



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년12월06일

(11) 등록번호 10-1337797

(24) 등록일자 2013년11월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/08 (2006.01) A61K 9/22 (2006.01)

A61K 38/27 (2006.01) A61K 47/36 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0067796

(22) 출원일자 2010년07월14일

심사청구일자 2011년09월23일

(65) 공개번호 10-2012-0007182

(43) 공개일자 2012년01월20일

(56) 선행기술조사문헌

KR100725315 B1*

US20060183197 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

한미사이언스 주식회사

경기도 화성시 동탄면 동탄기흥로 550

(72) 발명자

홍성희

경기도 수원시 영통구 영통로290번길 25, 506동
501호 (영통동, 신나무실주공아파트)

이병선

서울특별시 영등포구 도림로143길 32, 삼환아파트
101동 703호 (문래동4가)
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

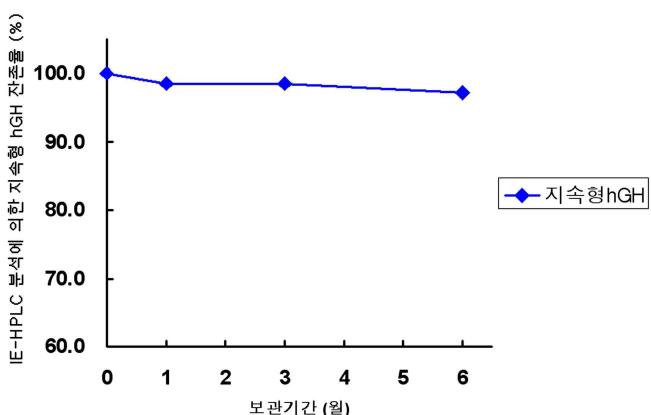
전체 청구항 수 : 총 20 항

심사관 : 정의준

(54) 발명의 명칭 지속형 인간 성장 호르몬 결합체 액상 제제

(57) 요약

본 발명은 유도체를 포함하는 인간 성장 호르몬 (human growth hormone, hGH)의 생체 내 지속성 및 안정성이 향상된 지속형 결합체가 장기간 안정하게 유지될 수 있는 액상 제제에 관한 것으로, 본 발명에 따른 액상 제제는 pH 5.0~6.0의 완충용액, 비이온성 계면 활성제, 당알코올 및 염화나트륨을 함유하는 안정화제를 포함하고, 인간 혈청 알부민 및 인체에 잠재적으로 유해한 인자를 포함하지 않아 바이러스 감염의 우려가 없이 우수한 저장 안정성을 나타낸다.

대 표 도 - 도1

(72) 발명자

임대성

경기도 용인시 기흥구 관곡로85번길 7-9, 302호 (구갈동)

이재민

서울특별시 송파구 삼전로10길 25-1, 303호 (삼전동)

배성민

경기도 성남시 분당구 정자동 112, 504동 801호 (정자동, 정든마을)

권세창

서울특별시 광진구 아차산로 552, 10동 1204호 (광장동, 극동아파트)

특허청구의 범위

청구항 1

인간 성장 호르몬(Human Growth Hormone, hGH)과 면역글로불린 Fc 영역이 결합된 야리학적 유효량의 지속형 인간 성장 호르몬(hGH) 결합체, 및 알부민-비함유 안정화제를 포함하며, 상기 안정화제는 pH5.0~6.0의 완충용액, 당알코올, 비이온성 계면활성제 및 염화나트륨을 함유하는 지속형 인간 성장 호르몬 결합체 액상 제제.

청구항 2

제1항에 있어서, 인간 성장 호르몬(hGH)은 천연형 hGH와 동일한 아미노산 서열을 갖는 지속형 인간 성장 호르몬 결합체 액상 제제.

청구항 3

제1항에 있어서, 인간 성장 호르몬(hGH)은 천연형 hGH의 아미노산이 치환, 제거 또는 삽입 등에 의해 변이된 hGH 유도체 또는 천연형 hGH와 유사한 활성을 나타내는 웨타이드 유사체인 지속형 인간 성장 호르몬 결합체 액상 제제.

청구항 4

제1항에 있어서, 면역글로불린 Fc 영역이 IgG, IgA, IgD, IgE 또는 IgM에서 유래된 Fc 영역인 지속형 인간 성장 호르몬 결합체 액상 제제.

청구항 5

제4항에 있어서, 면역글로불린 Fc 영역의 각각의 도메인이 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM로 이루어진 군에서 선택되는 면역글로불린에서 유래된 상이한 기원을 가진 도메인의 하이브리드인 지속형 인간 성장 호르몬 결합체 액상 제제.

청구항 6

제4항에 있어서, 면역글로불린 Fc 영역이 동일한 기원의 도메인으로 이루어진 단쇄 면역글로불린으로 구성된 이량체 또는 다량체인 지속형 인간 성장 호르몬 결합체 액상 제제.

청구항 7

제4항에 있어서, 면역글로불린 Fc 영역이 IgG4 Fc 영역인 지속형 인간 성장 호르몬 결합체 액상 제제.

청구항 8

제7항에 있어서, 면역글로불린 Fc 영역이 인간 비당쇄화 IgG4 Fc 영역인 지속형 인간 성장 호르몬 결합체 액상 제제.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 지속형 인간 성장 호르몬(hGH) 결합체는 인간 성장 호르몬과 면역글로불린 Fc 영역이 비웨타이드성 중합체에 의해 결합된 지속형 인간 성장 호르몬 결합체 액상 제제.

청구항 10

제9항에 있어서, 비웨타이드성 중합체가 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올, 폴리비닐 알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐 에틸에테르, PLA(폴리락트산, polylactic acid) 및 PLGA(폴리락틱-글리콜산, polylactic-glycolic acid)와 같은 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키تون류, 히아루론산 및 이들의 조합으로 구성된 지속형 인간 성장 호르몬 결합체 액상 제제.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 당알코올이 만니톨 및 소르비톨로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상인 지속형 인간 성장 호르몬 결합체 액상 제제.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 당알코올의 농도가 전체 용액 대비 1 내지 10%(w/v)인 지속형 인간 성장 호르몬 결합체 액상 제제.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 완충용액이 구연산 또는 인산 완충용액인 지속형 인간 성장 호르몬 결합체 액상 제제.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 완충용액의 pH 범위가 5.2 내지 6.0인 지속형 인간 성장 호르몬 결합체 액상 제제.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 염화나트륨의 농도가 5 내지 200mM인 지속형 인간 성장 호르몬 결합체 액상 제제.

청구항 16

삭제

청구항 17

제1항에 있어서, 상기 비이온성 계면활성제가 폴리솔베이트 80인 지속형 인간 성장 호르몬 결합체 액상 제제.

