(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0136382
(43) 공개일자 2024년09월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*A61K 38/30* (2024.01) *A61K 47/20* (2017.01)
*A61K 9/19* (2006.01) *C07K 14/47* (2006.01)
*C07K 14/65* (2024.01)
(52) CPC특허분류
*A61K 38/30* (2024.01)
*A61K 47/20* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7027032
(22) 출원일자(국제) 2023년01월18일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년08월12일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2023/051110
(87) 국제공개번호 WO 2023/139115
국제공개일자 2023년07월27일
(30) 우선권주장
63/300,860 2022년01월19일 미국(US)

(71) 출원인
**오크 힐 바이오 리미티드**
영국, 더블유에이14 2디티, 체셔, 올트링엄, 1 애슐리 로드, 3 플로어
(72) 발명자
**살라마트-밀러, 나질라**
미국 매사추세츠 02421 렉싱턴 샤이어 웨이 300
**로우, 크리스**
미국 매사추세츠 02421 렉싱턴 샤이어 웨이 300
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**특허법인에이아이피**

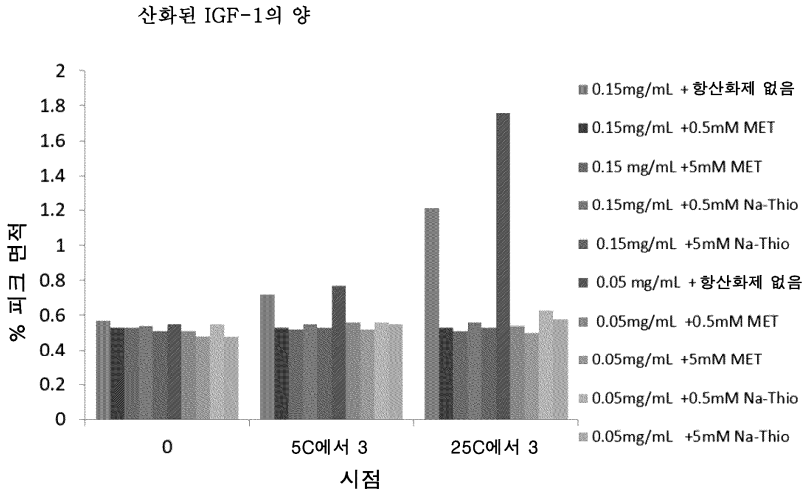
전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 **IGF-1/IGFBP의 산화를 감소시키기 위한 조성물 및 방법**

## (57) 요 약

본 발명은 무엇보다도 미숙아의 질환 및 합병증을 치료하기 위한 인슐린 유사 성장 인자-1(IGF-1)과 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질-3(IGFBP-3)을 포함하는 복합체의 산화를 감소시키는 조성물 및 방법을 제공한다. 일부 구체예에서, 방법은 항산화제를 첨가하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 항산화제는 메티오닌 또는 티오황산나트륨이다. 일부 양태에서, 제공된 조성물은 IGF-1 및 IGFBP-3을 포함하는 안정한, 순수하고 강력한 조성물이다. 일부 양태에서, 제형은 동결건조된다.

*대 표 도* - 도1



(52) CPC특허분류
***A61K 9/19*** (2013.01)
***C07K 14/4743*** (2013.01)
***C07K 14/65*** (2024.01)
(72) 발명자
**한, 마이클**
미국 매사추세츠 02421 렉싱턴 샤이어 웨이 300
**테일러, 캐서린**
미국 매사추세츠 02421 렉싱턴 샤이어 웨이 300

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

인슐린 유사 성장 인자 1(IGF-1)과 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질 3(IGFBP-3)을 1:1의 몰비로 포함하는 단리된 단백질 복합체를 포함하는 조성물로서, 상기 조성물은 항산화제를 포함하고 산화된 IGF-1 종은 약 25℃의 온도에서 저장시 3개월 후 50% 초과 증가하지 않는, 조성물.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 산화된 IGF-1 종은 약 25℃의 온도에서 저장 시 3개월 후 25% 초과 증가하지 않는, 조성물.

### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 산화된 IGF-1 종은 약 25℃의 온도에서 저장 시 3개월 후 10% 초과 증가하지 않는, 조성물.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 산화된 IGF-1 종은 약 25℃의 온도에서 저장 시 3개월 후 실질적으로 증가하지 않는, 조성물.

### 청구항 5

인슐린 유사 성장 인자 1(IGF-1)과 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질 3(IGFBP-3)을 1:1의 몰비로 포함하는 단리된 단백질 복합체를 포함하는 조성물로서, 상기 조성물은 항산화제를 포함하고 산화된 IGF-1 종의 %는 2-8℃ 사이의 온도에서 저장시 3개월 후 20% 초과 증가하지 않는, 조성물.

### 청구항 6

제5항에 있어서, 상기 산화된 IGF-1 종은 2-8℃ 사이의 온도에서 저장시 3개월 후 10% 초과 증가하지 않는, 조성물.

### 청구항 7

제6항에 있어서, 상기 산화된 IGF-1 종은 2-8℃ 범위(예컨대 그 사이)인 온도에서 저장시 3개월 후 실질적으로 증가하지 않는, 조성물.

### 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항산화제는 예를 들어 0.2mM 내지 50mM, 예컨대 0.5mM 내지 5mM, 특히 0.5mM 또는 5mM의 농도에서의 메티오닌인, 조성물.

### 청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항산화제는 예를 들어 0.2mM 내지 50mM 범위(예컨대 그 사이), 예컨대 0.5mM 내지 5mM, 특히 0.5mM 또는 5mM인 농도에서의 티오황산나트륨인, 조성물.

### 청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 3개월 동안 저장 시 상기 IGF-1의 1% 미만이 단백질 복합체에서 산화된 종으로 존재하며, 예를 들어 3개월 동안 저장 시 상기 IGF-1의 0.6% 미만이 단백질 복합체에서 산화된 종으로 존재하는, 조성물.

### 청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 산화된 종의 양은 RP-UPLC 또는 SEC-HPLC에 의해 측정되는, 조성물.

**청구항 12**

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IGFBP-3은 5% 미만의 삼황화물 변이체, 예를 들어 2% 미만의 삼황화물 변이체, 예컨대 1% 미만의 삼황화물 변이체, 특히 0.5% 미만의 삼황화물 변이체를 포함하는, 조성물.

**청구항 13**

재조합 IGF-1을 포함하는 조성물을 제공하는 단계; 상기 조성물에 항산화제를 첨가하는 단계; 및 상기 조성물로부터 IGF-1을 정제하는 단계를 포함하는, 인슐린 유사 성장 인자 1(IGF-1) 단백질 복합체를 제조하는 방법.

**청구항 14**

제23항에 있어서, 상기 항산화제는 예를 들어 0.2mM 내지 10mM, 예컨대 0.5mM 내지 5mM, 특히 0.5mM 또는 5mM의 농도로 첨가되는 메티오닌인, 방법.

**청구항 15**

제13항 또는 제14항에 있어서, 상기 항산화제는 예를 들어 0.2mM 내지 10mM, 예컨대 0.5mM 내지 5mM, 특히 0.5mM 또는 5mM의 농도의 티오황산나트륨인, 방법.

**청구항 16**

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 정제된 IGF-1 조성물에서 산화된 IGF-1 종은 약 25℃의 온도에서 저장 시 3개월 후 50% 초과 증가하지 않으며, 예를 들어 약 25℃의 온도에서 저장 시 3개월 후 20% 초과 증가하지 않으며, 예컨대 10% 초과 증가하지 않으며, 특히 실질적으로 증가하지 않는, 방법.

**청구항 17**

제13항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 정제된 IGF-1 조성물에서 산화된 IGF-1 종은 2-8℃ 사이의 온도에서 저장시 3개월 후 20% 초과 증가하지 않으며, 예를 들어 2-8℃ 사이의 온도에서 저장시 3개월 후 10% 초과 증가하지 않으며, 예컨대 실질적으로 증가하지 않는, 방법.

**청구항 18**

제13항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 정제된 IGF-1 단백질은 0.6% 미만의 산화된 IGF-1 종을 갖는, 방법.

**청구항 19**

제13항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 IGF-1 단백질은 *대장균*에서 발현되는, 방법.

**청구항 20**

제13항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 IGF-1 단백질은 봉입체로부터 정제되는, 방법.

**청구항 21**

제23항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질 3(IGFBP-3)을 상기 IGF-1 단백질에 첨가하여 단백질 복합체를 형성하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

**청구항 22**

제42항에 있어서, 상기 단백질 복합체는 IGF-1 및 IGFBP-3을 1:1의 몰비로 포함하는, 방법.

**청구항 23**

제13항 내지 제22항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 인슐린 유사 성장 인자 1(IGF-1)과 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질(예컨대 IGFBP-3)을 포함하는, 단리된 단백질 복합체를 포함하는 조성물.

**청구항 24**

인슐린 유사 성장 인자 1(IGF-1)과 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질 3(IGFBP-3)을 예를 들어 1:1의 몰비로 포함하는 단리된 단백질 복합체를 포함하는 조성물로서, 상기 조성물은 증량제, 완충액 및 계면활성제를 포함하는, 조성물.

**청구항 25**

제24항에 있어서, 상기 증량제는 수크로스 또는 트레할로스, 특히 트레할로스인, 조성물.

**청구항 26**

제24항 또는 제25항에 있어서, 상기 완충액은 히스티딘 또는 포스페이트인, 조성물.

**청구항 27**

제24항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 완충액은 pH 5.5 - 6.5 사이인, 조성물.

## *발명의 설명*

### *기 술 분 야*

[0001] 본 개시내용은 저장, 예를 들어 2-8℃ 및/또는 25℃에서 하나 이상의 종의 산화가 최소화되는 메카세르민 린파베이트(rhIGF-1/rhIGFBP-3)의 안정한 제형, 상기 제형을 제조하는 방법, 및 치료, 특히 조산아와 같은 유아의 치료에서의 그의 용도에 관한 것이다.

### *배 경 기 술*

[0002] 메카세르민 린파베이트는 미숙아의 심실내 출혈, 기관지폐 이형성증 및/또는 만성 폐 질환을 포함한 미숙아의 질환 및 합병증을 치료하는 데 사용되는 재조합 인간 인슐린 유사 성장 인자-1(rhIGF-1)과 재조합 인간 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질-3(rhIGFBP-3)의 복합체이다.

[0003] 예를 들어, 약 3-6개월 이상 동안 저장하는 동안 2-8℃, 25℃ 또는 40℃에서 치료적 단백질 제품의 더 큰 안정성을 위해 특별하게 최적화된 제형에 대한 필요성이 있다.

[0004] 유아 및 특히 조산아를 치료하기 위해서는 매우 희석한 제형이 필요하다. 메카세르민 린파베이트는 전형적으로 지속적인 정맥내 주입을 통해 조산 유아에게 투여된다. 놀랍게도 본 발명자들은 농도의 희석 제형에서 복합체가 보다 빠르게 산화한다는 것을 확증하였다.

### *발명의 내용*

[0005] 본 발명은 부분적으로, 인슐린 유사 성장 인자-1(IGF-1) 및 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질-3(IGFBP-3)을 포함하는 단백질 복합체를 포함하는 제형의 산화를 감소시키기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 임의의 특정 이론에 얽매이기를 바라지 않고, 산화된 종을 감소시키는 방법(예를 들어 항산화제의 첨가, 동결건조 및/또는 일회용 백)이 더 큰 효력 및 증가된 안정성을 갖는 개선된 제형을 제공하는 것으로 고려된다.

[0006] 본 개시내용은 다음 번호가 매겨진 단락에 요약되어 있다:

[0007] 1. 인슐린 유사 성장 인자 1(IGF-1)과 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질(예컨대 IGFBP-3)을 예를 들어 1:1의 몰비로 포함하는 단리된 단백질 복합체를 포함하는 조성물로서, 여기서 조성물은 항산화제를 포함하고, 산화된 IGF-1 종은 약 25℃의 온도에서 저장시 3개월 후 50% 초과 증가하지 않는, 조성물.

[0008] 2. 산화된 IGF-1 종은 약 25℃의 온도에서 저장시 3개월 후 25% 초과 증가하지 않는, 단락 1의 조성물.

[0009] 3. 산화된 IGF-1 종은 약 25℃의 온도에서 저장시 3개월 후 10% 초과 증가하지 않는, 단락 1 또는 단락 2의 조성물.

[0010] 4. 산화된 IGF-1 종은 약 25℃의 온도에서 저장시 3개월 후 실질적으로 증가하지 않는, 단락 1의 조성물.

[0011] 5. 인슐린 유사 성장 인자 1(IGF-1)과 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질(예컨대 IGFBP-3)을 예를 들어 1:1의 몰비로 포함하는 단리된 단백질 복합체를 포함하는 조성물로서, 여기서 조성물은 항산화제를 포함하고, 산화된

IGF-1 종의 %는 2-8℃ 사이의 온도에서 저장시 3개월 후 20% 초과 증가하지 않는, 조성물.

[0012] 6. 산화된 IGF-1 종은 2-8℃ 사이의 온도에서 저장시 3개월 후 10% 초과 증가하지 않는, 단락 5의 조성물.

[0013] 7. 산화된 IGF-1 종은 2-8℃ 사이의 온도에서 저장시 3개월 후 실질적으로 증가하지 않는, 단락 6의 조성물.

[0014] 8. 항산화제가 메티오닌인, 이전 단락 중 어느 한 단락의 조성물.

[0015] 9. 조성물은 메티오닌을 0.2mM 내지 50mM의 농도로 포함하는, 이전 단락 중 어느 한 단락의 조성물.

[0016] 10. 조성물은 메티오닌을 0.5mM의 농도로 포함하는, 단락 9의 조성물.

[0017] 11. 조성물은 메티오닌을 5mM 농도로 포함하는, 단락 9의 조성물.

[0018] 12. 항산화제는 티오황산나트륨인, 단락 1 내지 단락 7 중 어느 한 단락의 조성물.

[0019] 13. 조성물은 티오황산나트륨을 0.2mM 내지 50mM의 농도로 포함하는, 이전 단락 중 어느 한 단락의 조성물.

[0020] 14. 조성물은 티오황산나트륨을 0.5mM의 농도로 포함하는, 단락 13의 조성물.

[0021] 15. 조성물은 티오황산나트륨을 5mM의 농도로 포함하는, 단락 13의 조성물.

[0022] 16. 3개월 동안 저장시 IGF-1의 1% 미만이 단백질 복합체에 산화된 종으로 존재하는, 이전 단락 중 어느 한 단락의 조성물.

[0023] 17. 3개월 동안 저장 시 IGF-1의 0.6% 미만이 단백질 복합체에 산화된 종으로 존재하는, 이전 단락 중 어느 한 단락의 조성물.

[0024] 18. 산화된 종의 양은 RP-UPLC 또는 SEC-HPLC에 의해 결정되는, 이전 단락 중 어느 한 단락의 조성물.

[0025] 19. IGFBP-3은 5% 미만의 삼황화물 변이체를 포함하는, 이전 단락 중 어느 한 단락의 조성물.

[0026] 20. IGFBP-3은 2% 미만의 삼황화물 변이체를 포함하는, 단락 19의 조성물.

[0027] 21. IGFBP-3은 1% 미만의 삼황화물 변이체를 포함하는, 단락 19의 조성물.

[0028] 22. IGFBP-3은 0.5% 미만의 삼황화물 변이체를 포함하는, 단락 19의 조성물.

[0029] 23. 재조합 IGF-1을 포함하는 조성물을 제공하는 단계; 조성물에 항산화제를 첨가하는 단계 및 조성물로부터 IGF-1을 정제하는 단계를 포함하는 인슐린 유사 성장 인자 1(IGF-1) 단백질 복합체를 제조하는 방법.

[0030] 24. 항산화제는 메티오닌인, 단락 23의 방법.

[0031] 25. 메티오닌은 0.2mM 내지 10mM의 농도로 첨가되는, 단락 23의 방법.

[0032] 26. 메티오닌은 0.5mM의 농도로 첨가되는, 단락 23의 방법.

[0033] 27. 메티오닌은 5mM의 농도로 첨가되는, 단락 23의 방법.

[0034] 28. 항산화제는 티오황산나트륨인, 단락 23의 방법.

[0035] 29. 티오황산나트륨은 0.2mM 내지 10mM의 농도로 첨가되는, 단락 28의 방법.

[0036] 30. 티오황산나트륨은 0.5mM의 농도로 첨가되는, 단락 28의 방법.

[0037] 31. 티오황산나트륨은 5mM의 농도로 첨가되는, 단락 28의 방법.

[0038] 32. 정제된 IGF-1 조성물에서 산화된 IGF-1 종은 약 25℃의 온도에서 저장시 3개월 후 50% 초과로 증가하지 않는, 단락 23 내지 단락 31 중 어느 한 단락의 방법.

[0039] 33. 정제된 IGF-1 조성물에서 산화된 IGF-1 종은 약 25℃의 온도에서 저장시 3개월 후 20% 초과로 증가하지 않는, 단락 23 내지 단락 31 중 어느 한 단락의 방법.

[0040] 34. 정제된 IGF-1 조성물에서 산화된 IGF-1 종은 약 25℃의 온도에서 저장시 3개월 후 10% 초과로 증가하지 않는, 단락 23 내지 단락 31 중 어느 한 단락의 방법.

[0041] 35. 정제된 IGF-1 조성물에서 산화된 IGF-1 종은 약 25℃의 온도에서 저장시 3개월 후 실질적으로 증가하지 않는, 단락 23 내지 단락 31 중 어느 한 단락의 방법.

[0042] 36. 정제된 IGF-1 조성물에서 산화된 IGF-1 종은 3개월 후 약 2-8℃ 사이의 온도에서 저장시 20% 초과로 증가하지 않는, 단락 23 내지 단락 31 중 어느 한 단락의 방법.

[0043] 37. 정제된 IGF-1 조성물에서 산화된 IGF-1 종의 양은 3개월 후 약 2-8℃ 사이의 온도에서 저장시 10% 초과로 증가하지 않는, 단락 23 내지 단락 31 중 어느 한 단락의 방법.

[0044] 38. 정제된 IGF-1 조성물에서 산화된 IGF-1 종의 양은 3개월 후 약 2-8℃ 사이의 온도에서 저장시 실질적으로 증가하지 않는, 단락 23 내지 단락 31 중 어느 한 단락의 방법.

[0045] 39. 정제된 IGF-1 단백질은 0.6% 미만의 산화된 IGF-1 종을 갖는, 단락 23 내지 단락 31 중 어느 한 단락의 방법.

[0046] 40. 재조합 IGF-1 단백질은 *대장균*에서 발현되는, 단락 23 내지 단락 39 중 어느 한 단락의 방법.

[0047] 41. 재조합 IGF-1 단백질은 봉입체로부터 정제되는, 단락 23 내지 단락 40 중 어느 한 단락의 방법.

[0048] 42. 방법은 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질 3(IGFBP-3)을 IGF-1 단백질에 첨가하여 단백질 복합체를 형성하는 것을 추가로 포함하는, 단락 23 내지 단락 41 중 어느 한 단락의 방법.

[0049] 43. 단백질 복합체는 IGF-1 및 IGFBP-3을 1:1의 몰비로 포함하는, 단락 42의 방법.

[0050] 44. 단락 23 내지 단락 43 중 어느 한 단락의 방법에 따라 제조된 인슐린 유사 성장 인자 1(IGF-1)과 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질 3(IGFBP-3)을 포함하는 단리된 단백질 복합체를 포함하는 조성물.

[0051] 45. 인슐린 유사 성장 인자 1(IGF-1)과 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질 3(IGFBP-3)을, 예를 들어 1:1의 몰비로 포함하는 단리된 단백질 복합체를 포함하는 조성물로서, 여기서 조성물은 증량제, 완충액, 계면활성제를 포함하는, 조성물.

[0052] 46. 증량제는 수크로스 또는 트레할로스인, 단락 45의 조성물.

[0053] 47. 증량제는 트레할로스인, 단락 46의 조성물.

[0054] 48. 완충액은 히스티딘 또는 포스페이트인, 단락 45의 조성물.

[0055] 49. 완충액은 pH 5.5 - 6.5 사이인, 단락 48의 조성물.

[0056] 개선된 안정성은 약 25℃(예를 들어 약 23℃ 내지 약 27℃)에서 저장 동안, 또는 약 40℃(예를 들어 약 38℃ 내지 약 42℃)에서 저장 동안 예를 들어, 약 3-6개월 동안 저장 동안 달성된다.

[0057] 한 구체예에서, 항산화제(예를 들어 메티오닌 및/또는 티오황산나트륨)를 포함하는 개선된 IGF-1/IGFBP-3 제형이 본원에 제공된다.

[0058] 다른 구체예에서, 제형에서 산화된 종은 동결건조에 의해 감소되었다.

[0059] 다른 구체예에서, 농축된 단백질은 사용 전 희석을 위해 바이알에 제형화된다.

[0060] 한 구체예에서 개시내용은 항산화제(예를 들어 메티오닌 및/또는 티오황산나트륨)를 포함하는 동결건조된 제형을 제공한다.

[0061] 한 구체예에서 개시내용은 항산화제(예를 들어 메티오닌 및/또는 티오황산나트륨)를 포함하는 고농도 제형을 제공한다.

[0062] 다른 구체예에서, 산화된 종의 감소된 축적 및 개선된 안정성은 복합체를 제형 용액; 항산화제(예를 들어 메티오닌 및/또는 티오황산나트륨)를 포함하는 제형 및/또는 고농도 제형을 포함하는 것과 혼합하는 동안 일회용 백과 같은 스테인레스 강 이외의 접촉 표면의 사용을 통해 달성했다.

[0063] 요약하면, 본 발명은 무엇보다도 저장 동안 개선된 안정성의 이점을 갖는 개선된 IGF-1/IGFBP-3 제형을 제공하며, 이는 미숙아의 질환을 치료함에 있어 신생아에 대한 투여를 위한 안전하고 효과적인 제품을 제공한다.

[0064] 한 양태에서, 인슐린 유사 성장 인자 1(IGF-1)과 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질 3(IGFBP-3)을, 예를 들어 1:1의 몰비로 포함하는 단리된 단백질 복합체를 포함하는 조성물이 본원에 제공되며, 여기서 조성물은 항산화제를 포함하고, 산화된 IGF-1 종의 양은 3개월 후 약 25℃의 온도에서 저장 시 50% 초과 증가하지 않으며, 예를 들어 45% 초과 증가하지 않으며; 예컨대 40% 초과 증가하지 않고, 특히 35% 초과 증가하지 않고; 더 구체적으로

30% 초과 증가하지 않는다. 일부 구체예에서, 3개월 후 약 25℃의 온도에서 저장 시, 산화된 IGF-1 종의 양은 25%; 20%; 15%; 10%; 5%; 4%; 3%; 2%; 또는 1%* 초과 증가하지 않는다.

[0065] **각각의 이들 값은 우선권 출원에 제시된 바와 같은 개별 개시내용을 나타내고 청구범위에 대한 보정을 위한 기초로 별도로 사용될 수 있다.*

[0066] 일부 구체예에서, 산화된 IGF-1 종의 양은 약 25℃의 온도에서 저장시 3개월 후 실질적으로 증가하지 않는다.

[0067] 본 개시내용의 제형에 이용될 수 있는 IGF-1:IGFBP-3의 몰비는 1.5-0.5 IGF-1:1 IGFBP-3을 포함한다.

[0068] 한 양태에서, 인슐린 유사 성장 인자 1(IGF-1)과 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질 3(IGFBP-3)을 1:1의 몰비로 포함하는 단리된 단백질 복합체를 포함하는 조성물이 본원에 제공되며, 여기서 산화된 IGF-1 종의 양은 2-8℃ 사이의 온도에서 저장시 3개월 후 20% 초과 증가하지 않는다.

[0069] 일부 구체예에서, 2-8℃ 사이의 온도에서 저장시 3개월 후 산화된 IGF-1 종의 양은 15% 초과 증가하지 않으며, 예를 들어 10% 초과 증가하지 않고, 예컨대 5% 초과 증가하지 않고, 특히 4% 초과 증가하지 않고, 보다 구체적으로 3% 초과 증가하지 않는다. 일부 구체예에서, 산화된 IGF-1 종의 양은 2-8℃ 사이의 온도에서 저장시 3개월 후 2% 초과 증가하지 않는다. 일부 구체예에서, 산화된 IGF-1 종의 양은 2-8℃ 사이의 온도에서 저장시 3개월 후 1% 초과 증가하지 않는다. 일부 구체예에서, 산화된 IGF-1 종의 양은 2-8℃ 사이의 온도에서 저장시 3개월 후 실질적으로 증가하지 않는다.

[0070] 한 구체예에서, 항산화제가 메티오닌인, 본 개시내용에 따른 조성물 또는 방법이 본원에 제공된다.

[0071] 한 구체예에서, (예를 들어 다음 사이) 0.2mM 내지 15mM 예컨대 0.2mM 내지 10mM 범위인 농도로 메티오닌(메티오닌과 같은 항산화제를 첨가하는 것을 포함함)을 포함하는 본 개시내용에 따른 조성물 또는 방법이 본원에 제공된다. 한 구체예에서, 0.2mM; 0.3mM; 0.4mM; 0.5mM; 0.6mM; 0.7mM; 0.8mM; 0.9mM; 1mM; 2mM; 3mM; 4mm; 5mM; 6mM; 7mM; 8mM; 또는 9mM*의 농도로 메티오닌을 포함하는 조성물이 본원에 제공된다. 한 구체예에서, 10mM의 농도로 메티오닌(메티오닌과 같은 항산화제를 첨가하는 것을 포함함)을 포함하는 본 개시내용에 따른 조성물 또는 방법이 본원에 제공된다.

[0072] 한 구체예에서, 항산화제가 티오황산나트륨인, 본 개시내용에 따른 조성물 또는 방법이 본원에 제공된다.

[0073] 한 구체예에서, 본 개시내용에 따른 조성물 또는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 조성물은 (예를 들어 다음 사이) 0.2mM 내지 15mM 범위 예컨대 0.2mM 내지 10mM 범위인 농도로 티오황산나트륨(이를 첨가하는 것을 포함함)을 포함한다.

[0074] 한 구체예에서, 조성물이 본원에 제공되며, 여기서 본 개시내용에 따른 조성물 또는 방법은 0.2mM; 0.3mM; 0.4mM; 0.5mM; 0.6mM; 0.7mM; 0.8mM; 0.9mM; 1mM; 2mM; 3mM; 4mM; 5mM; 6mM; 7mM; 8mM; 또는 9mM*의 농도로 티오황산나트륨을 포함한다. 한 구체예에서, 조성물이 본원에 제공되며, 여기서 조성물은 10mM의 농도로 티오황산나트륨을 포함한다.

[0075] 한 구체예에서, 조성물이 본원에 제공되며, 여기서 3개월 동안 저장 시 단백질 복합체에서 산화된 종으로 5% 미만의 IGF-1이 존재하며, 예를 들어 4% 미만, 예컨대 특히 3% 미만, 2% 미만, 특히 1% 미만이 존재한다.

[0076] 한 구체예에서, 조성물이 본원에 제공되며, 여기서 3개월 동안 저장 시 단백질 복합체에서 산화된 종으로 0.9% 미만의 IGF-1이 존재하며, 예를 들어 0.8% 미만의 IGF-1이 산화된 종으로 존재하며, 예컨대 0.7% 미만의 IGF-1이 산화된 종으로 존재하고, 특히 0.6% 미만의 IGF-1이 3개월 동안 저장 시 단백질 복합체에서 산화된 종으로 존재하며, 보다 구체적으로 0.5% 미만의 IGF-1이 산화된 종으로 존재한다. 한 구체예에서, 조성물이 본원에 제공되며, 여기서 0.4% 미만의 IGF-1이 3개월 동안 저장 시 단백질 복합체에서 산화된 종으로 존재한다. 한 구체예에서, 조성물이 본원에 제공되며, 여기서 0.3% 미만의 IGF-1이 3개월 동안 저장 시 단백질 복합체에서 산화된 종으로 존재한다. 한 구체예에서, 조성물이 본원에 제공되며, 여기서 0.2% 미만의 IGF-1이 3개월 동안 저장 시 단백질 복합체에서 산화된 종으로 존재한다. 한 구체예에서, 조성물이 본원에 제공되며, 여기서 0.1% 미만의 IGF-1이 3개월 동안 저장 시 단백질 복합체에서 산화된 종으로 존재한다.

[0077] 한 구체예에서, 산화된 종의 양이 역상-초고성능 액체 크로마토그래피(RP-UPLC)에 의해 측정되는 조성물이 본원에 제공된다.

[0078] 한 구체예에서, 산화된 종의 양이 크기 배제 크로마토그래피-HPLC 분리 모드(SEC-HPLC)에 의해 결정되는 조성물이 본원에 제공된다.

[0079] 한 구체예에서, IGFBP-3가 5% 미만의 삼황화물 변이체, 예를 들어 4% 미만의 삼황화물 변이체, 예컨대 3% 미만의 삼황화물 변이체, 특히 2% 미만의 삼황화물 변이체, 보다 구체적으로는 1% 미만의 삼황화물 변이체를 포함하는 조성물이 본원에서 제공된다.

[0080] 한 양태에서, 재조합 IGF-1을 포함하는 조성물을 제공하는 단계, 조성물에 항산화제를 첨가하는 단계 및 조성물로부터 IGF-1을 정제하는 단계를 포함하는 인슐린 유사 성장 인자 1(IGF-1) 단백질 복합체를 제조하는 방법이 본원에 제공된다.

[0081] 한 구체예에서, 항산화제를 첨가하는 것을 포함하는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 항산화제는 메티오닌이다.

[0082] 한 구체예에서, 항산화제를 첨가하는 것을 포함하는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 항산화제는 티오황산나트륨이다.

[0083] 한 구체예에서, 정제된 IGF-1 조성물에서 산화된 IGF-1 종의 양이 약 25℃의 온도에서 저장시 3개월 후 50% 초과 증가하지 않는, 예를 들어 45% 초과 증가하지 않는, 예컨대 40% 초과 증가하지 않는, 특히 35% 초과 증가하지 않는, 보다 구체적으로 30% 초과 증가하지 않는 방법이 본원에 제공된다.

