



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0114235
(43) 공개일자 2012년10월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/16 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)

A61K 31/195 (2006.01) A61K 31/185 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-7013706

(22) 출원일자(국제) 2010년11월02일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2012년05월25일

(86) 국제출원번호 PCT/US2010/055135

(87) 국제공개번호 WO 2011/056793

국제공개일자 2011년05월12일

(30) 우선권주장

61/257,711 2009년11월03일 미국(US)

(71) 출원인

그리폴스 테라퓨틱스 인코포레이티드

미국 노스캐롤라이나 27709, 리서치 트라이앵글
파크, 티.더블유. 알렉산더 드라이브 79, 리서치
커먼스 4101

(72) 발명자

귀 지안신

미국 노스캐롤라이나 27527, 클레이턴, 허드슨 레
인 168

클로스 앤터니

미국 노스캐롤라이나 27607, 롤리, 비버 댐 로드
811

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

황의만

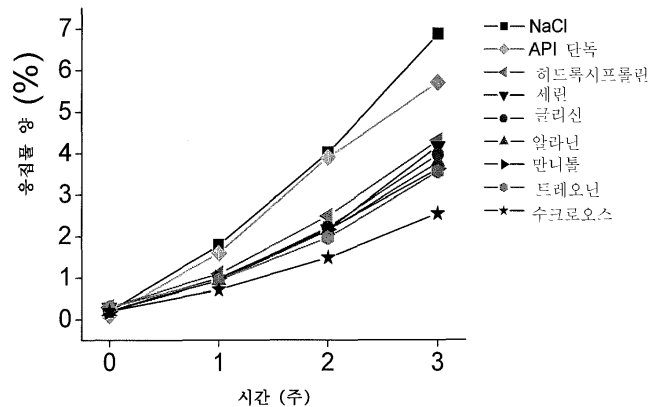
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 알파-1 프로테이나제 억제제에 대한 조성물, 방법 및 키트

(57) 요약

본 발명은 API 및 적어도 하나의 아미노산을 포함하는 조성물, 특히 아미노산을 포함하는 액체 API 제형, 및 그와 관련된 방법 및 키트를 제공한다. API 조성물에 혼입될 때 이들 아미노산은 API 제형에 대하여 안정성을 부여한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

콜드렌 브렛

미국 노스캐롤라이나 27709, 리서치 트라이앵글 파크, 티.더블유. 알렉산더 드라이브 79, 리서치 커먼스 4101

바네트 데보라

미국 노스캐롤라이나 27518, 케리, 보니우드 드라이브 200

매닝 마크

미국 노스캐롤라이나 27709, 리서치 트라이앵글 파크, 티.더블유. 알렉산더 드라이브 79, 리서치 커먼스 4101

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 알파 1-프로테이나제 억제제(API); 및

(b) 적어도 하나의 아미노산

을 포함하는 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 적어도 하나의 아미노산은, 상기 조성물이 소정 시간 동안 온도에 노출될 때 API가 그의 활성의 적어도 50%를 보유하기에 충분한 총 아미노산 양으로 상기 조성물 내에 존재하는 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 온도가 약 5℃ 내지 약 40℃인 조성물.

청구항 4

제 2항에 있어서, 상기 시간이 적어도 약 6개월인 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 적어도 하나의 아미노산이 중성 또는 친수성 아미노산인 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 적어도 하나의 아미노산이 알라닌, 트레오닌, 세린, 히드록시프롤린, 글리신, 프롤린, 로이신, 및 히스티딘으로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 아미노산이 알라닌인 조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 적어도 하나의 아미노산이 상기 조성물 내에 약 0.01 M 내지 약 3 M의 총 아미노산 양으로 존재하는 조성물.

청구항 9

제 1항에 있어서, 하나 이상의 부형제를 더 포함하는 조성물.

청구항 10

제 1항에 있어서, 상기 하나 이상의 부형제가 수크로오스, 만니톨, 글리세롤, 소르비톨, 텍스트란, 트레할로오스, 히드록시에틸 녹말(HES), 및 1,2-프로판디올로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.

청구항 11

제 1항에 있어서, 상기 조성물이 약제학적으로 허용되는 담체를 더 포함하는 조성물.

청구항 12

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 검체에 정맥내 투여하기에 적합한 조성물.

청구항 13

제 1항에 있어서, 상기 적어도 하나의 아미노산은, 상기 조성물이 소정 기간 동안 온도에 노출된 이후 약 5% 미

만으로 총 단백질 응집을 유지하기에 충분한 총 아미노산 양으로 상기 조성물 내에 존재하는 조성물.

청구항 14

제 13항에 있어서, 상기 온도는 약 25℃이며, 상기 시간은 약 6개월인 조성물.

청구항 15

제 13항에 있어서, 상기 온도는 약 5℃이고, 상기 시간은 약 6개월인 조성물.

청구항 16

제 15항에 있어서, 상기 적어도 하나의 아미노산은, 상기 조성물을 소정 시간 동안 상기 온도에 노출된 이후 약 2% 미만으로 총 단백질 응집을 유지하기에 충분한 총 아미노산 양으로 상기 조성물 내에 존재하는 조성물.

청구항 17

제 13항에 있어서, 상기 조성물의 pH는 약 6.3 내지 약 7.4인 조성물.

청구항 18

제 13항에 있어서, 상기 조성물의 pH는 약 6.7 내지 약 7.1인 조성물.

청구항 19

제 1항에 있어서, 상기 조성물이 동결건조된 형태인 조성물.

청구항 20

정맥 투여하기에 적합한 약제학적 조성물로서 제1항의 조성물을 포함하는 키트.

명세서

기술분야

[0001] 관련 출원의 교차 참조

[0002] 본 출원은, 전체 내용이 참조에 의해 본 명세서에 포함되어 있는, 2009년 11월 3일 출원된 미국출원번호 61/257,711호를 우선권 주장한다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 알파 1-프로테이나제 억제제(API: alpha 1-proteinase inhibitor)를 포함하는 조성물, 특히 안정한 API 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 API를 검체에 제공하기 위한, 특히 치료 또는 예방 유효량의 API를 검체에 제공하기 위한 방법 및 키트에 관한 것이다.

배경기술

[0005] API 결핍은 그 결핍을 갖는 사람들이 간질환 및/또는 폐기종에 취약하게 하는 비교적 흔한 유전 장애이다. 프로테아제 억제제 Z형(PiZ)이라 불리는 가장 흔한 유형의 API 결핍은 상염색체 열성 유전(autosomal recessive trait)으로 전달되며 또 대부분의 북유럽 및 북미 인구에서 1700 정상 출산 중 약 1명에게 영향을 미친다. PiZ 돌연변이는 단일 아미노산 치환(글루타메이트 342 내지 리신)을 초래하는 단일 뉴클레오티드 치환이다.

[0006] 인간 API는 394개 아미노산, 1개의 시스테인 잔기, 및 3개의 탄수화물 측쇄를 가지며, 52 kDa의 총 분자량을 갖는다. 단일 반응성 중심 루프(RCL)는 위치 358-359의 Met-Ser 서열에 존재한다. API의 삼차구조는 8개의 잘 정의된 α-헬릭스(A-H) 및 3개의 대형 β-시트(A-C)를 함유한다. 세르핀(serpin)은 비가역적 "자멸 기질" 메커니즘을 통하여 작용하는 것으로 믿어진다. 프로테아제에 의한 절단시, 세르핀은 형태 변화(conformational change)를 거치며, 그에 의해 상기 RCL이 절단되어 A β-시트의 중심에 삽입되며, 또 상기 프로테아제는 분자의 말단부로 전달(translocate)된다. 이러한 구조적 전이는 세르핀의 안정화 및 프로테아제 삼차구조의 광범위한 왜곡을 초래하여, 그의 촉매적 기구를 불활성화한다. API의 생물학적 활성은 예컨대 분자간- 또는 분자내 중합

반응, 산화, 복합체 형성, 및/또는 비특이적 프로테이나제에 의한 절단을 비롯한 화학적 변형에 의해 영향을 받을 수 있을 것으로 생각된다.

[0007] API의 주요 생리학적 작용은 호중구 엘라스타제, 카텡신 G, 및 프로테이나제 3의 억제라고 생각된다. 특정 엘라스타제 억제능력에서는 감소될 수 있지만, PiZ API 결핍에 걸린 개체에서 생산된 API는 기능적으로 활성이다. API 합성의 주요 부위는 간이지만, 대식세포, 장 상피세포 및 장 파네스(Paneth) 세포를 비롯한 간의 세포 유형에서도 합성된다.

[0008] API 결핍에서 폐 손상의 병인은 유용한 API 활성에서 뚜렷한 감소에 기인할 수 있다. API는 폐포세정액(pulmonary alveolar lavage fluid)에서 호중구 엘라스타제 억제제 활성의 90%를 초과하여 구성하는 것으로 밝혀져 있다. 따라서, API 결핍에 걸린 다수의 개체에서 보여지는 파괴적인 폐질환은 폐 내에서 엘라스타제와 API 사이의 네트 균형(net balance)의 변화에 기인하는 것으로 보인다. 호중구 엘라스타제, 카텡신 G, 및 프로테이나제 3의 억제되지 않은 활성은 폐의 결합 조직 완전성(integrity)의 느린 파괴를 초래한다. 이러한 결합 조직의 파괴는 폐의 과대한 확대 및 견인력의 감소를 초래하며, 이는 폐색성 기류 감소를 초래한다. 흡연은 API가 존재하는 것에 의해 상기 산화적 불활성화를 유발하는 문제를 악화시킨다.

[0009] 현재, API 결핍과 관련된 질병에 걸린 개체에 대한 치료법은 제한된다. API 결핍에 관련된 간질환은 뇌사자 간 이식에 의해 치료되고 있다. 결합있는 API 유전자를 치환하는 체세포 유전자 요법(Somatic gene therapy)이 논의되고 있지만, 아직까지 성공적으로 이용되고 있지 않다.

[0010] 따라서, 안정하고 검체에 투여한 이후 바람직한 API 혈장 생체이용률 수준을 제공하는 API 조성물이 요청되고 있다.

발명의 내용

[0011] **발명의 요약**

[0012] 일 양태에서, 본 발명은 (a) 알파 1-프로테이나제 억제제(API); 및(b) 적어도 하나의 아미노산을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0013] 다른 양태에서, 본 발명은 상기 조성물의 제조 방법을 제공한다.

[0014] 다른 양태에서, 상기 조성물을 포함하는 키트가 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 실시예 1의 표 1에 나타난 액체 API 제형의 응집 특성을 도시하는 그래프이다.

도 2는 알라닌, 수크로오스, 또는 수크로오스/알라닌을 함유하는 API 제형의 응집 특성을 도시하는 그래프이다.

도 3은 알라닌, 만니톨, 또는 만니톨/알라닌을 함유하는 API 제형의 응집 특성을 도시하는 그래프이다.

도 4는 알라닌, 수크로오스, 또는 트레할로오스를 함유하는 API 제형의 응집 특성을 도시하는 그래프이다.

도 5는 40℃에서 1주간 배양한 후 API 제형의 응집에 대한 아미노산 농도의 효과를 도시하는 그래프이다.

도 6은 40℃에서 2주간 배양한 후 API 제형의 응집에 대한 아미노산 농도의 효과를 도시하는 그래프이다.

도 7은 상이한 농도의 탈산소제(oxygen scavenger)를 갖거나 갖지 않는 알라닌을 함유하는 API 제형의 응집 특성을 도시하는 그래프이다.

도 8은 5℃에서 실시예 6에 기재된 API 제형의 효능 특성을 도시하는 그래프이다. "글리신"은 제형 1(API(50mg/ml)/글리신(250 mM))이고; "알라닌"은 제형 2(API(50mg/ml)/L-알라닌(250 mM))이며; "알라닌/수크로오스"는 제형 3(API(50mg/ml)/L-알라닌(125 mM)/수크로오스(125 mM))이고; 또 "NaCl"은 제형 4(API(50mg/ml)/NaCl(250 mM))이다.

도 9는 5℃에서 실시예 6에 기재된 API 제형의 비탁도측정(NTU) 특성을 도시하는 그래프이다. "글리신"은 제형 1(API(50mg/ml)/글리신(250 mM))이고; "알라닌"은 제형 2(API(50mg/ml)/L-알라닌(250 mM))이며; "알라닌/수크로오스"는 제형 3(API(50mg/ml)/L-알라닌(125 mM)/수크로오스(125 mM))이고; 또 "NaCl"은 제형 4(API(50mg/ml)/NaCl(250 mM))이다.

도 10은 5℃에서 실시예 6에 기재된 API 제형의 비활성 특성을 도시하는 그래프이다. "글리신"은 제형

1(API(50mg/ml)/글리신(250 mM))이고; "알라닌"은 제형 2(API(50mg/ml)/L-알라닌(250 mM))이며; "알라닌/수크로오스"는 제형 3(API(50mg/ml)/L-알라닌(125 mM)/수크로오스(125 mM))이고; 또 "NaCl"은 제형 4(API(50mg/ml)/NaCl(250 mM))이다.

도 11은 5℃에서 실시예 6에 기재된 API 제형의 탈아미드화 특성을 도시하는 그래프이다. "글리신"은 제형 1(API(50mg/ml)/글리신(250 mM))이고; "알라닌"은 제형 2(API(50mg/ml)/L-알라닌(250 mM))이며; "알라닌/수크로오스"는 제형 3(API(50mg/ml)/L-알라닌(125 mM)/수크로오스(125 mM))이고; 또 "NaCl"은 제형 4(API(50mg/ml)/NaCl(250 mM))이다.

도 12는 5℃에서 실시예 6에 기재된 API 제형의 응집 증가 특성을 도시하는 그래프이다. "글리신"은 제형 1(API(50mg/ml)/글리신(250 mM))이고; "알라닌"은 제형 2(API(50mg/ml)/L-알라닌(250 mM))이며; "알라닌/수크로오스"는 제형 3(API(50mg/ml)/L-알라닌(125 mM)/수크로오스(125 mM))이고; 또 "NaCl"은 제형 4(API(50mg/ml)/NaCl(250 mM))이다.

도 13은 5℃에서 실시예 6에 기재된 API 제형의 응집 특성을 도시하는 그래프이다. "글리신"은 제형 1(API(50mg/ml)/글리신(250 mM))이고; "알라닌"은 제형 2(API(50mg/ml)/L-알라닌(250 mM))이며; "알라닌/수크로오스"는 제형 3(API(50mg/ml)/L-알라닌(125 mM)/수크로오스(125 mM))이고; 또 "NaCl"은 제형 4(API(50mg/ml)/NaCl(250 mM))이다.

도 14는 5℃에서 실시예 6에 기재된 API 제형의 올리고머량 특성을 도시하는 그래프이다. "글리신"은 제형 1(API(50mg/ml)/글리신(250 mM))이고; "알라닌"은 제형 2(API(50mg/ml)/L-알라닌(250 mM))이며; "알라닌/수크로오스"는 제형 3(API(50mg/ml)/L-알라닌(125 mM)/수크로오스(125 mM))이고; 또 "NaCl"은 제형 4(API(50mg/ml)/NaCl(250 mM))이다.

도 15는 5℃에서 실시예 6에 기재된 API 제형의 단량체량 특성을 도시하는 그래프이다. "글리신"은 제형 1(API(50mg/ml)/글리신(250 mM))이고; "알라닌"은 제형 2(API(50mg/ml)/L-알라닌(250 mM))이다. "알라닌/수크로오스"는 제형 3(API(50mg/ml)/L-알라닌(125 mM)/수크로오스(125 mM))이며; 또 "NaCl"은 제형 4(API(50mg/ml)/NaCl(250 mM))이다.

도 16은 25℃에서 실시예 6에 기재된 API 제형의 효능 특성을 도시하는 그래프이다. "글리신"은 제형 1(API(50mg/ml)/글리신(250 mM))이고; "알라닌"은 제형 2(API(50mg/ml)/L-알라닌(250 mM))이며; "알라닌/수크로오스"는 제형 3(API(50mg/ml)/L-알라닌(125 mM)/수크로오스(125 mM))이고; 또 "NaCl"은 제형 4(API(50mg/ml)/NaCl(250 mM))이다.

도 17은 25℃에서 실시예 6에 기재된 API 제형의 NTU 특성을 도시하는 그래프이다. "글리신"은 제형 1(API(50mg/ml)/글리신(250 mM))이고; "알라닌"은 제형 2(API(50mg/ml)/L-알라닌(250 mM))이며; "알라닌/수크로오스"는 제형 3(API(50mg/ml)/L-알라닌(125 mM)/수크로오스(125 mM))이고; 또 "NaCl"은 제형 4(API(50mg/ml)/NaCl(250 mM))이다.

도 18은 25℃에서 실시예 6에 기재된 API 제형의 비활성 특성을 도시하는 그래프이다. "글리신"은 제형 1(API(50mg/ml)/글리신(250 mM))이고; "알라닌"은 제형 2(API(50mg/ml)/L-알라닌(250 mM))이며; "알라닌/수크로오스"는 제형 3(API(50mg/ml)/L-알라닌(125 mM)/수크로오스(125 mM))이고; 또 "NaCl"은 제형 4(API(50mg/ml)/NaCl(250 mM))이다.

