



(19) 대한민국특허청(KR)  
 (12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0091707  
 (43) 공개일자 2014년07월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 47/10* (2006.01) *A61K 47/26* (2006.01)  
*A61K 9/08* (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2014-7013305
- (22) 출원일자(국제) 2012년10월18일  
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2014년05월16일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2012/060745
- (87) 국제공개번호 WO 2013/059410  
 국제공개일자 2013년04월25일
- (30) 우선권주장  
 61/548,518 2011년10월18일 미국(US)  
 61/669,480 2012년07월09일 미국(US)

- (71) 출원인  
**코히러스 바이오사이언시즈, 인코포레이티드**  
 미국 캘리포니아 94065 레드우드 시티 수트 200  
 레드우드 쇼어스 파크웨이 201
- (72) 발명자  
**매닝 마크**  
 미국 콜로라도주 80534 존스타운 소렐 레인 4630  
**머피 브라이언**  
 미국 콜로라도주 80526 포트 콜린스 웨스트 프로  
 스팩트 1708
- (74) 대리인  
**장훈**

전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 **크실리톨로 안정화된 에타너셉트 제형**

### (57) 요 약

본 발명은, 에타너셉트 및 상기 제형에서 에타너셉트의 불안정성, 미스폴딩, 응집 및/또는 단편화를 억제시키는 안정화제를 포함하는 안정화된 수성 약제학적 조성물에 관한 것으로, 상기 안정화제는 크실리톨, 또는 크실리톨과 메글루민과의 배합물을 포함한다. 하기 논의에서 사용되는 각종 기술 용어들은 "정의" 부분에서 및 명세서 나머지 전반에 걸쳐 아래에 정의되어 있다. 임의로 및 바람직하게는 아르기닌을 함유하지 않는 본 발명의 안정화된 에타너셉트 제형은 장기 저장 안정성을 발휘한다.

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

에타너셉트(etanercept) 및 상기 에타너셉트의 불안정성, 미스폴딩(misfolding), 응집 및/또는 단편화를 억제시키는 안정화제를 포함하는 안정화된 수성 약제학적 조성물로서,

상기 안정화제는 크실리톨, 또는 크실리톨과 메글루민과의 배합물을 포함하는,

안정화된 수성 약제학적 조성물.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 완충제, 장성 개질제(tonicity modifier) 및 부형제로부터 선택된 하나 이상의 추가 성분을 추가로 포함하는, 조성물.

### 청구항 3

제2항에 있어서, 상기 조성물이 임의로, 아르기닌을 함유하지 않거나 아르기닌을 본질적으로 함유하지 않으며, 상기 조성물이 다음 중의 하나 이상을 특징으로 하는 장기 저장 안정성을 발휘하는, 조성물:

$M_3$  또는  $T_2$  또는  $T_4$ 에서의 SEC 분석에서의, 약 90% 초과의 단량체 함량; 약 3wt% 미만의 응집체 함량; 및 약 5wt% 미만의 단편 3 함량; 및

$M_3$  또는  $T_2$  또는  $T_4$ 에서의 HIC 분석에서의, HIC 크로마토그램의 피크 1로 나타나는 상기 조성물의 양 약 3wt.% 미만; HIC 크로마토그램의 피크 2로 나타나는 상기 조성물의 양 약 80wt.% 초과; 및 HIC 크로마토그램의 피크 3으로 나타나는 상기 조성물의 양 약 20wt.% 미만.

### 청구항 4

제2항에 있어서, 상기 조성물이 임의로 아르기닌을 함유하지 않거나 아르기닌을 본질적으로 함유하지 않으며, 상기 조성물이 약 25 내지 75mg/ml의 에타너셉트; 및 에타너셉트의 불안정성, 응집 및/또는 단편화를 억제시키는 안정화제를 포함하고, 상기 안정화제는 상기 조성물의 약 10wt.% 이하를 구성하는 양의 크실리톨이고, 상기 조성물은  $M_3$  또는  $T_2$  또는  $T_4$ 에서의 SEC 분석에서의, 약 80wt.% 초과의 단량체 함량; 약 3wt.% 미만의 응집체(들) 함량; 및 약 6wt.% 미만의 단편 3 함량을 특징으로 하고, 상기 조성물이 6.0 내지 6.6의 pH를 갖는, 조성물.

### 청구항 5

제4항에 있어서, 하기를 특징으로 하는 장기 저장 안정성을 발휘하는, 조성물:

(a)  $M_3$  또는  $T_2$  또는  $T_4$ 에서의 SEC 분석에서의, 약 90wt.% 초과의 단량체 함량; 및 약 3wt.% 미만의 응집체(들) 함량; 및

(b)  $M_3$  또는  $T_2$  또는  $T_4$ 에서의 HIC 분석에서의, HIC 크로마토그램의 피크 1로 나타나는 상기 조성물의 양 약 4wt.% 미만; HIC 크로마토그램의 피크 2로 나타나는 상기 조성물의 양 약 80wt.% 초과; 및 HIC 크로마토그램의 피크 3으로 나타나는 상기 조성물의 양 약 20wt.% 미만.

### 청구항 6

제3항에 있어서,  $M_3$  또는  $T_2$  또는  $T_4$ 에서의 HIC 분석에서의, HIC 크로마토그램의 피크 1로 나타나는 상기 조성물의 양 약 1wt.% 미만; HIC 크로마토그램의 피크 2로 나타나는 상기 조성물의 양 약 95wt.% 초과; 및 HIC 크로마토그램의 피크 3으로 나타나는 상기 조성물의 양 약 3wt.% 미만을 갖는, 조성물.

### 청구항 7

제3항에 있어서, 약 25 내지 75mg/ml의 에타너셉트; 약 1 내지 10wt.%의 크실리톨; 약 1 내지 30mM의 인산나트륨; 임의로 약 5wt.% 이하의 메글루민; 임의로 약 100mM 이하의 NaCl; 및 임의로 약 5wt.% 이하의 수크로즈를

포함하는, 조성물.

#### 청구항 8

제7항에 있어서, 약 1 내지 100mM의 NaCl; 약 1 내지 5wt.%의 수크로즈를 포함하고, 상기 안정화제가 조성물의 약 1 내지 5wt.%의 양으로 메글루민을 추가로 포함하는, 조성물.

#### 청구항 9

제7항에 있어서, 약 50mg/ml의 에타너셉트; 약 10wt.%의 크실리톨; 및 10 내지 약 30mM의 인산나트륨을 포함하고; 상기 제형이, M<sub>3</sub> 또는 T<sub>2</sub> 또는 T<sub>4</sub>에서의 SEC 분석에서의, 약 85wt.% 초파의 단량체 함량을 특징으로 하는, 조성물.

#### 청구항 10

제7항에 있어서, 약 50mg/ml의 에타너셉트; 약 10 내지 30mM의 인산나트륨; 약 1 내지 3wt.%의 크실리톨; 및 약 1 내지 3wt.%의 메글루민을 포함하고; 상기 제형이, M<sub>3</sub> 또는 T<sub>2</sub> 또는 T<sub>4</sub>에서의 SEC 분석에서의, 약 85wt.% 초파의 단량체 함량을 특징으로 하는, 조성물.

#### 청구항 11

제7항에 있어서, 약 50mg/ml의 에타너셉트; 약 10 내지 30mM의 인산나트륨; 약 1 내지 3wt.%의 크실리톨; 약 1 내지 3wt.%의 메글루민; 약 1 내지 100mM의 염화나트륨; 및 약 1 내지 4wt.%의 수크로즈를 포함하고; 상기 제형이, M<sub>3</sub> 또는 T<sub>2</sub> 또는 T<sub>4</sub>에서의 SEC 분석에서의, 약 85wt.% 초파의 단량체 함량을 특징으로 하는, 조성물.

#### 청구항 12

제7항에 있어서, 약 50mg/ml의 에타너셉트; 약 6wt.%의 크실리톨; 및 약 10 내지 30mM의 인산나트륨을 포함하고; 상기 제형이, M<sub>3</sub> 또는 T<sub>2</sub> 또는 T<sub>4</sub>에서의 SEC 분석에서의, 약 85wt.% 초파의 단량체 함량을 특징으로 하는, 조성물.

#### 청구항 13

제7항에 있어서, 약 50mg/ml의 에타너셉트; 약 10 내지 30mM의 인산나트륨; 약 2 내지 3wt.%의 크실리톨; 및 약 5%의 수크로즈를 포함하고; 상기 제형이, M<sub>3</sub> 또는 T<sub>2</sub> 또는 T<sub>4</sub>에서의 SEC 분석에서의, 약 85wt.% 초파의 단량체 함량을 특징으로 하는, 조성물.

#### 청구항 14

제3항에 있어서, M<sub>3</sub> 또는 T<sub>2</sub> 또는 T<sub>4</sub>에서의 HIC 분석에서의, HIC 크로마토그램의 피크 2로 나타나는 상기 조성물의 양 약 95wt.% 이상; 및 피크 3이 HIC 크로마토그램 상에 존재하는 경우, 피크 3으로 나타나는 상기 조성물의 양 약 1wt.% 이하를 특징으로 하는 장기 저장 안정성을 발휘하는, 조성물.

#### 청구항 15

제3항에 있어서, M<sub>3</sub> 또는 T<sub>2</sub> 또는 T<sub>4</sub>에서, 5μm 초파의 크기를 갖는 육안으로 보이지 않는 입자(subvisible particle)를 mL당 평균 약 10,000개 이하로 갖는, 조성물.

#### 청구항 16

제7항에 있어서, 존재하는 경우, 메글루민을 만노실글리세레이트, 만노실락테이트, 만노실글리콜레이트 또는 디글리세롤포스페이트로 대체하는, 조성물.

#### 청구항 17

제1항에 있어서, 상기 조성물이 아르기닌을 함유하지 않거나 아르기닌을 본질적으로 함유하지 않고, 상기 조성

물이, M<sub>3</sub> 또는 T<sub>2</sub> 또는 T<sub>4</sub>에서, 다음의 기준들 중의 하나 또는 둘 다를 충족시키는 장기 저장 안정성을 발휘하는, 조성물:

(A) (i) 상기 조성물 중의 응집체(들), 단량체 및 단편 3의 양에 대한 SEC 분석(명세서에 정의된 바와 같음) 및 (ii) HIC 크로마토그램의 피크 1, 2 및 3에 대응하는 상기 조성물 중의 물질의 양들에 대한 HIC 분석(명세서에 정의된 바와 같음)에 의해 측정된 것으로서, 상품명 Enbrel® 하에 판매되는 시판중인 에타너셉트에 필적하거나 이보다 양호한 안정성; 및

(B) (i) 피크 3이 부재하거나, 본질적으로 부재하고, (ii) 피크 2가 상기 조성물의 약 95wt% 초과를 나타내는 HIC 크로마토그램; 응집체(들)에 대응하는 피크를 본질적으로 포함하지 않는 SEC 크로마토그램; 및 단량체 함량이 상기 조성물의 약 95wt% 이상을 나타내는 SEC 크로마토그램.