[0084] 한 구체예에서, 정제된 IGF-1 조성물에서 산화된 IGF-1 종의 양이 약 25℃의 온도에서 저장시 3개월 후 25%; 20%; 15%; 10%; 5%; 3%; 2%* 초과 증가하지 않는 방법이 본원에 제공된다. 한 구체예에서, 정제된 IGF-1 조성물에서 산화된 IGF-1 종의 양이 약 25℃의 온도에서 저장시 3개월 후 1% 초과 증가하지 않는 방법이 본원에 제공된다. 한 구체예에서, 정제된 IGF-1 조성물에서 산화된 IGF-1 종의 양이 약 25℃의 온도에서 저장시 3개월 후 실질적으로 증가하지 않는 방법이 본원에 제공된다.

[0085] 일부 구체예에서, 정제된 IGF-1 조성물에서 산화된 IGF-1 종의 양이 2-8℃ 사이의 온도에서 저장시 3개월 후 20%; 15%; 10%; 5%; 4%; 3%; 2%* 초과 증가하지 않는 방법이 본원에 제공된다. 일부 구체예에서, 산화된 IGF-1 종의 양은 2-8℃ 사이의 온도에서 저장시 3개월 후 1% 초과 증가하지 않는다. 일부 구체예에서, 산화된 IGF-1 종의 양은 2-8℃ 사이의 온도에서 저장시 3개월 후 실질적으로 증가하지 않는다.

[0086] 일부 구체예에서, 정제된 IGF-1 단백질이 5%; 4%; 3%; 2%; 1%; 0.9%; 0.8%; 0.7%; 0.6%; 0.5%; 0.4%; 0.3%; 0.2%* 미만의 산화된 IGF-1 종을 갖는 방법이 본원에 제공된다. 일부 구체예에서, 정제된 IGF-1 단백질이 0.1% 미만의 산화된 IGF-1 종을 갖는 방법이 본원에 제공된다.

[0087] 일부 구체예에서, 재조합 IGF-1 단백질이 *대장균*에서 발현되는 방법이 본원에 제공된다. 일부 구체예에서, 재조합 IGF-1 단백질이 봉입체로부터 정제되는 방법이 본원에 제공된다.

[0088] 일부 구체예에서, 방법은 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질(예컨대 IGFBP-3)을 IGF-1 단백질에 첨가하여 단백질 복합체를 형성하는 것을 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 단백질 복합체는 IGF-1 및 IGFBP-3을 0.75 내지 1.25:1 또는 1:0.75-1.25, 예컨대 등몰량으로 포함한다. 일부 구체예에서, 단백질 복합체는 IGF-1과 IGFBP-3을 0.75 대 1.25 몰비로 포함한다. 일부 구체예에서, 단백질 복합체는 IGF-1과 IGFBP-3을 1:1 몰비로 포함한다. 일부 구체예에서, 단백질 복합체는 IGF-1과 IGFBP-3을 1.25-0.75 몰비로 포함한다.

[0089] 일부 구체예에서, 조성물은 방법에 의해 제조된 인슐린 유사 성장 인자 1(IGF-1) 및 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질 3(IGFBP-3)을 포함하는 단리된 단백질 복합체를 포함한다.

[0090] 일 구체예에서, 본 개시내용의 조성물은 예를 들어 폴리소르베이트(예컨대 폴리소르베이트 80 또는 20) 또는 Triton-X로부터 선택되는 계면활성제를 특히 0.01% 이하, 예컨대 0.008%, 0.0075%, 0.007%, 0.006%, 0.005%, 0.004%, 0.003% 또는 0으로 포함한다.

[0091] 한 구체예에서 제형/조성물의 %는 w/w, 또는 w/v 또는 v/v이다.

[0092] 일부 양태에서, 재조합 인슐린 유사 성장 인자 1(rIGF-1) 및 재조합 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질 3(rIGFBP-3)을 등몰량으로 포함하는 단백질 복합체, 80 또는 20과 같은 폴리소르베이트 계면활성제, 특히 약 0.005%의 농도와 같이 0.0025 내지 0.0075 범위인 농도로 폴리소르베이트 20, 및 아세트산나트륨, 아세트산 및/또는 염화나트륨을 포함하는 완충액을 포함하는 개시내용의 임의의 양태에 따른 조성물이 본원에 제공되며, 여기서 조성물의 pH는 약 5.3-5.8이고, 여기서 rIGF-1/IGFBP-3은 45 내지 55 마이크로그램/mL, 약 50 마이크로그램/mL의 농도로 되고, 여기서 0.6% 미만의 IGF-1이 산화된 종으로 존재하며, 예를 들어 여기서 조성물은 특히 본원의 다른 곳에 기술된 바와 같이 메티오닌 및/또는 티오황산나트륨과 같은 항산화제를 포함한다.

[0093] 한 구체예에서, 특히 증량제를 포함하는, 본원에 기술된 임의의 개시내용/구체예에 따른 조성물의 동결건조된

형태가 제공된다.

[0094] 한 양태에서, 인슐린 유사 성장 인자 1(IGF-1)과 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질(예컨대 IGFBP-3)을 1:1의 몰비로 포함하는 단리된 단백질 복합체, 증량제, 완충액 및 계면활성제를 포함하는 동결건조된 제형이 본원에서 제공된다.

[0095] 한 구체예에서, 증량제는 수크로스 또는 트레할로스이다. 한 구체예에서, 증량제는 수크로스이다. 한 작용제에서 증량제는 트레할로스이다.

[0096] 한 구체예에서, 완충액는 히스티딘 또는 포스페이트이다. 한 구체예에서, 완충액는 히스티딘이다. 한 구체예에서, 완충액는 포스페이트이다. 한 구체예에서, 완충액은 pH 5.5 - 6.5 사이이다.

[0097] 한 구체예에서 본 개시내용에 따른 제형은 예를 들어 필수 아미노산으로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 아미노산을 포함한다.

[0098] 한 구체예에서 치료에 있어서 개시내용에 따른 조성물의 용도를 제공한다.

[0099] 한 구체예에서, 치료, 특히 유아, 예컨대 조산아, 저임신 체중 유아 및/또는 임신중독증에 이은 유아의 치료를 위한, 특히 BPD, ROP 및/또는 IVH의 치료 또는 예방을 위한 약제의 제조에서 본 개시내용에 따른 조성물의 용도가 제공된다.

[0100] 발명은 그의 바람직한 특정 구체예와 관련하여 기술되었지만, 전술한 설명뿐만 아니라 다음의 실시예는 예시하기 위한 것이고 발명의 범주를 제한하려는 것이 아니라는 것이 이해되어야 한다. 발명의 범주 내의 다른 양태, 이점 및 변형은 발명이 속하는 기술 분야의 숙련자에게 명백할 것이다.

[0101] 한 구체예에서, 본 개시내용의 조성물은 액체이다.

[0102] 한 구체예에서, 본 개시내용의 조성물은 2-8℃에서 저장된다.

[0103] 한 구체예는 예를 들어 수성 용액(주사용수, 식염수 또는 글루코스, 등장액 포함)으로 본 개시내용에 따른 동결건조된 제형의 재구성을 포함한다.

[0104] 한 구체예에서 본 개시내용에 따른 제형은 환자에 대한 투여 전에 등장성인데, 이는 예를 들어 이것이 수성 용액(예컨대 등장성 용액)으로 재구성되었기 때문이거나 최종 약품이 등장성이기 때문이다.

[0105] 한 구체예에서, 본 개시내용에 따른 조성물은 벤잘코늄 클로라이드를 포함하지 않는다. 이 부형제는 조산아에게는 금기이다. 한 구체예에서, 본 개시내용의 제형은 보존제를 포함하지 않는다.

[0106] 한 구체예에서, 본 개시내용에 따른 제형/조성물은 유아, 예를 들어 조산아에게 독성인 임의의 성분을 포함하지 않는다.

[0107] 한 구체예에서 안정성은 화학적 안정성, 즉 화학적 분해의 안정화를 지칭한다.

[0108] 한 구체예에서 안정성은 물리적 안정성을 지칭하며, 예를 들어 종종 물리적 안정성은 응집, 흡착 및/또는 용해도에서의 변화(특히 증가된 불용성)를 초래한다.

[0109] 한 구체예에서 본 개시내용의 조성물은 제조 및/또는 투여 동안 단백질(즉, IGF-1 및/또는 IGFBP 예컨대 IGFBP-3)의 흡착 및/또는 손실을 최소화한다.

[0110] 구체예에서 안정성은 열적 안정성, 예를 들어 증가 및/또는 감소된 온도를 견디는 능력을 지칭하며, 예컨대 본 개시내용의 제형은 적어도 24시간 동안 실온(예컨대 약 25 내지 27℃)를 견딜 수 있으며, 특히 투여, 특별하게 연속 투여에 적절한 안정성을 제공한다.

[0111] 한 구체예에서 본 개시내용에 따른 조성물은 습기로 인한 분해 또는 변화에 대해 저항성이다.

[0112] 한 구체예에서 본 개시내용에 따른 조성물은 단위 용량, 예를 들어 24시간 기간 동안의 용량, 특히 조산아에 대한 용량으로 제공된다.

[0113] 한 구체예에서 단일-사용백에서의 본 개시내용의 조성물, 예를 들어 액체 제형이 제공되며, 특히 제형은 투여에 적합하고/준비되어 있다. 이는 산화를 촉매할 수 있는 표면과 제형의 접촉을 최소화하고 또한 오염을 최소화하여 환자에게 감염되기 때문에 유리하다.

[0114] 한 구체예에서, 바이알, 특히 유리 바이알에 제공된 본 개시내용에 따른 농축된 액체 제형이 제공된다.

[0115] 한 구체예에서 바이알, 예를 들어 유리 바이알에서의 본 개시내용에 따른 동결건조된 제형이 제공된다.

[0116] 한 구체예에서 본 개시내용에 따른 제형으로 충진된 바이알 또는 용기(백 포함)의 내용물은 질소와 같은 불활성 기체 하에 있다.

[0117] 한 구체예에서 탈아미노화 분해 경로는 본 개시내용에 따른 단백질 복합체 제형에서 최소화된다.

[0118] 한 구체예에서 본 개시내용의 제형은 적절한 조건 하에 저장될 때 적어도 3개월, 6개월, 9개월, 12개월, 18개월 또는 24개월의 저장 수명을 갖는다.

[0119] 한 구체예에서 본 개시내용의 제형은 여과에 의해 멸균되며, 예를 들어 여기서 단백질 복합체의 손실은 본 개시내용의 제형에 의한 여과 동안 최소화된다.

[0120] 한 구체예에서 약품은 수분 침투 및/또는 광에 대한 노출을 최소화하기 위해 외부 호일 포장 성분을 갖는다.

[0121] 한 구체예에서 본 개시내용에 따라 (액체 제형과 같이) 제형화되고/되거나 제조된 단백질 복합체는 스트레스 시험, 예를 들어 물리적 스트레스 시험 예컨대 교반 시험, 전단 시험, 응집 분석, 액체 공기 계면 분석, 용해 시험 또는 이와 유사한 것에서 잘 성능을 발휘한다.

[0122] 한 구체예에서 본원에 개시된 방법으로부터 얻을 수 있는 제형 및/또는 약품이 제공된다.

[0123] **상세한 설명**

[0124] 본 발명은 무엇보다도 인슐린 유사 성장 인자-1(IGF-1) 및 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질(예컨대 IGFBP-3)을 포함하는 단백질 복합체를 포함하는 제형의 산화를 감소시키기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 산화된 종을 감소시키는 방법(예를 들어 항산화제의 첨가, 동결건조, 일회용 백)은 더 큰 효력과 증가된 안정성을 갖는 개선된 제형을 제공한다. 개선된 안정성은 약 25℃(예를 들어 약 23℃ 내지 약 27℃)에서 저장하는 동안, 또는 약 40℃(예를 들어 약 38℃ 내지 약 42℃)에서 저장하는 동안, 예를 들어 약 3-6개월 동안 저장하는 동안 달성된다. 일부 구체예에서, 본 발명은 항산화제(예를 들어 메티오닌 또는 티오황산나트륨)를 포함하는 개선된 IGF-1/IGFBP-3 제형을 제공한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 산화된 종이 감소된 동결건조된 제형을 제공한다. 다른 구체예에서, 사용 전 희석을 위해 고농도의 단백질이 바이알에 제형화되었다.

[0125] 다른 구체예에서, 산화된 종의 감소된 축적 및 개선된 안정성은 복합체를 제형 용액과 배합하는 동안 일회용 백과 같은, 스테인레스강 이외의 접촉 표면의 사용을 통해 달성했다. 요약하면, 본 발명은 무엇보다도 저장 동안 개선된 안정성의 이점을 갖는 IGF-1/IGFBP-3의 개선된 제형을 제공하며, 이는 미숙아의 질환 치료 시 신생아에게 투여를 위한 안전하고 효과적인 제품을 제공한다.

[0126] 일부 양태에서, 인슐린 유사 성장 인자 1(IGF-1)과 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질 3(IGFBP-3)을 1:1의 몰비로 포함하는 단리된 단백질 복합체를 포함하는 조성물이 본원에 제공되며, 여기서 조성물은 항산화제를 포함하고, 여기서 산화된 IGF-1 종의 양은 약 25℃의 온도에서 저장시 3개월 후 50% 초과 증가하지 않는다.

[0127] 한 양태에서, 인슐린 유사 성장 인자 1(IGF-1)과 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질 3(IGFBP-3)을 1:1의 몰비로 포함하는 단리된 단백질 복합체를 포함하는 조성물이 본원에 제공되며, 여기서 산화된 IGF-1 종의 양은 2-8℃ 사이의 온도에서 저장시 3개월 후 20% 초과 증가하지 않는다.

[0128] 본 발명은 일부 구체예에서, 항산화제가 메티오닌이고, 예를 들어 0.2mM 내지 10mM의 농도로 메티오닌을 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 구체예에서, 항산화제가 예를 들어 0.2mM 내지 10mM 농도의 티오황산나트륨인 조성물이 본원에 제공된다. 일부 구체예에서, 3개월 동안 저장 시 5% 미만의 IGF-1이 단백질 복합체에서 산화된 종으로 존재하는 조성물이 본원에 제공된다. 산화된 종의 양은 역상-초고성능 액체 크로마토그래피(RP-UPLC) 또는 크기 배제 크로마토그래피-HPLC 분리 모드(SEC-HPLC)에 의해 결정된다. 일부 구체예에서, IGFBP-3이 5% 미만의 삼황화물 변이체를 포함하는 조성물이 본원에 제공된다.

[0129] 한 양태에서, 재조합 IGF-1을 포함하는 조성물을 제공하는 단계, 조성물에 항산화제를 첨가하는 단계 및 조성물로부터 IGF-1을 정제하는 단계를 포함하는 인슐린 유사 성장 인자 1(IGF-1) 단백질 복합체를 제조하는 방법이 본원에 제공된다.

[0130] 본원에서는 항산화제를 첨가하는 것을 포함하는 IGF-1/IGFBP-3 복합체를 제조하는 방법이 제공되며, 여기서 항산화제는 메티오닌이고, 항산화제는 0.2mM 내지 10mM의 농도로 첨가된 메티오닌이다. 한 구체예에서, 항산화제를 첨가하는 것을 포함하는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 항산화제는 티오황산나트륨이고, 항산화제는 0.2mM

내지 10mM의 농도로 첨가된 티오황산나트륨이다.

[0131] 본 발명은 일부 구체예에서 정제된 IGF-1 조성물에서 산화된 IGF-1 종의 양이 약 25℃의 온도에서 저장시 3개월 후 50% 초과 증가하지 않는 방법을 제공한다. 일부 구체예에서, 정제된 IGF-1 조성물에서 산화된 IGF-1 종의 양이 2-8℃ 사이의 온도에서 저장시 3개월 후 20% 초과 증가하지 않는 방법이 본원에 제공된다. 일부 구체예에서, 정제된 IGF-1 단백질이 5% 미만의 산화된 IGF-1 종을 갖는 방법이 본원에 제공된다. 일부 구체예에서, 재조합 IGF-1 단백질이 *대장균*에서 발현되는 방법이 본원에 제공된다. 일부 구체예에서, 재조합 IGF-1 단백질이 봉입체로부터 정제되는 방법이 본원에 제공된다.

[0132] 일부 구체예에서, 방법은 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질 3(IGFBP-3)을 IGF-1 단백질에 첨가하여 단백질 복합체를 형성하는 것을 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 단백질 복합체는 IGF-1 및 IGFBP-3을 0.75 내지 1.25:1 또는 1:0.75-1.25의 범위, 예컨대 등몰량으로 포함한다. 일부 구체예에서, 단백질 복합체는 IGF-1과 IGFBP-3을 0.75 대 1.25 몰비로 포함한다. 일부 구체예에서, 단백질 복합체는 IGF-1과 IGFBP-3을 1:1 몰비로 포함한다. 일부 구체예에서, 단백질 복합체는 IGF-1과 IGFBP-3을 1.25-0.75 몰비로 포함한다. 한 양태에서, 재조합 IGF-1, 재조합 IGFBP-3을 포함하는 조성물을 제공하는 단계, 항산화제를 조성물에 첨가하는 단계, 및 IGF-1/IGFBP-3을 정제하는 단계를 포함하는 인슐린 유사 성장 인자 1(IGF-1)/IGFBP-3 단백질 복합체를 제조하기 위한 방법이 본원에 제공된다.

[0133] 일부 구체예에서, 조성물은 방법에 의해 제조된 인슐린 유사 성장 인자 1(IGF-1) 및 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질 3(IGFBP-3)을 포함하는 단리된 단백질 복합체를 포함한다. 일부 양태에서,

[0134] 재조합 인슐린 유사 성장 인자 1(rIGF-1) 및 재조합 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질 3(rIGFBP-3)을 등몰량으로 포함하는 단백질 복합체, 약 0.005%의 농도에서의 폴리소르베이트 20 계면활성제, 및 아세트산나트륨, 아세트산 및/또는 염화나트륨을 포함하는 완충액을 포함하는 조성물이 본원에서 제공되며, 여기서 조성물의 pH는 약 5.3-5.8이고, rIGF-1/IGFBP-3의 농도는 약 50 마이크로그램/mL이고 0.6% 미만의 IGF-1이 산화된 종으로 존재한다.

[0135] 한 양태에서, 인슐린 유사 성장 인자 1(IGF-1)과 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질 3(IGFBP-3)을 1:1의 몰비로 포함하는 단리된 단백질 복합체, 증량제, 완충액 및 계면활성제를 포함하는 동결건조된 제형이 본원에서 제공된다.

[0136] 한 구체예에서, 증량제는 수크로스 또는 트레할로스이다. 한 구체예에서, 증량제는 수크로스이다. 한 작용제에서, 증량제는 트레할로스이다.

[0137] 한 구체예에서, 완충액는 히스티딘 또는 포스페이트이다. 한 구체예에서, 완충액는 히스티딘이다. 한 구체예에서, 완충액는 포스페이트이다. 한 구체예에서, 완충액은 pH 5.5 - 6.5 사이이다.

[0138] 발명의 다양한 양태는 다음 섹션에서 자세히 설명된다. 섹션의 사용은 발명을 제한하는 것을 의미하지 않는다. 각 섹션은 발명의 임의의 양태에 적용될 수 있다. 본 출원에서 "또는"의 사용은 달리 명시되지 않는 한 "및/또는"을 의미한다.

[0139] ***정의***

[0140] "조산" 또는 "조산아" 또는 "미숙아" 또는 "미숙 유아" 또는 "미숙 아기" 또는 문법적 동일어는 임신 37주 이전에 출생하거나 체중이 유아의 임신 연령에 대한 평균보다 10% 적은 유아를 지칭한다. 예를 들어, 22-37주 사이에 태어난 유아는 조산으로 간주된다.

[0141] 한 구체예에서, 본원에 이용된 조산 유아(또는 신생아)는 예를 들어 37주 이하의 임신 연령, 예컨대 22 내지 37주(임신 연령), 대안적으로 23 내지 34주 또는 24 내지 29주, 특히 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35 또는 36주 전에 태어난 유아를 지칭한다, 일반적으로, 환자, 예를 들어 조산아와 같은 유아는 인간이다.

[0142] 체중이 가장 낮은(반드시 가장 조산일 필요는 없음) 유아가 본 개시내용의 요법으로부터 가장 큰 이익을 얻을 수 있다.

[0143] 저임신 체중은 임신 연령에 대해 체중이 가장 낮은 4분위수에서의 유아를 지칭한다.

[0144] 임신중독증 이후에 태어난 유아는 단어로부터 그 자체로 자명하다.

[0145] "GA" 또는 "임신 연령"은 여성의 마지막 월경 주기의 첫날부터 현재 날짜까지 주 단위로 측정하여 임신이 얼마

나 진행되었는지 기술하는 일반적인 용어이다.

[0146] 일부 구체예에서, 미숙 유아는 적어도 1주, 2주, 3주, 4주, 1개월, 2개월 또는 3개월까지 조산으로 태어난 유아를 지칭한다. 일부 구체예에서, 미숙 유아는 임신 연령(GA) 32주 미만에 태어난 유아를 지칭한다. 일부 구체예에서, 미숙 유아는 임신 연령(GA) 28주 미만에 태어난 유아를 지칭한다. "PMA" 또는 "월경후 연령"은 임신 연령 플러스 생활 연령을 지칭한다. "CA" 또는 "보정 연령"은 임신 40주 전에 태어난 주의 수만큼 감소한 생활 연령이다.

[0147] "IGF-I"은 소, 양, 돼지, 말 및 인간을 포함하는 임의의 종, 바람직하게는 인간으로부터의 인슐린 유사 성장 인자 I을 지칭하고, 외인성 투여를 언급하는 경우, 적절한 부위에서 IGF 결합 단백질과 결합할 것이라면, 천연, 합성 또는 재조합체이든 간에 임의의 공급원으로부터의 인슐린 유사 성장 인자 I을 지칭한다. IGF-I은 예를 들어 WO95/04076에 기술된 바와 같이 재조합적으로 생산될 수 있다.

[0148] "IGFBP" 또는 "IGF 결합 단백질"은 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질 계열로부터의 단백질 또는 폴리펩티드를 지칭하고 그것이 순환계(즉, 혈청 또는 조직 내)인지 여부에 관계없이 일반적으로 IGF-I과 회합되거나 또는 이에 결합되거나 복합체화된다. 이러한 결합 단백질에는 수용체가 포함되지 않는다. 이 정의에는 IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5, IGFBP-6, Mac 25(IGFBP-7) 및 프로스타사이클린-자극 인자(PSF) 또는 내피 세포-특이적 분자(ESM-1)뿐만 아니라 IGFBP에 높은 상동성을 갖는 다른 단백질이 포함된다. Mac 25는 예를 들어 Swisshelm et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 4472-4476 (1995) 및 Oh et al., J. Biol. Chem., 271: 30322-30325 (1996)에 기재되어 있다. PSF는 Yamauchi et al., Biochemical Journal, 303: 591-598 (1994)에 기재되어 있다. ESM-1은 Lassalle et al., J. Biol. Chem., 271: 20458-20464 (1996)에 기재되어 있다. 다른 확인된 IGFBP에 대해서는 예를 들어 1990년 6월 27일 공개된 EP 375,438; 1990년 5월 23일 공개된 EP 369,943; 1989년 10월 5일 공개된 WO 89/09268; Wood et al., Molecular Endocrinology, 2: 1176-1185 (1988); Brinkman et al., The EMBO J., 7: 2417-2423 (1988); Lee et al., Mol. Endocrinol., 2: 404-411 (1988); Brewer et al., BBRC, 152: 1289-1297 (1988); 1988년 12월 7일 공개된 EP 294,021; Baxter et al., BBRC, 147: 408-415 (1987); Leung et al., Nature, 330: 537-543 (1987); Martin et al., J. Biol. Chem., 261: 8754-8760 (1986); Baxter et al., Comp. Biochem. Physiol., 91B: 229-235 (1988); 1989년 9월 21일 공개된 WO 89/08667; 1989년 10월 19일 공개된 WO 89/09792; 및 Binkert et al., EMBO J., 8: 2497-2502 (1989)를 참조한다.

[0149] "IGFBP-3"은 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질 3을 지칭한다. IGFBP-3은 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질 계열의 구성원이다. IGFBP-3은 천연 서열 또는 자연적으로-발생하는 대립형질 변이체를 포함하지만 이에 제한되지 않는 변이체 형태로 소, 양, 돼지 및 인간을 포함한 임의의 종으로부터의 것일 수 있다. IGFBP-3은 그것이 적절한 부위에서 IGF-I에 결합할 것이라면 천연, 합성 또는 재조합 여부에 관계없이 임의의 공급원으로부터의 것일 수 있다. IGFBP-3은 PCT 공개 WO95/04076에 기술된 대로 재조합적으로 생산될 수 있다.

[0150] IGF-1 및 IGF 결합 단백질(예컨대 IGFBP-3)에 대한 제형은 본원에 참고로 포함된 WO2022/086953에 개시되어 있다.

[0151] 본원에 사용된 "치료적 조성물"은 IGF-I, 이의 유사체, 또는 이의 결합 단백질인, IGFBP-3과 조합한 IGF-I(IGF-I/IGFBP-3 복합체)를 포함하는 것으로 정의된다. 치료적 조성물은 또한 다른 물질 예컨대 물, 미네랄, 담체 예컨대 단백질, 및 당업자에게 공지된 기타 부형제를 함유할 수 있다. 일부 구체예에서, 치료적 조성물은 폴리소르베이트 20(P20) 또는 폴리소르베이트 80(P80)과 같은 계면활성제를 포함한다.

[0152] IGF-I의 "유사체"는 인간이나 동물에서 IGF-I과 동일한 치료적 효과를 갖는 화합물이다. 이들은 IGF-I의 자연적으로 발생하는 유사체(예를 들어 절삭된 IGF-I) 또는 IGF-I의 공지된 합성 유사체 중 임의의 것일 수 있다. 예를 들어, IGF-I의 유사체 화합물에 대해 미국 특허 번호 5,473,054를 참조한다.

[0153] "항산화제"는 산화된 종의 형성을 방지하거나 감소시키는 제형에 포함된 화합물이다. 일부 구체예에서, 항산화제는 환원제, 유리-라디칼 소거제, 킬레이트제, 사슬 종결제, 질소 등으로부터 선택된다. 일부 구체예에서, 항산화제는 L-메티오닌, 메타중아황산나트륨, 티오황산나트륨 및 글루타티온으로 구성된 군으로부터 선택된 환원제이다. 일부 구체예에서, 항산화제는 L-히스티딘, L-아스코르브산, 카탈라제 및 백금으로 구성된 군으로부터 선택되는 유리-라디칼 소거제이다. 일부 구체예에서, 항산화제는 EDTA 이수화물의 나트륨 염, 디에틸렌트리아민펜타아세트산(DTPA) 및 시트르산으로 구성된 군으로부터 선택되는 킬레이트제이다. 일부 구체예에서, 항산화제는 L-메티오닌, L-시스테인, 티오황산나트륨 및 BHT로 구성된 사슬 종결제이다.

[0154] IGF-I의 "작용제"는 포유동물, 특히 인간에서 IGF, 특히 IGF-I의 혈청 및 조직 수준을 증가시킬 수 있는 펩티드를 포함한 화합물이다. 예를 들어, IGF 효능제 분자에 대해서는 US6,251,865를 참조한다.

[0155] "동결건조"는 제품을 냉동하고 진공 하에 놓은 후 제품에서 수분을 제거하여 얼음이 액체 상을 통과함이 없이 고체에서 증기로 직접적으로 변화하는 것을 허용하는 과정을 지칭한다. "동결건조된 제형"은 예를 들어 저장 동안 안정성을 개선하고 저장 수명을 연장하기 위해 동결건조되었으며 전형적으로 투여 이전에 재구성되는 제형을 지칭한다.

[0156] "안정성"은 의약품이 그 저장 및 사용 기간 동안 제조 시 보유한 특징 및 특성을 유지하는 정도를 지칭한다. 안정성은 그 제형, IGF-1 및 IGFBP(예컨대 IGFBP3) 성분의 안정성, (IGF-1/IGFBP3) 복합체의 완전성 및 안정성, 용기 및 마개, 제조 및 가공 조건, 포장 성분, 저장 및 운송 조건, 온도, 빛, 및 습도, 및 약국 저장-수명과 환자 사용의 예상 기간 및 조건과 관련된 양태를 포함한다. 일부 구체예에서, 안정성은 산화된 종, 응집을 초래하는 환원된 고분자량 종 및/또는 분해 생성물로 대표되는 환원된 저분자량 종을 포함하는 바람직하지 않은 종의 감소된 양을 지칭한다. 일부 구체예에서, 안정성은 바람직하지 않은 종이 10% 미만임을 지칭한다. 일부 구체예에서, 안정성은 바람직하지 않은 종이 5% 미만임을 지칭한다. 일부 구체예에서, 안정성은 바람직하지 않은 종이 2% 미만임을 지칭한다.

[0157] *IGF-1/IGFBP-3*

[0158] IGF-1 또는 이의 효능제 또는 유사체가 본 발명을 실시하는데 사용될 수 있다. IGF-I은 출생 후 성장과 신진대사의 잘-알려진 조절자이다. Baker J, Liu J P, Robertson E J, Efstratiadis A를 참조한다. 그것은 대략적으로 7.5 킬로달톤(Kd)의 분자량을 갖는다. 대부분의 순환 IGF는 IGF-결합 단백질, 및 특히 IGFBP-3에 결합되어 있다. IGF-I은 비정상적인 성장-관련된 병태를 진단하기 위해 혈청에서 측정될 수 있다.

