



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2017-0087538  
(43) 공개일자 2017년07월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 9/00 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01) A61K 47/18 (2017.01)  
A61K 47/22 (2017.01) A61K 47/26 (2017.01)  
A61K 9/08 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
A61K 9/0019 (2013.01)  
A61K 39/395 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7020365(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2010년12월20일  
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2012-7015931  
원출원일자(국제) 2010년12월20일  
심사청구일자 2015년12월18일
- (85) 번역문제출일자 2017년07월20일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2010/061347
- (87) 국제공개번호 WO 2011/084750  
국제공개일자 2011년07월14일
- (30) 우선권주장  
61/288,535 2009년12월21일 미국(US)

- (71) 출원인  
제넨테크, 인크.  
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우  
쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
- (72) 발명자  
고카른, 야틴, 알.  
미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔  
에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내  
캐머젤, 티모씨, 제이.  
미국 66213 캔사스 오버랜드 파크 웨스트 128번  
플레이스 13117  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
양영준, 이귀동

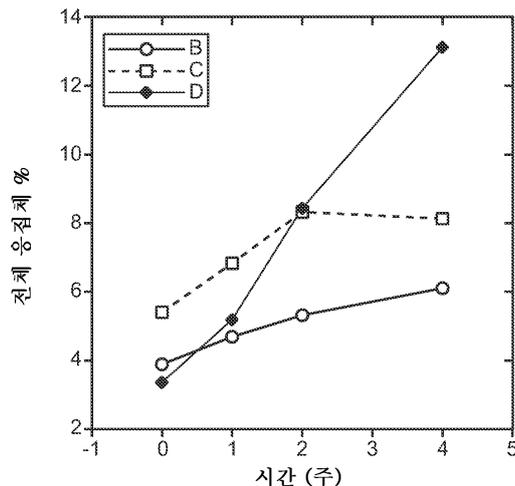
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 **항체 제제**

**(57) 요약**

본 발명은 치료 유효량의 항체 (임의로, 사전 동결건조되지 않음), 약 4.0 내지 약 6.0의 범위에서 pH를 유지하는 완충제, 및 임의의 계면활성제를 포함하는 안정한 수성 제약 제제, 이러한 제제의 제조 방법, 및 이러한 제제의 사용 방법을 제공한다.

**대표도** - 도1



(52) CPC특허분류

*A61K 39/39591* (2013.01)

*A61K 47/183* (2013.01)

*A61K 47/22* (2013.01)

*A61K 47/26* (2013.01)

*A61K 9/08* (2013.01)

*A61K 2039/505* (2013.01)

(72) 발명자

**리, 메간**

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔  
에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내

**크롬웰, 메리**

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔  
에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내

**리우, 홍**

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔  
에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

항체 제제.

**발명의 설명**

**기술분야**

[0001]

<관련 출원>

[0002]

본 출원은 그 전체 개시내용이 모든 목적을 위해 본원에 참고로 도입된, 2009년 12월 21일에 출원된 미국 특허가출원 번호 61/288,535를 우선권 주장한다.

[0003]

<발명의 분야>

[0004]

본 발명은 항체를 포함하는 안정한 수성 제약 제제에 관한 것이다.

**배경기술**

[0005]

지난 수년간, 생명공학의 진보는 재조합 DNA 기술을 이용하여 제약 용도를 위한 다양한 단백질을 생성하는 것을 가능하게 하였다. 단백질은 종래의 유기 및 무기 약물보다 더 크고 보다 복잡하기 때문에 (예를 들어, 복잡한 3차원 구조 뿐만 아니라 다수의 관능기를 가짐), 이러한 단백질의 제제에는 특수한 문제들이 있다. 단백질의 생물학적 활성을 유지하기 위해, 제제는 적어도 단백질의 아미노산의 핵심 서열의 무손상의 형태적 완전성을 보존해야 하며, 동시에 단백질의 여러 관능기를 분해로부터 보호해야 한다. 단백질에 대한 분해 경로는 화학적 불안정성 (예를 들어, 새로운 화학 물질을 생성하는, 결합 형성 또는 절단에 의한 단백질의 변형을 포함하는 임의의 과정) 또는 물리적 불안정성 (예를 들어, 단백질의 보다 고차원적인 구조에서의 변화)을 수반할 수 있다. 화학적 불안정성은 탈아미드화, 라세미화, 가수분해, 산화, 베타 제거 또는 디설피드 교환으로부터 초래될 수 있다. 물리적 불안정성은, 예를 들어 변성, 응집, 침전 또는 흡착으로부터 초래될 수 있다. 3가지의 가장 통상적인 단백질 분해 경로는 단백질 응집, 탈아미드화 및 산화이다. 문헌 [Cleland et al. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 10(4): 307-377 (1993)].

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0006]

제약 용도를 위해 사용되는 단백질에는 항체가 포함된다. 치료를 위해 유용한 항체의 예는 항-VEGF에 결합하는 항체이다. 당업계에는 치료 용도에 적합한, 항체 (예컨대, 항-VEGF 항체)를 포함하는 안정한 수성 제약 제제에 대한 요구가 존재한다.

**과제의 해결 수단**

[0007]

<개요>

[0008]

본 발명은 치료 유효량의 항체 (임의로, 사전 동결건조되지 않음), 약 4.0 내지 약 6.0의 범위의 pH를 유지하는 완충제, 및 임의의 계면활성제를 포함하는 안정한 수성 제약 제제, 제제의 제조 방법 및 제제의 사용 방법을 제공한다.

[0009]

본 발명의 한 실시양태는 pH 4.0 내지 6.0의 아르기닌 완충제 중에 치료 유효량의 항체를 포함하는 안정한 수성 제약 제제를 제공한다. 일부 실시양태에서, 완충제는 pH 4.5 내지 5.5의 아르기닌 아세테이트 완충제이다. 일부 실시양태에서, 완충제는 pH 4.8 내지 5.4의 아르기닌 아세테이트 완충제이다. 일부 실시양태에서, 완충제는 pH 5.2의 아르기닌 아세테이트 완충제이다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 25 mM 내지 약 250 mM이다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 50 mM 내지 약 250 mM

이다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 75 mM 내지 약 250 mM이다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 100 mM 내지 약 250 mM이다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 120 mM 내지 약 240 mM이다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 150 mM 내지 약 225 mM이다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 200 mM이다. 일부 실시양태에서, 제제는 계면활성제를 더 포함한다. 일부 실시양태에서, 계면활성제는 폴리소르베이트이다. 일부 실시양태에서, 폴리소르베이트는 폴리소르베이트 20이다. 일부 실시양태에서, 계면활성제 농도는 0.0001% 내지 약 1.0%이다. 일부 실시양태에서, 계면활성제 농도는 약 0.01% 내지 약 0.05%이다. 일부 실시양태에서, 계면활성제 농도는 0.04%이다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 10 mg/ml 내지 약 250 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 25 mg/ml 내지 200 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 30 mg/ml 내지 175 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 50 mg/ml 내지 약 150 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 75 mg/ml 내지 약 125 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 25 mg/ml 내지 약 100 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체는 사전 동결건조되지 않는다. 일부 실시양태에서, 항체는 VEGF에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 전장 항체이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 IgG1 항체이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 인간화 항체이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 항원-결합 영역을 포함하는 항체 단편이다. 일부 실시양태에서, 항체 단편은 Fab 또는 F(ab')<sub>2</sub> 단편이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 VEGF에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 베바시주맙이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 응집되기 쉽다. 일부 실시양태에서, 완충제는 pH 5.2의 200 mM 아르기닌 아세테이트이고, 계면활성제는 약 0.01-0.1% v/v의 양의 폴리소르베이트이고, 제제는 약 40°C의 온도에서 적어도 28일 동안 안정하다. 일부 실시양태에서, 제제는 멸균된다. 일부 실시양태에서, 제제는 약 40°C에서 적어도 28일 동안 저장시에 안정하다. 일부 실시양태에서, 제제는 수성이고, 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 제제는 정맥내 (IV), 피하 (SQ) 또는 근육내 (IM) 투여를 위한 것이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IV 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 10 mg/ml 내지 약 250 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IV 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 25 mg/ml 내지 약 175 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IV 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 50 mg/ml 내지 약 150 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IV 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 75 mg/ml 내지 약 125 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 SQ 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 10 mg/ml 내지 약 250 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 SQ 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 25 mg/ml 내지 약 175 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 SQ 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 50 mg/ml 내지 약 150 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 SQ 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 75 mg/ml 내지 약 125 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IM 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 10 mg/ml 내지 약 250 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IM 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 25 mg/ml 내지 약 175 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 SQ 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 50 mg/ml 내지 약 150 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IM 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 75 mg/ml 내지 약 125 mg/ml이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 실시양태는 치료 유효량의 항체, 약 pH 4.5 내지 약 6.0의 아르기닌 아세테이트 완충제, 및 계면활성제를 포함하는 안정한 수성 제약 제제를 수용하는 용기를 포함하는 제조품을 제공한다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 10 mg/ml 내지 약 250 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 25 mg/ml 내지 200 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 30 mg/ml 내지 175 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 50 mg/ml 내지 약 150 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 75 mg/ml 내지 약 125 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 25 mg/ml 내지 약 100 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체는 사전 동결건조되지 않는다. 일부 실시양태에서, 항체는 VEGF에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 전장 항체이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 IgG1 항체이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 인간화 항체이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 항원-결합 영역을 포함하는 항체 단편이다. 일부 실시양태에서, 항체 단편은 Fab 또는 F(ab')<sub>2</sub> 단편이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 VEGF에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 베바시주맙이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 응집되기 쉽다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 25 mM 내지 약 250 mM이다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 50 mM 내지 약 250 mM이다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 75 mM 내지 약 250 mM이다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 100 mM 내지 약 250 mM이다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 120 mM 내지 약 240 mM이다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 150 mM 내지 약 225 mM이다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는

약 200 mM이다. 일부 실시양태에서, 아르기닌 아세테이트 완충제는 약 4.5 내지 약 5.5의 pH를 갖는다. 일부 실시양태에서, 아르기닌 아세테이트 완충제는 약 4.8 내지 약 5.4의 pH를 갖는다. 일부 실시양태에서, 아르기닌 아세테이트 완충제는 약 5.2의 pH를 갖는다. 일부 실시양태에서, 계면활성제는 폴리소르베이트이다. 일부 실시양태에서, 폴리소르베이트는 폴리소르베이트 20이다. 일부 실시양태에서, 계면활성제 농도는 0.0001% 내지 약 1.0%이다. 일부 실시양태에서, 계면활성제 농도는 약 0.01% 내지 약 0.05%이다. 일부 실시양태에서, 계면활성제 농도는 0.04%이다. 일부 실시양태에서, 제제는 멸균된다. 일부 실시양태에서, 제제는 약 40°C에서 적어도 28일 동안 저장시에 안정하다. 일부 실시양태에서, 제제는 수성이고, 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 제제는 정맥내 (IV), 피하 (SQ) 또는 근육내 (IM) 투여를 위한 것이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IV 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 10 mg/ml 내지 약 250 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IV 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 25 mg/ml 내지 약 175 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IV 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 50 mg/ml 내지 약 150 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IV 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 75 mg/ml 내지 약 125 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 SQ 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 10 mg/ml 내지 약 250 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 SQ 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 25 mg/ml 내지 약 175 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 SQ 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 50 mg/ml 내지 약 150 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 SQ 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 75 mg/ml 내지 약 125 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IM 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 10 mg/ml 내지 약 250 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IM 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 25 mg/ml 내지 약 175 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 SQ 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 50 mg/ml 내지 약 150 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IM 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 75 mg/ml 내지 약 125 mg/ml이다.

[0011]

본 발명의 추가의 실시양태는 치료 유효량의 항체, 약 pH 4.5 내지 약 6.0의 아르기닌 아세테이트 완충제, 및 계면활성제를 조합함으로써 수성 제약 제제 중에서 항체를 안정화시키는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 10 mg/ml 내지 약 250 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 25 mg/ml 내지 200 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 30 mg/ml 내지 175 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 50 mg/ml 내지 약 150 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 75 mg/ml 내지 약 125 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 25 mg/ml 내지 약 100 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체는 사전 동결건조되지 않는다. 일부 실시양태에서, 항체는 VEGF에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 전장 항체이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 IgG1 항체이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 인간화 항체이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 항원-결합 영역을 포함하는 항체 단편이다. 일부 실시양태에서, 항체 단편은 Fab 또는 F(ab')<sub>2</sub> 단편이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 VEGF에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 베바시주맙이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 응집되기 쉽다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 25 mM 내지 약 250 mM이다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 50 mM 내지 약 250 mM이다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 75 mM 내지 약 250 mM이다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 100 mM 내지 약 250 mM이다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 120 mM 내지 약 240 mM이다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 150 mM 내지 약 225 mM이다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 200 mM이다. 일부 실시양태에서, 아르기닌 아세테이트 완충제는 약 4.5 내지 약 5.5의 pH를 갖는다. 일부 실시양태에서, 아르기닌 아세테이트 완충제는 약 4.8 내지 약 5.4의 pH를 갖는다. 일부 실시양태에서, 아르기닌 아세테이트 완충제는 약 5.2의 pH를 갖는다. 일부 실시양태에서, 계면활성제는 폴리소르베이트이다. 일부 실시양태에서, 폴리소르베이트는 폴리소르베이트 20이다. 일부 실시양태에서, 계면활성제 농도는 0.0001% 내지 약 1.0%이다. 일부 실시양태에서, 계면활성제 농도는 약 0.01% 내지 약 0.05%이다. 일부 실시양태에서, 계면활성제 농도는 0.04%이다. 일부 실시양태에서, 제제는 멸균된다. 일부 실시양태에서, 제제는 약 40°C에서 적어도 28일 동안 저장시에 안정하다. 일부 실시양태에서, 제제는 수성이고, 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 제제는 정맥내 (IV), 피하 (SQ) 또는 근육내 (IM) 투여를 위한 것이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IV 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 10 mg/ml 내지 약 250 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IV 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 25 mg/ml 내지 약 175 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IV 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 50 mg/ml 내지 약 150 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IV 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 75 mg/ml 내지 약 125 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 SQ 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 10 mg/ml 내지 약 250 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 SQ 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 25 mg/ml 내지 약 175 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 SQ 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 50 mg/ml 내지 약 150 mg/ml이다.

ml 내지 약 150 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 SQ 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 75 mg/ml 내지 약 125 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IM 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 10 mg/ml 내지 약 250 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IM 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 25 mg/ml 내지 약 175 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 SQ 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 50 mg/ml 내지 약 150 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IM 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 75 mg/ml 내지 약 125 mg/ml이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 실시양태는 치료 유효량의 항체, pH 5.2의 200 mM 아르기닌 아세테이트 완충제, 및 계면활성제를 포함하는 안정한 수성 제약 제제를 제공한다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 10 mg/ml 내지 약 250 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 25 mg/ml 내지 200 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 30 mg/ml 내지 175 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 50 mg/ml 내지 약 150 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 75 mg/ml 내지 약 125 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 25 mg/ml 내지 약 100 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체는 사전 동결건조되지 않는다. 일부 실시양태에서, 항체는 VEGF에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 전장 항체이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 IgG1 항체이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 인간화 항체이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 항원-결합 영역을 포함하는 항체 단편이다. 일부 실시양태에서, 항체 단편은 Fab 또는 F(ab')<sub>2</sub> 단편이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 VEGF에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 베바시주맙이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 응집되기 쉽다. 일부 실시양태에서, 계면활성제는 폴리소르베이트이다. 일부 실시양태에서, 폴리소르베이트는 폴리소르베이트 20이다. 일부 실시양태에서, 계면활성제 농도는 0.0001% 내지 약 1.0%이다. 일부 실시양태에서, 계면활성제 농도는 약 0.01% 내지 약 0.05%이다. 일부 실시양태에서, 계면활성제 농도는 0.04%이다. 일부 실시양태에서, 제제는 멸균된다. 일부 실시양태에서, 제제는 약 40°C에서 적어도 28일 동안 저장시에 안정하다. 일부 실시양태에서, 제제는 수성이고, 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 제제는 정맥내 (IV), 피하 (SQ) 또는 근육내 (IM) 투여를 위한 것이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IV 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 10 mg/ml 내지 약 250 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IV 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 25 mg/ml 내지 약 175 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IV 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 50 mg/ml 내지 약 150 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IV 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 75 mg/ml 내지 약 125 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 SQ 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 10 mg/ml 내지 약 250 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 SQ 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 25 mg/ml 내지 약 175 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 SQ 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 50 mg/ml 내지 약 150 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 SQ 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 75 mg/ml 내지 약 125 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IM 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 10 mg/ml 내지 약 250 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IM 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 25 mg/ml 내지 약 175 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 SQ 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 50 mg/ml 내지 약 150 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IM 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 75 mg/ml 내지 약 125 mg/ml이다.

[0013] 본 발명의 추가의 실시양태는 (a) 약 10 mg/ml 내지 약 250 mg/ml의 양의, 탈아미드화 또는 응집되기 쉬운 전장 IgG1 항체; (b) pH 4.5 내지 6.0의 아르기닌 아세테이트 완충제; 및 (c) 약 0.01% 내지 약 0.1%의 양의 폴리소르베이트 20을 포함하는 제약 제제를 제공한다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 25 mg/ml 내지 200 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 30 mg/ml 내지 175 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 50 mg/ml 내지 약 150 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 75 mg/ml 내지 약 125 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 25 mg/ml 내지 약 100 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체는 사전 동결건조되지 않는다. 일부 실시양태에서, 항체는 VEGF에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 베바시주맙이다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간화 항체이다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 25 mM 내지 약 250 mM이다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 50 mM 내지 약 250 mM이다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 75 mM 내지 약 250 mM이다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 100 mM 내지 약 250 mM이다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 120 mM 내지 약 240 mM이다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 150 mM 내지 약 225 mM이다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 200 mM이다. 일부 실시양태에서, 아르기닌 아세테이트 완충제는 약 4.5 내지 약 5.5의 pH를 갖는다. 일부 실시양태에서, 아르기닌 아세테이트 완충제는 약 4.8 내지 약 5.4의 pH를 갖는다. 일부 실시양태에서, 아르기닌 아세테이트 완충제는 약 5.2의 pH를 갖는다. 일부 실시양태에서, 폴리소르베이트 20은 약 0.01% 내지 약 0.05%이다. 일부 실시양태에서, 폴리소르베이트 20은 0.04%이다. 일부 실시양태에서, 제제는 멸균된다. 일부

실시양태에서, 제제는 약 40℃에서 적어도 28일 동안 저장시에 안정하다. 일부 실시양태에서, 제제는 수성이고, 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 제제는 정맥내 (IV), 피하 (SQ) 또는 근육내 (IM) 투여를 위한 것이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IV 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 10 mg/ml 내지 약 250 mg/ml 이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IV 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 25 mg/ml 내지 약 175 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IV 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 50 mg/ml 내지 약 150 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IV 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 75 mg/ml 내지 약 125 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 SQ 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 10 mg/ml 내지 약 250 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 SQ 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 25 mg/ml 내지 약 175 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 SQ 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 50 mg/ml 내지 약 150 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 SQ 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 75 mg/ml 내지 약 125 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IM 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 10 mg/ml 내지 약 250 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IM 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 25 mg/ml 내지 약 175 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 SQ 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 50 mg/ml 내지 약 150 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IM 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 75 mg/ml 내지 약 125 mg/ml이다.

[0014]

본 발명의 또 다른 실시양태는 약 4.5 내지 약 6.0의 pH의 아르기닌 아세테이트 완충제 중의 VEGF에 결합하는 항체, 및 계면활성제를 포함하는 제약 제제를 제공한다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 10 mg/ml 내지 약 250 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 25 mg/ml 내지 200 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 30 mg/ml 내지 175 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 50 mg/ml 내지 약 150 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 75 mg/ml 내지 약 125 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 25 mg/ml 내지 약 100 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체는 사전 동결건조되지 않는다. 일부 실시양태에서, 항체는 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 전장 항체이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 IgG1 항체이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 인간화 항체이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 항원-결합 영역을 포함하는 항체 단편이다. 일부 실시양태에서, 항체 단편은 Fab 또는 F(ab')<sub>2</sub> 단편이다. 일부 실시양태에서, 항체는 베바시주맙이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 응집되기 쉽다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 25 mM 내지 약 250 mM이다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 50 mM 내지 약 250 mM이다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 75 mM 내지 약 250 mM이다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 120 mM 내지 약 240 mM이다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 150 mM 내지 약 225 mM이다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 200 mM이다. 일부 실시양태에서, 아르기닌 아세테이트 완충제는 약 4.5 내지 약 5.5의 pH를 갖는다. 일부 실시양태에서, 아르기닌 아세테이트 완충제는 약 4.8 내지 약 5.4의 pH를 갖는다. 일부 실시양태에서, 아르기닌 아세테이트 완충제는 약 5.2의 pH를 갖는다. 일부 실시양태에서, 계면활성제는 폴리소르베이트이다. 일부 실시양태에서, 폴리소르베이트는 폴리소르베이트 20이다. 일부 실시양태에서, 계면활성제 농도는 0.0001% 내지 약 1.0%이다. 일부 실시양태에서, 계면활성제 농도는 약 0.01% 내지 약 0.05%이다. 일부 실시양태에서, 계면활성제 농도는 0.04%이다. 일부 실시양태에서, 제제는 멸균된다. 일부 실시양태에서, 제제는 약 40℃에서 적어도 28일 동안 저장시에 안정하다. 일부 실시양태에서, 제제는 수성이고, 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 제제는 정맥내 (IV), 피하 (SQ) 또는 근육내 (IM) 투여를 위한 것이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IV 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 10 mg/ml 내지 약 250 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IV 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 25 mg/ml 내지 약 175 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IV 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 50 mg/ml 내지 약 150 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IV 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 75 mg/ml 내지 약 125 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 SQ 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 10 mg/ml 내지 약 250 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 SQ 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 25 mg/ml 내지 약 175 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 SQ 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 50 mg/ml 내지 약 150 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 SQ 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 75 mg/ml 내지 약 125 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IM 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 10 mg/ml 내지 약 250 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IM 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 25 mg/ml 내지 약 175 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 SQ 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 50 mg/ml 내지 약 150 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IM 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 75 mg/ml 내지 약 125 mg/ml이다.

[0015]

본 발명의 또 다른 실시양태는 pH 4.5 내지 6.0의 아르기닌 아세테이트 완충제 중에서 항체를 제제화하는 것을 포함하는, 치료 모노클로날 항체의 응집을 감소시키는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약

10 mg/ml 내지 약 250 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 25 mg/ml 내지 200 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 30 mg/ml 내지 175 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 50 mg/ml 내지 약 150 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 75 mg/ml 내지 약 125 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체 농도는 약 25 mg/ml 내지 약 100 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 항체는 사전 동결건조되지 않는다. 일부 실시양태에서, 항체는 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 전장 항체이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 IgG1 항체이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 인간화 항체이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 항원-결합 영역을 포함하는 항체 단편이다. 일부 실시양태에서, 항체 단편은 Fab 또는 F(ab')<sub>2</sub> 단편이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 VEGF에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 베바시주맙이다. 일부 실시양태에서, 모노클로날 항체는 응집되기 쉽다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 25 mM 내지 약 250 mM이다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 50 mM 내지 약 250 mM이다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 75 mM 내지 약 250 mM이다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 120 mM 내지 약 240 mM이다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 150 mM 내지 약 225 mM이다. 일부 실시양태에서, 완충제 중 아르기닌 아세테이트 농도는 약 200 mM이다. 일부 실시양태에서, 아르기닌 아세테이트 완충제는 약 4.5 내지 약 5.5의 pH를 갖는다. 일부 실시양태에서, 아르기닌 아세테이트 완충제는 약 4.8 내지 약 5.4의 pH를 갖는다. 일부 실시양태에서, 아르기닌 아세테이트 완충제는 약 5.2의 pH를 갖는다. 일부 실시양태에서, 제제는 멸균된다. 일부 실시양태에서, 제제는 약 40°C에서 적어도 28일 동안 저장시에 안정하다. 일부 실시양태에서, 제제는 수성이고, 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 제제는 정맥내 (IV), 피하 (SQ) 또는 근육내 (IM) 투여를 위한 것이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IV 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 10 mg/ml 내지 약 250 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IV 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 25 mg/ml 내지 약 175 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IV 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 50 mg/ml 내지 약 150 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IV 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 75 mg/ml 내지 약 125 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 SQ 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 10 mg/ml 내지 약 250 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 SQ 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 25 mg/ml 내지 약 175 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 SQ 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 50 mg/ml 내지 약 150 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 SQ 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 75 mg/ml 내지 약 125 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IM 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 10 mg/ml 내지 약 250 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IM 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 25 mg/ml 내지 약 175 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 SQ 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 50 mg/ml 내지 약 150 mg/ml이다. 일부 실시양태에서, 제제는 IM 투여를 위한 것이고, 항체 농도는 약 75 mg/ml 내지 약 125 mg/ml이다.

- [0016] 또한, 본 발명의 추가의 실시양태는 본원에 기재된 제제 중 어느 하나를 수용하는 용기를 포함하는 제조품을 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명의 추가의 실시양태는 본원에 기재된 제제 중 어느 하나를 포함하는, 시린지에 의해 관통가능한 마개를 갖는 바이알을 제공한다. 일부 실시양태에서, 바이알은 약 2-8°C에 저장한다. 일부 실시양태에서, 바이알은 3 cc, 20 cc 또는 50 cc 바이알이다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 실시양태는 탱크 내부에 본원에 기재된 제제 중 어느 하나를 포함하는 스테인레스 스틸 탱크를 제공한다. 일부 실시양태에서, 제제는 동결된다.
- [0019] 본 발명의 추가의 실시양태는 (a) 본원에 기재된 제제 중 어느 하나를 제조하는 것; 및 (b) 제제 중에서 항체의 물리적 안정성, 화학적 안정성, 또는 생물학적 활성을 평가하는 것을 포함하는, 제약 제제의 제조 방법을 제공한다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 실시양태는 본원에 기재된 제제 중 어느 하나를 질환 또는 장애를 치료하는데 효과적인 양으로 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 질환은 암이다. 일부 실시양태에서, 암은 결장직장암, 폐암, 유방암, 신암 및 교묘세포종으로부터 선택된다.
- [0021] 본 발명의 상기 실시양태 및 다른 실시양태는 하기 상세한 설명에 추가로 기재된다.

**발명의 효과**

- [0022] 본 발명은 안정한 수성 제약 제제, 이러한 제제의 제조 방법, 및 이러한 제제의 사용 방법을 제공한다.

