(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2010년10월20일
(11) 등록번호 10-0989280
(24) 등록일자 2010년10월14일

(51) Int. Cl.
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-7020433
(22) 출원일자(국제출원일자) 2006년03월02일
심사청구일자 2007년09월06일
(85) 번역문제출일자 2007년09월06일
(65) 공개번호 10-2007-0100848
(43) 공개일자 2007년10월11일
(86) 국제출원번호 PCT/US2006/007555
(87) 국제공개번호 WO 2006/096491
국제공개일자 2006년09월14일
(30) 우선권주장
60/659,766 2005년03월08일 미국(US)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
US20030138417 A1*
KR1020040085185 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
파마시아 앤드 업존 캄파니 엘엘씨
미국 49001 미시건주 칼라마쭈 포티지 로드 7000
(72) 발명자
아바테 저스틴 도날드
미국 미주리주 63017 체스터필드 체스터필드 파크웨이 웨스트 700화이자 글로벌 리서치 앤드 디벨롭먼트
다스 타판 칸티
미국 미주리주 63017 체스터필드 체스터필드 파크웨이 웨스트 700화이자 글로벌 리서치 앤드 디벨롭먼트
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김창세, 장성구

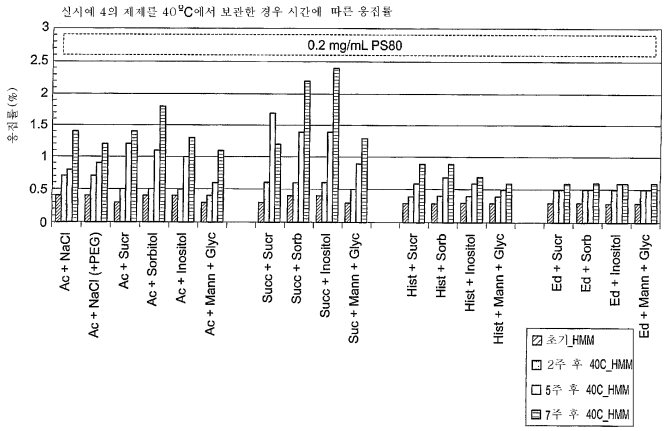
전체 청구항 수 : 총 3 항 심사관 : 박정민

(54) 항-C T L A-4 항체 조성물

(57) 요 약

본 발명은 킬레이트제를 포함하는, 신규한 항-CTLA-4 항체 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 신규한 항-CTLA-4 항체 조성물을 이용하여 다양한 네오플라시아 증상을 포함하는 여러 질병 및 증상을 치료하는 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

엘리엇 캐리 마리

미국 미주리주 63017 체스터필드 체스터필드 파크 웨이 웨스트 700화이자 글로벌 리서치 앤드 디벨롭먼트

무스라니아 케빈 와미티

미국 미주리주 63017 체스터필드 체스터필드 파크 웨이 웨스트 700화이자 글로벌 리서치 앤드 디벨롭먼트

네마 산딥

미국 미주리주 63017 체스터필드 체스터필드 파크 웨이 웨스트 700화이자 글로벌 리서치 앤드 디벨롭먼트

싱 새티쉬 쿠마

미국 미주리주 63017 체스터필드 체스터필드 파크 웨이 웨스트 700화이자 글로벌 리서치 앤드 디벨롭먼트

(30) 우선권주장

60/728,165 2005년10월19일 미국(US)

60/752,712 2005년12월20일 미국(US)

60/762,456 2006년01월26일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

SEQ ID NO: 2의 가변 부위를 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 4의 가변 부위를 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하고, 인간 CTLA-4와 결합하는, 20 mg/ml의 항체;

0.1 mg/ml의 EDTA;

20 mM의 히스티딘;

0.2 mg/ml의 폴리소르베이트 80; 및

84 mg/ml의 트레할로스

를 포함하는 조성물로서,

상기 조성물은, 킬레이트제를 포함하지 않는 점을 제외하고 동일한 조성을 갖는 조성물과 비교하여, 다음으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 향상된 특성을 갖는 조성물:

a) 상기 항체의 감소된 응집;

b) 상기 항체의 적은 절편화;

c) 상기 항체의 감소된 냉동/해동 불안정성;

d) 상기 조성물의 적은 변색; 및

e) 상기 항체의 감소된 탈아미드화.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물이 액상 조성물이고, 상기 항체가 인간 IgG2 항체인 조성물.

청구항 3

SEQ ID NO: 2와 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 4와 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 경쇄 아미노산 서열을 포함하고, 인간 CTLA-4와 결합하는, 20 mg/ml의 항체;

0.1 mg/ml의 EDTA;

20 mM의 히스티딘;

0.2 mg/ml의 폴리소르베이트 80; 및

84 mg/ml의 트레할로스

를 포함하는 조성물로서,

상기 조성물은, 킬레이트제를 포함하지 않는 점을 제외하고 동일한 조성을 갖는 조성물과 비교하여, 다음으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 향상된 특성을 갖는 조성물:

a) 상기 항체의 감소된 응집;

b) 상기 항체의 적은 절편화;

c) 상기 항체의 감소된 냉동/해동 불안정성;

d) 상기 조성물의 적은 변색; 및

e) 상기 항체의 감소된 탈아미드화.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

명 세 서

[0001] **관련 특허 및 특허 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 2005. 3. 8의 미국 가특허출원 제60/659,766호; 2005. 10. 19의 미국 가특허출원 제60/728,165호; 2005. 12. 20의 미국 가특허출원 제60/752,712호; 및 2006. 1. 26의 미국 가특허출원 제60/762,456호에 대해 우선권을 주장하며, 그것들은 전체적으로 본 출원에 참고 통합되어 있다.

배 경 기 술

[0003] 세포독성 T 림프구 항원-4("CTLA-4")는 면역글로불린 ("Ig") 단백질군에 속한다. CTLA-4는 T-세포 활성을 하향 조절하며 면역 항상성을 유지한다. 동물 모델시험 결과, CTLA-4의 억제는(예컨대, CTLA-4 항체에 의해) 암 면역치료의 유효성 증가와 관련이 있는 것으로 확인되었다.

[0004] CTLA-4에 결합하여 활성을 억제하는 항체가 문헌에 보고된 바 있다. 예를 들어, Pfizer, Inc.와 Abgenix, Inc.에 양도된 미국특허 제6,682,736호는 티실리무맙(ticilimumab(상표명))이라는 이름으로 알려진 항체 11.2.1의 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열을 갖는 CTLA-4 항체를 포함하는, CTLA-4에 대한 몇몇 인간 단일클론 항체를 개시하고 있다. 항체 11.2.1을 생성하는 하이브리도마 세포주는 ATCC Accession No. PTA-5169로 기탁되어 있다. Bristol-Myers Squibb Company에 양도된 미국특허 제5,977,318호는 CTLA-4의 세포외 부위를 인식하여 결합함으로써, CTLA-4가 B7 항원에 결합하지 못하도록 하는 또다른 단일클론 항체를 개시하고 있다. Medarex, Inc.에 양도된 미국 출원 공보 제20050201994호는 이필리무맙(ipilimumab(상표명))이라는 이름으로 알려진 항체를 포함하는, CTLA-4에 대한 몇몇 인간 서열 항체를 개시하고 있다.

[0005] 이러한 CTLA-4 항체를 투여하는 한 가지 방법으로 비경구 투여가 있다. 예를 들어, 미국특허 제6,682,736호는 항-CTLA-4 항체와 20mM 나트륨 아세테이트, 0.2 mg/ml 폴리소르베이트 80 및 140 mM 염화나트륨을 포함하는 pH 5.5의 항-CTLA-4 항체 정맥투여 제제를 개시하고 있다.

[0006] 여타 단백질 제제와 마찬가지로, CTLA-4 항체 제제는 시간이 흐름에 따라 제제 내의 항체 성분이 화학적, 물리적으로 변성되는 문제점을 내포하고 있다. 일반적으로, CTLA-4 항체 제제는 예상되는 범위의 저장 및 사용 조건에서 화학적, 물리적 안정도를 가져야 한다. 즉, CTLA-4 항체 제제는 충분한 저장 수명을 가지면서 생물학적 활성을 유지해야 한다. CTLA-4 항체 생성물 생성에 필요한 시간과 자원을 고려할 때, 생산손실이 적은 제제가 바람직하다. 따라서, 본 특허출원은 종래 공지된 CTLA-4 항체 제제에 비해 개선된 화학적 및/또는 물리적 안정도를 가지는 신규한 CTLA-4 항체 제제를 개시한다.

발명의 상세한 설명

[0007] 본 발명은 적어도 95%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 95%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 약학적 액상 조성물을 제공한다.

[0008] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 항체가 IgG2 항체인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 항체가 인간 항체인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 항체가 인간 V_H 3-33 배아 유전자를 이용하는 V_H 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 항체가 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열과 실시가능하게 연결된(operably linked) 인간 V_H 3-33 유전자군을 이용하는 인간 FR1, FR2 및 FR3 서열을 포함하는 V_H 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 항체가 분리된(isolated) 항체인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 항체가 재조합 항체인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 항체가 인간 CTLA-4 폴리펩타이드 상의 배좌 항원결정기(conformational epitope)에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 항체가 SEQ ID NO: 2와 적어도 95%의 서열 동일성을 가지는 중쇄 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 4와 적어도 95%의 서열 동일성을 가지는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 항체가 SEQ ID NO: 2와 적어도 99% 서열 동일성을 가지는 중쇄 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 4와 적어도 99% 서열 동일성을 가지는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 항체가 SEQ ID NO: 2의 가변 부위를 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 4의 가변 부위를 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하

는 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 항체가 SEQ ID NO: 5를 포함하는 중쇄 가변 부위 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 6를 포함하는 경쇄 가변 부위 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 항체가 SEQ ID NO: 2를 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 4를 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0020] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 항체의 중쇄의 C-말단 라이신이 존재하지 않는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0021] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 항체가 항체 11.2.1의 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열을 갖는 단일클론 IgG2 항-CTLA-4 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0022] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 항체가 ATCC Accession No. PTA-5169로 기탁된 하이브리도마 세포주 11.2.1.4가 생성하는 항체와 동일한 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0023] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 항체가 티실리무맙인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0024] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 킬레이트제가 아미노폴리카르복시산, 하이드록시아미노카르복시산, EDTA 염 및 그 유도체, N-치환 글리신, 데페록사민 유도체 및 그 혼합물로 구성되는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0025] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 킬레이트제가 에틸렌디아민 테트라아세트산, 디에틸렌트리아민 펜타아세트산 5, 니트릴로트리아세트산, N-2-아세트아미도-2-이미노디아세트산, 비스(아미노에틸)글리콜에테르, N,N,N',N'-테트라아세트산, 트랜스-디아미노사이클로헥산 테트라아세트산, 글루탐산, 아스파르트산, N-하이드록시에틸이미노디아세트산, N,N-비스-하이드록시에틸글리신, N-(트리스하이드록시메틸메틸) 10 글리신, 글리실글리신, 2-(2-아미노-2-옥소칠) 아미노에탄 술폰산, 데페록사민, 데페록사민 메실레이트, 디포타슘 이디테이트(edetate), 디나트륨 이디테이트, 이디테이트 칼슘 디나트륨, 나트륨 이디테이트, 트리나트륨 이디테이트, 포타슘 이디테이트, 시트르산, 시트르산나트륨, 무수 시트르산, 트리나트륨시트레이트-(등록상표명), 니아신아미드, 나트륨 데속시콜레이드(desoxycholate) 및 그 혼합물로 구성되는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0026] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 킬레이트제가 EDTA인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0027] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 완충제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0028] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하며 완충제를 더 포함하는 조성물에 있어서, 상기 완충제가 아세테이트, 숙시네이트, 글루코네이트, 시트레이트, 히스티딘, 아세트산, 포스페이트, 인산, 아스코르베이트, 타르타르산, 말레산, 글리신, 락테이트, 젖산, 아스코르브산, 이미다졸, 중탄산염 및 탄산, 숙신산, 나트륨 벤조에이트, 벤조산, 글루코네이트, 이디테이트, 아세테이트, 말레이트, 이미다졸, 트리스, 포스페이트 및 그 혼합물로 구성되는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0029] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하며 완충제를 더 포함하는 조성물에 있어서, 상기 완충제가 히스티딘을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0030] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하며 히스티딘을 더 포함하는 조성물에 있어서, 상기 히스티딘이 L-히스티딘 또는 D-히스티딘을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0031] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하며 히스티딘을 더 포함하는 조성물에 있어서, 상기 히스티딘이 L-히스티딘을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0032] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물이 약 0.1 내지 약 200 mg/ml 농도 범위의 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0033] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물이 약 20 mg/ml 농도의 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0034] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물이 등장화제(tonicity agent), 계면활성제 및 완충제로 구성되는 군에서 선택되는 적어도 하나의 부형제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0035] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물이 등장화제, 계면활성제 및 완충제로 구성되는 군에서 선택되는 적어도 2개의 부형제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0036] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물이 등장화제, 계면활성제 및 완충제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0037] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어

도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물이 등장화제, 항산화제, 계면활성제 및 완충제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0038] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물이 등장화제, 계면활성제 및 완충제로 구성되는 군에서 선택되는 적어도 하나의 부형제를 더 포함하며, 상기 등장화제는 사카라이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0039] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물이 등장화제, 계면활성제 및 완충제로 구성되는 군에서 선택되는 적어도 하나의 부형제를 더 포함하며, 상기 등장화제는 과당, 글루코스, 만노스, 소르보스, 자일로스, 락토스, 말토스, 수크로스, 덱스트란, 플루란(pullulan), 덱스트린, 사이클로덱스트린, 가용성 전분, 하이드록시에틸 전분, 수용성 글루칸 및 그 혼합물로 구성되는 군에서 선택되는 적어도 하나의 부형제를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0040] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물이 등장화제, 계면활성제 및 완충제로 구성되는 군에서 선택되는 적어도 하나의 부형제를 더 포함하며, 등장화제는 폴리올을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0041] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물이 등장화제, 계면활성제 및 완충제로 구성되는 군에서 선택되는 적어도 하나의 부형제를 더 포함하며, 상기 등장화제는 만니톨, 트레할로스, 소르비톨, 에리스리톨, 이소말트, 락티톨, 말티톨, 자일리톨, 글리세롤, 락티톨, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 이노시톨 및 그 혼합물로 구성되는 군에서 선택되는 폴리올을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0042] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물이 등장화제, 계면활성제 및 완충제로 구성되는 군에서 선택되는 적어도 하나의 부형제를 더 포함하며, 상기 등장화제는 비환원당을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0043] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물이 등장화제, 계면활성제 및 완충제로 구성되는 군에서 선택되는 적어도 하나의 부형제를 더 포함하며, 상기 등장화제는 비환원당을 포함하며, 상기 비환원당은 수크로스, 트레할로스 및 그 혼합물로 구성되는 군에서 선택되는 적어도 하나의 부형제를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0044] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물이 등장화제, 계면활성제 및 완충제로 구성되는 군에서 선택되는 적어도 하나의 부형제를 더 포함하며, 상기 등장화제는 비환원당을 포함하며, 상기 비환원당은 트레할로스인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0045] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물이 등장화제, 계면활성제 및 완충제로 구성되는 군에서 선택되는 적어도 하나의 부형제를 더 포함하며, 상기 계면활성제는 폴리소르베이트, 폴록사머, 트리톤, 나트륨 도데실 설페이트, 나트륨 라우릴 설페이트, 나트륨 옥틸 글리코사이드, 라우릴-술포베타인, 미

리스틸-술포베타인, 리놀레닐-술포베타인, 스테아릴-술포베타인, 라우릴-사르코신, 미리스틸-사르코신, 리놀레닐-사르코신, 스테아릴-사르코신, 리놀레닐-베타인, 미리스틸-베타인, 세틸-베타인, 라우로아미도프로필-베타인, 코카미도프로필-베타인, 리놀레아미도프로필-베타인, 미리스트아미도프로필-베타인, 팔미도프로필-베타인, 이소스트에라미도프로필-베타인, 미리스트아미도프로필-디메틸아민, 팔미도프로필-디메틸아민, 이소스트에라미도프로필-디메틸아민, 나트륨 메틸 코코일-타우레이트, 디나트륨 메틸올레일-타우레이트, 디하이드록시프로필 PEG 5 리놀레암모늄 클로라이드, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜 및 그 혼합물로 구성되는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0046] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물이 등장화제, 계면활성제 및 완충제로 구성되는 군에서 선택되는 적어도 하나의 부형제를 더 포함하며, 상기 계면활성제는 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 21, 폴리소르베이트 40, 폴리소르베이트 60, 폴리소르베이트 61, 폴리소르베이트 65, 폴리소르베이트 80, 폴리소르베이트 81, 폴리소르베이트 85 및 그 혼합물로 구성되는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0047] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물이 등장화제, 계면활성제 및 완충제로 구성되는 군에서 선택되는 적어도 하나의 부형제를 더 포함하며, 상기 계면활성제는 폴리소르베이트 80인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0048] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물이 등장화제, 계면활성제 및 완충제로 구성되는 군에서 선택되는 적어도 하나의 부형제를 더 포함하며, 상기 완충제는 히스티딘을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0049] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물이 폴리소르베이트 80을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0050] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물이 트레할로스를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0051] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물이 히스티딘, 트레할로스, 폴리소르베이트 80 및 EDTA를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0052] 본 발명은 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물이 히스티딘, 트레할로스, 폴리소르베이트 80 및 EDTA를 포함하며, 상기 조성물은 pH가 약 5.0 내지 약 6.5인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0053] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물이 히스티딘, 트레할로스, 폴리소르베이트 80 및 EDTA를 포함하며, 히스티딘의 농도는 약 1 mM 내지 약 50 mM인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0054] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물이 히스티딘, 트레할로스, 폴리소르베이트 80 및 EDTA

를 포함하며, 히스티딘의 농도는 약 20 mM인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0055] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물이 히스티딘, 트레할로스, 폴리소르베이트 80 및 EDTA를 포함하며, 폴리소르베이트 80의 농도는 약 0.01 mg/ml 내지 약 10 mg/ml인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0056] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물이 히스티딘, 트레할로스, 폴리소르베이트 80 및 EDTA를 포함하며, 폴리소르베이트 80의 농도는 약 0.2 mg/ml인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0057] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물이 히스티딘, 트레할로스, 폴리소르베이트 80 및 EDTA를 포함하며, EDTA의 농도는 약 0.001 mg/ml 내지 약 10 mg/ml인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0058] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물이 히스티딘, 트레할로스, 폴리소르베이트 80 및 EDTA를 포함하며, EDTA의 농도는 약 0.1 mg/ml인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0059] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물이 히스티딘, 트레할로스, 폴리소르베이트 80 및 EDTA를 포함하며, 트레할로스의 농도는 약 10 mg/ml 내지 약 100 mg/ml인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0060] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물이 히스티딘, 트레할로스, 폴리소르베이트 80 및 EDTA를 포함하며, 트레할로스의 농도는 약 84 mg/ml인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0061] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물이 히스티딘, 트레할로스, 폴리소르베이트 80 및 EDTA를 포함하며, 상기 조성물은 약 0.1 mg/ml 내지 약 100 mg/ml의 항체; 약 0.001 mg/ml 내지 약 1.0 mg/ml의 EDTA; 약 1 mM 내지 약 50 mM의 히스티딘; 약 0.01 mg/ml 내지 약 10 mg/ml의 폴리소르베이트 80; 및 약 10 mg/ml 내지 약 100 mg/ml의 트레할로스를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0062] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물이 히스티딘, 트레할로스, 폴리소르베이트 80 및 EDTA를 포함하며, 상기 조성물은 약 20 mg/ml의 항체; 약 0.1 mg/ml의 EDTA; 약 20 mM의 히스티딘; 약 0.2 mg/ml의 폴리소르베이트 80; 및 약 84 mg/ml의 트레할로스를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0063] 본 발명은 또한 SEQ ID NO: 2를 포함하는 중쇄 아미노산 서열, 및 SEQ ID NO: 4를 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 항체가 약 5℃의 온도에서 적어도 약 26주 동안 안정한 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0064] 본 발명은 또한 SEQ ID NO: 2를 포함하는 중쇄 아미노산 서열, 및 SEQ ID NO: 4를 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 항체가 약 25℃의 온도에서 적어도 약 26주 동안 안정한 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0065] 본 발명은 또한 SEQ ID NO: 2를 포함하는 중쇄 아미노산 서열, 및 SEQ ID NO: 4를 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 항체가 약 40℃의 온도에서 적어도 약 26주 동안 안정한 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0066] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 항체는 조성물을 동결 및 해동시키는 적어도 1회의 사이클 동안 안정한 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0067] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 항체는 조성물을 동결 및 해동시키는 적어도 6회의 사이클 동안 안정한 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0068] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물을 약 40℃의 온도에서 약 24주 동안 보관하는 경우, 상기 조성물의 응집체 크로마토그램 피크면적 감소량이 킬레이트제를 포함하지 않는 동일한 다른 조성물을 약 40℃의 온도에서 약 24주 동안 보관하는 경우의 응집체 크로마토그램 피크면적에 비해 적어도 약 2%인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0069] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물을 약 40℃의 온도에서 약 24주 동안 보관하는 경우, 상기 조성물의 응집체 크로마토그램 피크면적 감소량이 킬레이트제를 포함하지 않는 동일한 다른 조성물을 약 40℃의 온도에서 약 24주 동안 보관하는 경우의 응집체 크로마토그램 피크면적에 비해 적어도 약 2%이며, 상기 크로마토그래피 분리가 SE-HPLC를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0070] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물을 약 40℃의 온도에서 약 24주 동안 보관하는 경우, 상기 조성물의 응집체 크로마토그램 피크면적 감소량이 킬레이트제를 포함하지 않는 동일한 조성물을 약 40℃의 온도에서 약 24주 동안 보관하는 경우의 응집체 크로마토그램 피크면적에 비해 적어도 약 2%이며, 응집된 항체의 양을 측정하기 위하여 자외선 검출을 이용하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0071] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물을 약 40℃의 온도에서 약 24주 동안 보관하는 경우, 상기 조성물의 응집체 크로마토그램 피크면적 감소량이 킬레이트제를 포함하지 않는 동일한 조성물을 약 40℃의 온도에서 약 24주 동안 보관하는 경우의 응집체 크로마토그램 피크면적에 비해 적어도 약 2%이며, 상기 자외선 검출이 214 나노미터에서 수행되는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0072] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물을 약 40℃의 온도에서 약 24주 동안 보관하는 경우, 상기 조성물의 응집체 크로마토그램 피크면적 감소량이 킬레이트제를 포함하지 않는 동일한 조성물을 약 40℃의 온도에서 약 24주 동안 보관하는 경우의 응집체 크로마토그램 피크면적에 비해 적어도 약 2%이며, 상기 조성물은 실질적으로 무색 투명 상태로 보존되는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0073] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물을 약 40℃의 온도에서 약 24주 동안 보관하는 경우, 상기 조성물의 응집체 크로마토그램 피크면적 감소량이 킬레이트제를 포함하지 않는 동일한 조성물을 약 40℃의 온도에서 약 24주 동안 보관하는 경우의 응집체 크로마토그램 피크면적에 비해 적어도 약 2%이며, 상기 조성물을 약 40℃의 온도에서 약 24주 동안 보관하는 경우, 라이실 엔도펩티다제를 이용한 효소소화 및 역상(reversed phase) HPLC에 의한 분리에 의해 측정한 432번 아미노산 위치의 메티오닌 잔기의 총 산화율(percent oxidation) 감소량이 킬레이트제를 포함하지 않는 조성물의 항체에 비해 2.2% 이상인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0074] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물을 약 40℃의 온도에서 약 24주 동안 보관하는 경우, 상기 조성물의 응집체 크로마토그램 피크면적 감소량이 킬레이트제를 포함하지 않는 동일한 조성물을 약 40℃의 온도에서 약 24주 동안 보관하는 경우의 응집체 크로마토그램 피크면적에 비해 적어도 약 2%이며, 상기 조성물을 약 40℃의 온도에서 약 24주 동안 보관하는 경우, 라이실 엔도펩티다제를 이용한 효소소화 및 역상 HPLC에 의한 분리에 의해 측정한 256번 아미노산 위치의 메티오닌 잔기의 총 산화율 감소량이 킬레이트제를 포함하지 않는 조성물의 항체에 비해 4.2% 이상인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0075] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열로 본질적으로 구성되며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열로 본질적으로 구성되는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0076] 본 발명은 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열로 구성되며 또한 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열로 구성되는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0077] 본 발명은 또한 단일클론 항-CTLA-4 항체를 상기 항체의 불안정성을 줄일 수 있는 양의 약학적으로 허용가능한 킬레이트제와 혼합하는 단계를 포함하는 안정한 약학적 액상 조성물의 제조방법에 있어서, 상기 조성물을 약 40℃의 온도에서 약 24주 동안 보관하는 경우, 단일클론 항-CTLA-4 항체 및 킬레이트제를 포함하는 상기 안정한 약학적 액상 조성물의 응집체 크로마토그램 피크면적 감소량이 킬레이트제를 포함하지 않는 동일한 다른 조성물을 약 40℃의 온도에서 약 24주 동안 보관하는 경우의 응집체 크로마토그램 피크면적에 비해 적어도 약 2%인 것을 특징으로 하는 방법을 제공한다.

[0078] 본 발명은 또한 단일클론 항-CTLA-4 항체 및 약학적으로 허용가능한 킬레이트제를 포함하는 액상 조성물을 형성하는 단계를 포함하는, 약학적 액상 조성물 내의 상기 항체를 안정화하는 방법에 있어서, 상기 조성물을 약 40℃의 온도에서 약 24주 동안 보관하는 경우, 단일클론 항-CTLA-4 항체 및 킬레이트제를 포함하는 상기 안정한 약학적 액상 조성물의 응집체 크로마토그램 피크면적 감소량이 킬레이트제를 포함하지 않는 동일한 조성물을 약 40℃의 온도에서 약 24주 동안 보관하는 경우의 응집체 크로마토그램 피크면적에 비해 적어도 약 2%인 것을 특징으로 하는 방법을 제공한다.

[0079] 본 발명은 또한 치료에 효과적인 양의 단일클론 항-CTLA-4 티실리무맙 항체 및 약학적으로 허용가능한 킬레이트제를 포함하는 약학적 액상 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 네오플라시아 증상의 치료방법을 제공한다.

[0080] 본 발명은 또한 치료에 효과적인 양의 단일클론 항-CTLA-4 티실리무맙 항체 및 약학적으로 허용가능한 킬레이트제를 포함하는 약학적 액상 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 네오플라시아 증상의 치료방법에 있어서, 상기 조성물을 환자에게 정맥투여하는 것을 특징으로 하는 치료방법을 제공한다.

[0081] 본 발명은 또한 치료에 효과적인 양의 단일클론 항-CTLA-4 티실리무맙 항체 및 약학적으로 허용가능한 킬레이트제를 포함하는 약학적 액상 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 네오플라시아 증상의 치료방법에 있어서, 상기 환자가 네오플라시아 증상의 치료를 필요로 하는 환자인 것을 특징으로 하는 치료방법을 제공한다.

[0082] 본 발명은 또한 치료에 효과적인 양의 단일클론 항-CTLA-4 티실리무맙 항체 및 약학적으로 허용가능한 킬레이트제를 포함하는 약학적 액상 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 네오플라시아 증상의 치료방법에 있어서, 상기 네오플라시아 증상이 뇌암, 편평상피암, 방광암, 위암, 췌장암, 유방암, 두부암(head cancer), 경부암(neck cancer), 식도암, 전립선암, 결장암, 폐암, 신암(renal cancer), 신장암, 자궁암, 부인암(gynecological cancer) 및 갑상선암으로 구성되는 군에서 선택되는 암인 것을 특징으로 하는 치료방법을 제공한다.

[0083] 본 발명은 또한 용액 상태의 단일클론 항-CTLA-4 티실리무맙 항체을 포함하는 제1 용기 및 약학적으로 허용가능한 킬레이트제를 포함하는 제2 용기를 포함하는 안정화된 항체의 액상 조성물 제조용 키트를 제공한다.

[0084] 본 발명은 또한 티실리무맙의 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열을 갖는 적어도 하나의 항-CTLA-4 항체와 킬레이트제의 혼합물을 수용하는 용기를 포함하는 제조용 물품을 제공한다.

[0085] 본 발명은 또한 단일클론 항-CTLA-4 항체 및 약학적으로 허용가능한 킬레이트제를 포함하는 약학적 액상 조성물에 있어서, 상기 항체의 몰농도는 약 0.0006 밀리몰(mM) 내지 약 1.35 밀리몰 범위이고 상기 킬레이트제의 몰농

도는 약 0.003 밀리몰 내지 약 50 밀리몰 범위이며, 상기 항체와 킬레이트제의 몰비율이 약 0.00001 내지 약 450 범위인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0086] 본 발명은 또한 단일클론 항-CTLA-4 항체 및 약학적으로 허용가능한 킬레이트제를 포함하는 약학적 액상 조성물에 있어서, 상기 항체의 몰농도는 약 0.0006 밀리몰 내지 약 1.35 밀리몰 범위이고 상기 킬레이트제의 몰농도는 약 0.003 밀리몰 내지 약 50 밀리몰 범위이며, 상기 항체와 킬레이트제의 몰비율이 약 0.00001 내지 약 450 범위이고, 상기 항체는 티실리무맙 항체의 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열을 가지는 단일클론 항-CTLA-4 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0087] 본 발명은 또한 단일클론 항-CTLA-4 항체 및 약학적으로 허용가능한 킬레이트제를 포함하는 약학적 액상 조성물에 있어서, 상기 항체의 몰농도는 약 0.0006 밀리몰 내지 약 1.35 밀리몰 범위이고 상기 킬레이트제의 몰농도는 약 0.003 밀리몰 내지 약 50 밀리몰 범위이며, 상기 항체와 킬레이트제의 몰비율이 약 0.0001 내지 약 100 범위인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0088] 본 발명은 또한 단일클론 항-CTLA-4 항체 및 약학적으로 허용가능한 킬레이트제를 포함하는 약학적 액상 조성물에 있어서, 상기 항체의 몰농도는 약 0.0006 밀리몰 내지 약 1.35 밀리몰 범위이고 상기 킬레이트제의 몰농는 약 0.003 밀리몰 내지 약 50 밀리몰 범위이며, 상기 항체와 킬레이트제의 몰비율이 약 0.001 내지 약 10 범위인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0089] 본 발명은 또한 단일클론 항-CTLA-4 항체 및 약학적으로 허용가능한 킬레이트제를 포함하는 약학적 액상 조성물에 있어서, 상기 항체의 몰농도는 약 0.0006 밀리몰 내지 약 1.35 밀리몰 범위이고 상기 킬레이트제의 몰농도는 약 0.003 밀리몰 내지 약 50 밀리몰 범위이며, 상기 항체와 킬레이트제의 몰비율이 약 0.1 내지 약 1 범위인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0090] 본 발명은 또한 단일클론 항-CTLA-4 항체 및 약학적으로 허용가능한 킬레이트제를 포함하는 약학적 액상 조성물에 있어서, 상기 항체의 몰농도는 약 0.0006 밀리몰 내지 약 1.35 밀리몰 범위이고 상기 킬레이트제의 몰농도는 약 0.003 밀리몰 내지 약 50 밀리몰 범위이며, 상기 항체와 킬레이트제의 몰비율이 약 0.00001 내지 약 450 범위로서, 상기 항체와 킬레이트제의 몰비율이 약 0.5인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0091] 본 발명은 또한 적어도 하나의 인간 단일클론 항-CTLA 항체 및 킬레이트제를 포함하는 약학적 액상 조성물에 있어서, 상기 항체가 인간 CTLA-4와 결합하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0092] 본 발명은 또한 적어도 95%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 95%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체 및 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약학적 조성물에 있어서, 상기 조성물이 적어도 약 10 mg/ml 농도 이상의 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0093] 본 발명은 또한 적어도 95%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 95%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체 및 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약학적 조성물에 있어서, 상기 조성물이 약 10 mg/ml 내지 약 25 mg/ml 농도 범위의 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0094] 본 발명은 또한 적어도 95%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 95%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체 및 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약학적 조성물에 있어서, 상기 조성물이 약 10 mg/ml 내지 약 200 mg/ml 농도 범위의 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0095] 본 발명은 또한 적어도 95%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 95%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체 및 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약학적 조성물에 있어서, 상기 조성물이 약 20 mg/ml 농도의 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0096] 본 발명은 또한 적어도 하나의 킬레이트제 및 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는 적어도 하나의 항체를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 항체가 인간 CTLA-4와 결합하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0097] 본 발명은 또한 적어도 하나의 킬레이트제 및 적어도 90%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미

노산 서열을 가지며 적어도 90%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 항체가 티실리무맙의 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열을 갖는 단일클론 IgG2 항-CTLA-4 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0098] 본 발명은 또한 티실리무맙의 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열을 가지는 적어도 하나의 용액 상태의 항-CTLA-4 항체를 적어도 하나의 킬레이트제와 혼합하는 단계를 포함하는 약학적 액상 조성물의 제조방법을 제공한다.

[0099] 본 발명은 또한 치료에 효과적인 양의, 티실리무맙의 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열을 갖는 적어도 하나의 항-CTLA-4 항체 및 약학적으로 허용가능한 킬레이트제를 포함하는 약학적 액상 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 네오플라시아 증상의 치료방법을 제공한다.

[0100] 본 발명은 또한 티실리무맙의 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열을 갖는 적어도 하나의 용액 상태의 항-CTLA-4 항체를 포함하는 제1 용기 및 약학적으로 허용가능한 킬레이트제를 포함하는 제2 용기를 포함하는 안정화된 항체의 액상 조성물 제조용 키트를 제공한다.

[0101] 본 발명은 또한 적어도 95%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지며 또한 적어도 95%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체 및 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약학적 액상 조성물에 있어서, 상기 조성물이 적어도 약 10 mg/ml 농도의 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0102] 본 발명의 방법과 기술은 별도의 언급이 없으면 주로 당업자에게 잘 알려진 일반적인 방법에 따라서, 그리고 본 명세서를 통해 인용되고 논의된 다양한 일반적이고 구체적인 참조문헌에 기술된 바에 따라 수행된다. 예컨대, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) and Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), 그리고 Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990)를 참조하라. 효소 반응 및 정제 기술은 당업계에서 주로 수행되는 대로, 혹은 본 명세서에 기술된 대로 제조업체의 지시에 따라 수행되었다. 본 출원에서 기술된 분석화학, 합성 유기화학, 약용 및 제약화학의 실험 과정 및 기술과 연관되어 사용한 명명법은 잘 알려진 것들이고 당업계에서 주로 사용되는 것들이다. 화학적 합성, 화학적 분석, 약학적 준비, 조성, 전달 및 환자치료를 위해서 표준 기술이 사용되었다.

[0103] ***정의***

[0104] 후술할 상세한 설명에 대한 독자의 이해를 돕기 위해서, 다음과 같이 정의한다.

[0105] 본 명세서에서, "제제(formulation)" 또는 "조성물"이라는 용어는 항-CTLA-4 항체와 관련하여 킬레이트제를 포함하는 약학적으로 허용가능한 부형제와 조합되는 항체를 기술하는데 사용된다. 예를 들어, 본 발명의 제제는 당업계에 알려진 제제에 비해 증진된 저장 수명 및/또는 안정도를 갖는다.

[0106] 본 명세서에서, "항체"라는 용어는 특정 결합을 위해 무손상(intact) 항체와 경쟁하는 무손상 항체 또는 항원결합 부분을 의미한다. 일반적으로, *Fundamental Immunology*, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)를 참조하라. 항원결합 부분은 재조합 DNA 기술이나 무손상 항체의 효소적 혹은 화학적 절단에 의해 제조할 수 있다. 일태양에 있어서, 항원결합 부분은 Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fd, Fv, dAb 및 상보성 결정 부위(CDR) 절편, 단일사슬 항체(scFv), 키메라 항체, 폴리펩타이드에 결합하는 특정 항원을 공여하기에 충분한 적어도 일부분의 항체를 함유하는 다이아바디(diabodies) 및 폴리펩타이드를 포함한다. N-말단에서 C-말단까지, 성숙한 경쇄 및 중쇄 가변 부위는 모두 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4 부위를 포함하여 이루어진다. 각각의 부위에 대한 아미노산의 할당은 Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), 또는 Chothia et al., *Nature* 342:878-883 (1989)의 정의에 따른다.

[0107] 본 명세서에서, "폴리펩타이드"라는 용어는 자연적 또는 인공적 단백질, 단백질 절편 및 단백질 서열의 폴리펩타이드 유사물질을 포함한다. 폴리펩타이드는 단량체(monomeric)이거나 다량체(polymeric)일 수 있다.

[0108] 본 명세서에서, Fd 절편은 V_H 및 C_H1 부위로 이루어진 항체 절편을 의미한다. Fv 절편은 항체의 단일 팔(single arm)의 V_L 및 V_H 부위로 이루어진다. 그리고 dAb 절편(Ward et al., Nature 341 :544-546 (1989))은 V_H 부위로 이루어진다.

[0109] "항체"라는 용어와 함께 사용되는 "또는 그것의 항원결합 부분"라는 용어는 아미노 말단 및/또는 카르복시 말단을 가지는 폴리펩타이드를 의미하나, 그곳의 잔존 아미노산 서열은 자연적으로 발생하는 서열에서 대응하는 위치와 동일하다. 일태양에 있어서, 절편은 적어도 5, 6, 8 또는 10 아미노산 길이이다. 다른 태양에 있어서, 절편은 적어도 14, 적어도 20, 적어도 50, 또는 적어도 70, 80, 90, 100, 150 또는 200 아미노산 길이이다.

[0110] 본 명세서에서, "단일클론 항체"라는 용어는 실질적으로 동질의 항체 집단, 즉 적은 수로 존재하거나 C-말단 라이신을 결여할 수 있는 등의 자연적으로 발생 가능한 돌연변이를 제외하고는 동일한 개별적 항체들로 구성되는 집단으로부터 얻은 항체를 의미한다. 단일클론 항체는 단일 항원 부위에 대응하여 특이성이 높다. 또한, 주로 여러 항체를 포함하여 여러 항원결정기에 작용하는 일반적인 (다클론) 항체 제조의 경우와는 대조적으로, 각각의 단일클론 항체는 항원의 단일한 항원결정기에 작용한다. 수식어구 "단일클론의"는 실질적으로 동질의 항체 집단으로부터 얻은 항체의 특성을 지시하고, 어떤 특정한 방법에 의한 항체의 생산을 요하는 것으로는 해석되지 않는다. 예를 들어, 본 발명에서 사용되는 단일클론 항체는 Kohler, et al., *Nature* 256:495 (1975)에 의해 처음으로 기술된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있고, 또한 재조합 DNA 방법(예컨대, 미국특허 제4,816,567호 참조)에 의해 제조될 수도 있다. 또한 "단일클론 항체"는 예를 들어 Clackson, et al., *Nature* 352:624-628 (1991) 및 Marks, et al., *J. MoI. Biol.* 222:581-597 (1991)에서 설명된 기술을 사용하여 파지 항체 라이브러리로부터 분리될 수도 있다.

[0111] 본 명세서에서, "분리된 항체" 또는 "정제된 항체"라는 용어는 파생물의 기원이나 근원의 특성에 의해서 다음 하나 내지 네 가지를 가지는 항체를 의미한다. (1) 자연 상태에서 수반하는 자연적으로 결합된 성분과 관련이 없다. (2) 동일한 종에는 다른 단백질이 없다. (3) 다른 종으로부터의 세포에 의해 발현된다. (4) 자연적으로 생겨나지 않는다. 따라서, 화학적으로 합성되거나 자연적으로 기원한 세포와는 다른 세포 환경에서 합성된 항체는 자연적인 성분들과는 다른, 분리되고 정제된 항체이다. 또한 항체는 당업자에게 잘 알려진 단백질 정제 기술을 사용하여 분리 및 정제함으로써 자연적으로 결합된 성분을 실질적으로 제거하여 만들 수도 있다. 분리/정제된 항체의 예에는 CTLA-4를 사용하여 친화성 정제된 항-CTLA-4 항체, 하이브리도마나 생체 외에서 다른 세포주에 의해 합성된 항-CTLA-4 항체 및 유전자이식 마우스로부터 유래된 인간 항-CTLA-4 항체가 있다.

[0112] 분리/정제된 항체의 예에는 CTLA-4를 사용하여 친화성 정제된 항-CTLA-4 항체, 하이브리도마나 생체 외에서 다른 세포주에 의해 합성된 항-CTLA-4 항체 및 유전자이식 마우스로부터 유래된 인간 항-CTLA-4 항체가 있다. 따라서, 바람직한 구체예에서, 항-CTLA-4 항체는 적어도 약 95%(w/w, 항-CTLA-4 항체 질량/약학적으로 허용가능한 부형제 이외의 성분 질량)의 순도를 가지고, 더욱 바람직한 구체예에서, 항-CTLA-4 항체는 약 95% w/w 내지 약 99.5% w/w의 순도를 가진다.

[0113] 항체는 적어도 약 60 내지 75%의 샘플이 단일 종류의 항체를 나타낼 때 "실질적으로 순수하거나," "실질적으로 동질이거나," 또는 "실질적으로 정제된" 것이다. 항체는 단량체이거나 다량체일 수 있다. 실질적으로 순수한 항체는 일반적으로 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% w/w의 항체 샘플을 함유하여 이루어지고, 좀 더 일반적으로는 약 95%, 그리고 바람직하게는 99% 이상 순수하다. 항체의 순도나 동질성은 항체 샘플의 폴리아크릴아미드 젤 전기영동과 같은 당업자에게 잘 알려진 여러 수단에 의해 나타낼 수 있고, 이어서 당업자에게 잘 알려진 염료로 젤을 염색하여 단일 폴리펩타이드 밴드를 시각화할 수 있다. 특정 목적을 위해, HPLC 혹은 당업자에게 잘 알려진 다른 정제 수단을 사용하여 더 높은 해상도를 얻을 수 있다.

[0114] 본 명세서에서, "인간 항체"라는 용어는 인간 배아 면역글로불린 서열에서 유도된 가변 및 불변 부위를 갖는 항체를 포함한다. 본 발명의 인간 항체는 예를 들어 CDR, 특히 CDR3에서 인간 배아 면역글로불린 서열(예컨대, 생체 외에서 랜덤이거나 특정 부위 돌연변이 또는 생체 내에서 체세포 돌연변이에 의한 돌연변이)에 의해 인코딩되지 않은 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 그러나 본 명세서에서, "인간 항체"라는 용어는, 마우스 같은 다른 포유류 종들의 배아로부터 유도된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열에 융합된 항체를 포함하지는 않는다.

[0115] 본 명세서에서, "재조합 인간 항체"라는 용어는 재조합 수단에 의해 제조되거나 발현되거나 만들어지거나 분리된 모든 인간 항체, 가령 숙주 세포에 형질감염된 재조합 발현 벡터를 사용하여 발현된 항체, 재조합, 복합 인간 항체 라이브러리로부터 분리된 항체, 인간 면역글로불린 유전자가 유전자이식된 동물(예컨대, 마우스)로부터 분리된 항체(예컨대, Taylor, L. D., et al. (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295 참조) 또는 인간 면역글로불린 유전자 서열 내지 다른 DNA 서열의 절단과 관계된 다른 어떠한 수단에 의하여 제조되거나 발현되거나 만들어지거나 분리된 항체를 포함한다. 그러한 재조합 인간 항체는 인간 배아 면역글로불린 서열로부터 유도된 가변 및 불변 부위를 가진다. 그러나 일태양에 있어서, 그러한 재조합 인간 항체는 생체 외 돌연변이(또는, 인간 Ig 서열을 위한 동물 유전자이식이 사용되는 경우, 생체 내 체세포 돌연변이)가 일어나고 따라서 재조합 항체의

V_H 및 V_L 부위의 아미노산 서열은, 인간 배아 V_H 및 V_L 서열로부터 유래되고 관계하지만, 생체 내 인간 항체 배아 레퍼토리 내에서 자연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열이다.

[0116] 본 명세서에서, "폴리뉴클레오타이드" 또는 "핵산"이라는 용어는, 적어도 10 염기 길이의 뉴클레오타이드의 중합 형태, 리보뉴클레오타이드나 데옥시뉴클레오타이드 또는 어떠한 타입의 뉴클레오타이드의 변형된 형태를 의미하는 데 교환적으로 사용된다. 그 용어는 단일 및 이중 가닥 형태를 포함한다. "폴리뉴클레오타이드" 또는 "핵산" 서열은 다른 언급이 없으면 그들의 상보 서열도 포함한다. 따라서, 특정 서열을 갖는 핵산에 대한 참조는 그것의 상보 서열과 함께 그것의 상보 가닥을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0117] 본 명세서에서, "분리된 폴리뉴클레오타이드" 또는 "분리된 핵산"이라는 용어는 게놈, cDNA, 또는 합성 기원 폴리뉴클레오타이드 또는 그들의 어떤 조합, 파생물의 기원이나 근원의 특성에 의해서 다음 하나 내지 세 가지를 가지는, 분리된 폴리뉴클레오타이드를 의미한다. (1) 자연에서 발견되는 "분리된 폴리뉴클레오타이드" 전체나 부분과 결합하지 않는다. (2) 자연에서 연결되지 않는 폴리뉴클레오타이드에 실시 가능하게 연결되지 않는다. (3) 더 큰 서열의 일부로서 자연적으로 발생하지 않는다.

