



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년09월30일

(11) 등록번호 10-2307257

(24) 등록일자 2021년09월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/24 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 16/244 (2013.01)
A61K 39/39591 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-7032914

(22) 출원일자(국제) 2014년04월29일

심사청구일자 2019년04월29일

(85) 번역문제출일자 2015년11월18일

(65) 공개번호 10-2016-0002953

(43) 공개일자 2016년01월08일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2014/058733

(87) 국제공개번호 WO 2014/177568

국제공개일자 2014년11월06일

(30) 우선권주장

61/816,899 2013년04월29일 미국(US)

14305160.5 2014년02월05일

유럽특허청(EPO)(EP)

(56) 선행기술조사문헌

WO2012125775 A1*

WO2012154999 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

사노피

프랑스 75008 파리 튀 라 보에티에 54

(72) 발명자

카라용, 소피

프랑스 에프-75008 파리 튀 라 보에티에 54 사노피 내

부쎈프, 오토망

프랑스 에프-75008 파리 튀 라 보에티에 54 사노피 내

(74) 대리인

양영준, 김영

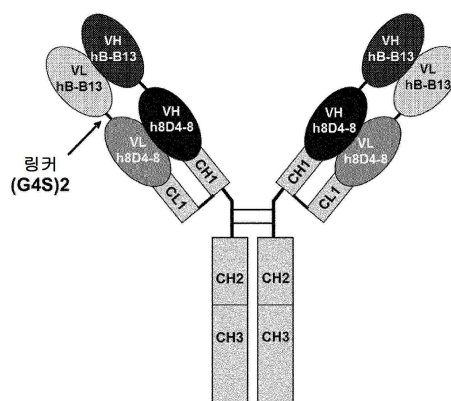
전체 청구항 수 : 총 32 항

심사관 : 정지혜

(54) 발명의 명칭 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체 제형

(57) 요약

본 발명은, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체 및 완충 시스템을 포함하는 동결건조된 제형을 포함한 안정적인 약학 항체 제형을 제공하며, 여기서 제형의 pH는 약 pH 7이고, 제형의 이온 강도를 감소시키기 위하여 제형의 염 농도는 낮다. 제형은 선택적으로 비이온성 계면활성제, 당, 및/또는 비이온성 안정화제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 제형은 다양한 질환의 치료에서 사용될 수 있다.

대표도 - 도1

(52) CPC특허분류

C07K 16/247 (2013.01)

A61K 2039/54 (2013.01)

A61K 2039/545 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/64 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

식 VL1-링커-VL2의 경쇄 및

식 VH1-링커-VH2의 중쇄

(여기서,

VL1 및 VH1은 IL-13 항원 결합 도메인을 형성하고,

VL2 및 VH2는 IL-4 항원 결합 도메인을 형성함)

를 포함하는 이중특이성 항-IL-4/항-IL-13 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및
제형의 pH를 pH 7로 유지시키기 위한 완충 시스템

을 포함하는 안정적인 항체 제형이며,

이온 강도를 감소시키기 위해 15 mM 이하의 염 농도를 갖고,

만니톨을 포함하는 제형.

청구항 2

제1항에 있어서,

VL1은 서열번호 1의 CDR 서열을 포함하고,

VH1은 서열번호 2의 CDR 서열을 포함하고,

VL2는 서열번호 3의 CDR 서열을 포함하고,

VH2는 서열번호 4 또는 5의 CDR 서열을 포함하는

제형.

청구항 3

제1항에 있어서,

VL1은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하고,

VH1은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하고,

VL2는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하고,

VH2는 서열번호 4 또는 5의 아미노산 서열을 포함하는

제형.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 경쇄가 식 N-VL1-링커-VL2-CL을 포함하고, 여기서 CL은 항체의 경쇄 불변 도메인이며,

상기 중쇄가 식 N-VH1-링커-VH2-CH1-CH2-CH3을 포함하고, CH2-CH3은 항체의 Fc 도메인에 해당하는 것인

제형.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 링커가 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 것인 제형.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 불변 영역 도메인을 추가로 포함하는 것인 제형.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 불변 영역 도메인이 CH1, CH2, CH3, 및 CL로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 제형.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 이중특이성 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 인간화된 IgG4 이중특이성 항체 또는 이의 항원 결합 단편인 제형.

청구항 9

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 농도가 100 mg/mL인 제형.

청구항 10

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 완충 시스템이 적어도 2 종의 완충제를 포함하는 것인 제형.

청구항 11

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 완충 시스템 농도가 10 mM인 제형.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 완충 시스템이 트리스 완충제 및 인산염 완충제를 포함하는 것인 제형.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 트리스 완충제 농도가 3.7 mM인 제형.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 인산염 완충제 농도가 6.3 mM인 제형.

청구항 15

제12항에 있어서, 상기 트리스 완충제 농도가 3.7 mM이고, 상기 인산염 완충제 농도가 6.3 mM인 제형.

청구항 16

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 비이온성 계면활성제를 추가로 포함하는 제형.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 비이온성 계면활성제 농도가 0.05% 내지 0.2%(w/v)인 제형.

청구항 18

제16항에 있어서, 상기 비이온성 계면활성제가 폴리소르베이트인 제형.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 폴리소르베이트가 폴리소르베이트 80인 제형.

청구항 20

제19항에서, 상기 폴리소르베이트 80 농도가 0.05% 내지 0.2%(w/v)인 제형.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 폴리소르베이트 80 농도가 0.2%(w/v)인 제형.

청구항 22

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 당을 추가로 포함하는 제형.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 당 농도가 5%(w/v)인 제형.

청구항 24

제22항에 있어서, 상기 당이 이당류인 제형.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 이당류가 수크로스인 제형.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 수크로스 농도가 5%(w/v)인 제형.

청구항 27

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 만니톨 농도가 1% 내지 3%(w/v)인 제형.

청구항 28

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 만니톨 농도가 3%(w/v)인 제형.

청구항 29

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 동결건조된 제형인 제형.

청구항 30

서열번호 2 및 4의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및
서열번호 1 및 3의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역
을 포함하는, 100 mg/mL의 이중특이성 항체 또는 이의 항원 결합 단편,
3.7 mM 농도의 트리스 완충제, 및 6.3 mM 농도의 인산염 완충제를 포함하는 10 mM의 완충 시스템,
0.2%(w/v) 폴리소르베이트 80,
5%(w/v) 수크로스, 및
3%(w/v) 만니톨
을 포함하며, pH는 pH 7인 안정적인 동결건조된 항체 제형.

청구항 31

제1항의 제형을 포함하는 용기, 및
제형의 투여 및 사용을 위한 지침서
를 포함하는 키트.

청구항 32

제1항에 있어서, 호지킨병, 천식, 알레르기성 천식, 아토피 피부염, 아토피성 알레르기, 궤양성 대장염, 피부경
화증, 알레르기 비염, 특발성 폐섬유화증, 만성 이식편 거절 반응, 블레오마이신-유발 폐섬유화증, 방사선-유발

폐섬유화증, 폐육아종증, 진행성 전신성 경화증, 주혈흡충병, 간섬유증, 신장암, 버킷림프종, 비호지킨병, 시자리 증후군 (Sezary syndrome), 세균성 관절염, 포진성 피부염, 만성 특발성 두드러기, 궤양성 대장염, 피부경화증, 비후성 반흔, 휘플씨병 (Whipple's Disease), 양성 전립선 비대증, IL-4 수용체가 역할을 하는 폐 장애, IL-4 수용체-매개 상피 장벽 붕괴가 역할을 하는 병태, IL-4 수용체가 역할을 하는 소화계의 장애, 약제에의 알레르기 반응, 가와사키병, 겸상적혈구 빈혈, 척-스트라우스 증후군, 그레이브스병, 임신 중독증, 쇼그렌 증후군, 자가면역 림프증식 증후군, 자가면역성 용혈성 빈혈, 바렛 식도, 자가면역 포도막염, 결핵, 낭포성 섬유증, 알레르기성 기관지폐 진균증, 만성 폐쇄성 폐질환, 블레오마이신-유발 폐병증 및 섬유화증, 폐포단백질증, 성인 호흡 곤란 증후군, 유육종증, 고 IgE 증후군, 특발성 고호산구 증후군, 자가면역성 수포 질환, 심상성 천포창, 수포성 유천포창, 중증 근무력증, 만성 피로 증후군, 또는 신증을 치료하는 데 사용하기 위한 제형.

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체 및 완충 시스템을 포함하는 동결건조된 제형을 포함한 안정적인 약학 항체 제형을 제공하며, 여기서 제형의 pH는 약 pH 7이고, 제형의 이온 강도를 감소시키기 위하여 제형의 염 농도는 낮다. 제형은 선택적으로 비이온성 계면활성제, 당, 및/또는 비이온성 안정화제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 제형은 다양한 질환의 치료에서 사용될 수 있다.

배경 기술

[0002]

IL-4 및 IL-13 둘 다 이들의 생물학적 작용에 기반한 치료적으로 중요한 사이토카인이며, 천식을 포함한 다수의 질환에서 중요한 역할을 한다(Curr Opin Allergy Clin Immunol 2005, Vo. 5, 161-166). IL-4는 자가면역 질환을 억제할 수 있는 것으로 나타났으며, IL-4 및 IL-13은 둘 다 항암 면역 반응을 향상시키는 잠재력을 나타내었다. 두 가지 사이토카인 모두 알레르기 질환의 발병에 수반되며, 이들 사이토카인의 억제제는 치료적 이익을 제공할 수 있었다.

[0003] 피하 투여에 적당한 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체를 함유하는 약학 제형을 개발하기 위하여, 항체는 약 100 mg/mL 이상으로 농축되어야 한다. 그러나, 이와 같은 높은 농도에서는, 점성의 증가, pH의 변화, 용액 색상의 변경, 및 가시적 입자와 미시적 입자의 형성을 포함한 다수의 문제가 발생할 수 있다. 항체의 제형은 높은 농도에서 응집하기 매우 쉽다는 사실에 의해 더 복잡해진다. 통상적인 항체는 보통 5°C에서 4 년의 기간에 걸쳐서 5% 미만으로 고분자량 응집물(high molecular weight aggregate; HMW)을 형성하며, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체는 25°C에서 시간 당 0.5% 내지 1%의 비율 및 5°C에서 시간 당 0.1%의 비율로 HMW를 형성한다. 실제로, 이러한 항체는 응집하는 경향이 매우 강하여 목표로 하는 농도 범위에서 액체로 제형화될 수 없다. 마지막으로, 항-IL4/항-IL13 이중특이성 항체는 특히 등전점이 낮아서, 용해도 문제로 인하여 제형화하는 것을 더 어렵게 한다. 예를 들어, 항-IL4/항-IL13 이중특이성 항체는 등전점이 5.8 내지 6.2인 반면, 대부분의 항체는 등전점이 8 내지 10이다.

[0004] 따라서, 이러한 문제를 처리할 수 있는 개선되고 안정적인 약학 제형에 대한 필요성이 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0005] 이들 및 기타 다른 필요성을 충족시키기 위하여, 본 명세서에서 매우 안정적인 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체 제형이 제공된다. 놀랍게도 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체 및 완충 시스템을 포함하는, 액체 및 동결건조된 분말의 형태인 매우 안정적인 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체 제형이 발견되었으며, 여기서 제형의 pH는 약 pH 7이고, 제형의 이온 강도를 감소시키기 위하여 제형의 염 농도는 낮다. 제형은 선택적으로 비이온성 계면활성제, 당, 및/또는 비이온성 안정화제를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 제형은, 종종 제형 중 항체의 농도를 증가시킬 때 항체의 분자 응집(HMW), 및 가시적 입자와 미시적 입자의 형성을 초래하는 통상적인 제형보다 개선된 것이다. 특히, 본 발명의 제형은 가시적 입자, 미시적 입자, 저분자량 단백질, 및 고분자량 단백질에 대하여 양호한 안정성을 나타낸다.

[0006] 본 발명의 구현예는, 식 VL1-링커-VL2의 경쇄 및 식 VH1-링커-VH2의 중쇄를 포함하는 이중특이성 항-IL-4/항-IL-13 항체 또는 이의 항원 결합 단편(여기서, VL1 및 VH1은 IL-13 항원 결합 도메인을 형성하고, VL2 및 VH2는 IL-4 항원 결합 도메인을 형성함); 및 제형의 pH를 약 pH 7에서 유지시키는 데 적당한 완충 시스템을 포함하는 안정적인 항체 제형을 제공하며, 여기서 제형의 이온 강도를 감소시키기 위하여 제형의 염 농도는 낮다.

[0007] 구체적인 구현예에서, VL1은 서열번호 1의 CDR 서열을 포함하고; VH1은 서열번호 2의 CDR 서열을 포함하며; VL2는 서열번호 3의 CDR 서열을 포함하고; VH2는 서열번호 4 또는 5의 CDR 서열을 포함한다. 대안의 구체적인 구현예에서, VL1은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하고; VH1은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하며; VL2는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하고; VH2는 서열번호 4 또는 5의 아미노산 서열을 포함한다.

[0008] 구체적인 구현예에서, 경쇄는 식 N-VL1-링커-VL2-CL을 포함하며, 여기서 CL은 항체의 경쇄 불변 도메인이고, 중쇄는 식 N-VH1-링커-VH2-CH1-CH2-CH3을 포함하며, 여기서 CH2-CH3은 항체의 Fc 도메인에 해당한다. 구체적인 구현예에서, 링커는 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함한다.

[0009] 구체적인 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 불변 영역 도메인을 추가로 포함한다. 구체적인 구현예에서, 불변 영역 도메인은 CH1, CH2, CH3, 및 CL로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0010] 구체적인 구현예에서, 이중특이성 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간화된 IgG4 이중특이성 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0011] 구체적인 구현예에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 농도는 약 100 mg/mL이다.

[0012] 본 발명의 특정 구현예에서, 완충 시스템은 적어도 2 종의 완충제를 포함한다. 구체적인 구현예에서, 완충 시스템 농도는 약 10 mM이다. 구체적인 구현예에서, 완충 시스템은 트리스(Tris) 완충제 및 인산염 완충제를 포함한다. 구체적인 구현예에서, 트리스 완충제 농도는 약 3.7 mM이다. 구체적인 구현예에서, 인산염 완충제 농도는 약 6.3 mM이다. 구체적인 구현예에서, 트리스 완충제 농도는 약 3.7 mM이고 인산염 완충제 농도는 약 6.3 mM이다.

- [0013] 본 발명의 특정 구현예에서, 제형은 비이온성 계면활성제를 추가로 포함한다. 구체적인 구현예에서, 비이온성 계면활성제 농도는 약 0.05% 내지 약 0.2%(w/v)이다. 구체적인 구현예에서, 비이온성 계면활성제는 폴리소르베이트이다. 구체적인 구현예에서, 폴리소르베이트는 폴리소르베이트 80이다. 구체적인 구현예에서, 폴리소르베이트 80 농도는 약 0.05% 내지 약 0.2%(w/v)이다. 구체적인 구현예에서, 폴리소르베이트 80 농도는 약 0.2%(w/v)이다.
- [0014] 본 발명의 특정 구현예에서, 제형은 당을 추가로 포함한다. 구체적인 구현예에서, 당 농도는 약 5%(w/v)이다. 구체적인 구현예에서, 당은 이당류이다. 구체적인 구현예에서, 이당류는 수크로스이다. 구체적인 구현예에서, 수크로스 농도는 약 5%(w/v)이다.
- [0015] 본 발명의 특정 구현예에서, 제형은 비이온성 안정화제를 추가로 포함한다. 구체적인 구현예에서, 비이온성 안정화제 농도는 약 1% 내지 약 3%(w/v)이다. 구체적인 구현예에서, 비이온성 안정화제는 아미노산 또는 당이다. 구체적인 구현예에서, 아미노산은 프롤린이다. 구체적인 구현예에서, 당은 만니톨이다. 구체적인 구현예에서, 프롤린 농도는 약 1% 내지 약 3%(w/v)이다. 구체적인 구현예에서, 프롤린 농도는 약 3%(w/v)이다. 구체적인 구현예에서, 만니톨 농도는 약 3%(w/v)이다.
- [0016] 본 발명의 특정 구현예에서, 제형은 동결건조된 제형이다.
- [0017] 본 발명의 특정 구현예에서, 제형은 가시적 입자, 미시적 입자, 저분자량 단백질, 및 고분자량 단백질에 대하여 양호한 안정성을 나타낸다.
- [0018] 본 발명의 구현예는, 약 100 mg/mL의 이중특이성 항체 또는 이의 항원 결합 단편(여기서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 2 및 4의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 1 및 3의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함함); 약 10 mM의 완충 시스템(여기서, 완충 시스템은 트리스 완충제를 약 3.7 mM의 농도로, 인산염 완충제를 약 6.3 mM의 농도로 포함함); 약 0.2%(w/v)의 폴리소르베이트 80; 약 5%(w/v)의 수크로스; 및 약 3%(w/v)의 프롤린;을 포함하는 안정적인 동결건조된 항체 제형을 제공하며; 여기서 제형의 pH는 약 pH 7이다.
- [0019] 본 발명의 구현예는, 약 100 mg/mL의 이중특이성 항체 또는 이의 항원 결합 단편(여기서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 2 및 4의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 1 및 3의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함함); 약 10 mM의 완충 시스템(여기서, 완충 시스템은 트리스 완충제를 약 3.7 mM의 농도로, 인산염 완충제를 약 6.3 mM의 농도로 포함함); 약 0.2%(w/v)의 폴리소르베이트 80; 약 5%(w/v)의 수크로스; 및 약 3%(w/v)의 만니톨;을 포함하는 안정적인 동결건조된 항체 제형을 제공하며; 여기서 제형의 pH는 약 pH 7이다.
- [0020] 본 발명의 구현예는 본 발명의 제형을 포함하는 용기 및 제형의 투여 및 사용을 위한 지시사항을 포함하는 키트를 제공한다.
- [0021] 본 발명의 구현예는, 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에게 본 발명의 제형을 투여하는 단계를 포함하는, 알레르기 질환, 암, 천식, IL-4 및/또는 IL-13의 비정상적인 생성과 연관된 질환, 또는 상승된 TH-2 매개 반응과 연관된 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 2 개의 경쇄 및 2 개의 중쇄를 포함하는 예시적인 이중특이성 항-IL-4/항-IL-13 항체 분자를 나타내는 개략도이다. 2 개의 경쇄는 N-VL_{hB-B13}-링커-VL_{h8D4-8}-CL-C 모이어티를 포함하고, 2 개의 중쇄는 N-VH_{hB-B13}-링커-VH_{h8D4-8}-CH1-CH2-CH3-C 모이어티를 포함한다. 링커 서열은 (G4S)₂ 또는 GGGGSGGGGS(서열번호 6)를 포함한다.
- 도 2는 예시적인 항체의 아미노산 서열, 즉 B-B13 항-IL-13 항체(서열번호 1 및 2)의 인간화된 가변 도메인 및 8D4-8 항-IL-4 항체(서열번호 3, 4 및 5)의 인간화된 가변 도메인을 예시한다. 밑줄은 아미노산 변경이 있는 것을 나타낸다. 굵은체는 CDR 서열(서열번호 7 내지 21)을 나타낸다.
- 도 3은 흔들림 스트레스 후 분석물 #P5(pH-완충제 스크리닝)에 대한 입자 오염을 나타내는 도면의 그룹이다.
- 도 4는 분석물 #P6(pH-완충제 스크리닝)에 대한 여러 번의 스트레스 후 1.5 μm 초과 미시적 입자 오염을 나타내는 그래프이다.
- 도 5는 분석물 #P6(pH-완충제 스크리닝)에 대한 여러 번의 스트레스 후 10 μm 초과 미시적 입자 오염을 나타

내는 그래프이다.

도 6은 열 스트레스 후 분석물 #P6(pH-완충제 스크리닝)에 대한 HMW 수준을 나타내는 그래프이다.

도 7은 45℃에서 2 주 후 분석물 #P5(pH-완충제 스크리닝)의 SEC 크로마토그램을 나타내는 그래프이다.

도 8은 45℃에서 2 주 후 분석물 #P5(pH-완충제 스크리닝)의 SDS-PAGE 겔의 사진이다.

도 9는 분석물 #P5 및 #P6(pH-완충제 스크리닝)에 대한 45℃에서 2 주 후 IEF 겔의 사진이다.

도 10은 분석물 #P13(염 효과)에 대한 스트레스 프로그램 후 HMW 수준을 나타내는 그래프이다.

도 11은 기계적 스트레스 후 분석물 #P12(계면활성제)의 쌍안경 이미지의 사진을 나타낸다.

도 12는 5℃에서 6 주 동안 저장하면서 분석물 #P12(계면활성제)에 대한 HMW 모니터링을 나타내는 그래프이다.

도 13은 5℃에서 6 주 동안 저장하면서 분석물 #P12(첨가제)에 대한 HMW 모니터링을 나타내는 그래프이다.

도 14는 5℃에서 4 주 동안 저장하면서 분석물 #P20-FDS(첨가제)에 대한 HMW 모니터링을 나타내는 그래프이다.

도 15는 5℃에서 2 주 동안 저장하면서 분석물 #P21(첨가제)에 대한 HMW 모니터링을 나타내는 그래프이다.

도 16은 선도 제형에서 1% 프롤린 대 3% 프롤린을 비교하는, 시간에 따른 단량체 함량의 역수의 그래프이다.

도 17은 제형 #P16-1에 대한 냉동 건조 공정 동안 온도에 따른 그래프이다.

도 18은 15 mL의 성형 유리 바이알 중 #P18-1 케이크의 사진을 나타낸다.

도 19는 동결건조 공정 후 분석물 #P14(첨가제)에 대한 HMW 수준을 나타내는 그래프이다.

도 20은 동결건조 후 분석물 #P20(첨가제)에 대한 HMW 수준을 나타내는 그래프이다.

도 21은 제형화되지 않은 DS(분석물 #9)에 대한 냉동/해동 사이클 후 HMW 수준(a)을 나타내는 그래프 및 사진(b)이다.

도 22는 재구성 후 분석물 #P14(첨가제)에 대한 HMW 수준을 나타내는 그래프이다.

도 23은 재구성 후 분석물 #P20(첨가제)에 대한 HMW 수준을 나타내는 그래프이다.

도 24는 케이크 저장 및 재구성 후 분석물 #P17(첨가제)에 대한 HMW 수준을 나타내는 그래프이다.

도 25는 케이크 저장 및 재구성 후 분석물 #P20(첨가제)에 대한 HMW 수준을 나타내는 그래프이다.

도 26은 제1 스크리닝(분석물 #H04-150 내지 172, pH-완충제 스크리닝)에 대한 DSC 결과를 나타내는 그래프이다.

도 27은 히스티딘 및 석신산염 제형(분석물 #P-H04-144 및 148, #H04-150 A1 내지 A6)의 시각적 양태의 사진을 나타낸다.

도 28은 5℃(분석물 #H04-150 B1) 및 RT(분석물 #H04-163 A1, B1, B2 및 H04-172 A1, A2)에서 SEC에 의해 완충제 스크리닝에 대한 HMW 변화를 나타내는 그래프이다.

도 29는 인산염/트리스 완충제에 대한 pH 스크리닝에 대한(분석물 #H04-187) DSC 결과를 나타내는 그래프이다.

도 30은 SEC에 의해 인산염/트리스 완충제에 대한 pH 스크리닝에 있어서(분석물 #H04-187) HMW 변화를 나타내는 그래프이다.

도 31은 완충제 농도 스크리닝에 대한(분석물 #H04-185) DSC 결과를 나타내는 그래프이다.

도 32는 RT에서 SEC에 의해 완충제 농도를 이용하여(분석물 #H04-185) HMW 변화를 나타내는 그래프이다.

도 33은 RT에서 SEC에 의해 NaCl에 대하여(분석물 #H04-185) HMW 변화를 나타내는 그래프이다.

도 34는 RT에서 SEC에 의해 글리신 대 수크로스에 대하여(분석물 #H04-185) HMW 변화를 나타내는 차트이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

본 발명은 본 명세서에 기술된 특정 방법론, 프로토콜, 세포주, 벡터, 또는 시약으로 한정되지 않는데, 이는 이

[0023]

들이 본 발명의 사상 및 범주로부터 벗어나지 않으면서 다양할 수 있기 때문이다. 추가로, 본 명세서에서 사용되는 용어는 단지 특정 구현예를 예시하기 위한 것이고, 본 발명의 범주를 한정하는 것으로 의도되지 않는다. 본 명세서에 기술된 방법 및 물질과 동등 또는 유사한 임의의 방법 및 물질은 본 발명의 시행에서 사용될 수 있으며, 단지 예시적인 방법, 장치 및 물질만이 본 명세서에 기술되어 있다.

[0024] 본 명세서에 언급된 모든 특허 및 간행물은, 상기 특허 및 간행물에 기록된 단백질, 효소, 벡터, 숙주 세포 및 방법론을 기술 및 개시하기 위하여 전체가 참조로 본 명세서에 포함되어 있으며, 이들은 본 발명과 함께 그리고 본 발명에서 사용될 수 있다. 그러나, 본 명세서에서 어느 것도, 종래 발명에 의해 본 발명이 이와 같은 개시 내용에 선행하는 권리가 없음을 인정하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0025] **A. 정의**

[0026] 달리 정의되지 않는다면, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 가진다.

[0027] 내용이 명백하게 다르게 지시하지 않는다면, 본 명세서 및 첨부된 청구항에서 사용되는 바와 같이, 단수 형태("a", "an", 및 "the")는 또한 복수 대상을 포함함을 여기에서 언급한다.

[0028] 용어 "약" 또는 "대략"은 주어진 값 또는 범위의 10% 이내, 더 바람직하게는 5%(또는 1% 이하) 이내를 의미한다.

[0029] 용어 "투여하다" 또는 "투여"는, 예컨대 점막, 피내, 정맥내, 피하, 근육내 전달 및/또는 본원에 기술되거나 당 업계에 공지된 임의의 기타 다른 물리적 전달 방법에 의해, 신체 밖에 존재하는 물질(예를 들어, 본 발명의 제형)을 환자 내로 주사 또는 다르게 물리적으로 전달하는 작용을 말한다. 질환 또는 이의 증상이 치료 중에 있을 때, 물질의 투여는 통상적으로 질환 또는 이의 증상의 개시 후에 일어난다. 질환 또는 이의 증상이 예방될 때, 물질의 투여는 통상적으로 질환 또는 이의 증상의 개시 전에 일어난다.

[0030] 폴리펩티드에 관한 내용에 있어서, 용어 "유사체"는 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 폴리펩티드, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 폴리펩티드의 단편, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 에피토프, 또는 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체와 유사 또는 동일한 작용을 가지는 폴리펩티드를 말하지만, 반드시 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 폴리펩티드, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 폴리펩티드의 단편, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 에피토프, 또는 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체의 유사 또는 동일한 아미노산 서열을 포함하지 않거나, 또는 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 폴리펩티드, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 폴리펩티드의 단편, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 에피토프, 또는 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체의 유사 또는 동일한 구조를 가지지 않는다. 유사한 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드는, (a) 본 명세서에 기술된 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 폴리펩티드(예를 들어, 서열번호 1 내지 5), 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 폴리펩티드의 단편, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 에피토프, 또는 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체의 아미노산 서열과 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 더 바람직하게는 적어도 95%, 또는 가장 바람직하게는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드; (b) 엄격한 조건 하에서 적어도 5 개의 아미노산 잔기, 적어도 10 개의 아미노산 잔기, 적어도 15 개의 아미노산 잔기, 적어도 20 개의 아미노산 잔기, 적어도 25 개의 아미노산 잔기, 적어도 40 개의 아미노산 잔기, 적어도 50 개의 아미노산 잔기, 적어도 60 개의 아미노산 잔기, 적어도 70 개의 아미노산 잔기, 적어도 80 개의 아미노산 잔기, 적어도 90 개의 아미노산 잔기, 적어도 100 개의 아미노산 잔기, 적어도 125 개의 아미노산 잔기, 또는 적어도 150 개의 아미노산 잔기의 본 명세서에 기술된 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 폴리펩티드, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 폴리펩티드의 단편, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 에피토프, 또는 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체(또는 이의 VH 또는 VL 영역)를 암호화하는 뉴클레오티드 서열에 혼성화하는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩티드(예를 들어, 문헌[Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.]; [Maniatis et al. (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.] 참조); 및 (c) 본 명세서에 기술된 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 폴리펩티드, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 폴리펩티드의 단편, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 에피토프, 또는 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체(또는 이의 VH 또는 VL 영역)를 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 90%, 더 바람직하게는 적어도 95%, 또는 가장 바람직하게는 적어도 99% 동일한 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 폴리펩티드; 중 적어도 하나를 만족시키는 폴리펩티드를 말한다. 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체 폴

리펩티드, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 폴리펩티드의 단편, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 에피토프, 또는 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체와 유사한 구조를 가지는 폴리펩티드는 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 폴리펩티드, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 폴리펩티드의 단편, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 에피토프, 또는 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체의 유사한 2 차, 3 차 또는 4 차 구조를 가지는 폴리펩티드를 말한다. 폴리펩티드의 구조는 X선 결정법, 핵자기 공명 및 결정학적 전자현미경을 포함하지만, 이로 제한되지 않는 당업자에게 공지된 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0031] 2 개의 아미노산 서열 또는 2 개의 핵산 서열의 동일성 백분율을 결정하기 위하여, 서열은 최적의 비교 목적을 위해 정렬된다(예를 들어, 2 차 아미노산 또는 핵산 서열을 가지는 최적의 정렬을 위해 간격(gap)이 1 차 아미노산 또는 핵산 서열의 서열에 도입될 수 있다). 그 다음, 해당하는 아미노산 위치 또는 뉴클레오티드 위치에서의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드를 비교한다. 1 차 서열 중 위치를 2 차 서열 중 해당하는 위치와 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드가 차지하는 경우, 그러면 분자는 그 위치에서 동일하다. 2 개의 서열 사이의 동일성 백분율은 서열에 의해 공유되는 동일한 위치의 수의 함수이다(즉, 동일성 % = 동일한 중복되는 위치의 수 / 위치의 총 수 X 100%). 일 구현예에서, 2 개의 서열은 길이가 동일하다.

[0032] 2 개의 서열(예를 들어, 아미노산 서열 또는 핵산 서열) 사이의 동일성 백분율의 결정은 또한 수학적 알고리즘을 사용하여 이루어질 수 있다. 2 개의 서열의 비교에 이용되는 수학적 알고리즘의 바람직한 비제한적인 예는 문헌[Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2264 2268]의 알고리즘이며, 상기 알고리즘은 문헌[Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873 5877]에서와 같이 변형된다. 이와 같은 알고리즘은 문헌[Altschul *et al.*, 1990, J. Mol. Biol. 215:403]의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램으로 포함되어 있다. BLAST 뉴클레오티드 검색은, 예를 들어 스코어=100, 단어 길이=12에 대하여 설정된 NBLAST 뉴클레오티드 프로그램 파라미터를 이용하여 실행하여 관심이 있는 핵산 분자와 상동성인 뉴클레오티드 서열을 얻을 수 있다. BLAST 단백질 검색은, 예를 들어 스코어 50, 단어 길이=3으로 설정된 XBLAST 프로그램 파라미터를 이용하여 실행하여 관심이 있는 단백질 분자와 상동성인 아미노산 서열을 얻을 수 있다. 비교 목적을 위해 간격이 있는 정렬을 얻기 위하여, Gapped BLAST는 문헌[Altschul *et al.*, 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389 3402]에 기술된 바와 같이 이용될 수 있다. 대안적으로, PSI BLAST가 분자(Id.) 사이의 뚜렷한 관계를 검출하는 반복 검색을 실행하는 데 사용될 수 있다. BLAST, Gapped BLAST, 및 PSI Blast 프로그램을 이용할 때, 각각의 프로그램(예를 들어, XBLAST 및 NBLAST)의 디폴트 파라미터가 사용될 수 있다(예를 들어, www.ncbi.nlm.nih.gov에서 National Center for Biotechnology Information(NCBI)를 참조). 서열의 비교를 위하여 이용되는 수학적 알고리즘의 다른 바람직한 비제한적인 예는 문헌[Myers and Miller, 1988, CABIOS 4:11 17]의 알고리즘이다. 이와 같은 알고리즘은 GCG 서열 정렬 소프트웨어 패키지의 부분인 ALIGN 프로그램(버전 2.0)에 포함되어 있다. 아미노산 서열을 비교하기 위하여 ALIGN 프로그램을 이용할 때, PAM120 중량 잔기 표, 간격 길이 페널티 12, 및 간격 페널티 4가 사용될 수 있다.

[0033] 2 개 서열 사이의 동일성 백분율은, 간격을 허용하거나 또는 허용하지 않으면서, 상기 기술된 것과 유사한 기법을 사용하여 결정될 수 있다. 동일성 백분율을 계산함에 있어서, 통상적으로 정확하게 공통되는 것만 계수된다.

[0034] "길항제" 또는 "억제제"는 표적 분자의 하나 이상의 생물학적 활성을 억제, 예컨대 IL-4 및/또는 IL-13에 의한 신호전달을 할 수 있는 분자를 말한다. 길항제는, 리간드에 의해 활성화되는 세포를 무능화시키거나 사멸시킴으로써, 및/또는 수용체 또는 리간드 활성화(예를 들어, 티로신 키나제 활성화) 또는 수용체와의 리간드 결합 후 신호 전달을 방해함으로써 리간드와의 수용체의 결합을 방해할 수 있거나, 이의 역일 수 있다. 길항제는 수용체-리간드 상호작용을 완전히 차단할 수 있거나 이와 같은 상호작용을 실질적으로 감소시킬 수 있다. 본 발명의 특정 구현예에서, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체는 인간화된 길항성 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체, 바람직하게는 인간화된 단일클론성 길항성 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체이다.

[0035] 용어 "항체", "면역글로불린", 또는 "Ig"는 본 명세서에서 상호교환적으로 사용될 수 있다. 용어 항체는 이로 제한되는 것은 아니지만, 상기한 것 중 임의의 것의 합성 항체, 단일클론성 항체, 재조합으로 생성된 항체, 다중특이성 항체(이중특이성 항체를 포함함), 인간 항체, 인간화된 항체, 키메라 항체, 인트라바디(intrabody), 단쇄 Fv(scFv)(예를 들어, 단일특이성, 이중특이성 등을 포함함), 카멜라이즈된(camelized) 항체, Fab 단편, F(ab') 단편, 이황화 결합 Fv(sdFv), 항이디오타입(항-Id) 항체, 및 에피토프-결합 단편을 포함한다. 특히, 항체는 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 분자의 면역학적으로 활성인 부분, 즉 IL-4 또는 IL-13 항원에 특이적으로 결합하는 항원-결합 부위(예를 들어, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체의 하나 이상의 상보성 결정 영역(complementarity determining region; CDR))을 함유하는 항원 결합 도메인 또는 분자를 포함한다. 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체는 면역글로불린 분자의 임의의 유형(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 임

의의 부류(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2), 또는 임의의 하위부류(예를 들어, IgG2a 및 IgG2b)의 것일 수 있다. 바람직한 구현예에서, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체는 인간화된 것, 예컨대 인간화된 단일클론성 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체이다. 특정 구현예에서, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체는 IgG 항체, 인간 IgG4 항체이다.

[0036] 용어 "항원"은 본 발명의 항체에 의해 결합될 수 있는 분자 또는 분자의 일부분을 말한다. 항원은 하나 이상의 에피토프를 가질 수 있다. 본 발명의 항체에 의해 인식되는 항원의 예는 이로 제한되는 것은 아니지만, 혈청 단백질, 예를 들어 사이토카인(예컨대, IL-4, IL5, IL9 및 IL-13), 생리활성 펩티드, 세포 표면 분자, 예를 들어 수용체, 운반체, 이온 채널, 바이러스 및 박테리아 단백질을 포함한다.

[0037] 용어 "항원 결합 부위"는 항원의 부분 또는 전부에 특이적으로 결합하고 이에 상보적인 영역을 포함하는 항체의 부분을 말한다. 항원이 큰 경우, 항체는 오직 항원의 특정 부분에만 결합할 수 있으며, 상기 부분은 에피토프라 칭하여진다. 항원 결합 도메인은 하나 이상의 항체 가변 도메인에 의해 제공될 수 있다. 바람직하게, 항원 결합 도메인은 항체 경쇄 가변 도메인(VL)과 항체 중쇄 가변 도메인(VH)의 회합으로 만들어진다.

[0038] 용어 "결합 제제"는, IL-4 및/또는 IL-13, 또는 이의 변이체 또는 단편에 결합하거나 특이적으로 결합하는 임의의 분자, 예컨대 항체, siRNA, 핵산, 앵타머, 단백질, 또는 소분자 유기 화합물을 의미한다.

[0039] 용어 "이중특이성 항체" 또는 "이중특이성 항체(BsAb)"는 단일 분자 내에서 2 개의 항체의 항원-결합 부위를 가진 분자를 말한다. 따라서, 이중특이성 항체는 2 개의 상이한 항원을 동시에 결합할 수 있다. 진단 목적을 위한 적용 이외에, BsAb는 발병한 영역으로 강력한 이펙터 시스템을 재유도함으로써 또는 항체의 중화 또는 자극 활성을 증가시킴으로써 새로운 치료적 적용을 촉진한다. 이중특이성 항체는 단일클론성일 수 있지만, 바람직하게는 인간 또는 인간화된 항체이다. 이중특이성 항체를 만들기 위한 방법은 당업계에 잘 공지되어 있다.

[0040] 용어 "부산물"은 주어진 제형 중에서 치료적/예방적 결합 제제, 예컨대 항체의 비율을 떨어뜨리거나 감소시키는 원치않는 생성물을 포함한다. 예를 들어, 통상적인 부산물은 항체의 응집물, 항체의 단편(예를 들어, 탈아미드화 또는 가수분해에 의한 항체의 분해에 의해 생성됨), 또는 이들의 혼합물을 포함한다. 통상적으로, 응집물은 분자량이 단량체 항체보다 더 큰 복합체이다. 항체 분해 생성물은, 예를 들어 항체의 단편(예를 들어, 탈아미드화 또는 가수분해에 의해 생성됨)을 포함할 수 있다. 통상적으로, 분해 생성물은 분자량이 단량체 항체보다 더 작은 복합체이다. IgG 항체의 경우에, 이와 같은 분해 생성물은 약 150 kD 미만이다.

[0041] 용어 "조성물" 및 "제형"은 선택적으로 명시된 양으로 명시된 성분(예를 들어, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체)을 함유하는 생성물뿐만 아니라, 선택적으로 명시된 양으로 명시된 성분의 조합으로부터 직접적 또는 간접적으로 생성되는 임의의 생성물을 포함하는 것으로 의도된다.

[0042] 용어 "불변 영역" 또는 "불변 도메인"은 항원과의 항체의 결합에 직접적으로 수반되지 않지만 다양한 이펙터 작용, 예컨대 Fc 수용체와의 상호작용을 나타내는 경쇄 및 중쇄의 카르복시 말단 부분을 말한다. 상기 용어들은 면역글로불린의 나머지 부분, 즉 항원 결합 부위를 함유하는 가변 도메인에 비하여 더 많이 보존된 아미노산 서열을 가지는 면역글로불린 분자의 부분을 말한다. 불변 도메인은 중쇄의 CH1, CH2 및 CH3과, 경쇄의 CHL 도메인을 함유한다.

[0043] 용어 "장애"는 본 발명의 제형을 이용한 치료로부터 이익을 얻을 임의의 상태를 말한다. 이는 포유동물, 특히 인간이 당해 장애에 취약하게 만드는 병적 상태를 포함하여 만성 및 급성 장애 또는 질환을 포함한다. 본 명세서에서 다루어질 장애의 비제한적인 예는 암, 염증, 자가면역 질환, 감염, 심혈관계 질환, 호흡기 질환, 신경계 질환 및 대사성 질환을 포함한다.

