



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2021-0011923  
(43) 공개일자 2021년02월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 39/395* (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)  
*A61K 47/02* (2006.01) *A61K 47/12* (2006.01)  
*A61K 47/26* (2017.01) *A61K 9/00* (2006.01)  
*A61P 27/02* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*A61K 39/39591* (2013.01)  
*A61K 47/02* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7033144
- (22) 출원일자(국제) 2019년04월17일  
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2020년11월17일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2019/027790
- (87) 국제공개번호 WO 2019/204380  
 국제공개일자 2019년10월24일
- (30) 우선권주장  
 62/658,772 2018년04월17일 미국(US)  
 62/776,686 2018년12월07일 미국(US)

- (71) 출원인  
**아웃룩 테라퓨틱스, 인크.**  
 미국 08852 뉴저지주 몬머스 정선 유에스 루트 1  
 4260
- (72) 발명자  
**요난 크리스**  
 미국 08512 뉴저지주 크랜버리 클라크 드라이브 7  
**덴담롱비트 워후사니**  
 미국 08512 뉴저지주 크랜버리 클라크 드라이브 7  
**힐리-프리드 마르타**  
 미국 08512 뉴저지주 크랜버리 클라크 드라이브 7
- (74) 대리인  
**김진희, 김태홍**

전체 청구항 수 : 총 64 항

**(54) 발명의 명칭 질환 치료 용도를 위한 베바시주맙의 완충 제제**

**(57) 요약**

본 발명은 베바시주맙의 완충 수성 제제를 제공한다. 본 발명은 추가로 베바시주맙의 완충 제제를 제조하는 방법을 제공한다. 본 발명은 본 개시 내용의 완충 항체 조성물을 투여함으로써 안질환, 특히 습성 나이 관련 황반 변성 및 황반 부종을 치료하는 방법을 제공한다.

(52) CPC특허분류

*A61K 47/12* (2013.01)

*A61K 47/26* (2013.01)

*A61K 9/0019* (2013.01)

*A61K 9/0048* (2013.01)

*A61P 27/02* (2018.01)

*C07K 16/22* (2013.01)

*A61K 2039/505* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

대상체의 안질환을 치료하는 데 사용하기 위한, 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체를 포함하는 완충 항체 제제.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 안질환이 망막, 공막, 유리체, 수정체, 동공, 홍채, 각막, 맥락막, 시신경, 망막 혈관계, 모양체, 또는 안각의 질환인 제제.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 안질환이 망막 또는 맥락막의 질환인 제제.

#### 청구항 4

제3항에 있어서, 망막 또는 맥락막의 안질환이 나이 관련 황반 변성, 황반 부종, 당뇨병성 황반 부종(DME: diabetic macular edema), 망막병증, 당뇨병성 망막병증, 근시 변성, 특발성 맥락막 혈관신생, 염증성 맥락막 혈관신생, 망막 혈관신생, 결절 맥락막 혈관병증, 눈 혈관신생, 분지 망막 정맥 폐쇄(BRVO: branch retinal vein occlusion), 중심 망막 정맥 폐쇄, 중심 장액 맥락 망막병증, 망막염, 망막 색소 변성증, 스타가르트병, 어셔(usher) 증후군, 망막 변성, 안구 내염, 가족성 삼출 유리체 망막병증, 특발성 중심와 부근 모세혈관 확장증, 격자 변성, 황반 원공, 잔존 태아 혈관, 망막 동맥 폐쇄, 또는 망막 모세포종인 제제.

#### 청구항 5

제3항에 있어서, 망막 또는 맥락막의 안질환이 나이 관련 황반 변성, 습성 나이 관련 황반 변성. 또는 신생혈관 나이 관련 황반 변성인 제제.

#### 청구항 6

제3항에 있어서, 망막 또는 맥락막의 안질환이 습성 나이 관련 황반 변성인 제제.

#### 청구항 7

제3항에 있어서, 망막 또는 맥락막의 안질환이 황반 부종인 제제.

#### 청구항 8

제1항에 있어서, 경구, 정맥내, 유리체내, 근육내, 국소, 피하, 맥락막상으로, 점안액을 통해, 또는 점막 조직을 통한 직접 흡수를 통해 대상체에게 투여되는 것인 제제.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, 유리체내 주사에 의해 대상체에게 투여되는 제제.

#### 청구항 10

제1항에 있어서, 매달 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 28, 29, 30, 또는 31회 대상체에게 투여되는 제제.

#### 청구항 11

제1항에 있어서, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12주마다 대상체에게 투여되는 제제.

#### 청구항 12

제1항에 있어서, 4, 8, 16, 24, 36, 또는 52주 지속되는 기간 동안 대상체에게 투여되는 제제.

**청구항 13**

제1항에 있어서, 1, 2, 3, 4, 5 또는 10년 지속되는 기간 동안 대상체에게 투여되는 제제.

**청구항 14**

제1항에 있어서, 10 내지 50일의 반감기를 갖는 제제.

**청구항 15**

제1항에 있어서, 약 10 mg/ml 내지 약 50 mg/ml의 항체를 포함하는 제제.

**청구항 16**

제1항에 있어서, 약 15 mg/ml 내지 약 35 mg/ml의 항체를 포함하는 제제.

**청구항 17**

제1항에 있어서, 약 23 mg/ml 내지 약 27 mg/ml의 항체를 포함하는 제제,

**청구항 18**

제1항에 있어서, 약 24 mg/ml 내지 약 27 mg/ml의 항체를 포함하는 제제.

**청구항 19**

제1항에 있어서, 약 25 mg/ml 내지 약 26 mg/ml의 항체를 포함하는 제제.

**청구항 20**

제1항에 있어서, 약 25.5 mg/ml의 항체를 포함하는 제제.

**청구항 21**

제1항에 있어서, 약 25 mg/ml의 항체를 포함하는 제제.

**청구항 22**

제1항에 있어서, 약 30 mM 내지 약 70 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함하는 제제.

**청구항 23**

제1항에 있어서, 약 40 mM 내지 약 60 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함하는 제제.

**청구항 24**

제1항에 있어서, 약 48 mM 내지 약 52 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함하는 제제.

**청구항 25**

제1항에 있어서, 약 49 mM 내지 약 51 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함하는 제제.

**청구항 26**

제1항에 있어서, 약 50 mM 내지 약 51 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함하는 제제.

**청구항 27**

제1항에 있어서, 약 30 mM 내지 약 70 mM의 인산나트륨을 포함하는 제제.

**청구항 28**

제1항에 있어서, 약 40 mM 내지 약 60 mM의 인산나트륨을 포함하는 제제.

**청구항 29**

제1항에 있어서, 약 48 mM 내지 약 52 mM의 인산나트륨을 포함하는 제제.

**청구항 30**

제1항에 있어서, 약 49 mM 내지 약 51 mM의 인산나트륨을 포함하는 제제.

**청구항 31**

제1항에 있어서, 약 50 mM 내지 약 51 mM의 인산나트륨을 포함하는 제제.

**청구항 32**

제1항에 있어서, 제1 인산나트륨, 제2 인산나트륨, 또는 제1 인산나트륨 및 제2 인산나트륨 둘 모두를 포함하는 제제.

**청구항 33**

제1항에 있어서, 완충액이 약 50 mM의 인산나트륨을 포함하는 것인 제제.

**청구항 34**

제1항에 있어서, 완충액이 약 51 mM의 인산나트륨을 포함하는 것인 제제.

**청구항 35**

제1항에 있어서, 약 120 mM 내지 약 180 mM의 트레할로스를 포함하는 제제.

**청구항 36**

제1항에 있어서, 약 140 mM 내지 약 180 mM의 트레할로스를 포함하는 제제.

**청구항 37**

제1항에 있어서, 약 150 mM 내지 약 170 mM의 트레할로스를 포함하는 제제.

**청구항 38**

제1항에 있어서, 약 157 mM 내지 약 161 mM의 트레할로스를 포함하는 제제.

**청구항 39**

제1항에 있어서, 약 158 mM 내지 약 160 mM의 트레할로스를 포함하는 제제.

**청구항 40**

제1항에 있어서, 약 159 mM의 트레할로스를 포함하는 제제.

**청구항 41**

제1항에 있어서, 약 160 mM의 트레할로스를 포함하는 제제.

**청구항 42**

제1항에 있어서, 약 0.02%(v/v) 내지 약 0.06%(v/v)의 폴리소르베이트 20을 포함하는 제제.

**청구항 43**

제1항에 있어서, 약 0.03%(v/v) 내지 약 0.05%(v/v)의 폴리소르베이트 20을 포함하는 제제.

**청구항 44**

제1항에 있어서, 약 0.04%(v/v)의 폴리소르베이트 20을 포함하는 제제.

**청구항 45**

제1항에 있어서, 약 5.6의 pH를 갖는 제제.

**청구항 46**

제1항에 있어서, 약 5.8의 pH를 갖는 제제.

**청구항 47**

제1항에 있어서, 약 6의 pH를 갖는 제제.

**청구항 48**

제1항에 있어서, 약 6.1의 pH를 갖는 제제.

**청구항 49**

제1항에 있어서, 완충액이 약 11 mM 내지 약 19 mM의 아세트산나트륨을 포함하는 것인 제제.

**청구항 50**

제1항에 있어서, 완충액이 약 13 mM 내지 약 17 mM의 아세트산나트륨을 포함하는 것인 제제.

**청구항 51**

제1항에 있어서, 완충액이 약 13 mM 내지 약 16 mM의 아세트산나트륨을 포함하는 것인 제제.

**청구항 52**

제1항에 있어서, 완충액이 약 15 mM의 아세트산나트륨을 포함하는 것인 제제.

**청구항 53**

제1항에 있어서, 약 165 mM 내지 약 185 mM의 수크로오스를 포함하는 제제.

**청구항 54**

제1항에 있어서, 약 170 mM 내지 약 180 mM의 수크로오스를 포함하는 제제.

**청구항 55**

제1항에 있어서, 약 174 mM 내지 약 176 mM의 수크로오스를 포함하는 제제.

**청구항 56**

제1항에 있어서, 약 175 mM의 수크로오스를 포함하는 제제.

**청구항 57**

a) 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체를 포함하는 완충 항체 제제; 및

b) 안질환을 치료하기 위한 방법에서 상기 항체 제제를 투여하기 위한 설명서를 포함하는 키트.

**청구항 58**

제57항에 있어서, 안질환이 망막, 공막, 유리체, 수정체, 동공, 홍채, 각막, 맥락막, 시신경, 망막 혈관계, 모양체, 또는 안각의 질환인 키트.

**청구항 59**

제57항에 있어서, 안질환이 망막 또는 맥락막의 질환인 키트.

**청구항 60**

제57항에 있어서, 망막 또는 맥락막의 안질환이 나이 관련 황반 변성, 황반 부종, 당뇨병성 황반 부종(DME), 망막 병증, 당뇨병성 망막병증, 근시 변성, 특발성 맥락막 혈관신생, 염증성 맥락막 혈관신생, 망막 혈관신생, 결절 맥락막 혈관병증, 눈 혈관신생, 분지 망막 정맥 폐쇄(BRVO), 중심 망막 정맥 폐쇄, 중심 장액 맥락 망막병증, 망막염, 망막 색소 변성증, 스타가르트병, 어서 증후군, 망막 변성, 안구 내염, 가족성 삼출 유리체 망막병증, 특발성 중심와 부근 모세혈관 확장증, 격자 변성, 황반 원공, 잔존 태아 혈관, 망막 동맥 폐쇄, 또는 망막 모세포종인 키트.

**청구항 61**

제57항에 있어서, 망막 또는 맥락막의 안질환이 나이 관련 황반 변성, 습성 나이 관련 황반 변성, 또는 신생혈관 나이 관련 황반 변성인 키트.

**청구항 62**

제57항에 있어서, 망막 또는 맥락막의 안질환이 습성 나이 관련 황반 변성인 키트.

**청구항 63**

제57항에 있어서, 상기 설명서는 제1항 내지 제56항 중 어느 하나의 항에 기재된 안정적인 항체를 투여하기 위한 설명서를 포함하는 것인 키트.

**청구항 64**

제57항에 있어서, 시린지, 니들 및 카테터를 포함하는 군으로부터 선택되는 완충 항체 제제를 주사하기 위한 디바이스를 추가로 포함하는 키트.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] **관련 출원의 상호 참조**

[0002] 본 출원은 2018년 12월 7일에 출원된 미국 가출원 제62/776,686호 및 2018년 4월 17일에 출원된 미국 가출원 제 62/658,772호에 우선권을 주장하며, 이들 각각의 내용은 전체적으로 그리고 모든 목적을 위해, 본원에 참고로 포함된다.

[0003] **서열 목록의 포함**

[0004] "ONBI-013\_001W0\_SeqListing\_ST25.txt,"로 명명된 텍스트 파일은 2019년 4월 16일에 생성하였으며, 9KB 크기이며, 그 내용은 이로써 그 전체가 참고로 포함된다.

[0005] **발명의 분야**

[0006] 본 발명은 일반적으로 항체 제제 화학 분야에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 혈관 내피 성장 인자(VEGF: vascular endothelial growth factor)에 대한 항체의 완충 제제로서, 항체의 열 안정성 및 콜로이드 안정성을 향상시켜 항체의 장기 보관을 향상시키는 제제에 관한 것이다. 이러한 안정적인 항체 제제는 VEGF가 조절 장애가 있는 것을 비롯한 안질환을 치료하는 방법에 사용될 수 있다.

**배경 기술**

[0007] 생물 제제 가격 경쟁 및 혁신법(BPCIA: Biologics Price Competition and Innovation Act)의 일부로, 생물학적 완제 의약품(살아있는 유기체로부터 생산되거나 유래됨)은 데이터가 무엇보다도 제품이 이미 승인된 생물학적 제제와 "매우 유사함"을 나타낼 경우 "바이오시밀러(biosimilar)"로 입증될 수 있다. 바이오시밀러 제품은 최소한 미국 식품의약국(U.S. Food and Drug Agency)에서 승인한 생물학적 제제의 생물학적 기능과 치료 효능을 유지해야 한다. 그러나 바이오시밀러 제품은 승인된 생물학적 제제와는 다르게 제제화될 수 있다. 제제는 생물학적 완제 의약품의 안정성 및 보관 기간을 개선할 수 있으며, 특정 질환 또는 병태를 치료하는 데 있어 효능도

개선할 수 있다. 제제는 또한 승인된 생물학적 제제의 투여시 환자의 불편함 또는 환자가 경험할 수 있는 기타 부작용의 감소를 비롯한 투여의 다른 측면을 개선할 수 있다.

[0008] 항체 분자는 생물학적 약물로 사용될 수 있으며 이러한 많은 항체가 인간에 사용하기 위해 승인되었다. 항체 분자는 바이오시밀러로서 생산되고 그에 따라 재제제화(reformulation)될 수 있다. 당 업계에서 고품질 항체 바이오시밀러가 여전히 요구된다.

[0009] 상표 아바스틴(Avastin)®(Genentech, Inc., 미국 캘리포니아주 샌프란시스코 소재)으로 시판되는 베바시주맵 항체는 보관 조건하에서 비공유 가역 응집체 및 공유 비가역 응집체의 두 가지 형태로 응집하는 것으로 알려져 있다. 후자(공유 응집체)는 항원 결합 도메인에서 발생하므로 혈관 내피 성장 인자(VEGF)에 결합할 수 있는 결합 부위의 수를 감소시키는 것으로 생각된다. 결과적으로, 항체의 효능이 감소한다. 이러한 응집체의 감소는 일반적으로, 특히 베바시주맵과 같은 항체에 바람직하다. 본 개시 내용은 당 업계의 이러한 요구를 다룬다.

### 발명의 내용

[0010] 일부 실시양태에서, 본 개시 내용은 안질환의 치료를 필요로 하는 대상체에서 이를 치료하는 방법으로서, 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체를 포함하는 완충 항체 제제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 특징으로 한다.

[0011] 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 안질환은 망막, 공막, 유리체, 수정체, 동공, 홍채, 각막, 맥락막, 시신경, 망막 혈관계, 모양체, 또는 안각의 질환이다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 안질환은 망막 또는 맥락막의 질환이다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 망막 또는 맥락막의 안질환은 나이 관련 황반 변성, 황반 부종, 당뇨병 황반 부종(DME: diabetic macular edema), 망막병증, 당뇨병 망막병증, 근시 변성, 특발성 맥락막 혈관신생, 염증성 맥락막 혈관신생, 망막 혈관신생, 결절 맥락막 혈관병증, 눈 혈관신생, 분지 망막 정맥 폐쇄(BRVO: branch retinal vein occlusion), 중심 망막 정맥 폐쇄, 중심 장액 맥락 망막병증, 망막염, 망막 색소 변성증, 스타가르트병, 어셔(usher) 증후군, 망막 변성, 안구 내염, 가족성 삼출 유리체 망막병증, 특발성 중심 와 부근 모세혈관 확장증, 격자 변성, 황반 원공, 잔존 태아 혈관, 망막 동맥 폐쇄, 또는 망막 모세포종이다.

[0012] 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 망막 또는 맥락막의 안질환은 나이 관련 황반 변성, 습성 나이 관련 황반 변성, 또는 신생혈관 나이 관련 황반 변성이다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 망막 또는 맥락막의 안질환은 습성 나이 관련 황반 변성이다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 망막 또는 맥락막의 안질환은 황반 부종이다.

[0013] 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 완충 항체 제제는 경구, 정맥내, 유리체내, 근육내, 국소, 피하, 맥락막상으로, 점안액을 통해, 또는 점막 조직을 통한 직접 흡수를 통해 대상체에게 투여된다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 완충 항체 제제는 유리체내 주사에 의해 대상체에게 투여된다.

[0014] 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 완충 항체 제제는 매달 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 28, 29, 30, 또는 31회 대상체에게 투여된다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 완충 항체 제제는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12주마다 대상체에게 투여된다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 완충 항체 제제는 4, 8, 16, 24, 36, 또는 52주 지속되는 기간 동안 대상체에게 투여된다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 완충 항체 제제는 1, 2, 3, 4, 5 또는 10년 지속되는 기간 동안 대상체에게 투여된다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 완충 항체 제제는 10 내지 50일의 반감기를 갖는다.

[0015] 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 제제는 약 10 mg/ml 내지 약 50 mg/ml의 항체를 포함한다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 제제는 약 15 mg/ml 내지 약 35 mg/ml의 항체를 포함한다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 제제는 약 23 mg/ml 내지 약 27 mg/ml의 항체를 포함한다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 제제는 약 24 mg/ml 내지 약 27 mg/ml의 항체를 포함한다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 제제는 약 25 mg/ml 내지 약 26 mg/ml의 항체를 포함한다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 제제는 약 25.5 mg/ml의 항체를 포함한다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 제제는 약 25 mg/ml의 항체를 포함한다.

[0016] 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 제제는 약 30 mM 내지 약 70 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함한다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 제제는 약 40 mM 내지 약 60 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함한다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 제제는 약 48 mM 내지 약 52 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함한다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 제제는 약 49 mM 내지 약 51 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함한다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 제제는 약 50 mM 내지 약 51 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함한다.

- [0017] 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 제제는 약 30 mM 내지 약 70 mM의 인산나트륨을 포함한다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 제제는 약 40 mM 내지 약 60 mM의 인산나트륨을 포함한다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 제제는 약 48 mM 내지 약 52 mM의 인산나트륨을 포함한다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 제제는 약 49 mM 내지 약 51 mM의 인산나트륨을 포함한다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 제제는 약 50 mM 내지 약 51 mM의 인산나트륨을 포함한다.
- [0018] 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 제제는 제1 인산나트륨, 제2 인산나트륨, 또는 제1 인산나트륨 및 제2 인산나트륨 둘 모두를 포함한다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 완충액은 약 50 mM의 인산나트륨을 포함한다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 완충액은 약 51 mM의 인산나트륨을 포함한다.
- [0019] 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 제제는 약 120 mM 내지 약 180 mM의 트레할로스를 포함한다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 제제는 약 140 mM 내지 약 180 mM의 트레할로스를 포함한다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 제제는 약 150 mM 내지 약 170 mM의 트레할로스를 포함한다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 제제는 약 157 mM 내지 약 161 mM의 트레할로스를 포함한다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 제제는 약 158 mM 내지 약 160 mM의 트레할로스를 포함한다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 제제는 약 159 mM의 트레할로스를 포함한다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 제제는 약 160 mM의 트레할로스를 포함한다.
- [0020] 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 제제는 약 0.02%(v/v) 내지 약 0.06%(v/v)의 폴리소르베이트 20을 포함한다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 제제는 약 0.03%(v/v) 내지 약 0.05%(v/v)의 폴리소르베이트 20을 포함한다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 제제는 약 0.04%(v/v)의 폴리소르베이트 20을 포함한다.
- [0021] 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 제제는 약 5.6의 pH를 갖는다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 제제는 약 5.8의 pH를 갖는다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 제제는 약 6의 pH를 갖는다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 제제는 약 6.1의 pH를 갖는다.
- [0022] 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 완충액은 약 11 mM 내지 약 19 mM의 아세트산나트륨을 포함한다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 완충액은 약 13 mM 내지 약 17 mM의 아세트산나트륨을 포함한다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 완충액은 약 13 mM 내지 약 16 mM의 아세트산나트륨을 포함한다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 완충액은 약 15 mM의 아세트산나트륨을 포함한다.
- [0023] 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 제제는 약 165 mM 내지 약 185 mM의 수크로오스를 포함한다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 제제는 약 170 mM 내지 약 180 mM의 수크로오스를 포함한다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 제제는 약 174 mM 내지 약 176 mM의 수크로오스를 포함한다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 제제는 약 175 mM의 수크로오스를 포함한다.
- [0024] 일부 실시양태에서, 본 개시 내용은 a) 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체를 포함하는 완충 항체 제제; 및 b) 안질환을 치료하기 위한 방법에서 항체 제제를 투여하기 위한 설명서를 포함하는 키트를 특징으로 한다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 안질환은 망막, 공막, 유리체, 수정체, 동공, 홍채, 각막, 맥락막, 시신경, 망막 혈관계, 모양체 또는 안각의 질환이다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 안질환은 망막 또는 맥락막의 질환이다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 망막 또는 맥락막의 안질환은 나이 관련 황반 변성, 황반 부종, 당뇨병성 황반 부종(DME), 망막병증, 당뇨병성 망막병증, 근시 변성, 특발성 맥락막 혈관신생, 염증성 맥락막 혈관신생, 망막 혈관신생, 결절 맥락막 혈관병증, 눈 혈관신생, 분지 망막 정맥 폐쇄(BRVO), 중심 망막 정맥 폐쇄, 중심 장액 맥락 망막병증, 망막염, 망막 색소 변성증, 스타가르트병, 어서 증후군, 망막 변성, 안구 내염, 가족성 삼출 유리체 망막병증, 특발성 중심와 부근 모세혈관 확장증, 격자 변성, 황반 원공, 잔존 태아 혈관, 망막 동맥 폐쇄, 또는 망막 모세포종이다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 망막 또는 맥락막의 안질환은 나이 관련 황반 변성, 습성 나이 관련 황반 변성, 또는 신생혈관 나이 관련 황반 변성이다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 망막 또는 맥락막의 안질환은 습성 나이 관련 황반 변성이다.
- [0025] 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 설명서는 청구항 1 내지 56 중 어느 하나의 항에 기재된 바와 같은 안정한 항체를 투여하기 위한 설명서를 포함한다. 본 개시 내용의 일부 실시양태에서, 키트는 시린지, 니들, 및 카테터를 포함하는 군으로부터 선택되는 완충 항체 제제를 주사하기 위한 디바이스를 추가로 포함한다.

### 도면의 간단한 설명

- [0026] [도 1]은 50 mM 인산나트륨 완충액에서 베바시주맵 열 안정성에 대한 다양한 안정제의 효과를 보여주는 DSC 플

롯을 보여준다. 표 1의 조건 1, 2, 9 및 10을 플롯에 나타낸다.

[도 2a]는 5°C에서 18개월의 기간에 걸쳐 보관될 때 조건 1(베바시주맴(아바스틴®) 매치), 조건 2(베바시주맴 시트레이트 포스페이트, pH 5.8), 조건 3(베바시주맴 시트레이트 포스페이트, pH 6.0), 조건 4(베바시주맴 아세테이트, pH 5.6), 및 조건 5(베바시주맴 아세테이트, pH 5.8)에서 베바시주맴 응집체의 백분율을 보여준다.

[도 2a(i)]은 제품이 5°C에서 18개월의 기간에 걸쳐 보관될 때 조건 1(베바시주맴(아바스틴®) 매치), 조건 2(베바시주맴 시트레이트 포스페이트, pH 5.8) 및 조건 3(베바시주맴 시트레이트 포스페이트, pH 6.0)에 대한 크로마토그래피 오버레이(비희석(neat) 주입 조건을 이용하여 크기 배제 크로마토그래피(SEC: size exclusion chromatography)에 의해 측정하고 총 응집체를 정량화함)를 보여준다.

[도 2a(ii)]는 5°C에서 18개월의 기간에 걸쳐 보관될 때 조건 1(베바시주맴(아바스틴®) 매치), 조건 4(베바시주맴 아세테이트, pH 5.6) 및 조건 5(베바시주맴 아세테이트, pH 5.8)에 대한 크로마토그래피 오버레이(비희석 주입 조건을 이용하여 크기 배제 크로마토그래피(SEC)에 의해 측정하고 총 응집체를 정량화함)를 보여준다.

[도 2b]는 5°C에서 18개월의 기간에 걸쳐 보관될 때 조건 1(베바시주맴(아바스틴®) 매치), 조건 2(베바시주맴 시트레이트 포스페이트, pH 5.8), 조건 3(베바시주맴 시트레이트 포스페이트, pH 6.0), 조건 4(베바시주맴 아세테이트, pH 5.6), 및 조건 5(베바시주맴 아세테이트, pH 5.8)에서 베바시주맴 공유결합 이량체의 백분율을 보여준다.

[도 2b(i)]은 제품이 5°C에서 18개월에 걸쳐 보관될 때 조건 1(베바시주맴(아바스틴®) 매치), 조건 2(베바시주맴 시트레이트 포스페이트, pH 5.8) 및 조건 3(베바시주맴 시트레이트 포스페이트, pH 6.0)에서 대한 크로마토그래피 오버레이(희석 주입 조건을 이용하여 크기 배제 크로마토그래피(SEC)에 의해 측정하고 베바시주맴 공유결합 이량체를 정량화함)를 보여준다.

[도 2b(ii)]는 제품이 5°C에서 18개월에 걸쳐 보관될 때 조건 1(베바시주맴(아바스틴®) 매치), 조건 4(베바시주맴 아세테이트, pH 5.6), 및 조건 5(베바시주맴 아세테이트, pH 5.8)에 대한 크로마토그래피 오버레이(희석 주입 조건을 이용하여 크기 배제 크로마토그래피(SEC)에 의해 측정하고 베바시주맴 공유결합 이량체를 정량화함)를 보여준다.

[도 2b(iii)]은 5°C에서 18개월에 걸쳐 보관될 때 조건 1(베바시주맴(아바스틴®) 매치), 조건 2(베바시주맴 시트레이트 포스페이트, pH 5.8), 조건 3(베바시주맴 시트레이트 포스페이트, pH 6.0), 조건 4(베바시주맴 아세테이트, pH 5.6), 및 조건 5(베바시주맴 아세테이트, pH 5.8)에서 양이온 교환 크로마토그래피(CEX: cation exchange chromatography)에 의해 측정된 베바시주맴 산성 종의 백분율의 변화를 보여준다.

[도 2b(iv)]는 제품이 5°C에서 18개월에 걸쳐 보관될 때 조건 1(베바시주맴(아바스틴®) 매치), 조건 2(베바시주맴 시트레이트 포스페이트, pH 5.8) 및 조건 3(베바시주맴 시트레이트 포스페이트, pH 6.0)에서 대한 크로마토그래피 오버레이(양이온 교환 크로마토그래피(CEX)에 의해 측정하고 % 산성, % 염기성 및 % 주요 종을 정량화함)를 보여준다

[도 2b(v)]는 제품이 5°C에서 18개월에 걸쳐 보관될 때 조건 1(베바시주맴(아바스틴®) 매치), 조건 4(베바시주맴 아세테이트, pH 5.6), 및 조건 5(베바시주맴 아세테이트, pH 5.8)에 대한 크로마토그래피 오버레이(양이온 교환 크로마토그래피(CEX)에 의해 측정하고 % 산성, % 염기성 및 % 주요 종을 정량화함)를 보여준다.

[도 2c]는 30°C에서 보관될 때 조건 1(베바시주맴(아바스틴®) 매치), 조건 2(베바시주맴 시트레이트 포스페이트, pH 5.8), 조건 3(베바시주맴 시트레이트 포스페이트, pH 6.0), 조건 4(베바시주맴 아세테이트, pH 5.6), 및 조건 5(베바시주맴 아세테이트, pH 5.8)에서 베바시주맴 응집체의 백분율을 보여준다.

[도 2d]는 30°C에서 보관될 때 조건 1(베바시주맴(아바스틴®) 매치), 조건 2(베바시주맴 시트레이트 포스페이트, pH 5.8), 조건 3(베바시주맴 시트레이트 포스페이트, pH 6.0), 조건 4(베바시주맴 아세테이트, pH 5.6), 및 조건 5(베바시주맴 아세테이트, pH 5.8)에서 베바시주맴 공유결합 이량체의 백분율을 보여준다.

[도 2e]는 37°C에서 보관될 때 조건 1(베바시주맴(아바스틴®) 매치), 조건 2(베바시주맴 시트레이트 포스페이트, pH 5.8), 조건 3(베바시주맴 시트레이트 포스페이트, pH 6.0), 조건 4(베바시주맴 아세테이트, pH 5.6), 및 조건 5(베바시주맴 아세테이트, pH 5.8)에서 베바시주맴 응집체의 백분율을 보여준다.

[도 2f]는 37°C에서 보관될 때 조건 1(베바시주맴(아바스틴®) 매치), 조건 2(베바시주맴 시트레이트 포스페이트, pH 5.8), 조건 3(베바시주맴 시트레이트 포스페이트, pH 6.0), 조건 4(베바시주맴 아세테이트, pH 5.6), 및

조건 5(베바시주맵 아세테이트, pH 5.8)에서 베바시주맵 공유결합 이량체의 백분율을 보여준다.

[도 2g]는 진탕 스트레스를 받을 때 조건 1(베바시주맵(아바스틴®) 매치), 조건 2(베바시주맵 시트레이트 포스페이트, pH 5.8), 조건 3(베바시주맵 시트레이트 포스페이트, pH 6.0), 조건 4(베바시주맵 아세테이트, pH 5.6), 및 조건 5(베바시주맵 아세테이트, pH 5.8)에서 베바시주맵 응집체의 백분율을 보여준다.

[도 2h]는 진탕 스트레스를 받을 때 조건 1(베바시주맵(아바스틴®) 매치), 조건 2(베바시주맵 시트레이트 포스페이트, pH 5.8), 조건 3(베바시주맵 시트레이트 포스페이트, pH 6.0), 조건 4(베바시주맵 아세테이트, pH 5.6), 및 조건 5(베바시주맵 아세테이트, pH 5.8)에서 베바시주맵 공유결합 이량체의 백분율을 보여준다.

[도 2i]는 동결/해동 스트레스를 받을 때 조건 1(베바시주맵(아바스틴®) 매치), 조건 2(베바시주맵 시트레이트 포스페이트, pH 5.8), 조건 3(베바시주맵 시트레이트 포스페이트, pH 6.0), 조건 4(베바시주맵 아세테이트, pH 5.6), 및 조건 5(베바시주맵 아세테이트, pH 5.8)에서 베바시주맵 응집체의 백분율을 보여준다.

[도 2j]는 동결/해동 스트레스를 받을 때 조건 1(베바시주맵(아바스틴®) 매치), 조건 2(베바시주맵 시트레이트 포스페이트, pH 5.8), 조건 3(베바시주맵 시트레이트 포스페이트, pH 6.0), 조건 4(베바시주맵 아세테이트, pH 5.6), 및 조건 5(베바시주맵 아세테이트, pH 5.8)에서 베바시주맵 공유결합 이량체의 백분율을 보여준다.

[도 3]은 농도 변화에 따른 베바시주맵의 유체역학적 크기를 보여준다.

[도 4]는 가속화된 안정성 T = 0 고유 형광 방출 스캔 트립토판 플롯을 보여준다.

[도 5]는 안정한 항체 조성물 ONS-5010의 제조 공정의 흐름도를 보여준다. 한외여과 및 정용여과(UF/DF: Ultrafiltration/Diafiltration) 공정은 안정한 항체 조성물을 제조하는 마지막에서 두 번째 단계이다.

[도 6a]는 첫 번째 실험의 UF/DF 공정에서 중간체 물질의 단백질 농도 및 % HMWS를 보여준다. 각 막대 쌍의 좌측 막대는 단백질 농도를 나타낸다. 각 막대 쌍의 우측 막대는 % HMWS를 나타낸다.

[도 6b]는 두 번째 실험의 UF/DF 공정에서 중간체 물질의 단백질 농도 및 % HMWS를 보여준다. 각 막대 쌍의 좌측 막대는 단백질 농도를 나타낸다. 각 막대 쌍의 우측 막대는 % HMWS를 나타낸다.

[도 6c]는 세 번째 실험에서 UF/DF 공정에서 중간체 물질의 단백질 농도 및 % HMWS를 보여준다. 각 막대 쌍의 좌측 막대는 단백질 농도를 나타낸다. 각 막대 쌍의 우측 막대는 % HMWS를 나타낸다.

