

명세서

발명의 명칭: I g E F c 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인을 포함하는 융합단백질의 제형

기술분야

- [1] 본 발명은 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인을 포함하는 융합단백질 이량체에 최적화된 제형에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 천식을 비롯한 알레르기성 비염, 아토피 피부염, 식품 알레르기 등 알레르기 질환은 산업화 및 서구화된 현대사회에서 빠른 속도로 증가하고 있으며, 중증 알레르기 질환인 아나필락시스의 발생도 증가하고 있다. 이러한 만성 면역질환은 개인 삶의 질을 매우 떨어트리며 이에 따른 사회경제적 비용도 급증하고 있어, 이를 극복하기 위한 대책이 절실한 실정이다.
- [3] 대부분의 알레르기 질환은 면역글로불린 E(IgE)의 과잉 면역반응에 의해 유발된다. IgE는 정상 상태에서는 혈청 중에 아주 낮은 농도로 존재하는 항체이다. IgE는 일반적으로 무해한 항원에 의해서 생성되기도 하며, 특별한 자극 없이도 IgE가 증가되는 경우가 있는데 이러한 경우에 알레르기 질환이 야기될 수 있다. 비정상적으로 증가된 IgE가 비만 세포(Mast cell)와 호염기성 과립구(basophils) 등의 표면에 발현되는 고친화성 IgE Fc 수용체(FcεRI)에 결합할 수 있다. 이러한 결합에 의해 비만 세포나 호염기성 과립구는 히스타민, 류코트리엔, 프로스타글란딘, 브라디키닌 및 혈소판-활성화 인자 등 화학 매개자를 방출하게 된다. 이러한 화학 매개자의 방출에 의해 알레르기 증상이 발생하게 된다. 특히, 알레르기 질환은 IgE 및 FcεRI 사이의 결합으로 증상이 악화될 수 있다.
- [4] 현재 알레르기 질환을 치료하기 위하여 알레르겐 회피, 항알레르기 약물 투여, 체내 IgE 합성 조절, 항 IgE 항체 개발 등 여러가지 방법이 제안되었다. 그러나, 현재까지 알려진 치료 방법은 알레르기의 근본 원인을 해결할 수 없고, 약제의 효능이 불충분하거나, 심각한 부작용이 발생하는 등 많은 단점을 가지고 있다.
- [5] 또한, IgE 및 FcγRIIb에 고친화성으로 결합하며, IgE를 발현하는 세포를 억제할 수 있는 면역글로불린 조성물이 연구되고 있다(KR 10-1783272B1). 이러한 조성물은 알레르기 및 천식을 포함하여 IgE-매개된 장애를 치료하는데 유용하다고 보고된 바 있다.
- [6] 한편, IgE 항체의 Fc 일부분을 표적으로 하는 오말리주맵(Omalizumab, 상품명: 졸레어(Xolair))이 개발되어 난치성 중증 천식과 난치성 두드러기 치료제로 사용되고 있다. 하지만, 효과를 유지하기 위해서는 고용량으로 투여되어야 하기 때문에 비용부담이 크고, 혈관부종, 아나필락시스 반응 등의 부작용이 있다는 것이 보고되었다. 그뿐 아니라, 시판 후 결과를 통해 알레르기성 육아종 혈관염,

특발성 중증 혈소판감소증이 보고되고 있어, 부작용 없이 알레르기 질환을 효율적으로 치료할 수 있는 치료제 개발에 대한 필요성이 증가하고 있는 실정이다.

- [7] 부작용 없이 알레르기 질환을 효율적으로 치료할 수 있는 치료제를 개발하기 위해, IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인을 포함하는 융합단백질을 개발하였고 상기 융합단백질이 알레르기 질환을 치료할 수 있다는 점을 확인하였다(KR 10-2038675B1). 이러한 단백질을 알레르기 질환 치료에 효율적으로 적용하기 위해서는 투약 및 투여 이점을 제공하는 안정한 고농도 단백질 제형 개발이 필요하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명의 목적은 IgE 매개 알레르기 질환을 치료하기 위한 융합단백질 이량체를 상용화하기 위해 최적화된 제형을 제공하는 것이다. 구체적으로, 상기 융합단백질 이량체를 상용화하기 위해 피하 주사 적용에 최적화된 고농도 수성 약제학적 제형을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

- [9] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인(FcεRIα ECD)을 포함하는 융합단백질 이량체를 포함하며, pH 6.0 내지 7.0을 갖는 수성 약제학적 제형을 제공한다.

발명의 효과

- [10] 본 발명에 따른 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인(FcεRIα ECD)을 포함하는 융합단백질 이량체를 포함하며, pH 6.0 내지 7.0을 갖는 수성 약제학적 제형은 안정성이 우수하다. 더욱이, 본 발명에 따른 제형은 상기 융합단백질 이량체를 고농도로 포함하고 피하 주사에 의해서 빠르고 편리하게 투여될 수 있으며, 안정성이 우수하고 응집물 형성을 감소시켜 저장 기간을 증가시킬 수 있다. 따라서, IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인(FcεRIα ECD)을 포함하는 융합단백질 이량체를 포함하는 상기 제형은 알레르기 질환 치료용 주사제로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [11] 도 1은 750 W/m² 조건에서 7.5시간 동안 빛 스트레스를 가한 샘플(#1 내지 #4)을 촬영한 사진이다.
- [12] 도 2는 35°C, 200 rpm 조건에서 5일 동안 스트레스를 가한 샘플(#1 내지 #6)을 촬영한 사진이다.
- [13] 도 3은 35°C, 200 rpm 조건에서 14일 동안 스트레스를 가한 샘플(#1 내지 #6)을 촬영한 사진이다.
- [14] 도 4는 35°C, 200 rpm 조건에서 14일 동안 스트레스를 가한 샘플(#1 내지 #6)의 회수율을 나타낸 그래프이다.

- [15] 도 5는 각 스트레스 조건에 따른 샘플들의 메인 피크 면적을 나타낸 그래프이다.
- [16] 도 6은 각 스트레스 조건에 따른 샘플들의 응집 면적을 나타낸 그래프이다.
- [17] 도 7은 각 스트레스 조건에 따른 샘플들의 단편 면적을 나타낸 그래프이다.
- [18] 도 8은 샘플(#1 또는 #2)이 충전된 시린지의 초기 상태 및 35°C, 200 rpm에서 14일 동안 스트레스를 가한 후 시린지를 촬영한 사진이다.
- [19] 도 9는 힘/경로 다이어그램을 나타낸 그래프이다. 이때, 압출 속도는 190 mm/min으로 수행하였다.
- [20] 도 10은 각 스트레스 조건에 따른 샘플(#1 및 #2)의 메인 피크 면적을 나타낸 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [21] 융합단백질 이량체에 최적화된 제형
- [22] 본 발명의 일 측면은, 상기 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인(FcεRIα ECD)을 포함하는 융합단백질 이량체를 포함하는 수성 약제학적 제형을 제공한다. 이때, 상기 수성 약제학적 제형의 pH는 6.0 내지 7.0 범위, 6.1 내지 7.0 범위, 6.2 내지 6.9 범위, 6.3 내지 6.8 범위, 6.4 내지 6.8 범위 또는 6.4 내지 6.6 범위일 수 있다.
- [23] 본 명세서에서 사용하는 용어, "약제학적 제형"은 활성 성분의 생물학적 활성이 명백하게 효과적일 수 있도록 하는 형태로 존재하고, 제형이 투여되는 개체에게 부작용을 유발하는 성분을 함유하지 않는 제제를 의미한다.
- [24] 상기 용어 "개체"란 사람, 개, 소, 말, 돼지, 양, 염소, 고양이, 마우스, 토끼, 래트와 같은 포유동물일 수 있으며, 바람직하게는 인간, 개 또는 고양이일 수 있다.
- [25] 본 명세서에서 사용하는 용어, "수성 약제학적 제형"은 적합한 수성 용매, 예컨대, 물 또는 수성/유성 혼합물(예를 들어, 물 알코올 혼합물)을 사용하는 약제학적 제형을 의미한다. 상기 제형은 안정성, 예컨대, 화학적 또는 물리적 안정성, 생물학적 활성을 유지할 수 있다.
- [26] 상기 용어, "안정성"은 일정한 상태를 유지하는 성질을 의미하는 것으로, 일반적으로 생물학적 활성 물질, 예컨대, 단백질, 펩타이드 또는 생물활성 거대분자의 분해, 변성, 응집 또는 언폴딩(unfolding)을 최소화하는 것과 관련이 있다.
- [27] 한편, 상기 제형은 액체 제형일 수 있다. 액체 제형은 수용액 또는 현탁액이며, 저장 동안 실온, 냉장(예를 들어, 2°C 내지 8°C) 또는 냉동(예를 들어, -20°C 또는 -70°C)에서 안정하게 유지될 수 있다.
- [28] 본 발명의 상기 수성 약제학적 제형은 비경구로 투여될 수 있다. 이때, 비경구는 피하 투여, 정맥 투여, 점막 투여, 근육 투여 등의 방법으로 수행될 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서, 상기 제형은 바람직하게는 피하 주사로 투여될 수 있다.

