



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년07월01일
 (11) 등록번호 10-1994809
 (24) 등록일자 2019년06월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *C07K 16/24* (2006.01)
 (52) CPC특허분류
A61K 39/395 (2013.01)
C07K 16/24 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2017-7022308(분할)
 (22) 출원일자(국제) 2012년10월30일
 심사청구일자 2017년10월30일
 (85) 번역문제출일자 2017년08월09일
 (65) 공개번호 10-2017-0096212
 (43) 공개일자 2017년08월23일
 (62) 원출원 특허 10-2014-7011246
 원출원일자(국제) 2012년10월30일
 심사청구일자 2014년04월25일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2012/062572
 (87) 국제공개번호 WO 2013/066866
 국제공개일자 2013년05월10일
 (30) 우선권주장
 61/553,916 2011년10월31일 미국(US)
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020060130625 A*
 US20070172479 A1*
 Clin. Ther. 28(10): 1619-1629(2006. 10.)*
 US20090214523 A1
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
제넨테크, 인크.
 미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우쓰 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
 (72) 발명자
데쉬무크, 에이제이
 미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
제이드, 주마나
 미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
쉐러, 토마스 엠.
 미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
 (74) 대리인
양영준, 이귀동

전체 청구항 수 : 총 17 항

심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 **항체 제제**

(57) 요약

항-IL-13 항체를 포함하는 제제 (제약 제제 포함) 및 이러한 제제의 사용 방법이 제공된다.

명세서

청구범위

청구항 1

항-IL13 항체를 포함하는 수성 제제이며, 제제 중 항체의 농도가 100 mg/mL 이상이고, 제제의 점도가 25°C에서 15 센티포아즈 (cP) 미만이며, 아르기닌을 포함하지 않으며,

항-IL13 항체가 서열 10의 아미노산 서열을 갖는 중쇄, 및 서열 14의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함하고,

상기 제제는 pH 5.4 내지 6.0의 히스티딘 아세테이트 완충제 5 mM 내지 40 mM, 폴리올 및 계면활성제를 포함하며, 제제 중 폴리올의 농도는 100 mM 내지 200 mM이고, 제제 중 계면활성제의 농도는 0.01% 내지 0.1%이며, 상기 폴리올이 수크로스이고, 계면활성제가 폴리소르베이트 20인, 알레르기성, 자가면역 또는 염증성 질환 또는 장애 치료용 수성 제제.

청구항 2

제1항에 있어서, 항체의 농도가 125 mg/mL인 제제.

청구항 3

제1항에 있어서, 항체의 농도가 150 mg/mL인 제제.

청구항 4

제1항에 있어서, 히스티딘 아세테이트 완충제가 pH 5.7이고, 완충제 중 히스티딘 아세테이트 농도가 20 mM이고, 제제 중 수크로스의 농도가 175 mM이고, 폴리소르베이트 20의 농도가 0.03%인 제제.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 천식 치료용인 제제.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 특발성 폐 섬유증 치료용인 제제.

청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 아토피성 피부염 치료용인 제제.

청구항 8

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 만성 폐쇄성 폐 질환 치료용인 제제.

청구항 9

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 제제 및 피하 투여 장치를 포함하는 제조품.

청구항 10

제9항에 있어서, 피하 투여 장치가 예비충전된 시린지를 포함하는 것인 제조품.

청구항 11

제10항에 있어서, 예비충전된 시린지가 유리 배럴, 바늘 및 바늘 실드를 포함하는 것인 제조품.

청구항 12

제11항에 있어서, 플런저 로드 및 플런저 스톱퍼를 추가로 포함하는 제조품.

청구항 13

제12항에 있어서, 바늘 안전성 장치를 추가로 포함하는 제조품.

청구항 14

제11항에 있어서, 유리 배럴이 보로실리케이트 유리를 포함하며, 0.3 mL, 1.0 mL 또는 2.0 mL의 제제를 함유하는 것인 제조품.

청구항 15

제12항에 있어서, 플런저 스톱퍼가 4023/50 고무 및 에틸렌-테트라플루오로에틸렌 코팅을 포함하는 것인 제조품.

청구항 16

제11항에 있어서, 바늘이 스택-인(staked-in), 스테인레스 스틸, 27G 박막, 1/2 인치 길이 및 5-베벨 팁인 제조품.

청구항 17

제11항에 있어서, 바늘 실드가 강성이며, 엘라스토머 성분, FM27/0 및 강성 폴리프로필렌 실드를 포함하는 것인 제조품.

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본원은 2011년 10월 31일에 출원된 미국 가출원 번호 61/553,916을 우선권 주장하며, 그의 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 분야

[0004] 항-IL-13 항체를 포함하는 제제 (제약 제제 포함) 및 이러한 제제를 사용하는 방법이 제공된다.

[0005] 서열 목록

[0006] 본원은 EFS-웹을 통해 ASCII 포맷으로 제출된 서열 목록을 함유하며, 그의 전문이 본원에 참조로 포함된다. 2012년 10월 4일에 생성된 상기 ASCII 복사본은 P4786R1W.txt로 명명되고, 크기는 22,776 바이트이다.

배경 기술

[0007] 인터류킨 (IL)-13은 다면발현성 T 헬퍼 세포 하위부류 2 (Th2) 시토카인이다. IL13은 천식의 증상과 연관된 이펙터 기능에서 다른 Th2 시토카인보다 더 중요한 역할을 수행할 수 있는 것으로 가정되었다 (문헌 [Corry, Curr. Opin. Immunol., 11: 610 (1999)]). 인간화 항-IL-13 항체가 기재되어 있다. 예를 들어, 국제 공개 번호 2005/062967을 참조한다. 한 특정한 항-IL13 항체, 레브리키주맵은 잘 제어되지 않는 천식을 갖는 환자의 치료를 위해 임상적으로 연구되었다. 이들 결과 중 특정한 것이 문헌 [Corren et al., N Engl J Med 365(12):1088-98 (2011)]에 기재되어 있다.

[0008] 항체를 비롯한 단백질은 종래의 유기 및 무기 약물보다 더 크고 보다 복잡하기 때문에 (예를 들어, 복잡한 3차원 구조 뿐만 아니라 다중 관능기를 보유함), 이러한 단백질의 제제는 특수한 문제를 제기한다. 단백질의 생물학적 활성을 유지하기 위해, 제제는 적어도 단백질의 아미노산의 코어 서열의 무손상 형태적 완전성을 보존해야 하며, 동시에 단백질의 다중 관능기를 분해로부터 보호해야 한다. 단백질에 대한 분해 경로는 화학적 불안정성 (예를 들어, 새로운 화학 물질을 생성하는, 결합 형성 또는 절단에 의한 단백질의 변형을 포함하는 임의의 과정) 또는 물리적 불안정성 (예를 들어, 단백질의 보다 고차원적인 구조에서의 변화)을 수반할 수 있다. 화학적 불안정성은 탈아미드화, 라세미화, 가수분해, 산화, 베타 제거 또는 디설피드 교환으로부터 초래될 수 있다. 물리적 불안정성은, 예를 들어 변성, 응집, 침전 또는 흡착으로부터 초래될 수 있다. 3가지 가장 통상적인 단

백질 분해 경로는 단백질 응집, 탈아미드화 및 산화이다. 문헌 [Cleland et al. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 10(4): 307-377 (1993)].

- [0009] 고농도 (예를 들어, > 100 mg/mL) 액체 항체 제제는 작은 부피의 약물 제품이 예를 들어 피하 주사에 바람직한 경우에 예를 들어 치료 투여의 경로 또는 치료 용도에 바람직하다. 그러나, 고농도 항체 제제는 다수의 도전 및 문제를 제기한다. 한가지 문제점은 미립자의 형성으로 인한 불안정성이다. 재구성된 액체 제제에서, 이 문제는 계면활성제 (예를 들어, 폴리소르베이트)의 사용을 통해 다루어졌으나, 계면활성제는 이들이 추가의 어려운 처리를 제공하기 때문에 때때로 액체 제제에 부적합한 것으로 생각된다. 또한, 계면활성제는 항체의 거대분자 특성으로부터 다수의 분자간 상호작용의 결과로서 유발된 증가된 점도를 추가로 감소시키지 않는다.
- [0010] 계면활성제가 단백질의 미립자 형성의 정도를 유의하게 감소시키는 것으로 밝혀졌으나, 이들은 농축된 항체 제제의 조작 및 투여를 어렵게 만드는 증가된 점도의 문제를 다루지 않는다. 항체는 그의 거대분자 특성 및 분자간 상호작용에 대한 잠재력으로 인해 고농도에서 점성 용액을 형성하는 경향이 있다. 또한, 제약상 허용되는 당은 종종 안정화제로서 사용된다. 이러한 당은 분자간 상호작용을 증진시킴으로써 제제의 점도를 증가시킬 수 있다. 고도의 점성 제제는 제조하고, 시린지로 빨아들여 피하로 주사하기 어렵다. 점성 제제의 조작시에 힘을 사용하면 과도한 거품이 발생하며, 이는 활성 생물제제의 변성 및 불활성화로 이어질 수 있다.
- [0011] 고농도 항체에 대한 특정 제제가 기재되어 있다. 예를 들어, 국제 공개 번호 2006/065746 및 2002/30463을 참조한다. 이들 공개는 특히 고농도 항-IL13 항체를 기재하지 않는다.
- [0012] 높은 항체 농도에서 확장된 안정성 및 저점도를 갖는 항-IL-13 항체를 포함하는 제제를 갖는 것이 매우 유리할 것이다. 이러한 특성을 갖는 높은 항체 농도 제제는 특정 투여 경로, 예를 들어 피하 투여에 매우 유리할 것이다. 본원에 제공된 제제는 이러한 요구를 다루며, 다른 유용한 이익을 제공한다.
- [0013] 특허 출원 및 공개를 비롯한 본원에 인용된 모든 참고문헌은 임의의 목적을 위해 그의 전문이 참조로 포함된다.

발명의 내용

- [0014] 본 발명의 조성물은 적어도 부분적으로 본원에 기재된 항-IL13 항체, 레브리키주맵이 폴리올 및 계면활성제를 함유하는 히스티딘 완충제 중에 고농도 (> 100 mg/mL)로 제제화될 수 있고, 이러한 높은 항체 농도 제제는 저점도이고, 확장된 물리적 및 화학적 안정성을 가지며, 효력을 유지한다는 발견에 기초한다. 본 발명의 조성물 또는 제제는 예를 들어 천식 및 다른 폐 장애, 예컨대 특발성 폐 섬유증 및 특정 알레르기성, 자가면역 및 다른 염증성 장애의 치료에 유용하다. 또한, 이러한 제제는 예를 들어 생물물 안정성 및 다른 바람직한 특성을 유지하면서 본원에 기재된 바와 같이 피하 투여 장치에 패키징될 수 있다.
- [0015] 따라서, 한 측면에서, 항-IL13 항체를 포함하는 제제가 제공된다. 특정 실시양태에서, 제제 중 항체의 농도는 100 mg/mL 이상이고, 제제의 점도는 25°C에서 15 센티포아즈 (cP) 미만이다. 또 다른 실시양태에서, 항-IL13 항체는 3개의 중쇄 CDR, 서열 1의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H1, 서열 2의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H2 및 서열 3의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H3, 및 3개의 경쇄 CDR, 서열 4의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L1, 서열 5의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L2 및 서열 6의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L3을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 서열 7의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 서열 9의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 서열 10의 아미노산 서열을 갖는 중쇄를 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 서열 14의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 서열 7의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열 9의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 서열 10의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열 14의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다. 한 실시양태에서, 항체의 농도는 125 mg/mL이다. 한 실시양태에서, 항체의 농도는 150 mg/mL이다.
- [0016] 또 다른 측면에서, 제제는 히스티딘 아세테이트 완충제, pH 5.4 내지 6.0을 포함하고, 완충제 중 히스티딘 아세테이트 농도는 5 mM 내지 40 mM이다. 특정 실시양태에서, 제제는 폴리올 및 계면활성제를 포함하고, 제제 중 폴리올의 농도는 100 mM 내지 200 mM이고, 제제 중 계면활성제의 농도는 0.01% 내지 0.1%이다. 특정 실시양태에서, 폴리올은 수크로스이고, 계면활성제는 폴리소르베이트 20이다. 특정 실시양태에서, 히스티딘 아세테이트 완충제는 pH 5.7이고, 완충제 중 히스티딘 아세테이트 농도는 20 mM이고, 제제 중 수크로스의 농도는 175 mM이고, 폴리소르베이트 20의 농도는 0.03%이다. 한 실시양태에서, 항체의 농도는 125 mg/mL 또는 150 mg/mL이다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 3개의 중쇄 CDR, 서열 1의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H1, 서열 2의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H2 및 서열 3의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H3, 및 3개의 경쇄 CDR, 서열 4의 아미노산 서열을

갖는 CDR-L1, 서열 5의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L2 및 서열 6의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L3을 포함한다.

[0017] 또 다른 측면에서, 제제는 히스티딘 아세테이트 완충제, pH 5.4 내지 6.0 중 항-IL13 항체를 포함하고, 완충제 중 히스티딘 아세테이트 농도는 5 mM 내지 40 mM이고, 제제 중 항체의 농도는 100 mg/mL 이상이다. 특정 실시양태에서, 제제는 폴리올 및 계면활성제를 추가로 포함하고, 제제 중 폴리올의 농도는 100 mM 내지 200 mM이고, 제제 중 계면활성제의 농도는 0.01% 내지 0.1%이다. 한 실시양태에서, 폴리올은 수크로스이고, 계면활성제는 폴리소르베이트 20이다. 한 실시양태에서, 히스티딘 아세테이트 완충제는 pH 5.7이고, 완충제 중 히스티딘 아세테이트 농도는 20 mM이고, 여기서 제제 중 수크로스의 농도는 175 mM이고, 폴리소르베이트 20의 농도는 0.03%이다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 3개의 중쇄 CDR, 서열 1의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H1, 서열 2의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H2 및 서열 3의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H3, 및 3개의 경쇄 CDR, 서열 4의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L1, 서열 5의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L2 및 서열 6의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L3을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 서열 7의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 서열 9의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 서열 10의 아미노산 서열을 갖는 중쇄를 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 서열 14의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 서열 7의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열 9의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 서열 10의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열 14의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다. 한 실시양태에서, 제제는 25°C에서 15 센티포아즈 (cP) 미만의 점도를 갖는다. 한 실시양태에서, 항체의 농도는 125 mg/mL이다. 한 실시양태에서, 항체의 농도는 150 mg/mL이다.

[0018] 또 다른 측면에서, 확장된 안정성을 갖는 항-IL13 항체를 포함하는 제제가 제공된다. 특정 실시양태에서, 항체 농도는 100 mg/mL 이상이고, 점도는 25°C에서 15 센티포아즈 (cP) 미만이다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 5°C에서 1년 이상 동안 안정하다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 5°C에서 2년 이상 동안 안정하다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 5°C에서 3년 동안 안정하다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 25°C에서 4주 이상, 또는 25°C에서 8주 이상, 또는 25°C에서 12주 이상 동안, 또는 4°C에서 26주 동안 안정하다. 한 실시양태에서, 제제는 히스티딘 아세테이트 완충제, pH 5.4 내지 6.0을 포함하고, 완충제 중 히스티딘 아세테이트 농도는 5 mM 내지 40 mM이다. 한 실시양태에서, 제제는 폴리올 및 계면활성제를 추가로 포함하고, 제제 중 폴리올의 농도는 100 mM 내지 200 mM이고, 제제 중 계면활성제의 농도는 0.01% 내지 0.1%이다. 한 실시양태에서, 폴리올은 수크로스이고, 계면활성제는 폴리소르베이트 20이다. 한 실시양태에서, 히스티딘 아세테이트 완충제는 pH 5.7이고, 완충제 중 히스티딘 아세테이트 농도는 20 mM이고, 제제 중 수크로스의 농도는 175 mM이고, 폴리소르베이트 20의 농도는 0.03%이다. 한 실시양태에서, 항체의 농도는 125 mg/mL 또는 150 mg/mL이다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 3개의 중쇄 CDR, 서열 1의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H1, 서열 2의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H2 및 서열 3의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H3, 및 3개의 경쇄 CDR, 서열 4의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L1, 서열 5의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L2 및 서열 6의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L3을 포함한다.

[0019] 또 다른 측면에서, 20 mM 히스티딘 아세테이트 완충제, pH 5.7, 175 mM 수크로스, 0.03% 폴리소르베이트 20 중에 확장된 안정성을 갖는 항-IL13 항체를 포함하는 제제가 제공된다. 한 실시양태에서, 제제 중 항체의 농도는 125 mg/mL이고, 제제의 점도는 25°C에서 15 센티포아즈 (cP) 미만이다. 한 실시양태에서, 제제 중 항체의 농도는 150 mg/mL이고, 제제의 점도는 25°C에서 15 센티포아즈 (cP) 미만이다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 3개의 중쇄 CDR, 서열 1의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H1, 서열 2의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H2 및 서열 3의 아미노산 서열을 갖는 CDR-H3, 및 3개의 경쇄 CDR, 서열 4의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L1, 서열 5의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L2 및 서열 6의 아미노산 서열을 갖는 CDR-L3을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 서열 7의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열 9의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 서열 10의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열 14의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다.

[0020] 추가 측면에서, 피하 투여 장치를 포함하는 제조품이 제공된다. 특정 실시양태에서, 피하 투여 장치는 환자에게 균일 용량의 항-IL13 항체를 제공한다. 한 실시양태에서, 균일 용량은 항-IL13 항체 37.5 mg이다. 한 실시양태에서, 균일 용량은 항-IL13 항체 75 mg이다. 한 실시양태에서, 균일 용량은 항-IL13 항체 125 mg이다. 한 실시양태에서, 균일 용량은 항-IL13 항체 150 mg이다. 특정 실시양태에서, 항-IL13 항체는 레브리키주맙이다. 피하 투여 장치 내의 항-IL13 항체는 완충제 및 상기 기재된 바와 같은 다른 부형제 중의 안정한 제약 제제로 제공되도록 제제화된다. 특정 실시양태에서, 피하 투여 장치는 유리 배럴, 플런저 스톱퍼를 포함하는 플런저 로드 및 바늘을 포함하는 예비충전된 시린지이다. 특정 실시양태에서, 피하 투여 장치는 바늘 실드 및 임의로

바늘 실드 장치를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 예비충전된 시린지 내에 함유된 제제의 부피는 0.3 mL, 1 mL, 1.5 mL 또는 2.0 mL이다. 특정 실시양태에서, 바늘은 3-베벨 팁 또는 5-베벨 팁을 포함하는 스택-인(staked-in) 바늘이다. 특정 실시양태에서, 바늘은 25 게이지 (G) 내지 30G이고, 1/2 인치 길이 내지 및 5/8 인치 길이이다. 한 실시양태에서, 피하 투여 장치는 예비충전된 1.0 mL 낮은 텅스텐 보로실리케이트 유리 (유형 I) 시린지 및 스테인레스 스틸 5-베벨 27G 1/2 인치 길이 박막 스택-인 바늘을 포함한다. 특정 실시양태에서, 피하 투여 장치는 강성 바늘 실드를 포함한다. 특정 실시양태에서, 강성 바늘 실드는 낮은 아연 함량을 갖는 고무 제제를 포함한다. 한 실시양태에서, 바늘 실드는 강성이며, 엘라스토머 성분, FM27/0 및 강성 폴리프로필렌 실드를 포함한다. 특정 실시양태에서, 플런저 로드는 고무 플런저 스톱퍼를 포함한다. 특정 실시양태에서, 고무 플런저 스톱퍼는 4023/50 고무 및 플루로텍(FluroTec)® 에틸렌-테트라플루오로에틸렌 (ETFE) 코팅을 포함한다. 특정 실시양태에서, 피하 투여 장치는 바늘 안전성 장치를 포함한다. 예시적인 바늘 안전성 장치는 울트라세이프 패시브(Ultrasafe Passive)® 니들 가드(Needle Guard) X100L (세이프티 시린지스, 인크.(Safety Syringes, Inc.)) 및 렉삼 세이프 앤 사운드(Rexam Safe n Sound)™ (렉삼)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0021] 또 다른 측면에서, 환자에서 천식을 치료하는 방법이 제공된다. 특정 실시양태에서, 방법은 환자에게 유효량의 임의의 상기 제제를 투여하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 유효량은 0.3 mL, 0.5 mL, 1 mL 또는 2 mL, 또는 약 0.3 mL, 약 0.5 mL, 약 1 mL 또는 약 2 mL이다. 또 다른 측면에서, 환자에서 특발성 폐 섬유증을 치료하는 방법이 제공된다. 특정 실시양태에서, 방법은 환자에게 유효량의 임의의 상기 제제를 투여하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 유효량은 0.5 mL, 1 mL 또는 2 mL, 또는 약 0.5 mL, 약 1 mL 또는 약 2 mL이다.

[0022] 또 다른 측면에서, 항-IL13 항체를 포함하는 제제를 피하로 투여하는 방법이 제공된다. 이러한 방법은 상기 기재된 임의의 항-IL13 항체 제제를 피하로 투여하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 방법은 상기 기재된 임의의 장치에 따른 피하 투여 장치를 포함한다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 실시예 1에 기재된 바와 같이 pH의 함수로서 1주당 항-IL13 항체 단량체 분해의 비율을 보여준다.
- 도 2는 실시예 1에 기재된 바와 같이 30°C에서의 저장 동안 pH의 함수로서 항-IL13 항체 용액의 350 nm에서의 용액 탁도의 증가를 보여준다.
- 도 3은 실시예 1에 기재된 바와 같이 pH의 함수로서 30°C에서의 저장 동안 비-환원된 CE-SDS에 의해 측정된 저분자량 (LMW) 가용성 단편 및 고분자량 (HMW) 응집체의 변화를 보여준다.
- 도 4는 실시예 1에 기재된 바와 같이 pH의 함수로서 30°C에서의 산성 변이체 (AV) 및 염기성 변이체 (피크 1) (BV) 형성의 비율을 보여준다. 전하 변이체 형성 비율은 수직축 상에 제시된 %/주로 표현된다.
- 도 5는 실시예 1에 기재된 바와 같이 pH의 함수로서 30°C에서의 염기성 변이체 (피크 2) (BV2) 형성 및 주요 피크 (MP) 상실의 비율을 보여준다. 전하 변이체 형성 비율은 수직축 상에 제시된 %/주로 표현된다.
- 도 6은 실시예 1에 기재된 바와 같이 항체 농도 및 용액 pH의 함수로서 항-IL13 항체의 유동학적 특성화를 보여준다. 용액 점도는 수직축 상에 제시된 25°C에서의 센티포아즈 (cP)로 나타낸다.
- 도 7은 실시예 1에 기재된 바와 같이 광범위한 농도에 걸쳐 상이한 모노클로날 항체의 유동학적 특성화를 보여준다. 용액 점도는 수직축 상에 제시된 25°C에서의 센티포아즈 (cP)로 표현된다.
- 도 8은 실시예 1에 기재된 바와 같이 90 도 비탁분석을 이용하여 농도의 함수로서 항-IL13 및 항-CD20 항체 용액의 시각적 외관의 정량화를 보여준다.
- 도 9는 실시예 1에 기재된 바와 같이 mAb 농도의 함수로서 항-IL13 및 항-CD20 항체 용액에 대한 탁도 측정값 (A350)을 보여준다.
- 도 10은 실시예 1에 기재된 바와 같이 농도 및 pH의 함수로서 항-IL13 항체 용액 탁도를 보여준다.
- 도 11은 실시예 1에 기재된 바와 같이 mAb 농도의 함수로서 항-IL13 및 항-CD20 항체 용액 내의 육안으로 보이지 않는 미립자 수를 보여준다.
- 도 12는 실시예 1에 기재된 바와 같이 항-IL13 항체의 125 mg/mL 용액의 비탁계, 탁도계, 및 정적 광 산란의 측정값을 보여준다.

도 13은 실시예 1에 기재된 바와 같이 125 mg/mL 및 204 mg/mL의 항-IL13 항체에 대한 상이한 pH 조건에서의 용액 유백광의 온도 의존성을 요약한다.

도 14는 실시예 1에 기재된 바와 같이 항-IL13 제제 조성 및 용액 pH의 함수로서 모세관 DSC에서의 2개의 부분적으로 분할된 피크에 대해 관찰된 열 용융 전이 피크를 요약한다.

도 15는 실시예 1에 기재된 바와 같이 지시되고 0.1-1.0 mg/mL로부터 측정된 바와 같은 단순 완충제 중 샘플을 사용하여 용액 pH의 함수로서 항-IL13 항체에 대해 측정된 삼투성 제2 비리알 계수 (B_2)를 요약한다 .

