(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0113271
(43) 공개일자 2021년09월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/08 (2006.01) *A61K 38/48* (2006.01)
A61K 47/10 (2017.01) *A61K 47/18* (2017.01)
A61K 47/26 (2017.01) *A61K 9/19* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/08 (2013.01)
A61K 38/4886 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7024557
(22) 출원일자(국제) 2020년01월03일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년08월03일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/012202
(87) 국제공개번호 WO 2020/142701
국제공개일자 2020년07월09일
(30) 우선권주장
62/788,916 2019년01월06일 미국(US)

(71) 출원인
엔도 글로벌 에스테틱스 리미티드
아일랜드 볼스브릿지 더블린 4 시몬스코트 로드 미네르바 하우스 퍼스트 플로어
(72) 발명자
스쿠루 카루나카르
미국 펜실베니아주 19060 가닛 밸리 브룩스톤 드라이브 1367
(74) 대리인
장훈

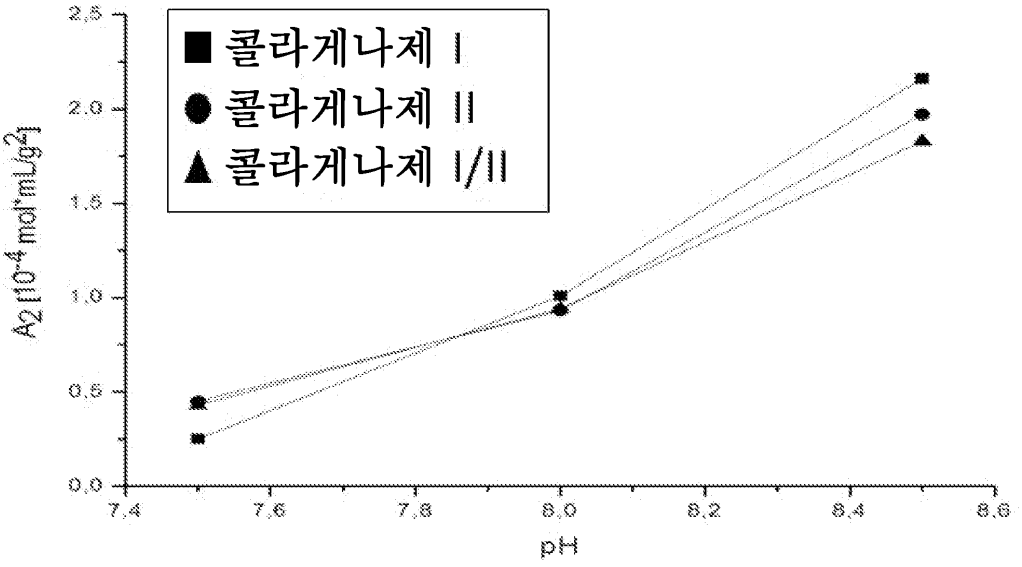
전체 청구항 수 : 총 38 항

(54) 발명의 명칭 **콜라게나제 제형 및 이의 제조 방법**

(57) 요 약

개선된 콜라게나제-함유 제형 및 이의 제조 방법이 본원에 개시된다. 콜라게나제-함유 제형은 콜라게나제, 약 30 mM 내지 약 240 mM의 디삭카라이드, 약 50 mM 내지 약 800 mM의 만니톨, 및 약 6 mM 내지 약 10 mM의 Tris-HCl을 포함한다. 동결건조되고 재구성된 제형을 또한 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 47/10 (2013.01)
A61K 47/18 (2013.01)
A61K 47/26 (2013.01)
A61K 9/19 (2013.01)
C12Y 304/24003 (2013.01)
C12Y 304/24007 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

콜라게나제;

약 30 mM 내지 약 240 mM의 디삭카라이드;

약 50 mM 내지 약 800 mM의 만니톨; 및

약 6 mM 내지 약 10 mM의 Tris-HCl

을 포함하는 제형.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 콜라게나제가 콜라게나제 I을 포함하는, 제형.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 콜라게나제 I이 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는, 제형.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 콜라게나제가 콜라게나제 II를 포함하는, 제형.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 콜라게나제 II가 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는, 제형.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 콜라게나제가 콜라게나제 I 및 콜라게나제 II의 혼합물을 포함하는, 제형.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 콜라게나제 I이 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 콜라게나제 II가 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는, 제형.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 콜라게나제가 콜라게나제 클로스트리듐 히스톨리티쿰 (collagenase *Clostridium histolyticum*; CCH)인, 제형.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 디삭카라이드가 수크로스 또는 트레할로스를 포함하는, 제형.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형의 pH가 약 7.8 내지 약 8.8인, 제형.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형이:

CCH;

약 60 mM 수크로스;

약 225 mM 만니톨; 및

약 10 mM Tris-HCl

을 포함하고,

상기 제형이 약 8.5의 pH를 갖는, 제형.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 80, 또는 폴록사머 188을 포함하는 계면활성제를 추가로 포함하는 제형.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 계면활성제를 약 0.01% 내지 약 2% 포함하는, 제형.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 계면활성제를 약 0.02% 포함하는, 제형.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형이 액체인, 제형.

청구항 16

콜라게나제;

디삭카라이드;

만니톨; 및

Tris-HCl

을 포함하는 동결건조된 제형.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 콜라게나제가 콜라게나제 I을 포함하는, 동결건조된 제형.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 콜라게나제 I이 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는, 동결건조된 제형.

청구항 19

제16항에 있어서, 상기 콜라게나제가 콜라게나제 II를 포함하는, 동결건조된 제형.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 콜라게나제 II가 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는, 동결건조된 제형.

청구항 21

제16항에 있어서, 상기 콜라게나제가 콜라게나제 I 및 콜라게나제 II의 혼합물을 포함하는, 동결건조된 제형.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 콜라게나제 I이 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 콜라게나제 II가 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는, 동결건조된 제형.

청구항 23

제21항 또는 제22항에 있어서, 상기 콜라게나제가 콜라게나제 클로스트리듐 히스톨리티쿰 (CCH)인, 동결건조된

제형.

청구항 24

제16항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 디삭카라이드가 수크로스 또는 트레할로스를 포함하는, 동결건조된 제형.

청구항 25

제16항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 동결건조 전에, 상기 제형이:

CCH;

60 mM 수크로스;

225 mM 만니톨; 및

10 mM Tris-HCl을 포함하고,

약 8.5의 pH를 갖는, 동결건조된 제형.

청구항 26

제16항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 동결건조된 제형이 380 μbar 초과의 압력에서 안정한, 동결건조된 제형.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 동결건조된 제형이 약 4000 μbar의 압력에서 안정한, 동결건조된 제형.

청구항 28

제16항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 동결건조된 제형이:

(i) 적어도 36 개월 동안 2 내지 8℃;

(j) 적어도 36 개월 동안 25℃/60% 상대 습도;

(k) 적어도 6 개월 동안 40℃/75% 상대 습도; 또는

(l) (a) 내지 (c)의 임의의 조합

에서 안정한, 동결건조된 제형.

청구항 29

제16항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 동결건조된 제형이:

상기 제형을 약 -25℃ 내지 -55℃의 온도에서 냉동시켜 냉동된 제형을 형성하는 단계; 및

상기 냉동된 제형을 약 25℃ 내지 약 50℃의 온도에서 건조시켜 상기 동결건조된 제형을 형성하는 단계

를 포함하는 방법에 의해 형성되는, 동결건조된 제형.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 동결건조된 제형이:

상기 제형을 약 -25℃ 내지 -55℃의 단일 온도에서 냉동시켜 냉동된 제형을 형성하는 단계; 및

상기 냉동된 제형을 약 25℃ 내지 약 50℃의 단일 온도에서 건조시켜 상기 동결건조된 제형을 형성하는 단계

를 포함하는 방법에 의해 형성되는, 동결건조된 제형.

청구항 31

제16항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 동결건조된 제형이 72 시간 미만 동안 수행되는 동결건조 방

법에 의해 형성되는, 동결건조된 제형.

청구항 32

제16항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 동결건조된 제형이 약 380 μbar 내지 약 4000 μbar의 압력에서 수행되는 동결건조 방법에 의해 형성되는, 동결건조된 제형.

청구항 33

제16항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 단위-용량 바이알, 다중-용량 바이알, 카트리지, 또는 주사기 내에 동결건조된 제형.

청구항 34

콜라게나제;

디삭카라이드;

만니톨;

Tris-HCl;

염화칼슘; 및

염화나트륨

을 포함하는 재구성된 제형.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 콜라게나제가 콜라게나제 클로스트리듐 히스톨리티쿰 (CCH)인, 재구성된 제형.

청구항 36

제34항 또는 제35항에 있어서, 상기 디삭카라이드가 수크로스 또는 트레할로스를 포함하는, 재구성된 제형.

청구항 37

제34항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재구성된 제형이 사람 혈액에 등장성인, 재구성된 제형.

청구항 38

제16항 내지 제32항 중 어느 하나의 동결건조된 제형을 포함하는 컨테이너; 및

염화칼슘 및 염화나트륨을 함유하는 멸균 희석제를 포함하는 컨테이너

를 포함하는, 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원의 교차 참조

[0002] 본 출원은 2019년 1월 6일에 출원된 미국 가출원 번호 62/788,916호에 대한 우선권을 주장하고, 이의 개시내용은 이의 전문이 본원에 참조로서 포함된다.

[0003] 서열 목록에 대한 참조

[0004] 본 출원은 2020년 1월 3일에 만든 17,447 바이트 크기의 텍스트 화일명 "117326_000001_Sequence_Listing.txt"로서 전자로 제출된 서열 목록을 포함한다. 상기 서열 목록을 본원에 참조로서 포함한다.

[0005] 발명의 분야

[0006] 개선된 안정성 및 저장 성질을 갖는 콜라게나제-포함 제형이 본원에 개시된다.

배 경 기 술

[0007] 발명의 배경

[0008] XIAFLEX® (클로스트리듐 히스톨리티쿰 (*Clostridium histolyticum*)으로부터의 콜라게나제(CCH)는 뒤피트렌 구축 (Dupuytren's Contracture; DC) 및 페이로니병 (Peyronie's Disease; PD)의 치료를 위해 현재 승인되어 있다. 현재 승인된 XIAFLEX® 제형은 희석제 바이알과 함께 0.9 mg CCH를 3CC 바이알 중에 포함하는 동결건조된 케이크로서 공급된다. 현재 XIAFLEX® 제형 (사전-동결건조)은 바이알 중 약 72 시간의 동결건조 순환 시간을 갖는다. 효율적인 동결건조는 저장 수명 및 효소 안정성이 요구된다.

발명의 내용

[0009] 발명의 요지

[0010] 콜라게나제; 약 30 mM 내지 약 240 mM의 디삭카라이드; 약 50 mM 내지 약 800 mM의 만니톨; 및 약 6 mM 내지 약 10 mM의 Tris-HCl을 포함하는 제형을 본원에 개시한다.

[0011] 콜라게나제; 디삭카라이드; 만니톨; 및 Tris-HCl을 포함하는 동결건조된 제형을 본원에 또한 제공한다.

[0012] 콜라게나제; 디삭카라이드; 만니톨; Tris-HCl; 염화칼슘; 및 염화나트륨을 포함하는 재구성된 제형을 또한 개시한다.

[0013] 키트가 또한 제공되고, 여기서, 키트는: 개시된 동결건조된 제형 중 어느 것을 포함하는 컨테이너; 및 염화칼슘 및 염화나트륨을 포함하는 멸균 희석제를 포함하는 컨테이너를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0014] 요지, 뿐만 아니라 하기 상세한 설명은, 추가로 첨부된 도면과 함께 판독하는 경우 이해될 수 있다. 개시된 제형을 설명하기 위한 목적으로, 제형의 예시적인 실시형태를 도면에 나타내지만; 제형은 개시된 특정 실시형태에 한정되지 않는다. 도면에서:

도 1은 트레할로스, 만니톨, 및 다양한 콜라게나제를 포함하는 예시적인 제형에서 단백질 상호작용에 미치는 pH의 영향를 나타낸다.

도 2a 및 도 2b는 pH 및 부형제가 탁도(turbidity)에 미치는 효과를 분석하는 예시적인 과산화수소 검사(Challenges)을 나타낸다. NTU - 네펠로메트릭 탁도 단위(Nephelometric Turbidity Units); PS - 폴리소르베이트; T - 트레할로스, S - 수크로스, M - 만니톨; H_2O_2 - 과산화수소; 7.5, 8.0, 및 8.5는 제형 pH를 언급한다.

도 3a, 도 3b, 도 3c, 도 3d, 도 3e, 도 3f, 도 3g, 도 3h, 도 3i, 도 3j, 도 3k, 도 3l, 도 3m, 도 3n, 도 3o, 도 3p, 도 3q, 및 도 3r은 다양한 동결건조된 제형으로부터의 케이크의 주사 전자 현미경 (SEM) 이미지를 나타낸다 (Va: 0.93 mg/ml CCH; 60 mM 수크로스; 112.5 mM 만니톨; 10 mM Tris/HCl 완충제 pH 8.5; Vb: 0.93 mg/ml CCH; 60 mM 수크로스; 225 mM 만니톨; 10 mM Tris/HCl 완충제 pH 8.5; 및 Vc: 0.93 mg/ml CCH; 60 mM 수크로스; 337.5 mM 만니톨; 10 mM Tris/HCl 완충제 pH 8.5).

도 4A, 도 4B, 및 도 4C는 128 μbar (도 4A), 380 μbar (도 4B), 및 1030 μbar (도 4C)의 압력하에 다양한 동결건조된 제형으로부터의 케이크의 이미지를 나타낸다.

도 5A 및 도 5B는 128 μbar (도 5A) 및 4000 μbar (도 5B)의 압력하에 다양한 동결건조된 제형으로부터의 케이크의 이미지를 나타낸다.

도 6은 다양한 동결건조된 제형에서 시간에 따른 수분 함량을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 실시형태를 예시하는 상세한 설명

[0016] 개시된 제형은, 본원 개시내용의 부분을 형성하는 하기 상세한 설명을 수반되는 도면과 함께 참조하여 보다 용이하게 이해할 수 있다. 개시된 제형이 본원에 기재되고/되거나 나타낸 특정한 제형을 한정하지 않고, 본원에

사용된 전문용어가 단지 예시의 방식으로 특정 실시형태를 기술하는 목적을 위한 것이고 주장된 제형을 제한하는 것을 의도하지 않는다는 것을 이해하여야 한다.

[0017] 구체적으로 달리 명시하지 않는 한, 가능한 개선을 위한 작용 메카니즘 또는 방식 또는 개선 이유에 관한 임의의 기재는 단지 예시적인 것으로 의도되고, 개시된 제형은 임의의 이러한 제시된 작용 메카니즘 또는 방식 또는 개선 이유에 대한 정확성 또는 부정확성을 제한하려는 것이 아니다.

[0018] 본원에 걸쳐서, 기술은 제형 및 제형을 제조하는 방법을 언급한다. 개시내용이 제형과 관련된 특징 및 실시형태를 기술하거나 주장하는 경우, 이러한 특징 또는 실시형태는 제형을 형성하는 방법에 동일하게 적용가능하다. 또한, 개시내용이 제형을 형성하는 방법에 관련된 특징 또는 실시형태를 기술하거나 주장하는 경우, 이러한 특징 또는 실시형태는 제형에 동일하게 적용가능하다.

[0019] 수치 값의 범위가 본원에 열거되거나 확립되는 경우, 상기 범위는 이의 종점 및 상기 범위 내의 모든 개별적인 정수 및 분수를 포함하고, 또한 이들 종점의 다양한 가능한 모든 조합으로 형성된 각각의 더 좁은 범위 및 이들 더 협소한 범위 각각이 명시적으로 인용되는 것과 동일한 범위까지의 상기 기재된 범위 내의 값의 더 큰 그룹의 하위그룹을 형성하는 내부 정수 및 분수를 포함한다. 수치 값의 범위가 본원에 기재된 값보다 큰 것으로 기재되는 경우, 그럼에도 불구하고 상기 범위는 제한되고, 본원에 기재된 본 발명의 문맥 내에서 사용될 수 있는 값까지 이의 상한으로 제한된다. 수치 값의 범위가 기재된 값보다 적은 것으로 본원에 기재되는 경우, 상기 범위는 그럼에도 불구하고 상기 범위는 0이 아닌 값까지 이의 하한으로 제한된다. 범위를 한정하는 경우 개시내용의 범위가 인용된 특정 값에 제한되는 것을 의도하지 않는다. 모든 범위는 포괄적이고 조합가능하다.

[0020] 값을 선행되는 "약"을 사용하여 근사치로서 표현하는 경우, 특정 값은 또다른 실시형태를 형성하는 것을 이해할 것이다. 문맥에서 달리 명확하게 기재하지 않는 한, 특정 수치 값에 대한 언급은 적어도 상기 특정 값을 포함한다.

[0021] 명확하게 하기 위해 개별적인 실시형태의 문맥에서 본원에 개시된 제형의 구체적인 특징은, 또한 단일 실시형태를 조합하여 제공될 수 있음을 이해하여야 할 것이다. 반대로, 간결하게 하기 위해 단일 실시형태의 문맥에 기재된 개시된 제형의 다양한 특징은, 또한 개별적으로 또는 임의의 하위 조합으로 제공될 수 있다.

[0022] 본원에 사용된 단일 형태 하나("a", "an") 및 상기("the")는 복수를 포함한다.

[0023] 명세서의 양상에 관련된 다양한 용어는 명세서 및 청구범위에 걸쳐서 사용된다. 이러한 용어는 달리 지시하지 않는 한 당해 기술 분야에서 이의 통상적인 의미로 제공되어야 한다. 다른 구체적으로 한정된 용어는 본원에 제공된 정의와 일치하는 방식으로 해석되어야 한다.

[0024] 용어 "포함하는(comprising)"은 용어 "로 본질적으로 이루어진(consisting essentially of)" 및 "로 이루어진(consisting of)"이 포함된 예시를 포함하는 것을 의도하고; 유사하게는, 용어 "로 본질적으로 이루어진"은 용어 "로 이루어진"이 포함된 예시를 포함하는 것을 의도한다.

[0025] 하기 약어는 본원에 사용된다: 콜라게나제 클로스트리듐 히스톨리티쿰 (CCH), 미국 약전 (United States Pharmacopeia; USP), 네펠로메트릭 탁도 단위 (NTU), 폴리소르베이트 (PS), 과산화수소 (H_2O_2).

[0026] 콜라게나제;

[0027] 약 30 mM 내지 약 240 mM의 디삭카라이드;

[0028] 약 50 mM 내지 약 800 mM의 만니톨; 및

[0029] 약 6 mM 내지 약 10 mM의 Tris-HCl을 포함하거나 이로서 이루어진 제형이 본원에 제공된다.

[0030] 제형은 약 0.2 mg/ml 내지 약 50 mg/ml의 콜라게나제를 포함할 수 있다. 예를 들면, 동결건조된 제형은 약 0.2 mg/ml, 약 0.3 mg/ml, 약 0.4 mg/ml, 약 0.6 mg/ml, 약 0.8 mg/ml, 약 0.9 mg/ml, 약 1 mg/ml, 약 1.2 mg/ml, 약 1.4 mg/ml, 약 1.6 mg/ml, 약 1.8 mg/ml, 약 2 mg/ml, 약 2.5 mg/ml, 약 3 mg/ml, 약 3.5 mg/ml, 약 4 mg/ml, 약 4.5 mg/ml, 약 5 mg/ml, 약 10 mg/ml, 약 15 mg/ml, 약 20 mg/ml, 약 25 mg/ml, 약 30 mg/ml, 약 35 mg/ml, 약 40 mg/ml, 약 45 mg/ml, 또는 약 50 mg/ml의 콜라게나제를 포함할 수 있다.

[0031] 본원에 사용된 "콜라게나제"는 하기 중 어느 것을 언급한다: (a) EC 3.4.24.3 (www.brenda-enzymes.org/enzyme.php/ecno=3.4.24.3 (2019년 7월 3일에 접속)에 정의된 활성을 갖는 콜라게나제 (돌연변이를 포함함); (b) 클로스트리듐 히스톨리티쿰 (또한 하테와야 히스톨리티카(*Hathewaya histolytica*)로서 공지

됨)의 발효에 의해 생성된 콜라게나제; (c) CCH (본원에 기재됨); (d) BLAST로 측정된 콜라게나제 I(또한 I형 콜라게나제로 언급됨)과 적어도 50% 서열 정렬을 갖는 콜라게나제; (e) BLAST로 측정된 콜라게나제 II (또한 II형 콜라게나제로 언급됨)와 적어도 50% 서열 정렬을 갖는 콜라게나제; (f) 다른 근원 유기체 (즉, 비-클로스트리듐 히스톨리티쿰), 예를 들면, 포유동물, 갑각류, 균류, 박테리아 또는 미생물 콜라게나제의 발효로 생성된 콜라게나제; (g) 재조합 기술로 입수된 콜라게나제; (h) 약 65 kDa 내지 약 130 kDa의 분자량을 갖는 콜라게나제; (i) 콜라게나제 I 또는 콜라게나제 II로서 설계된 콜라게나제; (j) 콜라게나제 I 및 II의 혼합물; (k) 균주 JCM 1403 (ATCC 19401)으로부터의 콜라게나제 또는 이의 유도체; (l) 균주 ATCC 21000으로부터의 콜라게나제 또는 이의 유도체; (m) ATCC 69334로부터의 콜라게나제 또는 이의 유도체; (n) 시. 퍼프린겐스(*C. perfringens*)로부터의 콜라게나제; (o) 비브리오 알기놀리티쿠스(*Vibrio alginolyticus*)로부터의 콜라게나제; (p) 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)로부터의 콜라게나제; (q) 슈도모나스(*Pseudomonas*)로부터의 콜라게나제; (r) 아크로모박터 이오파구스(*Achromobacter iophagus*)로부터의 콜라게나제; (s) Worthington Biochemical Corp. (www.Worthington-biochem.com; "Product Highlights")에 의해 기술된 콜라게나제; (t) Sigma-Aldrich (www.sigma-aldrich.com)에 의해 기술된 콜라게나제; (u) 하기 특징 중 하나 이상을 갖는 콜라게나제:

[0032] · V_{max} (min^{-1}), 약 0.08 내지 7.70 (SRC 검정), 또는 약 0.3 내지 30.5 (GPA 검정);

[0033] · K_M, 약 4.1 내지 410 nM (SRC 검정), 또는 약 0.03 내지 3.1 mM (GPA 검정);

[0034] · K_{cat} (sec^{-1}), 약 1.1 내지 107 (SRC 검정), 또는 약 93 내지 9,179 (GPA 검정);

[0035] · 1/ K_{cat}, 약 376 내지 37,222 (SRC 검정), 또는 약 4 내지 428 (GPA 검정)의 마이크로초; 또는

[0036] · K_{cat}/K_M, $mM^{-1}sec^{-1}$, 약 5,140 내지 508,814 (SRC 검정), 또는 약 60 내지 5,934 (GPA 검정);

[0037] (v) Nordmark Arzneimittel GmbH & Co. KG에 의해 기술된 콜라게나제; (w) 균주 004로부터의 콜라게나제; 또는 (x) 상기한 것들 중 어느 것의 등가물 또는 혼합물. 본원 개시내용에 사용될 수 있는 콜라게나제의 비제한적인 예는 미국 특허 번호 7,811,560, 미국 특허 번호 9,757,435, 미국 특허 번호 9,744,138, 및 국제 공보 번호 WO2012/125948에 기재되어 있다.

[0038] 일부 실시형태에서 콜라게나제는 콜라게나제 I을 포함할 수 있다. 적합한 콜라게나제 I은, 예를 들면, 서열번호 1의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 콜라게나제 I을 포함한다. 일부 양상에서, 콜라게나제 I는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함한다.

[0039] 일부 실시형태에서, 콜라게나제는 콜라게나제 II를 포함할 수 있다. 적합한 콜라게나제 II는, 예를 들면, 서열번호 2의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 콜라게나제 II를 포함한다. 일부 양상에서, 콜라게나제 II는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함한다.