## 명세서

### 기술분야

[0001]

본 발명은, 에타너셉트(etanercept)의 장기 저장을 위해 크실리톨로 안정화된 수성 약제학적 조성물, 상기 조성물의 제조방법, 이의 투여방법 및 이를 함유하는 키트에 관한 것이다. 본 발명은, 안정화를 위해 아르기닌을 필요로 하지 않는 에타너셉트 제형을 포함한다.

### 배경기술

[0002]

폴리펩타이드는 종종 사용 전에 저장해야 한다. 연장된 기간 동안 저장하는 동안, 폴리펩타이드는 흔히 용액 중에서 불안정하다(문헌 참조: Manning et al., 1989, Pharm. Res. 6:903-918). 이들의 저장 수명을 연장하기 위해, 건조, 예를 들면, 동결건조와 같은 추가의 가공 단계가 개발되었다. 그러나, 동결건조된 약제학적 조성물은 사용하기에 덜 편리하다.

[0003]

폴리펩타이드 안정성을 개선시키기 위한 전형적인 방법은 제형으로 성분들의 농도를 변화시킴으로써 또는 제형을 개질시키기 위해 부형제를 가함으로써 해결될 수 있다(예를 들면, 미국 특허 제5,580,856호 및 제6,171,586호 참조). 그러나, 첨가제의 사용은 여전히 불활성 폴리펩타이드를 야기할 수 있다. 게다가, 동결건조의 경우, 재수화 단계가, 예를 들면, 응집 또는 변성에 의해 폴리펩타이드의 불활성화를 초래할 수 있다(문헌 참조: Hora et al., 1992, Pharm. Res., 9:33-36; Liu et al., 1991, Biotechnol. Bioeng., 37:177-184). 폴리펩타이드의 응집은 면역원성을 야기할 수 있기 때문에 바람직하지 않다(문헌 참조: Cleland et al., 1993, Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems, 10:307-377; and Robbins et al., 1987, Diabetes, 36:838-845).

[0004]

폴리펩타이드 안정성을 개선시키는 또 다른 방법은 L-아르기닌을 특정 농도로 사용하는 것이다(미국 특허 제7,648,702호).

[0005]

사용 전 2년까지 저장되는 폴리펩타이드 중의 하나가 에타너셉트(Enbrel®, 제조원: Immunex Corporation)이며, 이것은 사람 IgG1의 Fc 부분에 결합된 사람 75 칠로달톤(p75) 중양 괴저 인자 수용체(TNFR)의 세포외 리간드-결합 부분으로 이루어진 이량체성 융합 폴리펩타이드이다. 이것은 934개의 아미노산으로 이루어지고, 대략 150 칠로달톤의 겉보기 문자량을 갖는다(문헌 참조: Physicians Desk Reference, 2002, Medical Economics Company Inc.). 에타너셉트의 Fc 성분은 불변 중쇄 2(CH2) 도메인, 불변 중쇄 3(CH3) 도메인 및 헌지 영역을 함유하지만, 사람 IgG1의 불변 중쇄 1(CH1) 도메인은 함유하지 않는다. Fc 도메인은 상기한 도메인 중의 하나 또는 전부를 함유할 수 있다. 에타너셉트는 통상적으로 중국 햄스터 난소(CHO) 포유류 세포 발현 시스템에서 재조합 DNA 기술에 의해 제조된다.

[0006]

본 발명은 장기간 저장할 수 있는 에타너셉트의 신규한 안정한 액체 제형을 제공한다.

### 발명의 내용

[0007]

본 발명은, 에타너셉트 및 상기 에타너셉트의 불안정성, 미스폴딩(misfolding), 응집 및/또는 단편화를 억제시키는 안정화제를 포함하는 안정화된 수성 약제학적 조성물에 관한 것으로, 여기서, 상기 안정화제는 크실리톨,

또는 크실리톨과 메글루민과의 배합물을 포함한다.

[0008] 하기 논의에서 사용되는 각종 기술 용어들은 "정의" 부분에서 및 명세서 나머지 전반에 걸쳐 아래에 정의되어 있다.

[0009] 임의로 및 바람직하게는 아르기닌을 함유하지 않는 본 발명의 안정화된 에타너셉트 제형은 다음 중의 하나 이상을 특징으로 하는 장기 저장 안정성을 발휘한다: (1) M<sub>3</sub> 또는 T<sub>2</sub> 또는 T<sub>4</sub>에서의 SEC 분석에서의, 약 90% 초파의 단량체 함량; 약 3wt% 미만의 응집체 함량; 및 약 5wt% 미만의 단편 3 함량; 및 (2) M<sub>3</sub> 또는 T<sub>2</sub> 또는 T<sub>4</sub>에서의 HIC 분석에서의, HIC 크로마토그램의 피크 1로 나타나는 상기 조성물의 양 약 3wt.% 미만; HIC 크로마토그램의 피크 2로 나타나는 상기 조성물의 양 80wt.% 초파; 및 HIC 크로마토그램의 피크 3으로 나타나는 상기 조성물의 양 약 20wt.% 미만.

[0010] 안정화된 제형의 바람직한 측면에서, 상기 제형은 M<sub>3</sub> 또는 T<sub>2</sub> 또는 T<sub>4</sub>에서의 HIC 분석에서의, HIC 크로마토그램의 피크 2로 나타나는 상기 조성물의 양 약 95wt.% 이상; 및 피크 3이 HIC 크로마토그램 상에 존재하는 경우, 피크 3으로 나타나는 상기 조성물의 양 약 3wt.% 이하를 특징으로 하는 장기 저장 안정성을 발휘한다.

[0011] 위에 요약된 바와 같은 안정화된 에타너셉트 제형은, 임의로 및 바람직하게는 아르기닌을 함유하지 않거나 아르기닌을 본질적으로 함유하지 않는다.

[0012] 본 발명의 제형은 5°C에서 1, 2 또는 3개월 저장 후에 수행되는 SEC(크기 배제 크로마토그래피) 및 HIC(소수성 상호작용 크로마토그래피) 분석에 의해 측정되는 바와 같은 탁월한 안정성을 갖는다. 이들 제형은 아르기닌이 필수 성분인 시판중인 에타너셉트 제형에 필적하거나 이보다 더 양호하다. 따라서, 본 발명은 추가로, 아르기닌을 함유하지 않거나 아르기닌을 본질적으로 함유하지 않고, 조성물이, M<sub>3</sub> 또는 T<sub>2</sub> 또는 T<sub>4</sub>에서 평가된, 다음의 기준들 중의 하나 또는 둘 다를 충족시키는 장기 저장 안정성을 발휘하는, 상기 요약된 안정화된 에타너셉트의 제형에 관한 것이다: (A) (i) 상기 조성물 중의 응집체(들), 단량체 및 단편 3의 양에 대한 SEC 분석(명세서에 정의된 바와 같음) 및 (ii) HIC 크로마토그램의 피크 1, 2 및 3에 대응하는 상기 조성물 중의 물질의 양들에 대한 HIC 분석(명세서에 정의된 바와 같음)에 의해 측정된 것으로서, 상품명 Enbrel® 하에 판매되는 시판중인 에타너셉트에 필적하거나 이보다 양호한 안정성; 및 (B) (i) 피크 3이 부재하거나, 본질적으로 부재하고, (ii) 피크 2가 상기 조성물의 약 95wt% 초파를 나타내는 HIC 크로마토그램; 응집체(들)에 대응하는 피크를 본질적으로 포함하지 않는 SEC 크로마토그램; 및 단량체 함량이 상기 조성물의 약 95wt% 이상을 나타내는 SEC 크로마토그램.

[0013] 하나의 바람직한 측면에서, 본 발명의 제형은 약 25 내지 약 75mg/ml의 에타너셉트; 및 에타너셉트의 불안정성, 응집 및/또는 단편화를 억제시키는 안정화제를 포함하고, 여기서, 상기 안정화제는 조성물의 약 10wt.% 이하를 구성하는 양의 크실리톨이고, 상기 조성물은 M<sub>3</sub> 또는 T<sub>2</sub> 또는 T<sub>4</sub>에서의 SEC 분석에서의, 약 80wt.% 초파의 단량체 함량; 약 3wt.% 미만의 응집체(들) 함량; 및 약 6wt.% 미만의 단편 3 함량을 특징으로 하고, 상기 조성물은 6.0 내지 6.6의 pH를 갖는다. 이들 분석 기준을 충족하는 제형은 안정화를 위해 아르기닌을 필요로 하지 않는다.

[0014] 추가의 바람직한 양태에서, 안정화된 에타너셉트 제형은, (a) M<sub>3</sub> 또는 T<sub>2</sub> 또는 T<sub>4</sub>에서의 SEC 분석에서의, 약 90wt% 초파의 단량체 함량; 및 약 3wt% 미만의 응집체(들) 함량; 및 (b) M<sub>3</sub> 또는 T<sub>2</sub> 또는 T<sub>4</sub>에서의 HIC 분석에서의, HIC 크로마토그램의 피크 1로 나타나는 상기 조성물의 양 약 4wt.% 미만; HIC 크로마토그램의 피크 2로 나타나는 상기 조성물의 양 80wt.% 초파; 및 HIC 크로마토그램의 피크 3으로 나타나는 상기 조성물의 양 약 20wt.% 미만을 추가의 특징으로 한다. 이들 분석 기준을 충족하는 제형은 안정화를 위해 아르기닌을 필요로 하지 않는다.

[0015] 본 발명의 에타너셉트 조성물은 육안으로 보이지 않는 입자(subvisible particle)를 허용가능한 수준으로 함유하는 제형을 제공하는 능력을 추가로 제공한다. 따라서, 본 발명은 추가로, M<sub>3</sub> 또는 T<sub>2</sub> 또는 T<sub>4</sub>에서, 5μm 초파의 크기를 갖는, 육안으로 보이지 않는 입자를 mL당 평균 약 10,000개 이하로 갖는 안정화된 에타너셉트 제형에 관한 것이다.