- [29] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 수성 약제학적 제형 중 용합단백질 이량체는 고농도로 포함될 수 있으며, 상세하게는 50 mg/mL 이상, 60 mg/mL 이상 또는 70 mg/mL 이상 포함될 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서, 상기 용합단백질 이량체의 농도는 이에 제한되지는 않으나 50 mg/mL 내지 150 mg/mL, 50 mg/mL 내지 130 mg/mL, 50 mg/mL 내지 120 mg/mL, 50 mg/mL 내지 110 mg/mL, 50 mg/mL 내지 100 mg/mL, 50 mg/mL 내지 90 mg/mL, 50 mg/mL 내지 80 mg/mL, 60 mg/mL 내지 150 mg/mL, 60 mg/mL 내지 130 mg/mL, 60 mg/mL 내지 120 mg/mL, 60 mg/mL 내지 110 mg/mL, 60 mg/mL 내지 100 mg/mL, 60 mg/mL 내지 90 mg/mL, 60 mg/mL 내지 80 mg/mL, 70 mg/mL 내지 150 mg/mL, 70 mg/mL 내지 130 mg/mL, 70 mg/mL 내지 120 mg/mL, 70 mg/mL 내지 110 mg/mL, 70 mg/mL 내지 100 mg/mL, 70 mg/mL 내지 90 mg/mL 또는 70 mg/mL 내지 80 mg/mL일 수 있으며, 바람직하게는 75 mg/mL일 수 있다.
- [30] 또한, 상기 수성 약제학적 제형은 버퍼 및 안정화제를 추가로 포함할 수 있다. 이때, 상기 버퍼는 히스티딘일 수 있다. 상기 히스티딘은 제형 중 10 mM 내지 100 mM의 농도로 존재할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서, 버퍼로서 상기 히스티딘은 제형 중 10 mM 내지 90 mM, 10 mM 내지 80 mM, 10 mM 내지 70 mM, 10 mM 내지 60 mM, 20 mM 내지 90 mM, 20 mM 내지 80 mM, 20 mM 내지 70 mM, 20 mM 내지 60 mM, 30 mM 내지 90 mM, 30 mM 내지 80 mM, 30 mM 내지 70 mM, 30 mM 내지 60 mM, 40 mM 내지 90 mM, 40 mM 내지 80 mM, 40 mM 내지 70 mM, 40 mM 내지 60 mM, 50 mM 내지 90 mM, 50 mM 내지 80 mM, 50 mM 내지 70 mM 또는 50 mM 내지 60 mM의 농도로 존재할 수 있다. 바람직하게는 55 mM의 농도로 존재할 수 있다.
- [31] 상기 히스티딘 버퍼는 이에 제한되지는 않으나 히스티딘 클로라이드, 히스티딘 아세테이트, 히스티딘 포스페이트, 히스티딘 설페이트 용액을 포함할 수 있다. 히스티딘 버퍼 또는 히스티딘-HCl 버퍼의 pH는 5.5 내지 7.5 범위, 6.0 내지 7.0 범위, 6.1 내지 7.0 범위, 6.2 내지 6.9 범위, 6.3 내지 6.8 범위, 6.4 내지 6.8 범위 또는 6.4 내지 6.6 범위일 수 있으며, 바람직하게는 pH 6.5일 수 있다.
- [32] 상기 안정화제는 프롤린일 수 있다. 상기 프롤린은 제형 중 200 mM 내지 300 mM의 농도로 존재할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서, 상기 프롤린은 제형 중 200 mM 내지 290 mM, 200 mM 내지 280 mM, 200 mM 내지 270 mM, 200 mM 내지 260 mM, 210 mM 내지 290 mM, 210 mM 내지 280 mM, 210 mM 내지 270 mM, 210 mM 내지 260 mM, 220 mM 내지 290 mM, 220 mM 내지 280 mM, 220 mM 내지 270 mM, 220 mM 내지 260 mM, 230 mM 내지 290 mM, 230 mM 내지 280 mM, 230 mM 내지 270 mM, 230 mM 내지 260 mM, 240 mM 내지 290 mM, 240 mM 내지 280 mM, 240 mM 내지 270 mM 또는 240 mM 내지 260 mM의 농도로 존재할 수 있다. 바람직하게는 250 mM의 농도로 존재할 수 있다.
- [33] 본 발명의 수성 약제학적 제형에는 항산화제가 추가로 포함될 수 있다. 이때, 상기 항산화제는 메티오닌일 수 있다. 상기 메티오닌은 제형 중 10 mg/mL 내지 30

mg/mL의 농도로 존재할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서, 상기 메티오닌은 제형 중 10 mg/mL 내지 28 mg/mL, 10 mg/mL 내지 26 mg/mL, 10 mg/mL 내지 24 mg/mL, 10 mg/mL 내지 22 mg/mL, 12 mg/mL 내지 28 mg/mL, 12 mg/mL 내지 26 mg/mL, 12 mg/mL 내지 24 mg/mL, 12 mg/mL 내지 22 mg/mL, 14 mg/mL 내지 28 mg/mL, 14 mg/mL 내지 26 mg/mL, 14 mg/mL 내지 24 mg/mL, 14 mg/mL 내지 22 mg/mL, 16 mg/mL 내지 28 mg/mL, 16 mg/mL 내지 26 mg/mL, 16 mg/mL 내지 24 mg/mL, 16 mg/mL 내지 22 mg/mL, 18 mg/mL 내지 28 mg/mL, 18 mg/mL 내지 26 mg/mL, 18 mg/mL 내지 24 mg/mL 또는 18 mg/mL 내지 22 mg/mL의 농도로 존재할 수 있다. 바람직하게는 20 mg/mL의 농도로 존재할 수 있다.

- [34] 상기 항산화제는 다른 분자의 산화를 억제하는 작용제로서, 산소를 제거함으로써 제형의 응집물 형성을 감소시킬 수 있다.
- [35] 또한, 상기 수성 약제학적 제형은 계면활성제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 계면활성제는 액체의 표면 장력을 낮추는 작용제로서, 가용성 및 불용성 응집물의 형성을 제어할 수 있다. 상기 계면활성제는 비-이온성 계면활성제일 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 28, 폴리소르베이트 40, 폴리소르베이트 60, 폴리소르베이트 65, 폴리소르베이트 80, 폴리소르베이트 81 및 폴리소르베이트 85와 같은 폴리소르베이트; 폴록사머 181, 폴록사머 188, 폴록사머 407과 같은 폴록사머; 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)일 수 있다. 바람직하게는 상기 계면활성제는 폴록사머일 수 있다.
- [36] 구체적으로 상기 폴록사머는 폴록사머 188(poloxamer 188)일 수 있다. 상기 폴록사머 188은 제형 중 0.01 w/v% 내지 1 w/v%의 농도로 존재할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서, 상기 폴록사머 188은 제형 중 0.02 w/v% 내지 0.8 w/v%, 0.02 w/v% 내지 0.6 w/v%, 0.02 w/v% 내지 0.4 w/v%, 0.02 w/v% 내지 0.2 w/v%, 0.02 w/v% 내지 0.15 w/v%, 0.04 w/v% 내지 0.8 w/v%, 0.04 w/v% 내지 0.6 w/v%, 0.04 w/v% 내지 0.4 w/v%, 0.04 w/v% 내지 0.2 w/v%, 0.04 w/v% 내지 0.15 w/v%, 0.06 w/v% 내지 0.8 w/v%, 0.06 w/v% 내지 0.6 w/v%, 0.06 w/v% 내지 0.4 w/v%, 0.06 w/v% 내지 0.2 w/v%, 0.06 w/v% 내지 0.15 w/v%, 0.08 w/v% 내지 0.8 w/v%, 0.08 w/v% 내지 0.6 w/v%, 0.08 w/v% 내지 0.4 w/v%, 0.08 w/v% 내지 0.2 w/v%, 0.08 w/v% 내지 0.15 w/v%, 0.09 w/v% 내지 0.8 w/v%, 0.09 w/v% 내지 0.6 w/v%, 0.09 w/v% 내지 0.4 w/v%, 0.09 w/v% 내지 0.2 w/v% 또는 0.09 w/v% 내지 0.15 w/v%의 농도로 존재할 수 있다. 바람직하게는 0.1 w/v%의 농도로 존재할 수 있다.
- [37] 본 발명의 또 다른 측면은, i) 50 mg/mL 내지 150 mg/mL 농도의 FcεRIα ECD를 포함하는 융합단백질 이량체; ii) 10 mM 내지 100 mM 농도의 히스티딘; iii) 200 mM 내지 300 mM 농도의 프롤린; iv) 10 mg/mL 내지 30 mg/mL 농도의 메티오닌; 및 v) 0.01 w/v% 내지 1 w/v% 농도의 폴록사머 188을 포함하는 수성 약제학적 제형을 제공한다. 이때, 상기 수성 약제학적 제형의 pH는 6.0 내지 7.0 범위, 6.1 내지 7.0 범위, 6.2 내지 6.9 범위, 6.3 내지 6.8 범위, 6.4 내지 6.8 범위 또는 6.4