[0044] 용어 "에피토프"는, 결합 제제, 예컨대 항체의 하나 이상의 항원 결합 영역에 결합할 수 있고, 동물, 바람직하게는 포유동물, 가장 바람직하게는 인간에서 항원 또는 면역성 활성을 가지며, 면역 반응을 유도할 수 있는 항원, 예컨대 IL-4 또는 IL-13 폴리펩티드 또는 IL-4 또는 IL-13 폴리펩티드 단편의 표면 상 국소화 영역을 말한다. 면역성 활성을 가지는 에피토프는 동물에서 항체 반응을 유도하는 폴리펩티드의 일부분이다. 항원 활성을 가지는 에피토프는, 예를 들어 면역분석법과 같은 당업계에 잘 공지된 임의의 방법에 의해 결정되는 바와 같이, 항체가 특이적으로 결합하는 폴리펩티드의 일부분이다. 항원 에피토프는 반드시 면역성일 필요는 없다. 에피토프는 보통 아미노산 또는 당 측쇄와 같은 분자의 화학적으로 활성인 표면 그룹으로 이루어지며, 특정한 3 차원 구조적 특징뿐만 아니라 특이적인 전하 특징을 가진다. 에피토프에 기여하는 폴리펩티드의 영역은 폴리펩티드의 인접한 아미노산일 수 있거나, 에피토프는 폴리펩티드의 2 개 이상의 비인접한 영역으로부터 합쳐질 수 있다. 에피토프에는 항원의 3 차원 표면 특성이 있을 수 있거나 없을 수 있다. 특정 구현예에서, IL-4 또는 IL-13 에

피토프에는 IL-4 또는 IL-13 폴리펩티드의 3 차원 표면 특성이 있다. 다른 구현예에서, IL-4 또는 IL-13 에피토프에는 IL-4 또는 IL-13 폴리펩티드의 1 차원 특성이 있다. 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체는 IL-4 또는 IL-13의 변성된 형태의 에피토프, IL-4 또는 IL-13의 원래 형태의 에피토프, 또는 IL-4 또는 IL-13의 변성된 형태 및 원래 형태 둘 다에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0045] 용어 "부형제"는 약물에 대하여 통상적으로 희석제, 비히클, 보존제, 결합제, 안정화제 등으로 사용되는 불활성 물질을 말하며, 이로 제한되는 것은 아니지만 단백질(예를 들어, 혈청 알부민 등), 아미노산(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산, 리신, 아르기닌, 글리신, 히스티딘 등), 지방산 및 인지질(예를 들어, 알킬 설포네이트, 카프릴레이트 등), 계면활성제(예를 들어, SDS, 폴리소르베이트, 비이온성 계면활성제 등), 당류(예를 들어, 수크로스, 말토스, 트레할로스 등) 및 폴리올(예를 들어, 만니톨, 소르비톨 등)을 포함한다. 또한, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, Pa.]을 참조하며, 상기 문헌은 본 명세서에 전체가 참조로 포함되어 있다.

[0046] 펩티드 또는 폴리펩티드에 관한 내용에 있어서, 용어 "단편"은 전장보다 짧은 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 또는 폴리펩티드를 말한다. 이와 같은 단편은, 예를 들어 아미노 말단에서의 절단, 카복시 말단에서의 절단, 및/또는 아미노산 서열로부터 잔기(들)의 내부 결실로 생길 수 있다. 단편은, 예를 들어 선택적 RNA 스플라이싱 (alternative RNA splicing) 또는 생체내 프로테아제 활성으로 생성될 수 있다. 특정 구현예에서, hIL-4 또는 hIL-13 단편은 IL-4 또는 IL-13 폴리펩티드 또는 IL-4 또는 IL-13 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체의 아미노산 서열의 적어도 5 개의 인접한 아미노산 잔기, 적어도 10 개의 인접한 아미노산 잔기, 적어도 15 개의 인접한 아미노산 잔기, 적어도 20 개의 인접한 아미노산 잔기, 적어도 25 개의 인접한 아미노산 잔기, 적어도 40 개의 인접한 아미노산 잔기, 적어도 50 개의 인접한 아미노산 잔기, 적어도 60 개의 인접한 아미노산 잔기, 적어도 70 개의 인접한 아미노산 잔기, 적어도 80 개의 인접한 아미노산 잔기, 적어도 90 개의 인접한 아미노산 잔기, 적어도 100 개의 아미노산 잔기, 적어도 125 개의 인접한 아미노산 잔기, 적어도 150 개의 인접한 아미노산 잔기, 적어도 175 개의 인접한 아미노산 잔기, 적어도 200 개의 인접한 아미노산 잔기, 또는 적어도 250 개의 인접한 아미노산 잔기의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.

[0047] 어구 및 용어 "작용성 단편, 변이체, 유도체 또는 유사체" 등뿐만 아니라 이의 형태, 항체 또는 항원의 형태에는 관심이 있는 전장 항체 또는 항원과 마찬가지로 정성적인 생물학적 활성을 가지는 화합물 또는 분자가 있다. 예를 들어, 항-IL-4 항체의 작용성 단편 또는 유사체는 IL-4 분자에 결합할 수 있는 것이거나 리간드 또는 작용성 또는 길항성 항체의 능력을 방지 또는 실질적으로 감소시켜 IL-4에 결합할 수 있는 것이다.

[0048] 항체와 관련하여 사용될 때 용어 "중쇄"는 중쇄 불변 도메인의 아미노산 서열을 기반으로 하여 알파(α), 델타(Δ), 엡실론(ϵ), 감마(γ), 및 뮤(μ)로 불리는 5 가지 별개의 유형을 말한다. 중쇄의 이들 별개의 유형은 당 업계에 잘 공지되어 있으며, 각각 5 가지 부류의 항체, 즉 IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM(4 가지의 IgG의 하위 부류, 즉 IgG1, IgG1, IgG3, 및 IgG4를 포함함)이 생기게 한다. 바람직하게, 중쇄는 인간 중쇄이다.

[0049] 용어 "힌지" 또는 "힌지 영역"은 항체의 제1 및 제2 불변 도메인 사이에 아미노산을 포함하는 유연성 폴리펩티드를 말한다.

[0050] 비인간(예를 들어, 뮤린) 항체의 "인간화된" 형태는 인간 항체와 비교하여 비인간 면역글로불린으로부터 유래되는 서열을 함유하는 키메라 면역글로불린, 면역글로불린 사슬 또는 이의 단편(예컨대, F_v , F_{ab} , F_{ab}' , $F_{(ab)'}^2$ 또는 항체의 기타 다른 표적-결합 하위서열)이다. 일반적으로, 인간화된 항체는 1 개, 통상적으로는 2 개의 가변 도메인의 실질적으로 전부를 포함할 것이며, 여기서 CDR 영역의 전부 또는 실질적으로 전부는 비인간 면역글로불린의 것에 해당하고, FR 영역의 전부 또는 실질적으로 전부는 인간 면역글로불린 주형 서열의 것이다. 인간화된 항체는 또한 면역글로불린 불변 영역(F_c)의 적어도 일부분, 통상적으로는 선택된 인간 면역글로불린 주형의 일부분을 포함할 수 있다. 일반적으로, 목표는 인간에서 면역성이 최소인 항체 분자를 가지는 것이다. 따라서, IL-4 및/또는 IL-13에의 하나 이상의 CDR의 특이적 결합 작용을 실질적으로 최소화시키지 않으면서 하나 이상의 CDR에서 하나 이상의 아미노산이 인간 숙주에 대하여 덜 면역성인 것으로 변할 수 있는 가능성이 있다. 대안적으로, FR은 비인간의 것일 수 있지만, 가장 면역성이 강한 아미노산은 면역성이 더 작은 것으로 대체된다. 그럼에도 불구하고, 상기 논의된 바와 같은 CDR 그래프팅은 인간화된 항체를 얻는 유일한 방법이 아니다. 예를 들어, 단지 CDR 영역을 변형시키는 것은 골격 잔기가 CDR 루프의 3 차원 구조 및 리간드에 대한 항체의 전반적인 친화도를 결정하는 데 역할을 하는 데 드문 것이 아니므로, 불충분할 수 있다. 따라서, 임의의 수단이 실시될 수 있으며, 비인간 부모 항체 분자는 인간에 대하여 면역성이 더 작은 것으로 변형되고, 인간 항체와의 전반적인 서열 동일성은 항상 필수적인 것은 아니다. 따라서, 인간화는 또한 예를 들어 단지 몇몇 잔기,

특히 항체 분자 상에서 노출되고 분자 내에 묻혀있지 않아, 따라서 숙주 면역계에 용이하게 접근할 수 없는 잔기의 단순 치환에 의해 이루어질 수 있다. 예를 들어, 문헌[Studnicka et al., Prot Eng 7(6):805-814, 1994]; [Mol Imm 44:1986-1988, 2007]; [Sims et al., J Immunol 151:2296 (1993)]; [Chothia et al., J Mol Biol 196:901 (1987)]; [Carter et al., Proc Natl Acad Sci USA 89:4285 (1992)]; [Presta et al., J Immunol 151:2623 (1993)], WO 2006/042333 및 U.S. 특허 번호 5,869,619를 참조한다. 대안적으로, 항체는 CDR 그래프팅(EPO 0 239 400; WO 91/09967; 및 U.S. 특허 번호 5,530,101 및 5,585,089), 베니어링(veneering) 또는 리서피싱(resurfacing)(EPO 0 592 106; EPO 0 519 596; 문헌[Padlan, 1991, Molec Imm 28(4/5):489-498]; [Studnicka et al., 1994, Prot Eng 7(6):805-814]; 및 [Roguska et al., 1994, PNAS 91:969-973]) 및 사슬 서플링(U.S. 특허 번호 5,565,332)을 포함한 기타 다른 기법에 의해 인간화될 수 있다. 인간 항체는 이로 제한되는 것은 아니지만, 파지 디스플레이 방법(U.S. 특허 번호 4,444,887, 4,716,111, 5,545,806 및 5,814,318; 및 WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 및 WO 91/10741 참조), 유전자이식 동물(예컨대, 설치류)을 사용하는 것, 키메라 세포를 사용하는 것 등을 포함하여 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 만들어질 수 있다.

[0051] "인터류킨-4"(IL-4)는 자연적으로 생성되거나 내인성 포유동물 IL-4 단백질, 및 자연적으로 생성되거나 내인성의 해당하는 포유동물 IL-4 단백질과 동일한 아미노산 서열을 가지는 단백질(예를 들어, 재조합 단백질, 합성 단백질(즉, 합성 유기 화학의 방법을 사용하여 생성된 것))에 관한 것이다. 따라서, 본 명세서에서 정의된 바와 같이, 상기 용어는 성숙한 IL-4 단백질, 다형성 또는 대립유전자 변이체, 및 IL-4의 기타 다른 이소형태, 및 상기한 것의 변형된 또는 비변형된 형태(예를 들어, 지질화, 글리코실화된 형태)를 포함한다. 자연적으로 생성되거나 내인성 IL-4는 성숙한 IL-4, 다형성 또는 대립유전자 변이체 및 기타 다른 이소형태와 같은 야생형 단백질 및 포유동물(예를 들어, 인간, 비인간 영장류)에서 자연적으로 생성되는 돌연변이 형태를 포함한다. 이와 같은 단백질은 예를 들어 자연적으로 IL-4를 생성하는 공급원으로부터 회수 또는 분리될 수 있다. 이들 단백질, 및 자연적으로 생성되거나 내인성의 해당하는 IL-4와 동일한 아미노산 서열을 가지는 단백질은 해당하는 포유동물의 명칭에 의해 지칭된다. 예를 들어, 해당하는 포유동물이 인간인 경우, 단백질은 인간 IL-4로서 지정된다. WO 03/038041에 개시된 것과 같은 몇몇 돌연변이 IL-4 단백질이 당업계에 공지되어 있다.

[0052] "인터류킨-13"(IL-13)은 자연적으로 생성되거나 내인성 포유동물 IL-13 단백질, 및 자연적으로 생성되거나 내인성의 해당하는 포유동물 IL-13 단백질과 동일한 아미노산 서열을 가지는 단백질(예를 들어, 재조합 단백질, 합성 단백질(즉, 합성 유기 화학의 방법을 사용하여 생성된 것))에 관한 것이다. 따라서, 본 명세서에서 정의된 바와 같이, 상기 용어는 성숙한 IL-13 단백질, 다형성 또는 대립유전자 변이체, 및 IL-13의 기타 다른 이소형태(예를 들어, 선택적 스플라이싱 또는 기타 다른 세포 과정), 및 상기한 것의 변형된 또는 비변형된 형태(예를 들어, 지질화, 글리코실화된 형태)를 포함한다. 자연적으로 생성되거나 내인성 IL-13은 성숙한 IL-13, 다형성 또는 대립유전자 변이체 및 기타 다른 이소형태와 같은 야생형 단백질 및 포유동물(예를 들어, 인간, 비인간 영장류)에서 자연적으로 생성되는 돌연변이 형태를 포함한다. 예를 들어, 본 명세서에서 사용된 바와 같이 IL-13은, 성숙한 인간 IL-13의 110 번 위치에서 Arg가 Gin으로 대체(성숙한 IL-13의 110 번 위치는 전구체 단백질의 130 번 위치에 해당함)되는 인간 IL-13 변이체(이는 천식(아토피성 및 비아토피성 천식)과 연관됨) 및 IL-13의 기타 다른 변이체를 포함한다. (Heinzmann et al., Hum Mol Genet. 9:549-559 (2000).) 이와 같은 단백질은 예를 들어 자연적으로 IL-13을 생성하는 공급원으로부터 회수 또는 분리될 수 있다. 이들 단백질, 및 자연적으로 생성되거나 내인성의 해당하는 IL-13과 동일한 아미노산 서열을 가지는 단백질은 해당하는 포유동물의 명칭에 의해 지칭된다. 예를 들어, 해당하는 포유동물이 인간인 경우, 단백질은 인간 IL-13으로서 지정된다. WO 03/035847에 개시된 것과 같은 몇몇 돌연변이 IL-13 단백질이 당업계에 공지되어 있다.

[0053] "분리된" 또는 "정제된" 결합 제제, 예컨대 항체에는, 결합 제제가 유래한 세포 또는 조직 공급원 유래의 세포 물질 또는 기타 다른 오염 단백질이 실질적으로 없거나, 화학적으로 합성될 때 화학 전구체 또는 기타 다른 화학물질이 실질적으로 없다. 예를 들어, 언어 "세포 물질이 실질적으로 없는"은 항체가 분리 또는 재조합으로 생성된 세포의 세포 구성성분으로부터 분리된 항체의 제조물을 포함한다. 따라서, 세포 물질이 실질적으로 없는 항체는 이중 단백질(또한 본 명세서에서 "오염 단백질"로서 지칭됨)을 약 30%, 20%, 10%, 또는 5%(건조 중량 기준) 미만으로 가지는 항체의 제조물을 포함한다. 항체가 재조합으로 생성될 때, 항체에는 또한 바람직하게 배양 배지가 실질적으로 없으며, 즉 배양 배지는 단백질 제조물 부피의 약 20%, 10%, 또는 5% 미만을 나타낸다. 항체가 화학 합성에 의해 생성될 때, 항체에는 바람직하게 화학 전구체 또는 기타 다른 화학 물질이 실질적으로 없으며, 즉 항체는 단백질의 합성에 수반된 화학 전구체 또는 기타 다른 화학 물질로부터 분리된다. 따라서, 항체의 이와 같은 제조물은 관심이 있는 항체 이외의 화학 전구체 또는 화합물을 약 30%, 20%, 10%, 5%(건조 중량

기준) 미만으로 가진다. 바람직한 구현예에서, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체는 분리 또는 정제된다.

- [0054] 용어 "카바트 번호 매김(Kabat numbering)" 등의 용어는 당업계에서 인식되며, 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역, 또는 이의 항원 결합 부분에서 기타 다른 아미노산 잔기보다 더 가변적인(즉, 초가변적인) 아미노산 잔기의 번호를 매기는 시스템을 말한다([Kabat *et al.* (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391]; 및 [Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242]). 중쇄 가변 영역에 있어서, 초가변 영역은 통상적으로 CDR1에 있어서 아미노산 위치 31 번 내지 35 번, CDR2에 있어서 아미노산 위치 50 번 내지 65 번, CDR3에 있어서 아미노산 위치 95 번 내지 102 번의 범위이다. 경쇄 가변 영역에 있어서, 초가변 영역은 통상적으로 CDR1에 있어서 아미노산 위치 24 번 내지 34 번, CDR2에 있어서 아미노산 위치 50 번 내지 56 번, CDR3에 있어서 아미노산 위치 89 번 내지 97 번의 범위이다.
- [0055] 항체와 관련하여 사용될 때 용어 "경쇄"는 불변 도메인의 아미노산 서열을 기초로 하여 람다(λ)의 카파(κ)로 불리는 2 가지의 별개의 유형을 말한다. 경쇄 아미노산 서열은 당업계에 잘 공지되어 있다. 바람직한 구현예에서, 경쇄는 인간 경쇄이다.
- [0056] 용어 "링커"는 항체의 항원 결합 도메인을 연결하는 분자를 말한다. 링커는 임의의 종류의 링커 분자일 수 있다. 바람직하게, 링커는 폴리펩티드이다. 링커는 중쇄 폴리펩티드와 경쇄 폴리펩티드 사이 및 내에서 서로 동일 또는 상이할 수 있다. 더욱이, 링커는 길이가 1 개, 2 개, 3 개, 4 개, 5 개, 6 개, 7 개, 8 개, 9 개, 10 개, 11 개, 12 개, 13 개, 14 개, 15 개, 16 개, 17 개, 18 개, 19 개 또는 20 개의 아미노산일 수 있다. 경쇄 도메인에 대한 것과 같이 중쇄 도메인에 대한 바람직한 펩티드 링커 유닛은 (G4S)₂, 즉 GGGSGGGGS(서열번호 6)이다. 중쇄 및 경쇄의 링커 유닛의 수는 서로 동일(대칭 체계) 또는 상이(비대칭 체계)할 수 있다. 펩티드 링커는 바람직하게 충분히 길어서 적절한 유연도를 제공하여, 항원 결합 모이어티가 예를 들어 입체 장애에 의해 서로 활성을 방해하는 것을 방지하고, 적절한 단백질 접힘을 가능하게 하며, 필요하다면 항체 분자가 동일한 세포 상에서 가능하게는 넓은 간격을 가지는 2 개 이상의 수용체와 상호작용하게 할 수 있고; 또한 바람직하게는 충분히 짧아서 항체 모이어티가 세포 내에서 계속 안정적으로 있을 수 있게 한다. 그러므로, 펩티드 링커의 길이, 조성 및/또는 형태는 다가 항체의 원하는 특성을 최적화시키기 위하여 당업자에 의해 용이하게 선택될 수 있다.
- [0057] 용어 "저염" 및 "낮은 염 농도"는 염 농도가 0 또는 염이 없는 것을 포함하여, 염 농도가 15 mM 이하로 비교적 낮은 것을 의미한다. 염 농도는 제형 중 염 및 완충제의 양에 의해 결정된다. 완충 시스템은 제형의 이온 강도를 낮추기 위하여 제형에 낮은 농도, 즉 약 15 mM 이하로 존재하는 것이 바람직하다. 대안적으로, 일부 바람직한 구현예는 염을 함유하지 않고 완충제를 함유하지 않는다. 또한 제형의 이온 강도를 가능한한 낮게 유지하기 위하여 어떠한 추가적인 염, 예컨대 NaCl이 제형에 첨가되지 않는 것이 바람직하다.
- [0058] 용어 "관리하다", "관리하는", 및 "관리"는, 대상체가 치료법(예를 들어, 예방제 또는 치료제)으로부터 감염의 치료로 이어지는 것이 아닌 유익한 효과를 얻는 것을 말한다. 특정 구현예에서, 대상체에 하나 이상의 치료법(예를 들어, 예방제 또는 치료제, 예컨대 본 발명의 제형)이 투여되어 IL-4 또는 IL-13-매개 질환(예를 들어, 암, 염증, 자가면역 질환, 감염, 심혈관계 질환, 호흡기 질환, 신경계 질환, 및 대사성 질환), 이들의 하나 이상의 증상을 "관리"하여, 상기 질환의 진행 또는 악화를 방지한다.
- [0059] 용어 "단일클론성 항체"는 상동성인 집단으로부터 얻은 항체 또는 실질적으로 상동성인 항체를 말하며, 각각의 단일클론성 항체는 통상적으로 항원 상의 단일 에피토프를 인식할 것이다. 바람직한 구현예에서, "단일클론성 항체"는 단일 하이브리도마 또는 기타 다른 세포에 의해 생성되는 항체이다. 용어 "단일클론성"은 항체를 만들기 위한 임의의 특정 방법으로 제한되지 않는다. 예를 들어, 단일클론성 항체는 문헌[Kohler *et al.*; Nature, 256:495 (1975)]에 기술된 바와 같은 하이브리도마 방법에 의해 만들어질 수 있거나 파지 라이브러리로부터 분리될 수 있다. 클론 세포주 및 이에 의해 발현되는 단일클론성 항체의 제조를 위한 기타 다른 방법은 당업계에 잘 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Chapter 11 in: Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5th Ed.]; [Ausubel *et al.*, eds., John Wiley and Sons, New York] 참조).
- [0060] 본 발명에서 사용되는 용어 "약학 조성물"은 다양한 제조물의 제형을 말한다. 치료적으로 유효한 양의 항체를 함유하는 제형은 멸균 액체 용액, 액체 현탁액 또는 동결건조된 형태이고 선택적으로 안정화제 또는 부형제를 함유한다.
- [0061] 용어 "약학적으로 허용가능한"은 동물, 더 구체적으로 인간에서의 사용을 위하여 연방 또는 주 정부의 규제 기

관에 의해 승인된 것, 또는 미국 약전, 유럽 약전 또는 기타 다른 일반적으로 인식되는 약전에 열거된 것을 의미한다.

[0062] "약학적으로 허용가능한 부형제"는 알맞은 또는 편리한 투약 형태를 제조하기 위하여 활성 분자, 예컨대 단일클론성 항체와 결합된 임의의 불활성 물질을 의미한다. "약학적으로 허용가능한 부형제"는 이용되는 투약 및 농도에서 수용체에 비독성인 부형제이며, 단일클론성 항체를 포함하는 제형의 기타 다른 성분과 양립가능하다.

[0063] 용어 "예방하다", "예방하는", 및 "예방"은, 본 명세서에서 제공되는 치료법 또는 치료법의 조합(예를 들어, 본 발명의 제형과 같은 예방제 또는 치료제의 조합)의 투여로 생기는, IL-4 또는 IL-13-매개 질환 및/또는 이와 관련된 증상의 발생, 재발, 개시 또는 확산의 전체 또는 부분적인 억제를 말한다.

[0064] 용어 "예방제"는 대상체에서 IL-4 또는 IL-13-매개 질환 및/또는 이와 관련된 증상의 발생, 재발, 개시 또는 확산을 전체적으로 또는 부분적으로 억제할 수 있는 임의의 제제를 말한다. 특정 구현예에서, 용어 "예방제"는 본 발명의 제형을 말한다. 특정 다른 구현예에서, 용어 "예방제"는 본 발명의 제형 이외의 제제를 말한다. 바람직하게, 예방제는 IL-4 또는 IL-13-매개 질환 및/또는 이와 관련된 증상을 예방, 또는 IL-4 또는 IL-13-매개 질환 및/또는 이와 관련된 증상의 개시, 발생, 진행 및/또는 중증도를 지연시키는 데 유용한 것으로 공지되거나 사용되어 왔거나 또는 현재 사용되고 있는 제제이다. 특정 구현예에서, 예방제는 인간화된 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체이다.

[0065] 용어 "재조합 항체"는 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 형성, 또는 분리된 항체, 예컨대 숙주 세포로 형질감염된 재조합 발현 벡터를 사용하여 발현된 항체, 재조합의 조합 인간 항체 라이브러리로부터 분리된 항체, 인간 면역글로불린 유전자를 위하여 유전자이식 및/또는 염색체이식한 동물(예를 들어, 마우스 또는 소)로부터 분리된 항체(예를 들어, 문헌[Taylor, L. D. et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295] 참조) 또는 인간 면역글로불린 유전자 서열의 기타 다른 DNA 서열로의 스플라이싱을 수반하는 임의의 기타 다른 수단에 의해 제조, 발현, 형성, 또는 분리된 항체를 포함한다. 이와 같은 재조합 항체는 면역글로불린 서열로부터 유래한 가변 및 불변 영역을 가질 수 있다(문헌[Kabat, E. A. et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242] 참조). 그러나 특정 구현예에서, 이와 같은 재조합 항체는 시험관내 돌연변이유발(또는, 인간 Ig 서열을 위하여 유전자이식된 동물이 사용될 때, 생체내 체세포 돌연변이유발)을 거치고, 따라서 재조합 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열은 생식계열 VH 및 VL 서열로부터 유래하고 이와 관련되는 한편, 생체내 항체 생식계열 레퍼토리 내에서 자연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열이다.

[0066] 용어 "당류"는 다가 알코올의 유도체인 분자의 부류를 말한다. 당류는 통상적으로 탄수화물로 지칭되며, 상이한 양의 당(당류) 유닛, 예를 들어 단당류, 이당류 및 다당류를 함유할 수 있다.

[0067] 용어 "특이적으로 결합한다" 또는 "특이적으로 결합하는"은 항원 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하지만 기타 다른 항원에는 특이적으로 결합하지 않는 것을 의미한다. 예를 들어, 항원에 특이적으로 결합하는 항체는, 예를 들어 방사성면역분석법(radioimmunoassay; RIA), 효소결합면역흡착법(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA), BIACORE, 또는 당업계에 공지된 기타 다른 분석법에 의해 결정되는 바와 같이 더 낮은 친화도를 가지는 기타 다른 펩티드 또는 폴리펩티드에 결합할 수 있다. 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 변이체 또는 단편은 관련 항원과 교차 반응성일 수 있다. 바람직하게, 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 변이체 또는 단편은 기타 다른 항원과 교차 반응하지 않는다. IL-4 및/또는 IL-13 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 변이체 또는 단편은 예를 들어 면역분석법, BIACore, 또는 당업자에게 공지된 기타 다른 기법에 의해 확인될 수 있다. 통상적으로 특이적 또는 선택적 반응은 적어도 2 배의 배경 신호 또는 노이즈, 더 통상적으로는 10 배 초과와 배경이 있을 것이다. 항체 특이성에 관한 논의를 위하여, 예를 들어 문헌[Paul, ed., 1989, Fundamental Immunology Second Edition, Raven Press, New York at pages 332-336]을 참조한다.

[0068] "안정적인" 또는 "안정화된" 제형은 제형 내 결합 제제, 예컨대 항체가 저장 시 자신의 물리적 안정성, 동일성, 완전성, 및/또는 화학적 안정성, 동일성, 완전성, 및/또는 생물학적 활성을 필수적으로 유지하는 것이다. 단백질 안정성을 측정하기 위한 다양한 분석 기법이 당업계에서 이용가능하며, 예를 들어 문헌[Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991)] 및 [Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10:29-90 (1993)]에서 검토된다. 안정성은 선택된 온도 및 선택된 기간 동안 기타 다른 저장 조건에서 측정될 수 있다. 안정성은 외관 검사, SDS-PAGE, IEF, HPSEC, RFFIT, 및 카파/람다 ELISA로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법 중 적어도 하나에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, 항체가 색상 및/또는 투명성의 외관 검사 시 또는 UV 광산란, SDS-PAGE에 의해, 또는 (고압) 크기 배제 크로마토그래피(HPSEC)

에 의해 측정될 때, 응집, 침전, 및/또는 변성의 징후를 나타내지 않는 경우, 항체는 약학 제형에서 "물리적 안정성을 유지한다". 바람직하게, 본 발명의 제형을 사용할 때, HPSEC 또는 응집 제형을 측정하기 위한 임의의 기타 다른 적당한 방법에 의해 측정될 때, 항체의 5% 이하, 통상적으로는 4% 이하, 바람직하게는 3% 이하, 더 바람직하게는 2% 이하, 특히 1% 이하가 응집물을 형성한다. 예를 들어, 특정 제형에서 특정한 저장 조건 하에서 특정한 소정의 기간 후 항체 단량체의 순도가 약 90%, 바람직하게는 약 95%, 특히 약 98%이면, 항체는 특정 제형 중에서 안정적인 것으로 여겨진다. 화학적 안정성은 단백질의 화학적으로 변경된 형태를 검출 및 정량화함으로써 평가될 수 있다. 화학적 변경은 크기 변형(예를 들어, 클리핑)을 수반할 수 있으며, 이는 예를 들어 (HP)SEC, SDS-PAGE, 및/또는 매트릭스 지원 레이저 이탈 이온화 질량 분석법(matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry; MALDI/TOF MS)을 사용하여 평가될 수 있다. 화학적 변경의 기타 다른 유형은 전하 변경(예를 들어, 탈아미드화의 결과로서 일어남)을 포함하며, 이는 예를 들어 이온-교환 크로마토그래피에 의해 평가될 수 있다. 주어진 때에 항체의 생물학적 활성이 예를 들어 항원 결합 분석법 또는 바이러스 중화 분석법에서 측정될 때, 약학 제형이 제조된 때에 나타난 생물학적 활성의 (분석법의 오차 내에서) 적어도 약 90%이면, 항체는 주어진 때의 약학 제형에서 "생물학적 활성을 유지한다".

[0069] 용어 "대상체" 및 "환자"는 상호교환적으로 사용된다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 대상체는 바람직하게 포유동물, 예컨대 비영장류(예를 들어, 소, 돼지, 말, 고양이, 개, 래트 등), 또는 영장류(예를 들어, 원숭이 및 인간), 가장 바람직하게는 인간이다. 일 구현예에서, 대상체는, IL-4 및/또는 IL-13-매개 질환을 가지는 포유동물, 바람직하게는 인간이다. 다른 구현예에서, 대상체는, IL-4 및/또는 IL-13-매개 질환을 발생시킬 위험에 있는 포유동물, 바람직하게는 인간이다.

[0070] 항체 사슬 폴리펩티드 서열과 관련하여 어구 "실질적으로 동일한"은 참조 폴리펩티드 서열과 적어도 70%, 80%, 90%, 95% 이상의 서열 동일성을 나타내는 항체 사슬로서 해석될 수 있다. 핵산 서열과 관련하여 상기 용어는 참조 핵산 서열과 적어도 약 85%, 90%, 95%, 또는 97% 이상의 서열 동일성을 나타내는 뉴클레오타이드의 서열로서 해석될 수 있다.

[0071] "치환형" 변이체는 동일한 위치에서의 그 자리에서 삽입되는 상이한 아미노산으로 대체되고 제거되는 적어도 하나의 아미노산 잔기를 가지는 것이다. 치환은 분자 내 단지 하나의 아미노산만이 치환되는 경우 단일일 수 있거나, 2 개 이상의 아미노산이 동일한 분자 내에서 치환되는 경우 다중일 수 있다. 복수의 치환이 연속 부위에서 있을 수 있다. 또한, 하나의 아미노산이 복수의 잔기로 대체될 수 있으며, 이와 같은 경우에 변이체는 치환과 삽입을 둘 다 포함한다. "삽입" 변이체는 원래 서열 중 특정 위치에서 어느 아미노산에 바로 인접하여 삽입되는 하나 이상의 아미노산을 가지는 것이다. 어느 아미노산에 바로 인접한다는 것은 아미노산의 α-카르복실 작용기 또는 α-아미노 작용기와 연결되는 것을 의미한다. "결실" 변이체는 제거되는 원래 아미노산 서열에서 하나 이상의 아미노산을 가지는 것이다. 보통, 결실 변이체는 분자의 특정 영역에서 결실된 1 개 또는 2 개의 아미노산을 가질 것이다.

[0072] 용어 "치료적으로 유효한 양"은 주어진 질환 및/또는 이와 관련된 증상의 중증도 및/또는 지속기간을 감소 및/또는 개선시키는 데 충분한 치료법(예를 들어, 본 발명의 제형)의 양을 말한다. 이 용어는 또한 주어진 질환의 전진 또는 진행의 감소 또는 개선, 주어진 질환의 재발, 발생 또는 개시의 감소 또는 개선을 위해 및/또는 다른 치료법(예를 들어, 본 발명의 제형 이외의 치료법)의 예방 또는 치료 효과(들)를 개선 또는 향상시키는 데 필요한 양을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 항체의 치료적으로 유효한 양은 약 5 ng/ml 내지 20 ng/ml, 바람직하게는 약 10 ng/ml 내지 20 ng/ml의 국소 농도를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 명세서에서 사용되는 "치료적으로 유효한 양"은 명시된 결과(예를 들어, IL-4 및/또는 IL-13 사이토카인의 억제)를 달성하는 본 발명의 항체의 양을 말한다.

[0073] 용어 "치료제"는 IL-4 및/또는 IL-13-매개 질환 및/또는 이와 관련된 증상의 치료, 관리 또는 개선에서 사용될 수 있는 임의의 제제를 말한다. 특정 구현예에서, 용어 "치료제"는 본 발명의 제형을 말한다. 특정한 다른 구현예에서, 용어 "치료제"는 본 발명의 제형 이외의 제제를 말한다. 바람직하게, 치료제는 IL-4 및/또는 IL-13-매개 질환 또는 이와 관련된 하나 이상의 증상의 치료, 관리 또는 개선에 유용한 것으로 공지되거나, 사용되어져 왔거나 현재 사용되고 있는 제제이다.

[0074] 용어 "치료법"은 IL-4 및/또는 IL-13-매개 질환(예를 들어, 암, 염증, 자가면역 질환, 감염, 심혈관계 질환, 호흡기 질환, 신경계 질환, 및 대사성 질환)의 예방, 관리, 치료, 및/또는 개선에 사용될 수 있는 임의의 프로토콜, 방법, 및/또는 제제를 말한다. 특정 구현예에서, 용어 "치료법들" 및 "치료법"은 생물학적 치료법, 지지 치료법, 및/또는 당업자, 예컨대 의료인에게 공지된 IL-4 및/또는 IL-13-매개 질환의 예방, 관리, 치료, 및/또는

개선에 유용한 기타 다른 치료법을 말한다.

[0075] 용어 "치료하다", "치료", "치료하는"은 하나 이상의 치료법의 투여(이로 제한되는 것은 아니지만, 하나 이상의 예방제 또는 치료제, 예컨대 본 발명의 제형의 투여를 포함함)로 생기는, IL-4 및/또는 IL-13-매개 질환(예를 들어, 암, 염증, 자가면역 질환, 감염, 심혈관계 질환, 호흡기 질환, 신경계 질환, 및 대사성 질환)의 진행, 중증도, 및/또는 지속기간의 감소 또는 개선을 말한다.

[0076] 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은, 경쇄 및 중쇄의 일부분으로서 통상적으로 중쇄에서 아미노 말단의 약 120 개 내지 130 개 아미노산 및 경쇄에서 약 100 개 내지 110 개의 아미노산을 말하며, 이는 항체 중 서열이 광범위하게 상이하고 특정 항원에 대한 각각의 특정 항체의 결합 및 특이성에서 사용된다. 서열의 가변성은 상보성 결정 영역(CDR)이라 불리는 영역에 농축되어 있는 한편, 가변 도메인 중 훨씬 더 보존된 영역은 골격 영역(framework region; FR)이라 불린다. 경쇄 및 중쇄의 CDR은 항체와 항원의 상호작용을 일차적으로 관할한다. 아미노산 위치의 번호 매김은 문헌[Kabat *et al.* (1991) Sequences of proteins of immunological interest. (U.S. Department of Health and Human Services, Washington, D.C.) 5th ed. ("Kabat *et al.*")]에서와 같이 EU Index에 따른다. 바람직한 구현예에서, 가변 영역은 인간 가변 영역이다.

[0077] B. 제형 및 제형 구성요소

[0078] 앞서 진술한 바와 같이, 본 발명의 제형은 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항 및 완충 시스템을 포함하며, 여기서 제형의 pH는 약 pH 7이고, 제형의 이온 강도를 감소시키기 위하여 제형의 염 농도는 낮다. 제형은 선택적으로 비이온성 계면활성제, 당, 및/또는 비이온성 안정화제를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 제형은, 종종 제형에서 항체의 농도를 증가시킬 때 항체의 분자 응집, 및 가시적 및 미시적 입자의 형성을 초래하는 종래 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체 제형보다 현저한 개선을 제공하는 것으로 발견되었다. 특히, 본 발명의 제형은 가시적 입자, 미시적 입자, 저분자량 단백질, 및 고분자량 단백질에 관하여 양호한 안정성을 나타낸다.

[0079] i. 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체, 및 이의 변이체 및 단편

[0080] 특정 구현예에서, 본 발명의 제형은 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체를 포함한다. 이중특이성 항체는 IL-4 및/또는 IL-13, 또는 이의 변이체 또는 단편에 결합하거나 특이적으로 결합한다. IL-4 및/또는 IL-13 분자는 임의의 중 유래일 수 있다. 바람직하게, IL-4 및/또는 IL-13 분자는 인간 유래이다. IL-4 및 IL-13 둘 다의 아미노산 서열 및 단백질 구조는 당업계에 잘 공지되어 있다.

[0081] 특정한 예시적인 구현예에서, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체는 인간화된 항체, 완전한 인간 항체, 또는 이의 변이체 또는 이의 항원-결합 단편이다. 바람직한 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체는 IL-4 및 IL-13과 이들의 수용체의 결합을 방지하고, IL-4 및 IL-13의 생물학적 활성을 억제한다.

[0082] 구체적인 구현예에서, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 1의 아미노산 서열(밑줄은 변형이 있는 아미노산을 나타냄. 굵은체는 CDR을 나타내며; CDR1은 서열번호 7인 RASEVDSYGQSYMHI이고; CDR2는 서열번호 8인 LASNLES이며; CDR3은 서열번호 9인 QQNAEDSR임을)을 포함하는 IL-13에 결합하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함한다.

항-IL13 hB-B13 VL3 (서열번호 1):

[0083] DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVD SYGQSYMHWY QQKAGQPPKL
LIYLASNLES GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVQAEDAATY YCQQNAEDSR
TFGGGTKLEI K

[0084] 구체적인 구현예에서, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 2의 아미노산 서열(밑줄은 변형이 있는 아미노산을 나타냄. 굵은체는 CDR을 나타내며; CDR1은 서열번호 10인 GFSLTDSSIN이고; CDR2는 서열번호 11인 DGRID이며; CDR3은 서열번호 12인 DGYFPYAMDF임을)을 포함하는 IL-13에 결합하는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함한다.

항-IL13 hB-B13 VH2 (서열번호 2):

[0085] EVQLKESGPG LVAPGGSLSI TCTVSGGFSLT DSSINWVRQP PGKGLEWLGM
IWGDGRIDYA DALKSRLSIS KDSSKSQVFL EMTSLRTDDT ATYYCARDGY
FPYAMDFWGQ GTSVTVSS

[0086] 구체적인 구현예에서, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 3의 아미노산

서열(밑줄은 변경이 있는 아미노산을 나타냄. 굵은체는 CDR을 나타내며; CDR1은 서열번호 13인 HASQNIDVWLS이고; CDR2는 서열번호 14인 KASNLHTG이며; CDR3은 서열번호 15인 QQAHSYPFT임)을 포함하는 IL-4에 결합하는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함한다.

항-IL4 h8D4-8 VL1 (서열번호 3):

DIQMTQSPAS LSVSVGDTIT LTCHASQNID VWLSWFQQKP GNIPKLLIYK
ASNLHTGVPS RFGSGSGGTG FTLTISSLQP EDIATYYCQQ AHSYPFTFGG
GTKLEIKR

구체적인 구현예에서, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 4의 아미노산 서열(밑줄은 변경이 있는 아미노산을 나타냄. 굵은체는 CDR을 나타내며; CDR1은 서열번호 16인 GYSFTSYWIIH이고; CDR2는 서열번호 17인 IDPSDGETR이며; CDR3은 서열번호 18인 LKEYGNYDSFYFDV임)을 포함하는 IL-4에 결합하는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함한다.

항-IL4 h8D4-8 VH1 (서열번호 4):

QVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKASGYSFT SYWIIHWIKQR PGQGLEWIGM
IDPSDGETRL NQRFQGRATL TVDESTSTAY MQLRSPTSED SAVYYCTRLK
EYGNYSFYF DVWGAGTLVT VSSA

다른 구체적인 구현예에서, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 5의 아미노산 서열(밑줄은 변경이 있는 아미노산을 나타냄. 굵은체는 CDR을 나타내며; CDR1은 서열번호 19인 GYSFTSYWIIH이고; CDR2는 서열번호 20인 IDASDGETR이며; CDR3은 서열번호 21인 LKEYGNYDSFYFDV임)을 포함하는 IL-4에 결합하는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함한다.

항-IL4 h8D4-8 VH2 (서열번호 5):

QVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKASGYSFT SYWIIHWIKQR PGQGLEWIGM
IDASDGETRL NQRFQGRATL TVDESTSTAY MQLRSPTSED SAVYYCTRLK
EYGNYSFYF DVWGAGTLVT VSSA

일부 구체적인 구현예에서, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 IL-13에 결합하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 IL-13에 결합하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

다른 구체적인 구현예에서, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 IL-4에 결합하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 IL-4에 결합하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

또 다른 구체적인 구현예에서, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 IL-4에 결합하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 IL-4에 결합하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

더 구체적인 구현예에서, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 2 및 4, 또는 2 및 5의 아미노산 서열을 포함하는 IL-13 및 IL-4 둘 다에 결합하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 1 및 3의 아미노산 서열을 포함하는 IL-13 및 IL-4 둘 다에 결합하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

가장 구체적인 구현예에서, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체는 서열번호 2 및 4의 아미노산 서열을 포함하는 IL-13 및 IL-4 둘 다에 결합하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 1 및 3의 아미노산 서열을 포함하는 IL-13 및 IL-4 둘 다에 결합하는 경쇄 가변 영역을 포함한다("리드 항체"). 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체의 구현예의 개략도는 도 1에 나타내어져 있고, 예시적인 중쇄 및 경쇄 가변 영역은 도 2에 나타내어져 있다. 질량분석법에 의해 결정된 리드 항체의 분자량은 198 kDa이다. 등전점 전기영동(isoelectric focusing)에 의해 측정된 리드 항체의 등전점은 5.8 내지 6.2의 범위이다.

