(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020 년 3 월 19 일 (19.03.2020)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2020/055123 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 9/08 (2006.01) *A61K 9/00* (2006.01)
A61K 47/10 (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2019/011762

(22) 국제출원일: 2019 년 9 월 10 일 (10.09.2019)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2018-0107588 2018 년 9 월 10 일 (10.09.2018) KR

(71) 출원인: 삼성바이오에피스 주식회사 (**SAMSUNG BIOEPIS CO., LTD.**) [KR/KR]; 21987 인천시 연수구 첨단대로 107, Incheon (KR).

(72) 발명자: 김인애 (**KIM, Inae**); 05090 서울시 광진구 뚝섬로34길 25-19 1004동 302호, Seoul (KR). 정소윤 (**JUNG, Soyun**); 21982 인천시 연수구 송도과학로27번길 55 201동 520호, Incheon (KR). 이재민 (**LEE, Jaemin**); 05536 서울시 송파구 토성로 38-6 102동 301호, Seoul (KR). 이현주 (**LEE, Hun Joo**); 21996 인천시 연수구 해돋이로6번길 7 112동 1004호, Incheon (KR). 김용국 (**KIM, Yongkook**); 22003 인천시 연수구 센트럴로 160 102동 3301호, Incheon (KR).

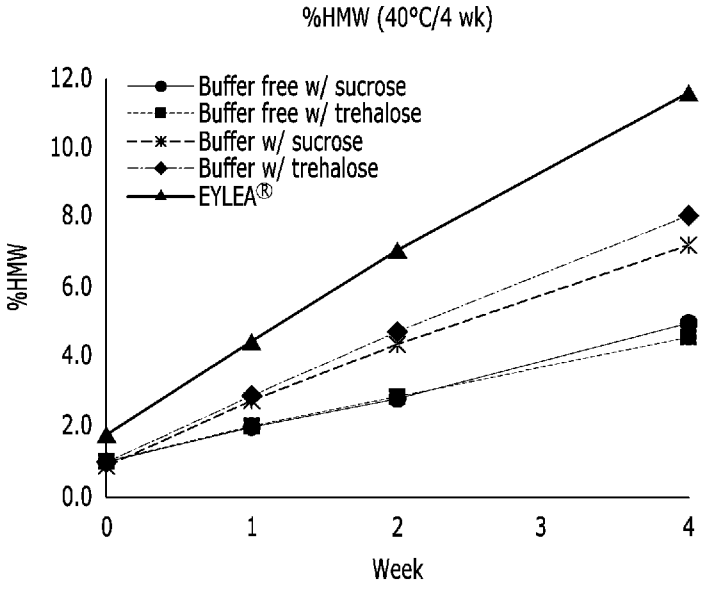
(74) 대리인: 팬코리아특허법인 (**PANKOREA PATENT AND LAW FIRM**); 06234 서울시 강남구 논현로85길 70 13F, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,

(54) **Title:** LIQUID COMPOSITION COMPRISING PROTEIN

(54) **발명의 명칭:** 단백질을 포함하는 액상 조성물



(57) **Abstract:** The present invention relates to a protein-stabilized liquid formulation and provides: a composition for protein stabilization which comprises a stabilizer and a surfactant and does not comprise a buffer; a protein liquid composition which comprises the composition for stabilization and a protein; and a method for producing a protein-stabilized liquid composition which uses the composition for stabilization.

(57) **요약서:** 단백질의 안정화된 액상 제형과 관련된 것으로, 안정화제 및 계면활성제를 포함하고 완충제를 포함하지 않는 단백질의 안정화용 조성물, 상기 안정화용 조성물 및 단백질을 포함하는 단백질의 액상 조성물, 및 상기 안정화용 조성물을 사용하는 단백질의 안정화된 액상 조성물의 제조 방법이 제공된다.

WO 2020/055123 A1

[다음 쪽 계속]

MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 단백질을 포함하는 액상 조성물

기술분야

[1] 단백질의 안정화된 액상 제형과 관련된 것으로, 안정화제 및 계면활성제를 포함하고 완충제를 포함하지 않는 단백질의 안정화용 조성물, 상기 안정화용 조성물 및 단백질을 포함하는 단백질의 액상 조성물, 및 상기 안정화용 조성물을 사용하는 단백질의 안정화된 액상 조성물의 제조 방법과 관련된 것이다.

배경기술

[2] 융합 단백질 의약품은 일반적인 단백질 의약품에 비해 분자량이 크고 복잡하여 최적 조건에서 벗어날 경우 물리화학적 불안정성이 유도되어 단백질의 응집(aggregation), 단편(fragment) 및 이성질체(isomer)가 생성될 가능성이 높으며 이는 단백질의 생리활성을 감소시킬 수 있다. 따라서 단백질 의약품은 pH 조건, buffer 종류, 단백질 농도, excipient 종류/농도 등 다양한 조건을 기반으로 최적의 제형을 개발하는 것이 중요하다.

[3] 특히, 단백질 의약품의 안정성과 활성은 pH에 의존적이기 때문에 의약품의 유효 기간 동안 목표 pH를 유지하는 것은 단백질의 안정성 및 효율성 측면에서 매우 중요하다. 따라서 단백질 의약품의 생산(제조 및 제형 포함)시에는 한 개 이상의 완충제(buffering agent)를 사용하여 목표하는 pH를 맞추는 것이 일반적이다.

[4] 단백질 의약품 조성물 내 포함되는 완충제는 다음의 요건을 만족해야 한다: 우선, 완충제는 적절하게 용해되어야 하고, 독성을 나타내거나 금속 이온과 유해한 착물을 형성하면 안 된다. 또한, 완충제는 조성물 내 타 성분과 상호 작용하여 단백질의 안정성 및 유효성에 영향을 미쳐서는 안 된다. 또한, 제제화 혹은 저장 중에 노출되는 조건에서 pH를 유지하는데 안정적이고 효과적이어야 한다.

[5] 그러나, 단백질의 안정성에 중요한 pH 유지를 위해 첨가되는 완충제의 경우 첨가 농도 및 종류에 의존적으로 이온강도(ionic strength)를 높여 오히려 단백질의 응집(aggregation) 생성을 증가시킬 수 있다는 문제점이 있다. 실제로 EYLEA®의 경우 40℃의 가혹 조건에서 단백질 응집 증가에 의한 안정화 효과가 현저히 감소되는 문제가 발생한다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[6] 이에, 본 명세서는 단백질의 안정성을 증진시키는 안정화용 조성물 및 이를 포함하는 안정한 단백질의 액상의 약학 조성물을 제공한다.

[7] 일 예는

[8] 안정화제; 및

[9] 계면활성제

[10] 를 포함하는, 단백질의 안정화용 조성물을 제공한다. 상기 안정화용 조성물은 pH 4 내지 8, 예컨대, pH 5.2 내지 7.2, pH 5.5 내지 7, pH 5.5 내지 6.6, pH 5.5 내지 6.4, pH 5.5 내지 6.2, pH 5.8 내지 7, pH 5.8 내지 6.6, pH 5.8 내지 6.4, pH 5.8 내지 6.2, pH 5.7 내지 6.7, 또는 pH 5.9 내지 6.5인 것일 수 있다. 상기 안정화용 조성물은 완충제를 포함하지 않는 것일 수 있다. 상기 계면활성제는 단백질 제형에 통상적으로 사용되는 모든 비이온성 계면활성제 중에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있다. 상기 안정화용 조성물은 수성의 조성물일 수 있다.

[11] 다른 예는 단백질; 안정화제; 및 계면활성제를 포함하는, 액상 조성물을 제공한다. 상기 액상 조성물은 pH 4 내지 8, 예컨대, pH 5.2 내지 7.2, pH 5.5 내지 7, pH 5.5 내지 6.6, pH 5.5 내지 6.4, pH 5.5 내지 6.2, pH 5.8 내지 7, pH 5.8 내지 6.6, pH 5.8 내지 6.4, pH 5.8 내지 6.2, pH 5.7 내지 6.7, 또는 pH 5.9 내지 6.5인 것일 수 있다. 상기 액상 조성물은 완충제를 포함하지 않는 것일 수 있다. 상기 액상 조성물은 수성의 액상 조성물일 수 있다.

[12] 예컨대, 상기 액상 조성물은,

[13] (1) 단백질 5 mg/ml 내지 300 mg/ml;

[14] (2) 안정화제; 및

[15] (3) 계면활성제

[16] 를 포함하고, pH 4 내지 8, 예컨대, pH 5.2 내지 7.2, pH 5.5 내지 7, pH 5.5 내지 6.6, pH 5.5 내지 6.4, pH 5.5 내지 6.2, pH 5.8 내지 7, pH 5.8 내지 6.6, pH 5.8 내지 6.4, pH 5.8 내지 6.2, pH 5.7 내지 6.7, 또는 pH 5.9 내지 6.5인 것일 수 있다. 상기 액상 조성물은 완충제를 포함하지 않는 것일 수 있다.

[17] 상기 액상 조성물은 안정화제를 전체 조성물 기준으로 0.5%(w/v) 내지 50%(w/v)의 양으로 포함할 수 있다. 상기 안정화제는 등장화제 작용을 하는 것일 수 있으며, 예컨대, 당알코올 등의 폴리올 및 당으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 일 예에서, 상기 안정화제는 트레할로오스, 수크로오스, 만니톨, 소르비톨, 자일리톨, 글루코오스, 글리세롤 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 안정화제는 염화나트륨을 포함하지 않는 것일 수 있다. 상기 액상 조성물은 수성의 액상 조성물일 수 있다.

[18] 상기 액상 조성물은 계면활성제를 전체 조성물 기준으로 0.01%(w/v) 내지 3%(w/v)의 양으로 포함할 수 있다. 상기 계면활성제는 단백질 제형에 통상적으로 사용되는 모든 계면활성제, 예컨대, 비이온성 계면활성제 중에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있다.

[19] 다른 예는 상기 액상 조성물을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 상기 약학 조성물은 상기 액상 조성물에 포함된 단백질의 활성에 대응하는 약리적 활성을 갖는다.

[20] 예컨대, 상기 액상 조성물 또는 약학적 조성물에 있어서, 상기 단백질은

분자량이 10 내지 500 kDa, 10 내지 400 kDa, 10 내지 300 kDa, 10 내지 200 kDa, 또는 10 내지 150 kDa인 것일 수 있다. 일 예에서, 상기 단백질은 VEGF 길항제일 수 있으며, 예컨대, 애플리버셉트(Aflibercept; 분자량 약 97 내지 115 kDa), 베바시주맙(Bevacizumab; 분자량 약 149 kDa), 라니비주맙(Ranibizumab; 분자량 약 48 kDa) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[21] 상기 단백질이 VEGF 길항제, 예컨대, 애플리버셉트(Aflibercept), 베바시주맙(Bevacizumab), 라니비주맙(Ranibizumab) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 경우, 상기 약제학적 조성물은 안약 조성물일 수 있으며, 구체적으로 눈의 유리체 내 투여용 주사제일 수 있다.

[22] 상기 액상 조성물 또는 약학적 조성물은 유리체 내 투여를 위한 것일 수 있다.

[23] 다른 예는 단백질을 상기한 안정화제와 혼합하는 단계를 포함하는 단백질의 안정화 방법 또는 안정화된 수성 액상 조성물의 제조 방법을 제공한다.

과제 해결 수단

[24] 본 명세서에서는, 단백질의 안정성을 증진시키기 위한 안정화용 조성물, 이를 포함하는 단백질의 안정한 액상 조성물, 및 단백질을 포함하는 안정한 액상 조성물의 제조 방법이 제공된다.

