(capillary zone electrophoresis)을 이용한 전하 불균질성의 평가에 의한 응집물 형성의 평가 (예를 들어, 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여, 탁도의 측정에 의해, 및/또는 육안 검사에 의해); 아미노-말단 또는 카르복시-말단 서열 분석; 질량 분광 분석; 환원되고 온전한 항체를 비교하기 위한 SDS-PAGE 분석; 펩티드 지도 (예를 들어, 트립신 처리(tryptic) 또는 LYS-C 분석; 항체의 생물학적 활성 또는 항원 결합 기능의 평가 등을 포함한다. 불안정성은 하기 중 임의의 하나 이상을 포함할 수 있다: 응집, 탈아미드화 (예를 들어 Asn 탈아미드화), 산화 (예를 들어 Met 산화), 이성질체화 (예를 들어 Asp 이성질체화), 클리핑(clipping)/가수분해/단편화 (예를 들어 힌지(hinge) 영역 단편화), 숙신아미드 형성, 쌍 비형성(unpaired) 시스테인(들), N-말단 연장, C-말단 프로세싱(processing), 글리코실화 변화 등. 본원에서 "탈아미드화" 단클론 항체는 이의 하나 이상의 아스파라긴 잔기가 예를 들어 번역 후 변형에 의해 아스파르트산 또는 이소-아스파르트산으로 변형된 것이다. 안정성을 측정하기 위하여, 본 발명의 조성물의 샘플을 안정성 연구에서 테스트할 수 있으며, 여기서, 샘플을 선택된 시간 기간 동안 스트레스 조건에 노출시키며, 이어서 적당한 분석 기술을 이용하여 화학적 및 물리적 안정성을 정량적으로 그리고 정성적으로 분석한다.

[0096] 따라서, 안정성은 선택된 온도에서 선택된 시간 기간 동안, 예를 들어 샘플을 -80°C, -20°C, 5, 25 및 55°C에서 최대 1개월 동안 보관함으로써 그리고 예를 들어 SEC, WAX, 광 차단, 탁도 및 DLS를 이용함으로써 (정량적 및 정성적 분석을 위하여) 측정될 수 있다.

[0097] 상기에 따르면, "안정한 조성물"은 항체가 보관시에 물리적 안정성 및 화학적 안정성을 갖고/갖거나 그의 생물학적 활성을 유지하는 것이다.

[0098] "화학적 안정성"은 화학적으로 변경된 형태의 항체의 검출 및 정량화에 의해 평가될 수 있다. 화학적 변경은 예를 들어 크기 배제 크로마토그래피, SDS-PAGE 및/또는 매트릭스-보조 레이저 탈착 이온화(matrix-assisted laser desorption ionization)/비행 시간 질량 분광법(time-of-flight mass spectrometry)(MALDI/TOF MS)을 이용하여 평가될 수 있는 크기 변형 (예를 들어 클리핑)을 포함할 수 있다. 다른 유형의 화학적 변경은 예를 들어 이온 교환 크로마토그래피에 의해 평가될 수 있는 전하 변경 (예를 들어 탈아미드화의 결과로서 나타남)을 포함한다. 본 발명의 맥락에서 화학적 안정성은 예를 들어 약한 양이온 교환 크로마토그래피(weak cationic exchange chromatography; WAX)에 의해 측정되며, 여기서, 2 내지 3%의 변화는 유의한 것으로 간주될 수 있다.

- [0099] "물리적 안정성"은 실질적으로 본 발명의 맥락에서 응집, 침전 및/또는 변성의 징후가 없는 항체를 나타낸다. 물리적 안정성에 접근하기 위한 방법으로는 예를 들어 크기 배제 크로마토그래피(SEC), 동적 광 산란(dynamic light scattering; DLS), 광 차폐(light obscuration; LO) 및 색 및 투명도(clarity)가 있다. 크기 배제 크로마토그래피(SEC)에 있어서, 함량의 1%의 차이는 본 발명의 맥락에서, 사용되는 컬럼, 작동 압력, 완충제의 속도에 따라, 테스트된 조건 하에서 유의하게 상이한 것으로 간주될 수 있다.
- [0100] 제약 조성물 중 항체가 그의 의도된 목적을 위하여 생물학적으로 활성인 경우, 항체는 제약 조성물에서 "그의 생물학적 활성을 유지하는" 것이다. 예를 들어, 제약 조성물 중 항체의 생물학적 활성이 (예를 들어, 항원 결합 분석법에서 측정되는 바와 같이) 제약 조성물을 제조한 시점에 나타난 생물학적 활성의 약 30%, 약 20%, 또는 약 10% 내에 있을 경우 (상기 분석법의 오차 내에서) 생물학적 활성은 유지된 것이다. 당업자에게 공지된 바와 같이, 용액 형태로 제형화된 단량체형 항체의 양이 적합한 제약적 활성 조성물에 가장 중요하다. 응집물은 몇몇의 심각한 부작용의 야기에 책임이 있을 수 있기 때문에, 단량체의 함량은 약물, 즉, 항체 또는 이의 항체 단편의 실제적인 제약적 활성 양(pharmaceutically active amount)을 표시한다.
- [0101] 본 발명의 맥락에서 "스트레스" 또는 "스트레스 조건"이라는 용어는 기계적 스트레스, 열적 스트레스, 또는 냉동 및 해동에서 생기는 스트레스를 나타낸다. 기계적 스트레스, 열적 스트레스, 또는 냉동 및 해동에서 생기는 스트레스를 시뮬레이션하기 위한 방법 및 조건으로는 다이버(diver)가 있으며, 이는 당업자에게 공지되어 있다. 기계적 스트레스는 예를 들어 200 rpm에서 2 내지 3시간 동안 교반시키는 것일 수 있다. 열적 스트레스는 예를 들어 감소되거나 증가된 온도에서 소정량의 시간 동안 보관하는 것을 나타내며, 일 실시예에서, 샘플은 -80°C, -20°C, 5°C, 25°C 및 40°C에서 보관될 수 있고, 여기서, 예를 들어 -80°C, -20°C 및 40°C는 스트레스 조건을 나타낸다. 샘플은 샘플을 -80°C에서의 24시간 동안의 냉동 및 실온에서의 90분 동안의 해동의 몇 사이클에 노출시킴으로써 냉동 및 해동으로부터의 스트레스에 노출될 수 있으며, 여기서, 상기 사이클은 5회 반복되고, 제5 사이클은 예를 들어 -80°C에서 72시간 동안 더 오래 유지된다.
- [0102] 일 실시 양태에서, 조성물은 기계적 스트레스에 대하여 증가된 안정성을 갖는다. 따라서, 조성물은 예를 들어 바리오마그 멀티포인트(Variomag Multipoint) HP를 이용하여 예를 들어 바이알 중 샘플을 교반시킴으로써 예를 들어 200 rpm에서 적어도 2시간 또는 3시간 동안 스트레스를 받을 수 있다.
- [0103] 일 실시 양태에서, 조성물은 증가된 열적 안정성을 갖는다. 따라서, 조성물은 40°C, 50°C 또는 55°C에서 적어도 1주일 또는 최대 1개월 동안 스트레스를 받을 수 있다. 조성물은 추가로 40°C에서 최대 3개월 또는 6개월 동안 스트레스를 받을 수 있다.
- [0104] 추가의 실시 양태에서, 조성물은 냉동 및 해동에서 생기는 스트레스에 대하여 증가된 안정성을 갖는다. 따라서, 조성물은 -80°C에서 24시간 동안 냉동되고, 이어서 실온에서 90분 동안 해동될 수 있으며, 여기서, 상기 사이클은 예를 들어 5회 반복된다. 제5 사이클은 예를 들어 -80°C에서 72시간 동안 유지될 수 있다.
- [0105] "감소된", "더 높은", "더 적은", "더 작은", "증가된", "더 낮은" 또는 "덜한" 또는 이와 유사한 용어와 같은 용어는 두 상태 사이의 정량적 차이를 나타내며, 상기 두 상태 사이의 적어도 통계적으로 유의한 차이를 말한다.
- [0106] 일 실시 양태에서, 조성물은 55°C에서 1주일 동안 안정하다.
- [0107] 추가의 실시 양태에서, 조성물은 40°C에서 1개월, 3개월 또는 6개월 동안 안정하다.
- [0108] 추가의 실시 양태에서, 조성물은 200 rpm에서의 3시간 동안의 교반 후 안정하다.
- [0109] 추가의 실시 양태에서, 조성물은 냉동 및 해동 후 안정하며, 여기서, 냉동 및 해동은 조성물을 -80°C에서 24시간 동안 냉동시키고 이어서 실온에서 90분 동안 해동시키는 것을 나타내며, 여기서, 상기 사이클은 5회 반복되고, 제5 사이클에서 온도는 -80°C에서 72시간 동안 유지된다.
- [0110] 상기 실시 양태에서, "안정한"은 SEC로 측정될 때 모든 피크의 총 면적에 대하여 90% 초과, 91% 초과, 92% 초과, 93% 초과, 94% 초과, 95% 초과, 96% 초과, 97% 초과 또는 98% 초과 단량체 %를 갖는 조성물을 나타낸다.
- [0111] 대안적으로, "안정한"은 DLS로 측정할 경우 부피 및/또는 강도로 분석될 때 90% 초과, 91% 초과, 92% 초과, 93% 초과, 94% 초과, 95% 초과, 96% 초과, 97% 초과, 98% 초과 또는 99% 초과 단량체 % 함량을 갖는 조성물을 나타낼 수 있다.

- [0112] 일 실시 양태에서, 본 발명의 조성물은 향상된 안정성을 갖는다.
- [0113] 추가의 실시 양태에서, 본 발명의 조성물은 스트레스에 대하여 향상된 안정성을 가지며, 여기서, 스트레스는 기계적 스트레스, 열적 스트레스 또는 냉동 및 해동에서 생기는 스트레스로부터 선택된다.
- [0114] 본 발명의 맥락에서 "향상된 안정성" 및/또는 "증가된 안정성"은 상기에 기술된 바와 같이 정성적으로 및/또는 정량적으로 평가된 물리적 및/또는 화학적 안정성으로서 동일 항체의 기준 조성물의 물리적 및/또는 화학적 안정성과 비교하여 증가된 물리적 및/또는 화학적 안정성을 나타낸다.
- [0115] 특정 실시 양태에서, 기준 조성물은 아달리무맙, 염화나트륨, 제일인산나트륨 2수화물, 제이인산나트륨 2수화물, 시트르산나트륨, 시트르산 1수화물, 만니톨, 폴리소르베이트 80, 및 주사용수를 함유하는 국제 공개 제2004/016286호의 구매가능한 아달리무맙 제형이다.
- [0116] 상기에 따르면, 일 실시 양태에서 본 발명의 제약 조성물은 기준 조성물과 비교하여 하기로 이루어진 균으로부터 선택되는 적어도 하나의 특징을 갖는다:
- [0117] (a) 크기 배제 크로마토그래피(SEC)로 측정할 경우 약 55°C에서 1주일 동안 보관한 후 응집물의 양의 감소,
- [0118] (b) SEC로 측정할 경우 약 55°C에서 1주일 동안 보관한 후 더 많은 양의 단량체,
- [0119] (c) SEC로 측정할 경우 약 55°C에서 1주일 동안 보관한 후 더 적은 단편.
- [0120] 더욱이, 상기에 따르면, 일 실시 양태에서, 본 발명의 제약 조성물은 하기로 이루어진 균으로부터 선택되는 적어도 하나의 특징을 갖는다:
- [0121] (a) 조성물은 55°C에서의 1주일의 열적 스트레스에 대하여 안정함,
- [0122] (b) 조성물은 55°C에서의 3시간 동안의 교반의 기계적 스트레스에 대하여 안정함, 및/또는
- [0123] (c) 조성물은 냉동 및 해동에서 생기는 스트레스에 대하여 안정함 (여기서, 냉동 및 해동은 조성물을 -80°C에서 24시간 동안 냉동시키고, 이어서 실온에서 90분 동안 해동시키는 것을 나타내며, 상기 사이클은 5회 반복으로 반복되고, 제5 사이클에서 온도는 -80°C에서 72시간 동안 유지되며,
- [0124] 안정성은 하기 특성 중 적어도 하나를 나타냄:
- [0125] i) 조성물은 SEC로 측정할 때 모든 피크의 총 면적과 비교하여 90% 초과, 91% 초과, 92% 초과, 93% 초과, 94% 초과, 95% 초과, 96% 초과, 97% 초과 또는 98% 초과와 %의 단량체 함량을 가짐,
- [0126] ii) 조성물은 SEC로 측정할 때 모든 피크의 총 면적과 비교하여 3% 미만, 2% 미만, 1.5% 미만, 1.4% 미만, 1.3% 미만, 1.2% 미만, 1.1% 미만, 1.0% 미만의 %의 응집물 함량을 가짐, 및/또는
- [0127] iii) 조성물은 SEC로 측정할 때 모든 피크의 총 면적과 비교하여 3% 미만, 2% 미만, 1.5% 미만, 1.4% 미만, 1.3% 미만, 1.2% 미만, 1.1% 미만, 1.0% 미만의 %의 단편 함량을 가짐).
- [0128] 게다가, 상기에 따르면, 일 실시 양태에서 본 발명의 제약 조성물은 기준 조성물과 비교하여 하기로 이루어진 균으로부터 선택되는 적어도 하나의 특징을 갖는다:
- [0129] (a) 동적 광 산란(DLS)으로 측정할 경우 약 40°C에서 3개월 동안 보관한 후 더 많은 양의 단량체, 및
- [0130] (b) 광 차단/광 차폐(LO)로 측정할 경우 약 40°C에서 1개월 내지 6개월 동안 보관한 후 현미경을 사용하지 않으면 안 보이는 입자의 양의 감소.
- [0131] 더욱이, 상기에 따르면, 일 실시 양태에서, 본 발명의 제약 조성물은 40°C에서의 1개월 내지 6개월, 특히 1개월, 3개월 또는 6개월의 열적 스트레스에 안정하며, 여기서, 안정하다는 것은 하기 특성 중 적어도 하나를 나타낸다:
- [0132] i) 조성물은 DLS로 측정할 경우 부피로 분석될 때 90% 초과, 91% 초과, 92% 초과, 93% 초과, 94% 초과, 95% 초과, 96% 초과, 97% 초과, 98% 초과 또는 99% 초과와 %의 단량체 함량을 가짐,
- [0133] ii) 조성물은 DLS로 측정할 경우 강도로 분석될 때 90% 초과, 91% 초과, 92% 초과, 93% 초과, 94% 초과, 95% 초과, 96% 초과, 97% 초과, 98% 초과 또는 99% 초과와 %의 단량체 함량을 가짐,
- [0134] iii) 조성물은 LO로 측정될 때 10 μm 초과인 입자가 6000개 미만, 25 μm 초과인 입자가 600개 미만, 그리고 1

μm 초과인 입자가 10000개 미만임.

