



(51) 국제특허분류:

A61K 47/12 (2006.01) A61K 47/10 (2006.01)
A61K 38/21 (2006.01) A61K 9/08 (2006.01)
A61K 47/16 (2006.01) A61K 9/19 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01) C07K 14/565 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2016/003632

(22) 국제출원일: 2016년 4월 7일 (07.04.2016)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:

10-2015-0049200 2015년 4월 7일 (07.04.2015) KR
10-2016-0042320 2016년 4월 6일 (06.04.2016) KR

(71) 출원인: 에이비온 주식회사 (ABION INC.) [KR/KR]; 06309 서울시 강남구 개포로 34길 5, 창원빌딩 202 (개포동), Seoul (KR).

(72) 발명자: 신영기 (SHIN, Young Kee); 06279 서울시 강남구 도곡로 78길 22, 114동 1301호 (대치동, 삼성아파트), Seoul (KR). 박상호 (PARK, Sang-Ho); 13520 경기도 성남시 분당구 양현로 272, 308동 2202호 (야탑동, 경향아파트), Gyeonggi-do (KR). 송경 (SONG, Kyoung); 21112 인천시 계양구 아나지로 185번길 12 (효성동), Incheon (KR). 이희정 (LEE, Heejung); 02079 서울특별시 중랑구 신내로 7가길 35 (상봉동), Seoul (KR). 곽은혜

(GWAK, Eunhye); 16548 경기도 수원시 영통구 동탄원천로 881번길 19 (매탄동), Gyeonggi-do (KR). 장은진 (JANG, Eun Jin); 08394 서울특별시 구로구 디지털로 242, 9층 (구로동), Seoul (KR). 정성훈 (JEONG, Seong Hoon); 10371 경기도 고양시 일산서구 대산로 164, 207동 1401호 (주엽동, 문촌마을 2단지아파트), Gyeonggi-do (KR). 김남아 (KIM, Nam Ah); 22714 인천광역시 서구 심곡로 135, 108동 501호 (심곡동, 대동아파트), Incheon (KR).

(74) 대리인: 이명진 (LEE, Myoung-Jin); 06180 서울특별시 강남구 영동대로 85길 28, 6층 (대치동), Seoul (KR).

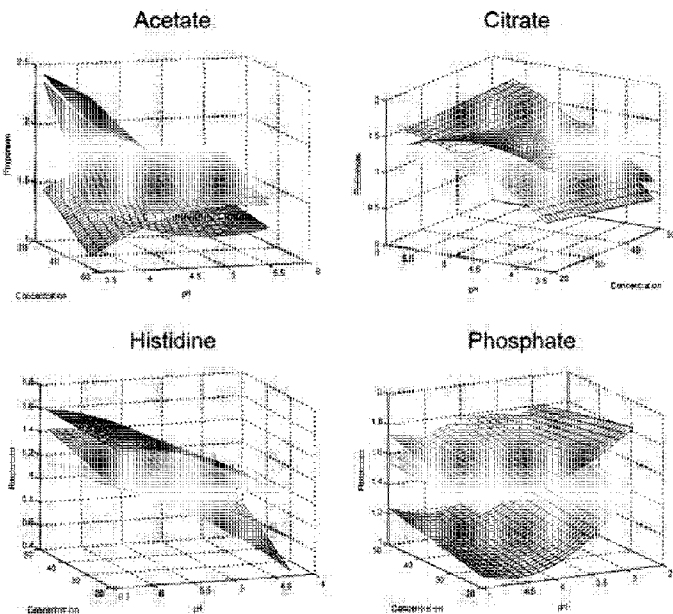
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA,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

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: STABILIZED PREPARATION OF INTERFERON BETA VARIANT

(54) 발명의 명칭: 인터페론 베타 변이체의 안정화 제제



(57) Abstract: The present invention relates to a stabilized pharmaceutical preparation of R27T comprising a human interferon beta variant (R27T), an acetic acid buffer solution, arginine, mannitol, poloxamer 188, and methionine. The stabilized R27T pharmaceutical preparation according to the present invention comprises an acetic acid buffer solution, arginine, mannitol, poloxamer 188, and methionine, and thereby inhibits formation of an aggregate of an R27T protein and enables long-period storage because of an improvement in thermodynamic and structural stability. Thus, it is expected that the stabilized R27T pharmaceutical preparation will be useful in prevention, improvement and treatment of multiple sclerosis, cancer, autoimmune diseases, viral infectious diseases, HIV infectious diseases, hepatitis C, rheumatoid arthritis, etc.

(57) 요약서: 본 발명은 인간 인터페론 베타 변이체 (R27T), 아세트산 완충액, 아르기닌, 만니톨, 폴록사머 188(Poloxamer 188), 및 메티오닌을 포함하는 R27T의 안정화된 약학 제제에 관한 것이다. 본 발명에 따른 안정화 R27T 약학 제제는, 아세트산 완충액, 아르기닌, 만니톨, 폴록사머 188, 및 메티오닌을 포함함으로써 R27T 단백질의 응집체 형성을 억제하고, 열역학적 및 구조적 안정성을 개선시킴으로써 장기간의 보관이 가능하여, 다발성 경화증,

암, 자가면역질환, 바이러스 감염질환, HIV 감염질환, C형 간염, 및 류마티스성 관절염 등의 예방, 개선 및 치료에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.



TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

명세서

발명의 명칭: 인터페론 베타 변이체의 안정화 제제

기술분야

- [1] 본 발명은 인간 인터페론 베타 변이체(R27T), 아세트산 완충액, 아르기닌, 만니톨, 폴록사머 188(Poloxamer 188), 및 메티오닌을 포함하는 R27T의 안정화된 약학 제제에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 인터페론(IFNs)은 사이토카인의 일종으로서 항-바이러스 활성을 나타내고, 세포 증식을 억제하며 자연 면역 반응을 조절하는 기능을 갖는다. IFN은 세포 기원(백혈구, 섬유모세포, T 세포)에 따라 IFN- α , IFN- β , IFN- γ 로 분류되며, 이 중 인터페론-베타(IFN- β)는 5개의 알파-헬릭스(α -helix)를 가지고 있는 구형 단백질로써 크기는 22 kD이며 당쇄를 제거하면 18kD이 된다.
- [3] IFN- β 의 임상 적용에 관한 연구는 활발하게 진행 중에 있고, 특히 다발성 경화증(Multiple Sclerosis)에 대한 증상의 완화, 경감 또는 치료제로 각광을 받고 있으며, 그 밖에도 항바이러스 활성, 세포 성장 억제, 림프구 세포 독성 증대 활성, 면역 조절 활성, 표적 세포의 분화 유도 또는 억제 활성, 대식세포의 활성화, 사이토카인 생성의 증가 활성, 세포독성 T세포의 효과 증가 활성, 자연 살해 세포(natural killing cell)의 증가 활성 등의 다양한 면역학적 활성으로 암, 자가 면역 장애 및 바이러스 감염, HIV와 관련된 질병, C형 간염, 및 류마티스성 관절염 등의 치료에 효과가 있다는 보고가 있다.
- [4] 인간 IFN- β 도 당단백질의 일종인데, 단백질에 연결된 당쇄 부분이 단백질의 활성에 중요한 역할을 하기 때문에, 당단백질의 경우 당쇄를 부가시키게 되면 그 활성이 증가하는 경우가 있다. 즉, 단백질 당화는 안정성, 용해도, intracellular trafficking activity, 약물 동태 및 항원성과 같은 많은 생화학적 특성에 영향을 미칠 수 있는 것으로 알려져 있다.
- [5] 이에, 당단백질인 인간 천연형 IFN- β 에 당쇄를 도입시켜 그 활성이나 기능이 증가 또는 향상된 인간 IFN- β 변이체를 제조한 예가 보고된바 있다(한국특허등록 10-0781666). R27T는 도 1에 나타낸 바와 같이 IFN- β 1a의 25번째 위치에 추가적인 당화를 위하여 27번째 위치의 아르기닌(Arg)을 트레오닌(Thr)으로 대체하여 설계된 재조합 인간 IFN- β 변이체(이하, rhINF- β)로서, 야생형의 INF- β 1a(Rebif)와 비교했을 때 안정성 증가, 단백질 응집 경향 감소 및 반감기 증가를 나타낸다. 즉, R27T는 위치-지정 변이를 통해 추가적인 당화로 생성된 rhINF- β 의 biobetter 버전이다.
- [6] 한편, 단백질 의약품 개발에 있어서 주요 과제 중 하나는 충분한 화학적, 물리적, 생물학적 안정성을 부여하여 24개월 이상 장기간의 유통기한을 가지는 제품을 생산하는 것이다. 그러나 단백질 분해 경로에서 다양한 고유의

민감성(intrinsic susceptibility), 단백질의 거대분자, 2차, 3차, 4차 구조와 같은 다양한 level을 가진 단백질 구조의 복잡성 때문에 안정성을 달성하는 것은 여전히 어려운 문제이다.

- [7] 최초의 재조합 펩타이드 호르몬으로서 인슐린이 1982년에 처음으로 승인되어 성공적으로 생산된 지 30년 이상 된 현재, 이를 이어서 수많은 재조합 단백질/펩타이드 의약품의 성공 사례들이 보고되고 있다. 그러나 바이오 의약품의 개발 과정, 특히 제제화에 있어서, 단백질 응집, 물리화학적 불안정성, 낮은 반감기, 저용해성, 약물 동태학적 특성(pharmacokinetic properties) 등 여러 가지 요인 때문에 여전히 난관에 직면하고 있다.

- [8] 특히, 단백질 응집은 치료용 단백질이 용액에서 구조적/열역학적으로 불안정하기 때문에 보관하는 동안에도 거의 모든 바이오의약품 공정에서 쉽게 발생하는 주요 문제들 중 하나이다. 치료용 단백질은 정제, 가공, 보관 시 다양한 요인으로 인한 구조적 변화에 민감하기 때문에 단백질들이 고온, 최고/최저 pH, 전단 변형률(shear strain) 및 표면흡착에 노출되면 상기와 같은 문제들이 악화될 수 있다. 또한, 단백질 기반 바이오 의약품들은 폴립(unfolding), 응집, 비정상적인(non-native) 응집으로 인한 불용성 입자화와 같은 물리적 변성(degradation)의 가능성이 있기 때문에 단백질 응집이나 물리적 변성을 피하고 안정성을 최대화하기 위해서 안정적인 pH 범위, 적절한 완충액 시스템, 및 부형제의 개발 등 제제 시스템 최적화가 요구된다.

- [9] 종래, DLS(Dynamic Light Scattering), DSC(Differential Scanning Calorimetry), CD(Circular Dichroism), SEC(Size Exclusion Chromatography), ATR-FTIR과 같은 다양한 생물리학적 분석 방법들을 이용하여, 인간 성장호르몬, 인간 상피성장인자, 항체 등의 단백질 제제를 신속하고 고효율로 생산하고자 하는 노력이 있었으며, 주로 용액의 pH, 완충액, 완충액 농도, 단백질 농도 및 부형제와 같은 다양한 용액 조건하에서 단백질 구조의 다양성을 관찰하기 위하여 이용되었다. 그러나 많은 데이터들은 다양성과 복잡성 때문에 해석하기 어려울 수 있기 때문에, 도출 결과 사이의 일관성을 찾고 표적 단백질의 물리적 상태를 정의하기 위한 의미 있는 연관성을 보여주기 위한 새로운 데이터 분석 방법 및 안정화 시스템이 필요한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 이에, 본 발명자들은 인터페론 베타 변이체인 R27T 단백질의 응집체 형성을 억제하고, 열역학적 및 구조적 안정성을 개선시켜 안정화된 약학 제제로서의 유용성을 높이하고자 예의 연구한 결과, 신규한 조성의 안정화 R27T 제제를 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [11] 이에, 본 발명은 신규한 조성의 인간 인터페론 베타 변이체(R27T)의 안정화된 약학 제제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

- [12] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [13] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 인간 인터페론 베타 변이체(R27T), 5 내지 100 mM 농도의 아세트산 완충액, 10 내지 150 mM 농도의 아르기닌(Arginine), 50 내지 300 mM 농도의 만니톨(Mannitol), 0.1 내지 10 mg/mL 농도의 폴록사머 188(Poloxamer 188), 및 0.5 내지 5 mM 농도의 메티오닌(Methionine)을 포함하는 인간 인터페론 베타 변이체(R27T)의 안정화된 약학 제제를 제공한다.
- [14] 본 발명의 일 구체예로, 상기 인간 인터페론 베타 변이체(R27T)는 인간 인터페론 베타의 27번째 아미노산인 아르기닌이 트레오닌으로 치환되어 25번째 아미노산인 아스파라진 잔기에 N-연결형 당쇄를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [15] 본 발명의 다른 구체예로, 상기 아세트산 완충액의 농도는 10 내지 30 mM인 것을 특징으로 한다.
- [16] 본 발명의 또 다른 구체예로, 상기 아세트산 완충액은 pH가 3.6 내지 4.4의 범위인 것을 특징으로 한다.
- [17] 본 발명의 또 다른 구체예로, 상기 아르기닌의 농도는 50 내지 100 mM인 것을 특징으로 한다.
- [18] 본 발명의 또 다른 구체예로, 상기 만니톨의 농도는 150 내지 250 mM인 것을 특징으로 한다.
- [19] 본 발명의 또 다른 구체예로, 상기 폴록사머 188의 농도는 0.1 내지 1 mg/mL인 것을 특징으로 한다.
- [20] 본 발명의 또 다른 구체예로, 상기 메티오닌의 농도는 0.5 내지 2 mM인 것을 특징으로 한다.
- [21] 본 발명의 또 다른 구체예로, 상기 안정화된 약학 제제는 pH가 3.6 내지 4.4의 범위인 것을 특징으로 한다.
- [22] 본 발명의 또 다른 구체예로, 상기 안정화된 약학 제제는 다발성 경화증, 암, 자가면역질환, 바이러스 감염질환, HIV 감염질환, C형 간염, 및 류마티스 관절염으로 이루어진 군에서 선택되는 질환의 예방 또는 치료용인 것을 특징으로 한다.
- [23] 본 발명의 또 다른 구체예로, 상기 안정화된 약학 제제는 경구 또는 비경구 투여용인 것을 특징으로 한다.
- [24] 본 발명의 또 다른 구체예로, 상기 안정화된 약학 제제는 액상 또는 동결건조 제형인 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [25] 본 발명에 따른 안정화 R27T 약학 제제는, 아세트산 완충액, 아르기닌, 만니톨,

폴록사머 188, 및 메티오닌을 포함함으로써 R27T 단백질의 응집체 형성을 억제하고, 열역학적 및 구조적 안정성을 개선시킴으로써 장기간의 보관이 가능하여, 다발성 경화증, 암, 자가면역질환, 바이러스 감염질환, HIV 감염질환, C형 간염, 및 류마티스 관절염 등의 예방, 개선 및 치료에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [26] 도 1은, 인간 인터페론 베타 변이체(R27T)의 유전자 및 단백질 서열을 나타낸 것이다.
- [27] 도 2는, 시차주사열량계(DSC)를 이용하여 제제 중의 R27T의 농도(0.8 mg/mL; 0.5 mg/mL; 0.3 mg/mL; 0.05 mg/mL)에 따른 열역학적 안정성을 평가한 결과이다.
- [28] 도 3a 및 도 3b는, DLS-제타전위(도 3a) 및 DSC-전이온도(도 3b)를 이용하여 다양한 pH 범위에서 R27T(0.8 mg/mL)의 물리화학적 안정성을 평가한 결과이다.
- [29] 도 4는, 4가지의 산성 완충액(인산, 아세트산, 구연산, 히스티딘)을 첨가한 후 DSC를 수행하여 T_m 을 측정함으로써 R27T에 최적인 완충액을 평가한 결과이다.
- [30] 도 5는, 다객체적(multi-objective) 강건 설계법(RD)을 이용하여 4가지의 산성 완충액(인산, 아세트산, 구연산, 히스티딘) 환경에서 최적의 pH 조건을 평가한 결과이다.
- [31] 도 6은, 다양한 pH의 20 mM 아세트산 완충액이 포함된 R27T 제제를 37°C에서 11일간 보관한 후, 크기배제 크로마토그래피(SEC)를 수행하여 단백질 용액의 잔여 단량체량을 측정함으로써 20 mM 아세트산 완충액 함유 제제의 보관 안정성에 대한 pH 효과를 평가한 결과이다.
- [32] 도 7은, pH 3.4 내지 4.4의 20 mM 아세트산 완충액이 포함된 R27T 제제에 대하여 DSC 분석을 실시하여 T_m 을 측정함으로써 20 mM 아세트산 완충액 함유 제제의 구조적 안정성에 대한 pH 효과를 평가한 결과이다.
- [33] 도 8a 및 도 8b는, pH 4.2의 20 mM 아세트산 완충액 및 다른 종류의 부형제가 포함된 각각의 R27T 제제에 대하여 DSC 분석을 실시하여 T_m 을 측정한 것으로서, 부형제의 혼합 첨가(도 8a) 및 단일 첨가(도 8b)에 따른 R27T 제제의 구조적 안정성 증진 여부를 평가한 결과이다. (Reference: 기존 Rebif 제제; A Formulation: Mannitol, Poloxamer 188, Methionine, 및 Benzyl alcohol 포함 제제; B Formulation: Arginine HCl 및 Polysorbate 20 포함 제제).
- [34] 도 9는, pH 4.2의 20 mM 아세트산 완충액 및 다른 종류의 부형제가 포함된 각각의 R27T 제제를 40°C에서 9일간 보관하면서 SEC를 수행하여 단백질 용액의 잔여 단량체량을 측정함으로써 부형제의 혼합 첨가 및 단일 첨가에 따른 R27T 제제의 보관 안정성을 평가한 결과이다.
- [35] 도 10은, R27T 안정화 제제의 조성을 최적화하기 위하여, 아세트산 완충액의 농도(10, 20, 및 50 mM) 및 pH(3.8, 4.2)를 달리하여 첨가한 R27T 안정화 제제를 4°C 또는 25°C에서 1 내지 2주간 보관한 후 SEC를 수행하여 단백질 용액의 잔여

단량체 및 응집체량을 측정함으로써 보관 안정성에 대한 아세트산 완충액의 농도 및 pH 효과를 평가한 결과이다.

