(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년06월27일
(11) 등록번호 10-2413592
(24) 등록일자 2022년06월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/08 (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 47/02* (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01) *A61K 47/26* (2017.01)
A61K 9/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/08 (2013.01)
A61K 38/1793 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7042112(분할)
(22) 출원일자(국제) 2017년10월19일
심사청구일자 2021년12월22일
(85) 번역문제출일자 2021년12월22일
(65) 공개번호 10-2021-0158878
(43) 공개일자 2021년12월31일
(62) 원출원 특허 10-2019-7014130
원출원일자(국제) 2017년10월19일
심사청구일자 2020년10월19일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/057472
(87) 국제공개번호 WO 2018/075818
국제공개일자 2018년04월26일
(30) 우선권주장
62/411,458 2016년10월21일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US20070243185 A1

(73) 특허권자
암젠 인크
미국 캘리포니아 91320-1799, 사우전드 오크, 원 암젠 센터 드라이브
(72) 발명자
고스 모니카
미국, 캘리포니아 91320, 뉴버리 파크, 3050 로지우드 스트리트
볼 니콜
미국, 캘리포니아 91360, 사우전드 오크스, 3260 헤더글로우 스트리트
(74) 대리인
특허법인한얼

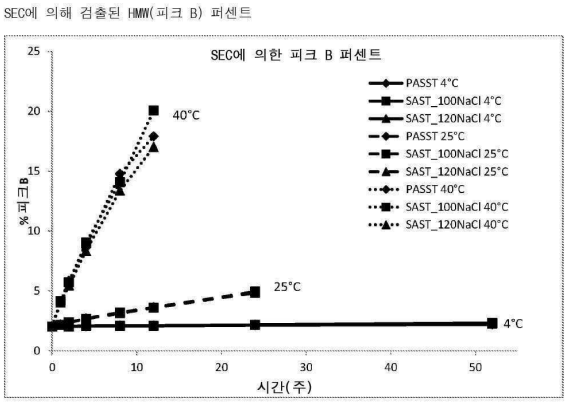
전체 청구항 수 : 총 58 항 심사관 : 최원철

(54) 발명의 명칭 **약학적 제형 및 그의 제조 방법**

(57) 요 약

본 발명은 에타너셉트의 약학적 조성물의 제형에 관한 것이다. 본 발명은 또한 완충제를 제거하고 에타너셉트의 약학적 조성물을 제형화하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 39/39591 (2013.01)
A61K 47/02 (2013.01)
A61K 47/183 (2013.01)
A61K 47/26 (2013.01)
A61K 9/0019 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

75 mM 내지 150 mM의 NaCl, 5 mM 내지 100 mM의 아르기닌, 0.5% 내지 2%(w/v)의 수크로스, 및 40 mg/mL 내지 100 mg/mL의 에타너셉트를 포함하는 약학적 조성물로서, 상기 약학적 조성물이 부가적 완충 제제를 포함하지 않고, 조성물의 pH가 약 6.1 내지 약 6.5인, 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 아르기닌이 L-아르기닌인, 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 약 50 mg/mL의 에타너셉트, 약 120 mM의 NaCl, 약 25 mM의 L-아르기닌 하이드로클로라이드, 및 약 1%(w/v)의 수크로스를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 대략 25℃에서의 2주 보관 후 소수성 상호작용 크로마토그래피를 사용하여 평가 시 에타너셉트 총량 중 28% 미만이 미스폴딩된 형태인, 약학적 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서, 에타너셉트가 서열번호 1의 아미노산 서열의 이량체로 구성되는, 약학적 조성물.

청구항 6

제2항에 있어서, L-아르기닌이 L-아르기닌 하이드로클로라이드인, 약학적 조성물.

청구항 7

제2항에 있어서, L-아르기닌이 L-아르기닌 염기인, 약학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 약학적 조성물이 2주 동안 제어된 실온(CRT)에서 보관될 때 6.1 내지 6.5의 pH를 유지하는, 약학적 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 약학적 조성물이 2주 동안 제어된 실온(CRT)에서 보관될 때 약 6.2 내지 약 6.3의 pH를 유지하는, 약학적 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 약학적 조성물이 대략 25℃에서 보관될 때 적어도 2주 동안 5.8 내지 6.7의 pH를 유지하고, 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 평가 시 총 에타너셉트의 6% 미만이 고 분자량 형태로 응집되는, 약학적 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 약학적 조성물이 대략 25℃에서의 보관 중에 적어도 2주 동안 약 6.1 내지 약 6.5의 pH를 유지하는, 약학적 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서, 약학적 조성물이 대략 25℃에서의 보관 중에 적어도 2주 동안 약 6.2 내지 약 6.4의 pH를 유지

하는, 약학적 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서, 대략 25℃에서의 2주 보관 후 소수성 상호작용 크로마토그래피를 사용하여 평가 시 에타너셉트 총량 중 28% 미만이 미스폴딩된 형태인, 약학적 조성물.

청구항 14

제1항에 있어서, 약학적 조성물이 약 180 내지 약 420 밀리오스몰랄의 삼투질농도를 갖는, 약학적 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 약학적 조성물이 약 250 내지 약 350 밀리오스몰랄의 삼투질농도를 갖는, 약학적 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 약학적 조성물이 약 290 내지 약 310 밀리오스몰랄의 삼투질농도를 갖는, 약학적 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 약학적 조성물이 약 300 내지 약 310 밀리오스몰랄의 삼투질농도를 갖는, 약학적 조성물.

청구항 18

약 50 mg/mL의 에타너셉트, 약 120 mM의 NaCl, 약 25 mM의 L-아르기닌 하이드로클로라이드, 약 1%(w/v)의 수크로스, 및 물로 구성되는 약학적 조성물로서, 상기 약학적 조성물의 pH가 약 6.1 내지 약 6.5인, 약학적 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 약학적 조성물이 대략 25℃에서의 보관 중에 적어도 2주 동안 약 6.1 내지 약 6.5의 pH를 유지하는, 약학적 조성물.

청구항 20

제18항에 있어서, 대략 25℃에서의 2주 보관 후 소수성 상호작용 크로마토그래피를 사용하여 평가 시 에타너셉트 총량 중 28% 미만이 미스폴딩된 형태인, 약학적 조성물.

청구항 21

제18항에 있어서, 에타너셉트가 서열번호 1의 아미노산 서열의 이량체로 구성되는, 약학적 조성물.

청구항 22

제1항에 있어서, 폴리소르베이트 20을 추가로 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, 폴리소르베이트 20의 농도(w/v)가 약 0.001% 내지 약 0.1%인, 약학적 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, 폴리소르베이트 20의 농도(w/v)가 약 0.005%, 약 0.01% 및 약 0.015%로 구성된 군으로부터 선택되는 농도인, 약학적 조성물.

청구항 25

제1항에 있어서, 에타너셉트가 서열번호 1의 아미노산 서열의 이량체로 구성되는, 약학적 조성물.

청구항 26

제1항에 있어서, 용액이 대략 25℃에서의 보관 중에 적어도 2주 동안 약 6.1 내지 약 6.5의 pH를 유지하고, 대략 25℃에서의 2주 보관 후 소수성 상호작용 크로마토그래피를 사용하여 평가 시 에타너셉트 총량 중 28% 미만

이 미스폴딩된 형태인, 약학적 조성물.

청구항 27

약품 제품 형태의 제1항에 따른 약학적 조성물 및 보관 및 사용을 위한 지침서를 포함하는 키트.

청구항 28

제1항에 따른 약학적 조성물을 함유하는 단일-투여량 용기.

청구항 29

제28항에 있어서, 단일-투여량 용기가 바이알, 시린지, 또는 자동주사기인, 단일-투여량 용기.

청구항 30

제28항에 있어서, 50.0 mg/mL의 에타너셉트, 120 mM의 소듐 클로라이드, 25 mM의 L-아르기닌 하이드로클로라이드, 및 1.0%(w/v)의 수크로스로 구성되는 수성 제형을 함유하는, 단일-투여량 용기.

청구항 31

75 mM 내지 150 mM의 NaCl, 5 mM 내지 100 mM의 아르기닌, 0.5% 내지 2%(w/v)의 수크로스, 및 40 mg/mL 내지 100 mg/mL의 에타너셉트를 포함하는 약학적 조성물의 단일 투여량으로 단일-투여량 용기를 충진하는 것을 포함하는, 단일-투여량 용기를 제조하는 방법으로서, 상기 약학적 조성물이 부가적 완충 제제를 포함하지 않고, 조성물의 pH가 멸균 조건 하에서 6.1 내지 6.5인, 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 아르기닌이 L-아르기닌인, 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 약학적 조성물이 약 50 mg/mL의 에타너셉트, 약 120 mM의 NaCl, 약 25 mM의 L-아르기닌 하이드로클로라이드, 및 약 1%(w/v)의 수크로스를 포함하는, 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 에타너셉트가 서열번호 1의 아미노산 서열의 이량체로 구성되는, 방법.

청구항 35

제31항에 있어서, 약학적 조성물이 약 180 내지 약 420 밀리오스몰랄의 삼투질농도를 갖는, 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 약학적 조성물이 약 300 내지 약 310 밀리오스몰랄의 삼투질농도를 갖는, 방법.

청구항 37

제31항에 있어서, 약학적 조성물이 약 50 mg/mL의 에타너셉트, 약 120 mM의 NaCl, 약 25 mM의 L-아르기닌 하이드로클로라이드, 약 1%(w/v)의 수크로스, 및 물로 구성되는, 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 에타너셉트가 서열번호 1의 아미노산 서열의 이량체로 구성되는, 방법.

청구항 39

제31항에 있어서, 약학적 조성물이 폴리소르베이트 20을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 폴리소르베이트 20의 농도(w/v)가 약 0.001% 내지 약 0.1%인, 방법.

청구항 41

제39항에 있어서, 폴리소르베이트 20의 농도(w/v)가 약 0.005%, 약 0.01% 또는 약 0.015% 농도인, 방법.

청구항 42

제31항에 있어서, 에타너셉트가 서열번호 1의 아미노산 서열의 이량체로 구성되는, 방법.

청구항 43

제31항에 있어서, 단일-투여량 용기가 시린지, 바이알, 또는 자동주사기인, 방법.

청구항 44

멸균 조건 하에서

서열번호 1의 아미노산 서열의 이량체로 구성되는, 약 50 mg/mL의 에타너셉트;

약 120 mM의 NaCl;

약 25 mM의 L-아르기닌 하이드로클로라이드;

약 1%(w/v)의 수크로스; 및

약 0.001% 내지 약 0.03% 농도의 폴리소르베이트 20

을 포함하는 약학적 조성물의 단일 투여량으로 단일-투여량 용기를 충진하는 것을 포함하는, 단일-투여량 용기를 제조하는 방법으로서,

여기서 약학적 조성물이 부가적 완충 제제를 포함하지 않고, 약학적 조성물이 약 290 내지 약 310 밀리오스몰랄의 삼투질농도를 가지며, 조성물의 pH가 6.2 내지 6.3인, 방법.

청구항 45

제44항에 있어서, 약학적 조성물이 약 0.005%, 약 0.01% 또는 약 0.015%의 농도(w/v)로 폴리소르베이트 20을 포함하는, 방법.

청구항 46

하기 단계를 포함하는, 약학적 조성물을 제조하는 방법:

에타너셉트를 발현하는 세포를 포함하는 배지로부터 에타너셉트를 정제하는 단계; 및

에타너셉트를 다음을 포함하는 제형으로 제형화하는 단계:

75 mM 내지 150 mM의 NaCl;

5 mM 내지 100 mM의 아르기닌;

0.5% 내지 2%(w/v)의 수크로스; 및

40 mg/mL 내지 100 mg/mL의 에타너셉트,

여기서 약학적 조성물은 부가적 완충 제제를 포함하지 않고, 조성물의 pH는 6.1 내지 6.5이다.

청구항 47

제46항에 있어서, 정제 단계가 크로마토그래피, 에탄올 침전, 겔 전기영동 및 투석 중 하나 이상의 사용을 포함하는, 방법.

청구항 48

제47항에 있어서, 정제 단계가 음이온 교환 크로마토그래피의 사용을 포함하는, 방법.

청구항 49

제48항에 있어서, 정제 단계가 하기를 포함하는, 방법:

음이온 교환 크로마토그래피를 통해 배지로부터 중간 푸울(intermediate pool)을 생성하는 단계로, 상기 중간 푸울이 40 mg/mL 내지 100 mg/mL의 에타너셉트를 포함하는, 단계; 및

중간 푸울을 75 mM 내지 150 mM의 NaCl, 5 mM 내지 100 mM의 아르기닌, 및 0.5% 내지 2%(w/v)의 수크로스를 포함하는 제형으로 교환하는 단계로, 상기 제형이 5.6 내지 6.5의 pH를 갖고, 완충 제제를 포함하지 않는, 단계.

청구항 50

제49항에 있어서, 방법이 교환 전에 중간 푸울을 조정하는(conditioning) 것을 추가로 포함하고, 조정된 중간 푸울이 6.2 내지 6.4의 pH를 갖는, 방법.

청구항 51

제50항에 있어서, 교환 단계가 한외여과를 포함하는, 방법.

청구항 52

제46항에 있어서, 대략 25℃에서의 2주 보관 후 소수성 상호작용 크로마토그래피를 사용하여 평가 시 약학적 조성물 내 에타너셉트 총량의 28% 미만이 미스폴딩된 형태인. 방법.

청구항 53

제46항에 있어서, 약학적 조성물이 대략 25℃에서의 보관 중에 적어도 2주 동안 약 6.1 내지 약 6.5의 pH를 유지하는, 방법.

청구항 54

제46항에 있어서, 약학적 조성물이 2주 동안 제어된 실온(CRT)에서 보관될 때 약 6.2 내지 약 6.3의 pH를 유지하는, 방법.

청구항 55

제46항에 있어서, 약학적 조성물이 대략 25℃에서 보관될 때 적어도 2주 동안 5.8 내지 6.7의 pH를 유지하고, 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 평가 시 총 에타너셉트의 6% 미만이 고 분자량 형태로 응집되는, 방법.

청구항 56

제46항에 있어서, 조성물에 계면활성제를 추가하는 것을 더 포함하는, 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, 계면활성제가 폴리소르베이트 20인, 방법.

청구항 58

제46항에 있어서, 단일-투여량 용기를 약학적 조성물의 단일 투여량으로 충진하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 교차-참조**

[0002] 본 출원은 2016년 10월 21일에 출원된 미국 가출원 번호 62/411,458의 이익을 주장하며, 이는 본원에 참조로서 그 전문이 포함된다.

[0003] **발명의 분야**

[0004] 본 발명은 에타너셉트(etanercept)의 약학적 조성물의 제형에 관한 것이다. 본 발명은 또한 완충제를 제거하고

에타너셉트의 약학적 조성물을 제형화하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0005] 단백질 약물의 제형은 약학자에게 많은 과제를 제시할 수 있다. 단백질 약물을 안정화시키고 단백질분해, 응집, 미스폴딩(misfolding) 등에 의한 분해에 저항성을 갖게 하는 제형이 발견되어야 한다. 특히 알려진 단백질과 상당한 점에서 상이한 조작된 단백질의 경우, 적절한 안정성 조건을 찾는 것이 어려울 수 있다. 단백질 약물이 환자에게 편리한 형태이도록 하는 것 또한 바람직하다. 원하는 특성으로는 주위 및 냉장 온도에서의 안정성; 장기 보관에 대한 적합성, 적절한 투약 시간 및 용량; 및 투여시의 불편의 최소화가 포함된다.

[0006] 에타너셉트는 인간 IgG1의 Fc 부분에 연결된 인간 75 킬로달톤(p75) 종양 괴사 인자 수용체(TNFR)의 세포외 리간드-결합 부분으로 구성된 이량체 융합 단백질이다. 에타너셉트의 Fc 성분은 CH2 도메인, CH3 도메인 및 힌지 영역을 함유하나, IgG1의 CH1 도메인은 함유하지 않는다. 포유류 세포에서 발현될 때, 이는 TNF 수용체의 2개의 도메인을 이용하여 동종이량체 복합체를 형성한다. 따라서, 이는 항체 및 가용성 TNF 수용체 둘 모두와 상이한 인공 단백질이며, 따라서 둘 모두와 상이한 분해 경로를 겪는다. 에타너셉트는 ENBREL®(Amgen Inc., Thousand Oaks, CA)로서 상업적으로 이용 가능하며 중등도 내지 중증의 활성 류마티스성 관절염, 2세 이상의 환자에서의 중등도 내지 중증의 활성 다관절 소아 특발성 관절염(JIA), 성인에서의 만성 중등도 내지 중증의 판상 건선(PsO), 성인에서의 건선 관절염(PsA), 및 활성 강직 척추염(AS)을 치료하는 것으로 승인되어 있다. 에타너셉트는 주사 직전에 재구성되는 동결건조 제형으로 처음 이용 가능했다.

[0007] 주사용수를 이용한 동결건조 제품 재구성 즉시, 제형은 약 25 mg/mL에서 10 mM Tris HCl, 4% 만니톨, 1% 수크로스, pH 7.4이다. 그러나, 이 제형은 보관시 안정하지 않다. 단백질을 안정화시키기 위해 아르기닌을 사용하여 에타너셉트의 액체 제형이 달성될 수 있음이 밝혀졌다(미국 특허 번호 7,648,702 참조). 예시적인 액체 제형은 수 중 pH 6.3에서 50 mg/mL 에타너셉트, 25 mM 포스페이트 완충제, 25 mM L-아르기닌 하이드로클로라이드, 100 mM NaCl, 1% 수크로스로 구성된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 에타너셉트의 신규하고 개선된 제형이 본원에 제공된다. 구체적으로, 본 발명은 안정하고, 부가적 완충 제제 없이도, 연장된 기간 동안 제어된 실온(CRT)에서 액체로서 편리하게 보관될 수 있는 에타너셉트를 함유하는 약학적 조성물을 제공한다. 추가적으로, 본 발명의 약학적 조성물이 대상체로 주사되는 경우, 이는 또한 상업적으로 이용 가능한 종래 기술의 제형과 비교하여 유의미하게 감소된 주사 통증을 나타낸다. 따라서, 이들 약학적 조성물은 환자에게 더욱 편리하고 유리하다.

[0009] 본 발명의 또 다른 양태는 최종 제형 내 부가적 완충 제제 없이 원하는 pH에서 에타너셉트의 약학적 조제물을 제형화하는 방법을 제공한다.