**도면의 간단한 설명**

- [0023] 도 1은 4주까지 동안 40℃에서 저장된 항-VEGF 제제 (100 mg/ml)에서 검출된 전체 응집체 수준을 설명한다.
- 도 2는 항-VEGF 제제 (0, 50, 100 및 150 mg/ml)에서 검출된 전체 응집체 수준을 설명한다.
- 도 3은 4주까지 동안 40℃에서 저장된 것과 비교하여 항-VEGF 제제 (100 mg/ml)에서 검출된 이량체 수준을 설명한다.
- 도 4는 항-VEGF 농도 (25, 50, 100, 125, 150 또는 175 mg/ml)의 함수로서 20℃에서 항-VEGF 제제의 점도를 설명한다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0024] <상세한 설명>
- [0025] I. 정의
- [0026] 본 발명을 상세히 기재하기에 앞서, 본 발명이 특정 조성물 또는 생물학적 시스템에 제한되는 것이 아니며, 물론 달라질 수 있다는 것을 이해해야 한다. 본원에 사용된 용어가 단지 특정한 실시양태를 기재하려는 목적을 위한 것일 뿐, 제한하려는 의도를 갖지 않는다는 것 또한 이해해야 한다. 본 명세서 및 첨부된 특허청구범위에서 사용된 바와 같은 단수 형태는 내용상 달리 명백히 지시되지 않는 한 복수 대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어 "분자"에 대한 언급은 임의로 2개 이상의 상기 분자의 조합 등을 포함한다.
- [0027] 용어 "제약 제제"는, 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적일도록 하는 형태로 존재하며 제제가 투여될 대상체에 허용될 수 없게 독성인 추가의 성분을 함유하지 않는 제제를 나타낸다. 이러한 제제는 멸균된다. "제약상 허용되는" 부형제 (비히클, 첨가제)는 사용된 활성 성분의 유효 용량을 제공하기 위해 대상 포유동물에 합리적으로 투여될 수 있는 것이다.
- [0028] "멸균" 제제는 무균성이거나, 또는 모든 살아있는 미생물 및 그의 포자가 없거나, 본질적으로 없다.
- [0029] 본원에서, "동결된" 제제는 0℃ 미만의 온도에 있는 것이다. 일반적으로, 동결된 제제는 동결-건조되지 않거나, 또는 사전 동결건조 또는 후속 동결건조되지 않는다. 특정 실시양태에서, 동결된 제제는 (스테인레스 스틸 탱크에서) 저장을 위한 동결된 약물 물질, 또는 동결된 약물 생성물 (최종 바이알 형태)을 포함한다.
- [0030] "안정한" 제제는 저장시 그 중의 단백질이 그의 물리적 안정성 및/또는 화학적 안정성 및/또는 생물학적 활성을 본질적으로 유지하는 것이다. 바람직하게는, 제제는 저장시 그의 물리적 및 화학적 안정성 뿐만 아니라 그의 생물학적 활성을 본질적으로 유지한다. 저장 기간은 일반적으로 제제의 의도된 저장 수명을 기초로 선택된다. 단백질 안정성을 측정하기 위한 다양한 분석 기술이 당업계에서 이용가능하고, 예를 들어 문헌 [Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301], [Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991)] 및 [Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993)]에 검토되어 있다. 안정성은 선택된 기간 동안 선택된 온도에서 측정될 수 있다. 특정 실시양태에서, 제제는 약 40℃에서 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28일, 또는 그 초과 기간 동안 안정하다. 특정 실시양태에서, 제제는 약 40℃에서 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8주, 또는 그 초과 기간 동안 안정하다. 특정 실시양태에서, 제제는 약 25℃에서 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24개월, 또는 그 초과 기간 동안 안정하다. 특정 실시양태에서, 제제는 약 5℃에서 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24개월, 또는 그 초과 기간 동안 안정하다. 특정 실시양태에서, 제제는 약 -20℃에서 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48개월, 또는 그 초과 기간 동안 안정하다. 특정 실시양태에서, 제제는 5℃ 또는 -20℃에서 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48개월, 또는 그 초과 기간 동안 안정하다. 또한, 제제는 바람직하게는 제제의 동결 (예를 들어, -20℃ 또는 -70℃까지) 및 해동 후에, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 또는 5사이클의 동결 및 해동 후에 안정하다. 안정성은 응집 형성의 평가 (예를 들어, 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여, 탁도 측정에 의해, 및/또는 육안 검사에 의해); 양이온 교환 크로마토그래피, 이미지 모세관 등전점 포커싱 (icIEF) 또는 모세관 구역 전기영동을 이용한 전하 이중성 평가; 아미노-말단 또는 카르복시-말단 서열 분석; 질량 분광측정 분석; 환원된 항체와 무손상 항체를 비교하기 위한 SDS-PAGE

분석; 펩티드 맵 (예를 들어, 트립신 또는 LYS-C) 분석; 항체의 생물학적 활성 또는 항원 결합 기능 평가 등을 포함하는 다양한 상이한 방식으로 정량적으로 및/또는 정성적으로 평가될 수 있다. 불안정성은 응집, 탈아미드화 (예를 들어, Asn 탈아미드화), 산화 (예를 들어, Met 산화), 이성질체화 (예를 들어, Asp 이성질체화), 클리핑/가수분해/단편화 (예를 들어, 힌지 영역 단편화), 숙신이미드 형성, 쌍을 형성하지 않은 시스테인(들), N-말단 연장, C-말단 프로세싱, 글리코실화 차이 등 중 어느 하나 이상과 관련될 수 있다.

- [0031] 제약 제제 중에서 단백질은, 색상 및/또는 투명도의 육안 검사시, 또는 UV 광 산란 또는 크기 배제 크로마토그래피에 의해 측정시에 응집, 침전 및/또는 변성의 징후가 없거나 거의 없는 경우에 "그의 물리적 안정성을 유지한다".
- [0032] 제약 제제 중에서 단백질은, 주어진 시간에서의 화학적 안정성이, 단백질이 하기 정의된 바와 같은 그의 생물학적 활성을 계속 유지하는 것으로 간주되도록 하는 경우에 "그의 화학적 안정성을 유지한다". 화학적 안정성은 화학적으로 변경된 단백질의 형태를 검출 및 정량하여 평가할 수 있다. 화학적 변경은, 예를 들어 크기 배제 크로마토그래피, SDS-PAGE 및/또는 매트릭스-보조 레이저 탈착 이온화/비행 시간형 질량 분광측정법 (MALDI/TOF MS)을 이용하여 평가할 수 있는 크기 변형 (예를 들어, 클리핑)을 포함할 수 있다. 다른 유형의 화학적 변경은, 예를 들어 이온-교환 크로마토그래피 또는 icIEF로 평가할 수 있는 전하 변경 (예를 들어, 탈아미드화의 결과로서 발생함)을 포함한다.
- [0033] 주어진 시점에서의 항체의 생물학적 활성이 예를 들어 항원 결합 검정시 제약 제제를 제조한 시점에서 나타낸 생물학적 활성의 약 10% (검정의 오차 내에 있음) 이내라면, 항체는 제약 제제 중에서 "그의 생물학적 활성을 유지한다". 항체에 대한 다른 "생물학적 활성" 검정은 아래 본문에서 설명된다.
- [0034] 본문에서, 모노클로날 항체의 "생물학적 활성"은 항원에 결합하는 항체의 능력을 나타낸다. 여기에는 항원에 대한 항체 결합이 더 포함될 수 있으며, 이는 시험관내 또는 생체내에서 측정될 수 있는 측정가능한 생물학적 반응을 일으킨다. 이러한 활성은 길항작용 또는 효능작용일 수 있다.
- [0035] 본문에서 "탈아미드화" 모노클로날 항체는 하나 이상의 그의 아스파라긴 잔기가, 예를 들어 아스파르트산 또는 이소-아스파르트산으로 유도체화된 것이다.
- [0036] "탈아미드화되기 쉬운" 항체는 탈아미드화되려는 경향이 있는 것으로 밝혀진 하나 이상의 잔기를 포함하는 것이다.
- [0037] "응집되기 쉬운" 항체는, 특히 동결 및/또는 교반시에 다른 항체 분자(들)와 응집되는 것으로 밝혀진 것이다.
- [0038] "단편화되기 쉬운" 항체는, 예를 들어 그의 힌지 영역에서 2개 이상의 단편으로 절단되는 것으로 밝혀진 것이다.
- [0039] "탈아미드화, 응집 또는 단편화의 감소"는 상이한 pH에서 또는 상이한 완충제 중에서 제제화된 모노클로날 항체에 대한 탈아미드화, 응집 또는 단편화의 양의 방지 또는 감소를 의도로 한다.
- [0040] 제제화된 항체는 바람직하게는 본질적으로 순수하고, 바람직하게는 본질적으로 균질하다 (즉, 오염 단백질 등이 없음). "본질적으로 순수한" 항체는 조성물의 총 중량을 기준으로 적어도 약 90 중량%, 바람직하게는 적어도 약 95 중량%의 항체를 포함하는 조성물을 의미한다. "본질적으로 균질한" 항체는 조성물의 총 중량을 기준으로 적어도 약 99 중량%의 항체를 포함하는 조성물을 의미한다.
- [0041] "등장성"은 관심 제제가 본질적으로 인간 혈액과 동일한 삼투압을 갖는다는 것을 의미한다. 등장성 제제는 일반적으로 약 250 내지 350 mOsm의 삼투압을 가질 것이다. 예를 들어, 증기압 또는 빙냉 유형 삼투압계를 사용하여 등장성을 측정할 수 있다.
- [0042] 본문에 사용된 "완충제"는 그의 산-염기 접합체 성분의 작용에 의해 pH 변화에 영향을 받지 않는 완충 용액을 나타낸다. 본 발명의 완충제는 바람직하게는 약 4.5 내지 약 7.0, 바람직하게는 약 4.5 내지 약 6.5, 예를 들어 4.5 내지 6.0, 4.5 내지 5.9, 4.5 내지 5.8, 4.5 내지 5.7, 4.5 내지 5.6, 4.5 내지 5.5, 4.5 내지 5.6, 4.5 내지 5.5, 4.5 내지 5.4, 4.5 내지 5.3, 4.5 내지 5.2, 4.5 내지 5.1, 4.5 내지 5.0, 4.5 내지 4.9, 4.5 내지 4.8, 4.5 내지 4.7, 또는 4.5 내지 4.6 범위의 pH를 갖는다. 한 실시양태에서, 완충제는 pH 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.8, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 또는 6.0을 갖는다. 이 범위에서 pH를 제어할 완충제의 예는 아세테이트, 숙시네이트, 숙시네이트, 글루코네이트, 히스티딘, 시트레이트, 글리실글리신 및 다른 유기 산 완충제를 포함한다.

- [0043] "아르기닌 완충제"은 아르기닌 이온을 포함하는 완충제이다. 아르기닌 완충제의 예는 아르기닌 아세테이트, 아르기닌 클로라이드, 아르기닌 포스페이트, 아르기닌 술페이트, 아르기닌 숙시네이트 등을 포함한다. 한 실시양태에서, 아르기닌 완충제는 아르기닌 아세테이트이다. 한 실시양태에서, 아르기닌 아세테이트 완충제는 L-아르기닌 (유리 염기, 고체)을 아세트산 (액체)으로 적정함으로써 제조된다. 특정 실시양태에서, 아르기닌 완충제는 pH 4.5 내지 6.0, 4.5 내지 5.9, 4.5 내지 5.8, 4.5 내지 5.7, 4.5 내지 5.6, 4.5 내지 5.5, 4.5 내지 5.6, 4.5 내지 5.5, 4.5 내지 5.4, 4.5 내지 5.3, 4.5 내지 5.2, 4.5 내지 5.1, 4.5 내지 5.0, 4.5 내지 4.9, 4.5 내지 4.8, 4.5 내지 4.7, 또는 4.5 내지 4.6이다. 한 실시양태에서 완충제는 pH 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.8, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 또는 6.0을 갖는다.
- [0044] 본원에서, "계면활성제"는 표면-활성제, 바람직하게는 비이온성 계면활성제를 나타낸다. 본원에서 계면활성제의 예는 폴리소르베이트 (예를 들어, 폴리소르베이트 20 및 폴리소르베이트 80); 폴록사머 (예를 들어, 폴록사머 188); 트리톤; 나트륨 도데실 술페이트 (SDS); 나트륨 라우렐 술페이트; 나트륨 옥틸 글리코시드; 라우릴-, 미리스틸-, 리놀레일- 또는 스테아릴-술포베타인; 라우릴-, 미리스틸-, 리놀레일- 또는 스테아릴-사르코신; 리놀레일-, 미리스틸- 또는 세틸-베타인; 라우로아미도프로필-, 코카미도프로필-, 리놀레아미도프로필-, 미리스트아미도프로필-, 팔미도프로필- 또는 이소스테아르아미도프로필-베타인 (예를 들어, 라우로아미도프로필); 미리스트아미도프로필-, 팔미도프로필- 또는 이소스테아르아미도프로필-디메틸아민; 나트륨 메틸 코코일- 또는 이나트륨 메틸 올레일-타우레이트; 및 모나쿠아트(MONAQUAT)<sup>TM</sup> 시리즈 (모나 인더스트리즈, 인크.(Mona Industries, Inc.), 뉴저지주 패터슨); 폴리에틸 글리콜, 폴리프로필 글리콜, 및 에틸렌과 프로필렌 글리콜의 공중합체 (예를 들어, 플루로닉스(Pluronics), PF68 등) 등을 포함한다. 한 실시양태에서, 본원에서 계면활성제는 폴리소르베이트 20이다.
- [0045] 약리학적 관점에서, 본 발명의 문맥상, 항체의 "치료 유효량"은 치료에 항체가 효과적인 장애의 예방 또는 치료에 효과적인 양을 나타낸다. "장애"는 항체를 사용한 치료로부터 이익을 얻을 임의의 상태이다. 이는 만성 및 급성 장애 또는 질환 (포유동물이 당해 장애에 걸리기 쉬운 병적 상태 포함)을 포함한다.
- [0046] "보존제"는, 예를 들어 박테리아 작용을 본질적으로 감소시켜 다용도 제제의 생성을 용이하게 하기 위하여 제제에 임의로 포함될 수 있는 화합물이다. 가능한 보존제의 예는 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드, 헥사메토늄 클로라이드, 벤즈알코늄 클로라이드 (알킬기가 장쇄 화합물인 알킬벤질디메틸암모늄 클로라이드들의 혼합물) 및 벤제토늄 클로라이드를 포함한다. 다른 유형의 보존제는 방향족 알콜, 예컨대 페놀, 부틸 및 벤질 알콜, 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤, 카테콜, 레조르시놀, 시클로헥산올, 3-펜탄올, 및 m-크레졸을 포함한다. 한 실시양태에서, 본원에서 보존제는 벤질 알콜이다.
- [0047] "폴리올"은 다중 히드록실기를 갖는 물질이고, 이는 당 (환원당 및 비환원당), 당 알콜 및 당 산을 포함한다. 폴리올은 제제에 임의로 포함될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에서 폴리올은 약 600 kD 미만 (예를 들어, 약 120 내지 약 400 kD 범위)의 분자량을 갖는다. "환원당"은 금속 이온을 환원시키거나 또는 단백질 내의 리신 및 다른 아미노기와 공유적으로 반응할 수 있는 헤미아세탈기를 함유하는 것이고, "비환원당"은 환원당의 이러한 특성을 갖지 않는 것이다. 환원당의 예는 프룩토스, 만노스, 말토스, 락토스, 아라비노스, 크실로스, 리보스, 람노스, 갈락토스 및 글루코스이다. 비환원당은 수크로스, 트레할로스, 소르보스, 멜레지토스 및 라피노스를 포함한다. 만니톨, 크실리톨, 에리트리톨, 트레일톨, 소르비톨 및 글리세롤은 당 알콜의 예이다. 당 산과 관련하여, 이는 L-글루코네이트 및 그의 금속 염을 포함한다. 제제가 동결-해동에 안정한 것이 바람직한 경우, 폴리올은, 바람직하게는 그가 제제 중의 항체를 불안정화시키도록 동결 온도 (예를 들어, -20°C)에서 결정화되지 않는 것이다. 특정 실시양태에서, 비환원당, 예컨대 수크로스 및 트레할로스가 폴리올의 예이며, 여기서 트레할로스의 용액 안정성 때문에 트레할로스가 수크로스보다 바람직하다.
- [0048] 본원에 사용된 용어 "VEGF" 또는 "VEGF-A"는 문헌 [Leung et al. (1989) Science 246:1306] 및 [Houck et al. (1991) Mol. Endocrin. 5:1806]에 기재된 바와 같은 165-아미노산 인간 혈관 내피 세포 성장 인자 및 관련 121-, 189- 및 206- 아미노산 인간 혈관 내피 세포 성장 인자와 함께, 그의 자연 발생 대립유전자 형태 및 프로세싱된 형태를 나타낸다. 용어 "VEGF"는 또한 비인간 종, 예컨대 마우스, 래트 또는 영장류로부터의 VEGF를 나타낸다. 때때로, 특정 종으로부터의 VEGF는 인간 VEGF의 경우에는 hVEGF, 뮌린 VEGF의 경우에는 mVEGF 등과 같은 용어로 표시된다. 용어 "VEGF"는 또한 165-아미노산 인간 혈관 내피 세포 성장 인자의 아미노산 8 내지 109 또는 아미노산 1 내지 109를 포함하는 폴리펩티드의 말단절단된 형태를 나타내는데 사용된다. VEGF의 임의의 상기 형태들에 대한 언급은 본 출원에서 예를 들어 "VEGF (8-109)", "VEGF (1-109)" 또는 "VEGF<sub>165</sub>"에 의해 확인될 수 있다. "말단절단된" 천연 VEGF에 대한 아미노산 위치는 천연 VEGF 서열에 표시된 바와 같이 넘버링된

다. 예를 들어, 말단절단된 천연 VEGF에서의 아미노산 위치 17 (메티오닌)은 또한 천연 VEGF에서의 위치 17 (메티오닌)이다. 말단절단된 천연 VEGF는 KDR 및 Flt-1 수용체에 대해 천연 VEGF와 대등한 결합 친화도를 갖는다.

[0049] "VEGF 생물학적 활성"은 임의의 VEGF 수용체에 대한 결합 또는 임의의 VEGF 신호전달 활성, 예컨대 정상적 및 비정상적 혈관신생 및 혈관형성 둘 다의 조절 (문헌 [Ferrara and Davis-Smyth (1997) *Endocrine Rev.* 18:4-25]; [Ferrara (1999) *J. Mol. Med.* 77:527-543]); 배아 혈관형성 및 혈관신생의 촉진 (문헌 [Carmeliet et al. (1996) *Nature* 380:435-439]; [Ferrara et al. (1996) *Nature* 380:439-442]); 및 여성 생식기에서의 순환적 혈관 증식 및 골 성장 및 연골 형성 조절 (문헌 [Ferrara et al. (1998) *Nature Med.* 4:336-340]; [Gerber et al. (1999) *Nature Med.* 5:623-628])을 포함한다. 혈관신생 및 혈관형성에 있어서 혈관신생 인자인 것에 더하여, 다면발현성 성장 인자로서 VEGF는 다른 생리학적 과정에서 다양한 생물학적 효과, 예컨대 내피 세포 생존, 혈관 투과성 및 혈관확장, 단핵구 화학주성 및 칼슘 유입을 나타낸다 (문헌 [Ferrara and Davis-Smyth (1997), 상기 문헌] 및 [Cebe-Suarez et al. *Cell. Mol. Life Sci.* 63:601-615 (2006)]). 또한, 최근 연구는 몇가지 비-내피 세포 유형, 예컨대 망막 색소 상피 세포, 췌장관 세포 및 쉬반 세포에 대한 VEGF의 유사분열 촉진 효과를 보고하였다. 문헌 [Guerrin et al. (1995) *J. Cell Physiol.* 164:385-394]; [Obergh-Welsh et al. (1997) *Mol. Cell. Endocrinol.* 126:125-132]; [Sondell et al. (1999) *J. Neurosci.* 19:5731-5740].

[0050] "VEGF 길항제" 또는 "VEGF-특이적 길항제"는 VEGF에 결합하거나, VEGF 발현 수준을 감소시키거나, 또는 하나 이상의 VEGF 수용체에 대한 VEGF 결합 및 VEGF 매개된 혈관신생 및 내피 세포 생존 또는 증식을 포함하나, 이에 제한되지 않는 VEGF 생물학적 활성을 중화, 차단, 억제, 제거, 감소 또는 방해할 수 있는 분자를 나타낸다. VEGF에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드, 항-VEGF 항체 및 그의 항원-결합 단편, VEGF에 특이적으로 결합하여 하나 이상의 수용체에 대한 그의 결합을 격리시키는 수용체 분자 및 유도체, 융합 단백질 (예를 들어, VEGF-트랩 (레게네론(Regeneron)) 및 VEGF<sub>121</sub>-젤로닌 (페레그린(Peregrine))이 본 발명의 방법에 유용한 VEGF-특이적 길항제로서 포함된다. VEGF-특이적 길항제는 또한 VEGF 폴리펩티드의 길항제 변이체, VEGF에 대한 안티센스 핵염기 올리고머, VEGF에 대한 소형 RNA 분자, RNA 압타머, 펩티마이드, 및 VEGF에 대한 리보자임을 포함한다. VEGF-특이적 길항제는 또한 VEGF에 결합하고, VEGF 생물학적 활성을 차단, 억제, 제거, 감소 또는 방해할 수 있는 비펩티드 소분자를 포함한다. 따라서, 용어 "VEGF 활성"은 구체적으로 VEGF의 VEGF 매개된 생물학적 활성을 포함한다. 특정 실시양태에서, VEGF 길항제는 VEGF의 발현 수준 또는 생물학적 활성을 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 그 초과만큼 감소 또는 억제한다.

[0051] "항-VEGF 항체"는 VEGF에 충분한 친화도 및 특이성으로 결합하는 항체이다. 특정 실시양태에서, 선택된 항체는 정상적으로, VEGF에 대해 충분히 결합 친화도를 가질 것이고, 예를 들어 항체는 100 nM-1 pM의 K<sub>d</sub> 값으로 hVEGF에 결합할 수 있다. 항체 친화도는 예를 들어 표면 플라즈몬 공명 기반 검정 (예컨대 PCT 출원 공보 번호 WO 2005/012359에 기재된 바와 같은 비아코어(BIAcore) 검정); 효소-연결된 면역흡착 검정 (ELISA); 및 경쟁 검정 (예를 들어, RIA)으로 결정할 수 있다.

[0052] 특정 실시양태에서, 항-VEGF 항체는 VEGF 활성이 관여하는 질환 또는 상태를 표적화하고 이를 방해하는데 있어 치료제로서 사용될 수 있다. 또한, 항체를 대상으로 다른 생물학적 활성 검정을 수행하여, 예를 들어 그의 치료제로서의 유효성을 평가할 수 있다. 이러한 검정은 당업계에 공지되어 있고, 표적 항원 및 항체의 의도된 용도에 따라 달라진다. 이것의 예는 HUVEC 억제 검정, 종양 세포 성장 억제 검정 (예를 들어, WO 89/06692에 기재된 바와 같음), 항체-의존성 세포 세포독성 (ADCC) 및 보체-매개 세포독성 (CDC) 검정 (미국 특허 5,500,362), 및 효능작용 활성 또는 조혈 검정 (WO 95/27062 참조)을 포함한다. 항-VEGF 항체는 통상적으로 다른 VEGF 동족체, 예컨대 VEGF-B 또는 VEGF-C에도 결합하지 않을 것이고, 다른 성장 인자, 예컨대 PlGF, PDGF 또는 bFGF에도 결합하지 않을 것이다. 한 실시양태에서, 항-VEGF 항체는 하이브리도마 ATCC HB 10709에 의해 생성되는 모노클로날 항-VEGF 항체 A4.6.1과 동일한 에피토프에 결합하는 모노클로날 항체이다. 또 다른 실시양태에서, 항-VEGF 항체는 베바시주맙 (BV; 아바스틴(AVASTIN)<sup>®</sup>)으로 공지된 항체를 포함하나, 이에 제한되지 않는, 문헌 [Presta et al. (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599]에 따라 생성되는 재조합 인간화 항-VEGF 모노클로날 항체이다.

[0053] "rhUMAb VEGF" 또는 "아바스틴<sup>®</sup>"으로 공지되기도 한 항-VEGF 항체 "베바시주맙 (BV)"은 문헌 [Presta et al. (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599]에 따라 생성된 재조합 인간화 항-VEGF 모노클로날 항체이다. 이것은 돌연변이된 인간 IgG1 프레임워크 영역, 및 인간 VEGF의 그의 수용체에 대한 결합을 차단하는 무린 항-hVEGF 모노클로

로날 항체 A.4.6.1로부터의 항원-결합 상보성-결정 영역을 포함한다. 베바시주맵의 아미노산 서열의 대략 93% (대부분의 프레임워크 영역 포함)는 인간 IgG1로부터 유래되고, 서열의 약 7%는 뮤린 항체 A4.6.1로부터 유래된다. 베바시주맵은 분자량이 약 149,000 달톤이고 글리코실화된다. 베바시주맵 및 다른 인간화 항-VEGF 항체는 2005년 2월 26일에 허여된 미국 특허 번호 6,884,879 (전체 개시 내용은 명백하게 본원에 참고로 포함됨)에 추가로 기재되어 있다.

[0054] 본원에 사용된 용어 "B20 시리즈 폴리펩티드"는 VEGF에 결합하는 항체를 포함하는 폴리펩티드를 나타낸다. B20 시리즈 폴리펩티드는 미국 공보 번호 20060280747, 미국 공보 번호 20070141065 및/또는 미국 공보 번호 20070020267 (이들 특허 출원의 내용은 명백하게 본원에 참고로 포함됨)에 기재된 B20 항체 또는 B20-유래 항체의 서열로부터 유래된 항체를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 한 실시양태에서, B20 시리즈 폴리펩티드는 미국 공보 번호 20060280747, 미국 공보 번호 20070141065 및/또는 미국 공보 번호 20070020267에 기재된 바와 같은 B20-4.1이다. 또 다른 실시양태에서, B20 시리즈 폴리펩티드는 그 전체 개시내용이 명백하게 본원에 참고로 포함되는 미국 특허 출원 60/991,302에 기재된 B20-4.1.1이다.

[0055] 본원에 사용된 용어 "G6 시리즈 폴리펩티드"는 VEGF에 결합하는 항체를 포함하는 폴리펩티드를 나타낸다. G6 시리즈 폴리펩티드는 미국 공보 번호 20060280747, 미국 공보 번호 20070141065 및/또는 미국 공보 번호 20070020267에 기재된 G6 항체 또는 G6-유래 항체의 서열로부터 유래된 항체를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 미국 공보 번호 20060280747, 미국 공보 번호 20070141065 및/또는 미국 공보 번호 20070020267에 기재된 바와 같은 G6 시리즈 폴리펩티드는 G6-8, G6-23 및 G6-31을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0056] 추가의 항체에 대해 미국 특허 번호 7,060,269, 6,582,959, 6,703,020; 6,054,297; WO 98/45332; WO 96/30046; WO 94/10202; EP 0666868B1; 미국 특허 출원 공보 번호 2006009360, 20050186208, 20030206899, 20030190317, 20030203409, 및 20050112126; 및 문헌 [Popkov et al., Journal of Immunological Methods 288:149-164 (2004)]을 참조한다. 특정 실시양태에서, 다른 항체는 잔기 F17, M18, D19, Y21, Y25, Q89, I91, K101, E103, 및 C104를 포함하거나, 또는 대안적으로 잔기 F17, Y21, Q22, Y25, D63, I83 및 Q89를 포함하는 인간 VEGF 상의 기능적 에피토프에 결합하는 것을 포함한다.

[0057] 다른 항-VEGF 항체가 또한 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Liang et al., J Biol Chem 281, 951-961 (2006)]에 기재되어 있다.

[0058] "치료"는 치유적 치료, 및 예방적 또는 방지적 조치를 둘 다 나타낸다. 치료를 필요로 하는 대상에는 이미 장애가 있는 대상, 뿐만 아니라 장애를 방지하고자 하는 대상이 포함된다.

[0059] "장애"는 포유동물이 해당 장애에 걸리기 쉽게 하는 병적 상태를 포함하여 만성 및 급성 장애 또는 질환을 포함하는 (이에 제한되지 않음), 치료로부터 이익을 얻게 될 임의의 상태이다. 장애는 혈관신생 장애를 포함한다. 본원에 사용된 "혈관신생 장애"는 비정상적인 혈관신생 또는 비정상적인 혈관 투과성 또는 누출이 관련된 임의의 상태를 나타낸다. 본원에서 치료될 혈관신생 장애의 비제한적 예는 악성 및 양성 종양; 비백혈병 및 림프양 악성종양; 및 특히 종양 (암) 전이를 포함한다.