[0159] 전형적으로, 예를 들어 CLD를 포함하여 본원에 기술된 질환의 치료에 적합한 치료적 조성물은 IGF-1 및 IGF-1 결합 단백질 예컨대 IGF 결합-단백질(IGFBP)을 함유한다. 다양한 조직과 체액에서 최소한 6개의 별개의 IGF 결합-단백질(IGFBP)이 식별되었다. 일부 구체예에서, 본 발명에 따른 적합한 치료적 조성물은 IGF-1 및 IGFBP-3을 함유한다. IGF-1과 IGFBP-3은 단백질 복합체로 사용될 수도 있고 별도로 사용될 수도 있다. 일부 구체예에서, IGF-1 및 IGFBP(예컨대 IGFBP-3)는 등몰량으로 복합체화된다. 일부 구체예에서, 치료적 조성물은 메카세르민 린파베이트를 포함한다. 일부 구체예에서, 치료적 조성물은 메카세르민 린파베이트 및 계면활성제를 포함한다. 일부 구체예에서, 치료적 조성물은 메카세르민 린파베이트, 계면활성제 및 항산화제를 포함한다. 일부 구체예에서, 치료적 조성물은 메카세르민 린파베이트 및 폴리소르베이트 20을 포함한다. 일부 구체예에서, 치료적 조성물은 메카세르민 린파베이트 및 폴리소르베이트 20 및 항산화제를 포함한다. 일부 구체예에서, 치료적 조성물은 메카세르민 린파베이트, 폴리소르베이트 20 및 메티오닌을 포함한다. 일부 구체예에서, 치료적 조성물은 메카세르민 린파베이트, 폴리소르베이트 20 및 티오황산나트륨을 포함한다. 일부 구체예에서, 치료적 조성물은 메카세르민 린파베이트, 폴리소르베이트 80 및 항산화제를 포함한다. 일부 구체예에서, 치료적 조성물은 메카세르민 린파베이트, 폴리소르베이트 80 및 메티오닌을 포함한다. 일부 구체예에서, 치료적 조성물은 메카세르민 린파베이트, 폴리소르베이트 80 및 티오황산나트륨을 포함한다.

[0160] IGF-I 및 IGF-I 결합 단백질 예컨대 IGFBP-3은 천연 공급원으로부터 정제되거나 재조합 수단에 의해 생산될 수 있다. 예로써, 인간 혈청으로부터 IGF-I의 정는 당업계에 잘 알려져 있다(Rinderknecht et al. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:2365-2369). 재조합 공정에 의한 IGF-I의 생산은 1984년 12월에 공개된 EP 0128733에 제시되어 있다. IGFBP-3은 Baxter et al. (1986, Biochem. Biophys. Res. Comm. 139:1256-1261)에 의해 제시된 것과 같은 공정을 사용하여 천연 공급원으로부터 정제될 수 있다. 대안적으로, IGFBP-3은 Sommer et al., pp. 715-728, Modern Concepts Of Insulin-Like Growth Factors (E. M. Spencer, ed., Elsevier, N.Y., 1991)에 의해 논의된 바와 같이 재조합적으로 합성될 수 있다. 재조합 IGFBP-3은 IGF-I에 1:1 몰비(등몰량)로 결합한다.

[0161] ***약학적 조성물 및 치료적 용도***

[0162] 한 양태에서, 인슐린 유사 성장 인자 1(IGF-1)과 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질(예컨대 IGFBP-3)을 예를 들어 1:1의 몰비로 포함하는 단리된 단백질 복합체를 포함하는 조성물이 본원에 제공되며, 여기서 조성물은 항산화제를 포함하고, 산화된 IGF-1 종의 양은 약 25℃의 온도에서 저장시 3개월 후 50% 초과 증가하지 않는다.

[0163] 본 발명의 제형은 미숙아의 질환 및 합병증, 예를 들어 심실내 출혈(IVH), 기관지폐 이형성증(BPD) 또는 만성 폐 질환(CLD), 예컨대 예를 들어 미숙아와 연관된 CLD를 앓고 있는 환자의 치료에 사용된다. 예를 들어, 본 발명은 CLD 또는 CLD와 연관된 합병증을 앓고 있는 미숙 유아를 치료하는 데 사용될 수 있다. 일부 구체예에서,

본 발명은 적어도 1주, 2주, 3주, 4주, 1개월, 2개월 또는 3개월까지 조산된 유아를 치료하는데 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명은 극도로 미숙 유아를 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0164] 발명의 한 구체예에서, IGF-I은 IGF-I에 결합할 수 있는 IGF 결합 단백질 및 계면활성제와 조합하여 투여된다. 일부 구체예에서, IGF-I에 결합할 수 있는 IGF 결합 단백질은 IGF 결합 단백질 3(IGFBP-3)이다. 일부 구체예에서, 조성물은 폴리소르베이트 20 또는 폴리소르베이트 80으로부터 선택된 계면활성제를 포함한다. 일부 구체예에서, 조성물은 메티오닌 또는 티오황산나트륨으로부터 선택된 항산화제를 추가로 포함한다.

[0165] 등몰량의 IGF-I 및 IGF-결합 단백질 3을 포함하는 조성물이 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, IGF-I 및 IGF 결합 단백질 3은 투여 이전에 복합체화된다. 복합체는 생리학적으로 적합한 담체 예컨대 생리식염수 또는 포스페이트 완충 식염수 용액에 용해된 대략적으로 등몰량의 IGF-I 및 IGF 결합 단백질 3을 혼합함에 의해 형성될 수 있다. 일부 구체예에서, 재조합 인간 IGF-I의 농축된 용액과 재조합 인간 IGF 결합 단백질 3의 농축된 용액은 등몰 복합체를 형성하기에 충분한 시간 동안 함께 혼합된다. 일부 구체예에서, 재조합 인간 IGF-I 및 재조합 인간 IGF 결합 단백질 3은 WO96/40736에 기술된 바와 같이 정제 동안 조합되어 복합체를 형성한다.

[0166] ***항산화제***

[0167] 단백질 잔류물의 산화는 다수의 다른 공급원으로부터 발생한다. 특정한 항산화제의 첨가 외에도 산화성 단백질 손상의 예방은 제조 공정과 제품의 저장 전반에 걸쳐 대기 산소, 온도, 광 노출, 및 화학적 오염과 같은 다수의 요인의 주의 깊은 제어를 포함한다. 따라서 발명은 제한 없이, 환원제, 산소/자유-라디칼 소거제 또는 킬레이트제를 포함하는 약학적 항산화제의 사용을 고려한다.

[0168] 항산화제는 산화된 종의 형성을 방지하거나 감소시키는 제형에 포함된 화합물이다. 산화 반응은 물질에서 산화제로 전자를 전달한다. 이 과정 동안 일부 자유-라디칼이 생성되어 동물 세포를 손상시키는 연쇄 반응이 시작된다. 임의의 특정 이론에 얽매이기를 바라지 않고, 항산화제는 자유-라디칼 중간체를 제거함에 의해 이들 연쇄 반응을 늦추고 결국 스스로 산화됨에 의해 다른 산화 반응을 억제한다는 것이 고려된다. 항산화제는 종종 환원제, 예를 들어 티올이나 폴리페놀의 역할을 수행한다.

[0169] 치료적 단백질 제형에서 항산화제는 한 양태에서 수용성이고 제품 저장 수명 전반에 걸쳐 활성을 유지한다. 환원제와 산소/유리-라디칼 소거제는 용액에서 활성 산소 종을 제거함에 의해 작동한다. EDTA와 같은 킬레이트제는 유리-라디칼 형성을 촉진하는 미량 금속 오염물질을 결합함에 의해 효과적이다.

[0170] 단백질 산화를 방지하기 위한 다양한 부형제의 효과 외에도 항산화제 자체가 단백질에 다른 공유결합 또는 물리적 변화를 유도할 가능성이 우려된다. 예를 들어, 환원제는 분자내 이황화물 연결의 파괴를 야기하여 이황화물 셔플링을 유도할 수 있다. 전이 금속 이온의 존재에서, 아스코르브산과 EDTA는 다수의 단백질과 펩티드에서 메티오닌 산화를 촉진하는 것으로 나타났다(Akers M J, and Defelippis M R. Peptides and Proteins as Parenteral Solutions. In: Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins. Sven Frokjaer, Lars Hovgaard, editors. Pharmaceutical Science. Taylor and Francis, UK (1999)); Fransson J. R., J. Pharm. Sci. 86(9): 4046-1050 (1997); Yin J, et al., Pharm Res., 21(12): 2377-83 (2004)). 티오황산나트륨은 rhuMab HER2에서 광 및 온도 유도된 메티오닌-산화의 수준을 감소시키는 것으로 보고되었다; 그러나, 티오황산염-단백질 부가물의 형성도 보고되었다(Lam X M, Yang J Y, et al., J Pharm Sci. 86(11): 1250-5(1997)). 적절한 항산화제의 선택은 단백질의 특정 스트레스와 민감도에 따라 이루어진다. 특정 양태에서 고려되는 항산화제는 제한 없이, 환원제 및 산소/유리-라디칼 소거제, EDTA 및 티오황산나트륨을 포함한다.

[0171] 일부 구체예에서, 항산화제는 환원제, 유리-라디칼 소거제, 킬레이트제, 사슬 종결제, 질소 등으로부터 선택된다. 메티오닌은 다수의 산화적 스트레스에 대해 효과적인 것으로 관찰되었다(Lam X M, et al., J Pharm Sci., 86(11): 1250-5 (1997)).

[0172] 일부 구체예에서, 항산화제는 L-메티오닌, 메타중아황산나트륨, 티오황산나트륨 및 글루타티온으로 구성된 군으로부터 선택되는 환원제이다. 일부 구체예에서, 항산화제는 L-히스티딘, L-아스코르브산, 카탈라제 및 백금으로 구성된 군으로부터 선택되는 유리 라디칼 소거제이다. 일부 구체예에서, 항산화제는 EDTA 이수화물의 나트륨염, 디에틸렌트리아민펜타아세트산(DTPA) 및 시트르산으로 구성된 군으로부터 선택되는 킬레이트제이다. 일부 구체예에서, 항산화제는 L-메티오닌, L-시스테인, 티오황산나트륨 및 BHT로 구성된 사슬 종결제이다. 일부 구체예에서, 산화는 반복된 풀 진공 및 질소 하에서의 추가 또는 작동에 의해 감소된다.

[0173] 일부 구체예에서, 조성물은 0.05mM 메티오닌, 0.10mM 메티오닌, 0.15mM 메티오닌, 0.20mM 메티오닌, 0.25mM 메티오닌, 0.30mM 메티오닌, 0.35mM 메티오닌, 0.40mM 메티오닌, 0.45mM 메티오닌, 0.50mM 메티오닌, 0.55mM 메

티오닌 , 0.60mM 메티오닌, 0.65mM 메티오닌, 0.70mM 메티오닌, 0.75mM 메티오닌, 0.80mM 메티오닌, 0.85mM 메티오닌, 0.90mM 메티오닌, 0.95mM 메티오닌, 또는 1mM 메티오닌을 포함한다.

[0174] 일부 구체예에서, 조성물은 1mM 메티오닌, 2mM 메티오닌, 3mM 메티오닌, 4mM 메티오닌, 5mM 메티오닌, 6mM 메티오닌, 7mM 메티오닌, 8mM 메티오닌, 9mM 메티오닌, 10mM 메티오닌, 11mM 메티오닌, 12mM 메티오닌, 13mM 메티오닌, 14mM 메티오닌, 15mM 메티오닌, 16mM 메티오닌, 17mM 메티오닌, 18mM 메티오닌, 19mM 메티오닌, 또는 20mM 메티오닌을 포함한다.

[0175] 일부 구체예에서, 조성물은 25mM 메티오닌, 30mM 메티오닌, 35mM 메티오닌, 40mM 메티오닌, 45mM 메티오닌, 50mM 메티오닌, 55mM 메티오닌, 60mM 메티오닌, 65mM 메티오닌, 70mM 메티오닌, 75mM 메티오닌, 80mM 메티오닌, 85mM 메티오닌, 90mM 메티오닌, 95mM 메티오닌, 또는 100mM 메티오닌을 포함한다.

[0176] 일부 구체예에서, 조성물은 0.05mM 티오황산나트륨, 0.10mM 티오황산나트륨, 0.15mM 티오황산나트륨, 0.20mM 티오황산나트륨, 0.25mM 티오황산나트륨, 0.30mM 티오황산나트륨, 0.35mM 티오황산나트륨, 0.40mM 티오황산나트륨, 0.45mM 티오황산나트륨, 0.50mM 티오황산나트륨, 0.55mM 티오황산나트륨, 0.60mM 티오황산나트륨, 0.65mM 티오황산나트륨, 0.70mM 티오황산나트륨, 0.75mM 티오황산나트륨, 0.80mM 티오황산나트륨, 0.85mM 티오황산나트륨, 0.90mM 티오황산나트륨, 0.95mM 티오황산나트륨 또는 1mM 티오황산나트륨을 포함한다.

[0177] 일부 구체예에서, 조성물은 1mM 티오황산나트륨, 2mM 티오황산나트륨, 3mM 티오황산나트륨, 4mM 티오황산나트륨, 5mM 티오황산나트륨, 6mM 티오황산나트륨, 7mM 티오황산나트륨, 8mM 티오황산나트륨, 9mM 티오황산나트륨, 10mM 티오황산나트륨, 11mM 티오황산나트륨, 12mM 티오황산나트륨, 13mM 티오황산나트륨, 14mM 티오황산나트륨, 15mM 티오황산나트륨, 16mM 티오황산나트륨, 17mM 티오황산나트륨, 18mM 티오황산나트륨, 19mM 티오황산나트륨 또는 20mM 티오황산나트륨을 포함한다.

[0178] 일부 구체예에서, 조성물은 25mM 티오황산나트륨, 30mM 티오황산나트륨, 35mM 티오황산나트륨, 40mM 티오황산나트륨, 45mM 티오황산나트륨, 50mM 티오황산나트륨, 55mM 티오황산나트륨, 60mM 티오황산나트륨, 65mM 티오황산나트륨, 70mM 티오황산나트륨, 75mM 티오황산나트륨, 80mM 티오황산나트륨, 85mM 티오황산나트륨, 90mM 티오황산나트륨, 95mM 티오황산나트륨, 또는 100mM 티오황산나트륨을 포함한다.

[0179] 일부 구체예에서, 조성물은 아세트산나트륨, 아세트산 및/또는 염화나트륨을 포함하는 완충액를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 조성물은 아세트산나트륨 또는 아세트산을 포함하는 완충액를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 조성물은 염화나트륨을 포함하는 완충액를 추가로 포함한다.

[0180] 일부 구체예에서, 아세트산 나트륨 또는 아세트산은 약 10 내지 100mM의 농도로 된다. 일부 구체예에서, 아세트산 나트륨 또는 아세트산은 약 10mM, 15mM, 20mM, 25mM, 30mM, 35mM, 40mM, 45mM, 50mM, 55mM, 60mM, 65mM, 70mM, 75mM, 80mM, 85mM, 90mM, 95mM 또는 100mM의 농도로 된다. 일부 구체예에서, 아세트산 나트륨 또는 아세트산은 약 50mM의 농도로 된다.

[0181] 일부 구체예에서, 염화나트륨은 약 20mM 및 200mM의 농도로 된다. 일부 구체예에서, 염화나트륨은 약 20mM, 약 25mM, 30mM, 35mM, 40mM, 45mM, 50mM, 55mM, 60mM, 65mM, 70mM, 75mM, 80mM, 약 90mM, 약 95mM, 약 100mM, 약 105mM, 약 110mM, 약 115mM, 약 120mM, 약 125mM, 약 130mM, 약 135mM, 약 140mM, 약 145mM, 약 150mM, 약 155mM, 약 160mM, 약 165mM, 약 170mM, 약 175mM, 약 180mM, 약 185mM, 약 190mM, 약 195mM, 또는 약 200mM의 농도로 된다. 일부 구체예에서, 염화나트륨은 약 105mM의 농도로 된다.

[0182] 일부 구체예에서, 조성물의 pH는 약 5.0 내지 6.0이다. 일부 구체예에서, pH는 약 5.0, 약 5.2, 약 5.4, 약 5.6, 약 5.8, 약 6.0, 약 6.2, 약 6.4, 약 6.6, 약 6.8 또는 약 7.0이다. 일부 구체예에서, 조성물의 pH는 약 5.1, 약 5.3, 약 5.5, 약 5.7, 약 5.9, 약 6.1, 약 6.3, 약 6.5, 약 6.7, 또는 약 6.9이다. 일부 구체예에서, 조성물의 pH는 약 5.5이다.

[0183] ***동결건조***

[0184] 한 양태에서, IGF-1/IGFBP(예컨대 IGFBP-3)를 포함하는 제형은 투여 이전에 동결건조된다. 동결건조 주기는 한 양태에서 3단계인: 동결, 1차 건조, 및 2차 건조로 구성된다. 동결 단계에서는 용액이 냉각되어 얼음 형성이 시작된다. 더욱이, 이 단계는 증량제의 결정화를 유도한다. 얼음은 진공을 사용하고 승화를 촉진하기 위해 열을 도입하여 얼음의 증기압 아래로 챔버 압력을 낮춤에 의해 수행되는 1차 건조 단계에서 승화된다. 마지막으로, 흡착되거나 결합된 물은 감소된 챔버 압력 하에의 2차 건조 단계에서 그리고 상승된 저장 온도에서 제거된다. 공정은 동결건조 케이크로 알려진 물질을 생성한다. 그 후 케이크는 멸균수 또는 주사용 적합한 희석제로 재구

성될 수 있다.

[0185] 동결건조 주기는 부형제의 최종 물리적 상태를 결정할 뿐만 아니라 재구성 시간, 외관, 안정성 및 최종 수분 함량과 같은 다른 매개변수에도 영향을 미친다. 동결 상태에서의 조성물 구조는 특정 온도에서 발생하는 여러 전이(예를 들어, 유리 전이, 습윤 및 결정화)를 통해 진행되고 구조는 동결건조 과정을 이해하고 최적화하는 데 사용될 수 있다. 유리 전이 온도(Tg 및/또는 Tg')는 용질의 물리적 상태에 대한 정보를 제공할 수 있고 시차 주사 열량계(DSC)에 의해 결정될 수 있다. Tg 및 Tg'는 동결건조 주기를 설계할 때 고려해야 하는 중요한 매개변수이다. 예를 들어, Tg'는 1차 건조에 중요하다. 더욱이, 건조된 상태에서 유리 전이 온도는 최종 제품의 저장 온도에 대한 정보를 제공한다. 예를 들어, 일부 구체예에서, 동결건조 실행은 리오스타 동결건조기를 사용하여 -25℃의 1차 건조 온도 및 25℃의 2차 건조 온도로 구성된 동결건조 주기 하에서 수행된다. 일부 구체예에서, 동결건조 실행은 리오스타 동결건조기를 사용하여 -20℃의 1차 건조 온도 및 25℃의 2차 건조 온도로 구성된 동결건조 주기 하에서 수행된다.

[0186] ***제형 및 부형제***

[0187] 부형제는 의약품(예를 들어, IGF-1/IGFBP(예컨대 IGFBP-3) 단백질 복합체)의 안정성과 전달을 부여하거나 증강시키는 첨가제이다. 부형제는 제형의 필수 성분이므로 안전해야 하고 환자가 잘 견딜 수 있어야 한다. 단백질 약물의 경우, 부형제의 선택은 약물의 효능과 면역원성 둘 모두에 영향을 미칠 수 있으므로 특히 중요하다. 따라서, 적절한 안정성, 안전성 및 시장성을 부여하는 적절한 부형제를 선택하여 단백질 제형을 개발해야 할 필요가 있다.

[0188] 일부 구체예에서, 본원에 기재된 조성물 및 하나 이상의 적합한 약학적 부형제를 포함하는 약학적 조성물이 제공된다.

[0189] 일부 구체예에서, 조성물은 폴리소르베이트 20을 포함한다. 일부 구체예에서, 폴리소르베이트 20 계면활성제는 약 0.001% 내지 2.4% v/v의 농도로 된다. 일부 구체예에서, 폴리소르베이트 20 계면활성제는 약 0.2% 내지 0.4% v/v의 농도로 된다. 일부 구체예에서, 폴리소르베이트 20 계면활성제는 약 0.001%, 0.005%, 0.01%, 0.02%, 0.03%, 0.05%, 0.10%, 0.15%, 0.2%, 0.5%, 0.7%, 1.0%, 1.2%, 1.5%, 1.8%, 2.0%, 2.2% 또는 2.4% v/v의 농도로 된다. 일부 구체예에서, 폴리소르베이트 20 계면활성제는 약 0.0025%, 약 0.005%, 또는 약 0.0075% v/v의 농도로 된다. 일부 구체예에서, 폴리소르베이트 20은 0.005%의 농도로 된다.

[0190] 일부 구체예에서, 조성물은 폴리소르베이트 80을 포함한다. 일부 구체예에서, 폴리소르베이트 80 계면활성제는 약 0.001% 내지 2.4% v/v의 농도로 된다. 일부 구체예에서, 폴리소르베이트 80 계면활성제는 약 0.2% 내지 0.4% v/v의 농도로 된다. 일부 구체예에서, 폴리소르베이트 80 계면활성제는 약 0.001%, 0.005%, 0.01%, 0.02%, 0.03%, 0.05%, 0.10%, 0.15%, 0.2%, 0.5%, 0.7%, 1.0%, 1.2%, 1.5%, 1.8%, 2.0%, 2.2% 또는 2.4% v/v의 농도로 된다. 일부 구체예에서, 폴리소르베이트 80 계면활성제는 약 0.0025%, 약 0.005%, 또는 약 0.0075% v/v의 농도로 된다. 일부 구체예에서, 폴리소르베이트 80은 0.005%의 농도로 된다.

[0191] 동결건조 제형은 한 양태에서 적어도 완충액, 증량제, 안정화제 및 계면활성제 중 하나 이상으로 구성된다. 동결건조 동안 제형을 pH의 안정 구역 내로 유지하기 위해 적절한 완충제가 포함된다.

[0192] 단백질용 단백질 제형을 개발함에 있어 어려운 점은 제조, 운송 및 저장의 스트레스에 대해 제품을 안정화하는 것이다. 제형 부형제의 역할은 이들 스트레스에 대한 안정화를 제공하는 것이다. 부형제는 또한 그 전달을 가능하게 하고 환자의 편의성을 증강시키기 위해 고농도 단백질 제형의 점도를 낮추기 위해 이용된다. 일반적으로 부형제는 다양한 화학적, 물리적 스트레스에 대해 단백질을 안정화시키는 메커니즘을 기준으로 분류될 수 있다. 일부 부형제는 특정 스트레스의 영향을 완화하거나 특정 단백질의 특정 감수성을 조절하는 데 사용된다. 다른 부형제는 단백질의 물리적 안정성과 공유결합 안정성에 대해 보다 일반적인 영향을 미친다. 본원에 기술된 부형제는 그 화학적 유형 또는 제형에서의 그 기능적 역할에 의해 구성된다. 각 부형제 유형을 논의할 때 안정화 방식에 대한 간략한 설명이 제공된다. 발명의 생물약학적 제형에 포함될 염의 양 및 유형은 최종 용액의 원하는 삼투압(즉, 등장성, 저장성 또는 고장성)뿐만 아니라 제형에 포함되어 지는 다른 성분의 양 및 삼투압에 기반하여 선택된다.

[0193] 예를 들어, 약 5% 소르비톨의 함입이 등장성을 달성할 수 있는 반면, 약 9%의 수크로스 부형제가 등장성을 달성하기 위해 필요하다. 발명의 생물약학적 제형 내에 포함될 수 있는 하나 이상의 부형제의 양 또는 농도 범위의 선택은 염, 폴리올 및 당을 참조하여 상기에 예시되었다. 그러나, 당업자는 본원에 기술되고 특정 부형제를 참조하여 추가로 예시된 고려사항이 예를 들어 염, 아미노산, 기타 긴장제, 계면활성제, 안정화제, 증량제, 냉동

방지제, 동결방지제, 항산화제, 금속 이온, 킬레이트제 및/또는 보존제를 포함한 부형제의 모든 유형 및 조합에 동등하게 적용가능하다는 것을 이해할 것이다.

[0194] 더욱이, 특정 부형제가 몰 농도로 보고되는 경우, 당업자는 용액의 등가 백분율(%) w/v(예를 들어, (용액 샘플에서 물질의 그램/용액의 mL) × 100%)도 고려된다는 것을 인식할 것이다.

[0195] 일부 구체예에서, 증량제의 농도는 예를 들어, 단백질 농도가 높거나 안정화제 농도가 높은 경우 낮아질 수 있다. 일부 구체예에서, 증량제가 없는 특정 제형의 등장성을 유지하기 위해, 안정화제의 농도는 이에 따라 조정될 것이다(즉, "긴장화" 양의 안정화제가 사용될 것이다).

[0196] 액체 및 동결건조된 단백질 제형에 대해 고려되는 부형제 성분의 비교가 표 A에 제공되어 있다.

[0197] **표 A**: 동결건조된 단백질 제형의 부형제 성분

| 부형제 성분 | 동결건조된 제형의 기능 |
|---|---|
| 완충액 | 동결건조 동안 및 재구성 시 제형의 pH 를 유지한다 |
| 강장제/안정제 | 안정제는 냉동 및 동결보호제, 예를 들어 폴리올, 당, 중합체를 포함한다. 냉동보호제는 동결 응력으로부터 단백질을 보호한다; 동결보호제는 냉동-건조된 상태에서 단백질을 안정화시킨다. |
| 증량제 | 제품을 강화하기 위해; 동결 케이크에 구조적 강도를 제공한다. 예를 들어 만니톨 및 글리신. |
| 계면활성제 | 동결 과정 동안 응집을 최소화하고; 재구성 시간을 감소시키는 데 도움이 된다. 예를 들어 폴리소르베이트 20 및 80 |
| 항산화제 | 동결 케이크에서 분자 반응은 매우 지연되므로, 이들은 액체 제형에 첨가되지만 동결 제형에는 필요하지 않다. |
| 금속 이온/킬레이트제 | 특정 금속 이온은 보조-인자로 포함될 수 있거나 프로테아제 활성을 위해 금속이 필요한 경우에도 포함될 수 있다. 동결 제형에는 킬레이트제가 필요하지 않다. |
| 보존제 | 다중-용량 제형에만 해당.<br>미생물 성장에 대한 보호를 제공한다<br>재구성 희석제에 포함되어 있다 |

[0198]

[0199] ***완충액 및 완충제***

[0200] 약리학적으로 활성인 단백질 제형의 안정성은 일반적으로 좁은 pH 범위에서 최대로 관찰된다. 이 최적 안정성의 pH 범위는 사전-제형 연구 중에 초기에 식별되어야 한다. 가속 안정성 연구 및 열량계 스크리닝 연구와 같은 여러 접근법이 이 노력에 유용하다. 일단 제형이 확정되면 단백질은 그 저장-수명에 걸쳐서 제조되고 유지되어야 한다. 따라서, 제형에서의 pH를 조절하기 위해 거의 항상 완충제가 이용된다.

[0201] 완충 종의 완충액 용량은 pKa와 동일한 pH에서 최대이고 pH가 이 값에서 멀어지거나 증가함에 따라 감소한다. 완충 용량의 구십 퍼센트는 그 pKa의 한 pH 단위 내에 존재한다. 완충액 용량도 완충액 농도가 증가함으로 비례적으로 증가한다.

[0202] 완충액을 선택할 때 완충액 종과 그 농도는 그 pKa와 원하는 제형 pH를 기준으로 정의해야 한다. 또한 완충액이 단백질 및 기타 제형 부형제와 호환성이고 임의의 분해 반응을 촉진하지 않는지 확인하는 것도 중요하다. 고려해야 할 또 다른 양태는 완충액이 투여 시 유발할 수 있는 따끔거림과 자극의 감각이다. 예를 들어, 시트레이트는 투여 시 제형이 혈액으로 빠르게 희석되는 IV 경로에 의해 투여되는 경우보다, 특히 약물 용액이 상대적으로 더 오랜 기간 동안 해당 부위에 남아 있는, 피하(SC) 또는 근육내(IM) 경로를 통해 투여할 때 주사 시 따끔거림을 유발하는 것으로 알려져 있다. 직접 IV 주입으로 투여되는 제형의 경우, 완충액(및 기타 제형 성분)의 총량을 모니터링해야 하고, 인산칼륨 완충액의 형태로 투여되는 칼륨 이온에 대해 심혈관 효과를 모니터링해야 한다.

[0203] 동결건조된 제형용 완충액은 추가적인 고려가 필요하다. 인산나트륨과 같은 일부 완충액은 동결 중에 단백질 무정형 단계에서 결정화되어 pH에서의 전이를 초래할 수 있다. 아세테이트 및 이미다졸과 같은 다른 일반적인 완

충액은 동결건조 과정 중에 승화 또는 증발할 수 있으며, 이로 인해 동결건조 동안 또는 재구성 후 제형의 pH가 전이될 수 있다.

[0204] 조성물에 존재하는 완충액 시스템은 생리학적으로 적합하고 약학적 제형의 원하는 pH를 유지하도록 선택된다. 한 구체예에서, 용액의 pH는 pH 2.0 내지 pH 12.0이다. 예를 들어, 용액의 pH는 2.0, 2.3, 2.5, 2.7, 3.0, 3.3, 3.5, 3.7, 4.0, 4.3, 4.5, 4.7, 5.0, 5.3, 5.5, 5.7, 6.0, 6.3, 6.5, 6.7, 7.0, 7.3, 7.5, 7.7, 8.0, 8.3, 8.5, 8.7, 9.0, 9.3, 9.5, 9.7, 10.0, 10.3, 10.5, 10.7, 11.0, 11.3, 11.5, 11.7, 또는 12.0일 수 있다.

[0205] pH 완충 화합물은 제형의 pH를 사전결정된 수준으로 유지하는데 적합한 임의의 양으로 존재할 수 있다. 한 구체예에서, pH 완충 농도는 0.1mM 내지 500mM(1M)이다. 예를 들어, pH 완충제는 적어도 0.1, 0.5, 0.7, 0.8 0.9, 1.0, 1.2, 1.5, 1.7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200 또는 500mM인 것으로 고려된다.

[0206] 본원에 제시된 제형을 완충하는데 사용되는 예시적인 pH 완충제는 유기산, 글리신, 히스티딘, 글루타메이트, 숙시네이트, 포스페이트, 아세테이트, 시트레이트, 트리스, HEPES 및 아미노산 또는 아스파르테이트, 히스티딘, 및 글리신을 포함하지만 이에 제한되지 않는 아미노산의 혼합물을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 본 발명의 한 구체예에서, 완충제는 시트레이트이다.