- 내지 6.6 범위일 수 있다. 바람직하게는 pH 6.5일 수 있다.
- [38] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 수성 약제학적 제형은 i) 75 mg/mL 농도의 FcεRIα ECD를 포함하는 융합단백질 이량체; ii) 55 mM 농도의 히스티딘; iii) 250 mM 농도의 프롤린; iv) 20 mg/mL 농도의 메티오닌; 및 v) 0.1 w/v% 농도의 폴록사머 188을 포함하는 것일 수 있다.
- [39] 상기 수성 약제학적 제형은 바이알, 카트리지, 주사기 및 자동 주사기(autoinjector)로 이루어진 군으로부터 선택된 용기에 보관될 수 있다.
- [40] 또한, 상기 제형이 보관된 용기는 치료가 필요한 개체에게 투여될 때까지 실온, 2°C 내지 8°C 또는 25°C 내지 40°C로 저장될 수 있다.
- [41] 상기 제형은 이에 제한되지는 않으나 5 mL 이하, 3 mL 이하 또는 2 mL 이하의 부피로 18G 내지 32G 바늘을 사용하여 비경구 투여, 예컨대 피하 투여, 정맥 투여, 점막 투여, 근육 투여, 복강 투여될 수 있다. 바람직하게는 1 mL 이하의 부피로 27G 바늘을 사용하여 피하 투여될 수 있다.
- [42] **IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인을 포함하는 융합단백질**
- [43] 상술한 융합단백질 이량체는 다음과 같다. 구체적으로, 상기 이량체는 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인(FcεRIα ECD)을 포함하는 단량체 두 개를 포함한다.
- [44] 상기 단량체는 변형된 Fc 영역을 포함하며, 상기 변형된 Fc 영역과 FcεRIα ECD는 IgD 항체의 힌지를 통해 연결된 것일 수 있다.
- [45] 본 명세서에서 사용하는 용어, "IgE"는 면역글로불린 E로 알려진 항체 단백질을 의미한다. IgE는 비만세포나 혈중의 호염기구 등에 친화성을 가진다. 또한, IgE 항체와 그것에 대응하는 항원(알레르겐)이 반응하면 염증반응을 일으킨다. 또한, IgE는 비만 세포 또는 호염기구가 갑자기 분비되어 나타나는 아나필락시스(anaphylaxis)를 일으키는 항체로 알려져 있다.
- [46] 본 명세서에서 사용하는 용어, "IgE Fc 수용체"란 Fcε수용체라고도 불리며, IgE의 Fc 부분과 결합한다. 상기 수용체는 2 종류가 존재한다. IgE Fc에 대해 고친화성인 수용체는 Fcε수용체I(FcεRI)라고 한다. IgE Fc에 대해 저친화성인 수용체는 Fcε수용체II(FcεRII)라고 한다. FcεRI은 비만세포, 호염기구에서 발현된다. FcεRI에 결합한 IgE 항체가 다가 항원에 의해 가교되면, 비만세포 또는 호염 기구에서 탈과립이 생겨 히스타민을 비롯한 여러 가지 화학 전달 물질을 방출한다. 이러한 방출에 의해 즉시형 알레르기 반응이 나타난다.
- [47] 상기 FcεRI는 하나의 α사슬과 한 개의 β사슬 및 이황화 결합한 2개의 γ사슬로 구성된 막단백질이다. 이 중 IgE가 결합하는 부분은 α사슬(FcεRIα)로서, FcεRIα는 60 kDa 정도의 크기를 가지며, 세포막 안에 존재하는 소수성 도메인과 세포막 외부에 존재하는 친수성 도메인으로 구성된다. 특히, α사슬의 세포외 도메인에 IgE가 결합하게 된다.
- [48] 구체적으로, 상기 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛은 NP_001992.1에 기재된 아미노산 서열을 가질 수 있다. 또한, IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외

도메인(FcεRIα ECD)은 서열번호 1의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 본 명세서에서 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인은 IgE와 결합을 할 수 있는 한, IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인의 단편 또는 변이체일 수 있다.

- [49] 상기 변이체는 FcεRI의 α사슬의 기능을 변형시키지 않는 한, 야생형 FcεRIα ECD(Extracellular domain)에서 하나 이상의 단백질을 치환, 결실 또는 추가하는 방법을 통하여 수행될 수 있다. 이러한 다양한 단백질 또는 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 것일 수 있다. 또한, 서열번호 1의 FcεRIα ECD는 서열번호 5의 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩될 수 있다.
- [50] 또한, 본 명세서에서 사용하는 용어, "변형된 Fc 영역"은 항체의 Fc 부분 중 일부가 변형된 영역을 의미한다. 이때, 용어 "Fc 영역"은 면역글로불린의 중쇄 불변 영역 2(CH2) 및 중쇄 불변 영역 3(CH3)을 포함하며, 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역 및 경쇄 불변 영역 1(CH1)은 포함하지 않는 단백질을 말한다. 특히, 변형된 Fc 영역은 Fc 영역 중 일부 아미노산이 치환되거나, 서로 다른 종류의 Fc 영역을 조합하여 제조된 것을 의미한다. 구체적으로, 상기 변형된 Fc 영역은 서열번호 2의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 또한, 서열번호 2의 변형된 Fc 영역은 서열번호 6의 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩될 수 있다.
- [51] 또한, 본 발명의 "변형된 Fc 영역"은 천연형 당쇄, 천연형에 비해 증가된 당쇄, 천연형에 비해 감소한 당쇄 또는 당쇄가 제거된 형태일 수 있다. 화학적 방법, 효소적 방법 및 미생물을 사용한 유전공학적 엔지니어링 방법 등과 같이 통상적인 방법으로 면역글로불린 Fc 당쇄를 변형시킬 수 있다.
- [52] 이때, 본 발명의 "변형된 Fc 영역"은 FcγR 또는 C1q에 대한 결합 부위를 갖지 않음으로 ADCC(antibody dependent Cellular Cytotoxicity) 및 CDC(Complement dependent Cytotoxicity) 기능이 결여된 것일 수 있다. 또한, 상기 변형된 Fc 영역과 FcεRIα ECD는 IgD 항체의 힌지를 통해 연결될 수 있다. 상기 IgD 항체의 힌지는 64개 아미노산으로 이루어져 있으며, 20 내지 60개의 연속된 아미노산, 또는 25 내지 50개의 연속된 아미노산, 또는 30 내지 40개의 아미노산으로 선택되어 포함될 수 있다. 일 구체예로 IgD 항체의 힌지는 하기의 30개 또는 49개의 아미노산으로 이루어질 수 있다. 또한, 상기 IgD 항체의 힌지는 상기 힌지 영역을 변형시킨 힌지 변이체일 수 있으며, 상기 힌지는 적어도 하나의 시스테인을 포함할 수 있다. 이때, 상기 힌지 변이체는 단백질 생산 과정에서 절단형 발생을 최소화하기 위해 IgD 항체의 힌지 서열에서 일부를 변형한 것일 수 있다.
- [53] 일 실시예로, 힌지는 다음과 같은 서열을 포함할 수 있다:
- [54] Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Xaa1 Xaa2 Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro(서열번호 17), 이때, Xaa1은 Lys 또는 Gly 일 수 있으며, Xaa2는 Glu, Gly 또는 Ser일 수 있다. 구체적으로, 상기

힌지는 서열번호 3 및 서열번호 19의 아미노산 서열을 가질 수 있고, 이를 통해 단백질 생산 과정에서 절단형 발생을 최소화할 수 있다.

[55] 힌지의 또 다른 실시예로 다음과 같은 서열을 포함할 수 있다:

[56] Ala Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Xaa3 Xaa4 Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro(서열번호 18)이며, 이때, Xaa3은 Lys 또는 Gly이며, Xaa4는 Glu, Gly 또는 Ser일 수 있다. 구체적으로, 상기 힌지는 서열번호 4의 아미노산 서열을 가질 수 있고, 이를 통해 단백질 생산 과정에서 절단형 발생을 최소화할 수 있다.

[57] 특히, 서열번호 4의 서열을 갖는 힌지에 있어서, Thr 중 적어도 하나는 글라이코실레이션 될 수 있다. 구체적으로, 서열번호 18의 아미노산 중, 13번째, 14번째, 18번째 및 19번째의 Thr이 글라이코실레이션 될 수 있다. 바람직하게 4개의 아미노산이 모두 글라이코실레이션 될 수 있다. 이때, 상기 글라이코실레이션은 O-글라이코실레이션일 수 있다.

[58] 또한, 본 발명에서 제공하는 융합단백질 이량체는 상술한 바와 같이, IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인과 변형된 Fc 영역이 결합된 단량체 두 개가 결합된 형태일 수 있다. 상기 융합단백질 이량체는 동일한 두 개의 단량체가 힌지 부위에 위치한 시스테인에 의해 결합된 형태일 수 있다. 또한, 상기 폴리펩티드 이량체는 서로 상이한 단량체 두 개가 결합된 형태일 수 있다. 예를 들어, 두 개의 단량체가 서로 다른 경우는, 하나의 단량체는 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인을 포함하고, 다른 단량체는 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인의 단편을 포함한 형태일 수 있다. 이때, 상기 단량체의 일 구체에는 서열번호 20, 서열번호 21 또는 서열번호 22의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[59] 또한, 본 발명에서 제공하는 융합단백질 이량체는 항 IgE 항체인 오말리주맙 대비 10 내지 100배, 20 내지 90배, 20 내지 70배, 30 내지 70배, 40 내지 70배 높은 IgE 결합력을 나타내며, 바람직하게는 오말리주맙 대비 70배 높은 IgE 결합력을 나타낼 수 있다.

[60] 융합단백질 이량체에 최적화된 제형의 치료 용도

[61] 본 발명의 또 다른 측면은, 알레르기 질환의 예방 또는 치료를 위한, 상기 융합단백질 이량체를 포함하는 조성 약제학적 제형의 용도를 제공한다.

[62] 본 명세서에서 사용하는 용어, "알레르기 질환"은 비만세포의 탈과립 등 비만세포의 활성화가 매개된 알레르기 반응으로 인하여 초래되는 병리적 증상을 의미하며, 이러한 알레르기 질환에는 식품 알레르기, 아토피 피부염(atopic dermatitis), 천식(asthma), 알레르기성 비염(allergic rhinitis), 알레르기성 결막염(allergic conjunctivitis), 알레르기성 피부염(allergic dermatitis), 알레르기성 접촉성 피부염(allergic contact dermatitis), 과민증(anaphylaxis), 두드러기, 소양증, 곤충 알레르기, 만성 특발성 두드러기(chronic idiopathic