[도 7]은 크기 배제 HPLC(SE-HPLC: size exclusion-HPLC)에 의해 측정된 바와 같이, 안정한 항체 조성물의 최종 pH 6.1로의 적정, 및 최종 0.2 $\mu$ m 여과 후와 관련된 % HMWS 변화를 보여준다.

[도 8]은 5.8 g/L 제1 인산나트륨 일수화물, 1.2 g/L 제2 인산나트륨, 무수물, 60.0 g/L  $\alpha$ ,  $\alpha'$ -트레할로스, 0.04% 폴리소르베이트 20의 조성물까지로 물 중 6%(w/v)  $\alpha$ ,  $\alpha'$ -트레할로스에서 정용여과에 이어 0.5M 인산나트륨 용액과 10% 폴리소르베이트 20 용액의 첨가와 관련된 % HMWS의 변화를 나타낸다.

[도 9]는 % HMWS에 대한 벌크 원료 의약품(BDS: bulk drug substance)의 pH 영향을 보여준다. 각 막대 세트의 좌측 막대는 HEPES를 나타낸다. 각 막대 세트의 중앙 막대는 포스페이트를 나타낸다. 각 막대의 우측 막대는 히드록시드를 나타낸다.

[도 10]은 % HMWS에 대한 ONS-5010 잔류액의 농도 변화의 영향을 보여준다. 중간 막대 세트의 네 번째 막대(가장 오른쪽)(28 g/L)는 저장 용액이 아닌 고체 제1 및 제2 인산나트륨으로 포스페이트 조정을 수행한 분취액을 나타낸다.

[도 11]은 ONS-5010을 제조하기 위한 UF/DF 공정의 흐름도를 보여준다.

[도 12]는 5가지 공급 유속에 대한 초기 투과 플럭스 대 잔류액 압력 곡선을 보여준다. 그래프의 선은 위에서 아래로 500 LMH, 400 LMH, 300 LMH, 200 LMH, 및 100 LMH를 나타낸다.

[도 13]은 출발 완충액(25 mM 아세트산나트륨, 237 mM 염화나트륨, pH 5.0)에서 5가지 공급 유속에 대한 농축된 플럭스 대 잔류액 압력 곡선을 보여준다. 그래프의 선은 위에서 아래로 500 LMH, 400 LMH, 300 LMH, 200 LMH, 및 100 LMH를 나타낸다.

[도 14]는 최종 완충액에서 5가지 공급 유속에 대한 농축된 플럭스 대 잔류액 압력 곡선을 보여준다. 그래프의 선은 위에서 아래로 500 LMH, 400 LMH, 300 LMH, 200 LMH, 및 100 LMH를 나타낸다.

[도 15]는 정용여과 최적화에 대한 안정한 항체 조성물의 농도의 영향을 보여준다. 그래프의 선은 위에서 아래

로 최종 완충액(51 mM 인산나트륨, 0.04% 폴리소르베이트, pH 6.1) 및 출발 완충액(25 mM 아세트산나트륨, 237 mM 염화나트륨, pH 5.0)을 나타낸다.

[도 16]은 ONS-5010, 미국 라이선스 아바스틴, E.U. 라이선스 아바스틴의 농도-시간 프로파일을 평균으로 보여 준다. 시간 0에서 수직선은 투약을 나타낸다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0027] 본 발명은 베바시주맙의 보관을 위한 완충 제제를 특징으로 한다. 베바시주맙은 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄, 또는 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 완충 제제에서, 베바시주맙은 약 10 mg 내지 약 50 mg, 또는 더 바람직하게는 약 15 mg/ml 내지 약 35 mg/ml, 또는 더 바람직하게는 약 24 mg/ml 내지 약 27 mg/ml, 또는 더 바람직하게는 약 25 mg/ml 또는 약 25.5 mg/ml의 농도로 존재할 수 있다. 제제는 수성이고, 완충액은 시트레이트 포스페이트 또는 아세트산나트륨을 포함할 수 있고, 제제는 또한 폴리소르베이트 20과 같은 순한 계면 활성제뿐만 아니라 트레할로스 또는 수크로오스와 같은 당을 포함하는 안정제를 포함할 수 있다. 제제는 바람직하게는 약 5.6 내지 약 6.1의 산성 pH를 가지며, 일부 측면에서, pH는 약 5.6, 또는 약 5.8, 또는 약 6이다.
- [0028] 일부 측면에서, 제제는 약 10 mM 내지 약 100 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함하는 완충액, 약 100 mM 내지 약 200 mM의 트레할로스, 및 약 0.01%(v/v) 내지 약 0.1%(v/v)의 폴리소르베이트 20을 포함하며, 약 5.7 내지 약 6.1의 pH를 갖는다. 시트레이트 포스페이트는 약 30 mM 내지 약 70 mM, 약 40 mM 내지 약 60 mM, 약 48 mM 내지 약 52 mM, 약 49 mM 내지 약 51 mM, 또는 약 50 mM 내지 약 51 mM의 농도 범위일 수 있거나, 약 50 mM 또는 약 51 mM의 농도일 수 있다. 트레할로스는 약 120 mM 내지 약 180 mM, 약 150 mM 내지 약 170 mM, 약 157 mM 내지 약 161 mM, 약 140 mM 내지 약 180 mM, 또는 약 158 mM 내지 약 160 mM의 농도 범위일 수 있거나, 약 159 mM 또는 약 160 mM의 농도일 수 있다. 폴리소르베이트는 약 0.02%(v/v) 내지 약 0.06%(v/v), 또는 약 0.03%(v/v) 내지 약 0.05%(v/v)의 농도 범위일 수 있거나, 약 0.04%(v/v)의 농도일 수 있다. 제제 pH는 약 5.8 일 수 있거나 약 6일 수 있다.
- [0029] 일부 측면에서, 제제는 약 5 mM 내지 약 25 mM의 아세트산나트륨 삼수화물을 포함하는 완충액, 약 150 mM 내지 약 201 mM의 수크로오스, 및 약 0.03%(v/v) 내지 약 0.05%(v/v)의 폴리소르베이트 20을 포함하며, 약 5.5 내지 약 5.9의 pH를 갖는다. 아세트산나트륨 삼수화물은 약 11 mM 내지 약 19 mM, 약 13 mM 내지 약 17 mM, 또는 약 13 mM 내지 약 16 mM의 농도 범위일 수 있거나, 약 15 mM의 농도일 수 있다. 수크로오스는 약 165 mM 내지 약 185 mM, 약 170 mM 내지 약 180 mM, 또는 약 174 mM 내지 약 176 mM의 농도 범위일 수 있거나, 약 175 mM의 농도일 수 있다.
- [0030] 본 개시 내용은 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체, 약 10 mM 내지 약 100 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함하는 완충액, 약 100 mM 내지 약 200 mM의 트레할로스, 및 약 0.01%(v/v) 내지 약 0.1%(v/v)의 폴리소르베이트 20을 포함하며, 약 5.7 내지 약 6.1의 pH를 갖는 완충 항체 제제를 제공한다. 바람직하게는, 항체 제제는 5°C에서 냉장 조건하에 보관될 때 적어도 18개월 동안 안정하다.
- [0031] 본 개시 내용은 또한 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 약 15 mg/ml 내지 약 35 mg/ml의 항체, 약 40 mM 내지 약 60 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함하는 완충액, 약 140 mM 내지 약 180 mM의 트레할로스, 및 약 0.02%(v/v) 내지 약 0.06%(v/v)의 폴리소르베이트 20을 포함하며, 약 5.7 내지 약 6.1의 pH를 갖는 완충 항체 제제를 제공한다. 바람직하게는, 항체 제제는 5°C에서 냉장 조건하에 보관될 때 적어도 18개월 동안 안정하다.
- [0032] 본 개시 내용은 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 약 24 mg/ml 내지 약 27 mg/ml의 항체, 약 48 mM 내지 약 52 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함하는 완충액, 약 157 mM 내지 약 161 mM의 트레할로스, 및 약 0.03%(v/v) 내지 약 0.05%(v/v)의 폴리소르베이트 20을 포함하며, 약 5.8 내지 약 6.0의 pH를 갖는 완충 항체 제제를 제공한다. 바람직하게는, 항체 제제는 5°C에서 냉장 조건하에 보관될 때 적어도 18개월 동안 안정하다.
- [0033] 본 개시 내용은 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체, 약 50 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함하는 완충액, 약 159 mM의 트레할로스, 및 약 0.04%(v/v)의 폴리소르베이트 20을 포함하며, 약 5.8 또는 약 6의 pH를 갖는 완충 항체 제제를 제공한다. 바람

직하게는, 항체 제제는 5°C에서 냉장 조건하에 보관될 때 적어도 18개월 동안 안정하다.

- [0034] 본 개시 내용은 또한 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 약 20 mg/ml 내지 약 30 mg/ml의 항체, 약 5 mM 내지 약 25 mM의 아세트산나트륨을 포함하는 완충액, 약 150 mM 내지 약 201 mM의 수크로오스, 및 약 0.03%(v/v) 내지 약 0.05%(v/v) 폴리소르베이트 20을 포함하며, 약 5.6 내지 약 5.8의 pH를 갖는 완충 항체 제제를 제공한다. 바람직하게는, 항체 제제는 5°C에서 냉장 조건하에 보관될 때 적어도 18개월 동안 안정하다.
- [0035] 본 개시 내용은 또한 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 약 24 mg/ml 내지 약 26 mg/ml의 항체, 약 13 mM 내지 약 17 mM의 아세트산나트륨을 포함하는 완충액, 약 170 mM 내지 약 180 mM의 수크로오스, 및 약 0.03%(v/v) 내지 약 0.05%(v/v) 폴리소르베이트 20을 포함하며, 약 5.6 내지 약 5.8의 pH를 갖는 완충 항체 제제를 제공한다. 바람직하게는, 항체 제제는 5°C에서 냉장 조건하에 보관될 때 적어도 18개월 동안 안정하다.
- [0036] 본 개시 내용은 또한 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체, 약 15 mM의 아세트산나트륨을 포함하는 완충액, 약 175 mM의 수크로오스, 및 약 0.04%(v/v)의 폴리소르베이트 20을 포함하며, 약 5.6 또는 약 5.8의 pH를 갖는 완충 항체 제제를 제공한다. 바람직하게는, 항체 제제는 5°C에서 냉장 조건하에 보관될 때 적어도 18개월 동안 안정하다.
- [0037] 본 개시 내용은 또한 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체, 약 15 mM의 아세트산나트륨을 포함하는 완충액, 약 175 mM의 수크로오스, 및 약 0.04%(v/v)의 폴리소르베이트 20을 포함하며, 약 5.6 또는 약 5.8의 pH를 갖는 완충 항체 제제를 제공한다. 바람직하게는, 항체 제제는 5°C에서 냉장 조건하에 보관될 때 적어도 18개월 동안 안정하다.
- [0038] 본 개시 내용은 또한 본원에 개시된 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체를 포함하는 임의의 완충 항체 제제를 포함하는 키트를 제공한다. 키트는 항체 제제를 대상체에 주사하기 위한 디바이스를 추가로 포함할 수 있다. 장치는 시린지, 니들, 카테터, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 키트는 본원에 개시된 하나 이상의 암을 치료하기 위한 설명서를 추가로 포함할 수 있다.
- [0039] 본 개시 내용은 또한 암 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, 본원에 개시된 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체를 포함하는 임의의 완충 항체 제제를 상기 암을 치료하는 데 유효한 양으로 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0040] 본 개시 내용은 또한 암 치료용 의약의 제조에서 사용하기 위한 본원에 개시된 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체를 포함하는 임의의 완충 항체 제제를 제공한다.
- [0041] 임의의 항체 제제는 백금 저항성 재발성 상피 난소암, 나팔관 암, 또는 원발성 복막암 중 하나 이상을 치료하기 위한 방법에 사용될 수 있다. 일반적으로, 방법은 베바시주맙 항체를 포함하는 제제를 이를 필요로 하는 대상체에게 백금 저항성 재발성 상피 난소암, 나팔관 암, 또는 원발성 복막암 중 하나 이상을 치료하기에 유효량으로 투여하는 단계를 포함한다. 대상체는 바람직하게는 인간이고, 제제는 바람직하게는 정맥 내 주입 또는 주사를 통해 투여된다. 임의의 항체 제제는 백금 저항성 재발성 상피 난소암, 나팔관 암 또는 원발성 복막암, 지속성, 재발성 또는 전이성 자궁 경부암, 전이성 대장암, 전이성 HER2(인간 표피 성장 인자 수용체 2) 음성 유방암, 전이성 신세포 암종, 교모세포종 또는 비소세포 폐암 중 하나 이상과 같은 암 치료용 의약의 제조에 유사하게 사용될 수 있다.
- [0042] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 숙련자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 인용된 모든 특허 및 간행물은 그 전체가 모든 목적을 위해 참고로 포함된다.
- [0043] 일부 실시양태에서, 본 개시 내용은 안정한 항체 조성물을 생산하는 방법을 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, 방법은 출발 조성물, 예를 들어 약 4.7 내지 약 5.3의 pH를 갖는 출발 조성물을 환외여과하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 출발 조성물은 항체 및 출발 완충 조성물을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 출발 조성물은 4 mg/ml 내지 또는 약 4 mg/ml 내지 6 mg/ml의 항체, 예컨대 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 항

체를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 출발 조성물의 한외여과는 농축된 조성물을 생성한다. 일부 실시양태에서, 농축된 조성물은 중점을 포함하여 30 g/L 내지 또는 약 30 g/L 내지 40 g/L의 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 농축된 조성물의 pH는 4.0 내지 또는 약 4.0 내지 6.0, 예컨대 4.5 내지 또는 약 4.5 내지 5.5이다. 일부 실시양태에서, 농축된 조성물의 pH는 5.0이거나 약 5.0이다.

[0044] 일부 실시양태에서, 방법은 출발 완충 조성물을 물 중 6% 트레할로스(w/v)를 포함하는 교환 용액으로 교환(예를 들어, 정용여과)하여 트레할로스 조성물을 생성하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 트레할로스 조성물은 중점을 포함하여 20 g/L 내지 또는 약 20 g/L 내지 50 g/L, 30 내지 또는 약 30 내지 40 g/L 또는 약 35 g/L의 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 트레할로스 조성물은 중점을 포함하여 약 30g/L 내지 약 40g/L의 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 트레할로스 조성물의 pH는 4.0 내지 또는 약 4.0 내지 6.0, 예컨대 4.5 내지 또는 약 4.5 내지 5.5이다. 일부 실시양태에서, 트레할로스 조성물의 pH는 5.0이거나 약 5.0이다.

[0045] 일부 실시양태에서, 방법은 트레할로스 조성물을 포스페이트 조성물과 접촉시켜 pH 조정된 조성물을 생성하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 포스페이트 조성물은 400 내지 또는 약 400 내지 600 mM 인산나트륨, 예컨대 450 내지 또는 약 450 내지 550 mM 인산나트륨을 포함한다. 일부 실시양태에서, 포스페이트 조성물은 약 500 mM 인산나트륨을 포함한다. 일부 실시양태에서, pH 조정된 조성물 중 인산나트륨의 최종 농도는 40 내지 또는 약 40 내지 60 mM, 예컨대 45 내지 또는 약 45 내지 55 mM이다. 일부 실시양태에서, pH 조정된 조성물 중 인산나트륨의 최종 농도는 약 50 mM이다. 일부 실시양태에서, pH 조정된 조성물의 pH는 중점을 포함하여 5.0 내지 또는 약 5.0 내지 7.0, 예컨대 5.9 내지 또는 약 5.9 내지 6.3이다. 일부 실시양태에서, pH 조정된 조성물의 pH는 약 6.1이다.

[0046] 일부 실시양태에서, 방법은 대상체에게 전달하기 위해 pH 조정된 조성물을 제제화하여 안정한 항체 조성물을 생성하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 안정한 항체 조성물은  $\leq 15\%$  고분자량 종(HMWS: high molecular weight species), 예컨대  $\leq 10\%$ ,  $\leq 7.5\%$ ,  $\leq 6\%$ ,  $\leq 5\%$ ,  $\leq 4\%$ ,  $\leq 3\%$ ,  $\leq 2.5\%$ ,  $\leq 2\%$ ,  $\leq 1.5\%$ , 또는  $\leq 1\%$  HMWS를 포함한다. 일부 실시양태에서, 안정한 항체 조성물은  $\leq 6\%$  HMWS를 포함한다.

[0047] 일부 실시양태에서, 안정한 항체 조성물은 ONS-5010으로 지칭될 수 있다.

[0048] 일부 실시양태에서, 출발 조성물은 4.0 내지 또는 약 4.0 내지 6.0, 예컨대 4.5 내지 또는 약 4.5 내지 5.5, 또는 약 4.7 내지 5.3의 pH를 갖는다. 일부 실시양태에서, 출발 조성물은 약 5.0의 pH를 갖는다.

[0049] 일부 실시양태에서, 출발 완충 조성물은 10 내지 또는 약 10 내지 40 mM 아세트산나트륨, 예컨대 15 내지 또는 약 15 내지 35 mM 아세트산나트륨, 또는 20 내지 또는 약 20 내지 30 mM 아세트산나트륨을 포함한다. 일부 실시양태에서, 출발 완충 조성물은 약 25 mM 아세트산나트륨을 포함한다. 일부 실시양태에서, 출발 완충액은 200 내지 또는 약 200 내지 300 mM NaCl, 예컨대 225 내지 또는 약 225 내지 240 mM NaCl을 포함한다. 일부 실시양태에서, 출발 완충 조성물은 약 237 mM NaCl을 포함한다. 일부 실시양태에서, 출발 완충 조성물의 pH는 4.0 내지 또는 약 4.0 내지 6.0, 예컨대 4.0 내지 또는 약 4.5 내지 5.5이다. 일부 실시양태에서, 출발 완충 조성물의 pH는 약 5.0이다.

[0050] 일부 실시양태에서, 한외여과는 30 kDa 막의 사용을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 막은 폴리에테르설폰 막이다. 일부 실시양태에서, 막은  $\leq 11000 \text{ g/m}^2$ ,  $\leq 750 \text{ g/m}^2$ ,  $\leq 500 \text{ g/m}^2$ , 또는  $\leq 250 \text{ g/m}^2$ 의 부하를 견딘다. 일부 실시양태에서, 막은  $\leq$  약  $500 \text{ g/m}^2$  내지  $\leq$  약  $100 \text{ g/m}^2$ 의 부하를 견딘다. 일부 실시양태에서, 막은  $\leq$  약  $300 \text{ g/m}^2$ 의 부하를 견딘다. 일부 실시양태에서, 한외여과는  $\leq$  약 450 LMH의 공급 유속을 갖는다. 일부 실시양태에서, 한외여과는 약 375 LMH의 공급 유속을 갖는다. 일부 실시양태에서, 한외여과는  $\leq$  약 25 psi의 잔류액 압력을 갖는다. 일부 실시양태에서, 한외여과는 5 psi 또는 약 5 psi의 잔류액 압력을 갖는다. 일부 실시양태에서, 한외여과는  $\leq$  약 20 psi의 막간 차압(TMP: transmembrane pressure)을 갖는다. 일부 실시양태에서, 한외여과는 약 15 psi의 막간 차압(TMP)을 갖는다.

[0051] 일부 실시양태에서, 농축된 조성물은 20 내지 또는 약 20 내지 50 mg/ml, 예컨대 25 내지 또는 약 25 내지 45 mg/ml, 또는 30 내지 또는 약 30 내지 40 mg/ml의 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 농축된 조성물은 35 mg/ml의 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 농축된 조성물의 pH는 4.0 내지 또는 약 4.0 내지 6.0, 예컨대 4.5 내지 또는 약 4.5 내지 5.5이다. 일부 실시양태에서, 농축된 조성물의 pH는 5.0이거나 약 5.0이다.

[0052] 본 개시 내용은 안정한 항체 조성물을 생성하는 방법으로서, 출발 완충 조성물을 물 중 6% 트레할로스(w/v)를

포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 교환 용액으로 교환하여 트레할로스 조성물을 생성하는 단계를 포함하는 방법을 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, 트레할로스 조성물은 중점을 포함하여 약 30g/L 내지 약 40g/L의 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 트레할로스 조성물의 pH는 4.0 내지 또는 약 4.0 내지 6.0, 예컨대 4.5 내지 또는 약 4.5 내지 5.5이다. 일부 실시양태에서, 트레할로스 조성물의 pH는 약 5.0이다.

[0053] 일부 실시양태에서, 교환 용액은 물 중 6%(w/v)  $\alpha$ ,  $\alpha'$ -트레할로스를 포함한다. 일부 실시양태에서, 교환 조성물의 pH는 4.0 내지 또는 약 4.0 내지 6.0, 예컨대 4.5 내지 또는 약 4.5 내지 5.5이다. 일부 실시양태에서, 교환 조성물의 pH는 약 5.0이다. 일부 실시양태에서, 트레할로스 조성물은 20 내지 또는 약 20 내지 50 g/L, 예컨대 25 내지 또는 약 25 내지 45 g/L, 또는 30 내지 또는 약 30 내지 40 g/L의 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 트레할로스 조성물은 약 35 g/L의 항체를 포함한다.

[0054] 본 개시 내용의 방법은 트레할로스 조성물의 농축 및 탈분극을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 탈분극은  $\leq 30$  psig의 압력에서 트레할로스 조성물을 재순환시키는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 재순환은  $\leq 60$ 분 동안 수행된다. 일부 실시양태에서, 재순환은 약 10분 동안 수행된다. 일부 실시양태에서, 농축은 플러그 흐름 추적을 사용하는 단계를 포함한다. 농축이 플러그 흐름 추적을 사용하는 단계를 포함하는 일부 이러한 실시양태에서, 트레할로스 조성물은 중점을 포함하여 27.5 g/L 내지 32.5 g/L의 항체를 포함한다.

[0055] 본 개시 내용의 방법은 트레할로스 조성물을 포스페이트 조성물과 접촉시켜 pH 조정된 조성물을 생성하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 포스페이트 조성물은 약 500 mM 인산나트륨을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 실시양태에서, pH 조정된 조성물 중 인산나트륨의 최종 농도는 약 50 mM이다. 일부 실시양태에서 pH 조정된 조성물의 pH는 중점을 포함하여 5.0 내지 또는 약 5.0 내지 7.0, 예컨대 5.9 내지 또는 약 5.9 내지 6.3이다. 일부 실시양태에서, pH 조정된 조성물의 pH는 약 6.1이다.

[0056] 일부 실시양태에서, 포스페이트 조성물은 450 내지 또는 약 450 내지 550 mM 인산나트륨, 500 내지 또는 약 500 내지 520 mM 인산나트륨, 또는 약 510 mM 인산나트륨을 포함한다. 일부 실시양태에서, pH 조정된 조성물 중 인산나트륨의 최종 농도는 45 내지 또는 약 45 내지 55 mM, 예컨대 약 51 mM이다. 일부 실시양태에서, 포스페이트 조성물은 제1 인산나트륨을 포함한다. 일부 실시양태에서, 포스페이트 조성물은 제2 인산나트륨을 포함한다. 일부 실시양태에서, 포스페이트 조성물은 제1 인산나트륨 및 제2 인산나트륨 둘 모두를 포함한다. 일부 실시양태에서, 포스페이트 조성물은 제2 인산나트륨 무수물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 포스페이트 조성물은 제1 인산나트륨 일수화물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 포스페이트 조성물은 제1 인산나트륨 이수화물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 포스페이트 조성물은 트레할로스를 포함한다. 일부 실시양태에서, 포스페이트 조성물은  $\alpha$ ,  $\alpha'$ -트레할로스를 포함한다. 일부 실시양태에서, 포스페이트 조성물은 10 내지 또는 약 10 내지 15 g/L의 제2 인산나트륨 무수물, 예컨대 약 12 g/L의 제2 인산나트륨 무수물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 포스페이트 조성물은 50 내지 또는 약 50 내지 75 g/L의 제1 인산나트륨 일수화물, 예컨대 약 58 g/L 제1 인산나트륨 일수화물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 포스페이트 조성물은 50 내지 또는 약 50 내지 70 g/L 또는 55 내지 또는 약 55 내지 65 g/L  $\alpha$ ,  $\alpha'$ -트레할로스, 예컨대 약 60 g/L  $\alpha$ ,  $\alpha'$ -트레할로스를 포함한다. 일부 실시양태에서, 포스페이트 조성물은 5.0 내지 또는 약 5.0 내지 7.0, 예컨대 5.5 내지 또는 약 5.5 내지 6.0의 pH를 갖는다. 일부 실시양태에서, 포스페이트 조성물은 5.74의 pH를 갖는다.

[0057] 일부 실시양태에서, 접촉 단계는 중점을 포함하여 1초 내지 3600초, 예컨대 100 내지 또는 약 1000 내지 3000초, 1500 내지 또는 약 1500 내지 2500초, 또는 약 1800초의 지속 시간을 갖는다.

[0058] 본 개시 내용의 방법은 대상체에게 전달하기 위한 pH 조정된 조성물을 제제화하여 안정한 항체 조성물을 생성하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 안정한 항체 조성물은  $\leq 15\%$  고분자량 중(HMWS), 예컨대  $\leq 10\%$ ,  $\leq 7.5\%$ ,  $\leq 6\%$ ,  $\leq 5\%$ ,  $\leq 4\%$ ,  $\leq 3\%$ ,  $\leq 2.5\%$ ,  $\leq 2\%$ ,  $\leq 1.5\%$ , 또는  $\leq 1\%$  HMWS를 포함한다. 일부 실시양태에서, 안정한 항체 조성물은  $\leq 6\%$  고분자량 중(HMWS)을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다.

[0059] 일부 실시양태에서, 제제화 단계는 pH 조정된 조성물을 폴리소르베이트 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리소르베이트 조성물은 약 20%, 약 15%, 약 10%, 약 5% 또는 약 1%(m/v) 폴리소르베이트 20을 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리소르베이트 조성물은 약 10%(m/v) 폴리소르베이트 20을 포함한다.

[0060] 일부 실시양태에서, 안정한 항체 조성물은 중점을 포함하여 5.9 내지 6.3의 pH를 갖는다. 일부 실시양태에서, 안정한 항체 조성물은 6.1의 pH를 갖는다. 일부 실시양태에서, 안정한 항체 조성물은 중점을 포함하여 15 내지

또는 약 15 내지 35 mg/ml, 예컨대 20 내지 또는 약 20 내지 30 mg/ml의 항체의 최종 농도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 안정한 항체 조성물은 중점을 포함하여 22.5 mg/ml 내지 27.5 mg/ml의 항체의 최종 농도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 안정한 항체 조성물은 0.01% 내지 또는 약 0.01% 내지 0.1%(m/v) 폴리소르베이트 20, 예컨대 0.02% 내지 또는 약 0.02% 내지 0.06%(m/v) 폴리소르베이트 20의 최종 농도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 안정한 항체 조성물은 0.04% (m/v) 폴리소르베이트 20의 최종 농도를 갖는다.

[0061] 일부 실시양태에서, 안정한 항체 조성물은 중점을 포함하여 2 내지 또는 약 2 내지 6 mS/cm, 예컨대 3 내지 또는 약 3 내지 5 mS/cm의 전도도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 안정한 항체 조성물은 중점을 포함하여 약 3.5 내지 약 4.5 mS/cm의 전도도를 갖는다.

[0062] 일부 실시양태에서, 제제화 단계 후 안정한 항체 조성물에서 항체의 예상 수율은  $\geq 80\%$ ,  $\geq 85\%$ , 또는  $\geq 90\%$ 이다. 일부 실시양태에서, 제제화 단계 후 안정한 항체 조성물에서 항체의 예상 수율은  $\geq 95\%$ 이다.

[0063] 일부 실시양태에서, 안정한 항체 조성물은 제제화 단계 완료 24개월 후  $\leq 15\%$ ,  $\leq 12\%$ ,  $\leq 10\%$ ,  $\leq 8\%$ ,  $\leq 7\%$ ,  $\leq 6\%$ , 또는  $\leq 5\%$  HMWS를 포함한다. 일부 실시양태에서, 안정한 항체 조성물은 제제화 단계 완료 24개월 후  $\leq 8\%$  HMWS를 포함한다. 일부 실시양태에서, 안정한 항체 조성물은 제제화 단계 완료 후 매달 중점을 포함하여 0.1% 내지 또는 약 0.1% 내지 1%, 0.2% 내지 또는 0.2% 내지 0.6%, 또는 0.3% 내지 또는 0.3% 내지 0.4%의 HMWS가 축적된다. 일부 실시양태에서, 안정한 항체 조성물은 제제화 단계 완료 후 매달 중점을 포함하여 0.25% 내지 0.50% HMWS가 축적된다.

[0064] 일부 실시양태에서, 안정한 항체 조성물은 중점을 포함하여  $\leq 5$ , 4, 3, 2.5, 2, 1.5, 1 또는 0.5%의 서열 번호 1의 아미노산 서열의 메티오닌 잔기의 산화를 포함한다. 일부 실시양태에서, 안정한 항체 조성물은 중점을 포함하여  $\leq 2.5\%$ 의 서열 번호 1의 아미노산 서열의 메티오닌 잔기의 산화를 포함한다. 일부 실시양태에서, 안정한 항체 조성물은 중점을 포함하여  $\leq 5$ , 4, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 또는 0.5%의 서열 번호 2의 아미노산 서열의 아미노산 서열의 메티오닌 잔기의 산화를 포함한다. 일부 실시양태에서, 안정한 항체 조성물은 중점을 포함하여  $\leq 2.5\%$ 의 서열 번호 2의 아미노산 서열의 아미노산 서열의 메티오닌 잔기의 산화를 포함한다. 특정 실시양태에서, 서열 번호 1의 아미노산 서열의 메티오닌 잔기의 산화는 서열 번호 1의 위치 258에서 메티오닌의 산화를 포함한다.

[0065] 일부 실시양태에서, 안정한 항체 조성물은 제제화 완료 후 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100일 이상 내에  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 에서 보관된다. 일부 실시양태에서, 안정한 항체 조성물은 제제화 단계 완료 후 60일 이내에  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 에서 보관된다. 일부 실시양태에서, 안정한 항체 조성물은 안정한 항체 조성물의 제조일 후 60일 이내에  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 에서 보관된다.

[0066] 안정한 항체 조성물은 암 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 치료는 안정한 항체 조성물을 대상체에게 상기 암을 치료하는 데 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 암은 백금 저항성 재발성 상피 난소암, 나팔관 암, 원발성 복막암, 지속성 자궁 경부암, 재발성 자궁 경부암, 전이성 자궁 경부암, 전이성 대장암, 전이성 HER2 음성 유방암, 전이성 신세포 암종, 교모세포종, 또는 비소세포 폐암일 수 있다.

[0067] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 개시 내용이 속하는 기술 분야에서 통상의 숙련자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 명세서에서, 단수형은 문맥상 달리 명시되지 않는 한 복수형도 포함한다. 본원에 기술된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 재료가 본 개시 내용의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 재료가 아래에 기술된다. 본원에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허, 및 기타 참고 문헌은 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 포함된다. 본원에 인용된 참고 문헌은 청구된 개시 내용에 대한 선행 기술로 인정되지 않는다. 상충되는 경우 정의를 포함한 본 명세서가 우선한다. 또한, 재료, 방법 및 실시예는 예시일 뿐이며 제한하려는 의도가 아니다. 본 개시 내용의 다른 특징 및 이점은 다음의 상세한 설명 및 청구 범위로부터 명백해질 것이다.

[0068] 본 개시 내용 전반에 걸쳐, 청구된 주제의 다양한 측면이 범위 형식으로 제시된다. 범위 형식의 설명은 단지 편의성과 간결성을 위한 것이며 청구된 주제의 범위에 대한 융통성 없는 제한으로 해석되어서는 안 된다는 것을 이해해야 한다. 따라서 범위에 대한 설명은 가능한 모든 하위 범위와 해당 범위 내의 개별 수치를 구체적으로 개시한 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어, 값의 범위가 제공되는 경우, 그 범위의 상한과 하한 사이의 각 중간 값과 그 명시된 범위의 임의의 다른 언급된 또는 사이의 값은 청구된 주제 내에 포함되는 것으로 이해된다. 이러한 더 작은 범위의 상한 및 하한은 독립적으로 더 작은 범위에 포함될 수 있으며, 또한 언급된 범위에서 특

별히 제외된 한계 값에 따라 청구된 주제 내에 포함된다. 언급된 범위에서 한계 값 중 하나 또는 둘 모두가 포함되는 경우 포함된 한계 값 중 하나 또는 둘 다를 제외한 범위도 청구 대상에 포함된다. 이것은 범위의 폭에 관계없이 적용된다.