[0207] ***안정제 및 증량제***

[0208] 한 양태에서, 저장-유도된 응집 및 화학적 분해를 방지하거나 감소시키기 위해 안정제(또는 안정제의 조합)가 첨가된다. 재구성 시 흐릿하거나 탁한 용액은 단백질이 침전되었거나 적어도 응집되었음을 나타낸다. 용어 "안정화제"는 수성 상태에서 화학적 분해(예를 들어, 자가분해, 탈아미드화, 산화 등)를 포함하는 응집 또는 물리적 분해를 방지할 수 있는 부형제를 지칭한다. 고려되는 안정제에는 수크로스, 트레할로스, 만노스, 말토스, 락토스, 글루코스, 라피노스, 셀로비오스, 젠티오비오스, 이소말토스, 아라비노스, 글루코사민, 프럭토스, 만니톨, 소르비톨, 글리신, 아르기닌 HCL, 다당류를 포함하는 폴리-하이드록시 화합물 예컨대 덱스트란, 전분, 하이드록시에틸 전분, 사이클로덱스트린, N-메틸 피롤리덴, 셀룰로오스 및 히알루론산, 염화나트륨이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 본 제형에서 안정제는 약 0.1, 0.5, 0.7, 0.8 0.9, 1.0, 1.2, 1.5, 1.7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 700, 900 또는 1000mM의 농도로 함입된다. 한 구체예에서, 만니톨 및 트레할로스가 안정화제로서 사용된다.

[0209] 추가 구체예에서, 제형은 또한 적절한 양의 증량제 및 삼투압 조절제를 포함한다. 증량제에는 예를 들어 만니톨, 글리신, 수크로스, 중합체 예컨대 덱스트란, 폴리비닐피롤리돈, 카르복시메틸셀룰로오스, 락토스, 소르비톨, 트레할로스 또는 자일리톨이 포함된다. 한 구체예에서, 증량제는 만니톨이다. 증량제는 약 0.1, 0.5, 0.7, 0.8 0.9, 1.0, 1.2, 1.5, 1.7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 700, 900 또는 1000mM의 농도로 함입된다.

[0210] ***계면활성제***

[0211] 단백질은 표면과 상호작용하는 높은 경향을 갖기 때문에 공기-액체, 유리병-액체 및 액체-액체(실리콘 오일) 경계면에서 이를 흡착 및 변성에 취약하게 만든다. 이 분해 경로는 단백질 농도에 반비례로 의존성이고 가용성 및 불용성 단백질 응집체의 형성 또는 표면에 대한 흡착을 통해 용액으로부터 단백질의 손실을 초래하는 것으로 관찰되었다. 용기 표면 흡착에 부가하여, 제품의 운송 및 취급 중에 경험하게 되는 물리적인 흔들림으로 인해 표면-유도된 분해가 악화된다.

[0212] 계면활성제는 표면-유도된 분해를 방지하기 위해 단백질 제형에 일반적으로 사용된다. 계면활성제는 계면 위치에 대해 단백질과의 경쟁에서 우위를 점하는 능력을 가진 양친매성 분자이다. 계면활성제 분자의 소수성 부분은 계면 위치(예를 들어, 공기/액체)를 차지하는 반면, 분자의 친수성 부분은 벌크 용매 방향으로 유지된다. 충분한 농도(전형적으로 세제의 임계 미셀 농도 근처)에서 계면활성제 분자의 표면층은 단백질 분자가 계면에서 흡착되는 것을 방지하는 역할을 한다. 이에 의해, 표면-유도된 분해가 최소화된다. 본원에서 고려되는 계면활성제에는 제한 없이, 소르비탄 폴리에톡실레이트의 지방산 에스테르, 즉 폴리소르베이트 20 및 폴리소르베이트 80이 포함된다. 둘은 각각 C-12 및 C-18인, 분자에 소수성을 부여하는 지방족 사슬의 길이에서만 상이하다. 따라서, 폴리소르베이트 80은 폴리소르베이트 20보다 더 표면-활성이 있고 더 낮은 임계 미셀 농도를 갖는다.

[0213] 세제는 단백질의 열역학적 형태 안정성에 영향을 미친다. 부분적으로 또는 전체적으로 펼쳐진 단백질 상태와 특이적 결합에 관여할 수 있는 세제 분자의 소수성 꼬리. 이들 유형의 상호작용은 보다 확장된 단백질 상태를 향

한 구조적 평형에서의 전이를 일으킬 수 있다(즉, 결합 폴리소르베이트에 대한 보완에서 단백질 분자의 소수성 부분의 노출을 증가시킴). **대안적으로, 단백질 천연 상태가 일부 소수성 표면을 나타내는 경우, 천연 상태에 대한 세제 결합은 해당 형태를 안정화시킬 수 있다.**

[0214] 폴리소르베이트의 또 다른 양태는 본질적으로 산화적 분해에 취약하다는 것이다. 종종 원료로서 그것은 단백질 잔류 측쇄, 특히 메티오닌의 산화를 야기하기에 충분한 양의 과산화물을 함유한다. 안정제의 첨가로 인해 발생하는 산화적 손상 가능성은 제형에 가장 낮은 유효 농도의 부형제를 사용해야 한다는 점을 강조한다. 계면활성제의 경우 주어진 단백질에 대한 유효 농도는 안정화의 메커니즘에 따라 달라진다.

[0215] 계면활성제는 또한 냉동 및 건조 동안 표면 관련된 응집 현상을 방지하기 위해 적절한 양으로 첨가된다. 따라서, 예시적인 계면활성제에는 제한 없이, 자연적으로 발생하는 아미노산으로부터 유래된 계면활성제를 포함하는 음이온성, 양이온성, 비이온성, 쯔비터이온성 및 양쪽성 계면활성제가 포함된다. 음이온성 계면활성제에는 나트륨 라우릴 설페이트, 디옥틸 나트륨 설포숙시네이트 및 디옥틸 나트륨 설포네이트, 케노데옥시콜산, N-라우로일사르코신 나트륨 염, 리튬 도데실 설페이트, 1-옥탄설폰산 나트륨 염, 나트륨 콜레이트 수화물, 나트륨 데옥시콜레이트, 및 글리코데옥시콜산 나트륨염이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 양이온성 계면활성제에는 벤잘코늄 클로라이드 또는 벤제토늄 클로라이드, 세틸피리디늄 클로라이드 일수화물 및 헥사데실트리메틸암모늄 브로마이드가 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 쯔비터이온성 계면활성제에는 CHAPS, CHAPSO, SB3-10 및 SB3-12가 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 비이온성 계면활성제에는 디지토닌, Triton X-100, Triton X-114, TWEEN-20 및 TWEEN-80이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 계면활성제에는 또한 라우로마크로골 400, 폴리옥실 40 스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 수소화된 피마자유 10, 40, 50 및 60, 글리세롤 모노스테아레이트, 폴리소르베이트 40, 60, 65 및 80, 대두 레시틴 및 기타 인지질 예컨대 디올레일 포스파티딜 콜린(DOPC), 디미리스토일포스파티딜 글리세롤(DMPG), 디미리스토일포스파티딜 콜린(DMPC), 및 (디올레일 포스파티딜 글리세롤) DOPG; 수크로스 지방산 에스테르, 메틸 셀룰로오스 및 카르복시메틸 셀룰로오스가 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 따라서, 개별적으로 또는 상이한 비율에서의 혼합물로서 이들 계면활성제를 포함하는 조성물이 추가로 제공된다. 본 발명의 한 구체예에서, 계면활성제는 TWEEN-80이다. 본 제형에서, 계면활성제는 약 0.01 내지 약 0.5g/L의 농도로 혼입된다. 제공된 제형의 일부 구체예에서, 계면활성제 농도는 0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1.0g/L이다. 일부 구체예에서, 계면활성제는 폴리소르베이트 20이다. 일부 구체예에서, 계면활성제는 폴리소르베이트 80이다. 일부 구체예에서, 계면활성제는 0.005% 폴리소르베이트 20이다. 일부 구체예에서, 계면활성제는 0.005% 폴리소르베이트 80이다.

[0216] ***염***

[0217] 염은 종종 단백질 용해도, 물리적 안정성 및 등장성에 중요할 수 있는 제형의 이온 강도를 증가시키기 위해 종종 첨가된다. 염은 다양한 방식으로 단백질의 물리적 안정성에 영향을 미칠 수 있다. 이온은 단백질의 표면 상의 전하를 띤 잔기와 결합하여 단백질의 천연 상태를 안정화할 수 있다. 대안적으로, 염은 단백질 백본(-CONH-)을 따라 펩티드 기에 결합하여 변성된 상태를 안정화할 수 있다. 염은 또한 단백질 분자 내의 잔기 사이의 반발적인 정전기 상호작용을 차폐함에 의해 단백질 천연 형태를 안정화할 수 있다. 단백질 제형에서의 염은 또한 단백질 응집 및 불용성을 유도할 수 있는 단백질 분자 사이의 끌어당기는 정전기적 상호작용을 차폐할 수 있다. 제공된 제형에서 염 농도는 0.1, 1, 10, 20, 30, 40, 50, 80, 100, 120, 150, 200, 300 및 500mM 사이이다.

[0218] ***기타 일반적인 부형제 성분***

[0219] ***아미노산***

[0220] 아미노산은 완충액, 증량제, 안정제 및 항산화제로서 단백질 제형에서 다양한 용도가 밝혀졌다. 따라서, 한 양태에서 히스티딘 및 글루탐산은 각각 5.5-6.5 및 4.0-5.5의 pH 범위에서 단백질 제형을 완충시키기 위해 이용된다. 히스티딘의 이미다졸 기는 pKa=6.0을 가지고 글루탐산 측쇄의 카르복실 기는 4.3의 pKa를 가지므로 이들 아미노산을 그 각각의 pH 범위에서 완충하는 데 적합하게 한다. 글루탐산은 이러한 경우에 특히 유용하다. 히스티딘은 시중에서 판매되는 단백질 제형에서 흔하게 발견되고, 이 아미노산은 주사 시 찌르는 것으로 알려진 완충액인 시트레이트에 대한 대안을 제공한다. 흥미롭게도 히스티딘은 또한 액체 및 동결건조된 형태 둘 모두에서 고농도로 사용될 때 응집과 관련하여 안정화 효과를 가지고 고단백질 농도 제형의 점도를 감소시킨다.

[0221] 다양한 양태에서, 우선적 배제의 메커니즘에 의해 단백질을 안정화시키는 것으로 밝혀진 아미노산 글리신, 프롤

린, 세린, 아르기닌 및 알라닌 중 하나 이상을 포함하는 제형이 제공된다. 글리신은 또한 동결건조된 제형에서 일반적으로 사용되는 증량제이다. 아르기닌은 응집을 억제하는 효과적인 작용제인 것으로 나타났으며 액체 및 동결건조된 제형 둘 모두에 사용되었다. 일부 구체예에서, 아미노산 농도는 0.1, 1, 10, 20, 30, 40, 50, 80, 100, 120, 150, 200, 300 및 500mM 사이이다.

[0222] ***금속 이온***

[0223] 일반적으로, 전이 금속 이온은 단백질에서 물리적 및 화학적 분해 반응을 촉진할 수 있기 때문에 단백질 제형에서는 바람직하지 않다. 그러나, 특정 금속 이온은 단백질의 보조-인자인 경우 제형 및 배위 착물을 형성하는 단백질의 현탁 제형(예를 들어, 인슐린의 아연 현탁액)에 포함된다. 더욱이, 마그네슘 이온(10-120mM)은 아스파르트산의 이소아스파르트산으로의 이성질체화를 억제하는 것으로 제안되었다.

[0224] 금속 이온이 단백질에서 안정성을 부여하거나 활성을 증가시키는 두 가지 예는 인간 데옥시리보뉴클레아제(rhDNase, Pulmozyme®)와 인자 VIII이다. rhDNase의 경우, Ca+2 이온(최대 100mM)은 특정 결합 부위를 통해 효소의 안정성을 증가시켰다. 실제로, EGTA를 갖는 용액으로부터 칼슘 이온의 제거는 탈아미드화 및 응집에서의 증가를 야기했다. 그러나, 이 효과는 Ca+2 이온에서만 관찰되었고; 다른 2가 양이온 Mg+2, Mn+2 및 Zn+2는 rhDNase를 불안정화시키는 것으로 관찰되었다. 유사한 효과가 인자 VIII에서도 관찰되었다. Ca+2 및 Sr+2 이온은 단백질을 안정화시킨 반면 Mg+2, Mn+2 및 Zn+2, Cu+2 및 Fe+2와 같은 다른 이온은 효소를 불안정화시켰다(Fatouros, A., et al., Int. J. Pharm., 155, 121-131(1997). 인자 VIII로의 별도의 연구에서, Al+3 이온의 존재에서 응집 속도에서의 상당한 증가가 관찰되었다(Derrick TS, et al., J. Pharm. Sci., 93(10): 2549-57 (2004)). 완충액 염 같은 다른 부형제는 종종 Al+3 이온으로 오염되고 이는 제형화된 제품에 적절한 품질의 부형제를 사용해야 한다는 것을 예시한다.

[0225] ***보존제***

[0226] 동일한 용기에서 1회 초과 추출을 포함하는 다용도 비경구 제형을 개발할 때는 보존제가 필요하다. 이들의 주요 기능은 미생물 성장을 억제하고 의약품의 저장-수명 또는 사용 전반에 걸쳐 제품 무균성을 보장하는 것이다. 일반적으로 사용되는 보존제는 제한 없이, 벤질 알코올, 페놀 및 m-크레졸을 포함한다. 보존제는 오랫동안 사용되어 왔지만 보존제를 포함하는 단백질 제형의 개발은 어려울 수 있다. 보존제는 거의 항상 단백질에 대한 불안정화 효과(응집)를 갖고 있고, 이는 다중-용량 단백질 제형에서 그 사용을 제한하는 주요 요인이 되었다(Roy S, et al., J Pharm Sci., 94(2): 382-96(2005)). 현재까지 대부분의 단백질 약물은 일회용으로만 제형화되었다. 다중-용량 제형이 가능한 경우, 환자의 편의성과 증가된 상품성을 가능하게 하는 장점이 추가된다. 보존된 제형의 개발이 보다 편리한 다중-사용 주사 펜의 상용화를 초래한 인간 성장 호르몬(hGH)의 경우, 예를 들어 Norditropin®(액상, Novo Nordisk), Nutropin AQ®(액상, Genentech) 및 Genotropin(동결건조된-이중 챔버 카트리지, Pharmacia & Upjohn)은 페놀을 함유하는 반면 Somatrope®(Eli Lilly)는 m-크레졸로 제형화된다.

[0227] 보존제 제형을 개발하는 동안 여러 양태를 고려해야 한다. 의약품에서의 유효 보존제 농도는 최적화되어야 한다. 이를 위해서는 단백질 안정성을 손상시키지 않으면서 항균 효과를 부여하는 농도 범위를 갖는 복용량 형태에서 제공된 보존제를 테스트해야 한다. 예를 들어, 시차 주사 열량계(DSC)를 사용하여 인터루킨-1 수용체(유형 I)에 대한 액상 제형의 개발에서 3가지 보존제를 성공적으로 스크리닝했다. 보존제는 시판 제품에 일반적으로 사용되는 농도에서 안정성에 대한 그 영향을 기준으로 순위가 매겨졌다.

[0228] 보존제를 함유한 액상 제형의 개발은 동결건조된 제형보다 더 어렵다. 동결-건조된 제품은 보존제 없이 동결건조되고 사용 시 희석제를 함유하는 보존제로 재구성될 수 있다. 이는 보존제가 단백질과 접촉하는 시간을 단축하여 연관된 안정성 위험을 유의하게 최소화한다. 액상 제형의 경우 보존제 효과와 안정성은 전체 제품 저장-수명(~18-24개월)에 걸쳐 유지되어야 한다. 주목해야 할 중요한 점은 활성 약물과 모든 부형제 성분을 함유하는 최종 제형에서 보존제 효과가 입증되어야 한다는 것이다.

[0229] 일부 보존제는 주사 부위 반응을 일으킬 수 있는데, 이는 보존제를 선택할 때 고려해야 할 또 다른 요소이다. Norditropin에서 보존제 및 완충액의 평가에 초점을 맞춘 임상 시험에서, 통증 인식은 m-크레졸을 함유한 제형에 비해 페놀 및 벤질 알코올을 함유한 제형에서 더 낮은 것으로 관찰되었다(Kappelgaard A. M., Horm Res. 62 Suppl 3:98-103(2004)). 흥미롭게도, 일반적으로 사용되는 보존제 중에서 벤질 알코올은 마취 특성을 가지고 있다(Minogue S C, and Sun DA., Anesth Analg., 100(3): 683-6 (2005)). 다양한 양태에서 보존제의 사용은 임의의 부작용을 능가하는 이점을 제공한다.

[0230] ***제조 방법***

[0231] 본 발명은 약학적 제형의 제조 방법을 추가로 고려한다. 본 방법은 다음 단계 중 하나 이상을 추가로 포함한다: 동결건조 이전에 상기 혼합물에 본원에 기술된 안정화제를 첨가하는 단계, 동결건조 이전에 상기 혼합물에, 그 각각이 본원에 기재된 바와 같은, 증량제, 삼투압 조절제 및 계면활성제로부터 선택된 적어도 하나의 작용제를 첨가하는 단계.

[0232] 동결건조된 물질에 대한 표준 재구성 실행은, 비경구 투여를 위한 의약품의 생산에는 항균제의 희석 용액이 때때로 사용되지만, 주사용 정제수 또는 멸균수(WFI)의 부피를 다시 추가하는 것이다(전형적으로 동결건조 동안 제거된 부피와 동등함)[Chen, Drug Development and Industrial Pharmacy, 18:1311-1354 (1992)].

[0233] 동결건조된 물질은 수성 용액으로 재구성될 수 있다. 다양한 수성 담체, 예를 들어 주사용 멸균수, 다중 용량 사용을 위한 보존제를 갖는 물, 또는 적절한 양의 계면활성제를 갖는 물(예를 들어 수성 현탁액의 제조에 적합한 부형제와 혼합된 활성 화합물을 함유하는 수성 현탁액). 다양한 양태에서, 이러한 부형제는 현탁화제, 예를 들어 제한 없이 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스, 알긴산나트륨, 폴리비닐피롤리돈, 트라가칸트 검 및 아카시아 검이고; 분산제 또는 습윤제는 자연적으로-발생하는 포스파티드, 예를 들어 제한 없이, 레시틴 또는 알킬렌 옥사이드와 지방산의 축합 생성물, 예를 들어 제한 없이, 폴리옥시에틸렌 스테아레이트, 또는 에틸렌 옥사이드와 장쇄 지방족 알코올의 축합 생성물, 예를 들어 제한 없이, 헵타데카에틸-에네옥시세탄올, 또는 에틸렌 옥사이드와 지방산 및 헥시톨로부터 유도된 부분 에스테르의 축합 생성물 예컨대 폴리옥시에틸렌 소르비톨 모노올레에이트, 또는 에틸렌 옥사이드와 지방산 및 헥시톨 무수물로부터 유도된 부분 에스테르의 축합 생성물, 예를 들어 제한 없이, 폴리에틸렌 소르비탄 모노올레에이트이다. 다양한 양태에서, 수성 현탁액은 또한 하나 이상의 보존제, 예를 들어 제한 없이 에틸, 또는 n-프로필, p-하이드록시벤조에이트를 함유한다.

[0234] 발명의 약학적 조성물에는 경구, 비강, 국소(협측 및 설하 포함), 또는 비경구(피하, 근육내, 정맥내 및 피내 포함) 투여에 적합한 것들이 포함된다. 제형은 단위 복용량 형태, 예를 들어 단일 용량(예를 들어 24시간 동안의 용량)을 함유하는 일회용 백, 정제 및 지속 방출 캡슐, 및 리포솜으로 편리하게 제공될 수 있으며, 약학 분야에서 잘 알려진 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa.(17판 1985)를 참조한다. 일부 구체예에서, 조성물은 정맥내로 투여된다.

[0235] 이러한 제조 방법에는 하나 이상의 보조 구성분을 구성하는 담체와 같은 구성분을 투여할 분자와 회합시키는 단계가 포함된다. 일반적으로, 조성물은 활성 구성분을 액체 담체, 리포솜 또는 미분된 고체 담체 또는 둘 모두와 균일하고 긴밀하게 회합시킨 다음, 필요한 경우 제품을 성형함에 의해 제조된다.

[0236] 경구 투여에 적합한 본 발명의 조성물은 각각 사전결정된 양의 활성 구성분을 함유하는 캡슐, 카세 또는 정제와 같은 개별 단위로; 분말 또는 과립으로; 수성 액체 또는 비-수성 액체에서의 용액 또는 현탁액으로; 또는 수중유 액체 에멀젼 또는 유중수 액체 에멀젼으로, 또는 리포솜에 포장되어, 그리고 볼루스 등으로 제공될 수 있다.

[0237] 비경구 투여에 적합한 조성물에는 항산화제, 완충액, 정균제 및 제형을 의도된 수령체의 혈액과 등장성으로 만드는 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비-수성 멸균 주사 용액; 및 현탁화제 및 증점제를 포함할 수 있는 수성 및 비-수성 멸균 현탁액을 포함한다. 제형은 단위-용량 또는 다중-용량 용기, 예를 들어 밀봉된 앰플 및 바이알로 제공될 수 있고, 사용 직전에 단지 멸균 액체 담체, 예를 들어, 주사용수의 첨가만을 요하는 냉동 건조된(동결건조된) 상태로 저장될 수 있다. 즉석 주사 용액 및 현탁액은 멸균 분말, 과립 및 정제로 제조될 수 있다.

[0238] 일부 구체예에서, 본원에 개시된 방법은 그러한 치료가 필요한 유아에게 계면활성제, 예를 들어 0.005% 폴리소르베이트 20 또는 폴리소르베이트 80 및 항산화제, 예를 들어 티오황산나트륨과 메티오닌의 존재에서 IGF 결합 단백질(예컨대 IGFBP-3)과 복합체화된 IGF-I의 비경구 투여에 대해 제공한다. 비경구 투여에는 정맥내(IV), 근육내(IM), 피하(SC), 복강내(IP), 비강내 및 흡입 경로가 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 일부 구체예에서, IGF-I/IGFBP-3 조성물은 정맥내로 투여된다. IV, IM, SC 및 IP 투여는 볼루스 또는 주입에 의해 이루어질 수 있고, 또한 펌프, 서방성 제형 및 기계적 디바이스를 포함하지만 이에 제한되지 않는 서방성 이식형 디바이스에 의해 이루어질 수도 있다. 제형, 투여 경로 및 방법, 복용량은 치료할 장애와 환자의 병력에 따라 달라질 것이다. 따라서, 일부 구체예에서, 본원에 개시된 방법은 그러한 치료가 필요한 유아에게 계면활성제, 예를 들어 0.005% 폴리소르베이트 20 또는 폴리소르베이트 80의 존재에서 IGF 결합 단백질(예컨대 IGFBP-3)과 복합체화된 IGF-I의 정맥내 투여에 대해 제공한다. 일부 구체예에서, 본원에 개시된 방법은 그러한 치료가 필요한 유아에게 계면활성제, 예를 들어 0.005% 폴리소르베이트 20 또는 폴리소르베이트 80, 및 항산화제, 예를 들어 메티오닌 또는 티오황산나트륨의 존재에서 IGF 결합 단백질 3과 복합체화된 IGF-I의 피하 투여에 대해 제공

한다.

[0239] 일부 구체예에서, rIGF-1/IGFBP-3을 포함하는 조성물은 약 10 마이크로그램/mL - 100 마이크로그램/mL 사이의 농도로 된다. 예를 들어, 일부 구체예에서, rIGF-1/IGFBP-3을 포함하는 조성물은 약 45 - 55 마이크로그램/mL 사이의 농도로 된다. 일부 구체예에서, rIGF-1/IGFBP-3을 포함하는 조성물은 약 50 마이크로그램/mL의 농도로 된다. 일부 구체예에서, 약 10 - 100 마이크로그램/mL의 농도에서 rIGF-1/IGFBP-3을 포함하는 조성물은 정맥내 투여에 적합하다. 일부 구체예에서, 약 45 - 55 마이크로그램/mL의 농도에서 rIGF-1/IGFBP-3을 포함하는 조성물은 정맥내 투여에 적합하다. 일부 구체예에서, 약 50 마이크로그램/mL의 농도에서 rIGF-1/IGFBP-3을 포함하는 조성물은 정맥내 투여에 적합하다.

[0240] 일부 구체예에서, rIGF-1/IGFBP-3을 포함하는 조성물은 약 1000 마이크로그램/mL - 5000 마이크로그램/mL 사이의 농도로 된다. 예를 들어, 일부 구체예에서, rIGF-1/IGFBP-3을 포함하는 조성물은 2000 마이크로그램/mL - 3000 마이크로그램/mL 사이의 농도로 된다. 일부 구체예에서, rIGF-1/IGFBP-3을 포함하는 조성물은 약 2500 마이크로그램/mL의 농도로 된다. 일부 구체예에서, 약 1000 - 5000 마이크로그램/mL 사이의 농도에서 rIGF-1/IGFBP-3을 포함하는 조성물은 정맥내 투여에 적합하다. 일부 구체예에서, 약 2000 마이크로그램/mL - 3000 마이크로그램/mL 사이의 농도에서 rIGF-1/IGFBP-3을 포함하는 조성물은 정맥내 투여에 적합하다. 일부 구체예에서, 약 2500 마이크로그램/mL의 농도에서 rIGF-1/IGFBP-3을 포함하는 조성물은 정맥내 투여에 적합하다.

[0241] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 다양한 용량으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 적합한 복용량은 약 100 내지 1000 마이크로그램/kg/24시간 범위일 수 있다. 일부 구체예에서, 적합한 복용량은 약 100 마이크로그램/kg/24시간, 150 마이크로그램/kg/24시간, 200 마이크로그램/kg/24시간, 250 마이크로그램/kg/24시간, 300 마이크로그램/kg/24시간, 350 마이크로그램/kg/24시간, 400 마이크로그램/kg/24시간, 450 마이크로그램/kg/24시간, 500 마이크로그램/kg/24시간, 550 마이크로그램/kg/24시간, 600 마이크로그램/kg/24시간, 650 마이크로그램/kg/24시간, 700 마이크로그램/kg/24시간, 750 마이크로그램/kg/24시간, 800 마이크로그램/kg/24시간, 850 마이크로그램/kg/24시간, 900 마이크로그램/kg/24시간, 950 마이크로그램/kg/24시간 또는 1000 마이크로그램/kg/24시간 이상일 수 있다. 일부 구체예에서, 적합한 복용량은 약 250 마이크로그램/kg/24시간이다. 일부 구체예에서, 적합한 복용량은 약 400 마이크로그램/kg/24시간이다. 일부 구체예에서, 적합한 복용량은 약 750 마이크로그램/kg/24시간이다. 일부 구체예에서, 적합한 복용량은 약 1000 마이크로그램/kg/24시간이다. 일부 구체예에서, 발명에 따른 약학적 조성물은 출생시부터 약 23 내지 34주의 월경후 연령(PMA), 약 28 내지 32주의 PMA, 약 29주의 PMA 플러스 6일까지 투여된다.

[0242] 비경구 또는 경구 투여의 경우, 복합체의 조성물은 액체, 현탁액 등과 같은 반고체 또는 액체 제제일 수 있다. 생리학적으로 적합한 담체는 이용된 복용량 및 농도에서 수령체에게 비-독성이고 제형의 다른 구성분과 양립할 수 있는 것들이다. 예를 들어, 제형은 바람직하게는 산화제 및 폴리펩티드에 해로운 것으로 알려진 다른 화합물을 포함하지 않는다. 따라서, 생리학적으로 적합한 담체에는 일반 식염수, 혈청 알부민, 5% 덱스트로스, 혈장 제제 및 기타 단백질-함유 용액이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 임의적으로 담체에는 세제 또는 계면활성제도 포함될 수 있다.

[0243] 일부 구체예에서, 건조 동결건조된 분말이 본원에 제공된다. 일부 구체예에서, 조성물은 멸균 약학 등급 물, 식염수 또는 완충된 물에서 재구성될 수 있다.

[0244] 일부 구체예에서, 본원에 기술된 방법을 수행하기 위한 키트가 제공된다. 특정 구체예에서, 키트는 rIGF-1, rIGFBP-3, 폴리소르베이트 20 또는 폴리소르베이트 80과 같은 폴리소르베이트 계면활성제 및 메티오닌 또는 티오황산나트륨과 같은 항산화제를 포함하는 조성물을 포함한다. 일부 구체예에서, 키트는 유리 또는 다른 적합한 재료로 된 바이알에 본원에 기술된 조성물을 함유한다.

[0245] 일부 구체예에서, 포장 재료 및 포장 재료 내에 함유된 약학적 작용제를 포함하는 제조 물품이 또한 제공된다. 포장 재료는 조산과 연관된 합병증을 치료 및/또는 예방하기 위해, 약제가 유효한 용량으로 충분한 기간 동안 투여될 수 있음을 나타내는 라벨을 포함한다. 약학적 작용제는 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 IGF-I, 이의 효능제 또는 유사체를 포함한다.

[0246] 실시예의 값 및/또는 특징은 청구범위의 보정을 위한 기초로 사용될 수 있으며, 여기서 값 및/또는 특징은 실시예에 사용된 다른 요소를 참조하지 않고 이용되며 즉 값은 별도로 이용될 수 있다.

[0247] 본원에서 "조성물"을 언급하는 구체예는 달리 명시되지 않는 한 방법 및 용도와 같은 본원에서 다른 유형의 개

시내용에 동일하게 적용되며 그 반대도 마찬가지이다.

[0248] 본원에 이용된 "이다"는 포함하는 것을 의미한다.

[0249] 본 명세서의 맥락에서 "포함하는"은 "포괄하는"으로 해석되어야 한다.

[0250] 특정 특징/요소를 포함하는 발명의 구체예는 또한 관련 요소/특징으로 "구성되는" 또는 "본질적으로 구성되는" 대안적인 구체예로 확장되도록 의도된다.

[0251] 기술적으로 적절한 경우, 발명의 구체예가 조합될 수 있다.

