



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0030704

(43) 공개일자 2015년03월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/08 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01) A61K 47/00 (2006.01)

A61K 47/30 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2015-7000510

(22) 출원일자(국제) 2013년07월09일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2015년01월08일

(86) 국제출원번호 PCT/US2013/049778

(87) 국제공개번호 WO 2014/011672

국제공개일자 2014년01월16일

(30) 우선권주장

61/669,480 2012년07월09일 미국(US)

61/806,235 2013년03월28일 미국(US)

(71) 출원인

코히러스 바이오사이언시즈, 인코포레이티드

미국 캘리포니아 94065 레드우드 시티 수트 200  
레드우드 쇼어스 파크웨이 201

(72) 발명자

매닝 마크

미국 콜로라도주 80534 존스타운 소렐 레인 4630

머피 브라이언

미국 콜로라도주 80526 포트 콜린스 웨스트 프로  
스펙트 1708

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

장훈

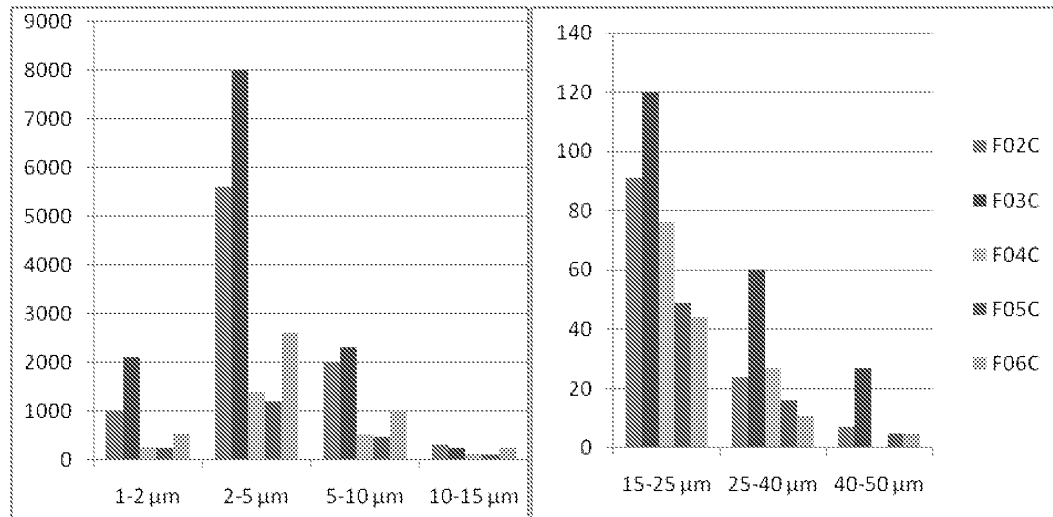
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 육안으로 보이지 않는 입자의 현저한 감소를 나타내는 에타너셉트 제형

(57) 요약

본 발명은, 육안으로 보이지 않는 입자가 실질적으로 감소된, 에타너셉트의 장기 보관에 적합한 안정화된 수성 약제학적 에타너셉트 조성물, 및 이들 조성물의 제조 방법, 투여 방법, 및 제조 물품을 제공한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

**파라 더글라스**

미국 콜로라도주 80503 롱몬트 옥스포드 로드 4601

**헤르만 알란**

미국 캘리포니아주 93012 카마릴로 로사 비스타 테  
라스 2225

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

장기 보관을 위해 안정화된, 에타너셉트 및 안정화제를 포함하는 수성 약제학적 조성물로서,

상기 안정화제는, 상기 조성물 중의 육안으로 보이지 않는 입자(sub-visible particle)의 발생을 방지하거나 억제하거나 감소시키기 위한 것이고,

상기 안정화제는, 바람직하게는, 폴리소르베이트 계면활성제 및 폴록사머 계면활성제로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 계면활성제를 포함하고, 상기 안정화제는, 계면활성제를 함유하지 않는 에타너셉트 조성물과 비교하여, 상기 조성물 중의 육안으로 보이지 않는 입자의 유의한 감소를 제공할 수 있으며; 여기서, 상기 조성물은, 안정화제로서 아르기닌을 함유하지 않거나 아르기닌을 실질적으로 함유하지 않는,

장기 보관을 위해 안정화된 수성 약제학적 조성물.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 안정화제가, 폴리소르베이트 80, 폴리소르베이트 60, 폴리소르베이트 40, 및 폴리소르베이트 20으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 폴리소르베이트 계면활성제를 포함하는, 안정화된 조성물.

### 청구항 3

제2항에 있어서, 상기 안정화제가 폴리소르베이트 80을 포함하는, 안정화된 조성물.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 안정화제가 폴록사머 계면활성제를 포함하고, 상기 폴록사머 계면활성제가 플루로닉(Pluronic) F-68인, 안정화된 조성물.

### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 에타너셉트 조성물이, (i) 약  $5\mu\text{m}$  내지  $10\mu\text{m}$ 의 크기를 갖는 입자를 ml당 약 2500개 미만으로 갖고; (ii) 약  $2\mu\text{m}$  내지  $5\mu\text{m}$ 의 크기를 갖는 입자를 약 3500개 미만으로 갖고; (iii) 약  $1\mu\text{m}$  내지  $2\mu\text{m}$ 의 크기를 갖는 입자를 ml당 약 700개 미만으로 갖도록 하는, (a) "T0"에서의 상기 조성물 ml당 약  $1\mu\text{m}$  내지  $10\mu\text{m}$ 의 크기를 갖는 육안으로 보이지 않는 입자의 일정량(여기서, 육안으로 보이지 않는 입자의 이러한 양은, 계면활성제를 갖지 않는 동일한 조성물과 비교하여, 이러한 육안으로 보이지 않는 입자의, 적어도 약 50% 내지 70%의 감소에 상응한다)을 포함하고/하거나; (b) "T0"에서의 제형 중의 육안으로 보이지 않는 입자의 일정량을 포함하는 것을 특징으로 하는, 안정화된 조성물.

### 청구항 6

제5항에 있어서, 상기 조성물이 추가의 안정화 성분을 포함하고, 여기서, 상기 추가의 안정화 성분이, (i) 세린, 프롤린, 및 글루타메이트로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산; (ii) 칼슘, 마그네슘, 및 아연으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 금속 이온; (iii) 크실리톨 단독, 또는 크실리톨과 메글루민의 배합물로부터 선택되는 크실리톨 안정화제; (iv) 염화 나트륨 단독; 슈크로스 또는 트레할로스와 배합물로의 염화 나트륨, 및 염화 나트륨, 슈크로스, 및 트레할로스의 배합물로부터 선택되는 염화 나트륨 안정화제; (v) 메글루민 단독; 슈크로스와 배합물로의 메글루민; 염화 나트륨과의 배합물로의 메글루민; 및 염화 나트륨 및 슈크로스와 배합물로부터 선택되는 메글루민 안정화제; 및 (vi) 당과 폴리올의 배합물로부터 선택되는, 안정화된 조성물.

### 청구항 7

제6항에 있어서, 상기 추가의 안정화 성분이 글루타메이트이고, 상기 조성물이, 약 25 내지  $75\text{mg/ml}$ 의 에타너셉트; 약  $150\text{mM}$  이하의 글루타메이트; 약 6wt% 미만의 슈크로스; 임의로 약  $100\text{mM}$  이하의 NaCl; 약 1 내지 약  $30\text{mM}$ 의 인산 나트륨, 및 약 0.01 내지 약 0.05(w/v)의 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제를 포함하고;

여기서, 상기 조성물이 약 6.0 내지 6.6의 pH를 갖는, 안정화된 조성물.

#### 청구항 8

제6항에 있어서, 상기 추가의 안정화 성분이 세린이고, 상기 조성물이, 약 0.01 내지 약 0.05%(w/v)의 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제; 약 25 내지 약 50mg/ml의 에타너셉트; 약 150mM 미만의 세린; 약 0.5 내지 약 3wt%의 슈크로스; 약 1 내지 약 30mM의 인산 나트륨을 포함하고, 여기서, 상기 제형이 pH 6.0 내지 약 pH 7.0을 갖고, 보다 바람직하게는 약 6.0 내지 약 6.6, 가장 바람직하게는 약 6.3 내지 약 6.5의 pH를 갖는, 안정화된 조성물.

#### 청구항 9

제6항에 있어서, 상기 추가의 안정화 성분이 프롤린이고, 상기 조성물이, 약 0.01 내지 약 0.05%(w/v)의 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제; 약 25 내지 약 50mg/ml의 에타너셉트; 약 150mM 미만의 프롤린; 약 0.5 내지 약 3wt%의 슈크로스; 약 1 내지 약 30mM의 인산 나트륨, 약 15 내지 약 100mM의 NaCl을 포함하며; 여기서, 상기 제형이 pH 6.0 내지 약 pH 7.0을 갖는, 안정화된 조성물.

#### 청구항 10

제6항에 있어서, 상기 추가의 안정화 성분이 염화 마그네슘이고, 상기 조성물이, 약 0.01 내지 약 0.05%(w/v)의 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제; 약 25 내지 약 50mg/ml의 에타너셉트; 약 1mM 내지 약 20mM의 염화 마그네슘; 임의로 약 6wt% 이하의 슈크로스; 약 25 내지 150mM의 NaCl; 약 1 내지 약 30mM의 인산 나트륨을 포함하며; 여기서, 상기 조성물이 약 6.0의 pH 내지 약 pH 7.0을 갖는, 안정화된 조성물.

#### 청구항 11

제6항에 있어서, 상기 추가의 안정화 성분이 염화 칼슘이고, 상기 조성물이, 약 0.01 내지 약 0.05%(w/v)의 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제; 약 25 내지 약 50mg/ml의 에타너셉트; 약 5mM 이하의 염화 칼슘; 임의로 약 0.5 내지 6wt%의 슈크로스 또는 트레할로스; 임의로 약 0 내지 100mM의 NaCl; 임의로 약 10mM 이하의 크실리톨; 약 1 내지 약 30mM의 인산 나트륨을 포함하며; 여기서, 상기 조성물이 약 6.0의 pH 내지 약 pH 7.0을 갖는, 안정화된 조성물.

#### 청구항 12

제6항에 있어서, 상기 추가의 안정화 성분이 크실리톨이고, 상기 조성물이, 약 25 내지 75mg/ml의 에타너셉트; 약 1 내지 10wt%의 크실리톨; 약 1 내지 30mM의 인산 나트륨; 임의로 약 5wt% 이하의 메글루민; 임의로 약 5mM 이하의 NaCl; 및 임의로 약 5wt% 이하의 슈크로스를 포함하며; 6.0 내지 6.6의 pH를 갖는, 안정화된 조성물.

#### 청구항 13

제6항에 있어서, 상기 추가의 안정화 성분이 염화 나트륨이고, 여기서, 상기 조성물이, 약 25 내지 75mg/ml의 에타너셉트; 약 0.01 내지 약 0.05%(w/v)의 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제; 약 150mM 이하의 염화 나트륨, 약 1 내지 약 30mM의 인산 나트륨; 및 약 0 내지 5wt%의 슈크로스 또는 트레할로스, 또는 이들의 배합물을 포함하며; 여기서, 상기 조성물이 약 6.0의 pH 내지 약 pH 7.0을 갖는, 안정화된 조성물.

#### 청구항 14

제6항에 있어서, 상기 추가의 안정화 성분이 메글루민이고, 여기서, 상기 조성물이, 약 25 내지 약 75mg/ml의 에타너셉트, 약 0.01 내지 약 0.05%(w/v)의 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제; 약 1 내지 30mM의 인산 나트륨; 약 10% 이하의 메글루민; 임의로 약 5wt% 이하의 슈크로스; 및 임의로 약 100mM 이하의 염화 나트륨을 포함하며; 여기서, 상기 조성물이 약 6.0 내지 7.0의 pH를 갖는, 안정화된 조성물.

#### 청구항 15

제6항에 있어서, 상기 조성물이,

(a) T<sub>4</sub>에서의 SEC 분석에서의, 약 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 또는 97wt% 초과와 단량체 함량; 및 약 3, 2, 또는 1wt% 미만의 응집체(들) 함량; 및

(b) T<sub>2</sub>에서의 HIC 분석(여기서, HIC 크로마토그램의 피크 1로 표시되는 상기 조성물의 양은 약 4, 3, 2, 또는 1wt% 미만이고; HIC 크로마토그램의 피크 2로 표시되는 상기 조성물의 양은 80, 81, 82, 83, 84, 또는 85wt% 초과이며; HIC 크로마토그램의 피크 3으로 표시되는 상기 조성물의 양은 약 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 또는 13wt% 미만이다); 및

(c) T<sub>4</sub>에서의 HIC 분석(여기서, HIC 크로마토그램의 피크 1로 표시되는 상기 조성물의 양은 약 3, 2, 또는 1wt% 미만이고; HIC 크로마토그램의 피크 2로 표시되는 상기 조성물의 양은 80, 81, 82, 83, 84, 또는 85wt% 초과이며; HIC 크로마토그램의 피크 3으로 표시되는 상기 조성물의 양은 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 또는 13wt% 미만이다)

을 특징으로 하는, 안정화된 조성물.

## 명세서

### 기술 분야

[0001]

본 발명은, 에타너셉트의 장기 보관을 위해 안정화된 수성 약제학적 조성물, 당해 조성물의 제조 방법, 이들 조성물의 투여 방법, 및 이들 조성물을 함유하는 키트에 관한 것이고, 여기서, 상기 안정화된 에타너셉트 조성물은, 육안으로 보이지 않는 입자(sub-visible particle)의 유의한 감소를 나타낸다. 본 발명은, 안정화를 위한 아르기닌을 요구하지 않는 에타너셉트 제형을 포함한다. 본 발명은, 추가로, 에타너셉트 제형 중의 육안으로 보이지 않는 입자에 대한 감소된 환자 노출을 제공하는 물품 및 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002]

폴리펩타이드는, 종종 이들을 사용하기 전에 보관되어야만 한다. 연장된 기간 동안 보관되는 경우, 폴리펩타이드는 용액 중에서 흔히 불안정하다(Manning et al., 1989, Pharm. Res. 6:903-918). 이들의 저장 수명을 연장시키기 위해, 건조, 예를 들면, 동결건조와 같은 추가의 프로세싱 단계들이 개발되어 왔다. 그러나, 동결건조된 약제학적 조성물은 사용하기에 덜 편리하다.

[0003]

폴리펩타이드 안정성을 개선하기 위한 전형적인 실행은, 제형을 이용하여 성분(element)들의 농도를 변화시킴으로써, 또는 부형제를 첨가하여 제형을 변형시킴으로써 해결될 수 있다(예를 들면, 미국 특허 제5,580,856호 및 제6,171,586호 참조). 그러나, 첨가제를 사용하는 것은 여전히 비활성 폴리펩타이드를 초래할 수 있다. 또한, 동결건조의 경우에 있어서, 재수화(rehydration) 단계는, 예를 들면, 응집 또는 변성에 의한 폴리펩타이드의 비활성화를 초래할 수 있다(Hora et al., 1992, Pharm. Res., 9:33-36; Liu et al., 1991, Biotechnol. Bioeng., 37:177-184). 폴리펩타이드의 응집은, 면역원성을 초래할 수 있으므로 바람직하지 못하다(Cleland et al., 1993, Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems, 10:307-377; 및 Robbins et al., 1987, Diabetes, 36:838-845).

[0004]

폴리펩타이드 안정성을 개선하기 위한 다른 방법은, 특정 농도의 L-아르기닌을 사용하는 것이다(미국 특허 제7,648,702호).

[0005]

사용하기 전에 2년 이하 동안 보관되는 폴리펩타이드들 중 하나가 에타너셉트(Enbrel®, Immunex Corporation)이고, 이는, 사람 IgG1의 Fc 부분에 연결된 사람 75킬로달톤(p75) 종양 괴사 인자 수용체(TNFR)의 세포외 리간드-결합부로 이루어진 이량체성 융합 폴리펩타이드이다. 이는 934개의 아미노산들로 이루어지고, 대략 150킬로달톤의 겔보기 분자량을 갖는다(Physicians Desk Reference, 2002, Medical Economics Company Inc.). 에타너셉트의 Fc 구성성분(component)은, 사람 IgG1의 불변 중쇄 2(CH2) 도메인, 불변 중쇄 3(CH3) 도메인 및 힌지 영역을 포함하지만, 불변 중쇄 1(CH1) 도메인은 포함하지 않는다. Fc 도메인은, 상기 기술된 도메인들 중 하나 또는 전부를 포함할 수 있다. 에타너셉트는, 일반적으로 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 포유동물 세포 발현 시스템에서 재조합 DNA 기술에 의해 생산된다.

[0006]

에타너셉트의 제형을 포함하는 약제학적 단백질 제형에 있어서의 알려져 있는 과제는, 이러한 제형들이, 육안으로 보이지 않는 입자의 존재를 나타내는 경향성이 있다는 것이다. 이러한 입자들은, 단백질 제형이 환자에게 투여되는 경우, 바람직하지 못한 면역 반응(면역원성)과 관련되는 것으로 생각된다. 이러한 면역 반응은 단백질 치료제의 유효성을 감소시킬 수 있고, 환자에게 해로울 수 있다.

[0007]

본 발명은, 장기 보관, 및 육안으로 보이지 않는 입자를 형성하는 경향성의 현저한 감소를 가능하게 하는, 에타

너셉트의 신규한 안정한 액체 제형을 제공한다.

## 발명의 내용

### 본 발명의 요약

[0008]

[0009]

본 발명은, 에타너셉트, 및 수성 약제학적 조성물 중의 육안으로 보이지 않는 입자의 발생을 방지하거나, 억제하거나, 감소시키기 위한 안정화제를 포함하는, 수성 약제학적 조성물을 제공하고, 여기서, 상기 안정화제는, 바람직하게는 폴리소르베이트 계면활성제 및 폴록사머 계면활성제로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 계면활성제를 포함하고, 여기서, 상기 계면활성제는, 이러한 계면활성제가 결합되어 있는 에타너셉트 조성물과 비교하여, 조성물 중의 육안으로 보이지 않는 입자의 유의한 감소를 제공할 수 있다. 본 발명은, 육안으로 보이지 않는 입자의 바람직한 감소를 달성할 수 있는 임의의 약제학적으로 허용되는 계면활성제의 사용을 고려한다.

[0010]

추가 실시형태에서, 본 발명은, 에타너셉트, 및 수성 약제학적 조성물 중의 육안으로 보이지 않는 입자의 발생을 방지하거나, 억제하거나, 감소시키기 위한 안정화제를 포함하는 수성 약제학적 조성물이고, 여기서, 상기 안정화제는, 폴리소르베이트 계면활성제 및 폴록사머 계면활성제로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 계면활성제를 포함한다. 상기 안정화제는, 폴리소르베이트 80, 폴리소르베이트 60, 폴리소르베이트 40, 및 폴리소르베이트 20으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 폴리소르베이트 계면활성제, 또는 폴록사머 계면활성제, 예를 들면, 플루로닉(Pluronic) F-68을 포함한다. 놀랍게도, 본 발명의 제형은, 우수한 안정성을 나타내고, 시판 Enbrel® 제형에 존재하는 아르기닌 안정화제를 필요로 하지 않으면서 육안으로 보이지 않는 입자의 감소를 나타낸다. 따라서, 상기 제형은 바람직하게는 아르기닌을 함유하지 않거나, 아르기닌을 실질적으로 함유하지 않는다.

[0011]

본 발명의 추가 실시형태에서, 육안으로 보이지 않는 입자 형성에 대한 안정화를 위한 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제를 함유하는 에타너셉트 제형은, 추가로, (i) 세린, 프롤린, 및 글루타메이트로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 아미노산; (ii) 칼슘, 마그네슘, 및 아연으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 금속 이온; (iii) 크실리톨 단독, 또는 크실리톨과 메글루민의 배합물로부터 선택되는 크실리톨 안정화제; (iv) 염화 나트륨 단독; 슈크로스 또는 트레할로스와 배합물로의 염화 나트륨, 및 염화 나트륨, 슈크로스, 및 트레할로스의 배합물로부터 선택되는 염화 나트륨 안정화제; (v) 메글루민 단독; 슈크로스와 배합물로의 메글루민; 염화 나트륨과의 배합물로의 메글루민; 및 염화 나트륨 및 슈크로스와 배합물로부터 선택되는 메글루민 안정화제; 및 (vi) 당과 폴리올의 배합물로부터 선택되는 추가의 안정화 성분을 포함할 수 있다.