도 16은 실시예 1에 기재된 바와 같이 1.0-10 mg/mL의 범위에 걸쳐 제제 조성 및 pH의 함수로서 항-IL13 항체에 대해 측정된 제2 비리알 계수를 보여준다.

도 17은 실시예 1에 기재된 바와 같이 강체 구 (HS) 모델과 비교하여 각각의 항-IL13 및 항-CD20 항체에 대해 측정된 정적 광 산란 강도 대 농도를 보여준다.

도 18은 실시예 1에 기재된 바와 같이 최대 200 mg/mL의 농도에서 관찰된 겔보기 분자량으로 나타낸 제제 pH의 함수로서 항-IL13 항체에 대한 정적 광 산란 데이터를 보여준다.

도 19는 실시예 1에 기재된 바와 같이 최대 200 mg/mL의 고농도 용액 중의 항-IL13 및 항-CD20 항체의 겔보기 분자량을 보여준다.

도 20은 실시예 1에 기재된 바와 같이 25°C에서 각각의 제제 조건 하에 항-IL13 및 항-CD20에 대해 측정된 전단 점도를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 전문 과학 용어는 본 발명이 속한 분야의 당업자가 통상적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다. 문헌 [Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, N.Y. 1994), 및 March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4th ed., John Wiley & Sons (New York, N.Y. 1992)]은 당업자에게 본원에 사용된 다수의 용어에 대한 일반적 지침을 제공한다.

[0025] 특정 정의

[0026] 본 명세서를 설명하려는 목적을 위해, 하기 정의가 적용될 것이고, 적절한 경우에는 언제라도, 단수형으로 사용된 용어는 또한 복수형도 포함할 것이고, 그 반대의 경우도 마찬가지이다. 하기 열거된 임의의 정의가 본원에 참조로 포함된 임의의 문헌과 모순되는 경우에는 하기 열거된 정의가 우선한다.

[0027] 본 명세서 및 첨부된 특허청구범위에 사용된 바와 같이, 단수 형태는 문맥상 달리 명백하게 지시되지 않는 한 복수 지시대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어 "단백질" 또는 "항체"에 대한 언급은 각각 복수의 단백질 또는 항체를 포함하고; "세포"에 대한 언급은 세포의 혼합물 등을 포함한다.

[0028] 용어 "제약 제제"는 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적이도록 하는 형태로 존재하고, 제제가 투여될 대상체에 허용되는 않는 독성인 추가의 성분을 함유하지 않는 제제를 지칭한다. 이러한 제제는 멸균된다. "제약상 허용되는" 부형제 (비히클, 첨가제)는 사용된 활성 성분의 유효 용량을 제공하기 위해 대상 포유동물에 합리적으로 투여될 수 있는 것이다.

[0029] "멸균" 제제는 무균성이거나, 또는 모든 살아있는 미생물 및 그의 포자가 없거나, 실질적으로 없다.

[0030] "동결된" 제제는 0°C 미만의 온도에 있는 것이다. 일반적으로, 동결된 제제는 동결-건조되지 않거나, 또는 사전 동결건조 또는 후속 동결건조되지 않는다. 특정 실시양태에서, 동결된 제제는 (스테인레스 스틸 탱크에서) 저장을 위한 동결된 약물 물질, 또는 동결된 약물 제품 (최종 바이알 형태)을 포함한다.

[0031] "안정한" 제제는 저장시에 내부의 단백질이 본질적으로 그의 물리적 안정성 및/또는 화학적 안정성 및/또는 생물학적 활성을 보유하는 것이다. 특정 실시양태에서, 제제는 저장시에 그의 물리적 및 화학적 안정성 뿐만 아니라 그의 생물학적 활성을 본질적으로 보유한다. 저장 기간은 일반적으로 제제의 의도된 저장 수명에 기초하여 선택된다.

[0032] 본원에 사용된 "확장된 안정성"을 갖는 제제는 내부의 단백질이 5°C에서 1년 이상 동안 저장시에 본질적으로 그의 물리적 안정성, 화학적 안정성 및 생물학적 활성을 보유하는 것을 의미한다. 특정 실시양태에서, 저장은 5

℃에서 2년 이상 동안이다. 특정 실시양태에서, 저장은 5℃에서 최대 3년 동안이다.

- [0033] 제약 제제에서 단백질은, 색상 및/또는 선명도의 육안 검사시에, 또는 UV 광 산란 또는 크기 배제 크로마토그래피에 의해 측정시에 응집, 침전 및/또는 변성의 징후가 없거나 거의 없는 경우에 "그의 물리적 안정성을 유지한다".
- [0034] 제약 제제에서 단백질은, 주어진 시간에서의 화학적 안정성이, 단백질이 하기 정의된 바와 같은 그의 생물학적 활성을 계속 유지하는 것으로 간주되도록 하는 경우에 "그의 화학적 안정성을 유지한다". 화학적 안정성은 단백질의 화학적으로 변경된 형태를 검출 및 정량화하여 평가할 수 있다. 화학적 변경은, 예를 들어 크기 배제 크로마토그래피, SDS-PAGE 및/또는 매트릭스-보조 레이저 탈착 이온화/비행 시간형 질량 분광측정법 (MALDI/TOF MS)을 이용하여 평가될 수 있는 크기 변형 (예를 들어, 클리핑)을 포함할 수 있다. 다른 유형의 화학적 변경은, 예를 들어 이온-교환 크로마토그래피 또는 영상화 모세관 등전 포커싱 (icIEF)에 의해 평가될 수 있는 전하 변경 (예를 들어, 탈아미드화의 결과로서 탈생함)을 포함한다.
- [0035] 제약 제제에서 항체는, 주어진 시간에서의 항체의 생물학적 활성이, 예를 들어 항원 결합 검정 또는 효력 검정에서 제약 제제를 제조한 시점에 측정시에 나타난 생물학적 활성의 약 10% 이내 (검정의 오차 이내)에 포함되는 경우에 "그의 생물학적 활성을 유지한다".
- [0036] 본원에서, 모노클로날 항체의 "생물학적 활성"은 항원에 결합하는 항체의 능력을 지칭한다. 이는 항원에 대한 항체 결합을 추가로 포함할 수 있으며, 시험관내 또는 생체내에서 측정될 수 있는 측정가능한 생물학적 반응을 발생시킨다. 이러한 활성은 길항작용 또는 효능작용일 수 있다.
- [0037] "탈아미드화" 모노클로날 항체는 하나 이상의 그의 아스파라긴 잔기가, 예를 들어 아스파르트산 또는 이소-아스파르트산으로 유도체화된 것이다.
- [0038] "탈아미드화되기 쉬운" 항체는 탈아미드화되려는 경향이 있는 것으로 밝혀진 하나 이상의 잔기를 포함하는 것이다.
- [0039] "응집되기 쉬운" 항체는, 특히 냉동 및/또는 교반시에 다른 항체 분자(들)와 응집되는 것으로 밝혀진 것이다.
- [0040] "단편화되기 쉬운" 항체는, 예를 들어 그의 힌지 영역에서 2개 이상의 단편으로 절단되는 것으로 밝혀진 것이다.
- [0041] "탈아미드화, 응집 또는 단편화의 감소"는 다양한 pH 또는 다양한 완충제에서 제제화된 모노클로날 항체에 대한 탈아미드화, 응집 또는 단편화의 방지 또는 그의 양의 감소를 의도한다.
- [0042] 제제화된 항체는 본질적으로 순수하고, 바람직하게는 본질적으로 균질하다 (예를 들어, 오염 단백질 등이 없음). "본질적으로 순수한" 항체는 조성물의 총 중량을 기준으로 적어도 약 90 중량%, 또는 적어도 약 95 중량%의 항체를 포함하는 조성물을 의미한다. "본질적으로 균질한" 항체는 조성물의 총 중량을 기준으로 적어도 약 99 중량%의 항체를 포함하는 조성물을 의미한다.
- [0043] "등장성"은 관심 제제가 본질적으로 인간 혈액과 동일한 삼투압을 갖는 것을 의미한다. 등장성 제제는 일반적으로 약 250 내지 350 mOsm의 삼투압을 가질 것이다. 예를 들어, 증기압 또는 빙냉 유형 삼투압계를 이용하여 등장성을 측정할 수 있다.
- [0044] 본원에 사용된, "완충제"는 그의 산-염기 접합체 성분의 작용에 의해 pH 변화에 영향을 받지 않는 완충 용액을 지칭한다.
- [0045] "히스티딘 완충제"는 히스티딘 이온을 포함하는 완충제이다. 히스티딘 완충제의 예는 히스티딘 클로라이드, 히스티딘 아세테이트, 히스티딘 포스페이트, 히스티딘 술페이트, 히스티딘 숙시네이트 등을 포함한다. 한 실시양태에서, 히스티딘 완충제는 히스티딘 아세테이트이다. 한 실시양태에서, 히스티딘 아세테이트 완충제는 아세트산 (액체)으로 L-히스티딘 (유리 염기, 고체)을 적정함으로써 제조된다. 특정 실시양태에서, 히스티딘 완충제 또는 히스티딘-아세테이트 완충제는 pH 4.5 내지 6.5이다. 특정 실시양태에서, 히스티딘 완충제 또는 히스티딘-아세테이트 완충제는 pH 5.4 내지 6.0이다. 한 실시양태에서, 완충제는 5.6의 pH를 갖는다. 한 실시양태에서, 완충제는 5.7의 pH를 갖는다. 한 실시양태에서, 완충제는 5.8의 pH를 갖는다.
- [0046] 본원에서 "계면활성제"는 표면-활성 작용제, 전형적으로 비이온성 계면활성제를 지칭한다. 본원에서 계면활성제의 예는 폴리소르베이트 (예를 들어, 폴리소르베이트 20 및 폴리소르베이트 80); 폴록사머 (예를 들어, 폴록사머 188); 트리톤; 소듐 도데실 술페이트 (SDS); 소듐 라우렐 술페이트; 소듐 옥틸 글리코시드; 라우릴-, 미리

스틸-, 리놀레일- 또는 스테아릴-술포베타인; 라우릴-, 미리스틸-, 리놀레일- 또는 스테아릴-사르코신; 리놀레일-, 미리스틸- 또는 세틸-베타인; 라우로아미도프로필-, 코카미도프로필-, 리놀레아미도프로필-, 미리스트아미도프로필-, 팔미도프로필- 또는 이소스테아르아미도프로필-베타인 (예를 들어, 라우로아미도프로필); 미리스트아미도프로필-, 팔미도프로필- 또는 이소스테아르아미도프로필-디메틸아민; 소듐 메틸 코코일- 또는 이소소듐 메틸 올레일-타우레이트; 및 모나퀴트(MONAQUAT)TM 시리즈 (모나 인더스트리즈, 인크.(Mona Industries, Inc.), 뉴저지주 패터슨); 폴리에틸 글리콜, 폴리프로필 글리콜, 및 에틸렌과 프로필렌 글리콜의 공중합체 (예를 들어, 플루로닉스(Pluronic), PF68 등) 등을 포함한다. 한 실시양태에서, 계면활성제는 폴리소르베이트 20이다.

[0047] "보존제"는, 예를 들어 박테리아 작용을 본질적으로 감소시켜 다용도 제제의 생산을 용이하게 하기 위하여 제제에 임의로 포함될 수 있는 화합물이다. 가능한 보존제의 예는 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드, 헥사메토늄 클로라이드, 벤즈알코늄 클로라이드 (알킬기가 장쇄 화합물인 알킬벤질디메틸암모늄 클로라이드의 혼합물) 및 벤제토늄 클로라이드를 포함한다. 다른 유형의 보존제는 방향족 알콜, 예컨대 페놀, 부틸 및 벤질 알콜, 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤, 카테콜, 레조르시놀, 시클로헥산올, 3-펜탄올 및 m-크레졸을 포함한다. 한 실시양태에서, 본원에서 보존제는 벤질 알콜이다.

[0048] "폴리올"은 다중 수산기를 갖는 물질이고, 이는 당 (환원당 및 비환원당), 당 알콜 및 당 산을 포함한다. 폴리올은 제제에 임의로 포함될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에서 폴리올은 약 600 kD 미만 (예를 들어, 약 120 내지 약 400 kD 범위)의 분자량을 갖는다. "환원당"은 금속 이온을 환원시키거나 또는 단백질 내의 리신 및 다른 아미노기와 공유적으로 반응할 수 있는 헤미아세탈기를 함유하는 것이고, "비환원당"은 환원당의 이러한 특성을 갖지 않는 것이다. 환원당의 예는 프룩토스, 만노스, 말토스, 락토스, 아라비노스, 크실로스, 리보스, 람노스, 갈락토스 및 글루코스이다. 비환원당은 수크로스, 트레할로스, 소르보스, 멜레지토스 및 라피노스를 포함한다. 만니톨, 크실리톨, 에리트리톨, 트레이톨, 소르비톨 및 글리세롤은 당 알콜의 예이다. 당 산과 관련하여, 이는 L-글루코네이트 및 그의 금속 염을 포함한다. 제제가 동결-해동에 안정한 것이 바람직한 경우, 폴리올은, 전형적으로 그가 제제 중의 항체를 불안정화시키도록 동결 온도 (예를 들어, -20°C)에서 결정화되지 않는 것이다. 한 실시양태에서, 폴리올은 비환원당이다. 한 이러한 실시양태에서, 비환원당은 수크로스이다.

[0049] 본원에 사용된 "천식"은 가변성 및 재발성 증상, 가역성 기류 폐쇄 (예를 들어, 기관지확장제에 의함) 및 기저염증과 연관될 수 있거나 연관되지 않을 수 있는 기관지 과민반응을 특징으로 하는 복합 장애를 지칭한다. 천식의 예는 아스피린 민감성/악화된 천식, 아토피성 천식, 중증 천식, 경도 천식, 중등도 내지 중증 천식, 코르티코스테로이드 미경험 천식, 만성 천식, 코르티코스테로이드 내성 천식, 코르티코스테로이드 불응성 천식, 새로 진단된 치료받지 않은 천식, 흡연으로 인한 천식, 코르티코스테로이드로 제어되지 않는 천식, 및 문헌 [J Allergy Clin Immunol (2010) 126(5):926-938]에 언급된 바와 같은 다른 천식을 포함한다.

[0050] 본원에서 사용될 때, "치료"는 치료되는 개체 또는 세포의 자연적 과정을 변경시키기 위한 시도의 임상적 개입을 나타내고, 임상 병리상태의 진행 전에 또는 진행 동안 수행될 수 있다. 바람직한 치료 효과는 질환 또는 그의 상태 또는 증상의 발생 또는 재발의 방지, 질환의 상태 또는 증상의 경감, 질환의 임의의 직접적인 또는 간접적인 병리학적 결과의 감소, 질환 진행 속도의 감소, 질환 상태의 개선 또는 완화, 및 차도 또는 개선된 예후의 달성을 포함한다.

[0051] "유효량"은 목적하는 치료 또는 예방 결과 달성에 필요한 투여량에서 이러한 기간 동안 유효한 양을 지칭한다. 치료제의 "치료 유효량"은 개인의 질환 상태, 연령, 성별 및 중량, 개체에서 요구되는 반응을 유도하기 위한 항체의 능력과 같은 인자에 따라 상이할 수 있다. 치료 유효량은 또한 치료제의 임의의 독성 또는 유해 효과보다 치료상 유익한 효과가 더 큰 양이다.

[0052] "개체", "대상체" 또는 "환자"는 척추동물이다. 특정 실시양태에서, 척추동물은 포유동물이다. 포유동물은 영장류 (인간 및 비-인간 영장류 포함) 및 설치류 (예를 들어, 마우스 및 래트)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 포유동물은 인간이다.

[0053] "의약"은 질환, 장애 및/또는 상태의 치료를 위한 활성 약물이다.

[0054] "항체" (Ab) 및 "이뮤노글로불린" (Ig)은 유사한 구조적 특성을 갖는 당단백질을 지칭한다. 항체는 특정 항원에 대해 결합 특이성을 나타내지만, 이뮤노글로불린은 항체, 및 일반적으로 항원 특이성이 결여된 다른 항체-유사 분자 둘 다를 포함한다. 후자 유형의 폴리펩티드는 예를 들어 림프계에 의해 낮은 수준으로, 골수중에 의해 증가된 수준으로 생산된다.

- [0055] 용어 "항체" 및 "이뮤노글로불린"은 가장 넓은 의미에서 교환가능하게 사용되고, 모노클로날 항체 (예를 들어, 전장 또는 무손상 모노클로날 항체), 폴리클로날 항체, 1가 항체, 다가 항체, 다중특이적 항체 (예를 들어, 바람직한 생물학적 활성을 나타내는 한 이중특이적 항체)를 포함하고, 또한 특정 항체 단편 (본원에서 보다 상세히 기재된 바와 같음)을 포함할 수 있다. 항체는 키메라, 인간, 인간화 및/또는 친화도 성숙 항체일 수 있다.
- [0056] 용어 "전장 항체", "무손상 항체" 및 "전체 항체"는 본원에서 교환가능하게 사용되고, 하기 정의된 항체 단편이 아닌, 그의 실질적으로 무손상 형태의 항체를 지칭한다. 이 용어는 특히 Fc 영역을 함유하는 중쇄를 갖는 항체를 지칭한다.
- [0057] "항체 단편"은 바람직하게는 항원 결합 영역을 포함하는 무손상 항체의 일부를 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체; 단일-쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중 특이적 항체를 포함한다.
- [0058] 항체를 과파인으로 소화시키면 "Fab" 단편으로 지칭되는, 각각 단일 항원-결합 부위를 갖는 2개의 동일한 항원-결합 단편과, 나머지 "Fc" 단편이 생성되며, 이러한 명칭은 그의 용이하게 결정화되는 능력을 반영한 것이다. 펩신 처리에 의해, 2개의 항원-결합 부위를 갖고 여전히 항원에 가교-연결될 수 있는 F(ab')₂ 단편이 생성된다.
- [0059] "Fv"는 완전한 항원-결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 한 실시양태에서, 2-쇄 Fv 중은 단단한, 비-공유 회합된 1개의 중쇄 및 1개의 경쇄 가변 도메인 이량체로 이루어진다. 총괄적으로, Fv의 6개의 CDR은 항체에 항원-결합 특이성을 부여한다. 그러나, 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 3개의 CDR만을 포함하는 Fv의 절반)일지라도 전체 결합 부위보다 친화도가 낮은 하지만 항원을 인식하고 결합하는 능력을 갖는다.
- [0060] Fab 단편은 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 함유하고, 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역으로부터의 1개 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에 수개의 잔기가 부가되었다는 점에서 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 본원에서 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 유리 티올 기를 보유하는 Fab'에 대한 명칭이다. F(ab')₂ 항체 단편은 본래 그 사이에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로 생산된다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링이 또한 공지되어 있다.
- [0061] 본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 동종인 항체 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하며, 즉, 이 집단을 구성하는 개별 항체는 소량으로 존재할 수 있는 가능한 돌연변이, 예를 들어 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 따라서, 수식어 "모노클로날"은 개별 항체들의 혼합물이 아닌 것으로서의 항체의 특징을 나타낸다. 특정 실시양태에서, 이러한 모노클로날 항체는 전형적으로 표적에 결합하는 폴리펩티드 서열을 포함하는 항체를 포함하고, 여기서 표적 결합 폴리펩티드 서열은 다수의 폴리펩티드 서열로부터 단일 표적 결합 폴리펩티드 서열의 선택을 포함하는 과정에 의해 수득한다. 예를 들어, 선택 과정은 다수의 클론, 예컨대 하이브리도마 클론, 파지 클론 또는 재조합 DNA 클론의 풀로부터 독특한 클론을 선택하는 것일 수 있다. 선택된 표적 결합 서열은 예를 들어 표적에 대한 친화도 개선, 표적 결합 서열의 인간화, 세포 배양물 중 그의 생산 개선, 생체내에서의 그의 면역원성 감소, 다중특이적 항체의 생성 등을 위해 추가로 변경될 수 있고, 변경된 표적 결합 서열을 포함하는 항체도 본 발명의 모노클로날 항체임을 이해해야 한다. 상이한 결정기 (에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 전형적으로 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 달리, 모노클로날 항체 제제의 각 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정기에 대해 지시된다. 모노클로날 항체 제제는 이것의 특이성에 더하여 전형적으로 다른 이뮤노글로불린에 의해 오염되지 않았다는 점에서 유리하다.
- [0062] 수식어 "모노클로날"은 항체의 특징이 실질적으로 동종인 항체 집단으로부터 수득된 것임을 나타내며, 임의의 특정한 방법을 통한 항체 생산이 필요하다는 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용될 모노클로날 항체는 다양한 기술, 예를 들어 하이브리도마 방법 (예를 들어, 문헌 [Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975); Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)]), 재조합 DNA 방법 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567 참조), 파지 디스플레이 기술 (예를 들어, 문헌 [Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004); 및 Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132(2004)] 참조), 및 인간 이뮤노글로불린 서열을 코딩하는 인간 이뮤노글로불린 유전자와 또는 유전자의 일부 또는 전부를 갖는 동물에서 인간 또는 인간-유사 항체를 생산하기 위한 기술 (예를 들어, W098/24893; W096/34096; W096/33735; W091/10741; 문헌 [Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., Nature 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immunol. 7:33 (1993)]; 미국 특허 번호 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016; [Marks et al., Bio.Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnol. 14: 845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnol. 14: 826 (1996) 및 Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995)] 참조)에 의해 제조될 수 있다.

[0063] 본원에서 모노클로날 항체는 특히 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정한 종으로부터 유래되거나 특정한 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이고, 쇠(들)의 나머지 부분은 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라" 항체, 뿐만 아니라 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 이러한 항체의 단편을 포함한다 (미국 특허 번호 4,816,567; 및 문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6855-9855 (1984)]).

[0064] "천연 항체"는 변화하는 구조를 갖는 자연 발생 이뮤노글로불린 분자를 지칭한다. 예를 들어, 천연 IgG 항체는 디설피드-결합된 2개의 동일한 경쇄 및 2개의 동일한 중쇄로 이루어진 약 150,000 달톤의 이종사량체 당단백질이다. N-말단으로부터 C-말단으로, 각각의 중쇄는 가변 영역 (VH) (또한 가변 중쇄 도메인 또는 중쇄 가변 도메인으로 지칭됨)에 이어 3개의 불변 도메인 (CH1, CH2 및 CH3)을 갖는다. 유사하게, N-말단으로부터 C-말단으로, 각각의 경쇄는 가변 영역 (VL) (또한 가변 경쇄 도메인 또는 경쇄 가변 도메인으로 지칭됨)에 이어 불변 경쇄 (CL) 도메인을 갖는다. 항체의 경쇄는 그의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기반으로, 카파 (κ) 및 람다 (λ)로 지칭되는 2가지 유형 중 하나로 할당될 수 있다.

[0065] 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체의 항원에 대한 결합에 관여하는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 지칭한다. 천연 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인 (각각 VH 및 VL)은 일반적으로 유사한 구조를 갖고, 각각의 도메인은 4개의 보존된 프레임워크 영역 (FR) 및 3개의 초가변 영역 (HVR)을 포함한다. (예를 들어, 문헌 [Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)] 참조). 단일 VH 또는 VL 도메인은 항원-결합 특이성을 부여하기에 충분할 수 있다. 또한, 특정한 항원에 결합하는 항체는 각각 상보성 VL 또는 VH 도메인의 라이브러리를 스크리닝하기 위해 항원에 결합하는 항체로부터의 VH 또는 VL 도메인을 사용하여 단리할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991)]을 참조한다.

[0066] "인간화" 항체는 비-인간 HVR로부터의 아미노산 잔기 및 인간 FR로부터의 아미노산 잔기를 포함하는 키메라 항체를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 인간화 항체는 실질적으로 적어도 1개, 전형적으로 2개의 가변 도메인을 모두 포함할 것이며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 HVR (예를 들어, CDR)은 비-인간 항체의 것에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 항체의 것에 상응한다. 인간화 항체는 임의로 인간 항체로부터 유래된 항체 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 항체, 예를 들어 비-인간 항체의 "인간화 형태"는 인간화를 거친 항체를 지칭한다.