[0016] 본 발명의 안정화된 에타너셉트 조성물은 (a) M<sub>3</sub> 또는 T<sub>2</sub> 또는 T<sub>4</sub>에서의 SEC 분석에서의, 약 90wt% 초파의 단량체 함량; 및 약 3wt% 미만의 응집체(들) 함량; 및 (b) M<sub>3</sub> 또는 T<sub>2</sub> 또는 T<sub>4</sub>에서의 HIC 분석에서의, HIC 크로마토

그램의 피크 1로 나타나는 상기 조성물의 양 약 3wt.% 미만; HIC 크로마토그램의 피크 2로 나타나는 상기 조성물의 양 80wt.% 초과; 및 HIC 크로마토그램의 피크 3으로 나타나는 상기 조성물의 양 약 20wt.% 미만을 추가의 특징으로 하고, 상기 제형은 아르기닌을 함유하지 않거나 아르기닌을 본질적으로 함유하지 않는다,

[0017] 제형의 안정성은, 아르기닌을 임의로 함유하지 않거나 아르기닌을 본질적으로 함유하지 않는 조성물이 M<sub>3</sub> 또는 T<sub>2</sub> 또는 T<sub>4</sub>에서의 HIC 분석에서의, HIC 크로마토그램의 피크 1로 나타나는 상기 조성물의 양 약 1% 미만; HIC 크로마토그램의 피크 2로 나타나는 상기 조성물의 양 95wt% 초과; 및 HIC 크로마토그램의 피크 3으로 나타나는 상기 조성물의 양 약 3wt% 미만을 나타냄을 추가의 특징으로 할 수 있다.

[0018] 바람직하게는 아르기닌을 함유하지 않거나 아르기닌을 본질적으로 함유하지 않는 본 발명의 바람직한 안정화된 조성물은, M<sub>3</sub> 또는 T<sub>2</sub> 또는 T<sub>4</sub>에서의 HIC 분석에서의, HIC 크로마토그램의 피크 1로 나타나는 상기 조성물의 양 약 2% 미만, 바람직하게는 약 1% 미만; HIC 크로마토그램의 피크 2로 나타나는 상기 조성물의 양 약 95wt.% 초과, 바람직하게는 약 97% 초과; 및 HIC 크로마토그램의 피크 3으로 나타나는 상기 조성물의 양 약 1wt% 미만, 바람직하게는 0 내지 1%를 나타낸다. 이를 분석 기준을 충족하는 제형은 안정화를 위해 아르기닌을 필요로 하지 않는다.

[0019] 안정화된 에타너셉트 제형은 크실리톨 외에 추가의 임의의 성분 메글루민, 수크로즈 및 염화나트륨을 함유할 수 있다. 따라서, 본 발명은 추가로, 약 25 내지 약 75mg/ml의 에타너셉트; 약 1 내지 10wt.%의 크실리톨; 약 1 내지 30mM의 인산나트륨; 임의로 약 5wt.% 이하의 메글리딘; 임의로 약 5mM 이하의 NaCl; 및 임의로 약 5wt.% 이하의 수크로즈를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0020] 아르기닌-함유 제형으로 제공된 시판중인 에타너셉트와 구별되는 바와 같이, 본 발명자들은 놀랍게도, 미국 특허 제7,648,702호에 비추어, 본원에 기재되고 예시된 에타너셉트의 제형 양태는, 경우에 따라, 아르기닌이 여전히 첨가될 수는 있지만 장기 안정화를 위해 아르기닌을 필요로 하지 않는다는 것을 밝혀내었다. 아르기닌 없이 안정화된 에타너셉트 제형을 제공할 수 있는 능력은, 환자 및 의료인들에게 안정화를 위해 아르기닌을 필요로 하는 현 시판중인 에타너셉트 제형(즉, Enbrel®)에 비해 보다 저렴한 비용으로 이용가능해질 수 있는 에타너셉트의 대체 제형을 제공함으로써 의료 보험 제도에 잠재적으로 상당한 혜택을 나타낸다.

[0021] 본원에서 사용된 용어 "불안정성" 또는 유사 용어들은 에타너셉트 단량체가 저장 동안 원치 않는 다양한 변환을 겪는 경향을 나타낸다. 이러한 변환은 올리고며 및 고분자량 응집체(들)(이하, 본질적으로 비손상 에타너셉트 단량체의 다중 카페가 각종 비공유 인력(예를 들면, 정전기 상호작용)을 통해 비가역적으로 서로 결합되어 있는 용어 "응집체(들)")의 형성을 포함한다. 저장 동안의 원치 않는 변환은 또한 보다 작은 단편 및/또는 잘려진 조각(clipped species)으로의 에타너셉트 단량체의 분해를 포함할 수 있다. 이상적으로, 에타너셉트의 제형은, 제형이 저장 동안 에타너셉트의 응집체, 부정확하게 풀딩된 단백질, 올리고며 및/또는 단편의 형성을 야기하는 경향을, 가능한 최대로, 최소화시켜야 한다. 원치 않는 응집체 또는 단편의 형성을 감소시킬 수 있는 능력으로부터 야기되는 중요한 이득은 약제의 잠재적인 독성 및/또는 면역원성의 감소이다.

[0022] 본 발명의 에타너셉트 제형은 임의로 및 바람직하게는 아르기닌을 함유하지 않거나 아르기닌을 본질적으로 함유하지 않는다. 용어 "아르기닌을 본질적으로 함유하지 않는"은 아르기닌이, 존재한다 하더라도, 당업계의 숙련자가 안정화 견지에서 이의 존재가 유리하거나 필요하다고 판단할 수 있는 정도로 제형에서 에타너셉트 단량체의 안정화에 기여하지 않음을 의미하는 것으로 의도된다.

[0023] 이러한 측면 및 기타의 측면은 하기 설명으로부터 자명해질 것이지만 그 안의 변화 및 수정은 기재내용의 신규한 개념의 취지 및 범위를 벗어나지 않으면서 이루어질 수 있다.

[0024] 상기의 일반적인 설명 및 하기의 상세한 설명 둘 다는 단지 예시적이고 설명적이며, 청구된 바와 같이 본 발명을 제한하는 것은 아님을 이해해야 한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 본 발명의 다양한 양태들이 이하에서 상세하게 설명된다. 설명부에서 및 특히청구범위 전반에 걸쳐 사용되는 바와 같이, "a", "an" 및 "the"의 의미는 문맥에 달리 명백히 나타내지 않는 한 복수형을 포함한다. 또한, 설명부에서 및 특히청구범위 전반에 걸쳐 사용되는 바와 같이, "in"의 의미는 문맥에 달리 명백히 나타내지 않는 한 "in" 및 "on"을 포함한다. 추가로, 본 명세서에서 사용되는 몇몇 용어들은 아래에 보다 상세하게 정의되어

있다.

[0026] 정의

[0027] 본 명세서에 사용되는 용어들은 일반적으로 본 발명의 문맥내에서 및 각 용어가 사용되는 구체적인 문맥에서 당 업계의 통상적인 의미를 갖는다. 본 발명을 기재하는데 사용되는 특정 용어들은 본 발명의 기술내용에 관해 전문가에게 추가의 안내를 제공하기 위해 아래에 또는 달리 명세서에 논의되어 있다. 특정 용어들에 대해 동의어가 제공되어 있다. 하나 이상의 동의어들의 리사이틀은 다른 동의어들의 사용을 배제하지 않는다. 본원에 논의된 모든 용어들의 예를 포함한 본 명세서 어디에서의 예의 사용은 단지 예시적인 것이며, 본 발명의 또는 모든 예시된 용어의 범위 및 의미를 어떠한 방식으로든 제한하는 것은 아니다. 본 발명은 본 명세서에 제공된 다양한 양태들로 제한되지 않는다.

[0028] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 숙련가에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 상충할 경우에는, 정의를 포함한 본 문서를 조절할 것이다.

[0029] "..쯤(around)", "약(about)" 또는 "대략(approximately)"은 일반적으로 주어진 값 또는 범위의 20% 이내, 10% 이내, 5, 4, 3, 2 또는 1% 이내를 의미해야 한다. 제공된 수치 양은 근사치이며, 용어 "..쯤(around)", "약(about)" 또는 "대략(approximately)"은, 명백히 나타내어져 있지 않다면, 유추할 수 있음을 의미한다.

[0030] 용어 "에타너셉트" 또는 "에타너셉트 단량체" 또는 "단량체"는 Enbrel®과 동의어이다. 이것은 사람 IgG1의 Fc 부분에 결합된 사람 75 칼로달톤(p75) 종양 괴저 인자 수용체(TNFR)의 세포외 리간드-결합 부분으로 이루어진 이량체성 융합 폴리펩타이드인 폴리펩타이드를 나타낸다. 이것은 934개의 아미노산으로 이루어지고, 대략 150 칸킬로달톤의 겉보기 분자량을 갖는다. 본 출원의 목적을 위해, 용어 "에타너셉트"는 또한 에타너셉트의 기능, 효능 또는 결합활성(avidity)에 상당한 영향을 미치지 않는 아미노산 구조에 있어서의 사소한 변형(아미노산의 결손, 부가 및/또는 치환을 포함함)을 갖는 에타너셉트를 포함한다. 용어 "에타너셉트"는 농축 제형, 바로 사용가능한 주사용 제형; 물, 알콜 및/또는 기타 성분으로 재구성된 제형 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 Enbrel®의 모든 형태 및 제형을 포함한다.

[0031] 용어 "당"은 단당류, 이당류 및 다당류를 나타낸다. 당의 예는 수크로즈, 트레할로스, 텍스트로즈 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0032] 용어 "메글루민"은 화학식  $\text{H}_3\text{NHCH}_2(\text{CHOH})_4\text{CH}_2\text{OH}$ 를 갖는 화합물을 나타내는 것으로, 또한 1-데옥시-1-메틸아미노 소르비톨; N-메틸-d-글루카민; 및 1-데옥시-1-메틸아미노-D-글루시톨로서 공지되어 있다.

[0033] 용어 "만노실글리세레이트", "만노실락테이트", "만노실글리콜레이트" 및 "디글리세롤포스페이트"는 당해 기술 분야에 익히 공지되어 있으며, 이들의 통상적으로 허용되는 의미를 갖는다. 하기 참조문헌은 이들 화합물을 일부 세부사항에서 기술한다[Faria et al., *Carbohydrate Res.* 2008, 343: 3025-3033; Borges et al., *Extremophiles* 2002, 6: 209-216; Faria et al., *ChemBioChem* 2003, 4: 734-741; Sawangwan et al., *Biotechnol. J.* 2010, 5: 187-191; and Pais et al., *J. Mol. Biol.* 2009, 394: 237-250]. 본 출원은 이들 참조문헌에 포함된 이들 화합물의 기술을 참조로 포함한다.

[0034] 용어 "폴리올"은 다수의 하이드록실 그룹을 함유하는 알콜을 나타낸다. 폴리올의 예는 만니톨, 소르비톨 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0035] 용어 "장기 저장"은 약제학적 조성물이 3개월 초과, 6개월 초과, 바람직하게는 1년 초과 동안 저장될 수 있음을 의미하는 것으로 이해된다. 장기 저장은 또한 약제학적 조성물이 액체로서 2 내지 8°C에서 저장되거나, 예를 들면, -20°C 또는 그 이하에서 동결됨을 의미하는 것으로 이해된다. 조성물은 1회 초과 동결 및 해동될 수 있는 것으로 고려된다.