- urticaria), 만성 자발성 두드러기(chronic spontaneous urticaria) 및 약품 알레르기 등이 포함된다. 특히, 상기 알레르기 질환은 IgE 매개성 질환일 수 있다.
- [63] 본 발명의 수성 약제학적 제형은 알레르기 질환을 치료하는데 효과적인 복용 계획 및 투여 용량에 따라 개체에게 투여될 수 있다. 본 발명의 제형 중 융합단백질 이량체는 항알레르기 활성을 나타낼 수 있는 한 임의의 양(유효량)으로 포함될 수 있는데, 통상적인 유효량은 조성물 전체 중량을 기준으로 할 때 0.001 중량% 내지 20.0 중량% 범위 내에서 결정될 수 있다. 여기서 "유효량"이란 항알레르기 효과를 유도할 수 있는 양을 말한다. 이러한 유효량은 당업자의 통상의 능력 범위 내에서 실험적으로 결정될 수 있다.
- [64] 상기 제형의 바람직한 투여량은 환자의 상태, 체중, 성별, 연령, 환자의 중증도, 투여 경로에 따라 1일 0.01 $\mu\text{g/kg}$ 내지 10 g/kg 범위, 바람직하게는 0.01 mg/kg 내지 1 g/kg 범위일 수 있다. 투여는 1일 1회 또는 수회로 나누어 이루어질 수 있다. 이러한 투여량은 어떠한 측면으로든 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 아니 된다.
- [65] 한편, 본 발명은 상기 융합단백질 이량체를 포함한 수성 약제학적 제형을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 알레르기 질환 치료 또는 예방 방법을 제공한다.
- [66] 상기 개체는 포유동물일 수 있으며, 바람직하게는 인간일 수 있다. 이때, 투여는 비경구를 통하여 투여할 수 있다. 이때, 비경구는 피하 투여, 정맥 투여, 점막 투여, 근육 투여 등의 방법으로 수행될 수 있다.
- 발명의 실시를 위한 형태**
- [67] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.
- [68] **제조예 1. Fc ϵ RI α ECD과 변형된 Fc 영역을 포함하는 융합단백질 이량체의 제조: GI-301**
- [69] IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인(Fc ϵ RI α ECD; Extracellular domain)의 C 말단이 변형된 폴리펩티드는 미국 특허 7,867,491에 개시된 방법에 따라 제조하였다.
- [70] 먼저, 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 Fc ϵ RI의 α 사슬의 세포외 도메인과 서열번호 2의 변형된 면역글로불린 Fc가 각각, 서열번호 19의 힌지로 연결된 단백질(Fc ϵ RI α ECD-Fc1), 서열번호 3의 힌지로 연결된 단백질(Fc ϵ RI α ECD-Fc2) 및 서열번호 4의 힌지로 연결된 단백질(Fc ϵ RI α ECD-Fc3)을 발현시키기 위하여, 각각의 단백질을 코딩하는 유전자를 연결한 카세트를 벡터에 클로닝하여, Fc ϵ RI α ECD-Fc 단백질 발현 벡터를 제작하였다. 그 후, 상기 발현 벡터를 각각 CHO 세포에 형질주입하였다.
- [71] 이때, 세포주에 형질 주입시 α -2,6-시알산 전이효소 유전자가 클로닝된 발현

백터를 동시에 형질주입하여, 시알산이 부가된 FcεRIα ECD-Fc2ST 및 FcεRIα ECD-Fc3ST 단백질을 발현할 수 있는 세포주를 별도로 제조하였다. 상기 세포주로부터 생산되는 융합단백질 이량체를 "GI-301"로 명명하였다.

- [72] 실시예 1. 고농축 GI-301 제조를 위한 버퍼 및 pH 조건 최적화
- [73] 주사가 가능한 정도의 낮은 점도를 가지며 2°C 내지 8°C에서 안정하고 100 mg/mL 정도의 GI-301 물질을 함유한 피하주사용(subcutaneous injection) 액상주사제 개발을 목표로 시험을 진행하였다. 먼저, 버퍼 및 pH 조건을 최적화하였다.
- [74] 적절한 제형 버퍼를 결정하기 위해, DOE(Design of experiments)를 통해 pH, 버퍼 성분, 이온 강도 및 안정화제가 서로 다른 총 25가지의 다양한 버퍼를 선정하고 이에 대하여 사전 스크리닝(1단계, 2단계) 및 최종 스크리닝(3단계)을 수행하였다.
- [75] i) 사전 스크리닝(1단계, 2단계):
- [76] - 샘플의 콜로이드 및 열역학적 안정성 증가를 확인하기 위해 DLS 플레이트 판독기에서 동적 레이저 광산란(dynamic laser light scattering)을 측정하였다.
- [77] - 샘플은 각 조건별 제형 버퍼로 투석하였다.
- [78] - 각 제형 버퍼에서 농도별 샘플의 유체역학적 반경(hydrodynamic radius)을 측정하여 단백질-단백질 상호작용을 확인함으로써 콜로이드 안정성을 결정하였다. 이 결과는 취급 및 보관 중 단백질 응집 위험이 낮은 제형 후보를 예측하는데 사용하였다.
- [79] - 각 제형 버퍼에서 온도별 샘플의 유체역학적 반경을 측정하여 변성 온도(열역학적 안정성)를 결정하였다. 이 결과는 취급 및 보관 중 단백질 변성 위험이 낮은 제형 후보를 예측하는데 사용하였다. 단백질 도메인이 변성되기 시작하면 단백질의 유체역학적 반경이 현저하게 증가한다. 단백질 언폴딩(unfolding) 시작 온도는 단백질 2차 구조 안정성의 지표로 간주할 수 있다.
- [80] ii) 최종 스크리닝(3단계):
- [81] - CG-MALS(composition gradient multi-angle light scattering)로 콜로이드 안정성(분자간 상호작용, A2)을 측정하였다.
- [82] - 나노DSC(nano differential scanning calorimetry)로 열역학적 안정성을 측정하였다.
- [83] - SE-HPLC로 단백질 응집 상태를 확인하였다.
- [84] - ELISA로 상대 효능(relative potency)을 측정하였다.
- [85] - 상기 결과에 따라 4개의 가장 적합한 제형을 선택하였다.
- [86] 구체적으로, 표 1의 첫 번째 14개 샘플에서 pH, 버퍼 성분 및 이온 강도에 따른 GI-301의 일반적인 물성을 평가하였다. GI-301을 각 제형 버퍼로 투석하여 샘플을 제조하였다.
- [87] pH는 피하 주사에 허용가능한 pH 범위인 6.0 내지 7.4로 조정하였다. 충분한 완충 용량을 달성하기 위해 각각의 pH 값에 대해 적합한 버퍼 성분을

선택하였다. 버퍼 성분은 약제학적으로 허용되는 부형제에서 선택하였다. 염화나트륨을 첨가하여 제형의 이온 강도(최대 이온 강도는 등장성으로 설정됨)를 조정하였다. 첫 번째 사전 스크리닝 실험 결과는 하기 표 1에 정리하여 나타냈다.

[88] [표1]

#	pH	버퍼 성분	염/안정화제	T _{onset} [°C]	kd[mL/mg × 10 ⁻²] ¹⁾	실제 pH
1	7.4	10 mM Na-포스페이트	150 NaCl	65	-0.1	7.36
2	7.4	10 mM Na-포스페이트	w/o	68	3.1	7.36
3	7.4	10 mM Tris/HCl	150 NaCl	65	-0.1	7.40
4	7.4	10 mM Tris/HCl	w/o	64	5.7	7.38
5	6.7	10 mM Na-포스페이트	150 NaCl	66	-1.2	6.72
6	6.7	10 mM Na-포스페이트	w/o	60	3.3	6.68
7	6.7	10 mM His/HCl	150 NaCl	63	-1.1	6.71
8	6.7	10 mM His/HCl	w/o	69	14.2	6.53
9	6.0	10 mM His/HCl	150 NaCl	54	-1.4	6.03
10	6.0	10 mM His/HCl	w/o	59	5.8	6.01
11	6.7	10 mM Na-시트레이트	150 NaCl	65	-1.2	6.62
12	6.7	10 mM Na-시트레이트	w/o	66	0.6	6.66
13	6.0	10 mM Na-시트레이트	150 NaCl	64	-1.4	6.00
14	6.0	10 mM Na-시트레이트	w/o	63	0.1	6.00

[89]

[90] ¹⁾ 샘플 #1에 대한 실시예: $kd = -0.1 \text{ mL/mg} \times 10^{-2} = -0.001 \text{ mL/mg}$

[91] 일반적으로, GI-301의 콜로이드 안정성은 높은 이온 강도에서 더 낮으며, 사용된 버퍼 시스템 및 제형 pH에 대하여 독립적이다. 낮은 이온 강도에서 버퍼 성분은 GI-301의 콜로이드 안정성에 가장 큰 영향을 나타냈다. pH의 영향은 크지 않았다. 가장 우수한 콜로이드 안정성은 His/HCl 버퍼 시스템에서 확인되었으며, 이어서 Tris/HCl, 인산나트륨 및 시트르산나트륨 순서로 우수한 안정성을 나타냈다. 일반적으로, 하나의 버퍼 그룹에서 제형이 더 산성인 pH 값을 가질 경우, 낮은 콜로이드 안정성을 나타냈다. 제형 샘플 #8(10 mM His/HCl, pH 6.7), 샘플 #10(10 mM His/HCl, pH 6.0) 및 샘플 #4(10 mM Tris/HCl, pH 7.4)는 우수한 콜로이드 안정성을 나타냈다.

[92] GI-301의 열역학적 안정성은 샘플 #9 및 #10을 제외한 모든 제형 샘플에서 유사하였다. 일반적으로 사용되는 약물 저장 온도에서 GI-301은 높은 열역학적 안정성을 나타냈다.

[93] 투석된 샘플의 실제 pH 값은 제형 샘플 #8을 제외하고 원하는 pH 값을 충족시켰다. 이때 약간의 도넨-효과(Donnan-effect)가 관찰되었다.

[94] 이러한 결과로부터 pH 6.7의 His/HCl 및 pH 7.4의 Tris/HCl을 GI-301에 대한 가장 적절한 버퍼로서 선택하였다. 샘플 #15 내지 #20에 대해 액체 및/또는 동결건조에 적합한 안정화제 및 비이온성 등장화제를 시험하였다. 시험에 사용된 부형제는 트레할로스(동결 건조에 사용되는 동결보호제), 만니톨(동결

건조에 사용되는 증량제 및 비이온성 등장화제) 및 프롤린(액체 제형에서 사용되는 아미노산 안정화제, 비이온성)이었다. 부형제에 대한 2단계 스크리닝 결과는 하기 표 2에 정리하여 나타냈다.