대안적인 가장 구체적인 구현예에서, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 식 VL1-링커-VL2의 경쇄 및 식 VH1-링커-VH2의 중쇄를 포함하며, 여기서 VL1 및 VH1은 IL-4 항원 결합 도메인을 형성하고 VL2 및 VH2는 IL-13 항원 결합 도메인을 형성한다. 일부 구현예에서, VL1은 서열번호 1의 CDR 서열을 포함하고; VH1은 서열번호 2의 CDR 서열을 포함하며; VL2는 서열번호 3의 CDR 서열을 포함하고; VH2는 서열번호 4 또는 5

의 CDR 서열을 포함한다. 대안적인 구현예에서, VL2는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하고; VH2는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하며; VL1은 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하고; VH1은 서열번호 4 또는 5의 아미노산 서열을 포함한다.

[0098] 일부 구현예에서, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 항체의 항원 결합 도메인 사이에 링커를 포함한다. 링커는 임의의 종류의 링커 분자일 수 있다. 바람직하게, 링커는 폴리펩티드이다. 링커는 중쇄 폴리펩티드와 경쇄 폴리펩티드 사이에서 및 내에서 서로 동일 또는 상이할 수 있다. 더욱이, 링커는 길이가 1 개, 2 개, 3 개, 4 개, 5 개, 6 개, 7 개, 8 개, 9 개, 10 개, 11 개, 12 개, 13 개, 14 개, 15 개, 16 개, 17 개, 18 개, 19 개 또는 20 개의 아미노산일 수 있다. 경쇄 도메인에 대한 것과 같이 중쇄 도메인에 대한 바람직한 펩티드 링커 유닛은 (G4S)₂, 즉 GGGSGGGGS(서열번호 6)이다. 가장 바람직하게, 서열번호 2 및 4는 제 1 펩티드 링커에 의해 함께 연결되고, 서열번호 1 및 3은 제 2 펩티드에 의해 함께 연결되며, 여기서 제 1 및 제 2 펩티드 링커는 각각 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함한다. 중쇄 및 경쇄의 링커 유닛의 수는 서로 동일(대칭 체계) 또는 상이(비대칭 체계)할 수 있다. 펩티드 링커는 바람직하게 충분히 길어서 적절한 유연도를 제공하여, 항원 결합 모이어티가 예를 들어 입체 장애에 의해 서로 활성을 방해하는 것을 방지하고, 적절한 단백질 접힘을 가능하게 하며, 필요하다면 항체 분자가 동일한 세포 상에서 가능하게는 넓은 간격을 가지는 2 개 이상의 수용체와 상호작용하게 할 수 있고; 또한 바람직하게는 충분히 짧아서 항체 모이어티가 세포 내에서 계속 안정적으로 있을 수 있게 한다. 그러므로, 펩티드 링커의 길이, 조성 및/또는 형태는 다가 항체의 원하는 특성을 최적화시키기 위하여 당업자에 의해 용이하게 선택될 수 있다.

[0099] 본 발명의 바람직한 구현예에서, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간화된 항체이다. 인간화된 항체 아이소타입의 예는 IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM을 포함한다. 바람직하게, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체는 IgG 항체이다. IgG의 4 가지 형태가 있다. 바람직하게, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체는 IgG4 항체이다. 본 발명의 더 바람직한 구현예에서, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체는 인간화된 IgG4 항체이다.

[0100] 일부 구현예에서, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 불변 영역, 예를 들어 CH1, CH2, CH3, 및 CL을 추가로 포함한다.

[0101] 본 발명의 제형의 특정 구현예는 또한 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 변이체를 포함한다. 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체의 변이체는 이의 높은 유사성을 기반으로 하여 유사한 물리화학적 특성을 가질 수 있으며, 따라서 또한 본 발명의 범주 내에 포함된다. 변이체는 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체와 적어도 95%, 바람직하게는 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98% 또는 99% 상동성이고, IL-4 및/또는 IL-13 폴리펩티드, IL-4 및/또는 IL-13 폴리펩티드 단편, 또는 IL-4 및/또는 IL-13 에피토프에 결합하기 위하여 경쟁할 수 있는 아미노산 서열을 가지는 항체로서 정의된다. 바람직하게, 변이체는 IL-4 및/또는 IL-13 생물학적 활성을 개선, 중화, 또는 다르게는 억제할 것이다. 표적에의 결합을 위한 경쟁을 결정하는 것은 당업자에게 공지된 통상적인 방법에 의해 수행될 수 있다. 바람직하게 변이체는 인간 또는 인간화된 항체이고, 바람직하게는 IgG4 분자이다. 바람직한 구현예에서, 변이체에는 서열번호 2, 4 및 5의 아미노산 서열을 포함하는 IL-13 및 IL-4 둘 다에 결합하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 1 및 3의 아미노산 서열을 포함하는 IL-13 및 IL-4 둘 다에 결합하는 경쇄 가변 영역을 가지는 아미노산 서열에서 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 동일성이 있다. 용어 "변이체"는 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체의 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상의 아미노산이 변경된 아미노산 서열을 포함하는 항체를 말한다. 변이체는 아미노산 치환, 변형, 첨가, 및 결실을 포함하여, 보존성 서열 변형을 가질 수 있다.

[0102] 변형의 예는 이로 제한되는 것은 아니지만, 글리코실화, 아세틸화, 페길화, 인산화, 아마이드화, 공지된 보호기/차단기에 의한 유도체화, 단백질분해성 절단, 및 세포 리간드 또는 기타 다른 단백질에의 연결을 포함한다. 아미노산 변형은 당업계에 공지된 표준 기법, 예컨대 항체를 암호화하는 핵산에서 부위-지정 돌연변이, 분자 클로닝, 올리고뉴클레오타이드-지정 돌연변이, 및 무작위 PCR-매개 돌연변이에 의해 도입될 수 있다. 보존성 아미노산 치환은 아미노산 잔기가 유사한 구조적 또는 화학적 특성을 가지는 아미노산 잔기로 대체된 것을 포함한다. 유사한 측쇄를 가지는 아미노산 잔기의 패밀리는 당업계에 정의된 바 있다. 이들 패밀리는 염기성 측쇄를 가지는 아미노산(예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄를 가지는 아미노산(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전 극성 측쇄를 가지는 아미노산(예를 들어, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판), 비극성 측쇄를 가지는 아미노산(예를 들어, 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), 베타-분지 측쇄를 가지는 아미노산(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신), 및 방향족

측쇄를 가지는 아미노산(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판)을 포함한다. 상기에서 사용된 것 이외의 아미노산 잔기 패밀리 분류가 또한 이용될 수 있음은 당업자에게 명백할 것이다. 더욱이, 변이체는 비보존성 아미노산 치환, 예를 들어 아미노산의 상이한 구조적 또는 화학적 특성을 가지는 아미노산 잔기로의 대체를 가질 수 있다. 유사한 소수의 변이는 또한 아미노산 결실 또는 삽입, 또는 둘 다를 포함할 수 있다. 아미노산 잔기가 면역학적 활성을 없애지 않으면서 치환, 변형, 삽입, 또는 결실될 수 있는지 여부를 결정하는 것에 있어서의 안내는 당업계에 잘 공지된 컴퓨터 프로그램을 사용하여 확인될 수 있다. 컴퓨터 알고리즘, 예컨대 그 중에서도 Gap 또는 Bestfit(이들은 당업자에게 공지되어 있음)은 아미노산 서열을 최적으로 정렬하는 데 사용되어 유사 또는 동일한 아미노산 잔기를 비교 및 정의할 수 있다. 변이체는 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체와 비교하여 동일 또는 상이한, 더 높거나 더 낮은 결합 친화도를 가질 수 있지만, IL-4 및/또는 IL-13에 여전히 특이적으로 결합할 수 있으며, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체와 동일하면서, 더 높거나 더 낮은 생물학적 활성을 가질 수 있다.

[0103] 본 발명의 구현에는 또한 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체의 항원 결합 단편을 포함한다. 용어 "항원 결합 도메인", "항원 결합 영역", "항원 결합 단편" 및 유사한 용어는 항원과 상호작용하고 결합 제제 상에서 항원에 대하여 특이성 및 친화도를 부여하는 아미노산 잔기를 포함하는 항체의 일부분(예를 들어, 상보성 결정 영역(CDR))을 말한다. 항원 결합 영역은 임의의 동물 종, 예컨대 설치류(예를 들어, 토끼, 래트 또는 햄스터) 및 인간으로부터 유래될 수 있다. 바람직하게, 항원 결합 영역은 인간 기원의 것일 것이다. 항원 결합 단편의 비제한적인 예는 Fab 단편, F(ab')₂ 단편, Fd 단편, Fv 단편, 단쇄 Fv(scFv) 분자, dAb 단편, 및 항체의 추가변 영역을 모방하는 아미노산 잔기로 이루어진 최소 인식 유닛을 포함한다.

[0104] 본 발명의 바람직한 구현예에서, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체(또는 이의 변이체 또는 이의 항원 결합 단편)는 생체 내 IL-4 및/또는 IL-13의 생물학적 활성을 개선, 중화, 또는 다르게는 억제시킬 것이다.

[0105] 본 발명의 바람직한 구현예에서, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체(또는 이의 변이체 또는 이의 항원 결합 단편)는 생체 내 IL-4 및/또는 IL-13의 생물학적 활성을 개선, 중화, 또는 다르게는 억제시키는 길항성 항체이다.

[0106] 서열번호 2 및 4의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 1 및 3의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체를 포함하여, IL-13 및 IL-4 둘 다에 결합하는 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체 또는 이의 변이체 또는 단편의 확인, 분리, 제조, 및 특성화는 PCT 공개 WO 2009/052081에 상세히 기술되었으며, 상기 PCT 공개는 본 명세서에 참고로 포함되어 있다.

[0107] 바람직하게, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체(또는 이의 변이체 또는 이의 항원 결합 단편)은 약 5 mg/mL 내지 약 200 mg/mL, 예를 들어 약 50 mg/mL 내지 약 150 mg/mL, 약 75 mg/mL 내지 약 125 mg/mL, 및 약 100 mg/mL의 양으로 제형에 존재한다. 대안적으로, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체(또는 이의 변이체 또는 이의 항원 결합 단편)은 약 5 mg/mL 내지 약 65 mg/mL, 약 66 mg/mL 내지 약 130 mg/mL, 약 131 mg/mL 내지 약 200 mg/mL의 양으로 제형에 존재한다. 예를 들어, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체는 약 5 mg/mL, 약 10 mg/mL, 약 15 mg/mL, 약 20 mg/mL, 약 25 mg/mL, 약 30 mg/mL, 약 35 mg/mL, 약 40 mg/mL, 약 45 mg/mL, 약 50 mg/mL, 약 55 mg/mL, 약 60 mg/mL, 약 65 mg/mL, 약 70 mg/mL, 약 75 mg/mL, 약 80 mg/mL, 약 85 mg/mL, 약 90 mg/mL, 약 95 mg/mL, 약 100 mg/mL, 약 105 mg/mL, 약 110 mg/mL, 약 115 mg/mL, 약 120 mg/mL, 약 125 mg/mL, 약 130 mg/mL, 약 135 mg/mL, 약 140 mg/mL, 약 145 mg/mL, 약 150 mg/mL, 약 155 mg/mL, 약 160 mg/mL, 약 165 mg/mL, 약 170 mg/mL, 약 175 mg/mL, 약 180 mg/mL, 약 185 mg/mL, 약 190 mg/mL, 약 195 mg/mL, 또는 약 200 mg/mL의 양으로 제형에 존재할 수 있다.

[0108] 특정한 예시적인 구현예에서, 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체는 약 100 mg/mL의 양으로 제형에 존재한다. 다른 예시적인 구현예에서, 서열번호 2 및 4, 또는 2 및 5의 아미노산 서열을 포함하는 IL-13 및 IL-4 둘 다에 결합하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 1 및 3의 아미노산 서열을 포함하는 IL-13 및 IL-4 둘 다에 결합하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 인간화된 IgG4 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체는 약 100 mg/mL의 양으로 제형에 존재한다.

[0109] **ii. 완충제, 완충 시스템, 이온 강도, 및 pH**

[0110] 완충제는 생리학적 조건에 근접하는 범위로 제형의 pH를 유지시키는 것을 돕는다. 완충제는 바람직하게 약 1 mM 내지 약 50 mM 범위의 농도로 제형에 존재한다. 본 발명과 함께 사용하기에 적당한 완충제는 유기 및 무기산, 이의 염, 예컨대 시트르산염 완충제(예를 들어, 시트르산일나트륨-시트르산이나트륨 혼합물, 시트르산-시트르산삼나트륨 혼합물, 시트르산-시트르산일나트륨 혼합물 등), 석신산염 완충제(예를 들어, 석신산-석신산

일나트륨 혼합물, 석신산-수산화나트륨 혼합물, 석신산-석신산이나트륨 혼합물 등), 타르타르산염 완충제(예를 들어, 타르타르산-타르트산나트륨 혼합물, 타르타르산-타르트산칼륨 혼합물, 타르트산-수산화나트륨 혼합물 등), 푸마르산염 완충제(예를 들어, 푸마르산-푸마르산일나트륨 혼합물, 푸마르산-푸마르산이나트륨 혼합물, 푸마르산일나트륨-푸마르산이나트륨 혼합물 등), 글루콘산염 완충제(예를 들어, 글루콘산-글리콘산나트륨 혼합물, 글루콘산-수산화나트륨 혼합물, 글루콘산-글루콘산칼륨 혼합물 등), 옥살산염 완충제(예를 들어, 옥살산-옥살산나트륨 혼합물, 옥살산-수산화나트륨 혼합물, 옥살산-옥살산칼륨 혼합물 등), 락트산염 완충제(예를 들어, 락트산-락트산나트륨 혼합물, 락트산-수산화나트륨 혼합물, 락트산-락트산칼륨 혼합물 등) 및 아세트산염 완충제(예를 들어, 아세트산-아세트산나트륨 혼합물, 아세트산-수산화나트륨 혼합물 등)를 포함한다. 인산염 완충제, 탄산염 완충제, 히스티딘 완충제, 트리메틸아민 염, 예컨대 트리스, HEPES 및 기타 다른 이와 같은 공지된 완충제가 또한 적당하며 사용될 수 있다. 바람직하게, 완충제의 조합, 즉 2 가지 이상의 완충제가 본 발명의 제형에서 사용된다. 2 가지 이상의 완충제의 조합은 본 명세서에서 완충 시스템으로 지칭된다.

[0111] 본 발명의 제형은 완충 시스템을 포함한다. 완충 시스템은 생리학적으로 적당한 pH를 유지한다. 추가적으로, 완충 시스템은 제형의 등장성 및 화학적 안정성을 달성하는데 관여한다. 이중특이성 항체를 위한 안정적인 항체 제형을 개발하는 곤란성으로 인하여, 2 가지 이상의 완충제의 이익을 이용하기 위하여 조합한 완충 시스템을 사용하는 것이 바람직하다. 2 가지 이상의 완충제의 이익을 조합함으로써, 더 안정적인 항체 제형을 개발할 수 있다.

[0112] 바람직하게, 완충 시스템은 약 1 mM 내지 약 50 mM, 예를 들어 약 5 mM 내지 약 25 mM, 약 5 mM 내지 약 15 mM, 또는 약 10 mM의 농도로 제형에 존재한다. 대안적으로, 완충 시스템은 약 1 mM 내지 약 15 mM, 약 16 mM 내지 약 30 mM, 약 31 mM 내지 약 45 mM, 또는 약 46 mM 내지 약 50 mM의 농도로 제형에 존재한다. 예를 들어, 완충 시스템은 약 1 mM, 약 2 mM, 약 3 mM, 약 4 mM, 약 5 mM, 약 6 mM, 약 7 mM, 약 8 mM, 약 9 mM, 약 10 mM, 약 11 mM, 약 12 mM, 약 13 mM, 약 14 mM, 약 15 mM, 약 16 mM, 약 17 mM, 약 18 mM, 약 19 mM, 약 20 mM, 약 21 mM, 약 22 mM, 약 23 mM, 약 24 mM, 약 25 mM, 약 26 mM, 약 27 mM, 약 28 mM, 약 29 mM, 약 30 mM, 약 31 mM, 약 32 mM, 약 33 mM, 약 34 mM, 약 35 mM, 약 36 mM, 약 37 mM, 약 38 mM, 약 39 mM, 약 40 mM, 약 41 mM, 약 42 mM, 약 43 mM, 약 44 mM, 약 45 mM, 약 46 mM, 약 47 mM, 약 48 mM, 약 49 mM, 및 약 50 mM의 농도로 제형에 존재할 수 있다. 더 바람직하게, 완충 시스템은 약 5 mM 내지 약 15 mM, 훨씬 더 바람직하게는 약 8 mM 내지 약 12 mM의 농도로 제형에 존재한다. 가장 바람직한 구현예에서, 완충 시스템은 약 10 mM의 농도로 존재한다.

[0113] 바람직하게, 완충 시스템은 트리스 완충제 및 인산염 완충제를 포함한다. 바람직하게, 트리스 완충제는 약 1 mM 내지 약 5 mM의 농도로 제형에 존재한다. 예를 들어, 트리스 완충제는 약 1 mM, 약 2 mM, 약 3 mM, 약 4 mM, 또는 약 5 mM의 농도로 제형에 존재할 수 있다. 더 바람직하게, 트리스 완충제는 약 2 mM 내지 약 4 mM, 훨씬 더 바람직하게는 약 3 mM 내지 약 4 mM의 농도로 제형에 존재한다. 가장 바람직한 구현예에서, 트리스 완충제는 약 3.7 mM의 농도로 존재한다.

[0114] 바람직하게, 인산염 완충제는 약 1 mM 내지 약 10 mM의 농도로 제형에 존재한다. 예를 들어, 인산염 완충제는 약 1 mM, 약 2 mM, 약 3 mM, 약 4 mM, 약 5 mM, 약 6 mM, 약 7 mM, 약 8 mM, 약 9 mM, 또는 약 10 mM의 농도로 제형에 존재할 수 있다. 더 바람직하게, 인산염 완충제는 약 3 mM 내지 약 8 mM, 훨씬 더 바람직하게는 약 5 mM 내지 약 7 mM의 농도로 제형에 존재한다. 가장 바람직한 구현예에서, 인산염 완충제는 약 6.3 mM의 농도로 존재한다.

[0115] 본 발명의 가장 바람직한 구현예에서, 완충 시스템은 트리스 완충제를 약 3.7 mM의 농도로, 인산염 완충제를 약 6.3 mM의 농도로 포함한다. 완충 시스템 중 트리스 완충제와 인산염 완충제의 이러한 조합은 매우 드문 것이며, 당업계에 공지되어 있지 않다.

[0116] 또한 완충 시스템은 제형의 이온 강도를 낮추기 위하여 저농도, 즉 약 15 mM 이하의 농도로 제형에 존재하는 것이 바람직하다. 이는 제형의 이온 강도가 증가할수록 항체의 응집 속도가 증가한다는 사실에 기인한다. 제형의 안정성을 개선시키기 위하여 항체의 응집 및/또는 항체의 응집 속도를 감소시키는 것이 필요하다.

[0117] 특정 구현예에서, 본 발명의 제형은 pH가 약 pH 7 근처이다. 바람직하게, 제형의 pH는 약 5.0 내지 약 8.0의 범위이다. 예를 들어, 제형의 pH는 약 5.0, 약 5.1, 약 5.2, 약 5.3, 약 5.4, 약 5.5, 약 5.6, 약 5.7, 약 5.8, 약 5.9, 약 6.0, 약 6.1, 약 6.2, 약 6.3, 약 6.4, 약 6.5, 약 6.6, 약 6.7, 약 6.8, 약 6.9, 약 7.0, 약 7.1, 약 7.2, 약 7.3, 약 7.4, 약 7.5, 약 7.6, 약 7.7, 약 7.8, 약 7.9, 및 약 8.0일 수 있다. 더 바람직하게, 제형의 pH는 약 6.5 내지 약 7.5의 범위일 수 있다. 가장 바람직한 구현예에서, pH는 약 7.0이다. 제형의 pH가 약

pH 7일 때, 제형은 가시적 입자, 미시적 입자, 저분자량 단백질, 및 고분자량 단백질에 관하여 양호한 안정성을 나타낸다. 제형의 pH는 당업자에게 공지된 임의의 수단에 의해 측정될 수 있다. pH를 측정하기 위한 바람직한 수단은 미소 전극을 포함하는 pH 미터를 사용하는 것이다. 제형의 pH는 당업계에 공지된 임의의 수단을 사용하여 조정될 수 있다. 제형의 pH를 변경시키기 위한 바람직한 화학물질은 염산(HCl) 및 수산화나트륨(NaOH)이다.

[0118] 특정 구현예에서, 본 발명의 제형은 pH가 항체의 등전점(pI)를 초과한다. 등전점은 특정 분자 또는 표면이 순(net) 전하가 0에 이르게 하는 pH이다. 이중특이성 항체의 pI는 당업자에게 공지된 임의의 수단에 의해 측정될 수 있다. 바람직하게, 이중특이성 항체의 pI는 변성된 등전점 전기영동에 의해 결정된다. 서열번호 2 및 4의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호 1 및 3의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체의 pI는 5.8 내지 6.2이다.

[0119] **iii. 비이온성 계면활성제**

[0120] 본 발명의 제형은 선택적으로 비이온성 계면활성제를 추가로 포함할 수 있다. 계면활성제는 제형 중 생물학적 분자 및/또는 일반적인 약학 부형제를 안정화시키는 화학적 화합물이다. 계면활성제는 일반적으로 분자 및 부형제를 공기/용액 계면이 유도한 스트레스 및 용액/표면이 유도한 스트레스로부터 보호하며, 이는 달리 분자의 응집을 생성할 수 있다. 계면활성제는 또한 가시적 입자 및 미시적 입자의 형성을 방지한다.

[0121] 바람직하게, 비이온성 계면활성제는 약 0.01% 내지 약 1%(w/v), 예를 들어 약 0.01% 내지 약 0.5%, 약 0.01% 내지 약 0.3%, 또는 약 0.01% 내지 약 0.2%의 농도로 제형에 존재한다. 대안적으로, 비이온성 계면활성제는 약 0.01% 내지 약 0.05%(w/v), 약 0.06% 내지 약 0.10%(w/v), 약 0.11% 내지 약 0.15%(w/v), 약 0.16% 내지 약 0.20%(w/v), 약 0.20% 내지 약 0.30%(w/v), 약 0.30% 내지 약 0.40%(w/v), 약 0.40% 내지 약 0.50%(w/v), 약 0.50% 내지 약 0.60%(w/v), 약 0.60% 내지 약 0.70%(w/v), 약 0.70% 내지 약 0.80%(w/v), 약 0.80% 내지 약 0.90%(w/v), 또는 약 0.90% 내지 약 1.0%(w/v)의 농도로 제형에 존재한다. 예를 들어, 비이온성 계면활성제는 약 0.01%(w/v), 약 0.02%(w/v), 약 0.03%(w/v), 약 0.04%(w/v), 약 0.05%(w/v), 약 0.06%(w/v), 약 0.07%(w/v), 약 0.08%(w/v), 약 0.09%(w/v), 약 0.1%(w/v), 약 0.2%(w/v), 약 0.3%(w/v), 약 0.4%(w/v), 약 0.5%(w/v), 약 0.6%(w/v), 약 0.7%(w/v), 약 0.8%(w/v), 약 0.9%(w/v), 및 약 1%(w/v)의 양으로 제형에 존재할 수 있다. 특정 구현예에서, 비이온성 계면활성제는 약 0.05% 내지 약 0.2%(w/v)로 제형에 존재한다.

[0122] 계면활성제의 예는 이로 제한되는 것은 아니지만, 폴리소르베이트, 글리세린, 디카르복실산, 옥살산, 석신산, 푸마르산, 프탈산, 및 이들의 조합을 포함한다. 당업자는 기타 다른 비이온성 계면활성제가 약학적으로 허용가능한 한, 즉 대상체로의 투여에 적당한 한 사용될 수 있음을 알고 있다. 비이온성 계면활성제는 바람직하게 폴리소르베이트이다. 폴리소르베이트의 예는 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 40, 폴리소르베이트 60, 폴리소르베이트 65, 및 폴리소르베이트 80을 포함한다. 가장 바람직하게, 비이온성 계면활성제는 폴리소르베이트 80이다.

[0123] 예시적인 구현예에서, 폴리소르베이트 80은 약 0.01% 내지 약 1%(w/v)의 양으로 제형에 존재한다. 예를 들어, 폴리소르베이트 80은 약 0.01%(w/v), 약 0.02%(w/v), 약 0.03%(w/v), 약 0.04%(w/v), 약 0.05%(w/v), 약 0.06%(w/v), 약 0.07%(w/v), 약 0.08%(w/v), 약 0.09%(w/v), 약 0.1%(w/v), 약 0.2%(w/v), 약 0.3%(w/v), 약 0.4%(w/v), 약 0.5%(w/v), 약 0.6%(w/v), 약 0.7%(w/v), 약 0.8%(w/v), 약 0.9%(w/v), 및 약 1%(w/v)의 양으로 제형에 존재할 수 있다. 특정 구현예에서, 폴리소르베이트 80은 약 0.03% 내지 약 0.2%(w/v)로 제형에 존재한다. 예를 들어, 폴리소르베이트 80은 약 0.01% 내지 약 1%(w/v), 약 0.02% 내지 약 0.5%(w/v), 및 약 0.03% 내지 약 0.2%(w/v)의 양으로 존재할 수 있다. 본 발명의 가장 바람직한 구현예에서, 폴리소르베이트 80은 0.2%(w/v)의 양으로 제형에 존재한다.

[0124] **iv. 당**

[0125] 본 발명의 제형은 선택적으로 당을 추가로 포함할 수 있다. 통상적으로, 당은 고분자량 단백질을 위한 안정화제로서 또는 동해방지제로서 또는 동결건조보호제로서 사용된다.

[0126] 바람직하게, 당은 약 1% 내지 약 10%(w/v), 예를 들어 약 2% 내지 약 8%(w/v), 약 3% 내지 약 7%(w/v), 약 4% 내지 약 6%(w/v), 또는 약 5%(w/v)의 농도로 제형에 존재한다. 대안적으로, 당은 약 1% 내지 약 3%(w/v), 약 3% 내지 약 6%(w/v), 또는 약 6% 내지 약 10%(w/v)의 농도로 제형에 존재한다. 예를 들어, 당은 약 1%(w/v), 약 2%(w/v), 약 3%(w/v), 약 4%(w/v), 약 5%(w/v), 약 6%(w/v), 약 7%(w/v), 약 8%(w/v), 약 9%(w/v), 또는 약 10%(w/v)의 양으로 제형에 존재할 수 있다. 특정 구현예에서, 당은 약 3% 내지 약 7%(w/v), 더 바람직하게는 약 5%로 제형에 존재한다.

- [0127] 당의 예는 이로 제한되는 것은 아니지만, 단당류, 이당류, 및 다당류를 포함한다. 당류의 예는 글루코스, 수크로스, 말토스, 트레할로스, 텍스트로스, 자일리톨, 프럭토스 및 만니톨을 포함한다. 당업자는 기타 다른 당이 약학적으로 허용가능한 한, 즉 대상체에의 투여에 적당한 한 사용될 수 있음을 알고 있다. 바람직하게, 당은 이당류이다. 더 바람직하게, 당은 수크로스이다.
- [0128] 특정 구현예에서, 수크로스는 약 1% 내지 10%(w/v)의 양으로 제형에 존재한다. 예를 들어, 수크로스는 약 1%(w/v), 약 2%(w/v), 약 3%(w/v), 약 4%(w/v), 약 5%(w/v), 약 6%(w/v), 약 7%(w/v), 약 8%(w/v), 약 9%(w/v), 또는 약 10%(w/v)의 양으로 제형에 존재할 수 있다. 바람직하게, 수크로스는 약 3% 내지 약 7%(w/v), 또는 약 4% 내지 약 6%(w/v)의 양으로 존재할 수 있다. 가장 바람직하게, 수크로스는 약 5%(w/v)의 양으로 제형에 존재한다.
- [0129] **v. 비이온성 안정화제**
- [0130] 본 발명의 제형은 선택적으로 비이온성 안정화제를 추가로 포함할 수 있다. 안정화제는 치료제를 안정화시키거나 용기 벽에의 부착 또는 변성을 방지하는 것을 돕는 중량제로부터 첨가제까지의 작용 범위일 수 있는 부형제의 광범위한 카테고리를 말한다. 안정화제는 또한 고분자량 단백질의 형성을 최소화시킨다.
- [0131] 바람직하게, 비이온성 안정화제는 약 1% 내지 약 10%(w/v), 예를 들어 약 2% 내지 약 8%(w/v), 약 2% 내지 약 5%(w/v), 약 2% 내지 약 4%(w/v), 또는 약 3%(w/v)의 농도로 제형에 존재한다. 대안적으로, 비이온성 안정화제는 약 1% 내지 약 2%(w/v), 약 2% 내지 약 4%(w/v), 약 4% 내지 약 6%(w/v), 약 6% 내지 약 8%(w/v), 또는 약 8% 내지 약 10%(w/v)의 농도로 제형에 존재한다. 예를 들어, 비이온성 안정화제는 약 1%(w/v), 약 2%(w/v), 약 3%(w/v), 약 4%(w/v), 약 5%(w/v), 약 6%(w/v), 약 7%(w/v), 약 8%(w/v), 약 9%(w/v), 또는 약 10%(w/v)의 양으로 제형에 존재할 수 있다. 특정 구현예에서, 비이온성 안정화제는 약 1% 내지 약 5%(w/v), 더 바람직하게는 약 1% 내지 약 3%(w/v), 가장 바람직하게는 약 3%(w/v)로 제형에 존재한다.
- [0132] 안정화제의 예는 이로 제한되는 것은 아니지만, 다가 당 알코올; 아미노산, 예컨대 프롤린, 아르기닌, 리신, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 알라닌, 오르니틴, L-류신, 2-페닐알라닌, 글루탐산, 트레오닌 등; 유기 당 또는 당 알코올, 예컨대 사이클리톨(예컨대, 이노시톨)을 포함하여, 락토스, 트레할로스, 스타키오스, 아라비톨, 에리스리톨, 만니톨, 소르비톨, 자일리톨, 리비톨, 미오이니시톨, 갈락티톨, 글리세롤 등; 폴리에틸렌 글리콜; 아미노산 중합체; 황 함유 환원제, 예컨대 우레아, 글루타티온, 티옥산, 티오글리콜산나트륨, 티오글리세롤, α-모노티오글리세롤 및 티오황산나트륨; 저분자량 폴리펩티드(즉, 10 개 미만의 잔기); 단백질, 예컨대 인간 혈청 알부민, 소 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈, 당류, 단당류, 예컨대 자일로스, 만노스, 프럭토스, 글루코스; 이당류, 예컨대 락토스, 말토스 및 수크로스; 삼당류, 예컨대 라피노스; 다당류, 예컨대 텍스트란 등을 포함한다. 당업자는 기타 다른 비이온성 안정화제가 약학적으로 허용가능한 한, 즉 대상체에의 투여에 적당한 한 사용될 수 있음을 알고 있다. 바람직하게, 비이온성 안정화제는 아미노산이다. 더 바람직하게, 비이온성 안정화제는 프롤린 또는 글리신이다. 가장 바람직하게, 비이온성 안정화제는 프롤린이다. 대안적으로, 비이온성 안정화제는 만니톨이다.
- [0133] 특정 구현예에서, 프롤린은 약 1% 내지 10%(w/v)의 양으로 제형에 존재한다. 예를 들어, 프롤린은 약 1%(w/v), 약 2%(w/v), 약 3%(w/v), 약 4%(w/v), 약 5%(w/v), 약 6%(w/v), 약 7%(w/v), 약 8%(w/v), 약 9%(w/v), 또는 약 10%(w/v)의 양으로 제형에 존재할 수 있다. 바람직하게, 프롤린은 약 1% 내지 약 5%(w/v), 또는 약 1% 내지 약 3%(w/v)의 양으로 존재할 수 있다. 가장 바람직하게, 프롤린은 약 3%(w/v)의 양으로 제형에 존재한다.
- [0134] 특정한 대안적인 구현예에서, 만니톨은 약 1% 내지 10%(w/v)의 양으로 제형에 존재한다. 예를 들어, 만니톨은 약 1%(w/v), 약 2%(w/v), 약 3%(w/v), 약 4%(w/v), 약 5%(w/v), 약 6%(w/v), 약 7%(w/v), 약 8%(w/v), 약 9%(w/v), 또는 약 10%(w/v)의 양으로 제형에 존재할 수 있다. 바람직하게, 만니톨은 약 1% 내지 약 5%(w/v), 또는 약 1% 내지 약 3%(w/v)의 양으로 존재할 수 있다. 가장 바람직하게, 만니톨은 약 3%(w/v)의 양으로 제형에 존재한다.
- [0135] **v. 기타 다른 부형제**
- [0136] 더욱이, 본 발명의 제형은 선택적으로, 이로 제한되는 것은 아니지만 주사용 증류수, 희석제, 가용화제, 진정제, 추가적인 완충제, 무기 또는 유기 염, 항산화제, 보존제, 중량제, 킬레이트제, 긴장제(tonicity agent) 등을 포함하여, 기타 다른 부형제를 추가로 포함할 수 있다. 그러나 바람직하게, 본 발명의 제형은 상기 기술된 것을 제외하고 어떠한 기타 다른 부형제도 포함하지 않는다. 기타 다른 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 또는 안정화제, 예컨대 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 기

술된 것은, 제형의 원하는 특징에 악영향을 주지 않는다면, 제형에 포함될 수 있다. 대안적인 구현예에서는 보존제가 필요에 따라 첨가될 수 있지만, 특정 구현예에서는 제형에 보존제가 실질적으로 없다. 예를 들어, 동결 방지제로서 또는 동결건조보호제가 동결건조된 제형에 포함될 수 있다.

vi. 액체 또는 동결건조된 제형

본 발명의 제형은 액체 제형 또는 동결건조된 제형일 수 있다. 바람직하게, 제형은 액체 제형이다. 더 바람직하게, 액체 제형은 주사용으로 준비된 것이다. 대안적으로, 제형은 동결건조된 분말일 수 있다. 바람직하게, 동결건조된 분말은 투여 직전에 용매와 합하여지는 것으로 준비된 것이다.

vii. 예시적인 제형

본 발명의 예시적인 일 구현예에서, 본 발명은 피하 투여에 적당한 액체 항체 제형을 제공하며, 상기 제형은

약 100 mg/mL의 이중특이성 항체 또는 이의 항원 결합 단편(여기서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 2 및 4의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 1 및 3의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함함);

약 10 mM의 완충 시스템(여기서, 완충 시스템은 트리스 완충제를 약 3.7 mM의 농도로, 인산염 완충제를 약 6.3 mM의 농도로 포함함);

약 0.2%(w/v) 폴리소르베이트 80;

약 5%(w/v) 수크로스; 및

약 3%(w/v) 프롤린;

을 포함하고, 여기서 제형의 pH는 약 pH 7이다.

본 발명의 다른 예시적인 구현예에서, 본 발명은 피하 투여에 적당한 액체 항체 제형을 제공하며, 상기 제형은

약 100 mg/mL의 이중특이성 항체 또는 이의 항원 결합 단편(여기서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 2 및 4의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 1 및 3의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함함);

약 10 mM의 완충 시스템(여기서, 완충 시스템은 트리스 완충제를 약 3.7 mM의 농도로, 인산염 완충제를 약 6.3 mM의 농도로 포함함);

약 0.2%(w/v) 폴리소르베이트 80;

약 5%(w/v) 수크로스; 및

약 3%(w/v) 만니톨;

을 포함하고, 여기서 제형의 pH는 약 pH 7이다.

본 발명의 대안적인 예시적인 구현예에서, 본 발명은 피하 투여에 적당한 안정적인 동결건조된 항체 제형을 제공하며, 상기 제형은

약 100 mg/mL의 이중특이성 항체 또는 이의 항원 결합 단편(여기서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 2 및 4의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 1 및 3의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함함);

약 10 mM의 완충 시스템(여기서, 완충 시스템은 트리스 완충제를 약 3.7 mM의 농도로, 인산염 완충제를 약 6.3 mM의 농도로 포함함);

약 0.2%(w/v) 폴리소르베이트 80;

약 5%(w/v) 수크로스; 및

약 3%(w/v) 프롤린;

을 포함하고, 여기서 제형의 pH는 약 pH 7이다.

본 발명의 다른 대안적인 예시적인 구현예에서, 본 발명은 피하 투여에 적당한 안정적인 동결건조된 항체 제형

을 제공하며, 상기 제형은

[0162] 약 100 mg/mL의 이중특이성 항체 또는 이의 항원 결합 단편(여기서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 2 및 4의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 1 및 3의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함함);

[0163] 약 10 mM의 완충 시스템(여기서, 완충 시스템은 트리스 완충제를 약 3.7 mM의 농도로, 인산염 완충제를 약 6.3 mM의 농도로 포함함);

[0164] 약 0.2%(w/v) 폴리소르베이트 80;

[0165] 약 5%(w/v) 수크로스; 및

[0166] 약 3%(w/v) 만니톨;

[0167] 을 포함하고, 여기서 제형의 pH는 약 pH 7이다.

[0168] **vii. 안정성**

[0169] 본 발명의 제형은 2℃ 내지 8℃에서 적어도 약 1 개월, 2 개월, 3 개월, 4 개월, 5 개월, 6 개월, 7 개월, 8 개월, 9 개월, 10 개월, 11 개월, 12 개월, 13 개월, 14 개월, 15 개월, 16 개월, 17 개월, 18 개월, 19 개월, 20 개월, 21 개월, 22 개월, 23 개월, 24 개월, 25 개월, 26 개월, 27 개월, 28 개월, 29 개월, 30 개월, 31 개월, 32 개월, 33 개월, 34 개월, 35 개월, 36 개월 이상 동안 안정적이다. 예시적인 구현예에서, 본 발명의 제형은 2℃ 내지 8℃에서 적어도 약 6 개월 이상 동안 안정적이다. 다른 예시적인 구현예에서, 본 발명의 제형은 2℃ 내지 8℃에서 적어도 약 9 개월 동안 안정적이다. 추가의 예시적인 구현예에서, 본 발명의 제형은 2℃ 내지 8℃에서 적어도 약 1 년 이상, 더 바람직하게는 약 2 년, 훨씬 더 바람직하게는 약 3 년 동안 안정적이다.

[0170] **C. 투여 방식**

[0171] 본 발명의 특정 구현예에서, 제형은 비경구, 정맥내, 근육내, 진피내, 피하 투여, 또는 이들의 조합에 적합하다. 본 발명의 제형은 다양한 기법에 의한 전달에 적합하다. 본 발명의 바람직한 구현예에서, 제형은 피하로 투여된다. 예를 들어, 100 mg/mL의 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체를 함유하는 제형은 피하로 투여되는 것이 바람직하다. 그러므로, 제형은 바람직하게 멸균 상태이다. 제형을 멸균 상태로 만들기 위한 방법은 당업계에 잘 공지되어 있으며, 예를 들어 멸균 여과막을 통한 여과 또는 항체를 제외한 제형의 성분을 약 120℃에서 약 30 분 동안 고압살균(autoclaving)하는 것을 포함한다.

[0172] **D. 투약 및 투약 형태**

[0173] 본 발명의 제형의 효과적인 용량은 투여 수단, 표적 부위, 대상체의 생리학적 상태, 대상체가 인간인지 동물인지 여부, 투여되는 기타 다른 약제, 및 처치가 예방을 위한 것인지 치료를 위한 것인지 여부를 포함하여, 다수의 여러 가지 인자에 따라서 다양할 수 있다. 보통, 대상체는 인간이지만, 유전자이식 포유동물을 포함하여 비인간 포유동물도 또한 처치될 수 있다. 처치 투약은 안전성 및 효능을 최적화하기 위하여 적정될 필요가 있을 수 있다. 바람직하게, 용량은 바이알 당 100 mg 내지 200 mg의 범위에 있다.