청구항 18

제1항에 있어서, 상기 비이온성 계면활성제의 농도가 전체 용액 대비 0.001 내지 0.05%(w/v)인 지속형 인간 성장 호르몬 결합체 액상 제제.

청구항 19

제1항에 있어서, 상기 안정화제가 당류, 다가알코올 및 아미노산으로 구성되는 군중에서 선택된 하나 또는 그 이상의 성분을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 지속형 인간 성장 호르몬 결합체 액상 제제.

청구항 20

제1항에 있어서, 상기 지속형 인간 성장 호르몬(hGH) 결합체는 인간 성장 호르몬과 면역글로불린 Fc 영역이 폴리에틸렌 글리콜에 의해 결합되고, 상기 안정화제가 pH 5.2 내지 6.0의 구연산 완충용액, 1 내지 10 %(w/v)의 만니톨, 0.001 내지 0.05%의 폴리솔베이트 80 및 5 내지 200 mM의 염화나트륨을 포함하는 지속형 인간 성장 호르몬 결합체 액상 제제.

청구항 21

a) 지속형 인간 성장 호르몬 결합체를 제조하는 단계; 및

b) a) 단계에서 제조된 지속형 인간 성장 호르몬 결합체를 pH 5.0~6.0의 완충용액, 당알코올, 비이온성 계면활성제 및 염화나트륨을 포함하는 안정화제와 혼합하는 단계를 포함하는 제1항 내지 제20항 중의 어느 한 항의 지속형 인간 성장 호르몬 결합체 액상 제제의 제조 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 유도체를 포함하는 인간 성장 호르몬과 면역글로불린 Fc 영역이 결합되어 천연형에 비해 생리활성 지속기간이 증가된 지속형 인간 성장 호르몬 결합체가 장기간 안정적으로 유지될 수 있는 알부민-비함유 안정화제를 포함하는 지속형 인간 성장 호르몬 결합체의 액상 제제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

인간 성장 호르몬(human growth hormone, hGH, 하기 "hGH"로 인용됨)은 뇌하수체 전엽에서 분비되는 당화되지 않은 펩타이드 호르몬으로서, 인체 여러 조직의 수용체에 결합하여 간접적으로 다른 성장 인자의 분비를 촉진하거나 직접 작용하여 인체 여러 부위의 성장을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 사람의 뇌하수체에서 추출한 성장 호르몬이 뇌하수체성 난장이증의 치료에 효과가 있음이 밝혀진 후, hGH의 수요가 폭발적으로 증가하였으나 사람의 뇌하수체로부터 hGH를 추출 정제하는 경우 그 양이 매우 제한적이며, 사망한 인간의 뇌하수체로부터 추출한 hGH를 투여 받은 어린이가 성장 호르몬 추출 시 오염된 바이러스에 의해 치명적인 신경계 질환인 크로이츠펠트-야콥병 (Creutsfeld-Jacobs Disease)에 의해 사망한 이후 미국 식품의약국 (FDA)에서는 사망한 사람의 뇌하수체로부터 추출 정제한 호르몬의 사용을 금지시켰다. (Roger, L., *Science* 234: 22, 1986). 현재, 유전자 재조합 기법으로 대장균에서 생합성된 hGH가 FDA로부터 허가를 받은 후, 재조합 hGH가 상업화되어 판매되고 있다.

[0003]

hGH와 같은 폴리펩타이드는 일반적으로 안정성이 낮아 쉽게 변성되고 혈액 내 단백질 가수분해효소에 의해 분해되어 신장이나 간을 통해 쉽게 제거되기 때문에, 약리성분으로 폴리펩타이드를 포함하는 단백질 의약품의 혈중 농도 및 역ガ를 유지하기 위해서는 단백질 약물을 환자에게 자주 투여할 필요가 있다. 그러나, 대부분 주사제 형태로 환자에게 투여되는 단백질 의약품의 경우, 활성 폴리펩타이드의 혈중 농도를 유지하기 위해 자주 주사를 놓는 것은 환자에게 고통을 야기하게 된다.

[0004]

이러한 문제점을 해결하기 위해, 단백질 약물의 혈중 안정성을 증가시키고 혈중 약물 농도를 오랫동안 높게 지속시켜 약효를 극대화하려는 노력이 계속되어 왔다. 이러한 단백질 약물의 지속성 제제는 단백질 약물의 안정성을 높이는 동시에 약물 자체의 역ガ가 충분히 높게 유지되어야 하고 환자에게 면역반응을 유발하지 않아야 한다.

[0005]

단백질을 안정화시키고 프로테아제 접촉 및 신장 손실을 억제하기 위한 방법으로, 종래에는 폴리에틸렌 글리콜 (polyethylene glycol, PEG)과 같이 용해도가 높은 고분자를 단백질 약물 표면에 화학적으로 부가시키는 방법이 사용되어 왔다. PEG는 목적 단백질의 특정 부위 또는 다양한 부위에 비특이적으로 결합하여 용해도를 높임으로써 단백질을 안정화시키고, 단백질의 가수분해를 방지하는 데에 효과가 있으며 특별한 부작용도 일으키지 않는 것으로 알려져 있다(Sada 등, *J. Fermentation Bioengineering*, 1991, 71:137-139). 그러나, PEG를 결합시키는 경우에 단백질의 안정성은 증가할 수 있지만 생리활성 단백질의 역ガ가 현저히 낮아지고, PEG의 분자량이 증가 할수록 단백질과의 반응성이 낮아져 수율이 감소하는 문제가 있다.

[0006]

생리활성 단백질의 생체 내 안정성을 높이는 또 다른 방법으로서, 유전자 재조합에 의해 혈중 안정성이 높은 단백질 유전자와 생리활성 단백질 유전자를 연결한 후, 상기 재조합 유전자로 형질전환된 동물세포 등을 배향하여 융합 단백질을 생산하는 방법이 개발되어 있다. 예를 들어, 단백질의 안정성 증가에 효과가 높은 것으로 알려져 있는 알부민 또는 그 단편을 유전자 재조합에 의해 목적하는 생리활성 단백질에 결합시켜 생산한 융합 단백질이 보고되어 있다 (국제공개공보 WO 93/15199 및 WO 93/15200, 유럽특허공개 EP 413,622).