- [36] 도 11은, pH 3.8의 20 mM 아세트산 완충액, 아르기닌, 폴록사머 188, 및 만니톨이 다양한 조성으로 첨가된 R27T 제제(F1~F8)를 저농도(100 $\mu\text{g/mL}$) 또는 고농도(640 $\mu\text{g/mL}$)로 4°C 또는 37°C에 14일 동안 보관한 후 SEC를 수행하여 단백질 용액의 잔여 단량체량을 측정함으로써 보관 안전성이 향상된 최적의 조성을 평가한 결과이다.
- [37] 도 12는, pH 3.8의 20 mM 아세트산 완충액, 아르기닌, 폴록사머 188, 및 만니톨이 다양한 조성으로 첨가된 R27T 제제(F1~F8)를 저온(4°C)에서 장기간(0 내지 28일) 보관하면서 7일 간격으로 SEC를 수행하여 단백질 용액의 잔여 단량체량을 측정함으로써 보관 안전성이 향상된 최적 조성을 평가한 결과이다.
- [38] 도 13은, pH 3.8의 20 mM 아세트산 완충액, 아르기닌, 폴록사머 188, 및 만니톨이 다양한 조성으로 첨가된 R27T 제제(F1~F8)에 대하여 CPE(Cytopathic effect) assay를 수행한 후 대조군(Control)을 기준으로 각 제제의 활성을 비교한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [39] 본 발명은, 0.3 내지 1.0 mg/mL의 농도의 인간 인터페론 베타 변이체(R27T) 및 5 내지 100 mM 농도의 아세트산 완충액, 10 내지 150 mM 농도의 아르기닌(Arginine), 50 내지 300 mM 농도의 만니톨(Mannitol), 0.1 내지 10 mg/mL 농도의 폴록사머 188(Poloxamer 188), 및 0.5 내지 5 mM 농도의 메티오닌(Methionine)을 포함하는, 인간 인터페론 베타 변이체(R27T)의 안정화된 약학 제제에 관한 것이다.
- [40] 단백질 기반 제제를 제조할 때 가장 근본적인 문제 중 하나는 용액에서 원하는 치료용 단백질 농도를 구하는 것인데, 이것은 단백질 안정성이 단백질 농도에 의존할 뿐만 아니라 용액의 pH, 온도, 이온강도 및 첨가제 농도에도 영향을 받기 때문이다. 따라서, 단백질 기반 제제는 치료용 단백질을 안정화시키는데 적합해야 하고, 응집, 침전, 또는 절편화와 같은 문제를 방지해야 한다.
- [41] R27T는 IFN- β 1a의 25번째 위치에 추가적인 당화를 위하여 27번째 위치의 아르기닌(Arg)을 트레오닌(Thr)으로 대체하여 설계된 재조합 인간 IFN- β 변이체(이하, rhINF- β)로서, 본 발명에서는, R27T의 안정화를 위한 제제를 개발하기 위하여, DSC, DLS, FT-IR, SEC와 같은 다양한 분석 방법을 이용하였다.
- [42] 당화는 많은 단백질의 용해도를 증가시킨다고 알려져 있고, 당화 안정성은 pH 의존적이다. 그러므로 적합한 pH와 완충액을 확인하는 것은 안정성 문제를 극복하고, 약물 생산, 정제, 보관 및 출시를 포함한 개발 공정의 다양한 단계에서 최적의 안정성을 얻는데 중요하다.
- [43] 본 발명에서는 시차 주사 열량측정법(DSC, differential scanning calorimetry)과 동적 광산란(DLS, dynamic light scattering)을 사용하여 pH 2-11의 용액으로 미리

- 선별한 결과, R27T의 실험적인 pI와 최적의 pH 범위는 각각 5.8과 3.6-4.4임을 확인하였다.
- [44] 또한, 다양한 농도의 아세트산, 히스티딘, 인산, 및 구연산 완충액을 이용하여 2.9에서부터 5.7까지의 pH 범위에서 기초 완충액 시스템을 얻기 위하여 실험설계법(DoE; Design of experiment)을 사용하였다. DoE 접근은 pH 2.9-5.7, 완충액(인산, 아세트산, 구연산, 히스티딘), 완충액 농도(20 mM 및 50 mM) 함수로써 제제 연구를 위한 실용적인 방법으로 개발되었다. 이러한 방법은 복잡한 데이터 결과를 해석하고 단백질 안정성을 나타내는 주요 요소를 조사하기 위하여 가중화 방법(weight-based procedure)을 이용하였다. 이때, 사용된 인자로는 T_m , 엔탈피, DSC와 FT-IR(Fourier Transform Infrared spectroscopy)을 통해 얻은 헬릭스(helix) 비율이다. 이들 3가지 인자에 의해 가중은 변했으나, 평가를 수행한 모든 시나리오 중 pH 3.6의 20 mM 아세트산 완충액에서 가장 높은 목적함수가 나타났고, 다음으로는 pH 2.9에서의 인산 완충액이었다. 이는 이들 완충액에서 열 안정성(T_m 및 엔탈피)과 2차 구조 안정성(상대적인 helix 함량)이 최적의 상태임을 의미한다.
- [45] 다만, 이들 완충액은 pH가 너무 낮아 환자의 피부 부작용을 초래할 수 있어 DoE로부터 얻은 제형은 피하 주사에 충분하지 않기 때문에, 열 안정성, 이차구조 안정성, 및 보관 안정성을 고려한 아세트산 완충액으로 R27T의 pH 값을 증가시킬 수 있는 후속연구를 더욱 수행하였다. 즉, 허용 가능한 안정성을 가진 pH 값을 최적화하기 위하여 크기-배제 크로마토그래피(SEC, Size Exclusion Chromatography)를 이용하였다.
- [46] 그 결과, R27T 단백질의 양은 37°C에서 pH가 3.4에서 4.4로 증가 시에도 유지되었다. 단백질 응집도 7일째까지 꾸준히 증가하였으나 단백질과 응집체 모두 11일째에는 감소하였고, 이는 비정상적(non-native) 응집으로부터 R27T의 손실이 있었음을 의미한다. DSC 열곡선(thermogram) 결과는 pH 4.2 및 4.4에서의 R27T 불안정성을 나타냈고, 같은 문제가 SEC에서 관찰되었으므로, 샘플의 2차 구조 안정성은 FT-IR로 분석하였다.
- [47] rhIFN- β 는 4-helix bundle domain을 가진 166 아미노산 당단백질로서, β -sheet 함량의 증가는 단백질 응집을 유도할 수 있는 분자 간 β -sheet 형성을 의미한다. 아세트산 완충액의 최적 pH 범위에서 R27T의 α -helix 및 β -sheet 함량을 분석한 결과, R27T의 열 안정성 및 2차 구조 안정성을 위한 최적의 pH 값은 $\text{pH } 3.8 \pm 0.2$ 임을 알 수 있었다.
- [48] 즉, helix 비율과 저장 안정성(monomer remaining)은 pH에 따라 증가했고 pH 4.0에서 가장 높은 반면, helix 비율과 열역학적 안정성은 pH 4.2와 pH 4.4에서 감소했고, 이는 단백질 응집(protein aggregation) 문제 때문일 수 있다. 따라서 R27T를 위한 최적화된 기초 완충액 시스템은 $\text{pH } 3.8 \pm 0.2$ 에서 20 mM 아세트산 완충액으로 예상되었다.
- [49] 나아가 R27T의 안정성을 더욱 증진시킬 수 있는 부형제를 찾기 위해, pH 4.2의

20 mM 아세트산 완충액과 함께 다양한 부형제가 혼합 또는 개별적으로 첨가된 조성의 R27T 제제를 제조하여 T_m 및 SEC 분석을 통해 실험을 진행한 결과, 만니톨(Mannitol)이 R27T의 구조 및 보관 안정성을 증진시키는 우수한 효과가 있으며, 아르기닌, 폴록사머 188, 또는 폴리소르베이트 20(Polysorbate 20) 역시 상기 인터페론 단백질의 안정성을 증진시키는 효과가 있음을 알 수 있었다.

- [50] 상기 실험 결과를 바탕으로, 부형제의 범위를 확장하여 R27T, pH 4.2의 20 mM 아세트산 완충액, 및 다양한 종류의 부형제가 첨가된 R27T 제제를 제조한 후 T_m 및 SEC 분석을 통해 부형제 종류에 따른 R27T의 안정성을 평가한 결과, 아르기닌과 폴록사머 188이 R27T의 안정성 증진에 우수한 효과가 있음을 확인하였고, 이러한 결과를 바탕으로 아르기닌과 폴록사머 188이 첨가된 R27T 제제의 최적의 조성을 설정하기 위한 후속 실험을 진행하였다.
- [51] 부형제의 최적 조성 평가 실험 이전에, 아세트산 완충액의 최종 조건을 결정하기 위한 실험을 통해, pH 3.8의 10 mM 또는 20 mM 아세트산 완충액 시스템이 R27T의 보관 안정성을 가장 증진시키는 조건임을 확인하였으며, 완충액의 수용력(capacity)를 고려하여 상기에서 확인된 pH 3.8의 20 mM 아세트산 완충액 시스템 조건에서 최종 부형제 조성을 평가하였다.
- [52] 아르기닌, 폴록사머 188, 및 메티오닌을 포함하는 것에 더하여 인터페론의 안정성을 증진시키는 것으로 확인된 만니톨을 첨가함으로써 6가지 다른 조성의 R27T 제제를 제조하고, 부형제를 포함하지 않는 대조군 및 기존 인터페론 베타 제제(Rebif)와의 안정성 및 활성 비교를 통해 R27T의 제제의 최적 조성을 결정하였다.
- [53] 본 명세서에서 사용된 용어 "인터페론-베타(IFN- β)"는 생물학적 유동액으로부터 분리하여 얻어지거나 진핵 또는 원핵 숙주 세포로부터 DNA 재조합 기술로 얻어진 인간 기원의 섬유모세포 인터페론뿐만 아니라, 그의 염, 기능성 유도제, 변이체(variants), 유사물 및 활성 분획물을 포함하는 것을 의미한다. 바람직한 IFN-베타는 인터페론 베타-1a를 의미하고자 한다.
- [54] "안정화 제제"는, 그 안에 포함된 단백질의 분해, 변성, 응집, 생물학적 활성의 손실의 정도가 허용 가능할 정도로 제어되며 시간에 따라 허용 불가능하게 증가하지 않는 것이다. 바람직하게는 상기 제제는 24개월까지는 R27T 활성의 적어도 약 60%, 바람직하게는 적어도 약 70%, 더욱 바람직하게는 적어도 약 80%를 유지하는 것이다.
- [55] "완충액"은 제제에 바람직한 pH 범위에 속하도록 제제의 pH를 조절 또는 유지하는 효과를 갖는 화합물의 용액을 의미한다. 본 발명에서 pH를 조절하기에 적합한 완충액은 제한이 없지만, 인산, 아세트산, 구연산, 히스티딘과 같은 화합물을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 20 mM 아세트산 완충액이며, 상기 완충액은 바람직하게 5 내지 100 mM의 농도, 더욱 바람직하게는 10 내지 30 mM의 농도로 포함될 수 있다.
- [56] 본 발명에 있어서, R27T의 안정화된 약학적 제제는 인간 인터페론 변이체인

R27T를 포함하는 용액을 5 내지 100 mM 농도의 아세트산 완충액 및 부형제를 포함하는 용액을 이용하여 투석하는 단계; 상기 투석액을 여과하는 단계를 포함하여 제조할 수 있다.

[57] 본 발명에 있어서, 상기 부형제는 10 내지 150 mM 농도의 아르기닌, 50 내지 300 mM 농도의 만니톨, 0.1 내지 10 mg/mL 농도의 폴록사머 188, 및 0.5 내지 5 mM 농도의 메티오닌을 첨가할 수 있고, 보다 바람직하게는 50 내지 100 mM 농도의 아르기닌, 150 내지 250 mM 농도의 만니톨, 0.1 내지 1 mg/mL 농도의 폴록사머 188, 및 0.5 내지 2 mM 농도의 메티오닌을 첨가할 수 있다.

[58] "액상 제형"의 경우 바람직한 용매는 물이며, 단일용량제제(monodose) 또는 다용량제제(multidose)일 수 있다. 본 발명의 다용량제제용 액상 R27T 제제는 페놀, m-크레졸, p-크레졸, o-크레졸, 클로로크레졸, 벤질알콜, 알킬파라벤(메틸, 에틸, 프로필, 부틸등), 벤즈알코늄클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드, 소듐 데히드로아세테이트 및 티메로살과 같은 정균제를 포함하는 것이 바람직하다. 상기 정균제는 다용량제제의 주사기간, 약 12 또는 24시간에서 약 12일, 바람직하게는 약 6 내지 12일 동안에 걸쳐 반드시 무균인 제제(주사에 적당한)를 유지시키기에 효과적인 농도를 줄 수 있는 함량으로 사용된다. 상기 정균제는 약 0.1% 내지 약 2.0%(정균제의 질량/용매의 질량)의 농도로 존재하는 것이 바람직하다.

[59] 본 발명의 제제는 추가로 희석제, 부형제 및 담체뿐만 아니라 생리학상/제약상 허용되는 첨가제, 예컨대 자유-유동화제, 유화제, 안정화제, 방부제, 착색제, 소포제 및 고결 방지제를 임의로 포함할 수 있다.

[60] 약제학적으로 허용 가능한 담체에 특별한 제한은 없으나, 생리식염수, 폴리에틸렌글리콜, 에탄올, 식물성 오일, 및 이소프로필미리스테이트 등을 포함할 수 있다.

[61] 또한, 본 발명은 안정화 제제를 약제학적 유효량으로 개체에 투여하여 다발성 경화증, 암, 자가면역질환, 바이러스 감염질환, HIV 감염질환, C형 간염, 류마티스성 관절염 등의 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[62] 본 발명에서 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간, 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 의미한다.

[63] "약제학적 유효량"은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율, 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하게 조절될 수 있음은 당업자에게 명백하다.

[64] 본 발명의 제제의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여경로, 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직하게는, 1일 0.001 내지 100 mg/체중kg으로, 보다 바람직하게는 0.01 내지 30 mg/체중kg으로 투여한다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 여러번 나누어 투여할 수 있다.