[0060] "비정상적인 혈관신생"은 병든 상태에서 또는 병든 상태를 유발하도록 새로운 혈관이 과도하게 또는 달리 부적절하게 성장할 때 (예를 들어, 의학적 관점에서 바람직하지 않은 혈관신생의 위치, 타이밍, 정도 또는 개시) 발생한다. 일부 경우에, 과도하거나, 제어되지 않거나 달리 부적절한 혈관신생은 병든 상태를 악화시키거나 또는 병든 상태를 유발하는데 일조하는 새로운 혈관 성장이 있는 경우에 발생한다. 새로운 혈관은 병든 조직에 양분을 공급하고, 정상 조직을 파괴하고, 암의 경우, 새로운 혈관은 종양 세포가 순환계로 벗어나서 다른 기관에 퍼무르게 할 수 있다 (종양 전이). 비정상적인 혈관신생이 관여하는 장애의 예는 암, 특히 혈관성 고형 종양 및 전이성 종양 (결장암, 폐암 (특히 소세포 폐암) 또는 전립선암 포함), 안구 신생혈관형성에 의해 유발되는 질환, 특히 당뇨병성 실명, 망막병증, 원발성 당뇨병성 망막증 또는 연령-관련 황반 변성, 맥락막 신생혈관형성 (CNV), 당뇨병성 황반 부종, 병적 근시, 폰 히펠-린다우병, 눈의 히스토플라스마증, 중심 망막 정맥 폐쇄 (CRVO), 각막 신생혈관형성, 망막 신생혈관형성 및 피부홍조; 건선, 건선성 관절염, 혈관모세포종, 예컨대 혈관종; 염증성 신 질환, 예컨대 사구체신염, 특히 사구체간질증식성 사구체신염, 용혈성 요독성 증후군, 당뇨병성 신병증 또는 고혈압성 신경화증; 다양한 염증성 질환, 예컨대 관절염, 특히 류마티스 관절염, 염증성 장 질환, 건선, 사르코이드증, 폐쇄성 동맥경화증 및 이식후 발생하는 질환, 자궁내막증 또는 만성 천식 및 다른 상태를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0061] "비정상적인 혈관 투과성"은 병든 상태에서 또는 병든 상태를 유발하도록 혈관과 혈관의 구획 사이의 유체, 분

자 (예를 들어, 이온 및 영양소) 및 세포 (예를 들어, 림프구)의 유동이 과도하거나 부적절할 때 (예를 들어, 의학적 관점에서 바람직하지 않은 혈관 투과성의 위치, 타이밍, 정도 또는 개시) 발생한다. 비정상적인 혈관 투과성은 혈관계를 통한 이온, 물, 영양소, 또는 세포의 과도하거나 달리 부적절한 "누출"을 일으킬 수 있다. 일부 경우에, 과도하거나 제어되지 않거나 달리 부적절한 혈관 투과성 또는 혈관 누출은 예를 들어 뇌 종양을 포함한 종양과 관련된 부종을 포함하는 질환 상태; 악성 종양과 관련된 복수; 메이그스 증후군; 폐렴; 신증후군; 심낭 삼출; 흉막 삼출; 심혈관 질환, 예를 들어 심근 경색 및 졸중 후의 상태와 관련된 투과성 등을 악화하거나 유도한다. 본 발명에서는 비정상적인 혈관 투과성 또는 누출과 관련된 질환 및 장애가 발생하였거나 발생할 위험이 있는 환자를 치료하는 것을 고려한다.

[0062] 용어 "세포 증식성 장애" 및 "증식성 장애"는 어느 정도의 비정상적인 세포 증식과 관련이 있는 장애를 나타낸다. 한 실시양태에서, 세포 증식성 장애는 암이다. 한 실시양태에서, 세포 증식성 장애는 종양이다.

[0063] 본원에 사용된 "종양"은 악성이든 또는 양성이든 모든 신생물성 세포 성장 및 증식 및 모든 전암성 및 암성 세포 및 조직을 나타낸다. 본원에 나타낸 바와 같이, 용어 "암", "암성", "세포 증식성 장애", "증식성 장애" 및 "종양"은 상호 배타적인 것이 아니다.

[0064] 용어 "암" 및 "암성"은 조절되지 않는 세포 성장을 전형적인 특징으로 하는 포유동물에서의 생리적 상태를 나타내거나 기재한다. 암의 예는 암종, 림프종, 모세포종, 육종, 및 백혈병 또는 림프양 악성종양을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 이러한 암의 보다 특정한 예는 편평세포암 (예를 들어, 상피 편평세포암), 폐암, 예를 들어 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 폐의 선암종 및 폐의 편평세포 암종, 복막암, 간세포암, 위암 또는 위장암, 예를 들어 위장암 및 위장 기질 암, 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 요로암, 간세포암, 유방암, 결장암, 직장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장암 또는 신암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종, 항문 암종, 음경 암종, 흑색종, 표재성 확산 흑색종, 악성 검은사마귀 흑색종, 말단성 흑점양 흑색종, 결절성 흑색종, 다발성 골수종 및 B-세포 림프종 (예를 들어, 저등급/여포성 비호지킨 림프종 (NHL); 소림프구성 (SL) NHL; 중등급/여포성 NHL; 중등급 미만성 NHL; 고등급 면역모세포성 NHL; 고등급 림프모구성 NHL; 고등급 소 비절단 세포 NHL; 거대 질환 NHL; 외투 세포 림프종; AIDS-관련 림프종 및 발덴스트롬 마크로글로불린혈증); 만성 림프구성 백혈병 (CLL); 급성 림프모구성 백혈병 (ALL); 모발상 세포 백혈병; 만성 림프모구성 백혈병; 및 이식 후 림프구성증식성 장애 (PTLD), 및 또한 모반증과 관련이 있는 비정상적인 혈관 증식, 부종 (예컨대 뇌 종양과 관련이 있는 부종), 메이그스 증후군, 뇌암, 뿐만 아니라 두경부암, 및 관련 전이를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체로 치료할 수 있는 암은 유방암, 결장직장암, 직장암, 비소세포 폐암, 교모세포종, 비호지킨 림프종 (NHL), 신세포암, 전립선암, 간암, 췌장암, 연조직 육종, 카포시 육종, 카르시노이드 암종, 두경부암, 난소암, 중피종 및 다발성 골수종을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 소세포 폐암, 교모세포종, 신경모세포종, 흑색종, 유방 암종, 위암, 결장직장암 (CRC) 및 간세포 암종으로부터 선택된다. 또한, 일부 실시양태에서, 암은 비소세포 폐암, 결장직장암, 교모세포종 및 유방 암종 (이들 암의 전이 형태 포함)으로부터 선택된다.

[0065] 용어 "항암 요법"은 암 치료에 유용한 요법을 나타낸다. 항암 치료제의 예는 예를 들어 화학요법제, 성장 억제제, 세포독성제, 방사선 요법에 사용되는 작용제, 항혈관신생제, 아포토시스 작용제, 항류블린 작용제, 및 암 치료를 위한 다른 작용제, 예컨대 항-HER-2 항체, 항-CD20 항체, 표피 성장 인자 수용체 (EGFR) 길항제 (예를 들어, 티로신 키나제 억제제), HER1/EGFR 억제제 (예를 들어, 에를로티닙 (타르세바(Tarceva)<sup>TM</sup>)), 혈소판 유래 성장 인자 억제제 (예를 들어, 글리벡(Gleevec)<sup>TM</sup> (이마티닙 메실레이트)), COX-2 억제제 (예를 들어, 셀레콕시브), 인터페론, 시토카인, 하기 표적 ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-베타, BlyS, APRIL, BCMA 또는 VEGF 수용체 (들) 중 하나 이상에 결합하는 길항제 (예를 들어, 중화 항체), TRAIL/Apo2, 및 다른 생물활성 및 유기 화학적 작용제 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 이들의 조합 또한 본 발명에 포함된다.

[0066] "혈관신생 인자 또는 작용제"는 혈관의 발생을 자극하는데 관여하는, 예를 들어 혈관신생, 내피 세포 성장, 혈관의 안정성 및/또는 혈관형성 등을 촉진하는 성장 인자 또는 그의 수용체이다. 예를 들어 혈관신생 인자는, 예를 들어 VEGF 및 VEGF 패밀리의 구성원 및 그의 수용체 (VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR1, VEGFR2 및 VEGFR3), PlGF, PDGF 패밀리, 섬유모세포 성장 인자 패밀리 (FGF), TIE 리간드 (안지오포이에틴, ANGPT1, ANGPT2), TIE1, TIE2, 에프린, Bv8, 델타-유사 리간드 4 (DLL4), De1-1, 섬유모세포 성장 인자: 산성 (aFGF) 및 염기성 (bFGF), FGF4, FGF9, BMP9, BMP10, 폴리스타틴, 과립구 콜로니-자극 인자 (G-CSF), GM-CSF, 간세포 성장 인자 (HGF)/산란 인자 (SF), 인터류킨-8 (IL-8), CXCL12, 렙틴, 미드카인, 뉴로필린, NRP1, NRP2, 태반 성장 인자, 혈소판-유래 내피 세포 성장 인자 (PD-ECGF), 혈소판-유래 성장 인자, 특히 PDGF-BB, PDGFR-알파,

또는 PDGFR-베타, 플레이오토로핀 (PTN), 프로그래놀린, 프로리페린, 형질전환 성장 인자-알파 (TGF-알파), 형질전환 성장 인자-베타 (TGF-베타), 중앙 괴사 인자-알파 (TNF-알파), Alk1, CXCR4, Notch1, Notch4, Sema3A, Sema3C, Sema3F, Robo4 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 이것은 혈관신생을 촉진하는 인자, 예컨대 ESM1 및 페렐레칸을 더 포함할 것이다. 이것은 또한 상처 치유를 가속화하는 인자, 예컨대 성장 호르몬, 인슐린-유사 성장 인자-I (IGF-I), VEGF, 표피 성장 인자 (EGF), EGF-유사 도메인, 멀티플 7 (EGFL7), CTGF 및 그의 패밀리 구성원, 및 TGF-알파 및 TGF-베타를 포함할 것이다. 예를 들어, 문헌 [Klagsbrun and D'Amore (1991) Annu. Rev. Physiol. 53:217-39]; [Streit and Detmar (2003) Oncogene 22:3172-3179]; [Ferrara & Alitalo (1999) Nature Medicine 5(12):1359-1364]; [Tonini et al. (2003) Oncogene 22:6549-6556] (예를 들어, 공지된 혈관신생 인자를 열거한 표 1); 및 [Sato (2003) Int. J. Clin. Oncol. 8:200-206]을 참조한다.

[0067] "항혈관신생제" 또는 "혈관신생 억제제"는 혈관신생, 혈관형성, 또는 바람직하지 않은 혈관 투과성을 직접적으로 또는 간접적으로 억제하는 적은 분자량의 물질, 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, 억제성 RNA (RNAi 또는 siRNA) 포함), 폴리펩티드, 단리된 단백질, 재조합 단백질, 항체, 또는 이들의 접합체 또는 융합 단백질을 나타낸다. 항혈관신생제는 혈관신생 인자 또는 그의 수용체에 결합하고 이것의 혈관신생 활성을 차단하는 작용제를 포함한다는 것을 이해해야 한다. 예를 들어, 항혈관신생제는 상기 정의된 바와 같은 혈관신생제에 대한 항체 또는 다른 길항제, 예를 들어 VEGF-A 또는 VEGF-A 수용체 (예를 들어, KDR 수용체 또는 Flt-1 수용체)에 대한 항체, 항-PDGFR 억제제, VEGF 수용체 신호전달을 차단하는 소분자 (예를 들어, PTK787/ZK2284, SU6668, 수텐트 (SUTENT)<sup>®</sup>/SU11248 (수니티닙 말레이트), AMG706, 또는 예를 들어 국제 특허 출원 WO 2004/113304에 기재된 것들)이다. 항혈관신생제는 하기 작용제들: VEGF 억제제, 예컨대 VEGF-특이적 길항제, EGF 억제제, EGFR 억제제, 에르비투스(Erbitux)<sup>®</sup> (세록시맵, 임클론 시스템즈, 인크.(ImClone Systems, Inc.), 뉴저지주 브랜치버그), 벡티빅스(Vectibix)<sup>®</sup> (파니투무맵, 암젠(Amgen), 캘리포니아주 싸우전드 오크스), TIE2 억제제, IGF1R 억제제, COX-II (시클로옥시게나제 II) 억제제, MMP-2 (매트릭스-메탈로프로테이나제 2) 억제제, 및 MMP-9 (매트릭스-메탈로프로테이나제 9) 억제제, CP-547,632 (화이자 인크.(Pfizer Inc.), 미국 뉴욕주), 악시티닙 (화이자 인크.: AG-013736), ZD-6474 (아스트라제네카(AstraZeneca)), AEE788 (노파르티스(Novartis)), AZD-2171), VEGF 트랩 (레게네론/아벤티스(Aventis)), 바탈라닙 (또한, PTK-787, ZK-222584로도 알려져 있음: 노파르티스 & 슈어링 AG(Schering AG)), 마쿠젠 (페가프타닙 옥타소듐, NX-1838, EYE-001, 화이자 인크./길리아드(Gilead)/아이테크(Eyetech)), IM862 (시트란 인크.(Cytran Inc.), 미국 워싱턴주 커크랜드); 및 리보자임(Ribozyme, 콜로라도주 볼더) 및 키론(Chiron, 캘리포니아주 에머리빌)으로부터 입수한 합성 리보자임인 안지오자임, 및 이들의 조합물을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 다른 혈관신생 억제제는 트롬보스폰딘1, 트롬보스폰딘2, 콜라겐 IV 및 콜라겐 XVIII를 포함한다. VEGF 억제제는 미국 특허 번호 6,534,524 및 6,235,764 (둘 다의 전문이 모든 목적을 위해 본원에서 참고로 포함됨)에 개시되어 있다. 항혈관신생제는 또한 천연 혈관신생 억제제, 예를 들어 안지오스타틴, 엔도스타틴 등을 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Klagsbrun and D'Amore (1991) Annu. Rev. Physiol. 53:217-39]; [Streit and Detmar (2003) Oncogene 22:3172-3179] (예를 들어, 악성 흑색종에서의 항혈관신생 요법을 열거한 표 3); [Ferrara & Alitalo (1999) Nature Medicine 5(12):1359-1364]; [Tonini et al. (2003) Oncogene 22:6549-6556] (예를 들어, 공지된 항혈관신생 인자를 열거한 표 2); 및 [Sato (2003) Int. J. Clin. Oncol. 8:200-206] (예를 들어, 임상 시험에서 사용된 항혈관신생제를 열거한 표 1)을 참조한다.

[0068] 용어 "항혈관신생 요법"은 항혈관신생제를 투여하는 것을 포함하는, 혈관신생을 억제하는데 유용한 요법을 나타낸다.

[0069] 본원에 사용된 용어 "세포독성제"는 세포의 기능을 억제 또는 방해하고/하거나 세포 사멸 또는 파괴를 유발하는 물질을 나타낸다. 이 용어는 방사성 동위원소 (예를 들어, At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup>, Pb<sup>212</sup>, 및 Lu의 방사성 동위원소), 화학요법제 (예를 들어, 메토트렉세이트, 아드리아미신, 빈카 알칼로이드 (빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포시드), 독소루비신, 멜팔란, 미토마이신 C, 클로람부실, 다우노루비신 또는 다른 삼입제, 효소 및 그의 단편, 예컨대 뉴클레오티드분해 효소, 항생제, 및 독소, 예컨대 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 소분자 독소 또는 효소 활성 독소, 예를 들어 그의 단편 및/또는 변이체, 및 하기 개시한 다양한 항종양제 또는 항암제를 포함한다. 다른 세포독성제는 하기 기재되어 있다. 종양사멸제는 종양 세포의 파괴를 유발한다.

[0070] "독소"는 세포의 성장 또는 증식에 해로운 영향을 미칠 수 있는 임의의 물질이다.

[0071] "화학요법제"는 암의 치료에 유용한 화학적 화합물이다. 화학요법제의 예는 알킬화제, 예컨대 티오테파 및 시

클로스포스포미드 (시톡산(CYTOXAN)<sup>®</sup>); 알킬 술포네이트, 예컨대 부술포, 임프로술포 및 피포술포; 아지리딘, 예컨대 벤조도파, 카르보쿠온, 메트우레도파 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸아멜라민 (알트라타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 및 트리메틸올로멜라민 포함); 아세토게닌 (특히 블라타신 및 블라타시논); 델타-9-테트라히드로칸나비놀 (드로나비놀, 마리놀(MARINOL)<sup>®</sup>); 베타-라파콘; 라파롤; 콜치신; 베틀린산; 캄프토테신 (합성 유사체 토포테칸 (히캄틴(HYCAMTIN)<sup>®</sup>, CPT-11 (이리노테칸, 캄프토사르(CAMPTOSAR)<sup>®</sup>), 아세틸캄프토테신, 스코폴렉틴 및 9-아미노캄프토테신 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (그의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 포도필로톡신; 포도필린산; 테니포시드; 크립토피신 (특히 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 둘라스타틴; 듀오카르마이신 (합성 유사체 KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; 사르코딕티인; 스포지스타틴; 질소 머스타드, 예컨대 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스포미드, 에스트라무스틴, 이포스포미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노베티친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스포미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라니무스틴; 항생제, 예컨대 에네디인 항생제 (예를 들어, 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마II 및 칼리케아미신 오메가II (예를 들어, 문헌 [Nicolaou et al., Angew. Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)] 참조); CDP323, 경구 알파-4 인테그린 억제제; 다이네미신 (다이네미신 A 포함); 에스페라미신; 뿐만 아니라 네오키노스타틴 발색단 및 관련 발색단백질 에네디인 항생 발색단), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데투루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신 (아드리아마이신(ADRIAMYCIN)<sup>®</sup>, 모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신, 독소루비신 HCl 리포솜 주사(독실(DOXIL)<sup>®</sup>), 리포솜 독소루비신 TLC D-99(미오세트(MYOCET)<sup>®</sup>), peg화 리포솜 독소루비신 (카엘릭스(CAELYX)<sup>®</sup>) 및 데옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예컨대 미토마이신 C, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포르피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항-대사물, 예컨대 메토티렉세이트, 겐시타빈 (겐자르(GEMZAR)<sup>®</sup>), 테가루프(우프트랄(UFTORAL)<sup>®</sup>), 카페시타빈(젤로다(XELODA)<sup>®</sup>), 에포틸론 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 콤레타스타틴; 염산 유사체, 예컨대 데노프테린, 메토티렉세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예컨대 플루다라빈, 6-메르캅토프린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록스우리딘; 안드로젠, 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤; 항-아드레날, 예컨대 아미노글루테티미드, 미토탄, 트리로스탄; 염산 보충제, 예컨대 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스포미드 글리코시드; 아미노레블린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트렉세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘립티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 질산갈륨; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다이신; 메이탄시노이드, 예컨대 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단몰; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK<sup>®</sup> 다당류 복합체 (제이에이치에스 내츄럴 프로덕츠 (JHS Natural Products, 오레곤주 유진)); 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2'-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센 (특히 T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신 (엘디신(ELDISINE)<sup>®</sup>, 필데신(FILDESIN)<sup>®</sup>); 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 티오테파; 탁소이드, 예를 들어 파클리탁셀 (탁솔(TAXOL)<sup>®</sup>, 브리스틀-마이어드스 스킵 온콜로지 (Bristol-Myers Squibb Oncology, 뉴저지주 프린스턴)); 파클리탁셀의 알부민-조작 나노입자 제제 (아브락산(ABRAXANE)<sup>™</sup> 및 독세탁셀 (탁소테레(TAXOTERE)<sup>®</sup>, 론-프랑 로러 (Rhone-Poulenc Rorer, 프랑스 안토니)); 클로란부실; 6-티오구아닌; 메르캅토프린; 메토티렉세이트; 백금 제제, 예컨대 시스플라틴, 옥살리플라틴 (예를 들어, 엘록사틴(ELOXATIN)<sup>®</sup>) 및 카르보플라틴; 빈블라스틴 (벨반(VELBAN)<sup>®</sup>), 빈크리스틴 (온코빈(ONCOVIN)<sup>®</sup>), 빈데신 (엘디신<sup>®</sup>, 필데신<sup>®</sup>), 및 비노렐빈 (나벨빈(NAVELBINE)<sup>®</sup>)을 비롯한, 튜블린 중합이 미세소관을 형성하는 것을 방지하는 빈카; 에토포시드 (VP-16); 이포스포미드; 미토크산트론; 류코보린; 노반트론; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 이반드로네이트; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드,

예컨대 레티노산 (백사로텐 (타르그레틴(TARGRETIN)<sup>®</sup>) 포함); 비스포스포네이트, 예컨대 클로드로네이트 (예를 들어, 보네포스(BONEFOS)<sup>®</sup> 또는 오스탁(OSTAC)<sup>®</sup>), 에티드로네이트 (디드로칼(DIDROCAL)<sup>®</sup>), NE-58095, 졸레드로논 산/졸레드로네이트 (조메타(ZOMETA)<sup>®</sup>), 알렌드로네이트 (포사맥스(FOSAMAX)<sup>®</sup>), 파미드로네이트 (아레디아 (ARELIA)<sup>®</sup>), 틸루드로네이트 (스켈리드(SKELID)<sup>®</sup>), 또는 리세드로네이트 (악토넬(ACTONEL)<sup>®</sup>); 트록사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히 이상 세포 증식에 관여하는 신호전달 경로에서 유전자의 발현을 억제하는 것, 예컨대 예를 들어 PKC-알파, Raf, H-Ras, 및 표피 성장 인자 수용체 (EGF-R) (예를 들어, 에를로티닙 (타르세바<sup>™</sup>); 및 세포 증식을 감소시키는 VEGF-A; 백신, 예컨대 테라토프(THERATOPE)<sup>®</sup> 백신 및 유전자 요법 백신, 예를 들어 알로벡틴(ALLOVECTIN)<sup>®</sup> 백신, 류벡틴(LEUVECTIN)<sup>®</sup> 백신, 및 백신(VAXID)<sup>®</sup> 백신; 토포이소머라제 1 억제제 (예를 들어, 루르토테칸(LURTOTECAN)<sup>®</sup>); rmRH (예를 들어, 아바렐릭스(ABARELIX)<sup>®</sup>); BAY439006 (소라페닙; 바이엘(Bayer)); SU-11248 (수니티닙, 수텐트<sup>®</sup>, 화이자); 페리포신, COX-2 억제제 (예를 들어, 셀레콕시브 또는 에토리콕시브), 프로테오솜 억제제 (예를 들어, PS341); 보르테조밐 (벨카데(VELCADE)<sup>®</sup>); CCI-779; 티피파르닙 (R11577); 오라페닙, ABT510; Bcl-2 억제제, 예컨대 오블리머센 나트륨 (게나센스(GENASENSE)<sup>®</sup>); 픽산트론; EGFR 억제제; 티로신 키나제 억제제; 세린-트레오닌 키나제 억제제, 예컨대 라파마이신 (시롤리무스, 라파문(RAPAMUNE)<sup>®</sup>); 파르네실트랜스퍼라제 억제제, 예컨대 로나파르닙 (SCH 6636, 사라사르(SARASAR)<sup>™</sup>); 및 상기 임의의 작용제의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체; 뿐만 아니라 2종 이상의 상기 작용제의 조합물, 예컨대 CHOP (시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴 및 프레드니솔론의 조합 요법에 대한 약어) 및 FOLFOX (5-FU 및 류코보린과 조합된 옥살리플라틴 (엘록사틴<sup>™</sup>)을 이용한 치료 처방에 대한 약어), 및 상기 임의의 작용제의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체; 뿐만 아니라 2종 이상의 상기 작용제의 조합물을 포함한다.

[0072] 본원에 정의된 바와 같은 화학요법제는 암의 성장을 촉진할 수 있는 호르몬의 효과를 조절, 감소, 차단 또는 억제하는 작용을 하는 "항호르몬 작용제" 또는 "내분비 치료제"를 포함한다. 이들은 그 자체가 호르몬일 수 있고, 항에스트로젠 및 선택적인 에스트로젠 수용체 조절제 (SERM), 예컨대, 예를 들어 타목시펜 (놀바텍스 (NOLVADEX)<sup>®</sup> 타목시펜 포함), 탈록시펜, 드롤록시펜, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤, 및 파레스톤(FARESTON)·톨레미펜; 부신에서 에스트로젠 생성을 조절하는 효소 아로마타제를 억제하는 아로마타제 억제제, 예컨대, 예를 들어 4(5)-이미다졸, 아미노글루테티미드, 메가세(MEGASE)<sup>®</sup> 메게스트롤 아세테이트, 아로마신(AROMASIN)<sup>®</sup> 액세메스탄, 포르메스타니, 파드로졸, 리비소르(RIVISOR)<sup>®</sup> 보로졸, 페마라(FEMARA)<sup>®</sup> 레트로졸, 및 아리미덱스(ARIMIDEX)<sup>®</sup> 아나스트로졸; 및 항-안드로젠, 예컨대 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 류프롤리드 및 고세렐린; 뿐만 아니라 트록사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히 이상 세포 증식에 연관된 신호전달 경로 중의 유전자의 발현을 억제하는 것, 예컨대, 예를 들어 PKC-알파, Raf 및 H-Ras; 리보자임, 예컨대 VEGF 발현 억제제 (예를 들어, 안지오자임(ANGIOZYME)<sup>®</sup> 리보자임) 및 HER2 발현 억제제; 백신, 예컨대 유전자 요법 백신, 예를 들어 알로벡틴<sup>®</sup> 백신, 류벡틴<sup>®</sup> 백신, 및 백신<sup>®</sup> 백신; 프로류킨(PROLEUKIN)<sup>®</sup> rIL-2; 루르토테칸<sup>®</sup> 토포이소머라제 1 억제제; 아바렐릭스<sup>®</sup> rmRH; 비노렐빈 및 에스페라미신 (미국 특허 번호 4,675,187 참조), 및 상기 임의의 작용제의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체; 뿐만 아니라 2종 이상의 상기 작용제의 조합물을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0073] 본원에 사용된 "성장 억제제"는 시험관내 또는 생체내에서 세포의 성장을 억제하는 화합물 또는 조성물을 나타낸다. 한 실시양태에서, 성장 억제제는 항체가 결합하는 항원을 발현하는 세포의 증식을 방지 또는 감소시키는 성장 억제 항체이다. 또 다른 실시양태에서, 성장 억제제는 S기에서 세포의 백분율을 유의하게 감소시키는 것일 수 있다. 성장 억제제의 예는 세포 주기 진행을 (S기 이외의 다른 단계에) 차단하는 작용제, 예컨대 G1 정지 및 M기 정지를 유도하는 작용제를 포함한다. 통상적인 M기 차단제는 빈카 (빈크리스틴 및 빈블라스틴), 탁산 및 토포이소머라제 II 억제제, 예컨대 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드 및 블레오마이신을 포함한다. G1을 정지시키는 작용제, 예를 들어 DNA 알킬화제, 예컨대 타목시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로레타민, 시스플라틴, 메토티렉세이트, 5-플루오로우라실 및 ara-C는 S기 정지로까지 이어질 수도 있다.

추가 정보는 문헌 [Mendelsohn and Israel, eds., The Molecular Basis of Cancer, Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (W.B. Saunders, Philadelphia, 1995)] (예를 들어, p. 13)에서 찾아볼 수 있다. 탁산 (파클리탁셀 및 도세탁셀)은 둘 다 주목에서 유래된 항암 약물이다. 유럽형 주목에서 유래된 도세탁셀 (탁소테레<sup>®</sup>, 론-프랑 로리)은 파클리탁셀 (탁솔<sup>®</sup>, 브리스톨-마이어스 스킵)의 반합성 유사체이다. 파클리탁셀 및 도세탁셀은 튜블린 이량체로부터의 미세소관 어셈블리를 촉진하고, 탈중합을 방지함으로써 미세소관을 안정화시켜서 세포에서의 유사분열 억제제를 유발한다.