[0007]

또한, 면역글로불린을 이용하는 방법으로서, 미국 특허 제5,045,312호는 교차결합체를 이용하여 인간 성장호르몬에 소 혈청 알부민(bovine serum albumin: BSA) 또는 쥐의 면역글로불린을 결합시킴으로써 변형되지 않은 성장호르몬에 비해 성장호르몬의 활성을 증가시킬 수 있음을 개시하고 있다. 그러나, 상기 특허에서는 교차결합체로서 카보디이미드(carbodiimide) 또는 글루타르알데히드(glutaraldehyde)와 같은 저분자량의 화학물질만을 개시하고 있을 뿐이다. 이러한 저분자량의 교차결합체를 사용할 경우 비특이적 결합으로 인해 균질한 조성물을 얻기 어려우며, 생체 내 독성을 갖는 문제가 있다. 또한 상기 특허에서는 성장호르몬의 화학적 커플링에 의해 그 활성을 증가시킬 수 있음을 보여줄 뿐이어서, 다양한 종류의 폴리펩타이드 약물에 대해서는 활성 증가의 효과가 나타날 것인지 조차 불명확하여, 지속시간 및 혈중 반감기 증가와 같은 단백질의 안정성과의 관련성에 대해서는 전혀 인식조차 못하고 있다.

[0008]

최근에 활성 감소 최소화와 안정성 증가를 동시에 이를 수 있는 지속성 단백질 약물 제제로, 면역글로불린 Fc 영역, 비펩타이드성 중합체 및 생리활성 폴리펩타이드를 결합시켜 제조한 결합체가 대한민국 등록특허 10-

0567902 (생체내 지속성이 증가된 생리활성 폴리펩타이드 결합체), 및 대한민국 등록특허 10-0725315 (면역글로불린단편을 이용한 단백질 결합체 및 그의 제조방법)에 개시되었다.

[0009] 상기의 방법으로 생리활성 폴리펩타이드로서 hGH를 적용시켜 지속형 hGH 결합체를 제조할 수 있는데, 지속형 hGH 결합체가 포함된 약물을 제품으로 공급하기 위해서는 저장 운송 과정에서 빛, 열, 또는 첨가제 내 불순물에 의해 유도된 열화에 의한 변성, 응집, 흡착 또는 가수분해 등의 물리화학적인 변화를 억제하면서 생체 내 효력을 유지시키는 것이 필수적이다. 지속형 hGH 결합체는 폴리펩타이드 상의 hGH에 비해 부피가 커지고, 분자량이 증가하여 폴리펩타이드 상의 hGH에 비해 안정화하는데 매우 어려움이 있다.

[0010] 일반적으로, 단백질은 그 반감기가 무척 짧으며 적당하지 않은 온도, 물-공기의 계면에의 노출, 고압, 물리적/기계적 스트레스, 유기용매, 미생물에 의한 오염 등에 노출 시, 단량체의 응집, 응집에 의한 침전 및 용기 표면에의 흡착 등의 변성 현상을 나타낸다. 변성된 단백질은 원래의 물리화학적 성질 및 생리활성 효과를 소실하게 되는데, 이러한 단백질의 변성 현상은 비가역적이기 때문에, 한번 변성된 단백질은 원래의 특성을 거의 회복할 수 없다.

[0011] 또한, 흡착된 단백질은 변성 과정에 의하여 쉽게 응집되며, 이렇게 응집된 변성 단백질은 인체에 투여 시, 인체 내에서 자연적으로 생산되는 단백질 자체에 대하여 항체 형성의 원인으로 작용하게 되므로, 단백질이 충분히 안정한 상태가 되도록 투여하여야 한다. 따라서, 용액 중의 단백질의 변성을 막기 위한 여러 가지 방법들이 연구되어 왔다(John Geigert, J.Parentral Sci. Tech., 43, No5, 220-224, 1989, David Wong, Pharm.Tech. october, 34-48, 1997, Wei Wang., Int.J.Pharm., 185, 129-188, 1999, Willem Norde, Adv.Colloid Interface Sci., 25, 267-340, 1986, Michelle et al., Int.J.Pharm. 120, 179-188, 1995).

[0012] 일부 단백질 약품은 동결 건조방법으로 안정성 문제를 해결하고 있으나, 동결 건조 제품은 사용할 때 다시 주사 용수에 녹여야 하는 불편이 있고, 동결 건조과정이 생산 공정에 포함되어 있어서, 대용량의 동결 건조기를 사용해야만 하는 등 대규모의 투자가 필요하다. 분무 건조기를 사용하여 단백질을 분말화하는 방법도 사용되고 있는데, 이 경우 낮은 수율로 인하여 경제성이 떨어지는 단점이 있고, 고온에 노출되기 때문에 단백질 자체의 안정성에 악영향을 미칠 수도 있다.

[0013] 이러한 한계를 해결하는 대안으로, 용액 상태인 단백질에 안정화제를 첨가하여 단백질 약물의 물리화학적 변화를 억제하면서, 장기간 저장을 하는 경우에도 단백질의 생체 내 효력을 유지시키는 연구를 수행하였다. 단백질의 일종인 인간 혈청 알부민은 여러 단백질 약물의 안정화제로서 꽤 넓게 사용되고 있으며 그 성능을 입증 받아 왔다(Edward Tarelli et al., Biologicals (1998) 26, 331-346).

[0014] 그러나, 인간 혈청 알부민은 정제 과정에서 미코플라스마, 프리온, 박테리아 및 바이러스 등의 생물학적 오염물에 대한 불활성 공정 또는 하나 이상의 생물학적 오염물 또는 병원체에 대한 생물학적 물질을 스크린 하거나 검사하는 방법들을 포함하고 있지만, 이들이 완전히 제거 또는 불활성 되지 않은 채 환자에게 노출될 위험이 존재한다. 예를 들어, 스크린 공정은 혈액 기증자로부터의 인간 혈액에서 특정 바이러스에 대한 검사를 포함하지만, 이러한 공정은 항상 신뢰할 수 있는 것은 아니며, 특히 매우 적은 수로 존재하는 특정 바이러스를 검출할 수 없다.

[0015] 상이한 단백질들은 그들의 화학적 차이점으로 인해, 저장 동안 상이한 비율 및 상이한 조건하에서 점진적으로 비활성화될 수 있다. 즉, 안정화를 위해 사용되는 물질에 의한 저장기간 연장 효과는 상이한 단백질에 대해서 동등하지 않으며, 이로 인해 저장 안정성을 부여하기 위해 사용되는 안정화제는 목적 단백질의 물리화학적 특성에 따라 적합한 비율, 농도 및 종류가 다양하다. 안정화제들을 병용할 경우 상호 간의 경쟁 작용 및 부작용으로 인하여 목적한 바와 다른 역효과를 가져올 수 있으며, 저장하는 동안 저장 단백질의 본질이 변화하거나 농도가 변화하기 때문에 상이한 효과를 나타낼 수 있다. 따라서, 용액중의 단백질을 안정화하기 위해서는 많은 노력과 주의가 필요하다.