[0012]

따라서, 한 실시형태에서, 본 발명은, 에타너셉트, 육안으로 보이지 않는 입자 형성에 대한 안정화를 위한 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제, 및 에타너셉트의 불안정성, 응집, 및/또는 단편화를 억제하기 위한 추가의 안정화제 성분을 포함하는, 안정한 수성 약제학적 조성물을 제공하고, 여기서, 상기 추가의 안정화제는, 세린, 프롤린, 및 글루타메이트로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 화합물을 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 상기 안정화제는 글루타메이트를 포함한다.

[0013]

다른 실시형태에서, 본 발명은, 에타너셉트, 육안으로 보이지 않는 입자 형성에 대한 안정화를 위한 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제, 및 에타너셉트의 불안정성, 응집, 및/또는 단편화를 억제하기 위한 추가의 안정화제를 포함하는, 안정한 수성 약제학적 조성물을 제공하고, 여기서, 상기 추가의 안정화제는 안정화 금속 이온을 포함한다. 바람직하게는 상기 계면활성제는 폴리소르베이트 80 또는 플루로닉 F-68이고, 상기 금속 이온은, 칼슘, 마그네슘, 아연, 및 이들의 배합물로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 보다 더 바람직한 실시형태에서, 칼슘, 마그네슘, 아연은 각각 염화 칼슘, 염화 마그네슘, 및 염화 아연으로서 제공된다. 염화 칼슘 및 염화 마그네슘은 에타너셉트를 위한 안정화제로서 특히 바람직하다.

[0014]

추가 실시형태에서, 본 발명은, 에타너셉트, 육안으로 보이지 않는 입자 형성에 대한 안정화를 위한 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제, 및 에타너셉트의 불안정성, 응집, 및/또는 단편화를 억제하기 위한 추가의 안정화제 성분을 포함하는, 안정한 수성 약제학적 조성물을 제공하고, 여기서, 상기 추가의 안정화제는, 이온성 폴리올 유도체, 예를 들면, 메글루민, 만노실글리세레이트, 글루코실글리세레이트, 만노실글리세레이트, 및 디글리세롤포스페이트로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 이러한 실시형태에서, 에타너셉트의 바람직한 수성 안정화된 제형은, 에타너셉트; 폴리소르베이트 80 계면활성제 또는 플루로닉 F-68 계면활성제; 및 제형 중의 에타너셉트의 불안정성, 응집, 및 단편화를 지연시키기 위한 안정화 성분을 포함하고, 상기 안정화 성분은 (a) 메글루민; 또는 (b) 슈크로스와 배합물로의 메글루민; 또는 (c) 염화 나트륨과의 배합물로의 메글루민; 또는 (d) 염화 나트륨 및 슈크로스와 배합물로의 메글루민으로 구성된다.

- [0015] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은, 에타너셉트, 육안으로 보이지 않는 입자 형성에 대한 안정화를 위한 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제, 및 에타너셉트의 불안정성, 응집, 및/또는 단편화를 억제하기 위한 추가의 안정화제 성분을 포함하는, 안정한 수성 약제학적 조성물을 제공하고, 여기서, 상기 추가의 안정화제는 당과 폴리올의 배합물을 포함한다. 바람직하게는 상기 계면활성제는 PS-80 또는 플루로닉 F-68이고, 상기 당은 슈크로스이며, 상기 폴리올은, 만니톨 및 소르비톨로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 이러한 실시형태의 추가의 양상에서, 상기 당은 텍스트로스이고, 상기 폴리올은, 만니톨 및 소르비톨로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 이러한 실시형태의 특히 바람직한 예에 있어서, 본 발명은, 슈크로스와 만니톨의 배합물이 존재하여 에타너셉트 단량체의 안정화를 제공하는, 안정화된 에타너셉트 제형에 관한 것이다.
- [0016] 추가의 실시형태에서, 본 발명은, 에타너셉트, 육안으로 보이지 않는 입자 형성에 대한 안정화를 위한 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제를 포함하는, 안정한 수성 약제학적 조성물을 제공하고, 여기서, 본 발명은, 에타너셉트의 불안정성, 응집, 및/또는 단편화를 감소시키기 위한 안정화를 위한 추가의 성분을 제공하고, 상기 제형은, 약 25 내지 약 75mg/ml의 에타너셉트, 및 1종 이상의 안정화제를 포함하고, 여기서, 상기 추가의 안정화제 성분은, (i) 염화 나트륨, 및 (ii) 슈크로스 또는 트레할로스의 배합물로의 염화 나트륨; 및 (iii) 염화 나트륨, 슈크로스, 및 트레할로스의 배합물로 이루어진 그룹으로부터 선택되며; 여기서, 육안으로 보이지 않는 입자의 감소를 위한 안정화제/계면활성제는 바람직하게는 PS 80 또는 플루로닉 F-68이다.
- [0017] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은, 에타너셉트, 육안으로 보이지 않는 입자 형성에 대한 안정화를 위한 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제, 바람직하게는 PS-80 또는 플루로닉 F-68을 포함하는, 안정한 수성 약제학적 조성물을 제공하고, 여기서, 본 발명은, 에타너셉트의 불안정성, 응집, 및/또는 단편화를 억제하기 위한 추가의 안정화 성분을 제공하며, 여기서, 상기 추가의 안정화제는 크실리톨, 또는 크실리톨과 메글루민의 배합물을 포함한다.
- [0018] 본 발명은, 추가로, 에타너셉트 제형 중의 육안으로 보이지 않는 입자의 수를 감소시키기 위한 방법에 관한 것이고, 상기 방법은, 제형의 ml당 약 1 내지 10마이크론의 크기를 갖는 육안으로 보이지 않는 입자의 수가, 상기 계면활성제의 부재 하에 제조된 동일한 제형과 비교하여, 50% 이상, 바람직하게는 약 60 내지 70% 이상 감소되도록(여기서, 육안으로 보이지 않는 입자의 수는, 제형이 제조되는 시점에, 그리고, 임의의 인지가 가능한 보관 또는 이의 열적 스트레스 전에 수행된 플로우캠 분석에 의해 측정된다), 에타너셉트 제형에 계면활성제, 바람직하게는 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제를, 상기 제형의 약 0.0001 내지 약 0.5w/v%(바람직하게는 약 0.01 내지 약 0.05w/v%)를 이루는 양으로 첨가하는 단계를 포함한다.
- [0019] 추가의 실시형태에서, 본 발명은, 최종 용량형 중의 에타너셉트 제형을 함유하는 격납(containment) 수단을 포함하는 제조 물품을 제공하고, 여기서, 상기 제형은 에타너셉트 및 약제학적으로 허용되는 계면활성제를 포함하며, 여기서, 상기 제형 중에 존재하는 육안으로 보이지 않는 입자의 양은, 계면활성제가 결여되어 있는 동일한 제형과 비교하여 실질적으로 감소된다. 0.0005 내지 1%(w/v)의 범위 내의 양으로 제형 중에 존재하는 계면활성제는 바람직하게는 상기 인용된 바와 같은 폴리소르베이트(예를 들면, 폴리소르베이트 80) 또는 폴록사머 계면활성제(예를 들면, 플루로닉 F-68)이다. 필요한 경우, 함유된 제형은, 상기 논의된 추가의 안정화 성분들 중 하나 이상을 포함할 수 있다. "T0"에서의 flowCAM 분석과 같은 종래 수단에 의해 측정된, 함유된 제형 중의 육안으로 보이지 않는 입자의 양은, 상기 제형이 (i) 약 5 내지 10 $\mu$ m의 크기를 갖는 입자를 ml당 약 2500개 미만으로; (ii) 약 2 내지 5 $\mu$ m의 크기를 갖는 입자를 3500개 미만으로; 그리고 (iii) 약 1 내지 2 $\mu$ m의 크기를 갖는 입자를 ml당 약 700개 미만으로 갖도록 존재하는 것이 바람직하다. 함유된 에타너셉트/계면활성제 제형 중에 존재하는 육안으로 보이지 않는 입자의 수준은, 계면활성제를 갖지 않는 동일한 함유된 제형과 비교하여 육안으로 보이지 않는 입자의 바람직하게는 약 50% 내지 70% 이상의 감소를 나타낸다.
- [0020] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은, 에타너셉트 제형 중의 육안으로 보이지 않는 입자에 대한 대상체의 노출을 감소시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은, 대상체에게 에타너셉트 및 약제학적으로 허용되는 계면활성제를 포함하는 에타너셉트 제형을 투여함을 포함하며, 여기서, 상기 제형 중에 존재하는 육안으로 보이지 않는 입자의 양은, 계면활성제가 결여되어 있는 동일한 제형과 비교하여 실질적으로 감소된다. 0.0005 내지 1%(w/v)의 범위 내의 양으로 제형 중에 존재하는 계면활성제는 바람직하게는 상기 인용된 바와 같은 폴리소르베이트(예를 들면, 폴리소르베이트 80) 또는 폴록사머 계면활성제(예를 들면, 플루로닉 F-68)이다. 필요한 경우, 함유된 제형은, 상기 논의된 추가의 안정화 성분들 중 하나 이상을 포함할 수 있다. "T0"에서의 flowCAM 분석과 같은 종래 수단에 의해 측정된, 상기 제형 중의 육안으로 보이지 않는 입자의 양은, 상기 제형이 (i) 약 5 내지 10 $\mu$ m의 크기를 갖는 입자를 ml당 약 2500개 미만으로; (ii) 약 2 내지 5 $\mu$ m의 크기를 갖는 입자를 약 3500개 미만으로; 그리고 (iii) 약 1 내지 2 $\mu$ m의 크기를 갖는 입자를 ml당 약 700개 미만으로 갖도록 존재하는 것이 바람직하다. 에

타너셉트/계면활성제 제형 중에 존재하는 옥안으로 보이지 않는 입자의 수준은, 계면활성제를 갖지 않는 동일한 제형과 비교하여 옥안으로 보이지 않는 입자의 바람직하게는 약 50% 내지 70% 이상의 감소를 나타낸다.

[0021]

시판 에타너셉트와 달리, 본 발명자들은, 놀랍게도 본원에 기술되고 예시되는 에타너셉트의 제형 실시형태의 각각이 장기 안정화를 위해 아르기닌을 필요로 하지 않지만, 여전히 필요에 따라 아르기닌이 첨가될 수도 있음을 발견하였다. 또한, 아르기닌의 존재 또는 부재 하에, 그리고 본원에 기술되는 계면활성제들을 이용하여, 상기 제형은, 옥안으로 보이지 않는 입자의 우수한 감소를 나타낼 수 있다. 아르기닌 부재 하에 안정화되어 옥안으로 보이지 않는 입자 형성에 대한 우수한 저항성을 나타내는 에타너셉트 제형을 제공하는 능력은, 환자들 및 의료인들에게, 안정화를 위해 아르기닌을 필요로 하는 현재 시판되는 에타너셉트 제형(즉, Enbrel®)과 비교하여 보다 저비용으로 입수가능해질 수 있는 시판 Enbrel®의 바이오시밀러(biosimilar) 및 바이오베터(biobetter) 이형을 포함하는 대안의 에타너셉트 제형을 제공함으로써 의료 시스템에 대한 잠재적으로 유의한 이점을 나타낸다. 옥안으로 보이지 않는 입자의 감소는, 또한, 단백질 치료제의 면역원성을 감소시키는 관점에서 매우 유의한 장점으로 보여진다.

[0022]

본원에 사용된 바와 같은 용어 "불안정성" 또는 유사 용어는, 각종 입자 크기의 옥안으로 보이지 않는 입자의 형성 또는 존재를 초래할 수 있는 형질전환을 포함하는, 보관 동안의 바람직하지 못한 각종 형질전환을 경험하는 에타너셉트 단량체의 경향성을 나타낸다. 이러한 형질전환은, 실질적으로 온전한 에타너셉트 단량체의 다중 카피들이 각종 비-공유결합적 인력(예를 들면, 정전기적 상호작용)을 통해 서로 무작위적으로 회합되는, 매우 높은 분자량의 응집체(들)의 형성을 포함한다. 보관 동안의 바람직하지 못한 형질전환은, 또한, 보다 작은 단편들 및/또는 올리고머들의 에타너셉트 단량체의 분해를 포함할 수 있다. 이상적으로, 에타너셉트의 제형은, 보관 동안 에타너셉트 단량체의 옥안으로 보이는 입자, 응집체, 올리고머, 및/또는 단편의 형성을 초래하는 상기 제형의 경향성을 가능한 최대 정도로 최소화해야만 한다. 원치 않는 응집체 또는 단편의 형성을 감소시키는 능력으로부터 얻어지는 중요한 이점은 약물의 면역원성의 감소이다.

[0023]

상기 인용된 실시형태들의 각각은, 아르기닌을 함유하지 않거나, 아르기닌을 실질적으로 함유하지 않는 제형으로 제공될 수 있다. 용어 "아르기닌을 실질적으로 함유하지 않는"은, 아르기닌이, 존재하는 경우라도, 당해 분야 숙련가가 아르기닌의 존재가 안정화 관점에서 이롭다고 판단할 수 있는 정도로 제형 중의 에타너셉트 단량체의 안정화에 기여하지 않음을 의미하도록 의도된다.

[0024]

이들 양상 및 다른 양상들은 각종 실시형태의 하기 설명으로부터 명백해질 것이지만, 이들의 이형 및 변형은, 본 개시의 신규한 개념의 정신 및 범위로부터 벗어나지 않으면서 영향을 미칠 수 있다.

[0025]

상기 일반적인 설명 및 하기 상세한 설명 둘 다는 예시적이고, 단지 설명하기 위한 것이고, 특허청구범위로 본 발명을 제한하지 않음이 이해되어야만 한다.

### 도면의 간단한 설명

[0026]

도 1은, 명세서의 표 VIII의 데이터에 상응하는 "T0"에서 측정된 옥안으로 보이지 않는 입자에 대한 flowCAM 분석을 나타내는 막대 도표이다. 명세서에서 추가로 설명된 "T0"은, 연구된 샘플에 인지가 가능한 열적 스트레스 또는 보관 시간을 수행하지 않은 시점에서의 옥안으로 보이지 않는 입자의 평가를 나타낸다. Y 축 상의 값은 ml 당 입자이다. 범례에서: F02C는 실시예 4.2의 제형(PS80 부재)이고; F03C는 실시예 3.5의 제형(PS 80 부재)이며; F04C는 Enbrel®이고; F05C는 실시예 4.2의 제형(PS 80 존재)이고; F06C는 실시예 3.5의 제형(PS80 존재)이다. 그래프의 데이터는, 계면활성제를 함유하지 않는 동일한 제형에 비하여, PS80이 실시예 4.2 및 실시예 3.5의 제형 중에 존재하는 경우에 옥안으로 보이지 않는 입자의 현저한 감소를 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027]

본 발명의 각종 실시형태는 하기에 상세하게 설명된다. 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용에서, 그리고 특허청구범위에 걸쳐 사용되는 바와 같은 "한(a)", "하나(an)" 및 "상기(the)"의 의미는, 문맥이 달리 명확하게 나타내지 않는 한 복수 참조를 포함한다. 또한, 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용에서, 그리고 특허청구범위에 걸쳐 사용되는 바와 같은 "중(in)"의 의미는, 문맥이 달리 명확하게 나타내지 않는 한 "중" 및 "상(on)"을 포함한다. 추가로, 본 명세서에서 사용된 일부 용어들은 하기에 보다 구체적으로 정의된다.

[0028]

### 정의

[0029]

본 명세서에서 사용된 용어들은, 일반적으로 본 발명의 문맥 내에서, 그리고 각각의 용어가 사용되는 특정 문맥

에서 이들 용어의 당해 분야에서의 통상적 의미를 갖는다. 본 발명을 설명하기 위해 사용되는 소정 용어들은, 본 발명의 설명을 고려하는 의사에게 추가의 지도를 제공하기 위해, 하기에, 또는 그렇지 않으면 명세서에 논의된다. 소정 용어에 대한 동의어가 제공된다. 하나 이상의 동의어의 나열은, 다른 동의어들의 사용을 배제하지 않는다. 본원에 논의되는 임의의 용어의 예를 포함하는 본 명세서 전체에서의 예의 사용은 단지 설명을 위한 것이고, 본 발명의 범위 및 의미, 또는 임의의 예시된 용어의 범위 및 의미를 제한하지 않는다. 본 발명은, 본 명세서에 제공된 각종 실시형태들에 제한되지 않는다.

[0030] 달리 정의하지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은, 본 발명이 속하는 당해 분야의 숙련가 중 하나에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 상충하는 경우, 정의를 포함하는 본 발명의 문헌이 제어할 것이다.

[0031] "약(around, about)" 또는 "대략(approximately)"은 일반적으로 주어진 값 또는 범위의 20% 내, 10% 내, 5, 4, 3, 2, 또는 1% 내를 의미할 것이다. 주어진 수적 양은 대략적이고, 이는 용어 "약" 또는 "대략"이 명백하게 언급되지 않는 경우에 추론될 수 있음을 의미한다.

[0032] 용어 "에타너셉트", 또는 "에타너셉트 단량체" 또는 "단량체"는 Enbrel®과 동의어이다. 이는, 사람 IgG1의 Fc 부분에 연결된 사람 75킬로달톤(p75) 중양 피사 인자 수용체(TNFR)의 세포외 리간드-결합부로 이루어진 이량체성 융합 폴리펩타이드인 폴리펩타이드를 말한다. 이는 934개의 아미노산들로 이루어지고, 대략 150킬로달톤의 겉보기 분자량을 갖는다. 본 출원의 목적을 위해, 용어 "에타너셉트"는, 또한, 에타너셉트의 기능, 효력, 또는 산가에 유의한 영향을 미치지 않는 아미노산 구조 내의 소량의 변형(아미노산들의 결실, 부가, 및/또는 치환 포함)을 갖는 에타너셉트를 포함한다. 용어 "에타너셉트"는, 농축된 제형, 주사가 가능한 즉시-사용(ready-to-use) 제형; 물, 알콜, 및/또는 다른 성분, 및 기타로 재구성되는 제형을 포함하지만 이들에 한정되지 않는 모든 형태 및 제형의 Enbrel®을 포함한다. 용어 에타너셉트는, 또한, 시판 Enbrel®에 사용되는 에타너셉트의 바이오시밀러 또는 바이오베터 이형을 포함하는 것으로 의도된다. 예를 들면, 에타너셉트의 바이오시밀러 또는 바이오베터는 시판 Enbrel®과 약간 상이한 당화(glycosylation) 프로파일을 가질 수 있다. 또한, 시판 Enbrel®에서 발견되는 에타너셉트의 바이오시밀러 또는 바이오베터 이형은, 활성 에타너셉트 성분을 구성하는 응집체의 양의 감소를 나타낼 수 있다.

[0033] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "단량체"는, 상기 인용된 이량체성 에타너셉트 융합 단백질을 의미하는 것으로 의도된다.

[0034] 용어 "메글루민"은, 1-데옥시-1-메틸아미노소르비톨; N-메틸-D-글루카민; 및 1-데옥시-1-메틸아미노-D-글루시톨로서도 공지되어 있는 화학식  $H_3NHCH_2(CHOH)_4CH_2OH$ 를 갖는 화합물을 말한다.

[0035] 용어 "만노실글리세레이트", "만노실락테이트", "만노실글리콜레이트", 및 "디글리세롤포스페이트"는 당해 분야에 익히 공지되어 있고, 이들의 통상적으로 허용되는 의미를 갖는다. 하기 참조 문헌은 이들 화합물을 다소 상세하게 기술한다: Faria et al., *Carbohydrate Res.* **2008**, 343: 3025-3033; Borges et al., *Extremophiles* **2002**, 6: 209-216; Faria et al., *ChemBioChem* **2003**, 4: 734-741; Sawangwan et al., *Biotechnol. J.* **2010**, 5: 187-191; 및 Pais et al., *J. Mol. Biol.* **2009**, 394: 237-250. 본 출원은, 이들 참조 문헌에 포함된 이들 화합물의 설명을 인용에 의해 포함한다. 용어 "세린"은, 코돈이 UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, 및 AGC인 아미노산을 말한다.

[0036] 용어 "프롤린"은, 코돈이 CCU, CCC, CCA, 및 CCG인 α-아미노산을 말한다.

[0037] 용어 "글루타메이트"는, 글루탐산(Glu)의 카르복실레이트 음이온 또는 염을 말한다. 본 출원의 목적을 위해, 용어 "글루타메이트"는, 또한, 글루탐산 자체도 포함한다.

