



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0098504  
(43) 공개일자 2008년11월10일

(51) Int. Cl.

A61K 9/08 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7020758

(22) 출원일자 2008년08월25일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2008년08월25일

(86) 국제출원번호 PCT/US2007/061544

국제출원일자 2007년02월02일

(87) 국제공개번호 WO 2007/092772

국제공개일자 2007년08월16일

(30) 우선권주장

60/764,750 2006년02월03일 미국(US)

60/825,231 2006년09월11일 미국(US)

(71) 출원인

메디문 엘엘씨

미국 20878 메릴랜드주 게이테르스부르크 원 메디문 웨이

(72) 발명자

알란 크리스티안

미국 20833 메릴랜드주 브루크빌 그레그 로드 4401

리치 윌리엄

미국 21402 메릴랜드주 엘리코트 시티 유닛 2 도르시 홀 4770

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김성기, 김진희

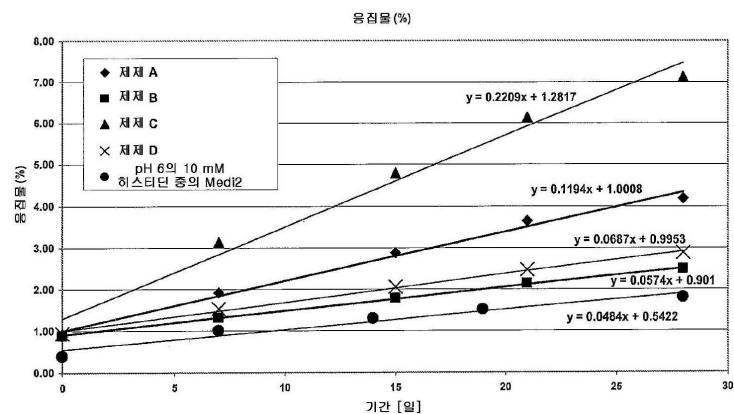
전체 청구항 수 : 총 29 항

(54) 단백질 제제

(57) 요약

본 발명은 부분적으로, 분자들이 신속히 응집되는 경향을 감소시킴으로써 안정성을 개선시키는 변이체 Fc 영역을 포함하는 단백질 제제를 제공한다. 본 발명은 피험체에게 투여하기에 적합한 고 단백질 농도 액체를 생성하는 데 사용될 수 있는 액체 제제 및 동결건조 제제를 제공한다. 또한, 본 발명은 질환 및 장애의 치료적 또는 예방적 처치 및 진단 목적을 위해 본 발명의 제제를 사용하는 방법을 제공한다.

대표도



(72) 발명자

**장 스티븐**

미국 21774 메릴랜드주 뉴 마켓 우드파운트 글레이드 5741

**비숍 스티븐**

미국 21704 메릴랜드주 프레드릭 차터하우스 로드 9117

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

Fc 변이체 단백질 및 1 mM 내지 100 mM 농도의 완충제를 포함하고,

- (a) 1% 내지 20% 중량/부피 농도의 탄수화물 부형제,
- (b) 1 mM 내지 400 mM 농도의 양이온성 아미노산,
- (c) 1 mM 내지 200 mM 농도의 음이온, 및
- (d) 0.001% 내지 0.1% 농도의 폴리소르베이트

로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 성분을 추가로 포함하며, pH가 약 5.5 내지 약 8인 액체 제제.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 성분 (a), (b)와, 경우에 따라 성분 (d)를 포함하는 액체 제제.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 성분 (a), (c)와, 경우에 따라 성분 (d)를 포함하는 액체 제제.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 동일한 Fc 변이체가 pH 6.0의 10 mM 히스티딘 중에서 제제화된 경우의 응집과 비교할 때, Fc 변이체 단백질이 10% 이상 더 적은 응집을 나타내는 것인 액체 제제.

### 청구항 5

제1항에 있어서, Fc 변이체 단백질이 항체 또는 Fc 융합 단백질인 액체 제제.

### 청구항 6

제1항에 있어서, 완충제가 히스티딘, 포스페이트 또는 시트레이트인 액체 제제.

### 청구항 7

제1항에 있어서, 탄수화물 부형제가 트레할로스, 수크로스, 만니톨, 말토스 또는 라피노스인 액체 제제.

### 청구항 8

제1항에 있어서, 양이온성 아미노산이 리신, 아르기닌 또는 히스티딘인 액체 제제.

### 청구항 9

제1항에 있어서, 음이온이 시트레이트, 석시네이트 또는 포스페이트인 액체 제제.

### 청구항 10

제1항에 있어서, pH가 6.0 내지 6.5인 액체 제제.

### 청구항 11

제1항에 있어서, Fc 변이체 단백질이 하기의 것들로 구성된 군으로부터 선택되는 임상 제품 또는 후보 항체와 동일한 항원에의 결합에 대해 경쟁하는 것인 액체 제제: 리투시마브(rituximab), 자놀리무마브(zanolimumab), hA20, AME-I33, HumaLYM, 트라스투주마브(trastuzumab), 퍼투주마브(pertuzumab), 세특시마브(cetuximab), IMC-3G3, 패니투무마브(panitumumab), 잘루투무마브(zalutumumab), 니모투주마브(nimotuzumab), 마투주마브(matuzumab), ch806, KSB-102, MR1-1, SC100, SC101, SC103, 알렘투주마브(alemtuzumab), 무로모나브(muromonab)-CD3, OKT4A, 이브리투모마브(ibritumomab), 겐투주마브(gemtuzumab), 알레페셉트(alefacept), 애브식시마브(abciximab), 바실릭시마브(basiliximab), 팔리비주마브(palivizumab), 모타비주마브(motavizumab),

인플릭시마브(infliximab), 아달리무마브(adalimumab), CDP-571, 에타네르셉트(etanercept), ABX-CBL, ABX-IL8, ABX-MA1 펩투모마브(pemtumomab), 테렉스(Therex), AS1405, 나탈리주마브(natalizumab), HuBC-1, 나탈리주마브(natalizumab), IDEC-131, VLA-1, CAT-152, J695, CAT-192, CAT-213, BR3-Fc, 림포스타트(LymphoStat)-B, TRAIL-R1mAb, 베바시주마브(bevacizumab), 래니비주마브(ranibizumab), 오말리주마브(omalizumab), 에팔리주마브(efalizumab), MLN-02, 자놀리무마브(zanolimumab), 휴맥스(HuMax)-IL15, 휴맥스-인플램(HuMax-Inflam), 휴맥스-캔서(HuMax-Cancer), 휴맥스-림포마(HuMax-Lymphoma), 휴맥스-TAC, 클레놀릭시마브(clenoliximab), 루밀릭시마브(lumiliximab), BEC2, IMC-1C11, DC101, 라벤투주마브(labetuzumab), 아르시투모마브(arcitumomab), 에프라투주마브(epratuzumab), 태캐투주마브(tacatuzumab), 마이엘로마사이드(MyelomaCide), 르코사이드(LkoCide), 프로스타사이드(ProstaCide), 이필리무마브(ipilimumab), MDX-060, MDX-070, MDX-018, MDX-1106, MDX-1103, MDX-1333, MDX-214, MDX-1100, MDX-CD4, MDX-1388, MDX-066, MDX-1307, HGS-TR2J, FG-3019, BMS-66513, SGN-30, SGN-40, 토실리주마브(tocilizumab), CS-1008, IDM-1, 골리무마브(golimomab), CNTO 1275, CNTO 95, CNTO 328, 메폴리주마브(mepolizumab), MOR101, MOR102, MOR201, 비실리주마브(visilizumab), HuZAF, 볼로식스마브(volocixmab), ING-1, MLN2201, 다클리주마브(daclizumab), HCD122, CDP860, PRO542, C14, 오레고보마브(oregovomab), 에드레콜로마브(edrecolomab), 에타라시주마브(etaracizumab), 시플리주마브(siplizumab), 린투주마브(lintuzumab), HuLD10, Lym-1, 에팔리주마브(efalizumab), ICM3, 갈릭시마브(galiximab), 에쿨리주마브(eculizumab), 펙셀리주마브(pexelizumab), LDP-01, huA33, WX-G250, 시브로투주마브(sibrotuzumab), 키메릭(Chimeric) KW-2871, hu3S193, huLK26, 비바투주마브(bivatuzumab), ch14.18, 3F8, BC8, huHMF1, MORAb-003, MORAb-004, MORAb-009, 데노수마브(denosumab), PRO-140, 1D09C3, 휴믹베타(huMikbeta)-1, NI-0401, NI-501, 캔투주마브(cantuzumab), HuN901, 8H9, chTNT-1/B, 바비톡시마브(bavituximab), huJ591, HeFi-1, 펜타세아(Pentacea), 아바고보마브(abagovomab), 토시투모마브(tositumomab), 105AD7, GMA161 및 GMA321.

## 청구항 12

제1항에 있어서, Fc 변이체 단백질이, 천연 발생 Fc 영역을 가지는 것을 제외하고 동일한 아미노산 서열을 가지는 단백질에 비해, 증가된 ADCC 활성을 가지는 Fc 영역을 포함하는 것인 액체 제제.

## 청구항 13

제12항에 있어서, Fc 변이체 단백질이 카바트(Kabat)에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 234, 235, 236, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 252, 254, 256, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 332, 333 및 334번 위치로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 위치에서 비천연 발생 아미노산 잔기를 가지는 Fc 영역 포함하는 것인 액체 제제.

## 청구항 14

제12항에 있어서, Fc 변이체 단백질이 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 234D, 234E, 234N, 234Q, 234T, 234H, 234Y, 234I, 234V, 234F, 235A, 235D, 235R, 235W, 235P, 235S, 235N, 235Q, 235T, 235H, 235Y, 235I, 235V, 235F, 236E, 239D, 239E, 239N, 239Q, 239F, 239T, 239H, 239Y, 240I, 240A, 240T, 240M, 241W, 241L, 241Y, 241E, 241R, 243W, 243L, 243Y, 243R, 243Q, 244H, 245A, 247V, 247G, 252Y, 254T, 256E, 262I, 262A, 262T, 262E, 263I, 263A, 263T, 263M, 264L, 264I, 264W, 264T, 264R, 264F, 264M, 264Y, 264E, 265G, 265N, 265Q, 265Y, 265F, 265V, 265I, 265L, 265H, 265T, 266I, 266A, 266T, 266M, 267Q, 267L, 269H, 269Y, 269F, 269R, 296E, 296Q, 296D, 296N, 296S, 296T, 296L, 296I, 296H, 269G, 297S, 297D, 297E, 298H, 298I, 298T, 298F, 299I, 299L, 299A, 299S, 299V, 299H, 299F, 299E, 313F, 325Q, 325L, 325I, 325D, 325E, 325A, 325T, 325V, 325H, 327G, 327W, 327N, 327L, 328S, 328M, 328D, 328E, 328N, 328Q, 328F, 328I, 328V, 328T, 328H, 328A, 329F, 329H, 329Q, 330K, 330G, 330T, 330C, 330L, 330Y, 330V, 330I, 330F, 330R, 330H, 332D, 332S, 332W, 332F, 332E, 332N, 332Q, 332T, 332H, 332Y 및 332A로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 비천연 발생 아미노산 잔기를 가지는 Fc 영역을 포함하는 것인 액체 제제.

## 청구항 15

제13항에 있어서, Fc 영역이 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 239, 330 및 332번 위치로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 위치에서 비천연 발생 아미노산 잔기를 포함하는 것인 액체 제제.

#### 청구항 16

제14항에 있어서, 하나 이상의 비천연 발생 아미노산 잔기가 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 239D, 330L, 330Y 및 332E로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 액체 제제.

#### 청구항 17

제1항의 액체 제제 중에서 Fc 변이체 단백질을 제제화하는 단계를 포함하는, 상기 Fc 변이체 단백질의 응집을 감소시키는 방법.

#### 청구항 18

제17항에 있어서, Fc 변이체 단백질의 응집이 동일한 Fc 변이체가 pH 6.0의 10 mM 히스티딘 중에서 제제화된 경우의 응집에 비해 10% 이상 감소되는 것인 방법.

#### 청구항 19

20 mg/ml 내지 100 mg/ml 농도의 Fc 변이체 단백질, 6% 트레할로스, 2% 아르기닌(~115 mM), 0.025% 폴리소르베이트-80 및 10 mM 히스티딘 완충제를 포함하며, pH가 6.0 내지 6.5인 사전 동결건조 벌크 제제.

#### 청구항 20

약 20 mg/ml 내지 약 100 mg/ml 농도의 Fc 변이체 단백질, 약 50 mM 내지 약 300 mM의 시트레이트, 약 10% 내지 약 20%의 트레할로스 및 경우에 따라 0.001% 내지 약 0.1%의 폴리소르베이트를 포함하며, pH가 6.0 내지 6.5 인 액체 제제.

#### 청구항 21

제20항에 있어서, 동일한 Fc 변이체가 pH 6.0의 10 mM 히스티딘 중에서 제제화된 경우의 응집과 비교할 때, Fc 변이체 단백질이 10% 이상 더 적은 응집을 나타내는 것인 액체 제제.

#### 청구항 22

제20항에 있어서, 시트레이트의 농도가 약 100 mM이고 트레할로스의 농도가 약 15%인 액체 제제.

#### 청구항 23

제20항에 있어서, 시트레이트의 농도가 약 200 mM이고 트레할로스의 농도가 약 10%인 액체 제제.

#### 청구항 24

제20항에 있어서, Fc 변이체 단백질이, 천연 발생 Fc 영역을 가지는 것을 제외하고 동일한 아미노산 서열을 가지는 단백질에 비해, 증가된 ADCC 활성을 가지는 Fc 영역을 포함하는 것인 액체 제제.

#### 청구항 25

제20항에 있어서, Fc 변이체 단백질이 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 234, 235, 236, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 252, 254, 256, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 332, 333 및 334번 위치로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 위치에서 비천연 발생 아미노산 잔기를 가지는 Fc 영역을 포함하는 것인 액체 제제.

#### 청구항 26

제20항에 있어서, Fc 변이체 단백질이 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 234D, 234E, 234N, 234Q, 234T, 234H, 234Y, 234I, 234V, 234F, 235A, 235D, 235R, 235W, 235P, 235S, 235N, 235Q, 235T, 235H, 235Y, 235I, 235V, 235F, 236E, 239D, 239E, 239N, 239Q, 239F, 239T, 239H, 239Y, 240I, 240A, 240T, 240M, 241W, 241L, 241Y, 241E, 241R, 243W, 243L, 243Y, 243R, 243Q, 244H, 245A, 247V, 247G, 252Y, 254T, 256E, 262I, 262A, 262T, 262E, 263I, 263A, 263T, 263M, 264L, 264I, 264W, 264T, 264R, 264F, 264M, 264Y, 264E, 265G, 265N, 265Q, 265Y, 265F, 265V, 265I, 265L, 265H, 265T, 266I, 266A, 266T, 266M, 267Q, 267L, 269H, 269Y, 269F, 269R, 296E, 296Q, 296D, 296N, 296S, 296T, 296L, 296I, 296H, 269G, 297S, 297D, 297E, 298H, 298I,

298T, 298F, 299I, 299L, 299A, 299S, 299V, 299H, 299F, 299E, 313F, 325Q, 325L, 325I, 325D, 325E, 325A, 325T, 325V, 325H, 327G, 327W, 327N, 327L, 328S, 328M, 328D, 328E, 328N, 328Q, 328F, 328I, 328V, 328T, 328H, 328A, 329F, 329H, 329Q, 330K, 330G, 330T, 330C, 330L, 330Y, 330V, 330I, 330F, 330R, 330H, 332D, 332S, 332W, 332F, 332E, 332N, 332Q, 332T, 332H, 332Y 및 332A로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 비천연 발생 아미노산 잔기를 가지는 Fc 영역을 포함하는 것인 액체 제제.

#### 청구항 27

제20항에 있어서, Fc 영역이 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 239, 330 및 332번 위치로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 위치에서 비천연 발생 아미노산 잔기를 포함하는 것인 액체 제제.

#### 청구항 28

제20항에 있어서, 하나 이상의 비천연 발생 아미노산 잔기가 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 239D, 330L, 330Y 및 332E로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 액체 제제.

#### 청구항 29

제20항에 있어서, Fc 변이체 단백질이 하기의 것들로 구성된 군으로부터 선택되는 임상 제품 또는 후보 항체와 동일한 항원에의 결합에 대해 경쟁하는 것인 액체 제제: 리투시마브, 자놀리무마브, hA20, AME-I33, HumaLYM, 트라스투주마브, 퍼투주마브, 세톡시마브, IMC-3G3, 패니투무마브, 잘루투무마브, 니모투주마브, 마투주마브, ch806, KSB-102, MR1-1, SC100, SC101, SC103, 알렘투주마브, 무로모나브-CD3, OKT4A, 이브리투모마브, 켈투주마브, 알레페셉트, 애브식시마브, 바실릭시마브, 팔리비주마브, 모타비주마브, 인플릭시마브, 아달리무마브, CDP-571, 에타네르셉트, ABX-CBL, ABX-IL8, ABX-MA1 켐투모마브, 테렉스, AS1405, 나탈리주마브, HuBC-1, 나탈리주마브, IDEC-131, VLA-1, CAT-152, J695, CAT-192, CAT-213, BR3-Fc, 림포스타트-B, TRAIL-R1mAb, 베바시주마브, 래니비주마브, 오말리주마브, 에팔리주마브, MLN-02, 자놀리무마브, 휴맥스-IL15, 휴맥스-인플렐, 휴맥스-켄서, 휴맥스-림포마, 휴맥스-TAC, 클레놀릭시마브, 루밀릭시마브, BEC2, IMC-1C11, DC101, 라베투주마브, 아르시투모마브, 에프라투주마브, 태캐투주마브, 마이엘로마사이드, 르코사이드, 프로스타사이드, 이필리무마브, MDX-060, MDX-070, MDX-018, MDX-1106, MDX-1103, MDX-1333, MDX-214, MDX-1100, MDX-CD4, MDX-1388, MDX-066, MDX-1307, HGS-TR2J, FG-3019, BMS-66513, SGN-30, SGN-40, 토실리주마브, CS-1008, IDM-1, 골리무마브, CNTO 1275, CNTO 95, CNTO 328, 메폴리주마브, MOR101, MOR102, MOR201, 비실리주마브, HuZAF, 볼로식스마브, ING-1, MLN2201, 다클리주마브, HCD122, CDP860, PRO542, C14, 오레고보마브, 에드레콜로마브, 에타라시주마브, 시플리주마브, 린투주마브, Hu1D10, Lym-1, 에팔리주마브, ICM3, 갈릭시마브, 에쿨리주마브, 켈셀리주마브, LDP-01, huA33, WX-G250, 시브로투주마브, 키메릭 KW-2871, hu3S193, huLK26, 비바투주마브, ch14.18, 3F8, BC8, huHMF1, MORAb-003, MORAb-004, MORAb-009, 데노수마브, PRO-140, 1D09C3, 휴믹베타-1, NI-0401, NI-501, 캄투주마브, HuN901, 8H9, chTNT-1/B, 바비톡시마브, huJ591, HeFi-1, 펜타세아, 아바고보마브, 토시투모마브, 105AD7, GMA161 및 GMA321.

### 명세서

#### 기술분야

<1> 본 발명은 단백질, 구체적으로 변이체 Fc 영역(예컨대, 항체 또는 Fc 융합 단백질)의 안정성을 개선시키는 제제를 제공한다. 구체적으로, 본 발명은 1 내지 50 mM의 완충제 및 하나 이상의 하기 성분을 포함하며, pH가 5.5 내지 8인 Fc 변이체 제제를 제공한다: 약 1 내지 15% 중량/부피의 탄수화물 부형제, 약 1 내지 400 mM의 양이온성 아미노산 및 약 1 내지 200 mM의 음이온. 또한, 본 발명은 pH가 약 5.5 내지 약 8이고 약 100 mM 내지 약 300 mM의 음이온성 완충제 및 약 5 내지 20% 중량/부피의 탄수화물 부형제를 포함하는 Fc 변이체 제제를 제공한다. 본 발명의 제제는 안정한 액체 제제 및 사전 동결건조 벌크 제제를 포함한다.

#### 배경기술

<2> 항체는 특정 항원에 결합하는 면역학적 단백질이다. 인간 및 마우스를 비롯한 대부분의 포유동물에서, 항체는 쌍을 이루는 중쇄 폴리펩티드 및 경쇄 폴리펩티드로부터 구축된다. 각각의 쇠는 가변(Fv) 영역 및 불변(Fc) 영역으로 지칭되는 2개의 상이한 영역으로 만들어진다. 경쇄 Fv 영역 및 중쇄 Fv 영역은 분자의 항원 결합 결정인자를 함유하며 표적 항원과의 결합을 담당한다. Fc 영역은 항체의 클래스(또는 이소타입)(예를 들어, IgG)를 결

정하고 효과기(effector) 기능으로서 지칭되는 중요한 기능적 능력을 가진 어레이를 제공하는 다수의 Fc 수용체와 다수의 Fc 리간드의 결합을 담당한다.

<3> IgG 클래스에 대한 Fc 수용체의 중요한 패밀리(family)는 Fc 감마 수용체(Fc $\gamma$ R)이다. 이 수용체들은 항체와 면역 시스템의 세포 팔(cellular arm) 사이의 신호전달을 매개한다(Raghavan et al., 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220; Ravetch et al., 2001, Annu Rev Immunol 19:275-290). 인간에서, 이 단백질 패밀리는 Fc $\gamma$ RI(CID64); Fc $\gamma$ RII(CD32); 및 Fc $\gamma$ RIII(CID16)를 포함한다(Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65). 이 수용체들은 Fc와의 결합을 매개하는 세포외 도메인, 막 횡단(membrane spanning) 영역 및 세포 내에서 일부 신호전달 과정을 매개할 수 있는 세포내 도메인을 가진다. Fc/Fc $\gamma$ R 복합체의 형성은 결합된 항원 부위에 효과기 세포를 유인하여 전형적으로 세포 내에서의 신호전달 과정 및 중요한 후속 면역 반응 예컨대, 염증 매개자의 방출, B 세포 활성화, 세포내이입, 대식작용 및 세포독성 공격을 유발한다. Fc $\gamma$ R을 발현하는 비특이적 세포독성 세포가 표적 세포 상의 결합된 항체를 인식한 후 표적 세포의 용해(lysis)를 야기하는 세포-매개 반응은 항체 의존성 세포-매개 세포독성(ADCC)으로 지칭된다(Raghavan et al., 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220; Ghetie et al., 2000, Annu Rev Immunol 18:739-766; Ravetch et al., 2001, Annu Rev Immunol 19:275-290). 또한, Fc 영역은 Fc 수용체-네오네이트(neonate)(FcRn)와 상호작용한다. 이 수용체는 항체 재활용을 위한 회수(salvage) 수용체로서 작용하고(Ghetie et al., 1997, Immunol. Today, 18:592-598) 혈청 반감기를 조절한다.

<4> 또 다른 중요한 Fc 리간드는 보체 단백질 C1q이다. C1q에 결합하는 Fc는 보체 의존성 세포독성(CDC)으로 불리는 과정을 매개한다[문헌(Ward et al., 1995, Ther Immunol 2:77-94)에서 상세히 논의되어 있음]. C1q는 2개의 IgG와의 결합이 보체 캐스케이드(cascade)를 활성화시키기에 충분하더라도 6개의 항체와 결합할 수 있다. C1q는 C1r 및 C1s 세린 단백질분해효소(protease)와 복합체를 형성하여 보체 경로의 C1 복합체를 형성한다.

<5> 표적에 대한 특이성, 면역 효과기 기작을 매개하는 능력 및 혈청 중의 긴 반감기를 포함하나 이들로 한정되지 않는 항체의 여러 핵심적인 특징 때문에 항체는 강력한 치료제가 된다. 다수의 단일클론 항체가 현재 개발중이거나 암을 비롯한 다양한 병태의 치료를 위해 치료적으로 사용되고 있다. 그 예로는 에타라시주마브(etaracizumab)(Vitaxin<sup>®</sup>, MedImmune), 인간화 인테그린  $\alpha_v\beta_3$  항체(예컨대, 국제특허공보 제WO 2003/075957호), 헤르셉틴<sup>®</sup>(Genentech), 유방암의 치료에 대해 승인받은 인간화 항-Her2/neu 항체(예컨대, 미국 특허 제5,677,171호) CNTO 95(Centocor), 인간 인테그린  $\alpha_v$  항체(국제특허공보 제WO 02/12501호), 리투산(Rituxan)<sup>®</sup>(IDEC/Genentech/Roche), 비-호치킨스 림프종(Non-Hodgkin's lymphoma)의 치료에 대해 승인받은 키메릭 항-CD20 항체(예컨대, 미국 특허 제5,736,137호), 에르비투스(Erbitux)<sup>®</sup>(ImClone), 및 키메릭 항-EGFR 항체(예컨대, 미국 특허 제4,943,533호)가 있다. 또한, 면역 효과기 기능을 매개하고 혈청 반감기를 안정화시키는 데 있어서 Fc 영역의 역할은 Fc 영역이 항체-유사 Fc 융합 단백질을 발생시키는 데 있어서 유용한 영역이 되게 한다(Chamow et al., 1996, Trends Biotechnol 14:52-60 and Ashkenazi et al., 1997, Curr Opin Immunol 9:195-200). Fc 융합 단백질은 항체의 Fc 영역들을 겸비함으로써 리간드, 수용체 또는 표적 인식을 매개하는 일부 다른 단백질 도메인의 표적-결합 영역과 함께 그의 유리한 효과기 기능 및 약동학적 성질을 겸비하고 있다. 또한, Fc 융합 단백질은 관절염(예를 들어, 엔브렐(Enbrel)<sup>®</sup>, TNFR-Fc 융합체), 다발성 경화증(IFN $\beta$  1a-Fc 융합체), 빈혈(EPO-Fc) 및 혈우병(FVIII-Fc 및 FIX-Fc)을 비롯한 다양한 병태의 치료를 위해 치료적으로 사용되고/되거나 개발되고 있다.

<6> Fc 영역과 그의 다양한 수용체 및 리간드의 결합을 변경시킴으로써 Fc 영역의 다운스트림(downstream) 활성을 조절할 수 있다고 밝혀져 있다. 예를 들면, FcRn에 대한 Fc 영역의 결합 친화성의 증가는 분자의 혈청 반감기를 증가시켰다(Kim et al., Eur. J. Immunol, 24:2429-2434, 1994; Popov et al., Mol Immunol, 33:493-502, 1996; Ghetie et al., Eur. J. Immunol, 26:690-696, 1996; Junghans et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 93:5512-5516, 1996; Israel et al., Immunol, 89:573-578, 1996; 및 미국 특허공보 제2003/0190311호). 유사하게, Fc $\gamma$ RIIIA에 대한 Fc 영역의 결합 친화성의 증가는 분자의 ADCC 활성을 증가시켰다(Shields et al., 2001, J Biol Chem 276:6591-6604 and Presta et al., 2002, Biochem Soc Trans 30:487-490). Fc 영역의 글리코실화에서의 변화뿐만 아니라 아미노산 결실, 치환 및 추가를 비롯한 변형은 Fc 영역과 그의 리간드 및/또는 수용체의 결합을 변경시켜 효과기 기능에서의 부수적 변화를 초래한다고 입증된 바 있다(예를 들어, 쉬엘드(Shield)의 상기 문헌, 프레스타(Presta)의 상기 문헌 및 미국 특허공보 제2004/0132101호 참조). 따라서, Fc 영역을 변형시킴으로써 Fc 함유 분자의 치료 효능 및/또는 약동학적 성질을 개선시킬 수 있다. 그러나, 후술하

는 바와 같이, Fc 영역의 변형은 안정성, 가용성 또는 구조적 완전성(integrity)에서의 감소와 같은 바람직하지 않은 특성을 초래할 수도 있다. 따라서, 안정성, 가용성 또는 구조적 완전성에서의 감소는 치료적 또는 예방적 투여를 위한 안정한 고농도 제제의 개발에 있어서 과제를 제시한다. 그러므로, 피험체(subject)에게 비경구 투여하기에 적합한 원하는 변형된 Fc 영역(예컨대, 항체 또는 Fc 융합 단백질)을 가지는 단백질을 안정화시키는 제제가 필요하다.

- <7> 본 명세서에서 참고문헌에 대한 인용 또는 논의는 그 참고문헌이 본 발명에 대한 선행기술이라는 것을 인정하는 것으로 해석되지 않아야 한다.

## 발명의 상세한 설명

- <8> [발명의 개요]

- <9> 본 발명은 부분적으로, 비천연 발생 Fc 영역을 포함하는 단백질(예컨대, 항체 또는 Fc 융합 단백질)이 천연 발생 Fc 영역(본 명세서에서 "야생형 Fc 영역"으로도 지칭됨)을 포함하는 동일한 단백질에 비해 신속히 응집되기 더 쉽다는 관찰에 기초한 것이다. 이 응집은 예를 들어, 크기 배제 크로마토그래피(SEC)에 의해 측정된다. 또한, 본 발명은 부분적으로, 비천연 발생 Fc 영역을 포함하는 단백질의 안정성을 증가시키며 피험체에게 비경구 투여하기에 적합한 상기 단백질의 제제를 확인하는 것에 기초한다. 본 발명의 제제는 비천연 발생 Fc 영역을 포함하는 단백질을 안정화시키는 데 특히 유용하지만, 본원의 제제가 신속히 응집되기 쉬운 다수의 단백질의 안정성을 증가시키는 데 사용될 수 있다는 것이 예상된다. 이러한 제제는 정제/충진/마감 과정 동안 보다 덜 제한적인 온도 요건, 보다 덜 엄격하거나 보다 더 용이하게 이용할 수 있는 수송/저장 조건, 및 상기 제제의 치료, 예방 및 진단 용도에 있어서 보다 덜 빈번한 투약 또는 보다 적은 투여량을 비롯한 다수의 장점을 제공한다. 추가로, 본 발명은 질환 및 장애의 치료적 또는 예방적 처치 또는 진단 목적을 위해 본 발명의 제제를 사용하는 방법을 제공한다.

- <10> 비천연 발생 Fc 영역을 포함하는 단백질(본 명세서에서 "Fc 변이체 단백질(들)"로 지칭됨)은 항체 및 Fc 융합 단백질을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 비천연 발생 Fc 영역(본 명세서에서 "변이체 Fc 영역"으로도 지칭됨)은 예를 들어, 변경된 결합성 및/또는 변경된 효과기 기능을 가질 수 있는 비천연 발생 아미노산 잔기들을 포함하는 Fc 영역을 포함한다. 비천연 발생 Fc 영역은 다수의 분자(예를 들어, 항체 또는 Fc 융합 단백질) 내로 도입되어 이들의 치료적 효능 및/또는 약동학적 성질을 개선시킬 수 있다.

- <11> 한 실시양태에서, 본 발명은 저장 시 단백질 성분의 감소된 응집으로 인해 증가된 안정성을 나타내는 Fc 변이체 단백질 제제를 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 제제는 10 mg/ml 이상, 15 mg/ml 이상, 25 mg/ml 이상, 50 mg/ml 이상, 75 mg/ml 이상, 100 mg/ml 이상, 150 mg/ml 이상 또는 200 mg/ml 이상의 Fc 변이체 단백질을 포함한다.

- <12> 한 실시양태에서, Fc 변이체 단백질은 변이체 Fc 영역을 포함하는 항체이고, 이때 상기 항체는 원하는 항원에 면역특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, 변이체 Fc 영역을 포함하는 항체 제제는 저장 시 단백질 성분의 감소된 응집으로 인해 증가된 안정성을 나타낸다. 또 다른 실시양태에서, Fc 변이체 단백질은 변이체 Fc 영역 또는 이의 단편을 포함하는 Fc 융합 단백질이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 변이체 Fc 영역을 포함하는 Fc 융합 단백질의 제제는 저장 시 Fc 융합 단백질 성분의 감소된 응집으로 인해 증가된 안정성을 나타낸다. 이러한 제제는 질환 및 장애의 진단적, 치료적 또는 예방적 처치에서 사용될 수 있다.

- <13> 한 실시양태에서, 본 발명의 제제는 약 1 mg/ml 내지 약 200 mg/ml의 Fc 변이체 단백질, 약 1 mM 내지 약 100 mM의 완충제를 포함하며 pH가 약 5.5 내지 약 8이고 하기 성분들로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 추가 성분을 포함한다: 약 1% 내지 약 15% 중량/부피의 탄수화물 부형제; 약 1 mM 내지 약 400 mM의 양이온성 아미노산; 및 약 1 mM 내지 약 200 mM의 음이온. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 제제는 약 1 mg/ml 내지 약 200 mg/ml의 Fc 변이체 단백질, 약 100 mM 내지 약 300 mM의 음이온성 완충제 및 약 5% 내지 20% 중량/부피의 탄수화물 부형제를 포함하며 pH가 약 5.5 내지 약 8이다. 본 발명의 제제는 안정한 액체 제제 및 사전 동결건조 벌크 제제를 포함한다. 경우에 따라, 본 발명의 제제는 다른 통상의 부형제 및/또는 첨가제, 예컨대, 사카라이드, 폴리올, 및 다른 아미노산(글리신, 메티오닌, 아스파르트레이트 및 글루타메이트를 포함하나 이들로 한정되지 않음)을 추가로 포함할 수 있다. 추가로 또는 별법으로, 본 발명의 제제는 통상의 부형제 및/또는 첨가제, 예컨대, 가용화제, 희석제, 결합제, 안정화제, 염, 친지성 용매, 계면활성제, 킬레이터, 보존제 등(이들로 한정되지 않음)을 추가로 포함할 수 있다.

- <14> 특정 실시양태에서, 완충제는 히스티딘, 포스페이트 및 시트레이트로 구성된 군으로부터 선택된다. 다른 실시양

태에서, 탄수화물 부형제는 트레할로스, 수크로스, 만니톨, 말토스 및 라피노스로 구성된 군으로부터 선택된다. 다른 실시양태에서, 양이온성 아미노산은 리신, 아르기닌 및 히스티딘으로 구성된 군으로부터 선택된다. 다른 실시양태에서, 음이온은 시트레이트, 석시네이트 및 포스페이트로 구성된 군으로부터 선택된다.

- <15> 본 발명은 액체 제제뿐만 아니라, 예를 들어, 동결건조, 냉동-건조, 분무-건조 또는 공기-건조(이들로 한정되지 않음)에 의해 건조된 제제를 포괄한다(예를 들어, 국제특허공보 제WO 05/123131호, 제WO 04/058156호, 제WO 03/009817호 및 제WO 97/04801호; 및 미국 특허 제6,165,463호 참조). 또한, 본 발명의 제제는 질환 및 장애의 치료적 또는 예방적 처치를 위해 피험체에게 투여될 수 있는 멸균 제제를 포괄한다.
- <16> 일부 실시양태에서, 본 발명의 제제는 응집에 대해 분석하는 크기 배제 크로마토그래피에 의해 측정될 때 37℃ 내지 42℃의 온도에서 5일 이상 동안, 20℃ 내지 25℃의 온도에서 30일 이상 동안, 2℃ 내지 8℃의 온도에서 90일 이상, 120일 이상, 180일 이상 또는 1년 이상 동안 단백질 중량 기준으로 10% 이하, 5% 이하, 2% 이하, 1% 이하 또는 0.5% 이하의 응집물을 가진다.
- <17> 한 실시양태에서, Fc 변이체 단백질은, 야생형 Fc 영역을 가지는 것을 제외하고 동일한 아미노산 서열을 가지는 단백질에 비해, Fc 수용체와의 증가된 결합을 가진다. 특정 실시양태에서, Fc 변이체 단백질은 Fc 수용체 FcγRIIIA와의 증가된 결합을 가진다. 또 다른 특정 실시양태에서, Fc 변이체 단백질은 Fc 수용체 FcRn와의 증가된 결합을 가진다.
- <18> 한 실시양태에서, Fc 변이체 단백질은, 야생형 Fc 영역을 가지는 것을 제외하고 동일한 아미노산 서열을 가지는 단백질에 비해, 증가된 ADCC 활성을 가진다. 또 다른 실시양태에서, Fc 변이체 단백질은, 야생형 Fc 영역을 가지는 것을 제외하고 동일한 아미노산 서열을 가지는 단백질에 비해, 증가된 혈청 반감기를 가진다. 다른 실시양태에서, Fc 변이체 단백질은, 야생형 Fc 영역을 가지는 것을 제외하고 동일한 아미노산 서열을 가지는 단백질에 비해, 증가된 ADCC 활성 및 증가된 혈청 반감기를 가진다.
- <19> 한 실시양태에서, 본 발명은 Fc 영역이 카바트(Kabat)에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 222, 224, 234, 235, 236, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 248, 252, 254, 256, 258, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 272, 274, 275, 278, 279, 280, 282, 290, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 332, 333, 334, 335, 339, 359, 360, 372, 377, 379, 396, 398, 400, 401, 430 및 436번 위치로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 위치에서 하나 이상의 비천연 발생 아미노산 잔기를 포함하는 것인 Fc 변이체 단백질 제제를 제공한다. 경우에 따라, Fc 영역은 당업자에게 공지되어 있는 추가 및/또는 대안적 위치에서 비천연 발생 아미노산 잔기를 포함할 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제5,624,821호, 제6,277,375호, 제6,737,056호; 및 국제특허공보 제WO 01/58957호, 제WO 02/06919호, 제WO 04/016750호, 제WO 04/029207호, 제WO 04/035752호 및 제WO 05/040217호 참조).
- <20> 특정 실시양태에서, 본 발명은 Fc 영역이 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 222N, 224L, 234D, 234E, 234N, 234Q, 234T, 234H, 234Y, 234I, 234V, 234F, 235A, 235D, 235R, 235W, 235P, 235S, 235N, 235Q, 235T, 235H, 235Y, 235I, 235V, 235F, 236E, 239D, 239E, 239N, 239Q, 239F, 239T, 239H, 239Y, 240I, 240A, 240T, 240M, 241W, 241L, 241Y, 241E, 241R, 243W, 243L, 243Y, 243R, 243Q, 244H, 245A, 247V, 247G, 248M, 252Y, 254T, 256E, 258D, 262I, 262A, 262T, 262E, 263I, 263A, 263T, 263M, 264L, 264I, 264W, 264T, 264R, 264F, 264M, 264Y, 264E, 265G, 265N, 265Q, 265Y, 265F, 265V, 265I, 265L, 265H, 265T, 266I, 266A, 266T, 266M, 267Q, 267L, 268D, 268N, 269H, 269Y, 269F, 269R, 296E, 272Y, 274E, 274R, 274T, 275Y, 278T, 279L, 280H, 280Q, 280Y, 282M, 290G, 290S, 290T, 290Y, 294N, 295K, 296Q, 296D, 296N, 296S, 296T, 296L, 296I, 296H, 269G, 297S, 297D, 297E, 298H, 298I, 298T, 298F, 299I, 299L, 299A, 299S, 299V, 299H, 299F, 299E, 300I, 300L, 312A, 313F, 318A, 318V, 320A, 320M, 325Q, 325L, 325I, 325D, 325E, 325A, 325T, 325V, 325H, 327G, 327W, 327N, 327L, 328S, 328M, 328D, 328E, 328N, 328Q, 328F, 328I, 328V, 328T, 328H, 328A, 329F, 329H, 329Q, 330K, 330G, 330T, 330C, 330L, 330Y, 330V, 330I, 330F, 330R, 330H, 332D, 332S, 332W, 332F, 332E, 332N, 332Q, 332T, 332H, 332Y, 332A, 335A, 335T, 335N, 335R, 335Y, 339T, 359A, 360A, 372Y, 377F, 379M, 396H, 396L, 398V, 400P, 401V 및 430A로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 비천연 발생 아미노산 잔기를 포함하는 것인 Fc 변이체 단백질 제제를 제공한다. 경우에 따라, Fc 영역은 당업자에게 공지되어 있는 추가 및/또는 대안적 비천연 발생 아미노산 잔기를 포함할 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제5,624,821호, 제6,277,375호 및 제6,737,056호; 및 국제특허공보 제WO 01/58957호, 제WO 02/06919호, 제WO 04/016750호, 제WO 04/029207호, 제WO 04/035752호 및 제WO 05/040217호 참조). 또한, 본 발명은 결실, 치환 및/또는 변형을 포함하는 Fc 영역을 포괄한다.

- <21> 한 실시양태에서, 본 발명은 Fc 영역이 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 252, 254 및 256 위치로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 위치에서 하나 이상의 비천연 발생 아미노산을 포함하는 것인 Fc 변이체 단백질 제제를 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 Fc 영역이 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 252Y, 254T 및 256E로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 비천연 발생 아미노산을 포함하는 것인 Fc 변이체 단백질 제제를 제공한다.
- <22> 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 Fc 영역이 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 239, 330 및 332 위치로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 위치에서 하나 이상의 비천연 발생 아미노산을 포함하는 것인 Fc 변이체 단백질 제제를 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 Fc 영역이 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 239D, 330L, 330Y 및 332E로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 비천연 발생 아미노산을 포함하는 것인 Fc 변이체 단백질 제제를 제공한다. 경우에 따라, Fc 영역은 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 252, 254 및 256번 위치로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 위치에서 하나 이상의 추가 비천연 발생 아미노산을 추가로 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 Fc 영역이 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 239D, 330L, 330Y 및 332E로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 비천연 발생 아미노산을 포함하고, 하나 이상의 위치에서 하나 이상의 비천연 발생 아미노산이 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 252Y, 254T 및 256E로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 Fc 변이체 단백질 제제를 제공한다.
- <23> 다른 실시양태에서, 본 발명은 단백질이 하나 이상의 개조된 당형태(glycoform), 즉 Fc 변이체 단백질에 공유결합된 탄수화물 조성물을 포함하는 것인 Fc 변이체 단백질 제제를 제공한다. 개조된 당형태는 효과기 기능의 증가 또는 감소를 포함하나 이들로 한정되지 않는 다양한 목적에 유용할 수 있다. 개조된 당형태는 당업자에게 공지된 임의의 방법에 의해 발생될 수 있다[예를 들어, 미국 특허 제6,602,684호 및 제6,946,292호; 국제특허공보 제WO 00/61739호, 제WO 01/292246호, 제WO 02/311140호, 제WO 02/30954호, 제WO 02/079255호, 제WO 00/061739호 및 제WO 03/035835호; 및 유럽 특허공보 제01229125호 참조]
- <24> 본 발명은 단백질뿐만 아니라 이의 서브유닛(subunit), 도메인, 모티프 및 에피토프를 포함하나 이들로 한정되지 않은 사실상 임의의 분자로부터 유래된 Fc 변이체 단백질을 포함하는 제제를 포괄한다. 분자의 비-제한적 예로는 호르몬, 성장 인자, 항-응고 인자, 종양 괴사 인자 수퍼패밀리의 구성원, 세포 표면 수용체(예를 들어, 호르몬 및 성장 인자 수용체), 인테그린 서브유닛 및 이의 조합물(예를 들어,  $\alpha V$ ,  $\beta 3$ ,  $\alpha V\beta 3$  등), 인테그린 수용체, 티로신 키나제 수퍼패밀리의 구성원(예를 들어, EphA2, EphA4, EphB4, ALK 등), 분화 단백질 클러스터(cluster)(CD)의 구성원(예를 들어, CD19, CD20, CD22 등), 면역글로불린, 암 항원, 미생물 단백질, 및 임상 시험 또는 개발에서 사용하도록 승인받은 항체 및 항체 도메인 융합 단백질(예를 들어, Fc 융합체)을 들 수 있다. 한 실시양태에서, Fc 변이체 단백질 조성물은 수용체 티로신 키나제 패밀리의 구성원에 결합하는 항체로부터 유래된 Fc 변이체 단백질을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 항체는 EphA2, EphA4, EphB4 또는 ALK에 결합한다. 또 다른 실시양태에서, Fc 변이체 단백질 조성물은 인테그린 서브유닛 및/또는 이의 조합물에 결합하는 항체로부터 유래된 Fc 변이체 단백질을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체는  $\alpha V$ ,  $\beta 3$  또는  $\alpha V\beta 3$ 에 결합한다.
- <25> 본 발명의 Fc 변이체 단백질 제제는 염증 질환, 자가면역 질환, 골 대사 관련 장애, 혈관신생 관련 장애, 감염 및 암을 포함하나 이들로 한정되지 않은 질환, 장애 및 감염의 진단, 예방, 관리 및 치료에 유용하다.
- <26> [도면의 간단한 설명]
- <27> 도 1: 항-EphA2 항체 Medi3 및 항-인테그린  $\alpha V\beta 3$  항체 Medi2의 중쇄( $V_H$ ) 및 경쇄( $V_L$ )의 가변 영역의 뉴클레오타이드 및 상응하는 아미노산 서열. 밑줄: CDR(카바트 정의). a) Medi3  $V_H$ (서열번호 1 및 2); b) Medi3  $V_L$ (서열번호 3 및 4); c) Medi2  $V_H$ (서열번호 5 및 6); d) Medi2  $V_L$ (서열번호 7 및 8). 서열번호는 각각 뉴클레오타이드 서열 및 아미노산 서열을 언급한다.
- <28> 도 2: "V3" Fc 변이체는 비-공유 응집을 증가시킨다. 패널 a는 pH 6.0의 10 mM 히스티딘 완충제 중에 제제화되어 40°C에서 저장된 경우 시간 경과에 따른 100 mg/ml의 항-EphA2 항체 Medi3, Medi3-V1, Medi3-V3 및 항-인테그린  $\alpha V\beta 3$  항체 용액에 존재하는 단량체 비율(%)을 작도한 것이다. Medi3-V3 용액 중의 단량체의 비율은 야생형 Fc 영역을 가지는 다른 항체의 단량체 비율과 비교할 때 14일 후 거의 40%까지 감소하고, 3개월 동안 저장한 후 ~15%까지만 떨어진다. 패널 b는 응집물을 전혀 갖지 않거나(레인 4) 또는 30%의 응집물을 가지는(레인 5) Medi3-V3의 2개 샘플의 코마시(coomassie) 염색 비-환원 PAGE 분석인데, 2개 샘플 모두 임의의 공유결합 응집물을 보이지 않는다. 패널 c는 하기 각각의 처리 후 40°C에서 먼저 항온처리된 10 mM 히스티딘 중의 80 mg/ml

Medi3-V3 용액의 응집률(%)에서의 감소를 보여주는 SEC 분석이다: 4℃에서 4시간 및 20시간 동안 항온처리(삼각형); 10 mg/ml까지 희석하고 4℃에서 4시간 및 20시간 동안 항온처리(사각형); 20 mM 시트레이트 완충제 내로 10 mg/ml까지 희석하고 4℃에서 4시간 및 20시간 동안 항온처리(폐쇄된 삼각형). 패널 d는 pH 6.0의 10 mM 히스티딘 완충제 중에 제제화되어 40℃에서 저장된 경우 시간 경과에 따른 100 mg/ml의 항-인테그린  $\alpha V\beta 3$  항체 Medi2 및 Medi2-V3 용액에 존재하는 단량체 비율(%)을 작도한 것이다. 단량체 비율은 40℃에서 2개월 반이 경과된 후 10% 미만까지 떨어지지만, Medi2-V3은 40℃에서 1주 미만 후 ~22%의 감소를 보인다.

<29> 도 3: Fc 변이체 영역은 감소된 Tm 값을 갖는다. 패널 a)에는 야생형 Medi3 및 2가지 Fc 변이체, 즉 Medi3-V1 및 Medi3-V3의 DSC 스캔이 나타나 있다. 화살표는 Medi3-V1 및 Medi3-V3의 Fc 영역의  $C_H^2$  도메인에 대한 보다 낮은 온도 용융 피크를 각각 ~59℃ 및 49℃에서 표시한다. 야생형 Medi3 항체의 용점은 ~72℃에서 가변 영역에 대해 관찰된 큰 피크와 중첩된다. 패널 b)에는 야생형 Medi2 및 Medi2-V3의 DSC 스캔이 나타나 있다. 화살표는 Medi2-V3의 Fc 영역의  $C_H^2$  도메인에 대한 Tm 피크를 표시한다. Medi3-V3에 대한 Tm은 Medi3-V3에 대해 관찰된 ~49℃의 Tm과 매우 유사한 ~47℃이다.

<30> 도 4: Medi3-V3의 응집은 농도 의존적이다. 40℃에서 pH 6.0의 10 mM 히스티딘 완충제 중에 저장된 10 mg/ml, 50 mg/ml 및 100 mg/ml의 Medi3-V3 용액에 대한 시간 경과에 따른 단량체 비율을 보여주는 도면은 10 mg/ml 용액의 경우 37일째 날에 5%의 감소를 보이고 50 mg/ml 및 100 mg/ml 용액의 경우 15일 직후 각각 15% 및 37% 감소를 보인다.

<31> 도 5: Medi3-V3의 응집은 온도 의존적이다. 4℃, 25℃ 및 40℃에서 pH 6.0의 10 mM 히스티딘 완충제 중에 저장된 100 mg/ml의 Medi3-V3 용액에 대한 시간 경과에 따른 단량체 비율을 보여주는 도면은 40℃에서 항온처리된 용액의 경우 15일 내에 약 37%의 감소를 보이고 4℃ 및 25℃에서 항온처리된 용액의 경우 30일에 걸쳐 5% 미만의 감소를 보인다.

<32> 도 6: 수크로스, 트레할로스 및 아르기닌은 Medi3-V3을 안정화시킨다. 10% 수크로스, 10% 트레할로스 또는 200 mM의 아르기닌 중 하나 이상의 부형제를 포함하는 pH 6.0의 10 mM 히스티딘 완충제 중에 제제화된 80 mg/ml의 Medi3-V3 용액을 40℃에서 7시간 동안 항온처리한 경우 순도 손실률(%)을 보여주는 도면은 각각의 부형제가 대조군(부형제 없음)에서 약 9%부터 2% 미만까지 손실률(%)을 감소시킨다는 것을 보여준다.

<33> 도 7: 보다 높은 농도의 당은 보다 효과적으로 안정화시킨다. 패널 a는 부형제로서 0%, 1%, 5% 또는 10%의 당(수크로스 또는 트레할로스)을 포함하는 pH 6.0의 10 mM 히스티딘 완충제 중에 제제화된 80 mg/ml의 Medi3-V3 용액을 40℃에서 24시간 동안 항온처리한 경우 순도 손실률(%)을 작도한 것으로서 각각 19%, 16%, 9% 및 3%의 순도 손실률(%)을 보여준다. 상기 2가지 당의 효과는 유사하였다. 패널 b는 부형제로서 0%, 5%, 10% 또는 20%의 당(트레할로스 또는 만니톨)을 포함하는 pH 6.0의 25 mM 히스티딘 완충제 중에 제제화된 50 mg/ml의 Medi3-V3 용액을 40℃에서 24시간 동안 항온처리한 경우 순도 손실률(%)을 작도한 것으로서 각각 8.4%, 4%, 2% 및 0.6%의 순도 손실률(%)을 보여준다. 상기 2가지 당의 효과는 유사하였다.

<34> 도 8: 양이온성 아미노산 및 음이온성 종은 안정화시킨다. 0, 50, 200 및/또는 400 mM의 최종 농도로 아르기닌, 리신, 글리신, 시스테인, 시트레이트 또는 DTPA 중 하나 이상의 부형제를 포함하는 pH 6.0의 10 mM 히스티딘 완충제 중에 제제화된 80 mg/ml의 Medi3-V3 용액을 40℃에서 24시간 동안 항온처리한 경우 순도 손실률(%)을 보여주는 도면은 시스테인 또는 DTPA 중 어느 것도 시험된 농도에서 손실률을 감소시키는데 효과적이지 않았지만, 다른 부형제 각각은 시트레이트>리신>아르기닌>글리신의 상대적 순서로 손실률을 감소시켰다는 것을 보여준다.

<35> 도 9: 5% 수크로스와 아르기닌은 조합되었을 경우 더 효과적이다. 부형제를 포함하지 않거나 5% 수크로스, 200 mM 아르기닌 또는 5% 수크로스 및 200 mM 아르기닌 둘다를 포함하는 pH 6.0의 10 mM 히스티딘 완충제 중에 제제화된 80 mg/ml의 Medi3-V3 용액을 40℃에서 24시간 동안 항온처리한 경우 순도 손실률(%)을 보여주는 도면은 각각 19%, 9%, 3.5% 및 1.5%의 순도 손실률(%)을 보여준다.

<36> 도 10: 양이온성 아미노산 및 음이온성 종은 안정화시킨다. 패널 a는 부형제를 포함하지 않거나 트레할로스(최종 10%), 리신, 아르기닌, 히스티딘, 시트레이트, 아스파르테이트, 석시네이트, 글루타메이트, 아세테이트, 포스페이트, 설페이트, 세린, 페닐알라닌, 알라닌, EDTA 또는 DTPA(각각 최종 50 mM)를 포함하는 pH 6.0의 10 mM 히스티딘 완충제 중에 제제화된 80 mg/ml의 Medi3-V3 용액을 40℃에서 19시간 동안 항온처리한 경우 순도 손실률(%)을 보여주는 도면은 각각 약 22%, 5.5%, 15.5%, 16%, 16%, 15%, 2%, 10%, 6%, 9%, 11%, <1%, 10%, 17%, 26%, 18%, 20% 및 24%의 순도 손실률(%)을 보여준다. 패널 b는 부형제를 포함하지 않거나 시트레이트, 아스파르

테이트, 아르기닌 또는 포스페이트를 각각 100 mM, 200 mM 또는 300 mM의 농도로 포함하는 pH 6.0의 25 mM 히스티딘 완충제 중에 제제화된 50 mg/ml의 Medi3-V3 용액을 40℃에서 24시간 동안 항온처리한 경우 순도 손실률(%)을 작도한 것이다. 시트레이트는 대조군에서 약 8.4%의 순도 손실률을 감소시켰고 100 mM에서 약 ~1.4%까지 순도 손실률을 감소시켰으며 200 mM 및 300 mM 둘다에서 ~0.8%까지 순도 손실률을 감소시켰다. 포스페이트는 100 mM에서 -1.8%의 순도 손실률을 감소시켰고 200 mM 및 300 mM 둘다에서 ~1.0%까지 순도 손실률을 감소시켰지만, 아르기닌만은 100 mM에서 ~6.0%까지 순도 손실률을 감소시켰고 200 mM 및 300 mM 둘다에서 ~4.8%까지 순도 손실률만을 감소시켰다.

<37> 도 11: 보다 낮은 농도의 트레할로스 및 시트레이트는 안정화시킨다. 패널 a는 부형제를 포함하지 않거나 트레할로스(최종 10%), 아르기닌, 리신, 시트레이트(각각 최종 50 mM) 또는 트레할로스와 아르기닌, 리신 또는 시트레이트의 조합물을 포함하는 10 mM 히스티딘 완충제(pH 6.0) 중에 제제화된 80 mg/ml의 Medi3-V3 용액을 40℃에서 19시간 동안 항온처리한 경우 순도 손실률(%)을 보여주는 도면으로서, 이때 조합된 시트레이트와 트레할로스가 시험된 농도에서 트레할로스 단독의 경우 ~7%까지 그리고 시트레이트 단독의 경우 ~2%까지 감소시킨 것에 비해 단지 약 1%까지 순도 손실률을 감소시키는 조합 효과를 보여준다. 패널 b는 pH 6.0에서 5%, 10% 또는 20%의 트레할로스 또는 만니톨과 조합된 100 mM, 200 mM 또는 300 mM 포스페이트 또는 시트레이트로 제제화된 50 mg/ml의 Medi3-V3 용액을 40℃에서 1주 동안 항온처리한 경우 순도 손실률(%)을 작도한 것이다(상세한 사항은 표 3 참조). 100 mM 시트레이트, 20% 트레할로스; 100 mM 시트레이트, 20% 만니톨 및 300 mM 시트레이트, 20% 트레할로스 제제는 안정한 항체에 대해 관찰된 순도 손실률(0.6%)에 비교할만한 1% 이하의 순도 손실률을 보여주었다.

<38> 도 12: 시트레이트는 히스티딘보다 더 강한 안정화제이다. 25 mM, 50 mM, 100 mM 및 200 mM의 시트레이트를 포함하는 pH 6.0의 10 mM 히스티딘 완충제 중에 제제화되거나 0 mM, 25 mM, 50 mM 및 100 mM의 히스티딘을 포함하는 pH 6.0의 10 mM 시트레이트 완충제 중에 제제화된 80 mg/ml의 Medi3-V3 용액을 40℃에서 19시간 동안 항온처리한 경우 순도 손실률(%)을 보여주는 도면은 시험된 각각의 농도에서 시트레이트가 히스티딘보다 강한 안정화 효과를 나타낸다는 것을 보여준다.

<39> 도 13: pH 5.5 이상이 안정화시킨다. pH 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7 및 8의 50 mM 시트레이트 완충제 중에 제제화된 80 mg/ml의 Medi3-V3 용액을 40℃에서 4시간 동안 항온처리한 경우 순도 손실률(%)을 보여주는 도면은 상기 손실률이 pH 값 5.5 미만의 경우 급격히 증가하고(21%부터 90%까지) pH 값 5.5 이상의 경우 감소한다(6%부터 1%까지)는 것을 보여준다.

<40> 도 14: 표준 완충제 농도의 시트레이트는 응집을 감소시킨다. pH ~5, 6 또는 7의 10, 20, 30 또는 50 mM 시트레이트 중에 제제화된 80 mg/ml의 Medi3-V3 용액을 40℃에서 4시간 동안 항온처리한 경우 순도 손실률(%)을 보여주는 도면은 시험된 모든 농도의 경우 pH 6 및 7에서 순도 손실률(%)이 ~6% 미만이었고 pH 5의 시트레이트는 안정화시키지 못한다는 것을 보여준다.

<41> 도 15: 시트레이트와 특정 아미노산 또는 음이온성 종의 조합물은 안정화시킨다. 20 mM의 시트레이트, 35 mM의 트레할로스, 아르기닌, 히스티딘, 리신, 아스파르테이트, 글루타메이트, 석시네이트 또는 포스페이트를 단독으로 또는 20 mM의 시트레이트와 함께 포함하는 pH 6.0의 10 mM 히스티딘 완충제 중에 제제화된 80 mg/ml의 Medi3-V3 용액을 40℃에서 4시간 동안 항온처리한 경우 순도 손실률(%)을 보여주는 도면은 시트레이트 단독의 경우 3.3%의 순도 손실률을 보여주고 히스티딘을 제외한 각각의 조합물의 경우 더 적은 순도 손실률(~0.5% 내지 ~1.85%)을 보여준다.

<42> 도 16: 조합 제제 효과의 맵핑(mapping). 패널 a 및 b는 10% 트레할로스, 10 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM 및 100 mM 농도의 시트레이트, 및 0 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM 및 200 mM 농도의 아르기닌을 포함하는 pH 6.0의 10 mM 히스티딘 완충제 중에 제제화된 80 mg/ml의 Medi3-V3 용액을 40℃에서 4시간 동안 항온처리한 경우 이론상 응집률(%) 곡선을 작도한 것이다.

<43> 도 17: 트레할로스는 모든 시트레이트 농도에서 강한 안정화 효과를 나타낸다. 100 mM 아르기닌, 10 mM, 25 mM, 50 mM 및 75 mM 농도의 시트레이트 및 0 내지 10% 농도의 트레할로스를 포함하는 pH 6.0의 10 mM 히스티딘 완충제 중에 제제화된 80 mg/ml의 Medi3-V3 용액을 40℃에서 4시간 동안 항온처리한 경우 이론상 응집률(%) 곡선이 작도되어 있다.

<44> 도 18: 제제 1은 Medi3-V3 안정성을 유의하게 개선시킨다. pH 6.5의 50 mM 시트레이트 및 10% 트레할로스 중에 제제화된 10 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml 또는 100 mg/ml의 Medi3-V3 용액을 4℃(패널 a), 25℃(패널 b) 또는

40℃(패널 c)에서 약 90일 동안 항온처리한 경우 시간 경과에 따른 단량체 비율(%)을 보여주는 도면은 pH 6.0의 10 mM 히스티딘 완충제 중의 상기 제제(도 2a 참조)에 비해 단량체 비율(%)에서 보다 덜한 감소를 보여준다.

<45> 도 19: 제제 2는 Medi3-V3 안정성을 유의하게 개선시킨다. pH 6.5의 25 mM 시트레이트, 200 mM 아르기닌 및 8% 트레할로스 중에 제제화된 10 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml 또는 100 mg/ml의 Medi3-V3 용액을 4℃(패널 a), 25℃(패널 b) 또는 40℃(패널 c)에서 약 90일 동안 항온처리한 경우 시간 경과에 따른 단량체 비율(%)을 보여주는 도면은 pH 6.0의 10 mM 히스티딘 중의 상기 제제(도 2a 참조)에 비해 단량체 비율(%)에서 보다 덜한 감소를 보여준다.

<46> 도 20: 두 가지 제제는 Medi2-V3 안정성을 유의하게 개선시킨다. pH 6.0의 10 mM 히스티딘 완충제(대조군 완충제) 중에 제제화된 80 mg/ml의 Medi2-V3 용액, pH 6.0의 50 mM 시트레이트 및 10% 트레할로스 중에 제제화된 80 mg/ml의 Medi2-V3 용액(제제 1) 또는 pH 6.0의 25 mM 시트레이트, 200 mM 아르기닌 및 8% 트레할로스 중에 제제화된 80 mg/ml의 Medi2-V3 용액(제제 2)을 40℃에서 72시간 동안 항온처리한 경우 시간 경과에 따른 단량체 비율(%)을 보여주는 도면은 제제 1 및 2 둘다가 안정성을 급격히 개선시킨다는 것을 보여준다.

<47> 도 21: 동일한 변이체 Fc 영역을 가지는 상이한 에피토프를 인식하는 항체는 동일한 제제에 의해 안정화된다. 40℃에서 0시간 및 3일 후 상이한 제제, 즉 Medi2-V3 및 Medi3-V3 제제에 존재하는 응집물의 비율(%)이 작도되어 있다. 상기 항체 둘다 pH 6의 10 mM 히스티딘(His) 중에 제제화된 경우 3일 후 ~23% 응집물을 나타낸다. pH 6의 10% 트레할로스 및 50 mM 시트레이트(Tre/Cit) 중에 제제화된 경우 또는 pH 6의 8% 트레할로스, 25 mM 시트레이트 및 200 mM 아르기닌(Tre/Cit/ Arg) 중에 제제화된 경우, 상기 항체 둘다 상기 두 가지 제제에 대해 각각 ~4% 및 ~8%의 유의하게 감소된 응집물을 보여준다.

