

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2022-0154834
(43) 공개일자 2022년11월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) **A61K 47/18** (2017.01)
A61K 47/22 (2017.01) **A61K 47/26** (2017.01)
A61K 9/00 (2006.01) **A61K 9/08** (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01) **A61P 1/04** (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01) **A61P 37/00** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 39/39591 (2013.01)
A61K 47/183 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7038842(분할)
(22) 출원일자(국제) 2012년05월02일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2021-7020871
원출원일자(국제) 2012년05월02일
심사청구일자 2021년07월27일
- (85) 번역문제출일자 2022년11월04일
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/036072
(87) 국제공개번호 WO 2012/151248
국제공개일자 2012년11월08일
- (30) 우선권주장
61/481,533 2011년05월02일 미국(US)
(뒷면에 계속)
- (71) 출원인
밀레니엄 파머슈티컬스 인코퍼레이티드
미합중국 메사추세츠 02139 캄브리지 랜즈다운 스트리트 40
- (72) 발명자
딜루지오, 윌로우
미국 01886 매사추세츠 웨스트포드 페른우드 드라이브 7
트루옹, 노벨 티.
미국 01757 매사추세츠 밀포드 스타일브룩 로드 26
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 68 항

(54) 발명의 명칭 **항-α4β7 항체에 대한 제형****(57) 요약**

비-환원 당, 항-α4β7 항체 및 적어도 한 종의 아미노산의 혼합물을 포함하는 항체 제형이 기재된다. 개시된 제형은 개선된 안정성, 감소된 응집물 형성을 가지며, 이것에서 항-α4β7 항체의 분해를 지연시킬 수 있거나 또는 그의 임의의 조합물을 나타낼 수 있다. 본 발명은 따르기 용이하고, 치료적 유효량의 생체내 항-α4β7 항체를 초래하는 이들 항체 제형의 안전한 투약 요법을 추가로 제공한다.

대표도 - 도1a

세로온 **LDP02** 중 **DNA** — 클로닝 부위 (소문자), 코작 서열 (대문자) 및 리더 (소문자)를 함유한다

gaattcgcagatgcgtcaccatgggatggagctgtatcctcttctgttagcaacagctacaggtgtccactccag
ggtCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTTAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAA
GGTGTCTGCAAGGGTCTGGCTACACCTTCAACAGCTACTGGATGCAATTGGG
TGAGGCAGGCGCTGGCCAACGCTAGAGTGGATCGGAGAGATTGATCCTTC
TGAGAGTAATACTAATACTAATAAATTCAAGGGACGCGTCACATTGACT
GTAGACATTTCCGCTAGCACAGCCTACATGGAGCTCTCCAGCCTGAGATCTG
AGGACACTGCGGTCTACTATTGTGCAAGAGGGGGTTACGACGGATGGGACTA
TGCTATTGACTACTGGGGTCAAGGCACCTGGTCACCGTCAGCTCAGCCTCCA
CCAAGGGCCATCGGTCTTCCCTGGCACCTCTCTCAAGAGCACCTCTGGG
GGCACAGCGGCTGGGCTGGCTGGTCAAGGACTCTTCCCGAACCCTGGA
CGGTGTCGTGGAACCTAGGCGCCCTGACAGCGGCTGCACACCTTCCCGGC
TGTCACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT
CCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAG
CAACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAATCTCAC
ACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCGCGGGGGCACCGTCAGTCTTCC
TCTTCCCGCAAAACCCAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
ACATGCGTGGTGGTGGAGCTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACT
GGTACGTGGACGGCTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCGGGGAGG
AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCTGCACCA
GGACTGGCTGAATGGC

(52) CPC특허분류

A61K 47/22 (2013.01)
A61K 47/26 (2013.01)
A61K 9/0019 (2013.01)
A61K 9/08 (2013.01)
A61K 9/19 (2013.01)
A61P 1/04 (2018.01)
A61P 29/00 (2018.01)
A61P 37/00 (2018.01)
C07K 16/2839 (2013.01)

(30) 우선권주장

61/550,545 2011년10월24일 미국(US)
61/585,859 2012년01월12일 미국(US)

(72) 발명자

마르가, 사나드 엠.

미국 02140 매사추세츠 캠브리지 잭슨 스트리트 95

팔라니아판, 바이티아나단

미국 01810 매사추세츠 앤도버 스프루스 씨클 7

브라운, 제이슨

미국 01803 매사추세츠 벌링턴 셉템버 레인 10

폭스, 얼빙 에이치.

미국 02482 매사추세츠 웰즐리 리빙스턴 로드 111

솔츠, 캐서린

미국 01801 매사추세츠 워번 내슈아 스트리트 1

명세서

청구범위

청구항 1

안정적인 제형으로서, 비-환원 당, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 및 적어도 한 종의 유리 아미노산의 혼합물을 포함하되, 상기 제형은 고체 형태이고, 상기 비-환원 당 대 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 몰 비(몰:몰)는 600:1 초과인 것인 안정적인 제형.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제형은 완충제를 더 포함하는 것인, 안정적인 제형.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 비-환원 당은 만니톨, 솔비톨, 수크로스, 트레할로스 및 이들의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 안정적인 제형.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 유리 아미노산은 히스티딘, 알라닌, 알기닌, 글라이신, 글루탐산 및 이들의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 안정적인 제형.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 제형은 계면활성제를 더 포함하는 것인, 안정적인 제형.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 계면활성제는 폴리솔베이트 20, 폴리솔베이트 80, 폴록사머 및 이들의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 안정적인 제형.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 제형은 동결건조되고, 동결건조 전 적어도 약 5% 내지 약 10% 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 포함하는 것인, 안정적인 제형.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 제형은 동결건조 전 적어도 약 6% 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 포함하는 것인, 안정적인 제형.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 제형은 약 100mM 내지 약 175mM의 유리 아미노산을 포함하는 것인, 안정적인 제형.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 제형은 액체 제형인 것인, 안정적인 제형.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 제형은 건조 제형인 것인, 안정적인 제형.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 제형은 40℃, 75% RH에서 적어도 3개월 동안 안정적인 것인, 안정적인 제형.

청구항 13

안정적인 액체 제형으로서, 수용액 중에서 비-환원 당, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 및 적어도 한 종의 유리 아미노산을 포함하되, 상기 비-환원 당 대 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 몰 비(몰:몰)는 600:1 초과인 것인, 안정적인 액체 제형.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 제형은 완충제를 더 포함하는 것인, 안정적인 액체 제형.

청구항 15

제13항에 있어서, 상기 비-환원 당은 만니톨, 솔비톨, 수크로스, 트레할로스 및 이들의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 안정적인 액체 제형.

청구항 16

제13항에 있어서, 상기 아미노산은 히스티딘, 알라닌, 알기닌, 글라이신, 글루탐산 및 이들의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 안정적인 액체 제형.

청구항 17

제13항에 있어서, 상기 제형은 계면활성제를 더 포함하는 것인, 안정적인 액체 제형.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 계면활성제는 폴리솔베이트 20, 폴리솔베이트 80, 폴록사머 및 이들의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 안정적인 액체 제형.

청구항 19

제13항에 있어서, 상기 제형은 약 5.5 내지 약 7.5의 pH를 갖는 것인, 안정적인 액체 제형.

청구항 20

제13항에 있어서, 상기 제형은 약 6.0 내지 약 6.5의 pH를 갖는 것인, 안정적인 액체 제형.

청구항 21

제13항에 있어서, 상기 제형은 적어도 약 60 mg/ml 내지 약 80 mg/ml 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 포함하는 것인, 안정적인 액체 제형.

청구항 22

제13항에 있어서, 상기 제형은 적어도 약 60 mg/ml 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 포함하는 것인, 안정적인 액체 제형.

청구항 23

안정적인 제형으로서, 적어도 약 60 mg/ml 내지 약 80 mg/ml 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체, 완충제 및 적어도 약 10%(w/w) 당을 포함하되, 상기 제형은 액체 제형인 것인, 안정적인 제형.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 완충제는 히스티딘 완충제인 것인, 안정적인 제형.

청구항 25

제23항에 있어서, 상기 당은 수크로스인 것인, 안정적인 제형.

청구항 26

안정적인 제형으로서, 적어도 약 60 mg/ml 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 및 적어도 약 10%(w/w) 비-환원 당을 포함하되, 상기 제형은 동결건조된 것인, 안정적인 제형.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 제형은 폴리솔베이트 80을 더 포함하는 것인, 안정적인 제형.

청구항 28

제26항에 있어서, 상기 비-환원 당은 수크로스인 것인, 안정적인 제형.

청구항 29

안정적인 제형으로서, 비-환원 당, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체, 히스티딘, 알기닌 및 폴리솔베이트 80의 혼합물을 포함하되, 상기 제형은 고체 형태이고, 비-환원 당 대 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 몰 비(몰:몰)는 600:1 초과인 안정적인 제형.

청구항 30

제13항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 금속 킬레이터(chelator)를 더 포함하는 것인, 안정적인 제형.

청구항 31

제13항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 항-산화제를 더 포함하는 것인, 안정적인 제형.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 베돌리주맙인 것인 안정적인 제형.

청구항 33

1차 건조 동안 붕괴 온도 미만의 온도로 생성물을 유지하는 단계를 포함하는, 제1항 내지 제32항 중 어느 한 항의 제형의 제조방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 어닐링 단계를 더 포함하는, 제형의 제조방법.

청구항 35

동결건조된 제형의 품질을 결정하는 방법으로서, 외관에 대한 제형을 검사하는 단계; 재구성 시간을 결정하는 단계; 수분 함량을 결정하는 단계; 존재하는 응집물 백분율을 결정하는 단계; 존재하는 단편 백분율을 결정하는 단계; 및 산화/탈아미드화 수준을 결정하는 단계를 포함하는, 동결건조된 제형의 품질 결정방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 제형의 생물학적 활성 및 효능을 결정하는 단계를 더 포함하는, 제형의 품질 결정방법.

청구항 37

염증성 장 질환에 걸린 인간 환자를 치료하는 방법으로서, 상기 방법은,

인간 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린에 대해 결합 특이성을 갖는 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편을 염증성 장 질환에 걸린 환자에게 투여하는 단계를 포함하되,

상기 환자에게 상기 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편을, 다음의 투약 요법:

- 정맥내 주입으로서 300mg의 상기 인간화된 면역글로불린 또는 항원-결합 단편의 초기 투약;
- 그 다음에 상기 초기 투약 후 약 2주에 정맥내 주입으로서 300mg의 상기 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편의 제2의 후속 투약;
- 그 다음에 상기 초기 투약 후 약 6주에 정맥내 주입으로서 300mg의 상기 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편의 제3의 후속 투약;
- 그 다음에 필요하다면 상기 인간화된 항체의 상기 제3의 투약 후 4주마다 또는 8주마다 정맥내 주입으로서 300mg의 상기 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편의 제4의 후속 투약

에 따라 투여하며,

상기 투약 요법은 상기 환자의 상기 염증성 장 질환에서 임상적 반응 및 임상적 관해(remission)를 유도하고;

추가로 상기 인간화된 면역글로불린 또는 항원-결합 단편은 비인간 유래의 항원 결합 영역 및 인간 유래의 항체의 적어도 일부를 포함하며, 상기 인간화된 면역글로불린 또는 항원-결합 단편은 상기 $\alpha 4 \beta 7$ 복합체에 대해 결합 특이성을 가지고, 상기 항원-결합 영역은 하기 CDR들을 포함하는 것인, 염증성 장질환에 걸린 인간 환자의 치료방법:

경쇄: CDR1 서열번호 9

CDR2 서열번호 10

CDR3 서열번호 11

중쇄: CDR1 서열번호 12

CDR2 서열번호 13

CDR3 서열번호 14.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 환자는 면역조절제, 종양 괴사 인자-알파 길항물질 또는 이들의 조합물 중 적어도 하나에 의한 적절한 반응이 결여되었거나, 이들에 대한 반응이 손실되었거나 또는 이들에 의한 처리에 대해 불내성(intolerant)인 것인, 염증성 장질환에 걸린 인간 환자의 치료방법.

청구항 39

제37항에 있어서, 염증성 장질환은 크론병 또는 궤양성 대장염인 것인, 염증성 장질환에 걸린 인간 환자의 치료방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 염증성 장질환은 궤양성 대장염인 것인, 염증성 장질환에 걸린 인간 환자의 치료방법.

청구항 41

제39항에 있어서, 상기 염증성 장 질환은 보통 내지 중증의 활성 궤양성 대장염인 것인, 염증성 장질환에 걸린 인간 환자의 치료방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 투약 요법은 보통 내지 중증의 활성 궤양성 대장염에 걸린 인간에서 점막 치유를 야기하는 것인, 염증성 장질환에 걸린 인간 환자의 치료방법.

청구항 43

제37항에 있어서, 상기 투약 요법은 상기 환자에 의한 코르티코스테로이드 사용의 감소, 제거 또는 감소 및 제거를 야기하는 것인, 염증성 장질환에 걸린 인간 환자의 치료방법.

청구항 44

제37항에 있어서, 상기 환자는 이전에 상기 염증성 장질환에 대해 적어도 한 종의 코르티코스테로이드에 의한 치료를 받은 것인, 염증성 장질환에 걸린 인간 환자의 치료방법.

청구항 45

제37항에 있어서, 상기 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편은 약 1.0 mg/ml 내지 약 1.4 mg/ml의 농도에서 최종 투약 형태로 투여되는 것인, 염증성 장질환에 걸린 인간 환자의 치료방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편은 약 1.2 mg/ml의 최종 투약 형태로 투여되는 것인, 염증성 장질환에 걸린 인간 환자의 치료방법.

청구항 47

제37항에 있어서, 상기 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편은 약 30분에 상기 환자에게 투여되는 것인, 염증성 장질환에 걸린 인간 환자의 치료방법.

청구항 48

제45항에 있어서, 상기 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편은 동결건조된 제형으로부터 재구성된 것인, 염증성 장질환에 걸린 인간 환자의 치료방법.

청구항 49

제45항에 있어서, 상기 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편은 안정적인 액체 제형을 포함하도록 재구성된 것인, 염증성 장질환에 걸린 인간 환자의 치료방법.

청구항 50

제37항에 있어서, 상기 투약 요법은 상기 치료를 받는 환자의 뇌척수액에서 상기 CD4 내지 CD8의 비를 변경시키지 않는 것인, 염증성 장 질환에 걸린 인간 환자의 치료방법.

청구항 51

염증성 장질환의 치료적 처치를 위한 투약 요법으로서, 상기 요법은 염증성 장질환에 걸린 환자에게 인간 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린에 대해 결합 특이성을 갖는 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편을 투여하는 단계를 포함하되,

상기 환자에게 상기 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편을, 다음의 투약 요법:

- a. 정맥내 주입으로서 300mg의 상기 인간화된 면역글로불린 또는 항원-결합 단편의 초기 투약;
- b. 그 다음에 상기 초기 투약 후 약 2주에 정맥내 주입으로서 300mg의 상기 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편의 제2의 후속 투약;
- c. 그 다음에 상기 초기 투약 후 약 6주에 정맥내 주입으로서 300mg의 상기 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편의 제3의 후속 투약;
- d. 그 다음에 필요하다면 상기 인간화된 항체의 상기 제3의 투약 후 4주마다 또는 8주마다 정맥내 주입으로서 300mg의 상기 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편의 제4의 후속 투약

에 따라 투여하고,

상기 투약 요법은 상기 환자의 염증성 장질환에서 임상적 반응 및 임상적 관해를 유도하며;

추가로, 상기 인간화된 면역글로불린 또는 항원-결합 단편은 비인간 유래 및 인간 유래의 항체의 적어도 일부의 항원 결합 영역을 포함하되, 상기 인간화된 면역글로불린 또는 항원-결합 단편은 상기 $\alpha 4\beta 7$ 복합체에 대해 결합 특이성을 가지고, 상기 항원-결합 영역은 하기 상보성 결정 영역(complementarity determining region: CDR)들을 포함하는 것인, 염증성 장질환의 치료적 처치를 위한 투약 요법:

경쇄: CDR1 서열번호 9

CDR2 서열번호 10

CDR3 서열번호 11

중쇄: CDR1 서열번호 12

CDR2 서열번호 13

CDR3 서열번호 14.

청구항 52

제51항에 있어서, 상기 환자는 면역조절제, 중양 피사 인자-알파 길항물질 또는 이들의 조합물 중 적어도 하나에 의한 적절한 반응이 결여되었거나, 이들에 대한 반응이 손실되었거나 또는 이들에 의한 치료에 대해 불내성인 것인, 염증성 장질환의 치료적 처치를 위한 투약 요법.

청구항 53

제51항에 있어서, 염증성 장질환은 크론병 또는 궤양성 대장염인 것인, 염증성 장질환의 치료적 처치를 위한 투약 요법.

청구항 54

제52항에 있어서, 상기 염증성 장질환은 궤양성 대장염인 것인, 염증성 장질환의 치료적 처치를 위한 투약 요법.

청구항 55

제54항에 있어서, 상기 염증성 장질환은 보통 내지 중증의 활성 궤양성 대장염인 것인, 염증성 장질환의 치료적 처치를 위한 투약 요법.

청구항 56

제55항에 있어서, 상기 투약 요법은 보통 내지 중증의 활성 궤양성 대장염에 걸린 환자에서 점막 치유를 야기하는 것인, 염증성 장질환의 치료적 처치를 위한 투약 요법.

청구항 57

제51항에 있어서, 상기 투약 요법은 상기 환자에 의한 코르티코스테로이드의 감소, 제거 또는 감소 및 제거를 야기하는 것인, 염증성 장질환의 치료적 처치를 위한 투약 요법.

청구항 58

제51항에 있어서, 상기 환자는 이전에 상기 염증성 장질환에 대해 적어도 한 종의 코르티코스테로이드에 의한 치료를 받은 것인, 염증성 장질환의 치료적 처치를 위한 투약 요법.

청구항 59

제51항에 있어서, 상기 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편은 약 1.0 mg/ml 내지 약 1.4 mg/ml의 농도에서 최종 투약 형태로 투여되는 것인, 염증성 장질환의 치료적 처치를 위한 투약 요법.

청구항 60

제59항에 있어서, 상기 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편은 약 1.2 mg/ml의 최종 투약 형태로 투여되는 것인, 염증성 장질환의 치료적 처치를 위한 투약 요법.

청구항 61

제51항에 있어서, 상기 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편은 약 30분에 상기 환자에게 투여되는 것인, 염증성 장질환의 치료적 처치를 위한 투약 요법.

청구항 62

제61항에 있어서, 상기 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편은 동결건조된 제형으로부터 재구성된 것인, 염증성 장질환의 치료적 처치를 위한 투약 요법.

청구항 63

제61항에 있어서, 상기 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편은 안정적인 액체 제형을 포함하도록 재구성된 것인, 염증성 장질환의 치료적 처치를 위한 투약 요법.

청구항 64

제51항에 있어서, 상기 투약 요법은 상기 치료를 받은 환자의 뇌척수액에서 상기 CD4 대 CD8의 비를 변경시키지 않는 것인, 염증성 장질환의 치료적 처치를 위한 투약 요법.

청구항 65

제51항에 있어서, 상기 환자는 65세 이상의 환자이고, 추가로 상기 환자는 상기 투약 요법의 임의의 조절을 필요로 하지 않는 것인, 염증성 장질환의 치료적 처치를 위한 투약 요법.

청구항 66

제51항에 있어서, 상기 환자는 65세 이상의 환자이고, 추가로 상기 환자는 상기 투약 요법의 임의의 조절을 필요로 하지 않는 것인, 염증성 장질환의 치료적 처치를 위한 투약 요법.

청구항 67

제1항에 있어서, 상기 유리 아미노산 대 항체 몰 비는 적어도 250:1인 것인 안정적인 제형.

청구항 68

제13항에 있어서, 상기 유리 아미노산 대 항체 몰 비는 적어도 250:1인 것인 안정적인 제형.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련출원

[0002] 본 출원은 2012년 1월 12일 출원된 미국 가특허 출원 제61/585,859호 및 2011년 10월 24일 출원된 미국 가특허 출원 제61/550,545호 및 2011년 5월 2일 출원된 미국 가특허 출원 제61/481,533호에 대해 우선권의 이익을 주장한다. 앞서 언급한 출원의 전문은 본 명세서에 참조로서 포함된다.

[0003] 서열목록

[0004] 본 출원은 EFS-웹(EFS-Web)을 통해 ASCII 형식으로 제출된 서열목록을 포함하며, 이는 본 명세서에 그의 전문이 참조로서 포함된다. 2012년 4월 30일에 작성된 상기 ASCII 사본은 92596615.txt로 칭해지며, 용량은 17,024 바이트이다.

배경 기술

[0005] 생명공학의 진보는 재조합 DNA 기법을 사용하여 약제학적 적용을 위한 다양한 단백질을 생성하는 것을 가능하게 하였다. 단백질은 전통적인 유기 및 무기 약물보다 더 크고 더 복잡하기 때문에(즉, 3-차원 구조를 복잡하게 하는 것에 추가로 다양한 작용기를 소유함), 이러한 단백질의 제형은 특별한 문제를 가진다. 생물학적 활성을 보유하는 단백질에 대해, 제형은 적어도 단백질 아미노산의 코어 서열의 입체구조적 완전함을 보존하여야 하는 한편, 동시에 단백질의 다양한 작용기가 분해되는 것으로부터 보호하여야 한다. 단백질은 안정성이 결여될 수 있고, 단클론성 및 다클론성 항체는 특히 상대적으로 불안정할 수 있다(예를 들어, 문헌[Wang, et al., *J. Pharm Sci.* 96:1-26 (2007)] 참조). 다수의 제형 선택사항이 이용가능하며, 하나의 접근 또는 시스템이 모든 단백질에 대해 적합하지는 않다. 고려되는 몇몇 인자는 보고되었다(예를 들어, 문헌[Wang et al.]).

[0006] 수많은 특징이 단백질의 안정성에 영향을 미칠 수 있다. 사실, 정제된 항체의 경우에서조차, 항체 구조는 불균질할 수 있는데, 이는 이러한 시스템의 제형을 더 복잡하게 만든다. 게다가, 항체 제형에 포함된 부형제는 임의의 잠재적인 면역 반응을 바람직하게는 최소화한다.

[0007] 항체의 경우에, 입체구조적 완전함의 보존은 훨씬 더 중요하다. 단백질에 대한 분해 경로는 화학적 불안정성(즉, 새로운 화학적 독립체를 야기하는 결합 형성 또는 절단에 의해 단백질의 변형을 수반하는 어떤 과정) 또는 생리적 불안정성(즉, 더 고차 구조의 단백질에서의 변화)을 수반할 수 있다. 화학적 불안정성은, 예를 들어 탈아미드화, 이성질체화, 가수분해, 산화, 단편화, 글라이칸 베타 제거 또는 이황화물 교환에서 분명해진다. 생리적 불안정성은, 예를 들어 변성, 응집, 침전 또는 흡착으로부터 초래될 수 있다. 4가지의 가장 흔한 단

백질 분해 경로는 단백질 단편화, 응집, 탈아미드화 및 산화이다. 치료적 단백질의 화학적 또는 생리적 불안정성의 결과는 효과적인 투여 용량의 저하, 예를 들어 자극 또는 면역학적 반응성에 기인하는 치료의 감소된 안전성 및 짧은 보관수명에 기인하는 더 빈번한 제조를 포함한다.

[0008] 냉동-건조는 단백질을 보존하기 위해 보통 사용되는 기법이며; 냉동-건조는 관심의 단백질 제제로부터 물을 제거하는 작용을 한다. 냉동-건조 또는 동결건조는 건조되는 물질이 우선 냉동된 다음, 얼음 또는 냉동된 용매가 진공하 승화에 의해 제거되는 과정이다. 부형제는 동결건조 동안 단백질을 안정화시키고/시키거나 동결건조된 단백질 제형의 안정성을 개선시키기 위해 사전-동결건조된 제형에 포함될 수 있다(문헌[Pikal M., *Biopharm.* 3(9)26-30 (1990) 및 Arakawa *et al.* *Pharm. Res.* 8(3):285-291 (1991)]).

[0009] 몇몇 간행물은 염증성 장질환을 치료하는 일반적으로 다양한 방법을 개시하였으며, 염증성 장질환을 치료하도록 설계된 작용제(agent)의 투여를 위한 투약 계획을 제공하였다. 예를 들어, WO 96/24673은 MAdCAM을 발현시키는 세포에 백혈구 결합의 결과로서 위장관에 대한 백혈구 보충물과 관련된 질병의 치료 및 점막 혈관 어드레신(addressin)을 개시한다. 미국특허 제2005/0095238호는 점막 조직의 백혈구 침윤과 관련된 질병의 치료 방법 및 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린에 대해 결합 특이성을 갖는 인간 또는 인간화된 면역글로불린 또는 항원 결합 단편의 유효량의 인간에 투여를 기재한다. 미국특허 제2005/0095238호는 다양한 용량(예를 들어, kg 체중 당 0.15, 약 0.5, 약 1.0, 약 1.5 또는 약 2.0mg 면역글로불린 또는 단편) 및 투약 사이에 다양한 간격(7, 14, 21, 28 또는 30일)을 추가로 기재한다. 그러나, 앞서 언급한 특허 및 간행물은 본 명세서에 기재되고 청구된 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 구체적인 제형 또는 구체적인 용량 및 투약 요법(dose regimen)을 개시하지 않는다. 중요하게는, 앞서 언급한 특허는 본 명세서에 기재되고 청구된 치료 방법(임상시험 데이터에 의해 뒷받침됨)을 제공하는 제형, 용량 및 투약 요법을 개시하지 않는다.

[0010] 본 발명의 항체 제형은 MAdCAM을 발현시키는 세포에 백혈구 결합을 억제하는데 유용할 수 있고, 따라서 환자에서 염증성 장질환의 치료에 도움을 준다. 따라서, 이들 화합물의 적합한 투약량 및 투약 스케줄을 발견하고, 안정하고 편리한 형태로 장기간의 시간에 걸쳐 꾸준하고, 치료적으로 효과적인 혈액 수준을 생기게 하는 제형, 바람직하게는 정맥내 제형을 개발할 긴급한 필요가 있다.

발명의 내용

[0011] 본 발명은 비-환원 당 및 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형을 제형화하기 위한 유용한 부형제로서 적어도 한 종의 아미노산의 식별에 관한 것인데, 항체 제형의 불안정성은 탈아미드화, 산화, 이성질체화 및/또는 응집에 민감하게 한다. 제형은 안정성을 개선하며, 응집물 형성을 감소시키고, 그것에서 항체의 분해를 지연시킨다.

[0012] 따라서, 제1 양태에서, 본 발명은 비-환원 당, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 및 적어도 한 종의 유리 아미노산의 혼합물을 포함하는 안정한 제형에 관한 것이며, 비-환원 당 대 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 몰 비(몰:몰)는 600:1 초과이다. 제형은 액체 제형 또는 건조 제형(예를 들어, 동결건조됨)일 수 있다. 제형은 또한 완충제를 함유할 수 있다. 일부 실시형태에서, 비-환원 당은 만니톨, 솔비톨, 수크로스, 트레할로스 또는 이들의 조합물이다.

[0013] 일부 실시형태에서, 제형의 유리 아미노산은 히스티딘, 알라닌, 알기닌, 글라이신, 글루탐산, 또는 이들의 임의의 조합이다. 제형은 유리 아미노산의 약 50mM 내지 약 175mM을 포함할 수 있다. 제형은 유리 아미노산의 약 100mM 내지 약 175mM을 포함할 수 있다. 유리 아미노산 대 항체 몰 비의 비는 적어도 250:1일 수 있다.

[0014] 제형은 또한 계면활성제를 함유할 수 있다. 계면활성제는 폴리솔베이트 20, 폴리솔베이트 80, 폴록사머 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다.

[0015] 일부 양태에서, 제형은 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 면역원성을 최소화할 수 있다.

[0016] 예를 들어 건조 상태에서, 제형은 40°C, 75% 상대적 습도(relative humidity: RH)에서 적어도 3개월 동안 안정할 수 있다.

[0017] 다른 양태에서, 제형은 동결건조되고, 동결건조 전 적어도 약 5% 내지 약 10% 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 포함한다. 제형은 동결건조 전 적어도 약 6% 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 함유할 수 있다. 제형은 동결건조된 제형으로부터 재구성될 수 있다(예를 들어, 안정한 액체 제형을 포함하도록 재구성됨).

[0018] 다른 양태에서, 본 발명은 비-환원 당, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 및 적어도 한 종의 유리 아미노산의 혼합물을 포함하는 안정한 제형에 관한 것이며, 비-환원 당 대 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 몰 비(몰:몰)는 600:1 초과이고, 유리 아미노산 대 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 몰 비(몰:몰)는 250:1 초과이다.

- [0019] 다른 양태에서, 본 발명은 비-환원 당, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 및 적어도 한 종의 유리 아미노산을 지니는 수용액으로 포함되는 안정한 액체 제형에 관한 것이되, 비-환원 당 대 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 몰 비(몰:몰)는 600:1 초과이다. 또한 추가 양태에서, 본 발명은 적어도 약 40 mg/ml 내지 약 80 mg/ml 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체, 적어도 약 50 내지 175mM의 한 종 이상의 아미노산, 및 적어도 약 6% 내지 적어도 약 10%(w/v) 당을 포함하는 액체 제형에 관한 것이다. 액체 제형은 또한 완충제를 함유할 수 있다. 일부 실시형태에서, 액체 제형은 또한 금속 킬레이터(chelator)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 액체 제형은 또한 항-산화제를 포함한다.
- [0020] 다른 양태에서, 본 발명은 적어도 약 60 mg/ml 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체, 적어도 약 10%(w/v) 비-환원 당, 및 적어도 약 125mM의 한 종 이상의 유리 아미노산을 포함하는 액체 제형에 관한 것이다.
- [0021] 다른 양태에서, 본 발명은 적어도 약 60 mg/ml 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체, 적어도 약 10%(w/v) 비-환원 당, 및 적어도 약 175mM의 한 종 이상의 유리 아미노산을 포함하는 액체 제형에 관한 것이다.
- [0022] 또 다른 추가 양태에서, 본 발명은 또한 비-환원 당, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체, 히스티딘, 알기닌 및 폴리솔베이트 80의 혼합물을 포함하는 건조, 예를 들어 동결건조된 제형에 관한 것이되, 제형은 고체 형태이고, 비-환원 당 대 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 몰 비(몰:몰)는 600:1 초과이다.
- [0023] 또 다른 추가 양태에서, 본 발명은 비-환원 당, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체, 히스티딘, 알기닌 및 폴리솔베이트 80의 혼합물을 포함하는 동결건조된 제형에 관한 것이다. 이 양태에서, 비-환원 당 대 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 몰 비(몰:몰)는 600:1 초과이다. 더 나아가, 제형 내 알기닌 대 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 몰 비(몰:몰)는 250:1 초과이다.
- [0024] 다른 양태에서, 본 발명은 1차 건조 동안 붕괴 온도 미만의 생성 온도를 유지하는 단계를 포함하는, 본 명세서에 기재된 제형의 제조방법에 관한 것이다. 해당 방법은 또한 어닐링 단계를 함유할 수 있다.
- [0025] 일 양태에서, 본 발명은 염증성 장 질환에 걸린 인간 환자를 치료하는 방법에 관한 것이되, 해당 방법은 염증성 장 질환에 걸린 환자에게 인간 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린에 대해 결합 특이성을 갖는 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편을 투여하는 단계를 포함하고, 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편은 비인간 유래의 항원-결합 영역 및 인간 유래 항체의 적어도 일부를 포함하며, 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편은 다음의 투약 요법: (a) 정맥내 주입으로서 300mg의 인간화된 면역글로불린 또는 항원-결합 단편의 초기 투약; (b) 그 다음에 초기 투약 후 약 2주에 정맥내 주입으로서 300mg의 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편의 제2의 후속 투약; (c) 그 다음에 초기 투약 후 약 6주에 정맥내 주입으로서 300mg의 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편의 제3의 후속 투약; (d) 그 다음에 필요하다면 인간화된 항체의 제3의 투약 후 4주마다 또는 8주마다 정맥내 주입으로서 300mg의 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편의 제4의 후속 투약에 따라 환자에게 투여되고; 투약 요법은 환자의 염증성 장질환에서 임상적 반응 및 임상적 관해(remission)를 유발하고; 추가로, 인간화된 면역글로불린 또는 항원-결합 단편은 $\alpha 4\beta 7$ 복합체에 대해 결합 특이성을 가지며, 항원-결합 영역은 이하에 제시되는 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역(CDR1, CDR2 및 CDR3) 및 중쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역(CDR1, CDR2 및 CDR3)을 포함한다: 경쇄: CDR1 서열번호 9, CDR2 서열번호 10, CDR3 서열번호 11; 중쇄: CDR1 서열번호 12, CDR2 서열번호 13, CDR3 서열번호 14.
- [0026] 다른 양태에서, 본 발명은 염증성 장 질환의 치료적 처치를 위한 투약 요법에 관한 것이되, 투약 요법은 인간 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린에 대해 결합 특이성을 갖는 염증성 장 질환에 걸린 환자에게 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편을 투여하는 단계를 포함하고, 인간화된 면역글로불린 또는 항원-결합 단편은 인간 유래의 비인간 유래의 항원-결합 영역 및 인간 유래의 적어도 일부를 포함하며, 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편은 다음의 투약 요법: (a) 정맥내 주입으로서 300mg의 인간화된 면역글로불린 또는 항원-결합 단편의 초기 투약; (b) 그 다음에 초기 투약 후 약 2주에 정맥내 주입으로서 300mg의 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편의 제2의 후속 투약; (c) 그 다음에 초기 투약 후 약 6주에 정맥내 주입으로서 300mg의 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편의 제3의 후속 투약; (d) 그 다음에 필요하다면 인간화된 항체의 제3의 투약 후 4주마다 또는 8주마다 정맥내 주입으로서 300mg의 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편의 제4의 후속 투약에 따라 환자에게 투여되고; 투약 요법은 환자의 염증성 장질환에서 임상적 반응 및 임상적 관해를 유발하고; 추가로, 인간화된 면역글로불린 또는 항원-결합 단편은 $\alpha 4\beta 7$ 복합체에 대해 결합 특이성을 가지되, 항원-결합 영역은 이하에 제시되는 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역(CDR1, CDR2 및 CDR3) 및 중쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역(CDR1, CDR2 및 CDR3)을 포함한다: 경쇄: CDR1 서열번호 9, CDR2 서열번호 10, CDR3 서열번호 11; 중쇄: CDR1 서열번호 12, CDR2 서열번호 13, CDR3 서열번호

14.