[0038] 용어 "당"은 모노사카라이드, 디사카라이드, 및 폴리사카라이드를 말한다. 당의 예로는 슈크로스, 글루코스, 및 텍스트로스 등이 포함되지만, 이들에 제한되는 것은 아니다.

[0039] 용어 "폴리올"은, 다중 하이드록실 그룹을 함유하는 알콜을 말한다. 폴리올의 예로는 만니톨, 및 소르비톨 등이 포함되지만, 이들에 제한되는 것은 아니다.

[0040] 용어 "금속 이온"은, 순수한 양성 또는 음성 전하를 갖는 금속 원자를 말한다. 본 출원의 목적을 위해, 용어 "금속 이온"은, 또한, 금속염을 포함하지만 이에 제한되지 않는 금속 이온의 공급원도 포함한다.

[0041] 용어 "장기 보관"은, 약제학적 조성물이 3개월 이상 동안, 6개월 이상 동안, 그리고 바람직하게는 1년 이상 동안

안 보관될 수 있음을 의미하는 것으로 이해된다. 장기 보관은, 또한, 약제학적 조성물이 2 내지 8℃에서 액체로서 보관되거나, 예를 들면, -20℃ 이하에서 동결됨을 의미하는 것으로 이해된다. 또한, 상기 조성물은 1회 초과로 동결 및 해동될 수 있음이 고려된다.

[0042] 장기 보관과 관련하여 용어 "안정한" 또는 "안정화된"은, 약제학적 조성물 중에 함유된 에타너셉트가, 보관의 개시시의 조성물의 활성에 비하여, 에타너셉트의 활성의 20%, 또는 보다 바람직하게는 15%, 또는 더욱 더 바람직하게는 10%, 그리고 가장 바람직하게는 5% 초과를 잃지 않음을 의미하는 것으로 이해된다. 안정성은, 또한, 장기 보관 후에 육안으로 보이지 않는 입자를 나타내는 에타너셉트 제형의 감소된 경향성을 나타낸다.

[0043] 용어 "포유동물"은 사람을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0044] 용어 "약제학적으로 허용되는 담체"는 비-독성 고체, 반고체, 또는 액체 충전제, 희석제, 캡슐화 재료, 제형 보조제, 또는 임의의 종래 유형의 부형제를 말한다. 약제학적으로 허용되는 담체는, 사용된 용량 및 농도에서 수용체에 대해 비독성이고, 제형의 다른 성분들과 혼화성(compatible)이다.

[0045] 용어 "조성물"은, 일반적으로 담체, 예를 들면, 당해 분야에 종래 존재하고 치료학적, 진단학적, 또는 예방학적 목적을 위해 대상체에게 투여하기에 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 함유하는 혼합물을 말한다. 이는, 세포에 또는 배양 배지에 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드가 존재하는 세포 배양물을 포함할 수 있다. 예를 들면, 경구 투여용 조성물은 용액, 현탁액, 정제, 환제, 캡셀제, 서방형 제형, 경구 린스제, 또는 산제를 형성할 수 있다.

[0046] 용어 "약제학적 조성물" 및 "제형"은 상호교환적으로 사용된다.

[0047] 용어 "치료"는, 포유동물의 질환에 대한 약(remedy)의 임의의 투여 또는 적용을 말하고, 용어 "치료"는, 예를 들면, 손실된, 상실된, 또는 결함이 있는 기능을 회귀시키거나 회복시키거나 수복시키거나; 또는 비효율적인 프로세스를 자극함으로써 질환을 억제하고, 질환의 발병을 저지하고, 질환을 경감시킴을 포함한다. 상기 용어는, 포유동물의 병리학적 병태 또는 장애의 임의의 치료를 포괄하는 바람직한 약리학 및/또는 생리학적 효과를 수득함을 포함한다. 효과는, 장애 또는 이의 증상을 완전히 또는 부분적으로 예방하는 관점에서 예방학적일 수 있고/있거나, 장애에 대한 부분적 또는 완전한 치유 및/또는 장애에 기여하는 유해 영향의 관점에서 치료학적일 수 있다. 이는, (1) 장애에 취약할 수 있지만 아직 증상을 보이지 않는 대상체에서 장애가 발생하거나 재발하는 것을 예방함, (2) 장애의 발병을 저지하는 등 장애를 억제함, (3) 장애 또는 장애의 증상들을 회귀시킴으로써, 예를 들면, 장애 또는 장애의 증상들을 회귀시키거나, 손실된, 상실된, 또는 결함이 있는 기능을 회복시키거나 수복시키거나, 또는 비효율적인 프로세스를 자극함으로써, 숙주가 장애 또는 장애의 증상들을 더 이상 앓지 않도록, 장애 또는 적어도 장애와 관련된 증상들을 정지시키거나 종료시킴, 또는 (4) 장애, 또는 장애와 관련된 증상들을 경감시키거나 완화시키거나 개선시킴(여기서, 개선은, 적어도 매개변수의 규모, 예를 들면, 염증, 통증, 및/또는 종양 크기의 감소를 나타내는 넓은 의미로 사용된다)을 포함한다.

[0048] 용어 "질환"은, 의료적 개입을 필요로 하거나 의료적 개입이 바람직한 임의의 병태, 감염, 장애, 또는 증후군을 말한다. 이러한 의료적 개입은 치료, 진단, 및/또는 예방을 포함할 수 있다.

[0049] 용어 "치료학적 유효량"은, 살아있는 대상체에게 투여되는 경우 상기 살아있는 대상체에 대해 바람직한 효과를 달성하는 양을 말한다. 예를 들면, 살아있는 대상체에게 투여를 위한 본 발명의 폴리펩타이드의 유효량은, 인테그린  $\alpha v \beta 3$ -매개된 질환을 예방하고/하거나 치료하는 양이다. 정확한 양은 치료의 목적에 의존할 것이고, 공지되어 있는 기술을 이용하여 당해 분야의 숙련가에 의해 확인될 수 있을 것이다. 당해 분야에 공지되어 있는 바와 같이, 전신 전달 대 국소 전달, 연령, 체중, 일반적 건강, 성별, 식이, 투여 시점, 약물 상호작용, 및 병태의 중증도에 대한 조정이 필요할 수 있으며, 당해 분야의 숙련가에 의해 일상적 실험으로 확인될 수 있을 것이다.

[0050] 용어 "T<sub>1</sub>"은, 에타너셉트 제형이 40℃에서 약 1주 동안 보관된 시점을 말한다.

[0051] 용어 "T<sub>2</sub>"는, 에타너셉트 제형이 40℃에서 약 2주 동안 보관된 시점을 말한다.

[0052] 용어 "T<sub>4</sub>"는, 에타너셉트 제형이 40℃에서 약 4주 동안 보관된 시점을 말한다.

# [0053] 본 발명의 실시형태

[0054] 에타너셉트의 수성 및 동결건조된 제형을 포함하는 에타너셉트를 함유하는 약제학적 조성물(Enbrel®)이 장기 단위로 보관되는 경우, 에타너셉트의 활성은, 단편 및 올리고머의 형성을 포함하는 응집 및/또는 분해를 통한

에타너셉트 단량체의 불안정성으로 인해 상실되거나 감소될 수 있다. 또한, 제형은 시간 경과에 따라 육안으로 보이지 않는 입자를 나타낼 수 있다. 따라서, 본 발명은, 에타너셉트가 액체 상태 또는 동결된 상태에서의 보관 과정에 걸쳐 안정하도록, 에타너셉트의 안정한 장기 보관, 및 육안으로 보이지 않는 입자의 감소를 가능하게 하는 에타너셉트의 수성 제형의 몇몇의 실시형태를 제공한다. 제공되는 제형으로는, 아르기닌을 함유하지 않고 재수화와 같은 임의의 추가의 단계를 필요로 하지 않는 제형이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0055] 이들 실시형태는 하기에 보다 상세하게 설명된다.

[0056] 에타너셉트

[0057] 본 발명의 조성물의 전부는, 시판 Enbrel®에 사용된 에타너셉트의 바이오시밀러 또는 바이오베터 이형을 포함하는 에타너셉트의 사용을 고려한다. 본 출원의 배경기술 섹션에 설명된 바와 같이, 에타너셉트는, 사람 IgG1의 Fc 부분에 연결된 사람 75킬로달톤(p75) 중양 과사 인자 수용체(TNFR)의 세포외 리간드-결합부로 이루어진 이량체성 융합 폴리펩타이드이다. 에타너셉트는 934개의 아미노산들로 이루어진다. 에타너셉트의 Fc 구성성분은, 사람 IgG1의 불변 중쇄 2(CH2) 도메인, 불변 중쇄 3(CH3) 도메인, 및 힌지 영역을 포함한다. Fc 도메인은, 상기 기술된 도메인들 중 하나 또는 전부를 포함할 수 있다.

[0058] 본 발명의 약제학적 조성물 중의 보관에 적합한 에타너셉트는, 에타너셉트를 발현하는 살아있는 숙주 세포, 예를 들면, 항체의 경우에는 하이브리도마, 또는 융합 폴리펩타이드 또는 항체의 경우에는 폴리펩타이드를 생산하도록 유전적으로 조작된 숙주 세포에 의해 생산될 수 있다. 폴리펩타이드를 생산하기 위해 세포를 유전자 조작하는 방법은 당해 분야에 익히 공지되어 있다. 예를 들면, 문헌[Ausubel et al., eds. (1990), Current Protocols in Molecular Biology (Wiley, New York)]을 참조한다. 이러한 방법은, 살아있는 숙주 세포에 폴리펩타이드를 암호화하고 폴리펩타이드의 발현을 가능하게 하는 핵산을 도입함을 포함한다. 이들 숙주 세포는, 배양물에서 성장된 세균 세포, 진균 세포, 또는 바람직하게는 동물 세포일 수 있다. 세균 숙주 세포로는 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 세포가 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 적합한 이. 콜라이(*E. coli*) 균주의 예로는 HB101, DH5, 알파, GM2929, JM109, KW251, NM538, NM539, 및 외인성 DNA를 개입시키는데 실패한 임의의 이. 콜라이 균주가 포함된다. 사용될 수 있는 진균 숙주 세포로는 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*), 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 및 아스퍼질러스(*Aspergillus*) 세포가 포함되지만, 이들에 제한되는 것은 아니다. 사용될 수 있는 동물 세포주의 몇몇의 예로는 CHO, VERO, BHK, HeLa, Cos, MDCK, 293, 3T3, 및 W138이 존재한다. 새로운 동물 세포주는, 당해 분야 숙련가에게 익히 공지되어 있는 방법을 이용하여(예를 들면, 형질전환, 바이러스 감염, 및/또는 선택에 의해) 확립할 수 있다. 임의로, 에타너셉트는 숙주 세포에 의해 배지에 분비될 수 있다.

[0059] 발현된 에타너셉트의 정제는 임의의 표준 방법에 의해 수행될 수 있다. 에타너셉트가 세포내에서 생산되는 경우, 미립자 잔해는, 예를 들면, 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거된다. 에타너셉트가 배지에 분비되는 경우, 이러한 발현 시스템으로부터의 상청액은 우선 표준 폴리펩타이드 농축 필터를 이용하여 농축될 수 있다. 또한, 프로테아제 억제제를 첨가하여 단백질 분해를 억제할 수 있고, 항생제를 포함시켜 미생물의 성장을 방지할 수 있다.

[0060] 에타너셉트는, 예를 들면, 하이드록시아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 및 친화성 크로마토그래피, 및 또는 단백질 A 크로마토그래피, 이온-교환 컬럼 상의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상의 크로마토그래피, 헤파린 SEPHAROSE® 상의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수치 크로마토그래피(예를 들면, 폴리아스파르트산 컬럼), 크로마토포킹, SDS-PAGE, 및 황산 암모늄 침전을 포함하지만 이들에 제한되지 않는 공지되어 있거나 발견될 정제 기술의 임의의 조합을 이용하여 정제할 수 있다.

[0061] I. 계면활성제 + 세린, 프롤린, 또는 글루타메이트를 이용하여 안정화된 에타너셉트

[0062] 한 실시형태에서, 본 발명은, 에타너셉트, 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제, 및 에타너셉트의 불안정성, 응집, 및/또는 단편화를 억제하기 위한 안정화제를 포함하는 안정한 수성 약제학적 조성물을 제공하고, 여기서, 상기 안정화제는, 세린, 프롤린, 및 글루타메이트로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 화합물을 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 상기 안정화제는 글루타메이트를 포함한다.

[0063] 본 발명의 임의의 특정 이론에 얽매이도록 의도되지 않으면서, 세린, 프롤린, 및 글루타메이트는 안정화제로서 작용하여, 바람직하지 못한 3급 또는 4급 복합체에 회합되는 에타너셉트의 경향성을 감소시키고, 따라서, 에타너셉트의 응집을 감소시키는 것으로 생각된다. 응집의 감소는, 장기의 시간, 예를 들면, 2년 이상 동안 지속되는 것으로 생각된다. 세린, 프롤린, 및 글루타메이트가, 에타너셉트를 함유하는 수성 약제학적 조성물을 안정화시

킬 수 있고, 이것은, 이들이 단백질의 표면으로부터 제외되어 순전한 입체구조(net conformation) 안정화를 초래하기 때문이라고 생각된다. 세린, 프롤린, 및/또는 글루타메이트의 안정화 효과로는 단량체를 함유하는 제형 중의 에타너셉트 단량체의 감소된 응집의 이점이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0064] 본 발명의 약제학적 조성물은, 정제된 에타너셉트와 언급된 안정화제를 배합함으로써 제조될 수 있다. 또한, 완충제, 등장성 변형제, 및 추가의 부형제, 및 기타 통상적으로 사용되는 비활성 성분이 필요에 따라 첨가될 수 있다. 편의를 위해, 이들은 후에 명세서에 보다 완전하게 논의된다. 당해 분야의 숙련가는, 본 발명의 조성물에 포함되는 각종 구성성분들의 배합을 임의의 적절한 순서로 수행할 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들면, 완충제는 처음에, 중간에, 또는 마지막에 첨가할 수 있고, 등장성 변형제도, 또한, 처음에, 중간에, 또는 마지막에 첨가할 수 있다. 당해 분야의 숙련가는, 또한, 이들 화학물질 중 일부가 소정 배합물에서 비혼화성(incompatible)일 수 있고, 따라서, 유사한 특성을 갖지만 관련 혼합물에서 혼화성인 다른 화학물질로 쉽게 치환된다는 것을 이해할 것이다.

[0065] 바람직한 실시형태에서, 제공된 제형 중의 세린, 프롤린, 또는 글루타메이트 안정화제의 농도는 바람직하게는 약 150mM 이하이다.

[0066] 세린, 프롤린, 및 글루타메이트는 시판 공급업자들로부터 입수가능하다.

[0067] 안정화제가 계면활성제 및 글루타메이트를 포함하는 실시형태에서, 본 발명의 제형은 약 0.01 내지 약 0.05%(w/v)의 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제; 약 25 내지 약 50mg/ml의 에타너셉트; 150mM 이하의 글루타메이트; 약 6wt% 미만의 슈크로스; 임의로 약 100mM 이하의 NaCl; 약 1 내지 약 30mM의 인산 나트륨을 포함할 수 있고, 여기서, 상기 제형은 pH 6.0 내지 약 pH 7.0, 보다 바람직하게는 약 6.0 내지 약 6.6, 가장 바람직하게는 약 6.3 내지 약 6.5의 pH를 갖는다.

[0068] 안정화제가 계면활성제 및 세린을 포함하는 실시형태에서, 본 발명의 제형은 약 0.01 내지 약 0.05%(w/v)의 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제; 약 25 내지 약 50mg/ml의 에타너셉트; 약 150mM 미만의 세린; 약 0.5 내지 약 3wt%의 슈크로스; 약 1 내지 약 30mM의 인산 나트륨을 포함할 수 있고, 여기서, 상기 제형은 pH 6.0 내지 약 pH 7.0, 보다 바람직하게는 약 6.0 내지 약 6.6, 가장 바람직하게는 약 6.3 내지 약 6.5의 pH를 갖는다.

[0069] 안정화제가 프롤린을 포함하는 실시형태에서, 본 발명의 제형은 약 0.01 내지 약 0.05%(w/v)의 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제; 약 25 내지 약 50mg/ml의 에타너셉트; 약 150mM 미만의 프롤린; 약 0.5 내지 약 3wt%의 슈크로스; 약 1 내지 약 30mM의 인산 나트륨, 약 15 내지 약 100mM의 NaCl을 포함할 수 있고; 여기서, 상기 제형은 pH 6.0 내지 약 pH 7.0, 보다 바람직하게는 약 6.0 내지 약 6.6, 가장 바람직하게는 약 6.3 내지 약 6.5의 pH를 갖는다.

[0070] 세린, 프롤린, 또는 글루타메이트를 포함하는 본 발명에 따른 에타너셉트 제형은, T<sub>2</sub>에서의 SEC 분석에서의, 바람직하게는 약 80 내지 약 95wt%의 단량체 함량; 약 4wt% 미만의 응집체(들) 함량; 및 약 8wt% 미만의 단편 3 함량을 특징으로 한다.

[0071] 안정화를 위해 세린, 프롤린, 또는 글루타메이트를 함유하는 제형에서, 상기 제형은 보다 바람직하게는

[0072] (a) T<sub>4</sub>에서의 SEC 분석에서의, 약 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 또는 97wt% 초과인 단량체 함량; 및 약 3, 2, 또는 1wt% 미만의 응집체(들) 함량; 및

[0073] (b) T<sub>2</sub>에서의 HIC 분석(여기서, HIC 크로마토그램의 피크 1로 표시되는 조성물의 양은 약 3, 2, 또는 1wt% 미만이고; HIC 크로마토그램의 피크 2로 표시되는 조성물의 양은 80, 81, 82, 83, 84, 또는 85wt% 초과이며; HIC 크로마토그램의 피크 3으로 표시되는 조성물의 양은 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 또는 13wt% 미만이다); 및

[0074] (c) T<sub>4</sub>에서의 HIC 분석(여기서, HIC 크로마토그램의 피크 1로 표시되는 조성물의 양은 약 3, 2, 또는 1wt% 미만이고; HIC 크로마토그램의 피크 2로 표시되는 조성물의 양은 80, 81, 82, 83, 84, 또는 85wt% 초과이며; HIC 크로마토그램의 피크 3으로 표시되는 조성물의 양은 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 또는 13wt% 미만이다)을 특징으로 한다.

[0075] 용어 "SEC", "T<sub>2</sub>", "T<sub>4</sub>", "HIC", "단량체 함량", "응집체(들)", 및 "단편 3", "피크 1", "피크 2", 및 "피크 3"은 하기 실시예에서 정의된다.

[0076] 안정화를 위해 계면활성제 + 세린, 프롤린, 또는 글루타메이트를 함유하는 특히 바람직한 제형에서는 바람직한

게 T<sub>4</sub> 또는 T<sub>2</sub>에서의 HIC 분석을 갖는 것을 특징으로 하고, 여기서, HIC 크로마토그램의 피크 1로 표시되는 조성물의 양은 약 1% 미만이고; HIC 크로마토그램의 피크 2로 표시되는 조성물의 양은 약 95wt% 초과이며, 가장 바람직하게는 약 99wt% 초과이고; HIC 크로마토그램의 피크 3으로 표시되는 조성물의 양은 약 1wt% 미만이다.

[0077]

에타너셉트의 안정화를 위해 계면활성제 + 세린, 프롤린, 및/또는 글루타메이트를 이용하는 추가의 바람직한 제형은, 약 50mg/ml의 에타너셉트; 약 150mM 미만의 세린, 프롤린, 또는 글루타메이트, 가장 바람직하게는 글루타메이트; 약 0 내지 3%의 슈크로스; 약 1 내지 30mM의 포스페이트 완충제를 포함하고, 약 6.0 내지 6.6의 pH를 갖고; T<sub>4</sub>에서의 SEC 분석에서의, 약 97wt% 초과와 단량체 함량 및 약 1wt% 미만의 응집체(들) 함량; T<sub>2</sub>에서의 HIC 분석(여기서, HIC 크로마토그램의 피크 1로 표시되는 조성물의 양은 약 3wt% 미만이고; HIC 크로마토그램의 피크 2로 표시되는 조성물의 양은 약 82wt% 초과이며; HIC 크로마토그램의 피크 3으로 표시되는 조성물의 양은 약 15wt% 미만이다); 및 T<sub>4</sub>에서의 HIC 분석(여기서, HIC 크로마토그램의 피크 1로 표시되는 조성물의 양은 약 2wt% 미만이고; HIC 크로마토그램의 피크 2로 표시되는 조성물의 양은 약 84wt% 초과이며; HIC 크로마토그램의 피크 3으로 표시되는 조성물의 양은 약 13wt% 미만이다)을 특징으로 한다.

