



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0136446
(43) 공개일자 2022년10월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01) A61K 47/22 (2017.01)
A61K 9/08 (2006.01) C07K 16/22 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 39/39591 (2013.01)
A61K 47/02 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7032627(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2019년10월25일
심사청구일자 2022년09월20일
- (62) 원출원 특허 10-2021-7012818
원출원일자(국제) 2019년10월25일
심사청구일자 2021년04월28일
- (85) 번역문제출일자 2022년09월20일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2019/079137
- (87) 국제공개번호 WO 2020/089051
국제공개일자 2020년05월07일
- (30) 우선권주장
18203104.7 2018년10월29일
유럽특허청(EPO)(EP)

- (71) 출원인
에프. 호프만-라 로슈 아게
스위스 체하-4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124
- (72) 발명자
프라이헬 크리스티안
스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호프만-라 로슈 아게
펠러 클라우디아
스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호프만-라 로슈 아게
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 장수길

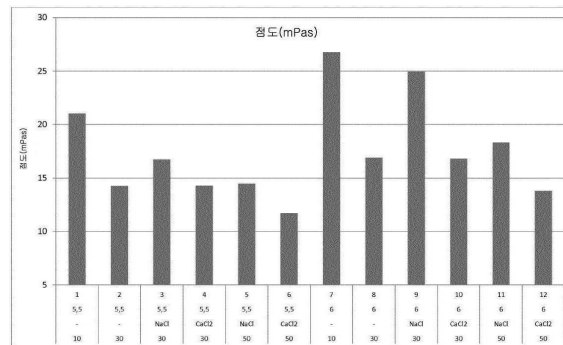
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 항체 제형

(57) 요약

본 발명은 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체의 약제학적 제형, 및 제형의 제조 방법 및 용도에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 47/22 (2013.01)

A61K 9/08 (2013.01)

C07K 16/22 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/94 (2013.01)

(72) 발명자

필리 로베르트

스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호
프만-라 로슈 아게

슈체스니 표트르 안

스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호
프만-라 로슈 아게

보르굴 마르틴

스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호
프만-라 로슈 아게

뷔르트 크리스틴

스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호
프만-라 로슈 아게

명세서

청구범위

청구항 1

5.5 ± 0.5의 pH에서

- 인간 IgG1 서브클래스의 불변 중쇄 영역을 포함하는 120 mg/mL ± 18 mg/mL의 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체,

- 15 내지 35 mM의 염화나트륨, 및

- 15 내지 25 mM의 히스티딘 아세테이트 완충액

을 포함하고,

상기 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체는 2가이고, 인간 VEGF에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위를 포함하고, 인간 ANG-2에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함하되,

i) VEGF에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 부위는 중쇄 가변 도메인에서 서열번호 1의 CDR3H 영역, 서열번호 2의 CDR2H 영역, 및 서열번호 3의 CDR1H 영역을 포함하고, 경쇄 가변 도메인에서 서열번호 4의 CDR3L 영역, 서열번호 5의 CDR2L 영역, 및 서열번호 6의 CDR1L 영역을 포함하고,

ii) ANG-2에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 부위는 중쇄 가변 도메인에서 서열번호 9의 CDR3H 영역, 서열번호 10의 CDR2H 영역, 및 서열번호 11의 CDR1H 영역을 포함하고, 경쇄 가변 도메인에서 서열번호 12의 CDR3L 영역, 서열번호 13의 CDR2L 영역, 및 서열번호 14의 CDR1L 영역을 포함하고,

iii) 상기 이중특이적 항체는 님버링이 카뱃(Kabat)의 EU 인덱스를 따르는 돌연변이 I253A, H310A, 및 H435A 및 돌연변이 L234A, L235A 및 P329G를 포함하는 인간 IgG1 서브클래스의 불변 중쇄 영역을 포함하는, 액체 약제학적 제형으로서,

당뇨병성 망막병증(DR), 당뇨병성 황반 부종(DME), 망막 정맥 폐쇄(RVO), 망막 중심 정맥 폐쇄(CRVO), 황반 변성, 습성 연령 관련 황반 변성(습성 AMD), 미숙아 망막증(ROP), 신생혈관 녹내장, 색소성 망막염(RP), 망막 혈관종 증식, 황반 모세혈관확장증, 허혈성 망막증, 홍채 신생혈관형성, 안구내 신생혈관형성, 각막 신생혈관형성, 망막 신생혈관형성, 맥락막 신생혈관형성, 및 망막 퇴행으로 이루어진 군으로부터, 특히 당뇨병성 망막병증(DR), 당뇨병성 황반 부종(DME), 망막 정맥 폐쇄(RVO), 망막 중심 정맥 폐쇄(CRVO), 및 습성 연령 관련 황반 변성(습성 AMD)으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 안구 혈관 질환의 치료에 사용하기 위한, 액체 약제학적 제형.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체는 2가이고, 인간 VEGF에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위를 포함하고, 인간 ANG-2에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함하며,

i) VEGF에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 부위는 중쇄 가변 도메인 VH로서 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 도메인 VL로서 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하고,

ii) ANG-2에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 부위는 중쇄 가변 도메인 VH로서 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 도메인 VL로서 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는, 액체 약제학적 제형.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체는 2가이고, 인간 VEGF에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위를 포함하고, 인간 ANG-2에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함하며,

iv) 카뱃(Kabat)의 EU 인덱스를 따르는 님버링에 따라, 상기 불변 중쇄 영역에서 S354C 및 T366W 돌연변이는 하나의 CH3 도메인에 포함되고, Y349C, T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이는 다른 CH3 도메인에 포함되는, 액체 약제학적 제형.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 안지오프이에틴-2(ANG-2)-2 및 인간 혈관 내피성 성장 인자(VEGF, VEGF-A)에 대한 이중특이적 항체 (이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체)의 액체 약제학적 제형 및 제형의 제조 공정 및 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 안지오프이에틴-2(ANG-2)-2 및 인간 혈관 내피성 성장 인자(VEGF, VEGF-A)(이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체)에 대한 이중특이적 항체는 특히 안구 혈관 질환을 포함하는 혈관 질환의 치료 및 치료의 예방을 위한 약제로서 치료적 관심 대상이다. 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체는 예를 들어 WO2010040508, WO2011/117329 또는 WO2014/009465에 기재되어 있다. 이들 항체는 VEGF 수용체에 대한 Vegf 결합 및 동시에 Tie2에 대한 ANG-2 결합을 억제한다.

[0003] 단백질 의약품의 그룹의 일부인 항체 분자는 물리적 및 화학적 분해에 매우 민감하다. 화학적 분해는 결합 형성 또는 절단을 통한 단백질의 변형을 수반하는 임의의 공정을 포함하여, 새로운 화학적 독립체를 생성한다. 다양한 화학 반응이 단백질에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 이들 반응은 펩티드 결합의 절단뿐만 아니라 탈아미드화, 이성질체화, 산화 및 분해를 포함하는 가수분해를 수반할 수 있다. 물리적 분해는 고차 구조의 변화를 지칭하고, 변성, 표면에 대한 흡착, 응집 및 침전을 포함한다. 단백질 안정성은 단백질 자체의 특성, 예를 들어 아미노산 서열, 글리코실화 패턴, 및 외부 영향, 예컨대 온도, 용매 pH, 부형제, 계면, 또는 전단율에 의해 영향을 받는다. 따라서, 제조, 보관 및 투여 동안 분해 반응에 대해 단백질을 보호하기 위한 최적의 제형 조건을 정의하는 것이 중요하다 (Manning, M. C., 등(1989), "Stability of protein pharmaceuticals", Pharm Res 6(11), 903-918; Zheng, J. Y., Janis, L. J.(2005), "Influence of pH, buffer species, and storage temperature on physicochemical stability of humanized monoclonal antibody LA298", Int. J. Pharmaceutics 308, 46-51). 치료 항체의 안정한 액체 제형은 제형이고 고농도로 항체를 포함해야 할 때 얻기가 특히 어렵다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 따라서, 본 발명의 목적은 원하는 투여를 가능하게 하고 환자에게 얇은 바늘을 통한 이중특이적 항체의 편리한 유리체내 투여를 가능하게 하는, 필요한 만큼 적은 부형제를 갖는 이중특이적 VEGF/ANG2 항체의 액체, 특히 고농도 제형을 제공하는 것이다.

[0005] 본 발명은 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체의 액체 약제학적 제형, 이 제형의 제조 공정 및 용도에 관한 것이다. 특히, 본 발명의 약제학적 제형은 안과적 질환 예컨대 AMD 및 DME의 치료를 위해 유리체내 투여에 사용하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

- [0006] 일 양태에서, 본 발명은 액체 약제학적 제형에 관한 것이고,
- [0007] 상기 제형은,
- [0008] - 인간 IgG1 서브클래스의 불변 중쇄 영역을 포함하는 20 내지 150 mg/mL의 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체
- [0009] - 15 내지 35 mM의 염화나트륨
- [0010] - 15 내지 25 mM의 히스티딘 아세테이트 완충액
- [0011] 을 5.5 ± 0.5의 pH에서 포함하고,
- [0012] 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체는 2가이고, 인간 VEGF에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위를 포함하고, 인간 ANG-2에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함하되,
- [0013] i) VEGF에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 부위는 중쇄 가변 도메인에서 서열번호 1의 CDR3H 영역, 서열번호 2의 CDR2H 영역, 및 서열번호 3의 CDR1H 영역을 포함하고, 경쇄 가변 도메인에서 서열번호 4의 CDR3L 영

역, 서열번호 5의 CDR2L 영역, 및 서열번호 6의 CDR1L 영역을 포함하고;

- [0014] ii) ANG-2에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 부위는 중쇄 가변 도메인에서 서열번호 9의 CDR3H 영역, 서열번호 10의 CDR2H 영역, 및 서열번호 11의 CDR1H 영역을 포함하고, 경쇄 가변 도메인에서 서열번호 12의 CDR3L 영역, 서열번호 13의 CDR2L 영역, 및 서열번호 14의 CDR1L 영역을 포함하고,
- [0015] iii) 이중특이적 항체는 돌연변이 I253A, H310A, 및 H435A 및 돌연변이 L234A, L235A 및 P329G를 포함하는 인간 IgG1 서브클래스의 불변 중쇄 영역(넘버링은 카바트의 EU 인덱스에 따른 것임)을 포함한다.
- [0016] 일 구현예에서, 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체는 2가이고, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 및 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0017] 일 구현예에서, 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체는 파리시맙이다.
- [0018] 일 구현예에서, 제형은 하기를 추가로 포함한다:
- [0019] - 1 내지 20mM의 적어도 하나의 안정화제.
- [0020] 일 구현예에서, 제형은 하기를 추가로 포함한다:
- [0021] - 7.0 mM ± 2.0 mM의 메티오닌.
- [0022] 일 구현예에서, 제형은 하기를 추가로 포함한다:
- [0023] - 0.01-0.07%(w/v)의 계면활성제.
- [0024] 일 구현예에서, 제형은 하기를 추가로 포함한다:
- [0025] - 0.04%(w/v) ± 0.02%(w/v)의 폴리소르베이트 20.
- [0026] 일 구현예에서, 제형은 하기를 추가로 포함한다:
- [0027] - 50-250 mM의 등장화제.
- [0028] 일 구현예에서, 제형은 하기를 추가로 포함한다:
- [0029] - 160 mM ± 24 mM의 수크로스.
- [0030] 일 구현예에서, 제형은 눈에 보이는 입자가 본질적으로 없다.
- [0031] 일 구현예에서, 제형은 안정한 제형이다.
- [0032] 일 구현예에서, 제형의 삼투질농도(osmolality)는 300±100 mOsm/kg이다.
- [0033] 일 구현예에서, 제형은 유리체내 투여를 위한 것이다.
- [0034] 일 양태에서, 제형은 안구 혈관 질환의 치료에 사용하기 위한 것이다.
- [0035] 일 구현예에서, 안구 혈관 질환은 당뇨병성 망막병증(DR), 당뇨병성 황반 부종(DME), 망막 정맥 폐쇄(RVO), 망막 중심 정맥 폐쇄(CRVO), 황반 변성, 습성 연령 관련 황반 변성(습성 AMD), 미숙아 망막증(ROP), 신생혈관 녹내장, 색소성 망막염(RP), 망막 혈관종 증식, 황반 모세혈관확장증, 허혈성 망막증, 홍채 신생혈관형성, 안구내 신생혈관형성, 각막 신생혈관형성, 망막 신생혈관형성, 맥락막 신생혈관형성, 및 망막 퇴행으로 이루어진 군으로부터, 특히 당뇨병성 망막병증(DR), 당뇨병성 황반 부종(DME), 망막 정맥 폐쇄(RVO), 망막 중심 정맥 폐쇄(CRVO), 습성 연령 관련 황반 변성(습성 AMD)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0036] 본 발명의 일 양태는 본 발명에 따른 약제학적 제형의 제조 공정이다.
- [0037] 본 발명의 일 양태는 본 발명에 따른 약제학적 제형을 포함하는 바이알이다.
- [0038] 본 발명의 일 양태는 본 발명에 따른 약제학적 제형을 포함하는 사전충전된 주사기이다.
- [0039] 본 발명의 일 양태는 본 발명에 따른 액체 약제학적 제형의 동결건조 형태이다.

발명의 효과

- [0040] 본 발명은 안과적 용도 및 유리체내 적용에 유용한 귀중한 특성을 갖는(IgG1 불변 영역을 갖는) 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체의 액체 약제학적 제형을 제공한다: 제형은(심지어 예를 들어 약 120 mg/l의 고농도에서) 낮은

점도 및 저탁도를 가지며, 제형은 안정되고 등장성이다. 이는 특히 본원에서 기재된 바와 같은 인간 IgG1 서브클래스의 불변 중쇄 영역을 포함하는 20 내지 150 mg/mL의(특히 100 내지 140 mg/mL의) 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체, 15 내지 35 mM의 염화나트륨 및 5.5 ± 0.5 의 pH의 15 내지 25 mM의 히스티딘 완충액의 조합에 의해 달성된다.

도면의 간단한 설명

[0041]

도 1 pH/완충액 스크린 파트 I로부터 제형의 탁도(도 1a) 및 점도(도 1b) 결과. 도 1은 pH/완충액 스크린 I로부터 제형의 탁도 및 점도 결과를 비교한다(막대 아래: 제1 행: 제형 샘플의 번호; 제2 행: pH 값; 제3 행: 완충액; 제4 행: 이온 강도).

도 2 pH/완충액 스크린 파트 II로부터 제형의 탁도(도 2a) 및 점도(도 2b) 결과(막대 아래: 제1 행: 제형 샘플의 번호; 제2 행 pH 값; 제3 행: 점도 감소제 부재-, NaCl 또는 CaCl₂; 제4 행: 이온 강도).

도 3 시작 시 및 5°C 및 25°C에서 8주 보관 후의 pH/완충액 스크린 파트 II로부터 제형의 더 높은 분자량 중(HMW)(막대 아래: 제1 행: 제형 샘플의 번호; 제2 행 pH 값; 제3 행: 점도 감소제 부재-, NaCl 또는 CaCl₂; 제4 행: 이온 강도).

도 4 초기에서 및 물리적 스트레스 후의 고분자량 중(HMW)의 수준(막대 아래: 제1 행: 물리적 스트레스의 유형; 제2 행: % 계면활성제; 제3 행: 제형 샘플의 번호).

도 5 부형제 스크린 I로부터 제형의 탁도(도 5a) 및 점도(도 5b)(막대 아래: 제1 행: 점도 감소제로서 NaCl를 사용한 pH 값; 안정화제로서 메티오닌의 부재(-) 또는 존재(+); 제2 행: 제형 샘플의 번호).

도 6 초기에서 및 5°C에서 보관 동안 고분자량 중(HMW)의 수준(막대 아래: 제1 행: 점도 감소제로서 NaCl를 사용한 pH 값; 안정화제로서 메티오닌의 부재(-) 또는 존재(+); 제2 행: 제형 샘플의 번호).

도 7 초기에서 및 25°C에서 보관 동안 고분자량 중(HMW)의 수준(막대 아래: 제1 행: 점도 감소제로서 NaCl를 사용한 pH 값; 안정화제로서 메티오닌의 부재(-) 또는 존재(+); 제2 행: 제형 샘플의 번호).

도 8 초기에서 및 5°C에서 보관 동안 하전된 중(주요 피크(도 8a), 산성 피크(도 8b) 및 염기성 피크(도 8c))의 수준(막대 아래: 제1 행: 점도 감소제로서 NaCl를 사용한 pH 값; 안정화제로서 메티오닌의 부재(-) 또는 존재(+); 제2 행: 제형 샘플의 번호).

도 9 초기에서 및 25°C에서 보관 동안 하전된 중(주요 피크(도 9a), 산성 피크(도 9b) 및 염기성 피크(도 9c))의 수준(막대 아래: 제1 행: 점도 감소제로서 NaCl를 사용한 pH 값; 안정화제로서 메티오닌의 부재(-) 또는 존재(+); 제2 행: 제형 샘플의 번호).

도 10 부형제 스크린 II로부터 단백질 120 mg/mL의 농도를 갖는 최적화 및 참조 제형의 탁도(도 10a) 및 점도(도 10b).

도 11 부형제 스크린 II로부터 30 mg/mL의 단백질 농도를 갖는 최적화 및 참조 제형의 탁도(도 11a) 및 점도(도 11b).

도 12 단백질 120 mg/mL의 농도를 갖는 최적화 및 참조 제형의 초기(왼쪽 막대)에서 및 5°C(중간 막대) 및 25°C(오른쪽 막대)에서 13주 보관 후의 고분자량 중(HMW)의 수준.

도 13 30 mg/mL의 단백질 농도를 갖는 최적화 및 참조 제형의 초기(왼쪽 막대)에서 및 5°C(중간 막대) 및 25°C(오른쪽 막대)에서 13주 보관 후의 고분자량 중(HMW)의 수준.

도 14 최적화 및 참조 제형의 초기(왼쪽 막대)에서 및 5°C(중간 막대) 및 25°C(오른쪽 막대)에서 13주 보관 후의 하전된 중(주요 피크(도 14a), 산성 피크(도 14b) 및 염기성 피크(도 14c))의 수준.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042]

본 발명은 인간 IgG1 서브클래스의 불변 중쇄 영역을 포함하는 이중특이적 항-VEGF/ANG2를 포함하는 액체 약제학적 제형에 관한 것이다.

[0043]

용어 "약제학적 제형"은 활성 성분의 생물학적 활성이 명백하게 효과적이라도 하는 형태이고 제형이 투여되는 대상체에게 독성이 있는 성분을 함유하지 않는 제제를 지칭한다.

- [0044] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "액체"는 본 발명에 따른 제형과 관련하여 대기압 하에 약 2°C 내지 약 35°C(일 구현예에서 약 2°C 내지 약 25°C)의 온도에서 적어도 액체인 제형을 지칭한다.
- [0045] 약제학적 제형을 포함하는 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체의 농도는 약 20 mg/mL 내지 약 150 mg/mL의 범위에 있고, 특히 농도는 120 mg/mL ± 18 mg/mL이고, 더욱 특히 농도는 120 mg/mL ± 12 mg/mL이다. 또 다른 구현예에서, 농도는 30 mg/mL ± 4.5 mg/mL일 수 있다.
- [0046] 본원에서 사용된 바와 같이, "항체"는 항원 결합 부위를 포함하는 결합 단백질을 지칭한다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어들 "결합 부위" 또는 "항원 결합 부위"는 리간드가 실제로 결합하는 항체 분자의 영역(들)을 지칭한다. 용어 "항원 결합 부위"는 항체 중쇄 가변 도메인(VH) 및 항체 경쇄 가변 도메인(VL)(VH/VL의 쌍)을 포함한다.
- [0047] 항체 특이성은 항원의 특정 에피토프에 대한 항체의 선택적 인식을 지칭한다. 천연 항체는, 예를 들어, 단일특이적이다.
- [0048] 본 발명에 따른 "이중특이적 항체"는 2개의 상이한 항원 결합 특이성을 갖는 항체이다. 본 발명의 항체는 2개의 상이한 항원, 즉, 제1 항원으로서 VEGF 및 제2 항원으로서 ANG-2에 대해 특이적이다.
- [0049] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "단일특이적" 항체는 동일한 항원의 동일한 에피토프에 결합하는 하나 이상의 결합 부위 각각을 갖는 항체를 지칭한다.
- [0050] 본원 내에서 사용된 바와 같은 용어 "가수(valent)"는 항체 분자에서 지정된 수의 결합 분자의 존재를 나타낸다. 이와 같이, 용어들 "2가", "4가", 및 "6가"는 항체 분자에서 2개의 결합 부위, 4개의 결합 부위, 및 6개의 결합 부위 각각의 존재를 나타낸다. 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 바람직하게는 "2가"이다.
- [0051] 본원에서 사용된 바와 같은 용어들 "인간 혈관 내피성 성장 인자(VEGF)에 및 인간 안지오프이에틴-2(ANG-2)에 결합하는 이중특이적 항체", "이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체" 및 이중특이적 <VEGF/ANG2> 항체"는 교환가능하고 적어도 2개의 상이한 항원 결합 부위, 즉, VEGF에 결합하는 첫 번째 것 및 ANG2에 결합하는 두 번째 것을 갖는 항체를 지칭한다.
- [0052] 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체는 예를 들어 WO2010/040508, WO2011/117329, WO2012/131078, WO2015/083978, WO2017/197199, 및 WO2014/009465에 기재되어 있다. WO2014/009465는 안구 혈관 질환의 치료를 위해 특히 설계된 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체를 기재하고 있다. WO2014/009465(이는 그 전체내용이 본원에 포함되어 있음)의 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체는 특히 본원에서 기재된 바와 같은 안구 혈관 질환의 치료 및 치료 스케줄에 유용하다. 특히, WO2014/009465에 기재된 항-VEGF/ANG2 항체 CrossMAb VEGFang2-0016은 또한 과리시맵으로서 기재된다(세계보건기구(2017)). "International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances(INN). Proposed INN: List 118" WHO Drug Information. 31(4))은 본 발명의 바람직한 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체이다.
- [0053] 일 구현예에서, 인간 혈관 내피성 성장 인자(VEGF)에 및 인간 안지오프이에틴-2(ANG-2)에 결합하는 이중특이적 항체는 인간 VEGF에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위를 포함하고, 인간 ANG-2에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함하는 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체이되,
- [0054] i) VEGF에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 부위는 중쇄 가변 도메인에서 서열번호 1의 CDR3H 영역, 서열번호 2의 CDR2H 영역, 및 서열번호 3의 CDR1H 영역을 포함하고, 경쇄 가변 도메인에서 서열번호 4의 CDR3L 영역, 서열번호 5의 CDR2L 영역, 및 서열번호 6의 CDR1L 영역을 포함하고;
- [0055] ii) ANG-2에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 부위는 중쇄 가변 도메인에서 서열번호 9의 CDR3H 영역, 서열번호 10의 CDR2H 영역, 및 서열번호 11의 CDR1H 영역을 포함하고, 경쇄 가변 도메인에서 서열번호 12의 CDR3L 영역, 서열번호 13의 CDR2L 영역, 및 서열번호 14의 CDR1L 영역을 포함하고,
- [0056] iii) 이중특이적 항체는 돌연변이 I253A, H310A, 및 H435A 및 돌연변이 L234A, L235A 및 P329G를 포함하는 인간 IgG1 서브클래스의 불변 중쇄 영역(넘버링은 카바트의 EU 인덱스에 따른 것임)을 포함한다.
- [0057] 일 구현예에서 이러한 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체는 2가이다.
- [0058] 일 구현예에서, 이러한 이중특이적, 2가 항-VEGF/ANG2 항체는 하기를 특징으로 한다:
- [0059] i) VEGF에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 부위는 중쇄 가변 도메인 VH로서 서열번호 7의 아미노산 서

열을 포함하고, 경쇄 가변 도메인 VL로서 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하고,

- [0060] ii) ANG-2에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 부위는 중쇄 가변 도메인 VH로서 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 도메인 VL로서 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0061] 본 발명의 일 양태에서, 본 발명에 따른 이러한 이중특이적 2가 항체는 하기를 포함하는 것을 특징으로 한다:
- [0062] a) VEGF에 특이적으로 결합하는 제1 전장 항체의 중쇄 및 경쇄;
- [0063] b) ANG-2에 특이적으로 결합하는 제2 전장 항체의 변형된 중쇄 및 변형된 경쇄로서, 불변 도메인 CL 및 CH1는 서로 대체되는, 변형된 중쇄 및 변형된 경쇄.
- [0064] 인간 혈관 내피성 성장 인자(VEGF) 및 인간 안지오프이오티신-2(ANG-2)에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체에 대한 상기의 이중특이적 2가 항체 형식은 WO 2009/080253(놈-인투-홀 변형된 CH3 도메인 포함)에 기재되어 있다. 이러한 이중특이적 2가 항체 형식을 기반으로 하는 항체는 CrossMAbs로 명명된다.
- [0065] 일 구현예에서 이러한 이중특이적인 2가 항-VEGF/ANG2 항체는 하기를 포함하는 것을 특징으로 한다:
- [0066] a) 제1 전장 항체의 중쇄로서 서열번호 17의 아미노산 서열, 및 제1 전장 항체의 경쇄로서 서열번호 18의 아미노산 서열, 및
- [0067] b) 제2 전장 항체의 변형된 중쇄로서 서열번호 19의 아미노산 서열, 및 제2 전장 항체의 변형된 경쇄로서 서열번호 20의 아미노산 서열.
- [0068] 일 구현예에서 이러한 이중특이적인 2가 항-VEGF/ANG2 항체는 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 및 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0069] 따라서, 본 발명의 하나의 구현예는 인간 VEGF에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위 및 인간 ANG-2에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함하는 이중특이적 2가 항체이고, 이는 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 및 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0070] 일 구현예에서, 본 발명에 따른 이중특이적 2가 항체의 CH3 도메인은 예를 들어 문헌[WO 96/027011, Ridgway J.B., 등, Protein Eng 9(1996) 617-621; 및 Merchant, A.M., 등, Nat Biotechnol 16(1998) 677-681]의 몇 개의 실시예에 상세히 기재되어 있는 "놈-인투-홀" 기술에 의해 변경된다. 이 방법에서, 2개의 CH3 도메인의 상호 작용 표면은 이들 2개의 CH3 도메인을 함유하는 중쇄 둘 개의 이중이량체화를 증가시키도록 변경된다. 2개의 CH3 도메인(2개의 중쇄의) 각각은 "놈"일 수 있고, 다른 하나는 "홀"이다. 디설파이드 브릿지의 도입은 이중이량체를 안정화시키고(Merchant, A.M, 등, Nature Biotech 16(1998) 677-681; Atwell, S., 등 J. Mol. Biol. 270(1997) 26-35), 수율을 증가시킨다.
- [0071] 본 발명의 바람직한 양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체는 하기를 특징으로 한다:
- [0072] 하나의 중쇄의 CH3 도메인 및 다른 중쇄의CH3 도메인은 각각 항체 CH3 도메인 사이의 원래 계면을 포함하는 계면에서 만나고;
- [0073] 상기 계면은 상기 이중특이적 항체의 형성을 촉진하도록 변경되고, 상기 변경은 하기를 특징으로 한다:
- [0074] a) 하나의 중쇄의 CH3 도메인은 변경되고,
- [0075] 이로써, 상기 이중특이적 항체 내의 다른 중쇄의 CH3 도메인의 원래의 계면과 만나는 하나의 중쇄의 상기 CH3 도메인의 상기 원래의 계면 내에서,
- [0076] 아미노산 잔기는 더 큰 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 대체되고, 이에 의해 하나의 중쇄의 CH3 도메인의 계면 내에 돌기를 생성하고, 이는 다른 중쇄의CH3 도메인의 계면 내의 공동 내에 배치가능하고,
- [0077] b) 다른 중쇄의 CH3 도메인은 변경되고,
- [0078] 이로써, 상기 이중특이적 항체 내의 제1 CH3 도메인의 원래의 계면과 만나는 제2 CH3 도메인의 원래의 계면 내에서,
- [0079] 아미노산 잔기는 더 작은 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 대체되고, 이에 의해 제1 CH3 도메인의 계면 내의 돌기가 위치할 수 있는 제2 CH3 도메인 계면 내의 공동을 생성한다.
- [0080] 따라서 본원에 기재된 바와 같이 사용을 위한 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체는 하기를 특징으로 한다:

- [0081] a)의 전장 항체의 중쇄의 CH3 도메인 및 b)의 전장 항체의 중쇄의 CH3 도메인은 각각 항체 CH3 도메인 사이의 원래 계면에서의 변경을 포함하는 계면에서 만나고;
- [0082] i) 하나의 중쇄의 CH3 도메인
- [0083] 아미노산 잔기는 더 큰 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 대체되고, 이에 의해 하나의 중쇄의 CH3 도메인의 계면 내에 돌기를 생성하고, 이는 다른 중쇄의 CH3 도메인의 계면 내의 공동 내에 위치할 수 있고,
- [0084] ii) 다른 중쇄의 CH3 도메인
- [0085] 아미노산 잔기는 더 작은 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 대체되고, 이에 의해 제1 CH3 도메인의 계면 내의 돌기가 위치할 수 있는 제2 CH3 도메인 계면 내의 공동을 생성한다.
- [0086] 바람직하게는 더 큰 측쇄 부피를 갖는 상기 아미노산 잔기는 아르기닌(R), 페닐알라닌(F), 티로신(Y), 트립토판(W)로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0087] 바람직하게는 더 작은 측쇄 부피를 갖는 상기 아미노산 잔기는 알라닌(A), 세린(S), 트레오닌(T), 발린(V)로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0088] 본 발명의 일 양태에서, CH3 도메인 둘 다는 각각의 CH3 도메인의 상응하는 위치에서 아미노산으로서 시스테인(C)의 도입에 의해 추가로 변경되어, CH3 도메인 둘 사이의 디설파이드 브릿지가 형성될 수 있다.
- [0089] 일 구현예에서, 이중특이적 항체는 "놈 사슬"의 CH3 도메인에서 T366W 돌연변이 및 "홀 사슬"의 CH3 도메인에서 T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 포함한다. CH3 도메인 사이의 추가의 사슬간 디설파이드 브릿지는 또한 예를 들어 S354C 돌연변이를 하나의 CH3 도메인에 도입하고 Y349C 돌연변이를 다른 CH3 도메인에 도입함으로써 사용될 수 있다(Merchant, A.M, 등, Nature Biotech 16(1998) 677-681).
- [0090] 또 다른 바람직한 구현예에서, 이중특이적 항체는 2개의 CH3 도메인 중 하나에서 S354C 및 T366W 돌연변이 및 2개의 CH3 도메인 중 다른 것에서 Y349C, T366S, L368A, Y407V 돌연변이를 포함한다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 이중특이적 항체는 2개의 CH3 도메인 및 S354C 중 하나에서 Y349C, T366W 돌연변이, 2개의 CH3 도메인의 다른 것에서 T366S, L368A, Y407V 돌연변이(하나의 CH3 도메인에서 추가의 Y349C 또는 S354C 돌연변이 및 사슬간 디설파이드 브릿지를 형성하는 다른 CH3 도메인에서 추가의 S354C 또는 Y349C 돌연변이)를 포함한다(항상 Kabat(Kabat, E.A., 등, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991)의 EU 인덱스에 따라 넘버링됨).
- [0091] 이중이량체화를 시행하기 위한 CH3-변형의 다른 기술은 본 발명의 대안으로서 고려되고 예를 들어 WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954 및 WO 2013/096291에 기재되어 있다.
- [0092] 일 구현예에서, EP 1 870 459A1에 기재된 이중이량체화 접근법이 대안적으로 사용된다. 이 접근법은 두 개의 중쇄 사이의 CH3/CH3 도메인 계면의 특이적 아미노산 위치에서 반대 전하는 갖는 하전된 아미노산의 치환/돌연변이의 도입에 기초한다. 상기 다중특이적 항체에 대한 하나의 바람직한 구현예는 하나의 중쇄의 CH3 도메인에서 아미노산 R409D 및 K370E 돌연변이 및 다중특이적 항체의 다른 중쇄의 CH3 도메인에서 아미노산 D399K 및 E357K 돌연변이이다(Kabat EU 인덱스에 따라 넘버링됨).
- [0093] 또 다른 구현예에서 상기 다중특이적 항체는 "놈 사슬"의 CH3 도메인에서 아미노산 T366W 돌연변이 및 "홀 사슬"의 CH3 도메인에서 아미노산 T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이를 포함하고; 및 추가로는 "놈 사슬"의 CH3 도메인에서 아미노산 R409D 및 K370E 돌연변이 및 "홀 사슬"의 CH3 도메인에서 아미노산 D399K 및 E357K 돌연변이를 포함한다.
- [0094] 일 구현예에서, WO2013/157953에 기재된 이중이량체화 접근법이 대안적으로 사용된다. 일 구현예에서, 하나의 중쇄의 CH3 도메인은 아미노산 T366K 돌연변이를 포함하고 다른 중쇄의 CH3 도메인은 아미노산 L351D 돌연변이를 포함한다. 추가 구현예에서, 하나의 중쇄의 CH3 도메인은 아미노산 L351K 돌연변이를 추가로 포함한다. 추가 구현예에서, 다른 중쇄의 CH3 도메인은 Y349E, Y349D 및 L368E(일 구현예에서 L368E)로부터 선택된 아미노산 돌연변이를 추가로 포함한다.
- [0095] 일 구현예에서, WO2012/058768에 기재된 이중이량체화 접근법이 대안적으로 사용된다. 일 구현예에서, 하나의 중쇄의 CH3 도메인은 아미노산 L351Y 및 Y407A 돌연변이를 포함하고, 다른 중쇄의 CH3 도메인은 아미노산 T366A