- [0027] 일부 양태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형, 용량, 투약 요법에 의한 치료 방법은 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 면역원성을 최소화할 수 있다.
- [0028] 환자는 면역조절제, 종양 괴사 인자-알파(tumor necrosis factor- α : TNF- α) 길항물질 또는 이들의 조합 중 적어도 하나에 의한 치료에 대해 적절한 반응이 결여되고, 치료에 대한 반응이 손실되거나 또는 치료에 대해 관용이 없을 수 있다
- [0029] 염증성 장질환은 크론병 또는 궤양성 대장염일 수 있다. 염증성 장질환은 보통 내지 중증의 활성 궤양성 대장염일 수 있다.
- [0030] 투약 요법은 보통 내지 중증의 활성 궤양성 대장염에 걸린 환자의 점막 치유를 야기할 수 있다.
- [0031] 환자는 염증성 장질환에 대해 이전에 적어도 한 종의 코르티코스테로이드로 치료받았을 수 있다. 투약 요법은 환자에 의한 코르티코스테로이드 사용의 감소, 제거 또는 감소와 제거를 야기할 수 있다.
- [0032] 일부 양태에서, 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편은 약 1.0 mg/ml 내지 약 1.4 mg/ml의 농도의 최종 투약 형태로 투여된다. 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편은 약 1.2 mg/ml의 최종 투약 형태로 투여될 수 있다. 인간화된 면역글로불린 또는 항원-결합 단편은 약 30분에 환자에게 투여될 수 있다.
- [0033] 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편은 동결건조된 제형으로부터 재구성될 수 있다.
- [0034] 인간화된 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편은 안정한 액체 제형을 포함하도록 재구성될 수 있다.
- [0035] 일부 양태에서, 투약 요법은 상기 치료를 받는 환자의 뇌척수액에서 CD4 대 CD8의 비를 변경시키지 않는다.
- [0036] 환자는 65세 이상의 사람일 수 있고, 투약 요법의 어떤 조절을 필요로 하지 않는다.

도면의 간단한 설명

- [0037] 도 1은 인간화된 항- $\alpha 4\beta 7$ 면역글로불린의 중쇄를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열(서열번호 1) 및 중쇄의 추론된 아미노산 서열(서열번호 2)을 도시한 도면. 뉴클레오타이드 서열은 중쇄의 5' 말단에서 클로닝 부위(소문자), 코작(Kozak) 서열(대문자, 서열번호 1의 뉴클레오타이드 18 내지 23) 및 리더 서열(소문자, 서열번호 1의 뉴클레오타이드 24 내지 86)을 함유한다. 뉴클레오타이드 서열의 오픈 리딩 프레임은 서열번호 1의 뉴클레오타이드 24 내지 1433이다.
- 도 2는 본 명세서에서 베돌리주맙으로서 지칭되는 인간화된 면역글로불린의 경쇄를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열(서열번호 3) 및 경쇄의 추론된 아미노산 서열(서열번호 4)을 도시한 도면. 뉴클레오타이드 서열은 중쇄의 5' 말단에서 클로닝 부위(소문자), 코작 서열(대문자, 서열번호 3의 뉴클레오타이드 18 내지 23) 및 리더 서열(소문자, 서열번호 3의 뉴클레오타이드 24 내지 80)을 함유한다. 뉴클레오타이드 서열의 오픈 리딩 프레임은 서열번호 3의 뉴클레오타이드 24 내지 737이다.
- 도 3은 (A) 본 명세서에서 베돌리주맙으로서 지칭되는 인간화된 면역글로불린의 성숙 인간화된 경쇄(서열번호 4의 아미노산 20 내지 238) 및 (B) 본 명세서에서 LDP-02로서 지칭되는 인간화된 면역글로불린의 성숙 인간화된 경쇄(서열번호 5)의 아미노산 서열의 정렬을 도시한 도면. (LDP-02에 대해서, WO 98/06248 및 문헌[Feagan et al., *N. Eng. J. Med.* 352:2499-2507 (2005)] 참조). 문헌[Feagan et al.]은 LDP-02의 임상 연구를 기재하지만, 논문에서 그들은 LDP-02를 MLN02로서 지칭한다) 정렬은 베돌리주맙과 LDP-02의 경쇄의 아미노산 서열이 성숙 경쇄의 위치 114 및 115에서 다르다는 것을 도시한다.
- 도 4는 (A) 일반적 인간 카파 경쇄 불변 영역(서열번호 6) 및 (B) 일반적 무린 카파 경쇄 불변 영역(서열번호 7)의 아미노산 서열의 정렬을 도시한 도면. 아미노산 잔기 Thr 및 Val(성숙 베돌리주맙 경쇄의 위치 114 및 115에서 존재함(서열번호 4의 아미노산 133 및 134))은 인간 카파 경쇄의 불변 영역에 존재하는 반면, 아미노산 잔기 Ala 및 Asp(성숙 LDP-02 경쇄의 위치 114 및 115에 존재함(서열번호 5))는 마우스 카파 경쇄의 불변 영역에 존재한다.
- 도 5는 MLN02의 인간화된 중쇄 및 인간화된 경쇄를 암호화하며, CHO 세포에서 베돌리주맙을 생성하는데 적합한 벡터 pLKTOK38D(또한 pTOK38MLN02-TV로서 지칭됨)의 맵을 도시한 도면. (pLKTOK38을 개시하는 미국특허 공개 제2004/0033561 A1호를 참조. pLKTOK38D는 pLKTOK38의 변이체인데, 맵 상에 표시된 제한 부위는 경쇄 가변 영

역을 암호화하는 서열에 축적한다)

도 6a는 항- $\alpha 4\beta 7$ 동결건조된 제형의 단량체 백분율의 변화, 응집물 백분율의 변화 및 주요 아이소폼 백분율의 변화에 대해 예측된 모델을 도시한 도면. 모델은 실시예 1에서 제시한 데이터의 통계적 분석을 기반으로 한다. 중앙선은 예측 모델에 대한 결과를 나타내며, 외곽선은 예측 모델에 대한 95% 신뢰 한계를 나타낸다. 도 6b는 입력 인자가 pH, 당:단백질 물 비, 및 알기닌:단백질 물 비일 때, 표 1 내지 3으로부터 40°C 데이터의 통계적 분석에 기반한 대안의 모델은 도시한 도면. 중앙선은 예측 모델에 대한 결과를 나타내며, 외곽선은 예측 모델에 대한 95% 신뢰 한계를 나타낸다.

도 7는 (A) 성숙 인간 GM607'CL 항체 카파 경쇄 가변 영역 및 (B) 인간 21/28'CL 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 도시한 도면.

도 8은 고체 및 로딩이 건조시간에 영향을 미친다는 것을 나타내는 그래프를 도시한 도면(선의 숫자는 건조시간(분)의 수를 나타낸다).

도 9는 위약 대조군과 비교하여 베돌리주맙(vedolizumab)이 실험적 자가면역 뇌수막염(experimental autoimmune encephalomyelitis: EAE)의 임상적 증상의 개시를 지연시키지 않는다는 것을 나타내는 그래프를 도시한 도면. 나탈리주맙(natalizumab)은 위약 대조군과 비교하여 EAE의 임상적 증상의 개시를 유의하게($p < 0.05$) 지연시켰다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0038] 본 발명은 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 포함하는 제형에 관한 것이다. 제형은 비-환원 당, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 및 한 종 이상의 유리 아미노산을 포함하는 혼합물 일 수 있고, 비-환원 당 대 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 몰 비는 600몰 비-환원 당:1몰 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 초과이다. 제형은 고체 또는 액체 형태일 수 있다.
- [0039] 정의
- [0040] 용어 "약제학적 제형"은 항체의 생물학적 활성이 효과적이 되게 하는 형태로 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 함유하고, 제형이 투여되는 피험체에 허용가능하지 않게 독성인 추가적인 성분을 함유하지 않는 제제를 지칭한다.
- [0041] "안정적인" 제형은 저장시 그것에서 항체가 그것의 생리적 안정성 및/또는 그의 화학적 안정성 및/또는 생물학적 활성을 실질적으로 보유하는 것이다. 일 양태에서, 제형은 저장 시 그의 생리적 및 화학적 안정성뿐만 아니라 그의 생물학적 활성을 실질적으로 보유한다. 저장 기간은 제형의 의도된 보관수명에 기반하여 일반적으로 선택된다. 단백질 안정성을 측정하기 위한 다양한 분석 기법은 당업계에서 입수가능하며, 예를 들어 문헌[*Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991)] 및 Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993)]에서 검토되어 있다.
- [0042] "탈아미드화된" 단클론성 항체는 그의 하나 이상의 아스파라긴 또는 글루타민 잔기가, 예를 들어 아스팔트산 또는 아이소-아스팔트산으로 유도체화된 것이다.
- [0043] "탈아미드화에 민감한" 항체는 탈아미드화되기 쉬운 것으로 발견된 하나 이상의 잔기를 포함하는 것이다.
- [0044] "산화에 민감한" 항체는 산화되기 쉬운것으로 발견된 하나 이상의 잔기를 포함하는 항체이다.
- [0045] "응집에 민감한" 항체는 특히 냉동, 가열, 건조, 재구성 및/또는 교반 시 다른 항체 분자(들)와 응집되는 것을 발견된 항체이다.
- [0046] "단편화에 민감한" 항체는, 예를 들어 그의 힌지 영역에서 2이상의 단편으로 절단되는 것으로 발견된 것이다.
- [0047] "탈아미드화, 산화, 응집, 또는 단편화의 감소"는 상이한 pH에서 또는 상이한 완충제에서 제형화된 단클론성 항체에 대해 탈아미드화, 응집, 또는 단편화를 방지하거나 또는 탈아미드화, 응집, 또는 단편화의 양을(예를 들어, 80%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% 또는 10%로) 감소시키는 것을 의미하는 것으로 의도된다.
- [0048] "응집물", "SEC 응집물" 또는 "가용성 응집물"은 더 큰 단백체를 형성하기 위해 공유적, 이온성 또는 소수성 상호작용 중 하나를 통해 함께 결합된 1개 초과이고 10개 이하인 항체 단백질 및/또는 단편이다.
- [0049] "불용성 응집물" 또는 "입자"는 더 큰 단백체를 형성하기 위해 공유적, 이온성 또는 소수성 상호작용 중 하나를 통해 함께 결합된 10개 초과인 단백질 및/또는 단편이다.
- [0050] 본 명세서에 사용되는 바와 같은, 단클론성 항체의 "생물학적 활성"은 항원에 결합하고, 시험관내 또는 생체내

에서 측정될 수 있는 측정가능한 생물학적 반응을 야기하는 항체의 능력을 지칭한다. 이러한 활성은 길항물질적(antagonistic) 또는 작용물질적(agonistic)일 수 있다.

[0051] 세포 표면 분자 " $\alpha_4\beta_7$ 인테그린" 또는 " $\alpha_4\beta_7$ "은 α_4 쇄(CD49D, ITGA4) 및 β_7 쇄(ITGB7)의 헤테로다이머이다. 각각의쇄는 또 다른 인테그린쇄와 함께 헤테로다이머를 형성하여 $\alpha_4\beta_1$ 또는 $\alpha_E\beta_7$ 을 형성할 수 있다. 인간 α_4 및 β_7 유전자(각각 젠뱅크(GenBank)(메릴랜드주 베테스타에 소재한 미국 국가생물공학센터(National Center for Biotechnology Information)) RefSeq 등록번호 NM_000885 및 NM_000889)은 B 및 T 림프구, 특히 기억 CD4+ 림프구에 의해 발현된다. 전형적인 다수의 인테그린, 즉, $\alpha_4\beta_7$ 은 남아있거나 또는 활성화된 상태 중 하나로 존재할 수 있다. $\alpha_4\beta_7$ 에 대한 리간드는 혈관 세포 접착 분자(vascular cell adhesion molecule: VCAM), 피브로넥틴 및 점막 접착(MAdCAM(예를 들어, MAdCAM-1))을 포함한다.

[0052] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, $\alpha_4\beta_7$ 복합체에 대해 결합 특이성"을 갖는 인간 면역글로불린 또는 그의 항원-결합 단편은 $\alpha_4\beta_7$ 에 결합되지만, $\alpha_4\beta_1$ 또는 $\alpha_E\beta_7$ 에 결합되지 않는다.

[0053] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, "등장성" 제형은 실질적으로 인간 혈액과 동일한 삼투압을 가진다. 등장성 제형은 일반적으로 약 250 내지 350mOsm의 삼투압을 가질 것이다. 등장성은, 예를 들어 수증기압 또는 빙냉형 삼투압계를 사용하여 측정될 수 있다.

[0054] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, "완충제"는 그의 산-염기 컨주게이트 성분의 작용에 의해 pH의 변화에 저항하는 완충제를 지칭한다. 완충제는 본 발명의 액체 또는 고체 제형에서 존재할 수 있다. 완충제는 약 5.0 내지 약 7.5, 내지 약 5.5 내지 약 7.5, 내지 약 6.0 내지 약 6.5로 또는 약 6.3의 pH로 제형의 pH를 조절한다. 일 양태에서, 5.0 내지 7.5 범위에서 pH를 제어하는 완충제의 예는, 아세테이트, 숙시네이트, 글루코네이트, 히스티딘, 시트레이트, 포스페이트, 말리에이트, 카코다일레이트, 2-[N-모폴리노]에탄설폰산(MES), 비스(2-하이드록시메틸)이미노트리스[하이드록시메틸]메탄(비스-트리스), N-[2-아세트아미도]-2-이미노다이아세트산(ADA), 글라이실글라이신 및 다른 유기산 완충제를 포함한다. 다른 양태에서, 본 명세서의 완충제는 히스티딘 또는 시트레이트이다.

[0055] "히스티딘 완충제"는 히스티딘 이온을 포함하는 완충제이다. 히스티딘 완충제의 예는 히스티딘 클로라이드, 히스티딘 아세테이트, 히스티딘 포스페이트, 히스티딘 설페이트 용액을 포함한다. 히스티딘 완충제 또는 히스티딘-HCl 완충제는 약 pH 5.5 내지 약 6.5, 약 pH 6.1 내지 6.5, 또는 약 pH 6.3의 pH를 가진다.

[0056] 본 명세서의 "당류"는 단당류, 이당류, 삼당류, 다당류, 당 알코올, 환원당, 비환원당 등을 포함하는, 화학식 $(CH_2O)_n$ 을 갖는 화합물 및 그의 유도체이다. 일 양태에서, 본 명세서의 당류의 예는 글루코스, 수크로스, 트레할로스, 락토스, 프락토스, 말토스, 텍스트란, 에리트ρί톨, 글라이세롤, 아라비톨, 사일리톨(sylitol), 솔비톨, 만니톨, 멜리비오스, 멜레지토스, 라피노스, 만노트라이오스, 스타키오스, 말토스, 락툴로스, 말톨로스, 글루시톨, 말티톨, 락티톨, 아이소-말톨로스 등을 포함한다. 당류는 동결건조보호제일 수 있다. 다른 양태에서, 본 명세서의 당류는 수크로스와 같은 비환원 이당류이다.

[0057] 본 명세서의 "계면활성제"는 액체의 표면 장력을 낮추는 작용제를 지칭한다. 계면활성제는 비이온성 계면활성제일 수 있다. 일 양태에서, 본 명세서의 계면활성제의 예는 폴리솔베이트(폴리옥시에틸렌 솔비탄 모노라우레이트, 예를 들어, 폴리솔베이트 20 및 폴리솔베이트 80); 트리톤(TRITON)(t-옥틸페녹시폴리에톡시에탄올, 비이온성 세정제, 미시간주 미들랜드에 소재한 다우 케미컬 컴퍼니의 유니온 카바이드(Union Carbide) 자회사); 도데실 황산 나트륨(sodium dodecyl sulfate: SDS); 라우릴 황산 나트륨; 소듐 옥틸 글라이코사이드; 라우릴-, 미리스틸-, 리놀레일- 또는 스테아릴-설포베타인; 라우릴-, 미리스틸-, 리놀레일- 또는 스테아릴-사코신; 리놀레일-, 미리스틸- 또는 세틸-베타인; 라우로아미도프로필-, 코카미도프로필-, 리놀레아미도프로필-, 미리스타미도프로필-, 팔미도프로필-, 또는 아이소스테아르아미도프로필-베타인(예를 들어, 라우로아미도프로필); 미리스타미도프로필-, 팔미도프로필-, 또는 아이소스테아르아미도프로필-다이메틸아민; 소듐 메틸 코코일-, 또는 다이소듐 메틸 올레일-타우레이트; 솔비탄 모노팔미테이트; 및 MONAQUAT 시리즈(뉴저지주 패터슨에 소재한 모나 인더스트리즈 인코퍼레이티드(Mona Industries, Inc.)); 폴리에틸 글라이콜(polyethyl glycol: PEG), 폴리프로필렌 글라이콜(PPG) 및 폴리옥시에틸렌 및 플록시프로필렌 글라이콜의 공중합체(예를 들어, 플루로닉스/플록사머(Pluronics/플록사머), PF68 등); 등을 포함한다. 다른 양태에서, 계면활성제는 폴리솔베이트 80이다.

[0058] 본 명세서의 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되며, 구체적으로는 전장 단클론성 항체, 면역글로불린, 다클

론성 항체, 적어도 2개의 전장 항체로부터 형성된 다중특이성 항체(예를 들어, 이중특이성 항체), 예를 들어, 상이한 항원 또는 에피토프, 및 dAbs, scFv, Fab, F(ab')₂, Fab'을 포함하고, 인간, 인간화된 항체 및 비-인간 종으로부터의 항체 및 모노바디(monobody) 및 다이아바디(diabody)와 같은 재조합 항원 결합 형태를 포함하는 개개의 항원 결합 단편에 대해 각각을 포괄한다.

[0059] 본 명세서에 기재된 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 대 다른 부형제의 몰 량 및 비는 항체에 대해 약 150,000 달톤의 대략의 분자량의 추정치에 대해 계산된다. 실제 항체 분자량은 아미노산 조성물 또는 번역 후 변형에 따라서, 예를 들어 항체를 발현시키기 위해 사용되는 세포주에 의존하여 150,000 달톤과 다를 수 있다. 실제 항체 분자량은 150,000 달톤의 +/- 5%일 수 있다.

[0060] 용어 "인간 항체"는 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유래된 서열을 소유하는 항체, 예컨대 인간 면역글로불린 유전자를 갖는 유전자이식 마우스로부터 유래된 항체(예를 들어, 제노마우스(XENOMOUSE) 유전적으로 유전자 조작된 마우스(캘리포니아주 프레몬트에 소재한 앵제닉스(Angenix)), 휴맵-마우스(HUMAB-MOUSE)(등록상표), 키린 티씨 마우스(KIRIN TC MOUSE)(상표명) 트랜스염색체(transchromosome) 마우스, 케이엠마우스(KMMOUSE)(등록상표)(뉴저지주 프린스턴에 소재한 메다렉스(MEDAREX))), 인간 파지 디스플레이 라이브러리, 인간 골수종 세포, 또는 인간 B 세포를 포함한다.

[0061] 본 명세서에서 사용되는 용어 "단클론성 항체"는 실질적으로 동종인 항체의 집단으로부터 얻어진 항체를 지칭하며, 즉, 집단을 포함하는 개개의 항체는 동일하고/하거나 동일 에피토프에 결합되며, 단클론성 항체의 생성 동안 생길 수 있는 가능한 변이체를 제외하고, 이러한 변이체는 일반적으로 부수적 양으로 존재한다. 전형적으로 상이한 결정소(에피토프)에 대해 관련된 상이한 항체를 포함하는 다클론성 항체 준비와 대조적으로, 각각의 단클론성 항체는 항원에 대한 단일 결정소와 관련된다. 변형어 "단클론성"은 항체의 실질적으로 동종인 집단으로부터 얻어지는 항체의 특징을 표시하며, 임의의 특정 방법에 의해 항체의 요구되는 생성으로서 해석되어서는 안 된다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 단클론성 항체는 문헌[Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975)]에 의해 처음 기재된 하이브리도마 방법에 의해 만들어질 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법에 의해 만들어질 수 있다(예를 들어, 미국특허 제4,816,567호 참조). "단클론성 항체"는 또한, 예를 들어 문헌[Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991)] 및 문헌[Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)]에 기재된 기법을 사용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다.

[0062] 본 명세서의 단클론성 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 종으로부터 유래되거나 또는 특정 항체 분류 또는 하위분류에 속하는 항체에서 대응되는 서열과 동일하거나 또는 상동성인 반면,쇄(들)의 나머지는 다른 종으로부터 유래되거나 또는 다른 항체 분류 또는 하위분류에 속하는 항체뿐만 아니라 그것들이 원하는 생물학적 활성을 나타낸다면, 이러한 항체의 단편에서 대응되는 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라" 항체를 포함한다(미국특허 제4,816,567호; 및 문헌[Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)]). 본 명세서의 관심의 키메라 항체는 비-인간 영장류(예를 들어, 긴꼬리 원숭이, 유인원 등) 및 인간 불변 영역 서열로부터 유래된 가변 도메인 항원 결합 서열을 포함하는 "영장류화된" 항체를 포함한다.

[0063] 본 발명의 제형에서 제조된 인간화된 면역글로불린의 "항원 결합 단편"은 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 중쇄 및/또는 경쇄의 적어도 가변 영역을 포함한다. 예를 들어, 베돌리주맙의 항원 결합 단편은 서열번호 4의 인간화된 경쇄 서열의 아미노산 잔기 20 내지 131을 포함한다. 이러한 항원 결합 단편의 예는 당업계에 공지된 인간화된 면역글로불린의 Fab 단편, Fab' 단편, scFv 및 F(ab')₂ 단편을 포함한다. 본 발명의 인간화된 면역글로불린의 항원 결합 단편은 효소 절단에 의해 또는 재조합 기법에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 파파인 또는 펩신 절단은 각각 Fab 또는 F(ab')₂ 단편을 만들기 위해 사용될 수 있다. 항체는 또한 하나 이상의 정지 코돈이 천연 정지 부위의 상류에 도입된 항체 유전자를 사용하여 다양한 절단된 형태로 생성될 수 있다. 예를 들어, F(ab')₂ 단편의 중쇄를 암호화하는 재조합 구성체는 CH₁ 도메인 및 중쇄의 힌지 영역을 암호화하는 DNA 서열을 포함하도록 설계될 수 있다. 일 양태에서, 항원 결합 단편은 그의 리간드(예를 들어, 점막 어드레신 MAdCAM(예를 들어, MAdCAM-1), 피브로넥틴) 중 하나 이상에 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린의 결합을 억제한다.

[0064] 항체의 파파인 분해는 각각 단일 항원 결합 부위를 지니는 "Fab" 단편, 및 잔여 "Fc" 단편으로 불리는 2개의 동일한 항원 결합 단편을 생성하는데, 이들 명칭은 그의 용이하게 결정화되는 능력을 반영한다. 펩신 처리는 2개의 항원 결합 부위를 가지며, 또한 항원을 가교할 수 있는 F(ab')₂ 단편을 수득한다.

[0065] "Fv"는 비-공유 결합에서 하나의 중쇄 가변 도메인 및 하나의 경쇄 가변 도메인의 다이머로 이루어진 항체 단편

이다.

- [0066] Fab 단편은 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인(CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역 으로부터 하나 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카복시 말단에서 몇 개의 잔기의 첨가에 의해 Fab 단편과 다르다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 적어도 하나의 유리 티올기를 함유하는 Fab'에 대한 본 명세서의 명칭이다. F(ab')₂ 항체 단편은 본래 그 사이에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으 로서 만들어졌다. 항체 단편의 다른 화학적 결합은 또한 공지되어 있다.
- [0067] "단일쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 V_H 및 V_L 도메인을 포함하되, 이들 도메인은 단일 폴리펩타이드 쇠 에 존재한다. 일 양태에서, Fv 폴리펩타이드는 scFv가 항원 결합을 위해 원하는 구조를 형성할 수 있게 하는 V_H 와 V_L 도메인 사이에 폴리펩타이드 링커를 추가로 포함한다. scFv의 검토를 위해, 문헌[Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조한다.
- [0068] 용어 "다이아바디"는 2개의 항원 결합 부위를 지니는 작은 항체 단편을 지칭하는데, 단편은 동일 폴리펩타이드 쇠(V_H-V_L)에서 가변 경쇄 도메인(V_L)과 연결된 가변 중쇄 도메인(V_H)을 포함한다. 동일 쇠 상의 두 도메인 사이 에 쌍을 이루는데 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 도메인은 다른 쇠의 상보성 도메인과 쌍을 이루도록 하며, 2 개의 항원 결합 부위를 만든다. 다이아바디는, 예를 들어 EP 404,097; WO 93/11161; 및 문헌[Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)]에 더 충분히 기재되어 있다.
- [0069] "전장 항체"는 항원 결합 가변 영역뿐만 아니라 경쇄 불변 도메인(C_L) 및 중쇄 불변 도메인, 즉, C_{H1}, C_{H2} 및 C_{H3} 을 포함하는 것이다. 불변 도메인은 천연 서열 불변 도메인(예를 들어, 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 그의 아미노산 서열 변이체일 수 있다. 일 양태에서, 전장 항체는 하나 이상의 효과기 기능을 가진다.
- [0070] 본 명세서의 "아미노산 서열 변이체" 항체는 주요종 항체와 다른 아미노산 서열을 지니는 항체이다. 본래, 아미 노산 서열은 주요 종 항체와 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90% 또는 적어도 약 95% 상동성을 가질 것이다. 아미노산 서열 변이체는 치환, 결실 및/또는 첨가 주요 종 항체의 아미노산 서열 내에서 또는 서열에 인접하여 특정 위치에서 치환, 결실 및/또는 첨가를 가지지만, 항원 결합 활성을 보유한다. 항체의 불변 영역의 서열에서 변형은 가변 영역에서 변형보다 항원 결합 활성에 대한 효과가 더 적을 것이다. 가변 영 역에서, 아미노산 서열 변이체는 주요 종 항체와 적어도 약 90% 상동성, 적어도 약 95% 상동성, 적어도 약 97% 상동성, 적어도 약 98% 상동성 또는 적어도 약 99% 상동성이 있을 것이다.
- [0071] "상동성"은 필요하다면 최대 상동성%를 달성하는 서열 및 도입 갭을 정렬한 후 동일한 아미노산 서열 변이체에 서 잔기의 백분율로서 정의된다. 정렬을 위한 방법 및 컴퓨터 프로그램은 당업계에 잘 공지되어 있다.
- [0072] "치료적 단클론성 항체"는 인간 피험체의 치료를 위해 사용된 항체이다. 본 명세서에 개시된 치료적 단클론성 항체는 항-α4β7 항체를 포함한다.
- [0073] 본 명세서의 "글라이코실화 변이체" 항체는 주요 종 항체에 부착된 하나 이상의 탄수화물 모이어티와 다른 항체 에 부착된 하나 이상의 탄수화물 모이어티를 지니는 항체이다. 본 명세서의 글라이코실화 변이체의 예는 G0 올 리고당 구조 대신 그의 Fc 영역에 부착된 G1 또는 G2 올리고당 구조를 지니는 항체, 그의 1 또는 2개의 경쇄에 부착된 1 또는 2개의 탄수화물 모이어티를 지니는 항체, 항체 등의 1 또는 2개의 중쇄에 부착된 탄수화물이 없 는 항체, 및 글라이코실화 변질(alteration)의 조합물을 포함한다.
- [0074] 항체 "효과기 기능"은 항체의 Fc 영역(천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기인하는 해당 생물학적 활성을 지칭한다. 항체 효과기 기능의 예는 C1q 결합; 보체 의존적 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체-의존적 세포-매개 세포독성(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: ADCC); 식세포 작용; 세포 표면 수용체의 하향 조절(예를 들어, B 세포 수용체(B cell receptor; BCR)) 등을 포함한다.
- [0075] 전장 항체는, 그의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라서, 상이한 "분류"로 지정될 수 있다. 전장 항체 의 5가지 주요 분류가 있다: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM, 및 이들 중 몇몇은 "하위분류"(아이스타입), 예를 들 어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 및 IgA2로 추가로 나누어질 수 있다. 상이한 분류의 항체에 대응되는 중쇄 불 변 도메인은 각각 α, δ, ε, γ 및 μ로 불린다. 상이한 분류의 면역글로불린의 서브유닛 구조 및 3차원 배치 는 잘 공지되어 있다.
- [0076] 임의의 척추동물 중으로부터 항체의 "경쇄"는 그의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기반으로 카파(κ) 및 람다

(λ)로 불리는 2개의 명확하게 별개인 유형 중 하나로 지정될 수 있다

- [0077] "항체-의존적 세포-매개 세포독성" 및 "ADCC"는 Fc 수용체(FcR)(예를 들어, 자연 살해(Natural Killer: NK) 세포, 호중구 및 대식세포)를 발현시키는 비특이적 세포독성 세포가 표적 세포 상의 항체에 결합되고, 후속하여 표적 세포의 용해를 야기하는 세포-매개 반응을 지칭한다. ADCC, NK 세포를 매개하기 위한 1차 세포는 Fc γ RIII만을 발현시키는 반면, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RRII 및 Fc γ RIII를 발현시킨다. 조혈 세포 상에서 FcR 발현은 문헌[Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991)]의 464 페이지의 표 3에서 요약된다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해, 시험관내 ADCC 분석, 예컨대 미국특허 제5,500,362호 또는 제5,821,337호에 기재된 것이 수행될 수 있다. 이러한 분석을 위한 유용한 효과기 세포는 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cell: PBMC) 및 자연 살해(NK) 세포를 포함한다. 대안적으로 또는 추가적으로, 관심의 분자의 ADCC 활성은 생체내, 예를 들어 문헌[Clynes *et al.* *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998)]에 개시된 것과 같은 동물 모델에서 평가될 수 있다.
- [0078] 용어 "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합되는 수용체를 설명하기 위해 사용된다. 일 양태에서, FcR은 천연 서열 인간 FcR이다. 다른 양태에서, FcR은 IgG 항체(감마 수용체)에 결합되고, 대립유전자 변이체를 포함하여, Fc γ RI, Fc γ RRII, 및 Fc γ RIII 하위분류의 수용체 및 대안적으로 이들 수용체의 스플라이싱된 형태를 포함하는 것이다. Fc γ RRII 수용체는 Fc γ RIIA("활성 수용체") 및 Fc γ RIIB("억제 수용체")를 포함하는데, 이는 주로 그의 세포질 도메인에서 다른 유사한 아미노산 서열을 가진다. 활성화 수용체 Fc γ RIIA는 그의 세포질 도메인에서 면역수용체 티로신-계 활성화 모티프(immunoreceptor tyrosine-based activation motif: ITAM)를 함유한다. 억제 수용체 Fc γ RIIB는 그의 세포질 도메인에서 면역수용체 티로신-계 억제 모티프(immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif: ITIM)를 함유한다. (문헌[M. Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)]의 검토 참조). FcR은 문헌[Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); 및 de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126:33-41 (1995)]에서 검토되어 있다. 장래에 확인되는 것을 포함하는 다른 FcR은 본 명세서의 용어 "FcR"에 의해 포함된다. 해당 용어는 또한, 태아에 모체 IgG의 전달에 책임이 있는 신생아 수용체인 FcRn을 포함한다(문헌[Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976)] 및 문헌[Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)]).
- [0079] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "초가변 영역"은 항원 결합을 초래하는 항체의 아미노산 잔기를 지칭한다. 초가변 영역은 일반적으로 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"(예를 들어, 경쇄 가변 도메인에서 잔기 24-34(L1), 50-56(L2) 및 89-97(L3) 및 중쇄 가변 도메인에서 31-35(H1), 50-65(H2) 및 95-102(H3); 문헌[Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)] 및/또는 "초가변 루프"로부터의 해당 잔기(예를 들어, 경쇄 가변 도메인에서 잔기 26-32(L1), 50-52(L2) 및 91-96(L3) 및 중쇄 가변 도메인에서 26-32(H1), 53-55(H2) 및 96-101(H3); 문헌[Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)]로부터의 아미노산 잔기를 포함한다. "프레임워크 영역" 또는 "FR" 잔기는 본 명세서에 정의된 초가변 영역 잔기 이외의 해당 가변 도메인 잔기이다. 초가변 영역 또는 그의 CDR은 하나의 항체 쇄로부터 다른 것에 또는 다른 단백질에 전달되어 결과(복합) 항체 또는 결합 단백질에 항원 결합 특이성을 부여할 수 있다.
- [0080] 비-인간(예를 들어, 설치류) 항체의 "인간화된" 형태는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대개, 인간화된 항체는 수용자의 초가변 영역으로부터의 잔기가 원하는 특이성, 친화도 및 수용력을 갖는 비-인간 중(공여체 항체), 예컨대 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류의 초가변 영역으로부터의 잔기로 대체되는 인간 면역글로불린이다. 일부 예에서, 인간 면역글로불린의 프레임워크(FR) 잔기는 대응되는 비-인간 잔기로 대체된다. 더 나아가, 인간화된 항체는 수용인 항체에서 또는 공여체 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 항체 성능을 추가로 개선시키도록 한다. 일반적으로, 인간화된 항체는 적어도 하나, 전형적으로는 2개의 가변 도메인 중 실질적으로 모두를 포함하는데, 초가변 루프의 모두 또는 실질적으로 모두는 비-인간 면역글로불린의 그것에 대응되고, FR의 모두 또는 실질적으로 모두는 인간 면역글로불린 서열의 그것이다. 인간화된 항체는 면역글로불린 불변 영역(Fc), 전형적으로 인간 면역글로불린의 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 것이다. 추가의 상세한 설명에 대해서는, 문헌[Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); 및 문헌[Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)]을 참조하면 된다.
- [0081] "친화도 성숙된" 항체는 해당 변질(들)을 갖지 않는 모 항체와 비교하여, 항원에 대해 항체의 친화도의 개선을 야기하는 그의 하나 이상의 초가변 영역에서 하나 이상의 변질을 지니는 것이다. 일 양태에서, 친화도 성숙된 항체는 표적 항원에 대해 나노몰 또는 심지어 피코몰의 친화도를 가질 것이다. 친화도 성숙된 항체는 당업계에

공지된 과정에 의해 생성된다. 문헌[Marks *et al.* *Bio/Technology* 10:779-783 (1992)]은 VH 및 VL 도메인 서플링에 의한 친화도 성숙을 기재한다. CDR 및/또는 프레임워크 잔기의 무작위 돌연변이유발은 문헌[Barbas *et al.* *Proc Nat. Acad. Sci.*, USA 91:3809-3813 (1994); Schier *et al.* *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton *et al.* *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); 및 Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992)]에 의해 기재되어 있다.