[95] [표2]

#	pH	버퍼 성분	염/안정화제	T _{onset} [°C]	kd[mL/mg×10 ⁻²]	실제 pH
15	6.7	10 mM His/HCl	250 mM 트레할로스	67	6.3	6.44
16	6.7	10 mM His/HCl	250 mM 만니톨	66	13.5	6.52
17	6.7	10 mM His/HCl	250 mM 프롤린	64	20.4	6.55
18	7.4	10 mM Tris/HCl	250 mM 트레할로스	65	5.2	7.34
19	7.4	10 mM Tris/HCl	250 mM 만니톨	68	6.1	7.40
20	7.4	10 mM Tris/HCl	250 mM 프롤린	68	7.3	7.39

[96]

[97] 버퍼 시스템 His/HCl 및 Tris/HCl 둘 모두에서 만니톨 및 프롤린 첨가시 증가된 콜로이드 안정성이 관찰되었다. 트레할로스 첨가시 약간 저하된 콜로이드 안정성이 관찰되었다. 부형제는 GI-301의 열역학적 안정성 또는 실제 pH에 대하여 현저한 영향을 나타내지 않았다.

[98] 최종 스크리닝 실험에서, CG-MALS(A₂), 나노DSC(T_{onset}) SE-HPLC(상대 단량체 함량) 및 ELISA(상대 효능)를 사용하여 액상 및 동결건조물에 대한 가장 유망한 제형 샘플을 조사하였다. 최종 스크리닝의 결과는 하기 표 3에 정리하여 나타냈다.

[99] [표3]

#	pH	버퍼 성분	안정화제	T _{onset} 나노 DSC [°C]	A ₂ [10 ⁻⁴ mol*ml*g ⁻²]	SE-HPLC에 의한 상대 단량체 함량 [%]	효력 ELISA [%]
21	6.7	10 mM His/HCl	250 mM 트레할로스	51	4.8	96.2	103
22	6.7	10 mM His/HCl	250 mM 만니톨	52	7.8	96.1	98
23	6.7	10 mM His/HCl	250 mM 프롤린	52	8.7	96.1	101
24	7.4	10 mM Tris/HCl	250 mM 만니톨	51	4.4	96.1	92
25	7.4	10 mM Tris/HCl	250 mM 프롤린	49	4.8	96.1	106

[100]

[101] 5개 샘플의 콜로이드 안정성 및 T_{onset}에 대한 상대 순위는 DLS로 얻은 이전 결과와 유사하였다. CG-MALS 결과, 모든 제형 샘플에서 강한 반발성 단백질-단백질-상호작용이 나타났다. DLS는 열적 언폴딩(thermal unfolding)으로 인한 응집의 결과인 단백질의 유체역학적 반경 증가를 측정하기 때문에 T_{onset}은 DLS 측정에 비해 나노DSC 측정시 더 낮았다. 대조적으로, 나노DSC는 폴딩된 단백질로부터 언폴딩된 단백질로의 열역학적 전이를 측정하므로 더 낮은 T_{onset} 값을 나타냈다. ELISA를 통해 측정한 상대 효능은 모든 제형 샘플에서 거의 100%였다.

[102] 상기 결과를 기반으로 "농도 부하 시험(concentration challenge test)"은 하기 표 4에 기재된 사항을 고려하여 수행하였다.

[103] [표4]

#	pH	버퍼 성분	안정화제	설명
21	6.7	10 mM His/HCl	250 mM 트레할로스	실제 pH 6.5를 갖는 액체 제형; 동결 건조된 제시를 위한 백업
22	6.7	10 mM His/HCl	250 mM 만니톨	pH 6.5를 갖는 액체 제형; 흔히 사용되는 부형제
23	6.7	10 mM His/HCl	250 mM 프롤린	pH 6.5를 갖는 액체 제형; 응집에 대한 경향이 더 낮을 수 있음
25	7.4	10 mM Tris/HCl	250 mM 프롤린	pH 7.4를 갖는 액체 제형; 완벽한 등장 상태, 그러나 화학적 안정성이 더 적을 수 있음

[104] 실시예 2. GI-301의 고농도 농축 가능여부 시험

[105] 상기 실시예 1에서 시험한 25개의 샘플 중 4개의 가장 적절한 샘플을 농도 부하 시험을 위해 선택하였다. 하기 표 5에 상기 실시예 1의 결과를 토대로 선택된 4개의 후보 제형 샘플을 정리하여 나타냈다.

[106] [표5]

#	pH	버퍼 성분	안정화제
1	6.7	10 mM His/HCl	250 mM 트레할로스
2	6.7	10 mM His/HCl	250 mM 만니톨
3	6.7	10 mM His/HCl	250 mM 프롤린
4	7.4	10 mM Tris/HCl	250 mM 프롤린

[107] 상기 4개의 제형 후보에 대해 다음과 같이 테스트하였다:

[108] - 각 제형 샘플에서 약 100 mg/mL의 목표 농도 달성(한외여과 및 공정-관련 시간 간격 사용) 여부를 확인하였다.

[109] - 농축 및 혼합 샘플의 pH 값을 측정하여 도넛-효과로 인한 pH 이동(shift)을 모니터링하였다.

[110] - 0.22 μ m 멤브레인 필터를 이용하여 샘플을 멸균 여과하고, 멸균 플런저 팁이 장착된 멀티-피펫을 사용하여 2R 바이알에 무균 충전하였다(100 mg/mL의 경우 목표 충전 부피 1.2 mL).

[111] - 4°C 및 35°C에서 72시간 동안 저장하여 모든 고농축 샘플에 대해 부하 시험을 수행하였다.

[112] - 72시간 보관 후, 샘플의 탁도 및 침전을 육안으로 분석하였다.

[113] - 점도 및 주사능(syringeability): 각 제형 샘플에 대하여 밀어내는 힘(push-out force)을 측정하여 주사능을 평가하였다. 힘/변위 측정 장치를 사용하여 부착된

바늘을 통해 지정 이송 속도(traverse speed)로 주사기의 내용물을 분배하였다. 하기 항목에 대해서 샘플을 분석하였다: 시각적 외관, UV 280에 의한 농도, pH, 모세관 점도계를 사용한 점도, 네펠로메트릭(nephelometric) 측정에 의한 탁도, 삼투압농도, ELISA에 의한 상대 효능 및 SE-HPLC에 의한 응집 상태.

- [114] 결과적으로, 상기 표 5의 4개의 제형 샘플을 100 mg/mL 농도로 성공적으로 농축시킬 수 있었다. 바이알 중 고점도(100 mg/mL) 용액은 35°C에서 72시간 동안 저장 후 침전이나 눈에 띄는 탁도를 나타내지 않았다.
- [115] 주사능 시험을 통해 30G 캐놀라 사용시 모든 100 mg/mL 샘플에 대해 20 N을 초과하는 밀어내는 힘이 유발되었음을 확인하였다. 27G 캐놀라를 사용한 경우, 밀어내는 힘은 허용가능한 수준이었다. 50 mg/mL 농도로 희석할 경우, 30G 캐놀라도 허용가능한 것으로 나타났다.
- [116] 농축 결과로 0.4 내지 0.8 정도의 pH 저하(도넨-효과)가 발생하였다. 도넨 효과를 보상하기 위해, 고농축 L-히스티딘 및 TRIS 염기를 사용하여 pH 값을 원래 수준으로 조정하였다.
- [117] 최종 단백질 농도는 약 65 mg/mL였다. 1 mL의 샘플로 충전된 1 mL 주사기를 인장 기계로 밀어내고, 전단-스트레스(sheer-stress)를 가한 물질(주사기로부터 밖으로 밀어낸 내용물)을 분석하였다.
- [118] 모든 시험 결과는 하기 표 6에 나타났다.

[119] [표6]

			샘플			
GI-301 농도	일차 포장 재료	방법	#1	#2	#3	#4
100 mg/mL	2R 바이알	시각적 외관/침전 5°C에서 72시간 후	✓	✓	✓	✓
100 mg/mL	2R 바이알	시각적 외관/침전 35°C에서 72시간	✓	✓	✓	✓
100 mg/mL	1 mL 주사기 30G 캐놀라	밀어내는 힘	X	X	X	X
		시각적 외관/침전	✓	✓	✓	✓
100 mg/mL	1 mL 주사기 27G 캐놀라	밀어내는 힘	✓	✓	✓	✓
		시각적 외관/침전	✓	✓	✓	✓
50 mg/mL	1 mL 주사기 30G 캐놀라	밀어내는 힘	✓	✓	✓	✓
		시각적 외관/침전	✓	✓	✓	✓
		pH-밀어냄의 영향	✓	✓	✓	✓
65 mg/mL (도넛 효과; 샘플 #2 - #4에 대한 보상)	1 mL 주사기 27G 캐놀라	밀어내는 힘		✓	✓	✓
		시각적 외관/침전		✓	✓	✓
		pH-밀어냄의 영향		✓	✓	✓
		SEC		✓	✓	✓
		ELISA		✓	✓	✓
		점도		✓	✓	✓
		탁도		✓	✓	✓
		삼투압 몰농도		✓	✓	✓

[120] 허용 가능한 결과: ✓ 허용 불가능한 결과: X

[121] 65 mg/mL 이하 농도의 단백질을 사용한 경우, 30G 캐놀라에서도 4개 제형 샘플 모두 주사능이 확인되었다.

[122] GI-301 단백질은 4개의 제형 샘플 모두에서 100 mg/mL 이하의 농도로 단기간 저장할 경우 매우 안정적이었다.

[123] 장기 안정성은 단기간 데이터로는 예측할 수 없으므로 가속 안정성 시험(accelerated stability test)을 추가로 수행하였다.

[124] 4개의 제형 후보는 상기 표 6에 나타난 바와 같이 유사한 결과를 나타냈다.

[125] 실시예 3. 가속 안정성 시험(강제 분해 시험 I)

[126] 상기 실시예 2에서 4개의 제형 버퍼에서 단백질을 고농도로 농축할 수 있음을 확인하였을 뿐만 아니라 주사능 또한 입증하였다. 4개 샘플에 대한 분석 결과,

이들 사이에 현저한 차이가 없음을 확인하였다. 이에, 2R 바이알을 이용하여 상기 실시예 2의 4개 샘플(표 5 참조)에 대하여 강제 분해 시험을 추가로 진행하였다.