[25] 일반적으로, 단백질 의약 조성물 제조에 있어서 단백질 변성을 방지하기 위한 범위로 pH를 조절하기 위하여 완충제 사용이 불가피한데, 이 경우 완충제에 의한 이온강도(ionic strength) 효과로 인하여 단백질 응집이 일어나고, 단백질의 제형 안정성이 저해된다. 특히, 안구 투여(예컨대, 유리체 내 투여)를 위한 단백질 제형의 경우, 단백질 응집에 의하여 생성된 작은 입자들로 인하여 안구 내 압력이 증가하고 염증 발생 위험이 증가할 가능성이 있다. 이에, 본 발명은 완충제에 의한 단백질의 응집 및 물리화학적 불안정성을 최소화하기 위해, 완충제를 포함하지 않으면서 적정 pH가 유지되고 단백질의 제형 안정성이 우수한 단백질의 안정화용 제형을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

[26] 일 예는

[27] 안정화제; 및

[28] 계면활성제

[29] 를 포함하는, 단백질의 안정화용 조성물을 제공한다. 상기 안정화용 조성물은 pH 4 내지 8, 예컨대, pH 5.2 내지 7.2, pH 5.5 내지 7, pH 5.5 내지 6.6, pH 5.5 내지 6.4, pH 5.5 내지 6.2, pH 5.8 내지 7, pH 5.8 내지 6.6, pH 5.8 내지 6.4, pH 5.8 내지 6.2, pH 5.7 내지 6.7, 또는 pH 5.9 내지 6.5인 것일 수 있다. 상기 안정화용 조성물은 완충제를 포함하지 않는 것일 수 있다. 상기 계면활성제는 단백질 제형에 통상적으로 사용되는 모든 비이온성 계면활성제 중에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있다. 상기 안정화용 조성물은 수성의 조성물일 수 있다.

[30] 다른 예는 단백질; 안정화제; 및 계면활성제를 포함하는, 액상 조성물을 제공한다. 상기 액상 조성물은 pH 4 내지 8, 예컨대, pH 5.2 내지 7.2, pH 5.5 내지 7, pH 5.5 내지 6.6, pH 5.5 내지 6.4, pH 5.5 내지 6.2, pH 5.8 내지 7, pH 5.8 내지 6.6, pH 5.8 내지 6.4, pH 5.8 내지 6.2, pH 5.7 내지 6.7, 또는 pH 5.9 내지 6.5인 것일 수 있다. 상기 액상 조성물은 완충제를 포함하지 않는 것일 수 있다. 상기 액상 조성물은 수성의 조성물일 수 있다.

[31] 본 명세서에서 제공되는 단백질의 액상 조성물은, 완충제를 포함하지 않으면서도, 단백질 안정성에 영향을 미치는 중요한 인자 중 하나인 pH를 적정 범위로 유지시킬 수 있고, 조성물 내 단백질이 안정성이 우수하다는 특징을 가지며(예컨대, 단백질의 %HMW, %charge variant 및/또는 %main 등의 단백질 안정성 표시 인자가 우수함), 이러한 pH 유지 및/또는 우수한 단백질 안정성의 특성은 반복적으로 재현 가능한 것을 특징으로 한다.

[32] 예컨대, 상기 액상 조성물은,

[33] (1) 단백질 5 mg/ml 내지 300 mg/ml;

[34] (2) 안정화제; 및

[35] (3) 계면활성제

[36] 를 포함하고, pH 4 내지 8, 예컨대, pH 5.2 내지 7.2, pH 5.5 내지 7, pH 5.5 내지 6.6, pH 5.5 내지 6.4, pH 5.5 내지 6.2, pH 5.8 내지 7, pH 5.8 내지 6.6, pH 5.8 내지 6.4, pH 5.8 내지 6.2, pH 5.7 내지 6.7, 또는 pH 5.9 내지 6.5인 것일 수 있다. 상기 액상 조성물은 완충제를 포함하지 않는 것일 수 있다.

[37] 상기 액상 조성물 내의 단백질 함량은 300 mg/ml 이하, 250 mg/ml 이하, 200 mg/ml 이하, 150 mg/ml 이하, 125 mg/ml 이하, 100 mg/ml 이하, 90 mg/ml 이하, 80 mg/ml 이하, 70 mg/ml 이하, 60 mg/ml 이하, 또는 50 mg/ml 이하일 수 있으며, 예컨대, 5 mg/ml 내지 300 mg/ml, 5 mg/ml 내지 250 mg/ml, 5 mg/ml 내지 200 mg/ml, 5 mg/ml 내지 150 mg/ml, 5 mg/ml 내지 125 mg/ml, 5 mg/ml 내지 100 mg/ml, 5 mg/ml 내지 90 mg/ml, 5 mg/ml 내지 80 mg/ml, 5 mg/ml 내지 70 mg/ml, 5 mg/ml 내지 60 mg/ml, 5 mg/ml 내지 50 mg/ml, 10 mg/ml 내지 300 mg/ml, 10 mg/ml 내지 250 mg/ml, 10 mg/ml 내지 200 mg/ml, 10 mg/ml 내지 150 mg/ml, 10 mg/ml 내지 125 mg/ml, 10 mg/ml 내지 100 mg/ml, 10 mg/ml 내지 90 mg/ml, 10 mg/ml 내지 80 mg/ml, 10 mg/ml 내지 70 mg/ml, 10 mg/ml 내지 60 mg/ml, 10 mg/ml 내지 50 mg/ml, 20 mg/ml 내지 300 mg/ml, 20 mg/ml 내지 250 mg/ml, 20 mg/ml 내지 200 mg/ml, 20 mg/ml 내지 150 mg/ml, 20 mg/ml 내지 125 mg/ml, 20 mg/ml 내지 100 mg/ml, 20 mg/ml 내지 90 mg/ml, 20 mg/ml 내지 80 mg/ml, 20 mg/ml 내지 70 mg/ml, 20 mg/ml 내지 60 mg/ml, 20 mg/ml 내지 50 mg/ml, 30 mg/ml 내지 300 mg/ml, 30 mg/ml 내지 250 mg/ml, 30 mg/ml 내지 200 mg/ml, 30 mg/ml 내지 150 mg/ml, 30 mg/ml 내지 125 mg/ml, 30 mg/ml 내지 100 mg/ml, 30 mg/ml 내지 90 mg/ml, 30 mg/ml 내지 80 mg/ml, 30 mg/ml 내지 70 mg/ml, 30 mg/ml 내지 60 mg/ml, 또는 30 mg/ml 내지 50 mg/ml일 수 있다.

[38] 또는, 일 구체예에서, 상기 액상 조성물 내의 단백질 함량은 5 mg/ml 내지 50 mg/ml, 5 mg/ml 내지 49 mg/ml, 5 mg/ml 내지 48 mg/ml, 5 mg/ml 내지 47 mg/ml, 5 mg/ml 내지 46 mg/ml, 5 mg/ml 내지 45 mg/ml, 5 mg/ml 내지 44 mg/ml, 5 mg/ml 내지 43 mg/ml, 5 mg/ml 내지 42 mg/ml, 5 mg/ml 내지 41 mg/ml, 10 mg/ml 내지 50 mg/ml, 10 mg/ml 내지 49 mg/ml, 10 mg/ml 내지 48 mg/ml, 10 mg/ml 내지 47 mg/ml, 10 mg/ml 내지 46 mg/ml, 10 mg/ml 내지 45 mg/ml, 10 mg/ml 내지 44 mg/ml, 10 mg/ml 내지 43 mg/ml, 10 mg/ml 내지 42 mg/ml, 10 mg/ml 내지 41 mg/ml, 20 mg/ml 내지 50 mg/ml, 20 mg/ml 내지 49 mg/ml, 20 mg/ml 내지 48 mg/ml, 20 mg/ml 내지 47 mg/ml, 20 mg/ml 내지 46 mg/ml, 20 mg/ml 내지 45 mg/ml, 20 mg/ml 내지 44 mg/ml, 20 mg/ml 내지 43 mg/ml, 20 mg/ml 내지 42 mg/ml, 20 mg/ml 내지 41 mg/ml, 30 mg/ml 내지 50 mg/ml, 30 mg/ml 내지 49 mg/ml, 30 mg/ml 내지 48 mg/ml, 30 mg/ml 내지 47 mg/ml, 30 mg/ml 내지 46 mg/ml, 30 mg/ml 내지 45 mg/ml, 30 mg/ml 내지 44 mg/ml, 30 mg/ml 내지 43 mg/ml, 30 mg/ml 내지 42 mg/ml, 또는 30 mg/ml 내지 41 mg/ml일 수 있다.

[39] 일 구체예에서, 상기 액상 조성물은 pH 4 내지 8, 예컨대, pH 5.2 내지 7.5, pH 5.2 내지 7.2, pH 5.2 내지 7, pH 5.2 내지 6.8, pH 5.2 내지 6.6, pH 5.2 내지 6.5, pH 5.2 내지 6.4, pH 5.2 내지 6.2, pH 5.5 내지 7.5, pH 5.5 내지 7.2, pH 5.5 내지 7, pH 5.5 내지 6.8, pH 5.5 내지 6.7, pH 5.5 내지 6.6, pH 5.5 내지 6.5, pH 5.5 내지 6.4, pH 5.5 내지 6.2, pH 5.7 내지 7.5, pH 5.7 내지 7.2, pH 5.7 내지 7, pH 5.7 내지 6.8, pH 5.7 내지 6.7, pH 5.7 내지 6.6, pH 5.7 내지 6.5, pH 5.7 내지 6.4, pH 5.7 내지 6.2, pH 5.8 내지 7.5, pH 5.8 내지 7.2, pH 5.8 내지 7, pH 5.8 내지 6.8, pH 5.8 내지 6.7, pH 5.8 내지 6.6, pH 5.8 내지 6.5, pH 5.8 내지 6.4, pH 5.8 내지 6.2, pH 5.9 내지 7.5, pH 5.9 내지 7.2, pH 5.9 내지 7, pH 5.9 내지 6.8, pH 5.9 내지 6.7, pH 5.9 내지 6.6, pH 5.9 내지 6.5, pH 5.9 내지 6.4, pH 5.9 내지 6.3, pH 5.9 내지 6.2, 또는 pH 6.2인 것일 수 있다.

[40] 본원 명세서에서 제공되는 액상 조성물은 단백질의 응집을 유발하는 완충제를 포함하지 않아서 단백질의 안정성이 증진된 것을 특징으로 한다. 상기 액상 조성물의 구성 성분에서 제외된 완충제는 통상적으로 사용되는 buffering capacity를 갖는 완충제들 중에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 예컨대, 상기 완충제는 (1) 인산, 아세트산, 시트르산, 숙신산, 탄산 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 산; (2) 상기 산들의 약학적으로 허용 가능한 염(예컨대, 나트륨염, 칼륨염 등), (3) 히스티딘, 아스파르트산, 글루탐산 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 아미노산, 및 (4) 상기 아미노산의 약학적으로 허용 가능한 염(예컨대, 히스티딘-HCl, 히스티딘-아세테이트 등과 같은 염산염 또는 아세테이트 등) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있다. 따라서, 상기 액상 조성물은 인산, 아세트산, 시트르산, 숙신산, 탄산, 상기 산(인산, 아세트산, 시트르산, 숙신산, 탄산)들의 약학적으로 허용 가능한 염(예컨대, 나트륨염, 칼륨염 등), 히스티딘, 아스파르트산, 글루탐산, 상기

아미노산(히스티딘, 아스파르트산, 글루탐산)들의 약학적으로 허용 가능한 염(예컨대, 히스티딘-HCl, 히스티딘-아세테이트 등) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하지 않는 것일 수 있다.