- [0069] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "약"은 이 기술 분야의 숙련자에게 쉽게 알려진 각각의 값에 대한 일반적인 오류 범위를 의미한다. 본원에서 값 또는 파라미터에 대한 "약"에 대한 언급은 그 값 또는 파라미터 그 자체에 관한 실시양태를 포함(및 설명)한다. 예를 들어, "약 X"를 언급하는 설명에는 "X"에 대한 설명이 포함된다.
- [0070] 본 발명의 측면과 관련된 다양한 용어는 명세서 및 청구 범위 전체에 걸쳐 사용된다. 그러한 용어는 달리 지시되지 않는 한 당해 분야에서 일반적인 의미를 부여받는다. 기타 구체적으로 정의된 용어는 본원에 제공된 정의와 일치하는 방식으로 해석되어야 한다.
- [0071] 본원에 사용되는 바와 같이, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 달리 명시적으로 언급되지 않는 한 복수의 지시 대상을 포함한다.
- [0072] 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "포함하는(comprising)", "갖는" 및 "포함하는(including)"은 더 제한적인 용어 "~로 본질적으로 이루어지는" 및 "로 이루어지는"을 포함한다.
- [0073] 용어 대상체 및 환자는 상호 교환적으로 사용되며, 임의의 동물을 포함한다. 대상체에는 반려 동물 및 농장 포유동물을 포함한 포유동물뿐만 아니라 마우스, 토끼, 랫트를 포함한 설치류, 및 기타 설치류가 포함된다. 비인간 영장류는 선호되는 대상체이다. 인간은 매우 바람직한 대상체이다.
- [0074] 용어 조성물 및 제제는 상호 교환적으로 사용된다. 따라서, 본 개시 내용의 제제는 본 개시 내용의 조성물일 수 있고 본 개시 내용의 조성물은 본 개시 내용의 제제일 수 있다.
- [0075] 본 발명에 따르면, 혈관 내피 성장 인자에 특이적으로 결합하는 베바시주맙 바이오시밀러 항체의 제제는 현재 환자용으로 승인된 베바시주맙(상품명 아바스틴®으로 판매) 제제보다 훨씬 더 항체의 열 및 콜로이드 안정성을 향상시키는 완충액을 이용하여, 트레할로스 또는 수크로오스와 함께 시트레이트 포스페이트로 완충되거나, 수크로오스와 함께 아세테이트(시트레이트 포스페이트 대신)로 완충될 수 있음이 관찰되었다. 특히, 본 발명의 제제는 상당히 낮은 항체 응집을 보였다. 완충액은 항체 분자의 보관 수명을 향상시킨다. 따라서, 본 개시 내용은 산성 pH에서 시트레이트 포스페이트를 포함하는 완충액뿐만 아니라 트레할로스 또는 수크로오스를 포함하는 수성 담체, 또는 대안으로 산성 pH에서 아세테이트를 포함하는 완충액뿐만 아니라 수크로오스를 포함하는 수성 담체를 포함하는 베바시주맙 바이오시밀러 항체의 완충 제제를 특징으로 한다.
- [0076] 항체는 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 상의 에피토프에 특이적으로 결합하고, 에피토프는 선형 또는 입체구조적일 수 있다. 일부 측면에서, 항체는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 또는 이와 적어도 또는 약 80, 85, 90, 95, 또는 99% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 바람직한 측면에서, 항체는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함한다. 일부 바람직한 측면에서, 항체는 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 바람직하게는, 항체는 중쇄 불변 도메인 및/또는 경쇄 불변 도메인을 포함한다. 매우 바람직한 측면에서, 항체는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 측면에서, 항체는 서열 번호 3의 아미노산 서열의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 4의 아미노산 서열의 경쇄 가변 영역을 포함한다.

<b>베바시주맙 중쇄 IgG1 (서열 번호 1)</b>					
EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYTFT	NYGMNWRQA	PGKGLEWVGW	INTYTGEPTY
AADFRRRFTF	SLDTSKSTAY	LQMNSLRAED	TAVYYCAKYP	HYYGSSHWYF	DVWGQGTTLVT
VSSASTKGPS	VFPLAPSSKS	TSGGTAALGC	LVKDYFPEPV	TVSWNSGALT	SGVHTFPAVL
QSSGLYSLS	VVTVPSSSLG	TQTYICNVNH	KPSNTKVDK	VEPKSCDKTH	TCPPCPAPEL
LGGPSVFLFP	PKPKDTLMIS	RTPEVTCVVV	DVSHEDPEVK	FNWYVDGVEV	HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS	VLTVLHQDWL	NGKEYKCKVS	NKALPAPIEK	TISKAKGQPR	EPQVYTLPPS
REEMTKNQVS	LTCLVKGFP	SDIAVEWESN	GQPENNYKTT	PPVLDSGDSF	FLYSKLTVDK
SRWQQGNVFS	CSVMHEALHN	HYTQKSLSL	PGK		
<b>베바시주맙 경쇄 (서열 번호 2)</b>					
DIQMTQSPSS	LSASVGRVT	ITCSASQDIS	NYLNWYQQK	GKAPKVLIIYF	TSSLHSGVPS
RFGSGSGTD	FTLTISLQP	EDFATYYCQQ	YSTVPWTFGQ	GTKVEIKRTV	AAPSVFIFPP
SDEQLKSGTA	SVVCLLNNFY	PREAKVQWKV	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYSLSSSTLT
LSKADYEKHK	VYACEVTHQG	LSSPVTKSFN	RGEC		
<b>베바시주맙 중쇄 가변 영역 (서열 번호 3)</b>					
EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYTFT	NYGMNWRQA	PGKGLEWVGW	INTYTGEPTY
AADFRRRFTF	SLDTSKSTAY	LQMNSLRAED	TAVYYCAKYP	HYYGSSHWYF	DVWGQGTTLVT
VSS					
<b>베바시주맙 경쇄 가변 영역 (서열 번호 4)</b>					
DIQMTQSPSS	LSASVGRVT	ITCSASQDIS	NYLNWYQQK	GKAPKVLIIYF	TSSLHSGVPS
RFGSGSGTD	FTLTISLQP	EDFATYYCQQ	YSTVPWTFGQ	GTKVEIKR	

[0077]

[0078]

일부 실시양태에서, 항체는 가변 및 불변 영역을 모두 포함하는 전장 항체이지만, 일부 측면에서 항체는 항원 결합 특이성을 보유하고, 또한 바람직하게는 전장 항체 분자의 대부분 또는 모든 친화성을 보유한 전장 항체의 유도체 또는 단편 또는 일부를 포함할 수 있다. 항체는 항체 활성 또는 안정성에 영향을 미칠 수 있는 번역 후 변형(PTM: post-translational modification) 또는 모이어티를 포함할 수 있다. 항체는 메틸화, 아세틸화, 글리코실화, 황산화, 인산화, 카르복실화, 및/또는 아미드화될 수 있으며, 당 업계에 잘 알려진 다른 모이어티를 포함할 수 있다.

[0079]

제제는 바람직하게는 치료 유효량의 항체를 포함한다. 치료 유효량은 항체 투여시 치료되는 질환 또는 병태에 따라 그리고/또는 항체가 투여되는 대상체의 특성, 예를 들어 연령, 성별, 키, 체중, 질환 또는 병태의 진행 상태 또는 단계, 이전 투여의 횟수 및 효능, 대상체에게 투여된 기타 치료제, 및 의사에게 알려져 있거나 적절한 투여량을 결정하는 데 고려될 기타 특성에 따라 달라질 수 있다. 바람직하게는, 치료 유효량은 비편평 비세포 폐암, 교묘세포종, 신세포 암종, 자궁 경부암, 또는 상피 난소암, 나팔관 암, 또는 원발성 복막암과 같은 암을 치료하는 데 유효한 양이다.

[0080]

제제는 약 10 mg/ml 내지 약 50 mg/ml의 항체를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 제제는 약 10 mg/ml 내지 약 40 mg/ml의 항체를 포함한다. 일부 측면에서, 제제는 약 10 mg/ml 내지 약 30 mg/ml의 항체를 포함한다. 일부 측면에서, 제제는 약 20 mg/ml 내지 약 50 mg/ml의 항체를 포함한다. 일부 측면에서, 제제는 약 20 mg/ml 내지 약 40 mg/ml의 항체를 포함한다. 일부 측면에서, 제제는 약 20 mg/ml 내지 약 30 mg/ml의 항체를 포함한다. 일부 측면에서, 제제는 약 15 mg/ml 내지 약 45 mg/ml의 항체를 포함한다. 일부 측면에서, 제제는 약 15 mg/ml 내지 약 35 mg/ml의 항체를 포함한다. 일부 측면에서, 제제는 약 15 mg/ml 내지 약 30 mg/ml의 항체를 포함한다. 일부 측면에서, 제제는 약 21 mg/ml 내지 약 29 mg/ml의 항체를 포함한다. 일부 측면에서, 제제는 약 22 mg/ml 내지 약 28 mg/ml의 항체를 포함한다. 일부 측면에서, 제제는 약 23 mg/ml 내지 약 27 mg/ml의 항체를 포함한다. 일부 측면에서, 제제는 약 24 mg/ml 내지 약 25 mg/ml의 항체를 포함한다. 일부 측면에서, 제제는 약 25 mg/ml 내지 약 30 mg/ml의 항체를 포함한다. 일부 측면에서, 제제는 약 25 mg/ml 내지 약 26 mg/ml의 항체를 포함한다. 일부 측면에서, 제제는 약 25 mg/ml 내지 약 27 mg/ml의 항체를 포함한다. 일부 측면에서, 제제는 약 25 mg/ml 내지 약 28 mg/ml의 항체를 포함한다. 일부 측면에서, 제제는 약 25 mg/ml 내지 약 29 mg/ml의 항체를 포함한다. 일부 측면에서, 제제는 약 25 mg/ml 내지 약 30 mg/ml의 항체를 포함한다. 일부 측면에서, 제제는 약 24 mg/ml 내지 약 27 mg/ml의 항체를 포함한다. 일부 측면에서, 제제는 약 24 mg/ml 내지 약 28 mg/ml의 항체를 포함한다. 일부 측면에서, 제제는 약 24 mg/ml 내지 약 29 mg/ml의 항체를 포함한다. 일부 측면에서, 제제는 약 24 mg/ml 내지 약 30 mg/ml의 항체를 포함한다. 일부 측면에서, 제제는 약 25.5 mg/ml 내지 약 26 mg/ml의 항체를 포함한다. 일부 측면에서, 제제는 약 25.4 mg/ml 내지 약 25.9 mg/ml의 항체를 포함한다. 일부 측면에서, 제제는 약 25.6 mg/ml 내지 약 25.9 mg/ml의 항체를 포함한다. 일부 측면에서, 제제는 약 25.5 mg/ml 내지 약 25.8 mg/ml의 항체를 포함한다. 일부 측면에서, 제제는 약 25.5 mg/ml 내지 약 25.7 mg/ml의 항체를 포함한다. 이러한 범위에는 범위를 정의하는 하한 및 상한이 포함된다. 일부 측면에서, 제제는 약 25

mg/ml의 항체를 포함한다. 일부 측면에서, 제제는 약 25.5 mg/ml의 항체를 포함한다. 일부 측면에서, 제제는 약 25.6 mg/ml의 항체를 포함한다. 일부 측면에서, 제제는 약 25.7 mg/ml의 항체를 포함한다. 일부 측면에서, 제제는 약 25.8 mg/ml의 항체를 포함한다.

[0081] 예를 들어, 본원에 기술되거나 예시된 농도의 항체는 바람직하게는 완충된 수성 담체와 함께 제제화되고, 담체는 바람직하게는 물을 포함한다. 완충 항체 제제는 바람직하게는 액체 형태이고, 더 바람직하게는 정맥 내 투여에 적합한 액체 형태이다. 따라서, 완충 제제의 물의 양은 원하는 주입 부위에 따라 달라질 수 있다. 일부 바람직한 측면에서, 완충액은 시트레이트 포스페이트, 트레할로스 및 순한 계면 활성제, 예컨대 폴리소르베이트 20을 포함하며, 약 5.8 내지 약 6.0의 산성 pH에서 항체 제제를 유지한다. 일부 대안적인 바람직한 측면에서, 완충액은 아세테이트, 수크로오스, 및 순한 계면 활성제, 예컨대 폴리소르베이트 20을 포함하며, 약 5.6 내지 약 5.8의 산성 pH에서 항체 제제를 유지한다. 완충 제제에 보관될 때 항체는 정상적인 보관 조건에서 보관 가능하다.

[0082] 시트레이트 포스페이트는 약 0.2 M의 제2 인산나트륨 및 약 0.1 M의 시트르산을 포함하는 미리 혼합된 용액에 제2 인산나트륨 도데카하이드레이트와 시트르산 일수화물의 수성 조합을 포함한다.

[0083] 완충액은 약 10 mM 내지 약 100 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 20 mM 내지 약 90 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 30 mM 내지 약 70 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 30 mM 내지 약 80 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 40 mM 내지 약 70 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 40 mM 내지 약 60 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 45 mM 내지 약 55 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 46 mM 내지 약 54 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 47 mM 내지 약 53 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 48 mM 내지 약 52 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 49 mM 내지 약 51 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 40 mM 내지 약 50 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 50 mM 내지 약 75 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 30 mM 내지 약 55 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 40 mM 내지 약 55 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 42 mM 내지 약 52 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 46 mM 내지 약 52 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 43 mM 내지 약 53 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함할 수 있다. 이러한 범위에는 범위를 정의하는 하한 및 상한이 포함된다. 일부 측면에서, 완충액은 약 50 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함한다.

[0084] 시트레이트 포스페이트 완충액은 약 100 mM 내지 약 200 mM의 트레할로스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 110 mM 내지 약 190 mM의 트레할로스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 120 mM 내지 약 180 mM의 트레할로스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 130 mM 내지 약 170 mM의 트레할로스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 140 mM 내지 약 170 mM의 트레할로스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 150 mM 내지 약 170 mM의 트레할로스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 155 mM 내지 약 165 mM의 트레할로스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 150 mM 내지 약 160 mM의 트레할로스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 153 mM 내지 약 164 mM의 트레할로스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 152 mM 내지 약 167 mM의 트레할로스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 154 mM 내지 약 164 mM의 트레할로스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 155 mM 내지 약 163 mM의 트레할로스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 156 mM 내지 약 162 mM의 트레할로스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 157 mM 내지 약 161 mM의 트레할로스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 158 mM 내지 약 160 mM의 트레할로스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 158.5 mM 내지 약 158.9 mM의 트레할로스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 158.6 mM 내지 약 158.8 mM의 트레할로스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 158 mM 내지 약 161 mM의 트레할로스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 159 mM 내지 약 161 mM의 트레할로스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 157 mM 내지 약 160 mM의 트레할로스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 157 mM 내지 약 159 mM의 트레할로스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 150 mM 내지 약 159 mM의 트레할로스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 159 mM 내지 약 160 mM의 트레할로스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 159 mM 내지 약 165 mM의 트레할로스를 포함할 수 있다. 이러한 범위에는 범위를 정의하는

하한 및 상한이 포함된다. 일부 측면에서, 완충액은 약 159 mM의 트레할로스를 포함한다. 일부 측면에서, 완충액은 약 158.7 mM의 트레할로스를 포함한다. 일부 측면에서, 수크로오스는 트레할로스 대신에 이들 농도 중 임의의 농도로 사용될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 시트레이트 포스페이트 완충액은 트레할로스 대신 안정제로서 수크로오스를 포함할 수 있다.

[0085] 아세테이트-수크로오스 완충액은 약 1 mM 내지 약 30 mM의 아세테이트를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 5 mM 내지 약 25 mM의 아세테이트를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 10 mM 내지 약 20 mM의 아세테이트를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 11 mM 내지 약 19 mM의 아세테이트를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 12 mM 내지 약 18 mM의 아세테이트를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 13 mM 내지 약 15 mM의 아세테이트를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 10 mM 내지 약 15 mM의 아세테이트를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 12 mM 내지 약 16 mM의 아세테이트를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 12 mM 내지 약 15 mM의 아세테이트를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 13 mM 내지 약 17 mM의 아세테이트를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 14 mM 내지 약 18 mM의 아세테이트를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 14 mM 내지 약 16 mM의 아세테이트를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 15 mM 내지 약 20 mM의 아세테이트를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 5 mM 내지 약 15 mM의 아세테이트를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 11 mM 내지 약 17 mM의 아세테이트를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 15 mM 내지 약 16 mM의 아세테이트를 포함할 수 있다. 이러한 범위에는 범위를 정의하는 하한 및 상한이 포함된다. 일부 측면에서, 완충액은 약 15 mM의 아세테이트를 포함한다. 바람직하게는, 아세테이트는 아세트산나트륨 삼수화물이다.

[0086] 아세테이트-수크로오스 또는 시트레이트 포스페이트-수크로오스 완충액은 약 100 mM 내지 약 250 mM의 수크로오스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 125 mM 내지 약 225 mM의 수크로오스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 150 mM 내지 약 200 mM의 수크로오스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 155 mM 내지 약 195 mM의 수크로오스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 160 mM 내지 약 190 mM의 수크로오스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 165 mM 내지 약 185 mM의 수크로오스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 166 mM 내지 약 184 mM의 수크로오스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 167 mM 내지 약 183 mM의 수크로오스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 168 mM 내지 약 182 mM의 수크로오스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 169 mM 내지 약 181 mM의 수크로오스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 170 mM 내지 약 180 mM의 수크로오스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 171 mM 내지 약 179 mM의 수크로오스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 172 mM 내지 약 178 mM의 수크로오스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 174 mM 내지 약 177 mM의 수크로오스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 174 mM 내지 약 176 mM의 수크로오스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 175 mM 내지 약 175.5 mM의 수크로오스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 175.2 mM 내지 약 175.4 mM의 수크로오스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 175 mM 내지 약 185 mM의 수크로오스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 165 mM 내지 약 175 mM의 수크로오스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 170 mM 내지 약 190 mM의 수크로오스를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 완충액은 약 150 mM 내지 약 175 mM의 수크로오스를 포함할 수 있다. 이러한 범위에는 범위를 정의하는 하한 및 상한이 포함된다. 일부 측면에서, 완충액은 약 175 mM의 수크로오스를 포함한다. 일부 측면에서, 완충액은 약 175.3 mM의 수크로오스를 포함한다.

[0087] 항체 제제(예를 들어, 시트레이트 포스페이트-트레할로스 또는 아세테이트 수크로오스 완충액 사용)는 바람직하게는 비이온성 계면 활성제를 포함한다. 더 바람직하게는, 비이온성 계면 활성제는 폴리소르베이트 20(영국 요크셔 소재의 Croda International Plc의 트윈(Tween)® 20 상표명의 폴리소르베이트를 포함할 수 있음)을 포함한다. 항체 및 수성 완충액을 포함하는 항체 제제는 바람직하게는 약 0.01% 내지 약 0.1%(부피 기준)의 폴리소르베이트 20을 포함한다. 일부 측면에서, 항체 제제는 약 0.02% 내지 약 0.09%(부피 기준)의 폴리소르베이트 20을 포함한다. 일부 측면에서, 항체 제제는 약 0.03% 내지 약 0.08%(부피 기준)의 폴리소르베이트 20을 포함한다. 일부 측면에서, 항체 제제는 약 0.01% 내지 약 0.07%(부피 기준)의 폴리소르베이트 20을 포함한다. 일부 측면에서, 항체 제제는 약 0.02% 내지 약 0.06%(부피 기준)의 폴리소르베이트 20을 포함한다. 일부 측면에서, 항체 제제는 약 0.03% 내지 약 0.05%(부피 기준)의 폴리소르베이트 20을 포함한다. 일부 측면에서, 항체 제제는 약 0.04% 내지 약 0.06%(부피 기준) 폴리소르베이트 20을 포함한다. 일부 측면에서, 항체 제제는 약 0.02% 내지 약 0.05%(부피 기준)의 폴리소르베이트 20을 포함한다. 일부 측면에서, 항체 제제는 약 0.02% 내지 약 0.04%(부피 기준)의 폴리소르베이트 20을 포함한다. 일부 측면에서, 항체 제제는 약 0.03% 내지 약 0.06%(부피

기준)의 폴리소르베이트 20을 포함한다. 일부 측면에서, 항체 제제는 약 0.01% 내지 약 0.05%(부피 기준)의 폴리소르베이트 20을 포함한다. 일부 측면에서, 항체 제제는 약 0.03% 내지 약 0.04%(부피 기준)의 폴리소르베이트 20을 포함한다. 일부 측면에서, 항체 제제는 약 0.03% 내지 약 0.04%(부피 기준)를 포함한다. 일부 측면에서, 항체 제제는 약 0.04% 내지 약 0.05%(부피 기준)의 폴리소르베이트 20을 포함한다. 일부 측면에서, 항체 제제는 약 0.035% 내지 약 0.045%(부피 기준)의 폴리소르베이트 20을 포함한다. 이러한 범위에는 범위를 정의하는 하한 및 상한이 포함된다. 일부 측면에서, 항체 제제는 약 0.04%(부피 기준)의 폴리소르베이트 20을 포함한다.

[0088] 항체 제제(예를 들어, 시트레이트 포스페이트-트레할로스/수크로오스 또는 아세테이트 수크로오스 완충액 사용)는 바람직하게는 산성 pH로 완충된다. 제제는 바람직하게는 약 5.3 내지 약 6.5의 pH를 갖는다. 일부 측면에서, 제제는 약 5.4 내지 약 6.4의 pH를 갖는다. 일부 바람직한 측면에서, 제제는 약 5.4 내지 약 5.9의 pH를 갖는다. 일부 바람직한 측면에서, 제제는 약 5.5 내지 약 5.8의 pH를 갖는다. 일부 바람직한 측면에서, 제제는 약 5.6 내지 약 5.8의 pH를 갖는다. 일부 바람직한 측면에서, 제제는 약 5.6 내지 약 5.9의 pH를 갖는다. 일부 측면에서, 제제는 약 5.5 내지 약 5.3의 pH를 갖는다. 일부 바람직한 측면에서, 제제는 약 5.6 내지 약 6.2의 pH를 갖는다. 일부 측면에서, 제제는 약 5.7 내지 약 6.1의 pH를 갖는다. 일부 측면에서, 제제는 약 5.8 내지 약 6.0의 pH를 갖는다. 일부 바람직한 측면에서, 제제는 약 5.4 내지 약 5.9의 pH를 갖는다. 일부 측면에서, 제제는 약 5.6 내지 약 5.9의 pH를 갖는다. 일부 바람직한 측면에서, 제제는 약 5.7 내지 약 5.9의 pH를 갖는다. 일부 바람직한 측면에서, 제제는 약 5.9 내지 약 6.1의 pH를 갖는다. 일부 측면에서, 제제는 약 6.0 내지 약 6.2의 pH를 갖는다. 일부 측면에서, 제제는 약 5.7 내지 약 6.0의 pH를 갖는다. 일부 바람직한 측면에서, 제제는 약 5.8 내지 약 6.1의 pH를 갖는다. 이러한 범위에는 범위를 정의하는 하한 및 상한이 포함된다. 일부 측면에서, 제제는 약 5.8의 pH를 갖는다. 일부 측면에서, 제제는 약 5.9의 pH를 갖는다. 일부 측면에서, 제제는 약 6.0의 pH를 갖는다.

[0089] 일부 바람직한 측면에서, 항체 제제는 VEGF에 특이적으로 결합하고 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 약 20 mg/ml 내지 약 30 mg/ml의 항체, 약 30 mM 내지 약 70 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함하는 완충액, 약 150 mM 내지 약 170 mM의 트레할로스, 및 약 0.01% 내지 약 0.07%(부피 기준)의 폴리소르베이트 20을 포함하며, 약 5.6 내지 약 6.0의 pH를 갖는다. 일부 측면에서, 항체 제제는 VEGF에 특이적으로 결합하고 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 약 20 mg/ml 내지 약 30 mg/ml의 항체, 약 30 mM 내지 약 70 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함하는 완충액, 약 150 mM 내지 약 170 mM의 트레할로스, 및 약 0.01% 내지 약 0.07%(부피 기준)의 폴리소르베이트 20로 본질적으로 이루어지며, 약 5.6 내지 약 6.0의 pH를 갖는다. 일부 측면에서, 항체 제제는 VEGF에 특이적으로 결합하고 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 약 20 mg/ml 내지 약 30 mg/ml의 항체, 약 30 mM 내지 약 70 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함하는 완충액, 약 150 mM 내지 약 170 mM의 트레할로스, 및 약 0.01% 내지 약 0.07%(부피 기준)의 폴리소르베이트 20로 이루어지며, 약 5.6 내지 약 6.0의 pH를 갖는다. 이러한 임의의 실시양태에서, 항체는 약 21 mg/ml 내지 약 29 mg/ml, 또는 약 22 mg/ml 내지 약 28 mg/ml, 또는 약 23 mg/ml 내지 약 27 mg/ml, 또는 약 24 mg/ml 내지 약 26 mg/ml, 또는 약 24.5 mg/ml 내지 약 26.5 mg/ml, 약 25 mg/ml, 약 26 mg/ml, 약 25.5 mg/ml, 약 25.6 mg/ml, 약 25.7 mg/ml 또는 약 25.8 mg/ml로 제제에 존재할 수 있다.

[0090] 일부 바람직한 측면에서, 항체 제제는 VEGF에 특이적으로 결합하고 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 약 20 mg/ml 내지 약 30 mg/ml의 항체, 약 40 mM 내지 약 60 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함하는 완충액, 약 154 mM 내지 약 164 mM의 트레할로스, 및 약 0.02% 내지 약 0.06%(부피 기준)의 폴리소르베이트 20을 포함하며, 약 5.6 내지 약 6.0의 pH, 또는 약 5.8의 pH, 또는 약 6.0의 pH를 갖는다. 일부 측면에서, 항체 제제는 VEGF에 특이적으로 결합하고 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 약 20 mg/ml 내지 약 30 mg/ml의 항체, 약 40 mM 내지 약 60 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함하는 완충액, 약 154 mM 내지 약 164 mM의 트레할로스, 및 약 0.02% 내지 약 0.06%(부피 기준)의 폴리소르베이트 20으로 본질적으로 이루어지며, 약 5.6 내지 약 6.0의 pH, 또는 약 5.8의 pH, 또는 약 6.0의 pH를 갖는다. 일부 측면에서, 항체 제제는 VEGF에 특이적으로 결합하고 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 약 20 mg/ml 내지 약 30 mg/ml의 항체, 약 40 mM 내지 약 60 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함하는 완충액, 약 154 mM 내지 약 164 mM의 트레할로스, 및 약 0.02% 내지 약 0.06%(부피 기준)의 폴리소르베이트 20으로 이루어지며, 약 5.6 내지 약 6.0의 pH, 또는 약 5.8의 pH, 또는 약 6.0의 pH를 갖는다. 이러한 임의의 실시양태에서, 항체는 약 21 mg/ml 내지 약 29 mg/ml, 또는 약 22 mg/ml 내지 약 28 mg/ml, 또는 약 23

mg/ml 내지 약 27 mg/ml, 약 24 mg/ml 내지 약 26 mg/ml, 또는 약 24.5 mg/ml 내지 약 26.5 mg/ml, 약 25 mg/ml, 약 26 mg/ml, 약 25.5 mg/ml, 약 25.6 mg/ml, 약 25.7 mg/ml 또는 약 25.8 mg/ml로 제제에 존재할 수 있다.

[0091] 일부 바람직한 측면에서, 항체 제제는 VEGF에 특이적으로 결합하고 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 약 25 mg/ml 내지 약 26.5 mg/ml의 항체, 약 45 mM 내지 약 55 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함하는 완충액, 약 157 mM 내지 약 161 mM의 트레할로스, 및 약 0.03% 내지 약 0.05%(부피 기준)의 폴리소르베이트 20을 포함하며, 약 5.6 내지 약 6.0의 pH, 또는 약 5.8의 pH, 또는 약 6.0의 pH를 갖는다. 일부 측면에서, 항체 제제는 VEGF에 특이적으로 결합하고 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 약 25 mg/ml 내지 약 26.5 mg/ml의 항체, 약 45 mM 내지 약 55 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함하는 완충액, 약 157 mM 내지 약 161 mM의 트레할로스, 및 약 0.03% 내지 약 0.05%(부피 기준)의 폴리소르베이트 20으로 본질적으로 이루어지며, 약 5.6 내지 약 6.0의 pH, 또는 약 5.8의 pH, 또는 약 6.0의 pH를 갖는다. 일부 측면에서, 항체 제제는 VEGF에 특이적으로 결합하고 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 약 25 mg/ml 내지 약 26.5 mg/ml의 항체, 약 45 mM 내지 약 55 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함하는 완충액, 약 157 mM 내지 약 161 mM의 트레할로스, 및 약 0.03% 내지 약 0.05%(부피 기준)의 폴리소르베이트 20로 이루어지며, 약 5.6 내지 약 6.0의 pH, 또는 약 5.8의 pH, 또는 약 6.0의 pH를 갖는다. 이러한 임의의 실시양태에서, 항체는 약 25 mg/ml 내지 약 26 mg/ml, 또는 약 25.5 mg/ml 내지 약 26 mg/ml, 약 25 mg/ml, 약 26 mg/ml, 약 25.5 mg/ml, 약 25.6 mg/ml, 약 25.7 mg/ml 또는 약 25.8 mg/ml로 제제에 존재할 수 있다.

[0092] 일부 바람직한 측면에서, 항체 제제는 VEGF에 특이적으로 결합하고 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 약 25.5 mg/ml 내지 약 26.1 mg/ml의 항체, 약 50 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함하는 완충액, 약 159 mM의 트레할로스, 및 약 0.04%(부피 기준)의 폴리소르베이트 20을 포함하며, 약 5.8의 pH, 또는 약 6.0의 pH를 갖는다. 일부 측면에서, 항체 제제는 VEGF에 특이적으로 결합하고 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 약 25.5 mg/ml 내지 약 26.1 mg/ml의 항체, 약 50 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함하는 완충액, 약 159 mM의 트레할로스, 및 약 0.04%(부피 기준)의 폴리소르베이트 20으로 본질적으로 이루어지며, 약 5.8의 pH, 또는 약 6.0의 pH를 갖는다. 일부 측면에서, 항체 제제는 VEGF에 특이적으로 결합하고 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 약 25.5 mg/ml 내지 약 26.1 mg/ml의 항체, 약 50 mM의 시트레이트 포스페이트를 포함하는 완충액, 약 159 mM의 트레할로스, 및 약 0.04%(부피 기준)의 폴리소르베이트 20으로 이루어지며, 약 5.8의 pH, 또는 약 6.0의 pH를 갖는다. 이러한 임의의 실시양태에서, 항체는 약 26 mg/ml, 약 25.5 mg/ml, 약 25.6 mg/ml, 약 25.7 mg/ml 또는 약 25.8 mg/ml로 제제에 존재할 수 있다.

[0093] 제제는 특히 수개월 내지 수년에 걸쳐 개선된 보관 기간을 위해 항체를 안정화시킨다. 제제에 보관될 때, 항체는 보관 기간 동안 열 및 콜로이드 안정성을 유지한다. 예를 들어, 제제에 보관될 때, 항체는 안정하고 최소한의 응집, 플로큘레이션(flocculation), 단편화 및 변성을 나타내며, 항체는 VEGF 결합 활성을 유지한다.

[0094] 항체 제제는 냉장 상태하에, 바람직하게는 약 2°C, 약 3°C, 약 4°C, 약 5°C, 약 6°C, 약 7°C, 약 8°C을 포함하여 약 2°C 내지 약 6°C의 온도에서 보관하는 것이 바람직하다. 항체 제제는 상기 온도에서 적어도 약 3개월 동안 보관될 수 있다. 일부 측면에서, 항체 제제는 상기 온도에서 적어도 약 6개월 동안 보관될 수 있다. 일부 측면에서, 항체 제제는 상기 온도에서 적어도 약 9개월 동안 보관될 수 있다. 일부 측면에서, 항체 제제는 상기 온도에서 적어도 약 12개월 동안 보관될 수 있다. 일부 측면에서, 항체 제제는 상기 온도에서 적어도 약 15개월 동안 보관될 수 있다. 일부 측면에서, 항체 제제는 상기 온도에서 적어도 약 18개월 동안 보관될 수 있다. 일부 측면에서, 항체 제제는 상기 온도에서 적어도 약 21개월 동안 보관될 수 있다. 일부 측면에서, 항체 제제는 상기 온도에서 적어도 약 24개월 동안 보관될 수 있다. 보관 기간 동안 항체는 안정하고 최소한의 응집, 플로큘레이션, 단편화, 및 변성을 나타내며, 항체는 VEGF 결합 활성을 유지하여 항체 제제가 보관으로부터 제거되어, 환자에게 투여되어, 제제가 투여되는 병태에 대해 여전히 치료 효능을 나타낼 수 있다.

[0095] 제제는 바람직하게는 약 20 mg/ml 내지 약 30 mg/ml의 항체, 더 바람직하게는 약 25 mg/ml 또는 약 25.5 mg/ml, 또는 약 26 mg/ml의 항체를 포함한다. 이 양의 항체 단백질 중에는 일정 백분율의 활성의 천연 형태의 항체 단량체와 VEGF 결합 활성이 감소하거나 없는 일정 백분율의 항체 응집체가 있다. 제제가 (변경되지 않은 단량체에 비해) 최대량의 기능적 항체 단량체 및 최소량의 항체 응집체, 및 결합 활성 및/또는 치료 효능이 감

소한 항체의 구조적으로 변경된 형태를 포함하는 것이 매우 바람직하다. 예를 들어, 항체 제제는 약 2°C 내지 약 6°C에서 적어도 약 6개월 동안 보관될 때 바람직하게는 적어도 약 85 중량%의 항체 단량체, 및 VEGF 결합 활성 및/또는 치료 효능이 감소한 약 15 중량% 미만의 항체 응집체를 함유한다.