[0078]

추가의 바람직한 글루타메이트 안정화된 에타너셉트 제형은 약 0.01 내지 약 0.05%(w/v)의 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제; 약 50mg/ml의 에타너셉트; 약 120mM의 글루타메이트; 약 1%의 슈크로스, 및 약 25mM의 포스페이트를 포함하고; 약 6.3 내지 약 6.5의 pH를 갖고, 상기 인용된 SEC 및 HIC 분석 특성을 나타낸다.

[0079]

본 발명은 아르기닌의 사용을 배제하지 않지만, 약 0.01 내지 약 0.05%(w/v)의 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제 + 본 발명에 따른 추가의 안정화를 위한 세린, 프롤린, 및/또는 글루타메이트를 포함하는 에타너셉트 제형은 바람직하게는 아르기닌을 함유하지 않거나, 아르기닌을 실질적으로 함유하지 않는다.

[0080]

## **II. 계면활성제 + 금속 이온을 이용하여 안정화된 에타너셉트**

[0081]

다른 실시형태에서, 본 발명은, 에타너셉트, 약 0.01 내지 약 0.05%(w/v)의 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제; 및 에타너셉트의 불안정성, 응집, 및/또는 단편화를 억제하기 위한 안정화제를 포함하는, 안정화된 수성 약제학적 조성물을 제공하고, 여기서, 상기 안정화제는 안정화 금속 이온을 포함한다.

[0082]

금속 이온, 예를 들면, 칼슘, 마그네슘, 및 아연은, 바람직하지 못한 3급 또는 4급 복합체에 회합되는 에타너셉트의 경향성을 감소시키고, 따라서, 에타너셉트의 응집을 감소키는 것으로 생각된다. 응집의 감소는 장기의 시간, 예를 들면, 2년 이상 동안 지속되는 것으로 생각된다. 특정 이론에 얽매이도록 의도되지 않으면서, 금속 이온은, 에타너셉트를 함유하는 수성 약제학적 조성물을 안정화시킬 수 있고, 이는, 금속이, 정확한 리간드 기하학이 발생하는 본래 상태에 결합할 수 있기 때문인 것으로 생각된다. 그렇게 함으로써, 본래 상태의 순전한 안정화가 이루어진다. 일단 단백질이 언폴딩되면, 결합 부위는 상실되고, 유리 에너지의 관점에서 상대적으로 영향을 받지 않은 변성된 상태이다. 그 결과는 입체구조의 순전한 안정화이고, 이는 장기 보관을 개선시킨다. 또한, 금속 결합도, 감소된 응집 및 증가된 용해도를 초래하는 단백질의 콜로이드 안정성을 개선시킬 수 있다. 금속 이온의 안정화 효과는, 응집체의 감소에 제한되지 않을 수 있지만, 또한, 제형 중의 에타너셉트 단량체의 불안정성의 다른 양상을 해결할 수도 있다.

[0083]

바람직한 실시형태에서, 금속 이온은, 칼슘, 마그네슘, 아연, 및 이들의 배합물로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 보다 더 바람직한 실시형태에서, 칼슘, 마그네슘, 및 아연은 각각 염화 칼슘, 염화 마그네슘, 및 염화 아연으로서 제공된다.

[0084]

본 발명의 약제학적 조성물은, 정제된 에타너셉트, 약 0.01 내지 약 0.05%(w/v)의 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제; 및 금속 이온을 배합함으로써 제조될 수 있다. 또한, 완충제, 등장성 변형제, 및 추가의 부형제, 및 기타 통상적으로 사용되는 비활성 성분이 필요에 따라 첨가될 수 있다. 편의를 위해, 이들은 후에 명세서에 보다 완전하게 논의된다. 당해 분야의 숙련가는, 조성물에 포함되는 각종 구성성분들의 배합을 임의의 적절한 순서로 수행할 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들면, 완충제는 처음에, 중간에, 또는 마지막에 첨가할 수 있고, 등장성 변형제도, 또한, 처음에, 중간에, 또는 마지막에 첨가할 수 있다. 당해 분야의 숙련가는, 또한, 이들 화합물질 중 일부가 소정 배합물에서 비혼화성일 수 있고, 따라서, 유사한 특성을 갖지만 관련 혼합물에서 혼화성인 다른 화합물질로 쉽게 치환된다는 것을 이해할 것이다.

[0085]

바람직한 실시형태에서, 제공된 제형 중의 금속 이온의 농도는 바람직하게는 약 1mM 내지 0.5M이고, 보다 바람직하게는 약 1mM 내지 약 100mM, 더욱 바람직하게는 약 2mM 내지 약 20mM, 더욱 더 바람직하게는 약 2 내지 10mM이다.

- [0086] 금속 이온의 공급원은 시판 공급업자들로부터 입수가능하다.
- [0087] 안정화를 위해 계면활성제 + 염화 칼슘을 이용하는 실시형태에서, 본 발명의 에타너셉트 제형은 약 0.01 내지 약 0.05(w/v)의 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제; 약 25 내지 약 50mg/ml의 에타너셉트; 약 5mM 이하의 염화 칼슘; 임의로 약 0.5 내지 6wt%의 슈크로스 또는 트레할로스; 임의로 약 0 내지 100mM의 NaCl; 임의로 약 10mM 이하의 크실리톨; 약 1 내지 약 30mM의 인산 나트륨을 포함하고; 여기서, 상기 조성물은 약 6.0의 pH 내지 약 pH 7.0, 보다 바람직하게는 약 6.0 내지 약 6.6, 가장 바람직하게는 약 6.3 내지 약 6.5의 pH를 갖는다.
- [0088] 안정화를 위해 염화 마그네슘을 이용하는 실시형태에서, 본 발명의 에타너셉트 제형은 약 0.01 내지 약 0.05(w/v)의 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제; 약 25 내지 약 50mg/ml의 에타너셉트; 약 1mM 내지 약 20mM의 염화 마그네슘; 임의로 약 6wt% 이하의 슈크로스; 약 25 내지 150mM의 NaCl; 약 1 내지 약 30mM의 인산 나트륨을 포함하고; 여기서, 상기 조성물은 약 6.0의 pH 내지 약 pH 7.0, 보다 바람직하게는 약 6.0 내지 약 6.6, 가장 바람직하게는 약 6.3 내지 약 6.5의 pH를 갖는다.
- [0089] 금속 이온으로 안정화된 조성물은, 바람직하게는 T<sub>2</sub>에서의 SEC 분석에서의 약 80wt% 내지 약 95wt%의 단량체 함량; T<sub>2</sub>에서의 SEC 분석에서의 약 4wt% 미만의 응집체(들) 함량; 및 T<sub>2</sub>에서의 SEC 분석에서의 약 8wt% 미만의 단편 3 함량을 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0090] 보다 바람직하게, 본 발명에 따른 안정화 금속 이온을 함유하는 에타너셉트 제형은:
- [0091] (a) T<sub>4</sub>에서의 SEC 분석에서의, 약 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 또는 97wt% 초과와 단량체 함량; 및 약 3, 2, 또는 1wt% 미만의 응집체(들) 함량; 및
- [0092] (b) T<sub>2</sub>에서의 HIC 분석(여기서, HIC 크로마토그램의 피크 1로 표시되는 조성물의 양은 약 3, 2, 또는 1wt% 미만이고; HIC 크로마토그램의 피크 2로 표시되는 조성물의 양은 80, 81, 82, 83, 84, 또는 85wt% 초과이며; HIC 크로마토그램의 피크 3으로 표시되는 조성물의 양은 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 또는 13wt% 미만이다); 및
- [0093] (c) T<sub>4</sub>에서의 HIC 분석(여기서, HIC 크로마토그램의 피크 1로 표시되는 조성물의 양은 약 3, 2, 또는 1wt% 미만이고; HIC 크로마토그램의 피크 2로 표시되는 조성물의 양은 80, 81, 82, 83, 84, 또는 85wt% 초과이며; HIC 크로마토그램의 피크 3으로 표시되는 조성물의 양은 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 또는 13wt% 미만이다)을 특징으로 한다.
- [0094] 안정화를 위해 계면활성제 + 금속 이온을 함유하는 본 발명의 에타너셉트 제형은 보다 바람직하게는 T<sub>4</sub> 또는 T<sub>2</sub>에서의 HIC 분석(여기서, HIC 크로마토그램의 피크 1로 표시되는 조성물의 양은 약 1% 미만이고; HIC 크로마토그램의 피크 2로 표시되는 조성물의 양은 약 95wt% 초과이며, 가장 바람직하게는 약 99wt% 초과이고; HIC 크로마토그램의 피크 3으로 표시되는 조성물의 양은 약 1wt% 미만이다)을 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0095] 용어 "SEC", "T<sub>2</sub>", "T<sub>4</sub>", "HIC", "단량체 함량", "응집체(들)", 및 "단편 3", "피크 1", "피크 2", 및 "피크 3"은 하기 실시예에서 정의된다.
- [0096] 계면활성제 + 염화 칼슘으로 안정화된 바람직한 에타너셉트 제형은, 약 0.01 내지 약 0.05(w/v)의 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제; 약 50mg/ml의 에타너셉트; 1 내지 5mM의 염화 칼슘; 약 1 내지 30mM의 인산 나트륨; 약 0 내지 100mM의 NaCl; 약 0.5 내지 5%의 슈크로스 또는 트레할로스, 또는 이들의 배합물을 포함하고; 여기서, 상기 조성물은 약 6.0 내지 6.6의 pH를 갖고, T<sub>4</sub>에서의 SEC 분석에서의, 약 97wt%의 단량체 함량 및 약 1wt% 미만의 응집체(들) 함량; T<sub>2</sub>에서의 HIC 분석(여기서, HIC 크로마토그램의 피크 1로 표시되는 조성물의 양은 약 4wt% 미만이고; HIC 크로마토그램의 피크 2로 표시되는 조성물의 양은 약 82wt% 초과이며; HIC 크로마토그램의 피크 3으로 표시되는 조성물의 양은 약 15wt% 미만이다); 및 T<sub>4</sub>에서의 HIC 분석(여기서, HIC 크로마토그램의 피크 1로 표시되는 조성물의 양은 약 2wt% 미만이고; HIC 크로마토그램의 피크 2로 표시되는 조성물의 양은 약 85wt% 초과이며; HIC 크로마토그램의 피크 3으로 표시되는 조성물의 양은 약 13wt% 미만이다)을 특징으로 한다.
- [0097] 계면활성제 + 염화 마그네슘으로 안정화된 바람직한 에타너셉트 제형은, 약 0.01 내지 약 0.05(w/v)의 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제; 약 1mM 내지 약 20mM의 염화 마그네슘; 임의로 약 6wt% 이하의 슈크로스;

약 25 내지 150mM의 NaCl; 약 1 내지 약 30mM의 인산 나트륨을 포함하고; 여기서, 상기 조성물은 약 6.0 내지 6.6의 pH를 갖고; 여기서, 상기 조성물은, T<sub>4</sub>에서의 SEC 분석에서의, 약 97wt% 초과와 단량체 함량 및 약 1wt% 미만의 응집체(들) 함량; T<sub>2</sub>에서의 HIC 분석(여기서, HIC 크로마토그램의 피크 1로 표시되는 조성물의 양은 약 4wt% 미만이고; HIC 크로마토그램의 피크 2로 표시되는 조성물의 양은 약 85wt% 초과이며; HIC 크로마토그램의 피크 3으로 표시되는 조성물의 양은 약 14wt% 미만이다); 및 T<sub>4</sub>에서의 HIC 분석(여기서, HIC 크로마토그램의 피크 1로 표시되는 조성물의 양은 약 2wt% 미만이고; HIC 크로마토그램의 피크 2로 표시되는 조성물의 양은 약 85wt% 초과이며; HIC 크로마토그램의 피크 3으로 표시되는 조성물의 양은 약 14wt% 미만이다)을 특징으로 한다.

[0098] 안정화를 위해 계면활성제 + 염화 칼슘을 이용하는 본 발명의 특히 바람직한 실시형태에서, 상기 인용된 분석 특성을 갖는 안정화된 에타너셉트 제형은, 약 50mg/ml의 에타너셉트; 약 2mM의 염화 칼슘; 약 15mM의 인산 나트륨; 약 75mM의 염화 나트륨; 및 약 3wt%의 슈크로스를 포함하고; 여기서, 상기 제형이 약 6.3 내지 6.5의 pH를 갖는다.

[0099] 안정화를 위해 계면활성제 + 염화 마그네슘을 이용하는 본 발명의 추가의 바람직한 실시형태에서, 상기 인용된 분석 특성을 갖는 안정화된 에타너셉트 제형은, 약 0.01 내지 약 0.05%(w/v)의 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제; 약 50mg/ml의 에타너셉트; 약 10mM의 염화 마그네슘; 약 15mM의 인산 나트륨; 약 75mM의 염화 나트륨; 및 약 3wt%의 슈크로스를 포함하고; 약 6.3 내지 6.5의 pH를 갖는다.

[0100] 용어 "SEC", "T<sub>2</sub>", "T<sub>4</sub>", "HIC", "단량체 함량", "응집체(들)" 및 "단편 3", "피크 1", "피크 2", 및 "피크 3"은 하기 실시예에 정의된다.

[0101] 본 발명에 따른 계면활성제 + 안정화 금속 이온을 사용하는 것은 아르기닌의 사용을 배제시키지 않지만, 본 발명에 따른 안정화를 위한 금속 이온을 포함하는 에타너셉트 제형은 바람직하게는 아르기닌을 함유하지 않거나, 아르기닌을 실질적으로 함유하지 않는다.

### [0102] III. 계면활성제 + 이온성 폴리를 유도체 부형제로 안정화된 에타너셉트

[0103] 다른 실시형태에서, 본 발명은, 에타너셉트, 약 0.01 내지 약 0.05%(w/v)의 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제; 및 이온성 폴리를 유도체 부형제를 포함하는, 안정한 수성 제형을 제공하고, 여기서, 상기 부형제는, 메글루민(N-메틸-D-글루카민), 만노실글리세레이트, 글루코실글리세레이트, 만노실락테이트, 만노실글리콜레이트, 및 디글리세로포스페이트로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0104] 바람직하게, 본 실시형태 또는 양상에서, 본 발명은, 에타너셉트; 약 0.01 내지 약 0.05%(w/v)의 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제; 제형 중의 에타너셉트의 불안정성, 응집, 및 단편화를 지연시키기 위한 안정화 성분을 포함하는 에타너셉트의 수성 안정화된 제형이고; 상기 안정화 성분은 (a) 메글루민; 또는 (b) 슈크로스와의 배합물로의 메글루민; 또는 (c) 염화 나트륨과의 배합물로의 메글루민; 또는 (d) 염화 나트륨 및 슈크로스와의 배합물로의 메글루민으로 구성된다.

[0105] 메글루민은 통상적으로 소분자 부형제로서 사용된다. 본 발명자들은 놀랍게도 본 발명에 이르러, 메글루민도 또한 거대 단백질, 예를 들면, 에타너셉트를 함유하는 수성 약제학적 조성물을 안정화시킬 수 있음을 발견하였다.

[0106] 메글루민은, 바람직하지 못한 3급 또는 4급 복합체에 회합되는 에타너셉트의 경향성을 감소시키고, 따라서, 에타너셉트의 응집을 감소키는 것으로 생각된다. 응집의 감소는, 장기의 시간, 예를 들면, 2년 이상 동안 지속되는 것으로 생각된다. 특정 이론에 얽매이도록 의도되지 않으면서, 메글루민은, 3개의 상이한 메커니즘의 조합에 의해 에타너셉트를 함유하는 수성 약제학적 조성물을 안정화시킬 수 있다. 첫번째로, 메글루민은, 만니톨, 슈크로스, 및 소르비톨이 입체구조적 안정성을 증가시키는 것과 동일한 방식으로, 배제된 용질로서 작용할 수 있다. 두번째로, 하전된 용질은 콜로이드 안정성을 변경시킬 수 있고, 이에 의해 자기-회합하는 경향을 감소시키고, 이에 의해 응집을 서행시킬 수 있다. 세번째로, 중성 부근의 pH로 하전되는 이들 이온성 폴리를 유도체는, 아르기닌이 작용하는 바와 같이 염용제(salting-in agent)로서 작용하여 응집체를 잠재적으로 재가용화한다. 메글루민의 안정화 효과는, 응집체의 감소에 제한되지 않지만, 단량체를 함유하는 제형 중의 에타너셉트 단량체의 안정화의 다른 양상을 포함할 수 있다.

[0107] 본 발명의 약제학적 조성물은, 정제된 에타너셉트, 약 0.01 내지 약 0.05%(w/v)의 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제, 및 이온성 폴리를 유도체, 바람직하게는 메글루민을 배합함으로써 제조될 수 있다. 또한, 완충제, 등장성 변형제, 및 추가의 부형제 및 기타 통상적으로 사용되는 비활성 성분이 필요에 따라 첨가될 수

있다. 편의를 위해, 이들은 후에 명세서에 보다 완전하게 논의된다. 당해 분야의 숙련가는, 본 발명의 조성물에 포함되는 각종 구성성분들의 배합을 임의의 적절한 순서로 수행할 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들면, 완충제는 처음에, 중간에, 또는 마지막에 첨가할 수 있고, 등장성 변형제도, 또한, 처음에, 중간에, 또는 마지막에 첨가할 수 있다. 당해 분야의 숙련가는, 또한, 이들 화학물질 중 일부가 소정 배합물에서 비혼화성일 수 있고, 따라서, 유사한 특성을 갖지만 관련 혼합물에서 혼화성인 다른 화학물질로 쉽게 치환된다는 것을 이해할 것이다.