[0118] 본 명세서에서, "자연 발생 뉴클레오타이드"이라는 용어는 데옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함한다. 본 출원에서 사용된 "변형된 뉴클레오타이드"는 변형되거나 치환된 당 작용기를 가지는 뉴클레오타이드를 포함한다. 본 출원에서 사용된 "올리고뉴클레오타이드 결합"이라는 용어는 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포로셀레노에이트, 포스포로디셀레노에이트, 포스포로아닐로티오에이트, 포스포로아닐라데이트, 포스포로아미데이트 등과 같은 올리고뉴클레오타이드 결합을 포함한다. 예컨대, LaPlanche et al, *Nucl. Acids Res.* 14:9081 (1986); Stec et al., *J. Am. Chem. Soc.* 106:6077 (1984); Stein et al., *Nucl. Acids Res.* 16:3209 (1988); Zon ef al., *Anti-Cancer Drug Design* 6:539 (1991); Zon et al., *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); 미국특허 제5,151,510호; Uhlmann and Peyman, *Chemical Reviews* 90:543 (1990)를 참조하라. 이들 명세서는 본 출원에 참고 통합되어 있다. 올리고뉴클레오타이드는 원한다면 탐지를 위한 라벨을 포함할 수 있다.

[0119] "실시가능하게 연결된" 서열은 관심 대상인 유전자와 인접하는 발현 조절 서열 및 관심 대상인 유전자를 조절하기 위해 트랜스적으로 또는 멀리에서 작용하는 발현 조절 서열을 모두 포함한다. 본 출원에서 사용된 "발현 조절 서열"이라는 용어는 발현 및 결찰되어 있는 코딩 서열의 프로세싱에 영향을 미치는 데 필요한 폴리뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 발현 조절 서열은 적당한 전사 개시, 종결, 프로모터 및 인핸서 서열; 스플라이싱 및 폴리아데닐레이션 신호와 같은 효율적인 RNA 프로세싱 신호; 세포질 mPiNA를 안정화시키는 서열; 번역 효율성을 증진시키는 서열 (즉, Kozak consensus 서열); 단백질 안정도를 증진시키는 서열; 및 필요하다면 단백질 분비를 증진시키는 서열을 포함한다. 그러한 조절 서열의 특성은 숙주 유기체에 따라서 다르다. 원핵세포에서, 그러한 조절 서열은 일반적으로 프로모터, 리보좀 결합 부위 및 전사 종결 서열을 포함한다. 진핵세포에서, 일반적으로, 그러한 조절 서열은 프로모터 및 전사 종결 서열을 포함한다. "조절 서열"이라는 용어는 발현 및 프로세싱에 필수적인 최소한의 모든 성분을 포함하고, 또한 있으면 유익한 추가적인 성분, 예를 들어, 리더 서열 및 융합 파트너 서열도 포함할 수 있다.

[0120] 본 명세서에서, "벡터"라는 용어는 자신과 연결된 다른 핵산을 운반할 수 있는 핵산 분자를 의미한다. 일태양에 있어서, 벡터는 플라스미드, 즉 그 안에 추가적인 DNA 조각을 결찰할 수 있는 환형의 이중 가닥 DNA 루프이다. 일태양에 있어서, 벡터는 바이러스 벡터로서, 추가적인 DNA 조각을 바이러스 게놈 안에 결찰할 수 있다. 일태양에 있어서, 벡터는 유입된 숙주 세포 내에서 자동 복제할 수 있다(예컨대, 박테리아 복제 기원을 가지는 박테리아 벡터 및 에피솜 포유류 벡터). 다른 태양에 있어서, 벡터(예컨대, 비-에피솜(non-episomal) 포유류 벡터)는 숙주 세포 내로 유도되어 숙주 세포의 게놈 내로 통합될 수 있고, 따라서 숙주 게놈과 함께 복제된다. 또한, 어떤 벡터는 자신과 작동적으로 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 본 출원에서 이러한 벡터를 "재조합 발현 벡터"(또는 간단히, "발현 벡터")라고 한다.

[0121] 본 명세서에서, "재조합 숙주 세포"(또는 간단히 "숙주 세포")라는 용어는 재조합 발현 벡터가 유입된 세포를 의미한다. "재조합 숙주 세포" 및 "숙주 세포"는 특정 대상 세포뿐만 아니라 그러한 세포의 자손도 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 왜냐하면 돌연변이나 환경적인 영향 때문에 특정 변형이 다음 세대에서도 일어날 수 있기 때문인데, 그러한 자손은 사실, 부모 세포와 동일하지는 않지만, 본 출원에서는 여전히 "숙주 세포"라는 용어의 범위 내에 포함된다.

[0122] 본 명세서에서, "선택적으로 결합 가능하다"는 용어는 1 μM 이하, 바람직하게는 1 nM 이하 및 가장 바람직하게

는 10 pM 이하의 해리 상수로 항체가 항원에 결합한다는 의미이다.

[0123] 본 명세서에서, "선택적으로 하이브리드한다"라는 용어는 검출적으로 그리고 선택적으로 결합한다는 의미이다. 본 발명에 따라서 폴리뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드 및 그들의 절편은 비특이적 핵산에 결합하는 검출 가능한 상당한 양을 최소화하는 하이브리다이제이션 및 워시 조건 하에서 핵산 가닥에 선택적으로 하이브리드한다. "높은 엄중함(high stringency)" 또는 "매우 엄중한(high stringent)" 조건은 당업자에 알려지고 본 출원에서 논의된 선택적인 하이브리다이제이션 조건을 얻기 위해 사용된다. "높은 엄중함" 또는 "매우 엄중한" 조건의 한 가지 예는 폴리뉴클레오타이드와 또다른 폴리뉴클레오타이드와의 인큐베이션이다. 이 경우, 하나의 폴리뉴클레오타이드를 6× SSPE 또는 SSC, 50% 포름아미드, 5× Denhardt 시약, 0.5% SDS, 100 ㎍/ml 변성된, 절편화된 연어 정자 DNA의 하이브리다이제이션 완충제에서 하이브리다이제이션 온도 42℃에서 12 내지 16 시간 동안, 하나의 폴리뉴클레오타이드는 멤브레인과 같은 고체 표면에 부착시킬 수 있고, "IX SSC, 0.5% SDS 워시 완충제를 사용하여 55℃에서 2회 세척한다. 또한 Sambrook et al., *supra*, pp. 9.50-9.55를 참조하라.

[0124] 핵산 서열과 관련하여 "퍼센트 서열 동일성(percent sequence identity)"이라는 용어는 첫 번째 인접하는 서열과 두 번째 인접하는 서열이 최대한 일치하도록 비교 및 정렬하였을 때 잔기의 퍼센트를 의미한다. 서열 동일성 비교의 길이는 적어도 약 9 뉴클레오타이드, 주로 적어도 약 18 뉴클레오타이드, 더욱 주로 적어도 약 24 뉴클레오타이드, 일반적으로 적어도 약 28 뉴클레오타이드, 더욱 일반적으로 적어도 약 32 뉴클레오타이드, 그리고 바람직하게는 적어도 약 36, 48 또는 그 이상의 뉴클레오타이드의 길이일 수 있다. 뉴클레오타이드 서열 동일성을 측정하는 데에 사용할 수 있는 알고리즘은 당업계에 많이 알려져 있다. 예를 들면, 폴리뉴클레오타이드 서열은 Wisconsin Package 버전 10.0, Genetics Computer Group(GCG), Madison, Wisconsin의 프로그램인 FASTA, Gap 또는 BESTFIT을 사용하여 비교할 수 있다. 예컨대, 프로그램 FASTA2 및 FASTA3을 포함하는 FASTA는 큐리와 검색 서열 간의 가장 오버랩되는 부위의 정렬과 퍼센트 서열 동일성을 제공한다(Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185-219 (2000); Pearson, *Methods Enzymol.* 266:227-258 (1996); Pearson, *J. Mol. Biol.* 276:71 -84 (1998)). 만일 다른 언급이 없으면, 특정 프로그램 또는 알고리즘의 디폴트 파라미터가 사용된다. 예를 들면, 핵산 서열 간의 퍼센트 서열 동일성은 디폴트 파라미터의 FASTA를 사용하거나(단어 크기 6 및 매트릭스 획득을 위한 NOPAM 인자) GCG 버전 6.1에서 제공되는 디폴트 파라미터의 Gap을 사용하여 결정할 수 있다.

[0125] "폴리뉴클레오타이드" 또는 "핵산" 서열이라는 용어는 별도의 언급이 없으면 그것의 상보 서열을 포함한다. 따라서, 특정 서열을 갖는 핵산에 대한 용어는 그것의 상보 서열과 함께 상보 가닥을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0126] "실질적 유사성" 또는 "실질적 서열 유사성"이라는 용어는, 핵산 또는 절편과 관련하여, 다른 핵산(또는 그것의 상보 가닥)에 적절한 뉴클레오타이드의 삽입이나 삭제를 통해 최상적으로 정렬되었을 때, 상기 논의된 것처럼 가령 FASTA, BLAST 또는 Gap과 같은 서열 동일성의 잘 알려진 어떠한 알고리즘에 의해서 측정된 바, 적어도 약 85%, 바람직하게는 적어도 약 90%, 더욱 바람직하게는 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 뉴클레오타이드 염기의 뉴클레오타이드 서열 동일성이 있다는 것을 의미한다.

[0127] 폴리펩타이드와 관련하여, "실질적 동일성", "퍼센트 동일성" 또는 "% 동일성"이라는 용어는 2개의 펩타이드 서열이, 최적으로 정렬되었을 때, 디폴트 갭 질량을 사용한 GAP 또는 BESTFIT 같은 프로그램에 의해, 적어도 70%, 75% 또는 80%의 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 90% 또는 95%의 서열 동일성, 그리고 더욱 바람직하게는 적어도 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 공유한다는 것을 의미한다. 일태양에 있어서, 동일하지 않은 잔기 위치는 보존적 아미노산 치환에 따라 다르다. "보존적 아미노산 치환"은 유사한 화학적 특성(예컨대, 전하 또는 소수성)의 측쇄 R 기를 갖는 다른 아미노산으로 치환하는 것을 의미한다. 일반적으로, 보존적 아미노산 치환은 단백질의 기능적 특성을 실질적으로 변화시키지 않는다. 보존적 치환에 의해 둘 이상의 아미노산 서열이 서로 달라지는 경우, 치환의 보존적 상태를 바로 잡기 위해 퍼센트 서열 동일성은 상향 조절될 수 있다. 이런 조절을 하기 위한 수단은 당업자에 잘 알려져 있다. 예컨대, Pearson, *Methods Mol. Biol.* 243:307-31 (1994)를 참조하라. 유사한 화학적 특성의 측쇄를 갖는 아미노산 기의 예에는 1) 지방족 측쇄: 글리신, 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신; 2) 지방족 하이드록실 측쇄: 세린 및 트레오닌; 3) 아미드-함유 측쇄: 아스파라긴 및 글루타민; 4) 방향족 측쇄: 페닐알라닌, 타이로신 및 트립토판; 5) 염기성 측쇄: 라이신, 아르기닌 및 히스티딘; 6) 산성 측쇄: 아스파르트산 및 글루탐산; 및 7) 황 함유 측쇄: 시스테인 및 메티오닌이 있다. 보존적 아미노산 치환 기에는 발린-류신-이소류신, 페닐알라닌-타이로신, 라이신-아르기닌, 알라닌-발린, 글루타메이트-아스파테이트 및 아스파라긴-글루타민이 있다.

[0128] 폴리펩타이드의 서열 동일성은 일반적으로 서열 분석 소프트웨어를 사용하여 측정한다. 단백질 분석 소프트웨어는 다양한 치환, 삭제 및 보존적 아미노산 치환을 포함한 다른 변형에 의한 유사성의 측정을 사용하여 서열을 매칭한다. 예를 들면, GCG는 디폴트 파라미터로 사용될 수 있는 "Gap" 및 "BESTFIT"과 같은 프로그램을 포함하는데, 프로그램과 함께 특화된 것으로서, 가까이 연관된 폴리펩타이드, 유기체의 다른 종들로부터의 상동의 폴리펩타이드 또는 와일드 타입 단백질 및 그들의 돌연변이 사이에 서열 상동성 또는 서열 동일성을 결정할 수 있다. 예컨대, GCG 버전 6.1을 참조하라. 폴리펩타이드 서열은 또한 디폴트 파라미터 또는 추천된 파라미터를 사용한 FASTA를 이용하여 비교할 수 있다. GCG 버전 6.1을 참조하라. (University of Wisconsin Wl) FASTA (예컨대, FASTA2 및 FAST A3)는 퓨리 및 검색 서열 사이에 가장 잘 오버랩되는 부분의 정렬 및 퍼센트 서열 동일성을 제공한다(Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63- 98 (1990); Pearson, *Methods MoI. Biol.* 132:185-219 (2000)). 본 발명의 서열을 수많은 다른 유기체로부터의 서열을 함유하는 데이터베이스와 비교할 때, 바람직한 다른 알고리즘으로는 프로그램과 함께 공급되어 디폴트 파라미터를 사용하는 컴퓨터 프로그램인 BLAST, 특히 blastp 또는 tblastn이 있다. 예컨대, Altschul et al., *J. MoI. Biol.* 215:403-410 (1990); Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402 (1997)를 참조하라. 상동성을 위해 비교되는 폴리펩타이드 서열의 길이는 일반적으로 적어도 약 16 아미노산 잔기, 주로 적어도 약 20 잔기, 더욱 주로 적어도 약 24 잔기, 일반적으로 적어도 약 28 잔기, 그리고 바람직하게는 약 35 잔기 이상이다. 수많은 다른 유기체로부터의 서열을 함유하는 데이터베이스를 검색할 때, 아미노산 서열을 비교하는 것이 바람직하다.

[0129] "치료에 효과적인 양"은 네오플라시아 증상의 치료나 예방을 포함하여 원하는 치료 결과를 얻기 위해서 필요한 투여량과 기간 동안의 효과적인 양을 의미한다. 투여량은 증상의 심각성이 완화되는 정도에 따라 달라질 수 있다는 것을 유념해야 한다. 나아가, 특정 환자에 따라, 그리고 개인적 필요와 조성물을 투여하거나 투여를 감독하는 사람의 전문적인 판단에 따라서, 특정 투여 요법이 시간에 따라 조절되어야 한다는 것과 본 출원에 기술된 투여량은 단지 예시일 뿐이며 청구된 조성물의 범위나 용도를 제한하기 위한 것이 아니라는 것임을 밝힌다. 마찬가지로, 항체나 항체 부분의 치료에 효과적인 양은 개인의 질병 상태, 나이, 성별 및 체중, 개인에서 원하는 반응을 유도하는 항체 또는 항체 부분의 능력 및 항체 조성의 원하는 투여 경로와 같은 요소에 따라 달라질 수 있다. 치료에 효과적인 양은 또한 항체 또는 항체 부분의 어떠한 유독하거나 유해한 효과가 치료적으로 유용한 효과에 의해 상쇄되는 양이기도 하다.

[0130] 본 명세서에서, 치료 목적과 관련된 "환자"라는 용어는 모든 환자를 포함하며, 바람직하게는 네오플라시아 증상의 치료를 필요로 하는 환자이다. 예방 목적과 관련하여서는, 환자는 어떠한 대상도 가능하며, 바람직하게는 네오플라시아 증상에 걸릴 가능성이 있거나 걸리기 쉬운 대상을 뜻한다. "환자"라는 용어는 살아있는 유기체, 예컨대, 원핵세포 및 진핵세포를 포함한다. 이러한 환자의 예로는 포유류, 예컨대, 인간, 개, 소, 말, 돼지, 양, 염소, 고양이, 마우스, 토끼, 래트 및 유전자이식 비-인간 동물이 있다. 본 발명의 일태양에 있어서, 환자는 인간이다.

[0131] 본 명세서에서, 본 출원에서 교환적으로 사용되는 "네오플라시아" 및 "네오플라시아 증상"이라는 용어는 정상적 성장 조절에 대한 반응성의 결핍에서 기인하는 새로운 세포 성장, 예컨대 "종양" 세포의 성장을 의미한다. 본 출원에서 네오플라시아는 또한 "암"이라는 용어와 교환적으로 사용되고, 본 발명의 목적을 위해서, 암은 네오플라시아의 하위개념이다. 본 명세서에서, "네오플라시아 증상"이라는 용어는 또한 증식, 화생(metaplasia) 및 형성이상(dysplasia)과 같은 다른 세포 이상을 포함한다. 네오플라시아, 화생, 형성이상 및 증식이라는 용어는 본 출원에서 교환적으로 사용될 수 있고 일반적으로 비정상적으로 성장 중인 세포를 의미한다.

[0132] 본 명세서에서, "치료"라는 용어는 치료 및 예방적이거나 방지적 방법을 모두 의미하는데, 이때 그 목적은 특정한 병리학적 질병이나 질병을 예방하거나 완화시키는(줄이는) 것이다. 치료가 필요한 대상에는 이미 질병에 걸린 대상뿐만 아니라 질병에 걸리기 쉽거나 질병을 예방할 대상도 포함된다.

[0133] 본 발명의 요소나 그들의 바람직한 구체예를 소개할 때, 단수는 하나 이상의 요소가 있다는 것을 의미한다. "포함하여 이루어지는", "포함하여 이루어진다", "포함한다", "포함하는" 및 "갖는"이라는 용어는 포괄적이고 열거된 요소 이외에 추가적인 요소가 있을 수 있다는 것을 의미한다.

[0134] ***항-CTLA-4 항체***

[0135] 본 발명에 따르면, 항-CTLA-4 항체를 에틸렌디아민테트라아세트산("EDTA")과 같은 약학적으로 허용가능한 킬레이트제와 함께 혼합함으로써 특정 단일클론 항-CTLA-4 항체의 안정도가 증진될 수 있다는 것이 밝혀졌다.

[0136] 이론상 이에 국한되는 것은 아니지만, 본 발명의 조성물에의 킬레이트제의 존재는 항-CTLA-4 항체 응집,

절편화, 산화, 냉동/해동 불안정성, 변색 및/또는 탈아미드화 중 하나 이상의 빈도를 줄임으로써 항체 폴리펩타이드의 안정도를 증진시키는 것을 돕는다고 믿어진다. 본 발명은 이전에 공지된 항체 조성물에 비교하여 증진된 화학적 및/또는 물리학적 안정도를 갖는 항-CTLA-4 항체 제제를 포함하여 이루어진다.

[0137] 따라서, 일태양에 있어서, 본 발명은 EDTA와 같은 약학적으로 허용가능한 킬레이트제 및 단일클론 항-CTLA-4 항체 또는 그 항원결합 부분을 포함하여 이루어진 조성물을 제공한다. 또다른 태양에 있어서, 킬레이트제를 포함하여 이루어진 전술한 항-CTLA-4 항체 액상 조성물은, 이에 한정된 것은 아니지만 완충제, 항산화제, 등장화제, 계면활성제 및 그 혼합물로부터 선택되는, 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함한다.

[0138] 본 발명은 항-CTLA-4 항체를 위한 새로운 제제를 제공한다. 본 명세서에서, "항-CTLA-4 항체"라는 용어는 어떠한 동물 내에 있거나 그로부터 분리된 세포독성 T-림프구-연관 단백질 4("CTLA-4") 폴리펩타이드의 어떠한 부분에 결합할 수 있는 어떠한 항체나 그것의 어떠한 부분을 의미한다. 일태양에 있어서, CTLA-4 폴리펩타이드는 인간 CTLA-4 폴리펩타이드이다.

[0139] 본 발명에 이용되는 적당한 항-CTLA-4 항체는 다클론 또는 단일클론 항체로부터 선택될 수 있다. 일태양에 있어서, 단일클론 항-CTLA-4 항체는 뮤린(murine) 항체, 키메라 항체, 인간화 항체 또는 인간 항체일 수 있다. 다른 태양에 있어서, 단일클론 항-CTLA-4 항체는 인간 단일클론 항-CTLA-4 항체이다.

[0140] 일태양에 있어서, 본 발명에서 사용되기 적당한 항-CTLA-4 항체는 Hanson, et al.의 1999. 12. 23의 미국특허 제6,682,736호에 기술된 항-CTLA-4 항체와 그 제조 방법을 포함한다. 다른 태양에 있어서, 본 발명에서 사용되기 적당한 항-CTLA-4 항체는 미국특허 제6,682,736호의 11.2.1로 표시된 항체의 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열을 갖는 항-CTLA-4 단일클론 항체을 포함한다. 다른 태양에 있어서, 본 발명에서 사용되기 적당한 항-CTLA-4 항체는 티실리무맙 항체 및 이필리무맙의 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열을 갖는 항-CTLA-4 단일클론 항체를 포함한다. 다른 태양에 있어서, 본 발명에서 사용되기 적당한 항-CTLA-4 항체는 티실리무맙 항체의 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열을 갖는 항-CTLA-4 단일클론 항체를 포함한다.

[0141] 본 명세서에서, 차례로 언급되는 항체는 같은 수의 하이브리도마로부터 얻은 단일클론 항체로서 동일한 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열을 갖는다. 예를 들어, 단일클론 항체 11.2.1은 하이브리도마 11.2.1로부터 얻은 것과 동일한 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열을 갖는다. 따라서, 항체 11.2.1에 대한 참조는 항체, 티실리무맙(상표명)을 포함하는데, 이는 SEQ ID NO. 2 및 4에 나타난 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열과 SEQ ID NO. 5에 나타난 중쇄를 위한 가변 부위 그리고 SEQ ID NO. 6에 나타난 경쇄를 위한 가변 부위를 갖는다. 또한 중쇄에 말단 라이신이 없는 항체를 포함하는데, 제조하는 동안 항체의 비율이 정상적으로 상실된다.

[0142] 또한, 그러한 항-CTLA-4 항체는 그들의 중쇄의 불변 부위의 아미노산 서열의 차이에 기반하여 선택될 수 있다. 예를 들어, 항-CTLA-4 항체는 "감마" 타입 중쇄를 갖는 IgG 클래스로부터 선택될 수 있는데, 항-CTLA-4 항체의 클래스 및 서브클래스는 당업계에 공지된 방법으로 결정될 수 있다. 일반적으로, 항체의 클래스 및 서브클래스는 항체의 특정 클래스 및 서브클래스에 특이적인 항체를 사용하여 결정될 수 있다. 그러한 항체는 상업적으로 이용가능하다. 클래스 및 서브클래스는 ELISA, 웨스턴 블롯, 기타 다른 기술을 이용하여 결정될 수 있다. 다른 한편, 클래스 및 서브클래스는 항체의 중쇄 및/또는 경쇄의 불변 부위의 전체나 부분을 시퀀싱하고, 그들의 아미노산 서열을 면역글로불린의 다양한 클래스 및 서브클래스의 알려진 아미노산 서열과 비교하고, 항체의 클래스 및 서브클래스를 결정함으로써 결정될 수 있다.

[0143] 항-CTLA-4 항체는 IgG, IgM, IgE, IgA 또는 IgD 분자일 수 있다. 다른 태양에 있어, 항-CTLA-4 항체는 IgG로서 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서브클래스이다. 그러나, 일반적으로 CTLA-4 발현세포를 사멸시키는 것은 바람직하지 않으며, 일반적으로 단지 CTLA-4가 리간드와 결합하는 것을 억제하여 T 세포 하향조절(down regulation)을 완화하는 것이 바람직하다. 항체가 세포를 사멸시키는 주요 메커니즘 중 한 가지는 보체 결합 및 CDC 참여이다. 항체의 불변 부위는 항체의 보체 결합 및 CDC 참여 능력과 관련하여 중요한 역할을 한다. 따라서, 일반적으로 보체 결합 능력을 제공하거나 또는 그렇지 않기 위하여 항체의 아이소타입(isotype)을 선택하게 된다. 본 발명의 경우, 위에서 언급한 바와 같이, 세포를 사멸시키는 항체를 이용하는 것은 일반적으로 바람직하지 않다. 보체 결합 및 CDC 능력을 가지는 항체의 아이소타입은 그 수가 매우 많다. 예컨대, 뮤린 IgM, 뮤린 IgG2a, 뮤린 IgG2b, 뮤린 IgG3, 인간 IgM, 인간 IgG1 및 인간 IgG3가 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다. 한편, 보체 결합 및 CDC 능력이 없는 아이소타입의 바람직한 예로는 인간 IgG2 및 인간 IgG4가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 중쇄 서열의 차이 외에도, IgG 항체들은 이황화 결합의 수 및 힌지 부분(hinge region)의 길이에 있어 서브클래스들 간에 다른 점이 있다. 예를 들어, IgG2 서브클래스는 몇 가지 점에서 다른 서브클래스와 구별된다. IgG2 및 IgG4 서브클래스는 힌지 부분 내에 4개의 이황화 결합을 가지는 것으로 알려진 반면,

IgG1은 2개, IgG3는 11개의 이황화 결합을 갖는다. IgG2 항체의 다른 구별되는 특징으로는 태반 횡단(cross) 능력이 낮고 림프구 Fc 수용체와 결합하지 못한다는 점이 포함된다. 따라서, 일태양에 있어서, 상기 항-CTLA-4 항체는 IgG2 또는 IgG4 서브클래스이다. 다른 바람직한 태양에 있어서, 상기 항-CTLA-4 항체는 IgG2 서브클래스이다.

[0144] 다른 태양에 있어서, 중쇄의 아미노산 서열 차이에 기인하여 적절한 항-CTLA-4 항체를 선택할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항-CTLA-4 항체는 인간 V_H 배아 유전자 V_H1, V_H2, V_H3, V_H4 또는 V_H5 중 어느 하나를 이용하는 인간 감마 타입 중쇄를 가질 수 있다. 일태양에 있어서, 상기 항-CTLA-4 항체는 인간 V_H3 배아 유전자를 이용한다. 다른 태양에 있어서, 상기 항-CTLA-4 항체는 인간 V_H3 배아 유전자 및 인간 DP-50 또는 DP-46 중쇄 가변 부위를 이용하며, 다른 태양에 있어서, 상기 항-CTLA-4 항체는 인간 DP-50 중쇄 가변 부위를 이용한다. DP-50 유전자는 V_H 3-33 계열 유전자라고도 하며, DP-46 유전자는 V_H 3-30.3 계열 유전자라고도 한다. 다른 태양에 있어서, 상기 항-CTLA-4 항체는 D1-26, DIR4 및 DIR3로부터 선택되는 인간 D_H 유전자를 이용하며, 다른 태양에 있어서, 상기 항-CTLA-4 항체는 D1-26 인간 D_H 유전자를 이용한다. 다른 태양에 있어서, 상기 항-CTLA-4 항체는 J_H4 및 J_H6로부터 선택되는 인간 J_H 유전자를 이용하며, 다른 태양에 있어서, 상기 항-CTLA-4 항체는 J_H6 인간 J_H 유전자를 이용한다.

[0145] 다른 태양에 있어서, 경쇄의 아미노산 서열 차이에 기인하여 적절한 항-CTLA-4 항체를 선택할 수 있다. 예를 들어, 적당한 항-CTLA-4 항체는 람다 경쇄 또는 카파 경쇄를 가질 수 있다. 그러나 일태양에 있어서, 본 발명의 항-CTLA-4 항체는 카파 경쇄를 갖는다. 항-CTLA-4 항체가 카파 경쇄를 포함하는 일태양에 있어서, 상기 경쇄의 가변 부위를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 인간 V_KL5, 012, L2, B3, L15 또는 A27 유전자 및 인간 J_K1, J_K2, J_K3, J_K4 또는 J_K5 유전자를 포함한다. 상기 항체가 카파 경쇄를 포함하는 일태양에 있어서, 경쇄 가변 부위(V_L)는 부분적으로 인간 V_K012 또는 V_KA27 유전자 및 인간 J_K3 또는 J_K4 유전자에 의해 암호화된다. 본 발명의 일태양에 있어서, 상기 경쇄 가변 부위는 인간 V_K012/J_K3 유전자에 의해 암호화된다.

[0146] 또한, 상기 항체는 V_H 3-30 또는 3-33 유전자, 그 보존적 치환체 또는 체세포 돌연변이로부터 유래된 인간 CDR 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 아미노산 서열을 포함할 수 있다. V_H 3-33 유전자는 항체 분자의 중쇄 가변 부위의 FR1 내지 FR3를 암호화할 수 있는 것으로 알려져 있다. 따라서, 본 발명은 티실리무맙 항체의 FR1 내지 FR3 서열과 적어도 85%, 더욱 바람직하게는 적어도 90%, 더더욱 바람직하게는 적어도 91%, 보다 바람직하게는 적어도 94%, 더더욱 바람직하게는 적어도 95%, 더욱 바람직하게는 적어도 97%, 보다 바람직하게는 적어도 98%, 더더욱 바람직하게는 적어도 99%, 그리고 가장 바람직하게는 100% 동일성을 공유하는 항체를 포함한다.

[0147] 상기 항체는 또한 경쇄 내에 A27 또는 012 유전자로부터 유래된 CDR 부위를 포함할 수 있으며, 티실리무맙 항체의 CDR 부위를 포함할 수 있다.

[0148] 본 발명의 다른 태양에 있어서, 상기 항체는 CTLA-4와 B7-1 또는 B7-2 둘 모두 사이의 결합을 억제한다. 바람직하게는, 상기 항체는 B7-1과의 결합을 IC_{50}이 약 100 nM 이하, 더욱 바람직하게는 약 10 nM 이하, 예를 들어 약 5 nM 이하, 더더욱 바람직하게는 약 2 nM 이하, 더더욱 바람직하게는, 예를 들어 약 1 nM 이하가 되도록 억제할 수 있다. 마찬가지로, 상기 항체는 B7-2와의 결합을 IC_{50}이 약 100 nM 이하, 더욱 바람직하게는 약 10 nM 이하, 예를 들어 더더욱 바람직하게는 약 5 nM 이하, 더더욱 바람직하게는 약 2 nM 이하, 더더욱 바람직하게는 약 1 nM 이하가 되도록 억제할 수 있다.

[0149] 또한, 또다른 태양에 있어서, 상기 항-CTLA-4 항체는 CTLA-4에 대하여 약 10^{-8} 이상, 더욱 바람직하게는 약 10^{-9} 이상, 더욱 바람직하게는 약 10^{-10} 이상, 더더욱 바람직하게는 약 10^{-11} 이상의 결합 친화력을 가진다.

[0150] 상기 항-CTLA-4 항체는 티실리무맙 항체의 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열을 갖는 항체와 결합 경쟁을 하는 항체를 포함한다. 또한, 상기 항-CTLA-4 항체는 이필리무맙 항체와도 결합 경쟁을 할 수 있다.

[0151] 또다른 태양에 있어서, 상기 항체는 바람직하게는 중쇄 및 경쇄 서열, 티실리무맙 항체의 가변 중쇄 및 가변 경쇄 서열 및/또는 중쇄 몇 경쇄 CDR 서열을 가지는 항체와 교차 경쟁(cross-competition)한다. 예를 들어, 상기 항체는 티실리무맙 항체의 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열, 가변 서열 및/또는 CDR 서열을 가지는 항체가 결합하는

항원결정기에 결합할 수 있다. 또다른 태양에 있어서, 상기 항체는 MDX-D010의 중쇄 및 경쇄 서열 또는 항원결합 서열을 가지는 항체와 교차 경쟁한다.

[0152] 또다른 태양에 있어서, 본 발명은 티실리무맙 항체의 CDR-1, CDR-2 및 CDR-3의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄와 CDR-1, CDR-2 및 CDR-3 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 또는 비극성 잔기가 다른 비극성 잔기로 교체, 극성 하전(charged) 잔기가 다른 극성 비하전(uncharged) 잔기로 교체, 극성 하전 잔기가 다른 극성 하전 잔기로 교체 및 구조적으로 유사한 잔기로의 치환으로 구성되는 군에서 선택되는 보존적 변경; 및 극성 하전 잔기를 극성 비하전 잔기로 치환 및 비극성 잔기를 극성 잔기로 치환, 삽입 및 결실로 구성되는 군에서 선택되는 비보존적 치환으로 구성되는 군에서 선택되는 CDR 서열상의 변화를 가지는 서열을 포함하는 항-CTLA-4 항체를 이용한다.

[0153] 또다른 태양에 있어서, 상기 항체는 프레임워크 또는 CDR 부위의 배아 서열로부터 10개, 7개, 5개 또는 3개 미만의 아미노산 변경을 가진다. 또다른 태양에 있어서, 상기 항체는 프레임워크 부위에서 5개 미만의 아미노산 변경을, CDR 부위에서 10개 미만의 아미노산 변경을 가진다. 바람직한 일태양에 있어서, 상기 항체는 프레임워크 부위에서 3개 미만의 아미노산 변경을, CDR 부위에서 7개 미만의 아미노산 변경을 가진다. 바람직한 태양에 있어서, 프레임워크 부위의 상기 변경은 보존적이며 CDR 부위에서의 상기 변경은 체세포 돌연변이이다.

[0154] 더더욱 바람직하게는, 상기 항체는 티실리무맙 항체의 중쇄 및 경쇄에 걸쳐 또는 중쇄 또는 경쇄 각각에 대하여 100%의 서열 동일성 또는 서열 유사성을 공유한다.

[0155] 또다른 태양에 있어서, 상기 항체는 중쇄 및 경쇄의 서열 길이 전체에 걸쳐 또는 중쇄 또는 경쇄 각각에 대하여, 배아 V_K A27, 배아 V_K 012 및 배아 DP50(V_H 3-33 유전자 자리의 대립유전자)의 서열과 적어도 80%, 더욱 바람직하게는 적어도 85%, 더더욱 바람직하게는 적어도 90%, 더더욱 바람직하게는 적어도 94%, 더욱 바람직하게는 적어도 95%, 더더욱 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성 또는 서열 유사성을 공유한다. 더더욱 바람직하게는, 상기 항체는 배아 DP50의 중쇄 서열에 걸쳐 및/또는 배아 A27 또는 배아 012의 경쇄 서열과 100%의 서열 동일성 또는 서열 유사성을 공유한다.

[0156] 일태양에 있어서, 상기 항체는 중쇄 및 경쇄 가변 부위 서열에 걸쳐서 또는 중쇄 또는 경쇄 가변 부위 서열 각각에 걸쳐서, 3.1.1, 4.1.1, 4.8.1, 4.10.2, 4.13.1, 4.14.3, 6.1.1, 티실리무맙, 11.6.1, 11.7.1, 12.3.1.1, 12.9.1.1, 이필리무맙의 서열과 적어도 80%, 더욱 바람직하게는 적어도 85%, 더더욱 바람직하게는 적어도 90%, 더더욱 바람직하게는 적어도 94%, 바람직하게는 적어도 95%, 더욱 바람직하게는 적어도 99%의 서열(예컨대, 아미노산, 핵산 또는 둘 다) 동일성 또는 서열 유사성을 공유한다. 더더욱 바람직하게는, 상기 항체는 중쇄 및 경쇄 가변 부위 서열에 걸쳐 또는 중쇄 또는 경쇄 서열과 각각, 3.1.1, 4.1.1, 4.8.1, 4.10.2, 4.13.1, 4.14.3, 6.1.1, 티실리무맙, 11.6.1, 11.7.1, 12.3.1.1, 12.9.1.1 및 이필리무맙에서 선택되는 항체와 100%의 서열 동일성 또는 서열 유사성을 공유한다.

[0157] 또다른 태양에 있어서, 상기 항체는 중쇄 가변 부위 서열에 걸쳐서, 중쇄 배아 DP50(V_H 3-33 유전자 자리의 대립유전자)의 중쇄 가변 서열 또는 배아 V_K A27 또는 배아 V_K 012의 경쇄 가변 서열과 적어도 80%, 더욱 바람직하게는 적어도 85%, 더더욱 바람직하게는 적어도 90%, 더더욱 바람직하게는 적어도 94%, 더욱 바람직하게는 적어도 95%, 더더욱 바람직하게는 적어도 99%, 서열 동일성 또는 서열 유사성을 공유한다. 더더욱 바람직하게는, 상기 항체의 중쇄 부위 서열은 배아 DP50의 서열 또는 배아 A27 또는 배아 012의 경쇄 서열과 100%의 서열 동일성 또는 서열 유사성을 공유한다.

[0158] 본 발명의 일태양에 있어서, 상기 항체는 티실리무맙 항체의 FR1 내지 FR4 부위의 중쇄 서열, 경쇄 서열 또는 둘 다와 적어도 80%, 더욱 바람직하게는 적어도 85%, 더더욱 바람직하게는 적어도 90%, 더더욱 바람직하게는 적어도 95%, 더욱 바람직하게는 적어도 99%, 서열 동일성 또는 서열 유사성을 공유한다. 더더욱 바람직하게는, 상기 항체는 티실리무맙 항체의 FR1 내지 FR4 부위의 중쇄 서열, 경쇄 서열 또는 둘 다에 대하여 100%의 서열 동일성 또는 서열 유사성을 공유한다.

[0159] 본 발명의 다른 태양에 있어서, 상기 항체는 배아 DP50의 FR1 내지 FR3 부위의 중쇄 서열과 적어도 80%, 더욱 바람직하게는 적어도 85%, 더더욱 바람직하게는 적어도 90%, 더더욱 바람직하게는 적어도 95%, 더욱 바람직하게는 적어도 99%, 그리고 가장 바람직하게는 약 100%의 서열 동일성 또는 서열 유사성을 공유한다.

[0160] 본 발명의 또다른 태양에 있어서, 상기 항체는 배아 V_K A27, 또는 배아 V_K 012의 FR1 내지 FR4 부위의 경쇄 서열과 적어도 80%, 더욱 바람직하게는 적어도 85%, 더더욱 바람직하게는 적어도 90%, 더더욱 바람직하게는 적어도 95%, 더욱 바람직하게는 적어도 99%, 그리고 가장 바람직하게는 약 100%의 서열 동일성 또는 서열 유사성을 공

유한다.

[0161] 본 발명의 일태양에 있어서, 상기 항체는 티실리무맙 항체의 CDR-1, CDR-2 및 CDR-3 중쇄 서열, 경쇄 서열 또는 둘 다와 적어도 80%, 더욱 바람직하게는 적어도 85%, 더더욱 바람직하게는 적어도 90%, 더더욱 바람직하게는 적어도 95%, 더욱 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성 또는 서열 유사성을 공유한다. 더더욱 바람직하게는, 상기 항체는 티실리무맙 항체의 CDR-1, CDR-2 및 CDR-3 중쇄 서열, 경쇄 서열 또는 둘 다와 100%의 서열 동일성 또는 서열 유사성을 공유한다.

[0162] 본 발명의 다른 태양에 있어서, 상기 항체는 중쇄 CDR-1 및 CDR-2 서열에 있어 배아 DP50의 CDR-1 및 CDR-2 서열과 적어도 80%, 더욱 바람직하게는 적어도 85%, 더더욱 바람직하게는 적어도 90%, 더더욱 바람직하게는 적어도 95%, 더욱 바람직하게는 적어도 99%, 그리고 가장 바람직하게는 약 100%의 서열 동일성 또는 서열 유사성을 공유한다.

[0163] 본 발명의 또다른 태양에 있어서, 상기 항체 경쇄 CDR-1, CDR-2 및 CDR-3 서열에 있어 배아 V_K A27 또는 배아 V_K 012의 CDR-1, CDR-2 및 CDR-3 서열과 적어도 80%, 더욱 바람직하게는 적어도 85%, 더더욱 바람직하게는 적어도 90%, 더더욱 바람직하게는 적어도 95%, 더욱 바람직하게는 적어도 99%, 그리고 가장 바람직하게는 약 100%의 서열 동일성 또는 서열 유사성을 공유한다.

[0164] 일태양에 있어서, 상기 항-CTLA-4 항체는 티실리무맙으로 알려진 항체이다.

[0165] 표 1에 항-CTLA-4 단일클론 항체 11.2.1(티실리무맙)로부터 유래된 중쇄 및 경쇄 인간 배아 유전자를 기재하였다.

표 1

[0166]

클론	중쇄 DNA				중쇄 DNA		
11.2.1	SEQ ID NO:	V_H	D_H	J_H	SEQ ID NO:	V_K	J_K
	1 (cDNA) (전체 길이)	DP-50 (3-33)	D1-26	6	3 (cDNA) (전체 길이)	O12	3

[0167] 본 발명에 따른 항-CTLA-4 항체 중 일부는 DP-50 중쇄 가변 부위를 이용하는 쪽으로 치우쳐져(with a bias) 생성되었다. DP-50 유전자는 V_H 3-33 계열 유전자라고도 한다. XenoMouse(상표명) 마우스의 경우, 30개 이상의 기능적으로 구별되는, 항체 생성 중쇄 가변 유전자가 존재한다. 따라서, 이와 같은 편중현상(bias)은 항원과의 결합 및 기능 활성의 결합된 특성과 관련하여 항체-항원 상호작용의 바람직한 결합 모티프를 시사한다.

[0168] 일태양에 있어서, 상기 항체는 V_L 및 V_H 부위가 쌍을 이루어, 하나의 단백질 사슬로 만들어지게 해 주는 합성 링커(synthetic linker)를 통해 1가(monovalent) 분자를 형성하는 단일사슬 항체(scFv)이다. Bird et al., *Science* 242:423-426 (1988) 및 Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988). 일태양에 있어서, 상기 항체는 다이어보디, 즉 V_H 및 V_L 부위가 하나의 폴리펩타이드 사슬 상에서 발현되지만, 같은 사슬 상의 두 부위를 짝짓기에는 길이가 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 해당 부위가 다른 사슬의 상보적 부위와 쌍을 이루게 하여 2개의 항원 결합자리를 형성하는 2가 항체이다. 예컨대, Holliger P. et al., *Proc. Natl. Acad. Scl USA* 90:6444-6448 (1993) 및 Poljak R. J. et al., *Structure* 2: 1121-1123 (1994)를 참고하라. 일태양에 있어서, 본 발명의 항체로부터 공유결합 또는 비공유결합에 의해 하나 이상의 CDR이 하나의 분자 내로 편입되어(incorporated) CTLA-4와 특이적으로 결합하는 면역접합체를 형성할 수 있다. 이 경우, 상기 CDR(들)은 더 큰 폴리펩타이드 사슬의 일부로서 편입되거나, 공유결합에 의해 다른 폴리펩타이드 사슬과 연결되거나, 비공유결합에 의해 편입될 수 있다.

[0169] 또다른 태양에 있어서, 상기 항-CTLA-4 항체는 CTLA-4에 대하여, 다른 임의의 폴리펩타이드에 대한 선택성보다 적어도 100배 이상의 선택성(또는 특이성)을 갖는다. 일태양에 있어서, 상기 항-CTLA-4 항체는 CTLA-4 이외의 다른 단백질에 대하여 뚜렷한 특이적 결합을 나타내지 않는다. CTLA-4에 대한 항-CTLA-4 항체의 선택성은 본 명세서에 개시된 바에 따라 당업자에게 잘 알려진 방법을 이용하여 결정할 수 있다. 예를 들면, 웨스턴 블롯, FACS, ELISA 또는 RIA를 이용하여 선택성을 결정할 수 있다. 따라서, 일태양에 있어서, 상기 단일클론 항-CTLA-4 항체는 CTLA-4에 대하여 특이적 결합능력을 가진다.

[0170] 일태양에 있어서, 본 발명의 항-CTLA-4 항체의 중쇄는 C-말단 라이신을 가지지 않는다. 본 발명의 일태양에 있어서, 상기 항-CTLA-4 항체는 일반적으로 시그널 폴리펩타이드를 포함하지 않는다. 시그널 폴리펩타이드는 일반적으로 번역 후 변형(post-translational modification) 과정 중에 제거되기 때문이다. 본 발명의 다양한 태양에 있어서, 상기 항-CTLA-4 항체의 중쇄 및 경쇄 중 하나 또는 양자 모두는 시그널 서열(또는 시그널 서열의 일부)을 포함한다. 본 발명의 다른 태양에 있어서, 상기 항-CTLA-4 항체의 중쇄 및 경쇄 모두 시그널 서열을 포함하지 않는다.

[0171] 표 2에 항-CTLA-4 단일클론 항체 11.2.1에 대한 중쇄 및 경쇄의 가변 부위 및 그에 대해 예측되는 아미노산 서열을 암호화하는 핵산의 서열 식별기호(SEQ ID NO)를 기재하였다.

표 2

[0172]

인간 항-CTLA-4 항체 11.2.1				
MAb	서열 식별기호(SEQ ID NO)			
	중쇄		경쇄	
	cDNA	아미노산	cDNA	아미노산
11.2.1(전체 길이)	1	2	3	4

[0173] 일태양에 있어서, 상기 핵산 분자는 단일클론 항체 11.2.1(SEQ ID NO: 4)의 V_L 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 또는 그 부분을 포함한다. 일태양에 있어서, 상기 부분은 적어도 CDR2 부위를 포함한다. 일태양에 있어서, 싱기 핵산은 상기 항체의 경쇄 CDR의 아미노산 서열을 암호화한다. 일태양에 있어서, 상기 부분은 CDR1 내지 CDR3를 포함하는 인접하는 부분이다. 일태양에 있어서, 상기 경쇄 CDR1 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 10에 의해, 상기 경쇄 CDR2 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 11에 의해, 상기 경쇄 CDR3 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 12에 의해 표시된다.