- [127] 50 mg/mL의 목표 단백질 농도를 갖는 4개의 제형 후보를 제조하고, 하기 단계를 수행하였다:
- [128] - 샘플 당 10개씩 2R 바이알 무균 충전
- [129] - 열 스트레스 및 교반: 35°C에서 2주 및 200 rpm에서 5일
- [130] - 빛 노출: 750 W/m² 조건으로 7.5시간
- [131] - 다음 항목에 대해 샘플을 분석하였다: 시각적 외관, UV 280에 의한 농도, pH, 네펠로메트릭 측정에 의한 탁도, 삼투압 몰농도, ELISA에 의한 상대 효능 및 SE-HPLC에 의한 응집 상태.
- [132] 4개의 제형 샘플에 적절한 pH 이동(shift) 보상을 적용하여 약 50 mg/mL 농도로 성공적으로 농축시켰다. 그 다음, 2R 바이알을 이용하여 가속 스트레스 안정성 시험을 수행하였다.
- [133] 하기 표 7에 최상(√) 및 최하(X) 결과를 표시하였다.
- [134] [표7]

실험 방법		샘플											
		#1			#2			#3			#4		
시각적 검사		5일, 35°C, 200 rpm	14일, 35°C, 200 rpm	빛	5일, 35°C, 200 rpm	14일, 35°C, 200 rpm	빛	5일, 35°C, 200 rpm	14일, 35°C, 200 rpm	빛	5일, 35°C, 200 rpm	14일, 35°C, 200 rpm	빛
		X	X	√	√	X	√	√	X	√	√	X	√
SE-HPLC		14일, 35°C, 200 rpm	빛		14일, 35°C, 200 rpm	빛		14일, 35°C, 200 rpm	빛		14일, 35°C, 200 rpm	빛	
SE-HPLC	메인 피크 (일 반)							√	√		X	X	
	응집 물							√	√		X	X	
	단편	√	X								X	√	

- [135] 시험 결과, 샘플 #3(프롤린, 히스티딘/HCl, pH 6.7)이 다음 개발 단계 진행을

위한 가장 적합한 버퍼인 것으로 확인되었다. 또한, 크로스-플로우 여과(cross-flow filtration)를 통한 150 mg/mL 농축 시험을 수행하기 위해 이 샘플을 사용하였다.

- [136] 한편, SE-HPLC 분석 결과, 모든 제형 샘플은 유의한 부정적인 영향(negative effect) 없이 3회 동결/해동할 수 있었다.
- [137] 실시예 4. 크로스-플로우 여과를 통한 고농축 타당성 분석
- [138] 실시예 3을 통해 크로스-플로우 여과를 통한 고농축(150 mg/mL) 타당성 분석을 위한 제형으로 250 mM 프롤린, 10 mM 히스티딘/HCl, pH 6.7을 포함하는 제형을 선택하였다. 목표는 농축 단백질 용액(150 mg/mL)을 얻는 것이다.
- [139] 실시예 4.1. 크로스-플로우 여과 및 pH 조정
- [140] 첫 번째 단계에서 1,400 g의 7.5 mg/mL 물질을 약 200 mL의 부피로 농축하였다. 농축은 1.0 bar의 TMP(trans-membrane pressure)에서 수행하였다.
- [141] 이 단계 후, 등용적 방식으로 버퍼 교체(각각 정용 여과)를 시작하였다.
- [142] 투과액 배수는 크로스-플로우 여과 장치의 교반 용기에 공급된 타겟 버퍼로 대체되었다. 타겟 버퍼의 총 공급량은 950 g이었다. 정용 여과 단계가 끝나는 시점에 원래 DS 버퍼의 농도는 1% 미만이었다.
- [143] 그 다음, 약 110 g의 부피에 도달할 때까지 두 번째 농축 단계를 수행하였다. pH 목표 6.70은 150 mM 히스티딘/250 mM 프롤린 버퍼로 조정하였다. 그 후, 농축 단계를 계속하였다.
- [144] 투과량이 감소하고 크로스-플로우 여과 장치의 최고 압력 경보가 발생하면서 최대 농도에 도달했음을 확인하였다. pH를 미세 조정하고 농축물을 수득하였다. 수득한 용액을 1 μ m 필터로 사전 여과하고, 무균 조건에서 0.2 μ m 필터로 여과한 다음, 추가 과정이 있을 때까지 2°C 내지 8°C에서 보관하였다.
- [145] 실시예 4.2. 육안 검사
- [146] 정용 여과 및 농축 후, 용액은 약간 황색을 띠고 탁함을 나타냈다.
- [147] 1.0 μ m 및 0.2 μ m 필터로 여과한 후 수득한 용액은 투명하고 약간 황색을 띠었다.
- [148] 실시예 4.3. UV 280
- [149] 수득한 용액의 농도는 여과 후 106.3 mg/mL $\pm$ 2.6 mg/mL였다(n=3).
- [150] 실시예 4.4. 주사능
- [151] 표 8은 측정 중 발생한 최대 밀어내기 힘을 나타낸다. 27G 캐놀라는 약 100 mg/mL 농도의 GI-301에 적합하였다. 30G 캐놀라는 약 100 mg/mL 농도에서 너무 높은 밀어내는 힘을 나타냈다. 상기 실험은 각각 2회 반복(n=2) 수행하였다.
- [152] [표8]

캐놀라	Fmax[N]
27G(0.4 mm OD) 12 mm	10.6 $\pm$ 0.5
30G(0.3 mm OD) 12 mm	23.5 $\pm$ 1.1

[153] 본 실시예를 통해 GI-301에 대하여 크로스-플로우 농축이 가능함을 확인하였다. GI-301 용액이 고농도에서 높은 점도를 나타냄에 따라 목표 농도(150 mg/mL)의 농축은 달성할 수 없었다. 약 106 mg/mL의 농도에서 정용 여과를 종료하였다. 27G 캐놀라에서 약 11 N의 적당한 밀어내기 힘을 나타내어 주사능을 입증하였다.

[154] 실시예 5. 가속 안정성 시험(강제 분해 시험 II)

[155] 실시예 4에서 크로스-플로우 여과를 통해 버퍼 조성물 250 mM 프롤린, 히스티딘/HCl, pH 6.7을 최고 농도 약 106 mg/mL로 농축하였다. 이에, 강제 분해 시험 II는 GI-301의 목표 농도를 100 mg/mL로 하여 진행하였다. 실시예 2에서 얻은 샘플 #3에 대하여 첨가제의 이점을 확인하고자 계면활성제 및/또는 항산화제 메티오닌을 첨가하였다(표 9). 2R 바이알을 1.5 mL의 상응하는 용액으로 각각 충전하였으며, 샘플은 열/기계 그리고 빛을 통해 스트레스를 가한 후 분석하였다.

[156] [표9]

염기성 조성물	250 mM 프롤린, 히스티딘/HCl, pH 6.7					
첨가제	#1(첨가제 없음)	#2	#3	#4	#5 ¹⁾	#6 ¹⁾
메티오닌		20 mg/mL		20 mg/mL	20 mg/mL	20 mg/mL
트윈 80			0.1 w/v%	0.1 w/v%		
폴록사머					0.1 w/v%	
트윈 20						0.1 w/v%

[157] ¹⁾ #1 내지 #4 결과를 얻은 후 샘플을 준비하였다.

[158] 계면활성제 및 메티오닌을 사용한 강제 분해 시험에 대한 제형 샘플은 아래와 같다:

[159] #1: 첨가제 없는 제형(PS80 없음, 메티오닌 없음)

[160] #2: 메티오닌(20 mg/mL)을 포함하는 제형

[161] #3: 트윈 80(0.1 w/v%)을 포함하는 제형

[162] #4: 트윈 80(0.1 w/v%) 및 메티오닌(20 mg/mL)을 포함하는 제형

[163] #5: 폴록사머 188(0.1 w/v%) 및 메티오닌(20 mg/mL)을 포함하는 제형

[164] #6: 트윈 20(0.1 w/v%) 및 메티오닌(20 mg/mL)을 포함하는 제형

[165] 실시예 5.1. 육안 검사

[166] 육안 검사 결과, 빛 스트레스에 의해 용액이 더 노란빛을 띠었다. 35°C, 200

rpm에서 14일 보관시 샘플 #1, #3 및 #4에서 탁도가 증가하였고, #6에서 약간의 탁도가 나타났으며, #2 및 #5은 맑은 용액 상태를 나타냈다(도 1 내지 도 3). 표 10은 각 샘플의 육안 검사 결과를 나타낸다.

[167] [표10]

	샘플					
	#1	#2	#3	#4	#5	#6
빛 스트레스 7.5시간 750 W/m ²	맑은 용액, 노란빛	맑은 용액, 노란빛	맑은 용액, 노란빛	맑은 용액, 노란빛	해당없음	해당없음
35°C, 200 rpm, 5일	가시적인 탁도, 옅은 노란빛	맑은 용액, 옅은 노란빛	가시적인 탁도, 옅은 노란빛	가시적인 탁도, 옅은 노란빛	맑은 용액, 옅은 노란빛	맑은 용액, 옅은 노란빛
35°C, 200 rpm, 14일	강한 탁도, 옅은 노란빛	맑은 용액, 옅은 노란빛	강한 탁도, 옅은 노란빛	강한 탁도, 옅은 노란빛	맑은 용액, 옅은 노란빛	약간의 탁도, 옅은 노란빛

[168] 실시예 5.2. UV 280

[169] 표 11은 강제 분해 시험 후 샘플 농도를 나타낸다. 스트레스 노출에 따른 현저한 차이는 없었다.

[170] [표11]

	샘플(n=2)					
	#1	#2	#3	#4	#5	#6
	c [mg/mL]	c [mg/mL]	c [mg/mL]	c [mg/mL]	c [mg/mL]	c [mg/mL]
35°C, 200 rpm, 5일	96.8±0.7	98.9±2.1	96.2±0.3	95.5±0.3	93.9±1.5	95.3±2.8
35°C, 200 rpm, 14일	102.1±1.6	94.3±1.7	96.5±2.5	94.5±1.5	95.6±1.0	96.0±2.5
빛 스트레스 7.5시간 750 W/m ²	97.6±1.6	96.1±1.1	95.2±0.8	95.8±2.4	-	-

[171] 실시예 5.3. pH 측정

[172] 표 12는 강제 분해 시험 후 샘플의 pH를 나타낸다. pH의 현저한 변화는 없었다.