- [0108] 바람직한 실시형태에서, 제공된 제형 중의 메글루민 농도는 바람직하게는 약 0.1%(w/v) 내지 40%(w/v), 보다 바람직하게는 약 1% 내지 약 20%, 더욱 바람직하게는 약 2% 내지 약 10%, 더욱 더 바람직하게는 약 2% 내지 약 5%이다.
- [0109] 메글루민은 시판의 공급업자들로부터 입수가능하다.
- [0110] 바람직한 실시형태는 약 25 내지 약 75mg/ml의 에타너셉트, 약 0.01 내지 약 0.05%(w/v)의 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제; 약 1 내지 30mM의 인산 나트륨; 10% 이하의 메글루민; 임의로 약 5wt% 이하의 슈크로스; 및 임의로 약 100mM 이하의 염화 나트륨을 포함하고, 여기서, 상기 조성물은 약 6.0 내지 7.0, 바람직하게는 약 6.0 내지 약 6.6, 가장 바람직하게는 약 6.3 내지 약 6.5의 pH를 갖는다.
- [0111] 계면활성제/메글루민 안정화된 에타너셉트 조성물은 바람직하게는 T<sub>2</sub>에서의 SEC 분석을 특징으로 하고, 여기서, 단량체 함량은 약 85wt% 초과이고; 응집체(들) 함량은 약 3wt% 미만이고; 단편 3 함량은 약 8wt% 미만이다.
- [0112] 안정화를 위해 메글루민과 같은 이온성 폴리올 유도체가 존재하는 에타너셉트의 보다 바람직한 제형은,
- [0113] (a) T<sub>4</sub>에서의 SEC 분석에서의, 약 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 또는 97wt% 초과와 단량체 함량; 및 약 3, 2, 또는 1wt% 미만의 응집체(들) 함량; 및
- [0114] (b) T<sub>2</sub>에서의 HIC 분석(여기서, HIC 크로마토그램의 피크 1로 표시되는 조성물의 양은 약 4, 3, 2, 또는 1wt% 미만이고; HIC 크로마토그램의 피크 2로 표시되는 조성물의 양은 80, 81, 82, 83, 84, 또는 85wt% 초과이며; HIC 크로마토그램의 피크 3으로 표시되는 조성물의 양은 약 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 또는 13wt% 미만이다); 및
- [0115] (c) T<sub>4</sub>에서의 HIC 분석(여기서, HIC 크로마토그램의 피크 1로 표시되는 조성물의 양은 약 3, 2, 또는 1wt% 미만이고; HIC 크로마토그램의 피크 2로 표시되는 조성물의 양은 80, 81, 82, 83, 84, 또는 85wt% 초과이며; HIC 크로마토그램의 피크 3으로 표시되는 조성물의 양은 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 또는 13wt% 미만이다)을 특징으로 하는 제형이다.
- [0116] 계면활성제 + 메글루민으로 안정화된 특히 바람직한 에타너셉트 제형은, T<sub>4</sub> 또는 T<sub>2</sub>에서의 HIC 분석(여기서, HIC 크로마토그램의 피크 1로 표시되는 조성물의 양은 약 1% 미만이고; HIC 크로마토그램의 피크 2로 표시되는 조성물의 양은 약 99wt% 초과이고; HIC 크로마토그램의 피크 3으로 표시되는 조성물의 양은 약 1wt% 미만이다)을 특징으로 한다.
- [0117] 용어 "SEC", "T<sub>2</sub>", "T<sub>4</sub>", "HIC", "단량체 함량", "응집체(들)", 및 "단편 3", "피크 1", "피크 2", 및 "피크 3"은 하기 실시예에서 정의된다.
- [0118] 다른 실시형태에서, 메글루민은, 제형 중의 소르비톨, 글리세롤, 또는 만니톨, 예를 들면, 만노실글리세레이트, 글루코실글리세레이트, 만노실락테이트, 만노실글리콜레이트, 및 디글리세롤포스페이트(약 0.1% 내지 약 40%)와 같은 다른 이온성 폴리올 유도체로 대체될 수 있다.
- [0119] 약 0.01 내지 약 0.05%(w/v)의 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제를 함유하고, 아르기닌을 함유하지 않으며, 상기 기술된 바와 같은 분석 특성을 나타내는, 바람직한 메글루민-안정화된 에타너셉트 제형은, 약 25 내지 약 75mg/ml의 에타너셉트; 약 0.5wt%의 메글루민; 약 25mM의 포스페이트; 약 1%의 슈크로스; 및 약 100mM의 염화 나트륨을 포함한다.
- [0120] 아르기닌을 함유하지 않고, 상기 기술된 바와 같은 분석 특성을 나타내는, 추가의 바람직한 계면활성제/메글루민-안정화된 에타너셉트 제형은, 약 0.01 내지 약 0.05%(w/v)의 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제; 약 50mg/ml의 에타너셉트; 약 5wt%의 메글루민; 약 25mM의 포스페이트를 포함한다.

- [0121] 본 발명은 아르기닌의 사용을 배제하지 않지만, 본 발명에 따른 안정화를 위해 이온성 폴리올 유도체, 예를 들면, 메글루민을 포함하는 에타너셉트 제형은 바람직하게는 아르기닌을 함유하지 않거나 아르기닌을 실질적으로 함유하지 않는다.
- [0122] **IV. 계면활성제, 및 당과 폴리올의 배합물로 안정화된 에타너셉트**
- [0123] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은, 에타너셉트, 약 0.01 내지 약 0.05%(w/v)의 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제; 당과 폴리올을 포함하는, 안정한 수성 제형을 제공한다.
- [0124] 당과 폴리올의 배합물이, 바람직하지 못한 3급 또는 4급 복합체에 회합되는 에타너셉트의 경향성을 감소시키고, 따라서, 에타너셉트의 응집을 감소키는 것으로 생각된다. 응집의 감소는, 장치의 시간, 예를 들면, 2년 이상 동안 지속되는 것으로 생각된다. 따라서, 당과 폴리올의 배합물은, 에타너셉트를 함유하는 수성 약제학적 조성물을 안정화할 수 있는 것으로 생각된다. 특정 이론에 얽매이도록 의도되지 않으면서, 당과 폴리올의 배합물은, 에타너셉트를 안정화시킬 목적을 위해 상승작용적인 것으로 생각되고, 이는, 배제된 용질이, 단백질의 표면 상에서 존재하기보다 오히려 대체로 벌크로 존재하기 때문인 것으로 생각되고, 사실은 당/폴리올과 단백질 사이에 상호작용이 존재할 것이다. 이들 상호작용은 아마 당과 보다 작은 폴리올 사이에 상이할 것이다. 또한, 고농도에서, 상기 2개의 첨가제들은 다른 것의 열역학적 활성을 변경시켜, 각각의 개개의 구성성분에 대해 관찰될 수 있는 것보다 다양할 것인 용액 거동(solution behavior)을 초래할 것이다. 하기에 추가로 논의되는 바와 같이, 아민은 폴리올에 대해 치환될 수 있다.
- [0125] 본 발명의 약제학적 조성물은, 정제된 에타너셉트, 약 0.01 내지 약 0.05%(w/v)의 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제; 당, 및 폴리올을 배합함으로써 제조될 수 있다. 추가로, 완충제, 등장성 변형제, 및 추가의 부형제, 및 기타 통상적으로 사용되는 비활성 성분을 필요에 따라 첨가할 수 있다. 편의를 위해, 이들은 후에 명세서에 보다 완전하게 논의된다. 당해 분야의 숙련가는, 조성물에 포함되는 각종 구성성분들의 배합을 임의의 적절한 순서로 수행할 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들면, 완충제는 처음에, 중간에, 또는 마지막에 첨가할 수 있고, 등장성 변형제도, 또한, 처음에, 중간에, 또는 마지막에 첨가할 수 있다. 당해 분야의 숙련가는, 또한, 이들 화합물질 중 일부가 소정 배합물에서 비혼화성일 수 있고, 따라서, 유사한 특성을 갖지만 관련 혼합물에서 혼화성인 다른 화합물질로 쉽게 치환된다는 것을 이해할 것이다.
- [0126] 몇몇 실시형태에서, 당과 폴리올은, 2개의 금속이, 둘 중 어느 한 금속에 의해 나타나지 않는 특성을 갖는 알로이(alloy)를 형성하는 것과 동일한 방식으로, 협력하여 작용할 수 있다. 동일한 접근법이, 프롤린, 세린, 또는 글루타메이트와 같은 아미노산을 당과 함께 사용하여 둘 중 어느 한 부형제가 그 자체에 대해 제공할 수 있는 것보다 우수한 안정성 프로파일을 달성하는 접근법을 유도할 것임이 이해되어야 한다. 알로이 중의 당 대 폴리올(또는 아미노산)의 바람직한 비는 5:1 내지 1:5인 것으로 생각된다.
- [0127] 가장 바람직한 당은 슈크로스, 트레할로스, 락토스, 라피노스, 및 말토스인 것으로 생각된다.
- [0128] 가장 바람직한 폴리올은 소르비톨, 만니톨, 글리세롤, 및 프로필렌 글리콜인 것으로 생각된다.
- [0129] 바람직한 아미노산은 프롤린, 세린, 트레오닌, 및 글루타메이트인 것으로 생각된다.
- [0130] 바람직한 실시형태에서, 제공된 제형 중의 당의 농도는 바람직하게는 약 0.1%(w/v) 내지 40%, 보다 바람직하게는 약 1% 내지 약 20%, 더욱 바람직하게는 약 2% 내지 약 10%, 더욱 더 바람직하게는 약 5% 내지 9%이다.
- [0131] 바람직한 실시형태에서, 제공된 제형 중의 폴리올의 농도는 바람직하게는 약 0.1% 내지 30%, 보다 바람직하게는 약 1% 내지 약 10%, 더욱 더 바람직하게는 약 2% 내지 약 5%이다.
- [0132] 당과 폴리올은 시판 공급업자들로부터 입수가능하다.
- [0133] 한 실시형태에서, 본 발명의 제형은 약 25 내지 약 75mg/ml의 에타너셉트; 약 0.01 내지 약 0.05%(w/v)의 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제; 약 1% 내지 약 10%의 슈크로스; 약 1% 내지 약 5%의 만니톨; 약 10mM 내지 약 50mM의 인산 나트륨; 및 약 0mM 내지 약 100mM의 NaCl을 약 pH 6.3 내지 약 pH 7.0으로 포함한다.
- [0134] 다른 실시형태에서, 슈크로스는 제형 중의 다른 당, 예를 들면, 트레할로스(약 1% 내지 약 10%)로 대체될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 만니톨은 제형 중의 다른 폴리올, 예를 들면, 소르비톨(약 1% 내지 약 5%)로 대체될 수 있다.
- [0135] 본 발명은 아르기닌의 사용을 배제하지 않지만, 안정화를 위해 당과 폴리올(또는 아미노산)을 포함하는 에타너

샤프트 제형은 바람직하게는 아르기닌을 함유하지 않거나 아르기닌을 실질적으로 함유하지 않는다.

[0136] **V. 계면활성제 + 크실리톨로 안정화된 에타너샤프트**

[0137] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은, 에타너샤프트, 약 0.01 내지 약 0.05%(w/v)의 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제; 및 에타너샤프트의 불안정성, 응집, 및/또는 단편화를 억제하기 위한 안정화제를 포함하는, 안정화된 수성 약제학적 조성물을 제공하고, 여기서, 상기 안정화제는 크실리톨, 또는 크실리톨과 메글루민의 배합물을 포함한다.

[0138] 임의의 특정 이론에 얽매이도록 의도되지 않으면서, 크실리톨은, 바람직하지 못한 3급 또는 4급 복합체로 회합되는 에타너샤프트의 경향성을 감소시키고, 따라서, 에타너샤프트의 응집을 감소키는 것으로 생각된다. 응집의 감소는, 장기의 시간, 예를 들면, 2년 이상 동안 지속되는 것으로 생각된다. 크실리톨의 안정화 효과는 응집체의 감소에 제한되는 것은 아니지만, 단량체를 함유하는 제형 중의 에타너샤프트 단량체의 안정화의 다른 양상을 포함할 수 있다.

[0139] 안정화를 위한 크실리톨을 포함하는 바람직한 안정화된 에타너샤프트 제형은, 약 0.01 내지 약 0.05%(w/v)의 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제 + 크실리톨과 메글루민의 배합물에 의해 안정화가 제공되는 제형이다.

[0140] 본 발명의 약제학적 조성물은, 정제된 에타너샤프트, 약 0.01 내지 약 0.05%(w/v)의 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제; 및 크실리톨, 또는 메글루민과의 배합물로의 크실리톨을 배합함으로써 제조될 수 있다. 추가로, 완충제, 등장성 변형제, 및 추가의 부형제, 및 기타 통상적으로 사용되는 비활성 성분을 필요에 따라 첨가할 수 있다. 편의를 위해, 이들은 후에 명세서에 보다 완전하게 논의된다. 당해 분야의 숙련가는, 조성물에 포함되는 각종 구성성분들의 배합을 임의의 적절한 순서로 수행할 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들면, 완충제는 처음에, 중간에, 또는 마지막에 첨가할 수 있고, 등장성 변형제도, 또한, 처음에, 중간에, 또는 마지막에 첨가할 수 있다. 당해 분야의 숙련가는, 또한, 이들 화학물질 중 일부가 소정 배합물에서 비혼화성일 수 있고, 따라서, 유사한 특성을 갖지만 관련 혼합물에서 혼화성인 다른 화학물질로 쉽게 치환된다는 것을 이해할 것이다.

[0141] 본 발명의 크실리톨 안정화된 에타너샤프트 제형은, 약 25 내지 75mg/ml의 에타너샤프트; 약 0.01 내지 약 0.05%(w/v)의 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제; 약 1 내지 10wt%의 크실리톨; 약 1 내지 30mM의 인산나트륨; 임의로 약 5wt% 이하의 메글루민; 임의로 약 5mM 이하의 NaCl; 및 임의로 약 5wt% 이하의 슈크로스를 포함할 수 있다.

[0142] 추가로 메글루민, 염화 나트륨, 및 슈크로스를 함유하는 계면활성제/크실리톨 안정화된 에타너샤프트 제형은, 크실리톨 이외에, 약 1 내지 3mM의 NaCl; 약 1 내지 5wt%의 슈크로스; 및 조성물의 약 1 내지 5wt%의 양으로의 메글루민을 포함할 수 있다.

[0143] 추가의 실시형태에서, 크실리톨 안정화된 에타너샤프트 제형은, 약 25 내지 약 75mg/ml의 에타너샤프트; 약 0.01 내지 약 0.05%(w/v)의 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제; 및 에타너샤프트의 불안정성, 응집, 및/또는 단편화를 억제하기 위한 안정화제를 포함할 수 있고, 여기서, 상기 안정화제는 조성물의 약 10wt% 이하를 구성하는 양으로의 크실리톨이며, 여기서, 상기 조성물은, T<sub>2</sub>에서의 SEC 분석에서의 약 80wt% 내지 약 95wt%의 단량체 함량; T<sub>2</sub>에서의 SEC 분석에서의 약 4wt% 미만, 바람직하게는 약 3wt% 미만의 응집체(들) 함량; 및 T<sub>2</sub>에서의 SEC 분석에서의 약 8wt% 미만, 바람직하게는 약 6wt% 미만의 단편 3 함량을 특징으로 하고; 여기서, 상기 조성물은 약 6.0의 pH 내지 약 pH 7.0, 보다 바람직하게는 약 6.0 내지 약 6.6, 가장 바람직하게는 약 6.3 내지 약 6.5의 pH를 갖는다.

[0144] 계면활성제 + 크실리톨, 또는 계면활성제 + 메글루민과의 배합물로의 크실리톨을 함유하는 상기 인용된 것들과 같은 안정화된 에타너샤프트 제형에서, 상기 제형은 보다 바람직하게는

[0145] (a) T<sub>4</sub>에서의 SEC 분석의, 약 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 또는 97wt% 단량체 함량; 및 약 3, 2, 또는 1wt% 미만의 응집체(들) 함량; 및

[0146] (b) T<sub>2</sub>에서의 HIC 분석(여기서, HIC 크로마토그램의 피크 1로 표시되는 조성물의 양은 약 3, 2, 또는 1wt% 미만이고; HIC 크로마토그램의 피크 2로 표시되는 조성물의 양은 80, 81, 82, 83, 84, 또는 85wt% 초과이며; HIC 크로마토그램의 피크 3으로 표시되는 조성물의 양은 약 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 또는 13wt% 미만이다); 및

- [0147] (c) T<sub>4</sub>에서의 HIC 분석(여기서, HIC 크로마토그램의 피크 1로 표시되는 조성물의 양은 약 3, 2, 또는 1wt% 미만이고; HIC 크로마토그램의 피크 2로 표시되는 조성물의 양은 80, 81, 82, 83, 84, 또는 85wt% 초과이며; HIC 크로마토그램의 피크 3으로 표시되는 조성물의 양은 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 또는 13wt% 미만이다)을 특징으로 한다.
- [0148] 용어 "SEC", "T<sub>2</sub>", "T<sub>4</sub>", "HIC", "단량체 함량", "응집체(들)", 및 "단편 3", "피크 1", "피크 2", 및 "피크 3"은 하기 실시예에서 정의된다.
- [0149] 약 0.01 내지 약 0.05%(w/v)의 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제 + 크실리톨, 또는 메글루민과의 배합물로의 크실리톨을 함유하는 특히 바람직한 제형은, T<sub>4</sub> 또는 T<sub>2</sub>에서의 HIC 분석(여기서, HIC 크로마토그램의 피크 1로 표시되는 조성물의 양은 약 1% 미만이고; HIC 크로마토그램의 피크 2로 표시되는 조성물의 양은 약 95wt% 초과, 바람직하게는 약 99wt% 초과이며; HIC 크로마토그램의 피크 3으로 표시되는 조성물의 양은 약 1wt% 미만이다)을 갖는 것을 특징으로 한다. 구체적인 크실리톨-안정화된 제형은, 상세히 설명된 실시예에서 제공된다.
- [0150] 본 발명은 아르기닌의 사용을 배제하지 않지만, 안정화를 위한 계면활성제 + 크실리톨을 포함하는 본 발명에 따른 에타너셉트 제형은 아르기닌을 함유하지 않거나 아르기닌을 실질적으로 함유하지 않는다.
- [0151] **VI. 계면활성제 + NaCl으로 안정화된 에타너셉트 제형**
- [0152] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은, 에타너셉트의 불안정성, 응집, 및/또는 단편화를 감소시키기 위해 안정화된 수성 에타너셉트 제형을 제공하고, 상기 제형은, 약 25 내지 약 75mg/ml의 에타너셉트, 약 0.01 내지 약 0.05%(w/v)의 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제; 및 1종 이상의 안정화제를 포함하고, 여기서, 상기 안정화제는, (i) 염화 나트륨, 및 (ii) 슈크로스 또는 트레할로스와 배합물로의 염화 나트륨, 및 (iii) 염화 나트륨, 슈크로스, 및 트레할로스의 배합물로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0153] 본 발명의 약제학적 조성물은, 정제된 에타너셉트, 약 0.01 내지 약 0.05%(w/v)의 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제; 및 임의로 슈크로스 및/또는 트레할로스와 염화 나트륨을 배합함으로써 제조될 수 있다. 추가로, 완충제, 등장성 변형제, 및 추가의 부형제, 및 기타 통상적으로 사용되는 비활성 성분을 필요에 따라 첨가할 수 있다. 편의를 위해, 이들은 후에 명세서에 보다 완전하게 논의된다. 당해 분야의 숙련가는, 조성물에 포함되는 각종 구성성분들의 배합을 임의의 적절한 순서로 수행할 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들면, 완충제는 처음에, 중간에, 또는 마지막에 첨가할 수 있고, 등장성 변형제도, 또한, 처음에, 중간에, 또는 마지막에 첨가할 수 있다. 당해 분야의 숙련가는, 또한, 이들 화합물질 중 일부가 소정 배합물에서 비혼화성일 수 있고, 따라서, 유사한 특성을 갖지만 관련 혼합물에서 혼화성인 다른 화합물질로 쉽게 치환된다는 것을 이해할 것이다.
- [0154] 안정화를 위해 계면활성제 + 염화 나트륨을 이용하는 실시형태에서, 본 발명의 에타너셉트 제형은 약 25 내지 75mg/ml의 에타너셉트, 약 0.01 내지 약 0.05%(w/v)의 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제; 약 150mM 이하의 염화 나트륨, 약 1 내지 약 30mM의 인산 나트륨; 및 약 0 내지 5wt%의 슈크로스 또는 트레할로스, 또는 이들의 배합물을 포함하고; 여기서, 상기 조성물은 약 6.0의 pH 내지 약 pH 7.0, 보다 바람직하게는 약 6.0 내지 약 6.6, 가장 바람직하게는 약 6.3 내지 약 6.5의 pH를 갖는다.
- [0155] 계면활성제/염화 나트륨 안정화된 조성물은 바람직하게는 T<sub>2</sub>에서의 SEC 분석을 특징으로 하고, 여기서, 단량체 함량이 약 80wt% 초과이고; 응집체(들) 함량이 약 3wt% 미만이며; 단편 3 함량은 약 8wt%이다.
- [0156] 염화 나트륨-안정화된 에타너셉트 조성물은 바람직하게는
- [0157] (a) T<sub>4</sub>에서의 SEC 분석에서의, 약 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 또는 97wt% 초과와 단량체 함량; 및 약 3, 2, 또는 1wt% 미만의 응집체(들) 함량; 및
- [0158] (b) T<sub>2</sub>에서의 HIC 분석(여기서, HIC 크로마토그램의 피크 1로 표시되는 조성물의 양은 약 4, 3, 2, 또는 1wt% 미만이고; HIC 크로마토그램의 피크 2로 표시되는 조성물의 양은 80, 81, 82, 83, 84, 85, 또는 86wt% 초과이며; HIC 크로마토그램의 피크 3으로 표시되는 조성물의 양은 약 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 또는 13wt% 미만이다); 및
- [0159] (c) T<sub>4</sub>에서의 HIC 분석(여기서, HIC 크로마토그램의 피크 1로 표시되는 조성물의 양은 약 3, 2, 또는 1wt% 미만

이고; HIC 크로마토그램의 피크 2로 표시되는 조성물의 양은 80, 81, 82, 83, 84, 또는 85wt% 초과이며; HIC 크로마토그램의 피크 3으로 표시되는 조성물의 양은 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 또는 13wt% 미만이다)을 특징으로 한다.