[0067] 본원에 사용된 용어 "초가변 영역" 또는 "HVR"은 서열이 초가변성이고/거나 구조적으로 한정된 루프 ("초가변 루프")를 형성하는 항체 가변 도메인의 각각의 영역을 지칭한다. 일반적으로, 천연 4-쇄 항체는 6개의 HVR; VH 내의 3개 (H1, H2, H3) 및 VL 내의 3개 (L1, L2, L3)를 포함한다. HVR은 일반적으로 초가변 루프로부터의 및/또는 "상보성 결정 영역" (CDR)으로부터의 아미노산 잔기를 포함하며, 후자는 서열 가변성이 가장 높고/거나 항원 인식과 관련된다. 예시적인 초가변 루프는 아미노산 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) 및 96-101 (H3)에서 발생한다. (문헌 [Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)]). 예시적인 CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3)은 L1의 아미노산 잔기 24-34, L2의 50-56, L3의 89-97, H1의 31-35B, H2의 50-65 및 H3의 95-102에서 발생한다. (문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]). VH 내의 CDR1을 제외하고, CDR은 일반적으로 초가변 루프를 형성하는 아미노산 잔기를 포함한다. CDR은 또한 항원에 접촉하는 잔기인 "특이성 결정 잔기" 또는 "SDR"을 포함한다. SDR은 단축-CDR 또는 a-CDR로 지칭되는 CDR의 영역 내에 함유된다. 예시적인 a-CDR (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2 및 a-CDR-H3)은 L1의 아미노산 잔기 31-34, L2의 50-55, L3의 89-96, H1의 31-35B, H2의 50-58 및 H3의 95-102에서 발생한다. (문헌 [Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)] 참조). 달리 나타내지 않는 한, HVR 잔기 및 가변 도메인에서의 다른 잔기 (예를 들어, FR 잔기)는 본원에서 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에 따라 넘버링된다.

- [0068] "인간 항체"는 인간에 의해 생산되고/거나 본원에 개시된 바와 같은 임의의 인간 항체 제조 기술을 사용하여 제조된 항체에 대응하는 아미노산 서열을 포함하는 항체이다. 상기 기술은 인간-유래된 조합 라이브러리, 예를 들어 파지 디스플레이 라이브러리의 스크리닝 (예를 들어, 문헌 [Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) 및 Hoogenboom et al., Nucl. Acids Res., 19: 4133-4137 (1991)] 참조); 인간 모노클로날 항체의 생산을 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주의 사용 (예를 들어, 문헌 [Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 55-93 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 및 Boerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991)] 참조); 및 내인성 이뮤노글로불린 생산의 부재 하에 인간 항체의 전체 레퍼토리를 생산할 수 있는 트랜스제닉 동물 (예를 들어, 마우스)에서의 모노클로날 항체의 생산 (예를 들어, 문헌 [Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362: 255 (1993); Bruggermann et al., Year in Immunol., 7: 33 (1993)] 참조)을 포함한다. 인간 항체의 이러한 정의는 비-인간 동물로부터의 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화 항체는 명백하게 제외한다.
- [0069] "친화도 성숙" 항체는 변경(들)을 나타내지 않는 모 항체와 비교해서 항원에 대한 항체의 친화도를 개선하는, 그의 하나 이상의 CDR 내에서의 하나 이상의 변경을 갖는 항체이다. 한 실시양태에서, 친화도 성숙 항체는 표적 항원에 대해 나노몰 또는 심지어 피코몰의 친화도를 갖는다. 친화도 성숙 항체는 당업계에 공지된 절차에 의해 생산된다. 문헌 [Marks et al. Bio/Technology 10:779-783 (1992)]은 VH 및 VL 도메인 서플링에 의한 친화도 성숙을 기재하고 있다. HVR 및/또는 프레임워크 잔기의 무작위 돌연변이 유발은 문헌 [Barbas et al. Proc Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813 (1994); Schier et al. Gene 169:147-155 (1995); Yelton et al. J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); 및 Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)]에 기재되어 있다.
- [0070] "차단 항체" 또는 "길항제 항체"는 자신이 결합하는 항원의 생물학적 활성을 억제하거나 저하시키는 항체이다. 특정 차단 항체 또는 길항제 항체는 항원의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 완전히 억제한다.
- [0071] 항체의 "부류"는 그의 중쇄에 의해 보유되는 불변 도메인 또는 불변 영역의 유형을 지칭한다. 5종의 주요 부류의 항체: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재하고, 이들 중 몇몇은 하위부류 (이소형), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2로 추가로 분류될 수 있다. 상이한 부류의 이뮤노글로불린에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α , δ , ϵ , γ 및 μ 로 지칭된다.
- [0072] 본원에 사용된 "항-IL13 항체"는 또한 레브리키주맘을 지칭하며, 인간 IL13에 결합하는 인간화 IgG4 항체를 의미한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 3개의 중쇄 CDR, CDR-H1 (서열 1), CDR-H2 (서열 2), 및 CDR-H3 (서열 3)을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 3개의 경쇄 CDR, CDR-L1 (서열 4), CDR-L2 (서열 5), 및 CDR-L3 (서열 6)을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 3개의 중쇄 CDR 및 3개의 경쇄 CDR, CDR-H1 (서열 1), CDR-H2 (서열 2), CDR-H3 (서열 3), CDR-L1 (서열 4), CDR-L2 (서열 5), 및 CDR-L3 (서열 6)을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 서열 7 및 8로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 가변 중쇄 영역, VH를 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 서열 9의 아미노산 서열을 갖는 가변 경쇄 영역, VL을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 서열 7 및 8로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 가변 중쇄 영역, VH 및 서열 9의 아미노산 서열을 갖는 가변 경쇄 영역, VL을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 서열 10 또는 서열 11 또는 서열 12 또는 서열 13의 아미노산 서열을 갖는 중쇄를 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 서열 14의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 서열 10, 서열 11, 서열 12 및 서열 13으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열 14의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다. 항-IL13 항체는 국제 공개 번호 2005/062967에 추가로 기재되어 있다.
- [0073] "단리된" 생물학적 분자, 예컨대 핵산, 폴리펩티드 또는 항체는 그의 자연 환경의 적어도 1종의 성분으로부터 확인 및 분리 및/또는 회수된 것이다.
- [0074] 본원에서 "약" 값 또는 파라미터에 대한 언급은 그 값 또는 파라미터 자체에 대한 실시양태를 포함(하고 이를 기재)한다. 예를 들어, "약 X"를 언급하는 기재는 "X"의 기재를 포함한다.
- [0075] "피하 투여 장치"는 약물, 예를 들어 치료 항체, 또는 제약 제제를 피하 경로에 의해 투여되도록 채택되거나 설계된 장치를 지칭한다. 예시적인 피하 투여 장치는 시린지 (예비-충전된 시린지 포함), 주사 장치, 주입 펌프, 주사기 펜, 무바늘 장치 및 패치 전달 시스템을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 피하 투여 장치는 제약 제제의 특정 부피, 예를 들어 약 1.0 mL, 약 1.25 mL, 약 1.5 mL, 약 1.75 mL 또는 약 2.0 mL를 투여한다.

- [0076] "포장 삽입물" 또는 "라벨"은 치료 제품 또는 의약의 상업용 패키지에 통상적으로 포함되어 있으며, 적응증, 용법, 투여량, 투여, 금기, 포장 제품과 조합될 다른 치료 제품 및/또는 이러한 치료 제품 또는 의약의 사용에 관한 경고 등에 대한 정보를 함유하는 지침서를 지칭하는데 사용된다.
- [0077] "키트"는 천식 또는 다른 폐 장애의 치료를 위한 하나 이상의 시약, 예를 들어, 의약을 포함하는 임의의 제조품 (예를 들어, 패키지 또는 용기)이다. 특정 실시양태에서, 제조품은 본 발명의 방법을 수행하기 위한 유닛으로서 프로모션되거나, 배급되거나 또는 판매된다.
- [0078] "표적 청중"은, 마케팅 또는 광고에 의해서와 같이, 특히 특정한 용도, 치료 또는 적응증을 위한 특정한 의약이 프로모션되고 있거나 프로모션되도록 의도되는 일군의 사람들 또는 기관, 예컨대 개별 환자, 환자 집단, 신문, 의학 문헌 및 잡지의 구독자, 텔레비전 또는 인터넷 시청자, 라디오 또는 인터넷 청취자, 의사, 제약 회사 등이다.
- [0079] 용어 "혈청 샘플"은 개체로부터 수득한 임의의 혈청 샘플을 나타낸다. 포유동물로부터 혈청을 얻기 위한 방법은 당업계에 공지되어 있다.
- [0080] 용어 "전혈"은 개체로부터 수득한 임의의 전혈 샘플을 지칭한다. 전형적으로, 전혈은 모든 혈액 성분, 예를 들어, 세포 성분 및 혈장을 함유한다. 포유동물로부터 전혈을 수득하는 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다.
- [0081] 특정 질환 또는 장애를 앓고 있는 환자에 대한 증가된 임상적 이익 또는 특정한 치료제 또는 치료 요법에 대한 반응의 예측과 연관된 바이오마커의 "양" 또는 "수준"은 생물학적 샘플의 검출가능한 수준이다. 이는 당업자에게 공지되고 또한 본원에 개시된 방법에 의해 측정될 수 있다. 평가되는 바이오마커의 발현 수준 또는 양은 치료 또는 치료제에 대한 반응 또는 예측된 반응을 결정하기 위해 사용될 수 있다.
- [0082] 용어 "발현의 수준" 또는 "발현 수준"은 일반적으로 교환가능하게 사용되고, 일반적으로 생물학적 샘플에서 미노산 생성물 또는 단백질의 양을 지칭한다. "발현"은 일반적으로 유전자-코딩 정보가, 세포 내에 존재하고 작동하는 구조로 전환되는 과정을 지칭한다. 따라서, 본원에 사용된 유전자의 "발현"은 폴리뉴클레오티드로의 전사, 단백질로의 번역 또는 심지어 단백질의 번역후 변형을 지칭할 수 있다.
- [0083] 천식 및 다른 폐 질환 및 특정 알레르기성, 자가면역 및 다른 염증성 질환
- [0084] 천식은 기도 염증, 과민반응 및 폐쇄를 포함하는 만성 폐 질환으로 설명된다. 생리학적으로, 기도 과민반응은 메타콜린 또는 히스타민을 사용한 기관지자극 후에 감소된 기관지 기류에 의해 보고된다. 기도 폐쇄를 유발하는 다른 촉발인자는 차가운 공기, 운동, 바이러스성 상기도 감염, 담배 연기 및 호흡 알레르겐을 포함한다. 알레르겐으로의 기관지 자극은 기관지 기류에서 신속한 조기 이뮤노글로불린 E (IgE)-매개 질환을 유발한 후에 다수의 환자에서 4-8시간 동안 기관지 기류에서 질환과의 후기 IgE-매개 반응을 유발한다. 조기 반응은 염증성 물질, 예컨대 히스타민, PGD², 류코트리엔, 트립타제 및 혈소판 활성화 인자 (PAF)의 급성 방출에 의해 일어나는 반면, 후기 반응은 신생 합성 염증유발 시토카인 (예를 들어, TNF α , IL4, IL13) 및 케모카인 (예를 들어, MCP-1 및 MIP-1 α)에 의해 일어난다 (문헌 [Busse et al., Allergy: Principles and Practice, Ed. Middleton, 1173 (1998)]). 만성 천식성 환자에서, 지속적인 폐 증상은 Th2 세포의 증강된 반응에 의해 매개된다. Th2 시토카인, 특히 설치류의 천식모델에서 나타난 바와 같이 기도에서 NK 표현형 (NKT)을 갖는 Th2 세포에 의해 생산된 IL13 및 IL4 (문헌 [Akbari et al., Nature Med., 9: 582 (2003)])는 질환에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 여겨진다 (문헌 [Larche et al., J. Allergy Clin. Immunol., 111: 450 (2003)]). 천식성 기도의 전반적 병리상태는 폐 과다팽창, 평활근 비대증, 망상층 증점, 점막 부종, 상피 세포 부육형성, 섬모 세포 파괴 및 점액선 과다분비를 나타낸다. 현미경상에서, 천식은 기관지 조직, 기관지 분비액 및 점액에서 호산구, 호중구, 림프구 및 형질 세포의 증가된 수의 존재에 의해 특성화된다. 처음에, 활성화된 CD4⁺ T-림프구에 의한 혈류로부터 기도로의 백혈구의 동원이 존재한다. 활성화된 T-림프구는 또한 호산구, 비만 세포 및 림프구로부터 염증 매개물의 방출을 지시한다. 또한 Th2 세포는 IL4, IL5, IL9 및 IL13을 생산한다. IL4는 IL13과 함께 IgM으로부터 IgE 항체로의 전환 신호를 전달한다.
- [0085] 알레르겐에 의한 막-결합된 IgE 분자의 가교는 비만 세포의 탈과립화를 발생시켜 히스타민, 류코트리엔 및 기도 염증을 영속시키는 다른 매개자를 방출시킨다. IL5는 호산구의 동원 및 활성화를 활성화한다. 활성화된 비만 세포 및 호산구는 또한 염증의 영속화를 돕는 그의 시토카인을 생성한다. 폐 조직에 대한 손상 후에 복구된 폐에서 이러한 반복되는 주기 염증은 기도의 장기 구조적 변화 ("재형성")를 일으킬 수 있다.
- [0086] 중등도 천식은 현재 돌발 증상 또는 알레르겐- 또는 운동-유발 천식을 완화하기 위해 일일 흡입용 항염증-코르

티코스테로이드 또는 비만 세포 억제제, 예컨대 크로몰린 소듐 또는 네도크로밀 플러스 흡입용 베타2-효능제 (필요에 따라) (1일에 3-4회)를 사용하여 치료된다. 크로몰린 소듐 및 네도크로밀은 기관지연축 및 염증을 차단하지만, 통상적으로 오직 알레르겐 또는 운동과 연관된 천식에만 효과적이며, 전형적으로는 오직 소아 천식에 만 효과적이다. 흡입용 코르티코스테로이드는 염증, 기도 과다반응 및 폐쇄를 개선하고, 급성 악화의 수를 감소시킨다. 그러나, 효과가 명백해지기 전에 적어도 수개월이 걸리고, 현저한 개선이 일어나기 위해서는 최대 1년이 걸린다. 가장 빈번한 부작용은 애성 및 경구 진균 감염, 즉 칸디다증이다. 보다 심각한 부작용으로 예를 들어 부분적 부신 억제, 성장 억제 및 감소된 골 형성이 보고되었으나, 단지 보다 높은 용량을 사용하는 경우만 이었다. 베클로메타손, 트리암시놀론 및 플루니솔리드는 아마도 유사한 효력을 가질 것인 반면; 부데소니드 및 플루티카손은 보다 강력하고, 보고에 따르면 보다 적은 전신 부작용을 갖는다.

[0087] 심지어는 경미한 질환을 갖는 환자가 활성화된 T 세포, 비만 세포 및 호산구를 갖는 점막 및 상피의 침윤을 비롯하여 기도 염증을 나타낸다. T 세포 및 비만 세포는 호산구 성장 및 성숙 및 IgE 항체의 생산을 촉진하는 시토카인을 방출하고, 이들은 이어서 미세혈관 투과성을 증가시키고, 상피를 파괴하고, 신경 반사 및 점액-분비선을 자극한다. 그 결과는 기도 과다반응, 기관지수축 및 과다분비이며, 천명, 기침 및 호흡곤란이 나타난다.

[0088] 전통적으로, 천식은 경구 및 흡입 기관지확장제를 사용하여 치료된다. 이러한 작용제는 천식의 증상을 돕지만, 기저 염증에 대해서는 어떠한 작용도 하지 않는다. 지난 십년 동안 천식의 병인에 있어 염증의 중요성에 대한 인식은 코르티코스테로이드의 사용 증가로 이어졌으나, 다수의 환자는 계속 제어되지 않는 천식을 앓고 있다.

[0089] 천식 뿐만 아니라, 본 발명의 제제에 의해 치료될 수 있는 다른 질환은 알레르기, 자가면역 질환 또는 다른 염증성 질환을 포함한다. 다른 알레르기성 질환은 알레르기성 비염, 아토피성 피부염, 식품 과민증 및 두드러기를 포함하고; 면역-매개 피부 질환은 수포성 피부 질환, 다형성 홍반 및 접촉성 피부염을 포함하고; 자가면역 질환은 건선, 류마티스 관절염, 소아 만성 관절염; 염증성 장 질환 (즉, 궤양성 결장염, 크론병)을 포함하고; IL13과 연관된 다른 질환은 특발성 간질성 폐렴, 배상 세포 화생, 염증성 및 섬유화 폐 질환, 예컨대 남성 섬유증, 글루텐-감수성 장병증 및 휘플병; 폐의 면역 질환, 예컨대 호산구성 폐렴, 특발성 폐 섬유증 및 과민성 폐렴; 만성 폐쇄성 폐 질환, RSV 감염, 포도막염, 경피증, 골다공증 및 호지킨 림프종을 포함한다.

[0090] 특발성 폐 섬유증 (IPF)은 본 발명의 제제를 사용하여 치료할 수 있는 장애이다. IPF는 폐 유조직의 진행성 간질성 섬유증을 특징으로 하는 제한성 폐 질환으로, 미국에서 대략 100,000명 환자가 발생하였다 (문헌 [Raghu et al., Am J Respir Crit Care Med 174:810-816 (2006)]). IPF와 연관된 이 간질성 섬유증은 폐 기능의 진행성 손실로 일어져, 대부분의 환자에서 호흡 부전으로 인한 사망이 발생한다. 진단 시점으로부터의 중앙 생존기간은 2-3년이다 (문헌 [Raghu et al., Am J Respir Crit Care Med 183:788-824 (2011)]). IPF의 병인 및 핵심 분자 및 병리생리학적 구동인자는 알려져 있지 않다. IPF 환자에서 생존을 연장하는 것으로 밝혀진 유일한 치료는 폐 이식이다 (문헌 [Thabut et al., Annals of internal medicine 151:767-774 (2009)]). 그러나, 폐 이식은 상당한 이환율과 연관되고, 모든 IPF 환자는 이를 위한 적절한 후보가 아니며, 적합한 공여자 폐의 상대적 부족이 존재한다. 수많은 시도에도 불구하고, 일부 개입은 일부 환자의 폐 기능 감퇴의 속도를 늦춘 것으로 나타났으나, 어떠한 약물 요법도 현재까지 IPF 환자에서의 무작위화 위약-제어된 개입 시험에서 생존을 실질적으로 연장시키는 것으로 밝혀지지 않았다 (문헌 [Raghu et al., Am J Respir Crit Care Med 183:788-824 (2011); Richeldi et al., The New England J. of Med. 365:1079-1087 (2011)]).

[0091] 모든 IPF 환자에 대한 예후가 심각할지라도, 질환 경로에 있어 상당한 이질성이 존재한다 (문헌 [Raghu et al., Am J Respir Crit Care Med 183:788-824 (2011)]). 일부 환자는 10년 이상만큼 오랜 기간에 걸쳐 상대적으로 일정한 비율로 폐 기능을 잃어가면서 상대적으로 무통성 과정을 나타낸 반면, 다른 환자들은 보다 급속한 폐 기능의 감퇴를 경험하였으며 진단으로부터 1년 또는 2년 내에 사망에 이르렀다. 또한, 일부 환자는 전형적으로 폐 기능의 갑작스러운 현저한 감소를 특징으로 하는 질환의 급성 악화를 앓고 있다. 일반적으로, 이러한 환자는 급성 사건 후에 완전히 회복되지 않고, 종종 악화 동안 또는 그 직후에 사망한다. 질환 경로에 있어 이러한 이질성은 다양한 IPF 환자가 그의 질환의 원인이 되는 상이한 병리생리학적 인자를 가질 수 있으며, 이는 본 발명의 제제와 같은 분자 표적화된 치료제에 차등적으로 영향을 받기 쉬울 수 있다.

[0092] 호산구성 염증은 알레르기성 및 비-알레르기성 둘 다의 다양한 질병 (문헌 [Gonlugur (2006) Immunol. Invest. 35(1):29-45])과 연관된다. 염증은 손상에 대한 살아있는 조직의 회복성 반응이다. 염증 반응의 특성은 조직 자체에서 생산된 특정 화학물질로 인한 손상된 조직에서의 백혈구의 축적이다. 호산구 백혈구는 폭넓게 다양한 상태, 예컨대 알레르기성 장애, 기생충 감염 및 신생물성 질환에서 축적된다 (문헌 [Kudlacz et al., (2002) Inflammation 26: 111-119]). 면역계의 성분인 호산구 백혈구는 점막 표면의 방어적 성분이다. 이들은 항원

뿐만 아니라 기생충, 화학물질 및 외상에도 반응한다.

[0093] 조직 호산구증가증은 아토피성 피부염에서 뿐만 아니라 피부 질환, 예컨대 습진, 천포창, 급성 두드러기 및 독성 표피 괴사증에서 발생한다 (문헌 [Rzany et al., 1996]). 호산구는 IgE-매개된 알레르기성 피부 반응에서 조직에, 및 비어있는 과립 단백질에 축적된다 (문헌 [Nielsen et al., 2001]). 비만 세포와 조합된 호산구는 관절 염증을 유발할 가능성이 있다 (문헌 [Miossec et al., 1997]). 호산구성 염증은 때때로 관절 외상을 수반한다. 활액 호산구증가증은 질환, 예컨대 류마티스 관절염, 기생충성 질환, 과다호산구 증후군, 라임병 및 알레르기성 과정, 뿐만 아니라 혈관질환 및 관절조영술과 연관될 수 있다 (문헌 [Atanes et al., 1996]). 호산구성 염증은 마찬가지로 골에 영향을 미칠 수 있다 (문헌 [Yetiser et al., 2002]). 호산구성 근육 질환의 예는 호산구성 근주위염, 호산구성 다발근염 및 국부 호산구성 근염을 포함한다 (문헌 [Lakhanpal et al., 1988]). 골격근에 영향을 미치는 호산구성 염증은 기생충 감염 또는 약물 또는 과다호산구증가증 중 일부 전신성 장애 (예를 들어, 특발성 과다호산구 증후군 및 호산구증가증-근육통 증후군)의 특징과 연관될 수 있다. 호산구는 자가면역 항체에 의해 인식된 에피토프에 대한 염증 반응에 참여한다 (문헌 [Engineer et al., 2001]). 결합 조직 질환은 호중구성, 호산구성 또는 림프구성 혈관 염증으로 이어질 수 있다 (문헌 [Chen et al., 1996]). 조직 및 말초 혈액 호산구증가증은 활성 류마티스성 질환에서 발생할 수 있다. 결합 조직 질환의 일종인 강직성 척추염에서의 혈청 ECP 수준의 상승은 호산구가 또한 기본적인 과정에 관련된다는 것을 시사한다 (문헌 [Feltelius et al., 1987]). 베게너 육아종증은 드물게 폐 결절, 흉막 삼출 및 말초 혈액 호산구증가증을 나타낼 수 있다 (문헌 [Krupsky et al., 1993]).

[0094] 적어도 400/mm³의 말초 혈액 호산구증가증은 전신 경화증의 사례의 7%, 국제화된 경피증의 사례의 31% 및 호산구성 근막염의 사례의 61%에서 발생할 수 있다 (문헌 [Falanga and Medsger, 1987]). 경피증은 마이스너 (Meissner) 및 아우어바흐 (Auerbach) 신경총과 밀접하게 닮은 염증 과정을 일으키며, 위장계에서 비만 세포 및 호산구 백혈구로 구성된다. 경피증에서 발생시, 호산구-유래 신경독소는 위장 운동 기능장애에 기여할 수 있다 (문헌 [de Schryver Kecskemeti and Clouse, 1989]).

[0095] 호산구는 국제화된 (문헌 [Varga and Kahari, 1997]) 또는 전신성 (문헌 [Bouros et al., 2002]) 결합 조직 증식을 수반할 수 있다. 이들은 섬유모세포에서 프로테오글리칸 분해를 억제함으로써 섬유증을 일으킬 수 있고 (문헌 [Hernnas et al., 1992]), 섬유모세포는 GM-CSF를 분비함으로써 호산구 생존을 매개한다 (문헌 [Vancheri et al., 1989]). 호산구는 비강 (문헌 [Bacherct et al., 2001]), 기관지 (문헌 [Arguelles and Blanco, 1983]) 및 위장 폴립 조직 (문헌 [Assarian and Sundareson, 1985])에서 발견될 수 있다. 마찬가지로, 호산구는 염증성 가성종양 (근섬유모세포 종양)에 국부화될 수 있다. 호산구는 종종 안구 부위에서 염증성 가성종양을 수반하고, 이 경우에 상태는 혈관부종 또는 알레르기성 비결막염을 모방할 수 있다 (문헌 [Li et al., 1992]).

[0096] 호산구성 염증은 (예를 들어, 수술 또는 손상의 결과로서) 조직 외상에서 발견될 수 있다. 호산구성 염증은 또한 심혈관 질병 (예를 들어, 호산구성 심근염, 호산구성 관상 동맥염, 허혈성 심장 질환, 급성 심근경색, 심장 파열)과 연관될 수 있다. 괴사성 염증 과정은 또한 호산구성 염증 (다발근염, 관상 동맥 박리, 신경-베체트병의 괴사성 병변, 치매, 뇌경색)을 포함할 수 있다.