[0096] 일부 측면에서, 항체 제제는 약 2°C 내지 약 8°C에서 적어도 약 6개월 동안 보관될 때 적어도 약 90 중량%의 항체 단량체, 및 VEGF 결합 활성 및/또는 치료 효능이 감소한 약 10 중량% 미만의 항체 응집체를 함유한다. 일부 측면에서, 항체 제제는 약 2°C 내지 약 8°C에서 적어도 약 6개월 동안 보관될 때 적어도 약 93 중량%의 항체 단량체, 및 VEGF 결합 활성 및/또는 치료 효능이 감소한 약 7 중량% 미만의 항체 응집체를 함유한다. 일부 측면에서, 항체 제제는 약 2°C 내지 약 8°C에서 적어도 약 6개월 동안 보관될 때 적어도 약 95 중량%의 항체 단량체, 및 VEGF 결합 활성 및/또는 치료 효능이 감소한 약 5 중량% 미만의 항체 응집체를 함유한다. 일부 측면에서, 항체 제제는 약 2°C 내지 약 8°C에서 적어도 약 6개월 동안 보관될 때 적어도 약 96 중량%의 항체 단량체, 및 VEGF 결합 활성 및/또는 치료 효능이 감소한 약 4 중량% 미만의 항체 응집체를 함유한다. 일부 측면에서, 항체 제제는 약 2°C 내지 약 8°C에서 적어도 약 6개월 동안 보관될 때 적어도 약 97 중량%의 항체 단량체, 및 VEGF 결합 활성 및/또는 치료 효능이 감소한 약 3 중량% 미만의 항체 응집체를 함유한다. 일부 측면에서, 항체 제제는 약 2°C 내지 약 8°C에서 적어도 약 6개월 동안 보관될 때 적어도 약 98 중량%의 항체 단량체, 및 VEGF 결합 활성 및/또는 치료 효능이 감소한 약 2 중량% 미만의 항체 응집체를 함유한다. 일부 측면에서, 항체 제제는 약 2°C 내지 약 8°C에서 적어도 약 6개월 동안 보관될 때 적어도 약 99 중량%의 항체 단량체, 및 VEGF 결합 활성 및/또는 치료 효능이 감소한 약 1 중량% 미만의 항체 응집체를 함유한다. 항체 단량체 및/또는 항체 응집체의 양은 시차 광 산란(DLS: differential light scattering), 시차 주사 열량 측정법(DSC: differential scanning calorimetry), 크기 배제 크로마토그래피(SE-HPLC), 비환원 및 환원 모세관 전기영동 SDS(NR CE-SDS 및 R CE-SDS: non-reducing and reducing capillary electrophoresis SDS) 및 미립자 수(PC: particulate count)의 임의의 하나 또는 조합을 포함하여, 본원에 설명되거나 예시된 기술을 포함하여 당 업계에 적합한 임의의 기술에 따라 결정될 수 있다.

[0097] 일부 측면에서, 항체 제제는 약 2°C 내지 약 8°C에서 적어도 약 12개월 동안 보관될 때 적어도 약 90 중량%의 항체 단량체, 및 VEGF 결합 활성 및/또는 치료 효능이 감소한 약 10 중량% 미만의 항체 응집체를 함유한다. 일부 측면에서, 항체 제제는 약 2°C 내지 약 8°C에서 적어도 약 12개월 동안 보관될 때 적어도 약 93 중량%의 항체 단량체, 및 VEGF 결합 활성 및/또는 치료 효능이 감소한 약 7 중량% 미만의 항체 응집체를 함유한다. 일부 측면에서, 항체 제제는 약 2°C 내지 약 8°C에서 적어도 약 12개월 동안 보관될 때 적어도 약 95 중량%의 항체 단량체, 및 VEGF 결합 활성 및/또는 치료 효능이 감소한 약 5 중량% 미만의 항체 응집체를 함유한다. 일부 측면에서, 항체 제제는 약 2°C 내지 약 8°C에서 적어도 약 12개월 동안 보관될 때 적어도 약 96 중량%의 항체 단량체, 및 VEGF 결합 활성 및/또는 치료 효능이 감소한 약 4 중량% 미만의 항체 응집체를 함유한다. 일부 측면에서, 항체 제제는 약 2°C 내지 약 8°C에서 적어도 약 12개월 동안 보관될 때 적어도 약 97 중량%의 항체 단량체, 및 VEGF 결합 활성 및/또는 치료 효능이 감소한 약 3 중량% 미만의 항체 응집체를 함유한다. 일부 측면에서, 항체 제제는 약 2°C 내지 약 8°C에서 적어도 약 12개월 동안 보관될 때 적어도 약 98 중량%의 항체 단량체, 및 VEGF 결합 활성 및/또는 치료 효능이 감소한 약 2 중량% 미만의 항체 응집체를 함유한다. 일부 측면에서, 항체 제제는 약 2°C 내지 약 8°C에서 적어도 약 12개월 동안 보관될 때 적어도 약 99 중량%의 항체 단량체, 및 VEGF 결합 활성 및/또는 치료 효능이 감소한 약 1 중량% 미만의 항체 응집체를 함유한다. 항체 단량체 및/또는 항체 응집체의 양은 시차 광 산란(DLS), 시차 주사 열량 측정법(DSC), 크기 배제 크로마토그래피(SE-HPLC), 비환원 및 환원 모세관 전기영동 SDS(NR CE-SDS 및 R CE-SDS) 및 미립자 수(PC)의 임의의 하나 또는 조합을 포함하여, 본원에 설명되거나 예시된 기술을 포함하여 당 업계에 적합한 임의의 기술에 따라 결정될 수 있다.

[0098] 일부 측면에서, 항체 제제는 약 2°C 내지 약 8°C에서 적어도 약 18개월 동안 보관될 때 적어도 약 90 중량%의 항체 단량체, 및 VEGF 결합 활성 및/또는 치료 효능이 감소한 약 10 중량% 미만의 항체 응집체를 함유한다. 일부 측면에서, 항체 제제는 약 2°C 내지 약 8°C에서 적어도 약 18개월 동안 보관될 때 적어도 약 93 중량%의 항체 단량체, 및 VEGF 결합 활성 및/또는 치료 효능이 감소한 약 7 중량% 미만의 항체 응집체를 함유한다. 일부 측면에서, 항체 제제는 약 2°C 내지 약 8°C에서 적어도 약 18개월 동안 보관될 때 적어도 약 95 중량%의 항체 단량체, 및 VEGF 결합 활성 및/또는 치료 효능이 감소한 약 5 중량% 미만의 항체 응집체를 함유한다. 일부 측면에서, 항체 제제는 약 2°C 내지 약 8°C에서 적어도 약 18개월 동안 보관될 때 적어도 약 96 중량%의 항체 단량체, 및 VEGF 결합 활성 및/또는 치료 효능이 감소한 약 4 중량% 미만의 항체 응집체를 함유한다. 일부 측면에서, 항체 제제는 약 2°C 내지 약 8°C에서 적어도 약 18개월 동안 보관될 때 적어도 약 97 중량%의 항체 단량체, 및 VEGF 결합 활성 및/또는 치료 효능이 감소한 약 3 중량% 미만의 항체 응집체를 함유한다. 일부 측면

에서, 항체 제제는 약 2°C 내지 약 8°C에서 적어도 약 18개월 동안 보관될 때 적어도 약 98 중량%의 항체 단량체, 및 VEGF 결합 활성 및/또는 치료 효능이 감소한 약 2 중량% 미만의 항체 응집체를 함유한다. 일부 측면에서, 항체 제제는 약 2°C 내지 약 8°C에서 적어도 약 18개월 동안 보관될 때 적어도 약 99 중량%의 항체 단량체, 및 VEGF 결합 활성 및/또는 치료 효능이 감소한 약 1 중량% 미만의 항체 응집체를 함유한다. 항체 단량체 및/또는 항체 응집체의 양은 시차 광 산란(DLS), 시차 주사 열량 측정법(DSC), 크기 배제 크로마토그래피(SE-HPLC), 비환원 및 환원 모세관 전기영동 SDS(NR CE-SDS 및 R CE-SDS) 및 미립자 수(PC)의 임의의 하나 또는 조합을 포함하여, 본원에 설명되거나 예시된 기술을 포함하여 당 업계에 적합한 임의의 기술에 따라 결정될 수 있다.

[0099] 일부 측면에서, 항체 제제는 약 2°C 내지 약 8°C에서 적어도 약 24개월 동안 보관될 때 적어도 약 90 중량%의 항체 단량체, 및 VEGF 결합 활성 및/또는 치료 효능이 감소한 약 10 중량% 미만의 항체 응집체를 함유한다. 일부 측면에서, 항체 제제는 약 2°C 내지 약 8°C에서 적어도 약 24개월 동안 보관될 때 적어도 약 93 중량%의 항체 단량체, 및 VEGF 결합 활성 및/또는 치료 효능이 감소한 약 7 중량% 미만의 항체 응집체를 함유한다. 일부 측면에서, 항체 제제는 약 2°C 내지 약 8°C에서 적어도 약 24개월 동안 보관될 때 적어도 약 95 중량%의 항체 단량체, 및 VEGF 결합 활성 및/또는 치료 효능이 감소한 약 5 중량% 미만의 항체 응집체를 함유한다. 일부 측면에서, 항체 제제는 약 2°C 내지 약 8°C에서 적어도 약 24개월 동안 보관될 때 적어도 약 96 중량%의 항체 단량체, 및 VEGF 결합 활성 및/또는 치료 효능이 감소한 약 4 중량% 미만의 항체 응집체를 함유한다. 일부 측면에서, 항체 제제는 약 2°C 내지 약 8°C에서 적어도 약 24개월 동안 보관될 때 적어도 약 97 중량%의 항체 단량체, 및 VEGF 결합 활성 및/또는 치료 효능이 감소한 약 3 중량% 미만의 항체 응집체를 함유한다. 일부 측면에서, 항체 제제는 약 2°C 내지 약 8°C에서 적어도 약 24개월 동안 보관될 때 적어도 약 98 중량%의 항체 단량체, 및 VEGF 결합 활성 및/또는 치료 효능이 감소한 약 2 중량% 미만의 항체 응집체를 함유한다. 일부 측면에서, 항체 제제는 약 2°C 내지 약 8°C에서 적어도 약 24개월 동안 보관될 때 적어도 약 99 중량%의 항체 단량체, 및 VEGF 결합 활성 및/또는 치료 효능이 감소한 약 1 중량% 미만의 항체 응집체를 함유한다. 항체 단량체 및/또는 항체 응집체의 양은 시차 광 산란(DLS), 시차 주사 열량 측정법(DSC), 크기 배제 크로마토그래피(SE-HPLC), 비환원 및 환원 모세관 전기영동 SDS(NR CE-SDS 및 R CE-SDS) 및 미립자 수(PC)의 임의의 하나 또는 조합을 포함하여, 본원에 설명되거나 예시된 기술을 포함하여 당 업계에 적합한 임의의 기술에 따라 결정될 수 있다.

[0100] **안정한 항체 조성물의 생산 방법**

[0101] 본 개시 내용의 방법은 안정한 항체 조성물을 생산한다. 이러한 안정한 항체 조성물은 ONS-5010으로 지칭될 수 있다. 일부 실시양태에서, ONS-5010은 항체 바이오시밀러, 제1 인산나트륨, 제2 인산나트륨, α, α'-트레할로스, 및 폴리소르베이트 20을 포함한다. 일부 실시양태에서, 안정한 항체 조성물은 (예를 들어, 다른 항체 조성물과 비교하여) 최소량의 HMWS를 함유하고, 시간 경과에 따라 더 느린 속도로 HMWS를 축적하고/거나, 장기간 보관 동안 적은 양의 HMWS를 유지한다.

[0102] 일반적으로, HMWS는 VEGF 상의 에피토프에 대한 항체, 예를 들어 베바시주맙의 결합을 감소시키는 공유 비가역적 응집체의 형성에 기여하여 항체의 치료 효능을 감소시킨다. 전형적으로 HMWS의 양을 제한하면 이 문제가 감소하고 항체의 활성이 향상된다. 또한, 규제 표준은 베바시주맙 항체 제제에서 허용되는 HMWS 양을 24개월 후 8% 이하로 제한한다. 따라서, 안정한 항체 조성물에서 HMWS의 양을 제한하고, 시간이 경과함에 따라 HMWS의 축적을 늦추고, 장기 보관 동안 HMWS의 양을 적게 유지하는 것이 바람직하다.

[0103] 일부 실시양태에서, 정용여과는 본 개시 내용의 안정한 항체 조성물(예를 들어, 항체 바이오시밀러)의 제조 공정에서 마지막에서 두 번째 단계의 구성 요소이다. 일반적으로, 정용여과 동안 6.2 이상의 pH 값은 항체 제제, 예를 들어 베바시주맙에서 HMWS를 증가시켜 시간이 경과함에 따라 HMWS의 더 많은 축적을 유발한다. 따라서, 본 개시 내용은 농축된 조성물을 트레할로스를 포함하는 교환 용액으로 정용여과하고, 정용여과 후, 포스페이트 조성물의 첨가에 의해 조성물의 pH를 빠르게 조정함으로써 HMWS를 감소시키는 정용여과 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 포스페이트 조성물의 첨가는 안정한 항체 조성물의 제조 및 보관 동안 HMWS의 생성 및 축적을 방지한다.

[0104] 본 개시 내용은 안정한 항체 조성물을 생산하는 방법을 제공한다. 방법은 출발 조성물을 한외여과하여 농축된 조성물을 생성하는 단계를 포함한다. 일부 측면에서, 출발 조성물은 중점을 포함하여 4 mg/ml 내지 또는 약 4 mg/ml 내지 6 mg/ml의 항체를 포함한다. 일부 측면에서, 출발 조성물은 중점을 포함하여 약 4.7 내지 약 5.3의 pH를 갖는다. 특정 측면에서, 출발 조성물의 pH는 약 5.0이다.

- [0105] 일부 측면에서, 본 개시 내용의 방법은 출발 조성물을 한외여과하는 단계를 포함하여 안정한 항체 조성물을 생성한다. 일부 측면에서, 본 개시 내용의 방법은 항체 및 출발 완충 조성물을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 출발 조성물을 사용한다. 일부 실시양태에서, 출발 조성물은 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 4 mg/ml 내지 또는 약 4 mg/ml 내지 6 mg/ml의 항체를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다.
- [0106] 일부 측면에서, 출발 완충 조성물은 약 5.0의 pH를 갖는다. 본 개시 내용의 예시적인 출발 완충 조성물은 아세트산을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 일부 측면에서, 출발 완충 조성물은 20 내지 또는 약 20 내지 30 mS/cm, 예컨대 약 25 mS/cm의 전도도를 갖는다. 일부 측면에서, 출발 완충 조성물은 25 mS/cm의 전도도를 갖는다. 일부 측면의 실시양태에서, 출발 완충 조성물은 하나 이상의 1가 또는 2가 금속 이온을 포함하지 않는 조성물에 비해 항체의 안정성을 감소시키지 않는 농도로 하나 이상의 1가 또는 2가 금속 이온을 포함한다. 예시적인 1가 또는 2가(또는 이가) 금속 이온은 수소(H), 리튬(Li), 나트륨(Na), 마그네슘(Mg), 칼륨(K), 칼슘(Ca), 망간(Mn), 철(Fe), 코발트(Co) 및 아연(Zn)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0107] 일부 측면에서, 본 개시 내용의 방법은 한외여과/정용여과(UF/DF)로 지칭될 수 있다. 일반적으로, 막 크기, 재료, 및 부하는 UF/DF 동안 단백질 흡착 또는 유지에 영향을 미칠 수 있다. 일부 측면에서, 본 개시 내용의 방법은 폴리에테르설폰 막을 사용한다. 일부 측면에서, 본 개시 내용의 방법은 30kD 분자량 기공 크기를 갖는 막을 사용한다. 일반적으로 원하는 공정 시간과 투과 플럭스(시간 경과에 따른 투과 부피)의 계수인 막 부하는 UF/DF에서 얻은 제품의 품질에 영향을 미칠 수 있다. 투과 플럭스는 전형적으로 공급 속도(LMH), 잔류액 압력/막간 차압, 및 물질의 점도에 의해 영향을 받는다. 일부 실시양태에서, 막은  $\leq 1000 \text{ g/m}^2$ ,  $\leq 750 \text{ g/m}^2$ ,  $\leq 500 \text{ g/m}^2$ , 또는  $\leq 250 \text{ g/m}^2$ 의 부하를 견딘다. 일부 실시양태에서, 막은  $\leq$  약  $500 \text{ g/m}^2$  내지  $\leq$  약  $100 \text{ g/m}^2$ 의 부하를 견딘다. 일부 실시양태에서, 막은  $\leq$  약  $300 \text{ g/m}^2$ 의 부하를 견딘다. 일부 측면에서,  $\leq 450 \text{ LMH}$ 의 공급 유속이 본 개시 내용의 방법에 사용된다. 일부 측면에서,  $375 \text{ LMH}$ 의 공급 유속이 본 개시 내용의 방법에 사용된다. 일부 측면에서,  $\leq 25 \text{ psi}$ 의 잔류액 압력이 본 개시 내용의 방법에 사용된다. 일부 측면에서,  $5 \text{ psi}$ 의 잔류액 압력이 본 개시 내용의 방법에 사용된다. 일부 측면에서,  $\leq 20 \text{ psig}$ 의 TMP가 본 개시 내용의 방법에 사용된다. 일부 측면에서,  $15 \text{ psig}$ 의 TMP가 본 개시 내용의 방법에 사용된다.
- [0108] 일부 측면에서, 본 개시 내용의 조성물(예를 들어, 출발 조성물, 농축 조성물, 트레할로스 조성물)은 정용여과 전에 한외여과될 수 있다. 일부 측면에서, 본 개시 내용의 조성물은 정용여과 전에 한외여과에 의해 농축될 수 있다. 일부 측면에서, 한외여과는 항체의 중점을 포함하여 30 내지 또는 약 30 내지  $40 \text{ mg/ml}$ 의 항체를 포함하는 농축된 조성물을 생성한다.
- [0109] 정용여과는 본 개시 내용의 조성물 또는 제제에서 염 또는 용매의 농도를 제거하거나 감소시키기 위해 사용될 수 있다. 정용여과는 연속적이거나 불연속적일 수 있다. 재생 셀룰로스 막 또는 폴리에테르설폰 막이 정용여과에 사용될 수 있다. 일반적으로 이러한 막 또는 카세트는 넓은 pH 및 온도 범위를 갖는다. 정용여과에 사용되는 막은 일반적으로 1 kDa, 30 kD, 및 100 kD를 포함한 다양한 분자량 컷오프로 이용 가능하다. 일부 측면에서, 본 개시 내용의 방법은 30 kD 분자량 기공 크기를 갖는 막을 사용한다. 이 막은 정용여과 전에 평형화될 수 있다. 일부 측면에서, 막은 아세트산나트륨으로 평형화된다. 일부 측면에서, 약 25 mM 아세트산나트륨을 사용하여 막을 평형화한다. 일부 측면에서, 막은 염화나트륨으로 평형화된다. 일부 측면에서, 약 240 mM 염화나트륨을 사용하여 막을 평형화한다. 일부 측면에서, 237 mM 염화나트륨이 사용된다. 일부 측면에서, 막은 트레할로스 용액으로 평형화된다. 일부 측면에서, 트레할로스 용액은 약 6% 트레할로스를 포함한다. 일부 측면에서, 트레할로스 용액은 물 중 트레할로스를 포함한다. 막은 또한 원하는 pH 및 전도도로 평형화될 수 있다. 일부 측면에서, 막은 4.5 내지 또는 약 4.5 내지 5.5, 예컨대 약 5.0의 pH로 평형화된다. 일부 측면에서, 막은 20 내지 또는 약 20 내지  $30 \text{ mS/cm}$ , 약  $25 \text{ mS/cm}$ 의 전도도로 평형화된다.
- [0110] 일부 측면에서, 정용여과는 농축된 조성물의 출발 완충 조성물을 교환 용액으로 교환하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 교환 용액은 수성일 수 있다. 일부 측면에서, 교환 용액은 트레할로스를 포함한다. 일부 실시양태에서, 교환 용액은 중점을 포함하여 약 4% 내지 약 8% 트레할로스(w/v)를 포함한다. 특정 측면에서, 교환 용액은 물 중 6% 트레할로스(w/v)를 포함한다. 일부 측면에서, 트레할로스는  $\alpha$ ,  $\alpha'$ -트레할로스이다. 일부 측면에서, 교환 용액은 비제한적인 예로서 폴리소르베이트 20을 포함하는 폴리소르베이트를 포함한다. 일부 측면에서, 약 10%의 폴리소르베이트를 포함하는 폴리소르베이트 조성물을 사용하여 교환 조성물 및/또는 트레할로스 조성물 중의 약 0.03% 내지 약 0.05%의 최종 농도를 생성한다. 일부 측면에서, 교환 용액 및/또는 트레할로스

조성물은 0.04% 폴리소르베이트의 최종 농도를 포함한다. 일부 측면에서,  $\geq 5$  정용여과 부피(diavolumes)의 교환 용액이 정용여과 동안 사용될 수 있다. 비제한적인 예로서, 사용되는 교환 용액의 양은 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 또는 8.0 정용여과 부피일 수 있다.

- [0111] 일부 측면에서, 트레할로스 조성물은 중점을 포함하여 30 g/L 내지 또는 약 30 g/L 내지 40 g/L의 항체를 포함한다. 일부 측면에서, 트레할로스 조성물은 약 35 g/L의 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 트레할로스 조성물은 35 g/L의 항체를 포함한다.
- [0112] 일부 측면에서, 트레할로스 조성물은 중점을 포함하여 약 4.7 내지 약 5.3의 pH를 갖는다. 특정 측면에서, 트레할로스 조성물의 pH는 약 5.0이다.
- [0113] UF/DF 제품의 회수율을 높이거나 품질을 향상시키기 위해 추가 처리 단계를 이용할 수 있다. 예를 들어, 제품 손실은 막을 통과하여 막에 결합되어 회수 전에 탈착될 수 없는 제품, 또는 시스템에서 달리 손실된 제품으로 인한 투과액 손실로 인해 발생할 수 있다. 회수 절차는 공기, 완충액 또는 중력 조력을 사용할 수 있다. 비제한적인 예로서, 완충액 재순환을 사용하여 제품을 농축하고 회수율을 향상할 수 있다. 또한, 완충액 재순환 방법을 사용하여 막을 탈분극하고 제품 혼함을 향상할 수 있다. 일부 실시양태에서,  $\leq 30$  psig의 재순환 압력이 사용된다. 일부 실시양태에서, 재순환 시간은  $\leq 60$ 분일 수 있다. 일부 실시양태에서, 재순환 시간은 약 10분이다. 플러그 흐름 행균 또는 추적에 사용하여 장비 또는 시스템에서 손실된 제품을 회수할 수 있다. 이 절차는 시스템에서 제품(단백질, 예를 들어, 항체)을 플러시(flush)하는 데 사용할 수 있다. 일부 측면에서, 플러그 흐름 행균 또는 추적에 사용되는 6%  $\alpha, \alpha'$ -트레할로스의 부피는 약 30 g/L의 단백질 농도를 생성하도록 선택될 수 있다. 일부 측면에서, 플러그 흐름 행균 또는 추적에 사용되는 부피는 중점을 포함하여 약 28.5 내지 약 31.5 g/L의 단백질 농도를 생성하도록 선택될 수 있다.
- [0114] 일부 실시양태에서, 본 개시 내용의 방법은 또한 트레할로스 조성물을 포스페이트 조성물과 접촉시켜 pH 조정된 조성물을 생성하는 단계를 포함한다.
- [0115] 일부 측면에서, 접촉 단계는 중점을 포함하여 1초 내지 또는 약 1초 내지 3600초의 기간을 갖는다. 일부 측면에서, 접촉 단계는 중점을 포함하여 1500초 내지 또는 약 1500초 내지 2100초의 기간을 갖는다. 일부 측면에서, 접촉 단계는 약 1800초의 기간을 갖는다. 당 업계에 공지된 방법을 사용하여 접촉이 발생하는 속도를 증가시킬 수 있다. 예시적인 방법은 트레할로스 조성물에 열, 압력, 또는 교반의 적용을 포함할 수 있지만 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 열, 압력, 또는 교반이 포스페이트 조성물에 적용될 수 있다.
- [0116] 일부 측면에서, 포스페이트 조성물은 중점을 포함하여 약 5.5 내지 약 5.9의 pH를 갖는다. 특정 측면에서, 포스페이트 조성물은 약 5.7의 pH를 갖는다. 일부 이러한 측면에서, 포스페이트 조성물은 5.74의 pH를 갖는다.
- [0117] 일부 실시양태에서, 본 개시 내용의 포스페이트 조성물은 인산나트륨을 포함한다. 일부 측면에서, 포스페이트 조성물은 중점을 포함하여 450 mM 내지 또는 약 450 mM 내지 550 mM의 인산나트륨을 포함한다. 일부 측면에서, 포스페이트 조성물은 약 500 mM 인산나트륨을 포함한다. 일부 이러한 측면에서, 포스페이트 조성물은 510 mM을 포함한다.
- [0118] 일부 측면에서, 인산나트륨은 제1 인산나트륨이다. 일부 측면에서, 인산나트륨은 제2 인산나트륨이다. 일부 실시양태에서, 인산나트륨은 제1 인산나트륨 및 제2 인산나트륨을 포함한다. 일부 측면에서, 포스페이트 조성물은 중점을 포함하여 50 내지 또는 약 50 내지 60 g/L의 제1 인산나트륨을 포함한다. 일부 측면에서, 포스페이트 조성물은 약 55 g/L의 제1 인산나트륨을 포함한다. 일부 실시양태에서, 포스페이트 조성물은 58 g/L의 제1 인산나트륨을 포함한다. 일부 측면에서, 포스페이트 조성물은 중점을 포함하여 10 내지 또는 약 10 내지 20 g/L의 제2 인산나트륨을 포함한다. 일부 측면에서, 포스페이트 조성물은 약 15 g/L의 제2 인산나트륨을 포함한다. 일부 실시양태에서, 포스페이트 조성물은 12 g/L의 제2 인산나트륨을 포함한다.
- [0119] 일부 측면에서, 포스페이트 조성물은 40 내지 또는 약 40 내지 80 g/L의  $\alpha, \alpha'$ -트레할로스, 예컨대 50 내지 또는 약 50 내지 70 g/L의  $\alpha, \alpha'$ -트레할로스를 포함한다. 일부 측면에서, 포스페이트 조성물은 약 60 g/L의  $\alpha, \alpha'$ -트레할로스를 포함한다.
- [0120] 일부 측면에서, pH 조정된 조성물에서 인산나트륨의 최종 농도는 중점을 포함하여 약 40 mM 내지 약 60 mM이다. 일부 측면에서, pH 조정된 조성물에서 인산나트륨의 최종 농도는 중점을 포함하여 45 mM 내지 55 mM이다. 일부 측면에서, pH 조정된 조성물에서 인산나트륨의 최종 농도는 약 50 mM이다. 일부 측면에서, pH 조정된 조성물에서 인산나트륨의 최종 농도는 51 mM이거나 약 51 mM이다.

- [0121] 일부 측면에서, pH 조정된 조성물의 pH는 중점을 포함하여 약 5.9 내지 약 6.3이다. 일부 측면에서, pH 조정된 조성물의 pH는 중점을 포함하여 5.9 내지 6.3이다. 일부 측면에서, pH 조정된 조성물의 pH는 6.2이거나 약 6.2이다.
- [0122] 일부 실시양태에서, 본 개시 내용의 방법은 대상체에게 전달하기 위한 pH 조정된 조성물을 제제화하여 안정한 항체 조성물을 생성하는 단계를 포함한다. 일부 측면에서, 제제화 단계는 수용액(포스페이트 및/또는 폴리소르베이트 용액)을 첨가하는 단계를 포함한다. 일부 측면에서, 제제화 단계는 비이온성 계면 활성제(폴리소르베이트 20)를 첨가하는 단계를 포함한다.
- [0123] 일부 측면에서, pH 조정된 조성물은 중점을 포함하여 약 3.0 내지 약 3.5% HMWS를 포함한다. 일부 측면에서, pH 조정된 조성물은 약 3.20, 약 3.25, 약 3.30, 약 3.35, 약 3.40, 약 3.45, 또는 약 3.50% HMWS를 포함한다. 일부 측면에서, pH 조정된 조성물은 3.20, 3.25, 3.30, 3.35, 3.40, 3.45, 또는 3.50% HMWS를 포함한다.
- [0124] 일부 실시양태에서, 본 개시 내용의 방법은 대상체에게 전달하기 위한 pH 조정된 조성물을 제제화하여 안정한 항체 조성물을 생성하는 단계를 포함한다. 일부 측면에서, 제제화는 pH 조정된 조성물을 폴리소르베이트 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0125] 일부 측면에서, 폴리소르베이트 조성물은 폴리소르베이트 20을 포함한다.
- [0126] 일부 측면에서, 폴리소르베이트 조성물은 약 10%의 폴리소르베이트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리소르베이트 조성물은 안정한 항체 조성물에서 약 0.03% 내지 약 0.05% 폴리소르베이트 20의 최종 농도를 생성하도록 사용된다. 일부 측면에서, 안정한 항체 조성물은 0.04% 폴리소르베이트의 최종 농도를 포함한다.
- [0127] 일부 측면에서, 본 개시 내용은 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 25g/L 항체, 5.8 g/L 제1 인산나트륨 일수화물, 1.2 g/L 제2 인산나트륨 무수물, 60.0 g/L  $\alpha, \alpha'$ -트레할로스 탈수화물, 및 0.04%(v/v) 폴리소르베이트 20을 포함하는 안정한 항체 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 안정한 항체 조성물은  $\leq 6\%$  HMWS를 포함한다.
- [0128] 일부 측면에서, 안정한 항체 조성물은 중점을 포함하여 22.5 g/L 내지 또는 약 22.5 g/L 내지 27.5 g/L의 항체의 최종 농도를 갖는다. 특정 측면에서, 안정한 항체 조성물은 약 25g/L의 항체의 최종 농도를 갖는다. 특정 측면에서, 안정한 항체 조성물은 약 0.04% 폴리소르베이트 20의 최종 농도를 갖는다. 특정 측면에서, 안정한 항체 조성물은 0.04% 폴리소르베이트 20의 최종 농도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 안정한 항체 조성물에 포함된 항체 중에 일정 백분율의 활성의 천연 형태의 항체 단량체뿐만 아니라, 일정 백분율의 중양 피사 결합 활성이 감소하거나 없는 항체 단편, 항체 응집체 및 변성된 또는 부분적으로 변성된 항체가 있다. 일부 실시양태에서, 안정한 항체 조성물은 (변경되지 않은 단량체에 비해) 최대량의 기능적 항체 단량체 및 결합 활성 및/또는 치료 효능이 감소된 최소량의 항체 단편, 응집체 및 항체의 구조적으로 변경된 형태를 포함한다.
- [0129] 일부 측면에서, 안정한 항체 조성물은 중점을 포함하여 약 3.0 내지 약 6.0% HMWS를 포함한다. 일부 측면에서, 안정한 항체 조성물은 약 3.20, 약 3.25, 약 3.30, 약 3.35, 약 3.40, 약 3.45, 약 3.50, 약 4.00, 약 4.50, 또는 약 6.00% HMWS를 포함한다.
- [0130] 일부 측면에서, 안정한 항체 조성물은 제제화 단계 후 매달 중점을 포함하여 0.25% 내지 0.50%의 HMWS가 축적된다. 일부 측면에서, 안정한 항체 조성물은 적어도 12, 적어도 16, 적어도 18, 적어도 24, 적어도 30, 또는 적어도 36개월 동안  $\leq 15\%$ ,  $\leq 12\%$ ,  $\leq 10\%$ ,  $\leq 8\%$ ,  $\leq 7\%$ ,  $\leq 6\%$ , 또는  $\leq 5\%$  HMWS를 유지한다. 일부 측면에서, 안정한 항체 조성물은 제제화 단계 완료 후 24개월 넘게  $\leq 8\%$  HMWS를 포함한다.
- [0131] 일부 측면에서, 안정한 항체 조성물은 서열 번호 1의 아미노산 서열 또는 서열 번호 2의 아미노산 서열의 메티오닌 잔기의 중점을 포함하여 0.5% 내지 2.5%의 산화를 포함한다. 일부 측면에서, 안정한 항체 조성물은 서열 번호 1의 아미노산 서열 또는 서열 번호 2의 아미노산 서열의 메티오닌 잔기의  $\leq 2.5\%$ 의 산화를 포함한다. 일부 측면에서, 서열 번호 1의 아미노산 서열의 메티오닌 잔기의 산화는 서열 번호 1의 위치 258에서 메티오닌의 산화를 포함한다.
- [0132] 일부 측면에서, 안정한 항체 조성물은 중점을 포함하여 약 5.9 내지 약 6.3의 pH를 갖는다. 특정 측면에서, 안정한 항체 조성물은 약 6.1의 pH를 갖는다. 일부 실시양태에서, 안정한 항체 조성물은 6.1의 pH를 갖는다.
- [0133] 일부 측면에서, 안정한 항체 조성물은 제제화 단계 완료 후 또는 안정한 항체 조성물의 제조일 후 60일 이내에  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 에서 보관된다. 안정한 항체 조성물은 제제화 단계 완료 후 또는 안정한 항체 조성물의 제조일 후 30일 이내에  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 에서 보관될 수 있다. 안정한 항체 조성물은 제제화 단계 완료 후 또는 안정한 항체

조성물의 제조일 후 15일 이내에  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 에서 보관될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시 내용의 조성물, 예를 들어 안정한 항체 조성물은 적어도 약 3개월, 적어도 약 6개월, 적어도 약 9개월, 적어도 약 12개월, 적어도 약 15개월, 적어도 약 18개월, 적어도 약 21개월, 적어도 약 24개월 또는 그 사이의 임의의 최소 개월 수 동안 상기 온도에서 보관될 수 있다. 일부 실시양태에서, 보관 기간 동안, 항체는 안정하고 HMWS의 최소 축적을 나타내므로, 안정한 항체 조성물이 보관으로부터 제거되어, 환자에게 투여되어, 안정한 항체가 투여되는 병태에 대해 여전히 치료 효능을 나타낼 수 있다.