도 19는 25℃에서 실시예 6에 기재된 API 제형의 탈아미드화 특성을 도시하는 그래프이다. "글리신"은 제형 1(API(50mg/ml)/글리신(250 mM))이고; "알라닌"은 제형 2(API(50mg/ml)/L-알라닌(250 mM))이며; "알라닌/수크로오스"는 제형 3(API(50mg/ml)/L-알라닌(125 mM)/수크로오스(125 mM))이고; 또 "NaCl"은 제형 4(API(50mg/ml)/NaCl(250 mM))이다.

도 20은 25℃에서 실시예 6에 기재된 API 제형의 응집 증가 특성을 도시하는 그래프이다. "글리신"은 제형 1(API(50mg/ml)/글리신(250 mM))이고; "알라닌"은 제형 2(API(50mg/ml)/L-알라닌(250 mM))이며; "알라닌/수크로오스"는 제형 3(API(50mg/ml)/L-알라닌(125 mM)/수크로오스(125 mM))이고; 또 "NaCl"은 제형 4(API(50mg/ml)/NaCl(250 mM))이다.

도 21은 25℃에서 실시예 6에 기재된 API 제형의 응집 특성을 도시하는 그래프이다. "글리신"은 제형 1(API(50mg/ml)/글리신(250 mM))이고; "알라닌"은 제형 2(API(50mg/ml)/L-알라닌(250 mM))이며; "알라닌/수크로오스"는 제형 3(API(50mg/ml)/L-알라닌(125 mM)/수크로오스(125 mM))이고; 또 "NaCl"은 제형

4(API(50mg/ml)/NaCl(250 mM))이다.

도 22는 25℃에서 API 제형의 올리고머 특성을 도시하는 그래프이다. "글리신"은 제형 1(API(50mg/ml)/글리신(250 mM))이고; "알라닌"은 제형 2(API(50mg/ml)/L-알라닌(250 mM))이며; "알라닌/수크로오스"는 제형 3(API(50mg/ml)/L-알라닌(125 mM)/수크로오스(125 mM))이고; 또 "NaCl"은 제형 4(API(50mg/ml)/NaCl(250 mM))이다.

도 23은 25℃에서 API 제형의 단량체 특성을 도시하는 그래프이다. "글리신"은 제형 1(API(50mg/ml)/글리신(250 mM))이고; "알라닌"은 제형 2(API(50mg/ml)/L-알라닌(250 mM))이며; "알라닌/수크로오스"는 제형 3(API(50mg/ml)/L-알라닌(125 mM)/수크로오스(125 mM))이고; 또 "NaCl"은 제형 4(API(50mg/ml)/NaCl(250 mM))이다.

도 24는 40℃에서 API 용액 중에서 1주, 2주 및 3주 동안 응집하는 동안 pH 및 단백질 농도에 대한 2D-컨투어(contour) 플롯이다.

도 25는 40℃에서 1주, 2주 및 3주 동안 API 용액의 pH 및 응집 상호작용 플롯이다.

도 26은 40℃에서 1주, 2주 및 3주 동안 API 용액 중에서 응집에 대한 pH 효과를 도시한다.

도 27은 40℃에서 1주, 2주 및 3주 동안 API 용액 중의 응집 특성에 대한 단백질 농도 효과를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

상세한 설명

본 발명은 조성물 내에 하나 이상의 아미노산을 포함하는 것에 의해 비교적 안정한 API 함유 조성물이 제조될 수 있다는 발견을 기초로 하고 있다. 특히 실시양태에서, 본 발명은 치료적 또는 예방적 효과를 위해 검체에게 투여하기 위한 API를 제공하기에 적합한 안정한 API 함유 약제학적 조성물을 포함한다. API(예를 들어, 정상적인 혈장 API 양보다 더 낮은)와 관련되고 또 본 발명의 실시양태가 특히 유용할 수 있는 장애 및 질환의 비제한적인 예는, 비제한적으로, 만성 폐색성 폐질환(COPD)(예를 들어, 폐기종)과 같은 폐 질환, 간질환, 혈관질환(예를 들어, 두개내 동맥류, 동맥성 섬유근성 이형성, 심각한 출혈 장애, 및 고혈압), 지방층염, 눈 질환(예를 들어, 전안부 포도막염), 전신성 괴사성 혈관염, 및 베게너 육아종증을 포함한다.

I. 조성물

일개 양태에서, 본 발명은,

(i) API; 및

(ii) 적어도 하나의 아미노산을 포함하는 조성물을 제공한다.

일부 실시양태에서, 상기 조성물은 API 및 적어도 하나의 아미노산으로 구성되거나 또는 본질적으로 구성된다.

본 발명의 조성물은 비교적 순수한 형태로 제공될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 약제학적 등급으로 특징화될 수 있다.

상기 조성물은 고체, 액체, 또는 반-고체 형태일 수 있다. 예를 들어, 상기 조성물은, 비제한적으로, 수용액, 수성 현탁액, 오일 현탁액 등을 포함하는 액체 제형일 수 있다. 다르게는, 상기 조성물은 동결건조된 제제, 건조 분말, 고체 입자 등일 수 있다. 다른 예는, 비제한적으로, 콜로이드, 에멀전, 젤, 및 연고를 포함한다.

일 실시양태에서, 상기 조성물은 액체 제형, 바람직하게는 수용액이다. 다른 실시양태에서, 상기 조성물은 약제학적 용도로, 예를 들어 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는 약제학적 조성물로서 적합하다.

일 실시양태에서, 상기 조성물은 API, 아미노산, 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물이다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, "약제학적으로 허용되는 담체"는 생리적으로 혼화성(compatible)인 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅 등을 포함한다. 담체의 유형은 목적하는 투여 경로를 기초로 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 담체는 비제한적으로 정맥, 흡입, 비경구, 피하, 근육내, 정맥내, 관절강내, 기관지내, 복강내, 관절내인대, 연골내, 강내, 복내, 소내뇌, 뇌실내, 결장내, 경부내, 위장내, 간내, 심근내, 골내, 골반내, 심장막공간내, 복강내, 흉막내, 전립선내, 폐내, 직장내, 신장내, 망막내, 척추내, 활액내, 흉관내, 자궁내, 방광내, 볼루스, 질내, 직장, 볼내, 설하, 코내, 또는 경피 수단에 의해 투여하기에 적합하다. 약제학적으로 허용되는 담체는 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 주사가능한 용액 또는 분산액을 제조하기 위한

멸균 분말을 포함한다.

- [0027] 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 멸균성이고 또 제조 및 저장하는 하나 이상의 조건하에서 안정하다. 상기 조성물은 용액, 마이크로에멀전, 리포솜, 또는 다른 맞춤형 구조로 제형화될 수 있다. 예를 들어, 멸균 주사가능한 용액은 여과 멸균에 의해 제조될 수 있다. 분산액은 API를 분산 매질을 함유하는 멸균 비히클(vehicle)에 혼입함으로써 제조될 수 있다. 멸균 주사가능한 용액을 제조하기 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 API와 아미노산 그리고 바람직하게는 그의 미리 여과된 용액으로부터 임의의 부가적인 소망하는 성분의 분말을 포함하는 조성물을 제공하는 진공건조 및 냉동건조이다.
- [0028] 예시적 희석제(예를 들어, 상기 조성물의 희석, 재구성 등을 위하여 사용되기 위한)는, 비제한적으로, 멸균수, 주사용 정균수(BWFI), pH 완충액(예를 들어 포스페이트 완충 염수), 멸균 염수 용액, 및 링거액 또는 텍스트로오스 용액을 포함할 수 있다. 상기 희석제는 경우에 따라 방부제를 함유한다. 이용된 방부제의 양은 API와의 혼화성을 위한 상이한 방부제 농도 및 방부제 효능 시험에 의해 결정된다.
- [0029] 흡입 요법은 에어로졸 형태의 약물을 호흡기관에 투여하는 것을 포함한다. 에어로졸 전달은 폐 상피의 95%를 차지하는 폐 심부 영역(폐포)로 전달하는 개념을 기본으로 하며, 분자가 생체이용가능한 것이라면 상피막을 통하여 단백질의 수송을 현저히 향상시킬 수 있다. 액체 에어로졸은 API의 분무 용액(nebulizing solution)에 의해 생성될 수 있다. 다르게는, 고체 입자는 계량된 투여량 흡입기로부터 투여되는 추진제에 현탁된 분말 형태이거나 또는 건조 분말 흡입기로부터 투여되는 단순한 분말 형태일 수 있다. 예를 들어, 고체 입자 에어로졸은 용액으로부터 API를 동결건조(예를 들어 냉동-건조)한 다음 상기 동결건조된 약물은 폐 투여를 위해 소망하는 크기 분포로 분쇄 또는 연마하는 것에 의해 제조될 수 있다. 다른 수법은 연속적 액체 공급물의 원자화에 의해 생성된 분산된 액적(droplets)을 증발시키기 위하여 고온 가스 기류(통상 공기)로부터 열을 이용하는 탈수 공정인 분무 건조를 포함한다. 이들 방법을 이용하여, API를 포함하는 상기 조성물은 바람직하게는 물 치환제로서 작용할 수 있는 것과 같은 적합한 유형 및 양의 부형제와 함께 미세 입자로 건조될 수 있다.
- [0030] 가압 계량 흡입기는 당해 분야에 현재 잘 알려져 있다. 약물을 환자의 폐나 코에 투여하기에 적합한 임의의 가압 계량 흡입기가 사용될 수 있다. 에어로졸 제형 및 계량 밸브는 치료 또는 예방 유효량의 API를 제공하도록 선택될 수 있다.
- [0031] **A. API**
- [0032] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "API"는 특별히 다르게 언급하지 않는 한 광범위한 의미로 이용된다. 상기 용어는 API의 모든 천연 산출 다형태를 지칭한다. 이 용어는 또한 API의 기능적 단편, API 또는 그의 기능적 단편을 포함하는 키메라 단백질(chimeric protein), API의 하나 이상의 아미노산의 유사 치환에 의해 수득한 상동체(homolog) 및 중 상동체를 포함한다. 이 용어는 또한 트랜스제닉(transgenic) 기술의 산물인 API를 비롯한 재조합 DNA 산물인 모든 API 폴리펩티드를 지칭한다. 예를 들어, API를 코딩하는 유전자는, 예를 들어 단백질성 화합물을 생산하는 방법을 시사하기 위하여 참조에 의해 본 명세서에 포함되어 있는 미국 특허번호 제5,322,775호에 기재된 바와 같이 DNA 서열이 유선(mammary gland)에서 발현되도록 유증 단백질을 코딩하는 포유동물 유전자에 삽입될 수 있다. 이 용어는 또한 예를 들어, 고체-상 펩티드 합성과 같은 당해 분야에 공지된 방법에 의해 화학적으로 합성된 모든 API 단백질을 지칭한다. 이 용어는 또한 혈장으로부터 제조된 API를 지칭한다. 이 용어는 또한 상업적으로 수득될 수 있는 API를 지칭한다. 상기 API는 인간 또는 비-인간 API에 상응할 수 있다.
- [0033] 일 실시양태에서, 상기 API는 혈장-유래 API이다. 다른 실시양태에서, 상기 API는 콘 분획(Cohn Fraction) IV-1 페이스트로부터 제조된다. 다른 실시양태에서, 상기 API는 알부민-제거된 혈장 분획, Cohn V 석출물, 또는 예비 정제된 API 제제 분획으로부터 제조된다. 미국 특허번호 제6,974,792호는 API를 제조하는 방법을 시사하기 위하여 참조에 의해 본 명세서에 포함된다.
- [0034] 다른 실시양태에서, 상기 API는 재조합 API이다. API에 대한 아미노산 및 뉴클레오티드 서열 및/또는 재조합 API의 생산은 예를 들어, 미국 특허번호 제4,711,848호; 제4,732,973호; 제4,931,373호; 제5,079,336호; 제5,134,119호; 제5,218,091호; 제6,072,029호; 및 Wright *et al.*, Biotechnology, 9:830(1991); 및 Archibald *et al.*, PNAS, 87:5178(1990)에 기재되어 있으며, 이들 문헌 각각은 API 서열, 재조합 API, 및/또는 API의 재조합 발현을 시사하기 위하여 참조에 의해 본 명세서에 포함된다.
- [0035] 일 실시양태에서, 상기 조성물은 90% 보다 큰 순도를 갖는 API를 포함하는 것을 특징으로 한다. 다른 실시양태에서, 상기 API는 95% 보다 큰, 바람직하게는 적어도 약 99%인 순도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 상기 조성물 중의 모든 API의 적어도 약 50%, 예시적으로 약 50% 내지 약 100%, 약 60% 내지 약 90%, 약 70% 내지 약 80%가

활성 API이다.

- [0036] 일 실시양태에서, 상기 조성물은 치료 유효량의 API를 포함한다. "치료 유효량"이라는 것은 예를 들어, API가 선천적으로 결핍된 것과 관련된 폐기종의 감소 또는 억제와 같은 소망하는 치료 효과를 달성하는데 필요한 투여량과 시간에서 유효량을 지칭한다. API의 치료 유효량은 개별 검체의 질병 상태, 연령, 성별 및 체중과 같은 인자 및 검체에서 소망하는 반응을 유발하기 위한 API의 능력에 따라 달라질 수 있다. 치료 유효량은 치료적으로 유리한 효과가 API의 독성 효과 또는 유해 효과를 상회하는 양일 수 있다.
- [0037] 다른 실시양태에서, 상기 조성물은 예방 유효량의 API를 포함한다. "예방 유효량"은 API가 선천적으로 결핍된 것과 관련된 폐기종의 예방 또는 억제와 같은 소망하는 예방 결과를 달성하는데 필요한 투여량과 시간에서 유효량을 지칭한다. 예방 유효량은 상기 치료 유효량에 대하여 상기 기재한 바와 같이 결정될 수 있다.
- [0038] 치료 또는 예방 유효량의 API를 결정할 때 고려될 수 있는 일개 인자는 치료를 받기 위한 검체의 생물학적 구획에서, 예를 들어 검체의 하부 호흡기 또는 상피 피복액(epithelial lining fluid; ELF)에서 발현된 기능적으로 활성인 API의 농도이다. 치료 또는 예방 유효량의 API를 결정할 때 고려될 수 있는 다른 인자는 API의 약리학(예를 들어, 약동학)이다.
- [0039] API의 약동학은 검체의 혈액에서 API의 농도 또는 수준을 지칭한다. 혈액에서 API 수준의 약동학적 변수 또는 정도는 곡선 아래의 면적(AUC), C_{min} [즉, 최저 혈중 농도(trough level)], 및 C_{max} 를 포함한다. AUC는 고정된 투여 기간(예를 들어, 8, 12 및 24 시간)에 걸친 검체의 혈액에서 API의 전체 노출이다. C_{min} (즉, 최저 혈중농도)는 고정된 투여 기간 동안 API의 가장 낮은 혈액 수준이다. C_{max} 는 고정된 투여 기간 동안 검체 혈액에서 API에 의해 달성된 최고 또는 피크 수준이다.
- [0040] 일 실시양태에서, 투여되는 치료 또는 예방 유효량은 표적 임계치를 초과하는 API 혈액(예를 들어, 혈장) 최저 농도를 달성하거나 유지하기에 충분하다. 일 실시양태에서, 상기 표적 임계치는 적어도 약 10 mg/dL, 예시적으로 약 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 및 200 mg/dL이다.
- [0041] 다른 실시양태에서, 상기 치료 또는 예방 유효량은 적어도 약 50 mg/dL의 API 최저 혈중 농도를 달성하거나 유지하기에 충분하다. 다른 실시양태에서, 상기 치료 또는 예방 유효량의 API는 적어도 약 80 mg/dL의 혈중 API 최저 농도를 유지하기에 충분하다.
- [0042] 일 실시양태에서, 상기 조성물 중의 API의 농도는 적어도 약 0.1 mg/ml, 예시적으로 적어도 약 0.1, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 및 1000 mg/ml이다. 일 실시양태에서, 상기 조성물 중의 API의 비활성은 적어도 약 0.05 mg 활성 API/mg 총 단백질, 예시적으로, 적어도 약 0.05, 0.1, 0.2 mg, 0.3mg, 0.4 mg, 0.5 mg, 0.6 mg, 0.7 mg, 또는 그 이상의 활성 API/mg 총 단백질이다.
- [0043] 일부 실시양태에서, 상기 조성물에 함유된 API의 농도는 중량% 기준(w/w)으로 적어도 약 1%, 예시적으로, 약 1 내지 약 60%, 약 5 내지 약 55%, 약 10 내지 약 45%, 약 20 내지 약 30%(w/v)이다.
- [0044] **B. 아미노산**
- [0045] 본 명세서에서 특이적으로 언급된 아미노산은 예시적 목적일 뿐 본 발명에 따라 사용될 수 있는 아미노산을 제한하려는 것이 아님을 이해해야 한다. 본 명세서에서 특별히 언급되지 않은 다른 아미노산은 이들의 관찰된 물리적 및 화학적 특성을 기초로 용이하게 분류될 수 있다. 또한 본 명세서에 언급된 일부 아미노산은 유전자적으로 코딩된 아미노산 측면에서 예시되었으나, 상기 아미노산은 유전자적으로 코딩된 아미노산에만 한정될 필요가 없을 뿐만 아니라 유전자적으로 코딩되지 않은 아미노산도 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 아미노산은 천연 산출 비코딩 아미노산 및 합성 아미노산(예를 들어, β -알라닌, 히드록시프롤린)을 또한 포함할 수 있다. 또한 고려될 수 있는 것은 L-에난티오머성 아미노산(L-아미노산) 및 D-아미노산뿐만 아니라 유리 아미노산 형태 및/또는 생리학적으로 허용되는 염 형태 및/또는 그의 혼합물이다.
- [0046] 표 1은 아미노산의 일부 비제한적인 예를 수록한다.