[0252] 특허 및 출원과 같은 기술적 참조는 본원에 참고로 포함되어 있다.

[0253] 본원에 구체적이고 명시적으로 언급된 임의의 구체예는 단독으로 또는 하나 이상의 추가 구체예와 조합하여 면책조항의 기초를 형성할 수 있다.

[0254] 배경 섹션은 보정의 기초로 사용될 수 있는 기술적으로 관련된 세부 사항을 함유한다.

[0255] 실시예에서의 개별 수치 값은 일반적으로 발명에 대한 양태 및 구체예와 관련되므로 청구범위에 대한 보정을 위한 기초로 사용될 수 있다.

[0256] 발명은 발명의 예시가 되도록 의도된 다음 실시예를 추가로 특징으로 할 것이다.

## *도면의 간단한 설명*

[0257] 도면은 단지 예시 목적을 위한 것이며; 제한을 위한 것이 아니다.

**도 1**은 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC)를 사용하여 측정한 산화된 rhIGF-1의 양을 퍼센트 면적으로 나타낸 그래프이다.

**도 2**는 RP-HPLC를 사용하여 측정한 rhIGFBP-3의 양을 퍼센트 면적으로 나타낸 그래프이다.

**도 3**은 RP-HPLC를 사용하여 측정한 rhIGF-1의 양을 퍼센트 면적으로 나타낸 그래프이다.

**도 4a**는 항산화제 없음, 0.5mM 또는 5mM 메티오닌, 또는 0.5mM 또는 5mM 티오황산나트륨의 존재에서 SEC-HPLC 평가에 의해 3개월 저장 후 0.15mg/mL 단백질의 제형에서 산화된 rhIGF-1의 변화를 보여주는 그래프이다. 도 4b는 항산화제 없음, 0.5mM 또는 5mM 메티오닌, 또는 0.5mM 또는 5mM 티오황산나트륨의 존재에서 SEC-HPLC 평가에 의해 3개월 저장 후 0.05mg/mL 단백질의 제형에서 산화된 rhIGF-1의 변화를 보여주는 그래프이다.

**도 5a**는 항산화제 없음, 0.5mM 또는 5mM 메티오닌, 또는 0.5mM 또는 5mM 티오황산나트륨의 존재에서 SEC-HPLC 평가에 의해 3개월 저장 후 0.15mg/mL 단백질의 제형에서 rhIGF-1의 양에서의 변화를 보여주는 그래프이다. **도 5b**는 항산화제 없음, 0.5mM 또는 5mM 메티오닌, 또는 0.5mM 또는 5mM 티오황산나트륨의 존재에서 SEC-HPLC 평가에 의해 3개월 저장 후 0.05mg/mL 단백질의 제형에서 rhIGF-1의 양에서의 변화를 보여주는 그래프이다.

**도 6a**는 항산화제 없음, 0.5mM 또는 5mM 메티오닌, 또는 0.5mM 또는 5mM 티오황산나트륨의 존재에서 SEC-HPLC 평가에 의해 3개월 저장 후 0.15mg/mL 단백질의 제형에서 rhIGF-BP3의 양에서의 변화를 보여주는 그래프이다.

**도 6b**는 항산화제 없음, 0.5mM 또는 5mM 메티오닌, 또는 0.5mM 또는 5mM 티오황산나트륨의 존재에서 SEC-HPLC 평가에 의해 3개월 저장 후 0.05mg/mL 단백질의 제형에서 rhIGF-BP3의 양에서의 변화를 보여주는 그래프이다.

**도 7a**는 2-8℃에서 항산화제 없음, 메티오닌 또는 티오황산나트륨의 존재에서 3개월 저장 후 150μg/mL의 IGF-1/IGFBP-3 단백질의 안정성을 보여주는 SDS-PAGE 겔이다.

**도 7b**는 2-8℃에서 항산화제 없음, 메티오닌 또는 티오황산나트륨의 존재에서 3개월 저장 후 50μg/mL의 IGF-1/IGFBP-3 단백질의 안정성을 보여주는 SDS-PAGE 겔이다.

**도 7c**는 2-8℃에서 항산화제 없음, 메티오닌 또는 티오황산나트륨의 존재에서 3개월 저장 후 150μg/mL의 IGF-1/IGFBP-3 단백질의 안정성을 보여주는 SDS-PAGE 겔이다.

**도 7d**는 2-8℃에서 항산화제 없음, 메티오닌 또는 티오황산나트륨의 존재에서 3개월 저장 후 50μg/mL의 IGF-1/IGFBP-3 단백질의 안정성을 보여주는 SDS-PAGE 겔이다.

**도 8a**는 사전-결정된 설정점에 도달한 동결건조 실행의 온도 프로파일을 보여준다.

**도 8b**는 동결건조 실행 동안의 압력 프로파일을 보여준다. 피라니 압력 프로파일은 정전용량 압력계로 측정했을 때 피라니 압력이 설정점 100mTorr에 도달했을 때 1차 건조 34시간 후에 승화가 종료되었음을 보여주었다. 2차 건조는 물의 추가 탈리를 야기하였고 2차 건조 동안 피라니 압력이 다시 설정점에 도달했다.

**도 9a**는 동결건조 실행으로부터의 의약품 바이알의 기준선 상태를 보여준다. **도 9b**는 60℃에서 2주 저장 후의 바이알을 보여준다. **도 9c**는 60℃에서 4주 저장 후의 바이알을 보여준다.

**도 10a**는 액상 제형과 비교하여 2주 및 4주 저장 후 기준선에서 SE-UPLC에 의한 rhIGF-1/rhIGFBP-3 단백질 복합체의 양을 보여준다.

**도 10b**는 액체 제형과 비교하여 2주 및 4주 저장 후 기준선에서 SE-UPLC에 의해 측정된 고분자량 종의 양을 보여준다.

**도 11a**는 액체 제형과 비교하여 2주 저장 후, 4주 저장 후 기준선에서 SE-UPLC에 의해 측정된 rhIGFBP-3의 양을 보여준다.

**도 11b**는 액체 제형과 비교하여 2주 저장 후, 4주 저장 후 기준선에서 SE-UPLC에 의해 측정된 rIGF-1의 양을 보여준다.

**도 11c**는 액체 제형과 비교하여 2주 저장 후, 4주 저장 후 기준선에서 SE-UPLC에 의해 측정된 산화된 rIGF-1의 양을 보여준다.

**도 12a**는 기준선에서의 대표적인 동결건조 실행을 보여준다.

**도 12b**는 60℃에서 4주 저장 후의 대표적인 제형을 보여준다.

**도 12c**는 60℃에서 4주 저장 후의 대표적인 제형을 보여준다.

**도 13a**는 기준선에서의 대표적인 동결건조 실행을 보여준다.

**도 13b**는 60℃에서 4주 저장 후의 대표적인 제형을 보여준다.

**도 13c**는 60℃에서 4주 저장 후의 대표적인 제형을 보여준다.

**도 13d**는 60℃에서 4주 저장 후의 대표적인 제형을 보여준다.

**도 14a**는 기준선에서의 대표적인 동결건조된 제형의 SDS PAGE 겔을 보여준다.

**도 14b**는 40℃에서 4주 저장 후 대표적인 동결건조된 제형의 SDS PAGE 겔을 보여준다.

**도 15a**는 예시적인 동결건조 실행의 온도 프로파일을 보여준다.

**도 15b**는 예시적인 동결건조 실행의 압력 프로파일을 보여준다.

**도 16a**는 예시적인 동결건조 실행으로부터의 rhIGF-1/rhIGFBP-3 단백질 복합체 퍼센트의 양의 그래프를 보여준다.

**도 16b**는 예시적인 동결건조 실행으로부터 고분자량 종의 양의 그래프를 보여준다.

**도 17a**는 액체 제형과 비교하여 기준선, 2주 저장 후, 4주 저장 후 RP-UPLC에 의해 측정된 rhIGFBP-3의 양의 그래프를 보여준다.

**도 17b**는 액체 제형과 비교하여 기준선, 2주 저장 후, 4주 저장 후 RP-UPLC에 의해 측정된 rhIGF-1의 양의 그래프를 보여준다.

**도 17c**는 액체 제형과 비교하여 기준선, 2주 저장 후, 4주 저장 후 RP-UPLC에 의해 측정된 산화된 rhIGF-1의 양의 그래프를 보여준다.

**도 18a**는 기준선에서의 대표적인 동결건조된 제형의 그래프를 보여준다.

**도 18b**는 40℃에서 4주 저장 후의 대표적인 제형의 그래프를 보여준다.

**도 18c**는 40℃에서 4주 저장 후의 대표적인 제형의 그래프를 보여준다.

**도 18d**는 40℃에서 4주 저장 후의 대표적인 제형의 그래프를 보여준다.

**도 18e**는 40℃에서 4주 저장 후의 대표적인 제형의 그래프를 보여준다.

**도 18f**는 실온에서 48시간 액체 저장 후의 대표적인 제형의 그래프를 보여준다.

**도 19a**는 기준선에서의 대표적인 제형의 그래프를 보여준다.

**도 19b**는 40℃에서 4주 저장 후의 대표적인 제형의 그래프를 보여준다.

**도 19c**는 실온에서 48시간 액체 저장 후의 대표적인 제형의 그래프를 보여준다.

**도 20a**는 기준선에서의 대표적인 동결건조된 단백질 제형의 SDS PAGE 겔을 보여준다.

**도 20b**는 40℃에서 4주 저장 후의 대표적인 동결건조된 단백질 제형의 SDS PAGE 겔을 보여준다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0258] **실시예**

[0259] 본원에 기술된 특정 화합물, 조성물 및 방법은 특정 구체예에 따라 구체적으로 기술되었지만, 다음 실시예는 단지 발명의 화합물을 예시하기 위한 역할을 하고 이를 제한하려는 의도는 아니다.

[0260] **실시예 1.**

[0261] **IGF-1/IGFBP-3 액체 제형에 항산화제의 첨가 후 RP-UPLC에 의한 산화된 rIGF-1 측정**

[0262] 본 실시예는 항산화제의 첨가가 있는 및 없는 인슐린 유사 성장 인자-1/인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질-3(rhIGF-1/rhIGFBP-3) 복합체를 포함하는 제형에서 산화된 종의 양을 예시한다.

[0263] 본 실시예에서, L-메티오닌과 티오황산나트륨이 5mM 및 50mM 농도에서 예시적인 항산화제로 사용된다. 메카세르민 린파베이트(IGF-1/rhIGFBP-3)는 0.15mg/mL 및 0.50mg/mL의 단백질 농도에서 사용된다. 안정성은 2-8℃ 및 25℃에서 3개월 저장 후에 측정되었다. 산화된 종(ox rhIGF-1, **도 1**), rhIGF-1(**도 2**) 및 rhIGFBP-3(**도 3**) 퍼센트는 2-8℃(예를 들어, 5℃) 및 25℃에서 3개월 후 RP-UPLC에 의해 측정되었다.

[0264] **표 1. RP-UPLC에 의해 3개월 후 Ox rhIGF-1(% 면적) 측정**

| RP-UPLC | 기준선 | 3 mo @ 2-8 °C | 3 mo @ 25 °C | % 증가 25 °C |
|---|---|---|---|---|
| **0.15 mg/mL + No AntiOx** | **0.57** | **0.72** | **1.21** | **112.3%** |
| 0.15 mg/mL + 0.5 mM MET | 0.53 | 0.53 | 0.53 | 0.0% |
| 0.15 mg/mL + 5 mM MET | 0.53 | 0.52 | 0.51 | -3.8% |
| 0.15mg/mL + 0.5 mM Na-Thio | 0.54 | 0.55 | 0.56 | 3.7% |
| 0.15mg/mL + 5 mM Na-Thio | 0.51 | 0.53 | 0.53 | -7.0% |
| **0.05 mg/mL + No AntiOx** | **0.55** | **0.77** | **1.76** | **220.0%** |
| 0.05 mg/mL + 0.5 mM MET | 0.51 | 0.56 | 0.54 | 5.9% |
| 0.05 mg/mL + 5 mM MET | 0.48 | 0.52 | 0.50 | 4.2% |
| 0.05mg/mL + 0.5 mM Na-Thio | 0.55 | 0.56 | 0.63 | 10.5% |
| 0.05mg/mL + 5 mM Na-Thio | 0.48 | 0.55 | 0.58 | 20.8% |

[0265]

[0266] 결과는 더 높은 농도(0.15mg/mL)의 단백질이 산화적 분해에 덜 민감하고 메티오닌과 티오황산나트륨 둘 모두가 산화된 rhIGF-1 종에서의 증가를 낮추는 모든 농도에서 효과적이었다는 것을 보여주었다. 더 낮은 단백질 농도에서, L-메티오닌은 항산화제로서 더 높은 효능을 나타냈다.

[0267] 표 2. RP-UPLC에 의한 3개월 후 rhIGF-1(% 면적) 측정

| RP-UPLC | 기준선 | 3 mo @ 2-8 °C | 3 mo @ 25 °C |
|---|---|---|---|
| **0.15 mg/mL + 항산화제 없음** | **21.00** | **20.51** | **19.66** |
| 0.15 mg/mL + 0.5 mM MET | 21.27 | 20.82 | 20.52 |
| 0.15 mg/mL + 5 mM MET | 21.10 | 20.84 | 20.48 |
| 0.15 mg/mL + 0.5 mM Na-thio | 21.06 | 20.83 | 20.44 |
| 0.15 mg/mL + 5 mM Na-thio | 21.02 | 20.79 | 20.66 |
| **0.05 mg/mL + 항산화제 없음** | **21.24** | **20.73** | **19.06** |
| 0.05 mg/mL + 0.5 mM MET | 21.41 | 20.94 | 20.63 |
| 0.05 mg/mL + 5 mM MET | 21.57 | 21.02 | 20.78 |
| 0.05 mg/mL + 0.5 mM Na-thio | 21.36 | 21.00 | 20.65 |
| 0.05 mg/mL + 5 mM Na-thio | 21.57 | 21.02 | 20.31 |

[0268]

[0269] 표 3. RP-UPLC에 의한 3개월 후 rhIGF-BP3(% 면적) 측정

| RP-UPLC | 기준선 | 3 mo @ 2-8 °C | 3 mo @ 25 °C |
|---|---|---|---|
| **0.15 mg/mL + 항산화제 없음** | **77.94** | **78.07** | **75.87** |
| 0.15 mg/mL + 0.5 mM MET | 77.86 | 78.05 | 76.43 |
| 0.15 mg/mL + 5 mM MET | 77.93 | 77.98 | 76.4 |
| 0.15 mg/mL + 0.5 mM Na-thio | 78.00 | 78.01 | 76.68 |
| 0.15 mg/mL + 5 mM Na-thio | 78.10 | 78.16 | 76.97 |
| **0.05 mg/mL + 항산화제 없음** | **77.90** | **77.85** | **76.04** |
| 0.05 mg/mL + 0.5 mM MET | 77.62 | 77.88 | 76.69 |
| 0.05 mg/mL + 5 mM MET | 77.69 | 77.8 | 76.61 |
| 0.05 mg/mL + 0.5 mM Na-thio | 77.60 | 77.9 | 77.15 |
| 0.05 mg/mL + 5 mM Na-thio | 77.94 | 77.96 | 77.26 |

[0270]

[0271] 실시예 2.

[0272] SEC-HPLC에 의한 IGF-1/IGFBP-3 제형에 항산화제의 첨가 후 산화된 rIGF-1 측정

[0273] 본 실시예는 항산화제의 첨가가 있는 및 없는 인슐린 유사 성장 인자-1/인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질-3(rhIGF-1/rhIGFBP-3) 복합체를 포함하는 제형에서 산화된 종의 양을 예시한다.

[0274] 본 실시예에서, L-메티오닌과 티오황산나트륨이 5mM 및 50mM 농도에서 예시적인 항산화제로 사용된다. 메카세르민 린파베이트(IGF-1/rhIGFBP-3)는 0.15mg/mL 및 0.50mg/mL의 단백질 농도에서 사용된다. 안정성은 2-8℃ 및 25℃에서 3개월 저장 후에 측정되었다. 산화된 종(ox rhIGF-1), rhIGF-1 및 rhIGFBP-3 퍼센트는 기준선과 2-8℃(예를 들어, 5℃) 및 25℃에서 3개월 후 SEC-UPLC에 의해 측정되었다. SEC 평가에 의한 기준선 및 3개월 후에 산화된 rhIGF-1에서의 변화는 0.15mg/mL(도 4a) 및 0.05mg/mL(도 4b)의 단백질 농도에서 도시되어 있다. SEC 평가에 의한 기준선 및 3개월 후에 rhIGF-1에서의 변화는 0.15mg/mL(도 5a) 및 0.05mg/mL(도 5b)의 단백질 농도에서 도시되어 있다. SEC 평가에 의한 기준선 및 3개월 후에 산화된 rhIGFBP-3에서의 변화는 0.15mg/mL(도 6a) 및 0.05mg/mL(도 6b)의 단백질 농도에서 도시되어 있다.

[0275] **표 4. SEC-HPLC에 의한 3개월 후 Ox rhIGF-1(% 면적) 측정**

| SEC-HPLC | 기준선 | 3 mo @2-8 °C | 3 mo @25°C | % 증가 25 °C |
|---|---|---|---|---|
| **0.15 mg/mL + No AntiOx** | **1.02** | **1.26** | **1.91** | **87%** |
| 0.15 mg/mL + 0.5 mM MET | 1.18 | 1.06 | 1.98 | 68% |
| 0.15 mg/mL + 5 mM MET | 1.31 | 1.03 | 2.06 | 57% |
| 0.15mg/mL + 0.5 mM Na-Thio | 0.87 | 1.13 | 1.58 | 82% |
| 0.15mg/mL + 5 mM Na-Thio | 1.08 | 0.99 | 1.63 | 51% |
| **0.05 mg/mL + No AntiOx** | **0.66** | **0.72** | **2.01** | **205.0%** |
| 0.05 mg/mL + 0.5 mM MET | 0.69 | 0.80 | 1.31 | 90% |
| 0.05 mg/mL + 5 mM MET | 0.61 | 0.43 | 1.31 | 115% |
| 0.05 mg/mL + 0.5 mM Na-Thio | 0.72 | 0.44 | 0.74 | 3% |
| 0.05 mg/mL + 5 mM Na-Thio | 0.87 | 0.51 | 0.93 | 7% |

[0276]

[0277] 결과는 제형이 0.05mg/mL에 비해 0.15mg/mL의 더 높은 단백질 농도에서 분해에 덜 민감하다는 것을 보여주었다. 결과는 또한 메티오닌과 티오황산나트륨 둘 모두가 모든 농도에서 효과적이었다는 것을 보여주었다.

[0278] 더욱이, SEC 분석에 의해, 결과는 낮은 단백질 농도에서는 티오황산나트륨이 메티오닌에 비해 항산화제로서 다소 더 효과적이다는 것을 보여주었다.

[0279] **표 5. SEC-HPLC에 의한 3개월 후 rhIGF-1(% 면적) 측정**

| SEC-HPLC | 기준선 | 3 mo @ 2-8 °C | 3 mo @ 25 °C | % 증가 25°C |
|---|---|---|---|---|
| 0.15 mg/mL + No AntiOx | 0.27 | 0.42 | 0.45 | 67% |
| 0.15 mg/mL + 0.5 mM MET | 0.32 | 0.39 | 0.45 | 41% |
| 0.15 mg/mL + 5 mM MET | 0.27 | 0.36 | 0.49 | 81% |
| 0.15mg/mL + 0.5 mM Na-Thio | 0.22 | 0.24 | 0.36 | 64% |
| 0.15mg/mL + 5 mM Na-Thio | 0.23 | 0.22 | 0.25 | 9% |
| **0.05 mg/mL + No AntiOx** | **0.22** | **0.43** | **0.37** | **68%** |
| 0.05 mg/mL + 0.5 mM MET | 0.33 | 0.52 | 0.34 | 3% |
| 0.05 mg/mL + 5 mM MET | 0.27 | 0.45 | 0.28 | 4% |
| 0.05 mg/mL + 0.5 mM Na-Thio | 0.25 | 0.14 | 0.28 | 12% |
| 0.05 mg/mL + 5 mM Na-Thio | 0.23 | 0.08 | 0.22 | -4% |

[0280]

[0281] **표 6. SEC-HPLC에 의한 3개월 후 rhIGFBP-3(% 면적) 측정**

| SEC-HPLC | 기준선 | 3 mo @ 2-8 °C | 3 mo @ 25 °C | % 감소 25 °C |
|---|---|---|---|---|
| **0.15 mg/mL + No AntiOx** | **98.76** | **98.32** | **97.64** | **1%** |
| 0.15 mg/mL + 0.5 mM MET | 98.51 | 98.55 | 97.57 | 1% |
| 0.15 mg/mL + 5 mM MET | 98.42 | 98.61 | 97.45 | 1% |
| 0.15 mg/mL + 0.5 mM Na-thio | 98.91 | 98.63 | 98.07 | 1% |
| 0.15 mg/mL + 5 mM Na-thio | 98.69 | 98.79 | 98.12 | 1% |
| **0.05 mg/mL + No AntiOx** | **99.06** | **98.86** | **97.64** | **1%** |
| 0.05 mg/mL + 0.5 mM MET | 98.98 | 98.68 | 97.57 | 1% |
| 0.05 mg/mL + 5 mM MET | 99.11 | 99.12 | 97.45 | 1% |
| 0.05 mg/mL + 5 mM Na-thio | 99.02 | 99.41 | 98.07 | 0% |
| 0.05 mg/mL + 0.5 mM Na-thio | 98.91 | 99.41 | 98.86 | 0% |

[0282]

[0283] 데이터는 L-메티오닌과 티오황산나트륨 둘 모두가 항산화제로 작용할 수 있음을 보여주었다.

[0284] SDS-PAGE에 의해, 2-8℃에서 150㎍(도 7a) 및 50㎍ 단백질 농도(도 7b) 또는 25℃에서 150㎍(도 7c) 및 50㎍(도 7d)에서 3개월 후, 유의한 단백질 분해가 관찰되지 않았다.

[0285] **실시예 3. -65℃ 미만 및 2-8℃에서 3개월 동안 저장 후 IGF-1/IGFBP-3 제형에 항산화제의 첨가 후 산화된 rIGF-1의 비교**

[0286] 본 실시예에서는 -65℃ 미만 및 2-8℃에서 3개월 동안 저장 후 IGF-1/IGFBP-3 제형에 항산화제의 첨가 후 산화

된 rIGF-1의 양을 측정한다.

[0287] **표 7. RP-UPLC에 의한 3개월 후 Ox rhIGF-1(% 면적) 측정**

[0288]

| RP-UPLC | 기준선 | 3 mo @ 2-8 °C | -65 °C 미만에서 3 mo |
|---|---|---|---|
| **0.15mg/mL + No AntiOx** | **0.57** | **0.72** | **NT** |
| 0.15mg/mL + No AntiOx (1mL/2 mL tube) | 0.57 | 0.60 | 0.54 |
| **0.05mg/mL + No AntiOx** | **0.54** | **0.56** | **NT** |
| 0.05mg/mL + No AntiOx (1mL/2 mL tube) | 0.54 | 0.64 | 0.56 |

[0289] 본 실시예에서의 데이터는 -65℃ 미만(냉동)에서 저장하는 것이 2-8℃에서 저장하는 것보다 더 바람직하다는 것을 보여주었다.

[0290] **표 8. SEC-UPLC에 의한 3개월 후 Ox rhIGF-1(% 면적) 측정**

[0291]

| SEC-UPLC | 기준선 | 3 mo at 2-8 °C | -65 °C 미만에서 3 mo |
|---|---|---|---|
| 0.15mg/mL + No AntiOx | 1.02 | 1.26 | NT |
| 0.15mg/mL + No AntiOx (1mL/2 mL tube) | 1.02 | 1.41 | 1.29 |
| **0.05mg/mL + No AntiOx** | **0.66** | **0.72** | **NT** |
| 0.05mg/mL + No AntiOx (1mL/2 mL tube) | 0.66 | 0.99 | 0.88 |

[0292] **실시예 4. 메카세르민 린파베이트(IGF-1/IGFBP-3)의 동결건조**

[0293] 본 실시예는 IGF-1/IGFBP-3의 산화 및 안정성 퍼센트에 대한 동결건조의 효과를 입증한다.

[0294] 본 실시예에서, 다양한 완충 부형제와 증량제를 사용하는 메카세르민 린파베이트 의약품 제형을 동결건조하고 물리적 특성과 분해를 평가했다.

[0295] 본 실시예에서 IGF-1/IGFBP-3 복합체의 단백질 농도는 0.15mg/mL(150μg/ml)였고 폴리소르베이트는 0.015%로 첨가되었다. 염화 히스티딘, 인산나트륨 및 시트르산나트륨 완충액와 같은 3가지 제형 완충액와 2가지 증량제인, 수크로스 및 트레할로스를 비교했다(표 9).

[0296] 결과는 히스티딘 완충액이 가장 적은 양의 고분자량(HMW) 종 형성을 초래하였다는 것을 입증했다.

[0297] **표 9. 메카세르민 린파베이트에서의 완충액 및 증량제**

[0298]

| | 완충액 | 증량제 |
|---|---|---|
| **1.** | 10 mM 시트레이트, pH 6.0 | 6% 수크로스 |
| **2.** | 10 mM 시트레이트, pH 6.0 | 6% 트레할로스 |
| **3.** | 10 mM 히스티딘, pH 6.0 | 6% 수크로스 |
| **4.** | 10 mM 히스티딘, pH 6.0 | 6% 트레할로스 |
| **5.** | 10 mM 포스페이트, pH 6.0 | 6% 수크로스 |
| **6.** | 10 mM 포스페이트, pH 6.0 | 6% 트레할로스 |

[0299] 동결건조는 1차 건조 온도 -25℃, 2차 건조 온도 25℃로 구성된 동결건조 주기 하에서 수행하였다(표 10). 실행 동안 온도 프로파일은 도 8a에 도시되어 있고 압력 프로파일은 도 8b에 도시되어 있다.

[0300] **표 10. 메카세르민 린파베이트에서의 완충액 및 증량제**

[0301]

| | 완충액 | 온도 | 램프 비율 | 압력 | 시간 |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. | 냉각 | 5 °C | 1.0 °C/min. | 대기압 | 0.5 hr |
| 2. | 냉동 | -50 °C | 0.5 °C/min. | 대기압 | 1 hr |
| 3. | 1 차 건조 | -25 °C | 0.5 °C/min. | 100 mTorr | 35 hr |
| 4. | 2 차 건조 | 25 °C | 0.5 °C/min. | 100 mTorr | 6 hr |

[0302] 동결건조 실행은 모든 바이알에 대해 균질한 백색 케이크를 초래하였다(표 11, 도 9a, 도 9b 및 도 9c). 동결건조된 바이알을 6.2mL의 일반 식염수로 재구성하고 제품 품질을 SoloVPE, pH, SE-UPLC, RP-UPLC 및 환원된 SDS-PAGE를 사용하여 단백질 농도에 의해 평가했다. 제형화된 액체 약품에 대해 기준선에서 평가된 삼투몰농도에 부가하여 동결건조된 제형에 대해 케이크 외관 및 재구성 시간을 또한 평가하였다.

[0303] **표 11. 60℃에서 2주 저장 후 케이크 외관**

| 번호 | 기준선 | 2 주, 60 °C | 4 주, 60 °C |
|---|---|---|---|
| 1 | 단단한, 백색, 40% 수축, 플러깅됨 | 용융됨 | 용융됨 |
| 2 | 단단한, 백색, 20% 수축, 풀림 | 변화없음 | 변화없음 |
| 3 | 단단한, 백색, 10% 수축, 플러깅됨 | 용융됨 | 용융됨 |
| 4 | 단단한, 백색, 10% 수축, 풀림 | 깨진 케이크 | 변화없음 |
| 5 | 단단한, 백색, 50% 수축, 플러깅됨 | 용융됨 | 용융됨 |
| 6 | 단단한, 백색, 10% 수축, 플러깅됨 | 변화없음 | 변화없음 |

[0304]

[0305] 표 11에서의 결과에서 알 수 있듯이, 60℃에서 2주 저장 후 수크로스를 함유한 케이크는 녹은 반면 트레할로스 함유 케이크는 변하지 않은 것으로 나타났다.

[0306] **표 12: 재구성 시간 및 삼투몰농도**

| 샘플 | 기준선 | | 2wk, 60°C | 4wk, 60°C |
|---|---|---|---|---|
| 번호 | 삼투몰농도 (동결건조 전) | 재구성 시간 | | |
| 1 | 212 | <15 sec | 60 sec | 90 sec |
| 2 | 198 | <15 sec | <20 sec | <20 sec |
| 3 | 199 | <15 sec | 40 sec | 30 sec |
| 4 | 183 | <15 sec | <20 sec | <20 sec |
| 5 | 205 | <15 sec | 60 sec | 60 sec |
| 6 | 190 | <15 sec | <20 sec | <20 sec |

[0307]

[0308] 수크로스 함유 케이크는 증가된 재구성 시간이 필요한 반면, 트레할로스 함유 케이크의 경우 재구성 시간은 실질적으로 변하지 않았다(표 12).

[0309] SE-UPLC는 고분자량 응집체 피크로부터 주요 피크를 분리한다(도 10a). SE-UPLC에 의한 분석은 증량제로 트레할로스의 사용이 수크로스의 사용보다 더 나은 단백질 안정성을 초래하였다는 것을 나타냈다. 60℃에서 4주 저장 후 수크로스 제형에 대한 HMW 피크 백분율은 제형 #3의 경우 7.9% 내지 제형 #5의 경우 20.2% 범위였다(도 10b). 응집에서의 증가는 트레할로스가 수크로스보다 더 우수한 동결보호제이거나, 예를 들어 케이크에 남아 있는 수분으로 인해 수크로스 함유 동결건조된 케이크가 붕괴되는 결과임을 나타낸다. 시트르산나트륨, 염화 히스티딘 및 인산나트륨 완충액에 대한 결과의 비교는 히스티딘 완충액에서 제형화된 약품이 가장 적은 양의 HMW 종 형성을 초래하였다는 것을 나타냈다.