[41] 상기 액상 조성물은 안정화제를 전체 조성물 기준으로 0.5%(w/v) 내지 50%(w/v)의 양으로 포함할 수 있다. 상기 안정화제는 등장화제 작용을 하는 것일 수 있으며, 예컨대, 당알코올 등의 폴리올 및 당으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 일 예에서, 상기 안정화제는 트레할로오스, 수크로오스, 만니톨, 소르비톨, 자일리톨, 글루코오스, 글리세롤 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 예컨대, 상기 안정화제는 1 내지 20%(w/v), 1 내지 15%(w/v), 1 내지 10%(w/v), 5 내지 20%(w/v), 5 내지 15%(w/v), 5 내지 10%(w/v), 5.5 내지 20%(w/v), 5.5 내지 15%(w/v), 5.5 내지 10%(w/v), 6 내지 20%(w/v), 6 내지 15%(w/v), 6 내지 10%(w/v), 7 내지 20%(w/v), 7 내지 15%(w/v), 7 내지 10%(w/v), 7.8 내지 20%(w/v), 7.8 내지 15%(w/v), 7.8 내지 10%(w/v), 7.8 내지 8.2%(w/v), 또는 8%(w/v)의 트레할로오스, 1 내지 20%(w/v), 1 내지 15%(w/v), 1 내지 10%(w/v), 5 내지 20%(w/v), 5 내지 15%(w/v), 5 내지 10%(w/v), 5.5 내지 20%(w/v), 5.5 내지 15%(w/v), 5.5 내지 10%(w/v), 6 내지 20%(w/v), 6 내지 15%(w/v), 6 내지 10%(w/v), 7 내지 20%(w/v), 7 내지 15%(w/v), 7 내지 10%(w/v), 7.8 내지 20%(w/v), 7.8 내지 15%(w/v), 7.8 내지 10%(w/v), 7.8 내지 8.2%(w/v), 또는 8%(w/v)의 수크로오스, 및 0.5 내지 10%(w/v), 0.5 내지 7.5%(w/v), 0.5 내지 5%(w/v), 1 내지 10%(w/v), 1 내지 7.5%(w/v), 1 내지 5%(w/v), 3 내지 10%(w/v), 3 내지 7.5%(w/v), 3 내지 5%(w/v), 4 내지 5%(w/v), 또는 4.5%(w/v)의 만니톨로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있다.

[42] 일 예에서, 상기 안정화제는 염화나트륨을 포함하지 않는 것일 수 있다. 이와 같이, 본 명세서에서 제공되는 단백질의 액상 조성물은 안정화제로서 염화나트륨을 포함하지 않음으로써, 단백질의 안정성이 보다 증진(예컨대, Δ%HMW 감소)된 것일 수 있다.

[43] 일 예에서, 상기 액상 조성물은 계면활성제를, 전체 조성물 기준으로, 0.001 내지 3 %(w/v), 0.001 내지 2 %(w/v), 0.001 내지 1 %(w/v), 0.001 내지 0.5 %(w/v), 0.001 내지 0.1 %(w/v), 0.001 내지 0.05 %(w/v), 0.01 내지 3 %(w/v), 0.01 내지 2 %(w/v), 0.01 내지 1 %(w/v), 0.01 내지 0.5 %(w/v), 0.01 내지 0.1 %(w/v), 0.01 내지 0.05 %(w/v), 또는 0.03 %(w/v)의 양으로 포함할 수 있다. 상기 계면활성제는 단백질을 액상 조성물 매질에 고르게 분산시킬 수 있는 약학적으로 허용 가능한 모든 계면활성제들로부터 선택된 것일 수 있다. 상기 계면활성제는 비이온성 계면활성제일 수 있으며, 예컨대, 폴리소르베이트류(예컨대, 폴리소르베이트 20(폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노라우레이트), 폴리소르베이트 40(폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노팔미테이트), 폴리소르베이트 60(폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노스테아레이트), 폴리소르베이트 80(폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노올레이트); 상기 폴리옥시에틸렌 뒤의

수치(20)은 옥시에틸렌기(-(CH2CH2O)-)의 총 개수를 의미함), 폴록사머(PEO-PPO-PEO 공중합체; PEO: poly(ethylene oxide), PPO: poly(propylene oxide)), 폴리에틸렌-폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시에틸렌 화합물(예컨대, 폴리옥시에틸렌-스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르(알킬: C1-C30), 폴리옥시에틸렌 모노라이릴 에테르, 알킬페닐 폴리옥시에틸렌 코폴리머(알킬: C1-C30) 등), 소듐 도데실 설페이트(sodium dodecyl sulphate, SDS) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 예컨대, 상기 계면활성제는 폴리소르베이트류(예컨대, 폴리소르베이트 20)일 수 있다.

[44] 상기 액상 조성물은 앞서 설명된 함량의 단백질, 안정화제, 및 계면활성제와, 잔량의 수성 매질(예컨대, 물(정제수), 생리식염수, 주사 용수 등)을 포함하는 것일 수 있다.

[45] 본 명세서에서 제공되는 액상 조성물은 생체와 등장성인 것일 수 있다. 예컨대, 상기 액상 조성물은 삼투압이 약 200 mOsm/kg 내지 약 400 mOsm/kg, 약 200 mOsm/kg 내지 약 350 mOsm/kg, 약 200 mOsm/kg 내지 약 300 mOsm/kg, 약 250 mOsm/kg 내지 약 400 mOsm/kg, 약 250 mOsm/kg 내지 약 350 mOsm/kg, 또는 약 250 mOsm/kg 내지 약 300 mOsm/kg일 수 있으며, 예컨대, 약 270 mOsm/kg 내지 약 290 mOsm/kg인 것일 수 있다. 이와 같은 삼투압은 상기 안정화제에 의하여 조절될 수 있다.

[46] 본 명세서에서 제공되는 액상 조성물은 전기 전도도가 약 0 mS/cm 이상(또는 초과), 약 0.0001 mS/cm 이상, 또는 약 0.001 mS/cm 이상, 예컨대, 약 0 mS/cm 내지 약 10 mS/cm, 약 0 mS/cm 내지 약 7 mS/cm, 0 mS/cm 내지 약 5 mS/cm, 약 0 mS/cm 내지 약 2.5 mS/cm, 약 0 mS/cm 내지 약 1 mS/cm, 약 0 mS/cm 내지 약 0.5 mS/cm, 약 0 mS/cm 내지 약 0.1 mS/cm, 약 0 mS/cm 내지 약 0.05 mS/cm, 약 0 mS/cm 초과 약 10 mS/cm 이하, 약 0 mS/cm 초과 약 7 mS/cm 이하, 0 mS/cm 초과 약 5 mS/cm 이하, 약 0 mS/cm 초과 약 2.5 mS/cm 이하, 약 0 mS/cm 초과 약 1 mS/cm 이하, 약 0 mS/cm 초과 약 0.5 mS/cm 이하, 약 0 mS/cm 초과 약 0.1 mS/cm 이하, 약 0 mS/cm 초과 약 0.05 mS/cm 이하, 약 0.0001 mS/cm 내지 약 10 mS/cm, 약 0.0001 mS/cm 내지 약 7 mS/cm, 0.0001 mS/cm 내지 약 5 mS/cm, 약 0.0001 mS/cm 내지 약 2.5 mS/cm, 약 0.0001 mS/cm 내지 약 1 mS/cm, 약 0.0001 mS/cm 내지 약 0.5 mS/cm, 약 0.0001 mS/cm 내지 약 0.1 mS/cm, 약 0.0001 mS/cm 내지 약 0.05 mS/cm, 약 0.001 mS/cm 내지 약 10 mS/cm, 약 0.001 mS/cm 내지 약 7 mS/cm, 0.001 mS/cm 내지 약 5 mS/cm, 약 0.001 mS/cm 내지 약 2.5 mS/cm, 0.001 mS/cm 내지 약 1 mS/cm, 약 0.001 mS/cm 내지 약 0.5 mS/cm, 약 0.001 mS/cm 내지 약 0.1 mS/cm, 또는 약 0.001 mS/cm 내지 약 0.05 mS/cm인 것일 수 있다.

[47] 본 명세서에서 제공되는 액상 조성물에서, 단백질은 단백질 약물, 예컨대, 분자량이 10 내지 500 kDa, 10 내지 400 kDa, 10 내지 300 kDa, 10 내지 200 kDa, 또는 10 내지 150 kDa인 단백질(예컨대, 융합 단백질)일 수 있다. 일 예에서, 상기

단백질은 VEGF(vascular endothelial growth factor) 길항제, 예컨대, 인간 VEGF 수용체 1 및 VEGF 수용체 2의 세포 외 도메인으로부터 유래하는 VEGF 결합 부위 및 인간 IgG1의 Fc 부위가 융합된 VEGF-특이적 융합 단백질일 수 있다. 일 구체예에서 상기 VEGF-특이적 융합 단백질은 인간 VEGF 수용체 1(Flt1)의 면역글로불린-유사(Ig) 도메인 2 및 인간 VEGF 수용체 2(Flt1 또는 Flt4)의 Ig 도메인 3을 필수적으로 포함하는 부위와 인간 IgG1의 Fc 부위가 융합된 융합 단백질일 수 있으며, 예컨대, 다음의 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 애플리버셉트(Aflibercept)일 수 있다.

[48] 애플리버셉트 아미노산 서열(서열번호 1)

[49] SDTGRPFVEM YSEIPEIIHM TEGRELVIPC RVTSPNITVT LKKFPLDTLI PDGKRIIWDS

[50] RKGFIISNAT YKEIGLLTCE ATVNGHLYKT NYLTHRQTNT IIDVVLSPSH GIELSVGEKL

[51] VLNCTARTEL NVGIDFNWEY PSSKHQHKKL VNRDLKTQSG SEMKKFLSTL TIDGVTRSDQ

[52] GLYTCAASSG LMTKKNSTFV RVHEKDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR

[53] TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN

[54] GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS

[55] DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH

[56] YTQKSLSLSP G

[57] (Disulfide bridge: 30-79; 124-185; 246-306; 352-410, Dimer: 211; 214)

[58] 상기 액상 조성물에 포함되는 단백질은 재조합적 또는 합성적으로 생산된 것일 수 있다

[59] 본 명세서에서 제공되는 액상 조성물은 약 40℃의 고온에서 4주일 이상 안정하게 유지되거나, 및/또는 1 cycle 이상(예컨대, 2 cycle 이상, 3 cycle 이상, 4 cycle 이상, 또는 5 cycle 이상)의 동결/해동 조건, 진동 조건(100rpm 이상(예컨대, 200rpm 이상, 300rpm 이상, 또는 400rpm 이상) 및 24시간 이상(예컨대, 36시간 이상, 48시간 이상, 60 시간 이상, 또는 72 시간 이상)) 등의 가혹 조건 하에서도 안정하게 유지된다.

[60] 상기 용어 "안정성이 우수하다" 또는 "안정하게 유지된다" 함은 보관 시에 조성물 내의 단백질의 구조, 및/또는 물리적, 화학적, 및/또는 생물학적 특성이 유지됨을 의미할 수 있다(예컨대, 보관 중의 낮은 단백질 중합체 형성률, 낮은 단백질 응집률, 낮은 단백질 분해율, 및/또는 낮은 변성률 등). 단백질의 안정성을 측정하는 다양한 분석 기술이 관련 기술분야에 잘 알려져 있다.