[0082] "단리된" 항체는 그의 천연 환경의 성분으로부터 식별되고, 확인되며/되거나 회수된 것이다. 특정 실시형태에서, 항체는 (1) 로리(Lowry) 방법에 의해 결정된 바와 같이 단백질의 95중량% 초과 및 대안적으로 99중량% 초과로, (2) 스피닝 컵 서열분석기(spinning cup sequenator)의 사용에 의해 N-말단의 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개 잔기를 얻기에 충분한 정도로, (3) 쿠마씨 블루(Coomassie blue) 또는 은 염색을 사용하는 환원성 또는 비환원성 조건 하에 SDS-파지(PAGE)에 의해 균질하게 정제될 것이다. 단리된 항체는 항체의 천연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문에 재조합 세포 내에서 인시츄로 항체를 포함한다. 그러나, 보통, 단리된 항체는 적어도 하나의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

[0083] "치치"는 치료적 치치와 예방적 또는 방지적 측정을 둘 다 지칭한다. 치료가 필요한 대상은 이미 질병이 있는 대상뿐만 아니라 질병 또는 그의 재발이 예방되어야 하는 대상을 포함한다. 따라서, 본 명세서에서 치료되는 환자는 질병을 갖는 것을 진단될 수 있거나 또는 질병의 성향이 있거나 또는 질병의 여지가 있을 수 있다. 용어 "환자" 및 "피험체"는 본 명세서에서 상호 호환적으로 사용된다.

[0084] 조제되는 항체는 실질적으로 순수하고, 원한다면 실질적으로 동종이다(즉, 오염 단백질 등이 없음). "실질적으로 순수한" 항체는 조성물 내 단백질의 전체 중량을 기준으로 적어도 약 90중량%, 적어도 약 95중량% 또는 97중량%를 포함하는 조성물을 의미한다. "실질적으로 동종인" 항체는 단백질을 포함하는 조성물을 의미하되, 단백질의 적어도 약 99중량%는 단백질의 전체 중량을 기준으로 특이적 항체, 예를 들어 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체이다.

[0085] 궤양성 대장염 피험체에 대해 본 명세서에서 사용되는 "임상적 관해"는 완전 마요(Mayo) 스코어가 2점 미만이고, 개개의 하위스코어가 1점을 초과하지 않는 것을 지칭한다. 크론병 "임상적 관해"는 CDAI 스코어가 150점 이하인 것을 지칭한다.

[0086] 궤양성 대장염 피험체에 대해 본 명세서에서 사용되는 "임상적 반응"은 1점 이상의 직장 출혈 하위스코어 또는 1점 이하의 절대 직장 출혈 스코어로 수반되는 감소와 함께, 완전 마요 스코어가 3점 이상, 기준으로부터 30% (또는 완전 마요 스코어가 방문시 수행되지 않는다면, 2점 이상의 부분적 마요 스코어 및 기준으로부터 25% 이상)인 감소를 지칭한다. 크론병에 대해 본 명세서에서 사용된 "임상적 반응"은 기준(제0주)으로부터 CDAI 스코어의 70점 이상을 지칭한다.

[0087] 궤양성 대장염 피험체에 대해 본 명세서에서 사용된 "점막 치유"는 1점 이하의 내시경 하위스코어를 지칭한다.

[0088] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, "치료 실패"는 질병 악화, 궤양성 대장염 또는 크론병의 치료를 위한 응급 의약 또는 수술적 개입에 대한 필요를 지칭한다. 응급 약물은 (만성 설사의 제어를 위한 항설사약 이외의) 새로운 또는 해결되지 않은 궤양성 대장염 또는 크론병 증상을 치료하기 위해 필요한 임의의 신규 의약 또는 기준 의약 용량의 임의의 증가이다.

[0089] **제형**

[0090] 본 명세서에 기재된 바와 같이, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 과량의(몰 기준으로) 비-환원 당과 함께 건조, 예를 들어 동결건조된 제형일 때 고도로 안정하다는 것이 발견되었다. 특히, 비-환원 당 대 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 비(몰:몰)가 600:1 초과인 동결건조된 제형은 적어도 2년 동안 안정한 것으로 본 명세서에서 나타난다.

[0091] 본 발명은 제1 양태에서, 안정한 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형을 제공한다. 일 양태에서, 제형은 완충제, 적어도 한 종의 안정제 및 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 포함한다. 일 양태에서, 건조 제형은 한 종 이상의 비-환원 당 및 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 포함하되, 비-환원 당 대 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 비(몰:몰)는 600:1 초과이다. 제형은 또한 한 종 이상의 유리 아미노산을 포함한다. 한 종 이상의 아미노산은 또한 완충제로서 작용할 수 있다. 일 양태에서, 한 종 이상의 아미노산은 안정제로서 작용할 수 있다. 제형은 선택적으로 적어도 한 종의 계면활성제를 추가로 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 제형은 건조, 예를 들어 동결건조된다. 제형 내 항체는 전장 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 예컨대 Fab, Fv, scFv, Fab' 또는 F(ab')₂ 단편일 수 있다.

[0092] 제형은 임의의 요망되는 비-환원 당을 함유할 수 있다. 일 양태에서, 제형에 포함될 수 있는 비-환원 당은, 예를 들어 만니톨, 솔비톨, 수크로스, 트레할로스, 라피노스, 스타키오스, 멜레지토스, 텍스트란, 만니톨,

락티톨, 아이소말토로스, 팔라티닛 및 이들의 조합물을 포함한다. 다른 양태에서, 비-환원 당은 수크로스, 트레할로스, 만니톨 및 솔비톨이다. 제형 내 비-환원 당의 절대적 양은 중요하지 않지만, 비-환원 당 대 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 비(몰:몰)는 400:1 초과이다. 다른 양태에서, 비-환원 당 대 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 비(몰:몰)는 적어도 약 600:1; 적어도 약 625:1; 적어도 약 650:1; 적어도 약 675:1, 적어도 약 700:1; 적어도 약 750:1, 적어도 약 800:1, 적어도 약 1000:1, 적어도 약 1200:1, 적어도 약 1400:1, 적어도 약 1500:1, 적어도 약 1600:1, 적어도 약 1700:1, 적어도 약 1800:1, 적어도 약 1900:1 또는 적어도 약 2000:1이다. 일반적으로, 비-환원 당은 액체 제형 내 가용성 응집물, 예컨대 냉동 및 해동 및/또는 건조 및 재구성 시 생기는 응집물 형성을 감소시키는 양으로 존재하는 것이 바람직하다. 약 730:1 초과인 비-환원 당 대 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 비(몰:몰)는 동결건조된 상태로 약간 감소된 가용성 응집물 형성을 제공할 수 있다. 당:단백질 중량비는 1.5:1(w/w) 초과일 수 있다. 다른 양태에서, 액체(예를 들어, 사전-건조 또는 재구성 후) 제형에 대한 비-환원 당 농도는 약 10mM 내지 약 1M, 예를 들어, 약 60mM 내지 약 600mM, 약 100mM 내지 약 450mM, 약 200mM 내지 약 350mM, 약 250mM 내지 약 325mM, 및 약 275mM 내지 약 300mM의 범위에 있다. 다른 양태에서, 건조물(예를 들어, 동결건조됨) 제형 내 비-환원 당의 양은 약 40% 내지 약 70%(w/w의 건조 제형)의 범위에 있다. 다른 양태에서, 건조물(예를 들어, 동결건조됨) 제형에서 비-환원 당의 양은 약 40% 내지 약 60%, 약 45% 내지 약 55% 또는 약 51%(w/w)의 범위에 있다. 다른 양태에서, 단백질 양이 31%(w/w의 건조 제형) 이상 또는 건조 제형 내 비-환원 당 대 단백질이 약 1.6:1 질량비일 때, 건조물(예를 들어, 동결건조됨) 제형 내 비-환원 당의 양은 약 51%(w/w의 건조 제형) 초과이다. 또한 추가의 다른 양태에서, 수크로스는 제형 내 사용을 위한 비-환원 당이다.

[0093] 제형은 임의의 원하는 유리 아미노산을 함유할 수 있는데, 이는 L-형태, D-형태 또는 이들 형태의 임의의 원하는 혼합물일 수 있다. 일 양태에서, 제형에 포함될 수 있는 유리 아미노산은, 예를 들어 히스티딘, 알라닌, 알기닌, 글라이신, 글루탐산, 세린, 리신, 트립토판, 발린, 시스테인 및 이들의 조합을 포함한다. 일부 아미노산은, 예를 들어 수소 결합, 염 브릿지, 항산화제 특성 또는 소수성 상호작용 또는 단백질 표면으로부터의 배제에 의해 제조, 건조, 동결건조 및/또는 저장 동안 분해에 대해 단백질을 안정화시킬 수 있다. 아미노산은 등장성 변형제로서 작용할 수 있고, 제형의 점성도를 감소시키도록 작용할 수 있다. 다른 양태에서, 유리 아미노산, 예컨대 히스티딘 및 알기닌은 동해방지제(cryoprotectant) 및 동결건조보호제로서 작용할 수 있고, 제형의 성분으로서 동결건조될 때 결정화되지 않는다. 유리 아미노산, 예컨대 글루탐산 및 히스티딘은 단독으로 또는 조합으로 5 내지 7.5의 pH 범위의 수용액 중에서 완충제로서 작용할 수 있다. 추가의 또 다른 양태에서, 제형은 히스티딘, 또는 히스티딘과 알기닌을 함유한다. 또한 더 추가적인 양태에서, 액체 제형에 대한 유리 아미노산 농도는 약 10mM 내지 약 0.5M, 예를 들어, 약 15mM 내지 약 300mM, 약 20mM 내지 약 200mM, 또는 약 25mM 내지 약 150mM, 약 50mM 또는 약 125mM의 범위에 있다. 또 다른 추가 양태에서, 건조물(예를 들어, 동결건조됨) 제형 내 히스티딘의 양은 약 1% 내지 약 10%(w/w의 건조 제형), 또는 약 3% 내지 약 6%(w/w)의 범위에 있다. 일부 실시형태에서, 단백질의 양이 31%(w/w의 건조 제형) 이상 또는 건조 제형 내 히스티딘 대 단백질이 약 0.15:1 질량비일 때, 건조물(예를 들어, 동결건조됨) 제형 내 히스티딘의 양은 약 4% 초과(w/w의 건조 제형)이다. 추가의 또 다른 양태에서, 건조물(예를 들어, 동결건조됨) 제형 내 알기닌의 양은 약 4% 내지 약 20%(w/w의 건조 제형), 또는 약 10% 내지 약 15%(w/w)의 범위에 있다. 일부 실시형태에서, 단백질의 양이 31%(w/w의 건조 제형) 이상 또는 건조 제형 내 알기닌 대 단백질이 약 0.4:1 질량비일 때, 건조물(예를 들어, 동결건조됨) 제형 내 알기닌의 양은 약 13%(w/w의 건조 제형) 초과이다. 히스티딘 및 알기닌과 같은 아미노산의 조합의 실시형태에서, 전체 아미노산 대 항체의 몰 비는 적어도 200:1, 약 200:1 내지 약 500:1 또는 적어도 400:1일 수 있다.

[0094] 제형은 선택적으로 적어도 한 종의 계면활성제를 추가로 함유할 수 있다. 일 양태에서, 제형에 포함될 수 있는 계면활성제는, 예를 들어, 폴리솔베이트 20, 폴리솔베이트 80, 폴록사머(플루로닉(Pluronic)(등록상표)) 및 이들의 조합물을 포함한다. 존재한다면, 계면활성제는, 예를 들어 보틀링(bottling), 냉동, 건조, 동결건조 및/또는 재구성 동안 항체의 불용성 응집물의 형성을 감소시키는 양으로 일반적으로 포함된다. 계면활성제 농도는, 예를 들어 사전-건조물(예를 들어, 동결건조됨) 또는 재구성 후 제형에서, 일반적으로 약 0.0001% 내지 약 1.0%, 약 0.01% 내지 약 0.1%, 예를 들어 약 0.02%, 0.03%, 0.04%, 0.05%, 0.06%, 0.07%, 0.08% 또는 0.09%(w/v), 0.05% 내지 0.07% 또는 0.06%(w/v)이다. 예를 들어 건조물(예를 들어, 동결건조됨) 제형에서 계면활성제 양은 일반적으로 약 0.01% 내지 약 3.0%(w/w), 약 0.10% 내지 약 1.0%, 예를 들어 약 0.15%, 0.20%, 0.25%, 0.30%, 0.35%, 0.40% 또는 0.50%(w/w)이다. 다른 양태에서, 계면활성제:항체 몰 비는 약 1:1이다. 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 제형에서 임의의 요망되는 양으로 존재할 수 있으며, 단, 비-환원 당 대 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 비(몰:몰)는 약 600:1 초과이다. 그러나, 제형은 고농도의 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 함유할 수 있다. 예를 들어, 액체 제형은 적어도 약 10 mg/ml, 적어도 약 20 mg/ml, 적어도 약 30 mg/ml, 적어도 약 40 mg/ml, 적어도 약 50 mg/ml, 적어도 약 60 mg/ml, 적어도 약 70 mg/ml, 적어도 약 80 mg/ml, 적어도 약 90 mg/ml, 적어도 약 100 mg/ml,

약 40 mg/ml 내지 약 80 mg/ml 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체, 약 60 mg/ml 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 포함할 수 있다. 건조 제형(예를 들어, 동결건조됨)은 적어도 약 5중량%, 적어도 약 10중량%, 적어도 약 15중량%, 적어도 약 20중량%, 적어도 약 25중량%, 적어도 약 30중량% 또는 약 31중량% 또는 약 32중량% 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 함유할 수 있다.

[0095] 원한다면, 제형은 금속 킬레이터 및/또는 항-산화제뿐만 아니라 다른 약제학적으로 허용가능한 부형제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 금속 킬레이터는, 예를 들어, 메틸아민, 에틸렌다이아민, 데스페록사민, 트라이엔틴, 히스티딘, 말레이트, 포스포네이트 화합물, 예를 들어, 에티드론산, 에틸렌다이아민테트라아세트산(EDTA), 에틸렌글라이코테트라아세트산(EGTA) 등을 포함한다. 적합한 항-산화제는, 예를 들어, 시트르산, 요산, 아스코브산, 리포산, 글루타티온, 토코페롤, 카로텐, 라이코펜, 시스테인 등을 포함한다.

[0096] 제형은 액체 또는 고체일 수 있다. 액체 제형은 수용액 또는 현탁액일 수 있으며, 적합한 수성 용매, 예컨대 물 또는 수성/유성 혼합물, 예컨대 물 알코올 혼합물에서 제조될 수 있다. 액체 제형은 약 5.5 내지 약 7.5, 약 6.0 내지 약 7.0, 또는 약 6.0 내지 약 6.5, 예컨대 약 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4 또는 6.5의 pH를 가질 수 있다. 액체 제형은 저장 동안 냉장(예를 들어, 2 내지 8°C) 또는 냉동(예를 들어, -20°C 또는 -80°C)될 수 있다. 고체 제형은 임의의 적합한 방법으로 제조될 수 있고, 예를 들어, 케이크 또는 분말의 형태일 수 있다. 고체 제형은 본 명세서에서 기재된 바와 같은 액체 제형을 건조시킴으로써, 예를 들어 동결건조 또는 분무 건조, 필름 내 공기 건조(예를 들어, 경피 전달), 액체 예멸전 내로 혼합 및 경구 전달용 구체로서 또는 경피 전달용 필름 으로서 건조에 의해 제조된다. 제형이 고체 제형일 때, 제형은 약 5% 이하, 약 4.5% 이하, 약 4% 이하, 약 3.5% 이하, 약 3% 이하, 약 2.5% 이하, 약 2% 이하, 약 1.5% 이하, 약 1% 이하의 수분 함량을 가질 수 있거나, 또는 실질적으로 무수물일 수 있다. 고체 제형은 투여에 적합한 액체가 되는 적합한 배지 또는 용매에서 용해될 수 있고, 즉 재구성될 수 있다. 고체 제형을 재구성하기 위한 적합한 용매는 물, 등장성 식염수, 완충제, 예를 들어, 인산염-완충 식염수, 링거(락테이트화 또는 텍스트로스) 용액, 최소 필수 배지, 알코올/수성 용액, 텍스트로스 용액 등을 포함한다. 용매의 양은 건조 전 농도보다 더 높거나, 동일하거나 또는 더 낮은 치료적 단백질 농도를 야기할 수 있다. 일 양태에서, 재구성된 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 농도는 사전-건조 액체 제형에서와 동일한 농도이다.

[0097] 제형은 멸균될 수 있고, 이는 제형의 제조 전 또는 후 인간 피험체에게 투여에 적합한 멸균의 약제학적 제형을 만들기 위해 당업자에게 공지된 절차에 따라서 달성될 수 있다. 제형은 작은 기공을 통한 여과에 의해, 무균 가공을 통해 또는 초음파 방사선에 노출에 의해, 예를 들어 건조 전 및/또는 재구성 후 액체로서 멸균될 수 있다. 필터 기공 크기는 필터 미생물유기체에 대해 0.1 μ m 또는 0.2 μ m 또는 필터 바이러스 입자에 대해 10 내지 20nm일 수 있다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 건조된 제형은, 예를 들어 감마 방사선에 노출에 의해 멸균될 수 있다. 일 양태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 액체 제형은 건조 전 여과에 의해 멸균된다.

[0098] 일 양태에서, 제형은 저장 시 안정하다. 다른 양태에서, 제형은 건조 상태로 저장 시 안정하다. 안정성은 제형화 시간뿐만 아니라 주목한 온도에서 다음의 저장 내내 제형 내 항체의 생리적 안정성, 화학적 안정성, 및/또는 생물학적 활성을 평가함으로써 시험될 수 있다. 액체 제형 또는 재구성된 건조 분말의 생리적 및/또는 화학적 안정성은 응집물 형성의 평가(예를 들어, 크기 배제(또는 겔 여과) 크로마토그래피(size exclusion chromatography: SEC), 기질-보조 레이저 탈착-이온화 시간 비행 질량 분석법(matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry: MALDI-TOF MS), 분석 초원심분리, 광 산란(광자 상관 분광법, 동적 광 산란(dynamic light scattering: DLS), 다각 레이저 광 산란(multi-angle laser light scattering: MALLS)), 유동-기반 현미경 영상화, 전자 임피던스(쿨터(coulter)) 카운터, 광 차단 또는 다른 액체 입자 계측 시스템을 사용하여, 탁도 측정에 의해, 밀도 구배 원심분리에 의해 및/또는 시각적 검사에 의해); 양이온 교환 크로마토그래피(또한 문헌[Vlasak and Ionescu, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 9:468-481 (2008)] 및 문헌[Harris et al. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 752:233-245 (2001)] 참조), 정전위점 초점화(isoelectric focusing: IEF), 예를 들어 모세관 기법(capillary technique: cIEF) 또는 모세관 전기영동을 사용하여 전하 이질성을 평가함으로써; 아미노-말단 또는 카복시 말단 서열 분석; 질량 분광 분석; 단편화, 무결합 및 멀티머(즉, 다이머, 트라이머 등) 항체를 비교하기 위한 SDS-파지 또는 SEC 분석; 펩타이드 맵(예를 들어 트립신 또는 LYS-등); 생물학적 활성 또는 항체의 항원 결합 작용 등의 평가를 포함하는, 다양한 상이한 방법으로 정성적으로 및/또는 정량적으로 평가될 수 있다(예를 들어, 문헌[*Analytical Techniques for Biopharmaceutical Development*, Rodriguez-Diaz et al. eds. Informa Healthcare (2005)] 참조). 생물학적 활성 또는 항원 결합 기능, 예를 들어, MAdCAM(예를 들어, MAdCAM-1)에 대한 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 결합 또는 MAdCAM(예를 들어, MAdCAM-1)에 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린을 발현시키는 세포 결합의 억제, 예를 들어, 고정된 MAdCAM(예를 들어, MAdCAM-1)은 당업자에게 이용가능한 다양한 기법을 사용하여 평가될 수 있다(예를 들어, 문헌[Soler

et al., J. Pharmacol. Exper. Ther. 330:864-875 (2009)] 참조). 건조 제형의 수분 함량 측정은 제형이 화학적 또는 생리적 분해를 겪을 가능성이 있는 방법을 표시할 수 있는데, 더 높은 수분은 더 많은 분해를 야기한다.

[0099] 고체-상태 제형의 안정성은 또한 직접 시험, 예컨대 X-레이 분말 회절(X-Ray Powder Diffraction: XRPD)에 의한 결정 구조의 확인; 푸리에 변환 적외분광법(Fourier Transform Infrared Spectroscopy: FTIR)을 사용하여 고체상태에서 항체 구조를 평가; 및 시차주사 열량측정법(Differential Scanning Calorimetry: DSC, 예를 들어 변성을 평가하기 위함)을 사용하여 동결건조된 고체에서 열 전이의 측정(용융, 유리 전이 등) 및 카를 피셔(Karl Fisher) 시험에 의해 수분함량을 측정하는 것, 예를 들어 가수분해를 통해 화학적 불안정성의 가능성을 추론하는 것과 같은 간접적 시험을 포함하는, 다양한 상이한 방법으로 정성적으로 및/또는 정량적으로 평가될 수 있다. 건조 제형의 수분 함량 측정은 제형이 화학적 또는 생리적 분해를 겪을 가능성이 있는 방법을 표시할 수 있는데, 더 높은 수분은 더 많은 분해를 야기한다.

[0100] 안정성은 선택된 시간 기간 동안 선택된 온도에서 측정될 수 있다. 일 양태에서, 건조물(예를 들어, 동결건조됨) 제형은 약 40℃에서, 적어도 약 2 내지 4주 동안 75% RH, 적어도 약 2개월, 적어도 약 3개월, 적어도 약 6개월, 적어도 약 9개월, 적어도 약 12개월 또는 적어도 약 18개월 안정하다. 다른 양태에서, 제형(액체 또는 건조물(예를 들어, 동결건조됨))은 약 5℃ 및/또는 25℃ 및 60% RH에서 적어도 약 3개월, 적어도 약 6개월, 적어도 약 9개월, 적어도 약 12개월, 적어도 약 18개월, 적어도 약 24개월, 적어도 약 30개월, 적어도 약 36개월 또는 적어도 약 48개월 동안 안정하다. 다른 양태에서, 제형(액체 또는 건조물(예를 들어, 동결건조됨))은 약 -20℃에서 적어도 약 3개월, 적어도 약 6개월, 적어도 약 9개월, 적어도 약 12개월, 적어도 약 18개월, 적어도 약 24개월, 적어도 약 30개월, 적어도 약 36개월, 적어도 약 42개월 또는 적어도 약 48개월 동안 안정하다. 더 나아가, 액체 제형은, 일부 실시형태에서, 냉동(예를 들어, -80℃로) 및 해동 후, 예를 들어, 1, 2 또는 3 주기의 냉동 및 해동 후 안정할 수 있다.

[0101] 불안정성은 응집(예를 들어, 비-공유 가용성 응집(소수성 또는 전하 상호작용에 의해 야기됨), 공유 가용성 응집(예를 들어, 이황화 결합 재정렬/스크램블링(scrambling)), 불용성 응집(액체/공기 및 액체/고체 경계면에서 단백질의 변성에 의해 야기됨)), 탈아미드화(예를 들어, Asn 탈아미드화), 산화(예를 들어, Met 산화), 이성질체화(예를 들어, Asp 이성질체화), 클리핑(clipping)/가수분해/단편화(예를 들어, 힌지 영역 단편화), 숙신이미드 형성, N-말단 연장, C-말단 처리, 글라이코실화 차이 등 중 어느 하나 이상을 수반할 수 있다.

[0102] 안정한 제형은 항-α4β7 항체의 낮은 면역원성에 기인할 수 있다. 면역원성 항-α4β7 항체는 인간 피험체 또는 환자에서 인간-항-인간 항체(human-anti-human antibody: HAHA) 반응을 야기할 수 있다. 항-α4β7 항체에 대한 HAHA 반응이 발생한 환자는 치료시 이상반응(예를 들어, 부위 주입 반응)이 있을 수 있거나 또는 항-α4β7 항체를 빠르게 제거할 수 있는데, 이는 치료에 의해 계획된 것보다 더 낮은 용량을 야기한다. 항-α4β7 항체 처리의 초기 연구 보고(Feagen et al. (2005) N. Engl. J. Med. 352:2499-2507)는 인간 항인간 항체가 치료된 환자의 44%에서 8주까지 발생한다는 것을 표시하였다. 이 연구에서 항체는 액체로서 저장되었고, 어떤 폴리솔베이트를 함유하지 않는다.

[0103] 일부 실시형태에서, 제형은 덜 안정한 제형의 HAHA 결과와 비교하여 환자의 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80% 또는 적어도 90%에 대해 HAHA 음성 환자의 비율을 증가시킬 수 있다.

[0104] 일부 실시형태에서, 항-α4β7 항체 제형은 ≥ 50% 주요 하전 아이소폼, ≥ 55% 주요 하전 아이소폼, 또는 65 내지 70% 주요 하전 아이소폼을 가진다. 다른 양태에서, 안정한 항-α4β7 항체 제형은 ≤ 45% 산성 하전 아이소폼, ≤ 40% 산성 하전 아이소폼, ≤ 30% 산성 하전 아이소폼 또는 22 내지 28% 산성 아이소폼을 가진다. 또 다른 양태에서, 안정한 항-α4β7 항체 제형은 ≤ 25% 염기성 아이소폼, ≤ 20% 염기성 아이소폼, ≤ 15% 염기성 아이소폼, 약 5% 염기성 아이소폼 또는 약 10% 염기성 아이소폼을 가진다. 일 양태에서, 안정한 항-α4β7 항체 제형은, 예를 들어 CEX에서 결정되는 바와 같이 ≥ 55% 주요 아이소폼, ≤ 30% 산성 아이소폼 및/또는 ≤ 20% 염기성 아이소폼을 가진다. 다른 양태에서, 안정한 항-α4β7 항체 제형은, 예를 들어 cIEF에서 결정되는 바와 같이 ≥ 50% 주요 아이소폼, ≤ 45% 산성 아이소폼 및/또는 < 10% 염기성 아이소폼을 가진다.

[0105] 일부 양태에서, 항-α4β7 항체 건조, 고체 제형은 ≤ 10% 수분 함량, ≤ 5% 수분 함량 또는 < 2.5% 수분 함량을 가진다. 재구성에 필요한 시간은 ≤ 60분, ≤ 50분 또는 ≤ 40 분 또는 ≤ 30분 또는 ≤ 20분이다.

[0106] 모노머 함량 및/또는 응집물 함량(예를 들어, 다이머, 트라이머, 테트라머, 펜타머, 올리고머 및 더 고차의 응집물로서)(즉, 액체 제형에서, 또는 재구성 후 건조물 제형에서)는 SEC, MALDI-TOF MS, 분석 초원심분리, 광 산

란(DLS 또는 MALLS) 또는 나노규모 측정, 예컨대 나노입자 트래킹 분석 NTA, 영국 윌트셔에 소재한 나노사이트 리미티드(NanoSight Ltd))에 의해 측정될 수 있다. 응집물의 분해능, 특징 및 정량화는 SEC 컬럼 분리의 길이를 증가시키는 것을 포함하는 다수의 방법으로, 예를 들어 더 긴 컬럼에 의해 또는 처음의 분석 SEC 컬럼과 연결된 제2 또는 그 이상의 SEC 컬럼(들)의 직렬 부착에 의해, 광 산란에 의해 모노머의 SEC 정량화를 보충하여, 또는 NTA를 사용함으로써 달성될 수 있다.

[0107] 일 실시형태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형은 $\geq 90\%$ 모노머 항체, $\geq 95\%$ 모노머 항체, 또는 97 내지 99% 모노머 항체를 가진다. 다른 실시형태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형에서 대다수의 물질은 $\leq 20\text{nm}$, $\leq 15\text{nm}$, $\leq 10\text{nm}$, 또는 약 5 내지 약 7nm의 평균 반경을 가진다. 일 양태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형은 단백질 분석에 의해 $\geq 80\%$ 량의 중쇄 + 경쇄를 가진다. 일 양태에서, $\geq 90\%$ 중쇄 + 경쇄가 있다. 다른 양태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형은 $\leq 10\%$ 응집물, $\leq 5\%$ 응집물, $\leq 2.5\%$ 응집물, $\leq 1.5\%$ 응집물, $\leq 1.0\%$ 응집물 또는 $\leq 0.5\%$ 응집물을 가진다. 다른 양태에서, 안정한 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형은 $\geq 96\%$ 모노머 및/또는 $\leq 2.5\%$ 응집물을 가진다. 또 다른 양태에서, 안정한 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형은 약 99% 모노머 및/또는 약 $< 1\%$ 응집물을 가진다.

[0108] 예를 들어, 응집물 또는 미용해 부형제의, 즉, 재구성된 제형에서 입자 크기는 광 염폐(obscuration)(예를 들어, 하크 울트라 애널리틱스(Hach Ultra Analytics)(오레곤주 그랜즈 패스에 소재)에 의한 액체 입자 계측 시스템(HIAC)), 현미경 검사, 쿨터 카운터(coulter counter) 또는 디지털(예를 들어, 유동-기반) 현미경 이미징 기반 시스템, 예컨대 브라이트웰(캘리포니아주 오타와에 소재)에 의한 마이크로플루이딕스 이미징(microfluidics imaging: MFI) 또는 플루이드 이미징 테크놀로지스(메인주 야머스에 소재)에 의한 플로우캠(FLOWCAM(등록상표)) 이미지 입자 분석기에 의해 측정될 수 있다. 일 양태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제제의 입자 크기는 약 $30\mu\text{m}$, 약 $25\mu\text{m}$, 약 $10\mu\text{m}$, 약 $5\mu\text{m}$, 약 $2\mu\text{m}$ 또는 $1\mu\text{m}$ 이하이다. 입자의 양은 항체 제형에서 최소화되어야 한다. 일 양태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형은 1 용량에서 $\geq 10\mu\text{m}$ 직경의 6000개 미만의 입자이고/이거나 $\geq 25\mu\text{m}$ 직경의 600개 미만의 입자이다(미국약전(U.S. Pharmacopoeia) Chp. 788, 광 염폐 계측 방법; 현미경 정량화 방법에 의한 절반의 해당량). 또 다른 양태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형, 예를 들어 재구성된 제형의 용량에서, 예를 들어 MFI 측정에 의해 밀리리터 당 입자의 양은 mL 당 약 500 내지 약 2000개, 또는 약 1000 내지 약 3000개의 2 내지 $10\mu\text{m}$ 입자, mL 당 약 50 내지 약 350개의 $\geq 10\mu\text{m}$ 입자 및 mL 당 약 0 내지 약 50개의 $\geq 25\mu\text{m}$ 입자이다.

[0109] 일 실시형태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형은 기준 표준 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 약 60% 내지 약 140%의 결합 친화도를 가진다. 일 양태에서, 본 명세서에 기재된 제형에서 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 기준 표준의 약 80% 내지 약 120%의 값에서, 예를 들어 세포 상에서 $\alpha 4\beta 7$ 에 결합된다(WO98/06248 또는 미국특허 제7,147,851호). 다른 실시형태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형은 MAdCAM, 예를 들어, MAdCAM-1, MAdCAM-Ig 키메라에 대한 세포 발현 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린 결합의 적어도 50% 또는 적어도 60%를 억제하는 능력을 가진다(또한 기준 표준 실시예에 대해 미국특허 출원 공개 제20070122404호).

[0110] 상기 논의한 바와 같이, 제형의 냉동은 본 명세서에서 구체적으로 고려된다. 따라서, 제형은 냉동 및 해동 시 안정성에 대해 시험될 수 있다. 따라서, 액체 제형의 항체는 제형의 냉동 및 해동 시 안정적인 수 있고, 예를 들어 항체는 1, 2, 3, 4, 5 이상의 냉동/해동 주기 후 안정적인 수 있다.

[0111] 일부 실시형태에서, 제형은 적어도 약 50 mg/mL 내지 약 100 mg/mL 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체, 완충제(예를 들어, 히스티딘) 및 적어도 약 9%(w/w) 비-환원 당(예를 들어, 수크로스, 트레할로스 또는 만니톨)을 포함하는 액체 제형이다. 일 실시형태에서, 제형은 적어도 약 50 내지 약 80 mg/mL , 약 60 mg/mL 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체, 완충제(예를 들어, 히스티딘), 유리 아미노산(예를 들어, 알기닌) 및 적어도 약 9% 또는 10%(w/w) 비-환원 당(예를 들어, 수크로스, 트레할로스 또는 만니톨)을 포함한다.

[0112] 다른 실시형태에서, 제형은 적어도 약 60 mg/mL 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체, 완충제(예를 들어, 히스티딘), 유리 아미노산(예를 들어, 알기닌) 및 적어도 약 10%(w/w) 비-환원 당(예를 들어, 수크로스, 트레할로스 또는 만니톨)을 포함한다. 이러한 실시형태에서, 완충제 농도는 약 15 내지 약 75mM , 약 25 내지 약 65mM , 또는 약 50mM 이다. 유리 아미노산 농도는 약 50 내지 약 250mM , 약 75 내지 약 200mM , 약 100 내지 약 150mM 또는 약 125mM 이다.

[0113] 일 실시형태에서, 제형은 비-환원 당, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체, 히스티딘, 알기닌 및 폴리솔베이트 80의 혼합물을 포함하는 건조물, 고체 제형(예를 들어, 동결건조된 제형)이며, 비-환원 당 대 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 물 비(물:물)는 600:1 초과이다.

[0114] 다른 실시형태에서, 제형은 비-환원 당, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체, 히스티딘, 알기닌 및 폴리솔베이트 80의 혼합물을 포

합하는 건조물, 고체, 비정질 제형(예를 들어, 동결건조된 제형)이며, 비-환원 당 대 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 몰 비(몰:몰)는 600:1 초과이다.

[0115] 일 실시형태에서, 제형은 비-환원 당, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체, 히스티딘, 알기닌 및 폴리솔베이트 80을 포함하는 동결건조된 제형이며, 제형에서 비-환원 당 대 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 몰 비(몰:몰)는 600:1 초과이다.

[0116] 일 실시형태에서, 제형은 비-환원 당, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체, 히스티딘, 알기닌 및 폴리솔베이트 80을 포함하는 동결건조된 제형이되, 제형에서 비-환원 당 대 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 몰 비(몰:몰)는 600:1 초과이고, 제형에서 알기닌 대 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 몰 비(몰:몰)는 250:1 초과이다.