[0310] 증량제로서 수크로스 또는 트레할로스를 사용한 메카세르민 린파베이트 제형의 동결건조는 백색의 균일한 케이크를 초래하였다. 일부 케이크 수축이 관찰되었다(트레할로스 함유 제형의 경우 ~10%-20% 및 수크로스 함유 제형의 경우 ~10-50% 시각적 수축). 60℃에서 4주 동안 열적 응력 저장을 사용하여 동결건조된 약품의 분해를 평가했다. 분해는 트레할로스를 포함하는 제형에서 가장 적었다.

[0311] 본 실시예로부터 데이터는 트레할로스가 동결건조된 제시를 위한 증량제로서 수크로스보다 더 나은 성능을 발휘했고 시트레이트 완충액와 비교할 때 히스티딘 및 포스페이트 완충액이 바람직한 완충액임을 보여주었다. 데이터는 또한 동결건조 전 액체 형태에서의 제형은 냉장된 상태에서 48시간 동안 안정한 것을 나타냈다.

[0312] **실시예 5. 메카세르민 린파베이트(IGF-1/IGFBP-3)의 동결건조**

[0313] 본 실시예는 히스티딘 완충액에서 IGF-1/IGFBP-3의 동결건조에 대한 pH의 영향을 입증한다.

[0314] 히스티딘 완충액에서 5.5, 6.0 및 6.5의 3가지 pH 값에서 메카세르민 린파베이트(IGF-1/IGFBP-3)를 비교했다(표 13). 동결건조 이전 단백질 농도는 0.15mg/mL이었고 폴리소르베이트는 0.015%로 첨가되었다. 트레할로스를 증량제로 사용했다. 전반적인 삼투몰농도를 감소시키기 위해 트레할로스의 농도를 4%로 감소시켰다. **표 5**에서의 제

형 #4는 산화 수준에 대한 메티오닌의 영향을 평가하기 위해 1mM 메티오닌을 함유했다.

[0315] **표 13. 약품 제형(단백질 150μg/mL 모든 샘플)**

| 샘플 | 완충액<br>10mM 히스티딘 | 계면활성제 | 증량제 | 메티오닌 |
|---|---|---|---|---|
| 1. | pH5.5 | 0.015% P20 | 4% 트레할로스 | -- |
| 2. | pH 6.0 | 0.015% P20 | 4% 트레할로스 | -- |
| 3. | pH 6.5 | 0.015% P20 | 4% 트레할로스 | -- |
| 4. | pH 6.0 | 0.015% P20 | 4% 트레할로스 | 1 mM |
| 5. | Ph 6.0 | 0.015% P20 | 4% 트레할로스 | 1 mM |

[0316]

[0317] 동결건조 실행은 리오스타 동결건조기를 사용하여 1차 건조 온도 -20℃ 및 2차 건조 온도 25℃로 구성된 동결건조 주기 하에서 수행하였다(표 14).

[0318] **표 14. 메카세르민 린파베이트에서의 완충액 및 증량제**

| | 완충액 | 온도 | 램프 비율 | 압력 | 시간 |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. | 냉각 | 5 °C | 1.0 °C/min. | 대기압 | 0.5 hr |
| 2. | 냉동 | -50 °C | 0.5 °C/min. | 대기압 | 1 hr |
| 3. | 1 차 건조 | -25 °C | 0.5 °C/min. | 100 mTorr | 35 hr |
| 4. | 2 차 건조 | 25 °C | 0.5 °C/min. | 100 mTorr | 6 hr |

[0319]

[0320] 동결건조된 약품 바이알을 2주 및 4주 동안 40℃, 및 2주 동안 60℃의 열적 응력 조건에 두었다. 각 제형의 한 바이알을 동결건조 없이 액체 대조군으로 실온에서 48시간 동안 유지했다. 동결건조 실행은 균질하고 견고한 백색 케이크를 초래하였고 시각적 평가에 의한 수축을 나타냈다(기준선에서 20%, 열적 응력 저장 후 20-30%). 동결건조된 바이알을 6.2mL의 일반 식염수로 재구성했다. 재구성 시간은 모든 제형에 대해 기준선에서 20초 미만이었다.

[0321] SE-UPLC 분석은 rhIGF-1과 rhIGFBP-3 복합체의 피크 면적 %는 pH 값 6.0과 6.5에서 가장 높았고, 고분자량 종은 pH 6.0, 이어서 pH 6.5에서 4주 열적 저장 후 가장 낮았다는 것을 보여주었다(도 11a). 메티오닌의 첨가는 실온에서 48시간 동안 유지된 액체 샘플에 대해 낮은 양의 고분자량 종을 보여주었다(**도 11a**).

[0322] 기준선에서의 대표적인 동결건조 실행이 **도 12a**에 도시되어 있다. 60℃에서 4주 저장 후의 2가지 대표적인 제형(**도 12b** 및 **도 12c**). **도 13a, 도 13b, 도 13c**에서 기준선에서 대표적인 동결건조 실행은 60℃에서 4주 저장 후의 대표적인 제형을 보여준다.

[0323] 기준선에서 대표적인 동결건조된 제형의 SDS PAGE 겔은 40℃에서 4주 저장 후 대표적인 동결건조된 제형의 SDS PAGE 겔(**도 14b**)과 비교하여 **도 14a**에 도시되어 있다. **도 15a**는 예시적인 동결건조 실행의 온도 프로파일을 보여준다. **도 15b**는 예시적인 동결건조 실행의 압력 프로파일을 보여준다. **도 16a**는 예시적인 동결건조 실행으로부터의 rhIGF-1/rhIGFBP-3 단백질 복합체 퍼센트의 양의 그래프를 보여준다. **도 16b**는 예시적인 동결건조 실행으로부터 고분자량 종의 양의 그래프를 보여준다.

[0324] 단백질을 함유하는 4가지 제형 모두의 RP-UPLC 데이터는 유사하였다(**도 17a**). 1mM 메티오닌을 함유한 샘플에서 산화 감소가 관찰되었다(**도 17a**). **도 17b**는 액체 제형에 비교하여 기준선, 2주 저장 후, 4주 저장 후에서 RP-UPLC에 의해 측정된 rhIGF-1의 양의 그래프를 보여준다. **도 17c**는 액체 제형과 비교하여 기준선, 2주 저장 후, 4주 저장 후에서 RP-UPLC에 의해 측정된 산화된 rhIGF-1의 양의 그래프를 보여준다. pH 5.5, 6.0 및 6.5 사이에는 유의미한 차이가 관찰되지 않았다. 도 18a는 기준선에서의 대표적인 동결건조된 제형의 그래프를 보여준다. 40℃에서 4주 저장 후 대표적인 제형의 그래프가 **도 18b, 도 18c, 도 18d** 및 **도 18e**에 나타나 있다. **도 18f**는 실온에서 액체 저장의 48시간 후 대표적인 제형의 그래프를 보여준다.

[0325] 기준선에서의 대표적인 제형의 그래프가, 40℃에서 4주 저장 후 대표적인 제형의 그래프(**도 19b**)와 비교하여 **도 19a**에 도시되어 있다. **도 19c**는 실온에서 액체 저장의 48시간 후의 대표적인 제형의 그래프를 보여준다. SDS-PAGE(Coomassie)에 의한 분석에서는 어떠한 분해도 나타나지 않았다(**도 20a** 및 **도 20b**). 측정된 pH 값은 응력 저장 후 예상된 값에서 ±0.1 단위의 범위에 있었다(표 12).

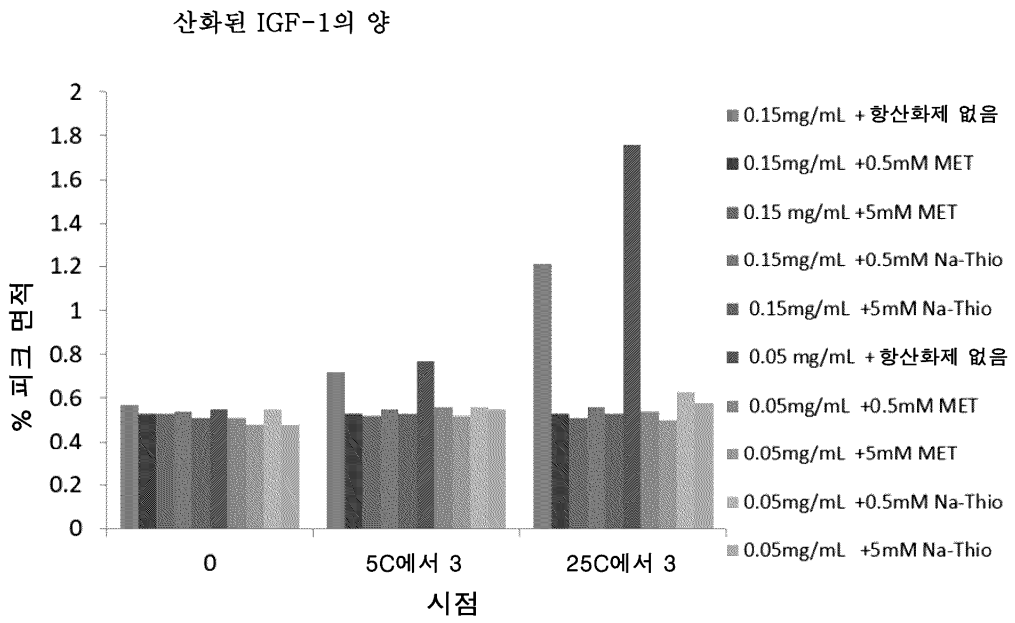
[0326] 전반적으로, 본 실시예에서의 데이터는 5.5 내지 6.5의 pH 범위가 제형에 적합하고 소량의 메티오닌(1mM)의 첨가가 동결건조된 제시 및 액체 대조군에 대해 산화에 대한 경향이 낮아졌다는 것을 보여주었다.

[0327] 본원에 기술된 특정 화합물, 조성물 및 방법은 특정 구체예에 따라 구체적으로 기술되었지만, 다음 실시예는 단지 발명의 화합물을 예시하기 위한 역할을 하고 이를 제한하려는 의도는 아니다.

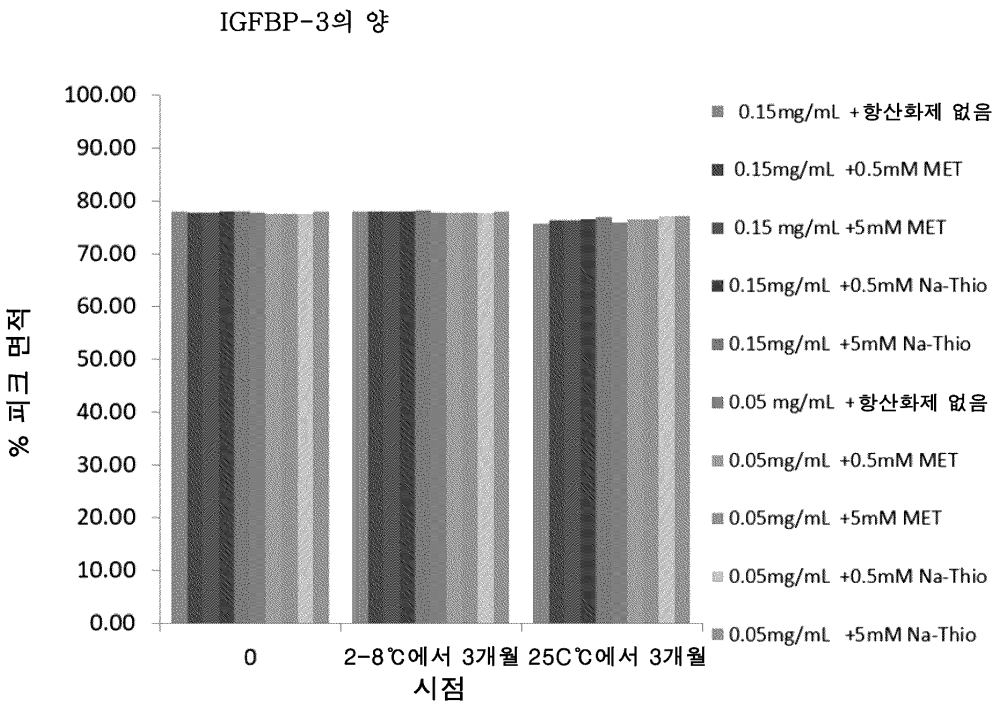
[0328] 명세서 및 특허청구범위에서 본원에 사용된 관사 "a" 및 "an"은 달리 반대로 명시되지 않는 한 복수형을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 그룹의 하나 이상의 구성원 사이에 "또는"이 포함된 특허청구범위 또는 설명은 반대로 나타내거나 달리는 문맥상 명백하지 않는 한 그룹 구성원 중 하나 이상 또는 모든 구성원이 주어진 제품이나 프로세스에 존재하거나, 이용되거나, 달리 관련된 경우 충족된 것으로 간주된다. 발명은 그룹의 정확히 한 구성원이 주어진 제품 또는 프로세스에 존재하거나, 이용되거나, 달리 관련되는 구체예를 포함한다. 발명은 또한 하나 초과 또는 전체 그룹 구성원이 주어진 제품 또는 프로세스에 존재하거나, 이용되거나, 달리 관련되는 구체예를 포함한다. 더욱이, 발명은 달리 명시되지 않는 한, 또는 모순이나 불일치가 발생할 수 있다는 것이 당업자에게 명백하지 않는 한, 나열된 청구항 중 하나 이상으로부터의 하나 이상의 제한, 요소, 조항, 설명 용어 등이 동일한 기본 청구항(또는 관련된 경우 임의의 다른 청구항)에 종속하는 다른 청구항에 도입되는 모든 변동, 조합 및 순열을 포괄한다는 것이 이해되어야 한다. 요소가 목록으로 표시되는 경우(예를 들어 Markush 그룹 또는 유사한 형식) 요소의 각 하위 그룹도 개시되고 임의의 요소(들)가 그룹에서 제거될 수 있음을 이해해야 한다. 일반적으로, 발명 또는 발명의 양태이 특정 요소, 특징 등을 포함하는 것으로 언급되는 경우, 발명의 특정 구체예 또는 발명의 양태는 그러한 요소, 특징 등으로 구성되거나 본질적으로 구성된다는 점을 이해해야 한다. 단순화를 위해 이들 구체예는 모든 경우에 본원에서 너무 많은 단어로 구체적으로 제시되지 않는다. 발명의 임의의 구체예 또는 양태는 명세서에 특정 제외사항이 언급되어 있는지 여부에 관계없이 특허청구범위에서 명시적으로 제외될 수 있다는 것도 이해해야 한다. 발명의 배경을 기술하고 그 실시에 관한 추가적인 세부사항을 제공하기 위해 본원에 참조된 간행물, 웹사이트 및 기타 참고자료는 본원에 참고로 포함된다.

## 도면

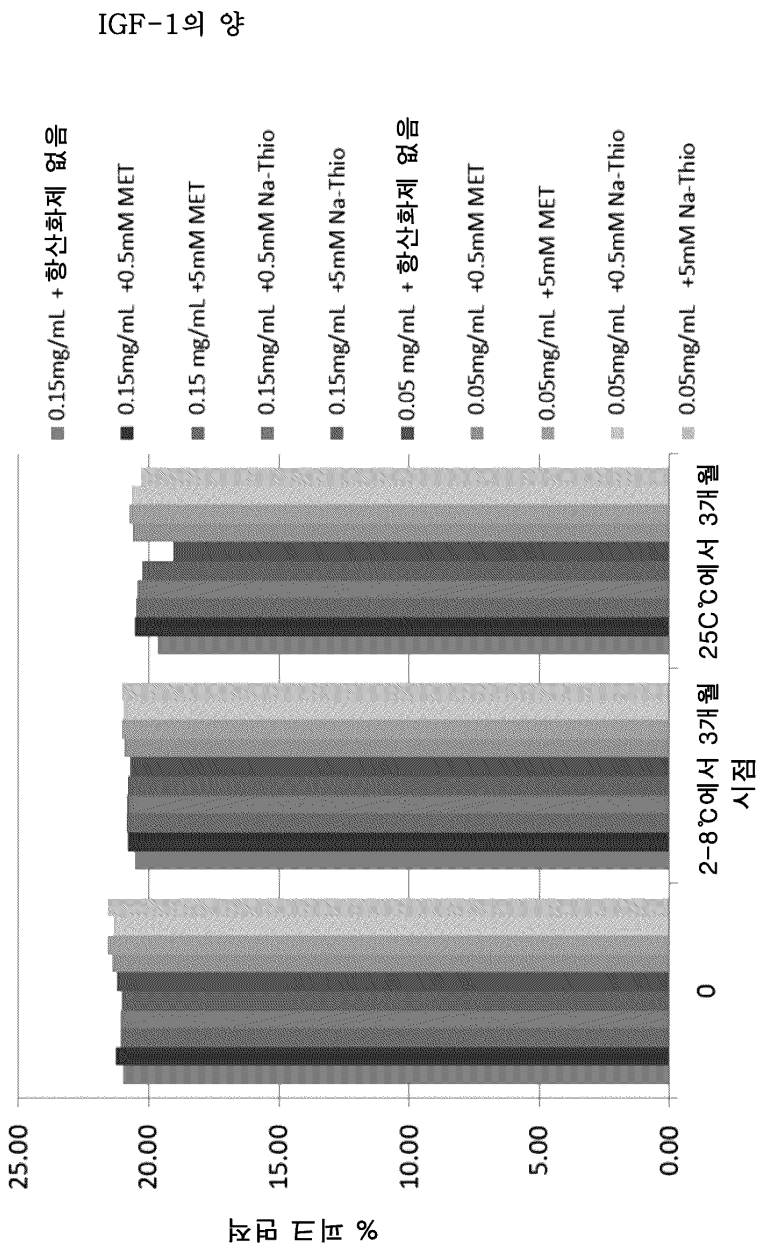
### 도면1



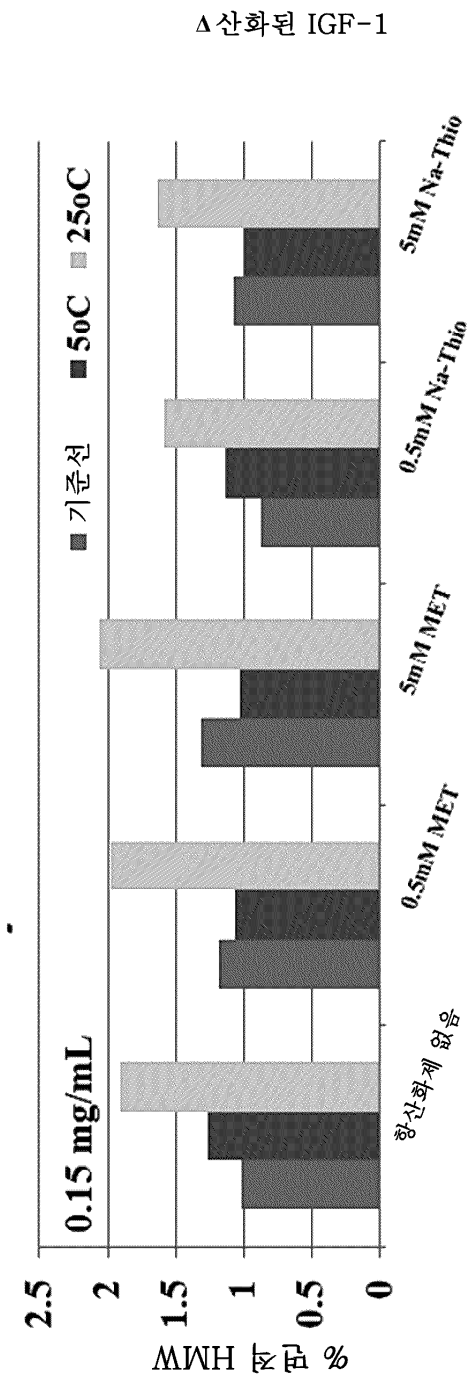
도면2


IGFBP-3의 양
100.00
90.00
80.00
70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
% 피크 면적
0
2-8℃에서 3개월
25C℃에서 3개월
시점
0.15mg/mL +항산화제 없음
0.15mg/mL +0.5mM MET
0.15 mg/mL +5mM MET
0.15mg/mL +0.5mM Na-Thio
0.15mg/mL +5mM Na-Thio
0.05 mg/mL +항산화제 없음
0.05mg/mL +0.5mM MET
0.05mg/mL +5mM MET
0.05mg/mL +0.5mM Na-Thio
0.05mg/mL +5mM Na-Thio

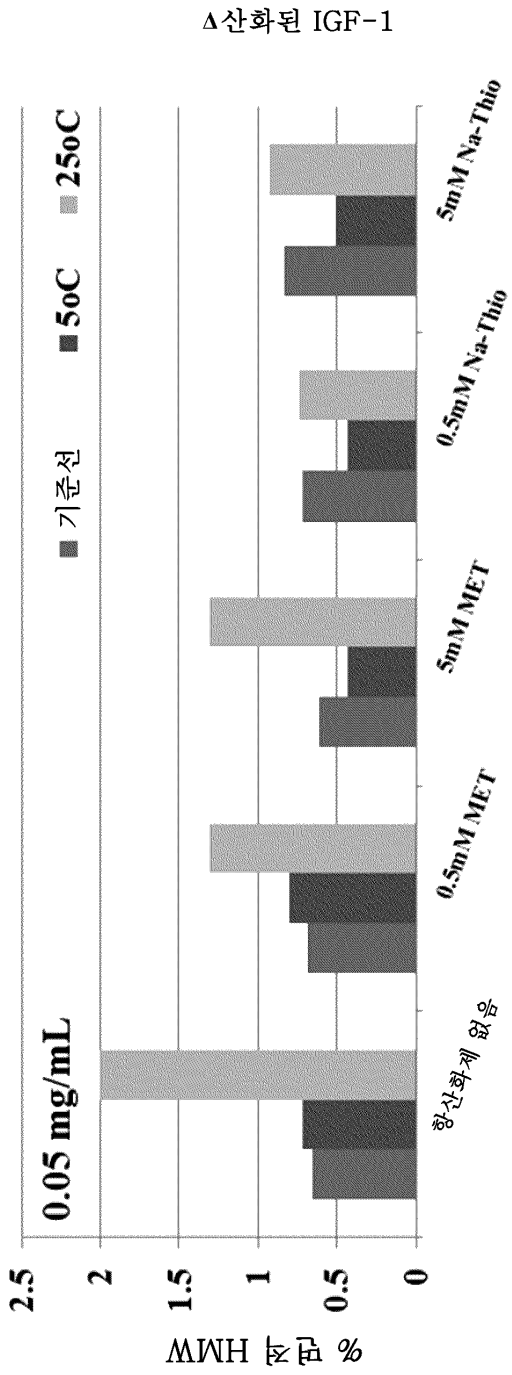
도면3


IGF-1의 양
0.15mg/mL + 항산화제 없음
0.15mg/mL +0.5mM MET
0.15 mg/mL +5mM MET
0.15mg/mL +0.5mM Na-Thio
0.15mg/mL +5mM Na-Thio
0.05 mg/mL + 항산화제 없음
0.05mg/mL +0.5mM MET
0.05mg/mL +5mM MET
0.05mg/mL +0.5mM Na-Thio
0.05mg/mL +5mM Na-Thio
25.00
20.00
15.00
10.00
5.00
0.00
% 피크 면적
0
2-8℃에서 3개월
25℃에서 3개월
시점

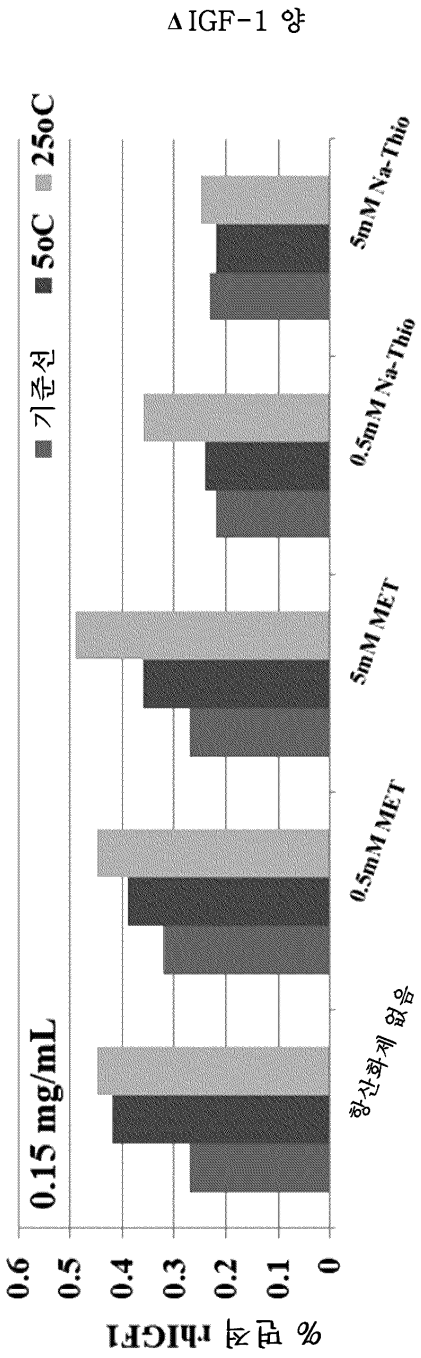
도면4a


Δ산화된 IGF-1
% 변적 HMW
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0.15 mg/mL
기준선
5oC
25oC
황산화제 없음
0.5mM MET
5mM MET
0.5mM Na-Thio
5mM Na-Thio

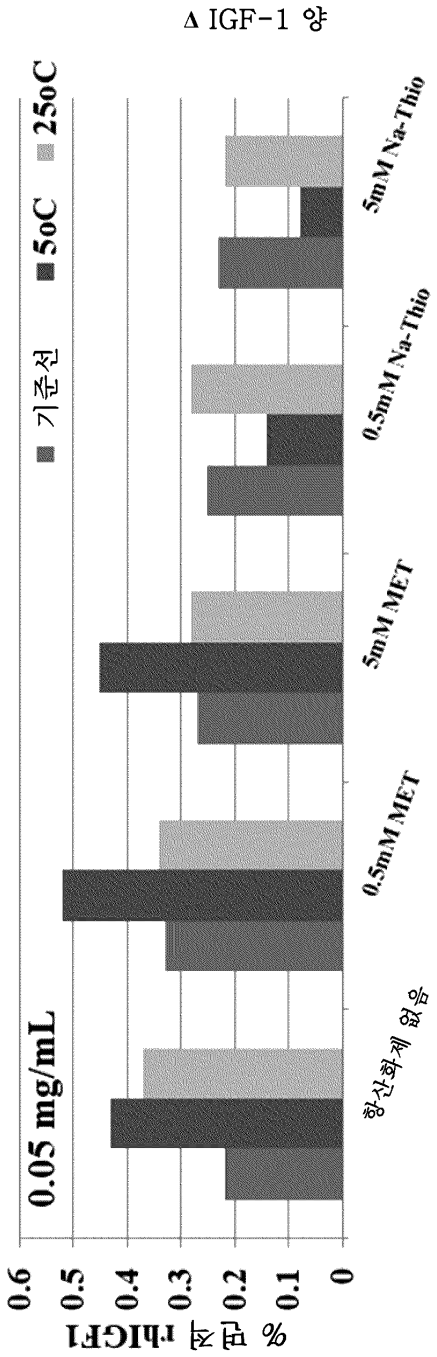
도면4b


Δ산화된 IGF-1
% 변적 HMW
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0.05 mg/mL
기준선
5oC
25oC
황산화제 없음
0.5mM MET
5mM MET
0.5mM Na-Thio
5mM Na-Thio

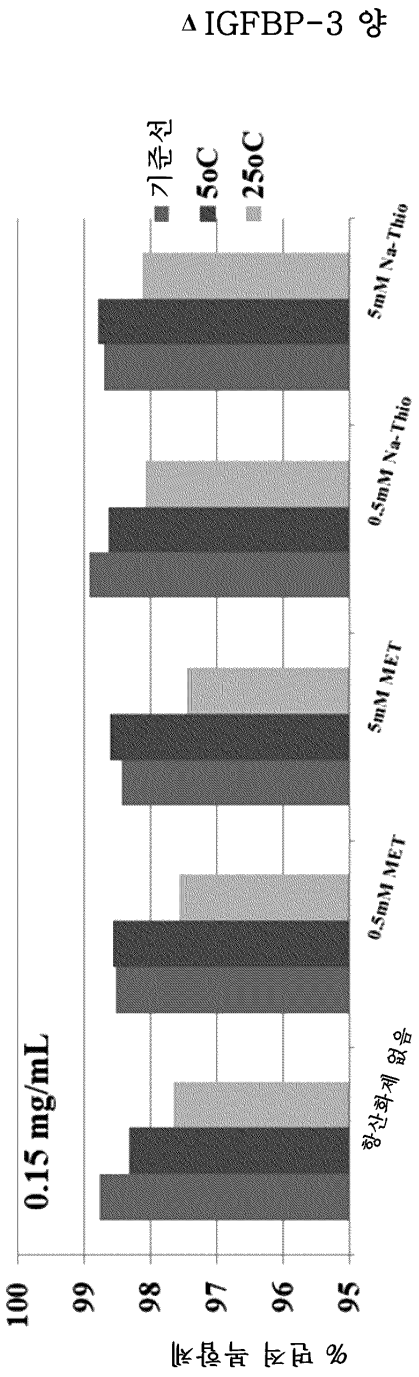
도면5a


ΔIGF-1 양
% 변화 rhIGF1
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0.15 mg/mL
기준선
5oC
25oC
항산화제 없음
0.5mM MET
5mM MET
0.5mM Na-Thio
5mM Na-Thio