표 1

서열

콜라게나제 I (서열번호: 1)	IANTNSEKYDFEYLNGLSYTELTNLIKNIKWNQINGLFNYSTGSQKFFG DKNRVQAIINALQESGRTYTANDMKGIETFTEVLRAGFYLGYYNDGLSY LNDRNFQDKCIPAMIAIQKNPNFKLGTAVQDEVITSLGKLIGNASANAE VVNNCVPVLKQFRENLNQYAPDYVKGTAVNELIKGIEFDFSGAAYEKDV KTMPWYGKIDPFINELKALGLYGNITSATEWASDVGIYYLSKFGLYSTN RNDIVQSLEKAVDMYKYGKIAFVAMERITWDYDGIGSNGKKVDHDKFLD DAEKHYLPKTYTFDNGTFIIRAGEKVSEEKIKRLYWASREVKSQFHRVV GNDKALEVGNADDVLTMKIFNSPEEYKFNTNINGVSTDNGGLYIEPRGT FYTYERTPQQSIFSLEELFRHEYTHYLQARYLVDGLWGQGPFYEKNRLT WFDEGTAEFFAGSTRTSGVLPRKSILGYLAKDKVDHRYSLKKTLNSGYD DSDWMFYNYGFAVAHYLYEKDMPTFIKMNKAILNTDVKSYDEIIKKLSD DANKNTEYQNHIQELADKYQGAGIPLVSDDYLKDHGYKKASEVYSEISK AASLTNTSVTAEKSQYFNTFTLRGTYTGETSKGEFKDWDEMSKKLDGTL ESLAKNSWSGYKTLTAYFTNYRVTSDNKVQYDVVFHGVLTDNADISNNK APIAKVTGPSTGAVGRNIEFSGKDSKDEDGKIVSYDWDFGDGATSRGKN SVHAYKKTGTYNVTLKVTDDKGATATESFTIEIKNEDTTTPITKEMEPN DDIKEANGPIVEGVTVKGDLNGSDDADTFYFDVKEDGDVTIELPYSGSS NFTWLVYKEGDDQNHIASGIDKNNSKVGTFKATKGRHYVFIYKHDSASN ISYSLNIKGLGNEKLKEKENNDSSDKATVIPNFNTTMQGSLLGDDSRDY YSFEVKEEGEVNIELDKKDEFGVTWTLHPESNINDRITYGQVDGNKVSN KVKLRPGKYYLLVYKYSGSGNYELRVNK
콜라게나제 II (서열번호 : 2)	AVDKNNATAAVQNESKRYTVSYLKTLNYYDLVDLLVKTEIENLPDLFQY SSDAKEFYGNKTRMSFIMDEIGRRAPQYTEIDHKGIPTLVEVVRAGFYL GFHNKELNEINKRSFKERVIPSILAIQKNPNFKLGTEVQDKIVSATGLL AGNETAPPEVVNNFTPIIQDCIKNMDRYALDDLKSKALFNVLAAPTYDI TEYLRATKEKPENTPWYGKIDGFINELKKLALYGKINDNNSWIIDNGIY HIAPLGKLHSNNKIGIETLTEVMKIYPYLSMQHLQSADQIERHYDSKDA EGNKIPLDKFKKEGKEKYCPKTYTFDDGKVIIKAGARVEEEKVKRLYWA SKEVNSQFFRVYGIDKPLEEGNPDDILTMVIYNSPEEYKLNSVLYGYDT NNGGMYIEPDGTFFTYERKAEESTYTLEELFRHEYTHYLQGRYAVPGQW GRTKLYDNDRLTWYEEGGAELFAGSTRTSGILPRKSIVSNIHNTTRNNR YKLSDTVHSKYGASFEFYNYACMFMDYMYNKDMGILNKLNDLAKNNDVD GYDNYIRDLSSNHALNDKYQDHMQERIDNYENLTVPFVADDYLVRHAYK NPNEIYSEISEVAKLKDAKSEVKKSQYFSTFTLRGSYTGGASKGKLEDQ KAMNKFIDDSLKKLDTYSWSGYKTLTAYFTNYKVDSSNRVTYDVVFHGY LPNEGDSKNSLPYGKINGTYKGTEKEKIKFSSEGSFDPDGKIVSYEWDF GDGNKSNEENPEHSYDKVGTYTVKLKVTDDKGESSVSTTTAEIKDLSEN KLPVIYMHVPKSGALNQKVVFYGKGTYDPDGSIAGYQWDFGDGSDFSSE QNPSHVYTKKGEYTVTLRVMDSSGQMSEKTMKIKITDPVYPIGTEKEPN NSKETASGPIVPGIPVSGTIENTSDQDYFYFDVITPGEVKIDINKLGYG GATWVVYDENNNAVSYATDDGQNLSGKFKADKPGRYYIHLYMFNGSYMP YRINIEGSVGR

[0040]

[0041] 일부 실시형태에서, 콜라게나제는 콜라게나제 I 및 콜라게나제 II의 혼합물을 포함할 수 있다. 콜라게나제는, 예를 들면, 서열번호 1의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 콜라게나제 I 및 서열번호 2의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 콜라게나제 II의 혼합물을 포함한다. 일부 양상에서, 콜라게나제는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 콜라게나제 I 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 콜라게나제 II의 혼합물을 포함한다. 콜라게나제 I 및 콜라게나제 II의 적합한 혼합물은, 예를 들면, 0.1:1, 0.25:1, 0.5:1, 0.75:1, 1:1, 1.1:1, 1.25:1, 1.5:1, 1.75:1, 2:1, 1:0.1, 1:0.25, 1:0.5; 1:0.75, 1:1.1, 1:1.25, 1:1.5, 1:1.75, 또는 1:2의 콜라게나제 I:콜라게나제 II 질량 비를 포함한다. 콜라게나제 I 및 콜라게나제 II 각각은, 예를 들면, 역상 HPLC로 측정하여 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 순도일 수 있다.

[0042] 일부 실시형태에서, 콜라게나제는 콜라게나제 클로스트리듐 히스톨리티쿰 (CCH)을 포함할 수 있다. 본원에 사용된 "CCH"는, 콜라게나제 I (서열번호 1) 및 콜라게나제 II (서열번호 2)의 대략 1:1 질량 비의 혼합물을 포함하는 콜라게나제 클로스트리듐 히스톨리티쿰을 언급한다. CCH는 클로스트리듐 히스톨리티쿰 (또한 하테와야 히스톨리티카로 공지됨)을 발효하여 수득한다.

[0043] 적합한 디삭카라이드는:

[0044] • 단백질을 안정화시키고;

[0045] • 냉동 및 탈수 둘 다 동안 단백질을 보호하고;

[0046] • 동결건조-유도된 언폴딩(unfolding)을 억제하고;

[0047] • 비-환원성(non-reducing)이고; 및/또는

[0048] • 동결건조 동안 무정형을 유지하는 경향이 있는 것을 포함한다.

[0049] 일부 실시형태에서, 디삭카라이드는 수크로스 또는 트레할로스를 포함한다. 일부 양상에서, 제형은: 콜라게나제; 약 30 mM 내지 약 240 mM 수크로스; 약 50 mM 내지 약 800 mM의 만니톨; 및 약 6 mM 내지 약 10 mM의 Tris-HCl을 포함한다. 일부 양상에서, 제형은: 콜라게나제; 약 30 mM 내지 약 240 mM의 트레할로스; 약 50 mM 내지 약 800 mM의 만니톨; 및 약 6 mM 내지 약 10 mM의 Tris-HCl을 포함한다.

[0050] 디삭카라이드는 약 30 mM 내지 약 240 mM, 약 60 mM 내지 약 240 mM, 약 90 mM 내지 약 240 mM, 약 120 mM 내지 약 240 mM, 약 150 mM 내지 약 240 mM, 약 180 mM 내지 약 240 mM, 약 210 mM 내지 약 240 mM, 약 30 mM 내지 약 210 mM, 약 30 mM 내지 약 180 mM, 약 30 mM 내지 약 150 mM, 약 30 mM 내지 약 120 mM, 약 30 mM 내지 약 90 mM, 또는 약 30 mM 내지 약 60 mM의 농도로 존재할 수 있다. 디삭카라이드는 약 30 mM, 60 mM, 90 mM, 120 mM, 150 mM, 180 mM, 210 mM, 또는 240 mM의 농도로 존재할 수 있다.

[0051] 만니톨은 약 50 mM 내지 약 800 mM, 약 100 mM 내지 약 800 mM, 약 150 mM 내지 약 800 mM, 약 200 mM 내지 약 800 mM, 약 250 mM 내지 약 800 mM, 약 300 mM 내지 약 800 mM, 약 350 mM 내지 약 800 mM, 약 400 mM 내지 약 800 mM, 약 450 mM 내지 약 800 mM, 약 500 mM 내지 약 800 mM, 약 550 mM 내지 약 800 mM, 약 600 mM 내지 약 800 mM, 약 650 mM 내지 약 800 mM, 약 700 mM 내지 약 800 mM, 약 750 mM 내지 약 800 mM, 약 50 mM 내지 약 750 mM, 약 50 mM 내지 약 700 mM, 약 50 mM 내지 약 650 mM, 약 50 mM 내지 약 600 mM, 약 50 mM 내지 약 550 mM, 약 50 mM 내지 약 500 mM, 약 50 mM 내지 약 450 mM, 약 50 mM 내지 약 400 mM, 약 50 mM 내지 약 350 mM, 약 50 mM 내지 약 300 mM, 약 50 mM 내지 약 250 mM, 약 50 mM 내지 약 200 mM, 약 50 mM 내지 약 150 mM, 또는 약 50 mM 내지 약 100 mM의 농도로 존재할 수 있다. 만니톨은 약 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 225 mM, 250 mM, 300 mM, 350 mM, 400 mM, 450 mM, 500 mM, 550 mM, 600 mM, 650 mM, 700 mM, 750 mM, 또는 800 mM의 농도로 존재할 수 있다.

[0052] 상기 제형의 pH는 약 7.8 내지 약 8.8일 수 있다. pH는 약 7.8, 약 7.9, 약 8.0, 약 8.1, 약 8.2, 약 8.3, 약 8.4, 약 8.5, 약 8.6, 약 8.7, 또는 약 8.8일 수 있다.

[0053] 상기 제형은: CCH; 약 60 mM 수크로스; 약 225 mM 만니톨; 및 약 10 mM Tris-HCl을 포함할 수 있고, 여기서, 상기 제형은 약 8.5의 pH를 갖는다. 상기 제형은: 약 0.9 mg CCH/ml; 약 60 mM 수크로스; 약 225 mM 만니톨; 및 약 10 mM Tris-HCl을 포함할 수 있고, 여기서, 상기 제형은 약 8.5의 pH를 갖는다.

[0054] 상기 제형은: CCH; 약 60 mM 수크로스; 약 225 mM 만니톨; 및 약 10 mM Tris-HCl로 이루어질 수 있고, 여기서, 상기 제형은 약 8.5의 pH를 갖는다. 상기 제형은: 약 0.9 mg CCH/ml; 약 60 mM 수크로스; 약 225 mM 만니톨; 및 약 10 mM Tris-HCl로 이루어질 수 있고, 여기서, 상기 제형은 약 8.5의 pH를 갖는다.

[0055] 개시된 제형은 계면활성제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 계면활성제는, 예를 들면, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 80, 또는 폴록사머 188를 포함한다. 계면활성제는 약 0.01% 내지 약 2%, 약 0.05% 내지 약 2%, 약 0.1% 내지 약 2%, 약 0.15% 내지 약 2%, 약 0.2% 내지 약 2%, 약 0.25% 내지 약 2%, 약 0.3% 내지 약 2%, 약 0.4% 내지 약 2%, 약 0.5% 내지 약 2%, 약 1% 내지 약 2%, 약 1.5% 내지 약 2%, 약 0.01% 내지 약 1.5%, 약 0.01% 내지 약 1%, 약 0.01% 내지 약 0.5%, 약 0.01% 내지 약 0.1%, 또는 약 0.01% 내지 약 0.05%의 농도로 존재할 수 있다. 계면활성제는 약 0.01%, 0.02%, 0.03%, 0.04%, 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.5%, 1%, 1.5%, 또는 2%의 농도로 존재할 수 있다. 일부 실시형태에서, 제형은 폴리소르베이트 20을 약 0.02%의 농도로 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 제형은 폴리소르베이트 80을 약 0.02%의 농도로 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 제형은 폴록사머 80을 약 0.02%의 농도로 추가로 포함한다.

[0056] 상기한 제형은 액체일 수 있다.

[0057] 개시된 제형은 이전 콜라게나제-함유 제형, 예를 들면, XIAFLEX®와 비교하여 더 공격적인(aggressive) 조건 하에서 동결건조될 수 있다. 예를 들면, 개시된 제형은 단시간 내에, 더 높은 압력를 사용하여, 및/또는 더 적은

건조 단계 (예를 들면, 단일 온도 건조)로 동결건조될 수 있고, 이는 증가된 안정성을 나타내고 재구성시 허용되는 콜라게나제 활성을 유지하는 동결건조된 제형을 야기한다. 본원에 나타낸 바와 같이, pH 및 만니톨은, 더 공격적인 동결건조를 후속적으로 겪을 수 있는 더 강건한 제형의 형성을 야기한다.

[0058] 동결건조된 제형을 본원에 또한 제공한다. 동결건조된 제형은 상기한 제형 중 어느 것을 동결건조하여 형성될 수 있다. 일부 실시형태에서, 동결건조된 제형은:

[0059] 콜라게나제;

[0060] 디삭카라이드;

[0061] 만니톨; 및

[0062] Tris-HCl을 포함하거나 이로서 이루어진다.

[0063] 동결건조된 제형은 약 0.2 mg 내지 약 50 mg의 콜라게나제를 포함할 수 있다. 예를 들면, 동결건조된 제형은 약 0.2 mg, 0.4 mg, 0.6 mg, 0.8 mg, 0.9 mg, 1 mg, 1.2 mg, 1.4 mg, 1.6 mg, 1.8 mg, 2 mg, 2.5 mg, 3 mg, 3.5 mg, 4 mg, 4.5 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg, 30 mg, 35 mg, 40 mg, 45 mg, 또는 50 mg의 콜라게나제를 포함할 수 있다.

[0064] 콜라게나제는 콜라게나제 I을 포함할 수 있다. 적합한 콜라게나제 I은, 예를 들면, 서열번호 1의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 콜라게나제 I을 포함한다. 일부 실시형태에서, 콜라게나제 I는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함한다.

[0065] 콜라게나제는 콜라게나제 II를 포함할 수 있다. 적합한 콜라게나제 II는, 예를 들면, 서열번호 2의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 콜라게나제 II를 포함한다. 일부 실시형태에서, 콜라게나제 II는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함한다.

[0066] 콜라게나제는 콜라게나제 I 및 콜라게나제 II의 혼합물을 포함할 수 있다. 콜라게나제는, 예를 들면, 서열번호 1의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 콜라게나제 I 및 서열번호 2의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 콜라게나제 II의 혼합물을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 콜라게나제는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 콜라게나제 I 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 콜라게나제 II의 혼합물을 포함한다. 콜라게나제 I 및 콜라게나제 II의 적합한 혼합물은, 예를 들면, 0.1:1, 0.25:1, 0.5:1, 0.75:1, 1:1, 1.1:1, 1.25:1, 1.5:1, 1.75:1, 2:1, 1:0.1, 1:0.25, 1:0.5; 1:0.75, 1:1.1, 1:1.25, 1:1.5, 1:1.75, 또는 1:2의 콜라게나제 I:콜라게나제 II 질량 비를 포함한다. 일부 실시형태에서, 콜라게나제는 콜라게나제 클로스트리듐 히스톨리티쿰 (CCH)이다.

[0067] 콜라게나제 I 및 콜라게나제 II 각각은, 예를 들면, 역상 HPLC로 측정하여 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 순도일 수 있다.

[0068] 적합한 디삭카라이드는, 예를 들면, 수크로스 또는 트레할로스를 포함한다. 일부 실시형태에서, 동결건조된 제형은, 콜라게나제, 수크로스, 만니톨, 및 Tris-HCl을 포함하거나 이로서 이루어진다. 일부 실시형태에서, 동결건조된 제형은, 콜라게나제, 트레할로스, 만니톨, 및 Tris-HCl을 포함하거나 이로서 이루어진다.

[0069] 동결건조된 제형은 단위-용량(unit-dose) 바이알, 다중-용량(multi-dose) 바이알, 카트리지, 또는 주사기일 수 있다. 동결건조된 제형은 약 0.2 mg 내지 약 50 mg의 콜라게나제를 포함할 수 있다. 예를 들면, 동결건조된 제형은 약 0.2 mg, 0.4 mg, 0.6 mg, 0.8 mg, 0.9 mg, 1 mg, 1.2 mg, 1.4 mg, 1.6 mg, 1.8 mg, 2 mg, 2.5 mg, 3 mg, 3.5 mg, 4 mg, 4.5 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg, 30 mg, 35 mg, 40 mg, 45 mg, 또는 50 mg의 콜라게나제를 포함할 수 있다. 바이알, 카트리지, 또는 주사기는 2 mL 내지 50 mL, 예를 들면, 5 mL, 7.5 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL, 30 mL, 40 mL, 또는 50 mL의 용적을 가질 수 있다. 바이알, 카트리지, 또는 주사기는 약 0.2 mg 내지 약 50 mg의 콜라게나제를 포함할 수 있다. 예를 들면, 바이알, 카트리지, 또는 주사기는 약 0.2 mg, 0.4 mg, 0.6 mg, 0.8 mg, 1 mg, 1.2 mg, 1.4 mg, 1.6 mg, 1.8 mg, 2 mg, 2.5 mg, 3 mg, 3.5 mg, 4 mg, 4.5 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg, 30 mg, 35 mg, 40 mg, 45 mg, 또는 50 mg의 콜라게나제를 포함할 수 있다. 바이알, 카트리지, 또는 주사기는 약 0.2 mg 내지 약 50 mg의 동결건조된 제형을 포함할 수 있다. 예를 들면, 바이알, 카트리지, 또는 주사기는 약 0.2 mg, 0.4 mg, 0.6 mg, 0.8 mg, 1 mg, 1.2 mg, 1.4 mg, 1.6 mg, 1.8 mg, 2 mg, 2.5 mg, 3 mg, 3.5 mg, 4 mg, 4.5 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg, 30 mg, 35 mg,

40 mg, 45 mg, 또는 50 mg의 동결건조된 제형를 포함할 수 있다.

[0070] 동결건조 전에, 상기 제형은: 콜라게나제; 약 30 mM 내지 약 240 mM의 디삭카라이드; 약 50 mM 내지 약 800 mM의 만니톨; 및 약 6 mM 내지 약 10 mM의 Tris-HCl을 포함하거나 이로서 이루어질 수 있다. 동결건조 전에, 상기 제형은: 약 0.9 mg 콜라게나제/ml; 약 30 mM 내지 약 240 mM의 디삭카라이드; 약 50 mM 내지 약 800 mM의 만니톨; 및 약 6 mM 내지 약 10 mM의 Tris-HCl을 포함하거나 이로서 이루어질 수 있다. 동결건조 전에, 상기 제형은: CCH; 60 mM 수크로스; 225 mM 만니톨; 10 mM Tris-HCl을 포함하거나 이로서 이루어질 수 있고, 약 8.5의 pH를 갖는다. 일부 실시형태에서, 동결건조 전에, 상기 제형은: 약 0.9 mg CCH/ml; 60 mM 수크로스; 225 mM 만니톨; 10 mM Tris-HCl을 포함하거나 이로서 이루어질 수 있고, 약 8.5의 pH를 갖는다.

[0071] 개시된 동결건조된 제형은 이전 콜라게나제-함유 제형, 예를 들면, XIAFLEX®와 비교하여 증가된 안정성을 갖는다. 예를 들면, 개시된 동결건조된 제형은 380 μbar 초과, 400 μbar 초과, 450 μbar 초과, 500 μbar 초과, 550 μbar 초과, 600 μbar 초과, 650 μbar 초과, 700 μbar 초과, 750 μbar 초과, 800 μbar 초과, 850 μbar 초과, 900 μbar 초과, 950 μbar 초과, 1000 μbar 초과, 1500 μbar 초과, 2000 μbar 초과, 2500 μbar 초과, 3000 μbar 초과, 3500 μbar 초과, 또는 4000 μbar 초과 압력에서 안정하다. 일부 실시형태에서, 동결건조된 제형은 약 4000 μbar의 압력에서 안정하다.

[0072] 개시된 동결건조된 제형은 또한 이전 콜라게나제-함유 제형과 비교하여 개선된 저장 수명 및 저장 조건을 나타낸다. 예를 들면, 개시된 동결건조된 제형은 저온에서, 예를 들면, 2 내지 8℃에서, 및 승온에서, 예를 들면, 실온 (40℃/75% 상대 습도)에서 연장된 저장 수명을 나타낸다. 개시된 동결건조된 제형은, 예를 들면:

[0073] (a) 적어도 36 개월 동안 2 내지 8℃;

[0074] (b) 적어도 36 개월 동안 25℃/60% 상대 습도;

[0075] (c) 적어도 6 개월 동안 40℃/75% 상대 습도; 또는

[0076] (d) (a) 내지 (c)의 임의의 조합에서 안정할 수 있다.

[0077] 개시된 동결건조된 제형은: 상기 제형을 약 -25℃ 내지 -55℃의 온도에서 냉동시켜 냉동된 제형을 형성하는 단계; 및 상기 냉동된 제형을 약 25℃ 내지 약 50℃의 온도에서 건조시켜 상기 동결건조된 제형을 형성하는 단계를 포함하는 방법에 의해 형성될 수 있다. 냉동 단계를 위한 적합한 온도는 약 -25℃ , -30℃ , -35℃ , -40℃ , -45℃, -50℃, 또는 -55℃를 포함한다. 건조 단계를 위한 적합한 온도는 약 25℃, 30℃, 35℃, 40℃, 45℃, 또는 50℃를 포함한다.

[0078] 동결건조된 제형이 단일 온도 냉동 단계 및 단일 온도 건조 단계를 사용하여 형성될 수 있다는 것을 나타내었다. 예를 들면, 동결건조된 제형은: 제형을 약 -25℃ 내지 -55℃의 단일 온도에서 냉동시켜 냉동된 제형을 형성하는 단계; 및 상기 냉동된 제형을 약 25℃ 내지 약 50℃의 단일 온도에서 건조시켜 상기 동결건조된 제형을 형성하는 단계를 포함하는 방법에 의해 형성될 수 있다. 단일 온도 냉동 단계는 약 -25℃ 내지 약 -55℃의 온도에서 수행할 수 있다. 예를 들면, 단일 온도 냉동 단계는 약 -25℃, -30℃, -35℃, -40℃ -45℃, -50℃, 또는 -55℃에서 수행할 수 있다. 단일 온도 건조 단계는 약 25℃ 내지 약 50℃의 온도에서 수행할 수 있다. 예를 들면, 단일 온도 건조 단계는 약 25℃, 30℃, 35℃, 40℃, 45℃, 또는 50℃에서 수행할 수 있다. 상기 방법이 단일 온도 냉동 단계 및 단일 온도 건조 단계로 수행되는 경우, 상기 방법은 냉동과 건조 사이에 동결건조기가 적합한 건조 온도에 도달하도록 "램프 업(ramp up)" 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0079] 개시된 동결건조된 제형은 다른 콜라게나제-함유 동결건조된 제형을 형성하기 위해 사용되는 동결건조 방법보다 훨씬 신속한 동결건조 방법으로 형성될 수 있다. 동결건조된 제형은 72 시간 미만 동안 수행되는 동결건조 방법에 의해 형성될 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 30 시간 미만 동안 수행할 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 18 시간 미만 동안 수행할 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 약 15 시간 내지 약 25 시간 동안 수행할 수 있다.

[0080] 개시된 동결건조된 제형은 다른 콜라게나제-함유 동결건조된 제형을 형성하는데 사용되는 동결건조 방법보다 훨씬 더 높은 압력을 사용하는 동결건조 방법에 의해 형성될 수 있다. 동결건조된 제형은 약 380 μbar 내지 약 4000 μbar의 압력에서 수행되는 동결건조 방법에 의해 형성될 수 있다. 개시된 방법은 약 500 μbar 내지 약 4000 μbar, 약 750 μbar 내지 약 4000 μbar, 약 1000 μbar 내지 약 4000 μbar의 압력에서 수행할 수 있다. 개시된 방법은 380 μbar, 500 μbar, 750 μbar, 1000 μbar, 1500 μbar, 2000 μbar, 2500 μbar, 3000 μbar, 3500 μbar, 또는 4000 μbar에서 수행할 수 있다.

[0081] 개시된 동결건조된 제형은, 재구성되는 경우, 셀룰라이트의 중증도 (또한 부종성 섬유경화성 범신경병증 (edematous fibrosclerotic panniculopathy; EFP)로서 공지됨), 감지할 수 있는 코드(cord)가 있는 뒤피트렌 구축 (DC), 또는 감지할 수 있는 플라크(palpable plaque) 및 적어도 30 도의 곡률 변형을 갖는 페이로니병 (PD)을 포함하는 콜라겐-중재된 상태를 치료 또는 감소시키기 위해 사용할 수 있다.

[0082] 콜라게나제; 디삭카라이드; 만니톨; Tris-HCl; 염화칼슘; 및 염화나트륨을 포함하거나 이로서 이루어진 재구성된 제형이 본원에 또한 제공한다.

[0083] 콜라게나제는 콜라게나제 I을 포함할 수 있다. 적합한 콜라게나제 I은, 예를 들면, 서열번호 1의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 콜라게나제 I을 포함한다. 일부 실시형태에서, 콜라게나제 I는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함한다. 콜라게나제는 콜라게나제 II를 포함할 수 있다. 적합한 콜라게나제 II는, 예를 들면, 서열번호 2의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 콜라게나제 II를 포함한다. 일부 실시형태에서, 콜라게나제 II는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함한다. 콜라게나제는 콜라게나제 I 및 콜라게나제 II의 혼합물을 포함할 수 있다. 콜라게나제는, 예를 들면, 서열번호 1의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 콜라게나제 I 및 서열번호 2의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 콜라게나제 II의 혼합물을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 콜라게나제는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 콜라게나제 I 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 콜라게나제 II의 혼합물을 포함한다. 콜라게나제 I 및 콜라게나제 II의 적합한 혼합물은, 예를 들면, 0.1:1, 0.25:1, 0.5:1, 0.75:1, 1:1, 1.1:1, 1.25:1, 1.5:1, 1.75:1, 2:1, 1:0.1, 1:0.25, 1:0.5; 1:0.75, 1:1.1, 1:1.25, 1:1.5, 1:1.75, 또는 1:2의 콜라게나제 I:콜라게나제 II 질량 비를 포함한다. 일부 실시형태에서, 콜라게나제는 콜라게나제 클로스트리듐 히스톨리티쿰 (CCH)이다.

[0084] 콜라게나제 I 및 콜라게나제 II 각각은, 예를 들면, 역상 HPLC로 측정하여 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 순도일 수 있다.