[61] 예컨대, 본 명세서에서 제공되는 액상 조성물은 단백질(예컨대, 융합 단백질) 함량이 40 mg/ml인 경우(pH 6.2), 통상적인 SEC(size exclusion chromatography)로 40℃에서 4주일 동안 보관 시에 측정된 단백질 중합체 형성률 또는 응집률(High Molecular Weight %(w/v); %HMW)의 변화량(보관 4주차의 %HMW - 0주차(보관 개시 시(initial)의 %HMW)이 약 9% 미만, 예컨대, 약 8% 이하, 약 7% 이하, 약 6% 이하, 약 5.5% 이하, 약 5% 이하, 약 4.5% 이하, 또는 약 4% 이하 (e.g., 약 0.1 내지 약 8%, 약 0.5 내지 약 8%, 약 1 내지 약 8%, 약 1.5 내지 약 8%, 약 2 내지 약 8%, 약 2.5 내지 약 8%, 약 3 내지 약 8%, 약 3.5 내지 약 8%, 약 0.1% 내지 약 7%, 약 0.5% 내지 약 7%, 약 1% 내지 약 7%, 약 1.5% 내지 약 7%, 약 2% 내지 약 7%, 약 2.5% 내지 약 7%, 약 3 내지 약 7%, 약 3.5 내지 약 7%, 약 0.1% 내지 약 6%, 약 0.5% 내지 약 6%, 약 1% 내지 약 6%, 약 1.5% 내지 약 6%, 약 2% 내지 약 6%, 약 2.5% 내지 약 6%, 약 3 내지 약 6%, 약 3.5 내지 약 6%, 약 0.1% 내지 약 5.5%, 약 0.5% 내지 약 5.5%, 약 1% 내지 약 5.5%, 약 1.5% 내지 약 5.5%, 약 2% 내지 약 5.5%, 약 2.5% 내지 약 5.5%, 약 3 내지 약 5.5%, 약 3.5 내지 약 5.5%, 약 0.1% 내지 약 5%, 약 0.5% 내지 약 5%, 약 1% 내지 약 5%, 약 1.5% 내지 약 5%, 약 2% 내지 약 5%, 약 2.5% 내지 약 5%, 약 3 내지 약 5%, 약 3.5 내지 약 5%, 약 0.1% 내지 약 4.5%, 약 0.5% 내지 약 4.5%, 약 1% 내지 약 4.5%, 약 1.5% 내지 약 4.5%, 약 2% 내지 약 4.5%, 약 2.5% 내지 약 4.5%, 약 3 내지 약 4.5%, 약 3.5 내지 약 4.5%, 약 0.1% 내지 약 4%, 약 0.5% 내지 약 4%, 약 1% 내지 약 4%, 약 1.5% 내지 약 4%, 약 2% 내지 약 4%, 약 2.5% 내지 약 4%, 약 3 내지 약 4%, 또는 약 3.5 내지 약 4%)인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[62] 다른 예에서, 본 명세서에서 제공되는 액상 조성물은 단백질(예컨대, 융합 단백질) 함량이 40 mg/ml인 경우(pH 6.2), freeze/thaw(5 cycles; 각 cycle: -70℃에서 18시간 이상 냉동 + 상온(25℃)에서 1-2시간 해동) 수행 후 통상적인 SEC(size exclusion chromatography)로 측정된 단백질 중합체 형성률 또는 응집률(High Molecular Weight %(w/v); %HMW)의 변화량(5 cycles 수행 후 %HMW - 개시 시(initial)의 %HMW)이 약 0.15% 미만, 예컨대, 약 0.13% 이하, 약 0.1% 이하, 약 0.08% 이하, 약 0.06% 이하, 약 0.05% 이하, 약 0.04% 이하, 또는 약 0.03% 이하 (하한값은 약 0.001%, 약 0.005%, 또는 약 0.01일 수 있음)인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[63] 다른 예에서, 본 명세서에서 제공되는 액상 조성물이 애플리버셉트 40 mg/ml을 포함하는 경우(pH 6.2), 40℃에서 4주일 동안 보관 시 측정된 애플리버셉트의 VEGF에 대한 %RPA(Relative Potency Activity) 변화량(4주차 %RPA - 개시 시(initial) %RPA)이 약 -10% 내지 약 10%, 약 -10 내지 약 7%, 약 -10% 내지 약 5%, -10% 내지 약 4%, -10% 내지 약 3%, 약 -7% 내지 약 10%, 약 -7 내지 약 7%, 약 -7% 내지 약 5%, -7% 내지 약 4%, -7% 내지 약 3%, 약 -6% 내지 약 10%, 약 -6 내지 약 7%, 약 -6% 내지 약 5%, -6% 내지 약 4%, -6% 내지 약 3%, 약 -5% 내지 약 10%, 약 -5 내지 약 7%, 약 -5% 내지 약 5%, -5% 내지 약 4%, 또는 -5% 내지 약

3%인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[64] 다른 예는 상기 액상 조성물을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 상기 약학적 조성물은 안과 질환의 예방 또는 치료 효과를 갖는 것일 수 있다. 따라서, 일 예는 상기 액상 조성물을 포함하는 안과 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 상기 안과 질환은 비정상적인 혈관생성에 의한 모든 안과 질환들 중에서 선택된 것일 수 있으며, 예컨대, 망막 정맥 폐쇄(망막 정맥 폐쇄성 황반 부종), 당뇨병성 황반 부종, 당뇨병성 망막병증, 맥락막 혈관신생, 연령-관련 황반 변성, 망막 부종, 안허혈증후군(망막허혈증후군) 등으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다. 상기 안과 질환은 인간 등의 포유 동물에서 발생하는 질환일 수 있다.

[65] 다른 예는 상기 액상 조성물을 안과 질환의 예방 또는 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 안과 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다. 상기 투여하는 단계는 안구 내 투여(주입), 예컨대, 유리체 내 투여(주입)에 의한 것일 수 있다. 상기 대상은 인간을 포함하는 포유 동물 중에서 선택될 수 있다. 상기 액상 조성물의 조성, 액상 조성물에 포함된 단백질(예컨대, VEGF 길항제)의 종류, 안과 질환 등은 앞서 설명한 바와 같다. 다른 예는 상기 액상 조성물을 안구 내 또는 유리체 내 투여하는 단계를 포함하는, 상기 액상 조성물 또는 상기 액상 조성물에 포함된 단백질(예컨대, VEGF 길항제)의 안구 내 또는 유리체 내 전달 방법, 또는 상기 액상 조성물 또는 상기 액상 조성물에 포함된 단백질(예컨대, VEGF 길항제)의 안구 내 또는 유리체 내 전달 강화 방법을 제공한다.

[66] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체, 희석제, 및/또는 부형제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용되는 담체는 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알지네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물(예컨대, 정제수), 생리식염수, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[67] 상기 액상 조성물 또는 약학적 조성물은 인간 등의 포유 동물에 투여하기 위한 것일 수 있다.

[68] 상기 액상 조성물 또는 약학적 조성물은 경구 또는 비경구적 경로로 투여되는 것일 수 있다. 비경구 투여(예컨대, 주사)인 경우에는 안구 내 투여(예컨대, 유리체 내 투여), 정맥 내 투여, 피하 투여, 근육 투여, 복강 내 투여, 내피 투여, 국소 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여, 직장 내 투여, 또는 종양 내 투여 등일 수 있으며, 예컨대, 유리체 내 투여로 투여할 수 있다.

[69] 일 구체예에서, 상기 액상 조성물 또는 약학 조성물은 앞서 설명한 VEGF 길항제를 포함하는 안약 조성물일 수 있고, 이 경우, 눈의 유리체 내 투여되는

주사제일 수 있다.

[70] 다른 예는 단백질을 상기한 안정화용 조성물과 혼합하는 단계를 포함하는 단백질의 안정화 방법 또는 안정화된 액상 조성물의 제조 방법을 제공한다.

[71] 일 구체예에서, 상기 방법은,

[72] (1) 단백질;

[73] (2) 안정화제; 및

[74] (3) 계면활성제

[75] 를 혼합하는 단계를 포함하는, 단백질의 안정화 방법 또는 안정화된 수성 액상 조성물의 제조 방법이 제공된다. 상기 방법은 완충제를 혼합하는 단계를 수행하지 않는 것을 특징으로 한다.

[76] 단백질의 안정화 방법 또는 안정화된 수성 액상 조성물의 제조 방법에 사용되는 각 성분의 종류 및 함량의 구체적 설명은 앞서 기재한 바와 같다.

발명의 효과

[77] 완충제를 포함하지 않는 단백질의 액상 제형을 제공함으로써, 단백질의 응집(aggregation), 단편화(degradation), 이성질체화(isomerization) 등으로 인한 생리 활성의 저하 억제 효과가 기존의 완충제를 포함하는 제형 및 시판 제형(예컨대, EYLEA®) 대비 동등 이상으로 우수하여 해당 단백질을 가혹 조건에서도 비교적 장기간 안정하게 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[78] 도 1은 실시예 3에서 측정된 시험 제형의 40℃에서 4주 보관시의 4 주 동안의 %HMW(High-molecular weight %) 변화율(Δ%HMW)을 보여주는 그래프이다.

[79] 도 2는 실시예 4에서 측정된 시험 제형의 40℃에서 4주 보관시의 4 주 동안의 %Acidic 변화율(Δ%Acidic)을 보여주는 그래프이다.

[80] 도 3a 및 3b는 실시예 4에서 측정된 시험 제형의 40℃에서 4주 보관시의 4 주 동안의 %Main 변화율(Δ%Main1 및 %Main2)을 보여주는 그래프이다.

[81] 도 4는 실시예 5에서 측정된 시험 제형의 40℃에서 4주 보관시의 4주 동안의 %RPA(Relative Potency Activity) 변화율(Δ%RPA)을 보여주는 그래프이다.

[82] 도 5는 실시예 6에서 측정된 시험 제형의 Freeze/thaw(5 cycles) 조건 하에서의 %HMW(High-molecular weight %) 변화율(Δ%HMW)을 보여주는 그래프이다.

[83] 도 6은 실시예 6에서 측정된 시험 제형의 Agitation Stress(400 rpm, 72 hours) 조건 하에서의 %HMW(High-molecular weight %) 변화율(Δ%HMW)을 보여주는 그래프이다.

발명의 실시를 위한 형태

[84] 이하 본 발명을 실시예 및 시험예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 이들 실시예 및 시험예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명을 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[85]

[86] **실시예** 1. 액상 조성물의 제조

[87] 단백질 약물로서 VEGF 길항제 작용을 하는 융합 단백질인 애플리버셉트(Aflibercept; 인간 VEGF 수용체 1 및 2의 세포외 도메인 유래의 VEGF 결합 부위와 인간 IgG1의 Fc 부위와의 융합 단백질; CAS Number: 862111-32-8; 서열번호 1)를 사용하여, 하기의 표 1의 조성으로 단백질 약물의 액상 제형을 제조하였다:

[88] [Table 1]

제형	단백질 약물 농도	pH	완충제	안정화제	계면활성제
제형 1(Buffer-freew/ sucrose)	40 mg/ml	6.2	불포함	8%(w/v) Sucrose	0.03%(w/v) PS20
제형 2(Buffer-free w/ trehalose)	40 mg/ml	6.2	불포함	8%(w/v) Trehalose	0.03%(w/v) PS20
제형 3(Buffer w/ sucrose)	40 mg/ml	6.2	10 mM 인산나트륨	8%(w/v) Sucrose	0.03%(w/v) PS20
제형 4(Buffer w/ trehalose)	40 mg/ml	6.2	10 mM 인산나트륨	8%(w/v) Trehalose	0.03%(w/v) PS20
EYLEA®(대조군)	40 mg/ml	6.2	10 mM 인산나트륨	5%(w/v) Sucrose, 40 mM NaCl	0.03%(w/v) PS20

[89] (PS20: 폴리소르베이트 20)

[90] **실시예** 2. pH 측정

[91] 실시예 1에서 제조된 완충제 불포함 액상 제형의 pH 측면 안정성을 확인하기 위해, 40℃/4주 조건에서 보관하면서 pH를 측정 후 재현성 확인을 위해 동일한 액상 제형 2종을 추가 제조하여 40℃/4주, F/T 5 cycling 조건 및 교반(agitation) 조건에서 pH를 추가 측정하였다. 상기 측정된 pH(initial pH, 4주차 pH, F/T 5 cycle 후 pH 및 교반 후 pH, 및 pH(해당 조건 pH - initial pH)를 표 2에 나타내었다

[92] [Table 2]

	pH				pH		
제형	Initial	40˚C/4 Wk	F/T 5 Cycles	Agitation	40˚C/4 Wk	F/T 5 Cycles	Agitation
제형 1(N=3)	6.0[SD:0.04]	6.1[SD:0.09]	N/A	N/A	0.1[SD:0.097]	N/A	N/A
제형 2(N=3)	5.9[SD:0.02]	6.0[SD:0.03]	N/A	N/A	0.0[SD:0.04]	N/A	N/A
추가 제형 1(N=3)	6.1[SD:0.02]	6.1[SD:0.02]	6.1[SD:0.02]	6.1[SD:0.03]	0.0[SD:0.01]	0.0[SD:0.03]	0.0[SD:0.01]
추가 제형 2(N=3)	6.1[SD:0.04]	6.0[SD:0.07]	6.1[SD:0.05]	6.0[SD:0.03]	0.0[SD:0.06]	0.0[SD:0.04]	0.0[SD:0.02]

[93] 표 2 에 나타난 바와 같이, 단백질 약물 농도 40 mg/ml 조건 하에서, 완충제를 포함하지 않는 제형 1 및 2는, thermal stress(40℃/4 wk), F/T cycle 및 교반(agitation) 조건에서도 초기(initial) 대비 pH의 유의한 변화가 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 본 발명의 제형이 단백질 안정성 측면에서 가장 중요한 인자인 pH를 유지시켜주는 완충(buffering) 효과를 갖는 완충제를 포함하지 않음에도 pH를 소망하는 범위로 유지시킬 수 있음과, 이러한 pH 유지 효과가 반복적으로 재현 가능함을 보여준다.