[0097] 특정 치료제

[0098] 천식 및 다른 폐 질환의 치료를 위한 치료제가 본원에 제공된다. 한 실시양태에서, 치료제는 항-IL13 항체이고, 이는 또한 레브리키주맵으로 지칭된다. 레브리키주맵은 IgG4 항체로도 지칭된다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 3개의 중쇄 CDR, CDR-H1 (서열 1), CDR-H2 (서열 2), 및 CDR-H3 (서열 3)을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 3개의 경쇄 CDR, CDR-L1 (서열 4), CDR-L2 (서열 5), 및 CDR-L3 (서열 6)을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 3개의 중쇄 CDR 및 3개의 경쇄 CDR, CDR-H1 (서열 1), CDR-H2 (서열 2), CDR-H3 (서열 3), CDR-L1 (서열 4), CDR-L2 (서열 5), 및 CDR-L3 (서열 6)을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 서열 7 및 8로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 가변 중쇄 영역, VH를 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 서열 9의 아미노산 서열을 갖는 가변 경쇄 영역, VL을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 서열 7 및 8로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 가변 중쇄 영역, VH 및 서열 9의 아미노산 서열을 갖는 가변 경쇄 영역, VL을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 서열 10 또는 서열 11 또는 서열 12 또는 서열 13의 아미노산 서열을 갖는 중쇄를 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 서열 14의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 서열 10, 서열 11, 서열 12 및 서열 13으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열 14의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다. 항-IL13 항체는

국제 공개 번호 2005/062967에 추가로 기재되어 있다.

- [0099] 또 다른 측면에서, 항-IL-13 항체는 서열 8의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 도메인 (VH) 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 VH 서열은 참조 서열에 대해 치환 (예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하지만, 그 서열을 포함하는 항-IL-13 항체는 인간 IL-13에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시양태에서, 총 1 내지 10개의 아미노산이 서열 8에서 치환, 변경, 삽입 및/또는 결실된다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 CDR 외부 영역에서 (즉, FR에서) 일어난다. 임의로, 항-IL13 항체는 서열 8의 VH 서열을 포함한다 (그 서열의 번역후 변형 포함).
- [0100] 또 다른 측면에서, 서열 9의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인 (VL)을 포함하는 항-IL-13 항체가 제공된다. 특정 실시양태에서, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성을 갖는 VL 서열은 참조 서열에 대해 치환 (예를 들어, 보존적 치환), 삽입 또는 결실을 함유하지만, 그 서열을 포함하는 항-IL-13 항체는 IL-13에 결합하는 능력을 보유한다. 특정 실시양태에서, 총 1 내지 10개의 아미노산이 서열 9에서 치환, 삽입 및/또는 결실된다. 특정 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 CDR 외부 영역에서 (즉, FR에서) 일어난다. 임의로, 항-IL-13 항체는 서열 9의 VL 서열을 포함한다 (그 서열의 번역후 변형 포함)
- [0101] 또 다른 실시양태에서, 항-IL-13 항체는 서열 9의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 VL 영역 및 서열 8의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 VH 영역을 포함한다.
- [0102] 특정 분자 바이오마커
- [0103] 특정 경우에, 바이오마커, 예를 들어 혈청 바이오마커는 주어진 치료제를 사용하는 치료를 위한 환자를 선택하는 수단으로서 환자로부터 수득된 생물학적 샘플에서 정량화된다. 미국 출원 번호 61/459760, 61/465425, 61/484650 및 61/574485 (표제 ["Diagnosis and Treatments Related to TH2 Inhibition"])는 페리오스틴 검정 및 본원에 기재된 항-IL13 항체 제제를 사용하는 치료를 위한 환자를 선택하는 방법을 기재한다.
- [0104] 제제를 위한 일반적 기술
- [0105] 항-IL13 항체를 포함하는 제제는 당업계에 공지되고 본원에 추가로 기재된 특정 부형제 및 기술을 이용하여 제조 및 분석될 수 있다. 특정 실시양태에서, 제제화될 항체는 사전 동결건조에 적용되지 않고, 본원의 관심 제제는 수성 제제이다. 특정 실시양태에서, 항체는 전장 항체이다. 한 실시양태에서, 제제 중의 항체는 항체 단편, 예컨대 F(ab')₂이고, 이러한 경우 전장 항체에 대해 발생할 수 없는 문제 (예컨대, Fab에 대한 항체의 클리핑)를 처리할 필요가 있을 수 있다. 제제 중에 존재하는 항체의 치료 유효량은, 예를 들어 바람직한 용량 부피 및 투여 방식(들)을 고려하여 결정된다. 약 0.1 mg/mL 내지 약 250 mg/mL, 또는 약 10 mg/mL 내지 약 200 mg/mL 또는 약 50 mg/mL 내지 약 175 mg/mL가 예시적인 제제 중 항체 농도이다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 125 mg/mL의 농도로 제제화된다. 한 실시양태에서, 항-IL13 항체는 150 mg/mL의 농도로 제제화된다.
- [0106] pH-완충 용액 중에 항체를 포함하는 수성 제제가 제조된다. 특정 실시양태에서, 완충제는 약 4.5 내지 약 6.5 범위의 pH를 갖는다. 특정 실시양태에서 pH는 5.0 내지 6.0의 pH 범위, 또는 pH 5.25 내지 5.75의 범위, 또는 pH 5.3 내지 5.6의 범위에 있다. 본 발명의 특정 실시양태에서, 제제는 5.6 또는 약 5.6의 pH를 갖는다. 본 발명의 특정 실시양태에서, 제제는 5.7 또는 약 5.7의 pH를 갖는다. 본 발명의 특정 실시양태에서, 제제는 5.8 또는 약 5.8의 pH를 갖는다. 상기 범위 내로 pH를 제어할 완충제의 예는 아세테이트 (예를 들어, 히스티딘 아세테이트, 아르기닌 아세테이트, 아세트산나트륨), 숙시네이트 (예컨대, 히스티딘 숙시네이트, 아르기닌 숙시네이트, 소듐 숙시네이트), 글루코네이트, 시트레이트 및 다른 유기 산 완충제, 및 그의 조합을 포함한다. 완충제 농도는 예를 들어 완충제 및 제제의 원하는 등장상에 따라 약 1 mM 내지 약 600 mM일 수 있다. 특정 실시양태에서, 히스티딘을 약 5 mM 내지 40 mM의 농도로 함유한다. 한 실시양태에서, 완충제는 20 mM 히스티딘 아세테이트, pH 5.7이다. 특정 실시양태에서, 완충제는 20 mM 히스티딘 숙시네이트, pH 5.7이다.
- [0107] 계면활성제가 항체 제제에 임의로 첨가될 수 있다. 예시적인 계면활성제는 비이온성 계면활성제, 예컨대 폴리소르베이트 (예를 들어, 폴리소르베이트 20, 80 등) 또는 폴록사머 (예를 들어, 폴록사머 188)를 포함한다. 계면활성제는 제제화된 항체의 응집을 감소시키고/거나 제제 중에서 미립자의 형성을 최소화시키고/거나 흡착을 감소시키는 양으로 첨가된다. 예를 들어, 계면활성제는 약 0.001% 내지 약 0.5%, 또는 약 0.005% 내지 약 0.2%, 또는 약 0.01% 내지 약 0.1%의 양으로 제제 중에 존재할 수 있다. 한 실시양태에서, 계면활성제는 0.03%

의 양으로 제제 중에 존재하는 폴리소르베이트 20이다.

- [0108] 한 실시양태에서, 제제는 상기-확인된 작용제 (예를 들어, 항체, 완충제 및/또는 계면활성제)를 함유하고, 본질적으로 하나 이상의 보존제, 예컨대 벤질 알콜, 페놀, m-크레졸, 클로로부탄올 및 벤제토늄 Cl을 함유하지 않는다. 한 실시양태에서, 제제는 보존제를 함유하지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 보존제는, 특히 제제가 다중투여 제제인 경우에 제제 내에 포함될 수 있다. 보존제의 농도는 약 0.1% 내지 약 2%, 또는 약 0.5% 내지 약 1% 범위일 수 있다. 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 기재된 바와 같은, 하나 이상의 다른 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제를 제제에 포함시킬 수 있는데, 단 이들은 제제의 원하는 특징에 불리한 영향을 미치지 않아야 한다. 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에 비독성이고, 여기에는 추가의 완충제; 공-용매; 아스코르브산 및 메티오닌을 비롯한 항산화제; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA; 금속 착체 (예를 들어, Zn-단백질 착체); 생분해성 중합체, 예컨대 폴리에스테르; 및/또는 염-형성 반대이온이 포함된다.
- [0109] 본원에서 킬레이트화제의 다양한 기제는 종종 EDTA에 중점을 두고 있지만, 다른 금속 이온 킬레이트화제가 또한 본 발명에 포함되는 것으로 인지될 것이다. 금속 이온 킬레이트화제는 당업자에게 널리 공지되어 있으며, 이는 아미노폴리카르복실레이트, EDTA (에틸렌디아민테트라아세트산), EGTA (에틸렌 글리콜-비스(베타-아미노에틸 에테르)-N,N,N',N'-테트라아세트산), NTA (니트릴로트리아세트산), EDDS (에틸렌 디아민 디숙시네이트), PDTA (1,3-프로필렌디아민테트라아세트산), DTPA (디에틸렌트리아민펜타아세트산), ADA (베타-알라닌디아세트산), MGCA (메틸글리신디아세트산) 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 추가로, 본원에서의 일부 실시양태는 포스포네이트/포스포산 킬레이트화제를 포함한다. 특정 실시양태에서, 제제는 메티오닌을 포함한다.
- [0110] 때때로 "안정화제"로 공지된 등장화제는 액체 조성물의 등장성을 조정하거나 유지하기 위해 존재한다. 큰 하전된 생체분자, 예컨대 단백질 및 항체를 사용하는 경우에, 이들은 아미노산 측쇄의 하전된 기와 상호작용하여 분자간 및 분자내 상호작용의 가능성을 줄일 수 있기 때문에 종종 "안정화제"로 지칭된다. 등장화제는 다른 성분의 상대 양을 고려하여, 0.1중량% 내지 25중량%, 또는 1 내지 5중량%의 양으로 존재할 수 있다. 등장화제는 다가 당 알콜, 3가 이상의 당 알콜, 예컨대 글리세린, 에리트리톨, 아라비톨, 크실리톨, 소르비톨 및 만니톨을 포함한다.
- [0111] 추가의 안정화제는 기능상 별칭제로부터 용해도 증진제까지, 변성 또는 용기 벽에 대한 부착을 방지하는 작용제까지의 범위로 광범위한 부형제를 포함한다. 안정화제는 0.1 내지 10,000 중량부 범위로 단백질 또는 항체에 존재할 수 있다. 전형적인 안정화제는 다음을 포함한다: 다가 당 알콜 (상기 열거됨); 아미노산, 예컨대 알라닌, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 리신, 오르니틴, 류신, 2-페닐알라닌, 글루탐산, 트레오닌 등; 유기 당 또는 당 알콜, 예컨대 수크로스, 락토스, 락티톨, 트레할로스, 스타키오스, 만노스, 소르보스, 크실로스, 리보스, 리비톨, 미오이니시토스, 미오이니시톨, 갈락토스, 갈락티톨, 글리세롤, 시클리톨 (예를 들어, 이노시톨), 폴리에틸렌 글리콜; 황 함유 환원제, 예컨대 우레아, 글루타티온, 티옥트산, 소듐 티오글리콜레이트, 티오글리세롤, α-모노티오글리세롤 및 소듐 티오 술페이트; 저분자량 단백질, 예컨대 인간 혈청 알부민, 소 혈청 알부민, 젤라틴 또는 다른 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 모노사카라이드 (예를 들어, 크실로스, 만노스, 프룩토스, 글루코스; 디사카라이드 (예를 들어, 락토스, 말토스, 수크로스); 트리사카라이드, 예컨대 라피노스; 및 폴리사카라이드, 예컨대 텍스트린 또는 텍스트란.
- [0112] 비-이온성 계면활성제 또는 세제 (또한 "습윤제"로 공지됨)는 치료제의 가용화를 도울 뿐만 아니라 치료 단백질을 교반-유도된 응집에 대해 보호하기 위해 존재한다 (이는 또한 활성 치료 단백질 또는 항체의 변성을 유발하지 않으면서 제제가 전단 표면 스트레스에 노출되는 것을 허용함). 비이온성 계면활성제는 약 0.05 mg/ml 내지 약 1.0 mg/ml, 바람직하게는 약 0.07 mg/ml 내지 약 0.2 mg/ml의 범위로 존재한다.
- [0113] 적합한 비-이온성 계면활성제는 폴리소르베이트 (20, 40, 60, 65, 80 등), 폴리옥사머 (184, 188 등), 플루로닉® 폴리올, 트리톤®, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노에테르 (트윈®-20, 트윈®-80 등), 라우로마크로골 400, 폴리옥실 40 스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 수산화 피마자 오일 10, 50 및 60, 글리세롤 모노스테아레이트, 수크로스 지방산 에스테르, 메틸 셀룰로스 및 카르복시메틸 셀룰로스를 포함한다. 사용될 수 있는 음이온성 세제는 소듐 라우릴 술페이트, 디옥틸 소듐 술포숙시네이트 및 디옥틸 소듐 술포네이트를 포함한다. 양이온성 세제는 벤즈알코늄 클로라이드 또는 벤제토늄 클로라이드를 포함한다.
- [0114] 단백질 안정성을 측정하기 위한 다양한 분석 기술이 당업계에서 이용가능하고, 예를 들어 문헌 [Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) 및 Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993)]에 검토되어 있다. 안정성은 선택된 기간 동안 선택된

온도에서 측정될 수 있다. 특정 실시양태에서, 제제는 약 40℃에서 약 2-4주 이상 동안 안정하고/거나, 약 5℃에서 3개월 이상 동안 안정하고/거나, 약 5℃에서 6개월 이상 동안 안정하고/거나, 약 5℃에서 12개월 이상 동안 안정하고/거나, 약 -20℃에서 3개월 이상 또는 1년 이상 동안 안정하다. 특정 실시양태에서, 제제는 약 25℃에서 6개월 이상 동안 안정하고/거나 약 25℃에서 12개월 동안 안정하고/거나 약 5℃에서 6개월 동안 안정하고/거나 약 5℃에서 12개월 동안 안정하고/거나 약 -20℃에서 6개월 이상 동안 안정하고/거나 약 -20℃에서 12개월 이상 동안 안정하고/거나 5℃ 또는 -20℃에서 2년 이상 동안 안정하다. 특정 실시양태에서, 제제는 제제의 냉동 (예컨대, -70℃로) 및 해동 후에, 예를 들어 냉동 및 해동의 1, 2 또는 3 사이클의 반복 후에 안정하다. 안정성은 응집체 형성의 평가 (예를 들어, 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여, 탁도 측정에 의해, 및/또는 육안 검사에 의해); 양이온 교환 크로마토그래피, 영상 모세관 등전점 포커싱 (icIEF) 또는 모세관 구역 전기영동을 이용한 전하 이종성 평가; 아미노-말단 또는 카르복시-말단 서열 분석; 질량 분광측정 분석; 환원된 항체와 무손상 항체를 비교하기 위한 SDS-PAGE 분석; 펩티드 맵 (예를 들어, 트립신 또는 LYS-C) 분석; 항체의 생물학적 활성 또는 항원 결합 기능 평가 등을 포함하는 다양한 상이한 방식으로 정량적으로 및/또는 정성적으로 평가될 수 있다. 불안정성은 응집, 탈아미드화 (예를 들어, Asn 탈아미드화), 산화 (예를 들어, Met 산화), 이성질체화 (예를 들어, Asp 이성질체화), 클리핑/가수분해/단편화 (예를 들어, 힌지 영역 단편화), 숙신이미드 형성, 쌍을 형성하지 않은 시스테인(들), N-말단 연장, C-말단 프로세싱, 글리코실화 차이 등 중 어느 하나 이상과 관련될 수 있다.

- [0115] 생체내 투여에 사용될 제제는 멸균되어야 한다. 이는 제제의 제조 전에 또는 후에 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성된다.
- [0116] 치료제는 공지의 방법에 따라, 예컨대 볼루스로서 정맥내 투여 또는 일정 시간에 걸친 연속 주입, 근육내, 복강내, 뇌척수내, 피하, 관절내, 활막내, 척수강내, 경구, 국소 또는 흡입 경로에 의해 투여될 수 있다. 임의로, 투여는 다양한 상업적으로 입수가 가능한 장치를 이용하여 미니-펌프 주입을 통해 수행될 수 있다.
- [0117] 본원의 제제는 또한 치료할 특정한 적응증에 필요한, 바람직하게는 서로 유해 효과를 내지 않는 보완적 활성을 갖는, 하나 초과 활성 화합물을 함유할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 조성물은 세포독성제, 시토키인 또는 성장 억제제를 포함할 수 있다. 이러한 분자는 의도된 목적에 유효한 양으로 조합되어 적합하게 존재한다.
- [0118] 활성 성분은 또한 예를 들어 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐에, 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로구체, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐)에, 또는 마크로에멀전에 포획될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 18th edition, 상기 문헌]에 개시되어 있다.
- [0119] 지속-방출 제제를 제조할 수 있다. 지속-방출 제제의 적합한 예는 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하고, 이 매트릭스는 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다. 지속-방출 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드 (미국 특허 번호 3,773,919), L-글루탐산 및 γ -에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예컨대 루프론 데포(LUPRON DEPOT)TM (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 이루어진 주사가 가능한 마이크로구체) 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산을 포함한다. 지속 방출을 위한 재조합 단백질의 마이크로캡슐화가 인간 성장 호르몬 (rhGH), 인터페론-(rhIFN-), 인터류킨-2 및 MN rpg 120으로 성공적으로 수행되었다. 문헌 [Johnson et al., Nat. Med. 2: 795-799 (1996); Yasuda et al., Biomed. Ther. 27: 1221-1223 (1993); Hora et al., Bio/Technology 8: 755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems," Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell and Newman, eds., (Plenum Press: New York, 1995), pp. 439-462]; WO 97/03692; WO 96/40072; WO 96/07399; 및 미국 특허 번호 5,654,010.
- [0120] 폴리 락트산-코글리콜산 (PLGA) 중합체의 생체적합성 및 광범위한 생분해성 특성으로 인해 이를 사용하여 이러한 단백질들의 지속-방출 제제를 개발할 수 있다. PLGA의 분해 산물인 락트산 및 글리콜산은 인간 신체 내에서 신속하게 제거될 수 있다. 또한, 이러한 중합체의 분해성은 그의 분자량 및 조성에 따라 수개월 내지 수년까지 조정될 수 있다. 문헌 [Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer", Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (Marcel Dekker; New York, 1990), M. Chasin and R.

Langer (Eds.) pp. 1-41].

- [0121] 중합체, 예컨대 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산은 100일을 초과하여 분자를 방출할 수 있는 반면, 특정 히드로겔은 단백질을 보다 짧은 기간 동안 방출한다. 캡슐화된 항체가 신체 내에서 장기간 동안 유지되는 경우에, 37°C에서 습도에 노출된 결과로 항체가 변성되거나 응집되어, 생물학적 활성의 손실 및 면역원성의 가능한 변화가 초래될 수 있다. 관련 메카니즘에 따라 안정화를 위한 합리적인 전략이 고안될 수 있다. 예를 들어, 응집 메카니즘이 티오-디설피드 상호교환을 통한 분자간 S-S 결합 형성인 것으로 발견되면, 안정화는 술포히드릴 잔기의 변형, 산성 용액으로부터의 동결건조, 수분 함량의 제어, 적절한 첨가제의 사용 및 특정 중합체 매트릭스 조성물의 개발에 의해 달성될 수 있다.
- [0122] 리포솜 또는 프로테노이드 조성물은 또한 본원에 개시된 단백질을 또는 항체를 제제화하는데 사용될 수 있다. 미국 특허 번호 4,925,673 및 5,013,556을 참조한다.
- [0123] 본원에 기재된 단백질 및 항체의 안정성은 비-독성 "수용성 다가 금속 염"의 사용을 통해 증진될 수 있다. 예는 Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺, Sn²⁺, Sn⁴⁺, Al²⁺ 및 Al³⁺를 포함한다. 상기 다가 금속 양이온과 수용성 염을 형성할 수 있는 음이온의 예는 무기 산 및/또는 유기 산으로부터 형성된 것을 포함한다. 이러한 수용성 염은 물 (20°C) 중에서 적어도 약 20 mg/ml, 대안적으로 적어도 약 100 mg/ml, 대안적으로 적어도 약 200 mg/ml의 용해도를 갖는다.
- [0124] "수용성 다가 금속 염"을 형성하는데 사용될 수 있는 적합한 무기 산은 염산, 아세트산, 황산, 질산, 티오시안산 및 인산을 포함한다. 사용될 수 있는 적합한 유기 산은 지방족 카르복실산 및 방향족 산을 포함한다. 이러한 정의 내의 지방족 산은 포화 또는 불포화 C₂-9 카르복실산 (예를 들어, 지방족 모노-, 디- 및 트리-카르복실산)으로 정의될 수 있다. 예를 들어, 이러한 정의 내의 예시적인 모노카르복실산은 포화 C₂-9 모노카르복실산 아세트산, 프로피리온산, 부티르산, 발레르산, 카프로산, 에난트산, 카프릴산, 펠라르곤산 및 카프리콘산, 및 불포화 C₂-9 모노카르복실산 아크릴산, 프로피리올산, 메타크릴산, 크로톤산 및 이소크로톤산을 포함한다. 예시적인 디카르복실산은 포화 C₂-9 디카르복실산 말론산, 숙신산, 글루타르산, 아디프산 및 피멜산을 포함하고, 불포화 C₂-9 디카르복실산은 말레산, 푸마르산, 시트라콘산 및 메사콘산을 포함한다. 예시적인 트리카르복실산은 포화 C₂-9 트리카르복실산 트리카르발릴산 및 1,2,3-부탄트리카르복실산을 포함한다. 추가로, 이러한 정의의 카르복실산은 또한 1 또는 2개의 히드록실기를 포함하여 히드록시 카르복실산을 형성할 수 있다. 예시적인 히드록시 카르복실산은 글리콜산, 락트산, 글리세르산, 타르트론산, 말산, 타르타르산 및 시트르산을 포함한다. 이러한 정의 내의 방향족 산은 벤조산 및 살리실산을 포함한다.
- [0125] 본 발명의 캡슐화된 폴리펩티드를 안정화하는 것을 돕기 위해 사용될 수 있는, 통상적으로 이용되는 수용성 다가 금속 염은 예를 들어 다음을 포함한다: (1) 할라이드 (예를 들어, 아연 클로라이드, 염화칼슘), 술페이트, 니트레이트, 포스페이트 및 티오시아네이트의 무기 산 금속 염; (2) 지방족 카르복실산 금속 염 (예를 들어, 칼슘 아세테이트, 아연 아세테이트, 칼슘 프로피리온에이트, 아연 글리콜레이트, 락트산칼슘, 아연 락테이트 및 아연 타르트레이트); 및 (3) 벤조에이트 (예를 들어, 아연 벤조에이트) 및 살리실레이트의 방향족 카르복실산 금속 염.
- [0126] 특정 실시양태에서, 항-IL13 항체는 예를 들어 자가-주사 장치, 자동주사기 장치, 또는 자가-투여를 위해 설계된 다른 장치를 이용하여 투여된다. 특정 실시양태에서, 항-IL13 항체는 피하 투여 장치를 이용하여 투여된다. 자동주사기 장치를 비롯한 다양한 자가-주사 장치 및 피하 투여 장치는 당업계에 공지되어 있고, 상업적으로 입수가능하다. 예시적인 장치는 예비충전된 시린지 (예컨대, 벡톤 디킨슨(Becton Dickinson)으로부터의 BD HYPAK SCF®, 레디필(READYFILL)[™] 및 스테리필 SCF(STERIFILL SCF)[™]; 백스터(Baxter)로부터의 클리어샷(CLEARSHOT)[™] 공중합체 예비충전된 시린지; 및 웨스트 파마슈티칼 서비스(West Pharmaceutical Services)로부터 입수가능한 다이코 세이코 크리스탈 제니트(Daikyo Seiko CRYSTAL ZENITH)[®] 예비충전된 시린지); 일회용 펜 주사 장치, 예컨대 벡톤 디킨슨으로부터의 BD 펜(BD Pen); 매우 예리한 미세바늘 장치 (예컨대, 벡톤 디킨슨으로부터의 인젝트-이즈(INJECT-EASE)[™] 및 미세주입기 장치; 및 발레리타스(Valeritas)로부터 입수가능한 H-패치(H-PATCH)[™]) 뿐만 아니라 무바늘 주사 장치 (예컨대, 바이오젝트(Bioject)로부터 입수가능한 바이오젝터(BIOJECTOR)[®] 및 이젝트(IJECT)[®]; 및 메드트로닉(Medtronic)으로부터 입수가능한 소프-서터(SOF-SERTER)[®] 및 패치 장치를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 피하 투여 장치의 특정 실시양태는 본원에 추가로 기재된다. 항-IL13 항체와 적어도 제2 치료 화합물의 이러한 자가-주사 장치 또는 피하 투여 장치로의 공동-제제화 또는 공동-투여가 계획된다.
- [0127] 제조방법