[0174] 다른 태양에 있어서, 상기 핵산 분자는 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%가 SEQ ID NO: 4의 V_L 아미노산 서열과 동일한 V_L 아미노산 서열을 암호화한다. 다른 태양에 있어서, 상기 핵산 분자는 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열 또는 그 부분을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 본 발명의 핵산 분자는 본 명세서에 기술된 것과 같은 매우 엄격한 조건 하에서 하이브리드화하여 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열을 형성하는 핵산을 포함한다.

[0175] 다른 태양에 있어서, 상기 핵산 분자는 11.2.1(SEQ ID NO: 2)의 V_H 아미노산 서열 또는 보존적 아미노산 돌연변이 및/또는 3개 이하의 비보존적 아미노산 치환을 갖는 상기 서열의 적어도 일부분을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 다양한 태양에 있어서, 상기 서열은 하나 이상의 CDR 부위, 바람직하게는 CDR3 부위, 3개의 CDR 부위 모두, CDR1 내지 CDR3를 포함하는 인접하는 부분 또는 전체 V_H 부위를 암호화한다. 일태양에 있어서, 상기 중쇄 CDR1 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 7에 의해, 상기 중쇄 CDR2 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 8에 의해, 상기 중쇄 CDR3 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 9에 의해 표시된다.

[0176] 일태양에 있어서, 상기 핵산 분자는 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%가 SEQ ID NO: 2의 V_H 아미노산 서열과 동일한 V_H 아미노산 서열을 암호화한다. 다른 태양에 있어서, 상기 핵산 분자는 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열 또는 그 일부분을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 본 발명의 핵산 분자는 본 명세서에 기술된 것과 같은 매우 엄격한 조건 하에서 하이브리드화하여 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열을 형성하는 핵산을 포함한다.

[0177] 일태양에 있어서, 본 발명은 인간 V_H 3-33 배아 유전자를 이용하는 V_H 아미노산 서열을 포함하는, CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 분리된 인간 항체; 및 킬레이트제를 포함하는 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약학적 액상 조성물을 제공한다.

[0178] 다른 태양에 있어서, 본 발명은 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 분리된 인간 항체를 포함하는 약학적 액상 조성물에 있어서, 상기 항체가 SEQ ID NO: 2와 적어도 90%의 서열 동일성을 가지는 중쇄 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 4와 적어도 90%의 서열 동일성을 가지는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0179] 다른 태양에 있어서, 본 발명은 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 분리된 인간 항체를 포함하는 약학적 액상 조성물에 있어서, 상기 항체가 SEQ ID NO: 2와 적어도 95%의 서열 동일성을 가지는 중쇄 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 4와 적어도 95%의 서열 동일성을 가지는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0180] 다른 태양에 있어서, 본 발명은 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 분리된 인간 항체를 포함하는 약학적 액상 조성물에 있어서, 상기 항체가 SEQ ID NO: 2와 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 중쇄 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 4와 적어도 99%의 서열 동일성을 가지는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0181] 또다른 태양에 있어서, 상기 항체는 SEQ ID NO: 2의 가변 부위를 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 4의 가변 부위를 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 다른 태양에 있어서, 상기 항체는 SEQ ID NO: 5를 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 6를 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 다른 태양에 있어서, 상기 항체는 SEQ ID NO: 2를 포함하는 중쇄 아미노산 서열 및 SEQ ID NO: 4를 포함하는 경쇄 아미노산 서열을 포함한다. 또다른 태양에 있어서, 상기 항체는 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열과 프레임이 맞도록 실시가능하게 연결된 인간 V_H 3-33 유전자군을 이용하는 인간 FR1, FR2 및 FR3 서열을 포함하는 V_H 아미노산 서열을 포함한다.

[0182] 일태양에 있어서, 상기 항-CTLA-4 항체는 티실리무맙(CP-675,206)으로서, 티실리무맙 항체의 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열을 가진다.

[0183] 본 발명의 일태양에 있어서, 상기 항-CTLA-4 항체는 인간 CTLA-4의 배좌 항원결정기에 특이적으로 결합한다. 다른 태양에 있어서, 상기 항-CTLA-4 항체는 환자에게 투여했을 때 인간 종양의 성장을 억제한다.

[0184] ***단일클론 항-CTLA-4 항체 제제의 제조***

[0185] 상기 항-CTLA-4 항체는 일반적으로 비경구 투여용 약학적 조성물의 형태로 제제화된다. 일태양에 있어서, 상기 약학적 조성물은 액상 조성물이다.

[0186] 본 발명의 조성물은 본 발명에 따른 하나 이상의 항-CTLA-4 단일클론 항체 및 히스티딘 및/또는 킬레이트제를 포함하는 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함한다. 본 발명의 액상 제제는 본 발명에 따른 하나 이상의 항-CTLA-4 단일클론 항체와 히스티딘 및/또는 킬레이트제를 포함하는 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함한다.

[0187] "약학적 조성물"이라 함은 유효성분의 생물학적 활성이 효과를 나타낼 수 있도록 형성된 제제를 뜻한다. "약학적으로 허용가능한 부형제"(비히클, 첨가제)란 합리적으로(즉, 안전하게) 환자에게 투여되어 사용된 유효성분의 유효량(effective dose)을 제공해 줄 수 있는 것을 뜻한다. 본 명세서에서, "부형제" 또는 "운반체"란 주로 약물의 희석제, 운반체, 보존제, 결합제 또는 안정화제로 사용되는 비활성 물질을 뜻한다. 본 명세서에서, "희석제"란 약학적으로 허용가능한(인체에 투여했을 경우 안전하며 독성을 나타내지 않는) 용매로서 본 발명의 액상 제제 제조에 유용한 것을 뜻한다. 희석제의 예로는, 멸균수(sterile water) 및 주사용 정균처리수(bacteriostatic water for injection, BWFI)가 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0188] 또다른 태양에 있어서, 본 발명은 항-CTLA-4 항체 및 약학적으로 허용가능한 킬레이트제를 포함하는 조성물을 제공한다. 또다른 태양에 있어서, 본 발명은 항-CTLA-4 항체 및 EDTA를 포함하는 본 발명은 약학적 액상 조성물을 제공한다. 또다른 태양에 있어서, 본 발명은 항-CTLA-4 항체 및 DTPA를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0189] 또다른 태양에 있어서, 본 발명은 항-CTLA-4 항체, 약학적으로 허용가능한 킬레이트제 및 약학적으로 허용가능한 완충제를 포함하는 조성물을 제공한다. 또다른 태양에 있어서, 본 발명은 항-CTLA-4 항체, 약학적으로 허용가능한 킬레이트제 및 히스티딘을 포함하는 조성물을 제공한다. 또다른 태양에 있어서, 본 발명은 항-CTLA-4 항체, EDTA 및 히스티딘을 포함하는 조성물을 제공한다. 또다른 태양에 있어서, 본 발명은 항-CTLA-4 항체, DTPA1 및 히스티딘을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0190] 또다른 태양에 있어서, 본 발명은 항-CTLA-4 항체, 약학적으로 허용가능한 킬레이트제 및 약학적으로 허용가능한 등장화제를 포함하는 조성물을 제공한다. 또다른 태양에 있어서, 본 발명은 항-CTLA-4 항체, 약학적으로 허용가능한 킬레이트제 및 트레할로스를 포함하는 조성물을 제공한다. 또다른 태양에 있어서, 본 발명은 항-CTLA-4 항체, EDTA 및 트레할로스를 포함하는 조성물을 제공한다. 또다른 태양에 있어서, 본 발명은 항-CTLA-4 항체, DTPA 및 트레할로스를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0191] 또다른 태양에 있어서, 본 발명은 항-CTLA-4 항체, 약학적으로 허용가능한 킬레이트제 및 약학적으로 허용가능한 계면활성제를 포함하는 조성물을 제공한다. 또다른 태양에 있어서, 본 발명은 항-CTLA-4 항체, EDTA 및 약학적으로 허용가능한 계면활성제를 포함하는 조성물을 제공한다. 또다른 태양에 있어서, 본 발명은 항-CTLA-4 항체, DTPA 및 약학적으로 허용가능한 계면활성제를 포함하는 조성물을 제공한다. 또다른 태양에 있어서, 본 발명은 항-CTLA-4 항체, EDTA 및 DTPA로 구성되는 군에서 선택되는 약학적으로 허용가능한 킬레이트제 및 폴리소르베이트 80을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0192] 또다른 태양에 있어서, 본 발명은 항-CTLA-4 항체, 약학적으로 허용가능한 완충제 및 약학적으로 허용가능한 계면활성제를 포함하는 조성물을 제공한다. 또다른 태양에 있어서, 본 발명은 항-CTLA-4 항체, 히스티딘 및 약학적으로 허용가능한 계면활성제를 포함하는 조성물을 제공한다. 또다른 태양에 있어서, 본 발명은 항-CTLA-4 항체, 히스티딘 및 폴리소르베이트 80을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0193] 또다른 태양에 있어서, 본 발명은 항-CTLA-4 항체, 약학적으로 허용가능한 킬레이트제, 약학적으로 허용가능한 완충제 및 약학적으로 허용가능한 계면활성제를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0194] 또다른 태양에 있어서, 본 발명은 항-CTLA-4 항체, 약학적으로 허용가능한 킬레이트제, 약학적으로 허용가능한 완충제 및 약학적으로 허용가능한 등장화제를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0195] 또다른 태양에 있어서, 본 발명은 항-CTLA-4 항체, 약학적으로 허용가능한 킬레이트제, 약학적으로 허용가능한 완충제, 약학적으로 허용가능한 계면활성제 및 약학적으로 허용가능한 등장화제를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0196] 또다른 태양에 있어서, 본 발명은 항-CTLA-4 항체 및 히스티딘을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0197] 상기 조성물에 포함되는 항-CTLA-4 항체는 전술한 바와 같다. 일태양에 있어서, 상기 조성물은 SEQ ID NO: 4의 V_L 아미노산 서열과 90%, 95% 또는 99%가 동일한 V_L 아미노산 서열을 포함하며 또한 SEQ ID NO: 2의 V_H 아미노산 서열과 90%, 95% 또는 99%가 동일한 V_H 아미노산 서열을 포함하는 항-CTLA-4 항체를 포함한다. 또다른 태양에 있어서, 상기 조성물은 단일클론 항-CTLA-4 항체 11.2.1인 항-CTLA-4 항체를 포함한다.

[0198] 상기 약학적 액상 조성물에 포함되는 항-CTLA-4 항체는 전술한 바와 같다. 일태양에 있어서, 상기 약학적 액상 조성물은 SEQ ID NO: 4의 V_L 아미노산 서열과 90%, 95% 또는 99%가 동일한 V_L 아미노산 서열을 포함하며 또한 SEQ ID NO: 2의 V_H 아미노산 서열과 90%, 95% 또는 99%가 동일한 V_H 아미노산 서열을 포함하는 항-CTLA-4 항체를 포함한다. 또다른 태양에 있어서, 상기 약학적 액상 조성물은 단일클론 항-CTLA-4 항체 11.2.1인 항-CTLA-4 항체를 포함한다.

[0199] 본 발명의 약학적 액상 조성물 내에 존재하는 항-CTLA-4 항체의 농도는 일반적으로 적어도 약 0.1 밀리그램/밀리리터(mg/ml) 이상, 적어도 약 1.0 mg/ml 이상, 적어도 약 10 mg/ml 이상, 적어도 약 50 mg/ml 이상, 적어도 약 100 mg/ml 이상 또는 적어도 약 200 mg/ml 이상이다. 일태양에 있어서, 상기 항-CTLA-4 항체의 농도는 일반적으로 약 0.1 mg/ml 내지 약 200 mg/ml, 약 0.5 mg/ml 내지 약 100 mg/ml, 약 1 mg/ml 내지 약 70 mg/ml, 약 2.0 mg/ml 내지 약 65 mg/ml, 약 5.0 mg/ml 내지 약 50 mg/ml, 약 10 mg/ml 내지 약 35 mg/ml, 약 15 mg/ml 내지 약 25 mg/ml 범위 또는 약 20 mg/ml이다. 일태양에 있어서, 상기 약학적 액상 조성물의 상기 항-CTLA-4 항체의 농도는 약 50 mg/ml 내지 약 100 mg/ml 범위이다. 일태양에 있어서, 피하 투여하는 경우 항체의 농도를 더 높일 수 있다.

[0200] 본 명세서에서, "킬레이트제"란 일반적으로 금속이온과 적어도 하나의 결합(예컨대, 공유결합, 이온결합 등)을 형성할 수 있는 부형제를 뜻한다. 킬레이트제는 일반적으로 특정 액상 조성물에서 불안정성을 초래할 수 있는 물질을 착화시키는 안정화제로 사용될 수 있는 여러자리(multidentate) 리간드이다. 많은 경우에 있어, 킬레이트제로 작용할 수 있는 화합물은 전자가 풍부한 작용기를 갖는다. 전자가 풍부한 작용기의 적절한 예로는 카르복시산기, 하이드록시기 및 아미노기가 포함된다. 아미노폴리카르복시산, 하이드록시폴리카르복시산, 하이드록시아미노카르복시산 등에서 이들 작용기의 배치상태에 따라 금속과의 결합능력을 가지는 부분이 생겨나게 된다.

[0201] 그러나, 본 발명의 킬레이트제는 금속이온과 결합하는 능력을 가지는 킬레이트제로 제한되지 않는다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 제제 내에서 킬레이트제가 작용하는 구체적인 메커니즘에 의해 제한되지 않으며 본 명세서에서 킬레이트제라고 칭해지는 부형제는 금속이온과의 결합능력과는 완전히 무관한 메커니즘을 통해서도 그 특성이 달성될 수 있다.

[0202] 본 발명에 이용되기에 적당한 킬레이트제에는 아미노폴리카르복시산, 하이드록시아미노카르복시산, N-치환 글리신, 2-(2-아미노-2-옥소칠) 아미노에탄 술폰산(BES), 데페록사민(DEF), 시트르산, 니아신아미드 및 데속시콜레이드가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 적당한 아미노폴리카르복시산의 예에는 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), 디에틸렌트리아민 펜타아세트산 5(DTPA), 니트릴로트리아세트산(NTA), N-2-아세트아미도-2-이미노디아세트산(ADA), 비스(아미노에틸)글리콜에테르, N,N,N',N'-테트라아세트산(EGTA), 트랜스-디아미노사이클로헥산 테트라아세트산(DCTA), 글루탐산 및 아스파르트산이 포함된다. 적당한 하이드록시아미노카르복시산의 예에는 N-하이드록시에틸이미노디아세트산(HIMDA), N,N-비스-하이드록시에틸글리신(비신) 및 N-(트리스하이드록시메틸

메틸) 10 글리신(트리신)이 포함된다. 적당한 N-치환 글리신의 예에는 글리실글리신이 포함된다. 적당한 데속시콜레이드의 예에는 나트륨 데속시콜레이드가 포함된다. 둘 이상의 킬레이트제의 혼합물 역시 본 발명의 범위에 포함된다.

[0203] 본 발명에 이용되는 킬레이트제는, 가능하다면, 유리산 또는 유리염기 형태(예컨대, "EDTA" 또는 "이디테이트"의 형태로) 또는 그에 상응하는 염의 형태(예컨대, 디나트륨 이디테이트와 같이 산 부가염 또는 염기 부가염의 형태로)로 존재할 수 있다. 적당한 산 부가염의 예에는 알칼리금속염(예컨대, 나트륨염 또는 포타슘염), 알칼리토금속염(예컨대, 칼슘염) 및 기타 약하게 결합된 금속이온으로부터 제조 가능한 염이 포함된다. 당업계에 공지된 바와 같이, 염의 특성과 중성화에 필요한 전하의 수는 카르복시기의 수 및 킬레이트제가 공급될 때의 pH에 따라 달라지게 된다. 또한, 당업계에 공지된 바와 같이, 킬레이트제는 결합하고 있는 이온의 종류에 따라 그 세기가 달라지게 된다. 이해를 돕기 위해 예를 들자면, 적절한 EDTA 염에는 디포타슘 이디테이트, 디나트륨 이디테이트, 이디테이트 칼슘 디나트륨, 나트륨 이디테이트, 트리나트륨 이디테이트 및 포타슘 이디테이트이 포함되며; 적절한 데페록사민(DEF) 염은 데페록사민 메실레이트(DFM)이다.

[0204] 본 발명에 이용되는 킬레이트제는 무수물 형태, 용매화된 형태 또는 수화된 형태로 존재할 수 있다. 킬레이트제가 용매화된 형태 또는 수화된 형태로 존재로 존재하는 경우, 여러 상태(예컨대, 무수물, 수화물, (등록상표명) 및 3수화물 형태)로 존재할 수 있다. 이해를 돕기 위해 예를 들자면, 적절한 EDTA 수화물은 디나트륨 EDTA(등록상표명)이며; 시트르산의 적절한 형태에는 무수 시트르산, 시트르산 1수화물 및 트리나트륨 시트레이트-(등록상표명)이 포함된다.

[0205] 본 발명의 항체 조성물에 사용되기에 적당한 킬레이트제에는 또한, 예를 들어, 용액 내에서 금속이온과 결합하여 O_2와 반응하지 못하도록 함으로써, 항체와 자유롭게 반응하여 항체를 변성시키는 하이드록실 라디칼의 생성을 최소화 또는 억제하는 킬레이트제가 포함된다. 킬레이트제는 본 발명의 조성물 내에서 환원 산소종(reduced oxygen species)의 생성을 억제하고, 산류의 생성(예컨대, 탈아미드화)을 줄이며, 항체 응집을 줄이거나 항체 절편화를 줄일 수 있다. 이러한 킬레이트제는 킬레이트제를 보호하지 않으면서 제형화되는 항체의 변성을 감소시키거나 억제할 수 있다.

[0206] 킬레이트제와 관련하여 언급된 농도는 킬레이트제의 유리산 또는 유리염기 형태의 몰농도를 나타낸다. 예를 들어, 특정 약학적 액상 조성물에서 킬레이트제의 농도는 일반적으로 약 0.01 마이크로몰 내지 약 50 밀리몰, 약 1 마이크로몰 내지 약 10.0 밀리몰, 약 15 마이크로몰 내지 약 5.0 밀리몰, 약 0.01 밀리몰 내지 약 1.0 밀리몰 또는 약 0.03 밀리몰 내지 약 0.5 밀리몰 범위이다. 일태양에 있어서, 상기 약학적 액상 조성물에서 킬레이트제의 농도는 약 0.01 밀리몰, 0.02 밀리몰, 0.027 밀리몰, 0.03 밀리몰, 약 0.04 밀리몰, 약 0.05 밀리몰, 약 0.06 밀리몰, 약 0.07 밀리몰, 약 0.10 밀리몰, 약 0.20 밀리몰, 약 0.26 밀리몰, 약 0.27 밀리몰, 약 0.30 밀리몰, 약 0.31 밀리몰, 약 0.34 밀리몰, 약 0.40 밀리몰, 약 0.50 밀리몰 또는 약 1.0 밀리몰일 수 있다. 일태양에 있어서, 킬레이트제의 농도는 약 0.027 밀리몰, 약 0.05 밀리몰, 약 0.13 밀리몰 또는 약 0.27 밀리몰이다. 일태양에 있어서, 킬레이트제의 농도는 약 0.05 밀리몰이다. 또다른 태양에 있어서, 킬레이트제의 농도는 약 0.13 밀리몰이다.

[0207] 다른 언급이 없는 경우, 본 명세서에서 언급된 농도는 주변 조건(즉, 25℃ 및 대기압 조건)에서의 농도이다. 전술한 킬레이트제 농도범위 안에 속하는 농도 역시 본 발명의 범위에 속한다. 예를 들어, 전술한 농도값들 중 어느 것을 상한 및/또는 하한으로 하는 농도범위는 본 발명에 포함된다.

[0208] 일태양에 있어서, 상기 킬레이트제는 EDTA, DTPA, DFM 및 그 혼합물로 선택되는 군에서 선택된다. 또다른 태양에 있어서, 상기 킬레이트제는 DFM이다. 또다른 태양에 있어서, 상기 킬레이트제는 EDTA이다. 또다른 태양에 있어서, 상기 킬레이트제는 DTPA이다. 또다른 태양에 있어서, 상기 약학적 액상 조성물은 일반적으로 약 0.01 마이크로몰 내지 약 50 밀리몰, 약 1 마이크로몰 내지 약 20.0 밀리몰, 약 15 마이크로몰 내지 약 10.0 밀리몰, 약 0.01 밀리몰 내지 약 5.0 밀리몰 또는 약 0.03 밀리몰 내지 약 1 밀리몰 범위의 EDTA를 포함한다. 일태양에 있어서, 상기 약학적 액상 조성물의 EDTA의 농도는 약 0.01 밀리몰, 0.02 밀리몰, 0.027 밀리몰, 0.03 밀리몰, 약 0.04 밀리몰, 약 0.05 밀리몰, 약 0.06 밀리몰, 약 0.07 밀리몰, 약 0.10 밀리몰, 약 0.20 밀리몰, 약 0.26 밀리몰, 약 0.27 밀리몰, 약 0.30 밀리몰, 약 0.31 밀리몰, 약 0.34 밀리몰, 약 0.40 밀리몰, 약 0.50 밀리몰 또는 약 1.0 밀리몰일 수 있다. 일태양에 있어서, EDTA의 농도는 약 0.027 밀리몰, 약 0.05 밀리몰, 약 0.13 밀리몰 또는 약 0.27 밀리몰이다. 일태양에 있어서, EDTA의 농도 는 약 0.05 밀리몰이다. 또다른 태양에 있어서, EDTA의 농도는 약 0.13 밀리몰이다. 또다른 태양에 있어서, 상기 약학적 액상 조성물은 약 0.27 밀리몰의 EDTA를 포함한다.

[0209] 앞서 언급한 바와 같이, 본 발명의 조성물은 또한 킬레이트제 외에 약학적으로 허용가능한 완충제를 선택적으로 더 포함할 수 있다. 본 명세서에서, "완충제"라 함은 액상 항체 제제가 pH 변화에 저항할 수 있도록 해 주기 위해 첨가되는 성분을 뜻한다. 일태양에 있어서, 상기 완충제는 산-염기 짝(conjugate)성분 작용에 의해 액상 항체 제제가 pH 변화에 저항할 수 있도록 해 준다.

[0210] 예를 들어, L-히스티딘-HCl(L-히스티딘-염산염) 및 L-히스티딘을 원하는 pH에 도달하기에 적당한 양만큼 가함으로써 완충제제(buffered formulation)를 제조할 수 있다. 그러나 다른 태양에 있어서, 상기 완충제는 산-염기 짝성분 작용에 의해 액상 항체 제제가 pH 변화에 저항할 수 있도록 해 준다. 두 번째 예로서, 염산과 같은 산 및 L-히스티딘을 원하는 pH에 도달하기에 적당한 양만큼 가함으로써 완충제제를 제조할 수 있다.

[0211] 적당한 완충제의 예에는 아세테이트(예컨대, 나트륨 아세테이트), 숙시네이트(예컨대, 나트륨 숙시네이트), 글루코네이트, 시트레이트, 아미노산(예컨대, 히스티딘), 아세트산, 인산 및 포스페이트, 아스코르베이트, 타르타르산, 말레산, 글리신, 락테이트, 젖산, 아스코르브산, 이미다졸, 탄산 및 중탄산염, 숙신산, 벤조산나트륨 및 벤조에이트, 글루코네이트, 이디테이트(EDTA), 아세테이트, 말레이트, 이미다졸, 트리스, 포스페이트 등의 기타 유기산 완충제 및 그 혼합물이 포함되나, 이에 한정되는 것은 아니다. 일태양에 있어서, 상기 완충제는 아세테이트이다.

[0212] 또다른 태양에 있어서, 상기 완충제는 히스티딘이다. 본 발명의 조성물 제조에 이용되는 히스티딘 출발물질은 여러 형태로 존재할 수 있다. 예를 들어, 상기 히스티딘은 히스티딘의 에난시오머 형태(예컨대, L- 또는 D-에난시오머) 또는 라세믹 형태, 히스티딘의 유리산 또는 유리염기 형태, 히스티딘의 염 형태(예컨대, 모노하이드로클로라이드, 디하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 설페이트 또는 아세테이트 염), 히스티딘의 용매화된 형태, 히스티딘의 수화된 형태(예컨대, 1수화물) 또는 히스티딘의 무수물 형태일 수 있다. 상기 조성물 제조에 사용되는 히스티딘 염기 및/또는 염의 순도는 일반적으로 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 적어도 약 99.5%일 수 있다. 본 명세서에서, 히스티딘과 관련하여 "순도"라 함은 당업계에서 이해되는 바 히스티딘의 화학적 순도, 예컨대, The Merck Index, 13th ed., O'Neil et al. ed. (Merck & Co., 2001)에 기술된 순도를 뜻한다.

[0213] 완충제와 관련하여 언급된 농도는 완충제의 유리산 또는 유리염기 형태의 몰농도를 나타낸다. 예를 들어, 특정 약학적 액상 조성물에서 완충제의 농도는 약 0.1 밀리몰(mM) 내지 약 100 mM 범위일 수 있다. 일태양에 있어서, 완충제의 농도는 약 1 mM 내지 약 50 mM이다. 또다른 태양에 있어서, 완충제의 농도는 약 5 mM 내지 약 30 mM이다. 다양한 태양에 있어서, 완충제의 농도는 약 1 mM, 약 5 mM, 약 10 mM, 약 15 mM, 약 20 mM, 약 25 mM, 약 30 mM, 약 35 mM, 약 40 mM, 약 45 mM, 약 50 mM, 약 55 mM, 약 60 mM, 약 65 mM, 약 70 mM, 약 75 mM, 약 80 mM, 약 85 mM, 약 90 mM, 약 95 mM 또는 약 100 mM이다. 일태양에 있어서, 상기 약학적 조성물의 히스티딘의 농도는 약 10mM이다. 또다른 태양에 있어서, 상기 약학적 조성물은 약 10 mM의 L-히스티딘(염기 형태)을 포함한다. 또다른 태양에 있어서, 상기 약학적 조성물의 히스티딘의 농도는 약 20 mM이다. 또다른 태양에 있어서, 상기 약학적 조성물은 약 20 mM의 L-히스티딘(염기 형태)를 포함한다. 전술한 히스티딘 농도범위 안에 속하는 농도 역시 본 발명의 범위에 속한다. 예를 들어, 전술한 농도값들 중 어느 것을 상한 및/또는 하한으로 하는 농도범위는 본 발명에 포함된다.

[0214] 일반적으로, 상기 완충제는 약학적 액상 조성물을 적당한 pH 수준(항체 안정도에 영향을 미칠 수 있음)으로 유지하기 위하여 사용된다. 일반적으로 상기 약학적 액상 조성물은 약 4 내지 약 8; 약 4.5 내지 약 7; 약 5.0 내지 6.5 또는 약 5.3 내지 약 6.3의 pH 범위로 유지된다. 전술한 pH 범위 안에 속하는 pH 역시 본 발명의 범위에 속한다. 예를 들어, 전술한 pH 값들 중 어느 것을 상한 및/또는 하한으로 하는 pH 범위는 본 발명에 포함된다. 일태양에 있어서, 상기 약학적 액상 조성물은 약 5.5의 pH로 유지된다. 또다른 태양에 있어서, 상기 약학적 액상 조성물은 약 6.0의 pH로 유지된다.

[0215] 전술한 바와 같이, 본 발명의 조성물은 킬레이트제 외에 약학적으로 허용가능한 등장화제를 선택적으로 더 포함할 수 있다. 본 명세서에서, "등장화제" 또는 "등장제"라 함은 액상 항체 제제의 삼투압을 조절할 수 있는 부형제를 뜻한다. 일태양에 있어서, 상기 등장화제는 등장성이 되도록 액상 항체 제제의 삼투압을 조절하여 항체 제제가 환자의 체조직의 세포와 생리학적으로 양립가능하도록 할 수 있다. 또다른 태양에 있어서, 상기 "등장화제"는 본 명세서에 기술된 임의의 항-CTLA-4 항체의 안정도를 개선하는 데 기여할 수 있다. "등장성" 제제란 인간 혈액과 삼투압이 실질적으로 동일한 제제를 뜻한다. 등장성 제제는 일반적으로 약 250 내지 350 mOsm의 삼투압을 가진다. "저장성"이라 함은 제제의 삼투압이 인간 혈액보다 낮은 경우를 일컫는다. 그리고, "고장성"이라 함은 제제의 삼투압이 인간 혈액보다 높은 경우를 일컫는다. 등장성 정도는 예컨대 증기압식 또

는 빙결식(ice-freezing) 삼투압계를 이용하여 측정할 수 있다.

[0216] 본 발명의 조성물을 제조하는 데 이용되는 등장화제는 여러 형태로 존재할 수 있다. 본 명세서에서 등장화제라 함은 이들 여러 형태를 모두 포함한다. 예를 들어, 등장화제는 에난시오머 형태(예컨대, L- 또는 D-에난시오머) 또는 라세믹 형태; 알파, 알파; 또는 베타, 베타; 또는 알파, 베타; 또는 베타, 알파를 포함하는, 알파 또는 베타와 같은 이성질체; 유리산 또는 유리염기 형태; 수화물 형태(예컨대, 1수화물) 또는 무수물 형태일 수 있다.

[0217] 일태양에 있어서, 상기 등장화제는 사카라이드이다. 본 명세서에서, "사카라이드"라 함은 다가 알코올의 유도체 분자들을 뜻한다. 사카라이드는 흔히 탄수화물이라고도 하며 다른 양의 당(사카라이드) 단위, 예컨대, 단당류, 이당류 및 다당류를 포함할 수 있다. 본 발명에서 등장화제로 이용하기에 적당한 사카라이드에는 과당, 글루코스, 만노스, 소르보스, 자일로스, 락토스, 말토스, 수크로스, 덱스트란, 플루란, 덱스트린, 사이클로덱스트린, 가용성 전분, 하이드록시에틸 전분, 수용성 글루칸 및 그 혼합물로 구성되는 군에서 선택되는 사카라이드가 포함되나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0218] 또다른 태양에 있어서, 상기 등장화제는 폴리올이다. 본 명세서에서, "폴리올"이라 함은 하이드록실기를 여러 개 갖는 부형제를 뜻하며, 당(환원당 및 비환원당), 당알코올 및 당산(sugar acids)을 포함한다. 일태양에 있어서, 상기 폴리올은 약 600 kD(예컨대, 약 120 내지 약 400 kD 범위) 이하의 분자량을 가진다. "환원당"은 금속이온을 환원시키거나 단백질 내의 라이신 및 다른 아미노기와 공유결합할 수 있는 헤미아세탈기를 가지는 당이며, "비환원당"은 환원당의 이러한 특성을 가지지 않는 당이다. 본 발명에서 등장화제로 이용하기에 적당한 폴리올에는 만니톨, 트레할로스, 소르비톨, 에리스리톨, 이소말트, 락티톨, 말티톨, 자일리톨, 글리세롤, 락티톨, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 이노시톨 및 그 혼합물로 구성되는 군에서 선택되는 폴리올이 포함되나, 이에 한정되는 것은 아니다. 일태양에 있어서, 상기 등장화제는 트레할로스, 수크로스 및 그 혼합물로 구성되는 군에서 선택되는 비환원당이다.

[0219] 일태양에 있어서, 상기 등장화제는 만니톨이다. 또다른 태양에 있어서, 상기 등장화제는 D-만니톨이다. 또다른 태양에 있어서, 상기 등장화제는 트레할로스이다. 또다른 태양에 있어서, 상기 등장화제는 α,α-트레할로스 2수화물이다. 또다른 태양에 있어서, 상기 등장화제는 수크로스이다.

[0220] 일태양에 있어서, 상기 약학적 액상 조성물내에서 상기 등장화제의 농도는 약 1 밀리몰 내지 약 600 밀리몰, 약 1 밀리몰 내지 약 400 밀리몰, 1 밀리몰 내지 약 300 밀리몰, 또는 200 밀리몰 내지 약 275 밀리몰 범위이다. 또다른 태양에 있어서, 상기 등장화제는 만니톨이며 약학적 액상 조성물 내에 약 247 밀리몰의 농도로 존재한다. 또다른 태양에 있어서, 상기 등장화제는 트레할로스이며 약학적 액상 조성물 내에 약 222 밀리몰의 농도로 존재한다. 또다른 태양에 있어서, 상기 등장화제는 트레할로스이며 약학적 액상 조성물 내에 약 238 밀리몰의 농도로 존재한다. 또다른 태양에 있어서, 상기 등장화제는 수크로스이며 약학적 액상 조성물 내에 약 263 밀리몰의 농도로 존재한다.

[0221] 일태양에 있어서, 상기 약학적 액상 조성물내에서 상기 등장화제의 농도는 약 1 mg/ml 내지 약 300 mg/ml, 약 1 mg/ml 내지 약 200 mg/ml 또는 약 50 mg/ml 내지 약 150 mg/ml 범위이다. 또다른 태양에 있어서, 상기 등장화제는 만니톨이며 약학적 액상 조성물 내에 약 45 mg/ml 밀리몰의 농도로 존재한다. 또다른 태양에 있어서, 상기 등장화제는 트레할로이며 약학적 액상 조성물 내에 약 84 mg/ml의 농도로 존재한다. 또다른 태양에 있어서, 상기 등장화제는 트레할로스이며 약학적 액상 조성물 내에 약 90 mg/ml의 농도로 존재한다. 또다른 태양에 있어서, 상기 등장화제는 수크로스 이며 약학적 액상 조성물 내에 약 90 mg/ml의 농도로 존재한다.

[0222] 일태양에 있어서, 상기 등장화제는 염화나트륨과 같은 염이다. 일태양에 있어서, 상기 등장화제가 염인 경우, 약학적 액상 조성물에서 그 염의 농도는 약 1 mg/ml 내지 약 20 mg/ml 범위이다. 또다른 태양에 있어서, 상기 등장화제는 염화나트륨이며 약학적 액상 조성물의 염화나트륨 농도는 약 8.18 mg/ml이다.

[0223] 전술한 등장화제의 농도범위 안에 속하는 농도 역시 본 발명의 범위에 속한다. 예를 들어, 전술한 농도값들 중 어느 것을 상한 및/또는 하한으로 하는 농도범위는 본 발명에 포함된다.

[0224] 전술한 바와 같이, 본 발명의 조성물은 킬레이트제 외에 약학적으로 허용가능한 계면활성제를 선택적으로 더 포함할 수 있다. 본 명세서에서, "계면활성제"라 함은 액상 항체 제제의 표면장력을 변화시킬 수 있는 부형제를 뜻한다. 일태양에 있어서, 상기 계면활성제는 액상 항체 제제의 표면장력을 감소시킨다. 또다른 태양에 있어서, 상기 "계면활성제"는 본 명세서에 기술된 임의의 항-CTLA-4 항체의 안정도 증진에 기여할 수 있다. 예를 들어, 상기 계면활성제는 제제화된 항체의 응집을 감소 및/또는 제제 내 입자형성을 최소화 및/또는 흡착을 감

소시킬 수 있다. 상기 계면활성제는 또한 냉동/해동 사이클 과정에서 또는 그 후의 항체의 안정도를 향상시킬 수 있다.

[0225] 적당한 계면활성제에는 폴리소르베이트 계면활성제, 폴록사머(예컨대, 폴록사머 18 및 407), 트리톤 계면활성제(예컨대, Triton X-100(등록상표명)), 폴리소르베이트 계면활성제(예컨대, Tween 20(등록상표명) 및 Tween 80(등록상표명)), 나트륨 도데실 설페이트, 나트륨 라우렐 설페이트, 나트륨 옥틸 글리코사이드, 라우릴- 술포베타인, 미리스틸-술포베타인, 리놀레닐-술포베타인, 스테아릴-술포베타인, 라우릴-사르코신, 미리스틸-사르코신, 리놀레닐-사르코신, 스테아릴-사르코신, 리놀레닐-베타인, 미리스틸-베타인, 세틸- 베타인, 라우로아미도프로필-베타인, 코카미도프로필-베타인, 리놀레아미도프로필-베타인, 미리스트아미도프로필-베타인, 팔미도프로필-베타인, 이소스트에라미도프로필-베타인, 미리스트아미도프로필-디메틸아민, 팔미도프로필-디메틸아민, 이소스트에라미도프로필- 디메틸아민, 나트륨 메틸 코코일-타우레이트, 디나트륨 메틸올레일-타우레이트, 디하이드록시프로필 peg 5 리놀레암모늄 클로라이드, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜 및 그 혼합물이 포함된다.

[0226] 일태양에 있어서, 상기 계면활성제는 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 21, 폴리소르베이트 40, 폴리소르베이트 60, 폴리소르베이트 61, 폴리소르베이트 65, 폴리소르베이트 80, 폴리소르베이트 81, 폴리소르베이트 85 및 그 혼합물로 선택되는 군에서 선택되는 적어도 하나의 부형제를 포함하는 폴리소르베이트 계면활성제이다. 또다른 태양에 있어서, 상기 약학적 액상 조성물은 폴리소르베이트 80을 포함한다.

[0227] 상기 조성물에서 상기 계면활성제의 농도범위는 일반적으로 약 0.01 mg/ml 내지 약 10 mg/ml, 약 0.05 mg/ml 내지 약 5.0 mg/ml, 약 0.1 mg/ml 내지 약 1.0 mg/ml 또는 약 0.2 mg/ml 내지 약 0.7 mg/ml이다. 또다른 태양에 있어서, 상기 계면활성제는 약 0.2 mg/ml의 양으로 존재한다. 또다른 태양에 있어서, 상기 계면활성제는 약 0.5 mg/ml의 양으로 존재한다. 일태양에 있어서, 상기 약학적 액상 조성물은 약 0.2 mg/ml의 폴리소르베이트 80을 포함한다. 또다른 태양에 있어서, 상기 약학적 액상 조성은 약 0.4 mg/ml의 폴리소르베이트 80을 포함한다. 또다른 태양에 있어서, 상기 약학적 액상 조성물은 약 0.5 mg/ml의 폴리소르베이트 80을 포함한다.

[0228] 전술한 계면활성제의 농도범위 안에 속하는 농도 역시 본 발명의 범위에 속한다. 예를 들어, 전술한 농도값들 중 어느 것을 상한 및/또는 하한으로 하는 농도범위는 본 발명에 포함된다.

[0229] 본 발명의 조성물은 킬레이트제 외에 약학적으로 허용가능한 항산화제를 선택적으로 포함할 수 있다. 적당한 항산화제에는 메티오닌, 나트륨 티오설페이트, 카탈라제 및 백금이 포함되나 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 상기 약학적 액상 조성물은 1 mM 내지 약 100 mM의 농도범위, 특히 약 27 mM의 메티오닌을 포함할 수 있다.

[0230] 일태양에 있어서, 본 발명은 적어도 95%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함하며 또한 적어도 95%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물을 포함한다.

[0231] 일태양에 있어서, 본 발명은 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 인간 단일클론 항-CTLA 항체와 킬레이트제를 포함하는 조성물을 포함한다.

[0232] 일태양에 있어서, 본 발명은 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 인간 단일클론 항-CTLA 항체와 킬레이트제를 포함하는 약학적 액상 조성물을 포함한다.

[0233] 일태양에 있어서, 본 발명은 적어도 95%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함하며 또한 적어도 95%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와; 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물이 적어도 약 10 mg/ml, 적어도 약 15 mg/ml, 적어도 약 20 mg/ml 또는 적어도 약 25 mg/ml 농도의 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 포함한다.

[0234] 일태양에 있어서, 본 발명은 적어도 95%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함하며 또한 적어도 95%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와; 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약학적 액상 조성물에 있어서, 상기 조성물은 약 10 mg/ml 내지 약 200 mg/ml 농도범위의 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 포함한다.

[0235] 일태양에 있어서, 본 발명은 적어도 95%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함하며 또한 적어도 95%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 인간 CTLA-

4와 결합하는 적어도 하나의 항체와; 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물은 약 15 mg/ml 내지 약 200 mg/ml 농도범위의 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 포함한다.

[0236] 일태양에 있어서, 본 발명은 적어도 95%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함하며 또한 적어도 95%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와; 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물은 약 20 mg/ml 내지 약 200 mg/ml 농도범위의 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 포함한다.

[0237] 일태양에 있어서, 본 발명은 적어도 95%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함하며 또한 적어도 95%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와; 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물은 약 50 mg/ml 내지 약 200 mg/ml 농도범위의 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 포함한다.

[0238] 일태양에 있어서, 본 발명은 적어도 95%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함하며 또한 적어도 95%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와; 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약학적 액상 조성물에 있어서, 상기 조성물은 약 100 mg/ml 내지 약 200 mg/ml 농도범위의 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 포함한다.

[0239] 일태양에 있어서, 본 발명은 적어도 95%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함하며 또한 적어도 95%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와; 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물은 약 10 mg/ml 내지 약 25 mg/ml 농도범위의 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 포함한다.

[0240] 일태양에 있어서, 본 발명은 적어도 95%가 SEQ ID NO: 2의 중쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함하며 또한 적어도 95%가 SEQ ID NO: 4의 경쇄 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 인간 CTLA-4와 결합하는 적어도 하나의 항체와; 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물은 약 20 mg/ml 농도의 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물을 포함한다.

[0241] 일태양에 있어서, 상기 약학적 액상 조성물은 약 0.01 mg/ml 내지 약 200 mg/ml의 단일클론 항-CTLA-4 티실리무맙 항체; 및 약 0.3 마이크로몰 내지 약 50 밀리몰의 킬레이트제를 포함한다.

[0242] 또다른 태양에 있어서, 상기 약학적 액상 조성물은 약 0.1 mg/ml 내지 약 100 mg/ml의 단일클론 항-CTLA-4 티실리무맙 항체; 및 약 3 마이크로몰 내지 약 5.0 밀리몰의 킬레이트제를 포함한다.

[0243] 또다른 태양에 있어서, 상기 약학적 액상 조성물은 약 0.1 mg/ml 내지 약 100 mg/ml의 단일클론 항-CTLA-4 티실리무맙 항체; 및 약 0.27 밀리몰의 킬레이트제를 포함한다.

[0244] 또다른 태양에 있어서, 상기 약학적 액상 조성물은 약 0.1 mg/ml 내지 약 100 mg/ml의 단일클론 항-CTLA-4 티실리무맙 항체; 및 약 0.3 마이크로몰 내지 약 50 밀리몰의 EDTA를 포함한다.

[0245] 또다른 태양에 있어서, 상기 약학적 액상 조성물은 약 0.1 mg/ml 내지 약 100 mg/ml의 단일클론 항-CTLA-4 티실리무맙 항체; 및 약 3 마이크로몰 내지 약 10.0 밀리몰의 EDTA를 포함한다.

[0246] 또다른 태양에 있어서, 상기 약학적 액상 조성물은 약 0.1 mg/ml 내지 약 100 mg/ml의 단일클론 항-CTLA-4 티실리무맙 항체; 및 약 0.1 밀리몰 내지 약 1.0 밀리몰의 EDTA를 포함한다.

[0247] 또다른 태양에 있어서, 상기 약학적 액상 조성물은 약 0.1 mg/ml 내지 약 100 mg/ml의 단일클론 항-CTLA-4 티실리무맙 항체; 및 약 0.27 밀리몰의 EDTA를 포함한다.

[0248] 또다른 태양에 있어서, 상기 약학적 액상 조성물은 약 0.1 mg/ml 내지 약 100 mg/ml의 단일클론 항-CTLA-4 티실리무맙 항체; 및 약 3 마이크로몰 내지 약 5.0 밀리몰의 DTPA를 포함한다.

[0249] 또다른 태양에 있어서, 상기 약학적 액상 조성물은 약 0.1 mg/ml 내지 약 100 mg/ml의 단일클론 항-CTLA-4 티실리무맙 항체; 및 약 3 마이크로몰 내지 약 5.0 밀리몰의 데페록사민을 포함한다.

[0250] 일태양에 있어서, 상기 약학적 액상 조성물은 약 0.01 mg/ml 내지 약 200 mg/ml의 단일클론 항-CTLA-4 티실리무맙 항체; 및 약 1 mM 내지 약 100 mM의 히스티딘을 포함한다.

[0251] 또다른 태양에 있어서, 상기 약학적 액상 조성물은 약 0.1 mg/ml 내지 약 200 mg/ml의 단일클론 항-CTLA-4 티실

리무맙 항체; 약 3 마이크로몰 내지 약 5.0 밀리몰의 킬레이트제; 및 약 1 mM 내지 약 100 mM의 히스티딘을 포함한다.

[0252] 또다른 태양에 있어서, 상기 약학적 액상 조성물은 약 0.1 mg/ml 내지 약 200 mg/ml의 단일클론 항-CTLA-4 티실리무맙 항체; 약 3 마이크로몰 내지 약 5.0 밀리몰의 킬레이트제; 및 약 10 밀리몰 내지 약 400 밀리몰의 트레할로스를 포함한다.