[94] **실시예** 3. HMW 함량(%) 측정(40℃ 조건)

[95] 실시예 1에서 제조된 액상 제형의 안정성을 시험하기 위하여, 단백질 약물 농도 40 mg/ml, pH 6.2, 및 40℃ 조건에서 4주 동안 보관하면서 제형 내의 단백질 약물의 응집 정도를 알 수 있는 HMW 함량(%)(%HMW; % high molecular weight; 중량 기준)를 SE-HPLC로 측정하였다.

[96] 보다 구체적으로, 모노머가 검출되는 시간 보다 먼저 검출되는 물질을 HMW로 정의하며, %HMW는 HPLC(Waters 2695 separation module alliance) 및 column(Tosoh, TSK-gel G3000 SWXL)을 사용하여 1.0 mL/min flow rate, 17 min injection time 조건 하에서 측정하였다(%HMW = $Area_H/Area_{TOTAL}$ x 100).

[97] 상기 측정된 %HMW(initial %HMW, 1주차 %HMW, 2주차 %HMW, 4주차 %HMW, Δ%HMW(해당 주차 %HMW - initial %HMW))를 표 3에 및 도 1에 나타내었다:

[98] [Table 3]

제형	Initial	40℃/1 wk		40℃/2 wk		40℃/4 wk	
	%HMW	%HMW	Δ%HMW	%HMW	Δ%HMW	%HMW	Δ%HMW
제형 1(N=3)	1.04[SD:0.00]	2.09[SD:0.07]	1.05[SD:0.07]	2.89[SD:0.10]	1.85[SD:0.10]	4.96[SD:0.18]	3.92[SD:0.18]
제형 2(N=3)	1.05[SD:0.02]	2.07[SD:0.02]	1.02 [SD:0.02]	2.87[SD:0.03]	1.81[SD:0.04]	4.60[SD:0.23]	3.55[SD:0.22]
제형 3(N=3)	0.81[SD:0.09]	2.70[SD:0.08]	1.88[SD:0.03]	4.22[SD:0.14]	3.42[SD:0.05]	7.06[SD:0.14]	6.25[SD:0.05]
제형 4(N=3)	0.84[SD:0.07]	2.84[SD:0.07]	1.98[SD:0.02]	4.53[SD:0.15]	3.69[SD:0.08]	7.63[SD:0.43]	6.79[SD:0.36]
EYLEA®(N=3)	1.81[SD:0.03]	4.48[SD:0.03]	2.67[SD:0.01]	7.06[SD:0.06]	5.26[SD:0.04]	11.57[SD:0.02]	9.76[SD:0.06]

[99] 표 3 및 도 1에서 알 수 있는 바와 같이, 단백질 약물 농도 40 mg/ml 및 pH 6.2 조건 하에서, 제형 1 내지 4가 EYLEA® 대비 SE-HPLC 분석 기반 Δ%HMW 감소 효과가 우수하였다. 특히 완충제를 포함하지 않는 제형 1 및 제형 2가 완충제를 포함한 제형 3 및 제형 4와 비교하여 Δ%HMW 감소 효과가 더 우수함을 확인하였다.

[100] **실시예** 4. Acidic 함량(%) 및 Main 함량(%) 측정

[101] 실시예 1에서 제조된 제형의 안정성을 시험하기 위하여, 단백질 약물 농도 40 mg/ml, pH 6.2, 및 40℃ 조건에서 4주 동안 보관하면서 조성물 내의 단백질 약물의 변성 정도를 알 수 있는 %Acidic(% Acidic variants 함량; 중량 기준)과 %Main(Charge variant 측면에서 initial 상태의 surface charge를 유지하는 형태의 함량(중량기준))를 imaged capillary isoelectric focusing(icIEF)으로 측정하였다.

[102] 보다 구체적으로, %Acidic는 Enzyme(Sialidase A, Sigma-Aldrich) 처리 후 incubation 한 sample을 icIEF instrument(Protein simple, iCE3)을 사용하여 110 sec sample injection duration, 2000 psi sample injection pressure 조건 하에서 acidic isoform을 분석하여 측정하였다.

[103] 상기 측정된 %Acidic(initial, 4주차, Δ%Acidic(4주차 %Acidic - initial %Acidic))를 표 4 및 도 2에 나타내었다:

[104] [Table 4]

제형	Initial	40℃/4 Wk	
	%Acidic	%Acidic	Δ%Acidic
제형 1(N=1)	65.4	78.7	13.3
제형 2(N=1)	65.6	77.5	11.9
제형 3(N=3)	66.5[SD: 1.25]	80.5[SD: 1.05]	14.0[SD: 0.69]
제형 4(N=3)	65.7[SD: 1.40]	80.8[SD: 0.97]	15.2[SD: 1.28]
EYLEA®(N=3)	76.1[SD: 0.70]	86.6[SD: 0.86]	10.5[SD: 0.97]

[105] 표 4 및 도 2에서 알 수 있는 바와 같이, 단백질 약물 농도 40 mg/ml 및 pH 6.2 조건 하에서, 완충제를 포함하지 않는 제형 1 및 2의 icIEF 분석 기반 acidic 함량(%) 증가율은 완충제를 포함하는 제형 3 및 4와 비교하여 현저히 낮게 나타났으며, 시판 제형인 대조군(EYLEA®) 제형과는 유의한 차이를 나타내지 않았다. %Main는 CE-SDS(Capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate)로 측정하였다(40℃, 4주). 보다 구체적으로, %Main를 다음의 방법으로 측정하였다: SDS sample buffer(AB Sciex) 및 BME(2-mercaptoethaol, Sigma Aldrich)와 mix한 sample(혼합비: 약 1:50(v:v))을 70℃에서 열처리 후 CE analysis instrument(Beckman Coulter, PA800 plus) 및 32 karat software(Beckman Coulter)를 이용하여 220 nm 하에서 detection되는 %total protein area를 분석하였다. 상기 측정된 측정된 %Main(initial, 4주차, Δ%Main(4주차 %Main - initial %Main))를 표 5 및 도 3a~3b에 나타내었다:

[106] [Table 5]

제형	Initial		40℃/4 Wk			
	%Main1	%Main2	%Main1	%Main2	Δ%Main1	Δ%Main2
제형 1	33.9	61.5	33.2	60.0	-0.7	-1.5
제형 2	34.1	62.0	32.5	60.9	-1.6	-1.1
제형 3	32.9[SD: 2.12]	61.6[SD: 1.38]	31.5[SD: 1.97]	59.3[SD: 1.29]	-1.4[SD:0.15]	-2.3[SD:0.10]
제형 4	32.7[SD: 2.00]	61.6[SD: 1.38]	31.3[SD: 2.06]	59.7[SD: 1.22]	-1.3[SD: 0.06]	-1.9[SD: 0.21]
EYLEA®	37.1[SD: 0.12]	55.7[SD: 0.15]	35.2[SD: 0.00]	54.4[SD: 0.15]	-1.9[SD: 0.12]	-1.3[SD: 0.10]

[107] (Main1: N-glycan 4N form; Main 2: N-glycan 5N form)표 5 및 도 3a~3b에 나타난 바와 같이, 단백농도 40 mg/ml 및 pH 6.2 조건 하에서, 완충제를 포함하지 않는

제형 1 및 제형 2의 main 함량(%) 감소율은 완충제를 포함한 제형 3 및 4와 비교하여 낮으며, 시판 제형인 대조군 EYLEA®과 비교하여 유의한 차이가 없음이 확인되었다

[108] **실시예 5. Aflibercept의 VEGF 결합 효율 측정**

[109] 실시예 1에서 제조된 제형 내의 약리학적 유효성분인 Aflibercept의 활성 유지 여부를 시험하기 위하여, 단백질 약물 농도 40 mg/ml, pH 6.2, 및 40℃ 조건에서 4주 동안 보관하면서 조성물 내의 Aflibercept의 VEGF에 대한 %RPA(Relative Potency Activity)를 측정하였다.

[110] %RPA는 다음의 방법으로 측정하였다: Aflibercept 및 VEGF를 순차적으로 loading시킨 96 well plate에 KDR 293 cell(Promega)을 loading 및 incubation 후, Envision microplate reader(Perkin Elmer, Envision 2014)를 이용하여 %RPA(Relative Potency Analysis)를 분석하였다.

[111] 상기 측정된 40℃에서의 0주차(initial)와 4주차의 %RPA 및 4주 간의 %RPA 변화율(Δ%RPA)을 표 6 및 도 4에 나타내었다:

[112] [Table 6]

후보	Initial	40℃/4 Wk	
	%RPA	%RPA	Δ%RPA
제형 1	97	100	3
제형 2	101	96	-5
제형 3	100[SD: 4]	88[SD: 2]	-12[SD: 5]
제형 4	104[SD: 6]	88[SD: 6]	-16[SD: 6]
EYLEA®	96	82	-14

[113] 표 6 및 도 4에 나타난 바와 같이, 단백질 약물 농도 40 mg/ml 및 pH 6.2 조건 하에서, 완충제를 포함하지 않는 제형 1 및 2의 potency(%) 변화율은, 완충제를 포함하는 제형 3 및 4와 시판 제형인 대조군 EYLEA®와 비교하여, 우수한 것이 확인되었다.

[114] **실시예** 6. HMW 함량(%) 측정(freeze/thaw 또는 agitation stress 조건)

[115] 실시예 1에서 제조된 액상 제형의 다양한 조건 하에서의 안정성을 시험하기 위하여, 단백질 약물 농도 40 mg/ml, pH 6.2, 및 freeze/thaw(5 cycle; 각 cycle: -70℃에서 18시간 이상 냉동 + 상온(25℃)에서 1-2시간 해동) 또는 agitation stress(400 rpm, 72 hours) 조건하에서 제형 내의 단백질 약물의 응집 정도를 알 수 있는 HMW 함량(%)(%HMW; % high molecular weight; 중량 기준)를 SE-HPLC로 측정하였다.

[116] HMW 함량(%)은 실시예 2에 기재된 방법을 참조로 수행하였다.