표 1

[0047]

아미노산.

| 아미노산 | 3자 코드 | 단일자 코드 |
|--------|-------|--------|
| 글리신 | Gly | G |
| 알라닌 | Ala | A |
| 발린 | Val | V |
| 로이신 | Leu | L |
| 이소로이신 | Ile | I |
| 메티오닌 | Met | M |
| 페닐알라닌 | Phe | F |
| 트립토판 | Trp | W |
| 프롤린 | Pro | P |
| 세린 | Ser | S |
| 트레오닌 | Thr | T |
| 시스테인 | Cys | C |
| 티로신 | Tyr | Y |
| 아스파라긴 | Asn | N |
| 글루타민 | Gln | Q |
| 리신 | Lys | K |
| 아르기닌 | Arg | R |
| 히스티딘 | His | H |
| 아스파르트산 | Asp | D |
| 글루탐산 | Glu | E |

[0048]

일 실시양태에서, 상기 조성물은 Ala(A), Thr(T), 히드록시프롤린, Gly(G), Ser(S), Gln(Q), Phe(F), Trp(W), Met(M), 아세틸 시스테인, Leu(L), Ile(I), Val(V), Lys(K), Pro(P), Tyr(Y), His(H), Glu(E), Asn(N), Asp(D), 및 Arg(R)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산을 포함한다.

[0049]

다른 실시양태에서, 상기 적어도 하나의 아미노산은 Ala(A), Thr(T), 히드록시프롤린, Gly(G), 및 Ser(S)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0050]

다른 실시양태에서, 상기 적어도 하나의 아미노산은 Ala(A) 또는 Gly(G)이다.

[0051]

일부 실시양태에서, 상기 아미노산은 중성 아미노산 또는 친수성 아미노산이다. 다른 실시양태에서, 친수성 아미노산은 콘센서스(consensus) 소수성 스케일에 따라 0보다 작은 소수성을 나타내는 것을 특징으로 하는 아미노산이다.

[0052]

일 실시양태에서, 상기 적어도 하나의 아미노산은 예를 들어 적어도 하나의 아미노산을 갖지 않는 API 조성물과 대조적으로 측정되는 바와 같이 안정한 API 조성물을 제공하기에 충분한 총 아미노산 양으로 상기 조성물에 존재한다.

[0053]

다른 실시양태에서, 상기 총 아미노산 양은 API가 소정 온도에서 소정 시간 동안 API 활성의 적어도 약 5%를 유지하는, 예시적으로 소정 온도에서 소정 시간 동안 API 활성의 적어도 약 5% 내지 약 100%, 약 10% 내지 약 95%, 약 20% 내지 약 90%, 약 30% 내지 약 80%, 약 40% 내지 약 70%, 및 약 50% 내지 약 60%를 유지하기에 충분한 양이다. 일부 실시양태에서, 상기 소정 시간 및/또는 온도는 저장 시간 및/또는 온도(예를 들어, 유효 기간)로 특징화된다. 일 실시양태에서, 상기 소정 시간은 적어도 약 1일, 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 8개월, 1년, 2년, 및 3년이다. 다른 실시양태에서, 상기 온도는 약 -120℃, -70℃, -20℃, 0℃, 5℃, 25℃, 37℃, 40℃, 및 50℃와 동일하거나 또는 그 이상이다.

[0054]

일 실시양태에서, 상기 API 활성은 예를 들어, 전체적으로 참조에 의해 본 명세서에 포함되어 있는 Coan *et al.*, Vox Sang., 48:333(1985)에 의해 기재된 바와 같이 돼지의 췌장 엘라스타제의 억제에 의해 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 API 활성은 시험관내 또는 동물에서 생체 내 및/또는 생체밖 결정(예를 들어 치료 지수, LD₅₀, ED₅₀ 등)에 의해 효능 또는 독성으로서 평가될 수 있다. 예를 들어, 벌크 용액 또는 저장 용액으로부터 일련의 희석 후, 또는 동결건조된 또는 진공 건조된 API 함유 조성물의 재구성(reconstitution) 후, 상기 재구성된 조성물 또는 수성 조성물에 존재하는 API는 생물학적 활성 API가 상기 조성물에 미리 혼입되어 있던 효능 또는 독성의 (적어도 하나의 아미노산 및/또는 적어도 하나의 총 아미노산 양의 존재하에서) 적어도

약 5% 내지 약 100%보다 큰 효능 또는 독성을 갖는다.

- [0055] 다른 실시양태에서, API의 안정성은 비제한적으로 산화, 단백질분해성 및/또는 탈아미드화 산물의 형성, 분자량 분포에서의 변화, 효능에서 변화, 기능성에서 변화, 비-효소적 글리케이션과 같은 부형제 존재에 기인한 응집물 또는 산물의 변형과 같은 불용성 물질의 증가를 비롯한 API의 분해를 결정화하는 것에 의해 측정될 수 있다. 또한, 안정성은 예를 들어, 휘발화, 흡착, 화학적 변형 등으로 인한 농도 변화로서 측정될 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 저장 안정한 API 조성물은 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70% 보다 낮은 API 분해를 나타내는 조성물이다. 저장 안정성 조성물은 또한 이들 특징의 조합을 나타낼 수 있다.
- [0056] 다른 실시양태에서, 상기 조성물의 총 아미노산 양은 적어도 하나의 아미노산을 갖지 않는 조성물에 대한 API의 용점을 증가시키기에 충분한 양이다. 당해 분야의 통상의 지식을 가진 사람은 예를 들어 미분주사열량계(DSC)를 이용하여 용점을 측정할 수 있다. 일 실시양태에서, 상기 조성물의 총 아미노산 양은 용점을 적어도 약 0.01°C, 0.1°C, 1°C, 1.2°C, 1.4°C, 1.6°C, 1.8°C, 및 2°C 정도 증가시키기에 충분하다.
- [0057] 다른 실시양태에서, 온도에서 소정 시간에서 상기 조성물을 저장한 후 상기 조성물의 총 아미노산 양은 상기 조성물 내의 단량체성 API의 %가 적어도 약 50%, 예시적으로, 약 50% 내지 약 100%, 약 60% 내지 약 99%, 약 98%, 약 70% 내지 약 98%, 약 80% 내지 약 95%, 및 약 85% 내지 약 90%이도록 충분한 양이다. 일 실시양태에서, 상기 시간은 적어도 약 1일, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 8개월, 1년, 2년, 및 3년이다. 다른 실시양태에서, 상기 온도는 약 -120°C, -70°C, -20°C, 0°C, 5°C, 25°C, 37°C, 40°C, 및 50°C와 동일하거나 또는 그보다 더 높다.
- [0058] 다른 실시양태에서, 상기 조성물의 총 아미노산 양은 상기 조성물을 소정 온도에서 소정 시간 동안 저장한 후, 상기 조성물 내의 단백질 응집물의 %가 약 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 및 0% 이하이도록 충분한 양이다. 일 실시양태에서, 소정 시간은 적어도 약 1일, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 8개월, 1년, 2년, 및 3년이다. 다른 실시양태에서, 상기 온도는 약: -120°C, -70°C, -20°C, 0°C, 5°C, 25°C, 37°C, 40°C, 및 50°C와 동일하거나 또는 그 보다 더 높다.
- [0059] 조성물 내에서 단백질 응집물 양은 예를 들어 크기 배제 고성능 액체 크로마토그래피(SE-HPLC)를 사용하는 것에 의해 당업자에 의해 측정될 수 있다.
- [0060] 일 실시양태에서, 상기 조성물 내에 존재하는 총 아미노산 양은 적어도 약 0.01 M, 예시적으로, 약 0.01 내지 약 3 M, 약 0.03 내지 약 1 M, 약 0.05 내지 약 0.5 M, 및 약 0.1 내지 약 0.3 M이다.
- [0061] 다른 실시양태에서, 상기 조성물 내에 존재하는 총 아미노산 양은 적어도 약 0.01 M, 적어도 약 0.03, 또는 적어도 약 0.3 M이다.
- [0062] 다른 실시양태에서, 상기 조성물은 적어도 약 0.01 M 알라닌, 예시적으로, 약 0.01 내지 약 1 M 및 약 0.01 내지 약 0.75 M 알라닌의 총 알라닌 농도로 알라닌을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 하나의 아미노산은 알라닌이며, 상기 조성물은 알라닌 이외의 아미노산을 함유하지 않는다.
- [0063] 일 실시양태에서, 상기 조성물은 적어도 약 0.01 M 트레오닌, 예시적으로, 약 0.01 내지 약 1 M 및 약 0.1 내지 약 0.3 M 트레오닌의 총 트레오닌 농도로 트레오닌을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 하나의 아미노산은 트레오닌이며, 상기 조성물은 트레오닌 이외의 아미노산을 함유하지 않는다.
- [0064] 다른 실시양태에서, 상기 조성물은 적어도 약 0.01 M 히드록시프롤린, 예시적으로, 약 0.01 내지 약 1 M 및 약 0.1 내지 약 0.3 M 히드록시프롤린의 총 히드록시프롤린 농도로 히드록시프롤린을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 하나의 아미노산은 히드록시프롤린이며, 상기 조성물은 히드록시프롤린 이외의 아미노산을 함유하지 않는다.
- [0065] 일 실시양태에서, 상기 조성물은 적어도 약 0.01 M 글리신, 예시적으로, 약 0.01 내지 약 1 M 및 약 0.1 내지 약 0.3 M 글리신의 총 글리신 농도로 글리신을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 하나의 아미노산은 글리신이며, 상기 조성물은 글리신 이외의 아미노산을 함유하지 않는다.
- [0066] 다른 실시양태에서, 상기 조성물은 적어도 약 0.01 M 세린, 예시적으로, 약 0.01 내지 약 1 M 및 약 0.1 내지 약 0.3 M 세린의 총 세린 농도로 세린을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 하나의 아미노산은 세린이며, 상기 조성물은 세린 이외의 아미노산을 함유하지 않는다.
- [0067] 일 실시양태에서, 상기 조성물은 적어도 약 0.01 M 글루타민, 예시적으로, 약 0.01 내지 약 1 M 및 약 0.1 내지

약 0.3 M 글루타민의 총 글루타민 농도로 글루타민을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 하나의 아미노산은 글루타민이고, 상기 조성물은 글루타민 이외의 아미노산을 함유하지 않는다.

[0068] 다른 실시양태에서, 상기 조성물은 적어도 약 0.01 M 페닐알라닌, 예시적으로, 약 0.01 내지 약 1 M 및 약 0.1 내지 약 0.3 M 페닐알라닌의 총 페닐알라닌 농도로 페닐알라닌을 함유한다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 하나의 아미노산은 페닐알라닌이고, 상기 조성물은 페닐알라닌 이외의 아미노산을 함유하지 않는다.

[0069] 일 실시양태에서, 상기 조성물은 적어도 약 0.01 M 트립토판, 예시적으로, 약 0.01 내지 약 1 M 및 약 0.1 내지 약 0.3 M 트립토판의 총 트립토판 농도로 트립토판을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 하나의 아미노산은 트립토판이고, 상기 조성물은 트립토판 이외의 아미노산을 함유하지 않는다.

[0070] 다른 실시양태에서, 상기 조성물은 적어도 약 0.01 M 메티오닌, 예시적으로, 약 0.01 내지 약 1 M 및 약 0.1 내지 약 0.3 M 메티오닌의 총 메티오닌 농도로 메티오닌을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 하나의 아미노산은 메티오닌이며, 상기 조성물은 메티오닌 이외의 아미노산을 함유하지 않는다.

[0071] 다른 실시양태에서, 상기 조성물은 적어도 약 0.01 M 아세틸 시스테인, 예시적으로, 약 0.01 내지 약 1 M 및 약 0.1 내지 약 0.3 M 아세틸 시스테인의 총 아세틸 시스테인 농도로 아세틸 시스테인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 하나의 아미노산은 아세틸 시스테인이고, 상기 조성물은 아세틸 시스테인 이외의 아미노산을 함유하지 않는다.

[0072] 일 실시양태에서, 상기 조성물은 적어도 약 0.01 M 로이신, 예시적으로, 약 0.01 내지 약 1 M 및 약 0.03 내지 약 0.15 M 로이신의 총 로이신 농도로 로이신을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 하나의 아미노산은 로이신이고, 상기 조성물은 로이신 이외의 아미노산을 함유하지 않는다.

[0073] 다른 실시양태에서, 상기 조성물은 적어도 약 0.01 M 이소로이신, 예시적으로, 약 0.01 내지 약 1 M 및 약 0.1 내지 약 0.3 M 이소로이신의 총 이소로이신 농도로 이소로이신을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 하나의 아미노산은 이소로이신이며, 상기 조성물은 이소로이신 이외의 아미노산을 함유하지 않는다.

[0074] 다른 실시양태에서, 상기 조성물은 적어도 약 0.01 M 발린, 예시적으로, 약 0.01 내지 약 1 M 및 약 0.1 내지 약 0.3 M 발린의 총 발린 농도로 발린을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 하나의 아미노산은 발린이고, 상기 조성물은 발린 이외의 아미노산을 함유하지 않는다.

[0075] 일 실시양태에서, 상기 조성물은 적어도 약 0.01 M 리신, 예시적으로, 약 0.01 내지 약 1 M 및 약 0.1 내지 약 0.3 M 리신의 총 리신 농도로 리신을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 하나의 아미노산은 리신이고, 상기 조성물은 리신 이외의 아미노산을 함유하지 않는다.

[0076] 다른 실시양태에서, 상기 조성물은 적어도 약 0.01 M 프롤린, 예시적으로, 약 0.01 내지 약 1 M 및 약 0.1 내지 약 0.3 M 프롤린의 총 프롤린 농도로 프롤린을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 하나의 아미노산은 프롤린이고, 상기 조성물은 프롤린 이외의 아미노산을 함유하지 않는다.

[0077] 다른 실시양태에서, 상기 조성물은 적어도 약 0.01 M 티로신, 예시적으로, 약 0.01 내지 약 1 M 및 약 0.1 내지 약 0.3 M 티로신의 총 티로신 농도로 티로신을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 하나의 아미노산은 티로신이고, 상기 조성물은 티로신 이외의 아미노산을 함유하지 않는다.

[0078] 일 실시양태에서, 상기 조성물은 적어도 약 0.01 M 히스티딘, 예시적으로, 약 0.01 내지 약 1 M 및 약 0.1 내지 약 0.3 M 히스티딘의 총 히스티딘 농도로 히스티딘을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 하나의 아미노산은 히스티딘이고, 상기 조성물은 히스티딘 이외의 아미노산을 함유하지 않는다.

[0079] 다른 실시양태에서, 상기 조성물은 적어도 약 0.01 M 글루탐산, 예시적으로, 약 0.01 내지 약 1 M 및 약 0.1 내지 약 0.3 M 글루탐산의 총 글루탐산 농도로 글루탐산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 하나의 아미노산은 글루탐산이고, 상기 조성물은 글루탐산 이외의 아미노산을 함유하지 않는다.

[0080] 다른 실시양태에서, 상기 조성물은 적어도 약 0.01 M 아스파라긴, 예시적으로, 약 0.01 내지 약 1 M 및 약 0.1 내지 약 0.3 M 아스파라긴의 총 아스파라긴 농도로 아스파라긴을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 하나의 아미노산은 아스파라긴이며, 상기 조성물은 아스파라긴 이외의 아미노산을 함유하지 않는다.

[0081] 일 실시양태에서, 상기 조성물은 적어도 약 0.01 M 아스파르트산, 예시적으로, 약 0.01 내지 약 1 M 및 약 0.1 내지 약 0.3 M 아스파르트산의 총 아스파르트산 농도로 아스파르트산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 하나의 아미노산은 아스파르트산이고, 상기 조성물은 아스파르트산 이외의 아미노산을 함유하지 않는다.