및 K409F 돌연변이를 포함한다. 추가 구현예에서, 다른 중쇄의 CH3 도메인은 위치 T411, D399, S400, F405, N390 또는 K392에서 아미노산 돌연변이를 추가로 포함한다. 일 구현예에서 상기 아미노산 돌연변이는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:

- [0096] a) T411N, T411R, T411Q, T411K, T411D, T411E 및 T411W,
- [0097] b) D399R, D399W, D399Y 및 D399K,
- [0098] c) S400E, S400D, S400R 및 S400K,
- [0099] d) F405I, F405M, F405T, F405S, F405V 및 F405W,
- [0100] e) N390R, N390K 및 N390D,
- [0101] f) K392V, K392M, K392R, K392L, K392F 및 K392E.
- [0102] 추가 구현예에서, 하나의 중쇄의 CH3 도메인은 아미노산 L351Y 및 Y407A 돌연변이를 포함하고, 다른 중쇄의 CH3 도메인은 아미노산 T366V 및 K409F 돌연변이를 포함한다. 추가 구현예에서, 하나의 중쇄의 CH3 도메인은 아미노산 Y407A 돌연변이를 포함하고, 다른 중쇄의 CH3 도메인은 아미노산 T366A 및 K409F 돌연변이를 포함한다. 추가 구현예에서, 다른 중쇄의 CH3 도메인은 아미노산 K392E, T411E, D399R 및 S400R 돌연변이를 추가로 포함한다.
- [0103] 일 구현예에서, W02011/143545에 기재된 이중이량체화 접근법이 대안적으로 사용된다. 일 구현예에서, W02011/143545에 따른 아미노산 변형은 368 및 409로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서 중쇄의 CH3 도메인에 도입된다.
- [0104] 일 구현예에서, 상기에 기재된 놉-인투-홀 기술을 또한 사용하는 W02011/090762에 기재된 이중이량체화 접근법이 대안적으로 사용된다. 일 구현예에서, 하나의 중쇄의 CH3 도메인은 아미노산 T366W 돌연변이를 포함하고, 다른 중쇄의 CH3 도메인은 아미노산 Y407A 돌연변이를 포함한다. 일 구현예에서, 하나의 중쇄의 CH3 도메인은 아미노산 T366Y 돌연변이를 포함하고, 다른 중쇄의 CH3 도메인은 아미노산 Y407T 돌연변이를 포함한다.
- [0105] 일 구현예에서, 다중특이적 항체는 IgG2 아이소타입의 것이고 W02010/129304에 기재된 이중이량체화 접근법이 대안적으로 사용된다.
- [0106] 일 구현예에서, W02009/089004에 기재된 이중이량체화 접근법이 대안적으로 사용된다. 일 구현예에서, 하나의 중쇄의 CH3 도메인은 음으로 하전된 아미노산에 의한 K392 또는 N392의 아미노산 치환(일 구현예에서 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D); 추가 구현예에서 K392D 또는 N392D 돌연변이)을 포함하고 및 다른 중쇄의 CH3 도메인은 양으로 하전된 아미노산에 의한 D399, E356, D356, 또는 E357의 아미노산 치환(일 구현예에서 라이신(K) 또는 아르기닌(R), 추가 구현예에서 D399K, E356K, D356K 또는 E357K 치환; 및 또 추가의 구현예에서 D399K 또는 E356K 돌연변이)을 포함한다. 추가 구현예에서, 하나의 중쇄의 CH3 도메인은 음으로 하전된 아미노산에 의한 K409 또는 R409의 아미노산 치환(일 구현예에서 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D); 추가 구현예에서 K409D 또는 R409D 돌연변이)을 추가로 포함한다. 추가 구현예에서, 하나의 중쇄의 CH3 도메인은 음으로 하전된 아미노산에 의한 K439 및/또는 K370의 아미노산 치환(일 구현예에서 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D))을 추가로 또는 대안적으로 포함한다.
- [0107] 일 구현예에서, W02007/147901에 기재된 이중이량체화 접근법이 대안적으로 사용된다. 일 구현예에서, 하나의 중쇄의 CH3 도메인은 아미노산 K253E, D282K 및 K322D 돌연변이를 포함하고, 다른 중쇄의 CH3 도메인은 아미노산 D239K, E240K 및 K292D 돌연변이를 포함한다.
- [0108] 일 구현예에서, W02007/110205에 기재된 이중이량체화 접근법이 대안적으로 사용된다.
- [0109] 하나의 바람직한 구현예에서 이러한 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체는 2가이다.
- [0110] 일 구현예에서, 인간 혈관 내피성 성장 인자(VEGF)에 및 인간 안지오펜테틴-2(ANG-2)에 결합하는 이중특이적 2가 항체는 인간 VEGF에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위를 포함하고, 인간 ANG-2에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함하는 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체를 포함하되,
- [0111] i) VEGF에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 부위는 중쇄 가변 도메인에서 서열번호 1의 CDR3H 영역, 서열번호 2의 CDR2H 영역, 및 서열번호 3의 CDR1H 영역을 포함하고, 경쇄 가변 도메인에서 서열번호 4의 CDR3L 영역, 서열번호 5의 CDR2L 영역, 및 서열번호 6의 CDR1L 영역을 포함하고;
- [0112] ii) ANG-2에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 부위는 중쇄 가변 도메인에서 서열번호 9의 CDR3H 영역,

서열번호 10의 CDR2H 영역, 및 서열번호 11의 CDR1H 영역을 포함하고, 경쇄 가변 도메인에서 서열번호 12의 CDR3L 영역, 서열번호 13의 CDR2L 영역, 및 서열번호 14의 CDR1L 영역을 포함하고,

- [0113] iii) 이종특이적 항체는 돌연변이 I253A, H310A, 및 H435A 및 돌연변이 L234A, L235A 및 P329G를 포함하는 인간 IgG1 서브클래스의 불변 중쇄 영역(넘버링은 카바트의 EU 인덱스에 따른 것임)을 포함하고,
- [0114] iv) 상기 불변 중쇄 영역에서 T366W 돌연변이는 하나의 CH3 도메인에 포함되고, T366S, L368A, Y407V 돌연변이는 다른 CH3 도메인(넘버링은 카바트의 EU 인덱스에 따른 것임)을 포함한다.
- [0115] 일 구현예에서, 인간 혈관 내피성 성장 인자(VEGF)에 및 인간 안지오펜이오티-2(ANG-2)에 결합하는 이종특이적 2가 항체는 인간 VEGF에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위를 포함하고, 인간 ANG-2에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함하는 이종특이적 항-VEGF/ANG2 항체를 포함하되,
- [0116] i) VEGF에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 부위는 중쇄 가변 도메인에서 서열번호 1의 CDR3H 영역, 서열번호 2의 CDR2H 영역, 및 서열번호 3의 CDR1H 영역을 포함하고, 경쇄 가변 도메인에서 서열번호 4의 CDR3L 영역, 서열번호 5의 CDR2L 영역, 및 서열번호 6의 CDR1L 영역을 포함하고;
- [0117] ii) ANG-2에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 부위는 중쇄 가변 도메인에서 서열번호 9의 CDR3H 영역, 서열번호 10의 CDR2H 영역, 및 서열번호 11의 CDR1H 영역을 포함하고, 경쇄 가변 도메인에서 서열번호 12의 CDR3L 영역, 서열번호 13의 CDR2L 영역, 및 서열번호 14의 CDR1L 영역을 포함하고,
- [0118] iii) 이종특이적 항체는 돌연변이 I253A, H310A, 및 H435A 및 돌연변이 L234A, L235A 및 P329G를 포함하는 인간 IgG1 서브클래스의 불변 중쇄 영역(넘버링은 카바트의 EU 인덱스에 따른 것임)을 포함하고;
- [0119] iv) 상기 불변 중쇄 영역에서 S354C 및 T366W 돌연변이는 하나의 CH3 도메인에 포함되고, Y349C, T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이는 다른 CH3 도메인(넘버링은 카바트의 EU 인덱스에 따른 것임)을 포함한다.
- [0120] 일 구현예에서 이러한 이종특이적인 2가 항-VEGF/ANG2은 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 및 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0121] 따라서, 본 발명의 하나의 구현예는 인간 VEGF에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위 및 인간 ANG-2에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함하는 이종특이적 2가 항체이고, 이는 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 및 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0122] 하나의 바람직한 구현예에서 이러한 이종특이적 항-VEGF/ANG2 항체는 파리시맵이다.
- [0123] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "VEGF"는 천연 발생 대립유전자 및 가공된 형태의 성장 인자들과 함께 문헌 [Leung, D.W., 등, Science 246(1989) 1306-9; Houck 등, Mol. Endocrin. 5(1991) 1806-1814; Keck, P.J., 등, Science 246(1989) 1309-12 및 Connolly, D.T., 등, J. Biol. Chem. 264(1989) 20017-24]에 기재된 바와 같이 인간 혈관 내피성 성장 인자(VEGF/VEGF-A), 165-아미노산 인간 혈관 내피성 세포 성장 인자(인간 VEGF165의 전구체 서열의 아미노산 27-191: 서열번호 25; 아미노산 1-26은 신호 펩티드를 나타냄), 및 관련된 121, 189, 및 206 혈관 내피성 세포 성장 인자 동형체를 지칭한다. VEGF은 종양 및 안구내 장애와 관련된 정상 및 비정상 혈관형성 및 신생혈관형성의 조절에 관여한다 [(Ferrara, N., 등, Endocr. Rev. 18(1997) 4-25; Berkman, R.A., 등, J. Clin. Invest. 91(1993) 153-159; Brown, L.F., 등, Human Pathol. 26(1995) 86-91; Brown, L.F., 등, Cancer Res. 53(1993) 4727-4735; Mattern, J., 등, Brit. J. Cancer. 73(1996) 931-934; 및 Dvorak, H.F., 등, Am. J. Pathol. 146(1995) 1029-1039]. VEGF은 몇 개의 공급원으로부터 단리되었고 몇 개의 동형체를 포함하는 동종이량체성 당단백질이다. VEGF는 내피성 세포에 대해 매우 특이적 유사분열 활성을 나타낸다. VEGF 길항제/억제제는 그것의 수용체 VEGFR에 대한 VEGF의 결합을 억제한다. 알려진 VEGF 길항제/억제제는 WO2014/009465에 기재된 바와 같이 이종특이적 항-VEGF/ANG2 항체를 포함한다.
- [0124] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "ANG-2"는 예를 들어 문헌[Maisonpierre, P.C., 등, Science 277(1997) 55-60 및 Cheung, A.H., 등, Genomics 48(1998) 389-91]에 기재된 인간 안지오펜이오티-2(ANG-2)(대안적으로 ANGPT2 또는 ANG2로 단축됨)(서열번호 24)를 지칭한다. 안지오펜이오티-1 및 -2는 혈관 내피 내에서 선택적으로 발현된 티로신 키나제의 계열인 타이스(Ties)에 대한 리간드로서 발견되었다(Yancopoulos, G.D., 등, Nature 407(2000) 242-48). 이제 안지오펜이오티 패밀리의 4개의 확정적인 멤버가 존재한다. 안지오펜이오티-3 및 -4(Ang-3 및 Ang-4)는 마우스 및 인간에서 동일한 유전자 좌위의 광범위하게 분기된 대응물을 나타낼 수 있다 (Kim, I., 등, FEBS Lett., 443(1999) 353-56; Kim, I., 등, J Biol Chem 274(1999) 26523-28). ANG-1 및 ANG-2는 원래 효능제 및 길항제 각각으로 조직 배양 실험에서 확인되었다(ANG-1: Davis, S., 등, Cell 87(1996)

1161-69; 및 ANG-2: Maisonpierre, P.C., 등, Science 277(1997) 55-60를 참조한다). 모든 알려진 안지오프이 에틴은 그것의 수용체 TIE2에 주로 결합하고, 및 Ang-1 및 -2 둘 다는 3 nM의 친화도(Kd)로 TIE2에 결합한다 (Maisonpierre, P.C., 등, Science 277(1997) 55-60). ANG2 길항제/억제제는 그것의 수용체 TIE2에 대한 ANG2의 결합을 억제한다. 알려진 ANG2 길항제/억제제는 WO2014/009465에 기재된 바와 같은 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체를 포함한다.

[0125] 본 발명의 이중특이적 항체의 항원 결합 부위는 항원에 대한 결합 부위의 친화도에 다양한 정도로 기여하는 6개의 상보성 결정 영역(CDR)을 함유한다. 3개의 중쇄 가변 도메인 CDR(CDRH1, CDRH2 및 CDRH3) 및 3개의 경쇄 가변 도메인 CDR(CDRL1, CDRL2 및 CDRL3)이 있다. CDR 및 프레임워크 영역(FR)의 정도는 아미노산 서열의 컴파일 링된 데이터베이스와 비교하여 결정되며, 여기서 이들 영역은 서열 사이의 가변성에 따라 정의되었다.

[0126] 본 발명의 항체는 면역글로불린 부류 IgG1의 인간 기원에서 유래된 면역글로불린 불변 영역을 포함한다.

[0127] 본원에서 사용된 바와 같은 용어들 "단클론성 항체" 또는 "단클론성 항체 조성물"은 단일 아미노산 조성물의 항체 분자의 제제를 지칭한다.

[0128] 용어 "키메라 항체"는 일반적으로 재조합 DNA 기술에 의해 제조된, 하나의 공급원 또는 종으로부터의 가변 영역, 즉 결합 영역, 및 상이한 공급원 및 종으로부터 유래된 불변 영역의 적어도 일부를 포함하는 항체를 지칭한다. 쫓과 가변 영역 및 인간 불변 영역을 포함하는 키메라 항체가 특히 관심의 대상이다. 본 발명에 의해 포괄된 "키메라 항체"의 다른 형태는, 불변 영역이 특히 C1q 결합 및/또는 Fc 수용체(FcR) 결합과 관련하여 본 발명에 따른 원하는 특성을 생성하기 위해 원래 항체의 불변 영역으로부터 추가로 변형 또는 변경된 것이다. 그와 같은 키메라 항체는 또한 "클래스-스위칭된 항체"로 지칭된다. 키메라 항체는 면역글로불린 가변 영역을 인코딩하는 DNA 분절 및 면역글로불린 불변 영역을 인코딩하는 DNA 분절을 포함하는 발현된 면역글로불린 유전자의 생성물이다. 키메라 항체를 생성하는 방법은 종래의 재조합 DNA를 수반하고 유전자 형질감염기술은 당해 기술에 잘 알려져 있다. 예를 들어 문헌[Morrison, S.L., 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81(1984) 6851-6855; US 특허 번호 5,202,238 및 5,204,244]를 참조한다.

[0129] 용어 "인간화 항체"는 프레임워크 또는 "상보성 결정 영역"(CDR)이 모 면역글로불린의 것과 비교하여 상이한 특이성의 면역글로불린의 CDR을 포함하도록 변형된 항체를 지칭한다. 바람직한 구현예에서, 쫓과 CDR은 인간 항체의 프레임워크 영역에 그래프팅되어 "인간화 항체"를 제조한다. 예를 들어 문헌[Riechmann, L., 등, Nature 332(1988) 323-327; 및 Neuberger, M.S., 등, Nature 314(1985) 268-270]을 참조한다. 특히 바람직한 CDR은 키메라 항체에 대해 상기 언급된 항원을 인식하는 서열을 나타내는 것에 상응한다. 본 발명에 포괄된 "인간화 항체"의 다른 형태는 불변 영역이 특히 C1q 결합 및/또는 Fc 수용체(FcR) 결합과 관련하여 본 발명에 따른 특성을 생성하기 위해 원래 항체의 불변 영역으로부터 추가로 변형 또는 변경된 것이다.

[0130] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "인간 항체"는 인간 생식 계열 면역글로불린 서열에서 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함하는 것으로 의도된다. 인간 항체는 당업계에서 잘 알려져 있다(van Dijk, M.A., 및 van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5(2001) 368-374). 인간 항체는 또한 면역화 시, 내인성 면역글로불린 생산의 부재에서 인간 항체의 전체 레퍼토리 또는 선택을 생성할 수 있는 형질전환 동물(예를 들어, 마우스)에서 생성될 수 있다. 이러한 생식계열 돌연변이 마우스에서 인간 생식선 면역글로불린 유전자 어레이의 전달은 항원 공격 시 인간 항체의 생산을 초래할 것이다(참고, 예를 들어, Jakobovits, A., 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(1993) 2551-2555; Jakobovits, A., 등, Nature 362(1993) 255-258; Bruggemann, M., 등, Year Immunol. 7(1993) 33-40). 인간 항체는 또한 파아지 디스플레이 라이브러리에서 생성될 수 있다(Hoogenboom, H.R., 및 Winter, G., J. Mol. Biol. 227(1992) 381-388; Marks, J.D., 등, J. Mol. Biol. 222(1991) 581-597). Cole 등 및 Boerner 등의 기술은 또한 인간 단클론성 항체의 제조에 이용가능하다(Cole 등, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77(1985); and Boerner, P., 등, J. Immunol. 147(1991) 86-95). 본 발명에 따른 키메라 및 인간화 항체에 대해 이미 언급된 바와 같이, 본원에 사용된 바와 같은 용어 "인간 항체"는 또한 특히 C1q 결합 및/또는 FcR 결합과 관련하여, 예를 들어 "클래스 스위칭", 즉 Fc 부분의 변화 또는 돌연변이(예를 들어 IgG1에서 IgG4 및/또는 IgG1/IgG4로의 돌연변이)에 의해 본 발명에 따른 특성을 생성하기 위해 불변 영역에서 변형된 이러한 항체를 포함한다.

[0131] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "재조합 인간 항체"는 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 모든 인간 항체, 예컨대 숙주 세포, 예컨대 NSO 또는 CHO 세포로부터 또는 인간 면역글로불린 유전자에 대해 형질전환 동물(예를 들어 마우스)로부터 단리된 항체 또는 숙주 세포 내로 형질감염된 재조합 발현 벡터를 사용하여 발현된 항체를 포함하는 것으로 의도된다. 그와 같은 재조합 인간 항체는 재배열된 형태의 가변 및 불변 영역을

갖는다. 본 발명에 따른 재조합 인간 항체는 생체내 체세포 과돌연변이를 거쳤다. 따라서, 재조합 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열은 인간 생식 계열 VH 및 VL 서열로부터 유래되고 관련되지만 생체내에서 인간 항체 생식 계열 레퍼토리 내에 자연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열이다.

[0132] 본원에서 사용된 바와 같은 "가변 영역"(경쇄의 가변 영역(V_L), 중쇄의 가변 영역(V_H)) 또는 "가변 도메인"은 항원에 대한 항체의 직접적인 결합에 관여하는 경쇄 및 중쇄 도메인의 각각의 쌍을 나타낸다. 가변 경쇄 및 중쇄 도메인은 동일한 일반적인 구조를 가지며 각각의 도메인은 3개의 "초가변 영역"(또는 상보적 결정 영역, CDR)에 의해 연결된 서열이 널리 보존된 4개의 프레임워크(FR) 영역을 포함한다. 프레임워크 영역은 b-시트 형태를 채택하고 CDR은 b-시트 구조를 연결하는 루프를 형성할 수 있다. 각 사슬 중의 CDR은 프레임워크 영역에 의해 3차원 구조로 유지되고 다른 사슬로부터의 CDR과 함께 항원 결합 부위를 형성한다. 항체의 중쇄 및 경쇄 CDR3 영역은 본 발명에 따른 항체의 결합 특이성/친화성에 특히 중요한 역할을 한다. 사용될 때, 용어 "항체의 항원 결합 부분"은 항원 결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기를 지칭한다. 항체의 항원 결합 부분은 "상보적 결정 영역" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기를 포함한다. "프레임워크" 또는 "FR" 영역은 본원에서 정의된 바와 같은 초가변 영역 잔기 이외의 가변 도메인 영역이다. 따라서, 항체의 경쇄 및 중쇄 가변 도메인은 N-말단에서 C-말단으로 도메인 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 및 FR4를 포함한다. 특히, 중쇄의 CDR3은 항원 결합에 가장 많이 기여하고 항체의 특성을 정의하는 영역이다. CDR 및 FR 영역은 문헌[Kabat 등, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991)]의 표준 정의 및/또는 "초가변 루프"로부터의 잔기에 따라 결정된다.

[0133] 용어 "에피토프"는 항체에 특이하게 결합할 수 있는 임의의 폴리펩티드 결정인자를 포함한다. 특정 구현예에서, 에피토프 결정인자는 분자 예컨대 아미노산, 당 측쇄, 포스포릴, 또는 설포닐의 화학적 활성 표면 그룹화를 포함하고, 특정 구현예에서 특정 3차원 구조 특성, 및 또는 특정 전하 특성을 가질 수 있다. 에피토프는 항체에 의해 결합된 항원의 영역이다.

[0134] 용어 "전장 항체"는 2개의 "전장 항체 중쇄" 및 2개의 "전장 항체 경쇄"로 이루어진 항체를 나타낸다. "전장 항체 중쇄"는 서브클래스IgE의 항체의 경우에 N-말단에서 C-말단 방향으로 항체 중쇄 가변 도메인(VH), 항체 불변 중쇄 도메인 1(CH1), 항체 힌지 영역(HR), 항체 중쇄 불변 도메인 2(CH2), 및 항체 중쇄 불변 도메인 3(CH3), 약칭 VH-CH1-HR-CH2-CH3; 및 선택적으로 항체 중쇄 불변 도메인 4(CH4)로 이루어진 폴리펩티드이다. 바람직하게는 "전장 항체 중쇄"는 N-말단에서 C-말단 방향으로 VH, CH1, HR, CH2 및 CH3로 이루어진 폴리펩티드이다. "전장 항체 경쇄"는 N-말단에서 C-말단 방향으로 항체 경쇄 가변 도메인(VL), 및 항체 경쇄 불변 도메인(CL), 약칭 VL-CL로 이루어진 폴리펩티드이다. 항체 경쇄 불변 도메인(CL)는 카파 또는 람다일 수 있다. 2개의 전장 항체 사슬은 CL 도메인과 CH1 도메인 사이 및 전장 항체 중쇄의 힌지 영역 사이의 폴리펩티드간 디설파이드 결합을 통해 함께 연결된다. 전형적인 전장 항체의 예는 천연 항체 예컨대 IgG(예를 들어, IgG1 및 IgG2), IgM, IgA, IgD, 및 IgE이다. 본 발명에 따른 전장 항체는 단일 중 예를 들어 인간으로부터의 것일 수 있거나, 또는 키메라화된 또는 인간화 항체일 수 있다. 본 발명에 따른 전장 항체는 둘 모두가 동일한 항원에 특이적으로 결합하는 한 쌍의 VH 및 VL에 의해 형성된 2개의 항원 결합 부위 각각을 포함한다. 상기 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄의 C-말단은 상기 중쇄 또는 경쇄의 C-말단에 있는 마지막 아미노산을 나타낸다. 상기 전장 항체의 중쇄 또는 경쇄의 N-말단은 상기 중쇄 또는 경쇄의 N-말단에 있는 마지막 아미노산을 나타낸다.

[0135] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "불변 영역" 또는 "불변 도메인"은 가변 영역 이외의 항체의 도메인의 합계를 나타낸다. 불변 영역은 항원의 결합에 직접 관여하지 않지만, 다양한 효과기 기능을 나타낸다. 그것의 중쇄의 불변 영역의 아미노산 서열에 따라, 항체는 부류: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM로 나누어지고, 및 이들 중 몇 개는 추가로 서브클래스, 예컨대 IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4, IgA1 및 IgA2로 나누어질 수 있다. 상이한 부류의 항체에 해당하는 중쇄 불변 영역은 각각 알파, 델타, 엡실론, 감마, 및 마이크로로 불린다. 모두 5개의 항체 부류에서 발견될 수 있는 카파 및 람다로 불린다.

[0136] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "인간 기원에서 유래된 불변 영역"은 서브클래스IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4의 인간 항체의 불변 중쇄 영역 및/또는 불변 경쇄 카파 또는 람다 영역을 나타낸다. 그와 같은 불변 영역은 당업계에서 잘 알려져 있고 예를 들어 Kabat, E. A.,(예를 들어, 문헌 [Johnson, G., and Wu, T. T., Nucleic Acids Res. 28(2000) 214-218; Kabat, E. A., et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72(1975) 2785- 2788]참고)에 의해 기재되어 있다.

[0137] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 불변 중쇄 도메인(또는 영역)은 적어도 일부의 불변 중쇄 영역을 함유하는 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의한다.

[0138] 용어는 불변 중쇄 도메인 및 변이체 불변 중쇄 도메인의 천연 서열을 포함한다. 변이체 불변 중쇄 도메인은 예를 들어 노브스인투 홀(knobsinto hole) 기술에 대해 상기에 기술한 바와 같이 이중이량체화를 촉진하기 위해 사용되는 불변 도메인에서 돌연변이를 포함한다. 또한 다른 돌연변이 예컨대 예를 들어 L234A(Leu235A1a), L235A(Leu234A1a) 및 P329G(Pro329Gly)는 이러한 돌연변이가 감소된 FcR 결합을 가져 불변 도메인으로 포함될 수 있다(특히 그것은 FcR감마I, FcR감마II 및 FcR감마III에 더 이상 결합을 나타내지 않는다). 이것은 잠재적 부작용 예컨대 예를 들어 혈전증을 감소시키는데 특히 유용하다(Meyer, T., 등, J. Thromb. Haemost. 7(2009) 171-81). 부가하여 예를 들어 또한 돌연변이 I253A, H310A, 및 H435A(Kabat의 EU 인덱스에 따른 넘버링)는 이러한 돌연변이가 감소된 FcRn 1 또는 2 돌연변이) 또는 제거된 FcRn 결합(모두 3 돌연변이)를 가져 불변 도메인으로 불변 도메인에 포함될 수 있다.

[0139] 일 양태에서, 인간 IgG 중쇄 불변 영역은 알라닌118(A118)(Kabat의 EU 인덱스에 따른 넘버링)로부터 중쇄의 카복실-말단으로 연장한다. 그러나, 숙주 세포에 의해 생산된 항체는 중쇄의 C-말단으로부터 하나 이상, 특히 1 또는 2, 아미노산의 번역후 절단을 당할 수 있다. 따라서, 전장 중쇄를 인코딩하는 특이적 핵산 분자의 발현에 의한 숙주 세포에 의해 생산된 항체는 전장 중쇄를 포함하거나, 또는 그것은 전장 중쇄의 절단된 변이체를 포함할 수 있다. 이는 중쇄의 최종 2개의 C-말단 아미노산이 글리신(G446) 및 라이신(K447, EU 인덱스에 따른 넘버링)인 경우일 수 있다. 따라서, 불변 중쇄 도메인의 C-말단 라이신(Lys447), 또는 C-말단 글리신(Gly446) 및 라이신(Lys447)은 존재할 수 있거나 존재하지 않을 수 있다. 불변 중쇄 도메인을 포함하는 중쇄의 아미노산 서열은 달리 표시되지 않는 경우 본원에서 C-말단 글리신-라이신 디펩티드로 표시된다.

[0140] "안정한" 제형은 그 안의 단백질, 예를 들어 항체가 그것의 물리적 및 화학적 안정성과, 따라서 보관시 그것의 생물학적 활성을 본질적으로 보유하는 것; 예를 들어 약제학적 제형에서 이중특이적 항체의 고분자량 함량(HMW)이 25°C에서 8주 후 10% 미만(일 구현예에서 5% 미만, 일 구현예에서 2.5% 미만)인 것이다. 일 구현예에서, 약제학적 제형에서 이중특이적 항체의 고분자량 함량(HMW)은 25°C에서 52주 후 10% 미만(일 구현예에서 5% 미만)이다.

[0141] 일 구현예에서, "안정한 액체 약제학적 제형"은 냉장된 온도(2-8°C)에서 적어도 12개월, 특히 2년, 및 더 상세하게는 3년 동안 상당한 변화가 관찰되지 않은 액체 제형이다. 안정성에 대한 기준은 다음이다: 크기 배제 크로마토그래피(SEC-HPLC)에 의해 측정될 때 항체 단량체의 10%, 특히 5% 이하가 분해된다. 또한, 용액은 시각적 분석에 의해 무색 또는 투명 내지 약간 유백색이다. 제형의 단백질 농도는 +/- 10% 이하 변화를 갖는다. 10%, 특히 5% 이하의 응집이 형성된다. 안정성은 UV 분광법, 크기 배제 크로마토그래피(SEC-HPLC), 이온교환 크로마토그래피(IE-HPLC), 탁도측정 및 육안 검사 같은 당해 분야에서 알려진 방법에 의해 측정된다.

[0142] **탁도(FTU(=포마진 탁도 단위))**

[0143] 약제학적 제형의 탁도는 탁도계(예를 들어, Ph. Eur. 2.2.1(액체의 명료성 및 유백색 정도)에 따른 Hach 2100 AN 탁도계 상에서 결정될 수 있다. 대략 2 mL 샘플 용액의 샘플 부피가 11 mM의 내부 직경 유리 큐벳 및 m 안으로 이전된다. 유리 큐벳은 탁도계 안으로 배치하였고 탁도는 참조 현탁액 1 FTU, 3 FTU, 10 FTU, 20 FTU 및 100 FTU의 보정 곡선에 대해 측정하였다.

[0144] **점도(mPa)**

[0145] 약제학적 제형의 제형 샘플의 점도는 유량계(예를 들어 1000 s⁻¹의 전단율 및 20°C의 온도에서 25 mm - 0.5° 콘을 갖는 Anton Paar Physica MCR 301 회전식 유량계) 상에서 결정될 수 있다.