[0134] **치료 방법**

[0135] 일부 실시양태에서, 본 개시 내용의 조성물 및 제제는 치료 유효량의 항체를 포함한다. 치료 유효량은 항체 투여시 치료되는 질환 또는 병태에 따라 그리고/또는 항체가 투여되는 대상체의 특성, 예컨대 연령, 성별, 키, 체중, 질환 또는 병태의 진행 상태 또는 단계, 이전 투여의 횟수 및 효능, 대상체에게 투여된 기타 치료제, 및 의사에게 알려져 있거나 적절한 투여량을 결정하는 데 고려될 기타 특성에 따라 달라질 수 있다. 전형적으로, 치료 유효량은 비편평 비소세포 폐암, 교모세포종, 신세포 암종, 자궁 경부암, 또는 상피 난소암, 나팔관 암, 또는 원발성 복막암과 같은 암을 치료하는 데 유효한 양이다. 일부 측면에서, 본 개시 내용의 조성물은 결장암, 폐암, 교모세포종, 직장암, 뇌종양, 및 신세포 암종을 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0136] 일부 측면에서, 본 개시 내용의 조성물은 망막, 공막, 유리체, 수정체, 동공, 홍채, 각막, 맥락막, 시신경, 망막 혈관계, 모양체, 또는 안각의 장애의 눈 병태 또는 장애를 포함하는, 그러나 이에 제한되지 않는 눈 병태 또는 장애를 치료하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 안각은 섬유주대 및 관련 구조를 포함한다. 일부 양태에서, 본 개시 내용의 조성물은 혈관 내피 성장 인자(VEGF)가 상향 조절되거나, 조절 장애가 있거나, 과활성인 눈 병태 또는 장애를 치료하는 데 사용될 수 있다. 일부 측면에서, 본 개시 내용의 조성물은 나이 관련 황반 변성, 황반 부종, 당뇨병성 황반 부종(DME), 망막병증, 당뇨병성 망막병증, 근시 변성, 특발성 맥락막 혈관신생, 염증성 맥락막 혈관신생, 망막 혈관신생, 결절 맥락막 혈관병증, 눈 혈관신생, 분지 망막 정맥 폐쇄(BRVO), 중심 망막 정맥 폐쇄, 중심 장액 맥락 망막병증, 망막염, 망막 색소 변성증, 스타가르트병, 어서 증후군, 망막 변성, 안구 내염, 가족성 삼출 유리체 망막병증, 특발성 중심와 부근 모세혈관 확장증, 격자 변성, 황반 원공, 잔존 태아 혈관, 망막 동맥 폐쇄, 또는 망막 모세포종을 포함하는, 그러나 이에 제한되지 않는 눈 병태 또는 장애를 치료하는데 사용될 수 있다. 일부 측면에서, 본 개시 내용의 조성물은 나이 관련 황반 변성, 습성 나이 관련 황반 변성, 및 신생혈관 나이 관련 황반 변성을 포함하는, 그러나 이에 제한되지 않는 눈 병태 또는 장애를 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0137] 일부 측면에서, 본 개시 내용의 안정한 항체 조성물로 습성 나이 관련 황반 변성을 치료하는 방법은 눈에서 혈관 성장을 억제, 예방, 또는 감소시키는 단계를 포함한다. 일부 측면에서, 본 개시 내용의 안정한 항체 조성물로 습성 나이 관련 황반 변성을 치료하는 방법은 눈의 혈관화를 억제, 예방 또는 감소시키는 단계를 포함한다.

[0138] 본 개시 내용의 안정한 항체 조성물은 경구 경로, 정맥 내 경로, 근육 내 경로, 국소, 피하, 맥락막상으로, 점안액을 통해 그리고 점막 조직을 통한 직접 흡수를 포함하는, 그러나 이에 제한되지 않는 임의의 적절한 경로를 통해 투여될 수 있다. 일부 측면에서, 본 개시 내용의 안정한 항체 조성물은 정맥 내 주입을 위한 용액으로서 투여될 수 있다. 일부 측면에서, 본 개시 내용의 안정한 항체 조성물은 유리체내 주사로서 투여될 수 있다. 일부 측면에서, 본 개시 내용의 안정한 항체 조성물은 유리체내 주입으로서 투여될 수 있다.

[0139] 일부 측면에서, 본 개시 내용의 안정한 항체 조성물은 2주마다 투여될 수 있다. 일부 측면에서, 본 개시 내용의 안정한 항체 조성물은 15일마다 투여될 수 있다. 일부 측면에서, 본 개시 내용의 안정한 항체 조성물은 한 달에 2회 투여될 수 있다. 항체 조성물에서 HMWS의 %를 제한하면 치료 효능을 달성하는 데 필요한 용량 투여 빈도가 감소할 수 있다. 본 개시 내용의 방법은 15 내지 30일마다 투여되는 조성물을 생성할 수 있다. 본 개시 내용의 방법은 약 20일마다 투여되는 조성물을 생성할 수 있다. 본 개시 내용의 방법은 약 3, 4, 5, 또는 6주마다 투여되는 조성물을 생성할 수 있다. 본 개시 내용의 방법은 한 달에 한 번 또는 두 달에 한 번 투여되는 조성물을 생성할 수 있다. 일부 측면에서, 개시 내용의 안정한 항체 조성물은 52주 동안 투여될 수 있다. 일부 측면에서, 본 개시 내용의 안정한 항체 조성물은 약 50주 동안 투여될 수 있다. 일부 측면에서, 본 개시 내용의 안정한 항체 조성물은 4주, 8주, 16주, 24주, 36주 또는 48주 동안 투여될 수 있다. 일부 측면에서, 안정한 항체 조성물은 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20 또는 25회 투여될 수 있다. 안정한 항체 조성물에서 % HMWS의 양을 제한하면 치료 효능을 달성하는 데 필요한 용량 투여의 양, 기간, 또는 빈도가 감소할 수 있다.

[0140] 일부 측면에서, 본 개시 내용의 안정한 항체 조성물은 대략 11 내지 50일의 반감기를 갖는다. 일부 측면에서, 본 개시 내용의 안정한 항체 조성물은 대략 20일의 반감기를 갖는다. 안정한 항체 조성물에서 % HMWS의 양을 제

한다면 반감기가 증가할 수 있다. 본 개시 내용의 방법은 종래의 방법에 의해 생성된 항체 조성물보다 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20일 이상의 긴 반감기를 갖는 조성물을 생성할 수 있다.

[0141] 적합한 조성물은 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 약학적으로 허용 가능한 부형제와 함께 항체 이소형 또는 이의 조합을 함유할 수 있다.

[0142] 본 발명은 또한 본원에 기술되거나 예시된 임의의 항체 제제의 치료 유효량을 투여함으로써 종양 치료를 필요로 하는 대상체에서 종양을 치료하는 방법을 특징으로 한다. 바람직하게는, 항체 제제는 백금 저항성 재발성 상피 난소암, 나팔관 암, 또는 원발성 복막암, 지속성, 재발성, 또는 전이성 자궁 경부암, 전이성 대장암, 전이성 HER2 음성 유방암, 전이성 신세포 암종, 교모세포종, 또는 비소세포 폐암(NSCLC)과 같은 암을 치료하는 방법에 사용된다. 치료 효능은 예를 들어 투여된 제제에 존재하는 베바시주맙 항체에 의해 달성된다. 항체 제제의 투여는 임의의 적합한 경로에 따라, 바람직하게는 주사에 의해, 더 바람직하게는 정맥 내 주사에 의해 수행될 수 있다. 투여는 의사의 지시 또는 감독하에 수행될 수 있다.

[0143] 본 발명은 또한 본원에 기술되거나 예시된 임의의 항체 제제의 치료 유효량을 투여함으로써 눈 병태 또는 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에서 이를 치료하는 방법에 관한 것이다. 바람직하게는, 항체 제제는 망막, 공막, 유리체, 수정체, 동공, 홍채, 각막, 맥락막, 시신경, 망막 혈관계, 모양체 또는 안각(섬유주대 및 관련 구조 포함)을 포함하는, 그러나 이에 제한되지 않는 눈 병태 또는 장애를 치료하는 방법에 사용된다. 일부 측면에서, 본 개시 내용의 조성물은 혈관 내피 성장 인자(VEGF)가 상향 조절되거나, 조절 장애가 있거나, 과활성인 눈 병태 또는 장애를 치료하는 데 사용될 수 있다. 일부 측면에서, 본 개시 내용의 조성물은 나이 관련 황반 변성, 황반 부종, 당뇨병성 황반 부종(DME), 망막병증, 당뇨병성 망막병증, 근시 변성, 특발성 맥락막 혈관신생, 염증성 맥락막 혈관신생, 망막 혈관신생, 결절 맥락막 혈관병증, 눈 혈관신생, 분지 망막 정맥 폐쇄(BRVO), 중심 망막 정맥 폐쇄, 중심 장액 맥락 망막병증, 망막염, 망막 색소 변성증, 스타가르트병, 어서 증후군, 망막 변성, 안구 내염, 가족성 삼출 유리체 망막병증, 특발성 중심와 부근 모세혈관 확장증, 격자 변성, 황반 원공, 잔존 태아 혈관, 망막 동맥 폐쇄, 및 망막 모세포종을 포함하는, 그러나 이에 제한되지 않는 눈 병태 또는 장애를 치료하는 데 사용될 수 있다. 일부 측면에서, 본 개시 내용의 조성물은 나이 관련 황반 변성, 습성 나이 관련 황반 변성, 및 혈관신생 나이 관련 황반 변성을 포함하는, 그러나 이에 제한되지 않는 눈 병태 또는 장애를 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0144] 본원에 기술되고 예시된 항체 제제는 의약으로서 사용하기 위한 것일 수 있다. 본원에 기술되고 예시된 항체 제제는 백금 저항성 재발성 상피 난소암, 나팔관 암, 또는 원발성 복막암, 지속성, 재발성 또는 전이성 자궁 경부암, 전이성 대장암, 전이성 HER2 음성 유방암, 전이성 신세포 암종, 교모세포종, 또는 비소세포 폐암과 같은 하나 이상의 암을 치료하기 위한 의약의 제조에 사용될 수 있다. 제제는 백금 저항성 재발성 상피 난소암, 나팔관 암, 또는 원발성 복막암의 치료에 사용하기 위한 것일 수 있다. 제제는 지속성, 재발성, 또는 전이성 자궁 경부암의 치료에 사용하기 위한 것일 수 있다. 제제는 전이성 대장암의 치료에 사용하기 위한 것일 수 있다. 제제는 전이성 HER2 음성 유방암의 치료에 사용하기 위한 것일 수 있다. 제제는 전이성 신세포 암종의 치료에 사용하기 위한 것일 수 있다. 제제는 교모세포종의 치료에 사용하기 위한 것일 수 있다. 제제는 비소세포 폐암(NSCLC)의 치료에 사용하기 위한 것일 수 있다. 본원에 기재되고 예시된 항체 제제는 망막, 공막, 유리체, 수정체, 동공, 홍채, 각막, 맥락막, 시신경, 망막 혈관계, 모양체, 또는 안각(섬유주대 및 관련 구조 포함)를 포함하는, 그러나 이에 제한되지 않는 하나 이상의 눈 병태 또는 장애의 치료를 위한 의약의 제조에 사용하기 위한 것일 수 있다. 일부 측면에서, 본 개시 내용의 제제는 혈관 내피 성장 인자(VEGF)가 상향 조절되거나, 조절 장애가 있거나, 과활성인 눈 병태 또는 장애를 치료하는 데 사용될 수 있다. 일부 측면에서, 본 개시 내용의 제제는 나이 관련 황반 변성, 황반 부종, 당뇨병성 황반 부종(DME), 망막병증, 당뇨병성 망막병증, 근시 변성, 특발성 맥락막 혈관신생, 염증성 맥락막 혈관신생, 망막 혈관신생, 결절 맥락막 혈관병증, 눈 혈관신생, 분지 망막 정맥 폐쇄(BRVO), 중심 망막 정맥 폐쇄, 중심 장액 맥락 망막병증, 망막염, 망막 색소 변성증, 스타가르트병, 어서 증후군, 망막 변성, 안구 내염, 가족성 삼출 유리체 망막병증, 특발성 중심와 부근 모세혈관 확장증, 격자 변성, 황반 원공, 잔존 태아 혈관, 망막 동맥 폐쇄, 및 망막 모세포종을 포함하는, 그러나 이에 제한되지 않는 눈 병태 또는 장애를 치료하는 데 사용될 수 있다. 일부 측면에서, 본 개시 내용의 제제는 나이 관련 황반 변성, 습성 나이 관련 황반 변성, 및 신생혈관 나이 관련 황반 변성을 포함하는 그러나 이에 제한되지 않는 눈 병태 또는 장애를 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0145] 본 발명은 또한 키트를 특징으로 한다. 키트는 예를 들어, 본원에 기술되거나 예시된 임의의 방법을 실시하기 위해 사용될 수 있다. 일부 측면에서, 키트는 본원에 기술되거나 예시된 임의의 항체 제제, 및 본원에 기술되거나 예시된 임의의 방법 또는 용도에서 항체 제제를 사용하기 위한 설명서를 포함한다. 키트는 시린지 및 니들,

또는 카테터를 포함하는, 그러나 이에 제한되지 않는, 항체 제제를 대상체에게 주사하기 위한 디바이스를 포함할 수 있다.

- [0146] 키트에 포함된 설명서는 치료를 필요로 하는 백금 저항성 재발성 상피 난소암, 나팔관 암 또는 원발성 복막암 환자에게 항체 제제를 주사하기 위한 설명서를 포함하여, 백금 저항성 재발성 상피 난소암, 나팔관 암 또는 원발성 복막암을 치료하는 방법에서 항체 제제를 투여하기 위한 설명서를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 키트에 포함된 설명서는 치료를 필요로 하는 지속성, 재발성 또는 전이성 자궁 경부암 환자에게 항체 제제를 주사하기 위한 설명서를 포함하여, 지속성, 재발성 또는 전이성 자궁 경부암을 치료하는 방법에서 항체 제제를 투여하기 위한 설명서를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 키트에 포함된 설명서는 치료를 필요로 하는 전이성 대장암 환자에게 항체 제제를 주사하기 위한 설명서를 포함하여, 전이성 대장암을 치료하는 방법에서 항체 제제를 투여하기 위한 설명서를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 키트에 포함된 설명서는 치료를 필요로 하는 전이성 HER2 음성 유방암 환자에게 항체 제제를 주사하기 위한 설명서를 포함하여, 전이성 HER2 음성 유방암을 치료하는 방법에서 항체 제제를 투여하기 위한 설명서를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 키트에 포함된 설명서는 치료를 필요로 하는 전이성 신세포 암종 환자에게 항체 제제를 주사하기 위한 설명서를 포함하여, 전이성 신세포 암종을 치료하는 방법에서 항체 제제를 투여하기 위한 설명서를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 키트에 포함된 설명서는 치료를 필요로 하는 교모세포종 환자에게 항체 제제를 주사하기 위한 설명서를 포함하여, 교모세포종을 치료하는 방법에서 항체 제제를 투여하기 위한 설명서를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 키트에 포함된 설명서는 치료를 필요로 하는 비소세포 폐암(NSCLC) 환자에게 항체 제제를 주사하기 위한 설명서를 포함하여, 비소세포 폐암(NSCLC)을 치료하는 방법에서 항체 제제를 투여하기 위한 설명서를 포함할 수 있다. 키트에 포함된 설명서는 치료를 필요로 하는 비소세포 폐암(NSCLC) 환자에게 항체 제제를 주사하기 위한 설명서를 포함하여, 비소세포 폐암(NSCLC)을 치료하는 방법에서 항체 제제를 투여하기 위한 설명서를 포함할 수 있다. 키트에 포함된 설명서는 망막, 공막, 유리체, 수정체, 동공, 홍채, 각막, 맥락막, 시신경, 망막 혈관계, 모양체 또는 안각(섬유주대 및 관련 구조 포함)을 포함하는, 그러나 이에 제한되지 않는 눈 병태를 치료하기 위한 방법에서 항체 제제를 투여하기 위한 설명서를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 본 개시 내용의 조성물은 혈관 내피 성장 인자(VEGF)가 상향 조절되거나, 조절 장애가 있거나, 과활성인 눈 병태 또는 장애를 치료하는 데 사용될 수 있다. 일부 측면에서 키트에 포함된 설명서는 나이 관련 황반 변성, 황반 부종, 당뇨병성 황반 부종 (DME), 망막병증, 당뇨병성 망막병증, 근시 변성, 특발성 맥락막 혈관신생, 염증성 맥락막 혈관신생, 망막 혈관신생, 결절 맥락막 혈관병증, 눈 혈관신생, 분지 망막 정맥 폐쇄(BRVO), 중심 망막 정맥 폐쇄, 중심 장액 맥락 망막병증, 망막염, 망막 색소 변성증, 스타가르트병, 어서 증후군, 망막 변성, 안구 내염, 가족성 삼출 유리체 망막병증, 특발성 중심와 부근 모세혈관 확장증, 격자 변성, 황반 원공, 잔존 태아 혈관, 망막 동맥 폐쇄, 및 망막 모세포종을 포함하는, 그러나 이에 제한되지 않는 눈 병태 또는 장애를 치료하는 방법에서 항체 제제를 투여하기 위한 설명서를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 키트에 포함된 설명서는 나이 관련 황반 변성, 습성 나이 관련 황반 변성, 및 신생혈관 나이 관련 황반 변성을 포함하는, 그러나 이에 제한되지 않는 눈 병태 또는 장애를 치료하는 방법에서 항체 제제를 투여하기 위한 설명서를 포함할 수 있다.

[0147] 하기 실시예는 본 발명을 보다 상세히 설명하기 위해 제공된다. 이들은 본 발명을 제한하는 것이 아니라 예시하기 위한 것이다.

[0148] **실시예 1 - 재료 및 방법**

[0149] 도입. 항체 ONS-5010은 베바시주맙의 바이오시밀러를 나타내며, 보관 안정성을 향상시키기 위해 재제제화하였다. 완충 제제는 적어도 장기 보관 동안 항체의 응집을 감소시킬 수 있다고 생각된다. 완충 제제는 베바시주맙 분자의 비공유 및 공유결합 이량체화 둘 모두를 감소시킬 수 있다고 생각된다. 아바스틴® (Genentech, Inc.)으로 판매되는 베바시주맙은 안정제로서 트레할로스를 포함하고 순한 계면 활성제를 포함하는 6.2의 산성 pH의 인산나트륨 완충액으로 제제화되어 있다. 하기에 설명된 실험 접근법은 콜로이드 안정성을 향상시키기 위해 베바시주맙을 재제제화하는 개발 작업을 포함하였다. 완충액과 pH를 변경함으로써, 특히 응집 감소와 관련하여, 안정성의 현저한 향상을 달성하였다.

[0150] 동적 광 산란(DLS: Dynamic Light Scattering). DLS 테스트 방법은 Wyatt DynaPro™ Plate Reader를 사용하여 용액에서 단백질 크기 분포 및 전반적인 콜로이드 안정성에 대한 정보를 제공하였다. 유체역학적 반경으로 용액에서 응집의 존재에 대한 정보를 얻었으며 분자 입체구조를 확인하였다. DLS 테스트는 비변성 조건하에서 용액에서 크기 분포에 대한 직교 측도를 제공하였다.

[0151] 시차 주사 열량 측정법(DSC). 시차 주사 열량 측정법으로 단백질의 용융 전이를 측정하여 용액에서 단백질 열

안정성에 대한 정보를 얻었다. 열량 측정법은 GE VP Capillary DSC 시스템을 사용하여 수행하였다. 단백질을 최적화된 주사 속도에서 25℃에서 95℃로 가열하여 단백질이 풀리면서 용융 전이(Tm)가 발생하도록 하였다. 완충액 대조군을 샘플과 함께 가열하였고 용융 온도 및 전이를 계산하는 데 사용하였다. DSC 프로파일은 항체의 전형이었으며 단백질이 별개의 도메인으로 접혔음을 입증하였다.

- [0152] 크기 배제 크로마토그래피(SE-HPLC). SE-HPLC를 사용하여 항체 크기 변이 분포를 모니터링하였다. SE-HPLC 테스트 방법은 크기에 따라 단백질을 분리한다. 단량체 피크 이전에 용출되는 중은 응집체(HMWS)였고 단량체 피크 후에 용리되는 피크는 분해물(LMWS)이었다.
- [0153] TSK3000SWx1 7.8 mm x 300 mm 컬럼(Tosoh Bioscience 카탈로그# 08541)을 사용하여 유속 0.5mL/min, 실행 시간 30분, 주위 온도에서의 컬럼으로 종을 분리하였다. 이동상은 0.2M 인산칼륨 및 0.25M 염화칼륨을 포함하였으며 pH 6.2였다. 2가지 형태의 샘플 주입이 있었다. 25 mg/mL의 비희석 주입 10 uL 및 0.5 mg/mL의 희석 주입 100 uL(비희석 주입은 가역성 응집체를 포함한 총 응집체를 측정하고 희석 주입은 주로 공유 성질의 이량체를 측정함). 희석 샘플을 이동상 A(0.2M 인산칼륨, 0.25M 염화칼륨, pH 6.2)에 의해 0.5 mg/mL로 희석하였다.
- [0154] 샘플을 24시간 동안 인큐베이션한 후 30℃에서 분석하였다. 자동 샘플 주입기 온도는 전체 실행 기간 동안 30℃로 유지하였다. 데이터는 280nm에서 분석하였다.
- [0155] 양이온 교환 크로마토그래피(CEX). 베바시주맙 샘플을 이동상 A에 희석하고 카르복시펩티다제 B로 분해하였다. 양이온 교환 HPLC 컬럼을 사용하여 종을 분리하였다. 0.5mL/min의 유속을 사용하여 이동상 A 및 이동상 B로 구배를 수행하였다. 컬럼 온도는 40℃로 유지하였고 샘플은 2 내지 8℃로 유지하였다. 데이터는 280nm에서 분석하였다.
- [0156] 미립자 함량(Fluid Imaging). Fluid Imaging(FI) 시스템은 이동하는 유체의 입자를 빠르게 분석하기 위한 통합 시스템이다. 시스템은 샘플 또는 연속 유동에서 입자 또는 세포를 자동으로 계수, 영상화 및 분석한다. FI 시스템에서, 샘플은 펌프에 의해 유동 챔버로 유입된다. AutoImage 모드에서 레이저를 사용하여, FI 시스템은 통과하는 입자의 광 산란을 모니터링하였다. 카메라는 사용자가 정의한 간격으로 이미지를 동기식으로 캡처하도록 설정하였다. 그런 다음 산란 검출 값을 VisualSpreadsheet에 의해 저장하였다(다른 모든 입자 특성 및 이미지에 추가하여). 컴퓨터와 디지털 신호 프로세서가 함께 작동하여 시야의 이미지를 시작, 검색 및 처리한다.
- [0157] 삼투압. 삼투압계를 사용하여 어느점 측정에 의해 완충액 및 단백질 용액의 삼투압을 측정하였다. 고정밀 서미스터(thermister)를 사용하여 샘플 온도를 감지하고, 초 냉각 및 동결 유도 정도를 제어하고, 샘플의 어느점을 측정하였다. 샘플 요구량은 측정당 20 µL이다.
- [0158] 고유 형광(Intrinsic Fluorescence). 고유 형광 분석법은 단백질의 3차 구조에 대한 정보를 제공하는 비침습적 생물 물리학적 특성화 방법이다. 이 방법은 단백질 구조의 폴립 정도를 측정하였다. 단백질 샘플(예를 들어, 트립토판 방출)의 강도 및 최대 파장을 형광 분광계에서 측정하였다. 반복물당 0.1mg/mL 단백질 용액 600 µL를 테스트한다. 방출 스캔: 295nm에서 여기, 310nm에서 시작하고 450nm에서 종료된다.
- [0159] HUVEC 세포 기반 VEGF 중화 분석. 항-혈관신생 단클론 항체 베바시주맙의 주요 작용 기전은 VEGF에 결합하여 그 동족 수용체에 결합하는 것을 방지하는 것이다. 이러한 방식으로, 베바시주맙은 내피세포 증식을 유도하는 VEGF의 능력을 중화하므로, 항-VEGF 항체의 효능은 VEGF 유도된 세포 증식을 억제하는 능력으로 정량화될 수 있다. HUVEC 세포 기반 효능 분석에서, 고정된 농도의 VEGF를 연속 희석된 약물과 함께 인큐베이션한다. 베바시주맙은 용량 의존적 방식으로 VEGF에 결합하여 VEGF가 다른 결합 상호 작용에 사용할 수 없게 된다. 그런 후 이 약물-VEGF 콕테일을 다중 웰 플레이트에 접종된 HUVEC 세포에 첨가하고 지속적인 증식을 위해 추가로 인큐베이션한다. 인큐베이션하는 동안, HUVEC 세포는 VEGF 농도 의존적 방식으로 증식한다. 낮은 약물 농도에서는 더 많은 VEGF를 사용할 수 있으므로 증식율이 높고 그 반대로 마찬가지이다. HUVEC 세포 증식의 항체 용량 의존적 억제는 인큐베이션 종료 시 생존 세포 수를 정량화하여 평가한다. VEGF 중화 분석은 샘플의 효능을 참조 표준과 비교하여 측정하는 상대적인 분석이다. 분석은 세 개의 독립적인 분석 플레이트로 이루어진다. 각 플레이트에서, 표준 및 샘플의 세포 생존 데이터를 통계 소프트웨어를 사용하여 4P 로지스틱 모델에 적합시켜 독립적인 곡선 파라미터로 시그모이드 곡선을 생성한다. 표준 및 샘플 곡선 파라미터를 비교하여 곡선 평행성을 평가하고 평행하다고 간주될 때 테스트 제품의 상대적인 효능을 계산한다. 최종 보고 값은 허용 가능한 변산성 범위 내에 있는 세 개의 독립 값의 평균이다.
- [0160] VEGF 결합 면역 분석. 항-혈관신생 단클론 항체 베바시주맙의 주요 작용 기전은 VEGF에 결합하고 그의 동족 수용체에 대한 결합을 방지하여 혈관 내피세포에 대한 VEGF 매개 유사 분열 효과를 억제하는 것이다. 베바시주맙

에 의한 이러한 VEGF의 증화는 혈관신생 과정을 억제하여 결국 종양의 생존 및 진행을 억제한다. 따라서, 항-VEGF 항체의 효능은 ELISA에서 VEGF에 대한 결합을 측정하여 정량화할 수 있다. 이 분석에서, 고정된 농도의 VEGF를 먼저 다중 웰 플레이트에 코팅한다. 비특이적 결합 부위를 차단한 후, 고정된 VEGF를 연속 희석된 참조 표준 및 테스트 샘플과 반응시킨다. 결합되지 않은 항체를 세척해내고 웰을 VEGF-항체 복합체에 결합하는 서양 고추냉이 페록시다아제(HRP) 결합된 항-카파 경쇄 항체와 함께 인큐베이션한다. 다음으로, 결합되지 않은 2차 항체를 세척해내고 웰을 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB) HRP 기질과 함께 인큐베이션하여 착색 산물을 생성한다. 인산을 첨가하여 발색을 억제하고 흡광도 값을 읽는다. 얻은 광학 밀도(O.D.) 값은 VEGF에 결합된 샘플의 양에 정비례한다. VEGF 결합 분석은 샘플의 효능을 참조 표준과 비교하여 측정하는 상대적인 분석이다. 분석은 두 개의 독립적인 분석 플레이트로 이루어진다. 각 플레이트에서, 표준 및 샘플의 O.D 데이터를 통계 소프트웨어를 사용하여 4P 로지스틱 모델에 적합시켜 독립적인 곡선 파라미터로 시그모이드 곡선을 생성한다. 표준 및 샘플 곡선 파라미터를 비교하여 곡선 평행성을 평가하고 평행하다고 간주될 때 테스트 제품의 상대적인 효능을 계산한다. 최종 보고 값은 허용 가능한 변산성 범위 내에 있는 두 개의 독립 값의 평균이다.

[0161] **실시예 2 - 베바시주맙 입체구조 및 콜로이드 안정성에 대한 완충액, 안정제, pH의 영향**

[0162] 초기 실험에서 베바시주맙의 입체구조 및 콜로이드 안정성에 대해 완충 성분을 평가하였다. 시트레이트, 포스페이트, 및 아세테이트 완충액이 베바시주맙의 안정성에 이상적임을 확인하였다. 더욱이, 이들 완충액은 개별적으로 가열 또는 진탕 관련 스트레스에 의해 유도되는 베바시주맙 응집에 대해 보호 효과를 나타냈다. 추가 실험에서 이들 완충액(시트레이트, 포스페이트 및 아세테이트)의 조합이 우수한 안정화 효과를 나타내는 지를 평가하였다. 시트레이트 포스페이트 완충액은 베바시주맙 매치 조성물(시판되는 아바스틴® 제제의 조성물과 매치) 내 인산나트륨 완충액에 비해 훨씬 더 적은 응집체(공유 유형 이량체 포함) 및 더 적은 전하 중을 생성하였다.

[0163] 50 mM 인산나트륨 완충액에서 트레할로스 안정제의 효과를 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 및 글리신을 포함한 대체 안정제와 비교하였다. 그런 후 다른 안정화된 완충 조성물에서 항체의 입체구조 안정성을 DSC에 의해 평가하였다(도 1). 이 데이터는 표 1에 제시하며, 테스트된 모든 안정제는 트레할로스와 동일하거나 더 우수하였음을 보여준다.

**표 1**

인산나트륨 완충액 중의 대체 입체구조 안정제

완충액 조건	모든 조건: 50mM 인산나트륨	최종 완충액 pH	T <sub>m1</sub>	T <sub>m2</sub>
1	트레할로스 60 mg/mL (매치)	6.20	73.3	83.5
2	트레할로스 25 mg/mL	6.26	73.0	83.0
3	수크로오스 25 mg/mL	6.13	72.9	82.9
4	수크로오스 60 mg/mL	6.11	73.4	83.4
5	소르비톨 25 mg/mL	6.19	73.1	82.9
6	소르비톨 60 mg/mL	6.12	73.6	83.5
7	만니톨 25 mg/mL	6.19	73.0	83.2
8	만니톨 60 mg/mL	6.05	73.7	83.4
9	글리신 16 mg/mL	6.11	73.5	83.3
10	글리신 25 mg/mL	6.05	73.9	83.6

[0164]

[0165] 다음으로 대체 안정제(수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 및 글리신)를 시트레이트 포스페이트 완충액과 함께 사용하였고, 베바시주맙 항체의 입체구조 안정성을 DSC에 의해 평가하였다. 데이터는 표 2에 제시하며, 시트레이트 포스페이트 완충액에서 대체 안정제가 베바시주맙 매치 제제와 동일하거나 더 우수하였음을 보여준다.

표 2

시트레이트 포스페이트(C/P) 완충액 중의 대체 입체구조 안정제

완충액 조건	샘플	pH	Tm1	Tm2
1	베바시주맙 매치: 50 mM 인산나트륨, 트레할로스 60 mg/mL	6.20	73.3	83.5
2	50 mM C/P 수크로오스 60 gm/mL	6.15	73.0	83.0
3	50 mM C/P 소르비톨 60 mg/mL	6.14	73.3	83.3
4	50 mM C/P 만니톨 60 mg/mL	6.11	73.3	83.2
5	50 mM C/P 글리신 25 mg/mL	6.1	73.5	83.6

[0166]

[0167]

안정제로서 트레할로스와 함께 시트레이트 포스페이트 완충액을 사용하여 항체(베바시주맙)의 입체구조 안정성에 대한 pH의 영향을 평가하였다. DSC를 사용하여 항체 안정성을 측정하였다. 표 3에 제시된 데이터는 각 제제 조성물에서 측정된 베바시주맙의 풀림 온도가 5.6보다 높은 pH(5.6, 5.8, 6.0, 6.2)에서만 베바시주맙 매치 조성물에 대해 관찰된 온도와 비슷함을 보여준다. 더 낮은 pH(특히 5.0)에서, 조기 풀림 현상이 약 65°C의 더 낮은 온도에서 발생하므로 이러한 낮은 pH(5.6 미만)는 베바시주맙의 제제에 적합하지 않다.

표 3

50 mM 시트레이트 또는 50 mM 시트레이트 포스페이트 완충액 중의 베바시주맙 열/입체구조 안정성에 대한 pH의 영향

샘플	최종 완충액 pH	Tm1	Tm2	Tm3
베바시주맙 매치	6.20	73.4	83.5	
35mM 시트레이트 트레할로스 60 mg/mL pH5.8	5.79	72.3	83.0	
50mM 시트레이트 트레할로스 60 mg/mL pH5.0	4.99	65.3	71.1	79.6
50mM 시트레이트 트레할로스 60 mg/mL pH5.2	5.13	71.5	80.9	
50mM 시트레이트 트레할로스 60 mg/mL pH5.4	5.32	71.9	82.0	
50mM 시트레이트 트레할로스 60 mg/mL pH5.6	5.51	72.1	82.4	
50mM 시트레이트 트레할로스 60 mg/mL pH5.8	5.70	72.2	82.8	
50mM 시트레이트 트레할로스 60 mg/mL pH6.0	5.93	72.3	82.8	
50mM 시트레이트 트레할로스 60 mg/mL pH6.2	6.13	72.4	83.0	
50mM C/P 트레할로스 60 mg/mL pH5.0	5.08	72.2	81.2	
50mM C/P 트레할로스 60 mg/mL pH5.2	5.25	72.5	81.9	
50mM C/P 트레할로스 60 mg/mL pH 5.4	5.43	72.8	82.3	
50mM C/P 트레할로스 60 mg/mL pH5.6	5.66	72.8	83.1	
50mM C/P 트레할로스 60 mg/mL pH5.8	5.92	72.9	83.1	
50mM C/P 트레할로스 60 mg/mL pH6.0	6.13	73.0	83.2	
50mM C/P 트레할로스 60 mg/mL pH6.2	6.26	73.1	83.4	

[0168]

[0169]

병행 실험으로 완충액으로서 아세테이트를 평가하였다. 아세테이트를 다양한 pH와 함께 5 mM, 15 mM, 및 25 mM의 농도에서 평가하였다(표 4 및 5). 이 실험은 안정제로서 수크로오스(60 mg/ml)와 트레할로스(60 mg/ml)를 비교하였다. 그런 후 각 조성물에서 베바시주맙 분자의 안정성을 DSC에 의해 평가하였다. 데이터는 표 4 및 5에 나타낸다. 아세테이트의 몰 농도를 높이면 Tm이 낮아지고 pH를 높여도 Tm이 낮아짐이 관찰되었다(표 4 및 5). pH 5.6 및 5.8에 대해 향상된 입체구조 안정성이 나타났다(표 5).