[173] [표12]

	샘플(n=2)					
	#1	#2	#3	#4	#5	#6
	pH	pH	pH	pH	pH	pH
35℃, 200 rpm, 5일	6.82±0.01	6.74±0.00	6.74±0.00	6.72±0.00	해당없음	해당없음
35℃, 200 rpm, 14일	6.76±0.00	6.71±0.00	6.73±0.01	6.70±0.00	해당없음	해당없음
빛 스트레스 7.5시간 750 W/m ²	6.72±0.01	6.72±0.00	6.71±0.01	6.70±0.01	해당없음	해당없음

[174] 실시예 5.4. 크기 배제 크로마토그래피(SE-HPLC)

[175] SE-HPLC는 응집 및 단편화된 단백질 검출을 위한 표준 방법이다. SEC 측정 결과를 표 13 및 도 5 내지 도 7에 나타냈다.

[176] [표13]

샘플(n=2)						
스트레스 유형	#1	#2	#3	#4	#5	#6
메인 피크 면적(main peak area)/퍼센트(%)						
35°C, 200 rpm, 5일	53.15±1.14	90.07±0.29	89.84±0.00	90.27±0.02	90.15±0.17	89.20±0.08
35°C, 200 rpm, 14일	36.83±0.08	88.07±0.05	87.52±0.04	87.89±0.05	87.78±0.03	86.19±0.01
빛 스트레스	92.97±0.07	94.08±0.45	93.12±0.43	93.74±0.52	해당없음	해당없음
응집 면적(aggregate area)/퍼센트(%)						
35°C, 200 rpm, 5일	5.78±0.23	8.20±0.08	8.72±0.04	8.24±0.06	8.26±0.11	9.23±0.05
35°C, 200 rpm, 14일	4.90±0.07	9.38±0.06	9.85±0.05	9.42±0.01	9.46±0.05	10.97±0.01
빛 스트레스	6.06±0.03	5.28±0.00	6.26±0.02	5.63±0.06	해당없음	해당없음
단편 면적(fragments area)/퍼센트(%)						
35°C, 200 rpm, 5일	41.07±1.37	1.73±0.21	1.44±0.03	1.50±0.04	1.59±0.05	1.58±0.13
35°C, 200 rpm, 14일	58.27±0.01	2.55±0.01	2.63±0.01	2.69±0.05	2.77±0.02	2.84±0.01
빛 스트레스	0.98±0.04	0.64±0.45	0.62±0.45	0.63±0.46	해당없음	해당없음

스						
회수율(recovery)/퍼센트(%)						
35°C, 200 rpm, 14일	97.17±0.26	100.25±0.0	98.61±0.14	98.56±0.04	100.17±0.1	100.43±0.1
		7			4	2

[177] 표 13에 나타난 바와 같이, 14일 35°C, 200 rpm 스트레스 조건에서의 회수율을 측정된 결과, 육안 검사와 유사한 양상을 보였다: #2, #5 및 #6 샘플은 높은 회수율을 나타냈다(도 4).

[178] 또한, 도 5에 나타난 바와 같이, 메인 피크 측정 결과 열/기계적 스트레스를 가한 #2, #4 및 #5 샘플에서 더 나은 결과가 나타났고, #1과 #6 샘플은 좋지 않은 결과를 나타냈다. 한편, 도 6에 나타난 바와 같이, #6 샘플에서 단백질 응집이 나타났다. 빛 스트레스 조건에서는 #2 샘플에서 단백질 응집이 가장 적었다. 도 7에 나타난 바와 같이, 단백질 단편과 관련하여 #2 샘플이 가장 좋은 결과를 나타냈다.

[179] 실시예 5.5. GI-301의 ELISA 기반 역가 분석

[180] GI-301의 상대 효능은 ELISA 기반 효능 분석결과에 따라 결정하였다. 이 분석의 원리는 인간 IgE에 결합할 수 있는 GI-301 분자를 정량화하는 것이다.

[181] ELISA에 의해 분석된 상대 효능은 표 14에 나타났다. 모든 샘플은 높은 결합 능력을 유지하였다.

[182] [표14]

	샘플(n=2)			
	#1	#2	#3	#4
35°C, 200 rpm, 5일	79.7%±3.8%	112.7%±1.6%	92.1%±5.2%	94.3%±30.4
35°C, 200 rpm, 14일	104.9%±0.0%	74.2%±6.5%	80.4%±7.5%	110.9%±12.6%
빛 스트레스	110.2%±6.6%	112.2%±5.1%	110.1%±6.8%	111.2%±3.3%

[183] 실시예 5.6. 네펠로메트릭(nephelometric) 측정에 의한 탁도

[184] 탁도 측정 결과를 표 15에 나타냈다. 시각적 외관과 탁도 측정 사이에는 명확한 상관 관계가 없었다(35°C에서 5일 보관 후, #3 및 #4 샘플 비교). 이러한 불일치의 잠재적인 원인은 농축된 단백질 용액에서 유광이 증가하여 기본 탁도를 높이기 때문일 수 있다. 결과적으로 응집으로 인해 육안으로 보이는 탁도는 기본 탁도에 중첩될 수 있다. 따라서, 샘플을 35°C에서 14일 동안 보관한 후 DLS를 통해 분석하였다.

[185] [표15]

	샘플 (n=2)			
	#1	#2	#3	#4
	NTU	NTU	NTU	NTU
35°C, 200 rpm, 5일	35.05±0.07	11.52±3.80	11.50±0.14	10.70±0.14
빛 스트레스	11.65±1.48	9.38±1.59	7.37±0.20	6.84±0.06

[186] 실시예 5.7. 삼투 농도

[187] 삼투압 몰농도(Osmolality) 결과를 표 16에 나타냈다. 예상대로 메티오닌은 삼투압 농도를 증가시켰다.

[188] [표16]

	샘플(n=2)			
	#1	#2	#3	#4
	mOSMOL/kg	mOSMOL/kg	mOSMOL/kg	mOSMOL/kg
35°C, 200 rpm, 5일	351±1	500±2	338±0	498±1
35°C, 200 rpm, 14일	363±1	488±3	333±1	492±0
빛 스트레스	338±2	496±1	338±1	495±0

[189] 실시예 5.8. 측정 결과 분석

[190] 하기 표 17에 분석 결과를 요약하여 나타냈다.

[191] [표17]

샘플	#1	#2	#3	#4	#5	#6
35°C/200 rpm에서 14일 후 시각적 외관	△	○	×	×	○	△
35°C/200 rpm에서 14일 후 SEC 회수율	×	○	△	△	○	○
35°C/200 rpm에서 14일 후 SEC 메인 피크	×	○	△	○	○	×
35°C/200 rpm에서 14일 후 DLS	△	△	×	×	△	△

[192] ×: 불량한 결과, △: 보통의 결과, ○: 양호한 결과

[193] 결과에 따라, 가장 적합한 제형 샘플은 아래와 같다:

[194] 샘플 #2 : His/프롤린 pH 6.7; 20 mg/mL 메티오닌

[195] 샘플 #5 : His/프롤린 pH 6.7; 20 mg/mL 메티오닌; 0.1 w/v% 폴록사머 188

[196] 시험 결과, 상기 표 17의 제형 샘플 중 샘플 #2 및 샘플 #5가 적합한 것으로

나타났다.

[197] 실시예 6. 시린지를 사용한 강제 분해 시험

[198] 2R 바이알을 사용한 실시예 5를 통해 두 가지 제형을 선택하였다: 250 mM 프롤린, 히스티딘/HCl, pH 6.7, 0.1 w/v% 폴록사머 188 포함/미포함, 20 mg/mL 메티오닌(항산화제). 이 결과를 기반으로 하여 샘플에 항산화제 및 계면활성제를 첨가하였다(표 18). 샘플의 목표 농도는 100 mg/mL였다. 2.25 mL 시린지에 해당 용액을 1.75 mL 채우고 14일 동안 열/기계적 스트레스를 가한 후 분석하였다.

[199] 강제 분해 연구를 위한 샘플은 다음과 같다:

[200] #1: 메티오닌(20 mg/mL)을 포함하는 제형

[201] #2: 폴록사머 188(0.1 w/v%) 및 메티오닌(20 mg/mL)을 포함하는 제형

[202] [표18]

기본 성분	250 mM 프롤린, 히스티딘/HCl, pH 6.7	
첨가제	#1	#2
메티오닌	20 mg/mL	20 mg/mL
폴록사머 188	-	0.1 w/v%

[203] 실시예 6.1. 육안 검사

[204] 육안 검사 결과를 표 19에 나타냈다. 도 8에서 확인할 수 있는 바와 같이 35°C에서 14일 보관 후 눈에 띄는 차이는 없었다.

[205] [표19]

	샘플	
	#1	#2
초기 상태	맑은 용액, 옅은 노란빛	맑은 용액, 옅은 노란빛
35°C, 200 rpm, 14일	맑은 용액, 옅은 노란빛	맑은 용액, 옅은 노란빛

[206] 실시예 6.2. 밀어내는 힘 측정

[207] 표 20은 인장기(tensile machine) 결과를 나타낸다. 27G 캐놀라 사용시 두 샘플 모두에서 20 N을 초과하는 밀어내기 힘이 발생하였다(도 9). 따라서, 100 mg/mL 단백질 농도를 수용하기 위해서는 내경이 더 크거나 바늘 크기가 더 큰 시린지(예컨대, 25G)를 선택해야 한다.

[208] [표20]

27G (0.4 mm OD) 18 mm	샘플	
	#1	#2
	F _{max} [N]	F _{max} [N]
n1	43.7	43.3
n2	42.6	41.0

[209] 실시예 6.3. UV 280

[210] 표 21은 강제 분해 시험 후 샘플의 농도를 나타낸다. 스트레스 노출 후 현저한 차이는 없었다.