- [0135] 본 발명자는 염화나트륨 첨가가 항-hTNF 항체의 안정성에 유리하지 않음을 보여 주었다. 더욱이, 염화나트륨의 첨가는 상기 항체의 변성 온도(T_M)에 부정적인 영향을 준다.
- [0136] 따라서, 일 실시 양태에서, 조성물은 7 mg/ml 미만의 염화나트륨, 6 mg/ml 미만의, 5 mg/ml 미만의, 2 mg/ml 미만의 염화나트륨을 포함하며, 예를 들어 염화나트륨을 전혀 포함하지 않는다.
- [0137] 조성물이 염화나트륨을 전혀 포함하지 않을 때, 조성물에는 염소산나트륨이 본질적으로 없다.
- [0138] 본원에서 사용되는 바와 같이, "본질적으로"라는 용어는 염소산나트륨 분자가 능동적으로는 첨가되지 않은, 즉, 의도적으로 첨가되는 것은 아닌 조성물을 나타낸다. 미량의 염소산나트륨이 5 mg/ml 미만, 3 mg/ml 미만, 2 mg/ml 미만, 1 mg/ml 미만, 예를 들어 0.5 mg/ml 미만, 더 바람직하게는 0.05 mg/ml 미만의 농도로 존재할 수 있다.
- [0139] 일 실시 양태에서, 조성물의 항체는 치료적 유효량으로 포함된다.
- [0140] 약리학적 의미에서, 본 발명의 맥락에서, 항체의 "치료적 유효량" 또는 "유효량"은 항체가 치료에 효과적인 장애의 치료 또는 예방에서 유효한 양을 나타낸다. 따라서, 조성물은 1 내지 150 mg/ml의 항체, 1 내지 140 mg/ml, 10 내지 130 mg/ml, 15 내지 110 mg/ml, 20 내지 100 mg/ml, 25 내지 90 mg/ml, 30 내지 80 mg/ml, 30 내지 70 mg/ml, 40 내지 70 mg/ml, 40 내지 60 mg/ml의 항체, 예를 들어 45 내지 55 mg/ml, 예를 들어 45, 56, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55 mg/ml의 항체를 포함할 수 있다. 상기에 나열된 농도들의 중간의 범위들도 본 발명의 일부인 것으로 의도된다. 예를 들어, 상한치 및/또는 하한치로서 상기에 나열된 값들 중 임의의 것의 조합을 이용한 값들의 범위가 포함되는 것으로 의도된다.
- [0141] 본원에서 사용되는 바와 같이, "완충제"는 그의 산-염기 완충제 성분들의 작용에 의해 pH의 변화에 저항하는 완충액을 나타낸다. 본원에서 "pH"는 25°C에서의 조성물의 산도 또는 염기도를 나타낸다. 조성물의 pH를 측정하는 표준 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 일 실시예에서, pH는 전형적으로 25°C에서 pH 미터(meter)를 사용하여 측정된다. 전형적으로, pH의 측정은 상기 기기를 보정하는 것, 잘 혼합된 샘플 내에 전극을 두는 것, 및 그 후 pH를 pH 미터로부터 직접적으로 판독하는 것으로 이루어진다. 본 발명자는 스크리닝 연구에서 조성물에 포함된 항체의 폴딩 해제(unfolding) 온도가 더 높은 완충제 농도에서 더 낮음을 보여 주었다.
- [0142] 이와 같이 본 조성물은 1 내지 100 mM의 적어도 하나의 완충제, 1 내지 50 mM의 적어도 하나의 완충제, 1 내지 30 mM의 적어도 하나의 완충제, 1 내지 15 mM의 적어도 하나의 완충제, 예를 들어 5 내지 15 mM, 예컨대 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM의 적어도 하나의 완충제를 포함한다. 일 실시 양태에서, 조성물은 10 mM의 적어도 하나의 완충제를 포함한다.
- [0143] 본 발명자는 아세테이트 및 히스티딘 완충제가 다른 완충제 시스템과 비교하여 항-hTNF 항체의 안정성을 강하게 향상시킴을 보여 주었다. 추가로, 본 발명자는 항-CXCR5 항체가 아세테이트 완충제에서 40°C에서 6개월까지 안정함을 보여 주었다.
- [0144] 따라서, 본 발명의 맥락에서 상기 적어도 하나의 완충제는 아세테이트 또는 히스티딘이다.
- [0145] 일 실시 양태에서, 상기 적어도 하나의 완충제는 2가지의, 3가지의 또는 이보다 더 많은 완충제일 수 있다. 따라서, 일 실시 양태에서, 상기 적어도 하나의 완충제는 2가지의 완충제이다. 일 실시예에서 상기 2가지 완충제는 아세테이트 및 히스티딘일 수 있으며, 여기서, 생성된 완충제는 아세테이트-히스티딘 완충제 또는 히스티딘-아세테이트 완충제이다.
- [0146] 일 실시 양태에서, 상기 적어도 하나의 완충제는 아세테이트이며, 상기 실시 양태에서, 조성물의 pH는 5 내지 6.5, 예를 들어 5.0 내지 6.0, 예를 들어 5.2 내지 5.8, 예를 들어 5.4 내지 5.6, 예를 들어 5.4, 5.5, 5.6이다.
- [0147] 당업자에게 공지되어 있는 바와 같이, 아세테이트 완충제는 아세테이트의 혼합물, 예를 들어 염기로서 아세트산나트륨과 산으로서 아세트산의 혼합물로 이루어진다. 특정 농도 및 pH의 아세테이트 완충제를 제조하기 위하여, 당업자라면 예를 들어 아세트산과 혼합되어야 하는 아세트산나트륨 또는 아세트산나트륨 3수화물의 양을 계산해야 한다. 예를 들어 pH가 5.5인 10 mM 아세테이트 완충제 1 ml에 있어서, 1.17 mg의 아세트산나트륨 3수화물이 0.08 mg의 아세트산과 혼합되며, 여기서, 아세트산은 일반적으로 pH 조절에 사용된다. 따라서, 특정 실시 양태에서, 조성물은 1.17 mg/ml의 아세트산나트륨 3수화물 및 0.08 mg/ml의 아세트산을 포함할 수 있어서 조성물은

10 mM의 아세테이트 완충제를 포함하게 되며 pH는 5.5가 된다.

- [0148] 일 실시 양태에서, 상기 적어도 하나의 완충제는 히스티딘이며, 상기 실시 양태에서 조성물의 pH는 5 내지 6.5, 예를 들어 5.5 내지 6.5, 예를 들어 5.7 내지 6.3, 예를 들어 5.9 내지 6.1, 예를 들어 5.9, 6.0, 6.1이다.
- [0149] 히스티딘 (pK 5.97)은 피하, 근육내 및 복강 주사에 바람직한 완충제이다.
- [0150] 추가로 본 발명자는 상이한 부형제들, 예를 들어 당 및 폴리올의 안정화 효과를 테스트하였다. 놀랍게도, 본 발명자는 μ DSC 실험에서 트레할로스 및 만니톨이 최고 T_m 온도를 나타냄을 발견하였다.
- [0151] 이와 같이 일 실시 양태에서 본 발명의 조성물은 트레할로스 및 만니톨로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 부형제, 예를 들어 만니톨을 포함한다.
- [0152] 본 발명의 일 실시 양태에서, 1 내지 70 mg/ml의 부형제, 예를 들어 1 내지 60 mg/ml의 부형제, 10 내지 50 mg/ml의 상기 적어도 하나의 부형제를 포함한다.
- [0153] 트레할로스는 두 알파-글루코스 단위 사이의 알파,알파-1,1-글루코시드 결합에 의해 형성된 알파-결합된 이당 (알파-D-글루코피라노실-(1→1)-알파-D-글루코피라노시드)인 비환원당이다. 일 실시 양태에서, 조성물은 1 내지 70 mg/ml의 트레할로스, 예를 들어 10 내지 70 mg/ml의 트레할로스, 예를 들어 20 내지 70 mg/ml의 트레할로스, 예를 들어 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 및 70 mg/ml의 트레할로스, 예를 들어 50 mg/ml의 트레할로스를 포함한다.
- [0154] 일 실시 양태에서, 조성물은 1 내지 60 mg/ml의 만니톨, 1 내지 50 mg/ml, 예를 들어 1 내지 40 mg/ml, 예를 들어 7.5 내지 40 mg/ml의 만니톨, 예를 들어 7.5 내지 30 mg/ml의 만니톨, 예를 들어 15 내지 25 mg/ml의 만니톨, 예를 들어 7.5, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 mg/ml, 예를 들어 12 mg/ml 또는 20 mg/ml의 만니톨을 포함할 수 있다. 일 실시 양태에서, 상기 적어도 하나의 부형제는 2가지의, 3가지의 또는 이보다 더 많은 부형제일 수 있다. 따라서, 일 실시 양태에서, 상기 적어도 하나의 부형제는 만니톨 및 트레할로스이다.
- [0155] 추가로, 본 발명자는 아미노산의 안정화 효과를 테스트하였으며, 여기서, 글리신, L-아스파라긴, 및 글루타민은 μ DSC 실험에서 항체에 있어서 최고 변성 온도를 나타냈다.
- [0156] 본원에서 사용되는 바와 같이, "아미노산"이라는 용어는 카르복실기에 대하여 α -위치에 위치하는 아미노 모이어티를 보유하는 제약상 허용가능한 유기 분자를 나타낸다. 아미노산의 예는 하기를 포함한다: 아르기닌, 글리신, 오르니틴, 라이신, 히스티딘, 글루탐산, 아스파라긴산, 이소류신, 류신, 알라닌, 페닐알라닌, 타이로신, 트립토판, 메티오닌, 세린, 및 프롤린. 이용되는 아미노산은 선택적으로 L형으로 존재한다.
- [0157] 일 실시 양태에서, 조성물은 1 내지 50 mg/ml, 1 내지 40 mg/ml, 예를 들어 1 내지 30 mg/ml의 상기 적어도 하나의 아미노산을 포함한다.
- [0158] 일 실시 양태에서, 상기 적어도 하나의 아미노산은 글리신이다. 본 조성물은 5 내지 30 mg/ml의 글리신, 예를 들어 10 내지 20 mg/ml의 글리신, 예를 들어 12 내지 16 mg/ml의 글리신, 예를 들어 12, 13, 14, 15, 16, 예를 들어 15 mg/ml의 글리신을 포함할 수 있다.
- [0159] 추가의 실시 양태에서, 상기 적어도 하나의 아미노산은 아스파라긴일 수 있다. 본 조성물은 1 내지 20 mg/ml의 아스파라긴, 예를 들어 1 내지 10 mg/ml의 아스파라긴, 예컨대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 예를 들어 2 mg/ml의 아스파라긴을 포함할 수 있다.
- [0160] "계면활성제" 및 "세제"라는 용어는 본원에서 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 예시적인 세제는 비이온성 세제, 예컨대 폴리소르베이트 (예를 들어 폴리소르베이트 20, 80 등) 또는 폴록사머 (예를 들어 폴록사머 188)를 포함한다. 첨가되는 세제의 양은 이것이 제형화된 항체의 응집을 감소시키고/시키거나 조성물 중 미립자의 형성을 최소화하고/하거나 흡착을 감소시키도록 하는 것이다.
- [0161] 일 실시 양태에서, 계면활성제는 폴리소르베이트이다. 폴리소르베이트는 지방산에 의해 에스테르화된 폐길화 (PGE-ylated) 소르비탄(소르비톨의 유도체)으로부터 유도된 유화제이다. 이러한 부류의 에이전트(agent)는 특히 폴리소르베이트 20, 21, 40, 60, 61, 65, 80, 81, 85, 및 120을 포함한다.
- [0162] 추가의 일 실시 양태에서, 조성물은 계면활성제 폴리소르베이트 20 (일반적인 상표명은 알케스트(Alkest) TW 20 and 트윈 20(Tween))을 포함함) 및/또는 폴리소르베이트 80 (일반적인 상표명은 알케스트 TW 80, 카나르셀

(Canarcel), 포에가스orb(Poegasorb) 80, 트윈 80을 포함함)을 포함한다. 본 조성물은 0.001% (w/v) 내지 1% (w/v)의 계면활성제, 예를 들어 0.001% (w/v) 내지 0.15% (w/v)의 계면활성제, 예를 들어 0.01% (w/v) 내지 0.15% (w/v)의 계면활성제를 포함할 수 있다.