[0010] 또 다른 양태에서, 본 발명은 에타너셉트, NaCl, 아르기닌, 및 수크로스를 포함하는 약학적 조성물을 제공하며, 여기서 약학적 조성물은 본질적으로 부가적 완충 제제를 갖지 않고, 조성물의 pH는 6.1 내지 6.5이다. 일 구현예에서, 약학적 조성물은 2주 동안 제어된 실온(CRT)에서 보관될 때 6.1 내지 6.5의 pH를 유지할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 에타너셉트 농도는 40 mg/mL 내지 100 mg/mL이다. 또 다른 구현예에서, 약학적 조성물은 등장성이다. 또 다른 구현예에서, 약학적 조성물은: 20 mM 내지 150 mM의 NaCl; 5 mM 내지 100 mM의 아르기닌; 및 0.5% 내지 2%(w/v)의 수크로스를 함유한다. 또 다른 구현예에서, 약학적 조성물은 계면활성제를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 계면활성제는 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 80, 또는 폴록사머 188이다. 또 다른 구현예에서, 계면활성제는 0.001% 내지 0.1% 농도(w/v)의 폴리소르베이트 20이다. 또 다른 구현예에서, 계면활성제는 0.001% 내지 0.1% 농도(w/v)의 폴리소르베이트 80이다. 또 다른 구현예에서, 계면활성제는 0.01% 내지 0.3% 농도(w/v)의 폴록사머 188이다. 또 다른 구현예에서, 약학적 조성물은 약 25℃에서 보관될 때 적어도 2주 동안 5.8 내지 6.7의 pH를 유지하며, 여기서 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 평가시 총 에타너셉트의 6% 미만이 고 분자량 형태로 응집된다. 또 다른 구현예에서, 약학적 조성물은 약 6.1 내지 약 6.5의 pH를 유지한다. 또 다른 구현예에서, 소수성 상호작용 크로마토그래피를 사용하여 평가시 에타너셉트 총량의 28% 미만이 미스폴딩된 형태이다. 또 다른 구현예에서, 약학적 조성물은 약 40 내지 100 mg/mL 에타너셉트, 약 120 mM NaCl, 약 25 mM 아르기닌, 약 1% 수크로스, 및 물로 필수적으로 구성된다. 또 다른 구현예에서, 약학적 조성물은 약 40 내지 100 mg/mL 에타너셉트, 약 120 mM NaCl, 약 25 mM 아르기닌, 약 1% 수크로스, 약 0.01% 폴리소르베이트 20, 및

물로 필수적으로 구성된다.

[0011] 또 다른 양태에서, 본 발명은, pH 6.1 내지 6.5에서 부가적 완충 제제를 포함하는 제형으로 에타너셉트 제형을 제형화하는 것, 및 부가적 완충 제제를 포함하는 제형을 부가적 완충 제제를 포함하지 않고 pH 5.6 내지 6.5인 제형과 교환하는 것, 및 생성된 약학적 제형을 수집하는 것을 포함하는, 부가적 완충 제제를 제거하고 pH를 6.1 내지 6.5로 유지하기 위해 에타너셉트의 약학적 조성물을 제형화하는 방법을 제공한다. 일 구현예에서, 교환 단계에서는 투석여과를 사용한다. 또 다른 구현예에서, 부가적 완충 제제를 포함하지 않는 제형은 등장성이다. 또 다른 구현예에서, 부가적 완충 제제를 포함하지 않는 제형은 수크로스, 아르기닌, 및 NaCl을 함유한다. 또 다른 구현예에서, 부가적 완충 제제를 포함하지 않는 제형은 20 mM 내지 150 mM의 NaCl; 5 mM 내지 100 mM의 아르기닌; 및 0.5% 내지 2%(w/v)의 수크로스를 함유한다. 또 다른 구현예에서, 부가적 완충 제제를 포함하지 않는 제형은 약 120 mM NaCl, 약 25 mM 아르기닌, 약 1% 수크로스, 및 물로 필수적으로 구성된다. 또 다른 구현예에서, 에타너셉트의 약학적 조성물을 제형화하는 방법은 폴리소르베이트를 첨가하는 것을 추가로 포함한다. 또 다른 구현예에서, 폴리소르베이트는 0.001% 내지 0.1% 농도(w/v)의 폴리소르베이트 20이다. 또 다른 구현예에서, 에타너셉트의 약학적 조성물을 제형화하는 방법은 약학적 조성물을 여과하는 것을 추가로 포함한다. 또 다른 구현예에서, 에타너셉트의 약학적 조성물을 제형화하는 방법은 약학적 조성물을 약물 제품 형태로 분취하는 것을 추가로 포함한다.

[0012] 또 다른 양태에서, 본 발명은 약물 제품 형태의 상기 기재된 에타너셉트의 약학적 조성물 및 보관 및 사용을 위한 지침서를 포함하는 키트를 제공한다.

[0013] 또 다른 양태에서, 본 발명은 에타너셉트, NaCl, 아르기닌, 수크로스, 포스페이트 완충제 및 벤질 알코올을 포함하는 약학적 조성물을 제공하며, 여기서 조성물의 pH는 6.1 내지 6.5이다. 일 구현예에서, 벤질 알코올은 0.1% 내지 5.0% 농도(v/v)이다. 또 다른 구현예에서, 벤질 알코올의 농도는 약 0.9%이다. 또 다른 구현예에서, 에타너셉트를 포함하는 약학적 조성물은 0.001% 내지 0.1% 농도(w/v)의 폴리소르베이트 20을 추가로 포함한다. 또 다른 구현예에서, 폴리소르베이트 20의 농도는 약 0.004%이다. 또 다른 구현예에서, 에타너셉트를 포함하는 약학적 조성물은 약 40 내지 100 mg/mL의 에타너셉트, 약 25 mM의 아르기닌, 약 100 mM의 소듐 클로라이드, 약 1% 농도(w/v)의 수크로스, 약 25 mM의 포스페이트 완충제, 및 약 0.9% 농도(v/v)의 벤질 알코올로 필수적으로 구성된다. 또 다른 구현예에서, 에타너셉트를 포함하는 약학적 조성물은 약 40 내지 100 mg/mL의 에타너셉트, 약 25 mM의 아르기닌, 약 100 mM의 소듐 클로라이드, 약 1% 농도(w/v)의 수크로스, 약 25 mM의 포스페이트 완충제, 약 0.9% 농도(v/v)의 벤질 알코올, 및 약 0.004% 농도(w/v)의 폴리소르베이트 20으로 필수적으로 구성된다.

[0014] 또 다른 양태에서, 본 발명은 상기 기재된 에타너셉트를 포함하는 약학적 조성물을 함유하는 단일-투여량 용기를 제공한다. 일 구현예에서, 약학적 조성물은 약 40 내지 100 mg/mL의 에타너셉트, 약 25 mM의 아르기닌, 약 100 mM의 소듐 클로라이드, 약 1% 농도(w/v)의 수크로스, 약 25 mM의 포스페이트 완충제, 및 약 0.9% 농도(v/v)의 벤질 알코올로 필수적으로 구성된다. 또 다른 구현예에서, 약학적 조성물은 약 40 내지 100 mg/mL의 에타너셉트, 약 25 mM의 아르기닌, 약 100 mM의 소듐 클로라이드, 약 1% 농도(w/v)의 수크로스, 약 25 mM의 포스페이트 완충제, 약 0.9% 농도(v/v)의 벤질 알코올, 및 약 0.004% 농도(w/v)의 폴리소르베이트 20으로 필수적으로 구성된다. 또 다른 구현예에서, 단일 투여량 용기는 바이알, 시린지, 또는 자동주사기이다. 또 다른 구현예에서, 단일-투여량 용기는 50.0 mg/mL의 에타너셉트, 120 mM의 소듐 클로라이드, 25 mM의 L-아르기닌, 1.0%(w/v)의 수크로스로 구성된 수성 제형을 함유한다.

[0015] 또 다른 양태에서, 본 발명은 멸균 조건 하에서 약학적 조성물의 대략 단일 투여량으로 단일-투여량 용기를 충진하는 것을 포함하는, 상기 기재된 에타너셉트를 포함하는 약학적 조성물을 함유하는 단일-투여량 용기를 제조하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명은 에타너셉트의 개선된 약학적 조성물을 제공한다. 본원에서 사용된 문구 "약학적 조성물"은 이를 필요로 하는 환자로의 주사 및/또는 투여에 적합한 폴리펩티드의 제형을 지칭하는 것으로 이해된다. 더욱 구체적으로, 약학적 조성물은 실질적으로 멸균된 것이고 수령자에게 과도하게 독성이거나 감염성인 어떠한 제제도 함유하지 않는다. 에타너셉트는 인간 IgG1의 Fc 도메인에 융합된 p75 TNF 수용체의 가용성 형태이다(TNFR:Fc). 상업적으로 이용 가능한 에타너셉트는 ENBREL®(Immunex Inc., Thousand Oaks, CA)로 알려져 있다. 에타너셉트는 중국 햄스터 난소(CHO) 포유류 세포 발현 시스템에서 재조합 DNA 기술에 의해 생산된다. 이는 934개의 아미노산으로 구성되고 약 150 킬로달톤의 겉보기 분자량을 갖는다(Physicians Desk Reference, 2002, Medical Economics Company Inc.). CHO 세포에서 발현된 전체 서열은 하기에 나타난다(서열번호 1). 그러나, 이 서열의

사소한 변형 및 결실(10% 까지)이 가능할 수 있고 본 발명의 범위 내에서 사용될 수 있음이 이해되어야 한다.

[0017]

1 Leu-Pro-Ala-Gln-Val-Ala-Phe-Thr-Pro-Tyr-
11 Ala-Pro-Glu-Pro-Gly-Ser-Thr-Cys-Arg-Leu-
21 Arg-Glu-Tyr-Tyr-Asp-Gln-Thr-Ala-Gln-Met-
31 Cys-Cys-Ser-Lys-Cys-Ser-Pro-Gly-Gln-His-
41 Ala-Lys-Val-Phe-Cys-Thr-Lys-Thr-Ser-Asp-
51 Thr-Val-Cys-Asp-Ser-Cys-Glu-Asp-Ser-Thr-
61 Tyr-Thr-Gln-Leu-Trp-Asn-Trp-Val-Pro-Glu-
71 Cys-Leu-Ser-Cys-Gly-Ser-Arg-Cys-Ser-Ser-
81 Asp-Gln-Val-Glu-Thr-Gln-Ala-Cys-Thr-Arg-
91 Glu-Gln-Asn-Arg-Ile-Cys-Thr-Cys-Arg-Pro-
101 Gly-Trp-Tyr-Cys-Ala-Leu-Ser-Lys-Gln-Glu-
111 Gly-Cys-Arg-Leu-Cys-Ala-Pro-Leu-Arg-Lys-
121 Cys-Arg-Pro-Gly-Phe-Gly-Val-Ala-Arg-Pro-
131 Gly-Thr-Glu-Thr-Ser-Asp-Val-Val-Cys-Lys-
141 Pro-Cys-Ala-Pro-Gly-Thr-Phe-Ser-Asn-Thr-
151 Thr-Ser-Ser-Thr-Asp-Ile-Cys-Arg-Pro-His-
161 Gln-Ile-Cys-Asn-Val-Val-Ala-Ile-Pro-Gly-
171 Asn-Ala-Ser-Met-Asp-Ala-Val-Cys-Thr-Ser-
181 Thr-Ser-Pro-Thr-Arg-Ser-Met-Ala-Pro-Gly-
191 Ala-Val-His-Leu-Pro-Gln-Pro-Val-Ser-Thr-

201 Arg-Ser-Gln-His-Thr-Gln-Pro-Thr-Pro-Glu-

211 Pro-Ser-Thr-Ala-Pro-Ser-Thr-Ser-Phe-Leu-

221 Leu-Pro-Met-Gly-Pro-Ser-Pro-Pro-Ala-Glu-

231 Gly-Ser-Thr-Gly-Asp-Glu-Pro-Lys-Ser-Cys-

241 Asp-Lys-Thr-His-Thr-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro-

251 Ala-Pro-Glu-Leu-Leu-Gly-Gly-Pro-Ser-Val-

261 Phe-Leu-Phe-Pro-Pro-Lys-Pro-Lys-Asp-Thr-

271 Leu-Met-Ile-Ser-Arg-Thr-Pro-Glu-Val-Thr-

281 Cys-Val-Val-Val-Asp-Val-Ser-His-Glu-Asp-

291 Pro-Glu-Val-Lys-Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-

301 Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-Ala-Lys-Thr-Lys-

311 Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asn-Ser-Thr-Tyr-

321 Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-

331 Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-

341 Cys-Lys-Val-Ser-Asn-Lys-Ala-Leu-Pro-Ala-

351 Pro-Ile-Glu-Lys-Thr-Ile-Ser-Lys-Ala-Lys-

361 Gly-Gln-Pro-Arg-Glu-Pro-Gln-Val-Tyr-Thr-

371 Leu-Pro-Pro-Ser-Arg-Glu-Glu-Met-Thr-Lys-

381 Asn-Gln-Val-Ser-Leu-Thr-Cys-Leu-Val-Lys-

391 Gly-Phe-Tyr-Pro-Ser-Asp-Ile-Ala-Val-Glu-

401 Trp-Glu-Ser-Asn-Gly-Gln-Pro-Glu-Asn-Asn-

411 Tyr-Lys-Thr-Thr-Pro-Pro-Val-Leu-Asp-Ser-

421 Asp-Gly-Ser-Phe-Phe-Leu-Tyr-Ser-Lys-Leu-

431 Thr-Val-Asp-Lys-Ser-Arg-Trp-Gln-Gln-Gly-

441 Asn-Val-Phe-Ser-Cys-Ser-Val-Met-His-Glu-

451 Ala-Leu-His-Asn-His-Tyr-Thr-Gln-Lys-Ser-

[0018]

461 Leu-Ser-Leu-Ser-Pro-Gly-Lys

[0019]

[0020] 본 발명은 에타너셉트를 포함하나 본질적으로 부가적 완충 제제를 함유하지 않는 약학적 조성물을 제공한다. 문구 "부가적 완충 제제"는 조성물 또는 제형의 완충 능력에 유의미하게 기여하는, 에타너셉트 그 자체 외의, 에타너셉트 조성물 또는 제형의 성분을 지칭한다. 에타너셉트 그 자체는 하기 기재된 조건 하에서 pH를 6.1 내지 6.5, 구체적으로 약 6.2 내지 6.3으로 유지하기 위하여 필요로 하는 모든 완충을 제공하는 것으로 본원에서 나타났다. 하기 실시예 1에서 입증된 바와 같이, 이 pH 범위는 에타너셉트 제형의 원하는 안정성 특성(6% 미만의 고 분자량 응집체 및 28% 미만의 미스폴딩 및 클리핑된 종)을 유지하는 데 효과적인 것으로 나타났다.

[0021] 문구 "본질적으로 부가적 완충 제제가 없는"은 에타너셉트 외의 임의의 완충 제제가 0.5 ㎜ 미만이라는 것을 의미한다. 문구 "총 부가적 완충 제제"는 조성물 또는 제형의 완충 능력에 유의미하게 기여하는, 에타너셉트 그 자체를 제외한, 에타너셉트 조성물 또는 제형의 모든 성분을 총괄하여 지칭한다. 일정 구현예에서, 본 발명에

따른 약학적 조성물은 2.0 mM 미만의 총 부가적 완충 제제, 1.5 mM 미만의 총 부가적 완충 제제, 1.0 mM 미만의 총 부가적 완충 제제, 0.5 mM 미만의 총 부가적 완충 제제, 0.25 mM 미만의 총 부가적 완충 제제, 0.1 mM 미만의 총 부가적 완충 제제, 또는 0.05 mM 미만의 총 부가적 완충 제제를 포함한다. 전형적인 약학적 조성물에서, 부가적 완충 제제는, 종종 5.0 mM 이상의 농도에서, pH를 원하는 범위로 유지하는 데 사용된다. 다양한 잘 알려진 부가적 완충 제제는 히스티딘, 포타슘 포스페이트, 소듐 또는 포타슘 시트레이트, 말레산, 암모늄 아세테이트, 트리스-(하이드록시메틸)-아미노메탄(트리스), 다양한 형태의 아세테이트 및 디에탄올아민이다. 하나의 통상적인 완충 제제는 완충 능력이 pH 6.2 또는 그 근처에 있는 소듐 포스페이트이다. 원하는 pH가 6.3이기 때문에 소듐 포스페이트는 에타너셉트의 현재 상업적 액체 제형에 사용되는 완충 제제이다. 본원에 기재된 발명에서, 에타너셉트의 약학적 제형에는 본질적으로 소듐 포스페이트가 존재하지 않는다. 놀랍게도, 본질적으로 임의의 부가적 완충 제제가 없음에도 불구하고, 본 발명의 약학적 조성물의 pH는 연장된 보관 후에도, 6.1 내지 6.5로 유지된다. 더욱 더 놀랍게도, 대상체(예를 들어, 인간 대상체 또는 환자)로 주사될 때, 본질적으로 부가적 완충 제제가 없는 약학적 조성물은 현재의 완충된 상업적 제형보다 유의미하게 더 적은 통증을 초래한다. 중성에 가까운 pH 완충 능력 및 (예를 들어, 시트레이트 완충제와 비교하여) 덜 고통스러운 완충제 성분 중 하나라는 확신 때문에 포스페이트가 약학적 조성물용 완충제로 종종 선택되지만, 본 발명자들은 pH 6.3 부근에서의 포스페이트 완충제는 주사 시 통증의 원인이 된다고 판단하였다.

[0022] 그 사용 맥락으로부터 달리 명확하지 않는 한, "제형 용액" 또는 "제형 완충제"는 그 자체가 에타너셉트를 함유하지 않지만 에타너셉트를 포함하는 제형을 제조하는 데 사용되는 용액 또는 완충제이다.

[0023] 전형적으로, 본 발명의 약학적 조성물 내 에타너셉트 농도는 수성 제형(예를 들어, 용매로서 물)에서 약 40 mg/mL 내지 약 200 mg/mL이다. 더욱 바람직하게, 에타너셉트 농도는 약 40 mg/mL 내지 약 100 mg/mL, 더욱 더 바람직하게는 약 40 mg/mL 내지 약 75 mg/mL, 선택적으로 약 50 mg/mL이다.