[0117] 일 실시형태에서, 제형은 액체 제형이며, 적어도 약 60 mg/ml 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체, 적어도 약 10%(w/v) 비-환원 당, 및 적어도 약 125mM의 한 종 이상의 유리 아미노산을 포함한다.

[0118] 일 실시형태에서, 제형은 액체 제형이며, 적어도 약 60 mg/ml 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체, 적어도 약 10%(w/v) 비-환원 당 및 적어도 약 175mM의 한 종 이상의 유리 아미노산을 포함한다.

[0119] 일 실시형태에서, 제형은 액체 제형이며, 약 60 mg/ml 내지 약 80 mg/ml 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체, 완충제 및 적어도 약 10%(w/w) 당을 포함한다.

[0120] 일 실시형태에서, 제형은 액체 제형이며, 약 60 mg/ml 내지 약 80 mg/ml 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체, 히스티딘 및 적어도 약 10%(w/w) 수크로스를 포함한다.

[0121] 일 실시형태에서, 제형은 동결건조되며, 하나의 바이알에서 1회 용량으로 저장된다. 바이알은 치료가 필요한 피험체에게 투여될 때까지 약 2 내지 8°C에서 바람직하게 저장된다. 바이알은, 예를 들어 20 또는 50cc 바이알(예를 들어, 60 mg/ml 용량에 대해)일 수 있다. 바이알은 적어도 약 120mg, 적어도 약 180mg, 적어도 약 240mg, 적어도 약 300mg, 적어도 약 360mg, 적어도 약 540mg 또는 적어도 약 900mg의 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 함유할 수 있다. 일 양태에서, 바이알은 약 300mg의 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 함유한다.

[0122] 하나 이상의 다른 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정제, 예컨대 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Hendrickson, R. Ed. (2005)]에 기재된 것은 제형에 포함될 수 있는데, 단, 제형의 원하는 특징에 부정적으로 영향을 미치지 않는다. 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정제는 사용되는 투약량 및 농도에서 수용인에게 무해하고, 추가적인 완충제; 공용매; 아스코브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; EDTA와 같은 킬레이트제; 금속 착물(예를 들어, Zn-단백질 복합체); 폴리에스터와 같은 생분해성 중합체; 보존제; 및/또는 나트륨과 같은 염-형성 반대이온을 포함한다.

[0123] **$\alpha 4\beta 7$ 항체**

[0124] 제형에서 사용에 적합한 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 임의의 원하는 공급원으로부터의 항체, 예컨대 완전 인간 항체, 무린 항체, 토끼 항체 등 및 임의의 원하는 유전자조작된 항체, 예컨대 키메라 항체, 인간화된 항체 등을 포함한다. 이들 유형의 항체 중 어떤 것의 항원-결합 단편, 예컨대 Fab, Fv, scFv, Fab' 및 F(ab')₂ 단편은 또한 제형에서 사용에 적합하다.

[0125] 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 $\alpha 4$ 쇠 상의(예를 들어, 인간화된 MAb 21.6(Bendig 등의 미국특허 제5,840,299호)), $\beta 7$ 쇠 상의(예를 들어, FIB504 또는 인간화된 유도체(예를 들어, Fong 등의 미국특허 제7,528,236호)) 에피토프에, 또는 $\alpha 4$ 쇠와 $\beta 7$ 쇠의 결합에 의해 형성된 조합 에피토프에 결합될 수 있다. 일 양태에서, 항체는 $\alpha 4\beta 7$ 복합체 상의 조합 에피토프에 결합되지만, 달리 쇠가 서로 결합되지 않는다면, $\alpha 4$ 쇠 또는 $\beta 7$ 쇠 상의 에피토프에 결합되지 않는다. $\alpha 4$ 인테그린과 $\beta 7$ 인테그린의 결합은 에피토프를 함께 포함하는 쇠 둘 다에 존재하는 근위 잔기로 이동시킴으로써 또는 하나의 쇠, 예를 들어 $\alpha 4$ 인테그린 쇠 또는 $\beta 7$ 인테그린 쇠 상에 적절한 인테그린 상대가 없거나 또는 인테그린 활성화가 없는 항체 결합에 접근가능하지 않은 에피토프 결합 부위를 입체구조적으로 노출시킴으로써 만들 수 있다. 다른 양태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 $\alpha 4$ 인테그린 쇠와 $\beta 7$ 인테그린 쇠 둘 다에 결합되며, 따라서, $\alpha 4\beta 7$ 인테그린 복합체에 특이적이다. 이러한 항체는 $\alpha 4\beta 7$ 에 결합될 수 있지만, $\alpha 4\beta 1$ 에 결합되지 않고/않거나, 예를 들어 $\alpha_E\beta 7$ 에 결합되지 않는다. 다른 양태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 Act-1 항체와 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 에피토프에 결합된다(Lazarovits, A. I. et al., J. Immunol., 133(4): 1857-1862 (1984), Schweighoffer et al., J. Immunol., 151(2): 717-729, 1993; Bednarczyk et al., J. Biol. Chem., 269(11): 8348-8354, 1994). 무린 Act-1 단클론성 항체를 생성하는 무린 ACT-1 하이브리도마 세포주는 미국 매사추세츠주 02139 캄브리지 랜즈다운 스트리트 40에 소재한 밀레니엄 파마슈티컬스 인코포레이티드(Millennium Pharmaceuticals, Inc.)를 대표하여 2001년 8월 22일의 부다페스트 조약 조항 하에서 미국

버지니아주 매너서스 20110-2209 유니버시티 볼러바드 10801 미국 미생물 보존센터(American Type Culture Collection)에서 등록번호 PTA-3663 하에 기탁되었다. 다른 양태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 미국 출원 공개 제 2010/0254975호에 제공된 CDR을 사용하는 인간 항체 또는 $\alpha 4\beta 7$ 결합 단백질이다.

[0126] 일 양태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 하나 이상의 그의 리간드(예를 들어, 점막 어드레신, 예를 들어, MAdCAM(예를 들어, MAdCAM-1), 피브로넥틴, 및/또는 혈관 어드레신(VCAM)) 중 하나 이상에 $\alpha 4\beta 7$ 의 결합을 억제한다. 영장류 MAdCAM은 국제특허출원 공개 WO 96/24673호에 기재되어 있으며, 그의 전체 교시는 전문이 본 명세서에 참조로서 포함된다. 다른 양태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 VCAM의 결합을 억제하지 않고 MAdCAM(예를 들어, MAdCAM-1) 및/또는 피브로넥틴에 $\alpha 4\beta 7$ 의 결합을 억제한다.

[0127] 일 양태에서, 제형에서 사용을 위한 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 마우스 Act-1 항체의 인간화된 형태이다. 인간화된 항체를 제조하기 위한 적합한 방법은 당업계에 잘 공지되어 있다. 일반적으로, 인간화된 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 마우스 Act-1 항체 및 적합한 인간 중쇄 프레임워크 영역의 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR, CDR1, 서열번호 8, CDR2, 서열번호 9 및 CDR3, 서열번호 10)을 함유하는 중쇄를 함유할 것이며; 또한, 마우스 Act-1 항체 및 적합한 인간 경쇄 프레임워크 영역의 3개의 경쇄 CDR(CDR1, 서열번호 11, CDR2, 서열번호 12 및 CDR3, 서열번호 13)을 함유하는 경쇄를 함유한다. 인간화된 Act-1 항체는 아미노산 치환이 있거나 또는 없는 컨센서스 프레임워크 영역을 포함하는 임의의 적합한 인간 프레임워크 영역을 함유할 수 있다. 예를 들어, 프레임워크 아미노산 중 하나 이상은 다른 아미노산, 예컨대 마우스 Act-1 항체에서 대응되는 위치에서 아미노산으로 대체될 수 있다. 인간 불변 영역 또는 그의 일부는, 존재한다면, 대립유전자 변이체를 포함하는 κ 또는 λ 경쇄, 및/또는 γ (예를 들어, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$), μ , α (예를 들어, $\alpha 1$, $\alpha 2$), δ 또는 ϵ 중쇄의 인간 항체로부터 유래될 수 있다. 특히 불변 영역(예를 들어, IgG1), 그의 변이체 또는 일부는 효과기 기능을 맞추기 위해서 선택될 수 있다. 예를 들어, 돌연변이된 불변 영역(변이체)은 Fc 수용체에 대한 결합 및/또는 보체를 고정하는 능력을 최소화하도록 융합 단백질에 포함될 수 있다(예를 들어, 1994년 12월 22일의 Winter 등의 GB 제2,209,757B호; Morrison 등의 WO 89/07142호; Morgan 등의 WO 94/29351 참조). Act-1 항체의 인간화된 형태는 국제특허 공개 WO98/06248호 및 WO07/61679호에서 기재되어 있으며, 그의 각각의 전체 교시는 본 명세서에 참조로서 포함된다.

[0128] 다른 양태에서, 제형에서 사용을 위한 항- $\alpha 4\beta 7$ 인간화된 항체는 서열번호 2의 아미노산 20 내지 140을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 4의 아미노산 20 내지 131 또는 서열번호 5의 아미노산 21 내지 132를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 원한다면, 적합한 인간 불변 영역(들)이 존재할 수 있다. 예를 들어, 인간화된 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 서열번호 2의 아미노산 20 내지 470을 포함하는 중쇄 및 서열번호 5의 아미노산 21 내지 239를 포함하는 경쇄를 포함할 수 있다. 다른 예에서, 인간화된 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 서열번호 2의 아미노산 20 내지 470을 포함하는 중쇄 및 서열번호 4의 아미노산 20 내지 238을 포함하는 경쇄를 포함할 수 있다. 도 4는 뮤린 항체를 지니는 인간 항체의 유전적 경쇄와 비교되는 정렬을 나타낸다. 정렬은 인간 잔기에 대해 전환된 2개의 마우스 잔기를 지니는 베돌리주맵의 인간화된 경쇄(예를 들어, 화학 초록 서비스(Chemical Abstract Service: CAS, 미국 화학 협회) 등록 번호 943609-66-3)는 LDP-02의 경쇄보다 더 인간화된다는 것을 도시한다(도 3). 추가로, LDP-02는 다소 소수성, 가요성 알라닌(114) 및 베돌리주맵에서 약간 친수성인 하이드록실-함유 트레오닌(114) 및 소수성의, 잠재적으로 안쪽으로 접하는 발린(115) 잔기로 대체된 친수성 부위(아스파테이트(115))를 가진다.

[0129] 항체 서열에 대한 추가 치환은, 예를 들어 중쇄 및 경쇄 프레임워크 영역으로 돌연변이, 예컨대 서열번호 14의 잔기 2 상에서 아이소류신의 발린으로 돌연변이; 서열번호 14의 잔기 4 상에서 메티오닌의 발린으로 돌연변이; 서열번호 15의 잔기 24 상에서 알라닌의 글라이신으로 돌연변이; 서열번호 15의 잔기 38 상에서 알기닌의 리신으로 돌연변이; 서열번호 15의 잔기 40 상에서 알라닌의 알기닌으로 돌연변이; 서열번호 15의 잔기 48 상에서 메티오닌의 아이소류신으로 돌연변이; 서열번호 15의 잔기 69 상에서 아이소류신의 류신으로 돌연변이; 서열번호 15의 잔기 71 상에서 알기닌의 발린으로 돌연변이; 서열번호 15의 잔기 73 상에서 트레오닌의 아이소류신으로 돌연변이; 이들의 임의의 조합; 및 중쇄 CDR의 마우스 Act-1 항체의 CDR(CDR1, 서열번호 8, CDR2, 서열번호 9 및 CDR3, 서열번호 10)로 치환; 및 경쇄 CDR의 마우스 Act-1 항체의 경쇄 CDR(CDR1, 서열번호 11, CDR2, 서열번호 12 및 CDR3, 서열번호 13)로 치환될 수 있다.

[0130] 일부 실시형태에서, 제형에서 사용을 위한 항- $\alpha 4\beta 7$ 인간화된 항체는 서열번호 2의 아미노산 20 내지 140에 대해 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 4의 아미노산 20 내지 131 또는 서열번호 5의 아미노산 21 내지 132에 대해 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 포함한다. 아미노산 서열 동일성은 디폴트 변수를 사용하여 레이저진 시스템(Lasergene system)(위스콘신주 매디슨에 소재한 DNA스타 인코포레이티드(DNASTAR, Inc.))과 같은 적합한 서열 정렬 알고리즘을 사용하여 결정될 수 있다. 실시형태에서, 제형에서 사용을 위한 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 베돌리주맵이다(CAS, 미국 화학 협회, 등록 번호 943609-66-

3).

- [0131] 다른 $\alpha 4\beta 7$ 항체는 또한 본 명세서에 기재된 제형 및 투약 요법에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 전문이 참조로서 포함된 미국특허 제2010/0254975호(암젠 인코포레이티드(Amgen, Inc.))에 기재된 $\alpha 4\beta 7$ 항체는 제형 및 개체에서 염증성 장질환을 치료하는 방법에서 사용에 적합하다.
- [0132] 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체는 살아있는 세포, 예를 들어 배양물 내 세포에서 각각의쇄를 암호화하는 핵산 서열의 발현에 의해 생성될 수 있다. 다양한 숙주-발현 벡터 시스템은 본 발명의 항체 분자를 발현시키기 위해 이용될 수 있다. 이러한 숙주-발현 시스템은 관심의 암호 서열이 생성되고, 실질적으로 정제되는 비히클을 나타내지만, 또한 적절한 뉴클레오타이드 암호 서열로 형질전환되거나 또는 형질감염될 때 인시츄로 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 발현시킬 수 있는 세포를 나타낸다. 이들은, 이하에 제한되는 것은 아니지만, 미생물유기체, 예컨대 항체 암호 서열을 함유하는 재조합 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환된 박테리아(예를 들어, 이콜라이(*E. coli*), 바실러스 서브틸리스(*B. subtilis*)); 항체 암호 서열을 함유하는 재조합 효모 발현 벡터로 형질전환된 효모(예를 들어, 사카로마이세스(*Saccharomyces*), 피키아(*Pichia*)); 항체 암호 서열을 함유하는 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들어, 바콜로바이러스)로 감염된 곤충 세포 시스템; 항체 암호 서열을 함유하는 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들어, 꽃양배추모자이크바이러스(cauliflower mosaic virus: CaMV); 담배 모자이크 바이러스(tobacco mosaic virus: TMV))로 감염되거나 또는 재조합 플라스미드 발현 벡터(예를 들어, Ti 플라스미드)로 형질전환된 식물 세포 시스템; 또는 포유류 세포의 계놈으로부터 유래된 프로모터(예를 들어, 메탈로티오네인 프로모터) 또는 포유류 바이러스로부터 유래된 프로모터(예를 들어, 아데노바이러스 후기 프로모터; 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터)를 함유하는 포유류 세포 시스템(예를 들어, COS, CHO, BHK, 293, 3T3, NSO 세포)은닉 재조합 발현 구성체를 포함한다. 예를 들어, 포유류 세포, 예컨대 중국 햄스터 난소 세포(Chinese hamster ovary cell: CHO)는 인간 거대세포바이러스로부터의 주요 중간체 조기 유전자 프로모터 구성 요소와 같은 벡터와 함께 항체에 대한 효과적인 발현 시스템이다(Foecking *et al.*, *Gene* 45:101 (1986); Cockett *et al.*, *Bio/Technology* 8:2 (1990)).
- [0133] 박테리아 시스템에서, 다수의 발현 벡터는 발현되는 항체 분자에 대해 의도되는 용도에 따라서 유리하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 항체 분자의 약제학적 조성물의 생성에 대해 다량의 이러한 단백질이 생성될 때, 용이하게 정제되는 융합 단백질 생성물의 고수준의 발현을 지시하는 벡터가 바람직할 수 있다. 이러한 벡터는, 이하에 제한되는 것은 아니지만, 이콜라이 발현 벡터 pUR278(Ruther *et al.*, *EMBO J.* 2:1791 (1983))(여기서, 항체 암호 서열은 lac Z 암호 영역을 지니는 프레임에서 벡터에 개별적으로 결합될 수 있고, 따라서 융합 단백질이 생성됨); pIN 벡터(Inouye & Inouye, *Nucleic Acids Res.* 13:3101-3109 (1985); Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 24:5503-5509 (1989)) 등을 포함한다. pGEX 벡터는 또한 글루타티온 S-트랜스퍼라제(glutathione S-transferase: GST)와 함께 융합 단백질로서 외래 폴리펩타이드를 발현시키기 위해 사용될 수 있다. 일반적으로, 이러한 융합 단백질은 가용성이며, 매트릭스 글루타티온-아가로스 비드에 흡착 및 결합 다음에 유리 글루타티온의 존재에서 용리에 의해 용해된 세포로부터 용이하게 정제될 수 있다. pGEX 벡터는 트롬빈 또는 인자 Xa 프로테아제 절단 부위를 포함하도록 설계되며, 따라서 클로닝된 표적 유전자 생성물은 GST 모이어티로부터 방출될 수 있다.
- [0134] 곤충 시스템에서, 아우토그라파 캘리포니카 핵다면체바이러스(*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: AcNPV)는 외래 유전자를 발현시키기 위해 벡터로서 사용된다. 바이러스는 스포도페라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) 세포에서 성장한다. 항체 암호 서열은 바이러스의 비-필수 영역(예를 들어, 폴리헤드린 유전자)에 개별적으로 클로닝될 수 있고, AcNPV 프로모터(예를 들어, 폴리헤드린 프로모터)의 제어 하에 놓인다.
- [0135] 포유류 숙주 세포에서, 다수의 바이러스-계 발현 시스템이 이용될 수 있다. 아데노바이러스가 발현 벡터로서 사용되는 경우, 관심의 항체 암호 서열은 아데노바이러스 전사/번역 제어 복합체, 예를 들어 후기 프로모터 및 3 부(tripartite) 리더 서열에 결합될 수 있다. 이 키메라 유전자는 그 다음에 시험관내 또는 생체내 재조합에 의해 아데노바이러스 계놈에 삽입될 수 있다. 바이러스 계놈의 비-필수 영역의 삽입(예를 들어, 영역 E1 또는 E3)은 살아있을 수 있고, 감염된 숙주에서 항체 분자를 발현시킬 수 있는 재조합 바이러스를 야기할 것이다(예를 들어, 문헌[Logan & Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:355-359 (1984)]). 특이적 개시 신호는 또한 삽입된 암호 서열의 효율적인 번역에 필요할 수 있다. 이들 신호는 ATG 개시 코돈 및 인접한 서열을 포함한다. 더 나아가, 개시 코돈은 전체 삽입물의 번역을 보장하기 위해 원하는 암호 서열의 리딩 프레임과 일치하여야 한다. 이들 외인성 번역 제어 신호 및 개시 코돈은 다수의 유래, 천연과 합성 둘 다를 가질 수 있다. 발현 효율은 적절한 전사 인핸서 구성요소, 전사 종결자 등의 포함에 의해 향상될 수 있다(문헌[Bittner *et al.*, *Methods in*

Enzymol. 153:51-544 (1987) 참조).

[0136] 추가로, 삽입된 서열의 발현을 조절하거나, 또는 원하는 구체적 형식에서 유전자 생성물을 변형하고 처리하는 숙주 세포 군주가 선택될 수 있다. 단백질 생성물의 이러한 변형(예를 들어, 글라이코실화) 및 처리(예를 들어, 절단)는 단백질의 기능에 중요할 수 있다. 상이한 숙주 세포는 단백질의 번역후 처리 및 변형 및 유전자 생성물에 대해 특징적이며 구체적인 메커니즘을 가진다. 적절한 세포주 또는 숙주 시스템은 발현되는 외래 단백질의 정확한 변형 및 처리를 보장하도록 선택될 수 있다. 이를 위하여, 유전자 생성물의 1차 전사, 글라이코실화 및 인산화반응의 적절한 처리를 위한 세포 기구를 소유하는 진핵 숙주 세포가 사용될 수 있다. 이러한 포유류 숙주 세포는, 이하에 제한되는 것은 아니지만, 중국 햄스터 난소(CHO), NS0, HeLa, VERY, 새끼 햄스터 신장(baby hamster kidney: BHK), 원숭이 신장(COS), MDCK, 293, 3T3, WI38, 인간 간세포암 세포(예를 들어, Hep G2), 유방암 세포주, 예를 들어, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 및 T47D, 및 정상 유선 세포주, 예를 들어, CRL7030 및 Hs578Bst를 포함한다.

[0137] 상이한 세포유형의 글라이코실화 기구는 박테리아 세포와 마찬가지로 다른 세포 유형에서보다 상이한 글라이코실화 조성을 지니는 또는 글라이코실화가 없는 항체를 생성할 수 있다. 일 양태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 생성을 위한 세포 유형은 포유류 세포, 예컨대 NS0 또는 CHO 세포이다. 일 양태에서, 포유류 세포는 세포 대사에 수반된 효소의 결실을 포함할 수 있고, 관심의 외인성 유전자는, 예를 들어 세포에 도입을 위한 작제물 또는 벡터에서, 예를 들어 형질전환 또는 형질감염에 의해 대체 효소에 작동가능하게(operably) 연결될 수 있다. 외인성 유전자를 지니는 작제물 또는 벡터는 외인성 유전자에 의해 암호화된 폴리펩타이드의 생성을 조장하는 선별 이점을 작제물 또는 벡터의 숙주가 되는 세포에 부여한다. 일 실시형태에서, CHO 세포는 다이하이드로폴레이트 환원효소 유전자의 결실 또는 불활성화를 포함하는 DG44 세포(Chasin and Urlaub (1980) *PNAS USA* 77:4216)이다. 다른 실시형태에서, CHO 세포는 글루타민 신타제 유전자의 결실 또는 불활성화를 포함하는 CHO K1 세포이다(예를 들어, 미국특허 제5,122,464호 또는 제5,827,739호 참조).

[0138] 고체 제형

[0139] 본 발명의 고체 제형은 일반적으로 액체 제형을 건조시킴으로써 제조된다. 임의의 적합한 건조 방법, 예컨대 동결건조 또는 분무 건조가 사용될 수 있다. 동결건조는 보통 제형을 저장하고, 출하하며 유통시키기 위해 사용될 용기(예를 들어, 바이알)에서 액체 제형을 냉동시키는 단계를 수반한다(예를 들어, 문헌[Gatlin and Nail in *Protein Purification Process Engineering*, ed. Roger G. Harrison, Marcel Dekker Inc., 317-367 (1994)] 참조). 일단 제형이 냉동되면, 대기압은 감소되고, 온도는, 예를 들어 승화를 통해 냉동된 용매를 제거하도록 조절된다. 이 동결건조 과정의 단계는 때때로 1차 건조로서 지칭된다. 원한다면, 그 다음에 온도는 상승되어 또한 증발에 의해 건조 제형에 결합된 어떤 용매를 제거할 수 있다. 이 단계의 동결건조 과정은 때때로 2차 건조로서 지칭된다. 제형은 원하는 정도의 건조에 도달될 때까지, 건조 과정이 끝나며, 용기는 밀봉된다. 최종 고체 제형은 때때로 "동결건조된 제형" 또는 "케이크"로서 지칭된다. 동결건조 과정은 임의의 적합한 도구를 사용하여 수행될 수 있다. 적합한 동결건조 도구는 다수의 상업적 공급원으로부터 입수가 가능하다(예를 들어, 뉴욕주 스톤 릿지에 소재한 에스피 사이언티픽(SP Scientific)).

[0140] 고체(예를 들어, 동결건조된) 제형을 생성하기 위해 다수의 적합한 장치가 건조 액체 제형에 사용될 수 있다. 일반적으로, 동결건조된 제형은 건조되는 액체 제형의 바이알이 위치되는 칸을 포함하는 밀봉된 챔버를 사용하여 당업자에 의해 제조된다. 칸의 온도뿐만 아니라 냉각 및 가열 속도는 챔버 내부의 압력과 같이 제어될 수 있다. 본 명세서에서 논의되는 다양한 과정 변수는 이런 유형의 장치를 사용하여 수행되는 과정을 지칭하는 것으로 이해될 것이다. 당업자는 원한다면 다른 유형의 건조 장치에 본 명세서에 기재된 변수를 용이하게 적용할 수 있다.

[0141] 1차 및 2차 건조를 위한 적합한 온도 및 진공의 양은 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 일반적으로 제형은 약 -30°C 이하, 예컨대 -40°C 또는 -50°C 의 온도에서 냉동된다. 냉각속도는 매트릭스 내 얼음 결정의 양 및 크기에 영향을 미칠 수 있다. 1차 건조는 냉동 온도보다 약 10°C , 약 20°C , 약 30°C , 약 40°C 또는 약 50°C 더 따뜻한 온도에서 일반적으로 수행된다. 일 양태에서, 1차 건조 조건은 제형의 유리 전이 온도 또는 붕괴 온도 미만에서 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 유지하도록 설정될 수 있다. 단백질 분자는 강성의 고체 매트릭스에 의해 둘러싸이지 않을 수 있고, 단백질 분자가 붕괴된 매트릭스에서 안정하지 않을 수 있는 것의 결과로서 붕괴 온도 초과에서, 무정형 냉동 매트릭스는 유동(붕괴)될 수 있다. 또한, 제형은 붕괴가 일어난다면, 완전히 건조되기 어려울 수 있다. 얻어진 제형 내 다량의 수분은 더 높은 단백질 분해 속도 및 품질이 허용가능한 수준으로 감소되기 전 동결건조된 생성물이 저장될 수 있는 시간 양의 감소를 야기할 수 있다. 일 양태에서, 보관 온도 및 챔버 압력

은 1차 건조 동안 붕괴 온도 미만으로 생성물 온도를 유지하도록 선택된다. 냉동된 제형의 유리 전이 온도는, 예를 들어 시차 주사 열량측정법(DSC)에 의해 당업계에 공지된 방법에 의해 측정될 수 있다. 붕괴 온도는 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 냉동-건조 현미경 검사에 의해 측정될 수 있다. 비-환원 당 대 단백질의 비(몰:몰) 및 다른 제형 성분의 양은 유리 전이 온도 및 붕괴 온도에 영향을 줄 것이다. 일부 실시형태에서, α 4 β 7 항체 제형에 대한 유리 전이 온도는 약 -35°C 내지 약 -10°C, 약 -35°C 내지 약 -25°C, 또는 약 -35°C 내지 약 -29°C이다. 다른 실시형태에서, α 4 β 7 항체 제형의 유리 전이 온도는 약 -29°C이다. 일부 실시형태에서, α 4 β 7 항체 제형의 유리 전이 온도는 약 -30°C, 약 -31°C, 약 -32°C, 약 -33°C, 약 -34°C, 약 -35°C 또는 약 -36°C이다. 일부 실시형태에서, α 4 β 7 항체 제형의 붕괴 온도는 약 -30°C 내지 약 0°C, 약 -28°C 내지 약 -25°C 또는 약 -20°C 내지 약 -10°C이다. 다른 실시형태에서, α 4 β 7 항체 제형의 붕괴 온도는 약 -26°C이다. 임의의 특정 이론에 의해 구속되지 않고, 램프업(ramp-up) 속도가 빠를수록, 생성물의 붕괴 온도는 더 높다. 1차 건조 단계는 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70% 이상의 용매를 제거할 수 있다. 일 양태에서, 1차 건조 단계는 항- α 4 β 7 항체 제형으로부터 용매의 80% 이상을 제거한다.

[0142] 1차 건조는 보관 온도 및 압력에 의존한다. 1차 건조를 위한 조건은 상이한 공정 변수 하에 동결건조에 의해 경험적으로 결정될 수 있다. 1차 건조는 또한 생성물 온도에 기반하여 수학적으로 모델링될 수 있다. Rp 및 Kv의 정보와 결합된 질량 및 열 전달 식(Milton, et al. (1997) *PDA J of Pharm Sci & Tech*, 51: 7-16)은 공정 입력 변수, 예컨대 보관 온도 및 압력, 및 Rp 값으로 표현되는 제형 변수의 조합 및 상호작용을 이해시킨다. 이들 모델은 붕괴 온도 및 장비 능력에 의한 생성물 온도의 제한을 기반으로 효율적인 공정을 위해 사용되는 변수를 결정하는 것에 도움을 줄 수 있다.

$$\frac{dm}{dt} = \frac{A_p(P_o - P_c)}{R_p} \quad \ln P_0 = -6144.96/T_p + 24.0185$$

식 1
식 2

[0143]

$$\frac{dQ}{dt} = A_v K_v (T_s - T_p) \quad \text{식 3} \qquad \frac{dQ}{dt} = \Delta H_s \frac{dm}{dt} \quad \text{식 4}$$

[0144]

[0145] 식 1은 용기의 내부 단면적(A_p), 얼음의 증기압(P_o), 챔버 압력(P_c) 및 케이크 및 마개에 대해 면적 정규화된 물질 전달 저항(R_p)에 대한 1차 건조 동안의 승화 속도(dm/dt)에 관한 것이다. 승화 경계면에서 P_o 는 식 2로부터 결정될 수 있는데(P_o 는 승화 경계면에서 생성물 얼음의 온도에 관한 것임), 이는 생성물 온도(T_p)로부터의 근사 값이며, 바이알의 바닥에서 씨코퍼플에 의해 측정될 수 있거나 또는 다른 변수가 결정될 때 상기 식으로부터 유도될 수 있다. 식 3은 보관으로부터 바이알까지 열 전달 속도에 관한 것이며, 여기서 A_v 는 바이알의 면적이고, K_v 는 바이알의 열 전달 효율이며, T_s 는 보관 온도이고, T_p 는 생성물 온도이다. 식 4는 열 및 물질 이동 식과 결합되며, 여기서 ΔH_s 는 승화열이다.

[0146] 1차 건조에 대한 식으로부터 알 수 있는 바와 같이, 보관 온도(T_s), 생성물 온도(T_p), 챔버 압력(P_c), 케이크의 물질 전달 저항(R_p) 및 열 전달 효율(K_v)은 승화 속도에 영향을 미칠 수 있다.

[0147] 냉동 후 및 1차 건조 전 선택적 단계는 어닐링이다. 이 단계에서, 동결건조기의 보관 온도는 단기간의 시간, 예를 들어, 약 2 내지 6시간, 약 3 내지 5시간, 또는 약 4시간 동안 제형의 유리 전이 초과로 상승된 다음, 보관 온도는 제형의 유리 전이 온도 미만으로 다시 저하된다. 어닐링은 팽화제를 결정화하며, 더 크고 더 균일한 얼음 결정을 형성하기 위해 사용될 수 있다. 어닐링 공정은 재구성 시간에 영향을 미칠 수 있는데, 이는 어닐링되고, 건조된 케이크가 비어닐링되고, 건조된 케이크보다 더 큰 표면적을 가지기 때문이다. $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형의 어닐링 단계는 약 -30°C 내지 약 -10°C 또는 약 -25°C 내지 약 -15°C 일 수 있다. 일 양태에서, $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형에 대한 어닐링 온도는 약 -20°C 이다.

[0148] 2차 건조는 액체 제형의 냉동 온도 초과인 온도에서 일반적으로 수행된다. 예를 들어, 2차 건조는 약 10℃, 약 20℃, 약 30℃, 약 40℃ 또는 약 50℃에서 수행될 수 있다. 일 양태에서, 2차 건조를 위한 온도는 주위 온도, 예를 들어, 20 내지 30℃이다. 2차 건조를 위한 시간은 <5%로 수분의 양을 감소시키는데 충분하여야 한다.

[0149] 다른 양태에서, 동결건조 주기는 약 -45°C 에서 냉동, 약 -20°C 에서 어닐링, 약 -45°C 에서 재냉동, 약 -24°C 및

150 mTorr에서 1차 건조, 및 약 27℃ 및 150 mTorr에서 2차 건조를 포함한다.

[0150] R_p 는 냉동된 DP의 고체 함량에 의해 그리고 케이크의 기공 구조에 영향을 미치는 DP의 열 이력(냉동, 어닐링 및 재냉동 단계)에 의해 영향을 받는다. 열 이력은 또한 2차 건조 단계에 영향을 미칠 수 있는데, 표면적이 클수록 물의 탈착(desorption)에 도움을 줄 수 있다(Pikal, et al. (1990) Int. J. Pharm., 60: 203-217). 1차 및 2차 동결건조 단계 동안 제어를 위한 유용한 공정 변수는 각 단계의 건조 주기 동안 보관 온도 및 챔버 압력일 수 있다.

[0151] 정물증가를 위해, 냉동 건조기 로딩 및 고체 함량은 건조 주기에 영향을 미칠 수 있다. 1차 건조 시간은 제형 내 고체 함량에 의해 영향을 받을 수 있다. 고체 함량이 높을수록, 예를 들어 전체 고체(부형제 및/또는 단백질) 농도가 10 w/v% 초과 또는 15 w/v% 초과, 예를 들어, 건조 시간이 결정된 제형과 50 내지 100% 변화량 만큼 다른 경우, 건조 시간은 영향받을 수 있다. 예를 들어, 높은 고체 함량 제형은 낮은 고체 함량 제형보다 더 긴 건조 시간을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 냉동 건조기 수용력의 사용 백분율은 약 25 내지 약 100%의 범위일 수 있다. 수용력의 로딩%가 더 높을 때, 1차 건조 시간은 낮은 로딩% 용량과 비교하여 2-배까지 증가될 수 있다. 상이한 로딩%에서 1차 건조 시간 사이의 차이는 고체 함량이 증가함에 따라 증가된다. 일 실시형태에서, 고체 함량은 20 내지 25% 미만이고, 로딩은 25 내지 100%이다.

[0152] 바이알 크기는 칸 및 동결건조 동안 진공에 노출될 표면적을 기준으로 선택될 수 있다. 건조 시간은 케이크 높이에 직접 비례하며, 따라서 바이알 크기는 합리적인 케이크 높이가 되는 것으로 결정되는 것을 기준으로 선택될 수 있다. 용적에 대해 거대 직경을 지니는 바이알은 동결건조 주기 동안 효율적인 열 전달을 위해 칸과 다량의 접촉을 제공할 수 있다. 고용적의 액체 내 희석 항체 용액은 건조 동안 더 많은 시간을 필요로 할 것이다. 제형 용적에 대한 바이알 크기의 균형이 파괴될 필요가 있는데, 더 큰 바이알은 저장하고 출하하는데 더 비용이 들 수 있고, 더 큰 공간부분 대 제형 비를 가질 수 있으며, 장기간의 저장 동안 수분의 분해 효과에 대해 높은 비율의 제형을 노출시킬 수 있기 때문이다. 300mg 용량에 대해, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형은 동결건조 전 3ml, 5ml, 6ml, 10ml, 20ml, 50 ml 또는 100ml의 용적을 가질 수 있다. 일 양태에서, 바이알 크기는 300mg 용량으로 60mg/ml에 대해 20ml이다.