<48> 도 22: 히스티딘을 포함하지 않는 일부 시트레이트/트레할로스 제제는 Medi3-V3을 안정화시킨다. 4가지 상이한 시트레이트/트레할로스 제제 중에서 제제화된 Medi3-V3의 응집률, 단량체 손실률, 단편화 비율 및 전하 변이체 비율(표 4 참조)은 40℃에서 1개월(28일) 동안의 항온처리에 걸쳐 측정되었다. pH 6.0의 10 mM 히스티딘 중에 제제화된 Medi2는 이 연구에서 대조군으로서 사용되었다. 패널 a는 응집률(%)을 작도한 것인데, 28일 후 대조군은 1.8%의 응집률을 보였지만, 제제 A, B, C 및 D 중의 Medi3-V3은 각각 4.18%, 2.48%, 6.14% 및 2.87%의 응집률을 보였다. 패널 b는 단량체 손실률(%)을 작도한 것인데, 28일 후 대조군은 4.6%의 단량체 손실률을 보였지만, 제제 A, B, C 및 D 중의 Medi3-V3은 각각 5.9, 3.61, 8.37 및 4.58%의 단량체 손실률을 보였다. 패널 c는 단편 비율을 작도한 것인데, 제제 A 내지 D 사이에서 차이가 거의 관찰되지 않았다. 패널 d는 전하 변이체 비율(에비피크 %)을 작도한 것인데, 제제 A 내지 D 사이에서 차이가 전혀 관찰되지 않았다.

<49> 도 23: 제제 B는 Medi3-V3의  $C_H^2$  도메인의 Tm을 증가시킨다. Medi3-V3을 pH 6.0의 10 mM 히스티딘(직선) 또는 제제 B(점선)에 0.5 mg/ml의 양으로 제제화시키고  $C_H^2$  도메인의 Tm을 측정하였다. 패널 a는 DSC 스캔인데, 10 mM 히스티딘(pH 6.0) 중의  $C_H^2$  도메인에 대한 융점 피크는 ~48℃이고 완충제 B 중에서 ~55℃로 변동되었다. 패널 b는 329 nm 대 온도에서 형광 방출 강도를 작도한 것인데, 화살표는  $C_H^2$  도메인의 융점과 일치하는 전이를 표시한다. 제제 B 중의 Medi3-V3의  $C_H^2$  도메인의 융점이 약 10℃ 만큼 증가하였다. 패널 c는 제2 차수 유도체 UV-Vis 모니터링 용융을 작도한 것인데, 화살표는  $C_H^2$  도메인의 용융과 일치하는 전이를 표시한다. 제제 B 중의 Medi3-V3의  $C_H^2$  도메인의 융점이 약 7℃ 만큼 증가하였다.

<50> 도 24: 시스테인은 Medi3-V3의 응집을 증가시킨다. 패널 a는 50 mM의 시스테인의 존재 하에(레인 1 및 4) 및 시스테인의 부재 하에(레인 2 및 5) 37℃에서 16시간 동안 항온처리된 Medi3-V3(레인 1 및 2) 및 Medi2(레인 4 및 5), 및 37℃에서 항온처리되지 않은 대조군 샘플(레인 3 및 6)의 코마시 염색 비-환원 PAGE 겔이다. 레인 7은 분자량 마커이고, 크기가 표시되어 있다. 패널 b는 50 mM의 시스테인의 존재 하에 및 시스테인의 부재 하에 37℃에서 16시간 동안 항온처리된 Medi3-V3 및 37℃에서 항온처리되지 않은 대조군 샘플의 SEC 분석으로서, 시스테인의 존재 하에 거의 모든 항체가 응집되지만(바닥), 시스테인의 부재 하에(중간) 및 대조군 샘플(바닥)에서는 응집을 거의 또는 전혀 보이지 않는다는 것을 보여준다. 패널 c는 50 mM의 시스테인의 존재 하에(바닥) 및 시스테인의 부재 하에(중간) 37℃에서 항온처리된 Medi2 및 37℃에서 항온처리되지 않은 대조군 샘플(상부)의 SEC 분석인데, 이들 각각은 단지 ~1 내지 1.4%의 응집만을 보였다.

<51> [상세한 설명]

<52> 본 발명은 부분적으로, 일부 제제가 야생형 Fc 영역을 포함하는 동일한 단백질에 비해 더 응집되기 쉬운 비천연 발생 Fc 영역(본 명세서에서 "변이체 Fc 영역")으로 지칭됨)을 포함하는 단백질을 안정화시킨다는 관찰에 기초한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명자들은 변이체 Fc 영역을 포함하는 단백질이 다양한 완충제 예컨대, pH 6의 10 mM 히스티딘 완충제 중에 제제화된 경우 야생형 Fc 영역을 포함하는 동일한 단백질에 비해 더 응집되기 쉽고 일부 제제가 변이체 Fc 영역을 포함하는 단백질의 응집을 감소시킴으로써 이 단백질을 안정화시킨다는 것을 발견하였다. 따라서, 본 발명은 단백질의 응집을 감소시킴으로써 변이체 Fc 영역을 포함하는 단백질의 안정성을 증가시키는 제제를 제공한다. 변이체 Fc 영역을 포함하는 단백질(본 명세서에서 "Fc 변이체 단백질(들)"로서 지칭됨)에는 항체 및 Fc 융합 단백질이 포함되나 이들로 한정되지 않는다. 본 명세서에서 사용된 바와 같은 "Fc 융합 단백질" 및 "Fc 융합체"는 하나 이상의 폴리펩티드 또는 소분자가 Fc 영역 또는 이의 단편에 연결되어 있는 단백질이다. 본 명세서에서 Fc 융합체는 선행 기술에서 사용된 바와 같은 용어 "면역부착제(immunoadhesin)", "Ig 융합체", "Ig 키메라" 및 "수용체 글로불린"과 동일한 의미를 갖는다[예컨대, 문헌(Chamow et al., 1996, Trends Biotechnol 14:52-60; Ashkenazi et al., 1997, Curr Opin Immunol 9: 195-200) 참조]. 변이체 Fc 단백질은 단백질 또는 이의 단편(예를 들어, 원하는 항원 또는 원하는 수용체의 세포의 도메인에 면역특이적으로 결합하는 가변 도메인)을 변이체 Fc 영역과 조합함으로써 "드 노보(de novo)" 제조될 수 있거나, 하나 이상의 비천연 발생 잔기를 Fc 영역 내로 도입하여 Fc 영역-함유 단백질(예를 들어, 원하는 항원 또는 Fc 융합 단백질에 결합하는 항체)을 변형시킴으로써 제조할 수 있다.

<53> 본 발명에 의해 제공된 제제는 야생형 Fc 영역을 포함하는 동일한 단백질에 비해 더 응집되기 쉬운 Fc 변이체 단백질에 있어서 특히 유용하다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 변이체 Fc 영역 대신에 야생형(WT) Fc 영역을 포함한다는 점을 제외하고 Fc 변이체 단백질로서 동일한 아미노산 서열을 가지는 단백질은 "비교 분자"로 지칭된다.

## <54> 1. 변이체 단백질 제제

<55> 본 발명은 저장 시 Fc 변이체 단백질 성분의 감소된 응집 때문에 증가된 안정성을 나타내는 Fc 변이체 단백질(본 명세서에서 "본 발명의 제제"로 지칭됨) 제제를 제공한다. 본 발명의 제제는 치료, 예방 또는 진단 용도를 가지는 임의의 Fc 변이체 단백질을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, Fc 변이체 단백질은 특히 pH 6의 10 mM 히스티딘 중에 제제화되는 경우 비교 분자에 비해 더 응집되기 쉬운 단백질이다.

<56> 본 발명의 제제는 Fc 변이체 단백질 및 완충제를 포함하고 탄수화물 부형제, 양이온성 아미노산 및 음이온으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 추가 성분을 추가로 포함한다. 본 발명의 제제는 안정한 액체 제제 및 사전 동결건조 벌크 제제를 포함한다.

<57> 일부 실시양태에서, 본 발명의 제제는 약 1 mg/ml 내지 약 200 mg/ml의 Fc 변이체 단백질 및 약 1 mM 내지 약 100 mM의 완충제를 포함하고 pH가 약 5.5 내지 약 8이며 약 1% 내지 약 15%의 중량/부피의 탄수화물 부형제, 약 1 mM 내지 약 400 mM의 양이온성 아미노산 및 약 1 mM 내지 약 200 mM의 음이온으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 추가 성분을 추가로 포함한다.

<58> 다른 실시양태에서, 본 발명의 제제는 약 1 mg/ml 내지 약 200 mg/ml의 Fc 변이체 단백질 및 약 1 mM 내지 약 100 mM의 완충제를 포함하고 pH가 약 5.5 내지 약 8이며 약 1% 내지 약 20%의 중량/부피의 탄수화물 부형제, 약 1 mM 내지 약 400 mM의 양이온성 아미노산 및 약 1 mM 내지 약 200 mM의 음이온으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 추가 성분을 추가로 포함한다.

<59> 한 실시양태에서, 본 발명의 제제는 본 발명의 제제는 약 1 mg/ml 내지 약 200 mg/ml의 Fc 변이체 단백질, 약 1 mM 내지 약 100 mM의 완충제, 및 약 1% 내지 약 15%의 중량/부피의 탄수화물 부형제를 포함하며 pH가 약 5.5 내지 약 8이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 제제는 약 1 mg/ml 내지 약 200 mg/ml의 Fc 변이체 단백질, 약 1 mM 내지 약 100 mM의 완충제, 및 약 1% 내지 약 20%의 중량/부피의 탄수화물 부형제를 포함하며 pH가 약 5.5 내지 약 8이다.

<60> 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 제제는 약 1 mg/ml 내지 약 200 mg/ml의 Fc 변이체 단백질, 약 1 mM 내지 약 100 mM의 완충제, 및 약 1 mM 내지 약 400 mM의 양이온성 아미노산을 포함하며 pH가 약 5.5 내지 약 8이다.

<61> 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 제제는 약 1 mg/ml 내지 약 200 mg/ml의 Fc 변이체 단백질, 약 1 mM 내지 약 100 mM의 완충제, 및 약 1 mM 내지 약 200 mM의 음이온을 포함하며 pH가 약 5.5 내지 약 8이다.

- <62> 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 제제는 약 1 mg/ml 내지 약 200 mg/ml의 Fc 변이체 단백질, 약 1 mM 내지 약 100 mM의 완충제, 약 1% 내지 약 15% 중량/부피의 탄수화물 부형제, 및 약 1 mM 내지 약 400 mM의 양이온성 아미노산을 포함하며 pH가 약 5.5 내지 약 8이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 제제는 약 1 mg/ml 내지 약 200 mg/ml의 Fc 변이체 단백질, 약 1 mM 내지 약 100 mM의 완충제, 약 1% 내지 약 20% 중량/부피의 탄수화물 부형제, 및 약 1 mM 내지 약 400 mM의 양이온성 아미노산을 포함하며 pH가 약 5.5 내지 약 8이다.
- <63> 다른 실시양태에서, 본 발명의 제제는 약 1 mg/ml 내지 약 200 mg/ml의 Fc 변이체 단백질, 약 1 mM 내지 약 100 mM의 완충제, 약 1% 내지 약 15% 중량/부피의 탄수화물 부형제, 및 약 1 mM 내지 약 200 mM의 음이온을 포함하며 pH가 약 5.5 내지 약 8이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 제제는 약 1 mg/ml 내지 약 200 mg/ml의 Fc 변이체 단백질, 약 1 mM 내지 약 100 mM의 완충제, 약 1% 내지 약 20% 중량/부피의 탄수화물 부형제, 및 약 1 mM 내지 약 200 mM의 음이온을 포함하며 pH가 약 5.5 내지 약 8이다.
- <64> 다른 실시양태에서, 본 발명의 제제는 약 1 mg/ml 내지 약 200 mg/ml의 Fc 변이체 단백질 및 약 1 mM 내지 약 100 mM의 완충제를 포함하고 약 1 mM 내지 약 400 mM의 양이온성 아미노산 및 약 1 mM 내지 약 200 mM의 음이온을 추가로 포함하며 pH가 약 5.5 내지 약 8이다.
- <65> 다른 실시양태에서, 본 발명의 제제는 약 1 mg/ml 내지 약 200 mg/ml의 Fc 변이체 단백질, 약 1 mM 내지 약 100 mM의 완충제, 약 1% 내지 약 15% 중량/부피의 탄수화물 부형제, 약 1 mM 내지 약 400 mM의 양이온성 아미노산 및 약 1 mM 내지 약 200 mM의 음이온을 포함하며 pH가 약 5.5 내지 약 8이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 제제는 약 1 mg/ml 내지 약 200 mg/ml의 Fc 변이체 단백질, 약 1 mM 내지 약 100 mM의 완충제, 약 1% 내지 약 20% 중량/부피의 탄수화물 부형제, 약 1 mM 내지 약 400 mM의 양이온성 아미노산 및 약 1 mM 내지 약 200 mM의 음이온을 포함하며 pH가 약 5.5 내지 약 8이다.
- <66> 경우에 따라, 본 발명의 제제는 다른 통상의 보조 성분 예컨대, 적절한 부형제, 가용화제, 희석제, 결합제, 안정화제, 염, 친지성 용매, 계면활성제, 킬레이터, 보존제 등(이들로 한정되지 않음)을 추가로 포함할 수 있다.
- <67> 한 실시양태에서, 본 발명의 제제는 약 1 mg/ml 이상, 약 10 mg/ml 이상, 약 15 mg/ml 이상, 약 25 mg/ml 이상, 약 50 mg/ml 이상, 약 75 mg/ml 이상, 약 100 mg/ml 이상, 약 150 mg/ml 이상, 약 200 mg/ml 이상, 약 250 mg/ml 이상 또는 약 300 mg/ml 이상의 농도로 Fc 변이체 단백질을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 제제는 1 mg/ml 이상, 10 mg/ml 이상, 15 mg/ml 이상, 25 mg/ml 이상, 50 mg/ml 이상, 75 mg/ml 이상, 100 mg/ml 이상, 150 mg/ml 이상, 200 mg/ml 이상, 250 mg/ml 이상 또는 300 mg/ml 이상의 농도로 Fc 변이체 단백질을 포함한다. 본 발명의 제제는 약 25 mg/ml 이상 내지 약 200 mg/ml 이상의 농도에서 Fc 변이체 단백질의 예시적 안정화를 제공한다.
- <68> 본 발명의 제제는 완충제 또는 pH 조절제를 포함하여 개선된 pH 조절을 제공한다. 본 발명의 제제의 pH는 넓은 범위를 커버할 수 있고, 예컨대 약 pH 5.5 내지 약 pH 8일 수 있다. 한 실시양태에서, pH는 약 pH 6 내지 약 pH 8이다. 또 다른 실시양태에서, pH는 약 pH 6 내지 약 pH 7이다. 또 다른 실시양태에서, pH는 약 pH 6.0 내지 약 pH 6.5이다. 또 다른 실시양태에서, pH는 약 pH 6.5 내지 약 pH 7이다. 특정 실시양태에서, pH는 약 6이다. 또 다른 특정 실시양태에서, pH는 약 6.5이다. 다른 특정 실시양태에서, pH는 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9 또는 7.0이다.
- <69> 전형적으로, 완충제는 유기 또는 무기 산 또는 염기로부터 제조된 염이다. 대표적인 완충제에는 유기산 염 예컨대, 시트르산 염, 아스코르브산 염, 글루콘산 염, 카본산 염, 타르타르산 염, 석신산 염, 아세트산 염 또는 프탈산 염; 트리스, 트로메트아민 히드로클로라이드 또는 포스페이트 완충제가 포함되나 이들로 한정되지 않는다. 또한, 아미노산 성분들은 완충 능력에 있어서 작용할 수도 있다. 본 발명의 제제에서 완충제로서 사용될 수 있는 대표적인 아미노산 성분에는 글리신 및 히스티딘이 포함되나 이들로 한정되지 않는다. 일부 실시양태에서, 완충제는 히스티딘, 포스페이트 및 시트레이트로 구성된 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 완충제는 시트레이트이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 완충제는 포스페이트이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 완충제는 히스티딘이다. 완충제의 순도는 98% 이상, 99% 이상 또는 99.5% 이상이어야 한다.
- <70> 일부 실시양태에서, 본 발명의 제제는 2개의 양이온성 아미노산, 즉 완충제로서의 양이온성 아미노산 및 제제의 양이온성 아미노산 성분으로서의 양이온성 아미노산을 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 제제는 완충을 위해 전형적으로 사용되는 농도보다 높은(예를 들어, 약 5 mM 내지 50 mM보다 높은) 농도로 양이온성 아미노산을 포함할 수 있는데, 이때 양이온성 아미노산은 완충제 및 제제의 양이온성 아미노산 성분 둘다로서 작용한다. 양이온성 아미노산이 완충제 및 제제의 양이온성 아미노산 성분 둘다로서 작용하는 제제에 있어서 양이

온성 아미노산의 최종 농도는 완충제의 농도와 양이온성 아미노산의 농도의 합계일 것임이 예상된다. 따라서, 양이온성 아미노산이 완충제 및 제제의 양이온성 아미노산 둘다로서 작용하는 실시양태에서, 양이온성 아미노산은 약 50 mM 내지 약 500 mM, 약 100 mM 내지 약 300 mM, 약 200 mM 내지 약 300 mM 또는 약 300 mM 내지 약 400 mM의 농도로 존재한다. 양이온성 아미노산이 완충제 및 제제의 양이온성 아미노산 성분 둘다로서 작용하는 일부 실시양태에서, 양이온성 아미노산은 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM, 300 mM, 350 mM 또는 400 mM의 농도로 존재한다.

<71> 일부 실시양태에서, 본 발명의 제제는 약 1 mg/ml 내지 약 200 mg/ml의 Fc 변이체 단백질, 약 100 mM 내지 약 500 mM의 양이온성 완충제 및 약 5% 내지 약 20% 중량/부피의 탄수화물 부형제를 포함하며 pH가 약 5.5 내지 약 8이다.

<72> 일부 실시양태에서, 본 발명의 제제는 2개의 음이온, 즉 완충제로서의 음이온 및 제제의 음이온 성분으로서의 음이온을 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 제제는 완충을 위해 전형적으로 사용되는 농도보다 높은(예를 들어, 약 5 mM 내지 50 mM 더 높은) 농도로 음이온을 포함할 수 있는데, 이때 음이온은 완충제 및 제제의 음이온 성분 둘다로서 작용한다. 음이온이 완충제 및 제제의 음이온 성분 둘다로서 작용하는 제제에 있어서 음이온의 최종 농도는 완충제의 농도와 음이온의 농도의 합계일 것임이 예상된다. 따라서, 음이온이 완충제 및 제제의 음이온 성분 둘다로서 작용하는 실시양태에서, 음이온은 약 50 mM 내지 약 300 mM, 약 100 mM 내지 약 200 mM, 또는 약 200 mM 내지 약 300 mM의 농도로 존재한다. 음이온이 완충제 및 제제의 음이온 성분 둘다로서 작용하는 일부 특정 실시양태에서, 음이온은 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM 또는 300 mM의 농도로 존재한다.

<73> 다른 실시양태에서, 본 발명의 제제는 약 1 mg/ml 내지 약 200 mg/ml의 Fc 변이체 단백질, 약 100 mM 내지 약 300 mM의 음이온성 완충제 및 약 5% 내지 20% 중량/부피의 탄수화물 부형제를 포함하며 pH가 약 5.5 내지 약 8이다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 제제는 약 50 mg/ml 내지 약 200 mg/ml의 Fc 변이체 단백질, 약 100 mM 내지 약 200 mM의 음이온성 완충제 및 약 10% 내지 약 15% 중량/부피의 탄수화물 부형제를 포함하며 pH가 약 6.0 내지 약 6.5이다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 제제는 50 mg/ml 내지 200 mg/ml의 Fc 변이체 단백질, 100 mM 내지 200 mM의 음이온성 완충제 및 10% 내지 15% 중량/부피의 탄수화물 부형제를 포함하며 pH가 6.0 내지 6.5이다.

<74> 완충제는 전형적으로, 원하는 음이온 강도 및 요구되는 완충 능력에 따라 1 mM 내지 200 mM 또는 이 범위 내의 임의의 범위 또는 값의 농도로 사용된다. 비경구 제제에서 사용되는 보편적인 완충제의 통상의 농도는 문헌(Pharmaceutical Dosage Form: Parenteral Medications, Volume 1, 2<sup>nd</sup> Edition, Chapter 5, p. 194, De Luca and Boylan, "Formulation of Small Volume Parenterals", Table 5: Commonly used additives in Parenteral Products)에서 찾을 수 있다. 한 실시양태에서, 완충제는 약 1 mM, 약 5 mM, 약 10 mM, 약 20 mM, 약 30 mM, 약 40 mM, 약 50 mM, 약 60 mM, 약 70 mM, 약 80 mM, 약 90 mM 또는 약 100 mM의 농도로 존재한다. 한 실시양태에서, 완충제는 1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM 또는 100 mM의 농도로 존재한다. 특정 실시양태에서, 완충제는 약 10 mM 내지 약 50 mM의 농도로 존재한다. 또 다른 특정 실시양태에서, 완충제는 10 mM 내지 50 mM의 농도로 존재한다.

<75> 일부 실시양태에서, 본 발명의 제제는 탄수화물 부형제를 포함한다. 탄수화물 부형제는 예를 들어, 점도 상승제, 안정화제, 증량제(bulking agent), 가용화제 등으로서 작용할 수 있다. 탄수화물 부형제는 일반적으로 약 1% 내지 약 99% 중량/부피로 존재한다. 한 실시양태에서, 탄수화물 부형제는 약 1% 내지 약 20%로 존재한다. 또 다른 실시양태에서, 탄수화물 부형제는 약 1% 내지 약 15%로 존재한다. 특정 실시양태에서, 탄수화물 부형제는 약 1% 내지 약 20%, 약 5% 내지 약 15%, 약 8% 내지 약 10%, 약 10% 내지 약 15%, 또는 약 15% 내지 약 20%로 존재한다. 또 다른 특정 실시양태에서, 탄수화물 부형제는 1% 내지 20%, 5% 내지 15%, 8% 내지 10%, 10% 내지 15%, 또는 15% 내지 20%로 존재한다. 또 다른 특정 실시양태에서, 탄수화물 부형제는 약 5% 내지 약 10%로 존재한다. 또 다른 특정 실시양태에서, 탄수화물 부형제는 약 10% 내지 약 15%로 존재한다. 또 다른 특정 실시양태에서, 탄수화물 부형제는 약 15% 내지 약 20%로 존재한다. 또 다른 특정 실시양태에서, 탄수화물 부형제는 1%, 5%, 10%, 15% 또는 20%로 존재한다.

<76> 본 발명의 제제에서 사용하기에 적합한 탄수화물 부형제로는 예를 들어, 단당류 예컨대, 프럭토스, 말토스, 갈락토스, 글루코스, D-만노스, 소르브스 등; 이당류 예컨대, 락토스, 수크로스, 트레할로스, 셀로비오스 등; 다당류 예컨대, 라피노스, 말레티토스, 말토덱스트린, 텍스트란, 전분 등; 알디톨 예컨대, 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 락티톨, 자일리톨 소르비톨(글루시톨) 등이 있다. 한 실시양태에서, 본 발명에서 사용되는 탄수화물 부형

제는 수크로스, 트레할로스, 락토스, 만니톨 및 라피노스로 구성된 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 탄수화물 부형제는 수크로스이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 탄수화물 부형제는 트레할로스이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 탄수화물 부형제는 만니톨이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 탄수화물 부형제는 라피노스이다. 탄수화물 부형제의 순도는 98% 이상, 99% 이상 또는 99.5% 이상이어야 한다.

<77> 일부 실시양태에서, 본 발명의 제제는 양이온성 아미노산을 포함한다. 한 실시양태에서, 양이온성 아미노산은 약 1 mM 내지 약 400 mM로 존재한다. 특정 실시양태에서, 양이온성 아미노산은 약 25 mM 내지 약 200 mM로 존재한다. 또 다른 특정 실시양태에서, 양이온성 아미노산은 10 mM 이상, 20 mM 이상, 30 mM 이상, 40 mM 이상, 50 mM 이상, 75 mM 이상, 100 mM 이상, 150 mM 이상, 200 mM 이상, 250 mM 이상, 300 mM 이상, 350 mM 이상 또는 400 mM 이상의 농도로 존재한다. 양이온성 아미노산은 당업자에게 공지되어 있고 천연 발생 또는 변형된 아미노산일 수 있다. 본 발명의 제제에서 사용될 수 있는 양이온성 아미노산으로는 L-리신, D-리신, L-다이메틸리신, D-다이메틸리신, L-히스티딘, D-히스티딘, L-오르니틴, D-오르니틴, L-아르기닌, D-아르기닌, L-호모아르기닌, D-호모아르기닌, L-노르아르기닌, D-노르아르기닌, 2,4-디아미노부티르산, 호모리신 및 p-리신이 있으나 이들로 한정되지 않는다. 한 실시양태에서, 본 발명의 제제는 양이온성 아미노산 리신을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 제제는 양이온성 아미노산 아르기닌을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 제제는 양이온성 아미노산 히스티딘을 포함한다. 본 발명의 제제가 2개의 양이온성 아미노산, 즉 완충제로서의 양이온성 아미노산 및 제제의 양이온성 아미노산 성분으로서의 양이온성 아미노산을 포함할 수 있다는 것이 예상된다. 전술한 바와 같이, 양이온성 아미노산은 고농도로 존재할 수 있고 완충제 및 제제의 양이온성 아미노산 성분 둘다로서 작용할 수 있다. 양이온성 아미노산의 순도는 98% 이상, 99% 이상 또는 99.5% 이상이어야 한다.

<78> 일부 실시양태에서, 본 발명의 제제는 음이온을 포함한다. 한 실시양태에서, 음이온은 약 1 mM 내지 약 200 mM로 존재한다. 또 다른 특정 실시양태에서, 음이온은 10 mM 이상, 20 mM 이상, 30 mM 이상, 40 mM 이상, 50 mM 이상, 75 mM 이상, 100 mM 이상, 150 mM 이상 또는 200 mM 이상의 농도로 존재한다. 음이온의 비-제한적 예로는 니트레이트, 니트라이트, 클로라이드, 시아나이드, 브로마이드, 요오다이드, 카보네이트, 바이카보네이트, 설페이트, 포스페이트, 아세테이트, 시트레이트 및 석시네이트를 들 수 있다. 또한, L-아스파르테이트, D-아스파르테이트, L-글루타메이트, D-글루타메이트,  $\gamma$ -카복시글루타메이트를 포함하나 이들로 한정되지 않는 다수의 천연 발생 아미노산 및 변형된 아미노산이 음이온으로서 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 제제는 음이온 시트레이트를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 제제는 음이온 석시네이트를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 제제는 음이온 포스페이트를 포함한다. 본 발명의 제제는 2개의 음이온, 즉 완충제로서의 음이온 및 제제의 음이온 성분으로서의 음이온을 포함할 수 있다는 것이 예상된다. 전술한 바와 같이, 양이온성 아미노산은 고농도로 존재할 수 있고 완충제 및 제제의 음이온 성분 둘다로서 작용할 수 있다. 음이온의 순도는 98% 이상, 99% 이상 또는 99.5% 이상이어야 한다.

<79> 일부 실시양태에서, 본 발명의 제제는 아미노산을 포함한다. 한 실시양태에서, 아미노산은 약 1 mM 내지 약 200 mM의 농도로 존재한다. 또 다른 특정 실시양태에서, 아미노산은 10 mM 이상, 20 mM 이상, 30 mM 이상, 40 mM 이상, 50 mM 이상, 75 mM 이상, 100 mM 이상, 150 mM 이상 또는 200 mM 이상의 농도로 존재한다. 아미노산의 비-제한적 예로는 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루탐산, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신 및 발린을 들 수 있다. 또한, 다수의 변형된 아미노산이 사용될 수 있다. 본 발명의 제제는 2개의 아미노산, 예를 들어, 제제의 음이온 성분으로서의 아미노산 및 부형제로서의 아미노산을 포함할 수 있다는 것이 예상된다. 별법으로, 본 발명의 제제는 2개의 아미노산을 포함할 수 있는데, 이때 하나는 제제의 양이온성 아미노산 성분이고 다른 하나는 부형제이다. 단일 아미노산이 고농도로 존재할 수 있고 부형제 및 양이온성 아미노산 및/또는 제제의 음이온 성분으로서 작용할 수 있다는 것이 예상된다. 아미노산의 순도는 98% 이상, 99% 이상 또는 99.5% 이상이어야 한다.

<80> 일부 실시양태에서, 본 발명의 제제는 부형제 및/또는 첨가제로서 시스테인을 포함하지 않는다. 일부 다른 실시양태에서, 본 발명의 제제는 부형제 및/또는 첨가제로서 메티오닌을 포함하지 않는다.

<81> 경우에 따라, 본 발명의 제제는 희석제, 결합제, 안정화제, 완충제, 염, 친지성 용매, 보존제, 보조제, 계면활성제 등을 포함하나 이들로 한정되지 않는 다른 통상의 부형제 및/또는 첨가제를 추가로 포함할 수 있다. 약학적으로 허용가능한 부형제 및/또는 첨가제가 본 발명의 제제에서 사용되기에 바람직하다. 통상적으로 사용되는 부형제/첨가제 예를 들어, 약학적으로 허용가능한 계면활성제, 예컨대, 폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트, 트윈 40(폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노팔미테이트), 트윈 80(폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노올레에이트), 플루로닉 F68(폴리옥시에틸렌 폴리옥시프로필렌 블록 공중합체)

및 PEG(폴리에틸렌 글리콜), 또는 계면활성제 예컨대, 폴리소르베이트 20 또는 80 또는 폴록사머 184 또는 188, 플루로닉<sup>®</sup> 폴릴, 다른 블록 공중합체 및 킬레이터 예컨대, EDTA, DTPA 또는 EGTA를 경우에 따라 본 발명의 제제에 첨가하여 응집을 감소시킬 수 있다. 이 첨가제들은 펌프 또는 플라스틱 용기가 제제를 투여하는 데 사용되는 경우 특히 유용하다. 약학적으로 허용가능한 계면활성제의 존재는 단백질이 응집되는 경향을 감소시킨다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 제제는 약 0.001% 내지 약 1%, 약 0.001% 내지 약 0.1% 또는 약 0.01% 내지 약 0.1%의 농도로 폴리소르베이트를 포함한다. 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 제제는 0.001%, 0.002%, 0.003%, 0.004%, 0.005%, 0.006%, 0.007%, 0.008%, 0.009%, 0.01%, 0.015 또는 0.02%의 농도로 폴리소르베이트를 포함한다. 또 다른 특정 실시양태에서, 폴리소르베이트는 폴리소르베이트-80이다.

<82> 보존제 예컨대, 페놀, m-크레졸, p-크레졸, o-크레졸, 클로로크레졸, 벤질 알코올, 페닐머큐릭 니트라이트, 페녹시에탄올, 포름알데히드, 클로로부탄올, 염화마그네슘(예를 들어, 헥사히드레이트), 알킬파라벤(메틸, 에틸, 프로필, 부틸 등), 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드, 소듐 데히드로아세테이트 및 티메로살, 또는 이들의 혼합물일 경우에 따라 임의의 적절한 농도 예를 들어, 약 0.001% 내지 약 5% 또는 이 범위 내의 임의의 범위 또는 값으로 본 발명의 제제에 첨가될 수 있다. 본 발명의 제제에 사용되는 보존제의 농도는 항균 효과를 나타내기에는 충분한 농도이다. 이러한 농도는 선택되는 보존제에 달려 있으며 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

<83> 본 발명의 제제에 사용될 수 있는 다른 고려되는 부형제/첨가제로는 예를 들어, 방향제, 향균제, 감미제, 향산 화제, 대전방지제, 지질 예컨대, 인지질 또는 지방산, 스테로이드 예컨대, 콜레스테롤, 단백질 부형제 예컨대, 혈청 알부민(인간 혈청 알부민(HSA), 재조합 인간 알부민(rHA)), 젤라틴, 카세인, 염-형성 반대이온 예컨대, 나트륨 등이 있다. 본 발명의 제제에서 사용되기에 적합한 이들 공지된 약학 부형제 및/또는 첨가제 또는 추가의 공지된 약학 부형제 및/또는 첨가제는 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어, 문헌["Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 21<sup>st</sup> ed., Lippincott Williams & Wilkins, (2005), and in the "Physician's Desk Reference", 60<sup>th</sup> ed., Medical Economics, Montvale, N.J. (2005)]에 기재되어 있다. 당업계에 잘 공지되어 있거나 본 명세서에 기재된 바와 같이 투여 방식, Fc 변이체 단백질의 가용성 및/또는 안정성에 적합한 약학적으로 허용가능한 담체를 관용적으로 선택할 수 있다.

<84> 당업자라면 본 발명의 제제가 인간 혈액에 대해 등장성을 가질 수 있다는 것, 즉 본 발명의 제제가 인간 혈액과 본질적으로 동일한 삼투압을 가진다는 것을 이해할 것이다. 이러한 등장성 제제는 일반적으로 약 250 mOsm 내지 약 350 mOsm의 삼투압을 가질 것이다. 등장성은 예를 들어, 증기압 또는 빙냉 유형의 삼투압측정기를 사용하여 측정할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 제제는 약 100 mOsm 내지 약 1200 mOsm, 약 200 mOsm 내지 약 1000 mOsm, 약 200 mOsm 내지 약 800 mOsm, 약 200 mOsm 내지 약 600 mOsm, 약 250 mOsm 내지 약 500 mOsm, 약 250 mOsm 내지 약 400 mOsm, 또는 약 250 mOsm 내지 약 350 mOsm의 삼투압을 가진다. 따라서, 본 발명의 제제 성분들의 농도는 최종 제제(예를 들어, 최종 액체 제제 또는 재구성된 제제)의 원하는 등장성에 따라 조절된다. 예를 들어, Fc 변이체 단백질에 대한 탄수화물 부형제의 비는 당업계에 공지된 방법(예를 들어, 미국 특허 제 6,685,940호)에 따라 조절할 수 있다. 특정 실시양태에서, Fc 변이체 단백질에 대한 탄수화물 부형제의 비는 약 1 몰의 Fc 변이체 단백질에 대한 약 100 몰 내지 약 1000 몰의 탄수화물 부형제, 또는 약 1 몰의 Fc 변이체 단백질에 대한 약 200 몰 내지 약 6000 몰의 탄수화물 부형제, 약 1 몰의 Fc 변이체 단백질에 대한 약 100 몰 내지 약 510 몰의 탄수화물 부형제, 또는 약 1 몰의 Fc 변이체 단백질에 대한 약 100 몰 내지 약 600 몰의 탄수화물 부형제일 수 있다.

<85> 한 실시양태에서, 본 발명의 제제는 내독소 및/또는 관련 발열성 물질을 실질적으로 함유하지 않는 발열원-무함유 제제이다. 내독소에는 미생물 내에 국한되어 있으며 미생물이 파괴되거나 사멸한 경우에만 방출되는 독소가 포함된다. 또한, 발열성 물질에는 박테리아 및 다른 미생물의 외막으로부터 유래된 발열-유도 열안정성 물질(당단백질)이 포함된다. 이 물질들 둘다 인간에게 투여되는 경우 발열, 저혈압 및 쇼크를 일으킬 수 있다. 잠재적인 유해 효과 때문에, 심지어 낮은 양의 내독소도 정맥내로 투여되는 약물 용액으로부터 제거되어야 한다. 식품의약청("FDA")은 정맥내 약물 투여의 경우 1시간 내에 체중 1 kg 당 투여량 당 5 내독소 유닛(EU)의 상한을 설정하였다(The United States Pharmacopeial Convention, Pharmacopeial Forum 26(1):223 (2000)). 치료 단백질을 체중 1 kg 당 수백 또는 수천 mg의 양으로 투여하는 경우(이것은 항체 또는 Fc 융합 단백질의 경우 흔히 있을 수 있음), 미량의 유해하고 위험한 내독소조차도 제거해야 한다. 일부 특정 실시양태에서, 조성물 중의 내독소 및 발열원 농도는 10 EU/mg 미만, 5 EU/mg 미만, 1 EU/mg 미만, 0.1 EU/mg 미만, 0.01 EU/mg 미만 또는 0.001 EU/mg 미만이다.

- <86> 생체내 투여에 사용되는 경우, 본 발명의 제제는 멸균되어야 한다. 본 발명의 제제는 멸균 여과, 방사선조사 등을 비롯한 다양한 멸균 방법으로 멸균할 수 있다. 한 실시양태에서, Fc 변이체 단백질 제제는 예비멸균된 0.22-마이크론 필터로 여과 멸균한다. 주사용 멸균 조성물은 문헌["Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 21<sup>st</sup> ed., Lippincott Williams & Wilkins, (2005)]에 기재된 바와 같은 보편적인 약학적 관행에 따라 제제화할 수 있다. Fc 변이체 단백질을 포함하는 제제 예컨대, 본 명세서에 개시된 제제는 통상적으로 동결 건조된 형태 또는 용액 형태로 저장될 것이다. Fc 변이체 단백질을 포함하는 멸균 조성물은 멸균 입구를 가지는 용기, 예를 들어, 제제의 복구를 허용하는 어댑터(adapter) 예컨대, 피하주사용 바늘에 의해 관통될 수 있는 막개를 가지는 정맥내 용액 백 또는 바이알 내에 넣는다.
- <87> 본 발명은 액체 제제 및 건조된 제제 둘다 포괄한다. 일부 실시양태에서, 제제는 액체 제제이다. 본 발명의 액체 제제는 1회 사용을 위한 액체 제제의 분취액을 함유하는 바이알을 제조함으로써 단위 투여량 형태로 제조할 수 있다. 예를 들어, 바이알 당 단위 투여량은 약 10 mg/ml 내지 약 200 mg/ml의 범위 내의 다양한 농도의 Fc 변이체 단백질을 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, 15 ml, 20 ml 또는 이 범위 내의 임의의 범위 또는 값의 양으로 함유할 수 있다. 필요하다면, 멸균 희석제를 각각의 바이알에 첨가함으로써 상기 제제들을 원하는 농도로 조절할 수 있다.
- <88> 다른 실시양태에서, 제제는 투여 전에 재구성되는 건조된 제제이다. 건조된 제제의 경우, Fc 변이체 단백질은 본 명세서에 개시된 하나 이상의 성분을 포함하는 "사전 동결건조 제제"로서 제조되는데, 이때 단백질 및 다른 제제 성분들(예를 들어, 부형제 및/또는 첨가제)의 양은 원하는 투여 부피, 투여 방식 등을 고려하여 결정하고, 생성된 제제는 건조한다. 한 실시양태에서, 사전 동결건조 제제는 재구성 시 최종 재구성된 제제가 약 1 mg/ml 내지 약 200 mg/ml의 Fc 변이체 단백질 및 약 1 mM 내지 약 100 mM의 완충제를 포함하고 pH가 약 5.5 내지 약 8 이며 약 1% 내지 약 15%의 중량/부피의 탄수화물 부형제, 약 1 mM 내지 약 400 mM의 양이온성 아미노산 및 약 1 mM 내지 약 200 mM의 음이온으로 구성된 균으로부터 선택되는 하나 이상의 추가 성분을 추가로 포함하도록 제조된다. 또 다른 실시양태에서, 사전 동결건조 제제는 재구성 시 최종 재구성된 제제가 약 0.001% 내지 약 0.05%의 계면활성제를 추가로 포함하도록 제조된다.
- <89> 본 발명의 제제 중 임의의 제제가 본 명세서에서 "사전 동결건조 벌크 제제"로도 지칭되는 사전 동결건조 제제로서 사용될 수 있다는 것이 예상된다.
- <90> 일부 실시양태에서, 본 발명의 제제는 약 20 mg/ml 내지 약 100 mg/ml의 Fc 변이체 단백질 및 약 1 mM 내지 약 250 mM의 완충제를 포함하며 pH가 약 5.5 내지 약 6.5이고 약 1% 내지 약 10%의 중량/부피의 탄수화물 부형제, 약 50 mM 내지 약 200 mM의 양이온성 아미노산, 약 50 mM 내지 약 200 mM의 음이온 및 약 0.001% 내지 약 0.05%의 계면활성제로 구성된 균으로부터 선택되는 하나 이상의 추가 성분을 추가로 포함하는 사전 동결건조 벌크 제제이다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 제제는 20 mg/ml 내지 100 mg/ml의 Fc 변이체 단백질 및 1 mM 내지 25 mM의 완충제를 포함하며 pH가 5.5 내지 6.5이고 1% 내지 10%의 중량/부피의 탄수화물 부형제, 50 mM 내지 200 mM의 양이온성 아미노산, 50 mM 내지 200 mM의 음이온 및 0.001% 내지 0.05%의 계면활성제로 구성된 균으로부터 선택되는 하나 이상의 추가 성분을 추가로 포함하는 사전 동결건조 벌크 제제이다.
- <91> 액체 제제의 건조된 형태를 제조하기 위한 특정 방법은 당업계에 잘 공지되어 있고 예를 들어, 동결건조, 냉동-건조, 분무-건조 또는 공기-건조가 있으나 이들로 한정되지 않는다(예를 들어, 국제특허공보 제WO 05/123131호, 제WO 04/058156호, 제WO 03/009817호 및 제WO 97/04801호; 및 미국 특허 제6,165,463호 참조). 한 실시양태에서, 본 발명의 제제의 성분들은 단위 투약 제형, 예를 들어, 활성제의 양을 표시하는 앰플 또는 샷세(sachette)와 같은 밀폐된 용기 내의 건식 동결건조 분말 또는 수분 무함유 농축물로서 개별적으로 또는 서로 혼합되어 공급된다. 조성물이 관주에 의해 투여되는 경우, 조성물은 멸균 약학 등급의 물 또는 식염수를 함유하는 관주 병으로 분배될 수 있다. 조성물이 주사에 의해 투여되는 경우, 투여되기 전에 성분들이 혼합될 수 있도록 주사용 멸균수 또는 식염수의 앰플이 제공될 수 있다.
- <92> **2. Fc 변이체 단백질 제제의 안정성**
- <93> 일부 실시양태에서, 본 발명의 제제는 동일한 Fc 변이체가 pH 6.0의 10 mM 히스티딘 중에 제제화된 경우의 응집에 비해 Fc 변이체의 응집을 감소시킨다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 제제는 동일한 Fc 변이체가 pH 6.0의 10 mM 히스티딘 중에 제제화된 경우의 응집에 비해 5% 이상, 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 100% 이상 Fc 변이체의 응집을 감소시킨다. 또 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 제제는 동일한 Fc 변이체가 pH 6.0의 10 mM 히스티딘 중에 제제화된 경우의 응집에 비해

2배 이상, 5배 이상, 10배 이상, 20배 이상, 30배 이상, 40배 이상, 50배 이상, 60배 이상, 70배 이상, 80배 이상, 90배 이상, 100배 이상, 200배 이상 또는 500배 이상 Fc 변이체의 응집을 감소시킨다.

<94> 일부 실시양태에서, 본 발명의 제제는 예를 들어 실온 또는 4℃에서(예를 들어, 1주, 1개월, 6개월, 1년, 2년, 3년 또는 5년을 포함하나 이들로 한정되지 않는) 장기간 동안 저장 시, 또는 승온 예컨대, 38℃ 내지 42℃에서(예를 들어, 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월 또는 6개월을 포함하나 이들로 한정되지 않는) 장기간 동안 저장 시 개선된 응집 프로파일을 유지한다. 일부 실시양태에서, 제제는 10% 이하, 20% 이하, 30% 이하, 40% 이하, 50% 이하, 60% 이하, 70% 이하, 80% 이하, 90% 이하 또는 100% 이하의 상대습도를 포함하나 이들로 한정되지 않는 다양한 습한 조건 하에 광에 노출되어 저장되거나 암실 내에서 저장될 때 개선된 응집 프로파일을 유지한다. 용어 "주위" 조건은 광에 노출된 경우 10% 내지 60%의 상대 습도에서 약 20℃의 온도를 일반적으로 지칭한다는 것이 당업계에서 이해될 것이다. 유사하게, 약 10% 미만의 상대 습도에서 약 2℃ 내지 약 8℃의 온도는 "4℃" 또는 "5℃"로서 총칭되고, 약 60%의 상대 습도에서 약 23℃ 내지 약 27℃의 온도는 "25℃"로 총칭되며, 약 75%의 상대 습도에서 약 38℃ 내지 약 42℃의 온도는 "40℃"로 총칭된다.

<95> 특정 실시양태에서, 본 발명의 제제는 크기 배제 크로마토그래프(SEC)에 의한 측정 시 또는 샘플의 응집 정도를 측정하기에 유용한 유사한 분석법에 의한 측정 시 5일 이상 동안 37℃ 내지 42℃의 온도, 30일 이상 동안 20℃ 내지 25℃의 온도, 90일 이상, 120일 이상, 180일 이상 또는 1년 이상 동안 2℃ 내지 8℃의 온도에서 총 단백질을 기준으로 20% 이하, 10% 이하, 5% 이하, 2% 이하, 1% 이하, 0.5% 이하, 0.4% 이하, 0.2% 이하, 0.1% 이하 또는 0.1% 미만의 응집물을 갖는다. 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 제제는 크기 배제 크로마토그래프(SEC)에 의한 측정 시 또는 샘플의 응집 정도를 측정하기에 유용한 유사한 분석법에 의한 측정 시 5일 이상 동안 38℃ 내지 42℃의 온도, 30일 이상 동안 23℃ 내지 27℃의 온도, 90일 이상 동안 2℃ 내지 8℃의 온도에서 총 단백질을 기준으로 약 20% 이하, 약 10% 이하, 약 5% 이하, 약 2% 이하, 약 1% 이하, 약 0.5% 이하, 약 0.4% 이하, 약 0.2% 이하, 약 0.1% 이하 또는 약 0.1% 미만의 응집물을 갖는다.

<96> 즉, 본 발명의 제제는 전술한 바와 같은 정해진 기간 동안 저장된 후 본 명세서에 정의된 바와 같은 낮은 수준 또는 검출불가능한 수준의 응집을 갖는다. 한 실시양태에서, 전술한 바와 같은 정해진 기간 동안 저장된 후 SEC에 의한 측정 시 또는 샘플의 응집 정도를 측정하기에 유용한 유사한 분석법에 의한 측정 시 Fc 변이체 단백질의 20% 이하, 10% 이하, 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 1% 이하, 0.5% 이하, 0.4% 이하, 0.2% 이하 또는 0.1% 이하(그러나, 일부 실시양태에서는 0.1% 이상)가 응집물을 형성한다.

<97> 게다가, 본 발명의 제제는 전술한 조건 하에 장기간 저장되는 동안 Fc 변이체 단백질의 생물학적 활성의 손실을 거의 나타내지 않는다. 본 발명의 제제는 상기 정해진 기간 동안 저장된 후 저장 전 제제의 초기 생물학적 활성의 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 98% 초과, 99% 초과 또는 99.5% 초과와 생물학적 활성을 유지한다.

<98> 저장되는 동안 상기 제제는 0℃ 내지 4℃, 2℃ 내지 8℃, 10℃ 내지 15℃, 20℃ 내지 24℃, 23℃ 내지 27℃, 실온 또는 승온 38℃ 내지 42℃(이로 한정되지 않음)와 같은 온도에서 1주, 2주, 1개월, 6개월, 1년, 3년 또는 5년(이로 한정되지 않음)과 같은 장기간 동안 일정한 응집 속도를 나타낸다는 것이 예상된다. 따라서, 한 실시양태에서, Fc 변이체 단백질 제제는 총 단백질을 기준으로 한 응집물 비율을 38℃ 내지 42℃에서 1%/월 내지 10%/월 이하, 20℃ 내지 24℃에서 0.2%/월 내지 1.0%/월 이하, 또는 ~4℃(즉, 2℃ 내지 8℃)에서 0.2%/월 이하까지 증가시킬 것이다.

<99> 일부 실시양태에서, 4℃에서 1개월 이상 동안 저장된 후, 본 발명의 제제는 입자 멀티사이저(multisizer)에 의한 측정 시 직경 2 μm 내지 4 μm의 약 3.4 E + 5 입자/ml 미만, 직경 4 μm 내지 10 μm의 약 4.0 E + 4 입자/ml 미만, 직경 10 μm 내지 20 μm의 약 4.2 E + 3 입자/ml 미만, 직경 20 μm 내지 30 μm의 약 5.0 E + 2 입자/ml 미만, 직경 30 μm 내지 40 μm의 약 7.5 E + 1 입자/ml 미만, 직경 40 μm 내지 60 μm의 약 9.4 E 입자/ml 미만의 입자 프로파일을 포함한다(또는 응집물 분획으로서 구성된다). 일부 실시양태에서, 본 발명의 제제는 40 μm보다 큰 또는 30 μm보다 큰 검출가능한 입자를 함유하지 않는다.

<100> 본 발명의 제제가 Fc 변이체 단백질을 안정화시키는 데 특히 유용하지만, 본 발명의 제제는 신속히 응집되기 쉬운 다수의 단백질의 안정성을 증가시키는 데 사용될 수 있다는 것이 예상된다. 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명의 제제는 응집되기 쉬운 단백질의 응집을 감소시킨다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 제제는 응집되는 것으로 공지되어 있는 제제 중의 단백질의 동일 농도에 비해 5% 이상, 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 100% 이상 응집되기 쉬운 단백질의 응집을 감소시킨다.

<101> 게다가, 다수의 단백질이 보다 높은 농도로 제제화될 때 더 응집되기 쉽다는 것이 당업계에 공지되어 있다. 따라서, 본 발명의 제제는 높은 농도에서 응집되는 것으로 공지되어 있는 높은 농도의 단백질 제제를 제제화하는데 사용될 수 있다. 한 특정 실시양태에서, 본 발명의 제제는 보다 낮은 농도(예컨대, 20 mg/ml 미만)로 또 다른 완충제 중에 제제화된 단백질에 비해 높은 농도에서 응집되기 쉬운 단백질의 높은 농도(예컨대, 20 mg/ml 이상)에서 응집을 감소시킨다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 제제는 높은 농도에서 더 응집되기 쉬운 단백질이 20 mg/ml 이상, 30 mg/ml 이상, 40 mg/ml 이상, 50 mg/ml 이상, 60 mg/ml 이상, 70 mg/ml 이상, 80 mg/ml 이상, 90 mg/ml 이상, 100 mg/ml 이상 또는 200 mg/ml 이상 농도로 제제화될 수 있게 하는데, 이때 상기 단백질의 20% 이하, 10% 이하, 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 1% 이하, 0.5% 이하, 0.4% 이하, 0.2% 이하 또는 0.1% 이하가 응집물을 형성한다.

<102> 응집 정도, 및/또는 단백질 제제(예컨대, 본 발명의 Fc 변이체 단백질 제제)에 존재하는 응집물의 유형 및/또는 크기를 측정하는 데 유용한 크기 배제 크로마토그래피(SEC), 고성능 크기 배제 크로마토그래피(HPSEC), 정적 광산란(SLS), 푸리에 변환 적외선 분광법(FTIR), 원편광 이색성 분광분석(CD), 우레아-유도 단백질 언폴딩 기법, 내인성 트립토판 형광도, 시차주사열량측정법 및 1-아닐리노-8-나프탈렌설폰산(ANS) 단백질 결합 기법을 포함하나 이들로 한정되지 않는 다수의 방법이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들면, 적절한 수지로 채워진 컬럼 상에서 분자를 통과시킴으로써 크기 배제 크로마토그래피(SEC)를 수행하여 분자들을 이들의 크기를 기준으로 분리할 수 있는데, 이때 보다 큰 분자들(예를 들어, 응집물)은 보다 작은 분자들(예를 들어, 단량체) 전에 용출될 것이다. 분자들은 일반적으로 280 nm에서의 UV 흡광도에 의해 검출되고 추가 특징규명을 위해 회수될 수 있다. 고압 액체 크로마토그래프 컬럼은 종종 SEC 분석(HP-SEC)을 위해 사용된다. 구체적인 SEC 방법은 하기 "실시예" 단락에 상세히 기재되어 있다. 별법으로, 분석 한외원심분리(AUC)를 이용할 수 있다. AUC는 액체 샘플 중의 거대분자의 침강 계수(스베드베르그 에스(Svedberg, S)의 문헌에 보고되어 있음)를 측정하는 오르토고날 기법이다. SEC와 마찬가지로, AUC는 단량체로부터 항체 단편/응집물을 분리하고 검출할 수 있으며 분자 질량에 대한 정보를 더 제공할 수 있다. 제제 중에서의 단백질 응집은 쿨터(coulter) 계수기를 사용한 입자 계수 분석 또는 탁도 측정기를 이용한 탁도 측정에 의해서도 특징규명될 수 있다. 탁도는 용액 중의 입자들이 광을 산란시킴으로써 단백질 응집의 일반적인 표시자로서 사용될 수 있는 정도의 척도이다. 또한, 비-환원 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(PAGE) 또는 모세관 겔 전기영동(CE)을 이용하여 본 발명의 제제 중의 Fc 변이체 단백질의 응집 및/또는 단편화 상태를 특징규명할 수 있다. PAGE 및 CEG 방법의 구체적인 예는 하기 "실시예" 단락에 상세히 기재되어 있다.

### <103> 3. 변이체 Fc 영역

<104> 본 발명은 변이체 Fc 영역, 즉 비천연 발생 Fc 영역, 예를 들어, 하나 이상의 비천연 발생 아미노산 잔기를 포함하는 Fc 영역을 포함하는 단백질 제제를 제공한다. 본 발명의 변이체 Fc 영역은 아미노산 결실, 추가 및/또는 변형을 포함하는 Fc 영역도 포괄한다.

<105> 본원에서 사용된 Fc 영역이 제1 불변 영역 면역글로불린 도메인을 제외한 항체의 불변 영역을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다는 것을 이해할 것이다. 따라서, Fc는 IgA, IgD 및 IgG의 마지막 2개의 불변 영역 면역글로불린 도메인, IgE 및 IgM의 마지막 3개의 불변 영역 면역글로불린, 및 이들 도메인에 대한 가요성 경첩 N-말단을 지칭한다. IgA 및 IgM의 경우, Fc는 J 쇄를 포함할 수 있다. IgG의 경우, Fc는 면역글로불린 도메인 C $\gamma$ 2 및 C $\gamma$ 3, 및 C $\gamma$ 1(C $\gamma$ 1)과 C $\gamma$ 2(C $\gamma$ 2) 사이의 경첩을 포함한다. Fc 영역의 경계가 다양할 수 있다 하더라도, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 통상적으로 그의 카르복시-말단에서 잔기 C226 또는 P230을 포함하도록 정의되는데, 이때 넘버링은 문헌[Kabat et al. (1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, VA)]에서와 같이 EU 인덱스에 따른 것이다. "카바트에 기재된 EU 인덱스"는 상기 카바트의 문헌에 기재된 인간 IgG1 EU 항체의 잔기 넘버링을 지칭한다. Fc는 단리에 있어서 이 영역을 지칭할 수 있거나, 항체, 항체 단편 또는 Fc 융합 단백질의 면에서 이 영역을 지칭할 수 있다. Fc 변이체 단백질은 항체, Fc 융합체, 또는 Fc 영역을 포함하는 임의의 단백질 또는 단백질 도메인일 수 있다. Fc의 비천연 발생 변이체인 변이체 Fc 영역을 포함하는 단백질이 특히 바람직하다. 카바트 270, 272, 312, 315, 356 및 358을 포함하나 이들로 한정되지 않는 다수의 Fc 위치에서 다형성이 관찰되므로, 제시된 서열과 선행 기술에서의 서열 사이에 약간의 차이가 존재할 수 있다는 것을 인지해야 한다.

<106> 본 발명은 비교 분자(예를 들어, 야생형 Fc 영역을 가지는 것을 제외하고 동일한 아미노산 서열을 가지는 단백질)에 비해, Fc 리간드(예를 들어, Fc 수용체, C1q)에 대한 변경된 결합성을 가지는 Fc 변이체 단백질을 포괄한다. 결합성의 예로는 결합 특이성, 평형 해리 상수( $K_D$ ), 해리 속도( $K_{off}$  속도), 결합 속도( $K_{on}$  속도), 결합 친화

성 및/또는 결합친화도를 들 수 있다. 일반적으로,  $K_D$ 가 낮은 결합 분자(예를 들어, Fc 변이체 단백질 예컨대, 항체)가  $K_D$ 가 높은 결합 분자보다 바람직하다는 것이 알려져 있다. 그러나, 일부 경우,  $k_{on}$  또는  $k_{off}$ 의 값은  $K_D$ 의 값보다 더 적절할 수 있다. 당업자라면 어떤 속도 매개변수가 주어진 항체 적용에 가장 중요한 지를 결정할 수 있다.

<107> Fc 도메인의 그의 리간드에 대한 친화성 및 결합성은 Fc-Fc $\gamma$ R 상호작용, 즉 Fc 영역과 Fc $\gamma$ R의 특이적 결합을 측정하기 위한, 당업계에 공지되어 있는 다양한 시험관내 분석 방법(생화학적 또는 면역학적 기재 분석)[평형 방법(예를 들어, 효소-결합 면역흡착 분석(ELISA)(실시예 3 참조) 또는 방사성면역분석(RIA)), 반응속도 분석(예를 들어, BIACORE<sup>®</sup> 분석), 및 다른 방법 예컨대, 간접적 결합 분석, 경쟁적 결합 분석, 형광 공명 에너지 전달(FRET), 겔 전기영동 및 크로마토그래피(예를 들어, 겔 여과)를 포함하나 이들로 한정되지 않음]에 의해 측정될 수 있다. 이 방법들 및 다른 방법들은 조사될 성분들 중 하나 이상의 성분 상의 표지를 이용할 수 있고/있거나 발색성 표지, 형광성 표지, 발광성 표지 또는 동위원소 표지를 포함하나 이들로 한정되지 않는 다양한 검출 방법을 이용할 수 있다. 결합 친화성 및 반응속도에 대한 상세한 설명은 항체-면역원 상호작용에 초점을 둔 문헌[Paul, W.E., ed., Fundamental Immunology, 4<sup>th</sup> Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999)]에서 찾을 수 있다.

<108> 한 실시양태에서, Fc 변이체 단백질은 비교 분자에 비해 하나 이상의 Fc 리간드에의 증가된 결합을 나타낸다. 또 다른 실시양태에서, Fc 변이체 단백질은 비교 분자의 친화성보다 2배 이상, 3배 이상, 5배 이상, 7배 이상, 10배 이상, 20배 이상, 30배 이상, 40배 이상, 50배 이상, 60배 이상, 70배 이상, 80배 이상, 90배 이상, 100배 이상, 또는 200배 이상 더 높은 Fc 리간드에 대한 친화성을 나타낸다. 특정 실시양태에서, Fc 변이체 단백질은 Fc 수용체에의 증가된 결합을 나타낸다. 또 다른 특정 실시양태에서, Fc 변이체 단백질은 Fc 수용체 Fc $\gamma$ RIIIA에의 증가된 결합을 나타낸다. 또 다른 특정 실시양태에서, Fc 변이체 단백질은 Fc 수용체 FcRn에의 증가된 결합을 나타낸다. 또 다른 특정 실시양태에서, Fc 변이체 단백질은 비교 분자에 비해 C1q에의 증가된 결합을 나타낸다.

<109> Fc 영역을 포함하는 단백질의 혈청 반감기는 FcRn에 대한 Fc 영역의 결합 친화성을 증가시킴으로써 증가시킬 수 있다. 한 실시양태에서, Fc 변이체 단백질은 비교 분자에 비해 증가된 혈청 반감기를 가진다.

<110> "항체-의존성 세포-매개 세포독성" 또는 "ADCC"는 일부 세포독성 세포(예를 들어, 천연 살해(NK) 세포, 호중구 및 대식세포) 상에 존재하는 Fc 수용체(FcR) 상에 결합된 분비된 Ig가 이 세포독성 효과기 세포들로 하여금 항원-보유 표적 세포에 특이적으로 결합한 후 표적 세포를 세포독소로 사멸시킬 수 있게 하는 세포독성의 형태를 지칭한다. 표적 세포의 표면에 대한 특이적 고-친화성 IgG 항체는 세포독성 세포를 "무장"시키고 이러한 사멸에 절대적으로 필요하다. 표적 세포의 용해는 세포외에서 일어나고 직접적인 세포-대-세포 접촉을 필요로 하며 보체를 수반하지 않는다. 항체 외에, 항원-보유 표적 세포에 특이적으로 결합하는 능력을 가지는 Fc 영역을 포함하는 다른 단백질, 구체적으로 Fc 융합 단백질이 세포-매개 세포독성에 영향을 줄 수 있을 것임이 예상된다. 간결하게 기재하기 위해, Fc 융합 단백질의 활성으로부터 비롯된 세포-매개 세포독성은 본 명세서에서 ADCC 활성으로도 지칭된다.

<111> ADCC에 의한 표적 세포의 용해를 매개하는 임의의 특정한 Fc 변이체 단백질의 능력을 분석할 수 있다. ADCC 활성을 평가하기 위해, 표적 세포의 세포질용해를 초래하는 항원-항체 복합체에 의해 활성화될 수 있는 면역 효과기 세포와 함께 원하는 Fc 변이체 단백질을 표적 세포에 첨가한다. 세포질용해는 일반적으로, 용해된 세포로부터의 표지(예를 들어, 방사성 기질, 형광 염료 또는 천연 세포내 단백질)의 방출에 의해 검출된다. 이러한 분석에 유용한 효과기 세포에는 말초혈 단핵 세포(PBMC) 및 천연 살해(NK) 세포가 포함된다. 시험관내 ADCC 분석의 구체적인 예는 문헌(Wisecarver et al., 1985 79:277-282; Bruggemann et al., 1987, J Exp Med 166:1351-1361; Wilkinson et al., 2001, J Immunol Methods 258:183-191; Patel et al., 1995 J Immunol Methods 184:29-38) 및 본 명세서(실시예 3 참조)에 기재되어 있다. 별법으로 또는 추가로, 원하는 Fc 변이체 단백질의 ADCC 활성은 생체 내, 예를 들어, 문헌(Clynes et al., 1998, PNAS USA 95:652-656)에 개시된 것과 같은 동물 모델에서 평가될 수 있다.