[0253] 또다른 태양에 있어서, 상기 약학적 액상 조성물은 약 0.1 mg/ml 내지 약 200 mg/ml의 단일클론 항-CTLA-4 티실리무맙 항체; 약 3 마이크로몰 내지 약 5.0 밀리몰의 킬레이트제; 약 10 밀리몰 내지 약 400 밀리몰의 트레할로스; 및 약 1 mM 내지 약 100 mM의 히스티딘을 포함한다.

[0254] 또다른 태양에 있어서, 상기 약학적 액상 조성물은 약 0.1 mg/ml 내지 약 200 mg/ml의 단일클론 항-CTLA-4 티실리무맙 항체; 약 3 마이크로몰 내지 약 5.0 밀리몰의 킬레이트제; 약 10 밀리몰 내지 약 400 밀리몰의 트레할로스; 약 1 mM 내지 약 100 mM의 히스티딘; 및 약 0.005 밀리몰 내지 약 10 밀리몰의 폴리소르베이트 80을 포함한다.

[0255] 또다른 태양에 있어서, 상기 약학적 액상 조성물은 약 0.1 mg/ml 내지 약 200 mg/ml의 단일클론 항-CTLA-4 티실리무맙 항체; 약 3 마이크로몰 내지 약 5.0 밀리몰의 EDTA; 약 10 밀리몰 내지 약 400 밀리몰의 등장화제; 약 1 mM 내지 약 100 mM의 완충제; 및 약 0.005 밀리몰 내지 약 10 밀리몰의 계면활성제를 포함한다.

[0256] 또다른 태양에 있어서, 상기 약학적 액상 조성물은 약 0.1 mg/ml 내지 약 200 mg/ml의 단일클론 항-CTLA-4 티실리무맙 항체; 약 3 마이크로몰 내지 약 5.0 밀리몰의 EDTA; 약 10 밀리몰 내지 약 400 밀리몰의 등장화제; 약 1 mM 내지 약 100 mM의 히스티딘; 및 0.005 밀리몰 내지 약 10 밀리몰의 계면활성제를 포함한다.

[0257] 또다른 태양에 있어서, 상기 약학적 액상 조성물은 약 0.1 mg/ml 내지 약 200 mg/ml의 단일클론 항-CTLA-4 티실리무맙 항체; 약 3 마이크로몰 내지 약 5.0 밀리몰의 EDTA; 약 10 밀리몰 내지 약 400 밀리몰의 트레할로스; 약 1 mM 내지 약 100 mM의 히스티딘; 및 약 0.005 밀리몰 내지 약 10 밀리몰의 계면활성제를 포함한다.

[0258] 본 발명의 일태양에 있어서, 상기 항-CTLA-4 항체 액상 조성물은 약 0.1 mg/ml 내지 약 200 mg/ml의 단일클론 항-CTLA-4 티실리무맙 항체; 약 1 mM 내지 약 100 mM의 히스티딘; 약 0.005 밀리몰 내지 약 10 밀리몰의 폴리소르베이트 80; 약 3 마이크로몰 내지 약 5.0 밀리몰의 EDTA; 및 약 10 밀리몰 내지 약 400 밀리몰의 트레할로스를 포함한다.

[0259] 본 발명의 다른 측면에서, 상기 항-CTLA-4 항체 액상 조성물은 약 1.0 mg/ml 내지 약 100 mg/ml의 단일클론 항-CTLA-4 티실리무맙 항체; 약 10 mM 내지 약 50 mM의 히스티딘; 약 0.01 밀리몰 내지 약 1.0 밀리몰의 폴리소르베이트 80; 약 3 마이크로몰 내지 약 5.0 밀리몰의 EDTA; 및 약 100 밀리몰 내지 약 300 밀리몰의 트레할로스를 포함한다.

[0260] 본 발명의 다른 측면에서, 상기 항-CTLA-4 항체 액상 조성물은 약 10 mg/ml 내지 약 50 mg/ml의 단일클론 항-CTLA-4 티실리무맙 항체; 약 10 mM 내지 약 30 mM의 히스티딘; 약 0.05 밀리몰 내지 약 0.5 밀리몰의 폴리소르베이트 80; 약 0.1 밀리몰 내지 약 1 밀리몰의 EDTA; 및 약 200 밀리몰 내지 약 250 밀리몰의 트레할로스를 포함한다.

[0261] 본 발명의 다른 측면에서, 상기 항-CTLA-4 항체 액상 조성물은 약 20 mg/ml의 단일클론 항-CTLA-4 티실리무맙 항체; 약 20 mM의 히스티딘; 약 0.15 밀리몰의 폴리소르베이트 80; 약 0.27 밀리몰의 EDTA; 및 약 222 밀리몰의 트레할로스를 포함한다.

[0262] 또다른 태양에 있어서, 본 발명은 항-CTLA-4 항체 및 약학적으로 허용가능한 킬레이트제를 포함하는 안정한 약학적 액상 조성물에 있어서, 상기 항체의 몰농도는 약 0.0006 밀리몰 내지 약 1.35 밀리몰 범위이고 상기 킬레이트제의 몰농도는 약 0.003 밀리몰 내지 약 50 밀리몰 범위이며, 상기 항체와 킬레이트제의 몰비율은 약 0.00001 내지 약 450; 약 0.0001 내지 약 100; 약 0.005 내지 약 50; 약 0.001 내지 약 10; 약 0.01 내지 약 5; 또는 약 0.1 내지 약 1 범위; 또는 약 0.5인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0263] 또다른 태양에 있어서, 본 발명은 티실리무맙 및 약학적으로 허용가능한 킬레이트제를 포함하는 안정한 약학적 액상 조성물에 있어서, 상기 항체의 몰농도는 약 0.0006 밀리몰 내지 약 1.35 밀리몰 범위이고 상기 킬레이트제의 몰농도는 약 0.003 밀리몰 내지 약 50 밀리몰 범위이며, 상기 항체와 킬레이트제의 몰비율은 약 0.00001 내지 약 450; 0.0001 내지 약 100; 약 0.005 내지 약 50; 약 0.001 내지 약 10 범위; 약 0.01 내지 약 5; 또는

약 0.1 내지 약 1 범위; 또는 약 0.5인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0264] 또다른 태양에 있어서, 본 발명은 티실리무맙, 약학적으로 허용가능한 킬레이트제 및 히스티딘을 포함하는 안정한 약학적 액상 조성물에 있어서; 상기 항체의 몰농도는 약 0.0006 밀리몰 내지 약 1.35 밀리몰 범위이고, 상기 킬레이트제의 몰농도는 약 0.003 밀리몰 내지 약 50 밀리몰 범위이고, 상기 히스티딘의 몰농도는 약 1 밀리몰 내지 약 100 밀리몰 범위이며; 상기 항체와 킬레이트제의 몰비율은 약 0.00001 내지 약 450; 약 0.0001 내지 약 100; 약 0.005 내지 약 50; 약 0.001 내지 약 10 범위; 약 0.01 내지 약 5; 또는 약 0.1 내지 약 1 범위; 또는 약 0.5인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0265] 또다른 태양에 있어서, 본 발명은 티실리무맙, 약학적으로 허용가능한 킬레이트제 및 히스티딘을 포함하는 안정한 약학적 액상 조성물에 있어서; 상기 항체의 몰농도는 약 0.0006 밀리몰 내지 약 1.35 밀리몰 범위이고, 상기 킬레이트제의 몰농도는 약 0.003 밀리몰 내지 약 50 밀리몰 범위이고, 상기 히스티딘의 몰농도는 약 10 밀리몰 내지 약 50 밀리몰 범위이며; 상기 항체와 킬레이트제의 몰비율은 약 0.0001 내지 약 100; 약 0.005 내지 약 50; 약 0.001 내지 약 10 범위; 약 0.01 내지 약 5; 또는 약 0.1 내지 약 1 범위; 또는 약 0.5인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0266] 또다른 태양에 있어서, 본 발명은 티실리무맙, 약학적으로 허용가능한 킬레이트제 및 히스티딘을 포함하는 안정한 약학적 액상 조성물에 있어서; 상기 항체의 몰농도는 약 0.0006 밀리몰 내지 약 1.35 밀리몰 범위이고, 상기 킬레이트제의 몰농도는 약 0.003 밀리몰 내지 약 50 밀리몰 범위이고, 상기 히스티딘의 몰농도는 약 10 밀리몰 내지 약 30 밀리몰 범위이며; 상기 항체와 킬레이트제의 몰비율은 약 0.005 내지 약 50; 약 0.001 내지 약 10 범위; 약 0.01 내지 약 5; 또는 약 0.1 내지 약 1 범위; 또는 약 0.5인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0267] 또다른 태양에 있어서, 본 발명은 티실리무맙, 약학적으로 허용가능한 킬레이트제 및 히스티딘을 포함하는 안정한 약학적 액상 조성물에 있어서; 상기 항체의 몰농도는 약 0.0006 밀리몰 내지 약 1.35 밀리몰 범위이고, 상기 킬레이트제의 몰농도는 약 0.003 밀리몰 내지 약 50 밀리몰 범위이고, 상기 히스티딘의 몰농도는 약 10 밀리몰 내지 약 30 밀리몰 범위이며; 상기 항체와 킬레이트제의 몰비율은 약 약 0.001 내지 약 10 범위; 약 0.01 내지 약 5; 또는 약 0.1 내지 약 1 범위; 또는 약 0.5인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0268] 또다른 태양에 있어서, 본 발명은 티실리무맙, 약학적으로 허용가능한 킬레이트제 및 히스티딘을 포함하는 안정한 약학적 액상 조성물에 있어서; 상기 항체의 몰농도는 약 0.0006 밀리몰 내지 약 1.35 밀리몰 범위이고, 상기 킬레이트제의 몰농도는 약 0.003 밀리몰 내지 약 50 밀리몰 범위이고, 상기 히스티딘의 몰농도는 약 20 밀리몰이며; 상기 항체와 킬레이트제의 몰비율은 약 약 0.001 내지 약 10 범위; 약 0.01 내지 약 5; 또는 약 0.1 내지 약 1 범위; 또는 약 0.5인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.

[0269] ***항-CTLA-4 항체 및 항체생성 세포주의 생산방법***

[0270] 본 발명에 따른 항체는 인간 항체생성 게놈의 상당 부분이 삽입되고 내생적인 뮤린 항체 생산능력이 결핍된 유전자이식 마우스를 이용하여 제조할 수 있다. 이러한 마우스는 인간 면역글로불린 분자 및 항체를 생산할 수 있는 반면 뮤린 면역글로불린 분자 및 항체는 생산하지 못한다. 유전자이식 마우스를 얻기 위한 기술은 다음과 같다.

[0271] 면역접종을 통해 내생적인 면역글로불린은 생산하지 못하는 반면 모든 인간 항체를 생산할 수 있는 유전자이식 동물(예컨대, 마우스)을 생산하는 것이 가능하다. 특히, 이를 통한 마우스 및 항체의 유전자이식 생산의 한 구체예가 미국특허 제6,682,736호(Hanson, et al)에 개시되어 있다. 이러한 기술을 이용하여, CTLA-4에 결합하는 항체 및 그러한 항체를 생산하는 하이브리도마를 제조할 수 있다.

[0272] 인간 항체는 뮤린(murine) 또는 래트의 가변 및/또는 불변 부위를 가지는 항체가 가지는 잠재적인 문제를 갖지 않는다. 이러한 뮤린 또는 래트에서 유래된 단백질이 존재하면 항체를 신속히 제거하거나 항체를 투여받은 환자의 면역반응을 야기할 수 있다.

[0273] 예를 들어, 키메라 및 배아 돌연변이 마우스에서 항체 중쇄 연결부위(J_H) 유전자가 동형접합 결실되면 내생적인 항체의 생산이 완전히 억제되는 것으로 알려져 있다. 그러한 배아 돌연변이 마우스에서 인간 배아 면역글로불린 유전자 배열을 전이(transfer)시키면 항원(예컨대, CTLA-4)에 대항하는 인간 항체가 생산된다. 예컨대, Jakobovits et al, *Proc. Natl. Acad. ScL USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); 및 Duchosal et al., *Nature* 355:258 (1992)를 참고하라. 또한, 인간 항체는 파지-디스플레이 라이브러리로부터도 얻을 수 있다(Hoogenboom et al., *J. MoI.*

Biol., 227:381 (1991); Marks et al., *J. MoL Biol.*, 222:581-597 (1991); Vaughan et al., *Nature Biotech* 14:309 (1996)).

[0274] 일태양에 있어서, 인간 항-CTLA-4 항체는 비인간 유전자이식 동물(예컨대, 게놈 내에 인간 면역글로불린 유전자를 포함하여 인간 항체를 생산할 수 있는 XENOMOUSE(상표명) 마우스)을 면역접종하여 생산할 수 있다. XENOMOUSE(상표명) 마우스는 인간 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 로커스(locus)의 절편을 다수 가지며 마우스 항체 생산능력이 결핍되도록 조작된 마우스이다. XENOMOUSE(상표명) 마우스는 성인 인간과 유사하게 인간 항체의 전체 레퍼토리를 생산하며 항원특이적인 인간 항체를 생성한다. 일태양에 있어서, XENOMOUSE(상표명) 마우스는 메가베이스 크기를 가지는 인간 중쇄 및 카파 경쇄 로커스의 배선형 배치(germline configuration) 효모 인공염색체(YAC) 절편 도입을 통해 인간 항체 V 유전자 레퍼토리의 약 80%를 포함한다. 다른 태양에 있어서, XENOMOUSE(상표명) 마우스는 또한 람다 경쇄 로커스를 거의 모두 포함한다. 예컨대, Green et al., *Nature Genetics* 7:13-21 (1994) 및 미국특허 제5,916,771호, 제5,939,598호, 제5,985,615호, 제5,998,209호, 제6,075,181호, 제6,091,001호, 제6,114,598호, 제6,130,364호, 제6,162,963호 및 제6,150,584호를 참고하라. 또한, WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096, WO 96/33735, WO 98/16654, WO 98/24893, WO 98/50433, WO 99/45031, WO 99/53049, WO 00/09560, 및 WO 00/037504를 참고하라.

[0275] 일태양에 있어서, 인간 면역글로불린 유전자를 가지는 상기 비인간 동물은 인간 면역글로불린 "미니로커스(minilocus)"를 가지는 동물을 포함한다. 미니로커스 방법에서는, Ig 로커스에서 개별 유전자를 포함시킴으로써 외생적인 Ig 로커스를 모방한다. 따라서, 하나 이상의 V_H 유전자, 하나 이상의 DH 유전자, 하나 이상의 J_H 유전자, 뮤(μ) 불변 부위 및 제2 불변 부위(바람직하게는 감마 불변 부위)가 형성되어 동물 내로 삽입된다. 이러한 방법은 특히 미국특허 제5,545,807, 제5,545,806호, 제5,569,825호, 제5,625,126호, 제5,633,425호, 제5,661,016호, 제5,770,429호, 제5,789,650호, 제5,814,318호, 제5,591,669호, 제5,612,205호, 제5,721,367호, 제5,789,215호 및 제5,643,763호에 기술되어 있다.

[0276] 따라서, 일태양에 있어서, 인간 항체는 게놈 내부에 CTLA-4 항원에 대한 인간 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 로커스 중 일부 또는 전부를 포함하는 비인간 동물을 면역접종하여 생산할 수 있다.

[0277] 일태양에 있어서, 상기 CTLA-4 항원은 분리된 및/또는 정제된 CTLA-4이다. 바람직한 태양에 있어서, 상기 CTLA-4 항원은 인간 CTLA-4이다. 일태양에 있어서, 상기 CTLA-4 항원은 CTLA-4의 절편이다. 일태양에 있어서, 상기 CTLA-4 절편은 적어도 하나의 CTLA-4의 항원결정기를 포함한다. 다른 태양에 있어서, 상기 CTLA-4 항원은 CTLA-4 또는 그 표면 상의 면역성 절편을 발현 또는 과잉발현하는 세포이다. 또다른 태양에 있어서, 상기 CTLA-4 항원은 CTLA-4 융합단백질이다. CTLA-4는 공지된 기술을 이용하여 자연 상태로부터 정제할 수 있다.

[0278] 바람직한 태양에 있어서, 상기 비인간 동물은 XENOMOUSE(상표명)(Abgenix Inc., Fremont, CA)이다. 다른 비인간 동물로서 Medarex(Medarex, Inc., Princeton, NJ)에서 생산하는 유전자이식 마우스를 이용할 수 있다.

[0279] 동물의 면역접종은 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 수행될 수 있다. See, 예컨대, Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, 1990을 참고하라. 마우스, 래트, 양, 염소, 돼지, 소 및 말과 같은 비인간 동물을 면역접종하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 예컨대, Harlow and Lane, *supra* 및 미국특허 제5,994,619호를 참고하라. 바람직한 태양에 있어서, 상기 CTLA-4 항원은 면역반응을 촉진하는 면역보조제와 함께 투여할 수 있다. 면역보조제의 예에는 완전 또는 불완전 Freund 면역보조제, RIBI(뮤라밀 디펩타이드) 또는 ISCOM(면역촉진 복합제)이 포함된다. 이러한 면역보조제는 폴리펩타이드를 국지적으로 고립시켜 급속한 분산을 막음으로써 폴리펩타이드를 보호하거나, 숙주세포가 마크로파지 및 면역계의 기타 성분에 대해 화학주성(chemotactic)을 갖는 물질을 분비하도록 자극하는 물질을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 폴리펩타이드를 투여하는 경우, 상기 면역접종은 수주에 걸쳐 폴리펩타이드를 2회 이상 투여하는 방법으로 수행될 수 있다.

[0280] 동물에 CTLA-4 항원을 면역접종한 후, 해당 동물로부터 항체 및/또는 항체 생산세포를 얻을 수 있다. 일태양에 있어서, 동물을 도살하거나 채혈하여 항-CTLA-4 항체를 포함하는 혈청을 얻는다. 동물로부터 얻은 혈청을 그대로 사용할 수도 잇고, 혈청으로부터 면역글로불린 분획을 얻거나 혈청으로부터 항-CTLA-4 항체를 정제할 수도 있다.

[0281] 일태양에 있어서, 면역접종된 동물에서 채취한 세포로부터 항체생성 불사화(immortalized) 세포주를 제조한다. 면역접종 후, 동물을 도살한 다음 림프절 및/또는 비장 B 세포를 불사화한다. 세포를 불사화하는 방법에는 종양유전자에 감염시키는 방법, 종양바이러스에 감염시키는 방법, 불사화 조건에서 세포를 배양하는 방법, 발암물

질 또는 돌연변이물질을 가하는 방법, 불사화된 세포(예컨대, 골수종 세포)와 융합시키는 방법, 종양억제 유전자를 비활성화하는 방법 등이 포함되나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예컨대, Harlow and Lane, *supra*를 참고하라. 바람직한 태양에 있어서, 상기 면역접종된 동물은 인간 면역글로불린 유전자를 발현하는 비인간 동물이며 비장 B 세포를 동일한 종으로부터 얻은 골수종 세포주와 융합한다. 보다 바람직한 태양에 있어서, 상기 면역접종된 동물은 XENOMOUSE(상표명)이며 상기 골수종 세포주는 비분비성(non-secretory) 마우스 골수종이다. 더욱 바람직한 태양에 있어서, 상기 골수종 세포주는 P3-X63-AG8-653이다. 골수종 세포와 융합하는 경우, 해당 골수종 세포는 바람직하게는 면역글로불린 폴리펩타이드(비분비성 세포주)를 분비하지 않는다. 불사화된 세포는 CTLA-4, 그 일부 또는 CTLA-4를 발현하는 세포를 이용하여 스크리닝한다. 바람직한 태양에 있어서, 상기 최초 스크리닝은 효소면역측정법(ELISA) 또는 방사선면역측정법을 이용하여 수행한다. ELISA 스크리닝의 예는 WO 00/37504에 제시되어 있다.

[0282] 항-CTLA-4 항체 생산세포(예컨대, 하이브리도마)는 이하 설명하는 바와 같이 성장력, 항체 생산성, 바람직한 항체특성 등과 같은 원하는 특성에 따라 선별, 클로닝 및 스크리닝을 거치게 된다. 하이브리도마는 예컨대, 누드 마우스와 같이 면역계가 제거된 동일계통의 동물 내에서 생체 내 방법에 의해 또는 생체 외 세포배양에 의해 확장될 수 있다. 하이브리도마의 선별, 클로닝 및 확장 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0283] 또한, 본 발명에 따른 항체는 하이브리도마 세포주 이외의 세포주 내에서 재조합 방법에 의해 발현될 수 있다. 특정 항체에 대한 cDNA 또는 게놈 클론을 암호화하는 핵산 서열을 이용하여 적당한 포유류 또는 비포유류 숙주 세포로의 전환을 꾀할 수도 있다.

[0284] 본 발명은 또한 항-CTLA-4 항체를 암호화하는 핵산 분자를 포함한다. 일태양에 있어서, 다른 핵산 분자들이 항-CTLA-4 면역글로불린의 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄를 암호화한다. 다른 태양에 있어서, 동일한 핵산 분자들이 항-CTLA-4 면역글로불린의 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄를 암호화한다. 일태양에 있어서, 상기 핵산은 본 발명의 항-CTLA-4 항체를 암호화한다.

[0285] 항-CTLA-4 항체의 중쇄 또는 경쇄 전체 또는 그 일부를 암호화하는 핵산 분자는 그 항체를 생산하는 임의의 생산원으로부터 분리할 수 있다. 다양한 태양에 있어서, 상기 핵산 분자는 항-CTLA-4를 면역접종한 동물로부터 또는 항-CTLA-4 항체를 발현하는 것과 같은 B 세포에서 유래된 불사화 세포로부터 분리된 B 세포로부터 분리된다. 항체를 암호화하는 mRNA의 분리방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 예컨대, Sambrook, et al., *Molecular Cloning* 3rd Ed. Vol.3 (1989)을 참고하라. mRNA를 이용하여 중합효소 연쇄반응(PCR)에 이용되는 cDNA 또는 항체 유전자를 클로닝하 cDNA를 생산할 수 있다. 바람직한 태양에 있어서, 상기 핵산 분자는 비인간 유전자이식 동물로부터 유래된 인간 면역글로불린 생산세포를 융합 파트너로 갖는 하이브리도마로 분리될 수 있다. 더더욱 바람직한 태양에 있어, 상기 인간 면역글로불린 생산세포는 XENOMOUSE(상표명)로부터 분리된다. 또다른 태양에 있어서, 상기 인간 면역글로불린 생산세포는 앞서 언급한, 비인간, 비마우스 유전자이식 동물로부터 분리된다. 또다른 태양에 있어서, 상기 핵산은 비인간, 비유전자이식 동물로부터 분리된다. 비인간 동물로부터 분리된 핵산 분자는 예컨대 인간화된 항체에 적용할 수 있다.

[0286] 일태양에 있어서, 본 발명의 항-CTLA-4 항체의 중쇄를 암호화하는 핵산은 임의의 소스로부터 중쇄 불변 부위를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열과 프레임이 맞도록 연결된 본 발명의 V_H 부위를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 마찬가지로, 본 발명의 항-CTLA-4 항체의 경쇄를 암호화하는 핵산은 임의의 소스로부터 경쇄 불변 부위를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열과 프레임이 맞도록 연결된 본 발명의 V_L 부위를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다.

[0287] 본 발명의 다른 태양에 있어서, 중쇄(V_H) 및 경쇄(V_L)의 가변 부위를 암호화하는 핵산 분자는 전체 길이의 항체 유전자로 "전환(converted)"된다. 일태양에 있어서, V_H 또는 V_L 부위를 암호화하는 핵산 분자는 암호화 중쇄 불변부위(C_H) 또는 경쇄 불변부위(C_L)에 각각 이미 존재하는 발현 벡터 내로 삽입함으로써, V_H 부위가 벡터 내에서 C_H 부위와 실시가능하게 연결되고 V_L 부위가 벡터 내에서 C_L 부위와 실시가능하게 연결되도록, 전체 길이의 항체 유전자로 전환된다. 또다른 태양에 있어서, V_H 및/또는 V_L 부위를 암호화하는 핵산 분자는 표준화된 분자생물학 기법을 이용하여 V_H 및/또는 V_L 부위를 암호화하는 핵산 분자를 C_H 및/또는 C_L 부위를 암호화하는 핵산 분자와 연결(예컨대, 리게이션)함으로써 전체 길이의 항체 유전자로 전환된다. 인간 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 불변 부위 유전자의 핵산 서열은 당해 기술분야에 잘 알려져 있다. 예컨대, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., NIH Publ. No. 91-3242, 1991을 참고하라. 전체 길이의 중쇄 및/또는 경쇄

를 암호화하는 핵산 분자는 도입된 세포로부터 발현이 되며 항-CTLA-4 항체가 분리된다.

[0288] 본 발명은 또한 본 발명의 항-CTLA-4 항체 또는 그 항원결합 부분의 중쇄를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 벡터를 제공한다. 본 발명은 또한 상기 항체 또는 그 항원결합 부분의 경쇄를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 벡터를 제공한다. 본 발명은 또한 융합단백질, 변형된 항체, 항체 절편 및 그 프로브(probes)를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 벡터를 제공한다.

[0289] 일태양에 있어서, 본 발명의 항-CTLA-4 항체 또는 항원결합 부분은 전술한 방법에 의해 얻어진 암호화 부분 또는 전체 길이의 경쇄 및 중쇄를 암호화하는 DNA를 발현 벡터 내로 삽입하여, 해당 유전자가 전사 및 번역 조절 서열과 같은 필요한 발현 조절 서열과 실시가능하게 연결되게 함으로써 발현된다. 발현 벡터에는 플라스미드, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노연관 바이러스(AAV), such as 콜리플라워 모자이크 바이러스, 담배 모자이크 바이러스, 코스미드, YAC, EBV 유래 에피좀 등과 같은 식물성 바이러스가 포함된다. 상기 항체 유전자는 벡터 내로 리게이션되어 벡터 내에서 전사 및 번역 조절 서열이 항체 유전자의 전사 및 번역을 조절하는 원래의 기능을 수행할 수 있게 한다. 발현 벡터 및 발현 조절 서열은 이용되는 발현 숙주 세포와 양립이 가능하도록 선택된다. 항체 경쇄 유전자와 항체 중쇄 유전자는 다른 벡터 내로 삽입될 수 있다. 바람직한 태양에 있어서, 두 유전자는 동일한 발현 벡터 내로 삽입된다. 항체 유전자는 표준화된 방법(예컨대, 항체 유전자 절편 및 벡터 상의 상보적 제한부위를 리게이션하거나, 제한부위가 없는 경우 말단을 리게이션함)에 의해 발현 벡터 내로 삽입된다.

[0290] 유용한 벡터는 전술한 바와 같이 임의의 V_H 또는 V_L 서열이 용이하게 삽입 및 발현될 수 있도록 적당한 제한부위를 가지는, 기능적으로 완전한 인간 C_H 또는 C_L 면역글로불린 서열을 암호화하는 벡터이다. 그러한 벡터에 있어서, 스플라이싱은 주로 삽입된 J 부위 내 스플라이스 제공 부위(splice donor site)와 인간 C 부위에 선행하는 스플라이스 수용 부위(splice acceptor site) 사이에서 일어나며, 인간 C_H 엑손 내부에 존재하는 스플라이스 부위에서도 일어난다. 폴리아데닐레이션 및 전사 종결은 코딩 부위 아래쪽에 위치하는 자연 염색체 부위(native chromosomal sites)에서 일어난다. 재조합 발현 벡터는 또한 숙주 세포로부터의 항체 사슬 분비를 촉진하는 시그널 펩타이드를 암호화할 수 있다. 항체 사슬 유전자는 벡터 내로 클로닝되어 상기 시그널 펩타이드가 면역글로불린 사슬의 아미노 말단과 프레임이 맞도록 연결되게 할 수 있다. 시그널 펩타이드는 면역글로불린 시그널 펩타이드 또는 이종성(heterologous) 시그널 펩타이드(즉, 비면역글로불린 단백질로부터 유래된 시그널 펩타이드)일 수 있다.

[0291] 항체 사슬 유전자 이외에, 본 발명의 재조합 발현 벡터는 숙주 세포 내에서 항체 사슬 유전자의 발현을 조절하는 조절 서열을 가질 수 있다. 조절 서열의 선택을 포함하는 발현 벡터의 설계는 전환하고자 하는 숙주 세포의 선택, 원하는 단백질의 발현 정도 등에 따라 달라질 수 있다. 포유류 숙주 세포의 발현에 대한 바람직한 조절 서열에는 레트로바이러스(예컨대, LTR 레트로바이러스), 거대세포바이러스(CMV)(예컨대, CMV 프로모터/인핸서), 원숭이바이러스 40(SV40)(예컨대, SV40 프로모터/인핸서), 아데노바이러스(예컨대, 아데노바이러스 메이저 레이트 프로모터 (AdMLP)), 폴리오마 및 기타 자연 면역글로불린 및 액틴 프로모터와 같은 강력한 포유류 프로모터로부터 유래된 프로모터 및/또는 인핸서와 같은 포유류 세포 내에서 상당량의 단백질 발현을 지시하는 바이러스 인자(viral elements)가 포함된다. 바이러스 조절인자 및 그 서열에 관한 보다 자세한 사항은, 예컨대 미국특허 제5,168,062호, 미국특허 제4,510,245호 및 미국특허 제4,968,615호를 참고하라. 식물 내에서 항체를 발현하는 방법(예컨대, 프로모터 및 벡터의 기술) 및 식물의 형질전환 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예컨대, 본 출원에 통합되는 미국특허 제6,517,529호를 참고하라. 박테리아 세포 또는 효모와 같은 진균류 세포 내에서 폴리펩타이드를 발현하는 방법 역시 당업계에 널리 공지되어 있다.

[0292] 항체 사슬 유전자 및 조절 서열 이외에, 본 발명의 재조합 발현 벡터는 숙주 세포 내에서 벡터의 복제를 조절하는 서열(예컨대, 복제 기점) 및 선발표지 유전자(selectable marker genes)와 같은 추가적인 서열을 가질 수 있다. 선발표지 유전자는 벡터가 도입된 숙주 세포의 선별을 촉진한다(예컨대, 미국특허 제4,399,216호, 제4,634,665호 및 5,179,017호 참조). 예를 들어, 일반적으로 선발표지 유전자는 벡터가 도입된 숙주 세포에 G418, 하이그로마이신 또는 메토트렉세이트 같은 약물에 대한 저항성을 제공해 준다. 바람직한 선발표지 유전자에는 디하이드로폴레이트 환원효소(DHFR) 유전자(DHFR 숙주 세포에서 메토트렉세이트 선별/증폭을 위해 이용됨), 네오마이신 내성 유전자(G418 선별에 이용) 및 글루타민 합성효소 유전자가 포함된다.

[0293] 항-CTLA-4 항체를 암호화하는 핵산 분자 및 그 핵산 분자를 포함하는 벡터는 적당한 포유류, 식물, 박테리아 또는 효모 숙주 세포의 형질전환에 이용될 수 있다. 본 발명의 항체는 생산하고자 하는 면역글로불린 중쇄 및 경

쇄 서열에 대하여 회수할 수 있는 형태로 유전자이식된 포유류 또는 식물 세대를 이용하여 유전자이식 방법에 의해 생산할 수 있다.

[0294] 형질전환은 예를 들어 폴리뉴클레오타이드를 바이러스 내로(또는 바이러스 벡터 내로) 패키징하고 그 바이러스(또는 벡터)를 숙주 세포에 형질 도입하는 방법 또는 미국특허 제4,399,216호, 제4,912,040호, 제4,740,461호 및 제4,959,455호에 예시된 것과 같은 공지된 형질감염 방법을 통해 폴리뉴클레오타이드를 숙주 세포 내로 도입함으로써 수행할 수 있다. 형질전환 방법의 선택은 형질전환하고자 하하는 숙주에 따라 달라진다. 이종성 폴리뉴클레오타이드를 포유류 세포 내로 도입하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 덱스트란 매개 형질감염, 칼슘 포스페이트 침전, 폴리브렌 매개 형질감염, 원형질 융합, 일렉트로포레이션, 입자 충격주입, 리포좀 내 폴리뉴클레오타이드 캡슐화, 펩타이드 컨쥬게이트, 덴드라이머 및 핵 내 직접 DNA 미세주입이 포함되나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0295] 발현 숙주로서 유용한 포유류 세포주는 당업자에게 잘 알려져 있으며, American Type Culture Collection(ATCC)에서 입수할 수 있는 여러 불사화된 세포주를 포함한다. 예컨대, 중국햄스터 난자(CHO) 세포, NSO 세포, HeLa 세포, 베이비햄스터 신장(BHK) 세포, 원숭이 신장세포(COS), 인간 간암세포(예컨대, Hep G2) 및 기타 다수의 세포주가 포함되나, 이에 한정되는 것은 아니다. 박테리아, 효모, 곤충 및 식물을 포함하는(이에 한정되는 것은 아니다) 비포유류 세포 역시 재조합 항체의 발현에 이용될 수 있다. 비인간 글리코실화로 인한 면역성, 약물동태학적 및/또는 작동인자(effector) 기능의 변화를 방지하기 위해서, 항체 C_H2 부위를 부위특이적(site directed)으로 돌연변이시키는 것이 바람직하다. 가장 높은 수준의 발현을 제공하는 시스템을 결정하여 발현 방법을 선택하고 구조적인 CTLA-4 결합특성을 갖는 항체를 생산한다.

[0296] 또한, 다수의 공지된 기술을 이용하여 생산 세포주로부터 본 발명의 항체(또는 그 일부분)을 발현을 강화할 수 있다. 예를 들어, 특정 조건 하에서 발현을 강화하기 위하여 글루타민 합성효소 및 DHFR 유전자 발현시스템을 이용하는 방법이 널리 이용된다. 고발현 세포 클론은 제한 희석 클로닝(limited dilution cloning)이나 Microdrop 기법과 같은 일반적인 기술을 이용하여 확인할 수 있다. 글루타민 합성효소 시스템은 유럽특허 제0 216 846호, 제0 256 055호 및 제0 323 997호와 유럽특허출원 제89303964.4호에 전체적으로 또는 부분적으로 논의되어 있다.

[0297] 포유류에서의 유전자이식 생산과 관련하여, 염소, 소 또는 기타 포유류의 젖에서 항체를 생산하거나 그로부터 항체를 회수할 수 있다. 예컨대, 미국특허 제5,827,690호, 제5,756,687호, 제5,750,172호 및 제5,741,957호를 참고하라.

[0298] 전술한 바와 같이, 세포주에서 발현된 항-CTLA-4 항체는 해당 세포물질로부터 정제 및/또는 분리할 수 있다. 항체는 온전한 세포에, 세포 용해물에 또는 부분적으로 정제된 상태로 또는 실질적으로 순수한 형태로 존재할 수 있다. 정제는 알칼리/SDS 처리, 칼럼 크로마토그래피 기타 당업자에게 잘 알려진 표준 기술에 의해 예컨대 세포 핵산 또는 단백질과 같은 기타 세포 성분 또는 기타 오염물질을 제거하기 위해 수행된다. Ausubel, F., ef al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)를 참고하라.

[0299] 본 발명에서, 다른 세포주에 의해 또는 유전자이식 동물에서 발현된 본 발명의 항-CTLA-4 항체는 서로 다른 글리코실화 패턴을 가질 수 있다. 그러나, 글리코실화 패턴 또는 그 변경 또는 결실 여부와 무관하게, 핵산 및 아미노산에 의해 암호화된 항-CTLA-4 항체는 모두 본 발명의 범위에 속한다. 따라서, 본 발명의 목적상, 항-CLTA-4 항체는 글리코실화된 것일 수도 그렇지 않은 것일 수도 있다. 항-CTLA-4 항체가 글리코실화된 것인 경우, 어떠한 글리코실화 패턴도 가능하다. 또한, 하나의 항체 내에서 각 중쇄는 동일한 글리코실화 패턴을 가질 수도 있고 두 중쇄가 서로 다른 글리코실화 패턴을 가질 수도 있다. 비인간 글리코실화로 인한 면역성, 약물동태학적 및/또는 작동인자 기능의 변화를 방지하기 위해 수행되는, 글리코실화를 제거하기 위한 항체 C_H2 부위의 부위특이적 돌연변이 역시 본 발명의 범위에 속한다.

[0300] 본 명세서에서, "글리코실화"란 공유결합에 의해 항체에 부착된 탄수화물 단위의 패턴을 뜻한다. 본 명세서에서, 항-M-CTLA-4 항체가 특정 글리코실화 패턴을 가진다 함은 해당 항-CTLA-4 항체의 과반수가 그 특정 글리코실화 패턴을 가진다는 의미이다. 다른 태양에 있어서, 항-M-CTLA-4 항체가 특정 글리코실화 패턴을 가진다 함은 해당 항-CTLA-4 항체의 50%, 75%, 90%, 95%, 99% 또는 100% 이상이 그 특정 글리코실화 패턴을 가진다는 의미이다.

[0301] 본 발명의 항-CTLA-4 항체는 또한 글리코실화의 변형(예컨대, 글리코실화 부위의 삽입 또는 결실에 의한 글리코

실화 부위의 제거, 적당한 아미노산 잔기의 삽입 또는 치환)를 포함한다.

[0302] 폴리펩타이드의 글리코실화는 일반적으로 N-결합 또는 O-결합이다. 항체 폴리펩타이드의 글리코실화는 일반적으로 N-결합으로서 이중안테나(biantennary) 구조를 형성한다. N-결합이란 탄수화물 부분이 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착된 것을 뜻한다. 트리펩타이드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌(X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산)은 탄수화물 부분이 아스파라긴 측쇄에 효소적으로 부착된 것을 알려주는 인식 서열이다. 따라서, 이 두 펩타이드 서열 중 하나가 항체 내에 존재하면, 글리코실화 부위가 존재할 수 있다.

[0303] 이중안테나 글리칸의 3가지 상이한 구조를 "G0", "G1" 및 "G2"로 표시하는데, 이들은 글리칸의 비환원 말단에 각각 0개, 1개 또는 2개의 말단 갈락토스 잔기를 가진다. Jefferis et al., *Biochem. J.*, 268, 529-537 (1990)를 참고하라. 경우에 따라서, 아스파라긴 아미노산과 공유결합(예컨대, 297번 위치)하고 있는 N-아세틸글루코사민에 연결된 푸코스(fucose) 잔기를 가지는 글리칸 구조가 항체 내에서 발견될 수 있다. 푸코스(F)가 존재하는 경우, 해당 이중안테나 글리칸 구조는 말단 갈락토스 잔기의 수에 따라 "G0F", "G1F" 또는 "G2F"로 표시한다. Teillaud, *Expert Opin. Biol. Ther.*, 5(Suppl.1):S15-S27 (2005)을 참고하라. 또한, 항체가 두 중쇄를 모두 포함하는 경우, 두 중쇄를 각각 반복하여 표기한다. "G0F,G0F" 단백당형(glycoform)의 경우, 두 중쇄가 모두 G0 글리칸이 부착되어 있고 각 G0 글리칸은 N-아세틸글루코사민에 연결된 푸코스(F) 잔기를 가진다. "G0F,G1F" 단백당형은 중쇄 중 하나에 G0 글리칸이 부착되어 있고 다른 중쇄에는 G1 글리칸이 부착되어 있으며 G0 글리칸과 G1 글리칸은 각각 N-아세틸글루코사민에 연결된 푸코스(F) 잔기를 가지는 경우이다.

[0304] 일태양에 있어서, 상기 항-CTLA-4 항체는 기 "G0F,G0F"; "G0F,G1F"; "G1F,G1F"; "G1F,G2F"; 및 그 조합으로 구성되는 군에서 선택되는 글리코실화 패턴을 가진다. 다른 태양에 있어서, 상기 항-CTLA-4 항체는 생산된 항체 중 50% 이상에서 "G0F,G1F" 글리코실화 패턴을 가진다. 다른 태양에 있어서, 상기 항-CTLA-4 항체는 생산된 항체 중 50% 미만에서 "G0F,G0F" 글리코실화 패턴을 가진다. 예를 들어, 일태양에 있어서, 항-CTLA-4 항체 11.2.1은 "G0F,G0F" 또는 "G0F,G1F" 글리코실화 패턴을 가진다. 일태양에 있어서, 상기 항-CTLA-4 항체(11.2.1)는 여러 글리코실화 패턴의 조합을 가지도록 생산된다. 예를 들어, 하나의 항체(11.2.1) 샘플 내에, "G0F,G1F" 글리코실화 패턴을 항체들과 "G0F,G0F" 글리코실화 패턴을 가지는 항체들이 약 3:2의 비율로 혼재되어 존재할 수 있다.

[0305] ***투여경로 및 투여량***

[0306] 본 발명의 조성물은 액상 용액(예컨대, 주사제 및 주입액) 상태로 존재할 수 있다. 바람직한 형태는 의도하는 투여방법 및 치료대상에 따라 달라진다. 일반적으로 바람직한 조성물은 인간의 수동면역에 사용되는 조성물과 같은 주사제 또는 주입액 형태이다. 바람직한 투여방법은 멸균 주사액 또는 유성 현탁액(olagenous suspension)을 비경구 투여(예컨대, 정맥 내, 피하, 복강 내, 근육 내 및 흉골 내)또는 주입하는 것이다. 당업자는 투여경로 및/또는 투여방법이 의도하는 효과에 따라 달라짐을 이해할 것이다. 바람직한 태양에 있어서, 상기 항체는 정맥 내 주입 또는 주사에 의해 투여된다. 다른 바람직한 태양에 있어서, 상기 항체는 근육 내 또는 피하 주사에 의해 투여된다. 치료용 조성물은 일반적으로 제조 및 보관 조건에서 멸균 상태의 안정한 주사제이다.

[0307] 이러한 조성물은 용액, 마이크로에멀젼, 분산액 또는 리포솜의 형태로 제제화할 수 있다. 멸균 주사액은 필요한 양의 항-CTLA-4 항체를 필요에 따라 위에서 언급한 하나 또는 그 이상의 첨가제와 함께 적당한 희석제에 혼합한 후 멸균(예컨대, 여과멸균)하여 제조할 수 있다. 분산액은 일반적으로 상기 유효성분을 염기성 분산매가 들어 있는 멸균 용기에 넣은 후, 위에서 언급한 기타 성분들을 가하여 제조한다. 그러한 현탁액은 적당한 분산제 또는 습윤제와 현탁제 또는 기타 적당한 작용제를 이용하여 공지된 기술에 따라 제조할 수 있다. 멸균 주사제제는 또한 비경구 투여가 가능한 비독성 희석제 또는 용매를 이용한 멸균 주사액 또는 현탁액(예컨대, 1,3-부탄디올 용액)일 수 있다. 이용 가능한 적절한 부형제 및 용매는 물, 링거액 및 등장성 염화나트륨 용액이다. 또한, 멸균된 비휘발성유(fixed oil) 역시 용매 또는 현탁매로 널리 이용된다. 이를 위하여, 합성 모노글리세라이드 또는 디글리세라이드를 포함한 임의의 무독성 비휘발성유를 사용할 수 있다. 또한, n-3 다가 불포화지방산을 이용하여 주사제를 제조할 수도 있다.

[0308] 멸균 주사액 제조용 멸균 분말을 얻기 위한 바람직한 방법은 사전에 멸균여과한 용액으로부터 진공건조 및 동결건조를 통해 유효성분 및 기타 필요한 성분의 분말을 얻는 것이다. 용액의 유동성은 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅을 이용하거나, 분산액의 경우 입자크기를 일정하게 유지하거나, 계면활성제를 사용함으로써 적절히 유지할 수 있다.

[0309] 조성물 내에 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어, 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 포함시키거나 데포(depot), 리포솜, 고분자 마이크로포어, 고분자 젤 및 임플란트 등의 흡수연장 조성물 형태로 제제화함으로써 주사제 조성물의 흡수를 연장할 수 있다.

[0310] 상기 항체의 다른 투여방법으로 약물을 환자의 피부 내로 직접 방출하는 피부 패치가 포함된다. 선택적으로, 그러한 패치는 본 발명의 항체를 완충화된 형태, 액상 용액 형태, 점착제 내에 용해된 및/또는 분산된 형태 또는 폴리머 내에 분산된 형태로 포함할 수 있다.

상기 항체의 또다른 투여방법으로 안구투여용 액체 안약이 포함된다.

[0311] 상기 항체는 1회 투여될 수 있으나, 더욱 바람직하게는 수회 투여된다. 예를 들어, 상기 항체는 1일 1회 내지 6개월 또는 그 이상의 기간에 1회로 투여될 수 있다. 상기 투여는 예를 들어 1일 3회, 1일 2회, 1일 1회, 2일 1회, 3일 1회, 주 1회, 2주 1회, 월 1회, 2월 1회, 3월 1회 및 6월 1회 등의 일정으로 투여될 수 있다.