**표 4**

아세트레이트 트레할로스 완충 제제 중의 베바시주맙의 입체구조 안정성

샘플	최종 pH	Tm1	Tm2
베바시주맙 매치 50 mM 포스페이트 pH 6.2	6.20	73.4	83.5
5 mM 아세트레이트 159 mM 트레할로스 pH 5.6	5.51	74.2	83.3
15 mM 아세트레이트 159 mM 트레할로스 pH 5.6	5.52	73.9	83.3
25 mM 아세트레이트 159 mM 트레할로스 pH 5.6	5.56	73.8	83.0
5 mM 아세트레이트 159 mM 트레할로스 pH 5.8	5.78	74.1	83.5
15 mM 아세트레이트 159 mM 트레할로스 pH 5.8	5.77	74.0	83.3
25 mM 아세트레이트 159 mM 트레할로스 pH 5.8	5.76	73.8	83.3
5 mM 아세트레이트 159 mM 트레할로스 pH 6.0	5.93	74.1	83.6
15 mM 아세트레이트 159 mM 트레할로스 pH 6.0	5.91	73.9	83.4
25 mM 아세트레이트 159 mM 트레할로스 pH 6.0	5.97	73.8	83.7
5 mM 아세트레이트 159 mM 트레할로스 pH 6.2	6.11	74.1	83.8
15 mM 아세트레이트 159 mM 트레할로스 pH 6.2	6.15	73.8	83.8
25 mM 아세트레이트 159 mM 트레할로스 pH 6.2	6.14	73.6	83.8

[0170]

**표 5**

아세트레이트 수크로오스 완충 제제 중의 베바시주맙의 입체구조 안정성

샘플	실제 완충액 pH	0.5 mg/mL 에서 최종 pH	Tm1	Tm2
베바시주맙 매치 50 mM 포스페이트 pH 6.2	6.20	6.20	73.4	83.7
5 mM 아세트레이트 60mg/mL 수크로오스 pH 5.6	5.57	5.72	74.1	83.4
15 mM 아세트레이트 60mg/mL 수크로오스 pH 5.6	5.52	5.60	73.9	83.0
5 mM 아세트레이트 60mg/mL 수크로오스 pH 5.8	5.76	5.92	74.1	83.4
15 mM 아세트레이트 60mg/mL 수크로오스 pH 5.8	5.73	5.80	73.9	83.3

[0171]

**실시예 3 - 시트레이트 포스페이트 완충 트레할로스 및 아세트레이트 수크로오스 제제에서의 보관 안정성**

[0172]

18개월에 걸친 베바시주맙 분자의 장기 보관 안정성을 평가하기 위해 4가지 완충 제제를 선택하였다. 이들 제제에 베바시주맙 매치/참조 제제(조건 1)와 병행하여 실시하였다. 보관 조건은 다음과 같았다: ~ 25 mg/ml(비희석) 또는 희석된 항체; 5°C, 30°C, 또는 37°C에서 보관; 실온에서 150 rpm으로 진탕; 및 동결/해동 (20°C 내지 실온, 3회 사이클). 테스트한 제제는 다음과 같다.

[0173]

조건 1: 베바시주맙(아바스틴®) 매치

[0174]

50 mM 인산나트륨

[0175]

159 mM 트레할로스

[0176]

0.04% 폴리소르베이트 20

[0177]

pH 6.20

[0178]

충분한 양의 주사용 멸균수

[0179]

조건 2: 베바시주맙 시트레이트 포스페이트, pH 5.8

[0180]

- [0181] 50 mM 시트레이트 포스페이트
- [0182] 159 mM 트레할로스
- [0183] 0.04% 폴리소르베이트 20
- [0184] pH 5.80
- [0185] 충분한 양의 주사용 멸균수
- [0186] 조건 3: 베바시주맙 시트레이트 포스페이트, pH 6.0
- [0187] 50 mM 시트레이트 포스페이트
- [0188] 159 mM 트레할로스
- [0189] 0.04% 폴리소르베이트 20
- [0190] pH 6.0
- [0191] 충분한 양의 주사용 멸균수
- [0192] 조건 4: 베바시주맙 아세테이트, pH 5.6
- [0193] 15 mM 아세테이트
- [0194] 175 mM 수크로오스
- [0195] 0.04% 폴리소르베이트 20
- [0196] pH 5.60
- [0197] 충분한 양의 주사용 멸균수
- [0198] 조건 5: 베바시주맙 아세테이트, pH 5.8
- [0199] 15 mM 아세테이트
- [0200] 175 mM 수크로오스
- [0201] 0.04% 폴리소르베이트 20
- [0202] pH 5.80
- [0203] 충분한 양의 주사용 멸균수
- [0204] 각 보관 조건하에서 항체의 안정성을 크기 배제 크로마토그래피(SEC), 양이온 교환 크로마토그래피(CEX), CE-SDS, HUVEC 세포 기반 VEGF 중화 분석, VEGF 결합 면역 분석 및 미립자 수(PC)를 포함하는, 그러나 이에 제한되지 않는 일련의 통상적인 분석 및 확장된 특성화 분석에 의해 테스트하였다. 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 항체 단량체의 백분율, 총 응집체의 백분율(공유 및 비공유), 및 분해물의 백분율을 평가하였다. 두 제제 유형 모두의 비교 안정성을 베바시주맙(아바스틴®) 참조/매치 조성물과 함께 평가하였다. 18개월에 걸쳐 5°C ± 3°C에서 보관된 장기 보관 안정성에 대한 샘플은 시트레이트 포스페이트 기반 조성물(조건 2 및 3) 및 아세테이트 완충액 기반 조성물(조건 4 및 5) 모두가 아바스틴® 매치 조성물보다 더 안정적임을 나타낸다(도 2a; 도 2a (i); 도 2a (ii); 표 6). [도 2b], [도 2b](i), [도 2b](ii) 및 표 7은 측정된 공유결합 이량체가 5가지 베바시주맙 바이오시밀러 조성물 모두에 존재하지만, 조건 2, 3, 4 및 5는 베바시주맙 매치 조성물(조건 1)에 존재하는 것보다 더 적은 공유결합 이량체를 갖는다는 것을 나타낸다(표 7).

**표 6**

SE-HPLC(비회석 주입)에 의해 측정된 베바시주맙 바이오시밀러 제제 중의 총 응집체 (5°C에서의 장기 안정성)

제제 조성	% 응집체				
	조건 1	조건 2	조건 3	조건 4	조건 5
시간 (5°C 에서)					
T0	6.0	3.1	3.5	5.7	6.2
2 개월	6.3	3.4	3.8	3.4	4.9
3.5 개월	6.3	3.3	3.9	3.4	4.9
7 개월	6.5	3.5	4.0	3.6	4.9
12 개월	6.4	3.4	4.0	3.0	4.1
18 개월	7.0	3.9	4.3	3.4	4.6

[0205]

**표 7**

SE-HPLC(회석 주입)에 의해 측정된 베바시주맙 바이오시밀러 제제 중의 공유결합 이량체 (장기 안정성)

제제 조성	% 공유결합 이량체				
	조건 1	조건 2	조건 3	조건 4	조건 5
시간 (5°C 에서)					
T0	1.7	1.7	1.7	1.5	1.4
3.5 개월	2.0	2.4	1.9	2.3	2.0
7 개월	2.5	2.2	2.5	2.1	2.2
12 개월	2.4	2.1	2.1	1.7	1.9
18 개월	2.9	2.5	2.6	2.1	2.3

[0206]

[0207] 또한, 18개월 장기 보관 안정성 연구 동안 모든 샘플에 대해 양이온 교환 크로마토그래피(CEX)에 의해 측정된 산성 하전된 종을 테스트하였다(표 7 (i), 도 2b (iii), 도 2b (iv) 및 도 2B (v)). 5가지 조성물 모두에서 하전된 종, 특히 산성 하전된 종은 5°C에서 18개월의 보관 동안 크게 변하지 않았다.

[0208]

[표 7 (i)]

CEX-HPLC 에 의해 측정된 베바시주맙 바이오시밀러 제제 중의 % 산성 종 (장기 안정성)

제제 조성	% 산성 종				
	조건 1	조건 2	조건 3	조건 4	조건 5
시간(5°C 에서)					
T0	22.9	25.7	26.5	26.9	26.7
3.5 개월	28.3	27.9	28.1	28.4	27.9
7 개월	29.2	28.8	29.1	29.4	29.4
12 개월	29.7	28.6	29.0	29.5	28.9
18 개월	28.7	27.3	27.3	27.6	27.4

[0209]

[0210] HUVEC 세포 기반 VEGF 중화 분석에 의해 측정된 베바시주맙 바이오시밀러 제제에 대한 상대적인 효능은 조건 1 과 비교하여 모든 조건(조건 2 내지 5)에 대해 90 내지 110% 이내인 것으로 밝혀졌다(표 7 (ii)). 이 발견은 또한 제제(조건 2 내지 5)의 효능이 제제 조성의 변경으로 인해 영향을 받지 않으며 2 내지 8°C에서 18개월의 보관 동안 아바스틴 조성의 제제와 동등함을 확인해 준다.

[0211] [표 7 (ii)]

2 내지 8℃에서 18 개월의 보관 후 HUVEC 세포 기반 VEGF 중화 분석에 의해 측정된 베바시주맙 바이오시밀러 제제(조건 1 내지 5)의 상대적인 효능

샘플 설명	조건 1 과 비교한 상대적인 효능
조건 1	100
조건 2	103
조건 3	101
조건 4	100
조건 5	99

[0212]

[0213] VEGF 결합 면역 분석에 의해 측정된 베바시주맙 바이오시밀러 제제의 상대적인 효능은 조건 1과 비교하여 모든 조건(조건 2 내지 5)에 대해 90 내지 100% 이내인 것으로 밝혀졌다(표 7 (iii)). 이 발견은 또한 제제(조건 2 내지 5)의 효능이 제제 조성의 변경으로 인해 영향을 받지 않으며 2 내지 8℃에서 18개월의 보관 동안 아바스틴 조성의 제제와 동등함을 확인해 준다.

[0214] [표 7 (iii)]

2 내지 8℃에서 18 개월 보관 후 VEGF 결합 면역 분석으로 측정된 베바시주맙 바이오시밀러 제제(조건 1 내지 5)의 상대적인 효능

샘플 설명	조건 1 과 비교한 상대적인 효능
조건 1	100%
조건 2	95%
조건 3	93%
조건 4	97%
조건 5	97%

[0215]

[0216] 가속화된 보관 안정성(30℃)에 대한 샘플은 시트레이트 포스페이트 기반 조성물 및 아세테이트 완충액 기반 조성물 모두가 베바시주맙(아바스틴®) 매치 조성물보다 더 안정함을 나타낸다(도 2c 및 도 2d; 표 8 및 9). [도 2d] 및 표 9는 5가지 베바시주맙 바이오시밀러 조성물 모두에서 측정 가능한 공유결합 이량체가 있음을 나타낸다. 모든 바이오시밀러 제제 조건(2 내지 5)이 베바시주맙 매치 조성물에 존재하는 것보다 더 적은 공유결합 이량체를 갖는 것으로 밝혀졌다.

**표 8**

SE-HPLC(비회석 주입)에 의해 측정된 베바시주맙 바이오시밀러 제제 중의 총 응집체 (30℃에서 가속화된 안정성)

제제 조성	% 응집체				
	조건 1	조건 2	조건 3	조건 4	조건 5
시간(30℃에서)					
T0	6.0	3.1	3.5	5.7	6.2
제 7 일	6.1	3.3	3.3	3.8	5.3
제 14 일	6.6	3.5	4.1	3.9	5.7
3.5 개월	8.3	4.6	5.3	4.1	6.2

[0217]

표 9

SE-HPLC(회석 주입)에 의해 측정된 베바시주맙 바이오시밀러 제제 중의 공유결합 이량체 (30°C에서 가속화된 안정성)

제제 조건	% 공유결합 이량체				
시간(30°C 에서)	조건 1	조건 2	조건 3	조건 4	조건 5
T0	1.7	1.7	1.7	1.5	1.4
2개월	3.6	2.8	3.0	2.3	2.5
3.5개월	4.0	3.2	3.7	2.7	3.2

[0218]

[0219]

가속화된 보관 안정성(37°C)에 대한 샘플은 시트레이트 포스페이트 기반 조성물 및 아세테이트 완충액 기반 조성물 모두가 베바시주맙 매치 조성물보다 더 안정함을 나타냈다(도 2e 및 도 2f; 표 10 및 11). [도 2f] 및 표 11은 5가지 베바시주맙 바이오시밀러 조성물 모두에서 측정 가능한 공유결합 이량체의 존재를 나타낸다. 그럼에도, 모든 조건(2 내지 5)이 베바시주맙 매치 조성물에 존재하는 것보다 더 적은 공유결합 이량체를 갖는다.

표 10

SE-HPLC(비회석 주입)에 의해 측정된 베바시주맙 바이오시밀러 제제 중의 총 응집체 (37°C에서 가속화된 안정성)

제제 조성	% 응집체				
시간(37°C 에서)	조건 1	조건 2	조건 3	조건 4	조건 5
T0	6.0	3.1	3.5	5.7	6.2
제 7일	6.7	3.4	4.0	3.9	5.7
제 14일	7.3	3.9	4.6	4.0	6.2
제 21일	7.8	4.2	4.9	4.3	6.2
제 28일	8.3	4.4	5.1	4.2	5.6
2개월	9.9	5.2	5.9	4.6	6.4

[0220]

표 11

SE-HPLC(회석 주입)에 의해 측정된 베바시주맙 바이오시밀러 제제 중의 공유결합 이량체 (37°C에서 가속화된 안정성)

제제 조성	% 공유결합 이량체				
시간(37°C 에서)	조건 1	조건 2	조건 3	조건 4	조건 5
T0	1.7	1.7	1.7	1.5	1.4
2개월	5.1	3.7	3.8	3.0	3.2

[0221]

[0222]

스트레스 테스트(실온에서 150 rpm으로 진탕)에 대한 샘플은 시트레이트 포스페이트 기반 조성물 및 아세테이트 완충액 기반 조성물 모두가 베바시주맙(아바스틴®) 매치 조성물보다 더 안정함을 나타낸다(도 2g 및 도 2h; 표 12 및 13). 아세테이트-수크로오스 조성물(조건 5)은 응집체 백분율이 약간 높았으며, 이는 베바시주맙의 제제 안정성을 위해 pH 5.8보다 pH 5.6이 선호됨을 나타낸다. [도 2h] 및 표 13은 5가지 베바시주맙 바이오시밀러 조성물 모두에서 측정된 공유결합 이량체를 나타낸다. 모든 조건(2 내지 5)이 베바시주맙(아바스틴®) 매치 조성물에 존재하는 것보다 더 적은 공유결합 이량체를 갖는 것으로 관찰되었다.

표 12

SE-HPLC(순수 주입)에 의해 측정된 베바시주맙 바이오시밀러 제제 중의 총 응집체 (150 rpm 으로 진탕)

제제 조성 시간 (150 rpm 으로 진탕)	% 응집체				
	조건 1	조건 2	조건 3	조건 4	조건 5
T0	6.0	3.1	3.5	5.7	6.2
제 7 일	6.4	3.3	3.9	4.0	5.3
제 14 일	6.5	3.2	4.0	4.0	6.0
제 21 일	6.7	3.8	4.3	4.2	5.7

[0223]

표 13

SE-HPLC(희석 주입)에 의해 측정된 베바시주맙 바이오시밀러 제제 중의 공유결합 이량체 (150 rpm 으로 진탕)

제제 조성 시간 (150 rpm 으로 진탕)	% 공유결합 이량체				
	조건 1	조건 2	조건 3	조건 4	조건 5
T0	1.7	1.7	1.7	1.5	1.4
제 21 일	2.8	2.2	2.4	2.0	2.1

[0224]

[0225]

스트레스 테스트(동결/해동 테스트)에 대한 샘플은 시트레이트 포스페이트 기반 조성물 및 아세테이트 완충액 기반 조성물 모두가 동결/해동 스트레스에 대해 보호를 제공한다는 점에서 베바시주맙(아바스틴®) 매치 조성물과 동등함을 나타낸다(2i 및 도 2j; 표 14 및 15). 아세테이트-수크로오스 조성물(조건 5)은 응집체 백분율이 약간 높았으며, 이는 베바시주맙의 제제 안정성을 위해 pH 5.8보다 pH 5.6이 선호됨을 나타낸다. [도 2j] 및 표 15는 5가지 베바시주맙 바이오시밀러 조성물 모두에서 측정 가능한 공유결합 이량체의 존재를 나타낸다. 모든 조건(2 내지 5)이 베바시주맙 매치 조성물에 존재하는 것보다 더 적은 공유결합 이량체를 가졌다.

표 14

SE-HPLC(비희석 주입)에 의해 측정된 베바시주맙 바이오시밀러 제제 중의 총 응집체 (150 rpm 으로 진탕)

제제 조성 동결/해동 스트레스 테스트	% 응집체				
	조건 1	조건 2	조건 3	조건 4	조건 5
T0	6.0	3.1	3.5	5.7	6.2
사이클 1 RT/-20°C	6.1	3.1	3.8	3.7	5.2
사이클 3 RT/-20°C	6.2	3.2	3.7	3.6	5.8

[0226]

**표 15**

**SE-HPLC(회석 주입)에 의해 측정된 베바시주맙 바이오시밀러 제제 중의 공유결합 이량체 (동결/해동 스트레스)**

제제 조건 동결/해동 스트레스 테스트	% 공유결합 이량체				
	조건 1	조건 2	조건 3	조건 4	조건 5
T0	1.7	1.7	1.7	1.5	1.4
사이클 1 RT/- 20°C	1.7	1.7	1.7	1.6	1.6
사이클 3 RT/- 20°C	1.7	1.6	1.8	1.6	1.7

[0227]

**[0228] 실시예 4 - 시트레이트 포스페이트 완충 트레할로스 및 아세테이트 수크로오스 제제에서의 베바시주맙 바이오시밀러의 생물 물리학적 특성**

[0229] 4가지 완충 바이오시밀러 테스트 제제의 생물 물리적 특성을 베바시주맙 매치 참조 제제와 병행하여 평가하였다. 시차 주사 열량 측정법(DSC), 동적 광 산란(DLS), 형광 분광법(고유 형광)에 의해 테스트된 것들을 포함하는, 그러나 이에 제한되지 않는 생물 물리적 특성을 평가하였다. 바이오시밀러의 유사성은 여러 직교 도구에 의해 평가하였으며, 이러한 생물 물리학적 방법은 생물학적 유사성을 평가하기 위한 직교 분석 방법 내에 있는 그러한 접근법 중 하나이다. 직교 도구는 베바시주맙 바이오시밀러의 4가지 완충 제제(조건 2 내지 5)의 생물 물리적 특성이 베바시주맙 매치 조성물(조건 1)과 유사하거나 더 우수하였음을 나타낸다.

[0230] 모든 제제에서 베바시주맙의 용융 온도, 이에 따른 열적 풀림 패턴은 약 73°C의 Tm1 및 약 83°C의 Tm2와 유사하다(표 16). 이는 개발된 모든 제제 조건이 베바시주맙과 유사한 입체구조 안정성을 제공함을 나타낸다. 궁극적으로 이는 실시예 3에 설명된 장기 안정성 연구(5°C에서 18개월 보관)이며, 이는 결정적으로 조건 2 내지 5를 베바시주맙이 더 안정하고 덜 응집되기 쉬운 제제(즉, 조성물)로서 확인해 준다.

**표 16**

**DSC에 의해 측정된 베바시주맙 바이오시밀러 제제 조성물의 입체구조 안정성**

제제 조건	샘플	실제 완충액 pH	Tm1	Tm2
1	베바시주맙 매치	6.2	73.3	83.3
2	베바시주맙 시트레이트 포스페이트 pH 5.8	5.8	72.8	82.8
3	베바시주맙 시트레이트 포스페이트 pH 6.0	6.0	72.4	82.9
4	베바시주맙 아세테이트 pH 5.6	5.6	73.5	83.1
5	베바시주맙 아세테이트 5.8	5.8	73.6	83.3

[0231]

[0232] 4가지 제제 조건 모두에서 베바시주맙 바이오시밀러의 유체역학적 특성에 대한 동적 광 산란(DLS) 기반 평가를 베바시주맙 매치 조성물(조건 1)과 비교하여 평가하였다. 베바시주맙 바이오시밀러의 유체역학적 반경은 조건 1 내지 3에서 약 6 nm에서 7 nm(15 mg/ml의 농도에서)로 증가한다(표 17, 도 3). 아세테이트 조건, 4 및 5는 베바시주맙 매치 조성물(조건 1)과 비교하여 현저히 다른 크기 경향을 보였으며, 이는 더 나은 콜로이드 안정성을 나타낸다. 시트레이트 포스페이트 조건, 2 및 3의 유체역학적 크기는 경향이 베바시주맙 매치 조건(조건 1)과 유사하였지만, 가역적 응집체 및 공유결합 이량체 형성 경향(실시예 3에 설명된 바와 같이 18개월의 기간에 걸쳐 장기 보관 및 가속화된 온도 보관 안정성)은 응집에 대해 더 우수한 보호를 제공함을 나타낸다.

표 17

DLS에 의해 상이한 제제 조건에 대해 측정된 유체역학적 크기(평균) 및 확산 계수(평균)

제제	조건 1		조건 2		조건 3		조건 4		조건 5	
	평균 Rh (nm)	평균 확산 계수 (nm)	평균 Rh (nm)	평균 확산 계수 (nm)	평균 Rh (nm)	평균 확산 계수 (nm)	평균 Rh (nm)	평균 확산 계수 (nm)	평균 Rh (nm)	평균 확산 계수 (nm)
1.0	5.6	4.31E-07	5.7	4.30E-07	5.6	4.24E-07	7.6	3.29E-07	6.1	2.51E-07
2.0	6.1	3.94E-07	6.4	3.80E-07	6.3	3.83E-07	6.2	3.87E-07	7.5	3.22E-07
5.0	6.7	3.59E-07	6.9	3.51E-07	6.7	3.60E-07	6.0	4.04E-07	6.3	3.82E-07
10.0	7.2	3.39E-07	7.2	3.31E-07	7.0	3.33E-07	5.8	4.20E-07	5.9	4.13E-07
15.0	7.3	3.27E-07	7.4	3.25E-07	7.4	3.21E-07	5.5	4.44E-07	5.5	4.42E-07
20.0	7.6	3.33E-07	7.9	3.06E-07	7.9	3.05E-07	5.1	4.76E-07	5.3	4.60E-07
25.7	8.0	3.02E-07	8.5	2.81E-07	8.7	2.85E-07	5.1	4.92E-07	5.2	4.73E-07

주: 여기에 굵게 표시된 Rh는 다중 모드 측정값이다.

[0233]

[0234]

고유 형광 분광법은 매치 조성물(조건 1)로서 베바시주맙과 유사한 입체구조 안정성을 제공하는 모든 제제 조건을 나타낸다(표 18 및 도 4). 이 테스트의 주요 생물 물리학적 기술자(descriptor)(최대 흡광도 및 최대 파장)는 모든 제제 조건에서 유사하다.

표 18

평균 피크 최대값 및 흡광도를 나타내는 모든 제제 조건에 대한 고유 형광 스펙트럼

제제 조건	제제 설명	트립토판 - 295/310	
		평균 피크 최대값 (nm)	평균 흡광도
1	베바시주맙 매치	341	542.6
2	베바시주맙 시트레이트 포스페이트 pH 5.8	338	502.7
3	베바시주맙 시트레이 포스페이트 pH 6.0	336	522.3
4	베바시주맙 아세테이트 pH 5.6	337	518.5
5	베바시주맙 아세테이트 pH 5.8	336	557.6

[0235]

[0236]

베바시주맙은 pH의 미묘한 변화에도 상당한 민감도를 나타내어 제어되지 않는 경우 공정 중간체에 또는 약물 물질에 존재하는 응집체의 양이 증가하는 것으로 나타났다. 항체 ONS-5010은 베바시주맙의 바이오시밀러를 나타내며, 보관 안정성을 향상시키기 위해 환외여과/정용여과 공정이 개선되어왔다. ONS-5010에 대한 최종 제제의 지정된 pH 범위는 5.9 내지 6.3이다. ONS-5010 개발 중에 6.2 이상에 근접한 pH 값이 HMWS%의 지속적인 증가를 보이는 것으로 관찰되었다. 또한, 베바시주맙은 "가역적 응집"이라는 추가 현상을 나타낸다. 처방된 보관 조건(2 내지 8°C)에서 시간이 경과함에 따라 원료 의약품에 존재하는 전체 % HMWS 중의 일부가 평형에 도달할 때까지 응집된 상태로 진행할 것이다. 이는 보관시 원료 의약품 또는 완제 의약품의 유통 기한에 대한 추가적인 우려를 나타낸다. 따라서 ONS-5010의 제조 공정 개발은 주로 전체에 걸쳐 허용 가능한 양의 % HMWS를 알고 유지하는 데 중점을 두었다. 하기 실시예는 하류 제조 공정인 환외여과/정용여과(UF/DF)에 이어 제제화 및 최종 여과에서 최종 단위 조작의 개발을 자세히 설명한다.

[0237]

**실시예 5: 종래의 UF/DF**

[0238]

가장 효과적인 처리 방법을 결정하기 위해 일련의 실험을 수행하였다. ONS-5010을 농축하고 최종 제제 원충액

(FFB: Final Formulation Buffer)으로 정용여과하는 종래의 UF/DF 공정이 실행 가능한지 결정하기 위해 초기 세트의 실험을 수행하였다. 조건은 표 19에 나타낸다.

표 19

종래의 TFF 공정의 공정 변수 및 분석 결과

	파라미터	조건 (N=3)
조건	막 유형	재생 셀룰로오스 PES
	막 컷오프	30 kD
	질량 부하 (g/m <sup>2</sup> )	100 – 150
	정용여과 완충액	FFB, FFB + 0.02 % (v/v) PS-20
	정용여과 부피	≥ 5
	부하 물질의 NaCl 농도 (mM)	118 – 237
절차	정용여과에서 ONS-5010 농도 (g/L)	12 – 30
조작 파라미터 (정용여과)	TMP	14 – 16
	공급 플럭스 (LMH)	240 – 720
	막면 유속 (LMH)	198 – 645

[0239]

표 20

종래의 TFF 공정의 분석 결과

중간 물질	실행 1	실행 2	실행 3
부하 물질	2.34	1.05	1.14
BDS	5.73	5.29	4.68
Δ % HMWS	+ 3.39	+ 4.24	+ 3.54

[0240]

[0241] HMWS 증가의 대부분은 정용여과 동안 관찰되었다(도 6 및 표 20). 이 단계에서, 원래 pH 5.0 및 전도도 25 mS/cm의 아세테이트 용액에 있던 물질을 pH 6.1 및 전도도 약 3.7 mS/cm인 최종 제제 완충액 내로 교환하였다.

[0242] 응집에 대한 pH 및 전도도의 영향

[0243] 표 21의 조작 조건을 이용하여 pH 및 전도도의 영향을 분석하기 위한 실험을 수행하였다. 출발 물질을 약 30 g/L로 농축하고 분취량을 취하여 0.5 M 인산나트륨, pH 8.0를 사용하여 최종 pH 6.1로 적정하였다(도 7). 이는 전도도에 거의 영향을 미치지 않으면서 pH를 증가시켜 결과적으로 HMWS가 약 2.2% 증가하였다. 남은 농축액을 물 중 6%(m/v) 트레할로스 내로 정용여과하여 결과적으로 pH의 큰 변화 없이 전도도가 25 mS/cm에서 약 1 mS/cm로 감소하였다. 응집 수준은 변경되지 않았으며(도 8, 데이터 포인트 1 및 2), 이로써 정용여과 동안 전도도가 변경되고 pH가 일정하게 유지될 때 HMWS가 영향받지 않는다는 것을 확인하였다. 6%(w/v) 트레할로스 중의 UF/DF 단계에서 회수된 물질은 나중에 대략적인 단백질 농도 25 g/L 및 포스페이트 몰 농도 51 mM을 목표로 하여 6%(w/v) α, α' 트레할로스 및 PS-20 없는 FFB 중 0.5M 인산나트륨을 사용하여 최종 단백질 농도 및 포스페이트 함량으로 희석하였다. 이러한 첨가 동안 HMWS는 1.64%까지 증가하였으며(도 8). 이는 농축 후 제거된 분취액의 pH를 조정하는 동안 관찰된 HMWS 증가와 관련이 있다(도 7). 폴리소르베이트-20을 첨가하여 0.04%(v/v)의 최종 농도를 얻었으며 결과적으로 응집이 증가하지 않았다. 마지막으로, BDS는 진공 여과 단위를 사용하여 0.2 μm 여과하였으며, 이는 0.50%의 응집을 추가로 증가시켰다. 이 실험은 UF/DF 단계 동안 대부분의 HMWS 증가의 근본 원인이 물질의 pH 변화에서 기인함을 보여주었다.

표 21

**α,α' 트레할로스에서 정용여과에 대한 공정 변수 및 분석 결과**

	파라미터	α,α' 트레할로스에서 정용여과 실험
	로트 #	B140101/03-D14
조건	막 유형	PES, 30 kD
	질량 부하 (g/m <sup>2</sup> )	150
	정용여과 완충액	물 중 6 % (w/v) α,α' 트레할로스
	정용여과 부피	5.3
	부하 물질	비회석
조작 파라미터 (정용여과)	TMP (psi)	15
	공급 플럭스 (LMH)	576
	막면 유속(LMH)	530

[0244]

표 22

**α,α' 트레할로스에서 정용여과에 대한 SEC-HPLC 결과**

중간 물질	α,α' 트레할로스에서 정용여과
출발 물질	1.57
사전 여과된 BDS	3.02
BDS	3.14
Δ % HMWS	1.95

[0245]

**실시예 6: 2단계의 정용여과 단계**

[0246]

[0247]

즉각적인 pH 변화가 종래의 UF/DF 공정에서 보이는 점진적인 증가보다 견고(robust)하다고 입증되는지 확인하기 위해 2단계의 정용여과 단계로 실험을 설계하였다. 세 가지 조건을 테스트하였다(표 22). 첫 번째로, 물 중 6%(w/v) α, α'-트레할로스의 2 정용여과 부피 후에 포스페이트 급증을 적용한 후 PS-20 없는 5 정용여과 부피가 뒤따른다. 이는 즉각적인 pH 변화를 허용했지만(급증을 통해) 추가 정용여과를 통해 견고하고 재현 가능한 pH 및 포스페이트 농도를 생성해야 한다. 두 번째 조건에서 42 mM 제1 인산나트륨, 2 mM 제2 인산나트륨, 6% (w/v) α, α'-트레할로스(pH 5.5)에서 두 번째 정용여과 단계를 수행하였다. 회수 후에 남은 제2 인산나트륨을 섞어 pH를 목표로 조정하였다. 마지막으로, 2 정용여과 부피의 물 중 6%(w/v) α, α'-트레할로스에 5 정용여과 부피의 FFB가 뒤따르는 조건을 테스트하였다. 결과는 표 23에 나타난다.

표 23

공정 변수: 2 단계의 정용여과 단계

파라미터	조건 1	조건 2	조건 3
절차	6% α,α'-트레할로스에서 2 DV 후 조정, 이어서 FFB 에서 5 DV	6% α,α'-트레할로스에서 2 DV + 인산나트륨에서 5 DV + 회수 후 제 2 인산나트륨 조정	6% α,α'-트레할로스에서 2 DV, 이어서 FFB 에서 5 DV
실행 횟수	1	1	2
조건			
막	PES		
표면적 (m <sup>2</sup> )	0.02		0.3
질량 부하 (g/m <sup>2</sup> )	200	200	200
완충액 #1	물 중 6% (w/v) α,α- 트레할로스		
정용여과 부피	2.7	2.1	2.3 - 2.4
완충액 #2	PS-20 없는 FFB	42 mM 제 1 인산나트륨, 2 mM 제 2 인산나트륨, 6% (w/v) α,α-트레할로스	PS-20 없는 FFB
정용여과 부피	5.1	5.2	5.0 - 5.4
조정 용액	0.51 M 인산나트륨 pH 5.74	고체 제 2 인산나트륨	N/A
정용여과 조작 파라미터			
TMP	15		
공급 플럭스 (LMH)	240		

[0248]

표 24

SEC-HPLC 결과: 2 단계의 정용여과 단계

중간 물질	조건 1		조건 2	조건 3
부하	0.82		1.17	1.17
BDS	2.58	2.60	3.18	2.86
Δ % HMWS	1.76	1.78	2.01	1.69

[0249]

[0250]

세 가지 조건 모두 % HMWS의 상당한 증가를 가져 왔는데, 이는 종래의 UF/DF 실험보다 낮지만 인산나트륨에서 수행한 모든 정용여과가 % HMWS를 증가시킨다는 것을 나타냈다. 이 실험의 결과를 기초로 하여, 모든 추가 실험은 회수 후 포스페이트 및 폴리소르베이트-20을 첨가한 정용여과를 위한 물 중 6%(w/v) α, α-트레할로스를 사용하여 수행하여 잔류액을 BDS 제제(5.8 g/L 제1 인산나트륨 일수화물, 1.2 g/L 제2 인산나트륨 무수물, 60 g/L α, α- 트레할로스, 0.04% 폴리소르베이트 20, pH 6.1)로 조정하였다.