[0024] 본 발명의 약학적 조성물은 또한 아르기닌을 함유한다. 아르기닌은 액체 제형에서 에타너셉트를 안정화시키는 데에 실질적인 기여를 하는 것으로 나타났다(참조로서 본원에 포함된, 미국 특허 번호 7,648,702 참조). 약학적으로 적절한 형태의 아르기닌은 상업적으로 이용 가능하다. 전형적으로, L-아르기닌(예를 들어, L-아르기닌 HCl 또는 L-아르기닌 염기)은 약학적 제형에 사용되는 아르기닌이다. 6.0과 6.6의 pH 범위 내에서, 구체적으로 약 6.2 내지 6.3의 pH에서, 아르기닌은 제형의 완충 능력에 의미있게 기여하지 않는 것으로 이해된다. 따라서, 이는 본 발명의 에타너셉트 제형 또는 조성물에서 부가적 완충 제제가 아니다. 본 발명의 조성물 내 아르기닌의 농도는 바람직하게는 약 1 mM 내지 약 1 M, 더욱 바람직하게는 약 10 mM 내지 약 200 mM, 또는 대안적으로 약 5 mM 내지 약 100 mM, 더욱 바람직하게는 약 10 mM 내지 약 100 mM, 더욱 더 바람직하게는 약 15 mM 내지 약 75 mM, 더욱 더 바람직하게는 약 25 mM이다. 따라서, 본 발명의 일 양태에서, 약학적 조성물은 약 50 mg/mL 내지 75 mg/mL의 에타너셉트 및 약 25 mM의 아르기닌을 포함하며, 여기서 약학적 조성물은 본질적으로 부가적 완충 제제를 갖지 않으며, 조성물의 pH는 6.0 내지 6.6이다. 본원에 사용된 용어 "약"은, 주어진 값의 10% 이하로, 기재된 제형의 성분 농도에 변동이 있을 수 있음을 의미하는 것으로 이해된다. 예를 들어, 제형이 약 10 mg/mL의 폴리펩티드를 갖는 경우, 이것은 제형이 명시된 폴리펩티드 9 내지 11 mg/mL를 가질 수 있음을 의미하는 것으로 이해된다.

[0025] 약학적 조성물은, 부가적 부형제가 부가적 완충 제제가 아니며, 구체적으로 포스페이트 완충 제제가 아닌 한, 이러한 부형제를 함유할 수 있다. 본 발명에 따른 부가적 부형제의 예로는 수크로스, 락토스, 글리세롤, 자일리톨, 소르비톨, 만니톨, 말토스, 이노시톨, 트레할로스, 글루코스와 같은 당/폴리올; 혈청 알부민(소 혈청 알부민(BSA), 인간 SA 또는 재조합 HA), 덱스트란, PVA, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스(HPMC), 폴리에틸렌이민, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈(PVP), 하이드록시에틸셀룰로스(HEC)와 같은 중합체; 다가 알코올(예를 들어, PEG, 에틸렌 글리콜 및 글리세롤) 디메틸설폭사이드(DMSO) 및 디메틸포름아미드(DMF)와 같은 비-수성 용매; 프롤린, L-세린, 알라닌, 글리신, 리신 하이드로클로라이드, 사르코신 및 감마-아미노부티르산과 같은 아미노산, 및 계면활성제가 포함되나 이에 한정되지 않는다.

[0026] 본 발명의 일부 바람직한 구현예에서, 부형제로는 NaCl 및/또는 수크로스가 포함된다. NaCl은 약 5 mM 내지 약 200 mM, 더욱 바람직하게는 약 20 mM 내지 약 150 mM, 더욱 더 바람직하게는 약 80 mM 내지 약 140 mM의 농도로 약학적 조성물 내에 존재할 수 있다. 수크로스는 약 0.5% 내지 약 2%(w/v) 수크로스, 더욱 바람직하게는 약 0.8% 내지 약 1.2%(w/v) 수크로스, 더욱 더 바람직하게는 약 1%(w/v) 수크로스의 농도까지 첨가될 수 있다.

[0027] 약학적 조성물의 삼투질농도는 바람직하게는 활성 성분의 안정성을 최대화하고 또한 투여시 환자의 불편을 최소화하기 위해 조절된다. 약학적 조성물은 혈청과 등장성, 즉 동일하거나 유사한 삼투질농도를 가지는 것이 일반

적으로 바람직하며, 이는 장성(tonicity) 변경제의 첨가에 의해 달성된다. 혈청은 킬로그램 당 약 300 +/- 50 밀리오스몰랄(milliosmolal)이므로, 등장성 약학적 조성물의 삼투질농도는 약 180 내지 약 420 밀리오스몰랄일 것으로 생각된다. 일부 구현예에서, 범위는 약 250 내지 약 350 밀리오스몰랄일 것이다.

[0028] 장성 변경제는 용액의 삼투질농도에 기여하는 분자인 것으로 이해된다. 삼투질농도를 변경하는 데 적합한 장성 변경제의 예로는 아미노산(예를 들어, 아르기닌, 시스테인, 히스티딘 및 글리신), 염(예를 들어, 소듐 클로라이드, 포타슘 클로라이드 및 소듐 시트레이트) 및/또는 당류(예를 들어, 수크로스 , 글루코스 및 만니톨)가 포함되나, 이에 한정되지 않는다. 제형 내 장성 변경제의 농도는 바람직하게는 약 1 mM 내지 1 M, 더욱 바람직하게는 약 10 mM 내지 약 200 mM이다. 일부 구현예에서, NaCl 및 수크로스의 농도는 등장성인 약학적 조성물을 생성하도록 조정된다. 예로서 하기에 예시된 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 약 40 내지 100 mg/mL의 에타너셉트, 약 120 mM NaCl, 약 25 mM 아르기닌, 약 1% 수크로스, 및 물을 함유한다. 구체적으로, 약학적 조성물은 약 50 내지 100 mg/mL의 에타너셉트, 약 120 mM의 NaCl, 약 25 mM의 아르기닌, 약 1%의 수크로스, 약 0.01%의 폴리소르베이트 20, 및 물로 필수적으로 구성될 수 있다.

[0029] 선택적으로, 본 발명의 약학적 조성물은 계면활성제를 포함할 수 있다. 계면활성제는 용액/표면 유도 응력을 감소시키는 제제이다. 계면활성제의 예는 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 40, 폴리소르베이트 60, 및 폴리소르베이트 80(예를 들어, TWEEN-20®(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 또는 TWEEN-80®(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO))과 같은 폴리소르베이트, 소듐 도데실 설페이트(SDS), 폴리옥시에틸렌 공중합체, 폴록사머 188(예를 들어, PLURONIC® F-68(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 또는 폴록사머 407(예를 들어, PLURONIC® F-127(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO))과 같은 폴록사머, CHAPS, 모노라우레이트, 또는 상기의 임의의 조합이다. 바람직한 계면활성제는 폴리소르베이트 20이다. 예를 들어, 폴리소르베이트 20은 약 0.001% 내지 약 0.03%의 농도(w/v)로 약학적 조성물 내에 포함될 수 있다. 예로서 하기에 예시된 구체적인 구현예에서, 폴리소르베이트 20은 0.01% 또는 약 0.004%의 농도(w/v)로 약학적 제형 내에 포함될 수 있다.

[0030] *약학적 조성물의 시험*

[0031] 하기 실시예는 제형이 원하는 범위의 pH를 유지할 수 있는지 여부를 당업자가 결정할 수 있는 방법을 예시한다. 본질적으로, 약학적 조성물은 시험 용기(유리 바이알, 유리 시린지, 플라스틱 시린지, 스테인리스 스틸 용기, 또는 약학적 조성물에 적합한 임의의 방식의 멸균 장치일 수 있음)에서 제형화되고 보관되며 pH는 0 시간, 그리고 그 후 적절한 지시된 시간에 평가된다. 통상적으로, 시험 조건은 약학적 조성물의 보관에 대한 필요를 예상할 것이고, 그 조건을 강조할 것이다. 예를 들어, 본 발명의 제형은 적어도 2주, 적어도 4주, 적어도 8주, 적어도 12주, 및 적어도 24주 동안 제어된 실온(CRT) 하에서 원하는 pH를 유지할 수 있다. CRT는 USP에 의해 정의되며, 20℃ 내지 25℃(68°F 내지 77°F)의 통상적이고 관례적인 작업 환경을 포괄하고; 25℃ 이하로 계산된 평균 운동 온도를 초래하며; 약국, 병원, 및 창고에서 경험하는 15℃ 내지 30℃(59°F 내지 86°F)의 이동을 가능하게 하는 자동온도조절로 유지되는 온도를 갖는다.

[0032] 일 양태에서, 본 발명의 약학적 조성물은 구체적인 품질 특성을 나타낸다. 이들 품질 특성의 시험은 또한 예로서 하기에 기재된다. 예를 들어, 본 발명의 약학적 조성물은 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 평가시 고분자량 형태로 응집된 총 에타너셉트를 6% 미만 함유한다. 또 다른 예로서, 본 발명의 약학적 조성물은 소수성 상호작용 크로마토그래피를 사용하여 평가시 미스폴딩 형태인 에타너셉트 총량을 28% 미만 함유한다.

[0033] 본 발명의 약학적 조성물은 다음의 온도 및 연장된 시간에 대해 pH 및/또는 다른 참고 품질 특성(최소 고 분자량 형태 및 최소 미스폴딩 형태)을 유지함으로써 여전히 안정할 수 있다: (1) -30℃(동결)에서 적어도 4주, 적어도 3개월, 적어도 6개월, 적어도 12개월, 및 적어도 36개월 동안; (2) 1회까지의 동결/해동 사이클, 2회까지의 동결/해동 사이클, 3회까지의 동결/해동 사이클, 및 5회까지의 동결/해동 사이클 동안; (3) 4℃(냉장 온도)에서 적어도 2주, 적어도 4주, 적어도 8주, 적어도 12주, 적어도 적어도 24주, 및 적어도 52주 동안; (4) 25℃(실온)에서 적어도 2주, 적어도 4주, 적어도 8주, 적어도 12주, 적어도 24주 동안; 및 (5) 40℃(가속 안정성 시험)에서 적어도 2주 동안.

[0034] 본 발명의 약학적 조성물은 또한 대상체에게 주사시 통증 감소의 놀라운 결과를 나타낸다. 이 특성은 문헌 [Gallagher et al, 2002, Am. J. Em. Med. v20; i4: 287-290]에 의해 입증된 시각상사척도(Visual Analog Scale, VAS)를 사용하여 평가될 수 있다. 훈련된 의료 종사자가 주사를 통해 약물을 투여하고, 각각의 주사 후 30초 내에, 대상체는 100 mm 시각상사척도(VAS)를 사용하여 주사 통증의 수준을 평가했다. VAS 상의 13 내지 16 mm의 차이는 임상적으로 의미있는 것으로 고려된다. 이 기술을 사용하여, 포스페이트가 없는 위약 제형은 pH 6.3의 포스페이트를 함유하는 위약 제형 및 pH 6.3의 에타너셉트 및 포스페이트를 모두 함유하는 현재의 상업적

제형보다 유의미하게 더 적은 통증을 유도했음이 입증되었다.

[0035] 본 발명의 약학적 조성물 및 방법에서 사용되는 에타너셉트의 생산 및 정제는 임의의 표준 방법에 의해 수행될 수 있다. 전형적으로, 에타너셉트는 CHO 세포에서 재조합적으로 발현되고 배지 내로 분비된다. 배지가 수집되고, 여과되고, 예를 들어 다양한 크로마토그래피 기술을 사용하여 정제된다. 예를 들어, 단백질 A는 에타너셉트와 같은 Fc 도메인 함유 폴리펩티드를 정제하는 데 사용될 수 있고, 제1 처리 단계로서 유리하다. 이온-교환 칼럼에서의 분별, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상의 크로마토그래피, 헤파린 SEPHAROSET™ 상의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지(예컨대 폴리아스파르트산 칼럼) 상의 크로마토그래피, 하이드록시 아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 및 친화성 크로마토그래피, 및 알려진 또는 아직 발견되지 않은 정제 기술의 임의의 조합과 같은 폴리펩티드 정제를 위한 다른 기술. 유용한 생산 및 정제 기술의 예는 미국 특허 번호 7,294,481(Fung), 7,452,695(Van Ness 외), 7,122,641(Vedantham 외), 7,157,557(Sassenfeld 외), 7,300,773(Drapeau 외), 8,163,522(Brockhaus 외), 및 7,648,702(Gombotz 외)에서 찾을 수 있다.

[0036] *발명의 방법*

[0037] 본 발명은 또한, 목표 범위의 완충된 제형 내에 에타너셉트를 제형화하는 것, 및 그 목표 범위 내에 또는 바로 아래에 있는 완충되지 않은 제형과 완충된 제형을 교환하는 것, 및 생성된 에타너셉트의 약학적 제형을 수집하는 것을 포함하는, 완충제를 제거하고 목표 범위의 pH를 유지하도록 에타너셉트의 약학적 조성물을 제형화하는 방법을 제공한다. 예로서 하기 예시된 바람직한 구현예에서, 방법은, pH 6.0 내지 6.6의 완충된 제형으로 에타너셉트 제형을 제형화하는 것, pH 5.6 내지 6.5의 완충되지 않은 제형과 완충된 제형을 교환하는 것, 및 생성된 약학적 제형을 수집하는 것을 포함하는, 완충제를 제거하고 6.0 내지 6.6의 pH를 유지하도록 에타너셉트의 약학적 조성물을 제형화하는 것을 제공한다. pH를 6.1 내지 6.5로 유지하는 에타너셉트의 완충되지 않은 조성물을 달성하기 위해서는, 출발 완충된 에타너셉트 제형 및 완충되지 않은 제형 모두의 pH가 반드시 보정되도록 것이 중요하다. 예를 들어, 출발 완충된 에타너셉트 제형이 pH 7.2인 경우, HCl과 같은 강산을 이용하여 6.1 내지 6.5 범위 내로 조정될 것이다. 유사하게, 교환을 위해 사용되는 완충되지 않은 제형은 pH 5.6 내지 6.5로 적정되어야 한다. 교환을 위해 사용되는 완충되지 않은 제형은 완충 제제를 갖지 않으므로, 적정 중에 주의를 기울여야 한다.

[0038] 완충되지 않은 제형과 완충된 제형을 교환하기 위해, 당업자는 당업계에 잘 알려진 다양한 완충제 교환 기술을 사용할 수 있다. 투석은 반투막을 통과하는 선택적 확산을 사용하여 더 큰 단백질 제형으로부터 원하지 않는 더 작은 분자를 제거한다. 일 구현예에서, 평형화는 원하지 않는 분자의 농도에서의 원하는 배수 감소가 달성될 때까지 순차적으로 수행된다. 예를 들어, 1,000,000배 이상의 농도 감소를 달성하기 위하여, 각각 100배 이상의 희석으로, 3회 순차적 평형화가 사용될 수 있다. 한외여과 및 투석여과는 반투막을 사용한다는 점에서 투석과 유사하다. 그러나 투석의 수동적 확산과 달리, 한외여과 및 투석여과는 다양한 기술을 사용하여 용액으로 하여금 막을 통과하도록 강제하는 것을 수반한다. 전형적으로 압력 및 원심분리가 사용된다. 완충제 교환의 또 다른 방법은 겔 여과 또는 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 수행될 수 있다. 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 및 혼합 모드 크로마토그래피와 같이 충분히 당업자의 기술 내인 완충제 교환을 달성하는 데 또한 사용될 수 있는 많은 다른 크로마토그래피 기술이 있다.

[0039] 완충된 제형이 완충되지 않은 제형으로 교환된 후에, 본 발명의 방법은 생성된 약학적 제형을 수집하는 것을 포함한다. 이 지점에서, 본질적으로 모든 완충제는 제거되었지만, pH는 여전히 원하는 수준으로 유지된다. 에타너셉트를 함유하는 약학적 조성물의 경우, pH는 6.0 내지 6.6에서 유지된다.

[0040] 약학적 제형은 필요에 따라 추가로 처리될 수 있다. 예를 들어, 계면활성제가 첨가될 수 있다. 또 다른 예에서, 입자를 제거하는 것을 원하는 경우, 약학적 조성물은 여과될 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 본 발명의 방법은 또한 약학적 조성물을 약물 제품 형태로 분취하는 것을 포함한다. 이러한 약물 제품 형태는 환자 또는 의료 제공자의 최종 사용을 위해 배포된다. 본 발명의 약학적 조성물은 비경구 투여, 즉 피하, 근육내, 정맥내, 복강내, 뇌척수내, 관절-내, 활막내, 및/또는 경막내에 특히 유용하다. 비경구 투여는 볼로스(bolus) 주사 또는 연속 주입에 의해 이루어질 수 있다. 주사용 약학적 조성물은 단위 투여량 형태, 예를 들어 앰풀 또는 다회-투여량 용기에, 제공될 수 있다. 약학적 조성물은, 원한다면, 활성 성분을 함유하는 하나 이상의 단위 투여량 형태를 함유할 수 있는 바이알, 팩 또는 디스펜서 장치에 제공될 수 있다. 일 구현예에서 디스펜서 장치는 주사 준비가 된 액체 제형의 단일 투여량을 갖는 시린지를 포함할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 약학적 조성물은 재사용 가능한 자동 주사기와 함께 사용하기 위한 카세트 요소 내로 분취된다. 본 발명의 또 다른 양태에서, 약학적 조성물은 온-바디(on-body) 주사기 장치 내에 또는 그와 함께 패키징되어 제공될 수 있다. 또한 또 다른 구

현예에서, 약학적 조성물은 무바늘 주사 장치에 적합한 약물 제품 형태로 분취될 수 있다.

[0041] 약학적 조성물은 또한 데포(depot) 조제물로서 적합한 형식으로 분취될 수 있다. 이러한 장시간 작용 제형은 이식(예를 들어, 피하 또는 근육내) 또는 근육내 주사에 의해 투여될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 제형은 적합한 중합체성 또는 소수성 물질(예를 들어, 허용되는 오일 중 에멀젼으로) 또는 이온 교환 수지를 이용하여, 또는 약간 가용성인(sparingly soluble) 유도체로서, 예를 들어, 약간 가용성인 염으로서 개질될 수 있다.

[0042] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 약학적 조성물을 함유하는, 키트 또는 용기에 관한 것이다. 키트에는 또한 약학적 조성물의 보관 및 사용에 대한 지침서가 첨부될 수 있다. 용기는, 예를 들어 단일-사용 용기, 즉 본 발명의 제형의 일 투여량을 보유하는 용기일 수 있다. 단일-사용 용기는 완전한 단일 투여량이 용기로부터 환자에게로 투여될 수 있음을 보장하는 충분한 여분을 단일 투여량에 더해 함유할 수 있지만, 용기가 제2 투여량을 투여하는 데 사용될 수 있을 정도로 많은 여분은 아니라는 것이 이해된다. 본 발명의 일정 양태에서 사용에 적합한 용기의 예(단일-사용이든 다회-사용 용기이든)로는 바이알, 시린지, 및 자동-주사기가 포함된다. 적합한 자동-주사기의 예로는 미국 특허 번호 8,177,749, 8,052,645, 및 8,920,374, 미국 특허 출원 번호 12/993163, 13/269750, 13/454531, 14/112479, 14/777255, 및 14/777259, 및 PCT 공보 WO 2014/0089393, WO 2016/033496, 및 WO 2016/033507에 있는 것들이 포함되며, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 포함된다.