- [0074] "방사선 요법"은, 정상적으로 기능하거나 세포를 파괴시키는 능력이 완전히 제한되도록 세포에 대한 충분한 손상을 유도시키기 위해 지정된 감마선 또는 베타선을 사용하는 것을 나타낸다. 당업계에는 투여량 및 치료의 지속시간을 결정하는 수많은 방법이 공지되어 있음을 이해할 것이다. 전형적인 치료는 1회 투여로 제공되며, 전형적인 투여량은 하루당 10 내지 200 유닛 (그레이(Gray))의 범위이다.
- [0075] 치료 목적의 "포유동물"은 인간, 가축 및 농장 동물, 및 동물원, 스포츠 또는 애완 동물, 예컨대 개, 말, 고양이, 소 등을 비롯한, 포유동물로 분류되는 임의의 동물을 나타낸다. 바람직하게는, 포유동물은 인간이다.
- [0076] 용어 "항체"는 본원에서 가장 광범위한 의미로 사용되고, 구체적으로 모노클로날 항체 (전장 모노클로날 항체 포함), 폴리클로날 항체, 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체), 및 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한은 항체 단편을 포함한다.
- [0077] "단리된" 항체는 천연 환경 성분으로부터 확인되고 분리 및/또는 회수된 항체이다. 이것의 천연 환경의 오염물 성분은 항체의 연구, 진단 또는 치료 용도를 방해하는 물질이고, 여기에는 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질이 포함될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 (1) 예를 들어 로우리방법으로 측정시에 95 중량% 초과 항체로, 일부 실시양태에서는 99 중량% 초과로, (2) 예를 들어 스피닝 컵 서열분석기를 이용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개의 잔기를 얻기에 충분한 정도로, 또는 (3) 예를 들어 쿠마시 블루 또는 은 염색을 이용하여 환원 또는 비환원 조건하에 SDS-PAGE에 의해 균질한 것으로 나타날 정도로 정제하였다. 단리된 항체는 재조합 세포 내의 계내 항체를 포함하는데, 이는 항체의 천연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문이다. 그러나, 통상적으로, 단리된 항체는 적어도 1회의 정제 단계를 통해 제조될 것이다.
- [0078] "천연 항체"는 통상적으로 2개의 동일한 경쇄 (L) 및 2개의 동일한 중쇄 (H)로 구성된 약 150,000 달톤의 이중사량체 당단백질이다. 각각의 경쇄는 1개의 공유 디설피드 결합에 의해 중쇄에 연결되고, 디설피드 연결의 수는 상이한 이뮤노글로불린 이소형의 중쇄마다 달라진다. 또한, 각각의 중쇄 및 경쇄는 일정하게 이격된 쇠내 디설피드 브릿지를 갖는다. 각각의 중쇄는 한쪽 말단에 가변 도메인 (V<sub>H</sub>)을 갖고, 그 뒤에는 수많은 불변 도메인이 존재한다. 각각의 경쇄는 한쪽 말단에 가변 도메인 (V<sub>L</sub>)을 다른쪽 말단에 불변 도메인을 갖고; 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인과 정렬되며, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 정렬된다. 특정 아미노산 잔기는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 사이에 인터페이스를 형성한다고 여겨진다.
- [0079] 용어 "불변 도메인"은 항원 결합 부위를 함유하는 이뮤노글로불린의 다른 부분인 가변 도메인에 비해 보다 보존된 아미노산 서열을 갖는 이뮤노글로불린 분자의 일부를 나타낸다. 불변 도메인은 중쇄의 C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2 및 C<sub>H</sub>3 도메인 (집합적으로, CH) 및 경쇄의 CHL (또는 CL) 도메인을 함유한다.
- [0080] 항체의 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체의 중쇄 또는 경쇄의 아미노-말단 도메인을 나타낸다. 중쇄의 가변 도메인은 "VH"로서 지칭될 수 있다. 경쇄의 가변 도메인은 "VL"로서 지칭될 수 있다. 이들 도메인은 일반적으로 항체의 가장 가변적인 부분이고, 항원-결합 부위를 함유한다.
- [0081] 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 부분들이 항체들 사이에서 광범위한 서열 상이성을 나타낸다는 사실을 나타내고, 각각의 특정 항체의 특정 항원에 대한 결합 및 특이성에서 사용된다. 그러나, 가변성이 항체 가변 도메인 전반에 걸쳐 고르게 분포되어 있는 것은 아니다. 이것은 경쇄 가변 도메인과 중쇄 가변 도메인 둘 다에서 초가변 영역 (HVR)이라 불리는 3개의 절편에 집중되어 있다. 가변 도메인의 보다 고도로 보존된 부분은 프레임 워크 영역 (FR)이라 불린다. 천연 중쇄 및 경쇄 각각의 가변 도메인은 주로 베타-시트 입체형태를 취하며 3개의 HVR에 의해 연결되어 있는 4개의 FR 영역을 포함하는데, 이것은 베타-시트 구조를 연결하고, 일부 경우에는 상기 베타-시트 구조의 일부를 형성하는 루프를 형성한다. 각 쇠에서의 HVR들은 서로 FR 영역에 의해 근접하게 유지되고, 다른 쇠로부터의 HVR과 함께 항체의 항원 결합 부위 형성에 기여한다 (문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health,

Bethesda, MD (1991)] 참조). 불변 도메인은 항체를 항원에 결합시키는데는 직접 관여하지 않지만, 항체 의존성 세포 독성에서의 항체 참여와 같은 다양한 이펙터 기능을 나타낸다.

- [0082] 임의의 척추동물 종의 항체 (이뮤노글로불린)의 "경쇄"는 그의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기초로 하여 카파( $\kappa$ ) 및 람다( $\lambda$ )라고 불리는 2개의 분명하게 구별되는 유형 중 하나로 배정될 수 있다.
- [0083] 본원에 사용된 용어 IgG "이소형" 또는 "서브클래스"는 그의 불변 영역의 화학적 및 항원성 특징으로 정의되는 임의의 서브클래스의 이뮤노글로불린을 의도한다.
- [0084] 중쇄 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 항체 (이뮤노글로불린)는 상이한 클래스로 배정될 수 있다. 5가지 주요 클래스의 이뮤노글로불린: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재하고, 이중 몇 가지는 서브클래스 (이소형), 예를 들어 IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub>, 및 IgA<sub>2</sub>로 추가로 나뉠 수 있다. 상이한 클래스의 이뮤노글로불린에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  및  $\mu$ 로 불린다. 상이한 클래스의 이뮤노글로불린의 서브유닛 구조 및 3차원 형태는 주지되어 있고, 일반적으로 예를 들어 문헌 [Abbas et al. Cellular and Mol. Immunology, 4th ed. (W.B. Saunders, Co., 2000)]에 기재되어 있다. 항체는 항체 및 하나 이상의 다른 단백질 또는 펩티드의 공유 또는 비공유 회합에 의해 형성되는, 더 큰 용합 분자의 일부일 수 있다.
- [0085] 용어 "전장 항체", "무손상 항체" 및 "온전한 항체"는 본원에서 구별없이 사용되며, 하기 정의된 바와 같은 항체 단편이 아니라 실질적으로 무손상인 형태의 항체를 나타낸다. 이 용어는 특히 Fc 영역을 함유하는 중쇄를 갖는 항체를 나타낸다.
- [0086] 본원의 목적상, "네이키드 항체"는 세포독성 모이어티 또는 방사성표지와 접합되지 않은 항체이다.
- [0087] "항체 단편"은 바람직하게는 항원 결합 영역을 포함하는 무손상 항체의 일부를 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> 및 Fv 단편, 디아바디, 선형 항체, 단일쇄 항체 분자, 및 항체 단편들로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.
- [0088] 항체를 과파인으로 소화시키면 "Fab" 단편이라 불리는 2개의 동일한 항원 결합 단편 (각각 단일 항원-결합 부위를 가짐) 및 나머지 "Fc" 단편 (이러한 명칭은 용이하게 결정화되는 능력을 반영함)이 생성된다. 펩신 처리하면, 2개의 항원-결합 부위를 갖고 항원과 여전히 가교 연결될 수 있는 F(ab')<sub>2</sub> 단편이 생성된다.
- [0089] "Fv"는 완전한 항원-결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 한 실시양태에서, 2-쇄 Fv 종은 1개의 중쇄 및 1개의 경쇄 가변 도메인이 단단하게 비공유 회합된 이량체로 이루어진다. 단일쇄 Fv (scFv) 종에서, 1개의 중쇄 및 1개의 경쇄 가변 도메인은 경쇄 및 중쇄가 2-쇄 Fv 종에서와 유사한 "이량체" 구조로 회합할 수 있도록 가요성 펩티드 링커에 의해 공유 결합에 의해 연결될 수 있다. 이러한 형태에서, 각 가변 도메인의 3개의 HVR은 상호작용하여 VH-VL 이량체의 표면 상에 항원 결합 부위를 규정한다. 전체적으로, 6개의 HVR이 항체에 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 3개의 HVR만을 포함하는 Fv의 절반)일지라도 전체 결합 부위보다 친화도가 낮은 하지만 항원을 인식하고 결합하는 능력을 갖는다.
- [0090] Fab 단편은 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 함유하고, 또한 경쇄의 불변 도메인과 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에 수개의 잔기가 부가되었다는 점에서 Fab 단편과 상이하다. 본원에서, Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)에 유리 티올 기를 보유하는 Fab'에 대한 명칭이다. F(ab')<sub>2</sub> 항체 단편은 원래 Fab' 단편들 사이에 힌지 시스테인을 갖는, Fab' 단편들의 쌍으로서 생성되었다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링이 또한 공지되어 있다.
- [0091] "단일쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 단일 폴리펩티드 쇠 내에 존재하는, 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함한다. 일반적으로, scFv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합을 위한 바람직한 구조를 형성할 수 있도록 하는, VH 도메인과 VL 도메인 사이의 폴리펩티드 링커를 더 포함한다. scFv의 검토투를 위해, 예를 들어 문헌 [Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315]을 참조한다.
- [0092] 용어 "디아바디"는 동일 폴리펩티드 쇠 내에서 경쇄 가변 도메인 (VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (VH) (VH-VL)을 포함하는, 2개의 항원-결합 부위를 갖는 항체 단편을 나타낸다. 동일 쇠 상의 2개의 도메인 사이에서 쌍 형성을 허용하기에는 지나치게 짧은 링커를 사용함으로써, 상기 도메인은 또 다른 쇠의 상보적 도메인과 쌍을 형성하게 되어 2개의 항원-결합 부위를 생성하게 된다. 디아바디는 2가 또는 이중특이적일 수 있다. 디아바디

는, 예를 들어 EP 404,097; WO 1993/01161; 문헌 [Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)]; 및 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)]에 보다 상세하게 기재되어 있다. 트리아바디 및 테트라바디 역시 문헌 [Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)]에 기재되어 있다.

[0093] 본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 동종인 항체 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하며, 즉, 이 집단을 구성하는 개별 항체는 소량으로 존재할 수 있는 가능한 돌연변이, 예를 들어 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 따라서, 수식어구 "모노클로날"은 항체의 특징을 별개의 항체의 혼합물이 아닌 것으로 나타낸다. 특정 실시양태에서, 이러한 모노클로날 항체는 전형적으로 표적에 결합하는 폴리펩티드 서열을 포함하는 항체를 포함하고, 표적 결합 폴리펩티드 서열은 복수개의 폴리펩티드 서열로부터 단일 표적 결합 폴리펩티드 서열의 선택을 포함하는 과정에 의해 수득하였다. 예를 들어, 선택 과정은 복수개의 클론, 예컨대 하이브리도마 클론, 파지 클론 또는 재조합 DNA 클론의 풀로부터 특징적인 클론을 선택하는 것일 수 있다. 선택된 표적 결합 서열은 예를 들어 표적에 대한 친화도 개선, 표적 결합 서열의 인간화, 세포 배양물 중 그의 생성 개선, 생체내에서의 그의 면역원성 감소, 다중특이적 항체의 생성 등을 위해 추가로 변경될 수 있고, 변경된 표적 결합 서열을 포함하는 항체도 본 발명의 모노클로날 항체임을 이해해야 한다. 전형적으로 상이한 결정자 (에피토프)에 대한 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 대조적으로, 모노클로날 항체 제제의 각각의 모노클로날 항체는 항원상의 단결정자에 대한 것이다. 모노클로날 항체 제제는 이것의 특이성에 더하여 전형적으로 다른 이뮤노글로불린에 의해 오염되지 않았다는 점에서 유익하다.

[0094] 수식어구 "모노클로날"은 항체의 특징을 실질적으로 동종인 항체 집단으로부터 수득된 것으로 나타내며, 임의의 특정한 방법을 통한 항체 생성이 필요하다는 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들어, 본 발명에 따라서 사용하고자 하는 모노클로날 항체는 예를 들어 하이브리도마 방법 (예를 들어, 문헌 [Kohler and Milstein, Nature, 256:495-97 (1975)]; [Hongo et al., Hybridoma, 14 (3): 253-260 (1995)], [Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988)]; [Hammerling et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)]), 재조합 DNA 방법 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567 참조), 파지-디스플레이 기술 (예를 들어, 문헌 [Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991)]; [Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992)]; [Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004)]; [Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004)]; [Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004)]; 및 [Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132(2004)] 참조), 및 인간 이뮤노글로불린 로커스 또는 인간 이뮤노글로불린 서열을 코딩하는 유전자의 일부 또는 전부를 갖는 동물에서 인간 또는 인간-유사 항체를 생성하는 기술 (예를 들어, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; 문헌 [Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551 (1993)]; [Jakobovits et al., Nature 362: 255-258 (1993)]; [Bruggemann et al., Year in Immunol. 7:33 (1993)]; 미국 특허 번호 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 및 5,661,016; 문헌 [Marks et al., Bio/Technology 10: 779-783 (1992)]; [Lonberg et al., Nature 368: 856-859 (1994)]; [Morrison, Nature 368: 812-813 (1994)]; [Fishwild et al., Nature Biotechnol. 14: 845-851 (1996)]; [Neuberger, Nature Biotechnol. 14: 826 (1996)]; 및 [Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995)] 참조)를 포함하는 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다.

[0095] 구체적으로, 본원에서 모노클로날 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 종으로부터 유래되거나 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이고,쇄(들)의 나머지 부분은 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라" 항체, 뿐만 아니라 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한은 이러한 항체의 단편을 포함한다 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567; 및 문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)] 참조). 키메라 항체는 항체의 항원 결합 영역이 예를 들어 마카쿠 원숭이를 관심 항원으로 면역화하는 것에 의해 생성된 항체로부터 유래된 프리마티즈드(PRIMATIZED)<sup>®</sup> 항체를 포함한다.

[0096] 비인간 (예를 들어, 무린) 항체의 "인간화" 형태는 비인간 이뮤노글로불린에서 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 한 실시양태에서, 인간화 항체는 수용자의 HVR로부터의 잔기가 원하는 특이성, 친화성 및/또는 능력을 갖는 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류와 같은 비인간 종 (공여자 항체)의 HVR의 잔기로 대체된 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)이다. 일부 경우에, 인간 이뮤노글로불린의 FR 잔기는 상응하는 비인간 잔기로 대체된다. 추가로, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서는 발견되지 않는 잔기를 포함할 수도 있다. 이러한 변형은 항체 성능이 추가로 개선되도록 이루어질 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 하나, 전형적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모

든 초가변 루프는 비인간 이뮤노글로불린의 그것에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 이뮤노글로불린 서열의 그것이다. 또한, 인간화 항체는 임의로 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc) 중 적어도 일부, 전형적으로는 인간 이뮤노글로불린의 적어도 일부를 포함할 것이다. 보다 상세한 내용에 대해 예를 들어 문헌 [Jones et al., Nature 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988)]; 및 [Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)]을 참조한다. 또한, 예를 들어 문헌 [Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998)]; [Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995)]; [Hurlle and Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994)]; 및 미국 특허 번호 6,982,321 및 7,087,409를 참조한다.

[0097] "인간 항체"는 인간에 의해 생성된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 갖고/거나 본원에 개시된 바와 같은 인간 항체 제조 기술 중 임의의 것을 이용하여 제조된 것이다. 인간 항체의 이러한 정의에서 비인간 항원 결합 잔기를 포함하는 인간화 항체는 명확하게 제외된다. 인간 항체는 과지 디스플레이 라이브러리를 비롯한 당업계에서 공지된 다양한 기술을 사용하여 생성할 수 있다. 문헌 [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991)]; [Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)]. 또한, 문헌 [Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985)]; [Boerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)]에 기재된 방법도 인간 모노클로날 항체의 제조에 이용가능하다. 또한 문헌 [van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol., 5: 368-74 (2001)]을 참조한다. 인간 항체는 항원 시험접종에 반응하여 이러한 항체를 생성하도록 변형되었으나 내인성 로커스는 무력화시킨 트랜스제닉 동물, 예를 들어 면역화된 제노마우스에게 항원을 투여하여 제조될 수 있다 (예를 들어, 제노마우스(XENOMOUSE)<sup>TM</sup> 기술에 관한 미국 특허 번호 6,075,181 및 6,150,584 참조). 또한, 인간 B-세포 하이브리도마 기술을 통해 생성된 인간 항체에 관해서는 예를 들어 문헌 [Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)]을 참조한다.

[0098] "중-의존성 항체"는 제1 포유동물 종으로부터의 항원에 대한 결합 친화도가 제2 포유동물 종으로부터의 상기 항원의 상동체에 대한 결합 친화도 보다 더 강한 항체이다. 통상적으로, 중-의존성 항체는 인간 항원에 "특이적으로 결합" (예를 들어, 결합 친화도 (Kd) 값이 약  $1 \times 10^{-7}$  M 이하, 바람직하게는 약  $1 \times 10^{-8}$  M 이하, 바람직하게는 약  $1 \times 10^{-9}$  M 이하)하지만, 제2의 비인간 포유동물 종으로부터의 항원의 상동체에 대한 결합 친화도는 인간 항원에 대한 결합 친화도보다 적어도 약 50배 또는 적어도 약 500배 또는 적어도 약 1000배 더 약하다. 중-의존성 항체는 상기 정의된 바와 같은 임의의 다양한 유형의 항체일 수 있으나, 바람직하게는 인간화 또는 인간 항체이다.

[0099] 용어 "초가변 영역", "HVR" 또는 "HV"가 본원에 사용된 경우, 이것은 서열에서 초가변이고/거나 구조적으로 한정된 루프를 형성하는 항체 가변 도메인의 영역을 나타낸다. 일반적으로, 항체는 6개의 HVR; VH 내에 3개 (H1, H2, H3) 및 VL 내에 3개 (L1, L2, L3)를 포함한다. 천연 항체에서, H3 및 L3은 6개의 HVR 중에서 가장 높은 다양성을 나타내고, 특히 H3은 항체에 정밀한 특이성을 부여하는데 특유의 역할을 수행한다고 여겨진다. 예를 들어, 문헌 [Xu et al., Immunity 13:37-45 (2000)]; [Johnson and Wu, in Methods in Molecular Biology 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)]을 참조한다. 실제로, 중쇄만으로 이루어진 자연 발생 낙타류 항체는 경쇄의 부재하에 기능적이고 안정하다. 예를 들어, 문헌 [Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-448 (1993)]; [Sheriff et al., Nature Struct. Biol. 3:733-736 (1996)]을 참조한다.

[0100] 많은 HVR 설명이 사용되고 있고 본원에 포함된다. 카바트 상보성 결정 영역 (CDR)은 서열 가변성을 기초로 하며, 가장 흔히 사용된다 (문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]). 대신, 코티아는 구조적 루프의 위치를 나타낸다 (문헌 [Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)]). AbM HVR은 카바트 HVR과 코티아 구조적 루프 사이의 절충안을 나타내고, 옥스포드 몰레큘라(Oxford Molecular)의 AbM 항체 모델링 소프트웨어에 의해 사용된다. "접촉" HVR은 이용가능한 복합 결정 구조의 분석을 기초로 한다. 이들 각각의 HVR로부터의 잔기를 아래 나타낸다.

루프 카바트	AbM	코티아	접촉
L1 L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2 L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3 L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1 H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(카바트 넘버링)			
H1 H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(코티아 넘버링)			
H2 H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3 H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0101]

[0102]

HVR은 다음과 같이 "확장된 HVR"을 포함할 수 있다: VL에서 24-36 또는 24-34 (L1), 46-56 또는 50-56 (L2) 및 89-97 또는 89-96 (L3) 및 VH에서 26-35 (H1), 50-65 또는 49-65 (H2) 및 93-102, 94-102, 또는 95-102 (H3). 가변 도메인 잔기는 각각의 상기 정의에 대해 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에 따라 넘버링된다.

[0103]

"프레임워크" 또는 "FR" 잔기는 본원에 정의된 바와 같은 HVR 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다.

[0104]

용어 "카바트에서와 같은 가변 도메인 잔기 넘버링" 또는 "카바트에서와 같은 아미노산 위치 넘버링" 및 이들의 변형은 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에서 항체 캄필레이션의 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 사용된 넘버링 시스템을 나타낸다. 이 넘버링 시스템을 사용하여, 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 HVR의 단축 또는 이들로의 삽입에 상응하는 보다 적은 또는 추가의 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 H2의 잔기 52 후에 단일 아미노산 삽입 (카바트에 따른 잔기 52a) 및 중쇄 FR 잔기 82 후에 삽입된 잔기 (예를 들어, 카바트에 따른 잔기 82a, 82b 및 82c 등)를 포함할 수 있다. 잔기의 카바트 넘버링은 항체 서열의 상동성 영역에서 "표준" 카바트 넘버링 서열과 정렬함으로써 주어진 항체에 대하여 결정할 수 있다.

[0105]

카바트 넘버링 시스템은 일반적으로 가변 도메인 내의 잔기 (대략 경쇄의 잔기 1-107 및 중쇄의 잔기 1-113)을 언급하는 경우에 사용된다 (예를 들어, 문헌 [Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]). "EU 넘버링 시스템" 또는 "EU 지수"는 일반적으로 이뮤노글로불린 중쇄 불변 영역 내의 잔기를 지칭할 때 사용된다 (예를 들어, 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에 보고된 EU 지수). "카바트에서와 같은 EU 지수"는 인간 IgG1 EU 항체의 잔기 넘버링을 나타낸다.

[0106]

표현 "선형 항체"는 문헌 [Zapata et al. (1995 Protein Eng, 8(10):1057-1062)]에 기재된 항체를 나타낸다. 간략하게, 이들 항체는 상보적 경쇄 폴리펩티드와 함께 한 쌍의 항원 결합 영역을 형성하는 한 쌍의 병렬식 Fd 절편 (VH-CH1-VH-CH1)을 포함한다. 선형 항체는 이중특이적 또는 단일특이적일 수 있다.

[0107]

본원에 사용된 바와 같은 "라이브리리"는 복수 개의 항체 또는 항체 단편 서열 (예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드), 또는 이들 서열을 코딩하는 핵산을 나타내는데, 이 서열은 본 발명의 방법에 따라서 이들 서열 내로 도입되는 변이체 아미노산의 조합에 있어서 상이하다.

[0108]

"파지 디스플레이"는 변이체 폴리펩티드를 파지 (예를 들어 필라멘트형 파지) 입자의 표면 상에 외피 단백질의 적어도 일부와의 융합 단백질로서 디스플레이하는 기술이다. 파지 디스플레이의 유용성은 무작위화 단백질 변이체의 대형 라이브러리를 표적 항원과 고 친화도로 결합하는 서열에 대해 신속하고 효율적으로 분류할 수 있다는 점에 있다. 파지 상의 펩티드 및 단백질 라이브러리의 디스플레이는 특이적 결합 특성을 갖는 것에 대해 수 백만개의 폴리펩티드를 스크리닝하는데 사용될 수 있다. 다가 파지 디스플레이 방법은 필라멘트형 파지의 유전자 III 또는 유전자 VIII과의 융합을 통하여 소형 무작위 펩티드 및 소형 단백질을 디스플레이하기 위해 사용되어 왔다. 문헌 [Wells and Lowman (1992) Curr. Opin. Struct. Biol. 3:355-362] 및 여기에 인용된 참고문헌을 참조한다. 1가 파지 디스플레이에서는, 단백질 또는 펩티드 라이브러리를 유전자 III 또는 그의 일부와 융합시키고, 야생형 유전자 III 단백질의 존재하에 낮은 수준으로 발현시켜 파지 입자가 상기 융합 단백질의 1개 카피를 디스플레이하거나 전혀 디스플레이하지 않도록 한다. 결합력 효과는 다가 파지에 비해 감소되어, 분류가 내인성 리간드 친화도에 기초하고, DNA 조작을 간소화시키는 파지미드 벡터가 사용된다. 문헌 [Lowman and Wells (1991) Methods: A companion to Methods in Enzymology 3:205-0216].

[0109] "과지미드"는 박테리아 복제 기점, 예를 들어 CoIE1, 및 박테리오파지의 유전자간 영역의 카피를 갖는 플라스미드 벡터이다. 과지미드는 필라멘트형 박테리오파지 및 람다형 박테리오파지를 비롯한 임의의 공지된 박테리오파지에서 사용될 수 있다. 이러한 플라스미드는 또한 일반적으로 항생제 내성에 대한 선택 마커를 함유할 것이다. 이들 벡터 내로 클로닝된 DNA 절편은 플라스미드로서 증식될 수 있다. 이들 벡터를 보유하는 세포에 과지 입자의 생성에 필요한 모든 유전자가 제공되는 경우, 플라스미드의 복제 방식이 롤링 서클 복제로 변화되어 플라스미드 DNA 및 패키징 과지 입자의 1개 가닥 카피를 생성시킨다. 과지미드는 감염성 또는 비감염성 과지 입자를 형성할 수 있다. 상기 용어는, 유전자 융합체로서 이중 폴리펩티드 유전자에 연결된 과지 외피 단백질 유전자 또는 그의 단편을 함유하여 상기 이중 폴리펩티드가 과지 입자의 표면에 디스플레이 되도록 하는 과지미드를 포함한다.

[0110] II. 본 발명의 수행 방식

[0111] 본 발명은 본원에서 항체를 포함하는 안정한 수성 제제에 관한 것이다. 제제 내의 항체는 항체의 생성을 위하여 당업계에서 이용가능한 기술, 하기 섹션에 보다 상세히 기재되어 있는 예시적인 방법을 이용하여 제조된다.

[0112] 항체는 관심 항원에 대해 지정된다. 바람직하게는, 항원은 생물학적으로 중요한 폴리펩티드이고, 장애를 앓는 포유동물에게 항체를 투여하는 것은 이러한 포유동물에서 치료 이점을 가져올 수 있다. 그러나, 비폴리펩티드 항원에 대해 지시된 항체 또한 고려된다.