[0085] 적합한 디삭카라이드는, 예를 들면, 수크로스 또는 트레할로스를 포함한다. 일부 실시형태에서, 재구성된 제형은, 콜라게나제, 수크로스, 만니톨, Tris-HCl, 염화칼슘, 및 염화나트륨을 포함하거나 이로서 이루어진다. 일부 실시형태에서, 동결건조된 제형은 콜라게나제, 트레할로스, 만니톨, Tris-HCl, 염화칼슘, 및 염화나트륨을 포함하거나 이로서 이루어진다.

[0086] 적합한 양의 염화칼슘 및 염화나트륨은 재구성된 제형이 사람 혈액에 등장성이 될 수 있게 하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 재구성된 제형은 약 0.01%, 0.02%, 0.03%, 0.04%, 0.05%, 0.06%, 0.07%, 0.08%, 0.09%, 0.1%, 또는 0.1% 초과의 염화칼슘을 포함한다. 일부 실시형태에서, 재구성된 제형은 약 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1%, 또는 1% 초과의 염화나트륨을 포함한다.

[0087] 재구성된 제형은 또한 주사용수 (WFI)를 포함할 수 있다.

[0088] 개시된 재구성된 제형은 셀룰라이트의 중증도 (또한 부종성 섬유경화성 범신경병증 (EFP)로서 공지됨), 감지할 수 있는 코드를 갖는 뒤피트렌 구축 (DC), 또는 감지할 수 있는 플라크 및 적어도 30 도의 곡률 변형을 갖는 페이로니병 (PD)을 포함하는 콜라겐-중재된 상태를 치료 또는 감소시키는데 사용될 수 있다.

[0089] 재구성된 제형은 약 0.01 mg 내지 약 50 mg의 콜라게나제를 단일 또는 분할 용량으로 포함할 수 있다. 재구성된 제형은, 예를 들면, 약 0.05 mg 내지 약 15 mg, 약 0.10 mg 내지 약 10 mg, 약 0.15 mg 내지 약 5 mg, 약 0.20 mg 내지 약 3 mg, 또는 약 0.25 mg 내지 약 2 mg의 콜라게나제를 단일 또는 분할 용량으로 포함할 수 있다. 재구성된 제형은, 예를 들면, 약 0.05 mg, 약 0.10 mg, 약 0.15 mg, 약 0.20 mg, 약 0.25 mg, 약 0.30 mg, 약 0.35 mg, 약 0.40 mg, 약 0.45 mg, 약 0.50 mg, 약 0.55 mg, 약 0.60 mg, 약 0.65 mg, 약 0.70 mg, 약 0.75 mg, 약 0.80 mg, 약 0.85 mg, 약 0.90 mg, 약 0.95 mg, 약 1.00 mg, 1.05 mg, 약 1.10 mg, 약 1.15 mg, 약 1.20 mg, 약 1.25 mg, 약 1.30 mg, 약 1.35 mg, 약 1.40 mg, 약 1.45 mg, 약 1.50 mg, 약 1.55 mg, 약 1.60 mg, 약 1.65 mg, 약 1.70 mg, 약 1.75 mg, 약 1.80 mg, 약 1.85 mg, 약 1.90 mg, 약 1.95 mg, 약 2.00 mg, 2.05 mg, 약 2.10 mg, 약 2.15 mg, 약 2.20 mg, 약 2.25 mg, 약 2.30 mg, 약 2.35 mg, 약 2.40 mg, 약 2.45 mg, 약 2.50 mg, 약 2.55 mg, 약 2.60 mg, 약 2.65 mg, 약 2.70 mg, 약 2.75 mg, 약 2.80 mg, 약 2.85 mg, 약 2.90 mg, 약 2.95 mg, 약 3.00 mg, 3.05 mg, 약 3.10 mg, 약 3.15 mg, 약 3.20 mg, 약 3.25 mg, 약 3.30 mg, 약 3.35 mg, 약 3.40 mg, 약 3.45 mg, 약 3.50 mg, 약 3.55 mg, 약 3.60 mg, 약 3.65 mg, 약 3.70 mg, 약

3.75 mg, 약 3.80 mg, 약 3.85 mg, 약 3.90 mg, 약 3.95 mg, 약 4.00 mg, 4.05 mg, 약 4.10 mg, 약 4.15 mg, 약 4.20 mg, 약 4.25 mg, 약 4.30 mg, 약 4.35 mg, 약 4.40 mg, 약 4.45 mg, 약 4.50 mg, 약 4.55 mg, 약 4.60 mg, 약 4.65 mg, 약 4.70 mg, 약 4.75 mg, 약 4.80 mg, 약 4.85 mg, 약 4.90 mg, 약 4.95 mg, 약 5.00 mg, 5.05 mg, 약 5.10 mg, 약 5.15 mg, 약 5.20 mg, 약 5.25 mg, 약 5.30 mg, 약 5.35 mg, 약 5.40 mg, 약 5.45 mg, 약 5.50 mg, 약 5.55 mg, 약 5.60 mg, 약 5.65 mg, 약 5.70 mg, 약 5.75 mg, 약 5.80 mg, 약 5.85 mg, 약 5.90 mg, 약 5.95 mg, 약 6.00 mg, 약 10 mg, 약 15 mg, 약 20 mg, 약 25 mg, 약 30 mg, 약 35 mg, 약 40 mg, 약 45 mg, 또는 약 50 mg의 콜라게나제를 포함할 수 있다.

[0090] 재구성된 제형은 약 0.1 mL 내지 약 50 mL의 총 용적일 수 있다. 예를 들면, 재구성된 제형은 약 0.1 mL, 0.2 mL, 0.3 mL, 0.4 mL, 0.5 mL, 1 mL, 1.5 mL, 2 mL, 2.5 mL, 3 mL, 3.5 mL, 4 mL, 4.5 mL, 5 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL, 25 mL, 30 mL, 35 mL, 40 mL, 45 mL, 또는 50 mL의 총 용적일 수 있다.

[0091] 개시된 동결건조된 제형 및 멸균 희석제를 포함하는 키트가 또한 제공된다. 키트는: 개시된 동결건조된 제형 중 어느 것을 포함하는 컨테이너; 및 염화칼슘 및 염화나트륨을 포함하는 멸균 희석제를 포함하는 컨테이너를 포함할 수 있다.

[0092] 동결건조된 제형 및/또는 멸균 희석제를 위해 적합한 컨테이너는, 예를 들면, 바이알, 카트리지, 또는 주사기를 포함한다. 바이알은 단위-용량 바이알 또는 다중-용량 바이알일 수 있다. 적합한 컨테이너 크기는, 예를 들면, 2 mL 내지 50 mL 컨테이너, 예를 들면, 5 mL, 7.5 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL, 30 mL, 40 mL, 또는 50 ml을 포함한다.

[0093] 개시된 동결건조된 제형을 포함하는 컨테이너는 약 0.2 mg 내지 약 50 mg 콜라게나제를 포함할 수 있다. 예를 들면, 컨테이너는 약 0.2 mg, 0.4 mg, 0.6 mg, 0.8 mg, 1 mg, 1.2 mg, 1.4 mg, 1.6 mg, 1.8 mg, 2 mg, 2.5 mg, 3 mg, 3.5 mg, 4 mg, 4.5 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg, 30 mg, 35 mg, 40 mg, 45 mg, 또는 50 mg 콜라게나제를 포함할 수 있다. 개시된 동결건조된 제형을 포함하는 컨테이너는 약 0.2 mg 내지 약 50 mg의 동결건조된 제형을 포함할 수 있다. 예를 들면, 컨테이너는 약 0.2 mg, 0.4 mg, 0.6 mg, 0.8 mg, 1 mg, 1.2 mg, 1.4 mg, 1.6 mg, 1.8 mg, 2 mg, 2.5 mg, 3 mg, 3.5 mg, 4 mg, 4.5 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg, 30 mg, 35 mg, 40 mg, 45 mg, 또는 50 mg의 동결건조된 제형을 포함할 수 있다.

[0094] 멸균 희석제를 포함하는 컨테이너는 동결건조된 제형를 재구성할 때, 사람 혈액에 등장성인 용액을 야기하는 멸균 희석제의 양을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 멸균 희석제는 약 0.01%, 0.02%, 0.03%, 0.04%, 0.05%, 0.06%, 0.07%, 0.08%, 0.09%, 0.1%, 또는 0.1% 초과의 염화칼슘을 포함한다. 일부 실시형태에서, 멸균 희석제는 약 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1%, 또는 1% 초과의 염화나트륨을 포함한다.

[0095] 멸균 희석제의 용적은 약 0.1 mL 내지 약 50 mL일 수 있다. 예를 들면, 멸균 희석제의 용적은 약 0.1 mL, 0.2 mL, 0.3 mL, 0.4 mL, 0.5 mL, 1 mL, 1.5 mL, 2 mL, 2.5 mL, 3 mL, 3.5 mL, 4 mL, 4.5 mL, 5 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL, 25 mL, 30 mL, 35 mL, 40 mL, 45 mL, 또는 50 mL일 수 있다.

[0096] 개시된 제형 중 어느 것을 동결건조시키는 방법이 본원에 제공되고, 상기 방법은: 상기 제형을 약 -25℃ 내지 -55℃의 온도에서 냉동시켜 냉동된 제형을 형성하는 단계; 및 상기 냉동된 제형을 약 25℃ 내지 약 50℃의 온도에서 건조시켜 상기 동결건조된 제형을 형성하는 단계를 포함한다.

[0097] 일부 실시형태에서, 냉동을 단일 온도에서 수행하고, 건조를 단일 온도에서 수행한다. 이러한 실시형태에서, 상기 방법은 추가로 동결건조기가 적합한 건조 온도에 도달하도록 냉동과 건조 사이에 "램프 업" 단계를 포함할 수 있다. 단일 온도 냉동 단계는 약 -25℃ 내지 약 -55℃의 온도에서 수행할 수 있다. 예를 들면, 단일 온도 냉동 단계는 약 -25℃, -30℃, -35℃, -40℃, -45℃, -50℃, 또는 -55℃에서 수행할 수 있다. 단일 온도 건조 단계는 약 25℃ 내지 약 50℃의 온도에서 수행할 수 있다. 예를 들면, 단일 온도 건조 단계는 약 25℃, 30℃, 35℃, 40℃, 45℃, 또는 50℃에서 수행할 수 있다.

[0098] 개시된 방법은 72 시간 미만 동안 동안 수행할 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 30 시간 미만 동안 수행할 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 18 시간 미만 동안 수행할 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 약 15 시간 내지 약 25 시간 동안 수행할 수 있다.

[0099] 개시된 방법은 약 128 μbar 내지 약 4000 μbar, 약 380 μbar 내지 약 4000 μbar, 약 500 μbar 내지 약 4000 μbar, 약 750 μbar 내지 약 4000 μbar, 약 1000 μbar 내지 약 4000 μbar의 압력에서 수행할 수 있다. 개시된 방법은 380 μbar, 500 μbar, 750 μbar, 1000 μbar, 1500 μbar, 2000 μbar, 2500 μbar,

3000 μbar, 3500 μbar, 또는 4000 μbar에서 수행할 수 있다.

[0100] 실시예

[0101] 하기 실시예는 본원에 개시된 실시형태의 일부를 추가로 기술하기 위해 제공된다. 실시예는 개시된 실시형태를 설명하는 것을 의도하고 제한하려는 것은 아니다.

[0102] XIAFLEX® 제형 (CCH, 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 60 mM 수크로스)은 72 시간의 비교적 긴 동결건조 순환 시간을 갖는다. 하기 연구의 목적은 감소된 순환 시간 및 개선된 수율을 갖는 보다 효율적인 동결건조 프로세스를 성취하는 것이었다.

[0103] 하기 기준은 제형화 및 동결건조 프로세스 동안 최적화인 것으로 고려되었다:

[0104] 제형:

[0105] • 단백질의 열역학적 안정성을 최적화하는 pH;

[0106] • 단백질을 안정화시키기 위한 동결보호제/동결건조보호제로서 트레할로스 또는 수크로스;

[0107] • 벌크제(bulking)/등장성 제제 (예를 들면, 만니톨)의 첨가; 및

[0108] • 필요한 경우, 단백질 응집(aggregation)을 감소시키기 위한 비이온성 계면활성제의 이용.

[0109] 동결건조 프로세스:

[0110] • 냉동 및 건조 동안 단백질 언폴딩의 억제;

[0111] • 계획된 저장 온도를 초과하는 생성물의 유리 전이 온도;

[0112] • 비교적 낮은 물 함량을 유지하는 능력; 및

[0113] • 명쾌한(elegant) 케이크 구조.

[0114] 동결건조에 대한 최적 제형 조성을 확인하기 위한 작업의 일부로서, 계면활성제의 존재하에 및 부재하에 상이한 수준으로 부형제, 예를 들면, 수크로스, 트레할로스, 및 만니톨의 다양한 조합을 포함하는 수개의 상이한 용액 제형 ("사전-동결건조")을 평가하였다. 추가로, 처리되지 않은 및 실리콘 처리된(siliconized) (그 위에 베이킹된(baked on)) 바이알을 또한 평가하였다.

[0115] **제형 강건성 연구 - 연구 1**

[0116] 이들 연구의 목적은, 원래의 XIAFLEX® 제형와 비교한 동결/융해 시험, 전단 응력, 열 응력, 과산화물 스트레스 및 소수성 표면 접촉에 의해, 2개의 제형 변형물(variants)을 검사하는 것이었다. 하기 제형을 열/전단 응력 및 동결/융해 응력 시험에 노출시켰다:

[0117] 변형물 A (V_A): CCH, 10 mM Tris/HCl pH 8.5, 60 mM 트레할로스, 225 mM 만니톨

[0118] 변형물 B (V_B): CCH, 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 60 mM 트레할로스, 225 mM 만니톨

[0119] 원래의 XIAFLEX® 약물 물질 제형 (Or): CCH, 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 60 mM 수크로스

[0120] 표준 유리 바이알 및 실리콘 처리 유리 바이알을 단백질 안정성에 미치는 소수성 표면의 영향을 조사하기 위한 시험을 위해 사용하였다. 제형을 검사 동안 제형의 안정성에 미치는 계면활성제의 영향을 조사하기 위해 2가지 타입의 계면활성제 (폴리소르베이트 20 및 폴록사머 188)로 보충하였다. 산화 스트레스를 강화하기 위해, 제형을 강한 산화제 (과산화수소)의 존재하에 검사하였다. 전체로서, 21 변형물의 매트릭스를 검사를 위해 사용하였다.

[0121] 실험 설계

[0122] CCH를 3가지 상이한 제형 변형물으로 제형화하였다. 제형 변형물을 제형 후보를 검사하기 위해 교반을 사용한 열 응력 및 동결/융해 응력에 노출시켰다. 과산화수소를 단백질에 대한 산화 스트레스를 강화시키기 위해 샘플에 첨가하였다. 각각의 샘플을 응집체(aggregates)의 형성을 모니터링하기 위해 탁도 측정으로 응력 노출 후 분석하였다.

[0123] 유리 바이알 및 스토퍼의 처리

[0124] 바이알을 실험실 식기세척기에서 정제수로 세척하였다. 그후에, 바이알을 건조시키고, 발열억제(pyrogenization)/멸균을 위해 300℃에서 2 시간 동안 열-처리하였다. 스토퍼를 2 bar 및 121℃에서 20 min 동안 멸균 백에서 오토클레이브 처리하고, 8 시간 동안 80℃에서 건조시켰다.

[0125] 샘플 제조

[0126] 첫번째 XIAFLEX® 약물 물질을 제형 변형물 A 또는 B에 대해 투석하였다. 투석을 정량적 완충제 교환을 달성하기 위해 3개의 독립적 투석 단계로 수행하였다. 60 ml의 XIAFLEX® 약물 물질을 제형 변형물 A에 대해 투석하고, 40 ml의 XIAFLEX® 약물 물질을 제형 변형물 B에 대해 투석하였다. XIAFLEX® 약물 물질을 2개의 사전-컨디셔닝된 (투석 완충제 중) Slide-A-Lyzer™ 카세트 (Thermo Scientific, Rockford, USA)로 옮겼다. 충전된 Slide-A-Lyzer™ 카세트를, 첫번째 완충제 교환 (2000 ml/1000ml)을 수행하기 전에, 2000 ml 또는 1000 ml의 표적 완충제 중에서 2 시간 동안 인큐베이팅하였다. 추가 2시간 동안 투석 후, 완충제를 다시 한번 (둘 다의 제형 변형물에 대해 2000 ml) 교환시켜 투석을 밤새 마무리하였다. 단백질 샘플을 Slide-A-Lyzer™ 카세트에서 제거하고, 농도를 희석하여 1 mg/ml로 조정하였다.

[0127] 세제 및 과산화수소의 첨가

[0128] 투석 후, 샘플을, 스톡 용액 (10% w/w 폴리소르베이트 20, 10% w/w 폴록사머 188, 30% w/w H_2O_2)을 첨가하여 폴리소르베이트 20, 폴록사머 188, 과산화수소, 및 이의 조합물로 보충하였다. 원래의 XIAFLEX® 제형의 변형물을 세제 또는 과산화수소를 직접적으로 벌크 용액으로 첨가하여 제조하였다. 각각의 변형물의 조성을 표 2에 나타낸다:

표 2

시험 검사를 위한 제형 변형물

#	샘플 코드	용기	+ PS20 0.02 %	+ P188 (0.1 %)	+ H_2O_2 (0.1%)
1	V_A1	유리 타입 1			
2	V_A2	유리 타입1	X		
3	V_A3	유리 타입 1		X	
4	V_A1s	실리콘 처리 유리			
5	V_A2s	실리콘 처리 유리	X		
6	V_A3s	실리콘 처리 유리		X	
7	V_A4s	실리콘 처리 유리			X
8	V_A5s	실리콘 처리 유리	X		X
9	V_A6s	실리콘 처리 유리		X	X
10	V_B1s	실리콘 처리 유리			
11	V_B2s	실리콘 처리 유리	X		
12	V_B3s	실리콘 처리 유리		X	
13	V_B4s	실리콘 처리 유리			X
14	V_B5s	실리콘 처리 유리	X		X
15	V_B6s	실리콘 처리 유리		X	X
16	Or1s	실리콘 처리 유리			
17	Or2s	실리콘 처리 유리	X		
18	Or3s	실리콘 처리 유리		X	
19	Or4s	실리콘 처리 유리			X
20	Or5s	실리콘 처리 유리	X		X
21	Or6s	실리콘 처리 유리		X	X

[0129]

[0130] 각각의 제형을 층류하에 멸균 여과하고, 열/교반 및 동결/융해 응력에 노출하였다.

[0131] 동결/융해 시험

[0132] 제형의 동결/융해 안정성을 총 3회 동결/융해 순환을 작동시켜 시험하였다. 실리콘 처리 6R 유리 바이알 또는 2R 표준 유리 바이알을 1.0 ml의 각각의 제형으로 충전시켰다. 3개의 바이알을 각각의 변형물에 대해 제조하였다. 액체 샘플을 25℃에서 -30℃로 55 min 내에 제어된 냉동 속도로 냉동하고, 실온으로 55 min 내에 제어된 가열 속도로 다시 가온시켰다. 적절한 온도 제어를 위해, 샘플을 파일럿 동결건조기 내로 로딩하였다. 각각의 동결/융해 순환 후 샘플의 탁도를 측정하였다. 탁도 측정을 위해, 1 ml의 각각의 샘플을 1회용 탁도 큐벳에 충전시키고, 분석하였다. 분석 후, 액체를 유리 바이알로 회수하고, 실험을 계속하였다.

[0133] 열 응력 시험

[0134] 모든 제형의 시험 샘플에 40℃에서 4 일 동안 교반 (200 rpm)하에 2R 바이알 (1 ml 충전 용적)에서 응력을 가하였다. 응력을 가한 샘플의 탁도를 그후에 분석하였다.

[0135] 탁도 측정

[0136] 샘플의 탁도를 유럽 약전에 따라 2100AN 탁도계 (Hach Lange, Dusseldorf, Germany)를 사용하여 측정하였다. 시스템을 다음과 같이 교정하였다:

[0137] · 하이드라진 설페이트 용액: 1.0 g의 하이드라진 설페이트를 정제수 중에 용해시키고, 100.0 ml로 동일한 용매를 사용하여 희석시켰다. 4-6 h 동인 방치되게 하였다.

[0138] · 헥사메틸렌 테트라민 용액: 2.5 g의 헥사메틸렌 테트라민을 25.0 ml 정제수 중에 100 ml 유리-토퍼 (toppered) 정량 플라스크에서 희석시켰다.

[0139] · 일차 유백색 현탁액: 25.0 ml 하이드라진 설페이트 용액을 헥사메틸렌 테트라민 용액에 정량 플라스크 중에 첨가하였다. 혼합하고 24 h 동안 방치되게 하였다.

[0140] · 유백광(opalescence)의 표준: 15.0 ml의 일차 유백색 현탁액을 1000.0 ml로 정제수를 사용하여 희석하였다. 이러한 현탁액을 새로 제조하였다 (최대 24 h 동안 저장함).

[0141] · 참조 현탁액: 표 3에 따라 제조된 참조 현탁액을 제조하였다.

표 3

탁도계의 교정을 위한 참조 용액의 제조

[0142]

	I	II	II	IV
유백광의 표준	5.00 mL	10.0 mL	30.0 mL	50.0 mL
정제수	95.0 mL	90.0 mL	70.0 mL	50.0 mL

[0143] 결과 및 논의

[0144] 표 4는 동결/융해 시험의 결과를 나타낸다. 어떠한 변형물도 동결/융해 순환의 수의 증가에 따른 탁도 증가를 나타내지 않았다. 효소는 동결/융해 응력에 대해 안정한 것으로 보인다. 계면활성제 또는 과산화수소의 첨가는 샘플의 탁도에 어떠한 영향도 미치지 않는 것으로 나타났다.

[0145] 표 5는 40℃에서 열 응력 및 200 rpm에서 교반의 결과를 나타낸다. 과산화수소를 포함하는 변형물은 (증가된 네펠로메트릭 탁도 단위 (NTU)로 나타난 바와 같이) 열 응력 후 명백한 탁도 증가를 나타내었다. 변형물 V_A 및 변형물 V_B (만니톨은 둘 다의 제형에 존재함)에서 수득한 탁도는 원래의 XIAFLEX® 제형 변형물 ("또는" - 만니톨 비함유)보다 현저하게 더 낮았다 (감소된 NTU). 만니톨이 유리하게 영향을 미치는 것은 이의 라디칼 스캐빈저 성질에 의해 야기되는 것으로 고려된다.

표 4

동결/융해 시험 검사에 대한 결과

#	샘플 코드	용기	PS20 0.02 %	P188 0.1 %	H2O2 0.1%	탁도 [NTU]			
						T0	1x F/T	2x F/T	3x F/T
1	V_A1	유리 타입 1				3.2	3.2	2.8	2.5
2	V_A2	유리 타입 1	X			3.3	2.7	2.3	2.7
3	V_A3	유리 타입 1		X		2.6	2.2	2.3	2.9
4	V_A1s	실리콘 처리 유리				3.2	4.2	2.9	1.8
5	V_A2s	실리콘 처리 유리	X			3.3	2.7	2.5	2.3
6	V_A3s	실리콘 처리 유리		X		2.6	2.1	2.1	2.5
7	V_A4s	실리콘 처리 유리			X	2.9	3.5	2.6	3.0
8	V_A5s	실리콘 처리 유리	X		X	2.0	2.3	2.2	2.8
9	V_A8s	실리콘 처리 유리		X	X	2.6	2.5	2.5	2.5
10	V_B1s	실리콘 처리 유리				1.9	2.5	2.4	2.7
11	V_B2s	실리콘 처리 유리	X			2.3	2.2	2.6	2.8
12	V_B3s	실리콘 처리 유리		X		3.0	2.5	2.6	3.1
13	V_B4s	실리콘 처리 유리			X	2.0	2.0	2.6	3.1
14	V_B5s	실리콘 처리 유리	X		X	2.2	1.9	2.1	2.5
15	V_B8s	실리콘 처리 유리		X	X	2.1	2.3	2.9	2.5
16	$Cr1s$	실리콘 처리 유리				2.3	1.9	1.9	3.0
17	$Cr2s$	실리콘 처리 유리	X			2.7	2.4	2.5	2.9
18	$Cr3s$	실리콘 처리 유리		X		2.2	2.9	2.4	2.7
19	$Cr4s$	실리콘 처리 유리			X	2.0	2.8	2.7	3.0
20	$Cr5s$	실리콘 처리 유리	X		X	2.5	2.8	2.2	3.0
21	$Cr8s$	실리콘 처리 유리		X	X	1.8	3.2	2.3	2.4

[0146]

표 5

열 시험 검사의 결과

#	샘플 코드	용기	PS20 0.02 %	P188 0.1 %	H2O2 0.1%	탁도 [NTU] T0	탁도 [NTU] 4 일 40°C + 200 rpm
1	V_A1	유리 타입 1				3.2	3.1
2	V_A2	유리 타입 1	X			3.3	2.5
3	V_A3	유리 타입 1		X		2.6	2.4
4	V_A1s	실리콘 처리 유리				3.2	2.6
5	V_A2s	실리콘 처리 유리	X			3.3	2.5
6	V_A3s	실리콘 처리 유리		X		2.6	2.6
7	V_A4s	실리콘 처리 유리			X	2.9	7.0
8	V_A5s	실리콘 처리 유리	X		X	2.0	6.2
9	V_A6s	실리콘 처리 유리		X	X	2.6	6.3
10	V_B1s	실리콘 처리 유리				1.9	2.7
11	V_B2s	실리콘 처리 유리	X			2.3	2.3
12	V_B3s	실리콘 처리 유리		X		3.0	1.9
13	V_B4s	실리콘 처리 유리			X	2.0	24.2
14	V_B5s	실리콘 처리 유리	X		X	2.2	24.5
15	V_B6s	실리콘 처리 유리		X	X	2.1	25.8
16	Cr1s	실리콘 처리 유리				2.3	2.1
17	Cr2s	실리콘 처리 유리	X			2.7	2.5
18	Cr3s	실리콘 처리 유리		X		2.2	2.9
19	Cr4s	실리콘 처리 유리			X	2.0	44.8
20	Cr5s	실리콘 처리 유리	X		X	2.5	46.5
21	Cr6s	실리콘 처리 유리		X	X	1.8	54.7

[0147]

[0148] 결론

[0149] 탁도의 증가는 변형물 V_A와 V_B 간에 유의하게 상이하였다. pH 8.0과 비교하여 pH 8.5에서 분자간의 더 높은 반발 상호작용이 산화 스트레스에 의해 야기되는 응집물 형성의 경향을 감소시켰음을 고려한다.