<112> 한 실시양태에서, Fc 변이체 단백질은 비교 분자에 비해 증가된 ADCC 활성을 나타낸다. 특정 실시양태에서, Fc 변이체 단백질은 비교 분자의 ADCC 활성보다 2배 이상, 3배 이상, 5배 이상, 10배 이상, 50배 이상 또는 100배 이상 더 높은 ADCC 활성을 나타낸다. 또 다른 특정 실시양태에서, Fc 변이체 단백질은 Fc 수용체 Fc $\gamma$ RIIIA에의 증가된 결합을 나타내고 비교 분자에 비해 증가된 ADCC 활성을 나타낸다. 다른 실시양태에서, Fc 변이체 단백질

은 비교 분자에 비해 증가된 ADCC 활성 및 증가된 혈청 반감기를 가진다.

<113> "보체 의존성 세포독성" 및 "CDC"는 보체의 존재 하에서의 표적 세포의 용해를 지칭한다. 보체 활성화 경로는 보체 시스템의 제1 성분(C1q)과 분자, 예를 들어, 동족 항원과 복합체를 형성하는 항체의 결합에 의해 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어, 문헌(Gazzano-Santoro et al., 1996, J. Immunol. Methods, 202:163)에 기재된 CDC 분석을 수행할 수 있다. 한 실시양태에서, Fc 변이체 단백질은 비교 분자에 비해 증가된 CDC 활성을 나타낸다. 특정 실시양태에서, Fc 변이체 단백질은 비교 분자의 CDC 활성보다 2배 이상, 3배 이상, 5배 이상, 10배 이상, 50배 이상 또는 100배 이상 더 높은 CDC 활성을 나타낸다. 다른 실시양태에서, Fc 변이체 단백질은 비교 분자에 비해 증가된 CDC 활성 및 증가된 혈청 반감기 둘다를 나타낸다.

<114> 한 실시양태에서, 본 발명은 Fc 영역이 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 222, 224, 234, 235, 236, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 248, 252, 254, 256, 258, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 272, 274, 275, 278, 279, 280, 282, 290, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 312, 313, 318, 320, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 332, 333, 334, 335, 339, 359, 360, 372, 377, 379, 396, 398, 400, 401, 430 및 436번 위치로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 위치에서 비천연 발생 아미노산 잔기를 포함하는 것인 제제를 제공한다. 경우에 따라, Fc 영역은 당업자에게 공지되어 있는 추가적 위치 및/또는 대안적 위치에서 비천연 발생 아미노산 잔기를 포함할 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제5,624,821호, 제6,277,375호, 제6,737,056호; 및 국제특허공보 제WO 01/58957호, 제WO 02/06919호, 제WO 04/016750호, 제WO 04/029207호, 제WO 04/035752호 및 제WO 05/040217호 참조).

<115> 특정 실시양태에서, 본 발명은 Fc 영역이 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 222N, 224L, 234D, 234E, 234N, 234Q, 234T, 234H, 234Y, 234I, 234V, 234F, 235A, 235D, 235R, 235W, 235P, 235S, 235N, 235Q, 235T, 235H, 235Y, 235I, 235V, 235F, 236E, 239D, 239E, 239N, 239Q, 239F, 239T, 239H, 239Y, 240I, 240A, 240T, 240M, 241W, 241L, 241Y, 241E, 241R, 243W, 243L, 243Y, 243R, 243Q, 244H, 245A, 247V, 247G, 248M, 252Y, 254T, 256E, 258D, 262I, 262A, 262T, 262E, 263I, 263A, 263T, 263M, 264L, 264I, 264W, 264T, 264R, 264F, 264M, 264Y, 264E, 265G, 265N, 265Q, 265Y, 265F, 265V, 265I, 265L, 265H, 265T, 266I, 266A, 266T, 266M, 267Q, 267L, 268D, 268N, 269H, 269Y, 269F, 269R, 296E, 272Y, 274E, 274R, 274T, 275Y, 278T, 279L, 280H, 280Q, 280Y, 282M, 290G, 290S, 290T, 290Y, 294N, 295K, 296Q, 296D, 296N, 296S, 296T, 296L, 296I, 296H, 269G, 297S, 297D, 297E, 298H, 298I, 298T, 298F, 299I, 299L, 299A, 299S, 299V, 299H, 299F, 299E, 300I, 300L, 312A, 313F, 318A, 318V, 320A, 320M, 325Q, 325L, 325I, 325D, 325E, 325A, 325T, 325V, 325H, 327G, 327W, 327N, 327L, 328S, 328M, 328D, 328E, 328N, 328Q, 328F, 328I, 328V, 328T, 328H, 328A, 329F, 329H, 329Q, 330K, 330G, 330T, 330C, 330L, 330Y, 330V, 330I, 330F, 330R, 330H, 332D, 332S, 332W, 332F, 332E, 332N, 332Q, 332T, 332H, 332Y, 332A, 335A, 335T, 335N, 335R, 335Y, 339T, 359A, 360A, 372Y, 377F, 379M, 396H, 396L, 398V, 400P, 401V 및 430A로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 비천연 발생 아미노산 잔기를 포함하는 것인 Fc 변이체 단백질 제제를 제공한다. 경우에 따라, Fc 영역은 당업자에게 공지되어 있는 추가 및/또는 대안적 비천연 발생 아미노산 잔기를 포함할 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제5,624,821호, 제6,277,375호 및 제6,737,056호; 및 국제특허공보 제WO 01/58957호, 제WO 02/06919호, 제WO 04/016750호, 제WO 04/029207호, 제WO 04/035752호 및 제WO 05/040217호 참조).

<116> 한 실시양태에서, 본 발명은 Fc 영역이 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 252, 254 및 256번 위치로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 위치에서 하나 이상의 비천연 발생 아미노산을 포함하는 것인 Fc 변이체 단백질 제제를 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 Fc 영역이 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 잔기 252Y, 254T 및 256E로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 비천연 발생 아미노산을 포함하는 것인 Fc 변이체 단백질 제제를 제공한다.

<117> 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 Fc 영역이 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 239, 330 및 332번 위치로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 위치에서 하나 이상의 비천연 발생 아미노산을 포함하는 것인 Fc 변이체 단백질 제제를 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 Fc 영역이 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 잔기 239D, 330L, 330Y 및 332E로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 비천연 발생 아미노산을 포함하는 것인 Fc 변이체 단백질 제제를 제공한다. 경우에 따라, Fc 영역은 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 252, 254 및 256번 위치로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 위치에서 추가 비천연 발생 아미노산을 추가로 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 Fc 영역이 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 239D, 330L, 330Y 및 332E로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 비천연 발생 아미노산을 포함하고 하나 이상의 위치에서 하나 이상의 비천연 발생 아미노산이 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링

시 252Y, 254T 및 256E로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 Fc 변이체 단백질을 제공한다.

<118>

한 실시양태에서, 본 발명의 Fc 변이체는 문헌(Ghetie et al., 1997, Nat Biotech. 15:637-40; Duncan et al., 1988, Nature 332:563-564; Lund et al., 1991, J. Immunol 147:2657-2662; Lund et al., 1992, Mol Immunol 29:53-59; Alegre et al., 1994, Transplantation 57:1537-1543; Hutchins et al., 1995, Proc Natl Acad Sci USA 92:11980-11984; Jefferis et al., 1995, Immunol Lett. 44:111-117; Lund et al., 1995, Faseb J 9: 115-119; Jefferis et al., 1996, Immunol Lett 54:101-104; Lund et al., 1996, J Immunol 157:4963-4969; Armour et al., 1999, Eur J Immunol 29:2613-2624; Idusogie et al., 2000, J Immunol 164:4178-4184; Reddy et al., 2000, J Immunol 164:1925-1933; Xu et al., 2000, Cell Immunol 200:16-26; Idusogie et al., 2001, J Immunol 166:2571-2575; Shields et al., 2001, J Biol Chem 276:6591-6604; Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65; Presta et al., 2002, Biochem Soc Trans 30:487-490); 미국 특허 제5,624,821호, 제 5,885,573호, 제5,677,425호, 제6,165,745호, 제6,277,375호, 제5,869,046호, 제6,121,022호, 제5,624,821호, 제5,648,260호, 제6,528,624호, 제6,194,551호, 제6,737,056호, 제6,821,505호 및 제6,277,375호; 및 국제특허 공보 제WO 99/58572호, 제WO 00/42072호, 제WO 02/060919호, 제WO 04/029207호, 제WO 04/099249호 및 제WO 04/063351호에 개시된 Fc 변이체들과 같은 다른 공지된 Fc 변이체와 조합될 수 있다. 본 발명은 결실, 추가 및/또는 변형을 포함하는 Fc 영역도 포괄한다. Fc 도메인의 다른 변형/치환/추가/결실은 당업자에게 용이하게 자명할 것이다.

<119>

구체적으로, 보존적 아미노산 치환은 전술된 치환들 중 임의의 치환에 대해 만들어질 수 있다는 것이 예상된다. "보존적 아미노산 치환"은 기능적으로 균등한 아미노산을 치환시키는 아미노산 치환을 지칭한다는 것이 당업계에 잘 공지되어 있다. 보존적 아미노산 변화는 생성된 펩티드의 아미노산 서열에서의 침묵 변화를 초래한다. 예를 들면, 유사한 극성을 가지는 하나 이상의 아미노산은 기능성 균등물로서 작용하여 펩티드의 아미노산 서열 내에서의 침묵 변경을 초래한다. 또한, 중성으로 하전시키고 잔기를 보다 작은 잔기로 치환시키는 치환은 잔기들이 상이한 군 내에 속한다고 하더라도(예를 들면, 페닐알라닌을 더 작은 이소류신으로 치환시키는 것) "보존적 치환"으로 간주될 수 있다. 유사한 측쇄를 가지는 아미노산 잔기의 패밀리는 당업계에 정의되어 있다. 보존적 아미노산 치환의 여러 비-제한적 패밀리는 하기 표 1에 기재되어 있다.

## 표 1

<120>

보존적 아미노산 치환의 패밀리

패밀리	아미노산
비-극성 아미노산	Trp, Phe, Met, Leu, Ile, Val, Ala, Pro
하전되지 않은 극성 아미노산	Gly, Ser, Thr, Asn, Gln, Tyr, Cys
산성/음으로 하전된 아미노산	Asp, Glu
염기성/양으로 하전된 아미노산	Ala, Lys, His
베타-분지된 아미노산	Thr, Val, Ile
쇄 배향에 영향을 주는 잔기	Gly, Pro
방향족 아미노산	Trp, Tyr, Phe, His

<121>

또한, 용어 "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 유사체 또는 변이체의 사용을 지칭한다. 표현형으로 나타나지 않는 아미노산 치환을 어떻게 만드는 지에 대한 지침은 문헌[Bowie et al., "Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions," (1990, Science 247:1306-1310)]에 기재되어 있다.

<122>

비천연 발생 Fc 영역을 발생시키는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들면, 아미노산 치환 및/또는 결실은 부위-지정 돌연변이유발(Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492 (1985)), PCR 돌연변이유발(Higuchi, in "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Academic Press, San Diego, pp. 177-183 (1990)), 및 카세트 돌연변이유발(Wells et al., Gene 34:315-323 (1985))을 포함하나 이들로 한정되지 않는 돌연변이유발 방법에 의해 발생될 수 있다. 바람직하게는, 부위-지정 돌연변이유발은 실시예(Higuchi, in "PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification", Stockton Press, New York, pp. 61-70 (1989))에 개시된 중첩-연장 PCR 방법에 의해 수행된다. 별법으로, 중첩-연장 PCR 기법(상기 문헌(Higuchi))은 임의의 원하는 돌연변이(들)를 표적 서열(출발 DNA) 내로 도입하는 데 사용될 수 있다. 예를 들면, 중첩-연장 방법에서 PCR의 제1 라운드는 외부 프라이머(프라이머 1) 및 내부 돌연변이유발 프라이머(프라이머 3)를 사용하

되 별도로 제2 외부 프라이머(프라이머 4) 및 내부 프라이머(프라이머 2)를 사용하여 표적 서열을 증폭시켜 2개의 PCR 절편(절편 A 및 B)을 생성하는 단계를 포함한다. 내부 돌연변이유발 프라이머(프라이머 3)는 원하는 돌연변이(들)를 특정하는 표적 서열에 대한 불일치(mismatch)를 함유하도록 디자인된다. PCR의 제2 라운드에서, PCR의 제1 라운드의 생성물(절편 A 및 B)을 2개의 외부 프라이머(프라이머 1 및 4)를 사용한 PCR로 증폭한다. 생성된 전장 PCR 절편(절편 C)은 제한효소로 절단하고, 생성된 제한효소 단편은 적절한 벡터 내로 클로닝한다. 돌연변이유발의 제1 단계로서, (예를 들면, Fc 융합 단백질, 항체 또는 단순히 Fc 영역을 코딩하는) 출발 DNA를 돌연변이유발 벡터 내로 작동가능하게 클로닝한다. 프라이머는 원하는 아미노산 치환을 반영하도록 디자인된다. 변이체 Fc 영역의 발생에 유용한 다른 방법들은 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, 미국 특허 제5,624,821호, 제5,885,573호, 제5,677,425호, 제6,165,745호, 제6,277,375호, 제5,869,046호, 제6,121,022호, 제5,624,821호, 제5,648,260호, 제6,528,624호, 제6,194,551호, 제6,737,056호, 제6,821,505호 및 제6,277,375호; 미국 특허공보 제2004/0002587호; 및 국제특허공보 제WO 94/29351호, 제WO 99/58572호, 제WO 00/42072호, 제WO 02/060919호, 제WO 04/029207호, 제WO 04/099249호 및 제WO 04/063351호 참조).

<123>

일부 실시양태에서, Fc 변이체 단백질은 Fc 영역을 포함하는 분자에 공유결합되는 하나 이상의 개조된 당형태, 즉 탄수화물 조성물을 포함한다. 개조된 당형태는 효과기 기능의 증가 또는 감소를 포함하나 이들로 한정되지 않는 다양한 목적에 유용할 수 있다. 개조된 당형태는 당업자에게 공지되어 있는 임의의 방법, 예를 들어, 개조된 또는 변이체 발현 균주를 사용함으로써, 하나 이상의 효소, 예를 들어, DI N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III(GnTIII)와 동시-발현시킴으로써, Fc 영역을 포함하는 분자를 다양한 유기체 또는 다양한 유기체로부터의 세포주 내에서 발현시킴으로써, 또는 Fc 영역을 포함하는 분자가 발현된 후 탄수화물(들)을 변형시킴으로써 발생시킬 수 있다. 개조된 당형태를 발생시키는 방법은 당업계에 공지되어 있고 문헌(Umana et al., 1999, Nat. Biotechnol 17:176-180; Davies et al., 20017 Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et al., 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473); 미국 특허 제6,602,684호; 미국 특허출원 제10/277,370호 및 제10/113,929호; 국제특허공보 제WO 00/61739A1호, 제WO 01/292246A1호, 제WO 02/311140A1호 및 제WO 02/30954A1호에 기재된 방법, 포틸레전트(Potillegent)<sup>TM</sup> 기술(Biowa, Inc. Princeton, N. J.), GlycoMAB<sup>TM</sup> 글리코실화 개조 기술(GLYCART biotechnology AG, Zurich, Switzerland)을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 예를 들면, 국제특허공보 제WO 00061739호, 유라시아 특허공보 제01229125호, 미국 특허공보 제20030115614호 및 문헌(Okazaki et al., 2004, JMB, 336: 1239-49)을 참조한다. 추가 방법은 하기 "항체" 단락에 기재되어 있다.

<124>

#### 4. Fc 변이체 단백질

<125>

전술한 바와 같이, Fc 변이체 단백질은 항체 및 Fc 융합 단백질을 포함하나 이들로 한정되지 않는, 변이체 Fc 영역 또는 이의 단편을 포함하는 단백질이다. Fc 융합체는 Fc 영역 또는 이의 단편과, 일반적으로 수용체의 표적-결합 영역, 부착 분자, 리간드, 효소, 또는 일부 다른 단백질 또는 단백질 도메인을 포함하나 이들로 한정되지 않는 임의의 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드일 수 있는 융합 파트너를 겸비한다. 본 발명은 소분자에 융합된, Fc 영역 또는 이의 단편을 포함하는 Fc 융합체 단백질을 포괄한다. Fc 융합체의 비-Fc 부분의 역할은 표적 결합을 매개하는 것이고, 따라서 항체의 가변 영역과 기능적으로 유사하다. 따라서, 한 실시양태에서, Fc 변이체 단백질은 항체이다. 또 다른 실시양태에서, Fc 변이체 단백질은 Fc 융합 단백질이다.

<126>

변이체 Fc 단백질은 단백질 또는 이의 단편(예를 들어, 원하는 항원 또는 원하는 수용체의 세포의 도메인에 면역특이적으로 결합하는 가변 도메인)을 변이체 Fc 영역 또는 이의 단편과 조합시킴으로써 "드 노보"로 제조할 수 있다. 별법으로, 변이체 Fc 단백질은 하나 이상의 비천연 발생 잔기를 Fc 영역 내로 도입함으로써 Fc 영역-함유 단백질(예를 들면, 원하는 항원 또는 Fc 융합 단백질에 결합하는 항체)를 변형시킴으로써 제조할 수 있다.

<127>

#### 4.1. 항체

<128>

항체는 가변 영역을 포함하며 하나 이상의 불변 영역을 추가로 포함할 수 있는 특이적 항원에 결합하는 면역 단백질이다. 불변 영역은 보다 낮은 서열 다양성을 보이며 중요한 생화학적 과정을 일으키는 다수의 천연 단백질과의 결합을 담당한다. 항체의 가변 영역은 분자의 항원 결합 결정인자를 함유함으로써 그의 표적 항원에 대한 항체의 특이성을 결정한다. 가변 영역은 이 영역이 동일 클래스 내의 다른 항체와 서열 면에서 가장 상이하기 때문에 이렇게 지칭된다. 서열 가변성의 대부분은 상보성 결정 영역(CDR)에서 일어난다. 중쇄 및 경쇄 당 각각 3개의 CDR이 있어 총 6개의 CDR이 있고, 이들은 VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 및 VL CDR3으로 명명되어 있다. CDR의 외부에 있는 가변 영역은 골격(FR) 영역으로 지칭된다. CDR만큼 다양하지 않더라도, 서열 가변성은 상이한 항체 사이에 FR 영역에서 일어난다. 본 명세서에 언급된 상보성 결정 영역(CDR) 잔기는 카바트

등의 문헌(1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, VA)의 상보성 결정 영역임을 이해할 것이다. 구체적으로, 경쇄 가변 도메인 내에는 잔기 24 내지 34(CDR1), 50 내지 56(CDR2) 및 89 내지 97(CDR3)이 있고, 중쇄 가변 도메인 내에는 잔기 31 내지 35(CDR1), 50 내지 65(CDR2) 및 95 내지 102(CDR3)가 있다. CDR은 항체마다 상당히 다양하다(그리고 당연히 카바트 일치(consensus) 서열과의 상동성을 나타내지 않을 것이다)는 것을 인식해야 한다. 골격 잔기의 최대 정렬은 Fv 영역에서 사용되기 위해 넘버링 시스템에서 "스페이스" 잔기의 삽입을 종종 필요로 한다. 본 명세서에서 언급된 CDR은 상기 카바트 등의 문헌의 CDR임을 이해할 것이다. 또한, 임의의 주어진 카바트 부위 번호에 있는 일부 개별적인 잔기들의 정체는 종간 다양성 또는 대립유전자 다양성으로 인해 항체 쇄마다 다양할 수 있다.

<129>

본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "항체" 및 "항체들"은 인식된 면역글로불린 유전자들 전부 또는 일부에 의해 실질적으로 코딩된 하나 이상의 폴리펩티드로 구성된 단백질을 지칭하며, 단일클론 항체, 다중특이적 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 낙타화(camelised) 항체, 키메라 항체, 단일-쇄 Fv(scFv), 이황화-결합 Fv(sdFv), Fab 단편, F(ab') 단편 및 항-이디오타입성(항-Id) 항체(예를 들면, 본 발명의 항체에 대한 항-Id 항체를 포함함), 및 Fc 영역 또는 이의 단편에 융합된 상기 항체들 중 임의의 항체의 에피토프-결합 단편을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 본 발명의 방법에서 사용된 항체는 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 분자의 면역학적 활성 부분, 즉 항원 결합 부위를 함유하는 분자를 포함한다. 특정 실시양태에서, 이 단편들은 변이체 Fc 영역일 수 있거나 변이체 Fc 영역이 아닐 수 있는 Fc 영역 또는 이의 단편에 융합된다. 본 명세서에 요약된 바와 같이, 용어 "항체" 및 "항체들"은 구체적으로, 본 명세서에 기재된 변이체 Fc 영역을 포함하는 항체, 전장 항체, 및 면역글로불린의 면역학적 활성 단편 또는 본 명세서에 기재된 다른 단백질에 융합되어 있으며 본 명세서에 기재되어 있는 변이체 Fc 영역 또는 이의 단편-함유 Fc-융합체를 포함한다. 이러한 Fc 변이체-융합체는 scFv-Fc 융합체, 가변 영역(예를 들면, VL 및 VH)-Fc 융합체 및 scFv-scFv-Fc 융합체를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 본 발명의 면역글로불린 분자는 임의의 유형(예컨대, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 클래스(예컨대, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 면역글로불린 분자의 서브클래스일 수 있다.

<130>

항체 또는 항체 단편은 조류 및 포유동물(예컨대, 인간, 뮤린, 당나귀, 양, 토끼, 염소, 기니아 피그, 낙타, 말 또는 닭)을 포함하는 임의의 동물로부터 유래될 수 있다. 한 실시양태에서, 항체는 인간 또는 인간화 단일클론 항체이다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "인간" 항체는 인간 면역글로불린의 아미노산 서열을 가지는 항체를 포함하고, 인간 면역글로불린 라이브러리로부터 단리되거나 인간 유전자로부터 유래된 항체를 발현하는 마우스로부터 단리된 항체를 포함한다.

<131>

모든 폴리펩티드처럼 항체는 폴리펩티드가 네트(net) 전하를 보유하지 않는 pH로서 일반적으로 정의된 등전점(pI)을 가진다. 단백질 가용성은 용액의 pH가 단백질의 등전점(pI)과 동일한 경우 전형적으로 가장 낮다는 것이 당업계에 공지되어 있다. 항체 내의 이온화성 잔기의 수 및 위치를 변경하여 pI를 조정함으로써 가용성을 최적화할 수 있다. 예를 들면, 폴리펩티드의 pI는 적절한 아미노산 치환을 도입함으로써(예컨대, 알라닌과 같은 하전되지 않은 잔기를 리신과 같은 하전된 아미노산으로 치환시킴으로써) 조정할 수 있다. 임의의 특정한 이론에 구속되고자 하는 것은 아니지만, 항체의 pI를 변화시키는 항체의 아미노산 치환은 항체의 가용성 및/또는 안정성을 개선시킬 수 있다. 당업자라면 어떤 아미노산 치환이 특정 항체의 원하는 pI를 달성하기에 가장 적합한 것 인지를 알 수 있을 것이다. 단백질의 pI는 등전 포커싱(isoelectric focusing) 및 다양한 컴퓨터 알고리즘을 포함하나 이들로 한정되지 않는 다양한 방법에 의해 측정될 수 있다[예를 들면, 문헌(Bjellqvist et al., 1993, Electrophoresis 14:1023-1031) 참조]. 한 실시양태에서, 본 발명에 따라 사용되는 항체의 pI는 약 6.5, 약 7.0, 약 7.5, 약 8.0, 약 8.5 또는 약 9.0보다 높다. 특정 실시양태에서, 항체의 pI를 변경시키는 치환은 항원에 대한 항체의 결합 친화성을 유의하게 감소시키지 않을 것이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명에 따라 사용되는 항체의 pI는 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 또는 9.0보다 높다. 구체적으로, (전술한) 하나 이상의 Fc 리간드와의 결합을 변경시키는 Fc 영역의 치환(들)이 pI도 변화시킬 수 있음이 예상된다. 또 다른 실시양태에서, Fc 영역의 치환(들)은 구체적으로 Fc $\gamma$ R 결합에서의 원하는 변경 및 pI에서의 임의의 원하는 변화 둘다에 영향을 미치도록 선택된다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, pI 값은 우세한 전하 형태의 pI로서 정의된다. 단백질의 pI는 등전 포커싱 및 다양한 컴퓨터 알고리즘을 포함하나 이들로 한정되지 않는 다양한 방법에 의해 측정될 수 있다[예컨대, 문헌(Bjellqvist et al., 1993, Electrophoresis 14:1023) 참조].

<132>

항체의 Fab 도메인의 Tm은 항체의 열적 안정성의 우수한 표시자일 수 있고 저장 수명을 표시할 수도 있다. 보다 낮은 Tm은 보다 많은 응집/보다 낮은 안정성을 표시하는 반면, 보다 높은 Tm은 보다 적은 응집/보다 높은 안정성을 표시한다. 따라서, Tm이 보다 높은 항체가 바람직하다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따라 사용되는 항체의 Fab 도메인의 Tm 값은 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C, 85°C, 90°C, 95°C, 100°C, 105°C, 110°C,

115℃ 또는 120℃ 이상이다. 단백질 도메인(예컨대, Fab 도메인)의 열적 용점(T<sub>m</sub>)은 당업계에 공지된 임의의 표준 방법, 예를 들면, 시차 주사 열량측정법을 이용하여 측정할 수 있다[예컨대, 문헌(Vermeer et al., 2000, Biophys. J. 78:394-404; Vermeer et al., 2000, Biophys. J. 79: 2150-2154) 참조]. 또한, 다양한 완충제 중에 제제화된 항체의 T<sub>m</sub>을 조사하여 항체 안정성에 대한 제제의 영향을 확인할 수 있다.

<133> 본 발명에 따라 사용되는 항체 또는 항체 단편은 단일특이적, 이중특이적, 삼중특이적 또는 더 높은 다중특이적 항체 또는 항체 단편일 수 있다. 다중특이적 항체는 원하는 표적 분자의 다양한 에피토프에 면역특이적으로 결합할 수 있거나 표적 분자 및 이중 에피토프 예컨대, 이중 폴리펩티드 또는 고체 지지체 물질에 면역특이적으로 결합할 수 있다. 예를 들면, 국제특허공보 제WO 93/17715호, 제WO 92/08802호, 제WO 91/00360호 및 제WO 92/05793호; 문헌(Tutt, et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69); 미국 특허 제4,474,893호, 제4,714,681호, 제4,925,648호, 제5,573,920호 및 제5,601,819호; 및 문헌(Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553)을 참조한다.

<134> 다중특이적 항체는 2개 이상의 상이한 항원에 대한 결합 특이성을 가진다. 이러한 분자는 통상적으로 2개의 항원에만 결합하지만(즉, 이중특이적 항체, BsAb), 삼중특이적 항체와 같은 추가 특이성을 가지는 항체도 본 발명에 포함된다. BsAb의 예로는 제1 항원에 대한 하나의 아암 및 제2 항원에 대한 다른 아암을 가지는 항체를 포함하나 이로 한정되지 않는다. 이중특이적 항체의 제조 방법은 당업계에 공지되어 있다. 전장 이중특이적 항체의 전통적인 제조는 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 동시발현에 기초한 것으로, 이때 상기 2개의쇄는 상이한 특이성을 가진다(Millstein et al., 1983, Nature, 305:537-539). 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 분류 때문에, 이 하이브리도마(쿠아드로마(quadroma))는 다양한 항체 분자들의 잠재적인 혼합물을 생성할 수 있고, 이들 중 하나만이 정확한 이중특이적 구조를 가진다. 친화성 크로마토그래피 단계에 의해 통상적으로 수행되는 정확한 분자의 정제는 다소 번거롭고 생성물 수율이 낮다. 유사한 절차가 국제특허공보 제WO 93/08829호 및 문헌(Traunecker et al., 1991, EMBO J., 10:3655-3659)에 개시되어 있다. 보다 직접적인 방법은 4가 이중특이적 항체의 다이-디아바디(Di-diabody)를 생성하는 것이다. 다이-디아바디의 제조 방법은 당업계에 공지되어 있다 [예를 들면, 문헌(Lu et al., 2003, J Immunol Methods 279:219-32; Marvin et al., 2005, Acta Pharmacologica Sinica 26:649) 참조].

<135> 상이한 방법에 따르면, 원하는 결합 특이성(항체-항원 결합 부위)을 가지는 항체 가변 도메인은 면역글로불린 불변 도메인 서열에 융합된다. 융합체는 바람직하게는 경쇄, CH2 및 CH3 영역의 적어도 일부를 포함하는 면역글로불린 중쇄 불변 도메인과의 융합체이다. 하나 이상의 융합체에 존재하는, 경쇄 결합에 필요한 부위를 함유하는 제1 중쇄 불변 영역(CH1)을 가지는 것이 바람직하다. 면역글로불린 중쇄 융합체를 코딩하는 DNA, 및 원하는 경우 면역글로불린 경쇄는 별개의 발현 벡터 내로 삽입하여 적절한 숙주 유기체 내로 동시-형질감염시킨다. 이것은 구축에서 사용되는 3개의 폴리펩티드쇄의 동일하지 않은 비가 최적 수율을 제공하는 실시양태에서 3개의 폴리펩티드 단편의 상호 비율을 조절하는 데 있어서 큰 유연성을 제공한다. 그러나, 2개 이상의 폴리펩티드쇄를 동일한 비율로 발현시키는 것이 수율을 높이거나 상기 비율이 특별한 의미가 없는 경우 2개의 폴리펩티드쇄 또는 3개 폴리펩티드쇄 모두에 대한 코딩 서열을 하나의 발현 벡터 내에 삽입할 수 있다.

<136> 이 방법의 한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 하나의 아암에 존재하는 제1 결합 특이성을 가지는 하이브리드 면역글로불린 중쇄, 및 다른 아암에 존재하는 하이브리드 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍(제2 결합 특이성을 제공함)으로 구성된다. 이 비대칭 구조는 이중특이적 분자의 절반에만 면역글로불린 경쇄가 존재하여 분리를 용이하게 하기 때문에 원치않는 면역글로불린쇄 조합물로부터 원하는 이중특이적 화합물의 분리를 용이하게 한다는 것이 밝혀졌다. 이 방법은 국제특허공보 제WO 94/04690호에 개시되어 있다. 이중특이적 항체의 제조에 대한 보다 상세한 설명은 예를 들면, 문헌(Suresh et al., 1986, Methods in Enzymology, 121:210)을 참조한다. 국제특허공보 제WO 96/27011호에 기재된 또 다른 방법에 따르면, 한 쌍의 항체 분자는 재조합 세포 배양물로부터 회수되는 이중이량체의 비율을 최대화하도록 개조될 수 있다. 바람직한 계면은 항체 불변 도메인의 CH3 도메인의 적어도 일부를 구성한다. 이 방법에서, 제1 항체 분자의 계면으로부터 유래된 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄는 보다 큰 측쇄(예컨대, 티로신 또는 트립토판)로 치환된다. 큰 측쇄(들)와 동일한 또는 유사한 크기를 가지는 보충 "캐비티(cavity)"는 큰 아미노산 측쇄를 보다 작은 아미노산 측쇄(예컨대, 알라닌 또는 트레오닌)로 치환시켜 제2 항체 분자의 계면 상에서 생성한다. 이것은 동종이량체와 같은 다른 원치않는 최종 생성물에 비해 이중이량체의 수율을 증가시키는 기작을 제공한다.

<137> 이중특이적 항체는 가교결합된 항체 또는 "헤테로접합체" 항체를 포함한다. 예를 들면, 헤테로접합체 중의 항체들 중 하나를 아비딘에 커플링시키고 다른 하나를 바이오틴에 커플링시킬 수 있다. 이러한 항체는 예를 들면, 면역 시스템 세포를 원치않는 세포에 표적화하고(미국 특허 제4,676,980호) HIV 감염의 치료 사용될 수 있는(국

제특허공보 제91/00360호 및 제WO 92/200373호, 및 유럽 특허 제03089호) 것으로 제안되어 있다. 이중접합체 항체는 임의의 편리한 가교결합 방법을 이용하여 제조할 수 있다. 적합한 가교결합체는 다수의 가교결합 기법과 함께 당업계에서 잘 공지되어 있고 미국 특허 제4,676,980호에 개시되어 있다. 2 원자가 초과 항체도 예상된다. 예를 들면, 삼중특이적 항체가 바람직할 수 있다. 예를 들면, 문헌[Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991)]을 참조한다.

<138> 구체적으로 예상되는 다른 항체는 "올리고클로날" 항체이다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "올리고클로날" 항체는 상이한 단일클론 항체의 소정의 혼합물을 지칭한다. 예를 들면, 국제특허공보 제WO 95/20401호, 및 미국 특허 제5,789,208호 및 제6,335,163호를 참조한다. 한 실시양태에서, 하나 이상의 에피토프에 대한 항체들의 소정의 혼합물로 구성된 올리고클로날 항체는 단일 세포 내에서 생성된다. 또 다른 실시양태에서, 올리고클로날 항체는 다수의 특이성을 가지는 항체를 생성하도록 공통된 경쇄와 쌍을 이룰 수 있는, 비천연 발생 아미노산을 가지는 다수의 중쇄를 포함한다(예를 들면, 국제특허공보 제WO 04/009618호). 올리고클로날 항체는 단일 표적 분자 상의 다수의 에피토프를 표적화하고자 하는 경우 특히 유용하다. 당업자라면 어떤 종류의 항체 또는 항체 혼합물이 의도된 목적 및 원하는 필요한 용도에 적용될 수 있는지를 알거나 결정할 수 있을 것이다.

<139> 본 발명은 낙타화 단일 도메인 항체를 비롯한 단일 도메인 항체를 사용하여 실시할 수도 있다[예를 들면, 문헌(Muyldermans et al., 2001, Trends Biochem. Sci. 26:230; Nuttall et al., 2000, Cur. Pharm. Biotech. 1:253; Reichmann and Muyldermans, 1999, J. Immunol. Meth. 231:25); 국제특허공보 제WO 94/04678호 및 제WO 94/25591호; 및 미국 특허 제6,005,079호 참조]

<140> 본 발명에 따라 사용될 수 있는 항체는 포유동물(예컨대, 인간)에서 5일 초과, 10일 초과, 15일 초과, 20일 초과, 25일 초과, 30일 초과, 35일 초과, 40일 초과, 45일 초과, 2개월 초과, 3개월 초과, 4개월 초과 또는 5개월 초과의 반감기(예컨대, 혈청 반감기)를 가지는 항체도 포함한다. 포유동물(예컨대, 인간)에서 항체의 증가된 반감기는 포유동물에서 상기 항체 또는 항체 단편의 혈청 역가를 높임으로써 상기 항체 또는 항체 단편의 투여 빈도를 감소시키고/시키거나 투여될 상기 항체 또는 항체 단편의 농도를 감소시킨다. 생체 내 반감기가 증가된 항체는 당업자에게 공지되어 있는 기법에 의해 생성될 수 있다. 예를 들면, 전술한 바와 같이, 증가된 생체 내 반감기를 가지는 항체는 Fc 도메인과 FcRn 수용체 사이의 상호작용에 관여하는 것으로 확인된 아미노산 잔기들을 변형(예컨대, 치환, 결실 또는 추가)시킴으로써 생성시킬 수 있다(예를 들면, 국제특허공보 제WO 97/34631호 및 제WO 04/029207호; 미국 특허 제6,737,056호; 및 미국 특허공보 제2003/0190311호 참조)

<141> 또 다른 실시양태에서, 본 발명에 따라 사용된 항체의 글리코실화를 변경시킨다. 예를 들면, 아글리코실화된(aglycosylated) 항체(즉, 글리코실화되지 않은 항체)를 제조할 수 있다. 글리코실화는 예를 들면, 표적 항원에 대한 항체의 친화성을 증가시키도록 변경될 수 있다. 이러한 탄수화물 변형은 예를 들면, 항체 서열 내의 하나 이상의 글리코실화 부위를 변경함으로써 달성될 수 있다. 예를 들면, 하나 이상의 가변 영역 골격 글리코실화 부위를 제거시켜 그 부위에서 글리코실화를 제거시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 만들 수 있다. 이러한 아글리코실화는 항원에 대한 항체의 친화성을 증가시킬 수 있다. 이러한 방법은 미국 특허 제5,714,350호 및 제6,350,861호에 더 상세히 기재되어 있다. 별법으로, Fc 영역 내에 존재하는 글리코실화 부위를 제거시키는 하나 이상의 아미노산 치환(예를 들면, IgG의 아스파라긴 297)을 만들 수 있다. 게다가, 글리코실화된 항체를 필요한 글리코실화 기구를 갖지 않는 박테리아 세포 내에서 제조할 수 있다.

<142> 추가로 또는 별법으로, 변형된 유형의 글리코실화를 가지는 항체 예컨대, 감소된 양의 푸코실 잔기를 가지는 하이포푸코실화된 항체 또는 증가된 이등분 GlcNAc 구조를 가지는 항체를 제조할 수 있다. 이러한 변경된 글리코실화 패턴은 항체의 ADCC 능력을 증가시킨다고 입증되어 있다. 이러한 탄수화물 변형은 예를 들면, 변경된 글리코실화 기구를 가지는 숙주 세포 내에서 항체를 발현시킴으로써 달성할 수 있다. 변경된 글리코실화 기구를 가지는 세포는 당업계에 공지되어 있으며 본 발명의 제조항 항체를 발현시켜 변경된 글리코실화를 가지는 항체를 제조하는 숙주 세포로서 사용될 수 있다. 예를 들면, 문헌(Shields, RX. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-1), 유럽 특허 제1,176,195호, 및 국제특허공보 제WO 03/035835호 및 제WO 99/54342호를 참조한다.

<143> 본 발명은 "항체-유사" 및 "항체-도메인 융합" 단백질도 포괄한다. 항체-유사 분자는 원하는 결합성을 가지도록 생성된 임의의 분자이다(예를 들면, 국제특허공보 제WO 04/044011호, 제WO 04/058821호, 제WO 04/003019호 및 제WO 03/002609호 참조). 항체-도메인 융합 단백질은 Fc 영역을 가지는 가변 도메인과 같은 하나 이상의 항체 도메인을 포함할 수 있다. 예를 들면, 이중 폴리펩티드는 Fc 영역 예컨대, 변이체 Fc 영역에 융합되는 Fab 단편, Fd 단편, Fv 단편, F(ab)<sub>2</sub> 단편, VH 도메인, VL 도메인, VH CDR, VL CDR, 또는 이들의 단편에 융합되거나

접합되어 본 발명에 따라 제제화될 수 있다. 디아바디(dsFv)<sub>2</sub>(Bera et al., 1998, J. Mol. Biol. 281:475-83); 미니바디(scFv-CH3 융합 단백질의 동종이량체)(Pessi et al., 1993, Nature 362:367-9), 4가 다이-디아바디(Lu et al., 2003 J. Immunol. Methods 279:219-32), Bs(scFv)<sub>4</sub>-IgG로 지칭되는 4가 이중특이적 항체(Zuo et al., 2000, Protein Eng. 13:361-367)를 포함하나 이들로 한정되지 않는 다수의 항체-도메인 분자가 당업계에 공지되어 있다. 이 분자들은 변이체 Fc 영역에 융합될 수 있거나 기존 Fc 영역 내의 비천연 발생 아미노산 잔기를 포함하도록 변형될 수 있다. 폴리펩티드를 항체의 일부에 융합시키거나 접합시키는 방법은 당업계에 잘 공지되어 있다. 예를 들면, 미국 특허 제5,336,603호, 제5,622,929호, 제5,359,046호, 제5,349,053호, 제5,447,851호 및 제5,112,946호; 유럽특허 제307,434호 및 제367,166호; 국제특허공보 제WO 96/04388호 및 제WO 91/06570호; 및 문헌(Ashkenazi et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535-10539; Zheng et al., 1995, J. Immunol. 154:5590-5600; and Vil et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337-11341)을 참조한다. 구체적으로 고려되는 다른 분자는 작은 개조된 단백질 도메인 예컨대, 면역-도메인 및/또는 단량체 도메인(예를 들면, 미국 특허공보 제2003082630호 및 제2003157561호 참조)이다. 면역-도메인은 항체의 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR)을 함유하지만, 단량체 도메인은 보존된 스카폴드(scaffold) 및 가변 결합 부위를 함유하는 공지된 천연 발생 비-항체 도메인 패밀리, 구체적으로 단백질 세포의 도메인에 기초한 것이며, 그 예로는 LDL 수용체 세포의 도메인, 및 리간드 결합에 관여하는 도메인을 들 수 있다. 이러한 단백질 도메인은 독립적으로 정확하게 폴딩할 수 있거나, 예컨대, 샤페로닌으로부터 제한적으로 도움을 받거나 금속 이온의 존재 하에 정확하게 폴딩할 수 있다. 이 능력은 도메인이 새로운 단백질 환경 내로 삽입되는 경우 도메인의 미스-폴딩을 회피함으로써 특정 표적에 대한 단백질 도메인의 결합 친화성을 보존하게 할 수 있다. 단백질 도메인의 가변 결합 부위는 다양한 다양성 발생 방법 예컨대, 무작위 돌연변이유발, 부위-특이적 돌연변이유발뿐만 아니라 직접적인 진화 방법 예컨대, 반복적인 오류-유발 PCR, 반복적인 재조합 등을 이용하여 무작위화한다. 다양한 다양성 발생 방법에 대한 상세한 설명은 미국 특허 제5,811,238호, 제5,830,721호 및 제5,834,252호; 및 국제특허공보 제WO 95/22625호, 제WO 96/33207호, 제WO 97/20078호, 제WO 97/35966호, 제WO 99/41368호, 제WO 99/23107호, 제WO 00/00632호, 제WO 00/42561호 및 제WO 01/23401호를 참조한다. 그 다음, 10<sup>10</sup> 개 이상의 변이체로 이루어진 라이브러리를 발생시킬 수 있으며 목적 표적에 대한 개선된 친화성 및 효능을 가지는 이들 단백질 도메인들의 단리를 후속 패닝(panning) 및 스크리닝에 의해 용이하게 할 수 있는 파지 시스템 예컨대, 파지 디스플레이를 이용하여 돌연변이된 단백질 도메인을 발현시킨다. 이러한 방법들은 국제특허공보 제WO 91/17271호, 제WO 91/18980호, 제WO 91/19818호 및 제WO 93/08278호에 기재되어 있다. 추가 디스플레이 시스템의 예는 미국 특허 제6,281,344호, 제6,194,550호, 제6,207,446호, 제6,214,553호 및 제6,258,558호에 기재되어 있다. 이 방법들을 이용하여 서브 nM의 결합 친화성(K<sub>d</sub>) 및 차단 기능(IC<sub>50</sub>)을 가지는 매우 다양한 개조된 단백질 도메인을 신속히 발생시킬 수 있다. 일단 확인되면, 2개 내지 10개의 이러한 개조된 단백질 도메인은 길이가 약 4 내지 15개 아미노산으로 이루어진 중성 단백질 링커를 사용하여 서로 연결시켜 결합 단백질을 형성할 수 있다. 개별 도메인들은 용도/질환 증상에 따라 단일 유형의 단백질 또는 여러 유형의 단백질을 표적화할 수 있다. 그 다음, 개조된 단백질 도메인을 변이체 Fc 영역에 연결하여 Fc 변이체 단백질을 발생시킬 수 있다.

<144>

#### 4.2. Fc 융합 단백질

<145>

전술한 바와 같이, 본 발명의 제제는 Fc 융합 단백질 제제를 포함한다. Fc 융합 단백질은 면역글로불린의 Fc 영역 또는 이의 단편과, 일반적으로 항체의 항원 결합 부분, 리간드, 효소, 수용체의 리간드 부분, 부착 단백질, 또는 일부 다른 단백질 또는 도메인을 포함하나 이들로 한정되지 않는 단백질일 수 있는 융합 파트너를 겸비한다. 예를 들면, 문헌(Chamow et al., 1996, Trends Biotechnol 14:52-60; Ashkenazi et al., 1997, Curr Opin Immunol 9:195-200; Heidaran et al., 1995, FASEB J. 9:140-5)을 참조한다. 폴리펩티드를 Fc 영역에 융합시키거나 접합시키는 방법은 당업계에 잘 공지되어 있다. 예를 들면, 미국 특허 제5,336,603호, 제5,349,053호, 제5,447,851호 및 제5,783,181호; 유럽 특허 제367,166호; 국제특허공보 제WO 91/06570호; 및 문헌(Ashkenazi et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539; Zheng et al., 1995, J. Immunol. 154:5590-5600; and Vie et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337-11341)을 참조한다. 변이체 Fc 영역을 포함하는 Fc 융합 단백질은 본 발명에 따라 제제화되어 안정성을 개선시킬 수 있다(예컨대, 응집을 감소시킨다)고 예상된다. 변이체 Fc 영역을 포함하는 Fc 융합 단백질은 예를 들면, 이중 폴리펩티드를 하나 이상의 비천연 발생 아미노산 잔기를 포함하는 Fc 영역(즉, 변이체 Fc 영역) 또는 이의 단편에 융합시키거나 접합시킴으로써 발생시킬 수 있다. 별법으로, Fc 융합 단백질의 Fc 영역은 하나 이상의 비천연 발생 잔기를 Fc 영역 내로 도입하여 변이체 Fc 영역을 발생시킴으로써 변형시킬 수 있다.

<146> 한 실시양태에서, 분자(즉, 표적)에 결합하는 Fc 융합 단백질은 본 명세서에 개시된 것들을 포함하나 이들로 한정되지 않는 변이체 Fc 영역에 융합된 융합 파트너를 포함한다. 이 실시양태에 따르면, 융합 파트너는 분자(즉, 표적)에 결합한다. 변이체 Fc 영역에 융합될 수 있는 융합 파트너는 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 소분자, 유사체, 합성 약물, 무기 분자 및 유기 분자를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 한 실시양태에서, 융합 파트너는 5개 이상, 10개 이상, 20개 이상, 30개 이상, 40개 이상, 50개 이상, 60개 이상, 70개 이상, 80개 이상, 90개 이상 또는 100개 이상의 인접 아미노산 잔기들을 포함하는 폴리펩티드이고 변이체 Fc 영역의 아미노산 서열에 대해 이종성을 나타낸다.

#### <147> 4.3. 항원, 융합 파트너 및 항체

<148> 하기 단백질들뿐만 아니라 하기 단백질 목록에 속하는 서브유닛, 도메인, 모티프 및 에피토프를 포함하나 이들로 한정되지 않는 사실상 임의의 분자가 Fc 변이체 단백질(예컨대, 항체, Fc 융합 단백질)에 의해 표적화되고/되거나 상기 Fc 변이체 단백질 내로 도입될 수 있다: 레닌; 인간 성장 호르몬 및 소 성장 호르몬을 비롯한 성장 호르몬; 성장 호르몬 방출 인자; 부갑상선 호르몬; 갑상선 자극 호르몬; 지단백질; 알파-1-항트립신; 인슐린 A-쇄; 인슐린 B-쇄; 프로인슐린; 여포 자극 호르몬; 칼시토닌; 황체 형성 호르몬; 글루카곤; 응고 인자 예컨대, 인자 VII, 인자 VIIIC, 인자 IX, 조직 인자(TF) 및 본 빌레브란트 인자; 항-응고 인자 예컨대, 단백질 C; 심방 나트륨이뇨 인자; 폐 계면활성제; 플라스미노겐 활성화자 예컨대, 유로키나제 또는 인간 소변 또는 조직-유형 플라스미노겐 활성화자(t-PA); 보베신; 트롬빈; 조혈 성장 인자; 종양 괴사 인자(TNF) 단백질 예컨대, TNF-알파, TNF-베타, TNF베타2, TNF $\alpha$ , TNF알파베타, 4-1BBL뿐만 아니라 TNF 수퍼패밀리 구성원 예컨대, TNF와 유사한 약한 아포토시스 유도체(TWEAK), 및 LIGHT, B 림프구 자극제(BlyS); TNF-RI, TNF-RII, TRAIL 수용체-1, CD137, 경막 활성화자 및 CAML 상호작용자(TACI) 및 OX40을 비롯한 TNF 수용체 수퍼패밀리 구성원; Fas 리간드(FasL); 엔케팔리나제; RANTES("regulated on activation normally T-cell expressed and secreted"의 약칭); 인간 대식세포 염증 단백질(MIP-1-알파); 혈청 알부민 예컨대, 인간 혈청 알부민; 뮐러리안-억제 물질(Muellerian-inhibiting substance); 렐랙신(relaxin) A-쇄; 렐랙신 B-쇄; 전구렐랙신; 마우스 성선자극호르몬-관련 펩티드; 미생물 단백질 예컨대, 베타-락타마제; DNase; IgE; 세포독성 T-림프구 관련 항원(CTLA) 예컨대, CTLA-4; 인히빈; 액티빈; 혈관 내피 성장 인자(VEGF); 호르몬 또는 성장 인자에 대한 수용체 예컨대, EGFR(ErbB-1), VEGFR, CTGF(결합 조직 성장 인자); 인터페론 예컨대, 알파 인터페론( $\alpha$ -IFN), 베타 인터페론( $\beta$ -IFN) 및 감마 인터페론( $\gamma$ -IFN); 인터페론 알파 수용체(IFNAR) 서브유닛 1 및/또는 2 및 다른 수용체 예컨대, A1, 아데노신 수용체, 림프독소 베타 수용체, BAFF-R, 엔도텔린 수용체; 단백질 A 또는 D; 류마티스 인자; 신경영양성 인자 예컨대, 골-유래 신경영양성 인자(BDNF), 뉴로트로핀-3, -4, -5 또는 -6(NT-3, NT-4, NT-5 또는 NT-6), 또는 신경 성장 인자; 혈소판-유래 성장 인자(PDGF); 섬유모세포 성장 인자 예컨대,  $\alpha$ FGF 및  $\beta$ FGF; 표피 성장 인자(EGF); 형질전환 성장 인자(TGF) 예컨대, TGF-1, TGF-2, TGF-3, TGF-4 또는 TGF-5를 비롯한 TGF-알파 및 TGF-베타; 인슐린-유사 성장 인자-I 및 인슐린-유사 성장 인자-II(IGF-I 및 IGF-II); 데스(1-3)-IGF-I(또는 IGF-I), 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질, 각질세포 성장 인자; 성장 인자 수용체 예컨대, FGFR-3, IGFR, PDGFR $\alpha$ ; CD 단백질 예컨대, CD2, CD3, CD3E, CD4, CD8, CD11, CD11a, CD14, CD16, CD18, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD27, CD27L, CD28, CD29, CD30, CD30L, CD32, CD33(p67 단백질), CD34, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD52, CD54, CD55, CD56, CD63, CD64, CD80; CD137 및 CD147; IL-2R/IL-15R 베타 서브유닛(CD122); 에리트로포이에틴; 골유도성 인자; 면역독소; 골 형태형성 단백질(BMP); 인터페론 예컨대, 인터페론-알파, 인터페론-베타 및 인터페론-감마; 콜로니 자극 인자(CSF) 예컨대, M-CSF, GM-CSF 및 G-CSF; 인터루킨(IL) 예를 들면, IL-1 내지 IL-13 및 IL-15, IL-18, IL-23; EPO; 수퍼록사이드 디스무타제; T-세포 수용체 알파/베타; 표면 막 단백질; 부패 가속화 인자; 바이러스 항원 예컨대, AIDS 외피의 일부, 예컨대, gp120; 수송 단백질; 귀소 수용체; 어드레신(addressin); 조절 단백질; 케모카인 패밀리 구성원 예컨대, 에오타신(eotaxin), MIP, MCP-1, RANTES; 세포 부착 분자 예컨대, 셀렉틴(selectin)(L-셀렉틴, P-셀렉틴, E-셀렉틴) LFA-1, LFA-3, Mac1, p150.95, VLA-1, VLA-4, ICAM-1, ICAM-3, EpCAM 및 VCAM, a4/p7 인테그린, 및 Xv/p3 인테그린, 인테그린 알파 서브유닛 예컨대, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, 알파7, 알파8, 알파9, 알파D, CD11a, CD11b, CD51, CD11c, CD41, 알파IIb, 알파IELb; 인테그린 베타 서브유닛 예컨대, CD29, CD18, CD61, CD104, 베타5, 베타6, 베타7 및 베타8;  $\alpha$ V $\beta$ 3,  $\alpha$ V $\beta$ 5 및  $\alpha$ 4 $\beta$ 7을 포함하나 이들로 한정되지 않는 인테그린 서브유닛 조합물; 세포 리간드 예컨대, TNF-관련 아포토시스-유도 리간드(TRAIL), 증식-유도 리간드(APRIL), B 세포 활성화 인자(BAFF), 아포토시스 경로 구성원; IgE; 혈액 군 항원; f1k2/f1t3 수용체; 비만(OB) 수용체; mp1 수용체; CTLA-4; 단백질 C; Eph 수용체 예컨대, EphA2, EphA4, EphB2 등; 면역 시스템 마커, 수용체 및 리간드 예컨대, CTLA-4, T 세포 수용체, B7-1, B7-2, IgE, 인간 백혈구 항원(HLA) 예컨대, HLA-DR, CBL; 보체 단백질 예컨대, 보체 수용체 CR1, C1Rq 및 다른 보체 인자 예컨대, C3 및 C5; 조직 인자 및 인자 VII

을 비롯한 혈액 인자; 당단백질 수용체 예컨대, GpIb $\alpha$ , GPIIb/IIIa 및 CD200; 및 전술한 폴리펩티드 중 임의의 폴리펩티드의 단편.

<149>

ALK 수용체(플레이오토로핀(pleiotrophin) 수용체), 플레이오토로핀; KS 1/4 팬(pan)-암종 항원; 난소 암종 항원(CA125); 전립선 산성 포스페이트; 전립선 특이적 항원(PSA); 전립선 특이적 막 항원(PSMA); 흑색종-관련 항원 p97; 흑색종 항원 gp75; 고분자량 흑색종 항원(HMW-MAA); 전립선 특이적 막 항원; 암배아 항원(CEA); 암배아 항원-관련 세포 부착 분자(CEACAM1); 사이토케라틴 종양-관련 항원; 인간 유지방구(HMFG) 항원; CanAg 항원; 종양-관련 항원 발현 루이스 Y 관련 탄수화물; 결장직장 종양-관련 항원 예컨대, CEA, 종양-관련 당단백질-72(TAG-72), CO17-1A, GICA 19-9, CTA-1 및 LEA; 버키트 림프종 항원-38.13; CD19; 인간 B-림프종 항원-CD20; CD22; CD33; 흑색종 특이적 항원 예컨대, 강글리오사이드 GD2, 강글리오사이드 GD3, 강글리오사이드 GM2 및 강글리오사이드 GM3; 종양-특이적 이식 유형 세포-표면 항원(TSTA); T-항원, DNA 종양 바이러스 및 RNA 종양 바이러스의 외피 항원을 비롯한 바이러스-유도 종양 항원; 종양태아성 항원-알파-태아단백질 예컨대, 결장의 CEA, 5T4 종양태아성 영양막 당단백질 및 방광 종양 종양태아성 항원; 분화 항원 예컨대, 인간 폐 암종 항원 L6 및 L20; 섬유육종의 항원; 인간 백혈병 T 세포 항원-Gp37; 네오당단백질; 스핑고지질; 유방암 항원 예컨대, EGFR (표피 성장 인자 수용체); NY-BR-16; NY-BR-16 및 HER2 항원(p185<sup>HER2</sup>); Her2/neu(ErbB-2), Her3(ErbB-3), Her4(ErbB-4), 다형성 상피 점액소(PEM) 항원; 상피 막 항원(EMA); 흑색종-관련 항원 MUC18; MUC1; 악성 인간 림프구 항원-APO-1; 분화 항원 예컨대, 태아 적혈구에서 발견되는 I 항원; 성체 적혈구에서 발견되는 일차 내배엽 I 항원; 착상전 배아; 위 선암종에서 발견되는 I(Ma); M18, 유방 상피에서 발견되는 M39; 골수 세포에서 발견되는 SSEA-1; VEP8; VEP9; My1; VIM-D5; 결장직장 암에서 발견되는 D<sub>1</sub>56-22; TRA-1-85(혈액 군 H); 정소암 및 난소암에서 발견되는 SCP-1; 결장 선암종에서 발견되는 C14; 폐 선암종에서 발견되는 F3; 위암에서 발견되는 AH6; Y 헵텐; 배아 암종 세포에서 발견되는 Le<sup>y</sup>; 결장직장 종양에서 발견되는 결장세포 분화 항원, 신장 세포 암종에서 발견되는 탄산탈수효소 IX, 다수의 종양 유형 주변에 있는 스트로마(stroma)에서 발견되는 FAP $\alpha$ , 난소 종양에서 발견되는 엽산 결합 단백질, PD1; 사망 수용체 단백질, DR5; TL5(혈액 군 A); A431 세포에서 발견되는 EGF 수용체; 췌장암에서 발견되는 E<sub>1</sub> 시리즈(혈액 군 B); 배아 암종 세포에서 발견되는 FC10.2; 위 선암종 항원; 선암종에서 발견되는 CO-514(혈액 군 Le<sup>a</sup>); 선암종에서 발견되는 NS-10; CO-43(혈액 군 Le<sup>b</sup>); A431 세포의 EGF 수용체에서 발견되는 G49; 결장 선암종에서 발견되는 MH2(혈액 군 AL<sup>b</sup>/Le<sup>y</sup>); 결장암에서 발견되는 19.9; 위암 점액소; 골수 세포에서 발견되는 T<sub>5</sub>A<sub>7</sub>; 흑색종에서 발견되는 R<sub>24</sub>; 배아 암종 세포에서 발견되는 4.2, G<sub>D3</sub>, D1.1, OFA-1, G<sub>M2</sub>, OFA-2, G<sub>D2</sub> 및 M1:22:25:8, 및 4 내지 8-세포 주기 배아에서 발견되는 SSEA-3 및 SSEA-4; 피부 T 세포 림프종 항원; MART-1 항원; 시알리(Sialy) Tn(STn) 항원; 큰 세포 림프종에서 발견되는 역형성 림프종 키나제(ALK); 결장암 항원 NY-CO-45; 폐암 항원 NY-LU-12 변이체 A; 선암종 항원 ART1; 부신생물 관련 뇌-정소-암 항원(종양신경성 항원 MA2; 부신생물 신경 항원); 신경-종양학적 배측(ventral) 항원 2(NOVA2); 간 세포 암종 항원 유전자 520; 종양-관련 항원 CO-029; 종양-관련 항원 MAGE-C1(암/정소 항원 CT7), MAGE-B1(MAGE-XP 항원), MAGE-B2(DAM6), MAGE-2, MAGE-4a, MAGE-4b 및 MAGE-X2; 암-정소 항원(NY-EOS-1); 태반 알칼리성 포스파타제(PLAP) 및 정소 PLAP-유사 알칼리성 포스파타제, 트랜스페린 수용체; 헤파라나제(Heparanase) I; 다수의 암과 관련된 EphA2; 많은 종양 유형의 피사 코어에서 발견되는 DNA/히스톤 H1 복합체; 아미노 인지질 예컨대, 포스파티딜세린; 태반 알칼리성 포스파타제(PALP); 다수의 종양 유형과 관련된 세포 표면 당단백질 예컨대, CS1, gp-3, gp4 및 gp9; 및 전술한 폴리펩티드들 중 임의의 폴리펩티드의 단편을 포함하나 이들로 한정되지 않는 암 관련 단백질도 예상된다.

<150>

Fc 변이체 단백질에 의해 표적화될 수 있고/있거나 Fc 변이체 단백질 내로 도입될 수 있는 다른 예시적 단백질은 전술한 단백질들뿐만 아니라 하기 미생물 단백질 목록에 속하는 서브유닛, 도메인, 모티프 및 에피토프를 포함하나 이들로 한정되지 않는다: 비. 안쓰라시스(*B. anthracis*) 단백질 또는 독소; 인간 사이토메갈로바이러스(HCMV) 단백질 예컨대, 외피 당단백질, gB, 바이러스의 내부 매트릭스 단백질, pp65 및 pp150, 즉각 초기(IE) 단백질; 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 단백질 예컨대, Gag, Pol, Vif 및 Nef(Vogt et al., 1995, Vaccine 13:202-208); HIV 항원 gp120 및 gp160(Achour et al., 1995, Cell. Mol. Biol. 41:395-400; Hone et al., 1994, Dev. Biol. Stand. 82:159-162); 인간 면역결핍 바이러스의 gp41 에피토프(Eckhart et al., 1996, J. Gen. Virol. 11:2001-2008); C형 간염 바이러스(HCV) 단백질 예컨대, 분비된 또는 비분비된 형태의 뉴클레오캡시드 단백질, 코어 단백질(pC); E1(pE1), E2(pE2)(Saito et al., 1997, Gastroenterology 112: 1321-1330), NS3, NS4a, NS4b 및 NS5(Chen et al., 1992, Virology 188:102-113); S(스파이크) 당단백질, 작은 외피 단백질

E(E 단백질), 막 당단백질 M(M 단백질), 헤마글루티닌 에스테라제 단백질(HE 단백질) 및 뉴클레오캡시드 단백질(N-단백질)을 포함하나 이들로 한정되지 않는 심각한 급성 호흡 증후군(SARS) 코로나 바이러스 단백질[예컨대, 문헌(Marra et al., "The Genome Sequence of the SARS-Associated Coronavirus," Science Express, May 2003) 참조]; 마이코박테리움 튜버쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) 단백질 예컨대, 일반적으로 세포 표면 상의 지질당단백질인 30 내지 35 kDa(a.k.a. 항원 85, 알파-항원), 65-kDa 열 충격 단백질, 및 36-kDa 프롤린-풍부 항원(Tascon et al. (1996) Nat. Med. 2:888-92), Ag85A, Ag85b(Huygen et al., 1996, Nat. Med. 2:893-898), 65-kDa 열 충격 단백질, hsp65(Tascon et al., 1996, Nat. Med. 2:888-892), MPB/MPT51(Miki et al., 2004, Infect. Immun. 72:2014-21), MTSP11, MTSP17(Lim et al., 2004, FEMS Microbiol. Lett. 232:51-9 및 상기 문헌); 단순 포진 바이러스(HSV) 단백질 예컨대, gD 당단백질, gB 당단백질; LPG, gp63(Xu and Liew, 1994, Vaccine 12: 1534-1536; Xu and Liew, 1995, Immunology 84: 173-176), P-2(Nylen et al., 2004, Scand. J. Immunol. 59:294-304), P-4(Kar et al 2000, J Biol. Chem. 275:37789-97) 및 LACK(Kelly et al., 2003, J Exp. Med. 198:1689-98)를 비롯한, 레이쉬매니아(*Leishmania*)와 같은 세포내 기생충으로부터 유래된 단백질; 미생물 독소 단백질 예컨대, 클로스트리디움 퍼프링겐스(*Clostridium perfringens*) 독소; 씨. 디피실(*C. difficile*) 독소 A 및 B; 및 국제특허공보 제WO 04010935A2호(Young et al.)에 상세히 기재되어 있는 인간 호흡 합포체성 바이러스(hRSV), 인간 메타뉴모바이러스(HMPV) 및 파라인플루엔자 바이러스(PIV)의 예시적 항원 펩티드.