[0113] 항원이 폴리펩티드인 경우, 이는 막횡단 분자 (예를 들어 수용체) 또는 리간드, 예컨대 성장 인자일 수 있다. 예시적 항원은 분자, 예컨대 혈관 내피 성장 인자 (VEGF); ox-LDL; ox-ApoB100; 레닌; 인간 성장 호르몬 및 소 성장 호르몬을 포함하는 성장 호르몬; 성장 호르몬 방출 인자; 부갑상선 호르몬; 갑상선 자극 호르몬; 지단백질; 알파-1-안티트립신; 인슐린 A-쇄; 인슐린 B-쇄; 프로인슐린; 여포 자극 호르몬; 칼시토닌; 황체형성 호르몬; 글루카곤; 옹고 인자, 예컨대 인자 VIIIC, 인자 IX, 조직 인자 및 폰 빌레브란트 인자; 항-옹고 인자, 예컨대 단백질 C; 심방 나트륨이노 인자; 폐 계면활성제; 플라스미노겐 활성화제, 예컨대 우로키나제 또는 인간 소변 또는 조직-유형 플라스미노겐 활성화제 (t-PA); 붐베신; 트롬빈; 조혈 성장 인자; 종양 괴사 인자-알파 및 -베타; 엔케팔리나제; RANTES (정상적으로 발현 및 분비된 T-세포 활성화에 대한 조절); 인간 대식세포 염증성 단백질 (MIP-1-알파); 혈청 알부민, 예컨대 인간 혈청 알부민; 필러-억제 물질; 텔락신 A-쇄; 텔락신 B-쇄; 프로텔락신; 마우스 고키나도트로핀-관련 펩티드; 미생물 단백질, 예컨대 베타-락타마제; DNase; IgE; 세포독성 T-림프구 관련 항원 (CTLA), 예컨대 CTLA-4; 인히빈; 액티빈; 호르몬 또는 성장 인자에 대한 수용체; 단백질 A 또는 D; 류마티스 인자; 신경영양 인자, 예컨대 골-유래 신경영양 인자 (BDNF), 뉴로트로핀-3, -4, -5, 또는 -6 (NT-3, NT-4, NT-5 또는 NT-6), 또는 신경 성장 인자, 예컨대 NGF-β; 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF); 섬유모세포 성장 인자, 예컨대 aFGF 및 bFGF; 표피 성장 인자 (EGF); 형질전환 성장 인자 (TGF), 예컨대 TGF-알파 및 TGF-베타 (TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4 또는 TGF-β5 포함); 인슐린-유사 성장 인자-I 및 -II (IGF-I 및 IGF-II); des(1-3)-IGF-I (뇌 IGF-I), 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질; CD 단백질, 예컨대 CD3, CD4, CD8, CD19 및 CD20; 에리트로포이에틴; 골유도성 인자; 면역독소; 골 형태형성 단백질 (BMP); 인터페론, 예컨대 인터페론-알파, -베타, 및 -감마; 콜로니 자극 인자 (CSF), 예를 들어 M-CSF, GM-CSF, 및 G-CSF; 인터루킨 (IL), 예를 들어 IL-1 내지 IL-10; 과산화물 디스무타제; T-세포 수용체; 표면 막 단백질; 붕괴 촉진 인자; 바이러스 항원, 예컨대 예를 들어 AIDS 외피의 일부; 운송 단백질; 귀소 수용체; 어드레신; 조절 단백질; 인테그린, 예컨대 CD11a, CD11b, CD11c, CD18, ICAM, VLA-4 및 VCAM; 종양 관련 항원, 예컨대 HER2, HER3 또는 HER4 수용체; 및 상기 열거된 폴리펩티드들 중 임의의 것의 단편을 포함한다.

[0114] 본 발명의 특정 실시양태에서, 본 발명에 포함된 항체에 대한 분자 표적은 VEGF를 포함한다. 한 실시양태에서, 본원에서 항체는 인간 VEGF에 결합하는 것이다.

[0115] A. 제제의 제조

[0116] 관심 항체의 제조 후 (예를 들어, 본원에 개시된 바와 같이 제제화될 수 있는 항체를 생성하기 위한 기술은 하기 상세히 설명되어 있고, 당업계에 공지되어 있음), 이를 포함하는 제약 제제를 제조한다. 특정 실시양태에서, 제제화될 항체는 사전 동결건조되지 않았고, 본원의 관심 제제는 수성 제제이다. 특정 실시양태에서, 항체는 전장 항체이다. 한 실시양태에서, 제제 내의 항체는 항체 단편, 예컨대 F(ab')<sub>2</sub>이고, 이러한 경우 전장 항체에 대해 발생할 수 없는 문제 (예컨대, Fab에 대한 항체의 클리핑)를 처리할 필요가 있을 수 있다. 제제 중에 존재하는 항체의 치료 유효량은, 예를 들어 바람직한 용량 부피 및 투여 방식을 고려하여 결정된다. 약 0.1 mg/ml 내지 약 250 mg/ml, 또는 약 10 mg/ml 내지 약 200 mg/ml 또는 약 50 mg/ml 내지 약 175 mg/ml가

제제 중 예시적인 항체 농도이다.

[0117] pH-완충 용액 중에 항체를 포함하는 수성 제제가 제조된다. 본 발명의 완충제는 약 4.0 내지 약 6.5 범위의 pH를 갖는다. 특정 실시양태에서, pH는 pH 4.25 내지 6.25 범위, 또는 pH 4.5 내지 6.0 범위, 또는 pH 4.75 내지 5.75 범위, 또는 pH 5.0 내지 5.5 범위, 또는 pH 5.1 내지 5.4 범위이다. 본 발명의 특정 실시양태에서, 제제는 5.2 또는 약 5.2의 pH를 갖는다. 이 범위 내에서 pH를 제어할 완충제의 예는 아세테이트 (예를 들어, 아르기닌 아세테이트 또는 나트륨 아세테이트), 숙시네이트 (예컨대, 아르기닌 숙시네이트 또는 나트륨 숙시네이트), 글루코네이트, 시트레이트 및 다른 유기산 완충제 및 이들의 조합을 포함한다. 완충제 농도는 예를 들어 완충제 및 제제의 원하는 등장성에 따라 약 1 mM 내지 약 600 mM일 수 있다. 특정 실시양태에서, 완충제는 50 mM 내지 500 mM, 75 mM 내지 400 mM, 100 mM 내지 250 mM, 120 mM 내지 240 mM, 150 mM 내지 225 mM, 또는 175 mM 내지 210 mM의 농도의 아르기닌을 함유한다. 본 발명의 특정 실시양태에서, 완충제는 200 mM 또는 약 200 mM의 농도의 아르기닌을 함유한다. 한 실시양태에서, 완충제는 pH 5.2의 아르기닌 아세테이트 (예를 들어, 200 mM 또는 약 200 mM)이다.

[0118] 계면활성제가 항체 제제에 임의로 첨가될 수 있다. 예시적인 계면활성제는 비이온성 계면활성제, 예컨대 폴리소르베이트 (예를 들어, 폴리소르베이트 20, 80 등) 또는 폴록사머 (예를 들어, 폴록사머 188)를 포함한다. 계면활성제는 제제화된 항체의 응집을 감소시키고/거나 제제 중에서 미립자의 형성을 최소화시키고/거나 흡착을 감소시키는 양으로 첨가된다. 예를 들어, 계면활성제는 약 0.001% 내지 약 0.5%, 약 0.005% 내지 약 0.2%, 약 0.01% 내지 약 0.1%, 또는 약 0.02% 내지 약 0.06%, 또는 약 0.03% 내지 약 0.05%의 양으로 제제 중에 존재할 수 있다. 특정 실시양태에서, 계면활성제는 0.04% 또는 약 0.04%의 양으로 제제 중에 존재한다. 한 실시양태에서, 제제는 계면활성제를 포함하지 않는다.

[0119] 한 실시양태에서, 제제는 상기-확인된 작용제 (예를 들어, 항체, 완충제 및/또는 계면활성제)를 함유하고, 본질적으로 하나 이상의 보존제, 예컨대 벤질 알콜, 페놀, m-크레졸, 클로로부탄올 및 벤제토늄 Cl을 함유하지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 보존제는, 특히 제제가 다중투여 제제인 경우에 제제 내에 포함될 수 있다. 보존제의 농도는 약 0.1% 내지 약 2%, 바람직하게는 약 0.5% 내지 약 1% 범위일 수 있다. 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 기재된 바와 같은, 하나 이상의 다른 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제를 제제에 포함시킬 수 있는데, 단 이들은 제제의 원하는 특징에 불리한 영향을 미치지 않아야 한다. 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에 비독성이고, 여기에는 추가의 완충제; 공용매; 아스코르브산 및 메티오닌을 비롯한 항산화제; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA; 금속 착체 (예를 들어, Zn-단백질 착체); 생분해성 중합체, 예컨대 폴리에스테르; 및/또는 염-형성 반대이온이 포함된다. 본원에서 예시적 제약상 허용되는 담체는 또한 간질성 약물 분산제, 예컨대 가용성 중성-활성 히알루로니다제 당단백질 (sHASEGP), 예를 들어 인간 가용성 PH-20 히알루로니다제 당단백질, 예컨대 rHuPH20 (힐레넥스(HYLENEX)<sup>®</sup>, 백스터 인터내셔널, 인크.(Baxter International, Inc.))을 포함한다. 특정 예시적 sHASEGP 및 사용 방법 (rHuPH20 포함)은 미국 특허 공보 번호 2005/0260186 및 2006/0104968에 기재되어 있다. 한 측면에서, sHASEGP는 콘드로이티나제와 같은 하나 이상의 추가의 글리코사미노글리카나제와 조합된다.

[0120] 본원에서 킬레이터의 다양한 설명이 대개 EDTA에 중점을 두고 있지만, 다른 금속 이온 킬레이터 또한 본 발명에 포함된다는 것을 인지할 것이다. 금속 이온 킬레이터는 당업자에게 주지되어 있으며, 이는 아미노폴리카르복실레이트, EDTA (에틸렌디아민테트라아세트산), EGTA (에틸렌 글리콜-비스(베타-아미노에틸 에테르)-N,N,N',N'-테트라아세트산), NTA (니트릴로트리아세트산), EDDS (에틸렌 디아민 디숙시네이트), PDTA (1,3-프로필렌디아민테트라아세트산), DTPA (디에틸렌트리아민펜타아세트산), ADA (베타-알라닌디아세트산), MGCA (메틸글리신디아세트산) 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 추가로, 본원에서의 일부 실시양태는 포스포네이트/포스폰산 킬레이터를 포함한다.

[0121] 본원에서 제제는 또한 치료될 특정 적응증에 필요한 하나 초과인 단백질, 바람직하게는 다른 단백질에 유해한 영향을 미치지 않는 보완적 활성을 갖는 것을 함유할 수 있다. 예를 들어, 항체가 항-VEGF인 경우, 이는 또 다른 작용제 (예를 들어, 화학요법제 및 항신생물제, 및 항)와 조합될 수 있다.

[0122] 생체내 투여에 사용하고자 하는 제제는 멸균되어야 한다. 이는 제제의 제조 전에 또는 후에 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성된다.

[0123] B. 제제의 투여

- [0124] 제제는 공지된 방법, 예를 들어 볼루스로서 또는 일정 기간에 걸친 연속 주입에 의한 정맥내 투여, 근육내, 복강내, 뇌척수내, 피하, 관절내, 활액막내, 경막내, 경구, 국소 또는 흡입 경로에 의해, 항체로의 처리를 필요로 하는 포유동물, 바람직하게는 인간에게 투여된다. 한 실시양태에서, 제제는 정맥내 투여에 의해 포유동물에게 투여된다. 이러한 목적을 위하여, 제제는 예를 들어 시린지를 이용하여 또는 IV 라인을 통해 주사될 수 있다. 한 실시양태에서, 제제는 포유동물에게 피하 투여에 의해 투여된다.
- [0125] 항체의 적절한 투여량 ("치료 유효량")은, 예를 들어 치료되는 상태, 상태의 중증도 및 경과, 항체가 치료 또는 예방 목적으로 투여되는지의 여부, 선행 요법, 환자의 임상 병력 및 항체에 대한 반응, 사용되는 항체의 유형, 및 담당의의 판단에 따라 달라질 것이다. 항체는 적합하게는 환자에게 1회 또는 일련의 치료에 걸쳐서 투여되고, 환자에게 진단 이후 임의의 시점에 투여될 수 있다. 항체는 단독 치료로서, 또는 당해 상태의 치료에 유용한 다른 약물 또는 요법과 함께 투여될 수 있다.
- [0126] 일반적으로 제안되는 바와 같이, 투여되는 항체의 치료 유효량은 1회 투여이든 그 초과 횟수 투여이든 약 0.1 내지 약 50 mg/kg(모체 체중) 범위일 것이며, 사용되는 항체의 전형적 범위는 약 0.3 내지 약 20 mg/kg, 바람직하게는 약 0.3 내지 약 15 mg/kg이고, 예를 들어 매일 투여된다. 그러나, 다른 투여 처방이 유용할 수 있다. 한 실시양태에서, 길항제는 항-VEGF 항체로, 이는 매 1, 2, 3 또는 4주마다 약 100 또는 400 mg의 용량으로 투여되거나, 또는 매 1, 2, 3 또는 4주마다 약 1, 3, 5, 7.5, 10, 15 또는 20 mg/kg의 용량으로 투여된다. 상기 용량은 단일 용량으로서 또는 다중 용량 (예를 들어, 2 또는 3 용량)으로서 투여, 예컨대 주입될 수 있다. 상기 요법의 진행은 통상의 기술에 의해 용이하게 모니터링된다.
- [0127] C. 항체 제조
- [0128] (i) 항원 제조
- [0129] 가용성 항원 또는 그의 단편 (다른 분자에 임의로 접합됨)이 항체를 생성하기 위한 면역원으로 사용될 수 있다. 막형단 분자, 예컨대 수용체의 경우에는, 그의 단편 (예를 들어, 수용체의 세포외 도메인)이 면역원으로 사용될 수 있다. 대안적으로, 막형단 분자를 발현하는 세포가 면역원으로 사용될 수 있다. 이같은 세포는 천연 공급원 (예를 들어, 암 세포주)으로부터 유래될 수 있거나, 또는 막형단 분자를 발현하도록 재조합 기술에 의해 형질전환된 세포일 수 있다. 항체의 제조에 유용한 다른 항원 및 그의 형태가 당업자에게 명백할 것이다.
- [0130] (ii) 특정 항체-기반 방법
- [0131] 폴리클로날 항체는 관련 항원 및 아주반트의 다중 피하 (sc) 또는 복강내 (ip) 주사에 의해 동물에서 바람직하게 생성된다. 이관능성 또는 유도체화제, 예를 들어 말레이미도벤조일 술포숙신이미드 에스테르 (시스테인 잔기를 통한 접합), N-히드록시숙신이미드 (리신 잔기를 포함), 글루타르알데히드, 숙신산 무수물, SOCl<sub>2</sub>, 또는 R<sup>1</sup>N=C=NR (여기서, R 및 R<sup>1</sup>은 상이한 알킬 기입)을 사용하여, 면역화될 종에서 면역원성인 단백질, 예를 들어 키홀 림펫 헤모시아닌, 혈청 알부민, 소 티로글로불린 또는 대두 트립신 억제제에 관련 항원을 접합시키는 것이 유용할 수 있다.
- [0132] 예를 들어 단백질 또는 접합체 100 μg 또는 5 μg (각각, 토끼 또는 마우스의 경우)을 3 부피의 프로인트 완전 아주반트와 합하고, 상기 용액을 여러 부위에 피내 주사함으로써, 동물을 항원, 면역원성 접합체 또는 유도체에 대해 면역화한다. 1개월 후, 프로인트 완전 아주반트 내의 펩티드 또는 접합체를 원래 양의 1/5 내지 1/10로 여러 부위에 피하 주사하여 동물을 부스팅한다. 7 내지 14일 후, 동물에서 채혈하여, 혈청을 항체 역가에 대해 검정한다. 역가가 정체기에 도달할 때까지 동물을 부스팅한다. 바람직하게는, 상이한 단백질에 및/또는 상이한 가교제를 통해 접합된 동일한 항원의 접합체로 동물을 부스팅한다. 접합체는 또한 재조합 세포 배양물에서 단백질 융합체로서 제조될 수도 있다. 또한, 명반과 같은 응집제를 적합하게 사용하여 면역 반응을 증진시킨다.
- [0133] 본 발명의 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)]에 최초로 기재되고, 예를 들어 문헌 [Hongo et al., Hybridoma, 14 (3): 253-260 (1995)], [Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988)]; [Hammerling et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)], 및 인간-인간 하이브리도마에 관한 문헌 [Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006)]에 추가로 기재된 하이브리도마 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 추가의 방법은, 예를 들어 하이브리도마 세포주로부터의 모노클로날 인간 천연 IgM 항체의 생성에 관한 미국 특허 번호 7,189,826에 기재된 방법을 포함한다. 인간 하이브리도마 기술 (트리오마 기술)은 문헌

[Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005)] 및 [Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005)]에 기재되어 있다.

- [0134] 다양한 다른 하이브리도마 기술에 대해서는, 예를 들어 US 2006/258841; US 2006/183887 (완전 인간 항체), US 2006/059575; US 2005/287149; US 2005/100546; US 2005/026229; 및 미국 특허 번호 7,078,492 및 7,153,507을 참조한다. 하이브리도마 방법을 사용하여 모노클로날 항체를 생성하는 예시적인 프로토콜은 다음과 같이 설명된다. 한 실시양태에서, 마우스 또는 다른 적절한 숙주 동물, 예컨대 햄스터를 면역화시킴으로써, 면역화를 위해 사용되는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하거나 생성할 수 있는 림프구를 유도한다. 본 발명의 폴리펩티드 또는 그의 단편, 및 아주반트, 예컨대 모노포스포릴 지질 A (MPL)/트레할로스 디크리노미콜레이트 (TDM) (리비 이뮤노캠 리서치, 인크.(Ribi Immunochem. Research, Inc.), 몬타나주 해밀턴)의 다중 피하(sc) 또는 복강내(ip) 주사에 의해 동물에서 항체를 유도한다. 본 발명의 폴리펩티드 (예를 들어, 항원) 또는 그의 단편은 그 일부가 본원에서 추가로 기재되는 제조법 방법과 같은 당업계에 주지된 방법을 이용하여 제조할 수 있다. 면역화된 동물로부터의 혈청을 항-항원 항체에 대해 검정하고, 부스터 면역화를 임의로 투여한다. 항-항원 항체를 생성하는 동물로부터 림프구를 단리한다. 대안적으로, 림프구를 시험관내에서 면역화시킬 수 있다.
- [0135] 이어서, 림프구를 하이브리도마 세포를 형성하는데 적합한 융합제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 골수종 세포와 융합시킨다. 예를 들어, 문헌 [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)]을 참조한다. 효율적으로 융합하고, 선택된 항체-생성 세포에 의한 항체의 안정적인 고수준 생성을 지지하고, HAT 배지와 같은 배지에 민감한 골수종 세포가 사용될 수 있다. 예시적인 골수종 세포주에는 뮤린 골수종 세포주, 예컨대 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양 (솔크 인스티튜트 셀 디스트리뷰션 센터(Salk Institute Cell Distribution Center; 미국 캘리포니아주 샌디에고)로부터 입수가능), 및 SP-2 또는 X63-Ag8-653 세포 (아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection; 미국 메릴랜드주 록빌)으로부터 입수가능)로부터 유도된 것이 포함되나, 이에 제한되지 않는다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주 역시 인간 모노클로날 항체 생성과 관련하여 기재된 바 있다 (문헌 [Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984)]; [Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)]).
- [0136] 이와 같이 제조한 하이브리도마 세포는 적합한 배양 배지, 예를 들어 융합되지 않은 모 골수종 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 함유하는 배지에 접종하여 성장시킨다. 예를 들어, 모 골수종 세포에 하이포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT) 효소가 없는 경우, 하이브리도마용 배양 배지는 전형적으로 하이포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘을 포함할 것이며 (HAT 배지), 이러한 물질들은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 방지한다. 바람직하게는, 예를 들어 문헌 [Even et al., *Trends in Biotechnology*, 24(3), 105-108 (2006)]에 기재된 바와 같이, 태아 소 혈청과 같은 동물-유래 혈청의 사용을 감소시키기 위해서 혈청-비함유 하이브리도마 세포 배양 방법을 이용한다.
- [0137] 문헌 [Franek, *Trends in Monoclonal Antibody Research*, 111-122 (2005)]에는 하이브리도마 세포 배양의 생산성을 개선하기 위한 도구로서 올리고펩티드가 기재되어 있다. 특히, 표준 배양 배지를 특정 아미노산 (알라닌, 세린, 아스파라긴, 프롤린)이나 단백질 가수분해물 분획으로 풍부화시키면, 3 내지 6개의 아미노산 잔기로 구성된 합성 올리고펩티드에 의해서 아폽토시스가 유의하게 억제될 수 있다. 펩티드는 밀리몰 또는 더 높은 농도로 존재한다.
- [0138] 하이브리도마 세포가 성장하는 배양 배지를 본 발명의 항체에 결합하는 모노클로날 항체의 생성에 대해 검정할 수 있다. 하이브리도마 세포에 의해 생성되는 모노클로날 항체의 결합 특이성은 면역침전 또는 시험관내 결합 검정, 예컨대 방사성면역검정 (RIA) 또는 효소-연결된 면역흡착 검정 (ELISA)으로 결정할 수 있다. 모노클로날 항체의 결합 친화도는, 예를 들어 스캐차드 분석에 의해 측정할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980)]을 참조한다.
- [0139] 원하는 특이성, 친화도 및/또는 활성을 갖는 항체를 생성하는 하이브리도마 세포를 확인한 후에, 클론을 한계 희석 절차에 의해 서브클로닝하고, 표준 방법에 의해 성장시킬 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Goding, 상기 문헌]을 참조한다. 이러한 목적에 적합한 배양 배지는, 예를 들어, D-MEM 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 또한, 하이브리도마 세포는 동물 생체내에서 복수 종양으로서 성장시킬 수 있다. 서브클론에 의해 분비되는 모노클로날 항체는 통상적인 이뮤노글로불린 정제 절차, 예를 들어 단백질 A-세파로스, 히드록시아파타이트 크로마

토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화성 크로마토그래피에 의해 배양 배지, 복수액 또는 혈청으로부터 적합하게 분리된다. 하이브리도마 세포로부터 단백질을 단리하는 하나의 절차가 US 2005/176122 및 미국 특허 번호 6,919,436에 기재되어 있다. 상기 방법은 결합 과정에서 최소한의 염, 예컨대 친액성 염의 사용을 포함하고, 바람직하게는 또한 용리 과정에서 소량의 유기 용매의 사용을 포함한다.

- [0140] (iii) 특정 라이브러리 스크리닝 방법
- [0141] 본 발명의 항체는 조합 라이브러리를 사용하여 원하는 활성 또는 활성들을 갖는 항체를 스크리닝함으로써 제조할 수 있다. 예를 들어, 파지 디스플레이 라이브러리를 생성하고, 원하는 결합 특성을 갖는 항체에 대하여 상기 라이브러리를 스크리닝하는 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있다. 이러한 방법은 문헌 [Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001)]에 일반적으로 기재되어 있다. 예를 들어, 관심 항체를 생성하는 하나의 방법은 문헌 [Lee et al., *J. Mol. Biol.* (2004), 340(5):1073-93]에 기재된 바와 같은 파지 항체 라이브러리를 사용하는 것을 통한다.
- [0142] 원칙적으로, 파지 코트 단백질에 융합된 항체 가변 영역 (Fv)의 다양한 단편을 디스플레이하는 파지를 함유하는 파지 라이브러리를 스크리닝함으로써 합성 항체 클론이 선택된다. 바람직한 항원에 대한 친화성 크로마토그래피에 의해 이러한 파지 라이브러리가 패닝된다. 바람직한 항원에 결합할 수 있는 Fv 단편을 발현하는 클론이 항원에 흡착되고, 따라서 라이브러리 내의 비결합 클론으로부터 분리된다. 이후에, 결합 클론이 항원으로부터 용리되고, 항원 흡착/용리의 추가의 사이클에 의해 추가로 강화될 수 있다. 본 발명의 임의의 항체는 관심 파지 클론을 선택하는데 적합한 항원 스크리닝 절차를 설계한 후, 관심 파지 클론으로부터 Fv 서열 및 문헌 [Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication* 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3]에 기재된 적합한 불변 영역 (Fc) 서열을 사용하여 전장 항체 클론을 구축함으로써 얻을 수 있다.
- [0143] 특정 실시양태에서, 항체의 항원-결합 도메인은 약 110개 아미노산의 2개의 가변 (V) 영역 (경쇄 (VL) 및 중쇄 (VH) (둘 다 3개의 초가변 루프 (HVR) 또는 상보성-결정 영역 (CDR)을 제시)로부터 각각 하나씩)으로부터 형성된다. 문헌 [Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994)]에 기재된 바와 같이, VH 및 VL이 짧은 가요성 펩티드를 통해 공유결합에 의해 연결된 단일쇄 Fv (scFv) 단편으로서, 또는 VH 및 VL이 불변 도메인에 각각 융합되어 비공유결합에 의해 상호작용하는 Fab 단편으로서, 가변 도메인이 파지 상에 기능적으로 디스플레이될 수 있다. 본원에 사용되는 scFv 코딩 파지 클론 및 Fab 코딩 파지 클론은 통칭하여 "Fv 파지 클론" 또는 "Fv 클론"으로 나타낸다.
- [0144] VH 및 VL 유전자의 레퍼토리가 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)에 의해 개별적으로 클로닝되어 파지 라이브러리에서 무작위로 재조합될 수 있고, 그 후 문헌 [Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994)]에 기재된 바와 같이 항원-결합 클론을 조사할 수 있다. 면역화된 공급원으로부터의 라이브러리는 하이브리도마를 구축할 필요 없이 면역원에 대한 고-친화도 항체를 제공한다. 대안적으로, 문헌 [Griffiths et al., *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993)]에 기재된 바와 같이 어떠한 면역화도 없이 광범위한 비자가 항원 및 또한 자가 항원에 대한 인간 항체의 단일 공급원을 제공하도록 나이브 레퍼토리를 클로닝할 수 있다. 마지막으로, 문헌 [Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992)]에 기재된 바와 같이, 줄기 세포로부터의 재배열되지 않은 V-유전자 절편을 클로닝하고, 고도로 가변성인 CDR3 영역을 코딩하고 시험관내 재배열이 달성되도록 무작위 서열을 함유하는 PCR 프라이머를 사용함으로써, 나이브 라이브러리를 또한 합성적으로 제조할 수 있다.
- [0145] 특정 실시양태에서, 소수 외피 단백질 pIII에의 융합에 의해 항체 단편을 디스플레이하기 위해 필라멘트형 파지가 사용된다. 항체 단편은, 예를 들어 문헌 [Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991)]에 기재된 바와 같이, 가요성 폴리펩티드 스페이서에 의해 동일한 폴리펩티드 쇄 상에서 VH 및 VL 도메인이 연결된 단일쇄 Fv 단편으로서, 또는 예를 들어 문헌 [Hoogenboom et al., *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991)]에 기재된 바와 같이, 하나의 쇄는 pIII에 융합되고 다른 하나는 박테리아 숙주 세포 주변세포질로 분비되고, 여기서 일부 야생형 외피 단백질을 대체함으로써 Fab-외피 단백질 구조의 어셈블리가 파지 표면 상에 디스플레이되게 되는 Fab 단편으로서 디스플레이될 수 있다.
- [0146] 일반적으로, 항체 유전자 단편을 코딩하는 핵산은 인간 또는 동물로부터 수득한 면역 세포로부터 수득하였다. 항-항원 클론에 유리하게 편향된 라이브러리가 바람직한 경우, 대상을 항체 반응을 생성하도록 항체로 면역화시키고, 비장 세포 및/또는 순환성 B 세포, 다른 말초혈 림프구 (PBL)를 라이브러리 구축을 위해 회수한다. 한 실시양태에서, 항-항원 클론에 유리하게 편향된 인간 항체 유전자 단편 라이브러리는 항원 면역화가 항원에 대한 인간 항체를 생성하는 B 세포를 유도하도록 기능적 인간 이뮤노글로불린 유전자 어레이를 갖는 (기능적 내인

성 항체 생성 시스템이 결핍된) 트랜스제닉 마우스에서 항-항원 항체 반응을 일으킴으로써 수득한다. 인간 항체-생성 트랜스제닉 마우스의 생성은 하기에서 기재된다.