- [0128] 항체는 재조합 방법 및 조성물을 이용하여, 예를 들어 미국 특허 번호 4,816,567에 기재된 바와 같이 생산할 수 있다. 한 실시양태에서, 본원에 기재된 항-IL13 항체를 코딩하는 단리된 핵산이 제공된다. 이러한 핵산은 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열 및/또는 VH를 포함하는 아미노산 서열 (예를 들어, 항체의 경쇄 및/또는 중쇄)을 코딩할 수 있다. 추가 실시양태에서, 이러한 핵산을 포함하는 하나 이상의 벡터 (예를 들어, 발현 벡터)가 제공된다. 추가 실시양태에서, 이러한 핵산을 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 이러한 한 실시양태에서, 숙주 세포는 다음을 포함한다 (예를 들어, 이들로 형질전환됨): (1) 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열 및 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터, 또는 (2) 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 제1 벡터 및 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 제2 벡터. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 진핵세포, 예를 들어 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 또는 림프성 세포 (예를 들어, YO, NSO, Sp20 세포)이다. 한 실시양태에서, 상기 제공된 바와 같은 항-IL13 항체를 코딩하는 핵산을 포함하는 숙주 세포를 상기 항체의 발현에 적합한 조건 하에 배양하는 것, 및 임의로 숙주 세포 (또는 숙주 세포 배양 배지)로부터 상기 항체를 회수하는 것을 포함하는 상기 항체를 제조하는 방법이 제공된다.
- [0129] 항-IL13 항체의 재조합 생산을 위해, 예를 들어 상기 기재된 바와 같은 항체를 코딩하는 핵산을 단리하고, 추가의 클로닝 및/또는 숙주 세포에서의 발현을 위해 하나 이상의 벡터에 삽입한다. 이러한 핵산은 통상의 절차를 이용하여 용이하게 단리하고 서열분석할 수 있다 (예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하는 것에 의함).
- [0130] 항체-코딩 벡터의 클로닝 또는 발현에 적합한 숙주 세포는 본원에 기재된 원핵 또는 진핵 세포를 포함한다. 예를 들어, 특히 글리코실화 및 Fc 이펙터 기능이 필요하지 않을 경우, 항체를 박테리아에서 생산할 수 있다. 박테리아에서의 항체 단편 및 폴리펩티드의 발현에 대해, 예를 들어 미국 특허 번호 5,648,237, 5,789,199, 및 5,840,523을 참조한다. (또한, 이. 콜라이(*E. coli*)에서의 항체 단편의 발현이 기재되어 있는 문헌 [Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254] 참조). 발현 후에, 가용성 분획에서 박테리아 세포 페이스트로부터 항체를 단리할 수 있고, 추가로 정제할 수 있다.
- [0131] 원핵생물 뿐만 아니라, 진핵 미생물, 예컨대 글리코실화 경로가 "인간화"되어 항체를 부분적으로 또는 전체적으로 인간 글리코실화 패턴으로 생산되게 하는, 진균 및 효모 균주를 비롯한 사상 진균 또는 효모가 항체-코딩 벡터에 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 문헌 [Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004), 및 Li et al., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006)]을 참조한다.
- [0132] 글리코실화 항체의 발현에 적합한 숙주 세포는 또한 다세포 유기체 (무척추동물 및 척추동물)로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 곤충 세포와 함께, 특히 스포도프테라 프루기페르다 (*Spodoptera frugiperda*) 세포를 형질감염시키는데 사용될 수 있는 다수의 바칼로바이러스 균주가 확인되었다.
- [0133] 식물 세포 배양물이 또한 숙주로서 이용될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978, 및 6,417,429 (트랜스제닉 식물에서 항체를 생산하기 위한 플랜티바디스(PLANTIBODIES)TM 기술을 기재함)를 참조한다.
- [0134] 척추동물 세포를 또한 숙주로서 이용할 수 있다. 예를 들어, 현탁액 중에서 성장시키는데 적합한 포유동물 세포주가 유용할 수 있다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 다른 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7); 인간 배아 신장 세포주 (예를 들어, 293 또는 문헌 [Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)]에 기재된 바와 같은 293 세포); 새끼 햄스터 신장 세포 (BHK); 마우스 세르틀리 세포 (예를 들어, 문헌 [Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)]에 기재된 바와 같은 TM4 세포); 원숭이 신장 세포 (CV1); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76); 인간 자궁경부 암종 세포 (HELA); 개 신장 세포 (MDCK); 버팔로 래트 간 세포 (BRL 3A); 인간 폐 세포 (W138); 인간 간 세포 (Hep G2); 마우스 유방 종양 (MMT 060562); 예를 들어 문헌 [Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)]에 기재된 바와 같은 TRI 세포; MRC 5 세포; 및 FS4 세포이다. 다른 유용한 포유동물 숙주 세포주는 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO) 세포, 예를 들어 DHFR- CHO 세포 (문헌 [Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)]); 및 골수종 세포주, 예컨대 YO, NSO 및 Sp2/0을 포함한다. 항체 생산에 적합한 특정 포유동물 숙주 세포주의 검토를 위해, 예를 들어 문헌 [Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003)]을 참조한다.

- [0135] 검정
- [0136] 본원에 제공된 항-IL13 항체는 당업계에 공지된 다양한 검정에 의해 확인되거나, 스크리닝되거나, 또는 그의 물리적/화학적 특성 및/또는 생물학적 활성에 대해 특성화될 수 있다.
- [0137] 결합 검정 및 기타 검정
- [0138] 한 측면에서, 항-IL13 항체를 예를 들어 ELISA, 웨스턴 블롯 등과 같은 공지된 방법에 의해 그의 항원 결합 활성에 대해 시험한다.
- [0139] 또 다른 측면에서, 경쟁 검정을 이용하여 IL13에 대한 결합에 대해 항-IL13 항체와 경쟁하는 항체를 확인할 수 있다. 특정 실시양태에서, 이러한 경쟁 항체는 레브리키주맵 또는 본원에 특정된 또 다른 항-IL13 항체에 의해 결합되는 동일한 에피토프 (예를 들어, 선형 또는 입체형태적 에피토프)에 결합한다. 항체가 결합하는 에피토프를 맵핑하는 예시적인 방법의 상세내용은 문헌 [Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ)]에 제공된다.
- [0140] 예시적인 경쟁 검정에서, 고정화된 IL13을 IL13에 결합하는 제1 표지된 항체 (예를 들어, 레브리키주맵) 및 IL13에 대한 결합에 대해 제1 항체와 경쟁하는 그의 능력에 대해 시험될 제2 비표지된 항체를 포함하는 용액 중에서 인큐베이션한다. 제2 항체는 하이브리도마 상정액에 존재할 수 있다. 대조군으로서, 고정화된 IL13은 제1 표지된 항체를 포함하나 제2 비표지된 항체는 포함하지 않는 용액에서 인큐베이션한다. IL13에 대한 제1 항체의 결합을 허용하는 조건 하에 인큐베이션한 후에, 잉여량의 미결합 항체를 제거하고, 고정화된 IL13과 연관된 표지의 양을 측정한다. 고정화된 IL13과 연관된 표지의 양이 대조 샘플에 비해 시험 샘플에서 실질적으로 감소된 경우에, 이는 제2 항체가 IL13에 대한 결합에 대해 제1 항체와 경쟁한다는 것을 나타낸다. 문헌 [Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)]을 참조한다.
- [0141] 활성 검정
- [0142] 한 측면에서, 생물학적 활성을 갖는 항-IL-13 항체를 확인하기 위한 검정이 제공된다. 생물학적 활성은 예를 들어 천식에서의 활성을 포함할 수 있다. 생체내 및/또는 시험관내에서 이러한 생물학적 활성을 갖는 항체가 또한 제공된다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 이러한 생물학적 활성에 대해 시험된다.
- [0143] 제조품 및 키트
- [0144] 제제를 함유하고, 그의 용도에 대한 지침서를 제공하는 제조품이 제공된다. 제조품은 용기를 포함한다. 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알 (예를 들어, 이중 챔버 바이알), 시린지 (예컨대, 단일 또는 이중 챔버 시린지) 및 시험 튜브를 포함한다. 용기는 다양한 물질, 예컨대 유리 또는 플라스틱으로 형성될 수 있다. 용기는 제제, 및 용기 상에, 또는 이와 연관된, 재구성 및/또는 사용에 관한 지시를 표시할 수 있는 라벨을 보유하고 있다. 라벨은 추가로 제제가 피하 투여에 유용하거나 피하 투여를 의도함을 나타낼 수 있다. 제제를 보유하는 용기는 재구성 제제의 반복 투여 (예를 들어, 2-6회 투여)를 가능하게 하는 다회 사용 바이알일 수 있다. 제조품은 추가로 적합한 희석제 (예를 들어, BWF1)를 포함하는 제2 용기를 포함할 수 있다. 희석제 및 동결건조된 제제를 혼합하는 경우에, 재구성된 제제에서의 최종 단백질 농도는 일반적으로 50 mg/ml 이상일 것이다. 제조품은 상업적 및 사용자 입장에서 바람직한 다른 물질, 예를 들어 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘, 시린지, 및 사용 지침서가 있는 포장 삽입물을 추가로 포함할 수 있다.
- [0145] 특정 실시양태에서, 환자에게 균일 용량의 항-IL13 항체를 전달하는 피하 투여 장치를 포함하는 제조품이 제공되며, 여기서 균일 용량은 예를 들어 37.5 mg, 75 mg, 또는 125 mg 또는 150 mg이나 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 항-IL13 항체는 레브리키주맵이다. 피하 투여 장치 내의 항-IL13 항체는 완충제, 예를 들어 히스티딘 pH 5.7, 및 다른 부형제, 예를 들어, 수크로스 및 폴리소르베이트 중에 안정한 제약 제제로 제공되도록 제제화된다. 특정 실시양태에서, 피하 투여 장치는 바늘을 갖는 유리 배럴 및 임의로 바늘 실드 및 또한 임의로 바늘 실드 장치를 포함하는 예비충전된 시린지이다. 특정 실시양태에서, 시린지 함유된 부피는 0.5 mL, 1 mL, 1.5 mL 또는 2.0 mL, 또는 약 0.5 mL, 약 1 mL, 약 1.5 mL 또는 약 2.0 mL이다. 특정 실시양태에서, 바늘은 3-베벨 팁 또는 5-베벨 팁을 포함하는 스택-인 바늘이다. 특정 실시양태에서, 바늘은 25 게이지 (G) 내지 30G이다. 특정 실시양태에서, 바늘은 1/2 인치 길이 내지 5/8 인치 길이이다. 한 실시양태에서, 피하 투여 장치는 예비충전된 1.0 mL 낮은 텅스텐 보로실리케이트 유리 (유형 I) 시린지 및 스테인레스 스틸 5-베벨 27G 1/2 인치 길이 박막 스택-인 바늘을 포함한다. 특정 실시양태에서, 피하 투여 장치는 강성 바늘 실드를 포함한다.

특정 실시양태에서, 강성 바늘 실드는 낮은 아연 함량을 갖는 고무 제제, 예를 들어, FM27/0 (다에트와일러 (Daetwyler))을 포함하고, 강성 폴리프로필렌 실드를 포함한다. 특정 실시양태에서, 플런저 로드는 고무 플런저 스톱퍼를 포함한다. 특정 실시양태에서, 고무 플런저 스톱퍼는 4023/50 고무 및 플루로텍® 에틸렌-테트라플루오로에틸렌 (ETFE) 코팅 (웨스트 파마슈티칼 서비스, 인크.)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 피하 투여 장치는 바늘 안전성 장치를 포함한다. 예시적인 바늘 안전성 장치는 울트라세이프 패시브® 니들 가드 X100L (세이프티 시린지스, 인크.) 및 렉삼 세이프 앤 사운드™ (렉삼)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0146] 피하 전달에 적합한 추가의 장치는 예를 들어 주사 장치, 예컨대 인젝트-이즈™ 및 진젝트(GENJECT)™ 장치; 주입 펌프, 예컨대 아큐-체크(ACCU-CHECK)™; 주사기 펜, 예컨대 진펜(GENPEN)™; 무바늘 장치, 예컨대 메드덕터(MEDDUCTOR)™ 및 바이오젝터™; 자동주사기 및 피하 패치 전달 시스템을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0147] 키트는 전형적으로 상기 기재된 용기, 및 완충제, 희석제, 필터, 바늘, 시린지 및 사용 지침서를 갖는 포장 삽입물을 포함하는, 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 물질을 포함하는 1개 이상의 다른 용기를 포함할 것이다. 라벨은 조성물이 특정 요법에 사용된다는 것을 나타내기 위해 용기 상에 존재할 수 있다.

[0148] **실시예**

[0149] 다음은 본 발명의 제제 및 방법의 실시예이다. 상기 제공된 일반적 설명에 따라 다양한 다른 실시양태를 실시할 수 있는 것으로 이해된다.

[0150] **실시예 1**

[0151] **물질 및 방법**

[0152] **물질 및 샘플 제조 절차**

[0153] 인간화 IgG4 모노클로날 항체인 항-IL13을 제외하고, 하기 기재된 실험에 사용된 모든 다른 항체는 인간화 IgG1 모노클로날 항체이다. 모노클로날 항체를 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포주에서 발현시키고, 단백질 A 및 이온 교환 크로마토그래피 방법을 포함하는 일련의 표준 크로마토그래피 단계에 의해 정제하였다. 정제된 항체는 첨가된 용액 완충제 및 안정화제를 갖는 접선 흐름 여과로부터 농축된 용액으로 수득하였다. 이들은 하기 기재된 연구에 출발 물질로 사용된 원액 항체 용액이다.

[0154] 이들 원액 mAb 출발 물질을 추가의 사용시까지 2-8°C에 저장하였다. mAb 용액의 추가의 제조법은 큰 미립자를 제거하기 위한 낮은 이온 강도 완충제에 대한 투석 및 0.22 μm 변형된 PVDF (폴리비닐리덴 플루오라이드) 필터 (밀리포어 스테리플립(Millipore Steriflip), 밀리포어 코포레이션(Millipore Corp.), 매사추세츠주)를 통한 여과를 포함하였다. 전형적으로, 투석 후에 140-150 mg/mL의 mAb 농도를 수득하였다. 보다 높은 mAb 농도를 수득하기 위해, 10 mL의 mAb를 2700 rpm에서 원심분리된 아미콘(Amicon) YM30 센트리프랩(Centriprep) (밀리포어 코포레이션, 매사추세츠주) 농축기로 농축하였다. 투석되고 원심분리에 의해 농축된 제제 중 최종 mAb 농도는 중량측정 희석 및 280 nm에서의 흡수율 (A280) 및 1 cm 경로 길이 석영 큐벳을 갖는 애질런트(Agilent) 다이오드 어레이 분광광도계 모델 8453을 이용하는 280 nm에서의 UV 흡수의 측정을 이용하여 결정하였다. 흡광 계수는 정량적 아미노산 분석에 의해 결정하였다.

[0155] 광 산란 실험을 위한 모노클로날 항체 용액은 증류 후드에서 기지의 원액 용액 농도의 중량측정 희석에 의해 0.5-275 mg/mL에 걸쳐 20 mL 샘플 바이알에서 제조하였다. 모든 샘플 바이알을 탈이온수로 주의깊게 세정하고, 여과된 압축 질소 기체의 스트림에서 건조시켰다. 단백질 용액에 첨가하기 전에, 모든 완충제 및 시약 용액을 0.10 μm 왓만(Whatman) 아노탑(Anotop) 25 필터를 통해 추가로 여과하였다. 샘플의 제조 및 희석 후에, mAb 용액을 균질하게 혼합하고, 2시간 동안 제어된 실온에서 열 및 화학적 평형에 도달하도록 하였다. 단백질 용액을 3000 rpm에서 20-30분 동안 실온에서 원심분리하여 용액으로부터 외래성 분진 및 거품을 제거한 후에 광 산란에 사용하였다. 보다 높은 농도 용액 (mAb > 170 mg/mL)을 광 산란 신호가 최소의 소음을 나타낼 때까지 보다 긴 기간 동안 원심분리하였다. 샘플 바이알의 외부 표면을 실리콘 오일로 가볍게 코팅하여 바이알 표면 결합으로부터의 바람직하지 않은 산란을 감소시켰다. 상기와 같이 제조된 샘플을 측정을 위해 광 산란 기기에 직접 넣었다.

[0156] **다각도 광 산란에 의한 B₉의 결정**

[0157] 광 산란을 위한 샘플 제조는 밀리큐(MilliQ) 물로 세정하고 여과된 질소 기체의 스트림 하에 건조시킨 20 mL 테플론(Teflon)®-정렬된 격막 캡 바이알을 이용하였다. 다양한 농도의 샘플은 적절한 부피의 원액 mAb 용액을

대략 80 mg/mL로 취하고, 우선 적절한 완충제를 사용하여 대략 8 mg/mL로 희석한 후에 20 mL의 0.2 μm 여과된 완충제를 사용하여 최종 희석을 수행하여 제조하였다. 각각의 완충제 조건에서 총 8개의 단백질 농도 (0.05-1.1 mg/mL mAb)를 실온에서 14-18시간 동안 평형화시킨 후에 측정값을 초기화하였다. 모든 측정은 증가하는 단백질 농도의 일련의 용액으로 수행하고, 각각의 실험은 삼중으로 수행하였다. 25 mm 밀리포어(Millipore) (밀리포어, 매사추세츠주 빌러리카) 용매 필터 (PVDF, 0.1 μm)를 갖는 애질런트(Agilent) 용매 탈기 및 등용매 펌프 (애질런트, 캘리포니아주 팔로 알토)를 0.5 mL/분의 연속적 유량으로 사용하였다. 샘플 주사를 0.1 μm, 10 mm PVDF 막을 갖는 2 mL 주사 루프 및 와이어트 테크놀로지 도이칠란드(Wyatt Technology Deutschland) 인라인 마이크로-필터로 구성된 길슨(Gilson) GX281 (길슨, 인크.(Gilson, Inc.), 위스콘신 미들레톤) 액체 취급 장치로 자동화하였다. 농축 및 광 산란 측정을 연속적으로 수행하고, 280nm에서 애질런트 MWD UV 검출기 측정을 수행한 후에 18-각도 EOS MALS 검출기 (와이어트 테크놀로지 코포레이션(Wyatt Technology Corporation), 캘리포니아주 산타 바바라)로 수행하여 21x로 감소된 이득을 얻었다. 데이터를 획득하고, 아스트라(Astra)TM 4.90.07 (WTC) 소프트웨어로 처리하고, 슬라이스 결과를 전달하여 추가의 분석을 수행하였다. 데이터가 선형 회귀 피팅된 $K^*c/R(q=0)/K^*c/$ 또는 $1/M_{wapp}$ 대 농도의 플롯은 기울기 = $2B_2$, 및 $1/M_{w0}$ 의 절편, 무한 희석시의 중량 평균 분자량을 제공한다.

[0158] 고농도 다각도 정적 광 산란 (SLS)

[0159] 와이어트 테크놀로지 (캘리포니아주 산타 바바라)로부터의 30 mW 고체 상태 레이저 ($\lambda = 690$ nm)를 갖는 18-각도 다운(Dawn) EOS 광 산란 검출기를 23°C에서 수-냉각식 펠티어(Peltier) 온도 제어기로서의 모든 정적 광 산란 측정에 이용하였다. 기기를 99.9% 톨루엔 (크로마토그래피 등급)으로 보정하였다. 전형적인 삼광 바이알 실험에서, 1x의 검출기 이득 설정을 38° 내지 148°의 고정된 각도에서 모든 포토다이오드에 이용하였다. 항-CD11a의 회전 반경 (Rg)은 10 nm 미만이므로, 항-CD11a의 묽은 용액 (1-2 mg/mL)을 각각의 염 농도에서 사용하여, 각각의 실험의 마지막에 21x의 포토다이오드 검출기 이득 설정을 이용하는 90° 검출기에 대해 포토다이오드의 각도 의존성을 정규화하였다. 정적 광 산란 강도의 측정을 0.5 mg/mL 내지 275 mg/mL의 mAb 농도의 함수로서, 및 NaCl 농도 (0 - 600 mM)의 함수로서 수행하였다. 각각의 샘플/바이알에 대한 산란 데이터를 5-10분의 간격에 걸쳐 수집하였으며, 데이터 수집 빈도는 12개 점/분이었다. 아스트라 4.90.07 소프트웨어 (와이어트 테크놀로지 코포레이션, 캘리포니아주 산타 바바라)를 이용하여 정적 광 산란 데이터를 획득 및 처리하였으며, 슬라이스 결과로부터 전달될 수 있는 계산에 0.185의 dn/dc 값을 적용하였다. 전달된 결과를 사용한 추가의 분석 및 계산을 마이크로소프트 엑셀(Microsoft Excel), 오리진(Origin) v7.5, 및 MATLAB R14로 수행하였다. 고농도 광 산란 데이터의 경우에, 결과를 분자량의 증가가 농도 의존성 가역적 자기-회합의 존재에 상응하는 M_{wapp} 대 mAb 농도의 포맷으로 해석하는 것이 종종 더 용이하였다. (예를 들어, 문헌 [Scherer, T. M., et al. The Journal of Physical Chemistry B 114(40): 12948-12957 (2010); Minton, A. P., J Pharm Sci 96(12): 3466-9 (2007); Minton, A. P. Biophysical Journal 93(4): 1321-1328 (2007)] 참조).

[0160] UV 분광분석법에 의한 탁도

[0161] 고농도 광 산란 실험으로부터의 시험된 단백질 용액 및 pH 스크린 실험으로부터의 단백질 용액 (각각, 하기에 추가로 기재된 바와 같음)에 대한 탁도를 애질런트 8453 분광광도계를 이용하여 주위 온도에서 측정하였다. 탁도를 5 nm 증분의 340 nm 내지 360 nm 파장 범위에 걸친 흡광도 값의 합을 5로 나눈 350 nm 파장에서의 흡광도의 평균으로 계산하였다. 단백질 용액의 측정을 1 cm 경로길이를 갖는 작은 부피 석영 큐벳에서 수행하였다. 690 nm에서의 흡광도를 또한 기록하였다.

[0162] 용융 온도 (Tm)의 모세관 시차 주사 열량측정법 (DSC) 특성화

[0163] 단백질 열 배좌 안정성을 마이크로칼(MicroCal) 모세관 시차 주사 열량계를 이용하여 평가하였다. MAb를 완충제에서 1 mg/mL로 희석하였다. 500 마이크로리터의 단백질 및 그의 매칭 완충제를 96 웰 플레이트에 로딩하였다. 열 용량을 15로부터 95°C까지 60 °C/hr의 주사 속도로 증가하는 온도로 모니터링하였다. 브이피뷰어 (VPViewer) 2000 캡 DSC를 이용하여 데이터를 획득하고, 마이크로칼, LLC DSC 데이터 분석을 이용하여 데이터를 분석하였다. 문헌 [Yadav, S. et al., J Pharm Sci. 99(3):1152-68 (2010)]을 참조한다.

[0164] 비탁분석

[0165] 비탁계 측정을 산란된 강도의 90 도 검출을 이용하는 HACH (모델 2100AN IS) 실험실 탁도계 기기를 이용하여 수행하였다. 검출기를 0-0.5 상대 탁도 표준 농도를 갖는 포르마진 표준 4000 비탁계 탁도 유닛 (NTU) 원액으로 보정하였다. 샘플을 큐벳에 넣고, 이중으로 측정하여 샘플의 평균 NTU를 보고하였다.