- [0163] 일 실시 양태에서, 조성물은 0.001% (w/v) 내지 0.15% (w/v)의 폴리소르베이트 80, 예를 들어 0.01% (w/v) 내지 0.15% (w/v), 예를 들어 0.05% (w/v) 내지 0.15% (w/v), 예를 들어 0.08% (w/v) 내지 0.12% (w/v), 예를 들어 0.08, 0.085, 0.09, 0.095, 0.1, 0.115, 0.12% (w/v)의 폴리소르베이트 80을 포함한다. 본 발명의 조성물은 예를 들어 약 0.1% (w/v)의 폴리소르베이트 80을 포함한다.
- [0164] 또 다른 실시 양태에서, 조성물은 0.001% (w/v) 내지 0.15% (w/v), 예를 들어 0.005% (w/v) 내지 0.1% (w/v), 예를 들어 0.008% (w/v) 내지 0.05% (w/v), 예를 들어 0.008% (w/v) 내지 0.015% (w/v), 예를 들어 0.008% (w/v) 내지 0.012% (w/v), 예를 들어 0.008, 0.009, 0.01, 0.011, 0.012, 0.013, 0.014, 0.015% (w/v)의 폴리소르베이트 20을 포함한다. 본 발명의 조성물은 예를 들어 0.01% (w/v)의 폴리소르베이트 20을 포함한다.
- [0165] 일 실시예에 따르면, 본 발명의 조성물은 50 mg/ml의 항체, pH 5.5의 10 mM의 아세테이트 완충제, 20 mg/ml의 만니톨, 15 mg/ml의 글리신 및 0.1% (w/v)의 폴리소르베이트 80 (PS80)을 포함한다. 더 구체적으로, 일 실시예에 따르면, 본 발명의 조성물은 50 mg/ml의 항체, 1.17 mg/ml의 아세트산나트륨 3수화물, 0.08 mg/ml의 아세트산, 20 mg/ml의 만니톨, 15 mg/ml의 글리신 및 0.1% (w/v)의 PS80을 포함하며, 조성물의 pH는 5.5이다.
- [0166] 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명의 조성물은 50 mg/ml의 항체, pH 5.5의 10 mM의 아세테이트 완충제, 20 mg/ml의 만니톨, 15 mg/ml의 글리신 및 0.01% (w/v)의 폴리소르베이트 20 (PS20)을 포함한다. 더 구체적으로, 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명의 조성물은 50 mg/ml의 항체, 1.17 mg/ml의 아세트산나트륨 3수화물, 0.08 mg/ml의 아세트산, 20 mg/ml의 만니톨, 15 mg/ml의 글리신 및 0.01% (w/v)의 PS20을 포함하며, 조성물의 pH는 5.5이다.
- [0167] 추가의 실시예에 따르면, 본 발명의 조성물은 41 mg/ml의 항체, pH 5.5의 10 mM의 아세테이트 완충제, 20 mg/ml의 만니톨, 15 mg/ml의 글리신 및 0.1% (w/v)의 PS80을 포함한다.
- [0168] 추가의 실시예에 따르면, 본 발명의 조성물은 50 mg/ml의 항체, pH 5.5의 10 mM의 아세테이트 완충제, 20 mg/ml의 만니톨, 15 mg/ml의 글리신, 0.1% (w/v)의 PS80 및 2 mg/ml의 NaCl을 포함한다.
- [0169] 추가의 실시예에 따르면, 본 발명의 조성물은 50 mg/ml의 항체, pH 5.5의 10 mM의 아세테이트 완충제, 15 mg/ml의 글리신 및 0.01% (w/v)의 PS20을 포함한다.
- [0170] 추가의 실시예에 따르면, 본 발명의 조성물은 50 mg/ml의 항체, pH 5.5의 10 mM의 아세테이트 완충제, 12 mg/ml의 만니톨, 0.1% (w/v)의 PS80 및 6.165 mg/ml의 NaCl을 포함한다.
- [0171] 추가의 실시예에 따르면, 본 발명의 조성물은 50 mg/ml의 항체, pH 6.0의 7.45 mM의 히스티딘 완충제, 12 mg/ml의 만니톨, 0.1% (w/v)의 PS80 및 6.165 mg/ml의 NaCl을 포함한다.
- [0172] 일 실시 양태에서, 하나 이상의 다른 제약상 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정제, 예컨대 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 기술된 것이 조성물에 포함될 수 있되, 단, 이들은 조성물의 요망되는 특성에 유의하게 불리한 영향을 주지 않는다. 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정제는 이용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 무독성이며 추가의 완충제; 공용매; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 산화방지제; 킬레이팅제, 예컨대 EDTA; 금속 복합체 (예를 들어 Zn-단백질 복합체); 생분해성 중합체, 예를 들어 폴리에스테르; 및/또는 염-형성 반대 이온, 예컨대 나트륨을 포함한다.
- [0173] 또한 본 발명의 조성물은 치료되는 특정 징후에 필요할 경우 하나 이상의 다른 치료제, 바람직하게는 조성물의 항체에 불리하게 영향을 주지 않는 상보적 활성을 갖는 것과 조합될 수 있다. 그러한 치료제는 적합하게는 의도된 목적에 효과적인 양으로 조합되어 존재한다.
- [0174] *본 제약 조성물을 이용한 치료 및 의약*
- [0175] 일 실시 양태에서, 본 발명은 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하는 방법을 제공하며, 이는 이를 필요로 하는 대상체에게 치료적 유효량의 본 발명의 제약 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0176] 또한 본 발명은 의약으로 사용하기 위한 본 발명의 제약 조성물에 관한 것이다. 추가로 본 발명은 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하기 위한 의약의 제조에 있어서의 본 발명의 제약 조성물의 용도에 관한 것이다. 일 실시 양태에서, 본 발명은 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하기 위한 본 발명의 제약 조성물의 용도에 관한 것

이다.

- [0177] "대상체" 또는 "개체"라는 용어는 상호교환가능하게 사용되며, 예를 들어 인간 또는 인간외 포유동물일 수 있다. 예를 들어, 대상체는 박쥐; 페럿(ferret); 토끼; 고양이과 동물 (고양이); 개과 동물 (개); 영장류 (원숭이), 말과 동물 (말); 남성, 여성 및 아동을 포함하는 인간이다. 일 실시 양태에서, "대상체"는 인간을 나타낸다.
- [0178] 본 발명의 맥락에서, "치료하는" 또는 "치료"라는 용어는 치료적 사용 (즉, 주어진 질환에 걸린 대상체에 대한 치료적 사용)을 나타내며, 그러한 장애 또는 병태의 하나 이상의 증상의 진행의 역전, 완화, 저해를 의미한다. 따라서, 치료는 질환의 완전한 치유를 초래하는 치료를 나타낼 뿐만 아니라 질환의 진행을 늦추고/늦추거나 대상체의 생존을 연장시키는 치료를 나타내기도 한다.
- [0179] "예방하는"은 예방적 사용 (즉, 주어진 질환이 발병하기 쉬운 대상체에 대한 예방적 사용)을 의미한다.
- [0180] "질환" 또는 "장애"는 항체를 이용한 치료로부터 이익을 얻는 임의의 병태이다. 이것은 대상체가 당해 장애에 취약하게 하는 병리학적 상태를 포함하는 만성 및 급성 장애 또는 질환을 포함한다.
- [0181] "치료를 필요로 하는"이라는 용어는 이미 그 장애에 걸린 대상체와, 그 장애를 예방해야 하는 대상체를 나타낸다.
- [0182] 일 실시 양태에서, 장애는 TNF알파 활성이 유해한 장애를 나타낸다.
- [0183] 본원에서 사용되는 바와 같이, "TNF알파 활성이 유해한 장애"라는 용어는 당해 장애를 앓고 있는 대상체에서의 TNF알파의 존재가 그 장애의 악화에 기여하는 요인이거나 그 장애의 병리생리학적 특성(pathophysiology)에 책임이 있는 것으로 밝혀졌거나 그러하리라 의심되는 질환 및 장애를 포함한다. 따라서, TNF알파 활성이 유해한 장애는 TNF알파 활성의 저해가 그 장애의 증상 및/또는 진행을 완화시킬 것으로 예상되는 장애이다. 이러한 장애는 예를 들어 그 장애를 앓고 있는 대상체의 생물학적 유체(biological fluid) 중 TNF알파의 농도의 증가 (예를 들어, 대상체의 혈청, 혈장, 활액 등에서의 TNF알파의 농도의 증가)에 의해 입증될 수 있으며, 이는 예를 들어 상기에 기술된 바와 같이 항-TNF알파 항체를 이용하여 탐지될 수 있다. TNF알파 활성이 유해한 장애의 다수의 예가 있다. TNF알파 활성이 유해한 장애의 예는 본원에 참고로 포함된 미국 특허 출원 제60/397275호에 개시되어 있다. TNF알파 활성이 유해한 예는 또한 미국 특허 제6,015,557호, 미국 특허 제6,177,077호, 미국 특허 제6,379,666호, 미국 특허 제6,419,934호, 미국 특허 제6,419,944호, 미국 특허 제6,423,321호, 및 미국 특허 제6,428,787호; 미국 특허 출원 공개 제2001/0016195호, 미국 특허 출원 공개 제2001/0004456호, 및 미국 특허 출원 공개 제2001/026801호; 국제 공개 제00/50079호 및 국제 공개 제01/49321호에 개시되어 있으며, 이들 각각은 본원에 참고로 포함된다.
- [0184] 일 실시 양태에서, 질환 또는 장애는 판상 건선, 크론병, 궤양성 대장염, 건선성 관절염, 강직성 척추염, 류마티스 관절염, 다관절형 소아 특발성 관절염이다.
- [0185] 또 다른 실시 양태에서, 장애는 비정상적이거나 비정상적인 CXCR5의 생물학적 특성(biology) 및 기능과 연관된 장애를 나타낸다.
- [0186] 본원에서 사용되는 바와 같이, "비정상적이거나 비정상적인 CXCR5의 생물학적 특성 및 기능과 연관된 장애"라는 용어는 CXCL13 또는 다른 CXCR5 리간드의 과다발현 또는 수준 증가, B 세포의 수준 증가, B 세포 활성의 수준 증가, CXCR5의 수준 증가 또는 CXCR5의 부적당한 대사 및 활성을 특징으로 하거나 이에 의해 야기되는 장애를 나타낸다. 그러한 장애는 자가면역 질환, 예컨대 루푸스(lupus), 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 중증 근무력증 및 다발성 경화증; 대장염, 류마티스 관절염 또는 건선성 관절염을 포함한다.
- [0187] "유효량"은 필요한 시간 기간 동안 및 투여량에서, 요망되는 치료 또는 예방 결과를 달성하기에 유효한 양을 나타낸다.
- [0188] 본 발명의 제약 조성물의 "치료적 유효량"은 요망되는 치료 결과를 도출하도록 본 발명의 맥락에서의 항체의 능력, 및 개체의 질환 상태, 연령, 성별, 및 중량과 같은 요인에 따라 달라질 수 있다. 치료적 유효량은 항체의 임의의 독성 또는 유해 효과가 치료적으로 유의한 효과보다 더 적은 양을 포함한다. 치료적 유효량은 이득, 예를 들어 임상적 이득을 부여하기에 충분한 양을 또한 포함한다.
- [0189] 당해 기술 분야의 통상의 지식을 가진 의사 또는 수의사는 요구되는 본 발명의 제약 조성물의 유효량을 쉽게 결정하고 처방할 수 있다. 예를 들어, 의사 또는 수의사는 요망되는 치료 효과를 달성하기 위하여 요구되는 것보

다 더 낮은 수준의 본 발명의 조성물의 용량에서 시작하여, 요망되는 효과가 달성될 때까지 투여량을 점진적으로 증가시킬 수 있다.

- [0190] 성인에 있어서, 조성물의 용량은 2주마다 주어질 경우 예를 들어 40 mg일 수 있다. 예를 들어 크론병 및 예를 들어 건선을 갖는 성인에 있어서, 처음 (유도) 용량은 80 mg일 수 있으며, 이것에 이어서 예를 들어 1주일 후 예를 들어 2주마다 40 mg이 뒤따를 수 있다. 궤양성 대장염에 있어서, 예를 들어 처음 두 용량은 예를 들어 2주 간격으로 주어질 경우 보통 160 mg 및 80 mg이며, 이것에 이어서 예를 들어 2주마다 40 mg이 뒤따른다.
- [0191] 일 실시 양태에서, 제약 조성물의 유효량은 TNF알파 활성의 저해에, 예를 들어 유해 TNF알파 활성-연관 상태의 다양한 형태적 및 신체적 증상의 예방에 필요하거나 충분한 양이다.
- [0192] 제약 조성물은 공지된 방법, 예컨대 정맥내 투여에 따라, 예를 들어, 볼루스(bolus)로서, 또는 소정 시간 기간에 걸친 연속 주입에 의해, 근육내, 복강내, 뇌척수내, 피하, 관절내, 활액낭내, 또는 경막내 투여에 의해, 예를 들어 근육내 또는 피하 투여에 의해 대상체에게 투여된다.
- [0193] 일 실시 양태에서, 투여는 피하 투여이다. 따라서, 본 발명의 일 실시 양태에서, 상기 제약 조성물은 피하 투여용으로 맞추어진다. 약물의 피하 투여, 또는 주사에 있어서, 약물은 볼루스를 피부로 총칭되는 표피 및 진피 바로 아래의 피부층인 피하조직(subcutis) 내로 전달한다. 피하 주사는 인슐린과 같은 의약의 투여에 있어서 고도로 효과적이고 잘 확립되어 있으며, 그 이유는 감염 위험 감소 및 투여의 용이함 때문에 의학적으로 숙련되지 않은 사람이 각각의 교육을 받았다면 이들에 의해 피하 투여가 수행될 수 있기 때문이다. 따라서 피하 투여는 보행중 투여(ambulant administration), 열악한 사회 기반 시설의 지역 (예를 들어, 의학적으로 숙련되지 않은 사람이 약물 투여에 책임이 있는 곳)에서의 투여, 또는 가정에서의 사용에 적합하다.
- [0194] 예를 들어 피하 투여는, 많은 만성 질환, 예컨대 자가 면역 질환 (예를 들어, 류마티스 관절염 또는 강직성 척추염), 또는 표적 치료법으로 인하여 만성으로 또는 거의 만성으로 되는 많은 암 유형에서 흔히 있듯이, 반복 치료를 요구하는 치료 요법에서 중요하다.
- [0195] 그러나, 상기에 언급된 이유로, 피하 투여용으로 맞추어진 제약 조성물은 일반인에 의해 차선의 보관 조건에 노출될 위험이 더 높으며, 예를 들어 쿨 체인(cool chain)이 방해받거나 또는 조성물이 광 또는 온도 급변에 노출된다는 것이 주지되어야 한다. 더욱이, 피하 투여용 조성물은 상대적으로 높은 농도의 치료제를 필요로 하며, 그 이유는 단회 주사에 의해 투여되는 부피가 다소 제한되기 때문이다 (0.1 mL 내지 최대 2.0 mL). 게다가, 주사 동안 주사바늘 통증을 감소시키기 위하여, 주사바늘은 가늘어야 될 필요가 있으며, 이는 저점도의 주사 용액을 필요로 한다. 그리고 마지막으로, 피하 주사는 심지어 주사바늘이 제거된 후에도 주사 부위에서 통증을 생성할 수 있다. 이것은 아마도 단백질 용액의 성분, 예컨대 완충제 분자 종류 및 오스몰 농도에 의해 영향을 받으며, 각각의 치료법의 대상체 순응도에 상당한 영향을 줄 수 있다. 따라서 안정성이 향상되고 대상체 순응도가 향상된 본 발명에 따른 조성물은 피하 투여에 적합하다.
- [0196] 질환의 예방 또는 치료를 위하여, 항체의 적절한 투여량은 상기에 정의된 바와 같이 치료될 질환의 유형, 그 질환의 중증도 및 경과 (단클론 항체가 예방 목적으로 투여되든지 치료 목적으로 투여되든지 간에), 이전의 치료법, 대상체의 임상 병력 및 단클론 항체에 대한 응답, 및 주치의의 재량에 따라 달라질 것이다. 항체는 적합하게는 한꺼번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 대상체에게 투여된다. 질환의 유형 및 중증도에 따라, 예를 들어 1회 이상의 별개의 투여에 의해서든지 연속 주입에 의해서든지 간에, 약 1 µg/kg 내지 50 mg/kg (예를 들어 0.1 내지 20 mg/kg)의 항체가 대상체에게 투여를 위한 초기 후보 투여량이다. 항체의 투여량은 일반적으로 약 0.05 mg/kg 내지 약 10 mg/kg이다.
- [0197] 또 다른 치료제가 투여될 경우, 이것은 보통 그에 따라 공지된 투여량으로, 또는 치료제의 투여에 기인하는 부정적인 부작용 또는 약물들의 조합된 작용으로 인하여 선택적으로 낮추어진 투여량으로 투여된다. 그러한 치료제들의 제조 및 투약 일정은 제조업자의 지시에 따라 또는 당업자에 의해 경험적으로 결정된 바와 같이 이용될 수 있다.
- [0198] 제품
- [0199] 본원에서, 본 발명은 또한 본 발명의 제약 조성물을 포함하는 장치에 관한 것이다. 그러한 장치는 0.1 ml 내지 2 ml (단회 사용), 또는 0.5 내지 1.5 ml의 액체 부피를 수용할 수 있다. 일 실시 양태에서, 상기 부피는 약 0.8 또는 약 1.0 ml이다.
- [0200] 일 실시 양태에서, 상기 장치는 피하 전달용이다. 피하 전달을 위하여, 조성물은 주사기 (예를 들어, 사전 충전

형 주사기); 자동 주입기(auto injector); 주사 장치 (예를 들어 인젝트-이즈(INJECT-EASE)TM 및 젠젝트(GENJECT)TM 장치); 인젝터 펜(injector pen) (예컨대 젠펜(GENPEN)TM); 또는 현탁 조성물의 피하 투여에 적합한 다른 장치를 통하여 투여될 수 있다. 일 실시 양태에서, 본원에서 장치는 사전 충전형 주사기이다.