[117] 상기 측정된 Freeze/thaw(5 cycles) 조건 하에서의 각 제형의 %HMW를 표 7에 및

도 5에 나타내었다:

[118] [Table 7]

후보	Initial	Freeze/thaw(5 Cycles)	
	%HMW	%HMW	Δ%HMW
제형 1(n=3)	0.67[SD: 0.01]	0.69[SD: 0.01]	0.02[SD: 0.00]
제형 2(n=3)	0.67[SD: 0.01]	0.69[SD: 0.01]	0.02[SD: 0.00]
제형 3(n=3)	0.81[SD: 0.09]	0.97[SD: 0.09]	0.17[SD: 0.03]
제형 4(n=3)	0.84[SD: 0.07]	0.99 [SD: 0.08]	0.15[SD: 0.03]
EYLEA®(n=3)	1.81[SD: 0.03]	1.95[SD: 0.01]	0.15[SD: 0.02]

[119] 표 7에 및 도 5에 나타난 바와 같이, 단백질 약물 농도 40 mg/ml 및 pH 6.2 조건 하에서, 완충제를 포함하지 않는 제형 1 및 2는, 완충제 포함 제형 3 및 4, 및 대조군 제형 EYLEA®와 비교하여, freeze/thaw 조건에 노출시에 SE-HPLC 분석 기반 HMW 함량(%)의 증가 정도가 낮은 것으로 나타났다. 또한, 상기 측정된 Agitation Stress 조건 하에서의 각 제형의 %HMW를 표 8에 및 도 6에 나타내었다:

[120] [Table 8]

후보	Control(No agitation, RT)	Agitation(400 rpm, 72 hours)	
	%HMW	%HMW	Δ%HMW
제형 1(n=3)	0.81[SD: 0.00]	0.84[SD: 0.00]	0.03[SD: 0.00]
제형 2(n=3)	0.81[SD: 0.02]	0.86[SD: 0.03]	0.06[SD: 0.03]
제형 3(n=3)	1.00[SD: 0.05]	1.03[SD: 0.08]	0.04[SD: 0.03]
제형 4(n=3)	1.03[SD: 0.06]	1.11 [SD: 0.08]	0.08[SD: 0.07]
EYLEA®(n=3)	1.96[SD: 0.01]	1.95[SD: 0.01]	-0.01[SD: 0.02]

[121] 표 8에 및 도 6에 나타난 바와 같이, 단백질 약물 농도 40 mg/ml 및 pH 6.2 조건 하에서, 완충제를 포함하지 않는 제형 1 및 2는, 완충제 포함 제형 3 및 4, 및 대조군 제형 EYLEA®와 비교하여, agitation stress에 노출시 SE-HPLC 분석 기반 HMW 함량(%)의 유의한 증가가 없는 것으로 나타났다.

청구범위

[청구항 1] (1) 단백질 5 mg/ml 내지 300 mg/ml;
(2) 폴리올 및 당으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 안정화제; 및
(3) 계면활성제
를 포함하고, pH 4 내지 8인, 액상 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 폴리올은 당알코올인, 액상 조성물.

[청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 당알코올은 만니톨, 소르비톨, 자일리톨, 및 글리세롤로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 액상 조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 당은 트레할로오스, 수크로오스, 글루코오스, 및 만니톨로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것인, 액상 조성물.

[청구항 5] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질 함량은 5 mg/ml 내지 250 mg/ml인, 액상 조성물.

[청구항 6] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질 함량은 5 mg/ml 내지 200 mg/ml인, 액상 조성물.

[청구항 7] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질 함량은 5 mg/ml 내지 150 mg/ml인, 액상 조성물.

[청구항 8] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질 함량은 5 mg/ml 내지 100 mg/ml인, 액상 조성물.

[청구항 9] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질 함량은 5 mg/ml 내지 50 mg/ml인, 액상 조성물.

[청구항 10] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질 함량은 10 mg/ml 내지 50 mg/ml인, 액상 조성물.

[청구항 11] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질 함량은 20 mg/ml 내지 50 mg/ml인, 액상 조성물.

[청구항 12] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질 함량은 30 mg/ml 내지 50 mg/ml인, 액상 조성물.

[청구항 13] 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 pH는 5.2 내지 7.2인, 액상 조성물.

[청구항 14] 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 pH는 5.5 내지 7인, 액상 조성물.

[청구항 15] 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 pH는 5.5 내지 6.6인, 액상 조성물.

[청구항 16] 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 pH는 5.5 내지 6.4인, 액상 조성물.

[청구항 17] 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 pH는 5.5 내지

6.2인, 액상 조성물.

[청구항 18] 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 pH는 5.8 내지 7인, 액상 조성물.

[청구항 19] 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 pH는 5.8 내지 6.6인, 액상 조성물.

[청구항 20] 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 pH는 5.7 내지 6.7인, 액상 조성물.

[청구항 21] 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 pH는 5.9 내지 6.5인, 액상 조성물.

[청구항 22] 제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 안정화제는 1 내지 20%(w/v)의 트레할로오스, 1 내지 20%(w/v)의 수크로오스, 및 0.5 내지 10%(w/v)의 만니톨로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것인, 액상 조성물.

[청구항 23] 제22항에 있어서, 상기 안정화제는 5 내지 12%(w/v)의 트레할로오스, 5 내지 12%(w/v)의 수크로오스, 및 2 내지 7%(w/v)의 만니톨로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것인, 액상 조성물.

[청구항 24] 제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 안정화제는 염화나트륨을 포함하지 않는 것인, 액상 조성물.

[청구항 25] 제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 계면활성제는 비이온성 계면활성제인, 액상 조성물.

[청구항 26] 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 계면활성제는 전체 조성물 기준으로 0.001 내지 3 %(w/v)의 양으로 포함되는 것인, 액상 조성물.

[청구항 27] 제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 등장성(isotonic)인, 액상 조성물.

[청구항 28] 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질은 분자량이 10 내지 500 kDa인 것인, 액상 조성물.

[청구항 29] 제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질은 VEGF 길항제인, 액상 조성물.

[청구항 30] 제29항에 있어서, 상기 VEGF 길항제는 애플리버셉트(Aflibercept)인, 액상 조성물.

[청구항 31] 제29항 또는 제30항에 있어서, 눈의 유리체 내 투여를 위한 것인, 액상 조성물.

[청구항 32] 제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 완충제를 포함하지 않는 것을 특징으로 하는, 액상 조성물.

[청구항 33] 제32항에 있어서, 상기 완충제는, 인산, 아세트산, 시트르산, 숙신산, 및 탄산으로 이루어진 군에서

선택된 1종 이상의 산,
상기 산의 약학적으로 허용 가능한 염,
히스티딘, 아스파르트산, 및 글루탐산으로 이루어진 군에서
선택된 1종 이상의 아미노산, 및
상기 아미노산의 약학적으로 허용 가능한 염
으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것인, 액상
조성물.

[청구항 34] 제32항에 있어서, 상기 완충제는 시트르산, 시트르산나트륨,
아세트산, 아세트산나트륨, 히스티딘, 히스티딘-HCl, 및
히스티딘-아세테이트로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인,
액상 조성물.

[청구항 35] 제32항 내지 제34항 중 어느 한 항의 액상 조성물을 포함하는 눈의
유리체 내 투여용 주사제.

[청구항 36] (1) 애플리버셉트(Aflibercept);
(2) 폴리올 및 당으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을
포함하는 안정화제; 및
(3) 계면활성제
를 포함하고, pH 5.7 내지 6.7인, 액상 조성물.

[청구항 37] 제36항에 있어서, 상기 애플리버셉트의 함량은 20mg/ml 내지
50mg/ml이고, pH 는 5.7 내지 6.7인, 액상 조성물.

[청구항 38] 제36항에 있어서, 상기 안정화제는 염화나트륨을 포함하지 않는
것인, 액상 조성물.

[청구항 39] 제37항에 있어서, 상기 안정화제는 염화나트륨을 포함하지 않는
것인, 액상 조성물.

[청구항 40] 제36항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 완충제를 포함하지
않는 것을 특징으로 하는, 액상 조성물.

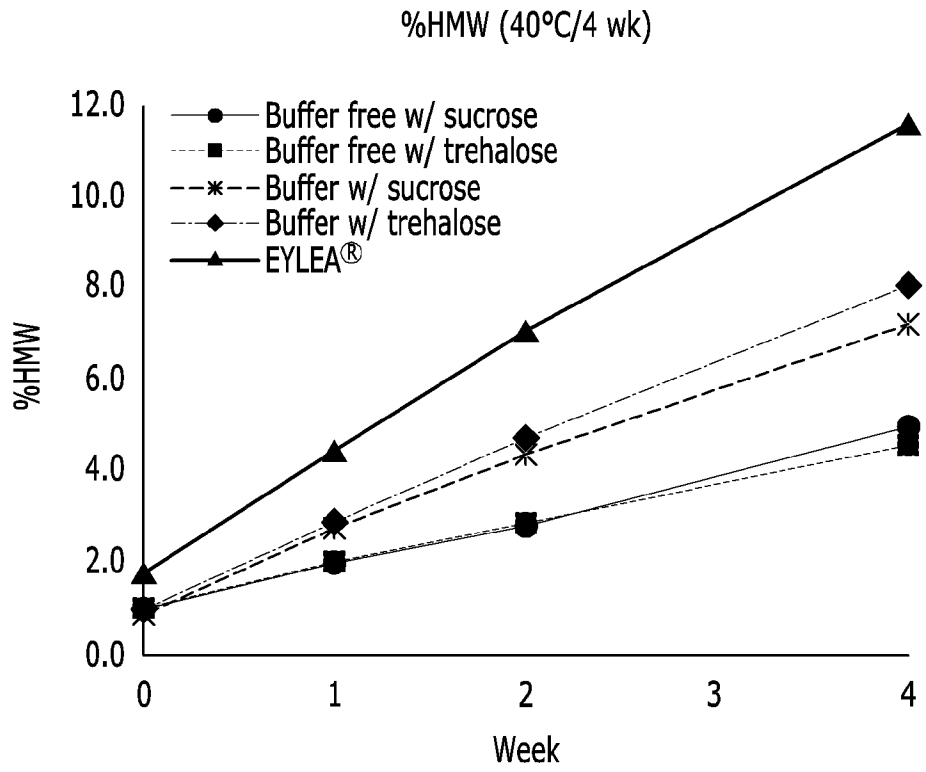
[청구항 41] 제40항에 있어서, 상기 완충제는,
인산, 아세트산, 시트르산, 숙신산, 및 탄산으로 이루어진 군에서
선택된 1종 이상의 산,
상기 산의 약학적으로 허용 가능한 염,
히스티딘, 아스파르트산, 및 글루탐산으로 이루어진 군에서
선택된 1종 이상의 아미노산, 및
상기 아미노산의 약학적으로 허용 가능한 염
으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것인, 액상
조성물.

[청구항 42] 제36항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 눈의 유리체 내
투여를 위한 것인, 액상 조성물.