- [0166] 레올로지
- [0167] 샘플의 점도를 원추형 및 플레이트 측정 시스템을 이용하여 MCR300 유량계 (안톤 파르(Anton Paar), 버지니아주 앳슈랜드)로 측정하였다. 샘플을 낮은 측정 플레이트에 로딩하고, 25°C에서 열 평형에 이르도록 하였다. 용매 트랩을 이용하여 용매 증발을 방지하였다. 샘플을 2개 사이클의 전단-속도 스위프 (각각의 사이클은 10 sec⁻¹로부터 1000 sec⁻¹로의 상승, 1분 동안 1000 sec⁻¹에서의 유지, 1000 sec⁻¹로부터 10 sec⁻¹로의 하강을 포함함)를 통과하였다. 사이클 사이에 하나의 1-분 휴지 시간이 존재한다. 보고된 값은 1000 sec⁻¹에서 1개의 샘플의 2개의 전단 속도 스위프의 평균이다. 오차 막대는 2회 시행의 표준 편차를 밀리파스칼-초 (mPas)의 단위로 나타낸다. 샘플은 1000 sec⁻¹에서 총 2분 동안 전단 응력 하에 있었다. 본 발명자들은 점도가 이 범위의 전단 속도 (200 sec⁻¹ < 전단 속도 < 2000 sec⁻¹)에 비교적 독립적이었기 때문에 1000 sec⁻¹을 선택하였다. 1개의 샘플의 2개의 분취액 사이의 점도 차이는 1000 sec⁻¹에서 ±0.5mPa 내였다. 각각의 전단 속도에서 측정의 지속기간은 US200 소프트웨어 (안톤 파르, 버지니아주 앳슈랜드)를 이용하여 최적화하였다.
- [0168] 구름 온도 결정
- [0169] 액체-액체 상 분리 (LLPS) 하의 시스템에서, 온도의 감소는 다른 상에서 하나의 액체 상의 액적을 형성한다. 이러한 액적이 형성되는 온도가 구름 온도로 지칭되며, 현미경검사 또는 용액의 투과성 모니터링에 의해 실험적으로 결정될 수 있다. 여기 기재된 실험에서, 구름 온도는 아비브(Aviv) 14DS 분광광도계 (아비브 바이오메디칼(Aviv Biomedical), 뉴저지주 레이크우드)에서 온도의 함수로서 600 nm에서의 투과성의 상실을 모니터링하여 결정하였다. 5 mm 사각 큐벳을 대략 0.6 mL의 항체 용액으로 채웠다. 온도를 열전기 냉각기를 이용하여 0.5°C 단계로 25°C로부터 0°C로 감소시켰다. 샘플을 각각의 온도에서 10분 동안 평형화시킨 후에 투과율을 기록하였다. 구름 온도를 % 투과율이 출발 값의 50%로 감소되는 온도로 지정하였다 (문헌 [Asherie, 2004]). 상이한 단백질 농도 및 상이한 연구 용액에서 항-IL13 상 분리에 대한 Tc를 아비브 바이오메디칼 모델 14S UV-Vis 분광광도계를 이용하여 측정하였다. 투과율 퍼센트 대 온도 데이터를 0.5°C, 600 초의 평형화 시간, 및 600 nm의 파장의 단계 크기에서 25°C 내지 0°C의 온도 스캔으로 수집하였다. 단백질 용액의 측정을 1 cm 경로길이를 갖는 석영 큐벳에서 수행하였다.
- [0170] 크기 배제 크로마토그래피
- [0171] 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 응집체 및 단편을 정량화하였다. 이 검정은 TSK G3000 SWXLTM, 7.8X300 mm 칼럼을 이용하였고, HP 1100TM HPLC 시스템 상에서 25°C로 진행하였다. 샘플을 이동 상을 사용하여 2 mg/mL로 희석하고, 주사 부피는 25 µL였다. 이동 상은 0.2 M K₂HPO₄, 0.25 M KCl (pH 6.2)이었고, 단백질을 30분 동안 0.5 mL/분의 정상 유량으로 용리하였다. 용리액 흡광도를 280 nm에서 모니터링하였다. 통합은 HP 켐스테이션(CHEMSTATION)TM 소프트웨어를 이용하여 수행하였다.
- [0172] 영상화 모세관 등전 포커싱 (icIEF)
- [0173] 샘플을 icIEF를 이용하여 검정함으로써 항-IL13 항체 안정성 샘플의 전하 (산성 및 염기성) 변이체를 정량화하였다. 이 방법은 PrinCE 미세주사기를 갖는 iCE280 분석기 (컨버전트 바이오사이언스(Convergent Bioscience))에서 플루오로카본 코팅된 모세관 (컨버전트 바이오사이언스)을 이용하였다. 양극액 및 음극액의 용액을 지이 헬스케어 바이오사이언시스(GE Healthcare Biosciences)로부터 구입하고; pI 마커의 용액을 컨버전트 바이오사이언스로부터 구입하였다.
- [0174] 모세관 전기영동-소듐 도데실 술페이트 (CE-SDS)
- [0175] CE-SDS를 488 nm 여기에서 LIF 검출기로 20 내지 40 ± 2°C의 모세관 온도 제어가 가능한 베크만(Beckman) P/ACE MDQ 또는 PA800 모세관 전기영동 시스템을 이용하여 수행하였다.
- [0176] 항-IL13 항체 효력 검정
- [0177] 항-IL13 항체 용액의 생물학적 활성 또는 효력을 인간 기관지 상피 세포주, L-Beas-2B 세포 (ATCC로부터 입수가 가능함, ATCC 카탈로그 번호 CRL-9609TM)에서 IL-13 유도된 루시페라제 발현을 억제하는 항-IL13 항체 용액의 능력을 측정하는 세포 배양 검정을 이용하여 평가하였다. 다양한 농도의 항-IL13 항체 표준, 대조군 및 샘플을 고정된 농도의 IL-13 (예를 들어, rhu-IL13, 페프로테크(Peprotech), 카탈로그 번호 200-13)과 혼합하고, L-

Beas-2B 세포를 2×10^5 개 세포/mL의 농도로 시딩한 96-웰 플레이트에 첨가하였다. 인큐베이션 후에, 루시페라제의 발현을 제조업체의 지침(브라이트-글로(Bright-Glo)TM 루시페라제 검정 시스템, 프로메가(Promega) 카탈로그 번호 E2620, E2650, 또는 브라이트-라이트 플러스(Brite-Lite Plus), 퍼킨 엘머(Perkin Elmer) 카탈로그 번호 6016761)에 따라 발광 루시페라제 기질을 이용하여 정량화하였다. 각각의 항체 용액에 대한 희석 곡선을 생성하고, 참조 물질과 비교하였다. 결과를 상대 발광 단위 (RLU)로 표현하였다. 상대 효력 추정값을 최소 제곱법 및 평행선 분석 프로그램의 방법을 이용하여 계산하였다. % 비활성은 상대 효력 추정값에 참조 물질의 비활성을 곱하여 계산하였다.

[0178] 항-IL13 항체 (레브리키주맵) 아미노산 서열

[0179] 하기 표는 레브리키주맵의 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 영역의 아미노산 서열을 VH, VL, 중쇄 서열 및 경쇄 서열과 함께 나타낸다. 하기 표 1에 나타낸 바와 같이, VH 및 중쇄는 N-말단 글루타민을 포함할 수 있고, 중쇄는 또한 C-말단 리신을 포함할 수 있다. 당업계에 널리 공지된 바와 같이, N-말단 글루타민 잔기는 피로글루타메이트를 형성할 수 있고, C-말단 리신 잔기는 제조 과정 동안 클리핑될 수 있다.

표 1

항-IL13 항체 (레브리키주맵) 아미노산 서열

CDR-H1 (서열 1)	Ala Tyr Ser Val Asn
CDR-H2 (서열 2)	Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
CDR-H3 (서열 3)	Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn
CDR-L1 (서열 4)	Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His
CDR-L2 (서열 5)	Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
CDR-L3 (서열 6)	Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Arg Thr
VH (서열 7)	Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
VH (서열 8)	Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
VL (서열 9)	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
H 쇠 (서열 10)	VTLRESGPA LVKPTQTLLT TCTVSGFSLA AYSVNWIRQP PGKALEWLAM IWGDGKIVYN SALKSRLTIS KDTSKNQVVL TMTNMDPVD ATYYCAGDGY YPYAMDNGQ GSLVTVSSAS TRGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSVGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGKTYT CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPPCPAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSVQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNKGEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYITLP PSQEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQEPENNYK TTPPVLDSDG SFFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMEAL HNHYTQKSLA LSLG
H 쇠 (서열 11)	QVTLRESGPA LVKPTQTLLT TCTVSGFSLA AYSVNWIRQP PGKALEWLAM IWGDGKIVYN SALKSRLTIS KDTSKNQVVL TMTNMDPVD ATYYCAGDGY YPYAMDNGQ GSLVTVSSAS TRGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY

[0180]

	FPEPVTVSWN SGALTSQVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGKTKYT CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPPCPAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPPEVTCV VVDVVSQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNKGEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGO PREPQVYITLP PSQEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSL SLSG
H쇄 (서열 12)	VTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTVSGFSL AYSVNWIRQP PGKALEWLAM IWGDGKIYVN SALKSRLTIS KDTSKNQVVL TMTNMDPVD ATYYCAGDGY YPPYAMDNWGO GSLVTVSSAS TKGPSVFFLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSQVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGKTKYT CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPPCPAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPPEVTCV VVDVVSQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNKGEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGO PREPQVYITLP PSQEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSL SLSGK
H쇄 (서열 13)	QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTVSGFSL AYSVNWIRQP PGKALEWLAM IWGDGKIYVN SALKSRLTIS KDTSKNQVVL TMTNMDPVD ATYYCAGDGY YPPYAMDNWGO GSLVTVSSAS TKGPSVFFLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSQVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGKTKYT CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPPCPAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPPEVTCV VVDVVSQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNKGEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGO PREPQVYITLP PSQEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSL SLSGK
L쇄 (서열 14)	DIVMTQSPDS LSVSLGERAT INCRASKSVD SYGNSFMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPDRFSGSG SGTDFLTITIS SLQAEDVAVY YCQQNEDPR TFGGGTKVEI KRTVAAPSVE IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL SLLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

[0181]

[0182]

결과

[0183]

다양한 pH에서의 항-IL13 항체 제제의 물리적 및 화학적 안정성

[0184]

다양한 pH를 갖는 완충제를 20 mM 히스티딘 아세테이트 또는 20 mM 인산나트륨을 이용하여 제조함으로써 pH 범위 5.4 - 7.8을 커버하였다. 히스티딘 아세테이트 완충제는 5.4 - 6.0의 pH 범위를 커버하고, 인산나트륨 완충제는 6.6 - 7.8의 pH 범위를 커버하였다. 각각의 완충제 pH에서, 다음을 일정하게 유지하였다: 150 mg/ml의 항-IL13 항체 농도, 175 mM 수크로스 및 0.3 mg/mL (0.03%) 폴리소르베이트 20.

[0185]

항체 용액을 하기 표 2에 나타낸 기간 동안 및 이러한 온도에서 바이알에 저장하였다. 표 2에서 "X"로 나타낸 다양한 시간에서, 샘플을 SEC, A350 탁도 및 비-환원 CE-SDS를 비롯한 물리적 안정성을 평가하는 다양한 방법 및 icIEF를 비롯한 화학적 안정성을 평가하는 다양한 방법에 의해 평가하였다.

표 2

항-IL13 항체 용액의 물리적 및 화학적 안정성의 결정에 이용된 안정성 시험 및 조건

온도	저장 조건에서의 주수						
	0	1	2	4	6	8	12
-70°C	X						
2-8°C					X		X
30°C		X	X	X	X	X	X

[0186]

[0187]

도 1은 SEC에 의해 측정된 바와 같은 지시된 pH의 완충제에서 주당 단량체 상실 퍼센트를 나타낸다. 도 1에 나타난 바와 같이, % 단량체 상실은 보다 높은 pH 범위에서 보다 낮은 pH 범위에서 낮았으며, pH 5.7에서 최저 % 단량체 상실이 나타나고, 0.056의 % 단량체 상실/주를 보여주었다.

[0188]

또 다른 물리적 안정성 검정은 pH의 함수로서 30°C에서 시간 경과에 따라 탁도의 변화를 측정하였다 (A350에 의해 결정된 바와 같음). 도 2에 나타난 바와 같이, 초기 탁도 및 변화는 보다 높은 pH 범위에서보다 pH5.4 - 6.0 사이의 완충제에서 더 높았다. 도 2에서, 순수 탁도는 A350 = 1/T이고, 여기서 T는 1 cm의 규정된 경로 길이를 갖는 350 nm에서의 투과된 광 강도이다.

[0189]

제3 물리적 안정성 검정은 pH의 함수로서 30°C에서 6주의 저장 동안 항-IL13 항체 용액에서 저분자량 (LMW) 가용성 단편 및 고분자량 (HMW) 응집체의 증가를 측정하였다. 도 3에 나타난 바와 같이, 단편화 비율 및 응집 비율은 보다 낮은 pH 범위, pH 5.4 - 6.6에서 최저였다.

- [0190] 본 발명자들은 또한 icIEF를 이용하여 화학적 안정성을 평가함으로써 pH의 함수로서 30℃에서 시간 경과에 따른 산성 및 염기성 변이체 형성의 속도의 변화 (도 4) 및 pH의 함수로서 30℃에서 시간 경과에 따른 염기성 변이체 및 주요 피크 상실의 속도의 변화를 결정하였다 (도 5). 도 4에 나타난 바와 같이, 산성 변이체의 비율은 낮은 pH 범위에서 최저이고, 높은 pH 범위에서 최고인 반면, 염기성 변이체 (BV1 피크)의 비율은 높은 pH 범위에서 최저이고, 낮은 pH 범위에서 최고였다. 도 5에 나타난 결과는 주요 피크 상실이 pH 5.4 - 6.0 사이에서 최소화되었다는 것을 나타낸다.
- [0191] pH가 용액 점도에 영향을 미치는지 여부를 결정하기 위해, 본 발명자들은 다양한 pH (pH 5.5 - 7.2 범위)에서의 상이한 항-IL13 항체 농도 (0 내지 200 mg/mL 항체 범위)의 유동학적 특성화를 수행하였다. 각각의 용액은 175mM 수크로스 및 0.3 mg/mL 폴리소르베이트 20을 갖는다. 결과는 도 6에 나타낸다. 이러한 결과는 일정한 점도 프로파일이 주어진 항체 농도에서의 용액 pH에 상관없이 유지된다는 것을 나타낸다. 특히, 결과는 보다 높은 항체 농도에서의 점도가 pH에 의해 영향을 받지 않는다는 것을 보여주었다.
- [0192] 도 1-6에 제시된 데이터는 함께 pH 5.4 - 6.0에서 대부분의 물리적 및 화학적 변화를 위한 얇은 구배가 존재함을 보여준다. 따라서, pH 5.7의 20 mM 히스티딘 아세테이트 완충제를 이후의 연구 및 제제 평가를 위해 선택하였다.
- [0193] 고농도 모노클로날 항체 용액의 유동학적 특성화
- [0194] 20 mM 히스티딘 아세테이트 pH 5.7, 175 mM 수크로스, 0.3 mg/mL 폴리소르베이트 20 중에 150 mg/mL로 제제화된 항-IL13 항체에 대해 관찰된 점도 (25℃에서 < 15 cP)가 일반적으로 다양한 상이한 항체에서 관찰될지 여부를 조사하기 위해, 본 발명자들은 150 mg/mL에서의 유사한 제제에서 3가지 추가의 항체의 점도를 시험하였다. 항-IL13 항체에 대해 관찰된 바와 같은 이러한 점도 프로파일은 높은 항체 농도에서의 제조 및 약물 투여의 특정 경로, 예를 들어 피하 주사에 바람직하다. 도 7에 나타난 바와 같이, 항-IL13 항체는 25℃에서 < 15 cP의 점도를 갖는 항-CD11a 항체와 유사한 점도 프로파일을 유지하였다. 대조적으로, 항-CD20 항체 및 mAb-1 항체는 매우 상이한 점도 프로파일을 나타내었다. 150 mg/mL에서의 항-CD20 항체의 점도는 25℃에서 > 15 cP인 반면, mAb-1은 도 7에서 볼 수 있는 바와 같은 점도에서의 유의한 문제로 인해 이 완충제 제제에서 150 mg/mL로 제제화될 수 없었다. 도 7은 125 mg/mL에서 mAb-1의 점도가 25℃에서 > 45 cP였음을 보여준다. 따라서, 이러한 데이터로부터 20 mM 히스티딘 아세테이트 pH 5.7, 175 mM 수크로스, 0.3 mg/mL 폴리소르베이트 20 중에 150 mg/mL로 제제화된 경우에 상이한 항체가 상이한 유동학적 특성을 갖는다는 것이 명백하다.
- [0195] 시각적 외관 및 유백광의 특성화
- [0196] 본 발명자들은 90 도 비탁분석 및 A350 탁도의 측정값을 이용하여 항-IL13 항체 제제의 시각적 외관 및 유백광을 항-CD20 항체 제제와 비교하여 특성화하였다. 도 8은 2개의 상이한 항체 제제의 시각적 외관의 비탁계 탁도 단위 (NTU)로의 정량화를 보여준다. 도 8에서, R1, R2, R3 및 R4는 참조 표준을 지칭하며, R4는 시각적 유백광의 최고 정도를 갖고 R1은 최저를 갖는다. 항-IL13 및 항-CD20 항체에 대한 A350 탁도의 측정값은 도 9에 나타낸다. 도 9에 나타난 바와 같이, 각각의 항체 제제에서, 탁도는 단백질 농도가 증가함에 따라 증가하였다. 이들 도면에 나타난 결과는 2개의 항체에 대한 시각적 외관의 2개의 상이한 측정값이 특히 보다 높은 단백질 농도에서 어떤 것이 고유하게 측정된 것인지에 대한 차이로 인해 상이한 경향을 갖는다는 것을 입증한다. 데이터는 또한 측정값 경향이 상승된 용액 유백광을 갖는 것으로 나타난 이들 2개의 항체 사이에서 일치한다는 것을 보여준다.
- [0197] 본 발명자들은 또한 농도 및 pH의 함수로서 항-IL13 항체 농도를 조사하였다. 결과는 도 10에 나타낸다. 최고 탁도를 나타내는 용액은 mAb 등전점 (pI)의 부근에 있었다.
- [0198] 이론에 제한되지 않으면서, 본 발명자들은 이러한 결과가 350 nm 파장에서의 흡광도 (탁도)가 단백질 흡수 밴드에 의한 광의 흡수로 인해 단백질 농도가 증가함에 따라 증가한다는 것을 나타내는 것으로 해석하였으며, 이 피크의 광범위한 꼬리로 인해 최대값은 280 nm 부근이었다. 증가된 A350 대 mAb 용액의 농도에 대한 제2의 기여 요인은 광 산란의 비-선형 증가였으며, 이는 전체 투과광을 감소시킨다.
- [0199] 또한, 본 발명자들은 mAb 농도의 함수로서 육안으로 보이지 않는 입자수를 평가하였고, 이들 결과는 도 11에 나타낸다. HIAC 광 암화 분석에 의해 미립자 > 2 μm에서 어떠한 유의한 크기의 증가도 관찰되지 않았으며, 이는 미립자 물질 > 2 μm이 항-IL13 항체 용액의 유백광 또는 탁도에 기여하지 않는다는 것을 나타낸다. 도 12는 항-IL13 항체의 125 mg/mL 용액을 점진적으로 작은 기공 크기 (0.1 μm 또는 100 nm로 감소)로 여과하였을 때 상기 항체 용액의 비탁계, 탁도계 및 정적 광 산란의 측정값을 보여준다. 도 11 및 12에 나타난 이러한 결과는

총괄적으로 항-IL13 항체 용액 및 약물 제제 외관이 광 산란의 농도 의존성을 유도하는 육안으로 보이지 않는 또는 서브마이크로미터 미립자 물질에 의해 결정되지 않는다는 것을 나타낸다.

[0200] 다음에, 본 발명자들은 125 mg/mL 및 204 mg/mL에서 용액 pH의 함수로서 용액 외관의 의존성을 연구하였다. 용액 외관은 600 nm에서의 투과광 강도의 온도 스캔을 이용하여 평가하였다. 결과는 도 13에 나타내었으며, 이는 감소하는 온도의 함수로서 일정하게 유지된 항-IL13 항체 용액 유백광이 결정적인 현상, 예컨대 용액 성분이 일치하지 않는 용해도를 가지며 특징적인 조성의 2개의 개별 상을 형성하는 액체-액체 상 분리로 인한 것이 아니었음을 나타낸다. 이는 소정 범위의 전형적인 저장 및/또는 노출 온도에 걸친 용액 균질성 (상 분리)이 초기 용액 유백광/시각적 외관 (실온에서)에도 불구하고 온도에 의해 영향을 받지 않는다는 것을 시사한다.

[0201] 열 안정성 (T_{melt}) 연구

[0202] 본 발명자들은 제제 조성 및 용액 pH의 함수로서 모세관 시차 주사 열량계에서 2개의 부분적으로 분할된 피크에 대한 열 용융 전이 피크를 측정하였다. 결과는 도 14에 나타낸다. 도 14에 나타난 바와 같이, pH의 함수로서 항-IL13에 대한 용융 전이 거동의 최대값은 pH 6.0-7.5 사이에서 관찰되었다. 우세한 과학적 의견은 용융 전이의 발생이 적을수록, 임의의 지속시간 동안 저장시에 시스템의 예상되는 물리적 안정성이 낮아진다는 것이다. 예를 들어, 문헌 [Chi et al., Protein Science 12(5):903-913 (2003); Chi et al., Pharmaceutical Research 20(9): 1325-1336 (2003); Goldberg et al., J. Pharm. Sciences 100(4):1306-1315 (2011)]을 참조한다. 따라서, 항-IL13 항체 제제 (pH 5.7)에 대해 본원에 제시된 물리적 안정성 데이터는 놀랍고 예상하지 못한 것이었다.

[0203] 콜로이드성 안정성

[0204] 콜로이드성 안정성을 항체의 묽은 용액 (0.10 - 1 mg/mL)을 이용한 정적 광 산란 뿐만 아니라 200 mg/mL를 초과하는 항체 농도에서의 광 산란에 의해 측정하였다. 콜로이드성 안정성은 용액 중에 현탁화된 거대분자의 용액 거동을 지칭하고, 거대분자, 예컨대 모노클로날 항체 사이의 평형, 시간 평균 상호작용의 연구를 허용한다. 이론에 제한되지 않고, 상호작용이 반발성인 경우에 용액 조성물은 안정하게 유지된 것으로 예상될 수 있다. 그러나, 용질 분자 사이에 순수 인력 상호작용이 발생하며, 이는 일반적으로 상 전이 및 단백질 용해도 문제와 연관된다.

[0205] 본 발명자들은 단순 완충제 중 샘플을 사용하여 용액 pH의 함수로서 항-IL13 항체 (0.1 내지 1.0 mg/mL 범위의 농도에서)에 대한 삼투성 제2 비리알 계수 (B_2)를 측정하였다. 도 15 및 16에서, 0 초과의 값은 순수 반발 상호작용을 나타내는 양의 삼투성 제2 비리알 계수이고, 0 미만의 값은 순수 인력 분자간 상호작용을 나타내는 음의 삼투성 제2 비리알 계수임에 주목한다. 도 15의 데이터는 항-IL13 항체가 pH 범위에 걸쳐 인력 상호작용을 갖지만, 가장 강한 인력 상호작용이 pH 5.5 - 6.5 사이에서 일어났음을 보여준다. 도 16에 제시된 결과를 위해, 제제 첨가제를 상이한 pH의 용액에 첨가하였다. 도 16에서 볼 수 있는 바와 같이, pH 5.5-6.5에서 측정된 삼투성 제2 비리알 계수는 음으로 유지되었고, 이에 따라 인력성이었다. 농도 1- 200 mg/mL 범위에 걸쳐 0의 산란 각도를 강도에 외삽하여 다각도 광 산란 검출기로 측정된 광 산란의 측정값은 도 17에 제시된다. 이러한 데이터는 산란된 강도 프로파일이 HACH 비탁계에서 관찰된 것과 매우 유사하다는 것을 밝혀내었다 (도 8을 도 17과 비교함). 기기는 둘 다 산란된 광 강도, 및 이에 따라 레일리(Rayleigh) 산란을 측정한다. 이러한 산란은 미립자가 존재하지 않는 용액에서 우세하고, 또한 산란 분자 사이의 상호작용에 의존하는 용액의 작은 밀도 및 농도 변동에 의해 발생한다. 산란광 강도의 감소는 분자가 서로 점진적으로 가까이 접촉하고 시간/공간에서 그의 위치가 상관되어 산란광의 파괴성 간섭을 발생시키는 경우에 일어난다 (예를 들어, 문헌 [Bettelheim et al., Biophysical Journal 41(1): 29-33 (1983); Xia et al., Biophysical Journal 66(3_Pt_1): 861-872 (1994); 및 Xia et al., Biophysical Journal 41(1): 29-33 (1996)] 참조). 도 18은 제제 pH의 함수로서 항-IL13 항체에 대한 정적 광 산란 데이터를 보여준다. 도 18의 데이터는 최대 200 mg/mL의 항체 농도에서 관찰된 겔보기 분자량으로 나타내었다. 도 18에 제시된 데이터는 mAb 배제된 부피의 단순 강체 구 종 모델에 대한 이론적 산란에 비해 (도 18의 점선) 농도 범위에 걸쳐 약한 (pH 7.2) 내지 중간 정도의 인력 콜로이드성 (pH 6.5) 상호작용 및 항-IL13 항체 자기-회합을 나타내었다.