[0043] 본 발명의 에타너셉트-함유 조성물 및 제형뿐만 아니라 본원에 기재된 시린지, 자동주사기, 키트, 등은 에타너셉트를 이용한 치료에 반응하는 질환을 갖는 환자의 치료에 사용될 수 있다. 이러한 질환의 예로는 류마티스성 관절염, 건선 관절염, 강직 척추염, 및 건선이 포함된다. 에타너셉트를 이용하여 환자를 치료하는 방법은, 예를 들어, 미국 특허 번호 7,915,225, 8,119,605, 8,410,060, 8,722,631, 및 8,119,604에 기재되어 있으며, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 포함된다.

발명의 효과

[0044] 본 발명은 에타너셉트의 약학적 조성물의 제형을 제공한다. 본 발명은 또한 완충제를 제거하고 에타너셉트의 약학적 조성물을 제형화하는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0045] 도 1은 실시예 3의 에타너셉트 안정성 분석을 위하여 SEC에 의해 검출된 HMW(피크 B) 퍼센트를 나타낸다.

도 2는 실시예 3의 에타너셉트 안정성 분석을 위하여 dSEC에 의해 검출된 LMW 퍼센트를 나타낸다.

도 3은 실시예 3의 에타너셉트 안정성 분석을 위하여 HIC에 의해 검출된 피크 3 퍼센트를 나타낸다.

도 4는 실시예 4의 스테인리스 스틸 냉동-용기 보관 에타너셉트 안정성 분석을 위하여 HIC에 의해 검출된 피크 3 퍼센트를 나타낸다.

도 5는 실시예 4의 스테인리스 스틸 냉동-용기 보관 에타너셉트 안정성 분석을 위하여 dSEC에 의해 검출된 LMW 퍼센트를 나타낸다.

도 6은 실시예 4의 스테인리스 스틸 냉동-용기 보관 에타너셉트 안정성 분석을 위하여 SEC에 의해 검출된 피크 B 퍼센트를 나타낸다.

도 7은 실시예 4의 동결-해동 에타너셉트 안정성 분석을 위하여 SEC에 의해 검출된 피크 B 퍼센트를 나타낸다.

도 8은 실시예 6의 분석에서 제어된 실온(CRT)에서 조정된 AEX 중간 푸울(pool)의 pH 안정성을 나타낸다.

도 9는 실시예 6의 분석에서 CRT에서의 UF/DF 푸울 pH(A) 및 전도도(B) 안정성을 나타낸다.

도 10은 실시예 6의 분석에서 SAS 용액에 제형화된 에타너셉트의 pH(A) 및 전도도(B) 안정성을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 본 발명은 다음의 실시예를 참조하여 더욱 충분히 이해될 것이다. 그러나, 실시예는 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0047] **실시예**

[0048] **실시예 1: 다양한 제형의 안정성 시험**

[0049] 본 실시예는 50 mg/mL의 에타너셉트에 대한 pH 및 완충제의 효과를 입증하고, 부가된 포스페이트 완충제가 없는 고농도(100 mg/mL) 용액의 안정성을 평가한다. 다음의 제형을 시험하였다.

[0050] [표 1]

pH 스크리닝을 위한 제형

제형 명칭	완충제	부형제	첨가된 폴리소르베이트	최종 pH	단백질 농도 (mg/mL)
A45SuT	10 mM 소듐 아세테이트	9% 수크로스	0.004% PS20	4.5	50
A52SuT	10 mM 소듐 아세테이트	9% 수크로스	0.004% PS20	5.2	50
A58SuT	10 mM 소듐 아세테이트	9% 수크로스	0.004% PS20	5.8	50
50_SAST_100NaCl	없음	25 mM L-아르기닌, 100 mM NaCl, 1% 수크로스	0.004% PS20	6.3	50
100_SAST_100NaCl	없음	25 mM L-아르기닌, 100 mM NaCl, 1% 수크로스	0.004% PS20	6.3	100
PASST + BeOH	25 mM 포스페이트	25 mM L-아르기닌, 100 mM NaCl, 1% 수크로스, 0.9% 벤질 알콜	0.004% PS20	6.3	50
PASST(대조군)	25 mM 포스페이트	25 mM L-아르기닌, 100 mM NaCl, 1% 수크로스	0.004% PS20	6.3	50

[0051]

[0052] **재료**: 50 mg/mL의 PASS(25 mM 포스페이트 완충제, 25 mM L-아르기닌, 100 mM NaCl, 1% 수크로스) 중 Enbrel 약물 물질을 본 연구에 사용하였다. 아세테이트 및 완충제-없는 제형의 경우, 재료를 새로운 제형(폴리소르베이트가 없음)으로 투석하고 10,000 MWCO 센트리프렙(centriprep)을 사용하여 50 mg/mL로 농축시켰다. 50_SAS_100NaCl 샘플 또한 100 mg/mL로 농축시켰다(100_SAS_100NaCl). 최종 농도 0.9%가 되도록 벤질 알코올을 현재의 제형 내에 첨가하였다. 폴리소르베이트 20의 1% 모용액을 새롭게 제조하고 최종 농도 0.004%가 되도록 모든 제형 내에 첨가하였다. 모든 제형을 1 mL 긴 BD 유리 시린지 내에 0.5 mL의 부피까지 수동으로 충진하고 나서 ASPU 진공화 마개 장치를 사용하여 마개를 하였다.

[0053] **방법**: pH는 메틀러 인랩(Mettler Inlab) 마이크로프로브와 결합된 메틀러 톨레도 세븐이지(Mettler Toledo SevenEasy) pH 측정기를 사용하여 측정하였다. 측정 전에 샘플을 실온까지 가온하였다. 삼투질농도는 어드밴스드 삼투압계 모델 3900을 사용하여 측정하였다. 각각의 측정은 250 μL의 샘플을 사용하여 수행하였고 290 삼투질농도 표준을 시험하여 시스템이 제대로 작동함을 확실하게 하였다. 크기 배제 HPLC는 크로멜레온(Chromeleon) 7.2 소프트웨어가 있는 애질런트(Agilent) 1100 HPLC에서 수행하였다. 변성 크기 배제 HPLC는 크로멜레온(Chromeleon) 7.2 소프트웨어가 있는 애질런트(Agilent) 1100 HPLC에서 수행하였다.

[0054] **결과**: 모든 제형의 pH는 24주 이상 유지되었다.

[0055] [표 2]

지시된 시점 및 온도에서의 pH

	pH			
	t=0	t=24w		
샘플	4°C	4°C	25°C	40°C
A45SuT	4.60	4.66	4.66	4.61
A52SuT	5.10	5.13	5.16	5.08
A58SuT	5.61	5.60	5.66	5.62
50_SAST_100NaCl	6.24	6.21	6.22	6.17
100_SAST_100NaCl	6.32	6.21	6.20	6.19
PASST + BeOH	6.27	6.22	6.22	6.21
PASST 대조군	6.26	6.21	6.21	6.19

[0056]

[0057] [표 3]

SEC 에 의한 응집체 수준(피크 B), 전체에 대한 %, 4°C

샘플	t=0	t=4w	t=8w	t=12w	t=24w
A45SuT	0.9	1.1	1.1	1.2	1.2
A52SuT	1.2	1.4	1.5	1.6	1.4
A58SuT	1.0	1.2	1.2	1.3	1.3
50_SAST_100NaCl	1.1	1.3	1.3	1.3	1.4
100_SAST_100NaCl	1.1	1.4	1.5	1.5	1.6
PASST + BeOH	1.0	1.2	1.2	1.3	1.3
PASST 대조군	1.0	1.1	1.2	1.2	1.3

[0058]

[0059] [표 4]

SEC 에 의한 응집체 수준(피크 B), 전체에 대한 %, 25°C

샘플	t=0	t=4w	t=8w	t=12w	t=24w
A45SuT	0.9	2.0	2.7	3.2	4.1
A52SuT	1.2	2.7	3.1	3.6	4.6
A58SuT	1.0	1.9	2.6	3.1	4.4
50_SAST_100NaCl	1.1	1.9	2.4	2.8	3.7
100_SAST_100NaCl	1.1	2.6	3.3	3.9	5.3
PASST + BeOH	1.0	1.9	2.4	2.8	3.8
PASST 대조군	1.0	1.8	2.2	2.6	3.5

[0060]

[0061] [표 5]

SEC 에 의한 응집체 수준(피크 B), 전체에 대한 %, 40°C

샘플	t=0	t=2w	t=4w	t=8w	t=12w	t=24w
A45SuT	0.9	5.6	9.0	11.9	11.9	9.6
A52SuT	1.2	6.3	12.9	13.6	16.4	17.9
A58SuT	1.0	5.1	9.1	14.7	18.4	24.5
50_SAST_100NaCl	1.1	3.9	6.8	12.1	16.0	26.0
100_SAST_100NaCl	1.1	5.9	10.8	18.5	24.0	37.8
PASST + BeOH	1.0	6.3	12.0	21.4	28.1	45.5
PASST 대조군	1.0	4.0	6.9	12.1	16.1	26.7

[0062]

[0063] [표 6]

저 분자 종(dSEC 클립) 4°C

샘플	t=0	t=4w	t=8w	t=12w	t=24w
A45SuT	1.6	1.3	1.4	2.3	2.5
A52SuT	1.2	1.6	1.3	1.7	1.7
A58SuT	1.4	1.7	1.5	1.4	1.4
50_SAST_100NaCl	0.9	1.5	1.4	1.4	1.5
100_SAST_100NaCl	1.0	1.5	1.7	2.0	2.6
PASST + BeOH	1.0	1.5	1.2	1.4	1.3
PASST 대조군	1.2	1.4	1.4	1.7	1.6

[0064]

[0065] [표 7]

저 분자 종(dSEC 클립) 25°C

샘플	t=0	t=4w	t=8w	t=12w	t=24w
A45SuT	1.6	3.6	5.9	8.4	13.1
A52SuT	1.2	2.9	2.9	5.8	9.2
A58SuT	1.4	2.2	2.8	4.0	5.7
50_SAST_100NaCl	0.9	2.2	2.4	2.9	4.7
100_SAST_100NaCl	1.0	2.9	3.2	4.4	6.9
PASST + BeOH	1.0	2.2	2.2	3.3	4.4
PASST 대조군	1.2	1.6	2.1	3.2	4.8

[0066]

[0067] [표 8]

저 분자 종(dSEC 클립) 40°C

샘플	t=0	t=2w	t=4w	t=8w	t=12w	t=24w
A45SuT	1.6	9.7	16.7	28.3	38.1	55.0
A52SuT	1.2	6.0	11.3	18.6	26.0	39.6
A58SuT	1.4	4.0	7.7	12.2	18.2	27.5
50_SAST_100NaCl	0.9	3.6	5.9	8.6	12.8	18.7
100_SAST_100NaCl	1.0	3.5	5.7	9.6	12.9	19.4
PASST + BeOH	1.0	3.6	5.8	9.8	13.2	20.5
PASST 대조군	1.2	3.3	5.9	10.0	12.8	20.2

[0068]

[0069] **결론:** 25℃ 및 40℃에서의 장기간 보관 동안, 더욱 낮은 pH 제형, A45SuT, A52SuT, 및 A58SuT는 변성 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 분석하였을 때 원하지 않는 수준의 저 분자량 분해 또는 클립핑된 종을 나타냈다. 25℃ 및 40℃에서 보관한 고농도 제형 100_SAST_100NaCl은 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 분석하였을 때 고 분자량 응집체의 증가를 나타내기 시작했지만, 4℃에서 현재의 상업적 제형과 유사하게 기능하였다. PASST+BeOH(0.004% 폴리소르베이트 20 및 0.9% 벤질 알코올의 첨가에 의해 개질된 현재의 상업적 제형)는 4℃ 및 25℃ 모두에서 현재의 상업적 제형과 유사하게 기능하였지만, 상승된 온도인 40℃에서 보관하였을 때 후기 시점에 SE-HPLC에 의한 고 분자량 종의 증가를 경험하였다. 그러나, 50_SAST_100NaCl 제형은, 포스페이트 완충제가 없어도, 모든 온도에서 현재의 상업적 제형에 필적하는 고 및 저 분자량 종 수준을 유지하였다.

[0071] **실시예 2: 통증 연구**

[0072] 본 연구는 48명의 건강한 남녀가 6 가지 용액의 단일 SC 주사를 받은 단일-기관, 무작위 배정, 단일-맹검, 교차 설계였다.

[0073] 시험 제형(하기 표 9에 상세 기재)을 각각의 시퀀스에 8명의 대상체가 무작위 배정된 6개의 고유 시퀀스로 훈련된 의료 종사자가 투여하였다. 주사는 앞 복벽 각각의 사분면에 투여하고 약 1시간 간격으로 투여하였다. 각각의 주사 후 30초 내에 대상체는 100 ㎜ 시각상사척도(VAS)를 사용하여 주사 통증의 수준을 평가했다. 이상 반응은 첫 번째 주사 개시부터 첫 번째 주사 후 30일에 걸쳐 수집하였다. 안전성 후속 전화는 2일째(6번째 주사 후 24시간)와 31일째(±2일)에 실시하였다.

[0074] [표 9]

시험 제형

용액	설명	부피	조성
A.	음성 통증 대조군	1.0	10 mM 소듐 아세테이트, 9%(w/v) 수크로스, 0.004%(w/v) 폴리소르베이트 20, pH 5.2
B.	상업적 제형 위약	.098	25 mM 소듐 포스페이트, 25 mM L-아르기닌, 100 mM 소듐 클로라이드, 1.0%(w/v) 수크로스, pH 6.3
C.	벤질 알콜이 있는 상업적 제형 위약	1.0	100 mM 소듐 클로라이드, 25 mM 소듐 포스페이트, 25 mM L-아르기닌, 1.0%(w/v) 수크로스, 0.01%(w/v) 폴리소르베이트 20, 0.9%(w/v) 벤질 알콜
D.	소듐 포스페이트가 없는 시험 제형	1.0	100 mM 소듐 클로라이드, 25 mM L-아르기닌, 1.0%(w/v) 수크로스, 0.01%(w/v) 폴리소르베이트 20
E.	소듐 포스페이트가 없는 시험 제형	0.51	100 mM 소듐 클로라이드, 25 mM L-아르기닌, 1.0%(w/v) 수크로스, 0.01%(w/v) 폴리소르베이트 20
F.	상업적 제형 에타너셉트 50 mg/mL	0.98	100 mM 소듐 클로라이드, 25 mM 소듐 포스페이트, 25 mM L-아르기닌 1% 수크로스, pH 6.3 로 구성된 용액 내 50 mg/mL 에타너셉트

[0075]

[0076] **통계적 방법:** 모든 분석은 적어도 하나의 용액을 받은 모든 대상체로 구성된, 안전성 분석 세트 상에서 실시하였다. 93.4% 검정력을 제공하여 용액 간 15 mm 차이(α=0.05, 양측)를 검출하기 위해, 48명 대상체(시퀀스 당 8명)의 표본 크기를 선택하였다. VAS 상의 13 내지 16 mm의 차이는 임상적으로 의미있는 것으로 고려된다 (Gallagher et al, 2002, Am. J. Em. Med. v20; i4: 287-290).

[0077] 용액에 의한 VAS 점수에 대해 요약 통계(평균, SD, 표준 오차[SE], 중앙값, 최소값, 최대값)를 계산하였다. VAS 점수는 독립 변수로서 시퀀스, 용액, 및 기간을, 무작위 효과로서 시퀀스 내 대상체를 포함하는, 분산 분석 (ANOVA) 모델을 사용하여 분석하였다. 다중 비교를 위한 조정을 하지 않았다.

[0078] 95% 신뢰 구간(95% CI) 에 상응하는, 1 차 및 2 차 비교에 대한 VAS 점수의 평균 차이 및 p-값을 제공하였다.

[0079] [표 10]

VAS 점수 요약

주사 직후	용액 A	용액 B	용액 C	용액 D	용액 E	용액 F
N	48	48	48	48	48	48
평균	19.6	53.6	28,.7	29.8	29.6	53.4
SD	18.0	27.9	23.5	26.4	24.3	32.4
SE	2.6	4.0	3.4	3.8	3.5	4.7
중앙값	13.0	59.0	24.0	21.5	21.0	49.0
Min, Max	0, 66	1, 98	1, 99	0, 94	1, 86	2, 100

[0080]

[0081] **결론:** 용액 C(벤질 알코올이 있는 비-제품 특이적 위약) 및 용액 D(소듐 포스페이트가 없는 비-제품 특이적 위약) 모두 용액 B(에타너셉트 위약; p <0.001)보다 유의미하게 더 낮은 평균 VAS 점수를 가졌으며, 이는 이들 2개 용액의 상대적으로 더 적은 주사 부위 통증을 시사한다. 용액 C와 D 간, 용액 B(에타너셉트 위약)와 용액 F (활성 에타너셉트) 간, 또는 상이한 주사 부피들(0.51과 1.0 mL) 간에서 평균 VAS 점수에서의 유의미한 차이가 발견되지 않았다. 용액 A(음성 통증 대조군)는 다른 모든 용액과 비교하여 가장 적은 통증과 관련되었다. 7명의

대상체는 1개 이상의 이상 반응을 가졌다. 모든 이상 반응은 CTCAE 등급 1의 심각하지 않은 주사 부위 반응이었다.

[0083] **실시예 3: 제형 후보에 대한 장기 안정성 시험**

[0084] 50 mg/mL의 신규 제형 후보 몇몇에서 에타너셉트 안정성을 모니터링 하기 위하여 장기 연구를 수행하였다. 안정성은 4℃, 25℃ 및 40℃에서 보관 후 SE-HPLC, HIC HPLC, dSEC HPLC, 및 입자성 물질(HIAC)을 사용하여 1 mL 유리 바늘 포함 시린지(staked glass needle syringe) 내 1 mL 채운 것 상에서 평가했다. 삼투질농도 및 단백질 농도는 0시간에만 시험하였고, pH 이동(drift)이 없음을 확인하기 위해 pH는 0시간 및 12주 보관 후에 시험하였다. 연구 결과는 시험된 제형이 40℃의 가속된 온도에서 12주 후뿐만 아니라, 2 내지 8℃의 권장 보관 및 25℃의 가속된 온도에서 24주 후에 여전히 현재의 상업적 제형과 유사했음을 나타내었다.