[0153] 동결건조 후, 바이알은 밀봉될 수 있고, 예를 들어 진공 하에 마개로 막을 수 있다. 대안적으로, 기체, 예를 들어 건조 공기 또는 질소는 밀봉 전 바이알에 허용될 수 있다. 산화에 관해서, 동결건조 챔버 내로 허용된 기체는 동결건조된 생성물의 산화를 지연시키거나 방지하는 기체를 포함할 수 있다. 일 양태에서, 기체는 비-산화 기체, 예를 들어 질소, 또는 비활성 기체, 예를 들어 헬륨, 네온, 아르곤, 크립톤 또는 제논이다. 다른 양태에서, 기체는 질소 또는 아르곤이다.

[0154] 일부 실시형태에서, 사전-동결건조 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형 용적은 사전-투여 재구성 용액 용적과 동일하다. 예를 들어, 약 5.5ml 사전-동결건조인 제형은 건조 고체의 용적을 고려하여 액체, 예를 들어 물 또는 식염수의 양을 첨가함으로써, 약 5.5ml의 용적으로 재구성될 수 있다. 다른 실시형태에서, 재구성된 용액 용적과 상이한 용적으로 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형을 동결건조시키는 것일 바람직할 수 있다. 예를 들어, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형은 묽은 용액, 예를 들어 0.25x, 0.5x 또는 0.75x 로서 동결건조될 수 있고, 사전-동결건조 용적보다 더 적은 액체, 예를 들어 75% 더 적거나, 절반이거나 또는 25% 더 적은 액체를 1x로 첨가함으로써 재구성될 수 있다. 실시형태에서, 300mg 용량은 5% 수크로스 중의 30 mg/ml 항체 용액으로서 동결건조될 수 있고, 10% 수크로스 중의 60 mg/ml 항체 용액으로 재구성될 수 있다. 대안적으로, 동결건조된 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형은 사전-동결건조된 제형보다 더 묽은 용액으로 재구성될 수 있다.

[0155] 항체 제형에 의한 처리

[0156] 일 양태에서, 본 발명은, 예를 들어 인간에서 질병 또는 장애를 치료하기에 효과적인 양으로 본 명세서에 기재된 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형을 피험체에 투여하는 단계를 포함하는, 피험체에서 질병 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 인간 피험체는 성인(예를 들어 18세 이상), 청소년 또는 어린이일 수 있다. 인간 피험체는 65세 이상의 사람일 수 있다. 대안적인 치료적 투약 요법과 대조적으로, 65세 이상의 인간 피험체는 본 명세서에 기재된 투약 요법의 임의의 변형을 필요로 하지 않으며, 본 명세서에 기재된 통상적인 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형이 투여될 수 있다.

[0157] 피험체는 면역조절제, TNF- α 길항물질 또는 이들의 조합에 의한 치료에 대한 적절한 반응의 결여가 있을 수 있거나, 또는 이들에 대해 불내성(intolerant)이다. 환자는 염증성 장질환에 대해 적어도 한 종의 코르티코스테로이드(예를 들어, 프레드니손)에 의한 이전에 수용된 치료를 가질 수 있다. 코르티코스테로이드에 대한 부적절한 반

응은 2주동안 매일 경구로 또는 1주 동안 정맥내로 프레드니손 30mg과 동등한 용량을 포함한 적어도 하나의 4-주 유발 요법의 이력에도 불구하고, 지속적으로 활성인 질병의 징후 및 증상을 지칭한다. 콜티코스테로이드에 대한 반응의 상실은 매일 경구로 프레드니손 10mg과 동등한 용량 미만으로 콜티코스테로이드를 점점 줄이는 2회의 실패한 시도를 지칭한다. 콜티코스테로이드의 불내성은 쿠싱 증후군, 골감소증/골다공증, 고혈당증, 불면증 및/또는 감염의 이력을 포함한다.

[0158] 면역조절제는, 예를 들어 경구 아자티오프린, 6-머캅토피린 또는 메토티렉세이트일 수 있다. 면역조절제에 대한 부적절한 반응은 적어도 하나의 8주 요법 또는 경구 아자티오프린(≥ 1.5 mg/kg), 6-머캅토피린(≥ 0.75 mg/kg), 또는 메토티렉세이트(≥ 12.5 mg/주)의 이력에도 불구하고 지속적으로 활성인 질병의 징후 및 증상을 지칭한다. 면역조절제의 불내성은, 이하에 제한되는 것은 아니지만, 구역/구토, 복부 통증, 체장염, LFT 이상, 림프구감소증, TPMT 유전적 돌연변이 및/또는 감염을 포함한다.

[0159] 일 양태에서, 피험체는 TNF- α 길항물질의 처리에 의한 적절한 반응이 결여되거나, 처리에 대한 반응이 손실되거나, 또는 처리에 대해 불내성일 수 있다. TNF- α 길항물질은, 예를 들어, TNF- α 의 생물학적 활성을 억제하며, 바람직하게는 TNF- α , 예컨대 단클론성 항체, 예를 들어, 레미케이드(REMICADE)(인플릭시맵), 휴미라(HUMIRA)(아달리무맵), 심지아(CIMZIA)(세툴리주맵 페골), 심포니(SIMPONI)(골리무맵) 또는 순환 수용체 융합 단백질, 예컨대 엔브렐(ENBREL)(에타너셉트)에 결합되는 작용제이다. TNF- α 길항물질에 대한 부적절한 반응은 적어도 한 번의 4주 유도 요법의 인플릭시맵 5 mg/kg IV, 적어도 2주 간격으로 2회 투약; 적어도 2주 간격으로 아달리무맵의 1회 80mg 피하 투약 후, 1회 40mg 용량; 또는 피하로 세툴리주맵 페골의 400mg, 적어도 2주 간격으로 2회 투약의 이력에도 불구하고 지속적으로 활성인 질병의 징후 및 증상을 지칭한다. TNF- α 길항물질에 대한 반응의 손실은 사전 임상적 이점 다음에 유지 투약 동안 증상의 재발을 지칭한다. TNF- α 길항물질의 불내성은, 이하에 제한되는 것은 아니지만, 주입 관련 반응, 탈수초, 울혈성심부전 및/또는 감염을 포함한다.

[0160] 궤양성 대장염 피험체에 대해 본 명세서에 사용된 바와 같은 관해의 유지 손실은 적어도 3점의 마요 스코어 및 적어도 2의 변형 바론 스코어(Modified Baron Score)의 증가를 지칭한다.

[0161] 다른 양태에서, 본 발명은 (1) 시험관내 및/또는 생체내 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린에 결합할 수 있고; (2) $\alpha 4\beta 7$ 인테그린의 활성 또는 기능, 예컨대 (a) 결합 기능(예를 들어, MAdCAM(예를 들어, MAdCAM-1), 피브로넥틴 및/또는 VCAM-1에 결합되는 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린의 능력) 및/또는 (b) 조직에서 백혈구의 채택 및/또는 축적을 포함하는 백혈구 침윤 기능(예를 들어, 장 점막 조직에 대한 림프구 이동을 억제하는 능력)을 조절할 수 있는 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형을 제공한다. 일 실시형태에서, 제형에서 항체는 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린에 결합될 수 있고, 그것의 리간드(예를 들어, MAdCAM (예를 들어, MAdCAM-1), VCAM-1, 피브로넥틴) 중 하나 이상에 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린의 결합을 억제할 수 있고, 이에 의해 조직의 백혈구 침윤(조직에서 백혈구의 채택 및/또는 축적을 포함)을 억제한다. 다른 실시형태에서, 제형에서 항체는 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린에 결합될 수 있고, 그의 리간드(예를 들어, MAdCAM(예를 들어, MAdCAM-1), VCAM-1, 피브로넥틴) 중 하나 이상에 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린의 결합을 선택적으로 억제할 수 있으며, 이에 의해, 조직의 백혈구 침윤(조직에서 백혈구의 채택 및/또는 축적을 포함)을 억제한다. 이러한 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형은 시험관내 및/또는 생체내에서 장-결합 조직, 림프 조직 기관 또는 백혈구(특히 T 또는 B 세포와 같은 림프구)를 포함하는 점막 조직에서 혈관 내피 세포에 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린을 함유하는 세포의 세포 부착을 억제할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형은 $\alpha 4\beta 7$ 과 MAdCAM(예를 들어, MAdCAM-1) 및/또는 피브로넥틴의 상호작용을 억제할 수 있다. 또한 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형은, 예를 들어 $\alpha 4\beta 7$ 과 VCAM의 상호작용을 억제하지 않고 $\alpha 4\beta 7$ 의 MAdCAM(예를 들어, MAdCAM-1)과 상호작용을 억제할 수 있다.

[0162] 본 발명의 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형은 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린의 결합 기능 및/또는 백혈구(예를 들어, 림프구, 단핵구) 침윤 기능을 조절하기 위해(예를 들어 억제(감소 또는 방지)하기 위함) 사용될 수 있다. 예를 들어, 리간드(즉, 하나 이상의 리간드)에 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린의 결합을 억제하는 인간화된 면역글로불린은 조직의, 특히 분자 MAdCAM(예를 들어, MAdCAM-1)을 발현시키는 조직의 백혈구(예를 들어, 림프구, 단핵구) 침윤(조직에서 백혈구의 채택 및/또는 축적을 포함)과 관련된 질병의 치료 방법에 따라서 투여될 수 있다.

[0163] 본 발명의 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형(즉, 하나 이상)의 유효량은 이러한 질병을 치료하기 위해서 개체(예를 들어, 포유류, 예컨대 인간 또는 다른 영장류)에게 투여된다. 예를 들어, 위장관(장-관련 내피를 포함), 다른 점막 조직 또는 분자 MAdCAM(예를 들어, MAdCAM-1)을 발현시키는 조직(예를 들어, 장-관련 조직, 예컨대 소장 및 대장의 점막고유층(lamina propria)의 세정막; 및 유선(예를 들어, 수유성 유선))의 백혈구 침윤과 관련된 질병을 포함하는, 염증 질병이 본 방법에 따라 치료될 수 있다. 유사하게, MAdCAM(예를 들어, MAdCAM-1)을 발현시키는 세포

에 백혈구 결합의 결과로서 조직의 백혈구 침윤과 관련된 질병을 갖는 개체는 본 발명에 따라 치료될 수 있다.

- [0164] 일 실시형태에서, 따라서 치료될 수 있는 질병은 염증성 장질환(IBD), 예컨대 궤양성 대장염, 크론병, 회장염, 셀리악병, 비열대성 스프루, 혈청음성 척추관절염과 관련된 장병증, 미세형 또는 교원성 대장염, 호산구성 위장염, 또는 직장결장절제술 후 생긴 맹장염, 및 회장 문합을 포함한다. 바람직하게는, 염증성 장질환은 크론병 또는 궤양성 대장염이다. 궤양성 대장염은 보통 내지 중증의 활성 궤양성 대장염일 수 있다. 치료는 보통 내지 중증의 활성 궤양성 대장염에 걸린 환자에서 점막 치유를 야기할 수 있다. 치료는 또한 환자에 의한 코르티코스테로이드 사용의 감소, 제거 또는 감소와 제거를 야기할 수 있다.
- [0165] 췌장염 및 인슐린 의존성 당뇨병은 본 발명의 제형을 사용하여 치료될 수 있는 다른 질병이다. MAdCAM(예를 들어, MAdCAM-1)은 NOD(비비만성 당뇨병) 마우스뿐만 아니라 BALB/c 및 SJL 마우스로부터의 외분비 췌장에서 일부 혈관에 의해 발현된다는 것이 보고되었다. MAdCAM-1의 발현은 보고에 의하면 NOD 마우스의 췌장의 염증이 생김새 내 내피 상에서 유발되며, MAdCAM-1은 초기 단계의 소도염에서 NOD 섬 내피에 의해 발현되는 우세한 어드레신이었다(Hanninen, A., *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 92: 2509-2515 (1993)). 항-MAdCAM(예를 들어, 항-MAdCAM-1) 또는 항- $\alpha 4 \beta 7$ 항체 중 하나에 의한 NOD 마우스의 처리는 당뇨병의 발생을 방지하였다(Yang *et al.*, *Diabetes*, 46:1542-1547 (1997)). 추가로, 섬 내에서 $\alpha 4 \beta 7$ 를 발현시키는 림프구의 축적이 관찰되었고, MAdCAM-1은 염증이 생긴 섬으로부터 혈관에 대해(Hanninen, A., *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 92: 2509-2515 (1993)) 또는 외투세포 림프종에서 위장관에 대해 $\alpha 4 \beta 7$ 를 통해 림프종 세포의 결합에 연루되었다(Geissmann *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 153:1701-1705 (1998)).
- [0166] 본 발명의 제형을 사용하여 치료될 수 있는 점막 조직과 관련된 염증성 질병의 예는, 예를 들어, 장 또는 담도 주위(담관 또는 간의 주변 조직)의 담낭염, 담관염(Adams and Eksteen *Nature Reviews* 6:244-251 (2006) Grant *et al.*, *Hepatology* 33:1065-1072 (2001)), 예를 들어, 원발경화성 담관염, 베체트병, 및 이식편대 숙주반응(예를 들어, 위장관에서(예를 들어, 골수 이식 후)(Petrovic *et al.* *Blood* 103:1542-1547 (2004))을 포함한다. 크론병에서 알 수 있는 바와 같이, 염증은 종종 점막면 위로 연장되고, 따라서 만성 염증 질병, 예컨대 유육종증, 만성 위염, 예를 들어, 자가면역 위염(Kataikai *et al.*, *Int. Immunol.*, 14:167-175 (2002)) 및 다른 특발성 질환은 치료될 수 있다.
- [0167] 본 발명은 또한 점막 조직의 백혈구 침윤을 억제하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 암(예를 들어, $\alpha 4 \beta 7$ 양성 종양, 예컨대 림프종)을 치료하기 위한 방법에 관한 것이다. 본 발명의 제형을 사용하여 치료될 수 있는 점막 조직과 관련된 염증 질병의 다른 예는 유방염(유선) 및 과민성 대장 증후군을 포함한다.
- [0168] 병인이 $\alpha 4 \beta 7$ 과 MAdCAM(예를 들어, MAdCAM-1)의 상호작용을 이용하는 질병 또는 병원균은 본 명세서에 기재된 제형에서 항- $\alpha 4 \beta 7$ 항체로 처리될 수 있다. 이러한 질병의 예는 인간 면역결핍 바이러스에 의해 야기되는 것과 같은 면역결핍 장애를 포함한다(예를 들어, WO2008140602호 참조).
- [0169] 본 발명의 제형은 $\alpha 4 \beta 7$ 인테그린을 그의 리간드에 대한 결합을 억제하는데 유효한 양으로 투여된다. 치료를 위해, 유효량은 원하는 치료적(예방적)을 포함) 효과(예컨대 $\alpha 4 \beta 7$ 인테그린-매개 결합 및/또는 신호처리를 감소시키거나 또는 방지하기에 충분한 양, 이에 의해 백혈구 접착 및 침윤 및/또는 관련된 세포 반응을 억제함)를 달성하기에 충분할 것이다. 항- $\alpha 4 \beta 7$ 항체의 유효량, 예를 들어, $\alpha 4 \beta 7$ 인테그린의 포화, 예를 들어 중화를 유지하기에 충분한 효과적인 역가는 염증성 장질환에서 임상적 반응 또는 관해를 포함할 수 있다. 본 발명의 제형은 1회 용량 또는 다회 용량으로 투여될 수 있다. 투약량은 당업계에서 공지된 방법에 의해 결정될 수 있고, 예를 들어 개체의 연령, 민감성, 관용 및 전반적인 웰빙에 의존할 것이다. 투여 방식의 예는 국소 경로, 예컨대 비강 또는 흡입 또는 경피 투여, 장 경로, 예컨대 공급관 또는 좌약을 통해, 및 비경구 경로, 예컨대 정맥내, 근육내, 피하, 동맥내, 복강내 또는 유리체내 투여를 포함한다. 항체에 대한 적합한 투약량은 치료 당 약 0.1 mg/kg 체중 내지 약 10.0 mg/kg 체중, 예를 들어 약 2 mg/kg 내지 약 7 mg/kg, 약 3 mg/kg 내지 약 6 mg/kg, 또는 약 3.5 내지 약 5 mg/kg일 수 있다. 특정 실시형태에서, 투여되는 용량은 약 0.3 mg/kg, 약 0.5 mg/kg, 약 1 mg/kg, 약 2 mg/kg, 약 3 mg/kg, 약 4 mg/kg, 약 5 mg/kg, 약 6 mg/kg, 약 7 mg/kg, 약 8 mg/kg, 약 9 mg/kg, 또는 약 10 mg/kg이다.
- [0170] 항- $\alpha 4 \beta 7$ 항체의 재구성된 항체(예를 들어, 식염수 또는 5% 텍스트로스 주입 시스템에서)의 희석 후 최종 투약 형태는 투여에 대해 약 0.5 mg/ml 내지 약 5 mg/ml일 수 있다. 최종 투약 형태는 약 1.0 mg/ml 내지 약 1.4 mg/ml, 약 1.0 mg/ml 내지 약 1.3 mg/ml, 약 1.0 mg/ml 내지 약 1.2 mg/ml, 약 1.0 내지 약 1.1 mg/ml, 약 1.1 mg/ml 내지 약 1.4 mg/ml, 약 1.1 mg/ml 내지 약 1.3 mg/ml, 약 1.1 mg/ml 내지 약 1.2 mg/ml, 약 1.2 mg/ml 내지 약 1.4 mg/ml, 약 1.2 mg/ml 내지 약 1.3 mg/ml, 또는 약 1.3 mg/ml 내지 약 1.4 mg/ml의 농도일 수 있다.

최종 투약 형태는 약 0.6 mg/ml, 0.8 mg/ml, 1.0 mg/ml, 1.1 mg/ml, 약 1.2 mg/ml, 약 1.3 mg/ml, 약 1.4 mg/ml, 약 1.5 mg/ml, 약 1.6 mg/ml, 약 1.8 mg/ml 또는 약 2.0 mg/ml의 농도일 수 있다. 일 실시형태에서, 전체 용량은 180mg이다. 다른 실시형태에서, 전체 용량은 300mg이다. 300mg 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 용량은 투여를 위해 250 ml 식염수 또는 5% 텍스트로스 용액으로 희석될 수 있다.

[0171] 일부 양태에서, 투약 요법은 2 단계, 즉, 유도 단계 및 유지 단계를 가진다. 유도 단계에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 면역 관용을 유발하는 것 또는 임상적 반응을 유도하고, 염증성 장질환 증상을 개선시키기 위한 것과 같은 특정 목적에 적합한 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 유효량을 빠르게 제공하는 방법으로 투여된다. 환자는 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체에 의해 우선 치료될 때, 치료로부터 긴 부재 후, 예를 들어, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 치료로부터 3개월 초과, 4개월 초과, 6개월 초과, 9개월 초과, 1년 초과, 8개월 초과 또는 2년 초과 후 치료될 때 유도 단계 치료로 또는 염증성 장질환 증상의 복귀가 있다면 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 치료의 유지 단계, 예를 들어 질병의 관해의 재발 동안 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 유도 단계 요법은 유지 요법 동안 유지된 평균 정상 상태 트로프 혈청 농도(mean steady state trough serum concentration)보다 더 높은 평균 트로프 혈청 농도, 예를 들어 다음 투약 바로 전 농도를 야기한다.

[0172] 유지 단계에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 안정한 수준에 의한 유도 치료에 의해 달성된 반응을 지속하는 방법으로 투여된다. 유지 요법은 염증성 장질환의 증상의 복귀 또는 재발을 예방할 수 있다. 유지 요법은 환자에게 편리함을 제공할 수 있으며, 예를 들어 단순한 투약 요법이거나 또는 치료를 위한 덜 빈번한 이동을 필요로 한다. 일부 실시형태에서, 유지 요법은, 예를 들어 본 명세서에 기재된 제형에서 저용량, 덜 빈번한 투여, 자기-투여 및 앞서 언급한 것 중 어떤 것의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 전략에 의해 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 투여를 포함할 수 있다.

[0173] 일 실시형태에서, 예를 들어, 치료의 유도 단계 동안, 투약 요법은 인간 환자에서 염증성 장질환의 관해를 유도하기 위해 본 명세서에 기재된 제형에서 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 또는 항원-결합 단편의 유효량을 제공한다. 일부 실시형태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 유효량은 유도 단계의 마지막까지 약 5 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 60 $\mu\text{g/ml}$, 약 15 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 45 $\mu\text{g/ml}$, 약 20 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 30 $\mu\text{g/ml}$, 또는 약 25 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 35 $\mu\text{g/ml}$ 평균 트로프 혈청 농도의 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 달성하기에 충분하다. 유도 단계의 지속기간은 약 4주, 약 5주, 약 6주, 약 7주, 또는 약 8주의 치료일 수 있다. 일부 실시형태에서, 유도 요법은, 예를 들어 본 명세서에 기재된 제형에서 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 고용량, 빈번한 투여 및 고용량과 빈번한 투여의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 전략을 이용할 수 있다. 유도 투약은, 1회 또는 1회 이상의 다회 투약, 예를 들어 2회 투약일 수 있다. 유도 단계 동안, 투약은 1일 당, 2일마다 1회, 1주당 2회, 1주당 1회, 10일마다 1회, 2주마다 1회 또는 3주마다 1회 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 유도 투약은 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체에 의한 치료의 처음 2주 내에 투여된다. 일 실시형태에서, 유도 투약은 치료의 개시 시(제0일) 1회 및 치료의 개시 후 약 2주에 1회일 수 있다. 다른 실시형태에서, 유도 단계 지속기간은 6주이다. 다른 실시형태에서, 유도 단계 지속기간은 6주이고, 다회의 유도 투약이 처음 2주 동안 투여된다.

[0174] 일부 실시형태에서, 예를 들어, 중증의 염증성 장질환을 지니는 환자의 치료를 개시할 때(예를 들어, 항-TNF α 치료가 실패한 환자에서), 유도 단계는 경증 또는 보통의 질병을 지니는 환자에 대해 더 긴 지속기간을 가질 필요가 있다. 일부 실시형태에서, 중증의 질병을 지니는 환자에 대한 유도 단계는 적어도 6주, 적어도 8주, 적어도 10주, 적어도 12주 또는 적어도 14주의 지속기간을 가질 수 있다. 일 실시형태에서, 중증의 질병을 지니는 환자에 대한 유도 투약 요법은 제0주의 투약(치료의 개시), 제2주의 투약 및 제6주의 투약을 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 중증의 질병을 지니는 환자에 대한 유도 투약 요법은 제0주의 용량(치료의 개시), 제2주의 투약, 제6주의 투약 및 제10주의 투약을 포함할 수 있다.

[0175] 일 실시형태에서, 예를 들어, 치료의 유지 단계 동안, 투약 요법은 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 약 5 내지 약 25 $\mu\text{g/ml}$, 약 7 내지 약 20 $\mu\text{g/ml}$, 약 5 내지 약 10 $\mu\text{g/ml}$, 약 10 내지 약 20 $\mu\text{g/ml}$, 약 15 내지 약 25 $\mu\text{g/ml}$ 또는 약 9 내지 약 13 $\mu\text{g/ml}$ 의 평균 정상 상태 트로프 혈청 농도, 예를 들어, 다음 투약 바로 전의 안정기 농도를 유지한다. 다른 실시형태에서, 예를 들어 치료의 유지 단계 동안 투약 요법은 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 약 20 내지 약 30 $\mu\text{g/ml}$, 약 20 내지 약 55 $\mu\text{g/ml}$, 약 30 내지 약 45 $\mu\text{g/ml}$, 약 45 내지 약 55 $\mu\text{g/ml}$ 또는 약 35 내지 약 40 $\mu\text{g/ml}$ 의 평균 정상 상태 트로프 혈청 농도를 유지한다.

[0176] 용량은 1주당 1회, 2주마다 1회, 3주마다 1회, 4주마다 1회, 6주마다 1회, 8주마다 1회 또는 10주마다 1회 투여될 수 있다. 더 높거나 또는 더 빈번한 용량, 예를 들어, 1주마다 1회, 2주마다 1회, 3주마다 1회 또는 4주마다 1회는 활성 질병의 관해를 유도하기 위해 또는 새로운 환자를 치료하기 위해, 예를 들어 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체에 대한

관용을 유도하기 위해 유용할 수 있다. 4주마다 1회, 5주마다 1회, 6주마다 1회, 8주마다 1회 또는 10주마다 1회의 덜 빈번한 투약이 예방적 치료를 위해, 예를 들어 만성 질병을 지니는 환자의 관해를 유지하기 위해 유용할 수 있다. 일 양태에서, 치료 요법은 제0일, 약 2주, 약 6주 및 그 후에 4주마다 또는 8주마다의 치료이다. 일 실시형태에서, 유지 요법은 8주마다의 투약을 포함한다. 실시형태에서, 8주마다 1회 투약 유지 요법에 대한 환자는 한 가지 이상의 질병 증상의 복귀를 경험하며, 예를 들어 재발이 있고, 투약 빈도는, 예를 들어 4주마다 1회로 증가될 수 있다.

[0177] 투약은 약 20분, 약 25분, 약 30분, 약 35분 또는 약 40분에 환자에게 투여될 수 있다.

[0178] 투약 요법은 환자의 염증성 장질환의 임상적 반응 및 임상적 관해를 유도하기 위해 최적화될 수 있다. 일부 실시형태에서, 투약 요법은 환자 수용 치료의 뇌척수액에서 CD4 대 CD8의 비를 변경시키지 않는다.

[0179] 일부 양태에서, 지속적 임상적 관해, 예를 들어, 치료 시작 후 6개월 또는 1년 기간 내에 담당의에 의한 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4회 방법을 통해 계속된 임상적 관해는 최적화된 투약 요법에 의해 달성될 수 있다.

[0180] 일부 양태에서, 지속적 임상적 반응, 예를 들어, 치료의 시작 후 적어도 6개월, 적어도 9개월, 적어도 1년 동안 계속된 임상적 관해는 최적화된 투약 요법에 의해 달성될 수 있다.

[0181] 일 실시형태에서, 투약 요법은 300mg의 초기 투약, 초기 투약의 약 2주 후에 300mg의 제2의 후속 투약, 초기 투약의 약 6주 후에 300mg의 제3의 후속 투약, 그 다음에 제3 후속 투약 후 4주마다 또는 8주마다 300mg의 제4 및 후속 투약을 포함한다.

[0182] 일부 실시형태에서, 치료 방법, 용량 또는 투약 요법은 환자가 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체에 대해 HAHA 반응을 나타낼 가능성을 감소시킨다. 예를 들어 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체에 대해 항체에 의해 측정되는 바와 같은 HAHA의 발생은 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 클리어런스를 감소시킬 수 있고, 예를 들어, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 혈청 농도를 감소시키며, 예를 들어, $\alpha 4\beta 7$ 인테그린에 결합된 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 수를 낮추고, 따라서 치료를 덜 효과적으로 만든다. 일부 실시형태에서, HAHA를 방지하기 위해, 환자는 유도 요법 후 유지 요법으로 치료될 수 있다. 일부 실시형태에서, 유도 요법과 유지 요법 사이에 휴지기는 없다. 일부 실시형태에서, 유도 요법은 환자에게 다수 용량의 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 투여하는 단계를 포함한다. HAHA를 방지하기 위해, 환자는 높은 초기 투약, 예를 들어, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체에 의한 치료를 시작할 때 표준 용량의 적어도 1.5 mg/kg, 적어도 2 mg/kg, 적어도 2.5 mg/kg, 적어도 3 mg/kg, 적어도 5 mg/kg, 적어도 8 mg/kg, 적어도 10 mg/kg 또는 약 2 내지 약 6 mg/kg, 또는 빈번한 초기 투여, 예를 들어, 1주 당 약 1회, 2주마다 약 1회 또는 3주마다 약 1회로 처리될 수 있다. 일부 실시형태에서, 치료방법은 HAHA-음성으로서 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 환자를 유지한다. 다른 실시형태에서, 치료 방법은 치료의 지속기간 동안 적어도 6주, 적어도 10주 적어도 15 주, 적어도 6개월, 적어도 1년, 적어도 2년 동안 또는 치료의 지속기간 동안 HAHA-음성으로서 환자를 유지한다. 일부 실시형태에서, HAHA가 발생한 환자 또는 환자의 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50% 또는 적어도 60%는 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 낮은 역가, 예를 들어, ≤ 125 를 유지한다. 실시형태에서, 치료 방법은 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체에 의한 치료의 시작 후 적어도 12주 동안 HAHA-음성으로서 환자의 적어도 70%를 유지한다.

[0183] 제형은 단독으로 또는 다른 작용제와 함께 개체(예를 들어, 인간)에게 투여될 수 있다. 본 발명의 제형은 추가적인 작용제의 투여 전, 투여와 함께 또는 투여에 후속하여 투여될 수 있다. 일 실시형태에서, $\alpha 4\beta 7$ 인테그린의 그것에 리간드에 대한 결합을 억제하는 하나 이상의 제형이 투여된다. 이러한 실시형태에서, 작용제, 예를 들어 단클론성 항체, 예컨대 항-MAdCAM(예를 들어, 항-MAdCAM-1) 또는 항-VCAM-1 단클론성 항체가 투여될 수 있다. 다른 실시형태에서, 추가적인 작용제는 $\alpha 4\beta 7$ 경로와 상이한 경로로 내피 리간드에 백혈구의 결합을 억제한다. 이러한 작용제는 이러한 작용제는 흥선 발현된 케모카인(TECK 또는 CCL25)에 대한 케모카인(C-C 모티프) 수용체 9(CCR9)-발현 림프구의 결합을 억제할 수 있거나 또는 세포내 접착 분자(intercellular adhesion molecule: ICAM)에 대한 LFA-1의 결합을 방지하는 작용제이다. 예를 들어, 항-TECK 또는 항-CCR9 항체 또는 소분자 CCR9 억제제, 예컨대 국제특허출원 WO03/099773 또는 WO04/046092에 개시된 억제제, 또는 항-ICAM-1 항체 또는 ICAM의 발현을 방지하는 올리고뉴클레오타이드가 본 발명의 제형에 추가로 투여된다. 또 다른 실시형태에서, 추가적인 활성 성분(예를 들어, 항-염증 화합물, 예컨대 설과살라진, 아자티오프린, 6-머캅토피린, 5-아미노살리실산 함유 항-염증요소, 다른 비-스테로이드성 항-염증 화합물, 스테로이드성 항-염증 화합물 또는 IBD의 제어를 위해 보통 투여되는 항생제(예를 들어, 시프로플록사신, 메트로니다졸), 또는 다른 생물학적 작용제(예를 들어, TNF 알파 길항물질)이 본 발명의 제형과 함께 투여될 수 있다.

[0184] 실시형태에서, 공동-투여된 의약의 용량은 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체를 포함하는 제형에 의한 치료 기간 동안 시간에 걸쳐

감소될 수 있다. 예를 들어, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형으로 처리 시작 시 또는 처리 전 스테로이드(예를 들어, 프레드니손, 프레드니솔론)로 처리한 환자는 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형에 의한 처리 6주만큼 빨리 스테로이드 시작의 감소된 용량의 요법을 겪는다. 스테로이드 용량은 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형으로 처리 동안 테이퍼링(tapering) 개시의 4 내지 8주 내에 약 25%만큼, 테이퍼링의 약 8 내지 12주에 50% 및 약 12 내지 16주에 75%만큼 감소될 것이다. 일 양태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형에 의한 치료의 약 16 내지 24주까지, 스테로이드 용량은 제거될 수 있다. 다른 예에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형에 의한 처리의 시작시, 또는 처리 전 6-머캅토피린과 같은 항-염증 화합물로 처리된 환자는 상기 주목한 스테로이드 투약에 대한 테이퍼링 요법과 유사한 항-염증 화합물의 감소된 용량의 요법을 겪는다.

[0185] 일 실시형태에서, 해당 방법은 환자에게 본 발명의 제형의 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 제형이 고체, 예를 들어 건조 상태라면, 투여 과정은 제형을 액체 상태로 전환시키는 단계를 포함할 수 있다. 일 양태에서, 건조 제형은, 예를 들어 주사에서 사용을 위해, 예를 들어 정맥내, 근육내 또는 피하 주사를 위해 상기 기재한 바와 같은 액체에 의해 재구성될 수 있다. 다른 양태에서, 고체 또는 건조 제형은 국소로, 예를 들어 패치, 크림, 에어로졸 또는 좌약으로 투여될 수 있다.

[0186] 본 발명은 또한 분자 MAdCAM(예를 들어, MAdCAM-1)을 발현시키는 조직의 백혈구 침윤과 관련된 질병을 치료하기 위한 방법에 관한 것이다. 해당 방법은 본 발명의 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형의 유효량을 치료가 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 실시형태에서, 질병은 이식편대 숙주반응이다. 일부 실시형태에서, 질병은 분자 MAdCAM(예를 들어, MAdCAM-1)을 발현시키는 장-관련 내피에 대해 백혈구 발현 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린의 결합의 결과로서 조직의 백혈구 침윤과 관련된 질병이다. 다른 실시형태에서, 질병은 위염(예를 들어, 호산구성 위염 또는 자가면역 위염), 췌장염 또는 인슐린 의존성 당뇨병이다. 또 다른 실시형태에서, 질병은 담낭염, 담관염 또는 담도주위염이다.

[0187] 본 발명은 또한 환자에서 염증성 장질환을 치료하기 위한 방법에 관한 것이다. 일 실시형태에서, 해당 방법은 본 발명의 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형의 유효량을 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 염증성 장질환은 궤양성 대장염 또는 크론병이다. 다른 실시형태에서, 염증성 장질환은 셀리악병, 혈청음성 척추관절염과 관련된 장병증, 미세형 또는 교원성 대장염, 위장염(예를 들어, 호산구성 위장염), 또는 맹장염이다.

[0188] 일부 실시형태에서, 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체에 의한 치료는 CD4:CD8의 비를 변경시키지 않는다. CD4:CD8 비는 혈액, 림프절 흡인물 및 뇌척수액(cerebro-spinal fluid: CSF)에서 측정될 수 있다. 건강한 개체에서 CSF CD4+:CD8+ 림프구 비는 전형적으로 약 1 이상이다. (Svenningsson et al., *J. Neuroimmunol.* 1995;63:39-46; Svenningsson et al., *Ann Neurol.* 1993; 34:155-161). 면역조절제는 CD4:CD8 비를 1 미만으로 변경시킬 수 있다.