[0206] 항-IL13 및 항-CD20은 둘 다 도 19에 나타난 바와 같이 인력 콜로이드성 상호작용 및 mAb 자기 회합에 의해 발생한 대등한 수준의 탁도를 보여주었다. 놀랍게도, 이러한 인력 콜로이드성 상호작용은 도 20에 나타난 바와 같은 항-IL13 항체에 대한 제제의 높은 점도 (예를 들어, 150 mg/mL에서 > 15 cP) 또는 유동학적 문제를 나타내지 않았다. 그러나 항-CD20 항체에서의 콜로이드성 상호작용은 용액 레올로지에 영향을 미쳤으며, 이는 용액

유백광 (도 8) 뿐만 아니라 25℃ 및 150 mg/mL에서 > 15 cP의 높은 점도를 발생시켰다 (도 20).

[0207] 장기간 물리적, 화학적 및 효력 안정성

[0208] 장기간 안전성 및 효력을 시험하기 위해, 항-IL13 항체를 20 mM 히스티딘 아세테이트 pH 5.7, 175 mM 수크로스 및 0.3 mg/mL 폴리소르베이트 20 중에 125 mg/mL로 제제화한 후에 다양한 저장 조건에 적용하였다. 바이알을 표 3에 제시된 주수 (5℃에서 최대 156주 및 25℃에서 최대 26주) 동안 5℃ 또는 25℃에 저장하였다. 표 3에 지시된 바와 같은 각각의 시점에서, 샘플을 색 발생 및 선명도 (CAC), pH, 및 지시된 화학적 또는 물리적 안정성 측정에 대해 분석하였다. 또한, 생물학적 활성 (효력)도 각각의 시점에서 평가하였다. 표 3에 제시된 데이터에 의해 나타난 바와 같이, 20 mM 히스티딘 아세테이트 pH 5.7, 175 mM 수크로스 및 0.3 mg/mL 폴리소르베이트 20 중에 125 mg/mL로 제제화된 항-IL13 항체는 효력을 유지하였고, 5℃에서 전체 156주 (3년) 동안 및 25℃에서 전체 26주 동안 양호한 화학적 및 물리적 안정성을 입증하였다. 이러한 데이터는 이 제제가 연장된 기간 동안 항-IL13 항체의 바람직한 화학적, 물리적 및 효력 특성을 유지한다는 것을 확인한다.

표 3

항-IL13 항체의 장기간 물리적, 화학적 및 효력 안정성의 결정에 이용된 안정성 및 조건

온도 (°C)	저장 시간 (주)	시각적 CAC	pH	SEC	icIEF	CE-SDS	강도	오스몰 농도	효력
				% 단량체	% 주요 피크	% 주요 피크	(mg/mL)	(mOsm/kg)	(% 비활성)
-70 T=0	0	SY, LIQ, SOPL	5.6	99.5	72	98	119	267	101
5	4	SY, LIQ, SOPL	5.6	99.5	74	98	128	268	98
	8	SY, LIQ, SOPL	5.6	99.5	74	98	124	270	NT
	12	SY, LIQ, SOPL	5.6	99.5	74	98	125	265	98
	26	SY, LIQ, SOPL	5.8	99.3	73	98	125	264	99
	39	SY, LIQ, SOPL	5.8	99.4	74	98	123	265	95
	52	SY, LIQ, SOPL	5.7	99.3	72	98	122	269	102
	78	SY, LIQ, SOPL	5.7	99.2	72	98	125	266	95
	104	SY, LIQ, SOPL	5.7	99.1	73	98	124	275	100
	130	SY, LIQ, SOPL	5.8	99.3	72	98	124	273	93*
	156	SY, LIQ, SOPL	5.8	99.1	71	98	125	268	94
25	1	SY, LIQ, SOPL	5.6	99.5	71	98	125	264	NT
	2	SY, LIQ, SOPL	5.7	99.4	72	98	124	265	NT
	4	SY, LIQ, SOPL	5.7	99.2	71	97	123	264	102
	8	SY, LIQ, SOPL	5.7	99.1	68	97	125	268	98
	12	SY, LIQ, SOPL	5.7	99.0	62	97	123	270	94
	26	SY, LIQ, SOPL	5.8	98.7	57	96	129	268	91

CAC: 색 발생 및 선명도
 SY = 약간 황색
 LIQ = 액체
 SOPL = 약간 유백색

[0209]

[0210] **결론**

[0211] 본 발명자들은 항-IL13 항체가 장기간 화학적 및 물리적 안정성을 촉진하고 효력을 유지시키는 부형제와 pH 및 용액 조건에서 성공적으로 제제화되었음을 보여주었다. 특히, 이 제제는 20 mM 히스티딘 아세테이트 pH5.7, 175 mM 수크로스 및 0.3 mg/mL 폴리소르베이트 20 중에 100 mg/mL 이상 (125 mg/mL 및 150 mg/mL 포함)의 농도의 항체를 포함하였다. 놀랍게도, 본 발명자들은 제제가 25℃에서 < 15 cP의 바람직한 점도 프로파일을 갖는다는 것을 발견하였다. 이러한 점도 프로파일은 제조성 및 또한, 예를 들어 작은 부피의 고농도 약물 제품이 환자의 편안함 및 편의성을 비롯한 여러 이유로 최적인 피하 주사의 투여 용이성을 위해 바람직하다. 본 발명자들은 동일하거나 유사한 제제 내의 다른 항체가 25℃에서 > 15 cP의 바람직하지 않은 점도 프로파일을 갖는다는 것을 관찰하였으며, 항-IL13 항체 제제에 대한 점도 프로파일의 예측불가능성을 강조한다.

[0212] 또한, 단백질 제제 선택을 위해 종종 사용되는 2가지 기준은 열 안정성 및 콜로이드성 안정성을 포함한다 (문헌 [Chi et al., Protein Science 12(5):903-913 (2003); Chi et al., Pharmaceutical Research 20(9): 1325-1336 (2003)] 참조). 항-IL13 항체 용액의 언폴딩 온도의 열 분석은 조건 pH 5.4- 6.0에서의 물리적 안정성이 항체 제제의 물리적 안정성에 가장 적합하지 않을 것임을 시사한다. 항-IL13 항체 용액의 콜로이드성 안정성 분석은 또한 pH 범위 5.5-6.5의 제제화 조건이 낮은 응집률을 유지하기에 최소로 바람직할 것임을 시사한다. 그러나, 놀랍게도, 여기 제시된 데이터에 의해 나타난 바와 같이, pH 5.7에서 제제화된 항-IL13 항체는 5℃에서 연장된 기간에 걸쳐 및 또한 가속 조건 하에 양호한 물리적 안정성을 입증하였다. 또한 이러한 조건 하에서의 제품 안정성이 보다 낮은 열 용융 전이 및 콜로이드성 안정성이 존재함에도 불구하고 물리적으로 및 화학적으로 둘 다 보다 높은 pH에서 관찰된 것보다 우수하다는 것이 놀라웠다. 제제화된 항-IL13 항체 용액 외관 (및 탁도)이 특정의 선택되지 않은 조건에서보다 선택된 제제화 조건에서 보다 더 유백색이었던 반면, 분자 특성 및

제제 조성은 양쪽 실시간 및 가속 저장 조건 하에 최적의 안정성을 유지하였고, 효력을 유지하였으며, 작은 부피의 고농도 약물 제품의 전달에 바람직한 용액 레올로지 특성을 제공하였다.

[0213] **피하 투여 장치**

[0214] 상기 기재된 항-IL13 제제의 투여를 위한 바늘, 플런저 스톱퍼를 갖는 플런저, 바늘 실드 및 바늘 안전성 장치를 갖는 예비충전된 시린지를 포함하는 피하 투여 장치가 다양한 상업적으로-입수가 가능한 성분의 평가에 의해 선택되었다. 예를 들어, 평가된 성분은 유리 케인, 스택-인 바늘, 플런저 및 플런저 스톱퍼를 갖는 형성된 시린지, 강성 바늘 실드 및 바늘 안전성 장치를 포함하였다.

[0215] 다양한 성분을 안정성을 포함하나 이에 제한되지는 않는 제제 특성, 및 다른 고려사항, 예컨대 환자의 편안함 및 편의성 (제제가 본원에 기재된 바와 같은 특정 점도를 갖는 경우에 주사 시간 및 미는 힘에 대한 바늘 게이지 및 내부 바늘 직경의 영향과 같은 요인을 포함함)에 대한 영향에 대해 당업자에게 공지된 방법에 따라 다양한 조합으로 평가하였다. 이러한 연구는 본 발명자들이 본원에 기재된 바와 같이 고농도로 제제화된 레브리키주맙의 투여를 위한 최적의 피하 투여 장치로서 예비충전된 1.0 mL 낮은 텅스텐 보로실리케이트 유리 (유형 I) 시린지 및 FM27/0 (다에트와일러)을 포함하는 강성 바늘 실드 및 강성 폴리프로필렌 실드를 갖는 스테인리스 스틸 5-베벨 27G 1/2 인치 박막 스택-인 바늘을 선택하도록 하였다. 또한, 플런저 로드는 4023/50 고무 및 플루로텍® 에틸렌-테트라플루오로에틸렌 (ETFE) 코팅 (웨스트 파마슈티칼 서비시스, 인크.)을 포함하는 고무 플런저 스톱퍼를 포함하였다. 피하 투여 장치는 또한 바늘 안전성 장치, 울트라세이프 패시브® 니들 가드 X100L (세이프티 시린지스, 인크.)을 포함하였다. 상기 상세하기 기재된 피하 투여 장치는 하기에서 스택-인 바늘 예비충전된 시린지 또는 "SIN PFS"로 지칭된다.

[0216] 선택된 SIN PFS와 대등한 바이알 내의 레브리키주맙 약물 제품의 안정성을 입증하기 위해, 본 발명자들은 40°C/주위 상대 습도에서 2 cc 바이알 또는 1 mL SIN PFS에 수동-충전된 GMP 약물 물질을 평가하였다. 본 발명자들은 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)에 의한 단량체의 변화 뿐만 아니라 영상화 모세관 등전 포커싱 (ICIEF) 및 모세관 전기영동 소듐 도데실 술페이트 (CE-SDS)에 의한 주요 피크 퍼센트의 변화에 의해 특성화된 분해율을 평가하였다.

[0217] 이러한 연구는 40°C에서 4주 동안 저장 후에, 바이알 및 SIN PFS 사이에 SEC에 의해 측정된 바와 같은 단량체의 감소 (각각 0.6%-0.9% 감소는 나타냄) 또는 주요 피크 퍼센트의 감소 (각각 ICIEF에 의해 측정시에 18-21% 감소 및 CE-SDS에 의해 측정시에 0.9%-1.5% 감소를 나타냄)에 있어 유의한 차이가 없다는 것을 밝혀내었다. 또한, 크로마토그래피 프로파일이 서로 대등하였고, 바이알 샘플과 비교하여 SIN PFS 샘플에서 새로운 피크가 관찰되지 않았다.

[0218] 분해율에 약간의 차이가 있었다 (40°C에서 4주 후에 바이알의 경우에 고분자량 중에서 0.5%-0.6% 증가 대 SIN PFS의 경우에 고분자량 중에서 0.8% 증가). 이러한 약간의 차이는 실시간 저장 동안 제품 품질에 영향을 미칠 가능성이 없는 것으로 간주되었다.

[0219] 따라서, 본 발명자들은 상기 기재된 데이터가 바이알에서 상기 기재된 바와 같이 제제화된 고농도 레브리키주맙 약물 제품의 안정성이 상기 기재된 선택된 SIN PFS에서와 대등하다는 것을 보여준다고 결론내렸다.

[0220] 특정 참고문헌

Akers, M.J. et al. (2002) "Formulation Development of Protein Dosage Forms", Development and Manufacture of Protein Pharmaceuticals, pgs. 47-127.
 Bettelheim, F. A. and E. L. Siew (1983). "Effect of change in concentration upon lens turbidity as predicted by the random fluctuation theory." *Biophysical Journal* **41**(1): 29-33.
 Burckbuchler, V.; Mekhloufi, G.; Giteau, A. P.; Grossiord, J. L.; Huille, S.; Agnely, F. *Eur J Pharm Biopharm* **2010**, *76*, 351.
 Chi, E. Y., S. Krishnan, et al. (2003). "Roles of conformational stability and colloidal stability in the aggregation of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor." *Protein Science* **12**(5): 903-913.

[0221]

- Chi, E. Y., S. Krishnan, et al. (2003). "Physical stability of proteins in aqueous solution: Mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation." *Pharmaceutical Research* **20**(9): 1325-1336.
- Development and Optimization of Protein Formulation DSC Application Note, *available at* [www\(dot\)microcalorimetry\(dot\)com](http://www(dot)microcalorimetry(dot)com) (October 31, 2011).
- Goldberg, D.S. et al. (April 2011). "Formulation Development of Therapeutic Monoclonal Antibodies Using High-Throughput Fluorescence and Static Light Scattering Techniques: Roll of Conformational and Colloidal Stability", *Journal of Pharm. Sciences*, 100, (4): pgs. 1306-1315.
- Jezeq, J.; Rides, M.; Derham, B.; Moore, J.; Cerasoli, E.; Simler, R.; Perez-Ramirez, B. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2011**, 63, 1107.
- Le Brun, V. et al. (2010). "A critical evaluation of self-interaction chromatography as a predictive tool for the assessment of protein-protein interactions in protein formulation development: A case study of a therapeutic monoclonal antibody", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 75, pgs. 16-25.
- Mason, B.D. et al. (2011). "Opalescence of an IgG2 Monoclonal Antibody Solution as it Relates to Liquid-Liquid Phase Separation", *Journal of Pharm. Sciences*, 100, pgs. 4587-4596.
- Minton, A. P. (2007). "The effective hard particle model provides a simple, robust, and broadly applicable description of nonideal behavior in concentrated solutions of bovine serum albumin and other nonassociating proteins." *J Pharm Sci* **96**(12): 3466-9.
- Minton, A. P. (2007). "Static Light Scattering from Concentrated Protein Solutions, I: General Theory for Protein Mixtures and Application to Self-Associating Proteins." *Biophysical Journal* **93**(4): 1321-1328.
- Nishi, H.; Miyajima, M.; Wakiyama, N.; Kubota, K.; Hasegawa, J.; Uchiyama, S.; Fukui, K. *J Biosci Bioeng* **2011**, 112, 326.
- Nishi, H.; Miyajima, M.; Nakagami, H.; Noda, M.; Uchiyama, S.; Fukui, K. *Pharmaceutical Research* **2010**, 27, 1348.
- Saito, S.; Hasegawa, J.; Kobayashi, N.; Kishi, N.; Uchiyama, S.; Fukui, K. *Pharm Res* **2012**, 29, 397.
- Salinas, B.A. et al. (Jan. 2010). "Understanding and Modulating Opalescence and Viscosity in a Monoclonal Antibody Formulation", *Journal of Pharm. Sciences*, 99 (1): pgs. 82-93.
- Saluja, A.; Badkar, A. V.; Zeng, D. L.; Nema, S.; Kalonia, D. S. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2006**, 95, 1967.
- Scherer, T. M., J. Liu, et al. (2010). "Intermolecular Interactions of IgG1 Monoclonal Antibodies at High Concentrations Characterized by Light Scattering." *The Journal of Physical Chemistry B* **114**(40): 12948-12957.
- Sukumar, M. et al. (July 2004): "Opalescent Appearance of an IgG1 Antibody at High Concentrations and Its Relationship to Noncovalent Association", *Pharm. Research*, 21 (7) pgs. 1087-1093.
- Volkin, D.B. et al. (2002) "Preformulation Studies as an Essential Guide to Formulation Development and Manufacture of Protein Pharmaceuticals", *Development and Manufacture of Protein Pharmaceuticals*, 14, 1-46.
- Xia, J. Z., T. Aerts, et al. (1994). "Light scattering by bovine alpha-crystallin proteins in solution: hydrodynamic structure and interparticle interaction." *Biophysical Journal* **66**(3_Pt_1): 861-872.

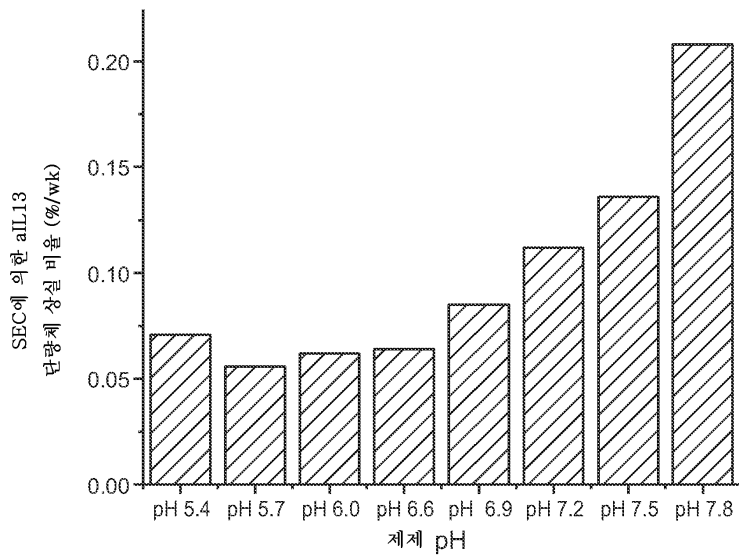
[0222]

- Xia, J. Z., Q. Wang, S. Tatarkova, T. Aerts, J. Clauwaert (1996). "Structural basis of eye lens transparency: light scattering by concentrated solutions of bovine alpha-crystallin proteins" *Biophysical Journal* **71**(5): 2815-2822.
- Yadav, S., J. Liu, et al. (2009). "Specific interactions in high concentration antibody solutions resulting in high viscosity." *J Pharm Sci*.
- Yadav, S.; Shire, S. J.; Kalonia, D. S. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2010**, 99, 4812.
- Yadav, S.; Sreedhara, A.; Kanai, S.; Liu, J.; Lien, S.; Lowman, H.; Kalonia, D. S.; Shire, S. J. *Pharmaceutical Research* **2011**, 28, 1750.
- Yadav, S.; Liu, J.; Shire, S. J.; Kalonia, D. S. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2010**, 99, 1152.
- Yadav, S.; Shire, S. J.; Kalonia, D. S. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2012**, 101, 998.
- Yadav, S.; Shire, S. J.; Kalonia, D. S. *Pharmaceutical Research* **2011**, 28, 1973.

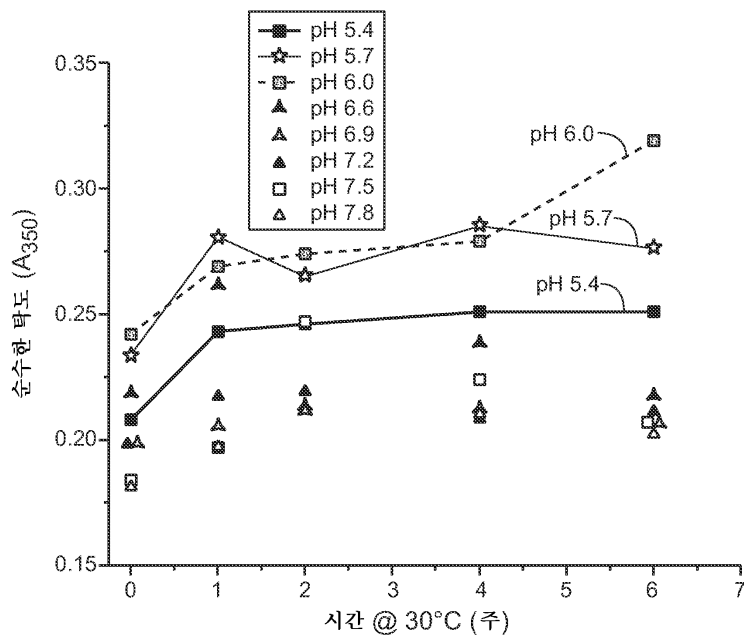
[0223]