[0251]

실시예 7: BDS 중의 HMWS 수준에 대한 최종 pH의 영향

[0252]

BDS 중의 HMWS 수준에 대한 최종 pH의 영향을 확인하기 위해서, 물 중 6% α, α-트레할로스에서 정용여과를 수행하고 회수된 잔류액을 pH 5.5, 5.7, 5.9, 및 6.1로 조정하는 실험을 수행하였다. pH를 조정하는 데 인산나트륨(0.5M, pH 9), 2M HEPES, pH 9, 및 1N NaOH를 사용하여 용액이 % HMWS에 영향을 미쳤는지 또는 pH가 % HMWS 증가의 유일한 동인이었는지 확인하였다(도 9).

[0253]

[도 9]의 결과는 pH가 증가함에 따라 더 높은 % HMWS를 가져 BDS의 pH가 % HMWS에 상당한 영향을 미쳤음을 확인해준다. 용액 성분은 % HMWS에 영향을 미치지 않는 것으로 보였으며, 이는 pH가 % HMWS 증가의 주요 동인이었다는 추가 증거이다.

[0254]

실시예 8: % HMWS에 대한 pH 조정 동안 단백질 농도의 영향

[0255] pH 조절 동안 단백질 농도가 % HMWS에 영향을 미치는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 정용여과는 물 중 6% α, α'-트레할로스에서 수행하였다. 회수 후, 잔류액은 물 중 6% α, α'-트레할로스를 사용하여 25, 28, 또는 30 g/L로 희석하였다. 그런 후 25 g/L 및 30 g/L 부분을 3개의 분취량으로 나누고 포스페이트를 조정하였다. 28 g/L 부분을 4개의 분취량으로 나누었다. 3개는 일반적인 포스페이트 조정을 거쳤지만 4번째는 분말화된 제1 인산나트륨과 제2 인산나트륨을 첨가하여 수행하여 51 mM, pH 6.0의 최종 인산나트륨 농도에 도달하였다.

[0256] [도 10]의 결과는 회수된 ONS-5010 잔류액의 농도가 30 - 25 g/L로 변할 때 % HMWS에 영향이 없었음을 보여준다. 28 g/L 농도에 대한 결과는 추가로 포스페이트 급증의 조성이 % HMWS 수준에 영향을 미치지 않는 것으로 보였다.

[0257] **실시예 9: 최종 UF/DF 공정**

[0258] 표 27에 개략한 파라미터와 [도 11]에 개략한 공정을 사용하여 0.02 m<sup>2</sup> 모델 규모에서 개정된 공정을 확인하기 위해 세 번의 실험을 수행하였다. 식 1 내지 4에 의해 인산나트륨 및 폴리소르베이트 성분을 추가하였다. 세 번의 실험을 표 26에 나타낸다. 확인 실험의 결과는 긍정적이었다. 최종 용액은 5.83 g/L 제1 인산나트륨 및 1.22 g/L 제2 인산나트륨을 함유하였다. 모든 실험에서 최종 포스페이트 농도는 51 mM이었고 모든 실험에서 최종 폴리소르베이트-20 농도는 0.04% v/v였다. % HMWS는 가역적 및 비가역적 응집체를 측정하기 위한 분석에서 변화로 인해 이전 연구보다 모든 경우에서 더 높았다. pH, 전도도, 농도, 및 % HMWS는 세 번의 실험에서 모두 매우 일관적이었으며 UF/DF 공정이 견고하고 재현 가능했음을 나타낸다.

표 25

UF/DF 및 BDS의 충전을 위한 공정 매개변수

단계 설명	공정 파라미터	목표	범위
막 준비	막 기공 크기 (kDa)	30	
	막 유형	PES	
	평형 부피 (L/m <sup>2</sup> )	5	NA
한외여과	막 부하 (g/m <sup>2</sup> )	NA	≤500
	공급 유속 (모든 조작) (LMH)	375	≤450
	잔류물 압력 (psi)	5	≤25
	조작 TMP (모든 조작) (psig)	15	≤20
정용여과	용액	물 중 6% (w/v) α,α'-트레할로스	
	정용여과 부피	5	≥5
농축-탈분극	재순환 -P <sub>F</sub> (psig)	NA	≤30
	재순환-시간 (min)	10	≤60
	완충액 플래시-P <sub>F</sub> (psig)	NA	≤30
	완충액 플래시-시간 (min)	10	≤60
	조정 전 단백질 농도 (g/L)	35	30 - 40
	플러그 흐름 추적 부피 (mL)	30 ± 1.5 g/L의 단백질 농도를 얻도록 계산됨	
인산나트륨 및 폴리소르베이트 20 첨가	조정 후 단백질 농도 (g/L)	25	22.5 - 27.5
	최종 투과액/잔류액 pH	6.2	5.9 - 6.3
	최종 투과액/잔류액 전도도 (mS/cm)	3.5	3.5 ± 1
여과 및 최종 충전	농축 후 침층 필터	MCE/보로실리케이트 유리 <sup>a</sup>	
	농축 후 침층 필터 용량 (L/m <sup>2</sup> )	25	≤25
	터미널 필터 막 재료	PVDF	
	터미널 필터 막 (L/m <sup>2</sup> )	50	≤50
BDS의 유지 시간	플럭스 (LMH)	300	≤300
	단기 보관	5 ± 3°C에서 ≤60 일	
	장기 보관	제조일로부터 60 일 이내에 20 ± 5°C 보관되어야 함	
예상 단계 수율 (%)		≥95	≥90

<sup>a</sup> 여과재는 보로실리케이트 유리를 사용하는 사전 필터가 있는 혼합 셀룰로오스 에스테르였다.

[0259]

[0260] 식 1: 인산나트륨 첨가를 위한 계산

[0261] 
$$V_{0.51M \text{ 인산나트륨 저장액}} = \frac{V_i}{9}$$

[0262] ·  $V_i$  = UF/DF로부터 회수한 잔류액의 부피

[0263] 식 2: 폴리소르베이트-20 첨가를 위한 계산

[0264] 
$$V_{10\% \text{ PS-20 저장 용액}} = \frac{V_{ii}}{249}$$

[0265] ·  $V_{ii}$  = 0.51M 인산나트륨 저장 용액을 첨가한 후 회수한 잔류액의 부피

[0266] 식 3: 최종 부피의 결정

[0267] 
$$V_{\text{최종}} = \frac{C_{iii}V_{iii}}{25}$$

[0268] ·  $V_{\text{최종}}$  = 25g/L의 표적 단백질 농도에 도달하는 데 필요한 총 부피 (L).

[0269] ·  $C_{iii}$  = 0.51M 인산나트륨 및 폴리소르베이트 20 저장 용액을 첨가한 후 회수한 물질의 농도 (g/L).

[0270] ·  $V_{iii}$  = 0.51M 인산나트륨 및 폴리소르베이트 20 저장 용액을 첨가한 후 희석 직전의 회수한 물질의 부피 (L).

[0271] 식 4. 단백질 농도 희석액 첨가를 위한 계산

[0272] 
$$V_{\text{FFB (PS-20 포함)}} - V_{\text{FFB (PS-20 없음)}} = V_{\text{최종}} - V_{iii}$$

[0273] ·  $V_{\text{FFB (PS-20 포함)}}$  = 단백질을 25g/L로 희석하고 식 3에서 계산된  $V_{\text{최종}}$ 을 달성하는 데 필요한 0.04%(m/v) PS 20이 포함된 최종 제제 완충액의 부피 (L).

[0274] ·  $V_{\text{최종}}$  = 식 3에서 계산된 총 부피 (L).

[0275] ·  $V_{iii}$  = 0.51M 인산나트륨 및 폴리소르베이트 20 저장 용액을 첨가한 후 희석 직전의 회수한 물질의 부피 (L).

**표 26**

**UF/DF 확인 실행의 결과**

속성	세부 사항	실행 1	실행 2	실행 3
pH	5.9 - 6.3 (6.2)	6.0	6.0	6.0
전도도 (mS/cm)	N/A	3.98	3.88	3.84
[단백질] (mg/mL)	23-27.5 (25)	25.2	24.6	24.9
SEC-HPLC 방법	TM-0026 (주요 피크) 및 TM-0033 (HMWS)			
%주요 피크 (단량체)	≥ 95	98.5	98.6	98.5
% HMWS	≤ 5	4.5	4.6	4.7
Met258	≤ 2	1.3	1.2	1.3

[0276]

표 27

UF/DF 확인 실행을 위한 파라미터

파라미터	값
막	PES (Pall Centramate Omega)
표면적 (m <sup>2</sup> )	0.02
질량 부하 (g/m <sup>2</sup> )	200
정용여과 완충액	물 중 6 % (w/v) α,α-트레할로스
정용여과 부피	5
공급 플럭스 (LMH)	240
TMP (psi)	15

[0277]

[0278]

표 27에 설명된 공정은 막 부하와 공급 유속이 낮지만 견고하고 재현 가능한 공정인 것으로 나타났다. 막 부하는 원하는 공정 시간과 투과 플럭스(시간 경과에 따른 투과 부피)의 계수이다. 투과 플럭스는 공급 속도(LMH), 잔류액 압력/막간 차압 및 물질의 점도에 의해 영향을 받는다. 합리적인 기간에 걸쳐 최소 막 면적에서 최대량의 물질에 필요한 최적 조건을 결정하기 위해 두 가지 최적화 실험을 수행하였다. 첫 번째는 제품 품질에 대한 플럭스 및 유속의 영향을 결정하는 것이었고(% HMWS 증가로 결정함) 두 번째는 공정에 허용되는 막 부하를 결정하는 것이었다.

[0279]

실시에 10 : 제품 품질에 대한 플럭스 및 공급 속도의 영향

[0280]

0, 5, 10, 15, 20, 및 25 psi의 잔류액 압력에서 100, 200, 300, 400, 및 500 LMH의 공급 속도에 대해 플럭스 속도를 얻었다. TMP가 잔류액 압력에 의해 결정되기 때문에 TMP보다는 잔류액 압력 조절을 선택하였다. 실험 파라미터는 표 28에 나타난다. 결과는 [도 12 내지 14]에 나타난다. [도 12]는 초기 ONS-5010 농도에서 5가지 공급 유속에 대한 초기 투과 플럭스 대 잔류액 압력 곡선을 보여준다. [도 13]은 역시 초기 ONS-5010 농도에서 5가지 공급 유속에 대한 플럭스 대 잔류액 압력 곡선을 보여준다. [도 14]는 약 50 g/L로 농축된 ONS-5010으로 5가지 공급 유속에 대한 플럭스 대 잔류액 압력 곡선을 보여준다. 실험은 테스트한 어떤 조건하에서도 추가 잔류액 압력으로 투과 플럭스가 크게 증가하지 않았음을 나타냈다. 따라서 잔류액 압력은 5 psi로 설정하였다.

표 28

플럭스 및 공급 속도의 영향 실험

파라미터	값		
막	PES (Pall Centramate Omega)		
표면적 (m <sup>2</sup> )	0.1		
질량 부하 (g/m <sup>2</sup> )	200		
초기 농도 (g/L)	2.3 g/L		
최종 농도 (g/L)	50 g/L		
정용여과 완충액	물 중 6 % (w/v) α,α-트레할로스		
정용여과 부피	5		
유속 (LMH)	300	375	450
잔류액 압력 (psi)	5		

[0281]

[0282]

실시에 11 : 정용여과 공정에 대한 농도의 영향

[0283]

정용여과(DF)를 위한 최적의 농도는 전형적으로 가장 큰 투과 플럭스로 가장 작은 부피를 허용하는 것이다. DF 최적화 파라미터는 농도에 투과 플럭스를 곱하여 결정한다. 얻은 최대 수는 UF/DF를 수행하기 위한 최적의 농도이다. [도 15]는 테스트한 범위에서 농도가 투과 플럭스에 영향을 미치지 않았음, 즉, DF 최적화 계수가 계속 증가하였음을 보여준다. 따라서, 35 g/L에서 정용여과의 이전 목표가 유지하였다. 이것은 포스페이트 첨가 공정과 결합되어 견고하고 재현 가능한 UF/DF 공정을 생성하였다.

[0284] **실시예 12: 허용 가능한 막 부하의 결정**

[0285] 500 g/m<sup>2</sup>의 막 부하를 목표로 하였으며 여러 유속에서 이를 평가하기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다. 이들을 대조 조건에 대해 테스트하였다. 5DV UFDF 및 시스템 플러시 후 물질의 샘플을 공정 A.0에 따라 51 mM 인산염 및 0.04% 트윈 20으로 급증시키고 SEC-HPLC 분석 전에 시린지 여과하였다(표 30). 표 30에서 나타난 바와 같이, HMWS의 변화는 공급 유속의 증가에 따라 증가하지 않았으며, 3가지 실험 모두 대조 실험(실험 4)에 의한 HMWS에 대해 비슷하였다.

표 29

허용 가능한 막 부하의 결정

파라미터	실험 1	실험 2	실험 3	대조
막	PES (Pall Centramate Omega)			
표면적 (m <sup>2</sup> )	0.02			
질량 부하 (g/m <sup>2</sup> )	500			200
정용여과 완충액	물 중 6 % (w/v) α,α-트레할로스			
정용여과 부피	5			
유속 (LMH)	300	375	450	240
간류액 압력 (psi)	5			N/A
TMP (psi)	N/A			15

[0286]

표 30

허용 가능한 막 부하의 결정의 결과

속성	HMWS			HMWS		LMWS	
	출발	BDS	Δ	출발	BDS	출발	BDS
실험 1	2.2	6.0	3.8	97.7	93.9	0.05	0.05
실험 2	2.3	6.1	3.8	97.7	93.9	0.05	0.04
실험 3	2.7	6.1	3.4	97.3	93.9	0.05	0.04
실험 4	2.7	6.4	3.7	97.2	93.5	0.06	0.05

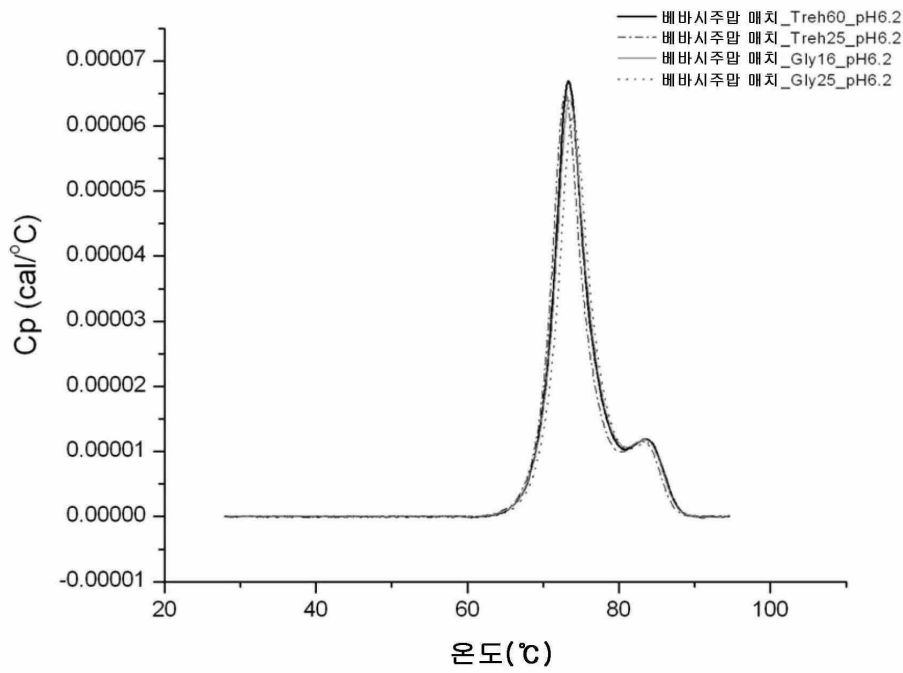
[0287]

[0288] **실시예 13 : ONS-5010과 아바스틴 제제 간의 비교 연구**

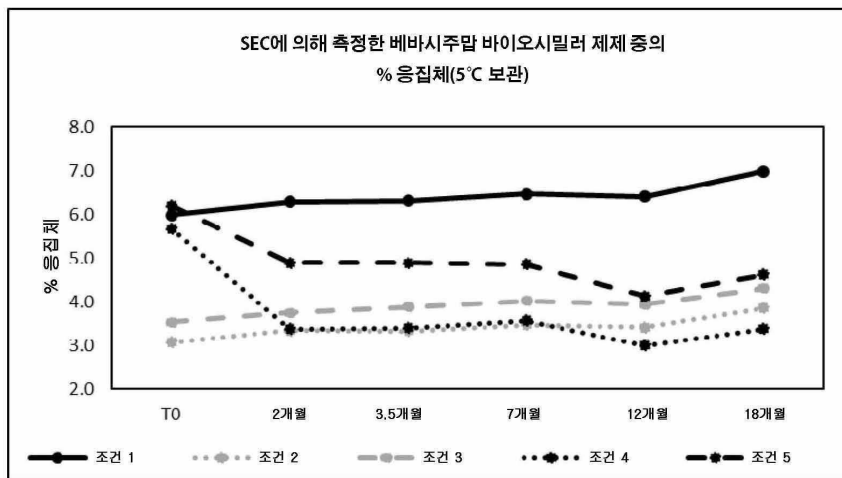
[0289] ONS-5010의 효능을 미국에서 사용하기 위해 제제화된 아바스틴과 E.U.에서 사용하기 위해 제제화된 아바스틴을 포함하는 대체 베바시주맵 제제와 비교하였다. [도 16]은 ONS-5010, 미국 라이선스 아바스틴 및 E.U. 라이선스 아바스틴의 농도-시간 프로파일을 평균으로 보여준다. 시간 0에서 수직선은 투약을 나타낸다. 이 결과는 세가지 제품 간의 높은 유사성 정도를 보여준다.

도면

도면1

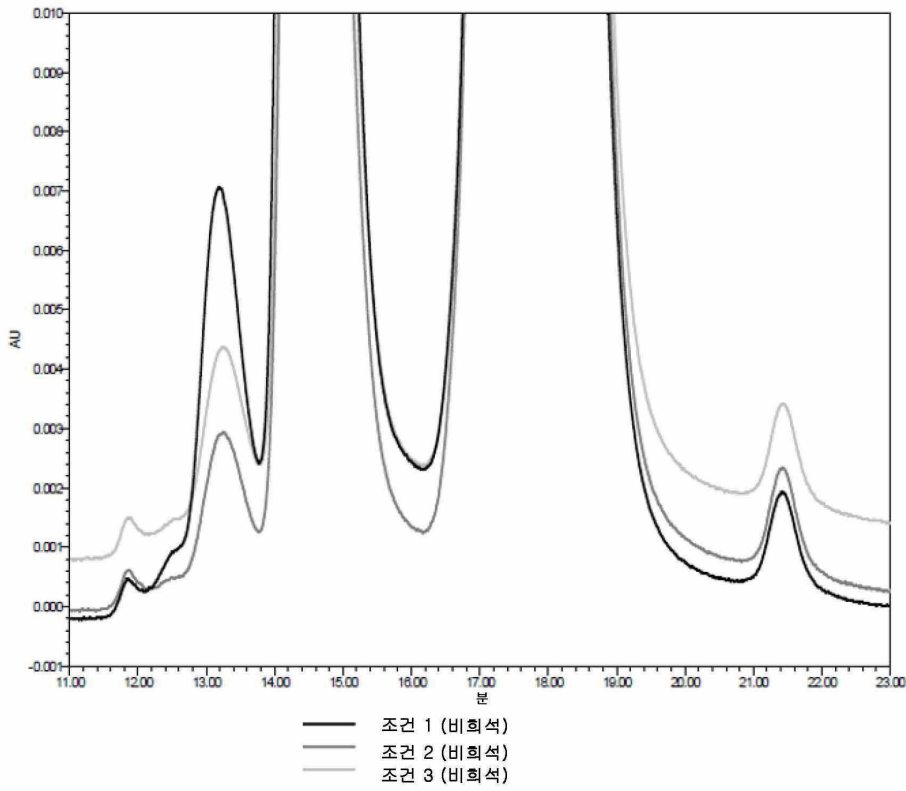


도면2aa



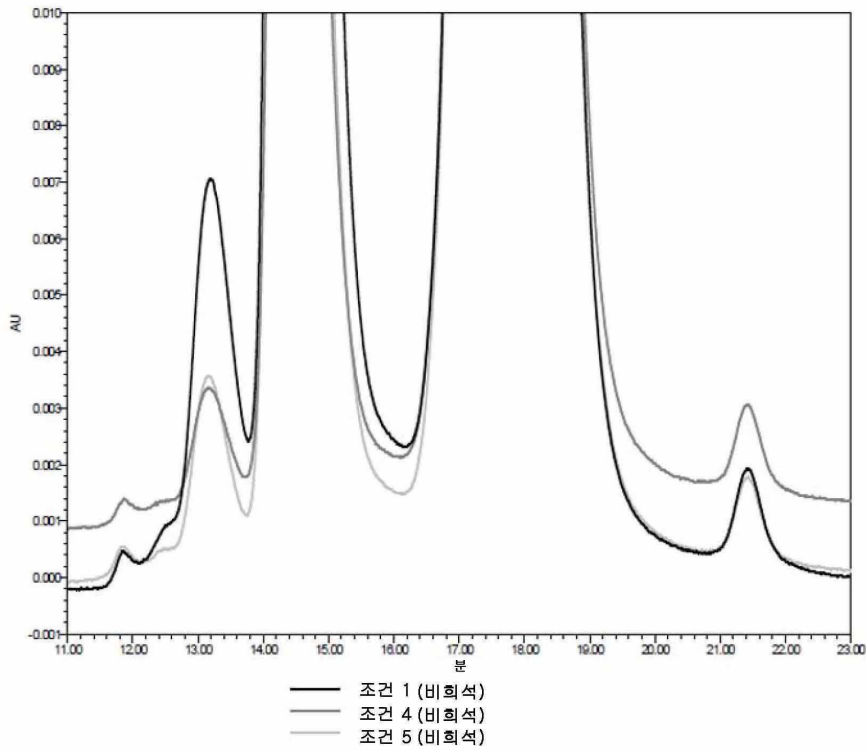
도 2a

도면2ab



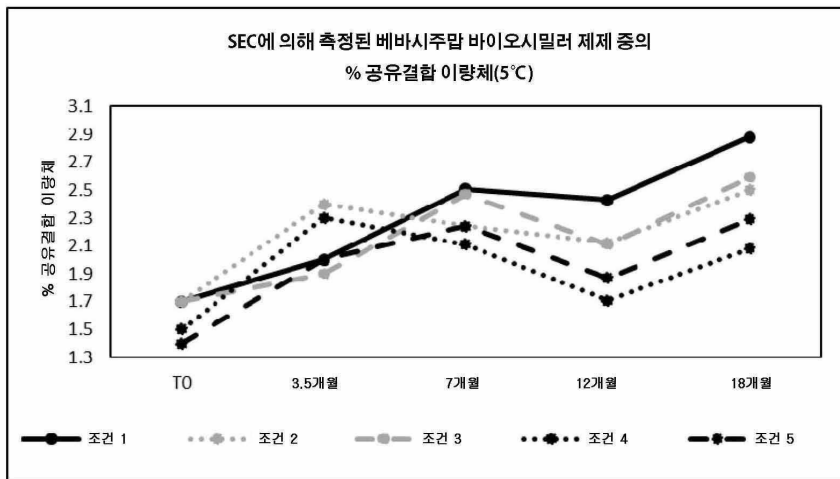
도 2a(i)

도면2ac



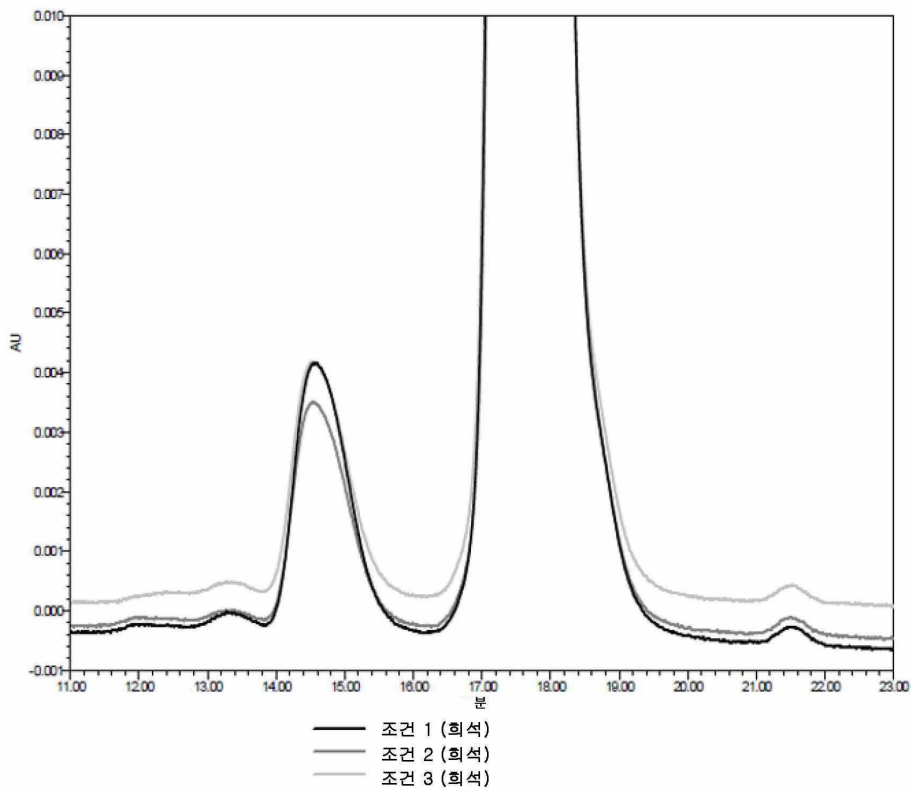
도 2a(ii)

도면2ba



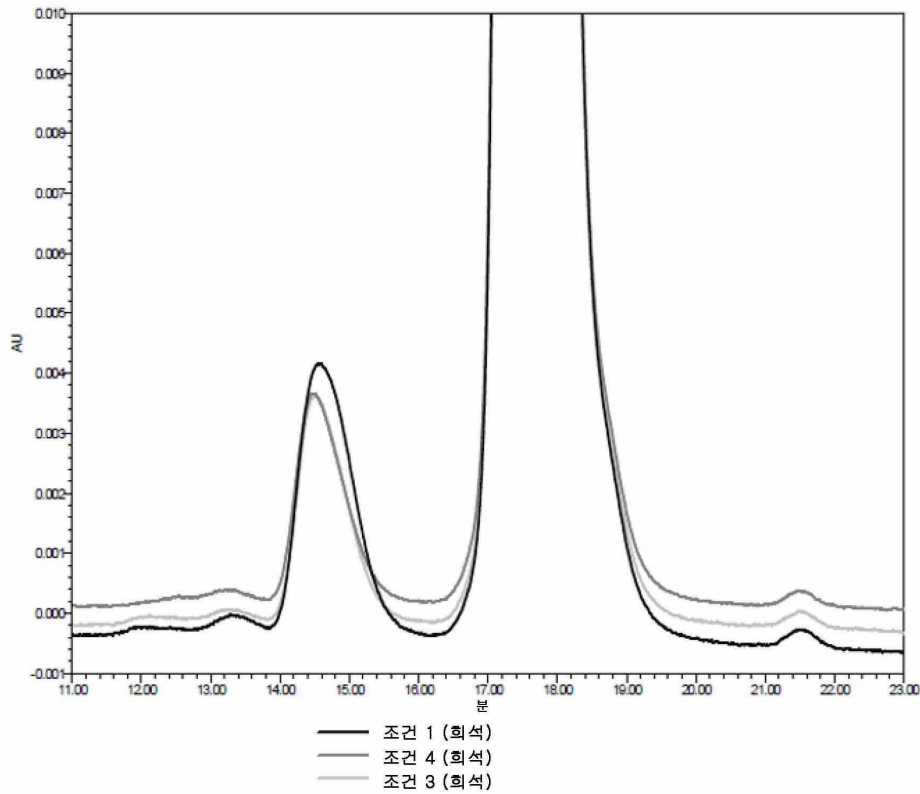
도 2b

도면2bb



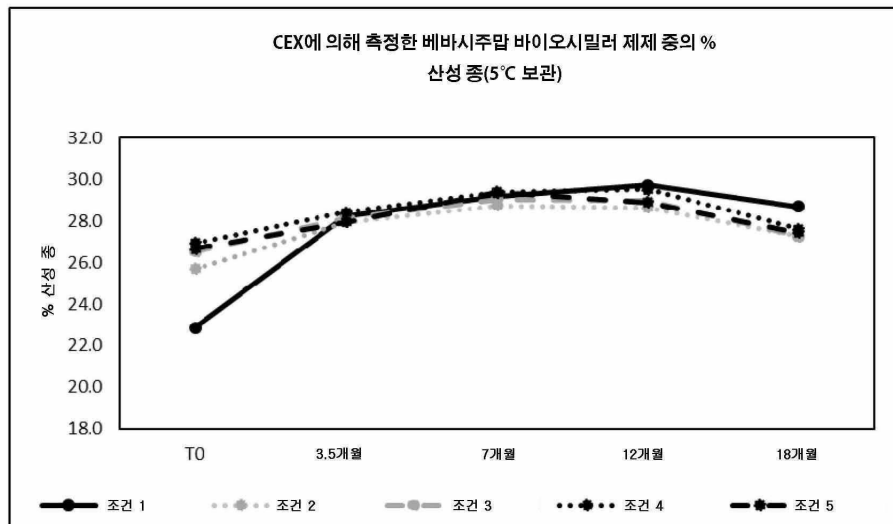
도 2b(i)

도면2bc



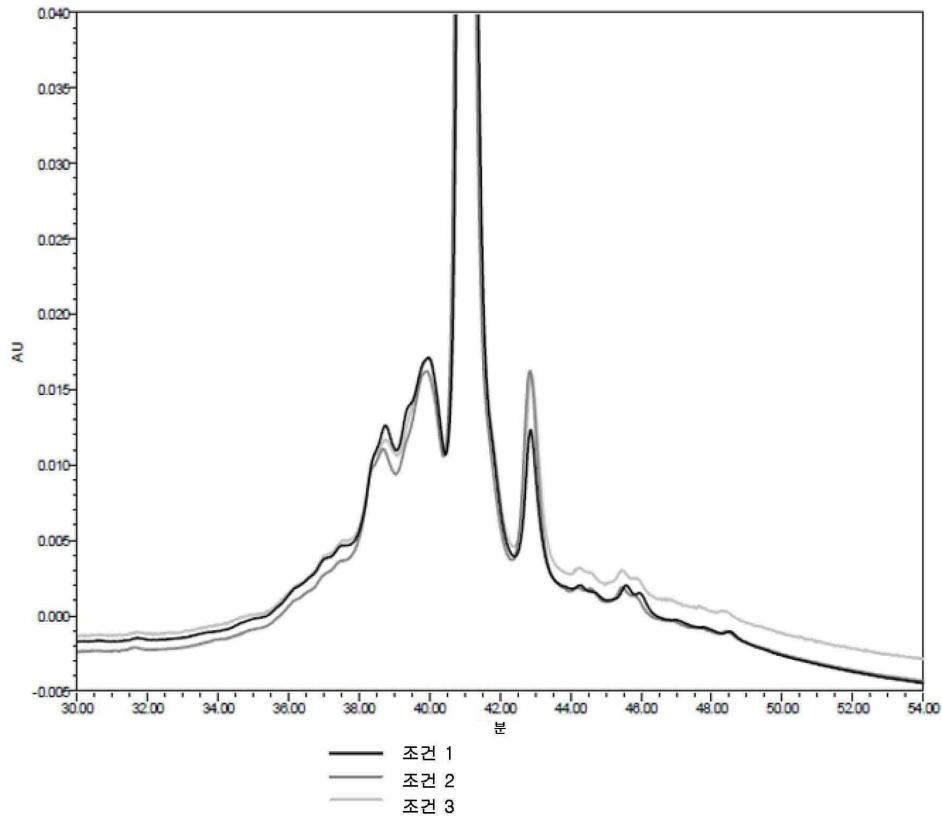
도 2b(ii)

도면2bd



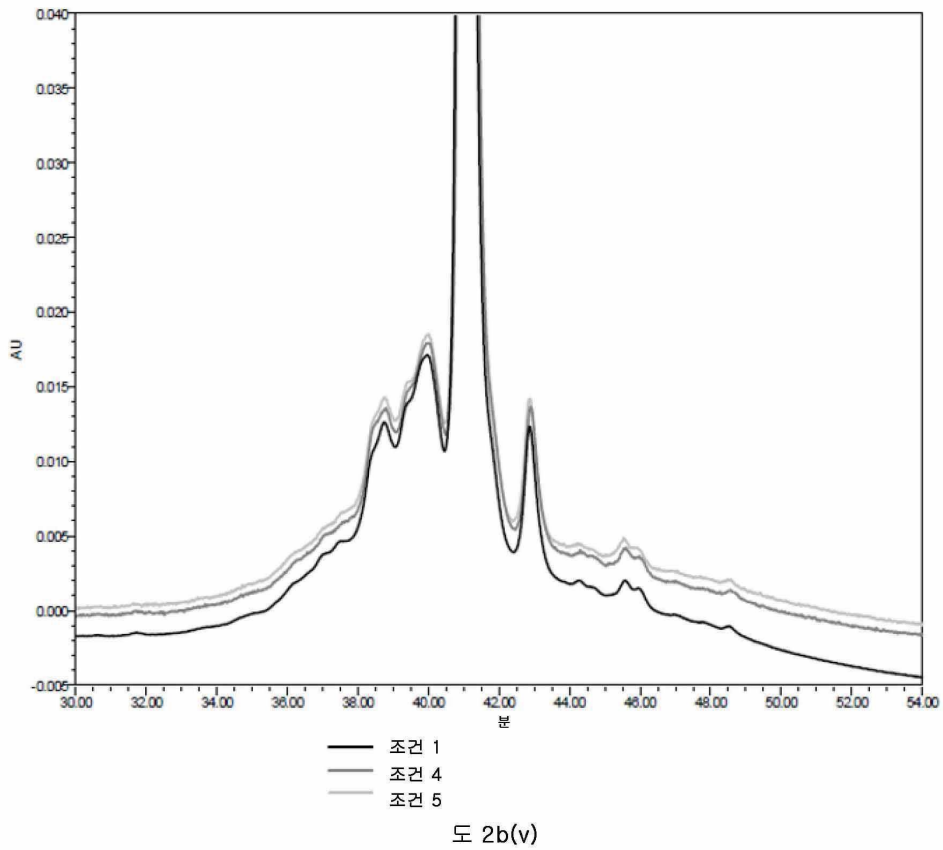
도 2b(iii)