[0036] 장기 저장과 관련하여 용어 "안정한" 또는 "안정화된"은 약제학적 조성물에 함유된 에타너셉트가 저장 시작시의 조성물의 활성과 비교하여 이의 활성의 20%, 또는 보다 바람직하게는 15%, 또는 보다 더 바람직하게는 10%, 가장 바람직하게는 5%를 초과하여 상실하지 않음을 의미하는 것으로 이해된다.

[0037] 용어 "포유동물"은 사람을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0038] 용어 "약제학적으로 허용되는 담체"는 비독성 고체, 반고체 또는 액체 충전제, 희석제, 캡슐화 재료, 제형화 조

제, 또는 임의의 통상의 유형의 부형제를 나타낸다. 약제학적으로 허용되는 담체는 사용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고 제형의 다른 성분들과 상용성이다.

[0039] 용어 "조성물"은 당업계에서 통상적이고 치료학적, 진단적 또는 예방적 목적을 위해 대상체에 투여하기에 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 같은 담체를 통상적으로 함유하는 혼합물을 나타낸다. 이것은 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드가 세포에 또는 배양 배지에 존재하는 세포 배양물을 포함할 수 있다. 예를 들면, 경구 투여용 조성물은 용제, 혼탁제, 정제, 환제, 캡슐제, 서방출 제형, 구강 세정제(oral rinse) 또는 산체를 형성할 수 있다.

[0040] 용어 "약제학적 조성물" 및 "제형"은 상호교환적으로 사용된다.

[0041] 용어 "치료"는 포유동물에서 질환에 대한 치료약의 임의의 투여 또는 적용을 나타내며, 예를 들면, 퇴행을 야기하거나, 상실하거나 없어지거나 결함이 있는 기능을 회복 또는 복구시키거나; 비효율적인 프로세스를 자극함으로써 질환을 억제시키고, 이의 발병을 막고, 질환을 완화시킴을 포함한다. 상기 용어는 목족하는 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 수득함을 포함하며, 포유동물에서 병리학적 상태 또는 장애의 임의의 치료를 포괄한다. 상기 효과는 장애 또는 이의 증상을 전부 또는 일부 예방하는 측면에서 예방학적일 수 있고/있거나, 장애 및/또는 장애에 기인할 수 있는 부작용에 대한 부분적인 또는 완전한 치유의 측면에서 치료학적일 수 있다. 이것은 (1) 장애에 걸리기 쉬울 수 있지만 증상이 있는 것은 아닌 대상체에서 장애가 발생하거나 재발하는 것을 예방하거나, (2) 장애의 발병을 막는 것과 같이 장애를 억제시키거나, (3) 예를 들면, 상실하거나 없어지거나 결함이 있는 기능을 회복 또는 복구시키거나, 비효율적인 프로세스를 자극함으로써 장애 또는 이의 증상의 퇴행을 야기하는 것과 같이 숙주가 더 이상 장애 또는 이의 증상을 앓지 않도록 장애 또는 적어도 이와 관련된 증상을 정지 또는 중단시키거나, (4) 장애 또는 이와 관련된 증상들을 완화, 경감 또는 개량시킴(여기서, 개량은 넓은 의미에서 적어도 염증, 통증 및/또는 종양 크기와 같은 파라미터의 크기에 있어서의 감소를 나타내는데 사용된다)을 포함한다.

[0042] 용어 "질환"은 의학적 중재를 필요로 하거나 의학적 중재가 요구되는 임의의 상태, 감염, 장애 또는 증후군을 나타낸다. 이러한 의학적 중재는 치료, 진단 및/또는 예방을 포함할 수 있다.

[0043] 용어 "치료학적 유효량"은 살아있는 대상체에 투여하는 경우 살아있는 대상체에 대해 목적하는 효과를 달성하는 양을 나타낸다. 예를 들면, 살아있는 대상체에 투여하기 위한 본 발명의 폴리펩타이드의 유효량은 인테그린  $\alpha$   $\beta$  3-매개된 질환을 예방 및/또는 치료하는 양이다. 정확한 양은 치료의 목적에 따라 좌우될 것이며, 공지된 기술들을 사용하여 당업계의 숙련가에 의해 확인될 것이다. 당업계에 공지된 바와 같이, 전신 대 국소 전달에 대한 적응, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 식이, 투여 시간, 약물 상호작용 및 상태의 중증도가 필요할 수 있으며, 당업계의 숙련가들에 의해 일반적인 실험으로 확인될 것이다.

[0044] 용어 " $T_1$ "은 에타너셉트 제형을 40°C에서 약 1주일 동안 저장했을 때의 시점을 나타낸다.

[0045] 용어 " $T_2$ "는 에타너셉트 제형이 40°C에서 약 2주일 동안 저장했을 때의 시점을 나타낸다.

[0046] 용어 " $T_4$ "는 에타너셉트 제형이 40°C에서 약 4주일 동안 저장했을 때의 시점을 나타낸다.

[0047] 용어 " $M_3$ "은, 집합적으로, 5°C의 저장 온도에서 약 1개월, 약 2개월 또는 약 3개월의 저장 기간 후의 세 가지 시점, 특히 에타너셉트 제형에 대해 관찰되는 분석 결과를 나타낸다. 예를 들면,  $M_3$ 에서 수행되는 분석에 대한 본원의 참조는, 이러한 분석이 약 1개월, 약 2개월 또는 약 3개월로부터 선택되는 지속시간 동안 에타너셉트 제형을 저장했을 때의 시점에서 수행됨을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 에타너셉트 제형이  $M_3$ 에서의 특정 분석 값 또는 측정치를 유도한다는 본원의 요건은, 요구되는 값이 다음의 저장 지속시간 중의 하나 이상에 상응하는 시점에서 관찰된다면 충족된다: 5°C에서 대략 1개월, 대략 2개월 또는 대략 3개월의 저장시.

[0048] 용어 "피크 1", "피크 2" 및 "피크 3"은, HIC 크로마토그래피 결과의 논의와 관련하여 본원에 사용되는 경우, 미국 특허 제7,294,481호에 논의된 동일한 피크 1, 2 및 3을 나타낸다.

#### 발명의 양태

[0050] 에타너셉트의 수성 제형 및 동결건조 제형을 포함하여 에타너셉트(Enbrel®)를 함유하는 약제학적 조성물을 장기적으로 저장하는 경우, 에타너셉트의 활성을 응집 및/또는 단편 및 올리고머의 형성을 포함한 화학적 분해를

통한 에타너셉트 단량체의 불안정성으로 인해 상실되거나 감소될 수 있다. 따라서, 본 발명은 에타너셉트가 저장 과정에 걸쳐 액체 또는 동결 상태에서 안정하도록 에타너셉트의 안정한 장기 저장을 가능케 하는 에타너셉트의 수성 제형의 몇몇 양태들을 제공한다. 제공된 제형은 아르기닌을 함유하지 않으며 재수화와 같은 추가의 단계들을 필요로 하지 않는 제형을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0051] 이러한 양태들은 아래에 보다 상세하게 설명되어 있다.

#### 에타너셉트

[0053] 본 발명의 조성물 모두는 에타너셉트(Enbrel®)를 포함한다. 본 출원의 배경 부분에 설명된 바와 같이, 에타너셉트는 사람 IgG1의 Fc 부분에 결합된 사람 75 킬로달톤(p75) 종양 괴저 인자 수용체(TNFR)의 세포외 리간드-결합 부분으로 이루어진 이량체성 융합 폴리펩타이드이다. 에타너셉트는 934개의 아미노산으로 이루어진다. 에타너셉트의 Fc 성분은 사람 IgG1의 불변 중쇄 2(CH2) 도메인, 불변 중쇄 3(CH3) 도메인 및 헌지 영역을 함유한다. Fc 도메인은 상기한 도메인들 중의 하나 또는 전부를 함유할 수 있다.

[0054] 본 발명의 약제학적 조성물에서 저장하기에 적합한 에타너셉트는, 에타너셉트를 발현하는 살아있는 숙주 세포, 예를 들면, 항체의 경우 하이브리도마, 또는 융합 폴리펩타이드 또는 항체의 경우에 폴리펩타이드를 생산하기 위해 유전자 조작된 숙주 세포에 의해 생산될 수 있다. 폴리펩타이드를 생산하기 위해 세포를 유전자 조작하는 방법들은 당업계에 널리 공지되어 있다[문헌 참조: Ausubel et al., eds. (1990), Current Protocols in Molecular Biology (Wiley, New York)]. 이러한 방법들은 폴리펩타이드를 암호화하여 살아있는 숙주 세포에 발현되도록 하는 핵산을 도입함을 포함한다. 이러한 숙주 세포는 박테리아 세포, 진균 세포, 또는 바람직하게는, 배양물에서 성장한 동물 세포일 수 있다. 박테리아성 숙주 세포는 에쉐리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 세포를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 적합한 이. 콜라이 균주의 예는 다음을 포함한다: HB101, DH5.alpha, GM2929, JM109, KW251, NM538, NM539, 및 외래성 DNA를 절단하지 못하는 임의의 이. 콜라이 균주. 사용될 수 있는 진균성 숙주 세포는 사카로마이세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*), 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 및 아스페길러스(*Aspergillus*) 세포를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 사용될 수 있는 동물 세포주의 몇가지 예는 CHO, VERO, BHK, HeLa, Cos, MDCK, 293, 3T3 및 W138이다. 당업계의 숙련가들에 의해 널리 공지된 방법(예를 들면, 형질전환, 바이러스 감염 및/또는 선별)을 사용하여 새로운 동물 세포주를 확립할 수 있다. 임의로, 에타너셉트는 숙주 세포에 의해 배지로 분비될 수 있다.

[0055] 발현된 에타너셉트의 정제는 임의의 표준 방법으로 수행할 수 있다. 에타너셉트가 세포내에서 생산되는 경우, 미립자 잔해는, 예를 들면, 원심분리 또는 한의여과에 의해 제거된다. 에타너셉트가 배지로 분비되는 경우, 이러한 발현 시스템으로부터의 상청액을 먼저 표준 폴리펩타이드 농축 필터를 사용하여 농축시킬 수 있다. 단백질분해를 억제하기 위해 프로테아제 억제제를 또한 가할 수 있으며, 미생물의 성장을 방지하기 위해 항생제를 포함시킬 수 있다.