도면5b

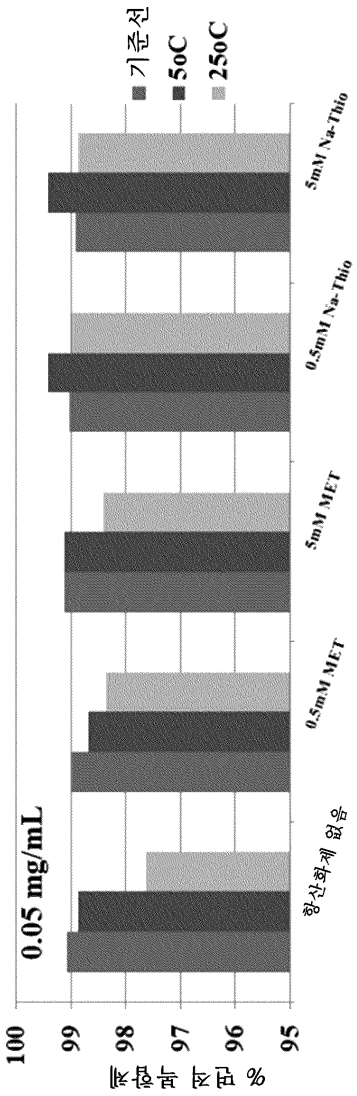

Δ IGF-1 양
% 변화 rhIGF1
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0.05 mg/mL
기준선
5oC
25oC
황산화제 없음
0.5mM MET
5mM MET
0.5mM Na-Thio
5mM Na-Thio

도면6a

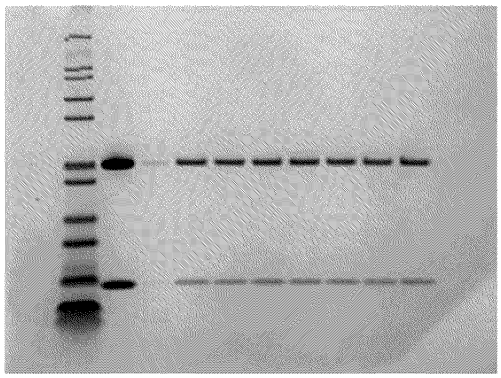

Δ IGFBP-3 양
기준선
5oC
25oC
0.15 mg/mL
% 면적 복합체
100
99
98
97
96
95
황산화제 없음
0.5mM MET
5mM MET
0.5mM Na-Thio
5mM Na-Thio

도면6b

△IGFBP-3 양

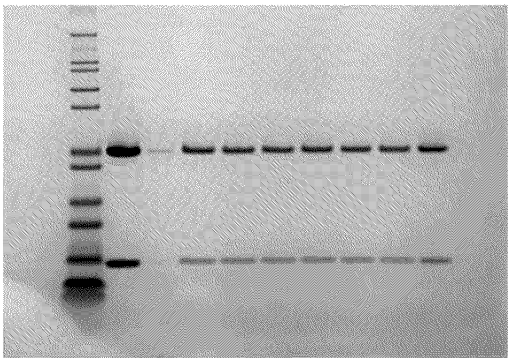


도면7a



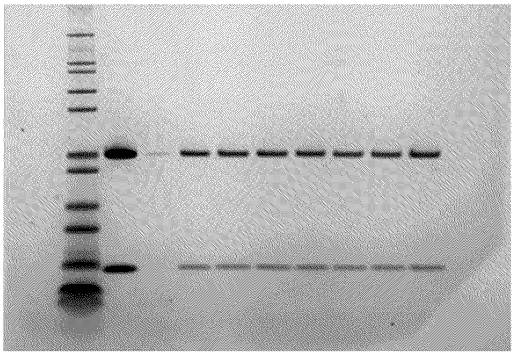
| 레인 | | 장입 (μg) |
|---|---|---|
| 1 | 블랭크 | |
| 2 | Mark 12 표준 | |
| 3 | 복합체 참조 표준 (DS) | 6.0 |
| 4 | 1% 강도 마커 | 0.06 |
| 5 | 150 μg/mL 대조군 5°C Sarstedt 튜브 | 0.65 |
| 6 | 150 μg/mL 항산화제 없음 | 0.65 |
| 7 | 150 μg/mL +0.5mM L-Met | 0.65 |
| 8 | 150 μg/mL +5mM L-Met | 0.65 |
| 9 | 150 μg/mL +0.5mM Na-Thio | 0.65 |
| 10 | 150 μg/mL 5mM Na-Thio | 0.65 |
| 11 | 150μg/mL 대조군 -65°C Sarstedt 튜브 | 0.65 |
| 12 | 블랭크 | |

도면7b



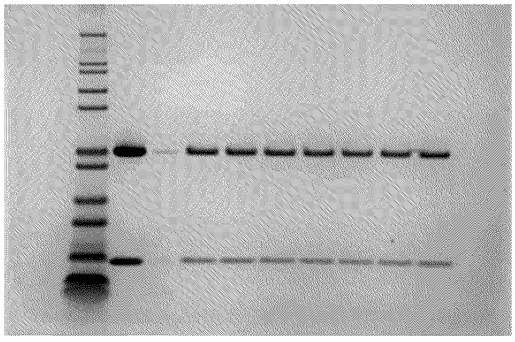
| 레인 | | 장입 (μg) |
|---|---|---|
| 1 | 블랭크 | |
| 2 | Mark 12 표준 | |
| 3 | 복합체 참조 표준 (DS) | 6.0 |
| 4 | 1% 강도 마커 | 0.06 |
| 5 | 50 μg/mL 대조군 5°C Sarstedt 튜브 | 0.65 |
| 6 | 50 μg/mL 항산화제 없음 | 0.65 |
| 7 | 50 μg/mL +0.5mM L-Met | 0.65 |
| 8 | 50 μg/mL +5mM L-Met | 0.65 |
| 9 | 50 μg/mL +0.5mM Na-Thio | 0.65 |
| 10 | 50 μg/mL 5mM Na-Thio | 0.65 |
| 11 | 50μg/mL 대조군 -65°C Sarstedt 튜브 | 0.65 |
| 12 | 블랭크 | |

도면7c



| 레인 | | 장입 (μg) |
|---|---|---|
| 1 | 블랭크 | |
| 2 | Mark 12 표준 | |
| 3 | 복합체 참조 표준 (DS) | 6.0 |
| 4 | 1% 강도 마커 | 0.06 |
| 5 | 150 μg/mL 대조군 5°C Sarstedt 튜브 | 0.65 |
| 6 | 150 μg/mL 항산화제 없음 | 0.65 |
| 7 | 150 μg/mL +0.5mM L-Met | 0.65 |
| 8 | 150 μg/mL +5mM L-Met | 0.65 |
| 9 | 150 μg/mL +0.5mM Na-Thio | 0.65 |
| 10 | 150 μg/mL 5mM Na-Thio | 0.65 |
| 11 | 150μg/mL 대조군 -65°C Sarstedt 튜브 | 0.65 |
| 12 | 블랭크 | |

도면7d

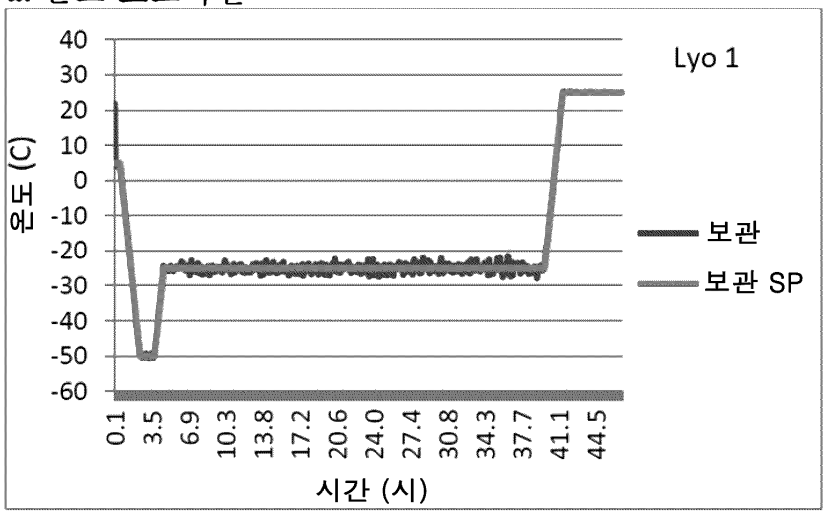


| 레인 | | 장입 (μg) |
|---|---|---|
| 1 | 블랭크 | |
| 2 | Mark 12 표준 | |
| 3 | 복합체 참조 표준 (DS) | 6.0 |
| 4 | 1% 강도 마커 | 0.06 |
| 5 | 50 μg/mL 대조군 5°C Sarstedt 튜브 | 0.65 |
| 6 | 50 μg/mL 항산화제 없음 | 0.65 |
| 7 | 50 μg/mL +0.5mM L-Met | 0.65 |
| 8 | 50 μg/mL +5mM L-Met | 0.65 |
| 9 | 50 μg/mL +0.5mM Na-Thio | 0.65 |
| 10 | 50 μg/mL 5mM Na-Thio | 0.65 |
| 11 | 50μg/mL 대조군 -65°C Sarstedt 튜브 | 0.65 |
| 12 | 블랭크 | |

도면8a

동결건조

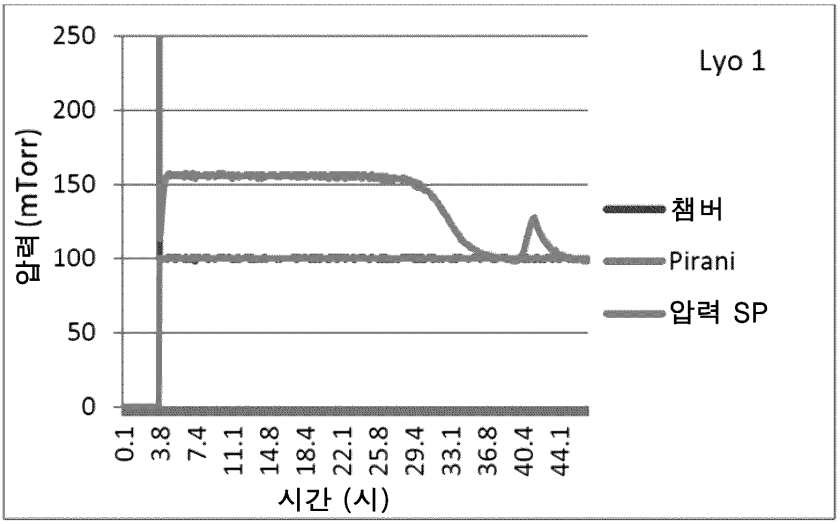
**a.** 온도 프로파일




도면8b

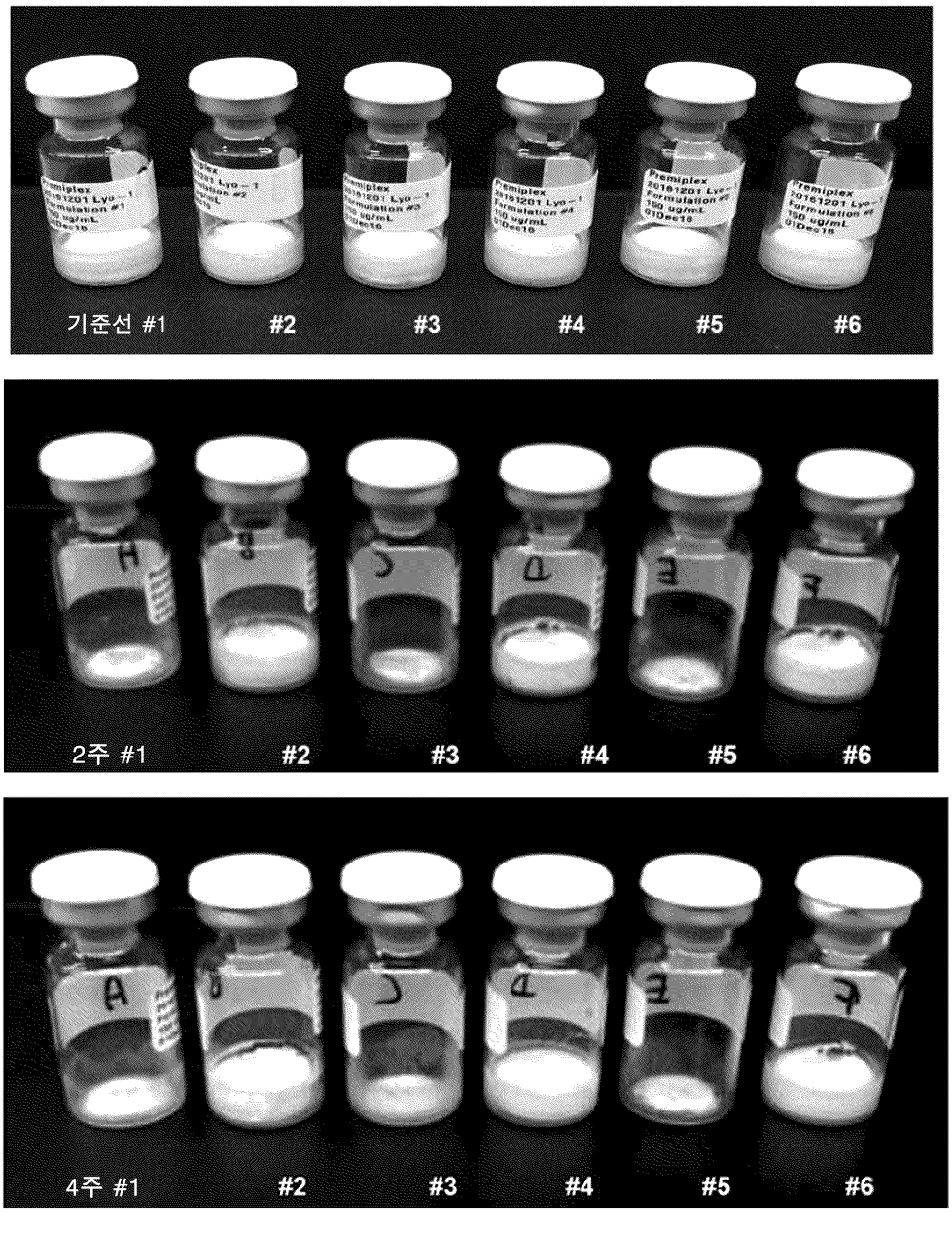
동결건조

**b.** 압력 프로파일



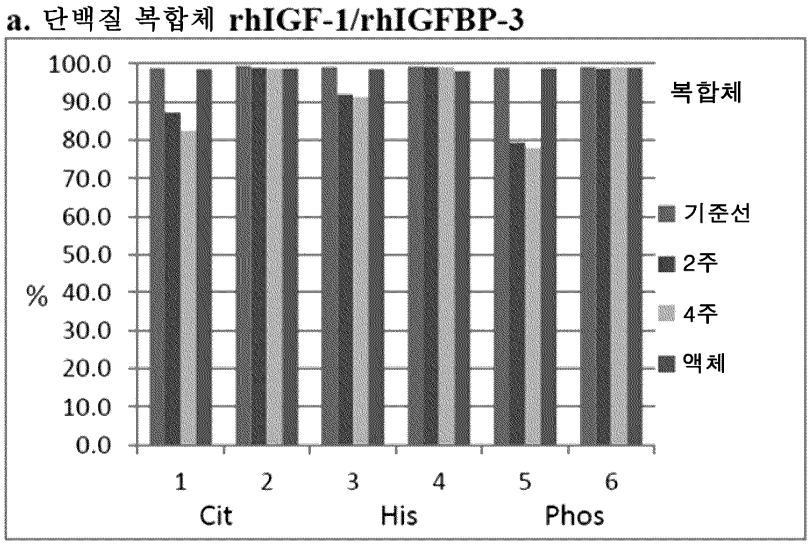
도면9

(A 기준선; B 60℃에서 2주; C 60℃에서 4주)

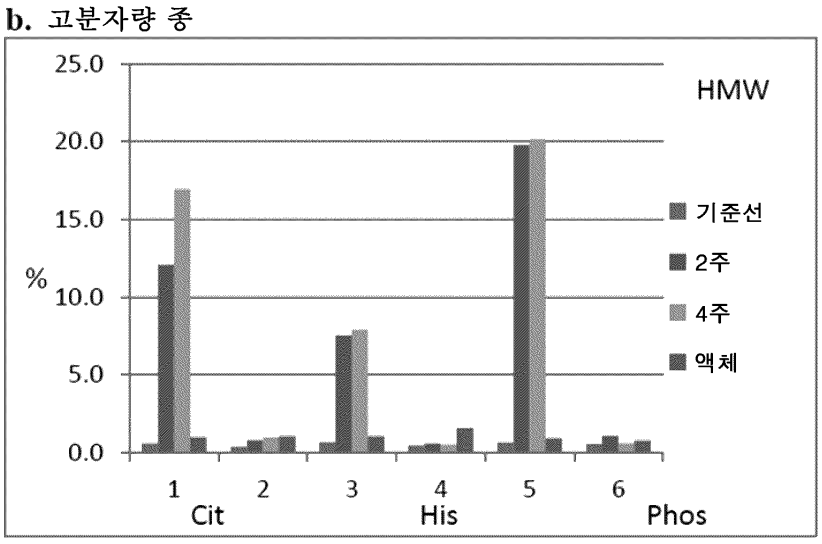


도면10a

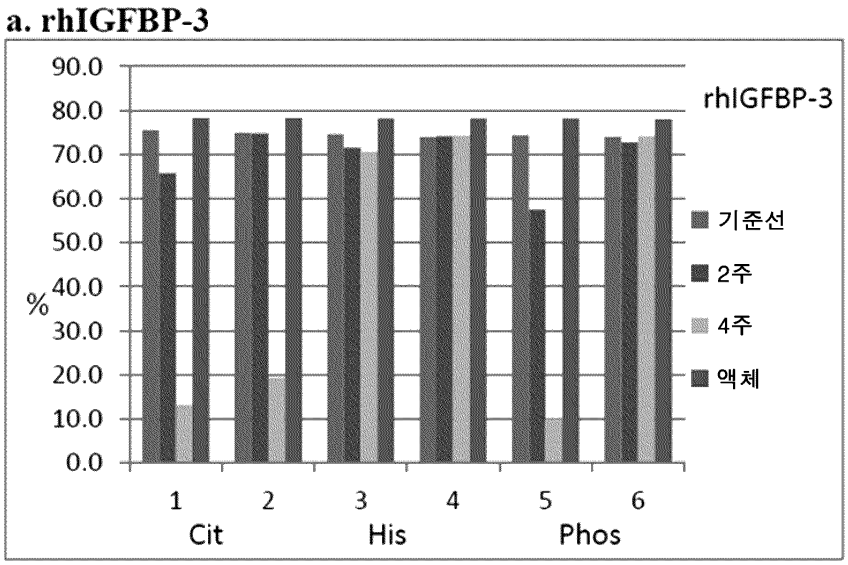
동결건조 실행 1에 대한 SE-UPLC



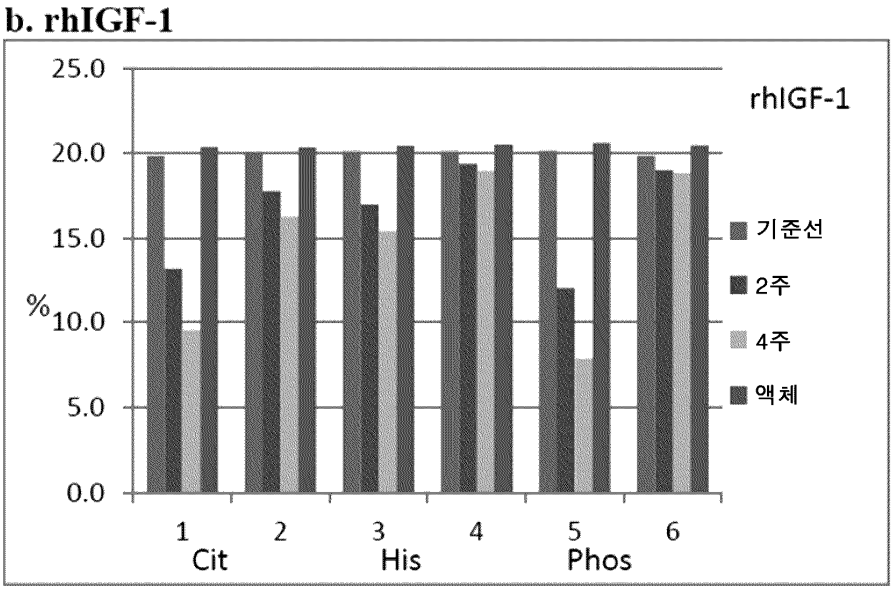

도면10b



도면11a

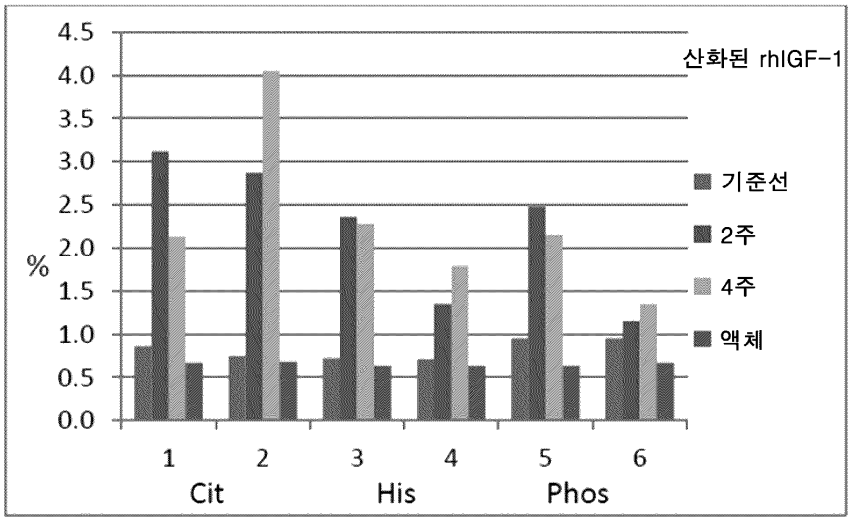

a. rhIGFBP-3
90.0
80.0
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
%
rhIGFBP-3
기준선
2주
4주
액체
1
2
3
4
5
6
Cit
His
Phos

도면11b


b. rhIGF-1
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
%
rhIGF-1
기준선
2주
4주
액체
1
2
3
4
5
6
Cit
His
Phos

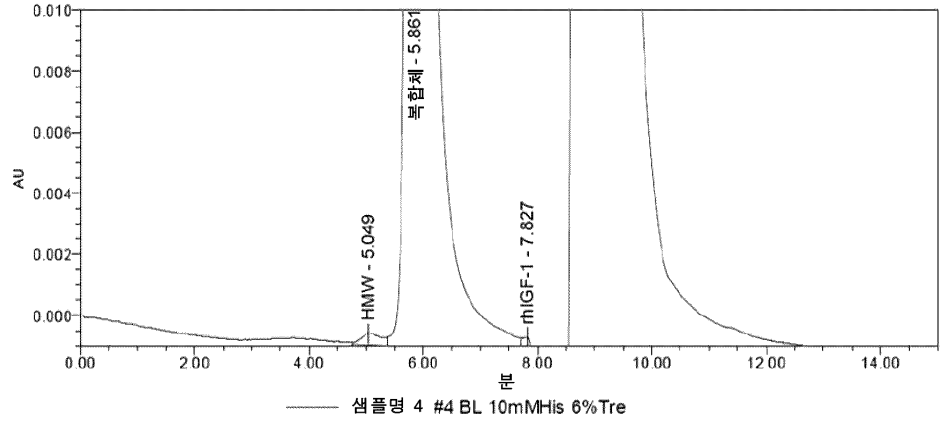
도면11c

c. 산화된 rhIGF-1



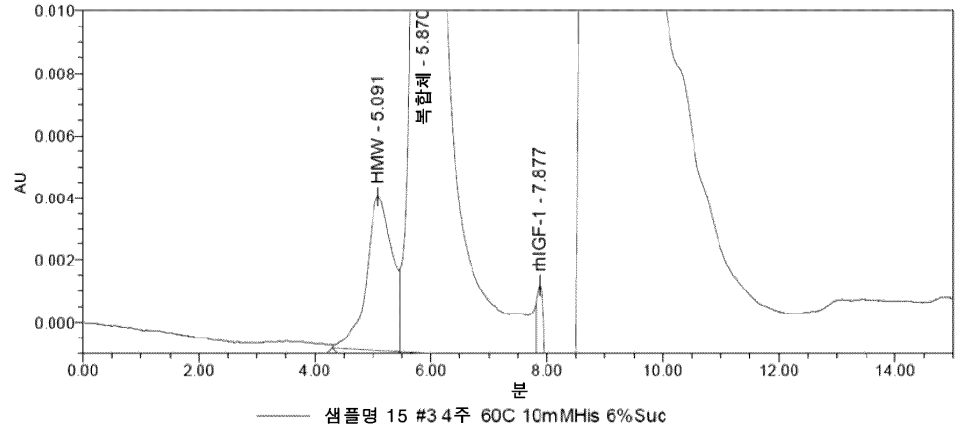

도면12a

a. 기준선에서 제형 #4 (동결건조 실행 1)



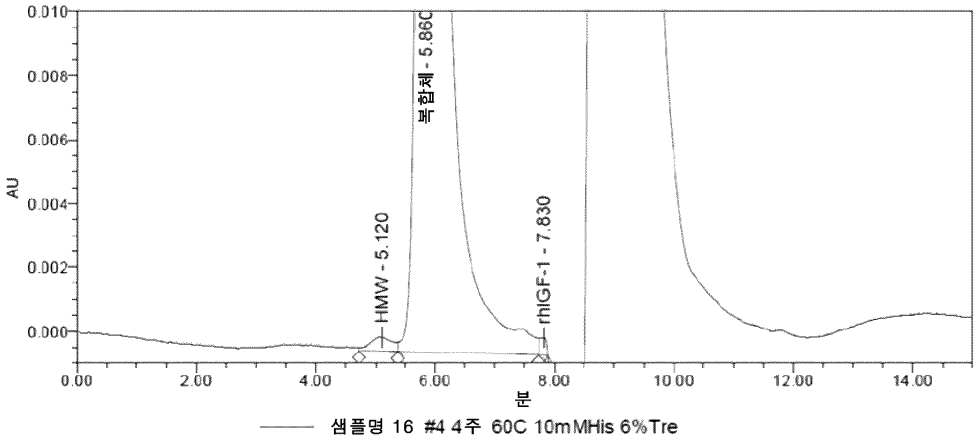

도면12b

b. 4주, 60℃에서 제형 #3 (동결건조 실행 1)



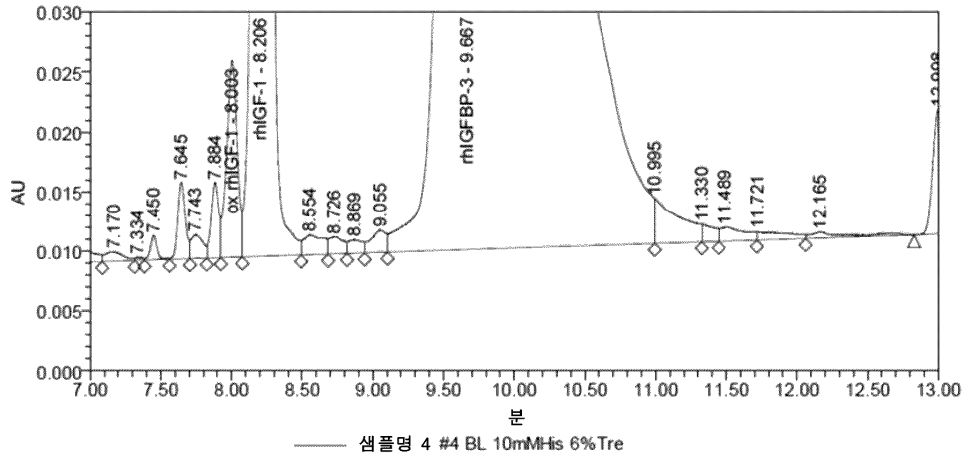
도면12c

**c.** 4주, 60℃에서 제형 #4 (동결건조 실행 1)



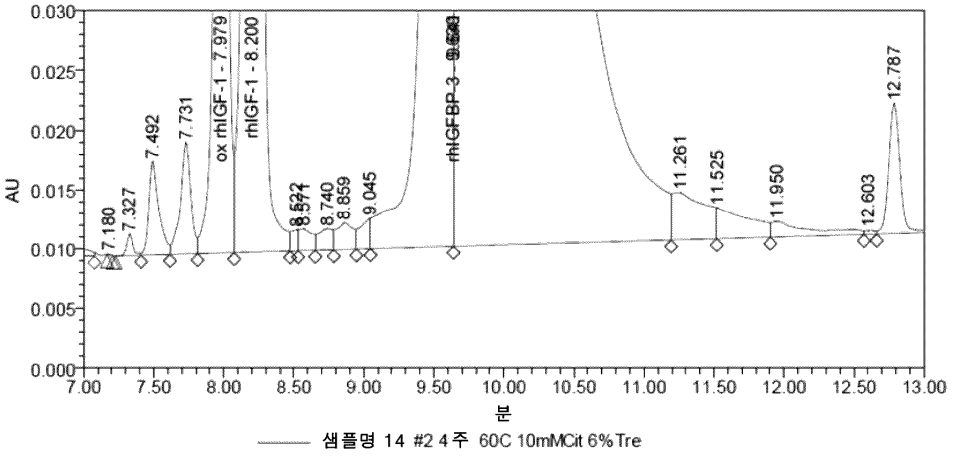

도면13a

**a.** 기준선 제형 #4 (동결건조 실행 1)



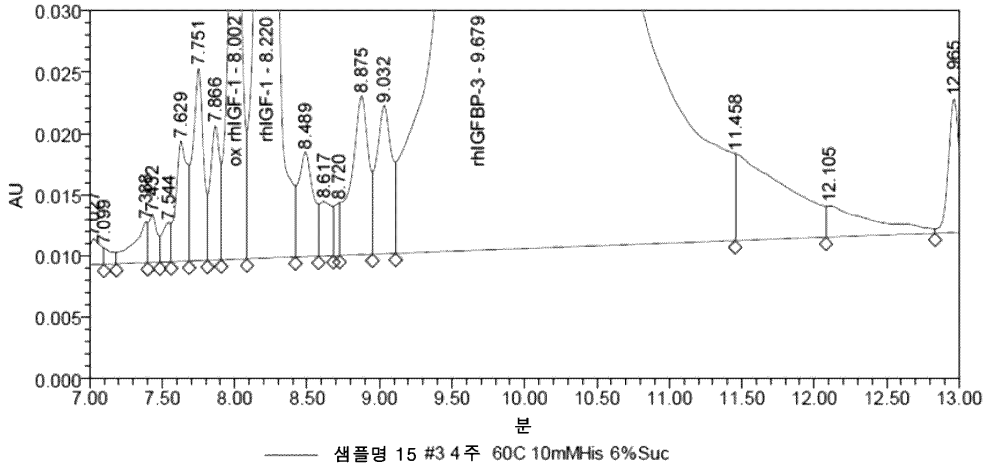

도면13b

**b.** 4주, 60℃에서 제형 #2 (동결건조 실행 1)



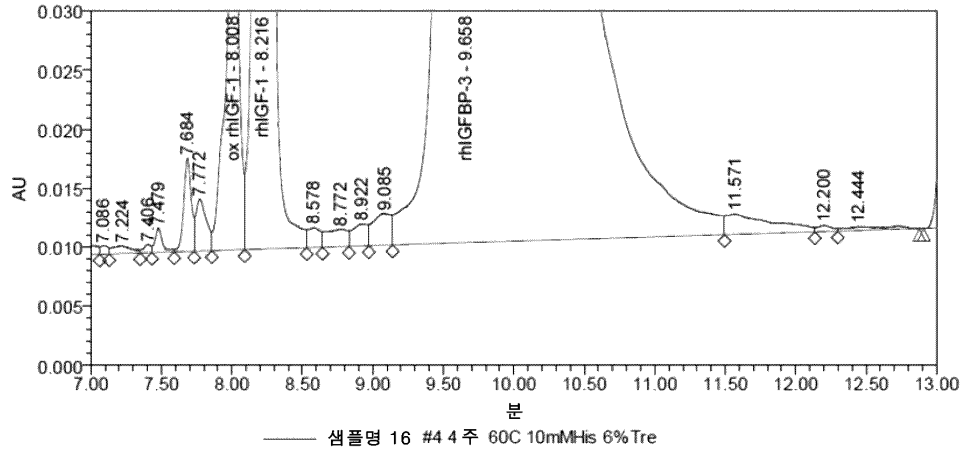
도면13c

c. 4주, 60℃에서 제형 #3 (동결건조 실행 1)