[65] 본 발명의 약학적 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여방법에는 제한이 없으며, 예를 들면, 경구, 직장, 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막, 또는 뇌혈관(intra cerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[66]

[67] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[68]

[69] [실시예]

[70] 실시예 1: 실험방법

[71] **1-1. 동적 광산란(Dynamic Light Scattering; DLS) 및 제타전위 분석**

[72] 인터페론 베타 변이체(R27T) 시료의 정전기적 상호작용을 평가하기 위하여, Zetasizer Nano ZS90(Malvern Instruments, Worcestershire, UK)을 사용하였으며, 기기의 측정온도는 10°C로 설정하였다. 각각의 시료는 30초 간격으로 총 5회 반복 측정을 실시하여 평균 유체역학적 크기, 다분산성지수(Polydispersity Index, PDI), 및 제타전위를 얻었다.

[73]

[74] **1-2. 시차 주사 열량계(Differential Scanning Calorimetry; DSC)**

[75] R27T 시료의 열역학적 안정성 평가를 실시하기 위하여, VP-DSC Microcalorimeter(Microcal, Northampton, MA, USA)를 이용하였다. 실험은 15°C에서 120°C까지 분당 1°C의 가열 속도로 진행되었으며, 총 3회 반복하였다. DSC 실험결과는 최종적으로 측정된 완충액을 이용하여 측정된 기준선을 차감하고, 시료에 존재하는 단백질의 농도를 계산함으로써 표준화하였다.

[76] R27T 측정결과는 선형 기준선 조절을 통해서 결과의 영점 조절을 위한 기준선을 설정하였다. 이때, 시료의 영점 조절을 위한 기준선을 설정하는 과정은 가열에 의해서 생기는 응집이나 침전 현상에 의해서 방해받기 때문에 복잡하게 되는데, 본 발명에서는 선형기준선 옵션을 선택함으로써 반복되는 실험에서 시료의 종류나 사용자의 결정에 관계 없이 가장 안정적인 결과를 얻도록 하였다.

[77] 최종 열량 기록은 초과 비열(cal/°Cmol)을 Y축으로, 온도를 X축(°C)으로 하여 작성되었다. 이러한 결과로부터 Multistate 모델을 사용하여 단백질 전이온도(Transition temperature; T_m)와 엔탈피 (ΔH)를 계산하였다.

[78]

[79] **1-3. ATR-FTIR 분광분석**

[80] 적외선 스펙트럼을 iD5 diamond ATR 액세서리가 장착된 Nicolet iS5 spectrophotometer(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 측정하였다. 약 10 μ l 시료를 이용하여 iD5 diamond crystal plate 위에서

측정하였으며, 4 cm^{-1} 의 해상도로 $4000\text{ cm}^{-1}\sim 600\text{ cm}^{-1}$ 파장 범위에서 총 100회 실시하였다. 시료의 스펙트럼은 완충 용액의 스펙트럼을 차감함으로써 얻어졌으며, Nicolet Omnic 소프트웨어를 사용하여 피크 평가를 수행하였다.

- [81] 단백질 용액에서의 α -helix, β -sheet, β -turn, random coil의 비율은 amide I 지역에서의 적외선 스펙트럼을 측정함으로써 얻을 수 있다. Amide I 지역의 피크들에서 OMNIC Peak Resolve software에서 제공하는 Gauss와 Lorentz 공식을 사용하여 곡선 맞춤 과정을 수행하고, 각각의 2차 구조가 나타내는 영역은 총 영역에서 각각의 2차 구조가 차지하는 비율로 나타내었다.

[82]

- [83] **1-4. R27T 용액 최적화를 위한 실험설계법(Design of Experiment; DoE)과 강건 설계(Robust Design; RD)**

- [84] 단백질이 가장 안정적으로 존재할 수 있는 최적 pH를 결정하기 위하여, 단백질 전이 온도(T_m), 엔탈피(ΔH), Helix 비율(α/β)을 사용하여 평가하였다. 초기 데이터 변환과정은 3가지의 측정 결과가 각각 다른 단위를 가지고 있기 때문에 4가지의 완충액 환경에서 최적의 pH 조건을 알아내기 위해서는 측정 결과를 변환해야 할 필요가 있다. 결과적으로 모든 측정 결과는 아래의 식을 통해서 1과 2 사이의 값으로 선형 변환이 이루어진다.

- [85] $y_{\text{transformed}} = (y - y_{\min}) / (y_{\max} - y_{\min}) + 1$

- [86] 상기 식에서, $Y_{\min}$ 과 $Y_{\max}$ 는 측정 결과에서의 최소값과 최대값을 나타내고, 완충액 농도 또는 pH 별 측정값 $Y(T_m, \text{Helix 비율}(\alpha/\beta), \text{엔탈피}(\Delta H))$ 가 삽입된다. Y값과 완충액 농도, pH와의 관계를 표현하고 최적점을 찾기 위해서, 아래식으로 정의되는 변형된 Response Surface Methodology (RSM) 모델을 사용하였다.

- [87] 상기 식에서, $m_0, m_1, m_2, m_{12}, m_{22}$ 는 2차 RSM에 사용되는 계수를 의미하며, RSM은 보통 수 개의 출력 값과 그와 관계된 입력 요인들의 관계가 매우 복잡하거나, 정확한 함수적 관계를 알기 어려울 때 최적화를 하기 위해서 사용한다.

- [88] 또한, 동시에 3개의 측정값을 최적화하기 위해서, 가중합 방법(weighted-sum method)을 활용한 강건 설계 이론(Robust Design principle)을 이용하였다. 본 방법은 강건 설계에서 효과적인 해법을 만들어내는 가장 보편적인 방법으로서, 중요도 수준을 $w_1\sim w_3$ 으로 한 가중합 방법을 기초로 하여 제안된 다객체적(multi-objective) 강건 설계 최적화 모델을 사용하였으며, 이러한 과정을 통해서 최적의 R27T 용액을 평가할 수 있다.

[89]

- [90] **1-5. 크기-배제 크로마토그래피 (Size Exclusion Chromatography; SEC)**

- [91] R27T 시료는 TSK-GEL G3000SWXL SEC 컬럼(TOSOH Bioscience, PA, USA)과 다이오드 검출기(DAD)가 장착된 Agilent 고성능 액체 크로마토그래피 시스템(Agilent HPLC 1260, Santa Clara, CA, USA)을 사용하여 분석하였다. 수용성 R27T 입자를 분리하기 위하여, 이동상 A(0.1% TFA(Trifluoroacetic acid))

수용액, 150 mM NaCl)와 이동상 B(0.1% TFA 아세토니트릴, 150 mM NaCl)를 4:6의 비율로 0.5 mL/min의 유속으로 흘려주었다. 시료에서 다량체의 피크로 분석된 영역은 수용성 응집체의 영역과 함께 계산되었다. 최초 측정과 이후 측정된 R27T 시료의 총 면적(크로마토그램 결과에서의 모든 피크 영역 넓이의 합)의 차이는 측정 시의 불용성 응집체의 형성으로 인하여 생겼다고 정의하였다. 각각의 종류(불용성 응집체, 단량체, 단백질 조각)의 남아있는 비율은 초기 시간과 비교한 피크 넓이로 계산되었고, 보관 기간을 X축으로 하여 그래프화하였다. 이때 남아있는 비율을 계산하는 식은 다음과 같다.

[92]
$$\text{남은 량 (\%)} = (a_t \div A_0) \times 100$$

[93] 상기 식에서, a_t 는 각각의 시간에서 단백질 피크의 넓이를 의미하며, A_0 는 각각의 단백질 피크의 최초의 넓이를 의미한다. 오차막대는 3회의 측정 동안의 표준 편차(Standard deviation; SD)를 의미한다.

[94]

[95] **실시예 2: 안정한 R27T 농도범위 분석**

[96] **2-1. R27T 용액 제조**

[97] 정제된 R27T(약 24,742 Da) 단백질을 4°C의 인산완충액(pH 2.9)에 보관하고, 이 R27T 용액을 4°C에서 24시간 동안 셀룰로오스 반투막(최소 투과분자량: 5000 Da)을 사용하여 투석하였다. 투석에 사용된 완충액은 인산완충액(pH 2.9, 3.6, 4.3, 5.0), 구연산완충액(pH 3.6, 4.3, 5.0, 5.7), 아세트산완충액(pH 3.6, 4.3, 5.0, 5.7), 히스티딘완충액(pH 4.3, 5.0, 5.7, 6.4)으로써 각각의 농도는 20 mM 또는 50 mM로 제조하였다. 투석은 8시간 간격으로 3회에 걸쳐 실시하였으며, 투석 후 남아 있는 불순물 입자를 제거하기 위하여 여과를 실시하였다(0.22 μ m 아세트산셀룰로오스, Advantec, Tokyo, Japan). 투석 후 각 완충용액에서의 단백질 농도는 자외선분광분석기(Mecasys, Seoul, Korea)를 이용하여 282 nm에서 측정하였다.

[98]

[99] **2-2. R27T 농도에 따른 유체역학적 크기, 제타전위 및 PDI 측정**

[100] R27T가 나노-크기의 응집체 형성시 단백질들 간의 정전기적 상호작용에 미치는 단백질 농도, pH, 완충액 농도의 효과를 조사하기 위하여, 동적 광산란법(DLS)을 실시하였다.

[101] 그 결과로서, 다양한 R27T 농도에서의 유체역학적 크기, 제타전위, 다분산성지수(PdI, Polydispersity Index)를 하기 표 1에 나타내었다.

[102] [표1]

R27T (mg/mL)	Size	Std.	Zeta potential	Std.	PDI
	(nm, Vol%)		(mV)		
0.80	5.37 (99.99)	0.27	21.16	0.90	0.63
0.50	7.00 (99.99)	0.33	13.24	0.13	0.78
0.30	8.22 (99.80)	0.44	11.84	0.80	0.93
0.10	-	-	3.60	1.15	1.00
0.05	-	-	3.17	1.80	1.00

[103] 상기 표 1에서 확인할 수 있듯이, 0.80 mg/mL 농도의 저장 완충액(storage buffer)에서 R27T의 유체역학적 크기는 직경 약 5.37 ± 0.27 nm이고, 농도가 감소함에 따라 유체역학적 크기는 증가하여 0.10 및 0.05 mg/mL 농도에서 단백질 응집이 관찰되었다.

[104] 또한, R27T 농도가 감소함에 따라 절대 제타전위(zeta potential) 값이 -21.16 mV부터 -3.17 mV까지 감소하였고, 이는 이웃한 단백질 사이에 단백질 응집이 유도되어 정전기적 상호작용이 감소하였기 때문이다. 한편, 다분산성 지수(PDI)가 0.7 이상일 경우는 고분자 시료가 매우 다분산된 불균질한 분포를 가짐을 의미하는데, 본 실시예에서는 R27T 농도가 낮을수록 다분산성지수(PDI)가 증가하였으며, 이는 단백질 응집이 발생하였음을 의미한다.

[105]

[106] **2-3. R27T 농도에 따른 T_m 측정**

[107] R27T의 농도(0.8, 0.5, 0.3, 0.05 mg/mL)에 따른 열역학적 안정성을 평가하기 위하여 시차주사열량계(DSC)를 실시하였다. 구체적으로, 단백질 3차 구조 유지에 중요한 역할을 하는 2가지 파라미터로서, 전이온도(T_m)와 일정 압력과 부피에서 접힌 3차 구조를 유지하는 에너지를 나타내는 엔탈피를 평가하였다.

[108] 그 결과, 도 2의 thermogram에 나타낸 바와 같이, 0.8 mg/mL 농도에서 R27T의 전이온도(T_m)는 60.07°C이고, 40~80°C 사이에서 하나의 흡열 피크(endothermic peak)가 관찰되었다. 하지만, 0.8 mg/mL에서 0.05 mg/mL로 R27T의 농도가 감소함에 따라 T_m 역시 60.07°C에서 50.68°C로 감소되었으며, 이는 낮은 농도일수록 R27T의 구조적 안정성(T_m 값)이 저하됨을 의미한다.

[109] 이상, 상기 DLS 및 DSC의 결과로부터, 저장 완충액에서 가장 안정한 R27T의 농도는 대략 0.80 mg/mL 내외임을 알 수 있었다.

[110]

[111] **실시예 3: 안정한 R27T의 pH 범위 분석**

[112] DLS-제타전위 및 DSC-전이온도(T_m)를 이용하여 다양한 pH 범위에서 R27T(0.8

mg/mL)의 물리화학적 안정성을 평가하였다.

- [113] 우선, 상기 실시예 2로부터 높은 절대 제타전위 값은 단백질 응집 억제에 중요한 요소임을 확인하였기 때문에, pH에 따른 제타전위의 변화를 측정하였다. 그 결과, 도 3a에 나타낸 바와 같이, 산성 pH에서 상대적으로 높은 전기적 반발을 나타냄을 알 수 있었고, 제타전위가 0에 도달하는 실험적인 등전점(pI; isoelectrical point) 값은 5.84였다.
- [114] 또한, 단백질이 극한 pH에 노출되면 내부 정전기적 힘과 전하-전하 상호작용의 파괴로 인한 구조적 결함을 초래할 수 있기 때문에, R27T 안정성(T_m)에 미치는 pH 효과를 더욱 측정하였으며, 이때 pH 범위는 투석 중에 염산 및 수산화나트륨을 사용하여 2.0에서 11.0까지 조정하였다. 그 결과, 도 3b에 나타낸 바와 같이, 가장 높은 구조적 안정성(T_m 값이 약 61°C)을 보이는 동안 최적의 pH 범위는 3.6과 4.4 사이임을 알 수 있었다.
- [115]
- [116] **실시예 4: 안정한 R27T의 완충액 분석**
- [117] **4-1. T_m 측정(DSC)**
- [118] R27T이 가장 안정적으로 존재할 수 있는 완충액 시스템을 결정하기 위하여, 다양한 pH 범위에서 다양한 농도의 산성 완충액(인산, 아세트산, 구연산, 히스티딘)을 첨가하여 DSC를 수행하고 T_m 을 측정하였다.
- [119] 그 결과, 도 4의 흡열피크로부터 확인할 수 있듯이, R27T의 구조적 안정성(T_m)이 pH와 완충액에 따라 변화하였고, 가장 높은 T_m 은 50 mM 아세트산 완충액(pH 3.6)에서 관찰되었으며, 다음으로는 20 mM 인산 완충액(pH 2.9), 50 mM 구연산 완충액(pH 5.7), 및 20 mM 아세트산 완충액(pH 3.6) 순이었다. 더욱 구체적인 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

[120] [표 2]

Buffer	Conc.	pH	T _m (°C)	Enthalpy (kJ/mol)	α-helix (%)	β-sheet (%)	β-turn (%)	Rd. Coil (%)	α/β
Acetate	20m M	3.6	62.59	21.51	48.20	17.24	11.29	23.27	2.80
	20m M	4.3	59.84	20.99	30.31	26.33	23.70	19.66	1.15
	20m M	5.0	58.52	30.68	29.59	30.59	28.00	12.05	0.97
	20m M	5.7	57.74	15.20	25.97	26.56	29.73	17.74	0.98
	50m M	3.6	63.70	13.64	23.65	32.22	28.23	15.90	0.73
	50m M	4.3	59.06	10.63	21.33	32.77	29.82	16.07	0.65
	50m M	5.0	59.71	15.11	32.53	24.49	30.62	12.36	1.33
	50m M	5.7	59.38	11.82	30.43	31.98	30.09	7.50	0.95

Histidine	20m M	4.3	59.64	1.52	22.30	33.97	23.86	19.88	0.66
	20m M	5.0	59.20	10.40	22.99	37.99	22.96`	16.06	0.60
	20m M	5.7	58.65	12.21	31.16	39.76	19.49	9.59	0.78
	20m M	6.4	56.90	11.03	33.45	29.28	23.12	14.12	1.14
	50m M	4.3	58.54	14.05	5.60	31.81	41.53	21.06	0.18
	50m M	5.0	60.15	12.10	20.50	41.58	21.30	16.62	0.49
	50m M	5.7	59.93	13.31	30.38	30.96	26.04	12.61	0.98
	50m M	6.4	57.95	11.61	9.89	29.51	38.87	21.72	0.34
Phosphat e	20m M	2.9	63.40	16.07	41.50	26.81	17.35	14.34	1.55
	20m M	3.6	60.67	18.09	19.62	23.79	34.35	22.24	0.82
	20m M	4.3	60.43	20.60	7.36	24.96	42.56	25.13	0.29
	20m M	5.0	59.59	16.56	8.52	24.23	42.63	24.62	0.35
	50m M	2.9	62.00	24.94	38.66	21.51	12.43	27.41	1.80
	50m M	3.6	60.46	17.80	22.72	26.31	30.39	20.57	0.86
	50m M	4.3	61.36	32.02	14.72	23.25	37.20	24.83	0.63
	50m M	5.0	60.99	15.23	21.34	25.07	31.26	22.32	0.85

Citrate	20m M	3.6	55.75	5.36	38.32	27.01	16.83	17.85	1.42
	20m M	4.3	58.27	9.47	51.92	21.35	21.12	5.61	2.43
	20m M	5.0	60.80	9.00	18.20	20.28	30.57	30.95	0.90
	20m M	5.7	60.43	11.31	9.65	26.95	37.14	26.26	0.36
	50m M	3.6	54.51	9.28	19.00	40.70	29.67	10.63	0.47
	50m M	4.3	57.98	10.46	33.15	43.07	23.65	0.13	0.77
	50m M	5.0	61.51	15.48	34.32	40.91	14.91	9.87	0.84
	50m M	5.7	62.84	15.78	18.79	26.68	26.18	28.35	0.70

[121]

[122] **4-2. α -helix의 상대적인 함량 측정(ATR-FTIR)**

[123] 상기 실시예 4-1의 DSC 데이터로부터 얻은 열역학적 특성들 이외에, 단백질의 구조학적인 특성들을 더욱 고려할 필요가 있기 때문에, ATR-FTIR을 이용하여 단백질 용액에서의 α -helix, β -sheet, β -turn, random coil의 비율을 측정하였다.