[0016] 특히, 생체 내 지속성 및 안정성을 높인 지속형 hGH 결합체의 경우, 생리활성 펩타이드인 인간 성장 호르몬과 면역글로불린 Fc영역이 결합된 형태이므로 분자량 및 부피가 일반적인 인간 성장 호르몬과 확연하게 달라, 단백

질을 안정화하기 위한 특별한 조성이 요구된다.

[0017] 또한, 생리활성 펩타이드인 인간 성장 호르몬과 면역글로불린 Fc영역은 각각 물리 화학적 특성이 다른 펩타이드 또는 단백질이므로, 생리활성 펩타이드인 인간 성장 호르몬과 면역글로불린 Fc영역을 동시에 안정화하여야 한다. 상기 설명한 바와 같이, 상이한 펩타이드 또는 단백질들은 그들의 물리 화학적 차이점으로 인해, 저장 동안 상이한 비율 및 상이한 조건하에서 점진적으로 비활성화될 수 있고, 각각의 펩타이드 또는 단백질에 적합한 안정화제들을 병용하는 경우 상호 간의 경쟁 작용 및 부작용으로 인하여 목적한 바와 다른 역효과를 가져올 수 있다. 따라서, 지속형 hGH 결합체의 경우 생리활성 펩타이드인 인간 성장 호르몬과 면역글로불린 Fc영역을 동시에 안정화하는 안정화제의 조성을 찾는 것에 많은 어려움이 있다.

[0018] 본 발명에서는 생리활성 펩타이드인 인간 성장 호르몬과 면역글로불린 Fc영역이 결합된 지속형 hGH 결합체를 바이러스 오염의 우려 없이 장기간 동안 보관할 수 있는 지속형 hGH 결합체의 안정한 액상 제제를 제공하기 위하여 pH 5.0~6.0의 완충용액, 당알코올, 염 및 비이온성 계면활성제를 포함하는 안정화제를 이용하여 지속형 hGH 결합체의 안정성을 증대시킴으로써, 경제적이고 안정한 액상 제형을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0019] 본 발명의 목적은 지속형 인간 성장 호르몬(hGH) 결합체, pH 5.0~6.0의 완충용액, 당알코올, 염 및 비이온성 계면활성제를 함유하는 안정화제를 포함하는 저장 안정성이 증대된 지속형 인간 성장 호르몬 결합체의 액상 제제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0020] 하나님의 양태로서, 본 발명은 약리학적 유효량의 지속형 인간 성장 호르몬(hGH) 결합체, pH 5.0~6.0의 완충용액, 당알코올, 염 및 비이온성 계면활성제를 함유하는 알부민-비함유 안정화제를 포함하는 안정한 지속형 인간 성장 호르몬 결합체 액상 제제를 제공한다.

[0021] 본 발명에서 사용된 "지속형 hGH 결합체"는 생리활성 펩타이드인 인간 성장 호르몬과 면역글로불린 Fc 영역이 연결된 형태의 단백질로서, 천연형 hGH에 비해 생리활성 지속기간이 증가된 특징을 가진다.

[0022] 본 발명의 용어 "지속형"이란 생리활성 지속기간이 천연형에 비해 증대된 것을 의미하는 것이며, "결합체"란 인간 성장 호르몬과 면역글로불린 Fc 영역이 결합된 형태를 의미한다.

[0023] 본 발명에서 유용한 hGH는 인간 성장 호르몬, 또는 그의 밀접하게 관련된 유사체의 서열을 갖는다. hGH는 천연 또는 재조합 기원 중 어떠한 방법으로 제조된 것이나 모두 가능하며, 바람직하게는 대장균을 숙주 세포로 이용하여 제조한 재조합 인간 성장 호르몬(hGH)이며, 생물학적 활성에 크게 영향을 미치지 않는 범위에서 아미노산의 치환, 제거, 삽입에 의한 유도체도 가능하다.

[0024] 또한, 본 발명에서 유용한 면역글로불린 Fc는 인간 면역글로불린 Fc, 그의 밀접하게 관련된 유사체의 서열을 갖는 것, 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트, 기니아 핵 등의 동물기원일 수 있다. 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 유래 또는 이들의 조합(combination) 또는 이들의 혼성 (hybrid)에 의한 Fc 영역일 수 있다. 바람직하게는 인간 혈액에 가장 풍부한 IgG 또는 IgM 유래이며 가장 바람직하게는 리간드 결합 단백질의 반감기를 향상시키는 것으로 공지된 IgG 유래이다. 면역글로불린 Fc는 천연 IgG를 특정 단백질 분해 효소로 처리하여 제조할 수 있으며, 재조합 기술을 이용하여 형질 전환된 세포로부터도 제조할 수 있다. 바람직하게는 *E.coli*에서 제조한 재조합 인간 면역글로불린 Fc이다.