[0160] 추가의 실시형태에서, 안정화를 위해 계면활성제 + 염화 나트륨을 이용하는 바람직한 조성물은, 약 150mM 이하의 염화 나트륨, 약 1 내지 30mM의 인산 나트륨, 및 약 0 내지 5wt%의 슈크로스 또는 트레할로스, 또는 슈크로스와 트레할로스의 배합물을 포함하고, 약 6.0 내지 6.6의 pH를 갖고; T<sub>4</sub>에서의 SEC 분석에서의, 약 95wt% 초과 단량체 함량 및 약 1wt% 미만의 응집체(들) 함량; T<sub>2</sub>에서의 HIC 분석(여기서, HIC 크로마토그램의 피크 1로 표시되는 조성물의 양은 약 3wt% 이하이고; HIC 크로마토그램의 피크 2로 표시되는 조성물의 양은 약 82wt% 초과이며; HIC 크로마토그램의 피크 3으로 표시되는 조성물의 양은 약 15wt% 미만이다); 및 T<sub>4</sub>에서의 HIC 분석(여기서, HIC 크로마토그램의 피크 1로 표시되는 조성물의 양은 약 2wt% 미만이고; HIC 크로마토그램의 피크 2로 표시되는 조성물의 양은 약 84wt% 초과이며; HIC 크로마토그램의 피크 3으로 표시되는 조성물의 양은 약 14wt% 이하이다)을 특징으로 한다.

[0161] 감소된 응집체 및 단편의 관점에서 특히 바람직한 조성물은, 계면활성제/염화 나트륨 안정화된 에타너셉트 제형이 T<sub>4</sub> 또는 T<sub>2</sub>에서의 HIC 분석(여기서, HIC 크로마토그램의 피크 1로 표시되는 조성물의 양은 약 1% 미만이고; HIC 크로마토그램의 피크 2로 표시되는 조성물의 양은 약 95wt% 초과, 바람직하게는 약 99wt% 초과이며; HIC 크로마토그램의 피크 3으로 표시되는 조성물의 양은 약 1wt% 미만이다)을 나타내는 조성물이다.

[0162] 본 발명의 추가의 실시형태에서, NaCl 안정화된 에타너셉트 제형은 약 5mM 이하의 아르기닌을 함유한다.

[0163] 상기 인용된 NaCl 안정화된 에타너셉트 제형에서, 용어 "SEC", "T<sub>2</sub>", "T<sub>4</sub>", "단량체 함량", "응집체(들)" 및 "단편 3", "피크 1", "피크 2", 및 "피크 3"은 하기 실시예에서 정의된다.

[0164] **감소된 욕안으로 보이지 않는 입자를 위한 계면활성제**

[0165] 상기 나타난 바와 같이, 본 발명은 계면활성제, 바람직하게는 폴리소르베이트 계면활성제 또는 폴록사머 계면활성제를 사용하여, 에타너셉트 제형 중의 욕안으로 보이지 않는 입자 형성의 현저한 감소를 달성한다. 본 발명은 임의의 계면활성제, 및 임의의 폴리소르베이트 또는 폴록사머 계면활성제의 사용을 고려하지만, 본 발명에서 사용하기에 바람직한 계면활성제는 폴리소르베이트 80 및 플루로닉 F-68이고, 이들 둘 다는 상업적으로 쉽게 입수가능하다. 본 발명은, 계면활성제 첨가제를 사용하여, 상기 실시형태에서 기술된 추가의 안정화 성분의 존재 또는 부재 하에 욕안으로 보이지 않는 입자의 감소를 달성하여 실행할 수 있다. 본 발명은, 계면활성제의 존재가, 이러한 계면활성제가 결여되어 있는 제형과 비교하여 에타너셉트 제형 중의 욕안으로 보이지 않는 입자의 현저한 감소를 제공할 수 있다는 본 발명자들의 놀랍고 예측하지 못한 발견에 부분적으로 근거한다.

[0166] 본원에서 사용하기 위해 고려되는 폴리소르베이트 계면활성제는 폴리에톡실화된 소르비탄으로부터 유도된다. 폴리소르베이트 80(폴리옥시에틸렌-소르비탄-20 모노-올레이트로서도 공지되어 있음)은, 또한, "Tween 80"로서도 상업적으로 입수가능하고, 본 발명에서 사용하기에 특히 바람직하다. 폴리소르베이트 20, 40, 및 60도 또한 사용할 수 있다.

[0167] 본원에서 사용하기 위해 고려되는 폴록사머 계면활성제는 약제학적 제형 분야에 익히 공지되어 있고, 에틸렌 옥사이드 및 프로필렌 옥사이드에 기초한 블록 공중합체로 이루어지며, BASF로부터 상업적으로 취득할 수 있다. 예를 들면, BASF는, 본 발명에 사용하기에 특히 바람직한 시판품 플루로닉 F-68로서 공지되어 있는 폴록사머를 판매한다.

[0168] 본 발명의 에타너셉트 제형에 유용한 폴리소르베이트 또는 폴록사머의 양은, 상기 제형의, 0.0005% 내지 1%(w/v)의 범위로; 바람직하게는 약 0.005% 내지 약 0.1%(w/v)의 범위 내로, 가장 바람직하게는 약 0.01 내지 약 0.05%(w/v)의 범위로 상기 제형에 첨가된다.

[0169] **제공된 약제학적 조성물의 추가의 구성성분**

[0170] 본 발명의 제형은, 또한, 완충제, 등장성 변형제, 부형제, 약제학적으로 허용되는 담체, 및 기타 통상적으로 사용되는 약제학적 조성물의 비활성 성분을 포함할 수 있다. 편의를 위해, 이들은 후에 본 출원에서 보다 완전하게 논의된다.

[0171] 완충제는 pH를 바람직한 범위로 유지한다. 적합한 완충제로는 히스티딘, 인산 칼륨, 시트르산 나트륨 또는 칼

류, 말레산, 아세트산 암모늄, 트리스-(하이드록시메틸)-아미노메탄(tris), 각종 형태의 아세테이트 및 디에탄올아민이 포함된다. 제형 중의 완충제의 농도는 바람직하게는 약 1mM 내지 약 1M, 보다 바람직하게는 약 10mM 내지 약 200mM이다. 완충제는 당해 분야에 익히 공지되어 있고, 공지의 방법에 의해 제조되며, 상업적 공급업자들로부터 입수가능하다.

[0172] 적합한 완충제의 예로는 포스페이트, 히스티딘, 시트레이트, 말레이이트, 타르트레이트, 석시네이트, 아세테이트, 트리스-(하이드록시메틸)-아미노메탄(tris), 중탄산염이 있다.

[0173] 바람직한 실시형태에서, 완충제는 인산 나트륨이다.

[0174] 바람직한 실시형태에서, 약제학적 조성물의 pH는 생리학적 수준이거나 생리학적 수준 부근이다. 따라서, 제공된 조성물의 pH는 바람직하게는 약 5.8 내지 약 8.4이고; 더욱 더 바람직하게는 약 6.2 내지 약 7.4이다. 당해 분야 숙련가는, pH를 필요에 따라 조정하여 특정 제형 중의 에타너셉트의 안정성 및 용해도를 최대화할 수 있을 것을 이해할 것이다. 따라서, 환자에게 여전히 허용되는 생리학적 범위 외의 pH에서의 에타너셉트 제형도, 또한, 본 발명의 범위 내이다.

[0175] 등장성 변형제는, 용액의 삼투질 농도에 기여하는 분자이다. 약제학적 조성물의 삼투질 농도를 바람직하게 조정하여 활성 성분의 안정성을 최대화하고/하거나 투여시 환자에게 불편감을 최소화한다. 혈청과 등장성인, 즉, 동일하거나 유사한 삼투질 농도를 갖는 약제학적 조성물은 등장성 변형제의 첨가에 의해 달성되는 것이 일반적으로 바람직하다.

[0176] 바람직한 실시형태에서, 제공된 제형의 삼투질 농도는 약 180 내지 약 420mOsm이다. 그러나, 삼투질 농도는 특정 상태가 요구하는 것보다 더 높거나 더 낮을 수 있음이 이해되어야 한다.

[0177] 삼투질 농도를 변형시키는데 적합한 등장성 변형제의 예로는 아미노산(아르기닌은 포함하지 않음)(예를 들면, 시스테인, 히스티딘, 및 글리신), 염(예를 들면, 염화 나트륨, 염화 칼륨, 및 시트르산 나트륨), 및/또는 사카라이드(예를 들면, 슈크로스, 글루코스, 및 만니톨)가 포함되지만, 이들에 제한되는 것은 아니다.

[0178] 바람직한 등장성 변형제는 글리신, 알라닌, 염화 나트륨, 염화 칼륨, 및 황산 나트륨이다.

[0179] 바람직한 실시형태에서, 제형 중의 등장성 변형제의 농도는 바람직하게는 약 1mM 내지 약 1M, 보다 바람직하게는 약 10mM 내지 약 200mM이다. 등장성 변형제는 당해 분야에 익히 공지되어 있고, 공지되어 있는 방법에 의해 제조되며, 상업적 공급업자들로부터 입수가능하다.

[0180] 용액 중에서(또한, 건조된 형태 또는 동결된 형태의) 폴리펩타이드를 안정화하는 부형제(화학적 첨가제, 공존-용질, 또는 공존-용매로서도 나타냄)도, 또한, 약제학적 조성물에 첨가할 수 있다. 부형제는 당해 분야에 익히 공지되어 있고, 공지되어 있는 방법에 의해 제조되며, 상업적 공급업자들로부터 입수가능하다.

[0181] 적합한 부형제의 예로는 당/폴리올, 예를 들면, 슈크로스, 락토스, 글리세롤, 크실리톨, 소르비톨, 만니톨, 말토스, 이노시톨, 트레할로스, 글루코스; 중합체, 예를 들면, 혈청 알부민(소 혈청 알부민(BSA), 사람 SA, 또는 재조합 HA), 텍스트란, 폴리(비닐 알콜) PVA, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스(HPMC), 폴리에틸렌이민, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈(PVP), 하이드록시에틸셀룰로스(HEC); 비수성 용매, 예를 들면, 다가 알콜(예를 들면, PEG 및 글리세롤) 및 디메틸포름아미드(DMF); 아미노산, 예를 들면, 프롤린, L-세린, 글루탐산 나트륨, 알라닌, 글리신, 리신 하이드로클로라이드, 사르코신, 및 감마-아미노부티르산; 및 다양한 부형제, 예를 들면, 인산 칼륨, 아세트산 나트륨, 황산 암모늄, 황산 마그네슘, 황산 나트륨, 트리메틸아민 N-옥사이드, 베타인, 금속 이온(예를 들면, 아연, 칼슘, 및 마그네슘), CHAPS, 모노라우레이트, 2-O-베타-만노글리세레이트, 또는 상기의 임의의 배합물이 포함되지만, 이들에 제한되는 것은 아니다.

[0182] 바람직한 부형제로는 슈크로스, 락토스, 글리세롤, 크실리톨, 소르비톨, 만니톨, 말토스, 이노시톨, 트레할로스, 글루코스, 소 혈청 알부민(BSA), 사람 혈청 알부민(HSA), 재조합 알부민, 텍스트란, PVA, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스(HPMC), 폴리에틸렌이민, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈(PVP), 하이드록시에틸셀룰로스(HEC), 폴리에틸렌 글리콜, 에틸렌 글리콜, 글리세롤, 알라닌, 글리신, 리신 하이드로클로라이드, 사르코신, SDS, 트리메틸아민 N-옥사이드, 베타인, 아연 이온, 칼슘 이온, 마그네슘 이온, CHAPS, 슈크로스 모노라우레이트, 및 2-O-베타-만노글리세레이트가 있다.

[0183] 본 발명의 제형 중의 하나 이상의 부형제의 농도는 약 0.001 내지 5중량%, 보다 바람직하게는 약 0.1 내지 2중량%이다.

- [0184] **치료 방법**
- [0185] 다른 실시형태에서, 본 발명은, 포유동물에게 본 발명의 약제학적 조성물의 치료학적 유효량을 투여함을 포함하는, 포유동물의 치료 방법을 제공하고, 여기서, 상기 포유동물은, 에타너셉트로 이롭게 치료될 수 있는 질환 또는 장애를 갖는다.
- [0186] 바람직한 실시형태에서, 에타너셉트는, 상기 조성물로 치료되는 바와 같은 포유동물과 동일한 종으로부터 유도된다.
- [0187] 바람직한 실시형태에서, 상기 포유동물은 사람이다.
- [0188] 제공된 조성물로 치료될 수 있는 질환 또는 장애로는, 류마티스 관절염, 건선성 관절염, 강직성 척추염, 베게너 질환(육아중증), 크론 질환(또는 염증성 장 질환), 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD), C형 간염, 자궁내막증, 천식, 악액질, 건선, 및 아토피성 피부염이 포함되지만, 이들에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 조성물로 치료될 수 있는 추가의 질환 또는 장애로는 WO 00/62790, WO 01/62272, 미국 특허 출원 제2001/0021380호, 및 미국 특허 7,648,702 B2에 기술되어 있는 것들이 포함되고, 이들의 관련 부분은 본원에 인용에 의해 포함된다.
- [0189] 제공된 약제학적 조성물은, 치료를 필요로 하는 대상체에게 전신 주사에 의해, 예를 들면, 정맥내 주사에 의해; 또는 관련 부위에의 주사 또는 적용에 의해, 예를 들면, 해당 부위가 진료시 노출되는 경우 해당 부위에의 직접 주사, 또는 직접 적용에 의해; 또는 국소 적용에 의해 투여될 수 있다.
- [0190] 한 실시형태에서, 본 발명은, 류마티스 관절염의 치료 및/또는 예방을 필요로 하는 포유동물에게, 제공된 에타너셉트 조성물들 중 하나의 치료학적 유효량을 투여함을 포함하는, 류마티스 관절염의 치료 및/또는 예방 방법을 제공한다.
- [0191] 제공된 조성물 중의 에타너셉트의 치료학적 유효량은, 치료되는 병태, 병태의 중증도, 사전 치료요법, 및 환자의 임상학적 병력, 및 치료제에 대한 반응에 의존할 것이다. 적절한 용량은 주치의의 판단에 따라 조정되어 환자에게 1회 또는 일련의 투여에 걸쳐 투여될 수 있다.
- [0192] 한 실시형태에서, 성인 용량당 유효한 에타너셉트 양은 약 1 내지 500mg/m<sup>2</sup>, 또는 약 1 내지 200mg/m<sup>2</sup>, 또는 1 내지 40mg/m<sup>2</sup>, 또는 약 5 내지 25mg/m<sup>2</sup>이다.
- [0193] 대안으로, 그 양이 2 내지 500mg/용량, 2 내지 100mg/용량, 또는 약 10 내지 80mg/용량의 범위일 수 있는 낮은 용량(flat dose)이 투여될 수 있다.
- [0194] 용량이 주당 1회 초과로 투여되는 경우, 예시 용량 범위는 상기 기술된 용량 범위들과 동일하거나, 그 이하이고, 바람직하게는 25 내지 100mg/용량의 용량 범위로 주당 2회 이상 투여된다.
- [0195] 다른 실시형태에서, 주사에 의한 투여에 허용되는 용량은 80 내지 100mg/용량을 함유하거나, 대안으로 80mg/용량을 함유한다.
- [0196] 용량은 매주, 격주, 또는 수주(예를 들면, 2 내지 8주)로 나누어 투여될 수 있다.
- [0197] 한 실시형태에서, 에타너셉트는 단일 피하(SC) 주사에 의해 25 내지 75mg/ml로 투여된다.
- [0198] 몇몇의 경우, 환자 병태의 개선은, 약 100mg 이하의 용량의 약제학적 조성물을 3주 이상의 기간에 걸쳐 주당 1 내지 3회 투여함으로써 수득될 것이다. 바람직한 개선 정도를 유도하기 위해서는 보다 긴 기간 동안의 치료가 필요할 수 있다. 치유할 수 없는 만성 병태에 관해서는 용법을 무기한으로 지속할 수 있다. 소아 환자(연령 4 세 내지 17세)에 관해서는 0.4mg/kg 내지 5mg/kg 용량의 에타너셉트를 주당 1회 이상 투여하는 적합한 용법을 연루시킬 수 있다.
- [0199] 다른 실시형태에서, 본 발명의 약제학적 제형은 벌크 제형으로 제조될 수 있고, 이와 같이, 약제학적 조성물의 구성성분들은, 투여에 요구되는 것보다 높게 조정되어 투여하기 전에 적절하게 희석한다.
- [0200] 약제학적 조성물은 단독 치료제로서 또는 필요에 따라 추가의 치료요법과 병용하여 투여할 수 있다. 따라서, 한 실시형태에서, 제공된 치료 및/또는 예방 방법은 다른 활성제의 치료학적 유효량의 투여와 병용하여 사용된다. 다른 활성제는, 본 발명의 약제학적 조성물을 투여하기 전에, 투여하는 동안, 또는 투여한 후에 투여할 수 있다. 다른 활성제는, 제공된 조성물의 일부로서, 또는 대안으로는 개별 제형으로서 투여할 수 있다.
- [0201] 제공된 약제학적 조성물의 투여는, 비경구, 경구, 협측, 비강, 직장, 복강내, 피내, 경피, 피하, 정맥내, 동맥

내, 심장내, 심실내, 두개내, 기관내, 척수강내 투여, 근육내 주사, 초자체내 주사, 및 국소 적용을 포함하는 각종 방식으로 달성될 수 있다.

[0202] 본 발명의 약제학적 조성물은, 비경구 투여, 즉, 피하, 근육내, 정맥내, 복강내, 뇌척수내, 관절내, 활막내, 및/또는 척수강내 투여에 특히 유용하다. 비경구 투여는 볼루스 주사 또는 연속적 주입에 의해 이루어질 수 있다. 주사용 약제학적 조성물은, 단위 용량형으로, 예를 들면, 보존제가 첨가된 앰플로 또는 다중-용량 컨테이너로 제시될 수 있다. 또한, 최근 다수의 약물 전달 접근법들이 개발되었고, 본 발명의 약제학적 조성물은, 이들 새로운 방법, 예를 들면, Inject-ease®, Genject®, GenPen®과 같은 인젝터 펜, 및 MediJector® 및 BioJector®와 같은 무바늘 장치(needleless device)를 이용하여 투여하기에 적합하다. 본 발명의 약제학적 조성물은, 또한, 발견될 투여 방법에도 적용될 수 있다. 또한, 문헌[Langer, 1990, Science, 249:1527-1533]을 참조한다.

[0203] 제공된 약제학적 조성물은, 또한, 데포 제제로서 제형화될 수 있다. 이러한 지효성(long acting) 제형은 체내 이식(implantation)(예를 들면, 피하 또는 근육내)에 의해 또는 근육내 주사에 의해 투여될 수 있다. 따라서, 예를 들면, 제형은, 적합한 중합체성 또는 소수성 재료(예를 들면, 허용되는 오일 중의 유제), 또는 이온 교환 수지, 또는 난용성 유도체, 예를 들면, 난용성 염을 이용하여 변형될 수 있다.

[0204] 약제학적 조성물은, 필요에 따라, 활성 성분을 함유하는 하나 이상의 단위 용량형을 함유할 수 있는, 바이알, 팩, 또는 디스펜서 장치로 제시될 수 있다. 한 실시형태에서, 디스펜서 장치는, 주사를 위해 준비된 단일 용량의 액체 제형을 갖는 시린지를 포함할 수 있다. 시린지는 투여를 위한 지침서를 수반할 수 있다.

[0205] 다른 실시형태에서, 본 발명은, 본 발명의 수성 약제학적 조성물을 함유하는, 키트 또는 컨테이너에 관한 것이다. 수성 약제학적 조성물 중의 폴리펩타이드의 농도는 넓은 범위에 걸쳐 변할 수 있지만, 일반적으로는 수성 제형 ml당 약 0.05 내지 약 20,000 $\mu$ g( $\mu$ g/ml)의 범위 내이다. 키트는, 또한, 사용을 위한 지침서를 수반할 수 있다.

[0206] 본 발명은, 단지 설명을 위한 것으로 의도되므로 그 안에서의 다수의 변형 및 이형이 당해 분야 숙련자에게 명백할 것인 하기 실시예에 보다 구체적으로 기술되어 있다. 하기 실시예에서, 각종 성분의 중량%는 w/v%로서 나타낸다는 것이 이해되어야만 한다.