- [0082] 다른 실시양태에서, 상기 조성물은 적어도 약 0.01 M 아르기닌, 예시적으로, 약 0.01 내지 약 1 M 및 약 0.17 내지 약 0.3 M 아르기닌의 총 아르기닌 농도로 아르기닌을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 하나의 아미노산은 아르기닌이고, 상기 조성물은 아르기닌 이외의 아미노산을 함유하지 않는다.
- [0083] **C. 부형제**
- [0084] 다른 실시양태에서, 본 발명은
- [0085] (i) API;
- [0086] (ii) 적어도 하나의 아미노산을 포함하는 조성물로서, 하나 이상의 부형제를 더 포함하는 조성물을 제공한다. 부형제의 비제한적인 예는 폴리올, 당, 계면활성제, 항산화제, 염(예를 들어, 무기염), 금속 킬레이터, 중합체(예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 시클로텍스트린, 텍스트란), 요소, 염화 구아니딘, 폴리펩티드(예를 들어, 항체), 및 그의 조합을 포함한다. 따라서, 당업자는 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "부형제"가 넓은 의미로 의도되며 단백질 함유 조성물을 제조하기 위해 당업자에 의해 흔히 사용되는 물질을 포함할 수 있음을 이해할 것이다.
- [0087] 일부 실시양태에서, 상기 부형제는 폴리올 또는 당이다. 예를 들어, 상기 폴리올 또는 당은 비제한적으로 수크로오스, 만니톨, 트레할로오스, 소르비톨, 소르보오스, 멜레지토오스, 글리세롤, 프럭토오스, 만노오스, 말토오스, 락토오스, 아라비노오스, 크실리토오스, 리보오스, 람노오스, 갈락토오스, 글루코오스, 크실리톨, 에리트리톨, 트레이톨, 라피노오스 등일 수 있다.
- [0088] 일 실시양태에서, 상기 하나 이상의 부형제 각각은 수크로오스, 만니톨, 글리세롤, 소르비톨, 텍스트란, 트레할로오스, 히드록시에틸 녹말(HES), 사카린 나트륨, 폴리에틸렌 글리콜(PEG)(예를 들어, PEG 3350, PEG 2000, PEG 8000), 및 1,2-프로판디올로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다른 실시양태에서, 상기 부형제는 수크로오스 또는 만니톨이다.
- [0089] 다른 실시양태에서, 상기 조성물에서 존재하는 경우 수크로오스의 총 양은 20%(w/v) 미만, 예시적으로, 약 0% 내지 약 15%(w/v), 약 2.5% 내지 약 7.5%, 및 약 4% 내지 약 5%(w/v)이다. 일 실시양태에서, 상기 조성물은 수크로오스를 함유하지 않는다.
- [0090] 각 부형제의 총량 및/또는 상기 조성물의 총 부형제 양은 예를 들어 사용된 부형제의 유형 및/또는 양 및/또는 API를 포함하는 상기 조성물 중에 존재하는 다른 성분의 유형 및/또는 양에 따라 달라질 수 있다.
- [0091] 일 실시양태에서, 상기 조성물은 적어도 약 0.01 M 당, 예시적으로, 약 0.01 내지 약 1 M 및 약 0.125 내지 약 0.75 M 당의 총 당 농도로 당을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 당은 수크로오스이다. 다른 실시양태에서, 상기 당은 수크로오스이고, 상기 조성물은 수크로오스 이외의 당을 함유하지 않는다.
- [0092] 다른 실시양태에서, 상기 조성물은 적어도 약 0.01 M 폴리올, 예시적으로, 약 0.01 내지 약 1 M 및 약 0.25 내지 약 0.75 M 폴리올의 총 폴리올 농도로 폴리올을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 폴리올은 만니톨이다. 다른 실시양태에서, 상기 폴리올은 만니톨이고, 상기 조성물은 만니톨 이외의 폴리올을 함유하지 않는다.
- [0093] 다른 실시양태에서, 상기 조성물은 적어도 약 0.25%(w/v) 폴리올, 예시적으로, 약 0.25 내지 약 5%(w/v) 폴리올의 총 폴리올 농도로 폴리올을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 폴리올은 글리세롤이다. 다른 실시양태에서, 상기 폴리올은 글리세롤이고, 상기 조성물은 글리세롤 이외의 폴리올을 함유하지 않는다.
- [0094] 일 실시양태에서, 상기 조성물은 적어도 약 0.01 M 폴리올, 예시적으로, 약 0.01 내지 약 1 M 및 약 0.27 내지 약 0.55 M 폴리올의 총 폴리올 농도로 폴리올을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 폴리올은 소르비톨이다. 다른 실시양태에서, 상기 폴리올은 소르비톨이고, 상기 조성물은 소르비톨 이외의 폴리올을 함유하지 않는다.
- [0095] 다른 실시양태에서, 상기 조성물은 적어도 약 0.25%(w/v) 중합체, 예시적으로, 약 0.25 내지 약 5%(w/v) 중합체의 총 중합체 농도로 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 중합체는 텍스트란이다. 다른 실시양태에서, 상기 중합체는 텍스트란이고, 상기 조성물은 텍스트란 이외의 중합체를 함유하지 않는다.
- [0096] 다른 실시양태에서, 상기 조성물은 적어도 약 0.01 M 당, 예시적으로, 약 0.01 내지 약 1 M 및 약 0.15 내지 약 0.75 M 당의 총 당 농도로 당을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 당은 트레할로오스이다. 다른 실시양태에서, 상기 당은 트레할로오스이고, 상기 조성물은 트레할로오스 이외의 당을 함유하지 않는다.
- [0097] 일 실시양태에서, 상기 조성물은 적어도 약 0.25%(w/v) HES, 예시적으로, 약 0.25 내지 약 5%(w/v) HES의 총

HES 농도로 HES를 포함한다.

- [0098] 다른 실시양태에서, 상기 조성물은 적어도 약 0.01 M 사카린 나트륨, 예시적으로, 약 0.01 내지 약 1 M 및 약 0.15 내지 약 0.75 M 사카린 나트륨의 총 사카린 나트륨 농도로 사카린 나트륨을 포함한다.
- [0099] 다른 실시양태에서, 상기 조성물은 적어도 약 0.25%(w/v) PEG, 예시적으로, 약 0.25 내지 약 10%(w/v) PEG, 및 약 1 내지 약 5%(w/v) PEG의 총 PEG 농도로 PEG를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 PEG는 PEG 3350이다. 다른 실시양태에서, 상기 PEG는 약 5%(w/v) PEG 3350이고, 상기 조성물은 PEG 3350 이외의 PEG를 함유하지 않는다.
- [0100] 일 실시양태에서, 상기 조성물은 적어도 약 0.01 M 1,2-프로판디올, 예시적으로, 약 0.01 내지 약 1 M 및 약 0.125 내지 약 0.3 M 1,2-프로판디올의 총 1,2-프로판디올 농도로 1,2-프로판디올을 포함한다.
- [0101] 계면활성제는, 비제한적으로, 예를 들어, 폴리에틸렌 및 폴리프로필렌 글리콜의 블록 중합체(예를 들어, Pluronic F68); 또는 폴리에틸렌 글리콜 소르비탄 모노라우레이트(예를 들어, Tween 80), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트(예를 들어, Tween 20) 등을 포함할 수 있다. 일 실시양태에서, 상기 계면활성제는 Pluronic F68 또는 Tween 80(즉, Polysorbate 80)이다.
- [0102] 일 실시양태에서, 상기 조성물은 적어도 약 0.0025%(v/v) 계면활성제, 예시적으로, 약 0.0025 내지 약 1%(v/v) 계면활성제, 약 0.025 내지 약 0.1%(v/v) 계면활성제, 및 약 0.05 내지 약 0.075%(v/v) 계면활성제의 총 계면활성제 농도로 계면활성제를 더 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 계면활성제는 Pluronic F68 또는 Tween 80이다.
- [0103] 다른 실시양태에서, 본 발명은
- [0104] (i) API;
- [0105] (ii) 적어도 하나의 아미노산을 포함하는 조성물로서, 염, 바람직하게는 무기 염을 더 포함하는 조성물을 제공한다. 비제한적으로, 무기 염의 예는 염화나트륨 또는 인산 나트륨을 포함한다.
- [0106] 일 실시양태에서, 상기 무기 염은 적어도 0.01 M, 예시적으로, 약 0.01 내지 약 0.5 M, 약 0.05 내지 약 0.4 M, 및 약 0.1 내지 약 0.15 M 무기 염의 총 무기 염 양으로 상기 조성물 내에 존재한다. 일부 실시양태에서, 상기 무기 염은 염화나트륨, 인산 나트륨, 또는 그의 조합물이다.
- [0107] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "항산화제"는 산화를 감소 또는 방지하는 물질을 지칭한다. "항산화제"는, 비제한적으로, 메티오닌, 글루타치온, 아세틸시스테인, 아스코르브산, 부틸 히드록실 아니솔(BHA), 부틸 히드록실 톨루엔(BHT), 및 말레산을 포함한다.
- [0108] 일 실시양태에서, 본 발명은
- [0109] (i) API;
- [0110] (ii) 적어도 하나의 아미노산을 포함하는 조성물로서, 항산화제를 더 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 상기 항산화제는 메티오닌이다. 다른 실시양태에서, 상기 항산화제는 글루타치온이다. 다른 실시양태에서, 상기 항산화제는 적어도 약 0.01%(w/v), 예시적으로, 약 0.01 내지 약 5%(w/v), 및 약 0.05 내지 약 0.7%(w/v)의 총 항산화제 양으로 상기 조성물 내에 존재한다.
- [0111] 금속 킬레이터의 비제한적인 예는 에틸렌 디아민 테트라아세트산(EDTA), (0.1-0.5%), [에틸렌비스(옥시에틸렌)트릴로] 테트라아세트산(EGTA), 1,2-비스(2-아미노페녹시)에탄-N,N',N'-테트라아세트산(BAPTA), 히드록시에틸렌 트리아민 디아세트산(HEDTA), 또는 그의 염을 포함한다. 일 실시양태에서, 상기 금속 킬레이터는 2가 금속 킬레이터이다. 다른 실시양태에서, 상기 금속 킬레이터는 EDTA, EGTA, BAPTA, HEDTA, 또는 그의 염이다. 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 금속 킬레이터의 조합을 포함한다. 다른 실시양태에서, 상기 금속 킬레이터는 적어도 약 0.01%(w/v), 예시적으로, 약 0.01 내지 약 1%(w/v), 약 0.05 내지 약 0.5%(w/v), 및 약 0.1 내지 약 0.25%의 총 킬레이터 양으로 상기 조성물 내에 존재한다.
- [0112] 다른 실시양태에서, 본 발명은
- [0113] (i) API;
- [0114] (ii) 적어도 하나의 아미노산을 포함하는 조성물로서, 금속 킬레이터를 더 포함하는 조성물을 제공한다.

- [0115] 따라서, 다른 실시양태에서, 본 발명은
- [0116] (a) API; 및
- [0117] (b) 아미노산을 포함하는 조성물로서, 하나 이상의 부형제를 더 포함하거나, 또는 경우에 따라 더 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0118] 본 발명에 따른 다수의 상이한 API 함유 조성물이 제공된다. 이러한 제형 내의 활성 성분은 인간 또는 비-인간 재조합 API일 수 있지만, 상기 나타낸 바와 같이, 혈장 공급원으로부터 추출된 API를 또한 포함할 수 있다. API는 그 자체가 유일한 활성 성분으로서 존재할 수 있지만, API는 하나 이상의 부가적 활성 성분과 함께 제공될 수 있다.
- [0119] **II. 조성물의 제조 방법**
- [0120] 다른 양태에서, 본 발명은 API 및 적어도 하나의 아미노산을 포함하는 조성물을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0121] 일 실시양태에서, 상기 방법은 상기 조성물에 존재하는 염(존재한다면)을 제거하기 위하여, API를 포함하는 제1 조성물을 투석하는 것을 포함한다.
- [0122] 예를 들어, 상기 제1 조성물은 완충액에서 제조되거나 완충액과 접촉된 API 함유 조성물일 수 있고, 상기 제1 조성물은 염을 포함한다. 상기 조성물은 비제한적으로 혈장(예를 들어, 인간 혈장)으로부터 API를 제조하기 위한 벌크 제조 방법으로부터 얻은 조성물 또는 재조합 API 제제일 수 있다.
- [0123] 일 실시양태에서, 상기 제1 조성물은 포스페이트 완충액(예를 들어, 20 mM 인산 나트륨, pH 7) 중에 API를 포함하며, 염화 나트륨은 완충액으로, 예를 들어 약 100 mM NaCl로 존재한다. 일부 실시양태에서, 투석은 한외여과/투석여과(UF/DF)를 이용하여 실시될 수 있다.
- [0124] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 상기 투석 단계 이후에 적어도 하나의 아미노산을 상기 조성물에 제공하는 단계를 더 포함한다. 부형제 및/또는 기타 다른 시약 등은 아미노산과 함께, 아미노산 부가 전에, 또는 아미노산 부가 이후에 부가될 수 있다.
- [0125] 다른 실시양태에서, 상기 방법은 적어도 하나의 아미노산 및/또는 부형제 및/또는 임의의 기타 시약을 포함하는 완충액(예를 들어, 포스페이트 완충액 20 mM, pH 7)에 대하여 API를 포함하는 제1 조성물을 투석시키는 단계를 포함한다.
- [0126] 일 실시양태에서, 상기 방법은 API 함유 조성물의 pH를 약 6.0 내지 약 8.0, 바람직하게는 약 6.6 내지 약 7.4로 유지하는 것을 더 포함한다. 예를 들어, 다른 실시양태에서, 완충액 염은 효과적인 pH 범위를 달성하기 위하여 먼저 부가된 다음, 아미노산 및/또는 부형제 및/또는 임의의 다른 시약/성분을 부가한다. 다른 실시양태에서, 아미노산 및/또는 부형제, 및 또는 기타 시약은 API 함유 조성물에 부가하기 위하여 조합될 수 있다.
- [0127] **III. 키트**
- [0128] 다른 양태에서, 본 발명은 또한 키트, 예를 들어 API 발현 또는 활성과 관련된 질병 또는 상텔르 치료하기 위한 키트를 제공한다. 일 실시양태에서, 상기 키트는 본 발명에 따른 조성물, 특히 API 및 아미노산을 포함하는 약제학적 조성; 및 경우에 따라 API와 관련된 질병 또는 상태, 예를 들어 정상적인 혈장 API 양보다 더 낮은 것과 관련되거나 그에 의해 유발된 질병 또는 상태를 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한 지시서를 포함한다.
- [0129] 다른 실시양태에서, 키트에는 별개의 용기가 제공되며, 적어도 하나의 용기는 API 함유 조성물을 포함하고, 또 하나 이상의 다른 용기에는 상이한 조성물, 특히 API 이외의 활성 성분을 포함하는 조성물을 포함한다. 임의적으로, 상기 키트는 활성 성분과 조합된 약제학적으로 허용되는 담체 및 희석제를 더 함유할 수 있고, 및/또는 별개의 용기에 분리할 수 있다.
- [0130] 본 발명은 실시예를 통하여 더욱 자세하게 설명되지만, 본 발명은 이들 실시예에 한정되지 않음을 알아야 한다.
- [0131] **실시예**
- [0132] **실시예 1**
- [0133] **API를 포함하는 액체 제형의 안정성**

[0134] API를 포함하는 액체 제형의 안정성을 결정하기 위하여 가속 안정화 연구를 실시하였다.

[0135] 분획 IV-1 제조 및 마크로 벤치 로트(macro bench lot)로부터 제조된 API를 포스페이트 완충액(20 mM, pH 7)에 대하여 투석시켜 염을 제거한 다음 100 mg/ml로 농축하였다. 투석에 이어, 다른 성분을 함유하는 2배 용액을 부가하는 것에 의해 다른 성분을 함유하는 다양한 API 제형을 얻었다. 약 2 ml의 최종 제형을 10 ml 튜브 바이얼에 부가한 다음 40℃에서 온도 제어되는 챔버에서 3~4주 동안 배양하는 것에 의해 API 안정성에 대하여 최종 API 제형을 시험하였다. 매 주마다 샘플을 수집하여 SEC-HPLC를 이용하여 응집물 양을 측정하였다.

[0136] 결과를 도 1에 도시하고 또 표 2에 요약하였다.

표 2

[0137] API 액체 제형의 % 응집물 양

| 제형 (50 mg/ml API) | 40℃에서 % 응집 | | | |
|----------------------|------------|-----|-----|-----|
| | 0 주 | 1 주 | 2 주 | 3 주 |
| API 단독 | 0.1 | 1.6 | 3.9 | 5.7 |
| API + 0.1 M NaCl | 0.2 | 1.8 | 4.0 | 6.9 |
| API + 0.3 M 히드록시프롤린 | 0.3 | 1.1 | 2.5 | 4.3 |
| API + 0.3 M 세린 | 0.3 | 1.0 | 2.2 | 4.2 |
| API + 0.3 M 글리신 | 0.2 | 1 | 2.2 | 4.0 |
| API + 0.3 M 알라닌 | 0.2 | 1 | 2.1 | 3.8 |
| API + 0.3 M 만니톨 | 0.2 | 1 | 2.2 | 3.6 |
| API + 0.3 M 트레오닌 | 0.3 | 1 | 2 | 3.6 |
| API + 0.3 M 수크로오스 | 0.2 | 0.7 | 1.5 | 2.6 |

[0138] 도 1 및 표 2에 나타난 바와 같이, API 단독을 함유하는 제형 및 0.1 M NaCl을 함유하는 제형은 가장 많은 응집량을 나타내었다. 수크로오스를 함유하는 API 제형은 시간 경과에 따라 응집물 형성이 가장 최소로 가장 안정하였다.

[0139] API(50 mg/mL); API(50 mg/mL) + 알라닌(0.25M) 또는 수크로오스(0.25M); 및 API(50 mg/mL) + 알라닌(0.125M)/수크로오스(0.125M)를 함유하는 액체 API 제형을 사용하여 40℃에서 가속 안정성 연구를 실시하였다.

[0140] 도 2에 도시한 바와 같이, 알라닌 단독은 시간 경과에 따른 % 응집물 양에 의해 측정되는 바와 같이 API 함유 조성물에 대하여 안정성을 부여하였다. 또한 제한된 양의 수크로오스와 알라닌을 조합하면 알라닌 단독보다는 큰 안정성을 제공하였다.

[0141] 실시예 2

[0142] API를 포함하는 액체 제형의 안정성

[0143] API(50 mg/mL); API(50 mg/mL) + 알라닌(0.25M) 또는 만니톨(0.25M); 및 API(50 mg/mL) + 알라닌(0.125M)/만니톨(0.125M)를 함유하는 액체 API 제형을 사용하여 실시예 1에 기재된 가속 안정성 연구를 40℃에서 실시하였다.