- [0147] 항-항원 반응성 세포 집단에 대한 추가의 풍부화물은, 예를 들어 항원 친화성 크로마토그래피 또는 형광색소-표지된 항원에 대한 세포의 흡착 후 유동-활성화 세포 분류 (FACS)를 사용하는 세포 분리에 의해, 항원-특이적 막 결합 항체를 발현하는 B 세포를 단리하는 적합한 스크리닝 절차를 이용하여 얻을 수 있다.
- [0148] 대안적으로, 비면역화 공여자로부터의 비장 세포 및/또는 B 세포 또는 다른 PBL을 사용함으로써, 가능한 항체 레퍼토리의 보다 우수한 예시를 제공하고, 또한 항원이 항원성이 아닌 임의의 동물 (인간 또는 비인간) 종을 사용한 항체 라이브러리의 구축을 허용한다. 시험관내 항체 유전자 구축물이 혼입된 라이브러리에 대해, 재배열되지 않은 항체 유전자 절편을 코딩하는 핵산을 제공하기 위해 대상체로부터 줄기 세포를 수득하였다. 관심 면역 세포는 다양한 동물 종, 예컨대 인간, 마우스, 래트, 토끼목, 이리, 개, 고양이, 돼지, 소, 말, 및 조류 종 등으로부터 수득될 수 있다.
- [0149] 항체 가변 유전자 절편 (VH 및 VL 절편 포함)을 코딩하는 핵산이 관심 세포로부터 회수되어, 증폭된다. 재배열된 VH 및 VL 유전자 라이브러리의 경우, 림프구로부터의 게놈 DNA 또는 mRNA의 단리에 이어서 문헌 [Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989)]에 기재된 바와 같은 재배열된 VH 및 VL 유전자의 5' 및 3' 말단을 매칭시키는 프라이머를 사용한 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)을 수행함으로써 원하는 DNA를 수득할 수 있고, 이에 의해 발현을 위한 다양한 V 유전자 레퍼토리가 제조된다. 문헌 [Orlandi et al. (1989)] 및 [Ward et al., Nature, 341: 544-546 (1989)]에 기재된 바와 같이, 성숙 V-도메인을 코딩하는 엑손의 5' 말단에서의 역방향 프라이머 및 J-절편을 기초로 하는 정방향 프라이머를 사용하여, V 유전자가 cDNA 및 게놈 DNA로부터 증폭될 수 있다. 그러나, cDNA로부터의 증폭을 위해, 역방향 프라이머가 또한 문헌 [Jones et al., Biotechnol., 9: 88-89 (1991)]에 기재된 바와 같이 리더 엑손을 기초로 할 수 있고, 정방향 프라이머가 문헌 [Sastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 5728-5732 (1989)]에 기재된 바와 같이 불변 영역을 기초로 할 수 있다. 상보성을 최대화하기 위해, 문헌 [Orlandi et al. (1989)] 또는 [Sastry et al. (1989)]에 기재된 바와 같이 프라이머 내에 축중성을 혼입시킬 수 있다. 특정 실시양태에서, 라이브러리 다양성은 예를 들어 문헌 [Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)]의 방법에 기재된 바와 같이 또는 문헌 [Orum et al., Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498 (1993)]의 방법에 기재된 바와 같이, 면역 세포 핵산 샘플 내에 존재하는 모든 이용가능한 VH 및 VL 배열을 증폭시키기 위해 각각의 V-유전자 패밀리에 표적화된 PCR 프라이머를 사용함으로써 최대화된다. 증폭된 DNA를 발현 벡터 내로 클로닝하기 위해, 회귀 제한 부위가 문헌 [Orlandi et al. (1989)]에 기재된 바와 같이 한 말단에서 태그로서, 또는 문헌 [Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991)]에 기재된 바와 같이 태그가 부착된 프라이머를 사용하는 추가의 PCR 증폭에 의해 PCR 프라이머 내에 도입될 수 있다.
- [0150] 합성적으로 재배열된 V 유전자의 레퍼토리가 시험관내에서 V 유전자 절편으로부터 유래될 수 있다. 대부분의 인간 VH-유전자 절편이 클로닝 및 서열분석되어 있고 (문헌 [Tomlinson et al., J. Mol. Biol., 227: 776-798 (1992)]에 보고됨), 맵핑되어 있으며 (문헌 [Matsuda et al., Nature Genet., 3: 88-94 (1993)]에 보고됨); 이러한 클로닝된 절편들 (H1 및 H2 루프의 모든 주요 형태 포함)은 문헌 [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)]에 기재된 바와 같이 다양한 서열 및 길이의 H3 루프를 코딩하는 PCR 프라이머로 다양한 VH 유전자 레퍼토리를 생성시키는데 사용될 수 있다. 문헌 [Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461 (1992)]에 기재된 바와 같이 모든 서열 다양성이 단일 길이의 긴 H3 루프에 초점이 맞춰진 VH 레퍼토리가 또한 제조될 수 있다. 인간 V<sub>K</sub> 및 V<sub>L</sub> 절편이 클로닝 및 서열분석되어 있고 (문헌 [Williams and Winter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461 (1993)]에 보고됨), 합성 경쇄 레퍼토리를 제조하는데 사용될 수 있다. 광범위한 VH 및 VL 폴딩, 및 L3 및 H3 길이를 기초로 하는 합성 V 유전자 레퍼토리는 상당한 구조적 다양성의 항체를 코딩할 것이다. V-유전자 코딩 DNA의 증폭에 이어서, 배선 V-유전자 절편이 문헌 [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)]의 방법에 따라 시험관내에서 재배열될 수 있다.
- [0151] 항체 단편의 레퍼토리는 VH 및 VL 유전자 레퍼토리를 서로 다양한 방식으로 조합하여 구축할 수 있다. 각각의 레퍼토리는 상이한 벡터 내에 생성될 수 있고, 벡터는 예를 들어 문헌 [Hogrefe et al., Gene, 128: 119-126 (1993)]에 기재된 바와 같이 시험관내 재조합되거나, 또는 조합 감염, 예를 들어 문헌 [Waterhouse et al., Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993)]에 기재된 loxP 시스템에 의해 생체내 재조합될 수 있다. 생체내 재조합 접근법은 이. 콜라이(*E. coli*) 형질전환 효율로 인한 라이브러리 크기의 한계를 극복하기 위해 Fab 단편의 2쇄 특성을 이용한다. 나이브 VH 및 VL 레퍼토리를 하나는 파지미드에서, 다른 하나는 파지 벡터에서 개별적으로 클로닝한다. 이어서, 2개의 라이브러리를 파지미드-함유 박테리아의 파지 감염에 의해 조합하여 각각의 세

포가 상이한 조합을 함유하도록 하고, 라이브러리 크기는 존재하는 세포의 개수로만 한정된다 (약  $10^{12}$  개 클론). 두 벡터는 VH 및 VL 유전자가 단일 레플리콘에서 재조합되어 파지 비리온 내에 공동-패키징되도록 하는 생체내 재조합 신호를 함유한다. 이러한 거대 라이브러리는 양호한 친화도 (약  $10^{-8}$  M의  $K_d^{-1}$ )를 갖는 다양한 항체를 대량으로 제공한다.

[0152] 대안적으로, 레퍼토리는 예를 들어 문헌 [Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982 (1991)]에 기재된 바와 같이 동일한 벡터에 순차적으로 클로닝될 수 있거나, 또는 예를 들어 문헌 [Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991)]에 기재된 바와 같이 PCR에 의해 함께 어셈블리된 후에 클로닝될 수 있다. PCR 어셈블리는 또한 가요성 펩티드 스페이서를 코딩하는 DNA로 VH 및 VL DNA를 연결하는데 사용되어 단일쇄 Fv (scFv) 레퍼토리를 형성할 수 있다. 또 다른 기술에서, "세포 PCR 어셈블리에서"는 문헌 [Embleton et al., Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837 (1992)]에 기재된 바와 같이 PCR에 의해 림프구 내의 VH 및 VL 유전자를 조합한 후에 연결된 유전자의 레퍼토리를 클로닝하는데 사용된다.

[0153] 나이트 라이브러리 (천연 또는 합성)에 의해 생성된 항체는 친화도가 중등도일 수 있지만 (약  $10^6$  내지  $10^7$  M<sup>-1</sup>의  $K_d^{-1}$ ), 문헌 [Winter et al. (1994), 상기 문헌]에 기재된 바와 같이 제2 라이브러리의 구축 및 이로부터의 재선택에 의해 시험관내에서 친화도 성숙이 또한 모방될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226: 889-896 (1992)]의 방법 또는 [Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 3576-3580 (1992)]의 방법에서 오류-유발성 폴리머라제 (문헌 [Leung et al., Technique, 1: 11-15 (1989)]에 보고됨)를 사용함으로써 시험관내에서 무작위로 돌연변이가 도입될 수 있다. 추가로, 예를 들어 관심 CDR에 스페닝된 무작위 서열을 운반하는 프라이머로 PCR을 사용하여, 선택된 개별 Fv 클론에서 하나 이상의 CDR을 무작위로 돌연변이시키고, 친화도가 더 높은 클론을 스크리닝함으로써 친화도 성숙이 수행될 수 있다. WO 9607754 (1996년 3월 14일 공개)에 이뮤노글로불린 경쇄의 상보성 결정 영역에서 돌연변이유발을 유도하여 경쇄 유전자의 라이브러리를 생성시키는 방법이 기재되어 있다. 또 다른 효과적인 접근법은, 면역화되지 않은 공여자로부터 수득한 자연 발생 V 도메인 변이체의 레퍼토리를 갖는 파지 디스플레이에 의해 선택된 VH 또는 VL 도메인을 재조합하고, 문헌 [Marks et al., Biotechnol., 10: 779-783 (1992)]에 기재된 바와 같이 수 회의쇄 재서플링으로 보다 높은 친화도에 대해 스크리닝하는 것이다. 상기 기술을 통해 친화도가 약  $10^{-9}$  M 이하인 항체 및 항체 단편을 생성할 수 있다.

[0154] 라이브러리의 스크리닝은 당업계에 공지된 다양한 기술로 달성할 수 있다. 예를 들어, 항원은 흡착 플레이트의 웰을 코팅하기 위해 사용하거나, 흡착 플레이트에 고정된 숙주 세포 상에 발현시키거나, 세포 분류에서 사용하거나, 스트랩타비딘-코팅된 비드로 포획하기 위해 비오틴에 접합하거나, 파지 디스플레이 라이브러리를 패닝하기 위한 임의의 다른 방법에서 사용할 수 있다.

[0155] 파지 라이브러리 샘플을 파지 입자의 적어도 일부를 흡착제에 결합시키는데 적합한 조건하에 고정된 항원과 접촉시킨다. 일반적으로, pH, 이온 강도, 온도 등을 포함하는 조건은 생리학적 조건을 모방하도록 선택된다. 고체상에 결합된 파지를 세척한 후, 예를 들어 문헌 [Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982 (1991)]에 기재된 바와 같이 산에 의해, 또는 예를 들어 문헌 [Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)]에 기재된 바와 같이 알칼리에 의해, 또는 예를 들어 문헌 [Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991)]의 항원 경쟁 방법과 유사한 절차로 항원 경쟁에 의해 용리시킨다. 단일 라운드의 선택으로 파지가 20 내지 1,000배 풍부화될 수 있다. 또한, 풍부화된 파지가 박테리아 배양에서 성장되어, 추가의 선택 라운드에 적용될 수 있다.

[0156] 선택 효율은 세정 동안의 해리 동역학, 및 단일 파지 상의 다중 항체 단편들이 동시에 항원과 맞물릴 수 있는지 여부를 비롯한 다수의 인자에 좌우된다. 신속한 해리 동역학 (및 약한 결합 친화도)의 항체는 단시간 세정, 다가 파지 디스플레이 및 고체상 내의 항원의 높은 코팅 밀도를 사용함으로써 유지될 수 있다. 높은 밀도는 다가 상호작용을 통해 파지를 안정화시킬 뿐만 아니라, 해리된 파지의 재결합을 장려한다. 느린 해리 동역학 (및 우수한 결합 친화도)의 항체의 선택은 문헌 [Bass et al., Proteins, 8: 309-314 (1990)] 및 WO 92/09690에 기재된 바와 같은 1가 파지 디스플레이 및 장시간 세정, 및 문헌 [Marks et al., Biotechnol., 10: 779-783 (1992)]에 기재된 바와 같은 항원의 낮은 코팅 밀도를 사용함으로써 증진될 수 있다.

[0157] 항원에 대한 상이한 친화도, 심지어 근소하게 상이한 친화도를 갖는 파지 항체 사이로부터 선택할 수도 있다. 그러나, 선택된 항체의 무작위 돌연변이 (예를 들어, 일부 친화성 성숙 기술에서 수행된 바와 같음)는 항원에

가장 강하게 결합하고, 몇몇은 보다 고친화성을 갖는 많은 돌연변이체를 초래하는 경향이 있다. 항원을 제한하여, 희귀 고친화도 파지를 경쟁시킬 수 있다. 보다 높은 친화도의 돌연변이체를 모두 보유하기 위해, 파지를 과량의 비오틴화 항원과 함께 인큐베이션시킬 수 있지만, 비오틴화 항원은 항원에 대한 표적 몰 친화도 상수보다 더 낮은 몰농도의 농도로 사용된다. 이후에, 고친화도-결합 파지가 스트렙타비딘이 코팅된 상자성 비드에 의해 포획될 수 있다. 이같은 "평형 포획"은 친화성이 더 낮은 과량의 파지로부터 친화성이 2배 정도 더 높은 돌연변이체 클론의 단리를 허용하는 감도로 항체가 이들의 결합 친화도에 따라 선택되도록 한다. 고체 상에 결합된 파지를 세정하는데 사용된 조건이 해리 동역학을 기초로 식별하도록 또한 조작될 수 있다.

[0158] 항-항원 클론은 활성을 기초로 선택될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 자연적으로 항원을 발현하는 살아있는 세포에 결합하거나, 또는 다른 세포 구조에 부착된 항원 또는 유리 부유 항원에 결합하는 항-항원 항체를 제공한다. 이러한 항-항원 항체에 상응하는 Fv 클론은 (1) 상기 기재된 바와 같은 파지 라이브러리로부터 항-항원 클론을 단리하고, 임의로 파지 클론의 단리된 집단을 적합한 박테리아 숙주에서 집단을 성장시킴으로써 증폭시키고; (2) 각각 차단 및 비차단 활성이 바람직한 항원 및 제2 단백질 선택하고; (3) 항-항원 파지 클론을 고정된 항원에 흡착시키고; (4) 과량의 제2 단백질을 사용하여 제2 단백질의 결합 결정자와 중첩되고/중첩되거나 또는 공유하는 항원-결합 결정자를 인식하는 임의의 바람직하지 않은 클론을 용리시키고; (5) 단계 (4) 이후에 흡착되어 남아있는 클론을 용리시킴으로써 선택할 수 있다. 임의로, 본원에 기재된 선택 절차를 1회 이상 반복함으로써 바람직한 차단/비차단 특성을 갖는 클론을 추가로 풍부화시킬 수 있다.

[0159] 본 발명의 하이브리도마-유래 모노클로날 항체 또는 파지 디스플레이 Fv 클론을 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 이용하여 (예를 들어, 하이브리도마 또는 파지 DNA 주형으로부터 관심 중쇄 및 경쇄 코딩 영역을 특이적으로 증폭시키도록 설계된 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용함으로써) 쉽게 단리되고 서열분석된다. 일단 단리되면, DNA를 발현 벡터 내로 넣을 수 있고, 그 후 이를 달리 이뮤노글로불린 단백질을 생성하지 않는 이. 콜라이 세포, 원숭이 COS 세포, 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 또는 골수종 세포와 같은 숙주 세포 내로 형질감염시켜, 재조합 숙주 세포에서 바람직한 모노클로날 항체의 합성물을 수득하였다. 항체-코딩 DNA의 박테리아에서의 재조합 발현에 대한 검토 논문은 문헌 [Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5: 256 (1993)] 및 [Pluckthun, Immunol. Revs., 130: 151 (1992)]을 포함한다.

[0160] 본 발명의 Fv 클론을 코딩하는 DNA는 중쇄 및/또는 경쇄 불변 영역을 코딩하는 공지의 DNA 서열 (예를 들어, 적절한 DNA 서열은 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]으로부터 얻을 수 있음)과 조합되어, 전장 또는 부분 길이 중쇄 및/또는 경쇄를 코딩하는 클론을 형성할 수 있다. IgG, IgM, IgA, IgD, 및 IgE 불변 영역을 포함하여 임의의 이소형 불변 영역이 이러한 목적에 사용될 수 있으며, 이같은 불변 영역이 임의의 인간 또는 동물 종으로부터 수득될 수 있음이 이해될 것이다. 하나의 동물 (예를 들어, 인간) 종의 가변 도메인 DNA로부터 유래된 후, 다른 동물종의 불변 영역 DNA에 융합되어 "하이브리드" 전장 중쇄 및/또는 경쇄에 대한 코딩 서열(들)을 형성하는 Fv 클론은 본원에 기재된 "키메라" 및 "하이브리드" 항체의 정의에 포함된다. 특정 실시양태에서, 인간 가변 DNA로부터 유래된 Fv 클론은 인간 불변 영역 DNA에 융합되어 전장 또는 부분 길이의 인간 중쇄 및/또는 경쇄에 대한 코딩 서열(들)을 형성한다.

[0161] 본 발명의 하이브리도마로부터 유래된 항-항원 항체를 코딩하는 DNA는 또한 예를 들어 하이브리도마 클론에서 유래된 상동성 무린 서열을 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인에 대한 코딩 서열로 치환함으로써 (예를 들어, 문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)]의 방법에서와 같이) 변형될 수도 있다. 비이뮤노글로불린 폴리펩티드에 대한 코딩 서열의 전부 또는 일부를 이뮤노글로불린 코딩 서열에 공유결합에 의해 연결시킴으로써 하이브리도마- 또는 Fv 클론-유래 항체 또는 단편을 코딩하는 DNA를 추가로 변형시킬 수 있다. 이러한 방식으로, 본 발명의 Fv 클론 또는 하이브리도마 클론-유래된 항체의 결합 특이성을 갖는 "키메라" 또는 "하이브리드" 항체가 제조된다.

[0162] (iv) 인간화 및 인간 항체

[0163] 비인간 항체를 인간화하는 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 인간화 항체에는 비인간 공급원으로부터의 하나 이상의 아미노산 잔기가 도입되어 있을 수 있다. 이들 비인간 아미노산 잔기는 종종 "유입" 잔기라 지칭되고, 전형적으로는 "유입" 가변 도메인으로부터의 것이다. 인간화는 설치류 CDR 또는 CDR 서열을 인간 항체의 상응하는 서열 대신 사용함으로써 본질적으로 윈터(Winter) 및 동료들의 방법 (문헌 [Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988)]; [Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)])에 따라 수행될 수 있다. 따라서, 이러한 "인간화" 항체는 무순상 인간 가변 도메인보다 실질적으로 더 적은 부분이 비인간 종으로부터의 상응하는 서열로 치환된 키메라 항체 (미국 특허

번호 4,816,567)이다. 실제로, 인간화 항체는 전형적으로 일부 CDR 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기가 설치류 항체의 유사 부위로부터의 잔기로 치환된 인간 항체이다.

[0164] 인간화 항체의 제조에 사용되는 인간 가변 도메인 경쇄 및 중쇄 둘 다의 선택은 항원성 감소에 매우 중요하다. 소위 "최적 맞춤" 방법에 따라, 설치류 항체의 가변 도메인 서열을 공지된 인간 가변 도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝한다. 이어서, 설치류의 서열에 가장 근접한 인간 서열이 인간화 항체에 대한 인간 프레임워크 (FR)로서 수용된다 (문헌 [Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993)]; [Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)]). 또 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정 하위군의 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 특정 프레임워크를 이용한다. 여러 상이한 인간화 항체에 대해 동일한 프레임워크를 사용할 수 있다 (문헌 [Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992)]; [Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)]).

[0165] 추가로, 항체가 항원에 대해 높은 친화도를 보유하고 다른 유리한 생물학적 특성을 보유하도록 인간화하는 것이 중요하다. 이러한 목적을 달성하기 위해서, 한 실시양태의 방법에 따라, 인간화 항체는 모 서열 및 인간화 서열의 3차원 모델을 이용하는 모 서열 및 다양한 개념적 인간화 생성물의 분석 과정에 의해 제조된다. 3차원 이뮤노글로불린 모델은 통상적으로 이용가능하고, 당업자에게 익숙하다. 선택된 후보 이뮤노글로불린 서열의 가능한 3차원 형태 구조를 예시하고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 이러한 디스플레이를 조사하면 후보 이뮤노글로불린 서열의 기능에 있어서 잔기의 가능한 역할의 분석, 즉 후보 이뮤노글로불린이 그의 항원에 결합하는 능력에 영향을 미치는 잔기의 분석이 가능하다. 이러한 방식으로, FR 잔기는 수용자 서열 및 유입 서열로부터 선택 및 조합되어 바람직한 항체 특징, 예컨대 표적 항원(들)에 대한 친화도 증가를 달성할 수 있다. 일반적으로, 항원 결합에 대한 영향에는 초가변 영역 잔기가 직접적이고 가장 실질적으로 관여한다.

[0166] 본 발명의 인간 항체는 인간-유래 파지 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 Fv 클론 가변 도메인 서열(들)을 상기 기재한 바와 같은 공지된 인간 불변 도메인 서열(들)과 조합함으로써 구축할 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 인간 모노클로날 항체는 하이브리도마 방법에 의해 만들 수 있다. 인간 모노클로날 항체의 생성을 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주가, 예를 들어 문헌 [Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984)]; [Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)]; 및 [Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991)]에 기재되어 있다.

[0167] 면역화시에 내인성 이뮤노글로불린의 생성 없이 인간 항체의 전체 레퍼토리를 생성할 수 있는 트랜스제닉 동물 (예를 들어, 마우스)을 생성하는 것이 가능하다. 예를 들어, 키메라 및 배선 돌연변이체 마우스에서 항체 중쇄 연결 영역 (J<sub>H</sub>) 유전자를 동형접합 결실시키면 내인성 항체의 생성이 완전히 억제된다는 것이 기재되어 있다. 인간 배선 이뮤노글로불린 유전자 어레이를 이같은 배선 돌연변이체 마우스에게 전달하면, 항원 접촉 시 인간 항체가 생성될 것이다. 예를 들어, 문헌 [Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993)]; [Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993)]; [Bruggemann et al., *Year in Immunol.*, 7:33 (1993)]; 및 [Duchosal et al. *Nature* 355:258 (1992)]을 참조한다.

[0168] 유전자 서플링은 또한 비인간, 예를 들어 설치류 항체로부터 인간 항체를 유도하는데 사용될 수 있고, 이때 인간 항체는 출발 비인간 항체와 유사한 친화도 및 특이성을 갖는다. "에피토프 임프린팅"이라고도 지칭되는 이러한 방법에 따라, 본원에 기재된 바와 같은 파지 디스플레이 기술에 의해 수득된 비인간 항체 단편의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역이 인간 V 도메인 유전자의 레퍼토리로 대체되어 비인간 쇠/인간 쇠 scFv 또는 Fab 키메라 집단을 생성시킨다. 항원에 의한 선택 결과로서, 인간 쇠가 1차 파지 디스플레이 클론에서 상응하는 비인간 쇠의 제거시에 파괴된 항원 결합 부위를 복원한 비인간 쇠/인간 쇠 키메라 scFv 또는 Fab가 단리되고, 즉, 에피토프가 인간 쇠 파트너의 선택을 좌우 (임프린팅)한다. 나머지 비인간 쇠를 대체하기 위해 상기 과정을 반복하는 경우에 인간 항체가 수득하였다 (1993년 4월 1일에 공개된 PCT WO 93/06213 참조). CDR 이식에 의한 비인간 항체의 전통적인 인간화와는 달리, 이러한 기술은 비인간 기원의 FR 또는 CDR 잔기가 없는 완전 인간 항체를 제공한다.

[0169] (v) 항체 단편

[0170] 항체 단편은 통상의 수단, 예컨대 효소 소화에 의해, 또는 재조합 기술에 의해 생성될 수 있다. 특정 상황에서는, 전체 항체가 아닌 항체 단편을 사용하는 것이 유리하다. 단편의 크기가 작을수록 제거가 신속하고, 고품종양에 대한 접근을 개선시킬 수 있다. 특정 항체 단편의 검토를 위해, 문헌 [Hudson et al. (2003) *Nat. Med.* 9:129-134]을 참조한다.

[0171] 항체 단편 생성을 위한 다양한 기술이 개발되었다. 전통적으로, 이들 단편은 무손상 항체의 단백질분해적 소화를 통해 유래되었다 (예를 들어, 문헌 [Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)]; 및 [Brennan et al., Science, 229:81 (1985)] 참조). 그러나, 현재 이러한 단편들이 재조합 숙주 세포에 의해 직접적으로 생성될 수 있다. Fab, Fv 및 ScFv 항체 단편은 모두가 이. 콜라이에서 발현되어 분리될 수 있고, 이에 의해 다량의 이들 단편을 용이하게 생성할 수 있다. 항체 단편은 상기 논의된 항체 파지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 대안적으로, Fab'-SH 단편은 이. 콜라이로부터 직접 회수되고 화학적으로 커플링되어 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 형성할 수 있다 (문헌 [Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)]). 또 다른 접근법에 따라, F(ab')<sub>2</sub> 단편은 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접 단리될 수 있다. 셀비지 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하는, 생체내 반감기가 증가된 Fab 및 F(ab')<sub>2</sub> 단편이 미국 특허 번호 5,869,046에 기재되어 있다. 항체 단편의 생성을 위한 또 다른 기술들이 당업자에게 명백할 것이다. 특정 실시양태에서, 항체는 단일쇄 Fv 단편 (scFv)이다. WO 93/16185; 미국 특허 번호 5,571,894; 및 5,587,458을 참조한다. Fv 및 scFv는 불변 영역이 결합된 무손상 결합 부위를 갖는 유일한 종이고; 따라서 생체내 사용 동안 비특이적 결합의 감소에 적합할 수 있다. scFv 용합 단백질은 scFv의 아미노 또는 카르복시 말단에 이펙터 단백질의 용합체를 생성시키도록 구축될 수 있다. 문헌 [Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, 상기 문헌]을 참조한다. 예를 들어, 항체 단편은 또한 예를 들어 미국 특허 번호 5,641,870에 기재된 바와 같은 "선형 항체"일 수 있다. 이러한 선형 항체 단편은 단일특이적 또는 이중특이적일 수 있다.

[0172] (vi) 다중특이적 항체

[0173] 다중특이적 항체는 적어도 2개의 상이한 에피토프에 대해 결합 특이성을 갖고, 이때 에피토프들은 일반적으로 상이한 항원들로부터의 것이다. 이같은 분자들은 일반적으로는 2개의 상이한 에피토프에만 결합할 것이지만 (즉, 이중특이적 항체, BsAb), 추가의 특이성이 있는 항체, 예컨대 삼중특이적 항체가 본원에 사용되는 경우 이러한 표현에 포함된다. 이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편 (예를 들어, F(ab')<sub>2</sub> 이중특이적 항체)으로 제조될 수 있다.

[0174] 이중특이적 항체의 제조 방법은 당업계에 공지되어 있다. 전장 이중특이적 항체의 통상적인 생성법은 2개의 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 공동 발현을 기초로 하며, 여기서 2개의 쇠는 상이한 특이성을 갖는다 (문헌 [Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983)]). 이뮤노글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 분류로 인해, 이들 하이브리도마 (퀴드로마)는 10종의 상이한 항체 분자들의 잠재적인 혼합물을 생성하며, 이 중에서 오직 하나만이 정확한 이중특이적 구조를 갖는다. 통상적으로 친화성 크로마토그래피 단계에 의해 수행되는 상기 정확한 분자의 정제는 다소 성가시고 생성 수율이 낮다. 유사한 절차가 WO 93/08829, 및 문헌 [Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991)]에 개시되어 있다.