[0150] 계면활성제의 첨가는 샘플의 탁도에 긍정적 영향도 부정적 영향도 나타내지 않았다. 실리콘 처리 유리 바이알의 소수성 표면은 열 응력 후 샘플의 탁도에 영향을 주지 않았다.

[0151] 샘플을 응집체의 형성을 모니터링하기 위해 탁도 측정에 의해 분석하였다. 샘플의 탁도는 동결/융해 순환에 의해 증가되지 않았다. 제형은 동결/융해 응력 (3회 이하 순환)하에 응집체 형성에 대항하여 안정한 것으로 보였다. 소수성 표면 접촉 뿐만 아니라 과산화수소의 첨가는 동결/융해 응력 동안 계면활성제의 존재 또는 부재하에 샘플의 탁도에 영향을 주지 않았다. 열 응력하에, 강화된 산화 스트레스 하에 탁도의 명백한 증가 (NTU로 측정함)가 관찰되었다 (과산화수소의 첨가). 만니톨을 함유하고 분자 간의 더 높은 반발 상호작용을 갖는 변형물은 강화된 산화 스트레스하에 탁도의 더 낮은 확연한 증가를 나타내었다. 산화 스트레스에 대항하는 제형의 안정성은 변형물 A > 변형물 B > 원래의 XIAFLEX® 제형의 순서로 더 높았다. 강화된 산화 스트레스하에 세제의 존재

는 샘플의 탁도에 영향을 주지 않았다. 산화 스트레스 없이, 모든 샘플은 열/교반 응력 동안 투명하게 유지되었다. 소수성 표면 접촉은 열/교반 응력 동안 세제의 존재 또는 부재하에 샘플의 탁도에 영향을 주지 않았다.

[0152] **제형 강건성 연구 - 연구 2**

[0153] 상이한 pH 값 및 만니톨 농도를 갖는 열두개(12)의 제형 변형물을 CG-MALS 및 나노DSC로 조사하였다. 각각의 변형물을 추가로 교반하에 열 응력 및 동결/융해 응력 시험에 노출하였다. 산화 스트레스를 강화하기 위해, 각각의 변형물을 0.1% H_2O_2로 보충하였다. 이러한 연구의 목적은 다음을 위한 것이다:

[0154] · CG-MALS 및 나노DSC를 통해 다양한 제형 변형물에서 2개의 단백질 종 콜라게나제 I 및 콜라게나제 II의 분자 상호작용을 특성화하기 위해; 및

[0155] · 동결/융해 및 열 응력에 대항하여 XIAFLEX®의 안정성 및 추가 제형 변형물을 시험하기 위해.

[0156] 하기 CCH 제형을 제조하고 시험하였다:

표 6

제형

[0157]

#	pH	Tris	만니톨	수크로스
		mM	mM	mM
1	7.5	10	0	60
2	8.0	10	0	60
3	8.5	10	0	60
4	7.5	10	112.5	60
5	8.0	10	112.5	60
6	8.5	10	112.5	60
7	7.5	10	225	60
8	8.0	10	225	60
9	8.5	10	225	60
10	7.5	10	337.5	60
11	8.0	10	337.5	60
12	8.5	10	337.5	60

[0158] 콜라게나제 I 및 콜라게나제 II를 상응하는 제형 완충제에 대항하여 투석하였다. 투석 후, 샘플 용액을 추가로 희석하였다. 콜라게나제 I, 콜라게나제 II, 및 혼합물의 콜로이드 안정성 및 열역학적 안정성을 CG-MALS 및 나노DSC 각각으로 측정하였다. 각각의 제형 변형물에서 단백질의 안정성을 추가로 응력 시험 (동결/융해 및 열/전단 응력) 연구에서 조사하였다. 안정성 시험 동안 산화 스트레스를 강화하기 위해, 각각의 제형 변형물을 0.1% H_2O_2의 존재 및 부재하에 시험하였다 (과산화수소가 부재한 하위-변형물은 a로 표시되고; 과산화수소가 존재하는 하위-변형물은 b로 표시된다).

[0159] 투석

[0160] 콜라게나제 I 및 콜라게나제 II의 투석을 정량적 완충제 교환을 성취하기 위한 3개의 독립적인 투석 단계로 수행하였다. 14 ml의 콜라게나제 I 중간체 샘플 및 14 ml의 콜라게나제 II 중간체 샘플을 2개의 사전-컨디셔닝된 (투석 완충제 중) Slide-A-Lyzer™ 카세트 (Thermo Scientific, Rockford, USA)로 옮겼다. 충전된 Slide-A-Lyzer™ 카세트를, 첫번째 완충제 교환 (1000 ml)을 수행하기 전에, 1000 ml의 표적 완충제 중에 2 시간 동안 인큐베이팅하였다. 추가로 2 시간 동안 투석 후, 완충제를 다시 한번 (1000 ml) 교환시켜 투석을 밤새 마무리하

였다. 단백질 샘플을 Slide-A-Lyzer™ 카세트에서 제거하고, 추가로 처리하였다. 각각의 투석 단계는 총 대략 2 x 10^5의 계산된 완충제 교환 양(factor)을 야기하는 1/35회 완충제 교환을 나타낸다.

[0161] 나노 시차 주사 열량분석

[0162] 시차 주사 열량분석 (DSC)은, 일정한 속도로 가열하는 경우 분자의 열 변성에 관련된 열 변화를 측정하여 이의 본래(native) 형태의 단백질의 안정성을 평가하기 위해 사용된 기술이다. 용액 중 단백질은 이의 본래 (폴딩) 및 변성된 (언폴딩) 형태 사이에 평형상태로 존재한다. 본래 단백질은 고유 온도 (T_{onset})에서 언폴딩 (열 변성)에 의해 열에 반응한다. 생체고분자가 본질적으로 더 안정할 수록, 언폴딩 전이의 개시 온도가 더 높다. DSC는 열-유도 변성로부터 야기되고, 본래 생체분자의 폴딩 및 안정성에 기여하는 인자를 설명할 수 있는 언폴딩의 엔탈피를 측정한다. 이들은 소수성 상호작용, 수소 결합, 형태 엔트로피, 및 물리적 환경을 포함한다. 하기 실험 방법을 수행하였다:

[0163] 방식: 주사

[0164] 온도 파라미터: 하한: 20℃

[0165] 상한: 100℃

[0166] 속도: 1℃/min 가열 및 냉각

[0167] 평형: 600 s

[0168] 압력 파라미터: 수동, 3.0 atm

[0169] 데이터 간격: 1 s

[0170] 완충제 스캔을 각각의 샘플 작업 전에 수행하여 기준선을 생성하였다.

[0171] 샘플 제조

[0172] 투석된 샘플을 상응하는 제형 완충제로 1 mg/ml까지 희석하였다. 상응하는 투석 완충제를 완충제 스캔 및 완충제 참조로서 사용하였다.

[0173] CG-MALS

[0174] 용액 중 단백질 분자간의 상호작용을 두번째 비리얼 계수 (A_2)를 계산하여 상이한 농도에서 이들의 광 산란 거동의 변화를 분석하여 특성화하였다. A_2는 용액 중 단백질-단백질 상호작용의 측정치이다. 음의 A_2 값은 견인(attractive) 단백질-단백질 상호작용을 나타내는 반면, 양의 값은 반발 단백질 상호작용을 나타낸다. A_2 값이 음인 경우 단백질 용액은 "불안정성 콜로이드"이다. 더 높은 A_2 값은 더 큰 반발력을 나타내고, 이는 더 작은 단백질 상호작용을 나타내고, 더 낮은 단백질 응집 가능성 및 더 우수한 안정성을 나타낸다. 다양한 제형에 대한 A_2 값은 CG-MALS로 측정하고, 비-특이 단백질-단백질 상호작용의 측정치로서 사용하였다.

[0175] 겉보기 무게 평균 분자량 (apparent weight average molecular weight; Mw_{app})을 광 산란 및 농도 데이터를 분석하여 농도 구배에서 각 단계에 대해 측정한다. 거대분자 간의 상당한 상호작용은 Mw_{app} 대 농도의 변화로서 분명해 진다. A_2 계산을 하기 공식 I에 따라서 0 mg/ml 농도까지 외삽하여 Zimm 플롯 분석을 통해 수행하였다:

[0176] 공식 I

$$\frac{K^*c}{R(\theta,c)} = \frac{1}{M_w P(\theta)} + A_2 c$$

[0177]

[0178] 여기서:

[0179] R(Θ,c): 산란 각 Θ 및 농도 c의 함수로서 용액의 과도한 레일리 비(Rayleigh ratio). 이는 용질에 의해 산란된 과도한 광 및 순수한 용매에 의해 산란된 광의 강도에 직접적으로 비례한다.

[0180] Mw: 중량 평균 분자량.

[0181] A_2: 제2 비리얼 계수

[0182] c: 농도

[0183] K^*: 광학 상수 ($4p^2(dn/dc)^2 n_0^2/N_a l_o^4$)

[0184] P(Θ): 산란된 광의 각도 의존을 기술하고, rms 반경에 관련될 수 있다.

[0185] 샘플 제조

[0186] 투석된 샘플을 CG-MALS 측정을 위해 희석하지 않고 사용하였다. 상응하는 투석 완충제를 CG-MALS 실험에 위한 희석제로서 사용하였다. 샘플 및 완충제를 0.1 μm 필터를 통해 통과시켰다. CG-MALS 시스템 내로 샘플을 로딩하기 전에 샘플의 정확한 농도를 UV-흡광 측정으로 측정하였다. 농도를 사용하여 각각의 구배 단계의 농도를 계산하였다.

[0187] 샘플 측정

[0188] Calypso II CG-MALS 시스템을 사용하여 피분석물의 농도 구배를 MALS 검출기에 공급하였다. 샘플을 시스템의 주사기 펌프 1 및 주사기 펌프 2 상에 로딩하고, 투석 완충제를 주사기 펌프 3 상에 로딩하였다. CG-MALS 측정은 3 단계로 이루어졌다. 첫번째 단계에서, 10% 내지 100% 범위의 샘플 1의 농도 구배를 적용하여 제형 중 샘플 1의 자가-비리얼 계수를 측정하였다. 두번째 단계는 크로스-오버(cross-over) 구배로 이루어졌고, 여기서, 샘플 1의 농도를 90%에서 10%로 감소시키는 반면, 샘플 2의 농도를 10%에서 90%로 증가시켰다. 이러한 단계를 수행하여 교차-비리얼 계수를 결정하였다. 3번째 단계에서, 100% 내지 10% 범위의 샘플 2의 농도 구배를 적용하여 제형 중 샘플 2의 자가-비리얼 계수를 결정하였다. 각각의 구배 단계에서 0.7 ml의 샘플을 MALS 검출기로 주입하였다. 수득된 광 산란 신호를 180 sec의 시간 기간 동안 기록하였다. 고정된 분자량을 갖는 다중 성분 Zimm 플롯 분석을 Calypso 소프트웨어 버젼 2.1.5로 수행하였다.

[0189] UV 측정

[0190] 콜라게나제 I 및 콜라게나제 II의 용액 중 농도를 8452A UV 분광계 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)를 사용하여 측정하였다. 샘플을 0.2 cm의 광학 경로 두께를 갖는 플라스틱 큐벳을 사용하여 약 3 mg/ml의 농도로 측정하였다. 농도를 각각 콜라게나제 I에 대한 소광 계수 1.52 ml/(mg*cm) 및 콜라게나제 II에 대한 소광 계수 1.48 ml/(mg*cm)를 사용하여 람베르트-비어 법칙에 따라서 계산하였다.

[0191] 동결/융해 시험

[0192] 제형의 동결/융해 안정성을 총 3개의 동결/융해 순환을 작동시켜 시험하였다. 투석된 콜라게나제 I 및 투석된 콜라게나제 II를 혼합하여 0.5 mg/ml 콜라게나제 I 및 0.5 mg/ml 콜라게나제 II를 포함하는 용액을 나타내었다.

[0193] 2R 유리 바이알을 1.0 ml의 각각의 제형으로 충전시켰다. 3개 바이알을 각각의 변형물에 대해 제조하였다. 액체 샘플을 25℃에서 -30℃로 55 min 내에 제어된 냉동 속도로 냉동하고, 실온으로 55 min 내에 제어된 가열 속도로 다시 가온시켰다. 적절한 온도 제어를 위해, 샘플을 파일럿 동결건조기 내로 로딩하였다. 각각의 동결/융해 순환 후, 샘플의 탁도를 측정하였다. 탁도 측정을 위해, 1 ml의 각각의 샘플을 1회용 탁도 큐벳에 충전시키고, 분석하였다. 분석 후, 액체를 유리 바이알로 회수하고, 실험을 계속하였다.

[0194] 열 응력 시험

[0195] 투석된 콜라게나제 I 및 투석된 콜라게나제 II를 혼합하여 0.5 mg/ml 콜라게나제 I 및 0.5 mg/ml 콜라게나제 II를 포함하는 용액을 나타내었다. 모든 제형의 시험 샘플에 40℃에서 4 일 동안 교반 (200 rpm)하에 2R 바이알 (1 ml 충전 용적) 중에서 응력을 가하였다. 응력을 가한 샘플의 탁도를 그후에 분석하였다.

[0196] 탁도 측정

[0197] 샘플의 탁도를 상기 기재한 바와 같이 측정하였다.

[0198] 결과 및 논의

[0199] 표 7은 각각의 제형 변형물의 CG-MALS 및 나노DSC 측정의 결과를 나타낸다.

[0200] 콜로이드 안정성 - 제형의 pH 값이 콜라게나제 I, 콜라게나제 II, 및 이의 혼합물의 콜로이드 안정성에 강하게 영향을 준다는 것을 나타내었다. 가장 강한 반발 상호작용을 pH 8.5에서 관찰하였다. pH 7.5에서, 반발 상호작용은 더 낮았다. pH 7.5에서, 콜라게나제 I은, 만니톨이 제형에서 존재하지 않는 경우, 견인 상호작용을 나타내고, 더 높은 농도의 만니톨에서 반발 상호작용이 더 강해졌다. 더 큰 염기성 pH 값에서, 만니톨의 영향은 경시되었다(subordinated).

[0201] 열역학적 안정성 - 콜라게나제 I은 언폴딩의 개시 온도의 약한 pH 의존성을 나타내었다. 더 높은 T_{onset} 값을 pH 8.5와 비교하여 pH 7.5에서 관찰하였다. 만니톨은 콜라게나제 I의 열역학적 안정성에 미치는 약한 농도 의존적 긍정적인 효과를 나타내었다. 콜라게나제 II의 열역학적 안정성은 조사된 pH 값에 독립적이었다. 만니톨의 존재는 콜라게나제 II의 열역학적 안정성에 대해 유리한 것으로 여겨졌다.

표 7

첨가 제형의 CG-MALS 및 나노DSC 분석의 결과

[0202]

					A2			나노 DSC			
#	pH	트리스	만니톨	수크로스	10^{-4} mol*ml/g^2			Tonset [°C]		Tm [°C]	
		mM	mM	mM	AUX-I	AUX-II	AUX-I <> AUX-II	AUX I	AUX II	AUX I	AUX II
1	7.5	10	0	60	-0.32	0.61	0.19	47.1	51.2	51.3	54.8
2	8.0	10	0	60	0.03	0.91	0.65	46.9	51.7	51.8	55.1
3	8.5	10	0	60	1.93	1.52	1.68	46.4	51.0	51.7	55.0
4	7.5	10	112.5	60	0.24	0.32	0.51	49.1	51.3	52.6	55.6
5	8.0	10	112.5	60	0.99	1.25	0.96	47.2	51.6	51.9	55.4
6	8.5	10	112.5	60	2.33	1.95	1.75	47.0	51.9	52.0	55.6
7	7.5	10	225	60	0.76	1.69	0.94	49.5	53.0	53.2	56.2
8	8.0	10	225	60	1.93	1.77	1.24	48.8	53.2	53.2	56.2
9	8.5	10	225	60	2.22	1.97	1.43	48.8	53.0	53.0	56.0
10	7.5	10	337.5	60	1.58	1.79	0.91	49.9	52.6	53.4	56.4
11	8.0	10	337.5	60	2.04	1.62	0.82	48.8	53.9	53.1	56.3
12	8.5	10	337.5	60	1.69	2.03	1.33	49.0	53.9	53.3	56.3

[0203] 표 8은 후속적인 동결 융해 순환 동안 샘플의 탁도 값을 나타낸다.

표 8

후속적인 동결/융해 순환을 갖는 제형의 탁도 값.

#	pH	트리스	만니톨	수크로스	H_2O_2	탁도 [NTU]			
		mM	mM	mM	%	T0	1x F/T	2x F/T	3x F/T
1a	7.5	10	0	60	0	2.1	3.0	2.8	2.6
2a	8.0	10	0	60	0	2.2	2.2	3.5	2.2
3a	8.5	10	0	60	0	2.8	1.8	3.8	2.1
4a	7.5	10	112.5	60	0	2.4	2.5	3.4	2.1
5a	8.0	10	112.5	60	0	3.0	2.6	3.0	2.3
6a	8.5	10	112.5	60	0	2.6	1.9	3.5	2.5
7a	7.5	10	225	60	0	1.8	2.8	3.6	2.5
8a	8.0	10	225	60	0	2.5	3.2	2.2	2.4
9a	8.5	10	225	60	0	2.7	3.0	3.0	2.5
10a	7.5	10	337.5	60	0	2.8	2.8	3.0	2.3
11a	8.0	10	337.5	60	0	2.6	3.0	3.4	3.3
12a	8.5	10	337.5	60	0	2.5	2.9	3.0	2.2
1b	7.5	10	0	60	0.1	1.9	2.2	3.3	2.6
2b	8.0	10	0	60	0.1	2.6	2.6	2.1	3.1
3b	8.5	10	0	60	0.1	2.6	1.8	2.1	1.8
4b	7.5	10	112.5	60	0.1	2.8	2.8	3.6	2.9
5b	8.0	10	112.5	60	0.1	1.9	2.8	3.3	2.3
6b	8.5	10	112.5	60	0.1	2.2	2.2	2.1	2.6
7b	7.5	10	225	60	0.1	2.3	2.6	2.1	2.9
8b	8.0	10	225	60	0.1	2.6	2.2	3.7	2.4
9b	8.5	10	225	60	0.1	1.9	2.9	2.5	3.6
10b	7.5	10	337.5	60	0.1	2.2	2.7	1.9	3.1
11b	8.0	10	337.5	60	0.1	2.9	2.9	3.5	2.7
12b	8.5	10	337.5	60	0.1	2.0	1.8	2.2	1.8

[0204]

[0205] 어떠한 변형물도 동결/융해 시험 후 탁도의 증가를 나타내지 않았다. 과산화수소의 존재는 동결/융해 응력하에 각각의 제형에서 잘 허용되었다(well tolerated).

[0206] 표 9는 열 응력 전 및 후 각각의 제형의 탁도 값을 나타낸다.

표 9

열 응력 전 및 후 탁도 값

#	pH	트리스	만니톨	수크로스	H_2O_2	탁도 [NTU]	
		mM	mM	mM	%	T0	4 일 / 200 rpm / 40°C
1a	7.5	10	0	60	0	2.1	2.3
2a	8.0	10	0	60	0	2.2	2.3
3a	8.5	10	0	60	0	2.8	2.4
4a	7.5	10	112.5	60	0	2.4	2.9
5a	8.0	10	112.5	60	0	3.0	2.4
6a	8.5	10	112.5	60	0	2.6	2.7
7a	7.5	10	225	60	0	1.8	2.8
8a	8.0	10	225	60	0	2.5	2.7
9a	8.5	10	225	60	0	2.7	2.6
10a	7.5	10	337.5	60	0	2.8	2.8
11a	8.0	10	337.5	60	0	2.6	2.7
12a	8.5	10	337.5	60	0	2.5	2.7
1b	7.5	10	0	60	0.1	1.9	388.0
2b	8.0	10	0	60	0.1	2.6	34.0
3b	8.5	10	0	60	0.1	2.6	10.4
4b	7.5	10	112.5	60	0.1	2.8	252.0
5b	8.0	10	112.5	60	0.1	1.9	22.7
6b	8.5	10	112.5	60	0.1	2.2	7.5
7b	7.5	10	225	60	0.1	2.3	336.0
8b	8.0	10	225	60	0.1	2.6	19.6
9b	8.5	10	225	60	0.1	1.9	7.0
10b	7.5	10	337.5	60	0.1	2.2	196.0
11b	8.0	10	337.5	60	0.1	2.9	20.7
12b	8.5	10	337.5	60	0.1	2.0	6.6

[0207]

[0208] 산소 라디칼의 부재하에, 탁도는 모든 조사된 제형 변형물에서 변함없이 남아있다. 과산화수소의 존재하에, 샘플의 탁도는 크게 증가하였다. 이는 산화 스트레스가 응집체 형성을 유도하였음을 나타내었다. 8.5의 더 큰 염기성 pH는 산화 스트레스로 유도된 응집에 대항하여 단백질을 안정화시켰다. 만니톨은 과산화수소의 존재하에 열 응력 후 샘플의 탁도에 미치는 추가로 유리한 효과를 나타내었다. 만니톨은 산화 스트레스에 대항하여 단백질의 안정성을 증가시키는 라디칼 스캐빈저로서 작용하는 것 같았다.

[0209] **제형 강건성 연구 - 연구 3**

[0210] 하기 연구는 수크로스 및 트레할로스를 60 mM의 농도에서 및 만니톨을 225 mM에서 이용하였다. 수개 농도의 계면활성제를 평가하고, 제공된 샘플에 대해 사용된 농도를 하기한 표의 데이터에 언급한다. 다양한 제형 사전-동결건조에 미치는 pH의 영향을 제형 최적화의 부분으로서 평가하였다.

[0211] 용액으로서 제안된 제형의 강건성을 상기 제형을 하기 응력에 적용하여 조사하였다:

[0212] · 3회 동결-융해 순환 (-30℃ 내지 25℃); 및/또는

[0213] · 200 rpm에서 40℃에서 4 일 동안 진탕

[0214] 이어서 응력을 가한 샘플을 탁도에 대해 시험하고, 주요 생성물 품질 속성을 하기 방법을 사용하여 평가하였다:

[0215] · UV_{A280}에 의한 단백질 농도

[0216] · 역상 - 고성능 액체 크로마토그래피에 의한 콜라게나제 I 및 콜라게나제 II의 질량 및 비 (본원에 논의됨)

[0217] · 가용성 래트 꼬리 콜라겐 (SRC) 효소 활성 검정 방법 (콜라게나제 I; 본원에 논의됨)

[0218] · 글리실-L-프롤릴-L-알라닌 (GPA) 효소 활성 검정 방법 (콜라게나제 II; 본원에 논의됨)

[0219] 결과

[0220] 탁도: 동결/융해 순환에 대해 생성된 데이터를 표 10에 제시한다.

표 10

생성물 탁도에 미치는 동결-융해 순환의 영향

샘플 기술					탁도 [NTU]			
					동결-융해 순환			
안정화제	벌크제	계면활성제	pH	컨테이너	T_0	1	2	3
트레할로스	만니톨	없음	8.5	유리 타입 1	3.2	3.2	2.8	2.5
트레할로스	만니톨	폴리소르베이트 20[a]	8.5	유리 타입 1	3.3	2.7	2.3	2.7
트레할로스	만니톨	없음	8.5	실리콘 처리 유리	3.2	4.2	2.9	1.8
트레할로스	만니톨	폴리소르베이트 20[a]	8.5	실리콘 처리 유리	3.3	2.7	2.5	2.3
트레할로스	만니톨	없음	8.0	실리콘 처리 유리	1.9	2.5	2.4	2.7
트레할로스	만니톨	폴리소르베이트 20[a]	8.0	실리콘 처리 유리	2.3	2.2	2.6	2.8
수크로스 (대조군)	없음	없음	8.0	실리콘 처리 유리	2.3	1.9	1.9	3.0
수크로스	없음	폴리소르베이트 20[a]	8.0	실리콘 처리 유리	2.7	2.4	2.5	2.9

[a] 0.02%

[0221]

[0222] 이들 결과는, 다중 동결-융해 순환이 시험된 제형/컨테이너 조합 중 어느 것에 대해서도 일관된 탁도 값으로 지시된 바와 같이 단백질 응집에 영향을 주지 않음을 입증하였다. 결과는 시험된 부형제가 추가 평가에 적합하다는 것을 나타내었다.

[0223] 높은 온도까지 진탕/노출에 대해 생성된 데이터를 표 11에 제시한다.