#### [0207] 실시예 1A

#### [0208] 계면활성제 + 세린으로 안정화된 에타너셉트

[0209] 에타너셉트를 함유하고 계면활성제 및 세린(아르기닌 부재)으로 안정화된 안정한 수성 약제학적 조성물을 하기 와 같이 제조하였다:

[0210] 각각의 제형 구성성분(완충제, 아미노산, 당, 폴리올, 계면활성제 등)을, 제형 완충제의 주어진 체적에 요구되는 양으로 칭량한다. 이들 구성성분은, 제형 완충제의 주어진 체적을 넣어 측정할 수 있는 비커 또는 베셀(vessel)에 배합한다. 주어진 목표의 제형 완충제의 대략 3/4와 동일한 탈이온수의 체적을 비커에 첨가하고, 마그네틱 교반 막대를 사용하여 구성성분을 용해시킨다. 완충제의 pH는, 1몰의 수산화 나트륨 및/또는 1몰의 염화 수소를 이용하여 목표의 제형 pH로 조정한다. 이어서, 최종 제형 완충제 체적은 탈이온수의 첨가를 통해 목표 체적으로 상승된다. 최종 물 첨가 후 상기 용액을 마그네틱 교반 막대를 이용하여 혼합한다. 에타너셉트 단백질 용액을 투석 재료 하우징(housing)(예를 들면, Thermo Scientific Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Unit 10,000 MWCO) 내에 두고, 이어서, 4℃에서 12시간 동안 바람직한 제형 완충제와 접촉되게 둔다. 제형 완충제 체적 대 단백질 용액 체적의 비는 1000:1 이상이어야만 한다. 이어서, 투석 하우징 및 투석 하우징이 함유하는 단백질 용액은 4℃에서 추가의 12시간 동안 동일한 체적의 제2 제형 완충제 중에 둔다.

[0211] 얻어진 단백질 용액을 투석 재료 하우징으로부터 제거하고, 자외선 분광법을 이용하여 단백질의 농도를 측정한다. 원심분리(예를 들면, Amicon Ultra 10,000 MWCO Centrifugal Concentrators) 및/또는 제형 완충제로의 희석을 이용하여 단백질 농도를 바람직한 수준으로 조정한다.

[0212] (아르기닌의 부재 하에) 세린으로 에타너셉트가 안정화된 본 발명의 5개의 샘플 조성물을 나타낸다.

(제형 1:15)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
세린 (비활성 성분)	25 mM
인산 나트륨, pH 6.3 (비활성)	25 mM
슈크로스 (비활성)	1 % (w/v)
NaCl (비활성)	100 mM
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

[0213]

(제형 1:12)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
세린 (비활성 성분)	25 mM
인산 나트륨, pH 6.4 (비활성)	25 mM
슈크로스 (비활성)	2.5 % (w/v) 또는 5% (w/v)
NaCl (비활성)	100 mM
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

[0214]

(제형 1:16)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
세린 (비활성 성분)	50 mM
인산 나트륨, pH 6.4 (비활성)	25 mM
슈크로스 (비활성)	5% (w/v)
NaCl (비활성)	25 mM
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

[0215]

(제형 2:4)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
세린 (비활성 성분)	100 mM
인산 나트륨, pH 6.3 (비활성)	25 mM
슈크로스 (비활성)	1% (w/v)
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

[0216]

(제형 3:8)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
세린 (비활성 성분)	120 mM
인산 나트륨, pH 6.3 (비활성)	25 mM
슈크로스 (비활성)	1% (w/v)
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

[0217]

[0218]

조성물은, 크기 배제 크로마토그래피(SEC), 변성된 SEC(dSEC), 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC), 도데실황산 나트륨 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)에 의해 장기 안정성에 대해, 그리고 각종 시점에서의 결합 및 생체활성에 대해 시험될 수 있다. 생체활성은, 하기 논의되는 바와 같은 SEC, dSEC, HIC를 포함하는 임의의 수의 익히 공지되어 있는 검정에 의해 측정될 수 있다. 육안으로 보이지 않는 입자를 평가하기 위해 플로우 캡 분석을 이용할 수 있다.

[0219]

예를 들면, 크기 배제 크로마토그래피 기술은 문헌[Hawe et al, Pharm. Res. 2011, 28: 2302 및/또는 van Marrschalkerweerd et al., Eur. J. Pharm. Biopharm. 2011, 78: 213]에 기재되어 있다. 유사하게, 변성된 크기 배제 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 및 도데실황산 나트륨-폴리아크릴아미드 겔 전기영동의 기술도, 또한, 당해 분야 숙련자에게 익히 공지되어 있다.

[0220]

조성물은 2년 이상의 기간에 걸쳐 안정할 것이라고 생각된다.

[0221]

#### 실시예 1B

[0222]

#### 계면활성제 + 프롤린으로 안정화된 에타너셉트

[0223]

실시예 1A에 기술된 바와 유사한 절차를 이용하여 본 실시예 1B에서 계면활성제 + 프롤린으로 안정화된 조성물을 제조하고 시험할 수 있다. 하기 예시되는 안정화를 위해 계면활성제 + 프롤린을 사용한 에타너셉트 제형은 아르기닌을 함유하지 않는다.

(제형 1:4)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
프롤린 (비활성 성분)	25 mM
인산 나트륨, pH 6.3 (비활성)	25 mM
슈크로스 (비활성)	2.5 % (w/v)
NaCl (비활성)	50 mM
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

[0224]

(제형 1:5)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
프롤린 (비활성 성분)	50 mM
인산 나트륨, pH 6.3 (비활성)	25 mM
슈크로스 (비활성)	1.0 % (w/v)
NaCl (비활성)	25 mM
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

[0225]

(제형 1:6)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
프롤린 (비활성 성분)	100 mM
인산 나트륨, pH 6.3 (비활성)	25 mM
슈크로스 (비활성)	1.0 % (w/v)
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

[0226]

[0227]

조성물은 장기 안정성에 대해 시험될 수 있고, 생체활성은 실시예 1A에서 논의된 바와 동일한 방식으로 측정될 수 있다. 육안으로 보이지 않는 입자를 평가하기 위해서 플로우 캡 분석을 이용할 수 있다.

[0228]

조성물은 2년 이상의 기간에 걸쳐 안정할 것이라고 생각된다.

[0229]

#### 실시예 1C

[0230]

#### 계면활성제 + 글루타메이트로 안정화된 에타너셉트

[0231]

실시예 1A에 기술된 바와 유사한 절차를 이용하여, 계면활성제 + 글루타메이트로 안정화된 조성물을 제조하고 시험할 수 있다.

[0232]

아르기닌을 함유하지 않는, 계면활성제/글루타메이트 안정화된 에타너셉트 조성물이 하기 예시된다:

(제형 1:9)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
글루타메이트 (비활성 성분)	25 mM
인산 나트륨, pH 6.3 (비활성)	25 mM
슈크로스 (비활성)	1 % (w/v)
NaCl (비활성)	100 mM
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

[0233]

(제형 2:2)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
글루타메이트 (비활성 성분)	50 mM
인산 나트륨, pH 6.3 (비활성)	25 mM
슈크로스 (비활성)	1 % (w/v)
NaCl (비활성)	50 mM
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

[0234]

(제형 2:3)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
글루타메이트 (비활성 성분)	100 mM
인산 나트륨, pH 6.3 (비활성)	25 mM
슈크로스 (비활성)	1 % (w/v)
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

[0235]

(제형 3:5)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
글루타메이트 (비활성 성분)	120 mM
인산 나트륨, pH 6.5 (비활성)	25 mM
슈크로스 (비활성)	1 % (w/v)
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

조성물은 장기 안정성에 대해 시험될 수 있고, 생체활성은 실시예 1A에서 논의된 바와 동일한 방식으로 측정될 수 있다. 육안으로 보이지 않는 입자를 평가하기 위해서 플로우 캡 분석을 이용할 수 있다.

조성물은 2년 이상의 기간에 걸쳐 안정할 것이라고 생각된다.

#### 실시예 2A

#### 계면활성제 + 염화 칼슘으로 안정화된 에타너셉트

실시예 1A에 기술된 바와 유사한 절차를 이용하여, 계면활성제 + 염화 칼슘으로 안정화된 에타너셉트 제형을 제조하고 시험할 수 있다.

아르기닌을 함유하지 않는, 계면활성제 + 염화 칼슘으로 안정화된 에타너셉트 조성물이 하기 예시된다.

(제형 P1:1)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
염화 칼슘 (비활성 성분)	2 mM
인산 나트륨, pH 6.3 (비활성)	25 mM
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

(제형 1:11)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
염화 칼슘 (비활성 성분)	2 mM
인산 나트륨, pH 6.3 (비활성)	25 mM
NaCl (비활성)	100 mM
슈크로스 (inert)	2.5 % (w/v)
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

(제형 1:18)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
염화 칼슘 (비활성 성분)	2 mM
인산 나트륨, pH 6.3 (비활성)	25 mM
크실리톨 (비활성)	10 mM
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

(제형 3:6)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
염화 칼슘 (비활성 성분)	2 mM
인산 나트륨, pH 6.3 (비활성)	15 mM
NaCl (비활성)	75 mM
슈크로스 (비활성)	3 % (w/v)
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

[0246]

(제형 3:9)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
염화 칼슘 (비활성 성분)	1 mM
인산 나트륨, pH 6.6 (비활성)	10 mM
NaCl (비활성)	50 mM
트레할로스 (비활성)	5 % (w/v)
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

[0247]

[0248]

조성물은 장기 안정성에 대해 시험될 수 있고, 생체활성은 실시예 1A에서 논의된 바와 동일한 방식으로 측정될 수 있다. 육안으로 보이지 않는 입자를 평가하기 위해서 플로우 캡 분석을 이용할 수 있다.

[0249]

조성물은 2년 이상의 기간에 걸쳐 안정할 것이라고 생각된다.

[0250]

#### 실시예 2B

[0251]

#### 계면활성제 + 염화 마그네슘으로 안정화된 에타너셉트

[0252]

실시예 1A에 기술된 바와 유사한 절차를 이용하여, 계면활성제 + 염화 마그네슘으로 안정화된 에타너셉트 제형을 제조하고 시험할 수 있다. 하기에 예시된 에타너셉트 제형은 아르기닌을 함유하지 않는다.

(제형 P1:2)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
염화 마그네슘 (비활성 성분)	2 mM
인산 나트륨, pH 6.3 (비활성)	25 mM
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

[0253]

(제형 2:15)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
염화 마그네슘 (비활성 성분)	4 mM
인산 나트륨, pH 6.4 (비활성)	25 mM
NaCl (비활성)	100 mM
슈크로스 (비활성)	2.5 % (w/v)
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

[0254]

(제형 3:7)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
염화 마그네슘 (비활성 성분)	5 mM
인산 나트륨, pH 6.3 (비활성)	15 mM
NaCl (비활성)	75 mM
슈크로스 (비활성)	2.5 % (w/v)
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

[0255]

(제형 3:14)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
염화 마그네슘 (비활성 성분)	10 mM
인산 나트륨, pH 6.3 (비활성)	25 mM
NaCl (비활성)	110 mM
슈크로스 (비활성)	1 % (w/v)
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

[0256]

(제형 4:2)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
염화 마그네슘 (비활성 성분)	10 mM
인산 나트륨, pH 6.5 (비활성)	15 mM
NaCl (비활성)	75 mM
슈크로스 (비활성)	3 % (w/v)
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

[0257]

[0258]

조성물은 장기 안정성에 대해 시험될 수 있고, 생체활성은 실시예 1A에서 논의된 바와 동일한 방식으로 측정될 수 있다. 육안으로 보이지 않는 입자를 평가하기 위해서 플로우 캡 분석을 이용할 수 있다.

[0259]

조성물은 2년 이상의 기간에 걸쳐 안정할 것이라고 생각된다.

[0260]

실시예 2C

[0261]

계면활성제 + 염화 아연으로 안정화된 에타너셉트

[0262]

실시예 1A에 기술된 바와 유사한 절차를 이용하여, 계면활성제 + 염화 아연으로 안정화된 에타너셉트 제형을 제조하고 시험할 수 있다.

[0263]

하기에 예시된 에타너셉트 제형은 아르기닌을 함유하지 않는다.

(제형 P1:3)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
염화 아연 (비활성 성분)	2 mM
인산 나트륨, pH 6.3 (비활성)	25 mM
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

[0264]

[0265] 조성물은 장기 안정성에 대해 시험될 수 있고, 생체활성은 실시예 1A에서 논의된 바와 동일한 방식으로 측정될 수 있다. 육안으로 보이지 않는 입자를 평가하기 위해서 플로우 캡 분석을 이용할 수 있다.

[0266] 조성물은 2년 이상의 기간에 걸쳐 안정할 것이라고 생각된다.

[0267] **실시예 3A**

[0268] **계면활성제 + 메글루민으로 안정화된 에타너셉트**

[0269] 실시예 1A에 기술된 바와 유사한 절차를 이용하여, 계면활성제 + 메글루민으로 안정화된 에타너셉트 조성물을 제조하고 시험할 수 있다. 하기에 예시되는 계면활성제/메글루민 안정화된 에타너셉트 조성물은 아르기닌을 함유하지 않는다.

(제형 1:19)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
메글루민 (비활성 성분)	5 % (w/v)
인산 나트륨, pH 6.3 (비활성)	25 mM
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

[0270]

(제형 1:21)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
메글루민 (비활성 성분)	0.49 % (w/v)
인산 나트륨, pH 6.3 (비활성)	25 mM
슈크로스 (비활성)	1 % (w/v)
NaCl (비활성)	100 mM
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

[0271]

[0272] 조성물은 장기 안정성에 대해 시험될 수 있고, 생체활성은 실시예 1A에서 논의된 바와 동일한 방식으로 측정될 수 있다. 육안으로 보이지 않는 입자를 평가하기 위해서 플로우 캡 분석을 이용할 수 있다.

[0273] 조성물은 2년 이상의 기간에 걸쳐 안정할 것이라고 생각된다.

[0274] **실시예 3B**

[0275] **계면활성제 + 만니톨의 유도체로 안정화된 에타너셉트**

[0276] 실시예 1A에 기술된 바와 유사한 절차를 이용하여, 만니톨의 유도체로 안정화된 에타너셉트 조성물을 제조하고 시험할 수 있다.

[0277] 하기에 예시되는 제형은 아르기닌을 함유하지 않는다:

성분	중량%
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
만노실글리세레이트 (비활성 성분)	4% (w/v)
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

[0278]

[0279] 조성물은 장기 안정성에 대해 시험될 수 있고, 생체활성은 실시예 1A에서 논의된 바와 동일한 방식으로 측정될 수 있다. 육안으로 보이지 않는 입자를 평가하기 위해서 플로우 캡 분석을 이용할 수 있다.

[0280] 조성물은 2년 이상의 기간에 걸쳐 안정할 것이라고 생각된다.

[0281] **실시예 4A**

**계면활성제 + 트레할로스(또는 슈크로스) 및 만니톨로 안정화된 에타너셉트**

실시에 1A에 기술된 바와 유사한 절차를 이용하여, 트레할로스(또는 슈크로스)와의 배합물로의 만니톨로 안정화된 에타너셉트 조성물을 제조하고 시험할 수 있다. 하기에 예시되는 안정화된 제형은 아르기닌을 함유하지 않는다.

(제형 P1:5)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
트레할로스 (비활성 성분)	4 % (w/v)
만니톨 (비활성)	2 % (w/v)
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

(제형 1:10)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
인산 나트륨, pH 6.32 (비활성)	25 mM
슈크로스 (비활성)	5 % (w/v)
만니톨 (비활성)	2 % (w/v)
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

조성물은 장기 안정성에 대해 시험될 수 있고, 생체활성은 실시에 1A에서 논의된 바와 동일한 방식으로 측정될 수 있다. 육안으로 보이지 않는 입자를 평가하기 위해서 플로우 캡 분석을 이용할 수 있다.

조성물은 2년 이상의 기간에 걸쳐 안정할 것이라고 생각된다.

**실시에 4B**

**계면활성제 + 슈크로스 및 소르비톨로 안정화된 에타너셉트**

실시에 1A에 기술된 바와 유사한 절차를 이용하여, 계면활성제 + 슈크로스 및 소르비톨의 배합물로 안정화된 에타너셉트 조성물을 제조하고 시험할 수 있다. 하기에 예시되는 제형은 아르기닌을 함유하지 않는다.

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
슈크로스 (비활성 성분)	4 % (w/v)
소르비톨 (비활성)	2 % (w/v)
인산 나트륨, pH 6.3 (비활성)	25 mM
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

조성물은 장기 안정성에 대해 시험될 수 있고, 생체활성은 실시에 1A에서 논의된 바와 동일한 방식으로 측정될 수 있다. 육안으로 보이지 않는 입자를 평가하기 위해서 플로우 캡 분석을 이용할 수 있다.

조성물은 2년 이상의 기간에 걸쳐 안정할 것이라고 생각된다.

본 발명의 예시 실시형태의 상기 설명은 실례 및 설명의 목적만을 위해 제시되었고, 본 발명을 철저하도록 또는 개시되어 있는 정확한 형태에 제한되도록 의도되는 것은 아니다. 상기 교시의 관점에서 다수의 변형 및 이형이 가능하다.

**실시에 5**

**계면활성제 + 크실리톨로 안정화된 에타너셉트**

실시에 1A에 기술된 바와 유사한 절차를 이용하여, 계면활성제 + 크실리톨로 안정화된 에타너셉트 제형을 제조

하고 시험할 수 있다. 하기에 예시되는 조성물은 아르기닌을 함유하지 않는다.

(제형 1:17)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
인산 나트륨, pH 6.3 (비활성)	25 mM
크실리톨 (비활성)	10 % (w/v)
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

[0298]

(제형 2:10)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
인산 나트륨, pH 6.31 (비활성)	25 mM
크실리톨 (비활성)	6 % (w/v)
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

[0299]

(제형 2:11)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
인산 나트륨, pH 6.3 (비활성)	25 mM
크실리톨 (비활성)	2.5 % (w/v)
슈크로스 (비활성 성분)	5 % (w/v)
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

[0300]

(제형 2:18)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
인산 나트륨, pH 6.4 (비활성)	25 mM
크실리톨 (비활성)	2.5 % (w/v)
메글루민 (비활성)	2.5 % (w/v)
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

[0301]

(제형 2:19)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
인산 나트륨, pH 6.24 (비활성)	10 mM
크실리톨 (비활성)	2.5 % (w/v)
메글루민 (비활성)	2.5 % (w/v)
NaCl (비활성)	2.5 % (w/v)
슈크로스 (비활성)	1 % (w/v)
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

[0302]

[0303]

[0304]

## 실시예 6

계면활성제 및 NaCl으로 안정화된 에타너셉트

[0305]

실시에 1A에 기술된 바와 유사한 절차를 이용하여, 계면활성제, 및 NaCl 단독, 또는 슈크로스, 트레할로스, 및/또는 아르기닌과의 배합물로의 NaCl로 안정화된 에타너셉트 제형을 제조하고 시험할 수 있다. 하기 제형 3:13을 제외한 하기 예시되는 조성물은 아르기닌을 함유하지 않는다.

(제형 2:8)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
인산 나트륨, pH 6.32 (비활성)	25 mM
NaCl (비활성)	150 mM
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

[0306]

(제형 2:6)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
인산 나트륨, pH 6.3 (비활성)	15 mM
NaCl (비활성)	100 mM
슈크로스 (비활성)	2 % (w/v)
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

[0307]

(제형 3:10)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
인산 나트륨, pH 6.57 (비활성)	10 mM
NaCl (비활성)	75 mM
슈크로스 (비활성)	3 % (w/v)
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

[0308]

(제형 3:11)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
인산 나트륨, pH 6.30 (비활성)	25 mM
NaCl (비활성)	75 mM
트레할로스 (비활성)	3 % (w/v)
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

[0309]

(제형 3:12)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
인산 나트륨, pH 6.3 (비활성)	25 mM
NaCl (비활성)	75 mM
슈크로스 (비활성)	3 % (w/v)
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

[0310]

(제형 3:13)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
인산 나트륨, pH 6.3 (비활성)	25 mM
NaCl (비활성)	120 mM
슈크로스 (비활성)	1 % (w/v)
아르기닌 (비활성)	5 mM
폴리소르베이트 80	.02 % (w/v)

조성물은 장기 안정성에 대해 시험될 수 있고, 생체활성은 실시예 1A에서 논의된 바와 동일한 방식으로 측정될 수 있다. 육안으로 보이지 않는 입자를 평가하기 위해서 플로우 캡 분석을 이용할 수 있다.