[0312] 또한, 상기 항체는 미니펌프를 이용하여 연속적으로 투여할 수도 있다. 상기 항체는 종양 부위 또는 염증이 생긴 신체부위에, 종양 부위 또는 염증이 생긴 신체부위 내부에, 또는 종양 부위 또는 염증이 생긴 신체부위에서 떨어진 곳에 투여할 수 있다. 상기 항체는 적어도 증상이 치료, 완화 또는 치유될 때까지의 기간 동안 1회 또는 2회 이상 투여할 수 있다. 상기 항체가 해당 종양 또는 암의 성장을 억제하거나 그 무게 또는 크기를 감소시키는 경우, 일반적으로 종양이 존재하는 동안 또는 염증이 생긴 신체부위가 치유될 때까지 항체를 투여할 수 있다. 상기 항체는 일반적으로 앞에서 기술한 약학적 조성의 한 성분으로서 투여될 수 있다.

[0313] 본 발명의 조성물은 본 발명의 항체 또는 항원결합 부분을 치료에 효과적인 양 또는 예방에 효과적인 양만큼 포함할 수 있다. 제제를 제조함에 있어서, 제제 내에 포함되는 항-CTLA-4 항체의 치료에 효과적인 양은, 예를 들어, 요구되는 투여량과 투여방법, 치료하고자 하는 증상의 특성과 정도, 환자의 연령과 신체크기를 고려하여 결정할 수 있다.

[0314] 본 발명의 약학적 조성물을 환자에게 투여하는 경우, 비제한적인 투여량 범위를 예시하자면, 약 0.01 mg/kg 내지 약 200 mg/kg(환자 체중 1킬로그램(kg) 당 투여되는 항-CTLA-4 항체의 밀리그램(mg) 수), 약 0.1 mg/kg 내지 약 100 mg/kg, 약 1.0 mg/kg 내지 약 50 mg/kg, 약 5.0 mg/kg 내지 약 20 mg/kg 또는 약 15 mg/kg이다. 본 발명의 목적상, 평균적인 인간 환자의 체중은 약 70 kg이다.

[0315] 위에서 언급한 투여량의 중간에 해당하는 범위, 예컨대 약 0.01 mg/kg 내지 199 mg/kg의 범위, 역시 본 발명에 포함된다. 예를 들어, 위에서 언급한 값들 중 임의의 값을 상한 및/또는 하한으로 하는 범위는 본 발명에 포함된다.

[0316] 일정 기간 동안 환자에게 투여하는 투여량을 세분하거나 치료 상태의 긴급한 변화에 따라 투여량을 증가 또는 감소시키는 등 바람직한 최적의 반응(예컨대, 치료 또는 예방적 반응)을 얻기 위해 투여량을 조절할 수도 있다. 특히 투여의 용이성과 투여량의 균일성을 위하여 비경구 투여 조성물을 단위투여 형태(dosage unit form)로 제제화하는 것이 효과적이다.

[0317] 본 명세서에서, 단위투여 형태라 함은 치료하고자 하는 포유류 환자에 적합한 단위용량으로 물리적으로 구분되는 단위로서, 개별 단위는 함께 사용되는 제약 부형제를 고려하여 원하는 치료효과를 얻기 위해 필요한 유효성분의 계산량을 포함한다. 본 발명의 단위투여 형태의 세부적인 사항은 (a) 항-CTLA-4 항체 또는 부분의 고유한 특성 및 의도하는 특정한 치료 또는 예방효과; 및 (b) 개별 환자의 치료에 대한 반응과 관련하여 그러한 항체를 제제화하는 기술의 고유한 한계에 의해 직접적인 영향을 받는다.

[0318] 본 발명의 액상 제제는 단위투여 형태로 제조할 수 있다. 예를 들어, 바이얼 한 개의 단위량은 1 내지 1000 밀리리터(ml) 범위의 다양한 농도의 항-CTLA-4 항체를 포함할 수 있다. 다른 태양에 있어서, 바이얼 한 개의 단위량은 약 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, 15 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml 또는 100 ml의 다양한 농도의 항-CTLA-4 항체를 포함할 수 있다. 필요하다면, 이들 제제는 각 바이얼에 멸균 희석제를 가함으로써 원하는 농도로 조절할 수 있다. 본 발명의 액상 제제는 또한 정맥 내 투여용 튜브 또는 카테터와 연결하기에 적당한 멸균 백 또는 용기 내에 단위투여 형태로 제조될 수 있다.

[0319] ***안정도 평가***

[0320] 본 발명은 본 발명의 항-CTLA-4 항체 및 약학적으로 허용가능한 킬레이트제를 포함하는 안정한 약학적 액상 조성물을 포함한다. 안정한 조성물은 예를 들어 제품의 외관 및 성질(생물학적 활성을 낮출 수 있는 물리적 또는 화학적 변성을 포함)을 유지하고 변화를 억제함에 있어 바람직하다. 단백질의 안정도 측정을 위한 다양한 분석

기법 및 장치가 여러 문헌에 보고되어 있으며, 다수의 그러한 기법 및 장치 들이 *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 검토된 바 있다. 일반적으로, 본 발명의 약학적 액상 조성물은 일정 시간 동안 낮은 보관온도에서 및/또는 하나 이상의 냉동/해동 사이클에서 개선된 안정도를 보인다.

[0321] 일태양에 있어서, 상기 조성물은 약 2℃ 내지 약 8℃의 온도에서 적어도 약 12 개월, 바람직하게는 적어도 약 18 개월, 더욱 바람직하게는 적어도 약 24 개월 동안 보관하였을 때, 같은 조건 하에서 같은 시간 동안 보관한 킬레이트제를 포함하지 않는 동일한 조성물에 비해 더 안정하다.

[0322] 또다른 태양에 있어서, 상기 조성물은 약 25℃ 내지 약 30℃의 온도에서 적어도 약 3 개월, 바람직하게는 적어도 6 개월, 더욱 바람직하게는 적어도 약 12 개월 동안 보관하였을 때, 같은 조건 하에서 같은 시간 동안 보관한 킬레이트제를 포함하지 않는 동일한 조성물에 비해 더 안정하다.

[0323] 또다른 태양에 있어서, 상기 조성물은 약 40℃의 온도에서 적어도 약 1 개월, 바람직하게는 적어도 약 2 개월, 더욱 바람직하게는 적어도 약 3 개월 동안 보관하였을 때, 같은 조건 하에서 같은 시간 동안 보관한 킬레이트제를 포함하지 않는 동일한 다른 조성물에 비해 더 안정하다.

[0324] 본 명세서에서, "냉동/해동 사이클"이라 함은 액체상태의 항체 샘플을 0℃ 이하의 온도로 냉각하여 냉동보관한 후, 상기 샘플을 사용할 수 있도록 샘플이 다시 액체 상태로 회복되는 온도에서 충분한 시간 동안 둔 후, 액체 항체 샘플을 사용하고, 다시 바람직하게는 0℃ 이하의 온도에서 냉동보관하는 기법을 뜻한다. 본 명세서에서, "냉동보관"이라 함은 액체상태에 있던 항체 샘플을 0℃ 이하, 바람직하게는 -20℃ 이하의 온도에서 냉동하여 보관하는 것을 뜻한다.

[0325] 일태양에 있어서, 상기 조성물은 적어도 1회의 냉동/해동 사이클, 바람직하게는 적어도 2회의 냉동/해동 사이클, 더욱 바람직하게는 적어도 3회의 냉동/해동 사이클, 더더욱 바람직하게는 적어도 4회의 냉동/해동 사이클, 더더욱 바람직하게는 적어도 5회의 냉동/해동 사이클, 더더욱 바람직하게는 적어도 6회의 냉동/해동 사이클에서, 같은 냉동/해동 조건에 처한 킬레이트제를 포함하지 않는 동일한 조성물에 비해 더 안정하다.

[0326] 또다른 태양에 있어서, 상기 조성물은 다음 조건들 중 둘 이상을 만족한다.

[0327] (a) 약 2℃ 내지 약 8℃의 온도에서 적어도 약 12 개월, 바람직하게는 적어도 약 18 개월, 더욱 바람직하게는 적어도 약 24 개월 동안 보관하였을 때, 같은 조건에서 같은 시간 동안 보관한 킬레이트제를 포함하지 않는 동일한 다른 조성물보다 안정하다.

[0328] (b) 약 25℃ 내지 약 30℃의 온도에서 적어도 약 3 개월, 바람직하게는 적어도 6 개월, 더욱 바람직하게는 적어도 약 12 개월 동안 보관하였을 때, 같은 조건에서 같은 시간 동안 보관한 킬레이트제를 포함하지 않는 동일한 다른 조성물보다 안정하다.

[0329] (c) 약 40℃의 온도에서 적어도 약 1 개월, 바람직하게는 적어도 약 2 개월, 더욱 바람직하게는 적어도 약 3 개월 동안 보관하였을 때, 같은 조건에서 같은 시간 동안 보관한 킬레이트제를 포함하지 않는 동일한 다른 조성물보다 안정하다.

[0330] (d) 1회의 냉동/해동 사이클, 바람직하게는 적어도 2회의 냉동/해동 사이클, 더욱 바람직하게는 적어도 3회의 냉동/해동 사이클, 더더욱 바람직하게는 적어도 4회의 냉동/해동 사이클, 더더욱 바람직하게는 적어도 5회의 냉동/해동 사이클, 더더욱 바람직하게는 적어도 6회의 냉동/해동 사이클에서, 같은 냉동/해동 조건에 처한 킬레이트제를 포함하지 않는 동일한 조성물보다 안정하다.

[0331] 또다른 태양에 있어서, 상기 조성물은 상기 조건들 중 셋 이상을 만족한다.

[0332] 본 특허출원의 목적상, 예를 들어, 항체 응집, 항체 절편화 및/또는 조성물 변색을 조성물의 안정도를 평가하는 기준으로 삼을 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 약학적 액상 조성물은 항체 응집, 항체 절편화 및 조성물 변색 중 적어도 하나에 있어서, 상기한 보관 또는 냉동/해동 조건들 중 하나 이상에서, 같은 조건에 처한 킬레이트제를 포함하지 않는 동일한 조성물보다 낮은 정도의 항체 응집, 항체 절편화 및 조성물 변색을 나타낸다.

[0333] 약학적 액상 조성물 내에서의 단백질 응집은 당업계에 공지된 다양한 방법으로 측정할 수 있다. 이러한 방법에는 단백질을 그 분자량에 따라 분리하는 젤 여과 크로마토그래피가 포함된다. "젤"은 물과 아가로스 또는 아크릴아미드 중합체 같은 폴리머의 매트릭스이다. 본 발명은 또한 젤 여과 HPLC(고성능 액체 크로마토그래피)의 이용을 포함한다. 그 외에 인정되는 응집 측정방법에는 음이온 컬럼을 사용하는 일반적인 액체 크로마토그래피

기법인 이온 교환 크로마토그래피 양이온 교환 크로마토그래피가 포함된다. 본 발명에서 이온교환되는 양이온은 단백질 분자에서 유래된 것이다. 다가의(multivalent) 단백질 응집체는 단일사슬 항원결합 단백질에 의한 여러 순전하를 가질 수 있으므로, 응집체들은 보다 강력하게 결합할 수도 있고 단일사슬 분자에서 쉽게 분리될 수도 있다. 바람직한 양이온 교환기는 폴리아스파르트산 컬럼이다. 따라서, 모노머 단백질은 응집체로부터 쉽게 구별될 수 있다. 그러나, 본 발명의 응집 분석은 특정 유형의 크로마토그래피 컬럼으로 국한되지 않으며, 두 가지 형태의 단백질 분자를 분리할 수 있는 것이면 된다.

[0334] 약학적 액상 조성물 내에서의 단백질 절편화는 공지된 다양한 방법을 통해 측정할 수 있다. 이러한 방법에는 예를 들어, 크기배제(size exclusion) 크로마토그래피, 자외선 검출(예컨대, 214 나노미터에서), SDS-PAGE 및/또는 매트릭스 이용 레이저 탈착이온화/비행시간 질량분석법(MALDI/TOF MS)이 포함된다. 단백질이 절편화되면 전하량이 달라지는데(예컨대, 탈아미드화), 예를 들어, 이온 교환 크로마토그래피 또는 등전 집속(IEF)에 의해 이를 측정할 수 있다.

[0335] 조성물 변색은 일반적으로 조성물 자체를 육안으로 관찰함으로써 측정할 수 있다. 킬레이트제를 포함하는 본 발명의 약학적 액상 조성물은 킬레이트제를 포함하지 않는 동일한 조성물에 비해 일반적으로 조성물의 변색(예컨대, 분홍색 또는 황색으로)을 줄이고/거나 조성물의 투명도(예컨대, 혼탁도, 흐림 및/또는 입자형성)를 유지하는 효과가 있다. 본 발명의 목적상, "변색"이라 함은 색의 변화(예컨대, 무색 투명 상태에서 분홍색 또는 황색으로)와 투명도의 변화(예컨대, 무색 투명 상태에서 혼탁, 흐림 및/또는 입자가 있는 상태로)를 모두 의미한다. 조성물 변색은 일반적으로 214 나노미터에서의 자외선 검출 및/또는 킬레이트제가 있는 조성물 및 킬레이트제가 없는 조성물에 대한 표준 색표(color scale)를 이용한 육안비교 등의 방법으로 측정할 수 있다. PhEur 5.0, 2005 Monograph 2.2.2를 참고하라.

[0336] 일태양에 있어서, 항체 응집은 조성물을 다음 조건들 중 적어도 하나에 처하게 한 후 측정한다.

[0337] (a) 약 2℃ 내지 약 8℃의 온도에서 적어도 약 12 개월, 바람직하게는 적어도 약 18 개월, 더욱 바람직하게는 적어도 약 24 개월 동안 보관

[0338] (b) 약 25℃ 내지 약 30℃의 온도에서 적어도 약 3 개월, 바람직하게는 적어도 6 개월, 더욱 바람직하게는 적어도 약 12 개월 동안 보관

[0339] (c) 약 40℃의 온도에서 적어도 약 1 개월, 바람직하게는 적어도 약 2 개월, 더욱 바람직하게는 적어도 약 3 개월 동안 보관

[0340] (d) 1회의 냉동/해동 사이클, 바람직하게는 적어도 2회의 냉동/해동 사이클, 더욱 바람직하게는 적어도 3회의 냉동/해동 사이클, 더더욱 바람직하게는 적어도 4회의 냉동/해동 사이클, 더더욱 바람직하게는 적어도 5회의 냉동/해동 사이클, 더더욱 바람직하게는 적어도 6회의 냉동/해동 사이클

[0341] 이후, 조성물에서 항체 응집체를 크로마토그래피로(예컨대, HPLC를 이용하여) 분리하고 크로마토그래피 분석결과로부터 응집도를 결정한다. 본 발명의 안정한 약학적 액상 조성물은 일반적으로 크로마토그램 상에서 전체 피크면적의 약 6% 미만, 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만 또는 약 1.5% 미만에 해당하는 응집체 피크면적을 가진다. 이러한 응집 측정기법의 한 구체예에서, 조성물을 40℃에서 24주 동안 보관한 후 SE-HPLC를 이용한 크로마토그래피 분리를 수행하고 214 나노미터에서의 자외선 검출을 실시한다. 실시예 11의 항체 응집 측정에서 이와 같은 방법을 이용하였다. 이 경우, 예를 들어, 크로마토그램 상에서 제제 37(킬레이트제 포함)의 응집체 피크면적은 약 1.1%였으며, 제제 26(킬레이트제 불포함)의 피크면적은 약 6.4%였다.

[0342] 일반적으로, 본 발명의 안정한 약학적 액상 조성물의 응집체 크로마토그램 피크면적과 같은 조건에 처한 킬레이트제를 포함하지 않는 동일한 조성물의 응집체 크로마토그램 피크면적의 차이는 적어도 약 2%, 적어도 약 3%, 적어도 약 4% 또는 적어도 약 4.5%이다. 예를 들어, 상기한 바와 같이 실시예 11에서, 제제 37(크로마토그램 상의 응집체 피크면적 = 약 1.1%)과 제제 26(크로마토그램 상의 응집체 피크면적 = 약 6.4%)은 약 5.3%의 차이가 난다.

[0343] 또다른 태양에 있어서, 항체 절편화는 조성물을 다음 조건들 중 적어도 하나에 처하게 한 후 측정한다.

[0344] (a) 약 2℃ 내지 약 8℃의 온도에서 적어도 약 12 개월, 바람직하게는 적어도 약 18 개월, 더욱 바람직하게는 적어도 약 24 개월 동안 보관

[0345] (b) 약 25℃ 내지 약 30℃의 온도에서 적어도 약 3 개월, 바람직하게는 적어도 6 개월, 더욱 바람직하게는 적어

도 약 12 개월 동안 보관

[0346] (c) 약 40℃의 온도에서 적어도 약 1 개월, 바람직하게는 적어도 약 2 개월, 더욱 바람직하게는 적어도 약 3 개월 동안 보관

[0347] (d) 1회의 냉동/해동 사이클, 바람직하게는 적어도 2회의 냉동/해동 사이클, 더욱 바람직하게는 적어도 3회의 냉동/해동 사이클, 더더욱 바람직하게는 적어도 4회의 냉동/해동 사이클, 더더욱 바람직하게는 적어도 5회의 냉동/해동 사이클, 더더욱 바람직하게는 적어도 6회의 냉동/해동 사이클

[0348] 이후, 조성물에서 항체 절편을 분리(예컨대, 젤 여과를 이용)하고 크로마토그래피 분석결과로부터 절편화 정도를 결정한다. 본 발명의 안정한 약학적 액상 조성물은 일반적으로 크로마토그램 상에서 전체 밴드크기(band volume)의 약 9% 미만, 약 8% 미만, 약 7% 미만, 약 6% 미만, 약 5% 미만 또는 약 4.5% 미만에 해당하는 절편 밴드크기를 가진다. 이러한 절편화 측정기법의 한 구체예에서, 조성물을 40℃에서 24주 동안 보관한 후 환원 SDS-PAGE(rSDS-PAGE)를 이용한 크로마토그래피를 수행하고 Molecular Dynamics Personal Densitometer PDQC-90 또는 Bio-Rad GS800 Imaging Densitometer로 스캔하여 밴드크기를 결정한다. 실시예 11의 항체 절편화 측정에서 이와 같은 방법을 이용하였다. 이 경우, 예를 들어, 크로마토그램 상에서 제제 37(킬레이트제 포함)의 응집체 절편 밴드크기는 약 4.5%였으며, 제제 26(킬레이트제 불포함)의 절편 밴드크기는 약 10.1%였다.

[0349] 일반적으로, 본 발명의 안정한 약학적 액상 조성물의 절편 밴드크기와 같은 조건에 처한 킬레이트제를 포함하지 않는 동일한 조성물의 절편 밴드크기의 차이는 적어도 약 2%, 적어도 약 3%, 적어도 약 4% 또는 적어도 약 5%이다. 예를 들어, 상기한 바와 같이 실시예 11에서, 제제 37(크로마토그램 상의 응집체 피크면적 = 약 4.5%)과 제제 26(크로마토그램 상의 응집체 피크면적 = 약 10.1%)은 약 5.6%의 차이가 난다.

[0350] ***치료방법***

[0351] 본 명세서에서 언급된 모든 유형의 항체가 치료에 이용될 수 있다. 바람직한 태양에 있어서, 항-CTLA-4 항체는 인간 항체이다. 다른 바람직한 태양에 있어서, CTLA-4 항체는 인간 항체이며 환자는 인간 환자이다. 또다른 바람직한 태양에 있어서, 항-CTLA-4 항체는 인간 IgG2 항체 항체이다. 또한, 환자는 항-CTLA-4 항체와 교차반응하는 CTLA-4 단백질을 발현하는 포유동물일 수 있다. 상기 항체는 동물치료를 위해 또는 인간질병에 대한 동물모델로서 그 항체와 교차반응하는 CTLA-4를 발현하는 비인간 포유동물(예컨대, 유인원)에 투여할 수 있다. 이러한 동물모델은 본 발명의 항체의 치료적 효과를 평가함에 있어 유용하다.

[0352] 본 발명은 항-CTLA-4 항체; 및 킬레이트제 단독 또는 완충제, 등장화제, 또는 계면활성제 및 그 혼합물로부터 선택되는 기타 부형제와의 조합;을 포함하는 약학적 액상 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 환자의 네오플라시아 증상의 치료방법을 제공한다. 다른 태양에 있어서, 상기 환자는 네오플라시아 증상의 예방 또는 치료를 필요로 하는 환자이다.

[0353] 또다른 태양에 있어서, 본 발명은 항-CTLA-4 티실리무맙 항체; 및 킬레이트제 단독 또는 완충제, 등장화제, 또는 계면활성제 및 그 혼합물로부터 선택되는 기타 부형제와의 조합을 포함하는 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약학적 액상 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 환자의 네오플라시아 증상의 치료방법을 제공한다.

[0354] "네오플라시아" 및 "네오플라시아 증상"이라 함은 양성, 전암성(premalignant), 전이성 또는 악성일 수 있는 네오플라즘 또는 종양을 뜻한다. 본 발명의 범위에는 양성, 전암성, 전이성 또는 악성 네오플라시아가 모두 포함된다. 또한, 양성, 전암성, 전이성 또는 악성 종양(tumor) 역시 모두 본 발명의 범위에 포함된다. 따라서, 양성, 전암성, 전이성 또는 악성 네오플라시아 또는 종양은 모두 본 발명의 범위에 포함되며, 종양, 네오플라시아 또는 종양관련 증상 등으로 칭해진다. 일반적으로 종양은 네오플라시아 또는 "네오플라즘" 세포의 덩어리로 알려져 있다. 그러나, 본 발명의 목적상 단 하나의 네오플라시아 세포라도 네오플라즘 또는 네오플라시아로 생각할 수 있다.

[0355] 본 발명의 항-CTLA-4 항체에 의해 치료될 수 있는 네오플라시아 증상은 임의의 조직 또는 기관을 포함할 수 있다. 예컨대, 골암, 뇌암, 폐암, 편평세포암, 방광암, 위암, 췌장암, 유방암, 두부암, 경부암, 간암, 신암, 난소암, 전립선암, 결장암, 식도암, 부인암(예컨대, 자궁경부암 및 자궁암), 비인강암 또는 갑상선암이 포함되나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한 네오플라시아 증상에는 골 전이(bone metastases), 흑색종(melanomas), 림프종(lymphomas), 백혈병 및 다발성 골수종이 포함된다. 특히, 본 발명의 항-CTLA-4 항체 제제는 유방암, 전립선암, 결장암 및 폐암의 치료에 유용하다.

[0356] 다른 태양에 있어서, 본 발명의 방법 및 조성물은 선단 흑자성 흑색종, 광선 각화증, 선암, 선양 낭종암, 선종(adenomas), 가족성 선종성 용종증, 가족성 용종증, 결장 용종증, 용종증, 선육종, 선평 편암종, 부신피질암, AIDS 관련 림프종, 항문암, 성상세포 종양, 바르톨린선암, 기저세포암, 담관암, 방광암암, 뇌줄기 신경아교종, 뇌종양, 유방암, 기관지선암, 모세관암, 암양종, 난관암, 자궁내막암, 암육종, 중추신경계 림프종, 대뇌 성상세포종, 담관암종, 연골육종, 맥락총 유두종/암, 클리어세포암, 피부암, 뇌암, 결장암, 직장암, 피부 T-세포 림프종, 낭샘종, 내배엽동 종양, 자궁내막 이상증식, 자궁내막 기질육종, 자궁내막 선암, 뇌실막암, 상피암, 식도암, Ewing 육종, 고환외 배아세포종양, 섬유판상암, 국소 결절성 이상증식, 담낭암, 가스트리노마, 배아세포종양, 임신성 융모종양, 교아세포증, 신경아교종, 글루카곤종, 혈관교아세포종, 혈관내피종, 혈관종, 간선종, 간 선종증, 간세포암, Hodgkin 림프종, 하인두암, 시상하부 및 시로(visual pathway) 신경교종, 인슐린종, 상피내 종양, 상피내 편평세포종양, 안내(intraocular) 흑색종, 침습성 편평세포암, 대세포암, 도세포종, Kaposi 육종, 신장암, 후두암, 평활근육종, 악성 흑자 흑색종, 백혈병 관련증상, 구순 및 구강암, 간암, 폐암, 림프종, 악성 중피종양, 악성 흉선종, 수아세포종, 수질상피종, 흑색종, 뇌막암, Merkel 세포암, 중피암, 전이성 암, 점액표피양 암종, 다발성 골수종/혈장세포 네오플라시아, 균상 식육종, 골수형성 이상증후군, 골수증식증, 비강 및 부비동암, 비강인두암, 신경모세포종, 신경상피선암 결절성 흑색종, 중추신경계 네오플라시아 증상(예컨대, 원발성 CNS 림프종, 척수종양, 뇌줄기 신경아교종 또는 뇌하수체 선종), 비-Hodgkin 림프종, 연맥세포암, 희소돌기아교세포암, 구강암, 인두암, 골육종, 췌장 폴리펩타이드증, 난소암, 난소 배아세포종양, 췌장암, 유두장액성 선암, 송과선세포암, 뇌하수체 종양, 형질세포종, 가육종, 폐아세포종, 부갑상선암, 음경암, 크롬친화세포종, 음경 및 천막상부 신경외배엽 종양, 뇌하수체 종양, 혈장세포 네오플라시아, 흉막폐아세포종, 전립선암, 직장암, 신장세포암, 망막모세포종, 횡문근육종, 육종, 장액성 암, 소세포암, 소장암, 연조직암, 소마토스타틴 분비성 종양, 편평세포암종, 편평세포암, 중피종, 표재 확장성 흑색종, 천막상부 원시신경외배엽 종양, 갑상선암, 미분화암, 요도암, 자궁암, 요소성 흑색종, 사마귀성 종양, 질암, 지방종, 외음부암, Waldenstrom 고분자글로불린혈증, 고분화(well differentiated) 암 및 Wilm 종양으로 이루어지는 군에서 선택되는 네오플라시아 증상의 예방 및 치료를 포함한다.

[0357] 보다 바람직한 태양에 있어서, 상기 항-CTLA-4 항체는 유방암, 전립선암, 폐암 또는 결장암을 가지는 환자에게 투여된다. 더더욱 바람직한 태양에 있어, 상기 방법은 암의 비정상적인 증식을 중단시키거나, 그 크기 또는 무게의 증가를 막거나, 크기 또는 무게를 감소시킨다.

[0358] ***제조용 물품***

[0359] 본 발명의 다른 태양에 있어서, 킬레이트제 단독 또는 기타 약학적으로 허용가능한 부형제와의 조합을 포함하는 제제 내에 본 발명의 단일클론 항-CTLA-4 항체를 적어도 하나 포함하는 약학적 액상 조성물을 수용하는 용기를 포함하며, 선택적으로 그 사용을 위한 지시사항을 포함하는 제조용 물품이 제공된다. 적당한 용기에는 예를 들어, 병(bottles), 바이얼, 백 및 주사기가 포함된다. 용기는 유리 또는 플라스틱 등 다양한 소재로 제작할 수 있다. 적당한 용기의 예는 3 내지 20 cc 용량의 1회용 유리 바이얼이다. 수회투여(multidose) 제제의 경우, 3 내지 100 cc 용량의 유리 바이얼을 사용할 수 있다. 용기는 상기 제제를 수용하며 용기에 부착되는(또는 용기와 함께 제공되는) 라벨에는 사용관련 지시사항이 기재된다. 상기 제조용 물품은 또한 사용 지시사항, 금지사항 및/또는 부작용 목록과 함께, 상업적 및 사용자적 관점에서 바람직한 완충제, 희석제, 필터, 바늘, 주사기 및 패키지 인서트를 더 포함할 수 있다.

[0360] 본 발명은 또한 용액 상태의 단일클론 항-CTLA-4 항체 11.2.1을 포함하는 제1 용기 및 상기 항체를 안정화시키기 위한 충분한 양의 용액 상태의 킬레이트제를 단독으로 또는 다른 부형제와 함께 포함하는 제2 용기를 포함하는 안정화된 항체의 액상 조성물 제조용 키트를 제공한다.

[0361] 이하에서 제시되는 실시예는 본 발명의 구현예를 설명한다. 당업자는 본 명세서에 개시된 사항 및 당해 기술분야의 관련지식으로부터 본 특허출원의 청구범위 내에서 다른 구현예를 자명하게 도출할 수 있을 것이다. 본 명세서의 기술내용 및 하기 실시예들은 예시적인 것에 불과하며, 본 발명의 범위와 사상은 첨부된 청구범위에 의해 정해진다. 별도의 언급이 없는 경우, 실시예들에서 % 값들은 모두 중량을 기준으로 한 것이다. 당업자는 실시예에 기재된 중량 값 및/또는 중량:부피 비 값을 당해 기술분야에서 인정된 해당 성분의 분자량을 이용하여 몰수 및/또는 몰농도로 환산할 수 있을 것이다. 실시예에 제시된 중량 값(예컨대, 그램)은 언급된 해당 부피(예컨대, 완충제 용액, 항체 제제 등)에 대한 것이다. 다른 부피의 제제가 필요한 경우, 당업자는 이러한 중량 값을 비례적으로 변경할 수 있을 것이다.

실 시 예

[0373] 실시예 1

[0374] 본 실시예에서는 미국특허 제6,682,736호(Hanson, et al.)에서와 같이 항-CTLA-4 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주의 생산을 예시한다.

[0375] 본 발명의 항체는 다음과 같이 제조, 선정 및 분석하였다.

[0376] 항원 제조 : XENOMOUSE(상표명) 마우스를 면역접종하기 위하여 다음과 같이 3가지의 면역원을 제조하였다. (i) CTLA-4-IgG 융합단백질, (ii) CTLA-4 펩타이드, (iii) 세포 표면에서 항시적으로(constitutively) 발현되는 CTLA-4의 돌연변이(Y201 V)에 감염시킨 300.19 뮤린 림프종 세포 CTLA-4-IgG1 융합단백질:

[0377] ***발현 벡터의 제조***

[0378] CTLA-4의 성숙한 세포외 부위를 암호화하는 cDNA를 발표된 서열(*Eur. J Immunol* 18:1901-1905 (1988))에 따라 설계한 프라이머를 이용하여 인간 흉선 cDNA 라이브러리(Clontech)로부터 PCR 증폭하였다. 절편을 인간 온코스타틴(oncostatin) M 시그널 펩타이드와 인간 IgG 감마 1(IgG1) $C_H1/C_H2/C_H3$ 부위 사이에서 신드비스(Sindbis) 바이러스 발현 플라스미드인 pSR5(InVitrogen)로 방향성 있게(directionally) 서브클로닝하였다. 해당 융합단백질은 힌지 부위를 포함하지 않으나, CTLA-4의 세포외 부위에 시스테인 120을 포함하므로 공유결합 2량체를 형성한다. 얻어진 벡터를 CTLA-4-IgG1/pSR5로 명명하였다. 벡터 내의 CTLA-4-IgG1 cDNA 전체에 대하여 두 가닥 모두 서열을 확인하였다. CTLA-4-lg 단백질의 아미노산 서열은 아래와 같다. CD44에 대한 성숙한 세포외 부위를 인간 림프구 라이브러리(Clontech)로부터 PCR 증폭한 후 pSinRep5로 서브클로닝하여 동일한 IgG1 테일을 갖는 대조(control) 단백질을을 생산하였다.

[0379] OM-CTLA-4-IgG1 융합단백질:

MGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMAMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVR
VTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYIC
KVELMYPPPYYLGIGNGTQIYVIDPEPCPDSDLEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPTPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH

[0380] YTQKSLSLSPGK

[0381] 밑줄 = 시그널 펩타이드

[0382] CD28의 성숙한 세포외 부위에 대한 cDNA를 인간 림프구 라이브러리(Clontech)로부터 PCR 증폭한 후 pCDM8으로 서브클로닝하여(*J. Immunol.* 151 : 5261-71 (1993)) 트롬빈 절단부분과 힌지 부분을 모두 가지는 인간 IgG1 융합단백질을 생산하였다. PHA 활성화 PBMC로부터 분리된 mRNA로부터 디제너레이트(degenerate) PCR 표준기술을 이용하여 마모셋(marmoset), 사이노몰거스(cynomologous) 및 리서스(rhesus) CTLA-4를 클로닝하였다. 시퀀싱 결과, 리서스와 사이노몰거스의 아미노산 서열은 동일하였으며, 성숙한 인간 CTLA-4 세포외 부위 3군데(S13N, 117T, L105M)에서 차이가 있었다. 마모셋은 성숙한 인간 CTLA-4 세포외 부위와 10군데(V21A, V33I, A41T, A51G, 541, S71F, Q75K, T88M, L105M, G106S)에서 차이가 있었다. 부위특이적 돌연변이를 이용하여 마모셋 CTLA-4의 모든 아미노산의 단일지점 돌연변이를 유도, 항체가 인간 CTLA-4-IgG와 상호작용하는 데 있어 중요한 역할을 하는 아미노산들을 매핑하였다. 매치메이커(matchmaker) 부위특이적 돌연변이(Promega)를 이용하여 항원결정기에 대한 인간 및 마모셋 CTLA-IgG의 돌연변이를 매핑하였다. Cos7 세포를 일시적으로 형질감염(transient transfection)한 후 표준 Protein A 기법으로 정제하여 IgG 융합단백질을 생산하였다. 이뮤노블롯(immunoblotting) 및 BIAcore 분석을 통해 돌연변이 CTLA-4-IgG 단백질의 항체결합 특성을 평가하였다.

[0383] ***재조합 단백질의 발현/정제***

[0384] SP6 생체 외 전사 CTLA-4-IgG1/pSR5 mRNA 및 DH-26S 헬퍼 mRNA를 이용하여, InVitrogen의 지시사항에 따라 베이비햄스터 신장세포를 일렉트로포레이션(Gibco)하여 재조합 신드비스 바이러스를 생산하였다. 48시간 후에 재조합 바이러스를 취하여 적정분석을 통해 중국햄스터 난소세포(CHO-K1) 내에서의 최적 단백질 발현을 측정하였다. CHO-K1 세포를 10% 가열 비활성 소 태아혈청(Gibco), 비필수 아미노산(Gibco), 4 mM 글루타민(Gibco), 페니실린/스트렙토마이신(Gibco), 10 mM Hepes pH 7.5(Gibco)를 포함하는 DMEM/F12 현탁액(Gibco)에서 배양하였

다. CTLA-4-IgG를 얻기 위하여, CHO-K1 세포를 DMEM/F12 1ml 당 1×10^7 세포의 농도로 재현탁한 후 실온에서 1시간 동안 신드비스 바이러스와 함께 배양하였다. 이어, Protein A 세파로스를 이용하여 소 IgG를 제거한 1% 소 태아혈청(Pharmacia), 비필수 아미노산, 4 mM 글루타민, 12.5 mM Hepes pH 7.5 및 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 DMEM/F12에 DMEM/F12 1ml 당 1×10^6의 농도로 세포를 희석하였다. 48시간 동안 감염시킨 후, 세포를 펠릿화한 다음 배양액을 취하여 단백질분해효소 억제제(Boehringer Mannheim)를 가한 후, pH를 7.5로 조절하고, 0.2μ(Nalgene)로 여과하였다. FPLC(Pharmacia)를 이용, 5 ml Protein A HiTrap 컬럼(Pharmacia)으로 10 ml/min의 유속에서 융합단백질을 친화 정제하였다. 30 충전 부피(bed volume)의 PBS로 컬럼을 세척한 후 0.1 M 글리신/HCl을 이용, pH 2.8에서 1 ml/min의 속도로 용출하였다. 트리스 pH 9를 이용하여 얻어진 분획들(1 ml)을 즉시 pH 7.5로 중화하였다. CTLA-4-IgG1을 포함하는 분획을 SDS-PAGE로 확인한 후 센트리플러스 50(Amicon)을 이용하여 농축하고, PBS를 용매로 하여 세파로스 200 컬럼(Pharmacia)에 1 ml/min의 속도로 가하였다. CTLA-4-IgG1을 포함하는 분획들을 풀링(pool) 및 0.2μ로 멸균 여과(Millipore)한 후 분취하여 -80℃에서 동결시켰다. CD44-IgG1을 발현시킨 후 같은 방법으로 정제하였다. CD28-IgG를 일시적으로 형질감염한 Cos7 세포로부터 조절된(conditioned) 배양액으로부터 정제하였다.

[0385] CTLA-4-IgG1의 특성화 :

[0386] 정제된 CTLA-4-IgG1는 콜로이드상 쿠마시 염색(Novex)을 이용한 SDS-PAGE 상에서 단일 밴드로 마이그레이션하였다. 비환원 조건 하에서 CTLA-4-IgG1은 2량체(100 kDa)였으며, 50 mM DTT로 처리하자 50 kDa의 단량체로 환원되었다. 정제된 용액 상태의 CTLA-4-IgG1의 아미노산 서열 분석을 통해 CTLA-4의 N-말단(MHVAQPAVVLAS)이 확인되었으며 성숙한 융합단백질로부터 온코스타틴-M 시그널 펩타이드를 절단하였다. CTLA-4-IgG1는 농도 의존적으로 고정화된 B7.1-IgG에 결합하는 양상을 보였는데, 이 결합은 햄스터-항-인간 항-CTLA-4 항체(BNI3: PharMingen)에 의해 차단되었다. 멸균 상태의 CTLA-4-IgG는 엔도톡신이 없었으며 소멸계수를 1.4로 하여 OD280으로 정량화하였다. 정제된 CTLA-4-IgG의 수율은 CHO-K1 세포 1리터 당 0.5 내지 3 mg 범위였다.

[0387] ***CTLA-4 펩타이드***

[0388] 다음과 같은 CTLA-4 펩타이드를 아래와 같이 제조하였다.

[0389] NH_2:MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTF
LDDSICTGTSSGNQ VNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYYLGIGNGTQIYVIDPEPC-CONH$_2$

[0390] ***약칭 및 사용물질***

[0391] NMP = N-메틸피롤리디논; TFE = 2,2,2-트리플루오로에탄올; DCM = 디클로로메탄; FMOC = 플루오레닐 메톡시카르보닐. 다음을 제외한 시약은 모두 Perkin Elmer 제품을 사용하였다: TFE(Aldrich Chemical), FMOC-PAL-PEG 수지(Perseptive Biosystems). 측쇄 보호기가 필요한 아미노산의 경우, Fmoc-Arg(PMC)-OH; FMOC-Asn(Trt)-OH, FMOC-Asp(tBu)-OH, FMOC-Cys(Trt)-OH, FMOC-Glu(tBu)-OH, FMOC-Gln(Trt)-OH, FMOC-His(Boc)-OH, FMOC-Lys(BOC)-OH, FMOC-Ser(tBu)- OH, FMOC-Thr(tBu)-OH 및 FMOC-Tyr(tBu)-OH를 사용하였다.

[0392] ***펩타이드 합성***

[0393] 301 nm UV 흡광(Perkin-Elmer Model 759A 검출기) 피드백 모니터링 기능을 갖춘 Perkin-Elmer 431 A를 이용하여 펩타이드를 합성하였다. 조건부 2중커플링 사이클(conditional double coupling cycles)을 이용하여 펩타이드 서열을 FMOC-PAL-PEG 수지 상에 어셈블하였다. 10, 11, 18, 19, 20 및 28 내지 33 사이클에서 강제 2중 커플링을 수행하였다. 매 아실레이션 사이클이 종료될 때마다 DCM과 TFE의 50% 혼합물로 수지를 세척한 후, 미반응 아미노기를 아세틱 언하이드라이드 NMP 용액으로 캐핑하였다. 49 사이클이 종료된 후 반응기에서 수지를 제거하고 나머지 사이클을 진행하였다. K 시약(King et al. *International Journal of Protein and Peptide Research* 36:255-266 (1990))을 이용하여 6시간에 걸쳐, 415 mg의 수지로부터 186 mg의 미정제 CTLA-4 펩타이드를 절단, 수득하였다.

[0394] ***펩타이드 특성화***

[0395] 미정제 CTLA-4 펩타이드 25 mg을 pH 6.4에서 5 ml의 6M 구아니딘 HCl/100 mM K_2PO_3에 용해시킨 후, Pharmacia Hi Load Superdex 75 16/60 컬럼(16 mm × 600 mm, 120 ml 충전 부피)을 이용, 2M 구아니딘 HCl/100 mM K_2PO_3으로 pH 6.4에서 2 ml/min의 속도로 180분간 용출하여 5 ml 분획을 얻었다. 얻어진 분획물들을 1.7μl씩 MES 러닝 버퍼(running buffer)를 이용하여 NuPAGE Laemeli 젤 러닝(gel running)에 로드하고 Daichii 은염색기법

(silver stain protocol)으로 시각화하여 분석하였다. 분자량이 12 KDa인 분획들을 모아 4℃에서 보관하였다. 모아진 분획을 UV 및 젤 전기영동으로 분석하였다. 100 마이크로리터 샘플을 ProSorb 카트리지에 흡수(PVDF 막에 흡수)시킨 후 세척하여 완충제 염을 제거함으로써 아미노산 서열을 분석하였다. 서열분석에는 Applied Biosystems 420 서열분석기를 이용하였다. 예측한 대로 N-말단 서열(MHVAQPA VVLA)이 확인되었다. 이뮤노블롯 결과, 펩타이드는 BNI3 항-인간 CTLA-4 항체(PharMingen)로 확인되었다. 염을 제거하기 위하여, 648㎍의 분획을 3500 Da MWCO 투석 튜브장치에 가한 후 4℃에서 9일 동안 교반하면서 0.1 % TFA/H_2O로 투석하였다. 투석 백의 내용물 전체를 동결건조하여 분말화하였다.

[0396] ***CTLA-4(Y201V) 펩타이드 항원으로 형질감염한 "300.19" 세포***

[0397] 전체 길이의 CTLA-4 cDNA를 인간 흉선 cDNA 라이브러리(Stratagene)로부터 PCR 증폭한 후 plRESneo(Clontech)로 서브클로닝하였다. MatchMaker Mutagenesis System(Promega)을 이용하여 항시적인 세포표면 발현을 나타내는 CTLA-4 돌연변이를 도입하였다. 타이로신 돌연변이인 Y201 V(발린)은 CTLA-4의 신속한 내재화(internalization)의 원인이 되는 아답틴(adaptin) 단백질 AP50의 결합을 방해한다(Chuang, et al. *J. Immunol.* 159:144-151 (1997)). 미코플라스마가 없는 300.19 뮤린 림프종 세포를 10% 소 태아혈청, 비필수 아미노산, 페니실린/스트렙토마이신, 2 mM 글루타민, 12.5 mM Hepes pH 7.5 및 25μM 베타-머캅토에탄올을 포함하는 RPMI-1640에 배양하였다. 20 ㎍의 CTLA-4-Y201 V/plRESneo와 200V/1180 uF(Gibco CellPorator)를 이용하여 세포를 1 ml 챔버에서 일렉트로포레이션(3×10^6/0.4 ml 무혈청 RPMI)하였다. 10분간 방치한 후 미리 덥힌 완전 RPMI 배양액 8 ml에 가하였다. 48시간 후에 세포를 1 mg/ml G418(Gibco)를 포함하는 완전 RPMI 배양액에서 0.5×10^6/ml으로 희석하였다. 얻어진 세포를 확장한 후, 피코에리트린과 컨쥬게이트된 BNI3 항체(PharMingen)를 이용하여, 세포 표면에서 CTLA-4가 발현되는 것을 확인하였다. 멸균 보관을 통해 고발현세포를 분리하였다.

[0398] ***면역접종 및 하이브리도마 생성***

[0399] (i) 전술한 바와 같이 CTLA-4를 발현하도록 형질감염된 1×10^7개의 300.19 세포를 포스페이트 완충액(PBS)에 재현탁한 후 완전 Freund 면역보조제와 함께 꼬리 쪽으로 피하 투여, 또는 (ii) 완전 Freund 면역보조제와 함께 유화시킨 (a) 10 ㎍의 CTLA-4 융합단백질 또는 (b) 10 ㎍의 CTLA-4 펩타이드를 꼬리 쪽으로 피하 투여하여 XENOMOUSE(상표명) 마우스(8 내지 10 주령)를 면역접종하였다. 각각의 경우에 대하여, 불완전 Freund 면역보조제로 3회 또는 4회 반복 투여하였다. 4일 후, 최종적으로 마우스에게 면역원 또는 PBS 세포용액을 주입하였다. 면역접종한 마우스로부터 취한 비장 및/또는 림프절 림프구를 [뮤린 미분비 골수종 P3 세포주]와 융합한 후 앞서 언급한 바와 같이 HAT 선별을 실시하였다(Galfre, G. and Milstein, C, "Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures." *Methods Enzymol.* 73:3-46 (1981)). CTLA-4 특이성 인간 IgG_2K 항체를 분비하는 하이브리도마들이 얻어졌다.

[0400] 항-CTLA-4 항체를 생산하는 하이브리도마들은 아래와 같이 표시하였으며, American Type Culture Collection(10801 University Blvd. Manassas, Va. 20110-2209)에 2003년 4월 29일자로 기탁하였다.

[0401]

클론	서브클론	ATCC 기탁번호

[0402]

11.2.1	11.2.1.4	PTA-5169

[0403]

4.1.1	4.1.1.1	PTA-5166

[0404] 실시예 2

[0405] 본 실시예에서는 항-CTLA-4 항체를 생산하는 재조합 포유류 세포주의 생산을 예시한다.