표 11

생성물 탁도에 미치는 열/진탕의 영향

샘플 기술				컨테이너	탁도 [NTU]	
안정화제	벌크제	계면활성제	pH		T_0	혼합 후 [a]
트레할로스	만니톨	없음	8.5	유리 타입 1	3.2	3.1
트레할로스	만니톨	폴리소르베이트 20[b]	8.5	유리 타입 1	3.3	2.5
트레할로스	만니톨	없음	8.5	실리콘 처리 유리	3.2	2.6
트레할로스	만니톨	폴리소르베이트 20[b]	8.5	실리콘 처리 유리	3.3	2.5
트레할로스	만니톨	없음	8.0	실리콘 처리 유리	1.9	2.7
트레할로스	만니톨	폴리소르베이트 20[b]	8.0	실리콘 처리 유리	2.3	2.3
수크로스 (대조군)	없음	없음	8.0	실리콘 처리 유리	2.3	2.1
수크로스	없음	폴리소르베이트 20[a]	8.0	실리콘 처리 유리	2.7	2.5

[a] 40°C 및 200 rpm 에서 4 일 동안 혼합 후
[b] 0.02%

[0224]

[0225] 이들 결과는, 시험된 제형/컨테이너 조합 중 어느 것에 대해 일관된 탁도 값이 지시하는 바와 같이, 열/진탕이 단백질 응집에 영향을 주지 않음을 입증하였다. 결과는 시험된 부형제가 추가 평가에 적합함을 나타낸다.

[0226] 두번째 연구는 응력을 가한 조건하에 생성물 탁도에 미치는 다양한 농도의 폴리소르베이트 20 및 더 높은 pH (8.8)의 효과(들)를 평가하기 위해 수행하였다. 이러한 연구에 대한 결과를 표 12에 제시한다.

표 12

응력 조건하에 생성물 탁도에 미치는 계면활성제 농도의 영향

샘플 기술				탁도 [NTU]				
				동결 융해 순환				
안정화제	벌크제	계면활성제	pH	T_0	1	2	3	진탕 후 [a]
트레할로스	만니톨	폴리소르베이트 20[c]	8.5	2.1	2.3	2.5	1.9	2.0
트레할로스	만니톨	없음	8.8	2.2	2.6	2.3	2.6	2.7
없음	만니톨	폴리소르베이트 20[b]	8.5	2.3	1.9	1.9	2.6	2.0
트레할로스	없음	폴리소르베이트 20[b]	8.5	1.8	2.3	2.0	2.5	1.8
트레할로스	없음	없음	8.5	2.4	2.2	2.0	2.7	2.4

[a] 40℃ 및 200 rpm 에서 4 일 동안 진탕 후
[b] 0.02%
[c] 0.1%

[0227]

[0228] 이들 데이터는, 연구된 계면활성제 수준 (0.02% 및 0.1%) 및 8.5 및 8.8의 pH 값이 동결/융해 순환시 또는 열/진탕시 일관된 탁도 값에 의해 지시되는 바와 같이 단백질 응집에 부정적인 영향을 주지 않는다는 것을 입증하였다. 결과는 열역학적으로 안정한 제형 및 연구되는 농도 범위에서 폴리소르베이트 20의 계면활성제로서의 사용이 고려될 수 있음을 나타내었다. 추가로, 데이터는 또한 트레할로스 또는 만니톨 단독 또는 조합의 사용이 샘플 탁도로 측정된 바와 같이 단백질 응집 에 부정적인 영향을 주지 않음을 지시하였다.

[0229] 주요 생성물 품질 속성 지시자 - -30℃에서 25℃까지 3회 순환 동안 동결/융해 순환 및 4 일 동안 40℃ 및 200 rpm의 열 응력/진탕의 영향을 평가하기 위해 생성된 데이터를 각각 표 13 및 14에 제시한다.

표 13

주요 생성물 품질 속성에 미치는 동결/융해 주기의 영향

샘플 기술					결과					
						질량 비				
안정화제	벌크제	계면활성제	pH	바이알	UV A_{280} (mg/mL)	Coll. II (μg/mL)	Coll. I (μg/mL)	비	SRC (Coll. I)[a]	GPA (Coll. II)[a]
트레할로스	만니톨	없음	8.5	유리 타입 1	1.0	483	488	1.0	1.04	1.05
트레할로스	만니톨	폴리소르베이트 20	8.5	유리 타입 1	1.0	508	518	1.0	1.12	1.08
트레할로스	만니톨	없음	8.5	실리콘 처리	1.0	511	501	1.0	0.99	1.06
트레할로스	만니톨	폴리소르베이트 20	8.5	실리콘 처리	1.0	504	516	1.0	1.03	1.09
트레할로스	만니톨	없음	8.0	실리콘 처리	1.0	525	510	1.0	1.03	1.02
트레할로스	만니톨	폴리소르베이트 20	8.0	실리콘 처리	1.0	531	541	1.0	1.01	1.09
수크로스	없음	없음	8.0	실리콘 처리	1.0	503	487	1.0	1.04	1.01
수크로스	없음	폴리소르베이트 20	8.0	실리콘 처리	1.0	513	524	1.0	1.06	1.08
트레할로스	만니톨	폴리소르베이트 20[b]	8.5	실리콘 처리	1.0	531	482	0.9	1.03	1.04
트레할로스	만니톨	없음	8.8	실리콘 처리	0.9	509	474	0.9	1.03	0.97

[0230]

[0231]

샘플 기술					결과					
						질량 비				
안정화제	벌크제	계면활성제	pH	바이알	UV A_{280} (mg/mL)	Coll. II (μg/mL)	Coll. I (μg/mL)	비	SRC (Coll. I)[a]	GPA (Coll. II)[a]
없음	만니톨	폴리소르베이트 20[c]	8.5	실리콘 처리	1.0	539	487	0.9	1.03	1.13
트레할로스	없음	폴리소르베이트 20[c]	8.5	실리콘 처리	1.0	558	507	0.9	1.05	1.09
트레할로스	없음	없음	8.5	실리콘 처리	1.0	537	498	0.9	1.06	1.04

[a] 참조와 비교하여
[b] 0.1%
[c] 0.02%
Coll. I = 콜라게나제 I; Coll. II = 콜라게나제 II

공개특허 10-2021-0113271

표 14

주요 생성물 품질 속성에 미치는 40℃ 온도 및 200 rpm (4 일)에서 진탕의 영향

샘플 기술					결과					
안정화제	벌크제	계면활성제	pH	바이알	UV A_{280} (mg/mL)	절량 비			SRC (Coll. I)[a]	GPA (Coll. II)[a]
						Coll. II (μg/mL)	Coll. I (μg/mL)	비		
트레할로스	만니톨	없음	8.5	유리 타입 1	1.0	474	474	1.0	0.96	0.95
트레할로스	만니톨	폴리소르베이트 20	8.5	유리 타입 1	1.0	458	475	1.0	0.95	0.99
트레할로스	만니톨	없음	8.5	실리콘 처리	1.0	439	459	1.0	0.95	0.94
트레할로스	만니톨	폴리소르베이트 20	8.5	실리콘 처리	1.0	431	468	0.9	0.94	0.97
트레할로스	만니톨	없음	8.0	실리콘 처리	1.0	462	475	1.0	0.95	0.97
트레할로스	만니톨	폴리소르베이트 20	8.0	실리콘 처리	1.0	444	485	0.9	0.94	0.99
수크로스	없음	없음	8.0	실리콘 처리	1.0	421	454	0.9	0.85	1.00
수크로스	없음	폴리소르베이트 20	8.0	실리콘 처리	1.0	414	464	0.9	0.90	1.02
트레할로스	만니톨	폴리소르베이트 20[b]	8.5	실리콘 처리	1.0	502	506	1.0	0.96	0.98
트레할로스	만니톨	없음	8.8	실리콘 처리	0.9	472	501	1.1	1.00	1.03

[0232]

샘플 기술						결과					
							질량 비				
안정화제	벌크제	계면활성제	pH	바이알	UV A_{280} (mg/mL)	Coll. II (μg/mL)	Coll. I (μg/mL)	비	SRC (Coll. I)[a]	GPA (Coll. II)[a]
없음	만니톨	폴리소르베이트 20[c]	8.5	실리콘 처리	1.0	511	512	1.0	0.93	1.00
트레할로스	없음	폴리소르베이트 20[c]	8.5	실리콘 처리	1.0	524	521	1.0	0.96	0.99
트레할로스	없음	없음	8.5	실리콘 처리	1.0	491	513	1.0	0.98	1.00

[a] 참조와 비교하여
[b] 0.1%
[c] 0.02%
Coll. I = 콜라게나제 I; Coll. II = 콜라게나제 II

[0233]

[0234] 이들 데이터에 의해, 다양한 pH 수준에서 3개의 시험 부형제로 제형을 개질하는 것이 단백질 안정성/농도 및 효소적 활성에 유해하게 영향을 주지 않고, 이들 성분이 모두 동결건조된 제형의 추가 평가에서 적합하다는 것을 확인하였다. 시험된 범위에서 pH 값은 또한 생성물 품질에 유해한 영향을 나타내지 않았다.

[0235] **제형 강건성 연구 - 연구 4**

[0236] 다양한 제형을 또한 자가- 및 헤테로- 단백질 상호작용을 평가하기 위한 조성-구배 다중-각 광 산란 (Composition-Gradient Multi-Angle Light Scattering; CG-MALS) 및 단백질 언폴딩을 평가하기 위한 나노 시차 주사 열량분석 (DSC)으로 특성화하였다. CG-MALS 및 나노DSC를 상기와 같이 수행하였다.

[0237] 연구를 또한 산화제로서 과산화수소가 탁도 값에 기초하여 연구되는 제형에 영향을 주는지를 결정하기 위해 수행하였다 (사전-동결건조 용액).

[0238] 결과

[0239] CG-MALS - 결과를 표 15에 제시한다.

표 15

CG-MALS 에 의한 단백질 상호작용에 미치는 조성 및 pH 의 영향

변수 파라미터					CG-MALS		
					A2 [10^{-4} mol*mL/g^2]		
pH	염화나트륨 (mM)	트레할로스 (mM)	만니톨 (mM)	수크로스 (mM)	Coll. I (자가)	Coll. II (자가)	Coll. I ↔ Coll. II (헤테로)
7.5	없음	60	0	0	0.25	0.45	0.43
8.0	없음	60	0	0	1.01	0.93	0.94
8.5	**없음**	**60**	**0**	**0**	**2.16**	**1.97**	**1.83**
7.5	100	60	0	0	0.31	0.42	0.44
8.5	100	60	0	0	0.85	0.54	0.60
7.5	없음	120	0	0	0.30	0.43	0.40
8.5	**없음**	**120**	**0**	**0**	**2.24**	**1.90**	**1.85**
8.5	50	120	0	0	0.47	0.28	0.35
7.5	100	120	0	0	0.26	0.17	0.20
8.5	100	120	0	0	0.56	0.27	0.34
8.5	**없음**	**60**	**225**	**0**	**2.15**	**1.77**	**1.79**
8.5	**없음**	**0**	**225**	**60**	**2.00**	**1.77**	**1.84**

Coll. I = 콜라게나제 I; Coll. II = 콜라게나제 II

[0240]

[0241] 제공된 제형 조성에 대해서, 최고 반발 상호작용을 트레할로스 함유 제형에 대해 도 1에 도시된 바와 같이 단백질 (콜라게나제 I & 콜라게나제 II) 내에서 및 이에 걸쳐서 pH 8.5에서 관찰하였다.

[0242] 트레할로스, 수크로스, 및 만니톨은 반발력에 악영향을 끼지치 않고, 이에 따라, 제형의 적합한 잠재적 성분이었다.

[0243] 나노-DSC - 단백질 언폴딩을 평가하기 위해 나노-DSC를 사용하여 연구되는 변수 (부형제의 pH, 타입 및 농도)를 표 16에 제시한다.

표 16

단백질 언폴딩을 위한 개시 온도 (T_{onset}) 및 단백질 언폴딩 온도 (T_m) 에 미치는 조성 및 pH 의 영향

변수 파라미터					나노 DSC			
					T_{onset} [°C]		T_m [°C]	
pH	염화나트륨 (mM)	트레할로스 (mM)	만니톨 (mM)	수크로스 (mM)	Coll. I	Coll. II	Coll. I	Coll. II
7.5	없음	60	없음	없음	46.8	52.7	52.8	55.5
8.0	없음	60	없음	없음	46.3	52.0	52.1	55.3
8.5	없음	60	없음	없음	45.9	51.2	51.8	55.1
7.5	100	60	없음	없음	48.8	51.0	53.3	53.8
8.5	100	60	없음	없음	49.0	50.3	52.3	53.0
7.5	없음	120	없음	없음	48.0	52.2	52.6	55.7
8.5	없음	120	없음	없음	45.9	51.5	52.0	55.3
8.5	50	120	없음	없음	48.5	49.1	52.6	53.8
7.5	100	120	없음	없음	48.7	50.4	53.8	54.1
8.5	100	120	없음	없음	48.4	48.9	52.9	53.3
8.5	없음	60	225	없음	46.4	51.8	52.3	55.8
8.5	없음	없음	225	60	45.3	51.4	52.5	55.9

Coll. I = 콜라게나제 I; Coll. II = 콜라게나제 II

[0244]

[0245] 결과는, 연구된 다양한 제형 성분이 단백질 언폴딩을 위한 개시 온도 (T_{onset}) 및 단백질 용융 온도 (T_m)에 영향을 주지 않음을 입증하였다. 추가로, T_{onset} 데이터는 40℃의 온도가 단백질 안정성에 영향을 미치지 않고 동결건조 프로세스의 이차 건조 단계 동안 성공적으로 사용할 수 있음을 나타내었다.

[0246] 과산화수소 검사 - 과산화수소를 단기 연구에서 제형을 검사하기 위해 사용하였다 (도 2a 및 도 2b). 트레할로스-함유 제형 (만니톨의 존재 또는 부재하에) 및 수크로스-함유 제형 (만니톨의 존재 또는 부재하에)은, 과산화수소에 노출 후 pH 8.0 및 pH 7.5에서 동일한 제형과 비교하여, pH 8.5에서 유의하게 더 낮은 탁도를 나타내었다. 더 낮은 탁도 값은 낮은 단백질 응집을 갖는 안정한 제형을 가리킨다. 이들 결과는 pH 8.5에서 제형을 사용하여 나타난 높은 A_2 값 (높은 반발 상호작용)과 일치하고, 이는 개선된 안정성의 가능성을 나타낸다. 결과는 또한, 과산화수소에 노출시, 폴리소르베이트 (pH 8.0 또는 8.5) 존재 또는 부재하에 트레할로스 및 만니톨-함유 제형이, pH 8.0에서 만니톨이 없는 수크로스-함유 제형과 비교하여, 유의하게 더 낮은 탁도 값을 나타낸다는 것을 나타내었다. 계면활성제의 존재는 탁도에 긍정적인 또는 부정적인 영향을 주지 않았다.

[0247] 결론

[0248] 최적 정성적 및 정량적 부형제 조성을 확인한, 제형 최적화 작동의 결과를 기초로 하여, 하기 제형 (사전-동결건조)을 동결건조 순환의 평가를 위해 수행하였다:

[0249] • pH 8.5에서 폴리소르베이트 20의 존재 또는 부재하에 만니톨 함유 CCH 및 수크로스

[0250] • pH 8.5에서 폴리소르베이트 20의 존재 또는 부재하에 만니톨 함유 CCH 및 트레할로스

[0251] 더 높은 농도가 이득을 제공하지 않기 때문에, 연구된 최저 농도의 폴리소르베이트 20 (0.02%)을 향후 분석을 위해 사용하였음을 주의한다.

[0252] 둘 다의 제형 변형물에 대한 동결건조 순환 개발을 5 mL 바이알에서 수행하였다. 표 17은 평가된 제형에 대한 세부사항을 제공한다.

표 17

동결건조 시도 제형 샘플

실험 제형	기술 (용액, 사전-동결건조)				
	CCH[a]	안정화제	벌크제	계면활성제	완충제
1[b]	0.9 mg/mL	60 mM 수크로스	없음	없음	10 mM 트리스/HCl pH 8.0
2		60 mM 수크로스	225 mM 만니톨	없음	10 mM 트리스/HCl pH 8.5
3		60 mM 수크로스	225 mM 만니톨	0.02% 폴리소르베이트 20	10 mM 트리스/HCl pH 8.5
4		60 mM 트레할로스	225 mM 만니톨	없음	10 mM 트리스/HCl pH 8.5
5		60 mM 트레할로스	225 mM 만니톨	0.02% 폴리소르베이트 20	10 mM 트리스/HCl pH 8.5

[a] 콜라게나제 클로스트리듐 히스톨리티쿰
[b] 대조군 (승인된 XIAFLEX® 제형)

[0253]

[0254] **동결건조 순환 최적화 - 연구 1 다양한 만니톨 농도**

[0255] 이러한 작업의 목적은 동결건조 프로세스 및 순환 시간에 미치는, 계면활성제의 부재하에 고정된 농도의 수크로스를 사용하면서 다양한 비의 만니톨의 영향을 연구하는 것이었다. 하기 실험 변형물을 위약 리오(Lyo) 샘플에 따라 제조하였다:

표 18

제형의 조성

변형물 #	패키징 시스템	제형	충전 용적
Va	5 ml 유리 바이알	0.93 mg/ml CCH; 60 mM 수크로스; 112.5 mM 만니톨; 10 mM 트리스/HCl 완충제 pH 8.5	1 ml
Vb	5 ml 유리 바이알	0.93 mg/ml CCH; 60 mM 수크로스; 225 mM 만니톨; 10 mM 트리스/HCl 완충제 pH 8.5	1 ml
Vc	5 ml 유리 바이알	0.93 mg/ml CCH; 60 mM 수크로스; 337.5 mM 만니톨; 10 mM 트리스/HCl 완충제 pH 8.5	1 ml
위약	5 ml 유리 바이알	60 mM 수크로스; 337.5 mM 만니톨; 10 mM 트리스/HCl 완충제 pH 8.5	1 ml

[0256]

[0257] 중간체 동결건조 순환 ("리오 사이클(lyo cycle)")을 사용하여 생성물을 동결건조하였다 (약 36 시간 총 순환 시간을 목표로 함). 이들 실험에서 사용된 파일럿 동결건조기에 대한 정보를 하기에 제공한다:

[0258] • 제조원: Hof Sonderanlagenbau (Lohra, Germany)

[0259] • 저장 면적: 0.5 m^2

[0260] · 냉응축기 용량: 10 kg

[0261] · 조절가능한 냉응축기 온도

[0262] · 바이알-내 온도 기록

[0263] · 차등 압력 측정

[0264] · 연결가능한 방사선 케이지

[0265] 패키징 물질의 제조

[0266] 동결건조 스토퍼를 121℃에서 15 min 동안 오토클레이브 처리하고, 8 시간 동안 105℃에서 건조시켰다. 바이알을 정제수로 세정하고, 300℃에서 2 시간 동안 발열 제거하였다(depyrogenized).

[0267] 제형 변형물을 투석에 의해 제조하였다. XIAFLEX® 약물 물질의 투석을 정량적 완충제 교환을 달성하는 3개 독립적 투석 단계로 수행하였다. 125 ml의 XIAFLEX® 약물 물질을 변형물 a, b 및 c에 대해 투석하였다. XIAFLEX® 약물 물질을 2개의 사전-컨디셔닝된 (투석 완충제 중) 투석 튜브로 옮겼다. 충전된 투석 튜브를, 첫번째 완충제 교환 (1 L)을 수행하기 전에, 1 L의 표적 완충제 내에서 2 시간 동안 인큐베이팅하였다. 추가 2 시간 동안 투석 후 완충제를 다시 한번 (2 L) 교환시켜 투석을 밤새 마무리하였다. 단백질 샘플을 투석 튜브로부터 제거하고, 농도를 0.93 mg/ml (± 10%)로 희석에 의해 조정하였다 (농도를 UV 280 nm로 점검하였다). 대조군으로서, XIAFLEX® 약물 물질을 투석 없이 사용하였다.

[0268] 여과 및 충전

[0269] 동결건조 용액을 충전 전에 0.22 μm 필터를 통해 통과시켰다. 1 ml의 상응하는 동결건조 용액을 바이알 내로 채웠다.

[0270] 동결건조

[0271] "리오-위치"로 바이알에 부착된 동결건조-스토퍼를 갖는 충전된 바이알을 파일럿 동결건조기 내로 로딩하였다. 제형당 약 125개의 바이알 및 100개의 Vb의 위약 바이알을 로딩하였다. 동결건조 순환을 하기 파라미터를 사용하여 작동하였다:

[0272] · 냉동 온도 (저장): -50℃

[0273] · 일차 건조 온도 (저장): -10℃

[0274] · 이차 건조 온도 (저장): 40℃

[0275] · 압력: 0.25 mbar

[0276] · 누적 시간: 대략 41 시간

[0277] 동결 건조 동안 생성물 온도를 제어하기 위해, 열전대를 생성물 바이알 내로 삽입하였다. 압력을 동결건조 동안 피라니-압력 센서를 사용하여 제어하였다. 압력 조절을 진공 및 계량(dosing) 밸브 (질소 주입)를 통해 유지관리하였다. 바이알을 750 mbar의 압력에서 질소 분위기하에 폐쇄하였다.

[0278] 칼-피셔(Karl-Fischer) 적정

[0279] 상응하는 동결건조물의 하나의 바이알의 함량을 유리 바이알 내로 칭량하고, 이를 크림프 마개(crimp cap)로 밀봉하였다. 샘플을 100℃로 가열된 칼-피셔 전량계의 오븐(756/774; Metrohm)으로 옮겼다. 마개의 격막을 주입 니들로 뚫고, 생성된 수증기를 건조 질소를 통해 칼-피셔 전량계의 적정 챔버 내로 직접적으로 이동시켰다. 1 시간 반복하여 측정하였다. 빈 유리 바이알을 블랭크 수정(blank correction)을 위해 사용하였다.

[0280] 결정수 분석

[0281] 오븐 샘플 프로세서 (774)는 칼 피셔 적정으로 고유한 온도 램프 방법을 가능하게 하였다. 샘플을 한정된 가열 속도로 가열시키고, 방출된 물을 칼-피셔 전량계의 적정 챔버로 직접적으로 이동시켰다. 오븐 온도에 따른 생성된 물 및 물 부유(water drift) (μg 물 /min)을 기록하여, 물이 방출되는 지정된 사건 (예를 들면, 수화수의 방출)을 검출할 수 있다. 동결건조물 50 내지 100 mg을 빈 6R 1형 유리 바이알 내로 칭량하고, 알루-크림프-캡(alu-crimp-cab)으로 폐쇄하였다. 샘플을 샘플 프로세서의 오븐으로 옮겼다. 샘플을 45 min 내에 50℃에서 140℃까지 한정된 온도 램프 (2℃/min)에 의해 가열한다. 램프를 목적하지 않는 마이야르(Maillard)-반응을 배제하

기 위해 140℃에서 마쳤다.

[0282] 가시적 외관

[0283] 유리 바이알을 조심스럽게 깨뜨려서 동결건조물을 바이알로부터 제거하고, 동결건조 케이크를 수직으로 절단하여 붕괴 영역에 대해 이의 내부 층을 스크리닝하였다.

[0284] 주사 전자 현미경

[0285] 동결건조물을 SEM로 분석하여 이들의 미세구조를 평가하였다. 동결건조물을 절단하고, 수직단면 및 상부/하부 표면을 SEM를 통해 50x 및 150x 배율에서 분석하였다.

[0286] 재구성

[0287] 바이알을 0.03% 염화칼슘 및 0.66% 염화나트륨을 포함하는 용액 4 ml로 재구성하였다. 동결건조물의 용해를 완료하기 위한 시간을 기록하였다.

[0288] 나노 시차 주사 열량분석

[0289] 나노 DSC를 상기한 바와 같이 수행하였다.

[0290] 샘플 제조

[0291] 동결건조 용액 및 재구성된 동결건조물을 0.93 mg CCH/ml의 농도에서 분석하였다. 상응하는 완충제를 완충제 스캔 및 완충제 참조로서 사용하였다.

[0292] 결과

[0293] 디지털 데이터 획득은 동결 건조 프로세스가 의도된 바와 같이 수행되었음을 증명하였다. 전도도 압력 센서 차이에 대해 피라니에 의해 지시된 바와 같이, 배치의 승화를 총 동결건조 시간 약 15 시간 후 종료하였다. 각 상이한 하위-로트의 승화 말기는 일차 건조 동안 생성물 온도의 급격한 증가에 의해 나타났다.

[0294] 일차 건조 단계를 총 동결건조 시간 약 17 시간 후 종결하였다. 이차 건조 18 시간 후 각 변형물의 하나의 바이알을 동결건조기에서 제거하고, 잔류 수분 수준을 칼-피셔 적정으로 측정한 반면, 이차 건조 단계를 배치의 나머지에 대해 연장하였다. 칼-피셔 분석은 잔류 수분 수준이 이미 목적하는 값 아래인 것을 나타내었다. 따라서, 배치의 나머지를 이들 결과를 받은 직후에 언로딩하였다. 이차 건조 총 기간은 19 시간이었다.

[0295] 가시적 외관 - 모든 샘플은 어떠한 케이크 결함 징후 없이 탁월한 거시적 외관을 나타내었다 (데이터는 나타내지 않음).

[0296] 재구성 거동 - 모든 하위-로트의 동결건조물은 수초내에 (< 30 sec.) 신속하고 자발적 용해를 나타내었다.

[0297] 잔류 수분 - 표 19는 칼-피셔 적정에 의해 측정된 샘플의 잔류 수분 수준을 나타낸다.