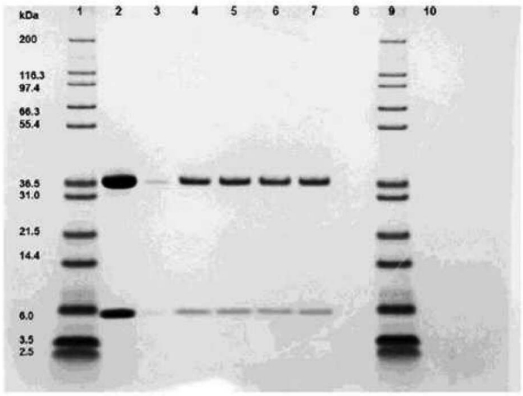

도면13d

d. 4주, 60℃에서 제형 #4 (동결건조 실행 1)




도면14a

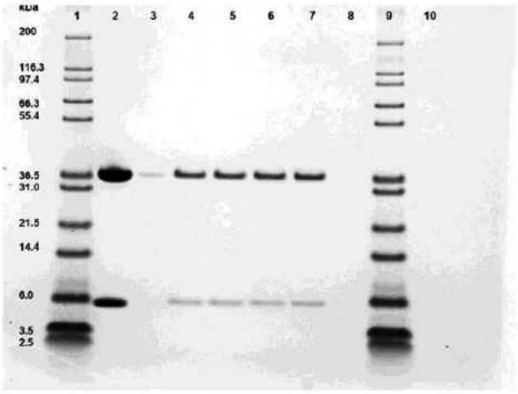
a. 기준선 (동결건조 실행 2)




1 – MW 표준
2 – 복합체 참조 표준) Lot PR20151115178-Eng)
3 – 1% 강도 마커 (Lot PR20151115178-Eng)
4 – 제형 #1 기준선
5 – 제형 #2 기준선
6 – 제형 #3 기준선
7 – 제형 #4 기준선
8 – 제형 #5 기준선
9 – MW 표준

도면14b

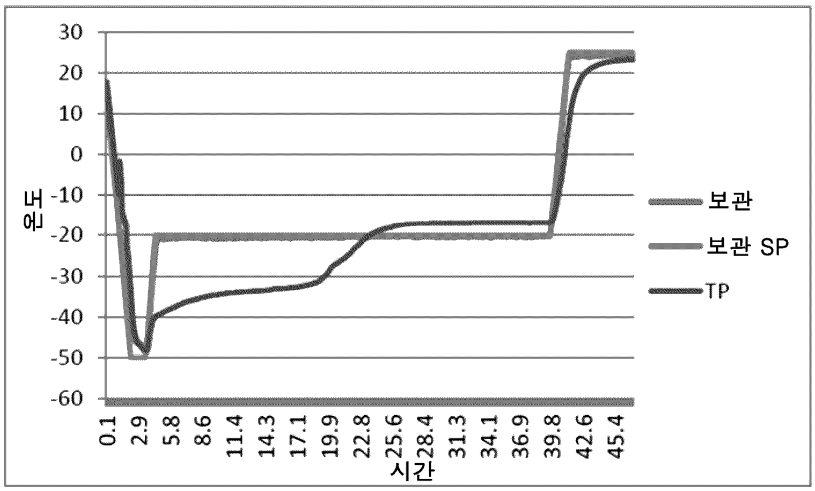
b. 4주, 40℃ (동결건조 실행 2)




1 – MW 표준
2 – 복합체 참조 표준)Lot PR20151115178-Eng)
3 – 1% 강도 마커 (Lot PR20151115178-Eng)
4 – 제형 #1 4주, 40°C
5 – 제형 #2 4주, 40°C
6 – 제형 #3 4주, 40°C
7 – 제형 #4 4주, 40°C
8 – 제형 #5 4주, 40°C
9 – MW 표준

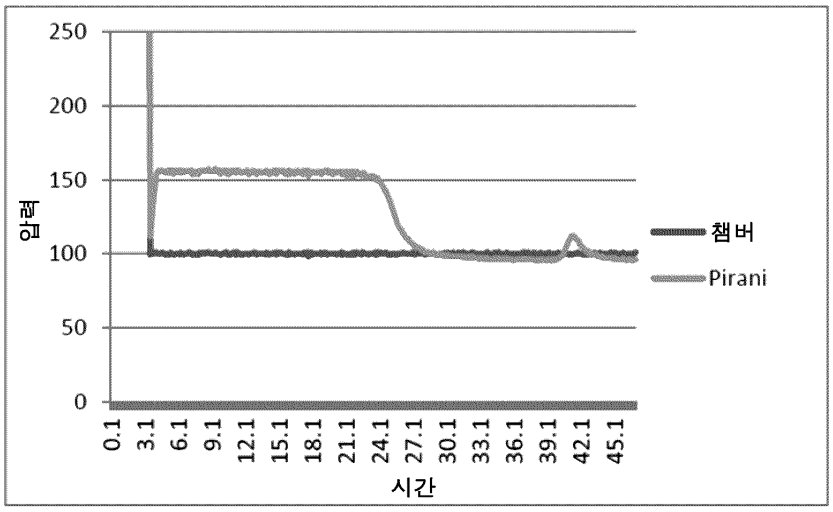
도면15a

a. 온도 프로파일



도면15b

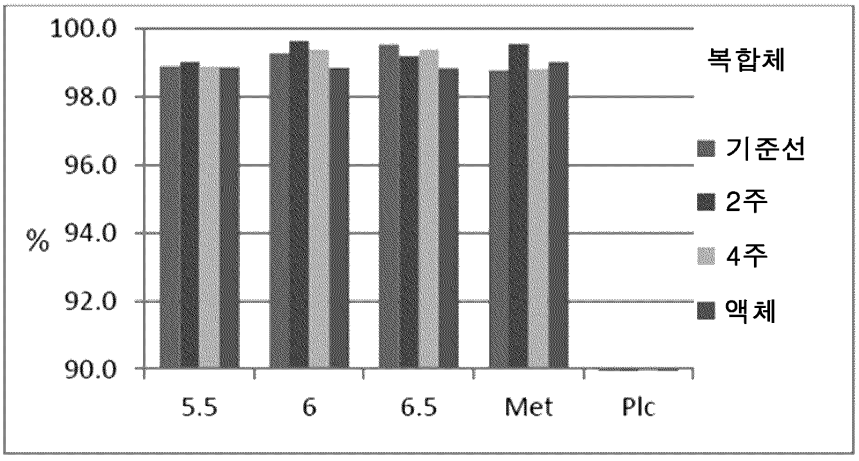
**b.** 압력 프로파일




도면16a

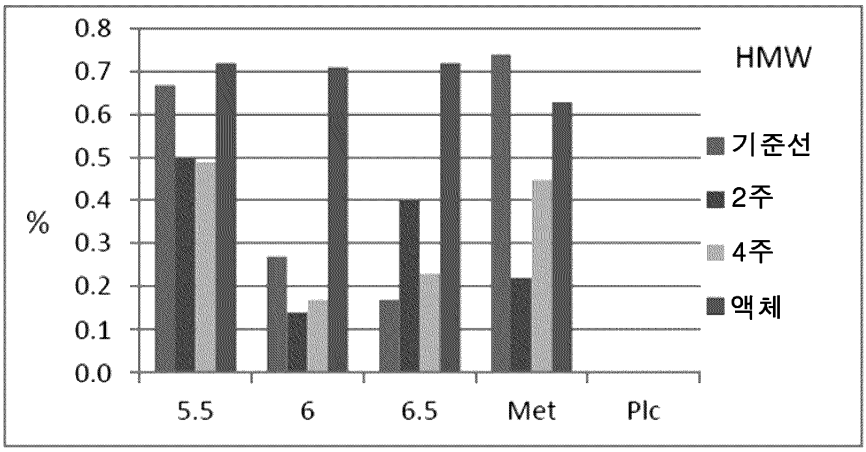
동결건조 실행 2에 대한 SE-UPLC

**a.** 단백질 복합체 **rhIGF-1/rhIGFBP-3**



도면16b

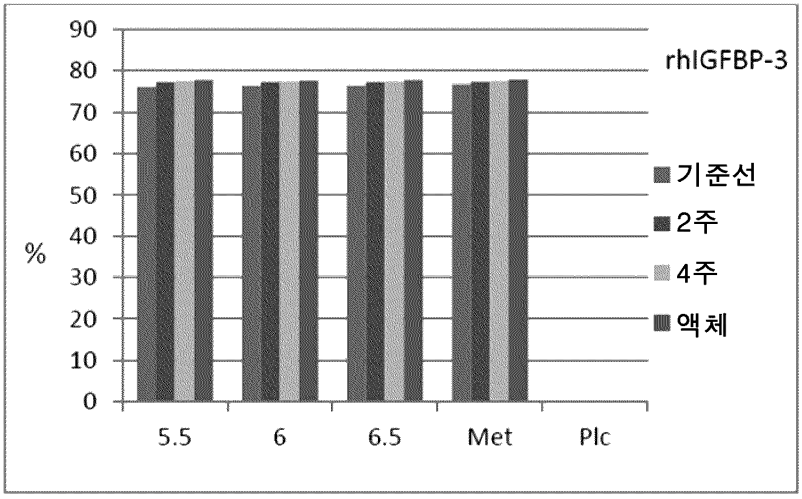
**b. 고분자량 종**




도면17a

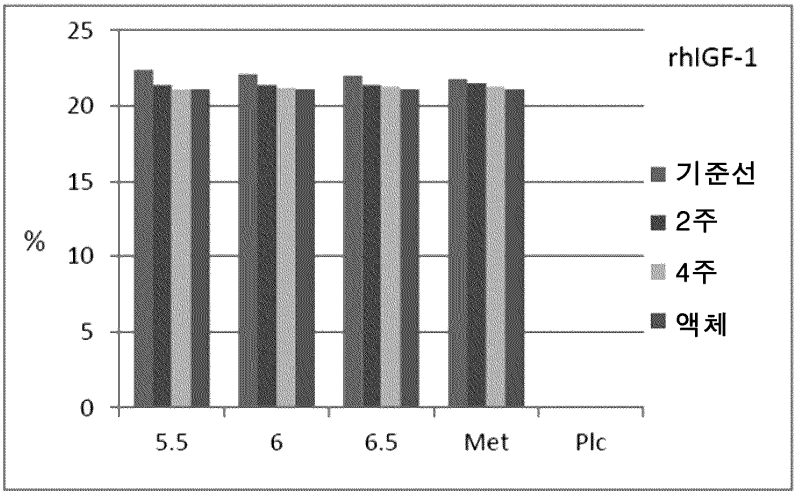
동결건조 실행 2에 대한 RU-UPLC

**a. rhIGFBP-3**



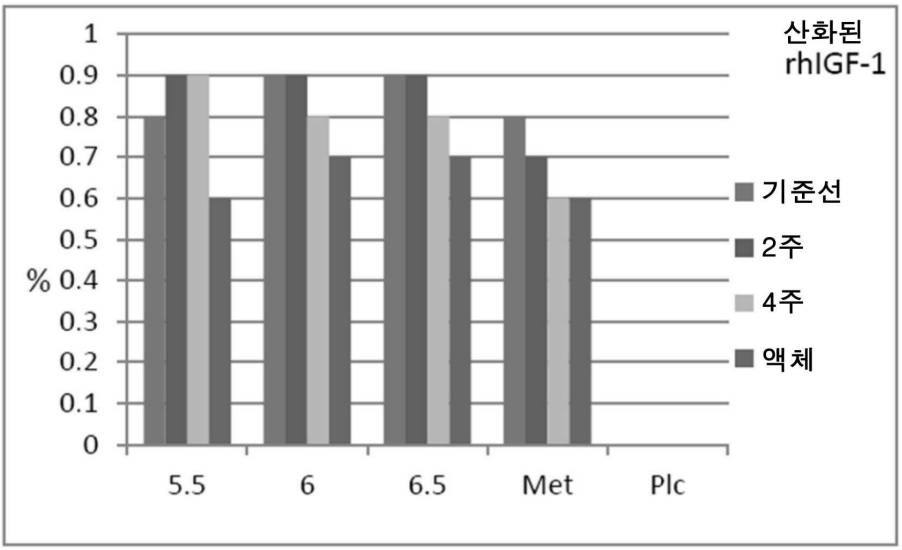
도면17b

**b. rhIGF-1**



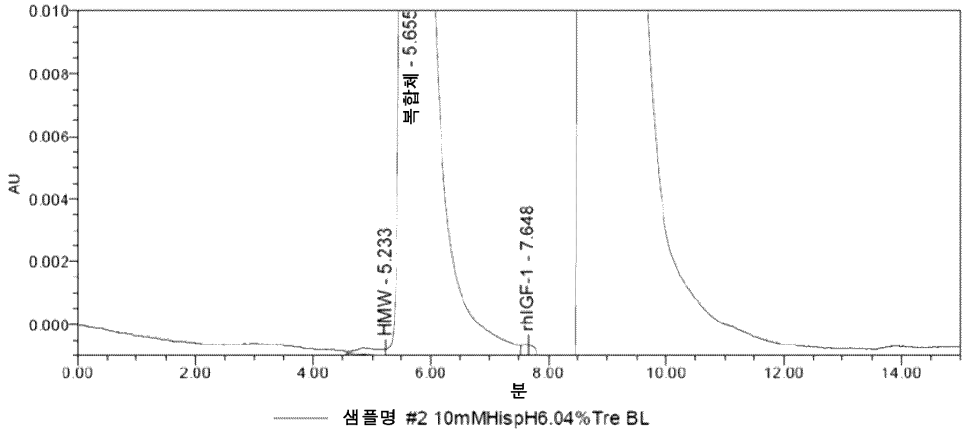

도면17c

**c. 산화된 rhIGF-1**



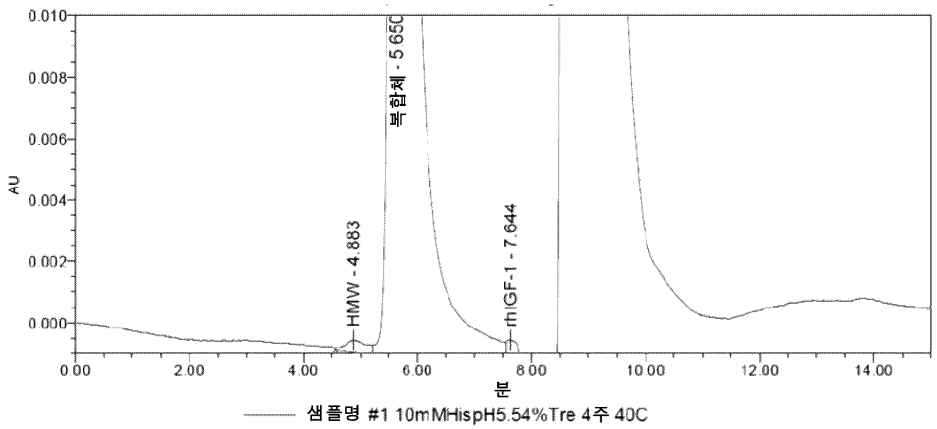
도면18a

a. 기준선에서 제형 #2 (동결건조 실행 2)



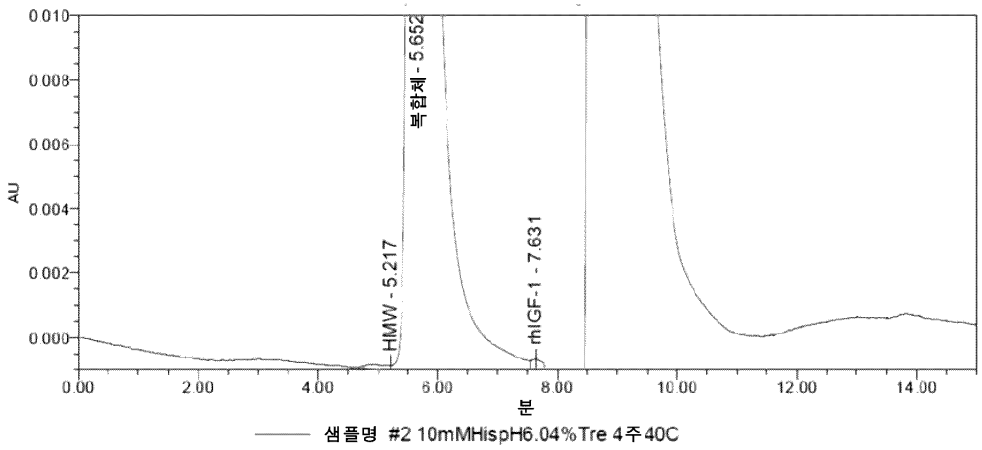

도면18b

b. 4주, 40℃에서 제형 #1 (동결건조 실행 2)



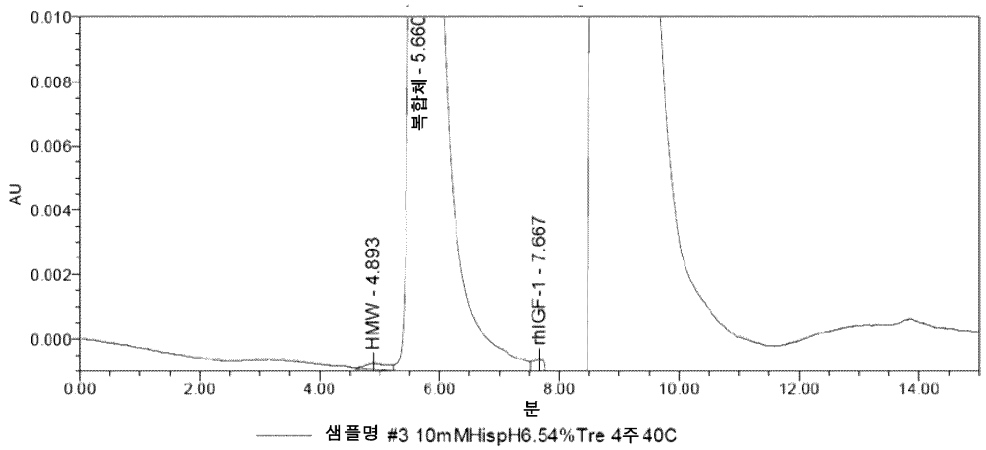

도면18c

c. 4주, 40℃에서 제형 #2 (동결건조 실행 2)



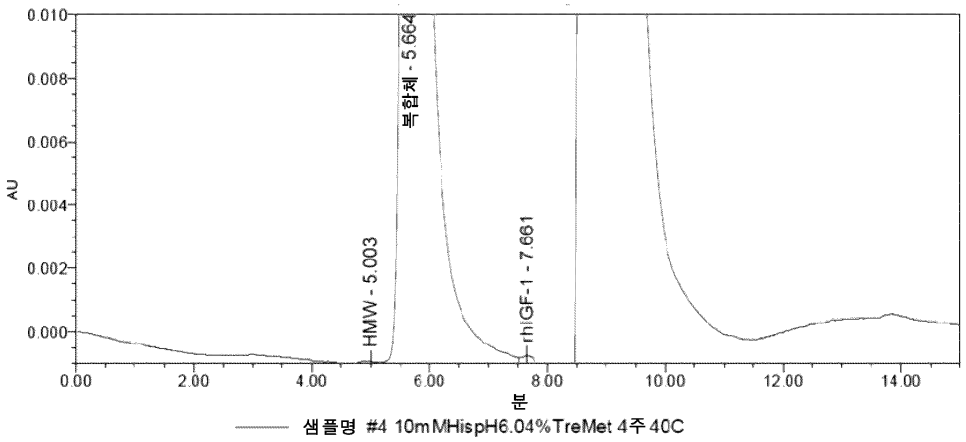
도면18d

**d.** 4주, 40℃에서 제형 #3 (동결건조 실행 2)



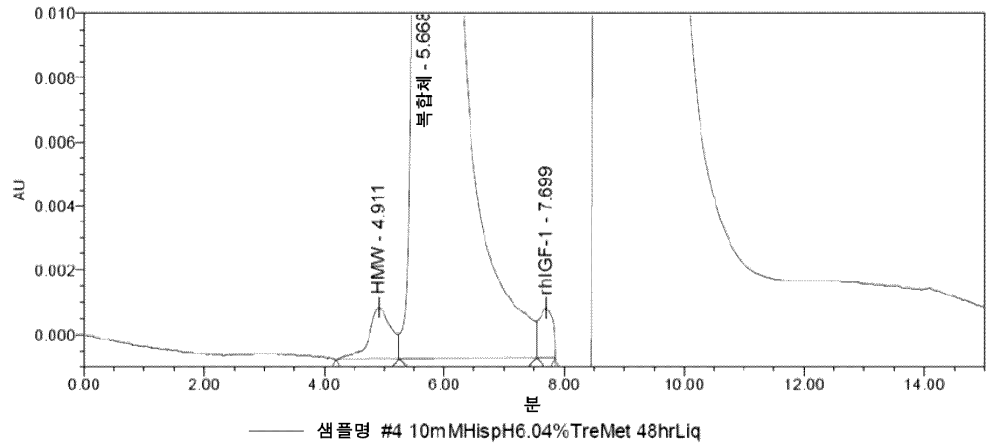

도면18e

**e.** 4주, 40℃에서 제형 #4 (동결건조 실행 2)




도면18f

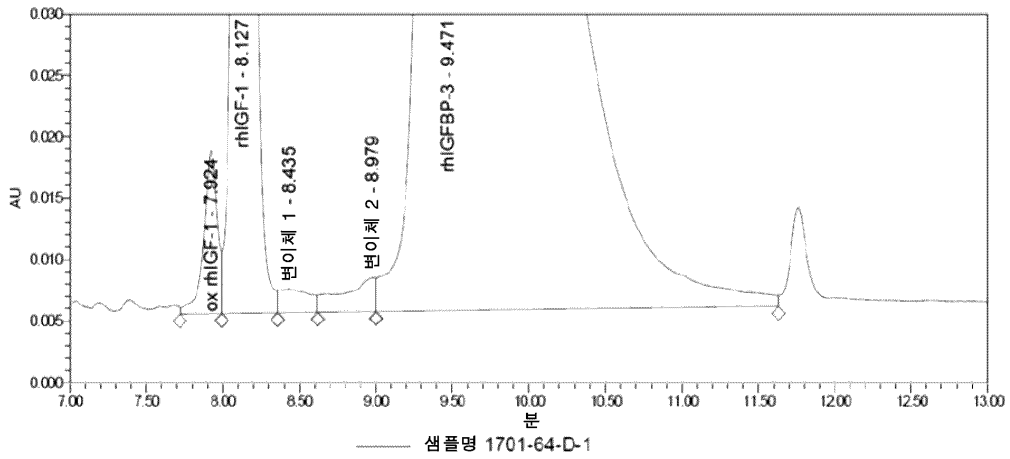
**f.** 실온에서 48시간 액체 저장에서 제형 #4 (동결건조 실행 2)



도면19a

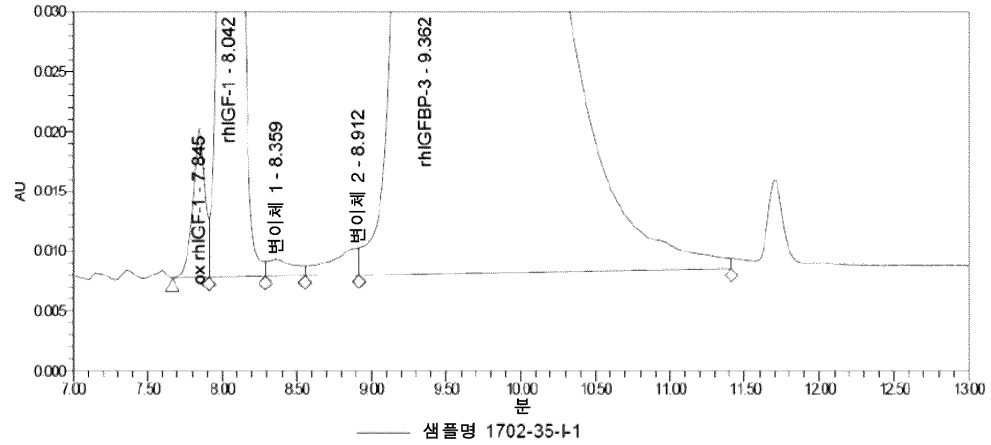
선택된 제형의 RU-UPLC 프로파일

**a.** 기준선에서 제형 #4 (동결건조 실행 2)



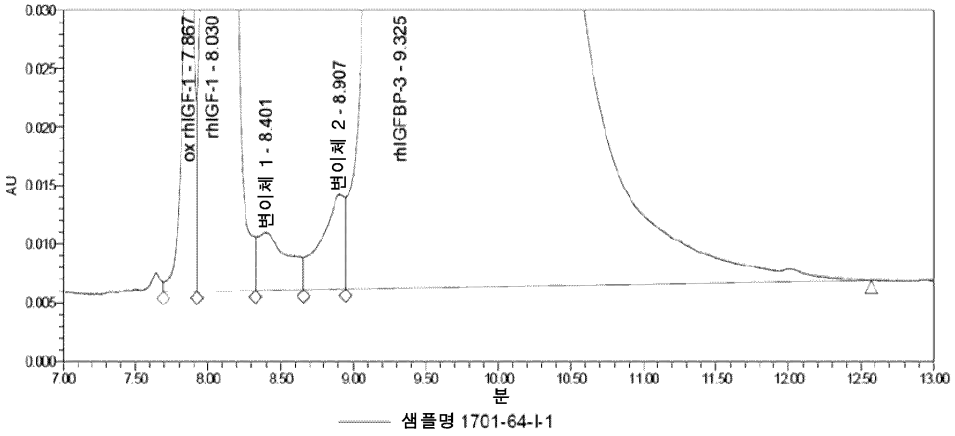

도면19b

**b.** 4주, 40℃에서 제형 #4 (동결건조 실행 2)



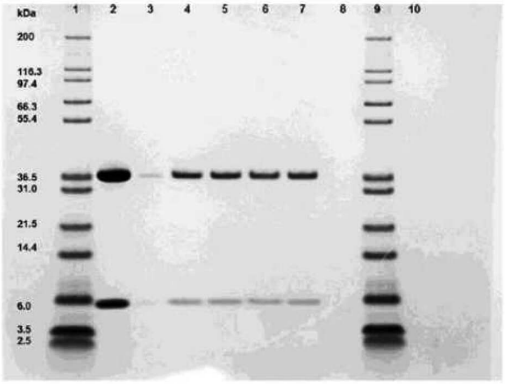
도면19c

c. 실온에서 48시간 액체 저장에서 제형 #4 (동결건조 실행 2)




도면20a

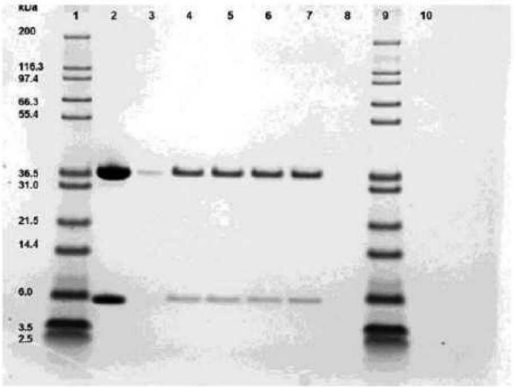
a. 기준선 (동결건조 실행 2)




1 – MW 표준
2 – 복합체 참조 표준) Lot PR20151115178-Eng)
3 – 1% 강도 마커 (Lot PR20151115178-Eng)
4 – 제형 #1 기준선
5 – 제형 #2 기준선
6 – 제형 #3 기준선
7 – 제형 #4 기준선
8 – 제형 #5 기준선
9 – MW 표준

도면20b

b. 4주, 40℃ (동결건조 실행 2)




1 – MW 표준
2 – 복합체 참조 표준) Lot PR20151115178-Eng)
3 – 강도 마커 (Lot PR20151115178-Eng)
4 – 제형 #1 4주, 40°C
5 – 제형 #2 4주, 40°C
6 – 제형 #3 4주, 40°C
7 – 제형 #4 4주, 40°C
8 – 제형 #5 4주, 40°C
9 – MW 표준