[0406] 단일클론 항체 11.2.1의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 DNA를 하이브리도마 세포주 11.2.1로부터 클로닝한 후 당업자에게 공지된 방법에 따라 DNA 서열을 결정하였다. 항체 11.2.1의 핵산 서열과 예견된 아미노산 서열로부터, 각 항체 사슬의 유전자 이용의 동일성을 확인하였다.

[0407] 이어, 11.2.1 DNA 서열 인서트(inserts)를 발현 벡터로 서브클로닝하였다. 그리고, 발현 벡터를 마우스 골수종(NSO) 숙주 세포 내로 형질감염하여 항-CTLA 항체를 생산하는 다양한 1차 형질감염(primary transfectant) 세포주를 얻었다. 성장도 및 생산석 분석을 통해 리드(lead) 세포주를 선택하였다. 선택된 리드 세포주는 추가로 서브클로닝하여 클로닝 세포주를 생산하였다.

[0408] 세포배양액을 포함하는 생물반응기 내에서 상기 세포주를 세포배양하여 항-CTLA-4 항체를 생산하였다. 생산 과

정에서 배양액에 영양분을 공급하였다. 수확 기준(harvest criteria)이 달성된 후, 여과만으로 또는 여과 후 원심분리하여 생물반응기로부터 세포주를 얻었다. 맑은 상청액을 총 3회(Protein A 친화성 컬럼으로 1회, 이온 교환 컬럼으로 2회)의 크로마토그래피로 정제하였다. 또한, 저(low) pH 비활성화 및 바이러스 여과를 실시하여 존재할지 모르는 바이러스를 제거하였다. 농축 및 한외여과를 통해 약물 제조를 위한 완충제제를 제조하였다.

[0409] 실시예 3

[0410] 상이한 4가지 완충제가 항체 응집 및 절편화에 미치는 영향을 조사하였다.

[0411] 구체적으로, 항-CTLA-4 항체 11.2.1을 포함하며 아세테이트, 숙시네이트, 히스티딘 또는 EDTA로 완충시킨 4가지 액상 제제를 제조하였다. 제제들을 40℃에서 보관한 후 0, 2, 5 및 7주 후에 항체 응집 및 절편화를 측정하였다.

[0412] ***완충액 제조***

[0413] 표 3과 같은 4가지 완충액을 제조하였다. 각 완충액은 먼저 일정량의 완충제(표 3에 기재)를 물에 용해시켜(약 80%의 농도로) 제조하였다. 이어, 충분한 양의 산 또는 염기 용액(표 3에 기재)을 가하여 각 완충액의 pH를 5.5로 맞추었다. pH 조절 후, 물을 더 가하여 완충제의 최종 농도가 20 mM이 되게 하였다. 완충제 농도를 20 mM로 한 것은 pH 5.5에서 충분한 pH 안정도를 보장하기 위함이다. 완충액을 멸균 필터(공경 = 0.22 마이크론)로 여과한 후 멸균 용기에 보관하였다.

표 3

완충액

[0414]

완충제 유형	완충제	완충제 농도(g/L)	산/염기 용액
아세테이트	나트륨 아세테이트 트리하이드레이트	2.74	1% v/v 빙초산
숙시네이트	숙신산	2.36	1M NaOH
히스티딘	L-히스티딘 HCl 모노하이드레이트	4.19	1M NaOH
EDTA	디나트륨 EDTA 디하이드레이트	7.45	5M HCl

[0415] 1% v/v 빙초산 용액은 빙초산(99.9%)을 물로 적절히 희석(1 ml 내지 100 ml)하여 제조하였다. 1 M 수산화나트륨 용액은 수산화나트륨 고체 40 g을 물 1 L에 녹여 제조하였다. 5 M 염산 용액은 진한 염산(37.8%)을 물로 적절히 희석하여 제조하였다.

[0416] ***항체 제제의 제조***

[0417] 본 실시예에서 평가한 항체 제제는 아래 표 4에 정리하였다. 각 제제를 제조하기 위하여, 먼저 일정량의 등장제(표 4, 단위는 mg/ml)를 해당 완충액에 가하고 얻어진 용액을 등장제가 용해될 때까지 교반하였다. 실시예 2의 정제 과정에서 20 mM 나트륨 아세테이트 완충제 pH 5.5 + 140 mM 염화나트륨을 이용하여 13.2 mg/ml의 벌크 용액을 얻었다. Amicon Ultra 15 MWCO10K(UFC901024) 원심분리 농축기를 이용하여 5℃에서 6500 RPM으로 Beckman Coulter Allegra 21 R 원심분리를 수행, 벌크용액의 완충제를 교환하여 원하는 제제용액을 제조하였다. 약 8배의 부피 교환을 통해 항체 용액을 27 내지 30 mg/ml으로 농축하였다. 약 3 내지 4 ml 부피의 제제 1 내지 18을 제조하였다. 280 nm에서 소멸계수를 1.43 $(mg/ml)^{-1}$ cm^{-1}으로 하여, 자외선-가시시광선(UV-Vis) 분광법을 통해 항체 농도를 결정하였다.

[0418] 상기와 같이 제조한 적당한 완충제제로 폴리소르베이트 80을 용해 및 희석하여 20 mg/ml 폴리소르베이트 80(PS80) 용액을 제조하였다. 20 mg/ml 농도의 폴리소르베이트 80을 적당량의 완충제, 항체, 등장제 및 물과 함께 항체 용액 및 완충액에 가하여 최종적으로 표 4의 조성을 가지는 20 mg/ml 항-CTLA-4 단일클론 항체 용액을 얻었다.

[0419] 표 4에서, 제제 2의 경우 200 mg/ml 농도의 PEG3350을 가하였다.

[0420] 제제를 0.2μ 무균필터로 여과한 후 바이얼에 담았다. 제제는 2 ml 용량의 Type 1 유리 바이얼에 0.5 내지 1 ml의 부피로 담았다. Daikyo 777-1 Flurotec(등록상표명) 코팅 스토퍼로 바이얼의 마개를 막고, 크림프(crimp) 밀봉한 후, 40℃의 안정화 챔버 안에 세운 채로 2, 5 및 7주 동안 보관하였다. 바이얼과 13 mm Daikyo 777-1 혈청 스토퍼는 세척 및 고압살균하였다. 동일한 바이얼 2개씩에 대하여 즉시 응집 및 절편화 정도를 분석하였

다.

표 4

시험대상 항체 제제

제제 번호	완충제 유형 20mM, pH 5.5	등장제 (mg/ml)	계면활성제 (mg/ml)
1	아세테이트	NaCl (9)	PS80 (0.2)
2	아세테이트	NaCl (9) + PEG3350 (10)	PS80 (0.2)
3	아세테이트	수크로스 (90)	PS80 (0.2)
4	아세테이트	소르비톨 (48)	PS80 (0.2)
5	아세테이트	이노시톨 (48)	PS80 (0.2)
6	아세테이트	만니톨 (41) + 글리신 (2)	PS80 (0.2)
7	숙시네이트	수크로스 (90)	PS80 (0.2)
8	숙시네이트	소르비톨 (48)	PS80 (0.2)
9	숙시네이트	이노시톨 (48)	PS80 (0.2)
10	숙시네이트	만니톨 (41) + 글리신 (2)	PS80 (0.2)
11	히스티딘	수크로스 (90)	PS80 (0.2)
12	히스티딘	소르비톨 (48)	PS80 (0.2)
13	히스티딘	이노시톨 (48)	PS80 (0.2)
14	히스티딘	만니톨 (41) + 글리신 (2)	PS80 (0.2)
15	EDTA	수크로스 (90)	PS80 (0.2)
16	EDTA	소르비톨 (48)	PS80 (0.2)
17	EDTA	이노시톨 (48)	PS80 (0.2)
18	EDTA	만니톨 (41) + 글리신 (2)	PS80 (0.2)

[0421]

[0422] ***응집 분석***

[0423] 표 4의 항체 제제들을 40℃의 온도에서 보관하였다. 0, 2, 5 및 7주 후, 각 제제에 대하여 크기배제 크로마토그래피(SEC)로 응집 분석을 실시하였다. 크기배제 크로마토그래피 조건은 다음과 같았다 : TSK 젤 G3000SWXL-G2000SWXL 컬럼, 이동상= 0.2 M 나트륨 포스페이트 완충제(pH 7.0), 유속 = 1 ml/min, 214 nm에서 UV 검출. 도 1은 각 제제에 대하여 시간에 따른 고분자량 물질(항-CTLA-4 단일클론 항체 11.2.1의 응집체)의 용출량을 보여준다. 각 제제에 대하여 크로마토그램 피크 아래 면적을 적분한 후, 고분자량 물질 피크 아래의 면적을 적분하여 전체 피크면적에 대한 %값을 구하여 응집도를 계산하였다(도 1 참고). 도 1에서 알 수 있듯이, EDTA로 완충화한 제제의 응집도가 가장 낮았으며, 히스티딘, 아세테이트, 숙시네이트로 완충화한 제제 순이었다.

[0424] ***절편화 분석***

[0425] 전술한 바와 같이, 표 4의 항체 제제들을 40℃의 온도에서 보관하였다. 0, 2, 5 및 7주 후, 각 제제에 대하여 rSDS-PAGE를 이용하여 절편화 분석을 실시하였다. rSDS-PAGE 분석은 NuPAGE 4 내지 12% 비스-트리스 젤과 콜로이드 블루(Coomassie) 염색을 이용하여 실시하였다. 환원 젤(rSDS-PAGE)의 환원은 NuPAGE(등록상표명) 환원제를 이용하여 실시하였다. Molecular Dynamics Personal Densitometer PDQC-90 또는 Bio-Rad GS800 Imaging Densitometer를 사용하여 스캐닝을 통해 가수분해 불순물(항-CTLA-4 단일클론 항체 11.2.1의 절편)의 총량을 추산하였다. 전체 밴드크기에 대한 상대량을 구하여 절편화도를 계산하였다(도 2 참고). 도 2에서 알 수 있듯이, EDTA로 완충화한 제제의 절편화도가 가장 낮았으며, 히스티딘, 아세테이트, 숙시네이트로 완충화한 제제 순이었다.

[0426] 도 1 및 2에 도시한 응집 및 절편화 관련 데이터를 아래 표 5a (0주), 표 5b (2주), 표 5c (5주), 표 5d (7주)에 제시하였다.

표 5a

0주 후의 응집 및 절편화

[0427]

제제 번호	응집률	절편화율
1	0.4%	0.62%
2	0.4%	0.66%
3	0.3%	0.53%
4	0.4%	0.49%
5	0.4%	0.67%
6	0.3%	0.56%
7	0.3%	0.46%
8	0.4%	0.62%
9	0.4%	0.49%
10	0.3%	0.51%
11	0.3%	0.64%
12	0.3%	0.62%
13	0.3%	0.47%
14	0.3%	0.37%
15	0.3%	0.42%
16	0.3%	0.50%
17	0.3%	0.49%
18	0.3%	0.47%

표 5b

2주 후의 응집 및 절편화

[0428]

제제 번호	응집률	절편화율
1	0.7%	1.52%
2	0.7%	1.35%
3	0.5%	0.16%
4	0.5%	1.13%
5	0.5%	1.10%
6	0.4%	1.34%
7	0.6%	1.34%
8	0.6%	1.44%
9	0.6%	1.22%
10	0.5%	1.16%
11	0.4%	1.29%
12	0.4%	1.19%
13	0.4%	1.00%
14	0.4%	0.99%
15	0.5%	1.24%
16	0.5%	1.00%
17	0.5%	1.07%
18	0.5%	0.96%

표 5c

5주 후의 응집 및 절편화

[0429]

제제 번호	응집률	절편화율
1	0.8%	1.40%
2	0.9%	1.59%
3	1.2%	2.61%
4	1.1%	1.49%
5	1.0%	2.12%
6	0.6%	1.56%
7	1.7%	2.50%
8	1.4%	1.86%
9	1.4%	2.03%
10	0.9%	1.46%
11	0.6%	1.42%
12	0.7%	1.36%
13	0.6%	1.03%
14	0.5%	1.05%
15	0.5%	1.21%
16	0.5%	0.78%
17	0.6%	1.27%
18	0.5%	1.25%

표 5d

7주 후의 응집 및 절편화

제제 번호	응집률	절편화율
1	1.4%	2.39%
2	1.2%	1.90%
3	1.4%	1.89%
4	1.8%	2.96%
5	1.3%	1.92%
6	1.1%	1.77%
7	1.2%	1.97%
8	2.2%	2.91%
9	2.4%	3.25%
10	1.3%	1.82%
11	0.9%	1.34%
12	0.9%	1.33%
13	0.7%	1.12%
14	0.6%	0.92%
15	0.6%	1.04%
16	0.6%	1.18%
17	0.6%	1.01%
18	0.6%	1.18%

[0430]

[0431] 실시예 4

[0432] 단일클론 항-CTLA-4 항체 11.2.1을 포함하는 액상 제제들이 여러 차례의 냉동 및 해동 사이클을 견디는 능력을 평가하였다.

[0433] 액상 제제가 여러 차례의 냉동/해동 사이클을 견디는 능력은 보통 해당 제제를 냉동 보관하였다가 (필요한 경우, 운반한 뒤) 해동하여 사용할 수 있는지 알아보기 위한 목적으로 평가한다.

[0434] 평가 대상 제제를 표 6에 기재하였다. 제제 제조과정은 실시예 3과 동일하다. 각 용액 2.5 ml씩을 5 ml Type 1 유리 바이얼에 넣고, 스토퍼를 한 후 밀봉하였다. 1 내지 4, 7, 8, 11, 12, 15 및 16으로 표시한 제제 번호는 실시예 3의 제제 번호와 동일하다.

표 6

시험대상 항체 제제

제제 번호	완충제 유형 20 mM, pH 5.5	등장제 (mg/ml)	계면활성제 (mg/ml)
1	아세테이트	NaCl (9)	PS80 (0.2)
2	아세테이트	NaCl (9) + PEG3350 (10)	PS80 (0.2)
3	아세테이트	수크로스 (90)	PS80 (0.2)
4	아세테이트	소르비톨 (48)	PS80 (0.2)
19	아세테이트	트레할로스 (90)	PS80 (0.2)
20	숙시네이트	NaCl (9)	PS80 (0.2)
21	숙시네이트	NaCl (9) + PEG3350 (10)	PS80 (0.2)
7	숙시네이트	수크로스 (90)	PS80 (0.2)
8	숙시네이트	소르비톨 (48)	PS80 (0.2)
22	히스티딘	NaCl (9)	PS80 (0.2)
23	히스티딘	NaCl (9) + PEG3350 (10)	PS80 (0.2)
11	히스티딘	수크로스 (90)	PS80 (0.2)
12	히스티딘	소르비톨 (48)	PS80 (0.2)
24	EDTA	NaCl (9)	PS80 (0.2)
25	EDTA	NaCl (9) + PEG3350 (10)	PS80 (0.2)
15	EDTA	수크로스 (90)	PS80 (0.2)
16	EDTA	소르비톨 (48)	PS80 (0.2)

[0435]

[0436] 각 제제를 6회 연속 냉동/해동 사이클에 가하였다. 처음 3회 사이클은 속도제어 냉동기에서 수행하였다. 뒤의 3회 사이클은 속도를 느리게 하였으며, 냉동기 또는 냉장고의 높은 열부하에 대응되도록 물을 채운 다수의 바이얼과 함께 수행하였다. 1, 2, 3 사이클의 경우, 제제가 들어 있는 바이얼을 속도제어 냉동기(Planer Kryo 560-16)에 넣고 다음 조건에서 사이클을 수행하였다. 0.2℃/min의 속도로 제제를 -70℃까지 냉각한 다음, -70℃에서 1.5 내지 3시간 유지한 후, 0.3℃/min의 속도로 제제의 온도가 5℃가 될 때까지 해동하였다. 4, 5, 6 사이

클의 경우, 바이얼들을 물을 채운 다른 바이얼들과 함께(각 제제별로 샘플 바이얼 하나씩 17개의 제제 바이얼 및 총 약 30개의 물을 채운 바이얼) 박스에 넣었다. 박스를 먼저 온도가 -70℃로 유지되는 냉동기에 넣고, 약 17시간 후 온도가 2 내지 8℃로 유지되는 냉장고로 옮겨 약 50시간 동안 보관하였다. 냉동과정의 평균 냉각속도는 0.09℃/min이었으며 해동과정의 평균 가열속도는 0.03℃/min이었다.

[0437] 매 냉동/해동 사이클 후, 각 제제의 입자형성 여부, 색 변화 및 혼탁도 변화를 육안으로 판정하였다. 육안 판정은 해동 직후 흑색과 백색의 배경에서 실시하였다. 결과를 아래 표 7에 제시하였다.

표 7

항-CTLA-4 항체 11.2.1의 냉동/해동 안정도 육안 판정

제제 번호	ID	1회 냉동/해동	2회 냉동/해동	3회 냉동/해동	4회 냉동/해동	5회 냉동/해동	6회 냉동/해동	입자(SEC) 증가율(%)
1	Ac + NaCl	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	혼탁	다량의 입자	다량의 입자	0.7
2	Ac + NaCl + PEG	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	플레이크	흐림, 플레이크	소량의 입자	0
3	Ac + 수크로스	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	0.1
4	Ac + 소르비톨	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	0.1
19	Ac + 트레할로스	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	0
20	Succ + NaCl	소량의 입자	소량의 입자	입자량 증가	입자량 증가	흐림, 플레이크, 입자	다량의 입자	1.3
21	Succ + NaCl + PEG	무색, 입자 없음	소량의 입자	소량의 입자	흐림	흐림	소량의 입자	0.2
7	Succ + 수크로스	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	0.1
8	Succ + 소르비톨	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	0
22	Hist + NaCl	무색, 입자 없음	혼탁	혼탁	흐림, 플레이크	흐림	흐림, 혼탁, 플레이크	1.1
23	Hist + NaCl + PEG	무색, 입자 없음	혼탁	소량의 입자	무색, 입자 없음	흐림, 플레이크, 소량의 입자	소량의 입자	0.1
11	Hist + 수크로스	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	0.1
12	Hist + 소르비톨	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	0
24	Ed + NaCl	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	흐림, 소량의 입자	다량의 입자	다량의 입자, 흐림	0.1
25	Ed + NaCl + PEG	무색, 입자 없음	혼탁, 소량의 입자	흐림, 플레이크	흐림	흐림, 플레이크	소량의 입자	0
15	Ed + 수크로스	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	0
16	Ed + 소르비톨	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	무색, 입자 없음	0.1

[0438]

[0439] 염화나트륨만을(즉, 염소이온만을) 포함하는 제제는 트레할로스, 수크로스 또는 소르비톨을 포함하는 제제에 비해 냉동/해동 사이클 이후 가용성 입자의 농도가 많이 증가하였다. 그러나, 염화나트륨을 포함하는 제제에 PEG를 가한 경우, 냉동/해동 사이클 후 가용성 입자의 양이 감소하는 것으로 나타났다.

[0440] ***응집 분석***

[0441] 또한, 6회의 연속 냉동/해동 사이클 후, 크기배제 크로마토그래피를 이용하여 각 제제의 가용성 입자 증가율(%)을 측정하였다.

[0442] 6회째 냉동/해동 사이클 후, 크기배제 크로마토그래피를 이용하여 각 제제의 응집 정도를 분석하였다. 크기배제 크로마토그래피 조건은 다음과 같았다 : TSK 젤 G3000SWXL-G2000SWXL 컬럼, 이동상 = 0.2 M 나트륨 포스페이트 완충제(pH 7.0), 유속 = 1 ml/min, 214 nm에서 UV 검출. 표 7에 각 제제의 시간에 따른 고분자량 물질(즉, 항-CTLA-4 단일클론 항체 11.2.1의 응집체)의 용출량을 기록하였다. 각 제제에 대하여 크로마토그램 피크 아래 면적을 적분한 후, 고분자량 물질 피크 아래의 면적을 적분하여 전체 피크면적에 대한 %값을 구하여 응집도를

계산하였다(표 7 참고). 표 7에서 알 수 있듯이, EDTA로 완충화한 제제의 응집도가 가장 낮았으며, 히스티딘, 아세테이트, 숙시네이트로 완충화한 제제 순이었다.

[0443] 실시예 5

[0444] EDTA, 메티오닌 및 무산소 조건이 단일클론 항-CTLA-4 항체 11.2.1을 포함하는 액상 제제의 변색 및 응집에 미치는 영향을 조사하였다. 이와 같은 액상 제제의 변색 및 응집은 제품의 외관 측면에서나 품질 측면에서 모두 일반적으로 바람직하지 못하다.

[0445] 평가 대상 제제의 처리방법을 아래의 표 8에 제시하였다. 제제의 일반적인 제조절차는 실시예 3과 같다. 이번 실시예의 경우, 단일클론 항-CTLA-4 항체 11.2.1(5 mg/ml), 나트륨 아세테이트 완충제(20 mM), 염화나트륨(8.2 mg/ml) 및 폴리소르베이트 80(0.2 mg/ml)을 포함하는 pH 5.5의 출발 제제를 먼저 제조한 후, 밀봉 캡이 구비된 여러 10 ml 유리 바이얼에 가하여 무균 샘플을 얻었다.

[0446] 출발 제제에 대하여 아래 표 8과 같이 다양한 처리를 하였다. 표 8에 제시된 바와 같이, 일부 바이얼에는 메티오닌을 가하였다. 다른 바이얼에는 두 가지 다른 농도의 EDTA를 가하였다. EDTA 또는 메티오닌을 가한 일부 바이얼에는 상부 공간에 질소 기체를 가하였다. 또한, 처리를 하지 않은 나머지 바이얼은 공기를 제거한 후 상부 공간에 질소 기체를 가하였다. 또한, 나머지 바이얼은 처리하지 않은 채로 실험 대조군으로 사용하였다.

[0447] 표 8의 각 처리군에 대하여 2개의 바이얼씩을 40℃에서 0, 2, 4, 6, 8, 10, 14, 16 및 18주 동안 보관하였다. 두 바이얼 중 하나에 대하여는 육안에 의한 색 평가를, 다른 하나는 무균 샘플링한 후 11.2.1 항체 응집 측정을 실시하였다. 결과를 표 9 및 10에 제시하였다.

표 8

시험대상 항체 제제의 처리

[0448]

제제 번호	처리 내용	처리 방법
26	처리하지 않음	처리하지 않음
27	상부 공간에 N_2 기체 가함	동결건조기 내에서 바이얼 상부 공간을 N_2 기체로 치환
28	공기 제거, 상부 공간에 N_2 기체 가함	동결건조기 내에서 공기 제거 후, 상부 공간을 N_2 기체로 치환
29	26.6 mM 메티오닌 가함	고체 상태의 26.6 mM 메티오닌을 가함
30	상부 공간에 N_2 기체 가함, 26.6 mM 메티오닌 가함	고체 상태의 26.6 mM 메티오닌을 가한 후, 동결건조기 내에서 바이얼 상부 공간을 N_2 기체로 치환
31	0.005% Na_2EDTA 가함	고체 상태의 0.005% $Na_2EDTA.2H_2O$를 가함
32	26.6 mM 메티오닌 가함, 0.005% Na_2EDTA 가함	고체 상태의 26.6 mM 메티오닌과 고체 상태의 0.005% $Na_2EDTA.2H_2O$를 가함
33	0.01% Na_2EDTA 가함	고체 상태의 0.01% $Na_2EDTA.2H_2O$를 가함

[0449] ***제제의 외관 분석***

[0450] 0(초기), 2, 4, 6, 8, 10, 14, 16 및 18주, 각 제제의 입자형성, 색 변화 및 혼탁도 변화를 육안으로 평가하였다. 육안 관찰 결과를 표 9에 제시하였다.

표 9

표 8에 의거 처리한 제제의 육안 평가

제제 번호	바이얼 처리	초기	40℃ 2주	40℃ 4주	40℃ 6주	40℃ 8주	40℃ 10주	40℃ 12주	40℃ 14주	40℃ 16주	40℃ 18주
26	처리하지 않음	무색 투명	무색 투명	분홍색	분홍색	분홍색	분홍색	분홍색	분홍색	분홍색	분홍색
27	+ N_2	무색 투명	무색 투명	분홍색	분홍색	분홍색	분홍색	분홍색	분홍색	분홍색	분홍색
28	공기 제거, + N_2	무색 투명	무색 투명	분홍색	분홍색	분홍색	분홍색	분홍색	분홍색	분홍색	분홍색
29	+ 26.6 mM 메티오닌	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명
30	+ N_2, + 26.6 mM 메티오닌	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명
31	+ 0.005% Na_2EDTA	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명
32	+ 26.6 mM 메티오닌, + 0.005% Na_2EDTA	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명
33	+ 0.01% Na_2EDTA	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명

[0451]

[0452] 표 9에서 알 수 있듯이, EDTA 및/또는 메티오닌을 처리하지 않은 제제는 40℃에서 4주 이상 보관했을 때 분홍색으로 변색되었다. 어떤 특정 이론에 한정하고자 하는 것은 아니지만, 본 발명의 한 태양에 있어서, 이러한 색 변화는 적어도 부분적으로는 산화과정에 기인하는 것일 수 있다. 그러나 다른 태양에 있어서, 상기 색 변화는 산화와 무관한 다른 과정에 기인하는 것일 수 있다.

[0453] 바이얼 상부 공간에 질소 기체를 가하는 것은 메티오닌 및/또는 EDTA의 첨가에 비해 변색을 줄이는 데 있어 효과가 적은 것으로 생각된다.

[0454] ***응집 분석***

[0455] 표 8에 따라 처리한 항체 제제를 40℃에서 보관하였다. 0, 2, 6, 8, 10, 14, 16 및 18주 후, 각 제제의 응집 상태를 크기배제 크로마토그래피로 분석하였다. 크기배제 크로마토그래피 조건은 다음과 같았다 : TSK 젤 G3000SWXL-G2000SWXL 컬럼, 이동상 = 0.2 M 나트륨 포스페이트 완충제(pH 7.0), 유속 = 1 ml/min, 214 nm에서 UV 검출. 각 처리 제제의 시간에 따른 고분자량 물질(즉, 항-CTLA-4 항체 11.2.1의 응집체) 용출량을 표 10에 제시하였다. 각 제제에 대하여 크로마토그램 피크 아래 면적을 적분한 후, 고분자량 물질 피크 아래의 면적을 적분하여 전체 피크면적에 대한 %값을 구하여 응집도를 계산하였다(표 10 참고).

표 10

표 8에 의거 처리한 제제의 응집률

제제 번호	바이얼 처리	초기	40℃ 2주	40℃ 4주	40℃ 6주	40℃ 8주	40℃ 10주	40℃ 12주	40℃ 14주	40℃ 16주	40℃ 18주
26	처리하지 않음	0.2%	0.8%	2.3%	3.5%	4.6%	5.31%	4.3%	8.8%	7.7%	7.1%
27	+ N2	0.2%	0.7%	2.3%	3.8%	4.4%	4.82%	4.5%	6.5%	6.0%	5.5%
28	공기 제거, + N2	0.2%	0.3%	0.9%	1.4%	2.5%	3.68%	4.3%	-	4.6%	4.8%
29	+ 26.6 mM 메티오닌	0.2%	0.2%	0.5%	0.5%	0.6%	0.59%	0.5%	0.7%	0.8%	0.7%
30	+ N2, + 26.6 mM 메티오닌	0.2%	0.2%	0.5%	0.4%	0.4%	0.51%	0.5%	0.5%	0.7%	0.7%
31	+ 0.005% Na_2EDTA	0.2%	0.2%	0.4%	0.6%	0.5%	0.69%	0.8%	1.0%	1.0%	0.8%
32	+ 26.6 mM 메티오닌, + 0.005% Na_2EDTA	0.2%	0.3%	0.3%	0.4%	0.4%	0.35%	0.4%	0.8%	0.5%	0.7%
33	+ 0.01% Na_2EDTA	0.2%	0.2%	0.4%	0.6%	0.6%	0.73%	0.3%	1.2%	1.0%	1.2%

[0456]

[0457] 표 9에서 알 수 있듯이, EDTA 및/또는 메티오닌을 처리하지 않은 제제는 40℃에서 4주 이상 보관하였을 때 분홍색이 나타나기 시작했다. 또한, 표 10에서 알 수 있듯이, EDTA 및/또는 메티오닌을 처리한 제제가 응집도가 가장 낮았으며, 질소 기체 처리, 미처리 대조군 순이었다.

[0458] 실시예 6

[0459] 메티오닌 및 EDTA가 액상 제제 상태로 보관한 항-CTLA-4 항체 11.2.1의 특정 메티오닌 아미노산 잔기의 산화에 미치는 영향을 평가하였다.

[0460] ***메티오닌의 산화 분석***

[0461] 40℃에서 8주간 보관 후, 항-CTLA-4 항체 11.2.1의 256번 및 432번 아미노산 위치에서의 메티오닌 잔기의 산화 정도를 라이신-C 매핑법으로 평가하였다.

[0462] 제제 26, 29 및 33(표 8) 및 실시예 5에 따라 처리한 제제가 들어 있는 유리 바이얼을 8주 후에 무균 샘플링하였다. 샘플을 Lyc-C 효소의 트리스 완충제 용액(pH 8.0)으로 표준 조건에서 소화시킨 후 역상 고성능 액체 크로마토그래피로 분석하였다. Grace Vydac Protein C4 분석컬럼을 이용, 0.1% TFA 수용액 및 0.085% TFA 아세토니트릴 용액으로 구배 용출하여 분리하였다.

표 11

표 8에 의거 처리한 항-CTLA-4 항체 11.2.1의 메티오닌 아미노산의 산화율

[0463]

제제 번호	처리	Met 432 산화율	Met 256 산화율
	초기	2.3%	4.9%
26	처리하지 않음	15.4%	32.9%
29	+ 26.6 mM 메티오닌	0.5%	1.1%
33	+ 0.01% Na_2EDTA	1.6%	3.3%

[0464] 표 11의 결과로부터, 메티오닌 또는 EDTA를 11.2.1 항체 제제에 가하면 두 메티오닌 잔기에서의 산화율이 감소함을 알 수 있다.

[0465] 실시예 7

[0466] 항-CTLA-4 항체 11.2.1의 특정 트립토판 및 타이로신 아미노산 잔기의 산화에 대해 조사하였다.

[0467] 분홍색으로의 변색을 보이는 항-CTLA-4 항체 11.2.1 제제는 자외선/가시광선 분광분석(UV-Vis)시 500 nm에서 특징적인 최대 흡수를 나타내는 것으로 확인되었다.

[0468] 실시예 3에서와 같은 방법으로 제제를 제조하였다. 이 실시예에서는, 20 mM 나트륨 아세테이트 완충제에 녹인 5 mg/ml 단일클론 항-CTLA-4 항체 11.2.1 용액, 8.2 mg/ml 염화나트륨 및 0.2 mg/ml 폴리소르베이트 80(pH 5.5)을 포함하는 제제를 2개의 유리 바이얼에 넣고 40℃에서 4주 동안 보관하였다. 4주 후, 제제들은 분홍색으로 변색되었다.

[0469] 변색된 바이얼들 중 하나의 제제에 대하여 분자량(컷오프) 여과를 실시하여 제제의 부형제 성분이 여과장치를 통과하고 항체 성분만 남게 하였다. 여과액(예컨대, 물 및 부형제)은 무색 투명한 상태였으며 수집된 분획(예컨대, 항체 11.2.1)은 분홍색을 유지하였다. 따라서, 여과실험 결과로부터 분홍색으로의 변색은 부형제 성분에 의한 것이 아니라 항체 11.2.1 자체와 관련이 있음을 알 수 있다.

[0470] 다음으로, 분홍색 변색을 보인 두 번째 바이얼을 표준 조건 하에서 트립신으로 소화시킨 후 역상 고성능 액체 크로마토그래피-질량분석(LC-MS)을 통해 분석하였다. Grace Vydac Protein C4 분석컬럼을 이용, 0.1% TFA 수용액 및 0.085% TFA 아세토니트릴 용액으로 구배 용출하여 분리하였다. 소화된 펩타이드의 UV-Vis 흡수를 500 nm에서 측정한 후, 분자량 분석을 통해 해당 펩타이드를 확인하였다.

[0471] 트립신에 의해 소화된 펩타이드(500 nm 흡수 피크)의 아미노산 서열은 GLEWVAVIWYDGSNK이었다. 펩타이드 서열 GLEWVAVIWYDGSNK을 표준 조건 하에서 Asp-N 단백질분해효소로 더 소화시키자, 500 nm 흡수(UV-Vis) 피크가 아미노산 서열이 GLEWVAVIWY인, Asp-N 단백질분해효소에 의해 소화된 펩타이드 쪽으로 이동하였다.

[0472] 따라서, 특정 이론에 한정하고자 하는 것은 아니지만, 단백질분해효소에 의해 소화된 펩타이드(GLEWVAVIWY)의 두 트립토판 아미노산 잔기(W) 또는 타이로신 잔기(Y) 중 하나 또는 양자 모두가 산화의 가능성이 있는 부위로 생각되며, 이 실시예에서 항체 11.2.1 제제가 분홍색으로 변색된 것은 그 때문인 것으로 보인다. 구체적인 태양에 있어서, 단백질분해효소에 의해 소화된 펩타이드(GLEWVAVIWY)의 두 트립토판 아미노산 잔기(W) 중 하나 또는 둘 모두가 산화의 가능성이 있는 부위로 생각되며, 분홍색으로의 변색은 그 때문인 것으로 보인다.

[0473] 그러나, 이 실시예에서 시험한 여러 제제에서 관찰된 하나 이상의 특정 변색(예컨대, 분홍색 또는 황색) 중 어느 것도 산화 이외의 메커니즘에 기인한 것이었을 가능성도 있다.

[0474] 실시예 8

[0475] EDTA 및 DTPA가 항-CTLA-4 항체 11.2.1의 변색, 응집 및 절편화에 미치는 영향을 평가하였다.

[0476] 구체적으로, 항체 11.2.1을 포함하며 EDTA 및 DTPA를 포함하거나 그렇지 않은 3가지 액상 제제를 제조하였다. 제제들을 40℃에 보관하고, 0, 2, 4, 6, 8 및 10주 후에 항체 변색, 응집 및 절편화를 평가하였다.

[0477] 실시예 3에서처럼, 8.2 mg/ml 염화나트륨 및 0.2 mg/ml 폴리소르베이트 80과 함께 20 mM 나트륨 아세테이트 완충제에 녹인 20 mg/ml 항-CTLA-4 항체 용액(pH 5.5)을 제조한 후 여러 유리 바이얼에 나누었다. 이어, EDTA 또는 DTPA를 가하여 처리하였다. EDTA와 DTPA는 고체 상태로 제제에 가하였다. 일부 바이얼들은 변색, 응집 및 절편화 정도를 즉시 분석하였고, 동일한 나머지 바이얼들은 40℃에서 2, 4, 6, 8 및 10주 동안 보관하였다.

[0478] 2, 4, 6, 8 및 10주 후, 처리한 바이얼 및 처리하지 않은 바이얼의 제제를 무균 샘플링한 뒤 항체 11.2.1의 응집 및 절편화 정도를 측정하고 변색 여부를 관찰하였다. 결과를 표 12 및 13에 제시하였다.

[0479] ***제제의 외관 분석***

[0480] 각 제제에 대하여 0(초기), 2, 4, 6, 8 및 10주 후의 입자형성, 색 변화 및 혼탁도 변화를 육안으로 평가하였다. 육안 관찰 결과를 표 12에 제시하였다.

표 12

[0481] EDTA 및 DTPA 처리 제제의 육안 평가

번호	처리	0주 초기	2주 40℃	4주 40℃	6주 40℃	8주 40℃	10주 40℃
26	처리하지 않음	무색 투명	무색 투명	무색 투명	분홍색	분홍색	분홍색
33	+ 0.01% $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명
34	+ 0.01% DTPA	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명	무색 투명

[0482] 표 12의 결과로부터, EDTA 또는 DTPA를 가하지 않은 제제는 40℃에서 6주 이상 보관한 경우 분홍색으로 변색되었음을 알 수 있다.

[0483] ***응집 분석***

[0484] 표 12에 의거 처리한 항체 제제를 40℃의 온도에서 보관하였다. 0, 2, 6, 8 및 10주 후, 각 제제에 대하여 크기배제 크로마토그래피를 이용한 응집 분석을 실시하였다. 크기배제 크로마토그래피 조건은 다음과 같았다 : TSK 젤 G3000SWXL-G2000SWXL 컬럼, 이동상 = 0.2 M 나트륨 포스페이트 완충제(pH 7.0), 유속 = 1 ml/min, 214 nm에서 UV 검출. 표 13에 각 처리 제제의 시간에 따른 고분자량 물질(즉, 항-CTLA-4 항체 11.2.1의 응집체) 용출률을 기록하였다. 각 제제에 대하여 크로마토그램 피크 아래 면적을 적분한 후, 고분자량 물질 피크 아래의 면적을 적분하여 전체 피크면적에 대한 %값을 구하여 응집도를 계산하였다(표 13 참고).

표 13a

EDTA 및 DTPA 처리 제제의 응집률

번호	처리	0주 초기	2주 40℃	4주 40℃	6주 40℃	8주 40℃	10주 40℃
26	처리하지 않음	0.6%	0.9%	1.4%	2.2%	2.6%	3.2%
33	+ 0.01% $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0.7%	0.8%	0.9%	0.9%	1.0%	1.2%
34	+ 0.01% DTPA	0.5%	0.7%	0.8%	0.9%	0.9%	0.9%

[0485]

[0486] 표 13a에서 알 수 있듯이, EDTA 및 DTPA를 포함하는 제제의 응집도가 EDTA 또는 DTPA를 포함하지 않는 제제보다 낮았다.

[0487] 실시예 9

[0488] EDTA 및 질소 기체가 항-CTLA-4 항체 11.2.1의 안정성에 미치는 영향을 평가하였다.

[0489] 구체적으로, 트레할로스 및 폴리소르베이트 80을 포함하는 히스티딘으로 완충화한 제제에 대하여, 변색, 응집, 산화, 절편화 및 하전물질 생성 측면에서 EDTA 및 질소 기체가 항체 11.2.1의 안정도에 미치는 영향을 분석하였

다.

[0490] 평가대상 제제는 아래 표 13과 같다. 제제 제조절차는 하기 실시예 10과 같았다. 제제를 40℃에서 보관하고, 0, 4, 8, 12 및 24주 후에 안정도 평가를 실시하였다.

[0491] 실시예 10에서와 같이, 20 mM 히스티딘 완충제(pH 5.5)에서 84 mg/ml 트레할로스 및 0.2 mg/ml 폴리소르베이트 80과 함께 20 mg/ml 항-CTLA-4 항체 용액을 제조하였다. 제제 중 일부는 농축된 항체 배액(stock solution)을 최종 항-CTLA-4 항체 조성이 20 mg/ml이 되도록 트레할로스 및 폴리소르베이트 80의 배액으로 희석하여 제조하였다. 나머지 제제는 10 mg/ml 농축 $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$를 추가로 가하여 최종 농도가 0.1 mg/ml되게 제조하였다.

제제를 2 ml 유리 바이얼에 1 ml씩 나누어 담았다. 각 제제의 바이얼들 중 절반은 냉동건조기에 넣고 탈기(evacuation) 후 상부 공간을 질소로 치환하였다. 질소 충전 후, 산소량을 측정하였더니 약 1.5% 내지 1.6%였다. 반면, 공기를 치환하지 않은 바이얼의 경우, 상부 공간의 산소량은 약 19.7% 내지 20%였다.

[0492] 일부 바이얼은 즉시 변색, 응집, 절편화, 산화 및 하전물질 생성 여부를 분석하였고, 나머지 동일한 바이얼들은 40℃에서 2, 4, 8, 12 및 24주 동안 보관하였다. 각 시점에서, 각 처리 당 2개의 바이얼씩에 대하여 제제 내 항체 11.2.1의 응집, 절편화, 산화 및 하전물질 생성을 측정하고 변색 여부를 관찰하였다. 결과를 표 14 내지 18에 기록하였다.

표 13b

[0493] 시험 대상 항체 제제

번호	바이얼 상부 공간	완충제	등장제	계면활성제	킬레이트제
35	공기	히스티딘	트레할로스	폴리소르베이트 80	-
36	질소	히스티딘	트레할로스	폴리소르베이트 80	-
37	공기	히스티딘	트레할로스	폴리소르베이트 80	EDTA
38	질소	히스티딘	트레할로스	폴리소르베이트 80	EDTA

[0494] ***제제 외관 분석***

[0495] 0(초기), 4, 8, 12 및 24주 후, 각 제제의 입자형성, 색 변화 및 혼탁도 변화를 육안으로 평가하였다. 육안관찰 결과를 표 14에 기록하였다.

표 14

표 13에 의거 처리한 제제의 육안 평가

번호	처리	0주 초기	4주 40℃	8주 40℃	12주 40℃	24주 40℃
35	상부 공간에 공기 가함	투명, 입자 없음	매우 연한 분홍색, 입자 3개 미만	매우 연한 분홍색, 입자 없음	연한 분홍색, 입자 없음	연한 분홍색, 입자 없음
36	상부 공간에 질소 가함	투명, 입자 없음	투명, 입자 없음	투명, 입자 없음	매우 연한 분홍색, 입자 없음	매우 연한 분홍색, 입자 없음
37	상부 공간에 공기 가함 + EDTA	투명, 입자 없음	투명, 입자 없음	투명, 입자 3개 미만	투명, 입자 없음	투명, 입자 없음
38	상부 공간에 질소 가함 + EDTA	투명, 입자 없음	투명, 입자 없음	투명, 입자 없음	투명, 입자 없음	투명, 입자 없음

[0496]

[0497] 표 14의 결과에서 알 수 있듯이, EDTA 또는 질소 기체가 없는 경우, 40℃에서 4주 동안 보관하였을 때 분홍색 변색이 나타났다. 또한, 표 14에서 알 수 있듯이, 바이얼 상부 공간의 공기를 질소 기체로 치환한 제제의 경우, 분홍색 변색의 시작이 12주 후로 늦춰졌다. EDTA를 포함하는 두 제제는 모두 적어도 24주까지 변색이 관찰되지 않았다.

[0498] ***응집 분석***

[0499] 표 13에 의거 제제한 항체 제제를 40℃의 온도에서 보관하였다. 0, 4, 8, 12 및 24주 후, 크기배제 크로마토그래피를 이용하여 각 제제의 응집을 분석하였다. 각 시점에서 바이얼 안의 제제를 무균 샘플링하였다. 샘플들

에 대하여 다음 조건에서 크기배제 크로마토그래피를 실시하였다 : TSK 젤 G3000SWXL-G2000SWXL 컬럼, 이동상 = 0.2 M 나트륨 포스페이트 완충제(pH 7.0), 유속 = 1 ml/min, 214 nm에서 UV 검출. 표 15에 각 처리 제제의 시간에 따른 고분자량 물질(즉, 항-CTLA-4 항체 11.2.1의 응집체) 용출률을 기록하였다. 각 제제에 대하여 크로마토그램 피크 아래 면적을 적분한 후, 고분자량 물질 피크 아래의 면적을 적분하여 전체 피크면적에 대한 %값을 구하여 응집도를 계산하였다(표 15 참고).

표 15

[0500] 표 13의 제제의 응집률

번호	처리	0주 초기	4주 40℃	8주 40℃	12주 40℃	24주 40℃
35	상부 공간에 공기 가함	0.7%	0.9%	1.3%	1.5%	3.9%
36	상부 공간에 질소 가함	0.7%	0.6%	0.7%	1%	1.5%
37	상부 공간에 공기 가함 + EDTA	0.7%	0.6%	0.8%	0.9%	1.5%
38	상부 공간에 질소 가함 + EDTA	0.7%	0.6%	0.6%	0.8%	1.1%

[0501] 표 15에서 알 수 있듯이, EDTA 처리 제제, 질소 기체 처리 제제 및 EDTA + 질소 기체 처리 제제의 시간에 따른 응집도는 EDTA를 포함하지 않으며 상부 공간에 공기가 있는 제제에 비해 낮았다.

[0502] ***절편화 분석***

[0503] 표 13에 의거 제조한 항체 제제를 40℃의 온도에서 보관하였다. 0, 4, 8, 12 및 24주 후, 환원 SDS-PAGE(rSDS-PAGE)를 이용하여 각 제제의 총 가수분해 불순물(즉, 절편화) 양을 분석하였다. 각 시점에서 바이얼 안의 제제를 무균 샘플링하고 콜로이드 블루(Coomassie) 염색을 한 NuPAGE 4 내지 12% 비스-트리스 젤에 로드하였다. NuPAGE(등록상표명) 환원제를 이용하여 젤을 환원하였다. Molecular Dynamics Personal Densitometer PDQC-90 또는 Bio-Rad GS800 Imaging Densitometer를 이용한 스캔을 통해 환원된 젤의 각 샘플 밴드의 불순물 상대량(즉, 절편화)을 추산하였다. 총 밴드크기에 대한 %값을 구하여 절편화도를 계산하였다(표 16 참조).