[0056] 에타너셉트는, 예를 들면, 하이드록시아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 및 친화성 크로마토그래피, 및 단백질 A 크로마토그래피, 이온-교환 컬럼에서의 분별, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상에서의 크로마토그래피, 헤파린 SEPHAROSET® 상에서의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지 크로마토그래피(예를 들면, 폴리아스파르트산 컬럼), 크로마토포커싱(chromatofocusing), SDS-PAGE 및 황산암모늄 침전을 포함하지만 이에 제한되지 않는 공지되거나 아직 밝혀지지 않은 정제 기술의 임의의 조합을 사용하여 정제 할 수 있다.

#### 크실리톨로 안정화된 에타너셉트

[0058] 본 발명은, 에타너셉트 및 상기 에타너셉트의 불안정성, 응집 및/또는 단면화를 억제시키는 안정화제를 포함하는 안정화된 수성 약제학적 조성물을 제공하고, 여기서, 상기 안정화제는 크실리톨, 또는 크실리톨과 메글루민과의 배합물을 포함한다.

[0059] 임의의 특정 이론에 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 크실리톨은 바람직하지 않은 3급 또는 4급 착물에서 회합하는 에타너셉트의 경향을 감소시켜, 따라서 에타너셉트의 응집을 감소시키는 것으로 간주된다. 아마, 크실리톨은 형태 안정화제로서 작용하고, 이에 의해 응집체에 대한 에타너셉트의 경향을 감소시킨다. 응집 감소는 장시간, 예를 들면, 2년 초과 동안 지속되는 것으로 간주된다. 크실리톨의 안정화 효과는 응집체에서의 감소로

제한되지 않지만, 에타너셉트의 안정화의 다른 측면을 유발할 수 있다.

[0060] 안정화를 위해 크실리톨을 포함하는 바람직한 안정화된 에타너셉트 제형은, 안정화가 크실리톨과 메글루민과의 배합물에 의해 제공된 하나이다.

[0061] 본 발명의 약제학적 조성물은 정제된 에타너셉트와 크실리톨, 또는 메글루민과 배합된 크실리톨을 배합함으로써 제조할 수 있다. 추가로, 완충제, 장성 개질제(tonicity modifier) 및 추가의 부형제 및 다른 통상적으로 사용되는 불활성 성분을 필요에 따라 가할 수 있다. 간소화를 위해, 이들은 명세서 후반에서 보다 상세하게 논의된다. 당업계의 통상의 숙련가는 조성물에 포함되는 각종 성분들의 배합은 어떠한 적절한 순서로도 수행될 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들면, 완충제를 먼저, 중간에 또는 마지막에 가할 수 있고, 장성 개질제를 또한 먼저, 중간에 또는 마지막에 가할 수 있다. 당업계의 통상의 숙련가는 또한 이러한 화학물질의 일부는 특정 배합물에서 비상용성일 수 있고, 이에 따라, 유사한 특성을 갖지만 관련 혼합물에서 상용성인 상이한 화학물질로 용이하게 대체된다는 것을 이해할 것이다.

[0062] 본 발명의 크실리톨 안정화된 에타너셉트 제형은 약 25 내지 75mg/ml의 에타너셉트; 약 1 내지 10wt.%의 크실리톨; 약 1 내지 30mM의 인산나트륨; 임의로 약 5wt.% 이하의 메글루민; 임의로 약 5mM 이하의 NaCl; 및 임의로 약 5wt.% 이하의 수크로즈를 포함할 수 있다.

[0063] 추가로 메글루민, 염화나트륨 및 수크로즈를 함유하는 크실리톨 안정화된 에타너셉트 제형은, 크실리톨 이외에, 약 1 내지 100mM의 NaCl; 약 1 내지 5wt.%의 수크로즈; 및 조성물의 약 1 내지 5wt.% 양의 메글루민을 포함할 수 있다.

[0064] 메글루민 대신에, 본 발명은 또한, 만노실글리세레이트, 만노실락테이트, 만노실글리콜레이트 및 디글리세롤포스페이트의 사용을 고려한다.

[0065] 추가의 양태에서, 크실리톨 안정화된 에타너셉트 제형은 약 25 내지 약 75mg/ml의 에타너셉트; 및 에타너셉트의 불안정성, 응집 및/또는 단편화를 억제시키는 안정화제를 포함할 수 있고, 여기서, 상기 안정화제는 조성물의 약 10wt.% 이하를 구성하는 양의 크실리톨이고, 상기 조성물은 T<sub>2</sub>에서의 SEC 분석에서의, 약 80wt.% 내지 약 95wt.%의 단량체 함량; T<sub>2</sub>에서의 SEC 분석에서의, 약 4wt.% 미만, 바람직하게는 약 3wt.% 미만의 응집체(들) 함량; 및 T<sub>2</sub>에서의 SEC 분석에서의, 약 8wt.% 미만, 바람직하게는 약 6wt.% 미만의 단편 3 함량을 특징으로 하고; 상기 조성물은 약 6.0 내지 약 7.0, 보다 바람직하게는 약 6.0 내지 약 6.6, 가장 바람직하게는 약 6.3 내지 약 6.5의 pH를 갖는다.

[0066] 크실리톨, 또는 메글루민과 배합된 크실리톨을 함유하는 상기 언급한 것과 같은 안정화된 에타너셉트 제형에서, 상기 제형은 보다 바람직하게는 하기를 특징으로 한다:

[0067] (a) T<sub>4</sub>에서의 SEC 분석에서의, 약 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96 또는 97wt.% 초과의 단량체 함량; 및 약 3, 2 또는 1wt.% 미만의 응집체(들) 함량; 및

[0068] (b) T<sub>2</sub>에서의 HIC 분석에서의, HIC 크로마토그램의 피크 1로 나타나는 상기 조성물의 양 약 3, 2 또는 1wt.% 미만; HIC 크로마토그램의 피크 2로 나타나는 상기 조성물의 양 80, 81, 82, 83, 84 또는 85wt.% 초과; 및 HIC 크로마토그램의 피크 3으로 나타나는 상기 조성물의 양 약 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14 또는 13wt.% 미만; 및

[0069] (c) T<sub>4</sub>에서의 HIC 분석에서의, HIC 크로마토그램의 피크 1로 나타나는 상기 조성물의 양 약 3, 2 또는 1wt.% 미만; HIC 크로마토그램의 피크 2로 나타나는 상기 조성물의 양 80, 81, 82, 83, 84 또는 85wt.% 초과; 및 HIC 크로마토그램의 피크 3으로 나타나는 상기 조성물의 양 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14 또는 13wt.% 미만.

[0070] 용어 "SEC", "T<sub>2</sub>", "T<sub>4</sub>", "HIC", "단량체 함량", "응집체(들)" 및 "단편 3", "피크 1", "피크 2", "피크 3"은 하기 실시예에 정의되어 있다.

[0071] 크실리톨, 또는 메글루민과 배합된 크실리톨을 함유하는 특히 바람직한 제형은 T<sub>4</sub> 또는 T<sub>2</sub>에서의 HIC 분석에서의, HIC 크로마토그램의 피크 1로 나타나는 상기 조성물의 양 약 1% 미만; HIC 크로마토그램의 피크 2로 나타나는 상기 조성물의 양 약 95wt.% 초과, 바람직하게는 약 99wt.% 초과; 및 HIC 크로마토그램의 피크 3으로 나타나는 상기 조성물의 양 약 1wt.% 미만을 가짐을 특징으로 한다. 특정 크실리톨-안정화된 제형은 상술된 실시예에 제공된다.

- [0072] 본 발명이 아르기닌의 사용을 배제하지는 않지만, 본 발명에 따른 안정화를 위해 크실리톨을 포함하는 에타너셉트 제형은 아르기닌을 함유하지 않거나 아르기닌을 본질적으로 함유하지 않는다.
- [0073] 제공된 약제학적 조성물의 추가의 성분들
- [0074] 본 발명의 제형은 또한 완충제, 장성 개질제, 부형제, 약제학적으로 허용되는 담체 및 약제학적 조성물의 기타의 통상적으로 사용된 불활성 성분들을 포함할 수 있다. 간소화를 위해, 이들은 본 출원의 후반부에 보다 상세하게 논의된다.
- [0075] 완충제는 pH를 목적하는 범위로 유지시킨다. 적합한 완충제는 히스티딘, 인산칼륨, 나트륨 또는 칼륨 시트레이트, 말레산, 암모늄 아세테이트, 트리스-(하이드록시메틸)-아미노메탄(트리스), 각종 형태의 아세테이트 및 디에탄올아민을 포함한다. 제형 중의 완충제의 농도는 바람직하게는 약 1mM 내지 약 1M, 보다 바람직하게는 약 10mM 내지 약 200mM이다. 완충제는 당업계에 널리 공지되어 있으며, 공지된 방법들로 제조되고, 시판 공급업체로부터 구입 가능하다.
- [0076] 적합한 완충제의 예는 포스페이트, 히스티딘, 시트레이트, 말레이트, 타르트레이트, 석시네이트, 아세테이트, 트리스-(하이드록시메틸)-아미노메탄(트리스), 바이카보네이트이다.
- [0077] 바람직한 양태에서, 완충제는 인산나트륨이다.
- [0078] 바람직한 양태에서, 약제학적 조성물의 pH는 생리학적 수준이거나 그 부근이다. 따라서, 바람직하게는, 제공된 조성물의 pH는 약 5.8 내지 약 8.4; 보다 더 바람직하게는 약 6.2 내지 약 7.4이다. 당업계의 통상의 숙련가는 특정 제형에서 에타너셉트의 안정성 및 용해도를 최대화시키기 위해 필요에 따라 pH를 조절할 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 생리학적 범위를 벗어나지만 환자에게 허용 가능한 pH의 에타너셉트 제형 또한, 본 발명의 범위 내에 있다.
- [0079] 장성 개질제는 용액의 삼투압에 기여하는 분자이다. 약제학적 조성물의 삼투압은 바람직하게는 활성 성분의 안정성을 최대화하고/하거나, 투여시 환자의 불편을 최소화하도록 조절된다. 약제학적 조성물이 혈청과 등장성이 고, 즉, 동일하거나 유사한 삼투압을 갖는 것이 일반적으로 바람직하며, 이것은 장성 개질제의 첨가에 의해 달성된다.
- [0080] 바람직한 양태에서, 제공된 제형의 삼투압은 약 180 내지 약 420mOsM이다. 그러나, 삼투압은 특정 조건이 요구됨에 따라 보다 높거나 낮을 수 있는 것으로 이해되어야 한다.
- [0081] 삼투압을 조절하는데 적합한 장성 개질제의 예는 아미노산(아르기닌은 포함하지 않음)(예를 들면, 시스테인, 히스티딘 및 글리신), 염(예를 들면, 염화나트륨, 염화칼륨 및 시트르산나트륨) 및/또는 당류(예를 들면, 수크로즈, 글루코즈 및 만니톨)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0082] 바람직한 장성 개질제는 글리신, 알라닌, 염화나트륨, 염화칼륨 및 황산나트륨이다.
- [0083] 바람직한 양태에서, 제형 중의 장성 개질제의 농도는 바람직하게는 약 1mM 내지 약 1M, 보다 바람직하게는 약 10mM 내지 약 200mM이다. 장성 개질제는 당업계에 널리 공지되어 있으며, 공지된 방법들로 제조되고 시판 공급업체로부터 이용 가능하다.
- [0084] 용액 속에서도(또한 건조된 형태 또는 동결된 형태에서도) 폴리펩타이드를 안정화시키는, 화학적 첨가제, 공-용질 또는 공-용매라고도 하는 부형제를 또한 약제학적 조성물에 가할 수 있다. 부형제는 당업계에 널리 공지되어 있으며, 공지된 방법들로 제조되고 시판 공급업체로부터 이용 가능하다.
- [0085] 적합한 부형제의 예는 당/폴리올, 예를 들면: 수크로즈, 락토즈, 글리세롤, 크실리톨, 소르비톨, 만니톨, 말토즈, 이노시톨, 트레할로스, 글루코즈; 중합체, 예를 들면: 혈청 알부민(소 혈청 알부민(BSA), 사람 SA 또는 재조합 HA), 텍스트린, 폴리(비닐 알콜) PVA, 하이드록시프로필 메틸셀룰로즈(HPMC), 폴리에틸렌이민, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈(PVP), 하이드록시에틸셀룰로즈(HEC); 비수성 용매, 예를 들면: 다가 알콜(예를 들면, PEG 및 글리세롤) 및 디메틸포름아미드(DMF); 아미노산, 예를 들면: 프롤린, L-세린, 나트륨 글루탐산, 알라닌, 글리신, 리신 하이드로클로라이드, 사르코신 및 감마-아미노부티르산; 계면활성제, 예를 들면: Tween®-80(폴리소르베이트 80), Tween®-20(폴리소르베이트 20), SDS, 폴리소르베이트, 폴록사며; 및 여러 종류의 부형제, 예를 들면: 인산칼륨, 아세트산나트륨, 황산암모늄, 황산마그네슘, 황산나트륨, 트리메틸아민 N-옥사이드, 베타인, 금속 이온(예를 들면, 아연, 칼슘 및 마그네슘), CHAPS, 모노라우레이트, 2-O-베타-만노글리세레이트 또는 상기의 임의