도면

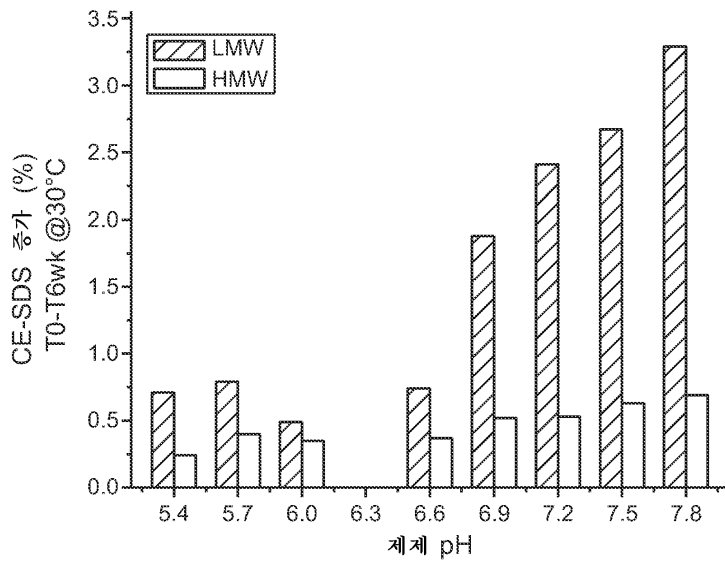
도면1



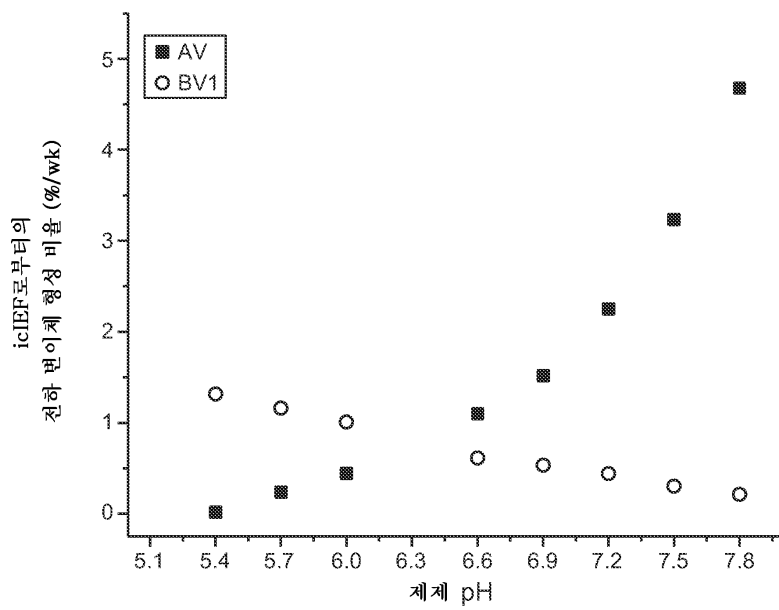
도면2



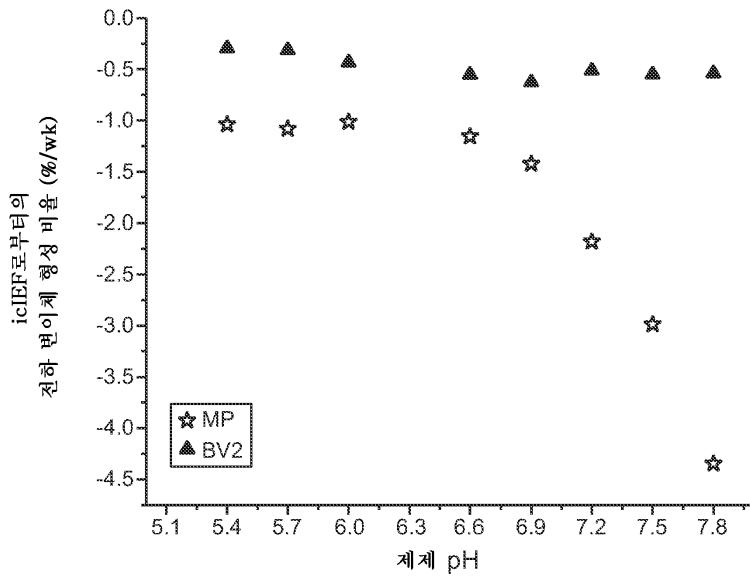
도면3



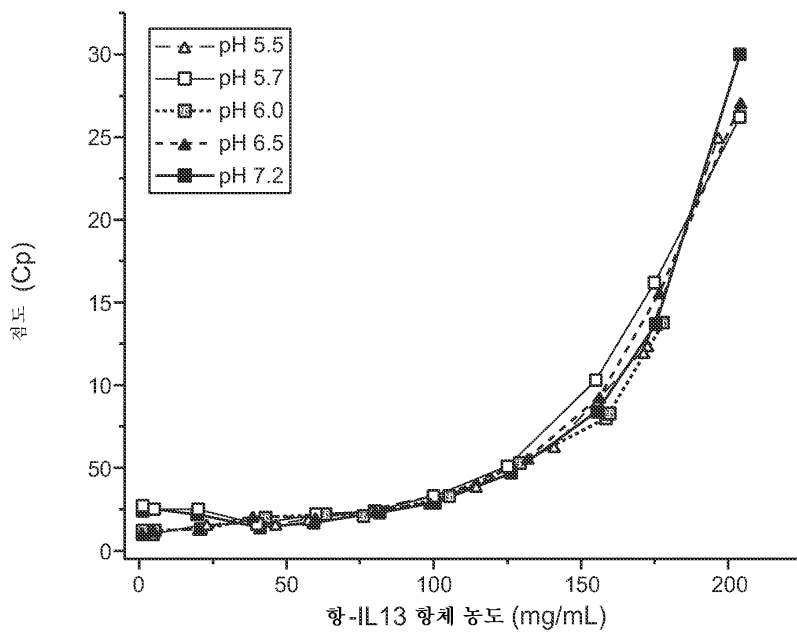
도면4



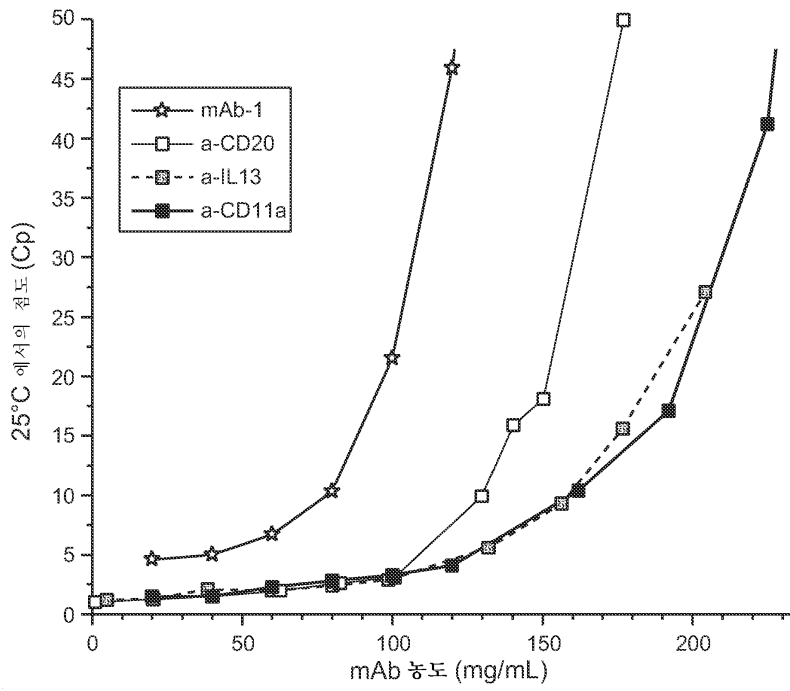
도면5



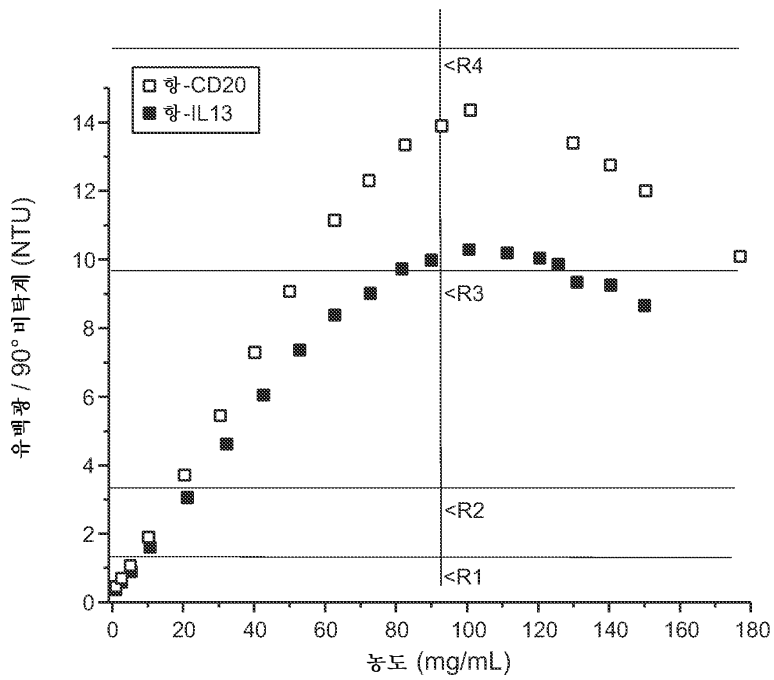
도면6



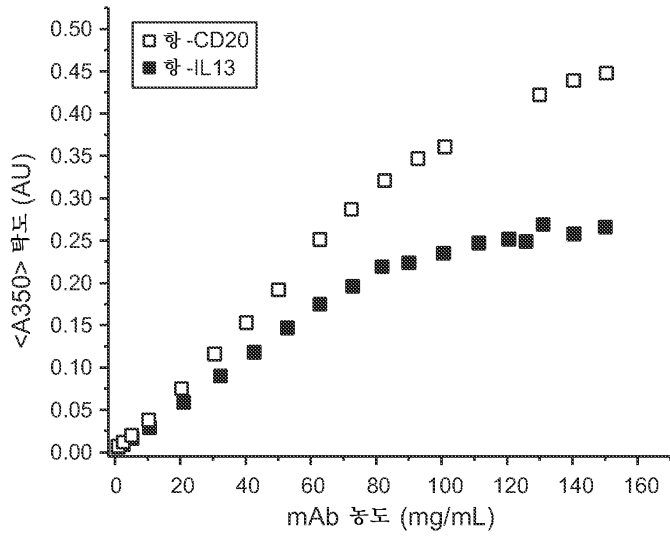
도면7



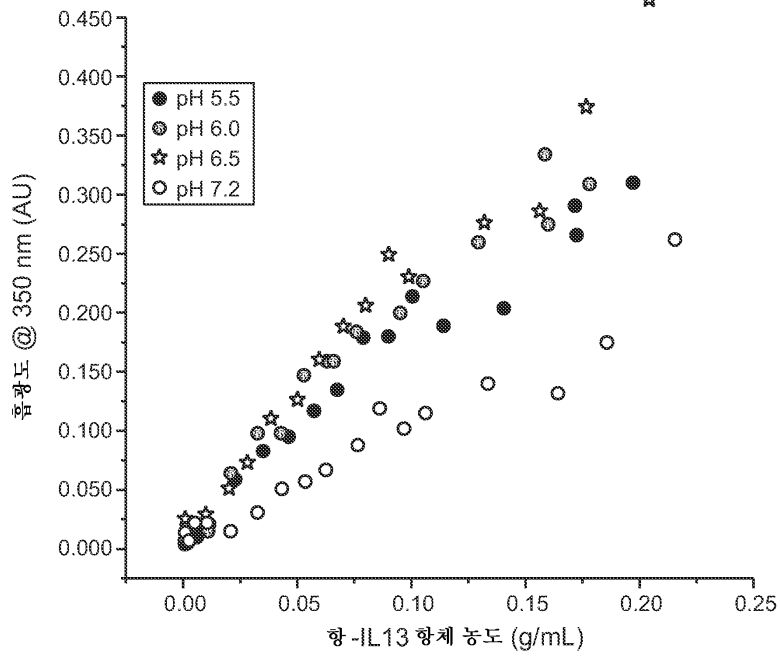
도면8



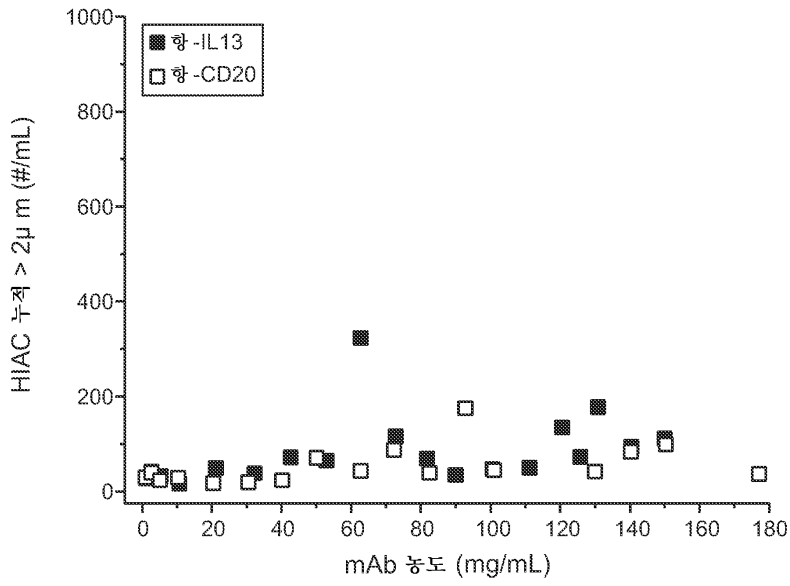
도면9



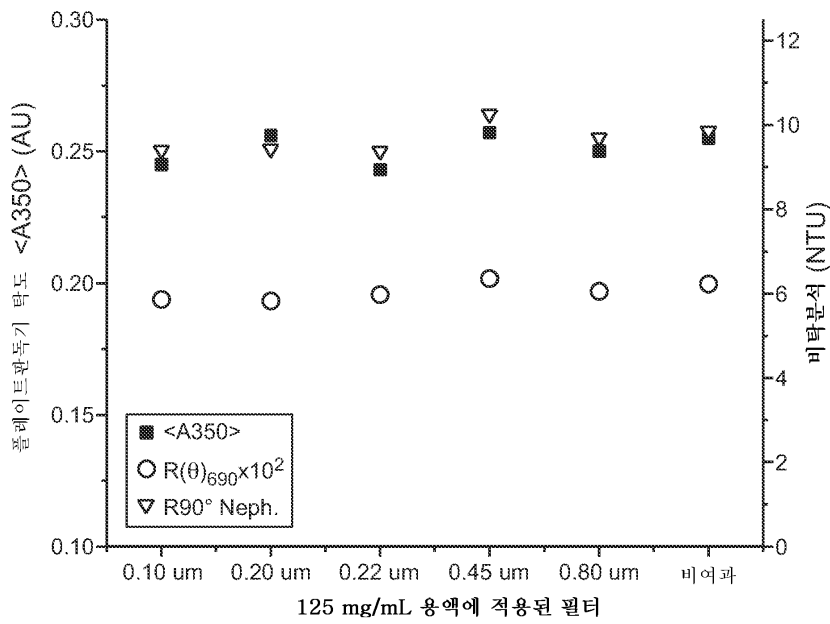
도면10



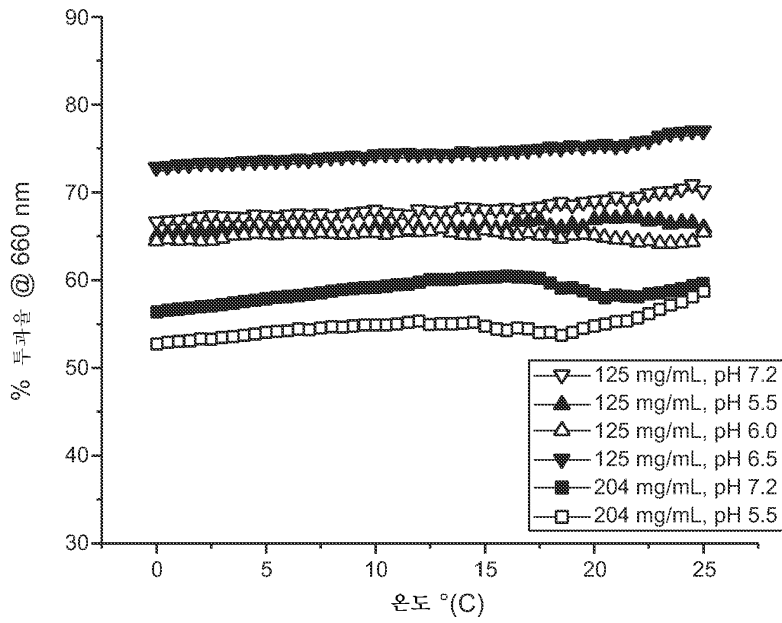
도면11



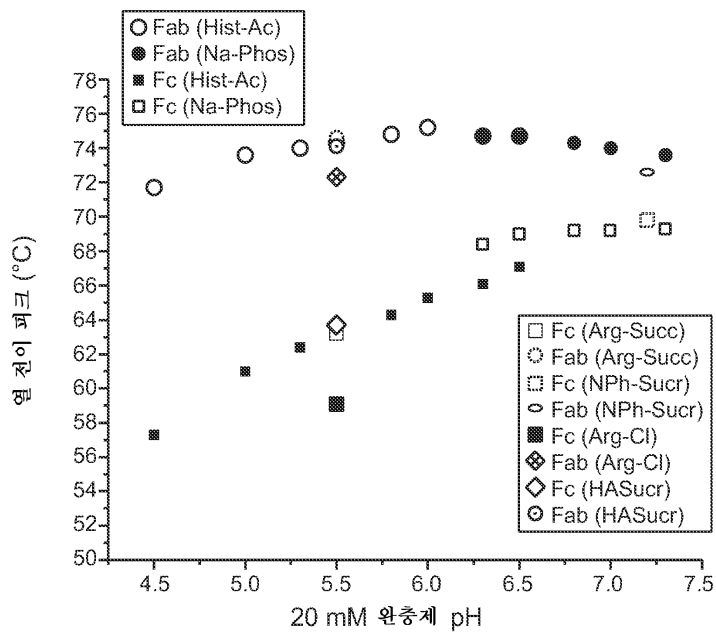
도면12



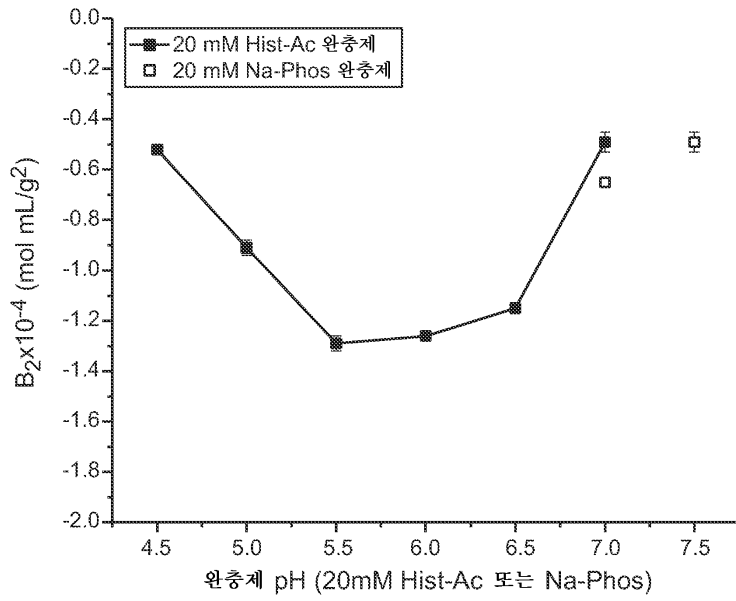
도면13



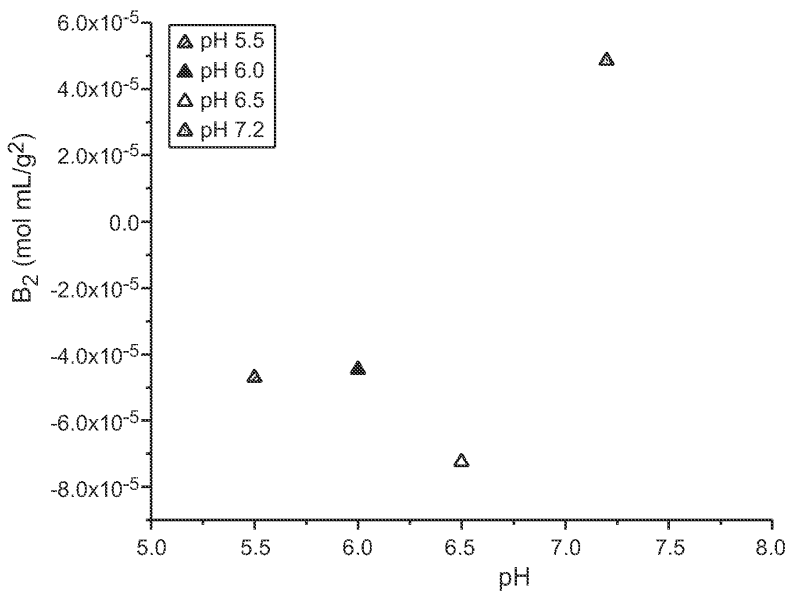
도면14



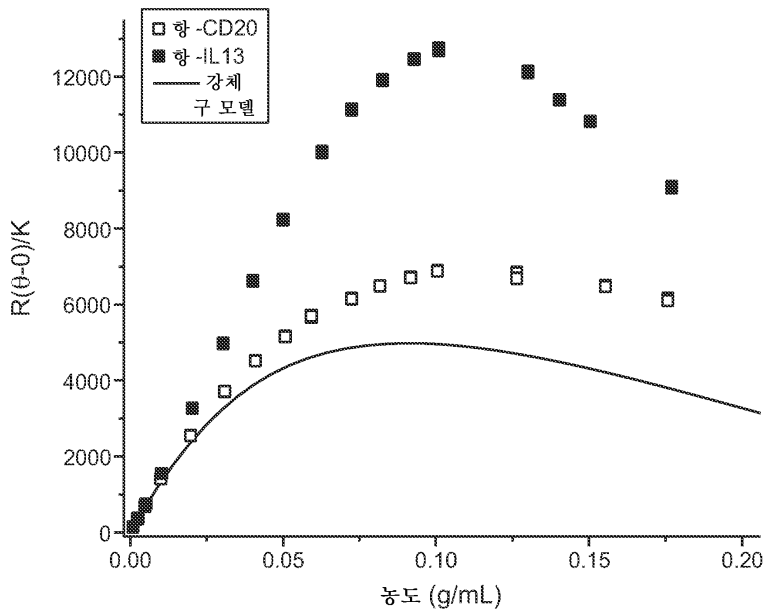
도면15



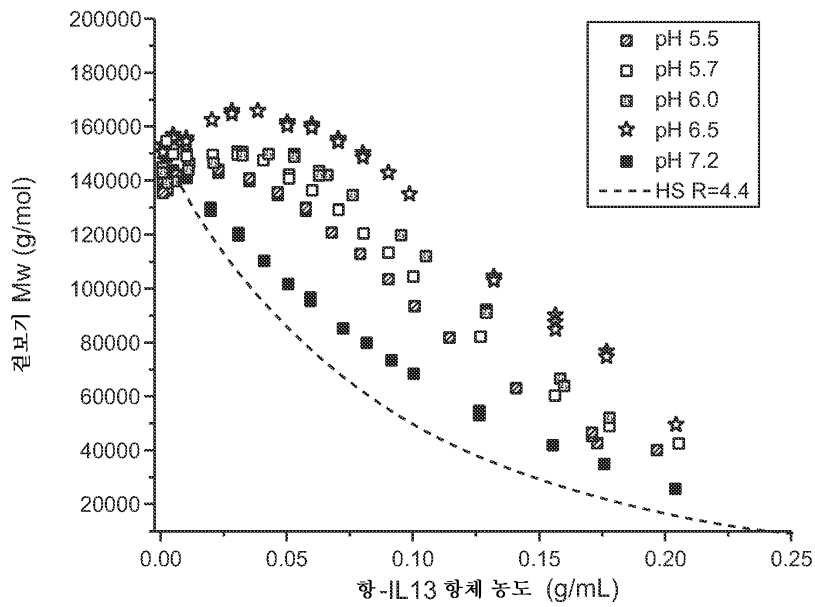
도면16



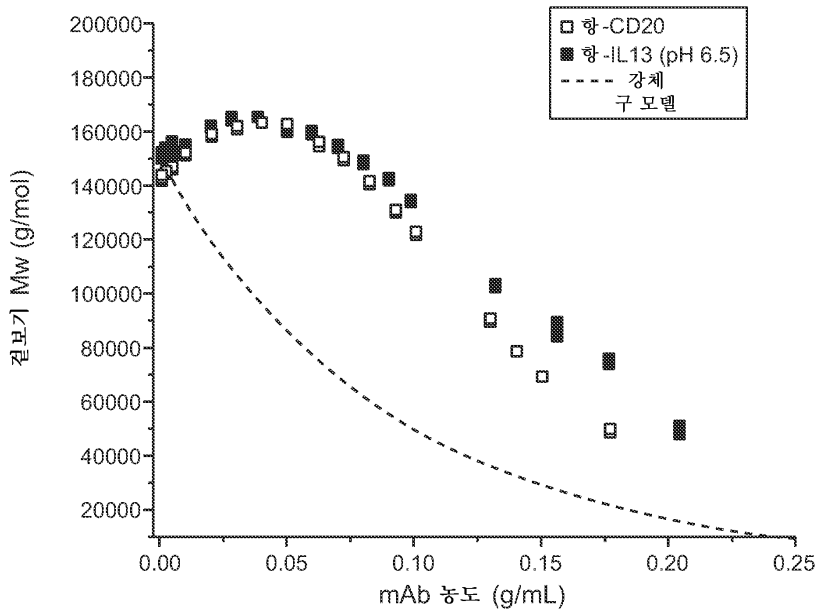
도면17



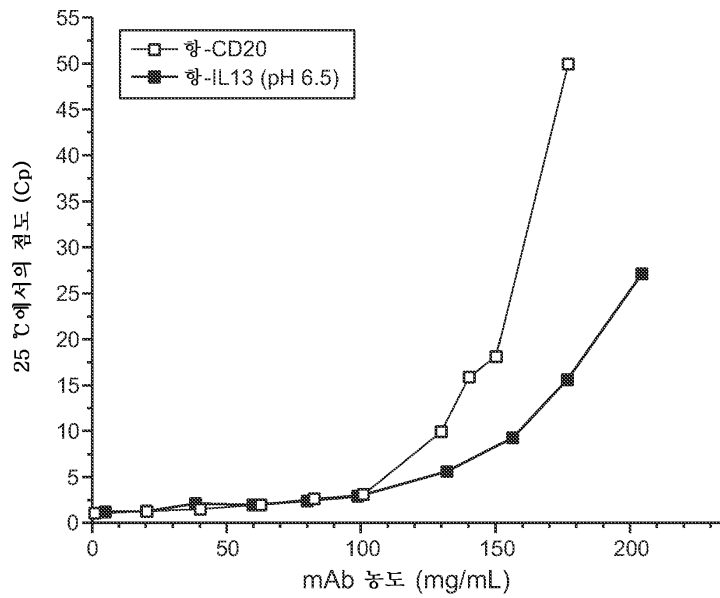
도면18



도면19



도면20



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> GENENTECH, INC. ET AL.

<120> ANTIBODY FORMULATIONS

<130> P4786R1-WO

<140><141><150> 61/553,916

<151> 2011-10-31

<160> 14
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 1
 Ala Tyr Ser Val Asn
 1 5

<210> 2
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 2
 Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 3
 Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn
 1 5 10

<210> 4
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 4

Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His

1 5 10 15

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 5

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 6

Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Arg Thr

1 5

<210> 7

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala

35 40 45

Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser

50 55 60

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr

65 70 75 80

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly

85 90 95

Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 8

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 8

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu

65 70 75 80

Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Gly Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 9

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide

<400> 9

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

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

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

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

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

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

<210> 10

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide

<400> 10

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

1 5 10 15
 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr Ser

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

 85 90 95
 Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

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

 210 215 220
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 225 230 235 240
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 275 280 285
 Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320
 Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 325 330 335
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
 340 345 350
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 355 360 365
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 370 375 380
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 385 390 395 400
 Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
 405 410 415
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440
 <210> 11
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide
 <400> 11
 Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln

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

 Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Gly Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

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

 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440

<210> 12

<211> 444

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400

> 12

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

 Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
 65 70 75 80
 Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly
 85 90 95
 Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125

 Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190

 Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
 210 215 220
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 225 230 235 240
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val

<400> 13

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

 Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu
 65 70 75 80
 Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Gly Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser
 100 105 110

 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 14

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide

<400> 14

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

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

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

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

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

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

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190

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

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