표 16

표 13의 제제의 총 불순물 양(절편화)

번호	처리	0주 초기	4주 40℃	8주 40℃	12주 40℃	24주 40℃
35	상부 공간에 공기 가함	1.3%	4.1%	5.5%	8.0%	12.4%
36	상부 공간에 질소 가함	1.2%	3.5%	4.4%	6.3%	10.6%
37	상부 공간에 공기 가함 + EDTA	1.3%	3.2%	4.4%	5.9%	10.6%
38	상부 공간에 질소 가함 + EDTA	1.3%	3.5%	4.1%	5.6%	10.2%

[0504]

[0505] 표 16에서 알 수 있듯이, EDTA 처리 제제, 질소 기체 처리 제제 및 EDTA와 질소 기체를 처리한 제제의 시간에 따른 절편화도는 EDTA를 포함하지 않으며 상부 공간에 공기가 있는 제제에 비해 낮았다.

[0506] ***산/염기물질의 생성***

[0507] 표 13에 의거 제조한 항체 제제를 40℃의 온도에서 보관하였다. 0, 4, 12 및 24 후, 각 제제에 대하여 이미징 모세관 전기영동(iCE)을 이용하여 산/염기물질의 생성을 분석하였다. 이미징 모세관 전기영동은 Convergent Biosciences iCE_{280} 분석기를 이용하여 전하 이질성(heterogeneity)을 평가하는 방법으로 수행하였다. Convergent iCE_{280}은 이미징 모세관 등전점 전기영동(IEF) 장비로서, 모세관 안에 들어 있는 개별 샘플의 이미지를 촬영할 수 있게 해 준다.

[0508] 각 시점에서 바이얼의 제제들을 무균 샘플링하였다. 이후, 샘플을 전기영동용 양쪽성 전해질, 메틸 셀룰로스, 보정용 마커 및 물의 혼합물에 처리하였다. 샘플을 iCE_{280}에 도입한 후, 고전위/전압을 가하였다. IEF 분석은 pH 3 내지 10.5의 폴리아크릴아미드 젤과 Coomassie 블루 염색을 이용하여 수동으로 수행하였다. 샘플의 단백

질 성분을 상대 등전위(pI) 및 그 위치를 기준으로 분리하였다. 분리된 각 성분의 상대량을 이미징 CCD 카메라로 관찰하였다. 일반적인 크로마토그래피 적분 소프트웨어를 이용한 데이터 처리를 통해 주 피크의 손실(즉, 산/염기물질의 생성)을 기록하였다(표 17 참고).

표 17

[0509] 표 13 제제의 주 피크 손실

번호	처리	0주 초기	4주 40℃	8주 40℃	12주 40℃	24주 40℃
35	상부 공간에 공기 가함	65.3	50.3	-	28.8	15.5
36	상부 공간에 질소 가함	63.8	52.2	-	33.1	22.7
37	상부 공간에 공기 가함 + EDTA	62.3	55.4	-	37.0	23.4
38	상부 공간에 질소 가함 + EDTA	63.9	56.6	-	40.0	24.8

[0510] 표 17에서 알 수 있듯이, EDTA 처리 제제, 질소 기체 처리 제제 및 EDTA와 질소 기체를 처리한 제제는 EDTA를 포함하지 않으며 상부 공간에 공기가 있는 제제에 비해 더 큰 무손상 비크를 보였다. 따라서, EDTA가 없거나 및/또는 상부 공간에 질소 기체가 있는 제제는 시간이 흐름에 따라 더 많은 양의 산/염기물질이 생성됨을 알 수 있다.

[0511] ***아미노산 산화 분석***

[0512] 40℃에서 12주 동안 보관한 후, 항-CTLA-4 항체 11.2.1의 256 및 432번 아미노산 위치의 메티오닌 잔기의 산화 정도를 라이신-C 매핑법으로 분석하였다.

[0513] 표 13의 제제가 들어 있는 바이얼을 12주 시점에서 무균 샘플링하였다. 샘플을 pH 8.0의 라이실 엔도펩티다제(Lys-C) 트리스 완충제로 표준 조건 하에서 소화시킨 후, 역상 고성능 액체 크로마토그래피로 분석하였다. Grace Vydac Protein C4 분석컬럼을 이용, 0.1% TFA 수용액 및 0.085% TFA 아세토니트릴 용액으로 구배 용출하여 분리하였다.

표 18

[0514] 표 13의 제제의 항-CTLA-4 항체 11.2.1에서 메티오닌 아미노산의 산화율

제제 번호	처리	아미노산 잔기	산화율 0주	산화 12주
35	상부 공간에 공기 가함	Met-432	1.6%	7.3%
		Met-256	5%	17.9%
36	상부 공간에 질소 가함	Met-432	1.6%	3.3%
		Met-256	5%	7.8%
37	상부 공간에 공기 가함 + EDTA	Met-432	1.6%	3.9%
		Met-256	5%	9.7%
38	상부 공간에 질소 가함 + EDTA	Met-432	1.6%	2.6%
		Met-256	5%	5.9%

[0515] 표 18에서 알 수 있듯이, 11.2.1 항체 제제에 EDTA를 가하거나 및/또는 바이얼 상부 공간에 질소 기체를 가하면 EDTA를 포함하지 않으며 상부 공간에 공기가 있는 제제에 비해 상기 두 메티오닌 잔기에서의 산화율이 감소함을 알 수 있다.

[0516] 실시예 10

[0517] 나트륨 아세테이트 완충제 및 염화나트륨(즉, 염소이온)을 포함하는 항-CTLA-4 항체 11.2.1 제제와 히스티딘 완충제 및 트레할로스를 포함하는 제제의 안정도를 비교하였다.

[0518] 구체적으로, 변색, 응집 및 절편화 측면에서 항체 11.2.1의 안정도에 미치는 영향을 분석하였다.

[0519] 평가 대상 제제는 아래 표 19와 같다. 실시예 3에서와 같은 방법으로 제제를 제조하였다.

[0520] 20 mM 나트륨 아세테이트 완충제(pH 5.5) 및 140 mM 염화나트륨에 11.9 mg/ml 항체 11.2.1 배액을 가하고 Millipore Lab Scale TFF System에서 Pellicon XL PBTK 30K 50cm^2 막으로 한외여과/정용여과(UF/DF)하여 표 19의 제제를 제조하였다. 다음으로, 35 내지 40 mg/ml 범위의 항체 11.2.1 농축 용액을 20 mM 나트륨 아세테이트 또는 20 mM 히스티딘 완충제에서 제조하였다.

[0521] 나트륨 아세테이트 또는 히스티딘 완충제를 이용하여 최종 농도의 3배가 되는 등장제 농축액을 제조하였다. 20 mg/ml의 농축 폴리소르베이트 80 용액을 제조하였으며 10 mg/ml의 $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$를 각 완충제에 대하여 제조하였다. 농축 용액을 적절히 희석하여 각 제제를 제조하였다. 제제를 0.2 μ 무균필터로 여과한 후 동일한 여러 바이얼에 담았다. 제제는 2 ml Type 1 유리 바이얼에 1 ml씩 채웠다. 바이얼을 Daikyo 777-1 Flurotec(등록상표명) 코팅한 스토퍼로 막고 크림프 밀봉한 후, 25℃ 및 40℃의 안정화 챔버에 보관하였다. 다른 세트의 바이얼을 역시 -20℃에서 4주 동안 보관하였으며, 또다른 세트는 실시예 4에서와 같이 4회의 냉동/해동 사이클(물을 채운 바이얼 박스)에 처하게 하였다. 모든 제제의 pH는 5.5였으며 항-CTLA-4 항체 11.2.1 농도는 20 mg/ml이었다.

[0522] 일부 바이얼에 대해서 즉시 변색, 응집 및 절편화를 분석하였으며, 나머지 동일한 바이얼은 25℃ 및 40℃에서 4, 8, 12, 18, 24 및 36주 동안 보관하였다. 각 시점에서, 제제별로 2개씩의 바이얼을 꺼내어 각 조건에 대한 항체 11.2.1의 응집 및 절편화 정도를 측정하였으며 변색 여부를 관찰하였다. 결과를 표 20 내지 24와 도 3 및 4에 제시하였다.

표 19

[0523] 시험대상 항체 제제

번호	아세테이트 (mM)	히스티딘 (mM)	트윈 80 (mg/ml)	염화나트륨 (mg/ml)	만니톨 (mg/ml)	트레할로스 (mg/ml)	글리신 (mg/ml)	EDTA (mg/ml)	PEG 3350 (mg/ml)	메티오닌 (mg/ml)
26	20	-	0.2	8.2	-	-	-	-	-	-
39	20	-	0.2	5.0	18	-	-	0.1	-	-
40	-	20	0.2	-	-	84	-	-	-	-
37	-	20	0.2	-	-	84	-	0.1	-	-
41	-	20	0.2	-	-	84	-	0.1	-	2
42	-	20	0.4	-	-	84	-	0.1	-	-
43	-	20	0.2	-	41	10	-	-	-	-
44	-	20	0.2	-	41	10	-	0.1	-	-

[0524] ***제제 외관 분석***

[0525] 1) 제제를 혼합한 직후, 2) 제제를 -20℃에서 냉동하여 4주 동안 보관한 후 및 3) 4회의 냉동/해동 사이클(실시예 4에서처럼, 박스 내에서 물을 채운 바이얼과 함께 -70℃에서 5℃로) 실시 후 각 제제를 육안 평가하였다. 0(초기), 8, 12 및 24주 후, 각 제제에 대하여 입자형성, 색 변화 및 혼탁도 변화를 육안 평가하였다. 제제의 입자형성, 색 변화 및 혼탁도 변화 평가결과를 표 20(냉동/해동), 표 21(25℃에서 보관) 및 표 22(40℃에서 보관)에 기록하였다.

표 20

[0526] 냉동/해동 후 표 19의 제제의 육안 평가

번호	초기	-20℃에서 4주간 냉동 후	냉동/해동 사이클 후
26	무색 투명, 입자 없음	매우 약간 흐림, 입자 수 3개 이상	매우 약간 흐림, 입자 수 다수
39	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만
40	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만
37	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만
41	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만
42	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만
43	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만

44	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만	무색 투명, 입자 없음

표 21

[0527] 25℃에서 보관 후 표 19의 제제의 육안 평가

번호	초기	8주 25℃	12주 25℃	24주 25℃
26	무색 투명, 입자 없음	매우 약간 흐림, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만
39	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만	-
40	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음
37	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음
41	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음
42	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음
43	무색 투명, 입자 없음	-	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음
44	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	매우 약간 흐림, 입자 없음

표 22

[0528] 40℃에서 보관 후 표 19의 제제의 육안 평가

번호	초기	8주 40℃	12주 40℃	24주 40℃
26	무색 투명, 입자 없음	매우 약간 흐림, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	연한 분홍색, 입자 없음
39	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	-
40	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	연한 분홍색, 입자 없음
37	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음
41	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음
42	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음
43	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	연한 분홍색, 입자 없음
44	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음

[0529] 표 20 내지 22의 결과에서 알 수 있듯이, EDTA를 포함하는 항체 11.2.1 제제는 EDTA를 포함하지 않는 제제에 비해 변색, 혼탁도 및 입자형성이 감소하였다. 대체로, 염화나트륨을 포함하는 제제는 EDTA를 포함하며 염화나트륨을 포함하지 않는 제제에 비해 변색, 혼탁도 및 입자형성이 증가하였다.

[0530] ***응집 분석***

[0531] 표 19에 의거하여 제조한 항체 제제를 25℃ 및 40℃의 온도에서 보관하였다. 0(초기), 4, 8, 12, 24 및 36주 후, 25℃에서 보관한 제제의 응집을 크기배제 크로마토그래피로 분석하였다. 4, 8, 12 및 24주 후, 40℃에서 보관한 제제의 응집을 크기배제 크로마토그래피로 분석하였다. 각 시점에서 바이얼 내의 제제를 무균 샘플링하였다. 샘플에 대한 크기배제 크로마토그래피 조건은 다음과 같았다 : TSK 젤 G3000SWXL-G2000SWXL 컬럼, 이동상 = 0.2 M 나트륨 포스페이트 완충제(pH 7.0), 유속 = 1 ml/min, 214 nm에서 UV 검출. 표 23a 및 23b에 각 제제에 대한 시간별 항체 11.2.1의 응집률을 기록하였다. 각 제제에 대하여 크로마토그램 피크 아래 면적을 적분한 후, 고분자량 물질 피크 아래의 면적을 적분하여 전체 피크면적에 대한 %값을 구하여 응집도를 계산하였다(표 23a 및 23b 참고).

표 23a

[0532] 표 19의 제제를 25℃에서 보관한 후의 응집률

번호	초기	4주 25℃	8주 25℃	12주 25℃	18주 25℃	24주 25℃	36주 25℃
26	0.7%	0.9%	0.9%	1.1%	1.8%	1.8%	3.0%
39	0.7%	0.8%	0.8%	1.1%	-	-	-
40	0.6%	0.6%	0.7%	0.9%	0.95%	0.8%	0.9%
37	0.6%	0.6%	0.6%	0.7%	0.7%	0.7%	0.8%
41	0.6%	0.6%	0.6%	0.7%	0.7%	0.7%	0.7%
42	0.6%	0.6%	0.6%	0.8%	0.8%	0.8%	0.8%
43	0.6%	0.6%	-	-	0.7%	0.8%	0.9%
44	0.6%	0.6%	0.6%	0.7%	0.7%	0.8%	0.8%

[0533] 도 3에 도시한 응집 데이터를 아래 표 23b에 기록하였다.

표 23b

[0534] 표 19의 제제를 40℃에서 보관한 후의 응집률

번호	초기	4주 40℃	8주 40℃	12주 40℃	24주 40℃
26	0.7%	1.0%	1.3%	2.8%	4.7%
39	0.6%	1.0%	1.0%	1.4%	-
40	0.6%	0.7%	0.9%	1.0%	1.4%
37	0.6%	0.6%	0.6%	0.8%	1.1%
41	0.6%	0.6%	0.6%	0.7%	0.8%
42	0.6%	0.6%	0.6%	0.8%	1.1%
43	0.6%	0.8%	-	-	1.7%
44	0.6%	0.6%	0.6%	0.8%	0.9%

[0535] 표 23a 및 23b와 도 3에서 알 수 있듯이, 25℃ 및 40℃에서 보관한 후, EDTA를 포함하는 제제는 EDTA를 포함하지 않고 아세테이트 완충제 및 염화나트륨을 포함하는 제제에 비해 낮은 응집도를 보였다. 또한, 히스티딘 완충제를 포함하는(EDTA 불포함) 제제는 EDTA를 포함하지 않고 아세테이트 완충제 및 염화나트륨을 포함하는 제제에 비해 적은 응집량을 나타냈다.

[0536] ***절편화 분석***

[0537] 표 19에 의거하여 제조한 항체 제제를 25℃ 및 40℃의 온도에서 보관하였다. 0(초기), 4, 8, 12, 18 및 36주 후, 각 제제의 총 가수분해 불순물 양(즉, 절편화)을 환원 SDS-PAGE(rSDS-PAGE)로 분석하였다. 각 시점에서 바이얼의 제제를 무균 샘플링한 후 콜로이드 블루(Coomassie)로 염색한 NuPAGE 4 내지 12% 비스-트리스 젤에 로드하였다. NuPAGE(등록상표명) 환원제를 사용하여 젤을 환원시켰다. Molecular Dynamics Personal Densitometer PDQC-90 또는 Bio-Rad GS800 Imaging Densitometer로 스캔하여 환원 젤의 각 샘플 밴드에 대한 불순물의 상대량(즉, 절편화 정도)을 추산하였다. 총 밴드크기에 대한 비율을 구하여 절편화도를 계산하였다(표 24a 및 24b 참조).

표 24a

[0538] 표 19의 제제를 25℃에서 보관한 후의 절편화율

번호	초기	4주 25℃	8주 25℃	12주 25℃	18주 25℃	24주 25℃	36주 25℃
26	1.8%	1.6%	2.6%	2.4%	1.3%	3.5%	3.7%
39	1.6%	1.4%	2.4%	1.5%	-	-	-
40	1.6%	1.7%	2.6%	1.4%	1.4%	3.3%	3.2%
37	1.6%	1.6%	2.5%	1.4%	1.4%	3.3%	3.1%
41	1.6%	1.6%	2.6%	1.4%	1.2%	3.3%	2.9%
42	1.9%	1.8%	2.5%	1.6%	1.2%	3.0%	2.9%

43	1.8%	1.8%	-	-	1.2%	3.2%	3.1%
44	1.7%	1.7%	2.6%	1.4%	1.3%	3.1%	2.8%

[0539] 도 4에 도시한 응집 데이터를 아래 표 24b에 기록하였다.

표 24b

[0540] 표 19의 제제를 40℃에서 보관한 후의 절편화율

번호	초기	4주 40℃	8주 40℃	12주 40℃	24주 40℃
26	1.8%	5.2%	6.1%	7.8%	11.7%
39	1.6%	5.3%	6.7%	6.5%	-
40	1.6%	5.3%	6.8%	6.2%	10.0%
37	1.6%	5.2%	6.6%	5.5%	10.2%
41	1.6%	5.2%	5.0%	5.5%	10.0%
42	1.9%	5.3%	5.1%	5.8%	9.7%
43	1.8%	5.3%	-	-	11.0%
44	1.7%	4.5%	5.2%	5.5%	9.5%

[0541] 표 24a 및 24b와 도 4에서 알 수 있듯이, 25℃ 및 40℃에서 보관한 후, EDTA를 포함하는 제제는 EDTA를 포함하지 않고 아세테이트 완충제 및 염화나트륨을 포함하는 제제에 비해 낮은 절편화도를 보였다.

[0542] 실시예 11

[0543] 다양한 농도의 EDTA가 항-CTLA-4 항체 11.2.1 제제의 안정도에 미치는 영향을 비교하였다. 또한, 트레할로스 일부를 만니톨로 교체하여 히스티딘 완충제-트레할로스 대체제제를 제조, 시험하였다.

[0544] 구체적으로, 변색, 응집, 절편화 및 산화 측면에서 항체 11.2.1의 안정도에 대한 영향을 분석하였다.

[0545] 평가 대상 제제를 표 25에 기재하였다. 실시예 10에서와 같은 절차를 통해 제제를 제조하였다.

[0546] 20 mM 나트륨 아세테이트 완충제(pH 5.5) 및 140 mM 염화나트륨에 11.9 mg/ml 항체 11.2.1 배액을 가하고 Millipore Lab Scale TFF System에서 Pellicon XL PBTK 30K 50cm^2 막으로 한외여과/정용여과(UF/DF)하여 표 25의 제제를 제조하였다. 다음으로, 35 내지 40 mg/ml 범위의 항체 11.2.1 농축 용액을 20 mM 나트륨 아세테이트 또는 20 mM 히스티딘 완충제에서 제조하였다.

[0547] 나트륨 아세테이트 또는 히스티딘 완충제를 이용하여 최종 농도의 3배가 되는 등장제 농축액을 제조하였다. 20 mg/ml의 농축 폴리소르베이트 80 용액을 제조하였으며 10 mg/ml의 $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$를 각 완충제에 대하여 제조하였다. 농축 용액을 적절히 희석하여 각 제제를 제조하였다. EDTA($Na_2EDTA \cdot 2H_2O$) 농도를 0 내지 0.1 mg/ml 범위에서 조사하였다. 제제를 0.2 μ 무균필터로 여과한 후 동일한 여러 바이얼에 담았다. 제제는 2 ml Type 1 유리 바이얼에 1 ml씩 채웠다.

[0548] 바이얼을 Daikyo 777-1 Flurotec(등록상표명) 코팅한 스토퍼로 막고 크림프 밀봉한 후, 25℃ 및 40℃의 안정화 챔버에 보관하였다. 다른 세트의 바이얼을 실시예 10에서처럼 4회의 냉동/해동 사이클에 처하게 하였다. 모든 제제의 pH는 5.5였으며 항-CTLA-4 항체 11.2.1 농도는 20 mg/ml이었다.

[0549] 일부 바이얼에 대해서 즉시 변색, 응집, 절편화 및 산화를 분석하였으며, 나머지 동일한 바이얼은 25℃ 및 40℃에서 4, 8, 13, 18 및 24주 동안 보관하였다. 각 시점에서, 제제별로 2개씩의 바이얼을 꺼내어 각 조건에 대한 항체 11.2.1의 응집 및 절편화 정도를 측정하였으며 변색 여부를 관찰하였다. 결과를 표 26 내지 31과 도 5 내지 10에 제시하였다.

표 25

[0550] 시험 대상 항체 제제

번호	아세테이트 (mM)	히스티딘 (mM)	트윈 80 (mg/ml)	만니톨 (mg/ml)	트레할로스 (mg/ml)	EDTA (mg/ml)	염화나트륨 (mg/ml)
26	20	-	0.2	-	-	-	8.4
40	-	20	0.2	-	84	-	-
45	-	20	0.2	-	84	0.001	-
46	-	20	0.2	-	84	0.005	-
47	-	20	0.2	-	84	0.01	-
48	-	20	0.2	-	84	0.05	-
37	-	20	0.2	-	84	0.1	-
49	-	20	0.2	10	70	0.001	-
50	-	20	0.4	10	70	0.01	-
51	-	20	0.2	10	70	0.1	-
52	-	20	0.2	20	50	0.001	-
53	-	20	0.2	20	50	0.01	-
54	-	20	0.2	20	50	0.1	-

[0551] ***제제 외관 분석***

[0552] 1) 제제를 혼합한 직후, 2) 4회의 냉동/해동 사이클 실시 후 및 3) 제제를 25℃ 및 40℃에서 4, 8, 13, 18 및 24주 동안 보관한 후 각 제제를 육안 평가하였다. 제제의 입자형성, 색 변화 및 혼탁도 변화 평가결과를 표 26 내지 28에 기록하였다.

표 26

[0553] 냉동/해동 후 표 25의 제제의 육안 평가

번호	초기	4회의 냉동/해동 사이클 후
26	무색 투명, 입자 없음	매우 약간 흐림, 입자 없음
40	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만
45	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만
46	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만
47	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만
48	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만
37	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음
49	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만
50	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만
51	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만
52	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음
53	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만
54	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만

표 27

25℃에서 보관 후 표 25의 제제의 육안 평가

번호	초기	13주 25℃	18주 25℃	24주 25℃
26	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	매우 연한 분홍색, 입자 없음	
40	무색 투명, 입자 없음	매우 연한 분홍색, 입자 없음	-	투명, Y6*, 입자 없음
45	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음
46	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	-	무색 투명, 입자 없음
47	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음
48	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	-	무색 투명, 입자 없음
37	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음
49	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	-	무색 투명, 입자 없음
50	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만	-	무색 투명, 입자 없음
51	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만	-	무색 투명, 입자 없음
52	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	-	무색 투명, 입자 없음
53	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	-	무색 투명, 입자 없음
54	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만	-	무색 투명, 입자 없음

[0554]

[0555] *Y6 및 Y4는 EP Yellow 표의 색 값을 나타낸다. Y6의 황색이 Y4의 황색보다 연하다(PhEur 5.0, 2005 Monograph 2.2.2 참고).

표 28

[0556] 40℃에서 보관 후 표 25의 제제의 육안 평가

번호	초기	8주 40℃	13주 40℃	18주 40℃	24주 40℃
26	무색 투명, 입자 없음	매우 연한 분홍색, 입자 없음	매우 연한 분홍색, 입자 없음	분홍색, 입자 없음	분홍색, 입자 없음
40	무색 투명, 입자 없음	매우 연한 분홍색, 입자 없음	매우 연한 분홍색, 입자 없음	-	투명, Y4*, 입자 없음
45	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음
46	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	-	무색 투명, 입자 없음
47	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음
48	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	-	무색 투명, 입자 없음
37	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음
49	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만	무색 투명, 입자 없음	-	무색 투명, 입자 없음
50	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만	무색 투명, 입자 수 3개 미만	-	무색 투명, 입자 없음
51	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	-	무색 투명, 입자 없음
52	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만	-	무색 투명, 입자 없음

53	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	-	무색 투명, 입자 없음
54	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만	-	무색 투명, 입자 없음

[0557] *Y6 및 Y4는 EP Yellow 표의 색 값을 나타낸다. Y6의 황색이 Y4의 황색보다 연하다(PhEur 5.0, 2005 Monograph 2.2.2 참고).

[0558] 표 26 내지 28의 결과에서 알 수 있듯이, 모든 시험 대상 항체 11.2.1 제제는 모든 EDTA 농도에서 EDTA가 없는 제제에 비해 감소된 변색, 혼탁 및 입자형성을 보였다.

[0559] 대체로, 염화나트륨을 포함하는 제제는 EDTA를 포함하며 염화나트륨을 포함하지 않는 제제에 비해 변색, 혼탁도 및 입자형성 측면에서 냉동/해동에 대한 보호효과가 감소하였다.

[0560] ***응집 분석***

[0561] 표 25에 의거 제조한 항체 제제를 25℃ 및 40℃의 온도에서 보관하였다. 0(초기), 4, 8, 13, 18 및 24주 후, 25℃ 보관 제제 및 40℃ 보관 제제의 응집을 크기배제 크로마토그래피로 분석하였다. 각 시점에서 바이얼의 제제를 무균 샘플링하였다. 크기배제 크로마토그래피 조건은 다음과 같았다 : TSK 젤 G3000SWXL-G2000SWXL 컬럼, 이동상 = 0.2 M 나트륨 포스페이트 완충제(pH 7.0), 유속 = 1 ml/min, 214 nm에서 UV 검출. 각 제제에 대하여 25℃에서 보관 후 측정한 항체 11.2.1의 응집률을 표 29a에 기록하였다. 표 29b에는 40℃에서 보관 후 측정한 항체 11.2.1의 응집률을 기록하였다. 각 제제에 대하여 크로마토그램 피크 아래 면적을 적분한 후, 고분자량 물질 피크 아래의 면적을 적분하여 전체 피크면적에 대한 %값을 구하여 응집도를 계산하였다(표 29a 및 29b 참조).

표 29a

25℃에서 보관한 표 25의 제제의 응집률

번호	초기	4주 25℃	8주 25℃	13주 25℃	18주 25℃	24주 25℃
26	0.8%	-	-	1.1%	1.6%	-
40	0.7%	-	-	0.7%	0.8%	0.8%
45	0.7%	0.6%	0.6%	0.6%	0.7%	0.7%
46	0.7%	-	-	0.6%	0.7%	0.7%
47	0.7%	0.7%	0.6%	0.6%	0.7%	0.7%
48	0.7%			0.6%	0.7%	0.7%
37	0.7%	0.6%	0.6%	0.6%	0.7%	0.7%
49	0.7%	-	-	0.6%	-	-
50	0.7%	-	-	0.6%	-	-
51	0.7%	-	-	0.6%	-	0.7%
52	0.7%	0.6%	0.6%	0.6%	-	-
53	0.7%	0.6%	0.6%	0.6%	-	0.7%
54	0.7%	0.6%	0.6%	0.6%	-	-

[0562]

[0563] 도 5에 도시한 응집 데이터를 아래 표 29b에 기록하였다.

표 29b

[0564] 40℃에서 보관한 표 25의 제제의 응집률

번호	초기	4주 40℃	8주 40℃	13주 40℃	18주 40℃	24주 40℃
26	0.8%	-	3.1%	4.3%	5.2%	-
40	0.7%	-	0.9%	1.2%	1.8%	2.7%
45	0.7%	0.6%	0.8%	0.8%	1.0%	1.4%
46	0.7%	-	0.7%	0.8%	1.0%	1.3%
47	0.7%	0.6%	0.7%	0.8%	0.8%	1.1%
48	0.7%	-	0.7%	0.8%	0.9%	1.3%
37	0.7%	0.7%	0.7%	0.8%	1.0%	1.1%
49	0.7%	-	0.8%	0.8%	-	-

50	0.7%	-	0.7%	0.8%	-	-
51	0.7%	-	0.8%	0.8%	-	1.2%
52	0.7%	0.6%	0.7%	0.8%	-	-
53	0.7%	0.7%	0.7%	0.7%	-	1.2%
54	0.7%	0.6%	0.8%	0.7%	-	-

[0565] 표 29a, 29b 및 도 5에서 알 수 있듯이, 25℃ 및 40℃에서 보관 후, EDTA를 포함하는 제제는 EDTA를 포함하지 않고 아세테이트 완충제 및 염화나트륨을 포함하는 제제에 비해 감소된 응집도를 나타냈다. 도 7에 표 25의 제제의 응집률 감소를 EDTA 농도에 대한 함수로 요약하여 도시하였다.

[0566] ***절편화 분석***

[0567] 표 25에 의거 제조한 항체 제제를 25℃ 및 40℃의 온도에서 보관하였다. 0(초기), 4, 8, 13, 18 및 24주 후, 25℃ 보관 제제 및 40℃ 보관 제제에 대하여, 환원 SDS-PAGE(rSDS-PAGE)를 이용하여 가수분해 불순물(즉, 절편화)의 총량을 분석하였다. 각 시점에서 제제의 바이얼을 무균 샘플링한 후 콜로이드 블루(Coomassie)로 염색한 NuPAGE 4 내지 12% 비스-트리스 젤에 로드하였다. NuPAGE(등록상표명) 환원제를 사용하여 젤을 환원시켰다. Molecular Dynamics Personal Densitometer PDQC-90 또는 Bio-Rad GS800 Imaging Densitometer를 이용하여 스캔을 통해 환원된 젤의 각 샘플 밴드의 불순물(즉, 절편화) 상대량을 추정하였다. 총 밴드크기에 대한 비율로부터 절편화도를 계산하였다(표 30a 및 30b 참고).

표 30a

[0568] 25℃에서 보관한 표 25의 제제의 절편화율

번호	초기	4주 25℃	8주 25℃	13주 25℃	18주 25℃	24주 25℃
26	1.3%	-	-	3.3%	3.7%	-
40	1.1%	-	-	2.6%	3.1%	3.1%
45	1.5%	2.7%	2.3%	3.1%	3.0%	3.4%
46	1.0%	-		2.5%	3.1%	2.9%
47	2.5%	2.5%	2.3%	3.1%	3.0%	3.3%
48	3.1%	-	-	2.5%	3.2%	2.9%
37	3.6%	2.6%	2.3%	3.1%	3.0%	3.3%
49	1.0%	-	-	2.6%	-	-
50	1.1%	-	-	2.7%	-	-
51	1.2%	-	-	2.7%	-	2.9%
52	2.4%	2.7%	2.3%	3.1%	-	-
53	1.6%	2.4%	2.3%	2.9%	-	3.4%
54	1.6%	2.7%	2.2%	3.2%	-	-

[0569] 도 6에 도시한 절편화 데이터를 아래 표 30b에 기록하였다.

표 30b

[0570] 40℃에서 보관한 표 25의 제제의 절편화율

번호	초기	4주 40℃	8주 40℃	13주 40℃	18주 40℃	24주 40℃
26	-	-	6.2%	7.3%	8.7%	10.1%
40	-	-	3.9%	6.9%	8.2%	7.2%
45	-	2.9%	4.3%	4.2%	6.7%	6.7%
46	-	-	4.1%	5.6%	7.1%	6.1%
47	-	1.9%	2.8%	3.4%	5.4%	5.6%
48	-	-	2.0%	4.2%	5.0%	4.0%
37	-	0.7%	1.5%	2.2%	5.0%	4.5%

49	-	-	4.1%	5.8%	-	-
50	-	-	3.7%	5.5%	-	-
51	-	-	3.7%	5.5%	-	5.4%
52	-	1.8%	2.4%	3.1%	-	-
53	-	2.4%	3.3%	4.1%	-	6.6%
54	-	2.3%	3.1%	3.8%	-	-

[0571] 표 30a, 30b 및 도 6에서 알 수 있듯이, 25℃ 및 40℃에서 보관한 후, EDTA를 포함하는 제제는 EDTA를 포함하지 않고 아세테이트 완충제 및 염화나트륨을 포함하는 제제에 비해 낮은 절편화도를 보였다. 또한, 히스티딘 및 트레할로스를 포함하고 EDTA를 포함하지 않는 제제는 염화나트륨을 포함하고 EDTA를 포함하지 않는 제제에 비해 시간에 따라 적은 절편화를 보였다.

[0572] 도 8은 표 25의 제제의 절편화율 감소 경향을 EDTA 농도의 함수로 요약 도시한 것이다.

[0573] ***아미노산 산화 분석***

[0574] 항-CTLA-4 항체 11.2.1의 256 및 432번 아미노산 위치에서의 특정 메티오닌 잔기의 산화 정도를 라이신-C 매핑 법으로 측정하였다. 표 25의 제제가 들어 있는 바이얼을 40℃에서 18주 및 24주 동안 보관한 후 무균 샘플링하였다. 샘플을 표준 조건에서 라이실 엔도펩티다제(Lys-C) 트리스 완충용액(pH 8.0)으로 소화시킨 후 역상 고성능 액체 크로마토그래피로 분석하였다. Grace Vydac Protein C4 분석컬럼과 0.1% TFA 수용액 및 0.085% TFA 아세토니트릴 용액을 이용하여 구배 용출을 통해 분리하였다. 결과를 표 31에 기록하였다.

표 31

[0575] 표 25의 제제의 항-CTLA-4 항체 11.2.1 내 메티오닌 아미노산의 산화율

번호	아미노산 잔기	초기	18주	24주
26	Met 432	1.6%	5.5%	6.9%
	Met 256	5%	12.8%	13.6%
40	Met 432	1.6%	5.6%	8.8%
	Met 256	5%	14.0%	16.1%
45	Met 432	1.6%	4.8%	6.2%
	Met 256	5%	11.6%	12.8%
46	Met 432	1.6%	3.5%	6.1%
	Met 256	5%	8.8%	12.5%
47	Met 432	1.6%	3.4%	4.2%
	Met 256	5%	8.4%	8.3%
48	Met 432	1.6%	2.8%	5.7%
	Met 256	5%	7.6%	12.6%
37	Met 432	1.6%	4.5%	4.7%
	Met 256	5%	11.0%	9.4%

[0576] 표 31에서 알 수 있듯이, EDTA를 포함하는 항체 11.2.1 제제에서는 시간에 따른 메티오닌 산화의 발생 정도가 감소하였다.

[0577] 실시예 12

[0578] 만니톨 및 소르비톨이 항-CTLA-4 항체 11.2.1 제제의 안정도의 안정도에 미치는 영향을 비교하였다. 또한, 트레할로스 일부를 다양한 농도의 만니톨 및/또는 소르비톨(표 32)로 교체하여 히스티딘 완충제-트레할로스 대체 제제를 제조, 시험하였다. EDTA($Na_2EDTA \cdot 2H_2O$) 농도를 0 내지 0.1 mg/ml 범위에서 조사하였다.

[0579] 구체적으로, 변색, 응집, 절편화 및 산화 측면에서 항체 11.2.1의 안정도에 대한 영향을 분석하였다.

[0580] 평가 대상 제제를 표 32에 기재하였다. 실시예 10에서와 같은 절차를 통해 제제를 제조하였다.

[0581] 20 mM 나트륨 아세테이트 완충제(pH 5.5) 및 140 mM 염화나트륨에 11.9 mg/ml 항체 11.2.1 배액을 가하고 Millipore Lab Scale TFF System에서 Pellicon XL PBTK 30K 50cm^2 막으로 한외여과/정용여과(UF/DF)하여 표 32의 제제를 제조하였다. 다음으로, 35 내지 40 mg/ml 범위의 항체 11.2.1 농축 용액을 20 mM 나트륨 아세테이트

또는 20 mM 히스티딘 완충제에서 제조하였다.

[0582] 나트륨 아세테이트 또는 히스티딘 완충제를 이용하여 최종 농도의 3배가 되는 등장제 농축액을 제조하였다. 20 mg/ml의 농축 폴리소르베이트 80 용액을 제조하였으며 10 mg/ml의 $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$를 각 완충제에 대하여 제조하였다. 농축 용액을 적절히 희석하여 각 제제를 제조하였다. 제제를 0.2 μ 무균필터로 여과한 후 동일한 여러 바이얼에 담았다. 제제는 2 ml Type 1 유리 바이얼에 1 ml씩 채웠다.

[0583] 바이얼을 Daikyo 777-1 Flurotec(등록상표명) 코팅한 스토퍼로 막고 크림프 밀봉한 후, 25℃ 및 40℃의 안정화 챔버에 보관하였다. 다른 세트의 바이얼을 실시예 10에서처럼 4회의 냉동/해동 사이클에 처하게 하였다. 모든 제제의 pH는 5.5였으며 항-CTLA-4 항체 11.2.1 농도는 20 mg/ml이었다.

[0584] 일부 바이얼에 대해서는 즉시 변색, 응집, 절편화 및 산화를 분석하였으며, 나머지 동일한 바이얼은 25℃ 및 40℃에서 4, 8, 13, 18 및 24주 동안 보관하였다. 각 시점에서, 제제별로 2개씩의 바이얼을 꺼내어 각 조건에 대한 항체 11.2.1의 응집 및 절편화 정도를 측정하였으며 변색 여부를 관찰하였다. 결과를 표 33 내지 37과 도 10 내지 11에 제시하였다.

표 32

[0585] 시험 대상 항체 제제

번호	나트륨 아세테이트 (mM)	히스티딘 (mM)	트윈 80 (mg/ml)	만니톨 (mg/ml)	소르비톨 (mg/ml)	EDTA (mg/ml)	염화나트륨 (mg/ml)
26	20	-	0.2	-	-	-	8.4
55	-	20	0.2	-	45	0.001	-
56	-	20	0.2	-	45	0.01	-
57	-	20	0.2	-	45	0.1	-
58	-	20	0.2	5	40	0.001	-
59	-	20	0.2	5	40	0.01	-
60	-	20	0.2	5	40	0.1	-
61	-	20	0.2	15	30	0.001	-
62	-	20	0.2	15	30	0.01	-
63	-	20	0.2	15	30	0.1	-

[0586] ***제제 외관 분석***

[0587] 1) 제제를 혼합한 직후, 2) 4회의 냉동/해동 사이클(실시예 4에서처럼, 박스 내에서 물을 채운 바이얼과 함께 -70℃에서 5℃로) 실시 후 및 3) 25℃ 및 40℃에서 8, 13 및 24주 동안 보관한 후 각 제제를 육안 평가하였다. 제제의 입자형성, 색 변화 및 혼탁도 변화 평가결과를 표 33 내지 35에 기록하였다.

표 33

표 32의 제제를 4회 냉동/해동 사이클 실시 후 육안 평가

[0588]

번호	초기	4회 냉동/해동 사이클 후
26	무색 투명, 입자 없음	매우 약간 흐림, 입자 없음
55	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만
56	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만
57	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음
58	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만
59	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만
60	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만
61	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음
62	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음
63	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음

표 34

[0589] 표 32의 제제를 25℃에서 보관 후의 육안 평가

번호	초기	13주 25℃	24주 25℃
26	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	-
55	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만	무색 투명, 입자 없음
56	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만	무색 투명, 입자 없음
57	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만	무색 투명, 입자 없음
58	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음
59	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음
60	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음
61	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음
62	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음
63	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음

표 35

[0590] 표 25의 제제를 40℃에서 보관 후의 육안 평가

번호	초기	8주 40℃	13주 40℃	24주 40℃
26	무색 투명, 입자 없음	매우 연한 분홍색, 입자 없음	매우 연한 분홍색, 입자 없음	분홍색, 입자 없음
55	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음
56	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음
57	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만	무색 투명, 입자 수 3개 미만	무색 투명, 입자 없음
58	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만	무색 투명, 입자 없음
59	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음
60	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음
61	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만	무색 투명, 입자 없음
62	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 수 3개 미만	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음
63	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음	무색 투명, 입자 없음

[0591] 표 33 내지 35의 결과에서 알 수 있듯이, 염화나트륨을 포함하며 EDTA를 포함하지 않는 항체 11.2.1 제제는 EDTA를 포함하고 염화나트륨을 포함하지 않는 제제에 비해 변색, 혼탁도 및 입자형성이 증가하는 것으로 보아 냉동/해동에 대한 보호효과가 낮았다. 또한, EDTA를 포함하는 항체 11.2.1 제제는 모든 EDTA 농도에서 EDTA를 포함하지 않는 제제에 비해 변색, 혼탁도 및 입자형성이 감소하였다.

[0592] ***응집 분석***

[0593] 표 32에 의거하여 제조한 항체 제제를 25℃ 및 40℃의 온도에서 보관하였다. 0(초기), 4, 8, 13, 18 및 24주 후, 25℃ 및 40℃에서 보관한 제제의 응집을 크기배제 크로마토그래피로 분석하였다. 각 시점에서 바이얼 내의 제제를 무균 샘플링하였다. 샘플에 대한 크기배제 크로마토그래피 조건은 다음과 같았다 : TSK 젤 G3000SWXL-G2000SWXL 컬럼, 이동상 = 0.2 M 나트륨 포스페이트 완충제(pH 7.0), 유속 = 1 ml/min, 214 nm에서 UV 검출. 표 36a에 25℃에서 보관한 각 제제의 시간별 항체 11.2.1 응집률을 기록하였다. 표 36b에는 40℃에서 보관한 각 제제의 시간별 항체 11.2.1 응집률을 기록하였다. 각 제제에 대하여 크로마토그램 피크 아래 면적을 적분한 후, 고분자량 물질 피크 아래의 면적을 적분하여 전체 피크면적에 대한 %값을 구하여 응집도를 계산하였다(표 36a 및 36b 참고).

표 36a

표 32의 제제를 25℃에서 보관한 후의 응집률

번호	초기	4주 25℃	8주 25℃	13주 25℃	18주 25℃	24주 25℃
26	0.8%	-	-	1.1%	1.6%	-
55	0.7%	0.6%	0.6%	0.6%	-	-
56	0.7%	0.6%	0.7%	0.6%	-	-
57	0.7%	0.6%	0.6%	0.6%	-	0.7%
58	0.7%	-	-	0.6%	-	-
59	0.7%	-	-	0.6%	-	-
60	0.7%	-	-	0.6%	-	-
61	0.7%	0.7%	0.6%	0.6%	-	-
62	0.7%	0.6%	0.6%	0.6%	-	-
63	0.7%	0.6%	0.8%	0.6%	-	-

[0594]

[0595] 도 9에 도시한 응집 데이터를 아래 표 36b에 기록하였다.

표 36b

[0596] 표 32의 제제를 40℃에서 보관한 후의 응집률

번호	초기	4주 40℃	8주 40℃	13주 40℃	18주 40℃	24주 40℃
26	0.8%	3.1%	4.3%	5.2%	6.4%	-
55	0.6%	0.7%	0.8%	0.8%	-	-
56	0.6%	0.7%	0.8%	0.7%	-	-
57	0.7%	0.7%	0.8%	0.8%	-	1.2%
58	0.7%	-	0.8%	0.8%	-	-
59	0.7%	-	0.8%	0.8%	-	-
60	0.6%	-	0.7%	0.8%	-	-
61	0.7%	0.7%	0.7%	0.8%	-	-
62	0.6%	0.7%	0.8%	0.8%	-	-
63	0.7%	0.7%	0.7%	0.8%	-	-

[0597] 표 36a, 36b 및 도 9에서 알 수 있듯이, 25℃ 및 40℃에서 보관 후, EDTA를 포함하는 제제는 EDTA를 포함하지 않고 아세테이트 완충제 및 염화나트륨(즉, 염소이온)을 포함하는 제제에 비해 모든 EDTA 농도에서 감소된 응집도를 나타냈다. 도 9에 표 32의 제제의 응집률 감소를 요약하여 도시하였다.

[0598] ***절편화 분석***

[0599] 표 32에 의거 제조한 항체 제제를 25℃ 및 40℃의 온도에서 보관하였다. 0(초기), 4, 8, 13, 18 및 24주 후, 25℃ 보관 제제 및 40℃ 보관 제제에 대하여, 환원 SDS-PAGE(rSDS-PAGE)를 이용하여 가수분해 불순물(즉, 절편화)의 총량을 분석하였다. 각 시점에서 제제의 바이얼을 무균 샘플링한 후 콜로이드 블루(Coomassie)로 염색한 NuPAGE 4 내지 12% 비스-트리스 젤에 로드하였다. NuPAGE(등록상표명) 환원제를 사용하여 젤을 환원시켰다. Molecular Dynamics Personal Densitometer PDQC-90 또는 Bio-Rad GS800 Imaging Densitometer를 이용하여 스캔을 통해 환원된 젤의 각 샘플 밴드의 불순물(즉, 절편화) 상대량을 추정하였다. 총 밴드크기에 대한 비율로부터 절편화도를 계산하였다(표 37a 및 37b 참고).

표 37a

[0600] 표 32의 제제를 25℃에서 보관한 후의 절편화율

번호	초기	4주 25℃	8주 25℃	13주 25℃	18주 25℃	24주 25℃
26	1.3%	-	-	3.3%	3.7%	-
55	1.6%	-	-	2.9%	-	-
56	1.6%	-	-	2.5%	-	-
57	1.6%	-	-	2.4%	-	2.9%
58	1.0%	-	-	2.5%	-	-

59	1.1%	-	-	2.6%	-	-
60	1.2%	-	-	2.6%	-	-
61	1.1%	-	-	2.5%	-	-
62	1.0%	-	-	2.5%	-	-
63	1.1%	2.3%	2.1%	2.6%	-	-

[0601] 도 10에 도시한 절편화 데이터를 아래 표 37b에 기록하였다.