의 배합물을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0086] 바람직한 부형제는 수크로즈, 락토즈, 글리세롤, 크실리톨, 소르비톨, 만니톨, 말토즈, 이노시톨, 트레할로스, 글루코즈, 소 혈청 알부민(BSA), 사람 혈청 알부민(HSA), 재조합 알부민, 텍스트란, PVA, 하이드록시프로필 메틸셀룰로즈(HPMC), 폴리에틸렌이민, 젤라틴, 폴리비닐파리리돈(PVP), 하이드록시에틸셀룰로즈(HEC), 폴리에틸렌 글리콜, 에틸렌 글리콜, 글리세롤, 알라닌, 글리신, 리신 하이드로클로라이드, 사르코신, SDS, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 80, 폴록사며 188, 트리메틸아민 N-옥사이드, 베타인, 아연 이온, 칼슘 이온, 마그네슘 이온, CHAPS, 수크로즈 모노라우레이트 및 2-0-베타-만노글리세레이트이다.

[0087] 본 발명의 제형 중의 하나 이상의 부형제의 농도는 바람직하게는 약 0.001 내지 5중량%, 보다 바람직하게는 약 0.1 내지 2중량%이다.

#### [0088] 치료방법

[0089] 또 다른 양태에서, 본 발명은 치료학적 유효량의 본 발명의 약제학적 조성물을 포유동물에게 투여함을 포함하여 포유동물을 치료하는 방법을 제공하며, 여기서, 포유동물은 에타너셉트에 의해 유리하게 치료될 수 있는 질병 또는 장애를 갖는다.

[0090] 바람직한 양태에서, 에타너셉트는 조성물로 치료하고자 하는 것과 동종의 포유동물로부터 유래된다.

[0091] 바람직한 양태에서, 포유동물은 사람이다.

[0092] 제공된 조성물로 치료될 수 있는 질환 또는 장애는 류마티스 관절염, 건선성 관절염, 강직성 척추염, 베게너병(육아종증), 크론병(또는 염증성 장 질환), 만성 폐쇄성 폐질환(COPD), C형 간염, 자궁내막증, 천식, 악액질, 건선 및 아토피성 피부염을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 조성물로 치료될 수 있는 추가의 질환 또는 장애는 국제 공개공보 제WO 00/62790호, 제WO 01/62272호, 미국 특허 출원 제2001/0021380호 및 미국 특허 제7,648,702 B2호에 기재된 것들을 포함하며, 상기 문헌들의 관련 부분은 인용에 의해 본원에 포함된다.

[0093] 제공된 약제학적 조성물은 전신 주사에 의해, 예를 들면, 정맥 주사에 의해; 또는 관련 부위로의 주사 또는 적용에 의해, 예를 들면, 부위가 수술시 노출되는 경우 부위로의 직접 주사 또는 직접 적용에 의해; 또는 국소 적용에 의해, 치료를 필요로 하는 대상체에 투여될 수 있다.

[0094] 하나의 양태에서, 본 발명은 치료학적 유효량의 제공된 에타너셉트 조성물 중의 하나를 류마티스 관절염의 치료 및/또는 예방을 필요로 하는 포유동물에게 투여함을 포함하여 류마티스 관절염을 치료 및/또는 예방하는 방법을 제공한다.

[0095] 제공된 조성물 중의 에타너셉트의 치료학적 유효량은 치료하고자 하는 상태, 상태의 중증도, 사전 치료법, 및 환자의 병력 및 치료제에 대한 반응에 따라 좌우될 것이다. 적절한 용량은 이것이 한번에 또는 일련의 투여에 걸쳐 환자에게 투여될 수 있도록 담당의의 판단에 따라 조절할 수 있다.

[0096] 하나의 양태에서, 성인 용량당 에타너셉트 유효량은 약 1 내지 500mg/m<sup>2</sup>, 또는 약 1 내지 200mg/m<sup>2</sup>, 또는 약 1 내지 40mg/m<sup>2</sup> 또는 약 5 내지 25mg/m<sup>2</sup>이다.

[0097] 또는, 플랫 용량(flat dose)을 투여할 수 있으며, 이의 양은 2 내지 500mg/용량, 2 내지 100mg/용량 또는 약 10 내지 80mg/용량에 이를 수 있다.

[0098] 용량을 1주당 1회 초과 투여하고자 하는 경우, 예시적인 용량 범위는 상기한 용량 범위와 동일하거나 보다 낮고, 바람직하게는 용량당 25 내지 100mg/용량의 범위로 1주당 2회 초과 투여된다.

[0099] 또 다른 양태에서, 주사에 의한 투여를 위해 허용가능한 용량은 80 내지 100mg/용량을 함유하거나, 대안적으로, 용량당 80mg을 함유한다.

[0100] 용량은 매주, 격주 투여하거나, 수 주(예를 들면, 2 내지 8주)로 나누어 투여할 수 있다.

[0101] 하나의 양태에서, 에타너셉트는 단일 피하(SC) 주사에 의해 25 내지 75mg/ml로 투여된다.

[0102] 몇몇 예에서, 환자 상태의 개선은 약 100mg 이하 용량의 약제학적 조성물을 3주 이상의 기간에 걸쳐 1주당 1 내지 3회 투여함으로써 수득될 것이다. 목적하는 정도의 개선을 유도하기 위해서는 장기간 동안의 치료가 필요할

수 있다. 불치의 만성 상태의 경우, 섭생을 무기한으로 지속할 수 있다. 소아 환자(4-17세)의 경우, 적합한 섭생은 0.4mg/kg 내지 5mg/kg 용량의 에타너셉트를 1주당 1회 초과 투여함을 포함할 수 있다.

[0103] 또 다른 양태에서, 본 발명의 약제학적 제형은 별크 제형으로 제조할 수 있으며, 이로써, 약제학적 조성물의 성분들을 투여에 필요한 것보다 더 높게 조절하고, 투여 전에 적절하게 희석시킨다.

[0104] 약제학적 조성물은 단독 치료제로서 또는 필요에 따라 추가의 치료제와 병용하여 투여할 수 있다. 따라서, 하나의 양태에서, 제공된 치료 및/또는 예방 방법은 치료학적 유효량의 또 다른 활성제의 투여와 병용하여 사용된다. 또 다른 활성제는 본 발명의 약제학적 조성물을 투여하기 전에, 투여하는 동안 또는 투여한 후에 투여할 수 있다. 또 다른 활성제는 제공된 조성물의 일부로서, 또는 대안적으로, 별도의 제형으로서 투여할 수 있다.

[0105] 제공된 약제학적 조성물의 투여는 비경구, 경구, 협축, 설하, 비강, 직장, 복강내, 피내, 경피, 피하, 정맥내, 동맥내, 심장내, 심실내, 두개내, 기관내, 경막내 투여, 근육내 주사, 유리체내 주사 및 국소 적용을 포함한 다양한 방식으로 달성될 수 있다.

[0106] 본 발명의 약제학적 조성물은 비경구 투여, 즉, 피하, 근육내, 정맥내, 복강내, 뇌척수내, 관절내, 활액내, 유리체내 및/또는 경막내 투여에 특히 유용하다. 비경구 투여는 볼루스 주사 또는 연속 주입에 의해 수행될 수 있다. 주사용 약제학적 조성물은 방부제를 첨가한 채, 단위 투여 형태로, 예를 들면, 앰플로 또는 다중-용량 용기에 존재할 수 있다. 또한, 다수의 최신 약물 전달법이 개발되었으며, 본 발명의 약제학적 조성물은 이러한 신규한 방법들, 예를 들면, Inject-ease®, Genject®, 주사기 펜, 예를 들면, GenPen® 및 무침(needleless) 장치, 예를 들면, MediJector® 및 BioJector®를 사용한 투여에 적합하다. 본 발명의 약제학적 조성물은 또한 아직 밝혀지지 않은 투여 방법들을 위해 채택될 수 있다[문헌 참조: Langer, 1990, Science, 249:1527-1533].

[0107] 제공된 약제학적 조성물은 또한 데포트 제제로서 제형화될 수 있다. 이러한 지효성 제형은 이식(예를 들면, 피하 또는 근육내)에 의해 또는 근육내 주사에 의해 투여될 수 있다. 따라서, 예를 들면, 제형을 적합한 중합체 성 또는 소수성 물질(예를 들면, 허용 가능한 오일 중의 에멀젼으로서) 또는 이온 교환 수지로, 또는 난용성 유도체로서, 예를 들면, 난용성 염으로서 개질시킬 수 있다.