[0085] [표 11]

50 mg/mL 에타너셉트의 제형 조건

제형 명칭	완충제	기타 부형제	pH
PASST(대조군)	25 mM 포스페이트	25 mM L-아르기닌, 100 mM NaCl, 1% 수크로스, 0.010% 폴리소르베이트 20	6.3
SAST_100NaCl	없음 없음	25 mM L-아르기닌, 100 mM NaCl, 1% 수크로스, 0.010% 폴리소르베이트 20	6.3
SAST_120NaCl		25 mM L-아르기닌, 120 mM NaCl, 1% 수크로스, 0.010% 폴리소르베이트 20	6.3

[0086]

[0087] **재료**: 50 mg/mL의 PASS(25 mM 포스페이트 완충제, 25 mM L-아르기닌, 100 mM NaCl, 1% 수크로스) 중 Enbrel 약물 물질을 본 연구에 사용했다. 재료는 50 mg/mL의 PASS 및 SAS_100NaCl(25 mM L-아르기닌, 100 mM NaCl, 1% 수크로스)로 투석여과한 후 약 75 mg/mL로 한외여과하였다. UF/DF-후 PASS 및 SAS 재료를 상응하는 용액으로 희석함으로써 50 mg/mL 제형을 제조하였다. SAST_120NaCl은 농축 NaCl 모용액을 사용하여 75 mg/mL SAS 재료를 희석하여 120 mM NaCl의 최종 농도를 달성함으로써 제조하였다. 폴리소르베이트 20의 1% 모용액을 새롭게 제조하고 최종 농도 0.010%가 되도록 모든 제형 내에 첨가하였다. 모든 제형을 1 mL 긴 BD 유리 시린지 내에 1 mL의 부피까지 수동으로 충진하고 나서 ASPU 진공화 마개 장치를 사용하여 마개를 하였다.

[0088] **방법**: pH는 Mettler Inlab 마이크로프로브와 결합된 메틀러 톨레도 세븐이지(Mettler Toledo SevenEasy) pH 측정기를 사용하여 측정하였다. 측정 전에 샘플을 실온까지 가온하였다. 모든 샘플의 280 nM에서의 흡광도를 사용한 단백질 농도 측정은 DropSense96 UV/Vis 랩 칩 DS 시스템을 사용하여 실온에서 수행하였다. 각각의 샘플은 제형 블랭크(blank) 용액을 포함하여, 적어도 3 반복(각각 3 μL)으로 섞이지 않게 측정하였다. 삼투질농도는 어드밴스드 삼투압계 모델 3900을 사용하여 측정하였다. 각각의 측정은 250 μL의 샘플을 사용하여 수행하였고 290 mOsm 삼투질농도 표준을 시험하여 시스템이 제대로 작동함을 확실하게 하였다. 크기 배제 HPLC는 크로멜레온(Chromeleon) 7.2 소프트웨어가 있는 애질런트(Agilent) 1100 HPLC에서 실행하였다. 소수성 상호작용 HPLC는 215 nm의 흡광도에서 크로멜레온(Chromeleon) 7.2 소프트웨어가 있는 애질런트(Agilent) 1100 HPLC에서 실행하였다. 변성 크기 배제 HPLC는 크로멜레온(Chromeleon) 7.2 소프트웨어가 있는 애질런트(Agilent) 1100 HPLC에서 실행하였다. 보이지 않는 입자 분석은 HRLD-150 레이저 및 팜 스펙(Pharm Spec) 소프트웨어가 장착된 HACH HIAC/Royco 입자 계수기 시스템을 사용하여 수행하였다. 모든 샘플을 PASS 제형 완충제로 25 mg/mL로 희석하였다. 분석 전 75 토르에서 2시간 동안 샘플을 완전히 혼합하고, 마개를 제거하고 탈기시켰다. 1.0 mL씩(용기 부피 없음) 4 분량(sip)을 수행하였으며, 첫 번째 분량은 버리고 나머지 3개 분량을 평균냈다. 입자 크기 2, 5, 10, 및 25 μm에 대한 데이터를 모든 시점에서 수집하였다. 결과는 희석에 대해 처리하고 밀리리터 당 누적 총수로 보고한다.

[0089] **결과 및 논의**: 모든 제형의 pH는 모든 온도에서 0시간 및 12주 후에 측정하였다. 시간 또는 보관 온도의 함수로서 어떠한 경향도 관찰되지 않았다. 모든 샘플에 대해 측정된 pH 값은 표 12에서 확인할 수 있다. 4℃에서 52주 보관, 25℃에서 24주 보관 또는 40℃에서 12주 보관 후 어떤 pH의 이동도 관찰되지 않았으며; 모든 샘플은 목표 Ph 6.3으로부터 +/- 0.2 pH 단위의 허용 기준을 만족하였다.

[0090] [표 12]

샘플에 대해 측정된 pH

제형 두문자어(Acronym)	t=0	t=52w 4℃	t=24w 25℃	t=12w 40℃
PASST	6.27	6.30	6.32	6.28
SAST_100NaCl	6.23	6.15	6.25	6.20
SAST_120NaCl	6.22	6.16	6.24	6.15

[0091]

[0092] 모든 제형의 단백질 농도는 0시간에서 시험하였다. 모든 샘플에 대한 단백질 농도 결과는 표 13에서 확인할 수 있다. 모든 샘플은 허용 기준을 만족하였다.

[0093] [표 13]

단백질 농도 측정

제형 두문자어	t=0
PASST	51.1
SAST_100NaCl	51.4
SAST_120NaCl	51.0

[0094]

[0095] 삼투질농도는 0시간에서만 시험하였다. 모든 샘플에 대한 삼투질농도 결과는 표 14에서 확인할 수 있다. 모든 제형은 목표 삼투질농도에 있었다. 완충제 및 부형제 수준의 차이로 인해, 삼투질농도는 다양한 제형에 걸쳐 동일할 것으로 예상되지 않았다.

[0096] [표 14]

삼투질농도 측정

제형 두문자어	t=0(측정치)	이론치
PASST	314	313
SAST_100NaCl	262	263
SAST_120NaCl	299	300

[0097]

[0098] 제형 조건, 시간 및 온도의 함수로서 응집 수준을 모니터링하기 위해 SE-HPLC를 수행하였다. 피크 B는 형성된 고 분자량 종(응집체)의 양이다. 결과는 4℃ 및 25℃에서 PASST 대조군과 완충제-없는 제형 간의 피크 B에서 차이를 나타내지 않았으며, 40℃에서 12주 후에 경미한 차이가 관찰되었다(도 1). 피크 B는 이들 제형에 대해 SE-HPLC에 의해 검출된 총 응집체를 나타낸다. 모든 샘플은 4℃에서 52주 보관, 25℃에서 24주 보관 후, 및 40℃에서 12주 보관 후, 여전히 허용 가능하다(피크 B≤6%).

[0099] 변성 SE-HPLC를 사용하여 클립 종 LMW를 모니터링하였다. 결과는 52주 후 제형 간의 HMW 종, 주 피크, LMW에서 유사한 경향을 나타냈다(도 2).

[0100] 미스폴딩된 응집체의 변화를 HIC HPLC로 모니터링하였다. 모든 시험 온도에서의 결과는 PASST 대조군과 완충제가 없는 제형 간의 피크 3에서 차이를 나타내지 않았다(도 3). 모든 샘플은 4℃에서 52주 보관, 25℃에서 24주 보관 후, 및 40℃에서 12주 보관 후 여전히 허용 가능한 범위(피크 1≤5%, 피크 2≥70%, 피크 3≤28%) 내에 있었다.

[0101] 보이지 않는 입자는 광 차폐 입자 계수기(HIAC)로 모니터링하였다. 결과는 과거 PFS 데이터와 일치하고 12주 후의 모든 온도에 걸쳐서 제형 간에 유사했다. 각각의 시점에서 3개의 푸울링된(pooled) 시린지를 함유하는 단일 바이알을 사용하였고 실리콘 유적에 대한 기여도에 있어서 높은 수준의 시린지-대-시린지 가변성이 있으므로,

이 데이터 세트로부터 경향을 확립할 수 없었다.

[0102] **결론**: 몇몇 새로운 재제형화 후보 및 폴리소르베이트를 첨가한 현재 상업적 제형의 장기 안정성을 4℃, 25℃ 및 40℃에서 평가하였다. 4℃에서 52주 및 25℃에서 24주 후에 제형 간에서 SE-, dSEC, 또는 HIC HPLC 분석뿐만 아니라 광 차폐에 의한 어떤 유의미한 차이도 관찰되지 않았고; 40℃에서 12주 후에 HPLC 분석에 의해 경미한 차이가 관찰되었다. pH에서의 이동은 관찰되지 않았고 모든 제형은 여전히 허용 가능 범위 내에 있었다. 연구 결과는 50 mg/mL의 SAST_120NaCl 및 SAST_100NaCl 제형이 안정하고 권장 보관 온도인 2℃ 내지 8℃에서 12주 후에 현재 상업적 제형과 유사함을 나타냈다.

[0104] **실시예 4: 스테인리스 스틸 용기 내 상위 재제형화 후보의 동결/해동 및 장기 안정성**

[0105] 동결/해동 사이클 연구를 수행하여 50 mg/mL의 3 가지 새로운 제형 후보에서의 에타너셉트 안정성을 모니터링하였다. 현재 상업적 제형 PASS(25 mM 포스페이트 완충제, 25 mM L-아르기닌, 100 mM NaCl, 1% 수크로스)와 비교한 제형은 SAST_100NaCl(25 mM L-아르기닌, 100 mM NaCl, 1% 수크로스, 0.010% 폴리소르베이트 20), SAS_120NaCl(25 mM L-아르기닌, 120 mM NaCl, 1% 수크로스), 및 SAST_120NaCl(25 mM L-아르기닌, 120 mM NaCl, 1% 수크로스, 0.010% 폴리소르베이트 20)이었다. 55 mL 스테인리스 스틸 냉동 용기에서 -30℃ 내지 4℃를 순환할 때 응집에 대한 안정성을 5회 동결/해동 사이클까지 SE-HPLC를 사용하여 평가했다.

[0106] 추가적으로, 50 mg/mL의 새로운 제형 후보에서의 에타너셉트 안정성을 모니터링하기 위해 장기 연구를 수행하였다. 현재 상업적 제형 PASS(25 mM 포스페이트 완충제, 25 mM L-아르기닌, 100 mM NaCl, 1% 수크로스)와 비교한 제형은 SAST_120NaCl(25 mM 포스페이트 완충제, 25 mM L-아르기닌, 100 mM NaCl, 1% 수크로스, 0.010% 폴리소르베이트 20)이었다. SE-HPLC, HIC HPLC, dSEC HPLC, 및 미립자 물질(HIAC)을 사용하여 10 mL 및 55 mL 스테인리스 스틸 냉동 용기에 보관했을 때의 안정성을 평가했다. 보관 온도 및 시점은 36개월까지 동안 -30℃ 및 12개월까지 동안 4℃였다. 52주에서의 결과는 본원에 제공된다.

[0107] **결과:** 모든 제형의 pH는 52주 시점 및 5 사이클의 동결/해동에 걸쳐 일정하게 유지되었다.

[0108] [표 15]

[0109]

pH, 단백질 농도 및 삼투질농도

샘플	농도(mg/mL)	삼투질농도 (mOsm)	pH		
			t=0	52wk -30℃	52wk 4℃
PASS	49.5	304	6.34	6.20	6.22
SAST_120NaCl	51.4	303	6.27	6.19	6.20

[0110] [표 16]

[0111]

동결/해동에 대한 pH, 단백질 농도 및 삼투질농도

샘플	농도(mg/mL)	삼투질농도 (mOsm)	pH		
			0 F/T	3 F/T	5 F/T
PASS	47.9	310	6.30	6.29	6.27
SAST_100NaCl	48.8	259	6.19	6.18	6.16
SAST_120NaCl	48.1	294	6.17	6.19	6.18
SAS_120NaCl	48.6	300	6.17	6.17	6.18

[0112] SAST_120NaCl 제형에서 2 μm 초과 및 5 μm 초과 입자의 작은 증가가 있었지만, 10 μm 초과 입자에 대하여는 어떤 경향도 HIAC에 의해 관찰되지 않았다. 도 4, 도 5, 및 도 6에 나타난 바와 같이, 제형 간에 어떤 유의미한 차이도 HIC, dSEC, 또는 SEC에 의해 관찰되지 않았다. 5회의 동결 해동 사이클에 노출된 후 제형 간에 어떤 유의미한 변화도 SEC에 의해 관찰되지 않았다. 도 7 참조.

[0113] **결론:** 지금까지 연구 결과는 시험된 새로운 제형이 -30℃뿐만 아니라 4℃에서 스테인리스 스틸 냉동 용기에 52주 보관 후 여전히 현재 상업적 제형과 유사함을 나타냈다.

[0115] **실시예 5: SAS 및 PASS 용액으로의 교환**

[0116] 이들 실시예의 목적은 TMS(트리스, 만니톨, 수크로스) 중의 상이한 에타너셉트 조제물을 시험 제형(L-아르기닌,

수크로스, NaCl)으로 투석하고 최종 pH를 목표 pH와 비교하는 것이다.

[0117] **재료**: 에타너셉트: 25 mg/mL, TMS(10 mM Tris HCl, 4% 만니톨, 1% 수크로스, pH 7.4) 중; 투석용 SAS_100NaCl 용액(100 mM NaCl, 25 mM L-아르기닌 HCl, 1% 수크로스, pH 6.3); PASS 완충제(25 mM 포스페이트, 100 mM NaCl, 25 mM L-아르기닌 HCl, 1% 수크로스, pH 6.3); 10,000 MWCO 센트리프렙; 3 내지 12 mL Slide-A-Lyzer 투석 카세트, 10,000 MWCO; 메틀러 톨레도(Mettler Toledo) MP220 pH 측정기 및 메틀러 톨레도 인랩(Mettler Toledo InLab) 마이크로프로브.

[0118] **방법**: UF/DF 실시예의 경우, TMS 중 25 mg/mL 에타너셉트를 밀리포어 펠리콘-2 미니(Millipore Pellicon-2 mini) 시스템 상에서 30K MWCO 펠리콘(Pellicon) 3 카세트를 사용하는 한외여과에 의해 약 50 mg/mL로 농축하였다. 그리고나서 재료를 7 디아볼륨(diavolume)으로 SAS_100NaCl 또는 PASS 용액으로 투석여과한 후, 한외여과에 의해 100 mg/mL로 농축시켰다. 투석 실시예의 경우, TMS 중 25 mg/mL 에타너셉트를 10,000 MWCO 센트리프렙을 사용하여 50 mg/mL로 농축했다. SAS 투석 용액과 마찬가지로, 메틀러 톨레도(Mettler Toledo) MP220 pH 측정기 및 InLab 마이크로프로브를 사용하여 TMS 중 50 mg/mL 샘플의 pH를 측정했다. 그리고나서 10,000 MWCO slide-a-lyzer 투석 카세트를 사용하여 재료를 투석하였다. TMS 중 50 mg/mL 에타너셉트 9.5 mL를 카세트에 첨가하고 1000 mL의 SAS100으로 교환하였다. 1,000,000 배 교환을 달성하기 위해 3회의 교환을 수행하였다. 첫 번째 교환은 1일째 오후 5시에 발생하여 밤새도록 진행하였다. 두 번째 1,000 mL 교환은 2일째 오전 8시 30분에 있었다. 세 번째이자 최종 교환은 2일째 오후 12시 30분에 있었다. 2일째 오후 5시에 투석 카세트에서 단백질을 제거(11 mL 제거)하고 동일한 메틀러 톨레도(Mettler Toledo) MP220 pH 측정기 상에서 pH를 측정했다. 측정된 pH는 6.98이었다.

[0119] **결과:**

[0120] 결과의 요약은 하기 표 17에 나타난다.

[0121] [표 17]

다양한 교환 방법 및 용액을 사용한 pH

교환 방법	샘플 명칭	여과 용액 pH	방법 교환-전 pH	방법 후 pH	교환 횟수
UF/DF	PASS, pH 6.3, 100 mg/mL	6.34	7.56	6.34	7 투석여과 부피
UF/DF	SAS_100NaCl, pH 6.3, 100 mg/mL	6.38	7.56	6.98	7 투석여과 부피
투석	SAS_100NaCl, pH 6.3, 50 mg/mL	6.29	7.56	6.98	1,000,000 배 교환

[0122]

[0123] **결론:** 샘플을 pH 7.56의 교환-전 용액으로부터 PASS 완충제로 한외여과/투석여과했을 때, 목표 pH 6.34를 달성하였다. 그러나, 샘플을 SAS_100NaCl 용액으로 한외여과/투석여과했을 때에는, 달성된 투석-후 재료의 pH는 6.98이었으며, 이는 예상보다 더 높았고 최종 목표 pH 6.3에 근접하지 않았다. SAS_100NaCl로 교환 방법으로서 투석을 사용한 것은 동일한 결과를 얻었다.

[0125] **실시예 6: UF/DF 푸울**

[0126] **도입:** 본 연구 후에 선택된 제형 용액을 SAS(120 mM 소듐 클로라이드, 25 mM L-아르기닌, 1% 수크로스, pH 6.3)로 칭하였고, 이는 부가된 포스페이트 완충제가 없다. 이전 실시예는 pH 7.56의 샘플 중 에타너셉트로부터 출발하는 경우 투석하거나 UF/DF를 사용할 때 목표 pH 6.3을 달성하는 것이 어렵다는 것을 입증했기 때문에, SAS 제형으로의 상이한 교환 방법이 필요했다. 별개의 최종 UF/DF 출발 재료를 사용하는 2 가지 방법을 평가하였다: 1) 출발 재료로서 컬럼 3(AEX) 중간 푸울, 및 2) 출발 재료로서 PASS 제형 완충제(PASS DS 중간 푸울) 중의 Enbrel 약물 물질. 각각의 방법을 하기 기재하고, SAS 제형 용액 제조, 최종 UF/DF 로딩 조정 및 처리를 포함하여, 50g/L SAS 제형화된 에타너셉트를 생산하기 위한 최종 UF/DF 장치 작동 단계의 개발을 요약한다.