- [0025] 한편, IgG 역시 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 서브클래스로 나눌 수 있고 본 발명에서는 이들의 조합 또는 이들의 혼성화도 가능하다. 바람직하게는 IgG2 및 IgG4 서브클래스이며, 가장 바람직하게는 보체 의존적 독성(CDC, Complement-dependent cytotoxicity)과 같은 이팩터 기능(effector function)이 거의 없는 IgG4의 Fc 영역이다. 즉, 가장 바람직한 본 발명의 약물의 캐리어 용 면역글로불린 Fc 영역은, 인간 IgG4 유래의 비-당쇄화된 Fc 영역이다. 인간 유래의 Fc 영역은 인간 생체에서 항원으로 작용하여 이에 대한 새로운 항체를 생성하는 등의 바람직하지 않은 면역 반응을 일으킬 수 있는 비-인간 유래의 Fc 영역에 비하여 바람직하다.
- [0026] 본 발명에서 사용되는 지속형 hGH 결합체는 상기된 방법으로 제조한 hGH와 면역글로불린 Fc 영역을 결합시켜 제조한다. 이 때 이용되는 결합 방법으로, hGH와 면역글로불린 Fc 영역을 비펩타이드성 중합체를 이용하여 교차 결합시키거나, 재조합기술을 이용하여 hGH와 면역글로불린 Fc 영역이 연결된 형태의 융합 단백질로 제조할 수 있으나, hGH와 면역글로불린 Fc 영역을 비펩타이드성 중합체를 이용하여 결합시킨 것이 바람직하다.
- [0027] 교차 결합 시 사용되는 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올, 폴리비닐 알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐 에틸 에테르, PLA(폴리락트산, polylactic acid) 및 PLGA(폴리락틱-글리콜산, polylactic-glycolic acid)와 같은 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으며, 바람직하게는 폴리에틸렌 글리콜이다. 당해 분야에 이미 알려진 이들의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0028] 본 발명에서 사용되는 지속형 hGH 결합체의 제조를 위해 대한민국 등록특허 제0725315호 등이 참고문헌으로서 본 발명에 해당된다. 당업자들은 상기의 문헌들에 의해 본 발명에 사용되는 지속형 hGH 결합체를 제조할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 지속형 hGH 결합체 액상 제제는 치료학적 유효량의 지속형 hGH 결합체를 포함한다. 일반적으로, hGH의 치료학적 유효량은 1회용 바이알 (single-use vial) 내에 약 1 ~ 3 mg 정도가 함유된 양이다. 본 발명에서 사용되는 지속형 hGH 결합체의 농도는 1 mg/mL 내지 55 mg/mL이고, 바람직하게는 15 mg/mL 내지 25 mg/mL이다.
- [0030] 본 발명의 용어 "안정화제"는 지속형 hGH 결합체가 안정하게 저장될 수 있도록 하는 물질을 의미한다. '안정화'는 일정한 시간 동안 특정 저장 조건 하에서 활성 성분의 손실이 특정량 미만, 일반적으로 10% 미만, 바람직하게는 5% 미만임을 의미한다. 보통, $10\pm3^{\circ}\text{C}$ 에서 2년, $25\pm2^{\circ}\text{C}$ 에서 6개월 또는 $40\pm2^{\circ}\text{C}$ 에서 1 내지 2주 동안 지속형 hGH 결합체가 90% 이상, 더욱 바람직하게는 약 92-95% 정도의 잔존율을 유지하는 경우 이러한 제제는 안정한 것으로 이해된다. 지속형 hGH 결합체와 같은 단백질에 있어서, 저장 안정성은 정확한 투여량을 보장하기 위해서 뿐만 아니라, 지속형 hGH 결합체에 대한 항원성 형태 물질의 잠재적인 생성을 억제하기 위해서 중요하다.
- 본 발명의 지속형 hGH 결합체에서 생리활성 펩타이드인 인간 성장 호르몬과 면역글로불린 Fc영역은 각각 물리화학적 특성이 다른 펩타이드 또는 단백질이므로, 생리활성 펩타이드인 인간 성장 호르몬과 면역글로불린 Fc영역을 동시에 안정화하여야 한다. 상이한 펩타이드 또는 단백질들은 그들의 물리화학적 차이점으로 인해, 저장 동안 상이한 비율 및 상이한 조건하에서 점진적으로 비활성화될 수 있고, 각각의 펩타이드 또는 단백질에 적합한 안정화제들을 병용하는 경우 상호 간의 경쟁 작용 및 부작용으로 인하여 목적한 바와 다른 역효과를 가져올 수 있다.
- [0031] 본 발명의 상기 안정화제는 생리활성 펩타이드인 인간 성장 호르몬과 면역글로불린 Fc영역을 동시에 안정화하여 지속형 hGH 결합체에 안정성을 부여하기 위해 완충용액, 당알코올, 염 및 비이온성 계면활성제를 함유하는 것이

바람직하다.

[0032]

[0033]

완충용액은 지속형 hGH 결합체가 안정해지도록 용액 제형의 pH가 급격히 변화하지 않게 용액의 pH를 유지시키는 역할을 한다. 완충용액은 알칼리 염(나트륨 또는 칼륨 포스페이트 또는 이들의 수소 또는 이수소 염), 나트륨 시트레이트/시트르산, 나트륨 아세테이트/아세트산을 비롯하여 당업계에 공지된 임의의 다른 제약 상 허용 가능한 pH 완충제를 포함할 수 있으며, 이들 완충제의 혼합물도 사용될 수 있다. 그러한 완충용액의 바람직한 예로는 구연산 완충용액(Citrate buffer), 인산 완충용액(Phosphate buffer) 등을 들 수 있으며, 그 중에서도 구연산 완충용액이 특히 바람직하다. 구연산 완충용액을 구성하는 구연산염의 농도는 바람직하게는 5 mM 내지 100 mM이고, 더욱 바람직하게는 10 mM 내지 50mM이다.

완충용액의 pH는 지속형 hGH 결합체의 안정성에 영향을 미치므로 중요하다. 본 발명의 안정화제는 pH 5.0 내지 6.0, 바람직하게는 pH 5.2 내지 6.0, 더욱 바람직하게는 pH 5.2~5.5의 완충용액을 포함한다.

[0034]

당 알코올은 지속형 hGH 결합체의 안정성을 증대시키는 역할을 하는데, 본 발명에 사용되는 당 알코올의 농도는 바람직하게는 전체 용액 대비 1 내지 10%(w/v), 더욱 바람직하게는 5%(w/v)이다. 당알코올로서, 만니톨 및 소르비톨로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한 표 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 만니톨에 0.5% L-Arg-HCl을 첨가하는 것은 지속형 hGH 결합체의 안정성에 영향을 주지 않았다.

[0035]

염은 지속형 hGH 결합체를 용액 상에서 체내에 투여할 때에 삼투압을 적절하게 유지하는 역할을 하며, 지속형 hGH 결합체를 용액 상에서 더욱 안정화시키는 효과도 나타낸다. 그러한 염의 대표적인 예로는 수용성 무기염을 들 수 있으며, 바람직한 예로는, 염화나트륨을 들 수 있다.

[0036]

[0037]

염의 농도는 바람직하게 5 내지 200 mM, 더욱 바람직하게는 150 mM이며, 제형에 포함된 성분들의 종류 및 양 등에 따라 각각의 혼합물이 모두 포함된 용액 제형이 등장액이 되도록 적절한 함량으로 조절될 수 있다.

본 발명의 구체적인 실시예에서, 안정화제로서 pH 5.0~6.0 완충용액, 당알코올, 비이온성 계면활성제를 함유하는 제형에 염의 유무에 따른 지속형 hGH 결합체의 안정성을 평가한 결과, 지속형 hGH 결합체 액상 제제를 25°C, 4주간 보관하였을 때, 5% 만니톨을 함유하는 제형에서 염화나트륨, 특히 150 mM NaCl이 존재할 때 염화나트륨이 포함되지 않은 대조군에 비해 지속형 hGH 결합체의 안정성이 현저히 높게 유지되는 것으로 나타났다(표 2). 상기 결과로부터, 본 발명에 따른 지속형 hGH 결합체는 1 내지 10%(w/v)의 당알코올 및 5 내지 200 mM의 염화나트륨을 포함하는 제형에서 안정화될 수 있으며, pH 5.0~6.0 완충용액, 당알코올, 비이온성 계면활성제 및 염을 포함하는 경우 더 큰 안정성을 나타내는 것을 알 수 있다.