[124] 구체적으로, rhIFN- β 은 α -helix가 지배적이고 β -sheet 함량의 증가는 단백질 응집을 유도할 수 있는 분자간 β -sheet 형성을 의미하며, 단백질의 아미노산 결사슬의 이온화 상태는 구조적 변화를 초래할 수 있는 pH에 영향을 받기 때문에, 다양한 pH 범위에서 다양한 농도의 산성 완충액(인산, 아세트산, 구연산, 히스티딘)을 첨가하여 ATR-FTIR을 수행함으로써 β 구조에 대한 α -helix의 상대적인 함량을 측정하였다.

[125] 그 결과, 상기 표 2에 나타낸 바와 같이, 20 mM 아세트산 완충액(pH 3.6)에서 가장 높은 α -helix 함량을 가졌고, 다음으로는 20 mM 구연산 완충액(pH 4.3), 50 mM 인산 완충액(pH 2.9) 순으로 나타났다.

[126]

[127] **4-3. 강건 설계(Robust Design; RD)**

[128] 상기 실시예 4-1 및 4-2에서 얻어진 단백질 전이 온도(T_m), 엔탈피(ΔH), Helix 비율(α/β)의 3가지 측정결과는 각각 다른 단위를 가지고 있기 때문에, 4가지의 산성 완충액(인산, 아세트산, 구연산, 히스티딘) 환경에서 최적의 pH 조건을

알아내기 위해서는 측정 결과를 변환해야 할 필요가 있다. 이를 위해, 다객체적(multi-objective) 강건 설계(RD)를 수행하였으며 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[129] 4가지 완충액의 패턴을 설명하기 위하여, 3가지 반응 함수와 목적 함수를 도표하였다. 이때, T_m , Helix 비율(α/β), 및 엔탈피(ΔH)는 각각 구조적 안정성, 2차 구조 안정성, 및 열용량과 관련된 용해도를 나타내며, 4가지 완충액의 모든 목적 함수는 서로 다른 오목 패턴을 보임을 알 수 있다.

[130] 또한, 3가지 반응함수를 동시에 평가함으로써 최적의 완충액, 완충액 농도, 및 각각의 pH 값을 선택하기 위하여, 19가지 가중(weighting) 시나리오를 조사하였으며 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

[131] [표3]

Scenarios	T_m	Relative helix content	Enthalpy
	w_1	w_2	w_3
1	0.65	0.30	0.05
2	0.65	0.25	0.10
3	0.65	0.20	0.15
4	0.60	0.35	0.05
5	0.60	0.30	0.10
6	0.60	0.25	0.15
7	0.55	0.40	0.05
8	0.55	0.35	0.10
9	0.55	0.30	0.15
10	0.55	0.25	0.20
11	0.50	0.45	0.05
12	0.50	0.40	0.10
13	0.50	0.35	0.15
14	0.50	0.30	0.20
15	0.45	0.40	0.15
16	0.45	0.35	0.20
17	0.45	0.30	0.25
18	0.40	0.35	0.25
19	0.33	0.33	0.33

- [132] T_m 이 단백질의 열역학적 안정성을 나타내는 가장 중요한 요소이므로 가장 높은 가중치(weight)를 부여하였으며, 3가지 요소에 할당된 다른 가중치의 19가지 시나리오를 선택하고, 단백질 용액의 안정성과 다양한 pH 또는 완충액 사이의 상관관계를 조사하였다. 최종적으로, 19가지 시나리오의 최적화 결과는 하기 표 4에 나타내었다.

[133] [표4]

Optimal solutions												
Buffers	Acetate		Citrate		Histidine		Phosphate		Acetate	Citrate	Histidine	Phosphate
Scenarios	C	pH	C	pH	C	pH	C	pH	Objective functions			
1	20.00	3.60	50.00	5.67	50.00	5.32	20.00	2.90	1.887	1.659	1.449	1.799
2	20.00	3.60	50.00	5.70	50.00	5.30	20.00	2.90	1.875	1.675	1.463	1.794
3	20.00	3.60	50.00	5.70	50.00	5.29	20.00	2.90	1.864	1.692	1.476	1.789
4	20.00	3.60	50.00	5.59	20.00	5.14	20.00	2.90	1.886	1.623	1.430	1.779
5	20.00	3.60	50.00	5.66	50.00	5.32	20.00	2.90	1.874	1.637	1.441	1.774
6	20.00	3.60	50.00	5.70	50.00	5.30	20.00	2.90	1.863	1.654	1.454	1.769
7	20.00	3.60	50.00	5.51	20.00	5.19	20.00	2.90	1.884	1.588	1.415	1.759
8	20.00	3.60	50.00	5.57	50.00	5.34	20.00	2.90	1.873	1.602	1.419	1.754
9	20.00	3.60	50.00	5.64	50.00	5.32	20.00	2.90	1.862	1.616	1.433	1.750
10	20.00	3.60	50.00	5.70	50.00	5.30	20.00	2.90	1.851	1.632	1.446	1.745
11	20.00	3.60	50.00	5.43	20.00	5.24	20.00	2.90	1.883	1.556	1.401	1.740
12	20.00	3.60	50.00	5.49	20.00	5.26	20.00	2.90	1.872	1.568	1.402	1.735
13	20.00	3.60	50.00	5.55	50.00	5.34	20.00	2.90	1.861	1.581	1.411	1.730
14	20.00	3.60	50.00	5.62	50.00	5.32	20.00	2.90	1.849	1.595	1.424	1.725

15	20.00	3.60	50.00	5.46	50.00	5.36	20.00	2.90	1.860	1.548	1.389	1.710
16	20.00	3.60	50.00	5.53	50.00	5.34	50.00	2.90	1.848	1.560	1.402	1.710
17	20.00	3.60	50.00	5.60	50.00	5.32	50.00	2.90	1.837	1.574	1.416	1.715
18	20.00	3.60	50.00	5.51	50.00	5.34	50.00	2.90	1.836	1.539	1.394	1.705
19	20.00	3.60	50.00	5.49	50.00	5.34	50.00	2.90	1.816	1.516	1.387	1.699

[134] (C: buffer concentration)

[135] 상기 4가지 완충액으로부터 얻은 목적 함수의 최적 값을 비교함으로써, 최적의 제제를 생산할 수 있는 최적 pH 값과 완충액을 선택할 수 있는바, 도 4 및 표 4의 결과를 종합하여 볼 때, pH 3.6의 20 mM 아세트산 완충액이 최적의 제제(optimal formulation)로 이용될 수 있음을 알 수 있었다.

[136]

[137] **실시예 5: acetate 완충액에서의 최적 pH 분석**

[138] 상기 실시예 4로부터 아세트산 완충액이 R27T 제제를 위한 최적의 완충액임을 확인하였기 때문에, 아세트산 완충액을 이용하여 후속실험을 더욱 수행하였다.

[139]

[140] **5-1. SEC : 단량체량 분석**

[141] 우선, 아세트산 완충액에서 테스트된 pH 범위값 3.6, 4.3, 5.0, 및 5.7 중에서는 최적의 pH 값이 pH 3.6이었지만, 낮은 pH는 피하 주사 시 피부 부작용을 일으킬 수 있으므로 안정성을 위하여 제제의 pH를 증가시킬 필요가 있다. 이러한 이유로, 제제의 보관 안정성에 대한 pH 효과를 더욱 평가하기 위하여, pH 3.4에서 4.4까지 범위에서 R27T 제제를 37°C에서 11일간 보관한 후, SEC(크기 배제 크로마토그래피)를 수행하여 단백질 용액의 잔여 단량체의 크로마토그램을 매일 비교하였다.

[142] 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이, pH가 3.4에서 4.4로 0.2씩 증가함에 따라, 11일의 보관기간 동안 R27T의 단량체 잔여량이 증가하였다. 증가된 R27T 안정성 결과는 11일에 4% 단량체 잔여물만이 있는 pH 3.4에서 낮은 안정성을 나타내었으나, pH가 3.6에서 3.8, 4.0, 4.2, 및 4.4로 증가함에 따라, 11일간의 단량체 잔여량도 21.35%, 22.59%, 23.42%, 24.93%, 및 25.10%로 증가하였다. 단량체량의 증가는 응집체의 감소를 의미하므로 pH가 3.4에서 4.4로 증가할수록 단백질 안정성도 증가함을 알 수 있었다.

[143]

[144] **5-2. DSC : T_m 분석**

[145] 아세트산 완충액을 pH 3.4부터 4.4까지 0.2씩 증가시키면서 R27T의 DSC 분석을 실시하였다. 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, pH가 증가함에 따라 T_m이 증가하여 구조적 안정성이 증가함을 알 수 있었다.

[146]

[147] **실시예 6: 부형제가 첨가된 R27T 제제의 안정성 증진여부 분석**

[148] **6-1. R27T 제제의 제조**

[149] R27T 단백질과 완충액을 포함하는 제제에 부형제를 첨가함으로써 안정성이 증진된 R27T 제제를 제조하기 위하여, 2가지 다른 조성의 제제(A Formulation 및 B Formulation)를 제조한 후 기존의 인터페론 베타 제제인 Rebif 제제와 안정성을 비교하였다. 이를 위해, 2가지 R27T 제제의 조성은 하기 표 5에 나타낸 바와 같으며, 다음과 같은 방법에 따라 제조하였다.

[150] [표5]

Contents	Key excipient	Excipients
A Formulation	250 mM Mannitol	Poloxamer 188 (0.5 g/mL)Methionine (0.12 g/L), Benzyl alcohol (4.765 mL/L)
B Formulation	150 mM Arginine HCl	Polysorbate 20(0.005%)

[151] 먼저, 0.8 mg/mL 농도의 정제된 R27T 단백질을 4°C의 인산완충액(pH 2.9)에 보관하고, 상기 R27T 용액을 Cellu Sep® H1 셀룰로오스 반투막(최소 투과분자량: 5000 Da)을 사용하여 상온에서 12시간 동안 교반시키면서 투석하였다. 투석에 사용된 완충액은 20 mM 농도의 아세트이트 완충액(pH 4.2) 1L를 사용하였고, 이때 완충액과 상기 표 5에 나타낸 조성에 따라 부형제를 첨가하여 투석을 진행하였다. 투석 완료 후 남아있는 불순물 입자는 0.22 μ m 아세트산셀룰로오스(Advantec, Tokyo, Japan)를 이용하여 여과를 통해 제거하였다.

[152]

[153] **6-2. DSC : T_m 분석**

[154] 상기 실시예 6-1을 통해 제조한 2종류의 R27T 제제 및 기존의 인터페론 베타 제제인 Rebif 제제에 대하여 DSC를 수행하고 T_m을 측정하여 R27T의 구조적 안정성을 평가하였다.

[155] 그 결과, 도 8a에 나타낸 바와 같이, B Formulation이 Rebif 제제(Reference)보다 T_m 값이 높게 측정되었으며, A Formulation은 Rebif 제제보다 T_m 값이 더 낮게 측정된 것을 통해 B Formulation의 경우 구조적 안정성이 더 높은 것을 확인하였다.

[156] 나아가, 부형제 종류에 따른 구조적 안정성을 비교하기 위하여, 실시예 6-1에

기재된 방법과 동일하게 R27T 제제를 제조하되, 상기 표 5에 기재된 각 부형제들을 한가지씩만 완충액에 첨가하여 R27T 제제를 제조한 후 DSC를 수행하였다.

- [157] T_m 측정 결과, 도 8b에 나타낸 바와 같이, 부형제로 벤질 알코올(Benzyl alcohol)을 첨가한 경우에는 T_m 값($T_m=56.74$)이 감소하는 것으로 보아 벤질 알코올은 R27T 제제의 안정성을 감소시키는 것을 알 수 있었고, 반면 만니톨(Mannitol), 메티오닌(Methionine), 폴록사머 188(Poloxamer 188), 또는 폴리소르베이트 20(Polysorbate 20)을 첨가한 경우에는 제제의 안정성이 향상되는 것을 확인하였다. 구체적인 결과값은 하기 표 6에 나타내었다.

- [158] [표6]

	$T_m(^{\circ}\text{C})$	SD
A formulation	58.08	0.12
B formulation	59.47	0.02
Mannitol	61.06	0.04
Methionine	60.44	0.02
Poloxamer 188	60.71	0.02
Benzyl alcohol	56.74	0.02
Arginine	58.62	0.036
Polysorbate 20	59.84	0.02
Reference	58.88	0.04

- [159]

- [160] **6-3. SEC : 단량체량 분석**

- [161] 상기 DSC 분석을 통한 구조적 안정성 평가결과에 더하여, 부형제를 첨가하여 제조한 제제의 보관 안정성을 평가하기 위하여, 상기 실시예 6-1 및 6-2에서 제조한 A Formulation, B Formulation, 및 각각의 부형제를 개별적으로 첨가하여 제조한 R27T 제제를 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 40 $^{\circ}\text{C}$ 에서 9일간 보관하면서 잔여 단량체의 양을 매일 측정하였다.

- [162] 그 결과, 도 9에 나타낸 바와 같이, 상기 DSC 결과와 마찬가지로, A Formulation와 B Formulation를 비교하였을 때 B Formulation에서 단량체 잔여량이 더 높게 측정된 것을 확인하였다. 이에 더하여, A Formulation의 경우 각각의 부형제 첨가에 따른 단량체 비율 측정 결과, mannitol이 첨가된 제제의 단량체 잔여량 수치가 A Formulation을 비롯한 다른 제제들에 비해 현저히 높았으며, B Formulation의 경우에는 arginine 또는 polysorbate 20이 첨가된 제제보다 이들을 함께 첨가하여 제조된 B Formulation의 단량체 잔여량이 더 낮게 측정된 것을 확인하였다. 이를 통해 Mannitol이 R27T 제제의 안전성을

향상시키는 효과가 있고, arginine과 polysorbate의 혼합은 제제의 보관 안정성을 감소시키는 것을 알 수 있었다.

- [163] 상기 결과들을 통해, arginine이 주요 부형제로 첨가된 조성의 B Formulation의 경우 기존의 인터페론 제제보다 안정성을 향상시키며, Mannitol이 인터페론의 안정성을 증진시키는 우수한 효과가 있음을 알 수 있었고, 또한 제제의 가역성에도 크게 기여할 것으로 예상되었다.

[164]

[165] **실시예 7: R27T 제제의 부형제 스크리닝**

[166] **7-1. 다양한 부형제가 첨가된 R27T 제제의 제조**

- [167] 상기 실시예 6에서 얻은 결과를 바탕으로 하여, 좀 더 다양한 종류의 부형제를 첨가하여 R27T 제제를 제조한 후 이의 안전성을 평가하여 최적의 부형제를 스크리닝하고자 하였다. 이를 위해, R27T 제제의 제조에 사용된 부형제 종류 및 농도를 하기 표 7에 나타내었으며, 하기 방법에 따라 R27T 제제를 제조하였다.