#### 에타너셉트 제형의 분석

##### A. 열적 안정성 보관

투석 및 농축 후, 상기 예시된 에타너셉트 제형의 샘플을 생물 안전 작업대(bio safety cabinet)에서 멸균 여과 하였다. 멸균된 피펫 및 고압살균된(autoclaved) 피펫 팁을 이용하여, 에타너셉트 제형의 샘플을, 사전-표지되고 고압살균된 1mL 동결건조 바이알에 이동시켰다. 바이알을 멸균 부틸 마개(stopper)로 막았고, 알루미늄 캡(cap)으로 크림핑하였다(crimped). 이어서, 모든 바이알을 열적 안정성 오븐에 이동시켰다. 샘플에 2개의 열적 안정성 용법을 수행하였다: (1) 40℃에서 2주, 및 (2) 25℃에서 4주. 본 명세서에 걸쳐, 이들 2개의 온도 용법은 각각 "T<sub>2</sub>" 및 "T<sub>4</sub>"로 나타낸다.

##### B. 크기 배제 크로마토그래피(SEC)

분석물이 크기에 따라 분리되는 고성능 액체 크로마토그래피 방법인 크기 배제 크로마토그래피(SEC)의 익히 공지되어 있는 기술(참조: Rogner, M. (2000). Size Exclusion Chromatography. Protein Liquid Chromatography. M. Kastner. Amsterdam, Elsevier. **61**: 89-145.)을 이용하여, 본원에 개시되어 있는 에타너셉트 제형을 분석하였다. 상기 기술되어 있는 에타너셉트 샘플의 열적 안정성을 평가하기 위해서, 문헌(van Maarschalkerweerd, A., G. J. Wolbink, et al. (2011). "Comparison of analytical methods to detect instability of etanercept during thermal stress testing." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **78**(2): 213-221.)에 기초한 SEC 방법에 의해 샘플을 실험하였다. 이동상 완충제는, 50mM의 인산 나트륨 1염기성 1수화물 및 150mM의 아르기닌을 함유하도록 제조하였다. pH는, 1M의 HCl을 이용하여 6.5로 조정하였다. 모든 분리는, Tosoh TSK-Gel G4000 SWxl 7.8mm x 30cm(cat. no. 8542)에 직선으로 부착된 Tosoh TSK-Gel SWxl 6mm x 4cm 가드 컬럼(cat. no. 8543)을 이용하여 수행하였다. 분리를 행하기 위해, 컬럼을 실온(23℃)에 가져왔고, 0.5mL/분의 유속의 이동상으로 평형화하였다. 50mg/mL 에타너셉트 제형의 5μl를 오토샘플러를 이용하여 컬럼 상에 주입하였다. 분리는 0.5mL/분의 유속으로 30분에 걸쳐 달성하였다. 컬럼 용출액을 상기 시간 동안 280nm의 파장에서 모니터링하였다.

##### C. 크기 배제 크로마토그래피 크로마토그램의 적분

모든 적분은 Chromeleon 소프트웨어(Dionex)를 이용하여 수행하였다. 적분 전에, 에타너셉트를 함유하지 않는 완충제에 대한 SEC 크로마토그램을 모든 크로마토그램으로부터 감하였다. 모든 적분은 12분 내지 26분의 보유 시간 사이에 수행하였다. 몇몇의 매개변수를 사용하여 피크를 정의하였다. 검출된 피크에 대한 최소 면적은 0.05mAu<sup>\*</sup>분으로 설정하였다. 피크 검출에 대한 2차원 감도는 0.01mAu 및 75초로 설정하였다. 수동 적분 도구를 이용하여 피크 숄더(peak shoulder)를 수동적으로 추가하였다. 검출된 모든 피크는 2 단계로 수동적으로 조정되었다. 첫번째로, 피크 기저선(피크의 저면 경계선)을 수평으로 조정하였다. 두번째로, 피크 기저선의 수직 위치를 크로마토그램 기저선의 수직 위치로 조정하였다. 크로마토그램 기저선 값은 분석물 부재시의 신호로서 정의되었다. 분석물 부재시의 신호는 12분의 보유 시간에서의 흡광도(mAu)로서 정의되었다.

##### D. 에타너셉트 제형의 SEC 분석

상기 기술된 에타너셉트 제형의 SEC 분석에서, 3개의 SEC 크로마토그래피 분석을 동정하고 연구하였다. 분석된 분석물은 SEC 컬럼으로부터의 용출 순서로 (1) 온전한 에타너셉트 분자들 사이에서 비-공유결합적 정전기적 인력

을 통해 집합되는(assembled) 경향이 있는 온전한 에타너셉트 TNFR:FC 융합 단백질의 응집체를 나타내는 매우 높은 분자량의 분획(이하, 응집체(들) 또는 응집체(들) 함량); (2) 온전한 에타너셉트 TNFR:FC 융합 단백질을 나타내는 단량체 함량(이하에 "단량체" 또는 "단량체 함량"으로서 나타냄); (3) TNFR:분자 융합 단백질의 한 부분이 단량체로부터, 해리; 예를 들면, 분자의 힌지 영역에서의 융합 단백질의 FC 부분의 아암(arm)의 해리되는 에타너셉트 분자의 한 단편 또는 단편들의 집단을 나타내는 분획(이하에 "단편 3"으로서 나타냄)이었다. 하기 표는, 상기 기술된 바와 같은 SEC 분석에 의해 측정된 응집체, 단량체, 및 단편 3의 상대적인 양을 나타낸다.

#### E. 육안으로 보이지 않는 입자의 FlowCAM® 분석

방법 개발은 비샘플 절차를 이용한 Manuel Prime(액체 대 액체 계면)을 이용하여 수행할 수 있다. 표명된 혼합 효과가 유세포(flow cell)에서 보여지므로, 대안의 에어 갭 절차(샘플을 이용한 Manual Prime)가 샘플 평가를 위해 선택된다.

실시에 3.5 및 실시에 4.2의 제형은 "T0"에서 PS 80의 존재 및 부재 하에 평가하였다. flowCAM 분석과 관련하여 사용되는 용어 "T0"은, 시험되는 제형이 제조된 후 샘플이 임의의 인지가능한 열적 또는 보관 스트레스 하에 처하지 않게(즉, 5°C 이하로 유지되게) 한 후에 즉시(24 내지 72시간 내에) flowCAM 분석을 이용하여 시험하였음을 나타낸다.

#### 기기 및 부속품

FlowCAM 기기:	모델 VS1, 일련번호 #551, Sony SX90 카메라 및 1mL의 시린지를 갖는 C70 펌프(Fluid Imaging Technologies)가 구비됨
FlowCAM 소프트웨어:	DSP 펌웨어 버전: 54; 버전 3.0.3
유세포:	80µm의 깊이 및 700µm의 폭을 갖는 관측 시야(FOV FC80)(Fluid Imaging Technologies)
대물렌즈:	10X

#### 상황정보 설정 (방법 & 설정 매개변수)

방법:	샘플을 이용한 Manuel Prime(에어 갭)
샘플 분석:	0.200mL의 체적, 0.170mL 분석됨
유속:	0.100 ml/분
자동 화상 속도:	22 프레임/초
효율:	38.7%
실행 시간:	1.7 분
가장 근접한 이웃과의 거리:	0 마이크로론
폐쇄 홀:	5 반복
화상:	5의 폴라주 화상 경계 패딩
입자 분절화:	암 역치 15.00, 명 역치 15.00
허용되는 영역:	좌 15, 우 1255, 상 0, 하 959
카메라:	셔터 8
증가	57
자동 화상 속도:	22 프레임/초
플래시 카메라 지연:	100 마이크로초
플래시 지속기간:	18.5 마이크로초
직경 (ESD):	최소 2.00, 최대 1000.00 마이크로론

샘플을 실행하기 전에, 유세포 및 대물렌즈를 설치하고, 관측 시야 및 포커스 최적화를 행한다. 시스템 자격은, 유수 블랭크(running water blank) 및 다중 복제물에서의 입자 크기 표준을 포함한다. 샘플을 실행하기 전에, 세척 절차를 착수하여, 입자수가, 전형적으로 샘플들 사이에 1000개의 입자/mL 미만, 또는 복제 샘플들 사이에 5% 미만의 샘플 입자/mL의 허용되는 수준으로 존재함을 확실히 한다. 일상적인 세척 절차는, 세척제들 사이에, 그리고 입자수 수준을 측정하기 전에 최종 플러시로서 물(Millipore Direct-Q 타입 1, 0.22µm 여과됨, 18.2MΩ)을 사용한다. 일단 입자수가, 허용되는 입자수/mL 수준에 도달하면, 샘플을 샘플 팁으로 주의 깊게 피펫팅하고, 샘플 분석을 개시하기 전에 플로우에 적재한다. 실행 품질은, 각각의 실행 동안에, 그리고 각각의 실행 직후에, x-y 포획 플롯(유동 패턴 역학을 가시화하기 위함), 직경 크기 플롯에 대한 중형비(고착된 입자를 동정하기 위함), 각종 입자 특성(예를 들면, 크기, 순환성, 길이, 중형비)을 이용한 실행 동안의 화상 재관측 및 실행의 완료시의 분석을 포함하는 VisualSpreadSheet의 일련의 진단 도구를 이용하여 측정한다. 개개의 입자 크기는, Equivalent Spherical Diameter(ESD)로서 공지되어 있는 Fluid Imaging Technologies 소프

트웨어 측정 기술로 측정한다. ESD는, 36개의 샘플 측정에 기초한 입자의 평균 feret 측정이다(5° 마다 행함). feret 측정은 입자의 반대측에 닿는 평행 접선들 사이의 수직 거리이다.

**표 1**

**단량체의 SEC 분석**

주의: 표 I, 표 II, 및 표 III에 보고된 양은 중량%이다.

$T_0$  = 5 °C로 유지되고 생성 24시간 내에 분석된 제형

$T_1$  = 40°C에서 1주 동안 보관된 제형

$T_2$  = 40°C에서 2주 동안 보관된 제형

제형 번호	$t_0$	$t_1$	$t_2$
시판 Enbrel® (비교) [1:2]	98.81	92.58	87.64
1:5	98.38	91.65	86.89
1:9	98.48	92.05	86.06
1:10	98.25	91.84	84.51
1:11	98.60	92.08	89.71
1:17	98.02	93.90	87.53
1:18	98.27	92.89	88.21
1:19	98.10	91.94	86.06
1:21	98.22	90.78	85.43
2:2	98.11	--	86.92
2:3	98.14	--	88.84
2:4	98.12	--	88.16
2:6	98.09	--	87.77
2:8	98.07	--	88.38
2:10	98.09	--	87.56
2:11	98.10	--	88.03
2:15	98.18	--	88.22
2:18	98.10	--	89.19
2:19	98.19	--	89.63
3:5	98.35	--	90.75
3:6	98.07	--	90.75
3:7	98.09	--	89.60

제형 번호	t <sub>0</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>
3:8	98.15	--	89.27
3:9	97.90	--	91.44
3:10	98.16	--	89.77
3:11	98.32	--	89.87
3:12	98.33	--	90.92
3:13	98.18	--	90.74
3:14	98.22	--	90.54
4:2	98.62		90.47

[0335]

[0336]

표 II

응집체의 SEC 분석

제형 번호	t <sub>0</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>
시판 Enbrel® (비교)	0.09	0.59	1.02
1:5	0.23	0.63	1.01
1:9	0.18	0.67	2.20
1:10	0.26	0.68	0.82
1:11	0.12	0.50	0.64
1:17	0.31	0.70	2.17
1:18	0.24	0.65	1.61
1:19	0.26	0.63	1.50
1:21	0.23	0.64	1.30
2:2	0.29	--	3.53
2:3	0.29	--	2.31
2:4	0.29	--	2.29
2:6	0.30	--	1.81
2:8	0.30	--	1.42
2:10	0.29	--	2.57
2:11	0.31	--	1.68
2:15	0.27	--	1.83
2:18	0.29	--	1.53
2:19	0.26	--	1.24
3:5	0.28	--	0.99
3:6	0.23	--	1.27
3:7	0.28	--	0.93

[0337]

제형 번호	$t_0$	$t_1$	$t_2$
3:8	0.28	--	1.60
3:9	0.37	--	0.73
3:10	0.27	--	1.33
3:11	0.20	--	1.24
3:12	0.21	--	0.85
3:13	0.28	--	0.86
3:14	0.25	--	0.91
4:2			1.56

표 III

단편 3의 분석

제형 번호	$t_0$	$t_1$	$t_2$
시판 Enbrel® (비교) [1:2]	0.00	3.30	6.29
1:5	0.00	4.43	6.64
1:9	0.00	3.96	6.34
1:10	0.00	3.78	8.04
1:11	0.00	3.92	4.71
1:17	0.00	2.33	4.10
1:18	0.00	3.05	4.65
1:19	0.00	3.82	6.73
1:21	0.00	4.92	7.37
2:2	0.00	--	4.67
2:3	0.00	--	3.61
2:4	0.00	--	3.61
2:6	0.00	--	4.73
2:8	0.00	--	6.29
2:10	0.00	--	5.10
2:11	0.00	--	5.68
2:15	0.00		5.56
2:18	0.00		4.24
2:19	0.00		4.34
3:5	0		3.15
3:6	0		4.72

제형 번호	$t_0$	$t_1$	$t_2$
3:7	0		4.37
3:8	0		3.61
3:9	0		3.48
3:10	0		3.76
3:11	0		3.59
3:12	0		3.68
3:13	0		3.88
3:14	0		3.83
4:2			5.40

**표 IV**

SEC 단량체 함량

(4주/25℃)

표 IV는, 25℃에서 4주 동안 보관한 경우(부호  $T_4$ 로 나타냄), 본 발명에 따라 제조된 에타너셉트 제형의 단량체(에타너셉트) 함량을 나타낸다. 하기 표에서,  $T_0$ 은, 제형 제조의 24시간 내에 수행한 5℃의 샘플 온도에서의 SEC 측정을 나타내고;  $T_4$ 는, 25℃에서 4주 보관 후 SEC 분석을 수행한 에타너셉트 제형 샘플을 나타낸다.

제형 번호	$T_0$ 단량체 함량	$T_4$ 단량체 함량
시판 Enbrel® (비교)	98.15	97.86
3:5	98.35	95.16
3:6	98.07	94.84
3:7	98.09	97.75
3:8	98.15	97.65
3:9	97.90	97.44
3:10	98.16	97.66
3:11	98.32	97.75
3:12	98.33	97.90
3:13	98.18	97.78
3:14	98.22	97.79
4:2	98.62	94.70

**표 V**

SEC 응집체 함량

(4주/25℃)

표 V는, 25℃에서 4주 동안 보관 후 본 발명에 따라 제조된 에타너셉트 제형의 응집체(들) 함량을 나타낸다. 하기 표에서,  $T_0$ 은, 제형 제조의 24시간 내에 수행한 5℃의 샘플 온도에서의 SEC 측정을 나타내고;  $T_4$ 는, 25℃에서 4주 보관 후 SEC 분석을 수행한 에타너셉트 제형 샘플을 나타낸다.

제형 번호	T <sub>0</sub> 응집체(들) 함량	T <sub>4</sub> 응집체(들) 함량
시험 Enbrel® (비교)	0.28	0.25
3:5	--	0.50
3:6	--	0.57
3:7	0.28	0.31
3:8	0.28	0.37
3:9	0.37	0.41
3:10	0.27	0.32
3:11	0.20	0.27
3:12	0.21	0.26
3:13	0.28	0.32
3:14	0.25	0.28
4:2	--	0.57

#### 에타너셉트 제형의 HIC 분석

하기 표들(표 VI 및 표 VII)은, 샘플 3:5 내지 3:14에 대해 수행된 소수성 상호작용 크로마토그래피("HIC 크로마토그래피")의 결과를 나타낸다. HIC 크로마토그래피는, 본원에 인용에 의해 포함되는 미국 특허 7,294,481에 기술되어 있는 방식으로 수행된다. 샘플은, t<sub>0</sub>(5℃에서 제조의 24시간 내)에서 평가하였고, 25℃에서 2주의 보관 후(t<sub>2</sub>)(표 VI 참조)에 또는 25℃에서 4주의 보관 후(t<sub>4</sub>)(표 VII 참조)에 다시 평가하였다. 피크 1은, SEC 데이터의 논의시 상기 인용된 단편 3이거나 단편 3을 포함하는 것으로 생각되고; 피크 2는, SEC 데이터의 논의시 상기 인용된 에타너셉트 단량체이고; 피크 3은, SEC 데이터 논의시 상기 인용된 응집체(들)을 나타내거나 응집체(들)를 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "피크 1", "피크 2", 및 "피크 3"은, 또한, 본원에 인용에 의해 포함되는 미국 특허 7,294,481의 도 4에 나타내고 개시되어 있는 HIC 피크 1, 피크 2, 및 피크들에 대한 참조번호를 구성한다는 것이 추가로 이해되어야만 한다.

[0354]

표 VI

40°C 에서 2 주 보관 후 HIC 데이터.

	피크 1		피크 2		피크 3	
제형 번호	T <sub>0</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>2</sub>
시판 Enbrel® (비교)	0.91	3.23	86.72	83.41	12.33	13.36
3:5	0.72	2.95	85.82	82.50	13.45	14.55
3:6	0.72	3.44	85.91	83.26	13.36	13.30
3:7	0.74	3.52	86.11	82.41	13.15	14.07
3:8	0.72	3.08	85.80	83.90	13.48	13.02
3:9	0.69	2.39	90.93	85.09	8.38	12.52
3:10	0.74	3.06	87.36	84.24	11.90	12.70
3:11	0.56	3.10	86.46	83.73	12.98	13.18
3:12	0.68	3.07	86.80	83.52	12.52	13.40

[0355]

	피크 1		피크 2		피크 3	
3:13	0.77	2.86	86.45	84.33	12.78	12.82
3:14	0.71	2.51	87.14	84.54	12.15	12.95

[0356]

[0357]

표 VII

25°C 에서 4 주 동안 보관 후 HIC 데이터

	피크 1		피크 2		피크 3	
제형 번호	T <sub>0</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>4</sub>
시판 Enbrel®	0.91	1.09	86.76	86.95	12.33	11.97
(비교)						
3:5	0.54	1.10	85.12	84.06	14.33	14.84
3:6	0.55	1.40	85.50	84.07	13.96	14.53
3:7	0.74	1.63	86.11	85.65	13.15	12.72
3:8	0.72	1.20	85.80	85.98	13.48	12.82
3:9	0.69	1.05	90.93	86.46	8.38	12.50
3:10	0.74	1.03	87.36	85.83	11.90	13.14
3:11	0.56	1.11	86.46	85.32	12.98	13.57
3:12	0.68	0.81	86.80	86.36	12.52	12.83
3:13	0.77	1.01	86.45	85.78	12.78	13.21

[0358]

	피크 1		피크 2		피크 3	
제형 번호	T <sub>0</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>4</sub>
3:14	0.71	1.13	87.14	85.58	12.15	13.29
4:2	0.63	1.38	85.16	84.38	14.21	14.25

[0359]

[0360]

표 VIII

육안으로 보이지 않는 입자의 플로우 캡 분석

(입자수/ml)

	입자 크기 1 내지 2 μm	입자 크기 2 내지 5 μm	입자 크기 5 내지 10 μm	입자 크기 10 내지 15 μm	입자 크기 15 내지 25 μm	입자 크기 25 내지 40 μm	입자 크기 40 내지 50 μm
제형 4.2 (PS80 부제)	1000/ml ±230	5600/ml ±250	2000/ml ±490	300/ml ±71	91/ml ±64	24/ml ±9	7/ml ±13
제형 3.5 (PS 80 부제)	2100 ±1100	8000 ±3900	2300 ±940	240 ±210	120 ±84	60 ±66	27 ±34
Enbrel®	270 ±150	1400 ±670	500 ±190	120 ±50	76 ±41	27 ±10	0 ±0
제형 4.2 (PS80 존제)	230 ±130	1200 ±440	470 ±310	98 ±87	49 ±57	16 ±17	5 ±9
제형 3.5 (PS80 존제)	540 ±120	2600 ±440	1000 ±290	240 ±81	44 ±34	11 ±9	5 ±9

[0361]

[0362]

본 발명의 다른 실시형태들은, 본원에 개시되어 있는 본 발명의 명세서 및 실행을 고려하여 당해 분야 숙련가에게 명백할 것이다. 명세서 및 실시예는 단지 예시적인 것으로 간주되고, 본 발명의 적용 범위 및 정신은 하기 특허청구범위에 의해 나타내는 것으로 의도된다.

도면

도면1