[0189] 제조 물품

[0190] 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 약제학적 제형을 함유하고 그의 사용을 위한 설명서를 제공하는 제조물품이다. 제조물품은 용기를 포함한다. 적합한 용기는, 예를 들어, 보틀, 바이알(예를 들어, 이중 챔버 바이알, 바늘이 있거나 또는 없는 액체 제형의 바이알, 바늘이 있거나 또는 없는 재구성 액체의 바이알이 있거나 또는 없는 고체 제형의 바이알), 주사기(예컨대, 이중 챔버 주사기, 사전장전된 주사기) 및 시험관을 포함한다. 용기는 다양한 재료, 예컨대 유리, 금속 또는 플라스틱으로부터 형성될 수 있다. 용기는 제형을 보유하며, 용기 상에 또는 용기와 결합된 라벨은 사용을 위한 지침을 표시할 수 있다. 다른 실시형태에서, 제형은 자기-투여를 위해 제조될 수 있고/있거나 자기-투여를 위한 설명서를 함유할 수 있다. 일 양태에서, 제형을 보유하는 용기는 1회 용 바이알일 수 있다. 다른 양태에서, 제형을 보유하는 용기는, 예를 들어 재구성된 제형의 1부분 이상을 사용하여 제형의 반복 투여(예를 들어, 2 내지 6회 투여)를 허용하는 다회 용량 바이알일 수 있다. 제조물품은 앞의 부문에서 주목한 바와 같이 사용을 위한 설명서와 함께 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘, 주사기 및 포장 삽입물을 포함하는 상업적 및 사용자 견지에서 바람직한 다른 재료를 추가로 포함할 수 있다.

[0191] 임상 및 품질 분석

[0192] 다른 양태에서, 본 발명은 약제학적 제형인 생물물 품질 표준을 충족시키는 것을 결정하기 위한 방법이다. 해당 방법은 제형을 외관의 평가, 재구성 시간의 결정, 동결건조된 제형의 수분 함량의 결정, 동결건조된 제형 내 응집물의 측정, 단편의 측정, 산화/탈아미드화 측정 및 선택적으로 생물학적 활성 및 효능의 평가를 위해 조사하는 단계를 포함하는, 동결건조된 약제학적 제형(예를 들어, 인간화된 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체)의 평가를 포함할 수 있다, 사전-결정된 표준의 달성은 생성물이 임상적 용도를 나타낸다는 것을 증명한다.

[0193] 허용가능한 품질 수준은 $\leq 5.0\%$ 수분, ≤ 40 분 재구성 시간, pH 6.3 ± 0.3 의 재구성된 액체, 54.0 내지 66.0 mg/

mL 항체 농도, CEX에 의해 $\geq 55.0\%$ 의 주요 아이소폼, SEC에 의해 $\geq 96.0\%$ 의 단량체, $\leq 2.5\%$ 고분자량(응집물), SDS-파지에 의해 $\geq 90\%$ H+L 쇄, 60 내지 140%의 기준 표준 접착을 포함한다.

[0194] 본 발명은 다음의 실시예에 대해 더 완전하게 이해될 것이다. 그러나 그것들은 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 모든 문헌 및 특허 인용문은 본 명세서에 참조로서 포함된다.

[0195] 제형을 제조하기 위한 개발 프로토콜

[0196] A. 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 용액

[0197] 냉동시킨, 고농도 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제제(베돌리주맙, 50mM 히스티딘, 125mM 알기닌, 0.06% 폴리솔베이트 80, pH 6.3)의 보틀을 실온에서 16 내지 24시간 동안 해동시킨다. 해동시킨 보틀을 스테인레스 스틸 조제 용기 내로 풀링시키고(poolled), 혼합한다. 그 다음에 제제를 80 mg/mL의 베돌리주맙에 대해 희석 완충제 A(50mM 히스티딘, 125mM 알기닌, 0.06% 폴리솔베이트 80, pH 6.3)로 희석시키고, 혼합한다. 그 다음에 수크로스를 함유하는 희석 완충제 B(50mM 히스티딘, 125mM 알기닌, 40% 수크로스, 0.06% 폴리솔베이트 80, pH 6.3)로 제제를 희석시킴으로써 수크로스를 첨가한다. 이 단계는 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제제를 60 mg/mL 베돌리주맙, 50mM 히스티딘, 125mM 알기닌, 10% 수크로스, 0.06% 폴리솔베이트 80, pH 6.3의 액체 제형으로 희석시킨다.

[0198] B. 동결건조

[0199] pH 6.3에서 50mM 히스티딘, 125mM 알기닌, 0.06% 폴리솔베이트 80, 10% 수크로스 중의 60 mg/mL에서 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 액체 제형을 바이알 당 5.52mL로 20mL 유리 바이알 내에 채우고, 마개를 동결건조 위치로 둔다. 바이알을 동결건조기 내 약 20°C로 설정한 칸에 장전한다. 모든 바이알을 장전하고 문을 닫은 후, 보관 온도를 낮추어서 용액을 약 -45°C로 낮춘다. 이 온도에서 3시간 후, 칸의 온도를 어닐링을 위해 -20°C로 상승시킨다. 4시간 동안 어닐링 후, 칸의 온도를 낮추어서 용액을 약 -45°C로 재냉동시킨다. 이 온도로 바이알의 평형화 후, 공기를 챔버로부터 제거한다. 압력이 150 mTorr일 때, 보관 온도는 1차 건조 온도인 약 -24°C로 증가된다. 모든 결정질 얼음이 바이알로부터 승화될 때까지 1차 건조를 진행한다. 그 다음에 수분이 대략 2.5% 미만의 동결건조된 제형일 때, 보관 온도를 2차 건조를 위해 16시간 동안 27°C로 상승시킨다. 2차 건조가 완료될 때, 주위 압력에 도달될 때까지 질소 기체를 챔버 내로 다시 채운다. 바이알을 마개로 막고 동결건조기로부터 제거한다.

[0200] C. 동결건조된 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 저장 및 사용

[0201] 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체의 동결건조된 바이알은 원하는 시간 기간 동안 -70°C, -20°C, 2 내지 8°C 또는 25°C에서 저장된다. 사용을 위한 준비가 될 때, 바이알을 실온에 대해 평형상태로 한다. 그 다음에 바이알의 내용물을 21G 니들을 사용하여 주사용수(water for injection: "WFI")를 함유하는 주사기로 재구성한다. 재구성된 항체 용액의 최종 용적이 사전-동결건조된 용액의 용적과 동일하도록 WFI의 양을 결정한다. 5.52mL 사전-동결건조 용적에 대해, 4.8mL의 WFI를 첨가한다. 바이알을 부드럽게 교반시킨 다음, 10 내지 30분 동안 유지하여 제형을 재구성되도록 한 다음, 주사기를 사용하여 항체 용액을 제거하고, 첨가하며, 환자에게 IV 주입을 위한 IV 백에 첨가한다.

[0202] **실시예**

[0203] 실시예 1

[0204] 동결건조된 제형에서 당 및 아미노산%의 변화에 대한 비교 데이터

[0205] 당(수크로스 및 만니톨) 대 단백질의 몰 비, 알기닌 대 단백질의 몰 비 및 히스티딘 완충제의 몰의 변화 효과를 보기 위해 실험 접근의 설계를 수행하였다. 히스티딘 및 알기닌은 이들을 잠재적인 동해방지제 또는 동결건조보호제로 만드는 동결건조 공정 동안 결정화되지 않는 것으로 공지되어 있다. 1.5mL의 제형을 -30°C, 150 mT에서 1차 건조 및 20°C, 150 mT에서 2차 건조된 동결건조된 5mL 바이알 내로 채웠다. 상이한 저장 조건 후 1.5mL로 재구성한 동결건조된 제형의 안정성을 표 1 내지 3에 나타낸다(두 실험으로부터의 60 mg/mL 결과를 엮음). 도 6a는 40°C에서 저장했을 때, 당 및 알기닌의 pH 및 몰 비가 변화되었을 때, 단량체 백분율, 응집물 백분율 및 주요 아이소폼 백분율의 변화에 대한 예측 모델을 나타낸다. 제형의 안정성은 낮은 pH 및 단백질에 대해 (당+알기닌)의 높은 몰 비에서 최고였다. 시험한 히스티딘 몰량에서, 히스티딘은 제형의 안정성에 영향을 미치지 않았다. 모든 제형은 저장 동안 1 내지 2% 수분을 가졌다.

표 1

[0206]

3개월 동안 5℃, 25℃/60% RH 및 40℃/75% RH에서 저장했을 때 단량체 백분율의 변화. 단량체 백분율은 크기 배제 크로마토그래피(Size Exclusion Chromatography: SEC)를 사용하여 측정하였다.				
제형 60 mg/ml 베돌리주맙 +	SEC에 의한 단량체%			
	t=0	5℃ 3개월	25℃ 60%RH 3개월	40℃ 75% RH 3개월
25mM 히스티딘, 75mM 알기닌, 2% 수크로스, 0.05% 폴리솔베이트 80, pH 6.3	98.1	98.1	97.8	96.5
25mM 히스티딘, 75mM 알기닌, 4% 수크로스, 0.05% 폴리솔베이트 80, pH 6.9	98.0	98.2	98.0	97.5
50mM 히스티딘, 125mM 알기닌, 2% 수크로스, 0.05% 폴리솔베이트 80, pH 6.7	98.0	98.3	98.1	97.4
50mM 히스티딘, 125mM 알기닌, 4% 수크로스, 0.05% 폴리솔베이트 80, pH 6.9	98.0	98.3	98.1	97.4
50mM 히스티딘, 125mM 알기닌, 6% 수크로스, 1.5% 만니톨, 0.06% 폴리솔베이트 80, pH 6.3	98.7	98.4	98.4	98.1
50mM 히스티딘, 125mM 알기닌, 9% 수크로스, 0.06% 폴리솔베이트 80, pH 6.3	98.7	98.3	98.1	98.3

표 2

[0207]

3개월 동안 5℃, 25℃/60% RH 및 40℃/75% RH에서 저장했을 때 응집물 백분율의 변화. 단량체 백분율은 크기 배제 크로마토그래피(SEC)를 사용하여 측정하였다.				
제형 60 mg/ml 베돌리주맙 +	SEC에 의한 응집물%			
	t=0	5℃ 3개월	25℃ 60%RH 3개월	40℃ 75% RH 3개월
25mM 히스티딘, 75mM 알기닌, 2% 수크로스, 0.05% 폴리솔베이트 80, pH 6.3	0.42	0.53	0.89	1.99
25mM 히스티딘, 75mM 알기닌, 4% 수크로스, 0.05% 폴리솔베이트 80, pH 6.9	0.41	0.51	0.62	1.15
50mM 히스티딘, 125mM 알기닌, 2% 수크로스, 0.05% 폴리솔베이트 80, pH 6.7	0.42	0.47	0.60	1.23
50mM 히스티딘, 125mM 알기닌, 4% 수크로스, 0.05% 폴리솔베이트 80, pH 6.9	0.36	0.44	0.52	0.82
50mM 히스티딘, 125mM 알기닌, 6% 수크로스, 1.5% 만니톨, 0.06% 폴리솔베이트 80, pH 6.3	0.53	0.49	0.51	0.56
50mM 히스티딘, 125mM 알기닌, 9% 수크로스, 0.06% 폴리솔베이트 80, pH 6.3	0.51	0.51	0.59	0.56

표 3

[0208]

3개월 동안 5℃, 25℃/60% RH 및 40℃/75% RH에서 저장했을 때 주요 아이소폼%의 변화. 주요 아이소폼은 양이온 교환 크로마토그래피(Cation Exchange Chromatography: CEX)를 사용하여 측정하였다.				
제형 60 mg/ml 베돌리주맙 +	CEX에 의한 주요 아이소폼%			
	t=0	5℃ 3개월	25℃ 60%RH 3개월	40℃ 75% RH 3개월
25mM 히스티딘, 75mM 알기닌, 2% 수크로스, 0.05% 폴리솔베이트 80, pH 6.3	70.5	68.8	67.4	66.3
25mM 히스티딘, 75mM 알기닌, 4% 수크로스, 0.05% 폴리솔베이트 80, pH 6.9	70.8	98.9	68.0	67.7
50mM 히스티딘, 125mM 알기닌, 2% 수크로스, 0.05% 폴리솔베이트 80, pH 6.7	70.5	68.9	67.8	66.5
50mM 히스티딘, 125mM 알기닌, 4% 수크로스, 0.05% 폴리솔베이트 80, pH 6.9	70.6	68.9	68.0	67.4

50mM 히스티딘, 125mM 알기닌, 6% 수크로스, 1.5% 만니톨, 0.06% 폴리솔베이트 80, pH 6.3	69.6	69.5	69.3	67.4
50mM 히스티딘, 125mM 알기닌, 9% 수크로스, 0.06% 폴리솔베이트 80, pH 6.3	69.5	69.3	69.2	68.1

[0209] 도 6a는 표 1 내지 3으로부터의 40℃ 데이터의 통계학적 분석에 기반한 예측 모델을 나타낸다. SEC 분석에 의해 40℃에서 1개월 당 단량체%의 변화에 대한 모델은 $-3.10 + (0.386)*pH + 0.000516*((\text{당의 물} + \text{알기닌 물}) / \text{단백질의 물})$ 이다. SEC 분석에 의해 40℃에서 1개월 당 응집물%의 변화에 대한 모델은 $2.43 - (0.263)*pH - 0.000787*((\text{당의 물} + \text{알기닌 물}) / \text{단백질의 물})$ 이다. CEX 분석에 의해 40℃에서 1개월 당 주요 아이소폼 백분율의 변화에 대한 모델은 $-2.54 + (0.109)*pH - 0.00130*((\text{당의 물} + \text{알기닌 물}) / \text{단백질의 물})$ 이다. 중앙선은 예측 모델에 대한 결과를 나타내며, 외곽선은 예측 모델에 대한 95% 신뢰한계를 나타낸다.

[0210] 도 6b는 입력 인자가 pH, 당:단백질 물 비 및 알기닌:단백질 물 비율 때, 표 1 내지 3의 40℃ 데이터의 통계학적 분석에 기반한 대안의 모델을 나타낸다. SEC 분석에 의해 40℃에서 1개월 당 단량체 백분율의 변화에 대한 모델은 $-3.02 + (0.370)*pH + 0.000482*((\text{당의 물}) / (\text{단백질의 물})) + 0.000657*((\text{알기닌의 물}) / (\text{단백질의 물}))$ 이다. SEC 분석에 의해 40℃에서 1개월 당 응집물%의 변화에 대한 모델은 $2.35 - (0.244)*pH - 0.000727*((\text{당의 물}) / (\text{단백질의 물})) - 0.00102*((\text{알기닌의 물}) / (\text{단백질의 물}))$ 이다. CEX 분석에 의해 40℃에서 1개월 당 주요 아이소폼 백분율의 변화에 대한 모델은 $-2.92 + (0.210)*pH + 0.00164*((\text{당의 물}) / (\text{단백질의 물})) - 0.000220*((\text{알기닌의 물}) / (\text{단백질의 물}))$ 이다. 중앙선은 예측 모델에 대한 결과를 나타내며, 외곽선은 예측 모델에 대한 95% 신뢰한계를 나타낸다.

[0211] 실시예 2

[0212] 안정성 데이터

[0213] 제형(배치(batch) A, B 및 C)의 3개의 1차 안정성 배치를 예측한 저장 조건(24 개월까지 동안 5 및 25℃/60% RH)에서 저장 후 안정성에 대해 시험하였다. 모두 3개의 배치는 동결건조된 동일한 액체 제형을 함유한다: 60 mg/ml 항-α4β7 항체, 50mM 히스티딘, 125mM 알기닌, 10% 수크로스, 0.06% 폴리솔베이트 80, pH 6.3. A에 대해, 3.5ml의 용액을 20ml 바이알 내에 채우고, 동결건조시키며, 배치 B 및 C에 대해, 5.52ml의 용액을 20ml 바이알 내에 채우고, 동결건조시킨다.

[0214] 별개의 연구에서, 60 mg/ml 항-α4β7 항체, 50mM 히스티딘, 125mM 알기닌, 10% 수크로스, 0.06% 폴리솔베이트 80, pH 6.3의 단일 약물 제형을 2 가지의 용적, 각각 3.5ml 및 9.5ml로 동결건조시켜 안정성 샘플에 대한 배치 R 및 S를 획득하였고, 이를 38개월에 걸쳐 분석하였다. 빈칸은 NT이다(시험하지 않음(not tested)).

[0215] 데이터(표 4 내지 19)는 5℃에서 38개월까지 및 25℃/60% RH에서 30개월까지 저장했을 때 항체 제형이 안정하게 남아있다는 것을 나타내었다. 모든 생성물이 38개월 시점 내내 규격 내에 남아있는 것으로 여겨진다.

표 4

[0216]

5℃에서 저장했을 때 SEC에 의한 단량체 백분율의 변화					
시간(개월)	배치 A	배치 B	배치 C	배치 R	배치 S
0	99.8	99.8	99.8	98.9	98.8
1	99.8	99.1	99.2	98.8	99.2
3	99.8	99.1	99.1	98.8	98.8
6	99.8	99.8	99.8	98.9	99.0
9	99.1	99.2	99.2	99.2	99.1
12	99.4	99.0	99.0	98.8	98.9
15	99.4	99.1	99.1		
18	99.5	99.4	99.4	98.9	98.9
24	99.4	99.2	99.2	99.0	99.0
30		99.2	99.2		
38				99.3	99.3

표 5

[0217]

5℃에서 저장했을 때 SEC에 의한 응집물 백분율의 변화					
시간(개월)	배취 A	배취 B	배취 C	배취 R	배취 S
0	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2
1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1
3	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2
6	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
9	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2
12	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
15	0.2	0.2	0.2		
18	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
24	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
30		0.2	0.2		
38				0.2	0.2

표 6

[0218]

5℃에서 저장했을 때 CEX에 의한 주요 아이소폼 백분율의 변화					
시간(개월)	배취 A	배취 B	배취 C	배취 R	배취 S
0	68.6	69.9	69.5	71.7	71.6
1	67.5	68.9	68.8	71.2	72.0
3	68.7	68.8	68.7	70.4	70.3
6	67.7	68.2	68.2	71.9	71.9
9	70.0	68.3	67.8	69.2	69.7
12	67.8	68.3	68.1	70.8	70.9
15	66.9	67.5	67.5		
18	67.4	67.0	66.7	71.0	70.8
24	68.1	69.6	69.1	71.3	70.9
30		68.5	68.6		
38				73.6	73.1

표 7

[0219]

5℃에서 저장했을 때 CEX에 의한 산성 아이소폼 백분율의 변화					
시간(개월)	배취 A	배취 B	배취 C	배취 R	배취 S
0	22.8	20.8	21.4	20.3	20.6
1	21.9	21.7	22.3	21.6	20.3
3	21.7	22.2	22.8	22.0	22.0
6	22.9	23.1	23.6	21.1	21.4
9	19.8	22.2	22.9	21.8	21.8
12	22.9	21.3	22.1	21.2	21.2
15	22.7	22.3	22.8		
18	22.8	22.3	22.6	21.1	21.5
24	21.7	22.1	22.9	20.6	20.7
30		22.8	23.2		
38				18.9	19.1

표 8

[0220]

5℃에서 저장했을 때 CEX에 의한 염기성 아이소폼 백분율의 변화					
시간(개월)	배취 A	배취 B	배취 C	배취 R	배취 S
0	8.5	9.3	9.1	8.1	7.8
1	10.7	9.4	8.9	7.3	7.7
3	9.7	9.0	8.5	7.6	7.8
6	9.5	8.7	8.2	7.0	6.7

9	10.2	9.6	9.3	9.0	8.4
12	9.3	10.3	9.9	8.0	7.9
15	10.4	10.1	9.7		
18	9.8	10.7	10.7	7.9	7.7
24	10.2	8.3	8.1	8.1	8.3
30		8.7	8.2		
38				7.5	7.7

표 9

[0221]

5℃에서 저장했을 때 환원된-SDS 파지에 의한 (H+L)%의 변화					
시간(개월)	배취 A	배취 B	배취 C	배취 R	배취 S
0	98	98	98	96	96
1	98	94	98	98	98
3	98	98	98	98	98
6	98	97	97	97	97
9	97	97	97	98	98
12	98	96	97	98	98
15	97	98	97		
18	98	97	97	99	99
24	98	98	98	99	99
30		97	97		
38				99	99

표 10

[0222]

5℃에서 저장했을 때 결합 효능의 변화					
시간(개월)	배취 A	배취 B	배취 C	배취 R	배취 S
0	107	106	105	93	102
1	106	106	103	103	111
3	101	109	108	91	98
6	97	106	105	114	121
9	100	93	88	102	102
12	103	101	87	119	116
15	105	90	94		
18	86	101	96	95	104
24	92	82	95	81	101
30		87	94		
38				89	91

표 11

[0223]

5℃에서 저장했을 때 KF에 의한 수분%의 변화					
시간(개월)	배취 A	배취 B	배취 C	배취 R	배취 S
0	0.5	0.6	0.6	0.8	1.0
1	0.5	0.4	0.6		
3	0.5	0.6	0.6		
6	0.6	0.7	0.5	0.8	1.3
12	0.6	0.6	0.7	0.9	0.9
24	0.5	0.7	0.7	0.9	0.9
30		0.7	0.7		

표 12

[0224]

25℃/60%RH에서 저장했을 때 SEC에 의한 단량체 백분율의 변화					
시간(개월)	배치 A	배치 B	배치 C	배치 R	배치 S
0	99.8	99.8	99.8	98.9	98.8
1	99.8	99.1	99.2	98.7	98.7
3	99.8	99.0	99.0	98.6	98.5
6	99.8	99.7	99.7	98.9	98.9
9	99.0	99.1	99.1	99.1	99.1
12	99.3	98.9	98.9	98.8	98.9
15	99.3	99.0	99.0		
18	99.4	99.3	99.3	98.7	98.9
24	99.2	99.1	99.1	98.9	98.9
30		99.0	99.0		

표 13

[0225]

25℃/60%RH에서 저장했을 때 SEC에 의한 응집물 백분율의 변화					
시간(개월)	배치 A	배치 B	배치 C	배치 R	배치 S
0	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2
1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
3	0.2	0.3	0.2	0.3	0.3
6	0.2	0.3	0.3	0.2	0.2
9	0.2	0.3	0.3	0.2	0.2
12	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3
15	0.3	0.3	0.3		
18	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2
24	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2
30		0.4	0.3		

표 14

[0226]

25℃/60%RH에서 저장했을 때 CEX에 의한 주요 아이소폼 백분율의 변화					
시간(개월)	배치 A	배치 B	배치 C	배치 R	배치 S
0	68.6	69.9	69.5	71.7	71.6
1	67.2	68.4	68.6	71.2	71.0
3	68.1	68.6	68.2	70.3	70.3
6	65.9	67.8	67.8	71.5	71.1
9	69.3	67.5	66.3	68.6	69.0
12	66.7	67.5	67.4	70.1	70.2
15	66.2	66.6	66.8		
18	66.1	65.8	64.9	70.0	70.3
24	66.7	68.4	68.2	70.6	70.1
30		67.2	67.2		

표 15

[0227]

25℃/60%RH에서 저장했을 때 CEX에 의해 저장했을 때 CEX에 의한 산성 아이소폼%의 변화					
시간(개월)	배치 A	배치 B	배치 C	배치 R	배치 S
0	22.8	20.8	21.4	20.3	20.6
1	21.9	21.8	22.2	21.4	21.6
3	21.7	22.2	22.8	21.8	22.0
6	22.6	22.9	23.5	21.1	21.4
9	19.9	22.1	23.1	21.8	21.8
12	23.0	21.4	22.0	21.3	21.3
15	22.5	22.1	22.7		

18	22.6	22.1	22.6	21.3	21.5
24	21.7	21.9	22.6	20.7	20.7
30		22.7	23.2		

표 16

[0228]

25℃/60%RH에서 저장했을 때 CEX에 의한 염기성 아이소폼 백분율의 변화					
시간 (개월)	배치 A	배치 B	배치 C	배치 R	배치 S
0	8.5	9.3	9.1	8.1	7.8
1	10.8	9.8	9.2	7.4	7.3
3	10.3	9.3	9.0	7.8	7.7
6	11.5	9.3	8.7	7.4	7.5
9	10.8	10.4	10.6	9.7	9.3
12	10.3	11.1	10.7	8.7	8.5
15	11.3	11.2	10.6		
18	11.2	12.1	12.5	8.7	8.2
24	11.6	9.7	9.1	8.7	9.2
30		10.2	9.6		

표 17

[0229]

25℃/60%RH에서 저장했을 때 환원된-SDS 과지에 의한 (H+L)% 변화					
시간 (개월)	배치 A	배치 B	배치 C	배치 R	배치 S
0	98	98	98	96	96
1	98	98	98	98	98
3	97	98	98	98	98
6	97	97	97	97	97
9	97	97	97	98	98
12	98	96	96	98	98
15	97	97	97		
18	98	97	97	99	99
24	98	97	98	99	99
30		97	98		

표 18

[0230]

25℃/60%RH에서 저장했을 때 결합 효능의 변화					
시간 (개월)	배치 A	배치 B	배치 C	배치 R	배치 S
0	107	106	105	93	102
1	115	103	109		
3	92	113	100	96	94
6	109	89	97	101	114
9	97	89	85	97	102
12	83	91	123		
15	96	91	96		
18	106	123	87	92	102
24	103	82	90	98	94
30		84	114		

표 19

[0231]

25℃/60%RH에서 저장했을 때 KF에 의한 수분%의 변화					
시간 (개월)	배치 A	배치 B	배치 C	배치 R	배치 S
0	0.5	0.6	0.6	0.8	1.0
1	0.5	0.6	0.5		

3	0.5	0.7	0.6		
6	0.5	0.7	0.7	1.3	1.2
12	0.6	0.8	0.6	0.9	1.0
24	0.7	0.8	0.6	1.1	1.0
30		0.8	0.7		

- [0232] 양이온 교환 크로마토그래피(CEX)
- [0233] 약한 양이온 교환 컬럼에 대한 포스페이트/염화 나트륨 구배를 고성능 액체 크로마토그래피 시스템에서 사용하여 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체 제형 내 하전된 종을 분리시키고, 항체 종의 하전 조성을 결정한다. 주요 아이소폼 전에 산성 아이소폼을 용리시키고, 주요 아이소폼 후 염기성 아이소폼을 용리시킨다.
- [0234] CEX 분석을 사용하여 만든 모든 베돌리주맙 배취에 대한 안정성 데이터를 표 3, 6 내지 8 및 14 내지 16에 제시한다. 표는 이들 저장 조건이, 55.0% 미만의 주요 아이소폼%를 감소시키는 경향이 없다는 것을 나타낸다.
- [0235] 크기 배제 크로마토그래피(SEC)
- [0236] SEC는 분석적 SEC 컬럼을 사용하여 수행한다(필라델피아주 킹 오브 프리시아에 소재한 토소 바이오사이언스 엘엘씨(Tosoh Bioscience, LLC)). 이동상은 인산염-완충 식염수 용액이고, 흡광도는 280nm에서 모니터링한다.
- [0237] SEC 분석을 사용하여 만든 안정성 데이터를 표 1, 2, 4, 5, 12 및 13에서 제시한다. 열거된 저장 조건은 96.0% 미만으로 단량체%의 저하를 야기한다는 것을 나타낸다. 유사하게, 응집물%는 모든 열거된 저장 조건에서 모든 배취에 대해 $\leq 2.5\%$ 를 나타내었다.
- [0238] SDS-파지 분석
- [0239] SDS-파지는 인비트로젠(캘리포니아주 칼스베드에 소재) 트리스-글라이신 겔을, 환원 조건을 위해 4 내지 20% 및 비-환원 조건을 위해 4 내지 12%를 사용하여 수행한다. 재구성된 항체 제형 샘플을 액체 제형에서 희석시킨 다음 10% 2-머캅토에탄올과 함께(환원성 샘플 완충제) 또는 2-머캅토에탄올 없이(비-환원성 샘플 완충제) 트리스-글라이신 SDS 샘플 완충제(2X, 인비트로젠(Invitrogen))에 의해 1 내지 2회 희석시켰다. 샘플을 간단히 가열시키고, 분자량 마커(인비트로젠(Invitrogen))와 비교하여 로딩한다. 겔을 제조업자의 설명서에 따라서 콜로이드 쿠마씨 블루(인비트로젠(Invitrogen))로 염색한다. 단백질 밴드를 환원된 겔에 대해 중쇄 및 경쇄%를 그리고 비-환원 겔에 대해 IgG%를 확인하기 위해 덴시토메트리(densitometry)에 의해 분석한다.
- [0240] 환원된 SDS-파지 분석을 사용하여 만든 안정성 데이터를 표 9 및 17에 제시한다. 모든 안정성 로트에 대해 열거한 모든 저장 조건에서 중 + 경(H+L)쇄%에 대해 현저한 변화가 관찰되지 않았다. 무늬 모양은 기준 표준의 무늬 모양과 유사하였고, %(H+L)는 $\geq 90\%$ 수준으로 남아있었다.
- [0241] 결합 효능
- [0242] HuT78 세포(인간 T 세포 림프종 세포, 버지니아주 매너서스에 소재한 미국 미생물 보존센터(American Type Culture Collection))를 PBS 중의 1% BSA 중에서 현탁시켰고, 0.01% 아자이드 나트륨을 1차 시험 항체의 단계 희석물과 접촉시킨다. 얼음 상에서 인큐베이션 후, 세포를 세척하고, 형광으로 표지한 2차 항체로 처리한다. 추가 세척 후, 세포를 고정시키고, 유세포 분석기(뉴저지주 프랭클린 레이크스에 소재한 벡톤 디킨슨(Becton Dickinson); 또한 미국 특허 제7,147,851호 참조)에 의한 분석을 위해 FACS 시약 중에서 현탁시킨다.
- [0243] 베돌리주맙의 결합 효능을 기준 표준에 대해 측정하였고, 기준 표준% 및 EC50으로서 보고하였다. 안정성 데이터를 표 10 및 18에 제시한다. 기준 표준%에 대한 데이터는 가변성을 나타내었지만, 모든 저장 조건에서 규격 한계 내에 남아있었다. 베돌리주맙의 평가 로트는 열거한 저장 조건에서 감소된 결합 효능의 경향을 나타내지 않았다.
- [0244] 카를 피셔에 의한 수분
- [0245] 제형을 전량 분석 카를 피셔(Karl Fischer) 수분 결정을 위해 메탄올로 적정한다. 수분 데이터를 표 11 및 19에 제시한다. 베돌리주맙의 모든 평가 로트는 모든 열거한 저장 조건에서 5% 미만의 수분을 가졌다.
- [0246] 모세관 등전점 전기영동(Capillary Isoelectric Focusing: cIEF)
- [0247] iCE280 전체 컬럼 검출 cIEF 시스템(온타리오주 토론토에 소재한 컨버전트 바이오사이언스(Convergent

Biosciences))를 사용하여 cIEF를 수행한다. 양성전해질의 선택은 제조업자에 의해 추천된 바와 같거나 또는 상업적으로 입수가 가능한 양성전해질의 조합물일 수 있다. 유용한 조합물은 3-10 및 5-8 PHARMALYTE(상표명)(뉴저지주 피츠카타웨이에 소재한 GE 헬스케어(Healthcare))의 혼합물이다.

[0248] 실시예 3: 동결건조 과정의 정물증가 모델링

[0249] 설계에 의한 품질을 사용하는 한편, 냉동 건조기 내 장전 및 제형의 고체 함량을 조작한다. 로딩을 33 내지 100%로 달리하였다. 0.5x, 1.0x 및 1.5x의 표적 제형인 제형을 로딩에 포함함으로써 제형 고체 함량을 9 내지 27%로 달리하였다. 이들 제형은 유사한 T_g 를 가졌다. 더 높은 고체%에 의해, 1차 건조 시간을 증가시켰다. 추가로, 더 높은 고체 함량에서, 더 큰 R_p 에 기인하여 생성물 온도를 증가시켰다. 로딩은 또한 건조 단계 둘 다에 대해 효과를 가진다(도 8).

[0250] 실시예 4: 비-임상적 안전성 연구

[0251] 레서스(Rhesus) EAE에서 CNS의 면역 감시에 대한 나탈리주맙 및 베돌리주맙의 교과를 비교하기 위한 연구를 설계하였다. 1주 1회 8마리 동물에 위약 대조군으로 투약하였다. 1주 1회 7마리 동물에 30 mg/kg으로 나탈리주맙을 투약하였다. 1주 1회 7마리 동물에 30 mg/kg으로 베돌리주맙을 투약하였다. EAE의 임상적 증상을 관찰하였고; CSF에서 백혈구 서브세트의 빈도 및 비를 유세포분석기에 의해 측정하였으며; MRI를 사용하여 뇌에서 전체 T2 병변 부하를 측정하였고; 뇌의 병변 부하 및 탈수초를 조직병리학을 사용하여 측정하였다.

[0252] 베돌리주맙은 위약 대조군과 비교하여 EAE의 임상적 증상의 개시를 지연시키지 않았다. EAE의 유병률도, 임상적 스코어의 규모도 억제되지 않았다. 나탈리주맙은 위약 대조군과 비교하여 EAE의 임상적 증상의 개시를 유의하게 ($p<0.05$) 지연시켰다. 이는 EAE의 유병률 및 임상적 스코어의 규모를 억제하였다(도 9).

[0253] 베돌리주맙은 백혈구, T 림프구(헬퍼 T 림프구, 세포독성 T 림프구), B 림프구, 자연 살해 세포 또는 단핵구에 의해 CSF의 침윤을 방지하지 않았다. 대조적으로, 나탈리주맙은 CSF의 침윤을 억제하였다.

[0254] MRI를 통해 증가된 T2 및 감소된 MTR 값에 의해 검출된 바와 같이, 베돌리주맙은 뇌 병변의 축적을 억제하지 않았다. 나탈리주맙은 한 마리의 동물을 제외한 모두에서 병변 형성을 방지하였다. 뇌 침윤 및 탈수초의 유의한 ($p<0.05$) 억제를 조직학에 의해 측정하였다.

[0255] 생체 내 투약한 베돌리주맙과 생체 밖에 첨가된 분석적 항- $\alpha 4\beta 7$ 단클론성 항체 간의 경쟁적 결합 분석에 의해 나타나는 바와 같이, 연구 동안 베돌리주맙에 의해 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린을 포화시켰다. 분석적 항- $\alpha 4\beta 7$ mAb는 베돌리주맙으로 투약한 동물에서 기억 헬퍼 T 림프구에 결합되지 않았다. 따라서 CNS 내 베돌리주맙 효과의 결여는 $\alpha 4\beta 7$ 인테그린의 위장관-샘자극(gastrointestinal-tropic) 생물학에 기인한다.