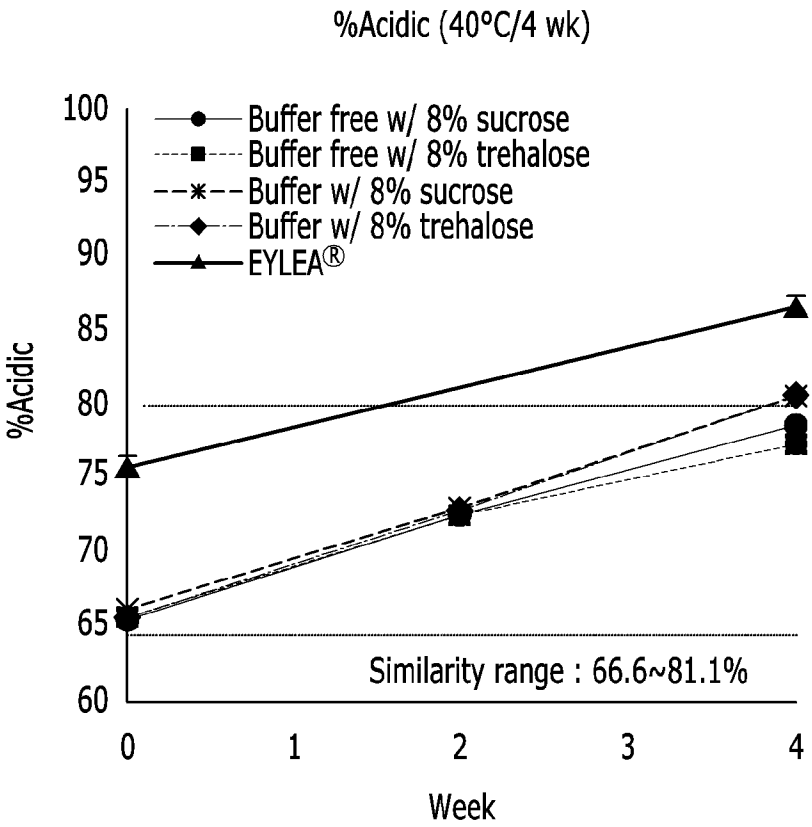
[청구항 43] 제36항 내지 제42항 중 어느 한 항의 액상 조성물을 포함하는 눈의

유리체 내 투여용 주사제.

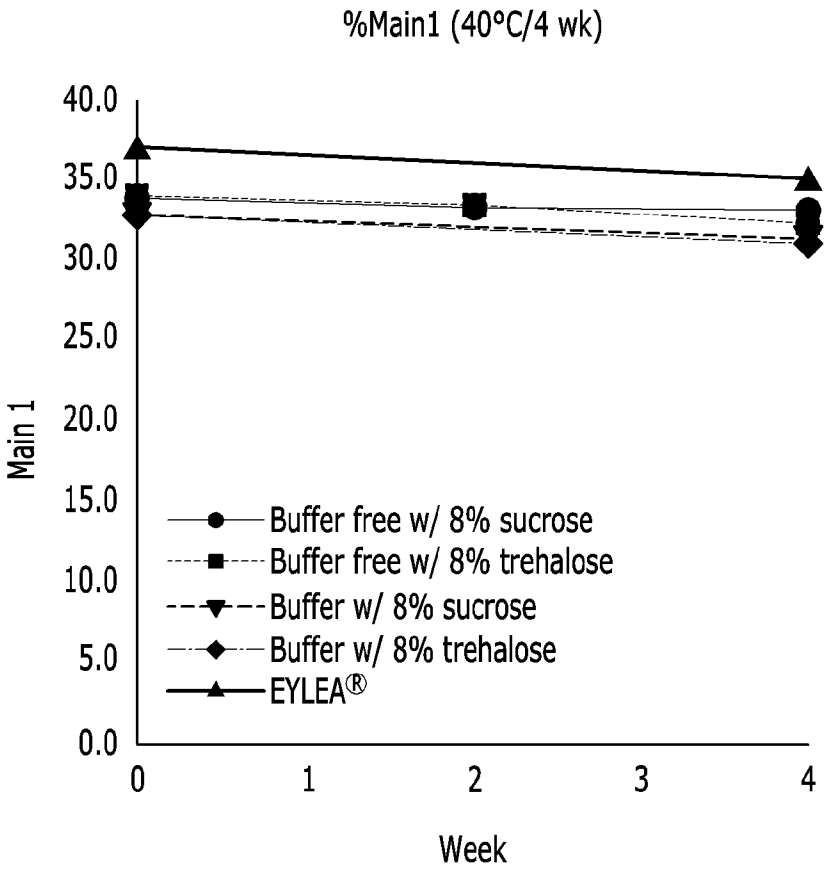
[Fig. 1]


%HMW (40°C/4 wk)
Buffer free w/ sucrose
Buffer free w/ trehalose
Buffer w/ sucrose
Buffer w/ trehalose
EYLEA®
%HMW
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
0
1
2
3
4
Week

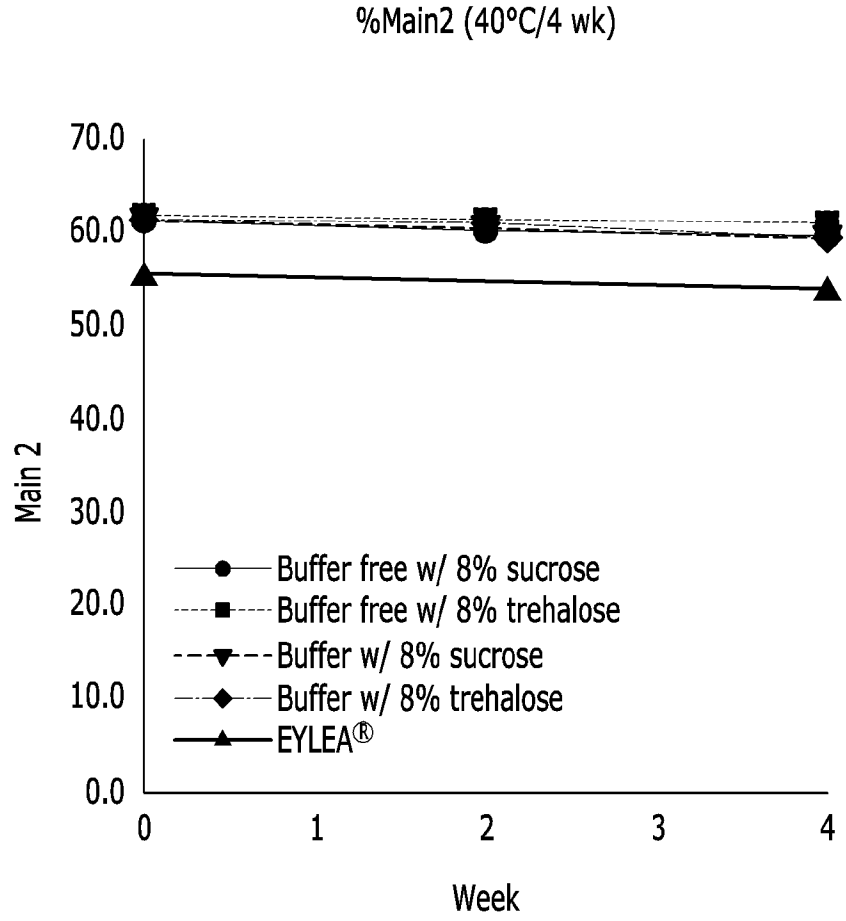
[Fig. 2]


%Acidic (40°C/4 wk)
Buffer free w/ 8% sucrose
Buffer free w/ 8% trehalose
Buffer w/ 8% sucrose
Buffer w/ 8% trehalose
EYLEA®
%Acidic
100
95
90
85
80
75
70
65
60
Similarity range : 66.6~81.1%
0
1
2
3
4
Week

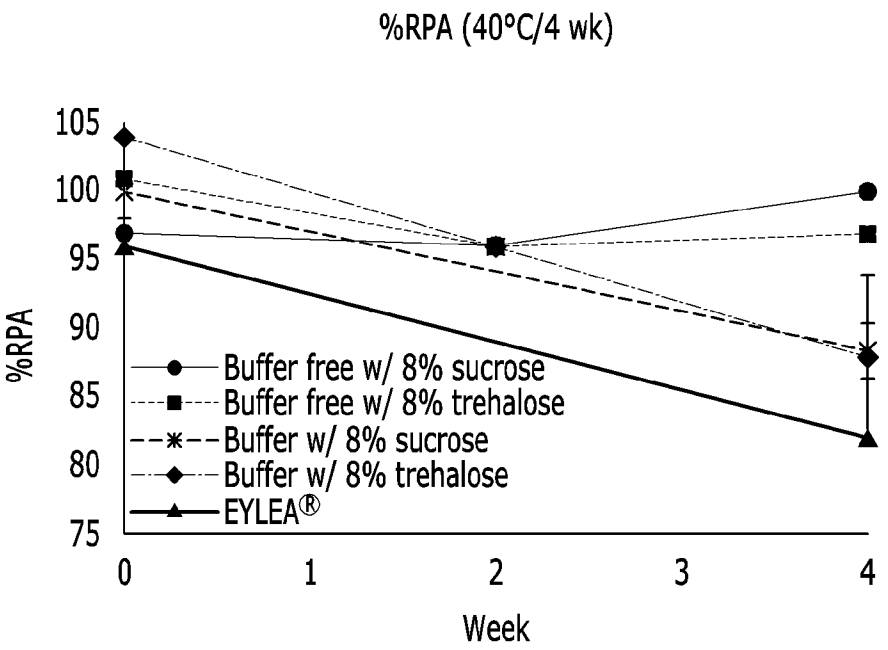
[Fig. 3a]


%Main1 (40°C/4 wk)
Main 1
Week
40.0
35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
0
1
2
3
4
Buffer free w/ 8% sucrose
Buffer free w/ 8% trehalose
Buffer w/ 8% sucrose
Buffer w/ 8% trehalose
EYLEA®

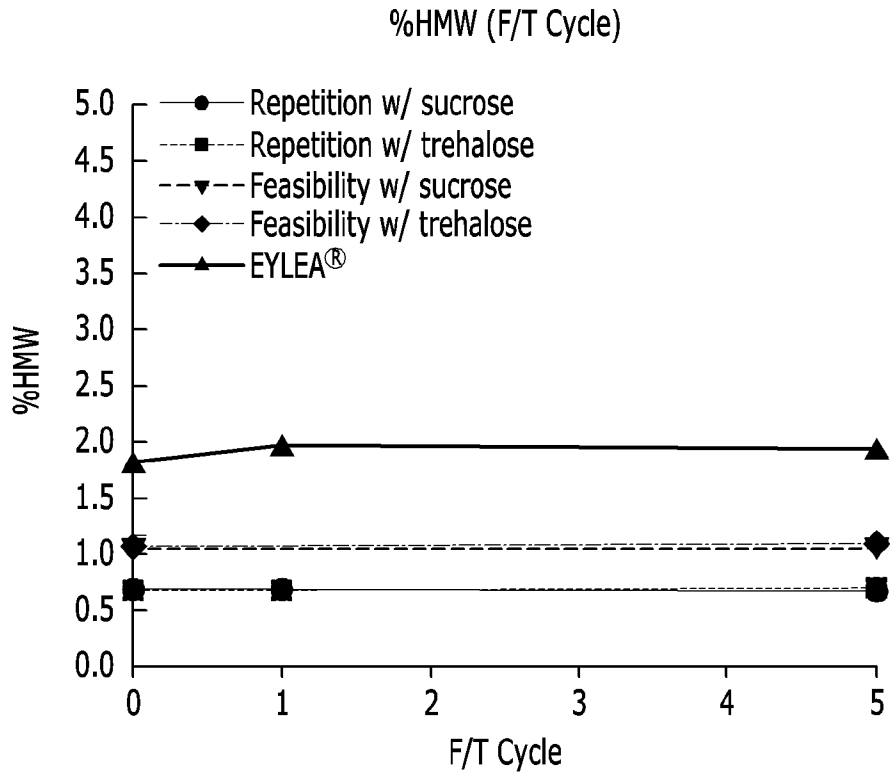
[Fig. 3b]


%Main2 (40°C/4 wk)
Main 2
Week
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
0
1
2
3
4
Buffer free w/ 8% sucrose
Buffer free w/ 8% trehalose
Buffer w/ 8% sucrose
Buffer w/ 8% trehalose
EYLEA®