- [0201] 관련 측면에서, 본 발명은 용기를 본 발명의 제약 조성물로 충전시키는 단계를 포함하는 제품의 제조 방법을 제공한다.
- [0202] 제품에서의 용기의 실시 양태는 하기를 포함한다: 주사기 (예컨대 사전 충전형 주사기), 자동 주입기, 병, 바이알 (예를 들어 이중 챔버형 바이알), 및 시험관 등. 용기는 현탁 조성물을 수용하며, 용기 상의 또는 용기와 결합된 라벨은 사용 설명서를 나타낼 수 있다. 제품은 이전의 섹션에서 주지되는 바와 같이 다른 완충제, 희석제, 필터, 주사바늘, 주사기, 및 사용 설명서를 포함하는 패키지 인서트(package insert)를 비롯하여 상업적 견지 및 사용자 입장에서 바람직한 다른 물질을 추가로 포함할 수 있다.
- [0203] *키트*
- [0204] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 키트가 제공되며; 상기 키트는 상기에 개시된 바와 같은 적어도 하나의 제약 조성물을 포함하는 적어도 하나의 용기, 및 주사 장치를 포함한다. 일 실시 양태에서, 키트 또는 주사 장치는 근육내 또는 피하 투여용으로, 예를 들어 피하 투여용으로 맞추어져 있다. 일 실시 양태에서, 키트는 예를 들어 피하 투여에 있어서의 조성물의 투여 설명서를 추가로 포함한다.
- [0205] 본 발명의 또 다른 실시 양태에 따르면, 본 발명에 따른 제약 조성물을 포함하는 장치의 용도 또는 본 발명에 따른 키트의 용도가 제공된다. 추가의 실시 양태에서, 본 발명은 상기에 기술된 적어도 하나의 질환의 치료에 있어서의 본 발명의 맥락에서의 키트의 용도 또는 본 발명의 제약 조성물을 포함하는 장치의 용도에 관한 것이다.
- [0206] *응집의 감소 방법*
- [0207] 상기를 고려하면, 본 발명은 또한 본 발명에 따른 조성물을 사용함으로써 항체의 응집 및/또는 단편화를 감소시키는 방법에 관한 것이다. 당업자라면 응집되기 쉽거나 덜 안정한 치료적 활성 항체를 본 발명에 따른 조성물 중에 제형화하는 것이 기준 조성물과 비교하여 상기 항체의 감소된 양의 응집 및 안정화를 초래한다는 것을 이해할 것이다.
- [0208] 따라서, 일 측면에서, 본 발명은 항체의 응집의 감소 방법에 관한 것이며, 이는
- [0209] b) 아세테이트 또는 히스티딘으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 완충제,
- [0210] c) 글리신, 아스파라긴 및 글루타민, 예를 들어 글리신 및 아스파라긴으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산, 및/또는 트레할로스 및 만니톨로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 부형제, 및
- [0211] d) 계면활성제를 포함하는 조성물 중에 항체를 제형화하는 단계를 포함하고,
- [0212] 여기서, pH는 5.0 내지 6.5이다.
- [0213] 추가의 측면에서, 본 발명은 본 발명의 조성물 중에 항체를 제형화하는 단계를 포함하는 항체의 안정화 방법에 관한 것이다.
- [0214] "응집되기 쉬운" 항체는 특히 냉동, 교반시에 및/또는 증가된 온도, 예컨대 40° 또는 55°C에서 다른 항체 분자(들)과 함께 응집되는 것으로 밝혀졌다. 응집되기 쉬운 항체는 예를 들어 SEC로 측정할 경우 약 55°C에서 1주일 동안 보관한 후 94% 미만, 93% 미만, 92% 미만, 90% 미만의 단량체를 갖는 항체일 수 있다. 응집되기 쉬운 항체는 예를 들어 DLS로 측정할 경우 약 40°C에서 3개월 동안 보관한 후 94% 미만, 93% 미만, 92% 미만, 90% 미만의 단량체를 갖는 항체일 수 있다.
- [0215] "단편화되기 쉬운" 항체는 예를 들어 이의 힌지 영역에서 2개 이상의 단편으로 절단되는 것으로 밝혀진 것이다.
- [0216] "응집 또는 단편화의 감소"는 후미라[®]라는 시장 제형과 같은 기준 조성물 중에 제형화된 항체에 비하여 응집, 또는 단편화의 방지 또는 상기 응집 또는 단편화의 양의 감소를 의도한다.
- [0217] 상기 실시 양태들의 임의의 조합은 본 발명의 일부를 만든다.
- [0218] 본 출원 전체에 걸쳐, "포함하는"이라는 용어는 모든 구체적으로 언급된 특징과, 선택적, 추가적, 불특정 특징을 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "포함하는"이라는 용어의 사용은 구체적으

로 언급된 특징 이외의 특징은 전혀 존재하지 않는 (즉, "~로 이루어진") 실시 양태를 또한 개시한다. 더욱이, 단수형 ("a" 또는 "an")은 복수형을 배제하지 않는다. 특정한 방안들이 상호간에 다른 종속항에서 나열된다는 단순한 사실은 이러한 방안들의 조합이 유리해지도록 사용될 수 없음을 나타내는 것은 아니다.

[0219] 이제 본 발명을 하기 실시예를 참고로 하여 더 상세하게 기술할 것이다. 본원에 인용된 모든 문헌 및 특허 문서는 본원에 참고로 포함된다. 본 발명은 전술한 설명에서 상세하게 예시되고 기술되었지만, 실시에는 제한하는 것이 아니라 예시적이거나 시범적인 것으로 간주되어야 한다.

[0220] **서열의 간단한 설명**

[0221] 서열 번호 1은 항-TNF알파 항체의 중쇄 서열을 나타낸다.

[0222] 서열 번호 2는 항-TNF알파 항체의 경쇄 서열을 나타낸다.

[0223] **실시예**

[0224] **1. 방법**

[0225] **1.1 샘플 제조**

[0226] 상이한 완충제들을 처음에 항-TNF알파 항체를 이용하여 스크리닝하였다. 이것은 비바 스피(viva spin) (15R; 멤브란(Membran): 30,000 MWCO HY)을 이용하여 표 1에 열거된 완충제들에 대하여 항-TNF알파 항체를 투석시킴으로써 행하였다. 비교를 위하여, 완충제 스크린을 구매가능한 아달리무맙 항체에 대하여 또한 수행하였다.

표 1

항-TNF 알파 항체 III 상 조성물 개발 연구 동안 스크리닝한 완충제 및 pH 값

완충제	pH 값
트리스(Tris)-시트레이트	5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0
트리스	7.0
포스페이트	6.5, 7.0
히스티딘	5.5, 6.0, 6.5
시트레이트	5.0, 5.5, 6.0
아세테이트	5.0, 5.5
숙시네이트	5.0, 5.5, 6.0
포스페이트-시트레이트	5.2, 5.5, 6.0

[0227]

[0228] 2.1.6에 설명된 바와 같은 부형제 스크린을 위하여, 부형제, 예컨대 수크로스, 트레할로스, 만니톨, 소르비톨, 글리세롤, L-아르제닌 HCl, L-글리신, L-아스파르긴 1수화물, L-글루타민, L-글루탐산, 염화나트륨, 폴리소르베이트 20 (PS 20) 및 폴리소르베이트 80 (PS 80)을 항-TNF알파 항체에 분말 형태로 첨가하거나 (예를 들어 만니톨 및 염화나트륨) 액체 형태로 첨가하였다 (예를 들어 스톡 용액(stock solution)으로서 트윈 80). 모든 샘플, 용액 및 완충제를 사르토포어-2(Sartopore-2) 막을 이용하여 살균 여과하였다 (0.22 μm). 샘플을 살균된 병 또는 바이알 내로 여과시키고, 클린-벤치(clean-bench) 내에서 무균 조건 하에 닫아서 미생물 오염을 방지하였다.

[0229] **1.2 분석 방법**

[0230] 시차 주사 미세 열량 측정법(Differential scanning microcalorimetry; μDSC)을 대부분의 스크리닝 연구 (완충제 스크리닝, 이온 강도, 부형제 스크리닝)에서 이용하여 사전 선택을 한 후 스트레스 연구에 들어갔다. 그 후, 스트레스 연구에 들어간 조성물 (이는 섹션 1.3에 추가로 설명되어 있음)을 분석 방법, 예를 들어 크기 배제 크로마토그래피(SEC), 약 양이온 교환 크로마토그래피(WCX), 광 차단 및/또는 동적 광 산란(DLS) 또는 하기

에 설명된 추가의 분석 방법을 이용하여 분석하였다.

[0231] 1.2.1 시차 주사 미세 열량 측정법(μ DSC)

[0232] 시차 주사 미세 열량 측정법(μ DSC)을 모든 스크리닝 연구에서 이용하여 사전 선택을 한 후 스트레스 연구에 들어갔다. 모든 측정을 지이 헬스케어(GE Healthcare)로부터의 VP 모세관 μ DSC를 이용하여 수행하였다. 기본적으로, 각각의 샘플을 시간당 90°C의 가열 속도를 이용하여 30°C로부터 100°C까지 가열하였다. 주로 폴딩 해제 온도(T_m)를 파라미터로서 이용하여 가장 유망한 조성물을 선택하였다. 특히, Fc1 도메인의 T_m 을 순위용 파라미터로서 이용하였으며, 그 이유는 이것이 서모그램(thermogram)에서 첫 번째 폴딩 해제 사건이기 때문이었다.

[0233] 1.2.2 크기 배제 크로마토그래피(SEC)

[0234] 크기 배제 크로마토그래피(SEC)를 이용하여 고분자량 변이체(high molecular weight variant; HMW) 및 저분자량 변이체(low molecular weight variant; LMW)뿐만 아니라 단량체의 상대적인 양도 결정하였다. 크기 배제 크로마토그래피는 항체 단편(LMW), 용해성 응집물(HMW) 및 항체의 크기에 따른 단백질 분리에 사용된다. 응집물은 온전한 항체 전에, 그리고 단편 회석물 후에 용출된다. 모든 피크의 백분율 단위의 총 면적과 비교한 주 피크의 면적 백분율을 평가에 이용한다.

[0235] 1.2.3 약 양이온 교환 크로마토그래피(WCX)

[0236] 하전된 이소형의 수준을 약 양이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 측정하였다. 크로마토그래피 분리를 UV 검출과 커플링된 약 양이온 교환 컬럼에서 실시한다. 약 양이온 교환 크로마토그래피(WCX)는 전하 불균질성을 기반으로 하여 항체의 상이한 이소형들을 분리한다. 더 산성인 이소형은 더 적은 이온 상호작용을 나타내며 따라서 WCX 크로마토그램에서 염기성 이소형보다 더 일찍 용출된다. 이 방법의 목적은 하전된 이소형의 상대적인 양을 결정하기 위한 것이다. 산성, 중성 및 염기성 이소형의 합계를 100%로 설정하고, 주 피크 면적, 산성 이소형의 면적 및 염기성 이소형의 면적을 상대적으로 계산한다.

[0237] 1.2.4 동적 광 산란(DLS):

[0238] 나노미터 크기 범위의 입자 및 응집물의 존재를 말vern(Malvern)으로부터의 제타사이저 나노-ZS(Zetasizer Nano-ZS)를 사용하여 측정하였다. 입자 크기 분포를 강도 및 부피에 의해 측정하였다. 부가적으로, 유체역학적 직경(hydrodynamic diameter) 및 다분산 지수를 측정하였다. 이 측정을 위하여 250 내지 300 μ l가 필요하였다.

[0239] 1.2.5 광 차단/광 차폐(L0)

[0240] 광 차폐 측정을 수행하여 항-TNF알파 항체 함유 조성물 중의 현미경을 사용하지 않으면 안 보이는 입자의 농도 및 크기를 평가하였다. 상기 측정을 HIAC[®] 입자 계수기 (독일 뒤셀도르프 소재의 하흐 랑게(HACH LANGE))를 이용하여 수행하였다. 이 측정을 위하여 800 내지 1000 μ l가 필요하였다.

[0241] 1.2.6 미세유동 이미징

[0242] 이 방법을 일부의 경우에서 사용하여 형성된 입자의 형태를 더 깊게 살펴 보았다. 다른 경우에, 이 방법을 광 차단에 대한 대안적인 방법으로 이용하였다.

[0243] 1.2.7 시차 주사 형광 측정법(differential scanning fluoremetry; DSF)

[0244] 측정을 CFX96 바이오라드(BioRad)를 이용하여 수행하였다. 온도 주사는 분당 1°C의 가열 속도를 이용하여 20°C로부터 90°C까지의 범위였으며, 인비트로젠(Intvirogen)의 사이프로오렌지(SyproOrange) 형광 리포팅(reporting) 염색제를 5배의 최종 농도로 물에 희석시켰다. 21가지의 상이한 조성물들을 5 mg/ml의 농도의 플라세보(placebo)에 대하여 테스트하였다. 9 μ l의 샘플을 1 μ l의 사이프로오렌지 형광 염색제에 첨가하였으며 이는 4.5 mg/ml의 최종 항-TNF알파 항체 농도를 생성한다. 각각의 조성물을 2회 측정하였다.

[0245] 1.8 제2 비탈 삼투 계수(viral osmotic coefficient) (B_{22})

[0246] 제2 비리알(virial) 삼투 계수, A_2 또는 B_{22} 는 단백질-용매 상호작용뿐만 아니라 단백질-단백질 상호작용의 척도이다. 비리알 계수는 분자들 사이의 전체 인력 또는 반발력을 나타내며, 이는 용매에 의해 매개되는 분자간 포텐셜의 일반 척도를 제공한다. 생명공학 응용에서, 비리알 계수는 원충제에서의 다양한 부형제의 농도, 이온 강도 및 pH의 변화를 평가함으로써 조성물의 안정성, 정제, 및 결정화에 최적의 조건을 결정하는 것을 도울 수 있다. B_{22} 값은 정적 광 산란법을 이용하여 각각의 조성물의 다양한 농도로부터 생성한 데비 플롯(Debye plot)

(K_c/R^0 대 c)의 기울기로부터 계산하며, mol mL g^{-2} 의 단위로 보고된다. 양의 B_{22} 값은 더 큰 반박력을 나타내며 이에 따라 더 적은 응집물 형성을 나타내고, 음의 B_{22} 값은 더 큰 인력을 나타내며 따라서 더 큰 응집 경향을 나타낸다. 따라서, 더 큰 양의 B_{22} 가 유리하다.