[0256] 요약하면, 베돌리주맙($\alpha 4\beta 7$ 길항물질)은 EAE를 억제하지 않았다. 대조적으로, 나탈리주맙($\alpha 4\beta 1$ 및 $\alpha 4\beta 7$ 길항물질)은 EAE를 억제한다. $\alpha 4\beta 1$ 인테그린은 EAE에서 CNS의 침윤을 매개한다. 따라서, 베돌리주맙은 나탈리주맙보다 PML에 대해 환자의 소인적(predisposing) 위험이 더 낮을 수 있는데, 이는 $\alpha 4\beta 1$ 인테그린을 길항하지 않고, 레서스 EAE에서 CNS의 면역감시를 손상시키지 않기 때문이다.

[0257] 실시예 5: 베돌리주맙에 의한 I상 임상 연구

[0258] 49명의 건강한 피험체를 무작위화하였고, 연구 의약의 1회 용량을 투여하였다: 39명의 피험체에 베돌리주맙(5 mg/ml 항체, 20mM 시트레이트/시트르산, 125mM 염화나트륨, 0.05% 폴리솔베이트 80, pH 6.0(장기간 -70°C 및 3개월까지 -20°C에서 저장함))을 투여하였고, 10명의 피험체에 위약을 투여하였다. 베돌리주맙을 투여한 39명의 피험체 중에서, 8명의 피험체에 각각 0.2, 2.0, 6.0 및 10.0 mg/kg 용량을 투여하였고, 7명의 피험체에 베돌리주맙 0.5 mg/kg을 투여하였다. 모두 49명의 피험체가 연구를 완료하였다.

[0259] 임의의 인구통계학적 또는 기준 특징에 대해 베돌리주맙 코호트에 걸쳐 현저한 차이가 없었다. 평균 연령은 35.4 내지 51.0세 범위에 있으며; 개개의 피험체의 연령은 21 내지 63세의 범위에 있었다.

[0260] PK 결과

[0261] 베돌리주맙을 0.2 내지 10.0 mg/kg의 30분 정맥내 주입으로서 투여하였다. C_{max} 및 혈청 약물 농도-시간 곡선하 면적(AUC) 값은 용량이 증가함에 따라 증가되었다. 용량-보정된 C_{max} 는 코호트에 걸쳐 거의 동일하였는데, 이는 이 변수에 대해 용량과 비례를 나타낸다. 0 내지 무한대 시간으로부터 혈청 약물 농도값 하의 용량-정규화된 면적(AUC_{0-inf})은 2.0 mg/kg까지 용량이 증가됨에 따라 증가되었는데, 이는 이 연구에서 투여된 낮은 범위의 용량

이상으로 용량이 증가함에 따라 AUC_{0-inf} 에서 비선형 증가가 있었다는 것을 나타낸다. 그 후에, AUC_{0-inf} 는 용량과 비례하여 증가되는데, 이는 용량 범위 2.0 내지 10.0 mg/kg에 걸쳐 AUC_{0-inf} 의 선형성을 나타낸다. AUC_{0-inf} 의 증가는 0.2 mg/kg 용량과 비교하여 10.0 mg/kg 용량에서 예상한 것보다 대략 2.4배 더 높았다.

[0262]

유사하게, 클리어런스(clearance)의 추정, 분포 용적 및 최종 반감기는 0.2 내지 2.0 mg/kg 용량 범위에 걸쳐 용량-의존적이었다. 용량이 증가함에 따라, 클리어런스는 감소되었고, 분포 용적은 증가되었으며, 결과적으로, 최종 제거 반감기는 연장되었다. 그러나, 2 내지 10.0 mg/kg에서 이들 변수에 명백한 변화가 없었는데, 이는 저 농도에서 베돌리주맙에 대한 빠른 제거 과정의 포화를 시사한다. 더 느린 선형 제거 과정은 더 높은 용량에서 베돌리주맙의 큰 클리어런스 분율을 설명할 수 있다.

[0263]

베돌리주맙에 대해 HAHA가 발생한 일부 피험체에서, 각각의 용량 수준 내에서 HAHA-음성 피험체와 비교하여 베돌리주맙의 더 빠른 클리어런스를 관찰하였다.

표 20

건강한 피험체에서 0.2-10.0 mg/kg 베돌리주맙의 IV 투여 후 투약 코호트에 의한 베돌리주맙의 개요(PK 분석 설정)

변수	베돌리주맙 용량	N	평균	SD	기하학적 평균	%CV	중앙값	최소값	최대값
$C_{max}(\mu g/ml)$	0.2 mg/kg	4	5.65	0.629	5.62	11.1	5.45	5.13	6.56
	0.5 mg/kg	4	10.6	2.09	10.4	19.7	10.6	8.07	13.1
	2.0 mg/kg	7	59.3	11.6	58.4	19.6	58.4	47.6	78.4
	6.0 mg/kg	6	151	19.1	150	12.6	157	120	168
	10.0 mg/kg	7	243	22.1	243	9.07	242	213	281
AUC_{0-last} (일* $\mu g/ml$)	0.2 mg/kg	4	31.6	4.98	31.3	15.8	31.6	25.7	37.5
	0.5 mg/kg	4	127	48.0	119	37.9	129	70.9	178
	2.0 mg/kg	7	964	147	955	15.2	972	772	1170
	6.0 mg/kg	6	3090	749	3020	24.2	2830	2360	4100
	10.0 mg/kg	7	4870	624	4840	12.8	4750	4120	5870
AUC_{0-inf} (일* $\mu g/ml$)	0.2 mg/kg	4	39.5	5.79	39.1	14.7	40.2	31.7	45.7
	0.5 mg/kg	4	134	48.9	127	36.5	134	79.2	188

[0264]

	2.0 mg/kg	7	979	146	969	14.9	993	784	1180
	6.0 mg/kg	6	3100	750	3030	24.2	2840	2390	4110
	10.0 mg/kg	7	4880	637	4850	13.0	4750	4130	5920
V _z (ℓ)	0.2 mg/kg	4	4.02	0.151	4.02	3.76	4.03	3.83	4.18
	0.5 mg/kg	4	4.92	0.620	4.89	12.6	4.66	4.52	5.84
	2.0 mg/kg	7	3.34	0.665	3.28	19.9	3.23	2.29	4.27
	6.0 mg/kg	6	2.98	0.644	2.92	21.6	2.98	2.06	3.98
	10.0 mg/kg	7	2.89	1.02	2.73	35.2	2.98	1.49	4.58
CL (ℓ / 일)	0.2 mg/kg	4	0.413	0.042	0.412	10.1	0.395	0.388	0.476
	0.5 mg/kg	4	0.310	0.106	0.297	34.3	0.291	0.212	0.446
	2.0 mg/kg	7	0.165	0.018	0.164	10.7	0.162	0.145	0.194
	6.0 mg/kg	6	0.140	0.031	0.136	22.0	0.145	0.083	0.166
	10.0 mg/kg	7	0.140	0.024	0.139	16.9	0.135	0.103	0.171
t _{1/2} (일)	0.2 mg/kg	4	6.79	0.736	6.76	10.8	6.95	5.79	7.47

[0265]

0.5 mg/kg	4	11.7	2.83	11.4	24.2	11.4	9.09	14.8
2.0 mg/kg	7	14.1	2.67	13.9	18.9	14.3	10.6	17.5
6.0 mg/kg	6	15.1	3.15	14.8	20.9	14.0	11.9	20.3
10.0 mg/kg	7	14.8	7.38	13.7	49.8	12.5	8.26	30.7

약어: AUC_{0-inf} =무한대로 추정된 약물 농도-시간 곡선하면적; $AUC_{0-t_{last}}$ =투여 시간으로부터 농도가 정량의 하한 초과인 최종 측정 시점까지의 약물 농도-시간 곡선하면적; CL= 전체 클리어런스; C_{max} = 최대 약물 농도; $t_{1/2}$ = 최종 반감기; V_z = 최종 단계에 기반한 분포 용적.

[0266]

[0267]

C_{max} 에 도달된 후, 베돌리주맙의 혈청 농도는 일반적으로 농도가 대략 1 내지 10mg/ℓ에 도달될 때까지 단일지수적(monoexponential) 형식에 속한다. 그 후에, 농도는 비선형 형식에 속한다는 것을 나타내었다.

[0268]

C_{max} 및 AUC 값은 용량이 증가됨에 따라 증가되었다. 이용가능한 데이터에 대해, 용량-보정 C_{max} 는 코호트에 걸쳐 거의 동일하였는데, 이는 이 변수에 대해 용량 비례를 나타낸다. 용량-정규화된 AUC_{0-inf} 는 2.0 mg/kg까지 용량이 증가됨에 따라 증가되었는데, 이는 이 연구에서 투여된 더 낮은 범위의 용량 이상으로 용량이 증가됨에 따라 AUC_{0-inf} 가 비선형으로 증가된다는 것을 나타내었다. 그 후에, AUC_{0-inf} 는 용량과 비례적으로 증가되었는데, 이는 용량 범위 2.0 내지 10.0 mg/kg에 걸쳐 AUC_{0-inf} 의 선형성을 나타낸다. AUC_{0-inf} 의 증가는 0.2 mg/kg 용량과 비교하여 10.0 mg/kg 용량에서 예상한 것보다 대략 2.4배 더 높았다.

[0269]

PD 결과

[0270]

코호트에 의해 0.2 내지 10.0 mg/kg 베돌리주맙의 30-분 정맥내 주입 후 베돌리주맙의 PD 변수를 각각 Act-1 및 MAdCAM에 대해 표 21 및 표 22에서 요약한다.

표 21

[0271]

건강한 피험체에서 0.2 내지 10.0 mg/kg 베돌리주맙의 IV 투여 후 용량 코호트에 의한, 베돌리주맙 약력학, %Act-1 ⁺ [CD4 ⁺ CD45RO ^{high}]의 억제 백분율의 개요(PD 분석 설정)									
변수	베돌리주맙 용량	N	평균	SD	기하학적 평균	%CV	중앙값	최소값	최대값
E_{max} (억제%)	0.2 mg/kg	4	99.6	0.387	99.6	0.388	99.6	99.1	100
	0.5 mg/kg	4	99.5	0.599	99.5	0.602	99.5	98.9	100
	2.0 mg/kg	6	99.9	0.172	99.9	0.172	100	99.6	100
	6.0 mg/kg	6	100	0.000	100	0.000	100	100	100
	10.0 mg/kg	6	99.7	0.326	99.7	0.327	99.8	99.3	100
$AUEC_{0-inf}$ (억제%*d)	0.2 mg/kg	4	4030	1010	3920	25.2	4090	2760	5160
	0.5 mg/kg	4	6430	1450	6300	22.6	6530	4860	7810
	2.0 mg/kg	6	13200	623	13200	4.72	12900	12800	14500
	6.0 mg/kg	6	16700	3030	16500	18.1	16300	13300	20100
	10.0 mg/kg	6	19300	644	19300	3.33	19600	18200	19900
$AUEC_{0-inf}$ = 시간 0으로부터 최종 0이 아닌 농도의 시간까지 약물 효과 대 시간 곡선하 면적; E_{max} = 최대 약물 효과									

표 22

[0272]

건강한 피험체에서 0.2 내지 10.0 mg/kg 베돌리주맙의 IV 투여 후 용량 코호트에 의한, 베돌리주맙 억제학, %MADCAM ⁺ [CD4 ⁺ CD45RO ^{high}]의 억제 백분율의 개요(PD 분석 설정)									
변수	베돌리주맙 용량	N	평균	SD	기하학적 평균	%CV	중앙값	최소값	최대값
E _{max} (억제%)	0.2 mg/kg	4	99.2	0.537	99.2	0.542	99.4	98.4	99.6
	0.5 mg/kg	4	99.6	0.323	99.6	0.324	99.5	99.3	100
	2.0 mg/kg	6	99.7	0.365	99.7	0.366	99.7	99.2	100
	6.0 mg/kg	6	99.8	0.279	99.8	0.280	100	99.4	100
	10.0 mg/kg	6	100	0.000	100	0.000	100	100	100
AUEC _{0-inf} (억제%*d)	0.2 mg/kg	4	4000	576	3970	14.4	4210	3160	4440
	0.5 mg/kg	4	6770	1400	6660	20.6	6840	5170	8230
	2.0 mg/kg	6	13000	796	13000	6.12	13000	11700	13900
	6.0 mg/kg	6	16200	3320	15900	20.5	15800	11800	20000
	10.0 mg/kg	6	17700	1330	17700	7.5	17700	16500	19000
AUEC _{0-inf} = 시간 0으로부터 최종 0이 아닌 농도의 시간까지 약물 효과 대 시간 곡선하 면적; E _{max} = 최대 약물 효과									

[0273]

베돌리주맙은 베돌리주맙이 혈청 내에서 측정가능한 모든 시점에 거의 최대로 PD 변수, Act-1 및 MAdCAM-1-Fc를 억제하였다, 일단 베돌리주맙 농도가 분석의 검출 한계 미만으로 감소된다면, Act-1 및 MAdCAM-1-Fc의 억제는 거의 기준 수준으로 되돌아갔다.

[0274]

베돌리주맙에 대해 HAHA가 발생한 일부 피험체에서, 각 용량 수준에서 HAHA-음성 피험체와 비교하여 α4β7 수용체 포화의 더 빠른 손실을 관찰하였다.

[0275]

안전성 결과

[0276]

베돌리주맙은 일반적으로 안전했고, 10.0 mg/kg까지 1회 IV 용량에서 잘 관용되었다. 연구 동안 사망, 심각한 부작용(serious adverse event: SAE) 또는 연구 중단을 야기하는 AE는 발생하지 않았다.

[0277]

면역원성/인간 항인간 항체(HAHA) 제형

[0278]

위약 그룹에서 1명(10%)의 피험체 및 조합된 베돌리주맙 투약 그룹에서 21명(54%) 피험체는 연구 동안 일부 시점에 양성 HAHA를 가졌다. 양성 HAHA 샘플이 모든 투약 코호트에서 관찰되었지만, >125 HAHA 역가는 2개의 가장 낮은 베돌리주맙 투약 그룹에서만 발견되었다. HAHA 제형의 용량-의존적 억제는 베돌리주맙에 의해 사전에 관찰되었다. HAHA-양성인 22명의 베돌리주맙-처리 피험체 19명은 중화 HAHA 존재를 가졌다.

표 23

[0279]

인간 항인간 항체 발견의 개요: 안전성 집단							
	위약 N=10	0.2 mg/kg 베돌리주맙 N=8	0.5 mg/kg 베돌리주맙 N=7	2.0 mg/kg 베돌리주맙 N=8	6.0 mg/kg 베돌리주맙 N=8	10.0 mg/kg 베돌리주맙 N=8	조합된 베돌리주맙 N=39
시험한 피험체	10	8	7	8	8	8	39
임의의 HAHA 양성, n(%)	1 (10)	6 (75)	4 (57)	2 (25)	3 (38)	6 (75)	21 (54)
가장 높은 HAHA 역가<125, n(%)	1 (10)	4 (50)	2 (29)	2 (25)	3 (38)	6 (75)	17 (44)
가장 높은 HAHA 역가 ≥125, n(%)	0	2 (25)	2 (29)	0	0	0	4 (10)
임의의 중화 HAHA 양성, n(%)	0	5 (63)	4 (57)	2 (25)	3 (38)	5 (63)	19 (49)

가장 높은 중화 HAHA 역가<125, n(%)	0	3 (38)	2 (29)	2 (25)	3 (38)	5 (63)	15 (38)
가장 높은 중화 HAHA 역가 ≥25, n(%)	0	2 (25)	2 (29)	0	0	0	4 (10)

[0280] 위약 그룹에서 1명의 피험체 및 베돌리주맙 그룹에서 11명의 피험체가 지속적으로 HAHA-양성이었다.

표 24

[0281]

전반적인 인간 항인간 항체 상태(안전성 집단)							
	위약 N=10	0.2 mg/kg 베돌리주맙 N=8	0.5 mg/kg 베돌리주맙 N=7	2.0 mg/kg 베돌리주맙 N=8	6.0 mg/kg 베돌리주맙 N=8	10.0 mg/kg 베돌리주맙 N=8	조합된 베돌리주맙 N=39
HAHA 음성 ^a n(%)	9 (90)	2 (25)	3 (43)	6 (75)	5 (63)	2 (25)	18 (46)
단리된 HAHA ^b n(%)	0	2 (25)	1 (14)	1 (13)	1 (13)	5 (63)	10 (26)
지속적 HAHA ^c n(%)	1 (10)	4 (50)	3 (43)	1 (13)	2 (25)	1 (13)	11 (28)
a HAHA 음성: 양성 HAHA 결과가 없는 피험체 b 단리된 HAHA: <25의 역가를 지니는 단지 1개의 양성 HAHA 샘플을 지니는 피험체 c 지속적 HAHA: 2 이상의 양성 HAHA 샘플 또는 25의 역가를 지니는 1개의 양성 샘플							

[0282] 결론

[0283] 이 1상 연구는 PK/PD 및 CHO 세포로부터 유래된 베돌리주맙의 초기 안전성 프로파일을 특성규명하였다. 염증성 장 질환에서 3상 중심축 시험(pivotal trial)에 대한 용량 선택을 뒷받침하기 위해 이 연구의 결과를 사용하였다.

[0284] 베돌리주맙은 C_{max} 변수에 대해 시험한 용량 범위에 대한 용량 비례를 증명하였지만; AUC_{0-inf}, CL, V_z 및 t_{1/2}에서 용량-의존적 변화를 0.2 내지 2.0 mg/kg에서 관찰하였는데, 이는 베돌리주맙의 비선형 PK 거동을 시사한다. 2.0 mg/kg 초과 용량 수준에서, 이들 변수에 추가 변화는 관찰되지 않았는데, 이는 저농도에서 베돌리주맙에 대해 빠른 제거 처리의 포화를 시사한다. 더 느린 선형 제거는 더 높은 용량에서 베돌리주맙의 클리어런스의 거대 분율을 고려할 수 있게 한다.

[0285] 베돌리주맙은 베돌리주맙이 혈청에서 측정가능할 때, 모든 시점에 최대 수준으로 또는 거의 최대 수준으로 PD 변수, Act-1 및 MAdCAM-1-Fc를 억제하였다. 일단 베돌리주맙 농도가 분석의 검출한계 미만으로 감소되면, Act-1 및 MAdCAM-1-Fc의 억제는 거의 기준 수준으로 되돌아갔다.

[0286] 베돌리주맙에 대해 HAHA가 발생한 일부 피험체에서, 각 투약 수준 내에서 HAHA-음성 피험체와 비교하여 베돌리주맙의 더 빠른 클리어런스 및 α4β7 수용체 포화의 손실을 관찰하였다.

[0287] 베돌리주맙은 잘-관용되었다. 연구 동안 사망, SAE 또는 연구 중단을 야기하는 AE는 발생하지 않았고, 어떤 용량-독성 관계도 관찰되지 않았다. 전신 기회 감염(PML을 포함) 또는 신생물(neoplasm)은 보고되지 않았다.

[0288] 비특이적 α4 길항물질과 달리, 베돌리주맙은 림프구증가증 또는 순환 호산구, 호염구 또는 단핵구의 평균 증가와 관련되지 않았고, 림프구 고갈의 증거도 없었다.

[0289] 베돌리주맙은 HAHA의 형성을 유발하였지만, 2개의 가장 낮은 용량 그룹에서만 가장 높은 역가(>125)가 관찰되었고, 이 발견점은 이전의 면역원성의 용량-의존적 감소의 관찰을 뒷받침한다. 이들 데이터는 고용량의 베돌리주맙이 임상적으로 유의한 HAHA 형성을 최소화할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0290] 결론적으로, 베돌리주맙은 건강한 피험체에게 0.2 내지 10.0 mg/kg의 1회 용량으로 투여될 때, 일반적으로 안전하며 잘 관용된다.

- [0291] 실시예 6: CD4:CD8 비에 대한 베돌리주맵 효과의 결정
- [0292] 18 내지 45세의 건강한 피험체를 10% 수크로스의 동결건조된 제형으로부터 재구성된 1회 450mg 용량의 베돌리주맵으로 처리하였고, 0.9% 식염수의 주입 시스템 내로 희석시켰다. 뇌척수액(Cerebrospinal fluid: CSF)을 베돌리주맵의 1회 450mg 투약 전 및 투약 5주 후 요추천자에 의해 수집하였다. 각각의 피험체는 그/그녀 자신이 대조군의 역할을 한다.
- [0293] 나탈리주맵으로 처리한 MS를 지니는 환자가 CSF CD4+:CD8+ 림프구 비 상의 효과 및 단지 1회 투약 후 다수의 뇌병변의 감소를 증명한다는 것을 나타낸 이전의 연구를 기반으로 5-주 시점을 선택하였고(Stuve et al. *Arch Neurol*.2006;63:1383-1387; Stuve et al. *Ann Neurol*. 2006;59:743-747. Miller et al. *N Engl J Med*. 2003;348(1):15-23); 또한 5주이기 때문에, 베돌리주맵의 450-mg 용량은 표적을 포화시키는 것에 충분하며, 4주마다 300mg의 3상 투약 요법과 관련된 추정된 정상-상태 트로프 수준을 초과한 혈청 농도를 제공한다.
- [0294] 면역 표현형검사(immunophenotyping)를 위해 대략 15ml CSF를 각 피험체로부터 얻었다. 분석을 위해, 다음의 기준: 샘플 당 ≤ 10 RBC/ μ l(말초 혈액 오염물을 최소화하기 위함); 음성 CSF 배양 결과; 각각의 유세포 샘플에서 적절한 T-림프구 수; 및 베돌리주맵에 대해 혈청 항체의 검출 없음을 충족시킨다면, CSF 샘플을 포함하였다.
- [0295] 제5주 중앙값($34.80 \mu\text{g/ml}$) 및 개개의 피험체 혈청 베돌리주맵 농도(24.9 내지 $47.9 \mu\text{g/ml}$ 범위)는 3상 투약 요법에 대해 예상된 정상-상태 트로프 농도($\sim 24 \mu\text{g/ml}$)보다 더 높았다. MAdCAM-1-Fc에 의해 측정된 바와 같이 제5주에 높은 정도의($>90\%$) $\alpha 4\beta 7$ 수용체 포화도를 관찰하였고, 이는 종말점 평가 시간에 그의 표적의 베돌리주맵 포화를 나타낸다.
- [0296] 베돌리주맵은 어떤 CSF 샘플에서도 검출되지 않았다(검출한계 = $0.125 \mu\text{g/ml}$).
- [0297] CD4+ 및 CD8+ T 림프구 수 및 비에 대한 효과
- [0298] 베돌리주맵은 CD4+:CD8+ 비를 유의하게 감소시키지 않았다(표 25). 피험체 중 누구도 투약후 CD4+:CD8+ 비 <1 를 가지지 않았다($p < 0.0001$ (1-측 t-검정)). 베돌리주맵은 CSF에서 CD4+ 또는 CD8+ T 림프구의 수를 유의하게 감소시키지 않았다. 추가로, CSF % CD4+ 및 % CD8+ T 림프구에서 유의한 변화가 없었다(표 26). 또한, 말초혈액 WBC, CD4+ 및 CD8+ 기억 T 림프구에서 유의한 변화(표 27)는 관찰되지 않았다.

표 25

[0299]

CSF CD4+:CD8+ 비에 대한 치료 효과(평가가능한 집단, n=13)			
	기준	제5주	CD4+:CD8+ 비 차이†
CD4+:CD8+ 비 평균(SE) 범위	3.59 (0.273) 1.53-5.67	3.60 (0.265)* 1.42-5.15	0.01 (0.197)
비에 대한 90% 2-측 CI	3.00-4.19	3.132, 4.077	
비에 대한 90% 2-측 차이			-0.337, 0.363
CI=신뢰구간 * $p < 0.0001$ ($H_0: \mu < 1$ vs $H_1: \mu \geq 1$ 에 대한 단측 1 샘플 t-검정). †차이는 5주 비 - 기준 비로서 정의함			

표 26

[0300]

CSF CD4+ 및 CD8+ 계측에 대한 치료 효과(평가가능한 집단, n=13)		
	기준	제5주
림프구의 %로서 CD4+, 평균(SD)	75.160 (7.3831)	74.215 (6.3732)
림프구의 %로서 CD8+, 평균(SD)	22.272 (5.4320)	22.007 (6.1624)

표 27

[0301]

말초혈액 기억 T 림프구(R0+) 계측(평가가능한 집단, n=13)		
	기준	제5주
	평균(SD)	평균(SD)
CD4+CD45RO+	27.85 (4.98)	27.06 (5.02)
CD8+CD45RO+(%)	11.24 (3.40)	10.78 (2.98)

- [0302] 요약
- [0303] 베돌리주맵은 단일 450mg 투약 후 건강한 지원자에서 CSF CD4+ 및 CD8+ 세포수 또는 CD4+:CD8+ 비에 영향을 미치지 않았다. 피험체 중 누구도 투약후 CSF CD4+:CD8+ 비가 1 미만으로 감소되지 않았다. 베돌리주맵은 CSF에서 검출되지 않았다. 추가로, 말초 혈액에서 전체 WBC 또는 기억 T 림프구 CD4+ 및 CD8+ 서브세트에서 변화가 관찰되지 않았다. 혈액 내 표적($\alpha 4\beta 7$)의 포화는 종말점 평가 시점에 모든 피험체에서 생겼다. CSF CD4+ 및 CD8+ 림프구 수준 및 비는 문헌에서 이전에 보고한 것과 유사하였다.
- [0304] 이들 결과는 원숭이의 생리적 CNS 면역 감시와 병리적 CNS 염증 둘 다에 대한 베돌리주맵 효과의 기여와 일치된다(실시에 4 참조).
- [0305] 실시예 7: IBD의 치료를 위해 베돌리주맵에 의한 장기간 임상 경험
- [0306] 2상 개방-표지 안전성연장 연구를 장기간 약동학적(PK), 약력학적(PD), 안전성 및 베돌리주맵의 효능을 평가하기 위해 완료하였다. 환자는 18세 내지 75세였고, 이전에 궤양성 대장염 환자에서 초기 PK/PD/안전성 연구에 참가하였거나, 스크리닝의 36개월 내에 내시경적으로 및/또는 조직병리학적으로 및/또는 방사선적으로 확인한 적어도 2개월 동안의 IBD 증상을 가졌다.
- [0307] 모든 환자에게 제1일, 제15일 및 제43일에 2 mg/kg 또는 6 mg/kg의 베돌리주맵(5 mg/ml 항체, 20mM 시트레이트/시트르산, 125mM 염화나트륨, 0.05% 폴리솔베이트 80, pH 6.0(장기간 -70℃ 및 3 내지 -20℃까지 저장함)) 다음에 전체 78주까지 8주마다 용량의 정맥내 투약 요법으로 투여하였다. 환자는 더 조기의 임상 시험에 참여한 치료-나이프(naive) 궤양성 대장염 또는 크론병 환자였다.
- [0308] 효능/삶의 질(quality of life: QoL); 부분적 마요 스코어(partial Mayo score: PMS), 크론병 활동 지수(Crohn's disease activity index: CDAI) 및 염증성 장질환 질문지(Inflammatory Bowel Disease Questionnaire: IBDQ)를 사용하여 연구 결과를 평가하였다.
- [0309] PK 결과
- [0310] 평균 사전-주입 베돌리주맵 농도는 용량 비례하였고, 연구 내내 정상 및 검출가능하게 남아있었다.
- [0311] PD 결과
- [0312] 수용체(%ACT-1 + [CD4+CD45RO HIGH] 및 % MADCAM + [CD4+CD45RO HIGH]는 모든 용량 수준에서 연구 기간 내내 거의 완전하게 억제되었다.
- [0313] 부분적 마요 스코어
- [0314] 기준 평균 PMS는 궤양성 대장염 롤오버(rollover) 환자(2.3)에 대해서보다 치료-나이프 궤양성 대장염 환자(5.4)에 대해 더 높았다. 제43일까지, 평균 PMS는 롤오버 및 치료-나이프 궤양성 대장염 환자 둘 다에 대해 뚜렷한 감소를 나타내었다. 제155일까지, 두 그룹의 평균 스코어는 유사하였다. 평균 PMS는 267일 내내 계속해서 감소되었고, 그 후에 변동이 없었다.
- [0315] 크론병 활동 지수
- [0316] CD 환자의 평균 CDAI는 기준의 294.6으로부터 제43일에 237.7로 감소되었고, 155일 내내 계속해서 감소되었다(156.1).
- [0317] IBDQ
- [0318] 궤양성 대장염 롤오버 환자는 기준에서 가장 높은 평균 IBDQ 스코어를 가졌다. 제43일까지, 평균 IBDQ 스코어는 모두 3개의 질병 그룹에서 증가되었다. 평균 IBDQ 스코어는 모두 3개의 질병 그룹에서 시간에 따라 계속해서 증가되었고, 크론병 환자에 대해 제155일에 그리고 치료-나이프 궤양성 대장염 환자 및 궤양성 대장염 롤오버 환자에 대해 제491일에 최대로 도달되었다.
- [0319] C-반응성 단백질
- [0320] 궤양성 대장염 롤오버와 크론병 환자는 둘 다155일 내내 감소된 평균 CRP 수준을 나타내었고, 그 다음에 변동이 없었다. 치료-나이프 궤양성 대장염 환자는 궤양성 대장염 롤오버 환자보다 기준에서 더 낮은 평균 CRP 수준을 가졌다(2.28 대 7.09). 치료-나이프 궤양성 대장염 환자의 평균 CRP 수준은 평가한 모든 시점에 상대적으로 일

정하게 남아있었다.

다른 안전성 결과

연구 동안 전신 기회적 감염(PML을 포함)이 없다는 것을 보고하였다. 한 명의 환자는 단일 시점에 JC 바이러스 혈증에 대해 양성으로 시험하였고, 트로프는 모든 다른 시점에 JCV에 대해 음성이었다. 72명 환자 중 3명(4%)은 양성 HAHA 결과를 가졌다(이들 중 2명은 일시적으로 양성이었음). 연구는 간 독성, 림프구증가증 또는 림프구감소증 또는 임의의 다른 약물-관련 실험실 변화의 증거가 없다는 것을 나타내었다.

결론

78주까지 8주마다 1회 2.0 또는 6.0 mg/kg를 투여한 베돌리주맵은 표적 수용체 포화를 이루었고, 질병 활성의 지속적 평균 감소 및 개선된 IBDQ 스코어와 관련되었으며, 일반적으로 안전하였고, 잘 관용되며, 허용가능한 면역원성을 증명하였다.

실시예 8: 보통 내지 중증의 활성 크론병을 지니는 환자에서 반응 및 관해의 유도

6주(2회 투약--제0주 및 제2주 후) 및 10주에(3회 투약 후) TNF α 길항물질 부전 환자에서 300mg 용량에서 베돌리주맵(pH 6.3에서 50mM 히스티딘, 125mM 알기닌, 0.06% 폴리솔베이트 80, 10% 수크로스 중의 60 mg/ml 항체 제형으로부터 재구성, 동결건조됨)의 유도 효과를 평가하기 위해 무작위, 이중맹검, 위약 제어 다기관 연구를 완료하였다. 연구는 416명의 환자로 이루어지는데, 이들 중 75%는 TNF α 길항물질 부전이고, 이들 중 25%는 TNF α 나이브였다. 인구통계학적 및 협잡물(concomitant) IBD 의약은 치료군에 걸쳐 균형 잡혀 있었다. 기준 질병 특징은 기준 질병 활성을 제외하고 치료군에 걸쳐 균형 잡혀 있었다.

연구를 위해 지정한 1차 종말점은 항-TNF- α 길항물질 부전 집단에서 6주 관해(%)였다. 평가한 중요한 2차 종말점(순차적 시험 절차)은 전체 집단에서 6주 관해(%), 항-TNF- α 길항물질 부전 및 전체 집단에서 10주 관해(호크버그(Hochberg) 과정 사용), 항-TNF- α 길항물질 부전 및 전체 집단에서 6주 및 10주 지속된 관해(호크버그 과정 사용) 및 항-TNF- α 길항물질 부전 집단에서 6주 향상된 반응(%)이었다.

표 28

기준 CDAI:			
	위약	베돌리주맵	p-값
TNF ITT: 평균(표준 편차)	306.1 (55.43)	316.1 (52.63)	0.0945
전체 ITT: 평균(표준 편차)	301.3 (54.97)	313.9 (53.17)	0.0153

표 29

유도 연구 결과: 1차 및 중요한 2차 종말점								
종말점	TNF ITT (N=315)				전반적 ITT (N=416)			
	PLA N=157	베돌리 주맵 V=158	차이 (RR)	P-값	PLA N=207	베돌리주 맵 N=209	차이(RR)	P-값
1차 6주 관해	12.1%	15.2%	3.0% (1.2)	0.4332				
제1 2차 6주 관해					12.1%	19.1%	6.9% (1.6)	0.0478
제2 2차 10주 관 해	12.1%	26.6%	14.4% (2.2)	0.0012	13%	28.7%	15.5% (2.2)	<0.0001
지속된 관해(6주 와 10주 둘 다)	8.3%	12.0%	3.7% (1.4)	0.2755	8.2%	15.3%	7% (1.9)	0.0249
향상된 반응 (CDAI100)	22.3%	39.2%	16.9% (1.8)	0.0011				

표 30

항-TNF- α 길항물질 나이브 환자에서 결과(n=101, 전체의 24%)				
	위약%	베돌리주맵%	차이%	95% CI
관해 6주	12	31.4	19.1	(3.3, 35.0)

관해 10주	16	35.3	19.2	(2.4, 35.8)
--------	----	------	------	-------------

표 31

연구 결과: 제6주 및 제10주에 임상적 관해, 중요한 하위 그룹- 이전의 Tx 부전, ITT 전체					
하위 그룹	변수	위약	베돌리주맙	차이	95% CI
임의의 사전 항-TNF 부전(ITT의 75%)	N	156	155		
	6주 관해(%)	12.8	14.8	2	(-5.7, 9.7)
	10주 관해(%)	12.8	26.5	13.6	(4.9, 22.3)
사전 면역조절제 부전 그러나 항-TNF 부전 없음(21% ITT)	N	45	44		
	6주 관해(%)	11.1	31.8	20.7	(-0.5, 39.7)
	10주 관해(%)	15.6	31.8	16.3	(-1.1, 33.6)
사전 코르티코스테로이드 부전 단독(3% ITT)	N	5	9		
	6주 관해(%)	0	33.3	33.3	(-23.9, 75.7)
	10주 관해(%)	0	44.4	44.4	(-13.4, 85.3)

연구는 TNF- α 길항물질 부전 환자는 관해의 유도를 위해 3회 투약을 필요로 한다는 것을 나타내었다. TNF- α 길항물질 부전 환자에서뿐만 아니라 베돌리주맙 그룹에서 관해 비율은 제6주 내지 제10주 사이에 증가되었다(위약 없음). TNF- α 길항물질 나이브 환자에 대한 관해 비율은 제6주 내지 제10주 사이에 실질적으로 증가되지 않았다. 높은 정도의 질량 중증도를 지니는 TNF- α 길항물질 부전 집단 중에서, 43%는 TNF- α 길항물질에 반응하지 않았지만, 45%는 반응이 상실되지 않았다.