[0146] **눈에 보이는 입자**

[0147] 바이알 샘플은 2 x 확대 렌즈의 도움으로 각각의 검사 기계(예를 들어, Seidenader 검사 기계 V90-T 상에서 가시적으로 검사하였다. 조명 광원 L1, L2 및 L3은 셋팅 5로 조정하였다. 바이알 샘플은 입자의 존재에 대해 회전식 운동 동안 검사하였다. 눈에 보이는 입자의 형성은, 눈에 보이는 입자가 본질적으로 없는 USP-NF <790>의 요건에 따른 유리체내 주사에 대해 허용가능하지 않다. USP-NF <790>은 "본질적으로 없는" 표준은 비경구 약물이 검사되고 지정된 수의 단위 이하가 눈에 보이는 미립자를 함유하는 것으로 관찰될 때 달성되는 것을 제공한다. 더 구체적으로, 100% 검사를 받는 비경구 약물 경우, "본질적으로 없는" 표준은 배치가 0.65% 이하의 허용가능한 품질 수준(AQL)을 만족할 때 충족된다. 또한, (예를 들어, 불만 또는 규제 문제 때문에) 고객에게 출하된 생성물을 평가할 필요가 있을 경우, 회사는 20 단위로 샘플링하고 검사할 수 있다. 만일 샘플에서 입자가 관찰되지 않으면, 배치는 눈에 보이는 미립자가 "본질적으로 없는" 것으로 간주된다.

[0148] **단백질 농도(mg/mL)**

[0149] 제형 샘플의 단백질 농도는 Perkin Elmer로부터의 UV/Vis 광도계 램다 35 상에서 자외선(UV) 광 흡수에 의해 측정하였다. 제형 샘플은 20 mM의 L-히스티딘-아세테이트 완충 용액 pH 5.5로 대략 0.5 mg/mL의 단백질 농도로 희석하고 1 cm의 두께를 갖는 측정 큐벳 안으로 채웠다. 측정 큐벳의 UV 흡수는 280 및 320 nm에서의 파장에서 측정하였다.

[0150] 단백질 농도는 다음의 방정식에 따른 실제 희석에 상응하는 280(A280) 및 320 nm(A320)에서 측정된 UV 광 흡수, 1.70 mL/(mg x cm)의 소광 계수(E), 1 cm의 두께(d) 및 희석 인자(DF)로부터 계산하였다:

[0151]
$$\text{단백질 농도 (mg/mL)} = \frac{(A280 - A320)}{(E \times d)} \times DF$$

[0152] **pH**

[0153] 제형 샘플의 pH는 유리 전극을 갖는 전위측정법에 의해 결정하였다.

[0154] **이온 강도**

[0155] 제형의 무차원 이온 강도 I는 방정식 1에 따라 계산한다:

[0156]
$$\text{방정식 1: } I = \sum_i z_i^2 \left(\frac{b_i}{b^\theta} \right)$$

[0157] 이 표현에서 z는 이온 I의 전하 수(양이온에 대해 양성 및 음이온에 대해 음성)이고 b_i는 그것의 중량 몰농도이다. b^θ는 1 mol/kg에 상응하고 I 무차원을 만들기 위해 필요하다(Physical Chemistry, P. Atkins, J. de Paula, Oxford Press Ninth edition, p. 194).

[0158] 충전된 완충액 중의 중량 몰농도는 Henderson-Hasselbalch 방정식을 사용하여 계산하였다(Methods in Enzymology- Guide to Protein Purification, Volume 182, M.P. Deutscher, Academic Press, Inc., 1990, p.24ff).

[0159] **삼투질농도**

[0160] 제형 샘플의 삼투질농도는 빙점 강하의 원리에 따라 Gonotec으로부터의 Osmomat 030 3P 삼투압계 상에서 측정하였다.

[0161] **계면활성제**

[0162] 본 발명의 약제학적 제형은 항체의 응집 및 입자 형성을 감소시키기 위해 계면활성제를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "계면활성제"는 기계적 응력 예컨대 진탕(shaking) 및 진단에 대해 단백질 제형을 보호하기 위해 사용되는 약제학적으로 허용가능한 부형제를 나타낸다. 약제학적으로 허용가능한 계면활성제의 예는 폴리옥시에틸렌소르비탄 지방산 에스테르(Tween), 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르(예를 들어 상표명 BrijTM으로 시판되는 것들) 및 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체(폴록사머, 플루로닉)을 포함한다.

[0163] 바람직하게는, 계면활성제는 폴리옥시에틸렌소르비탄-지방산 에스테르 또는 폴록사머이다. 폴리옥시에틸렌소르비탄-지방산 에스테르의 예는 폴리소르베이트 20(상표명 Tween 20TM으로 시판됨) 및 폴리소르베이트 80(상표명 Tween 80TM으로 시판됨)이다. 바람직한 폴리옥시에틸렌소르비탄-지방산은 폴리소르베이트 20이다.

[0164] 상기 언급된 계면활성제는 일반적으로 0.01%(w/v) 이상, 예를 들어 0.01 내지 약 0.09%(w/v)의 농도로 사용된다. 본 발명의 약제학적 조성물 중의 계면활성제는 특히 약 0.02% 내지 약 0.06%(w/v)의 범위로, 더욱 특히 약 0.03% 내지 약 0.05%(w/v)의 범위로, 훨씬 더 특히 약 0.04%(w/v)의 농도로 사용된다.

[0165] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "폴록사머"는 BASF(Parsippany, N.J.)에 의해 상표명 PLURONIC® F68으로 시판되는 폴록사머 188로 알려진 폴리옥시에틸렌의 2개의 친수성 사슬에 의해 측정된 폴리옥시프로필렌의 중앙 소수성 사슬을 포함하는 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 트리블록 공중합체를 포함한다. 본 발명의 제형에 사용될 수 있는 다른 폴록사머는 폴록사머 403(PLURONIC® P123으로 시판됨), 폴록사머 407(PLURONIC® P127로 시판됨), 폴록사머 402(PLURONIC® P122로 시판됨), 폴록사머 181(PLURONIC® L61로 시판됨), 폴록사머

401(PLURONIC® L121로 시판됨), 폴록사머 185(PLURONIC® P65로 시판됨), 및 폴록사머 338(PLURONIC® F108로 시판됨)을 포함한다.

[0166] **완충액**

[0167] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "완충액"은 약제학적 제제의 pH를 안정화시키는 약제학적으로 허용가능한 부형제를 나타낸다. 적합한 완충액은 당해 분야에서 잘 알려져 있고 문헌에서 찾을 수 있다. 유리체내 투여를 위한 전형적인 약제학적으로 허용가능한 완충액은 히스티딘-완충액, 시트레이트-완충액, 석시네이트-완충액, 아세테이트-완충액, 포스페이트-완충액 또는 이들의 혼합물을 비제한적으로 포함한다. 이러한 문맥에서, 특히 관심 대상의 완충액은 당업계에서 알려진 산 또는 염기로 pH를 조정하는 L-히스티딘("히스티딘 완충액") 또는 L-히스티딘과 L-히스티딘 하이드로클로라이드의 혼합물을 포함한다. 특히 관심 대상의 완충액은 아세트산(예를 들어, 30%) 또는 하이드로클로라이드로 pH를 조정하는 L-히스티딘("히스티딘 완충액") 특히 L-히스티딘을 포함한다. 위에서 언급한 완충액은 일반적으로 약 2 mM 내지 약 200 mM 또는 약 5 mM 내지 약 100 mM의 농도, 특히 약 10 mM 내지 약 30 mM 또는 약 15 mM 내지 약 20 mM의 농도 및 더 상세하게는 약 20 mM의 농도로 사용된다. 사용된 완충액과 독립적으로, pH는 당업계에서 알려진 산 또는 염기, 예를 들어 아세트산, 염산, 인산, 황산 및 시트르산, 수산화나트륨 및 수산화칼륨, 특히 아세트산으로 4.5 내지 7.0의 범위의 값 및 특히 5.0 내지 6.0 범위의 값 및 가장 특히 pH 5.5 ± 0.2 범위의 값으로 조정될 수 있다. 특히 관심 대상의 완충액은 5.5 ± 0.5의 pH에서(일 구현예에서 5.5 ± 0.3의 pH에서; 특히, 5.5 ± 0.2의 pH에서) 15-25 mM(일 구현예에서 20 mM ± 3mM, 특히 20 mM ± 2mM)의 농도의 히스티딘(L-히스티딘) 아세테이트 완충액이다.

[0168] **안정화제**

[0169] 용어 "안정화제"는 제조, 보관 및 적용 동안 화학적 및/또는 물리적 분해로부터 활성 약제학적 성분 및/또는 제형을 보호하는 약제학적 허용가능한 부형제를 나타낸다. 단백질 의약품의 화학적 및 물리적 분해 경로는 문헌 [Cleland 등(1993), Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 10(4):307-77, Wang(1999) Int J Pharm 185(2):129-88, Wang(2000) Int J Pharm 203(1-2):1-60 and Chi 등(2003) Pharm Res 20(9):1325-36]에 의해 검토된다. 안정화제는 당, 아미노산, 폴리올, 사이클로덱스트린, 예를 들어 하이드록시프로필- β -사이클로덱스트린, 설포부틸에틸- β -사이클로덱스트린, β -사이클로덱스트린, 폴리에틸렌글라이콜, 예를 들어 PEG 3000, PEG 3350, PEG 4000, PEG 6000, 알부민, 인간 혈청 알부민(HSA), 소 혈청 알부민(BSA), 염, 예를 들어 염화나트륨, 마그네슘 클로라이드, 염화칼슘, 킬레이터, 예를 들어 이후에 정의된 EDTA를 비제한적으로 포함한다. 특히 본 발명에 사용된 안정화제는 당, 폴리올 및 아미노산으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 더 상세하게는, 안정화제는 수크로스, 트레할로스, 소르비톨 및 메티오닌으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0170] 더 바람직하게는, 안정화제는 메티오닌이다. 메티오닌은 안구 적용에 사용하기 위해 처음으로 본원에 기재된 제형에 사용되었다. 전임상 안전성 시험은, 메티오닌이 예를 들어 유리체내로 투여될 때 안구 질환에 사용하기 위한 양호한 안전성 프로파일을 보여줌을 나타내었다.

[0171] 안정화제는 약 2 mM 내지 약 600 mM의 농도, 특히, 안정화제가 메티오닌이면, 약 2mM 내지 약 15mM 또는 5 내지 12mM의 농도; 더 상세하게는 약 5 내지 9 mM 또는 약 7mM의 농도로 제형에 존재할 수 있다.

[0172] 하나의 바람직한 구현예에서, 안정화제는 7.0 mM ± 2.0 mM의 메티오닌(일 구현예에서 7.0 mM ± 1.0 mM의 메티오닌이고; 일 구현예에서 7.0 mM ± 0.7 mM의 메티오닌). 안정화제로서의 메티오닌은 주사 용액 또는 포장된 사전충전된 주사의 멸균에 사용되는 과산화수소용 스캐빈저 제제로서 추가로 기능할 수 있기 때문에 특히 유용하다.

[0173] 일부 구현예에서, 본 발명의 액체 약제학적 제형은 제2 안정화제로서 항산화제를 포함한다. "항산화제"는 약제학적으로 허용가능한 부형제이고, 이는 활성 약제학적 성분의 산화를 방지한다. 항산화제는 킬레이트제 예컨대 EDTA, 시트르산, 아스코르브산, 부틸화된 하이드록시톨루엔(BHT), 부틸화된 하이드록시 아니솔(BHA), 아황산나트륨, p-아미노 벤조산, 글루타티온, 프로필 갈레이트, 시스테인, 메티오닌, 에탄올, 벤질 알코올 및 n-아세틸 시스테인을 비제한적으로 포함한다. 항산화제는 약 0.01 내지 약 100 mM의 농도, 특히 약 5 내지 약 50 mM의 농도 및 더 상세하게는 약 5 내지 약 25 mM의 농도로 사용될 수 있다. 특히, 메티오닌은 제2 안정화제로서, 특히 약 5 내지 약 25 mM의 농도, 더 상세하게는 약 10 mM의 농도로 선택된다.

[0174] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "당"은 모노사카라이드 또는 올리고당을 나타낸다. 모노사카라이드는 단당 및 그것의 유도체, 예를 들어 아미노당을 포함하여 산에 의해 가수분해되지 않는 단량체성 탄수화물이다. 모노사카라이드의 예는 글루코스, 푸룩토스, 갈락토스, 만노스, 소르보스, 리보오스, 데옥시리보스, 뉴라민산을 포함한

다. 올리고당은 분지 또는 사슬에 글리코시드 결합(들)을 통해 연결된 하나 초과와 단량체성 사카라이드 단위로 이루어진 탄수화물이다. 올리고당 내의 단량체성 사카라이드 단위는 동일하거나 상이할 수 있다. 단량체성 사카라이드 단위의 수에 따라, 올리고당은 디-, 트리-, 테트라- 펜타- 등 사카라이드이다. 폴리사카라이드와는 대조적으로, 모노사카라이드 및 올리고당은 수용성이다. 올리고당의 예는 수크로스, 트레할로스, 락토스, 말토스 및 라피노오스를 포함한다. 특히, 당은 수크로스 및 트레할로스, 특히 수크로스로부터 선택된다.

[0175] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "아미노산"은 일반적으로 카복실기에 대한 α-위치에 위치한 아미노 모이어티를 보유하는 약제학적으로 허용가능한 유기 분자를 나타낸다. 아미노산의 예는 아르기닌, 글리신, 오르니틴, 라이신, 히스티딘, 글루탐산, 아스파라긴산, 이소류신, 류신, 알라닌, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 메티오닌, 세린, 프롤린, 특히 메티오닌을 포함한다.

[0176] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "폴리올"은 하나 초과와 하이드록시기를 갖는 약제학적으로 허용가능한 알코올을 나타낸다. 적합한 폴리올은 만니톨, 소르비톨, 글리세린, 텍스트란, 글리세롤, 아라비톨, 프로필렌 글라이콜, 폴리에틸렌 글라이콜, 및 이들의 조합을 비제한적으로 포함한다. 폴리올은 약 10 mM 내지 약 500 mM의 농도, 특히 약 10 내지 약 250 mM의 농도 및 더 상세하게는 약 200 내지 약 250 mM의 농도로 사용될 수 있다.

[0177] 용어 "안정화제"는 또한 동결건조보호제를 포함한다. 용어 "동결건조보호제"는 약제학적 허용가능한 부형제를 나타내고, 이는 동결건조 공정, 후속 보관 및 재구성 동안 불안정한 조건에 대해 불안정한 활성 성분(예를 들어, 단백질)을 보호한다. 동결건조보호제는 당, 폴리올(예컨대 예를 들어 당 알코올) 및 아미노산으로 이루어진 균을 비제한적으로 포함한다. 특히, 동결건조보호제는 당 예컨대 수크로스, 트레할로스, 락토스, 글루코스, 만노스, 말토스, 갈락토스, 푸룩토스, 소르보스, 라피노오스, 뉴라민산, 아미노 당 예컨대 글루코사민, 갈락토사민, N-메틸글루코사민("메글루민"), 폴리올 예컨대 만니톨 및 소르비톨, 및 아미노산 예컨대 메티오닌 또는 글리신으로 이루어진 균으로부터 선택될 수 있다. 동결건조보호제는 일반적으로 약 10 내지 약 600 mM의 농도, 특히 약 10 내지 약 250 mM의 농도 및 더 상세하게는 약 100 내지 약 250 mM의 농도로 사용된다.

[0178] **등장화제**

[0179] 약제학적 제형은 또한 등장화제를 함유할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "등장화제"는 제형의 등장성을 조절하기 위해 사용되는 약제학적으로 허용가능한 등장화제를 나타낸다. 제형은 저삼투압, 등장성 또는 고장성일 수 있다. 등장성은 일반적으로 용액에 대한 일반적으로 인간 혈청의 것에 대한 삼투압과 관련된다. 본 발명에 따른 제형은 저삼투압, 등장성 또는 고장성일 수 있고, 바람직하게는 약제학적 제형은 등장성이다. 등장성 제형은 액체이거나 또는 고체 형태로부터, 예를 들어 동결건조 형태로부터 재구성된 액체이고 생리적 염 용액 및 혈청과 같이 비교되는 일부 다른 용액과 유사한 등장성을 갖는 용액을 나타낸다. 적합한 등장화제는 염화나트륨, 염화칼륨, 글리세린 및 아미노산, 당, 특히 수크로스의 균으로부터의 임의의 성분을 비제한적으로 포함한다. 본 발명의 일 구현예에서, 바람직한 등장화제는 수크로스이다. 등장화제는 일반적으로 약 5mM 내지 약 1000mM, 특히 약 30 mM 내지 약 500 mM; 더욱 특히 약 120 mM 내지 약 200 mM의 농도로 사용된다. 본 발명의 등장성 제형을 위한 등장화제는 일반적으로 약 50 mM 내지 약 250 mM, 특히 약 120 mM 내지 약 200mM의 농도로 사용된다. 더 상세하게는, 등장성 제형을 위한 등장화제는 수크로스가 등장화제로서 사용되는 경우 130 mM의 내지 190 mM, 및 훨씬 더 특히 약 160 mM ± 24 mM의 농도로 사용된다. 등장화제 및 그의 농도는 300 ± 100 mOsm/kg의 표적 삼투질농도를 갖는(특히 300 ± 50 mOsm/kg의 표적 삼투질농도를 갖는) 등장성 제형을 가능하게 하도록 선택된다.

[0180] 안정화제 및 등장화제 내에는 두 가지 방식으로 기능할 수 있는 화합물 군이 있고, 즉 동시에 안정화제 및 등장화제일 수 있다. 그것의 예는 당, 아미노산, 폴리올, 사이클로덱스트린, 폴리에틸렌글라이콜 및 염의 그룹에서 찾을 수 있다. 동시에 안정화제 및 등장화제일 수 있는 당의 예는 수크로스 및 트레할로스, 특히 수크로스이다.

[0181] **점도 감소제**

[0182] 약제학적 제형은 또한 점도 감소제를 함유할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "점도 감소제"는 제형의 점도를 감소시키기 위해 사용되는 약제학적으로 허용가능한 이온 강도 개질제를 나타내며, 이는 고농도 제형 및 안구 질환의 치료에서 얇은 바늘을 통해 눈에 유리체내로 투여되는 것으로 예상되는 제형(주사를 위한 고압의 필요 없이 비교적 빠른 적용을 가능하게 함)에 중요하다. 전형적인 점도 감소제의 예는 예를 들어 염화칼슘 또는 염화나트륨이다.

[0183] **아쥬반트**

- [0184] 약제학적 제형은 또한 아주반트 예컨대 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제를 함유할 수 있다. 미생물의 존재의 방지는 멸균 절차에 의해, 및 다양한 항균 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 등의 포함에 의해 보장될 수 있다. 보존제는 일반적으로 약 0.001 내지 약 2 % (w/v)의 농도로 사용된다. 보존제는 에탄올, 벤질 알코올, 페놀, m-크레졸, p-클로르-m-크레졸, 메틸 또는 프로필 파라벤, 벤즈알코늄 클로라이드를 비제한적으로 포함한다.
- [0185] 약제학적 제형은 또한 예를 들어 20 mPas 이하(바람직하게는 15mPas 이하)의 점도, 30 FTU 이하(바람직하게는 25 FTU 이하)의 탁도, 300±50 mOsm/kg의 삼투질농도로써 본 발명의 약제학적 제형의 기술적 특징을 본질적으로 변화시키지 않는 더 적은 양으로 상이한 상기에 언급된 제제 예컨대 완충액, 계면활성제, 안정화제, 이온 강도 개질제의 양을 함유할 수 있고, 눈에 보이는 입자가 본질적으로 없다.
- [0186] **용도**
- [0187] 본 발명에 따른 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체의 약제학적 제형은 안구 혈관 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다. 이러한 목적을 위해, 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체의 약제학적 제형은 20 mPas 이하(바람직하게는 15mPas 이하)의 점도, 30 FTU 이하(바람직하게는 25 FTU 이하)의 탁도, 300±50 mOsm/kg의 삼투질농도를 갖는 액체 등장성 제형으로서 유리체내 투여를 위해 제공되고, 눈에 보이는 입자가 본질적으로 없다. 이러한 목적을 위한 액체 등장성 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체의 약제학적 제형은 유리 바이알에 또는 사전충전된 주사기의 형태, 특히 사전충전된 유리 주사기의 형태로 제공될 수 있다.
- [0188] 눈 부형제, 예를 들어 아르기닌에 유리체내로 투여되는 이러한 제형의 경우, 망막 및 망막 색소 상피에 대한 조직 플라스미노겐 활성화제(t-PA)에 대한 담체로서의 아르기닌의 독성이 기술되어 있기 때문에, 아르기닌은 피해야 한다(예를 들어 문헌[Benner J D, Morse LS, Toth CA 등 Arch Ophthalmool 19911091731-1736.1736; Johnson MW, Olsen KR, Hernandez E. 등, Arch Ophthalmool 1990108259-263.263, Irvine W D, Johnson MW, Heinandez E. 등, Arch Ophthalmool 1991109718-722.722, Johnson MW, Olsen KR, Heinandez E., Retina 199111250-258.258]을 참조한다). 따라서, 본 발명의 액체 약제학적 제형은 아르기닌이 본질적으로 없거나(이는 제형이 아르기닌을 포함하지 않거나, 이들이 독성일 수 있거나(조직 플라스미노겐 활성화제(t-PA)에 대한 담체로서의 이들의 기능을 통해) 아르기닌을 함유하지 않는 농도/수준 미만의 양의 아르기닌을 포함한다는 것을 의미한다). 낮은 점도는 또한 상업적 규모의 생산 공정(한외 여과에 의한 상향 농축)을 가능하게 하고, 20 N 미만, 특히 50 mm/분의 주사 속도로 15 N 미만의 용이하고 편리한 유리체내 주사(주사(글라이딩)력)를 보장하기 위해 필수적이다. 15 mPas 미만의 점도를 갖는 본 발명의 액체 약제학적 제형이 5 N 미만의 주사력으로 5s 주사 시간으로 30G 주사 바늘을 통해 주사될 수 있음이 입증되었다. 이러한 목적을 위해, 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체의 약제학적 제형은 15 mPas 이하의 점도, 25 FTU 이하의 탁도, 300±50 mOsm/kg의 삼투질농도를 갖는, 눈에 보이는 입자가 본질적으로 없는 액체 등장성 제형이다. 임의의 눈에 보이는 입자를 피하기 위해, 본 발명의 액체 약제학적 제형은 염화칼슘이 본질적으로 없거나(이는 제형이 염화칼슘을 포함하지 않거나 또는 이들이 눈에 보이는 입자의 형성에 기여할 수 있는 농도/수준 미만의 양의 염화칼슘을 포함하여, 제형이 눈에 보이는 입자를 유지하거나/본질적으로 없음을 의미함) 또는 염화칼슘을 포함하지 않는다.
- [0189] 용어들 "안구 혈관 질환" 및 "혈관 안구 질환"은 본원에서 교환가능하게 사용되고 안구내 신생혈관 증후군 예컨대 당뇨병성 망막병증, 당뇨병성 황반 부종, 미숙아 망막증, 신생혈관 녹내장, 망막 정맥 폐쇄, 망막 중심 정맥 폐쇄, 황반 변성, 연령 관련 황반 변성, 색소성 망막염, 망막 혈관종 증식, 황반 모세혈관확장증, 허혈성 망막증, 홍채 신생혈관형성, 안구내 신생혈관형성, 각막 신생혈관형성, 망막 신생혈관형성, 맥락막 신생혈관형성, 및 망막 퇴행을 비제한적으로 포함한다 (Garner, A., Vascular diseases, In: Pathobiology of ocular disease, A dynamic approach, Garner, A., 및 Klintworth, G.K.,(eds.), 2nd edition, Marcel Dekker, New York(1994), pp. 1625-1710). 본원에서 사용된 바와 같이, 안구 혈관 장애는 안구 조직 예컨대 망막 또는 각막의 구조로 새로운 혈관의 변경된 또는 조절되지 않은 증식 및 침입을 특징으로 하는 임의의 병리 상태를 지칭한다. 일 구현예에서, 안구 혈관 질환은 습성 연령 관련 황반 변성(습성 AMD)(또한 소위 신생혈관 연령 관련 황반 변성(nAMD)), 당뇨병성 황반 부종(DME), 당뇨병성 망막증(DR), 비-증식성 당뇨병성 망막병증(NPDR), 증식성 당뇨병성 망막병증(PDR), 포낭 황반 부종(CME), 혈관염(예를 들어, 망막 중심 정맥 폐쇄), 망막 정맥 폐쇄(RVO), 망막 중심 정맥 폐쇄(CRVO), 유두부종, 망막염, 결막염, 포도막염, 맥락막염, 다초점 맥락막염, 안구 히스토플라마증, 눈꺼풀염, 안구 건조(쇼그렌병) 및 다른 안과용 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 안구 질환 또는 장애는 안구 신생혈관형성, 혈관 누출, 및/또는 망막 부종, 특히 습성 연령 관련 황반 변성(습성 AMD)(또한 소위 신생혈관 연령 관련 황반 변성(nAMD)), 당뇨병성 황반 부종(DME), 당뇨병성 망막증(DR), 비-증식성 당뇨병성 망막병증(NPDR), 증식성 당뇨병성 망막병증(PDR), 포낭 황반 부종(CME), 혈관염(예를 들어, 망막 중심

정맥 폐쇄), 망막 정맥 폐쇄(RVO), 망막 중심 정맥 폐쇄(CRVO)와 관련된다. 따라서, 본원에서 기재된 용도 및 방법을 위한 항-VEGF/ANG2 이중특이적 항체는 습성 AMD(또한 소위 신생혈관 연령 관련 황반 변성(nAMD)), DME, DR, NPDR, PDR, 또한 바람직하게는 습성 AMD, DME, 및 RVO, 또한 바람직하게는 습성 AMD 습성 AMD의 예방 및 치료에 유용하다. 일부 구현예에서, 안구 혈관 질환은 습성 연령 관련 황반 변성(습성 AMD), 당뇨병성 황반 부종(DME), 망막 정맥 폐쇄(RVO), 당뇨병성 망막병증(DR) 및 미숙아 망막증(ROP)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0190] 각막 신생혈관형성과 관련된 다른 질환은, 비제한적으로, 유행병 각결막염, 비타민 A 결핍, 콘택트 렌즈 과도착용, 아토피성 각막염, 상윤부 각막염, 건성 익상편 각막염, 쇼그렌, 장미 여드름, 플릭텐성 각결막염, 매독, 마이코박테리아 감염, 지질 퇴행, 화학적 화상, 박테리아 궤양, 진균 궤양, 단순 포진 감염, 대상포진 감염, 원생동물 감염, 카포시 육종, 무륜 궤양, 테리언(Terrien) 변연 변성, 변연 각질용해, 류마티스성 관절염, 전신 낭창, 다발동맥염, 트라우마, 베게너 유육종증, 공막염, 스티븐 존슨(Steven's Johnson)병, 유천포창 방사상 각막 절개, 및 각막 이식 거부를 포함한다.

[0191] 망막/맥락막 신생혈관형성과 관련된 다른 질환은, 비제한적으로, 당뇨병성 망막병증, 황반 변성, 검상 적혈구 빈혈, 유육종증, 매독, 탄력섬유 가황색증, 파젯(Paget)병, 정맥 폐쇄, 동맥 폐색, 경동맥 폐쇄성 질환, 만성 포도막염/유리체염, 마이코박테리아 감염, 라임(Lyme)병, 전신 홍반성 낭창, 미숙아 망막증, 색소성 망막염, 망막 부종(황반 부종 포함), 이글스 질환, 베체트(Bechet)병, 감염 야기하는 망막염 또는 맥락막염, 추정된 안구 히스토플라즈마증, 베스트(Best)병, 근시, 시신경 유도소와, 스트가트(Stargart)병, 평면 부염, 만성 망막 박리, 과다점성 증후군, 톡소플라스마증, 트라우마 및 레이저후 합병증을 포함한다. 다른 질환은, 비제한적으로, 조홍(각의 신생혈관형성)과 관련된 질환 및 모든 형태의 증식성 유리체망막병증을 포함하는 섬유막관 또는 섬유 조직의 비정상 증식에 의해 야기된 질환을 포함한다.

[0192] 미숙아 망막증(ROP)은 미숙아에 영향을 미치는 눈의 질환이다. 이는 흉터 형성 및 망막 박리를 초래할 수 있는 망막 혈관의 해체된 성장에 의해 야기되는 것으로 생각된다. ROP는 온화한 것일 수 있고 자발적으로 분해될 수 있지만, 심각한 경우에는 실명을 초래할 수 있다. 이와 같이, 모든 조기 유아는 ROP의 위험이 있고, 매우 낮은 출생 체중은 추가의 위험 인자이다. 산소 독성 및 상대적 저산소증 둘 모두는 ROP의 발달에 기여할 수 있다.

[0193] 황반 변성은 망막의 황반 영역으로 알려진 눈의 내부 내층의 중심이 얇아짐, 위축, 및 일부 경우에 출혈을 겪는 노인에서 주로 발견되는 의학적 상태이다. 이는 중심 시력의 손실을 초래할 수 있으며, 이는 미세한 상체를 보거나, 얼굴을 읽거나 인식할 수 없는 것을 수반한다. 미국 안과학의 아메리칸 아카데미(American Academy of Ophthalmology)에 따르면, 이는 50세 이상의 사람들에게 대해 오늘날 미국에서 중심 시력 손실(실명)의 주요 원인이다. 어린 개체에 영향을 미치는 일부 황반 이영양증은 때때로 황반 변성으로 지칭되지만, 상기 용어는 일반적으로 연령-관련 황반 변성(AMD 또는 ARMD)을 지칭한다.

[0194] 본원에 사용된 바와 같은 "연령-관련 황반 변성(AMD)"은 황반으로 알려진 망막의 작은 중앙 부분이 악화될 때 심각한 눈 병태를 지칭한다. AMD의 습성 형태(습성 AMD(wAMD), 소위 신생혈관 AMD)), 진전된 AMD 형태는 황반 아래의 맥락막으로부터 비정상적인 혈관의 성장을 특징으로 한다. 이를 맥락막 혈관신생이라 한다. 이들 혈관은 혈액 및 유체를 망막으로 누출시켜, 직선을 물결 모양으로 보이게 하는 시력의 왜곡뿐만 아니라 사각 지대 및 중심 시력의 손실을 야기한다. 이러한 비정상적인 혈관은 결국 흉터를 일으켜, 중심 시력의 영구적인 손실을 초래한다. AMD의 증상은 시력 중심의 어두운, 흐릿한 영역; 및 감소되거나 변경된 색 지각을 포함한다. AMD는 일상적인 눈 검사에서 검출될 수 있다. 황반 변성의 가장 흔한 조기 징후 중 하나는 망막 아래의 결정강(drusen) 작은 황색 침착물 또는 색소 문침의 존재이다.

[0195] 색소성 망막염(RP)은 유전적 눈 병태의 그룹이다. RP에 대한 증상의 진행에서, 야맹증은 일반적으로 수년 또는 심지어 수십년까지 터널 시력에 선행한다. RP를 가진 많은 사람들은 그들의 40대 또는 50대까지 법적으로 시력을 잃지 않고 평생 어떤 시력을 유지한다. 다른 사람들은 소아기에 일부 경우에 RP에서 완전히 눈을 멀게 한다. RP의 진행은 각각의 경우에 상이하다. RP는 선천성 망막 이상증의 한 유형이며, 망막의 광수용체(간상체 및 추상체) 또는 망막 색소 상피(RPE)의 비정상이 진행성 시각 손실을 초래하는 선천적 장애의 군이다. 감염된 개인은 먼저 결함있는 암 적응 또는 야맹증(밤소경)을 경험하고, 이어서 말초 시야의 감소(터널 시력으로 공지됨) 및 때로는 질환의 과정에서 늦게 중심 시력의 손실을 경험한다.