[168] [표7]

		Content	Concentration
		R27T	1 mg/mL
Amino acids	1	Arginine HCl	50, 100, 150 mM
	2	Lysine HCl	50, 100, 150 mM
	3	Methionine	50, 100, 150 mM
Surfactants	4	Poloxamer 188	0.25, 0.5, 0.1 mg/mL
Carbohydrates	5	Mannose	50, 150, 250 mM
	6	Mannitol	50, 150, 250 mM
	7	Sucrose	50, 150, 250 mM
	8	Xylitol	50, 150, 250 mM
	9	Sorbitol	50, 150, 250 mM

- [169] 먼저, 1.0 mg/mL 농도의 정제된 R27T 단백질을 4°C의 인산완충액(pH 2.9)에 보관하고, 상기 R27T 용액을 Cellu Sep® H1 셀룰로오스 반투막(최소 투과분자량: 5000 Da)을 사용하여 4°C에서 12시간 동안 교반시키면서 투석하였다. 투석에 사용된 완충액은 20 mM 농도의 아세트이트 완충액(pH 4.2) 1L를 사용하였고, 이때 완충액에 상기 표 7에 나타난 각각의 부형제들을 농도를 달리하여 첨가한 후 투석을 진행하였다. 투석 완료 후 남아있는 불순물 입자는 0.22 μ m 아세트산셀룰로오스(Advantec, Tokyo, Japan)를 이용하여 여과를 통해 제거하였다.

[170]

[171] **7-2. DSC : T_m 분석**

- [172] 상기 실시예 7-1을 통해 제조한 각각의 R27T 제제에 대하여 DSC 분석을 실시하여 R27T의 구조적 안정성을 평가하였다.
- [173] 그 결과, 하기 표 8에 나타낸 바와 같이, 부형제를 첨가하지 않은 대조군(Control)의 T_m 값과 비교하였을 때, 아미노산 부형제 중에서 아르기닌(Arginine)을 첨가한 제제, 및 poloxamer 188을 첨가한 제제의 경우 T_m 값이 약간 높게 측정된 것을 통해 상기 부형제들이 R27T 제제의 구조적 안정성을 다소 증진시키는 것을 알 수 있었다. 또한, 탄수화물(Carbohydrates) 부형제 중에서는 수크로오스(Sucrose)를 첨가하여 제조한 제제에서 대조군에 비해 구조적 안정성이 증진된 것을 확인하였다.

[174] [표8]

Samples	$T_m(^{\circ}\text{C})$	Samples	$T_m(^{\circ}\text{C})$
Control	57.82	Mannose	
		50 mM	57.01
		150 mM	57.77
		250 mM	57.59
Arginine HCl		Mannitol	
50 mM	58.13	50 mM	56.67
100 mM	58.02	150 mM	56.28
150 mM	57.94	250 mM	56.98
Lysine HCl		Sucrose	
50 mM	58.05	50 mM	56.73
100 mM	57.56	150 mM	58.53
150 mM	58.16	250 mM	54.37
Methionone		Sorbitol	
50 mM	57.88	50 mM	56.93
100 mM	57.88	150 mM	57.61
150 mM	58.49	250 mM	57.02
Poloxamer 188		Xylitol	
0.25 mg/mL	58.00	50 mM	56.33
0.5 mg/mL	57.86	150 mM	56.93
1 mg/mL	57.31	250 mM	56.34

[175]

[176] **7-3. SEC : 단량체량 및 응집체량 분석**

[177] 각각의 부형제를 첨가하여 제조한 R27T 제제의 보관 안정성을 평가하기 위해, 상기 실시예 7-2의 DSC 분석샘플과 동일한 각각의 R27T 제제를 1.0 mg/mL의 농도로 40°C에서 7일간 또는 4°C에서 16일간 보관한 후 잔여 단량체(monomer) 및 응집체(aggregation) 양을 측정하였으며, 그 결과를 하기 표 9 내지 표 11에 나타내었다.

[178] [표9]

40 °c	Content	Concentration/Monomer (%) after 7 days		
		Low	Medium	High
	R27T			
1	Arginine HCl	84.33	69.34	67.42
2	Lysine HCl	79.30	64.98	63.00
3	Methionine	75.02	74.84	78.72
4	Poloxamer 188	81.78	76.02	77.42
5	Mannose	62.89	66.17	77.63
6	Mannitol	65.43	67.37	64.24
7	Sucrose	66.89	64.03	86.19
8	Sorbitol	61.33	68.72	53.41
9	Xylitol	68.42	76.08	78.92

[179]

[180] [표10]

40 °c	Content	Concentration/aggregation (%) after 7 days		
		Low	Medium	High
	R27T			
1	Arginine HCl	8.85	11.14	14.90
2	Lysine HCl	9.54	13.26	13.37
3	Methionine	7.26	6.80	6.86
4	Poloxamer 188	9.36	7.70	9.01
5	Mannose	9.89	12.80	15.51
6	Mannitol	16.42	12.51	12.37
7	Sucrose	14.13	14.52	22.55
8	Sorbitol	11.77	11.54	9.87
9	Xylitol	11.64	15.29	15.69

[181]

[182] [표 11]

4 °C	Content	Concentration/Monomer (%) after 16 days		
		Low	Medium	High
1	Arginine HCl	95.01	92.78	91.83
2	Lysine HCl	92.59	92.17	91.64
3	Methionine	95.12	94.45	95.28
4	Poloxamer 188	98.27	98.82	98.92
5	Mannose	91.75	95.53	91.18
6	Mannitol	93.58	92.96	89.65
7	Sucrose	83.3	92.04	124.15
8	Sorbitol	92.82	86.11	68.74
9	Xylitol	93.39	79.79	104.58

[183] 보관 조건에 따른 안정성 평가 실험 결과, 상기 표 9 내지 11에 나타난 바와 같이, 4°C에서 16일간 R27T 제제를 보관한 경우에는 첨가한 부형제의 종류에 관계없이 R27T 단백질의 응집이 일어나지 않는 것을 확인하였다. 또한, 상기 2가지 보관 조건에 따른 결과를 종합적으로 고려하였을 때, arginine 또는 poloxamer 188이 첨가된 제제에서 단량체 잔여량이 높게 나타난 것으로 보아 상기 부형제들이 R27T 제제의 보관 안정성을 증진시키는 것을 알 수 있었으며, 이러한 결과는 상기 DSC 분석결과와 상응하였다. 탄수화물 부형제 중에서는 두 가지 온도 조건에서 Sucrose 또는 Xylitol이 첨가된 경우 단량체 잔여량이 높게 나타난 반면, 고온인 40°C에서는 고농도의 sucrose 첨가 시 응집체가 다소 높은 비율로 형성되는 것이 관찰되었다. 이를 통해 sucrose 또는 xylitol에 응집 억제제를 함께 처리하여 Mannitol을 대체할 수 있을 것이라 판단되었다.

[184]

[185] **실시예 8: R27T 안정화 제제 조성의 최적화**

[186] 상기 실시예 결과들을 바탕으로, R27T의 안정성을 증진시킬 수 있는 제제의 최적의 조성을 설정하고자 하였다.

[187]

[188] **8-1. 완충액 조건 최적화**

[189] 먼저, 상기 실시예 4 및 5를 통해 R27T 제제의 안정성을 증진시키기 위한 완충액이 pH 3.4~4.4 범위의 아세트산 완충액임을 확인하였는바, 상기 완충액 농도 및 pH를 달리하여 다시 한 번 완충액 최적 조건을 설정하고자 하였다. 보다 구체적으로, 아세트산 완충액의 농도를 10, 20, 50 mM 농도로 달리하고, pH를 3.8 또는 4.2로 달리하여 R27T 제제를 제조하고 4°C 또는 25°C에서 1주일(1 week)

또는 2주일(2 week) 동안 보관한 후 SEC 분석을 실시하여 각각 단량체 및 응집체 잔여량을 측정하여 비교하였다.

- [190] 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, pH 3.8의 10 mM 또는 20 mM 아세트산 완충액을 이용한 경우 단량체 잔여량이 가장 높고, 응집체 잔여량은 가장 낮게 측정된 것을 통해 상기 조건의 아세트산 완충액을 이용하는 것이 R27T 제제의 안정성을 증진시키기 위한 최적의 조건임을 확인하였다.

[191]

[192] **8-2. R27T 안정화 제제 조성의 최적화**

- [193] R27T 제제의 최적 조성을 설정하기 위하여 상기 실시예 7-1의 방법에 따라 R27T 제제를 제조하였으며, 이때 완충액은 상기 실시예 8-1을 통해 제제의 안정성을 증진시키는 최적의 조건인 pH 3.8의 20 mM 아세트산 완충액을 이용하였고, 부형제는 상기 실시예 6 및 7을 통해 R27T 제제의 안정성을 증진시키는 것으로 확인된 arginine HCl과 poloxamer 188, 및 methionine을 첨가하였으며, mannitol을 첨가하여 arginine과 mannitol의 혼합 효과를 평가하였다. 첨가한 부형제들의 조성은 하기 표 12에 나타내었다.

[194] [표12]

Formulation	Contents			
F1(Control)	-	-	-	-
F2(Rebif formulation)	-	-	-	-
F3	Arginine 50 mM		Poloxamer 1880.5 mg/mL	Methionine 1 mM
F4	Arginine 50 mM	Mannitol 150 mM	Poloxamer 1880.5 mg/mL	Methionine 1 mM
F5	Arginine 50 mM	Mannitol 250 mM	Poloxamer 1880.5 mg/mL	Methionine 1 mM
F6	Arginine 100 mM		Poloxamer 1880.5 mg/mL	Methionine 1 mM
F7	Arginine 100 mM	Mannitol 150 mM	Poloxamer 1880.5 mg/mL	Methionine 1 mM
F8	Arginine 100 mM	Mannitol 250 mM	Poloxamer 1880.5 mg/mL	Methionine 1 mM

- [195] 상기 표 12에 나타난 서로 다른 8가지 조성의 R27T 제제(F1~F8)의 보관 안정성을 평가하기 위하여, 각각의 제제를 저농도(100 μ g/mL) 또는 고농도(640 μ g/mL)로 4°C 또는 37°C에 14일 동안 보관한 후 SEC를 실시하여 단량체 잔여량을 측정하였으며, 결과를 도 11 및 하기 표 13에 나타내었다.

[196] [표 13]

Formulation	Condition	F1(Control)) 대비	F2 대비	Condition	F1(Control) 대비	F2 대비
F1(Control)	Day 14, 4°C	100.00	89.73	Day 14, 37°C	100.00	85.61
F2(Rebif formulation)		111.45	100.00		116.81	100.00
F3		109.38	98.14		101.97	87.30
F4		102.22	91.72		98.10	83.99
F5		115.68	103.80		107.66	92.17
F6		104.66	93.91		93.45	80.00
F7		121.15	108.71		105.92	90.68
F8		112.50	100.95		99.66	85.32

[197] 단량체 잔여량 측정결과, 도 11에 나타낸 바와 같이, 4°C 조건에서 저농도 제제의 경우 F5 및 F7에서, 고농도 제제의 경우 F5에서 단량체 잔여량이 가장 높게 측정되었다. 또한, 상기 표 13에서 볼 수 있듯이, 기존 Rebif 제제와 비교하였을 때 arginine과 mannitol이 첨가된 F5 및 F7 제제에서 보관 안정성이 높은 것을 확인하였다. 그러나 고온(37°C) 및 고농도(640 µg/mL)에서는 제제의 안정성이 감소하는 것을 알 수 있었다.

[198] 상기 결과를 바탕으로, 저온에서 상기 제제들을 좀 더 장기간으로 보관한 후 안정성을 평가하고자 하였다. 이를 위해, 상기 표 12에 나타낸 각 조성의 제제들을 4°C에서 28일 동안 보관하면서 7일 간격으로 SEC를 실시하여 단량체 잔여량을 측정하였다.

[199] 그 결과, 도 12 및 하기 표 14에 나타낸 바와 같이, 저온 보관 조건에서 F5 및 F7 조성의 제제가 기존 Rebif 제제(F2)보다 보관 안정성이 우수한 것을 확인하였다.

[200] [표14]

Formulation	Condition	F2 대비 (%)
F1(Control)	Day28, 4°C	98.85
F2(Rebif formulation)		100.00
F3		95.96
F4		91.46
F5		101.45
F6		92.73
F7		108.26
F8		97.56

[201] 나아가, 상기 8가지 조성의 제제에 있어서, 각 제제 처리에 따른 R27T의 항바이러스 효과를 CPE(Cytopathic effect) assay를 통해 측정하였다. 보다 구체적으로, 96 well plate에 A549 세포 3×10^5 cells/mL가 포함된 배지 100 μ l에 상기 각제제 100 μ l를 처리하고 세포를 37°C에서 22시간 동안 배양하였다.

2일차에 상층액을 제거하고, 1000 TCID₅₀/mL의 농도의 EMCV(encephalomyocarditis virus) 100 μ l를 세포에 처리하여 37°C에서 22시간 동안 배양한 후 3일차에 상층액을 제거하고 살아있는 세포를 염색하여, 570nm에서 흡광도를 측정하여 Standard 대비 역가를 계산하였다.

[202] 그 결과, 도 13에 나타낸 바와 같이, F5 조성의 제제가 대조군(control)에 비하여 약 40% 정도 활성이 증진된 것을 확인하였다. 상기 결과들을 통해 F5 조성이 R27T의 안정성 및 활성을 증진시킬 수 있는 최적의 제제 조성임을 확인하였다.

[203]

[204] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예 들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

청구범위

- [청구항 1] 하기를 포함하는 인간 인터페론 베타 변이체(R27T)의 안정화된 약학 제제:
- (a) 인간 인터페론 베타 변이체(R27T),
 - (b) 5 내지 100 mM 농도의 아세트산 완충액,
 - (c) 10 내지 150 mM 농도의 아르기닌(Arginine),
 - (d) 50 내지 300 mM 농도의 만니톨(Mannitol),
 - (e) 0.1 내지 10 mg/mL 농도의 폴록사머 188(Poloxamer 188), 및
 - (f) 0.5 내지 5 mM 농도의 메티오닌(Methionine).
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 인간 인터페론 베타 변이체(R27T)는 인간 인터페론 베타의 27번째 아미노산인 아르기닌이 트레오닌으로 치환되어 25번째 아미노산인 아스파라진 잔기에 N-연결형 당쇄를 포함하는 것임을 특징으로 하는, 안정화된 약학 제제.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서, 상기 아세트산 완충액은 10 내지 30 mM의 농도로 포함되어 있는 것을 특징으로 하는, 안정화된 약학 제제.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서, 상기 아세트산 완충액은 pH가 3.6 내지 4.4의 범위인 것을 특징으로 하는, 안정화된 약학 제제.
- [청구항 5] 제 1 항에 있어서, 상기 아르기닌은 50 내지 100 mM의 농도로 포함되어 있는 것을 특징으로 하는, 안정화된 약학 제제.
- [청구항 6] 제 1 항에 있어서, 상기 만니톨은 150 내지 250 mM의 농도로 포함되어 있는 것을 특징으로 하는, 안정화된 약학 제제.
- [청구항 7] 제 1 항에 있어서, 상기 폴록사머 188은 0.1 내지 1 mg/mL의 농도로 포함되어 있는 것을 특징으로 하는, 안정화된 약학 제제.
- [청구항 8] 제 1 항에 있어서, 상기 메티오닌은 0.5 내지 2 mM의 농도로 포함되어 있는 것을 특징으로 하는, 안정화된 약학 제제.
- [청구항 9] 제 1 항에 있어서, 상기 안정화된 약학 제제는 pH가 3.6 내지 4.4의 범위인 것을 특징으로 하는, 안정화된 약학 제제.
- [청구항 10] 제 1 항에 있어서, 상기 안정화된 약학 제제는 다발성 경화증, 암, 자가면역질환, 바이러스 감염질환, HIV 감염질환, C형 간염, 및 류마티스성 관절염으로 이루어진 군에서 선택되는 질환의 예방 또는 치료용인 것을 특징으로 하는, 안정화된 약학 제제.
- [청구항 11] 제 1 항에 있어서, 상기 안정화된 약학 제제는 경구 또는 비경구 투여용인 것을 특징으로 하는, 안정화된 약학 제제.
- [청구항 12] 제 1 항에 있어서, 상기 안정화된 약학 제제는 액상 또는 동결건조 제형인 것을 특징으로 하는, 안정화된 약학 제제.