[0174] 본 발명의 제형은 여러 번 투여될 수 있다. 단일 투약 사이의 간격은 1 일, 1 주일, 2 주일, 1 개월 또는 1 년 일 수 있다. 간격은 또한 불규칙적일 수 있다. 일부 방법에서, 투약은 특정 혈장 결합 제제, 예컨대 항체의 농도를 달성하기 위해 조정된다. 투약 및 빈도는 대상체에서 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체의 반감기에 따라서 다양할 것이다. 일반적으로, 인간 항체가 가장 긴 반감기를 나타내며, 그 다음 인간화된 항체, 키메라 항체 및 비인간 항체의 순이다.

[0175] 추가 구현예에서, 본 발명은 대상체에 투약 형태의 투여를 통한 대상체에서 하나 이상의 질환의 치료를 위하여 본 발명의 제형의 치료적으로 유효한 양을 포함하는 약학적 유닛 투약 형태를 제공한다. 바람직한 구현예에서, 대상체는 인간이다. 인간은 성인일 수 있거나 유아일 수 있다. 용어 "약학적 유닛 투약 형태"는 단일 투약으로서 치료될 대상체에 적당한 물리적으로 별개인 유닛을 말하며, 각각의 유닛은 계산된 활성 화합물의 소정 양을 함유하여 필요한 시트르산염 완충제 및 pH와 함께 원하는 치료적/예방적 효과를 생성한다.

[0176] 유닛 투약 형태는 제형을 포함하는 용기일 수 있다. 적당한 용기는 이로 제한되는 것은 아니지만, 밀봉된 앰플, 바이알, 병, 시린지, 및 시험관을 포함한다. 용기는 다양한 물질, 예컨대 유리 또는 플라스틱으로부터 형성될

수 있으며, 멸균된 접근 포트를 가질 수 있다(예를 들어, 용기는 피하주사기의 주사 바늘에 의해 관통가능한 마개를 가지는 바이알일 수 있음). 바람직한 구현예에서, 용기는 바이알이다. 일반적으로, 용기는 제형의 멸균성 및 안정성을 유지하여야 한다.

[0177] 구체적 구현예에서, 제형은 투명한 무색의 I형 유리로 만들어진 7 mL, 10 mL, 15 mL 또는 20 mL의 바이알에 포장되고, 플랜지(폴리프로필렌)가 포함된 가볍게 치면 열리는 캡으로 밀봉되는 마개(플루오로중합체-코팅 브로모부틸)로 밀폐된다.

[0178] 구체적 구현예에서, 제형은 바이알을 빛으로부터 보호하는 용기, 예컨대 판지 상자에 2 차적으로 포장된다.

[0179] 생체 내 투여에 사용될 제형은 멸균 상태이어야 한다. 이는 예를 들어 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 이루어질 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 액체 제형은 0.2 μm 또는 0.22 μm 필터를 사용하는 여과에 의해 멸균될 수 있다.

[0180] E. 치료 방법

[0181] IL-4 및/또는 IL-13-매개 질환 또는 장애를 치료하기 위한 방법이 본 명세서에서 추가로 제공되며, 상기 방법은 본 발명의 제형을 대상체에 투여하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, IL-4 및/또는 IL-13-매개 질환은 암, 염증, 자가면역 질환, 감염, 심혈관계 질환, 호흡기 질환, 신경계 질환 및 대사성 질환이다.

[0182] 본 발명의 제형은 알레르기성 질환, Th2-매개 질환, IL-13-매개 질환, IL-4-매개 질환, 및/또는 IL-4/IL-13-매개 질환과 같은 질환을 치료, 억제 또는 예방하는 데 사용될 수 있다. 이와 같은 질환의 예는 호지킨병, 천식, 알레르기성 천식, 아토피 피부염, 아토피성 알레르기, 궤양성 대장염, 피부경화증, 알레르기 비염, COPD3 특발성 폐섬유화증, 만성 이식편 거절 반응, 블레오마이신-유발 폐섬유화증, 방사선-유발 폐섬유화증, 폐육아종증, 진행성 전신성 경화증, 주혈흡충병, 간염, 신장암, 버킷림프종, 호지킨병, 비호지킨병, 시자리 증후군, 천식, 세균성 관절염, 포진성 피부염, 만성 특발성 두드러기, 궤양성 대장염, 피부경화증, 비후성 반흔, 휘플씨병, 전립선 비대증, IL-4 수용체가 역할을 하는 폐 장애, IL-4 수용체-매개 상피 장벽 붕괴가 역할을 하는 병태, IL-4 수용체가 역할을 하는 소화계의 장애, 약제에의 알레르기 반응, 가와사키병, 겸상적혈구 빈혈, 척-스트라우스 증후군, 그레이브스병, 임신 중독증, 쇼그렌 증후군, 자가면역 림프종식 증후군, 자가면역성 용혈성 빈혈, 바렛 식도, 자가면역 포도막염, 결핵, 낭포성 섬유증, 알레르기성 기관지폐 진균증, 만성 폐쇄성 폐 질환, 블레오마이신-유발 폐병증 및 섬유화증, 폐포탄백질증, 성인 호흡 곤란 증후군, 유육종증, 고 IgE 증후군, 특발성 고호산구 증후군, 자가면역성 수포 질환, 심상성 천포창, 수포성 유천포창, 중증 근무력증, 만성 피로 증후군, 신증을 포함한다.

[0183] 용어 "알레르기성 질환"은 환자가 정상적으로는 비면역성인 물질에 과민하게 되고, 상기 물질에 대하여 면역학적 반응을 시작하는 병리학적 병태를 말한다. 알레르기성 질환은 일반적으로, 콧물과 같은 양성인 증상을 일으킬 수 있는 염증 반응(예를 들어, 국소 반응, 전신 반응)으로 생성된 IgE에 의한 비만 세포의, 생명을 위협하는 과민성 쇼크 및 사망으로의 활성화에 의해 특징지어진다. 알레르기성 질환의 예는 이로 제한되는 것은 아니지만, 알레르기 비염(예를 들어, 고초열), 천식(예를 들어, 알레르기성 천식), 알레르기성 피부염(예를 들어, 습진), 접촉성 피부염, 음식물 알레르기 및 두드러기(담마진)을 포함한다.

[0184] 용어 "Th2-매개 질환"은, 병변이 특징적으로 IL-4, IL-5, IL-9 및 IL-13을 생성하는 CD4⁺ Th2 T 림프구에 의해 조절되는 면역 반응(Th2-유형 면역 반응)에 의해 (전체적으로 또는 부분적으로) 생성되는 질환을 말한다. Th2-유형 면역 반응은 특정 사이토카인(예를 들어, IL-4, IL-13) 및 특정 부류의 항체(예를 들어, IgE)의 생성과 연관되며, 체액성 면역과 연관된다. Th2-매개 질환은 Th2 사이토카인(예를 들어, IL-4, IL-13) 및/또는 특정 부류의 항체(예를 들어, IgE)의 상승된 수준의 존재로 특징지어지며, 예를 들어 알레르기성 질환(예를 들어, 알레르기 비염, 아토피 피부염, 천식(예를 들어, 아토피성 천식), 알레르기성 기도 질환(allergic airways disease; AAD), 과민성 쇼크, 결막염), IL-4 및/또는 IL-13의 상승된 수준과 연관된 자가면역 장애(예를 들어, 류마티스 관절염, 숙주 편대 이식 질환, 신장 질환(예를 들어, 신염 증후군, 루푸스 신염)), 및 IL-4 및/또는 IL-13의 상승된 수준과 연관된 감염(예를 들어, 바이러스, 기생충, 진균(예를 들어, *C. albicans*)) 감염)을 포함한다. 특정 암은 IL-4 및/또는 IL-13의 상승된 수준과 연관되거나 IL-4-유도 및/또는 IL-13-유도 암 세포 증식과 연관된다(예를 들어, B 세포 림프종, T 세포 림프종, 다발성 골수종, 두경부암, 유방암 및 난소암). 이들 암은 본 발명의 제형을 사용하여 치료, 억제 또는 예방될 수 있다.

[0185] 용어 "암"은, 통상적으로 조절되지 않는 세포 성장에 의해 특징지어지는 포유동물, 특히 인간에서의 생리학적 상태를 말하거나 기술한다. 암의 예는 이로 제한되는 것은 아니지만, 암종, 림프종, 아세포종, 육종 및 백혈병

을 포함한다.

[0186] 용어 "자가면역 질환"은 개체 자신의 조직으로부터 생성되고 이에 대하여 유도되는 비악성 질환 또는 장애를 말한다. 자가면역 질환 또는 장애의 예는 이로 제한되는 것은 아니지만 염증 반응, 예컨대 건선 및 피부염을 포함한 염증성 피부염; 알레르기성 병태, 예컨대 습진 및 천식; T 세포의 침윤 및 만성 염증 반응을 수반하는 기타 다른 병태; 죽상동맥경화증; 당뇨병(예를 들어, I형 당뇨병 또는 인슐린 의존성 당뇨병); 다발성 경화증 및 중추신경계(central nervous system; CNS) 염증 장애를 포함한다.

[0187] 특정 구현예에서, 본 발명의 제형은 하나 이상의 치료법(예를 들어, IL-4 및/또는 IL-13-매개 질환을 예방, 치료, 관리, 및/또는 개선시키기 위해 현재 투여되는 본 발명의 제형이 아닌 치료법)과 조합하여 투여될 수 있다. 용어 "조합하여"의 사용은 치료법이 대상체에 투여되는 순서를 제한하지 않는다. 제1 치료법은 IL-4 및/또는 IL-13-매개 질환에 걸렸던, 걸린 또는 걸리기 쉬운 대상체에 제2 치료법의 투여 전(예를 들어, 1 분, 45 분, 30 분, 45 분, 1 시간, 2 시간, 4 시간, 6 시간, 12 시간, 24 시간, 48 시간, 72 시간, 96 시간, 1 주, 2 주, 3 주, 4 주, 5 주, 6 주, 8 주, 또는 12 주 전), 동시에, 또는 투여 후(예를 들어, 1 분, 45 분, 30 분, 45 분, 1 시간, 2 시간, 4 시간, 6 시간, 12 시간, 24 시간, 48 시간, 72 시간, 96 시간, 1 주, 2 주, 3 주, 4 주, 5 주, 6 주, 8 주, 또는 12 주 후) 투여될 수 있다. 임의의 추가적인 치료법이 기타 다른 추가적인 치료법과 함께 임의의 순서로 투여될 수 있다. 본 발명의 항체와 조합하여 투여될 수 있는 치료법의 비제한적인 예는 미국 약전 및/또는 의사용 처방 참고집(Physician's Desk Reference)에 열거된 승인된 항염증제를 포함한다.

[0188] F. 키트

[0189] 본 발명의 특정 구현예는 본 발명의 제형을 포함하는 키트를 포함한다. 키트는 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 하나 이상의 용기를 추가로 포함할 수 있으며, 필터, 바늘 및 시린지를 포함하여 상업적으로 및 사용자 관점으로부터 바람직한 기타 다른 물질을 포함할 수 있다. 예를 들어, 치료, 예방 또는 진단 제품의 사용에 관한 지시, 사용, 투약, 제조, 투여, 사용금지사유, 및/또는 경고에 관한 정보를 포함하는 치료, 예방 또는 진단 제품의 상업적 포장 내에 관례적으로 포함된 지시사항은 키트와 연관될 수 있다.

[0190] 실시예

[0191] 본 발명을 설명하는 것을 돕기 위하여, 하기 실시예가 제공된다. 실시예는 어떠한 방법으로도 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 일반적으로, 본 발명의 실시는 달리 나타내어져 있지 않다면, 예를 들어 문헌[Sambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)]; [Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology), volume 51, Ed.: Paul S., Humana Press (1996)]; [Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169), Eds.: McCafferty J. *et al.*, Humana Press (1996)]; [Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999)]; 및 [Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Ausubel *et al.*, John Wiley & Sons (1992)]에 기술된 바와 같은 약학 제형, 화학, 분자 생물학, 재조합 DNA 기술, 항체 기술과 같은 면역학, 및 폴리펩티드 제조의 표준 기법의 종래 기법을 이용한다.

[0192] 실시예 2 내지 실시예 6에서 사용되는 약어는 다음과 같다:

[0193] BD: 생명공학 개발

[0194] BsAb: 이중특이성 항체

[0195] DLS: 동적광산란법

[0196] DoE: 실험 설계

[0197] DP: 약품

[0198] DS: 약물 물질

[0199] DSC: 시차주사 열량측정법

[0200] FCM: 유세포 현미경 검사

[0201] FDS: 제형화된 약물 물질

[0202] FT-IR: 푸리에 변환 적외선

[0203]	HAP:	하이드록시아파타이트 크로마토그래피
[0204]	HDPE:	고밀도 폴리에틸렌
[0205]	HMW:	고분자량
[0206]	HPLC:	고성능 액체 크로마토그래피
[0207]	IEF:	등전점 전기영동
[0208]	IgG:	면역글로불린 G
[0209]	IL:	인터루킨
[0210]	kDa:	킬로달톤
[0211]	LMW:	저분자량
[0212]	Nd:	측정되지 않음
[0213]	PEG:	폴리에틸렌 글리콜
[0214]	PES:	폴리에테르설폰
[0215]	PS80:	폴리소르베이트 80
[0216]	PVDF:	폴리비닐리덴 디플루오라이드
[0217]	rpm:	분당 회전수
[0218]	SC:	피하
[0219]	SDS-PAGE:	소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동
[0220]	SEC:	크기 배제 크로마토그래피
[0221]	SLS:	정적 광산란법
[0222]	Sq:	충분량
[0223]	TGA:	열중량분석
[0224]	UF/DF:	한외여과/투석여과
[0225]	USP:	미국 약전
[0226]	UV-Vis:	자외선-가시광선
[0227]	w/v:	중량/부피
[0228]	WFI:	주사용 증류수
[0229]	XRPD:	X선 분말 회절법
[0230]	최적의 제형 조건을 결정하기 위하여, 하기 실시예에서 서열번호 2 및 4의 아미노산 서열을 포함하는 IL-13 및 IL-4 둘 다에 결합하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 1 및 3의 아미노산 서열을 포함하는 IL-13 및 IL-4 둘 다에 결합하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 인간화된 IgG4 항-IL-4/항-IL-13 이중특이성 항체("리드 항체")를 사용하였다.	
[0231]	하기 제형 연구(실시예 2 내지 실시예 6)의 목적은 용액 및 냉동 건조된 상태로 리드 항체의 거동을 이해하는 것(즉, 주요 분해 경로를 확인하는 것)과 추가 제형 개발을 위하여 약 100 mg/mL에서 리드 항체에 대하여 양호한 안정성을 제공하는 적당한 첨가제 및 완충제-pH 시스템을 결정하는 것이다.	
[0232]	하기는 실시예 2 내지 실시예 6에서 사용되는 약물 물질을 나타낸다:	
[0233]	HAP 정제 단계 후 리드 항체(하류 가공의 마지막 단계):	
[0234]	배치 #RSN0169(연구물 #P5 내지 P6)	

- [0235] 제형 완충제: 인산나트륨 완충제 75 mM, pH 6.7
- [0236] 농도: 10.4 mg/mL;
- [0237] 배치 #RSN0169-SZW 320, 326 및 327(연구물 #P7 내지 P13)
- [0238] 제형 완충제: 인산나트륨 완충제 59 mM, pH 6.9
- [0239] 농도: 4.5 mg/mL;
- [0240] 배치 #RSN0169-SZW 330(연구물 #P14)
- [0241] 제형 완충제: 인산나트륨 완충제 55 mM, NaCl 20 mM, pH 6.8
- [0242] 농도: 4.4 mg/mL; 및
- [0243] 배치 #RSN0152(연구물 #P15 내지 P21)
- [0244] 제형 완충제: 인산나트륨 완충제 55 mM, NaCl 20 mM, pH 6.8
- [0245] 농도: 3.9 mg/mL.
- [0246] 각각의 제형 분석에 있어서, 리드 항체 농도는 물 또는 최종 완충제 중 UF/DF의 후에 조정된 다음, 원하는 최종 제형까지 적절한 양의 농축된 완충제 및 첨가제 용액으로 추가로 희석하였다(상세한 내용에 대해서는 표 1 참조).

표 1

[0247] 제형 조정의 상세한 내용

분석물 #	초기 농도 ^a	초기 완충제 ^a	최종 농도 ^b
P5-7	2 mg/mL	물	1 mg/mL
P12	95 mg/mL	물	85 mg/mL
P13	112 mg/mL	물	100 mg/mL
P14-16	27 mg/mL	물	20 mg/mL
P15	125 mg/mL	물	100 mg/mL
17	46 mg/mL	물	38 mg/mL
P18	46 mg/mL	인산염/트리스 3.5 mM	38 mg/mL
P20	42 mg/mL	인산염/트리스 3.5 mM	35 mg/mL
P21	42 mg/mL	인산염/트리스 3.5 mM	35 mg/mL
<i>a</i>	UF/DF 및 조정 후 농도 및 완충제		
<i>b</i>	농축 완충제 및 첨가제 용액으로 희석한 후 농도		

- [0248] 각각의 제형은 층류 하에서 멸균 여과하고(Millex[®] GV, Millipore, 0.22 μm, PVDF), 냉동/해동 연구에 대한 것은 폴리프로필렌 튜브를 사용한 것을 제외하고 분획을 각각의 안정성 시점에 적절하게 1형 유리 바이알로 분배하였다.
- [0249] 기계적 스트레스 및 열 스트레스 조건을 실시예 2 내지 실시예 6에서 제형에 대하여 결정하였다.
- [0250] 제형 분석물 #P5-7에 대한 흔들림 스트레스의 영향을 평가하기 위하여, Rota Test 74401을 사용하여 실온에서 2 시간 내지 15 시간 동안 350 rpm에서 바이알을 진탕한 다음 분석하였다.
- [0251] 제형 분석물 #P12, 13, 16 내지 18, 및 20에 대한 시린지 가능성 스트레스의 영향을 평가하기 위하여, 시린지 가능성(즉, 바늘 내 전단 응력)의 잠재적인 영향을, 소부피 샘플이 이용가능할 때는 HPLC 시린지(Unimetrics Corporation 100 μL)를 이용하여, 큰 부피 샘플이 이용가능할 때는 Terumo 26G x ½ - 0.45x12 mm 시린지를 이용하여 평가하였다.
- [0252] 제형 분석물 #P5-7 및 13에 대한 열 스트레스의 영향을 평가하기 위하여, 바이알을 45°C에서 1 주 및 2 주 동안 저장한 다음, 분석하였다. 열 스트레스를 위한 적절한 온도를 DSC에 의해 결정하였다. 분석물 #P5-7 및 13를 또

한 5℃에서 2 주 저장한 다음, 분석하였다.

[0253] 제형 분석물 #P12, 15, 및 21에 대한 열 스트레스의 영향을 평가하기 위하여, 바이알을 5℃에서 3 주 내지 6 주 동안 저장하고, 매주 분석하였다. 분석물 #P16 내지 18 및 20에 대하여 제형화 약물 물질(Formulated Drug Substance; FDS)이라 불리는 동결건조 전 용액을 5℃에서 4 주 내지 5 주 동안 저장하고 매주 분석하였다. 분석물 #P14, 16 내지 18, 및 20에 대한 동결건조 후 재구성된 용액을 5℃에서 24 시간 동안 저장한 다음 분석하였다.

[0254] 실시예 1 - pH 최적화

[0255] 제형 개발 공정에서의 제1 단계는 리드 항체 제형을 위한 최적의 pH를 결정하는 것이다. 최적의 pH의 결정하기 위하여, 낮은 농도의 리드 항체를 사용하였는데(100 mg/ml와 대조적으로 1 mg/ml), 이는 이러한 리드 항체의 낮은 농도가 최적의 pH를 결정하는 데 충분하기 때문이었다. 표 2는 본 연구에서 시험된 제형을 나타낸다.

표 2

[0256] 분석물 #P5 - pH 스크리닝

제형 #P5-x	완충 시스템	pH	농도
1	시트르산염 100 mM	4.5	1 mg/ml
2	시트르산염 100 mM	5.0	1 mg/ml
3	시트르산염 100 mM	5.5	1 mg/ml
4	시트르산염 100 mM	6.0	1 mg/ml
5	인산염 100 mM	6.5	1 mg/ml
6	인산염 100 mM	7.0	1 mg/ml
7	인산염 100 mM	7.5	1 mg/ml
8	트리스 100 mM	8.0	1 mg/ml
9	트리스 100 mM	8.5	1 mg/ml

[0257] 본 연구에서, 제형 1은 리드 항체에 대하여 형태상의 불안정성을 초래하였기 때문에 안정적이지 않았다. 구체적으로, 리드 항체는 펼쳐지는 경향이 있었다. 또한, 제형 9는 탈아미드화를 초래하였다. 따라서, 리드 항체 제형에 대한 최적의 pH는 pH 7.0 근처의 좁은 범위 내인 것으로 결정되었다.

[0258] 기타 다른 제형 파라미터, 예컨대 완충제, 계면활성제, 및 안정화의 후속 연구는 더 높은 농도의 리드 항체를 포함하였다. 이들 후속 연구는 고농도의 리드 항체가 사용될 때 리드 항체 제형에 대한 최적의 pH에 관한 상기 결론을 확인하였다.

[0259] 실시예 2 - 완충 시스템/이온 강도(염)

[0260] 완충제

[0261] 제형 개발 공정에서 다음 단계는 리드 항체 제형에 대한 최적의 완충제를 결정하는 것이었다. 몇 가지 다양한 완충제, 예컨대 히스티딘, 인산염, 트리스, 및 이들의 조합을 몇 가지 상이한 분석에서 시험하였다.

표 3

[0262] 분석물 #P6 - 1 mg/ml에서 완충 시스템 스크리닝

제형 #P6-x	완충 시스템	pH	농도
1	히스티딘 10 mM	6.5	1 mg/ml
2	인산염 10 mM	6.5	1 mg/ml
3	인산염 10 mM	7.0	1 mg/ml
4	인산염 10 mM	7.5	1 mg/ml
5	트리스 10 mM	7.0	1 mg/ml
6	트리스 10 mM	7.5	1 mg/ml
7	인산염 60 mM	7.0	1 mg/ml

표 4

[0263]

분석물 #P7 - 1 mg/ml에서 염 스크리닝

제형 #P7-x	완충 시스템	pH	농도	첨가제
1	인산염 10 mM	7.0	1 mg/ml	NaCl 70 mM
2	인산염 10 mM	7.0	1 mg/ml	NaCl 140 mM
3	트리스 10 mM	7.0	1 mg/ml	NaCl 70 mM
4	트리스 10 mM	7.0	1 mg/ml	NaCl 140 mM

표 5

[0264]

분석물 #P13 - 100 mg/ml에서 완충제/염 스크리닝

제형 #P13-x	완충 시스템	pH	농도	첨가제
1	인산염 10 mM	7.0	100 mg/ml	-
2	인산염 10 mM	7.0	100 mg/ml	NaCl 70 mM
3	트리스 10 mM	7.0	100 mg/ml	-
4	트리스 10 mM	7.0	100 mg/ml	NaCl 70 mM

표 6

[0265]

완충 시스템 조제

완충 시스템(산/염기)	pH	산 농도	염기 농도
시트르산 / NaOH	4.5	100 mM	pH 5.0으로의 충분량
시트르산 / NaOH	5.0	100 mM	pH 5.0으로의 충분량
시트르산 / NaOH	5.5	100 mM	pH 5.5으로의 충분량
시트르산 / NaOH	6.0	100 mM	pH 6.0으로의 충분량
인산이수소나트륨 / NaOH	6.5	100 mM	pH 6.5으로의 충분량
인산이수소나트륨 / NaOH	6.5	10 mM	pH 6.5으로의 충분량
인산이수소나트륨 / NaOH	7.0	100 mM	pH 7.0으로의 충분량
인산이수소나트륨 / NaOH	7.0	60 mM	pH 7.0으로의 충분량
인산이수소나트륨 / NaOH	7.0	10 mM	pH 7.0으로의 충분량
인산이수소나트륨 / NaOH	7.5	100 mM	pH 7.5으로의 충분량
인산이수소나트륨 / NaOH	7.5	10 mM	pH 7.5으로의 충분량
인산 / 트리스 아미노메탄	8.0	pH 8.0으로의 충분량	100 mM
인산 / 트리스 아미노메탄	8.5	pH 8.5으로의 충분량	100 mM
인산 / 트리스 아미노메탄	7.0	pH 7.0으로의 충분량	10 mM
인산 / 트리스 아미노메탄	7.5	pH 7.5으로의 충분량	10 mM
HCl / L-히스티딘	6.5	pH 6.5으로의 충분량	10 mM
인산이수소나트륨 / 트리스 아미노메탄	7.0	6.3 mM	3.7 mM
인산이수소나트륨 / 트리스 아미노메탄	7.0	2.22 mM	1.28 mM

[0266]

가공 및 제형 배합 시, 여과된 제형 분석물 및 대조군에는 가시적 입자 및 미시적 입자가 없었고, SEC 분석은 5.5%의 HMW를 함유하는 출발 DS로 인하여 순도가 92.0% 이하임을 나타내었다.

[0267]

DSC에 의해 얻은 개시 및 변성 온도는 하기 완충제-pH 시스템에 대하여 더 양호한 열적 안정성을 나타내었으며,

[0268]

· 인산염 pH 6.5 및 7.0: #P5-5, P5-6, P6-2, P6-3

[0269]

· 트리스 pH 7.0 및 7.5: #P6-5, P6-6

[0270]

이에 대한 개시 온도는, 예를 들어 pH 4.5에 있어서 48℃, 히스티딘 완충제에 있어서 59℃인 것과 비교하여, 대략 61℃이었다.

[0271]

SLS에 의해 얻은 콜로이드 안정성은 하기 완충제-pH 시스템에 대하여 더 양호한 안정성을 나타내었으며,

[0272]

· 인산염 pH 7.5: #P6-4

- [0273] · 트리스 pH 7.0 및 7.5: #P6-5, P6-6
- [0274] 이에 대한 제2 비리얼 계수는, 예를 들어 히스티딘 완충제에 있어서 $0.4 \cdot 10^{-4} \text{ mL.mol/g}^2$ 에 가깝고, 인산염 pH 7.0 완충제에 있어서 $1.5 \cdot 10^{-4} \text{ mL.mol/g}^2$ 에 가까운 것과 비교하여, $3.0 \cdot 10^{-4} \text{ mL.mol/g}^2$ 에 가까웠다.
- [0275] 입자 오염의 상이한 수준은 1 시간 30분 흔들림 스트레스 후 관찰하였다(도 3 참조).
- [0276] 가시적 입자에 관하여, 분석물 #P5에 대하여 양호한 안정성을 나타내는 완충제-pH 시스템 후보는 하기와 같았다:
- [0277] · 인산염 pH 6.5, 7.0 및 7.5: #P5-5, P5-6 및 P5-7
- [0278] · 트리스 pH 8.0 및 8.5: #P5-8 및 P5-9
- [0279] 분석물 #6은 6.5 내지 7.5의 pH를 가지는 2 가지 완충 시스템에 대하여 실행하였다. 최상의 안정성을 나타내는 후보는 하기와 같았다:
- [0280] · 인산염 pH 7.0 및 7.5: #P6-3 및 P6-4
- [0281] · 트리스 pH 7.0 및 7.5: #P6-5 및 P6-6
- [0282] 염기성 pH는 입자 형성을 최소화하는 데 더 양호한 것 같았다.
- [0283] 흔들림 스트레스 및 열 스트레스(45℃에서 2 주)는 미시적 입자에 관한 완충제-pH 시스템 식별을 위한 적절한 방법이다.
- [0284] 양호한 안정성을 제공하는 완충제-pH 시스템 후보는 하기와 같았다:
- [0285] 분석물 #5: 제형 #P5-6 내지 P5-9, 즉 pH 7.0 이상
- [0286] 분석물 #6(도 4 및 도 5 참조):
- [0287] - 인산염 7.5: # P6-4
- [0288] - 트리스 7.5: # P6-6
- [0289] 그 다음:
- [0290] - 인산염 pH 7.0: #P6-3
- [0291] - 트리스 pH 7.0: #P6-5
- [0292] 히스티딘 완충제(#P6-1)는 모든 스트레스 조건에 대하여 중요한 불안정화 효과를 나타내었음을 주목한다.
- [0293] HIAC 측정으로 외관 검사 결과, 즉 염기성 pH는 입자 형성을 최소화시키는 데 더 양호하였음을 확인하였다. 더욱이, 동일한 pH에서, 인산염계 제형은 트리스 완충제-시스템보다 다소 더 적은 미시적 입자를 제공하였다.
- [0294] 분석물 #5 및 6에 관하여, 열 스트레스는 HMW 및 LMW 둘 다에 대하여 흥미로운 결과를 나타내었다. 제형 #P5-1(pH 4.5)은 45℃에서 1 주일 후에 완전히 분해되었고; 제형 #P5-2도 45℃에서 2 주일 후에 그러하였음을 주목한다. 이들 2 개의 샘플은 하기 분석으로부터 뽑힐 것이다.
- [0295] HMW에 관하여, 45℃에서 2 주 후의 결과는 제형 #P5-6 내지 P5-9(pH 7.0 이상)에 대하여 유사하였고, pH가 6.5에서 5.5로 감소함에 따라 #P5-5 내지 P5-3에 대하여 더우수하였다. 분석물 #6에 대하여, 이러한 경향이 확인되었고, 양호한 안정성을 제공하는 완충제-pH 시스템 후보는 하기와 같았다(도 6 참조):
- [0296] · 인산염 pH 6.5: #P6-2
- [0297] · 트리스 pH 7.0: #P6-5
- [0298] · 히스티딘 pH 6.5: #P6-5
- [0299] 따라서, pH 6.5는 pH 7.0보다 HMW 형성을 최소화하는 것에 대하여 더 양호한 안정성을 제공하였으며, 그 자체는 pH 7.5보다 더 양호하였다. 더욱이, 동일한 pH(7.0 및 7.5)에서, 트리스계 제형은 인산염 완충제-시스템보다 다소 더 적은 HMW를 제공하였다.
- [0300] LMW에 관하여, 제형 #P5-3 내지 P5-5(pH 6.5 이하)는 45℃에서 2 주 후 양호한 안정성을 나타내었다. SDS-PAGE

겔 상에서 실질적인 LMW 및 추가의 밴드 형성이 제형 #P5-6 내지 P5-9($7.0 \leq \text{pH} \leq 8.5$)에 대하여 일어났다. LMW 분해는 제형 #P5-9(트리스 pH 8.5)에 대하여 더 뚜렷하였고(도 7 참조), SDS-PAGE 겔 상의 추가의 밴드는 #P5-7(인산염 pH 7.5)에 대하여 특히 가시적이었다(도 8 참조). 분해 생성물은 인산염 및 트리스 완충 시스템에 대하여 상이한 것으로 보였음을 주목한다.

- [0301] 분석물 #6은 이들 결과를 확인하였으며, 동일한 pH, 인산염계 제형은 트리스 완충제-시스템보다 다소 더 많은 LMW를 제공하였음을 나타내었다.
- [0302] HMW 및 LMW에 관하여, 산성 pH는 염기성 pH보다 더 우수한 안정성을 제시하는 것으로 보였으며, 이 때 인산염 완충제-시스템보다 트리스에 있어서 약간 이점이 있었다.
- [0303] 45°C에서 4 주 동안 열 스트레스는 IEF에 의해 증명된, 리드 항체(즉, 산성 패턴에서의 변화)의 화학적 분해를 강요하여, 따라서 리드 항체에 대하여 양호한 안정성을 제공하는 완충제-pH 시스템을 선택하는 적절한 수단이었다(도 9 참조). 가장 덜 안정적인 제형은 동형 패턴으로서 트리스 pH 8.5(#P5-9) 및 인산염 pH 7.5(#P6-4)이었으며, 둘 다 2 개의 추가 산 형태를 제시하였고, 주요 형태는 소수 형태가 되었다. 양호한 안정성을 나타내는 완충제-pH 시스템 후보는 트리스 pH 7.0(#P6-5)이었다.
- [0304] 결론적으로, 분석물 #P5 및 6(1 mg/mL 용액)에 대한 초기 상태 분석 및 스트레스 프로그램 결과를 기반으로 하여, pH는 7.0으로 설정되었다. 이러한 선택은 가시적 입자와 미시적 입자(염기성 pH)에 관한 양호한 안정성과 HMW 및 LMW(산성 pH)에 관한 안정성 사이의 절충이다. 완충 시스템에 관하여, 인산염 및 트리스 둘 다 선택된 pH에 대하여 이점, 즉 인산염은 가시적/미시적 입자에 관하여, 트리스는 HMW 및 LMW에 관하여 이점을 나타내었다.
- [0305] 제1 첨가제 평가에 있어서, 완충 시스템 인산염 10 mM 또는 트리스 10 mM을,
- [0306] · 100 mg/mL 리드 항체 용액에 대한 상기 결과를 확인, 및
- [0307] · 완충 시스템 둘 다에 대한 냉동-건조 공정을 별개로 시험
- [0308] 하는 데 사용하였음을 주목한다.
- [0309] 상기 결과를 확인하였고, 완충 시스템 둘 다(#P14-3 및 P14-8)는 냉동 건조 공정 동안 양호한 결과를 나타내었다(도 19 참조).
- [0310] pH 7.0에서, 인산염은 트리스보다 더 강력한 완충 능력을 가지지만; 그러나, 트리스와 달리, 인산염의 염기는 냉동 단계 동안 침전하는 경향이 있다. 트리스와 인산염 둘 다의 이점을 합하기 위하여, 이들 2 가지 완충 시스템의 혼합물, 즉 인산염 6.3 mM 및 트리스 3.7 mM이 선택되었다. 트리스 완충제 또는 인산염 완충제의 사용이 당업계에 공지되어 있지만(각각 별개로 사용), 완충 시스템 중 트리스 완충제와 인산염 완충제의 조합은 매우 흔치 않으며, 당업계에 공지되어 있지 않다.
- [0311] **전도성(pH 및 완충제 선택)**
- [0312] 동결건조 전 용액은 전도도가 대략 300 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 이었고, 이는 재구성 후 DP에 대하여 이론상 전도도 850 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 을 제공한다.
- [0313] 본 발명자들은 우선 pH 6.2 및 6.6의 완충 영역에서 및 10 mM의 농도에서 mAb에 대하여 통상적으로 사용되는 완충제, 즉 히스티딘을 시험하였다. pH 6.2에서, 실온에서 리드 항체의 침전으로 불용성 문제에 직면하였다(도 29 참조). pH 6.6에서, 용액은 실온에서 약간 유백색이었으며, 제2 비리얼계수는 $0.4 \cdot 10^{-4} \text{ mL} \cdot \text{mol}/\text{g}^2$ 로 낮았다. 대부분의 mAb와 달리, 히스티딘은 리드 항체에 대하여 양호한 완충제가 아니다.
- [0314] 그 다음, 본 발명자들은 pH 6.5, 7.0 및 7.5의 완충 영역에서 및 10 mM의 농도에서 통상적으로 사용되는 다른 완충제, 즉 인산염을 시험하였다. pH 6.5 및 7.0에 대하여, 제2 비리얼계수는 $1.5 \cdot 10^{-4} \text{ mL} \cdot \text{mol}/\text{g}^2$ 미만이었으며, 이는 낮은 콜로이드 안정성을 의미한다. pH 7.5에 대하여, 제2 비리얼계수는 $3.0 \cdot 10^{-4} \text{ mL} \cdot \text{mol}/\text{g}^2$ 에 가까웠으며, 이는 양호한 콜로이드 안정성을 의미하지만, 열 스트레스(45°C에서 2 주)는 pH 6.5 및 7.0에 대한 것보다 더 중요한 순도 감소(HMW 및 LMW 둘 다 증가)를 나타내었다. 인산염은 양호한 완충제이지만, 산성 pH에서 콜로이드 안정성이 낮고, 염기성 pH에서 리드 항체는 열 스트레스에 대하여 민감하다.
- [0315] 완충제 스크리닝을 확장하기 위하여, 트리스를 pH 7.0 및 7.5의 완충 영역, 및 10 mM의 농도에서 시험하였다.

상기 pH 둘 다 $3.0 \times 10^{-4} \text{ mL.mol/g}^2$ 에 가까운 비리얼 계수를 가지는 양호한 콜로이드 안정성을 제시하였다. 열 스트레스(45°C에서 2 주)는 pH 7.0보다 pH 7.5에 대하여 더 중요한 순도 감소(HMW 및 LMW 둘 다 증가)를 나타내었다. 그러나, pH 7.0에서 트리스는 HMW에 관하여 훨씬 더 양호한 안정성을 제공하였고, 동일한 pH에서 인산염보다 LMW에 관하여 약간 더 양호한 안정성을 제공하였다. 트리스 pH 7.0은 트리스 pH 7.5 및 인산염 pH 7.0보다 더 양호한 완충 시스템이다. 이러한 pH(pka = 8.1)에서 트리스의 양호한 완충 능력을 얻기 위하여, 필요한 양은 상업화된 제품에서 사용되는 최대치보다 더 많았다.

[0316] 리드 항체에 대하여 완충제를 최적화하기 위하여, 인산염으로 인한 pH 7.0(pka = 7.2)에서 양호한 완충 능력, 및 트리스로 인한 리드 항체의 양호한 안정화를 얻기 위하여 인산염 6.5 mM/트리스 3.7 mM의 조합이 선택되었다.

[0317] 상기 진술한 바와 같이, 트리스 완충제 또는 인산염 완충제의 사용이 당업계에 공지되어 있지만(각각 별개로 사용), 완충 시스템 중 트리스 완충제와 인산염 완충제의 조합은 매우 흔치 않으며, 당업계에 공지되어 있지 않다.

[0318] **이온 강도/염 농도**

[0319] 염화나트륨(NaCl)을 100 mg/mL 리드 항체 용액에 대하여 70 mM의 농도로 2 가지 선택된 완충제-pH 후보자와 함께 시험하였다.

[0320] DSC에 의해 얻은 개시 및 변성 온도뿐만 아니라 SLS에 의해 얻은 콜로이드 안정성은 상기 용액의 안정성에 대하여 NaCl의 어떠한 상당한 효과를 나타내지 않았다. 제형 분석물 #P13의 기계적 스트레스 및 동일한 제형의 5°C에서의 2 주 저장 후, 후보 #P13-1 및 P13-3, 즉 NaCl이 없는 것은 HMW 형성에 관하여 더 양호한 안정성을 나타내었다(도 10 참조). 도 33에 동일한 c/c.

[0321] 염 농도를 증가시키는 것은 이온 강도의 증가를 야기하였고, 이는 리드 항체의 응집 속도의 증가를 야기하였다. 따라서, 제형은 염 또는 삼투압제를 함유하면 안 되는 것으로 결정되었다. 추가적으로, 최적의 제형은 낮은 이온 강도를 가지기 위하여 낮은 농도의 완충제를 포함하여야 하는 것으로 결정되었다.

[0322] **실시예 3 - 계면활성제**

[0323] 제형 개발 공정에서 다음 단계는 리드 항체 제형에 대한 최적의 부형제를 결정하는 것이었다. 부형제는 리드 항체를 안정화시키는 데 충분하여야 하며, 동결건조와 양립가능하여야 한다. 몇 가지 다양한 계면활성제, 예컨대 폴리소르베이트 및 폴록사머를 다양한 농도로 시험하였다.

표 7

[0324] 분석물 #P12 - 85 mg/ml에서 첨가제 스크리닝

제형 #P12-x	완충 시스템	pH	농도	첨가제 1	첨가제 2
1	인산염 10 mM	7.0	85 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	글리신 1% (w/v) (130 mM)
3	인산염 10 mM	7.0	85 mg/ml	PS80 0.01%(w/v)	수크로스 5%(w/v)
4	인산염 10 mM	7.0	85 mg/ml	PS80 0.01%(w/v)	트레할로스 5%(w/v)
5	인산염 10 mM	7.0	85 mg/ml	PS80 0.01%(w/v)	-
6	인산염 10 mM	7.0	85 mg/ml	PS80 0.1%(w/v)	-
7	인산염 10 mM	7.0	85 mg/ml	PS20 0.01%(w/v)	-
8	인산염 10 mM	7.0	85 mg/ml	PS20 0.1%(w/v)	-
9	인산염 10 mM	7.0	85 mg/ml	폴록사머 0.05%(w/v)	-
10	인산염 10 mM	7.0	85 mg/ml	폴록사머 0.1%(w/v)	-
11	인산염 10 mM	7.0	85 mg/ml	-	-

표 8

[0325] 분석물 #P23 - 100 mg/ml에서 첨가제 스크리닝

제형 #P23-x	완충 시스템	pH	농도	첨가제
1	트리스 / 인산염 10 mM	7.0	100 mg/ml	PS80 0.1% (w/v)
2	트리스 / 인산염 10 mM	7.0	100 mg/ml	PS80 0.2% (w/v)

3	트리스 / 인산염 10 mM	7.0	100 mg/ml	PS80 0.3% (w/v)
---	-----------------	-----	-----------	-----------------

[0326] 0.22 μm 여과 직후, 제형 분석물 및 대조군에는 가시적 입자 및 미시적 입자가 없었다. SEC 분석은 4.5 mg/mL 내지 100 mg/mL의 리드 항체의 농도로 인하여 순도가 92.0% 이하임을 나타내었다(출발 DS는 3.0% HMW를 함유함).