[0196] 황반 부종은 유체 및 단백질 침착물이 망막의 황색 중심 영역인 눈의 황반 상에 또는 그 아래에 수집될 때 발생하여, 이를 증점시키고 팽윤시킨다. 황반이 안구의 후방에서 망막의 중심 근처에 있기 때문에, 팽윤은 사람의 중심 시력을 왜곡시킬 수 있다. 이 영역은 사람이 직접 시선에 있는 형태, 색상 및 상체를 볼 수 있도록 날카롭

고 선명한 중심 시력을 제공하는 단단히 패키징 된 원주를 유지한다. 낭종 황반 부종은 낭종 형성을 포함하는 황반 부종의 유형이다.

[0197] 본원에 사용된 바와 같은 "당뇨병성 황반 부종"(DME)은 당뇨병(1형 또는 2형)을 앓는 사람에게 영향을 미치는 심각한 눈 병태를 지칭한다. 황반 부종은 망막 내의 혈관이 황반으로 누출되고, 유체 및 단백질 침착물이 눈의 황반(망막의 황색 중심 영역) 상에 또는 그 아래에 수집되어 이를 증점 및 팽윤(부종)시킬 때 발생한다. 황반이 안구 뒤쪽에서 망막의 중심 근처에 있기 때문에, 팽윤은 사람의 중심 시력을 왜곡시킬 수 있다. DME의 1차 증상은 흐릿한 시력, 부유물, 콘트라스트의 손실, 이중 시력 및 최종적인 시력의 손실을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. DME의 병리학은 혈액-망막 장벽의 파괴를 특징으로 하고, 보통 망막에서의 물 이동을 방지하며, 따라서 유체가 망막 조직에 축적되게 하고, 망막 비후가 존재한다. DME는 표준화된 차트 상에서 사람이 판독할 수 있는 가장 작은 문자를 결정하는 시력 검사, 질환의 징후를 점검하기 위한 팽창된 눈 검사, 광 간섭 단층 촬영(OCT) 또는 플루오레세인 혈관조영술(FA)과 같은 이미징 검사 및 안압측정, 눈 내부의 압력을 측정하는 기구로 구성되는 눈 검사 동안 현재 진단된다. 치료를 결정하기 위해 하기 연구가 또한 수행된다: 광 간섭 단층촬영(OCT), 플루오레세인 혈관조영술, 및 컬러 스테레오 안저 사진술. DME는 2개의 주요 카테고리 - 초점 및 확산 -로 광범위하게 특징지어질 수 있다. 초점 DME는 충분한 황반 혈류를 갖는 황반에서 분리되고 뚜렷한 누출의 특정 영역을 특징으로 한다. 확산 DME는 눈의 내부 혈액-망막 장벽의 파괴로 인한 황반을 둘러싸는 전체 모세혈관 베드(bed)의 누출로 인한 것이다. 초점 및 확산에 더하여, DME는 또한 임상 시험 발견에 기초하여 임상적으로 유의한 황반 부종(CSME), 비-CSME 및 중심 관여를 갖는 CSME(CSME-CI)로 분류되며, 이는 중심외를 수반한다. 본 발명은 전술한 DME의 카테고리를 처리하는 방법을 포함한다.

[0198] 본 발명의 일 구현예에서, 안구 혈관 질환은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: 습성 연령 관련 황반 변성(습성 AMD), 당뇨병성 황반 부종(DME), 당뇨병성 망막병증(DR), 비-증식성 당뇨병성 망막병증(NPDR), 증식성 당뇨병성 망막병증(PDR), 혈관염(예를 들어, 망막 정맥 폐쇄(RVO) 및 망막 중심 정맥 폐쇄(CRVO)).

[0199] 일 구현예에서, 안구 혈관 질환은 당뇨병성 망막병증(DR), 당뇨병성 황반 부종(DME), 망막 정맥 폐쇄(RVO), 망막 중심 정맥 폐쇄(CRVO), 황반 변성, 습성 연령 관련 황반 변성(습성 AMD), 미숙아 망막증(ROP), 신생혈관 녹내장, 색소성 망막염(RP), 망막 혈관종 증식, 황반 모세혈관확장증, 허혈성 망막증, 홍채 신생혈관형성, 안구내 신생혈관형성, 각막 신생혈관형성, 망막 신생혈관형성, 맥락막 신생혈관형성, 및 망막 퇴행으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 특히 당뇨병성 망막병증(DR), 당뇨병성 황반 부종(DME), 망막 정맥 폐쇄(RVO), 망막 중심 정맥 폐쇄(CRVO), 습성 연령 관련 황반 변성(습성 AMD)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0200] 본 발명의 일 구현예에서, 안구 혈관 질환은 당뇨병성 망막병증(DR)이다.

[0201] 본 발명의 일 구현예에서, 안구 혈관 질환은 당뇨병성 황반 부종(DME)이다.

[0202] 본 발명의 일 구현예에서, 안구 혈관 질환은 망막 정맥 폐쇄(RVO)이다.

[0203] 본 발명의 일 구현예에서, 안구 혈관 질환은 망막 중심 정맥 폐쇄(CRVO)이다.

[0204] 본 발명의 일 구현예에서, 안구 혈관 질환은 미숙아 망막증(ROP)이다.

[0205] 본 발명의 일 구현예에서, 안구 혈관 질환은 황반 변성이다.

[0206] 본 발명의 일 구현예에서, 안구 혈관 질환은 연령 관련 황반 변성(AMD)이다.

[0207] 본 발명의 일 구현예에서, 안구 혈관 질환은 습성 연령 관련 황반 변성(wAMD)이다.

[0208] 본 발명의 일 구현예에서, 안구 혈관 질환은 맥락막 신생혈관형성이다.

[0209] **투여**

[0210] 본 발명에 따른 액체 약제학적 제형은 유리체내(IVT) 수단, 예컨대 약제학적 기술에 알려진 것(예를 들어 적절한 주사기)에 의해 투여될 수 있다. 유리체내 주사를 위해 전형적으로 주사 용량은 50 내지 100 μ L이다. 유리체내 주사는 일회용 주사기 및 30G(25G 내지 30G)의 주사 바늘 또는 적절한 주사 바늘을 구비한 미리 충전된 주사기의 사용에 의해 수행된다. 액체 제형은 5 μ m의 기공 크기를 갖는 필터 바늘의 사용에 의해 제형을 함유하는 마이알로부터 꺼낼 수 있다. 유리체내 주사 기술은 예를 들어 문헌[D.Yorston, Community Eye Health. 2014; 27(87): 47]에 기재되어 있다.

[0211] 이러한 목적을 위해, 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체의 약제학적 제형은 15mPas 이하의 점도, 25 FTU 이하의 탁

도, 300 ± 50 mOsm/kg의 삼투질농도를 갖는 액체 등장성 제형이고, 이는 눈에 보이는 입자가 본질적으로 없다.

- [0212] 생체내 투여에 사용될 제형은 멸균이어야 한다. 이는 멸균 여과 멤브레인 및 무균성 제조 실시를 통한 여과에 의해 쉽게 달성된다.
- [0213] **제형의 제조 공정**
- [0214] 본 발명에 따른 약제학적 제형은 당업계에서 알려진 방법 또는 공정, 예를 들어 한외여과-정용여과, 투석, 첨가 및 혼합, 동결건조, 재구성, 및 이들의 조합에 의해 제조될 수 있다. 본 발명에 따른 제형 제조의 예는 이후 본원에서 찾을 수 있다.
- [0215] 본 발명의 일 구현예에서, 약제학적 제형은 하기의 단계들을 포함하는 제조 방법 또는 공정에 의해 제조될 수 있다:
- [0216] 1. 5 내지 80 kD(30 내지 50 kD)(30kD)의 MWCO(분자량 컷-오프)를 갖는 반투과성 멤브레인을 사용하는 한외여과 및 정용여과에 의해 히스티딘-아세테이트 완충액; 히스티딘-아세테이트 완충액 및 염화나트륨; 히스티딘-아세테이트 완충액, 염화나트륨 및 메티오닌; 또는 히스티딘-아세테이트 완충액, 염화나트륨, 메티오닌 및 수크로스를 함유하는 정용여과 완충액에 대한 완충액 교환. 전형적으로, 정용여과 완충액과 벌크 용액 사이의 비는 5 내지 20(5 내지 10)이다.
- [0217] 2. 1에 대안적으로, 완충액-교환은 히스티딘-아세테이트 완충액; 히스티딘-아세테이트 완충액 및 염화나트륨; 히스티딘-아세테이트 완충액, 염화나트륨 및 메티오닌; 또는 히스티딘-아세테이트 완충액, 염화나트륨, 메티오닌 및 수크로스를 함유하는 투석 완충액을 사용하는 투석 및 5 내지 80 kD(30 내지 50 kD)(30kD)의 MWCO를 갖는 투석 멤브레인에 의해 달성될 수 있다. 전형적으로, 투석 완충액과 벌크 용액 사이의 비는 5 내지 20(5 내지 10)이다.
- [0218] 3. 완충액 교환된 벌크 용액은 5 내지 80 kD(30 내지 50 kD)(30kD)의 MWCO(분자량 컷-오프)를 갖는 정용여과 멤브레인을 사용하는 한외여과에 의해 120 mg/mL 초과(120 내지 160 mg/mL)(120 내지 200 mg/mL)의 단백질 농도로 농축된다.
- [0219] 4. 약제학적 제형의 최종 조성물은 각 부형제의 스톱 용액의 첨가에 의해 또는 적절한 컨디셔닝 완충액에 의해 조정된다. 용액은 혼합에 의해 균질화된다.
- [0220] 또한, 제조 방법 또는 공정은 하기 단계들을 포함할 수 있다.
- [0221] 5. 최종 제형화된 용액은 -20°C 미만(-40°C 미만)의 온도에서 냉동 보관될 수 있다.
- [0222] 6. 최종 1차 용기를 채우기 전에 용액은 해동된다.
- [0223] 7. 약제학적 제형의 몇 개의 용기 또는 배치는 혼합되고 교반으로 균질화된다.
- [0224] 8. 균질화된 약제학적 제형은 적어도 0.2 또는 $0.22 \mu\text{m}$ 의 기공 크기를 갖는 몇 개(적어도 2개)의 멸균 등급 필터를 통해 여과한다.
- [0225] 9. 멸균-여과된 용액은 무균성 조건 하에 멸균 바이알 또는 사전충전가능 주사기에 채워지고 탄성중합체 스톱퍼, 각각 플런저 스톱퍼 및 팁 캡(tip cap)로 폐쇄된다.
- [0226] 10. 채워진 1차 용기는 결합 및 눈에 보이는 입자에 대해 검사된다.
- [0227] 11. 미리 충전된 주사기는 각각의 장치 구성요소와 조립되고, 멸균 장벽 시스템으로 포장되고, 외부 표면에서 멸균된다.
- [0228] 12. 바이알 및 멸균 주사기는 최종 2차 포장에서 포장된다.
- [0229] 본 발명에 따른 약제학적 제형은 또한 동결건조 형태 또는 동결건조 형태로부터 재구성된 액체 형태일 수 있다. "동결건조 형태"는 당해 분야에서 알려진 냉동-건조 방법에 의해 제조된다. 리오피리제이트는 일반적으로 약 0.1 내지 5%(w/w)의 잔류 수분 함량을 가지며 분말 또는 물리적으로 안정한 케이크로서 존재한다. "재구성된 형태"는 재구성 매체의 첨가 후 빠른 용해에 의해 리오피리제이트로부터 수득될 수 있다. 적합한 재구성 매체는 주사용 물(WFI), 정균 주사용 물(BWFI), 염화나트륨 용액(예를 들어, 0.9%(w/v)의 NaCl), 및 글루코스 용액(예를 들어, 5%(w/v)의 글루코스)를 비제한적으로 포함한다.
- [0230] **항체의 생산**

- [0231] 본 발명에 특히 유용한 항-VEGF/ANG2 항체는 제조할 수단에 의해 생산된다. 제조할 생산 방법은 당업계에 널리 공지되어 있고, 원핵 및 진핵 세포에서의 단백질 발현과, 이어서 항체의 단리 및 통상적으로 약제학적으로 허용 가능한 순도로의 정제를 포함한다. 숙주 세포에서 상기 언급된 바와 같은 항체의 발현을 위해, 각각의 변형된 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 핵산은 표준 방법에 의해 발현 벡터에 삽입된다. 발현은 적절한 원핵 또는 진핵 숙주 세포 예컨대 CHO 세포, NSO 세포, SP2/0 세포, HEK293 세포, COS 세포, PER.C6 세포, 효모, 또는 E.콜리 세포에서 수행되고, 및 항체는 세포(용해 후 상청액 또는 세포)에서 회수된다. 항체의 제조할 생산을 위한 일반적인 방법은 당업계에 잘 알려져 있고, 예를 들어, 문헌[Makrides, S.C., Protein Expr. Purif. 17(1999) 183-202; Geisse, S., 등, Protein Expr. Purif. 8(1996) 271-282; Kaufman, R.J., Mol. Biotechnol 16(2000) 151-160; Werner, R.G., Drug Res. 48(1998) 870-880]의 검토 논문에 기재되어 있다. 본 발명에 유용한 항체의 제조 방법은 a) 상기 항체를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터로 숙주 세포를 형질전환시키는 단계; b) 상기 항체 분자의 합성을 허용하는 조건 하에 상기 숙주 세포를 배양하는 단계; 및 c) 상기 배양물로부터 상기 항체 분자를 회수하는 단계를 포함한다.
- [0232] 항체는 적합하게는 종래의 면역글로불린 정제 절차 예컨대, 예를 들어, 단백질 A-세파로스, 하이드록실인회석 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 또는 친화성 크로마토그래피에 의해 배양 배지로부터 분리된다. 단클론성 항체를 인코딩하는 DNA 및 RNA는 쉽게 단리되고 종래의 절차를 사용하여 서열분석된다. 하이브리도마 세포는 그와 같은 DNA 및 RNA의 공급원으로 쓰일 수 있다. 일단 단리되면, DNA는 발현 벡터 내로 삽입될 수 있고, 이어서 숙주 세포, 예컨대 달리 면역글로불린 단백질을 생성하지 않는 HEK 293 세포, CHO 세포, 또는 골수종 세포 내로 형질감염되어, 숙주 세포에서 제조할 단클론성 항체의 합성을 수득한다.
- [0233] 이중특이적 항체의 아미노산 서열 변이체(또는 돌연변이체)는 항체 DNA에 적절한 뉴클레오티드 변화를 도입함으로써, 또는 뉴클레오티드 합성에 의해 제조된다. 그러나, 이러한 변형은 매우 제한된 범위에서만 수행될 수 있다. 예를 들어, 변형은 상기 언급된 항체 특성, 예컨대 IgG 이소타입 및 항원 결합을 변경시키지 않지만, 제조할 생성의 수율, 단백질 안정성을 개선시키거나 정제를 용이하게 할 수 있다.
- [0234] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "숙주 세포"는 본 발명의 제형에 포함된 항체를 생성하기 위해 조작될 수 있는 세포 시스템의 임의의 종류를 나타낸다. 일 구현예에서 HEK293 세포 및 CHO 세포는 숙주 세포로서 사용된다.
- [0235] 본원에서 사용된 바와 같이, 표현 "세포", "세포주" 및 "세포 배양물"은 상호교환적으로 사용되고, 모든 이러한 지정은 자손을 포함한다. 따라서, 용어 "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"는 전환 횟수에 관계없이 1차 대상 세포 및 이로부터 유래된 배양물을 포함한다. 또한, 모든 자손은 고의적이거나 의도하지 않은 돌연변이로 인해 DNA 함량이 정확하게 동일하지 않을 수 있는 것으로 이해된다. 원래 형질전환된 세포에서 스크리닝된 것과 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 변이체 자손이 포함된다.
- [0236] NSO 세포에서의 발현은, 예를 들어, 문헌[Barnes, L.M., 등, Cytotechnology 32(2000) 109-123; Barnes, L.M., 등, Biotech. Bioeng. 73(2001) 261-270]에 기재되어 있다. 일시적 발현은 예를 들어, 문헌[Durocher, Y., 등, Nucl. Acids. Res. 30(2002) E9]에 기재되어 있다. 가변 도메인의 클로닝은 문헌[Orlandi, R., 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86(1989) 3833-3837; Carter, P., 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89(1992) 4285-4289; 및 Norderhaug, L., 등, J. Immunol. Methods 204(1997) 77-87]에 기재되어 있다. 바람직한 일시적 발현 시스템(HEK 293)은 문헌[Schlaeger, E.-J., 및 Christensen, K., in Cytotechnology 30(1999) 71-83 및 Schlaeger, E.-J., in J. Immunol. Methods 194(1996) 191-199]에 기재된다.
- [0237] 예를 들어, 원핵생물에 적합한 조절 서열은, 프로모터, 선택적으로 작동자 서열, 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵 세포는 프로모터, 증진제 및 폴리아데닐화 신호를 이용하는 것으로 알려져 있다.
- [0238] 핵산은 또 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 "작동가능하게 연결된" 것이다. 예를 들어, 전-서열 또는 분비 리더에 대한 DNA는 폴리펩티드의 분비에 관여하는 전-단백질로서 발현되는 경우 폴리펩티드에 대한 RNA에 작동가능하게 연결되고; 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 미치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되며; 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 위치되는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결된 DNA 서열이 연속적이고, 분비 리더의 경우 인접하고 해독틀임을 의미한다. 그러나, 증진제는 인접할 필요는 없다. 연결은 편리한 제한 부위에서 결합에 의해 달성된다. 그와 같은 부위가 존재하지 않으면, 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터 또는 링커는 종래의 실시예에 따라 사용된다.
- [0239] 항체의 정제는 알칼리성/SDS 처리, CsCl 결합, 칼럼 크로마토그래피, 아가로스 겔 전기영동, 및 당해 분야에서

잘 알려진 기타를 포함하는 표준 기술에 의해 세포 성분 또는 다른 오염물질, 예를 들어 다른 세포 핵산 또는 단백질을 제거하기 위해 수행된다. 문헌[Ausubel, F., et al, ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York(1987)]을 참조한다. 상이한 방법은 잘 확립되어 있고 단백질 정제, 예컨대 미생물 단백질을 사용하는 친화성 크로마토그래피(예를 들어, 단백질 A 또는 단백질 G 친화성 크로마토그래피), 이온 교환 크로마토그래피(예를 들어, 양이온 교환(카복시메틸 수지), 음이온 교환(아미노에틸 수지) 및 혼합식 교환), 티오친황성 흡착(예를 들어, 베타-머캅토에탄올 및 다른 SH 리간드 사용), 소수성 상호작용 또는 방향족 흡착 크로마토그래피(예를 들어, 페닐-세파로스, 아자-아레노필릭 수지, 또는 m-아미노페닐붕산 사용), 금속 킬레이트 친화성 크로마토그래피(예를 들어, Ni(II)- 및 Cu(II)-친화성 물질 사용), 크기 배제 크로마토그래피, 및 전기영동 방법(예컨대 겔 전기영동, 모세관 전기영동)를 위해 널리 사용된다 (Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75(1998) 93-102).

[0240] 본원에 개시된 아미노산 서열:

서열번호: 설명

1	<VEGF>의 중쇄 가변 도메인 CDR3
2	<VEGF>의 중쇄 가변 도메인 CDR2
3	<VEGF>의 중쇄 가변 도메인 CDR1
4	<VEGF>의 경쇄 가변 도메인 CDR3
5	<VEGF>의 경쇄 가변 도메인 CDR2
6	<VEGF>의 경쇄 가변 도메인 CDR1
7	<ANG-2>의 중쇄 가변 도메인 CDR3
8	<ANG-2>의 중쇄 가변 도메인 CDR2
9	<ANG-2>의 중쇄 가변 도메인 CDR1
10	<ANG-2>의 경쇄 가변 도메인 CDR3
11	<ANG-2>의 경쇄 가변 도메인 CDR2
12	<ANG-2>의 경쇄 가변 도메인 CDR1
13	<VEGF>의 중쇄 가변 도메인 (VH)
14	<VEGF>의 경쇄 가변 도메인 (VL)
15	<ANG-2>의 중쇄 가변 도메인 (VH)
16	<ANG-2>의 경쇄 가변 도메인 (VL)
17	이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체: CrossMab VEGFang2-0016 -<VEGF> 경쇄
18	이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체: CrossMab VEGFang2-0016 -<ANG2> 경쇄
19	이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체: CrossMab VEGFang2-0016 -<VEGF> 중쇄
20	이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체: CrossMab VEGFang2-0016 -<ANG2> 중쇄
21	예시적인 카파 불변 경쇄 영역
22	예시적인 람다 불변 경쇄 영역
23	예시적인 인간 IgG1 서브클래스의 불변 중쇄 영역
24	리더 및 His-태그를 갖는 인간 안지오프이에틴-2(ANG-2)
25	인간 혈관 내피성 성장 인자(VEGF)

[0241]

하기에 본 발명의 구현예가 열거된다:

[0242]

1. 액체 약제학적 제형으로서,

[0243]

- 인간 IgG1 서브클래스의 불변 중쇄 영역을 포함하는 20 내지 150 mg/mL(일 구현예에서 30 mg/mL ± 4.5 mg/mL 또는 120 mg/mL ± 18 mg/mL)의 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체,

[0244]

- 15 내지 35 mM의 염화나트륨(일 구현예에서 25 mM ± 5 mM; 일 구현예에서 25 mM ± 3.75 mM의 염화나트륨; 특히, 25 mM ± 2.5 mM의 염화나트륨),

[0245]

- 15 내지 25 mM의 히스티딘 아세테이트 완충액(일 구현예에서 20 mM ± 3mM의 히스티딘 아세테이트 완충액; 일 구현예에서 20 mM ± 2mM의 히스티딘 아세테이트 완충액)을,

[0246]

5.5 ± 0.5의 pH에서(일 구현예에서 5.5 ± 0.3의 pH에서; 특히, 5.5 ± 0.2의 pH에서) 포함하되;

[0247]

상기 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체는 2가이고, 인간 VEGF에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위를 포함하고, 인간 ANG-2에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함하며,

[0248]

- [0249] i) VEGF에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 부위는 중쇄 가변 도메인에서 서열번호 1의 CDR3H 영역, 서열번호 2의 CDR2H 영역, 및 서열번호 3의 CDR1H 영역을 포함하고, 경쇄 가변 도메인에서 서열번호 4의 CDR3L 영역, 서열번호 5의 CDR2L 영역, 및 서열번호 6의 CDR1L 영역을 포함하고;
- [0250] ii) ANG-2에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 부위는 중쇄 가변 도메인에서 서열번호 9의 CDR3H 영역, 서열번호 10의 CDR2H 영역, 및 서열번호 11의 CDR1H 영역을 포함하고, 경쇄 가변 도메인에서 서열번호 12의 CDR3L 영역, 서열번호 13의 CDR2L 영역, 및 서열번호 14의 CDR1L 영역을 포함하고,
- [0251] iii) 이중특이적 항체는 돌연변이 I253A, H310A, 및 H435A 및 돌연변이 L234A, L235A 및 P329G를 포함하는 인간 IgG1 서브클래스의 불변 중쇄 영역(넘버링은 카바트의 EU 인덱스에 따른 것임)을 포함한다.
- [0252] 2. 구현예 1에 따른 약제학적 제형으로서, 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체는 2가이고, 인간 VEGF에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위를 포함하고, 인간 ANG-2에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함하며,
- [0253] i) VEGF에 특이적으로 결합하는 상기 제1 항원 결합 부위는 중쇄 가변 도메인 VH로서 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 도메인 VL로서 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하고,
- [0254] ii) ANG-2에 특이적으로 결합하는 상기 제2 항원 결합 부위는 중쇄 가변 도메인 VH로서 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄 가변 도메인 VL로서 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0255] 3. 구현예 2에 따른 약제학적 제형으로서, 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체는 2가이고, 인간 VEGF에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 부위를 포함하고, 인간 ANG-2에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 부위를 포함하며,
- [0256] iv) 상기 불변 중쇄 영역에서 S354C 및 T366W 돌연변이는 하나의 CH3 도메인에 포함되고, Y349C, T366S, L368A 및 Y407V 돌연변이는 다른 CH3 도메인(넘버링은 카바트의 EU 인덱스에 따른 것임)을 포함한다.
- [0257] 4. 구현예 1 내지 3 중 어느 하나에 따른 약제학적 제형으로서, 상기 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체는 2가이고, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 및 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0258] 5. 구현예 1 내지 3 중 어느 하나에 따른 약제학적 제형으로서, 상기 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체는 파리시맙이다.
- [0259] 6. 구현예 1에 따른 약제학적 제형으로서, 상기 제형은,
- [0260] - 120 mg/mL \pm 18 mg/mL의 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체(특히 120 mg/mL \pm 12 mg/mL의 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체)를 포함한다.
- [0261] 7. 제1항 내지 제7 중 어느 하나에 따른 약제학적 제형으로서, 유리체내 투여를 위한 것이다.
- [0262] 8. 구현예 1 내지 6 중 어느 하나에 따른 약제학적 제형으로서, 상기 제형은 눈에 보이는 입자가 본질적으로 없다.
- [0263] 9. 구현예 1 내지 8 중 어느 하나에 따른 약제학적 제형으로서, 상기 제형은 하기를 추가로 포함한다:
- [0264] - 1 내지 20mM의 적어도 하나의 안정화제(일 구현예에서 이는 당, 폴리올 및 아미노산으로부터 선택됨).
- [0265] 10. 구현예 1 내지 8 중 어느 하나에 따른 약제학적 제형으로서, 상기 제형은 하기를 추가로 포함한다:
- [0266] - 7.0 mM \pm 2.0 mM의 메티오닌(일 구현예에서 7.0 mM \pm 1.0 mM의 메티오닌; 일 구현예에서 7.0 mM \pm 0.7 mM의 메티오닌).
- [0267] 11. 구현예 1 내지 10 중 어느 하나에 따른 약제학적 제형으로서, 상기 제형은 하기를 추가로 포함한다:
- [0268] - 0.01-0.07%의 계면활성제(일 구현예에서 이는 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 80, 또는 폴록사머로부터 선택됨).
- [0269] 12. 구현예 1 내지 10 중 어느 하나에 따른 약제학적 제형으로서, 상기 제형은 하기를 추가로 포함한다:
- [0270] - 0.04%(w/v) \pm 0.02%(w/v)(일 구현예에서 0.03%(w/v) 내지 0.07%(w/v)); 일 구현예에서 0.04%(w/v) \pm 0.01%(w/v); 일 구현예에서 약 0.04%(w/v)의 폴리소르베이트 20.
- [0271] 13. 구현예 1 내지 12 중 어느 하나에 따른 약제학적 제형으로서, 상기 제형은 하기를 추가로 포함한다:
- [0272] - 50-250 mM의 등장화제(일 구현예에서 이 등장화제는 수크로스, 트레할로스, 및 소르비톨로부터 선택됨).

- [0273] 14. 구현예 1 내지 12 중 어느 하나에 따른 약제학적 제형으로서, 상기 제형은 하기를 추가로 포함한다:
- [0274] - 160 mM \pm 24 mM(일 구현예에서 160 mM \pm 16 mM; 일 구현예에서 약 160 mM)의 수크로스.
- [0275] 15. 구현예 1 내지 14 중 어느 하나에 따른 약제학적 제형으로서, 상기 제형은 20 mPas 이하(일 구현예에서 17 mPas 이하; 일 구현예에서 16 mPas 이하, 일 구현예에서 약 15 mPas 이하; 일 구현예에서 15 mPas 이하)의 점도를 갖는다.
- [0276] 16. 구현예 1 내지 15 중 어느 하나에 따른 약제학적 제형으로서, 상기 제형은 30 FTU 이하(일 구현예에서 27 FTU 이하; 일 구현예에서 26 FTU 이하; 일 구현예에서 약 25 FTU 이하; 일 구현예에서 25 FTU 이하)의 탁도를 갖는다.
- [0277] 17. 구현예 1 내지 16 중 어느 하나에 따른 약제학적 제형으로서, 상기 제형은 20 내지 50의 이온 강도(일 구현예에서 30 내지 50의 이온 강도(일 구현예에서 30 내지 45의 이온 강도; 일 구현예에서 30 \pm 10의 이온 강도)를 갖는다.
- [0278] 18. 유리체 투여를 위한 구현예 1 내지 17 중 어느 하나에 따른 약제학적 제형으로서, 상기 제형은 염화칼슘이 본질적으로 없다(또는 염화칼슘을 포함하지 않는다).
- [0279] 19. 유리체 투여를 위한 구현예 1 내지 17 중 어느 하나에 따른 약제학적 제형으로서, 상기 제형은 아르기닌이 본질적으로 없다(또는 아르기닌을 포함하지 않는다).
- [0280] 20. 유리체 투여를 위한 구현예 1 내지 17 중 어느 하나에 따른 약제학적 제형으로서, 상기 제형은 아르기닌 및 염화칼슘이 본질적으로 없다(또는 아르기닌 및 염화칼슘을 포함하지 않는다).
- [0281] 21. 구현예 1 내지 5 및 7 내지 20 중 어느 하나에 따른 약제학적 제형으로서, 상기 제형은(적어도) 다음의 성분을 포함하거나, 그것으로 이루어진다:
- [0282] - 20 내지 150 mg/mL(일 구현예에서 30 mg/mL \pm 4.5 mg/mL 또는 120 mg/mL \pm 18 mg/mL, 특히 120 mg/mL \pm 12 mg/mL)의 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체;
- [0283] - 15 내지 35 mM의 염화나트륨(일 구현예에서 25 mM \pm 5 mM; 일 구현예에서 25 mM \pm 3.75 mM의 염화나트륨; 특히, 25 mM \pm 2.5 mM의 염화나트륨);
- [0284] - 15 내지 25 mM의 히스티딘 아세테이트 완충액(일 구현예에서 20 mM \pm 3mM의 히스티딘 아세테이트 완충액; 일 구현예에서 20 mM \pm 2mM의 히스티딘 아세테이트 완충액);
- [0285] - 7.0 mM \pm 2.0 mM의 메티오닌(일 구현예에서 7.0 mM \pm 1.0 mM의 메티오닌; 일 구현예에서 7.0 mM \pm 0.7 mM의 메티오닌)
- [0286] - 0.03%(w/v)의 내지 0.07%(w/v)(일 구현예에서 0.04%(w/v) \pm 0.02(w/v); 일 구현예에서 0.04%(w/v) \pm 0.01(w/v); 일 구현예에서 약 0.04%(w/v))의 폴리소르베이트 20;
- [0287] - 160 mM \pm 24 mM(일 구현예에서 160 mM \pm 16 mM; 일 구현예에서 약 160 mM)의 수크로스;
- [0288] -((안과적) 주사를 위한) 물;
- [0289] 5.5 \pm 0.5의 pH에서(일 구현예에서 5.5 \pm 0.3의 pH에서; 특히, 5.5 \pm 0.2의 pH에서);
- [0290] 22. 구현예 1 내지 21 중 어느 하나에 따른 약제학적 제형으로서, 제형은 안정한 제형이다.
- [0291] 23. 구현예 1 내지 21 중 어느 하나에 따른 약제학적 제형으로서, 상기 약제학적 제형 중의 이중특이적 항체의 고분자량 중(HMW) 함량은 25°C에서 8주 후 또는 25°C에서 52주 후 10% 미만이다(일 구현예에서 5% 미만이다).
- [0292] 24. 구현예 1 내지 21 중 어느 하나에 따른 약제학적 제형으로서, 상기 약제학적 제형 중의 이중특이적 항체의 주요 피크는 50% 초과이고, 약제학적 제형 중의 이중특이적 항체의 고분자량 중(HMW) 함량은 2 내지 8°C에서 2년 후(또는 2 내지 8°C에서 3년 후) 10% 미만이다(약제학적 제형 중의 이중특이적 항체의 주요 피크는 55% 초과이고, 약제학적 제형 중의 이중특이적 항체의 고분자량 중(HMW) 함량은 2 내지 8°C에서 2년 후(또는 2 내지 8°C에서 3년 후) 7% 미만이다).
- [0293] 25. 구현예 1 내지 24 중 어느 하나에 따른 약제학적 제형으로서, 상기 제형의 삼투질농도는 300 \pm 100 mOsm/kg (일 구현예에서 300 \pm 50 mOsm/kg)이다.