[0127] **방법**: SAS 제형 용액은 120 mM 소듐 클로라이드, 25 mM L-아르기닌, 1% 수크로스, pH 6.3으로 구성된다. SAS 제형 용액은 10 N NaOH를 사용하여 pH 6.3으로 적정하였다. 특정 pH 범위에 도달하는 데 필요한 적정제의 부피는 4.4 μL/L SAS 제형 용액이었다. SAS 최종 UF/DF 장치 작동을 수행하는 동안, SAS 제형 용액을 이용하여 10 L/m^2의 막을 평형시킨 후, 투과액의 pH는 SAS 제형 용액의 pH보다는 WFI의 pH에 근접하게 유지되었다. 특정 이론에 얽매이지 않고, 이는 SAS 제형 용액의 낮은 완충 능력에 기인하는 것으로 여겨진다. SAS 제형 용액 조제물의 범위를 사용한 막 평형화 후의 투과액의 전도도에 대한 예상 범위는 12 내지 16 mS/cm이다. SAS 제형 용액보다 더 높은 평형화 후 pH가 예상되고 이는 막이 평형 상태가 아니라는 우려를 불러일으키거나 시사하지 않아야 한다

[0128] AEX 중간 푸울 출발 재료: AEX 중간 푸울을 UF/DF 탱크의 보유물 탱크로 이송하기 전에, 푸울을 2 M HCl을 사용하여 목표 pH 6.3(허용 가능한 범위 6.2 내지 6.4)으로 조정하였다. 특정 pH 범위에 도달하는 데 필요한 적정제의 부피는 약 2.8 mL/L AEX 중간 푸울이었다.

[0129] 출발 재료로서 AEX 중간 푸울을 사용하여, SAS 최종 UF/DF 장치 작동 단계를 개발하는 동안 수행된 8 가지 실시예가 표 18에 나열되어있다. 2 가지 파라미터를 조사하였다: 조정된 AEX 중간 푸울의 pH 및 SAS 제형 용액의 pH. 처음 3 번의 실행은 pH, 전도도, 삼투질농도, 단백질 농도, 및 제품 품질에 대해 분석하였다. 실행 4 내지 7은 제형 용액 pH 및 로딩 pH의 영향 UF/DF 푸울 pH 영향을 결정하기 위해 pH, 전도도, 삼투질농도, 및 단백질 농도에 대해서만 측정하였다.

[0130] [표 18]

AEX 중간 푸울 출발 재료: 로딩, 교환 용액, 및 최종 UF/DF 푸울 pH

실행 번호	목표 로딩 pH	목표 SAS	UF/DF 푸울 pH
1	6.3	6.3	6.26
2	6.3	6.3	6.33
3	6.3	6.3	6.22
4	6.3	5.6	6.22
5	6.2	5.3	6.06
6	6.4	7.3	6.94
7	6.2	5.6	6.14
8	6.4	6.5	6.43

[0131]

[0132] **결과:** AEX 중간 푸울을 출발 재료로 사용하여 생성된, 최종 SAS UF/DF 푸울에 대한 제품 품질 결과는 표 19에 나타난다. 실행 1의 단계 수율은 허용 기준 밖이었다; 그러나, 이는 벤치-규모 처리의 인공물이었을 가능성이 높았으며 연구 결론에 유의미하지 않은 것으로 고려되었다. 3개 최종UF/DF SAS 실행 모두는 또한, 상기 기재된 바와 같이, SEC 및 HIC 분석을 사용하여 제품 품질에 대한 허용 기준을 충족했다.

[0133] [표 19]

AEX 중간 푸울 출발 재료: 최종 SAS UF/DF 푸울 제품 품질

파라미터	허용 기준	최종 SAS UF/DF 푸울		
		실행 1	실행 2	실행 3
pH	6.1 내지 6.5	6.26	6.22	6.33
단백질 농도 (mg/mL)	49 내지 51	50.08	49.68	49.90
단계 수율 (%)	95 내지 103	93.4	99.5	100.5

[0134]

[0135] **조정된 AEX 중간 푸울 안정성**

[0136] 조정된 AEX 중간 푸울은 제어된 실온(CRT)에서 52.6시간까지 동안 보유될 수 있다. 보유 중의 푸울의 pH는 도 8에 나타난다.

[0137] **UF/DF 푸울 안정성**

[0138] AEX 중간 푸울을 출발 재료로 사용하여 생성된, 최종 UF/DF SAS 푸울은 CRT에서 96.3시간까지 동안 보유될 수 있다. 보유 중의 pH와 전도도는 도 9 A 및 B에 나타난다. 96.3시간 보유에 걸쳐서, pH 및 전도도는 허용 가능한 한도 내로 유지된다.

[0139] PASS DS 중간 푸울 출발 재료: PASS DS 중간 푸울이 이미 허용 가능한 pH 범위 내에 있기 때문에 PASS DS 중간 푸울을 UF/DF 보유물 탱크로 이송하기 전에 조정이 필요하지 않다. 추가적으로, 출발 재료가 50 mg/mL PASS 제형화된 Enbrel DS이므로, 이미 투석여과를 수행하기에 정확한 농도에 있기 때문에 푸울을 50 g/L로 농축할 필요가 없다.

[0140] 출발 재료 공급원을 평가하기 위해, SAS 최종 UF/DF 장치 작동 단계를 개발하는 동안 수행된 하나의 실시예가 표 20에 나열되어 있다. 이 실시예는 DS PASS 중간 푸울을 출발 재료로서 이용하였고 pH, 전도도, 삼투질농도, 단백질 농도, 및 제품 품질에 대해 분석하였다.

[0141] [표 20]

PASS DS 중간 푸울 출발 재료: 로딩, 교환 용액, 및 최종 UF/DF 푸울 pH

실행 번호	목표 로딩 pH	목표 SAS 용액 pH	UF/DF 푸울 pH
1	6.3	6.3	6.23

[0142]

[0143] **결과:** PASS DS 중간 푸울을 출발 재료로 사용하여 생성된, 최종 SAS UF/DF 푸울의 제품 품질 결과는 표 21에 나타난다. 실행 1의 단계 수율은 허용 기준 밖이었다; 그러나, 이는 벤치-규모 처리의 인공물이었을 가능성이 높았으며 연구 결론에 유의미하지 않은 것으로 고려되었다. 최종 SAS UF/DF SAS 푸울은 또한, 상기 기재된 바와 같이, SEC 및 HIC 분석을 사용하여 제품 품질에 대한 허용 기준을 충족했다.

[0144] [표 21]

PASS DS 중간 푸울 출발 재료: 최종 SAS UF/DF 푸울 제품 품질

파라미터	허용 기준	최종 SAS UF/DF 푸울
		실행 1
pH	6.1 내지 6.5	6.23
단백질 농도 (mg/mL)	49 내지 51	49.60
단계 수율 (%)	95 내지 103	105.7

[0145]

[0146] **PASS DS 중간 푸울 안정성**

[0147] 이 중간 푸울은 이미 목표 pH(6.3)에 있기 때문에 PASS 푸울은 SAS 용액을 이용한 UF/DF 처리 전에 조정이 필요하지 않다. 푸울의 상태가 Enbrel PASS DS으로부터 변경되지 않았으므로 이 중간 푸울에 대한 푸울 보유 연구는 수행하지 않았다. 푸울은 25℃에서 96시간까지 동안 보유될 수 있다.

[0148] **UF/DF 푸울 안정성**

[0149] PASS DS 중간 푸울을 출발 재료로 사용하여 생성된, 최종 UF/DF SAS 푸울은 CRT에서 96.3시간까지 동안 보유될 수 있다. 보유 중 pH 및 전도도는 도 9 A 및 B에 나타난다. 96.3시간 보유에 걸쳐서, pH 및 전도도는 허용 가능한 한도 내로 유지된다.

[0150] **SAS 제형 용액 안정성**

[0151] SAS 제형 용액은 CRT에서 28일까지 동안 보유될 수 있다. pH 및 전도도는 도 10 A 및 B에 나타난다. 매우 작은 헤드 스페이스를 갖는 소규모 스테인리스 스틸 안정성 챔버에서의 42일 보유에 걸쳐서, SAS 제형 용액은 pH를

5.6 내지 6.5 내로 유지함이 입증된다. 35일 및 42일 시점에서 침전이 관찰되었다. 21일 시점에서의 측정인 5.09는 후속 시점이 제안된 허용 기준 내에 있다는 사실로 인해 이상 값인 것으로 보인다.

[0152] **결론**: 최종 UF/DF 장치 작동은 다음의 공정 권장 하에 50 g/L SAS 제형 제품을 생산하고 현재 상업 PASS 제형 제품과 비교하여 일관된 제품 품질을 달성할 수 있다: 1) AEX 중간 푸울, 또는 PASS DS 중간 푸울을 출발 재료로 사용하여 2) SAS 용액은 CRT에서 적어도 28일 동안 보유될 수 있고 5.6 내지 6.5의 pH를 유지할 수 있고, 3) 조정된 AEX 중간 푸울은 CRT에서 적어도 52.6시간 동안 보유될 수 있고 pH 6.3±0.1을 유지할 수 있으며, 4) SAS 제형화된 UF/DF 푸울은 CRT에서 적어도 96.3시간 동안 보유될 수 있고 6.1 내지 6.5의 pH 및 10 내지 14 mS/cm의 전도도를 유지할 수 있다.

[0154] **실시예 7: 등장성 대안 제형**

[0155] 본 실시예의 목표는 40℃에서 75 mg/mL의 에타너셉트 안정성에 대해서 증가된 수준의 아르기닌, 수크로스 또는 소듐 클로라이드의 응집에 대한 효과를 결정하는 것이었다. 부가된 포스페이트 완충제 없이 등장성 제형을 유지하도록 이들 부형제의 수준을 각각 증가시켰다. 추가적으로, 히스티딘은 포스페이트를 대체할 완충제로서 평가하였다. 시험된 제형은 표 22에 요약되어 있다.

[0156] [표 22]

0.01% PS20 을 갖는 pH 6.3 의 등장성 대안 제형을 위한 제형

제형 명칭	완충제	L-아르기닌(mM)	NaCl(mM)	수크로스 (% w/w)
PASST	25 mM 포스페이트	25	100	1%
SAST_100NaCl	없음	25	100	1%
SAST_30Arg	없음	30	100	1%
SAST_35Arg	없음	35	100	1%
SAST_40Arg	없음	40	100	1%
SAST_2Suc	없음	25	100	2%
SAST_120NaCl	없음	25	120	1%
HASST	10 mM 히스티딘	25	100	1%

[0157]

[0158] **재료**: 50 mg/mL의 PASS(25 mM 포스페이트 완충제, 25 mM L-아르기닌, 100 mM NaCl, 1% 수크로스) 중 Enbrel 약물 물질을 본 연구에 사용하였다. 재료를 새로운 제형(폴리소르베이트가 없음)으로 투석하고 30,000 MWCO 센트리프렙을 사용하여 75 mg/mL 사용하는 것으로 농축시켰다. 폴리소르베이트 20의 1% 모용액을 새롭게 제조하고 최종 농도 0.01%가 되도록 모든 제형 내에 첨가하였다. 모든 제형을 1 mL 긴 BD 유리 시린지 내에 1.0 mL의 부피까지 수동으로 충진하고 나서 ASPU 진공화 마개 장치를 사용하여 마개를 하였다.

[0159] **방법**: pH는 메틀러(Mettler) 마이크로프로브와 결합된 메틀러 톨레도(Mettler Toledo) pH 측정기를 사용하여 측정하였다. 측정 전에 샘플을 실온까지 가온하였다. 삼투질농도는 어드밴스드 삼투압계 모델 3900을 사용하여 측정하였다. 각각의 측정은 250 μL의 샘플을 사용하여 수행하였고 290 삼투질농도 표준을 시험하여 시스템이 제대로 작동함을 확실하게 하였다. 크기 배제 HPLC는 크로멜론(Chromeleon) 7.2 소프트웨어가 있는 애질런트(Agilent) 1100 HPLC에서 수행하였다.

[0160] **결과**: 농도, pH 및 삼투질농도를 표 23에 나타내었다. 40℃에서 75 mg/mL의 응집 속도는, 표 24에 나타난 바와 같이, 증가된 수준의 L-아르기닌, 수크로스 및 NaCl을 갖는 모든 포스페이트-없는 제형에 대하여 상업적 제형 조성물과 유사했다.

[0161] 추가적으로, 완충제로서 포스페이트 대신 히스티딘을 사용하면 40℃에서 응집 속도가 증가하게 된다.

[0162] [표 23]

등장성 대안 제형에 대한 농도, pH 및 삼투질농도

샘플	농도 (mg/mL)	pH	삼투질농도
PASST	76.3	6.27	308
SAST_100NaCl	76.8	6.30	266
SAST_30Arg	74.9	6.28	271
SAST_35Arg	76.9	6.27	280
SAST_40Arg	76.5	6.26	288
SAST_2Suc	75.2	6.26	291
SAST_120NaCl	77.1	6.24	301
HASST	76.3	6.36	272

[0163]

[0164] [표 24]

SEC 응집체/HMW 수준, 전체에 대한 %, 40℃

샘플	0 주	1 주	2 주	4 주	8 주	12 주
PASST	2.3	5.3	6.6	12.0	16.1	26.1
SAST_100NaCl	2.3	5.0	6.4	11.0	15.3	24.1
SAST_30Arg	2.4	5.1	6.6	11.3	15.9	24.8
SAST_35Arg	2.4	5.2	6.8	11.5	16.7	25.3
SAST_40Arg	2.4	5.1	6.7	11.0	16.1	23.7
SAST_2Suc	2.4	4.9	6.6	10.7	16.2	23.4
SAST_120NaCl	2.4	5.0	6.9	11.0	16.7	23.7
HASST	2.3	6.2	9.1	14.8	22.9	32.3

[0165]

[0167] **실시예 8: 다양한 수준의 폴리소르베이트 20을 갖는 제형의 안정성**

[0168] 50 mg/mL 에타너셉트의 SAS 제형 중 0, 0.005, 0.01 및 0.015% 폴리소르베이트 20에서의 에타너셉트 안정성을 모니터링하기 위한 장기 연구를 수행하였다. 추가적으로, 100 mg/mL 에타너셉트의 SAST 고농도 제형을 시험하였다. 안정성은 4℃, 25℃ 및 40℃에서 보관 후 SE-HPLC, dSEC HPLC, 및 입자성 물질(HIAC)을 사용하여 1 mL 유리 바늘 포함 시린지 내 1 mL 채운 것 상에서 평가했다. 삼투질농도, pH 및 단백질 농도는 0시간에만 시험하였다. 연구 결과는 시험된 50 mg/mL 제형이 2 내지 8℃의 권장 보관뿐만 아니라, 25℃ 및 40℃의 가속된 온도에서 24주 후에 여전히 현재의 상업적 제형과 유사했음을 나타내었다. 100 mg/mL SAST 제형은 pH 및 보이지 않는 입자의 면에서는 50 mg/mL 제형과 동등하게 기능하였고; SEC에 의한 응집체 수준에서의 차이는 단백질 농도에 기인하였다.

[0169] [표 25]

50 mg/mL 에타너셉트의 제형 조건

제형 명칭	완충제	기타 부형제	폴리소르베이트	단백질 농도(mg/mL)
PASS	25 mM 포스페이트	25 mM L-아르기닌, 100 mM NaCl, 1% 수크로스	0	50
SAS000T	없음	25 mM L-아르기닌, 120 mM NaCl, 1% 수크로스	0	50
SAS005T	없음	25 mM L-아르기닌, 120 mM NaCl, 1% 수크로스	0.005	50
SAS010T	없음	25 mM L-아르기닌, 120 mM NaCl, 1% 수크로스	0.01	50
SAS015T	없음	25 mM L-아르기닌, 120 mM NaCl, 1% 수크로스	0.015	50
100_SAS010T	없음	25 mM L-아르기닌, 120 mM NaCl, 1% 수크로스	0.010	100

[0170]

[0171] **재료**: 25 mg/mL의 TMS(10 mM 트리스 완충제, 4% 만니톨, 1% 수크로스) 중 Enbrel 약물 물질을 본 연구에 사용했다. SAS 제형에 사용된 대용량은 pH 6.3으로 적정하였다. 재료는 약 50 mg/mL 에타너셉트로 한외여과한 후, 50 mg/mL 에타너셉트의 PASS(25 mM 포스페이트, 25 mM L-아르기닌, 120 mM NaCl, 1% 수크로스) 또는 SAS(25 mM L-아르기닌, 120 mM NaCl, 1% 수크로스)로 투석여과하였다. 이어서 고농도 암(arm)을 위한 재료는 100 mg/mL 에타너셉트로 한외여과하였다. 폴리소르베이트 20의 1% 모용액을 새롭게 제조하고 표 25에 나열된 최종 농도가 되도록 제형 내에 첨가하였다. 모든 제형을 1 mL 긴 BD 유리 시린지 내에 1 mL의 부피까지 수동으로 충진하고 나서 ASPU 진공화 마개 장치를 사용하여 마개를 하였다.

[0172] **결과 및 논의:** 모든 제형의 pH는 0시간 및 40℃에서 12주 및 4℃ 및 25℃에서 24주 후에 측정하였다. 시간 또는 보관 온도의 함수로서 어떠한 경향도 관찰되지 않았다. 모든 샘플에 대해 측정된 pH 값은 표 26에서 확인할 수 있다. 40℃에서 12주 보관 또는 4℃ 및 25℃에서 24주 후 어떤 pH의 이동도 관찰되지 않았고 모든 샘플은 목표 pH 6.3으로부터 +/- 0.2 pH 단위의 허용 기준을 만족하였다. 모든 제형의 단백질 농도 및 삼투질농도는 0시간에 시험하였다. 모든 샘플에 대한 단백질 농도 및 삼투질농도 결과는 표 26에서 확인할 수 있다.

[0173] [표 26]

농도, 삼투질농도 및 pH

샘플	농도 (mg/mL)	삼투질농도 (mOsm)	pH t=0	pH 24 wk 4°C	pH 24 wk 25°C	pH 12 wk 40°C
PASS	51.6	318	6.32	6.34	6.34	6.33
SAS000T	52.1	306	6.33	6.31	6.33	6.37
SAS005T	51.2	304	6.33	6.30	6.30	6.32
SAS010T	51.5	304	6.34	6.30	6.30	6.36
SAS015T	51.5	301	6.30	6.30	6.30	6.35
100_SAS010T	102.8	304	6.32	6.28	6.29	6.36

[0174]

[0175] 제형 조건, 시간 및 온도의 함수로서 응집 수준을 모니터링하기 위해 SE-HPLC를 수행하였다. 피크 B는 형성된 고 분자량 종(응집체)의 양이다. 결과는 각각의 단백질 농도에서의 모든 온도의 PASST 대조군과 완충제가 없는 제형 간의 피크 B에서 차이를 나타내지 않았다(표 27 내지 29). 피크 B는 이들 제형에 대해 SE-HPLC에 의해 검출된 총 응집체를 나타낸다. 모든 50 mg/mL 샘플은 4℃ 및 25℃에서 24주 보관 후, 및 40℃에서 2주 보관 후, 여전히 허용 가능하다(피크 B≤6%).