[0108] 약제학적 조성물은, 경우에 따라, 활성 성분을 함유하는 하나 이상의 단위 투여 형태를 함유할 수 있는 바이알, 팩 또는 디스펜서에 존재할 수 있다. 하나의 양태에서, 디스펜서 장치는 바로 주사하기 위한 단일 용량의 액체 제형을 갖는 시린지를 포함할 수 있다. 상기 시린지에는 투여 지침서가 첨부될 수 있다.

[0109] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 수성 약제학적 조성물을 함유하는 키트 또는 용기에 관한 것이다. 수성 약제학적 조성물 중의 폴리펩타이드의 농도는 광범위한 범위에 걸쳐 변할 수 있지만, 일반적으로 수성 제형 m1당 약 0.05 내지 약 20,000 $\mu$ g/m1의 범위 이내이다. 키트에도 사용 지침서가 첨부될 수 있다.

[0110] 본 발명은 그 안의 다수의 수정 및 변화가 당업계의 숙련가에게 자명하기 때문에 단지 예시적인 것으로서 의도되는 하기 실시예에 보다 특히 기재되어 있다.

#### 0111] 실시예

#### 0112] 크실리톨로 안정화된 에타너셉트

[0113] 바람직하게는 아르기닌 없이 크실리톨로 안정화된 에타너셉트 제형은 일반적으로 하기에 기술된 과정을 사용하여 제조하고 시험할 수 있다.

[0114] 각각의 고체 제형 성분을 소정 용적의 제형 완충액에 대해 필요한 양으로 칭량한다. 이러한 성분들을 소정 용적의 제형 완충액을 운반하고 측정할 수 있는 비이커 또는 용기에 배합한다. 제공된 표적 제형 완충액의 대략 3/4에 해당하는 용적의 탈이온수를 비이커에 가한 다음, 성분들을 용해시킨다. 완충액의 pH는 1M 수산화나트륨 및/또는 1M 염화수소를 사용하여 표적 제형 pH로 되도록 조절한다. 그후, 탈이온수의 첨가를 통해 최종 제형 완충액 용적을 표적 용적으로 증가시킨다. 에타너셉트 단백질 용액을 투석 물질 하우징(예를 들면, Thermo Scientific Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Unit 10,000 MWCO)에 배치한 다음, 이를 4°C에서 12시간 동안 목적하는 제형 완충액과 접한 채로 둔다. 제형 완충액 용적 대 단백질 용액 용적 비는 1000:1보다 낮지 않아야 한다. 그후, 투석 하우징 및 이에 담겨진 단백질 용액을 4°C에서 추가로 12시간 동안 제2의 동일 용적의 제형 완충액에 둔다. 생성된 단백질 용액을 투석 물질 하우징으로부터 제거하고, 단백질의 농도를 자외선 분광법을 사용하여 측정한다. 단백질 농도는 원심분리(예를 들면, Amicon Ultra 10,000 MWCO Centrifugal Concentrators) 및/

또는 제형 완충액으로의 희석을 사용하여 목적하는 수준으로 조절한다.

[0115] 조성물을 크기 배제 크로마토그래피(SEC), 변성 SEC(dSEC), 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC), 나이트륨 도데실설페이트 폴리아크릴아미드 젤 전기영동(SDS-PAGE)에 의해 장기 안정성에 대해, 및 다양한 시점에서의 결합 및 생활성에 대해 시험할 수 있다. 생활성은 다수의 널리 공지된 검정에 의해 측정할 수 있다.

[0116] 예를 들면, 크기 배제 크로마토그래피의 기술은 문헌[참조: Hawe et al., Pharm. Res. 2011, 28: 2302 및/또는 van Marrschootkerweerd et al., Eur. J. Pharm. Biopharm. 2011, 78: 213]에 기재되어 있다. 유사하게도, 변성 크기 배제 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피 및 나이트륨 도데실설페이트-폴리아크릴아미드 젤 전기영동의 기술들 또한 당업계의 통상의 숙련가에게 널리 공지되어 있다.

[0117] 조성물은 2년 초과의 기간에 걸쳐 안정할 것으로 간주된다. 하기 예시된 조성물은 아르기닌을 함유하지 않는다.

[0118] (제형 1:17)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
인산나이트륨, pH 6.3 (불활성)	25 mM
크실리톨 (불활성)	10 %(w/v)

[0119]

[0120] (제형 2:10)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
인산나이트륨, pH 6.31 (불활성)	25 mM
크실리톨 (불활성)	6 %(w/v)

[0121]

[0122] (제형 2:11)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
인산나이트륨, pH 6.3 (불활성)	25 mM
크실리톨 (불활성)	2.5 %(w/v)
수크로즈 (불활성 성분)	5 %(w/v)

[0123]

[0124] (제형 2:18)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
인산나이트륨, pH 6.4 (불활성)	25 mM
크실리톨 (불활성)	2.5 %(w/v)
메글루민 (불활성)	2.5 %(w/v)

[0125]

[0126] (제형 2:19)

성분	농도
에타너셉트 (활성 성분)	50 mg/ml
인산나이트륨, pH 6.24 (불활성)	10 mM
크실리톨 (불활성)	2.5 %(w/v)
메글루민 (불활성)	2.5 %(w/v)
NaCl (불활성)	2.5 %(w/v)
수크로즈 (불활성)	1 %(w/v)

[0127]

[0128] 실시예 2

[0129] 에타너셉트의 제조

[0130] 단계 1. 세포 증식. 당업계에 공지된 방식으로, 생산용 생물반응기의 접종을 위해 충분한 수의 세포들을 생성하는데 필요한 세포 증식은 에타너셉트 용합 단백질을 발현하는 CHO 세포들의 클론을 사용하여 수행한다. 이러한 발현 과정의 생성물(수확된 세포 배양액)은 추가의 불순물과 함께, 정확하게 풀딩된 에타너셉트와 부정확하게 풀딩되고/되거나 응집된 에타너셉트의 혼합물을 야기한다. 이러한 단백질 혼합물을 포함하는 수확된 세포 배양액을 세제 바이러스 불활성화(detergent viral inactivation)에 적용한다.

[0131] 단계 2. 친화성 크로마토그래피. 친화성 크로마토그래피는 종래의 단백질 A 친화성 컬럼을 사용하여 널리 공지된 방식으로 상기 단계 1에서 수득된 수확된 세포 배양물에서 수행한다. 생성물 회수율은 대략 85%이다. 수득된 생성물은 정확하게 풀딩된 에타너셉트, 부정확하게 풀딩된 에타너셉트 및/또는 정확하게 및/또는 부정확하게 풀딩된 에타너셉트의 응집물, 또는 단백질 단편을 포함하는 복합 단백질 혼합물이다. 이러한 단백질 A 친화도 컬럼 정제 단계로부터 수득된 생성물을 pH 3.5로 되도록 조절한 다음, 바이러스 불활성화 단계에 적용한다. 바이러스 불활성화 후, 생성물을 pH 5.5로 되도록 조절한 다음, 상업적으로 입수된 캡슐 필터를 사용하여 공지된 방식으로 추가로 청정화시킨다.

[0132] 단계 3A. 혼합형 양이온 교환 크로마토그래피. 31.8L(45cm 직경 × 20cm 상 높이) 충전 상 GE Healthcare Capto MMC 크로마토그래피 컬럼을 상기 단계 2에서 수득된 생성물을 정제하는데 사용한다. 사용 전에, 컬럼을 2CV의 25mM 아세테이트 pH 5.5로 평형화시키고, 2CV의 0.1N NaOH, 1M NaCl로 위생처리하고, 2CV의 25mM 아세테이트, 0.7M NaCl, pH 5.5로 중화시킨다. 그후, 컬럼을 유출물이 pH 5.5 및 3.5mS/cm일 때까지 8 내지 10CV의 25mM 아세테이트 pH 5.5로 평형화시킨다. 상기 단계 2로부터의 단백질 A 풀(pool)을 WFI로 ≤6mS/cm로 되도록 회석시키고, 각 사이클에 대해 15g/L 배지 이하의 컬럼 부하량으로 되도록 적용한다. 컬럼을 200cm/h의 선 속도에서 작동시켜 6분의 체류 시간을 제공한다. 부하시킨 후, 컬럼을 2CV의 25mM 아세테이트 pH 5.5로 세척한다. 그후, 생성물을 8.5CV, 15% 내지 85% 구배의 25mM 아세테이트 pH 5.5 내지 25mM 아세테이트, 0.7M NaCl, pH 5.5로 용출시킨다. 생성물 수집은 0.15 OD(A280, 1.0cm 경로 길이)에서 시작하고, 최대 피크의 50%에서 종료한다. 용출물 용적은 대략 5CV이다. 잔류 생성물 및 오염물을 2CV의 10mM 트리스, 1M NaCl, pH 8.0을 사용하여 컬럼으로부터 스트리핑하고 버린다. 혼합 모드 컬럼으로부터 수득된 생성물을 Millipore Opticap XL10, 0.22 $\mu$ m Durapore 캡슐 필터, (0.69 $\text{m}^2$ )를 사용하여 여과한다. 이러한 단계로부터 수득된 생성물은 단계 2에서 수득된 단백질 A 물질의 약 70%의 회수율을 나타낸다.

[0133] 단계 3B. 혼합 모드 음이온 교환 크로마토그래피. 27.0L(45cm 직경 × 17cm 상 높이) 충전 상 GE Healthcare Capto Adhere 크로마토그래피 컬럼을 상기 단계 3A에서 수득된 생성물을 추가로 정제하는데 사용한다. 사용 전에, 컬럼을 2CV의 25mM 트리스, pH 8.0으로 평형화시키고, 2CV의 0.1N NaOH, 1M NaCl로 위생처리하고, 2CV의 25mM 트리스, pH 8.0으로 중화 및 평형화시킨다. 생성물 부하 전에, 컬럼을 3CV의 10mM 트리스, pH 8.0으로 평형화시킨다. 상기 단계 3A로부터의 Capto MMC 풀을 풀 kg당 ~0.045kg의 1M 트리스, pH 8.3을 사용하여 pH 8.1로 되도록 조절한다. 상기 단계 3A로부터의 생성물을 WFI로 1:3.8로 인라인으로 회석시켜 전도율을 12.0mS/cm 및 pH 8.0로 조절한다. 그후, 생성된 물질을 15g/L 배지 이하의 컬럼 부하량으로 적용한다. 컬럼을 170cm/h의 선 속도에서 작동시켜 6분 체류 시간을 제공한다. 부하시킨 후, 컬럼을 2CV의 25mM 트리스, pH 8.0으로 세척한다. 그후, 생성물을 10CV 구배(20% 내지 90%)의 25mM 트리스, pH 8.0 내지 10mM 트리스, 1M NaCl, pH 8.0으로 용출시킨다. 생성물 수집은 0.15 OD(A280, 1.0cm 경로 길이)에서 시작하고, 최대 피크의 25%에서 종료한다. 용출물 용적은 4 내지 6CV이다. 용출된 생성물을 시판중인 캡슐 필터를 사용하여 여과한 다음, 공지된 방식으로 바이러스성 여과 및 접선 유동 여과 단계(tangential flow filtration step)들에 적용한다. 단계 3B(최종 바이러스성 및 접선 유동 여과 단계 포함)로부터의 전반적인 생성물 회수율은 대략 68%이었다. 여과 단계 전에 측정한 생성물 회수율은 약 75%이었다. 이러한 단계로부터의 용출 분획에 대해 수득된 HIC 데이터의 도식적 표현이 도 12에 나타내어져 있다.