표 19

잔류 수분 (n = 3)

[0298]

샘플	잔류 수분 [%]		
Va	0.16	0.16	0.17
Vb	0.24	0.22	0.27
Vc	0.16	0.13	0.16

[0299] 주사 전자 현미경 (SEM) - 리오 케이크(lyo cakes)의 SEM 분석은 어떠한 붕괴 징후도 다른 케이크 결함도 나타내지 않았다 (도 3a 내지 도 3r 참조). 모든 제형 변형물의 내부 구조는 비슷하였다. 변형물 Va (최저 양의 수크로스)의 상부 표면은 더 큰 개방-다공성(open-porous) 구조를 가졌고, 변형물 Vb 및 Vc보다 더 적은 스킨 형성을 나타내었다. 변형물 Vc의 하부 표면은 다른 제형의 하부 표면보다 더 밀도가 높은 것으로 보였다.

[0300] 나노 DSC - 표 20은 수득된 결과를 요약한다.

표 20

동결건조 전 및 후 나노 DSC 분석 결과

변형물	동결건조 전			동결건조 후		
	Tm [°C]	Tonset [°C]	ΔH [kJ/mol]	Tm [°C]	Tonset [°C]	ΔH [kJ/mol]
Va	54.9	47.9	1116	55.4	48.3	1140
Vb	55.4	48.2	1165	55.7	48.6	1183
Vc	56.1	49.2	1207	56.2	49.2	1124

[0301]

[0302] 언폴딩 온도 및 변성 엔탈피의 정확성을 입증하기 위해, 변형물 Vc (동결건조 전)를 6 회 분석하였다. 샘플은 임의의 농도 불확실성을 제거한 하나의 샘플 제조로부터 유도되었다. T_{onset} 및 T_m에 대한 결과간의 차이는 1% 아래인 반면, 엔탈피의 변화는 7%보다 크고, 이는 장치의 상세항목과 잘 일치한다 (TA 장치는 리소자임을 위한 언폴딩의 엔탈피의 경우 5% 불확실성을 명시한다) (데이터는 나타내지 않음). 모든 제형이 언폴딩 온도 및 전이 엔탈피에 대해 상기 방법의 허용 오차 내에 동결건조 전 및 후에 동일하다는 것을 결론내릴 수 있고, 이는 사용되는 동결건조 프로세스 조건이 CCH에 부정적인 영향을 주지 않음을 나타낸다. 증가되는 양의 만니톨은 약간 더 높은 값의 T_m 및 T_{onset}로 표현된 증가된 열역학적 안정성을 야기하는 것 같다.

[0303] 결론

[0304] 관찰 및 모든 상기 수집된 데이터는 CCH의 동결건조된 제형을 Tris 완충제 중 수크로스의 존재하에 만니톨 농도 범위를 사용하여 제조할 수 있음을 나타낸다. 이러한 작업은 또한 약 40 시간의 순환 시간을 야기하는 보다 더 적당한 동결건조 조건을 확인하였다.

[0305] **동결건조 순환 최적화 - 연구 2 고정된 만니톨 농도**

[0306] 이러한 작업의 목적은 더 짧은 프로세스 시간 및 보다 더 효율적이고 강건한 프로세스를 야기하도록 동결건조 순환을 갱신하는 것이었다.

[0307] 실험 설계

[0308] 대조군으로서 XIAFLEX® 제형과 함께 4개의 실험적 제형 변형물을 사용한 실험실 규모 동결건조 시도는 5 cc 바이알을 사용하여 완료하였다. 이들 변형물은 하기 표 21에 열거된다.

표 21

동결건조 시도 제형 샘플

실험 제형	기술 (용액, 사전-동결건조)				
	CCH[a]	안정화제	벌크제	계면활성제	완충제
1[b]	0.9 mg/mL	60 mM 수크로스	없음	없음	10 mM 트리스/HCl pH 8.0
2		60 mM 수크로스	225 mM 만니톨	없음	10 mM 트리스/HCl pH 8.5
3		60 mM 수크로스	225 mM 만니톨	0.02% 폴리소르베이트 20	10 mM 트리스/HCl pH 8.5
4		60 mM 트레할로스	225 mM 만니톨	없음	10 mM 트리스/HCl pH 8.5
5		60 mM 트레할로스	225 mM 만니톨	0.02% 폴리소르베이트 20	10 mM 트리스/HCl pH 8.5

[a] 콜라게나제 클로스트리듐 히스톨리티쿰
[b] 대조군 (승인된 XIAFLEX® 제형)

[0309]

[0310] 실험적 제형 #2 내지 #5를 제조하기 위해, 제형 #1을 투석을 사용하여 완충제 교환하여 신규 부형제 (트레할로스, 만니톨, 및 폴리소르베이트 20)를 Tris 완충제, pH 8.5 중 제형 내로 도입하였다.

[0311] 초기 동결건조 순환 개발 작업을 건조 온도, 압력, 및 시간의 면에서 XIAFLEX® 제형을 위해 사용된 조건보다 약간 더 공격적인 리오사이클 조건을 사용하여 수행하였다. 이차 건조를 생성물의 효율적인 건조를 용이하게 하기 위해 및 0.5% 미만의 표적 수분을 달성하기 위해 40℃에서 수행할 수 있다. XIAFLEX® 프로세스 및 실험 동결건조 프로세스의 비교를 통한 세부사항을 하기 표 22에 요약한다.

표 22

XIAFLEX® (0.9 mg CCH/바이알) 및 실험 리오사이클 프로세스 (0.92 mg CCH/바이알) 의 비교

	XIAFLEX® 프로세스	실험 동결건조 프로세스
냉동 온도	-50 °C	-50 °C
일차 건조 온도	-37 °C	-10 °C
이차 건조 온도	30 °C	40 °C
압력	40 마이크론	188 밀리토르
누적 시간 (대략)	70.5 시간	57.5 시간

[0312]

[0313] 결과 및 결론

[0314] 모든 제형에 대해 동결건조된 케이크는 10 초 미만의 재구성 시간을 사용하여 희석제 중 신속하게 용해되고, 0.4% 미만의 수분 함량 (KF)을 가졌다.

[0315] 단축된 실험 순환 시간에서, XIAFLEX® 케이크는 실험적 제형 변형물과 비교하여 수축되었음을 나타내고, 이들 모두는 적격이고(well formed) 강건한 케이크를 나타내었다. 모든 실험적 제형을 단백질 농도, 콜라게나제 I 및 콜라게나제 II 질량 조성, 및 생물학적 활성을 포함하는 다양한 특성에 대해 시험하였다. 모든 제형에 대한 시

험 결과를 XIAFLEX® 제형과 함께 정렬되었다.

[0316] 실험적 제형 #3 및 #5는 추가 시험을 위해 선택되었다. 이들 제형을 5℃에서 및 25℃/60% RH의 가속화된 저장 조건에서 일상적인 단기 안정성 연구를 수행하기 위해 사용하였다. 샘플을 승인된 시험 방법에 대하여 분석하였다. 둘 다의 제형에 대해 생성된 모든 결과는 XIAFLEX® 제형에 대한 역사적 데이터와 일치하고, 연구된 제형 변화가 생성물 품질에 악영향을 끼치지 않음(데이터는 나타내지 않음)을 지시한다. 상기 언급한 바와 같이, 현재 승인된 한계는 실험적 제형에 대해 생성된 데이터의 통계학적 분석에 기초하여 변경될 수 있다.

[0317] 요약하면, 제형 최적화 개발 업무 및 지금까지 생성된 데이터는, 2개의 연구되는 단백질 안정화제 (수크로스, 트레할로스), 벌크제 (만니톨)의 첨가, 및 계면활성제 (폴리소르베이트 20)의 첨가가, 생성물 품질에 악영향을 끼치지 않고, 이들 제형이 추가로 계속하기에 적합할 것임을 지시하였다.

[0318] **동결건조 순환 최적화 - 연구 3 압력 분석**

[0319] 연구 목적

[0320] 압력 시험을 최적 동결건조 프로세스 조건의 확인을 용이하게 하기 위해 수행하였다. 이러한 시험을 신속하고 강건한 동결건조 순환을 실현하기 위한 프로세스 관련 조건하에 동결건조 동안 최대 허용가능한 압력 및 냉동, 일차 건조, 및 이차 건조를 위한 다른 신뢰할 만한 프로세스 파라미터를 확인하기 위해 착수하였다.

[0321] 실험 설계

[0322] 5 cc 바이알 중 3개의 제형 변형물을 표 23에 사용하였다.

표 23

동결건조 시도 제형 샘플

실험 제형	기술 (용액, 사전-동결건조)				
	CCH[a]	안정화제	벌크제	계면활성제	완충제
1[b]	0.9 mg/mL	60 mM 수크로스	없음	없음	10 mM 트리스/HCl pH 8.0
3		60 mM 수크로스	225 mM 만니톨	0.02% 폴리소르베이트 20	10 mM 트리스/HCl pH 8.5
5		60 mM 트레할로스	225 mM 만니톨	0.02% 폴리소르베이트 20	10 mM 트리스/HCl pH 8.5

[a] 콜라게나제 클로스트리듐 히스톨리티쿰
[b] 대조군 (승인된 XIAFLEX® 제형)

[0323]

[0324] 승화 단계를 위한 압력을 확인하기 위해, 2개의 압력 시험을 상이한 저장 온도 및 상이한 압력 단계에서 수행하였다. 실험적 제형으로 채운 샘플 바이알을 하나의 동결건조기 저장소 (중간 위치) 상으로 로딩하였다. 냉동 후, 챔버 압력을 128 μbar의 초기 값으로 설정하고, 저장 온도를 초기 값까지 증가시켰다 (시험 1에서 -10℃/시험 2에서 +10℃). 소정 시간 동안 동결건조를 수행하여 소 용적의 동결건조물을 얼음 계면 위에서 생성하였다. 이어서, 챔버 압력을 단계적으로 증가시키고 (예를 들면, 380 μbar, 1030 μbar 등), 샘플 바이알을 케이크 붕괴 또는 다른 가시적 유해한 효과에 대해 비디오 모니터링하였다. 저장 온도를 -10℃로 설정하여 적당한(moderate) 에너지 투입을 달성하였다.

[0325] 각 압력 단계의 말기에 바이알의 사진을 도 4A 내지 도 4C에 제시한다. 이들 도면에서 나타낸 바와 같이, 대조군 (#1, XIAFLEX® 가장 오른쪽 바이알) 케이크는 압력이 증가함에 따라 붕괴되었다. 따라서, XIAFLEX® 제형을 위한 최대 허용가능한 압력은 128 μbar 내지 380 μbar이고, 얼음 계면 온도는 -40℃ 내지 -30℃와 등가이다. 실험적 제형 #3 및 #5는 조사된 전체 압력 범위에 걸쳐서 손상되지 않고 잔존하였다

[0326] 두번째 압력 시험을 수행하고, 여기서, 실험적 제형 #3 및 #5를 추가로 조사하였다. 압력 범위를 4 mbar로 확장

하였다. 이러한 압력 범위에서 효율적인 승화가 가능할 수 있도록 충분한 에너지 투입을 제공하기 위해 시험 동안 저장 온도를 +10℃로 설정하였다.

[0327] 결과를 도 5A 및 도 5B에 제공한다. 어떠한 붕괴된 케이크 또는 임의의 다른 결함도 조사된 전체 압력 범위에 걸쳐서 관찰되지 않았다. 이러한 발견을 기초로 하여, 만니톨을 포함하는 제형이 훨씬 더 높은 챔버 압력에서 동결 건조될 수 있고, 이로서 보다 짧은 동결건조 순환 시간을 사용하여 보다 효율적이고 강건한 동결건조 프로세스를 야기할 것이라는 결론지었다.

[0328] 이러한 초기 동결건조 순환 개발 작업은 보다 효율적이고 강건한 동결건조 순환을 계속하기 위한 만니톨의 사용을 뒷받침하였다.

[0329] **동결건조 순환 최적화 - 연구 4 추가 최적화**

[0330] 상기 압력 시험의 결과를 기초로 하여, 동결건조 파라미터의 최적화를 실험적 제형 #3 및 #5 (데이터는 나타내지 않음)에 대해 수행하였다.

[0331] 만니톨-함유 제형을 승화 동안 구조 붕괴의 위험 없이 4 mbar 이하의 챔버 압력에서 동결건조할 수 있다고 압력 시험에서 입증되었기 때문에, 최적화 시도를 위한 리오사이클은 높은 승화 속도를 이용하기 위해 1 mbar의 챔버 압력를 사용하여 작동하였다.

[0332] 2개의 실험 리오사이클 작동을 수행하여 강건하고 효율적인 동결 건조 순환을 위해 기본 파라미터를 확인하였다. 샘플을 동결건조-후 가시적 외관, 잔류 수분, 물리적 안정성에 대해, 주사 전자 현미경 (SEM)에 의해 분석하였다.

[0333] 작동 #1: 실험적 제형 #3 단독을 이용함. 이러한 작동으로부터의 결과는 이차 건조 동안 잔류 수분 수준이 0.5 % 아래로 도달하기 위해 더 높은 온도가 필요로 함을 나타낸다. 다른 물리적 속성 시험의 결과는 허용되었다 (데이터는 나타내지 않음). 사용되는 동결건조 파라미터의 요지는 하기에 제시한다:

[0334] · 냉동 온도 (저장): -50℃

[0335] · 건조 온도 (승화 및 이차 건조) (저장): 35℃

[0336] · 압력: 1 mbar

[0337] · 누적 시간: 대략 21.5 시간

[0338] 작동 #2: 실험적 제형 #3 단독을 이용함. 이러한 작동은 40℃를 사용하는 건조를 위한 적절한 조건을 확인하였다. 모든 결과는 허용되었다 (데이터는 나타내지 않음). 사용되는 동결건조 파라미터의 요지를 하기에 나타낸다:

[0339] · 냉동 온도 (저장): -50℃

[0340] · 건조 온도 (승화 및 이차 건조) (저장): 40℃

[0341] · 압력: 1 mbar

[0342] · 누적 시간: 대략 21.5 시간

[0343] 결론

[0344] 리오사이클 최적화 연구는 효율적인 동결 건조 순환을 위한 기본적인 파라미터를 확인하였다. 동결건조된 케이크의 물리적 속성에 대한 모든 시험은 허용되었다.

[0345] **안정성 연구 - 장기간 안정성 연구**

[0346] CCH 제형의 6개의 프로세스 검증 로트 (10 mM Tris, 60 mM 수크로스, 225 mM 만니톨, pH 8.5 중 1 mg/mL의 농도에서 콜라게나제 I 및 콜라게나제 II의 1:1 혼합물)를 제조하고, 안정성에 대해 평가하였다. 동일한 제형을 사용하지만 비슷한 컨테이너 폐쇄 시스템에서 더 낮은 충전 수량을 갖는, 하나의 조기 제형 개발 로트를, 제조하고, 안정성에 대해 평가하였다.

[0347] 6개의 프로세스 검증 로트를 장기간 안정성에 대해 모니터링하였다. 저장 조건은 생성물 저장 수명을 뒷받침하는 다양한 저장 조건 (2 내지 8℃; 25℃/60% 상대 습도 (RH); 및 40℃/75% RH)에서 장기간 안정성, 뿐만 아니라 선적 또는 저장 동안 잠재적 온도 편차(excursions) 평가를 뒷받침하는 다양한 저장 조건에서 단기간 안정성 연

구를 포함하였다. 동일한 제형을 이용하지만 비슷한 컨테이너 폐쇄 시스템에서 더 낮은 충전 수량 (0.46 mg)을 갖는, 조기 제형 개발 로트를 위한 데이터를, 또한 포함하였다.

[0348] 이용가능한 안정성 데이터와 함께 연구의 요지를 표 24에 제공한다.

표 24

CCH 제형 안정성 연구 요지

[0349]

충전 수량 (mg CCH/ 바이알)	로트 번호	저장 조건	연구 기간 (개월)	이용가능한 데이터 (개월)
0.46	003H16	5°C ± 3°C	36	36
		25°C ± 2°C / 60% ± 5% RH	36	36
		40°C ± 2°C / 75% ± 5% RH	6	6
0.92	307984	5°C ± 3°C	36	24
		25°C ± 2°C / 60% ± 5% RH	36	24
		40°C ± 2°C / 75% ± 5% RH	6	6
	307985	5°C ± 3°C	36	24
		25°C ± 2°C / 60% ± 5% RH	36	24
		40°C ± 2°C / 75% ± 5% RH	6	6
	313877	5°C ± 3°C	36	18
		25°C ± 2°C / 60% ± 5% RH	36	18
		40°C ± 2°C / 75% ± 5% RH	6	6
1.84	320971	5°C ± 3°C	36	12
		25°C ± 2°C / 60% ± 5% RH	36	12
		40°C ± 2°C / 75% ± 5% RH	6	6
	320972	5°C ± 3°C	36	12
		25°C ± 2°C / 60% ± 5% RH	36	12
		40°C ± 2°C / 75% ± 5% RH	6	6
	320973	5°C ± 3°C	36	12
		25°C ± 2°C / 60% ± 5% RH	36	12
		40°C ± 2°C / 75% ± 5% RH	6	6

[0350] 안정성 배치를 외관 (재구성-전 및 재구성-후), 재구성 시간, 오스몰농도(osmolality), pH, 농도에 대해 UV_{A280}로 시험하고, 정량적 나트륨 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-PAGE), 역-상 고성능 액체 크로마토그래피 (RP-HPLC) [순도], RP-HPLC에 의한 질량 및 조성 비, 크기-배제 고-성능 액체 크로마토그래피 (SEC-HPLC), 콜라게나제 I 효능에 대한 가용성 래트 꼬리 콜라겐 (SRC) 검정, 콜라게나제 II 효능에 대한 글리실-L-프롤릴-L-알라닌 (GPA) 검정, 수분, 미립자, 내독소, 및 컨테이너 폐쇄 무결성(integrity) 헬륨 누출을 실험하였다.

[0351] 결과 및 분석

[0352] 다양한 저장 조건 (2 내지 8℃; 25℃/60% 상대 습도 (RH); 및 40℃/75% RH)에서 각 시험에 대한 경향 분석과 함께 안정성 결과의 평가를, 적용가능한 경우, 하기에 요약한다:

[0353] 외관 (재구성-전 및 재구성-후) - 시험된 저장 조건에서 외관 (재구성-전 및 재구성-후)에 대한 결과는 어떠한 상당한 변화도 예상치 못한 경향 (데이터는 나타내지 않음)도 나타내지 않았다.

[0354] 재구성 시간 - 시험된 저장 조건에서 재구성 시간에 대한 결과는 어떠한 상당한 변화도 예상치 못한 경향 (데이터는 나타내지 않음)도 나타내지 않았다.

[0355] 오스몰농도 - 시험된 저장 조건에서 오스몰농도에 대한 결과는 어떠한 상당한 변화도 예상치 못한 경향 (데이터는 나타내지 않음)도 나타내지 않았다.

[0356] pH - 시험된 저장 조건에서 pH에 대한 결과는 어떠한 상당한 변화도 예상치 못한 경향 (데이터는 나타내지 않음)도 나타내지 않았다.

[0357] UV_{A280}에 의한 농도 - 시험된 저장 조건에서 UV_{A280}에 의한 농도에 대한 결과는 어떠한 상당한 변화도 예상치 못한 경향 (데이터는 나타내지 않음)도 나타내지 않았다.

[0358] 정량적 SDS-PAGE - 시험된 저장 조건에서 정량적 SDS-PAGE에 대한 결과는 어떠한 상당한 변화도 예상치 못한 경향 (데이터는 나타내지 않음)도 나타내지 않았다.

[0359] RP-HPLC (순도) - 시험된 저장 조건에서 RP-HPLC (순도)에 대한 결과는 어떠한 상당한 변화도 예상치 못한 경향 (데이터는 나타내지 않음)도 나타내지 않았다.

[0360] RP-HPLC에 의한 질량 및 비 조성 - 시험된 저장 조건에서 조성 RP-HPLC에 의한 질량 및 비에 대한 결과는 어떠한 상당한 변화도 예상치 못한 경향 (데이터는 나타내지 않음)도 나타내지 않았다.

[0361] SEC-HPLC - 시험된 저장 조건에서 SEC-HPLC에 대한 결과는 어떠한 상당한 변화도 예상치 못한 경향 (데이터는 나타내지 않음)도 나타내지 않았다.

[0362] 콜라게나제 I 효능에 대한 SRC 검정 - 시험된 저장 조건에서 콜라게나제 I 효능에 대한 SRC 검정의 결과는 어떠한 상당한 변화도 예상치 못한 경향 (데이터는 나타내지 않음)도 나타내지 않았다.

[0363] 콜라게나제 II 효능에 대한 GPA 검정 - 시험된 저장 조건에서 콜라게나제 II 효능에 대한 GPA 검정의 결과는 어떠한 상당한 변화도 예상치 못한 경향 (데이터는 나타내지 않음)도 나타내지 않았다.

[0364] 수분 - 도 6에서 나타난 바와 같이, 25℃/60% 상대 습도에서, 만니톨-함유 제형은 XIAFLEX® 제형보다 더 낮은 수분을 나타내고, 이는 만니톨-함유 제형의 개선된 안정성을 지시한다.

[0365] 미립자 - 시험된 저장 조건에서 미립자에 대한 결과는 어떠한 상당한 변화도 예상치 못한 경향 (데이터는 나타내지 않음)도 나타내지 않았다.

[0366] 컨테이너 폐쇄 무결성/헬륨 누출 - 컨테이너 폐쇄 무결성/헬륨 누출에 대한 결과는 어떠한 상당한 변화도 예상치 못한 경향 (데이터는 나타내지 않음)도 나타내지 않았다.

[0367] 광안정성 연구

[0368] 연구를 주광색 광(cool, white light)의 1.2 백만 럭스 시간에 노출시키고, 이어서, 200 와트 시간/제곱미터 (W/m^2)의 UV 에너지에 노출시킨 후, CCH 제형의 광안정성을 측정하기 위해 수행하였다. 샘플을 150 시간 동안 8.00 킬로럭스의 주광색 광에 노출시키고, 이어서, 10.00 W/m^2 UV 광에 20 시간 동안 노출시켰다. 이러한 노출 후 모든 결과는 노출되지 않은 대조군 (데이터는 나타내지 않음)과 비슷하였다.

[0369] 재구성 안정성 연구

[0370] 재구성을 위해 사용되는 멸균 희석제로 동결건조된 CCH 제형의 상용성(compatibility)을 입증하기 위해, 및 잠재적 사용 조건하에 재구성된 생성물에 대한 안정성 데이터를 생성하기 위해, 수개의 재구성 안정성 연구를 수행하였다. 동결건조된 CCH 제형을 멸균 희석제로 재구성하고, 지정된 온도에서 저장 후 지정된 시점에서 분석하였다. 표 25에 수행된 재구성 안정성 연구를 요약한다.

표 25

재구성 안정성 연구의 요지

충전 수량 (mg CCH/바이알)	연구의 기술
0.92	온도 순환: 희석제로 재구성하고, 25°C/60% RH 에서 24 시간 동안, 이어서 2°C-8°C 에서 96 시간 동안 및 이어서 25°C/60% RH 에서 추가 24 시간 동안 저장 후 (T0 및 연구 말기에 시험)
	25°C/60% RH 24 시간 동안: 희석제로 재구성하고, 25°C/60% RH 에서 24 시간 동안 저장 후 (T0 및 연구 말기에 시험)
	2°C-8°C 120 시간 동안: 희석제로 재구성하고, 2°C-8°C 에서 120 시간 동안 저장 후 (T0, 24 시간, 96 시간, 및 120 시간에 시험)
1.84	온도 순환: 희석제로 재구성하고, 25°C/60% RH 에서 24 시간 동안, 이어서 2°C-8°C 에서 96 시간 동안 및 이어서 25°C/60% RH 에서 추가 24 시간 동안 저장 후 (T0 및 연구 말기에 시험)
	25°C/60% RH 24 시간 동안: 희석제로 재구성하고, 25°C/60% RH 에서 24 시간 동안 저장 후 (T0 및 연구 말기에 시험)
	2°C-8°C 120 시간 동안: 희석제로 재구성하고, 2°C-8°C 에서 120 시간 동안 저장 후 (T0, 24 시간, 96 시간 및 120 시간에 시험)

[0371]

[0372] 시간 제로 및 후속적인 안정성 시점에서 모든 결과는 비슷하고, 데이터는 어떠한 경향도 나타내지 않았다 (데이터는 나타내지 않음). 이들 연구는, 큐벳-기반 시험 방법보다 더 높은 처리량 및 더 신속한 회전(turnaround)을 갖기 때문에 가능성 결정을 위해 마이크로플레이트 버젼의 SRC 및 GPA 시험 방법을 이용하였다; 각각에 대해, 마이크로플레이트 시험 방법의 전반적인 분석 접근법은 큐벳 시험 방법과 동일하다. 이들 결과는 동결건조된 CCH 제형 및 멸균 희석제의 상용성을 입증하였을 뿐만 아니라 잠재적 사용 조건하에 재구성된 CCH 제형의 안정성을 입증하였다.

[0373] 결론

[0374] CCH 제형의 6 프로세스 검증 로트에 대한 이용가능한 안정성 데이터는 5℃ 및 25℃/60% RH 저장 조건 둘 다에서 적어도 18-개월 풀 포인트(pull point) 동안, 뿐만 아니라 40℃/75% RH 저장 조건에서 6 개월 풀 포인트 동안 물질의 안정성을 입증하였다. 추가로, 더 작은 바이알 중 CCH 제형의 제형 개발 로트에 대한 이용가능한 데이터는 5℃ 및 25℃/60% RH 저장 조건 둘 다에서 24-개월 풀 포인트 동안 뿐만 아니라 40℃/75% RH 저장 조건에서 6-개월 풀 포인트 동안 안정성을 입증하였다.