[0247] **1.3 스트레스 연구**

[0248] **1.3.1 가속화된 안정성 연구**

[0249] 상이한 가속화된 안정성 연구들을 이 연구에서 적용하였으며, 여기서, 조성물을 상이한 종류의 스트레스에 노출시켰다.

[0250] **기계적 스트레스:** 본 연구에 따른 기계적 스트레스는 예를 들어 200 rpm에서 최대 6시간 동안 교반시키는 것이었다. 이 조건을 각각의 실험에서 그에 맞추어 조정하였다. 이 연구에서, 바이알에서의 교반을 이용하여 샘플에 스트레스를 주었으며, 여기서, 바리오맥 멀티포인트 HP 교반기(Variomag Multipoint HP stirrer)를 이용하였다.

[0251] **짧은 등은 스트레스:** 짧은 등은 안정성 연구에서, 샘플을 적용한 테스트에 따라 40°C에서 7 내지 14일 동안 보관하였다.

[0252] **긴 등은 스트레스:** 긴 등은 안정성 연구에서, 샘플을 적용한 테스트에 따라 40°C에서 1개월, 3개월 또는 6개월 동안 보관하였다.

[0253] **가속화된 열적 스트레스:** 가속화된 안정성 연구에서, 샘플을 50°C 및 55°C에서 최대 1개월 동안 보관하였다. 이러한 조건들을 예를 들어 상이한 조성물들의 최종 선택에 적용하였다.

[0254] **냉동 및 해동:** 이 연구에서, 샘플을 -80°C에서 24시간 동안 냉동시키고, 실온에서 90분 동안 해동시켰다. 이것을 5회의 사이클에 대하여 반복하였다. 제5 사이클을 -80°C에서 72시간 동안 유지하였다.

[0255] **1.3.2 탐험적 안정성 연구**

[0256] 최종 조성물의 최종 선택을 위하여, 더 긴 등은 안정성 연구를 본 발명의 조성물을 이용하여 수행하였다. 따라서, 항-TNF알파 항체를 포함하는 조성물을 상이한 온도 (-80, -20, 5, 25, 및 40°C)에서 6개월까지 보관하였다. 그 후 샘플들을 안정성에 대하여 체크하였다.

[0257] **1.4 조성물의 선택 방법/순위 매김**

[0258] 섹션 1.2 하에 상기에 언급된 상이한 분석 방법들의 호도하는 해석을 피하기 위하여, 순위를 매기는 방법을 각각의 방법의 유의성을 기반으로 하여 확립하였다. 첫 번째 순위 매김을 각각의 안정성 연구에서 각각의 분석 방법으로부터 획득한 결과에 따라 조성물 군 내에서 수행하였다. 그 후, 최종 순위를 모든 분석 방법으로부터 수득한 상이한 순위들의 평균의 계산에 의해 수득한다. 적용한 스트레스에 따라, 각각의 분석 방법의 중요성을 평가하고, 순위 매김 절차에서 고려하였다.

[0259] **1.4.1 물리적 안정성의 순위 매김**

[0260] 물리적 안정성의 전체 순위를 하기에 언급한 모든 방법으로부터의 평균 순위를 기반으로 하여 계산하였다. 방법의 중요성은 적용한 스트레스에 따라 변하였다. 예를 들어 보관 스트레스에 있어서는 SEC 순위가 입자 분석보다 더 중요하게 고려되었으며, 기계적 스트레스와, 냉동 및 해동으로부터 유래된 스트레스에 있어서는 입자 분석이 SEC보다 더 중요하게 고려되었다.

[0261] **크기 배제 크로마토그래피(SEC):** 상이한 조성물들은 모두 안정화 효과를 가지며, 따라서 단지 0.5%의 단량체 함량의 차이가 이 순위 내에서 유의하게 상이한 것으로 간주되었다.

[0262] **동적 광 산란(DLS):** 하기 4가지의 순위 매김 파라미터를 이용하였다: 첫 번째 순위 매김 파라미터는 부피에 의해 분석된 단량체 함량이며 (첫 번째), 두 번째 순위 매김 파라미터는 강도에 의해 분석된 단량체 함량이며 (두 번째), Z-평균은 세 번째 순위 매김 파라미터이며, 네 번째 순위 매김 파라미터는 다분산 지수(polydispersity index; PDI)이다. 순위 매김은 조성물이 첫 번째에서 불합격했을 때 이것을 나머지에서 추가로 고려하지 않으며 두 번째, 세 번째, 네 번째 순위 매김 파라미터의 경우에도 유사한 방식으로 상기에 언급된 순서대로 행한다.

[0263] **광 차폐(LO):** 조성물들은 그 조성 내에서 관찰된 크기 분포에 따라 순위 매김을 하였다. 10 μm 초과인 입자가 6000개 미만, 25 μm 초과인 입자가 600개 미만, 그리고 1 μm 초과인 입자가 10000개 미만인 조성물의 순위 매김

을 하였다. 10 μm 초과인 입자가 6000개 미만, 25 μm 초과인 입자가 600개 미만, 그리고 1 μm 초과인 입자가 100000개 미만인 모든 조성물을 2로 순위 매김하였다. 10 μm 초과인 입자가 6000개 미만, 25 μm 초과인 입자가 600개 미만, 그리고 1 μm 초과인 입자가 100000개 초과인 모든 조성물을 3으로 순위 매김하였다. 1 μm 초과인 입자 계수치와는 상관없이 10 μm 초과 및 25 μm 초과인 입자에 대한 한계치가 파괴된 모든 조성물을 4로 순위 매김하였다.

[0264] **색 및 투명도:** 순위는 단순히 포마진 네펠로법 단위(Formazin Nephelometry unit; FNU)의 단위를 기반으로 하였으며, 유의한 변화는 표준 수의 변화 (예를 들어 < I로부터 < II로)를 초래하는 FNU 변화를 나타낸다.

[0265] **1.4.2 화학적 안정성의 순위 매김**

[0266] **약 양이온 교환 크로마토그래피(WCX):** 산성, 중성 및 염기성 이소형의 백분율의 변화가 순위 매김 파라미터였다. 2 내지 3%의 변화는 유의한 것으로 간주된다.

[0267] **1.4.3 전체 안정성의 순위 매김**

[0268] 전체 안정성 순위는 물리적 및 화학적 안정성 순위 둘 모두의 평균으로부터 생성하며, 여기서, 물리적 및 화학적 안정성 둘 모두를 동일하게 중요하게 고려하였다.

[0269] **2 결과 및 토론**

[0270] **2.1 완충제 스크리닝 (실시예 1)**

[0271] **2.1.1 초기 완충제 스크린**

[0272] 아달리무맙 및 그의 바이오시밀러 (본원에서 항-TNF알파 항체 BS로 칭함)의 안정성을 상이한 완충제들 (10 mM) 및 pH 값들에서 테스트하였다. 분석을 위하여, 시차 주사 미세 열량 측정법(μDSC)을 분석 방법으로 이용하였으며 이는 섹션 1.2.1에서 상기에 설명한 바와 같다. 항-TNF알파 항체 BS 폴딩 해제 곡선은 독립적으로 폴딩 해제 되는 4개의 도메인(Fab, Fc1, Fc2, Fc3)의 존재를 나타냈으며, 가장 큰 엔탈피를 갖는 피크는 Fab 단편이고, 다른 3개는 Fc 단편이다 (데이터는 예시되어 있지 않음). 순위 매김 목적을 위하여, Fc1 단편 피크를 이용하였으며, 그 이유는 이것이 일어나는 첫 번째 폴딩 해제 사건이기 때문이다. 항-TNF알파 항체 BS 및 아달리무맙은 유사한 결과 (유사한 T_m 값들)를 제공하였다. 대부분의 완충제에서 상기 둘 모두의 분자에 있어서 최적 pH 범위는 pH 5.5 내지 6.5로 결정되었다. 표 2는 항-TNF알파 항체 BS에 대하여 수득된 폴딩 해제 온도를 나타낸다.

표 2

상이한 완충제 시스템들 중 항-TNF 알파 항체 BS의 T_M 값

완충제 ¹	pH 값	상이한 도메인들의 폴딩 해제 온도 (T _M)			
		Fab	Fc1	Fc2	Fc3
트리스-시트레이트	5	71.18	64.88	73.13	81.87
트리스-시트레이트	5.5	71.73	71.09	76.24	82.58
트리스-시트레이트	6	71.91	70.25	74.08	83.34
트리스-시트레이트	7	72	71.77	73.48	83.48
트리스	7.1	72.78	72.08	77.46	83.82
포스페이트	6.5	72.76	72.68	76.82	83.59
포스페이트	7	72.59	68.28	75.58	83.26
히스티딘	5.5	71.93			
히스티딘	6	73.03	71.28	76.28	83.3
히스티딘	6.5	73.36	71.57	74.08	83.93
시트레이트	5	70.7	65.55	74.55	81.53
시트레이트	5.5	71.3	70.06	75.83	83.12
아세트레이트	5	72.74	69.27	75.86	83.25
아세트레이트	5.5	72.99	72.4	79.72	84.08
숙시네이트	5	71.94	67.38	74.98	82.72
숙시네이트	5.5	72.3	71.1	76.48	83.25
숙시네이트	6	72.68	71.41	73.59	83.47
시트레이트-포스페이트	5.2	71.59	68.7	75.29	82.24
원래의 것	5.5	71.77	70.24	75.98	82.83
원래의 것	6	72.08	70.45	74.26	83.41
시트레이트-포스페이트 + Exc ²	5.2	71.52	68.8	75.12	82.15

¹10 mM 완충제, ²Exc. = 후미라® 제형의 부형제

[0273]

[0274]

8가지의 최적 완충제 시스템을 선택하고, 기계적 스트레스 연구를 수행하여 최적 완충제 시스템을 선택하였다. 부가적으로, 원래의 완충제 및 원래의 조성물 (시판 제형)을 기준물로서 테스트하였다. 기계적 안정성 연구를 가속화된 안정성 연구로서 선택하여 완충제 및 pH 값이 항-TNF알파 항체의 기계적 안정성을 향상시킬 수 있는지를 모니터링하였으며, 그 이유는 기계적 불안정성이 상기 항체의 주요한 약점인 것으로 결정되었기 때문이었다. 기계적 안정성을 모니터링하기 위하여, 크기 배제 크로마토그래피(SEC), 광 차폐(LO) 및 동적 광 산란(DLS)과 같은 분석 기술을 선택하였다 (섹션 1.2에 설명된 바와 같음). 기계적 스트레스 연구의 결과를 섹션 1.3에서 설명한 순위 시스템을 기반으로 하여 평가하였으며, 이를 표 3에 나타낸다.

표 3

항-TNF 알파 항체 BS 를 위한 상이한 완충 조성물들의 기계적 안정성 연구 후 최종 순위

조성물 ¹	SEC 순위	DLS 순위	HIAC 순위	평균	순위
포스페이트 pH 6.5	6	9	2	5,666667	6
아세테이트 pH 5.5	1	1	3	1,666667	1
히스티딘 pH 6	4	2	3	3	2
트리스 시트레이트 pH 5.5	7	4	6	5,666667	6
트리스 시트레이트 pH 6	8	8	3	6,333333	8
트리스 시트레이트 pH 6.5	9	7	6	7,333333	9
트리스 시트레이트 pH 7	10	10	6	8,666667	10
숙시네이트 pH 6	5	3	6	4,666667	4
시트레이트-포스페이트 pH 5.2	2	6	6	4,666667	4
시트레이트-포스페이트 + Exc. ² pH 5.2	3	5	1	3	2

¹10 mM 완충제 ²Exc. = 후미라® 제형의 부형제

[0275]

[0276]

이 순위에 따르면, pH 5.5의 아세테이트 완충제 및 pH 6의 히스티딘 완충제가 테스트한 항체에 대하여 최적의 기계적 안정성을 나타냈으며, 이를 추가의 안정성 연구용으로 선택하였다. 부가적으로, 안정성 연구에서 조합된 완충제를 갖기 위하여 pH 6의 트리스(tris)-시트레이트 완충제를 선택하였다.

[0277]

2.1.2 DS 안정성 연구

[0278]

선택된 3가지 완충제 (pH 5.5의 아세테이트 완충제, pH 6의 히스티딘 완충제 및 pH 6의 트리스-시트레이트 완충제)를 -80, -20, 5, 25, 및 40°C에서의 짧은 탐험적 안정성 연구에서 추가로 테스트하였다 (섹션 1.3.2 참조). 최종 완충제의 사전 선택을 1개월 후에 하였으며 (데이터는 예시되어 있지 않음) 이를 3개월 후에 확인하였다 (데이터는 예시되어 있지 않음). 상기 연구를 6개월 후에 추가로 분석하였다. 분석을 위한 이러한 연구에 있어서, 분석 방법 SEC, WCX, DLS, UV, 외관, LO, SDS-PAGE 및 ELISA를 이용하였다. 결과를 기반으로 하여, 10 mM 아세테이트 완충제 (pH 5.5)를 항-TNF알파 항체 BS를 위한 최종 완충 조성물로 선택하였다. 백업(back-up)으로서, pH 6의 히스티딘 완충제를 두 번째 선택으로서 선택하였다. pH 6의 트리스-시트레이트 완충제는 선택된 다른 완충제 시스템에 비하여 이득을 나타내지 않았으며, 따라서 이를 표 3에 나타난 기계적 안정성 연구에서 관찰된 항-TNF알파 항체 BS의 낮은 기계적 안정성으로 인하여 배제하였다.

[0279]

2.1.4 계면활성제 스크리닝 (실시예 2)

[0280]

PS 20 및 PS 80 둘 모두를 처음에 아세테이트 완충제 (pH 5.5)에서 3가지 상이한 농도 (0.001% (w/v), 0.01% (w/v) 및 0.1% (w/v))에서 테스트하였다. 계면활성제의 예상되는 주요 효과는 기계적 스트레스에 대하여 항-TNF 알파 항체 BS를 보호하는 것이기 때문에, 단지 교반 실험을 수행하였으며, 이는 섹션 BS 하에 설명된 바와 같다. 샘플들을 하기에 의해 분석하였다: SEC, WCX, 광 차폐, 및 DLS. 표 4에 나타난 결과를 기반으로 하면, 0.01% (w/v) PS 20, 0.1% (w/v) PS 80 및 0.01% (w/v) PS 80이 최적 농도라는 결론을 내릴 수 있다.