[0144] 도 3에 도시한 바와 같이, 알라닌 단독은 시간 경과에 따라 % 응집물 양으로 측정되는 바와 같이 API 함유 조성물에 대하여 안정성을 부여하였다. 또한, 제한된 양의 만니톨과 알라닌을 조합하면 알라닌 단독보다는 큰 안정성을 제공하였다.

[0145] 실시예 3

[0146] API를 포함하는 액체 제형의 안정성

[0147] 다양한 농도의 수크로오스, 트레할로오스, 및 알라닌의 안정화 효과를 측정하기 위하여 40℃에서 실시예 1에 기재된 가속 안정성 연구를 40℃에서 실시하였다. 수크로오스, 트레할로오스 및 알라닌의 안정화 효과를 평가하기 위하여, 이들 성분을 각각 0.25 M, 0.5 M, 및 0.75 M 함유하는 10개 제형을 제조하고 무균적으로 5 ml 튜브 바이얼에 충전하였다. 이들 샘플의 40℃에서의 응집은 4주 동안 시험하였다.

[0148] 결과는 도 4에 도시한다. 출발 응집물 양은 0이었다. 4주 배양하는 동안, 0.75 M 수크로오스 또는 0.75 M 트레할로오스 제형에서는 API의 응집이 검출되지 않았다. 40℃에서 첫 주에는 응집이 검출되지 않았다. 다양한 성분의 부재하는 API는 첫 주에 응집하였고 또 응집물 양은 각 시점에서 최고이었다. 응집물 양은 부가된 성분의 농

도가 증가함에 따라서 감소하였다. 트레할로오스가 응집에 대하여 가장 우수한 안정화 효과를 나타내었고, 이어 수크로오스 및 알라닌이었다.

[0149] 실시예 4

[0150] API를 포함하는 액체 제형의 안정성

[0151] API 제형에 대한 알라닌 또는 글리신 농도의 효과를 측정하기 위하여 실시예 1에 기재된 가속 안정성 연구를 40℃에서 실시하였다. 0 M, 0.1 M, 0.15 M, 0.2 M, 0.25 M, 또는 0.3 M의 알라닌 또는 글리신을 상기 API 액체 제형에 부가하고 또 40℃에서 상이한 시간 간격으로 응집물 양을 비교하였다. 모든 제형은 약 1.3-1.4% 응집물 양으로 시작하였다.

[0152] 도 5는 40℃에서 1주 동안 배양한 후 상이한 알라닌 또는 글리신 농도를 갖게 제형화된 API 액체 용액에서 응집물 양을 도시한다. 응집물 양은 알라닌 또는 글리신 농도가 증가함에 따라서 감소하였다. 도 6은 2주에서 응집물 양을 도시한다. 결과는 1주 데이터와 일치한다. 상기 응집물 양은 알라닌 또는 글리신 농도가 증가함에 따라서 감소하였다. 3주 및 4주에서 응집은 더 많은 알라닌 또는 글리신이 부가하여도(데이터 도시되지 않음) 응집이 적음을 나타낸다.

[0153] 실시예 5

[0154] API를 포함하는 액체 제형의 안정성

[0155] 응집에 대한 탈산소제의 효과를 측정하기 위하여 실시예 1에 기재된 가속 안정화 연구를 40℃에서 실시하였다. 따라서, API(50mg/ml) 및 알라닌(0.25 M)을 함유하는 액체 제형은 0.3%, 0.5%, 및 0.7% 메티오닌을 더 함유하도록 제조하였다.

[0156] 도 7은 40℃에서 응집 특성을 도시한다. 응집에 대한 메티오닌의 효과는 미미하였다. 응집물 양에서 현저한 감소는 관찰되지 않았다.

[0157] 실시예 6

[0158] API를 포함하는 액체 제형의 안정성

[0159] 알파-1 프로테이나제 억제제(API)(인간 혈장으로부터 제조; 65 mg/ml 효능)를 포함하는 벌크 용액은 100 mM 염화나트륨을 함유하는 20 mM 인산 나트륨 완충액 내에 얻었다. 벌크 용액(30 L)을 포스페이트 완충액(20 mM, pH 7)으로 투석하기 위하여 240 L의 포스페이트 완충액을 사용하여 한외여과/여과투석(UF/DF)을 실시하여 종점에 도달하였다. 그후 아미노산 및/또는 다른 성분을 부가하고 또 최종 단백질 농도를 50 mg/ml로 조절하였다. 최종 제형 용액을 0.22 µm 필터를 통하여 여과하고 또 층류 후드 하에서 충전하였다. 충전 부피는 20.0 ml이었다. 바이알을 밀봉하고 라벨링하였다.

[0160] 제형 1은 250 mM 글리신을 함유하였고; 제형 2는 250 mM L-알라닌을 함유하였으며; 제형 3은 125 mM L-알라닌 및 4.2% 수크로오스를 함유하였고; 또 제형 4는 100 mM 염화나트륨을 함유하였다. 각 제형의 경우, API는 50 mg/ml이었고 또 완충액은 20 mM 인산 나트륨 완충액(일염기성 및 이염기성 질수화물의 혼합물)이었다. 동결건조된 산물의 경우, 재구성 및 케이크 습윤 이후 용해 시간/육안 외관을 비롯한 부가적 분석을 실시하였다.

[0161] 안정성 평가를 위해 샘플을 5℃ 및 25℃에서 방치하였다. 다음 시험은 제형 당 초기(시간 0) 샘플에 대해 외관, 피브릴, 효능, pH, SEC-HPLC, A₂₈₀에서 광 흡수성 측정, 비탁도측정(NTU), 모세관 존 전기영동(CZE)에 의한 단백질 조성, 탈아미드화 및 동적 광 산란(DLS)에 대해 실시하였다. 나트륨의 측정은 원자 흡수 분광광도계에 의해 실시하였고; 수크로오스의 측정은 이온 크로마토그래피에 의해 실시하였으며; 비탁도측정: 탁도 측정은 HACH비탁도계를 이용하여 실시하였고; 또 API의 정량 측정은 96-웰 플레이트계 효능 분석을 이용하여 실시하였다.

[0162] 표 3은 초기 분석 시험으로부터 결과를 도시한다.

표 3

[0163] 초기 분석 시험의 결과

| | 제형 | | | | | |
|----|----|---|---|---|-------|--|
| 시험 | 1 | 2 | 3 | 4 | 동결건조됨 | |

| | | | | | | | |
|---------------------|----------|--------------------|--------|--------|--------|--------|-------|
| 외관(단백질 입자 단독) | | 없음 | 없음 | 없음 | 없음 | | |
| CIE에 의한 외관 | | L ^{coord} | 96.45 | 96.37 | 96.38 | 96.03 | 96.2 |
| | | a ^{coord} | -0.61 | -0.6 | -0.56 | -0.76 | -0.72 |
| | | b ^{coord} | 2.55 | 2.52 | 2.44 | 2.81 | 2.78 |
| NTU | | 2.89 | 2.83 | 2.62 | 4.77 | 4.71 | |
| pH | | 6.97 | 7.00 | 7.03 | 6.92 | 7.01 | |
| 알파 효능 (mg/mL) | | 51.39 | 52.57 | 50.55 | 52.89 | 51.72 | |
| A ₂₈₀ AU | | 25.3 | 25.3 | 24.9 | 25.6 | 24.5 | |
| 비활성 | | 2.03 | 2.08 | 2.03 | 2.07 | 2.11 | |
| 알파 HPLC (% 면적) | 영역1 | | 1.78 | 1.75 | 1.65 | 2.04 | 1.44 |
| | 영역2 | | 6.45 | 6.43 | 6.43 | 6.42 | 6.51 |
| | 영역3 | | 3.27 | 3.17 | 3.13 | 3.14 | 3.44 |
| | 영역4 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 영역5 | | 88.44 | 88.57 | 88.73 | 88.33 | 88.52 |
| | 단편 면적 | | 0.07 | 0.09 | 0.07 | 0.08 | 0.11 |
| CZE (% 면적) | 감마 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 베타 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 알파 2 | | 2.9 | 3.3 | 3.0 | 3.2 | 3.4 |
| | 알파 1 | | 97.1 | 96.7 | 97.1 | 96.8 | 96.7 |
| | 알부민 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 나트륨(mEq/L) | | 51.07 | 51.33 | 51.08 | 153.83 | 152.31 | |
| 클로라이드(mEq/L) | | n/a | n/a | n/a | 96.0 | 88.0 | |
| 포스페이트(mEq/L) | | 1472.4 | 1472.3 | 1445.6 | 1511.7 | 1765.3 | |
| 탈아미드화(% 면적) | | 5.9 | 6.4 | 6.4 | 6.7 | n/a | |
| DLS | 1 | 반경(nm) | 3.7 | 3.6 | n/a | 3.9 | n/a |
| | | % 질량 | 99.9 | 99.9 | n/a | 99.9 | n/a |
| | 2 | 반경(nm) | 23 | 25 | n/a | 25.1 | n/a |
| | | % 질량 | 0.1 | 0.1 | 0 | 0.1 | n/a |
| | 3 | 반경(nm) | n/a | n/a | n/a | n/a | n/a |
| | | % 질량 | n/a | n/a | n/a | n/a | n/a |
| | 4 | 반경(nm) | 188 | n/a | 365.3 | n/a | n/a |
| | | % 질량 | 0 | n/a | 0 | n/a | n/a |

[0164] - 백색(오프 화이트) 케이크, 단백질 입자 없음, 투명, 120(담황색), 용해화 시간: 1분.

[0165] 5℃ 안정성 데이터: 5℃에서, 알라닌/수크로오스(제형 3)와 함께 제형화된 API 중, 3 및 6개월에서 몇 개의 피크가 관찰되었다. 어떤 시점에서도 다른 제형에서는 피크가 관찰되지 않았다. 효능(도 8), NTU(도 9), pH, 비활성(도 10), DLS 및 탈아미드화 측정(도 11)에서 어떠한 현저한 변화도 관찰되지 않았다. 효능의 최종 용기 정확도(BCS)는 5%이다. NTU 및 탈아미드화에 대한 중간 정확도는 각각 3.0% 및 18.5%이다. 관찰된 차이는 분석가변성 내에 든다.

[0166] 크기 배제 크로마토그래피(SEC-HPLC)는 분자의 유체역학적 부피를 기초로 하여 샘플의 단백질을 분리한다. SEC-HPLC에서, 큰 유체역학적 부피를 갖는 분자는 컬럼 팩킹과 미미한(있다면) 상호작용을 갖고 컬럼의 공극 부피(V₀)에서 용출된다. 더 작은 유체역학적 부피를 갖는 분자는 컬럼의 팩킹과 더 많이 상호작용하여 공극 부피 후 컬럼에서 용출된다.

[0167] 안정성 데이터에 따르면, NaCl(제형 4)과 함께 제형화된 API는 SEC-HPLC에 의해 측정된 바와 같이 다른 제형과 비교할 때 약간 더 높은 응집물 양을 나타내었다. 6개월에서, 응집물 양은 NaCl(제형 4), 글리신(제형 1), 알라닌(제형 2) 및 알라닌/수크로오스(제형 3) 샘플(도 12 및 13) 중에서 각각 0.66%, 0.58%, 0.43% 및 0.42% 정도 증가하였고; 올리고머 피크는 변동없이 유지되었다(도 14); 또 단량체 양은 각각 0.87%, 0.61%, 0.57% 및 0.65% 정도 감소하였다(도 15).

[0168] 25℃ 안정성 데이터: 25℃에서, 6개월의 모든 제형에서 피크는 관찰되지 않았다. 효능(도 16), pH 및 DLS에서 약간의 변화가 관찰되었다. NaCl이 최고값 7.88에 도달함에 따라서 NTU는 증가하였다(도 17).

- [0169] 6개월에 걸쳐 모든 제형에서는 비활성이 0.2-0.3 정도 감소되었다(도 18). 이러한 감소는 A_{280} 흡수에서의 증가에 기인할 수 있고, 6개월에 걸쳐 모든 제형에서 25 AU에서부터 약 28AU로 증가하였다(도 19).
- [0170] 탈아미드화는 벌크 생산 과정에서 생길 수 있고, 이는 출발 물질의 약 6% 탈아미드화 양을 설명할 것이다. 탈아미드화는 6개월에 걸쳐 초기 평균 6%에서부터 20%로 증가하였다(도 19). 제형 4는 다른 제형(약 20%)에 비하여 약간 낮은 탈아미드화 양(17%)을 나타내지만, 그러한 차이는 18.5%의 분석 가변성 내에 든다.
- [0171] 응집물 양 및 올리고머 양은 증가하였다(도 21-23). 단량체 양은 시간 경과에 따라 감소하였다(도 23). 단량체 양의 감소는 응집물 및 올리고머 증가의 합에 필적한다. 6개월에 걸쳐, 응집물 양은 제형 4, 제형 1, 제형 2, 및 제형 3에서 각각 3.52%, 3.12%, 2.6% 및 2.25% 정도 증가하였다(도 20).
- [0172] 5℃에서 6개월 동안 배양한 후, 효능, NTU, pH, 비활성, DLS 및 탈아미드화 측정에 의해서는 어떠한 분명한 변화도 관찰되지 않았다. 응집물 양에서 약간의 증가(<1%)가 있었고 또 단량체 양에서 상응하는 감소가 있었다. 이들 결과는 5℃에서 6개월 동안 API 제형의 안정성을 나타낸다.
- [0173] 25℃에서 6개월 동안 배양한 후, 제형 4(즉, API + NaCl)에서 응집물 양 및 NTU에서 현저한 증가가 관찰되었다. 글리신, 알라닌, 및 알라닌/수크로오스는 응집물 및 NTU를 감소시켰고 알라닌/수크로오스는 가장 효과적인 안정화제였다. 탈아미드화는 급격하게 증가하였다. 이들 결과는 API를 포함하는 액체 제형이 25℃에서 응집 및 탈아미드화 처리되고 또 아미노산은 응집에 대하여 보호를 제공한다는 것을 나타낸다. 5℃에서 응집 데이터로부터 외삽(도 13)하면 5% 응집물 양에 도달하는 예상 시간이 제형 4의 경우 ~25개월, 제형 2의 경우 44개월이고 또 제형 3의 경우 51개월임을 보여준다. 따라서 아미노산은 현저한 단백질 안정화 작용을 부여하고 또 유효기간을 실질적으로 증가시킬 것으로 기대된다.
- [0174] **실시예 7**
- [0175] **API를 포함하는 액체 제형의 용점**
- [0176] 용점을 측정하기 위하여 다양한 API 제형의 전이 중간값(T_m)을 측정하기 위한 DSC를 실시하였다.
- [0177] 다양한 성분을 함유하고, API(50 mg/ml)를 함유하는 API 제형을 제조하였다. 간단히, 표 4에 수록된 성분 각각을 함유하는 API 용액을 포스페이트 완충액(20 mM, pH 7)에 대해 투석시켰다. 결과를 표 4에 나타낸다.

표 4

API 제형의 용점

| 성분 | 농도(mM) | 용점(℃) |
|----------|--------|-------|
| - | 0 | 61.54 |
| 알라닌 | 300 | 64.10 |
| 트레오닌 | 300 | 64.36 |
| 히드록시프롤린 | 300 | 64.07 |
| 글리신 | 300 | 64.43 |
| 세린 | 300 | 64.37 |
| 수크로오스 | 300 | 64.29 |
| 글루타민 | 30 | 62.13 |
| 페닐알라닌 | 30 | 62.02 |
| 트립토판 | 30 | 61.26 |
| 메티오닌 | 30 | 61.32 |
| 아세틸 시스테인 | 30 | 63.91 |
| 로이신 | 30 | 62.24 |
| 이소로이신 | 30 | 62.50 |
| 발린 | 300 | 62.70 |
| 리신 | 30 | 63.61 |
| 아르기닌 | 300 | 62.88 |

- [0179]
- [0180] pH 7 포스페이트 완충액 중의 API 단백질의 용점은 61.54℃이다. 용점에서 증가는 API 단백질의 형태 안정성에

서 증가를 나타내는 것으로 작용할 수 있다.

실시예 8

API를 포함하는 액체 제형에 대한 pH 및 단백질 농도의 효과

응집에 대한 pH 및 단백질 농도의 효과를 측정하기 위하여, 상이한 pH 및 단백질 농도에서 제조한 API 용액을 40℃에서 배양하고, 또 응집 데이터는 E-CHIP 분석 처리하였다. 단백질 농도는 280nm에서 광 흡수를 측정하는 것에 의해 산출하였으며, A280/0.53는 50mg/ml의 농도 값에 상응한다. 40℃에서 응집 데이터는 하기 표 5에 수록한 시험으로 측정하였다.