[0175] 다른 접근법에 따라, 원하는 결합 특이성 (항체 항원 결합 부위)을 갖는 항체 가변 도메인을 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열에 용합시킨다. 바람직하게는, 용합은 힌지의 적어도 일부, CH2 및 CH3 영역을 포함하는 이뮤노글로불린 중쇄 불변 도메인에 의한다. 용합체 중 적어도 하나에 존재하는, 경쇄 결합에 필요한 부위를 함유하는 제1 중쇄 불변 영역 (CH1)을 갖는 것이 바람직하다. 이뮤노글로불린 중쇄 용합체 및 바람직한 경우에는 이뮤노글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA를 별개의 발현 벡터 내로 삽입하고, 적합한 숙주 유기체 내로 공동형질감염시킨다. 이것은 구축에 사용된 3종의 폴리펩티드 쇠의 동일하지 않은 비율이 최적의 수율을 제공하는 실시양태에서 상기 3종의 폴리펩티드 단편의 상호 비율을 조절하는데 있어서 큰 유연성을 제공한다. 그러나, 동일한 비율의 적어도 2종의 폴리펩티드 쇠의 발현으로 높은 수율이 취득되는 경우, 또는 비율이 특별한 유의성을 갖지 않는 경우, 2중 또는 모든 3종의 폴리펩티드 쇠에 대한 코딩 서열을 1개의 발현 벡터에 삽입할 수 있다.

[0176] 이러한 접근법의 한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 한쪽 아암 내에 제1 결합 특이성을 갖는 하이브리드 이뮤노글로불린 중쇄, 및 다른쪽 아암 내의 하이브리드 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍 (제2 결합 특이성을 제공함)으로 구성된다. 이중특이적 분자의 절반에만 이뮤노글로불린 경쇄가 존재하는 것이 용이한 분리 방법을 제공하기 때문에, 이러한 비대칭 구조는 원치않는 이뮤노글로불린 쇠 조합물로부터 바람직한 이중특이적 화합물의 분리를 용이하게 하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 접근법은 WO 94/04690에 개시되어 있다. 이중특이적 항체의 생성에 대한 추가의 세부사항에 대해서는 예를 들어 문헌 [Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986)]을 참조한다.

[0177] WO 96/27011에 기재된 또 다른 접근법에 따르면, 한 쌍의 항체 분자 사이의 인터페이스를 조작하여 재조합 세포 배양물로부터 회수되는 이중이량체의 백분율을 최대화할 수 있다. 하나의 인터페이스는 항체 불변 도메인의 C<sub>H</sub>3

도메인의 적어도 일부를 포함한다. 이러한 방법에서, 제1 항체 분자의 인터페이스로부터 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄가 보다 큰 측쇄 (예를 들어, 티로신 또는 트립토판)로 대체된다. 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 아미노산 측쇄 (예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)로 대체함으로써 큰 측쇄(들)에 대한 동일하거나 유사한 크기의 보상 "공동"이 제2 항체 분자의 인터페이스에 생성된다. 이는 동종이량체와 같은 다른 원치않는 최종-생성물에 비해 이종이량체의 수율을 증가시키는 메카니즘을 제공한다.

[0178] 이종특이적 항체는 가교된 또는 "이종접합체" 항체를 포함한다. 예를 들어, 이종접합체 내의 항체들 중 하나는 아비딘에 커플링되고, 다른 하나는 비오틴에 커플링될 수 있다. 이러한 항체는 예를 들어 면역계 세포의 원치않는 세포로의 표적화 (미국 특허 번호 4,676,980) 및 HIV 감염의 치료 (WO 91/00360, WO 92/200373, 및 EP03089)를 위해 제안된 바 있다. 임의의 편리한 가교 방법을 이용하여 이종접합체 항체가 제조될 수 있다. 적합한 가교제가 당업계에서 공지되어 있고, 수많은 가교 기술과 함께 미국 특허 번호 4,676,980에 개시되어 있다.

[0179] 항체 단편으로부터 이종특이적 항체를 생성시키는 기술이 또한 문헌에 기재되어 있다. 예를 들어, 화학적 연결을 이용하여 이종특이적 항체를 제조할 수 있다. 문헌 [Brennan et al., Science, 229: 81 (1985)]은 무손상 항체를 단백질 가수분해적으로 절단하여 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 생성하는 절차를 기재한다. 이러한 단편을 디티올 착화제인 아비산나트륨의 존재 하에 환원시켜, 인접한 디티올들을 안정화시키고 분자간 디설피드 형성을 방지한다. 그 후 생성된 Fab' 단편을 티오니트로벤조에이트 (TNB) 유도체로 전환시킨다. 그 후 Fab'-TNB 유도체 중 하나를 메르캅토에틸아민으로의 환원에 의해 Fab'-티올로 재전환시키고 등몰량의 다른 Fab'-TNB 유도체와 혼합하여 이종특이적 항체를 형성시킨다. 생성된 이종특이적 항체를 효소의 선택적 고정화를 위한 작용제로서 사용할 수 있다.

[0180] 최근의 진보는 이종특이적 항체를 형성하도록 화학적으로 커플링될 수 있는, 이. 콜라이로부터의 Fab'-SH 단편의 직접 회수를 용이하게 하였다. 문헌 [Shalaby et al., J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992)]은 완전 인간화 이종특이적 항체 F(ab')<sub>2</sub> 분자의 생성을 기재한다. 각각의 Fab' 단편을 이. 콜라이로부터 개별적으로 분비시키고, 이종특이적 항체를 형성하도록 시험관내 유도 화학 커플링을 실시하였다.

[0181] 제조업 세포 배양물로부터 직접적으로 이종특이적 항체 단편을 제조 및 단리하기 위한 다양한 기술이 또한 기술되었다. 예를 들어, 류신 지퍼를 사용하여 이종특이적 항체가 생성되었다. 문헌 [Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)]. Fos 및 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 펩티드가 2개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 유전자 융합에 의해 연결되었다. 항체 동종이량체가 힌지 영역에서 환원되어 단량체가 형성된 후, 다시 산화되어 항체 이종이량체가 형성되었다. 이러한 방법은 항체 동종이량체의 생성에 또한 이용될 수 있다. 문헌 [Hollinger et al., Proc. Nati. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)]에 기재된 "디아바디" 기술은 이종특이적 항체 단편 제조를 위한 대안적 메카니즘을 제공하였다. 상기 단편은 동일 체 상의 2개의 도메인 사이의 쌍 형성을 허용하기에는 지나치게 짧은 링커에 의해 경쇄 가변 도메인 (V<sub>L</sub>)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (V<sub>H</sub>)을 포함한다. 따라서, 한 단편의 V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub> 도메인이 또 다른 단편의 상보적인 V<sub>L</sub> 및 V<sub>H</sub> 도메인과 쌍을 이루게 되어, 2개의 항원 결합 부위가 형성된다. 단일쇄 Fv (sFv) 이량체를 사용하여 이종특이적 항체 단편을 제조하기 위한 또 다른 전략이 또한 보고되었다. 문헌 [Gruber et al., J. Immunol, 152:5368 (1994)]을 참조한다.

[0182] 2가 초과 항체가 고려된다. 예를 들어, 삼중특이적 항체를 제조할 수 있다. 문헌 [Tuft et al. J. Immunol. 147: 60 (1991)].

[0183] (vii) 단일-도메인 항체

[0184] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 단일-도메인 항체이다. 단일 도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부 또는 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부를 포함하는 단일 폴리펩티드 체이다. 특정 실시양태에서, 단일-도메인 항체는 인간 단일-도메인 항체이다 (도만티스, 인크.(Domantis, Inc.), 매사추세츠주 윌섬; 예를 들어, 미국 특허 번호 6,248,516 B1 참조). 한 실시양태에서, 단일-도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부로 이루어진다.

[0185] (viii) 항체 변이체

[0186] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체의 아미노산 서열 변형(들)이 고려된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선시키는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체는 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 적절한 변경을 도입하거나 펩티드 합성에 의해 제조할 수 있다. 이러한 변형은

예를 들어 항체의 아미노산 서열 내 잔기의 결실 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 원하는 특징을 갖는 최종 구축물이 생성되도록 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합이 이루어질 수 있다. 아미노산 변경은 서열이 제조되는 시점에 대상 항체 아미노산 서열에 도입될 수 있다.

[0187] (ix) 항체 유도체

[0188] 본 발명의 항체는 당업계에서 공지되고 용이하게 입수가능한 추가의 비단백질성 모이어티를 함유하도록 추가로 변형될 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체의 유도체화에 적합한 모이어티는 수용성 중합체이다. 수용성 중합체의 비제한적 예는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸셀룰로스, 덱스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산 (단독중합체 또는 랜덤 공중합체), 및 텍스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 단독중합체, 폴리프로필렌 옥시드/에틸렌 옥시드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올 (예를 들어, 글리세롤), 폴리비닐 알콜, 및 이들의 혼합물을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드는 물에서의 안정성으로 인해 제조에 유리할 수 있다. 중합체는 임의의 분자량을 가질 수 있고, 분지형 또는 비분지형일 수 있다. 항체에 부착되는 중합체의 수는 다양할 수 있으며, 1개 초과 중합체가 부착될 경우에 이들은 동일하거나 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 사용되는 중합체의 수 및/또는 유형은 개선될 항체의 특정 특성 또는 기능, 항체 유도체가 규정된 조건하에 요법에서 사용될 것인지의 여부 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는 고려사항을 기초로 결정될 수 있다.

[0189] (x) 벡터, 숙주 세포, 및 재조합 방법

[0190] 항체는 재조합 방법을 사용하여 생성할 수도 있다. 예를 들어, 항-항원 항체를 재조합 생성하기 위해, 이러한 항체를 코딩하는 핵산을 단리하고, 이를 복제 가능한 벡터 내로 삽입하여 추가로 클로닝하거나 (DNA의 증폭) 또는 추가로 발현시킨다. 항체를 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 사용하여 (예를 들어, 항체의 증쇄와 경쇄를 코딩하는 유전자와 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써) 용이하게 단리하고 서열 분석할 수 있다. 다수의 벡터가 이용가능하다. 벡터 성분은 일반적으로 다음 중 하나 이상을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다: 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열.

[0191] (a) 신호 서열 성분

[0192] 본 발명의 항체는 직접적으로 뿐만 아니라 이중 폴리펩티드, 바람직하게는 신호 서열, 또는 성숙 단백질 또는 폴리펩티드의 N-말단에 특이적 절단 부위를 갖는 다른 폴리펩티드와의 융합 폴리펩티드로서 재조합적으로 생성될 수 있다. 바람직하게 선택된 이중 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식 및 프로세싱 (즉, 신호 펩티다제에 의해 절단)되는 것이다. 천연 항체 신호 서열을 인식 및 프로세싱하지 못하는 원핵 숙주 세포의 경우에는, 신호 서열을 예를 들어 알칼리성 포스파타제, 페니실리나제, lpp 또는 열-안정성 엔테로톡신 II 리더의 군으로부터 선택된 원핵 신호 서열로 대체시킨다. 효모 분비의 경우에는, 천연 신호 서열을 예를 들어 효모 인버타제 리더,  $\alpha$  인자 리더 (사카로미세스(*Saccharomyces*) 및 클루이베로미세스(*Kluyveromyces*)  $\alpha$ -인자 리더 포함), 또는 산 포스파타제 리더,  $\psi$ . 알비칸스(*C. albicans*) 글루코아밀라제 리더, 또는 WO 90/13646에 기재된 신호로 대체할 수 있다. 포유동물 세포 발현시에는, 포유동물 신호 서열 및 또한 바이러스 분비 리더, 예를 들어 단순 포진 gD 신호가 이용가능하다.

[0193] (b) 복제 기점

[0194] 발현 벡터 및 클로닝 벡터는 둘 다 벡터가 하나 이상의 선택된 숙주 세포 내에서 복제될 수 있게 하는 핵산 서열을 함유한다. 일반적으로, 클로닝 벡터에서는 상기 서열이 숙주 염색체 DNA와 상관없이 벡터를 복제할 수 있는 것이고, 복제 기점 또는 자율 복제 서열을 포함한다. 이러한 서열은 다양한 박테리아, 효모 및 바이러스에 대해 주지되어 있다. 플라스미드 pBR322로부터의 복제 기점은 대부분의 그람-음성 박테리아에 적합하고, 2 $\mu$  플라스미드 기점은 효모에 적합하며, 다양한 바이러스 기점 (SV40, 폴리오마, 아데노바이러스, VSV 또는 BPV)은 포유동물 세포에서의 클로닝 벡터에 유용하다. 일반적으로, 복제 기점 성분은 포유동물 발현 벡터에서는 필요하지 않다 (전형적으로, SV40 기점은 단지 초기 프로모터를 함유하기 때문에 사용될 수 있음).

[0195] (c) 선택 유전자 성분

[0196] 발현 및 클로닝 벡터는 선택가능한 마커라고도 불리는 선택 유전자를 함유할 수 있다. 전형적인 선택 유전자는 (a) 항생제 또는 다른 독소, 예를 들어 암피실린, 네오마이신, 메토타렉세이트 또는 테트라시클린에 대한 내성

을 부여하거나, (b) 영양요구성 결핍을 보완하거나, 또는 (c) 복합 배지로부터 얻을 수 없는 중요 영양분을 공급하는 단백질을 코딩하고, 예를 들어 바실루스의 경우에는 D-알라닌 라세마제를 코딩하는 유전자이다.

- [0197] 선택 양식의 한 예는 숙주 세포의 성장을 정지시키기 위해 약물을 사용한다. 이종 유전자로 연속적으로 형질전환된 세포는 약물 내성을 부여하는 단백질을 생성하고, 이에 따라 선택 처방을 살린다. 이러한 우세한 선택의 예는 약물 네오마이신, 미코페놀산 및 히그로마이신을 사용한다.
- [0198] 포유동물 세포에 대해 적합한 선택 마커의 또 다른 예는 항체-코딩 핵산을 선택하는 데 반응을 일으키는 세포의 확인을 가능하게 하는 것들, 예컨대 DHFR, 글루타민 신데타제 (GS), 티미딘 키나제, 메탈로티오네인-I 및 -II, 바람직하게는 영장류 메탈로티오네인 유전자, 아데노신 데아미나제, 오르니틴 데카르복실라제 등을 포함한다.
- [0199] 예를 들어, DHFR 유전자로 형질전환시킨 세포는 형질전환체를 DHFR의 경쟁적 길항제인 메토틱세이트 (Mtx)를 함유하는 배양 배지에서 배양함으로써 확인한다. 이들 조건 하에서, DHFR 유전자를 임의의 다른 공동 형질전환된 핵산과 함께 증폭시킨다. 내인성 DHFR 활성이 결핍된 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO) 세포주 (예를 들어, ATCC CRL-9096)를 사용할 수 있다.
- [0200] 대안적으로, GS 유전자로 형질전환시킨 세포는 형질전환체를 GS의 억제제인 L-메티오닌 술폭시민 (Msx)을 함유하는 배양 배지에서 배양함으로써 확인한다. 이들 조건 하에서, GS 유전자를 임의의 다른 공동 형질전환시킨 핵산과 함께 증폭시킨다. GS 선택/증폭 시스템을 상기 기재된 DHFR 선택/증폭 시스템과 조합하여 이용할 수 있다.
- [0201] 대안적으로, 관심 항체, 야생형 DHFR 유전자 및 또 다른 선택 마커, 예컨대 아미노글리코시드 3'-포스포트랜스퍼라제 (APH)를 코딩하는 DNA 서열로 형질전환되거나 공동-형질전환된 숙주 세포 (특히, 내인성 DHFR을 함유하는 야생형 숙주)는 선택 마커에 대한 선택제, 예컨대 아미노글리코시드계 항생제, 예를 들어 카나마이신, 네오마이신 또는 G418을 함유하는 배지에서의 세포 성장에 의해 선택될 수 있다. 미국 특허 번호 4,965,199를 참조한다.
- [0202] 효모에 사용하기 적합한 선택 유전자는 효모 플라스미드 YRp7에 존재하는 *trp1* 유전자이다 (문헌 [Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979)]). *trp1* 유전자는 트립토판에서 성장할 수 있는 능력이 결여된 효모의 돌연변이체 균주, 예를 들어 ATCC 번호 44076 또는 PEP4-1에 대한 선택 마커를 제공한다. 문헌 [Jones, Genetics, 85:12 (1977)]. 이후, 효모 숙주 세포 계능 내 *trp1* 변이의 존재는 트립토판 부재하에서 성장시켜 형질전환을 검출하는데 효과적인 환경을 제공한다. 유사하게, *Leu2*-결핍 효모 균주 (ATCC 20,622 또는 38,626)는 *Leu2* 유전자를 보유하는 공지된 플라스미드에 의해 보완된다.
- [0203] 또한, 1.6  $\mu$ m 원형 플라스미드 pKD1로부터 유래된 벡터는 *클루이베로미세스* 효모의 형질전환에 사용될 수 있다. 대안적으로, 재조합 송아지 키모신의 대규모 생산을 위한 발현 시스템이 *케이. 락티스(K. lactis)*에 대해 보고되어 있다. 문헌 [Van den Berg, Bio/Technology, 8:135 (1990)]. *클루이베로미세스*의 산업적 균주에 의한 성숙 재조합 인간 혈청 알부민의 분비를 위한 안전한 다중 카피 발현 벡터도 개시된 바 있다. 문헌 [Fleer et al., Bio/Technology, 9:968-975 (1991)].
- [0204] (d) 프로모터 성분
- [0205] 발현 및 클로닝 벡터는 일반적으로, 숙주 유기체에 의해 인식되고 항체를 코딩하는 핵산에 작동가능하게 연결되는 프로모터를 함유한다. 원핵 숙주에 사용하기 적합한 프로모터는 *phoA* 프로모터,  $\beta$ -락타마제 및 락토스 프로모터 시스템, 알칼리성 포스파타제 프로모터, 트립토판 (*trp*) 프로모터 시스템, 및 하이브리드 프로모터, 예컨대 *tac* 프로모터를 포함한다. 그러나, 다른 공지의 박테리아 프로모터도 적합하다. 박테리아 시스템에 사용하기 위한 프로모터는 또한, 항체를 코딩하는 DNA에 작동가능하게 연결된 샐인-달가노 (S.D.) 서열을 함유할 것이다.
- [0206] 프로모터 서열은 진핵생물에 대해 공지되어 있다. 실질적으로 모든 진핵 유전자는 전사가 개시되는 부위로부터 대략 25 내지 30개 염기 상류에 위치하는 AT-풍부 영역을 갖는다. 많은 유전자의 전사 출발점으로부터 70 내지 80개 염기 상류에 존재하는 또 다른 서열은 CNCAAT 영역 (여기서, N은 임의의 뉴클레오티드일 수 있음)이다. 코딩 서열의 3' 말단에 폴리 A 꼬리의 부가를 위한 신호일 수 있는 AATAAA 서열이 대부분의 진핵세포 유전자의 3' 말단에 존재한다. 모든 이러한 서열들이 진핵 발현 벡터 내로 적합하게 삽입된다.
- [0207] 효모 숙주에 의해 사용되기 적합한 프로모터 서열의 예는 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 글리콜분해 효소, 예컨대 예놀라제, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제, 헥소키나제, 피루베이트 데카르복실라

제, 포스포프рук토키나제, 글루코스-6-포스페이트 이소머라제, 3-포스포글리세레이트 뮤타제, 피루베이트 키나제, 트리오스포스페이트 이소머라제, 포스포글루코스 이소머라제, 및 글루코키나제에 대한 프로모터를 포함한다.

[0208] 성장 조건에 의해 제어되는 전사의 추가의 이점을 갖는 유도성 프로모터인 다른 효모 프로모터는 알콜 데히드로게나제 2, 이소시토크롬 C, 산 포스파타제, 질소 대사과 관련된 분해 효소, 메탈로티오네인, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제, 및 말토스 및 갈락토스 이용을 담당하는 효소에 대한 프로모터 영역이다. 효모 발현에 사용하기에 적합한 벡터 및 프로모터는 EP 73,657에 추가로 기재되어 있다. 또한, 효모 인헨서도 효모 프로모터와 함께 유익하게 사용된다.

[0209] 포유동물 숙주 세포에서 벡터로부터의 항체 전사는, 예를 들어 폴리오마 바이러스, 계두 바이러스, 아데노바이러스 (예컨대 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 시토메갈로바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스, 원숭이 바이러스 40 (SV40)과 같은 바이러스 계놈으로부터 수득한 프로모터, 이중 포유동물 프로모터, 예를 들어 액틴 프로모터 또는 이뮤노글로불린 프로모터, 및 열 충격 프로모터에 의해 제어될 수 있는데, 단 이들 프로모터는 숙주 세포 시스템과 호환가능하여야 한다.

[0210] SV40 바이러스의 초기 및 후기 프로모터는 SV40 바이러스 복제 기점을 또한 함유하는 SV40 제한 단편으로서 편리하게 수득하였다. 인간 시토메갈로바이러스의 극초기 프로모터가 HindIII E 제한 단편으로 편리하게 수득하였다. 소 유두종 바이러스를 벡터로 사용하여 포유동물 숙주에서 DNA를 발현시키기 위한 시스템이 미국 특허 번호 4,419,446에 개시되어 있다. 이러한 시스템의 변형은 미국 특허 번호 4,601,978에 기재되어 있다. 또한, 단순 포진 바이러스로부터의 티미딘 키나제 프로모터의 조절 하에 마우스 세포에서 인간  $\beta$ -인터페론 cDNA의 발현에 대해서는 또한 문헌 [Reyes et al., Nature 297:598-601 (1982)]을 참조한다. 대안적으로, 라우스 육종 바이러스의 긴 말단 반복체를 프로모터로 사용할 수 있다.

[0211] (e) 인헨서 요소 성분

[0212] 고등 진핵생물에 의해 본 발명의 항체를 코딩하는 DNA를 전사하는 것은 종종, 인헨서 서열을 벡터 내로 삽입함으로써 증가된다. 많은 인헨서 서열이 현재 포유동물 유전자 (글로빈, 엘라스타제, 알부민,  $\alpha$ -태아단백질 및 인슐린)로부터 공지되어 있다. 그러나, 전형적으로는 진핵 세포 바이러스로부터의 인헨서를 사용할 것이다. 이것의 예는 복제 기점의 하류 쪽 (bp 100-270)의 SV40 인헨서, 시토메갈로바이러스 초기 프로모터 인헨서, 복제 기점 하류 쪽의 폴리오마 인헨서 및 아데노바이러스 인헨서를 포함한다. 또한, 진핵 프로모터의 활성화를 위한 증강 요소에 대한 문헌 [Yaniv, Nature 297:17-18 (1982)]을 참조한다. 인헨서는 항체 코딩 서열에 대한 5' 또는 3' 위치에서 벡터 내로 스플라이싱될 수 있지만, 바람직하게는 프로모터로부터 5' 부위에 위치한다.

[0213] (f) 전사 종결 성분

[0214] 진핵 숙주 세포 (효모, 진균, 곤충, 식물, 동물, 인간, 또는 다른 다세포 유기체로부터의 유핵 세포)에 사용되는 발현 벡터 역시 전사의 종결 및 mRNA의 안정화에 필요한 서열을 함유할 것이다. 이러한 서열은 진핵생물 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 5' 및 때때로 3' 비번역 영역으로부터 통상적으로 이용가능하다. 이들 영역은 항체를 코딩하는 mRNA의 비번역 부분에서 폴리아데닐화 단편으로서 전사된 뉴클레오티드 절편을 함유한다. 유용한 전사 종결 성분 중 하나는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 영역이다. WO 94/11026 및 이에 개시된 발현 벡터를 참조한다.

[0215] (g) 숙주 세포의 선택 및 형질전환

[0216] 본원에서의 벡터 내의 DNA의 클로닝 또는 발현을 위한 적합한 숙주 세포는 상기 기재된 원핵생물, 효모, 또는 고등 진핵생물 세포이다. 이러한 목적에 적합한 원핵생물에는 유박테리아, 예컨대 그람-음성 또는 그람-양성 유기체, 예를 들어 엔테로박테리아세아에(Enterobacteriaceae), 예컨대 에스케리키아(*Escherichia*), 예를 들어 이. 콜라이, 엔테로박터(*Enterobacter*), 에르위니아(*Erwinia*), 클레브시엘라(*Klebsiella*), 프로테우스(*Proteus*), 살모넬라(*Salmonella*), 예를 들어 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아(*Serratia*), 예를 들어 세라티아 마르세스칸스(*Serratia marcescans*) 및 시겔라(*Shigella*), 뿐만 아니라 바실루스, 예를 들어 비. 서브틸리스(*B. subtilis*) 및 비. 리케니포르미스(*B. licheniformis*) (예를 들어, 1989년 4월 12일자로 공개된 DD 266,710에 개시된 비. 리케니포르미스 41P), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 예컨대 피. 아에루기노사(*P. aeruginosa*) 및 스트렙토미세스(*Streptomyces*)가 포함된다. 한 바람직한 이. 콜라이 클로닝 숙주는 이. 콜라이 294 (ATCC 31,446)이지만, 다른 균주, 예컨대 이. 콜라이 B, 이. 콜라이 X1776 (ATCC 31,537), 및 이. 콜라이 W3110 (ATCC 27,325)도 적합하다. 이러한 예들은 제한적이기보다는 예시적이다.