<151>

당업자라면 전술한 목록의 단백질들이 특정한 단백질 및 생체분자뿐만 아니라 이들을 포함하는 생화학적 경로 또는 경로들을 언급한다는 것을 인식할 것이다. 예를 들면, 표적 항원 및/또는 융합 파트너로서의 CTLA-4에 대한 언급은 CTLA-4, B7-1, B7-2, CD28, 및 이 단백질들에 결합하는 임의의 다른 발견되지 않은 리간드 또는 수용체들을 비롯한, T 세포 보조-자극 경로를 구성하는 리간드 및 수용체들도 표적 항원 및/또는 융합 파트너로서 유용하다는 것을 내포한다. 따라서, 본 발명은 특정한 생체분자뿐만 아니라, 상기 생체분자 및 이 생체분자가 속하는 생화학적 경로의 구성원과 상호작용하는 단백질 세트도 포괄한다. 당업자라면 단백질, 이들에 결합하는 리간드 또는 수용체, 또는 이들의 상응하는 생화학적 경로의 다른 구성원들에 결합하는 항체 및/또는 이의 항원 결합 단편이 당업계에 공지된 방법 예컨대, 후술한 방법에 의해 유도될 수 있고, 이러한 항체 및/또는 항원 결합 단편이 본 명세서에 기재된 것들을 포함하나 이들로 한정되지 않는 변이체 Fc 영역 또는 이의 단편을 포함하도록 개조될 수 있다는 것도 인식할 것이다. 또한, 당업자라면 전술한 단백질들 중 임의의 단백질, 이들에 결합하는 리간드 또는 수용체, 또는 이들의 상응하는 생화학적 경로의 다른 구성원들이 본 명세서에 기재된 것들을 포함하나 이들로 한정되지 않는 변이체 Fc 영역 또는 이의 단편에 작동가능하게 연결되어 Fc 융합체를 발생시킬 수 있다는 것을 인식할 것이다. 따라서, 예를 들면, EGFR을 표적화하는 Fc 융합체는 변이체 Fc 영역을 EGFR에 결합하는 EGF, TGF  $\alpha$ , 또는 발견되거나 발견되지 않은 임의의 다른 리간드에 작동가능하게 연결시킴으로써 구축할 수 있다. 따라서, 변이체 Fc 영역은 EGF, TGF  $\alpha$  또는 EGFR에 결합하는 발견된 또는 미발견된 임의의 다른 리간드에 결합하는 Fc 융합체를 생성하도록 EGFR에 작동가능하게 연결될 수 있다. 따라서, 전술한 표적, 및 이들의 상응하는 생화학적 경로를 구성하는 단백질을 포함하나 이들로 한정되지 않는 사실상 임의의 폴리펩티드가 리간드이든, 수용체이든, 아니면 일부 다른 단백질 또는 단백질 도메인이든 Fc 변이체 단백질을 생성하기 위한 융합 파트너로서 사용될 수 있다. 전술한 분자들 중 하나 이상의 분자를 표적화하고/하거나 도입하는 생성된 Fc 변이체 단백질(예컨대, 항체, Fc 융합체)은 본 발명에 따라 제제화된다고 예상된다.

<152>

다수의 특이적 다중도메인 단백질, 즉 임상 시험 또는 개발에서 사용하도록 승인받은 항체 및 항체 도메인 융합 단백질(예컨대, Fc 융합체)은 당업계에 공지된 방법을 이용하여 변이체 Fc 영역을 포함하도록 변형시켜 Fc 변이체 단백질을 생성할 수 있다. 따라서, 이러한 Fc 변이체 단백질은 본 발명의 제제로부터 이점을 얻을 것이다. 상기 항체 및 항체 도메인 융합 단백질(예컨대, Fc 융합체)은 본 명세서에서 "임상 제품 및 후보물질"로 지칭된다. 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명의 제제는 변이체 Fc 영역을 포함하도록 변형된 일군의 임상 제품 및 후보물질을 포함할 수 있다.

<153>

다른 실시양태에서, 본 발명의 제제는 본 명세서에 기재된 임상 제품 및/또는 후보물질로부터 유래된 Fc 변이체 단백질을 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 제제는 임상 제품 및/또는 후보물질로부터 유래된 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상 또는 6개 이상의 CDR을 포함하는 Fc 변이체 단백질을 포함할 수 있다. 당업자라면 임상 제품 및/또는 후보물질이 개선된 특성을 가지는 분자를 발생시키도록 예를 들면, CDR 최적화에 의해 최적화될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 따라서, 다른 실시양태에서, 본 발명의 제제는 임상 제품 및/또는 후보물질로부터 유래된 하나 이상의 CDR의 아미노산 서열과 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 92% 이상, 94% 이상, 96% 이상, 98% 이상 또는 99% 이상 동일한 하나 이상의 CDR의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 변이체 단백질을 포함할 수 있다. 2개의 아미노산 서열의 동일성(%)은 BLAST 단백질 검색을 비롯한, 당업자에게 공지되어

있으며 본 명세서에 기재되어 있는 임의의 방법에 의해 측정될 수 있다.

<154>

다른 실시양태에서, 본 발명의 Fc 변이체 단백질 제제는 임상 제품 및/또는 후보물질과 동일한 항원에 결합하는 Fc 변이체 단백질을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 Fc 변이체 단백질 제제는 임상 제품 및/또는 후보물질과 동일한 항원에의 결합에 대해 경쟁하는 Fc 변이체 단백질을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 제제에 존재하는 Fc 변이체 단백질은 임상 제품 및/또는 후보물질과 실질적으로 유사한 결합 및 기능적 특성을 갖고, 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 239D, 330L, 330Y 및 332E로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 비천연 발생 아미노산을 Fc 영역 내에 포함한다.

<155>

예를 들면, 본 발명의 제제는 하기 임상 제품 및/또는 후보물질을 포함하나 이들로 한정되지 않는 임상 제품 및/또는 후보물질과 실질적으로 유사한 결합 및 기능적 특성을 가지는 변이체 Fc 영역을 포함하는 항체 또는 Fc 융합 단백질의 안정화(예컨대, 응집 감소)에서 사용될 수 있다: 리툽시마브(rituximab)(Rituxan<sup>®</sup>, IDEC/Genentech/Roche)(예컨대, 미국 특허 제5,736,137호 참조), 비-호치킨 림프종을 치료하는 데 승인받은 키메라 항-CD20 IgG1 항체; 자놀리무마브(zanolimumab)(휴맥스-CD20, Genmab), 항-CD20(예를 들면, 국제특허공보 제WO 04/035607호 참조); 미국 특허 제5,500,362호에 기재된 항-CD20 항체; 인간화되고 최적화된 항-CD20 Mab인 AME-I33(Applied Molecular Evolution); 인간화된 항-CD20 Mab인 hA20(Immunomedics, Inc.); 전장 인간 항-CD20 Mab인 HumaLYM<sup>™</sup>(Intracel); 미국 특허공보 제2006-0233791호, 제2006-0263357호 및 제2006-0280738호에 기재된 항-CD19 항체; 국제특허공보 제 WO 05/000901호에 기재된 항-CD20 항체; 미국 특허 제5,484,892호 및 미국 특허공보 제2003-0202975호에 기재된 항-CD22 항체; 유방암을 치료하는 데 승인받은 인간화된 항-Her2/neu 항체인 트라스투주마브(trastuzumab)(Herceptin<sup>®</sup>, Genentech)(예컨대, 미국 특허 제5,677,171호 참조); 폐루주마브(pertuzumab)(rhuMab-2C4, Omnitarg<sup>™</sup>, Genentech); 미국 특허 제4,753,894호에 기재된 항-Her2 항체; 다양한 암에 대한 임상 시험에서 키메라 항-EGFR 항체인 세툽시마브(Erbitux<sup>®</sup>, Imclone)(미국 특허 제4,943,533호 및 국제특허공보 제WO 96/40210호); 전장 인간 항-PDGFR $\alpha$  항체인 IMC-3G3(ImClone); 미국 특허 제6,235,883호에 기재된 전장 인간 항-EGFR 항체인 패니투무마브(Vectibx<sup>™</sup>, ABX-EGF, Abgenix/Immunex/Amgen); 미국 특허출원 제10/172,317호에 기재된 잘루투무마브(zalututumumab)(휴맥스-EGFr, Genmab); 항-EFGR 항체인 EMD55900, EMD62000 및 마투주마브(EMD72000, 인간화된 EMD55900)(Merck KGaA)(미국 특허 제5,558,864호); ICR62(Institute of Cancer Research)(국제특허공보 제WO 95/20045호); 니모투주마브(TheraCIM hr3, YM Biosciences, Canada and Centra de Immunologia Molecular, Cuba)(미국 특허 제5,891,996호 및 제6,506,883호); 항-EGFR 항체인 ch806(인간화된 mAb-806, Ludwig Institute for Cancer Research, Memorial Sloan-Kettering)(Jungbluth et al. 2003, Proc Natl Acad Sci USA. 100(2):639-44); KSB-102(KS Biomedix); 친화성이 최적화된 항-EGFR Fvs인 MR1-1(IVAX, National Cancer Institute)(국제특허공보 제WO 01/62931호); 및 탈면역화된 항-EGFR 항체인 SC100(Scancell)(국제특허공보 제WO 01/88138호); 항-루이스<sup>y/b</sup> 항체인 SC101(Scancell); 항-PALP 항체인 SC103(Scancell); B-세포 만성 림프구성 백혈병을 치료하는 데 현재 승인받은 인간화된 단일클론 항-CD52 IgG1 항체인 알렘투주마브(Campath<sup>®</sup>, Genzyme); 항-CD3 항체인 무로모나브(muromonab)-CD3(Orthoclone OKT3<sup>®</sup>, Ortho Biotech/Johnson & Johnson); 인간화된 항-CD4 IgG 항체인 오르토클론(OrthoClone) OKT4A(Ortho Biotech); 방사성표지된 항-CD20 항체인 이브리투모마브 티우섹탄(ibritumomab tiuxetan)(Zevalin<sup>®</sup>, IDEC/Schering AG); 항-CD33(p67 단백질) 항체인 겐투주마브 오조가미신(gemtuzumab ozogamicin)(Mylotarg<sup>®</sup>, (공식적으로, AVE9633, huMy9-6-DM4), Celltech/Wyeth); 항-LFA-3 Fc 융합체인 알레페셉트(alefacept)(Amevive<sup>®</sup>, Biogen); 응괴 형성의 방지를 위한 혈소판에 대한 항-당단백질 IIb/IIIa 수용체인 애브식시마브(abciximab)(ReoPro<sup>®</sup>, Centocor/Lilly); 항-CD25 항체인 바실릭시마브(basiliximab)(Simulect<sup>®</sup>, Novartis); 인간화된 중화 항-RSV 항체인 팔리비주마브(palivizumab)(Synagis<sup>®</sup>, MedImmune); 인간화된 중화 항-RSV 항체인 모타비주마브(motavizumab)(Numax<sup>™</sup>, MedImmune); 항-TNF알파 항체인 인플릭시마브(infliximab)(Remicade<sup>®</sup>, Centocor); 항-TNF알파 항체인 아달리무마브(adalimumab)(Humira<sup>®</sup>, Abbott); 항-TNF알파 항체인 휴미캐이드(Humicade)<sup>™</sup>(CDP-571, CellTech); 항-TNF알파 Fc 융합체인 에타네르셉트(etanercept)(Enbrel<sup>®</sup>, Immunex/Amgen); 항-CD147 항체인 ABX-CBL(Abgenix); 항-IL8 항체인 ABX-IL8(Abgenix); 항-MUC18 항체인 ABX-MA1(Abgenix); 항-MUC1 항체인 펌투모마브(pemtumomab)(R1549, <sup>90</sup>Y-muHMFg1, Antisoma); 항-MUC1 항체인 테렉스(Therex)(R1550, Antisoma); 항-종양태아성 피브로블라스트 항체인 엔

지오Mab(AngioMab)(AS1405, HuBC-1, Antisoma) 및 안티소마(Antisoma)에 의해 개발된 티오플라틴(Thioplatin)(AS1407); 항-알파-4-베타-1(VLA-4) 및 알파-4-베타-7 항체인 나탈리주마브(natalizumab)(Antegren<sup>®</sup>, Biogen); 인간화된 항-CD40L IgG 항체인 ANTOVA<sup>™</sup>(IDEC-131, Biogen); 항-VLA-1 인테그린 항체인 VLA-1 mAb(Biogen); 항-림프독소 베타 수용체(LTBR) 항체인 LTBR mAb(Biogen); 항-TGFβ2 항체인 CAT 152(Cambridge Antibody Technology); 항-IL-12 항체인 J695(Cambridge Antibody Technology/Abbott); 항-TGFβ1 항체인 CAT-192(Cambridge Antibody Technology/Genzyme); 항-에오택신1 항체인 CAT-213(Cambridge Antibody Technology); 가용성 BAFF 길항제인 BR3-Fc(BiogenIdec); 항-Blys 항체인 림포스타트-B(LymphoStat-B<sup>™</sup>), 및 항-TRAIL-R1 항체인 TRAIL-R1mAb(개발사: Cambridge Antibody Technology and Human Genome Sciences, Inc.); 항-VEGF 항체인 베바시주마브(bevacizumab)(Avastin<sup>™</sup>, rhuMAB-VEGF, Genentech); 항-VEGF 항체 단편인 래니비주마브(ranibizumab)(Lucentis<sup>™</sup>, Genentech); 항-HER 수용체 패밀리 항체(Genentech); 항-조직 인자 항체(Genentech); 항-IgE 항체인 오말리주마브(omalizumab)(Xolair<sup>™</sup>, Genentech); 항-CD11a 항체인 에팔리주마브(efalizumab)(Raptiva<sup>™</sup>, Genentech/Xoma); 인간화된 항-α4β7 항체인 MLN-02 항체(공식적으로, LDP-02, Genentech/Millennium Pharmaceuticals); 항-CD4 항체인 자놀리무마브(zanolimumab)(휴맥스 CD4, Genmab); 항-IL15 항체인 휴맥스-IL15(Genmab and Amgen); 휴맥스-인플램(휴맥스-Inflam)(Genmab/Medarex); 항-헤파라나제(Heparanase) I 항체인 휴맥스-캔서(휴맥스-Cancer)(Genmab/Medarex/Oxford GcoSciences); 휴맥스-림포마(휴맥스-Lymphoma)(Genmab/Amgen); 휴맥스-TAC(Genmab); 항-CD4 항체인 클레놀릭시마브(clenoliximab)(IDEC-151, IDEC Pharmaceuticals); 항-CD23인 루밀릭시마브(lumiliximab)(IDEC-152, IDEC Pharmaceuticals); 항-대식세포 이동 인자(MIF) 항체(개발사: IDEC Pharmaceuticals); GD3과 유사한 항-이디오타입 항체인 BEC2(Imclone, 미국 특허 제5792455호 참조); 항-KDR 항체인 IMC-1C11(Imclone); 항-flk-1 항체인 DC101(Imclone); 항-VE 캐드헤린(cadherin) 항체(개발사: Imclone); 항-암배아 항원(CEA) 항체인 라베투주마브(labetuzumab)(CEA-Cide<sup>™</sup>, Immunomedics); 항-암배아 항원(CEA) 항체인 아르시투모마브(arcitumomab)(CEAScan<sup>®</sup>, Immunomedics); 항-CD22 항체인 에프라투주마브(epratuzumab)(LymphoCide<sup>™</sup>, Immunomedics); 인간화된 항-알파 태아단백질 항체인 태케투주마브(tacatuzumab)(AFP-Cide, Immunomedics); 마이엘로마사이드(MyelomaCide)(Immunomedics); 르코사이드(LkoCide)(Immunomedics); 프로스타사이드(ProstaCide)(Immunomedics); 항-CTLA4 항체인 이필리무마브(ipilimumab)(MDX-010, Medarex); 항-CD30 항체인 MDX-060(Medarex); MDX-070(Medarex); MDX-018(Medarex); 항-B. 안쓰라시스 항체인 발로르티프(Valortim<sup>™</sup>)(MDX-1303, Medarex); 항-IFNα 항체인 MDX-1103(MEDI-545, Medarex/MedImmune); 항-IFNAR 항체인 MDX-1333(MEDI-546, Medarex/MedImmune); 항-PD1 항체인 MDX-1106(ONO-4538, Medarex/Ono Pharmaceutical); 인간 항-CD4 IgG 항체인 MDX-CD4(Medarex/Eisai/Genmab); 인간 항-씨. 디피사일 독소 B 항체인 MDX-1388(MBL/Medarex); 항-씨. 디피사일 독소 A 항체인 MDX-066(CDA1, MBL/Medarex); 항-만노스 렉틴(Rector)(hCG β) 항체인 MDX-1307(Medarex/Celldex); 항-EGFR(CD89) 항체인 MDX-214(Medarex); 항-IP10 항체인 MDX-1100(Medarex); 항-CTGF 항체인 FG-3019(Medarex/Fibrogen); 항-TRAIL-R2인 HGS-TR2J(Medarex/Kirin); 항-CD137 항체인 BMS-66513(Medarex/Bristol-Myers Squibb); 키메라 항-CD30 항체인 SGN-30(Seattle Genetics); 인간화된 항-CD40 항체인 SGN-40(Seattle Genetics); 인간화된 항-IL-6 항체인 토실리주마브(tocilizumab)(Actemra<sup>™</sup>, Roche); 인간화된 항-DR5 항체인 CS-1008(Daiichi Sankyo); 항-Her2 항체인 오시템(Ositem<sup>™</sup>)(IDM-1, Medarex/Immuno-Designed Molecules); 항-TNFα 항체인 골리무마브(golimumab)(CNTO 148, Medarex/Centocor/J&J); 항-사이토카인 항체인 CNTO 1275(Centocor/J&J); 인간 인테그린 α<sub>v</sub> 항체인 CNTO 95(Centocor/J&J)(국특허공보 제WO 02/12501호); 항-IL-6 항체인 CNTO 328(Centocor/J&J); 인간화된 항-IL-5 항체인 메폴리주마브(mepolizumab)(GlaxoSmithKline); 에리쓰로포이에틴 유사체 항체 융합 단백질인 CNTO 528(Centocor/J&J); 항-세포간 부착 분자-1(ICAM-1)(CD54) 항체인 MOR101 및 MOR102(MorphoSys); 항-섬유모세포 성장 인자 수용체 3(FGFR-3) 항체인 MOR201(MorphoSys); 항-CD3 항체인 비실리주마브(visilizumab)(Nuvion<sup>®</sup>, Protein Design Labs); 항-감마 인터페론 항체인 HuZAF<sup>™</sup>(Protein Design Labs); 키메라 항-α5β1 인테그린 항체인 볼로식스마브(volocixmab)(M200, Protein Design Labs); 항-IL-12(Protein Design Labs); 인간화된 항-CS1 당단백질 항체인 HuLuc63(Protein Design Labs); 항-Ep-CAM 항체인 ING-1(Xoma); 항-베타2 인테그린 항체인 MLN2201(MLN01, Xoma); 전장 인간 항-CD40 항체인 HCD122(CHIR-12.12, Xoma/Chiron); 급성 신장 동종이식 거부 예방을 위한 인간화된 항-CD25 단일클론 항체인 다클리주마브(daclizumab)(ZENAPAX<sup>®</sup>, Roche Pharmaceuticals) 면역억제제; 인간화된 PEG화 항-CD18 F(ab')<sub>2</sub>인 CDP860(Celltech, UK); CD4와 융합된 항-HIV gp120 항체인 PRO542(Progenics/Genzyme Transgenics); 항-CD14 항체인 C14(ICOS Pharm); 무린 항-CA125 항체인 오레고보마브(oregovomab)(OVAREX<sup>™</sup>, Altarex); 무린 항-17-IA

세포 표면 항원 IgG2a 항체인 에드레콜로마브(edrecolomab)(PANOREX™, Glaxo Wellcome/Centocor); 인간화된 항- $\alpha V \beta 3$  인테그린 항체인 에타라시주마브(etaracizumab)(VITAXIN™, MedImmune, 국제특허공보 제WO 2003/075957호); 무린 단일클론 항-CD2 항체인 BTI-322의 인간화된 형태인 시플리주마브(siplizumab)(MEDI-507, MedImmune); 인간화된 항-CD33 IgG 항체인 린투주마브(lintuzumab)(Zamyl™, Smart M195, Protein Design Lab/Kanebo); 인간화된 항-HLA 항체인 레미토젠(Reinitogen™)(HulD10, Protein Design Lab/Kanebo); 방사성표지된 무린 항-HLA DR 항체인 ONCOLYM™(Lym-1, Techniclone); 인간화된 단일클론 항-CD11a 항체인 에팔리주마브(efalizumab)(Genetech/Xoma); 인간화된 항-ICAM3 항체인 ICM3(ICOS Pharm); 영장류화된(primatized) 항-CD80 항체인 갈릭시마브(galiximab)(IDEC-114, IDEC Pharm/Mitsubishi); 인간화된 항-보체 인자 5(C5) 항체인 에쿨리주마브(eculizumab)(5G1.1, Alexion Pharm); 전장 인간화된 단일쇄 단일클론 항체인 펙셀리주마브(pexelizumab)(5G1.1-SC, Alexion Pharm); 인간화된 항- $\beta_2$ -인테그린 IgG 항체인 LDP-01(Millennium/Xoma); 전장 인간화된 항-결장세포 분화 항원 항체인 huA33; 무린-인간 키메라 항-탄산탈수효소 IX 항체인 렌카렉스(Rencarex®)(WX-G250, Willex AG); 인간화된 항-FAP  $\alpha$  항체인 시브로투주마브(sibrotuzumab)(BIBH 1); 항-GD3 항체인 키메릭 KW-2871; 인간화된 항-루이스<sup>y</sup> 혈액 군 항원 항체인 hu3S193; 인간화된 항-엽산 결합 단백질 항체인 huLK26; 항-CD44v6 항체인 비바투주마브(bivatuzumab)(Boehringer/ImmunoGen); 키메라 항-GD2 항체인 ch14.18; 무린 항-GD2 항체인 3F8; 무린 항-CD45 항체인 BC8; 인간화된 항-인간 유지방구 항체인 huHMFg1; 인간화된 항-GP-3 단일클론 항체인 MORAb-003(Morphotek); 인간화된 항-GP-4 단일클론 항체인 MORAb-004(Morphotek); 인간화된 항-GP-9 단일클론 항체인 MORAb-009(Morphotek); 전장 인간 항 RANK 리간드 항체인 데노수마브(denosumab)(AMG 162, Amgen); 항-CCR5 항체인 PRO-140(Progenies); 전장 인간 항-HLA-DR IgG4 항체인 1D09C3(GPC Biotech/Morphosys); 인간화된 항-IL-2R/IL-15R 베타 서브유니트(CD122) 항체인 휴믹베타-1(huMikbeta-1); 항-CD3 항체인 NI-0401(NovImmune); 항-IFN-감마 항체인 NI-501(NovImmune); 항-CanAg 항원 항체인 캔투주마브 메르탄신(cantuzumab mertansine)(HuC242, ImmunoGen Inc); 항-CD56 항체인 HuN901(ImmunoGen Inc); 미국 특허공보 제2003/0103963호에 기재된 8H9 항체; 키메라 항-DNA/히스톤 H1 복합체 항체인 chTNT-1/B(Peregrine); 키메라 항-포스포타디세린 항체인 바비투시마브(bavituximab)(Peregrine); 탈면역화된 항-PSMA 항체인 huJ591; 마우스 항-CD30 항체인 HeFi-1; 항-CEAx 항-DTPA-인듐 이중특이적 항체인 펜타세아(Pentacea™)(IBC Pharmaceuticals); CA125에 대한 무린 항-이디오타입 항체의 조합물인 아바고보마브(abagovomab)(MEL-1 and MEL-1, MELIMMUNE®); CD55(Gp72)와 유사한 이디오타입 항체인 105AD7(Onyvax-P, CRC Technology/Oncovac); 토시투모마브(tositumomab)(BEXXAR™, Corixa/GSK); 항-Fc  $\gamma$  RIIB(CD32B) 항체인 GMA321(MacroGenics) 및 항-Fc  $\gamma$  RIIB(CD32B) 항체인 GMA161(MacroGenics) 및 항-Fc  $\gamma$  RIIB(CD32B) 항체인 GMA321(MacroGenics); 미국 특허공보 제2007/0004909호에 기재된 항-CD16A/CD32B 디아바디-Fc 융합 분자.

<156>

한 실시양태에서, 본 발명의 Fc 변이체 단백질 제제는 수용체 티로신 키나제 패밀리의 구성원 또는 이의 리간드에 결합하는 항체 또는 다른 단백질(예컨대, Fc 융합 단백질)로부터 유래된 Fc 변이체 단백질을 포함한다. 상기 수용체 티로신 키나제 패밀리의 구성원에는 수용체의 Eph 패밀리의 구성원들(예컨대, EphA1, EphA2, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4, EphB5, EphB6) 및 ALK가 포함되나 이들로 한정되지 않는다. 수용체 티로신 키나제 패밀리의 리간드에는 에프린 리간드 구성원들(예컨대, 에프린A1, 에프린A2, 에프린A4, 에프린A5, 에프린B1, 에프린B2, 에프린B3 및 플레오토로핀)이 포함되나 이들로 한정되지 않는다. 일부 실시양태에서, 상기 항체 또는 다른 단백질은 EphA2, EphA4, EphB4 또는 ALK에 결합한다. 다른 실시양태에서, 상기 항체 또는 다른 단백질은 EphA2, EphA4, EphB4 또는 ALK의 리간드에 결합한다. EphA2, EphA4, EphB4, ALK 또는 이들의 리간드에 결합하는 예시적 항체 및 다른 단백질은 미국 특허출원 제11/203,251호, 국제특허출원 제PCT/US2006/044637호, 및 국제특허공보 제WO 06/034456호 및 제WO 06/034455호에 개시되어 있다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 Fc 변이체 단백질 제제는 EphA2에 결합하는 Fc 변이체 단백질을 포함하는데, 이때 상기 Fc 변이체 단백질은 Medi3 가변 도메인의 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상 또는 6개 이상의 CDR을 포함한다(도 1A 및 1B 참조). 또 다른 특정 실시양태에서, EphA2에 결합하는 Fc 변이체 단백질은 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 239D, 330L, 330Y 및 332E로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 비천연 발생 아미노산을 Fc 영역 내에 포함한다.

<157>

한 실시양태에서, 본 발명의 Fc 변이체 단백질 제제는 인테그린 서브유니트 및 이의 조합물에 결합하는 항체 또는 다른 단백질(예컨대, Fc 융합 단백질)로부터 유래된 Fc 변이체 단백질을 포함한다. 인테그린 서브유니트의 구성원에는 인테그린 알파 서브유니트 예컨대, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, 알파7, 알파8, 알파9, 알파D, CD11a, CD11b, CD51, CD11c, CD41, 알파IIb, 알파IELb; 및 인테그린 베타 서브유니트 예컨대, CD29, CD18, CD61, CD104, 베타5, 베타6, 베타7 및 베타8이 포함되나 이들로 한정되지 않는다. 예시적 인테그린

서브유닛 조합물에는  $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha V\beta 5$  및  $\alpha 4\beta 7$ 이 포함되나 이들로 한정되지 않는다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 다른 단백질은  $\alpha V$ ,  $\beta 3$  및/또는  $\alpha V\beta 3$ 에 결합한다.  $\alpha V$ ,  $\beta 3$  및/또는  $\alpha V\beta 3$ 에 결합하는 예시적 항체 및 다른 단백질은 미국 특허출원 제11/203,253호에 개시되어 있다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 Fc 변이체 단백질 제제는 인테그린  $\alpha V\beta 3$ 에 결합하는 Fc 변이체 단백질을 포함하는데, 이때 상기 Fc 변이체 단백질은 Medi2 가변 도메인의 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상 또는 6개 이상의 CDR을 포함한다(도 1C 및 1D 참조). 또 다른 특정 실시양태에서, 인테그린  $\alpha V\beta 3$ 에 결합하는 Fc 변이체 단백질은 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 239D, 330L, 330Y 및 332E로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 비천연 발생 아미노산을 Fc 영역 내에 포함한다.

<158> 2개의 아미노산 서열(또는 2개의 핵산 서열)의 동일성(%)은 예를 들면, 최적 비교를 위해 서열을 정렬함으로써(예를 들면, 갭(gap)이 제1 서열의 서열 내에 도입될 수 있음) 측정할 수 있다. 그 다음, 상응하는 위치에서 아미노산 또는 뉴클레오타이드를 비교하는데, 2개 서열 사이의 동일성(%)은 서열이 공유하는 동일한 위치의 수의 합수이다(즉, 동일성(%) = 동일한 위치의 # / 위치의 총 # x 100). 2개 서열의 실제 비교는 잘 공지된 방법, 예를 들면, 수학 알고리즘의 사용에 의해 달성될 수 있다. 이러한 수학 알고리즘의 구체적인 비-제한적 예는 문헌[Karlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873-5877 (1993)]에 기재되어 있다. 이러한 알고리즘은 문헌[Schaffer et al., Nucleic Acids Res., 29:2994-3005 (2001)]에 기재된 바와 같이 BLASTN 및 BLASTX 프로그램(버전 2.2) 내로 도입된다. BLAST 및 갭드(Gapped) BLAST 프로그램을 사용할 때, 각 프로그램(예컨대, BLASTN)의 디폴트 매개변수가 사용될 수 있다. 2002년 4월 10일자로 이용가능한 웹사이트(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)를 참조한다. 한 실시양태에서, 검색된 데이터베이스는 비-중복(NR) 데이터베이스이고, 서열 비교를 위한 매개변수는 다음과 같이 설정될 수 있다: 필터 없음; 10의 기대 값; 3의 워드 크기; 매트릭스는 BLOSUM62임; 갭 코스트(Gap Cost)는 11의 존재(Existence) 및 1의 연장(Extension)을 가짐.

<159> 서열의 비교에 사용되는 수학 알고리즘의 또 다른 비-제한적 예는 메이어스(Myers)와 밀러(Miller)의 알고리즘이다(CABIOS (1989)). 이러한 알고리즘은 GCG(Accelrys) 서열 정렬 소프트웨어 패키지의 일부인 ALIGN 프로그램(버전 2.0) 내로 도입된다. 아미노산 서열을 비교하기 위해 ALIGN 프로그램을 사용하는 경우, PAM120 중량 잔기표, 12의 갭 길이 패널티, 및 4의 갭 패널티가 사용될 수 있다. 서열 비교를 위한 추가 알고리즘은 당업계에 공지되어 있고 문헌[Torellis and Robotti, Comput. Appl. Biosci., 10:3-5 (1994)]에 기재된 ADVANCE 및 ADAM; 및 문헌[Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 85:2444-8 (1988)]에 기재된 FASTA를 포함한다.

<160> 또 다른 실시양태에서, 2개의 아미노산 서열 사이의 동일성(%)은 GCG 소프트웨어 패키지(2001년 8월 31일자로 이용가능한 웹사이트(<http://www.accelrys.com>))에서 입수가가능함) 중의 GAP 프로그램을 사용하되 Blossom 63 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스, 및 12, 10, 8, 6 또는 4의 갭 중량 및 2, 3 또는 4의 길이 중량을 사용하여 달성할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 2개 핵산 서열 사이의 동일성(%)은 GCG 소프트웨어 패키지(웹사이트(<http://www.cgc.com>))에서 입수가가능함) 중의 GAP 프로그램을 사용하되 50의 갭 중량 및 3의 길이 중량을 사용하여 달성할 수 있다.

#### <161> 4.4. Fc 변이체 단백질 접합체 및 유도체

<162> 본 발명의 제제는 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 융합 단백질, 핵산 분자, 소분자, 유사 물질, 합성 약물, 무기 분자 및 유기 분자를 포함하나 이들로 한정되지 않는 임의의 유형의 분자의 부착에 의해 변형된 Fc 변이체 단백질인 Fc 변이체 단백질 유도체도 포함한다. 예를 들면, Fc 변이체 단백질 유도체에는 예를 들면, 글리코실화, 아세틸화, PEG화, 인산화, 아미드화, 공지된 보호기/차단기에 의한 유도체화, 단백질분해 절단, 세포 리간드 또는 다른 단백질에의 연결 등에 의해 변형된 Fc 변이체 단백질이 포함되나 이들로 한정되지 않는다. 다수의 화학적 변형 중의 임의의 화학적 변형이 특이적 화학적 절단, 아세틸화, 포르밀화, 투니카마이신의 대사 합성 등을 포함하나 이들로 한정되지 않는 공지된 기법에 의해 수행될 수 있다. 추가로, 유도체는 하나 이상의 비-고전적 아미노산을 함유할 수 있다.

<163> 생체 내 반감기가 증가된 Fc 변이체 단백질은 중합체 분자 예컨대, 고분자량 폴리에틸렌글리콜(PEG)를 상기 항체 또는 항체 단편에 부착시킴으로써 생성할 수 있다. PEG는 상기 항체 또는 항체 단편의 N-말단 또는 C-말단과 PEG의 부위-특이적 접합 또는 리신 잔기 상에 존재하는 엡실론-아미노기를 통해 다가작용성 링커를 사용하거나 사용하지 않고 상기 항체 또는 항체 단편에 부착시킬 수 있다. 생물학적 활성의 손실을 최소화하는 직쇄 또는 분지쇄 중합체 유도체화가 이용될 것이다. PEG 분자와 항체의 적절한 접합을 보장하기 위해 접합 정도가 SDS-PAGE 및 질량 분광분석법에 의해 철저히 모니터링될 것이다. 반응하지 않은 PEG는 예를 들면, 크기 배제 또는 이온-교환 크로마토그래피에 의해 항체-PEG 접합체로부터 분리될 수 있다.

- <164> 한 실시양태에서, 본 발명은 이종 단백질 또는 폴리펩티드(또는 이들의 단편, 바람직하게는 10개 이상, 20개 이상, 30개 이상, 40개 이상, 50개 이상, 60개 이상, 70개 이상, 80개 이상, 90개 이상 또는 100개 이상의 아미노산으로 이루어진 폴리펩티드)에 제조합적으로 융합되거나 화학적으로 접합(공유 및 비-공유 접합 둘다를 포함함)된 Fc 변이체 단백질을 포함하는 제제를 포괄한다. 예를 들면, Fc 변이체 단백질은 Fc 변이체 단백질을 특정 세포 표면 수용체에 대해 특이적인 항체에 융합시키거나 접합시킴으로써 시험관 내 또는 생체 내에서 이종 폴리펩티드를 특정 유형의 세포에 표적화시키는 데 사용될 수 있다. 이종 폴리펩티드에 융합되거나 접합된 Fc 변이체 단백질은 당업계에 공지된 방법을 이용하여 시험관 내 면역분석 및 정제 방법에서 사용할 수도 있다. 예를 들면, 국제특허공보 제WO 93/21232호; 유럽 특허 제439,095호; 문헌(Naramura et al., 1994, Immunol. Lett. 39:91-99); 미국 특허 제5,474,981호; 및 문헌(Gillies et al., 1992, PNAS 89:1428-1432; and Fell et al., 1991, J. Immunol. 146:2446-2452)을 참조한다.
- <165> 또한, Fc 변이체 단백질이 생체 내에서 더 안정하게 되거나 생체 내에서 더 긴 반감기를 갖도록 Fc 변이체 단백질을 알부민에 접합시킬 수 있다. 이 기법은 당업계에 잘 공지되어 있다[예를 들면, 국제특허공보 제WO 93/15199호, 제WO 93/15200호 및 제WO 01/77137호; 및 유럽특허 제413,622호 참조].
- <166> 게다가, Fc 변이체 단백질은 마커 서열 예컨대, 정제를 용이하게 하기 위한 펩티드에 융합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 마커 아미노산 서열은 헥사-히스티딘 펩티드 예컨대, 특히 pQE 벡터(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311) 내에 제공된 태그(tag)이고, 이들 중 대부분이 시판된다. 예를 들면, 문헌(Gentz et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824)에 기재된 바와 같이, 헥사-히스티딘은 융합 단백질의 편리한 정제를 제공한다. 정제에 유용한 다른 펩티드 태그에는 인플루엔자 헤마글루티닌 단백질로부터 유래된 에피토프에 사용하는 헤마글루티닌 "HA" 태그(Wilson et al., 1984, Cell 37:767) 및 "flag" 태그가 포함되나 이들로 한정되지 않는다.
- <167> 다른 실시양태에서, Fc 변이체 단백질 또는 이들의 유사체 또는 유도체는 진단제 또는 검출제에 접합된다. 이러한 Fc 변이체 단백질은 임상 시험 절차의 일부로서 질환의 발달 또는 진행을 모니터링하거나 예측하는 데, 예컨대, 특정한 요법의 효능을 확인하는 데 유용할 수 있다. 이러한 진단 및 검출은 호스라디쉬 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, 베타-갈락토시다제 또는 아세틸콜린에스테라제를 포함하나 이들로 한정되지 않는 다양한 효소; 스트렙타비딘바이오틴 및 아비딘/바이오틴을 포함하나 이들로 한정되지 않는 보철 기; 옴벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민, 플루오레세인, 덴실 클로라이드 또는 파이크오레쓰린을 포함하나 이들로 한정되지 않는 형광 물질; 루미놀을 포함하나 이로 한정되지 않는 발광 물질; 루시페라제, 루시페린 및 애쿠오린을 포함하나 이들로 한정되지 않는 생물발광 물질; 요오드(<sup>131</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>123</sup>I, <sup>121</sup>I, ), 탄소(<sup>14</sup>C), 황(<sup>35</sup>S), 트리튬(<sup>3</sup>H), 인듐(<sup>115</sup>In, <sup>113</sup>In, <sup>112</sup>In, <sup>111</sup>In, ), 및 테크네튬(<sup>99</sup>Tc), 탈륨(<sup>201</sup>Ti), 갈륨(<sup>68</sup>Ga, <sup>67</sup>Ga), 팔라듐(<sup>103</sup>Pd), 몰리브덴(<sup>99</sup>Mo), 제논(<sup>133</sup>Xe), 불소(<sup>18</sup>F), <sup>153</sup>Sm, <sup>177</sup>Lu, <sup>159</sup>Gd, <sup>149</sup>Pm, <sup>140</sup>La, <sup>175</sup>Yb, <sup>166</sup>Ho, <sup>90</sup>Y, <sup>47</sup>Sc, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>142</sup>Pr, <sup>105</sup>Rh, <sup>97</sup>Ru, <sup>68</sup>Ge, <sup>57</sup>Co, <sup>65</sup>Zn, <sup>85</sup>Sr, <sup>32</sup>P, <sup>153</sup>Gd, <sup>169</sup>Yb, <sup>51</sup>Cr, <sup>54</sup>Mn, <sup>75</sup>Se, <sup>113</sup>Sn 및 <sup>117</sup>Tin을 포함하나 이들로 한정되지 않는 방사성 물질; 다양한 양전자 방출 단층촬영술을 이용한 양전자 방출 금속, 비방사성 상자성 금속 이온, 및 방사성표지되거나 특정 방사성동위원소에 접합된 분자를 포함하나 이들로 한정되지 않는 검출가능한 물질에 Fc 변이체 단백질을 커플링시킴으로써 달성할 수 있다.
- <168> 추가로, 본 발명은 치료제에 접합된 Fc 변이체 단백질을 포괄한다. Fc 변이체 단백질은 치료 물질 예컨대, 세포독소, 예를 들면, 세포증식억제제 또는 세포파괴제, 치료제 또는 방사성 금속 이온, 예를 들면, 알파-방사체에 접합될 수 있다. 세포독소 또는 세포독성제는 세포에 유해한 임의의 물질을 포함한다. 그 예로는 팍클리탁셀(paclitaxel), 사이토칼라신(cytochalasin) B, 그라미시딘(gramicidin) D, 에티뎀 브로마이드, 에메틴(emetine), 마이토마이신, 에토포사이드, 테노포사이드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜치신(colchicin), 독소루비신(doxorubicin), 다우노루비신(daunorubicin), 디하이드록시 안트라신 디온(dihydroxy anthracin dione), 미톡산트론(mitoxantrone), 미쓰라미신(mithramycin), 액티노마이신(actinomycin) D, 1-데하이드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 퓨로마이신, 에피루비신 및 사이클로포스프라미드 및 이들의 유사체 또는 상동체를 들 수 있다. 치료제에는 항대사물질(예컨대, 메토티렉세이트, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 사이타라빈(cytarabine), 5-플루오로우라실 데카르바진), 알킬화제(예컨대, 메클로에타민, 티오에파 클로람부실, 멜팔란, 카르무스틴(BCNU) 및 로무스틴(CCNU), 사이클로토스포아미드(cyclophosphamide), 부셀판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 마이토마이신 C, 및 시스디클로로디아민 백금(II)(DDP) 시스플라틴), 안트라사이클린(예컨대, 다우노루비신(공식적으로, 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제(예컨대, 닥티노마이신(공식적으로, 액티노마이신), 블레오마이신, 미쓰라마이신 및 안쓰라마이신(AMC)),

및 항-유사분열제(예컨대, 빈크리스틴 및 빈블라스틴)을 들 수 있으나 이들로 한정되지 않는다. 치료 물질의 보다 광범위한 목록은 국제특허공보 제WO 03/075957호에서 찾을 수 있다.

<169> 또한, Fc 변이체 단백질은 주어진 생물학적 반응을 변경시키는 치료제 또는 약물에 접합될 수 있다. 치료제 또는 약물은 고전적인 화학적 치료제로 한정되는 것으로 해석되지 않는다. 예를 들면, 약물은 원하는 생물학적 활성을 보유하는 단백질 또는 폴리펩티드일 수 있다. 이러한 단백질로는 예를 들면, 독소 예컨대, 애브린(abrin), 리신 A, 온코나제(Onconase)(또는 또 다른 세포독성 RNase), 슈도모나스 외독소, 콜레라 독소 또는 디프테리아 독소; 단백질 예컨대, 중앙 괴사 인자,  $\alpha$ -인터페론,  $\beta$ -인터페론, 신경 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 조직 플라스미노겐 활성화제, 아포토시스성 물질 예컨대, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , AIM I(국제특허공보 제WO 97/33899호 참조), AIM II(국제특허공보 제WO 97/34911호 참조), Fas 리간드(Takahashi et al., 1994, J. Immunol, 6:1567) 및 VEGI(국제특허공보 제WO 99/23105호 참조), 혈전용해제 또는 항-혈관신생제, 예를 들면, 안지오테나틴 또는 엔도스타틴; 또는 생물학적 반응 변경제 예컨대, 림포카인(예컨대, 인터루킨-1("IL-1"), 인터루킨-2("IL-2"), 인터루킨-6("IL-6"), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자("GM-CSF"), 및 과립구 콜로니 자극 인자("G-CSF")), 또는 성장 인자(예컨대, 성장 호르몬("GH"))를 들 수 있다.

<170> 나아가, Fc 변이체 단백질은 치료 물질 예컨대, 방사성 물질 또는 방사성금속 이온을 접합시키는 데 유용한 거대고리형 킬레이터에 접합될 수 있다(방사성 물질에 대한 상기 예 참조). 일부 실시양태에서, 거대고리형 킬레이터는 링커 분자를 통해 Fc 변이체 단백질에 부착될 수 있는 1,4,7,10-테트라아자사이클로도데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산(DOTA)이다. 이러한 링커 분자는 당업계에 통상적으로 공지되어 있고 문헌(Denardo et al., 1998, Clin Cancer Res. 4:2483; Peterson et al., 1999, Bioconjug. Chem. 10:553; and Zimmerman et al., 1999, Nucl. Med. Biol. 26:943)에 기재되어 있다.

<171> 치료 물질을 항체에 접합시키는 기법은 잘 공지되어 있다. 물질은 알데히드/쉬프(Schiff) 결합, 설프히드릴 결합, 산-불안정성 결합, 시스-아코니틸 결합, 히드라존 결합, 효소적으로 분해될 수 있는 결합을 포함하나 이들로 한정되지 않는 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 항체(예컨대, Fc 변이체 단백질)에 접합될 수 있다[일반적으로 문헌(Garnett, 2002, Adv Drug Deliv Rev 53:171) 참조]. 항체를 폴리펩티드에 융합시키거나 접합시키는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들면, 미국 특허 제5,336,603호, 제5,622,929호, 제5,359,046호, 제5,349,053호, 제5,447,851호 및 제5,112,946호; 유럽 특허 제307,434호 및 제367,166호; 국제특허공보 제WO 96/04388호 및 제WO 91/06570호; 및 문헌(Ashkenazi et al., 1991, PNAS USA 88:10535; Zheng et al., 1995, J Immunol 154:5590; and Vil et al., 1992, PNAS USA 89:11337)을 참조한다. 항체와 물질의 융합은 반드시 직접적인 필요는 없고 링커 서열을 통해 일어날 수 있다. 이러한 링커 분자는 당업계에 통상적으로 공지되어 있고 문헌(Denardo et al., 1998, Clin Cancer Res 4:2483; Peterson et al., 1999, Bioconjug Chem 10:553; Zimmerman et al., 1999, Nucl Med Biol 26:943; Garnett, 2002, Adv Drug Deliv Rev 53:171)에 기재되어 있다. 이 방법들은 치료 물질을 Fc 융합 단백질에 접합시키는 데에도 이용될 수 있다.

## <172> 5. Fc 변이체 단백질의 제조 방법

### <173> 5.1. 항체의 제조

<174> 본 발명의 제제는 당업계에 공지되어 있는 임의의 항체 합성 방법, 특히 화학적 합성 또는 재조합 발현 기법에 의해 제조된 항체에 유용하다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 제제는 항체를 포함할 수 있고, 이때 상기 항체는 변이체 Fc 영역을 포함한다.

<175> 특정한 항원을 인식하는 다클론 항체는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들면, 항원 또는 그의 면역원성 단편을 토끼, 마우스, 래트 등을 포함하나 이들로 한정되지 않는 다양한 숙주 동물에게 투여하여 특정 항원에 대해 특이적인 다클론 항체를 함유하는 혈청의 생성을 유도할 수 있다. 숙주 종에 따라 다양한 보조제를 사용하여 면역 반응을 증가시킬 수 있고, 보조제로는 프로인트(Freund's) (완전 및 불완전) 보조제, 미네랄 겔 예컨대, 수산화알루미늄, 표면 활성 물질 예컨대, 리소레스틴, 플루로닉 폴리올, 다가음이온, 펩티드, 오일 에멀전, 키텔 림프 헤모시아닌, 디니트로페놀 및 잠재적으로 유용한 인간 보조제 예컨대, BCG(바실 칼메트-구에린(bacille Calmette-Guerin)) 및 코리네박테리움 파르븀(*corynebacterium parvum*)을 들 수 있으나 이들로 한정되지 않는다. 이러한 보조제들은 당업계에도 잘 공지되어 있다.

<176> 단일클론 항체는 하이브리도마의 사용, 재조합 기법, 파지 디스플레이 기법 또는 이들의 조합 기법을 포함하는 당업계에 공지되어 있는 매우 다양한 기법을 이용하여 제조할 수 있다. 예를 들면, 단일클론 항체는 당업계에 공지되어 있는 기법들을 비롯한 하이브리도마 기법을 이용하여 제조할 수 있고, 예컨대 문헌[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)]에 교시되어 있다. 본 명세서에서 사용된 용어 "단일클론 항체"는 하이브리도마 기법을 통해 제조된 항체로 한정되지 않는다. 용어 "단일클론 항체"는 임의의 진핵, 원핵 또는 파지 클론을 비롯한 단일 클론으로부터 유래된 항체를 지칭하는 것이 아니라 그를 제조하는 방법을 지칭하는 것이 아니다.

<177> 하이브리도마 기법을 이용하여 특이적 항체를 제조하고 스크리닝하는 방법은 관용적인 것이고 당업계에 잘 공지되어 있다. 요약하면, 마우스를 항원 또는 이의 면역원성 단편으로 면역화시킬 수 있고, 일단 면역 반응이 검출되면, 예를 들면, 투여된 항원에 대해 특이적인 항체가 마우스 혈청 중에서 검출되면, 마우스 비장을 회수하고 비장세포를 단리한다. 이어서, 비장세포를 잘 공지되어 있는 기법으로 임의의 적절한 골수종 세포 예를 들면, ATCC로부터 입수가 가능한 세포주인 SP20으로부터 유래된 세포에 융합시킨다. 또한, RIMMS(반복적인 면역화, 다중 부위) 기법을 이용하여 동물을 면역화시킬 수 있다(Kilpatrick et al., 1997, Hybridoma 16:381-9). 하이브리도마를 제한 희석법으로 선별하여 클로닝한다. 그 다음, 하이브리도마 클론을, 본 발명의 폴리펩티드에 결합할 수 있는 항체를 분비하는 세포에 대해 당업계에 공지되어 있는 방법으로 분석한다. 일반적으로 높은 농도의 항체를 함유하는 복수액은 마우스를 양성 하이브리도마 클론으로 면역화시켜 발생시킬 수 있다.

<178> 따라서, 단일클론 항체는 항체를 분비하는 하이브리도마 세포를 배양함으로써 발생시킬 수 있고, 이때 하이브리도마는 항원 또는 이의 면역원성 단편으로 면역화된 마우스로부터 단리된 비장세포를 골수종 세포와 융합시킨 후 투여된 항원에 결합할 수 있는 항체를 분비하는 하이브리도마 클론에 대한 융합으로부터 생성된 하이브리도마를 스크리닝함으로써 발생시킬 수 있다.

<179> 본 발명의 제제는 변이체 Fc 영역 또는 이의 단편을 포함하는 항체를 안정화시키는 데 유용하다. 변이체 Fc 영역을 포함하는 항체는 당업자에게 잘 공지되어 있는 다수의 방법에 의해 발생될 수 있다. 비-제한적 예로는 (예컨대, 하이브리도마로부터 유래된) 항체 코딩 영역을 단리하고 하나 이상의 변형을 단리된 항체 코딩 영역의 Fc 영역 내로 도입하는 방법을 들 수 있다. 별법으로, 본 명세서에 기재된 벡터를 포함하나 이들로 한정되지 않는, 변이체 Fc 영역 또는 이의 단편을 코딩하는 벡터 내로 상기 가변 영역을 서브클로닝할 수 있다. 추가 방법 및 상세한 설명은 후술되어 있다.

<180> 특정 항원을 인식하는 항체 단편은 당업자에게 공지되어 있는 임의의 기법에 의해 발생될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 Fab 및 F(ab')<sub>2</sub> 단편은 효소 예컨대, 파파인(Fab 단편을 생성하기 위함) 또는 펩신(F(ab')<sub>2</sub> 단편을 생성하기 위함)을 이용하여 면역글로불린 분자를 단백질분해적으로 절단함으로써 제조할 수 있다. F(ab')<sub>2</sub> 단편은 가변 영역, 경쇄 불변 영역 및 중쇄의 CH1 도메인을 함유한다. 또한, 본 발명의 항체는 당업계에 공지되어 있는 다양한 파지 디스플레이 방법을 이용하여 발생시킬 수도 있다.

<181> 파지 디스플레이 방법에서, 기능성 항체 도메인은 이들을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 보유하는 파지 입자의 표면 상에 디스플레이된다. 구체적으로, VH 및 VL 도메인을 코딩하는 DNA 서열은 동물 cDNA 라이브러리(립프제 조직의 인간 또는 뮤린 cDNA 라이브러리)로부터 증폭된다. VH 및 VL 도메인을 코딩하는 DNA는 PCR에 의해 scFv 링커와 재조합되고 파지미드 벡터(예컨대, pCANTAB 6 또는 pComb 3 HSS) 내로 클로닝된다. 상기 벡터는 전기천공법에 의해 대장균(*E. coli*) 내로 도입되고 상기 대장균은 헬퍼(helper) 파지에 의해 감염된다. 이 방법들에서 사용된 파지는 전형적으로 fd 및 M13을 비롯한 섬유상 파지이고, VH 및 VL 도메인은 통상적으로 파지 유전자 III 또는 유전자 VIII에 재조합적으로 융합된다. 원하는 항원 에피토프에 결합하는 항원 결합 도메인을 발현하는 파지를 항원 예를 들면, 표지된 항원, 또는 고체 표면 또는 비드에 결합되거나 포획된 항원을 사용하여 선별하거나 확인할 수 있다. 본 발명의 항체를 제조하는 데 사용될 수 있는 파지 디스플레이 방법의 예로는 문헌(Brinkman et al., 1995, J. Immunol. Methods 182:41-50; Ames et al., 1995, J. Immunol. Methods 184:177-186; Kettleborough et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24:952-958; Persic et al., 1997, Gene 187:9-18; Burton et al., 1994, Advances in Immunology 57:191-280); 국제특허공보 제WO 90/02809호, 제WO 91/10737호, 제WO 92/01047호, 제WO 92/18619호, 제WO 93/11236호, 제WO 95/15982호, 제WO 95/20401호 및 제WO 97/13844호; 및 미국 특허 제5,698,426호, 제5,223,409호, 제5,403,484호, 제5,580,717호, 제5,427,908호, 제5,750,753호, 제5,821,047호, 제5,571,698호, 제5,427,908호, 제5,516,637호, 제5,780,225호, 제5,658,727호, 제5,733,743호 및 제5,969,108호에 개시된 파지 디스플레이를 들 수 있다.

<182> 상기 참고문헌에 기재된 바와 같이, 파지 선별 후, 파지로부터 유래된 항체 코딩 영역은 단리되어 인간 항체를 비롯한 전장 항체 또는 임의의 다른 원하는 항원 결합 단편을 발생시키는 데 사용될 수 있고, 예를 들면, 후술되는 바와 같이 포유동물 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 효모 및 박테리아를 비롯한 임의의 원하는 숙주 내에서

발현될 수 있다. Fab, Fab' 및 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 재조합적으로 제조하는 기법은 당업계에 공지되어 있는 방법 예컨대, 국제특허공보 제WO 92/22324호; 및 문헌(Mullinax et al., 1992, BioTechniques 12(6):864-869; Sawai et al., 1995, AJRI 34:26-34; and Better et al., 1988, Science 240:1041-1043)에 개시된 방법을 이용하여 사용할 수도 있다.

<183> 전장 항체를 발생시키기 위해, VH 또는 VL 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 PCR 프라이머, 제한효소절단 부위, 제한효소절단 부위를 보호하는 측접(flanking) 서열을 사용하여 scFv 클론에서 VH 또는 VL 서열을 증폭할 수 있다. 당업자에게 공지되어 있는 클로닝 기법을 이용하여, PCR에 의해 증폭된 VH 도메인을 VH 불변 영역 예컨대, 인간 감마 불변 영역을 발현하는 벡터 내로 클로닝할 수 있고, PCR에 의해 증폭된 VL 도메인을 VL 불변 영역 예컨대, 인간 카파 또는 람다 불변 영역을 발현하는 벡터 내로 클로닝할 수 있다. 중쇄 불변 영역은 본 명세서에 개시된 변이체 Fc 영역을 포함하나 이로 한정되지 않는 변이체 Fc 영역을 포함하거나 변이체 Fc 영역으로 구성된다 것이 예상된다. 일부 실시양태에서, VH 또는 VL 도메인을 발현하기 위한 벡터는 프로모터, 분비 신호, 가변 도메인 및 불변 도메인 둘다에 대한 클로닝 부위, 및 선별 마커 예컨대, 네오마이신을 포함한다. VH 및 VL 도메인은 원하는 불변 영역을 발현하는 하나의 벡터 내로 클로닝할 수도 있다. 그 다음, 당업자에게 공지되어 있는 기법을 이용하여 중쇄 전환 벡터 및 경쇄 전환 벡터를 세포주 내로 동시-형질감염시켜 전장 항체 예컨대, IgG를 발현하는 안정한 또는 일시적인 세포주를 발생시킨다.

<184> 또한, 파지 디스플레이 기법은 항원 결합 항체를 보유하는 지에 대해 스크리닝된 인간으로부터 유래된 림프구의 PCR 증폭 v-유전자의 레파토리 또는 천연 라이브러리로부터의 항원에 대한 결합 활성을 가지는 항체 유전자를 선별하는 데 이용될 수 있다(McCafferty et al., Nature 348:552-554, 1990; and Marks, et al., Biotechnology 10:779-783, 1992). 이 항체들의 친화성은 쇠 셔플링(chain shuffling)에 의해 개선될 수도 있다(Clackson et al., Nature 352: 624-628, 1991). 관련 기법은 항체 최적화에 대해 기재되어 있다[예컨대, 문헌(Wu & An, 2003, Methods Mol. Biol., 207, 213-233; Wu, 2003, Methods Mol. Biol., 207, 197-212; and Kunkel et al., 1987, Methods Enzymol. 154, 367-382) 참조].

<185> 키메라 항체는 항체의 상이한 부위가 상이한 면역글로불린 분자로부터 유래된 분자이다. 키메라 항체의 제조 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들면, 문헌[Morrison, 1985, Science 229:1202; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214; Gillies et al., 1989, J. Immunol. Methods 125:191-202]; 및 미국 특허 제5,807,715호, 제4,816,567호, 제4,816,397호 및 제6,311,415호를 참조한다.

<186> 인간에서 항체의 생체 내 사용 및 시험관 내 검출 분석에서 항체의 사용을 비롯한 일부 용도의 경우, 인간 또는 키메라 항체를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 완전한 인간 항체가 인간 피험체의 치료적 처치에 특히 바람직하다. 인간 항체는 인간 면역글로불린 서열로부터 유래된 항체 라이브러리를 사용한 전술된 파지 디스플레이 방법을 비롯한 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 제조될 수 있다. 미국 특허 제4,444,887호 및 제4,716,111호; 및 국제특허공보 제WO 05/042743호, 제WO 98/46645호, 제WO 98/50433호, 제WO 98/24893호, 제WO 98/16654호, 제WO 96/34096호, 제WO 96/33735호 및 제WO 91/10741호 또한 참조한다.

<187> 항체가 생체내 적용에 있어서 치료적으로 사용되는 경우, 항체는 개체에서 보다 낮은 면역원성을 나타내도록 변형시키는 것이 바람직하다. 예를 들면, 상기 개체가 인간인 경우, 항체는 바람직하게는 "인간화"되는데, 이때 항체의 상보성 결정 영역(들)은 (예컨대, 문헌(Jones et al., Nature 321:522-525, 1986); 및 문헌(Tempest et al., Biotechnology 9:266-273, 1991))에 기재된 바와 같이) 인간 항체 내로 이식되어 있다.

<188> 인간화 항체는 소정의 항원에 결합할 수 있으며 실질적으로 인간 면역글로불린의 아미노산 서열을 가지는 골격 영역 및 실질적으로 비-인간 면역글로불린의 아미노산 서열을 가지는 CDR을 포함하는 항체 또는 이의 변이체 또는 단편이다. 인간화 항체는 1개 이상, 전형적으로 2개의 가변 도메인(Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fabc, Fv)을 실질적으로 모두 포함하며, 이때 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역은 비-인간 면역글로불린(즉, 공여자 항체)의 CDR 영역에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 골격 영역은 인간 면역글로불린 일차 서열의 골격 영역이다. 특정 실시양태에서, 인간화 항체는 면역글로불린 불변 영역(Fc), 전형적으로 인간 면역글로불린의 면역글로불린 불변 영역의 적어도 일부도 포함한다. 통상적으로, 상기 항체는 하나 이상의 중쇄 가변 도메인뿐만 아니라 경쇄도 함유할 것이다. 또한, 상기 항체는 중쇄의 CH1, 경첩, CH2, CH3 및 CH4 영역을 포함할 수 있다. 인간화 항체는 IgM, IgG, IgD, IgA 및 IgE를 비롯한 면역글로불린의 임의의 클래스, 및 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 비롯한 임의의 이소타입으로부터 선택될 수 있다. 통상적으로, 불변 도메인은 보체 고정 불변 도메인이고, 이때 인간화 항체가 세포독성 활성을 나타내고 클래스가 전형적으로 IgG.sub.1인 것이 바람직하다. 이러한 세포독성 활성이 바람직하지 않은 경우, 상기 불변 도메인은 IgG.sub.2 클래스일 수 있다. 인간화 항체는 1개 초과인 클레

스 또는 이소타입으로부터 유래된 서열을 포함할 수 있다. 뿐만 아니라, 본 명세서에 기재된 바와 같이, 원하는 효과기 기능을 최적화하는 변이체 Fc 영역을 포함하는 특정한 불변 도메인을 선별하는 것은 당업계의 통상의 기술 내에 있다. 인간화 항체의 골격 영역 및 CDR 영역은 모 서열에 정확히 상응할 필요는 없다. 예를 들면, 공여자 CDR 또는 일치 골격은 하나 이상의 잔기의 치환, 삽입 또는 결실에 의해 돌연변이되어 그 부위에서 CDR 또는 골격 잔기가 일치 또는 이입 항체에 상응하지 않도록 할 수 있다. 그러나, 이러한 돌연변이는 광범위하지 않을 것이다. 통상적으로, 인간화 항체 잔기의 75% 이상, 보다 흔하게는 90% 초과 또는 95% 초과 잔기가 모 골격 영역(FR) 또는 CDR 서열의 잔기에 상응할 것이다. 인간화 항체는 CDR-이식(유럽 특허 제239,400호; 국제특허공보 제WO 91/09967호; 및 미국 특허 제5,225,539호, 제5,530,101호 및 제5,585,089호), 베니어링(veneeding) 또는 리서페이싱(resurfacing)(유럽 특허 제592,106호 및 제519,596호; 및 문헌(Padlan, 1991, *Molecular Immunology* 28(4/5): 489-498; Studnicka et al., 1994, *Protein Engineering* 7(6):805-814; and Roguska et al., 1994, *PNAS* 91:969-973); 쇄 서플링(미국 특허 제5,565,332호), 골격 서플링(국제특허공보 제WO 05/042743호) 및 예컨대, 미국 특허 제6,407,213호 및 제5,766,886호, 국제특허공보 제WO 9317105호, 및 문헌[Tan et al., *J. Immunol.* 169:1119-25 (2002), Caldas et al., *Protein Eng.* 13(5):353-60 (2000), Morea et al., *Methods* 20(3):267-79 (2000), Baca et al., *J. Biol. Chem.* 272(16):10678-84 (1997), Roguska et al., *Protein Eng.* 9(10):895-904 (1996), Couto et al., *Cancer Res.* 55 (23 Supp):5973s-5977s (1995), Couto et al., *Cancer Res.* 55(8):1717-22 (1995), Sandhu JS, *Gene* 150(2):409-10 (1994), and Pedersen et al., *J. Mol. Biol.* 235(3):959-73 (1994)]에 개시된 기법들을 포함하나 이들로 한정되지 않는 당업계에 공지된 다양한 기법을 이용하여 제조할 수 있다. 종종, 골격 영역 내의 골격 잔기들은 항원 결합을 변경, 바람직하게는 개선시키도록 CDR 공여자 항체로부터의 상응하는 잔기로 치환될 것이다. 이 골격 치환은 당업계에 잘 공지되어 있는 방법, 예를 들면, CDR과 골격 잔기의 상호작용을 모델링하여 항원 결합에 중요한 골격 잔기들을 찾고 서열 비교를 수행하여 특정 위치에서 흔하지 않은 골격 잔기들을 찾음으로써 확인할 수 있다[예컨대, 미국 특허 제5,585,089호(Queen et al.); 및 문헌(Riechmann et al., 1988, *Nature* 332:323) 참조].