실시에 9: 보통 내지 중증의 활성 궤양성 대장염을 지니는 환자에서 반응 및 관해의 유도 및 유지

2 무작위, 이중맹검, 다-기관 연구를 포함하는 단일 시험을 보통 내지 중증의 활성 궤양성 대장염을 지니는 환자에서 반응 및 관해의 유도 및 유지를 평가하기 위해 설계하였다. 인구 통계학적 및 기준 질병 특징은 모든 처리군에 걸쳐서 비슷하였다.

정맥내 투여를 사용하는 유도 연구는 pH 6.3에서 50mM 히스티딘, 125mM 알기닌, 0.06% 폴리솔베이트 80, 10% 수크로스 중의 60 mg/ml 항체의 동결건조된 제형으로부터 재구성된 300mg 용량에서 베돌리주맙에 대한 위약을 2회 투약의 베돌리주맙 후 6주에 종말점과 비교하였다.

유도 연구로서 동일 제형 및 투여 경로를 사용하는 유지 연구를 4주마다 투약한 베돌리주맙에 대한 위약 및 8주마다 투약한 베돌리주맙에 대한 위약과 비교하였다. 각각의 환자는 18 내지 80세였고, 보통 내지 중증으로 활성인 궤양성 대장염으로 진단되었으며; 이전의 5년 기간에 걸쳐 적어도 한 종의 통상적인 치료제(예를 들어, 코르티코스테로이드)에 대해 부적절한 반응, 또는 통상적인 치료제에 대해 반응의 손실, 또는 통상적인 치료제에 대한 불내성을 증명하였고; IBD에 대한 통상적인 치료제의 치료적 용량을 투여받을 수 있었다. 이 연구의 종말점은 유도 반응자 집단을 분석하는 52주였다. 시험의 상은 둘 다 그의 1차 종말점, 즉 유도의 임상적 반응 및 유도의 임상적 관해를 충족시킨다.

베돌리주맙 농도를 측정하기 위해 연구 동안 혈액 샘플을 수집하였다. 유도 단계의 마지막에 베돌리주맙의 평균 혈청 농도는 20 내지 30 $\mu\text{g/ml}$ 였다. 300mg 용량 투여의 30분 IV 주입 후 정상 상태에서 평균 베돌리주맙 트로프 혈청 농도는 8주마다의 요법 동안 9 내지 13 $\mu\text{g/ml}$ 였고, 4주마다의 요법 동안 35 내지 40 $\mu\text{g/ml}$ 였다. 주입의 마지막에, 베돌리주맙 중앙값 혈장 농도는 8주마다의(제8주) 요법 동안 98 내지 101 $\mu\text{g/ml}$ 였고, 4주마다의(제4주) 요법 동안 대략 129 내지 137 $\mu\text{g/ml}$ 였다.

유도 및 유지 연구 반응의 요약을 표 32 내지 35에 제공한다. 상당히 더 큰 비율의 베돌리주맙-처리 환자는 위약과 비교하여 6주에 임상적 반응, 관해 및 점막 치유를 달성하였다(표 32). 39%의 유도 단계 치료 의도(intent-to-treat) 집단은 사전의 항-TNF α 부전을 가졌다. 임상적 반응 및 관해율은 사전의 항-TNF 부전을 지니는 환자와 사전의 항-TNF 노출이 없는 환자 둘 다 중에서 위약 환자보다 베돌리주맙이 더 높았다. 6주 내내 예비 분석에서, 부작용(adverse event: AE)의 비율, 심각한 AE 및 연구 중단을 야기하는 부작용은 베돌리주맙 그룹보다 위약 그룹에서 더 높았다. 위약 환자보다 베돌리주맙 환자의 상당히 더 높은 비율은 52주에 임상적 관해, 점막 치유 및 무-코르티코스테로이드 관해 및 지속적 반응 및 관해를 이루었다(표 33). 32%의 유지 연구 집단은 사전의 항-TNF α 부전을 가졌다. 임상적 관해 및 지속적 임상적 반응률은 TNF 부전과 TNF 나이브 환자 둘 다에서 위약보다 베돌리주맙에 의해 더 높았다. 제0주 내지 제52주 동안 안전성 집단(N=895)에서, 부작용(AE)의

비율, 심각한 AE 및 심각한 감염은 베돌리주맙 그룹과 위약 그룹 간에 유사하였다. 기회감염 또는 장 감염 속도의 증가는 베돌리주맙 그룹에서 관찰되지 않았다.

표 32

[0339]

유도 연구 결과- 1차 및 중요한 2차 종말점				
효능 종말점	위약	베돌리주맙	차이/RR	P값
임상적 반응(%)	25.5%	47.1%	21.7%/1.8	<0.0001
임상적 관해(%)	5.4%	16.9%	11.5%/3.1	0.0010
점막 치유(%)	24.8%	40.9	16.1%/1.6	0.0013

표 33

[0340]

유지 연구 결과- 1차 및 중요한 2차 종말점					
효능 종말점	위약 N=126	베돌리주맙 Q8 N=122	베돌리주맙 Q4 N=125	차이/RR Q8 대 위약 Q4 대 위약	P 값
임상적 관해(%)	15.9	41.8	44.8	26.1/2.7 29.1/2.8	<0.0001 <0.0001
지속적 반응(%)	23.8	56.6	52.0	32.8/2.4 28.5/2.2	<0.0001 <0.0001
점막 치유(%)	19.8	51.6	56.0	32.0/2.6 36.3/2.8	<0.0001 <0.0001
지속적 관해(%)	8.7	20.5	24.0	11.8/2.4 15.3/2.8	0.0090 0.0011
무-콜티코스테로이드 관해(%)	13.9 n=72	31.4 n=70	45.2 N=73	17.6/2.3 31.4/3.3	0.0133 <0.0001

표 34

[0341]

유도 연구: 사전 항-TNF-α 길항물질 부전을 지니는 환자 및 항-TNF 노출이 없는 환자, ITT 집단에서 6주에 임상적 반응 및 관해				
사전 항-TNF-α 길항물질 부전을 지니는 환자(39%)				
종말점	위약 N=63	베돌리주맙 N=82	차이	95% CI
임상적 반응(%)	20.6	39.0	18.4	3.9, 32.9
임상적 관해(%)	3.2	9.8	6.6	-9.8, 22.8
항-TNF-α 길항물질 노출이 없는 환자(55%)				
	위약 N=76	베돌리주맙 N=130	차이	95% CI
임상적 반응(%)	26.3	53.1	26.8	13.7, 39.9
임상적 관해(%)	6.6	23.1	16.5	2.4, 30.2

표 35

[0342]

52주에 임상적 관해 및 지속적 임상적 반응: 사전 항-TNF-α 길항물질 부전이 있거나 또는 항-TNF-α 길항물질 노출이 없는 환자, ITT 집단					
사전 항-TNF-α 길항물질 부전이 있는 환자(32%)					
종말점	위약 N=38	8주마다 베돌리주맙 N=43	4주마다 베돌리주맙 N=40	8주마다 대 위약 4주마다 대 위약 차이	95% CI

임상적 관해(%)	5.3	37.2	35.0	31.9 29.7	10.3, 51.4 7.4, 49.4
지속적 임상적 반응(%)	15.8	46.5	42.5	30.7 26.7	11.8, 49.6 7.5, 45.9
항-TNF- α 길항물질 노출이 없는 환자(60%)					
	위약 N=79	8주마다 베돌리주맙 N=72	4주마다 베돌리주맙 N=73	8주마다 대 위약 4주마다 대 위약 차이	95% CI
임상적 관해(%)	19.0	45.8	47.9	26.8 29.0	12.4, 41.2 14.6, 43.3
지속적 임상적 반응(%)	26.6	65.3	56.2	38.7 29.6	24.0, 53.4 14.6, 44.6

[0343] 실시예 10: 보통 내지 중증의 활성 크론병을 지니는 환자에서 반응 및 관해의 유도 및 유지

[0344] 보통 내지 중증의 활성 크론병을 지니는 환자에서 반응 및 관해의 유도 및 유지를 평가하기 위해 2 무작위, 이중맹검, 다기관 연구를 포함한 단일 시험을 설계하였다. 인구통계학적 및 기준 질병 특징은 모든 치료군에 걸쳐서 유사하였다.

[0345] 유도 연구에서, 정맥내 투여를 사용하여 베돌리주맙의 2회 투약 후 6주에 종말점으로 pH 6.3에서 50mM 히스티딘, 125mM 알기닌, 0.06% 폴리솔베이트 80, 10% 수크로스 중에서 60 mg/ml 항체의 동결건조된 제형으로부터 재구성된 300mg의 용량으로 베돌리주맙에 대해 위약을 비교하였다.

[0346] 유도 연구로서 동일 제형 및 투여 경로를 사용하는 유지 연구를 4주마다 투약한 베돌리주맙에 대해 위약을 그리고 8주마다 투약한 베돌리주맙에 대해 위약을 비교하였다. 이 연구의 종말점은 52주였고, 유도 반응자 집단을 분석하였다.

[0347] 놀랍게도, 이 연구는 Q4 및 Q8주 그룹이 매우 유사한 결과를 얻었다는 것을 나타내었다. 유도 및 유지 연구 반응의 용약을 표 36 내지 39에 제공한다. 상당히 더 큰 비율의 베돌리주맙-처리 환자는 위약과 비교하여 임상적 관해 및 향상된 반응을 이루었다(표 36). 임상적 관해 및 향상된 반응 속도는 사전 항-TNF 부전을 지니는 환자와 사전 항-TNF 노출이 없는 환자 둘 다에서 위약 환자보다 베돌리주맙에서 더 높았다. 부작용 비율(AE), 심각한 AE 및 심각한 감염은 베돌리주맙과 위약 그룹 간에 유사하였다. 베돌리주맙 그룹에서 기회감염 또는 장 감염 속도 증가는 관찰되지 않았다.

표 36

[0348]

유도 연구 결과- 1차 및 2차 종말점				
종말점	위약 N=148	베돌리주맙	조절된 차이/RR	P 값
임상적 관해(%)	6.8%	14.5%	7.8%/2.1	0.0206
향상된 반응(%)	25.7%	31.4%	5.7%/1.2	0.2322
평균 CRP 변화($\mu\text{g/ml}$)	-3.6 N=147	-2.9 N=220		0.9288

표 37

[0349]

유지 연구 결과 - 1차 및 중요한 2차 종말점					
효능 종말점	위약 N=153	베돌리주맙 Q8 N=154	베돌리주맙 Q4 N=154	조절된 차이/RR Q8 대 Pb Q4 대 Pb	P 값
임상적 관해(%)	21.6	39.0	36.4	17.4/1.8 14.7/1.7	0.0007 0.0042
향상된 반응(%)	30.1	43.5	45.5	13.4/1.4 15.3/1.5	0.0132 0.0053
무 코르티코스테로이드 관해(%)	15.9 N=82	31.7 N=82	28.8 N=80	15.9/2.0 12.9/1.8	0.0154 0.0450

지속적 관해(%)	14.4	21.4	16.2	7.2/1.5 2.0/1.1	0.1036 0.6413
-----------	------	------	------	--------------------	------------------

표 38

[0350]

사전 항-TNF- α 길항물질 부전을 지니는 환자와 항-TNF 노출이 없는 환자에서 6주에 임상적 관해 및 향상된 반응, ITT 집단				
사전 항-TNF- α 길항물질 부전을 지니는 환자(48%)				
종말점	위약 N=70	베돌리주맵 N=105	차이	95% CI
임상적 관해 (%)	4.3	10.5	6.2	(-9.1, 21.3)
향상된 반응(%)	22.9	23.8	1.0	(-11.8, 13.7)
항-TNF- α 길항물질 노출이 없는 환자(50%)				
	위약 N=76	베돌리주맵 N=130	차이	95% CI
임상적 관해 (%)	9.2	17.4	8.2	(-1.4, 17.9)
향상된 반응 (%)	30.3	42.2	11.9	(-1.9, 25.8)

표 39

[0351]

52주에 임상적 관해 및 향상된 반응: 사전 항-TNF- α 길항물질 부전을 지니는 환자 또는 항-TNF- α 길항물질 노출이 없는 환자, ITT 집단					
사전 항-TNF- α 길항물질 부전을 지니는 환자(51%)					
종말점	위약 N=78	8주마다 베돌리주맵 N=82	4주마다 베돌리주맵 N=77	차이 8주마다 대 위약 4주마다 대 위약	95% CI
임상적 관해(%)	12.8	28.0	27.3	15.2 14.5	(3.0, 27.5) (2.0, 26.9)
향상된 반응(%)	20.5	29.3	37.7	8.8 17.1	(-4.6, 22.1) (3.1, 31.2)
항-TNF- α 길항물질 노출이 없는 환자(45%)					
	위약 N=71	8주마다 베돌리주맵 N=66	4주마다 베돌리주맵 N=71	차이 8주마다 대 위약 4주마다 대 위약	95% CI
임상적 관해(%)	26.8	51.1	46.5	24.8 19.7	(8.9, 40.6) (4.2, 35.2)
향상된 반응(%)	38.0	60.6	53.5	22.6 15.5	(6.3, 38.9) (-0.7, 31.7)

표 40

[0352]

서열의 요약		
서열번호	나타낸 서열	설명
1	도 1	인간화된 항- $\alpha 4\beta 7$ 면역글로불린의 중쇄를 암호화하는 DNA
2	도 1	인간화된 항- $\alpha 4\beta 7$ 면역글로불린의 중쇄의 아미노산 서열
3	도 2	인간화된 항- $\alpha 4\beta 7$ 면역글로불린의 경쇄를 암호화하는 DNA
4	도 2	인간화된 항- $\alpha 4\beta 7$ 면역글로불린의 경쇄의 아미노산 서열
5	도 3	LDP-02의 성숙 인간화된 경쇄
6	도 4	일반적 인간 카파 경쇄 불변 영역
7	도 4	일반적 뮤린 카파 경쇄 불변 영역
8	30페이지 참조 SYWMH	중쇄 마우스 ACT-1 항체의 CDR1

9	30페이지 참조 EIDPSESNTNYNQKFKG	중쇄 마우스 ACT-1 항체의 CDR2
10	30페이지 참조 GGYDGWDYAIDY	중쇄 마우스 ACT-1 항체의 CDR3
11	30페이지 참조 RSSQSLAKSYGNTYLS	경쇄 마우스 ACT-1 항체의 CDR1
12	30페이지 참조 GISNRFS	경쇄 마우스 ACT-1 항체의 CDR2
13	30페이지 참조 LQGTHQPYT	경쇄 마우스 ACT-1 항체의 CDR3
14	도 7	인간 GM607 CL 항체 카파 경쇄 가변 영역
15	도 7	인간 21/28 CL 항체 중쇄 가변 영역

[0353]

본 발명을, 그의 바람직한 실시형태를 참조하여 특별히 도시하고 기재하였지만, 당업자라면, 형태 및 세부사항의 다양한 변화가 첨부된 특허청구범위에 의해 포함되는 본 발명의 범주로부터 벗어나는 일 없이 이루어질 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다.

도면

도면1a

새로운 **LDP02** 중 **DNA** — 클로닝 부위 (소문자), 조각 서열 (대문자) 및 리더 (소문자)를 함유한다

```
gaattctcgagatcgatCTACCAatgggatggagctgtatcatcctcttcttgtagcaacagctacaggtgtccactcccag
gtgCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTTAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAA
GGTGTCTGCAAGGGTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCATTGGG
TGAGGCAGGCGCCTGGCCAACGTCTAGAGTGGATCGGAGAGATTGATCCTTC
TGAGAGTAATACTAACTACAATCAAAAATTCAAGGGACGCGTCACATTGACT
GTAGACATTTCCGCTAGCACAGCCTACATGGAGCTCTCCAGCCTGAGATCTG
AGGACACTGCGGTCTACTATTGTGCAAGAGGGGGTTACGACGGATGGGACTA
TGCTATTGACTACTGGGGTCAAGGCACCCTGGTCAACCGTCAGCTCAGCCTCCA
CCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG
GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA
CGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGC
TGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT
CCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAG
CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAACTCAC
ACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCGCGGGGGCACCGTCAGTCTTCC
TCTTCCCCCCTAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACT
GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG
AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA
GGACTGGCTGAATGGC
```


도면1b

AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGA
AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCT
GCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTG
GTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC
AGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTC
CTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG
AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA
GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAtaatctagagca

새로운 **LDP02** 중 단백질 (VHL, VH 및 인간 IgG1-FcRmut 사이의 공간)

MGWSCILFLVATATGVHS

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKSGSYTFTSYWMHWVRQAPGQRLEWIGEIDP
SENTNYNQKFKGRVTLTVDISASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYDGWDY
AIDYWGQGTTLTVSS

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSGFSFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK

도면2

새로운 **LDP02** 경 DNA - 클로닝 부위 (소문자), 코작 서열 (대문자) 및
리더 (소문자) 를 함유한다

gaattctcgatcgatCTACCAatgggatggagctgtatcatctcttcttgtagcaacagctacaggtgtccactccgat
GTAGTGATGACTCAAAGTCCACTCTCCCTGCCTGTCACCCCTGGAGAACCAGC
TTCTATCTCTTGACAGGTCTAGTCAGAGTCTTGCAAAGAGTTATGGGAACACCT
ATTTGTCTTGGTACCTGCAGAAGCCTGGCCAGTCTCCACAGCTCCTCATCTAT
GGGATTTCCAACAGATTTTCTGGGGTGCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGTT
CAGGGACAGATTTACACTCAAGATCTCGCGAGTAGAGGCTGAGGACGTGGG
AGTGTATTACTGCTTACAAGGTACACATCAGCCGTACACGTTCCGGACAGGGG
ACCAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC
GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGA
ATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCT
CCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAG
CACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAA
CACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCA
CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTtagtctagagcagc

새로운 **LDP02** 경 단백질 (VKL, VK 및 인간 C 카파 사이의 공간)

MGWSCILFLVATATGVHS

DVVMTQSPLSLPVTPEPASISCRSSQSLAKSYGNTYLSWYLQKPGQSPQLLIYGI
SNRFSGVPRDFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYCLQGTHQPYTFGQGTKVEI
K

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

도면3

장별 새로운MLN02-신호 없음

LDP-02-no sig.txt

```

A 1 DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLAKSYGNTYLSWYLQKPGQSPQ 50
  |||
B 1 DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLAKSYGNTYLSWYLQKPGQSPQ 50
  |||
51 LLIYGISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQGTHQP 100
  |||
51 LLIYGISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQGTHQP 100
  |||
101 YTFGQGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK 150
  |||
101 YTFGQGTKVEIKRADAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK 150
  |||
151 VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTISSTLTLSKADYKHKVYACE 200
  |||
151 VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYKHKVYACE 200
  |||
201 VTHQGLSSPVTKSFNRGEC 219
  |||
201 VTHQGLSSPVTKSFNRGEC 219
  |||

```

도면4

장별 홈 (Hum) 카파-상수

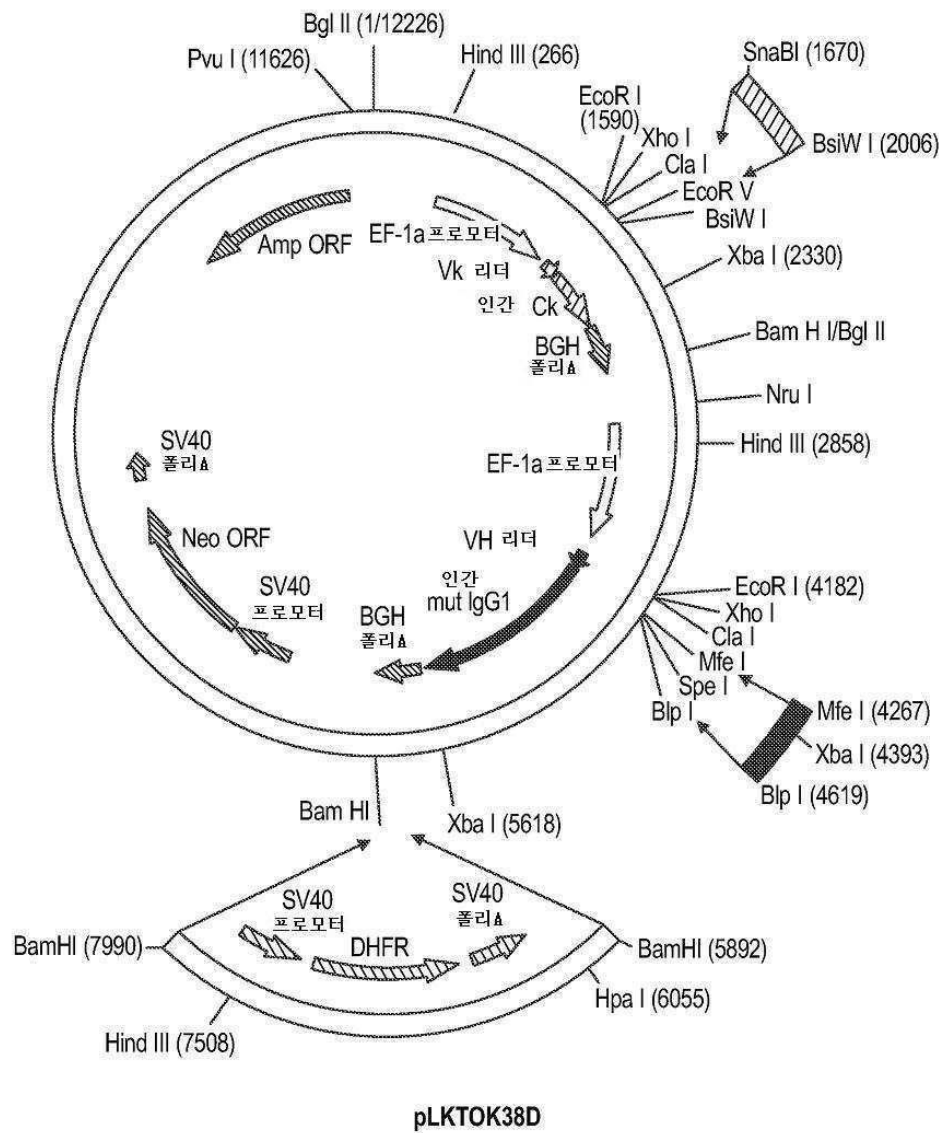
MI:Mur kappa-const.txt

```

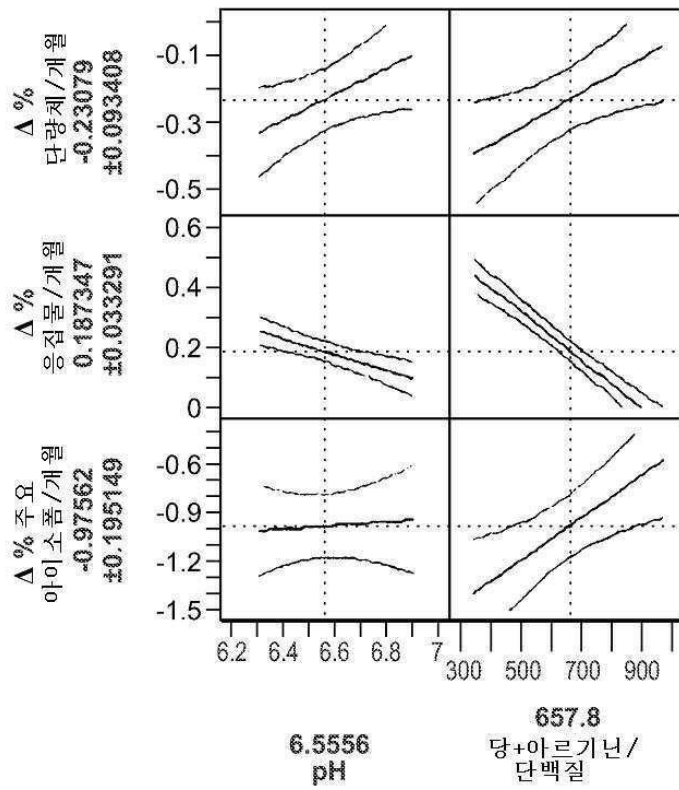
A 1 rtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcllnnfypreakvqwkvdnalqsg 50
  | |||. | ||||| ||| || ||||| |||||:: |.||:| . .
B 1 radaaptvsifppsseqltsggasvvcflnnfypkdinvkwkidgserqn 50
  |||
51 nsqesvteqdsksdstyslsstltlskadyekhkvyacevthqglsspvtk 100
  | |:|||||||:|||||. | :||:| | || ||. .||:|
51 gvlinswtdqdsksdstysmsstltltkdeyerhnsytceathktstspivk 100
  |||
101 sfnrgec 107
  |||| ||
101 sfnrnec 107

```

도면5

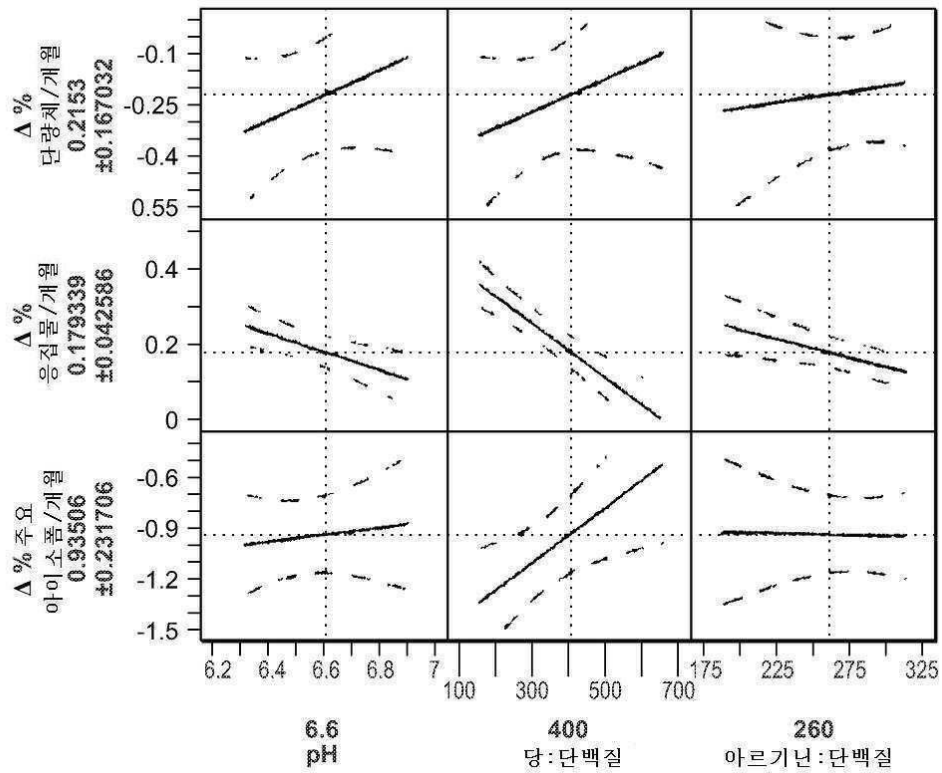


도면6a



도면6b

예측 프로파일러



도면7

GM607'CI 항체 카파 경쇄

가변영역

서열번호 14

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95
Leu Gln Thr Pro Gln Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

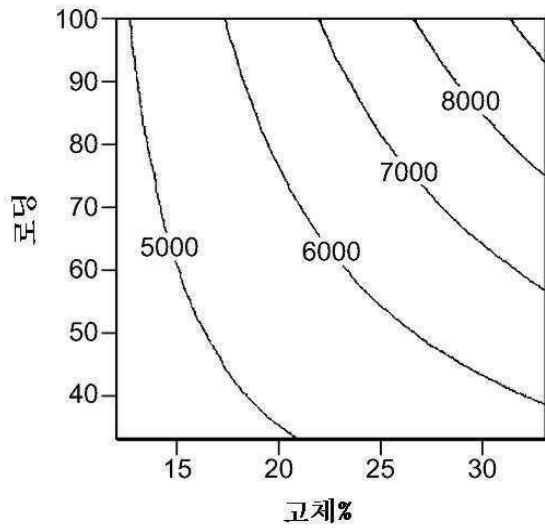
21/28'CL 항체 중쇄

가변영역

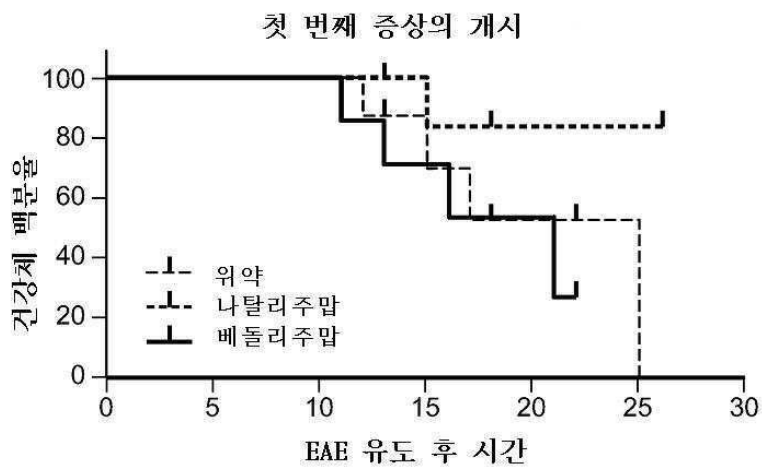
서열번호 15

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Asn Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

도면8



도면9



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.

<120> FORMULATION FOR ANTI-ALPHA-4-BETA-7 ANTIBODY

<130> 079259-0615

<140><141><150> 61/585,859

<151> 2012-01-12

<150> 61/550,545

<151> 2011-10-24

<150> 61/481,533

<151> 2011-05-02

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1445

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 1

gaattctcga gatcgatctc accatgggat ggagctgtat catcctcttc ttggtagcaa	60
cagctacagg tgtccactcc cagggtgcaat tgggtgcagtc tggggctgag gtaagaagc	120
ctggggcttc agtgaaggat tcttgcagg gtcttggtta caccttcacc agctactgga	180
tgcattgggt gaggcaggcg cctggccaac gtctagagtg gatcggagag attgatcctt	240
ctgagagtaa tactaactac aatcaaaaat tcaaggacg cgtcacattg actgtagaca	300
tttccgctag cacagcctac atggagctct ccagcctgag atctgaggac actgcggtct	360
actattgtgc aagagggggt tacgacggat gggactatgc tattgactac tggggtaag	420
gcacctggt caccgtcagc tcagcctcca ccaagggcc atcgggtctc cccctggcac	480
cctctccaa gagcacctct gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact	540
tccccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct	600
tcccggctgt cctacagtc tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct	660
ccagcagctt gggcacccag acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca	720
aggtggacaa gaaagttag cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc	780
cagcacctga actcgcgggg gcaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca	840
ccctcatgat ctcccgacc cctgaggta catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag	900
accctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa	960
agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgtgtggt cagcgtctc accgtcctgc	1020
accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag	1080
ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca	1140
ccctgcccc atcccggtat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtea	1200
aaggcttcta tcccagcagc atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca	1260

actacaagac cacgcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttcttc tacagcaagc 1320

tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg 1380

aggtctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaataatcta 1440

gagca 1445

<210> 2

<211> 470

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 2

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe

35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Ser Glu Ser Asn Thr Asn Tyr Asn

65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Ile Ser Ala Ser

85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Trp Asp Tyr Ala Ile Asp

115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys

130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly

145 150 155 160
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205

 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 210 215 220
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 225 230 235 240
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 245 250 255
 Leu Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270

 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 305 310 315 320
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 325 330 335

 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 340 345 350
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 370 375 380
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
405 410 415
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
420 425 430
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
435 440 445
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 3

<211> 751

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 3

gaattctcga gatcgatctc accatgggat ggagctgtat catcctcttc ttggtagcaa 60
cagctacagg tgtccaactcc gatgtagtga tgactcaaag tccactctcc ctgcctgtca 120
cccctggaga accagcttct atctcttgca ggtctagtca gagtcttgca aagagttatg 180
ggaacaccta tttgtcttgg tacctgcaga agcctggcca gtctccacag ctctctcatc 240

atgggatttc caacagattt tctggggtgc cagacaggtt cagtggcagt gggtcaggga 300
cagatttcac actcaagatc tcgcgagtag aggctgagga cgtgggagtg tattactgct 360
tacaaggtag acatcagccg tacacgttcg gacaggggac caaggtggag atcaagcgta 420
cgggtggctgc accatctgtc ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa 480
ctgcctctgt tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga 540
aggtggataa cgccctccaa tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca 600
aggacagcac ctacagcctc agcagcacc tgaccctgag caaagcagac tacgagaaac 660

acaaagtcta cgctgcgaa gtcacccatc agggcctgag ctgccccgtc acaaagagct 720
tcaacagggg agagtgttag tctagagcag c 751

<210> 4

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 4

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val

20 25 30

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu

35 40 45

Ala Lys Ser Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro

50 55 60

Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser

65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys

100 105 110

Leu Gln Gly Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val

115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro

130 135 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu

145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn

165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser

180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala

195 200 205
Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly

210 215 220
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230 235

<210> 5

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 5

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ala Lys Ser

20 25 30
Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly

85 90 95
Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

165 170 175

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

180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 7

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu

1	5	10	15
Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe			
20	25	30	
Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg			
35	40	45	
Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser			
50	55	60	
Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu			

65	70	75	80
Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser			
85	90	95	
Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys			
100	105		

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 8

Ser Tyr Trp Met His

1	5
---	---

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 9

Glu Ile Asp Pro Ser Glu Ser Asn Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1	5	10	15
Gly			

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 10

Gly Gly Tyr Asp Gly Trp Asp Tyr Ala Ile Asp Tyr

1 5 10

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 11

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ala Lys Ser Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Ser

1 5 10 15

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 12

Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 13

Leu Gln Gly Thr His Gln Pro Tyr Thr

1 5

<210> 14

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95
 Leu Gln Thr Pro Gln Thr Phe Gly Gln Gly Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 15

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Asn Tyr Trp Gly Gln Gly

100

105

110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115