[0134] 분석: 당해 실시예에서 수득된 최종 여과된 생성물은, HIC로 측정하여 약 90wt% 초과의 정확하게 풀딩된 에타너셉트; HIC로 측정하여 5wt% 미만의 부정확하게 풀딩된 에타너셉트 조각; HIC 분석에 의해 약 3wt% 미만의 잘려진 물질(이의 TNFR 부분이 절단된 에타너셉트의 단편인 것으로 간주됨) 및 크기 배제 크로마토그래피로 측정하여 95wt% 초과의 정확하게 풀딩된 에타너셉트와 부정확하게 풀딩된 에타너셉트의 배합량을 갖는 것으로 밝혀졌다.

[0135] 에타너셉트 제형의 분석

[0136] A. 열 안정성 저장

투석 및 농축 후, 상기 예시된 에타너셉트 제형의 샘플을 생물 안전 작업대(bio safety cabinet)에서 멸균 여과하였다. 멸균된 피펫 및 오토클레이브 피펫 텁을 사용하여, 에타너셉트 제형의 샘플을 미리 라벨을 붙여 오토클레이빙시킨 1mL 동결건조 바이알로 옮겼다. 바이알을 멸균 부틸 스토퍼로 막고, 알루미늄 캡으로 크럼핑시켰다. 그후, 모든 바이알을 열 안정성 오븐으로 옮겼다. 샘플을 두 가지 열 안정성 섭생에 적용하였다: (1) 40°C에서 2주 및 (2) 25°C에서 4주. 본 명세서 전반에 걸쳐, 이러한 두 가지 온도 섭생을 각각 "T<sub>2</sub>" 및 "T<sub>4</sub>"로 나타낸다.

[0138] B. 크기 배제 크로마토그래피(SEC)

본원에 기재된 에타너셉트 제형을 분석물질을 크기에 의해 분리하는 고성능 액체 크로마토그래피 방법인 크기 배제 크로마토그래피(SEC)의 널리 공지된 기술을 사용하여 분석하였다(문헌 참조: Rogner, M. (2000). Size Exclusion Chromatography. *Protein Liquid Chromatography*. M. Kastner. Amsterdam, Elsevier. 61: 89-145.). 상기한 에타너셉트 샘플의 열 안정성을 평가하기 위해, 샘플을 문헌(참조: van Maarschalkerweerd, A., G. J. Wolbink, et al. (2011). "Comparison of analytical methods to detect instability of etanercept during thermal stress testing." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 78(2): 213-221)에 기초하여 SEC 방법으로 실험하였다. 이동상 완충액은 50mM 인산나트륨 일염기성 일수화물 및 150mM 아르기닌을 함유하도록 제조하였다. pH는 1M HCl을 사용하여 6.5로 되도록 조절하였다. 모든 분리는 Tosoh TSK-Gel G4000 SWx1 7.8mm × 30cm(cat. no. 8542)에 직선으로 부착된 Tosoh TSK-Gel SWx1 6mm × 4cm 가드 컬럼(cat. no. 8543)을 사용하여 수행하였다. 분리를 수행하기 위해, 컬럼을 실온(23°C)으로 되게 하고, 0.5mL/min의 유속에서 이동상으로 평형화시켰다. 5μl의 50mg/ml 에타너셉트 제형을 오토샘플러를 사용하여 컬럼에 주입하였다. 분리는 0.5mL/분의 유속에서 30분에 걸쳐 달성되었다. 이 시간 동안 280nm의 파장에서 컬럼 용출물을 모니터링하였다.

[0140] C. 크기 배제 크로마토그래피 크로마토그램들의 통합

모든 통합은 Chromleon 소프트웨어(Dionex)를 사용하여 수행하였다. 통합 전에, 에타너셉트를 함유하지 않는 완충액에 대한 SEC 크로마토그램을 모든 크로마토그램으로부터 공제하였다. 모든 통합은 12분 내지 26분의 체류 시간 사이에 수행하였다. 피크를 정의하기 위해 몇몇 파라미터들을 사용하였다. 검출된 피크에 대한 최소 면적은 0.05 mAU \* min으로 설정하였다. 피크 검출을 위한 이차원 감도(two-dimensional sensitivity)는 0.01mAU 및 75초로 설정하였다. 피크 솔더(peak shoulder)를 수동 통합 도구를 사용하여 수동으로 추가하였다. 모든 검출된 피크를 2단계로 수동으로 조절하였다. 첫째, 피크 베이스라인(피크의 바닥 경계선)을 수평으로 조절하였다. 둘째, 피크 베이스라인의 수직 위치를 크로마토그램 베이스라인의 수직 위치로 조절하였다. 크로마토그램 베이스라인 값은 분석물질의 부재하에서의 시그널로서 정의하였다. 분석물질의 부재하에서의 시그널은 12분의 체류 시간에서의 흡광도(mAU)로서 정의하였다.

[0142] D. 에타너셉트 제형의 SEC 분획

상기한 에타너셉트 제형의 SEC 분석에서, 3개의 SEC 크로마토그래피 분획이 확인되고 연구되었다. 분석된 분획은 SEC 컬럼으로부터의 용출 순서에 따라 다음과 같았다: (1) 비순상 에타너셉트 분자 간의 비공유 정전기 인력을 통해 조립될 것 같은 비순상 에타너셉트 TNFR:FC 융합 단백질의 응집체를 나타내는 고분자량 분획(이하, 응집체(들) 또는 응집체(들) 함량); (2) 비순상 에타너셉트 TNFR:Fc 융합 단백질을 나타내는 단량체 함량(이하, "단량체 함량"의 "단량체"라고 함); (3) 분자의 헌지 영역에서 융합 단백질의 Fab부분의 암(arm)의 손실시 TNFR:분자 융합 단백질의 한 부분이 단량체로부터 절단되어지는 에타너셉트 분자의 하나의 단편 또는 단편의 집단을 나타낼 것 같은 분획. SEC에 의해 측정되는 바와 같이, 가장 통상적인 단편 또는 잘려진 조각을 단편 3이라고 한다. SEC 분석을 수행하는데 있어서, 응집체가 먼저 용출된 다음, 단량체가 용출되고, 이어서 단편 3이 용출되는 것으로 관찰될 것이다.

[0144] 하기 표는 상기한 바와 같은 SEC 분석에 의해 측정된 응집체(들), 단량체 및 단편 3의 상대량을 보여준다.

[0145] [표 1]

[0146] 단량체의 SEC 분석

[0147] 주지: 표 I, II 및 III에 보고된 양은 중량%이다.

[0148]  $T_0 = 5^{\circ}\text{C}$ 에서 유지시키고 생성된지 24시간 이내에 분석한 제형

[0149]  $T_1 = 40^{\circ}\text{C}$ 에서 1주일 동안 저장한 제형

[0150]  $T_2 = 40^{\circ}\text{C}$ 에서 2주일 동안 저장한 제형

제형 번호	$t_0$	$t_1$	$t_2$
시판증인 Enbrel (비교용) [1:2]	98.81	92.58	87.64
1:17	98.02	93.90	<b>87.53</b>
2:10	98.09	--	87.56
2:11	98.10	--	88.03
2:18	98.10	--	89.19
2:19	98.19	--	89.63

[0151]

[표 II]

[0153]

응집체의 SEC 분석

제형 번호	$t_0$	$t_1$	$t_2$
시판증인 Enbrel (비교용)	0.09	0.59	1.02
1:17	0.31	0.70	2.17
2:10	0.29	--	2.57
2:11	0.31	--	1.68
2:18	0.29	--	1.53
2:19	0.26	--	1.24

[0154]

[표 III]

[0156]

단편 3의 분석

제형 번호	$t_0$	$t_1$	$t_2$
시판증인 Enbrel (비교용)	0.00	3.30	6.29
1:17	0.00	2.33	<b>4.10</b>
2:10	0.00	--	5.10
2:11	0.00	--	5.68
2:18	0.00		4.24
2:19	0.00		4.34

[0157]

[0158] 에타너셉트 제형의 HIC 분석

[0159]

HIC 크로마토그래피는 당업계에 공지된 방식으로 수행될 수 있고 인용에 의해 본원에 포함되는 미국 특허 제 7,294,481호에 일반적으로 기재된 방식으로 수행하였다. 샘플을  $t_0$ (5°C에서 제조한지 24시간 이내)에서 평가하고, 다시 25°C에서 2주 저장한 후( $t_2$ ) 또는 25°C에서 4주 저장한 후 평가하였다. 본 발명의 제형의 HIC 크로마토그램에서, HIC 크로마토그램에서 피크 1은 "단편 3"이거나 이를 포함하는 것으로 간주되며, 이것은 SEC 데이터의 논의부에서 상기 언급된 바와 같이 SEC를 사용하여 확인 및 정량되고; 피크 2는 SEC 데이터의 논의부에서 상기 언급된 바와 같은 에타너셉트 단량체이며; 피크 3은 SEC 데이터의 논의부에서 상기 언급된 바와 같은 "응집체(들)"를 포함한다. 여기서 사용되는 바와 같은 용어 "피크 1", "피크 2" 및 "피크 3"은 또한 인용에 의해 본원에 포함되는 미국 특허 제7,294,481호의 도 4에 도시되고 기재된 HIC 피크 1, 피크 2 및 피크 3에 대한 참조를 구성하는 것으로 또한 이해해야 한다.

[0160]

본 발명의 또 다른 양태들은 명세서 및 본원에 기재된 본 발명의 실행의 고려로부터 당업계의 숙련가들에게 자명할 것이다. 명세서 및 실시예는 단지 예시적인 것으로 간주되며, 본 발명의 실제 범위 및 취지는 다음의 특허청구범위에 의해 나타내어지는 것으로 의도된다.