[도1]

1 atg acc aac aag tgt ctc ctc caa att gct ctc ctg ttg tgc ttc tcc act aca gct ctt
M T N K C L L Q I A L L L C F S T T A L

1
61 tcc atg age tac aac ttg ctt gga ttc cta caa aga age age aat ttt cag tgt cag aag
S M S Y N L L G F L Q R S S N F Q C Q K

20 27
121 ctc ctg tgg caa ttg aat ggg agg ctt gaa tat tgc ctc aag gac agg atg aac ttt gac
L L W Q L N G R L E Y C L E D R M N F D

▼
T

40
181 atc cct gag gag att aag cag ctg cag cag ttc cag aag gag gac gcc gca ttg acc atc
I P E E I K Q L Q Q F Q K E D A A L T I

60
241 tat gag atg ctc cag aac atc ttt gct att ttc aga caa gat tca tct agc act ggc tgg
Y E M L Q N I F A I F R Q D S S S T G W

80
301 aat gag act att gtt gag aac ctc ctg gct aat gtc tat cat cag ata aac cat ctg aag
N E T I V E N L L A N V Y H Q I N H L K

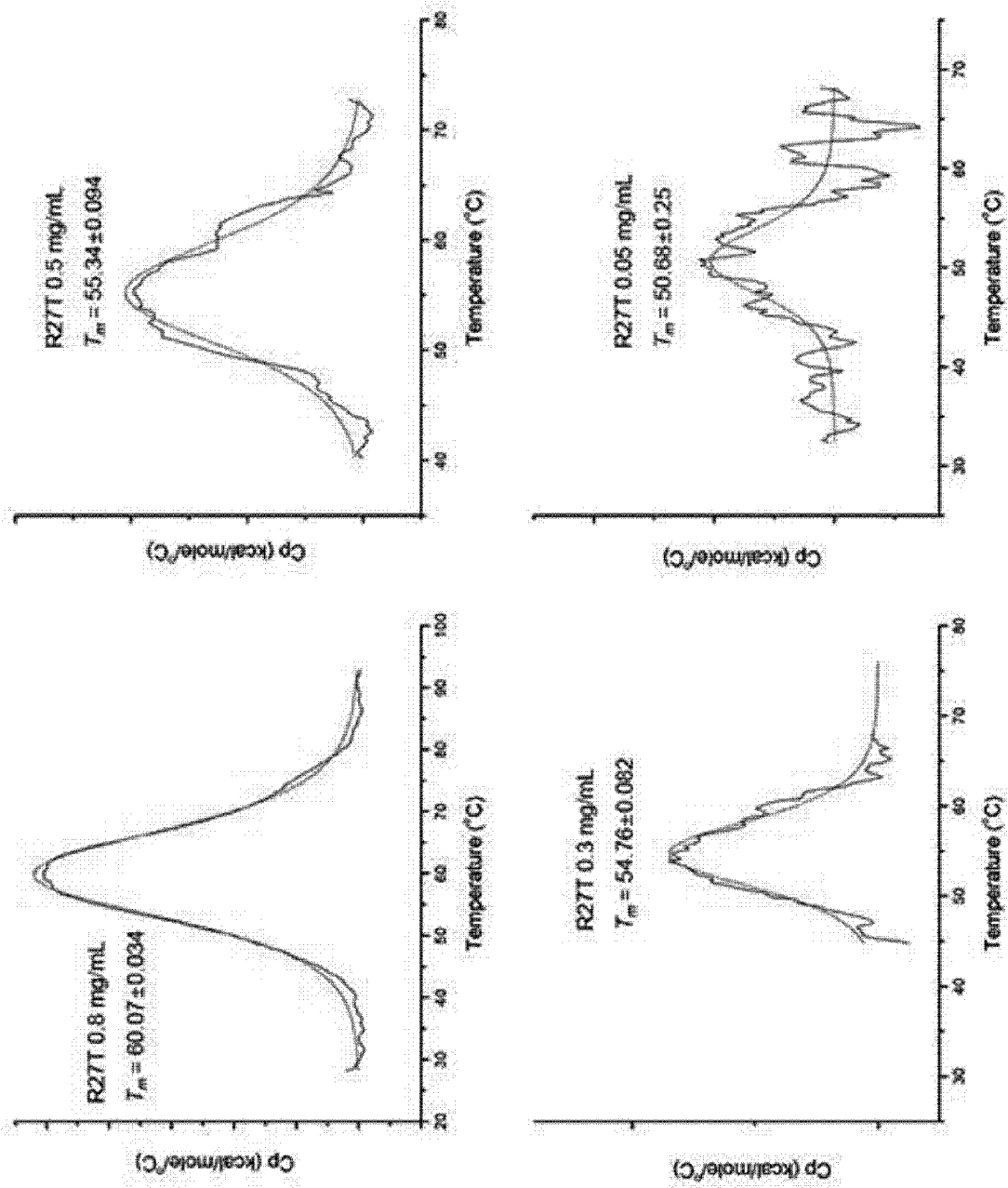
100
361 aca gtc ctg gaa gaa aaa ctg gag aaa gaa gat ttt acc agg gga aaa ctc atg age agt
T V L E E K L E K E D F T R G K L M S S

120
421 ctg cgc ctg aaa aga tat tat ggg agg att ctg cat tac ctg aag gcc aag gag tac agt
L H L K R Y Y G R I L H Y L K A K E Y S

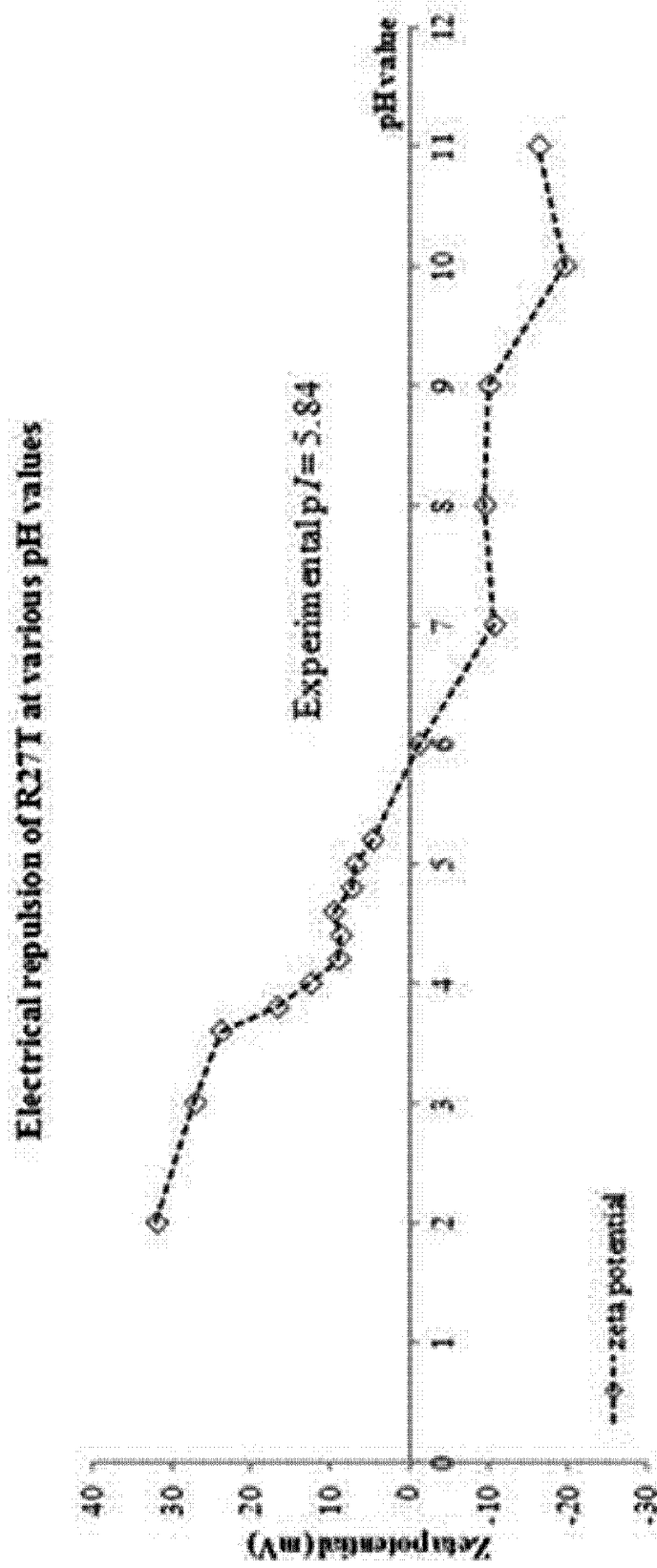
140
481 caa tgt gcc tgg aca ata gtc aga gtc gaa aic cta agg aac ttt tac ttc att aac aga
H C A W T I V R V E I L R N F Y F I N R

160
541 ctt aca ggt tac ctc cga aac tga aga tct cct age ctg tcc ctc tgg gac tgg aca att
L T G Y L R N Stop

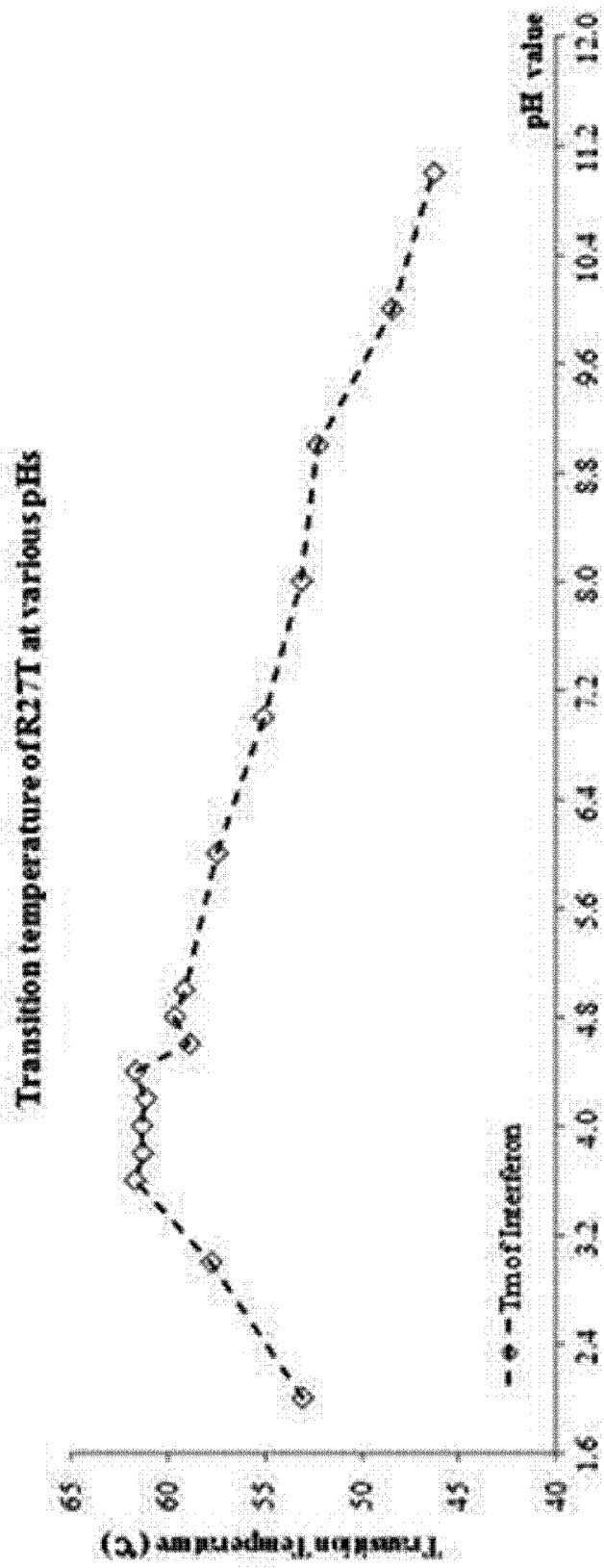
[도2]



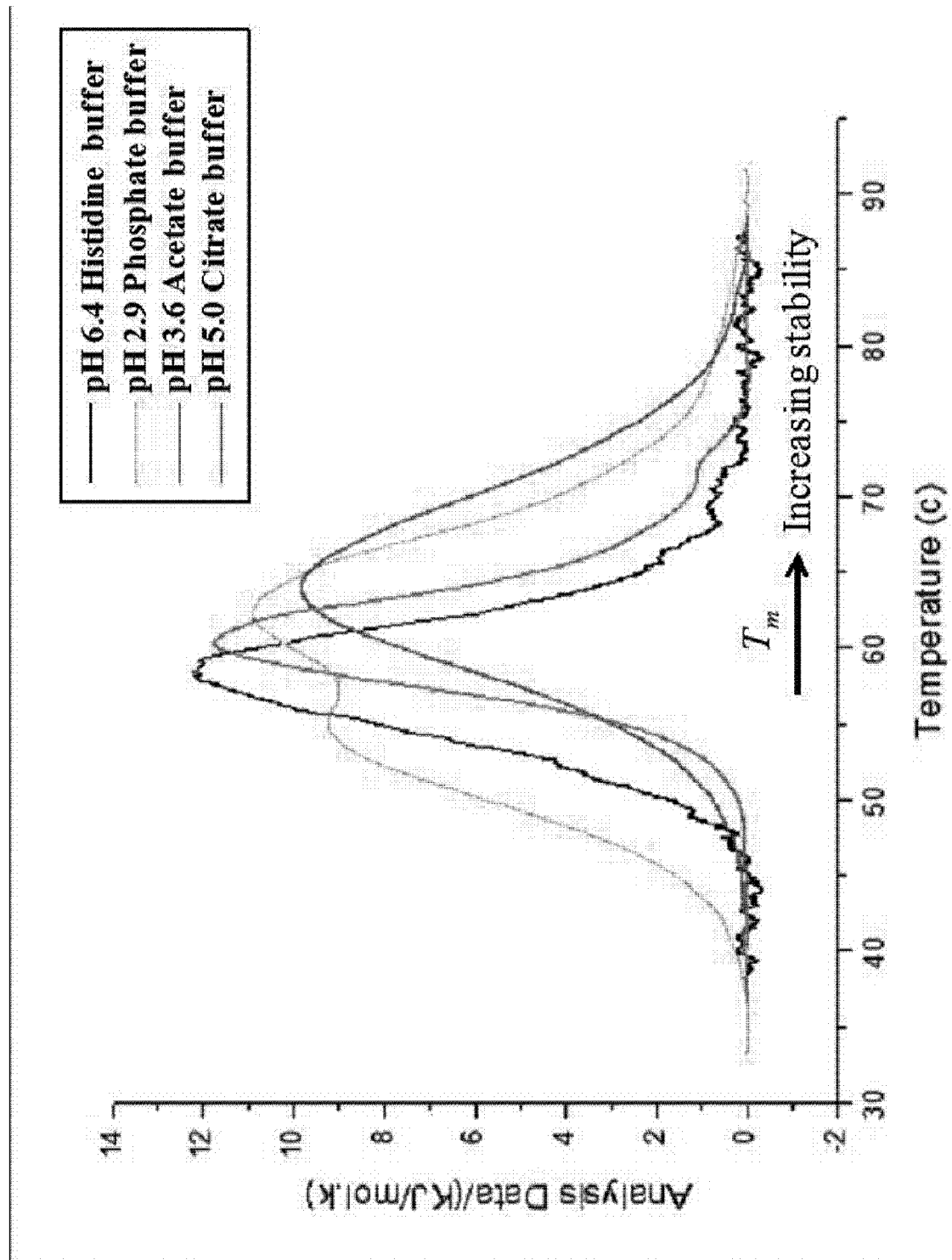
[도3a]