[0327] 기계적인 스트레스는 제형 후보 사이를 식별하는 적절한 수단이었다. 출발 물질의 제한된 양의 이용가능성으로 인하여, 표준 목적 관찰이 가능하지 않았으며, 따라서 확대경 하 모세관에서의 관찰을 사용하였다. 가시적/미시적 입자에 관하여, 분석물 #12에 대한 양호한 안정성을 나타내는 후보는 하기와 같았다(도 11 참조):

[0328] · PS80 0.1%: #P12-6

[0329] · PS20 0.1%: #P12-8

[0330] 시험한 계면활성제 중에서, #P12-8(PS20 0.1%)을 제외하고 계면활성제가 없는 제형과 비교하여 어떤 것도 HMW 형성에 대하여 영향을 미치지 않았으며, 이는 5°C에서 6 주 저장에 걸쳐서 약간의 부정적인 효과를 미쳤다(도 12 참조).

[0331] 결론적으로, 계면활성제 사이에 강한 차이점은 없었다. 계면활성제 PS80이 가시적/미시적 입자 형성을 방지하기 위해 선택되었다.

[0332] 다음에, 다양한 농도의 PS80을 리드 항체 제형에서 시험하였다(표 23 참조). 0.05% 내지 0.2%의 PS80 농도를 350 rpm에서 15 시간 동안 흔들림 스트레스에 대하여 시험하였다(실온). 샘플을 유세포 현미경 검사에 의해 분석하였고, 결과는 표 9에 나타내어져 있다. 표 9는 0.05% 내지 0.2%의 PS80 농도는 흔들림 스트레스에 관한 모든 농도에 대하여 동등한 안정화 효과를 미친 것을 나타낸다. 따라서, 0.05% 내지 0.2%의 PS80 농도가 제형에서 사용될 수 있다.

표 9

[0333] PS80 농도

	350 rpm, 실온에서 15 시간		
	$\geq 2 \mu\text{m}$	$\geq 10 \mu\text{m}$	$\geq 25 \mu\text{m}$
F2(0.05% PS80)	2589	148	21
F3(0.07% PS80)	975	32	2
F4(0.1% PS80)	698	58	3
F5(0.2% PS80)	1969	98	16

[0334] FCM: mL 당 입자 수

[0335] 실시예 4 - 수크로스

[0336] 상기 진술한 바와 같이, 제형 개발 공정에서 다음 단계는 리드 항체 제형에 대한 최적의 부형제를 결정하는 것이었다. 부형제는 리드 항체를 안정화시키는 데 충분하여야 하며, 동결건조와 양립가능하여야 한다. 몇 가지 다양한 당, 예컨대 수크로스, 트레할로스, 및 만니톨을 다양한 농도로 시험하였다.

표 10

[0337] 분석물 #P14 - 동결건조물에 대한 첨가제 스크리닝

제형 #P14-x	완충 시스템	pH	강도	첨가제 1	첨가제 2	첨가제 3
1	인산염 10 mM	7.0	100 mg/바이알	PS80 0.1% (w/v)	-	-
2	인산염 10 mM	7.0	100 mg/바이알	PS80 0.1% (w/v)	수크로스 10% (w/v)	-
3	인산염 10 mM	7.0	100 mg/바이알	PS80 0.1% (w/v)	수크로스 5% (w/v)	만니톨 3% (w/v)
4	인산염 10 mM	7.0	100 mg/바이알	PS80 0.1% (w/v)	NaCl 70 mM	만니톨 3% (w/v)

5	인산염 10 mM	7.0	100 mg/바이알	PS80 0.1% (w/v)	NaCl 70 mM	만니톨 3% (w/v)
6	인산염 10 mM	7.0	100 mg/바이알	PS80 0.1% (w/v)	글리신 1% (w/v)	만니톨 3% (w/v)
7	인산염 10 mM	7.0	100 mg/바이알	PS80 0.3% (w/v)	수크로스 5% (w/v)	만니톨 3% (w/v)
8	트리스 10 mM	7.0	100 mg/바이알	PS80 0.1% (w/v)	수크로스 5% (w/v)	만니톨 3% (w/v)

표 11

[0338]

분석물 #P15 - 100 mg/ml에서 첨가제 스크리닝 - DoE

제형 #P15-x	완충 시스템	pH	농도	첨가제 1	첨가제 2	첨가제 3	첨가제 4
1	인산염 10 mM	7.0	100 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	수크로스 10%(w/v)	-	프롤린 5.8%(w/v)
2	인산염 10 mM	7.0	100 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	만니톨 3%(w/v)	-	프롤린 5.8%(w/v)
3	인산염 10 mM	7.0	100 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	트레할로스 10%(w/v)	-	-
4	인산염 10 mM	7.0	100 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	-	에탄올 2%(w/v)	글루탐산 7.3%(w/v)
5	인산염 10 mM	7.0	100 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	-	PEG 400 1% (w/v)	아스파르트산염 8.7%(w/v)
6	인산염 10 mM	7.0	100 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	트레할로스 10%(w/v)	-	아스파르트산염 8.7%(w/v)
7	인산염 10 mM	7.0	100 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	수크로스 10%(w/v)	글리세롤 5%(w/v)	글리신 1.9%(w/v)
8	인산염 10 mM	7.0	100 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	만니톨 3%(w/v)	PEG 400 1% (w/v)	-
9	트리스 10 mM	7.0	100 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	트레할로스 10%(w/v)	PEG 400 1% (w/v)	프롤린 5.8%(w/v)
10	트리스 10 mM	7.0	100 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	만니톨 3%(w/v)	-	아스파르트산염 8.7%(w/v)
11	트리스 10 mM		100 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	수크로스 10%(w/v)	에탄올 2%(w/v)	-
12	트리스 10 mM	7.0	100 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	-	글리세롤 5%(w/v)	-
13	트리스 10 mM		100 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	트레할로스 10%(w/v)	글리세롤 5%(w/v)	글루탐산 7.3%(w/v)
14	트리스 10 mM		100 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	-	-	글리신 1.9%(w/v)
15	트리스 10 mM	7.0	100 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	수크로스 10%(w/v)	-	글루탐산 7.3%(w/v)
16	트리스 10 mM	7.0	100 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	만니톨 3%(w/v)	에탄올 2%(w/v)	글리신 1.9%(w/v)

표 12

[0339]

분석물 #P16 - 동결건조물에 대한 첨가제 스크리닝 및 공정 개발

제형 #P16-x	완충 시스템	pH	강도	첨가제 1	첨가제 2	첨가제 3	첨가제 4
1	인산염 10 mM	7.0	100 mg/바이알	PS80 0.1%(w/v)	수크로스 5%(w/v)	만니톨 3%(w/v)	-
2	인산염 10 mM	7.0	100 mg/바이알	PS80 0.1%(w/v)	트레할로스 5%(w/v)	만니톨 3%(w/v)	-
3	인산염 10 mM	7.0	100 mg/바이알	PS80 0.05%(w/v)	수크로스 5%(w/v)	만니톨 3%(w/v)	-
4	인산염 10 mM	7.0	100 mg/바이알	PS80 0.1%(w/v)	수크로스 5%(w/v)	만니톨 3%(w/v)	PEG 4000 1%(w/v)

표 13

[0340]

분석물 #P17-FDS - 38 mg/mL에서 첨가제 스크리닝

제형 #P17-x-FDS	완충 시스템	pH	농도	첨가제 1	첨가제 2	첨가제 3
1	트리스 / 인산염 3.3 mM	7.0	38 mg/mL	PS80 0.033% (w/v)	수크로스 3.33% (w/v)	-
2	트리스 / 인산염 3.3 mM	7.0	38 mg/mL	PS80 0.033% (w/v)	수크로스 1.67% (w/v)	만니톨 1% (w/v)
3	트리스 / 인산염 3.3 mM	7.0	38 mg/mL	PS80 0.033% (w/v)	-	글리신 0.37% (w/v)

표 14

[0341]

분석물 #P17 - 동결건조물에 대한 첨가제 스크리닝 및 공정 개발

제형 #P17-x	완충 시스템	pH	강도	첨가제 1	첨가제 2	첨가제 3
1	트리스 / 인산염 10 mM	7.0	190 mg/바이알	PS80 0.1% (w/v)	수크로스 10%(w/v)	-
2	트리스 / 인산염 10 mM	7.0	190 mg/바이알	PS80 0.1% (w/v)	수크로스 5%(w/v)	만니톨 3%(w/v)
3	트리스 / 인산염 10 mM	7.0	190 mg/바이알	PS80 0.1% (w/v)	-	글리신 2.2%(w/v)

[0342]

결론적으로, 상기 연구를 기반으로 하여, 수크로스는 리드 항체를 안정화시켰으므로, 부형제로서 선택되었다. 추가적으로, 수크로스가 동결건조보호제이어서 동결건조된 제형을 개선시킬 것임이 잘 공지되어 있다. 사실, 수크로스를 이용하지 않은 동결건조는 HMW의 증가를 초래한다(도 19 참조). 또한, 5% 수크로스가 제형에 최적인 것으로 확인되었다.

[0343]

실시예 5 - 안정화제

[0344]

상기 진술한 바와 같이, 제형 개발 공정에서 다음 단계는 리드 항체 제형에 대한 최적의 부형제를 결정하는 것이었다. 부형제는 리드 항체를 안정화시키는 데 충분하여야 하며, 동결건조와 양립가능하여야 한다. 몇 가지 다양한 안정화제, 예컨대 만니톨, 아스파르트산염, 프롤린, 글리신, 아르기닌 및 류신을 다양한 농도로 시험하였다. 이는 하기 표 및 상기 표 10 내지 표 14에서 확인할 수 있다.

표 15

[0345]

분석물 #P18 - 동결건조물에 대한 첨가제 스크리닝 및 공정 개발

제형 #P18-x	완충 시스템	pH	강도	첨가제 1	첨가제 2	첨가제 3
1	트리스 / 인산염 10 mM	7.0	175 mg/바이알	PS80 0.1% (w/v)	수크로스 5% (w/v)	만니톨 3%(w/v)
2	트리스 / 인산염 10 mM	7.0	175 mg/바이알	PS80 0.1% (w/v)	수크로스 5% (w/v)	아스파르트산염 4.3%(w/v)
3	트리스 / 인산염 10 mM	7.0	175 mg/바이알	PS80 0.1% (w/v)	수크로스 5% (w/v)	프롤린 5.8%(w/v)

표 16

[0346]

분석물 #P20-FDS - 35 mg/mL에서 첨가제 스크리닝

제형 #P20-x-FDS	완충 시스템	pH	농도	첨가제 1	첨가제 2	첨가제 3
1	트리스 / 인산염 3.5 mM	7.0	35 mg/mL	PS80 0.07% (w/v)	수크로스 1.75%(w/v)	만니톨 1.05% (w/v)

2	트리스 / 인산염 3.5 mM	7.0	35 mg/mL	PS80 0.07% (w/v)	수크로스 1.75%(w/v)	아스파르트산염 1.05% (w/v)
3	트리스 / 인산염 3.5 mM	7.0	35 mg/mL	PS80 0.07% (w/v)	수크로스 1.75%(w/v)	프롤린 1.05% (w/v)
4	트리스 / 인산염 3.5 mM	7.0	35 mg/mL	PS80 0.07% (w/v)	수크로스 1.75%(w/v)	글리신 1.05% (w/v)
5	트리스 / 인산염 3.5 mM	7.0	35 mg/mL	PS80 0.07% (w/v)	수크로스 1.75%(w/v)	아르기닌 1.05% (w/v)

표 17

[0347]

분석물 #P20 - 동결건조물에 대한 첨가제 스크리닝 및 공정 개발

제형 #P20-x	완충 시스템	pH	강도	첨가제 1	첨가제 2	첨가제 3
1	트리스 / 인산염 10 mM	7.0	175 mg/vial	PS80 0.1% (w/v)	수크로스 5%(w/v)	만니톨 3% (w/v)
2	트리스 / 인산염 10 mM	7.0	175 mg/vial	PS80 0.1% (w/v)	수크로스 5%(w/v)	아스파르트산염 3% (w/v)
3	트리스 / 인산염 10 mM	7.0	175 mg/vial	PS80 0.1% (w/v)	수크로스 5%(w/v)	프롤린 3% (w/v)
4	트리스 / 인산염 10 mM	7.0	175 mg/vial	PS80 0.1% (w/v)	수크로스 5%(w/v)	글리신 3% (w/v)
5	트리스 / 인산염 10 mM	7.0	175 mg/vial	PS80 0.1% (w/v)	수크로스 5%(w/v)	아르기닌 3% (w/v)

표 18

[0348]

분석물 #P21 - 35 mg/mL에서 첨가제 스크리닝

제형 #P21-x	완충 시스템	pH	농도	첨가제 1	첨가제 2	첨가제 3
1	트리스 / 인산염 3.5 mM	7.0	35 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	수크로스 1%(w/v)	만니톨 3%(w/v)
2	트리스 / 인산염 3.5 mM	7.0	35 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	수크로스 1%(w/v)	설포부틸-에테르-β-사이클로덱스트린 3%(w/v)
3	트리스 / 인산염 3.5 mM	7.0	35 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	수크로스 1%(w/v)	N-아세틸-시스테인 3%(w/v)
4	트리스 / 인산염 3.5 mM	7.0	35 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	수크로스 1%(w/v)	류신 0.3%(w/v)
5	트리스 / 인산염 3.5 mM	7.0	35 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	수크로스 1%(w/v)	L-리신 모노클로르하이드레이트 3%(w/v)
6	트리스 / 인산염 3.5 mM	7.0	35 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	수크로스 1%(w/v)	N-아세틸-시스테인 0.03%(w/v)
7 ^c	트리스 / 인산염 3.5 mM	7.0	35 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	수크로스 1%(w/v)	만니톨 3%(w/v)
8	트리스 / 인산염 3.5 mM	7.0	35 mg/ml	PS80 0.01% (w/v)	-	-
^c #P21-1과 동일한 제형이지만, 5°C에서의 저장 동안 질소 덕분에 이 샘플은 불활성화됨						

[0349]

이 스크리닝의 목표는 HMW 형성에 관하여 리드 항체를 추가로 안정화시키는 첨가제를 찾는 것이었다(분석물 #12, 15, 20-FDS, 및 21). 응집에 대한 리드 항체의 높은 민감성으로 인하여, 의도된 장기간의 저장 온도(즉, 5 °C)는 첨가제의 효과를 모니터링하는 데 적절한 것으로 확인되었다.

[0350]

실험 설계(DoE)-스크리닝 모델의 제1 정도, D-최적 매트릭스는 HMW 형성에 대한 다양한 당, 폴리올, 아미노산 및 용매의 효과를 스크리닝하는 데 수행되었다(분석물 #15). 이러한 DoE의 결과는 표 19에 요약되어 있다.

표 19

[0351]

첨가제 스크리닝에 관한 분석물 #15(DoE)의 결과

파라미터	HMW	DSC	결론
당 및 폴리올	만니톨에 의한 약간의 안정화	수크로스 및 트레할로스에 의한 약간의 안정화	당 및 폴리올의 약간의 긍정적인 효과
아미노산	아스파르트산염에 의한 강한 안정화, 및 글리신, 프롤린 및 글루타민에 의한 약간의 안정화	아스파르트산염에 의한 안정화 및 글리신과 프롤린에 의한 약간의 안정화	아스파르트산염, 글리신 및 프롤린의 긍정적인 효과
용매	에탄올에 의한 강한 불안정화	에탄올에 의한 강한 불안정화	용매의 영향이 없거나 불안정화
완충 시스템	영향 없음	ND	완충 시스템 사이의 차이점 없음

[0352]

HMW에 대하여 영향을 미치는 것으로 확인된 첨가제는 분석물 #12 및 20-FDS에서 별개로 시험하였다:

[0353]

· 아미노산 글리신(#P12-1 및 P20-4-FDS) 및 프롤린(#P20-3-FDS)은 HMW 형성을 최소화하는 데 있어서 최상의 효과를 미치는 것으로 확인되었다(도 13 및 도 14 참조),

[0354]

· 만니톨(#P20-1-FDS)은 그 다음이었다(도 14 참조),

[0355]

· 그 다음은, 수크로스(#P12-3) 및 트레할로스(#P12-4), 이들은 훨씬 덜 효율적이었다(도 13 참조),

[0356]

· 마지막으로, 아스파르트산염 8%(#P20-2-FDS)의 긍정적인 효과는 4%의 농도에서 확인되지 않았다(도 14 참조).

[0357]

분석물 #21 동안 몇 가지 기타 다른 첨가제를 시험하였다:

[0358]

· 리신(#P21-5)은 HMW 형성에 대하여 약간의 긍정적인 효과를 미치는 것으로 확인되었다(도 15 참조),

[0359]

· 만니톨(#P21-1)은 이 분석에서 최상인 것으로 확인되었다.

[0360]

제형에의 프롤린의 첨가는 2 가지 효과, 즉 프롤린은 액체 제형에서 응집 속도를 감소시킴으로써 HMW 형성을 제어하고, 증량제로서 작용하여 동결건조된 제형에서 케이크를 더 고상하게 만드는 것으로 확인되었다. 또한 동결건조된 제형에 만니톨의 첨가는 케이크를 고상하게 되도록 야기하는 것으로 확인되었다.

[0361]

다음에, 다양한 농도의 프롤린을 리드 항체 제형에서 시험하였다(표 23 참조). 1% 및 3%의 농도를 시험하였다. 샘플을 UPLC에 의해 분석하였고, 결과는 표 20 및 표 21과 도 16에 나타내어져 있다. 표 20 및 표 21은 1% 또는 3%의 프롤린 농도가 제형에서 사용될 수 있음을 나타낸다. 이들 데이터는 또한 HMW 속도에 대한 프롤린의 긍정적인 효과를 확인한다. 더욱이, 케이크는 프롤린 3%를 이용할 때 약간 더 고상하고(덜 수축되고), 이는 밸러스 트로서 프롤린의 역할을 확인한다(결과는 나타내어져 있지 않음).

표 20

[0362]

1% 프롤린

F1(1% 프롤린)				
안정성 n° 2				
시간(h)	% 단량체(M)	1/M	1/M - 1/M0	%HMW
0	95.0	0.01053		4.2
3.5	92.6	0.01080	0.00027	6.6
7	90.6	0.01104	0.00051	8.7
24	82.0	0.01220	0.00167	17.4

표 21

[0363]

3% 프롤린

F5(3% 프롤린)				
안정성 n° 2				
시간(h)	% 단량체(M)	1/M	1/M - 1/M0	%HMW

0	95.3	0.01049		3.8
3.5	93.2	0.01073	0.00024	6
7	91.6	0.01092	0.00042	7.8
24	84.1	0.01189	0.00140	15.1

[0364] 결론적으로, HMW 형성이 부형제, 즉 만니톨 및 글리신과 프롤린 같은 아미노산의 첨가에 의해 상당히 감소되었지만, 100 mg/mL의 리드 항체 농도에서 유의한 효과는 만족스러운 저장 수명을 얻을 수 있을 정도로 충분히 강하지 않았다. 따라서, 동결건조 공정과 함께 동결건조된 제형을 개발하였다.

[0365] 실시예 6 - 동결건조된 제형

[0366] 냉동/건조 공정에 있어서, 리드 항체 농도가 20 mg/mL 내지 38 mg/mL 범위인 원하는 FDS 원형의 5 mL 내지 5.5 mL를 15 mL 바이알로 분배하였다(예로서 표 13 및 표 14 참조).

[0367] 냉동/건조 공정을 15 mL 바이알로 분배한 5 mL 내지 5.5 mL의 최종 제형에 근접하게 20 mg/mL 내지 38 mg/mL에서 사전 농축된 용액에 대하여 수행하였다.

[0368] Usifroid 사의 동결건조된 시스템의 3 가지 상이한 유형, 즉 PL45(분석물 #14), SMH-300(분석물 #17), 및 SMH-90(분석물 #16, 18, 20)을 사용하였다. 동결건조 사이클의 상세한 내용에 대해서는 표 22를 참조한다. 동결건조 단계 사이에서 변하는 온도의 기울기는 1°C/분이다.

표 22

[0369] 각각의 분석에 사용된 동결건조 사이클

분석물 #	냉동 온도 T _냉 동	T _{냉동} 에서의 길이	1 차 건조 온 도	1 차 건조 단계 의 지속기간 ^a	2 차 건조 온도	2 차 건조 단계의 지속기간	20°C에서 유지 시간 ^b
14	-45°C	100 분	-10°C	20 시간	30°C	7 시간	14 시간
16	-42°C	60 분	-25°C	46 시간	30°C	18 시간	18 시간
17	-45°C	60 분	-25°C	51 시간	30°C	21 시간	20 시간
18	-42°C	60 분	-25°C	37 시간	30°C	18 시간	18 시간
20	-42°C	60 분	-25°C	53 시간	40°C	18 시간	3 시간
^a 생성물 온도 측정에 따른 실험 동안 설정							
^b 사이클은 표준 작동 시간 동안에만 끝난다							

[0370] 그 다음 얻은 건조된 물질을 적절한 양의 WFI(1.0 mL 내지 1.6 mL)를 첨가함으로써 100 mg/mL의 목표로 하는 농도로 재구성하였다.

[0371] 동결건조 분석물 #P16-20에 있어서, 1 mL FDS 용액을 -20°C에서 냉동시키고, 실온에서 한 번 해동한 다음, 분석하였다.

[0372] 중간 DS(HAP 단계 후 - BD)의 냉동 및 해동을 또한 시험하였다(분석물 #9). 이 분석물에 대하여, 50 mL HDPE Nalgene 유리병 중 DS 20 mL를 -20°C와 -70°C 둘 다에서 냉동시키고, 실온에서 한 번 해동한 다음, 분석하였다.

[0373] 하기 분석 방법을 실행하였다:

[0374] · 외관(투명도 및 색상)에 대한 외관 검사

[0375] · 미시적 입자의 정량화를 위한 광 업페(HIAC)

[0376] · 단백질 순도에 대한 SEC

[0377] · 단백질 순도에 대한 SDS-PAGE

[0378] · 전하의 이질성에 대한 IEF

[0379] · 미시적 입자의 정량화를 위한 FCM

[0380] · 응집에 대한 DLS

- [0381] · 변성 온도에 대한 DSC
- [0382] · 콜로이드 안정성에 대한 SLS
- [0383] · 2 차 구조에 대한 FT-IR 분광분석
- [0384] · 3 차 구조에 대한 형광 분광 분석
- [0385] · (동결건조물에 대한) 잔류 수분 백분율 결정을 위한 Karl ficher
- [0386] · (동결건조물에 대한) 케이크의 결정질/비정형 매트릭스 결정에 대한 XRPD
- [0387] 제형 및 동결건조 공정의 선택에 대한 주요 기준은 하기와 같았다:
- [0388] 하기 파라미터를 모니터링하였다:
- [0389] · 동결건조 공정 동안 리드 항체의 안정성
- [0390] · 재구성된 용액의 안정성
- [0391] · FDS(동결건조 전 용액)의 안정성
- [0392] · 케이크의 고상성
- [0393] · 재구성 시간
- [0394] · 케이크의 안정성
- [0395] 동결건조 사이클은 케이크의 붕괴를 피하도록 선택되었다(표 22 참조):
- [0396] · 냉동 온도는 완전히 응고되는 온도 미만, 즉 유리 전이 온도(Tg')보다 약간 아래로 설정하였으며, 이는 각각의 FDS 후보(동결건조 전 용액)에 대하여 DSC에 의해 측정하였다(도 17 참조).
- [0397] · 1 차 건조 온도는 샘플의 온도가 붕괴 온도 미만(이는 Tg'에 근접함)을 유지하도록 설정하였다(도 17 참조).
- [0398] 다양한 동결건조 분석 동안 얻은 케이크는 모두 고상하였으며(도 18 참조), 재구성 시간은 5 분 이내이었다. 파라미터가 개발 동안 모니터링하는데 중요하였지만, 파라미터는 제형 사이를 식별하는 데 적절하지 않았다.
- [0399] 냉동 단계 동안, 리드 항체 농도 및 pH에서 상당한 변화를 회피하도록 1℃/분의 냉각 속도가 선택되었다. Karl fisher에 의해 측정된 케이크 중 잔류 수분의 수준을 1% 미만으로 얻도록 2 차 건조 온도가 선택되었다(표 22 참조).
- [0400] 리드 항체의 안정화를 순도에 있어서는 SEC 및 SDS-PAGE에 의해, 입자 형성에 있어서는 DLS 및 FCM에 의해 평가하였다. 제형 사이를 식별하는 데 적절한 기준은 재구성 전 및 후의 HMW 수준 및 재구성 후 미시적 입자 계수이었다.
- [0401] 동결건조 공정의 영향을 평가하기 위하여, 동결건조 전 및 재구성 후 HMW의 수준뿐만 아니라, 이 수준의 증가(동결건조 전 수준에 대한 백분율)를 각각의 제형에 대하여 나타내었다(도 19 및 도 20 참조). 각각의 도면에 있어서 점선은 10%의 증가를 나타낸다. 양호한 안정성을 제공하는 후보는 하기와 같았다:
- [0402] · 인산염과 수크로스 10%: #P14-2
- [0403] · 인산염 및 트리스와 수크로스 5% + 만니톨 3%: #P14-3 및 P14-8
- [0404] · 인산염과 만니톨 3% + 글리신 1%: #P14-6
- [0405] · 트리스/인산염과 수크로스 5% + 만니톨 3%: #P20-1
- [0406] · 트리스/인산염과 수크로스 5% + 아스파르트산염 3 %: #P20-2
- [0407] · 트리스/인산염과 수크로스 5% + 프롤린 3%: #P20-3
- [0408] · 트리스/인산염과 수크로스 5% + 글리신 3%: #P20-4
- [0409] 어떠한 부형제 없이(#P14-1), 동결건조 전 및 후에 HMW에 대하여 대략 130%의 증가가 관찰되었으므로 리드 항체는 동결건조 공정에 대하여 강하게 불안정적이었음을 주목한다. -20℃ 및 -70℃(분석물 #9)에서 DS에 대하여 수

행한 냉동/해동 사이클이 리드 항체의 강한 불안정화를 나타내었으므로(도 21 참조), 이러한 결과가 예상되며, 냉동은 동결건조 공정의 제1 단계이었다.

[0410] 미시적 입자에 관하여, FCM에 의한 재구성 용액 사이의 비교는 하기 후보에 대하여 더 양호한 안정성을 나타내었다:

[0411] · 트리스/인산염과 수크로스 5% + 프롤린 3%: #P20-3

[0412] · 트리스/인산염과 수크로스 5% + 글리신 3%: #P20-4

[0413] 주: 분석물 #14에 대해서는 측정되지 않음

[0414] 케이크의 재구성 후 리드 항체를 안정화시키기 위하여, 응집을 지연시키는 것으로 앞서 발견된 부형제를 사용하였다(액체 제형에 대한 부형제 스크리닝에 관한 섹션 참조). 재구성 후 리드 항체의 안정화는 순도에 대하여 SEC에 의해, 입자 형성에 대하여 DLS 및 FCM에 의해 평가되었다. 제형 사이를 식별하는 데 적절한 기준은 하기와 같았다:

[0415] · 재구성하고 24 시간 후 HMW의 수준(5℃에서 저장)

[0416] · 기계적 스트레스 후 입자의 수.

[0417] 재구성하고 24 시간 후 HMW 형성에 관하여(5℃에서 저장), 최상의 안정성을 제공하는 후보는 하기와 같았다(도 22 및 도 23 참조):

[0418] · 인산염과 만니톨 3% + 글리신 1%: #P14-6

[0419] · 트리스/인산염과 수크로스 5% + 프롤린 3 %: #P20-3

[0420] · 트리스/인산염과 수크로스 5% + 글리신 3%: #P20-4

[0421] 그 다음:

[0422] · 인산염과 수크로스 10%: #P14-2

[0423] · 인산염 및 트리스와 수크로스 5% + 만니톨 3%: #P14-3, P14-7 및 P14-8

[0424] · 트리스/인산염과 수크로스 5% + 만니톨 3%: #P20-1

[0425] 동결건조물의 안정성을 평가하기 위하여, 제조 직후 및 이후 1 개월(분석물 #16-20) 내지 2 개월(분석물 #18-20) 후에 재구성을 실시하였다. 동결건조물 후보를 5℃(분석물 #16-20) 및 20℃(분석물 #17)에서 저장하였다. 케이크의 안정성을 순도에 대하여 SEC에 의해, 입자 형성에 대하여 FCM에 의해, 케이크 구조에 대하여 XRPD에 의해 평가하였다.

[0426] HMW 및 가시적/미시적 입자 형성에 관하여, 5℃에서의 저장 동안 모든 제형은 안정적인 것으로 확인되었다(도 24 및 도 25 참조). 5℃에서 1 개월 후 분석물 #17 및 20 둘 다에 대하여 관찰된 HMW 수준에서의 약간의 증가는 하기 분석에서 재현되지 않았다(나타내지 않음). 더욱이, 20℃에서의 저장 동안 HMW 수준에서의 약간의 증가가 관찰되었다(도 24 참조).

[0427] DP의 품질을 보장하는 중요한 파라미터인 FDS 안정성은 분석물 #16-18 및 20에 대하여 고려되었다. 공정의 이 단계에서 리드 항체의 안정화는 순도에 대하여 SEC에 의해, 입자 형성에 대하여 DLS 및 FCM에 의해 평가되었다. 5℃에서의 저장은 리드 항체의 안정성에 대한 첨가제의 영향을 모니터링하는 데 적절한 것으로 확인되었다. FDS에 대하여 수행된 1 회의 냉동/해동 사이클은 또한 제형 사이를 식별하는 데 적절하였다.

[0428] 5℃에서의 저장 동안 리드 항체의 안정성에 대하여, 결과는 첨가제에 관한 섹션에 기술하였다(도 14 참조). 최상의 안정성은 하기에 대하여 얻어졌다:

[0429] · 트리스/인산염과 수크로스 1.75% + 프롤린 1.05%: #P20-3-FDS

[0430] · 트리스/인산염과 수크로스 1.75% + 글리신 1.05%: #P20-4-FDS

[0431] 그 다음:

[0432] · 트리스/인산염과 수크로스 1.75% + 만니톨 1.05%: #P20-1-FDS

[0433] 냉동/해동 사이클 1 회 후 리드 항체의 안정성에 관하여, FCM에 의해 수행한 입자 계수는 하기 제형 후보가 안

정적임을 나타내었다:

[0434] · 트리스/인산염과 수크로스 1.67% + 만니톨 1%: #P17-2-FDS

[0435] · 트리스/인산염과 수크로스 1.75% + 만니톨 1.05%: #P20-1-FDS

[0436] · 트리스/인산염과 수크로스 1.75% + 프롤린 1.05%: #P20-3-FDS

[0437] 결론적으로, 공정 동안 리드 항체의 안정성, 케이크의 양태 및 안정성뿐만 아니라 재구성 시간, 재구성된 용액 및 FDS의 안정성의 기준을 고려하여, 2 가지 제형 후보가 명백하게 두드러진다:

[0438] · 트리스/인산염과 수크로스 5% + 만니톨 3%

[0439] · 트리스/인산염과 수크로스 5% + 프롤린 3%

[0440] **실시예 2 내지 실시예 6에 대한 결론**

[0441] 사전 제형화 작업 동안, pH의 범위(7.0 이상), 완충 시스템(트리스/인산염)의 선택 및 계면활성제(0.2%의 농도로 폴리소르베이트 80)의 첨가에 기인하여 가시적/미시적 입자의 형성이 이루어졌다.

[0442] 그러나, HMW의 형성은 여전히 액체 제형에 대하여 문제가 있었다. HMW 형성이 최적의 pH(7.0) 및 일부 부형제(즉, 수크로스, 만니톨, 및 글리신 및 프롤린과 같은 아미노산)의 선택에 의해 상당히 감소되었지만, 100 mg/mL에서의 유의한 효과는 액체 제형에 대한 만족스러운 저장 수명을 예상하는 HMW의 형성을 충분히 예방하지 않았다.

[0443] 따라서, 동결건조된 제형이 동결건조 공정과 함께 개발되었다. 동결건조 공정 동안 응집을 방지하기 위하여, 동해방지제(5% 농도의 수크로스)가 선택되었다. 액체 제형을 위해 선택되는 안정화 부형제는 동결건조 공정에서 동결건조 전 액체(농도: 35 mg/mL) 및 재구성된 용액(농도: 100 mg/mL) 둘 다를 더 양호하게 안정화시키는지 시험되었다. 이들 부형제 중 몇몇은 동결건조 공정과 양립가능하며, 이들 중 2 개, 즉 만니톨과 프롤린(농도: 3%)이 선택되었다. 선택을 위한 주요 기준은 케이크의 안정성 및 고상성뿐만 아니라 FDS(동결건조 전 용액) 및 재구성된 용액의 안정성이었다.

[0444] 장기간 안정성에 놓인 2 가지 제형은 하나의 부형제와 상이하다(표 23 참조):

[0445] · 원형 1: 프롤린

[0446] · 원형 2: 만니톨

표 23

제형 기술

화합물	농도	작용
리드 항체	100 mg/mL	활성 성분
트리스/인산염	10 mM	완충제 - pH 7.0
폴리소르베이트 80	0.2% (p/v)	가시적/미시적 입자에 대한 안정화제
수크로스	5% (p/v)	동해방지제 + HMW에 대한 안정화제
원형 1: 프롤린 3%	3% (p/v)	HMW에 대한 안정화제 + 토닉제
원형 2: 만니톨 3%	3% (p/v)	HMW에 대한 안정화제 + 토닉제

[0448] **추가적인 제형 연구(실시예 7 및 실시예 8)**

[0449] 실시예 7 및 실시예 8에서 사용된 약어는 하기와 같다:

[0450] DP: 약품

[0451] DS: 약물 물질

[0452] FD: 제형 개발

[0453] FDS: 제형화된 약물 물질

[0454] FIM: 사람 우선

[0455] GRAS: 일반적으로 안전한 것으로 인식됨

[0456] HDPE: 고밀도 폴리에틸렌

[0457] HMW: 고분자량

[0458] IEF: 등전점 전기영동

[0459] IL: 인터루킨

[0460] LMW: 저분자량

[0461] PC: 폴리카르보네이트

[0462] PES: 폴리에테르설폰

[0463] PP: 폴리프로필렌

[0464] PVDF: 폴리비닐리덴 플루오라이드

[0465] RT: 실온

[0466] SC: 피하

[0467] Td1: 변성 제1 온도

[0468] TOR: 냉장 타임아웃

[0469] **요약**

[0470] 본 연구(실시에 7 및 실시예 8)의 목표는 액체 상태로 리드 항체의 HMW 형성에 대한 높은 경향에 관하여 FDS 안정성을 개선시키는 것이었다.

[0471] 연구 계획은 사전 제형 연구(실시에 2 내지 실시예 6)에서 획득한 사전 지식을 기반으로 하여 한정하였으며, 35 mg/mL으로 FDS 중 실온에서 HMW 형성의 속도에 초점을 맞추었다.

[0472] 사용한 모든 완충제 및 부형제는 이미 시판된 항체 제품 또는 비경구용 기타 다른 제품에서 사용되었으며, 특히 상기 완충제 및 부형제는 모두 GRAS(일반적으로 안전한 것으로 인식됨)이다. pH는 6.2 내지 7.4의 범위이다.

[0473] 50 개의 다양한 제형 전부를 표 23에 기술된 제형과 함께 비교하였다. 주요 결론은 하기와 같았다:

[0474] · 대략 6.2의 pH 값은 리드 항체 용해도를 감소시킨다: 겔 형성 및 침전이 각각 석신산염 및 히스티딘을 이용하여 관찰되었다

[0475] · 추가적으로, 용액이 유백색이고 약간 덜 열적으로 안정적이므로, 히스티딘은 pH 6.6에서 피하여야 한다

[0476] · 6.6 내지 7.4의 pH 범위에서, HMW 형성 속도에 대한 명백한 pH 효과가 없었다

[0477] · 이온 강도를 증가시키는 것은 HMW 형성 속도에 대하여 불안정화 효과를 가졌다

[0478] · 인산염 및 시트르산염은 1.75 mM와 같은 낮은 농도라면, 시험된 최상의 완충제이었다

[0479] · 시험된 모든 부형제 중에서, 최상의 안정화 효과는 글리신 10 mM 및 72 mM, 수크로스 2.4%를 이용하여 얻어졌다. 그러나, 안정화 효과는 본 발명자들이 HMW 형성을 상당히 지연시키지 않도록 했다.

[0480] 결론적으로, 실시예 7 및 실시예 8의 결과는 HMW 형성에 관하여 표 23에 기술된 제형을 상당히 개선시킬 수 있었던 부형제의 새로운 조합을 확인하지 않았다. 권고사항은 하기 제형(표 24 참조), 즉 인산염 6.5 mM/트리스 3.7 mM, pH 7.0, PS80 0.2%(w/v), 수크로스 5%(w/v), 프롤린 3%(w/v)을 유지하는 것이다.

표 24

제형 기술

[0481]

구성성분	농도
리드 항체	100 mg/mL
인산염	6.5 mM
트리스	3.7 mM

수크로스	5%(w/v)
프롤린	3%(w/v)
PS80	0.2%(w/v)

[0482] 도입

[0483] 리드 항체는 사이토카인 IL-4 및 IL-13을 표적으로 하는 조작된 인간화된 이중특이성 항체(BsAb)이다. 질량 분석법에 의해 측정된 바와 같이, 이의 분자량은 198 kDa이고, IEF에 의해 측정된 바와 같이 I_p 는 5.8 내지 6.2의 범위이다.

[0484] 주요한 DS 제조 공정 변화는 IIb 상에 대하여 이행되는 것이고, 비교가능성 연구는 I/IIa 상과 IIb DS과 DP 품질 사이에서 계획된다. DS 제조 변화의 부분으로서, 액체 상태로 HMW 형성을 감소시키는 것을 목적으로 하는 제형 연구를 실행하는 것이 결정되었다. 따라서, 제형의 잠재적인 개선은 비교가능성 연구에 포함될 수 있다.

[0485] 동시에, IIb 상에 대한 DP 제조 공정은, 규모 확대, FDS 해동, 및 DP 용량/150 mg/15 mL 바이알 대신에 100 mg/7 mL 바이알까지 바이알 변화에 대하여 최적화된다. 이 연구는 제형 개발과 동시에 수행된다.

[0486] 이 연구(실시에 7 및 실시예 8)에 대한 현재 표적 생성물 프로파일은 약품의 하기 특징을 규정한다:

- [0487] · 투여 경로: SC 주사
- [0488] · DP 형태: 동결건조
- [0489] · 농도: 100 mg/mL으로 재구성된 용액
- [0490] · 저장 수명: 24 개월
- [0491] · 저장 온도: 2°C 내지 8°C
- [0492] · 용량 강도: 100 mg/바이알
- [0493] · 1 차 용기: 7 mL의 1형의 관으로 된 투명한 유리 바이알

[0494] 약물 물질은 1 L의 폴리카르보네이트 유리병 중 -20°C에서 저장 이전에 35 mg/mL로 제형화되어야 한다. 냉동-건조 전에 어떠한 추가적인 부형제 또는 희석제가 실행되지 않는다.

[0495] FIM을 위한 사전 제형 및 제형 연구는 하기 조건을 허용하였다:

[0496] · 6.0 미만의 산성 pH(낮은 열적 및 콜로이드 안정성) 및 7.5 초과와 염기성 pH(열 스트레스 하 LMW 형성 및 전하 동형 변경)를 피한다.

[0497] · 가시적/미시적 입자는 완충 시스템, 즉 인산염/트리스(pH 7.0)와 조합하여 0.2%의 농도로 폴리소르베이트 80을 사용함으로써 상당히 감소되었다

[0498] · 리드 항체 농도를 이용한 HMW 형성 속도 증가, 및 시험된 제형은 본 발명자가 액체 제형에 대하여 만족스러운 저장 수명을 예상하는 100 mg/mL에서 HMW 형성을 충분히 방지하지 않았다.

[0499] · 액체 상태로 HMW 형성은 초기 부피(동결건조 전)의 1/3보다 약간 더 적은 동결건조된 DP 재구성된 것으로 개발 방향이 향하게 하여 35 mg/mL FDS로부터 100 mg/mL를 달성하였다. 동해방지제 및 동결건조보호제, 즉 5% 농도의 수크로스를 선택하였다.

[0500] · I 상 및 IIa 상에 대하여 선택된 제형은 인산염 6.5 mM/트리스 3.7 mM, pH 7.0, PS80 0.2%(w/v), 수크로스 5%(w/v), 프롤린 3%(w/v)와 같았다.