- [0217] 전장 항체, 항체 융합 단백질, 및 항체 단편은 특히 글리코실화 및 Fc 이펙터 기능이 필요하지 않은 경우, 예를 들어 치료 항체를 그 자체만으로도 종양 세포 파괴에 있어서 효과적인 것으로 나타나는 세포독성제 (예를 들어, 독소)와 접합시킨 경우에 박테리아에서 생성시킬 수 있다. 전장 항체는 순환 반감기가 더 길다. 이. 콜라이에서의 생성은 보다 신속하고 보다 비용 효율적이다. 박테리아에서 항체 단편 및 폴리펩티드의 발현에 대해서는, 예를 들어 발현 및 분비 최적화를 위한 번역 개시 영역 (TIR) 및 신호 서열을 설명하고 있는 U.S. 5,648,237 (Carter et al.), U.S. 5,789,199 (Joly et al.), 및 U.S. 5,840,523 (Simmons et al.)을 참조한다. 또한, 이. 콜라이에서의 항체 단편의 발현이 기재되어 있는 문헌 [Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254]을 참조한다. 발현 후, 항체를 이. 콜라이 세포 페이스트로부터 가용성 분획으로 분리시킬 수 있고, 예를 들어 이소형에 따라서 단백질 A 또는 G 칼럼을 통하여 정제할 수 있다. 최종 정제는 예를 들어 CHO 세포에서 발현된 항체를 정제하는 방법과 유사하게 수행될 수 있다.
- [0218] 원핵생물에 더하여, 진핵 미생물 예컨대 사상 진균 또는 효모가 항체-코딩 벡터에 대한 적절한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 하등 진핵 숙주 미생물 중에서 사카로미세스 세레비지아에(*Saccharomyces cerevisiae*), 또는 통상적인 빵 효모가 가장 흔하게 사용된다. 그러나, 다수의 다른 속, 종, 및 균주가 본원에서 일반적으로 이용 가능하며 유용한데, 예컨대 스킴조사카로미세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*); 클루이베로미세스 숙주, 예컨대 예를 들어 케이. 락티스, 케이. 프라길리스(*K. fragilis*)(ATCC 12,424), 케이. 불가리쿠스(*K. bulgaricus*)(ATCC 16,045), 케이. 위케라미이(*K. wickeramii*)(ATCC 24,178), 케이. 왈티이(*K. waltii*)(ATCC 56,500), 케이. 드로스필라툼(*K. drosophilum*)(ATCC 36,906), 케이. 썬모톨레란스(*K. thermotolerans*), 및 케이. 마르시아누스(*K. marxianus*); 야로위아(*Yarrowia*)(EP 402,226); 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)(EP 183,070); 칸디다(*Candida*); 트리코더마 레에시아(*Trichoderma reesia*)(EP 244,234); 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*); 슈와니오미세스(*Schwanniomyces*), 예를 들어 슈와니오미세스 옥시덴탈리스(*Schwanniomyces occidentalis*); 및 필라멘트형 진균, 예컨대 예를 들어 뉴로스포라(*Neurospora*), 페니실륨(*Penicillium*), 톨리포클라디움(*Tolypocladium*), 및 아스페르길루스(*Aspergillus*) 숙주, 예컨대 에이. 니둘란스(*A. nidulans*) 및 에이. 니거(*A. niger*)가 있다. 치료 단백질을 생성하기 위하여 효모 및 필라멘트형 진균을 사용하는 것에 관한 논의를 검토하기 위해, 예를 들어 문헌 [Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004)]을 참조한다.
- [0219] 글리코실화 경로를 "인간화"시킴으로써, 부분적으로 또는 완전한 인간 글리코실화 패턴을 지닌 항체를 생성시키는 특정 진균 및 효모 균주를 선택할 수 있다. 예를 들어 문헌 [Li et al., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006)] (피키아 파스토리스에서의 글리코실화 경로의 인간화 기재); 및 문헌 [Gerngross et al., 상기 문헌]을 참조한다.
- [0220] 글리코실화된 항체를 발현하기에 적합한 숙주 세포는 또한, 다세포 유기체 (척추 동물 및 무척추 동물)로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예로는 식물 및 곤충 세포가 포함된다. 수많은 바칼로바이러스 균주 및 변이체, 및 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) (썩기벌레), 아에테스 아에집티(*Aedes aegypti*) (모기), 아에테스 알보픽투스(*Aedes albopictus*) (모기), 드로스필라 멜라노가스터(*Drosophila melanogaster*) (과실파리) 및 봄빅스 모리(*Bombyx mori*)와 같은 숙주로부터의 상응하는 허용성 곤충 숙주 세포가 확인된 바 있다. 형질감염을 위한 다양한 바이러스 균주, 예를 들어 아우토그라파 칼리포르니카(*Autographa californica*) NPV의 L-1 변이체, 및 봄빅스 모리 NPV의 Bm-5 균주가 공개적으로 이용가능하고, 이러한 바이러스는 특히 스포도프테라 프루기페르다 세포의 형질감염을 위해 본 발명에 따라 본원에서 바이러스로서 사용될 수 있다.
- [0221] 목화, 옥수수, 감자, 대두, 페튜니아, 토마토, 좁개구리밥 (렘나세아에(*Lemnaceae*)), 알팔파 (엠. 트룬카툴라(*M. truncatula*)), 및 담배의 식물 세포 배양물을 또한 숙주로서 사용할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978, 및 6,417,429 (트랜스제닉 식물에서 항체를 생성하는 플랜티바디스(PLANTIBODIES)<sup>™</sup> 기술을 기재함)를 참조한다.
- [0222] 척추동물 세포를 숙주로서 사용할 수 있고, 척추동물 세포를 배양하여 증식시키는 것이 (조직 배양) 통상적인 과정이 되었다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주 (현탁 배양에서의 성장을 위해 서브클로닝된 293 또는 293 세포, 문헌 [Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)]); 새끼 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 마우스 세르톨리 세포 (TM4, 문헌 [Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)]); 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부 암종 세포 (HELA, ATCC CCL 2); 개 신장

세포 (MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 래트 간 세포 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포 (W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포 (Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포 (문헌 [Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)] 참조); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간종양 세포주 (Hep G2)이다. 다른 유용한 포유동물 숙주 세포주는 DHFR<sup>-</sup> CHO 세포를 비롯한 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 (문헌 [Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)]); 및 NS0 및 Sp2/0와 같은 골수종 세포주를 포함한다. 항체 생성에 적합한 특정 포유동물 숙주 세포주의 검토를 위해, 예를 들어 문헌 [Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 255-268]을 참조한다.

[0223] 숙주 세포를 상기 기재된 항체 생성을 위한 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환시킨 다음, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선택하거나, 바람직한 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기 위해 적절하게 변형시킨 통상의 영양 배지에서 배양시킨다.

[0224] (h) 숙주 세포의 배양

[0225] 본 발명의 항체를 생성하는데 사용된 숙주 세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 시판 배지, 예컨대 햄 F10 (시그마(Sigma)), 최소 필수 배지 (MEM) (시그마), RPMI-1640 (시그마) 및 돌베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ((DMEM) (시그마))가 숙주 세포의 배양에 적합하다. 또한, 문헌 [Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979)], [Barnes et al., Anal. Biochem.102:255 (1980)], 미국 특허 번호 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 또는 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; 또는 미국 특허 Re. 30,985에 기재된 배지 중 임의의 배지를 숙주 세포용 배양 배지로 사용할 수 있다. 임의의 이들 배지에는 필요에 따라 호르몬 및/또는 다른 성장 인자 (예컨대, 인슐린, 트랜스페린 또는 표피 성장 인자), 염 (예컨대, 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 포스페이트), 완충제 (예컨대, HEPES), 뉴클레오티드 (예컨대, 아데노신 및 티미딘), 항생제 (예컨대, 겐타마이신(GENTAMYCIN)<sup>TM</sup> 약물), 미량 원소 (통상적으로 마이크로몰 범위의 최종 농도로 존재하는 무기 화합물로서 정의됨) 및 글루코스 또는 등가의 에너지원이 보충될 수 있다. 또한, 임의의 다른 필요한 보충물을 당업자에게 공지된 적절한 농도로 포함시킬 수도 있다. 배양 조건, 예컨대 온도, pH 등은 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 이전에 이용된 것이고, 당업자에게 명백할 것이다.

[0226] (xi) 항체의 정제

[0227] 제조법 기술을 이용하는 경우, 항체는 세포 내에서 또는 주변세포질 공간 내에서 생성될 수 있거나, 또는 배지로 직접 분비될 수 있다. 항체가 세포 내에서 생성되는 경우, 제1 단계로서 입자 잔해인 숙주 세포 또는 용해된 단편을 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거하였다. 문헌 [Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)]에는 이. 콜라이의 주변세포질 공간에 분비되는 항체를 분리하는 절차가 기재되어 있다. 간략하게, 세포 페이스트를 아세트산나트륨 (pH 3.5), EDTA 및 페닐메틸술폰닐플루오라이드 (PMSF)의 존재하에 약 30분에 걸쳐 해동시킨다. 세포 잔해는 원심분리로 제거할 수 있다. 항체가 배지로 분비되는 경우, 일반적으로는 우선 이러한 발현 시스템으로부터의 상청액을 시판되는 단백질 농축 필터, 예를 들어 아미콘(Amicon) 또는 밀리포어 펠리콘(Millipore Pellicon) 한외여과 장치를 사용하여 농축시킨다. 단백질분해를 억제하기 위해 프로테아제 억제제, 예를 들어 PMSF를 임의의 이전 단계에 포함시킬 수 있고, 부정성 오염물의 성장을 저해하기 위해 항생제를 포함시킬 수 있다.

[0228] 세포로부터 제조된 항체 조성물은, 예를 들어 히드록시아파타이트 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 및 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제할 수 있는데, 친화성 크로마토그래피가 전형적으로 바람직한 정제 단계 중의 하나이다. 친화도 리간드로서의 단백질 A의 적합성은 항체 내에 존재하는 임의의 이뮤노글로불린 Fc 도메인의 중 및 이소형에 따라 달라진다. 단백질 A가 인간  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2, 또는  $\gamma$ 4 중쇄를 기초로 한 항체를 정제하기 위해 사용될 수 있다 (문헌 [Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)]). 단백질 G는 모든 마우스 이소형 및 인간  $\gamma$ 3에 대해 권장된다 (문헌 [Guss et al., EMBO J. 5:15671575 (1986)]). 친화성 리간드가 부착되는 매트릭스는 가장 흔하게는 아가로스이지만, 다른 매트릭스도 이용가능하다. 기계적으로 안정한 매트릭스, 예컨대 공극이 제어된 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠은 아가로스로 달성할 수 있는 것보다 더 빠른 유량 및 더 짧은 처리 시간을 가능하게 한다. 항체가 C<sub>H</sub>3 도메인을 포함하는 경우, 베이커본드 ABX(Bakerbond ABX)<sup>TM</sup> 수지 (제이.티. 베이커(J.T. Baker), 뉴저지주 필립스버그)가 정제에 유용하다. 회수할 항체에 따라, 단백질 정제를 위한 다른 기술, 예컨대 이온-교환 칼럼에서의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상에서의 크로마토그래피, 헤파린 세파로스(SEPHAROSE)<sup>TM</sup> 크로마토그래피, 음이

온 또는 양이온 교환 수지 (예를 들어, 폴리아스파르트산 칼럼) 상에서의 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE 및 황산암모늄 침전이 이용될 수도 있다.

- [0229] 일반적으로, 조사, 시험 및 임상에 사용하기 위한 항체를 제조하는 다양한 방법론이 당업계에 널리 확립되고 있고, 이는 상기 기재된 방법론과 일치하고/거나 관심 특정 항체에 대해 당업자에 의해 적절하다고 간주되는 바와 같다.
- [0230] D. 생물학적 활성 항체의 선택
- [0231] 상기 기재된 바와 같이 생성된 항체를 하나 이상의 "생물학적 활성" 검정에 적용시켜, 치료 관점에서 유익한 특성을 갖는 항체를 선택할 수 있다. 항체는 발생된 항원에 대한 그의 결합 능력에 대해 스크리닝될 수 있다. 예를 들어, 하기 실시예에 나타낸 바와 같은 항-VEGF 항체, 항체의 항원 결합 특성은 VEGF에 대한 결합 능력을 검출하는 검정으로 평가할 수 있다.
- [0232] 또 다른 실시양태에서, 항체의 친화도는, 예를 들어 포화 결합, ELISA 및/또는 경쟁 검정 (예를 들어, RIA)에 의해 결정될 수 있다.
- [0233] 또한, 상기 항체를 대상으로 하여 다른 생물학적 활성 검정을 수행하여, 예를 들어 그의 치료제로서의 유효성을 평가할 수 있다. 이러한 검정은 당업계에 공지되어 있고, 표적 항원 및 항체의 의도된 용도에 따라 달라진다.
- [0234] 관심 항체 상의 특정 에피토프에 결합하는 항체 (예를 들어, 실시예의 항-VEGF 항체가 VEGF에 결합하는 것을 차단하는 것)를 스크리닝하기 위해, 문헌 [Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)]에 기재된 바와 같은 통상의 교차-차단 검정을 수행할 수 있다. 대안적으로, 에피토프 맵핑 (예를 들어, 문헌 [Champe et al., J. Biol. Chem. 270:1388-1394 (1995)]에 기재됨)을 수행하여, 항체가 관심 에피토프에 결합하는지 여부를 결정할 수 있다.
- [0235] E. 제조품
- [0236] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 수성 제약 제제가 담긴 용기를 포함하는 제조품이 제공되며, 임의로 그의 사용 지침서가 제공된다. 적합한 용기에는, 예를 들어 병, 바이알 또는 시린지가 포함된다. 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 물질로 형성될 수 있다. 예시적인 용기는 3-20 cc 단일 용도 유리 바이알이다. 대안적으로, 다중투여 제제를 위해, 용기는 3-100 cc 유리 바이알일 수 있다. 용기는 제제를 수용하며, 용기 상의 또는 용기에 부착된 라벨에 사용에 대한 지시를 나타낼 수 있다. 제조품은 상업적 및 사용자 입장에서 바람직한 다른 물질, 예를 들어 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘, 시린지, 및 사용 지침서가 있는 포장 삽입물을 더 포함할 수 있다.
- [0237] 하기 실시예를 참조하여 보다 충분히 본 발명을 이해할 수 있을 것이다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 모든 문헌 및 특허 인용은 본원에 참조로 포함된다.
- [0238] 본 명세서는 당업자가 본 발명을 실시할 수 있도록 하기에 충분한 것으로 여겨진다. 본원에 제시되고 기재된 것 이외에 본 발명의 다양한 변형이 상기 기재로부터 당업자에게 명백할 것이고, 이는 첨부된 청구범위의 범주에 속할 것이다. 본원에서 인용된 모든 공보, 특허 및 특허 출원은 모든 목적을 위하여 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0239] 실시예
- [0240] 본원에 기재된 실시예 및 실시양태는 단지 예시적 목적을 위한 것으로, 이러한 관점에서 다양한 변형 또는 변화가 당업자에게 제안될 것이며, 이는 본 출원의 취지 및 범위와 첨부된 특허청구범위의 범주 내에 포함됨을 이해한다.
- [0241] 실시예 1: 안정한 항-VEGF 항체 액체 제제
- [0242] 본 실시예는 히스티딘, 아르기닌, 아세테이트, 또는 염화나트륨을 포함하는 다양한 액체 제제 중에 약 20 mg/ml -200 mg/ml 범위의 단백질 농도에서 항-VEGF 항체를 포함하는 안정한 액체 제제의 개발 및 안정성 시험을 기재한다. 3 cc 유리 바이알 중 1 ml의 각각의 제제를 40°C에서 저장하고, 1, 2, 및 4주에 안정성을 평가하였다. UV (농도 및 탁도를 위한), 크기 변이체 분석을 위한 크기 배제 크로마토그래피 (SEC), 전하 변이체 분석을 위한 영상화된 모세관 등전점 포커싱 (icIEF), 크기 분포를 위한 CE-SDS 및 활성을 위한 결합 검정을 포함하는 여러 검정에 의해 항-VEGF의 안정성을 모니터링하였다. 안정성 시험 4주 후에, 본 발명자들의 결과는 항-VEGF가 200 mM 아르기닌 아세테이트, 150 mM 염화나트륨, 0.04% PS20, pH 5.2에서 안정하다는 것을 나타낸다.

[0243] 히스티딘, 염화나트륨, 아르기닌, 및 아세테이트를 포함하는 다양한 액체 제제 중에서 항-VEGF의 안정성 (예를 들어, 응집체 형성, 점도 등)을 조사하였다. 응집체 형성 분석을 위한 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)를 포함하는 여러 검정에 의해 항-VEGF의 안정성을 모니터링하였다. 본 발명자들의 결과는 항-VEGF가 약 pH 5.2의 아르기닌-함유 완충제 중에서 안정하다는 것을 나타낸다.

[0244] 항-VEGF를 슬라이드-a-라이저(Slide-a-Lyzer)<sup>®</sup> 카세트를 사용하는 투석에 의해 상이한 완충제로 제제화하여 표 1에 열거된 최종 농도를 달성하였다. 각각의 제제를 0.22 μm 스테리플립(Steriflip)<sup>®</sup> 필터 장치로 멸균 여과하고, 오토클레이브 바이알에 무균 상태로 충전하고, 마개를 닫고, 밀봉하였다. 샘플을 2-8°C, 25°C, 및 40°C에 놓고, 선택 온도에서 안정성 연구를 수행하였다.

**표 1**

**제제**

제제	
A	51 mM 인산나트륨, 159 mM 트레할로스, 0.04% PS20, pH 6.2
B	200 mM 아르기닌 아세테이트, 0.04% PS20, pH 5.2
C	20 mM 아세트산나트륨, 240 mM 수크로스, 0.04% PS20, pH 5.2
D	20 mM 히스티딘 클로라이드, 200 mM 아르기닌 클로라이드, 0.04% PS20, pH 5.2

[0245]

[0246] 방법

[0247] pH: 200 μl 부피의 각각의 샘플을 주위 온도에서 1.5 ml 에펜도르프 튜브에 넣고, 그의 pH를 로스(Ross)<sup>®</sup> 세미-마이크로 전극을 갖춘 써모 오리온(Thermo Orion) pH 미터를 이용하여 측정하였다. pH 미터는 써모 오리온 완충제 표준 (pH 4.0, 5.0 및 7.0)을 사용하여 보정하였다.

[0248] 점도: 전단 점도를 0.049 mm의 높이에서 25 mm 원뿔체 (CP 25-1) 세트를 갖춘 안톤 파르 피지카(Anton Paar Physica) MCR300 레오미터를 이용하여 측정하였다. 75 μl의 각각의 샘플을 펠티에(Peltier) 플레이트 상에 25 °C에서 로딩하고, 1000 1/s의 일정한 전단율에서 100s 간격 당 10회 측정하였다.

[0249] 크기 배제 교환 크로마토그래피 (SEC): 크기 배제 크로마토그래피를 수행하여 전체 응집체 수준 (순수 주사 사용) 및 느린-헤리 응집체 수준 (희석 주사 사용)을 정량하였다. 희석 주사는 이동상 완충제 (0.20M 인산칼륨, 0.25M 염화칼륨, pH 6.2)로 0.5 mg/ml로 희석하였다. 모든 샘플은 30°C에서 24시간 인큐베이션한 후에 분석하였다. 10 μl의 각각의 순수한 샘플 및 100 μl의 각각의 희석 샘플을 애질런트(Agilent) 1100 HPLC 시스템을 이용하여 TSK G3000SWXL, 7.8 X 300 mm 칼럼 (TOSOHAAS, 파트 번호 08541)에 주사하였다. 오토샘플러는 칼럼을 주위 온도에서 유지하는 동안 30°C에서 유지하였다. 유량은 0.5 ml/분이고, 샘플 당 전체 러닝 시간은 30분이었다. 데이터를 HP 캄스태이션을 이용하여 280 nm에서의 샘플 흡광도로 분석하였다.

[0250] 이온 교환 크로마토그래피 (IEC): 이온 교환 크로마토그래피를 수행하여 카르복시펩티다제 B (CpB)-소화된 샘플 중에서 대전된 변이체를 정량하였다. 샘플을 용매 A (20 mM N-(2-아세트아미도)-2-아미노에탄술폰산 (ACES) 완충제, pH 6.5)를 사용하여 1 mg/ml로 희석하고, 1 mg/ml CpB의 1% w/w 첨가로 처리하고, 37°C에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 50 μl의 각각의 샘플을 애질런트 1100 HPLC 시스템을 이용하여 디오넥스(Dionex) ProPac WCX-10, 4.6 X 250 mm 칼럼에 주사하였다. 오토샘플러 온도는 칼럼을 40°C에서 유지하는 동안 2-8°C에서 유지하였다. 유량은 시험 절차에 열거된 바와 같이, 90분에 걸쳐 용매 A 및 용매 B (용매 A 중 200 mM 염화나트륨)의 구배를 사용하는 동안 0.5 ml/분이었다. 데이터를 HP 캄스태이션을 사용하여 280 nm에서의 샘플 흡광도로 분석하였다.

[0251] 탁도 검정: 탁도를 모니터링하기 위해 각각의 제제의 광학 밀도를 애질런트 8453 UV-VIS 분광광도계를 사용하여 350 nm에서 측정하였다. 모든 샘플을 1 cm 통로 길이 석영 큐벳을 사용하여 희석하지 않고 분석하였다.

[0252] -20°C 및 동결 해동 안정성 연구: 제제 A-D를 316L 스테인레스 스틸 미니-캔 (15 ml/미니캔)에 무균 상태로 충전하였다. 모든 샘플을 -20°C에서 변화하는 양의 시간 (예를 들어, 24, 48, 72시간, 또는 그 초과 기간; 4, 5, 6, 7일 또는 그 초과 기간; 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8주, 또는 그 초과 기간; 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24개월, 또는 그 초과 기간) 동안 저장하고, 계속적으로

층류 후드 하에 무균 상태로 샘플링하였다. 또한, 제제 A-D를 6 cc 유리 바이알에 충전하고, -20℃에 저장하였다. 각각의 바이알에 5 동결 해동 사이클을 적용하고, SEC, IEC 및 탁도 검정을 이용하여 분석하였다. 동결-해동 사이클은 적어도 24시간 동안 -20℃에서의 저장 후에 적어도 24시간 동안 5℃에서의 저장을 수반한다.

[0253] 결과 및 논의

[0254] 본 연구는 아르기닌-기반 제제 중에서 다양한 농도의 항-VEGF의 안정성 (예를 들어, 응집체 형성, 점도, 화학적 안정성 등)을 조사하였다. SEC 및 IEC를 사용하여 응력을 가하고 가속화된 저장 조건에서 항-VEGF의 안정성을 모니터링하였다. 항-VEGF의 응집 및 점도를 측정하여, 아래 표 2에 열거하고, 도 2 및 4에서 설명하였다.

**표 2**

연구된 제제의 물리적 특성

제제	[단백질] (mg/ml)	전체 응집체 %	점도 (cP)
A	25	7	
A	30	8	
A	100	10	
A	150	13	
B	20	N/D	1.3
B	50	2.6	1.9
B	100	3.8	4.2
B	110	N/D	4.7
B	125	N/D	6.1
B	150	N/D	9.5
C	20	N/D	1.6
C	50	3	2.3
C	100	5.3	5.7
C	125	N/D	12.4
C	150	N/D	23.5
C	175	N/D	52
D	20	N/D	1.3
D	50	2.1	1.8
D	100	3.4	4.3
D	125	N/D	6
D	150	N/D	11.3
D	175	N/D	17.7

[0255]

[0256] 40℃에서의 모든 제제의 응집: 40℃에서 0, 1, 2 및 4주 동안 저장한 후에 각각의 항-VEGF 제제 중에 형성된 전체 응집체 및 이량체의 양을 측정하여, 아래 표 3, 4 및 5에 열거하고, 도 1 및 3에서 설명하였다.

**표 3**

40℃에서 저장 후 전체 응집체

샘플	전체 응집체 % 4 주
A	10.3
B	5
C	7.1
D	10.8

[0257]

표 4

40℃에서 저장 후 전체 응집체

샘플	전체 응집체 % 0주	전체 응집체 % 1주	전체 응집체 % 2주	전체 응집체 % 4주
B	3.9	4.7	5.3	6.1
C	5.4	6.8	8.3	8.1
D	3.4	5.2	8.4	13.1

[0258]

표 5

40℃에서 저장 후 이량체

샘플	이량체 % 0 주	이량체 % 1 주	이량체 % 2 주	이량체 % 4 주
B	3.3	3.9	4.4	5.0
C	4.7	6.0	7.4	7.1
D	2.8	4.2	6.7	10.8

[0259]

[0260] 25℃에서의 제제의 응집: 25℃에서 0, 2, 4 및 8주 동안 저장한 후에 각각의 항-VEGF 제제 (100 mg/ml) 중에 형성된 전체 응집체 및 이량체의 양을 측정하여, 아래 표 6에 열거하였다.

표 6

25℃에서 저장 후 전체 응집체

제제	전체 응집체 % 0 주	전체 응집체 % 2 주	전체 응집체 % 4 주	전체 응집체 % 8 주
B	3.9	4.6	4.3	3.4
C	5.4	6.6	6.6	4.8
D	3.4	5.1	6.4	6.1

[0261]

[0262] 2-8℃에서의 제제의 응집: 2-8℃에서 0 및 4주 동안 저장한 후에 각각의 항-VEGF 제제 (100 mg/ml) 중에 형성된 응집체 및 이량체의 양을 측정하여, 아래 표 7에 열거하였다.

표 7

2-8℃에서 저장 후 전체 응집체 및 이량체

제제	전체 응집체 %	전체 응집체 %	이량체 %	이량체 %
	0 주	4 주	0 주	4 주
B	3.9	3.8	3.3	3.2
C	5.4	5.7	4.7	5.1
D	3.4	3.5	2.8	2.9

[0263]

[0264]

40℃에서 다양한 아르기닌 농도에서의 응집: 다양한 아르기닌 아세테이트 농도에서 각각의 항-VEGF 제제 중에 형성된 전체 응집체의 양을 측정하여, 아래 표 8에 열거하였다.

표 8

다양한 아르기닌 아세테이트 농도에서의 전체 응집체

아르기닌 아세테이트 농도 (mM)	전체 응집체 %
25	5.2
50	4.8
100	4.4
200	4.2

[0265]

[0266]

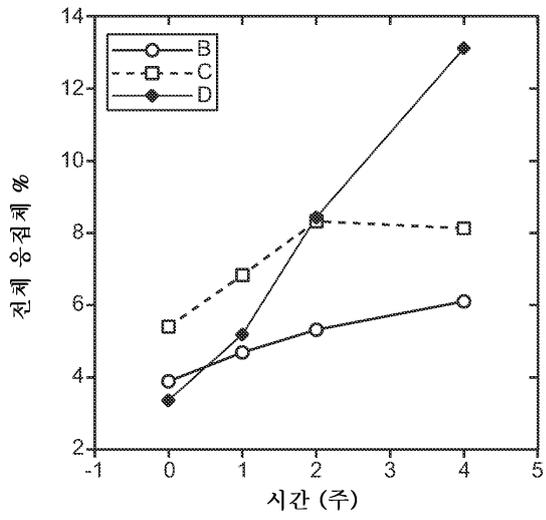
부형제 및 이온 강도의 효과: 항-VEGF의 안정성에 대한 다양한 부형제의 효과를 조사하였다. 조사된 부형제의 목록은 인산나트륨, 아르기닌 아세테이트, 아세트산나트륨 및 히스티딘 클로라이드를 포함한다. 본 발명자들의 결과는 아르기닌 클로라이드 및 히스티딘 클로라이드를 함유하는 제제가 다른 모든 제제보다 더 빠르게 응집되었다는 것을 보여주었다.

[0267]

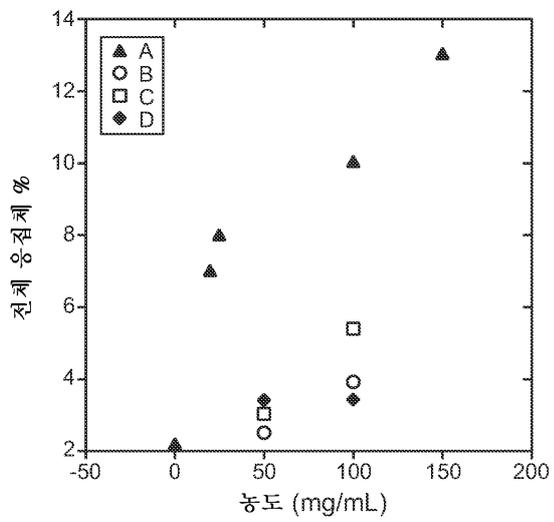
항-VEGF의 안정성을 다양한 완충제 조건에서 평가하였다. 연구로부터 얻은 데이터는 항-VEGF가 pH 4.0 내지 pH 6.0의 아르기닌 아세테이트 완충제 중에서 더 안정하다는 것을 보여주었다. 제제 스크리닝 연구로부터 얻은 데이터는 항-VEGF가 pH 5.2의 200 mM 아르기닌 아세테이트, 0.04% PS20 중에서 100 mg/ml 단백질 농도에서 안정하며, 응집체 및 이량체 형성이 감소된다는 것을 보여주었다.

도면

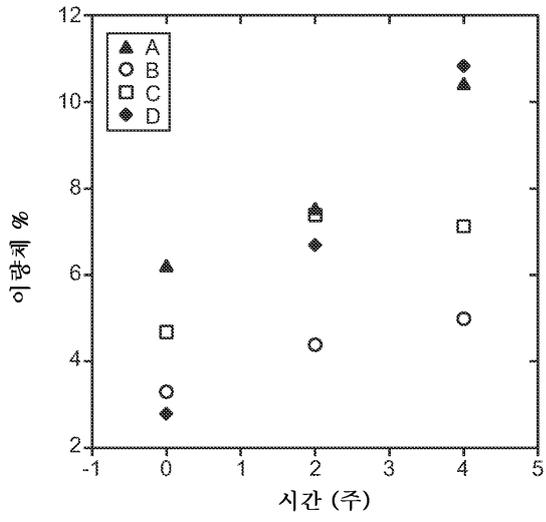
도면1



도면2



도면3



도면4