표 37b

표 32의 제제를 40℃에서 보관한 후의 절편화율

번호	초기	4주 40℃	8주 40℃	13주 40℃	18주 40℃	24주 40℃
26	-	-	6.2%	7.3%	8.7%	10.1%
55	-	1.6%	2.3%	5.7%	-	-
56	-	1.9%	2.3%	4.8%	-	-
57	-	2.0%	2.6%	4.7%	-	5.3%
58	-	-	3.7%	5.6%	-	-
59	-	-	3.6%	5.7%	-	-
60	-	-	3.5%	5.3%	-	-
61	-	2.5%	3.3%	5.5%	-	-
62	-	2.6%	3.6%	5.9%	-	-
63	-	2.6%	3.6%	2.3%	-	-

[0602]

[0603] 도 37a, 37b 및 도 10에서 알 수 있듯이, 25℃ 및 40℃에서 보관한 후, EDTA를 포함하는 제제는 EDTA를 포함하지 않고 아세테이트 완충제 및 염화나트륨(즉, 염소이온)을 포함하는 제제에 비해 절편화도가 낮았다.

[0604] 실시예 13

[0605] 본 실시예에서는 항-CTLA-4 티실리무맙 항체, L-히스티딘 모노하이드로클로라이드 1수화물, 디나트륨 에틸렌디아민테트라아세트산 2수화물, α,α-트레할로스 2수화물 및 폴리소르베이트 80을 포함하는 약학적 액상 조성물의 생산을 예시한다.

[0606] 다음 성분들로부터 본 발명의 약학적 액상 조성물을 제조하였다 : 항-CTLA-4 티실리무맙 항체(실시예 1에 따라 또는 실시예 2에 따라 포유류 세포주로부터 재조합하여 얻은, ATCC Accession No. PTA-5169로 기탁된 하이브리도마 세포주 11.2.1.4에서 얻을 수 있음), L-히스티딘 모노하이드로클로라이드 1수화물(Ajinomoto, Raleigh, NC), L-히스티딘(Ajinomoto, Raleigh, NC), 디나트륨 에틸렌디아민테트라아세트산 2수화물(Titriplex III, Merck KgaA, Darmstadt, Germany), α,α-트레할로스 2수화물(Product Number T-104-1-MC, Ferro Pfanstiehl, Waukegan IL), 폴리소르베이트 80(Crillet 4 HP, Croda Inc., Mill Hall PA).

[0607] 먼저, 항-CTLA-4 티실리무맙 항체, L-히스티딘 모노하이드로클로라이드 1수화물, 디나트륨 에틸렌디아민테트라아세트산 2수화물, α,α-트레할로스 2수화물 및 폴리소르베이트 80의 수배 배액을 제조하였다. 3.27 mg/ml(15.6 mM)의 L-히스티딘 HCl 1수화물 및 0.68 mg/ml(4.4 mM) L-히스티딘을 물에 녹여 20 mM 히스티딘 완충제(pH 5.5)를 제조하였다. 3.27 mg/ml(15.6 mM) L-히스티딘 HCl 1수화물 및 0.68 mg/ml(4.4 mM) L-히스티딘, 84 mg/ml(222 mM) α,α-트레할로스 2수화물, 0.2 mg/ml 폴리소르베이트 80 및 0.1 mg/ml(0.268 mM) 디나트륨 에틸렌디아민테트라아세트산 2수화물을 물에 녹여 1× 완충제제를 제조하였다. 3.27 mg/ml(15.6 mM) L-히스티딘 HCl 1수화물 및 0.68 mg/ml(4.4 mM) L-히스티딘, 168 mg/ml(444 mM) α,α-트레할로스 2수화물, 0.4 mg/ml 폴리소르베이트 80 및 0.2 mg/ml(0.536 mM) 디나트륨 에틸렌디아민테트라아세트산 2수화물을 물에 녹여 2× 완충제제를 제조하였다. 실시예 2에 따라 항-CTLA-4 티실리무맙 항체을 제조한 후, Type 50kD 막(Biomax PES)을 사용한 한외여과를 통해 히스티딘 완충제에서 42 내지 55 mg/ml(목표농도 45 mg/ml) 범위로 농축하였다.

[0608] 약학적 조성물을 제조하기 위해, 동일한 부피의 항-CTLA-4 티실리무맙 항체 농축 배액 및 2× 완충제제를 적당한 용기에 가하여 혼합하였다. 혼합 후, 용액 일부를 취하여 소멸계수를 1.43 $(mg/ml)^{-1}$ cm^{-1}로 한 자외선-가시광선 분광법(UV-Vis)을 통해 항체 농도를 결정하였다(예상범위 = 21 내지 27.5 mg/ml, 목표농도 = 22.5 mg/ml). 마지막으로, 적절히 계산한 양의 1× 완충제제를 가한 후 혼합하여 항체 농도를 20 mg/ml(범위 = 18

내지 22 mg/ml)로 조절하였다.

[0609] 얻어진 약학적 조성물을 0.2 μ 무균필터로 여과한 후 바이얼에 넣었다. 20 밀리리터 용량의 Type 1 유리 바이얼에 공칭부피가 20 밀리리터가 되게 채웠다. 바이얼을 Daikyo 777-1 Flurotec(등록상표명) 코팅한 스토퍼로 막고 크림프 밀봉하였다. 유리 바이얼은 20 mm Daikyo 777-1 혈청 스토퍼와 함께 멸균 처리하였다.

[0610] 바이얼의 각 단위용량은 항-CTLA-4 티실리무맙 항체 약 400 mg, L-히스티딘 모노하이드로클로라이드 1수화물 65.4 mg, L-히스티딘 13.6 mg, 디나트륨 에틸렌디아민테트라아세트산 2수화물 2 mg, α,α-트레할로스 2수화물 1680 mg 및 폴리소르베이트 80 4 mg이 된다.

[0611] 실시예 14

[0612] 본 실시예에서는 항-CTLA-4 티실리무맙 항체, L-히스티딘 모노하이드로클로라이드 1수화물, 칼슘 디나트륨 에틸렌디아민테트라아세트산, α,α-트레할로스 2수화물 및 폴리소르베이트 80을 포함하는 약학적 액상 조성물의 가능한 생산을 예시한다.

[0613] 다음 성분들로부터 본 발명의 약학적 액상 조성물을 제조할 수 있다 : 항-CTLA-4 티실리무맙 항체(실시예 1에 따라 또는 실시예 2에 따라 포유류 세포주로부터 재조합하여 얻은, ATCC Accession No. PTA-5169로 기탁된 하이브리도마 세포주 11.2.1.4에서 얻을 수 있음), L-히스티딘 모노하이드로클로라이드 1수화물(Ajinomoto, Raleigh, NC), L-히스티딘(Ajinomoto, Raleigh, NC), 칼슘 디나트륨 에틸렌디아민테트라아세트산(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), α,α-트레할로스 2수화물(Product Number T-104-1-MC, Ferro Pfanstiehl, Waukegan IL), 폴리소르베이트 80(Crillet 4 HP, Croda Inc., Mill Hall PA).

[0614] 먼저, 항-CTLA-4 티실리무맙 항체, L-히스티딘 모노하이드로클로라이드 1수화물, 칼슘 디나트륨 에틸렌디아민테트라아세트산, α,α-트레할로스 2수화물 및 폴리소르베이트 80의 수배 배액을 제조할 수 있다. 3.27 mg/ml(15.6 mM)의 L-히스티딘 HCl 1수화물 및 0.68 mg/ml(4.4 mM) L-히스티딘을 물에 녹여 20 mM 히스티딘 완충제(pH 5.5)를 제조할 수 있다. 3.27 mg/ml(15.6 mM) L-히스티딘 HCl 1수화물 및 0.68 mg/ml(4.4 mM) L-히스티딘, 84 mg/ml(222 mM) α,α-트레할로스 2수화물, 0.2 mg/ml 폴리소르베이트 80 및 0.1003 mg/ml(0.268 mM) 칼슘 디나트륨 에틸렌디아민테트라아세트산을 물에 녹여 1× 완충제제를 제조할 수 있다. 3.27 mg/ml(15.6 mM) L-히스티딘 HCl 1수화물 및 0.68 mg/ml(4.4 mM) L-히스티딘, 168 mg/ml(444 mM) α,α-트레할로스 2수화물, 0.4 mg/ml 폴리소르베이트 80 및 0.2006 mg/ml (0.536 mM) 칼슘 디나트륨 에틸렌디아민테트라아세트산을 물에 녹여 2× 완충제제를 제조할 수 있다. 실시예 2에 따라 항-CTLA-4 티실리무맙 항체을 제조한 후, Type 50kD 막(Biomax PES)을 사용한 한외여과를 통해 히스티딘 완충제에서 42 내지 55 mg/ml(목표농도 45 mg/ml) 범위로 농축할 수 있다.

[0615] 약학적 조성물을 제조하기 위해, 동일한 부피의 항-CTLA-4 티실리무맙 항체 농축 배액 및 2× 완충제제를 적당한 용기에 가하여 혼합할 수 있다. 혼합 후, 용액 일부를 취하여 소멸계수를 1.43 $(mg/ml)^{-1}$ cm^{-1}로 한 자외선-가시광선 분광법(UV-Vis)을 통해 항체 농도를 결정할 수 있다(예상범위 = 21 내지 27.5 mg/ml, 목표농도 = 22.5 mg/ml). 마지막으로, 적절히 계산한 양의 1× 완충제제를 가한 후 혼합하여 항체 농도를 20 mg/ml(범위 = 18 내지 22 mg/ml)로 조절할 수 있다.

[0616] 얻어진 약학적 조성물을 0.2 μ 무균필터로 여과한 후 바이얼에 넣을 수 있다. 20 밀리리터 용량의 Type 1 유리 바이얼을 이용하여 공칭부피가 20 밀리리터가 되게 채울 수 있다. 바이얼을 Daikyo 777-1 Flurotec(등록상표명) 코팅한 스토퍼로 막고 크림프 밀봉할 수 있다. 유리 바이얼은 20 mm Daikyo 777-1 혈청 스토퍼와 함께 멸균 처리할 수 있다.

[0617] 바이얼의 각 단위용량은 항-CTLA-4 티실리무맙 항체 약 400 mg, L-히스티딘 모노하이드로클로라이드 1수화물 65.4 mg, L-히스티딘 13.6 mg, 칼슘 디나트륨 에틸렌디아민테트라아세트산 2.006 mg, α,α-트레할로스 2수화물 1680 mg 및 폴리소르베이트 80 4 mg이 된다.

[0618] 실시예 15

[0619] 본 실시예에서는 항-CTLA-4 티실리무맙 항체, L-히스티딘 모노하이드로클로라이드 1수화물, 트리나트륨 에틸렌디아민테트라아세트산, α,α-트레할로스 2수화물 및 폴리소르베이트 80을 포함하는 약학적 액상 조성물의 가능한 생산을 예시한다.

[0620] 다음 성분들로부터 본 발명의 약학적 액상 조성물을 제조하였다 : 항-CTLA-4 티실리무맙 항체(실시예 1에 따라

또는 실시예 2에 따라 포유류 세포주로부터 재조합하여 얻은, ATCC Accession No. PTA-5169로 기탁된 하이브리도마 세포주 11.2.1.4에서 얻을 수 있음), L-히스티딘 모노하이드로클로라이드 1수화물(Ajinomoto, Raleigh, NC), L-히스티딘(Ajinomoto, Raleigh, NC), 트리나트륨 에틸렌디아민테트라아세트산(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), α,α-트레할로스 2수화물(Product Number T-104-1-MC, Ferro Pfanstiehl, Waukegan IL), 폴리소르베이트 80(Crillet 4 HP, Croda Inc., Mill Hall PA).

[0621] 먼저, 항-CTLA-4 티실리무맙 항체, L-히스티딘 모노하이드로클로라이드 1수화물, 트리나트륨 에틸렌디아민테트라아세트산, α,α-트레할로스 2수화물 및 폴리소르베이트 80의 수배 배액을 제조하였다. 3.27 mg/ml(15.6 mM)의 L-히스티딘 HCl 1수화물 및 0.68 mg/ml(4.4 mM) L-히스티딘을 물에 녹여 20 mM 히스티딘 완충제(pH 5.5)를 제조하였다. 3.27 mg/ml(15.6 mM) L-히스티딘 HCl 1수화물 및 0.68 mg/ml(4.4 mM) L-히스티딘, 84 mg/ml(222 mM) α,α-트레할로스 2수화물, 0.2 mg/ml 폴리소르베이트 80 및 0.096 mg/ml(0.268 mM) 트리나트륨 에틸렌디아민테트라아세트산을 물에 녹여 1× 완충제제를 제조하였다. 3.27 mg/ml(15.6 mM) L-히스티딘 HCl 1수화물 및 0.68 mg/ml(4.4 mM) L-히스티딘, 168 mg/ml(444 mM) α,α-트레할로스 2수화물, 0.4 mg/ml 폴리소르베이트 80 및 0.192 mg/ml(0.536 mM) 트리나트륨 에틸렌디아민테트라아세트산을 물에 녹여 2× 완충제제를 제조하였다. 실시예 2에 따라 항-CTLA-4 티실리무맙 항체을 제조한 후, Type 50kD 막(Biomax PES)을 사용한 한외여과를 통해 히스티딘 완충제에서 42 내지 55 mg/ml(목표농도 45 mg/ml) 범위로 농축하였다.

[0622] 약학적 조성물을 제조하기 위해, 동일한 부피의 항-CTLA-4 티실리무맙 항체 농축 배액 및 2× 완충제제를 적당한 용기에 가하여 혼합하였다. 혼합 후, 용액 일부를 취하여 소멸계수를 1.43 $(mg/ml)^{-1}$ cm^{-1}로 한 자외선-가시광선 분광법(UV-Vis)을 통해 항체 농도를 결정하였다(예상범위 = 21 내지 27.5 mg/ml, 목표농도 = 22.5 mg/ml). 마지막으로, 적절히 계산한 양의 1× 완충제제를 가한 후 혼합하여 항체 농도를 20 mg/ml(범위 = 18 내지 22 mg/ml)로 조절하였다.

[0623] 얻어진 약학적 조성물을 0.2 μ 무균필터로 여과한 후 바이얼에 넣었다. 20 밀리리터 용량의 Type 1 유리 바이얼에 공칭부피가 20 밀리리터가 되게 채웠다. 바이얼을 Daikyo 777-1 Flurotec(등록상표명) 코팅한 스토퍼로 막고 크림프 밀봉하였다. 유리 바이얼은 20 mm Daikyo 777-1 혈청 스토퍼와 함께 멸균 처리하였다.

[0624] 바이얼의 각 단위용량은 항-CTLA-4 티실리무맙 항체 약 400 mg, L-히스티딘 모노하이드로클로라이드 1수화물 65.4 mg, L-히스티딘 13.6 mg, 트리나트륨 에틸렌디아민테트라아세트산 1.92 mg, α,α-트레할로스 2수화물 1680 mg 및 폴리소르베이트 80 4 mg이 된다.

도면의 간단한 설명

[0362] 도 1은 여러 시험용 제제를 40℃에서 최대 7주까지 보관한 후 크기배제 크로마토그래피(SEC)로 측정한 응집률을 보여주는 막대그래프이다.

[0363] 도 2는 여러 시험용 제제를 40℃에서 최대 7주까지 보관한 후 환원 SDS PAGE(rSDS PAGE)로 측정한 (가수분해) 불순물의 전체 비율을 보여주는 막대그래프이다.

[0364] 도 3은 여러 시험용 제제를 40℃의 가속조건에서 최대 24주까지 보관한 후 SEC로 측정한 응집률을 보여주는 직선그래프이다.

[0365] 도 4는 여러 시험용 제제를 40℃의 가속조건에서 최대 24주까지 보관한 후 rSDS PAGE로 측정한 (가수분해) 불순물의 전체 비율을 보여주는 직선그래프이다.

[0366] 도 5는 여러 시험용 제제를 40℃의 가속조건에서 최대 24주까지 보관한 후 SEC로 측정한 응집률을 보여주는 직선그래프이다.

[0367] 도 6은 여러 시험용 제제를 40℃의 가속조건에서 최대 24주까지 보관한 후 rSDS PAGE로 측정한 (가수분해) 불순물의 전체 비율을 보여주는 직선그래프이다.

[0368] 도 7은 EDTA 함량이 다른 여러 시험용 제제를 40℃의 가속조건에서 최대 24주까지 보관한 후 SEC로 측정한 응집률을 보여주는 막대그래프이다.

[0369] 도 8은 EDTA 함량이 다른 여러 시험용 제제를 40℃의 가속조건에서 최대 24주까지 보관한 후 rSDS PAGE로 측정한 (가수분해) 불순물의 전체 비율을 보여주는 막대그래프이다.

[0370] 도 9는 여러 시험용 제제를 40℃의 가속조건에서 최대 13주까지 보관한 후 SEC로 측정한 응집률을 보여주는 직

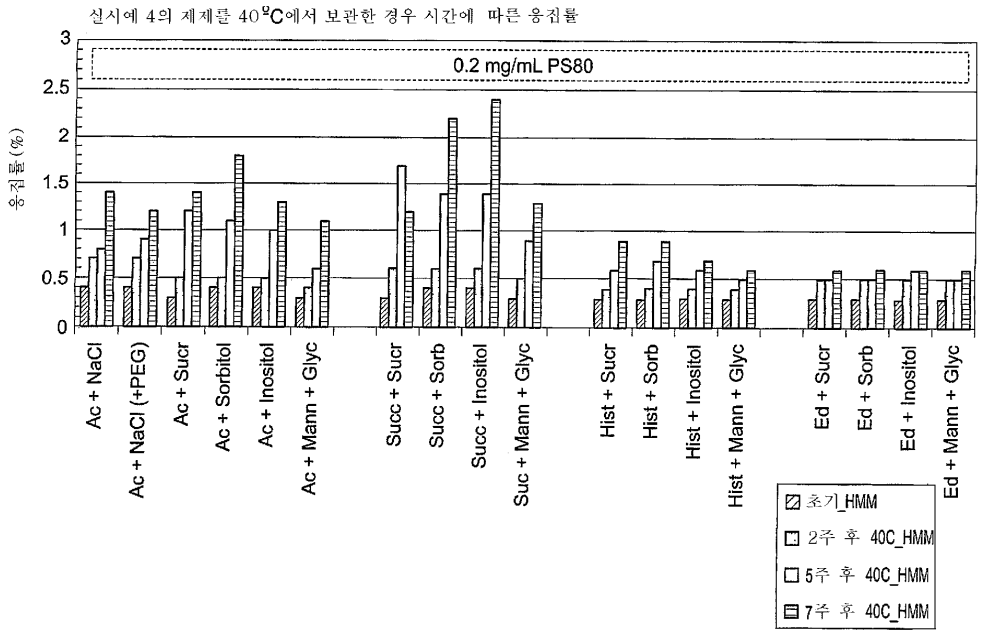
선그래프이다.

[0371] 도 10은 여러 시험용 제제를 40℃의 가속조건에서 최대 13주까지 보관한 후 rSDS PAGE로 측정한 (가수분해) 불순물의 전체 비율을 보여주는 직선그래프이다.

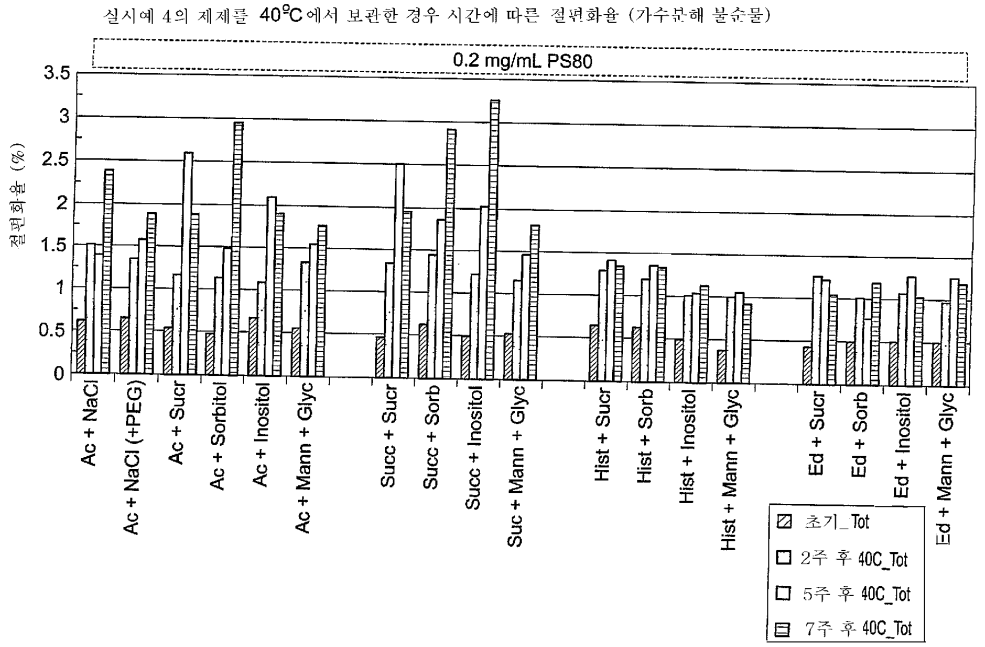
[0372] 도 11(도 11A 내지 11 D)은 항-CTLA-4 항체 11.2.1(티실리무맙)의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열이다. 도 11A는 11.2.1 중쇄에 대한 전체 길이 뉴클레오타이드 서열(SEQ ID NO: 1)이다. 도 11B는 11.2.1 중쇄에 대한 전체 길이 아미노산 서열(SEQ ID NO: 2)로서, 11.2.1 중쇄 가변 부위에 대한 아미노산 서열은 "[ ]"(SEQ ID NO: 5) 안에 표시하였다. 11.2.1 중쇄 CDR 각각의 아미노산 서열은 밑줄로 표시하였다. CDR 서열들은 다음과 같다. CDR1 : GFTFSSYGMH (SEQ ID NO: 7); CDR2 : VIWYDGSNKYYADSV (SEQ ID NO: 8); CDR3 : DPRGATLYYYYYGMDV (SEQ ID NO: 9). 도 11C는 11.2.1 경쇄에 대한 뉴클레오타이드 서열(SEQ ID NO: 3)이다. 도 11D는 11.2.1 경쇄 전체 길이에 대한 아미노산 서열(SEQ ID NO: 4)로서, 경쇄 가변 부위는 "[ ]"(SEQ ID NO: 6)로 표시하였다. CDR 각각의 아미노산 서열은 다음과 같다. CDR1 : RASQSINSYLD (SEQ ID NO: 10); CDR2 : AASSLQS (SEQ ID NO: 11); CDR3 : QQYYSTPFT (SEQ ID NO: 12).

도면

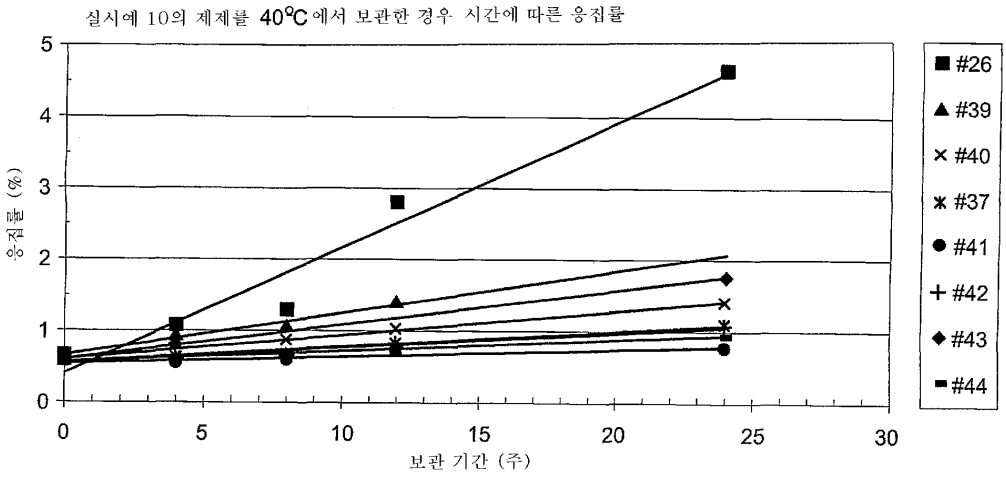
도면1



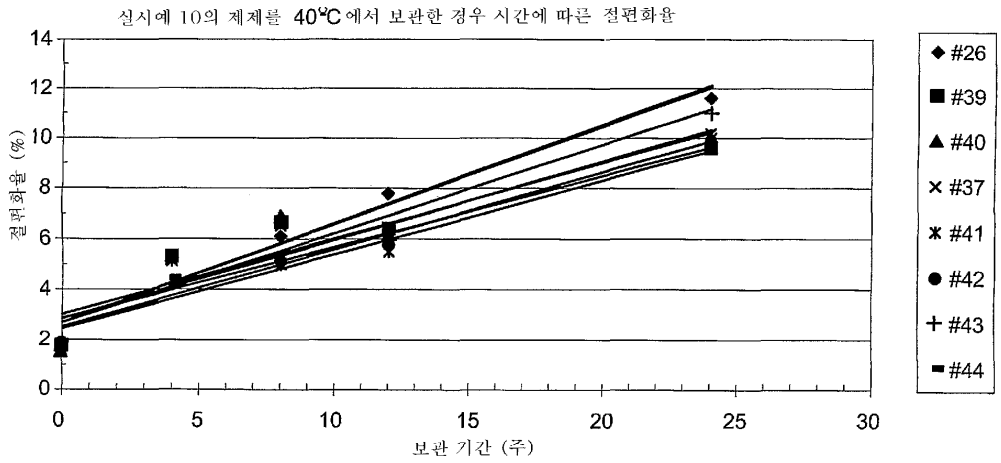
도면2


실시예 4의 제제를 40℃에서 보관한 경우 시간에 따른 절편화율 (가수분해 불순물)
0.2 mg/mL PS80
절편화율 (%)
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Ac + NaCl
Ac + NaCl (+PEG)
Ac + Sucr
Ac + Sorbitol
Ac + Inositol
Ac + Mann + Glyc
Succ + Sucr
Succ + Sorb
Succ + Inositol
Suc + Mann + Glyc
Hist + Sucr
Hist + Sorb
Hist + Inositol
Hist + Mann + Glyc
Ed + Sucr
Ed + Sorb
Ed + Inositol
Ed + Mann + Glyc
초기_Tot
2주 후 40C_Tot
5주 후 40C_Tot
7주 후 40C_Tot

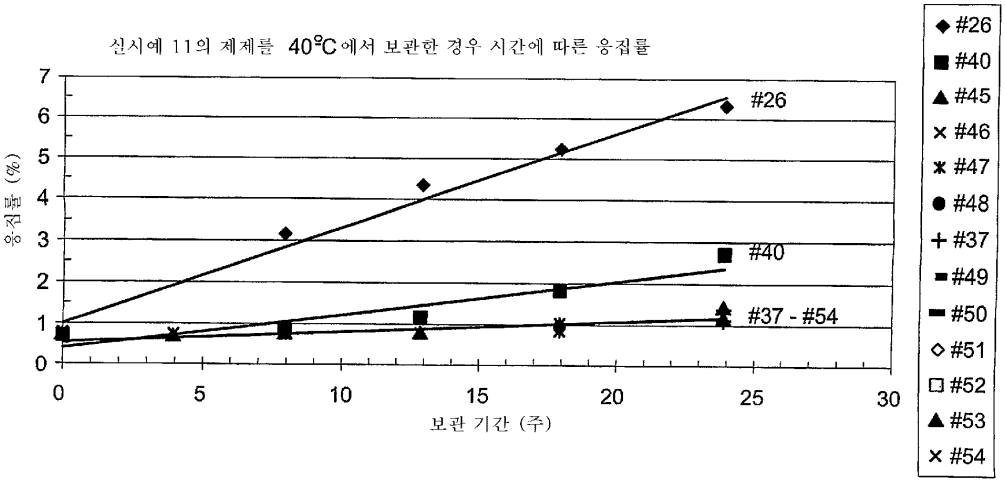
도면3


실시예 10의 제제를 40℃에서 보관한 경우 시간에 따른 응집률
응집률 (%)
5
4
3
2
1
0
0
5
10
15
20
25
30
보관 기간 (주)
#26
#39
#40
#37
#41
#42
#43
#44

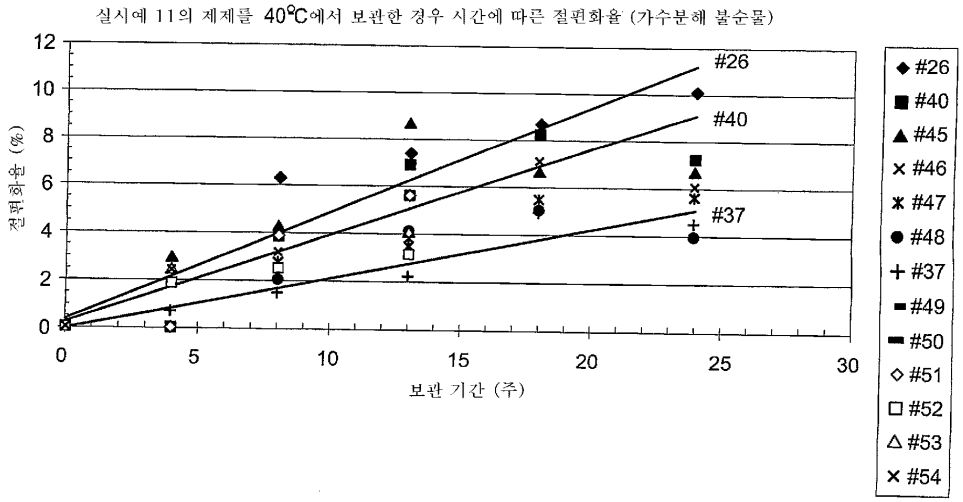
도면4


실시예 10의 제제를 40℃에서 보관한 경우 시간에 따른 절편화율
절편화율 (%)
보관 기간 (주)
#26
#39
#40
#37
#41
#42
#43
#44

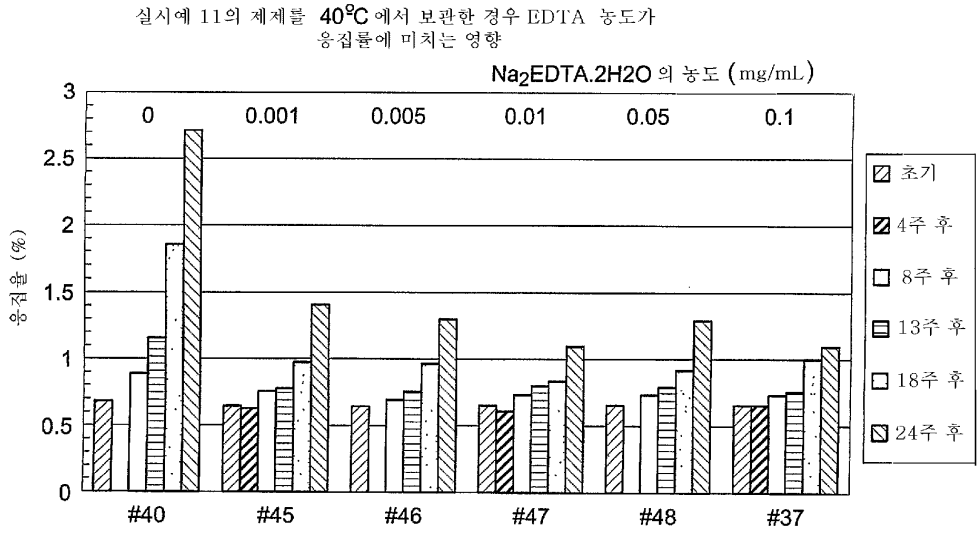
도면5


실시예 11의 제제를 40℃에서 보관한 경우 시간에 따른 응집률
응집률 (%)
보관 기간 (주)
#26
#40
#37 - #54
#26
#40
#45
#46
#47
#48
#37
#49
#50
#51
#52
#53
#54

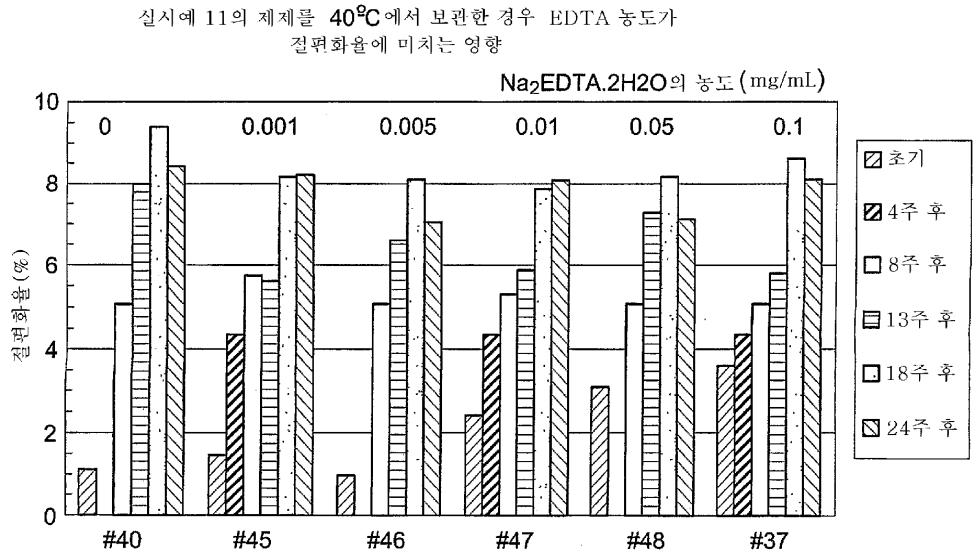
도면6


실시예 11의 제제를 40℃에서 보관한 경우 시간에 따른 절편화율 (가수분해 불순물)
절편화율 (%)
보관 기간 (주)
#26
#40
#37
#26
#40
#45
#46
#47
#48
#37
#49
#50
#51
#52
#53
#54

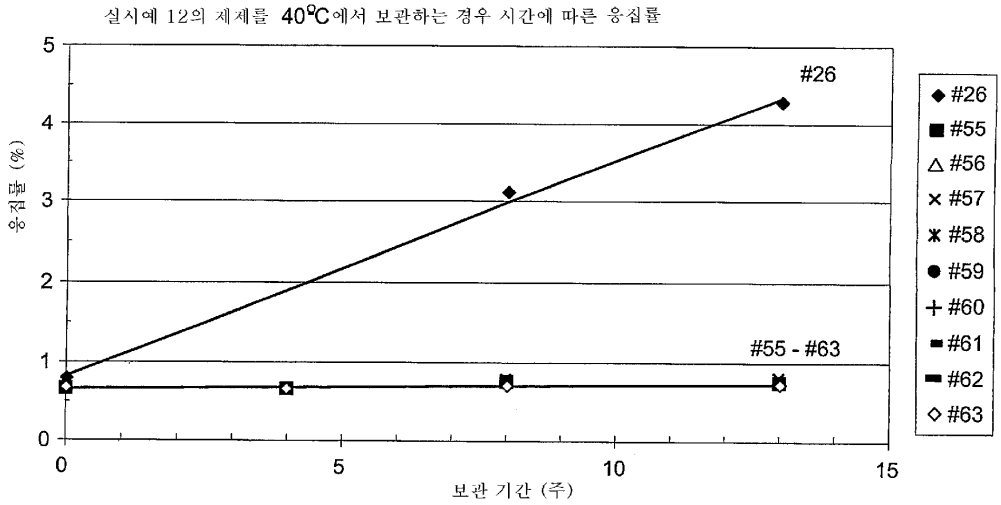
도면7


실시예 11의 제제를 40℃에서 보관한 경우 EDTA 농도가
응집률에 미치는 영향
Na2EDTA.2H2O의 농도 (mg/mL)
0
0.001
0.005
0.01
0.05
0.1
응집율 (%)
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
#40
#45
#46
#47
#48
#37
초기
4주 후
8주 후
13주 후
18주 후
24주 후

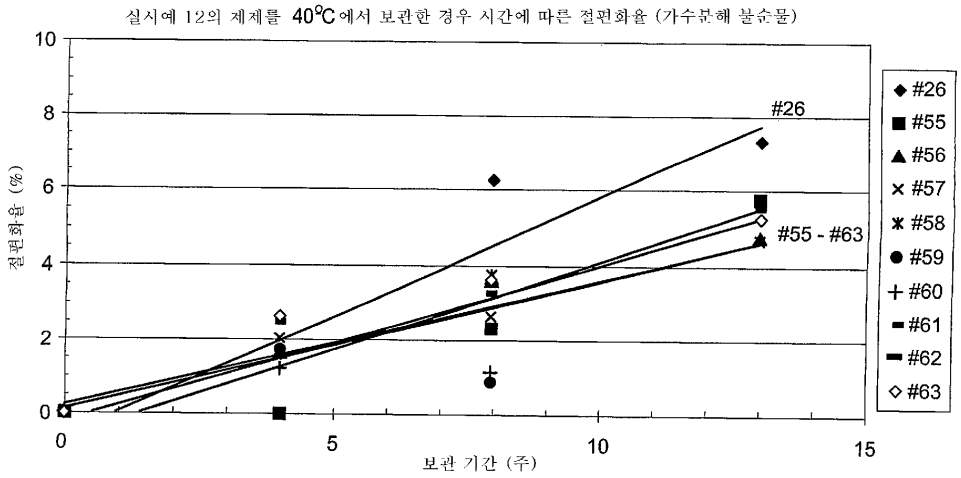
도면8


실시예 11의 제제를 40℃에서 보관한 경우 EDTA 농도가
절편화율에 미치는 영향
Na2EDTA.2H2O의 농도 (mg/mL)
0
0.001
0.005
0.01
0.05
0.1
절편화율 (%)
10
8
6
4
2
0
#40
#45
#46
#47
#48
#37
초기
4주 후
8주 후
13주 후
18주 후
24주 후

도면9


실시예 12의 제제를 40℃에서 보관하는 경우 시간에 따른 응집률
응집률 (%)
보관 기간 (주)
#26
#55 - #63
#26
#55
#56
#57
#58
#59
#60
#61
#62
#63

도면10


실시예 12의 제제를 40℃에서 보관한 경우 시간에 따른 절편화율 (가수분해 불순물)
절편화율 (%)
보관 기간 (주)
#26
#55 - #63
#26
#55
#56
#57
#58
#59
#60
#61
#62
#63

도면11A

티실리무밥(11.2.1) 중쇄 DNA (SEQ NO: 1)

```
atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag   60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc  120
tgtgcagcgt ctggattcac cttcagtagc tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca  180
ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttata tggtatgatg gaagtaataa atactatgca  240
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg  300
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agatccgagg  360
ggagctaccc tttactacta ctactacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc  420
accgtctcct cagcctccac caagggccca tcggtcttcc ccctggcgcc ctgctccagg  480
agcacctccg agagcacagc ggccctgggc tgcctggtca aggactactt ccccgaaccg  540
gtgacggtgt cgtggaactc aggcgctctg accagcggcg tgcacacctt cccagctgtc  600
ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcaacttc  660
ggcacccaga cctacacctg caacgtagat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag  720
acagttgagc gcaaatgttg tgtcgagtgc ccaccgtgcc cagcaccacc tgtggcagga  780
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct  840
gaggtcacgt gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ccgaggtcca gttcaactgg  900
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cacgggagga gcagttcaac  960
agcacgttcc gtgtggtcag cgtcctcacc gttgtgcacc aggactggct gaacggcaag 1020
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaaggc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1080
aaaaccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag 1140
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctaccc cagcgacatc 1200
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac acctcccatg 1260
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1320
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1380
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga                               1413
```

도면11B

티실리무밥(11.2.1) 중쇄 단백질 (SEQ ID NO: 2)

```
[QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSNKYY   60
ADSVKGRFTI  SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDP RGATLYYYYY GMDVWGQGTT  120
VTVSS]ASTKG PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA  180
VLQSSGLYSL  SSVVTVPSSN FGTQTYTCNV DHKPSNTKVD KTVERKCCVE CPPCPAPPVA  240
GPSVFLFPPK  PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVQFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF  300
NSTFRVVSVL  TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPAPIEKTI SKTKGQPREP QVYTLPPSRE  360
EMTKNQVSLT  CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP MLDSDGSFFL YSKLTVDKSR  420
WQQGNVFSCS  VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K                                  451
```

가변부위(SEQ ID NO: 5)는 [ ]안에 표시하였으며 CDR은 밑줄로 표시하였다. CDR1은 SEQ ID NO: 7, CDR2는 SEQ ID NO: 8, CDR3은 SEQ ID NO; 9 에 해당한다.

도면11C

티실리무맙(11.2.1) 경쇄 DNA (SEQ ID NO:3)

```
atggacatga gggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc   60
agatgtgaca tccagatgac ccagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga  120
gtcaccatca cttgccgggc aagtcagagc attaacagct atttagattg gtatcagcag  180
aaaccaggga aagcccctaa actcctgatc tatgctgcat ccagtttgca aagtggggtc  240
ccatcaaggt tcagtggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagtctg  300
caacctgaag attttgcaac ttactactgt caacagtatt acagtactcc attcactttc  360
ggccctggga ccaaagtgga aatcaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc  420
ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac  480
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac  540
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc  600
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat  660
cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgtta gtga         714
```

도면11D

티실리무맙(11.2.1) 경쇄 단백질 SEQ ID NO:4

```
[DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIN SYLDWYQQKP GKAPKLLIYA  ASSLQSGVPS    60
RFSGSGSGTD  FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YYSTPFTFGP GTKVEIK]RTV AAPSVFIFPP   120
SDEQLKSGTA  SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD  STYSLSSTLT   180
LSKADYEKHK  VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC                               214
```

가변부위(SEQ ID NO: 6)는 [ ]안에 표시하였으며 CDR은 밑줄로 표시하였다. CDR1은 SEQ ID NO: 10, CDR2는 SEQ ID NO: 11, CDR3은 SEQ ID NO; 12에 해당한다.

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Pharmacia and Upjohn Company, LLC
Das, Tapan
Elliott, Carrie
Muthurania, Kevin
Abate, Justin
Nema, Sandeep
Singh, Satish

<120> ANTI-CTLA-4 ANTIBODY COMPOSITIONS

<130> PC 33042

<150> 60/659,766
<151> 2005-03-08

<150> 60/728,165
<151> 2005-10-19

<150> 60/752,712
<151> 2005-12-20

<150> 60/762,456

<151> 2006-01-26

<160> 12

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 1413
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 1
atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120

tgtgcagcgt ctggattcac cttcagtagc tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180

ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttata tggtatgatg gaagtaataa atactatgca 240

gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300

caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agatccgagg 360

ggagctaccc tttactacta ctactacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 420

accgtctcct cagcctccac caagggccca tcggtcttcc ccctggcgcc ctgctccagg 480

agcacctccg agagcacagc ggccctgggc tgcctggtca aggactactt ccccgaaccg 540

gtgacggtgt cgtggaactc aggcgctctg accagcggcg tgcacacctt cccagctgtc 600

ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcaacttc 660

ggcacccaga cctacacctg caacgtagat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 720

acagttgagc gcaaatgttg tgtcgagtgc ccaccgtgcc cagcaccacc tgtggcagga 780

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccccct 840

gaggtcacgt gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ccgaggtcca gttcaactgg 900

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cacgggagga gcagttcaac 960

agcacgttcc gtgtggtcag cgtcctcacc gttgtgcacc aggactggct gaacggcaag 1020

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaaggc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1080

aaaaccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaggag 1140

atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctaccc cagcgacatc 1200

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac acctcccatg 1260

ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1320

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1380

cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga 1413

<210> 2
<211> 451
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Pro Arg Gly Ala Thr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
130 135 140

Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
145 150 155 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys
195 200 205

Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu
210 215 220

Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

```
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
            260                 265                 270

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
        275                 280                 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe
    290                 295                 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305                 310                 315                 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile
                325                 330                 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
            340                 345                 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
        355                 360                 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
    370                 375                 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385                 390                 395                 400

Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
                405                 410                 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
            420                 425                 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
        435                 440                 445
```

Pro Gly Lys
450

<210> 3
<211> 714
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
atggacatga gggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60

agatgtgaca tccagatgac ccagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 120

gtcaccatca cttgccgggc aagtcagagc attaacagct atttagattg gtatcagcag 180

aaaccaggga aagcccctaa actcctgatc tatgctgcat ccagtttgca aagtggggtc 240

ccatcaaggt tcagtggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagtctg 300

caacctgaag attttgcaac ttactactgt caacagtatt acagtactcc attcactttc 360

ggccctggga ccaaagtgga aatcaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc 420

ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 480

ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac 540

tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 600

ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 660

cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgtta gtga 714

<210> 4
<211> 214
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

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

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

Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

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

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
```

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 5
<211> 125
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

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

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

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Pro Arg Gly Ala Thr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 6
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

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

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

Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His

1 5 10

<210> 8
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

<210> 9
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Asp Pro Arg Gly Ala Thr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Tyr Leu Asp
1 5 10

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr
1 5