표 5

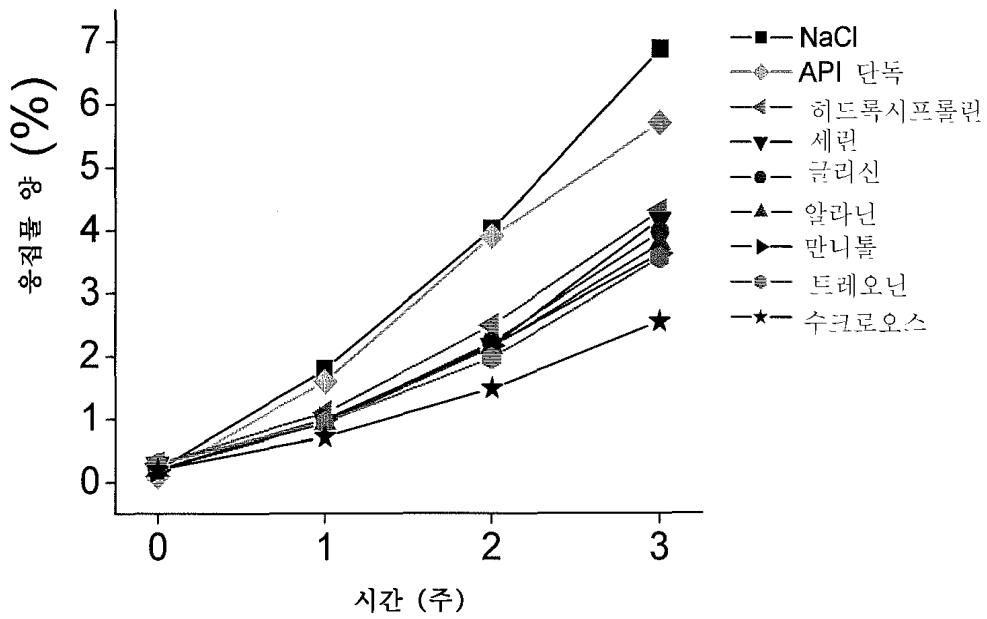
API 제형의 응집에 대한 pH 및 단백질 농도의 효과에 관한 연구

| 시험 | API 농도 (mg/ml) | pH |
|----|----------------|-----|
| 3 | 50 | 6.3 |
| 9A | 50 | 6.7 |
| 9B | 50 | 6.7 |
| 6 | 25 | 7.1 |
| 4 | 50 | 7.1 |
| 8 | 25 | 6.3 |
| 5 | 75 | 7.1 |
| 7 | 75 | 6.3 |
| 9C | 50 | 6.7 |
| 9D | 50 | 6.7 |
| 1 | 25 | 6.7 |
| 2 | 75 | 6.7 |
| 9E | 50 | 6.7 |

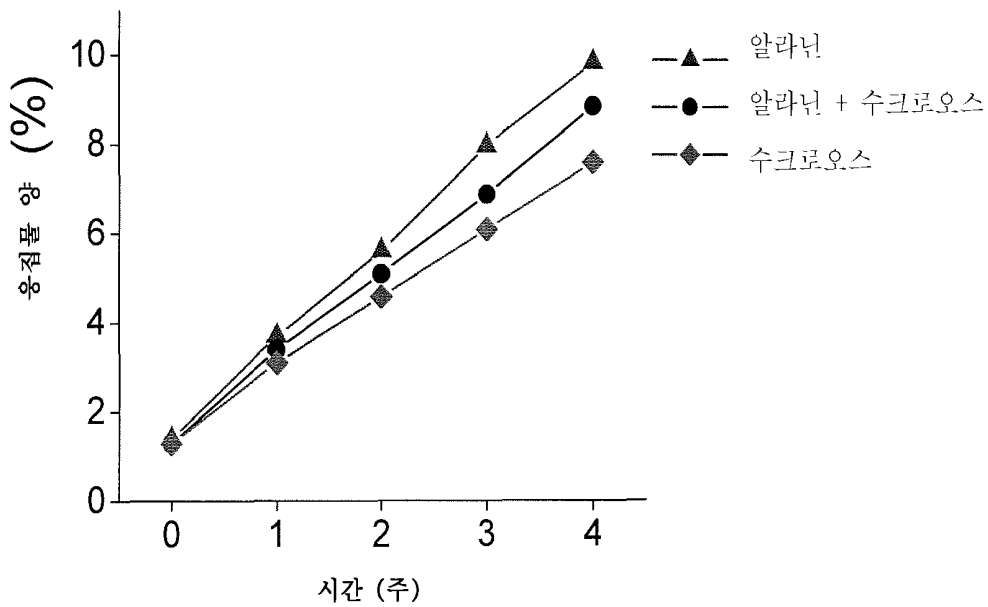
E-CHIP 모델은 50 mg/ml API에서 최소 응집을 위한 최적 pH가 6.9임을 제시하였다(도 24). 응집은 pH 6.3에서 관찰되었고 또 응집물 양은 pH 6.7 및 7.1에서 훨씬 적었다(도 25). pH 증가에 따라 응집은 감소하였고 또 pH 6.9에서 최소 값에 도달하였다(도 26). 도 27은 단백질 농도에 따라 응집이 거의 선형적으로 증가하였음을 도시한다.