도면2be

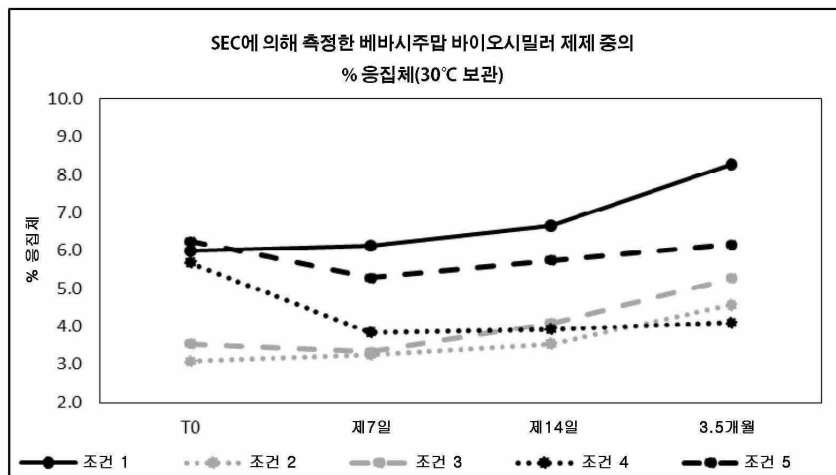


도 2b(iv)

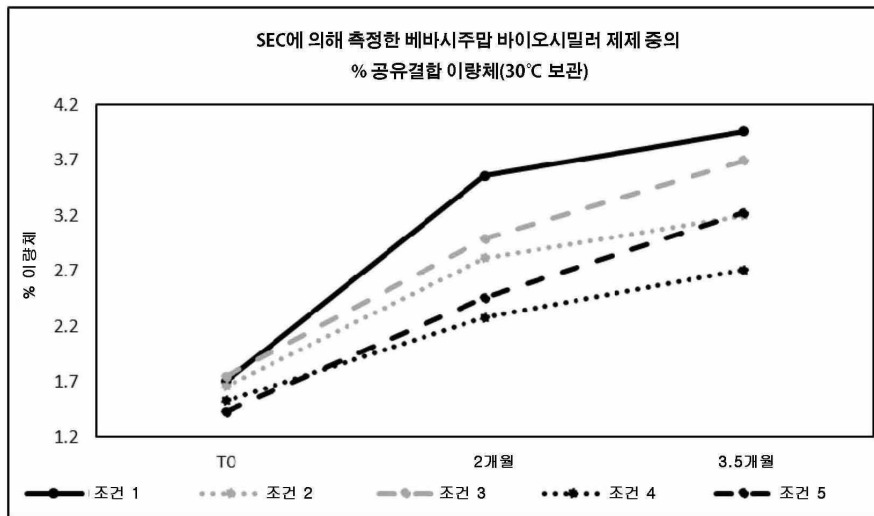
도면2bf



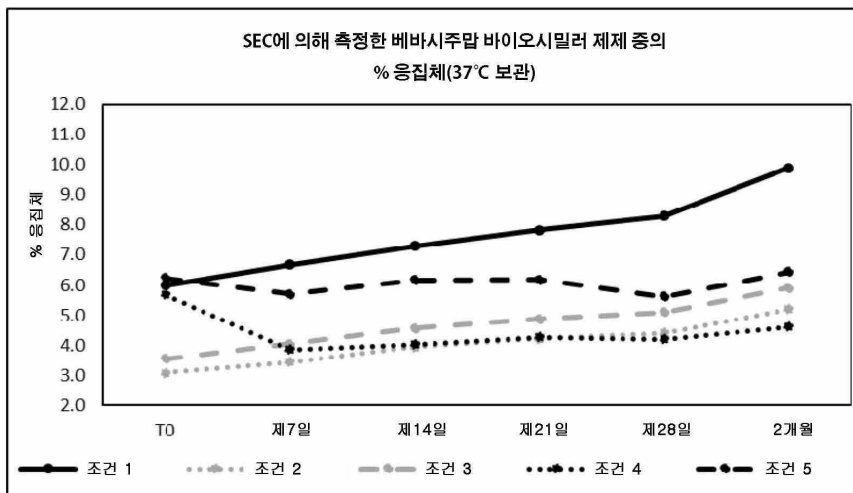
도면2c



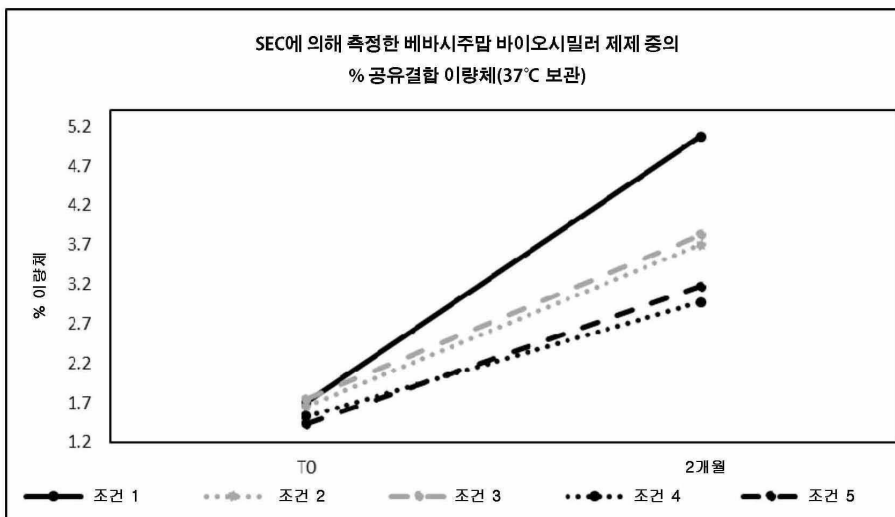
도면2d



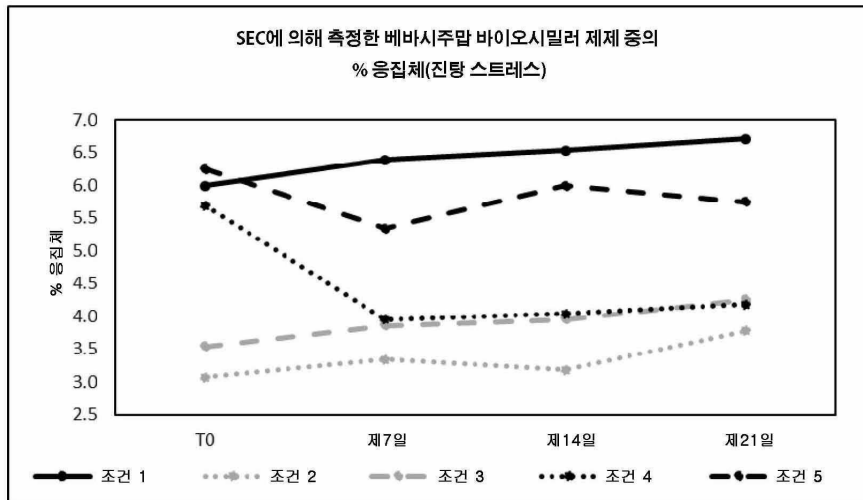
도면2e



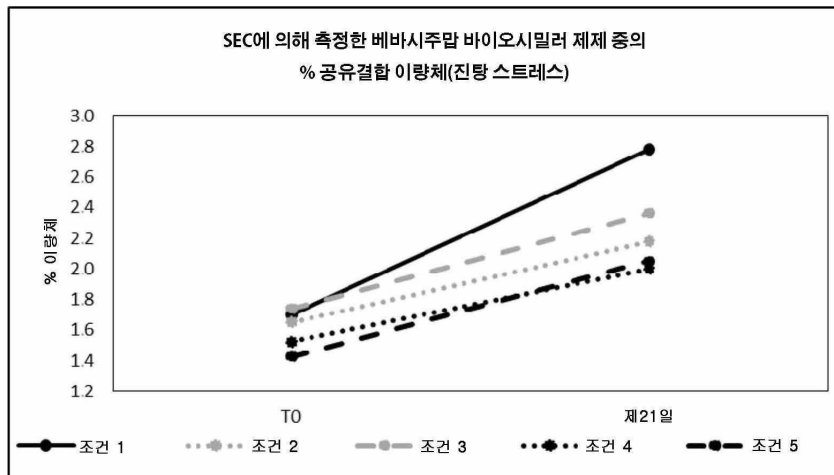
도면2f



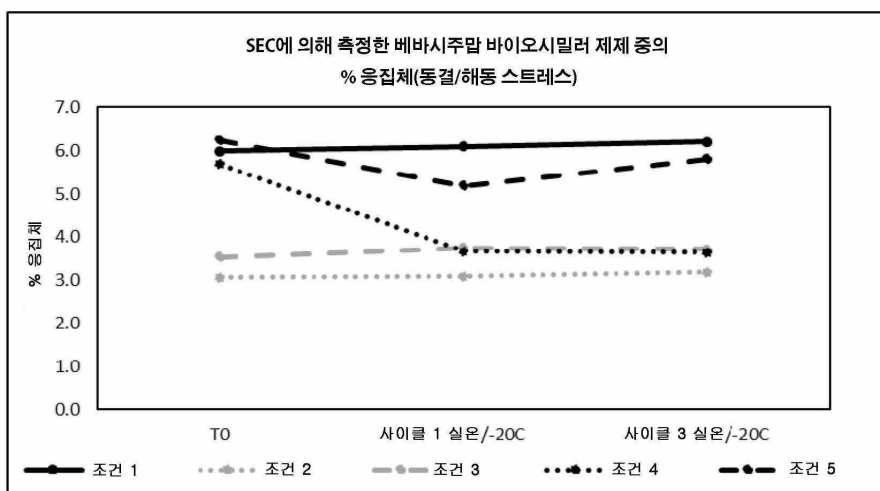
도면2g



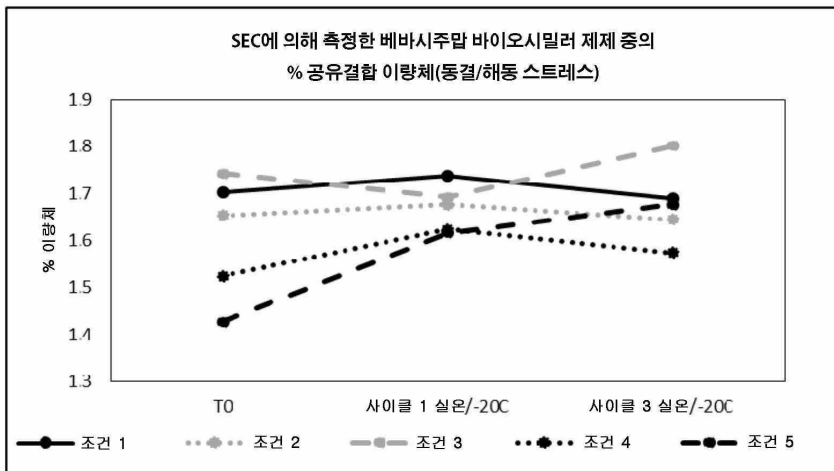
도면2h



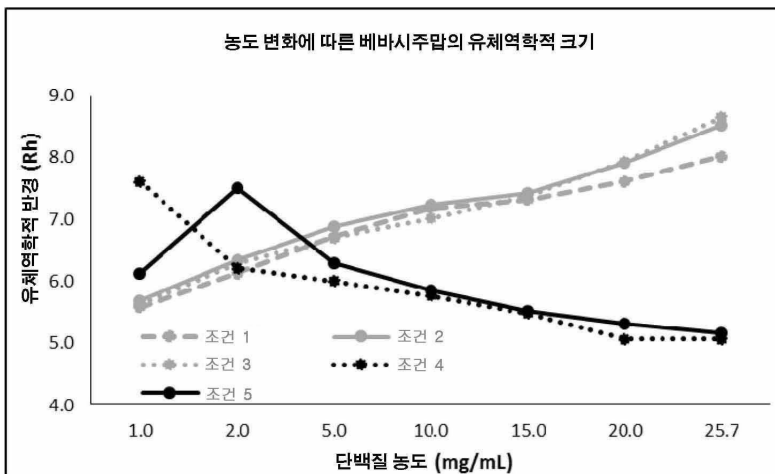
도면2i



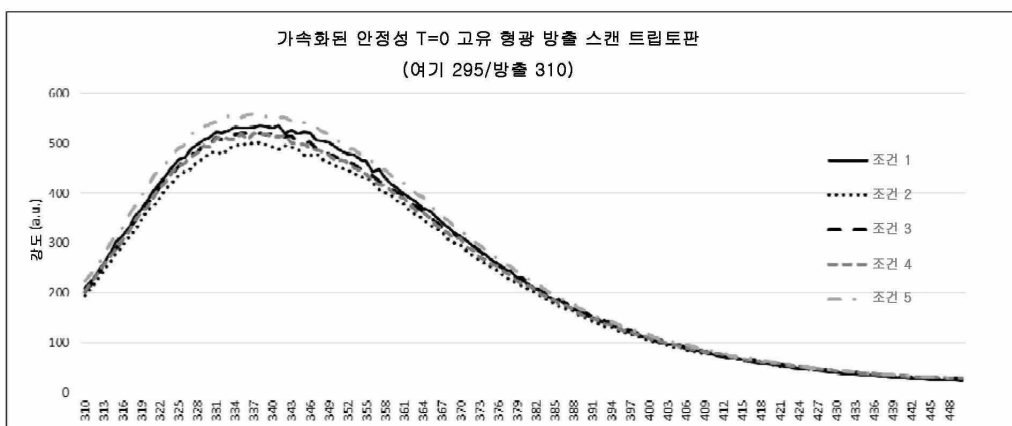
도면2j



도면3



도면4



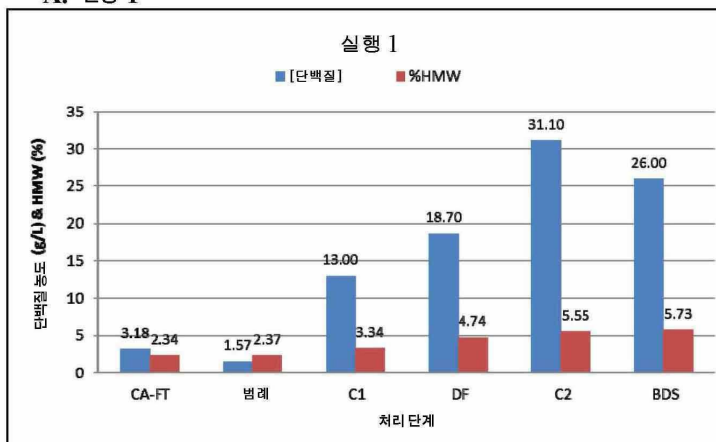
도면5



도면6a

접선 유동 여과를 위한 UF/DF에서의 중간체 물질의 단백질 농도 및 %HMWS

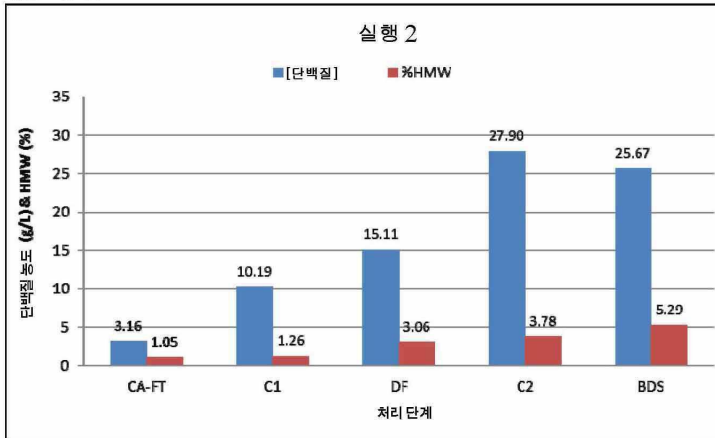
A. 실험 1



범례: CA-FT - 부하; 부하 - 희석된 부하; C1 - 초기 농축 후; DF - 정용 여과 후; C2 - 최종 농축 후; BDS - 최종 여과 후

도면6b

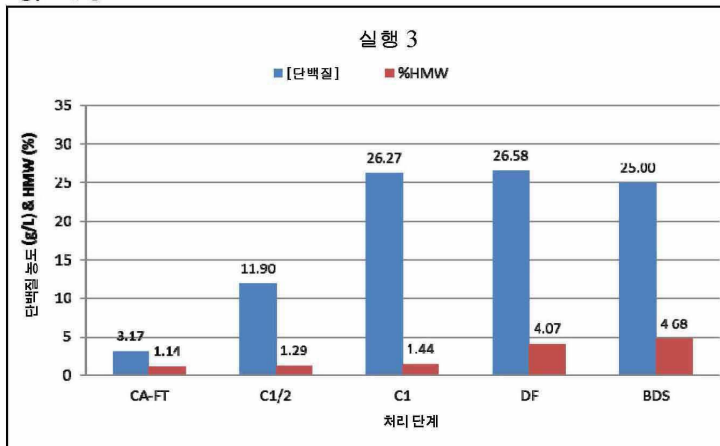
B. 실험 2



범례: CA-FT - 부하 ; C1 - 초기 농축 후 ; DF - 정용 여과 후 ; C2 - 최종 농축 후 ; BDS - 최종 여과 후

도면6c

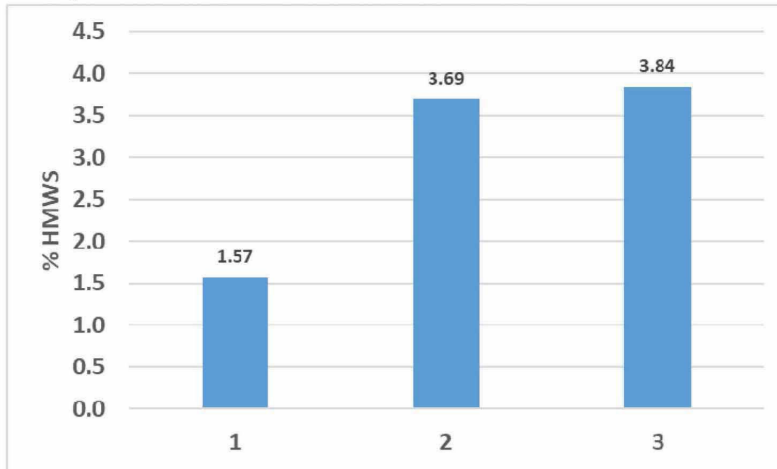
C. 실험 3



범례: CA-FT - 부하 ; C1 - 목표의 1/2로 농축 후 ; C1 - 농축 후 ; DF - 정용 여과 후 ; BDS - 최종 여과 후

도면7

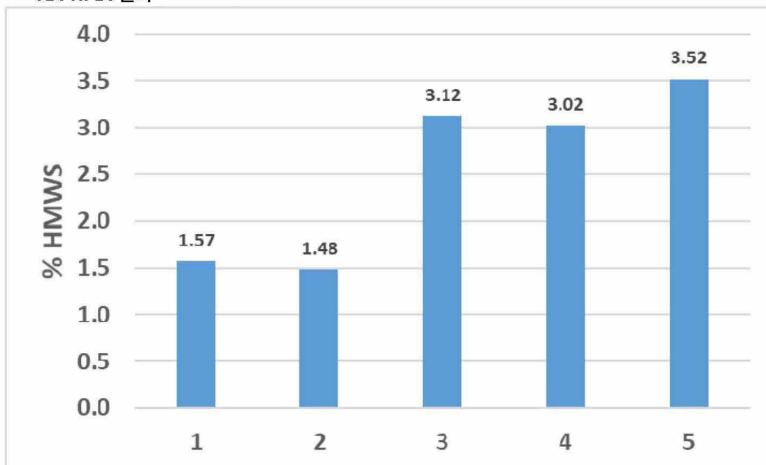
적정된 물질의 SEC - HPLC 결과



범례: 1 - 부하 물질; 2 - pH 조정 후; 3 - 여과 후

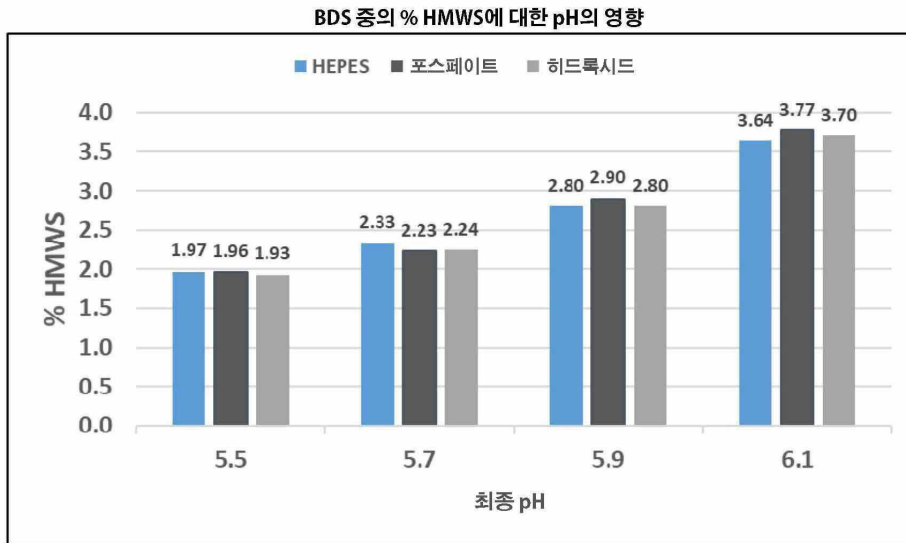
도면8

수중 6% (w/v)  $\alpha$ ,  $\alpha'$  트레할로스에서의 정용 여과 후 포스페이트 첨가에 대한 SEC-HPLC 결과



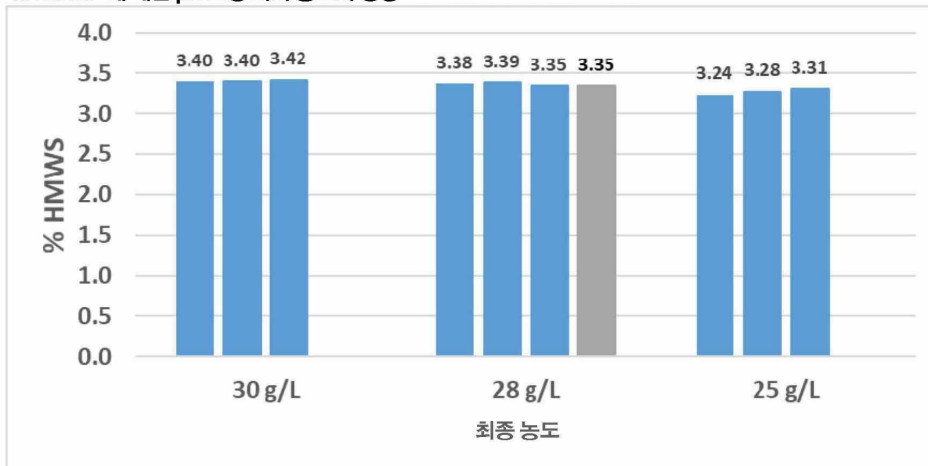
범례: 1 - 부하 물질; 2 - 정용 여과 후; 3 - 포스페이트 첨가에 의한 pH 조정 및 FFB 첨가에 의한 농도 조정 후; 4 - PS-20 첨가 후; 5 - 0.2  $\mu$ m 여과 후 (BDS)

도면9



도면10

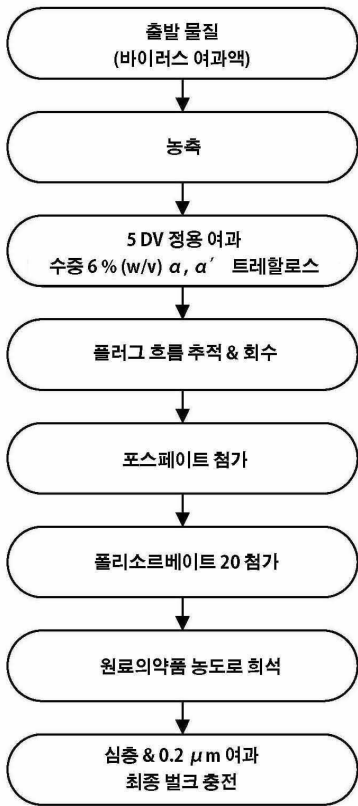
% HMWS<sup>1</sup>에 대한 pH 조정 시의 농도의 영향



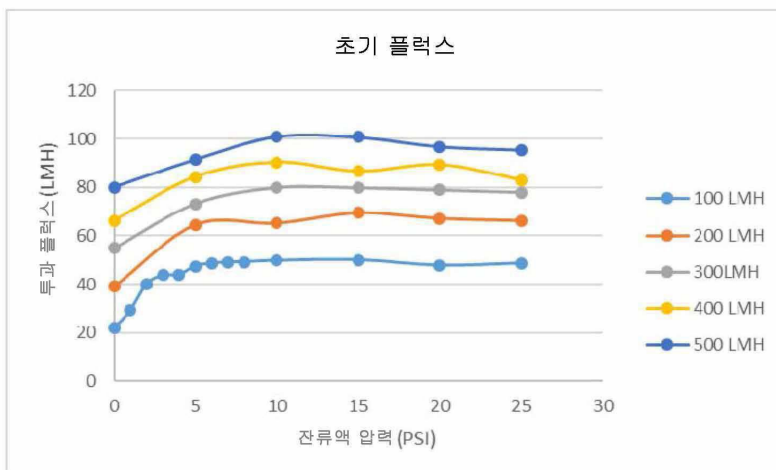
<sup>1</sup>회색 막대는 저장 용액이 아닌 고체 제1 및 제2 인산나트륨으로 포스페이트 조정을 수행한 분취액을 나타낸다.

도면11

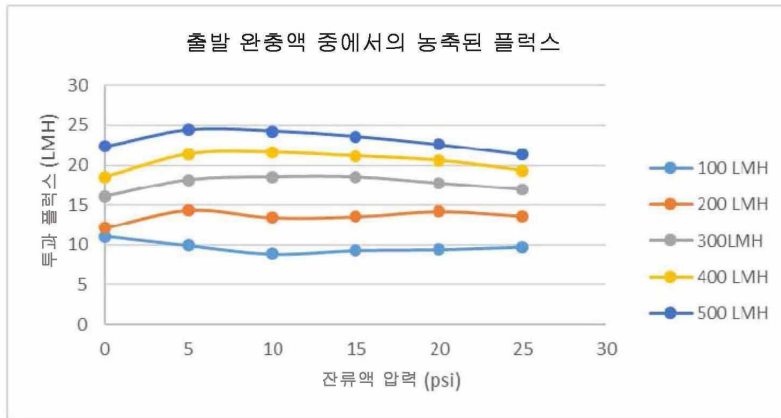
최종 UF/DF 단위 조작에 대한 공정 흐름도



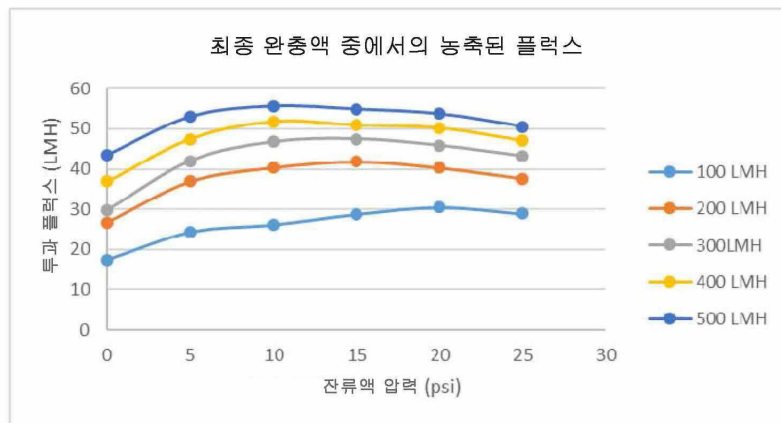
도면12



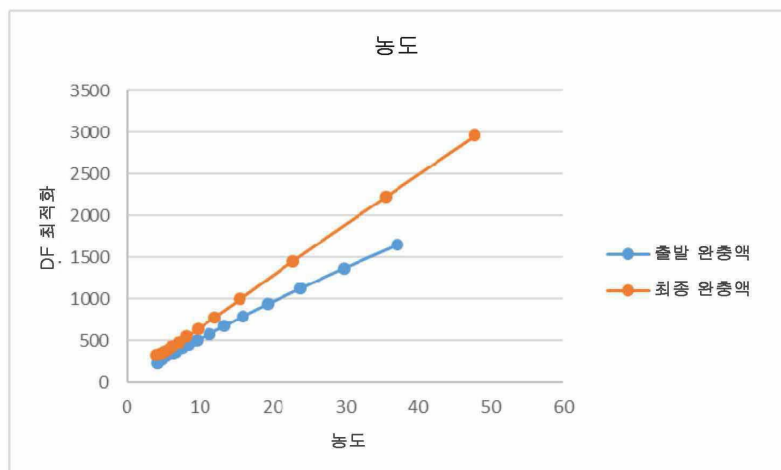
도면13



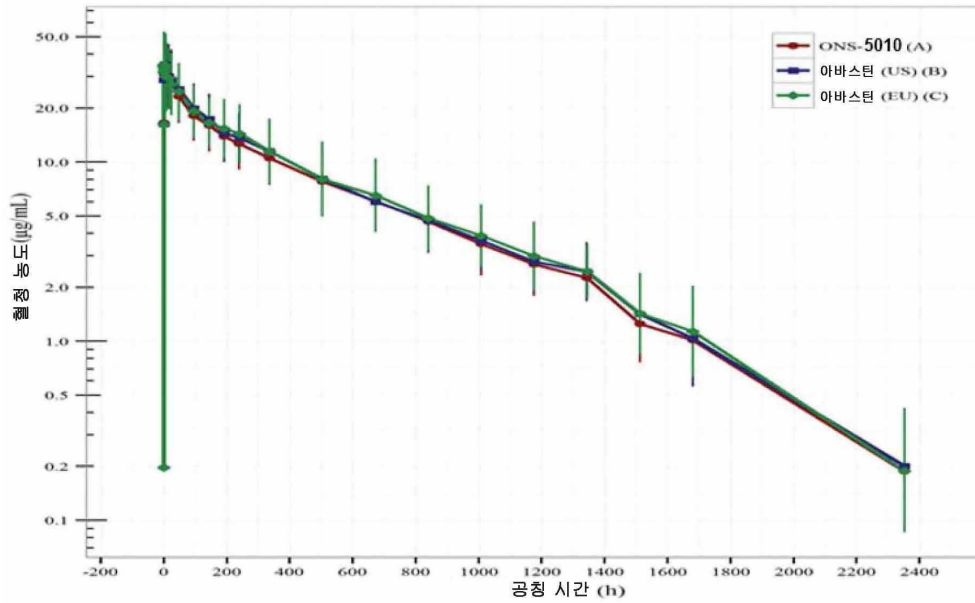
도면14



도면15



도면16



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Outlook Therapeutics, Inc.

<120> METHODS OF TREATING DISEASE WITH BUFFERED FORMULATIONS OF BEVACIZUMAB

<130> ONBI-013/001WO 325849-2089

<150> US 62/776,686

<151> 2018-12-07

<150> US 62/658,772

<151> 2018-04-17

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 453

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220><223> Bevacizumab Heavy Chain IgG1

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30  
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe  
 50 55 60  
 Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val  
 100 105 110  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
 115 120 125  
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly  
 130 135 140  
  
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val  
 145 150 155 160  
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 165 170 175  
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
 180 185 190  
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
 195 200 205  
  
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys  
 210 215 220  
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
 225 230 235 240  
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 245 250 255  
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val



Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
                   20                    25                    30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile  
                   35                    40                    45  
 Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
                   50                    55                    60  
  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65                    70                    75                    80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp  
                   85                    90                    95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
                   100                    105                    110  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
                   115                    120                    125  
  
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
                   130                    135                    140  
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145                    150                    155                    160  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
                   165                    170                    175  
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
                   180                    185                    190  
  
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
                   195                    200                    205  
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
                   210  
 <210> 3  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Bevacizumab Heavy Chain Variable Region

<400> 3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1                    5                    10                    15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20                    25                    30

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

35                    40                    45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe

50                    55                    60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr

65                    70                    75                    80

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

85                    90                    95

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val

100                    105                    110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115                    120

<210> 4

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bevacizumab Light Chain Variable Region

<400> 4

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

1                    5                    10                    15

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

20                    25                    30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile

35                    40                    45

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50                    55                    60