[0501] · 이 제형은 약간 긍정적인 효과를 가지는 것으로 확인된 부형제, 즉 수크로스, 만니톨 및 글리신과 프롤린과 같은 아미노산을 함함으로써 HMW 형성에 관하여 최적화될 수 있었다.

[0502] 액체 상태로 HMW 제형은 분해의 주요 경로인 것으로 확인되었다. 용액의 온도(DP 중 RT에서보다 5°C에서 10 배 더 지연됨) 및 리드 항체 농도와 함께 증가한다:

- [0503] · 35 mg/mL, RT에서 FDS: Δ HMW= 7 시간에서 +1.6%, + 24 시간에서 +4.1%
- [0504] · 100 mg/mL, RT에서 DP: Δ HMW= 1 시간에서 +0.6%, 5 시간에서 +3.5%

[0505]

목적

[0506]

본 연구(실시에 7 및 실시예 8)의 목표는 HMW 형성에 관하여 액체 상태로 리드 항체의 안정성을 증가시키는 것이었다. 이 연구에 대한 정량적인 표적을 설정하기 위하여, 하기 값을 제안하였다:

[0507]

· 사용 중 안정성에 대하여 DP 재구성 후 실온에서 5 시간: 5 시간 후 Δ HMW +1% 미만,

[0508]

· DP 제조를 용이하게 하기 위하여 FDS에 대하여 TOR 12 시간: 12 시간 후 Δ HMW +1% 미만.

[0509]

이들 목표 값은, 35 mg/mL에서 FDS가 냉장 조건을 벗어날 때 100 mg/mL에서 재구성된 DP의 사용 조건 및 공정 제조 조건을 고려한 것이다. 이들 값은 품질 표적 생성물 프로파일(Quality Target Product Profile)에 따라서 조정되어야 한다.

[0510]

연구 설계

[0511]

본 연구(실시에 7 및 실시예 8)에 대하여 제안된 접근법은 35 mg/mL의 리드 항체 농도에서 광범위한 제형에 대하여 합한 부형제를 스크리닝하는 것이었다.

[0512]

제형의 스크리닝은 HMW 형성에 잠재적으로 영향을 미칠 수 있는 안정화 부형제에 초점을 맞추었다. 이 연구에 있어서 하기가 결정되었다:

[0513]

· 제형의 I 상 농도에서 HMW 형성에 대한 부정적인 영향이 없는 것으로 입증되고 제조 공정 및/또는 재구성에 대한 강한 긍정적인 영향이 관찰되었으므로, 제형의 I 상 농도에서 PS80 및 수크로스는 스크리닝이 계속되었다.

[0514]

· 이전 연구는 pH 7 근처에서 pH를 유지하는 이익을 나타내었으므로 pH 범위는 6.2 내지 7.4로 엄격하게 하였다

[0515]

· 이러한 pH 범위 내에서 5 가지의 주사가 가능한 완충제가 몇 가지 부형제, 즉 기타 다른 완충 시스템 및/또는 첨가제(대부분 아미노산, 수크로스(I 상 제형에 이미 함유된 것에 추가적임) 및 염)와 조합하여 또는 단독으로 스크리닝되었다.

[0516]

약물 물질

[0517]

본 연구(실시에 7 및 실시예 8)에서 사용된 DS는 표 25에 기술되어 있다.

표 25

[0518]

DS 기술

배치 번호 #	유형	제조일	제조사	제형	농도	저장	분석에 사용
LT-10006-DS	FDS			인산염 2.22 mM/ 트리스 1.28 mM, 수크로스 1.75%, 프롤린 1.05%, PS80 0.07%	33 mg/mL	-20°C	H04-150 내지 190
VAB-YKR1-000079	DS			수크로스 2.1%	42 mg/mL	-20°C	H04-193

[0519]

약물 제품

[0520]

본 연구(실시에 7 및 실시예 8)에서 사용된 DP는 제형의 I/IIa 상과 함께 제형화되었다(인산염 6.5 mM/트리스 3.7 mM, pH 7.0, PS80 0.2%, 수크로스 5%, 프롤린 3%)(표 26 참조).

표 26

[0521]

DP 기술

DP 동결건조물 #	제조일	제조사	강도/포맷	FDS # 유래
H04-016			150 mg /15 mL 바이알	CER0315 및 CER0375
H04-046			150 mg /15 mL 바이알	CER0378, CER0382 및 CER0392

C1016207			150 mg /15 mL 바이알	GMP2
H04-193			100 mg /7 mL 바이알	H04-193

조제(들)

실시에 7 및 실시예 8의 각각의 분석에 대한 조제는 하기 표 27에 열거되어 있다.

표 27

조제

제형 분석물 #	완충 시스템	pH	부형제의 공칭 조성	공칭 농도(mg/mL)
H04-150 A1	석신산염 10 mM	6.2	수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-150 A2	석신산염 10 mM	6.2	트리스 10 mM - 수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-150 A3	석신산염 10 mM	6.2	히스티딘 10 mM - 수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-150 A4	석신산염 10 mM	6.2	프롤린 10 mM - 수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-150 A5	석신산염 10 mM	6.2	글리신 10 mM - 수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-150 A6	석신산염 10 mM	6.2	트리스 10 mM - 글리신 10 mM - 수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
예비 시험 (P-H04-144)	히스티딘 10 mM	6.2	수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
예비 시험 (P-H04-148)	히스티딘 10 mM	6.2	글리신 10 mM - 수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-150 B1	히스티딘 10 mM	6.6	수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-150 B2	히스티딘 10 mM	6.6	트리스 10 mM - 수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-150 B3	히스티딘 10 mM	6.6	프롤린 10 mM - 수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-150 B4	히스티딘 10 mM	6.6	글리신 10 mM - 수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-150 C	-	6.8	수크로스 2.1% - PS80 0.07%	36.25
H04-150 D	인산염 3.33 mM /트리스 1.92 mM	6.9	수크로스 8.42% - PS80 0.07%	36.25
H04-163 A1	시트르산염 10 mM	6.6	수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-163 A2	시트르산염 10 mM	6.6	트리스 10 mM - 수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-163 A3	시트르산염 10 mM	6.6	히스티딘 10 mM - 수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-163 A4	시트르산염 10 mM	6.6	프롤린 10 mM - 수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-163 A5	시트르산염 10 mM	6.6	글리신 10 mM - 수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-163 A6	시트르산염 10 mM	6.6	트리스 10 mM - 글리신 10 mM - 수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-163 B1	인산염 10 mM	6.6	수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-163 B2	인산염 10 mM	7.0	수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-163 B3	인산염 10 mM	7.0	트리스 10 mM - 수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-163 B4	인산염 10 mM	7.0	히스티딘 10 mM - 수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-163 B5	인산염 10 mM	7.0	프롤린 10 mM - 수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-163 B6	인산염 10 mM	7.0	글리신 10 mM - 수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-172 A1	트리스 10 mM	7.0	수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-172 A2	트리스 10 mM	7.4	수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25

H04-172 A3	트리스 10 mM	7.4	석신산염 10 mM NaCl 7.5 mM - 수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-172 A4	트리스 10 mM	7.0	히스티딘 10 mM - 수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-172 A5	트리스 10 mM	7.4	히스티딘 10 mM - 수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-172 A6	트리스 10 mM	7.4	글리신 10 mM - 수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-172 B1	인산염 1.75 mM	7.0	수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-172 B2	인산염 1.75 mM	7.0	수크로스 4% - PS80 0.07%	36.25
H04-185 A1	-	6.8	수크로스 4.15% - PS80 0.07%	36.25
H04-185 A2	-	6.8	글리신 72 mM - 수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-185 B1	인산염 1.75 mM	6.8	글리신 72 mM - 수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-185 B2	인산염 1.75 mM	6.8	수크로스 4.15% - PS80 0.07%	36.25
H04-185 B3	인산염 1.75 mM	6.8	벤조산나트륨 37.8 mM - 수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-185 B4	인산염 1.75 mM	6.8	NaCl 38.5 mM - 수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-185 B5	인산염 5.25 mM	6.8	글리신 72 mM - 수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-185 C1	시트르산염 5.25 mM	6.8	글리신 72 mM - 수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-185 C2	시트르산염 1.75 mM	6.8	글리신 72 mM - 수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-185 C3	시트르산염 1.75 mM	6.8	수크로스 4.15% - PS80 0.07%	36.25
H04-185 C4	시트르산염 10 mM	6.8	글리신 72 mM - 수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-185 D	인산염 2.22 mM / 트리스 1.28 mM	6.8	프롤린 91 mM - 수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-187 A1	인산염 2.22 mM / 트리스 1.28 mM	6.7	프롤린 91 mM - 수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-187 A2	인산염 2.22 mM / 트리스 1.28 mM	6.8	프롤린 91 mM - 수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-187 A3	인산염 2.22 mM / 트리스 1.28 mM	7.0	프롤린 91 mM - 수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-187 A4	인산염 2.22 mM / 트리스 1.28 mM	7.2	프롤린 91 mM - 수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
H04-190 A1	-	6.8	수크로스 20.5% - PS80 0.07%	20
H04-190 A2	-	6.8	수크로스 13.42% - PS80 0.07%	36.25
H04-190 A2	-	6.8	수크로스 1.75% - PS80 0.07%	36.25
<i>a</i> 부형제의 양은 w/v의 %로 표현됨				

[0525] **제조 공정**

[0526] 실시예 7 및 실시예 8에서 제형은 수크로스 2.1% 중 42 mg/mL의 농도로 UF/DF에 의해 얻은 리드 항체의 농축된 용액을 이용하여 제조하였다. 이러한 리드 항체 용액은 부형제의 농축된 원액으로 희석하였다.

[0527] **UF/DF 공정**

[0528] UF/DF 공정 동안(실시예 7 및 실시예 8), 35 mg/mL의 초기 단백질 용액을 우선 40 mg/mL으로 농축시킨 다음, 완충제를 교환하였다. 투석여과 후, 단백질 용액을 목표로 하는 최종 농도인 42 mg/mL 초과로 농축시켰다(표 28 참조).

[0529] 각각의 UF/DF의 공정 조건 및 사용된 물질은 표 28에 기술되어 있다. UF/DF 후, 리드 항체의 농도는 수크로스 2.1% 용액 중에서 42 mg/mL로 조정되었다.

표 28

[0530]

UF/DF 제조 파라미터

제형 분석물 #	막	비율: 단백질 의 g / 막의 m ² (g/m ²)	투석여과 동인 단 백질 농도 (mg/mL)	통과한 투석여 과 부피의 수	완충제 교환	UF/DF 후 단백질 농도 (mg/mL)
H04-137	Pellicon 3 [®] 0.11 m ²	216	40	9	수크로스 2.1%	48.5

[0531]

제형 조정

[0532]

UF/DF 후 리드 항체 용액(실시에 7 및 실시예 8)을 원하는 최종 제형까지 적절한 양의 농축된 원액으로 희석하였다. 본 연구를 위하여 제조된 농축된 용액의 조성 및 참조내용은 표 29에 요약되어 있다.

표 29

[0533]

농축된 원액 처방

제형 분석물 #	완충 시스템	부형제의 공칭 조성 ^a	조정된 pH
P -H04-138	석신산염 60 mM	-	5.9
P -H04-139	석신산염 60 mM	트리스 60 mM	5.9
P -H04-140	석신산염 60 mM	히스티딘 60 mM	6.2
P -H04-141	석신산염 60 mM	프롤린 60 mM	5.9
P -H04-142	석신산염 60 mM	글리신 60 mM	5.9
P -H04-143	석신산염 60 mM	트리스 60 mM - 글리신 60 mM	5.9
P -H04-144	히스티딘 60 mM	-	6.1
P -H04-145	히스티딘 60 mM	-	6.6
P -H04-146	히스티딘 60 mM	트리스 60 mM	6.4
P -H04-147	히스티딘 60 mM	프롤린 60 mM	6.5
P -H04-148	히스티딘 60 mM	글리신 60 mM	6.1
P -H04-149	히스티딘 60 mM	글리신 60 mM	6.6
(H04-150)	인산염 20 mM /트리스 11.5 mM	수크로스 40%	조정되지 않음
P -H04-151	시트르산염 60 mM	-	6.4
P -H04-152	시트르산염 60 mM	트리스 60 mM	6.3
P -H04-153	시트르산염 60 mM	히스티딘 60 mM	6.6
P -H04-154	시트르산염 60 mM	프롤린 60 mM	6.4
P -H04-155	시트르산염 60 mM	글리신 60 mM	6.4
P -H04-156	시트르산염 60 mM	트리스 60 mM- 글리신 60 mM	6.2
P -H04-157	인산염 60 mM	-	6.4
P -H04-158	인산염 60 mM	-	7
P -H04-159	인산염 60 mM	트리스 60 mM	6.9
P -H04-160	인산염 60 mM	히스티딘 60 mM	7
P -H04-161	인산염 60 mM	프롤린 60 mM	7
P -H04-162	인산염 60 mM	글리신 60 mM	6.8
P -H04-164	트리스 60 mM	-	7.3
P -H04-165	트리스 60 mM	-	7.7
P -H04-166	트리스 60 mM	석신산염 60 mM NaCl 45 mM	7.7
P -H04-167	트리스 60 mM	히스티딘 60 mM	7.2
P -H04-168	트리스 60 mM	히스티딘 60 mM	7.5
P -H04-169	트리스 60 mM	글리신 60 mM	7.6
P -H04-170	인산염 10.5 mM	-	7.2
P -H04-171	인산염 10.5 mM	수크로스 13.5%	7.2
P -H04-173	-	수크로스 14.4%	조정되지 않음
P -H04-174	-	글리신 432 mM	조정되지 않음
P -H04-175	인산염 10.5 mM	글리신 432 mM	6.8
P -H04-176	인산염 10.5 mM	수크로스 14.4%	6.8
P -H04-177	인산염 10.5 mM	벤조산나트륨 227 mM	6.8

P -H04-178	인산염 10.5 mM	NaCl 231 mM	6.8
P -H04-179	인산염 31.5 mM	글리신 432 mM	6.8
P -H04-180	시트르산염 31.5 mM	글리신 432 mM	6.8
P -H04-181	시트르산염 10.5 mM	글리신 432 mM	6.8
P -H04-182	시트르산염 10.5 mM	수크로스 14.4%	6.8
P -H04-183	시트르산염 60 mM	글리신 432 mM	6.8
P -H04-184	인산염 13.3 mM /트리스 7.7 mM	프롤린 547 mM	7
P -H04-186	인산염 13.3 mM /트리스 7.7 mM	프롤린 547 mM	6.5
P -H04-189 1	-	수크로스 37.5%	조정되지 않음
P -H04-189 2	-	수크로스 70%	조정되지 않음
<i>a</i> 부형제의 양은 w/v의 %로 표현			

[0534] 각각의 제형은 층류 하에서 멸균 여과하였으며(Millex[®] GV), 분획을 각각의 안정성 시점에 적절하게 2 mL의 I형 유리 바이알(1 mL 내지 2 mL)로 분배하고 마개를 하였다.

[0535] **스트레스 조건**

[0536] **열 스트레스**

[0537] 제형 분석에 따라서 실시예 7 및 실시예 8에서 실행된 열 스트레스 조건은 표 30에 열거되어 있다.

표 30

[0538] **열 스트레스 조건**

제형 분석물 #	온도 스트레스	스트레스 시간
H04-150	RT ^a 5°C ^b	일수: 1, 2 및 3 일수: 2, 3 및 6
H04-163	RT ^a 5°C ^b	일수: 1, 2 및 3 일수: 2, 3 및 7
H04-172	RT ^a 5°C ^b	일수: 1, 2, 3 및 6 일수: 2, 3 및 6
H04-185	RT ^a 5°C ^b	일수: 1, 2 및 3 일수: 2, 3 및 6
H04-187	RT ^a	16 시간, 24 시간 및 40 시간
H04-190	RT ^a	16 시간, 40 시간 및 48 시간
H04-193	5°C ^c 25°C ^c	21 시간, 30 시간 및 46 시간 21 시간, 30 시간 및 46 시간
<i>a</i>	실험실 에어컨으로 인하여, RT는 21°C 내지 29°C의 범위에 있음	
<i>b</i>	표준 비 GMP 냉장 챔버에서 실행됨	
<i>c</i>	GMP 항온 챔버	

[0539] **분석 방법 기술**

[0540] 하기 분석 방법을 실시예 7 및 실시예 8에서 실행하였다:

[0541] · 외관(투명도 및 색상)에 대한 외관 검사

[0542] - 7 mL 바이알 중 용액을 자연광으로 관찰하였다

- [0543] · 단백질 순도에 대한 HPLC-SEC
- [0544] - 2 개의 컬럼 PROSEC 300S- 250 x 4.6 mm, 35℃
- [0545] - 이동상: 인산염 0.1 M/NaCl 0.2 M pH 7.0
- [0546] - 검출: 280 nm
- [0547] - 주입: 10 μ L(농도 5 mg/mL)
- [0548] - 유속: 0.2 mL/분
- [0549] - 전체 실행 시간: 40 분
- [0550] 하기 분석 방법을 실행하였다:
- [0551] · 단백질 순도에 대한 UPLC-SEC
- [0552] - 컬럼: 1 Acquity BEH200 SEC(150 x 4.6 mm dp=1.7 μ m), 40℃
- [0553] - 이동상: Na₂HPO₄ 50 mM/NaClO₄ 300 mM, pH 7.0
- [0554] - 검출: 280 nm에서 UV
- [0555] - 주입: 1 μ L(5 mg/mL의 용액) 표준 3014ET
- [0556] - 주입: 2 μ L(2.0 mg/mL의 용액)
- [0557] - 유속: 0.3 mL/분
- [0558] - 전체 실행 시간: 8 분
- [0559] 하기 분석 방법을 모니터링하였다:
- [0560] · 변성 온도에 대한 DSC:
- [0561] - 시차주사 열량측정법(Differential Scanning Calorimetry; DSC)을 상이한 제형에서 항체의 열적 안정성을 평가하는 데 사용하였다.
- [0562] - 1℃/분의 가열 속도로 25℃에서 100℃까지 VP-Capillary DSC를 이용하여 열량 측정을 실행하였다.
- [0563] - 용량 곡선은 변성 온도 Td(℃)(최대 피크) 근처의 정보를 제공하였다.
- [0564] **평가 기준**
- [0565] · SEC: 차이가 HMW의 0.5% 이하일 때, 결과가 비슷한 것으로 간주하였다.
- [0566] · DSC: Td1에 대한 차이가 0.4℃ 이하일 때, 결과가 비슷한 것으로 간주하였다.
- [0567] **UPLC 대 HPLC 방법**
- [0568] 제1 스크리닝(분석물 #H04-150 내지 172)을 I 상에 대하여 개발된 HPLC 방법에 대하여 실행하였다. 매우 많은 샘플을 연이어 분석할 때, HMW 수준 결정에 영향을 주는 기준선의 불안정성에 대한 문제가 관찰되었다.
- [0569] 제2 스크리닝에 있어서(분석물 #H04-185 내지 190), 정확한 HMW 수준 변화를 얻기 위하여, 어떠한 불안정적인 기준선이 관찰되지 않은 UPLC 방법을 사용하였다. 심지어 200 개 초과 샘플을 동일한 컬럼에 주사한 후에도 표준물질의 동일한 크로마토그래피 프로파일이 관찰되었다.
- [0570] **SEC 측정에 대한 참고사항**
- [0571] 시간 경과에 따른 HMW 변화에 관한 상이한 시리즈를 비교하기 위하여, I 상 제형을 참조물질로서 사용하였다:
- [0572] · 제1 스크리닝에 대하여(분석물 #H04-150 내지 172), DP 동결건조물 #H04-016의 35 mg/mL으로 WFI를 이용한 재구성에 의해 3 개 시리즈의 각각에 대하여 FDS I 상이 얻어졌다.
- [0573] · 제2 스크리닝에 대하여(분석물 #H04-185 내지 190), 앞선 FDS I 상(H04-016)에 추가적으로, 시험된 제형과 함께 새로 제조된 다른 FDS I 상이 3 개 시리즈의 각각에 대하여 사용되었다. 더욱이, 3번째 FDS I 상 참

고물질(#LT-10006-DS), 즉 냉동 건조되지 않고 단지 해동만 시킨 FDS를 사용하였다.

[0574] 예상외로, HMW 속도는 다양한 참조물질 사이에서 상이한 것으로 나타났다. 비교를 위하여, 2 개의 추가적인 DP 동결건조물을 DP 동결건조물 #H04-016과 함께 시험하였다. DP 동결건조물 내의 차이점은 RT에서 40 시간 후에 상당히 되었다. 그러나, 해동된 참조물질인 #LT-10006-DS는 RT에서 16 시간으로부터 DP 동결건조물 전부와 상당히 상이하였다. DP 동결건조물은 해동된 참조물질인 #LT-10006-DS보다 더 빠른 HMW 속도를 나타내었으며, 따라서 본 연구에서 제조된 제형(본 연구를 위한 제형은 해동된 FDS로부터 제조하였음(제조 공정에 관한 섹션 참조))을 제형 I/IIa 상과 비교하는 데 사용될 수 없다.

[0575] 동일한 배치 및 새로 제조된 냉동-건조 DP를 사용하여, 해동된 FDS와 DP 동결건조물 사이에서 HMW 속도에 대한 어떠한 상당한 차이도 관찰되지 않았다. 따라서, 본 연구를 위하여 새로 제조된 제형에 대하여 관찰된 HMW 속도는 냉동-건조 후 동일한 제형에 대하여 역시 관찰될 것이었다.

[0576] 상기 분석으로부터 나온 결론은 모든 DP 동결건조물 및 모든 해동된 FDS에 대하여 일반화될 수 없다. 상이한 배치 사이에서 HMW 속도의 비교는 다양한 파라미터에 따라서 상이할 수 있으며, 구체적인 별개의 연구를 필요로 할 것이다.

[0577] 결과 및 논의

[0578] 실시예 7 및 실시예 8에서 제조된 모든 제형은 적어도 1.75%(w/v)의 수크로스 및 0.07%(w/v)에 근접한 PS80을 함유하였다. 이들 농도는 공칭 값이며, 리드 항체 출발 용액에 적용되는 희석 인자를 기반으로 한다. PS80 농도에 관하여, UF/DF 동안 PS80 흡착은 무시할 수 있는 정도인 것으로 추정하였다. 이들 부형제 농도는 제형 I 상과 동일하였다.

[0579] 실시예 7 - 완충 스크리닝

[0580] 본 실시예에서 pH는 6.2 에서 7.4까지 스크리닝하였고, 이 범위 내에서 모든 주입가능한 완충제, 즉 석신산염, 히스티딘, 시트르산염, 인산염, 및 트리스를 시험하였다.

[0581] A) 완충제 및 pH의 유형

[0582] 제1 스크리닝에서(분석물 #H04-150 내지 172), 상기 완충제를 실시예 8(첨가제 스크리닝)에 추가로 상술할 여러 가지 부형제와 조합하여 10 mM의 농도로 시험하였다. 완충제 농도는 10 mM로 고정하였고 HMW 형성에 대한 완충제의 영향은 완충제 농도에 관한 섹션(실시예 7)에서 보여질 것임을 주목한다.

[0583] DSC

[0584] DSC 결과는, 열적으로 약간 덜 안정적인 히스티딘 제형(Td1= 64.7°C 내지 65.1°C)을 제외하고, 모든 제형이 참고물질(Td1= 65.5°C)과 비슷함을 나타내었다(도 26 참조).

[0585] 초기 시간에서의 외관 검사

[0586] pH 6.2인 제형 및 pH 6.6인 히스티딘 제형을 제외하고, 모든 제형이 참고물질과 비슷하고 맑았다.

[0587] pH 6.2에서, 용해도의 감소는 시험한 완충제 둘 다에 대하여 관찰되었다:

[0588] · RT에서 히스티딘 제형 침전(도 27 참조)

[0589] · 석신산염 제형은 RT에서 약간 유백색이었고, 5°C에서 겔 형성이 관찰될 수 있으며(도 27 참조), 이는 용액이 RT로 되돌아가고 부드럽게 진탕될 때 가역적이었다. 석신산염은 킬레이트화 특성을 가질 수 있다.

[0590] pH 6.6에서 히스티딘 제형은 참고물질보다 RT에서 약간 더 유백색이었다.

[0591] SEC에 의한 HMW 변화

[0592] 여기에 제시된 결과는 3 개의 상이한 시리즈로부터의 것이므로, HMW 변화는 직접적으로 비교될 수는 없지만, 단지 참고물질과 비교될 수 있다.

[0593] · 히스티딘 pH 6.6은 참고물질과 RT에서 비슷하고 5°C에서 약간 더 양호하였다(히스티딘 단독에 대하여 +2.4%, 참고물질에 대하여 144 시간 후에 +3.2%).

[0594] · 시트르산염 pH 6.6은 RT에서 참고물질보다 약간 더 양호하고(시트르산염 단독에 대하여 +4.6%, 참고물질에 대하여 24 시간 후에 +5.2%), 5°C에서 참고물질과 비슷하였다.

- [0595] · 인산염 pH 6.6은 RT에서 참고물질보다 약간 더 양호하고(인산염 단독에 대하여 +8.2%, 참고물질에 대하여 48 시간 후에 +9.0%), 5℃에서 참고물질과 비슷하였다.
- [0596] · 인산염 pH 7은 RT 및 5℃에서 참고물질과 비슷하였다.
- [0597] · 트리스 pH 7은 RT에서 참고물질보다 약간 더 나뉘고(트리스 단독에 대하여 +7.8%, 참고물질에 대하여 48 시간 후에 +7.0%), 5℃에서 참고물질과 비슷하였다.
- [0598] · 트리스 pH 7.4는 RT 및 5℃에서 참고물질과 비슷하였다.
- [0599] 도 28을 참조한다.
- [0600] HMW 형성에 관하여, pH 6.6에서 인산염 및 시트르산염은 비슷하였고, pH 7.0에서 인산염은 트리스보다 약간 더 안정화하였다. 본 스크리닝에 사용되는 참조물질은 다른 배치로부터 제조된 동결건조물이었으므로, 10 mM에서 상기 완충제는 제형 I/IIa 상과 직접적으로 비교될 수 없다(상기 SEC 측정을 위한 참조물질에 관한 섹션 참조).
- [0601] **결론**
- [0602] 10 mM 농도에서 완충 시스템 스크리닝에 관하여, 하기와 같이 결론지어질 수 있다:
- [0603] · 6.2(pI에 근접) 근처의 pH 값은 리드 항체 용해성을 감소시킨다:
- [0604] - pH 6.2에서 석신산염을 이용하여 겔 형성이 관찰되었다
- [0605] pH 6.2에서 히스티딘을 이용하여 침전이 관찰되었다
- [0606] · 추가적으로, 용액은 유백색이고 열적으로 약간 덜 안정적이므로, 히스티딘은 pH 6.6을 피하여야 한다
- [0607] · 시험된 완충제, 즉 히스티딘, 시트르산염, 인산염 및 트리스에 있어서 HMW 형성에 대하여 6.6 내지 7.4의 범위 내에서 pH 효과의 명백한 성향은 없다.
- [0608] · 시트르산염 및 인산염이 10 mM에서 최상의 완충제인 것으로 나타났지만, HMW 제형에 관한 완충제의 매우 약한 효과
- [0609] **B) I/IIa 상 제형에 대한 pH의 미세 조정**
- [0610] 동일 실시예 있어서 HMW 제형에 대한 pH의 영향을 결정하기 위하여, I 상 제형(분석물 #H04-187)에 대하여 6.7 내지 7.2의 범위에 걸쳐서 pH를 스크리닝하였다.
- [0611] **DSC**
- [0612] DSC 결과는 모든 제형이 참고물질(pH 7.0)과 비슷하였음을 나타내었다(도 29 참조).
- [0613] **SEC에 의한 HMW 변화**
- [0614] 6.7에서 7.2까지 pH를 증가시킬 때 HMW 형성을 감소시키는 성향이 약간 있었지만(도 30 참조), 이는 RT에서 24 시간 후에만 상당히 되었다(pH 6.7에 대하여 +4.1%, pH 7.2에 대하여 +3.4%).
- [0615] **결론**
- [0616] 완충제 인산염 2.2 mM/트리스 1.3 mM(제형 I 상)을 이용하여, RT에서 24 시간 후 6.7 내지 7.2의 범위에 걸친 pH의 영향이 약간 있었다. 그러나, 이러한 영향은 처음 16 시간 동안에는 유의하지 않았으므로, 약하였다. 이는, 이러한 pH 범위에서 HMW 형성에 대한 pH의 약한 영향을 확인하였다.
- [0617] **C) 완충제 농도**
- [0618] HMW 형성(분석물 #H04-185)에 대한 완충제 농도의 영향을 조사하기 위하여 10 mM 미만의 더 작은 농도, 즉 0 mM, 1.75 mM, 및 5.25 mM에서 시트르산염 및 인산염을 시험하였다. pH는 시험한 범위에서 중간 지점, 즉 pH=6.8로 설정하였다. 모든 제형은, 결과 및 논의에 관한 섹션의 초반에 언급한 바와 같이, 삼투압을 조정하기 위한 글리신 72 mM, 1.75% 수크로스 및 대략 0.07% PS80을 함유하였다.
- [0619] **DSC**
- [0620] DSC 결과는 모든 제형이 참고물질(제형 I 상)과 비슷하였음을 나타내었다(도 31 참조). 완충제를 포함하지 않는 글리신(185A2)은 기타 다른 시험된 제형(Td1에서 약 1℃ 차이)보다 약간 덜 안정적이었음을 주목한다.

- [0621] SEC에 의한 HMW 변화
- [0622] 시험한 완충제 둘 다에 있어서, 완충제 농도를 감소시킬 때 HMW 형성을 감소시키는 성향이 약간 있었고, 최상의 결과는 완충제를 사용하지 않을 때와 완충제 중 1.75mM일 때 얻어졌다(예를 들어, 시트르산염 10 mM에 대하여 +7.8%, RT에서 48 시간 후 완충제가 없을 때에 대하여 +7.0%)(도 32를 참조). 1.75 mM의 시트르산염 및 완충제가 없는 것은 참조물질과 비슷하였다(예를 들어, 시트르산염에 대하여 +7.1%, RT에서 48 시간 후 완충제가 없을 때에 대하여 +7.0%, 반면 참조물질에 대하여 +6.8%).
- [0623] 결론
- [0624] 완충제 농도를 감소시키는 것은 HMW 형성 속도에 대하여 약간의 안정화 효과를 가졌다. 이러한 효과는 이온 강도와 관련이 있을 가능성이 있었다. 완충제가 없는 것과 완충제 시트르산염 1.75 mM은 HMW 형성의 관점에서 최상의 후보이었으며, 그 바로 다음에는 인산염 1.75 mM이었다. 글리신 72 mM로 시험한 이들 완충제는 제형 I/IIa 상과 비슷하였다.
- [0625] 실시예 8 - 첨가제 스크리닝
- [0626] 부형제 사이의 잠재적인 시너지를 결정하기 위하여, 첨가제인 글리신, 프롤린, 히스티딘, 및 트리스의 스크리닝을 완충제 스크리닝(제1 스크리닝: 분석물 #H04-150 내지 172)과 조합하여 수행하였다. 첨가제 염화나트륨, 벤조산나트륨, 글리신, 및 수크로스의 스크리닝(제2 스크리닝: 분석물 #H04-185 내지 190)은, 제1 스크리닝으로부터 최상인 것으로 선택된 완충제인 인산염 또는 시트르산염에 대하여 수행하였다(실시예 7).
- [0627] 제형은 1.75% 수크로스 및 대략 0.07% PS80을 함유하였다.
- [0628] A) 염화나트륨 및 벤조산나트륨
- [0629] 염화나트륨 및 벤조산나트륨을 시험하여 HMW 형성에 대한 이온 강도 및 소수성 상호작용의 효과를 각각 평가하였다. 이들 첨가제는 제형 I 상의 삼투압(FDS 중 165 mOsm/kg)을 초과하지 않는 농도에서 인산염 1.75 mM pH 6.8에 대하여 시험하였다.
- [0630] DSC
- [0631] DSC 결과는 NaCl 제형이 참조물질과 비슷한 반면(Td1= NaCl에 대하여 65.7°C, 참조물질에 대하여 65.6°C), 벤조산나트륨 제형은 열적으로 약간 덜 안정적이었음(Td1= 65.0°C)을 나타내었다.
- [0632] SEC에 의한 HMW 변화
- [0633] 시험한 첨가제 둘 다에 있어서, 참조물질과 비교하여 HMW 형성에 대한 명백한 부정적인 영향이 있었다(예를 들어 NaCl에 대하여 38.5 mM에서 +5.2%, 벤조산나트륨에 대하여 37.8 mM에서 +5.2%, 참조물질에 대하여 RT에서 24 시간 후에 +3.2%). 변화는 2 가지 부형제에 대하여 유사하며, NaCl 결과만 본원에 나타낸다(도 33 참조).
- [0634] 결론
- [0635] 완충제 농도에 대하여 나타낸 바와 같이, NaCl 또는 벤조산나트륨을 이용한 이온 강도의 증가는 HMW 형성 속도에 대하여 명백한 부정적인 영향을 미쳤다. 더욱이, HMW 속도에 대한 소수성 상호작용의 영향은 벤조산나트륨의 첨가로 인하여 관찰되지 않았다.
- [0636] B) 글리신, 프롤린, 히스티딘 및 트리스
- [0637] 이들 첨가제(글리신, 프롤린, 히스티딘, 및 트리스)를 10 mM의 농도에서 시험하였다(제1 스크리닝: 분석물 #H04-150 내지 172).
- [0638] DSC
- [0639] DSC 결과는 상기 첨가제를 포함하는 모든 제형이 첨가제가 없는(완충제만을 포함) 제형과 비슷하였음을 나타내었다.
- [0640] SEC에 의한 HMW 변화
- [0641] RT에서 48 시간 후 및 5°C에서 6 일 후에 성향이 보일 수 있었지만, 제형 간의 차이는 약하였다:
- [0642] · 히스티딘 완충제:

[0643] - RT에서: \emptyset (첨가제 없음) = 글리신 > 프롤린 > 트리스

[0644] - 5℃에서: \emptyset > 글리신 = 프롤린 > 트리스

[0645] · 시트르산염 완충제:

[0646] - RT에서: 글리신 > 프롤린 = 히스티딘 = 트리스 = (트리스 + 글리신) > \emptyset

[0647] - 5℃에서: 글리신 > 프롤린 = 히스티딘 = 트리스 = (트리스 + 글리신) = \emptyset

[0648] · 인산염 완충제

[0649] - RT에서: 글리신 = 프롤린 = \emptyset > 히스티딘 = 트리스

[0650] - 5℃에서: 글리신 > 프롤린 = \emptyset = 히스티딘 = 트리스

[0651] · 트리스 완충제:

[0652] - RT에서: 글리신 > \emptyset = 히스티딘

[0653] - 5℃에서: 글리신 = \emptyset = 히스티딘

[0654] 결론

[0655] HMW 형성에 관하여, 하기와 같은 성향이 관찰될 수 있었지만 이들 첨가제의 영향은 약하였다:

[0656] · 글리신은 10 mM에서 약간의 긍정적인 효과를 가졌다

[0657] · 히스티딘 및 프롤린은 10 mM에서 아무런 영향이 없는 것으로 보였다

[0658] · 트리스는 10 mM에서 안정화 효과를 가지지 않으며, 심지어 약간의 불안정화 효과를 가질 수 있었다

[0659] C) 수크로스 및 글리신

[0660] 제2 스크리닝(분석물 #H04-185)에 있어서, 추가적인 양의 수크로스 2.4%(모든 제형에서 이미 함유되어 있는 1.75%의 수크로스에 추가적으로, 이는 총 4.15%(w/v)의 수크로스를 제공함) 및 72 mM 농도로 글리신을 최상인 것으로 선택된 완충제에 대하여 시험하였다(완충제 스크리닝에 관한 섹션 참조). 제형 I 상 삼투압(FDS 중 165 mOsm/kg)을 초과하지 않도록, 이들 농도를 최대화하였다.

[0661] DSC

[0662] DSC 결과는 모든 수크로스 2.4% 및 글리신 72mM 제형이 참조물질과 비슷하였음을 나타내었다(예를 들어, 수크로스의 경우에, 인산염 1.75 mM에 대하여 Td1= 65.7℃, 참조물질에 대하여 Td1=65.6℃).

[0663] SEC에 의한 HMW 변화

[0664] 시트르산염 1.75 mM에 대한 제형 및 완충제를 함유하지 않는 제형을 함유하는 수크로스와만 비교할 때 글리신의 약한 긍정적인 영향이 확인되었다(도 34 참조). 그러나, 이러한 긍정적인 영향은 RT에서 48 시간 후에만 상당하였다.

[0665] 결론

[0666] HMW 형성에 관하여, 관심이 있는 기간(RT에서 24 시간 미만)에 대하여 최상의 완충제 후보에 대하여 시험한 수크로스 및 글리신 제형은 제형 I 상과 비슷하였다.

[0667] 실시예 7 및 실시예 8에 대한 결론

[0668] 본 연구에 있어서, 대략 50 개의 제형을 제조하고 현재 I/IIa 상 제형과 비교하였다. 부형제 사이의 잠재적인 시너지를 평가하기 위하여, pH 스크리닝은 몇 가지 부형제(모두 GRAS)와 함께 또는 단독으로 6.2 내지 7.4의 범위(이 pH 범위 내에 모든 주사가 가능한 완충제를 포함함)이었다.

[0669] 주요 결론은 하기와 같다:

[0670] · 대략 6.2의 pH 값은 리드 항체 용해도를 감소시킨다: 석신산염 및 히스티딘 각각을 이용하여 겔 형성 및 침전이 관찰되었다;

[0671] · 추가적으로, 용액이 유백색이고 열적으로 약간 덜 안정적이므로, 히스티딘은 pH 6.6에서 피하여야

한다;

- [0672] · 6.6 내지 7.4의 pH 범위에서, HMW 형성 속도에 대한 명백한 pH 효과가 없었다;
- [0673] · 이온 강도를 증가시키는 것은 HMW 형성 속도에 대하여 불안정화 효과를 가졌다;
- [0674] · 인산염 및 시트르산염은 1.75 mM과 같은 낮은 농도라면, 시험된 최상의 완충제이었다;
- [0675] · 시험된 모든 부형제 중에서, 최상의 안정화 효과는 글리신 10 mM 및 72 mM, 및 수크로스 2.4%를 이용하여 얻어졌다. 그러나 안정화 효과는 HMW 형성을 상당히 지연시키는 것을 허용하지 않았다;
- [0676] · 프롤린(10 mM에서 효과가 없음)은 등장화제로서 사용될 수 있다(91 mM(FDS I 상 제형 중 프롤린 농도)의 프롤린의 효과는 HMW 형성에 관하여 평가되지 않았음(예를 들어 프롤린과 함께, 프롤린 없이 FDS 제형 I 상을 평가함)).
- [0677] 결론적으로, 실시예 7 및 실시예 8의 결과는 HMW 제형에 관하여 현재 제형을 상당히 개선시킬 수 있는 부형제의 새로운 조합을 확인하지 않았다. 즉, 실시예 7 및 실시예 8의 결과는 실시예 1 내지 실시예 6의 결과를 확인한다. 권고사항은 IIb 상 연구를 위하여 현재 I/IIa 상 제형을 유지하는 것이었다. 그러므로, 현재 제형은 하기와 같았다(표 31 참조): 인산염 6.5 mM/트리스 3.7 mM, pH 7.0, PS80 0.2%(w/v), 수크로스 5%(w/v), 프롤린 3%(w/v).