<189>

인간 항체는 기능성 내인성 면역글로불린을 발현할 수 없지만 인간 면역글로불린 유전자들을 발현할 수 있는 형질전환 마우스를 사용하여 제조할 수도 있다. 예를 들면, 인간 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 유전자 복합체를 무작위로 또는 상동성 재조합으로 마우스 배아 줄기 세포 내로 도입할 수 있다. 별법으로, 인간 중쇄 유전자 및 경쇄 유전자 외에 인간 가변 영역, 불변 영역 및 다양성 영역을 마우스 배아 줄기 세포 내로 도입할 수 있다. 마우스 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 유전자는 상동성 재조합에 의해 인간 면역글로불린 좌위의 도입과 별개로 또는 동시에 비-기능적으로 될 수 있다. 구체적으로, JH 영역의 동형접합 결실은 내인성 항체 생성을 방해한다. 변형된 배아 줄기 세포를 증폭하여 포배 내로 미세주입함으로써 키메라 마우스를 발생시킨다. 그 다음, 상기 키메라 마우스를 교배하여 인간 항체를 발현하는 동형접합 자손을 발생시킨다. 형질전환 마우스를 선택되는 항원 또는 이의 면역원성 단편으로 통상적인 방식으로 면역화시킨다. 항원에 대한 단일클론 항체는 보편적인 하이브리도마 기법을 이용하여 면역화된 형질전환 마우스로부터 수득할 수 있다. 상기 형질전환 마우스가 보유하는 인간 면역글로불린 형질전환유전자는 B 세포 분화 과정 동안에 재배열된 후, 클래스 전환 및 체세포 돌연변이를 겪는다. 따라서, 이러한 기법을 이용하여 치료적으로 유용한 IgG, IgA, IgM 및 IgE 항체를 제조할 수 있다. 인간 항체의 제조를 위한 이 기법에 대한 개략적인 검토는 문헌[Lonberg and Huszar (1995, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93)]을 참조한다. 인간 항체 및 인간 단일클론 항체의 제조를 위한 이 기법 및 이러한 항체들의 제조를 위한 프로토콜에 대한 상세한 설명은 예를 들면, 국제특허공보 제WO 98/24893호, 제WO 96/34096호 및 제WO 96/33735호; 및 미국 특허 제5,413,923호, 제5,625,126호, 제5,633,425호, 제5,569,825호, 제5,661,016호, 제5,545,806호, 제5,814,318호 및 제5,939,598호를 참조한다. 또한, 회사 예컨대, 애브제닉스 인코포레이티드(Abgenix, Inc.)(Freemont, CA), 젠팜(Genpharm)(San Jose, CA) 및 메다렉스(Medarex)(Princeton, NJ)는 전술한 기법과 유사한 기법을 이용하여 선별된 항원에 대한 인간 항체를 제공하기 위해 노력중일 수 있다.

<190>

선별된 에피토프를 인식하는 완전한 인간 항체는 "유도된(guided) 선별"로 지칭되는 기법을 이용하여 발생시킬 수 있다. 이 기법에서, 선별된 비-인간 단일클론 항체, 예컨대, 마우스 항체는 동일한 에피토프를 인식하는 완전한 인간 항체의 선별을 유도하는 데 사용된다(Jespersen et al., *Bio/technology* 12:899-903 (1988)).

<191>

또한, 본 발명의 항체는 당업자에게 잘 공지되어 있는 기법을 이용하여 폴리펩티드를 "모방하는" 항-이디오타입 항체를 발생시키는 데 사용될 수 있다[예를 들어, 문헌(Greenspan & Bona, 1989, *FASEB J.* 7(5): 437-444; and Nissinoff, 1991, *J. Immunol.* 147(8): 2429-2438) 참조]. 예를 들면, 폴리펩티드에 결합하여(당업계에 잘 공지되어 있는 분석 및 상기 개시된 분석에 의한 측정 시) 폴리펩티드와 결합 파트너(예컨대, 리간드 또는 수용체)의 결합을 경쟁적으로 억제하는 본 발명의 항체는 상기 폴리펩티드를 "모방하고" 그 결과 결합 파트너(예컨대, 수용체 및/또는 그의 리간드)에 결합하여 중화시키는 항-이디오타입을 발생시키는 데 사용될 수 있다.

이러한 중화 항-이디오타입 또는 이러한 항-이디오타입의 Fab 단편은 치료 섭생법에서 사용되어 폴리펩티드의 결합 파트너를 중화시킬 수 있다.

<192> 한 실시양태에서, 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 수득하여 본 발명의 Fc 변이체 단백질을 생성하는 데 사용한다. 뉴클레오티드 서열은 하이브리도마 클론 DNA를 시퀀싱함으로써 수득할 수 있다. 특정한 항체 또는 이의 에피토프-결합 단편을 코딩하는 핵산을 함유하는 클론을 사용할 수 없지만, 항체 분자 또는 이의 에피토프-결합 단편의 서열이 공지되어 있는 경우, 면역글로불린을 코딩하는 핵산은 상기 서열의 3' 말단 및 5' 말단에 혼성화하는 합성 프라이머를 사용하여 PCR로 증폭함으로써, 또는 특정한 유전자 서열에 대해 특이적인 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하여 클로닝하여 예컨대, 항체를 코딩하는 cDNA 라이브러리로부터의 cDNA 클론을 찾는으로써 적당한 공급원(예컨대, 항체 cDNA 라이브러리, 또는 항체를 발현하는 임의의 조직 또는 세포 예컨대, 항체를 발현하는 선별된 하이브리도마 세포로부터 생성된 cDNA 라이브러리 또는 상기 세포로부터 단리된 핵산, 바람직하게는 폴리 A+mRNA)으로부터 화학적으로 합성하거나 수득할 수 있다. 그 다음, PCR에 의해 생성된 증폭된 핵산은 당업계에서 잘 공지되어 있는 임의의 방법을 이용하여 복제가능한 클로닝 벡터 내로 클로닝할 수 있다.

<193> 일단 항체의 뉴클레오티드 서열이 결정되면, 상기 항체의 뉴클레오티드 서열은 당업계에 잘 공지되어 있는 뉴클레오티드 서열 조작 방법, 예컨대, 재조합 DNA 기법, 부위-지정 돌연변이유발, PCR 등을 이용하여 예컨대, 항체의 원하는 영역 내로 결실 및/또는 삽입을 도입하여 상이한 아미노산 서열을 가지는 항체를 생성하도록 조작할 수 있다[예를 들면, 문헌(Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., ed., John Wiley & Sons (Chichester, England, 1998); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition, J. Sambrook et al., ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY, 2001); Antibodies: A Laboratory Manual, E. Harlow and D. Lane, ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY, 1988); and Using Antibodies: A Laboratory Manual, E. Harlow and D. Lane, ed., Cold Spring Harbor Laboratory (Cold Spring Harbor, NY, 1999))에 기재된 기법 참조].

<194> 한 실시양태에서, 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항체의 Fc 영역(예컨대, 상기 Fc 영역) 내에 하나 이상의 변형을 만든다. 구체적으로, 상기 변형은 하나 이상의 Fc 리간드(예컨대, FcγR 및/또는 C1q)와의 결합을 변경시키고/시키거나 ADCC 및/또는 CDC 기능을 변경시킬 것으로 예상된다.

<195> 특정 실시양태에서, 하나 이상의 CDR을 관용적인 재조합 DNA 기법을 이용하여 골격 영역 내에 삽입한다. 상기 골격 영역은 인간 골격 영역[예컨대, 인간 골격 영역의 목록에 대해서는 문헌(Chothia et al., 1998, J. Mol. Biol. 278: 457-479) 참조]을 포함하나 이로 한정되지 않는 천연 발생 또는 일차 골격 영역일 수 있다. 골격 영역과 CDR의 조합물에 의해 생성된 폴리뉴클레오티드는 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 코딩할 것으로 예상된다. 한 실시양태에서, 전술한 바와 같이, 하나 이상의 아미노산 치환을 골격 영역 내에 만들 수 있고, 일부 실시양태에서, 상기 아미노산 치환은 항체와 그의 항원의 결합을 개선시킨다. 항체의 인간화 및 최적화 기법은 당업계에 공지되어 있다[예컨대, 문헌(Wu & An, 2003, Methods Mol. Biol. 207, 213-233; Wu, 2003, Methods Mol. Biol. 207, 197-212; Dall'Acqua et al. 2005, Methods, 36: 43-60) 및 미국 특허공보 제2006/0228350호 참조]. 또한, 이러한 방법은쇄내 이황화 결합에 참여하는 하나 이상의 가변 영역 시스테인 잔기의 아미노산 치환 또는 결실을 만들어 하나 이상의쇄내 이황화 결합을 갖지 않는 항체 분자를 생성하는 데 사용될 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 다른 변형은 본 발명에 포함되고 당업계의 기술 내에 있다.

<196> 본 명세서에 기재된 스크리닝 방법들을 포함하나 이들로 한정되지 않는 스크리닝 방법들로부터 확인된 항체의 Fc 영역은 가변 Fc 영역을 포함하는 항체를 생성하도록 전술한 바와 같이 변형될 수 있다. 새로이 확인된 항체의 Fc 변이체 단백질은 염증 질환, 자가면역 질환, 골 대사 관련 장애, 혈관신생 관련 장애, 감염 및 암을 포함하나 이들로 한정되지 않는 질환, 장애 및 감염의 예방, 관리 및 치료에 유용할 것이라는 것도 예상된다. 이러한 항체는 본 발명의 제제에 의해 안정화된다(예를 들면, 더 적은 응집을 나타낼 것임).

## <197> 5.2. Fc 융합 단백질의 생성

<198> Fc 융합 단백질은 면역글로불린 Fc 영역 또는 이의 단편과, 일반적으로 임의의 단백질, 폴리펩티드, 펩티드 또는 소분자일 수 있는 융합 파트너를 결미한다. Fc 융합 단백질의 비-Fc 부분, 즉 융합 파트너의 역할은 항상은 아니지만 종종 표적 결합을 매개하므로 항체의 가변 영역과 기능적으로 유사하다. 예시적 융합 파트너는 상세히 전술되어 있다("항원, 융합 파트너 및 항체" 단락 참조). 본 명세서에 정의되고 기재된 다양한 링커를 사용하여 Fc 영역을 융합 파트너에 공유결합시켜 Fc 융합 단백질을 생성할 수 있다. 별법으로, Fc 융합 단백질은 표준 재조합 DNA 기법 또는(예컨대, 펩티드 합성기의 사용에 의한) 단백질 합성 기법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들

면, 융합 단백질을 코딩하는 핵산 분자는 자동화된 DNA 합성기를 비롯한 보편적인 기법으로 합성할 수 있다. 경우에 따라, 유전자 단편의 PCR 증폭은 2개의 연속적인 유전자 단편들 사이에서 상보적인 오버행(overhangs)을 발생시키는 앵커 프라이머를 사용하여 수행할 수 있고, 상기 상보적인 오버행은 추후에 어닐링되고 재증폭되어 키메라 유전자 서열을 발생시킬 수 있다[예를 들면, 문헌(Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., ed., John Wiley & Sons (Chichester, England, 1998); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition, J. Sambrook et al., ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY, 2001)) 참조]. 나아가, 융합 파트너를 코딩하는 핵산은 융합 파트너가 불변 도메인 또는 이의 단편(예컨대, Fc 영역)에 인-프레임(in-frame)으로 연결되도록 Fc 영역 또는 이의 단편을 함유하는 발현 벡터 내로 클로닝할 수 있다.

<199> 폴리펩티드를 항체의 불변 도메인에 융합시키거나 접합시키는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들면, 미국 특허 제5,336,603호, 제5,622,929호, 제5,359,046호, 제5,349,053호, 제5,447,851호, 제5,723,125호, 제5,783,181호, 제5,908,626호, 제5,844,095호 및 제5,112,946호; 유럽 특허공보 제0 307 434호, 제 0 367 166호 및 제0 394 827호; 국제특허공보 제WO 91/06570호, 제WO 96/04388호 제WO 96/22024호, 제WO 97/34631호 및 제WO 99/04813호; 및 문헌(Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539 (1991); Traunecker et al., Nature 331:84-86 (1988); Zheng et al., J. Immunol. 154:5590-5600 (1995); and ViI et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337-11341 (1992))을 참조한다.

<200> 융합 파트너로서 사용될 수 있는 단백질 분자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 당업자에게 입수가 가능한 임의의 정보(예컨대, 진뱅크, 문헌, 또는 관용적인 클로닝)로부터 입수할 수 있고, Fc 영역 또는 이의 단편을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 진뱅크 또는 문헌으로부터 입수할 수 있다. Fc 영역 또는 이의 단편은 천연 발생 도메인일 수 있거나 본 명세서에 기재된 변이체 Fc 영역들을 포함하나 이들로 한정되지 않는 변이체 Fc 영역일 수 있다. 천연 발생 Fc 영역이 사용되는 경우, 변이체는 본 명세서에 개시된 방법들을 포함하나 이들로 한정되지 않는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 발생시킬 수 있다. 융합 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 적절한 발현 벡터, 즉 삽입된 단백질-코딩 서열의 전사 및 번역에 필요한 요소들을 함유하는 벡터 내로 삽입될 수 있다. 본 발명에서 단백질 코딩 서열을 발현하는 데 다양한 숙주-벡터 시스템을 사용할 수 있다. 이 숙주-벡터 시스템으로는 바이러스(예컨대, 백시니아 바이러스, 아데노바이러스 등)로 감염된 포유동물 세포 시스템; 바이러스(예컨대, 바콜로바이러스)로 감염된 곤충 세포 시스템; 효모 벡터를 함유하는 효모와 같은 미생물; 또는 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA로 형질감염된 박테리아가 있으나 이들로 한정되지 않는다. 벡터의 발현 요소들은 이들의 강도 및 특이성에서 다양하다. 사용된 숙주-벡터 시스템에 따라, 다수의 적절한 전사 및 번역 요소들 중 어느 하나를 사용할 수 있다.

### <201> 5.3. Fc 변이체 단백질의 재조합 발현

<202> Fc 변이체 단백질, 또는 이의 유도체, 유사체 또는 단편(예컨대, 항체 또는 Fc 융합 단백질)의 재조합 발현은 Fc 변이체 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 발현 벡터의 구축을 필요로 한다. 일단 Fc 변이체 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 수득되면, Fc 변이체 단백질의 제조용 벡터를 당업계에 잘 공지되어 있는 기법을 이용하여 재조합 DNA 기술로 제조할 수 있다. 따라서, 변이체 Fc 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 함유하는 폴리뉴클레오티드를 발현함으로써 단백질을 제조하는 방법은 본 명세서에 기재되어 있다. 당업자에게 잘 공지되어 있는 방법을 이용하여 Fc 변이체 단백질 코딩 서열 및 적절한 전사 및 번역 조절 신호를 함유하는 발현 벡터를 구축할 수 있다. 이 방법들은 예를 들면, 시험관 내 재조합 DNA 기법, 합성 기법 및 생체 내 유전적 재조합을 포함한다. 따라서, 본 발명은 프로모터에 작동가능하게 연결된 Fc 변이체 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 복제가능한 벡터를 제공한다. 이러한 벡터는 항체 분자의 불변 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있고(예를 들면, 국제특허공보 제WO 86/05807호 및 제WO 89/01036호; 및 미국 특허 제5,122,464호 참조), 항체의 가변 도메인 또는 Fc 융합 단백질을 생성하는 폴리펩티드를 상기 벡터 내로 클로닝하여 전장 항체 쇄(예컨대, 중쇄 또는 경쇄), 또는 비-항체 유래 폴리펩티드와 변이체 Fc 영역의 융합체를 포함하는 완전한 Fc 융합 단백질을 발현시킬 수 있다.

<203> 발현 벡터를 보편적인 기법으로 숙주 세포로 전달한 후, 형질감염된 세포를 보편적인 기법으로 배양하여 Fc 변이체 단백질을 생성한다. 따라서, 본 발명은 이중 프로모터에 작동가능하게 연결된 Fc 변이체 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 숙주 세포를 포함한다. 이중-쇄 항체를 포함하는 Fc 변이체 단백질의 발현에 대한 특정 실시양태에서, 후술하는 바와 같이, 중쇄 및 경쇄 둘다를 코딩하는 벡터를 숙주 세포 내에서 동시에 발현시켜 전체 면역글로불린 분자를 발현시킬 수 있다.

- <204> 다양한 숙주-발현 벡터 시스템을 사용하여 Fc 변이체 단백질(예컨대, 항체 또는 Fc 융합 단백질)을 발현시킬 수 있다(예컨대, 미국 특허 제5,807,715호 참조). 이러한 숙주-발현 시스템은 원하는 코딩 서열이 제조된 후 정제될 수 있게 하는 비히클을 대표할 뿐만 아니라, 적절한 뉴클레오티드 코딩 서열로 형질전환되거나 형질감염된 경우 동일 반응계 내에서 Fc 변이체 단백질을 발현할 수 있는 세포도 대표한다. 이들은 Fc 변이체 단백질 코딩 서열을 함유하는 재조합 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환된 박테리아(예컨대, 대장균 및 비. 서브틸리스)와 같은 미생물; Fc 변이체 단백질 코딩 서열을 함유하는 재조합 효모 발현 벡터로 형질전환된 효모(예컨대, 사카로마이세스 피치아(*Saccharomyces Pichia*); Fc 변이체 단백질 코딩 서열을 함유하는 재조합 바이러스 발현 벡터(예컨대, 바클로바이러스)로 감염된 곤충 세포 시스템; 재조합 바이러스 발현 벡터(예컨대, 꽃양배추 모자이크 바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV)로 감염되거나 Fc 변이체 단백질 코딩 서열을 함유하는 재조합 플라스미드 발현 벡터(예컨대, Ti 플라스미드)로 형질전환된 식물 세포 시스템; 또는 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터(예컨대, 메탈로티오네인 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예컨대, 아데노바이러스 후기 프로모터; 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터)를 함유하는 재조합 발현 구축물을 보유하는 포유동물 세포 시스템(예컨대, COS, CHO, BHK, 293, NSO 및 3T3 세포)이 있으나 이들로 한정되지 않는다. 일부 실시양태에서, 박테리아 세포 예컨대, 대장균, 또는 진핵 세포를 사용하여 재조합 항체 또는 Fc 융합 단백질인 Fc 변이체 단백질을 발현시킨다. 예를 들면, 인간 사이토메갈로바이러스로부터 유래된 주요 중간 초기 유전자 프로모터 요소와 같은 벡터와 함께 차이니스 햄스터 난소 세포(CHO)와 같은 포유동물 세포는 항체를 위한 효과적인 발현 시스템이다(Foecking et al., 1986, Gene 45:101; and Cockett et al., 1990, Bio/Technology 8:2). 특정 실시양태에서, Fc 변이체 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 발현은 연속적인 프로모터, 유도성 프로모터 또는 조직 특이적 프로모터에 의해 조절된다.
- <205> 박테리아 시스템에서, 다수의 발현 벡터를 발현되는 Fc 변이체 단백질(예컨대, 항체 또는 Fc 융합 단백질)의 의도된 용도에 따라 유리하게 선택할 수 있다. 예를 들면, 약학적 용도로 사용하기 위한 Fc 변이체 단백질 체제를 생성하기 위해 상기 단백질을 대량으로 제조해야 하는 경우, 용이하게 정제되는 융합 단백질 생성물을 고도로 발현시키는 벡터가 바람직할 수 있다. 이러한 벡터로는 lacZ-융합 단백질이 제조되도록 Fc 변이체 단백질 코딩 서열을 lacZ 코딩 서열과 인-프레임으로 벡터 내로 개별적으로 결합시킬 수 있는 대장균 발현 벡터 pUR278(Ruther et al., 1983, EMBO 12:1791); pIN 벡터(Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24:5503-5509) 등이 있으나 이들로 한정되지 않는다. pGEX 벡터를 사용하여 글루타치온 5-트랜스퍼라제(GST)와의 융합 단백질로서 외래 폴리펩티드를 발현할 수도 있다. 일반적으로, 이러한 융합 단백질은 가용성을 나타내고 흡착 및 매트릭스 글루타치온 아가로스 비드에의 결합 후 유리 글루타치온의 존재 하에 용출하여 용해된 세포로부터 용이하게 정제할 수 있다. pGEX 벡터는 클로닝된 표적 유전자 생성물이 GST 부분으로부터 방출될 수 있게끔 트롬빈 또는 인자 Xa 단백질분해효소 절단 부위를 포함하도록 디자인될 수 있다.
- <206> 곤충 시스템에서, 아우토그라파 칼리포르니카(*Autographa californica*) 핵 폴리헤드로시스(polyhedrosis) 바이러스(AcNPV)가 외래 유전자를 발현시키기 위한 벡터로 사용된다. 상기 바이러스는 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) 세포에서 성장한다. Fc 변이체 단백질 코딩 서열은 바이러스의 비-필수 영역(예컨대, 폴리헤드린 유전자) 내로 개별적으로 클로닝되어 AcNPV 프로모터(예컨대, 폴리헤드린 프로모터)의 조절 하에 놓일 수 있다.
- <207> 포유동물 숙주 세포에서, 다수의 바이러스-기재 발현 시스템이 사용될 수 있다. 아데노바이러스가 발현 벡터로서 사용되는 경우, 원하는 Fc 변이체 단백질 코딩 서열을 아데노바이러스 전사/번역 조절 복합체, 예컨대, 후기 프로모터 및 삼부(tripartite) 리더 서열에 결합시킬 수 있다. 이어서, 이 키메라 유전자를 시험관 내 또는 생체 내 재조합으로 아데노바이러스 게놈 내에 삽입할 수 있다. 바이러스 게놈의 비-필수 영역(예컨대, 영역 E1 또는 E3) 내로의 삽입은 생존할 수 있으며 감염된 숙주 내에서 Fc 변이체 단백질을 발현할 수 있는 재조합 바이러스를 발생시킬 것이다[예를 들면, 문헌(Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359) 참조]. 특정한 개시 신호도 삽입된 항체 코딩 서열의 효율적인 번역에 필요할 수 있다. 이 신호는 ATG 개시 코돈 및 인접 서열을 포함한다. 뿐만 아니라, 상기 개시 코돈은 전체 삽입물의 번역을 보장하도록 원하는 코딩 서열의 관독 프레임과 인-프레임으로 존재해야 한다. 이 외인성 번역 조절 신호 및 개시 코돈은 다양한 유래, 즉 천연적으로 발생된 것 또는 합성된 것일 수 있다. 발현의 효율은 적절한 전사 인핸서 요소, 전자 종결자 등의 포함에 의해 상승될 수 있다[예컨대, 문헌(Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol. 153:516-544) 참조].
- <208> Fc 변이체 단백질의 발현은 당업계에 공지된 임의의 프로모터 또는 인핸서 요소에 의해 조절될 수 있다. Fc 변이체 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 조절하는 데 사용될 수 있는 프로모터로는 SV40 초기 프로모터 영역

(Bernoist and Chambon, 1981, Nature 290:304-310); 라우스 육종 바이러스의 3' 장 말단 반복부에 포함된 프로모터(Yamamoto, et al., 1980, Cell 22:787-797); 헤르페스 티미딘 키나제 프로모터(Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1441-1445); 메탈로티오네인 유전자의 조절 서열(Brinster et al., 1982, Nature 296:39-42); 테트라사이클린(Tet) 프로모터(Gossen et al., 1995, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89:5547-5551); 원핵 발현 벡터 예컨대,  $\beta$ -락타마제 프로모터(Villa-Kamaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731) 또는 tac 프로모터[문헌(DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25) 및 문헌("Useful proteins from recombinant bacteria" in Scientific American, 1980, 242:74-94) 참조]; 노팔린 합성효소 프로모터 영역(Herrera-Estrella et al., Nature 303:209-213) 또는 꽃양배추 모자이크 바이러스 35S RNA 프로모터(Gardner et al., 1981, Nucl. Acids Res. 9:2871) 및 광합성 효소 리불로스 비포스 페이트 카복실라제(Herrera-Estrella et al., 1984, Nature 310:115-120) 프로모터를 포함하는 식물 발현 벡터; 효모 또는 다른 진균으로부터의 프로모터 요소 예컨대, Gal4 프로모터, ADC(알코올 데히드로게나제) 프로모터, PGK(포스포글리세롤 키나제) 프로모터, 알칼리성 포스파타제 프로모터, 및 조직 특이성을 나타내며 형질전환 동물에서 사용되는 하기 동물 전사 조절 영역이 있으나 이들로 한정되지 않는다: 돼장 파리 세포에서 활성을 나타내는 엘라스타제 I 유전자 조절 영역(Swift et al., 1984, Cell 38:639-646; Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515), 돼장 베타 세포에서 활성을 나타내는 인슐린 유전자 조절 영역(Hanahan, 1985, Nature 315:115-122), 림프계 세포에서 활성을 나타내는 면역글로불린 유전자 조절 영역(Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647-658; Adames et al., 1985, Nature 318:533-538; Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436-1444), 정소, 유방, 림프계 및 비만 세포에서 활성을 나타내는 마우스 유선 종양 바이러스 조절 영역(Leder et al., 1986, Cell 45:485-495), 간에서 활성을 나타내는 알부민 유전자 조절 영역(Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1:268-276), 간에서 활성을 나타내는 알파-태아단백질 유전자 조절 영역(Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, Science 235:53-58), 간에서 활성을 나타내는 알파 1-항트립신 유전자 조절 영역(Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1:161-171), 골수 세포에서 활성을 나타내는 베타-글로빈 유전자 조절 영역(Mogam et al., 1985, Nature 315:338-340; Kollias et al., 1986, Cell 46:89-94), 뇌 내의 회소돌기아교세포에서 활성을 나타내는 수초 염기성 단백질 유전자 조절 영역(Readhead et al., 1987, Cell 48:703-712), 골격근에서 활성을 나타내는 미오신 경쇄-2 유전자 조절 영역(Sani, 1985, Nature 314:283-286), 신경 세포에서 활성을 나타내는 신경-특이적 에놀라제(NSE)(Morelli et al., 1999, Gen. Virol. 80:571-83), 신경 세포에서 활성을 나타내는 뇌-유래의 신경영향성 인자(BDNF) 유전자 조절 영역(Tabuchi et al., 1998, Biochem. Biophysic. Res. Com. 253:818-823), 성상교세포에서 활성을 나타내는 신경교원 섬유 산성 단백질(GFAP) 프로모터(Gomes et al., 1999, Braz J Med Biol Res 32(5): 619-631; Morelli et al., 1999, Gen. Virol. 80:571-83) 및 시상하부에서 활성을 나타내는 성선자극 방출 호르몬 유전자 조절 영역(Mason et al., 1986, Science 234:1372-1378).

<209>

Fc 변이체 단백질을 코딩하는 유전자의 삽입물을 함유하는 발현 벡터는 3가지 일반적인 방법으로 확인할 수 있다: (a) 핵산 혼성화, (b) "마커" 유전자 기능의 존재 또는 부재, 및 (c) 삽입된 서열의 발현. 첫 번째 방법에서, 발현 벡터 내의 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 또는 융합 단백질을 코딩하는 유전자의 존재는 상기 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 또는 융합 단백질 각각을 코딩하는 삽입된 유전자와 상동성을 가지는 서열을 포함하는 프로브를 사용한 핵산 혼성화에 의해 검출될 수 있다. 두 번째 방법에서, 벡터 내의 항체 또는 융합 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 삽입에 의해 야기된 특정 "마커" 유전자 기능(예컨대, 티미딘 키나제 활성, 항생제에 대한 내성, 형질전환 표현형, 바콜로바이러스 내에서의 폐쇄체 형성 등)의 존재 또는 부재를 기초로 하여 재조합 벡터/숙주 시스템을 확인하고 선별할 수 있다. 예를 들면, Fc 변이체 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 벡터의 마커 유전자 서열 내에 삽입되는 경우, 항체 또는 융합 단백질 삽입물을 코딩하는 유전자를 함유하는 재조합체는 마커 유전자 기능의 부재에 의해 확인될 수 있다. 세 번째 방법에서, 재조합 발현 벡터는 재조합체에 의해 발현된 유전자 생성물(예를 들면, 항체 또는 Fc 융합 단백질)을 분석함으로써 확인할 수 있다. 이러한 분석은 예를 들면, 시험관내 분석 시스템에서 융합 단백질의 물리적 또는 기능적 성질 예컨대, 항-생체활성 분자 항체와의 결합에 기초한 것일 수 있다.

<210>

또한, 원하는 특정 방식으로 삽입된 서열의 발현을 조절하거나, 유전자 생성물을 변형시키거나 프로세싱하는 숙주 세포 균주를 선택할 수 있다. 일부 프로모터로부터의 발현은 일부 유도제의 존재 하에 상승될 수 있으므로, 유전적으로 개조된 융합 단백질의 발현은 조절될 수 있다. 뿐만 아니라, 다양한 숙주 세포가 전사 및 번역 후 프로세싱 및 변형(예컨대, 단백질의 글리코실화, 인산화 등)에 대한 특징적 및 특이적 기작을 가진다. 발현된 외래 단백질의 원하는 변형 및 프로세싱을 보장하기에 적합한 세포주 또는 숙주 시스템을 선택할 수 있다. 예를

들면, 박테리아 시스템 내에서의 발현은 글리코실화되지 않은 생성물을 생성할 것이고 효모 내에서의 발현은 글리코실화된 생성물을 생성할 것이다. 유전자 생성물의 일차 전사체의 적절한 프로세싱(예컨대, 글리코실화 및 인산화)을 위한 세포 기구를 보유하는 진핵 숙주 세포를 사용할 수 있다. 이러한 포유동물 숙주 세포로는 CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 3T3, WI38, NSO, 및 특히 신경 세포주 예컨대, SK-N-AS, SK-N-FI, SK-N-DZ 인간 신경모세포종(Sugimoto et al., 1984, J. Natl. Cancer Inst. 73:51-57), SK-N-SH 인간 신경모세포종(Biochim. Biophys. Acta, 1982, 704:450-460), 다오이(Daoy) 인간 소뇌 수모세포종(He et al., 1992, Cancer Res. 52:1144-1148), DBTRG-05MG 아교모세포종 세포(Kruse et al., 1992, In Vitro Cell. Dev. Biol. 28A: 609-614), IMR-32 인간 신경모세포종(Cancer Res., 1970, 30:2110-2118), 1321N1 인간 성상세포종(Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1977, 74: 4816), MOG-G-CCM 인간 성상세포종(Br. J. Cancer, 1984, 49:269), U87MG 인간 아교모세포종-성상세포종(Acta Pathol. Microbiol. Scand., 1968, 74:465-486), A172 인간 아교모세포종(Olopade et al., 1992, Cancer Res. 52:2523-2529), C6 래트 신경아교종 세포(Benda et al., 1968, Science 161:370-371), Neuro-2a 마우스 신경모세포종(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1970, 65:129-136), NB41A3 마우스 신경모세포종(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1962, 48:1184-1190), SCP 양 맥락막 열기(Bolin et al., 1994, J. Virol. Methods 48:211-221), G355-5, PG-4 Cat 정상 성상세포종(Haapala et al., 1985, J. Virol. 53:827-833), Mpf 흰족제비 뇌(Trowbridge et al., 1982, In Vitro 18:952-960), 및 정상 세포주 예컨대, CTX TNA2 래트 정상 피질 뇌(Radany et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6467-6471) 예컨대, CRL7030 및 Hs578Bst가 있으나 이들로 한정되지 않는다. 나아가, 상이한 벡터/숙주 발현 시스템은 상이한 정도로 프로세싱 반응에 영향을 줄 수 있다.

<211> 재조합 단백질의 장기간 고수율 제조를 위해, 안정한 발현이 종종 바람직하다. 예를 들면, Fc 변이체 단백질을 안정하게 발현하는 세포주를 개조할 수 있다. 바이러스 복제 기점을 함유하는 발현 벡터를 사용하는 것보다는, 적절한 발현 조절 요소(예컨대, 프로모터, 인핸서 서열, 전사 종결자, 폴리아데닐화 부위 등)에 의해 조절된 DNA 및 선별가능한 마커로 숙주 세포를 형질전환시킬 수 있다. 외래 DNA의 도입 후, 개조된 세포를 풍부 배지(enriched medium) 중에서 1 내지 2일 동안 성장시킨 후 선별 배지로 전환할 수 있다. 재조합 플라스미드 내의 선별가능한 마커는 선별에 대한 내성을 부여하고 세포가 상기 플라스미드를 그의 염색체 내로 안정하게 통합시키고 포커스를 형성하게 하는데, 상기 포커스는 클로닝되고 세포주로 증폭될 수 있다. 이 방법은 항원에 특이적으로 결합하는 Fc 변이체 단백질을 발현하는 세포주를 개조하는 데 유리하게 사용될 수 있다. 이러한 개조된 세포주는 항원에 특이적으로 결합하는 Fc 단백질의 활성에 영향을 주는 화합물의 스크리닝 및 평가에 특히 유용할 수 있다.

<212> tk-세포, hgprrt-세포 또는 aprrt-세포 각각에서 사용될 수 있는 헤르페스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나제(Wigler et al., 1911, Cell 11:223), 하이포잔틴-구아닌 포스포라이보실트랜스퍼라제(Szybalska & Szybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026) 및 아데닌 포스포라이보실트랜스퍼라제(Lowy et al., 1980, Cell 22:817) 유전자를 포함하나 이들로 한정되지 않는 다수의 선별 시스템이 사용될 수 있다. 또한, 항대사물질 내성이 메토폭레사이트에 대해 내성을 부여하는 dhfr 유전자(Wigler et al., 1980, Natl. Acad. Sci. USA 77:3567; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527); 마이코페놀산에 대한 내성을 부여하는 gpt 유전자(Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072); 아미노글라이코사이드 G-418에 대한 내성을 부여하는 neo 유전자(Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1); 및 하이그로마이신에 대한 내성을 부여하는 hygrr 유전자(Santerre et al., 1984, Gene 30:147)에 대한 선별의 기준으로서 이용될 수 있다.

<213> Fc 변이체 단백질의 발현 수준은 벡터 증폭에 의해 증가될 수 있다[검토를 위해, 문헌(Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol.3. (Academic Press, New York, 1987)) 참조]. 예를 들면, 항체 또는 Fc 융합 단백질을 발현하는 벡터 시스템 내의 마커가 증폭가능한 경우, 숙주 세포 배양물 중에 존재하는 억제제 농도의 증가는 마커 유전자의 카피 수를 증가시킬 것이다. 증폭된 유전자가 항체 유전자와 관련되기 때문에, 항체 또는 융합 단백질의 생성도 증가될 것이다(Crouse et al., 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257).

<214> 숙주 세포는 본 발명의 2개 발현 벡터, 예를 들면, 중쇄 유래 폴리펩티드를 코딩하는 제1 벡터 및 경쇄 유래의 폴리펩티드를 코딩하는 제2 벡터로 동시-형질감염될 수 있다. 2개의 벡터는 중쇄 폴리펩티드 및 경쇄 폴리펩티드의 동등한 발현을 가능하게 하는 동일한 선별가능한 마커를 함유할 수 있다. 별법으로, 융합 단백질 또는 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드 둘다를 코딩하고 발현할 수 있는 단일 벡터를 사용할 수 있다. 상기 융합 단백질 또는 중쇄 및 경쇄에 대한 코딩 서열은 cDNA 또는 게놈 DNA를 포함할 수 있다.

<215> **5.4. Fc 변이체 단백질의 정제**

<216> 일단 Fc 단백질이 재조합 발현에 의해 생성되면, Fc 단백질은 당업계에 공지되어 있는 임의의 단백질 정제 방법, 예를 들면, 크로마토그래피(예컨대, 이온 교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 특히 단백질 A 다음의 특정 항원에 대한 친화성 크로마토그래피, 및 크기별 분리 컬럼 크로마토그래피), 원심분리, 차등 가용성 또는 단백질 정제를 위한 임의의 다른 표준 기법에 의해 정제될 수 있다.

<217> "단리된" 또는 "정제된" Fc 변이체 단백질은 단백질의 공급원인 세포 또는 조직 공급원으로부터 세포 물질 또는 다른 오염 단백질을 실질적으로 갖지 않거나, 화학적으로 합성된 경우 화학적 전구체 또는 다른 화학물질을 실질적으로 갖지 않는다. 표현 "세포 물질을 실질적으로 갖지 않는다"는 Fc 변이체 단백질의 단리 또는 재조합 제조에 사용된 세포의 세포 성분들로부터 분리된 Fc 변이체 단백질의 제제를 포함한다. 따라서, 세포 물질을 실질적으로 갖지 않는 Fc 변이체 단백질은 약 30%, 20%, 10% 또는 5%(건조 중량 기준)의 이중 단백질(본 명세서에서 "오염 단백질"로도 지칭됨)을 가지는 Fc 변이체 단백질 제제를 포함한다. 또한, Fc 변이체 단백질이 재조합적으로 제조된 경우, 상기 Fc 변이체 단백질은 바람직하게는 배양 배지를 실질적으로 갖지 않는다. 즉, 배양 배지는 단백질 제제의 부피의 약 20%, 10% 또는 5% 미만을 차지한다. Fc 변이체 단백질이 화학적 합성에 의해 제조되는 경우, 상기 Fc 변이체 단백질은 바람직하게는 화학적 전구체 또는 다른 화학물질을 실질적으로 갖지 않는다. 즉, 상기 Fc 변이체 단백질은 단백질의 합성에 사용되는 화학적 전구체 또는 다른 화학물질로부터 분리된다. 따라서, 이러한 Fc 변이체 단백질 제제는 원하는 항체 외에 약 30%, 20%, 10% 또는 5%(건조 중량 기준) 미만의 화학적 전구체 또는 화합물을 갖는다. 일부 실시양태에서, Fc 변이체 단백질은 본 발명에 따라 제제화되기 전에 또는 본 발명에 따라 제제화되면서 동시에 단리되거나 정제된다.

<218> 일반적으로, Fc 변이체 단백질의 발현은 SDS-PAGE 환원 또는 비-환원 단백질 겔 분석을 사용한 겔 전기영동, 또는 당업계에 공지된 임의의 다른 기법에 의해 먼저 확인된다. ELISA도 Fc 변이체 단백질의 발현 및 존재하는 Fc 변이체 단백질의 양을 검출하는 데 사용될 수 있다. 본 명세서에 기재된 변형된 Fc-융합 단백질은 세포 내 또는 세포주위질 공간 내로 생성될 수 있거나, 배지 내로 직접 분비될 수 있다. 한 실시양태에서, Fc 변이체 단백질은 배양 배지 내로 분비된다. Fc 변이체 단백질을 생성하는 숙주 세포 배양물의 배지를 모아 원심분리하여 세포 데브리스를 침전시킨다. 상청액을 모아 단백질 정제 방법으로 정제한다. 단일클론 항체 및 다중클론 항체의 제조 및 정제 방법은 당업계에 공지되어 있고 예를 들어, 문헌[Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988)]에 기재되어 있다. 정제된 Fc 변이체 단백질을 농축하는 것이 바람직할 수 있다. 단백질을 농축하는 방법은 당업계에 잘 공지되어 있고 적당한 분자량(MW) 컷오프(예컨대, 전체 항체 분자의 30 kD 컷오프)를 가지는 반투과성 막을 사용하는 것을 포함한다. 다수의 방법을 이용하여 정제된 Fc 변이체 단백질을 본 발명의 제제로 제제화할 수 있다. 예를 들면, 정용여과를 완충제 교환에 사용할 수 있고, 이 방법은 농축 및 완충제 교환 둘다에 사용될 수 있다. 당업자라면 예를 들면, 정용여과를 이용하여 Fc 변이체 단백질을 본 발명의 제제의 성분들의 전부가 아닌 일부를 포함하는 염기 완충제 내로 먼저 제제화한 후, 제제의 남은 성분들을 첨가하여 바람직한 농도에서 모든 원하는 성분들을 포함하는 최종 제제를 생성할 수 있음을 이해할 것이다. 일반적으로, 약학 제제에서 사용하기 위한 Fc 변이체 단백질의 최소 허용 가능한 순도는 90%, 바람직하게는 95%, 보다 바람직하게는 98%, 가장 바람직하게는 99% 이상이다.

<219> **6. 사용 방법**

<220> 본 발명은 질환, 장애 또는 감염과 관련된 하나 이상의 증상을 예방하거나, 치료하거나 또는 개선시키기 위해 하나 이상의 Fc 변이체 단백질(예컨대, 변이체 Fc 영역을 포함하는 항체)을 포함하는 본 발명의 제제를 동물, 바람직하게는 포유동물, 가장 바람직하게는 인간에게 투여하는 것을 포괄한다. Fc 변이체 단백질은 효과기 세포 기능(예컨대, ADCC, CDC)의 변경된 효능이 바람직한 질환 또는 장애의 치료 또는 예방에 특히 유용하다. Fc 변이체 단백질을 포함하는 본 발명의 제제는 원발성 또는 전이성 신생물 질환(즉, 암) 및 감염성 질환의 치료 또는 예방에 특히 유용하다. 약학적으로 허용가능한 성분들을 포함하는 본 발명의 제제는 본 명세서에 기재된 바와 같이 생성될 수 있다. 후술하는 바와 같이, 본 발명의 제제는 암(특히, 수동 면역요법), 자가면역 질환, 염증성 장애 또는 감염성 질환의 치료 또는 예방 방법에서 사용될 수 있다.

<221> 본 발명의 제제는 암, 자가면역 질환, 염증성 장애 또는 감염성 질환의 치료 또는 예방용으로서 당업계에 공지된 다른 치료제와 조합되어 유리하게 사용될 수도 있다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 제제는 예를 들면, 분자와 상호작용하여 면역 반응을 증가시키는 효과기 세포의 수 또는 활성을 증가시키는 데 기여하는 단일클론 항체, 키메라 항체, 림포카인 또는 조혈 성장 인자(예컨대, IL-2, IL-3 및 IL-7)와 조합되어 사용될 수 있다. 본 발명의 제제는 질환, 장애 또는 감염을 치료하기 위해 사용되는 하나 이상의 약물, 예컨대, 항암제, 소염제

또는 항바이러스제와 조합되어 유리하게 사용될 수도 있다.

- <222> 본 발명은 현행 표준 및 실험실 화학요법, 호르몬 요법, 생물학적 요법, 면역요법, 방사선 요법 또는 수술을 포함하나 이들로 한정되지 않는 당업계에 공지된 다른 암 치료 또는 예방 요법과 병행하여 본 발명의 제제를 투여하는 것도 포괄한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 제제는 다른 암 치료 및/또는 예방용으로서 당업자에게 공지된 하나 이상의 항암제, 치료 항체 또는 다른 치료제의 치료 유효량 또는 예방 유효량과 조합되어 투여될 수 있다. 본 발명의 제제와 조합될 수 있는 투약 섭생법 및 치료법의 예는 당업계에 잘 공지되어 있고 다른 문헌에 상세히 기재되어 있다(예컨대, 국제특허공보 제WO 02/070007호 및 제WO 03/075957호 참조).
- <223> 본 발명의 방법 및 조성물에 의해 치료되거나 예방될 수 있는 암 및 관련 장애로는 하기 질환들이 있으나 이들로 한정되지 않는다: 백혈병, 림프종, 다발성 골수종, 골 및 결합 조직 육종, 뇌 종양, 유방암, 부신암, 갑상선암, 췌장암, 뇌하수체암, 눈암, 질암, 외음부암, 자궁경부암, 자궁암, 난소암, 식도암, 위암, 결장암, 직장암, 간암, 쓸개암, 담관암, 폐암, 정소암, 전립선암, 폐암(penal cancer), 구강암, 타액선암, 인두암, 피부암, 신장암, 방광암[이러한 질환에 대한 검토는 문헌(Fishman et al., 1985, Medicine, 2<sup>nd</sup> Ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia and Murphy et al., 1997, Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., United States of America) 참조].
- <224> 특정 실시양태에서, 본 발명의 제제는 다른 항암제 또는 다른 항암 치료요법과 함께 또는 단독으로 원발성 종양의 성장 또는 암 세포의 전이를 본 발명의 상기 제제의 부제 하에서의 원발성 종양의 성장 또는 전이에 비해 99% 이상, 95% 이상, 90% 이상, 85% 이상, 80% 이상, 75% 이상, 70% 이상, 60% 이상, 50% 이상, 45% 이상, 40% 이상, 45% 이상, 35% 이상, 30% 이상, 25% 이상, 20% 이상 또는 10% 이상 억제하거나 감소시킨다.
- <225> 본 발명은 피험체에서 염증 질환과 관련된 하나 이상의 증상을 예방하거나, 치료하거나 관리하는 데 있어서 본 발명의 하나 이상의 제제의 용도를 포괄한다.
- <226> 또한, 본 발명은 치료 유효량 또는 예방 유효량의 하나 이상의 소염제와 조합하여 본 발명의 제제를 투여하는 것을 포괄한다. 또한, 본 발명은 치료 유효량 또는 예방 유효량의 하나 이상의 면역조절제와 조합하여 본 발명의 제제를 상기 피험체에게 투여하는 것을 추가로 포함하는, 자가면역 질환과 관련된 하나 이상의 증상을 예방하거나, 치료하거나 관리하는 방법을 제공한다. 본 발명의 제제를 투여함으로써 치료될 수 있는 자가면역 질환의 예로는 원형탈모증, 강직성 척수염, 항인지질 증후군, 자가면역 애디슨병(Addison's disease), 부신의 자가면역 질환, 자가면역 용혈 빈혈, 자가면역 간염, 자가면역 난소염 및 고환염, 자가면역 혈소판감소증, 베체트병, 수포성 유천포창, 심근병증, 비열대성 스프루-피부염, 만성 피로 면역 기능장애 증후군(CFIDS), 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증, 초고-스트라우스 증후군(Churg-Strauss syndrome), 반흔성 유천포창, CREST 증후군, 한랭 응집 질환, 크론병, 원판상 루프스, 본태성 혼합 한랭글로불린혈증, 섬유근육통-섬유근육염, 사구체신염, 그레이브스병(Graves' disease), 켈랑-바레(Guillain-Barre), 하시모토 갑상선염, 특발성 폐 섬유증, 특발성 혈소판감소성 자반증(ITP), IgA 신경병증, 소아 관절염, 편평태선, 전신성 홍반 루프스, 메니에르병, 혼합 결합 조직 병, 다발성 경화증, 타입 1 또는 면역-매개 진성 당뇨병, 중증근무력증, 심상성 천포창, 악성 빈혈, 결절성 다발동맥염, 다발연골염, 다분비선 증후군, 류마티스성 다발근육통, 다발근육염 및 피부근육염, 원발성 무감마글로불린혈증, 원발성 쓸개관 경화증, 건선, 건선성 관절염, 레이나울드 현상(Raynaud's phenomenon), 레이터 증후군, 류마티스성 관절염, 사코이드증, 피부경화증, 쇼그렌 증후군, 근육강직증후군, 전신성 홍반성 루프스, 홍반성 루프스, 타카야스 동맥염, 관자동맥염/거세포 동맥염, 궤양성 대장염, 포도막염, 혈관염 예컨대, 피부염성 포진 혈관염, 백반증, 및 베게너 육아종증을 들 수 있으나 이들로 한정되지 않는다. 염증성 질환의 예로는 천식, 뇌염, 염증성 장 질환, 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD), 알레르기성 질환, 패혈성 쇼크, 폐 섬유증, 미분화된 척추관절병증, 미분화된 관절병증, 관절염, 염증성 골용해, 및 만성 바이러스 또는 박테리아 감염으로부터 기인한 만성 염증을 들 수 있으나 이들로 한정되지 않는다. 일부 자가면역 질환은 염증 상태와 관련되어 있으므로 자가면역 질환으로서 간주되는 것과 염증 질환으로서 간주되는 것 사이에 중복이 있다. 따라서, 일부 자가면역 질환은 염증 질환을 특징으로 할 수 있다. 본 발명의 방법에 따라 예방되거나, 치료되거나 관리될 수 있는 염증 질환의 예로는 천식, 뇌염, 염증성 장 질환, 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD), 알레르기성 질환, 패혈성 쇼크, 폐 섬유증, 미분화된 척추관절병증, 미분화된 관절병증, 관절염, 염증성 골용해, 및 만성 바이러스 또는 박테리아 감염으로부터 기인한 만성 염증을 들 수 있으나 이들로 한정되지 않는다.
- <227> 본 발명의 제제는 염증 질환을 가지는 동물, 특히 포유동물이 앓는 염증을 감소시키는 데 사용될 수도 있다. 특정 실시양태에서, 또 다른 소염제 또는 소염 요법과 함께 또는 단독으로 본 발명의 제제는 본 발명의 제제를 투여받지 못한 동물의 염증에 비해 동물의 염증을 99% 이상, 95% 이상, 90% 이상, 85% 이상, 80% 이상, 75% 이상,

70% 이상, 60% 이상, 50% 이상, 45% 이상, 40% 이상, 45% 이상, 35% 이상, 30% 이상, 25% 이상, 20% 이상 또는 10% 이상 감소시킨다.

<228> 또한, 본 발명은 치료 유효량 또는 예방 유효량의 본 발명의 제제를 투여하는 것을 포함하는 피험체에서 감염성 질환을 치료하거나 예방하는 방법을 포괄한다. 본 발명의 제제에 의해 치료될 수 있거나 예방될 수 있는 감염성 질환은 바이러스, 박테리아, 진균, 원생동물 및 바이러스를 포함하나 이들로 한정되지 않는 감염성 물질에 의해 야기된다.

<229> 본 발명의 방법과 함께 본 발명의 제제를 사용하여 치료하거나 예방할 수 있는 바이러스 질환으로는 A형 간염, B형 간염, C형 간염, 인플루엔자 감염, 바리셀라 감염, 아데노바이러스 감염, 단순 포진 타입 I(HSV-I) 감염, 단순 포진 타입 II(HSV-II) 감염, 우역 감염, 리노바이러스 감염, 에코바이러스 감염, 로타바이러스 감염, 호흡합포체성 바이러스 감염, 파필로마 바이러스 감염, 파포마 바이러스 감염, 사이토메갈로바이러스 감염, 에키노 바이러스 감염, 아르보바이러스 감염, 헨타바이러스 감염, 콕사키에 바이러스 감염, 볼거리 바이러스 감염, 홍역 바이러스 감염, 풍진 바이러스 감염, 폴리오 바이러스 감염, 천연두 바이러스 감염, 엡스테인 바 바이러스 감염, 인간 면역결핍 바이러스 타입 I(HIV-I) 감염, 인간 면역결핍 바이러스 타입 II(HIV-II) 감염, 및 바이러스 질환 예컨대, 바이러스성 수막염, 뇌염, 탕기 또는 천연두의 병원 물질에 의해 야기되는 질환들이 있으나 이들로 한정되지 않는다.

<230> 본 발명의 방법과 함께 본 발명의 제제를 사용하여 치료하거나 예방할 수 있는, 박테리아에 의해 야기되는 박테리아 질환으로는 마이코박테리아 리케차(*mycobacteria rickettsia*) 감염, 마이코플라스마(*mycoplasma*) 감염, 네이세리아(*neisseria*) 감염, 에스. 뉴모니아(*S. pneumonia*) 감염, 보렐리아 부르그도르페리(*Borrelia burgdorferi*) 감염(라임 질환), 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*)(탄저) 감염, 과상풍, 스트렙토코커스 감염, 스태필로코커스 감염, 마이코박테리아 감염, 과상풍, 백일해, 콜레라, 흑사병, 디프테리아 감염, 클라미디아 감염, 에스. 아우레우스(*S. aureus*) 감염 및 레지오넬라(*legionella*) 감염이 있으나 이들로 한정되지 않는다. 본 발명의 방법과 함께 본 발명의 제제를 사용하여 치료하거나 예방할 수 있는, 원생동물에 의해 야기되는 원생동물 질환으로는 레이쉬매니아(*leishmania*), 콕지디오아(*kokzidioa*), 트리파노소마(*trypanosoma*) 또는 말라리아 감염이 있으나 이들로 한정되지 않는다. 본 발명의 방법과 함께 본 발명의 제제를 사용하여 치료하거나 예방할 수 있는, 기생충에 의해 야기되는 기생충 질환으로는 클라미디아 및 리케차 감염이 있으나 이들로 한정되지 않는다.

<231> 일부 실시양태에서, 본 발명의 제제는 감염성 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 치료제로서 당업자에게 공지되어 있는 치료 유효량 또는 예방 유효량의 하나 이상의 치료제와 조합되어 투여될 수 있다. 본 발명은 감염성 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 치료제로서 당업자에게 공지되어 있는 항생물질, 항진균제 및 항-바이러스제를 포함하나 이들로 한정되지 않는 다른 분자와 조합하여 본 발명의 제제를 사용하는 것을 예상한다.

<232> 따라서, 본 발명은 유효량의 본 발명의 제제를 피험체에게 투여함으로써 질환, 장애 또는 감염과 관련된 하나 이상의 증상을 예방하거나, 치료하거나 개선시키는 방법을 제공한다. 한 측면에서, 상기 제제는 실질적으로 정제된(즉, 제제의 효과를 제한하거나 원치않는 부작용을 나타내는 물질을 실질적으로 갖지 않는) Fc 변이체 단백질을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 피험체는 동물 예컨대, 비-영장류(예를 들면, 소, 돼지, 말, 고양이, 개, 래트 등) 및 영장류(예를 들면, 원숭이 예컨대, 시아노몰구스 원숭이, 및 인간)를 포함하는 포유동물이다. 특정 실시양태에서, 피험체는 인간이다. 또 다른 특정 실시양태에서, Fc 변이체 단백질은 피험체와 동일한 종으로부터 유래된다.

<233> 본 발명은 질환, 장애 또는 감염과 관련된 하나 이상의 증상을 예방하거나, 치료하거나 개선시키는 방법으로서, (a) 투여량으로서 치료 유효량 또는 예방 유효량의 본 발명의 제제를 상기 예방, 치료 또는 개선이 필요한 피험체에게 투여하는 단계, 및 (b) 상기 제제의 1회 이상의 후속 투여량을 투여하여 항원 또는 표적 분자에 연속적으로 결합하는 Fc 변이체 단백질의 혈장 농도를 바람직한 수준(예컨대, 약 0.1 내지 약 100  $\mu\text{g/ml}$ )으로 유지하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, Fc 변이체 단백질의 혈장 농도는 10  $\mu\text{g/ml}$ , 15  $\mu\text{g/ml}$ , 20  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$ , 30  $\mu\text{g/ml}$ , 35  $\mu\text{g/ml}$ , 40  $\mu\text{g/ml}$ , 45  $\mu\text{g/ml}$  또는 50  $\mu\text{g/ml}$ 로 유지된다. 특정 실시양태에서, 투여될 Fc 변이체 단백질의 상기 유효량은 1회 투여 당 1 mg/kg 이상 내지 8 mg/kg이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 투여될 Fc 변이체 단백질의 상기 유효량은 1회 투여 당 4 mg/kg 이상 내지 8 mg/kg이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 투여될 Fc 변이체 단백질의 상기 유효량은 1회 투여 당 50 mg 내지 250 mg이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 투여될 Fc 변이체 단백질의 상기 유효량은 1회 투여 당 100 mg 내지 200 mg이다.

<234> 또한, 본 발명은 질환, 장애 또는 감염과 관련된 하나 이상의 증상을 예방하거나, 치료하거나 개선시키는 프로

토콜을 포괄하는데, 이때 본 발명의 제제는 본 발명의 제제 외의 요법(예컨대, 예방제 또는 치료제)과 조합되어 사용된다. 본 발명은 부분적으로, 본 발명의 제제의 성분들, 구체적으로 Fc 변이체 단백질이 현행 표준 및 실험 요법들을 비롯한 다른 요법들을 강화시키고 이 요법들과 상승작용하고/하거나, 상기 다른 요법들의 효능을 증가시키고/시키거나, 상기 다른 요법들의 내성을 개선시키고/시키거나 상기 다른 요법들에 의해 초래된 부작용을 감소시킨다는 인식에 기초한 것이다. 본 발명의 조합요법은 부가적 효능, 부가적 치료 효과 또는 상승작용적 효과를 나타낸다. 본 발명의 조합요법은 질환, 장애 또는 감염과 관련된 하나 이상의 증상을 예방하거나, 치료하거나 개선시키는 데 있어서 본 발명의 제제와 함께 사용되는 요법(예컨대, 예방제 또는 치료제)의 더 낮은 투여량을 허용할 수 있고/있거나 질환 또는 장애를 가지는 피험체에게 상기 예방제 또는 치료제의 덜 빈번한 투여를 허용하여 상기 피험체의 삶의 질을 개선시키고/시키거나 예방 또는 치료 효과를 달성할 수 있다. 또한, 본 명세서에 기재된 조합요법은 현행 단일 치료제 요법 및/또는 기존 조합요법의 투여와 관련된 원치않는 또는 유해한 부작용을 감소시키거나 피할 수 있어 치료 프로토콜에 대한 환자의 순응성을 개선시킬 수 있다. 본 발명의 제제와 조합되어 사용될 수 있는 다수의 분자가 당업계에 잘 공지되어 있다. 예를 들면, 국제특허공보 제WO 02/070007호 및 제WO 03/075957호, 및 미국 특허공보 제2005/ 064514호를 참조한다.

<235> 조성물의 투여 경로는 치료될 증상에 달려 있다. 예를 들면, 정맥내 주사는 전이된 림프계 암 또는 종양과 같은 전신성 장애의 치료에 바람직할 수 있다. 투여될 조성물의 투여량은 표준 투여량-반응 연구와 함께 과도한 실험 없이 당업자에 의해 결정될 수 있다. 이러한 결정을 하는 데 있어서 고려되어야 하는 관련 인자로는 치료될 증상 또는 증상들, 투여될 조성물의 선택, 개개의 환자의 연령, 체중 및 반응, 및 환자의 증상의 심각도가 있다. 증상에 따라, 조성물은 경구, 비경구, 비강내, 질, 직장, 설, 설하, 협측, 협내 및/또는 경피 경로 환자에게 투여될 수 있다.

<236> 따라서, 본 발명의 제제는 당업계에 잘 공지되어 있는 수단, 예를 들면, 불활성 희석제 또는 식용 담체를 사용하여 과도한 실험 없이 경구, 설, 설하, 협측 및 협내 투여가 이루어지도록 디자인할 수 있다. 본 발명의 제제는 젤라틴 캡슐 내로 봉입될 수 있거나 정제로 압축될 수 있다. 경구 치료 투여 목적의 경우, 본 발명의 제제는 부형제와 함께 도입될 수 있고 정제, 트로치(troches), 캡슐, 엘릭시르, 현탁액, 시럽, 와이퍼, 츄잉검 등의 형태로 사용될 수 있다.

<237> 정제, 환제, 캡슐, 트로치 등은 결합제, 부형제, 붕해제, 윤활제, 감미제 및/또는 방향제도 함유할 수 있다. 결합제의 일부 예로는 미세결정성 셀룰로스, 검 트라가칸스 및 젤라틴이 있다. 부형제의 예로는 전분 및 락토스가 있다. 붕해제의 일부 예로는 알긴산, 옥수수전분 등이 있다. 윤활제의 예로는 스테아르산마그네슘 및 스테아르산칼륨이 있다. 윤활제의 예는 콜로이드성 이산화규소이다. 감미제의 일부 예로는 수크로스, 사카린 등이 있다. 방향제의 예로는 페퍼민트, 메틸 살리실레이트, 오렌지 방향제 등이 있다. 이 다양한 조성물들을 제조하는 데 사용되는 물질은 약학적으로 순수하고 사용된 양에서 독성을 나타내지 않아야 한다.

<238> 본 발명의 제제는 비경구, 예를 들면, 정맥내, 근육내, 수막강내 및/또는 피하 주사에 의해 투여될 수 있다. 비경구 투여는 본 발명의 제제를 용액 또는 현탁액 내로 도입함으로써 달성할 수 있다. 이러한 용액 또는 현탁액은 멸균 희석제 예컨대, 주사용수, 생리 식염수, 고정된 오일, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 및/또는 다른 합성 용매도 포함할 수 있다. 비경구 제제는 항균제 예컨대, 벤질 알코올 및/또는 메틸 파라벤, 항산화제 예컨대, 아스코르브산 및/또는 소듐 비설파이트, 및 킬레이팅제 예컨대, EDTA를 포함할 수도 있다. 완충제 예컨대, 아세트이트, 시트레이트 및 포스페이트, 및 강직성 조절제 예컨대, 염화나트륨 및 텍스트로소도 첨가될 수 있다. 비경구 제제는 앰플, 일회용 주사기 및/또는 유리 또는 플라스틱으로 만들어진 다회 투여용 바이알 내에 봉입될 수 있다. 직장 투여로는 조성물을 직장 및/또는 대장 내로 투여하는 것을 포함한다. 이것은 좌약제 및/또는 관장제를 사용하여 달성할 수 있다. 좌약 제제는 당업계에 공지되어 있는 방법으로 만들 수 있다. 경피 투여는 피부를 통한 조성물의 경피 흡수를 포함한다. 경피 제제는 패치, 연고, 크림, 젤, 고약 등을 포함한다. 본 발명의 제제는 환자에게 비강 투여될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 비강으로 투여하는 것 또는 비강 투여는 조성물을 환자의 코 통로 및/또는 코 캐비티의 점막에 투여하는 것을 포함한다.