[0176] 보이지 않는 입자는 광 차폐 입자 계수기(HIAC)로 모니터링하였다. 결과는 과거 PFS 데이터와 일치하고 24주 후의 모든 온도에 걸쳐서 제형 간에 유사했다(표 30).

[0177] [표 27]

Peak B 의 SEC 분석, 전체에 대한 %, 4℃

샘플	t=0wk	t=4wk	t=8wk	t=12wk	t=24wk
PASS	1.7	1.7	1.7	1.7	1.8
SAS000T	1.7	1.8	1.8	1.8	1.9
SAS005T	1.7	1.8	1.8	1.8	1.9
SAS010T	1.7	1.8	1.8	1.9	1.9
SAS015T	1.7	1.8	1.8	1.8	1.9
100_SAS010T	1.9	2.0	2.1	2.2	2.4

[0178]

[0179] [표 28]

Peak B 의 SEC 분석, 전체에 대한 %, 25℃

샘플	t=0wk	t=2wk	t=4wk	t=8wk	t=12wk	t=24wk
PASS	1.7	2.1	2.4	2.9	3.5	4.8
SAS000T	1.7	2.1	2.5	2.9	3.5	5.0
SAS005T	1.7	2.2	2.5	2.9	3.5	4.9
SAS010T	1.7	2.1	2.5	3.0	3.6	4.8
SAS015T	1.7	2.2	2.4	3.0	3.5	4.8
100_SAS010T	1.9	2.8	3.4	4.4	5.4	7.6

[0180]

[0181] [표 29]

Peak B 의 SEC 분석, 전체에 대한 %, 40℃

샘플	t=0wk	t=2wk	t=4wk	t=8wk	t=12wk
PASS	1.7	5.7	10.4	17.4	20.6
SAS000T	1.7	4.9	8.9	15.4	19.2
SAS005T	1.7	5.2	9.1	15.9	19.4
SAS010T	1.7	5.2	9.3	15.8	19.2
SAS015T	1.7	5.4	9.4	15.9	19.0
100_SAS010T	1.9	9.0	15.6	24.5	27.1

[0182]

[0183] [표 30]

입자/mL(광 차폐), 4℃

	2 μm		10 μm		25 μm	
	t=0 wk	t=24 wk	t=0 wk	t=24 wk	t=0 wk	t=24 wk
PASS	19197	3422	1785	670	25	67
SAS000T	13004	4489	1265	762	60	104
SAS005T	12344	1292	502	59	7	4
SAS010T	11964	2254	1058	167	9	2
SAS015T	11388	7283	934	591	2	4
100_SAS010T	58087	8931	559	816	3	0

[0184]

[0185] **결론**: 폴리소르베이트의 수준이 0 내지 0.015%인 50 mg/mL 에타너셉트의 재제형화 후보 및 현재 상업적 제형의 장기 안정성을 4℃, 25℃ 및 40℃에서 평가하였고; 100 mg/mL 에타너셉트의 고농도 암 역시 SAS010T 제형에 대해 시험하였다. 24주 후 각각의 단백질 농도의 제형 간에서 SE-, dSEC, 또는 HIC HPLC 분석뿐만 아니라 광 차폐에 의한 어떤 유의미한 차이도 관찰되지 않았다. pH에서의 이동은 관찰되지 않았고 모든 제형은 여전히 허용 가능 범위 내에 있었다. 연구 결과는 50 mg/mL의 SAST_120NaCl 제형이 안정하고 권장 보관 온도인 2℃ 내지 8℃에서 24주 후에 현재 상업적 제형과 유사함을 나타냈다.

[0187] **실시예 9: 플라스틱 시린지에서의 제형의 안정성**

[0188] 유리 실리콘처리 프리필드(pre-filled) 시린지과 비교하여 COP 플라스틱 실리콘 오일이 없는 프리필드 시린지 시스템에서 50 mg/mL 에타너셉트의 PASS 및 SAS 제형에서의 에타너셉트 안정성을 모니터링하기 위한 장기 연구를 수행하였다. 안정성은 4℃, 25℃ 및 40℃에서 보관 후 SE-HPLC, pH 및 입자성 물질(HIAC)을 사용하여 다양한 시린지 시스템 내 1 mL 채운 것 상에서 평가했다. 단백질 농도는 0시간에만 시험하였다.

[0189] **재료:** 25 mg/mL 에타너셉트의 TMS(10 mM 트리스 완충제, 4% 만니톨, 1% 수크로스) 중 에타너셉트 약물 물질을 본 연구에 사용했다. SAS 제형에 사용된 대용량은 pH 6.3으로 적정하였다. 재료는 약 50 mg/mL 에타너셉트로 한외여과한 후, 50 mg/mL 에타너셉트의 PASS(25 mM 포스페이트, 25 mM L-아르기닌, 120 mM NaCl, 1% 수크로스) 또는 SAS(25 mM L-아르기닌, 120 mM NaCl, 1% 수크로스)로 투석여과하였다. 모든 제형을 1 mL 긴 유리 시린지 또는 1 mL COP 플라스틱 실리콘 오일이 없는 시린지(COP_A 및 COP_B) 내에 1 mL의 부피까지 수동으로 충진하고 나서 진공화 마개 장치를 사용하여 마개를 하였다.

[0190] **방법**: pH는 메틀러 인랩(Mettler Inlab) 마이크로프로브와 결합된 메틀러 톨레도 세븐이지(Mettler Toledo SevenEasy) pH 측정기를 사용하여 측정하였다. 측정 전에 샘플을 실온까지 가온하였다. 모든 샘플에 대해 280 nM에서의 흡광도를 사용한 단백질 농도 측정은 나노 드랍(Nano Drop) 시스템을 사용하여 실온에서 수행하였다. 크기 배제 HPLC는 크로멜론(Chromeleon) 7.2 소프트웨어가 있는 애질런트(Agilent) 1100 HPLC에서 실행하였다. 보이지 않는 입자 분석은 HRLD-150 레이저 및 팜 스펙(Pharm Spec) 소프트웨어가 장착된 HACH HIAC/Royco 입자 계수기 시스템을 사용하여 수행하였다. 모든 샘플을 PASS 제형 완충제를 사용하여 25 mg/mL로 희석하였다. 분석 전 75 토르에서 2시간 동안 샘플을 완전히 혼합하고, 마개를 제거하고 탈기시켰다. 1.0 mL씩(용기 부피 없음) 4분량을 수행하였으며, 첫 번째 분량은 버리고 나머지 3개 분량을 평균냈다. 입자 크기 2, 5, 10, 및 25 μm에 대한 데이터를 모든 시점에서 수집하였다. 결과는 희석에 대해 처리하고 mL 당 누적 총수로 보고한다.

[0191] **결과 및 논의:** 플라스틱 실리콘 오일이 없는 시린지에서의 안정성은 유리 실리콘처리된 시린지에서의 안정성과 유사하다. 모든 제형의 단백질 농도는 0시간에 시험하였다. 모든 제형의 pH는 0시간 및 40℃에서 12주 및 4℃ 및 25℃에서 24주 후에 측정하였다. 시간 또는 보관 온도의 함수로서 어떠한 경향도 관찰되지 않았고 모든 샘플은 목표 pH 6.3으로부터 +/- 0.2 pH 단위의 pH 허용 기준을 만족하였다. 모든 샘플에 대한 단백질 농도 및 측정된 pH 값은 표 31에서 확인할 수 있다.

[0192] [표 31]

단백질 농도 및 pH 결과

샘플	농도(mg/mL)	pH t=0	pH 24 wk 4°C	pH 24 wk 25°C	pH 12 wk 40°C
PASS_유리	50.9	6.3	6.4	6.4	6.4
SAS_유리	52.3	6.3	6.4	6.4	6.3
PASS_COP_A	51.1	6.3	6.4	6.4	6.3
SAS_COP_A	51.9	6.3	6.4	6.4	6.3
PASS_COP_B	51.1	6.4	6.4	6.4	6.3
SAS_COP_B	52.2	6.3	6.4	6.4	6.3

[0193]

[0194] 제형 조건, 시간 및 온도의 함수로서 응집 수준을 모니터링하기 위해 SE-HPLC를 수행하였다. 피크 B는 형성된 고 분자량 종(응집체)의 양이다. 결과는 유리 시린지와 COP 플라스틱 실리콘 오일이 없는 시린지 간의 피크 B에서 차이를 나타내지 않았다(표 32 내지 34). 피크 B는 이들 제형에 대해 SE-HPLC에 의해 검출된 총 응집체를 나타낸다. 모든 샘플은 4℃ 및 25℃에서 24주 보관 후, 여전히 허용 가능하다(피크 B≤6%).

[0195] [표 32]

Peak B 의 SEC 분석, 전체에 대한 %, 4℃

샘플	t=0wk	t=4wk	t=8wk	t=12wk	t=24wk
PASS_유리	2.9	3.0	3.1	3.1	3.1
SAS_유리	3.0	3.1	3.2	3.2	3.1
PASS_COP_A	2.9	3.0	3.1	3.1	3.1
SAS_COP_A	3.0	3.1	3.2	3.2	3.2
PASS_COP_B	3.0	3.1	3.2	3.2	3.3
SAS_COP_B	3.0	3.1	3.2	3.2	3.2

[0196]

[0197] [표 33]

Peak B 의 SEC 분석, 전체에 대한 %, 25℃

샘플	t=0wk	t=2wk	t=4wk	t=8wk	t=12wk	t=24wk
PASS_유리	2.9	3.0	3.4	3.9	4.4	5.5
SAS_유리	3.0	3.1	3.6	4.1	4.5	5.6
PASS_COP_A	2.9	3.1	3.4	3.9	4.4	5.4
SAS_COP_A	3.0	3.2	3.5	4.1	4.6	5.8
PASS_COP_B	3.0	3.2	3.6	4.1	4.6	5.5
SAS_COP_B	3.0	3.1	3.5	4.0	4.5	5.7

[0198]

[0199] [표 34]

Peak B 의 SEC 분석, 전체에 대한 %, 40℃

샘플	t=0wk	t=2wk	t=4wk	t=8wk	t=12wk
PASS_유리	2.9	6.4	11.1	17.2	23.0
SAS_유리	3.0	6.1	9.8	15.4	21.0
PASS_COP_A	2.9	6.5	9.9	16.2	21.4
SAS_COP_A	3.0	6.3	9.9	14.9	18.6
PASS_COP_B	3.0	6.4	10.7	17.8	19.6
SAS_COP_B	3.0	6.2	10.0	17.1	22.4

[0200]

[0201] 보이지 않는 입자는 광 차폐 입자 계수기(HIAC)로 모니터링하였다. BD 유리 시린지에 충진된 제형에 대한 결과는 과거 PFS 데이터와 일치한 반면 실리콘 오일이 없는 플라스틱 시린지에서는 보이지 않는 입자가 감소한다(표 35).

[0202] [표 35]

입자/mL(광 차폐), 4℃

	2 μm		10 μm		25 μm	
	t=0 wk	t=24 wk	t=0 wk	t=24 wk	t=0 wk	t=24 wk
PASS_유리	10090	15994	468	726	14	2
SAS_유리	12240	13340	1183	505	18	5
PASS_COP_A	93	130	2	6	0	0
SAS_COP_A	30	74	2	2	0	0
PASS_COP_B	81	204	3	4	0	2
SAS_COP_B	62	237	2	8	0	1

[0203]

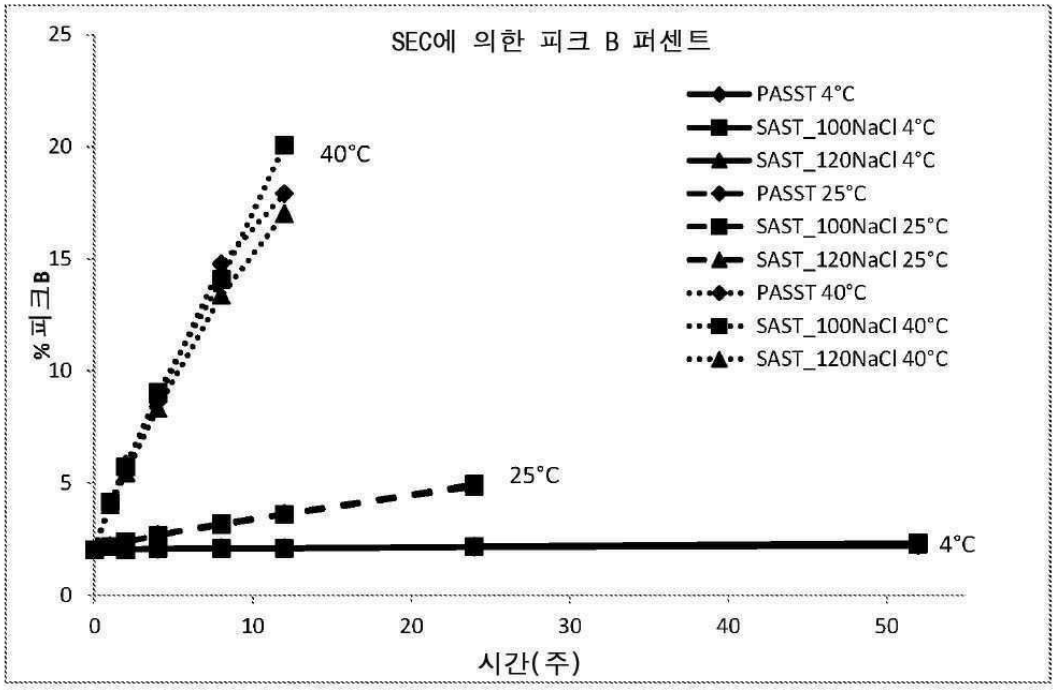
[0204] **결론**: 유리 실리콘처리된 시린지 및 COP 실리콘 오일이 없는 시린지에 보관된 50 mg/mL 에타너셉트의 SAS 제형 및 현재 상업적 에타너셉트 제형의 장기 안정성을 4℃, 25℃ 및 40℃에서 평가하였다. 24주 후 시린지 유형의 함수로서 제형 간에서 SE-HPLC에 의한 어떤 유의미한 차이도 관찰되지 않았다. pH에서의 이동은 관찰되지 않았

고 모든 제형은 여전히 허용 가능 범위 내에 있었다. 보이지 않는 입자는 COP 실리콘 오일이 없는 플라스틱 시린지에서는 감소하였고 유리 시린지에 보관된 경우에는 과거 PFS 결과와 일치하였다. 연구 결과는 50 mg/mL 에타너셉트의 SAS 제형이 안정하고 다양한 시린지 유형 내에서 권장 보관 온도인 2℃ 내지 8℃에서 24주 후에 현재 상업적 제형과 유사함을 나타냈다.