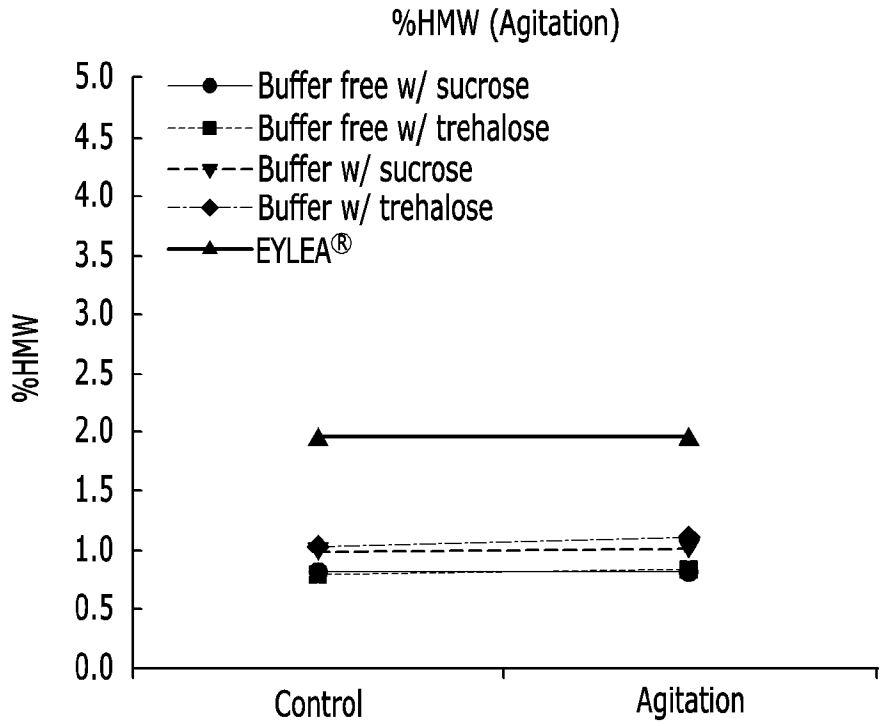
[Fig. 4]


%RPA (40°C/4 wk)
105
100
95
90
85
80
75
%RPA
0
1
2
3
4
Week
Buffer free w/ 8% sucrose
Buffer free w/ 8% trehalose
Buffer w/ 8% sucrose
Buffer w/ 8% trehalose
EYLEA®

[Fig. 5]


%HMW (F/T Cycle)
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
%HMW
0
1
2
3
4
5
F/T Cycle
Repetition w/ sucrose
Repetition w/ trehalose
Feasibility w/ sucrose
Feasibility w/ trehalose
EYLEA®

[Fig. 6]


%HMW (Agitation)
Buffer free w/ sucrose
Buffer free w/ trehalose
Buffer w/ sucrose
Buffer w/ trehalose
EYLEA®
%HMW
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Control
Agitation

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2019/011762

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 9/08(2006.01)i, A61K 47/10(2006.01)i, A61K 47/26(2006.01)i, A61K 9/00(2006.01)i, A61K 38/17(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 9/08; A61K 38/17; A61K 38/18; A61K 47/10; A61K 47/18; A61K 47/26; A61K 47/30; A61K 47/36; A61K 9/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: protein, liquid, aflibercept, VEGF antagonist, buffer

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-1861163 B1 (SAM CHUN DANG PHARM. CO., LTD.) 25 May 2018 See abstract; paragraphs [0007], [0019]; claims 1-2, 5-6, 14-15.	1-12,36-41
X	KR 10-1808234 B1 (ALTEOGEN, INC.) 12 December 2017 See abstract; claims 1, 8.	1-12,36-37
Y		38-39
X	KR 10-2017-0079409 A (HANMI PHARM. CO., LTD.) 10 July 2017 See abstract; paragraph [0019]; claims 1, 6, 7.	1-12
Y		38-39
X	WO 2018-094316 A1 (JUST BIOTHERAPEUTICS, INC.) 24 May 2018 See abstract; claims 1-24.	1-12,36-37
X	WO 2017-129685 A1 (FORMYCON AG.) 03 August 2017 See abstract; claims 1-17.	1-12,36-37
A	WO 2017-178544 A1 (DR. GERHARD MANN CHEM.-PHARM. FABRIK GMBH.) 19 October 2017 See the entire document.	1-12,36-41

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
10 JANUARY 2020 (10.01.2020)	**10 JANUARY 2020 (10.01.2020)**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2019/011762

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: **23, 30, 33-34**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 23, 30, and 33-34 respectively refer to claims 22, 29, and 32 which violate the manner of referring to dependent claims (PCT Rule 6.4(a)), and thus are unclear.

3. ☒ Claims Nos.: **13-22, 24-29, 31-32, 35, 42-43**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2019/011762

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1861163 B1	25/05/2018	CN 109475597 A	15/03/2019
		EP 3452075 A1	13/03/2019
		JP 2019-517513 A	24/06/2019
		TW 201838646 A	01/11/2018
		US 2019-0160145 A1	30/05/2019
		WO 2018-199408 A1	01/11/2018
KR 10-1808234 B1	12/12/2017	AU 2016-283557 A1	14/12/2017
		BR 112017027945 A2	28/08/2018
		CA 2990582 A1	29/12/2016
		CN 107889457 A	06/04/2018
		EP 3313373 A1	02/05/2018
		EP 3313373 A4	20/03/2019
		JP 2018-517773 A	05/07/2018
		JP 6541875 B2	17/07/2019
		KR 10-2017-0000356 A	02/01/2017
		KR 10-2017-0138387 A	15/12/2017
		MX 2017016907 A	18/04/2018
		RU 2688679 C1	22/05/2019
		US 2016-0376342 A1	29/12/2016
		US 9982032 B2	29/05/2018
		WO 2016-208989 A1	29/12/2016
KR 10-2017-0079409 A	10/07/2017	AR 107276 A1	11/04/2018
		AU 2016-382383 A1	26/07/2018
		BR 112018013535 A2	04/12/2018
		CA 3009627 A1	06/07/2017
		CN 108697642 A	23/10/2018
		EP 3398586 A2	07/11/2018
		JP 2019-500390 A	10/01/2019
		MX 2018008026 A	29/11/2018
		TW 201735940 A	16/10/2017
		US 2019-0022183 A1	24/01/2019
		WO 2017-116191 A2	06/07/2017
		WO 2017-116191 A3	08/03/2018
WO 2018-094316 A1	24/05/2018	CA 3043487 A1	24/05/2018
		CN 109937034 A	25/06/2019
		EP 3541365 A1	25/09/2019
WO 2017-129685 A1	03/08/2017	AU 2017-213103 A1	26/07/2018
		CA 3011638 A1	03/08/2017
		EP 3407868 A1	05/12/2018
		JP 2019-504882 A	21/02/2019
		US 2019-0030123 A1	31/01/2019
WO 2017-178544 A1	19/10/2017	CA 3018636 A1	19/10/2017
		CN 109069415 A	21/12/2018
		EP 3231417 A1	18/10/2017

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2019/011762

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		EP 3231417 B1	05/12/2018
		ES 2704918 T3	20/03/2019
		JP 2019-515882 A	13/06/2019
		MX 2018012192 A	11/02/2019
		PL 3231417 T3	31/05/2019
		US 2019-0111075 A1	18/04/2019

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2019/011762

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 9/08(2006.01)i, A61K 47/10(2006.01)i, A61K 47/26(2006.01)i, A61K 9/00(2006.01)i, A61K 38/17(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 9/08; A61K 38/17; A61K 38/18; A61K 47/10; A61K 47/18; A61K 47/26; A61K 47/30; A61K 47/36; A61K 9/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드:단백질(protein), 액상(liquid), 애플리버셉트(aflibercept), VEGF 길항제(VEGF antagonist), 완충제(buffer)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-1861163 B1 (삼천당제약주식회사) 2018.05.25 요약; 단락 [0007], [0019]; 청구항 1-2, 5-6, 14-15	1-12,36-41
X	KR 10-1808234 B1 ((주)알테오젠) 2017.12.12 요약; 청구항 1, 8	1-12,36-37
Y		38-39
X	KR 10-2017-0079409 A (한미약품 주식회사) 2017.07.10 요약; 단락 [0019]; 청구항 1, 6, 7	1-12
Y		38-39
X	WO 2018-094316 A1 (JUST BIOTHERAPEUTICS, INC.) 2018.05.24 요약; 청구항 1-24	1-12,36-37
X	WO 2017-129685 A1 (FORMYCON AG) 2017.08.03 요약; 청구항 1-17	1-12,36-37
A	WO 2017-178544 A1 (DR. GERHARD MANN CHEM.-PHARM. FABRIK GMBH) 2017.10.19 전체 문헌	1-12,36-41

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2020년 01월 10일 (10.01.2020)	2020년 01월 10일 (10.01.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
박제현
전화번호 +82-42-481-3349

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2019/011762

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☐ 청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,

2. ☒ 청구항: 23,30,33-34
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
청구항 23, 30, 33-34는 종속항 기재방법(PCT 규칙 6.4(a))을 위반한 청구항 22, 29, 32를 인용하고 있어 불명료합니다.

3. ☒ 청구항: 13-22,24-29,31-32,35,42-43
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.

2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.

3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.

4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에 관한 기재

☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.

☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.

☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2019/011762

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1861163 B1	2018/05/25	CN 109475597 A	2019/03/15
		EP 3452075 A1	2019/03/13
		JP 2019-517513 A	2019/06/24
		TW 201838646 A	2018/11/01
		US 2019-0160145 A1	2019/05/30
		WO 2018-199408 A1	2018/11/01
KR 10-1808234 B1	2017/12/12	AU 2016-283557 A1	2017/12/14
		BR 112017027945 A2	2018/08/28
		CA 2990582 A1	2016/12/29
		CN 107889457 A	2018/04/06
		EP 3313373 A1	2018/05/02
		EP 3313373 A4	2019/03/20
		JP 2018-517773 A	2018/07/05
		JP 6541875 B2	2019/07/17
		KR 10-2017-0000356 A	2017/01/02
		KR 10-2017-0138387 A	2017/12/15
		MX 2017016907 A	2018/04/18
		RU 2688679 C1	2019/05/22
		US 2016-0376342 A1	2016/12/29
		US 9982032 B2	2018/05/29
		WO 2016-208989 A1	2016/12/29
KR 10-2017-0079409 A	2017/07/10	AR 107276 A1	2018/04/11
		AU 2016-382383 A1	2018/07/26
		BR 112018013535 A2	2018/12/04
		CA 3009627 A1	2017/07/06
		CN 108697642 A	2018/10/23
		EP 3398586 A2	2018/11/07
		JP 2019-500390 A	2019/01/10
		MX 2018008026 A	2018/11/29
		TW 201735940 A	2017/10/16
		US 2019-0022183 A1	2019/01/24
		WO 2017-116191 A2	2017/07/06
		WO 2017-116191 A3	2018/03/08
WO 2018-094316 A1	2018/05/24	CA 3043487 A1	2018/05/24
		CN 109937034 A	2019/06/25
		EP 3541365 A1	2019/09/25
WO 2017-129685 A1	2017/08/03	AU 2017-213103 A1	2018/07/26
		CA 3011638 A1	2017/08/03
		EP 3407868 A1	2018/12/05
		JP 2019-504882 A	2019/02/21
		US 2019-0030123 A1	2019/01/31
WO 2017-178544 A1	2017/10/19	CA 3018636 A1	2017/10/19
		CN 109069415 A	2018/12/21
		EP 3231417 A1	2017/10/18

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2019/011762

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		EP 3231417 B1	2018/12/05
		ES 2704918 T3	2019/03/20
		JP 2019-515882 A	2019/06/13
		MX 2018012192 A	2019/02/11
		PL 3231417 T3	2019/05/31
		US 2019-0111075 A1	2019/04/18