#### <239> 특정 실시양태

<240> 실시양태 1. Fc 변이체 단백질 및 약 1 mM 내지 약 100 mM 농도의 완충제를 포함하고 (a) 약 1% 내지 약 20% 중량/부피 농도의 탄수화물 부형제, (b) 약 1 mM 내지 약 400 mM 농도의 양이온성 아미노산, (c) 약 1 mM 내지 약 200 mM 농도의 음이온 및 (d) 약 0.001% 내지 약 0.1% 농도의 폴리소르베이트로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 성분을 추가로 포함하며 pH가 약 5.5 내지 약 8.0인 제제.

<241> 실시양태 2. 실시양태 1에 있어서, 성분 (a)를 포함하나 성분 (b), (c) 또는 (d)를 포함하지 않는 제제.

- <242> 실시양태 3. 실시양태 1에 있어서, 성분 (a) 및 (b)를 포함하나 성분 (c) 또는 (d)를 포함하지 않는 제제.
- <243> 실시양태 4. 실시양태 1에 있어서, 성분 (a) 및 (c)를 포함하나 성분 (b) 또는 (d)를 포함하지 않는 제제.
- <244> 실시양태 5. 실시양태 1에 있어서, 성분 (a) 및 (d)를 포함하나 성분 (b) 또는 (c)를 포함하지 않는 제제.
- <245> 실시양태 6. 실시양태 1에 있어서, 성분 (b) 및 (c)를 포함하나 성분 (a) 또는 (d)를 포함하지 않는 제제.
- <246> 실시양태 7. 실시양태 1에 있어서, 성분 (b) 및 (d)를 포함하나 성분 (a) 또는 (c)를 포함하지 않는 제제.
- <247> 실시양태 8. 실시양태 1에 있어서, 성분 (c) 및 (d)를 포함하나 성분 (a) 또는 (b)를 포함하지 않는 제제.
- <248> 실시양태 9. 실시양태 1에 있어서, 성분 (b), (c) 및 (d)를 포함하나 성분 (a)를 포함하지 않는 제제.
- <249> 실시양태 10. 실시양태 1에 있어서, 성분 (a), (c) 및 (d)를 포함하나 성분 (b)를 포함하지 않는 제제.
- <250> 실시양태 11. 실시양태 1에 있어서, 성분 (a), (b) 및 (d)를 포함하나 성분 (c)를 포함하지 않는 제제.
- <251> 실시양태 12. 실시양태 1에 있어서, 성분 (a), (b) 및 (c)를 포함하나 성분 (d)를 포함하지 않는 제제.
- <252> 실시양태 13. 실시양태 1에 있어서, 성분 (a), (b), (c) 및 (d)를 포함하는 제제.
- <253> 실시양태 14. 실시양태 1 내지 13 중 임의의 실시양태에서 있어서, 완충제가 음이온인 제제.
- <254> 실시양태 15. 실시양태 1 내지 14 중 임의의 실시양태에서 있어서, Fc 변이체 단백질이 이와 동일한 Fc 변이체 단백질이 pH 6.0의 10 mM 히스티딘 중에 제제화된 경우의 응집과 비교할 때 10% 이상 더 적은 응집을 나타내는 것인 제제.
- <255> 실시양태 16. 실시양태 1 내지 15 중 임의의 실시양태에서 있어서, Fc 변이체 단백질이 크기 배제 크로마토그래피(SEC)에 의한 평가 시 2℃ 내지 8℃의 온도에서 90일 이상 동안 총 Fc 변이체 단백질을 기준으로 약 2% 이하의 응집물을 가지는 것인 제제.
- <256> 실시양태 17. 실시양태 1 내지 16 중 임의의 실시양태에서 있어서, 부형제 및/또는 첨가제로서 시스테인을 포함하지 않는 제제.
- <257> 실시양태 18. 실시양태 1 내지 17 중 임의의 실시양태에서 있어서, Fc 변이체 단백질 농도가 약 10 mg/ml 내지 약 200 mg/ml인 제제.
- <258> 실시양태 19. 실시양태 1 내지 18 중 임의의 실시양태에서 있어서, Fc 변이체 단백질이 항체인 제제.
- <259> 실시양태 20. 실시양태 1 내지 18 중 임의의 실시양태에서 있어서, Fc 변이체 단백질이 Fc 융합 단백질인 제제.
- <260> 실시양태 21. 실시양태 19 또는 20에 있어서, Fc 변이체 단백질이 하기 임상 제품 또는 후보물질로 구성된 군으로부터 선택되는 임상 제품 또는 후보물질과 동일한 항원에 결합하는 것인 제제: 리툽시마브, 자놀리무마브, hA20, AME-I33, HumALYM™, 트라스투주마브, 퍼투주마브, 세툽시마브, IMC-3G3, 패니투무마브, 잘루투무마브, 니모투주마브, 마투주마브, ch806, KSB-102, MR1-1, SC100, SC101, SC103, 알렘투주마브, 무로모나브-CD3, OKT4A, 이브리투모마브, 켄투주마브, 알레페셉트, 애브식시마브, 바실릭시마브, 팔리비주마브, 모타비주마브, 인플릭시마브, 아달리무마브, CDP-571, 에타네르셉트, ABX-CBL, ABX-IL8, ABX-MA1, 켄투모마브, 텍스, AS1405, 나탈리주마브, HuBC-1, 나탈리주마브, IDEC-131, VLA-1, CAT-152, J695, CAT-192, CAT-213, BR3-Fc, 림포스타트-B™, TRAIL-R1mAb, 베바시주마브, 래니비주마브, 오말리주마브, 에팔리주마브, MLN-02, 자놀리무마브, 휴맥스-IL15, 휴맥스-인플렐, 휴맥스-캔서, 휴맥스-립포마, 휴맥스-TAC, 클레놀릭시마브, 루밀릭시마브, BEC2, IMC-1C11, DC101, 라베투주마브, 아르시투모마브, 에프라투주마브, 태캐투주마브, 마이엘로마사이드™, 르코사이드™, 프로스타사이드™, 이필리무마브, MDX-060, MDX-070, MDX-018, MDX-1106, MDX-1103, MDX-1333, MDX-214, MDX-1100, MDX-CD4, MDX-1388, MDX-066, MDX-1307, HGS-TR2J, FG-3019, BMS-66513, SGN-30, SGN-40, 토실리주마브, CS-1008, IDM-1, 골리무마브, CNTO 1275, CNTO 95, CNTO 328, 메폴리주마브, MOR101, MOR102, MOR201, 비실리주마브, HuZAF™, 볼로식시마브, ING-1, MLN2201, 다클리주마브, HCD122, CDP860, PRO542, C14, 오레고보마브, 에드레콜로마브, 에타라시주마브, 시플리주마브, 린투주마브, HulD10, Lym-1, 에팔리주마브, ICM3, 갈릭시마브, 에쿨리주마브, 펙셀리주마브, LDP-01, huA33, WX-G250, 시브로투주마브, 키메릭 KW-2871, hu3S193, huLK26, 비바투주마브, ch14.18, 3F8, BC8, huHMFG1, MORAb-003, MORAb-004, MORAb-009, 데노수마브, PRO-140, 1D09C3, 휴믹베타-1, NI-0401, NI-501, 켄투주마브, HuN901, 8H9, chTNT-1/B, 바비톡시마브, huJ591, HeFi-1, 펜타세아™, 아바고보마브, 토시투모마브, 105AD7, GMA161 및 GMA321.

- <261> 실시양태 22. 실시양태 19에 있어서, Fc 변이체 단백질이 하기 임상 제품 또는 후보물질로 구성된 군으로부터 선택되는 임상 제품 또는 후보물질과 동일한 항원에의 결합에 대해 경쟁하는 것인 제제: 리툭시마브, 자놀리무마브, hA20, AME-I33, HumaLYM™, 트라스투주마브, 퍼투주마브, 세톡시마브, IMC-3G3, 패니투무마브, 잘루투무마브, 니모투주마브, 마투주마브, ch806, KSB-102, MR1-1, SC100, SC101, SC103, 알렘투주마브, 무로모나브-CD3, OKT4A, 이브리투모마브, 켄투주마브, 알레페셉트, 애브식시마브, 바실릭시마브, 팔리비주마브, 모타비주마브, 인플릭시마브, 아달리무마브, CDP-571, 에타네르셉트, ABX-CBL, ABX-IL8, ABX-MA1 켄투모마브, 테렉스, AS1405, 나탈리주마브, HuBC-1, 나탈리주마브, IDEC-131, VLA-1, CAT-152, J695, CAT-192, CAT-213, BR3-Fc, 림포스타트-B™, TRAIL-R1mAb, 베바시주마브, 래니비주마브, 오말리주마브, 에팔리주마브, MLN-02, 자놀리무마브, 휴맥스-IL15, 휴맥스-인플렘, 휴맥스-캔서, 휴맥스-림포마, 휴맥스-TAC, 클레놀릭시마브, 루밀릭시마브, BEC2, IMC-1C11, DC101, 라베투주마브, 아라시투모마브, 에프라투주마브, 태케투주마브, 마이엘로마사이드™, 르코사이드™, 프로스타사이드™, 이필리무마브, MDX-060, MDX-070, MDX-018, MDX-1106, MDX-1103, MDX-1333, MDX-214, MDX-1100, MDX-CD4, MDX-1388, MDX-066, MDX-1307, HGS-TR2J, FG-3019, BMS-66513, SGN-30, SGN-40, 토실리주마브, CS-1008, IDM-1, 골리무마브, CNTO 1275, CNTO 95, CNTO 328, 메폴리주마브, MOR101, MOR102, MOR201, 비실리주마브, HuZAF™, 볼로식시마브, ING-1, MLN2201, 다클리주마브, HCD122, CDP860, PRO542, C14, 오레고보마브, 에드레콜로마브, 에타라시주마브, 시플리주마브, 린투주마브, Hu1D10, Lym-1, 에팔리주마브, ICM3, 갈릭시마브, 에쿨리주마브, 펙셀리주마브, LDP-01, huA33, WX-G250, 시브로투주마브, 키메릭 KW-2871, hu3S193, huLK26, 비바투주마브, ch14.18, 3F8, BC8, huHMF1, MORAb-003, MORAb-004, MORAb-009, 테노수마브, PRO-140, 1D09C3, 휴믹베타-1, NI-0401, NI-501, 캔투주마브, HuN901, 8H9, chTNT-1/B, 바비톡시마브, huJ591, HeFi-1, 펜타세아™, 아바고보마브, 토시투모마브, 105AD7, GMA161 및 GMA321.
- <262> 실시양태 23. 실시양태 19에 있어서, Fc 변이체 단백질이 하기 임상 제품 또는 후보물질로 구성된 군으로부터 선택되는 임상 제품 또는 후보물질로부터의 하나 이상의 CDR을 포함하는 것인 제제: 리툭시마브, 자놀리무마브, hA20, AME-I33, HumaLYM™, 트라스투주마브, 퍼투주마브, 세톡시마브, IMC-3G3, 패니투무마브, 잘루투무마브, 니모투주마브, 마투주마브, ch806, KSB-102, MR1-1, SC100, SC101, SC103, 알렘투주마브, 무로모나브-CD3, OKT4A, 이브리투모마브, 켄투주마브, 알레페셉트, 애브식시마브, 바실릭시마브, 팔리비주마브, 모타비주마브, 인플릭시마브, 아달리무마브, CDP-571, 에타네르셉트, ABX-CBL, ABX-IL8, ABX-MA1 켄투모마브, 테렉스, AS1405, 나탈리주마브, HuBC-1, 나탈리주마브, IDEC-131, VLA-1, CAT-152, J695, CAT-192, CAT-213, BR3-Fc, 림포스타트-B™, TRAIL-R1mAb, 베바시주마브, 래니비주마브, 오말리주마브, 에팔리주마브, MLN-02, 자놀리무마브, 휴맥스-IL15, 휴맥스-인플렘, 휴맥스-캔서, 휴맥스-림포마, 휴맥스-TAC, 클레놀릭시마브, 루밀릭시마브, BEC2, IMC-1C11, DC101, 라베투주마브, 아라시투모마브, 에프라투주마브, 태케투주마브, 마이엘로마사이드™, 르코사이드™, 프로스타사이드™, 이필리무마브, MDX-060, MDX-070, MDX-018, MDX-1106, MDX-1103, MDX-1333, MDX-214, MDX-1100, MDX-CD4, MDX-1388, MDX-066, MDX-1307, HGS-TR2J, FG-3019, BMS-66513, SGN-30, SGN-40, 토실리주마브, CS-1008, IDM-1, 골리무마브, CNTO 1275, CNTO 95, CNTO 328, 메폴리주마브, MOR101, MOR102, MOR201, 비실리주마브, HuZAF™, 볼로식시마브, ING-1, MLN2201, 다클리주마브, HCD122, CDP860, PRO542, C14, 오레고보마브, 에드레콜로마브, 에타라시주마브, 시플리주마브, 린투주마브, Hu1D10, Lym-1, 에팔리주마브, ICM3, 갈릭시마브, 에쿨리주마브, 펙셀리주마브, LDP-01, huA33, WX-G250, 시브로투주마브, 키메릭 KW-2871, hu3S193, huLK26, 비바투주마브, ch14.18, 3F8, BC8, huHMF1, MORAb-003, MORAb-004, MORAb-009, 테노수마브, PRO-140, 1D09C3, 휴믹베타-1, NI-0401, NI-501, 캔투주마브, HuN901, 8H9, chTNT-1/B, 바비톡시마브, huJ591, HeFi-1, 펜타세아™, 아바고보마브, 토시투모마브, 105AD7, GMA161 및 GMA321.
- <263> 실시양태 24. 실시양태 1 내지 23 중 임의의 실시양태에 있어서, Fc 변이체 단백질이 서열번호 2, 4, 6 및 8 내지 20으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 중 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 것인 제제.
- <264> 실시양태 25. 실시양태 1 내지 13 중 임의의 실시양태에 있어서, 완충제의 농도가 약 10 mM 내지 약 50 mM인 제제.
- <265> 실시양태 26. 실시양태 1 내지 13 중 임의의 실시양태에 있어서, 완충제가 약 50 mM 내지 약 100 mM인 제제.
- <266> 실시양태 27. 실시양태 1 내지 13 중 임의의 실시양태에 있어서, 완충제가 히스티딘, 포스페이트 및 시트레이트로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 제제.
- <267> 실시양태 28. 실시양태 27에 있어서, 완충제가 히스티딘인 제제.
- <268> 실시양태 29. 실시양태 27에 있어서, 완충제가 포스페이트인 제제.

- <269> 실시양태 30. 실시양태 27에 있어서, 완충제가 시트레이트인 제제.
- <270> 실시양태 31. 실시양태 1 내지 13 중 임의의 실시양태에 있어서, 탄수화물 부형제의 농도가 약 5% 내지 약 20% 중량/부피인 제제.
- <271> 실시양태 32. 실시양태 1 내지 13 중 임의의 실시양태에 있어서, 탄수화물 부형제가 트레할로스, 수크로스, 만니톨, 말토스 및 라피노스로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 제제.
- <272> 실시양태 33. 실시양태 32에 있어서, 탄수화물 부형제가 트레할로스인 제제.
- <273> 실시양태 34. 실시양태 32에 있어서, 탄수화물 부형제가 수크로스인 제제.
- <274> 실시양태 35. 실시양태 1, 3, 6, 7, 9, 11, 12 또는 13에 있어서, 양이온성 아미노산의 농도가 약 35 mM 내지 약 200 mM인 제제.
- <275> 실시양태 36. 실시양태 1, 3, 6, 7, 9, 11, 12 또는 13에 있어서, 양이온성 아미노산이 리신, 아르기닌 및 히스티딘으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 제제.
- <276> 실시양태 37. 실시양태 36에 있어서, 양이온성 아미노산이 리신인 제제.
- <277> 실시양태 38. 실시양태 36에 있어서, 양이온성 아미노산이 아르기닌인 제제.
- <278> 실시양태 39. 실시양태 36에 있어서, 양이온성 아미노산이 히스티딘인 제제.
- <279> 실시양태 40. 실시양태 1, 3, 6, 7, 9, 11, 12 또는 13에 있어서, 음이온의 농도가 약 10 mM 내지 약 50 mM인 제제.
- <280> 실시양태 41. 실시양태 1, 3, 6, 7, 9, 11, 12 또는 13에 있어서, 음이온의 농도가 약 50 mM 내지 약 100 mM인 제제.
- <281> 실시양태 42. 실시양태 1, 3, 6, 7, 9, 11, 12 또는 13에 있어서, 음이온의 농도가 약 100 mM 내지 약 200 mM인 제제.
- <282> 실시양태 43. 실시양태 1, 3, 6, 7, 9, 11, 12 또는 13에 있어서, 음이온이 시트레이트, 석시네이트 및 포스페이트로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 제제.
- <283> 실시양태 44. 실시양태 43에 있어서, 음이온이 시트레이트인 제제.
- <284> 실시양태 45. 실시양태 43에 있어서, 음이온이 석시네이트인 제제.
- <285> 실시양태 46. 실시양태 43에 있어서, 음이온이 포스페이트인 제제.
- <286> 실시양태 47. 실시양태 43에 있어서, 음이온이 시트레이트이고 완충제가 시트레이트이며, 시트레이트의 총 농도가 약 100 mM 내지 300 mM인 제제.
- <287> 실시양태 48. 실시양태 47에 있어서, 시트레이트의 총 농도가 약 100 mM인 제제.
- <288> 실시양태 49. 실시양태 47에 있어서, 시트레이트의 총 농도가 약 200 mM인 제제.
- <289> 실시양태 50. 실시양태 1, 5, 7, 8, 9, 10, 11 또는 13에 있어서, 폴리소르베이트의 농도가 약 0.01% 내지 약 0.05%인 제제.
- <290> 실시양태 51. 실시양태 1, 5, 7, 8, 9, 10, 11 또는 13에 있어서, 폴리소르베이트가 폴리소르베이트-20, 폴리소르베이트-60 및 폴리소르베이트-80으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 제제.
- <291> 실시양태 52. 실시양태 1 내지 13 중 임의의 실시양태에 있어서, pH가 약 5.5 내지 약 7.0인 제제.
- <292> 실시양태 53. 실시양태 52에 있어서, pH가 약 6.0 내지 약 7.0인 제제.
- <293> 실시양태 54. 실시양태 1 내지 13 중 임의의 실시양태에 있어서, Fc 변이체 단백질이 천연 발생 Fc 영역을 가진다는 점을 제외하고 동일한 아미노산 서열을 가지는 단백질에 비해 Fc 수용체와의 증가된 결합을 가지는 Fc 영역을 포함하는 것인 제제.
- <294> 실시양태 55. 실시양태 54에 있어서, Fc 수용체가 Fc  $\gamma$ RIIIA인 제제.

- <295> 실시양태 56. 실시양태 54에 있어서, Fc 수용체가 FcRn인 제제.
- <296> 실시양태 57. 실시양태 1 내지 13 중 임의의 실시양태에 있어서, Fc 변이체 단백질이 천연 발생 Fc 영역을 가진다는 점을 제외하고 동일한 아미노산 서열을 가지는 단백질에 비해 증가된 ADCC 활성을 가지는 Fc 영역을 포함하는 것인 제제.
- <297> 실시양태 58. 실시양태 1 내지 13 중 임의의 실시양태에 있어서, Fc 변이체 단백질이 천연 발생 Fc 영역을 가진다는 점을 제외하고 동일한 아미노산 서열을 가지는 단백질에 비해 증가된 혈청 반감기를 가지는 Fc 영역을 포함하는 것인 제제.
- <298> 실시양태 59. 실시양태 1 내지 13 중 임의의 실시양태에 있어서, Fc 변이체 단백질이 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 222, 224, 234, 235, 236, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 248, 252, 254, 256, 258, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 272, 274, 275, 278, 279, 280, 282, 290, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 332, 333, 334, 335, 339, 359, 360, 372, 377, 379, 396, 398, 400, 401, 430 및 436번 위치로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 위치에서 하나 이상의 비천연 발생 아미노산 잔기를 가지는 Fc 영역 포함하는 것인 제제.
- <299> 실시양태 60. 실시양태 1 내지 13 중 임의의 실시양태에 있어서, Fc 변이체 단백질이 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 222N, 224L, 234D, 234E, 234N, 234Q, 234T, 234H, 234Y, 234I, 234V, 234F, 235A, 235D, 235R, 235W, 235P, 235S, 235N, 235Q, 235T, 235H, 235Y, 235I, 235V, 235F, 236E, 239D, 239E, 239N, 239Q, 239F, 239T, 239H, 239Y, 240I, 240A, 240T, 240M, 241W, 241L, 241Y, 241E, 241R, 243W, 243L, 243Y, 243R, 243Q, 244H, 245A, 247V, 247G, 248M, 252Y, 254T, 256E, 258D, 262I, 262A, 262T, 262E, 263I, 263A, 263T, 263M, 264L, 264I, 264W, 264T, 264R, 264F, 264M, 264Y, 264E, 265G, 265N, 265Q, 265Y, 265F, 265V, 265I, 265L, 265H, 265T, 266I, 266A, 266T, 266M, 267Q, 267L, 268D, 268N, 269H, 269Y, 269F, 269R, 296E, 272Y, 274E, 274R, 274T, 275Y, 278T, 279L, 280H, 280Q, 280Y, 282M, 290G, 290S, 290T, 290Y, 294N, 295K, 296Q, 296D, 296N, 296S, 296T, 296L, 296I, 296H, 296G, 297S, 297D, 297E, 298H, 298I, 298T, 298F, 299I, 299L, 299A, 299S, 299V, 299H, 299F, 299E, 300I, 300L, 312A, 313F, 318A, 318V, 320A, 320M, 325Q, 325L, 325I, 325D, 325E, 325A, 325T, 325V, 325H, 327G, 327W, 327N, 327L, 328S, 328M, 328D, 328E, 328N, 328Q, 328F, 328I, 328V, 328T, 328H, 328A, 329F, 329H, 329Q, 330K, 330G, 330T, 330C, 330L, 330Y, 330V, 330I, 330F, 330R, 330H, 332D, 332S, 332W, 332F, 332E, 332N, 332Q, 332T, 332H, 332Y, 332A, 335A, 335T, 335N, 335R, 335Y, 339T, 359A, 360A, 372Y, 377F, 379M, 396H, 396L, 398V, 400P, 401V 및 430A로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 비천연 발생 아미노산 잔기를 가지는 Fc 영역을 포함하는 것인 제제.
- <300> 실시양태 61. 실시양태 59에 있어서, Fc 영역이 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 239, 330 및 332번 위치로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 위치에서 비천연 발생 아미노산 잔기를 포함하는 것인 제제.
- <301> 실시양태 62. 실시양태 60에 있어서, 하나 이상의 비천연 발생 아미노산 잔기가 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 239D, 330L, 330Y 및 332E로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 제제.
- <302> 실시양태 63. 실시양태 60에 있어서, Fc 영역이 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 비천연 발생 아미노산 239D, 330L 및 332E를 포함하는 것인 제제.
- <303> 실시양태 64. 실시양태 60에 있어서, Fc 영역이 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 비천연 발생 아미노산 239D, 330Y 및 332E를 포함하는 것인 제제.
- <304> 실시양태 65. 실시양태 60에 있어서, Fc 영역이 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 비천연 발생 아미노산 332E를 포함하는 것인 제제.
- <305> 실시양태 66. 실시양태 59에 있어서, Fc 영역이 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 252, 254 및 256번 위치로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 위치에서 비천연 발생 아미노산 잔기를 추가로 포함하는 것인 제제.
- <306> 실시양태 67. 실시양태 60에 있어서, 하나 이상의 위치에서 비천연 발생 아미노산이 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 252Y, 254T 및 256E로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 제제.
- <307> 실시양태 68. 실시양태 1 내지 14, 17 내지 20 또는 25 내지 53 중 임의의 실시양태의 제제 중에서 Fc 변이체

단백질을 제제화하는 단계를 포함하는, 상기 Fc 변이체 단백질의 응집을 감소시키는 방법.

- <308> 실시양태 69. 실시양태 68에 있어서, Fc 변이체 단백질의 응집이 동일한 Fc 변이체가 pH 6.0의 10 mM 히스티딘 중에 제제화된 경우의 응집에 비해 10% 이상 감소되는 것인 방법.
- <309> 실시양태 70. 약 20 mg/ml 내지 약 100 mg/ml 농도의 Fc 변이체 단백질, 약 6% 트레할로스, 약 2% 아르기닌(~115 mM), 약 0.25% 폴리소르베이트-80 및 약 10 mM 히스티딘 완충제를 포함하며 pH가 약 6.0 내지 6.5인 사전 동결건조 벌크 제제.
- <310> 실시양태 71. 실시양태 70에 있어서, Fc 변이체 단백질이 서열번호 2, 4, 6 및 8 내지 20으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열들 중 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 것인 사전 동결건조 벌크 제제.
- <311> 실시양태 72. 약 40 mg/ml 내지 약 100 mg/ml 농도의 Fc 변이체 단백질, 약 2% 내지 약 12% 트레할로스, 약 1% 내지 약 4% 아르기닌 또는 대략적으로 58 mM 내지 230 mM 아르기닌 및 약 5 mM 내지 약 20 mM 히스티딘 완충제를 포함하며 pH가 약 6.0인 재구성된 제제.
- <312> 실시양태 73. 실시양태 72에 있어서, 약 40 mg/ml 내지 약 100 mg/ml 농도의 Fc 변이체 단백질, 약 12% 트레할로스, 약 4% 아르기닌 또는 대략적으로 230 mM 아르기닌 및 약 20 mM 히스티딘 완충제를 포함하며 pH가 6인 재구성된 제제.
- <313> 실시양태 74. 실시양태 72에 있어서, 약 40 mg/ml 농도의 Fc 변이체 단백질, 약 4.5% 트레할로스, 약 1.5% 아르기닌 또는 대략적으로 58 mM 아르기닌 및 약 7.5 mM 히스티딘 완충제를 포함하며 pH가 6인 재구성된 제제.
- <314> 실시양태 75. 실시양태 72, 73 또는 74에 있어서, Fc 변이체 단백질이 서열번호 2, 4, 6 및 8 내지 20으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열들 중 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 것인 재구성된 제제.
- <315> 실시양태 76. 실시양태 72, 73 또는 74에 있어서, 약 0.01% 내지 약 0.05% 폴리소르베이트 80을 추가로 포함하는 재구성된 제제.
- <316> 실시양태 77. 약 20 mg/ml 내지 약 100 mg/ml 농도의 Fc 변이체 단백질, 약 50 mM 내지 약 300 mM 시트레이트, 및 약 10% 내지 약 20% 트레할로스를 포함하며 pH가 약 6.0 내지 약 7.0인 액체 제제.
- <317> 실시양태 78. 실시양태 77에 있어서, 시트레이트의 농도가 약 50 mM이고 트레할로스의 농도가 약 10%이며, pH가 약 6.0 내지 약 6.5인 액체 제제.
- <318> 실시양태 79. 실시양태 77에 있어서, 시트레이트의 농도가 약 200 mM이고 트레할로스의 농도가 약 10%인 액체 제제.
- <319> 실시양태 80. 실시양태 77에 있어서, 시트레이트의 농도가 약 100 mM이고 트레할로스의 농도가 약 15%인 액체 제제.
- <320> 실시양태 81. 실시양태 77, 79 또는 80에 있어서, pH가 약 6.0인 액체 제제.
- <321> 실시양태 82. 실시양태 77, 79 또는 80에 있어서, pH가 약 6.5인 액체 제제.
- <322> 실시양태 83. 실시양태 77, 79 또는 80에 있어서, pH가 약 7.0인 액체 제제.
- <323> 실시양태 84. 실시양태 77, 79 또는 80에 있어서, 약 0.001% 내지 약 0.1% 농도로 폴리소르베이트를 추가로 포함하는 액체 제제.
- <324> 실시양태 85. 약 20 mg/ml 내지 100 mg/ml 농도의 Fc 변이체 단백질, 약 25 mM 시트레이트, 약 200 mM 아르기닌 및 약 8% 트레할로스를 포함하며, pH가 약 6.0 내지 약 6.5인 액체 제제.
- <325> 실시양태 86. 실시양태 85에 있어서, 약 0.001% 내지 약 0.1% 농도로 폴리소르베이트를 추가로 포함하는 액체 제제.
- <326> 실시양태 87. 실시양태 77 내지 85 중 임의의 실시양태에 있어서, Fc 변이체 단백질이 이와 동일한 Fc 변이체 단백질이 pH 6.0의 10 mM 히스티딘 중에 제제화된 경우의 응집과 비교할 때 10% 이상의 더 적은 응집을 나타내는 것인 액체 제제.
- <327> 실시양태 88. 실시양태 77 내지 85 중 임의의 실시양태에 있어서, Fc 변이체 단백질이 크기 배제 크로마토그래피(SEC)에 의한 평가 시 2°C 내지 8°C의 온도에서 90일 이상 동안 총 Fc 변이체 단백질을 기준으로 약 2% 이하

의 응집물을 가지는 것인 액체 제제.

- <328> 실시양태 89. 실시양태 77 내지 87 중 임의의 실시양태에 있어서, Fc 변이체 단백질이 항체인 액체 제제.
- <329> 실시양태 90. 실시양태 77 내지 87 중 임의의 실시양태에 있어서, Fc 변이체 단백질이 Fc 융합 단백질인 액체 제제.
- <330> 실시양태 91. 실시양태 88 또는 90에 있어서, Fc 변이체 단백질이 인간 EphA2 또는 인간  $\alpha V\beta 3$  인테그린에 결합하는 것인 액체 제제.
- <331> 실시양태 92. 실시양태 91에 있어서, Fc 변이체 단백질이 서열번호 2, 4, 6 및 8 내지 20으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열들 중 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 것인 액체 제제.
- <332> 실시양태 93. 실시양태 89 또는 90에 있어서, Fc 변이체 단백질이 하기 임상 제품 또는 후보물질로 구성된 군으로부터 선택되는 임상 제품 또는 후보물질과 동일한 항원에 결합하는 것인 액체 제제: 리툽시마브, 자놀리무마브, hA20, AME-I33, HumaLYM™, 트라스투주마브, 퍼투주마브, 세툽시마브, IMC-3G3, 패니투무마브, 잘루투무마브, 니모투주마브, 마투주마브, ch806, KSB-102, MR1-1, SC100, SC101, SC103, 알렘투주마브, 무로모나브-CD3, OKT4A, 이브리투모마브, 켈투주마브, 알레페셉트, 애브식시마브, 바실릭시마브, 팔리비주마브, 모타비주마브, 인플릭시마브, 아달리무마브, CDP-571, 에타네르셉트, ABX-CBL, ABX-IL8, ABX-MA1 켈투모마브, 테렉스, AS1405, 나탈리주마브, HuBC-1, 나탈리주마브, IDEC-131, VLA-1, CAT-152, J695, CAT-192, CAT-213, BR3-Fc, 림포스타트-B™, TRAIL-R1mAb, 베바시주마브, 래니비주마브, 오말리주마브, 에팔리주마브, MLN-02, 자놀리무마브, 휴맥스-IL15, 휴맥스-인플렘, 휴맥스-캔서, 휴맥스-림포마, 휴맥스-TAC, 클레놀릭시마브, 루밀릭시마브, BEC2, IMC-1C11, DC101, 라베투주마브, 아르시투모마브, 에프라투주마브, 태캐투주마브, 마이엘로마사이드™, 르코사이드™, 프로스타사이드™, 이필리무마브, MDX-060, MDX-070, MDX-018, MDX-1106, MDX-1103, MDX-1333, MDX-214, MDX-1100, MDX-CD4, MDX-1388, MDX-066, MDX-1307, HGS-TR2J, FG-3019, BMS-66513, SGN-30, SGN-40, 토실리주마브, CS-1008, IDM-1, 골리무마브, CNTO 1275, CNTO 95, CNTO 328, 메폴리주마브, MOR101, MOR102, MOR201, 비실리주마브, HuZAF™, 볼로식스마브, ING-1, MLN2201, 다클리주마브, HCD122, CDP860, PRO542, C14, 오레고보마브, 에드레콜로마브, 에타라시주마브, 시플리주마브, 린투주마브, Hu1D10, Lym-1, 에팔리주마브, ICM3, 갈릭시마브, 에쿨리주마브, 펙셀리주마브, LDP-01, huA33, WX-G250, 시브로투주마브, 키메릭 KW-2871, hu3S193, huLK26, 비바투주마브, ch14.18, 3F8, BC8, huHMF1, MORAb-003, MORAb-004, MORAb-009, 데노수마브, PRO-140, 1D09C3, 휴믹베타-1, NI-0401, NI-501, 켈투주마브, HuN901, 8H9, chTNT-1/B, 바비톡시마브, huJ591, HeFi-1, 펜타세아™, 아바코보마브, 토시투모마브, 105AD7, GMA161 및 GMA321.
- <333> 실시양태 94. 실시양태 89 또는 90에 있어서, Fc 변이체 단백질이 하기 임상 제품 또는 후보물질로 구성된 군으로부터 선택되는 임상 제품 또는 후보물질과 동일한 항원에의 결합에 대해 경쟁하는 것인 액체 제제: 리툽시마브, 자놀리무마브, hA20, AME-I33, HumaLYM™, 트라스투주마브, 퍼투주마브, 세툽시마브, IMC-3G3, 패니투무마브, 잘루투무마브, 니모투주마브, 마투주마브, ch806, KSB-102, MR1-1, SC100, SC101, SC103, 알렘투주마브, 무로모나브-CD3, OKT4A, 이브리투모마브, 켈투주마브, 알레페셉트, 애브식시마브, 바실릭시마브, 팔리비주마브, 모타비주마브, 인플릭시마브, 아달리무마브, CDP-571, 에타네르셉트, ABX-CBL, ABX-IL8, ABX-MA1 켈투모마브, 테렉스, AS1405, 나탈리주마브, HuBC-1, 나탈리주마브, IDEC-131, VLA-1, CAT-152, J695, CAT-192, CAT-213, BR3-Fc, 림포스타트-B™, TRAIL-R1mAb, 베바시주마브, 래니비주마브, 오말리주마브, 에팔리주마브, MLN-02, 자놀리무마브, 휴맥스-IL15, 휴맥스-인플렘, 휴맥스-캔서, 휴맥스-림포마, 휴맥스-TAC, 클레놀릭시마브, 루밀릭시마브, BEC2, IMC-1C11, DC101, 라베투주마브, 아르시투모마브, 에프라투주마브, 태캐투주마브, 마이엘로마사이드™, 르코사이드™, 프로스타사이드™, 이필리무마브, MDX-060, MDX-070, MDX-018, MDX-1106, MDX-1103, MDX-1333, MDX-214, MDX-1100, MDX-CD4, MDX-1388, MDX-066, MDX-1307, HGS-TR2J, FG-3019, BMS-66513, SGN-30, SGN-40, 토실리주마브, CS-1008, IDM-1, 골리무마브, CNTO 1275, CNTO 95, CNTO 328, 메폴리주마브, MOR101, MOR102, MOR201, 비실리주마브, HuZAF™, 볼로식스마브, ING-1, MLN2201, 다클리주마브, HCD122, CDP860, PRO542, C14, 오레고보마브, 에드레콜로마브, 에타라시주마브, 시플리주마브, 린투주마브, Hu1D10, Lym-1, 에팔리주마브, ICM3, 갈릭시마브, 에쿨리주마브, 펙셀리주마브, LDP-01, huA33, WX-G250, 시브로투주마브, 키메릭 KW-2871, hu3S193, huLK26, 비바투주마브, ch14.18, 3F8, BC8, huHMF1, MORAb-003, MORAb-004, MORAb-009, 데노수마브, PRO-140, 1D09C3, 휴믹베타-1, NI-0401, NI-501, 켈투주마브, HuN901, 8H9, chTNT-1/B, 바비톡시마브, huJ591, HeFi-1, 펜타세아™, 아바코보마브, 토시투모마브, 105AD7, GMA161 및 GMA321.
- <334> 실시양태 95. 실시양태 89 또는 90에 있어서, Fc 변이체 단백질이 하기 임상 제품 또는 후보물질로 구성된 군으로부터 선택되는 임상 제품 또는 후보물질로부터의 하나 이상의 CDR을 포함하는 것인 액체 제제: 리툽시마브,

자놀리무마브, hA20, AME-I33, HumaLYM™, 트라스투주마브, 퍼투주마브, 세톡시마브, IMC-3G3, 패니투무마브, 잘루투무마브, 니모투주마브, 마투주마브, ch806, KSB-102, MR1-1, SC100, SC101, SC103, 알렘투주마브, 무로 모나브-CD3, OKT4A, 이브리투모마브, 켄투주마브, 알레페셉트, 애브식시마브, 바실릭시마브, 팔리비주마브, 모 타비주마브, 인플릭시마브, 아달리무마브, CDP-571, 에타네르셉트, ABX-CBL, ABX-IL8, ABX-MA1 켄투모마브, 테 렉스, AS1405, 나탈리주마브, HuBC-1, 나탈리주마브, IDEC-131, VLA-1, CAT-152, J695, CAT-192, CAT-213, BR3-Fc, 림포스타트-B™, TRAIL-R1mAb, 베바시주마브, 래니비주마브, 오말리주마브, 에팔리주마브, MLN-02, 자 놀리무마브, 휴맥스-IL15, 휴맥스-인플렘, 휴맥스-캔서, 휴맥스-림포마, 휴맥스-TAC, 클레놀릭시마브, 루밀릭시 마브, BEC2, IMC-1C11, DC101, 라베투주마브, 아르시투모마브, 에프라투주마브, 태케투주마브, 마이엘로마사이 드™, 르코사이드™, 프로스타사이드™, 이필리무마브, MDX-060, MDX-070, MDX-018, MDX-1106, MDX-1103, MDX- 1333, MDX-214, MDX-1100, MDX-CD4, MDX-1388, MDX-066, MDX-1307, HGS-TR2J, FG-3019, BMS-66513, SGN-30, SGN-40, 토실리주마브, CS-1008, IDM-1, 골리무마브, CNTO 1275, CNTO 95, CNTO 328, 메폴리주마브, MOR101, MOR102, MOR201, 비실리주마브, HuZAF™, 볼로식스마브, ING-1, MLN2201, 다클리주마브, HCD122, CDP860, PRO542, C14, 오레고보마브, 에드레콜로마브, 에타라시주마브, 시폴리주마브, 린투주마브, Hu1D10, Lym-1, 에팔 리주마브, ICM3, 갈릭시마브, 에콜리주마브, 펙셀리주마브, LDP-01, huA33, WX-G250, 시브로투주마브, 키메릭 KW-2871, hu3S193, huLK26, 비바투주마브, ch14.18, 3F8, BC8, huHMF1, MORAb-003, MORAb-004, MORAb-009, 데노수마브, PRO-140, 1D09C3, 휴믹베타-1, NI-0401, NI-501, 켄투주마브, HuN901, 8H9, chTNT-1/B, 바비톡시 마브, huJ591, HeFi-1, 펜타세아™, 아바코보마브, 토시투모마브, 105AD7, GMA161 및 GMA321.

<335> 실시양태 96. 실시양태 77 내지 86 중 임의의 실시양태에 있어서, Fc 변이체 단백질이 천연 발생 Fc 영역을 가 진다는 점을 제외하고 동일한 아미노산 서열을 가지는 단백질에 비해 Fc 수용체에의 증가된 결합을 가지는 Fc 영역을 포함하는 것인 액체 제제.

<336> 실시양태 97. 실시양태 96에 있어서, Fc 수용체가 Fc  $\gamma$ RIIIA인 액체 제제.

<337> 실시양태 98. 실시양태 96에 있어서, Fc 수용체가 FcRn인 액체 제제.

<338> 실시양태 99. 실시양태 77 내지 86 중 임의의 실시양태에 있어서, Fc 변이체 단백질이 천연 발생 Fc 영역을 가 진다는 점을 제외하고 동일한 아미노산 서열을 가지는 단백질에 비해 증가된 ADCC 활성을 가지는 Fc 영역을 포 함하는 것인 액체 제제.

<339> 실시양태 100. 실시양태 77 내지 86 중 임의의 실시양태에 있어서, Fc 변이체 단백질이 천연 발생 Fc 영역을 가 진다는 점을 제외하고 동일한 아미노산 서열을 가지는 단백질에 비해 증가된 혈청 반감기를 가지는 Fc 영역을 포함하는 것인 액체 제제.

<340> 실시양태 101. 실시양태 77 내지 86 중 임의의 실시양태에 있어서, Fc 변이체 단백질이 카바트에 기재된 EU 인 텍스에 의한 넘버링 시 222, 224, 234, 235, 236, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 248, 252, 254, 256, 258, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 272, 274, 275, 278, 279, 280, 282, 290, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 332, 333, 334, 335, 339, 359, 360, 372, 377, 379, 396, 398, 400, 401, 430 및 436번 위치로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 위치에서 하나 이상의 비천 연 발생 아미노산 잔기를 가지는 Fc 영역 포함하는 것인 액체 제제.

<341> 실시양태 102. 실시양태 77 내지 86 중 임의의 실시양태에 있어서, Fc 변이체 단백질이 카바트에 기재된 EU 인 텍스에 의한 넘버링 시 222N, 224L, 234D, 234E, 234N, 234Q, 234T, 234H, 234Y, 234I, 234V, 234F, 235A, 235D, 235R, 235W, 235P, 235S, 235N, 235Q, 235T, 235H, 235Y, 235I, 235V, 235F, 236E, 239D, 239E, 239N, 239Q, 239F, 239T, 239H, 239Y, 240I, 240A, 240T, 240M, 241W, 241L, 241Y, 241E, 241R, 243W, 243L, 243Y, 243R, 243Q, 244H, 245A, 247V, 247G, 248M, 252Y, 254T, 256E, 258D, 262I, 262A, 262T, 262E, 263I, 263A, 263T, 263M, 264L, 264I, 264W, 264T, 264R, 264F, 264M, 264Y, 264E, 265G, 265N, 265Q, 265Y, 265F, 265V, 265I, 265L, 265H, 265T, 266I, 266A, 266T, 266M, 267Q, 267L, 268D, 268N, 269H, 269Y, 269F, 269R, 296E, 272Y, 274E, 274R, 274T, 275Y, 278T, 279L, 280H, 280Q, 280Y, 282M, 290G, 290S, 290T, 290Y, 294N, 295K, 296Q, 296D, 296N, 296S, 296T, 296L, 296I, 296H, 296G, 297S, 297D, 297E, 298H, 298I, 298T, 298F, 299I, 299L, 299A, 299S, 299V, 299H, 299F, 299E, 300I, 300L, 312A, 313F, 318A, 318V, 320A, 320M, 325Q, 325L, 325I, 325D, 325E, 325A, 325T, 325V, 325H, 327G, 327W, 327N, 327L, 328S, 328M, 328D, 328E, 328N, 328Q, 328F, 328I, 328V, 328T, 328H, 328A, 329F, 329H, 329Q, 330K, 330G, 330T, 330C, 330L, 330Y, 330V, 330I, 330F, 330R, 330H, 332D, 332S, 332W, 332F, 332E, 332N, 332Q, 332T, 332H, 332Y, 332A, 335A, 335T, 335N, 335R, 335Y, 339T, 359A, 360A, 372Y, 377F, 379M, 396H, 396L, 398V, 400P, 401V 및 430A로 구성된 군으로부터

터 선택되는 하나 이상의 비천연 발생 아미노산 잔기를 가지는 Fc 영역을 포함하는 것인 액체 제제.

- <342> 실시양태 103. 실시양태 101에 있어서, Fc 영역이 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 239, 330 및 332번 위치로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 위치에서 비천연 발생 아미노산을 포함하는 것인 액체 제제.
- <343> 실시양태 104. 실시양태 102에 있어서, 하나 이상의 비천연 발생 아미노산 잔기가 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 239D, 330L, 330Y 및 332E로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 액체 제제.
- <344> 실시양태 105. 실시양태 102에 있어서, Fc 영역이 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 비천연 발생 아미노산 239D, 330L 및 332E를 포함하는 것인 액체 제제.
- <345> 실시양태 106. 실시양태 102에 있어서, Fc 영역이 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 비천연 발생 아미노산 239D, 330Y 및 332E를 포함하는 것인 액체 제제.
- <346> 실시양태 107. 실시양태 102에 있어서, Fc 영역이 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 비천연 발생 아미노산 332E를 포함하는 것인 액체 제제.
- <347> 실시양태 108. 실시양태 101에 있어서, Fc 영역이 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 252, 254 및 256번 위치로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 위치에서 비천연 발생 아미노산을 추가로 포함하는 것인 액체 제제.
- <348> 실시양태 109. 실시양태 102에 있어서, 하나 이상의 위치에서 비천연 발생 아미노산이 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 252Y, 254T 및 256E로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 액체 제제.

## 실시예

- <349> 이하, 본 발명은 하기 실시예와 관련하여 기재된다.
- <350> 본 실시예는 설명을 위한 것일 뿐 본 발명이 본 실시예로 한정되는 것으로 해석되지 않아야 하고, 오히려 본 발명이 본 명세서에 제공된 교시의 결과로서 자명하게 되는 임의의 모든 변경을 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

### 1. 실시예 1

#### Fc 변이체의 안정성 분석

- <353> 항-EphA2 항체의 2개 Fc 변이체("Medi3"으로 명명됨, 가변 영역에 대해서는 도 1a-b를 참조하고, 서열번호에 대해서는 표 2를 참조함)를 발생시켰다. 변이체 1("Medi3-V1"로 명명됨)은 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 잔기 332에서 글루타메이트를 가지며 Medi3보다 8.8배 더 높은 Fc $\gamma$ RIIIA에 대한 결합 친화성을 가진다. 변이체 2("Medi3-V3"으로 명명됨)는 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 잔기 239에서 아스파르트레이트, 잔기 330에서 류신 및 잔기 332에서 글루타메이트를 가지며 Medi3보다 거의 100배 더 높은 Fc $\gamma$ RIIIA에 대한 결합 친화성을 가진다(테이타는 나타나지 않음). 또한, Medi3-V1 및 Medi3-V3은 야생형 Medi3에 비해 더 높은 ADCC 활성을 가지며, 상대적 ADCC 활성은 Medi3-3V>Medi3-1V>Medi3이었다(테이타는 나타나지 않음). 상이한 가변 영역을 가지는 야생형 Medi3 항체 및 Fc 변이체뿐만 아니라 제2 야생형 항-인테그린  $\alpha v \beta 3$  항체("Medi2"로 명명됨, 가변 영역에 대해서는 도 1c-d를 참조하고, 서열번호에 대해서는 표 2를 참조함)를 pH 6.0의 10 mM 히스티딘 완충제 중에 100 mg/ml 농도로 제제화하였고, 샘플을 40℃에서 저장한 경우 3개월의 기간에 걸쳐 UV 검출을 이용한 크기 배제 크로마토그래피로 분석하였다. 별법으로, 상기 항체 제제를 후술된 것과 같은 모세관 겔 전기영동 방법으로 항체 응집물 및/또는 단편의 존재에 대해 분석하였다. 추가로, 발생된 물질은 후술된 것과 같은 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 방법을 이용하여 분석하여 순도, 응집물-공유결합 또는 비공유결합의 성질 및 임의의 단편의 존재/부재에 대해 모니터링할 수 있다. 시간에 따라 작도된 제제 중에서 존재하는 단량체의 비율은 도 2a에 나타나 있다. 존재하는 단량체 양의 감소는 제제 중의 항체의 응집과 상관관계를 가지며 감소된 안정성을 표시한다. 야생형 항체 제제 및 Medi3-V1 제제 둘다에 존재하는 단량체의 양은 3개월의 기간에 걸쳐 15% 미만의 감소를 보여주면서 유사하였다. 대조적으로, Medi3-V3 제제 중의 단량체의 비율은 15일 직후 ~40%까지 떨어졌다. 이것은 Medi3-V3 항체가 WT 버전(Medi3) 및 관련없는 항체(Medi2)의 WT 버전에 비해 제제화되었을 때 불안정하다는 것을 의미한다.

- <354> 거의 또는 전혀 응집을 갖지 않는 Medi3-V3 용액을 비-환원 조건 하에 SDS-PAGE로 조사하여 주로 단일 단량체 밴드로서 런닝한다는 것을 발견하였다(도 2b, 라인 4). 유사하게, (SEC에 의한 측정 시) ~30% 응집물을 가지는

용액(데이터는 나타나지 않음)도 이 조건 하에 주로 단량체 밴드로서 런닝한다는 것이 밝혀졌는데(도 2b, 라인 5), 이것은 응집물이 성질 면에서 공유결합성이 아니고 응집이 가역적일 수 있음을 의미한다. SEC 분석을 이용하여 농축된 항체를 40℃에서 항온처리함으로써 형성된 응집물의 가역성을 조사하였다. 80 mg/ml 용액 중에서 40℃에서 형성된 % 응집물에서의 ~2% 감소는 4℃에서 16시간에 걸쳐 항온처리한 경우 관찰되었다(도 2c, 삼각형 참조). 상기 용액이 10 mg/ml로 먼저 희석된 후 4℃에서 항온처리된 경우 유사한 감소가 관찰되었지만(도 2c, 사각형), 조사한 최초 시점(4시간)에서의 % 응집은 희석되지 않은 항체 용액에 비해 이미 감소되어 있었다(삼각형과 사각형을 비교함). % 응집물에서의 큰 초기 감소(~3%)는 응집된 항체 용액이 20 mM 시트레이트를 포함하는 완충제 중에 10 mg/ml까지 희석된 경우 4℃에서 6시간 후에 관찰되었고, % 응집물은 4℃에서 더 오래 항온처리하였을 때 계속 감소되었다(도 2c, 다이아몬드). 이 데이터를 모두는 Medi3-V3의 응집이 비-공유결합적이며 특정 항온처리 조건 하에서 다소 가역적일 수 있음을 의미한다.

<355>

Medi3-V3의 안정성을 감소시키는 데 있어서 변이체 Fc 영역의 역할을 더 조사하기 위해, 카바트에 기재된 EU 인덱스에 의한 넘버링 시 잔기 239에서 아스파르테이트, 잔기 330에서 류신 및 잔기 332에서 글루타메이트를 가지는, Medi2 항체의 "V3" Fc 변이체 또한 발생시켰다("Medi2-V3"으로 명명됨). Medi2-V3과 마찬가지로, Medi2-V3은 Medi2보다 78배 더 높은 FcγRIIIA에 대한 훨씬 더 높은 결합 친화성 및 더 높은 ADCC 활성을 갖는다(데이터는 나타나지 않음). pH 6.0의 10 mM 히스티딘 완충제 중에 80 mg/ml의 농도로 제제화되고 40℃에 저장된 Medi2-V3의 안정성은 24시간의 기간에 걸쳐 UV 검출을 이용한 크기 배제 크로마토그래피로 분석하였다. 시간에 따라 작도된 제제 중에서 존재하는 단량체의 비율은 도 2d에 나타나 있다. 용액 중에 존재하는 단량체의 비율은 4일 직후 20.7%까지 떨어진 반면, Medi2(WT) 단량체의 농도는 2.5개월 단지 약 9.0%까지 떨어졌다.

<356>

항체 안정성을 감소시키는 데 있어서 변이체 Fc 영역의 역할의 특징을 규명하기 위해, 시차 주사 열량측정(DSC)을 이용하여 Medi3 및 2개의 Fc 변이체의 용융 곡선을 조사하였다(도 3). 이전 연구들은 이 곡선에서의 가장 큰 피크가 가변 도메인의 용융에 의해 발생하는 것이므로, Medi3 및 상기 변이체 둘다의 가변 도메인들 모두가 ~72℃의 용점(T<sub>m</sub>)을 가진다는 것을 입증하였다. 나타나지 않은 연구에서, 야생형 Fc 영역, 구체적으로 C<sub>H</sub><sup>2</sup> 도메인의 T<sub>m</sub>은 ~69℃로 측정되었고, Medi3의 Fc 영역의 구별되는 피크는 가변 영역의 용융에 의해 발생된 곡선과의 중첩으로 인해 관찰될 수 없다. 그러나, 상기 피크는 Fc 변이체 둘다에 대해 관찰될 수 있다. Fc 변이체의 T<sub>m</sub>은 Medi3-V1의 경우 ~59℃로 떨어졌고, Medi3-V3의 경우 단지 ~49℃까지의 추가 감소가 관찰된다. 이 결과 모두는 변이체 Fc 영역, 특히 C<sub>H</sub><sup>2</sup> 도메인이 부분적으로 변이체 Fc 영역에 대한 T<sub>m</sub>에서의 감소로 인한 Medi3-V3 및 Medi2-V3 Fc 변이체의 증가된 응집의 주된 원인임을 입증한다.

## 표 2

<357>

설명	서열번호
항-EphA2 항체 Medi3 중쇄 가변 영역(뉴클레오티드)	1
항-EphA2 항체 Medi3 중쇄 가변 영역(아미노산)	2
항-EphA2 항체 Medi3 경쇄 가변 영역(뉴클레오티드)	3
항-EphA2 항체 Medi3 경쇄 가변 영역(아미노산)	4
항-인테그린 αvβ3 항체 Medi2 중쇄 가변 영역(뉴클레오티드)	5
항-인테그린 αvβ3 항체 Medi2 중쇄 가변 영역(아미노산)	6
항-인테그린 αvβ3 항체 Medi2 경쇄 가변 영역(뉴클레오티드)	7
항-인테그린 αvβ3 항체 Medi2 경쇄 가변 영역(아미노산)	8
항-EphA2 항체 Medi3 중쇄 CDR1	9
항-EphA2 항체 Medi3 중쇄 CDR2	10
항-EphA2 항체 Medi3 중쇄 CDR3	11
항-EphA2 항체 Medi3 경쇄 CDR1	12
항-EphA2 항체 Medi3 경쇄 CDR2	13
항-EphA2 항체 Medi3 경쇄 CDR3	14
항-인테그린 αvβ3 항체 Medi2 중쇄 CDR1	15
항-인테그린 αvβ3 항체 Medi2 중쇄 CDR2	16
항-인테그린 αvβ3 항체 Medi2 중쇄 CDR3	17
항-인테그린 αvβ3 항체 Medi2 경쇄 CDR1	18
항-인테그린 αvβ3 항체 Medi2 경쇄 CDR2	19

항-인테그린 $\alpha v \beta 3$ 항체 Medi2 경쇄 CDR3	20
--	----

<358>

## 1.1. 방법

<359>

크기 배제 크로마토그래피(SEC): 크기 배제 크로마토그래피를 수행하여 항체 응집물 및 단편의 존재에 대한 항체 제제를 분석하였다. 시험 샘플을 크기 배제 G3000 SW<sub>XL</sub> 컬럼(5  $\mu$ m, 300Å, 7.8 × 300 mm, TosohHaas) 상에 주입하였다. 이동상은 1.0 ml/분의 유속으로 등용리적으로 런닝하는 0.1 M 인산이나트륨, 0.1 M 황산나트륨 및 0.05% 소듐 아지드(pH 6.8)이었다. 용출된 단백질은 280 nm에서의 UV 흡광도로 검출하고 추가 특징규명을 위해 수집하였다. 검출된 임의의 단백질 종의 상대적 양은 초기에 포함된 부피 피크를 제외한 모든 다른 검출된 피크의 총 면적에 비해 생성물 피크의 면적 비율(%)로서 보고되었다. 항체 단량체 피크보다 더 일찍 용출되는 피크는 응집물 백분위수로 기록되었지만, 항체 단량체 피크보다 더 늦게 용출되지만 완충제 피크보다 더 일찍 용출되는 피크는 단편 백분위수로 기록되었다.

<360>

소듐 도데실 설페이트를 사용한 모세관 겔 전기영동(CGE-SDS): CGE-SDS를 내경이 50  $\mu$ m이고 총 길이가 38.5 cm 인 연장된 광 경로 모세관(Agilent Technologies)에서 수행한다. 휴렛 팩커드 3D-모세관 전기영동 유닛을 사용하여 분석을 수행한다. UV 검출은 220 nm에서 수행한다. **시약**-SDS 샘플 완충제, SDS 런닝 완충제 및 2-머캅토에탄올을 시판 공급사로부터 구입할 수 있다. **샘플 제조**. 샘플을 물 중에 2.5 mg/ml까지 희석한다. 환원된 샘플의 경우, 80  $\mu$ l의 희석된 항체를 100  $\mu$ l의 CE-SDS 샘플 완충제 및 20  $\mu$ l의 순수한 2-머캅토에탄올과 혼합한다. 비환원된 샘플의 경우, 20  $\mu$ l의 2-머캅토에탄올을 물로 교체한다. 환원된 샘플은 끓는 수조에서 10분 동안 항온 처리한다. 비환원된 샘플은 가열하지 않는다. **CE 분석**. 주입 전에, 상기 모세관을 0.1 M NaOH, 0.1 M HCl 및 SDS 런닝 완충제로 각각 3분, 3분 및 8분 동안 린싱한다. 샘플을 -10 kV에서 40초 동안 전기영동적으로 주입한다. CE 분석은 음성 극성 모드(-15 kV)에서 수행한다. 수득된 전형적인 전류는 ~20  $\mu$ A이다. 모세관 온도는 50 °C로 유지하고 샘플은 주위 온도에 둔다.

<361>

폴리아크릴아미드 겔 전기영동: 4-12% 비스-트리스를 함유하는 NuPAGE 겔(Invitrogen)을 사용한다. 분석은 환원 조건(70°C에서 10분 동안 가열) 및 비-환원 조건(가열 없음) 하에서 샘플을 런닝하는 것을 포함한다. NR 샘플의 경우 - 5 mg/ml 농도의 샘플 5 $\mu$ l, 역 삼투 탈이온(RODI) 수 60  $\mu$ l, 샘플 완충제 25  $\mu$ l(총 부피 = 90  $\mu$ l). 이어서, RODI 수 10  $\mu$ l를 상기 샘플에 첨가하여 샘플의 총 부피가 100  $\mu$ l가 되게 한다. R 샘플의 경우 - 5 mg/ml 농도의 샘플 5 $\mu$ l, RODI 수 60  $\mu$ l, 샘플 완충제 25  $\mu$ l(총 부피 = 90  $\mu$ l). 이어서, 환원제 10  $\mu$ l를 상기 샘플에 첨가하여 샘플의 총 부피가 100  $\mu$ l가 되게 한다. 그 다음, 이 샘플들을 70°C로 10분 동안 가열한다. 웰 당 샘플 15  $\mu$ l를 로딩한다. 겔을 200 V에서 1× MES 런닝 완충제 중에서 35분 동안 런닝한다. 황산화제 500  $\mu$ l를 환원된 겔의 내부 챔버에 첨가한다. 전기영동 마커(예컨대, 컬러 버스트, 시그마)를 사용하여 넓은 범위, 즉 220 kDa 내지 8 kDa를 커버한다. 예를 들면, 겔을 심플리 블루 세이프 스테인(Simply Blue Safe Stain)으로 염색하고 예를 들면, 겔-건조 용액으로 보존한다.

<362>

시차 주사 열량측정(DSC): 1.0°C/분의 스캔 속도 및 10-110°C 또는 25-120°C의 온도를 이용하여 VP-DSC(MicroCal, LLC)로 열적 용점(T<sub>m</sub>)을 측정하였다. 8초의 여과 시간을 5분의 예비-스캔 온도조절과 함께 이용하였다. 샘플을 pH 6의 10 mM 히스티딘-HCl 내로의 투석으로 준비하거나 제제 내로의 투석(예컨대, 피어스 투석 컵(3.5 kDa))으로 준비하였다. 평균 mAb 농도는 A<sub>280</sub>에 의한 측정 시 50  $\mu$ g/ml이었다. 용점은 시스템과 함께 공급된 오리진(Origin) 소프트웨어를 사용하여 제조자의 방법에 따라 측정하였다. 요약하면, 다수의 기준치를 샘플 셀 및 기준 셀 둘다에서 완충제와 함께 런닝하여 열적 평형을 확립하였다. 기준치를 샘플 열분석도로부터 차감한 후, 데이터를 농도 표준화하고 역함수(deconvolution function)를 사용하여 피팅하였다. T<sub>m</sub>은 수득된 열분석도에서 열 용량의 흡열 피크 최대치에서 보고된다.

<363>

## 2. 실시예 2

<364>

### Fc 변이체 안정성에 대한 농도 및 온도의 효과

<365>

40°C에서 저장된 경우 여러 상이한 농도(10, 50 및 100 mg/ml)에서 pH 6.0의 10 mM 히스티딘 완충제 중에 제제화된 Medi3-V3의 안정성을 UV 검출을 이용한 크기 배제 크로마토그래피(전술한 바와 같음)로 37일의 기간에 걸쳐 분석하였고, 상기 제제에 존재하는 단량체의 비율(%)을 시간에 따라 작도하였다(도 4). 10 mg/ml 용액에 존재하는 단량체 비율(%)은 37일째 날에 약 4.4%까지만 감소하였지만, 50 mg/ml 및 100 mg/ml 용액은 14일 직후에 각각 약 14% 및 37.5%의 감소를 보였는데, 이것은 응집이 고농도 용액 중에서 증가한다는 것을 의미한다.