- [0294] 26. 구현예 1 내지 25 중 어느 하나에 따른 약제학적 제형으로서, 안구 혈관 질환의 치료에 사용하기 위한 것이다.
- [0295] 27. 구현예 26에 따라 사용하기 위한 약제학적 제형으로서, 상기 안구 혈관 질환은 당뇨병성 망막병증(DR), 당뇨병성 황반 부종(DME), 망막 정맥 폐쇄(RVO), 망막 중심 정맥 폐쇄(CRVO), 황반 변성, 습성 연령 관련 황반 변성(습성 AMD), 미숙아 망막증(ROP), 신생혈관 녹내장, 색소성 망막염(RP), 망막 혈관종 증식, 황반 모세혈관 확장증, 허혈성 망막증, 홍채 신생혈관형성, 안구내 신생혈관형성, 각막 신생혈관형성, 망막 신생혈관형성, 맥락막 신생혈관형성, 및 망막 퇴행으로 이루어진 군으로부터, 특히 당뇨병성 망막병증(DR), 당뇨병성 황반 부종(DME), 망막 정맥 폐쇄(RVO), 망막 중심 정맥 폐쇄(CRVO), 습성 연령 관련 황반 변성(습성 AMD)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0296] 28. 구현예 26에 따라 사용하기 위한 약제학적 제형으로서, 상기 안구 혈관 질환은 당뇨병성 망막병증이다.
- [0297] 29. 구현예 26에 따라 사용하기 위한 약제학적 제형으로서, 상기 안구 혈관 질환은 당뇨병성 황반 부종(DME)이다.
- [0298] 30. 구현예 26에 따라 사용하기 위한 약제학적 제형으로서, 상기 안구 혈관 질환은 망막 정맥 폐쇄(RVO)이다.
- [0299] 31. 구현예 26에 따라 사용하기 위한 약제학적 제형으로서, 상기 망막 정맥 폐쇄는 망막 중심 정맥 폐쇄(CRVO)이다.
- [0300] 32. 구현예 26에 따라 사용하기 위한 약제학적 제형으로서, 상기 안구 혈관 질환은 황반 변성이다.
- [0301] 33. 구현예 26에 따라 사용하기 위한 약제학적 제형으로서, 상기 황반 변성은 연령 관련 황반 변성(AMD)이다.
- [0302] 34. 구현예 26에 따라 사용하기 위한 약제학적 제형으로서, 상기 황반 변성은 습성 연령 관련 황반 변성(wAMD) (또한 소위 신생혈관 연령 관련 황반 변성(nAMD)이다.
- [0303] 35. 구현예 26에 따라 사용하기 위한 약제학적 제형으로서, 상기 안구 혈관 질환은 맥락막 신생혈관형성이다.
- [0304] 36. 구현예 1 내지 25 중 어느 하나의 약제학적 제형의 제조 공정으로서,
 [0305] 상기 방법은 하기의 단계들을 포함하는, 약제학적 제형의 제조 공정:
 [0306] -a) 한외여과 및 정용여과에 의한 정용여과 완충액에 대한 또는 b) 투석 완충액을 사용하는 투석에 의한 이중특이적 항체 벌크 용액의 완충액 교환으로서, 상기 완충액은 히스티딘-아세테이트 완충액; 히스티딘-아세테이트 완충액 및 염화나트륨; 히스티딘-아세테이트 완충액, 염화나트륨 및 메티오닌; 또는 히스티딘-아세테이트 완충액, 염화나트륨, 메티오닌 및 수크로스를 함유하는
 [0307] - 한외여과에 의한 완충액 교환된 벌크 용액의 농축
 [0308] - 각 부형제의 스톱 용액의 첨가에 의한 또는 적절한 컨디셔닝 완충액에 의한 약제학적 제형의 최종 조성물의 조정 및 혼합에 의해 균질화되는 액체 약제학적 제형의 균질화.
- [0309] 37. 구현예 1 내지 25 중 어느 하나의 약제학적 제형을 포함하는 마이알.
- [0310] 38. 구현예 1 내지 25 중 어느 하나의 약제학적 제형을 포함하는 사전충진된 주사기.
- [0311] 39. 구현예 1 내지 25 중 어느 하나의 액체 약제학적 제형의 동결건조 형태.
- [0312] **실시예**
- [0313] 본 발명에 따른 유리체내(IVT) 투여를 위한 액체 의약품 약제학적 제형은 아래와 같이 개발되었다.
- [0314] **실시예 1: 물질 및 방법**
- [0315] W02014/009465에 기재된 바와 같이 제조되고 정제된 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체 CrossMAb VEGFang2-0016(파리시맵)이 pH 5.5에서 20 mM의 히스티딘-HCl 완충액 내에 대략 130 내지 140 mg/mL의 농도에서 초기에 추가 실험을 위해 제공되었다.

[0316] 제형의 제조 및 그것의 1차 포장 동안 사용된 물질(공급자 포함)의 요약은 표 1 및 표 2에 주어진다.

표 1: 제형에 사용된 화학물질

화학물질	공급자
L-히스티딘 유리 염기	Ajinomoto
L-히스티딘-HCl 일수화물	Ajinomoto
나트륨-아세테이트 - 3 수화물	Merck
빙초산	Wacker Chemie
염화나트륨	Merck
염화칼슘 이수화물(CaCl ₂)	Applichem
수크로스	FPS
메티오닌	Ajinomoto
폴리소르베이트 20	Croda
폴록사머	BASF

[0317]

표 2: 1차 포장

지정	공급자
6 ml 바이알, 무색, 20 mm	Schott
테플론화 혈청-스토퍼 D777-1, 20 mm	Daikyo
PP-캡을 갖는 알루미늄 캡, 20 mm	Helvoet (Datwyler)
2 ml 바이알, 무색, 13 mm	Schott
테플론화 혈청-스토퍼 D777-1, 13 mm	Daikyo
PP-캡을 갖는 알루미늄 캡, 13 mm	Helvoet (Datwyler)
1.0 mL 사전충전가능 주입기(PFS)	Gerresheimer Buende
1.0 mL PFS 플런저 스톱퍼	West
0.5 mL 사전충전가능 주입기(PFS)	Nuova Ompi
0.5 mL PFS 플런저 스톱퍼	West

[0318]

[0319] 용기 폐쇄 시스템

[0320] 무색 2-mL 또는 6-mL 유리 바이알(1형 유리)을 고무 마개(D 777-1, 13mm)와 플립-오프 캡이 있는 알루미늄 오버 밀봉부의 수단으로 폐쇄했다.

[0321] 루어콘을 갖는 무색 1.0-mL 사전충전가능 주입기(1형 유리)를 Gerresheimer Buende TELC 팁 캡 및 West 4023/50 플런저 스톱퍼의 수단으로 폐쇄했다.

[0322] 루어콘을 갖는 무색 0.5-mL 사전충전가능 주입기(1형 유리)를 Vetter OVS 팁 캡 및 웨스트 4023/50 플런저 스톱퍼의 수단으로 폐쇄했다. Vetter OVS 팁 캡은 웨스트 4023/50 탄성중합체로 구성된다.

[0323] 크기 배제 크로마토그래피(SE-HPLC)

[0324] 크기 배제 크로마토그래피(SEC)는 제형에서 가용성 고분자량 중(응집체) 및 저분자량 가수분해 생성물(LMW)을 검출하기 위해 사용되었다. 방법은 TSK-겔 G3000SWXL, 7.8 x 300 mm, 5 μm(Tosoh Bioscience, 카탈로그 번호 08541) 또는 BioSuite 250, 7.8 x 300 mm, 또는 5 μm(Waters, 카탈로그 번호 186002165)로 수행하였다. 온전한 단량체, 응집체 및 단편은 이동상으로 0.2 M 인산칼륨, 0.25 M KCl, pH 7.0을 사용하여 등용매 용리 프로파일에 의해 분리하였고, 280 nm의 파장에서 검출하였다.

[0325] 이온 교환 크로마토그래피(IE-HPLC)

[0326] 이온 교환 크로마토그래피(IEC)는 제형에서 테스트 항체의 순전하를 변경하는 화학적 분해 생성물을 검출하기 위해 수행하였다. 방법은 YMC BioPro SP-F, 100 x 4.6 mm, 5 μm 칼럼(YMC, 카탈로그 번호 SF00S05-1046WP)으로 수행하였다. 20 mM의 BES(N,N-비스[2-하이드록시에틸]-2-아미노에탄설폰산), pH 6.8은 용리물 A로, 그리고 20 mM의 BES, 488 mM의 NaCl, pH 6.8은 용리물 B로서, 각각 0.8 mL/min의 유량으로 사용하였다. 샘플은 칼럼 상으로 주입하기 전에 용리액 A를 3 mg/mL로 희석했다.

[0327] 구매 프로그램:

시간(분)	% 이동상 A	% 이동상 B
0	98	2
5	98	2
35	85	15
35.1	0	100
40	0	100
40.1	98	2
50	98	2

[0328]

[0329] **탁도(FTU(=포마진 탁도 단위))**

[0330] 제형 샘플의 탁도는 Ph. Eur. 2.2.1(액체의 명료성 및 유백색 정도)에 따라 Hach 2100 AN 탁도계에서 측정하였다. 대략 2 mL 샘플 용액의 샘플 부피는 11 mm의 내부 직경 유리 큐벳 및 m 안으로 이전되었다. 유리 큐벳은 탁도계 안으로 배치하였고 탁도는 참조 현탁액 1 FTU, 3 FTU, 10 FTU, 20 FTU 및 100 FTU의 보정 곡선에 대해 측정하였다.

[0331] **점도(mPa)**

[0332] 제형 샘플의 점도는 1000 s⁻¹의 전단율 및 20°C의 온도에서 25 mm - 0.5° 콘을 갖는 Anton Paar Physica MCR 301 회전식 유량계에서 측정하였다.

[0333] **눈에 보이는 입자**

[0334] 바이알 샘플은 2 x 확대 렌즈의 도움으로 Seidenader 검사 기계 V90-T에서 가시적으로 검사하였다. 조명 광원 L1, L2 및 L3은 셋팅 5로 조정하였다. 바이알 샘플은 입자의 존재에 대해 회전식 운동 동안 검사하였다.

[0335] **단백질 농도(mg/mL)**

[0336] 제형 샘플의 단백질 농도는 Perkin Elmer로부터의 UV/Vis 광도계 램다 35 상에서 자외선(UV) 광 흡수에 의해 측정하였다. 제형 샘플은 20 mM의 L-히스티딘-아세테이트 완충 용액 pH 5.5로 대략 0.5 mg/mL의 단백질 농도로 희석하고 1 cm의 두께를 갖는 측정 큐벳 안으로 채웠다. 측정 큐벳의 UV 흡수는 280 및 320 nm에서의 파장에서 측정하였다.

[0337] 단백질 농도는 다음의 방정식에 따른 실제 희석에 상응하는 280(A280) 및 320 nm(A320)에서 측정된 UV 광 흡수, 1.70 mL/(mg x cm)의 소광 계수(E), 1 cm의 두께(d) 및 희석 인자(DF)로부터 계산하였다:

[0338]
$$\text{단백질 농도 (mg/mL)} = \frac{(A280 - A320)}{(E \times d)} \times DF$$

[0339] **삼투질농도**

[0340] 제형 샘플의 삼투질농도는 빙점 강하의 원리에 따라 Gonotec으로부터의 Osmomat 030 3P 삼투압계에서 측정하였다.

[0341] **pH**

[0342] 제형 샘플의 pH는 유리 전극을 갖는 전위측정법에 의해 결정하였다.

[0343] **실시예 2: pH/ 완충액 스크린 I**

[0344] **셋업**

[0345] pH/완충액 스크린의 범위는 항-VEGF/ANG2 항체의 상업적 제형에 대한 최적의 pH 및 완충액을 선택하고 가용성 응집물 및 충전된 변형체의 낮은 형성을 초래하는 저점도, 감소된 탁도 및 양호한 안정성 행동을 갖는 제형을 선택하기 위한 것이다.

[0346] pH/완충액 스크린의 제1 파트는 3개의 완충체인 L-히스티딘/ L-히스티딘-HCl(His/His-HCl), L-히스티딘-아세테이트(His/아세테이트) 및 아세트산나트륨(Na/아세테이트)을 포함했고, pH는 5.3 내지 6.5 범위이고, 완충액 강도는 7 내지 300 mM 범위이고 이온 강도는 5 내지 86 범위이다. 활성 제형의 셋업은 표 3에 나타낸다.

표 3: 제형 코드: pH/완충액 스크린 파트 I

제형 코드	완충제	pH	완충액 농도(mM)	이온 강도	단백질 (mg/mL)	충진 부피(mL)	투여 형태
F1	His/His-HCl	5.3	7	5	120	2.7	6mL 바이알
F2		5.9	75	45.5	120	2.7	6mL 바이알
F3		6.5	300	86	120	2.7	6mL 바이알
F4	His/아세트레이트	5.3	102	86	120	2.7	6mL 바이알
F5		5.9	10	5	120	2.7	6mL 바이알
F6		6.5	180	45.5	120	2.7	6mL 바이알
F7	Na/아세트레이트	5.3	58	45.5	120	2.7	6mL 바이알
F8		5.9	91	86	120	2.7	6mL 바이알
F9		6.2	6	5	120	2.7	6mL 바이알
F10	His/His-HCl	5.3	100	86	120	2.7	6mL 바이알
F11		5.9	10	5	120	2.7	6mL 바이알
F12		6.5	165	45.5	120	2.7	6mL 바이알
F13	His/아세트레이트	5.3	53	45.5	120	2.7	6mL 바이알
F14		5.9	150	86	120	2.7	6mL 바이알
F15		6.5	20	5	120	2.7	6mL 바이알
F16	Na/아세트레이트	5.3	7	5	120	2.7	6mL 바이알
F17		5.9	49	45.5	120	2.7	6mL 바이알
F18		6.2	89	86	120	2.7	6mL 바이알
F19	His/His-HCl	5.9	75	45.5	120	2.7	6mL 바이알
F20		5.9	75	45.5	120	2.7	6mL 바이알

[0347]

[0348] **물질 및 방법**

[0349] 제형의 제조 및 그것의 1차 포장 동안에 사용된 물질의 요약은 표 1 및 표 2에 주어진다.

[0350] 원료 의약품은 표 3에 열거된 바와 같은 완충제에 대해 10kD 분자량 컷-오프를 갖는 Slide-A-Lyzer G2(Thermo Scientific)를 사용한 투석에 의해 완충액 교환하였다. 이에 의해, 42 mL의 원료 의약품이 투석 디바이스에 채워졌고 3회 5 L의 투석 완충액에 대해 완충액을 교환하였다.

[0351] 선택적으로, 투석 후 단백질 농도가 120 mg/mL 이하이면, 원료 의약품을 Amicon Ultra 15, Ultracel 10K(Millipore) 디바이스(20°C, 4000 rpm)를 사용하여 원심분리에 의해 농축하였다.

[0352] 나중에, 투석된 및 선택적으로 농축된 원료 의약품을 각각의 투석 완충액으로 120 mg/mL의 표적 단백질 농도로 희석하여, 최종 의약품 용액을 수득하였다.

[0353] 각각의 의약품 용액을 0.22 μm의 Sterivex GV(Millipore) 필터를 통해 여과하고 2.7 mL의 충전 부피를 갖는, 깨끗하고 멸균된 6 mL 바이알에 채웠다. 바이알을 마개를 하고 크림핑하였다.

[0354] **분석 방법**

[0355] 분석 테스트 방법 탁도 및 점도는 실시예 1에 기재되어 있다.

[0356] **결과**

[0357] 도 1은 pH/완충액 스크린 I로부터 제형의 탁도 및 점도 결과를 비교한다.

[0358] 일반적으로, 높은 이온 강도(예를 들어, 4, 14, 10, 3, 8 및 18)를 갖는 제형은 높은 탁도(30 FTU 초과) 및 저점도(대략 10 mPas)를 나타낸다. 대신에, 낮은 이온 강도를 갖는 제형은 고점도(대략 25 내지 40 mPas) 및 저탁도(10 FTU 아래)를 가진다. 놀랍게도, 완충제 히스티딘-아세트레이트(13, 6, 4, 14)를 갖는 제형은 대략 10 mPas의 저점도 및 25 FTU 미만의 탁도로 확인될 수 있었다.

[0359] **결론**

[0360] pH/완충액 스크린 I로부터의 제형을 점도 및 탁도에 대해 측정하였다. 놀랍게도, 45.5 또는 더 높은 이온 강도를 갖는 히스티딘-아세테이트 완충계의 제형은 저점도 및 감소된 탁도 값을 나타냈다.

[0361] **실시예 3: pH/ 완충액 스크린 II**

[0362] **설정**

[0363] pH/완충액 스크린의 범위는 항-VEGF/ANG2 항체 CrossMab VEGFang2-0016(파리시삽) 항-VEGF/ANG2 항체의 제형에 대한 최적의 pH 및 완충액을 선택하고 가용성 응집물 및 충전된 변형체의 낮은 형성을 초래하는 저점도, 감소된 탁도 및 양호한 안정성 행동을 갖는 제형을 선택하기 위한 것이다.

[0364] pH/완충액 스크린의 제2 파트는 pH/완충액 스크린 I의 결과에 기반하고 완충계 L-히스티딘-아세테이트(His/아세테이트)를 포함하여 설계하였고, pH는 5.5 내지 6.0 범위로 완충액 강도는 14 내지 59 mM 사이 범위이다. 제형의 이온 강도는 완충액 강도를 증가시키거나 염화나트륨(NaCl) 또는 염화칼슘(Ca Cl₂)의 첨가에 의해 변형되어 10 내지 50 사이의 이온 강도 범위를 생성한다. 활성 제형의 셋업은 표 4에 나타낸다.

표 4: 제형 코드: pH/완충액 스크린 파트 II

제형 코드 (= 샘플 번호)	완충계	완충액 농도(mM)	pH	염	염 농도(mM)	이온 강도	단백 질(mg /mL)	충전 부피(mL)	투여 형태
GRM0069-01 = 01	His- 아세테이트	14	5.5	-	-	10	120	2.7	6-mL 바이알
GRM0069-02 = 02	His- 아세테이트	39	5.5	-	-	30	120	2.7	6-mL 바이알
GRM0069-03 = 03	His- 아세테이트	14	5.5	NaCl	20	30	120	2.7	6-mL 바이알
GRM0069-04 = 04	His- 아세테이트	14	5.5	CaCl ₂	6.7	30	120	2.7	6-mL 바이알
GRM0069-05 = 05	His- 아세테이트	14	5.5	NaCl	40	50	120	2.7	6-mL 바이알
GRM0069-06 = 06	His- 아세테이트	14	5.5	CaCl ₂	13.3	50	120	2.7	6-mL 바이알
GRM0069-07 = 07	His- 아세테이트	20	6.0	-	-	10	120	2.7	6-mL 바이알
GRM0069-08 = 08	His- 아세테이트	59	6.0	-	-	30	120	2.7	6-mL 바이알
GRM0069-09 = 09	His- 아세테이트	20	6.0	NaCl	20	30	120	2.7	6-mL 바이알
GRM0069-10 = 10	His- 아세테이트	20	6.0	CaCl ₂	6.7	30	120	2.7	6-mL 바이알
GRM0069-11 = 11	His- 아세테이트	20	6.0	NaCl	40	50	120	2.7	6-mL 바이알
GRM0069-12 = 12	His- 아세테이트	20	6.0	CaCl ₂	13.3	50	120	2.7	6-mL 바이알

[0365] **물질 및 방법**

[0366] 제형의 제조 및 그것의 1차 포장 동안에 사용된 물질의 요약은 표 1 및 표 2에 주어진다.

[0367] 원료 의약품은 표 4에 열거된 완충계에 대해 30kD 분자량 컷-오프 반-투과성 멤브레인을 갖는 LabScale TTF(Millipore)을 사용하는 한외여과-정용여과에 의해 완충액을 교환하였다. 이에 의해, 120 mL의 원료 의약품을 LabScale 시스템에 채우고 1050 mL의 정용여과 완충액에 대해 완충액을 교환하였다.

[0368] 완충액 교환 후, 원료 의약품을 LabScale 시스템에서 대략 150 mg/mL의 단백질 농도로 농축하였다.

[0369] 나중에, 농축된 원료 의약품을 각각의 완충액과 염 용액의 스톱 용액으로 120 mg/mL하여의 표적 단백질 농도로

회석하여, 표 4에 따른 최종 의약품 용액을 얻었다.

- [0371] 각각의 의약품 용액을 0.22 μm 의 Sterivex GV(Millipore) 필터를 통해 여과하고 2.7 mL의 충전 부피를 갖는, 깨끗하고 멸균된 6 mL 바이알에 채웠다. 바이알을 마개를 하고 크립핑하였다.
- [0372] **분석 방법**
- [0373] 분석 테스트 방법 탁도, 점도 및 SE-HPLC는 실시예 I에 기재되어 있다.
- [0374] **안정성 프로그램**
- [0375] 제형은 2 내지 8°C 및 8 주 동안 25에서 안정하게 유지했다. 안정성 연구의 개시 및 8 주의 저장 후 샘플을 취하고 분석했다.
- [0376] **결과**
- [0377] 도 2는 pH/완충액 스크린의 제2 파트의 탁도 및 점도 결과를 비교한다. 일반적으로, 탁도는 증가하는 이온 강도 및 pH 5.5에 비교하여 pH 6.0에서 증가한다. 더욱이, 염화나트륨의 존재는 또한 더 높은 탁도를 초래한다. pH 5.5는 또한 pH 6에 비교하여 점도를 감소시킨다. 또한, 적어도 30의 이온 강도는 대략 15 mPas의 수준으로 점도를 감소시키는데 도움이 된다. 점도에 대해 상이한 염의 효과를 비교할 때, 염화칼슘 또는 더 높은 완충액 강도는 염화나트륨보다 점도를 감소시키는데 더 효율적이다.
- [0378] 탁도 및 점도를 감소시키는 양 목표를 고려할 때, 적어도 30의 이온 강도 및 pH 5.5를 갖는 제형은 대략 20 FTU의 감소된 탁도 수준 및 점도 약 15 mPas를 나타낸다.
- [0379] 도 3은 5°C 및 25°C에서 8주 후 수준과 개시시(= 0) pH/완충액 스크린 II 제형의 응집물 수준(HMWS)을 비교한다. 일반적으로, HMW 수준은 이온 강도가 증가함에 따라 증가한다. 상이한 염의 효과를 비교하면, 높은 완충액 강도 또는 염화나트륨의 존재는 염화나트륨의 존재보다 응집물의 더 낮은 증가를 초래한다. 5.5의 더 낮은 pH는 응집물 형성을 감소시키는데 작은 영향을 미친다.
- [0380] **결론**
- [0381] pH 5.5 및 30의 이온 강도를 갖는 제형은 감소된 탁도, 저점도 및 감소된 응집물 형성에 최적을 제공한다. 이온 강도는 더 높은 완충액 강도, 또는 염화나트륨 및 염화칼슘 염의 첨가로 조정될 수 있다. 일반적으로, 더 높은 완충액 강도 또는 염화칼슘의 존재는 바람직한 탁도 및 점도 행동을 나타낸다.
- [0382] **실시예 4: 계면활성제 스크린**
- [0383] **설정**
- [0384] 계면활성제 스크린의 범위는 항-VEGF/ANG2 항체 CrossMAb VEGFang2-0016(파리시맵)의 제형에 대한 최적의 계면활성제 유형 및 계면활성제 농도를 선택하기 위한 것이다.
- [0385] 120 mg/mL의 Vegf/Ang-2 항체, pH 5.5에서 20 mM의 L-히스티딘-아세테이트 완충액, 25 mM의 염화나트륨 및 180 mM의 수크로스의 제형 매트릭스는 pH/완충액 스크린 I 및 II의 결과와 등장성 제형이 300±50 mOsm/kg의 목표 삼투질농도를 갖도록 가능하게 하는 것에 기반하였다.
- [0386] 계면활성제 스크린은 Vegf-Ang2 항체에 대해 0.01 내지 0.07% 사이의 상이한 계면활성제 농도에서 계면활성제 폴리소르베이트 20 및 폴록사머188의 안정화 효과를 시험했다. 또한, 계면활성제-유리 제형이 시험되었다.

[0387] 표 5는 계면활성제 스크린의 테스트 제형을 요약한다.

표 5: 계면활성제 스크린에 대한 제형 코드

제형 코드 (= 샘플 번호)	제형 매트릭스	이온 강도	표적 삼투질농도 (mOsm/kg)	계면활성 제	계면활 성제 농도(%)	충전 부피(m L)	투여 형태
GRM0071-01	120 mg/mL의 Vegf-Ang2 항체 20 mM의 His- 아세테이트 pH 5.5, 25 mM의 NaCl 180 mM의 수크로스	40	311	-	0	2.7	6-mL 바이알
GRM0071-02				폴리소르베 이트 20	0.01	2.7	6-mL 바이알
GRM0071-03				폴리소르베 이트 20	0.03	2.7	6-mL 바이알
GRM0071-04				폴리소르베 이트 20	0.05	2.7	6-mL 바이알
GRM0071-05				폴리소르베 이트 20	0.07	2.7	6-mL 바이알
GRM0071-06				폴록사머	0.01	2.7	6-mL 바이알
GRM0071-07				폴록사머	0.03	2.7	6-mL 바이알
GRM0071-08				폴록사머	0.05	2.7	6-mL 바이알
GRM0071-09				폴록사머	0.07	2.7	6-mL 바이알

[0388]

[0389] **물질 및 방법**

[0390] 제형의 제조 및 그것의 1차 포장 동안에 사용된 물질의 요약은 표 1 및 표 2에 주어진다.

[0391] 원료 의약품을 20 mM의 히스티딘-아세테이트 pH 5.3 정용여과 완충액에 대해 30kD 분자량 컷-오프 반-투과성 멤브레인을 갖는 Labscale TTF(Millipore)을 사용하는 한외여과-정용여과에 의해 완충액을 교환하였다. 이에 의해, 250 mL의 원료 의약품을 Labscale 시스템에 채우고 1700 mL의 정용여과 완충액에 대해 완충액을 교환하였다.

[0392] 완충액 교환 후, 원료 의약품을 Labscale 시스템에서 대략 170 mg/mL의 단백질 농도 및 대략 5.5의 pH로 농축하였다.

[0393] 나중에, 농축된 원료 의약품을 각각의 완충액과 염 용액의 스톱 용액으로 120 mg/mL의 표적 단백질 농도로 희석하여, 표 5에 따른 최종 의약품 용액을 얻었다.

[0394] 각각의 의약품 용액을 0.22 μm의 Sterivex GV(Millipore) 필터를 통해 여과하고 2.7 mL의 충전 부피를 갖는, 깨끗하고 멸균된 6 mL 바이알에 채웠다. 바이알을 마개를 하고 크립핑하였다.

[0395] **분석 방법**

[0396] 분석 테스트 방법 단백질 농도, pH, 삼투질농도, 탁도, 점도, 눈에 보이는 입자 및 SE-HPLC는 실시예 I에 기재되어 있다.

[0397] **안정성 프로그램**

[0398] 2 내지 8°C에서 1-주 수평 진탕(200rpm)의 계면활성제 스크린 기계적 스트레스 시험 조건 동안, 25°C에서 1 주 수평 진탕(200 rpm) 및 5 주기 냉동/해동(-40°C/ 5°C)을 적용했다.

[0399] **결과**

[0400] 표 6은 계면활성제 스크린 샘플의 초기 결과를 요약한다. 모든 제형은 대략 120 mg/mL의 단백질 농도 및 pH 5.5 ±0.1을 가졌다. 측정된 삼투질농도는 335 내지 350 mOsm/kg이었고 그에 따라 311 mOsm/kg의 목표보다 약간 더 높았다. pH 5.5에서 20 mM의 히스티딘-아세테이트 완충액 플러스 25 mM의 염화나트륨 및 180 mM의 수크로스를

갖는 120 mg/mL의 Vegf-Ang2의 선택된 제형 매트릭스는 대략 15 mPas의 저점도 및 20 FTU의 감소된 탁도를 초래했다.

[0401] 계면활성제 스크린 제형은 5°C 및 25°C에서 진탕 스트레스 및 냉동-해동 스트레스(5 냉동-해동 주기)에 노출시켰고 눈에 보이는 입자 및 가용성 응집물(HMWS)에 대해 분석하였다.

[0402] 표 7은 초기와 물리적 스트레스 후 눈에 보이는 입자 결과를 요약한다. 모든 제형 샘플은 초기에 입자가 없었다. 상이한 물리적 스트레스에 노출한 후, 계면활성제가 없는 제형 GRM0071-01은 항상 많은 입자를 나타냈다. 적어도 0.01% 폴리소르베이트 20의 첨가는 3개의 물리적 스트레스 방법에 노출 동안 눈에 보이는 입자의 형성을 예방했다.

[0403] 놀랍게도, 폴록사머의 첨가는 5°C에서 1 주 진탕에 노출 후 눈에 보이는 입자의 형성을 예방할 수 없었던 반면, 그것은 25°C에서 진탕 및 냉동-해동 스트레스에 대해 단백질을 보호할 수 있었다.

[0404] 도 4는 초기 샘플 및 응력 샘플의 가용성 응집물 수준(HMWS)을 도시한다. 계면활성제 없는 제형 GRM0071-01(1)은 진탕 스트레스에 민감하였고 5°C 및 25°C에서 진탕 1주 후 최대 10% 증가된 응집물 수준을 나타냈다. 0.01% 폴리소르베이트 20의 존재는 응집물 수준이 3에서 3.8%로 증가됨에 따라 25°C에서 1주 진탕 후 가용성 응집물의 증가를 충분히 예방하기에 충분하지 않았다. 놀랍게도, 25°C에서 1주 진탕 후 가용성 응집물의 증가를 방지하기 위해 0.03% 이상의 폴리소르베이트 20 수준이 필요하였다.