표 4

폴리소르베이트의 기계적 안정성의 최종 순위

조성 ¹	SEC 순위	DLS 순위	HIAC 순위	평균	순위
PS 없음	1	1	7	3	6
PS 20 0.001%	1	1	6	2.67	4
PS 20 0.01%	1	1	1	1	1
PS 20 0.1%	1	7	1	3	7
PS 80 0.001%	1	1	5	2.33	5
PS 80 0.01%	1	1	1	1	1
PS 80 0.1%	1	1	1	1	1

¹ 아세테이트 완충제 (pH 5.5) 중

[0281]

[0282] 그러나, 0.1%의 PS 80의 더 높은 농도에서는 더 적은 입자를 갖는 추세가 있다. 따라서, 부형제 조합물의 추가의 테스트를 위하여, 0.01% (w/v)의 PS 20 (0.1 mg/ml) 또는 0.1% (w/v)의 PS 80 (1 mg/ml)을 고려하였다.

[0283] **2.1.5 조성물의 이온 강도 (실시예 3)**

[0284] 조성물의 이온 강도를 상이한 완충제 농도 및 상이한 NaCl 농도의 면에서 테스트하였다. μ DSC 스크리닝을 10 및 100 mM의 완충제 농도 및 2 및 20 mg/ml의 NaCl 농도에 대하여 행하였다. 생성된 폴딩 해제 온도가 표 5에 열거되어 있다.

표 5

상이한 이온 강도들에서의 항-TNF 알파 항체 BS의 폴딩 해제 온도

완충제 (pH 값)	농도 (mM)	NaCl (mg/ml)	상이한 도메인들의 폴딩 해제 온도 (Tm)			
			Fab	Fc1	Fc2	Fc3
아세테이트 (pH 5.5)	10	0	73.44	73.53	82.01	84.61
트리스-시트레이트 (pH 6)	10	0	71.9	69.47	74.28	83.34
히스티딘 (pH 6)	10	0	73.78	71.67	82.91	85.11
아세테이트 (pH 5.5)	100	0	72.34	70.11	74.82	82.53
트리스-시트레이트 (pH 6)	100	0	72.44	71.02	72.25	82.75
히스티딘 (pH 6)	100	0	72.34	68.84	74.87	82.65
아세테이트 (pH 5.5)	10	2	72.61	71.94	76.11	83.17
트리스-시트레이트 (pH 6)	10	2	72.15	71.42	76	83.34
히스티딘 (pH 6)	10	2	72.51	70.35	74.90	82.76
아세테이트 (pH 5.5)	10	20	71.14	67.12	73.79	82.26
트리스-시트레이트 (pH 6)	10	20	71.54	68.29	74.53	82.48
히스티딘 (pH 6)	10	20	71.46	68.28	74.2	82.13

[0285]

[0286] T_m 스크리닝 연구는, 트리스-시트레이트 완충제의 경우를 제외하고는 완충제 농도가 높을수록 폴딩 해제 온도가 낮아짐을 나타낸다. 부가적으로, NaCl의 첨가는 항-TNF알파 항체 BS의 안정성에 유리하지 않으며 이는 수득된 T_m 값으로부터 결론이 내려지는 바와 같다. 더욱이, NaCl의 농도의 증가는 T_m 에 대하여 강한 부정적 영향을 준다. 2.1.2에 설명된 DS 안정성 연구의 1개월 후 데이터에서 상기에 설명한 바와 같이, 아세테이트 완충제를 본 발명에 따른 조성물에 바람직한 완충제로서 선택하였으며, 따라서, 가속화된 안정성 연구를 아세테이트 완충제를 이용하여 수행하였다. 그 후 짧은 등은 안정성 연구 (40°C, 7일) 및 기계적 안정성 (2시간 동안 200 rpm 교반) 연구를 수행하였다. 샘플들을 하기 분석 기술을 이용하여 스트레스 전후에 분석하였다: SEC, WCX, 광 차단, 및 DLS.

[0287] 가속화된 안정성 연구를 위하여, 5 mM의 더 낮은 완충제 농도를 2 mg/ml의 NaCl의 존재 및 부재 하에 10 mM의 완충제 농도와 비교하였다. 표 6은 열적 스트레스 및 기계적 스트레스 후 조성물들의 최종 순위를 나타낸다. 표 6에 나타난 최종 순위는 10 mM의 완충제 농도에 있어서 더 우수한 안정성을 나타내며 0 내지 2 mg/ml의 NaCl 농도에 있어서는 유의한 차이가 전혀 없음을 나타낸다. 따라서, 부형제 조합물 연구에 있어서 완충제 농도를 10 mM로 고정하고, NaCl (2 mg/ml)의 존재 및 부재를 나중에 고려하였다.

표 6

이온 강도 안정성의 일반 순위 (물리적 및 화학적)

조성	조건		물리적	화학적	순위	평균 순위
	시점	스트레스				
아세테이트 완충제 10 mM	T0	/	1	1	1	
	1 주일	40°C	1	1	1	1.22
	1 시간	200 rpm	2.33	1	1.67	
아세테이트 완충제 10 mM 및 2 mg/ml 의 NaCl	T0	/	1.33	1	1.17	
	1 주일	40°C	2	1	1.5	1.22
	1 시간	200 rpm	1	1	1	
아세테이트 완충제 5 mM	T0	/	3.33	1	2.17	
	1 주일	40°C	2.67	1	1.83	1.89
	1 시간	200 rpm	2.33	1	1.67	
아세테이트 완충제 5 mM 및 2 mg/ml 의 NaCl	T0	/	3	1	2	
	1 주일	40°C	3.67	1	2.33	1.78
	1 시간	200 rpm	1	1	1	

[0288]

[0289] **2.1.6 부형제 스크리닝 (실시에 4):**

[0290] 당 및 폴리올:

[0291] 상이한 당 및 폴리올을 μ DSC를 이용하여 항-TNF알파 항체 BS 안정성에 대한 그의 영향에 대하여 아세테이트 완충제 (10 mM, pH 5.5)에서 테스트하였다. 상기 연구의 결과를 표 7에 나타낸다. 트레할로스 및 만니톨은 최고의 폴딩 해제 온도를 나타냈다. 여기서 순위 (및 또한 모든 μ DSC 스크리닝 연구에서)는 Fc1 도메인의 T_m 을 기반으로 하였으며, 그 이유는 이것이 서모그램에서의 첫 번째 폴딩 해제 사건이기 때문이었다. 슈크로스, 소르비톨 및 글리세롤은 최저 T_m 값을 나타냈다.

표 7

상이한 당 및 폴리올을 포함하는 조성물의 폴딩 해제 온도

조성 ¹ (당 또는 폴리올)	농도 (mM)	농도 (mg/ml)	상이한 도메인들의 폴딩 해제 온도 (T _m)			
			Fab	Fc1	Fc2	Fc3
수크로스	146	50	73.65	72.36	74.85	83.95
트레할로스	146	55.24	73.76	73.77	79.52	84.2
만니톨	146	26.6	73.52	73.4	79	83.94
소르비톨	146	26.6	73.54	72.15	74.66	83.75
글리세롤	146	13.35	73.17	72.94	77.15	83.52

¹10 mM 아세테이트 완충제 (pH 5.5) 중

[0292]

[0293]

따라서, 만니톨 및 트레할로스를 가속화된 안정성 연구 (짧은 등은 안정성 연구 (40°C, 7일) 및 기계적 안정성 연구 (2시간 동안 200 rpm 교반))에서 2가지의 상이한 농도에서 아세테이트 완충제 (10 mM, pH 5.5)에서 테스트 하였다. 부가적으로, 소르비톨을 음성 대조구로서 가속화 연구에서 테스트하여 T_m 값을 기반으로 한 선택을 확인 하였다. 가속화된 안정성 연구를 하는 샘플들을 하기 분석 기술을 이용하여 스트레스 전후에 분석하였다: SEC, WCX, 광 차단, 및 DLS. 생성된 최종 순위는 표 8에 나타낸 바와 같이 부형제로서의 만니톨에 있어서 더 우수한 안정성을 나타냈다. 따라서, 상이한 농도의 만니톨을 추가의 연구를 위하여 선택하였다.

표 8

당 및 폴리올의 안정성의 일반 순위 (물리적 및 화학적)

조성 ¹	조건		물리적	화학적	순위	평균 순위
	시점	스트레스				
만니톨 10 mg/ml	T0	/	1	1	1	1.375
	1 주일	40°C	1.75	1	1.375	
	1 시간	200 rpm	2.5	1	1.75	
만니톨 40 mg/ml	T0	/	2	1	1.5	1.708
	1 주일	40°C	3.25	1	2.125	
	1 시간	200 rpm	2	1	1.5	
소르비톨 40 mg/ml	T0	/	1.5	1	1.25	1.875
	1 주일	40°C	3.25	2	2.625	
	1 시간	200 rpm	2.5	1	1.75	
트레할로스 50 mg/ml	T0	/	1	1	1	1.958
	1 주일	40°C	1	3	2	
	1 시간	200 rpm	1.75	4	2.875	
트레할로스 20 mg/ml	T0	/	1.5	1	1.25	2.208
	1 주일	40°C	1.75	3	2.375	
	1 시간	200 rpm	2	4	3	

¹10 mM 아세테이트 완충제 (pH 5.5) 중

[0294]

[0295] **아미노산:**

[0296] 더욱이, 상이한 아미노산들을 μ DSC를 이용하여 10 mM 아세테이트 완충제 (pH 5.5)에서 테스트하였다. 생성된 T_m 이 표 9에 열거되어 있다.

표 9

부형제로서의 상이한 아미노산들에 있어서의 항-TNF 알파 항체 BS의 폴딩 해제 온도

조성 ¹ (아미노산)	농도 (mM)	농도 (mg/ml)	상이한 도메인들의 폴딩 해제 온도 (T_m)			
			Fab	Fc1	Fc2	Fc3
아르기닌	200	42.13	70.48	68.09	74.35	81.89
글리신	200	15	73.41	72.8	78.71	84.17
L-라이신 HCl	200	36.53	71.14	69.46	75.27	82.76
L-아스파라긴	200	10	72.85	72.04	77.48	83.84
글루타민	200	29.23	73.19	72.55	78.7	84.03
아르기닌 / 글루탐산	100/100	17.42 / 14.71	72.18	70.66	76.52	83.55

¹10 mM 아세테이트 완충제 (pH 5.5) 중

[0297]

[0298] T_m 스크리닝 연구는 글리신, L-아스파라긴 및 글루타민이 최고 T_m 을 나타냄을 보여주었다. 반면에, 아르기닌,

L - 라이신 및 아르기닌 / 글루탐산은 최저 T_m 값을 나타냈다. 가속화된 안정성 연구에 있어서 글리신, L - 아스파라긴 및 글루타민을 2가지 상이한 농도에서 테스트하였다. 표 10에 나타낸 최종 순위는 글리신 및 아스파라긴을 사용할 때 더 우수한 안정성을 보여준다.

표 10

아미노산의 안정성의 일반 순위 (물리적 및 화학적)

조성 ¹	조건		물리적	화학적	순위	평균 순위
	시점	스트레스				
글리신 7.5 mg/ml	T0	/	1.25	1	1.125	1.333
	1 주일	40°C	1	2	1.5	
	1 시간	200 rpm	1.75	1	1.375	
글리신 30 mg/ml	T0	/	2.75	1	1.875	2.25
	1 주일	40°C	3.75	2	2.875	
	1 시간	200 rpm	3	1	2	
아스파라긴 2 mg/ml	T0	/	1	1	1	1.958
	1 주일	40°C	1	3	2	
	1 시간	200 rpm	1.75	4	2.875	
아스파라긴 5 mg/ml	T0	/	2.25	1	1.625	2.375
	1 주일	40°C	1	3	2	
	1 시간	200 rpm	3	4	3.5	
글루타민 15 mg/ml	T0	/	3.75	1	2.375	2.958
	1 주일	40°C	4	1	2.5	
	1 시간	200 rpm	4	4	4	
글루타민 29.23 mg/ml	T0	/	3.75	1	2.375	2.75
	1 주일	40°C	4.25	2	3.125	
	1 시간	200 rpm	4.5	1	2.75	

¹10 mM 아세테이트 완충제 (pH 5.5) 중

[0299]

[0300]

2.2 프로토타입(prototype) 조성물의 선택 (실시예 5):

[0301]

2.2.1 실험 설계(design of experiment; DOE)

[0302]

최상의 조건 (완충제, pH 값 및 이온 강도) 및 최상의 안정제의 선택 후, 실험 설계(DOE) 접근법을 이용하여 최종 조성물을 선택하였다. 예측적 고처리량 방법, 예컨대 시차 주사 미세 열량 측정법(μ DSC), 시차 주사 형광 측정법(DSF) 및 제2 비탈 삼투 계수(B_{22}) (섹션 1.2에서 상기에 설명된 바와 같음)를 이용하였다. DOE에 포함된 조성물 및 각각의 예측적 방법의 결과를 표 11에 제시한다.

표 11

DOE 조성물¹ 및 3 가지의 예측적 고처리량 방법의 결과

런(Run)	NaCl (mg/ml)	만니톨 (mg/ml)	글리신 (mg/ml)	PS ²	μDSC Fc1 T _m	DSF T _m	B ₂₂
1	2	10	7.5	80	71.115	69.8	
2	2	10	7.5	20	71.58	64.9	
3	0	20	7.5	20	72.615	67	
4	2	20	15	80	71.48	70.4	
5	0	10	15	80	73.515	71.7	
6	0	0	15	20	73.685	66.8	6.59
7	4	20	0	20	70.475	64	
8	4	0	15	80	70.58	70	
9	4	0	7.5	20	70.54	64.3	
10	2	10	7.5	80	70.875	69.8	3.1
11	2	10	7.5	20	71.14	64.8	
12	4	10	0	80	70.075	69	
13	4	20	15	20	71.17	64.8	2.79
14	0	20	0	80	71.945	70.7	5.83
15	0	0	0	20	71.59	66.2	
16	2	0	0	80	70.37	69.4	
17	0	0	7.5	80	72.705	71	
18	4	20	7.5	80	70.765	69.8	
19	2	10	7.5	80	71.05	69.9	
20	2	10	7.5	20	71.12	64.9	
21	4	0	0	80	70.015	68.8	2.88

¹ 모든 조성은 pH 5.5 의 10 mM 아세트레이트 완충제에서의 것임. ² PS 20 농도는 0.1 mg/ml 이며, PS 80 은 1 mg/ml 임.

[0303]

[0304]

μDSC에 의해 DOE로부터 수득한 결과는 하기를 나타냈다: i) NaCl의 유의한 부정적 영향, ii) 글리신의 유의한 긍정적 영향, iii) 만니톨의 긍정적 영향, iv) PS20과 PS80 사이의 차이는 없음.

[0305]

DSF에 의해 DOE로부터 수득한 결과는 하기를 나타냈다: i) NaCl의 유의한 부정적 영향, ii) 만니톨의 유의한 긍정적 영향, iii) PS 80의 유의한 긍정적 영향, 및 iv) PS20의 유의한 부정적 영향.

[0306]

DOE에 따라 B₂₂에 의해 수득한 결과는 NaCl의 유의한 부정적 영향을 나타냈다.

[0307]

μDSC T_m 및 DSF T_m을 기반으로 하여, 통계적 DOE에 따라, 2가지 조성물을 탐험적 안정성 연구를 위하여 선택하였으며, 이는 표 12에 나타낸 바와 같이 하나는 NaCl을 포함하고 또 다른 것은 글리신만을 포함하는 추가의 2가지 조성물과 함께였다.