- <366> pH 6.0의 10 mM 히스티딘 완충제 중에 제제화되어 여러 상이한 온도(4, 25 및 40℃)에서 저장된 Medi3-V3의 안정성을 UV 검출을 이용한 크기 배제 크로마토그래피로 30일의 기간에 걸쳐 분석하였고, 상기 제제에 존재하는 단량체의 비율(%)을 시간에 따라 작도하였다(도 5). 4℃ 및 25℃에서 저장된 용액에 존재하는 단량체 비율(%)은 30일 후 각각 0.3% 및 1.0%까지 감소하였지만, 40℃에서 저장된 용액 중의 단량체 비율(%)은 15일 직후 약 37%까지 감소하였다.
- <367> 이 데이터는 "V3" 변이체가 보다 낮은 농도 및/또는 보다 낮은 온도에서 보다 안정하지만, pH 6.0의 10 mM 히스티딘 완충제 중의 V3 항체의 전체적인 안정성이 고농도 항체 제제의 생성 및 완성에 최적이지 아니라는 것을 의미한다.
- <368> **3. 실시예 3**
- <369> **완충제 제제의 신속 스크린(Fast Screen) 분석**
- <370> "신속 스크린" 분석 방법은 V3 변이체의 안정성을 개선시키는 제제에 대해 상당수의 상이한 완충제 제제를 신속히 스크리닝하기 위해 개발되었다. 요약하면, pH 6.0의 10 mM 히스티딘 완충제 중의 Medi3-V3의 100 mg/ml 용액을 단일클론 항체(mAb) 저장 용액으로서 사용하였다. 상기 방법은 mAb 저장 용액의 분취액 내로 20% 부피의 양으로 첨가되는 농축된 부형제 용액을 사용한다. 부형제를 스파이킹한 후, 단백질 농도는 80 mg/ml이었다. mAb 용액을 함유하는 이 부형제를 40℃에서 4-24시간 동안 항온처리하였고 응집물 함량을 SEC(전술한 바와 같음)로 측정하였다. "순도 손실률(%)"(응집물 비율(%)의 증가와 사실상 동일함)을 부형제에 의해 부가된 안정화를 비교하기 위한 척도로서 사용하였다. 일련의 부형제들을 후술하는 바와 같이 이 분석법을 이용하여 스크리닝하였다.
- <371> **3.1. 당 및 아르기닌**
- <372> 10% 수크로스, 10% 트레할로스 및 200 mM L-아르기닌 각각은 7시간의 항온처리에 걸쳐 대조군(pH 6.0의 10 mM 히스티딘 완충제)에서 약 9%부터 2% 미만까지 순도 손실률을 감소시키는 유의한 안정화를 제공하였다(도 6). 수크로스 및 트레할로스의 효과는 다양한 농도에서 비교하였다. 24시간의 항온처리 기간에 걸친 순도 손실률은 대조군에서 약 19%이었고 각각 1%, 5% 및 10% 당을 함유하는 샘플에서는 약 16%, 9% 및 3%이었다(도 7a). 이 당들 중 어느 한 당의 농도 증가는 안정화를 증가시켰고, 이 두 가지 당들 모두 거의 동일한 안정화 효과를 나타내었는데, 이것은 이들이 상호교환가능할 수 있음을 의미한다.
- <373> 유사하게, 트레할로스 및 만니톨의 50 mg/ml 항체 용액(pH 6의 20 mM 히스티딘 완충제)에 대한 안정화 효과를 다양한 농도(5%-20%)에서 비교하였다. 샘플을 40℃에서 1일 동안 항온처리하였고, 순도 손실률을 SEC(전술한 바와 같음)로 측정하였다. 24시간의 항온처리 기간에 걸친 순도 손실률은 대조군에서 약 8.4%이었고 각각 5%, 10% 및 20% 당을 함유하는 샘플에서는 약 4%, 2% 및 0.6%이었다(도 7b). 앞서 관찰된 바와 같이, 이 당들 중 어느 한 당의 농도 증가는 안정화를 증가시켰고, 세 가지 당들 모두 5-10%에서 거의 동일한 안정화 효과를 나타내었는데, 이것은 이들 세 가지 당들이 상호교환가능할 수 있음을 의미한다. 트레할로스만이 20% 초과 농도에서 시험되었지만, 안정성에서의 유사한 개선이 시험된 당들 중 임의의 당에서 기대될 것이다.
- <374> **3.2. 아미노산, 음이온성 중 및 킬레이팅제**
- <375> L-아르기닌 및 여러 추가 아미노산들을 음이온성 종인 시트레이트와 함께 50 mM, 200 mM 및 400 mM에서 시험하였다. 또한, 킬레이팅제 DTPA를 50 mM에서 시험하였다. 도 8a에 나타난 바와 같이, 아르기닌, 리신 및 시트레이트 각각은 24시간의 항온처리에 걸쳐 대조군(pH 6.0의 10 mM 히스티딘 완충제)에서 19%부터 200 mM 내지 400 mM의 농도에서 4% 이하까지 순도 손실률을 감소시키는 유의한 안정화를 제공하였다. 글리신은 200 mM 내지 400 mM의 농도에서 약 9% 이하까지 순도 손실률을 감소시켜 다소 덜 효과적이었다. 상대적인 순위는 시트레이트>리신>아르기닌>글리신인 것으로 관찰되었는데, 이때 ">"는 "보다 더 높은 안정화 효과를 나타냄"을 의미하는 데 사용된다. DTPA는 임의의 효과를 나타내지 않는 것으로 관찰되었지만, 시스테인은 응집물에서의 유의한 증가를 초래하였다(하기 실시예 7 참조).
- <376> **3.3. 수크로스와 L-아르기닌의 조합 효과**
- <377> 5% 수크로스 단독이 24시간의 항온처리에 걸쳐 대조군(pH 6.0의 10 mM 히스티딘 완충제)에서 약 19%부터 약 9%까지 순도 손실률을 감소시켰지만, 200 mM L-아르기닌은 약 3.5%까지 순도 손실률을 감소시켰다(도 9). 그러나, 5% 수크로스와 200 mM L-아르기닌의 조합물은 개별적으로 단지 1.5%까지 순도 손실률을 감소시키는 각각의 성분들보다 훨씬 더 효과적이었다(도 9).

<378>

### 3.4. 분자의 여러 클래스의 추가 구성원들

<379>

상기 시험된 부형제에 대해 자세히 연구하기 위해, 분자의 각각의 클래스의 여러 추가 구성원들을 조사하였다. 추가로, 분자의 여러 추가 클래스들을 시험하였다. 샘플을 40℃에서 19시간 동안 항온처리하고 순도 손실률을 SEC(전술한 바와 같음)로 측정하였다. 트레할로스는 10%에서 다시 시험되었고 19시간의 항온처리에 걸쳐 대조군(pH 6.0의 10 mM 히스티딘 완충제)에서 약 22%부터 약 5.4%까지 순도 손실률을 감소시키는 것으로 밝혀졌다(도 10).

<380>

음이온성 분자인 시트레이트, 아스파르테이트, 석시네이트, 글루타메이트, 아세테이트, 포스페이트 및 셀페이트는 각각 약 2%, 10%, 6%, 9%, 11%, <1% 및 10%까지 순도 손실률을 감소시켜 안정성에 대해 중간 정도 내지 강한 정도의 효과를 주는 것으로 밝혀졌다(도 10). 상대적인 순위는 포스페이트>시트레이트>석시네이트>다른 음이온 예컨대, 아스파르테이트, 글루타메이트, 아세테이트 & 셀페이트인 것으로 관찰되었고, 이때 ">"는 "보다 더 높은 안정화 효과를 나타냄"을 의미하는 데 사용된다.

<381>

양이온성 아미노산인 리신, 아르기닌 및 히스티딘 각각은 약 16%까지 순도 손실률을 감소시켜 50 mM에서 약한 안정화 효과를 나타내었다(도 10). 친수성 아미노산인 세린 및 소수성 아미노산인 페닐알라닌 및 알라닌은 50 mM에서 안정성에 대한 약한 영향 또는 심지어 악영향을 주었다. 세린 및 알라닌은 각각 약 17% 및 18%까지 순도 손실률을 중간 정도로 감소시키는 것으로 밝혀졌지만, 페닐알라닌은 26%까지 순도 손실률을 증가시켰다(도 10a).

<382>

상기 결과에 기초하여, 시트레이트, 아르기닌 및 포스페이트의 효과는 100 mM, 200 mM 및 300 mM 농도에서도 시험하였다. 이 실험에서, 최종 항체 농도는 pH 6.0의 25 mM 히스티딘 완충제 단독 또는 시트레이트, 아르기닌 또는 포스페이트를 표시된 농도로 함유하는 pH 6.0의 25 mM 히스티딘 완충제 중에서 50 mg/ml이었고, 샘플은 40℃에서 1일 동안 항온처리하였고, 순도 손실률을 SEC(전술한 바와 같음)로 측정하였다. 100 mM에서, 시트레이트 및 포스페이트는 각각 약 8.4% 내지 ~1.4% 및 ~1.8%까지 순도 손실률을 감소시켰지만, 아르기닌만이 ~6.0%까지 순도 손실률을 감소시켰다. 200 mM 및 300 mM에서, 시트레이트 및 포스페이트는 각각 약 8.4% 내지 ~0.8% 및 ~1.0%까지 순도 손실률을 감소시켰지만, 아르기닌만이 ~4.8%까지 순도 손실률을 감소시켰다(도 10b).

<383>

킬레이팅제 EDTA 및 DTPA는 순도 손실률에 대한 영향을 거의 또는 전혀 주지 않았다. EDTA 또는 DTPA를 함유하는 샘플은 대조군(pH 6.0의 10 mM 히스티딘 완충제)에서 약 22%인 것에 비해 각각 약 20% 및 24%의 순도 손실률을 나타내었다(도 10a).

<384>

### 3.5. 트레할로스와 양이온성 아미노산 또는 시트레이트의 조합 효과

<385>

50 mM 아르기닌, 리신 또는 시트레이트의 효과를 단독으로 또는 5% 트레할로스와 함께 시험하였다. 샘플을 40℃에서 19시간 동안 항온처리하였고, 순도 손실률을 SEC(전술한 바와 같음)로 측정하였다. 부형제 단독은 이전에 관찰된 대조군(pH 6.0의 10 mM 히스티딘 완충제)에 비해 순도 손실률에서 유사한 감소를 보였다(도 10a와 도 11a의 진한 막대를 비교함). 5% 트레할로스와 50 mM의 리신 또는 아르기닌의 조합은 19시간의 항온처리에 걸쳐 대조군(pH 6.0의 10 mM 히스티딘 완충제)에서 약 22%부터 약 7%까지 순도 손실률을 감소시키는 트레할로스 단독에 비해 유의한 조합 효과를 나타내지 않았다(도 11a). 리신 및 아르기닌 둘다 보다 높은 농도에서 안정화시켰기 때문에(도 8 참조), 보다 높은 농도는 트레할로스와 조합될 때 안정성을 현저히 개선시킬 것이다. 50 mM 시트레이트와 5% 트레할로스의 조합은 트레할로스 단독의 경우 ~7% 또는 시트레이트 단독의 경우 ~2%에 비해 약 1%까지 순도 손실률을 감소시키는 강한 조합 효과를 나타내었다.

<386>

트레할로스 또는 만니톨과 조합된 포스페이트 또는 시트레이트의 효과를 보다 높은 농도 범위에 걸쳐 조사하였다(도 11b). 이 실험의 경우, 안정한 야생형 Medi2 항체(부형제를 함유하지 않는 pH 6.0의 10 mM 히스티딘 완충제 중의 50 mg/ml)는 대조군으로 사용되었고, Medi3-V3은 pH 6.0에서 5, 10 또는 20% 트레할로스 또는 만니톨과 조합된 100, 200 또는 300 mM 포스페이트 또는 시트레이트를 함유하는 pH 6.0의 25 mM 히스티딘 완충제 중에 50 mg/ml의 최종 농도로 제제화되었다. 샘플을 40℃에서 1주일 동안 항온처리하고 순도 손실률을 전술한 바와 같이 HPLC-SEC로 측정하였다. 제제 각각에 대한 순도 손실률은 도 11b에 작도되었고 하기 표 3에 요약되어 있다. 안정한 대조군의 경우 순도 손실률은 0.6%이었다. 100 mM 시트레이트, 20% 트레할로스; 100 mM 시트레이트, 20% 만니톨; 및 300 mM 시트레이트, 20% 트레할로스 제제는 안정한 항체에 대해 관찰된 것에 비해 1% 이하의 순도 손실률을 보였다. 여러 다른 제제(예컨대, 100 mM 포스페이트, 20% 트레할로스; 200 mM 포스페이트, 10% 트레할로스; 200 mM 포스페이트, 10% 만니톨; 300 mM 포스페이트, 20% 트레할로스; 300 mM 포스페이트, 20% 만니톨; 100 mM 시트레이트, 20% 만니톨; 200 mM 시트레이트, 10% 트레할로스; 300 mM 시트레이트, 5% 트레할로스; 및

300 mM 시트레이트, 10% 만니톨)는 1% 초과 내지 2% 미만의 순도 손실률을 보였다. 시험된 남은 제제들 모두 2% 이상의 순도 손실률을 보였다.

### 표 3

포스페이이트 또는 시트레이트와 트레할로스 또는 만니톨의 조합 제제에 대한 순도 손실

완충제	당					
	5% 트레할로스	10% 트레할로스	20% 트레할로스	5% 만니톨	10% 만니톨	20% 만니톨
100 mM 포스페이이트	4.5	시험하지 않음	1.2	4.3	시험하지 않음	2.2
200 mM 포스페이이트	시험하지 않음	1.7	시험하지 않음	시험하지 않음	1.7	시험하지 않음
300 mM 포스페이이트	2.2	시험하지 않음	1.3	2.0	시험하지 않음	1.3
100 mM 시트레이트	3.3	시험하지 않음	0.7	2.8	시험하지 않음	1.6
200 mM 시트레이트	시험하지 않음	1.2	시험하지 않음	시험하지 않음	1.0	시험하지 않음
300 mM 시트레이트	1.7	시험하지 않음	0.8	시험하지 않음	1.5	시험하지 않음

### 3.6. 완충제 또는 부형제로서의 시트레이트 및 히스티딘

부형제로서의 시트레이트의 안정화 효과 및 완충제로서의 히스티딘의 안정화 효과를 다음과 같이 조사하였다. 시트레이트를 증가하는 농도(50, 100 및 200 mM)로 pH 6.0의 10 mM 히스티딘 완충제 중의 저장 mAb 용액에 부형제로서 첨가하였다. 시트레이트는 19시간의 항온처리에 걸쳐 대조군(pH 6.0의 10 mM 히스티딘 완충제)에서 ~23%부터 50 mM, 100 mM 및 200 mM에서 각각 ~2.2%, ~1.3% 및 <1%까지 순도 손실률을 감소시키는 것으로 밝혀졌다. 부형제로서의 히스티딘 및 완충제로서의 시트레이트를 시험하기 위해, mAb 용액을 먼저 pH 6.0의 10 mM 시트레이트 완충제 내로 투석하였고, 히스티딘을 25, 50 또는 100 mM의 최종 농도로 첨가하였다. 대조군에서 ~23%부터 25, 50 또는 100 mM에서 각각 ~22%, ~20% 및 ~16%까지 순도 손실률을 감소시켜 부형제로서의 히스티딘의 안정화 효과는 상대적으로 약하였다(도 12). 시트레이트와 히스티딘 중 어느 것도 완충제로서 사용될 수 있지만, 시트레이트가 히스티딘보다 부형제로서 더 강한 안정화 효과를 나타내었다. 다양한 농도 및 다양한 pH 값에서 완충제로서의 시트레이트의 효과도 조사하였다(하기 참조).

### 3.7. pH의 효과

3 내지 8의 pH 범위에 걸쳐 완충제로서의 시트레이트의 안정화 효과는 저장 mAb 용액을 절반 단위씩 증가하면서 pH 3 내지 8에서 50 mM 시트레이트 완충제 내로 투석함으로써 조사하였다. pH 5.5 미만의 시트레이트 완충 제제는 4시간의 항온처리에 걸쳐 pH 3에서 ~90%부터 pH 5에서 ~21%까지 떨어진 순도 손실률을 보였다(도 13). pH 5.5 이상의 시트레이트 완충 제제는 동일한 시간의 항온처리에 걸쳐 pH 5.5에서 ~6%부터 pH 6.5 이상에서 ~1%까지 떨어진 순도 손실률을 보였다(도 13). 이 데이터는 pH 5.5 미만에서 시트레이트 완충 제제가 탈안정화되지만, pH 5.5 이상에서 상기 제제가 안정화된다는 것을 의미한다.

### 3.8. 시트레이트 완충 농도

pH 5, 6 및 7에서 시트레이트 농도의 효과는 저장 mAb 용액을 pH 5, 6 및 7에서 각각 10 mM, 20 mM, 30 mM 또는 50 mM 시트레이트 완충제 내로 투석함으로써 조사하였다. 도 14에 작도된 결과는 시트레이트 농도가 증가함에 따라 4시간의 항온처리에 걸쳐 ~15% 내지 22%의 순도 손실률을 나타내어 pH 5에서 보다 높은 농도의 시트레이트가 탈안정화시킨다는 것을 의미한다. 그러나, pH 6 및 7에서 시트레이트는 10 mM 및 pH 6에서 ~6% 순도 손실률을 나타내고 50 mM 및 pH 7에서 ~1%의 순도 손실률만을 나타내어 통상의 완충제 범위 내의 모든 농도에서 더 안정화시켰다. 앞서 관찰된 바와 같이, pH 5.5 초과와 시트레이트 완충 제제는 안정화된다. 또한, 통상의 완충제 농도 범위(10-50 mM)에서 증가하는 시트레이트 농도는 응집을 감소시키는 경향을 보여 유리하다.

### 3.9. 시트레이트와 선택되는 부형제의 조합 효과

<395> 트레할로스, 아르기닌, 히스티딘, 리신, 아스파르테이트, 글루타메이트, 석시네이트 또는 포스페이트와 조합된 부형제로서의 시트레이트의 효과를 조사하였다. 이 연구를 위해, 최종 농도 20 mM의 시트레이트 및/또는 최종 농도 35 mM의 다른 부형제를 전술한 바와 같이 저장 mAb 용액(pH 6.0의 10 mM 히스티딘 완충제)에 첨가하였다. 4시간의 항온처리에 걸친 순도 손실률은 각각의 샘플에 대해 도 15에 작도되어 있다. 시트레이트 단독은 약 3.3%의 손실을 보여지만, 트레할로스, 아르기닌, 히스티딘, 리신, 아스파르테이트, 글루타메이트, 석시네이트 및 포스페이트 대해 각각 3.5%, 4.4%, 8.5%, 4.6%, 4.5%, 4.0%, 3.4% 및 0.6%의 순도 손실이 관찰되었다. 이 농도에서 시트레이트와 히스티딘의 조합물이 시트레이트 단독(~3.3% 대 ~4.3%)에 대한 순도 손실률을 약간 증가시켜 다소 길항제와 같은 역할을 하였지만, 남은 조합물들은 시트레이트 단독에 비해 순도 손실을 감소시켰고 체제를 위해 고려될 수 있었다. 상대적인 순위는 포스페이트(~0.5%)>트레할로스(~1.3%)>아르기닌, 히스티딘, 리신, 아스파르테이트, 글루타메이트 및 석시네이트(각각 ~1.75% 내지 ~1.85%)인 것으로 관찰되었는데, 이때 ">"는 "보다 더 높은 안정화 효과를 나타냄"을 의미하는 데 사용된다.

#### <396> 4. 실시예 4

##### <397> 신속 스크린 분석에 의해 분석된 DOE

<398> 초기 연구에 기초하여, 디자인-엑스퍼트(Design-Expert)(Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN) 소프트웨어를 사용하여 일련의 실험을 디자인하여 시트레이트, 아르기닌 및 트레할로스의 조합 효과의 철저한 예측 시험을 수행하였다. 20개 용액을 디자인-엑스퍼트에 의해 지시된 바와 같이 제조하여 4℃에서 4시간 동안 항온처리하고, 전술한 바와 같이 SEC로 분석하였다(실시예 1 참조). 결과(% 응집물)를 디자인-엑스퍼트 내로 입력하고 2차 방정식으로 피팅하였다. 이 방정식을 사용하여 작도한 이론상 반응 곡선은 도 16-17에 나타나 있다.

<399> 도 16a 및 16b는 상이한 농도의 시트레이트 및 아르기닌의 효과에 대한 반응 곡선을 작도한 것이다. 시트레이트의 효과는 아르기닌이 존재하지 않는 경우 최대이고, 아르기닌이 높은 농도로 존재하는 경우 최소이다. 진한 선 만곡은 시트레이트 농도가 10 mM부터 50 mM까지 증가한 경우 응집에 대한 높은 효과를 표시하지만, 시트레이트를 50-60 mM 초과하는 농도로 첨가한 경우 응집에 대한 감소하는 효과를 표시한다. 증가하는 아르기닌 농도는 시트레이트 농도가 낮은 경우(<50 mM) 매우 유리하지만, 시트레이트 농도가 높은 경우(50 mM 초과) 최소한의 효과를 나타낸다. 시트레이트와 트레할로스의 상이한 농도의 효과에 대한 반응 곡선은 트레할로스가 모든 시트레이트 농도에서 강한 안정화 효과를 나타낸다는 것을 표시한다(도 17).

#### <400> 5. 실시예 5

##### <401> Medi3-V3에 대한 정식 안정성 분석

<402> Medi3-V3을 전술한 파일럿 연구에 기초하여 2개의 특정 제제 중에서 10, 25, 50 또는 100 mg/ml 농도로 제제화하였고, 4℃, 25℃ 및 40℃에서 시간의 경과에 따른 안정성을 전술한 바와 같은 SEC 분석으로 모니터링하였다. 제제 1(50 mM 시트레이트, 10% 트레할로스, pH 6.5) 중의 Medi3-V3의 각각 농도에 대한 시간의 경과에 따라 존재하는 단량체 비율(%)은 도 18a, b 및 c(각각 4℃, 25℃ 및 40℃)에 작도되어 있고, 제제 2(25 mM 시트레이트, 200 mM 아르기닌, 8% 트레할로스, pH 6.5)에 대해서는 도 19a, b 및 c(각각 4℃, 25℃ 및 40℃)에 작도되어 있다. 4℃ 및 25℃에서 7일 경과 후, 단량체 비율(%)은 제제 1 및 2에서 항체의 각 농도에 대해 1% 미만까지 떨어졌다(도 18a-b와 19a-b를 비교함). 40℃에서 단량체 비율(%)은 제제 1에서 최대 항체 농도에서 거의 3%까지 떨어졌고, 제제 2에서 최대 항체 농도에서 거의 14%까지 떨어졌지만, 이 제제들은 동일한 기간에 걸쳐 단량체 비율(%)에서 거의 32%의 하강을 보인 대조군 완충제(pH 6.0의 10 mM 히스티딘 완충제)(도 2a)에 비해 Medi3-V3의 안정성을 크게 증가시켰다. 거의 90일에서, 단량체 비율(%)은 4℃에서 저장된 경우 제제 1 및 2 둘다에서 항체의 각 농도에 대해 1% 이하까지 떨어졌고 25℃에서 저장된 경우 항체의 각 농도에 대해 4% 이하까지 떨어졌지만, 제제 1은 최대 항체 농도에서 제제 2보다 25℃에서 다소 더 우수한 안정성을 보였다. 40℃에서 거의 90일 후, 단량체 비율(%)은 제제 1 및 2 중 어느 제제에서도 각 농도에 대해 약 30 내지 60%까지 떨어졌다. 그러나, 전술한 바와 같이, 상기 두 제제는 유사한 항온처리 기간에서 대조군 완충제에 비해 유의한 안정화를 제공하였다(7일 및 15일에서 도 18c, 19c 및 도 2a를 비교함). 도 21은 Medi3-V3 및 Medi2-V3의 경우 40℃에서 시점 0 및 3일 후에 각 제제 중에서 존재하는 응집물의 비율(%)을 작도한 것이다(상세한 내용은 하기 참조). 이 데이터는 일부 제제가 유사한 변이체 Fc 영역을 가지는 임의의 항체에 대해 응집을 감소시키는 데 있어서 유용하다는 발견을 지지한다.

#### <403> 6. 실시예 6

##### <404> Medi2-V3에 대한 정식 안정성 분석

<405> Medi2-V3을 대조군 완충제(pH 6.0의 10 mM 히스티딘 완충제), 제제 1'(50 mM 시트레이트, 10% 트레할로스, pH 6.0) 또는 제제 2'(25 mM 시트레이트, 200 mM 아르기닌, 8% 트레할로스, pH 6.0) 중에 80 mg/ml의 농도로 제제화하였고, 40℃에서 72시간에 걸쳐 안정성을 전술한 바와 같은 SEC 분석으로 모니터링하였다. 대조군 완충제 중의 % 단량체는 72시간에 걸쳐 약 23.6%까지 떨어진 것으로 관찰되었지만, 제제 1' 및 2'의 경우 각각 5% 및 7.4%의 하강이 있었다(도 20). 이 데이터는 전술한 것과 일치하고, 상기 두 제제 1' 및 2'가 높은 농도(80-100 mg/ml) 및 높은 온도(25-40℃)에서 조차도 대조군 완충제에 비해 Medi2-V3의 안정성을 크게 증가시킨다는 것을 의미한다. 도 21은 Medi2-V3 및 Medi3-V3의 경우 40℃에서 시점 0 및 3일 후에 각 제제 중에서 존재하는 응집물의 비율(%)을 작도한 것이다(상세한 내용은 하기 참조). 이 데이터는 일부 제제가 유사한 변이체 Fc 영역을 가지는 임의의 항체에 대해 응집을 감소시키는 데 있어서 유용하다는 발견을 지지한다.

## <406> 7. 실시예 7

### <407> Medi3-V3에 대한 정식 안정성 분석

<408> 완충제로서의 음이온 시트레이트를 사용한 연구를 확장하기 위해, 100-200 mM 시트레이트와 10-15% 트레할로스의 조합물을 함유하는 pH 6.0 또는 6.5의 제제 또한 조사하였다. pH 6.0의 100 mM 시트레이트 중의 100 mg/ml Medi3-V3을 하기 표 4에 나타난 제제 내로 투석하였고(제제 A-D로서 지칭됨) 최종 항체 농도가 50 mg/ml 또는 100 mg/ml가 되도록 부피를 조절하였다. 정식 안정성 프로토콜을 개시하여 2-8℃, 23-27℃ 및 38-42℃에서 봉규 산염 유리 바이알 중에서 장기간 안정성을 모니터링하였다. pH 6.0의 10 mM 히스티딘 완충제 중에 ~50 mg/ml의 농도로 제제화된 야생형 Medi2 항체는 이 연구를 위한 대조군 제제이었다. 응집물, 단량체 및 단편의 비율을 0, 7, 15, 21, 28 및 63일째 날에 SEC(전술한 바와 같음)로 측정하였다. 또한, 전하 변이체(% 예비피크)에서의 변화를 0일째 날 및 28일째 날에 IEC로 측정하였다.

<409> 최대 28일까지 38-42℃에서 유지된 샘플에 대한 대표적인 데이터는 도 22A-D에 나타나 있다. 샘플에 대한 시간의 경과에 따른 응집물 비율(%)의 도면은 제제 B 및 D가 대조군 제제에 대해 관찰된 1.8%에 비해 28일째 날에 각각 2.48% 및 2.87%의 최종 % 응집을 나타냄으로써 안정한 야생형 항체에 대해 관찰된 것과 매우 유사한 응집 프로파일을 갖는다는 것을 보여준다(표 5). 유사하게, 제제 B 및 D는 대조군에 대한 4.6%에 비해 각각 3.61% 및 4.58%의 % 단량체 손실을 가졌다(도 22b 및 표 5). 또한, 완충제의 pH를 6.0부터 6.5까지 증가시킴으로써 개선된 프로파일이 관찰되었다(제제 A와 제제 D를 비교함, 표 5). 이 개선은 Medi3-V3의 농도가 덜 안정한 제제 A(pH 6.0) 중에서 50 mg/ml이고 더 안정한 제제 D(pH 6.5) 중에서 100 mg/ml이므로 항체의 농도를 고려할 때 훨씬 더 현저하고, 초기 연구는 Medi3-V3의 응집이 항체 농도에 따라 증가한다는 것을 보여주었다(예컨대, 도 4 참조). 50 mg/ml 농도에서, 제제 B는 제제 A보다 더 우수하였지만, 100 mg/ml에서 제제 D는 가장 우수하였다. 이러한 경향은 63일째 날에 샘플에 대해서도 관찰되었다(표 5 참조, 데이터는 나타나지 않음). 단편 농도에서의 차이는 제제 A-D 사이에서 전혀 관찰되지 않았다(도 22c).

<410> 흥미롭게도, 모든 제제가 23-27℃ 및 2-8℃에서 대조군보다 더 우수한 안정성을 나타내었는데(표 5 참조, 데이터는 나타나지 않음), 이것은 이 제제들이 야생형 항체를 보다 효과적으로 안정화시킬 수 있음을 시사한다. 이 온도들에서, 제제 A 및 B의 프로파일은 2-8℃에서 0.01 미만의 응집 속도 및 23-27℃에서 0.1 미만의 응집 속도를 나타내면서 거의 동일하였다. 38-42℃에서 관찰된 것과 대조적으로, 제제 C는 제제 D보다 더 우수하였다.

<411> 탈아미드화가 보다 높은 pH에서 가속화될 수 있기 때문에, IEC를 사용하여 40℃에서 제제 A-D 중의 항체의 전하에서의 임의의 변화를 모니터링하였다. 예비-피크 수준은 탈아미드화와 같은 과정으로 인한 전하 변이체 변화를 표시한다. 도 22d에 나타난 바와 같이, 40℃에서 항온처리함으로써 발생한 전하 변이체 농도에서의 차이가 제제 A-D 사이에서 전혀 발견되지 않았는데, 이것은 pH를 6.0부터 6.5까지 증가시키는 것이 더 많은 전하 변이체의 생성을 유도하지 않는다는 것을 의미한다.

<412> 이 데이터는 V3-유사 항체들이 광범위한 온도(2-42℃)에 걸쳐 제제 A(100 mM 시트레이트, 15% 트레할로스, pH 6.0) 중에서 효과적으로 안정화될 수 있음을 의미한다. 보다 높은 온도(38-42℃)에서는 제제 A와 제제 D가 유사하였지만, 보다 낮은 온도(2-27℃)에서는 제제 A와 제제 B가 유사하였다. 이 데이터는 보다 높은 농도의 트레할로스(>10%)를 포함하며 pH가 보다 높은(>6.0) 제제가 보다 높은 온도에서 Medi3-V3, 및 유사한 변이체 Fc 영역을 가지는 항체의 안정성 프로파일을 개선시킨다는 것을 의미한다. 도 14에 나타난 데이터와 함께 이 연구는 6.5 내지 7.0 이상 또는 훨씬 더 높은 pH가 응집 프로파일을 개선시킬 수 있고 따라서 더 높은 온도에서의 V3-유사 항체의 전체적인 안정성을 개선시킬 수 있음을 의미한다. 한편, 더 낮은 온도 시트레이트 및 더 낮은 pH(~6.0)가 개선된 안정성을 부여한다.

표 4

Medi-V3 정식 안정성 분석에서 사용된 제제

mAb	농도 mg/ml	제제	시트레이트	트레할로스	pH
MedI2	50	Y	10 mM	히스티딘	6.0
MedI3-V3	50	A	200 mM	10%	6.0
	50	B	100 mM	15%	6.0
	100	C	200 mM	10%	6.0
	100	D	200 mM	10%	6.5

표 5

### 항온처리 결과

mAb	제제	응집 속도 2개월 #	% 응집물 증가 @ 1개월 #	% 단량체 손실 @ 1개월 #	% 응집물 증가 @ 2개월 #	% 단량체 손실 @ 2개월 #
38-42°C						
MedI2	Y	1.0024	1.8	4.60	2.3	6.8
MedI3-V3	A	3.7512	4.18	5.90	7.66	11.33
	B	2.1934	2.48	3.61	4.41	8.02
	C	5.9707	6.14	8.37	12.36	16.03
	D	2.4236	2.87	4.58	4.92	8.68
23-27°C						
MedI2	Y	0.3338	0.3	0.4	0.7	2.9*
MedI3-V3	A	0.078	0.04	0.10	0.16	0.29
	B	0.0812	0.04	0.13	0.16	0.29
	C	0.1363	0.12	0.19	0.27	0.39
	D	0.2031	0.2	0.25	0.41	0.52
2-8°C						
MedI2	Y	0.1888	0.3	0.2	0.4	0.3
MedI3-V3	A	-0.0027	-0.04	-0.03	-0.01	-0.01
	B	0.009	-0.04	-0.02	0.02	0.02
	C	0.0165	0.00	0.00	0.03	0.02
	D	0.0434	0.03	0.04	0.09	0.08

\* 이 연구에서 1개월 값은 28일째 날에 측정되었고 2개월 값은 63일째 날에 측정되었음. \* 적분 곤란함

### 7.1. 방법

이온 교환 크로마토그래피: 컬럼은 ProPac WCX-10 4×250 mm 분석용 컬럼(Dionex Cat# 54993)이었다. 완충제는 다음과 같다: A - 20 mM 인산나트륨, pH 7.0 및 B - 20 mM 인산나트륨, 100 mM 염화나트륨, pH 7.0. 샘플은 완충제 A 중에 3 µg/µl까지 희석하여 준비하였고, 각각의 샘플 25 µl를 주입하여 주입된 샘플이 75 µg이 되게 하였다. 용출 구배는 다음과 같았다:

시간 % 완충제 B

0분 20%

<419>	5분	30%
<420>	45분	60%
<421>	45.1분	90%
<422>	50분	20%

<423> 피크는 전형적으로 10-40분 사이에서 용출되었다. 단백질 용출은 220 nm에서 흡광도로 모니터링하였다.

## <424> 8. 실시예 8

### <425> 상이한 완충제 중에서의 용점 분석

<426> 앞서 입증한 바와 같이(실시예 1),  $C_H^2$  도메인의 용점은 V3-유사 항체에서 더 낮다. 제제가 V3-유사 항체의 T<sub>m</sub>에 어떤 효과를 미치는 지를 조사하기 위해, pH 6의 10 mM 히스티딘 또는 100 mM 시트레이트 및 15% 트레할로스(제제 B) 중에 제제화된 Medi3-V3(0.5 mg/ml)의 T<sub>m</sub>을 전술한 바와 같이 DSC로 모니터링하였다. 도 23a에 나타난 바와 같이,  $C_H^2$  도메인의 T<sub>m</sub>은 Medi3-V3이 제제 B 중에서 시험된 경우 ~48℃부터 ~55℃까지 증가하였다. 유사하게,  $C_H^2$  도메인 용융에 대한 ~10℃ 증가 또한 형광도에 의해 관찰되었고(도 23b), 7℃ 증가는 제제 B 중의 Medi3-V3의 제2 유도체 UV-Vis. 모니터링 용융(도 23c)에 의해 관찰되었다. 이 데이터는 제제 B 및 다른 안정화 제제가 적어도 부분적으로  $C_H^2$  도메인의 T<sub>m</sub>을 증가시킴으로써 작용한다는 것을 의미한다. 따라서, 이 제제들은 더 낮은 용점을 가지는 변이체 Fc 영역을 가지는 항체를 안정화시키는 데 있어서 널리 적용될 수 있을 것이다. 또한, 이 연구들은 DSC가 일반적으로 항체, 특히 V-3유사 항체를 안정화시키는 제제의 잠재력을 조사하는 데 사용되는 유용한 수단임을 의미한다.

### <427> 8.1. 방법

<428> 샘플 제조: Medi3-V3을 WFI 중에서 재구성하여 농도가 ~40 mg/ml가 되게 하였다. 이어서, 3,500 MWCO 피어스 투석 카세트를 사용하여 제제를 pH 6의 10 mM 히스티딘 내로 투석하였다. > 8시간 동안 지속되는 1ℓ 교환 후, 샘플을 pH 및 삼투압에 대해 시험하여 완전한 완충제 교환을 확인하였다. 그 다음, 추가 생체물리학적 연구(DSC, 형광도 및 UV 분광분석)를 위해 샘플을 pH 6의 10 mM 히스티딘 또는 pH 6의 100 mM 시트레이트 및 15% 트레할로스 내로 ~0.5 mg/ml까지 희석하였다.

<429> 형광도 모니터링 용융: 형광도 방사 스펙트럼을 퀀타마스터(QuantaMaster)<sup>TM</sup> 형광측정기(Photon Technologies Incorporated Monmouth, NJ, 75 W Xenon 아크 램프, 모델 810 pmt 검출기, 및 FeliX32 v. 1.0 작동 소프트웨어)로 수집하였다.

<430> 트리토판 방사 스펙트럼을 295 nm에서의 여기 시 305-450 nm로부터 수집하였다. 0.5 mg/ml MEDI-531 샘플을 각각의 온도에서 5분 동안 유지한 후 방사 스펙트럼을 10-85℃의 온도 범위에 걸쳐 수집하였다. 시험된 온도 및 329 nm에서 수집된 강도를 동일한 파장 및 10℃에서 수집된 값으로 나누어 상대적인 방사 강도를 계산하였다.

<431> 제2 유도체 UV-Vis. 모니터링 용융: UV 흡광도 연구를 위해 아질런트 8453 다이오드-어레이 UV-가시광선 분광측정기(Palo Alto, CA)를 사용하였다. 25초 흡광도 스펙트럼을 수집하기 전에 5분 동안 각각의 온도에서 1 cm 경로 길이 셀 내에서 0.5 mg/ml MEDI-531 용액을 항온처리하면서 온도를 10℃부터 85℃까지 증가시켰다. 온도가 증가함에 따라 방향족 아미노산의 제2 유도체 피크 위치에서의 변동에 대해 스펙트럼을 분석하였다. 제2 유도체 스펙트럼은 5분의 1도 사비츠키-골라이(Savitzky-Golay) 다항식에 기초한 계산, 9-데이터 점 필터 길이 창 및 3차 함수에의 피팅을 통해 획득하였다. 마지막으로, 0.01 nm에서 해상된 2차 유도체 스펙트럼을 각각의 1 nm 데이터 점 사이에 삽입된 99개의 점을 사용한 스플라이닝(splining)으로 획득하였다. 얻은 2차 유도체 스펙트럼은 대략 0.01 nm의 이론상 피크 해상도를 가졌다. 방향족 잔기들의 음성 피크 위치들은 온도가 증가함에 따라 3차 구조의 변화를 표시하기 위해 250 내지 300 nm에서 모니터링하였다.

## <432> 9. 실시예 9

### <433> 용집을 증가시킬 수 있는 부형제

<434> 전술한 바와 같이, 시스테인은 용집을 증가시키는 것으로 밝혀졌다. 이 효과의 특징을 더 규명하기 위해, Medi3-V3 및 Medi2(야생형 Fc 영역을 가짐)를 37℃에서 50 mM 시스테인의 존재 또는 부재 하에 16시간 동안 항

온처리하고, 가열하지 않은 비-환원 SDS-PAGE 및 SEC로 분석하였다. 37℃에서 항온처리되지 않은 대조군 샘플 또한 분석하였다. 시스테인과 함께 항온처리된 항체 샘플 둘다가 SDS-PAGE 상에서 런닝되었을 때 분리된 중쇄와 경쇄로 분할된다(도 24a, 레인 1 및 4). 또한, 소량의 단편화가 각각의 +시스테인 샘플에서 존재하고, Medi3-V3+시스테인은 존재하는 소량의 공유 응집물을 가지는 것으로 보인다(도 24a, 별표). 동일한 샘플을 SEC로도 분석하였다(도 24b-c). Medi3-V3 대조군 샘플 및 -시스테인 샘플은 거의 응집을 보이지 않았지만(도 22b, 상부 및 중간부), +시스테인 샘플은 존재하는 단량체를 거의 갖지 않으면서 거의 대부분 응집물로서 런닝하였다(도 24b, 하부). 대조적으로, Medi2 샘플은 +시스테인 샘플에서 증가하지 않는 일정한 소량의 응집물(~1% 내지 1.4%)을 보였다(도 24c, 모든 세 가지 프로파일을 비교함). Medi3-V3이 0.4%부터 1.6%까지 증가하고 Medi2가 0.4%부터 0.8%까지 증가하는 경우 시스테인과의 항온처리 후 상기 항체 둘다가 단편에서의 약간의 증가를 보였다. 이 데이터 모두는 시스테인이 비-공유 응집물의 형성을 증가시키고 V3 Fc 영역을 가지는 항체의 단편화를 증가시킬 수 있지만 야생형 Fc 영역을 가지는 항체의 단편화를 증가시킬 수 없다는 것을 의미한다.

## 10. 실시예 10

### Medi3-V3의 동결건조 제제의 안정성

Medi3-V3을 하기 표 6에 나타난 제제들 중 하나 중에 제제화하였다. 이 경우들에서, 사전 동결건조 벌크를 하기 성분들 중 하나 중에 재구성되도록 제제화하였다:

i) 모든 성분들의 최종 농도가 벌크 액체 약물 중의 원 농도의 대략 200%가 되도록 1 ml의 WFI 내지 대략 절반 부피의 벌크 충전제.

ii) 모든 성분들의 최종 농도가 벌크 액체 약물 중의 원 농도의 대략 75%가 되도록 3 ml의 WFI.

### 표 6

#### 사전 동결건조 벌크 제제

제제	C (mg/ml)	완충제	당	이온성 안정화제	계면활성제	pH
#1	50	10 mM 히스티딘	6% 트레할로스	2% 아르기닌	0.025% PS-80	6.0
#2	20	10 mM 히스티딘	6% 트레할로스	2% 아르기닌	0.025% PS-80	6.0
#3	50	10 mM 히스티딘	6% 트레할로스	2% 아르기닌	0.025% PS-80	6.0
CL	50	25 mM 시트레이트	6% 트레할로스	2% 리신	0.025% PS-80	6.0
A	50-56	10 mM 히스티딘	6% 트레할로스	2% 아르기닌	0.025% PS-80	6.0
HL	50-56	10 mM 히스티딘	6% 트레할로스	2% 리신	0.025% PS-80	6.0

샘플을 후술된 조건 하에 동결건조하였다. 동결건조된 샘플을 2-8℃, 23-27℃ 및 38-42℃에 저장하고 ICH 지침에 상응하는 시점에서 시험하였다. 동결건조 후 재구성 시 순도 손실은 최소한이었거나 전혀 없었다(표 7 참조). 38-42℃(40℃로 지칭됨)에서 항온처리한 후, 액체 제제에 비해 최소한의 순도 손실이 있었는데(표 7), 이것은 사전 동결건조 제제가 고체 상태에서도 안정화되었음을 의미한다.

### 표 7

#### 동결건조 후 제제의 안정성

샘플 #	사전 동결건조 벌크 Medi3-V3 mg/ml	충전		재구성 특징				순도 손실	
		부피 (ml)	투여량 (mg)	WFI 부피 (ml)	시간 (분)	Medi3-V3 mg/ml	Osmol (mOsm)	동결건조 전 내지 후	40℃에서 12일
1	50	2.2	100	1	>5	80-100	846	0	0.2
2	20	2.2	40	1	>5	30-50	747	0	0
3	50	2.2	100	1	>5	80-100	610	0	0.4
CL	50	2.2	100	1	>5	80-100	NS	0	1개월 내에 0.9
A	50	2.4	100	3	<2	40	281	0.1	1년 내에 1.5
HL	50	2.4	100	3	<2	40	NS	0.1	1년 내에 1.9

- <443> 동결건조: 제제화된 Medi3-V3을 생물학적으로 안정한 캐비넷 내에서 5 cc 바이알 내로 2.3 내지 2.4 ml 만큼 충전하고 부분적으로 마개를 막았다. 상기 바이알을 트레이 상에 6각형-유사 팩킹 구조 내에 넣어 두고 비르티스 제네시스(Virtis Genesis) 동결건조기의 선반 상으로 옮겼다. 동결건조 주기는 다음 단계로 구성되었다:
- <444> 1) 5-20℃, 대기압에서 바이알로 시작하는 단계,
- <445> 2) 0.5℃/분의 속도로 -40℃까지 "동결-단계" 온도 램프를 작동하는 단계,
- <446> 3) 40℃에서 120분 동안 유지하는 단계(상기 시간 동안 진공은 125 mTorr로 떨어지고 컨테이너 온도는 -60℃로 떨어짐),
- <447> 4) -10℃ 내지 -20℃까지 온도를 상승시키고, 일차 건조의 지속기간(44시간) 동안 상기 온도를 유지하는 단계, 및
- <448> 5) 25℃에서 10-18시간 동안 2차 건조하는 단계.
- <449> 이어서, 동결건조기를 600~700 Torr의 압력까지 무수 질소 기체로 다시 채우고, 동결건조기의 유압 시스템을 사용하여 바이알의 마개를 막았다. 다음으로, 챔버를 대기압까지 배출시키고 바이알을 제거하였다.
- <450> 본 발명의 특정 실시양태는 설명을 위해 전술된 것이므로, 당업자라면 첨부된 청구범위에 기재된 본 발명을 벗어나지 않으면서 다수의 세부적인 변경을 가할 수 있음을 인식할 것이다.
- <451> 본 명세서에서 언급된 모든 공개문헌, 특허 및 특허 출원은 각 개개의 공개문헌, 특허 또는 특허 출원이 본 명세서에 참고로 도입되는 것으로 구체적으로 개별적으로 기재되는 것과 동일한 정도로 본 명세서 내로 참고로 도입된다. 하기 미국 가출원 또한 모든 목적을 위해 본 명세서에 완전히 참고로 도입된다: 2006년 2월 3일 출원된 제60/764,750호 및 2006년 9월 11일 출원된 제60/825,231호.

도면

도면1a

서열 번호: 1 GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG CGA GGT GTG GTA CCG CCT GGG GGG 48  
 2 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly 16  
 TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GGC TCT GGG TTG ACC GTG AGT GAT TAC 96  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Asp Tyr 32  
 TGC ATG AAC TGG GTG GGG CAG GCT CCA GGC AAG GGC CTG GAG TGG ATT 144  
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Gln Trp Ile 48  
 GGG TTT ATT AGA AAC AAA GCT AAT GCG TAC ACA AGA GAG TAC AGT GCA 192  
 Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Ala Tyr Thr Thr Gln Tyr Ser Ala 64  
TCT GTG AAG GGT AGA TTC ACC ATC TCA AGA GAT GAT TCA AAA AAC AGC 240  
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr 80  
 CTG TAT CTG CAA ATG AAC ACC CTG AAA ACC GAG GAC ACA GCC GTG TAT 288  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Gln Asp Thr Ala Val Tyr 96  
 TAC TGT ACC ACA TAC CCT AAG TAT CAT GCT ATG GAC TCC TGG GGC GAG 336  
 Tyr Cys Thr Thr Tyr Pro Arg Tyr His Ala Met Asp Ser Trp Gly Gln 112  
 GGC ACC ATG GTC ACC GTC TCC TCA 360  
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser 120

도면1b

서열 번호: 3 GGC ATC GAG TTG ACT CAG TCT CGA TGC TTC CTG TCT GCA TCT GTA GGA 48  
 4 Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly 16  
 GAC AGA GTG ACC ATC ACT TGC AGG GGC AGG CAA AGT ATT AGC AAC AAC 96  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn 32  
 CTA CAC TGG TAC CTG CAG AAG CGA GGG CAG TCT CCA CAG CTG CTG ATC 144  
 Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Ile 48  
 TAT TAT GGC TTC CAG TGC ATC TCT GGG GTT CCA TCA AGG TTC AGT GGC 192  
 Tyr Tyr Gly Phe Gln Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 64  
 AGT GCA TCT GGG ACA GAT TTG ACT CTG ACC ATC AGC AGT CTG CAA GCT 240  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro 80  
 GAA GAT TTT GCA ACT TAC TAC TGT CAA CAG GGC AAC AGC TGG CTG CTG 288  
 Gln Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Trp Pro Leu 96  
 AAG TTC GGG GGA GGC AGC AAG CTG GAG ATC AAA 324  
 Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Gln Ile Lys 107

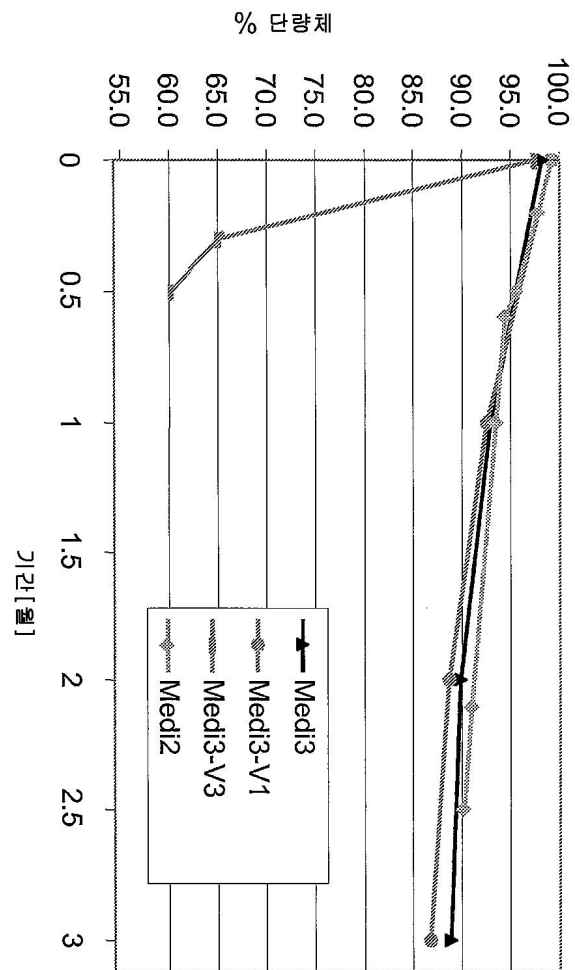
도면1c

서열 번호: 5	
6 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg	48
106 CTG AGA CTC TCC TGT GCA GGC TCT GGA TTC ACC TTT AGT AGC TAT	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	32
GAC ATG TCT TGG GTT GGC CAG GCT CCG GGC AAG GGT CTG GAG TGG GTC	144
Asp Met Ser Trp Val Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Gln Trp Val	48
GCA AAA GTT AGT AGT GGT GGT GGT AGC ACC TAC TAT TTA GAC ACT GTG	192
Ala Lys Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Leu Asp Thr Val	64
CAG GGC GGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT AGT AAG AAC ACC CTA TAC	240
Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	80
CTG CAA ATG AAC TCT CTG AGA GGC GAG GAC ACA GGC GTG TAT TAC TGT	288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gln Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	96
GCA AAG CAT CTG CAT GGC AGT TTT GCT TCT TGG GGC CAA GGG ACT ACA	336
Ala Arg His Leu His Gly Ser Phe Ala Ser Trp Gly Gln Gly Thr Thr	112
GTG ACT GTT TGT AGT	351
Val Thr Val Ser Ser	117

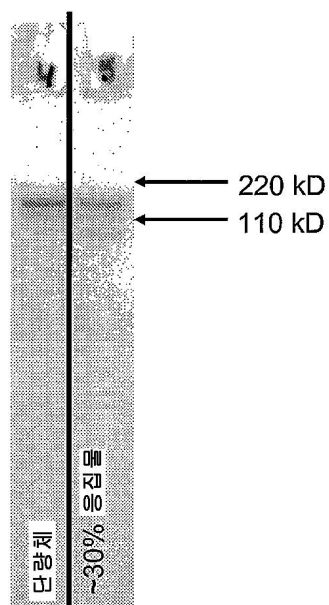
도면1d

서열 번호: 7 GAG ATT GAG CTA ACT GAG TCT CGA GCG AGC CTG TGT CTC AAC CGA GGA  
 8 Gln Ile Val Leu Thr Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 GAA AGG GCG ACT CTT TCC TCC CAG GCC AGC CAA AAT ATT AGC AAC TTC  
 Gln Arg Ala Thr Leu Ser Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Phe  
 CTA CAC TGG TAT CAA CAA AGG CCT GGT CAA GCC CGA AGG CTT CTC ATC  
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 GGC TAT CGT TCC CAG TCC ATC TGT GCG ATC CGC GCG AGG TTC AGT GGC  
 Arg Tyr Arg Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 AGT GGA TCA GCG ACA GAT TTC ACC CTC ACT AAT TCG AGT CTG GAG CCT  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 GAA GAT TTT GCG CTC TAT TAC TGT CAA CAG AGT GCG AGC TGG CCT CTG  
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Gly Ser Trp Pro Leu  
 AAG TTC GGA GCG GCG ACC AAG GTC GAA ATT AAC  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Gln Ile Lys  
 48  
 16  
 96  
 32  
 144  
 48  
 192  
 62  
 240  
 80  
 288  
 96  
 321  
 107