표 6: 제조 후의 계면활성제 스크린 샘플의 단백질 농도, pH, 삼투질농도, 탁도 및 점도 결과에 대한 요약

제형 코드 (= -샘플 번호)	단백질 농도(mg/mL)	pH	삼투질농도 (mOsm/kg)	탁도(FTU)	점도(mPas)
GRM0071-01	121	5.6	341	22.9	15
GRM0071-02	118	5.6	344	20.4	14
GRM0071-03	121	5.6	337	20	14
GRM0071-04	124	5.5	341	20.1	14
GRM0071-05	121	5.5	341	20.3	14
GRM0071-06	121	5.5	347	20.5	14
GRM0071-07	120	5.6	340	20.1	15
GRM0071-08	121	5.5	350	21	15
GRM0071-09	122	5.5	346	20.8	15

[0405]

표 7: 초기 및 물리적으로 응력 계면활성제 스크린 샘플의 눈에 보이는 입자 결과에 대한 요약

제형 코드 (= 샘플 번호)	계면활성제	초기	5°C에서 진탕 1주 후	25°C에서 1주 진탕 후	5 번의 냉동/해동 사이클 후
GRM0071-01	없음	입자 없음	많은 입자 있음	많은 입자 있음	많은 입자 있음
GRM0071-02	0.01% 폴리소르베이트 20	입자 없음	입자 없음	입자 없음	입자 없음
GRM0071-03	0.03% 폴리소르베이트 20	입자 없음	입자 없음	입자 없음	입자 없음
GRM0071-04	0.05% 폴리소르베이트 20	입자 없음	입자 없음	입자 없음	입자 없음

[0406]

GRM0071-05	0.07% 폴리소르베이트 20	입자 없음	입자 없음	입자 없음	입자 없음
GRM0071-06	0.01% 폴록사머	입자 없음	많은 입자 있음	입자 없음	입자 없음
GRM0071-07	0.03% 폴록사머	입자 없음	많은 입자 있음	입자 없음	입자 없음
GRM0071-08	0.05% 폴록사머	입자 없음	많은 입자 있음	입자 없음	입자 없음
GRM0071-09	0.07% 폴록사머	입자 없음	많은 입자 있음	입자 없음	입자 없음

[0407]

[0408]

결론

[0409]

진탕 및 냉동-해동 스트레스에 대해 120 mg/mL의 농도에서 항-VEGF/ANG2 항체를 충분히 안정화시키기 위해 적어도 0.03% 폴리소르베이트 20의 첨가가 필요하다.

[0410]

계면활성제 폴록사머는 5°C에서 진탕 스트레스에 대해 120 mg/mL의 농도에서 이중특이적 항-VEGF/ANG2 항체를 보호할 수 없다.

[0411]

pH 5.5에서 20 mM의 히스티딘-아세테이트 완충액, 25 mM의 염화나트륨 및 180 mM의 수크로스를 갖는 제형 매트릭스는 120 mg/mL의 항-VEGF/ANG2 항체 제형에 대해 허용가능한 탁도(대략 20 FTU) 및 점도 결과(대략 15 mPas)를 제공한다.

[0412]

실시예 5: 부형제 스크린 I

[0413]

설정

[0414]

부형제 스크린의 범위는 항-VEGF/ANG2 항체 CrossMab VEGFang2-0016(파리시맵)의 상업적 제형을 위한 최종 조성물을 선택하기 위한 것이다.

[0415]

이전의 pH/완충액 스크린 I 및 II와 계면활성제 스크린의 결과를 기반으로, 120 mg/mL의 Vegf-Ang2 항체, 20 mM의 히스티딘 아세테이트 완충액, 160 mM의 수크로스 및 0.04% 폴리소르베이트 20으로 구성된 제형 매트릭스를 선택했다. 제형 매트릭스에서 pH(5.5 대 5.8), 염(25 mM의 염화나트륨 대 8 mM의 염화칼슘) 및 메티오닌(0 대 7 mM)의 효과를 시험했다. 완충액 및 염 농도로부터의 기여에 기반하여 이온 강도를 40으로 조정하였다.

[0416] 표 8은 부형제 스크린 I의 제형을 요약한다.

표 8: 부형제 스크린 파트 I에 대한 제형 코드

제형 코드(= -샘플 번호)	단백질 농도	pH/ 완충액	염	메티 오닌 (mM)	수크로 스	폴리소 트베이 트 20	충전 부피	투여 형태
GRM0073-01	120 mg/mL	pH 5.5의 20 mM의	25 mM의 NaCl	0	160 mM	0.04%	2.7 mL	6-mL 바이알
GRM0073-02				7				
GRM0073-03		히스티 딘- 아세테 이트	8 mM의 CaCl ₂	0				
GRM0073-04				7				
GRM0073-05		pH 5.8의 20 mM의	25 mM의 NaCl	0				
GRM0073-06Tab				7				
GRM0073-07		히스티 딘- 아세테 이트	8 mM의 CaCl ₂	0				
GRM0073-08				7				

[0417]

[0418] **물질 및 방법**

[0419] 제형의 제조 및 그것의 1차 포장 동안에 사용된 물질의 요약은 표 1 및 표 2에 주어진다.

[0420] 원료 의약품을 20 mM의 히스티딘-아세테이트 pH 5.3 정용여과 완충액 또는 20 mM의 히스티딘-아세테이트 pH 5.6에 대해 30kD 분자량 컷-오프 반-투과성 멤브레인을 갖는 Labscale TTF(Millipore)을 사용하는 한외여과-정용여과에 의해 완충액을 교환하였다. 이에 의해, 410 mL의 원료 의약품을 Labscale 시스템에 채우고 완충액을 3000 mL의 정용여과 완충액으로 교환하였다.

[0421] 완충액 교환 후, 원료 의약품을 Labscale 시스템에서 대략 165 mg/mL의 단백질 농도 및 대략 5.5의 pH 또는 pH 5.8로 농축하였다.

[0422] 나중에, 농축된 원료 의약품을 각각의 완충액과 염 용액의 스톱 용액으로 120 mg/mL의 표적 단백질 농도로 희석하여, 표 8에 따른 최종 의약품 용액을 얻었다.

[0423] 각각의 의약품 용액을 0.22 μm의 Sterivex GV(Millipore) 필터를 통해 여과하고 2.7 mL의 충전 부피를 갖는 깨끗하고 멸균된 6 mL 바이알에 채웠다. 바이알을 마개를 하고 크립핑하였다.

[0424] **분석 방법**

[0425] 분석 테스트 방법 단백질 농도, pH, 삼투질농도, 탁도, 점도, 눈에 보이는 입자, SE-HPLC 및 IE-HPLC는 실시예 I에 기재되어 있다.

[0426] **안정성 프로그램**

[0427] 제형은 최대 20주 동안 2 내지 8°C에서 및 최대 13-주 동안 25°C에서 안정성을 유지하였다. 또한, 샘플은 2 내지 8°C에서 1-주 수평 진탕(200rpm), 25°C에서 1-주 수평 진탕(200 rpm) 및 5 주기 냉동/해동(-40°C/ 5°C)에 노출시켰다.

[0428] **결과**

[0429] 표 9는 부형제 스크린 I의 초기 결과를 요약한다. 모든 제형은 125 내지 130 mg/mL 사이의 단백질 농도를 가졌다. 목표 pH 5.5를 갖는 제형 GRM0073-01 내지 -04는 대략 5.6의 측정된 pH 값을 갖는 반면, 목표 pH 5.8을 갖는 제형 GRM0073-05 내지 -08는 대략 5.9의 측정된 pH 값을 가졌다. 25 mM의 염화나트륨을 함유하는 제형의 삼투질농도(GRM0073-01, - 02, -05 및 -06)는, 273 내지 288 mOsm/kg)인 8 mM의 염화칼슘을 갖는 제형(GRM0073-03, - 04, -07 및 -08)에 비교하여 더 높은 삼투질농도 결과(313 내지 322 mOsm/kg)를 가졌다.

[0430] 표 10은 초기, 물리적 스트레스 후 및 5°C와 25°C에서 13-주 저장 후에서 눈에 보이는 입자 결과를 요약한다. 제조 후 및 물리적 스트레스(5°C 또는 25°C에서 1 주 진탕, 또는 5 냉동-해동 주기)에 노출 후, 모든 제형은 입

자가 없었다. 놀랍게도, 8 mM의 염화칼슘을 함유한 모든 제형은 5°C 및 25°C에서 13주의 저장 후 눈에 보이는 입자를 나타낸 반면, 25 mM의 염화나트륨을 함유하는 모든 제형은 입자가 없었다.

[0431] 도 5는 25 mM의 염화나트륨을 함유한 제형의 탁도 및 점도 결과를 비교한다. 이에 의해, pH 5.5를 갖는 제형은 더 낮은 탁도(21 FTU 대 25 FTU) 및 더 낮은 점도(17 mPas 대 21 mPas)를 나타냈다.

[0432] 도 6 및 7은 5°C에서 20 주의 저장, 각각 25°C에서 13 주 저장 동안 가용성 응집물(HMWS)의 증가를 도시한다. pH 5.8을 갖는 제형은 pH 5.5에서의 제형에 비교하여 가용성 응집물에서 약간 더 낮은 증가를 나타냈다. 놀랍게도, 메티오닌의 첨가는 가용성 응집물의 형성을 감소시킬 수 있었고 응집에 대한 더 낮은 pH의 영향을 보상할 수 있었다.

[0433] 도 8 및 9는 각각 5°C에서 20 주의 저장 및 25°C에서 13 주 저장 후 IEC에 의해 측정된 충전된 변형체의 전하를 비교한다. 모든 제형은 5°C에서 13 주 저장 후 주요 피크 영역의 대략 1%의 약간의 강하를 나타냈다. 이는 산성 변형체에서 대략적인 0.2% 증가율 및 염기성 피크 면적에서 대략적인 1% 증가율을 동반한다. 상이한 pH 또는 메티오닌의 존재에 의해 야기된 명확한 차별화는 없다. 비록 주요 피크의 강하는 훨씬 더 강하지만(대략 18%), 25°C에서 13 주 저장 후, pH 및 메티오닌에 기반한 명확한 차별화는 없다. 25°C에서 저장 동안 주요 피크의 감소는 주로 산성 변형체에서 증가에 의해 야기된다.

표 9: 제조 후의 부형제 스크린 I 샘플의 단백질 농도, pH 및 삼투질농도 결과에 대한 요약

제형 코드 (= -샘플 번호)	단백질 농도(mg/mL)	pH	삼투질농도 (mOsm/kg)
GRM0073-01	126	5.6	315
GRM0073-02	125	5.6	322
GRM0073-03	126	5.6	275
GRM0073-04	127	5.6	288
GRM0073-05	126	5.9	313
GRM0073-06	128	5.9	314
GRM0073-07	129	5.9	273
GRM0073-08	128	5.9	281

[0434]

표 10: 초기 및 응력 부형제 스크린 I 샘플의 눈에 보이는 입자 결과에 대한 요약

제형 코드 (= -샘플 번호)	염	초기	5°C에서 진탕 1주 후	25°C에서 1주 진탕 후	5 번의 냉동/해동 사이클 후	5°C에서 13주 후	25°C에서 13주 후
GRM0073-01	25 mM 의 NaCl	입자 없음	입자 없음	입자 없음	입자 없음	입자 없음	입자 없음
GRM0073-02		입자 없음	입자 없음	입자 없음	입자 없음	입자 없음	입자 없음
GRM0073-03	8 mM 의 CaCl ₂	입자 없음	입자 없음	입자 없음	입자 없음	많은 입자 있음	많은 입자 있음
GRM0073-04		입자 없음	입자 없음	입자 없음	입자 없음	많은 입자 있음	많은 입자 있음
GRM0073-05	25 mM 의 NaCl	입자 없음	입자 없음	입자 없음	입자 없음	입자 없음	입자 없음
GRM0073-06		입자 없음	입자 없음	입자 없음	입자 없음	입자 없음	입자 없음
GRM0073-07	8 mM 의 CaCl ₂	입자 없음	입자 없음	입자 없음	입자 없음	많은 입자 있음	많은 입자 있음
GRM0073-08		입자 없음	입자 없음	입자 없음	입자 없음	많은 입자 있음	많은 입자 있음

[0435]

[0436]

결론

[0437]

비록 염화칼슘의 존재는 염화나트륨을 갖는 제형(실시예 2 및 3을 지칭)에 비교하여 더 낮은 점도 및 탁도 수준을 초래하지만, 그것은 놀랍게도 또한 눈에 보이는 입자의 형성을 야기했다. 눈에 보이는 입자의 형성은, 눈에 보이는 입자가 본질적으로 없는 USP-NF <790>의 요건에 따라 유리체내 주입에 대해 허용가능하지 않다. 따라서, 점도의 감소를 위한 이온 강도 개질제로서 염화나트륨의 첨가가 염화칼슘의 사용에 비하여 선호된다.

[0438]

또한, 5.5의 pH의 제형은 pH 5.8에서의 제형에 비교하여 더 낮은 탁도 및 더 낮은 점도를 나타낸다. 그러나, 5.8의 pH의 제형은 pH 5.5에서의 제형보다 가용성 응집물의 약간 더 낮은 형성을 나타냈으나, 이 효과는 7 mM의 메티오닌의 첨가에 의해 보상될 수 있다. 따라서, 메티오닌의 첨가는 여전히 더 낮은 점도 및 탁도 수준을 실현하면서 pH 5.5에서 가용성 응집물 형성을 감소시킬 수 있다.

[0439]

pH에서 차이(pH 5.5 대 5.8) 또는 메티오닌의 존재 또는 부재는 충전된 변형체의 형성에 영향을 미치지 않는다.

[0440]

요약하면, 8 mM의 염화칼슘 대신에 25 mM의 염화나트륨 및 7 mM의 메티오닌과 160 mM의 수크로스를 갖는 pH 5.5에서 20 mM의 히스티딘-아세테이트 완충액 및 0.04% 폴리소르베이트 20을 갖는 제형은 저탁도 및 점도와 개선된 안정성 행동을 갖는 입자-유리 제형을 허용한다.

[0441]

실시예 6: 부형제 스크린 II

[0442]

설정

[0443]

부형제 스크린의 제2 파트에서, 안정성 행동은 미리 충전된 주입기 및 30 mg/mL의 단백질 농도에서 추가로 특장화된다.

[0444]

부형제 스크린 I은 120 mg/mL의 항-VEGF/ANG2 항체 CrossMAb VEGFang2-0016(파리시맵), pH 5.5에서 20 mM의 히스티딘-아세테이트, 25 mM의 염화나트륨, 160 mM의 수크로스, 7 mM의 메티오닌 및 0.04% 폴리소르베이트 20으로 구성되는 최적화된 제형을 수득했으며, 이것을 유리 바이알에 채웠다(제형 GRM0073-02에 상응한다).

[0445]

이 제형은 또한 미리 충전된 주입기에 채웠다(GRM0076-02). 또한, 이 제형 매트릭스의 안정성 행동은 미리 충전된 주입기(GRM0077-02) 또는 유리 바이알(GRM0077-06)에 채워진, 30 mg/mL의 단백질 농도에서 시험하였다.

[0446]

비교하기 위해, 유리 바이알에 채워진 참조 제형의 안정성은 30 mg/mL(GRM0077-09) 및 120 mg/mL(GRM0076-05)에서 시험하였다.

[0447]

표 11은 부형제 스크린 II의 제형을 요약한다.

표 11: 부형제 스크린 파트 II에 대한 제형 코드

제형 코드 (= 샘플 번호)	단백질 농도	pH/ 완충액	염	메티오닌	수크로스	폴리-소르베이트 20	충전 부피	투여 형태
GRM0076-02	120 mg/mL	20 mM의 히스티딘-아세테이트 pH 5.5	25 mM의 NaCl	7 mM	160 mM	0.04%	1 mL	1 mL PFS
GRM0077-02	30 mg/mL							
GRM0077-06								
GRM0077-09	30 mg/mL	20 mM의 히스티딘-HCl pH 6.0	100 mM의 NaCl	0 mM	60 mM	2.7	6 mL 바이알	
GRM0076-05	120 mg/mL							

[0448]

[0449]

물질 및 방법

[0450]

제형의 제조 및 그것의 1차 포장 동안에 사용된 물질의 요약은 표 1 및 표 2에 주어진다.

[0451]

원료 의약품을 30kD 분자량 컷-오프 반-투과성 멤브레인을 갖는 Labscale TTF(Millipore)을 사용하는 한외여과-정용여과에 의해 완충액을 교환하였다.

[0452]

pH 5.5의 20 mM의 히스티딘-아세테이트 완충액 중 항-VEGF/ANG2 항체 CrossMAb VEGFang2-0016(파리시맵)의 제조를 위해, 대략 340 mL의 원료 의약품을 Labscale 시스템에 채우고 2400 mL의 20 mM의 히스티딘-아세테이트 pH

5.2 정용여과 완충액에 대해 완충액을 교환하였다.

[0453] pH 6.0의 20 mM의 히스티딘-HCl 완충액 중 항-VEGF/ANG2 항체 CrossMab VEGFang2-0016(과리시맵)을 대략 200 mL의 원료 의약품을 사용하여 제조하였다. 이것을 LabScale 시스템에 채우고 1400 mL의 20 mM의 히스티딘-HCl pH 5.85 정용여과 완충액에 대해 완충액을 교환하였다.

[0454] 완충액 교환 후, 각각의 원료 의약품을 LabScale 시스템에서 대략 165 mg/mL의 단백질 농도 및 대략 5.5의 pH 또는 pH 6.0로 농축하였다.

[0455] 나중에, 농축된 원료 의약품을 각각의 완충액과 염 용액의 스톱 용액으로 30 또는 120 mg/mL의 표적 단백질 농도로 희석하여, 표 8에 따른 최종 의약품 용액을 얻었다.

[0456] 각각의 의약품 용액을 0.22 μ m의 Sterivex GV(Millipore) 필터를 통해 여과하고 2.7 mL의 충전 부피를 갖는, 깨끗하고 멸균된 6 mL 바이알 또는 1 mL의 충전 부피를 갖는, 깨끗하고 멸균된 1 mL 미리 충전된 주입기에 채웠다. 바이알을 마개를 하고 크립핑하는 반면, 주입기를 플런저 스톱퍼로 폐쇄하였다.

[0457] **분석 방법**

[0458] 분석 테스트 방법 단백질 농도, pH, 삼투질농도, 탁도, 점도, 눈에 보이는 입자 및 SE-HPLC는 실시예 I에 기재되어 있다.

[0459] **안정성 프로그램**

[0460] 제형은 최대 13주 동안 2 내지 8°C 및 24°C에서 안정성을 유지하였다. 또한, 샘플은 2 내지 8°C에서 1-주 수평 진탕(200rpm), 25°C에서 1-주 수평 진탕(200 rpm) 및 5 주기 냉동/해동(-40°C/ 5°C)에 노출시켰다.

[0461] **결과**

[0462] 표 12는 부형제 스크린 II의 초기 결과를 요약한다. GRM0076-02(PFS에서 최적화된 제형) 및 GRM0076-05(참조 제형)는 각각 119 또는 123 mg/mL의 측정된 값으로 120 mg/mL의 표적화된 단백질 농도에 둘 모두 매칭되었다. GRM0077-02(PFS에서 최적화된 제형), GRM0077-06(바이알에서 최적화된 제형) 및 GRM0076-05(참조 제형)는 30 mg/mL의 목표 단백질 농도로 제조되었다. 실제 단백질 농도는 30 내지 31 mg/mL 사이 범위였다.

[0463] 모든 제형의 pH는 표적화된 pH에 근접하고 단지 0.1 pH 단위의 최대 편차를 가졌다.

[0464] 120 mg/mL에서의 제형의 삼투질농도는 약간 더 높았고 310 내지 320 mOsm/kg인 반면, 30 mg/mL의 제형은 278 내지 394 mOsm/kg였다.

[0465] 표 13은 초기, 물리적 스트레스 후 및 5°C와 25°C에서 13-주 저장 후에서 눈에 보이는 입자 결과를 요약한다. 제조 후 및 물리적 스트레스(5°C 또는 25°C에서 1 주 진탕, 또는 5 냉동-해동 주기)에 노출 후, 모든 제형은 입자가 없었다. 놀랍게도, 참조 제형은 5°C 및 25°C에서 13주의 저장 후 많은 입자를 나타냈다. 모든 다른 제형은 입자가 없었다.

[0466] 도 10은 120 mg/mL의 단백질 농도에서 최적화된 및 참조 제형의 탁도 및 점도 결과를 비교한다. 최적화된 제형은 대략 23 FTU의 분명히 더 낮은 탁도를 나타낸 반면, 임상 서비스 제형은 45 FTU 초과 탁도를 가졌다. 흥미롭게도, 양 제형의 점도는 둘 모두 14 mPas 미만이었다.

[0467] 도 11은 30 mg/mL의 제형의 탁도 및 점도를 도시한다. 여기서, 탁도의 차이는 제형 GRM0072-02와 GRM0077-09 사이에서 더 작지만, 그러나 여전히 최적화된 제형은 더 낮은 탁도를 나타냈다. 양 30 mg/mL의 제형에 대한 점도는 120 mg/mL의 제형에 비교하여 아주 낮고 2 mPas 미만이다.

[0468] 도 12 및 도 13은 5 및 25°C에서 13 주 저장 후 HMW 종의 증가를 도시한다. 최적화된 제형은 둘 모두 참조 제형보다 HMW 종의 120 mg/mL 및 30 mg/mL 낮은 증가를 나타냈다. 안정화 효과는 25°C에서 13 주의 저장 후 가장 확연한 반면, HMW는 최적화된 제형 GRM0076-02에서 단지 2.4% 증가했고, 제형 GRM0076-05는 최대 2.9% 증가는 나타냈다. 동일한 경향은 또한 최적화된 제형으로 관찰된 1.0%로 더 낮은 증가 및 참조 형태에 대한 1.3% 증가로, 30 mg/mL의 제형에 대해 관찰된다.

[0469] 도 14는 5°C 및 25°C에서 13 주 저장 후 IEC에 의해 측정된 충전된 변형체의 전하를 비교한다. 모든 제형은 5°C에서 13 주의 저장 후 주요 피크 영역의 대략 1%의 약간의 강하를 나타냈다. 이는 염기성 피크 면적에서 상응하는 증가를 동반하는 반면, 산성 피크 면적은 일정하게 유지한다. 비록 주요의 피크의 강하는 훨씬 더 강하지만(대략 10%), 25°C에서 13 주의 저장 후, 제형 사이에 명확한 차별화는 없다. 25°C에서 저장 동안 주요 피크의

감소는 주로 산성 변형체에서 증가(약 8%) 및 염기성 변형체에서 약간의 증가(1-2%)에 의해 야기된다. 25℃에서 13주 후 염기성 변형체의 증가는 최적화된 제형(약 2% 증가율)에 비교하여 참조 제형(pH 6.0에서 제형화됨)이 약간 더 낮다(약 1%). 더 낮은 단백질 농도 및 1차 용기는 충전된 변형체에 영향을 미치지 않는다.

표 12: 제조 후 부형제 스크린 II 샘플의 단백질 농도, pH 및 삼투질농도 결과에 대한 요약

제형 코드	제형 및 투여 형태	단백질 농도(mg/mL)	pH	삼투질농도 (mOsm/kg)
GRM0076-02	PFS 에서 120 mg/mL	119	5.6	318
GRM0077-02	PFS 에서 30 mg/mL	30	5.5	278
GRM0077-06	바이알에서 30 mg/mL	30	5.5	278
GRM0077-09	바이알에서 30 mg/mL, 참조 제형	31	6.0	294
GRM0076-05	바이알에서 120 mg/mL, 참조 제형	123	6.1	312

[0470]

표 13: 초기 및 응력 부형제 스크린 II 샘플의 눈에 보이는 입자 결과에 대한 요약

제형 코드	제형 및 투여 형태	초기	5℃에서 진탕 1주 후	25℃에서 1주 진탕 후	5 번의 냉동/해동 사이클 후	5℃에서 13주 후	25℃에서 13주 후
GRM0076-02	PFS 에서 120 mg/mL	입자 없음	입자 없음	입자 없음	입자 없음	입자 없음	입자 없음
GRM0077-02	PFS 에서 30 mg/mL	입자 없음	입자 없음	입자 없음	입자 없음	입자 없음	입자 없음
GRM0077-06	바이알에서 30 mg/mL	입자 없음	입자 없음	입자 없음	입자 없음	입자 없음	입자 없음
GRM0077-09	바이알에서 30 mg/mL, 참조 제형	입자 없음	입자 없음	입자 없음	입자 없음	많은 입자 있음	많은 입자 있음
GRM0076-05	바이알에서 120 mg/mL, 참조 제형	입자 없음	입자 없음	입자 없음	입자 없음	입자 없음	입자 없음

[0471]

[0472]

결론

[0473]

부형제 스크린 II의 결과는 최적화된 제형이 참조 제형보다 우수하다는 것을 확인했다. 120 mg/mL에서 최적화된 제형의 탁도는 45 FTU 초과로부터 25 FTU 미만으로 감소된 반면, 점도는 15 mPas 미만으로 유지했다. 저점도는 상업적-규모 생산 공정(한외여과에 의해 상향 농축)을 가능하게 하고 용이하고 편리한 유리체내 주입(20N 미만, 특히 15 N 미만의 주입력)을 보장하기 위해 필수적이다. 15 mPas 미만의 점도로 최적화된 제형은 N 미만의 주입력으로 5초 주입 시간으로 30G 주입 바늘을 통해 주입될 수 있음이 입증되었다.

[0474]

또한, 30 mg/mL에서 최적화된 제형은 입자가 없는 것을 유지한 반면, 참조 제형은 5 및 25℃에서 13 주의 저장 후 눈에 보이는 입자를 나타냈다. 또한, HMW 중의 증가는 최적화된 제형에서 더 낮았다.

[0475]

최적화된 제형의 개선된 안정성 행동은 30 및 120 mg/mL의 단백질 농도 및 바이알에서 뿐만 아니라 미리 충전된 주입기에서 관찰되었다.

[0476]

요약하면, 히스티딘-아세테이트 완충액 pH 5.5, 25 mM의 염화나트륨, 7 mM의 메티오닌, 160 mM의 수크로스 및 0.04% 폴리소르베이트 20을 함유하는 30 내지 120 mg/mL 사이의 단백질 농도를 갖는 최적화된 제형은 바이알 및

미리 충전된 주입기에서 저탁도와 점도 및 개선된 안정성 행동을 갖는 입자-유리 제형을 허용한다.

[0477] **실시예 7:(유리체내 적용을 위한 제형에서) 안구 적용중에 사용하기 위한 메티오닌의 안전성**

[0478] **L-메티오닌으로 비임상 독성 연구의 개요**

[0479] 메티오닌(10 mM)이 비히클의 성분이고 제형화된 시험품 CrossMab VEGFang2-0016(파리시맵)으로 된 사이노몰구스 원숭이에서의 독성 연구를 수행했다. 본 연구에서, 총 12마리 동물(6마리 수컷/6마리 암컷)을 14일 간격으로 50 mL/눈으로 2회 유리체내로 처리했다. 왼쪽 눈은 비히클(10 mM의 메티오닌 함유)로 처리하고 오른쪽 눈은 또한 10 mM의 메티오닌을 함유하는, 제형화된 시험품 CrossMab VEGFang2-0016(파리시맵)으로 처리했다. 본 연구에서, 메티오닌의 안구 효과는 사이노몰구스 원숭이에서 관찰되지 않았다.

[0480] 메티오닌(5-25 mM)이 비히클의 성분이고, 14 일 간격으로 최대 6회 유리체내로 투여된(또한 50 mL/눈), 3가지 연구(사이노몰구스 원숭이 및 뉴질랜드 화이트 토끼)를 수행했다. 이들 연구에서, 메티오닌의 안구 효과는 메티오닌-함유 비히클로 처리된 임의의 동물에서 관찰되지 않았다.

[0481] 비임상 독성 연구의 개요는 표 14에 제공된다.

표 14:(유리체내로 투여된) 메티오닌을 함유하는 비임상 독성 연구의 요약

종	—	사이노몰구스 원숭이	NZW 토끼	사이노몰구스 원숭이	NZW 토끼
N(m/f)	—	6M/6F	3M	5M/5F	5M/5F
투여	—	왼쪽 눈에서의 비히클, 오른쪽 눈에서의 제형화된 파리시맵	두 눈에서의 비히클(대조군)	두 눈에서의 비히클(대조군)	두 눈에서의 비히클(대조군)
용량의 N(14 일 간격)	—	2	1	6	4
시험품	CrossMab VEGFang2-0016(파리시맵)을 위한 제형	—	—	—	—
비히클/대조물품 조성	7 mM의 메티오닌	10 mM의 메티오닌	25 mM의 메티오닌	5 mM의 메티오닌	5 mM의 메티오닌
	—	—	5 mM의 NAT	1 mM의 NAT	1 mM의 NAT
	pH 5.5의 20 mM의 히스티딘 아세테이트 완충액	20 mM의 히스티딘-히스티딘-HCl	20 mM의 히스티딘 HCl	20 mM의 히스티딘 HCl	20 mM의 히스티딘 HCl
	160 mM의 수크로스	50 mM의 수크로스	240 mM의 수크로스	240 mM의 수크로스	240 mM의 수크로스
	0.04% 폴리소르베이트 20	0.04%(w/v)의 폴리소르베이트 20	0.02% 폴리소르베이트 20	0.02% 폴리소르베이트 20	0.02% 폴리소르베이트 20
	25 mM의 염화나트륨	100 mM의 염화나트륨	—	—	—

약어: NAT = N-아세틸 트립토판; NZW = 뉴질랜드 화이트.

[0482] **실시예 8: 안정성**

[0484] 의약품 배치(20 mM의 L-히스티딘- 아세테이트 pH 5.5, 160 mM의 수크로스, 25 mM의 염화나트륨, 7 mM의 L-메티오닌, 0.04% 폴리소르베이트 20에서 120 mg/mL의 Vegf/Ang2 항체(파리시맵))를 0.22 μm 평균 필터를 통해 여과하고 0.24 mL의 충전 부피를 갖는 깨끗하고 멸균된 2 mL 유리 바이알 안으로 채웠다.

[0485] 제조 후, pH는 5.6, 삼투질농도 320 mOsm/kg 및 단백질 농도 120 mg/mL였다.

[0486] 표 15는 5°C에서 저장 동안 의약품 배치 GLI0219-01의 안정성 데이터를 제시한다. 표 16은 25°C에서 저장 동안의 안정성을 나타낸다.