표 12

개발된 새로운 4 가지의 프로토타입 조성물의 조성

완충제 (mM)	pH	만니톨 (mg/ml)	PS (mg/ml)	글리신 (mg/ml)	NaCl (mg/ml)
아세트레이트 (10 mM)	5.5	20	80 (1 mg/ml)	15	0
아세트레이트 (10 mM)	5.5	20	20 (0.1 mg/ml)	15	0
아세트레이트 (10 mM)	5.5	20	80 (1 mg/ml)	15	2
아세트레이트 (10 mM)	5.5	0	80 (1 mg/ml)	15	0

[0308]

[0309]

탐험적 안정성 연구를 24개월까지의 것을 위하여 설계하며, 섹션 1.4에 설명된 순위 매김 방법을 이용하여 3개월 데이터를 기반으로 하여 선택을 하였다. 샘플들을 하기 분석 기술을 이용하여 상이한 시점에 분석하였다: SEC, WCX, 광 차단, 탁도 및 DLS. SEC의 3개월 데이터를 표 13에 나타낸다. 최종 조성물을 3개월 데이터를 기반으로 하여 결정하였다.

표 13

탐험적인 4 가지의 항-TNF 알파 항체 BS의 안정성으로부터 생성한 SEC의 미가공 데이터

조성 ¹	보관 온도	결과			순위	평균 순위
		HMW의 %	주 피크의 %	LMW의 %		
만니톨 20 mg/ml, 글리신 15 mg/ml, PS80 0.1% (w/v)	-80°C	0.6	99.3	0.10	1	1.2
	-20°C	2.4	97.5	0.10	2	
	5°C	0.6	99.3	0.10	1	
	25°C	0.8	98.2	0.90	1	
	40°C	2.3	94.2	3.40	1	
만니톨 20 mg/ml, 글리신 15 mg/ml, PS20 0.01% (w/v)	-80°C	0.6	99.3	0.10	1	1.2
	-20°C	2.5	97.4	0.10	2	
	5°C	0.6	99.3	0.10	1	
	25°C	0.9	98.2	0.90	1	
	40°C	2.5	94.2	3.40	1	
만니톨 20 mg/ml, 글리신 15 mg/ml, PS80 0.1% (w/v), NaCl 2 mg/ml	-80°C	0.7	99.3	0.10	1	1
	-20°C	1.5	98.4	0.10	1	
	5°C	0.7	99.2	0.10	1	
	25°C	0.9	98.2	0.90	1	
	40°C	2.6	94.2	3.30	1	
글리신 15 mg/ml, PS20 0,01 %	-80°C	0.7	99.3	0.10	1	2.2
	-20°C	3.4	96.5	0.10	4	
	5°C	0.6	99.3	0.10	1	
	25°C	1	98.1	0.90	1	
	40°C	4.8	91.7	3.50	4	

¹ 모든 조성은 pH 5.5의 10 mM 아세트레이트 완충제에서의 것임

[0310]

[0311] 최종 결정은 사용한 모든 분석 기술 (SEC, WCX, 광 차단, 탁도 및 DLS)로부터 생성된 순위를 기반으로 한다. 3개월 후 2가지의 최상위 조성물을 2가지의 유망한 후보로서 규정하였다 (표 14 참조).

표 14

개발된 새로운 조성물의 3개월 후 안정성의 일반 순위

조성 ¹	보관 온도	물리적	화학적	순위	평균 순위
만니톨 20 mg/ml, 글리신 15 mg/ml 및 PS80 0.1% (w/v)	-80°C	1.20	1	1.1	1.2
	-20°C	1.40	1	1.2	
	5°C	1.20	1	1.1	
	25°C	1.20	1	1.1	
	40°C	1.00	2	1.5	
만니톨 20 mg/ml, 글리신 15 mg/ml 및 PS20 0.01% (w/v)	-80°C	1.20	1	1.1	1.2
	-20°C	1.40	1	1.2	
	5°C	1.20	1	1.1	
	25°C	1.20	1	1.1	
	40°C	1.00	2	1.5	
만니톨 20 mg/ml, 글리신 15 mg/ml, PS80 0.1% (w/v) 및 NaCl 2 mg/ml	-80°C	1.60	1	1.3	1.26
	-20°C	1.80	1	1.4	
	5°C	1.60	1	1.3	
	25°C	1.60	1	1.3	
	40°C	1.00	1	1	
글리신 15 mg/ml 및 PS20 0.01% (w/v)	-80°C	1.20	1	1.1	1.65
	-20°C	3.40	1	2.2	
	5°C	1.00	1	1	
	25°C	2.40	1	1.7	
	40°C	2.50	2	2.25	

¹ 모든 조성은 pH 5.5 의 10 mM 아세트레이트 완충제에서의 것임

[0312]

[0313] 2.2.2 등은 안정성 연구:

[0314] 단기간 가속화 안정성 연구를 수행하여 3개월 데이터를 기반으로 하여 선택된 조성물을 지원하였다 (표 14). 조성물을 55°C, 1주일의 등은 스트레스에 노출시킨 후 수득한 SEC 미가공 데이터를 표 15에 나타내어 순위 매김에 이용한 파라미터들 중 하나를 예시한다. 표 16에 나타낸 이 연구의 최종 순위는 4가지의 조성물 사이의 차이를 더 명확하게 나타내며; 따라서, 20 mg/ml의 만니톨, 20 mg/ml, 글리신 15 mg/ml 및 0.1% (w/v)의 PS80을 갖는 조성물은 테스트한 조건 하에서 최상의 조성물 중 하나이다 (표 16).

표 15

등온 스트레스 전후의 4 가지의 프로토타입 조성물에서의 SEC

조성 ¹	보관 온도 및 시간	결과			순위
		HMW 의 %	주 피크의 %	LMW 의 %	
만니톨 20 mg/ml, 글리신 15 mg/ml, PS80 0.1% (w/v)	T0 55°C, 1 주일	0.30 1.01	99.63 96.00	0.08 0.80	1 1
만니톨 20 mg/ml, 글리신 15 mg/ml, PS20 0.01% (w/v)	T0 55°C, 1 주일	0.29 1.07	99.60 96.27	0.11 0.77	1 1
만니톨 20 mg/ml, 글리신 15 mg/ml, PS80 0.1% (w/v), NaCl 2 mg/ml	T0 55°C, 1 주일	0.34 1.43	99.58 94.64	0.08 0.76	1 4
글리신 15 mg/ml, PS20 0.01% (w/v)	T0 55°C, 1 주일	0.33 1.27	99.61 95.20	0.06 0.75	1 3

¹ 모든 조성은 pH 5.5 의 10 mM 아세테이트 완충제에서의 것임

[0315]

표 16

등온 스트레스 후 일반 순위

조성 ¹	온도/시간	물리적	화학적	평균	전체 순위
만니톨 20 mg/ml, 글리신 15 mg/ml, PS80 0.1% (w/v)	50°C / 1 개월 55°C / 1 주일	1 1	1.33 1	1.165 1	1.0825
만니톨 20 mg/ml, 글리신 15 mg/ml, PS20 0.01% (w/v)	50°C / 1 개월 55°C / 1 주일	2 2	1.33 1	1.665 1.5	1.5825
만니톨 20 mg/ml, 글리신 15 mg/ml, PS80 0.1% (w/v), NaCl 2 mg/ml	50°C / 1 개월 55°C / 1 주일	4 4	1 1	2.5 2.5	2.5
글리신 15 mg/ml, PS20 0.01% (w/v)	50°C / 1 개월 55°C / 1 주일	3 3	1.33 1	2.165 2	2.0825

¹ 모든 조성은 pH 5.5 의 10 mM 아세테이트 완충제에서의 것임

[0316]

[0317] 2.2.3 가속화된 안정성 연구

[0318] 표 16에 나타낸 4가지의 선택된 조성물은 2가지의 대안적인 조성물 (히스티딘 완충제 (7.45 mM, pH 6), 만니톨 12, PS80 0.1% (w/v), NaCl 6.165 mg/ml 및 아세테이트 완충제 (10 mM, pH5.5), 만니톨 12, PS80 0.1% (w/v),

NaCl 6.165 mg/ml)과 함께 추가의 가속화된 안정성 연구를 추가로 하였다. 상기 6가지의 조성물을 기계적 안정성 및 냉동/해동 안정성에 대하여 테스트하고, 샘플을 하기 분석 기술을 이용하여 스트레스 전후에 분석하였다: SEC, 광 차단, 및 DLS. 200 rpm, 3시간의 기계적 스트레스를 적용한 후 수득한 SEC 미가공 데이터를 표 17에 나타내어 순위 매김에 사용한 파라미터들 중 하나를 예시한다.

표 17

기계적 스트레스 (200 rpm, 3 시간) 전후의 6 가지의 조성물의 SEC 의 미가공 데이터

조성	스트레스 조건: 스트레스 및 시간	결과			순위
		LMW 의 %	주 피크의 %	HMW 의 %	
아세테이트 완충제 (10 mM, pH 5.5), 만니톨 20 mg/ml, 글리신 15 mg/ml, PS80 0.1% (w/v)	T0 에서	0.08	99.63	0.30	1
	200 rpm 에서 3 시간 후	0.08	100.49	0.34	1
아세테이트 완충제 (10 mM, pH 5.5), 만니톨 20 mg/ml, 글리신 15 mg/ml, PS20 0.01% (w/v)	T0 에서	0.11	99.60	0.29	1
	200 rpm 에서 3 시간 후	0.10	100.37	0.32	1
아세테이트 완충제 (10 mM, pH 5.5), 만니톨 20 mg/ml, 글리신 15 mg/ml, PS80 0.1% (w/v), NaCl 2 mg/ml	T0 에서	0.08	99.58	0.34	1
	200 rpm 에서 3 시간 후	0.08	100.13	0.35	1
아세테이트 완충제 (10 mM, pH 5.5), 글리신 15 mg/ml, PS20 0.01% (w/v)	T0 에서	0.06	99.61	0.33	1
	200 rpm 에서 3 시간 후	0.07	99.52	0.33	1
히스티딘 완충제 (7.45 mM pH 6), 만니톨 12 mg/ml, PS80 0.1% (w/v), NaCl 6,165 mg/ml	T0 에서	0.08	99.37	0.56	1
	200 rpm 에서 3 시간 후	0.13	99.40	0.57	1
아세테이트 완충제 (10 mM, pH 5.5), 만니톨 12 mg/ml, PS80 0.1% (w/v), NaCl 6,165 mg/ml	T0 에서	0.07	99.38	0.55	1
	200 rpm 에서 3 시간 후	0.08	99.06	0.53	1

[0319]

[0320]

냉동/해동 스트레스의 제5 사이클 후 수득된 SEC의 미가공 데이터를 표 18에 나타내어 순위 매김에 사용한 파라미터들 중 하나를 예시한다.

표 18

냉동/해동 스트레스 전후의 6 가지 조성물의 SEC의 미가공 데이터

조성	스트레스 조건: 스트레스 및 시간	결과			순위
		HMW 의 %	주 피크의 %	LMW 의 %	
아세트레이트 완충제 (10 mM, pH 5.5), 만니톨 20 mg/ml, 글리신 15 mg/ml, PS80 0.1% (w/v)	T0 에서	0.30	99.63	0.08	1
	제 5 사이클	0.32	100.96	0.09	1
아세트레이트 완충제 (10 mM, pH 5.5), 만니톨 20 mg/ml, 글리신 15 mg/ml, PS20 0.01% (w/v)	T0 에서	0.29	99.60	0.11	1
	제 5 사이클	0.35	101.68	0.10	1
아세트레이트 완충제 (10 mM, pH 5.5), 만니톨 20 mg/ml, 글리신 15 mg/ml, PS80 0.1% (w/v), NaCl 2 mg/ml	T0 에서	0.34	99.58	0.08	1
	제 5 사이클	0.38	100.95	0.09	1
아세트레이트 완충제 (10 mM, pH 5.5), 글리신 15 mg/ml, PS20 0.01% (w/v)	T0 에서	0.33	99.61	0.06	1
	제 5 사이클	0.43	100.16	0.08	1
히스티딘 완충제 (7.45 mM pH 6), 만니톨 12 mg/ml, PS80 0.1% (w/v), NaCl 6.165 mg/ml	T0 에서	0.56	99.37	0.08	1
	제 5 사이클	0.60	100.03	0.09	1
아세트레이트 완충제 (10 mM, pH 5.5), 만니톨 12 mg/ml, PS80 0.1% (w/v), NaCl 6.165 mg/ml	T0 에서	0.55	99.38	0.07	1
	제 5 사이클	0.55	100.03	0.07	1

[0321]

[0322] 기계적 안정성 및 냉동/해동 안정성 연구에 따라 수득한 최종 순위를 표 19 및 표 20에 나타낸다.

표 19

기계적 스트레스 후 일반 순위

조성	스트레스	방법			평균	순위	전체 순위
		SEC 순위	DLS 순위	HIAC 순위			
아세트레이트 완충제 (10 mM, pH 5.5), 만니톨 20 mg/ml, 글리신 15 mg/ml, PS80 0.1% (w/v)	100 rpm	1.00	3	1	1.67	2	1.5
	200 rpm	1.00	2.333333	1	1.44	1	
아세트레이트 완충제 (10 mM, pH 5.5), 만니톨 20 mg/ml, 글리신 15 mg/ml, PS20 0.01% (w/v)	100 rpm	1.00	4.66667	1	2.222222	5	4.5
	200 rpm	1.00	3.333333	1.5	1.944444	4	
아세트레이트 완충제 (10 mM, pH 5.5), 만니톨 20 mg/ml, 글리신 15 mg/ml, PS80 0.1% (w/v), NaCl 2 mg/ml	100 rpm	1.00	3	1	1.666667	2	2.5
	200 rpm	1.00	3	1.5	1.833333	3	
아세트레이트 완충제 (10 mM, pH 5.5), 글리신 15 mg/ml, PS20 0.01% (w/v)	100 rpm	1.00	3	1.5	1.833333	4	3
	200 rpm	1.00	2.333333	1.5	1.611111	2	
히스티딘 완충제 (7.45 mM pH 6), 만니톨 12, PS80 0,1% (w/v), NaCl 6.165 mg/ml	100 rpm	4.33	1.66667	2	2.666556	6	6
	200 rpm	2.67	1.66667	2	2.111222	6	
아세트레이트 완충제 (10 mM, pH5.5), 만니톨 12, PS80 0,1% (w/v), NaCl 6.165 mg/ml	100 rpm	1.00	1.66667	1.5	1.388889	1	2.5
	200 rpm	1.00	3.333333	1.5	1.944444	4	

[0323]

[0324] 기계적 안정성은 모든 다른 조성물에 비하여 아세트레이트 완충제 (10 mM, pH 5.5), 만니톨 20 mg/ml, 글리신 15 mg/ml, PS80 0.1% (w/v)를 포함하는 조성물의 경우가 유의한 더 우수한 안정성을 나타냈다.