도면

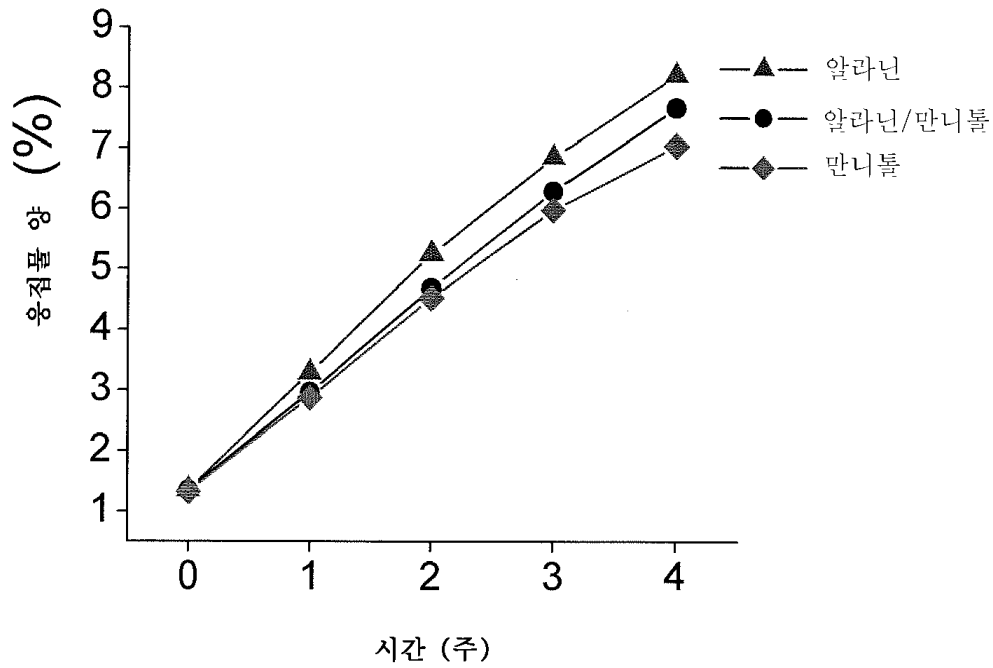
도면1



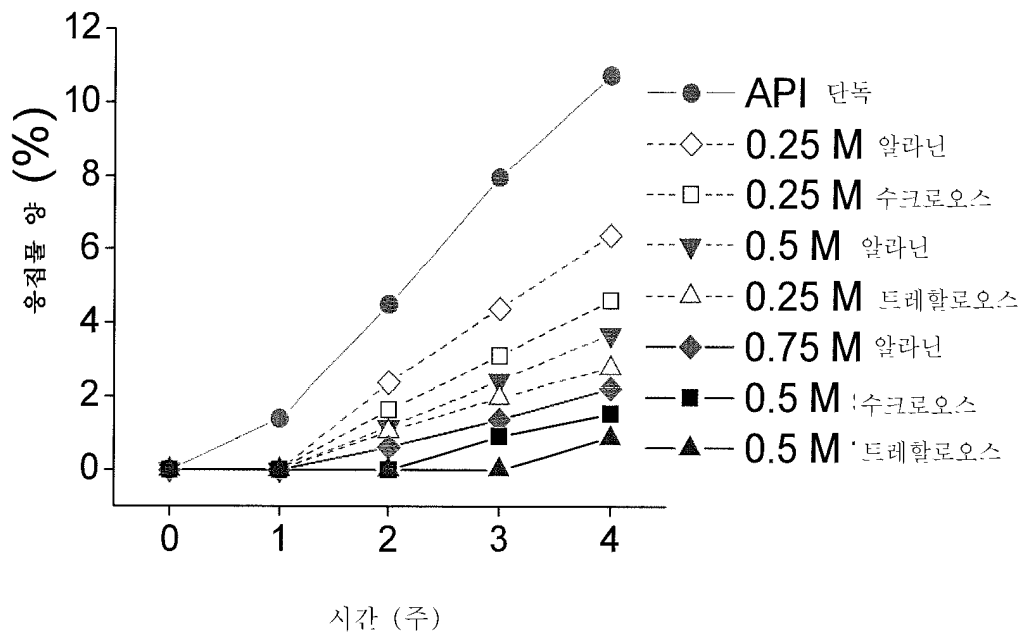
도면2



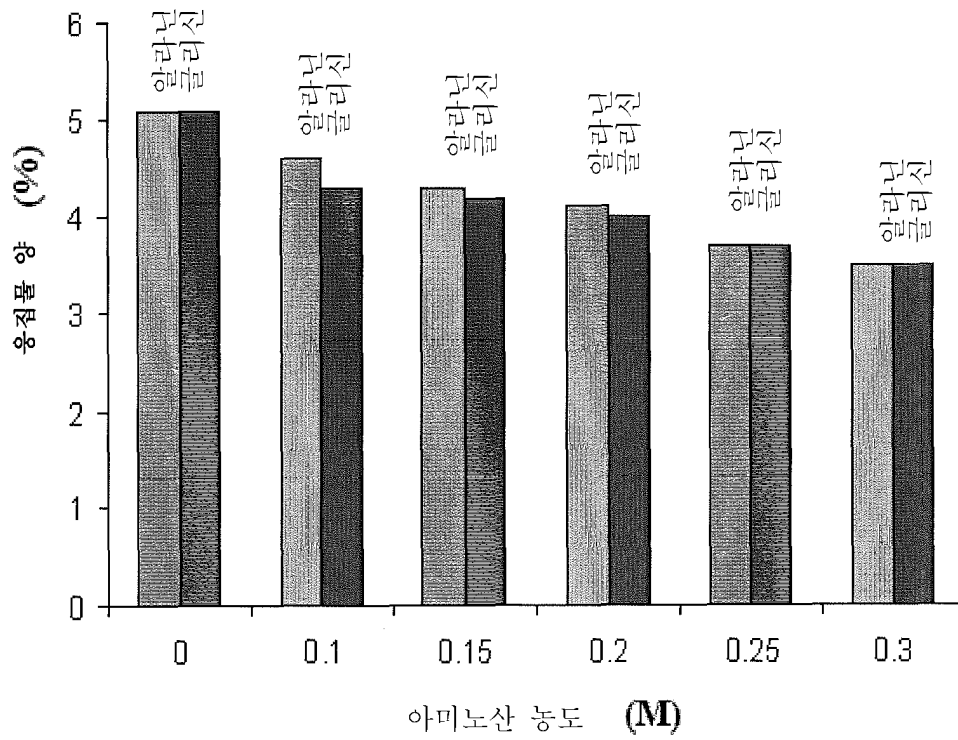
도면3



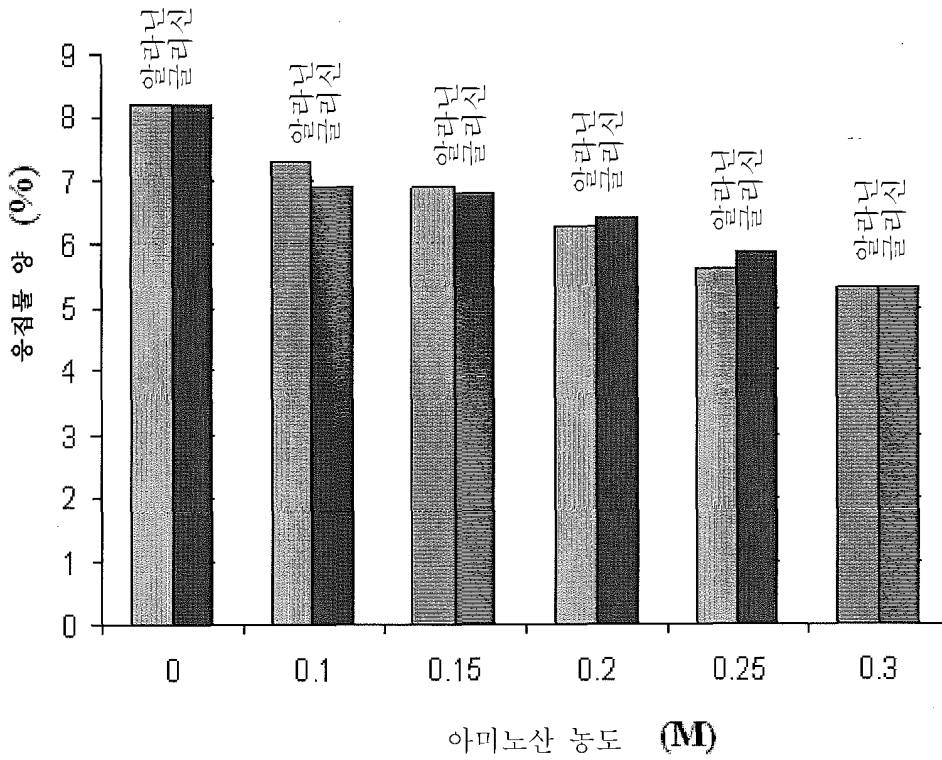
도면4



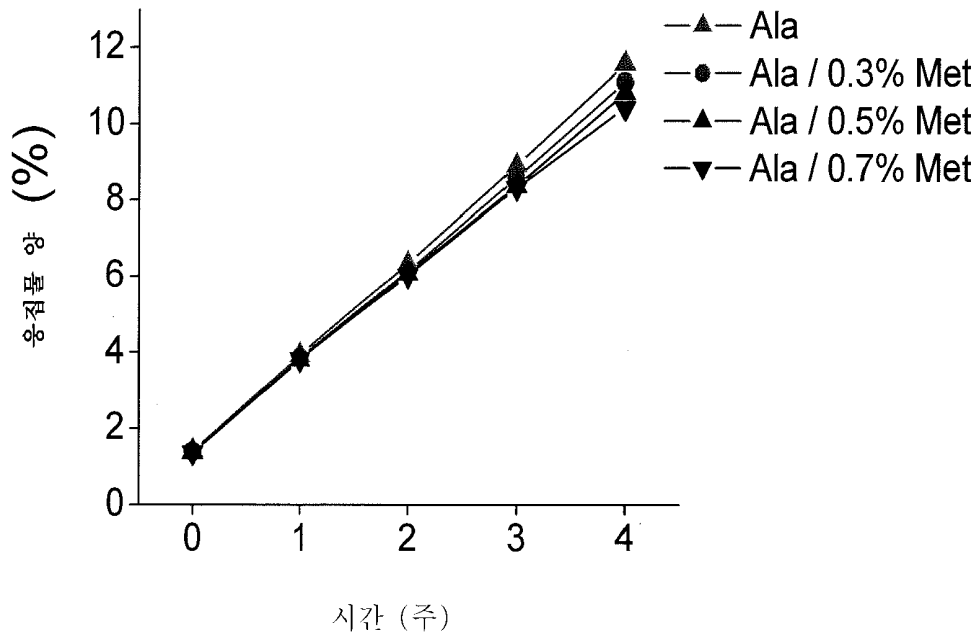
도면5



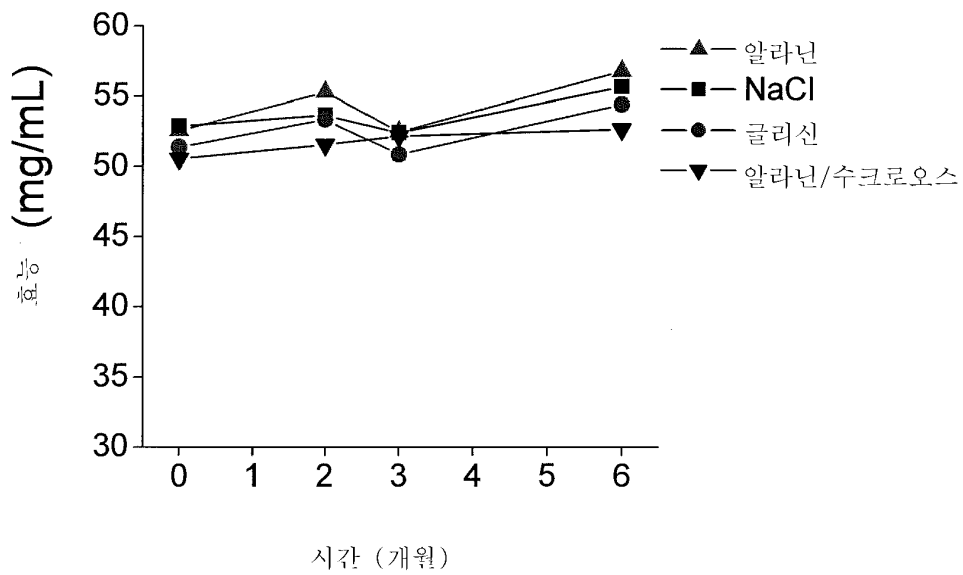
도면6



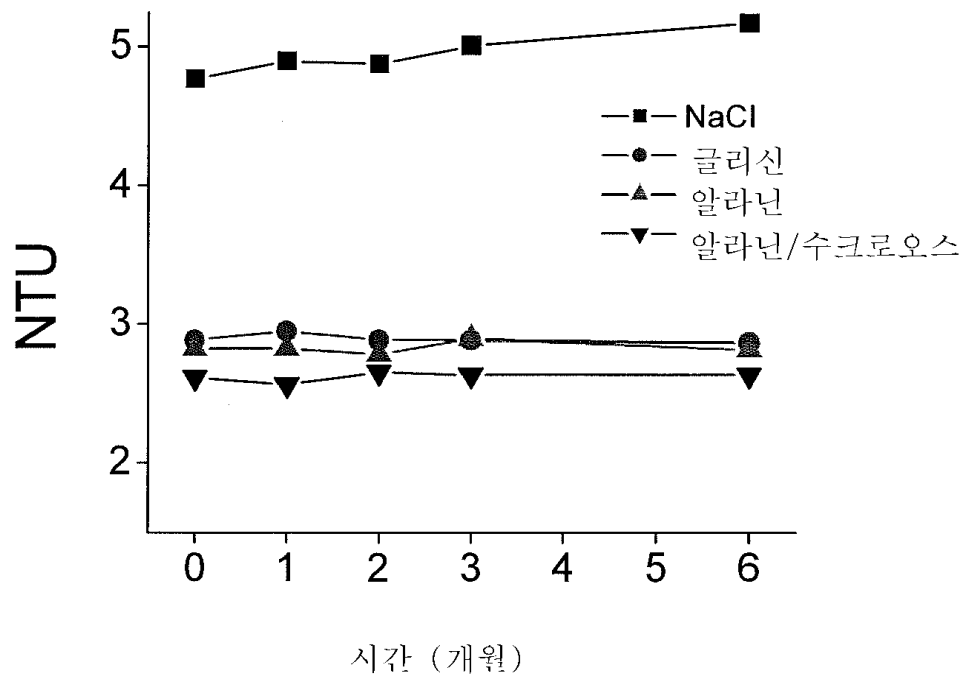
도면7



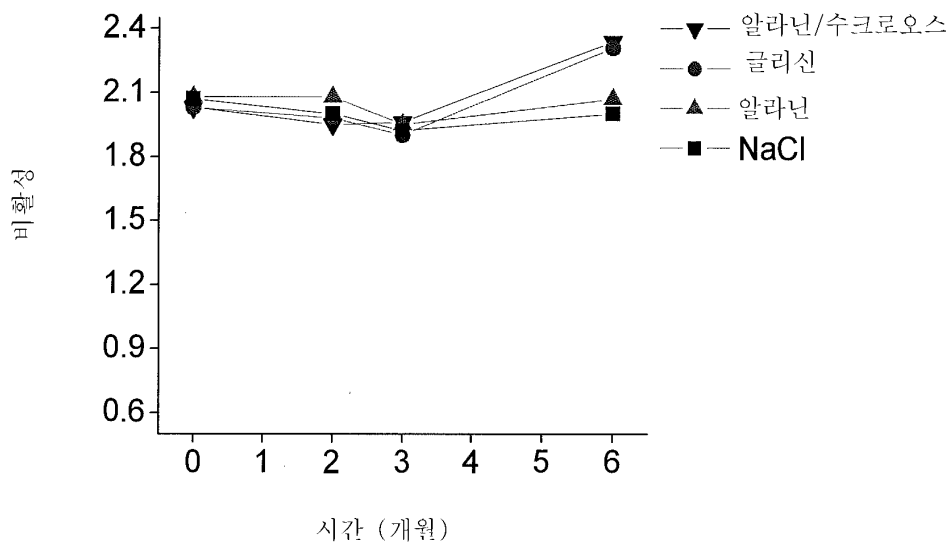
도면8



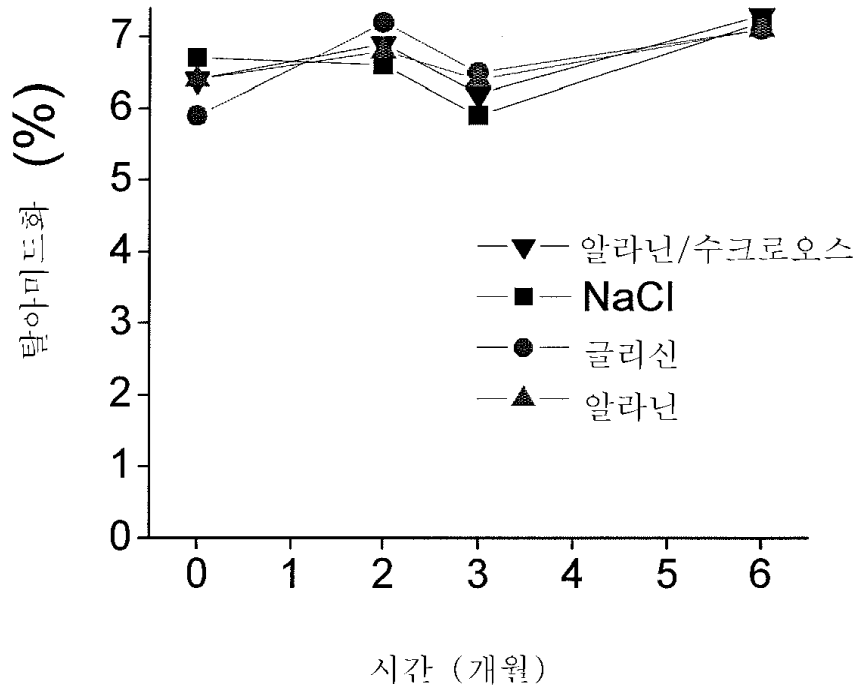
도면9



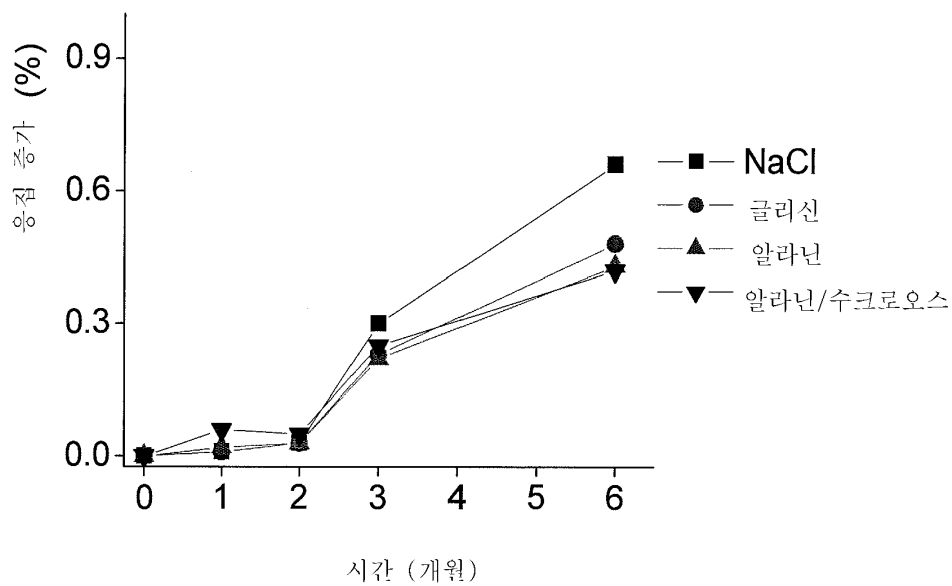
도면10



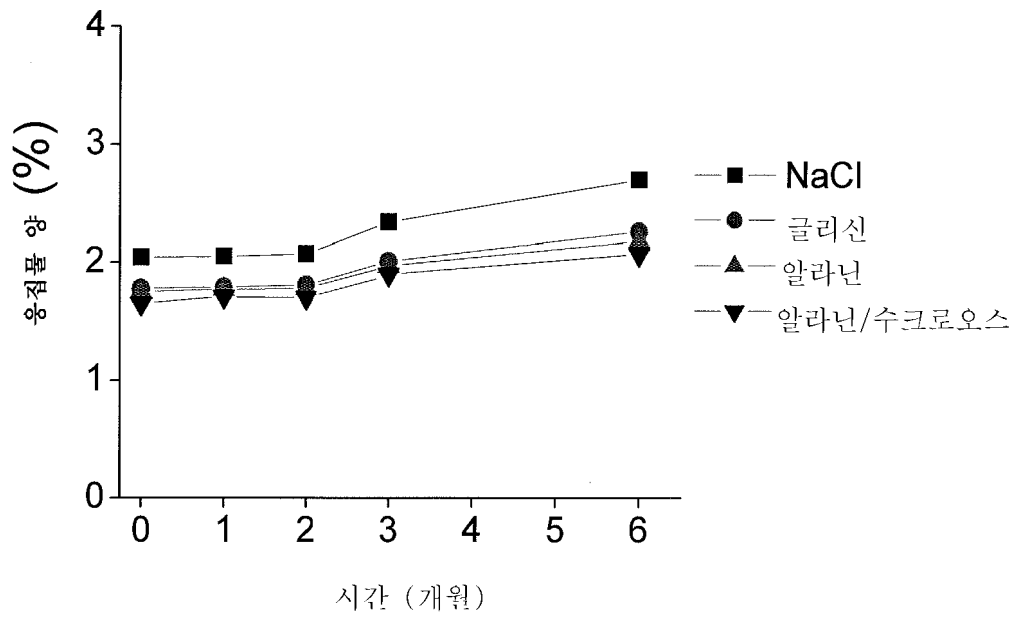
도면11



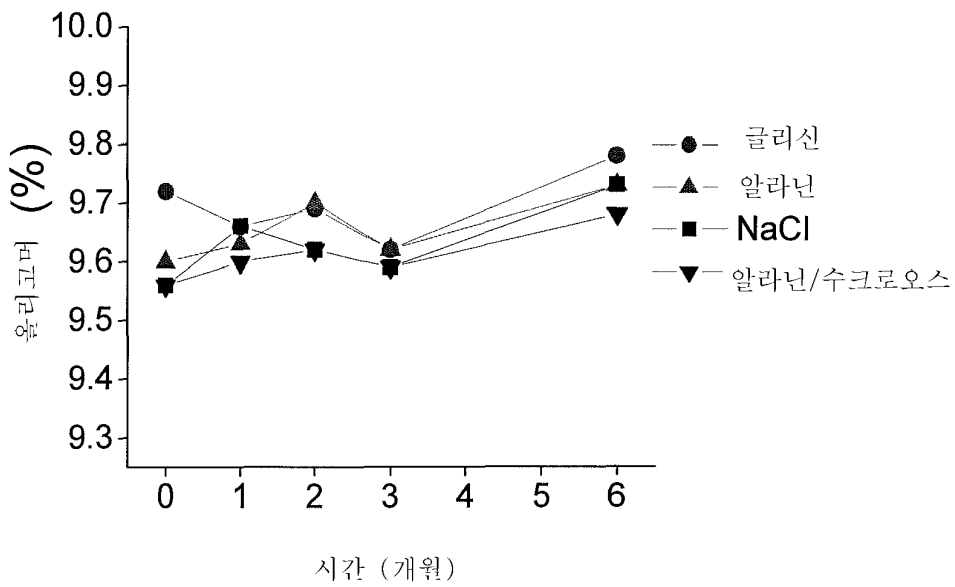
도면12



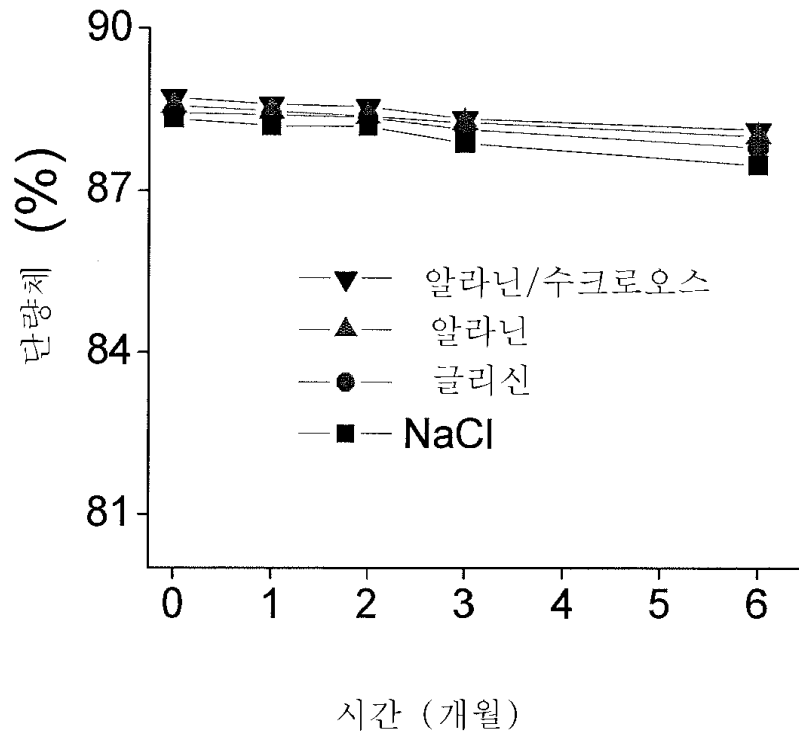
도면13