표 15: 5°C에서 저장 동안 Vegf-Ang2 항체(파리시맵) 의약품 배치의 안정성 데이터

시간(주)	눈에 보이는 입자	탁도 (NTU)	SEC에 의한 HMW(면적%)	주요 피크 (면적%)	산성 피크 (면적%)	염기성 피크 (면적%)
0	실제로 입자 없음	24	0.8	72.8	18.9	8.3
4	10개의 바이알 당 0개의 입자	22	1.2	72.2	18.9	8.9
13	10개의 바이알 당 0개의 입자	23	1.7	71.6	19.5	8.9
26	10개의 바이알 당 0개의 입자	22	2.2	71.0	19.5	9.5
39	10개의 바이알 당 0개의 입자	24	2.4	70.6	19.8	9.6
52	10개의 바이알 당 0개의 입자	23	2.8	69.5	20.2	10.3
65	10개의 바이알 당 0개의 입자	24	3.1	68.8	20.7	10.5
78	10개의 바이알 당 0개의 입자	24	3.3	68.3	20.8	11.0

[0487]

표 16: 25℃에서 저장 동안 Vegf-Ang2 항체(파리시맙) 의약품 배치의 안정성 데이터

시간(주)	눈에 보이는 입자	탁도 (NTU)	SEC 에 의한 HMW(면적%)	주요 피크 (면적%)	산성 피크 (면적%)	염기성 피크 (면적%)
0	실제로 입자 없음	24	1.0	72.8	18.9	8.3
4	10 개의 바이알 당 0 개의 입자	23	2.0	68.1	21.4	10.5
13	10 개의 바이알 당 0 개의 입자	23	2.6	59.7	28.6	11.7
26	10 개의 바이알 당 0 개의 입자	23	3.0	50.0	37.2	12.8
52	10 개의 바이알 당 0 개의 입자	24	3.5	37.7	49.9	12.4

[0488]

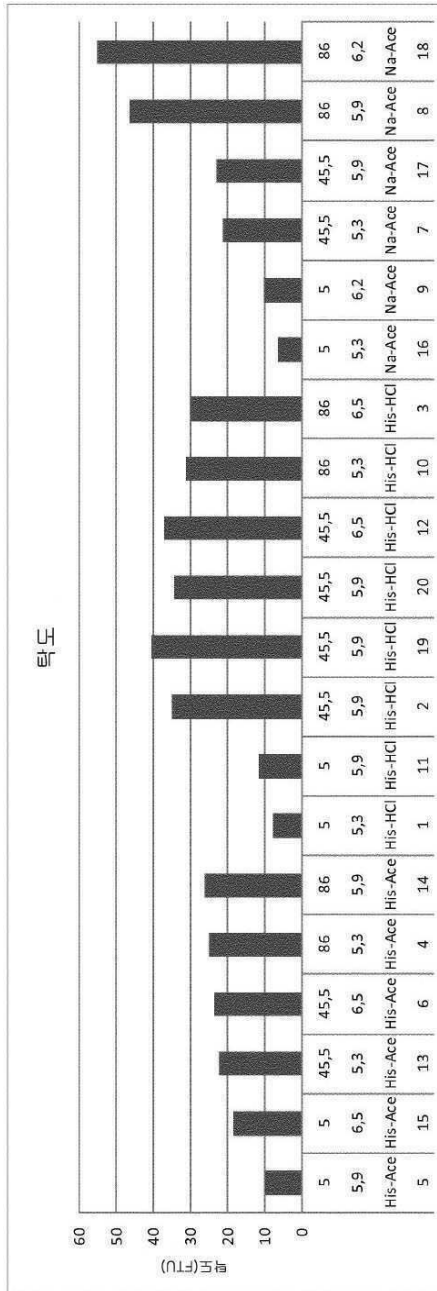
약어

약어	설명
His/Ace	히스티딘-아세트레이트 완충액
His-HCl	히스티딘-하이드로클로라이드 완충액
SE-HPLC	크기 배제 고성능 액체 크로마토그래피
IE-HPLC	이온 교환 고성능 액체 크로마토그래피
FTU	포마진(Formazin) 탁도 단위
HMW	고분자량 종
mPas	밀리 파스칼 초
LMW	저분자량 종
mg/mL	밀리그램/ 밀리리터

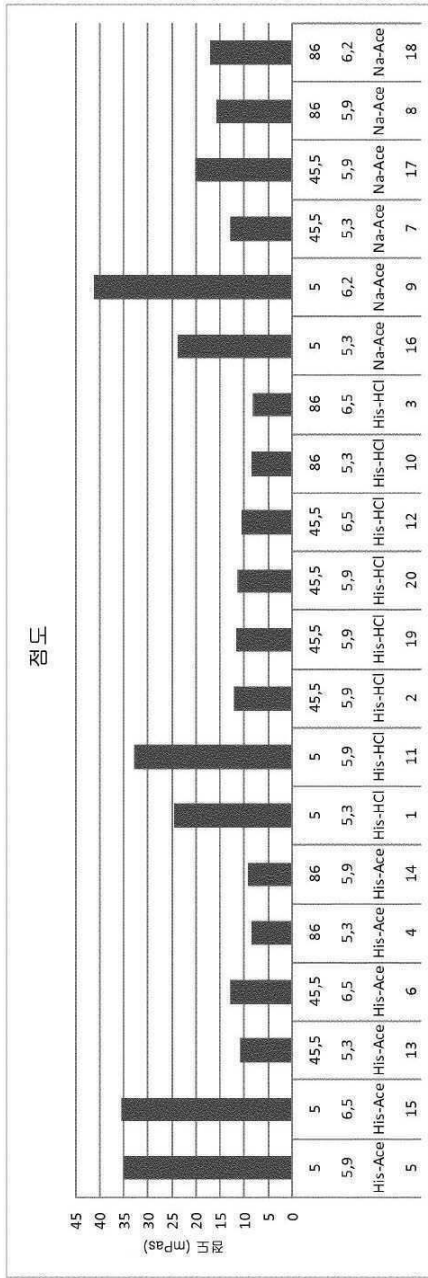
[0489]