표 20

냉동/해동 스트레스 후 일반 순위							
조성	스트레스	방법			평균	전체 순위	
		SEC 순위	DLS 순위	HIAC 순위			
아세트레이트 완충제 (10 mM, pH 5.5), 만니톨 20 mg/ml, 글리신 15 mg/ml, PS80 0.1% (w/v)	5 회의 사이클 F/T	1.00	1.25	1	1.08	2	
아세트레이트 완충제 (10 mM, pH 5.5), 만니톨 20 mg/ml, 글리신 15 mg/ml, PS20 0.01% (w/v)	5 회의 사이클 F/T	1.00	1	1	1.00	1	
아세트레이트 완충제 (10 mM, pH 5.5), 만니톨 20 mg/ml, 글리신 15 mg/ml, PS80 0.1% (w/v), NaCl 2 mg/ml	5 회의 사이클 F/T	1.00	4	1	2.00	4	
아세트레이트 완충제 (10 mM, pH 5.5), 글리신 15 mg/ml, PS20 0.01% (w/v)	5 회의 사이클 F/T	1.00	1.75	1	1.25	3	
히스티딘 완충제 (7.45 mM pH 6), 만니톨 12 mg/ml, PS80 0.1% (w/v) NaCl 6,165 mg/ml	5 회의 사이클 F/T	1.00	5	1.5	2.50	6	
아세트레이트 완충제 (10 mM, pH5.5), 만니톨 12 mg/ml, PS80 0.1% (w/v), NaCl 6,165 mg/ml	5 회의 사이클 F/T	1.00	5	1	2.33	5	

[0325]

[0326]

-80℃에서의 냉동/해동 연구는 아세트레이트 완충제 (10 mM, pH 5.5), 만니톨 20 mg/ml, 글리신 15 mg/ml, PS20 0.01% (w/v), 이어서 아세트레이트 완충제 (10 mM, pH 5.5), 만니톨 20 mg/ml, 글리신 15 mg/ml, PS80 0.1% (w/v)의 조성에 있어서 더 우수한 안정성을 나타냈다. 그러나, 냉동/해동 안정성 연구에 대하여 수득된 차이는 수득된 미가공 데이터 (예시되어 있지 않음)를 고려하면 유의하지 않다.

[0327]

최종 결정에 도달하기 위하여, 6가지의 조성물을 3개월 후에 추가로 비교하였다. 여기서 최종적인 전체 안정성 순위를 표 21에 제시한다.

표 21

상이한 온도들에서의 3 개월의 보관 후 조성물의 최종 순위

조성	보관 온도	물리적	화학적	순위	평균 순위
아세트레이트 완충제 (10 mM pH 5.5), 만니톨 20 mg/ml, 글리신 15 mg/ml, PS80 0.1% (w/v)	-80°C	1.75	1	1.375	1.67
	-20°C	2.75	1	1.875	
	5°C	1.75	1	1.375	
	25°C	1.75	1	1.375	
	40°C	1.67	3	2.3	
아세트레이트 완충제 (10 mM, pH 5.5), 만니톨 20 mg/ml, 글리신 15 mg/ml, PS20 0.01% (w/v)	-80°C	1.75	1	1.375	1.67
	-20°C	2.75	1	1.875	
	5°C	1.75	1	1.375	
	25°C	1.75	1	1.375	
	40°C	1.67	3	2.3	
아세트레이트 완충제 (10 mM, pH 5.5), 만니톨 20 mg/ml, 글리신 15 mg/ml, PS80 0.1% (w/v), NaCl 2 mg/ml	-80°C	1.75	1	1.375	1.67
	-20°C	2.75	1	1.875	
	5°C	1.75	1	1.375	
	25°C	1.75	1	1.375	
	40°C	1.67	3	2.3	
아세트레이트 완충제 (10 mM, pH 5.5), 글리신 15 mg/ml, PS20 0.01% (w/v)	-80°C	1.75	1	1.375	2.25
	-20°C	5.25	1	3.125	
	5°C	1.75	1	1.375	
	25°C	1.75	1	1.375	
	40°C	5	3	4	
아세트레이트 완충제 (10 mM, pH 5.5), 만니톨 12 mg/ml, PS80 0.1% (w/v), NaCl 6.165 mg/ml	-80°C	2	1	1.5	1.825
	-20°C	2.25	1	1.625	
	5°C	2	1	1.5	
	25°C	4	1	2.5	
	40°C	3	1	2	
히스티딘 완충제 (7.45 mM pH 6), 만니톨 12 mg/ml, PS80 0.1% (w/v) NaCl 6.165 mg/ml	-80°C	2	1	1.5	1.8
	-20°C	2	1	1.5	
	5°C	2	1	1.5	
	25°C	4	1	2.5	
	40°C	3	1	2	

[0328]

[0329] 따라서, 표 22에 정의된 하나의 최종 조성물 (FC)을 시판 제형을 이용한 추가의 비교 연구를 위하여 선택하였다.

표 22

3 상에 있어서의 항-TNF 알파 항체 BS 조성물의 조성

성분	조성 mg/ml	기능	표준에 대한 언급
항-TNF 알파 항체 BS	50.000	활성 물질	사내
아세트산나트륨 3 수화물	1.170	완충제	USP
아세트산 ¹	0.080	완충제	USP
만니톨	20.000	등장화제(Tonicity agent)	
글리신	15.000	완충제	USP
폴리소르베이트 80	1.000	계면활성제, 단백질 안정제	NF
주사용수 ²	1 mL 이 되게 하는 양	희석제	USP

¹아세트산을 모든 부형제의 첨가 후 (필요할 경우) pH 조정에 사용하였음

²유럽 약전에 따라 증류에 의해 제조한 주사용수를 USP 에 따라 일상적으로 테스트함

[0330]

[0331]

3 III상을 위한 항-TNF알파 항체 BS 조성물과 원래의 조성물 (OC)의 비교 (실시예 6)

[0332]

3.1 가속화된 등은 안정성 연구

[0333]

표 22에 정의된 최종 조성물 (FC) 및 원래의 조성물 (OC)에 1주일 동안 55℃를 가하였다. 1.3에서 설명한 가속화된 등은 안정성 연구로부터 수득된 최종 조성물의 데이터를 원래의 조성으로 제조한 원래의 조성물에서 수행한 유사 연구와의 비교에 이용하였다. 이 경우, 단지 SEC 및 WCX 데이터가 비교에 이용가능하였다. 이 비교 분석의 결과를 표 23에 제시한다.

표 23

1 주일 동안의 55℃에서의 안정성에 관한 선택된 조성물과 시판 조성물 사이의 비교

조성물	시점	SEC		
		LMW 의 %	단량체의 %	HMW 의 %
FC	T0	0.08	99.63	0.30
	1 주일	0.81	98.15	1.03
OC	T0	0.10	99.30	0.60
	1 주일	4.40	88.30	7.40

조성물	시점	WCX		
		LMW 의 %	단량체의 %	HMW 의 %
FC	T0	17	65	18
	1 주일	48	34	17
OC	T0	16	63	21
	1 주일	46	29	25

[0334]

[0335]

결과는 시판 조성물 (OC)과 비교하여 선택된 최종 조성물 (FC)의 경우가 유의한 더 우수한 안정성을 나타낸다.

[0336]

더욱이, 표 23 및 표 15에 나타낸 데이터의 비교는 표 1에 보고된 바와 같은 분석된 본 발명의 다른 조성물이

시판 제형과 비교하여 항체 항-TNF알파와 항체 BS에 향상된 안정성을 또한 제공하였음을 나타낸다. 따라서, 모든 6가지의 조성물은 시판 제형과 비교하여 열안정성을 증가시킬 수 있으며, 그 이유는 모든 6가지의 조성물에 있어서 활성 단량체의 양이 전체 피크 면적과 비교하여 94% 초과인 반면 시장 제형은 단지 약 88%의 양의 단량체를 함유하기 때문이다.

[0337] **3.2 기계적 안정성**

[0338] 이 연구에서, 최종 조성물 (FC)의 기계적 안정성을 항-TNF 알파와 항체 BS를 이용하여 시판 조성물 (OC)의 기계적 안정성과 비교하였으며, 여기서, 최종 조성물을 200 rpm에서 3시간 동안, 그리고 시판 조성물을 2시간 동안 200 rpm 교반에서 교반하였다. 평가를 위하여, SEC, DLS 및 광 차단 (HIAC)을 이용하였다 (표 24).

[0339] 용해성 응집물과 관련하여 차이는 보이지 않았다. 차이는 주로, 현미경을 사용하지 않으면 안 보이는 입자의 형성과, 더 작은 응집물 (광 차단 및 동적 광 산란(DLS) 둘 모두에 의해 보이는 바와 같음)에서 있었다. 시판 조성물 (OC)보다 최종 조성물 (FC)에 더 많은 스트레스를 주었지만 (3시간 대 2시간), 이것은 특히 입자 형성과 관련하여 더 높은 기계적 안정성을 나타냈다.

표 24

기계적 안정성에 관한 선택된 조성물 (FC)과 시판 조성물 (OC) 사이의 비교

조성물	시점	광 차단 (HIAC)			
		> 1 μm	> 10 μm	> 25 μm	
FC	T0	280	18	3	
	3 시간	5575	75	5	
OC	T0	1846	62	2	
	2 시간	54868	113	3	
DLS					
		단량체의 % (부피 기준)	단량체의 % (강도 기준)	Z-평균	PDI
FC	T0	100	100	1.72	0.07
	3 시간	100	36.5	8.74	0.89
OC	T0	100	100	13.28	0.06
	2 시간	98.7	48.1	51.80	0.54

[0340]

[0341] **4. 결론**

[0342] 본 발명자는 항체 안정성을 향상시키는 조성물을 개발하기 위하여 예시적 분자로서 항-TNF알파와 항체 BS를 사용하였다. 본 발명자는 처음에 기계적 스트레스에 대하여 항체를 안정화시키기를 원하였지만, 상이한 스크리닝 방법들을 이용하고 상이한 완충제들, 부형제들, 예컨대 폴리올, 당, 아미노산, 상이한 세제들 및 염의 존재를 비교함으로써, 본 발명자는 기계적 스트레스에 대하여 항체를 보호할뿐만 아니라 열적 스트레스에 대한 안정성도 증가시키는 조성물의 개발을 성취하였다.

[0343] 따라서, 항-TNF알파와 항체 BS를 기반으로 하여, 본 발명자는 기준 시판 제형과 비교하여 이 항체의 열안정성뿐만 아니라 기계적 안정성도 향상시키는 조성물의 개발을 성취하였다. 상이한 조성물들은 많은 상이한 스트레스 조건들 (예를 들어, 높은 온도 및 전단률)에서 매우 우수한 결과를 나타냈으며 이는 요망되는 보관 온도 (2 내지 8℃)에 매우 적합하다. 개발된 조성물은 다른 항체의 안정성도 향상시키며, 그 이유는 테스트한 항체 항-TNF알파와 항체 BS가 IgG 항체이고 따라서 다른 IgG 항체의 아미노산 조성물과 높은 유사성을 공유하기 때문이다.

[0344] 더욱이, 개발된 조성물들 전부는 시판되는 조성물과 비교하여 항-TNF알파와 항체 BS의 열안정성뿐만 아니라 기계적 안정성도 향상시킨다. 본 조성물은 55℃에서 1주일 후 기능성 단량체 형태의 항체를 94%보다 많이 함유하며, 최종 선택된 조성물은 심지어 98.15%를 함유하고, 반면에 원래의 조성물은 단지 88.30%의 기능성 단량체를 함유한다. 기능성 단량체의 10% 증가는 그의 생산 면에서 고가인 분자에 있어서 상당한 이득이다.

[0345] 5. 본 발명의 조성물의 형태의 항-CXCR5 항체의 안정성의 연구 (실시예 7)

[0346] 하기 표 25에 규정된 바와 같은 항-CXCR5 항체 함유 조성물에 1 내지 6개월 동안 5°C 또는 40°C를 인가하였다.

표 25

안정성 테스트에 사용한 항-CXCR5 항체의 조성물

성분	조성 mg/ml	기능	표준에 대한 언급
항-CXCR5 항체 SAR113244	41.000	활성 물질	사내
아세트산나트륨 3 수화물	1.170	완충제	USP
아세트산 ¹	0.080	완충제	USP
만니톨	20.000	등장화제	
글리신	15.000	완충제	USP
폴리소르베이트 80	1.000	계면활성제, 단백질 안정제	NF
주사용수 ²	1 mL 이 되게 하는 양	희석제	USP

¹아세트산을 모든 부형제의 첨가 후 (필요할 경우) pH 조절에 사용하였음

²유럽 약전에 따라 증류에 의해 제조한 주사용수를 USP 에 따라 일상적으로 테스트함

[0347]

[0348] 상기 연구에서, 조성물을 40°C에서 1개월, 3개월 및 6개월 동안 보관하고 이것을 상기 기간 동안 5°C에서 보관한 상기 조성물과 비교함으로써 조성물의 긴 등은 안정성을 분석하였다. 평가를 위하여, DLS (표 26) 및 광 차단 (HIAC, 표 27)을 이용하였다.

[0349] 결과는 항-CXCR5 항체가 심지어 가속화된 조건 하에서도 본 발명의 제형에 의해 장시간에 걸쳐 안정함을 명백하게 보여준다.

표 26

DLS 에 의해 측정된 항-CXCR5 항체 조성물의 단백질 응집의 측정

시점	보관 온도	DLS			
		단량체의 % (부피 기준)	단량체의 % (강도 기준)	Z-평균	PDI
T0	-	100	100	5.03	0.076
3 개월	+ 5°C	100	100	4.978	0.053
3 개월	+ 40°C	100	100	6.41	0.113

[0350]

표 27

광 차단에 의해 측정된 항-CXCR5 항체 조성물의 현미경을 사용하지 않으면 안 보이는 입자

시점	광 차단 (HIAC)				
	T0	1 개월		6 개월	
온도	-	+ 5°C	+ 40°C	+ 5°C	+ 40°C
1.5 μm	530	120	197	780	200
2.0 μm	328	62	128	307	118
5.0 μm	95	18	38	73	40
10.0 μm	20	5	13	20	18
15.0 μm	7	2	5	10	8
25.0 μm	0	0	0	3	5

[0351]

[0352]

따라서 이러한 결과는 본 발명의 제형이 단클론 항체의 안정성의 증가를 가능하게 함을 확인해 준다.

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Sanofi

<120> STABLE LIQUID FORMULATION FOR MONOCLONAL ANTIBODIES

<130> FR2015/003-PCT

<150> EP15305218.8

<151> 2015-02-13

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> heavy chain sequence of the anti-TNFAlpha antibody

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr

20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Lys
 450
 <210> 2
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> light chain sequence of the anti-TNFAlpha antibody
 <400> 2
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210