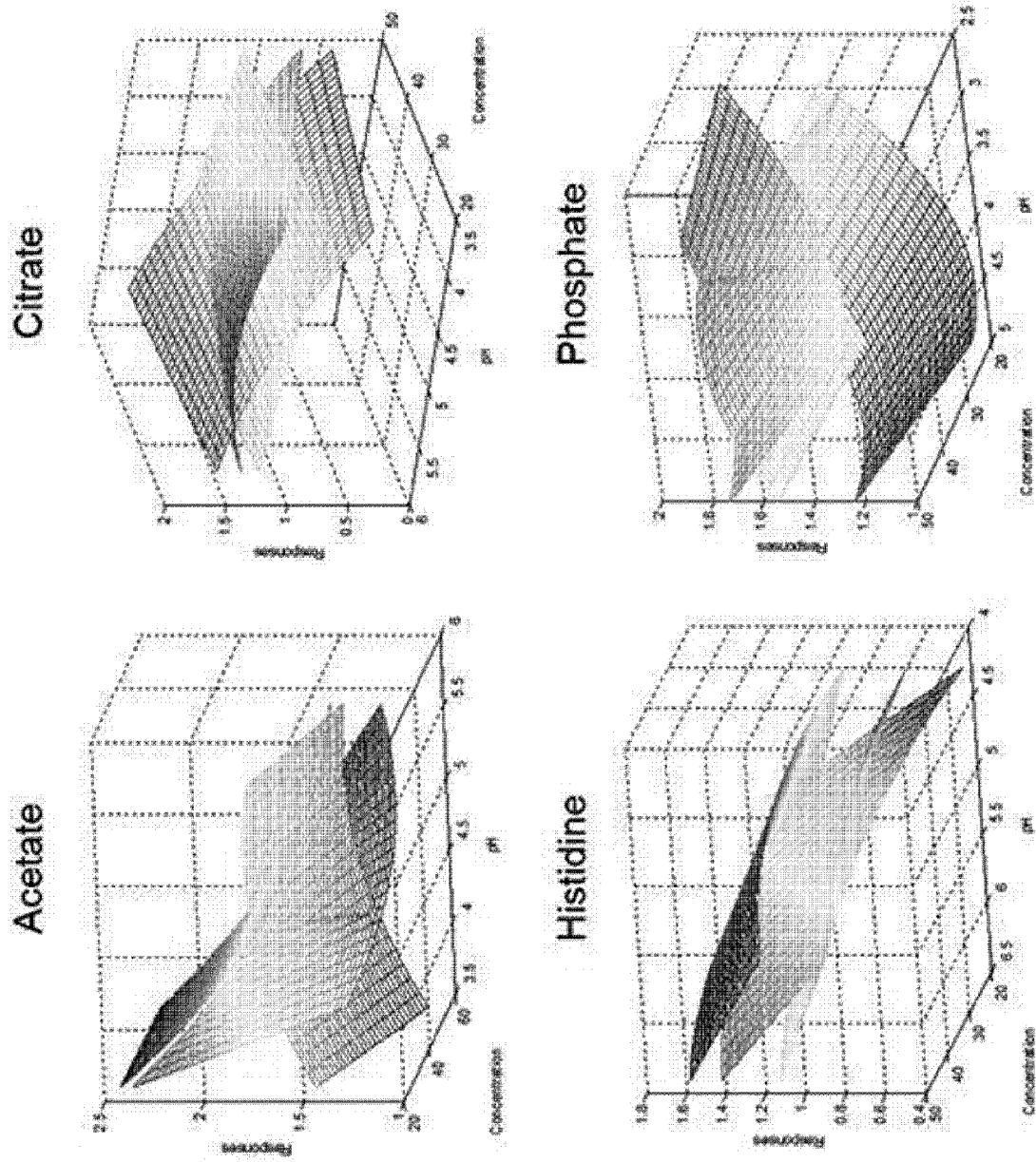
[도3b]



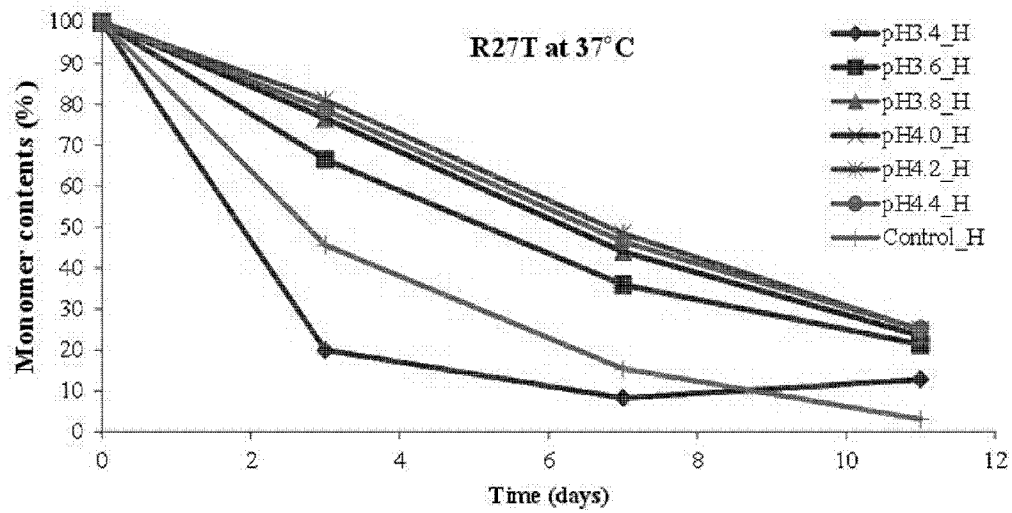
[도4]



[도5]

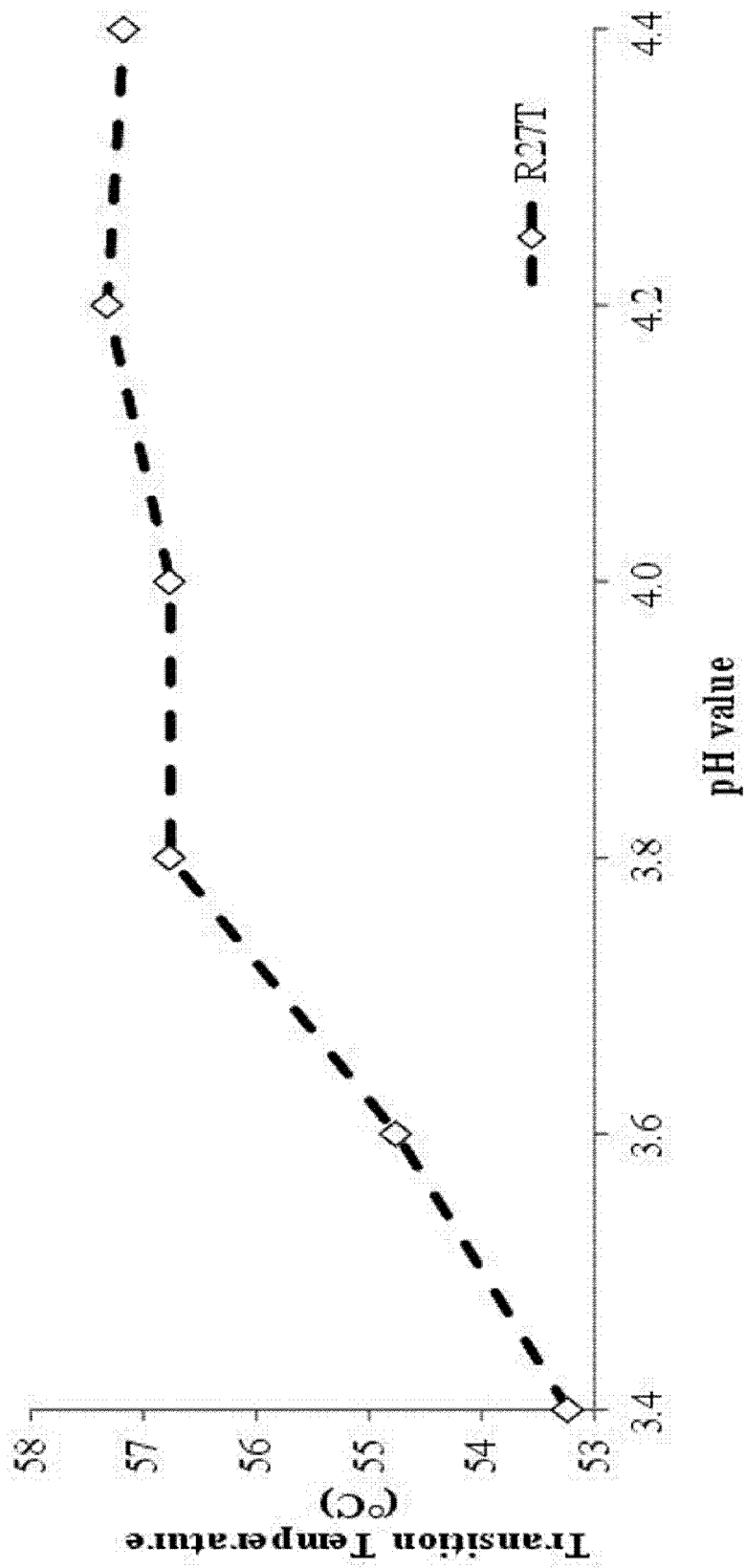


[도6]

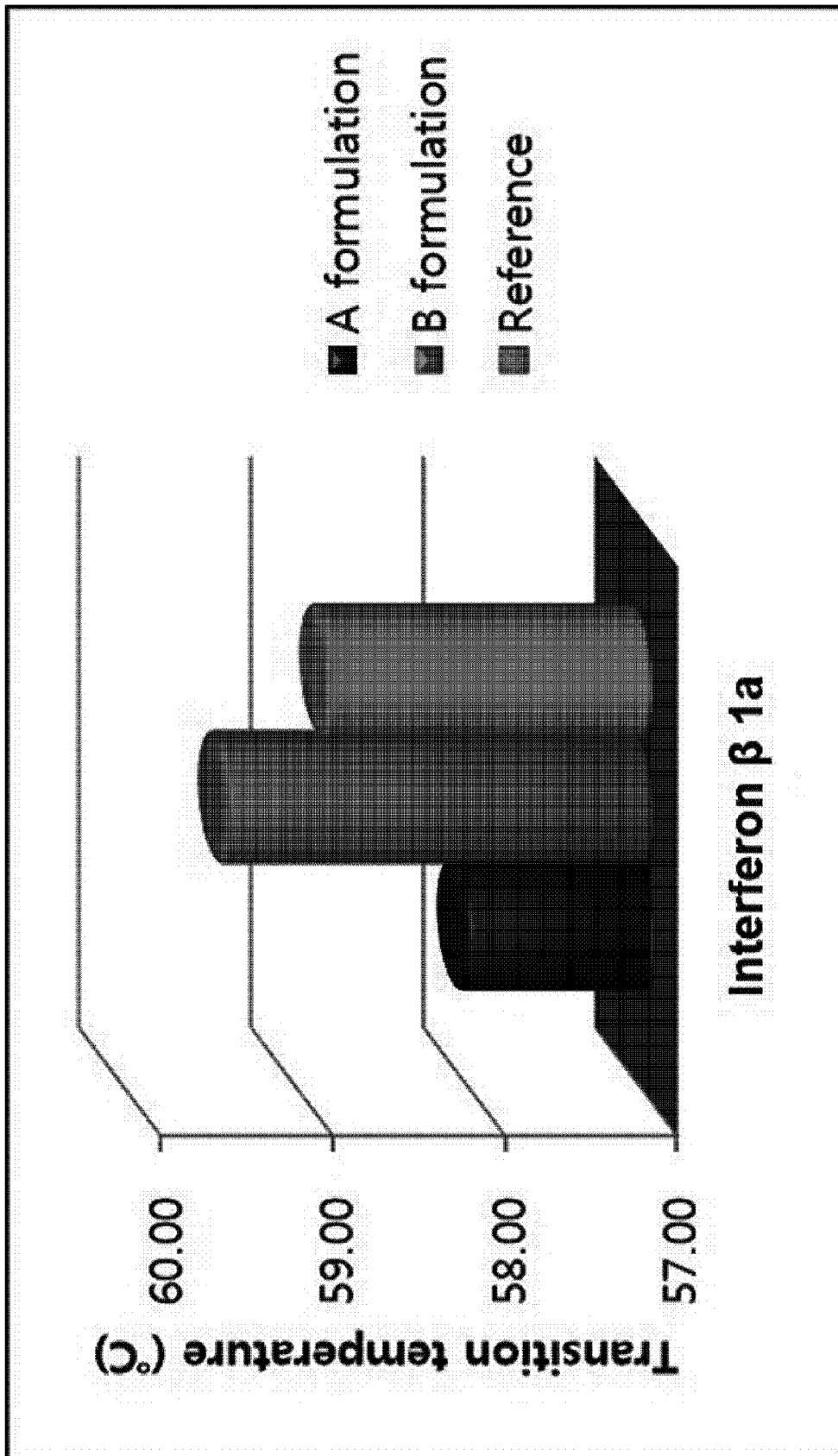


Day	0		3		7		11	
37°C	Average	STD	Average	STD	Average	STD	Average	STD
pH 3.4	100.00	1.97	19.95	4.13	8.26	0.95	12.80	0.42
pH 3.6	100.00	0.93	66.57	2.37	35.92	1.32	21.35	0.51
pH 3.8	100.00	16.56	71.32	1.09	38.49	1.57	22.59	1.71
pH 4.0	100.00	0.07	76.51	1.15	43.98	3.24	23.42	0.88
pH 4.2	100.00	0.10	81.02	0.79	48.45	2.77	24.93	0.81
pH 4.4	100.00	1.39	78.59	0.72	46.41	2.50	25.10	0.61
Control	100.00	3.21	45.57	3.03	15.42	3.10	3.07	0.88

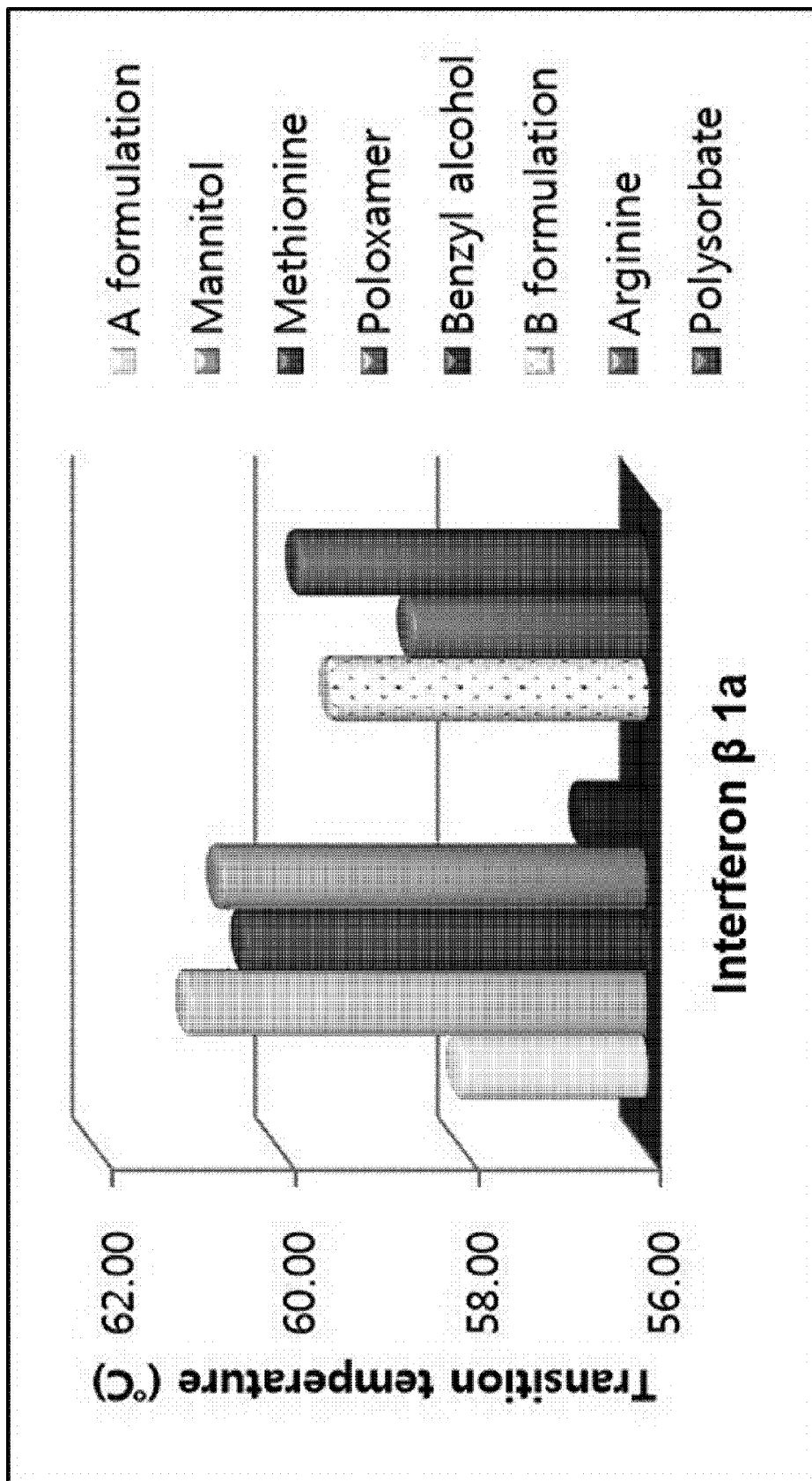
[도7]