[0038]

비이온 계면활성제는 단백질 용액의 표면장력을 낮추어 소수성 표면에 단백질이 흡착하거나 응집되는 것을 방지하여 준다. 본 발명에 사용될 수 있는 비이온 계면활성제의 바람직한 예로는 폴리솔베이트계 비이온 계면활성제 및 폴록사미계 비이온 계면활성제 등을 들 수 있고, 이들의 하나 또는 둘 이상의 조합 형태로 사용될 수 있으며, 그 중에서도 폴리솔베이트계 비이온 계면활성제가 더욱 바람직하다. 폴리솔베이트계 비이온 계면활성제의 예로는 폴리솔베이트 20, 폴리솔베이트 40, 폴리솔베이트 60 및 폴리솔베이트 80 등이 있으며, 그 중에서도 폴리솔베이트 80이 바람직하다.

본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, 동일한 조건 하에서 폴리솔베이트 80이 포함될 때 지속형 hGH 결합체의 안정성이 증가함을 확인할 수 있다(표 8). 폴리솔베이트 20의 경우 25°C에서 2주까지는 안정성에 차이가 없이 진행되었으나, 4주까지 장기간 보관 시 매우 유사한 물질임에도 지속형 hGH 결합체의 안정성에 차이가 발생함이 확인되었다.

[0039]

본 발명의 용액 제형에는 상기 비이온 계면활성제가 바람직하게는 0.1%(w/v) 이하의 저농도, 더욱 바람직하게는

0.001 내지 0.05%(w/v), 더욱 더 바람직하게는 0.005%(w/v)로 포함된다. 시판 중인 hGH 액상 약물인 노르디스크(Nordisk)사의 노디트로핀은 계면활성제로서 3 mg/mL Poloxamer 188를 사용하나(표 9), 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, 3 mg/mL의 폴록사머 188이 포함된 제형에서는 25°C에서 2주 후 지속형 hGH 결합체의 응집이 형성되었다(표 8).

[0040] 본 발명의 일 실시예에 따르면, pH 5.2의 완충용액, 1 내지 10%(w/v)의 당알코올, 비이온성 계면활성제, 5 내지 200 mM의 염화나트륨을 포함시키는 경우 지속형 hGH 결합체의 저장 안정성을 현저히 증가시키는 결과가 나타났다. 이는 pH 5.2의 완충용액, 당알코올 및 비이온성 계면활성제와 염의 동시 사용이 시너지 효과를 나타내어 지속형 hGH 결합체에 특별한 안정성을 부여한다는 것을 의미한다.

[0041] 본 발명의 상기 안정화제는 알부민을 함유하지 않는 것이 바람직하다. 단백질의 안정화제로 이용될 수 있는 인간 혈청 알부민은 인체의 혈액으로부터 제조되므로, 인간 유래의 병원성 바이러스에 의한 오염 가능성이 존재하며, 젤라틴이나 소 혈청 알부민은 질환을 야기하거나, 또는 일부 환자의 경우에는 알러지 반응을 유발할 가능성이 있다. 본 발명의 알부민-비함유 안정화제는 인간 또는 동물 유래의 혈청 알부민 또는 정제된 젤라틴 등의 이종 단백질을 함유하지 않아 바이러스 감염의 우려가 없다.

[0042] 본 발명의 액상 제제에는 상기 설명한 pH 5.0~6.0의 완충용액, 염, 당 알코올, 및 비이온 계면활성제 이외에, 본 발명의 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 당업계에 공지되어 있는 기타의 성분 내지 물질들이 선택적으로 더 포함될 수도 있다. 구체적으로 본 발명의 상기 안정화제는 당류, 다가 알코올 또는 중성 아미노산을 추가로 포함할 수 있다.

[0043] 지속형 hGH 결합체의 저장 안정성을 증대시키기 위해 추가로 포함될 수 있는 당류 및 다가 알코올 중 당류의 바람직한 예로는 만노오스, 글루코오스, 푸코오스 및 크실로오스 등의 단당류와 락토오스, 말토오스, 수크로오스, 라피노오스 및 텍스트란 등의 다당류 등을 들 수 있고, 다가 알코올의 바람직한 예로는, 프로필렌글리콜 및 저분자량의 폴리에틸렌글리콜, 글리세롤, 저분자량의 폴리프로필렌글리콜 등을 들 수 있으며, 이들의 하나 또는 둘 이상의 조합 형태로 사용될 수 있다.

본 발명은 바람직한 일례로서 20 mM 구연산나트륨(Na-Citrate) 완충용액(pH 5.2 내지 6.0)과 5 내지 200 mM 염화나트륨, 1 내지 10 %(w/v) 만니톨, 그리고 0.001 내지 0.05% 폴리솔베이트 80으로 이루어진 액상 제제용 조성물을 제공한다. 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, pH 5.2의 구연산나트륨(Na-Citrate) 완충용액, 5 %(w/v)의 만니톨, 150 mM의 염화나트륨, 및 0.005%의 폴리소르베이트 80을 함유하는 지속형 hGH 결합체의 액상 제제의 저장 안정성을 시판 중인 hGH 액상 약물인 노르디크사의 노디트로핀과 비교하였다. 그 결과, 본 발명의 지속형 hGH 결합체의 액상 제제의 저장 안정성은 노디트로핀보다 동등 이상으로 안정함을 확인하였다(표 10 참고). 본 발명의 다른 실시예에 따르면, pH 5.2의 구연산 완충용액과 만니톨, 염화나트륨 및 폴리소르베이트 80으로 이루어진 본 발명의 지속형 hGH 결합체 액상제제의 장기 보존 안정성 시험 결과, 최종 액상 제제에서 6개월 동안 지속형 hGH 결합체의 우수한 안정성을 확인하였다.(표 11).

[0044] 삭제

[0045] 지속형 인간 성장 호르몬 결합체에 안정성을 제공하는 본 발명에 따른 알부민-비함유 지속형 인간 성장 호르몬 결합체 액상 제제는 바이러스 감염의 우려가 없을 뿐만 아니라, 간단한 제형으로 우수한 저장 안정성을 나타내어 다른 안정화제나 동결 건조 제제에 비해 경제적인 제공이 가능한 제제이다.

[0046] 또한, 본 발명의 액상 제제는 천연형에 비해 생리활성 지속기간이 증대된 지속형 인간 성장 호르몬 결합체를 포함하고 있으므로, 통상적인 인간 성장 호르몬 제제에 비해 인체 내에서 단백질 활성을 장기간 유지할 수 있어

효율적인 약물 제제로 이용할 수 있다.