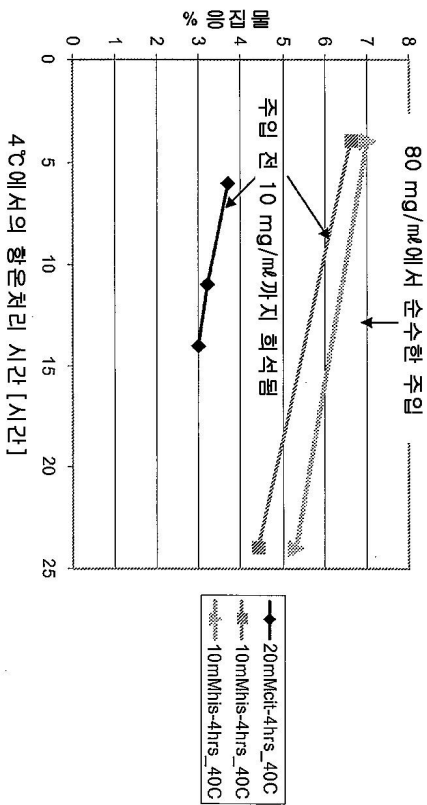
도면2a



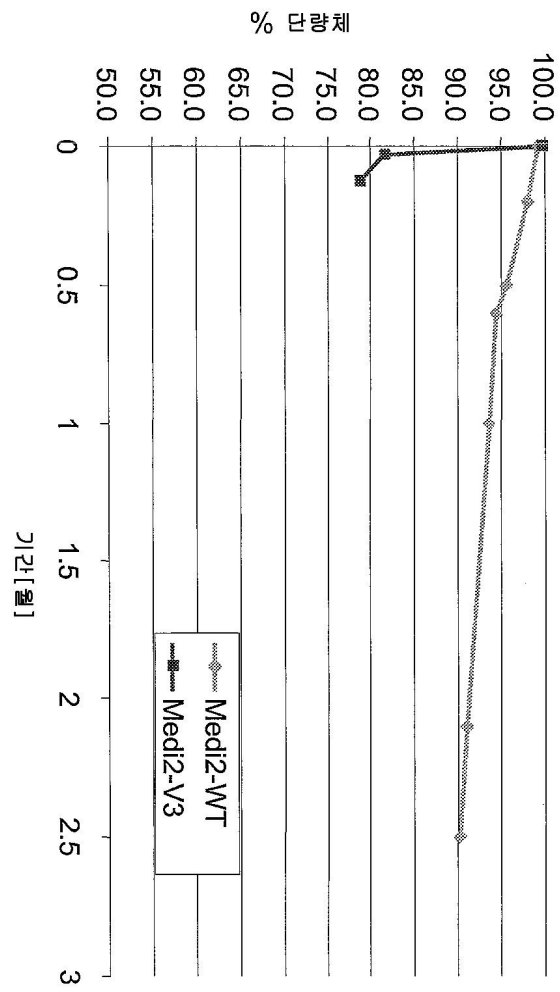
도면2b



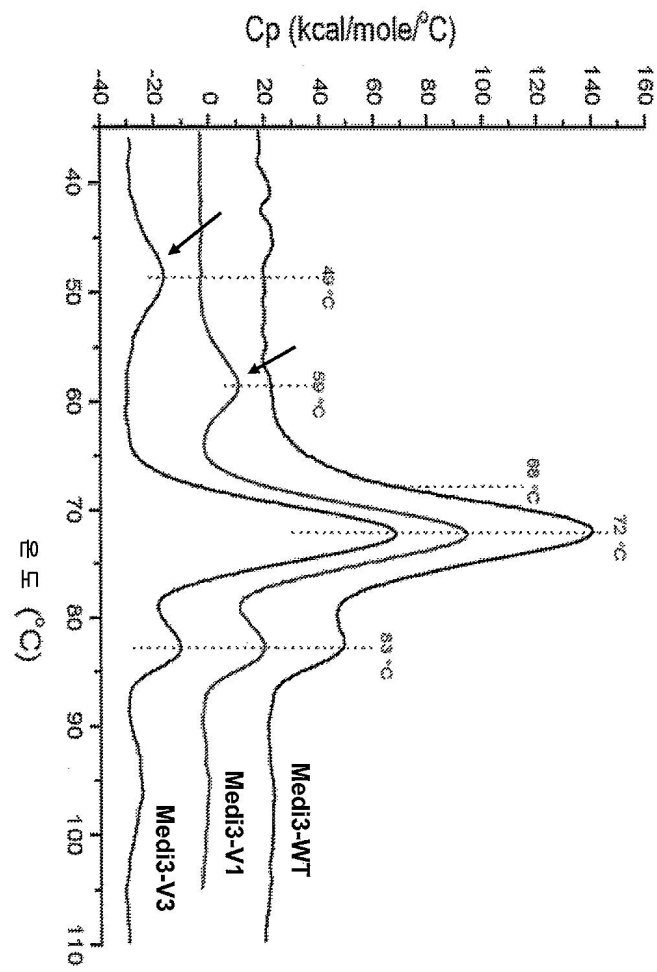
도면2c



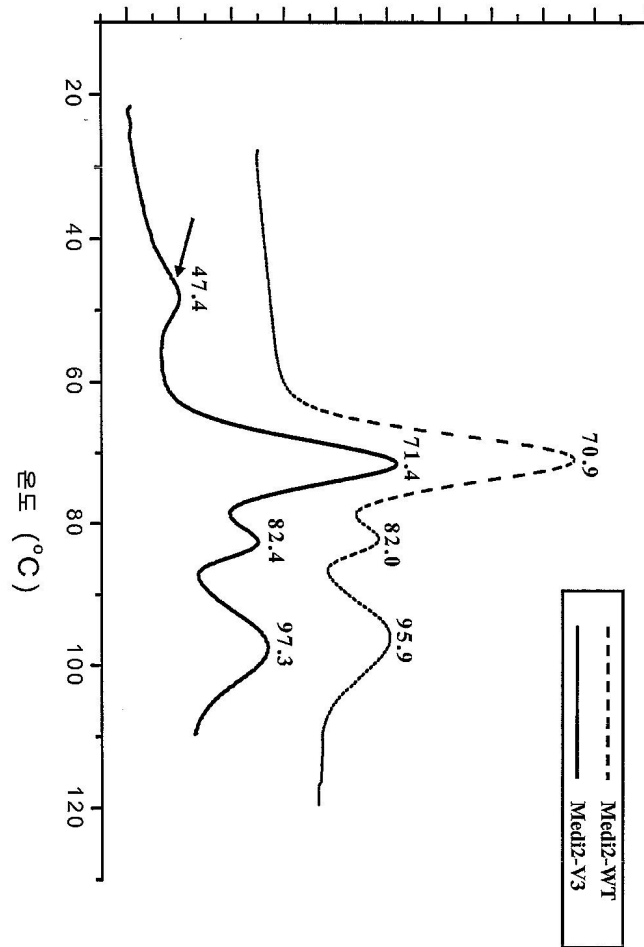
도면2d



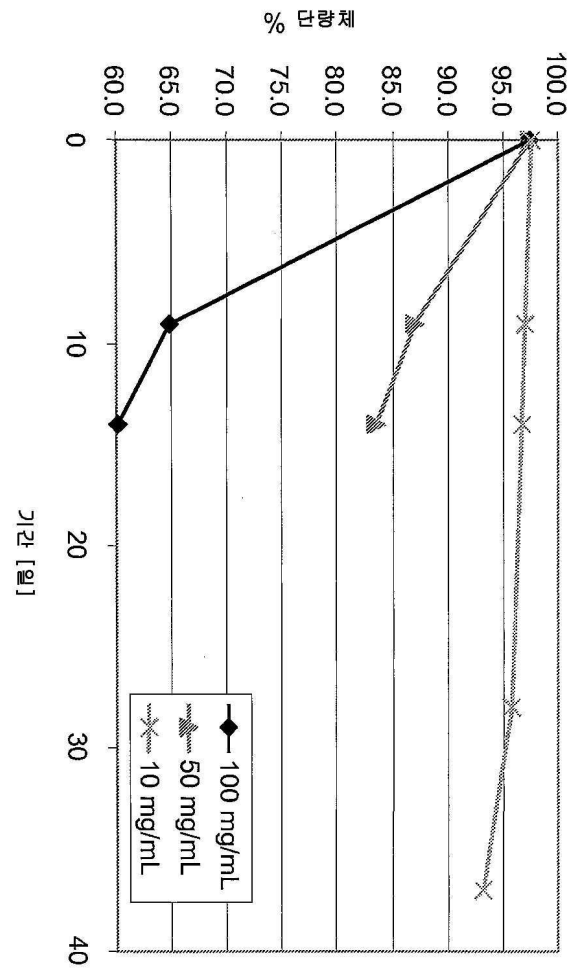
도면3a



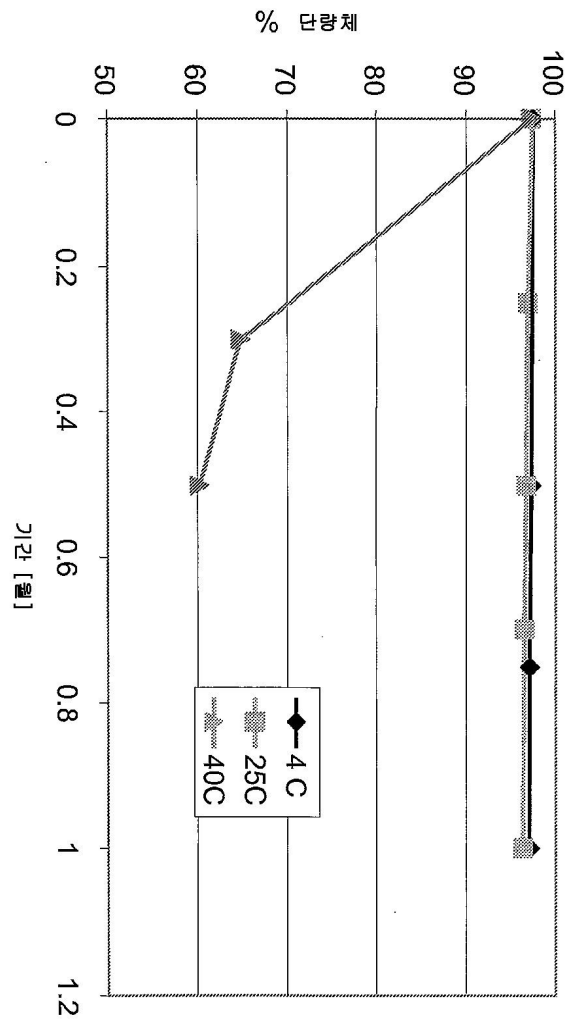
도면3b



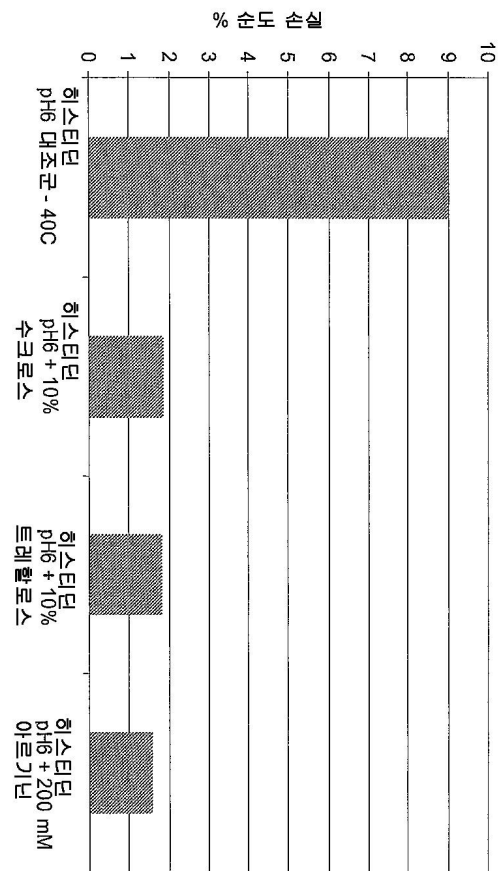
도면4



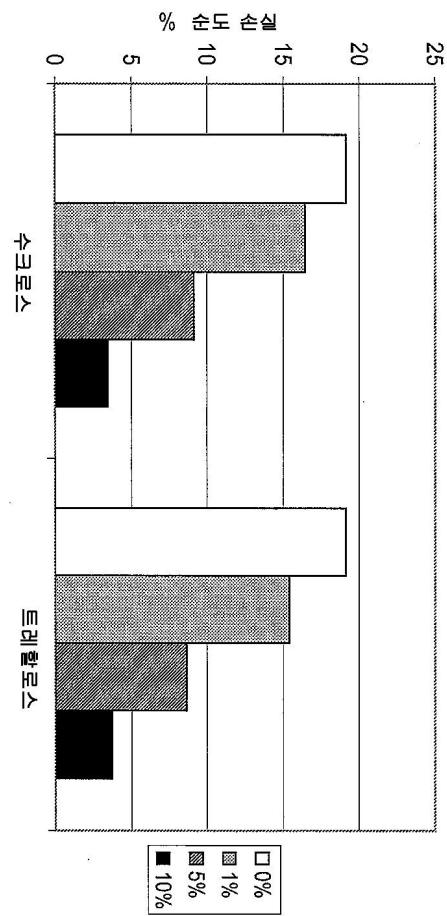
도면5



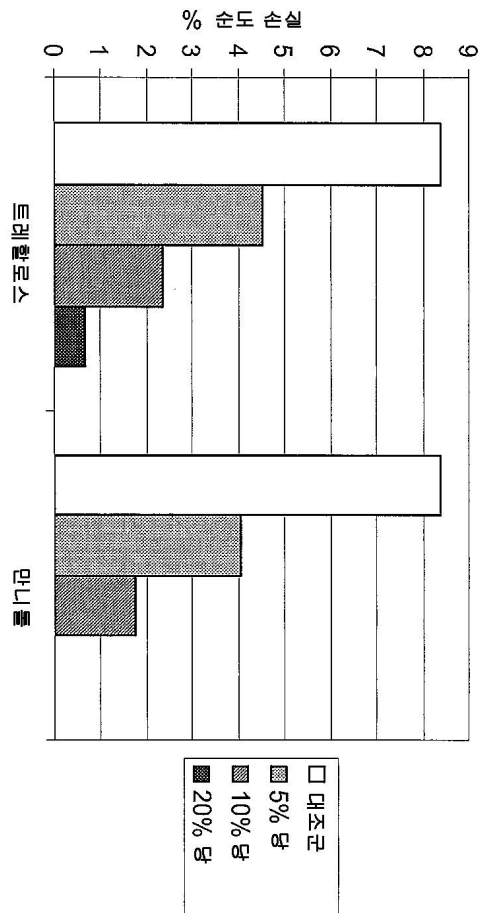
도면6



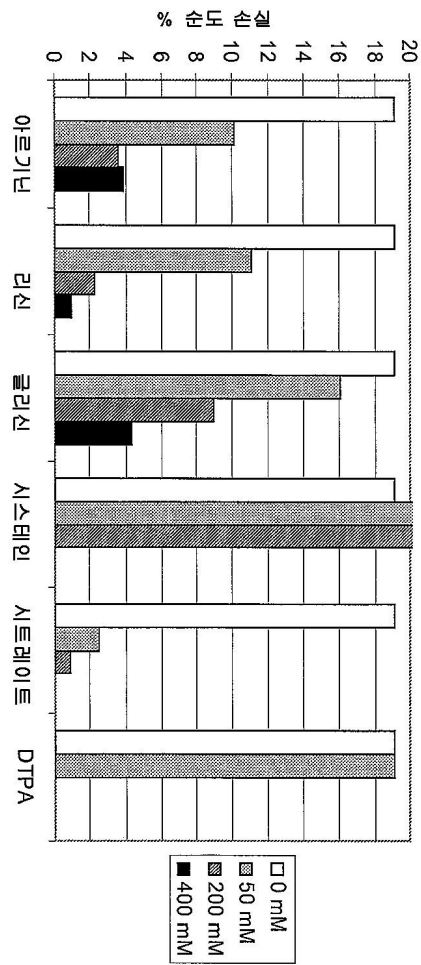
도면7a



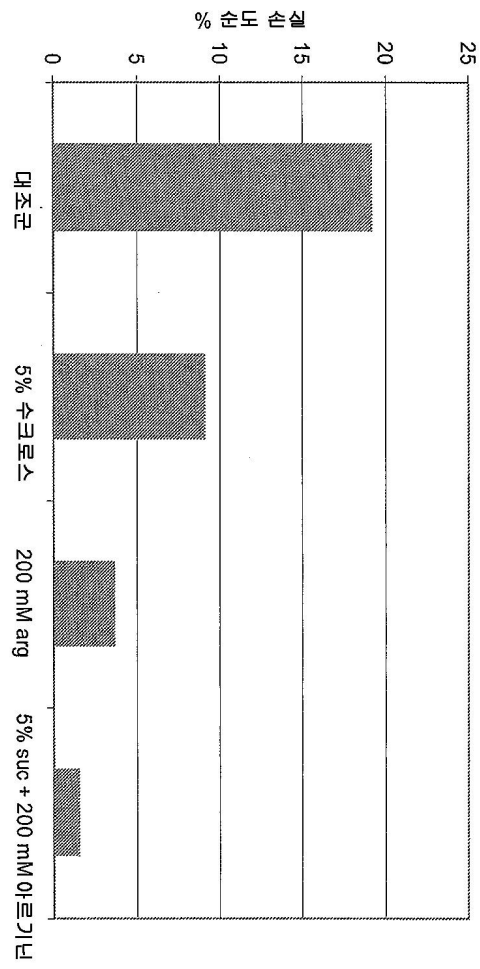
도면7b



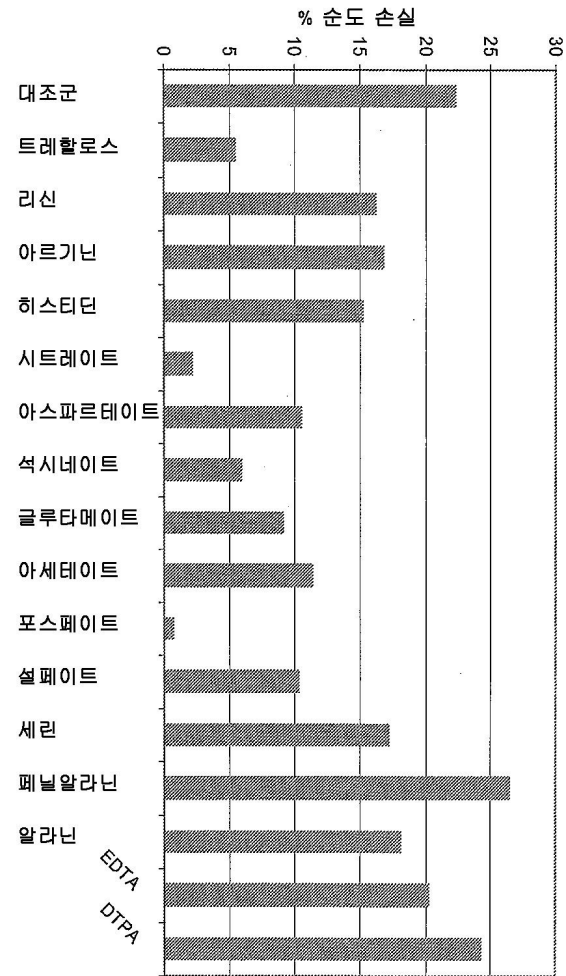
도면8



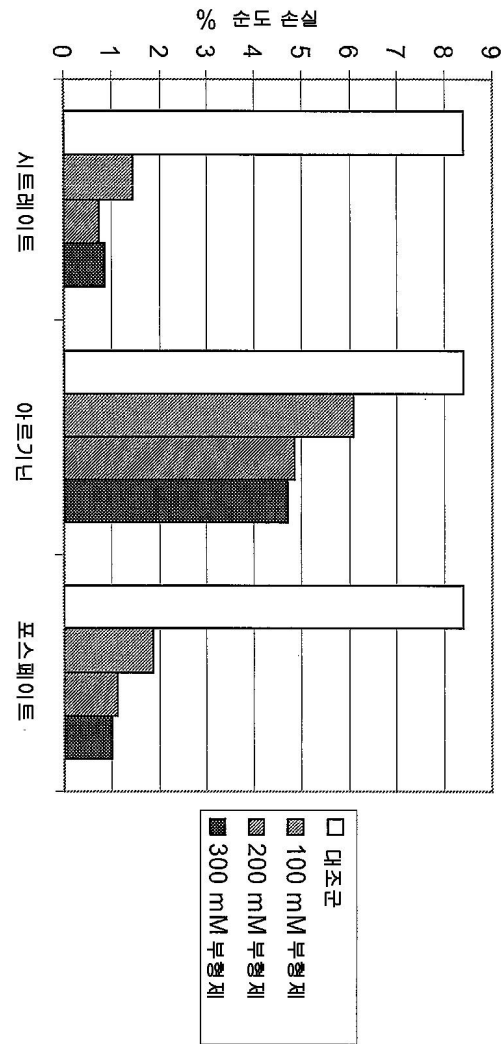
도면9



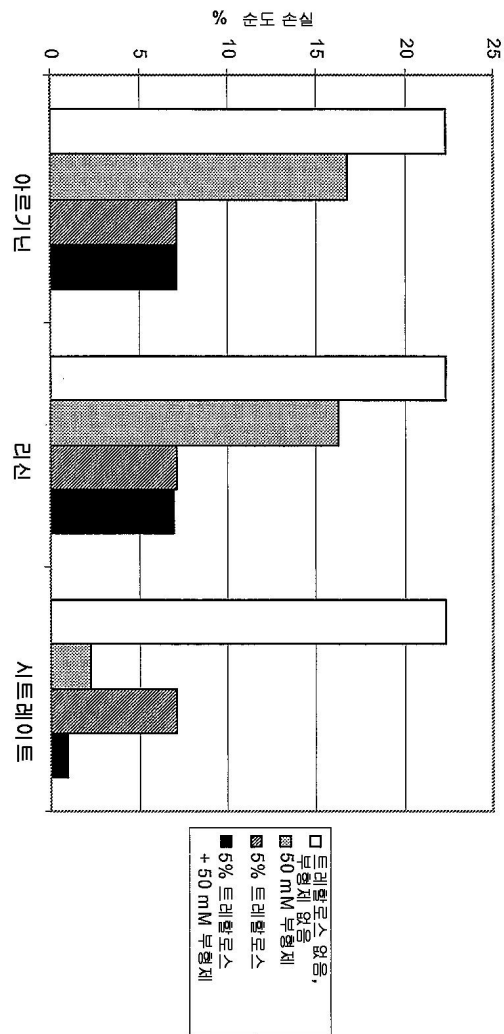
도면10a



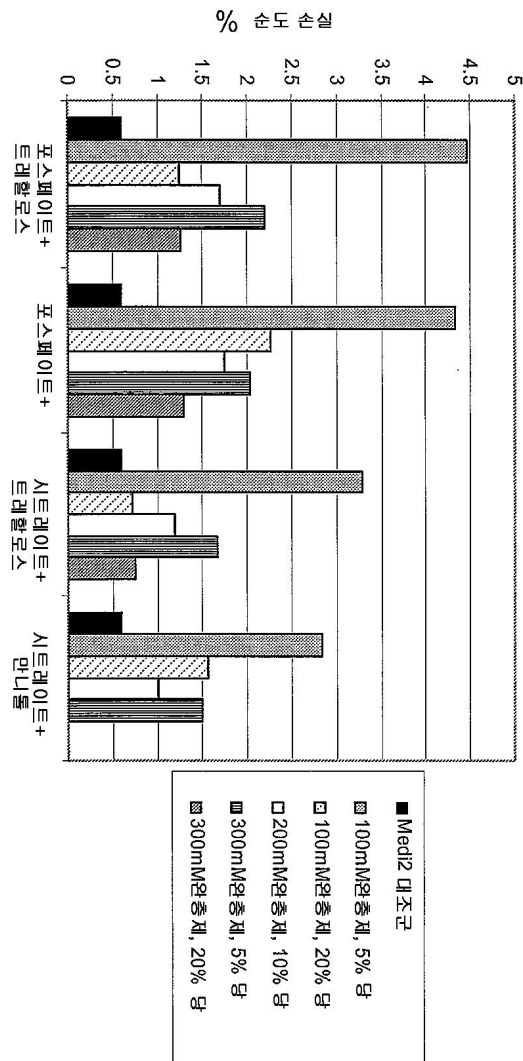
도면10b



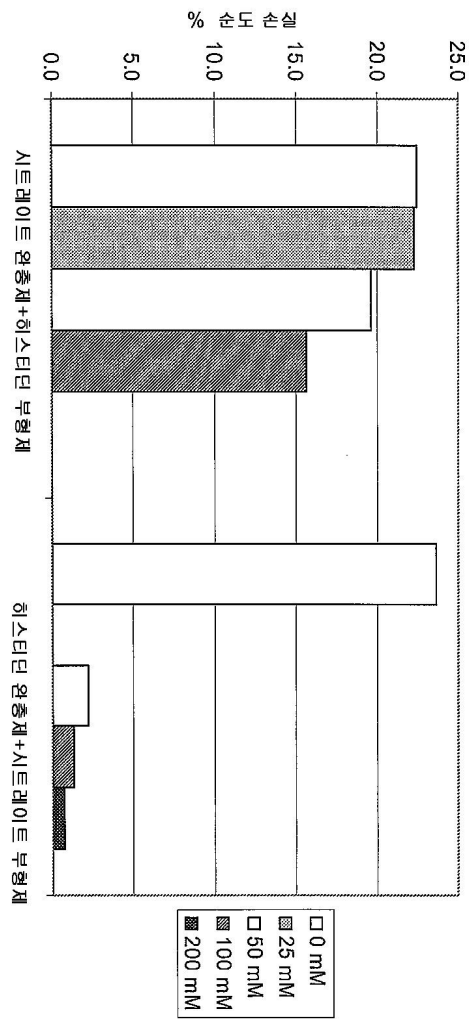
도면11a



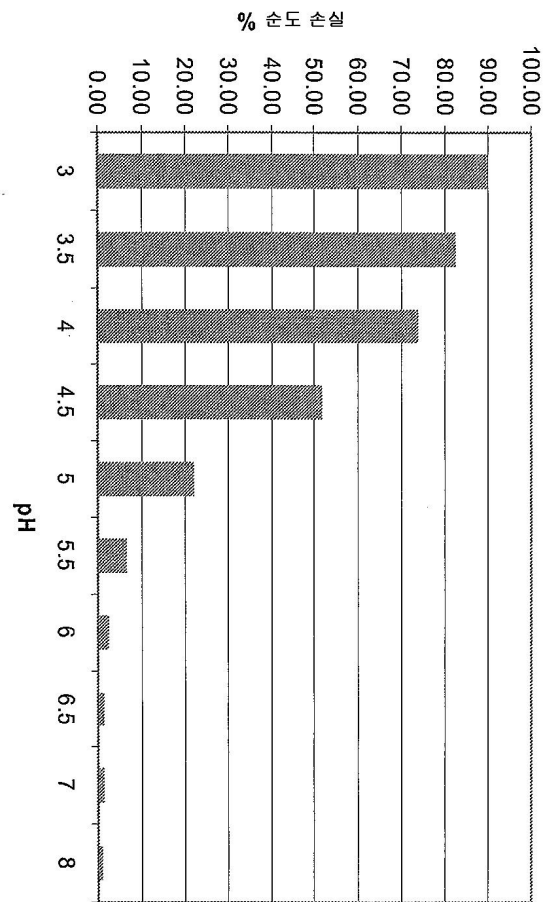
도면11b



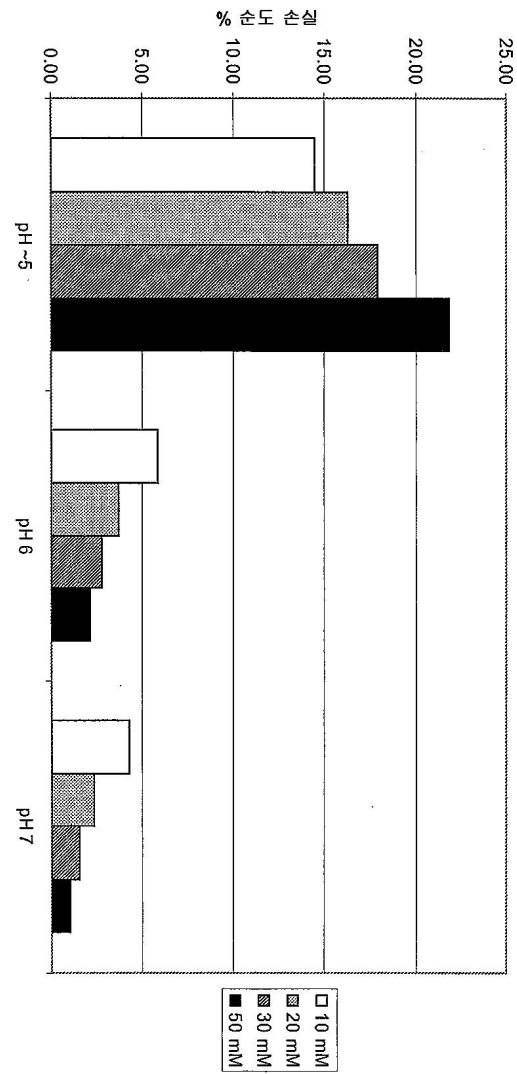
도면12



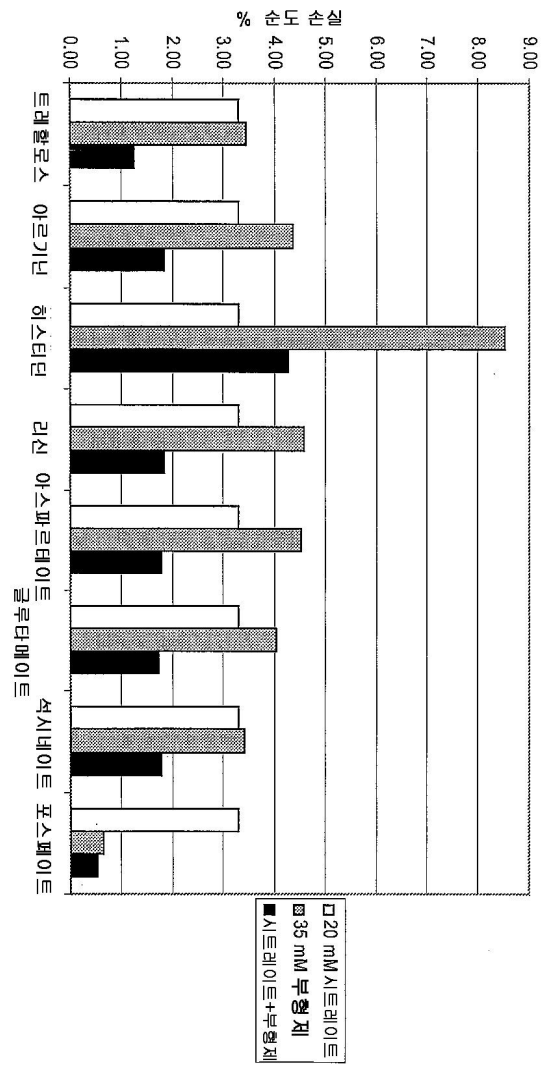
도면13



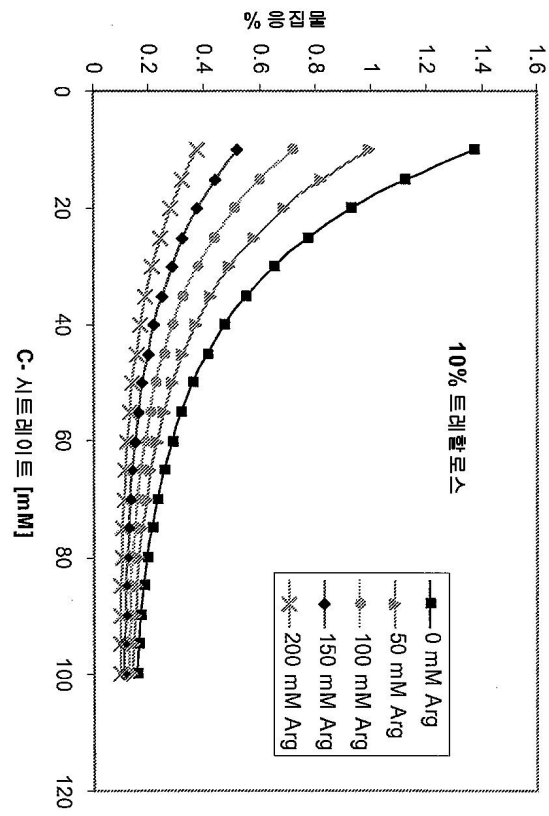
도면14



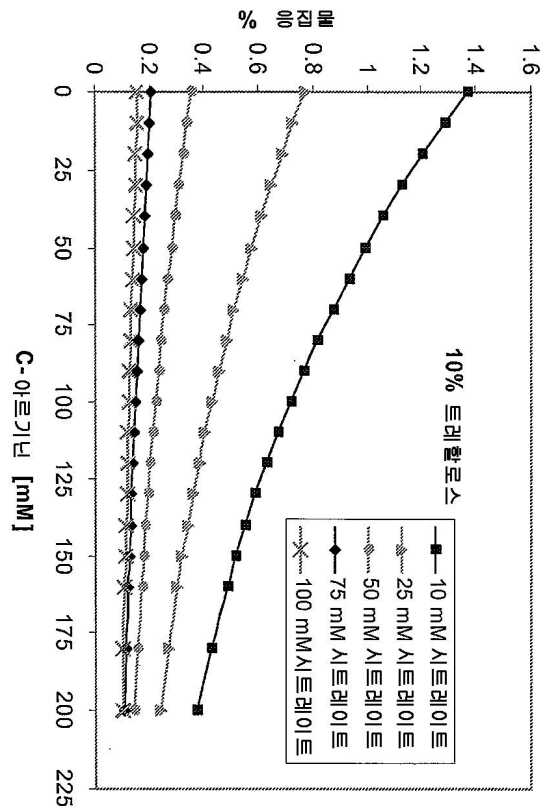
도면15



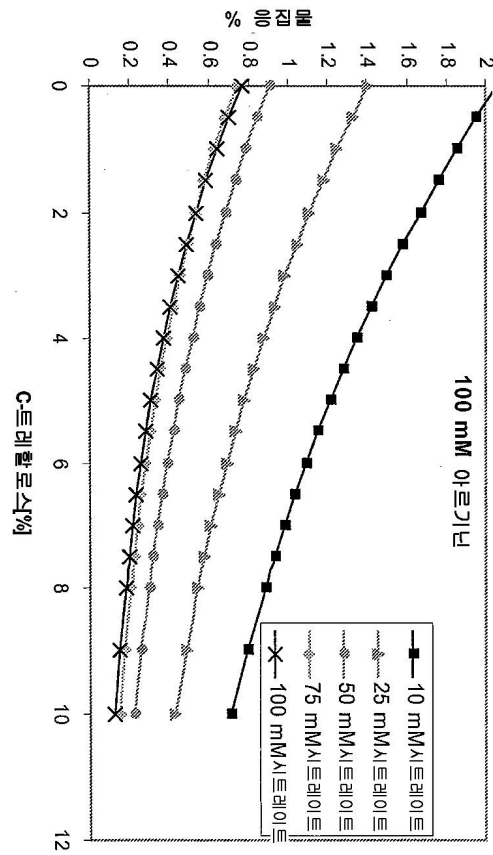
도면16a



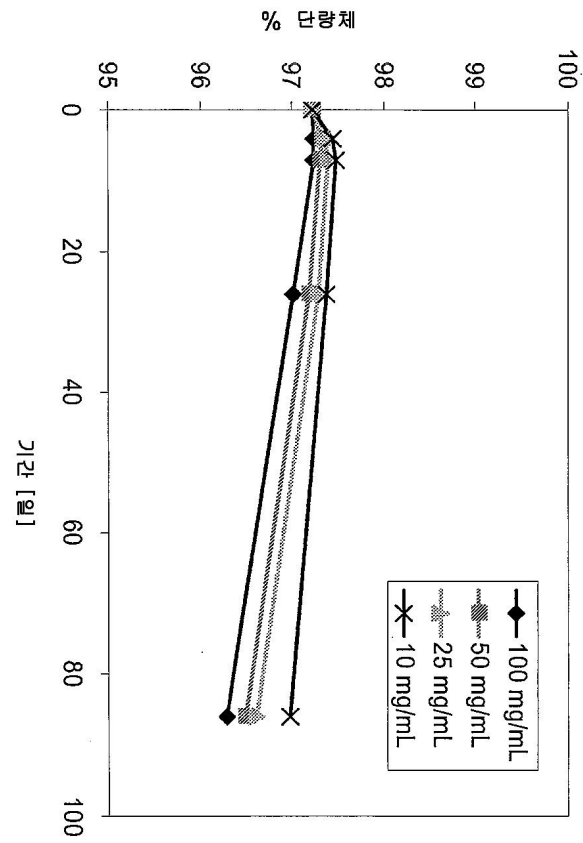
도면16b



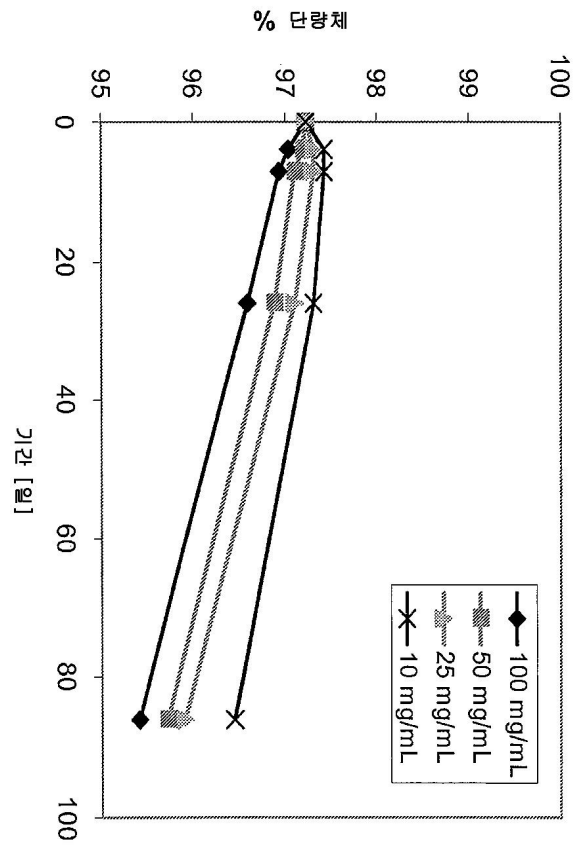
도면17



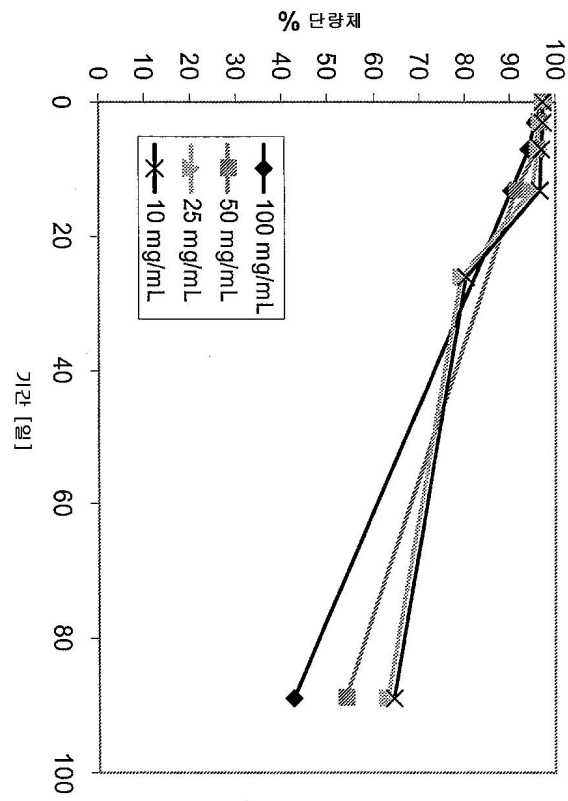
도면18a



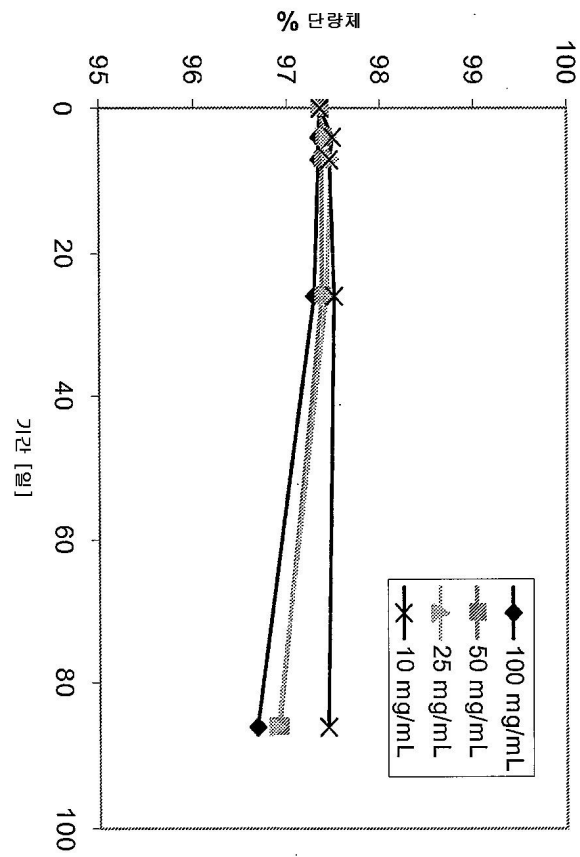
도면18b



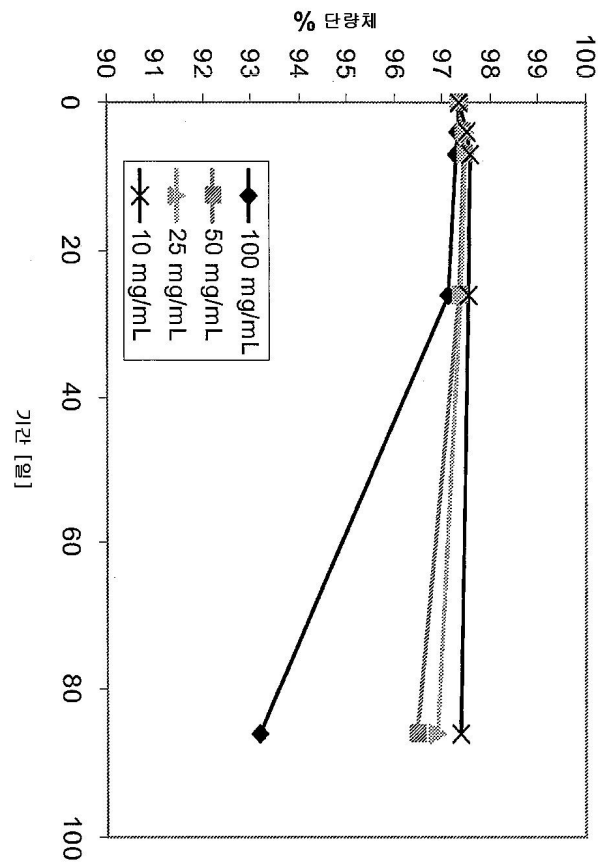
도면18c



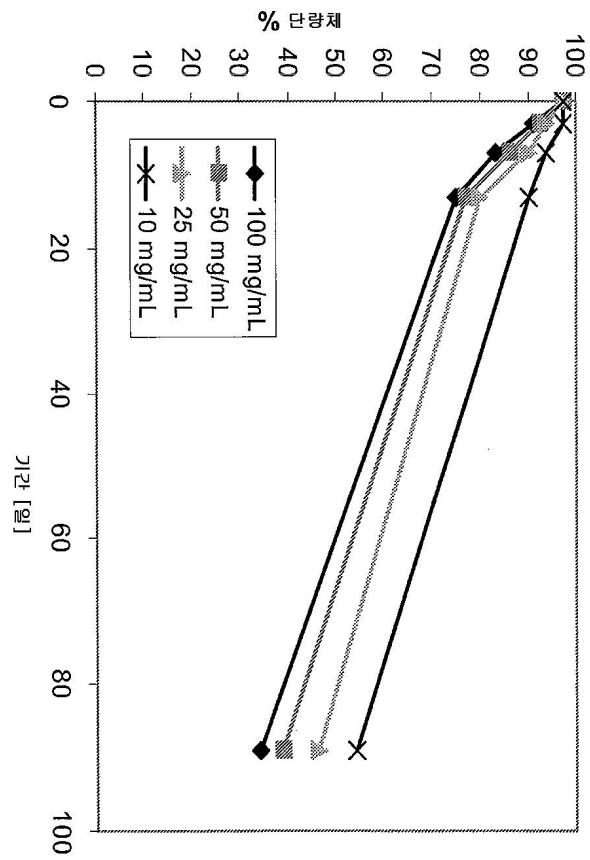
도면19a



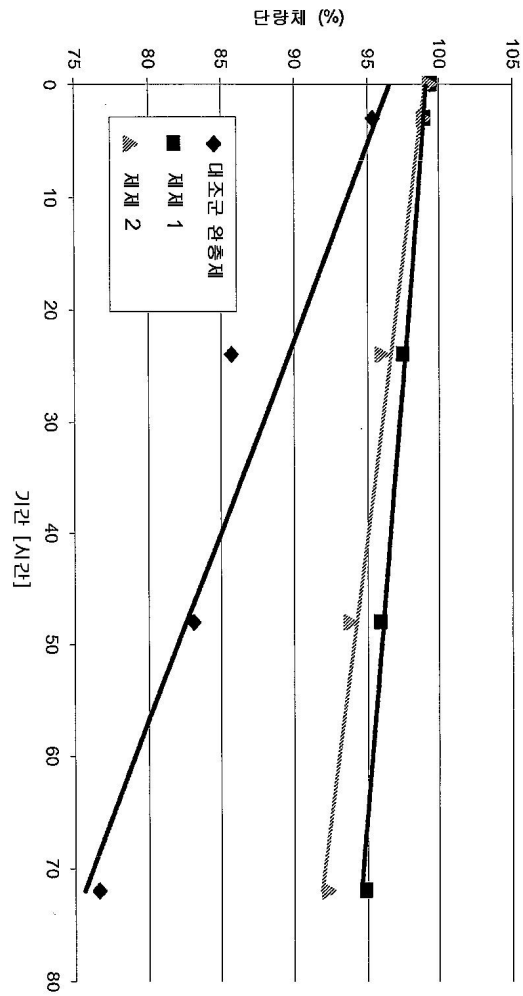
도면19b



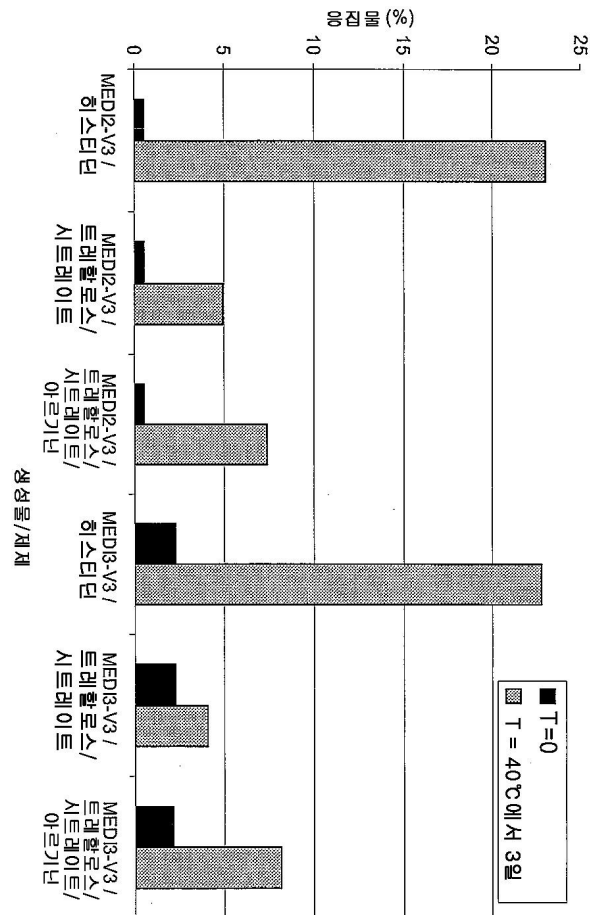
도면19c



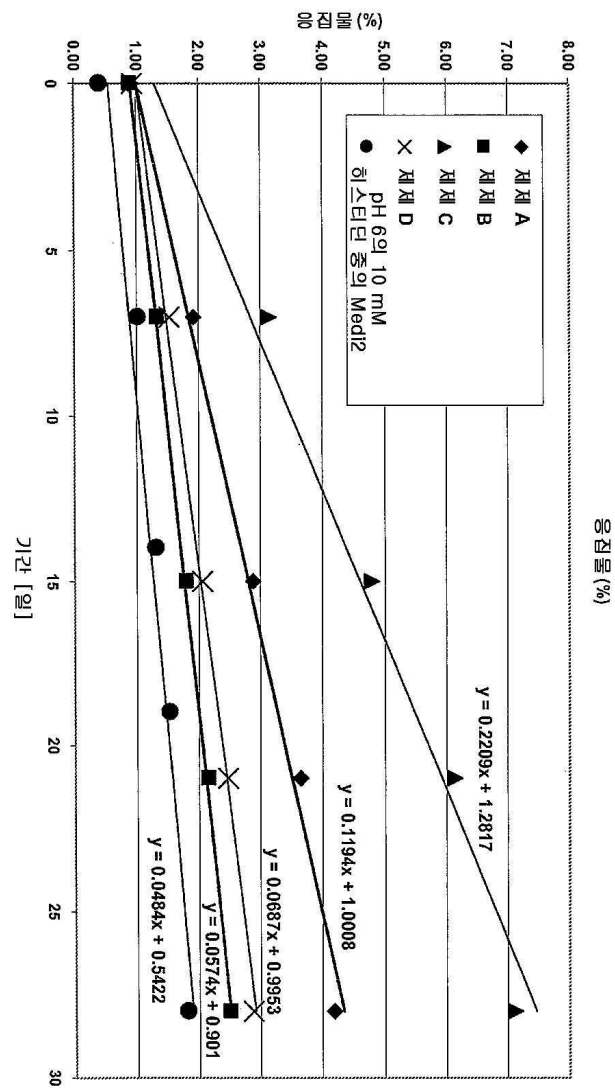
도면20



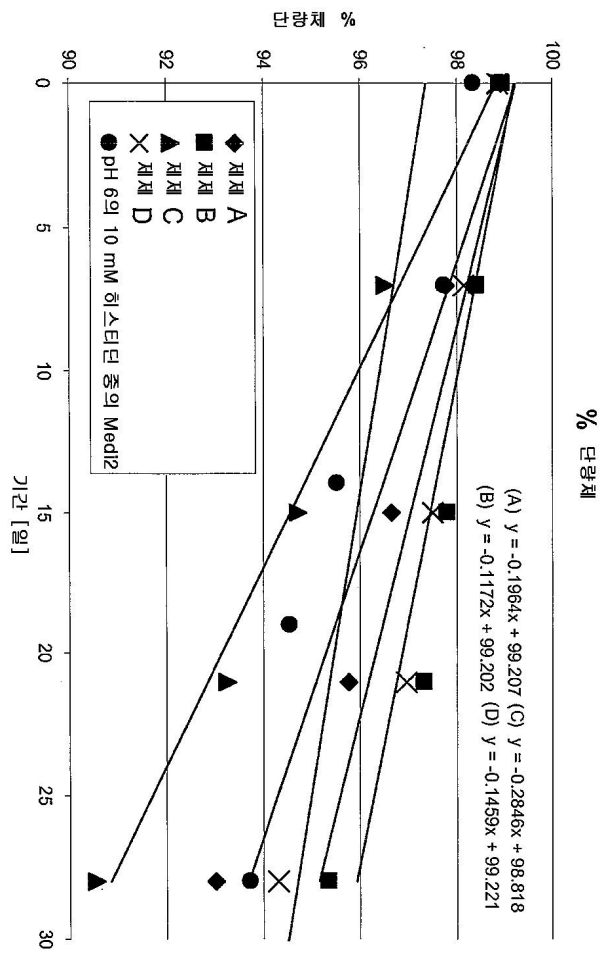
도면21



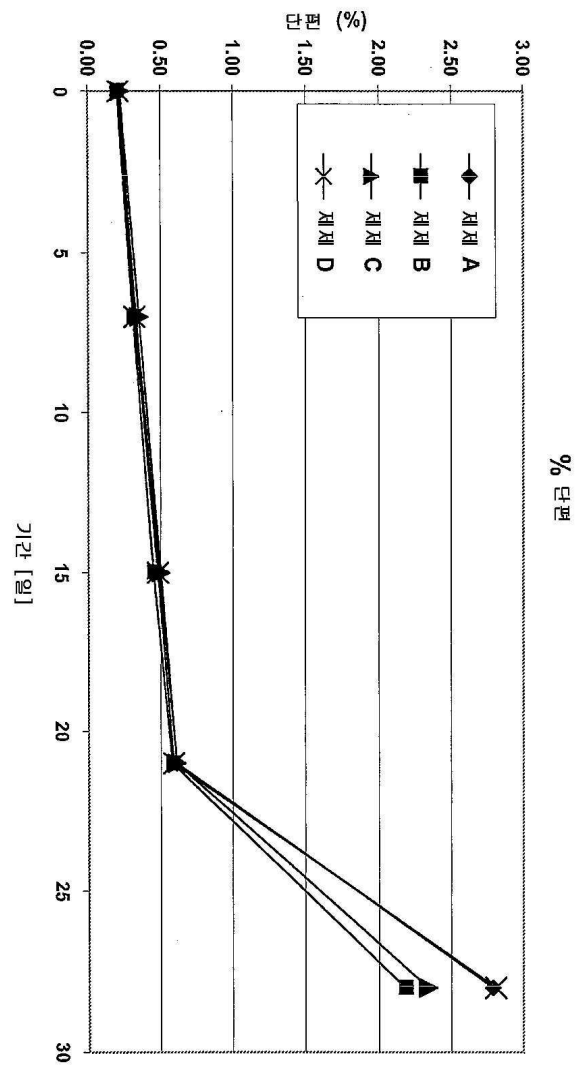
도면22a



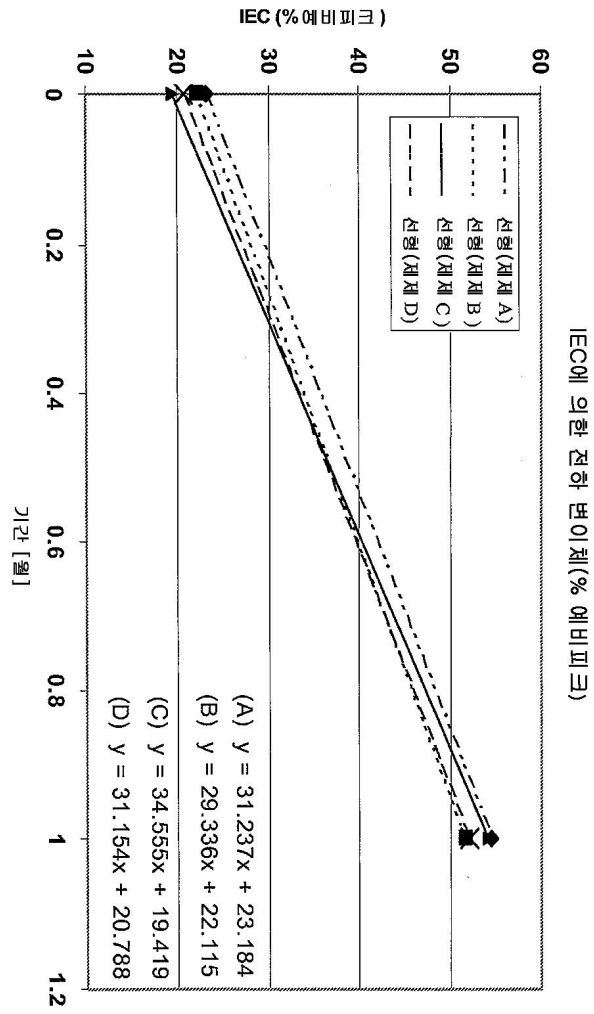
도면22b



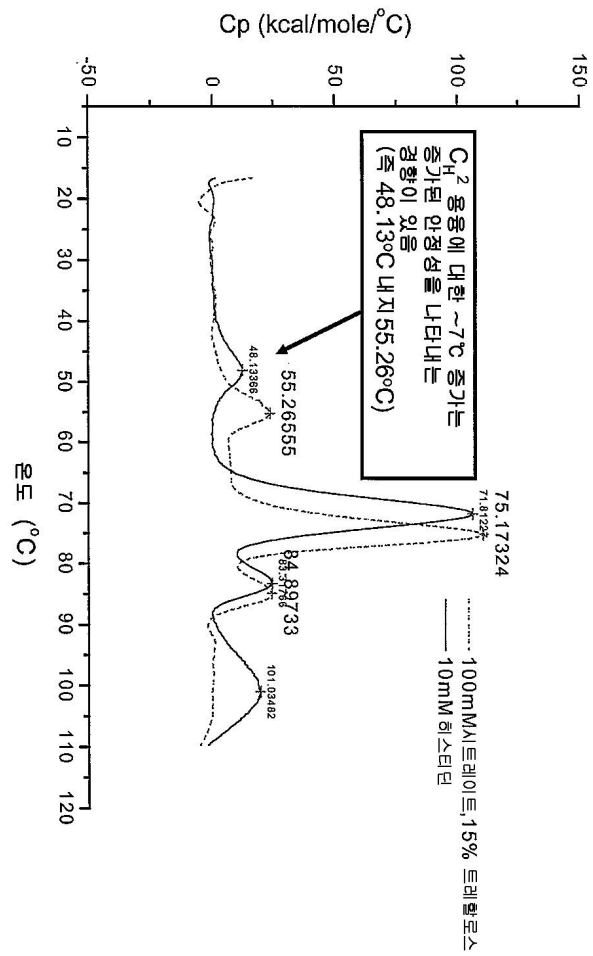
도면22c



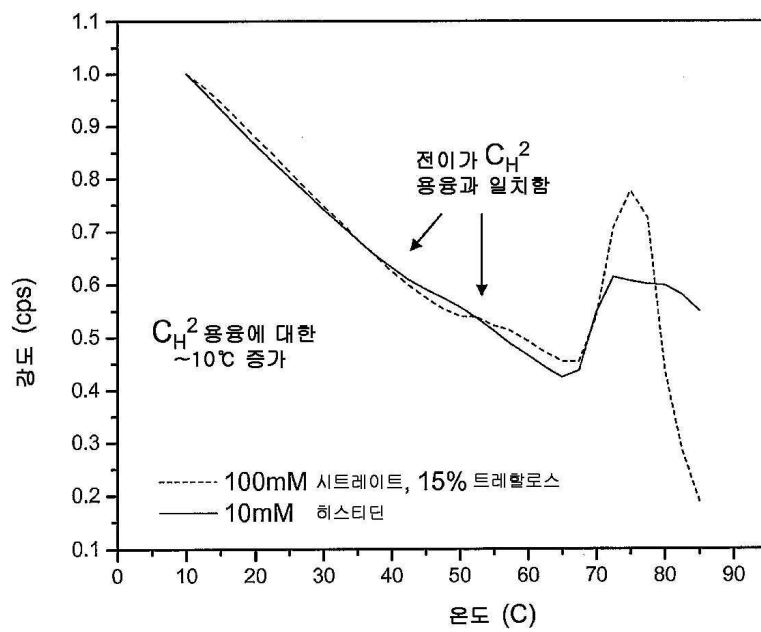
도면22d



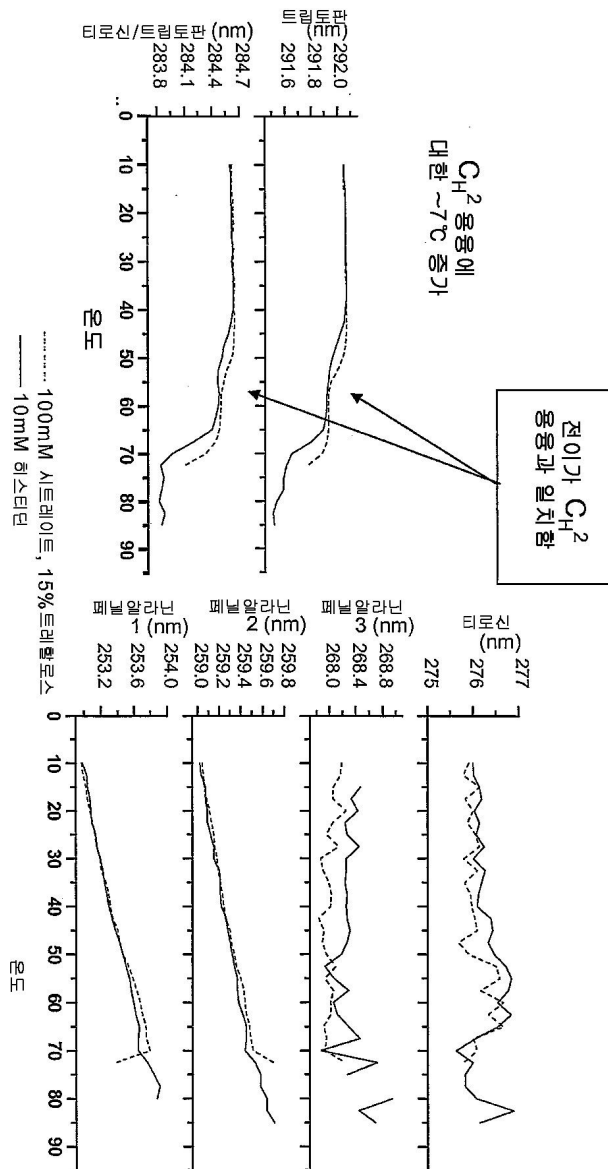
도면23a



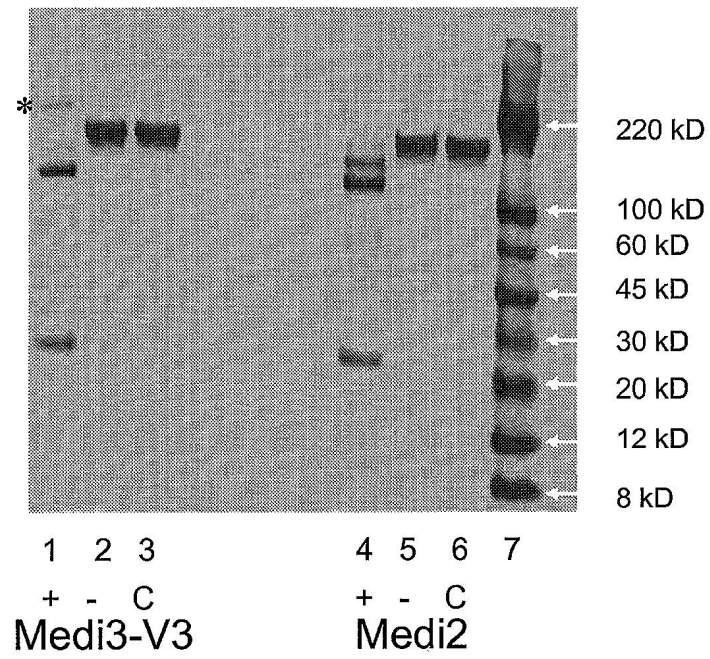
도면23b



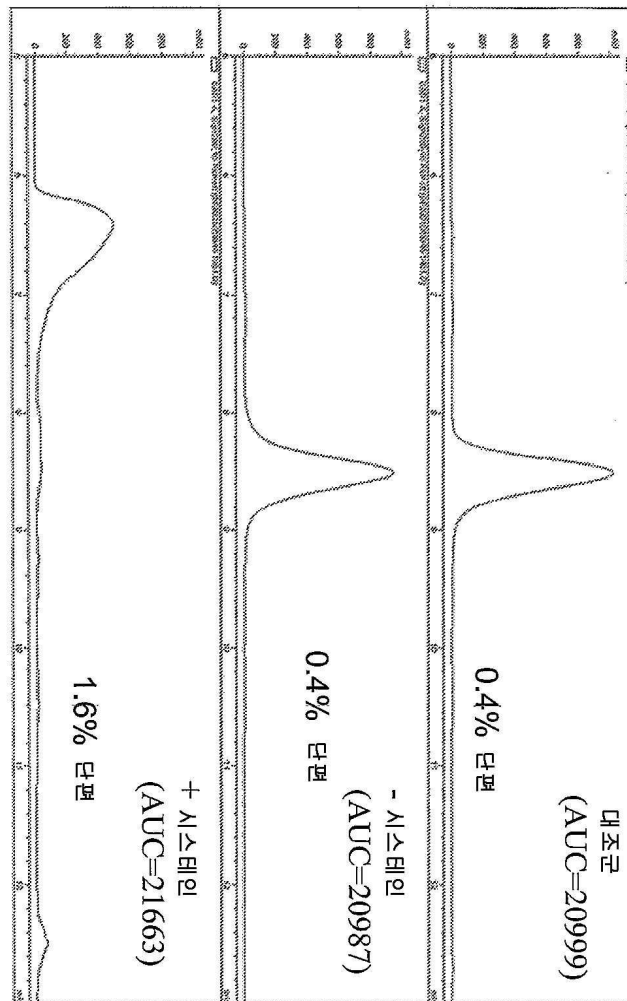
도면23c



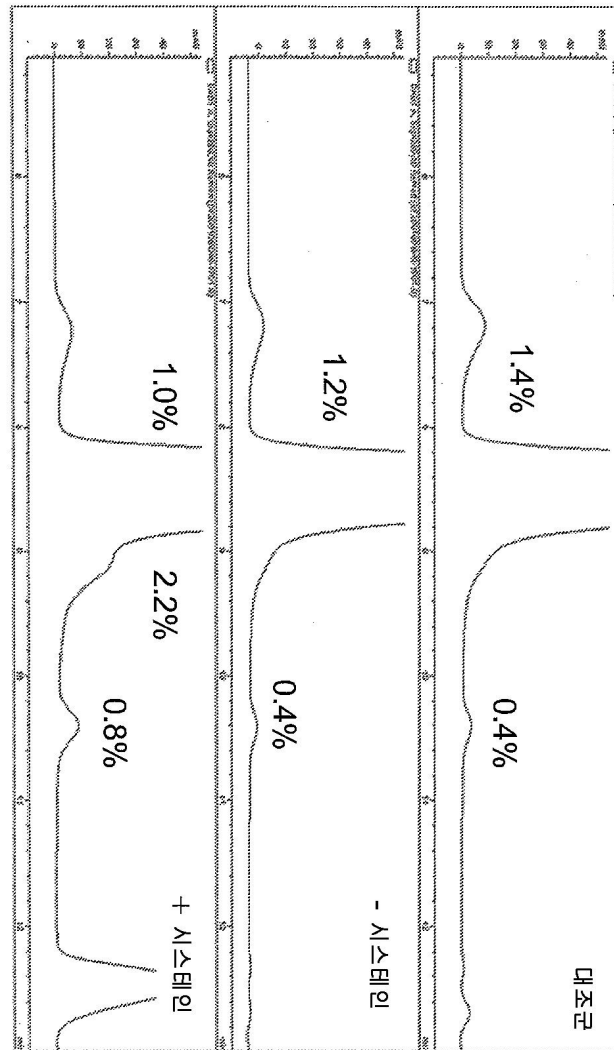
도면24a



도면24b



도면24c



## 서열 목록

### SEQUENCE LISTING

- <110> MedImmune Inc.  
ALLAN, Christian  
LEACH, William  
CHANG, Stephen  
BISHOP, Steven
- <120> Protein Formulation
- <130> AE708PCT
- <150> US 60/764,750
- <151> 2006-02-03
- <150> US 60/825,231

<151> 2006-09-11

<160> 20

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 361

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> recombinant antibody region

<400> 1

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggt gtggtacggc ctggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctgggtt caccgtcagt gattactcca tgaactgggt ccgccaggct 120

ccaggaagg gcctggagtg gattgggttt attagaaaca aagctaagtc ctacacaaca 180

gagtacagtg catctgtgaa gggtagattc accatctcaa gagatgattc aaaaaacacg 240

ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtgtatta ctgtaccaca 300

taccctaggt atcatgttat ggactcctgg ggccaggga ccatggtcac cgtctcctca 360

g 361

<210> 2

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> recombinant antibody region

<400> 2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Asp Tyr  
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Ala Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala  
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
85 90 95

Tyr Cys Thr Thr Tyr Pro Arg Tyr His Ala Met Asp Ser Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 3  
<211> 321  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> recombinant antibody region

<400> 3  
gccatccagt tgactcagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgea gggccagcca aagtattagc aacaacctac actggtacct gcagaagcca 120

gggcagtctc cacagctcct gatctattat ggcttcagtc ccatctctgg ggtcccatca 180

aggttcagtgcgcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag gccaacagct ggccgctcac gttcgcgga 300

gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 4  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> recombinant antibody region

<400> 4

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn  
 20 25 30

Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Tyr Gly Phe Gln Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Trp Pro Leu  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 5

<211> 351  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> recombinant antibody region

<400> 5  
caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gttgtgcagc ctggaaggtc cctgagactc 60  
  
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatgaca tgtcttgggt tcgccaggct 120  
  
ccgggcaagg gtctggagtg ggtcgcaaaa gttagtagtg gtggtggtag cacctactat 180  
  
ttagacactg tgcagggccg attcaccatc tccagagaca atagtaagaa caccctatac 240  
  
ctgcaaatga actctctgag agccgaggac acagccgtgt attactgtgc aagacatctg 300  
  
catggcagtt ttgtttcttg gggccaaggg actacagtga ctgtttctag t 351

<210> 6  
<211> 117  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> recombinant antibody region

<400> 6

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Lys Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Leu Asp Thr Val

50

55

60

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg His Leu His Gly Ser Phe Ala Ser Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 7  
<211> 321  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> recombinant antibody region

<400> 7  
gagattgtgc taactcagtc tccagccacc ctgtctctca gcccaggaga aagggcgact 60  
  
ctttcctgcc aggccagcca aagtattagc aatttcctac actggtatca acaaagcct 120  
  
ggtaagccc caaggcttct catccgtat cgttccagtc ccatctctgg gatccccgcc 180  
  
aggttcagtg gcagtggatc agggacagat ttcaccctca ctatctccag tctggagcct 240  
  
gaagattttg cagtctatta ctgtcaacag agtggcagct ggcctctgac gttcggaggg 300  
  
gggaccaagg tggaaattaa g 321

<210> 8  
<211> 107  
<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> recombinant antibody region

<400> 8

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Phe  
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
35 40 45

Arg Tyr Arg Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Gly Ser Trp Pro Leu  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> recombinant antibody region

<400> 9

Asp Tyr Ser Met Asn  
1 5

<210> 10  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> recombinant antibody region

<400> 10

Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Ala Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser  
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 11  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> recombinant antibody region

<400> 11

Tyr Pro Arg Tyr His Ala Met Asp Ser  
1 5

<210> 12  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> recombinant antibody region

<400> 12

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn Leu His  
1 5 10

<210> 13  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> recombinant antibody region

<400> 13

Tyr Gly Phe Gln Ser Ile Ser  
1 5

<210> 14  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> recombinant antibody region

<400> 14

Gln Gln Ala Asn Ser Trp Pro Leu Thr  
1 5

<210> 15  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> recombinant antibody region

<400> 15

Ser Tyr Asp Met Ser

1 5

<210> 16  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> recombinant antibody region

<400> 16

Lys	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Leu	Asp	Thr	Val	Gln
1				5					10					15	

Gly

<210> 17  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> recombinant antibody region

<400> 17

His	Leu	His	Gly	Ser	Phe	Ala	Ser
1				5			

<210> 18  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> recombinant antibody region

<400> 18

Gln Ser Ile Ser Asn Phe Leu His  
1 5

<210> 19  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> recombinant antibody region

<400> 19

Tyr Arg Ser Gln Ser Ile Ser  
1 5

<210> 20  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> recombinant antibody region

<400> 20

Gln Gln Ser Gly Ser Trp Pro Leu Thr  
1 5