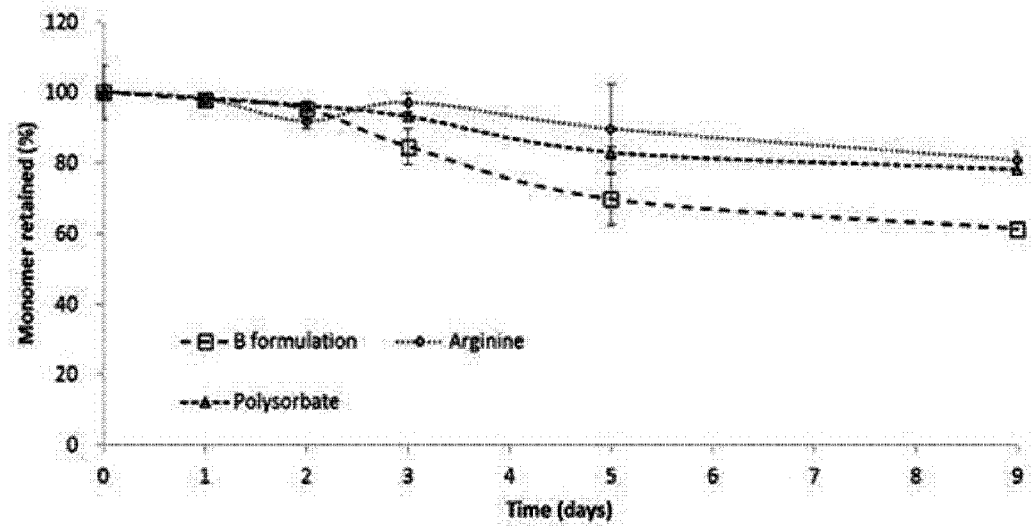
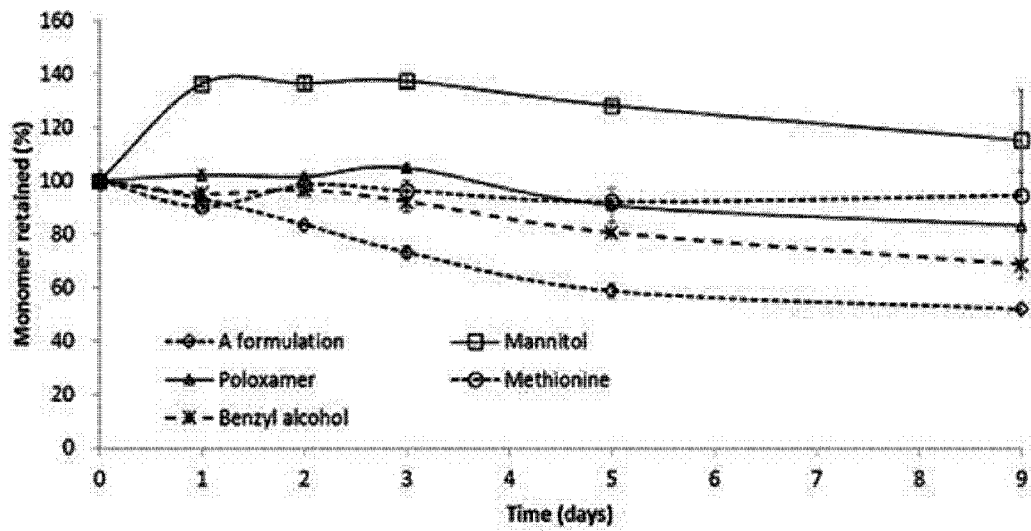
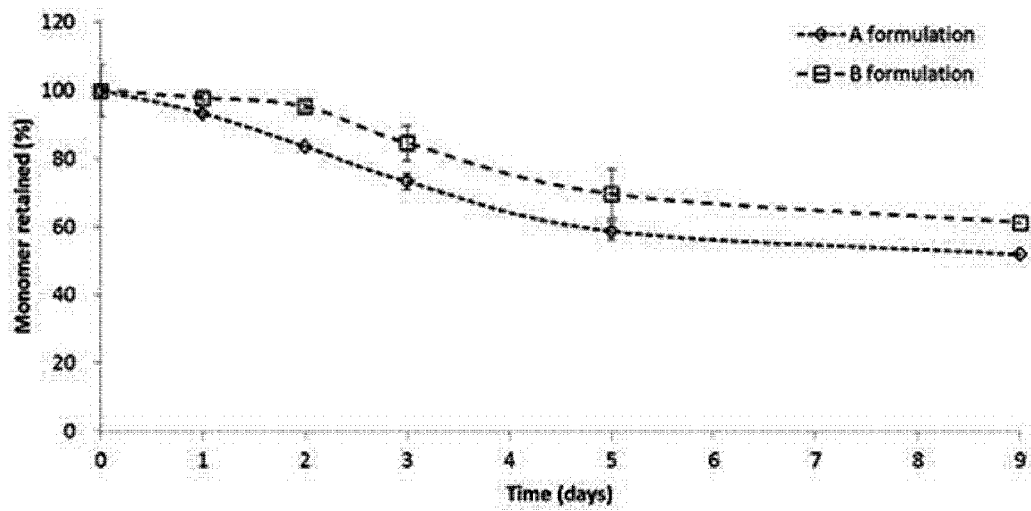
[도8a]



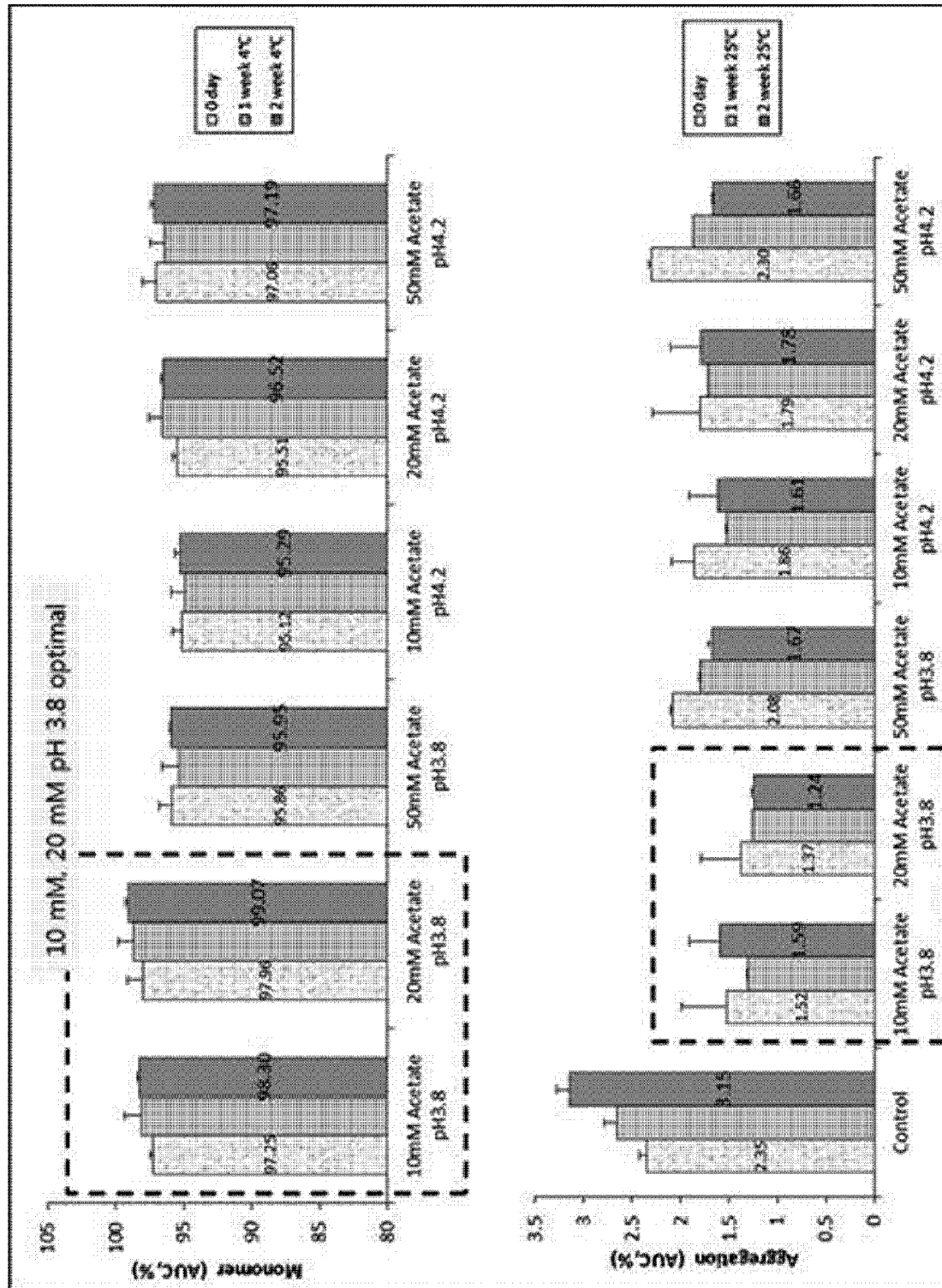
[도8b]



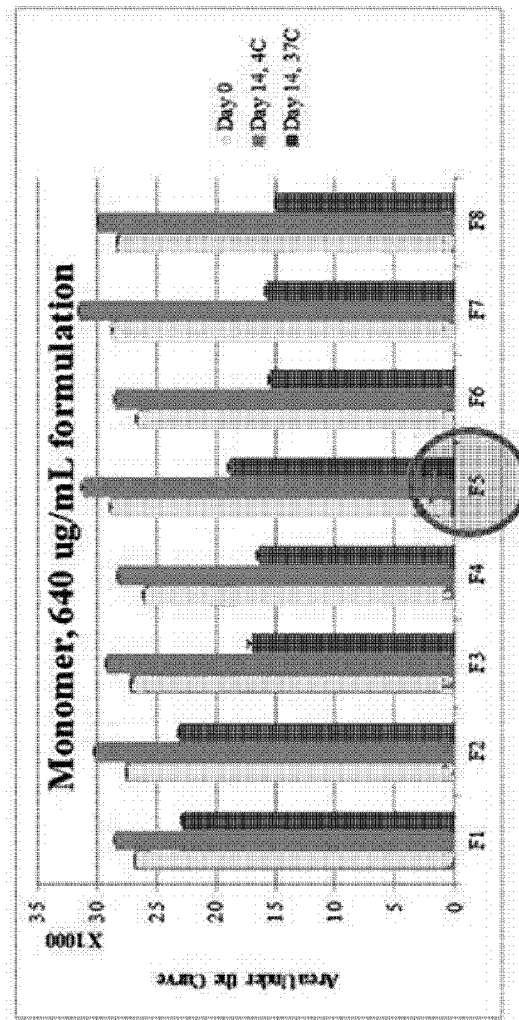
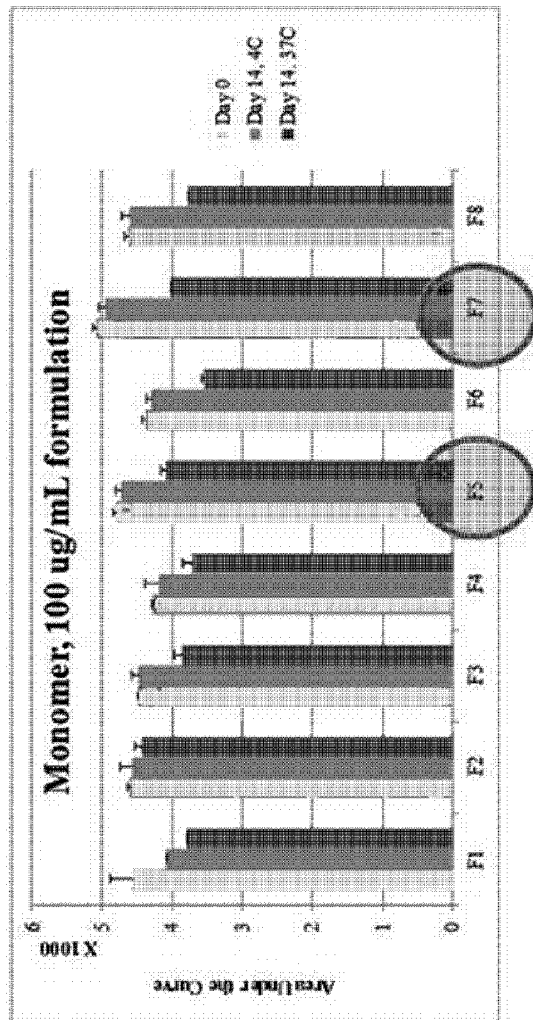
[도9]



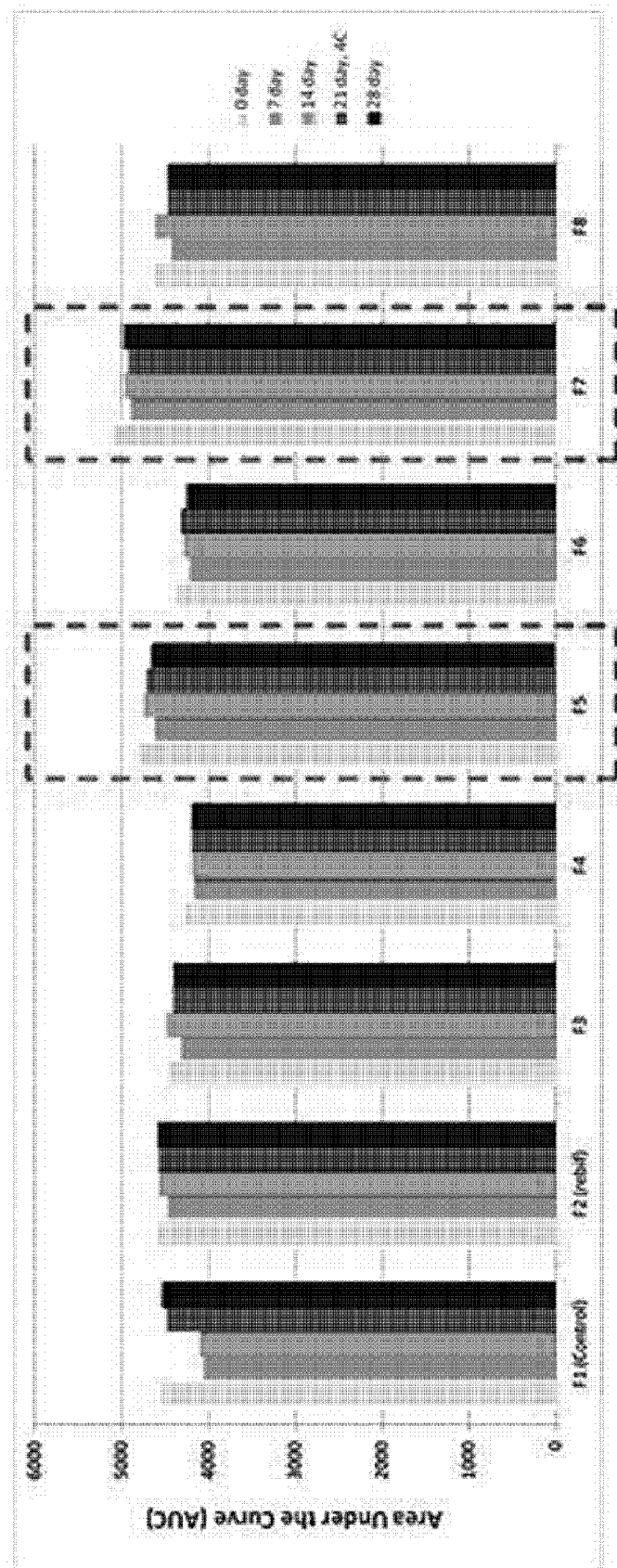
[도10]



[도11]



[도12]



[도13]