발명의 효과

[0047] 본 발명에 따른 지속형 인간 성장 호르몬 결합체의 액상 제제는 pH 5.0~6.0 의 완충용액, 당알코올, 염 및 비이온성 계면활성제를 함유하는 안정화제를 포함하고 인간 혈청 알부민 및 인체에 잠재적으로 유해한 인자를 포함하지 않아, 바이러스 감염의 우려가 없고, hGH 폴리펩티드와 면역글로불린 Fc 영역의 결합으로 이루어져 천연형에 비해 분자량이 크고 생리활성 지속기간이 증대된 지속형 hGH 결합체에 대해 우수한 저장 안정성을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0048] 도 1은 실시예 6을 통해 최종 선택된 pH 5.2의 지속형 hGH 결합체 액상제제의 4°C 장기보존 안정성 시험을 통해 6개월간 지속형 hGH 결합체를 보관하면서 시료의 안정성을 IE-HPLC를 통해 분석한 그래프이며, 지속형 hGH 결합체가 본 액상제형을 통해 4°C에서 6개월간 안정성을 유지하고 있음을 알 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 본 발명을 좀 더 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[실시예 1] 염의 유무에 따른 지속형 hGH 결합체의 안정성 평가

[0051] 본 발명에서 안정화제로서 완충용액, 당알코올, 비이온성 계면활성제를 함유하는 제형에 염의 유무에 따라 지속형 hGH 결합체의 안정성을 확인하기 위해 하기의 표 1과 같은 조성으로 25°C에서 4주 동안 보관 후 이온교환 크로마토그래피법(Ion Exchange Chromatography, IEC)과 크기 배제 크로마토그래피법(Size Exclusion Chromatography, SEC)을 이용해 분석하였다. 완충용액으로는 구연산 완충용액, 당알코올로는 만니톨, 비이온성 계면활성제로는 폴리솔베이트 80을 사용하였다. 표 2의 IE-HPLC(%)와 SE-HPLC(%)는 (Area %/Start Area %)로서, 초기 결과 값에 대비한 지속형 hGH 결합체의 잔존율을 나타낸다.

표 1

번호	농도	완충용액	등장화제	당알코올	계면 활성제
1	19.5 mg/mL	20 mM Na-Citrate (pH 5.2)	150 mM NaCl	5% Mannitol	0.005% Polysorbate 80
2	19.5 mg/mL	20 mM Na-Citrate (pH 5.2)	-	5% Mannitol	0.005% Polysorbate 80

표 2

번호	IE-HPLC (%)				SE-HPLC (%)			
	Start	1 week	2week	4week	Start	1 week	2week	4week
1	100	94.5	92.5	85.0	100	98.5	98.4	93.9
2	100	94.7	90.7	80.9	100	98.9	98.1	93.6

[0054] 상기 결과에서 보듯이, 지속형 hGH 결합체 액상 제제를 25°C, 4주간 보관하였을 때, 5% 만니톨의 존재 하에서 염화나트륨, 특히 150 mM NaCl이 존재할 때 지속형 hGH 결합체의 안정성이 현저히 높게 유지되는 것으로 나타났다.

[실시예 2] 당알코올에 따른 지속형 hGH 결합체의 안정성 평가

[0056] 본 발명에 따른 안정화제로서 완충용액, 등장화제로서의 염화나트륨, 비이온성 계면활성제를 함유하는 제형에 당알코올의 종류가 지속형 hGH 결합체의 안정성에 미치는 영향을 실험하였다.

[0057] 완충용액은 구연산(나트륨-사이트레이트) 완충제를 이용하였으며(pH 5.2), 당 알코올로서 만니톨과 소르비톨, 비이온성 계면 활성제로서 폴리소르베이트 80을 이용하였다.

[0058] 하기의 표 3과 같은 조성을 각각 지속형 hGH 결합체의 안정화제로 사용하여 25°C에서 4주 동안 장기간 보관 후

이온 교환 크로마토그래피법 (Ion exchange chromatography, IEC) 및 크기 배제 크로마토그래피법 (Size exclusion chromatography, SEC)을 이용해 분석하였다. 표 4의 IE-HPLC(%)는 (Area% / Start Area%) %로서 초기 결과값에 대비한 지속형 hGH 결합체의 잔존율을 나타낸다.

표 3

[0059]	번호	농도	완충용액	등장화제	당알코올	계면 활성제
1	19.5 mg/mL	20 mM Na-Citrate (pH 5.2)	150 mM NaCl	5% Mannitol	0.005% Polysorbate 80	
2	19.5 mg/mL	20 mM Na-Citrate (pH 5.2)	150 mM NaCl	5% Sorbitol	0.005% Polysorbate 80	
3	19.5 mg/mL	20 mM Na-Citrate (pH 5.2)	150 mM NaCl	5% Mannitol 0.5% Arg-HCl	0.005% Polysorbate 80	

표 4

[0060]	번호	IE-HPLC (%)				SE-HPLC (%)			
		Start	1 week	2week	4week	Start	1 week	2week	4week
1	100	98.8	97.6	94.7	100	96.0	100	99.9	
2	100	98.6	97.4	94.6	100	100	99.9	99.9	
3	100	98.8	97.8	94.6	100	99.6	99.4	99.3	

[0061] 상기 결과에서 보듯이, 당알코올로서 만니톨의 첨가는 소르비톨의 첨가 시와 유사한 안정성을 나타냈다. 또한 만니톨에 0.5% L-Arg-HCl을 첨가하는 것은 지속형 hGH 결합체의 안정성에 영향을 주지 않았다.

[실시예 3] 완충용액의 pH에 따른 지속형 hGH 결합체의 안정성 평가

[0063] 다양한 pH의 완충용액에서 지속형 hGH 결합체의 안정성을 비교하였다. 하기의 표 5과 같은 조성을 각각 지속형 hGH 결합체의 완충용액으로 사용하여 4°C에서 3개월간 보관 후 IEC를 이용해 안정성 평가를 하였다. 표 6의 IE-HPLC(%)는 (Area% / Start Area%) %로서 초기 결과값에 대비한 지속형 hGH 결합체의 주피크 잔존율을 나타낸다.

표 5

[0064]	번호	농도	완충용액	등장화제	당알코올	계면 활성제
1	19.5 mg/mL	20 mM Na-Citrate (pH 5.2)	150 mM NaCl	5% Mannitol	0.005% Polysorbate 80	
2	19.5 mg/mL	20 mM Na-Citrate (pH 5.5)	150 mM NaCl	5% Mannitol	0.005% Polysorbate 80	
3	19.5 mg/mL	20 mM Na-Citrate (pH 6.0)	150 mM NaCl	5% Mannitol	0.005% Polysorbate 80	

표 6

[0065]	번호	보관 기간	IE-HPLC (%)	
			주 피크의 잔존율	
1	0M	100		
		96.9		
		96.0		
2	0M	100		
		97.3		
		95.8		
3	0M	100		
		97.5		
		95.9		

[0066] 상기 결과의 3개월 시점에서 분석 시 pH 5.2 일 때와 pH 5.5, pH 6.0일 때는 유사한 지속형 hGH 결합체의 안정성을 나타냈다.