[0375] CCH 제형은, 노출 후 생성되는 모든 결과가 대조군 (노출되지 않은) 샘플과 비슷하였기 때문에, 허용되는 광안정성을 입증하였다.

[0376] 멸균 희석제로 재구성 후, CCH 제형은 25℃/60% RH에서 24 시간 이하 동안 및 5℃에 저장하였을 때 120 시간 이하 동안 허용되는 안정성을 나타내었다. 재구성된 CCH 제형은 또한 25℃/60% RH에서 24 시간 동안, 이어서, 2℃ 내지 8℃에서 96 시간 동안, 및 이어서 25℃/60% RH에서 추가 24 시간 동안 저장하였을 때 허용되는 안정성을 입증하였다.

[0377] 향후 매년 안정성 연구는 수행될 것이고, 5℃ ± 3℃ 및 25℃ ± 2℃/60% ± 5% RH 조건에서 저장을 포함한다. 둘 다의 저장 조건에서 물질을 제안된 36-개월 저장 수명 동안 평가할 것이다.

[0378] 당해 기술분야의 숙련가는 다양한 변화 및 변형이 본 발명의 바람직 실시형태에서 수행될 수 있고, 이러한 변화 및 변형이 본 발명의 취지로부터 벗어나지 않고 수행될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 따라서, 첨부된 청구범위가 본 발명의 진정한 취지 및 범위내에 속하는 모든 이러한 등가물 변화를 포함하는 것을 의도한다.

[0379] 본 문서에 인용되거나 기술된 각각의 특허, 특허 출원, 및 공보의 개시내용은 이의 전문이 참조로서 본원에 포함된다.

[0380] 실시형태

[0381] 하기 열거된 실시형태는 이전 기술을 대체하거나 대신하기 보다는 보완하려는 의도한다.

[0382] 실시형태 1.

[0383] 콜라게나제;

[0384] 약 30 mM 내지 약 240 mM의 디삭카라이드;

[0385] 약 50 mM 내지 약 800 mM의 만니톨; 및

[0386] 약 6 mM 내지 약 10 mM의 Tris-HCl

[0387] 을 포함하는 제형.

[0388] 실시형태 2. 실시형태 1의 제형으로서, 상기 콜라게나제는 콜라게나제 I을 포함한다.

[0389] 실시형태 3. 실시형태 2의 제형으로서, 상기 콜라게나제 I는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함한다.

[0390] 실시형태 4. 실시형태 1의 제형으로서, 상기 콜라게나제는 콜라게나제 II를 포함한다.

[0391] 실시형태 5. 실시형태 4의 제형으로서, 상기 콜라게나제 II는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함한다.

[0392] 실시형태 6. 실시형태 1의 제형으로서, 상기 콜라게나제는 콜라게나제 I 및 콜라게나제 II의 혼합물을 포함한다.

[0393] 실시형태 7. 실시형태 6의 제형으로서, 상기 콜라게나제 I는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하고, 콜라게나제 II는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함한다.

[0394] 실시형태 8. 실시형태 6 또는 7의 제형으로서, 상기 콜라게나제는 콜라게나제 클로스트리듐 히스톨리티쿰 (CCH)이다.

[0395] 실시형태 9. 이전 실시형태 중 어느 하나의 제형으로서, 상기 디삭카라이드는 수크로스 또는 트레할로스를 포함한다.

[0396] 실시형태 10. 이전 실시형태 중 어느 하나의 제형으로서, 상기 제형의 pH는 약 7.8 내지 약 8.8이다.

[0397] 실시형태 11. 이전 실시형태 중 어느 하나의 제형으로서, 상기 제형은:

[0398] CCH;

[0399] 약 60 mM 수크로스;

[0400] 약 225 mM 만니톨; 및

[0401] 약 10 mM Tris-HCl을 포함하고,

[0402] 여기서, 상기 제형은 약 8.5의 pH를 갖는다.

[0403] 실시형태 12. 이전 실시형태 중 어느 하나의 제형으로서, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 80, 또는 폴록사머 188를 포함하는 계면활성제를 추가로 포함한다.

[0404] 실시형태 13. 실시형태 12의 제형으로서, 약 0.01% 내지 약 2%의 계면활성제를 포함한다.

[0405] 실시형태 14. 실시형태 13의 제형으로서, 약 0.02%의 계면활성제를 포함한다.

[0406] 실시형태 15. 이전 실시형태 중 어느 하나의 제형으로서, 상기 제형은 액체이다.

[0407] 실시형태 16. 다음을 포함하는 동결건조된 제형:

[0408] 콜라게나제;

[0409] 디삭카라이드;

[0410] 만니톨; 및

[0411] Tris-HCl.

[0412] 실시형태 17. 실시형태 16의 동결건조된 제형으로서, 상기 콜라게나제는 콜라게나제 I을 포함한다.

[0413] 실시형태 18. 실시형태 17의 동결건조된 제형으로서, 상기 콜라게나제 I는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함한다.

[0414] 실시형태 19. 실시형태 16의 동결건조된 제형으로서, 상기 콜라게나제는 콜라게나제 II를 포함한다.

[0415] 실시형태 20. 실시형태 19의 동결건조된 제형으로서, 상기 콜라게나제 II는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함한다.

[0416] 실시형태 21. 실시형태 16의 동결건조된 제형으로서, 상기 콜라게나제는 콜라게나제 I 및 콜라게나제 II의 혼합물을 포함한다.

[0417] 실시형태 22. 실시형태 21의 동결건조된 제형으로서, 상기 콜라게나제 I는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하고, 콜라게나제 II는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함한다.

[0418] 실시형태 23. 실시형태 21 또는 22의 동결건조된 제형으로서, 상기 콜라게나제는 콜라게나제 클로스트리듐 히스톨리티쿰 (CCH)이다.

[0419] 실시형태 24. 실시형태 16-23 중 어느 하나의 동결건조된 제형으로서, 상기 디삭카라이드는 수크로스 또는 트레할로스를 포함한다.

[0420] 실시형태 25. 실시형태 16-24 중 어느 하나의 동결건조된 제형으로서, 동결건조 전에, 상기 제형은:

[0421] CCH;

[0422] 60 mM 수크로스;

[0423] 225 mM 만니톨; 및

[0424] 10 mM Tris-HCl을 포함하고,

[0425] 약 8.5의 pH를 갖는다.

[0426] 실시형태 26. 실시형태 16-25 중 어느 하나의 동결건조된 제형으로서, 상기 동결건조된 제형은 380 μbar 초과의 압력에서 안정하다.

[0427] 실시형태 27. 실시형태 26의 동결건조된 제형으로서, 상기 동결건조된 제형은 약 4000 μbar의 압력에서 안정하다.

[0428] 실시형태 28. 실시형태 16-27 중 어느 하나의 동결건조된 제형으로서, 상기 동결건조된 제형은:

[0429] (e) 적어도 36 개월 동안 2 내지 8℃;

[0430] (f) 적어도 36 개월 동안 25℃/60% 상대 습도;

[0431] (g) 적어도 6 개월 동안 40℃/75% 상대 습도; 또는

[0432] (h) (a) 내지 (c)의 임의의 조합에서 안정하다.

[0433] 실시형태 29. 실시형태 16-28 중 어느 하나의 동결건조된 제형으로서, 상기 동결건조된 제형은:

[0434] 상기 제형을 약 -25℃ 내지 -55℃의 온도에서 냉동시켜 냉동된 제형을 형성하는 단계; 및

[0435] 상기 냉동된 제형을 약 25℃ 내지 약 50℃의 온도에서 건조시켜 상기 동결건조된 제형을 형성하는 단계

[0436] 를 포함하는 방법에 의해 형성된다.

[0437] 실시형태 30. 실시형태 29의 동결건조된 제형으로서, 상기 동결건조된 제형은:

[0438] 상기 제형을 약 -25℃ 내지 -55℃의 단일 온도에서 냉동시켜 냉동된 제형을 형성하는 단계; 및

[0439] 상기 냉동된 제형을 약 25℃ 내지 약 50℃의 단일 온도에서 건조시켜 상기 동결건조된 제형을 형성하는 단계

[0440] 를 포함하는 방법에 의해 형성된다.

[0441] 실시형태 31. 실시형태 16-30 중 어느 하나의 동결건조된 제형으로서, 상기 동결건조된 제형은 72 시간 미만 동

안 수행되는 동결건조 방법에 의해 형성된다.

[0442] 실시형태 32. 실시형태 16-31 중 어느 하나의 동결건조된 제형으로서, 상기 동결건조된 제형은 약 380 μbar 내지 약 4000 μbar의 압력에서 수행되는 동결건조 방법에 의해 형성된다.

[0443] 실시형태 33. 단위-용량 바이알, 다중-용량 바이알, 카트리지, 또는 주사기 내에 실시형태 16-32 중 어느 하나의 동결건조된 제형.

[0444] 실시형태 34.

[0445] 콜라게나제;

[0446] 디삭카라이드;

[0447] 만니톨;

[0448] Tris-HCl;

[0449] 염화칼슘; 및

[0450] 염화나트륨을 포함하는 재구성된 제형.

[0451] 실시형태 35. 실시형태 34의 재구성된 제형으로서, 상기 콜라게나제는 콜라게나제 클로스트리듐 히스톨리티쿰(CCH)이다.

[0452] 실시형태 36. 실시형태 34 또는 35의 재구성된 제형으로서, 상기 디삭카라이드는 수크로스 또는 트레할로스를 포함한다.

[0453] 실시형태 37. 실시형태 34-36 중 어느 하나의 재구성된 제형으로서, 상기 재구성된 제형은 사람 혈액에 등장성이다.

[0454] 실시형태 38. 키트로서:

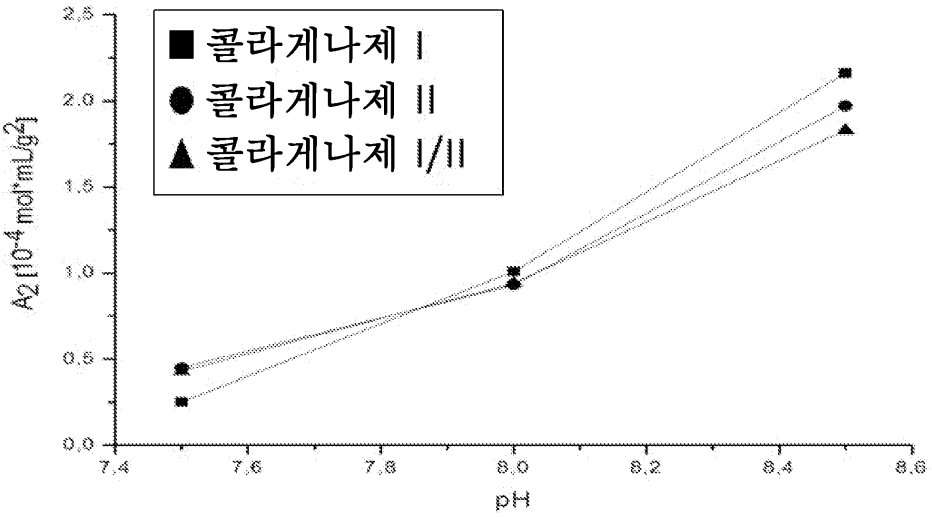
[0455] 실시형태 16-32 중 어느 하나의 동결건조된 제형을 포함하는 컨테이너; 및

[0456] 염화칼슘 및 염화나트륨을 포함하는 멸균 희석제를 포함하는 컨테이너

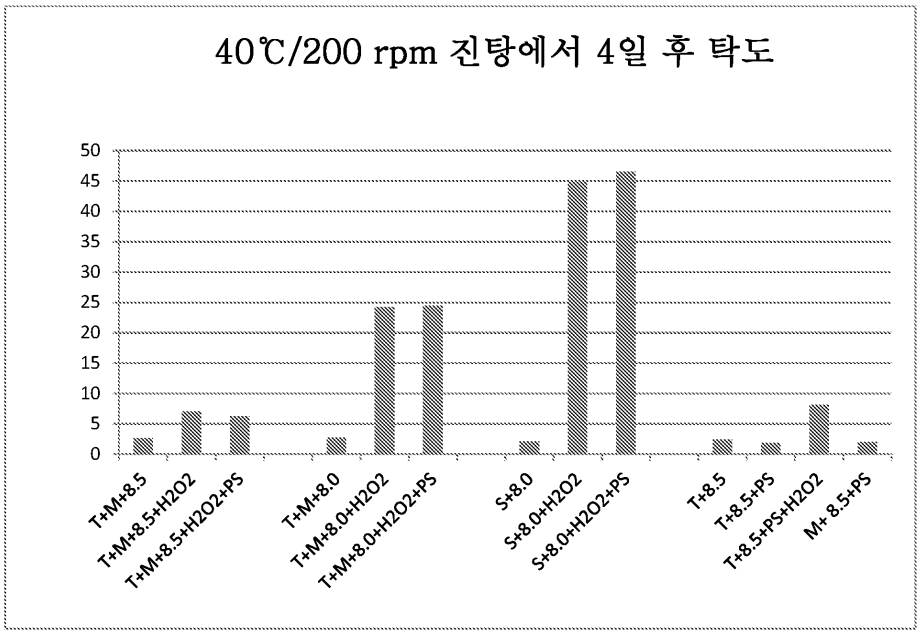
[0457] 를 포함하는, 키트.

도면

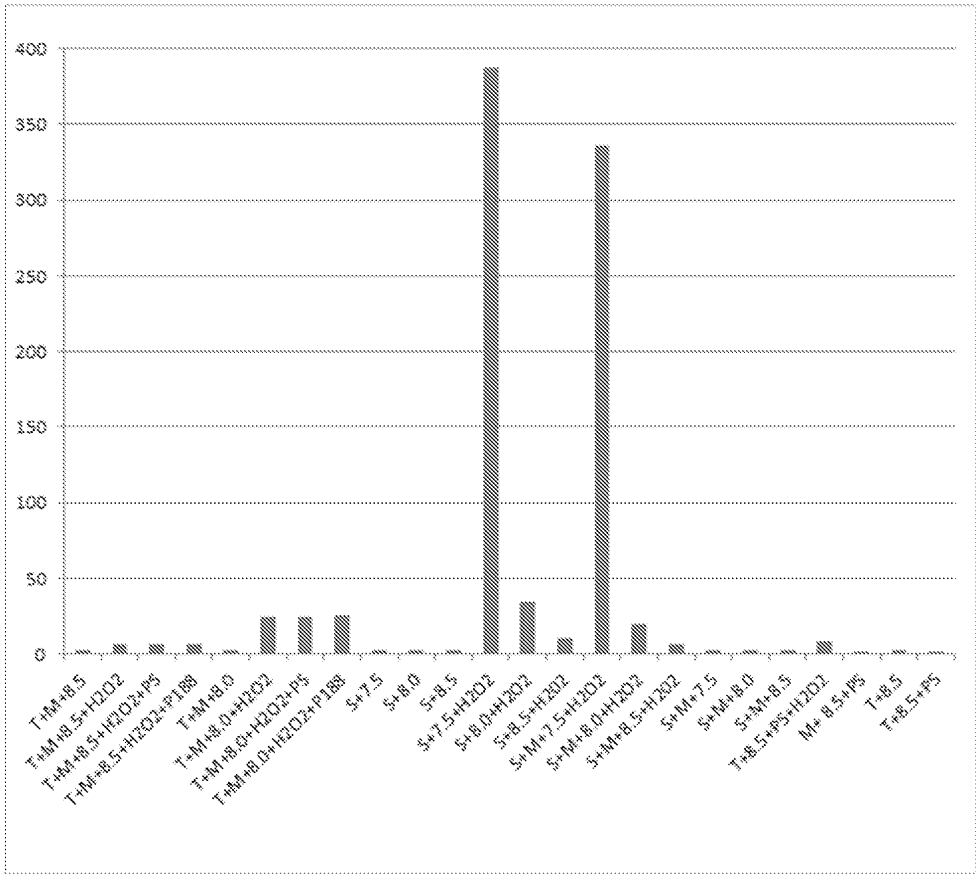
도면1



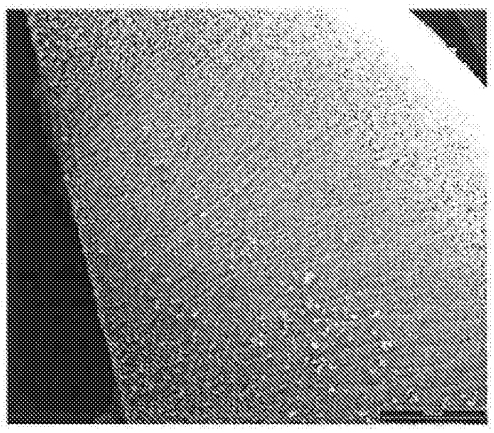
도면2a


40℃/200 rpm 진탕에서 4일 후 탁도
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
T+M+8.5
T+M+8.5+H2O2
T+M+8.5+H2O2+PS
T+M+8.0
T+M+8.0+H2O2
T+M+8.0+H2O2+PS
S+8.0
S+8.0+H2O2
S+8.0+H2O2+PS
T+8.5
T+8.5+PS
T+8.5+PS+H2O2
M+ 8.5+PS

도면2b

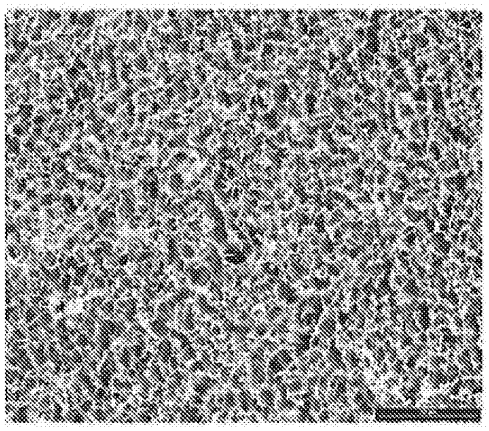

400
350
300
250
200
150
100
50
0
T+M+8.5
T+M+8.5+H2O2
T+M+8.5+H2O2+PS
T+M+8.5+H2O2+PBB
T+M+8.0
T+M+8.0+H2O2
T+M+8.0+H2O2+PS
T+M+8.0+H2O2+PBB
S+7.5
S+8.0
S+8.5
S+7.5+H2O2
S+8.0+H2O2
S+8.5+H2O2
S+M+7.5+H2O2
S+M+8.0+H2O2
S+M+8.5+H2O2
S+M+7.5
S+M+8.0
S+M+8.5
T+8.5+PS+H2O2
M+ 8.5+PS
T+8.5
T+8.5+PS