표 31

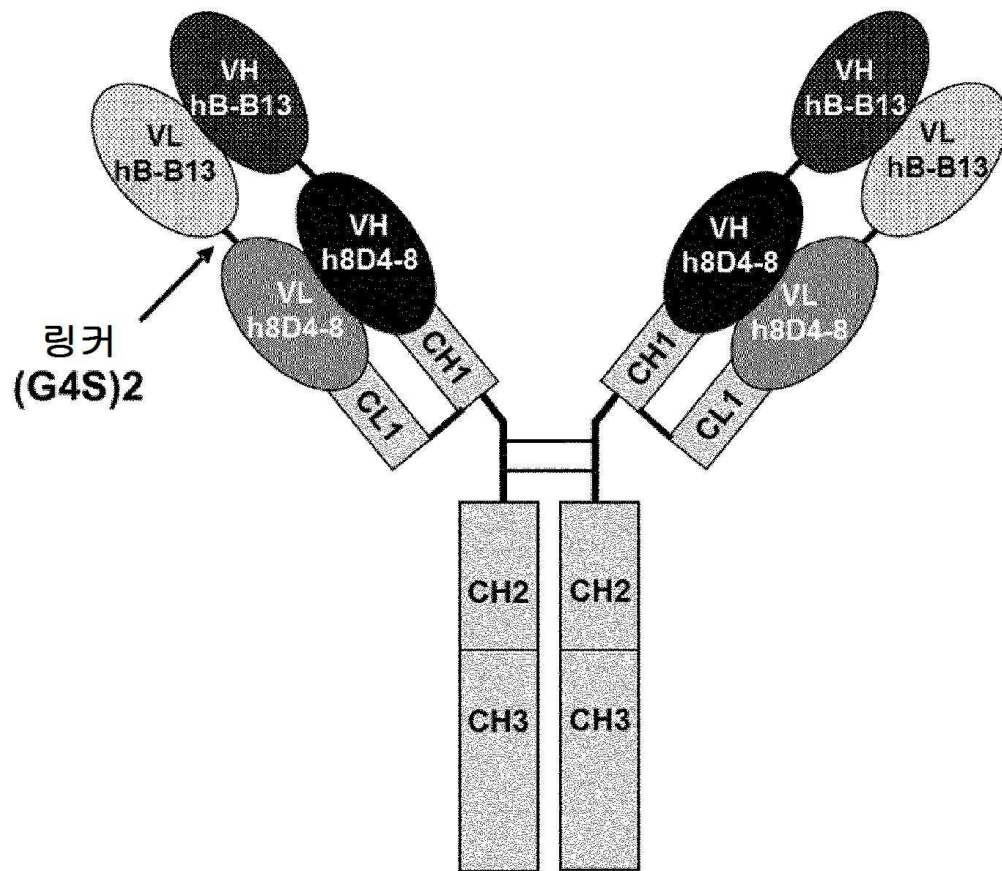
- [0678] I/ IIa/ IIb 상 제형 기술

구성성분	농도
리드 항체	100 mg/mL
인산염	6.5 mM
트리스	3.7 mM
수크로스	5%(w/v)
프롤린	3%(w/v)
PS80	0.2%(w/v)

- [0679] 현재 제형의 정량적인 조정(새로운 부형제의 첨가 없이 부형제 농도의 미세 조정)은 III 상/상업적 제형에 대하여 실행될 수 있다.

도면

도면1



도면2

항-IL13 hB-B13 VL3 (서열번호 1):

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISC**RASESVD SYGQSYM**HWY QQKAGQPPKL
LIY**LASNLES** GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVQAEDAATY YC**QQNAEDSR**
TFGGGTKLEI K

Anti-IL13 hB-B13 VH2 (서열번호 2):

EVQLKESGPG LVAPGGSLSI TCTVS**GFSLT DSSIN**WVRQP PGKGLEWLGK
IW**DGRIDYA** DALKSRLSIS KDSSKSQVFL EMTSLRTDDT ATYYCARD**GY**
FPYAMDFWGQ GTSVTVSS

항-IL4 h8D4-8 VL1 (서열번호 3):

DIQMTQSPAS LSVSVGDTIT LT**CHASQ**NID **VWLSWFQ**QKP GNIPKLLIY**K**
ASNLHTGVPS RFSGSGSGTG FTLTISSLPQ EDIATYYC**QQ AHSYP**FTFGG
GTKLEIKR

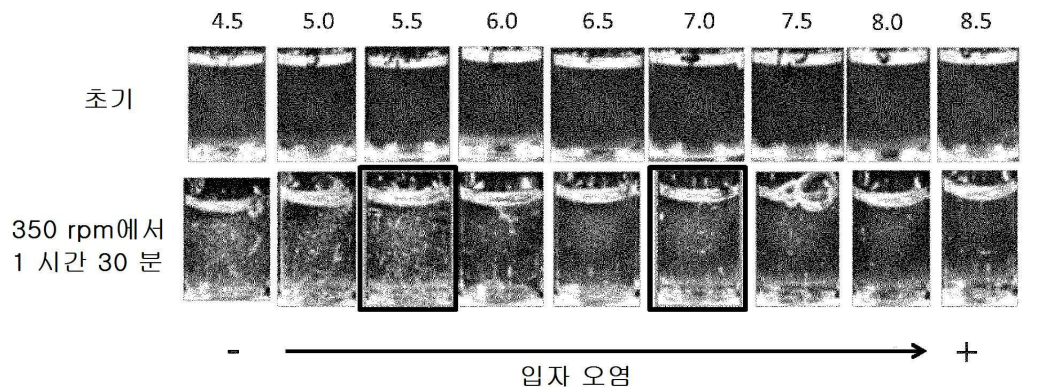
항-IL4 h8D4-8 VH1 (서열번호 4):

QVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKAS**GYSFT SYWIH**WIKQR PGQGLEWIGK
IDPSDGETRL NQRFQGRATL TVDE**ST**STAY MQLRSPTSED SAVYYCTR**LK**
EYGNYDSFYF DVWGAGTLVT VSSA

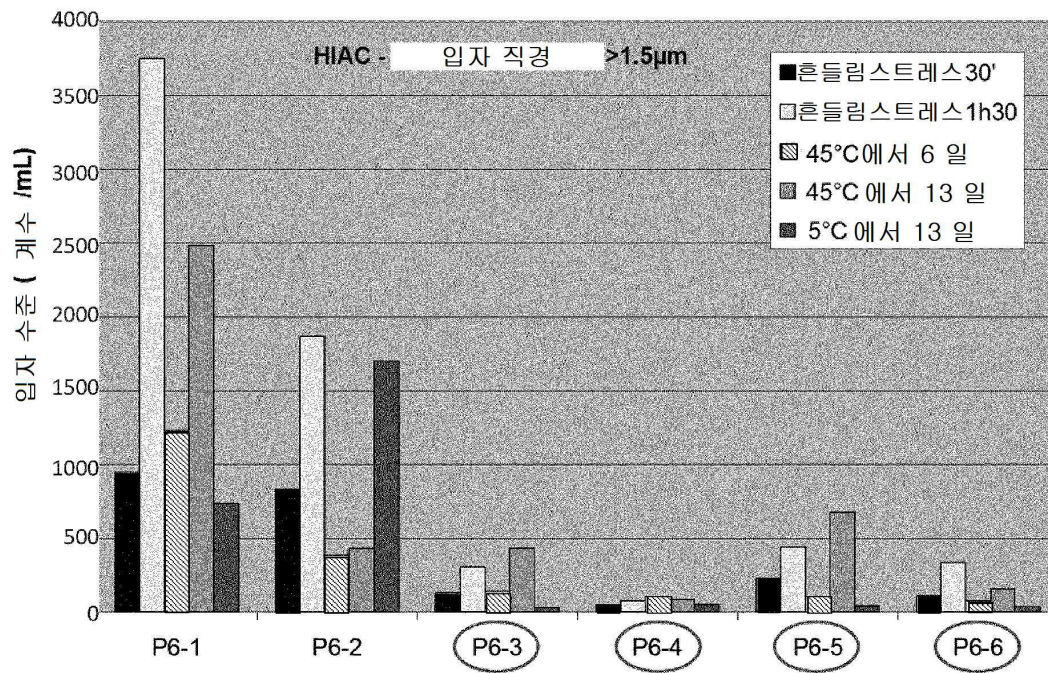
항-IL4 h8D4-8 VH2 (서열번호 5):

QVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKAS**GYSFT SYWIH**WIKQR PGQGLEWIGK
IDASDGETRL NQRFQGRATL TVDE**ST**STAY MQLRSPTSED SAVYYCTR**LK**
EYGNYDSFYF DVWGAGTLVT VSSA