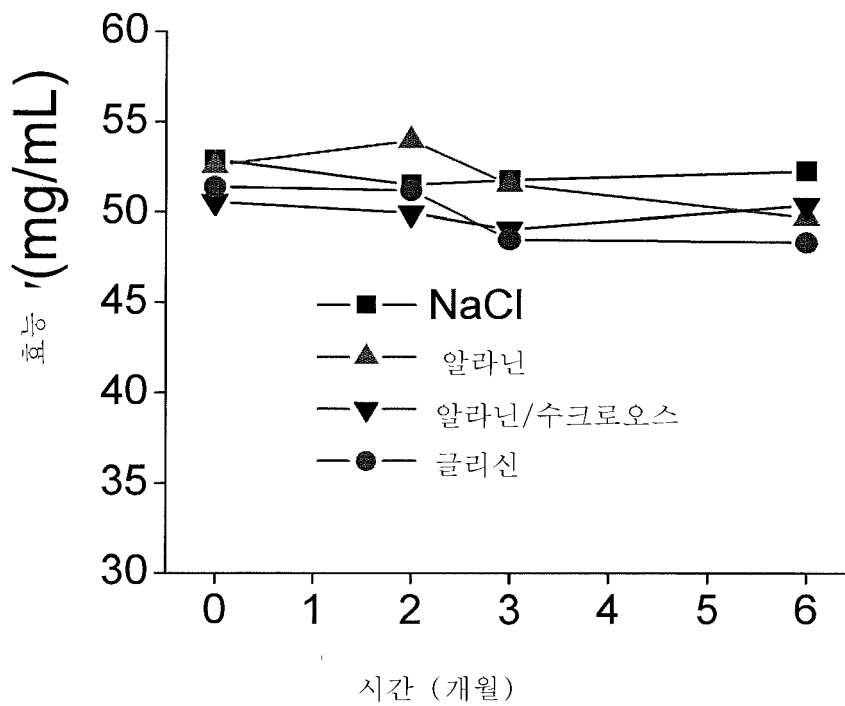
도면14



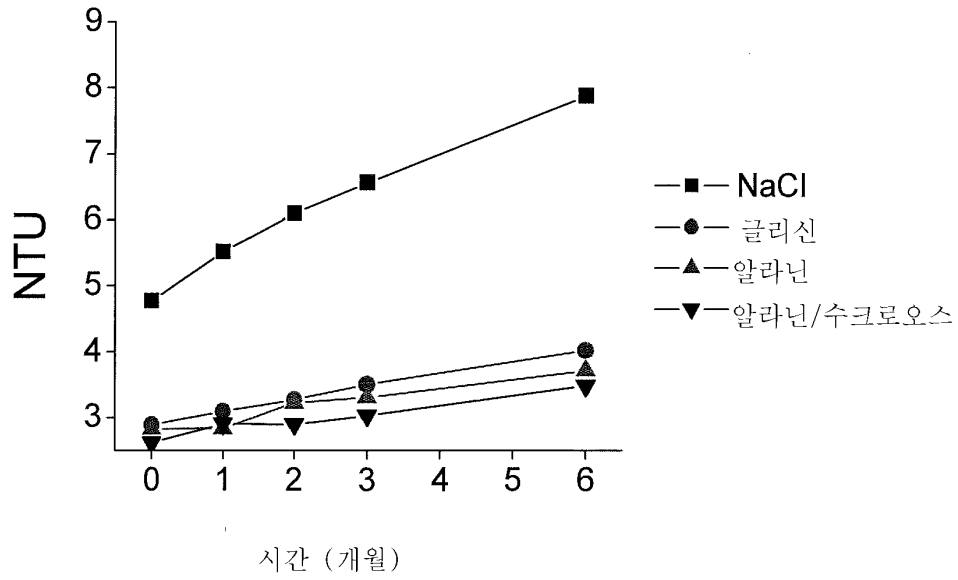
도면15



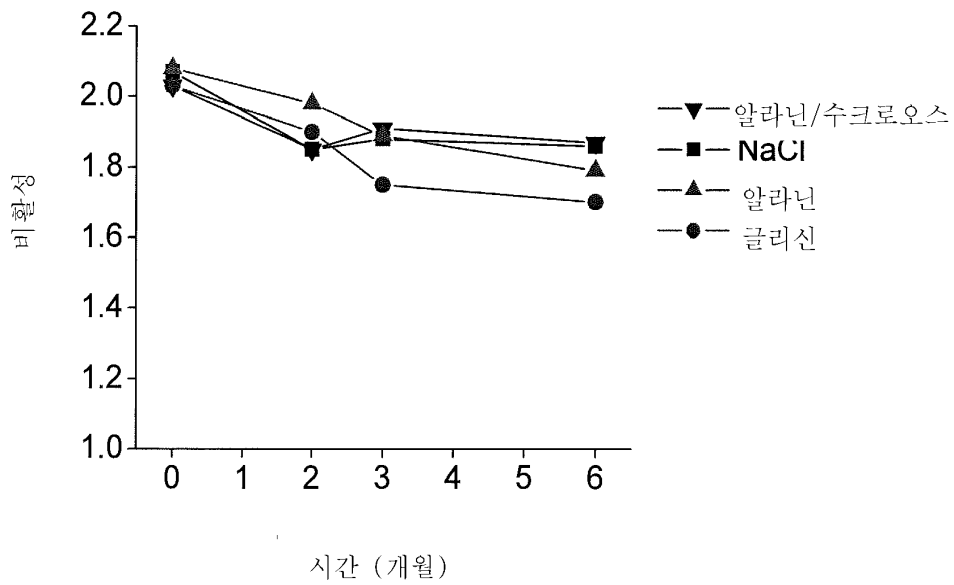
도면16



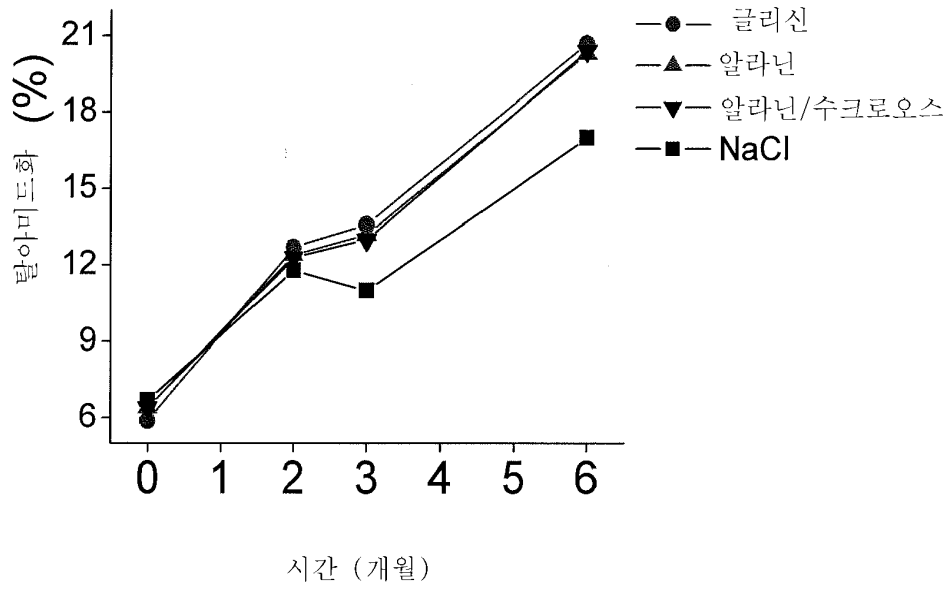
도면17



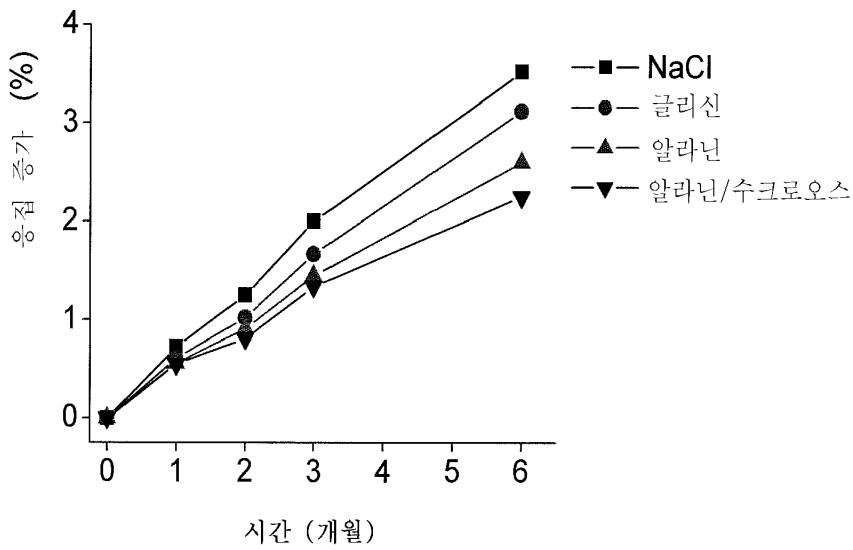
도면18



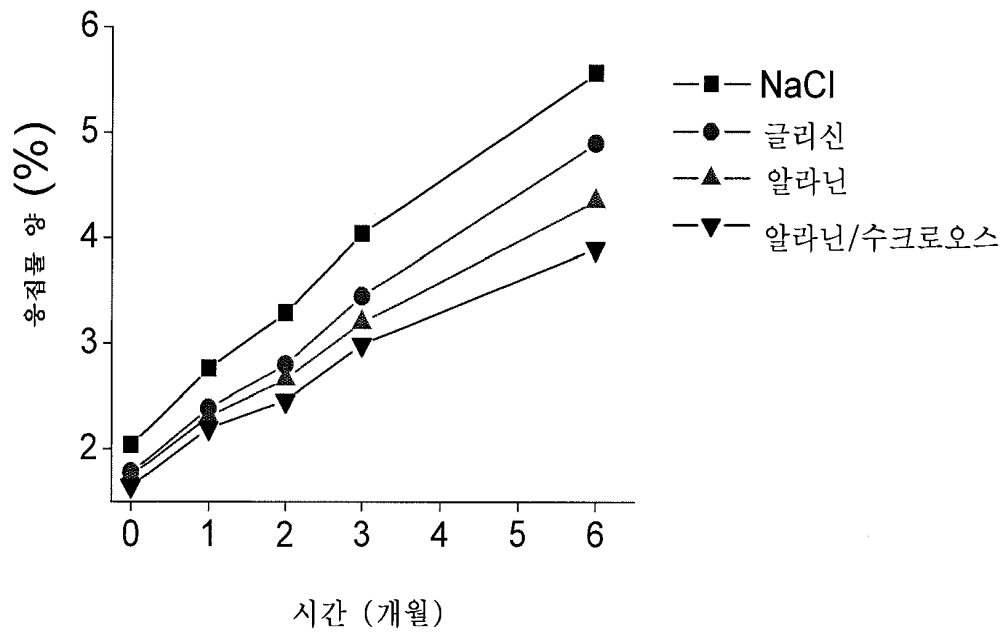
도면19



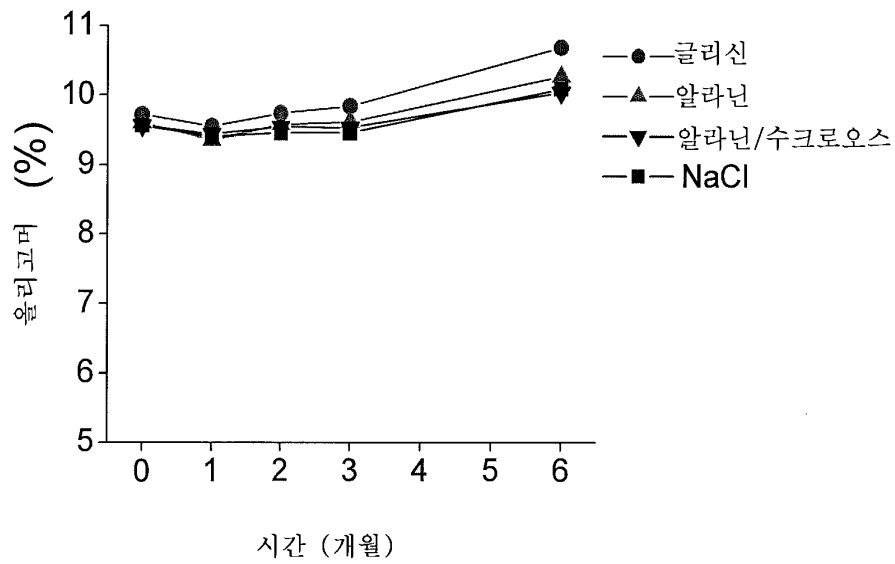
도면20



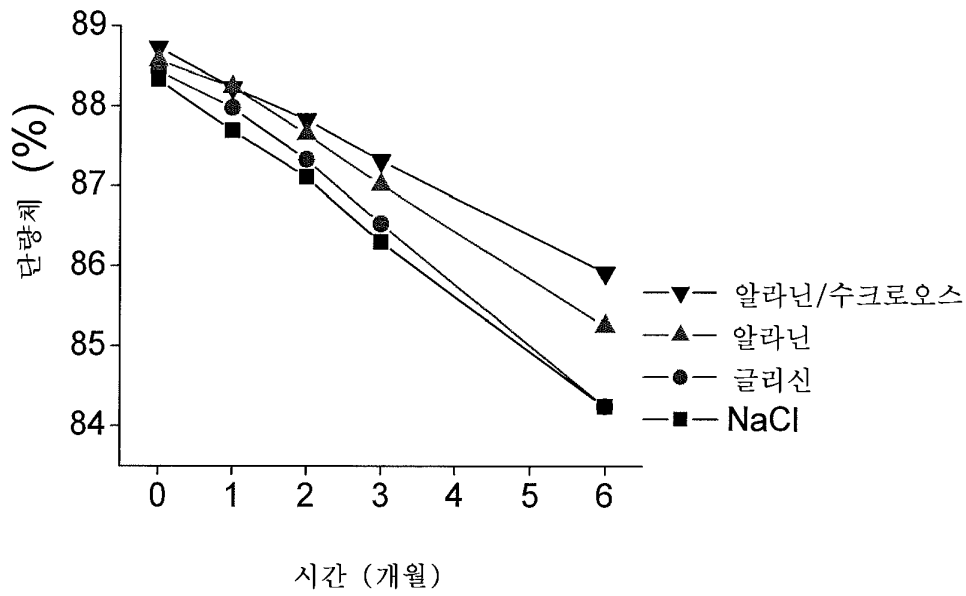
도면21



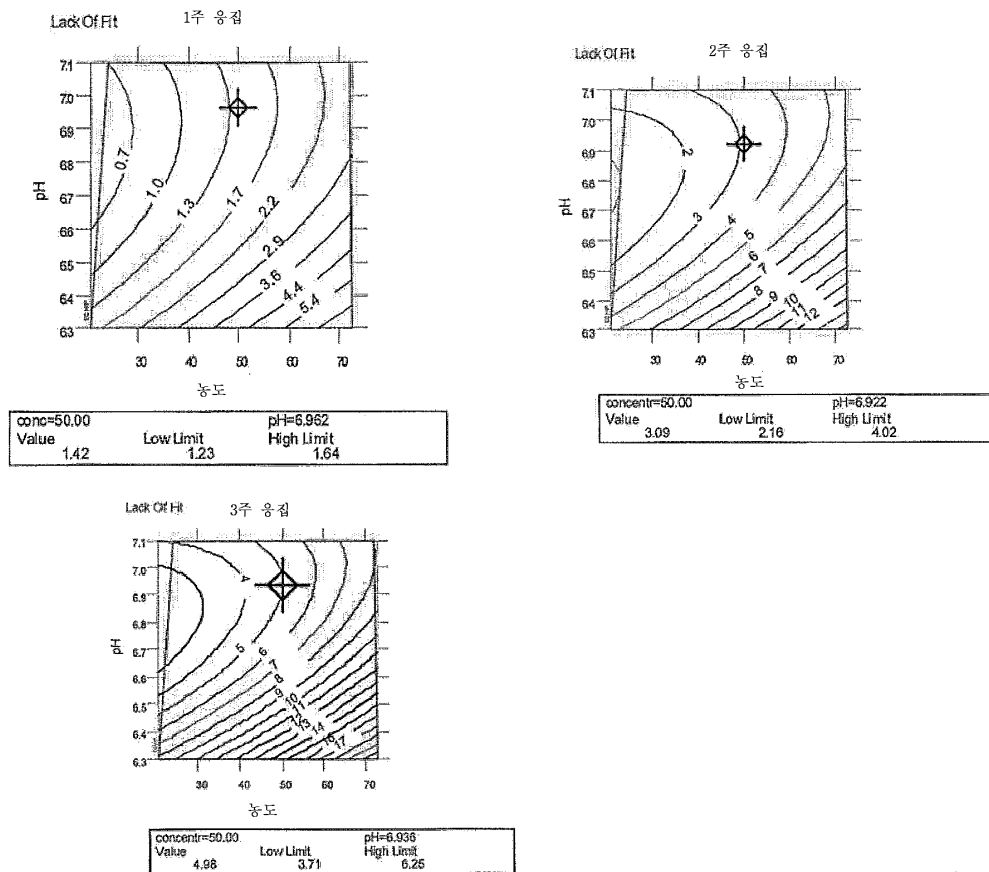
도면22



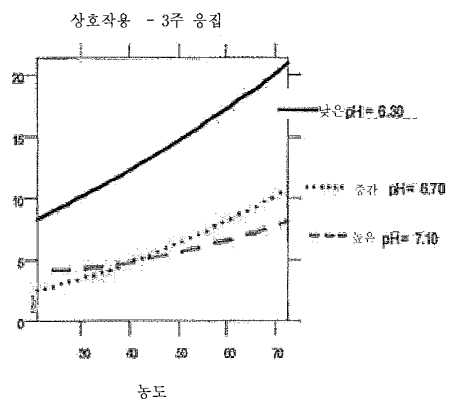
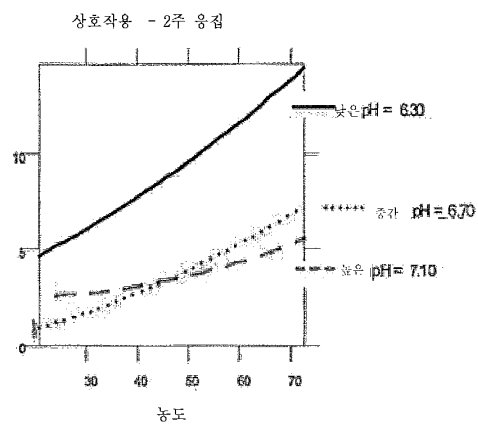
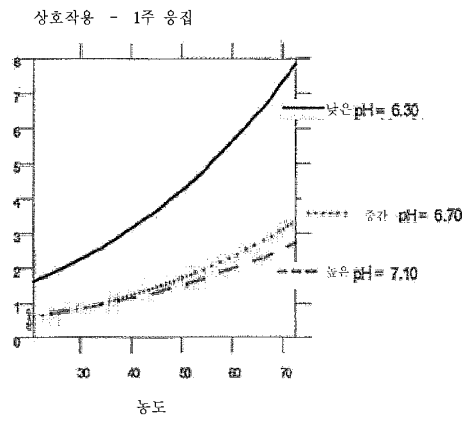
도면23



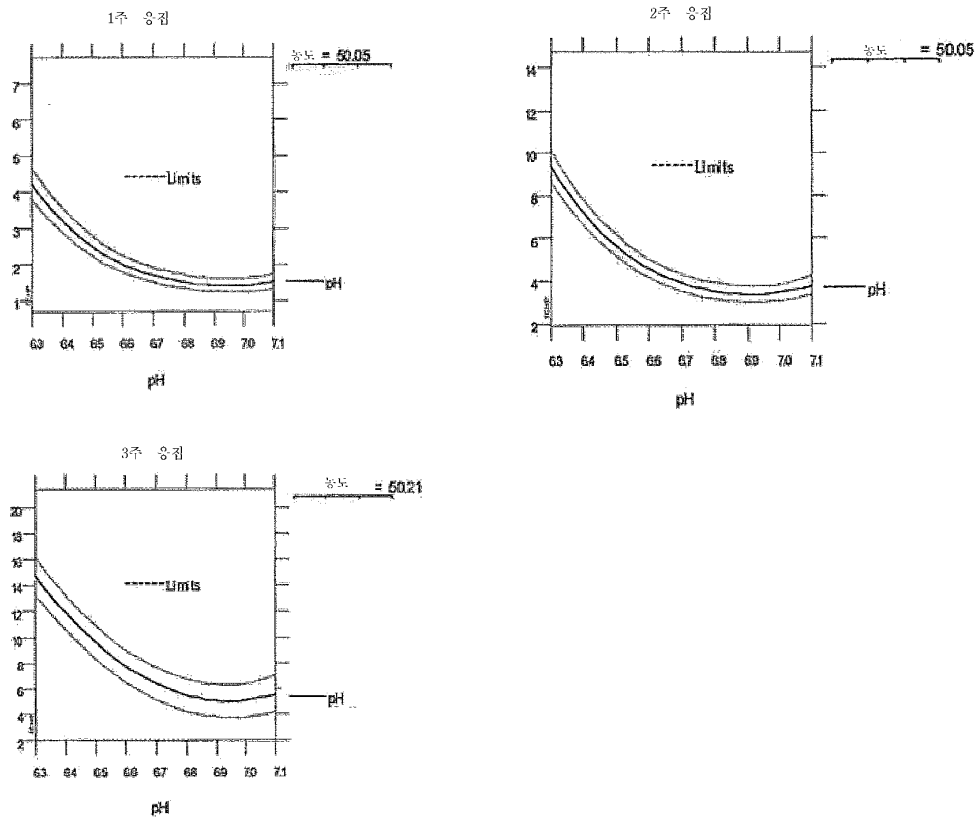
도면24



도면25



도면26



도면27