도면3a



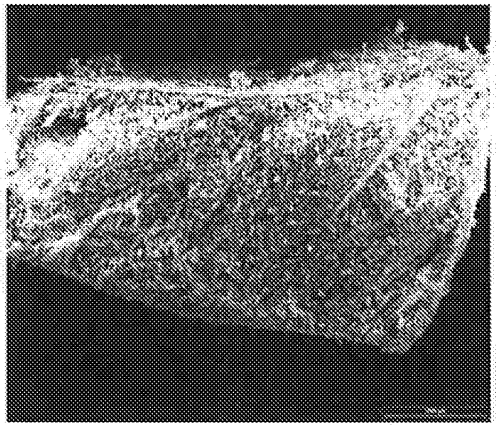
Va의 리오 케이크의 하부, 50x 배율

도면3b



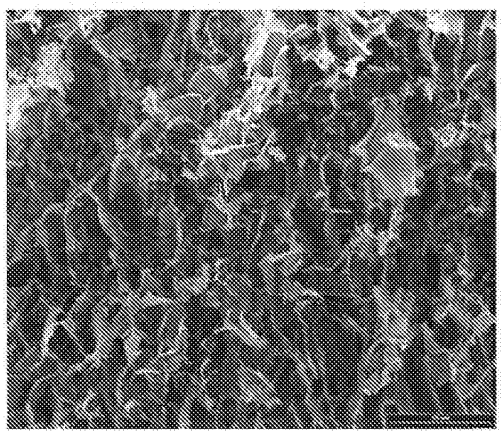
Va의 리오 케이크의 하부, 150x 배율

도면3c



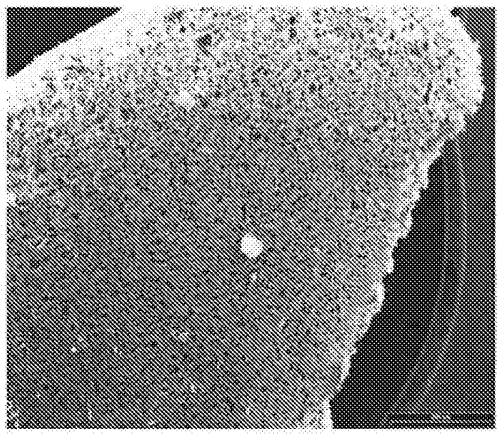
Va의 리오 케이크의 단면, 50x 배율

도면3d



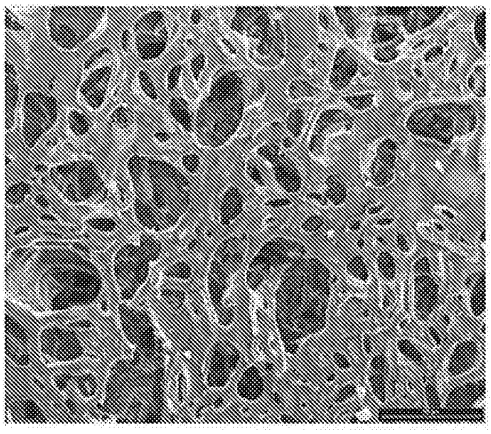
Va의 리오 케이크의 단면, 150x 배율

도면3e



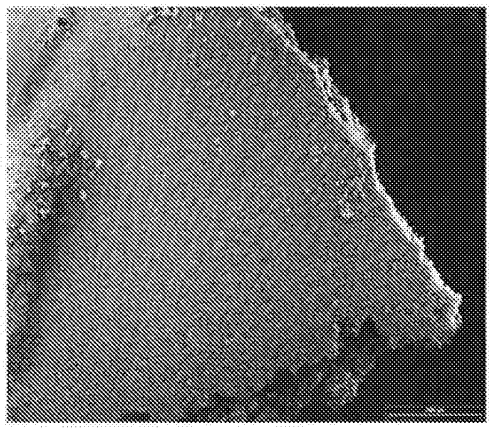
Va의 리오 케이크의 상부 표면, 50x 배율

도면3f



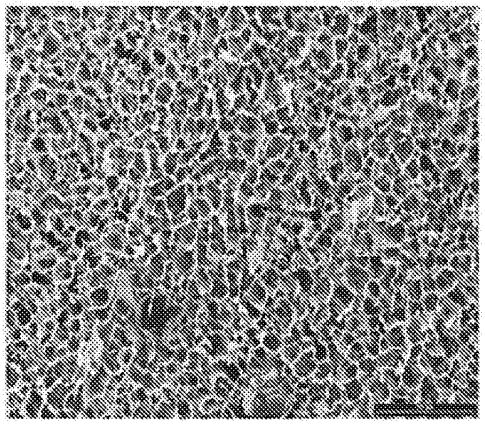
Va의 리오 케이크의 상부 표면,
150x 배율

도면3g



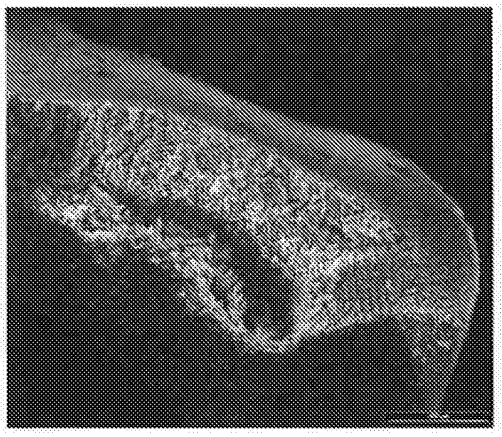
Vb의 리오 케이크의 하부, 50x 배율

도면3h



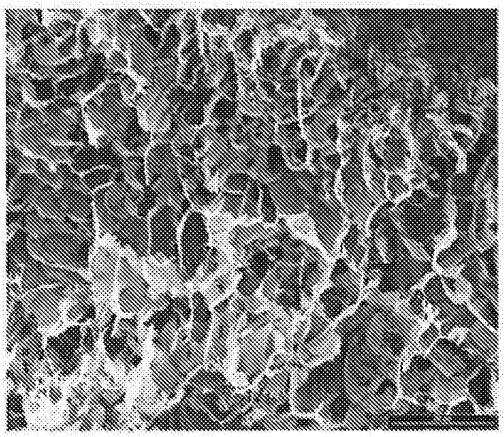
Vb의 리오 케이크의 하부, 150x 배율

도면3i



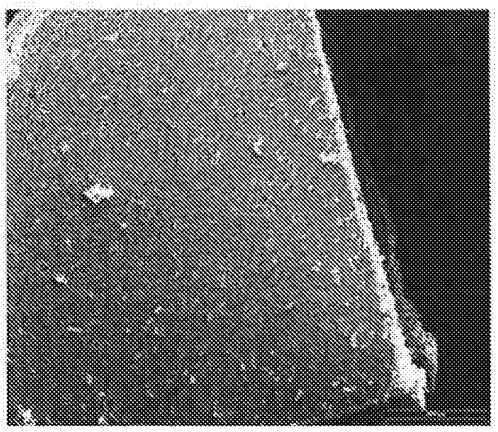
Vb의 리오 케이크의 단면, 50x 배율

도면3j



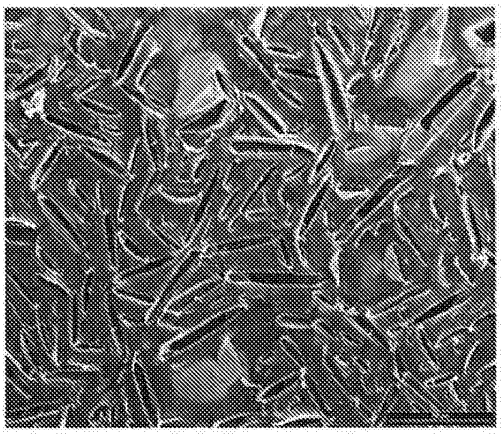
Vb의 리오 케이크의 단면, 150x 배율

도면3k



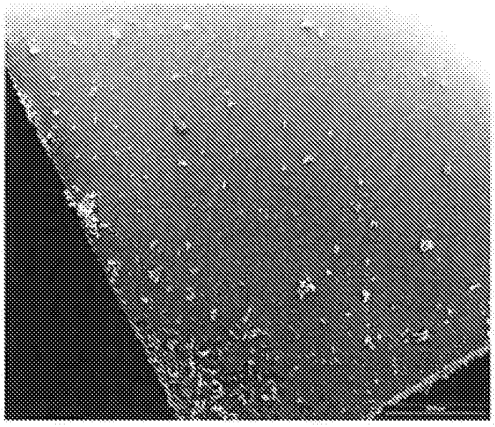
Vb의 리오 케이크의 상부 표면, 50x 배율

도면31



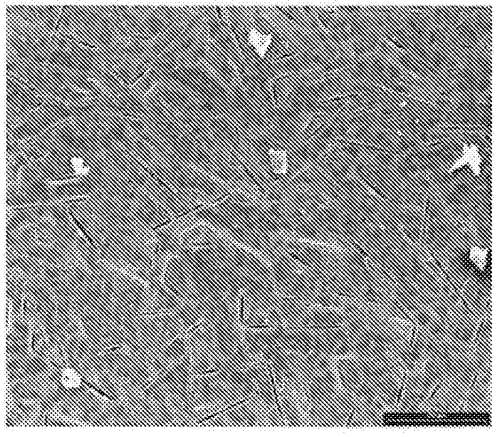
Vb의 리오 케이크의 상부 표면,
150x 배율

도면3m



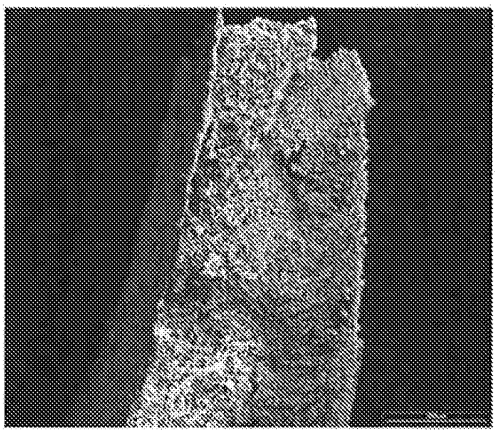
Vc의 리오 케이크의 하부, 50x 배율

도면3n



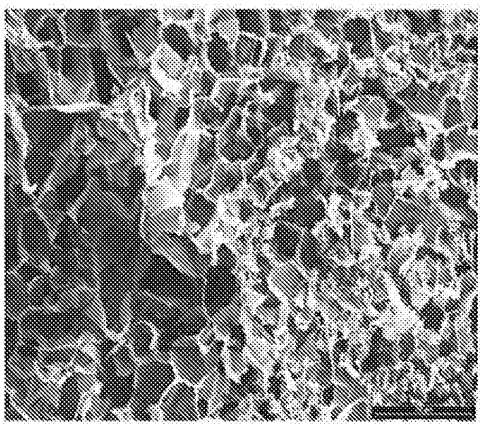
Vc의 리오 케이크의 하부, 150x 배율

도면3o



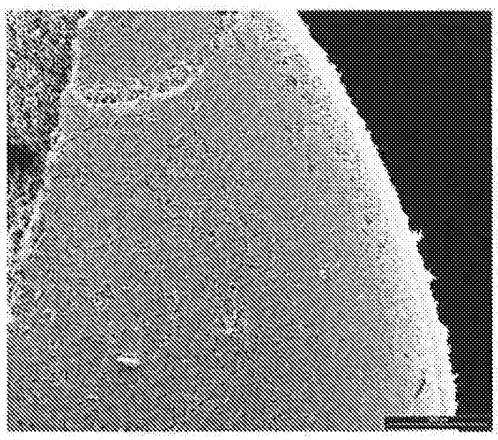
Vc의 리오 케이크의 단면, 50x 배율

도면3p



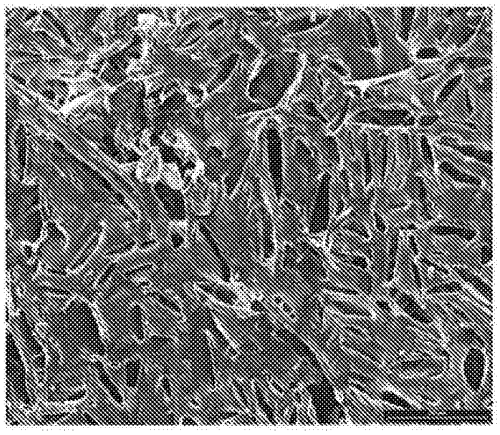
Vc의 리오 케이크의 단면, 150x 배율

도면3q



Vc의 리오 케이크의 상부 표면,
50x 배율

도면3r



Vc의 리오 케이크의 상부 표면,
150x 배율

도면4

도 4A

128 μbar의 진공에서 외관
좌측에서 우측으로: 제형 5, 3 및 1

도 4B

380 μbar의 진공에서 외관
좌측에서 우측으로: 제형 5, 3 및 1

도 4C

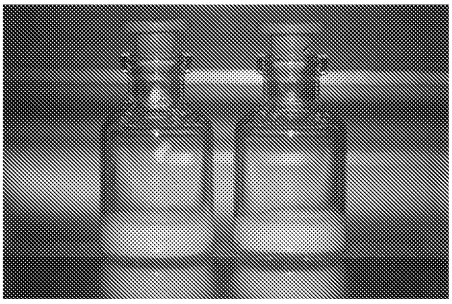
1030 μbar의 진공에서 외관
좌측에서 우측으로: 제형 5, 3 및 1

도면5

도 5A

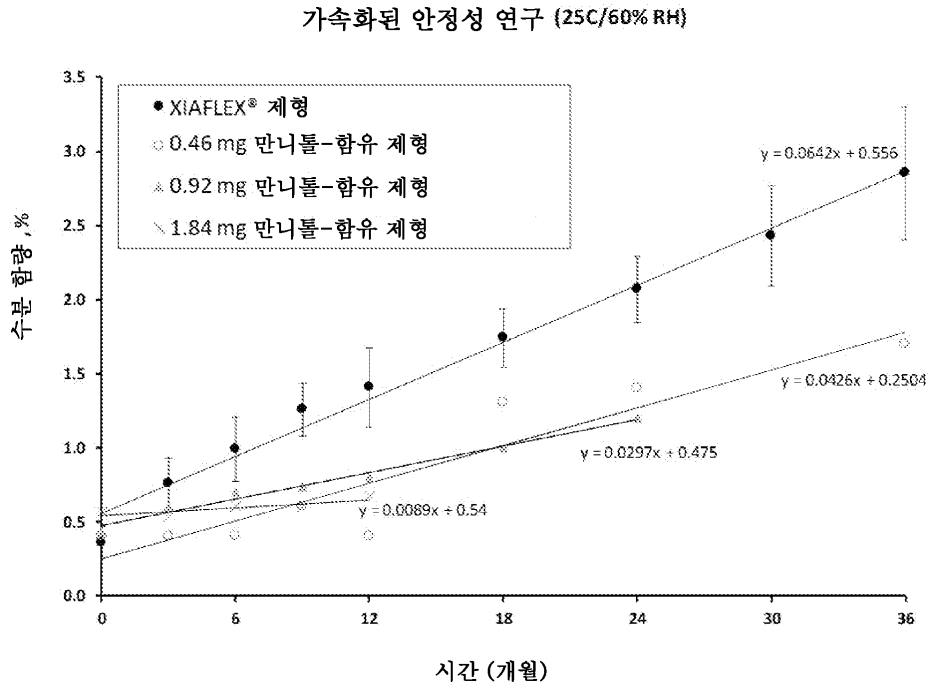
128 μbar의 진공에서 외관
좌측에서 우측으로: 제형 5 및 3

도 5B



4000 μbar의 진공에서 외관
좌측에서 우측으로: 제형 5 및 3

도면6



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> ENDO GLOBAL AESTHETICS LIMITED

<120> COLLAGENASE FORMULATIONS AND METHODS OF PRODUCING THE SAME

<130> 117326.000001

<150> US 62/788,916

<151> 2019-01-06

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1008

<212> PRT

<213> Clostridium histolyticum

<400> 1

Ile Ala Asn Thr Asn Ser Glu Lys Tyr Asp Phe Glu Tyr Leu Asn Gly

1 5 10 15

Leu Ser Tyr Thr Glu Leu Thr Asn Leu Ile Lys Asn Ile Lys Trp Asn

20 25 30

Gln Ile Asn Gly Leu Phe Asn Tyr Ser Thr Gly Ser Gln Lys Phe Phe

35 40 45

Gly Asp Lys Asn Arg Val Gln Ala Ile Ile Asn Ala Leu Gln Glu Ser

50 55 60

Gly Arg Thr Tyr Thr Ala Asn Asp Met Lys Gly Ile Glu Thr Phe Thr

65 70 75 80

Glu Val Leu Arg Ala Gly Phe Tyr Leu Gly Tyr Tyr Asn Asp Gly Leu

85 90 95

Ser Tyr Leu Asn Asp Arg Asn Phe Gln Asp Lys Cys Ile Pro Ala Met

100 105 110

Ile Ala Ile Gln Lys Asn Pro Asn Phe Lys Leu Gly Thr Ala Val Gln

115 120 125

Asp Glu Val Ile Thr Ser Leu Gly Lys Leu Ile Gly Asn Ala Ser Ala

130 135 140

Asn Ala Glu Val Val Asn Asn Cys Val Pro Val Leu Lys Gln Phe Arg

145 150 155 160

Glu Asn Leu Asn Gln Tyr Ala Pro Asp Tyr Val Lys Gly Thr Ala Val

165 170 175

Asn Glu Leu Ile Lys Gly Ile Glu Phe Asp Phe Ser Gly Ala Ala Tyr

180 185 190

Glu Lys Asp Val Lys Thr Met Pro Trp Tyr Gly Lys Ile Asp Pro Phe

195 200 205

Ile Asn Glu Leu Lys Ala Leu Gly Leu Tyr Gly Asn Ile Thr Ser Ala

210 215 220

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

225 230 235 240

Leu Tyr Ser Thr Asn Arg Asn Asp Ile Val Gln Ser Leu Glu Lys Ala

245 250 255

Val Asp Met Tyr Lys Tyr Gly Lys Ile Ala Phe Val Ala Met Glu Arg

260 265 270

Ile Thr Trp Asp Tyr Asp Gly Ile Gly Ser Asn Gly Lys Lys Val Asp

275 280 285

His Asp Lys Phe Leu Asp Asp Ala Glu Lys His Tyr Leu Pro Lys Thr

290 295 300

Tyr Thr Phe Asp Asn Gly Thr Phe Ile Ile Arg Ala Gly Glu Lys Val

305 310 315 320

Ser Glu Glu Lys Ile Lys Arg Leu Tyr Trp Ala Ser Arg Glu Val Lys

325 330 335

Ser Gln Phe His Arg Val Val Gly Asn Asp Lys Ala Leu Glu Val Gly

340 345 350

Asn Ala Asp Asp Val Leu Thr Met Lys Ile Phe Asn Ser Pro Glu Glu

355 360 365

Tyr Lys Phe Asn Thr Asn Ile Asn Gly Val Ser Thr Asp Asn Gly Gly

370 375 380

Leu Tyr Ile Glu Pro Arg Gly Thr Phe Tyr Thr Tyr Glu Arg Thr Pro

385 390 395 400

Gln Gln Ser Ile Phe Ser Leu Glu Glu Leu Phe Arg His Glu Tyr Thr

405 410 415

His Tyr Leu Gln Ala Arg Tyr Leu Val Asp Gly Leu Trp Gly Gln Gly

420 425 430

Pro Phe Tyr Glu Lys Asn Arg Leu Thr Trp Phe Asp Glu Gly Thr Ala

435 440 445

Glu Phe Phe Ala Gly Ser Thr Arg Thr Ser Gly Val Leu Pro Arg Lys

450 455 460

Ser Ile Leu Gly Tyr Leu Ala Lys Asp Lys Val Asp His Arg Tyr Ser

465 470 475 480

Leu Lys Lys Thr Leu Asn Ser Gly Tyr Asp Asp Ser Asp Trp Met Phe

485 490 495

Tyr Asn Tyr Gly Phe Ala Val Ala His Tyr Leu Tyr Glu Lys Asp Met

500 505 510

Pro Thr Phe Ile Lys Met Asn Lys Ala Ile Leu Asn Thr Asp Val Lys

515 520 525

Ser Tyr Asp Glu Ile Ile Lys Lys Leu Ser Asp Asp Ala Asn Lys Asn

530 535 540

Thr Glu Tyr Gln Asn His Ile Gln Glu Leu Ala Asp Lys Tyr Gln Gly

545 550 555 560

Ala Gly Ile Pro Leu Val Ser Asp Asp Tyr Leu Lys Asp His Gly Tyr

565 570 575

Lys Lys Ala Ser Glu Val Tyr Ser Glu Ile Ser Lys Ala Ala Ser Leu

580 585 590

Thr Asn Thr Ser Val Thr Ala Glu Lys Ser Gln Tyr Phe Asn Thr Phe

595 600 605

Thr Leu Arg Gly Thr Tyr Thr Gly Glu Thr Ser Lys Gly Glu Phe Lys

610 615 620

Asp Trp Asp Glu Met Ser Lys Lys Leu Asp Gly Thr Leu Glu Ser Leu

625 630 635 640

Ala Lys Asn Ser Trp Ser Gly Tyr Lys Thr Leu Thr Ala Tyr Phe Thr

645 650 655

Asn Tyr Arg Val Thr Ser Asp Asn Lys Val Gln Tyr Asp Val Val Phe

660 665 670

His Gly Val Leu Thr Asp Asn Ala Asp Ile Ser Asn Asn Lys Ala Pro

675 680 685

Ile Ala Lys Val Thr Gly Pro Ser Thr Gly Ala Val Gly Arg Asn Ile

690 695 700

Glu Phe Ser Gly Lys Asp Ser Lys Asp Glu Asp Gly Lys Ile Val Ser

705 710 715 720

Tyr Asp Trp Asp Phe Gly Asp Gly Ala Thr Ser Arg Gly Lys Asn Ser

725 730 735

Val His Ala Tyr Lys Lys Thr Gly Thr Tyr Asn Val Thr Leu Lys Val

740 745 750

Thr Asp Asp Lys Gly Ala Thr Ala Thr Glu Ser Phe Thr Ile Glu Ile

755 760 765

Lys Asn Glu Asp Thr Thr Thr Pro Ile Thr Lys Glu Met Glu Pro Asn

770 775 780

Asp Asp Ile Lys Glu Ala Asn Gly Pro Ile Val Glu Gly Val Thr Val

785 790 795 800

Lys Gly Asp Leu Asn Gly Ser Asp Asp Ala Asp Thr Phe Tyr Phe Asp

805 810 815

Val Lys Glu Asp Gly Asp Val Thr Ile Glu Leu Pro Tyr Ser Gly Ser

820 825 830

Ser Asn Phe Thr Trp Leu Val Tyr Lys Glu Gly Asp Asp Gln Asn His

835 840 845

Ile Ala Ser Gly Ile Asp Lys Asn Asn Ser Lys Val Gly Thr Phe Lys

850 855 860

Ala Thr Lys Gly Arg His Tyr Val Phe Ile Tyr Lys His Asp Ser Ala

865 870 875 880

Ser Asn Ile Ser Tyr Ser Leu Asn Ile Lys Gly Leu Gly Asn Glu Lys

885 890 895

Leu Lys Glu Lys Glu Asn Asn Asp Ser Ser Asp Lys Ala Thr Val Ile

900 905 910

Pro Asn Phe Asn Thr Thr Met Gln Gly Ser Leu Leu Gly Asp Asp Ser

915 920 925

Arg Asp Tyr Tyr Ser Phe Glu Val Lys Glu Glu Gly Glu Val Asn Ile

930 935 940

Glu Leu Asp Lys Lys Asp Glu Phe Gly Val Thr Trp Thr Leu His Pro

945 950 955 960

Glu Ser Asn Ile Asn Asp Arg Ile Thr Tyr Gly Gln Val Asp Gly Asn

965 970 975

Lys Val Ser Asn Lys Val Lys Leu Arg Pro Gly Lys Tyr Tyr Leu Leu

980 985 990

Val Tyr Lys Tyr Ser Gly Ser Gly Asn Tyr Glu Leu Arg Val Asn Lys

995 1000 1005

<210> 2

<211> 991

<212> PRT

<213> Clostridium histolyticum

<400> 2

Ala Val Asp Lys Asn Asn Ala Thr Ala Ala Val Gln Asn Glu Ser Lys
1 5 10 15

Arg Tyr Thr Val Ser Tyr Leu Lys Thr Leu Asn Tyr Tyr Asp Leu Val
20 25 30

Asp Leu Leu Val Lys Thr Glu Ile Glu Asn Leu Pro Asp Leu Phe Gln
35 40 45

Tyr Ser Ser Asp Ala Lys Glu Phe Tyr Gly Asn Lys Thr Arg Met Ser
50 55 60

Phe Ile Met Asp Glu Ile Gly Arg Arg Ala Pro Gln Tyr Thr Glu Ile
65 70 75 80

Asp His Lys Gly Ile Pro Thr Leu Val Glu Val Val Arg Ala Gly Phe
85 90 95

Tyr Leu Gly Phe His Asn Lys Glu Leu Asn Glu Ile Asn Lys Arg Ser
100 105 110

Phe Lys Glu Arg Val Ile Pro Ser Ile Leu Ala Ile Gln Lys Asn Pro
115 120 125

Asn Phe Lys Leu Gly Thr Glu Val Gln Asp Lys Ile Val Ser Ala Thr
130 135 140

Gly Leu Leu Ala Gly Asn Glu Thr Ala Pro Pro Glu Val Val Asn Asn
145 150 155 160

Phe Thr Pro Ile Ile Gln Asp Cys Ile Lys Asn Met Asp Arg Tyr Ala
165 170 175

Leu Asp Asp Leu Lys Ser Lys Ala Leu Phe Asn Val Leu Ala Ala Pro
180 185 190

Thr Tyr Asp Ile Thr Glu Tyr Leu Arg Ala Thr Lys Glu Lys Pro Glu
195 200 205

Asn Thr Pro Trp Tyr Gly Lys Ile Asp Gly Phe Ile Asn Glu Leu Lys
210 215 220

Lys Leu Ala Leu Tyr Gly Lys Ile Asn Asp Asn Asn Ser Trp Ile Ile
225 230 235 240
Asp Asn Gly Ile Tyr His Ile Ala Pro Leu Gly Lys Leu His Ser Asn
245 250 255
Asn Lys Ile Gly Ile Glu Thr Leu Thr Glu Val Met Lys Ile Tyr Pro
260 265 270
Tyr Leu Ser Met Gln His Leu Gln Ser Ala Asp Gln Ile Glu Arg His
275 280 285

Tyr Asp Ser Lys Asp Ala Glu Gly Asn Lys Ile Pro Leu Asp Lys Phe
290 295 300
Lys Lys Glu Gly Lys Glu Lys Tyr Cys Pro Lys Thr Tyr Thr Phe Asp
305 310 315 320
Asp Gly Lys Val Ile Ile Lys Ala Gly Ala Arg Val Glu Glu Glu Lys
325 330 335
Val Lys Arg Leu Tyr Trp Ala Ser Lys Glu Val Asn Ser Gln Phe Phe
340 345 350

Arg Val Tyr Gly Ile Asp Lys Pro Leu Glu Glu Gly Asn Pro Asp Asp
355 360 365
Ile Leu Thr Met Val Ile Tyr Asn Ser Pro Glu Glu Tyr Lys Leu Asn
370 375 380
Ser Val Leu Tyr Gly Tyr Asp Thr Asn Asn Gly Gly Met Tyr Ile Glu
385 390 395 400
Pro Asp Gly Thr Phe Phe Thr Tyr Glu Arg Lys Ala Glu Glu Ser Thr
405 410 415

Tyr Thr Leu Glu Glu Leu Phe Arg His Glu Tyr Thr His Tyr Leu Gln
420 425 430
Gly Arg Tyr Ala Val Pro Gly Gln Trp Gly Arg Thr Lys Leu Tyr Asp
435 440 445
Asn Asp Arg Leu Thr Trp Tyr Glu Glu Gly Gly Ala Glu Leu Phe Ala
450 455 460
Gly Ser Thr Arg Thr Ser Gly Ile Leu Pro Arg Lys Ser Ile Val Ser

465 470 475 480

Asn Ile His Asn Thr Thr Arg Asn Asn Arg Tyr Lys Leu Ser Asp Thr
485 490 495
Val His Ser Lys Tyr Gly Ala Ser Phe Glu Phe Tyr Asn Tyr Ala Cys
500 505 510
Met Phe Met Asp Tyr Met Tyr Asn Lys Asp Met Gly Ile Leu Asn Lys
515 520 525
Leu Asn Asp Leu Ala Lys Asn Asn Asp Val Asp Gly Tyr Asp Asn Tyr
530 535 540

Ile Arg Asp Leu Ser Ser Asn His Ala Leu Asn Asp Lys Tyr Gln Asp
545 550 555 560
His Met Gln Glu Arg Ile Asp Asn Tyr Glu Asn Leu Thr Val Pro Phe
565 570 575
Val Ala Asp Asp Tyr Leu Val Arg His Ala Tyr Lys Asn Pro Asn Glu
580 585 590
Ile Tyr Ser Glu Ile Ser Glu Val Ala Lys Leu Lys Asp Ala Lys Ser
595 600 605

Glu Val Lys Lys Ser Gln Tyr Phe Ser Thr Phe Thr Leu Arg Gly Ser
610 615 620
Tyr Thr Gly Gly Ala Ser Lys Gly Lys Leu Glu Asp Gln Lys Ala Met
625 630 635 640
Asn Lys Phe Ile Asp Asp Ser Leu Lys Lys Leu Asp Thr Tyr Ser Trp
645 650 655
Ser Gly Tyr Lys Thr Leu Thr Ala Tyr Phe Thr Asn Tyr Lys Val Asp
660 665 670

Ser Ser Asn Arg Val Thr Tyr Asp Val Val Phe His Gly Tyr Leu Pro
675 680 685
Asn Glu Gly Asp Ser Lys Asn Ser Leu Pro Tyr Gly Lys Ile Asn Gly
690 695 700
Thr Tyr Lys Gly Thr Glu Lys Glu Lys Ile Lys Phe Ser Ser Glu Gly
705 710 715 720

Ser Phe Asp Pro Asp Gly Lys Ile Val Ser Tyr Glu Trp Asp Phe Gly
725 730 735

Asp Gly Asn Lys Ser Asn Glu Glu Asn Pro Glu His Ser Tyr Asp Lys
740 745 750

Val Gly Thr Tyr Thr Val Lys Leu Lys Val Thr Asp Asp Lys Gly Glu
755 760 765

Ser Ser Val Ser Thr Thr Thr Ala Glu Ile Lys Asp Leu Ser Glu Asn
770 775 780

Lys Leu Pro Val Ile Tyr Met His Val Pro Lys Ser Gly Ala Leu Asn
785 790 795 800

Gln Lys Val Val Phe Tyr Gly Lys Gly Thr Tyr Asp Pro Asp Gly Ser
805 810 815

Ile Ala Gly Tyr Gln Trp Asp Phe Gly Asp Gly Ser Asp Phe Ser Ser
820 825 830

Glu Gln Asn Pro Ser His Val Tyr Thr Lys Lys Gly Glu Tyr Thr Val
835 840 845

Thr Leu Arg Val Met Asp Ser Ser Gly Gln Met Ser Glu Lys Thr Met
850 855 860

Lys Ile Lys Ile Thr Asp Pro Val Tyr Pro Ile Gly Thr Glu Lys Glu
865 870 875 880

Pro Asn Asn Ser Lys Glu Thr Ala Ser Gly Pro Ile Val Pro Gly Ile
885 890 895

Pro Val Ser Gly Thr Ile Glu Asn Thr Ser Asp Gln Asp Tyr Phe Tyr
900 905 910

Phe Asp Val Ile Thr Pro Gly Glu Val Lys Ile Asp Ile Asn Lys Leu
915 920 925

Gly Tyr Gly Gly Ala Thr Trp Val Val Tyr Asp Glu Asn Asn Asn Ala
930 935 940

Val Ser Tyr Ala Thr Asp Asp Gly Gln Asn Leu Ser Gly Lys Phe Lys
945 950 955 960

Ala Asp Lys Pro Gly Arg Tyr Tyr Ile His Leu Tyr Met Phe Asn Gly

965 970 975

Ser Tyr Met Pro Tyr Arg Ile Asn Ile Glu Gly Ser Val Gly Arg

980 985 990