[211] [표21]

샘플(n=2)					
초기 상태		35°C, 200 rpm, 14일 후			
#1	#2	#1 시린지 1	#1 시린지 2	#2 시린지 1	#2 시린지 2
c[mg/mL]	c[mg/mL]	c[mg/mL]	c[mg/mL]	c[mg/mL]	c[mg/mL]
98.9±2.9	99.6±1.6	100.2±1.2	101.3±0.8	98.2±1.0	98.9±0.7

[212] 실시예 6.4. pH 측정

[213] 표 22는 강제 분해 시험 후 샘플의 pH를 나타낸다. pH의 현저한 변화는 없었다.

[214] [표22]

샘플(n=2)					
초기 상태		35°C, 200 rpm, 14일 후			
#1	#2	#1 시린지 1	#1 시린지 2	#2 시린지 1	#2 시린지 2
pH	pH	pH	pH	pH	pH
6.74±0.00	6.77±0.01	6.75±0.01	6.73±0.03	6.75±0.00	6.75±0.00

[215] 실시예 6.5. 크기 배제 크로마토그래피(SE-HPLC)

[216] SEC 측정 결과를 표 23 및 도 10에 나타냈다.

[217] [표23]

샘플(n=2)					
초기 상태(t0)		35°C, 200 rpm, 14일 후			
#1	#2	#1 시린지 1	#1 시린지 2	#2 시린지 1	#2 시린지 2
메인 피크 면적(main peak area)/퍼센트(%)					
93.87±0.14	93.73±0.03	83.83±0.04	83.74±0.16	84.44±0.41	84.10±0.11
응집 면적(aggregate area)/퍼센트(%)					
4.36±0.04	4.49±0.01	9.60±0.04	9.61±0.08	9.40±0.16	9.48±0.05
단편 면적(fragments area)/퍼센트(%)					
1.76±0.18	1.79±0.02	6.57±0.00	6.66±0.08	6.16±0.26	6.41±0.06
회수율(recovery)/퍼센트(%)					
98.19±0.02	98.79±0.03	101.56±0.28	102.99±0.34	101.44±0.72	102.72±0.14

[218] 35°C, 200 rpm에서 14일 동안 보관한 후 두 샘플 간의 차이는 미미하였다. 그러나, 메인 피크 면적은 #1 샘플(폴록사머 사용 안함)과 비교하여 #2 샘플(폴록사머 사용)에서 더 나은 결과를 나타냈다. 바이알을 사용한 결과와 비교하여 주사기를 사용한 경우, 단편 면적이 약 4% 증가하였다. 이는 메인 피크 결과와 일치하였다(도 10).

[219] 실시예 6.6. 삼투 농도

[220] 삼투압 물농도 결과를 표 24에 나타냈다. 삼투 농도는 샘플에 스트레스를 가한 후에도 동일한 수준으로 유지되었다.

[221] [표24]

샘플(n=2)					
초기 상태		35°C, 200 rpm, 14일 후			
#1	#2	#1 시린지 1	#1 시린지 2	#2 시린지 1	#2 시린지 2
mOSMOL/kg	mOSMOL/kg	mOSMOL/kg	mOSMOL/kg	mOSMOL/kg	mOSMOL/kg
504±1	507±2	515±8	514±6	514±2	516±1

[222] 실시예 6.7. 비가시적 입자

[223] 눈에 보이지 않는 입자의 양은 유체 이미징 현미경을 사용하여 평가하였다. 물을 채워 스트레스를 가한 주사기는 입자 부하가 낮았다. 이는 입자 부하에 대한 실리콘 주사기의 영향이 제한적임을 나타낸다.

[224] #1 샘플 및 #2 샘플은 유사한 입자 부하를 나타냈다. 관찰된 대부분의 입자는 실리콘 입자였고, 단백질 응집체/침전을 나타내는 입자는 없었다.

[225] 실시예 6.8. 측정 결과 분석

[226] 표 25에 분석 결과를 요약하여 나타냈다.

[227] [표25]

샘플	#1	#2
35°C/200 rpm에서 14일 후 시각적 외관	○	○
35°C/200 rpm에서 14일 후 SEC 회수율	○	○
35°C/200 rpm에서 14일 후 SEC 메인 피크	○	○
35°C/200 rpm에서 14일 후 DLS	△	△
플로우 이미징 현미경(정성적)	○	○

[228] x: 불량한 결과, △: 보통의 결과, ○: 양호한 결과

[229] 두 샘플은 거의 비슷한 결과를 보였다. 유일한 차이점은 #2 샘플이 SEC 분석(상대적인 메인 피크 면적)에서 약간 더 나은 결과를 보였다는 것이다.

[230] 이상의 결과를 종합할 때, 100 mg/mL 농도의 GI-301을 포함하고 20 mg/mL 메티오닌을 항산화제로 포함하며, 0.1 w/v% 폴록사머 188을 계면활성제로 포함한 250 mM 프롤린, 10 mM 히스티딘/HCl, pH 6.7의 버퍼 제형이 GI-301에 가장 적합한 것으로 판단되었다.

[231] 다만, 상기 조건의 경우 최종 농도인 100 mg/mL을 맞추기 위한 한외여과 공정에서의 Donnan-effect로 인해 pH가 목표인 6.7보다 감소하는 현상을 보였다. 이에 대한 보완으로 한외여과 이후 고농도 히스티딘 희석을 통해 pH를 조정하는 공정을 추가하였다. 이를 반영하여 최종적으로 75 mg/mL GI-301, 20 mg/mL 메티오닌, 250 mM 프롤린, 55 mM 히스티딘/HCl, 0.1 w/v% 폴록사머 188, pH 6.5를 최종 제형조건으로 확립하였다.

청구범위

- [청구항 1] IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인(FcεRIα ECD)을 포함하는 융합단백질 이량체를 포함하며, pH 6.0 내지 7.0을 갖는 수성 약제학적 제형.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 제형은 피하 주사용인, 수성 약제학적 제형.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 융합단백질 이량체는 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인을 포함하는 단량체 두 개를 포함하는 것인, 수성 약제학적 제형.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 단량체는 변형된 Fc 영역을 포함하며, 상기 변형된 Fc 영역과 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인은 힌지를 통해 결합된 것인, 수성 약제학적 제형.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 변형된 Fc 영역은 서열번호 2로 이루어진 것인, 수성 약제학적 제형.
- [청구항 6] 제4항에 있어서, 상기 힌지는 면역글로불린 IgD에서 유래한 힌지 영역 또는 이의 변이체인 것인, 수성 약제학적 제형.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인은 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 이의 단편으로 이루어진 것인, 수성 약제학적 제형.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 융합단백질 이량체의 농도가 50 mg/mL 내지 150 mg/mL인 것인, 수성 약제학적 제형.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 제형은 버퍼 및 안정화제를 추가로 포함하는 것인, 수성 약제학적 제형.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 버퍼는 히스티딘인 것인, 수성 약제학적 제형.
- [청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 히스티딘의 농도가 10 mM 내지 100 mM인 것인, 수성 약제학적 제형.
- [청구항 12] 제9항에 있어서, 상기 안정화제는 프롤린인 것인, 수성 약제학적 제형.
- [청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 프롤린의 농도가 200 mM 내지 300 mM인 것인, 수성 약제학적 제형.
- [청구항 14] 제1항에 있어서,

- 상기 제형은 항산화제를 추가로 포함하는 것인, 수성 약제학적 제형.
- [청구항 15] 제14항에 있어서,
상기 항산화제는 메티오닌인 것인, 수성 약제학적 제형.
- [청구항 16] 제15항에 있어서,
상기 메티오닌의 농도가 10 mg/mL 내지 30 mg/mL인 것인, 수성 약제학적 제형.
- [청구항 17] 제1항에 있어서,
상기 제형은 계면활성제를 추가로 포함하는 것인, 수성 약제학적 제형.
- [청구항 18] 제17항에 있어서,
상기 계면활성제는 폴록사머 188(poloxamer 188)인 것인, 수성 약제학적 제형.
- [청구항 19] 제18항에 있어서,
상기 폴록사머 188의 농도가 0.01 w/v% 내지 1 w/v%인 것인, 수성 약제학적 제형.
- [청구항 20] i) 50 mg/mL 내지 150 mg/mL 농도의 IgE Fc 수용체의 알파 서브유닛의 세포외 도메인을 포함하는 융합단백질 이량체;
ii) 10 mM 내지 100 mM 농도의 히스티딘;
iii) 200 mM 내지 300 mM 농도의 프롤린;
iv) 10 mg/mL 내지 30 mg/mL 농도의 메티오닌; 및
v) 0.01 w/v% 내지 1 w/v% 농도의 폴록사머 188을 포함하며,
pH 6.0 내지 7.0을 갖는 수성 약제학적 제형.
- [청구항 21] 제20항에 있어서,
상기 제형은 바이알, 카트리지, 주사기 및 자동 주사기(autoinjector)로 이루어진 군으로부터 선택된 용기에 존재하는 것인, 수성 약제학적 제형.
- [청구항 22] 제20항에 있어서,
상기 제형은 피하 투여를 위한 것인, 수성 약제학적 제형.
- [청구항 23] 제20항에 있어서,
상기 제형은 알레르기 질환의 예방 또는 치료를 위한 것인, 수성 약제학적 제형.
- [청구항 24] 제23항에 있어서,
상기 알레르기 질환은 식품 알레르기, 아토피 피부염(atopic dermatitis), 천식(asthma), 알레르기성 비염(allergic rhinitis), 알레르기성 결막염(allergic conjunctivitis), 알레르기성 피부염(allergic dermatitis), 만성 특발성 두드러기(chronic idiopathic urticaria), 만성 자발성 두드러기(chronic spontaneous urticaria) 및 알레르기성 접촉성 피부염(allergic contact dermatitis)으로 구성된 군에서 선택된 하나인 것인, 수성 약제학적 제형.