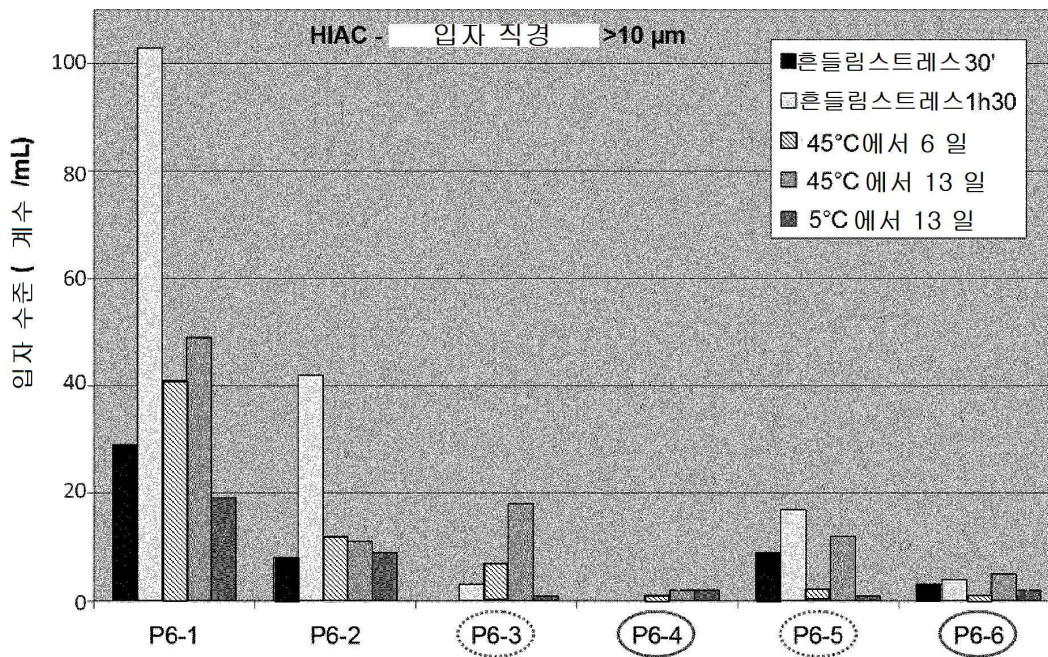
도면3



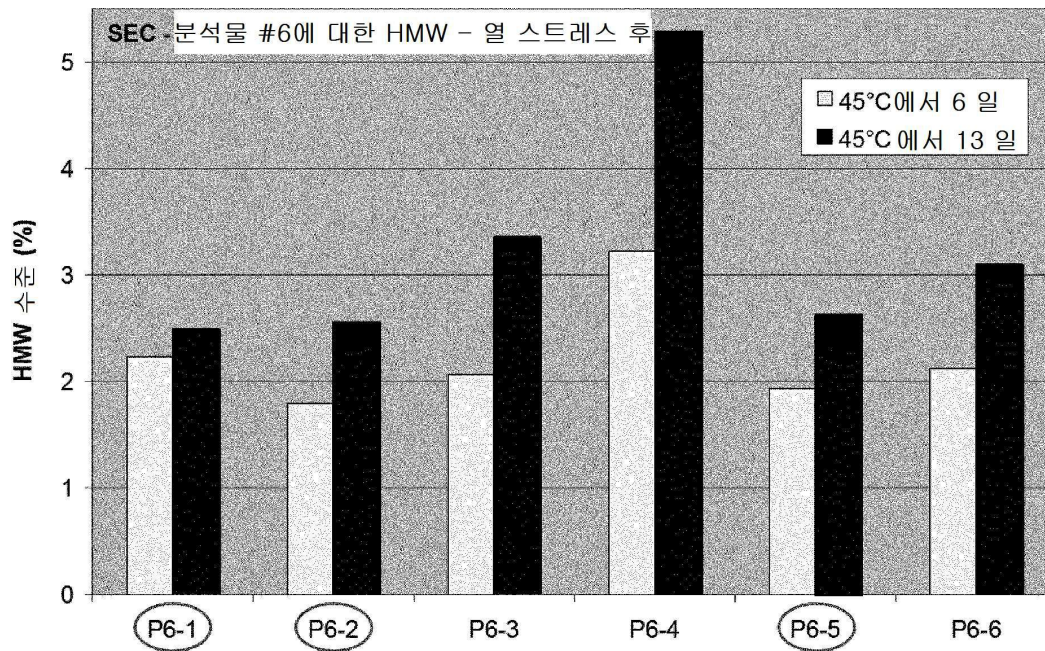
도면4



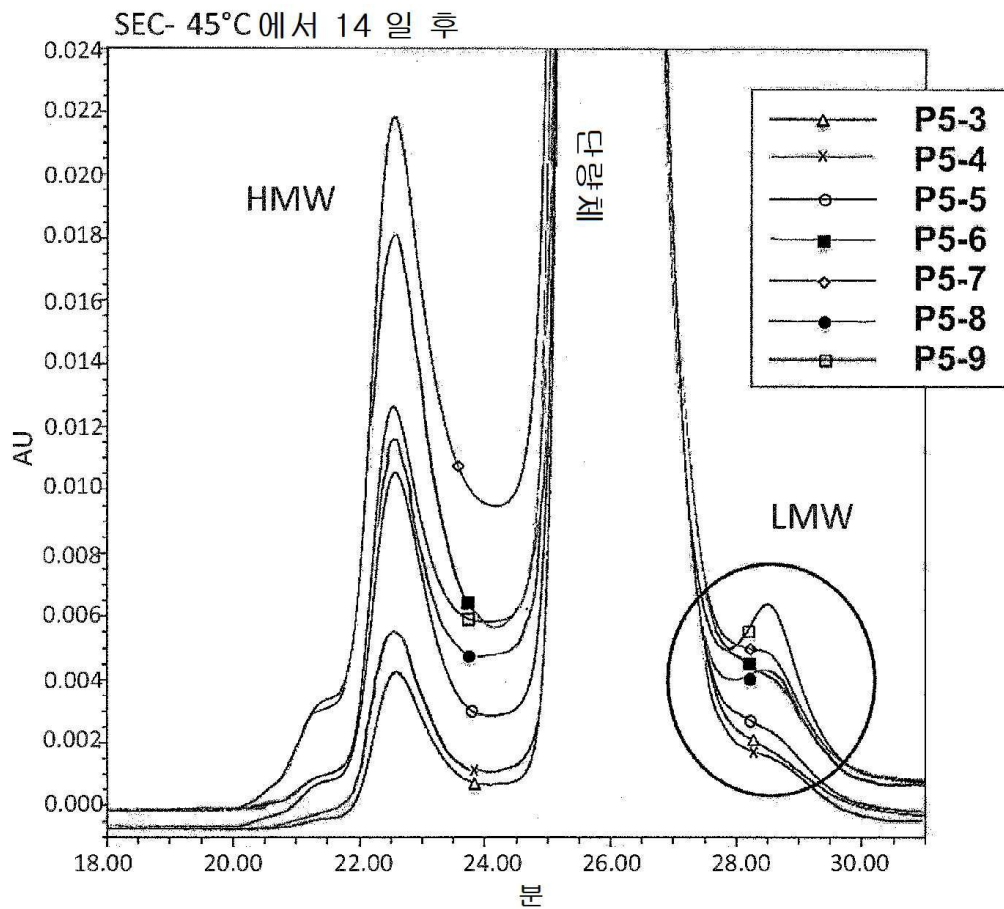
도면5



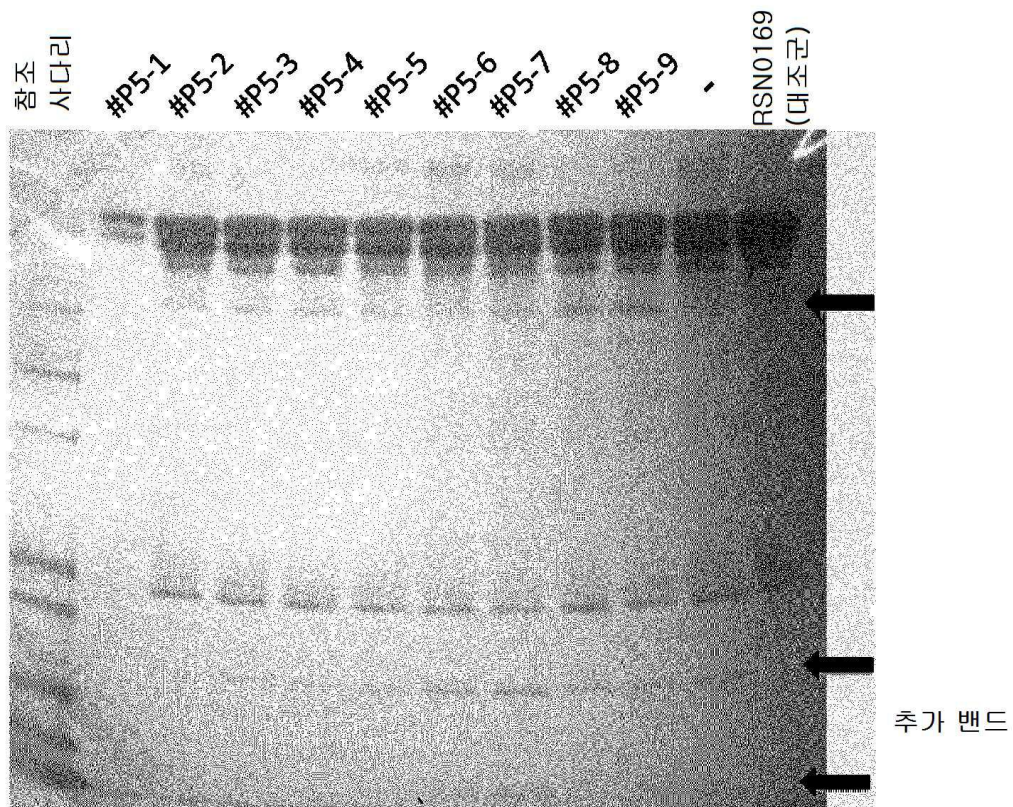
도면6



도면7

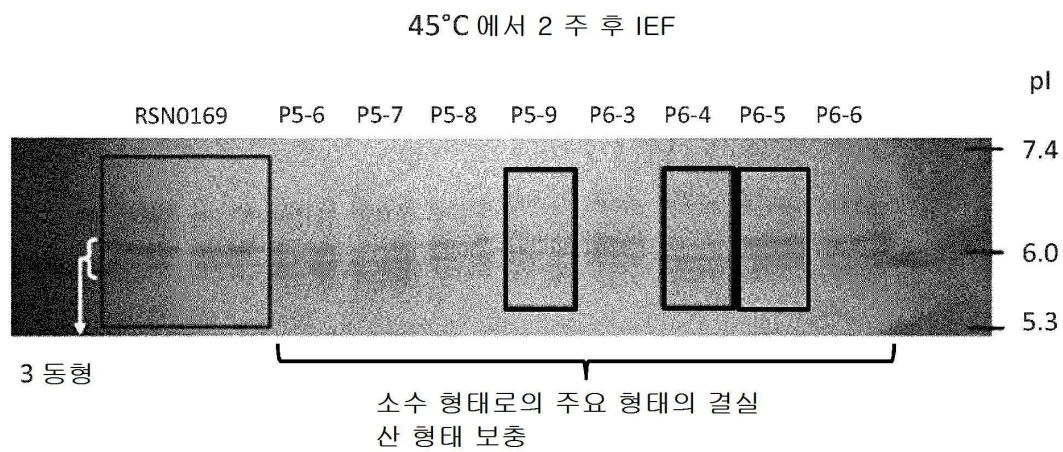


도면8

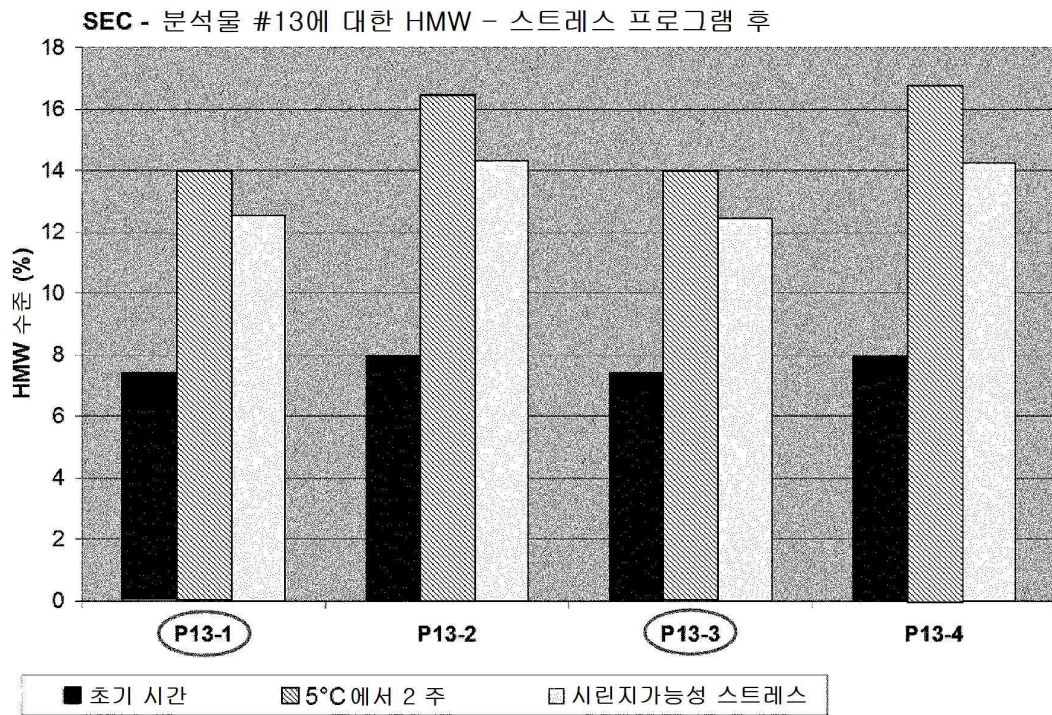


SDS-PAGE: 45°C 에서 2 주

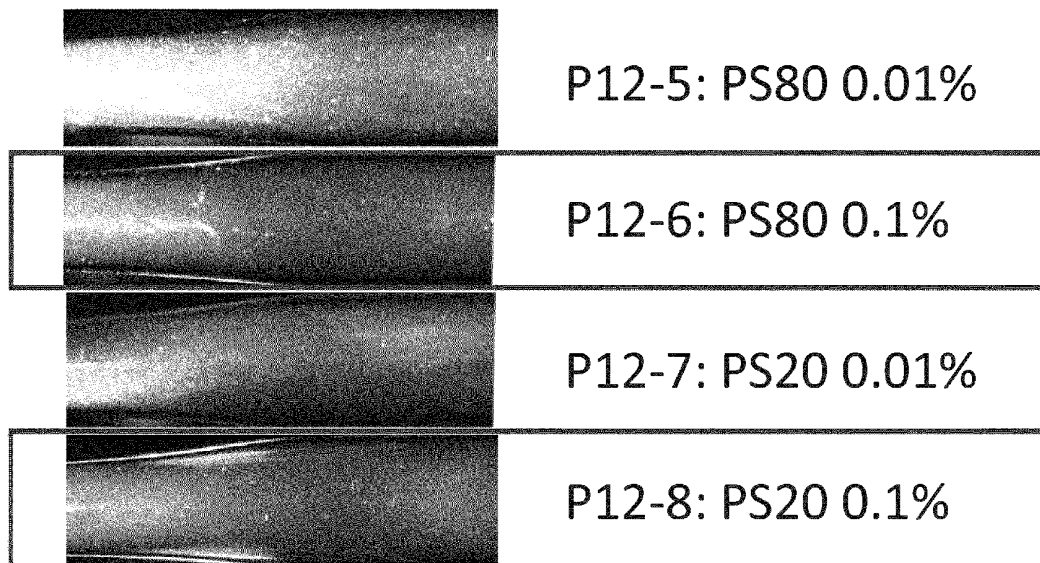
도면9



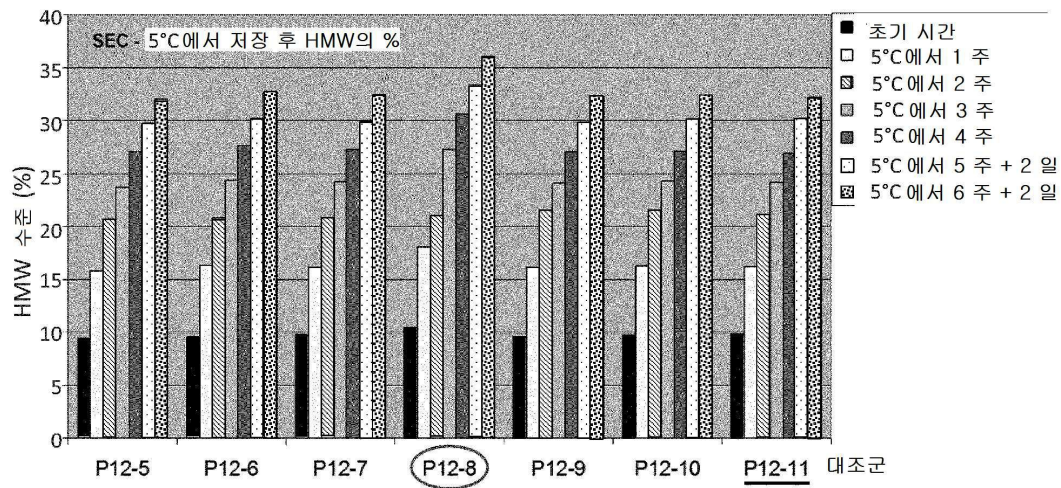
도면10



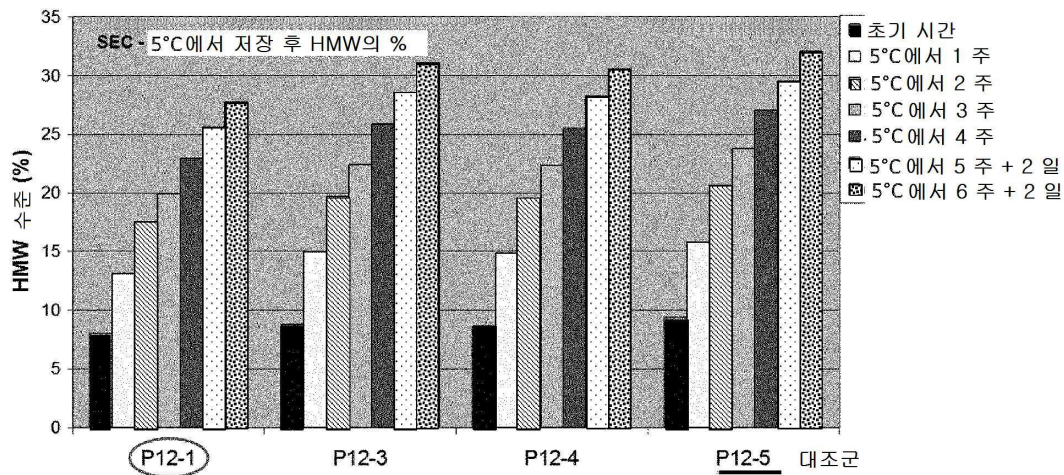
도면11



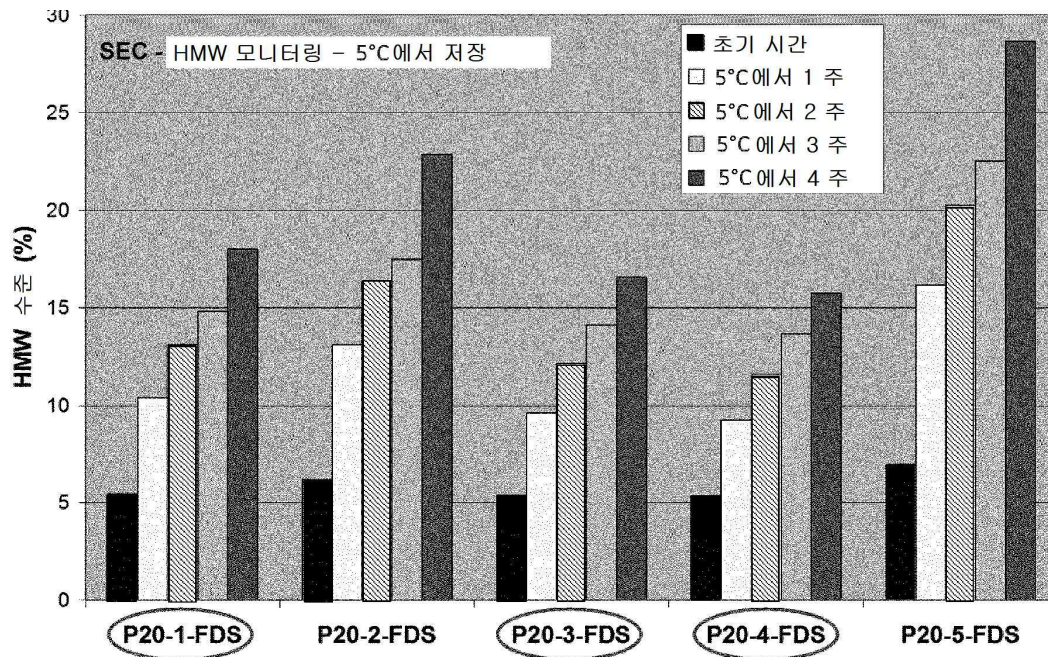
도면12



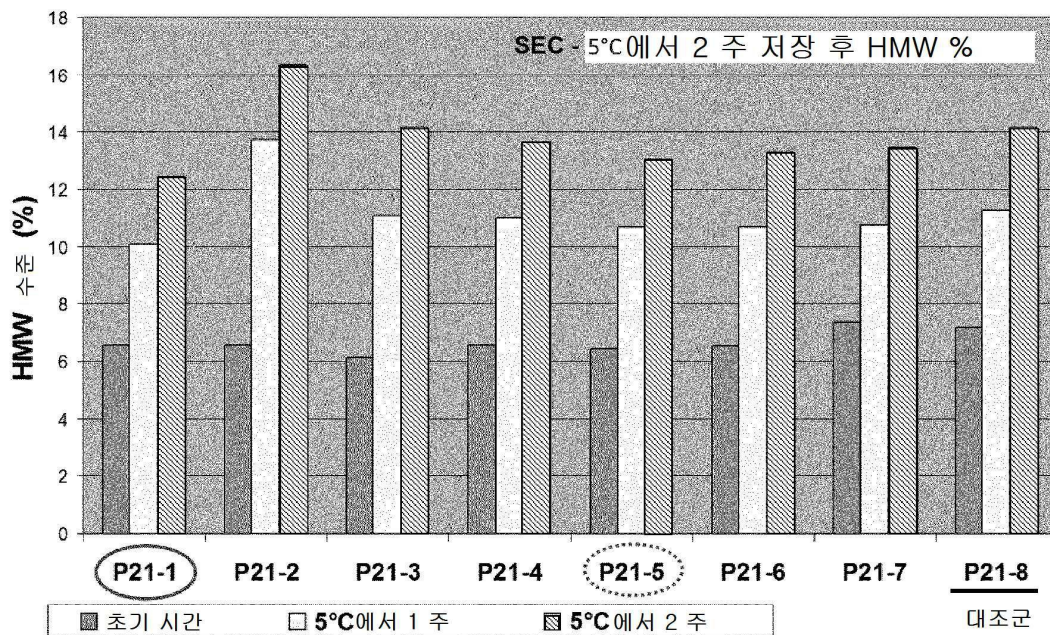
도면13



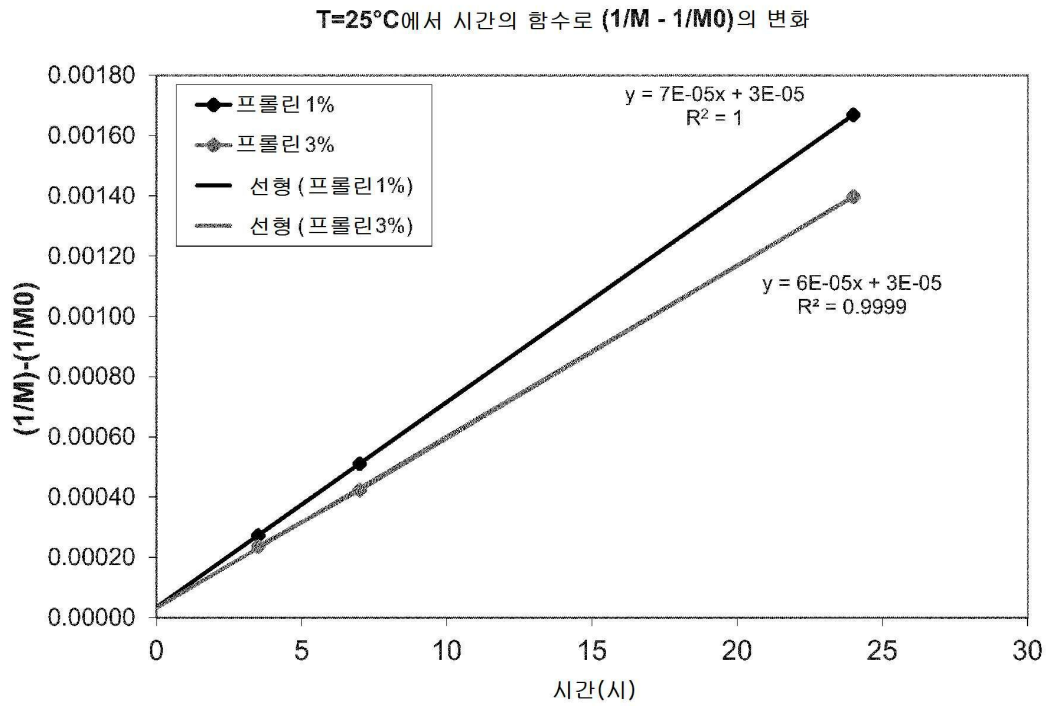
도면14



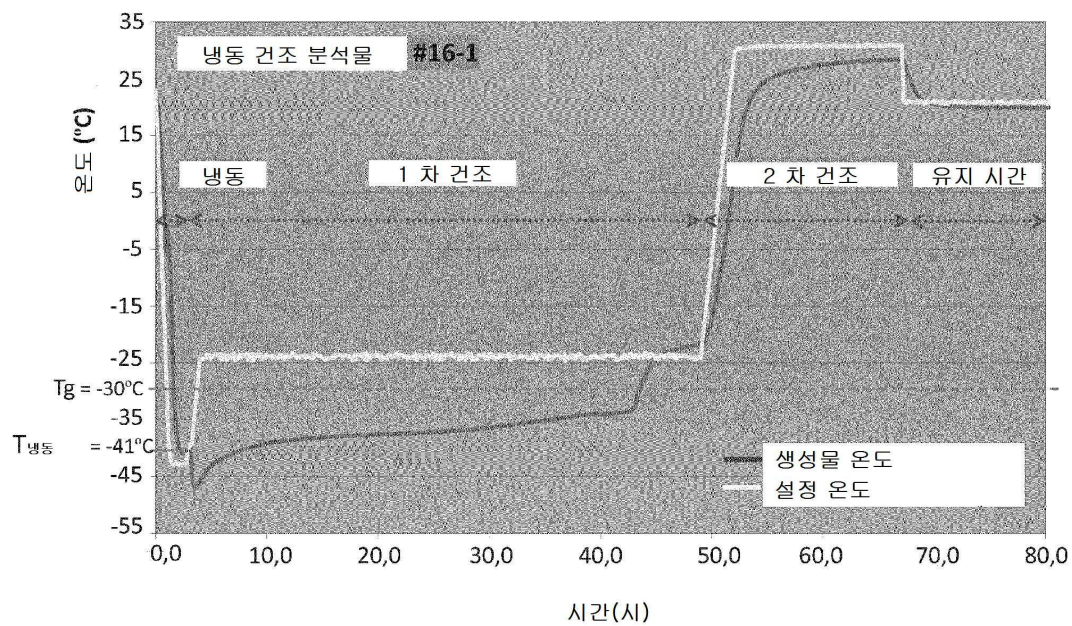
도면15



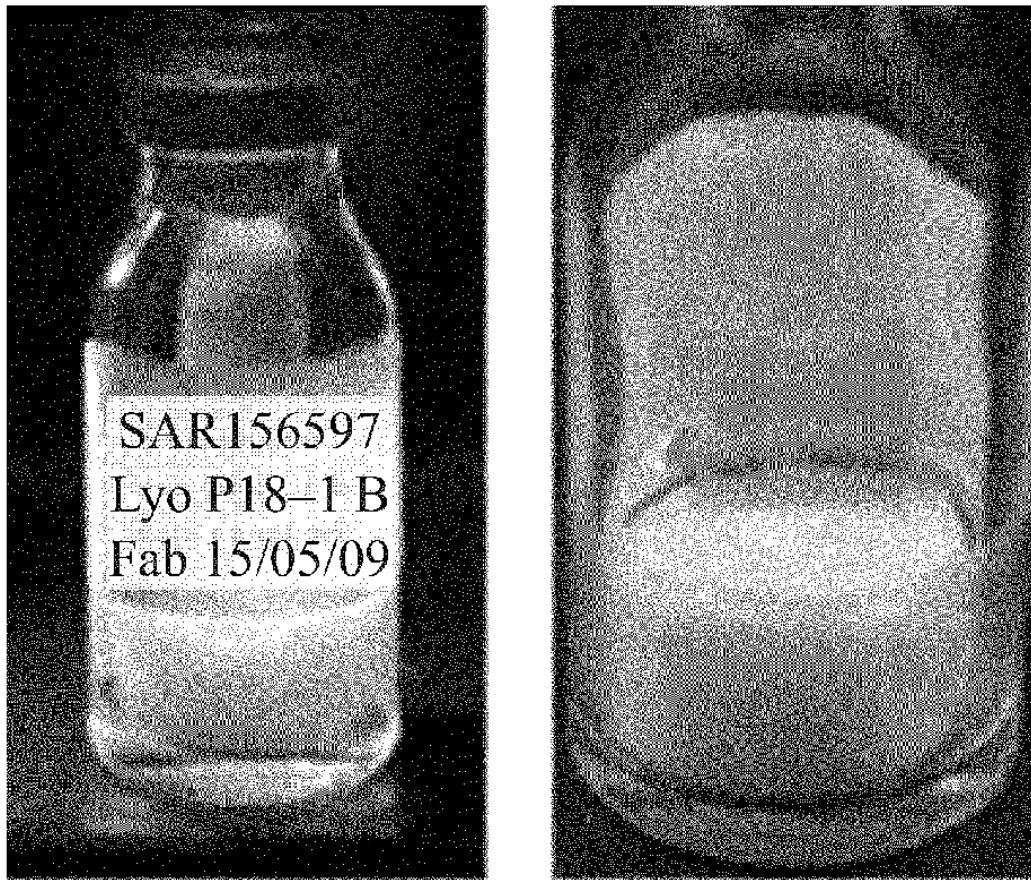
도면16



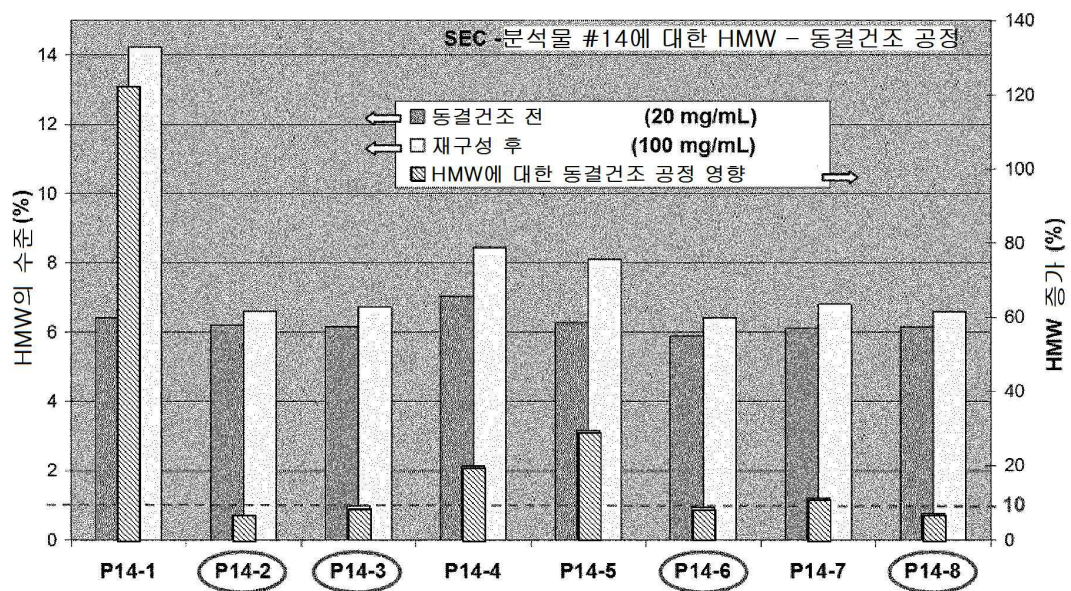
도면17



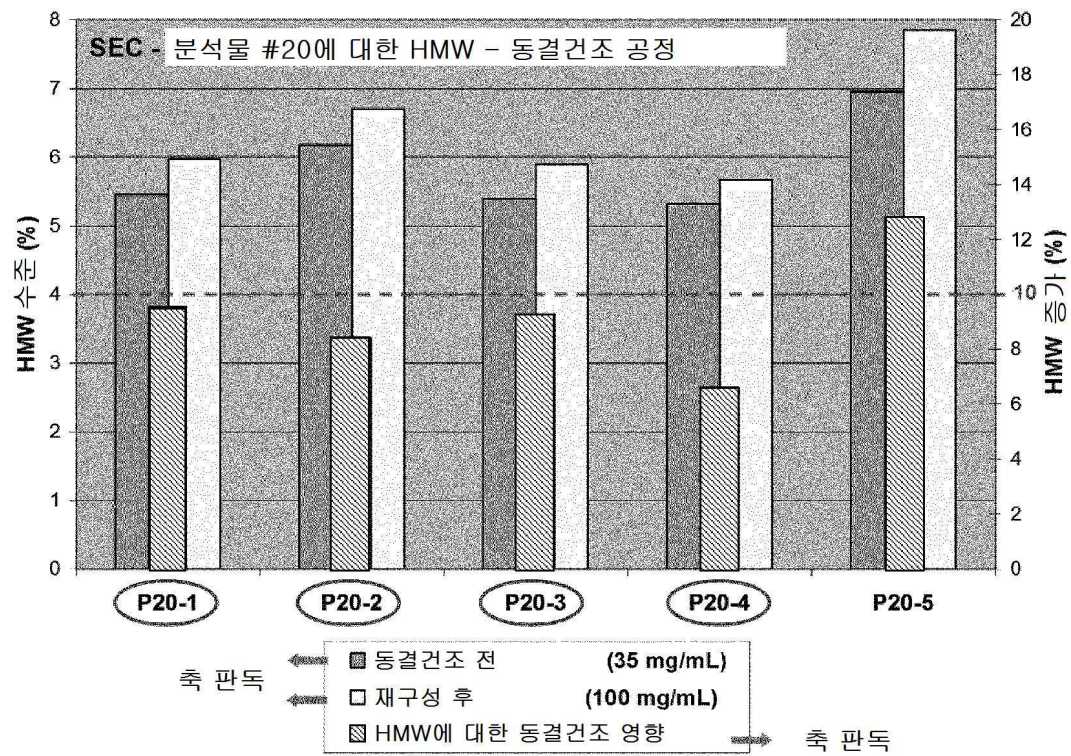
도면18



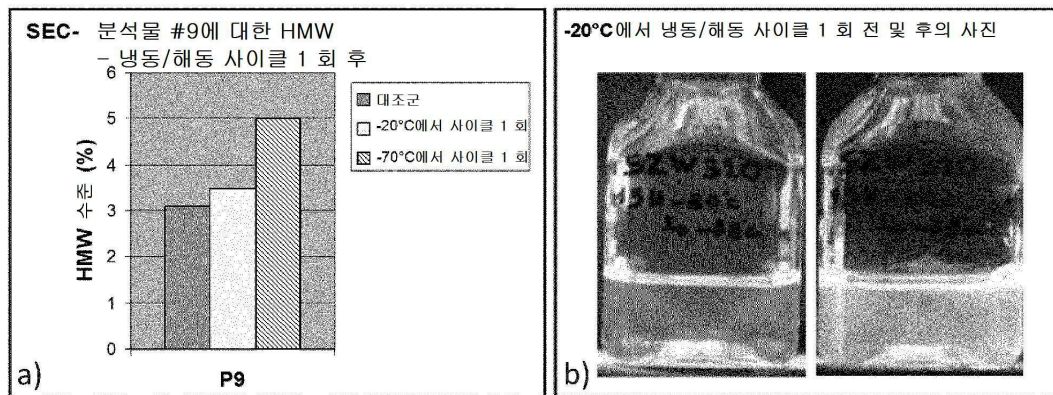
도면19



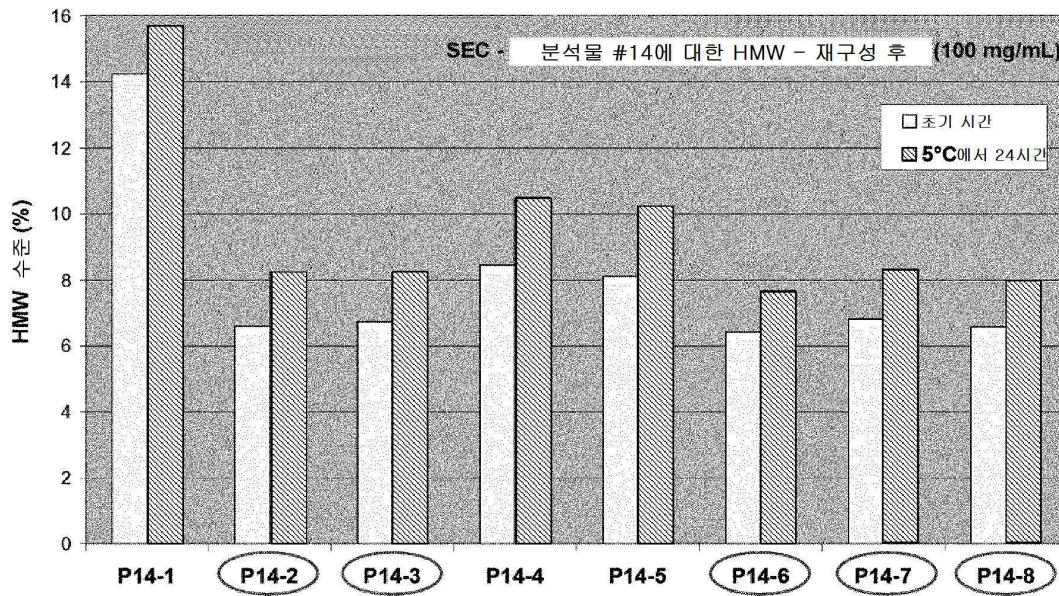
도면20



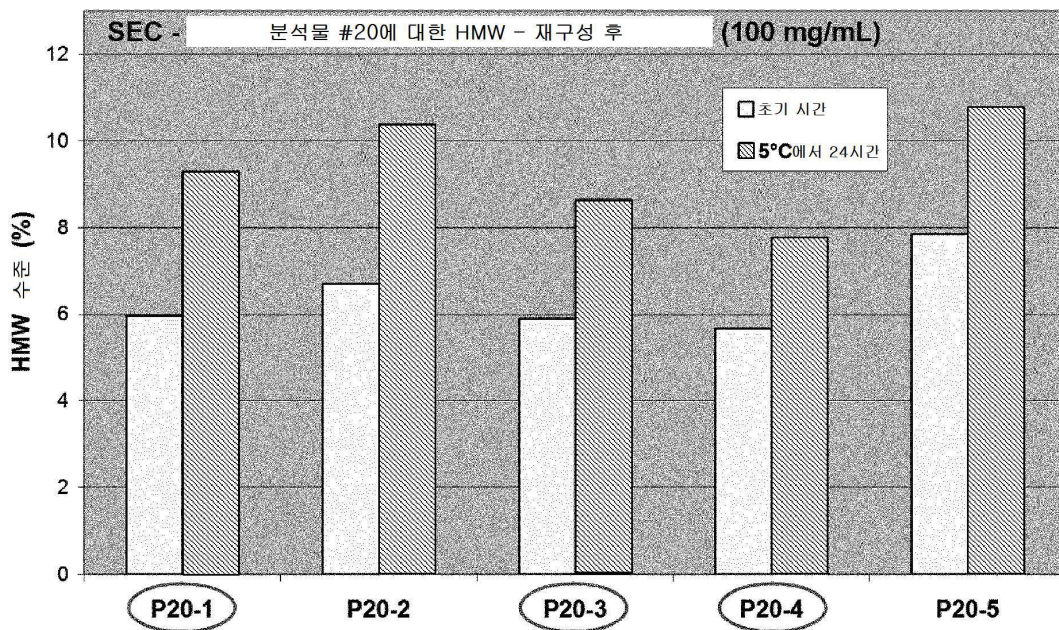
도면21



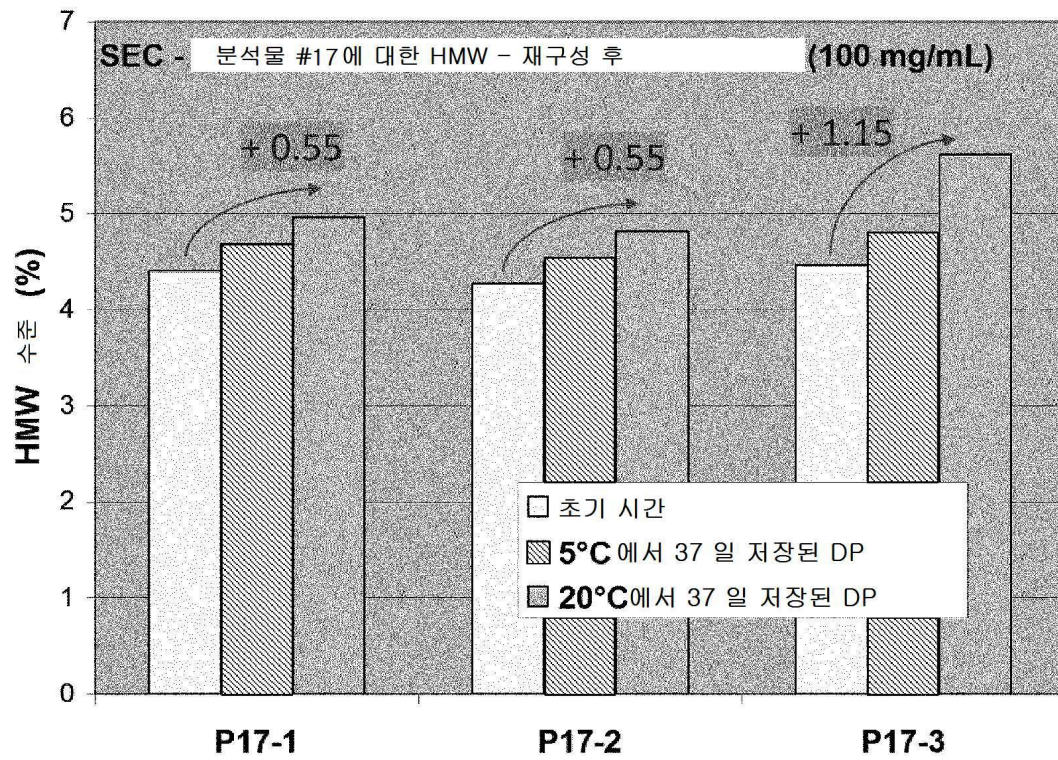
도면22



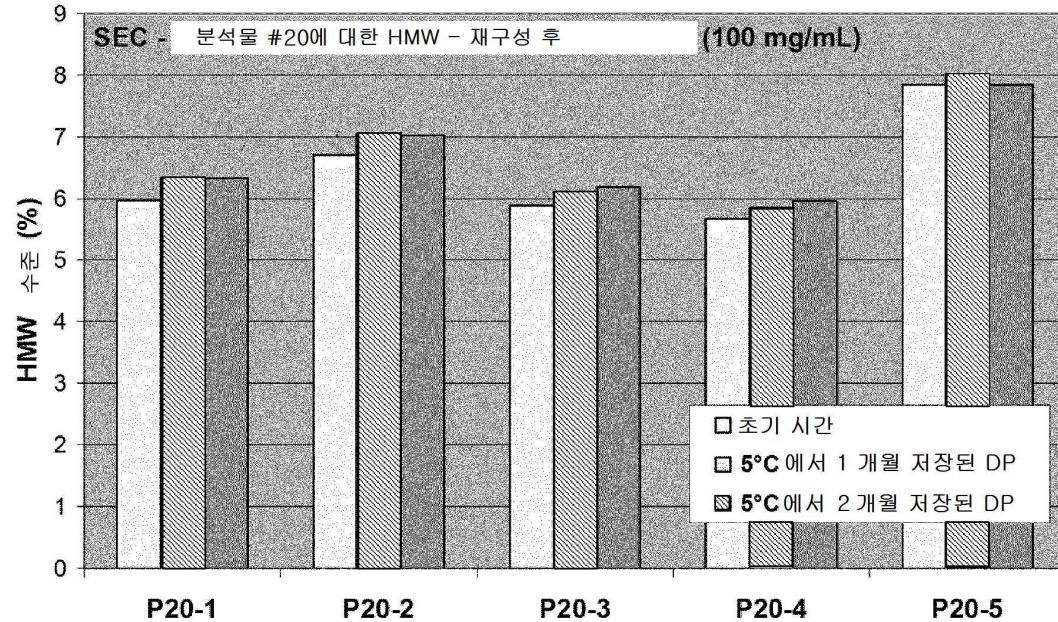
도면23



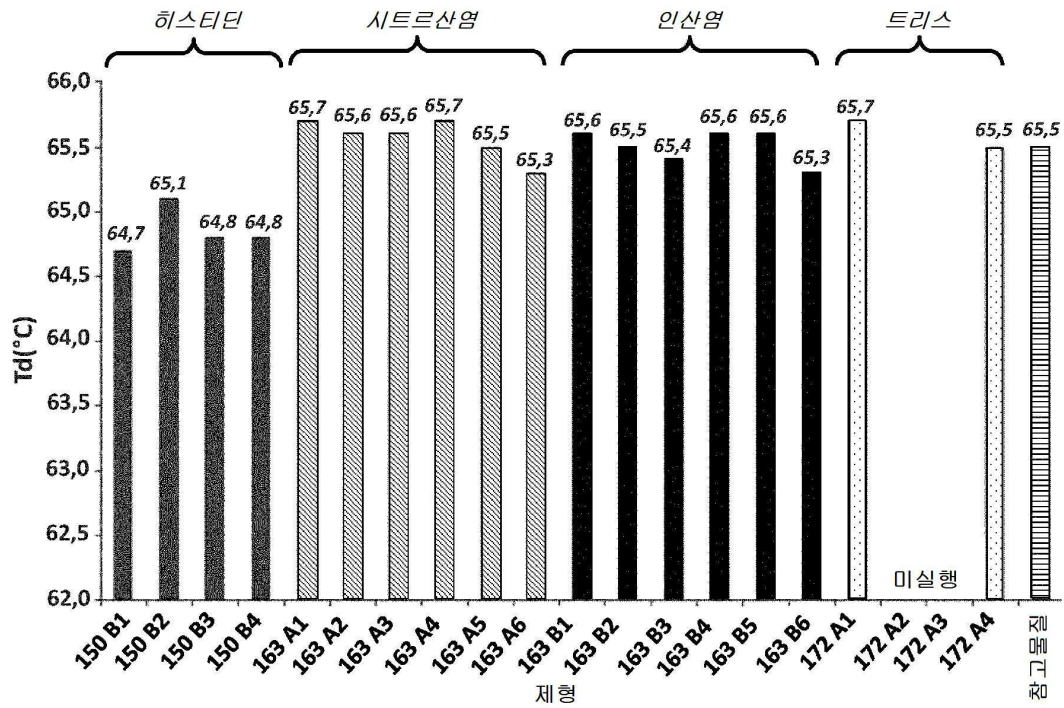
도면24



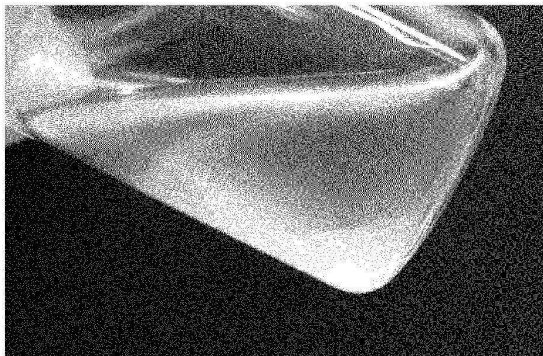
도면25



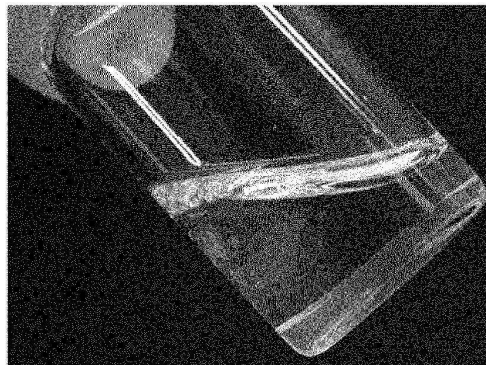
도면26



도면27



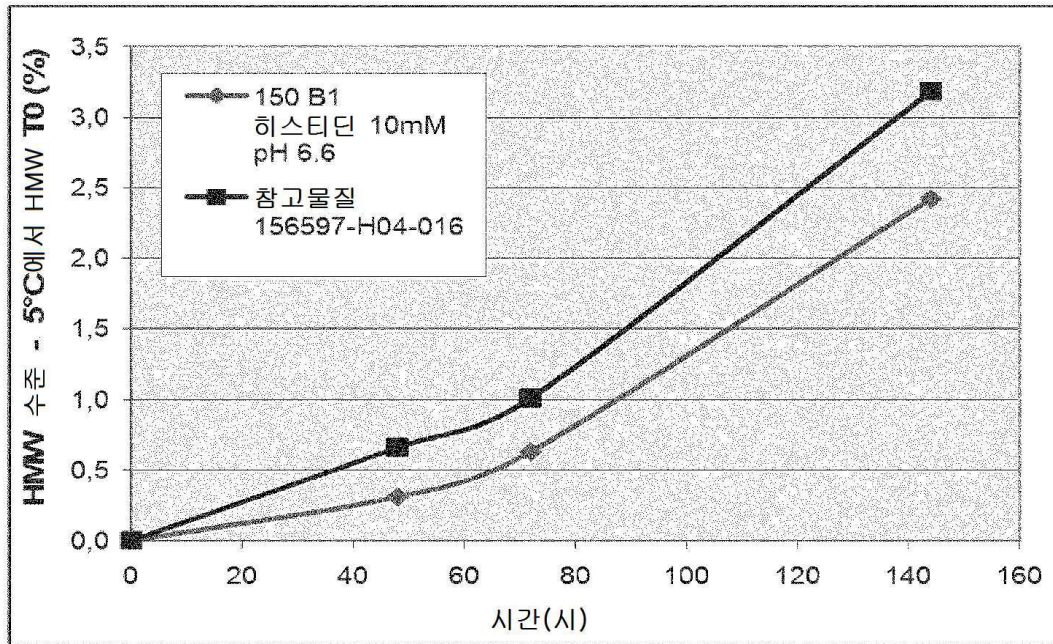
히스티딘 RT



석신산염 5°C

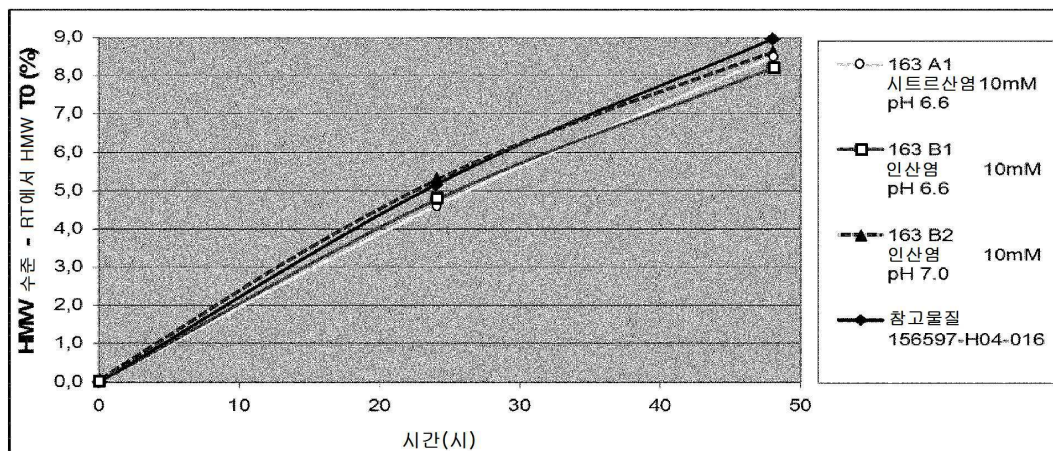
도면28a

시간(시)	5°C 에서 ΔHMW	
	150 B1 히스티딘 10mM pH 6.6	참고물질 156597-H04-016
0	0,0	0,0
48	0,3	0,7
72	0,6	1,0
144	2,4	3,2



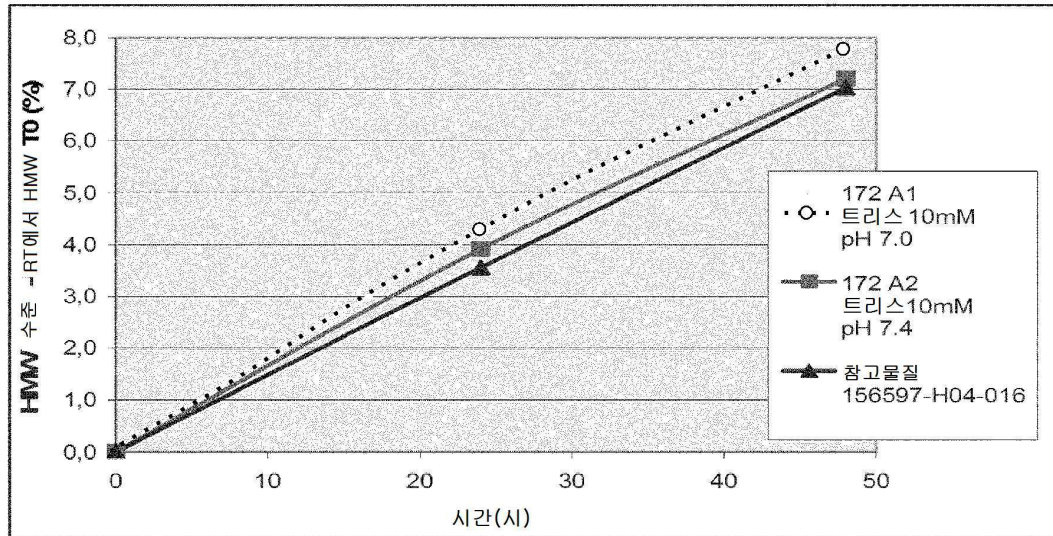
도면28b

시간(시)	RT에서 ΔHMW			
	163 A1 시트르산염 10mM pH 6.6	163 B1 인산염 10mM pH 6.6	163 B2 인산염 10mM pH 7.0	참고물질 156597-H04-016
0	0,0	0,0	0,0	0,0
24	4,6	4,8	5,3	5,2
48	8,5	8,2	8,7	9,0

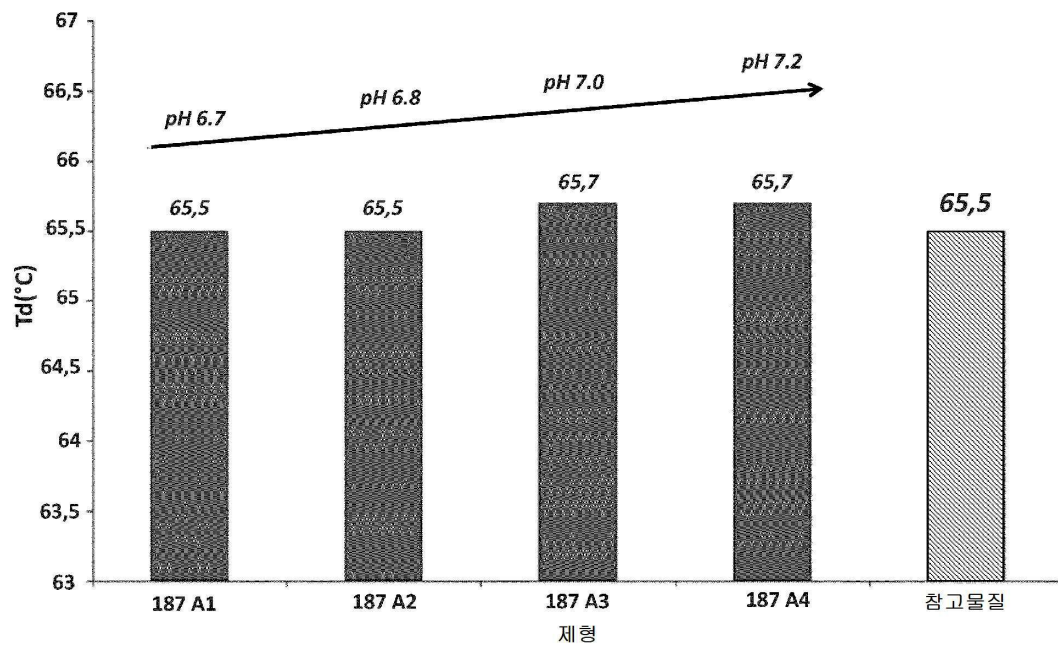


도면28c

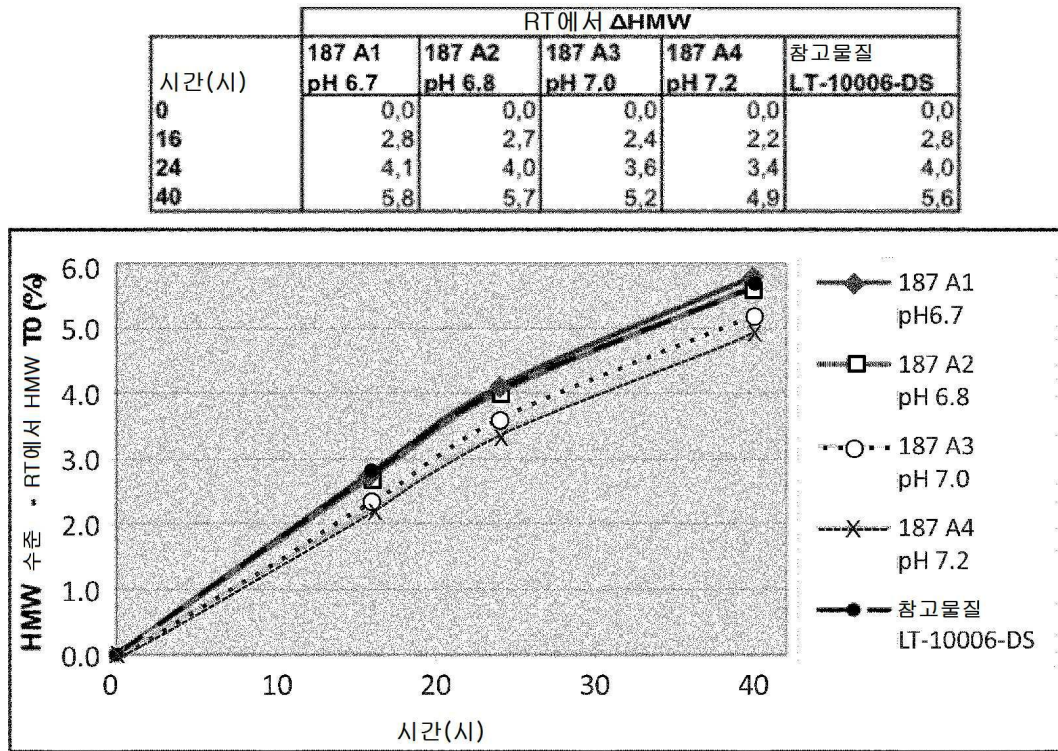
시간(시)	RT에서 Δ HMW		
	172 A1 트리스 10mM pH 7.0	172 A2 트리스 10mM pH 7.4	참고물질 156597-H04-016
0	0,0	0,0	0,0
24	4,2	3,9	3,6
48	7,8	7,2	7,0



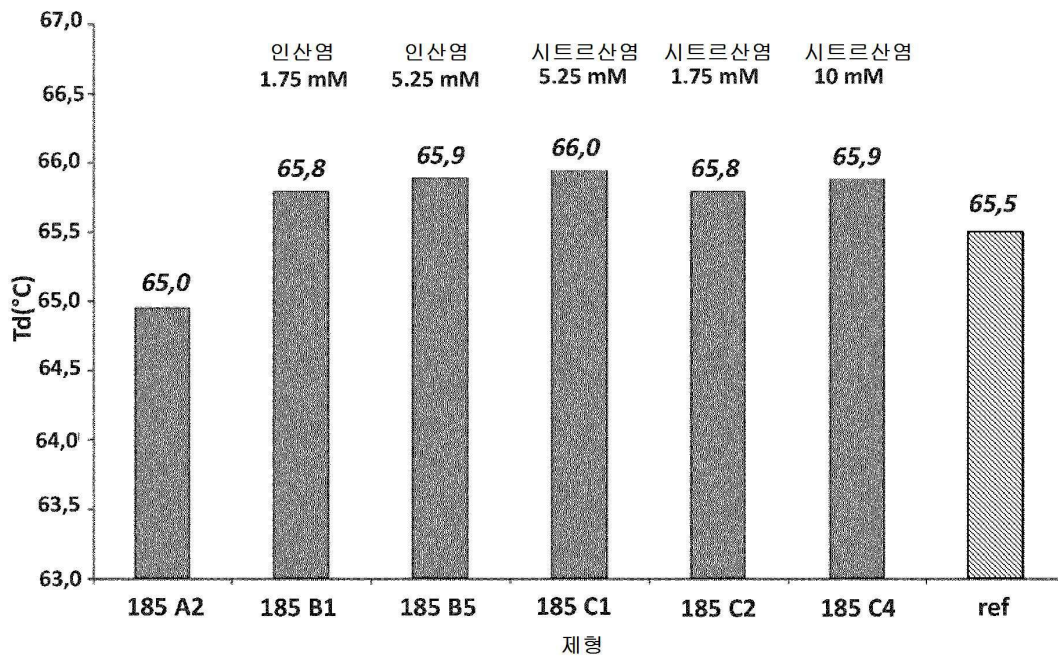
도면29



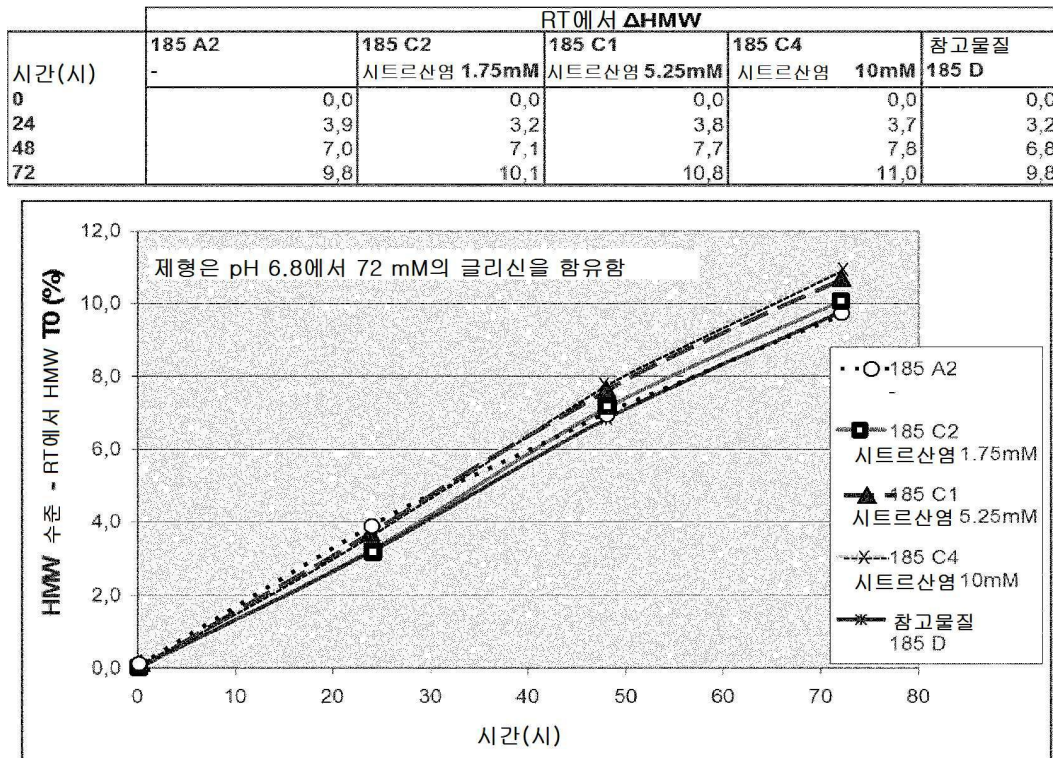
도면30



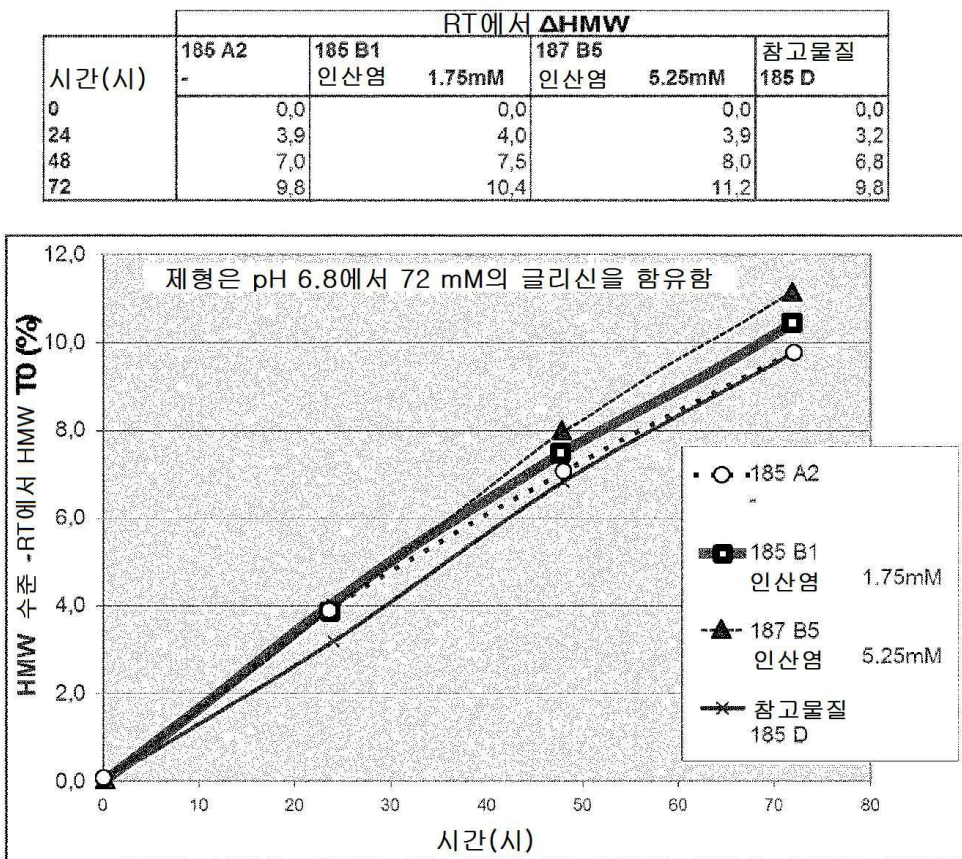
도면31



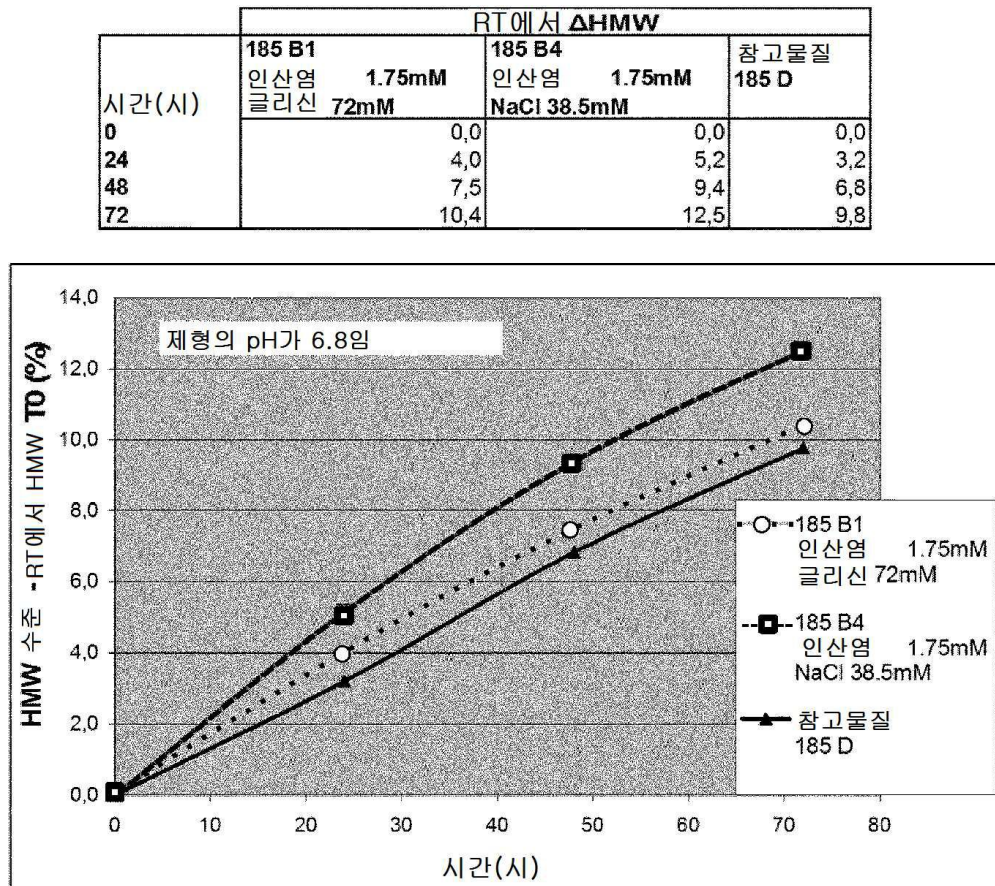
도면32a



도면32b



도면33



도면34

RT에서 Δ HMW							
시간(시)	185 A2 글리신 72mM	185 A1 수크로스 2.4%	185 B1 인산염 1.75mM 글리신 72mM	185 B2 인산염 1.75mM 수크로스 2.4%	185 C2 시트르산염 1.75mM 글리신 72mM	185 C3 시트르산염 1.75mM 수크로스 2.4%	참고물질 185 D
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
24	3,9	4,1	4,0	4,2	3,2	4,1	3,2
48	7,0	7,5	7,5	7,5	7,1	7,9	6,8
72	9,8	10,1	10,4	10,4	10,1	10,9	9,8

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> SANOFI

Carayon, Sophie

Boussif, Otmane

<120> ANTI-IL-4/ANTI-IL-13 BISPECIFIC ANTIBODY

<130> 14-646-WO

<150> US 61/816,899

<151> 2013-04-29

<150> EP 14305160.5

<151> 2014-02-05

<160> 21

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-IL13 hB-B13 VL3

<400> 1

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

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr

20 25 30

Gly Gln Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Val Gln Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Ala

85 90 95

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

100 105 110

<210> 2

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-IL13 hB-B13 VH2

<400> 2

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

1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Ser

20 25 30

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

85 90 95
 Arg Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 3

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-IL4 h8D4-8 VL1

<400> 3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Thr Ile Thr Leu Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asp Val Trp

20 25 30
 Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala His Ser Tyr Pro Phe

85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 4

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-IL4 h8D4-8 VH1

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Ile His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Gly Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Arg Leu Lys Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val

100 105 110

Trp Gly Ala Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala

115 120

<210> 5

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-IL4 h8D4-8 VH2

<400> 5

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

85 90 95
 Thr Arg Leu Lys Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Ala Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 6

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hB-B13 VL3 CDR1

<400> 7

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Gln Ser Tyr Met His

1 5 10 15

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hB-B13 VL3 CDR2

<400> 8

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hB-B13 VL3 CDR3

<400> 9

Gln Gln Asn Ala Glu Asp Ser Arg Thr

1 5

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hB-B13 VH2 CDR1

<400> 10

Gly Phe Ser Leu Thr Asp Ser Ser Ile Asn

1 5 10

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hB-B13 VH2 CDR2

<400> 11

Asp Gly Arg Ile Asp

1 5

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hB-B13 VH2 CDR3

<400> 12

Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Phe

1 5 10

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> h8D4-8 VL1 CDR1

<400> 13

His Ala Ser Gln Asn Ile Asp Val Trp Leu Ser

1 5 10

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> h8D4-8 VL1 CDR2

<400> 14

Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> h8D4-8 VL1 CDR3

<400> 15

Gln Gln Ala His Ser Tyr Pro Phe Thr

1 5

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> h8D4-8 VH1 CDR1

<400> 16

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile His

1 5 10

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> h8D4-8 VH1 CDR2

<400> 17

Ile Asp Pro Ser Asp Gly Glu Thr Arg

1 5

<210> 18

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> h8D4-8 VH1 CDR3

<

400> 18

Leu Lys Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> h8D4-8 VH2 CDR1

<400> 19

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile His

1 5 10

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> h8D4-8 VH2 CDR2

<400> 20

Ile Asp Ala Ser Asp Gly Glu Thr Arg

1 5

<210> 21

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> h8D4-8 VH2 CDR3

<400> 21

Leu Lys Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val

1

5

10