도면

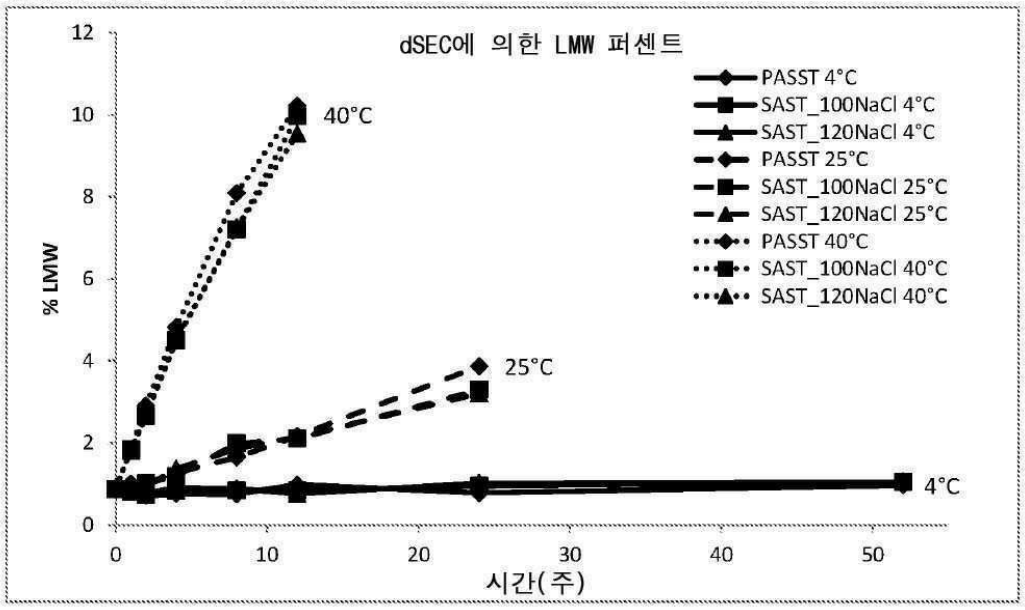
도면1

SEC에 의해 검출된 HMW(피크 B) 퍼센트



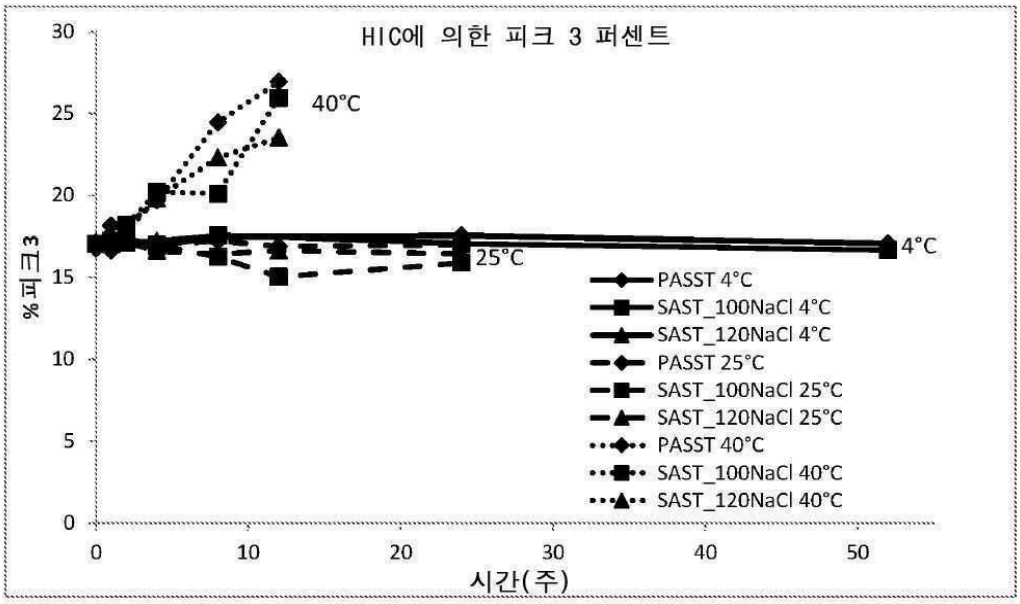
도면2

dSEC에 의해 검출된 LMW 퍼센트



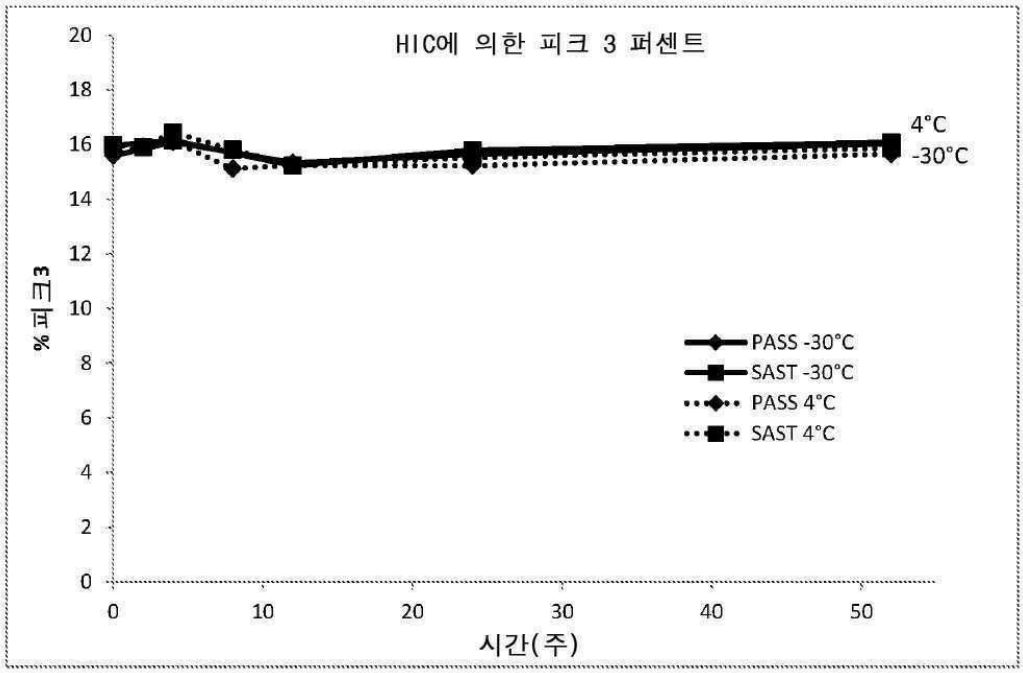
도면3

HIC에 의해 검출된 피크 3 퍼센트



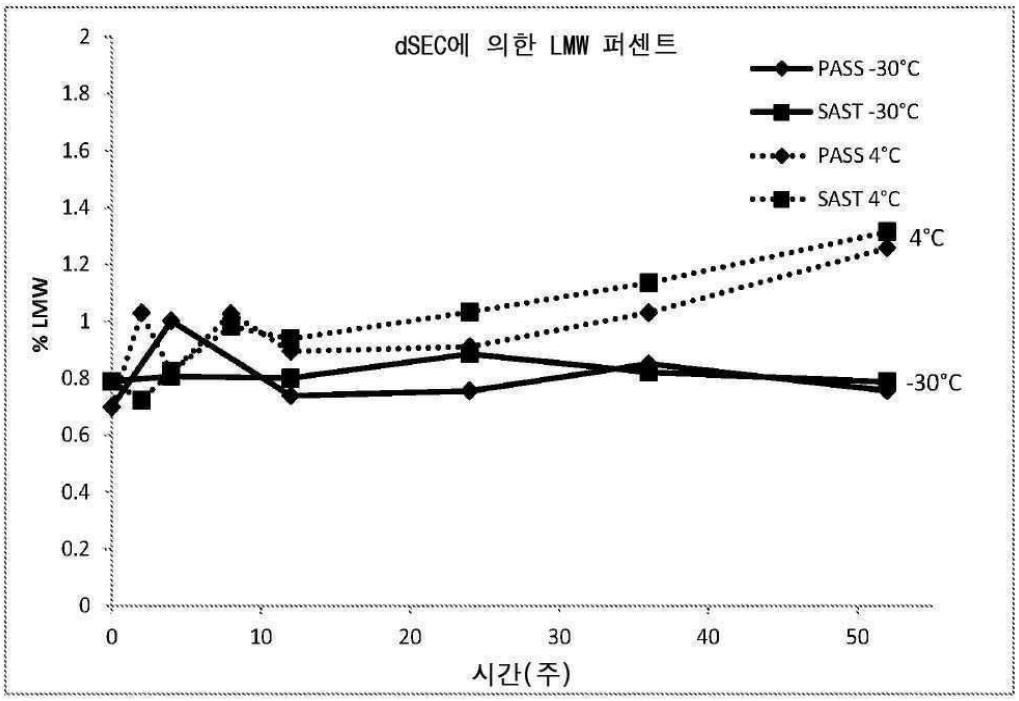
도면4

스테인리스 스틸 냉동 용기 보관 - HIC에 의한 피크 3 퍼센트



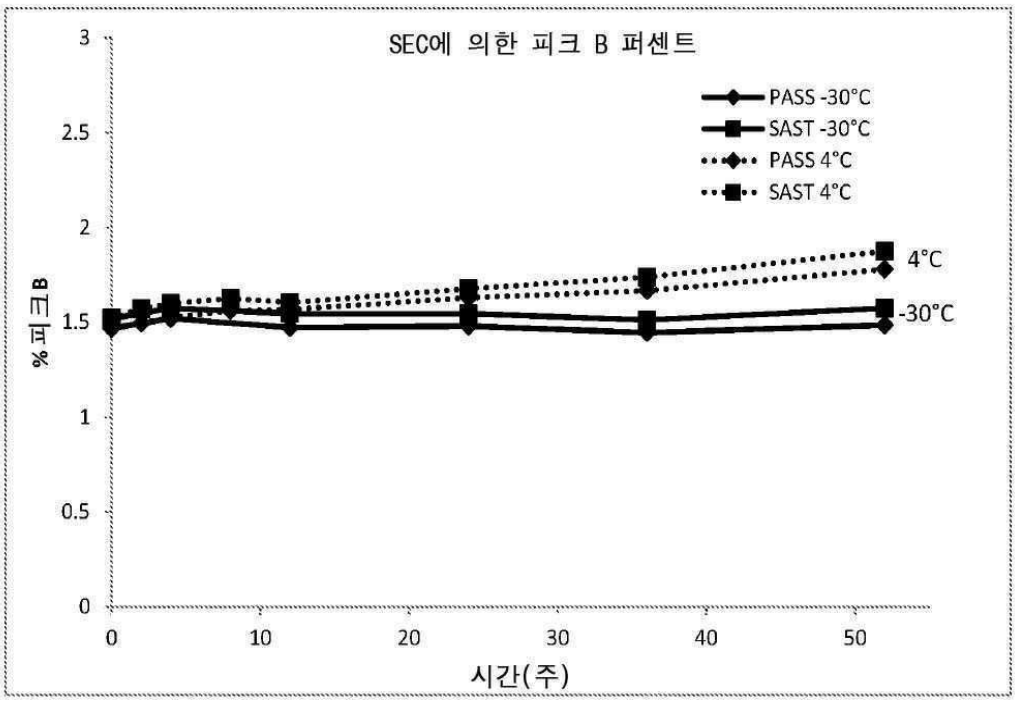
도면5

스테인리스 스틸 냉동 용기 보관 - dSEC에 의한 LMW 퍼센트



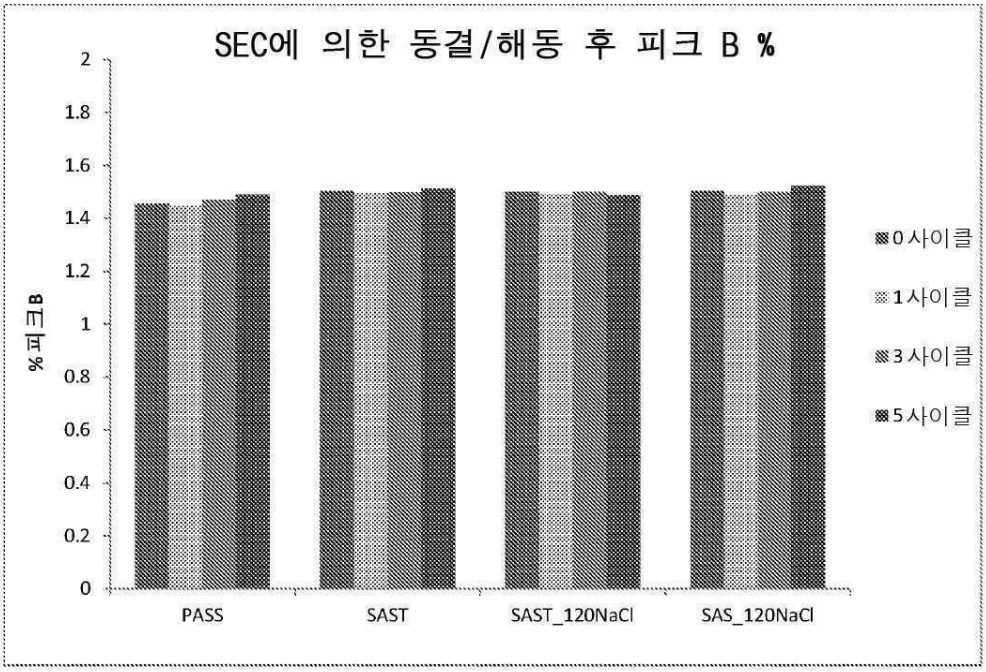
도면6

스테인리스 스틸 냉동 용기 보관 - SEC에 의한 피크 B 퍼센트

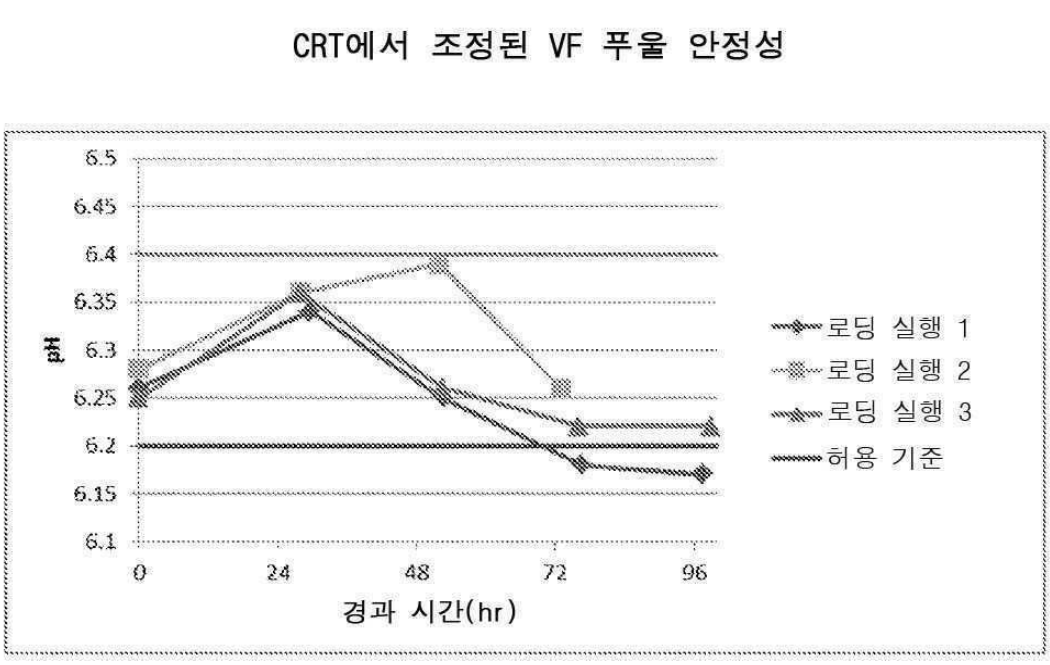


도면7

동결 해동 안정성

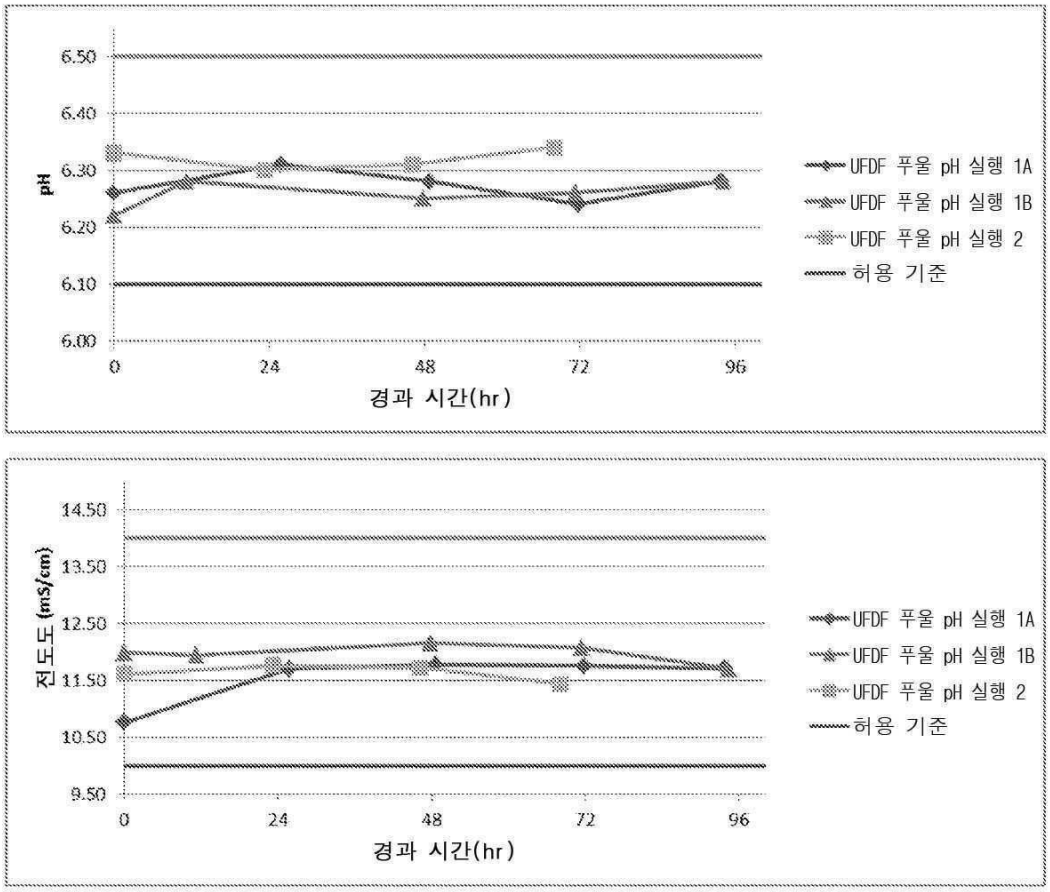


도면8

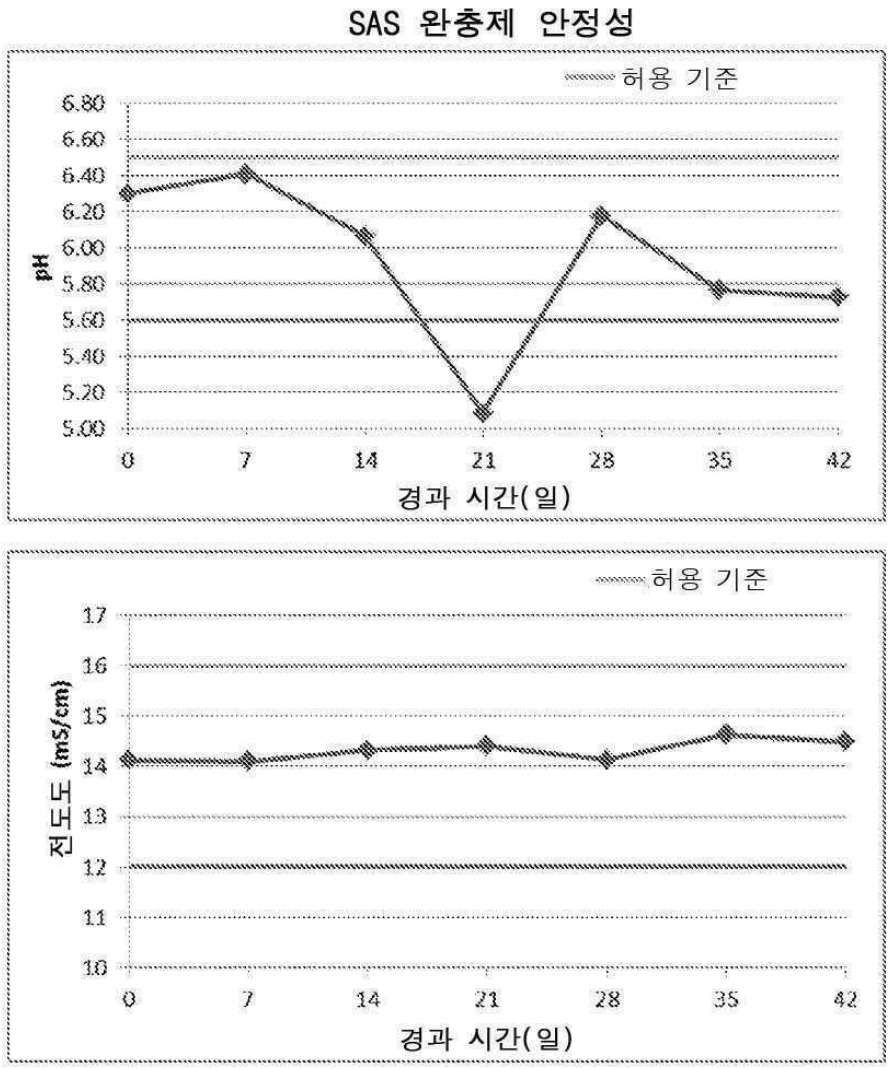


도면9

CRT에서의 UF/DF 푸울 안정성 pH 및 전도도



도면10



서 열 목 록

<110> AMGEN INC.

<120> Pharmaceutical Formulations and Methods of Making the Same

<130> IPA190523-US-D1

<140> 10-2019-7014130

<141> 2019-05-16

<150> PCT/US2018/057472

<151> 2017-10-19

<150> 62/411,458

<151> 2016-10-21

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 467

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fusion

<400> 1

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

Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys
20 25 30

Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr
35 40 45

Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu
50 55 60

Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser
65 70 75 80

Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys

85 90 95

Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys
100 105 110

Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala
115 120 125

Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro
130 135 140

Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His
145 150 155 160

Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala

165 170 175

Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val
180 185 190

His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr
195 200 205

Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly

210 215 220

Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp Glu Pro Lys Ser Cys

225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser

370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

405 410 415

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

420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

450 455 460

Pro Gly Lys

465