[0067] [실시예 4] 비이온성 계면활성제에 따른 지속형 hGH 결합체의 안정성 평가

[0068] 본 발명에 따른 안정화제로서 비이온성 계면 활성제인 폴리솔베이트 80 또는 20, 폴록사며 188을 이용하여 25°C에서 4주일간 보관 후 SEC 및 IEC를 이용해 지속형 hGH 결합체의 안정성에 미치는 영향을 실험하였다. 하기 표 7과 같이 완충액은 pH 5.2 구연산 완충액을 사용하였고 당알코올로는 만니톨을 사용하였다. 하기 표 8의 IE-HPLC(%)와 SE-HPLC(%)는 초기 결과 값에 대비한 지속형 hGH 결합체의 잔존율을 나타낸다.

표 7

번호	농도	완충용액	등장화제	당알코올	계면 활성제
1	19.5 mg/mL	20 mM Na-Citrate (pH 5.2)	150 mM NaCl	5% Mannitol	0.05 mg/mL Polysorbate 80
2	19.5 mg/mL	20 mM Na-Citrate (pH 5.5)	150 mM NaCl	5% Mannitol	3 mg/mL Poloxamer 188
3	19.5 mg/mL	20 mM Na-Citrate (pH 5.2)	150 mM NaCl	5% Mannitol	2 mg/mL Polysorbate 20

[0070] * 0.05 mg/mL Polysorbate 80은 0.005% Polysorbate 80과 같다.

표 8

번호	IE-HPLC (%)				SE-HPLC (%)			
	Start	1 week	2week	4week	Start	1 week	2week	4week
1	100	98.0	96.4	93.3	100	99.6	99.5	99.3
2	100	98.3	85.8	N/A ^A	100	100	95.3	N/A ^A
3	100	98.3	96.4	84.8	100	99.7	99.9	96.3

[0072] ^A 응집으로 인한 침전으로 데이터 이용 불가

[0073] 상기 결과에서 볼 수 있듯이, 동일한 조건 하에서 폴리솔베이트 80이 포함될 때 지속형 hGH 결합체의 안정성이 증가함을 확인할 수 있다. 폴리솔베이트 20의 경우 25°C에서 2주까지는 안정성에 차이가 없이 진행되었으나, 4주까지 장기간 보관 시 매우 유사한 물질임에도 지속형 hGH 결합체의 안정성에 차이가 발생함이 확인되었다. 또한 3 mg/mL의 폴록사며 188이 포함된 제형에서는 25°C에서 2주 후 지속형 hGH 결합체의 응집이 형성되었다.

[0074] [실시예 5] 최종 선택한 지속형 hGH 결합체의 액상 제제와 시판 액상 hGH 약물인 노르디스크사의 노디트로핀과의 안정성 비교 평가

[0075] 실시예 1 내지 4의 안정성 실험을 통해 선택한 pH 5.2의 구연산 완충용액과 염화나트륨, 만니톨, 그리고 폴리솔베이트 80으로 이루어진 액상 제제의 안정성을 확인하기 위해 시판 중인 액상 hGH 약물인 노르디크사의 노디트로핀(Norditropin, Novo Nordisk)과 비교 실험 하였다. 노디트로핀은 10 mg/mL의 농도이며, 성분명을 표 9에 나타내었다. 보관조건은 25°C에서 기간은 4주 동안 보관하였으며 노디트로핀의 분석법으로는 전하의 다양성을 확인하기 위해 유립약전에 명시된 Capillary Electrophoresis (CE)와 SEC를 이용해 분석하였으며, 본 발명의 지속형 hGH 결합체는 CE 분석법의 원리와 유사한 IEC와 SEC를 이용하여 분석하였다. 그 결과를 표 10에 나타냈으며, CE(%) 또는 IEC(%)와 SEC(%)는 초기 결과값에 대비한 각 물질의 잔존율을 나타낸다.

표 9

성분명	농도	완충 용액	등장화제 또는 그외	당알코올 또는 그외	계면활성제
노디트로핀	10 mg/mL	-	3 mg/mL Phenol	1.13 mg/mL Histidine 38.7 mg/mL Mannitol	3 mg/mL Poloxamer 188
지속형 hGH	19.5 mg/mL (6 mg/mL hGH)	20mM Na-Citrate (pH5.2)	150mM NaCl	5% Mannitol	0.005% Polysorbate 80

표 10

번호	CE(%) 또는 IEC(%)				SEC (%)			
	Start	1 week	2week	4week	Start	1 week	2week	4week
노디트로핀	100	98.2	95.9	91.5	100	100	100.1	100
지속형 hGH	100	98.0	96.4	93.3	100	99.6	99.5	99.3

[0078] 안정성 시험 결과 시판 중인 hGH 액상 약물인 노디트로핀 보다 동등 이상으로 안정함을 확인하였다. 이 결과에서, 본 발명의 지속형 hGH 액상 제제는 효과적으로 저장 안정성을 제공할 수 있는 안정한 조성임을 확인할 수 있다.

[실시예 6] 최종 선택한 지속형 hGH 결합체 액상 제제의 장기 보존 안정성 시험

[0080] 최종 선택한 pH 5.2의 구연산 완충용액과 염화나트륨, 만니톨, 그리고 폴리솔베이트 80으로 이루어진 액상 제제의 장기 보존 안정성을 확인하기 위해 4°C에서 6개월 보관한 시료의 안정성을 분석하였다. 그 결과를 도 1 및 표 11에 나타냈으며, IE-HPLC(%), SE-HPLC(%), 단백질 함량(%)은 초기 결과 값에 대비한 지속형 hGH 결합체 잔존율을 나타낸다.

표 11

장기 보존 안정성 시험 (4°C 보관)									
보관기간	성상	pH	확인시험		순도시험			단백질 함량 시험 (%)	생물학적 비활성 시험
			IE-HPLC	웨스턴 블로트	SDS-PAGE	IE-HPLC(%)	SE-HPLC(%)		
Start	무색 투명	5.3	일치	적합	적합	100.0	100.0	100.0	적합
1개월	무색 투명	5.3	일치	적합	적합	98.5	99.9	104.2	적합
3개월	무색 투명	5.3	일치	적합	적합	98.5	100.0	104.5	적합
6개월	무색 투명	5.3	일치	적합	적합	97.2	99.3	101.9	적합

[0082] 장기 보존 안정성 시험 결과, 본 발명의 지속형 hGH 결합체는 최종 액상제제에서 6개월 이상 안정하다는 것을 확인하였다.

[0083] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있음을 이해할 수 있다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 제한적인 것이 아닌 것으로 이해하여야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 상세한 설명보다는 후술되는 특허청구범위의 의미 및 범위, 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경

또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1