도면

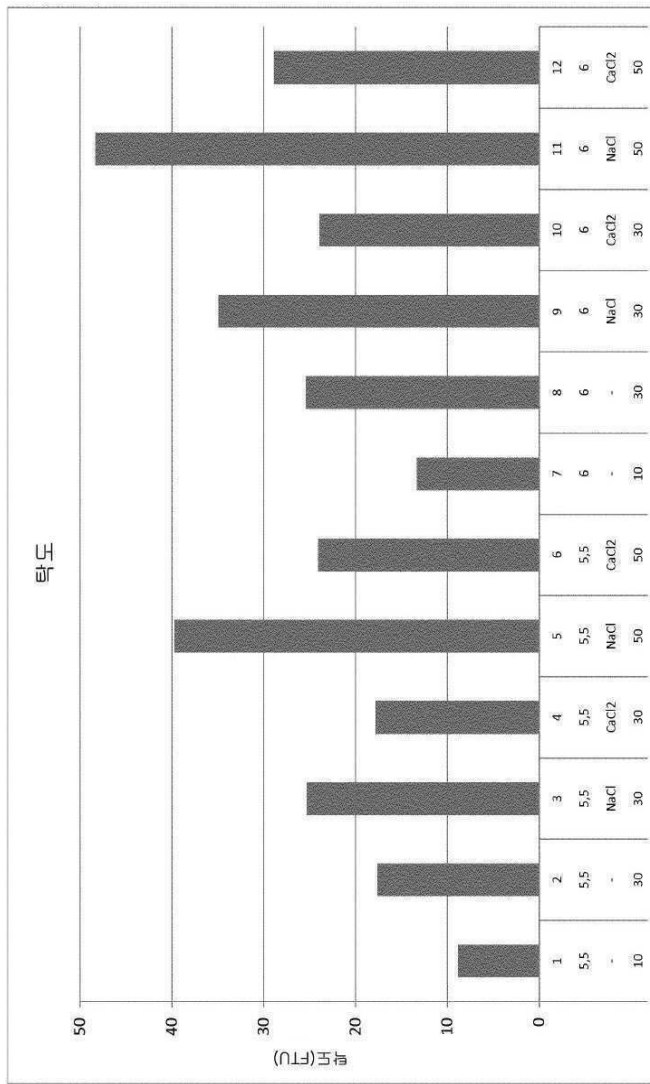
도면1



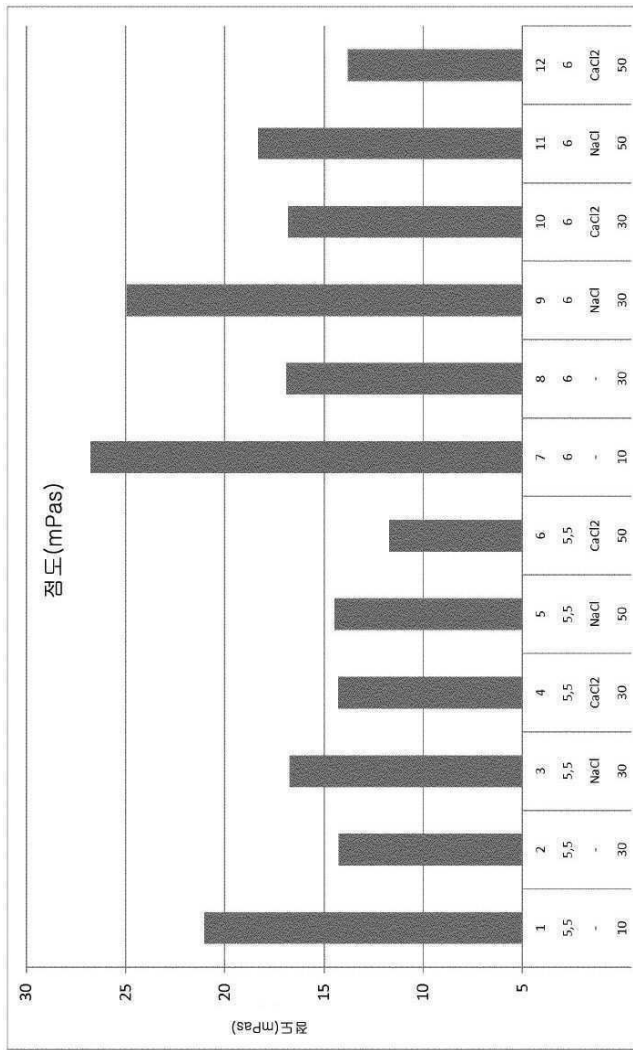
도면1b



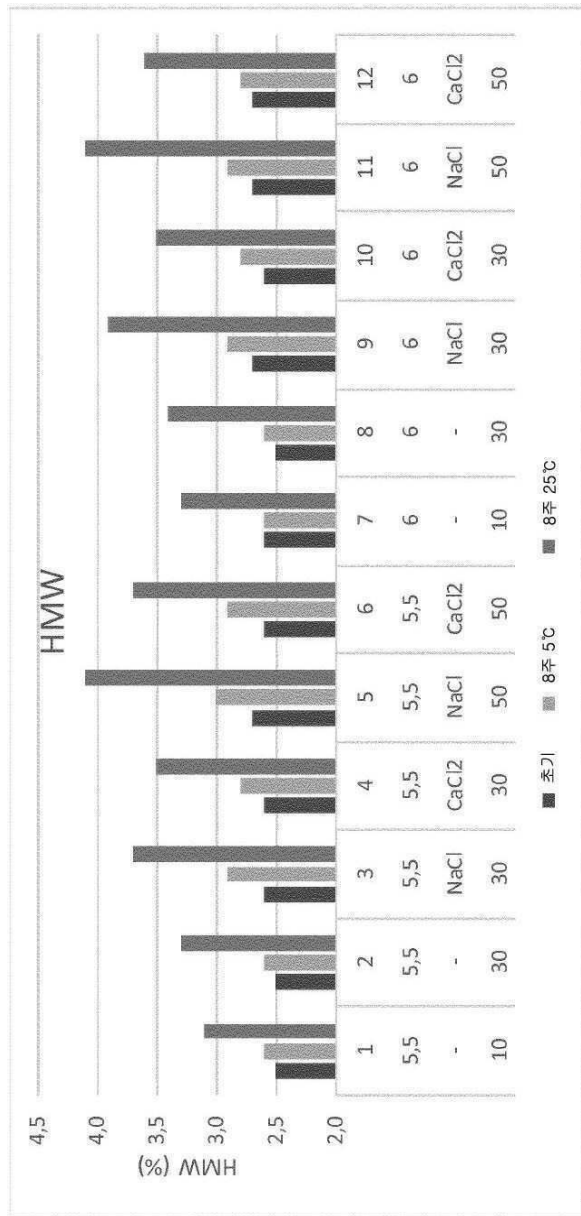
도면2a



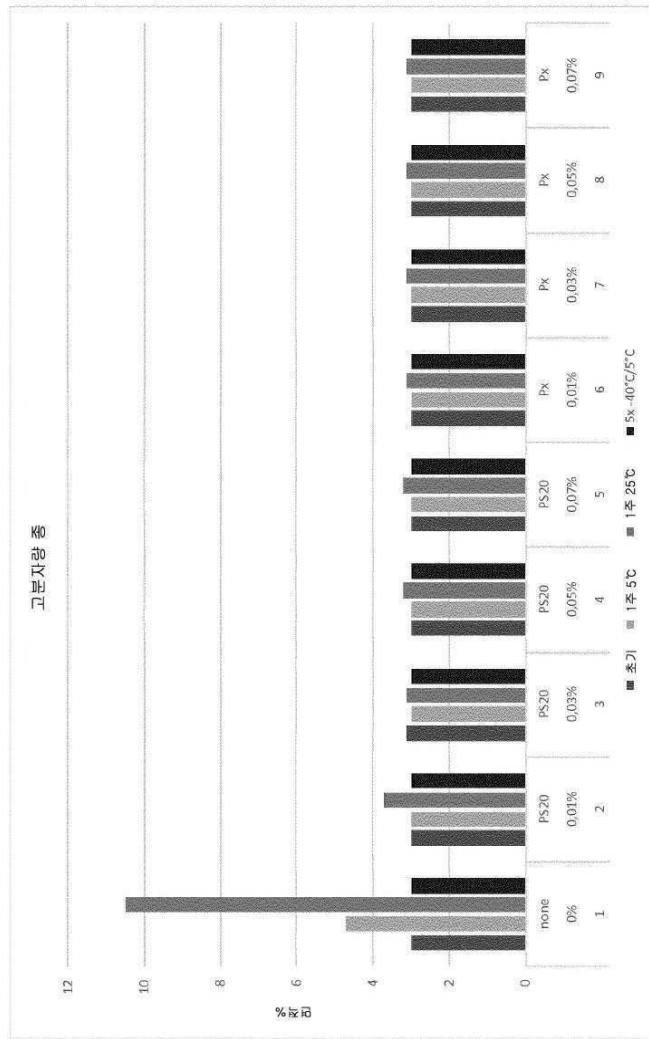
도면2b



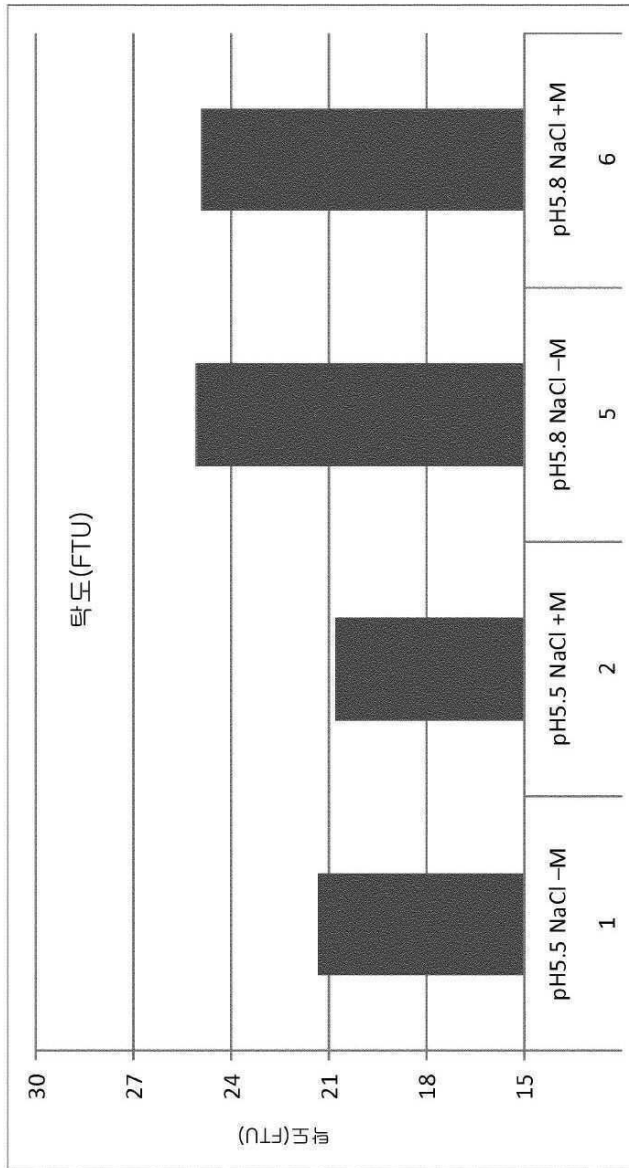
도면3



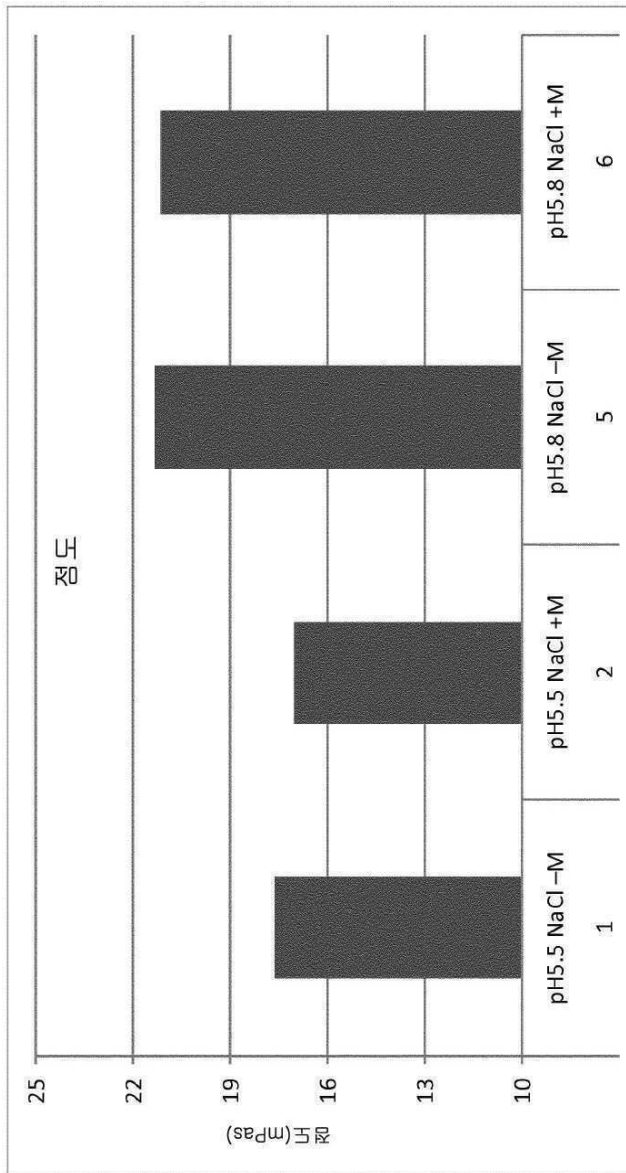
도면4



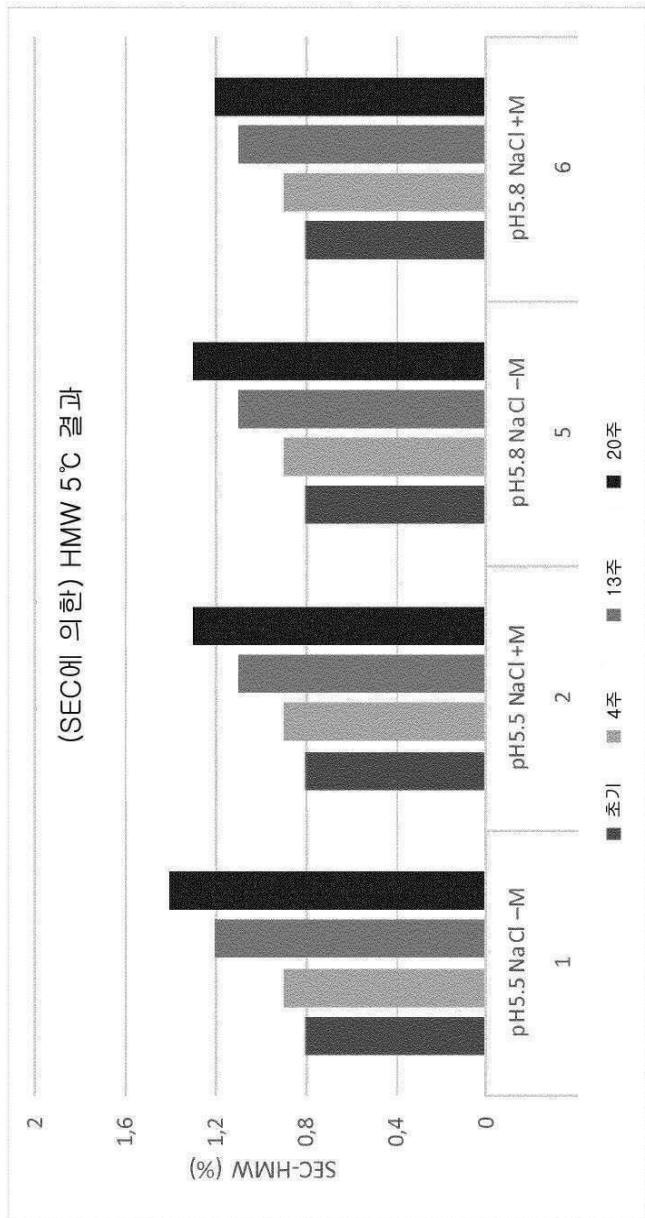
도면5a



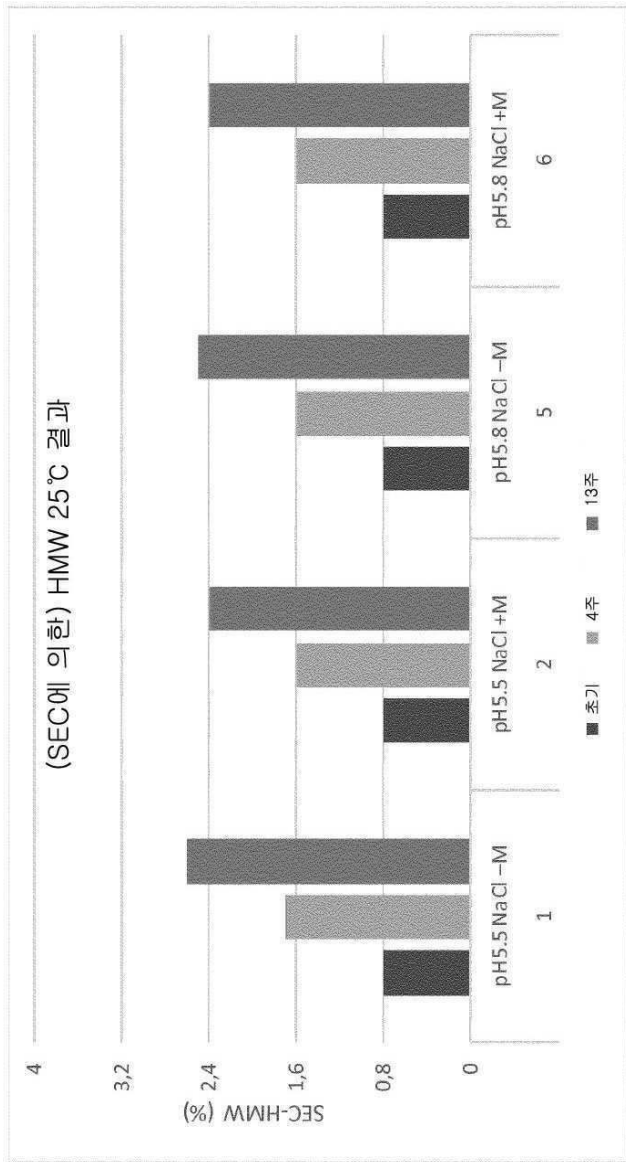
도면5b



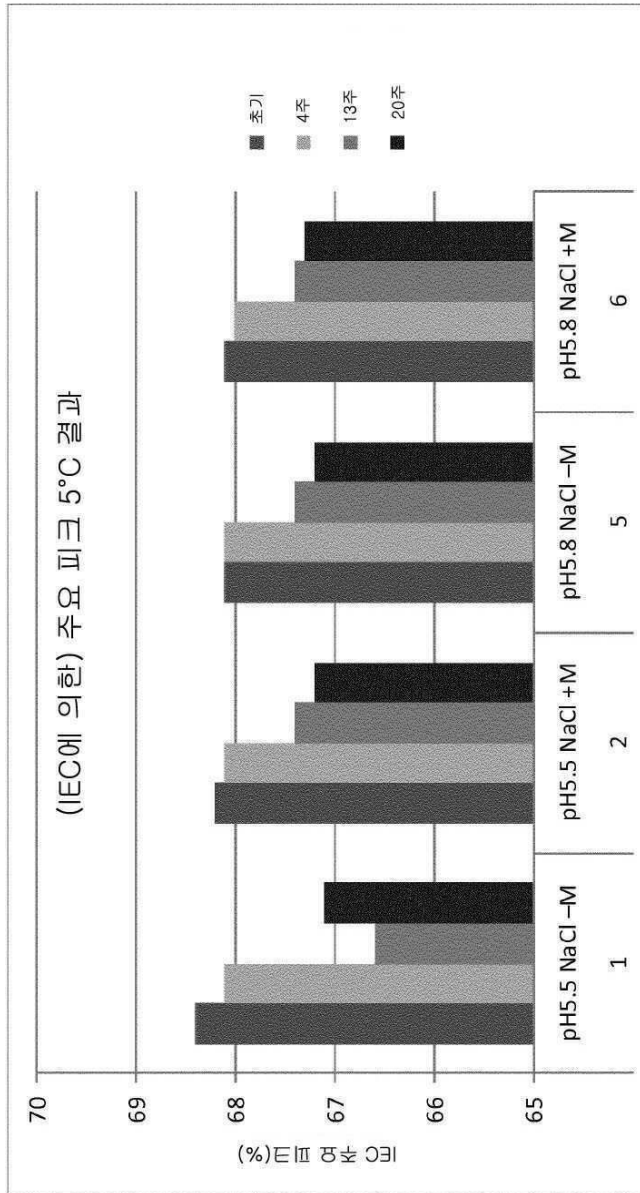
도면6



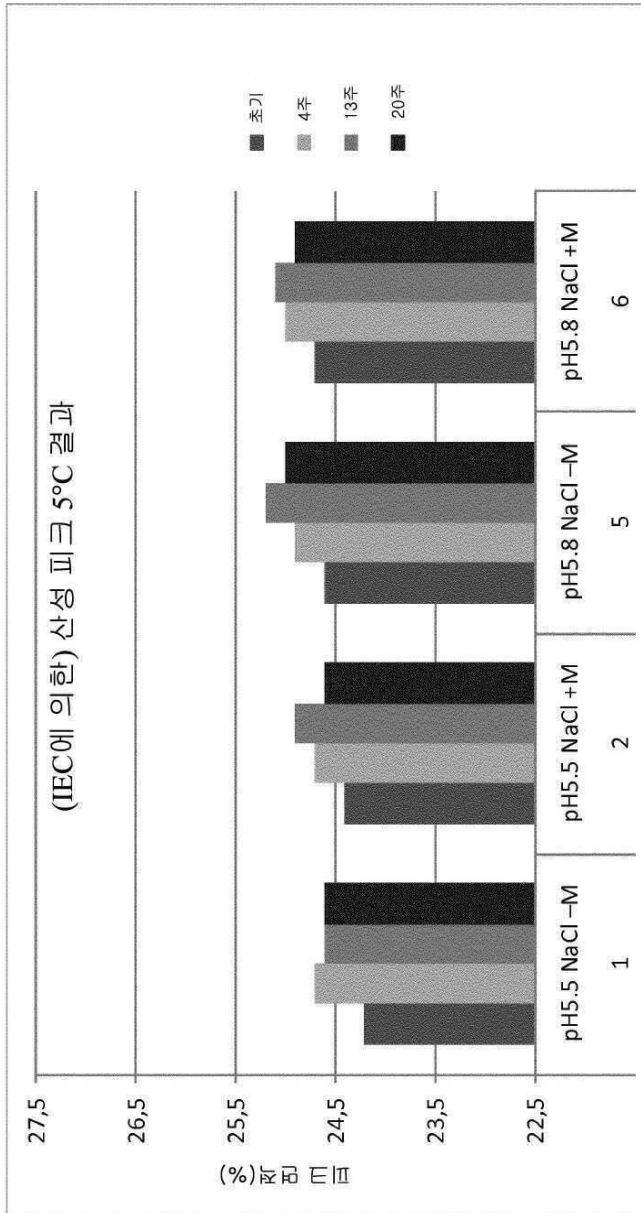
도면7



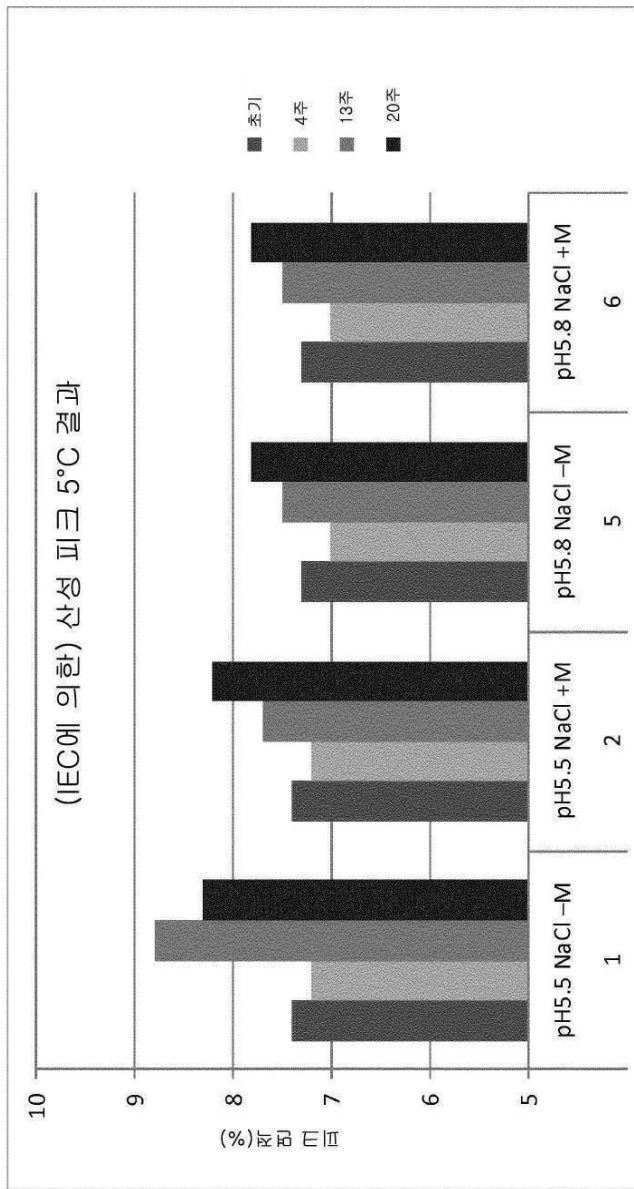
도면8a



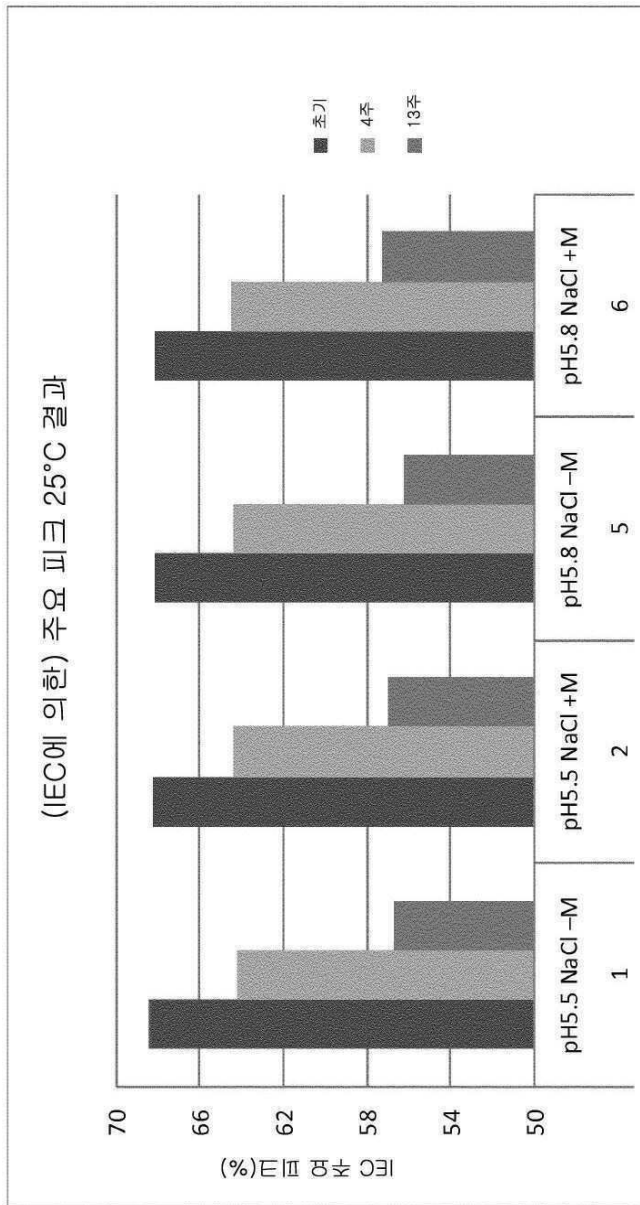
도면8b



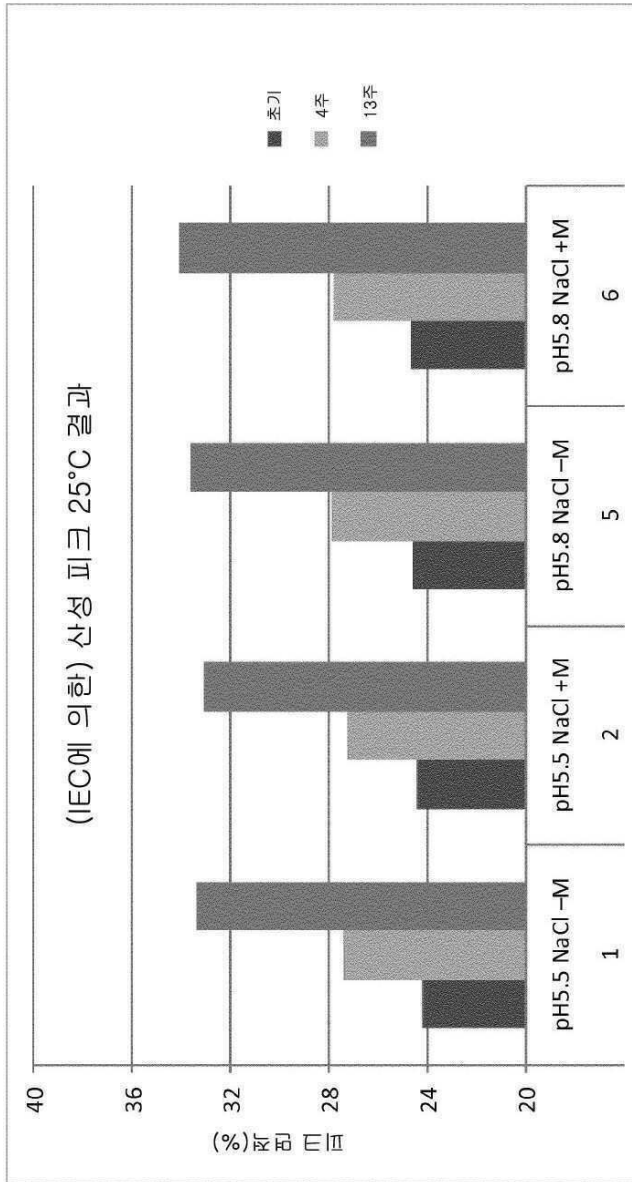
도면8c



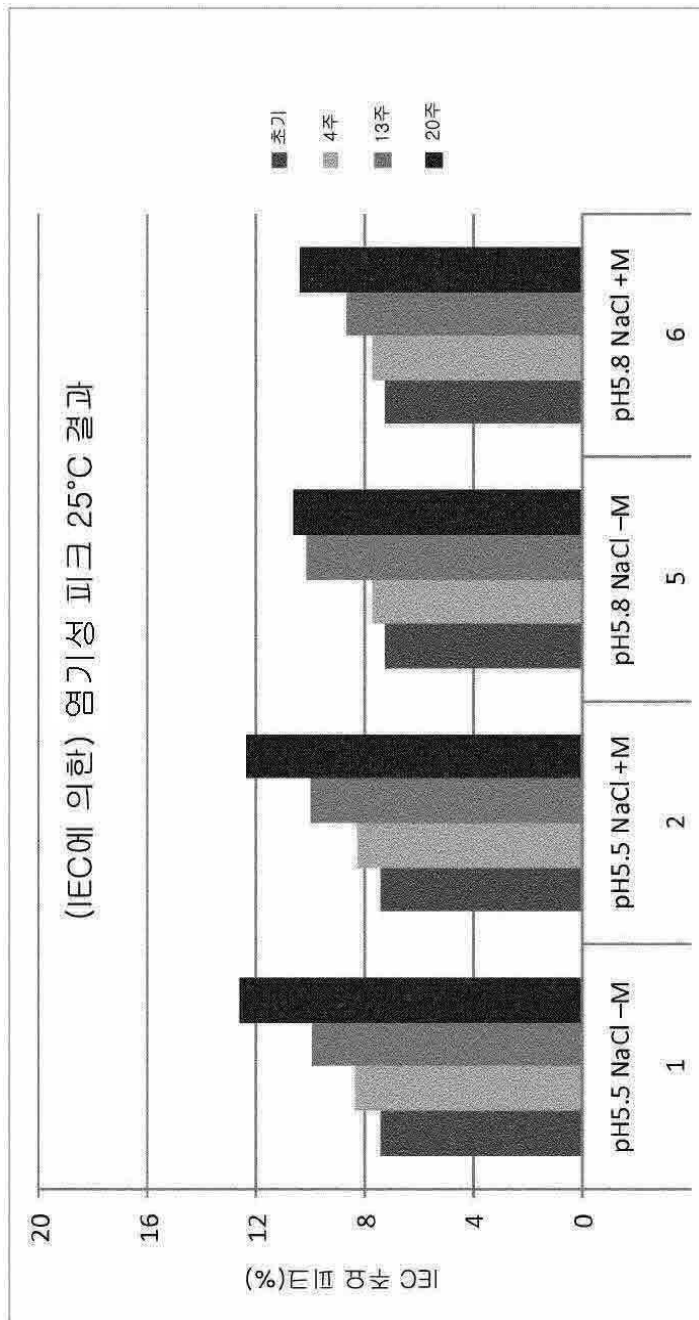
도면9a



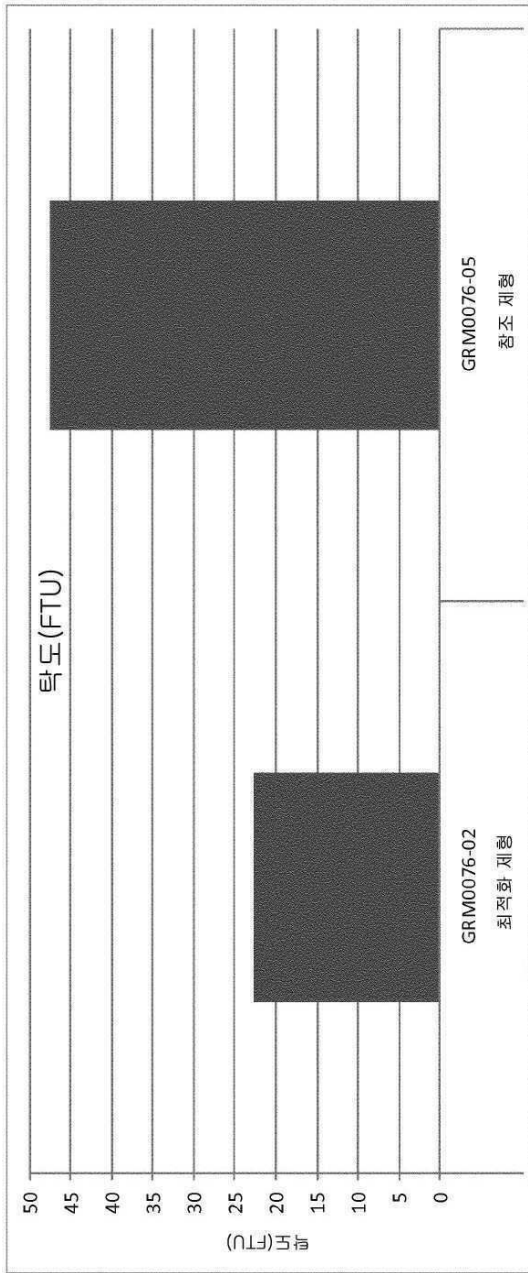
도면9b



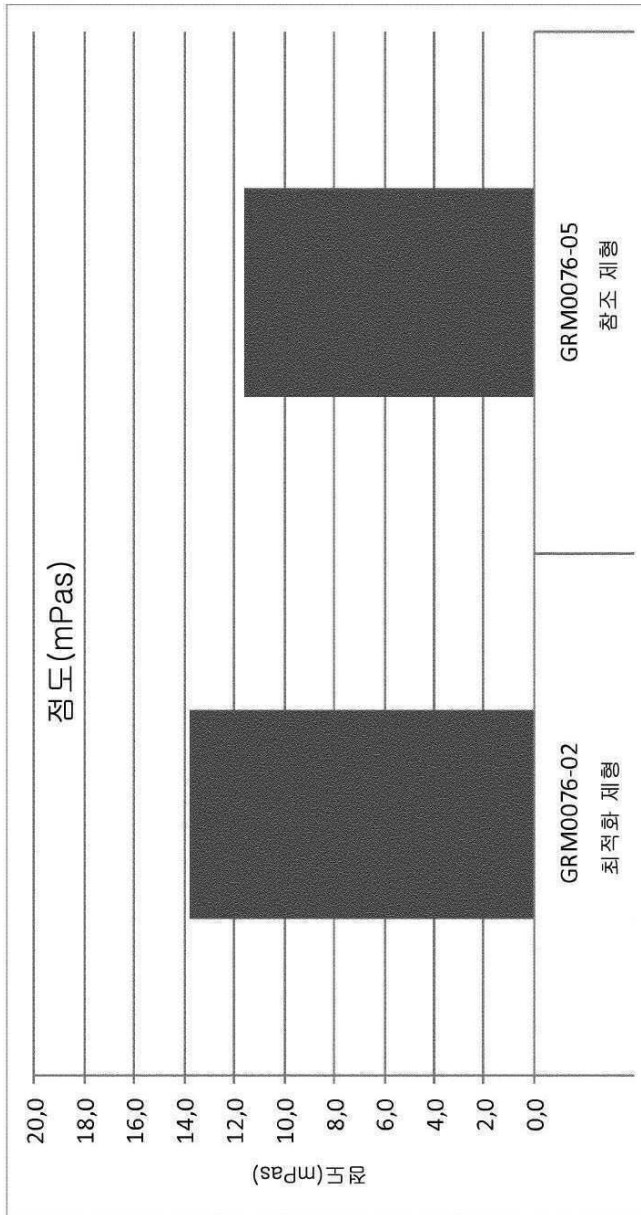
도면9c



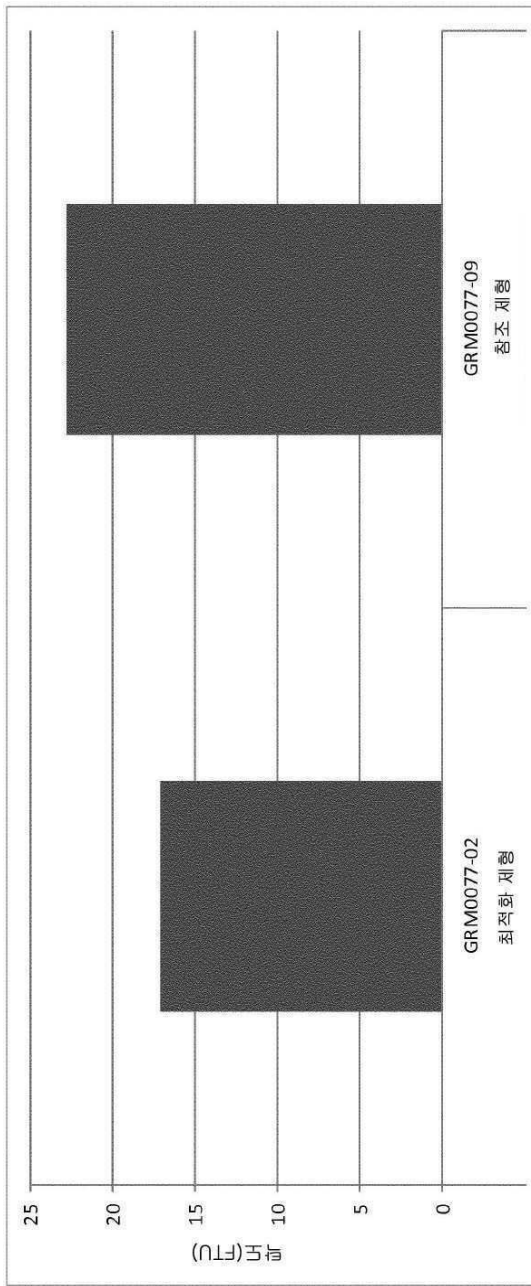
도면10a



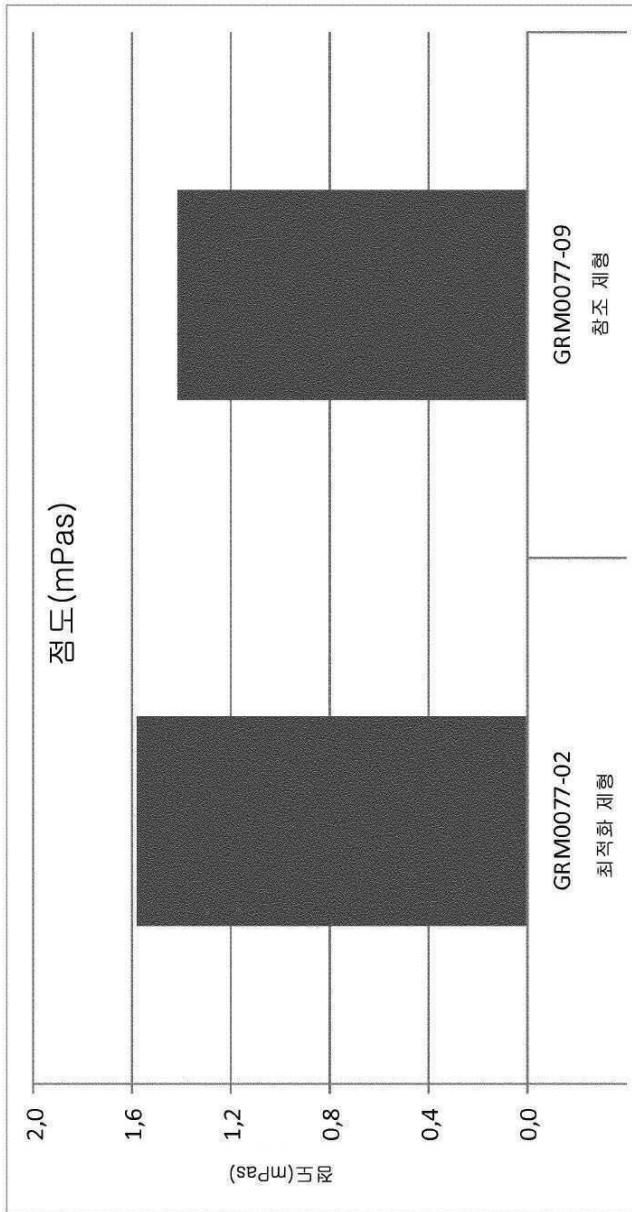
도면10b



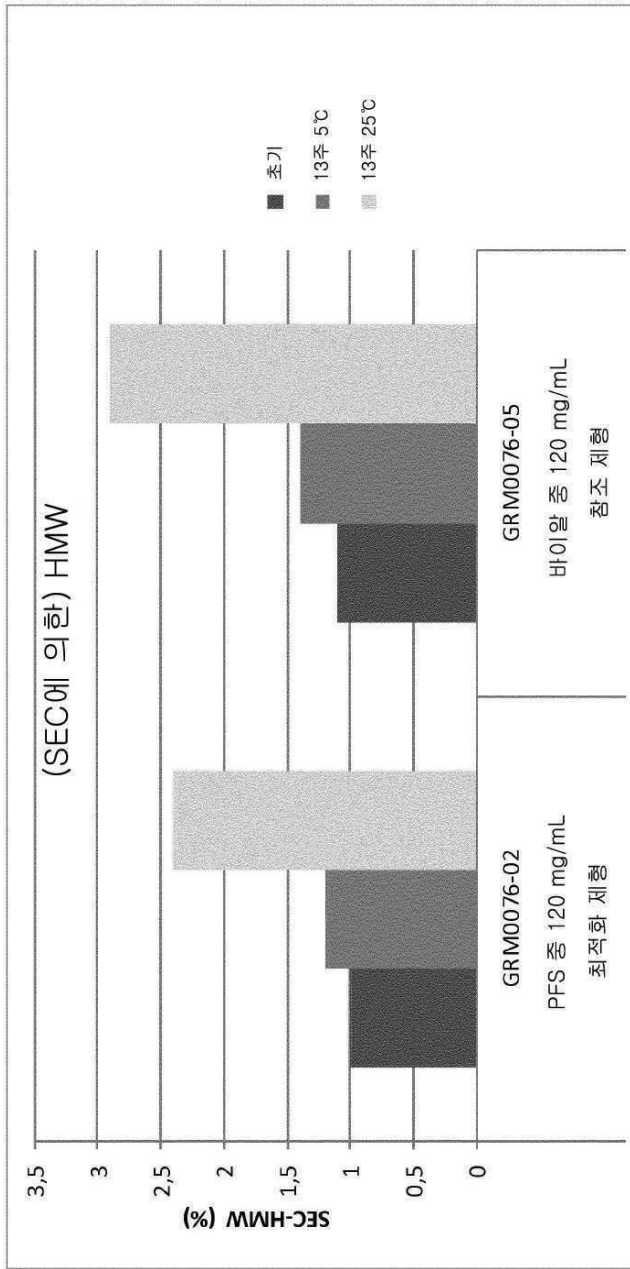
도면11a



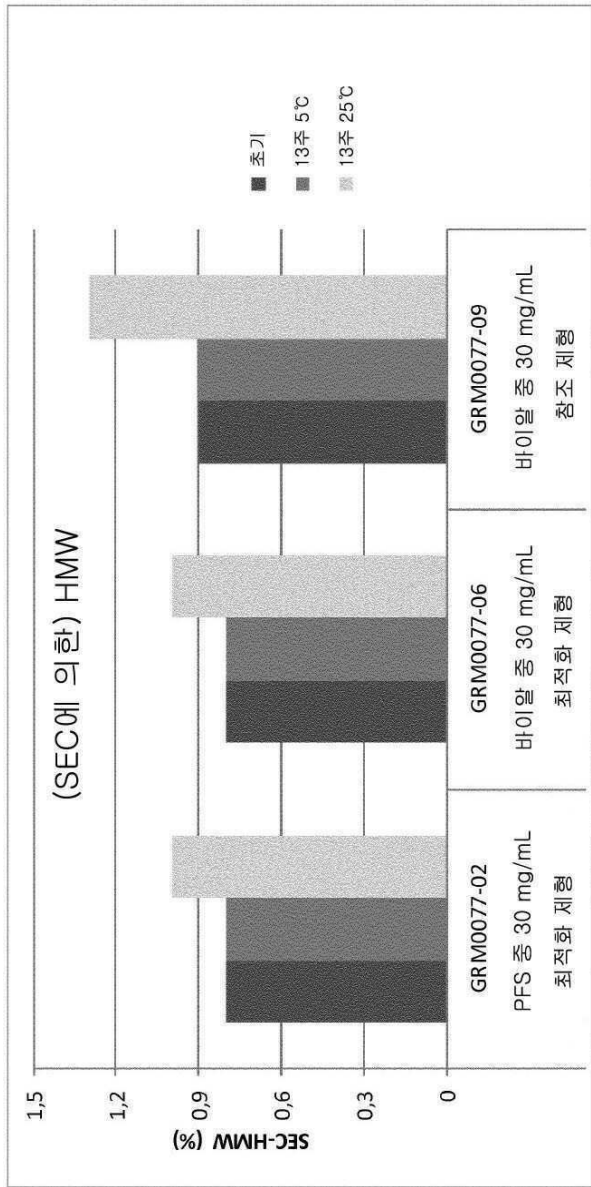
도면11b



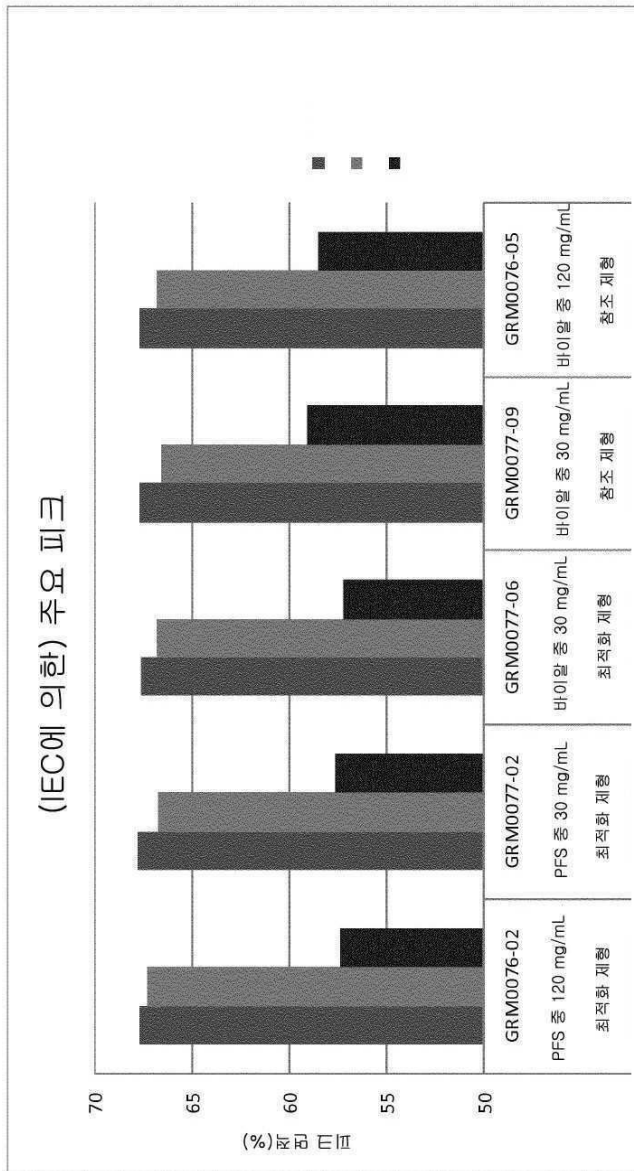
도면12



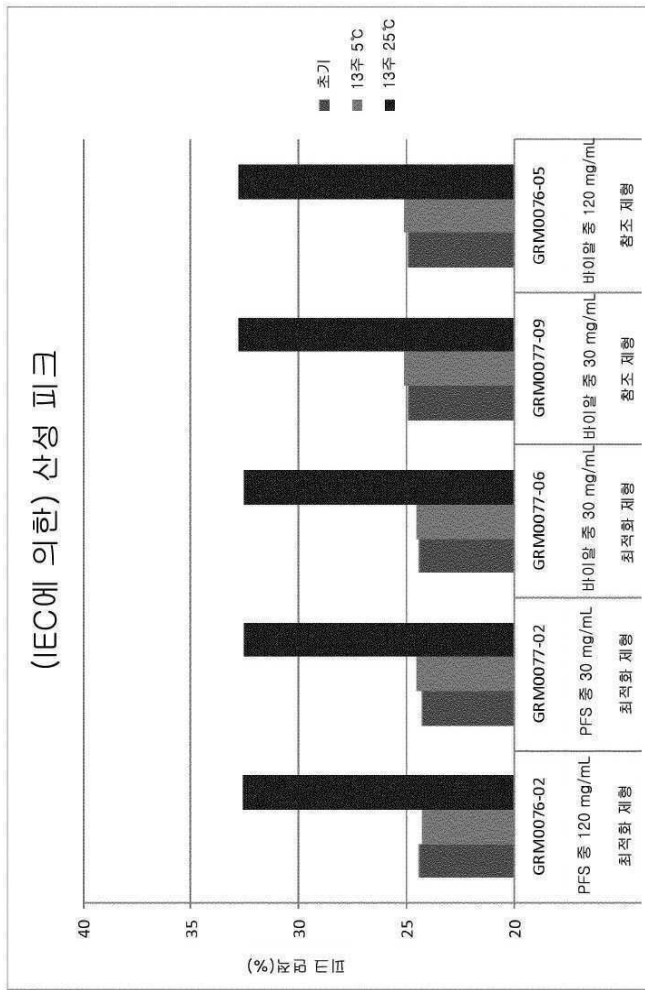
도면13



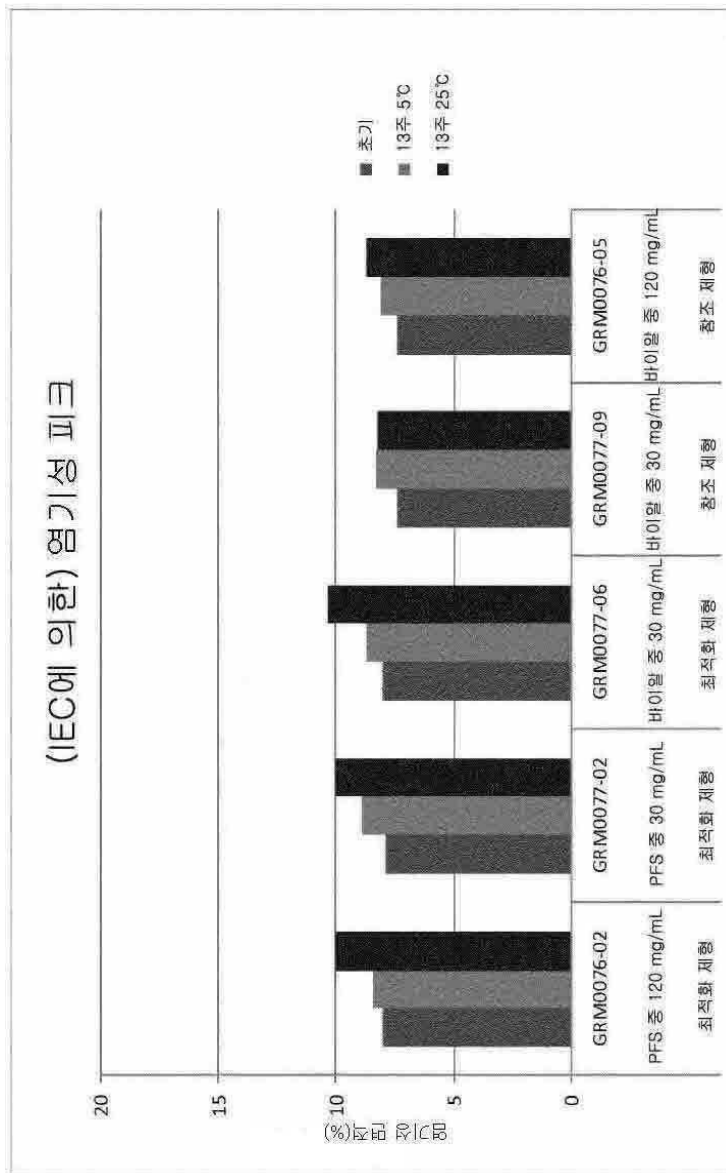
도면14a



도면14b



도면14c



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> F.Hoffmann-La Roche AG

<120> Antibody formulation

<130> P35108-WO

<150> EP18203104.7

<151> 2018-10-29

<160> 25

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> heavy chain CDR3H, <VEGF><400> 1
 Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10

<210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR2H, <VEGF><400> 2

 Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys
 1 5 10 15
 Arg

<210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> heavy chain CDR1H, <VEGF><400> 3

His Tyr Gly Met Asn
 1 5

<210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220><223> light chain CDR3L, <VEGF><400> 4

Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr
 1 5

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213>

> Artificial

<220><223> light chain CDR2L, <VEGF><400> 5

Phe Thr Ser Ser Leu His Ser

1 5

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR1L, <VEGF><400> 6

Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 7

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain variable domain VH, <VEGF><400> 7

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 Asp Phe Thr His 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 Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain variable domain VL, <VEGF><400> 8

Asp Ile Gln Leu 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
 100 105

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR3H, <ANG-2><400> 9

Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Pro Gly

1 5 10 15

Ala Phe Asp Ile
 20

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR2H, <ANG-2><400> 10

Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain CDR1H, <ANG-2><400> 11

Gly Tyr Tyr Met His

1 5

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light

chain CDR3L, <ANG-2><400> 12

Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His Trp Val

1 5 10

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR2L, <ANG-2><400> 13

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser

1 5

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain CDR1L, <ANG-2><400> 14

Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His

1 5 10

<210> 15

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> heavy chain variable domain VH, <ANG-2><400> 15

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

 85 90 95

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr

 100 105 110

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser

 115 120 125

Ser

<210> 16

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> light chain variable domain VL, <ANG-2><400> 16

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val

 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr

 35 40 45

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

<210> 17

<211> 453

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Heavy chain 1 of <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 with AAA mutations
 and P329G LALA mutations (VEGFang2-0016)

<400> 17

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 Asp Phe Thr His 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 Tyr Tyr Tyr Gly Thr 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

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

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415

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

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

Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 18

<211> 463

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Heavy chain 2 of <VEGF-ANG-2> CrossMab IgG1 with AAA mutations
 and P329G LALA mutations (VEGFang2-0016)

<400> 18

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Pro Asn Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr
 100 105 110

Pro Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala
 370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

420 425 430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

435 440 445

His Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

450 455 460

<210> 19

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Light chain 1 of <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 with AAA mutations
 and P329G LALA mutations (VEGFang2-0016)

<400> 19

Asp Ile Gln Leu 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> 20
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220
 >>223> Light chain 2 of <VEGF-ANG-2> CrossMAb IgG1 with AAA mutations
 and P329G LALA mutations (VEGFang2-0016)
 <400> 20
 Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
 35 40 45

 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 22

<211> 105

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 22

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 1 5 10 15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105

<210> 23

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

Leu Glu His Ser Leu Ser Thr Asn Lys Leu Glu Lys Gln Ile Leu Asp
 165 170 175
 Gln Thr Ser Glu Ile Asn Lys Leu Gln Asp Lys Asn Ser Phe Leu Glu
 180 185 190
 Lys Lys Val Leu Ala Met Glu Asp Lys His Ile Ile Gln Leu Gln Ser
 195 200 205
 Ile Lys Glu Glu Lys Asp Gln Leu Gln Val Leu Val Ser Lys Gln Asn
 210 215 220
 Ser Ile Ile Glu Glu Leu Glu Lys Lys Ile Val Thr Ala Thr Val Asn
 225 230 235 240
 Asn Ser Val Leu Gln Lys Gln Gln His Asp Leu Met Glu Thr Val Asn
 245 250 255
 Asn Leu Leu Thr Met Met Ser Thr Ser Asn Ser Ala Lys Asp Pro Thr
 260 265 270
 Val Ala Lys Glu Glu Gln Ile Ser Phe Arg Asp Cys Ala Glu Val Phe
 275 280 285
 Lys Ser Gly His Thr Thr Asn Gly Ile Tyr Thr Leu Thr Phe Pro Asn
 290 295 300
 Ser Thr Glu Glu Ile Lys Ala Tyr Cys Asp Met Glu Ala Gly Gly Gly
 305 310 315 320
 Gly Trp Thr Ile Ile Gln Arg Arg Glu Asp Gly Ser Val Asp Phe Gln
 325 330 335
 Arg Thr Trp Lys Glu Tyr Lys Val Gly Phe Gly Asn Pro Ser Gly Glu
 340 345 350
 Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Val Ser Gln Leu Thr Asn Gln Gln Arg
 355 360 365
 Tyr Val Leu Lys Ile His Leu Lys Asp Trp Glu Gly Asn Glu Ala Tyr
 370 375 380
 Ser Leu Tyr Glu His Phe Tyr Leu Ser Ser Glu Glu Leu Asn Tyr Arg
 385 390 395 400
 Ile His Leu Lys Gly Leu Thr Gly Thr Ala Gly Lys Ile Ser Ser Ile

