

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0122993

(43) 공개일자 2022년09월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/08 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
 A61K 39/00 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
 A61K 47/18 (2017.01) A61K 47/22 (2017.01)
 A61K 9/00 (2006.01) C07K 16/22 (2006.01)
 C07K 16/24 (2006.01) C07K 16/32 (2006.01)
 C07K 16/42 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/08 (2013.01)
 A61K 38/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-7021109

(22) 출원일자(국제) 2020년11월24일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2022년06월21일

(86) 국제출원번호 PCT/US2020/062051

(87) 국제공개번호 WO 2021/108427

국제공개일자 2021년06월03일

(30) 우선권주장

62/940,683 2019년11월26일 미국(US)

(71) 출원인

코메라 라이프 사이언시스, 인코포레이티드

미국 01801 매사추세츠주 워번 스위트 4650 길 스트리트 12

(72) 발명자

손, 데이비드, 에스.

미국 33480 플로리다 팜 비치 브라질리언 애비뉴 130

우스리치, 필립

미국 02472 매사추세츠 워터타운 브롬필드 스트리트 14

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 남앤남

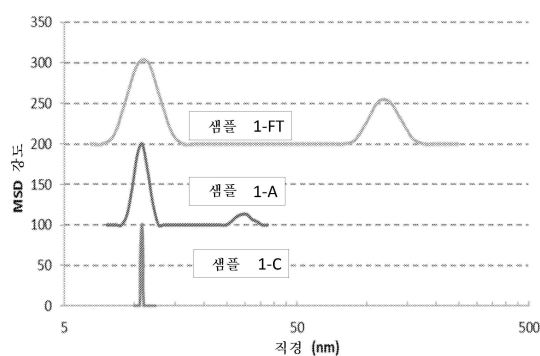
전체 청구항 수 : 총 36 항

(54) 발명의 명칭 바이오폴리머 제형을 위한 부형제 화합물

(57) 요약

단백질 및 부형제 화합물을 포함하는, 점도 감소 액체 제형이 본원에 개시된다. 추가로, 단백질을 포함하는 액체 제형의 점도를 감소시키는 방법, 치료 방법, 및 단백질 가공의 개선 방법이 개시된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 39/39591 (2013.01)
A61K 47/183 (2013.01)
A61K 47/22 (2013.01)
A61K 9/0019 (2013.01)
C07K 16/22 (2013.01)
C07K 16/241 (2013.01)
C07K 16/32 (2013.01)
C07K 16/4291 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)

(72) 발명자

마허니, 로버트, 피.

미국 01922 매사추세츠 뉴버리 오스틴 레인 2

정, 유홍

미국 02420 매사추세츠 렉싱턴 버트웰 로드 60

나익, 수바시찬드라

미국 02472 매사추세츠 워터타운 로렐 스트리트 13

트란, 티모시

미국 02155 매사추세츠 메드퍼드 펠스웨이 1046

명세서

청구범위

청구항 1

단백질 및 부형제 화합물을 포함하는 액체 제형으로서, 상기 부형제 화합물이 피리미딘이고, 상기 부형제 화합물이 점도-감소량으로 첨가되는, 액체 제형.

청구항 2

제1항에 있어서, 피리미딘이 메틸-치환된 피리미딘인, 액체 제형.

청구항 3

제1항에 있어서, 피리미딘이 피리미딘, 피리미디논, 트리아미노피리미딘, 1,3-디메틸우라실, 1-메틸우라실, 3-메틸우라실, 1,3-디에틸우라실, 5-메틸우라실, 6-메틸우라실, 우라실, 1,3-디메틸-테트라하이드로 피리미디논, 티민, 1-메틸티민, 0-4-메틸티민, 1,3-디메틸티민, 디메틸티민 이량체, 테아크린, 시토신, 5-메틸시토신, 및 3-메틸시토신으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 액체 제형.

청구항 4

제3항에 있어서, 피리미딘이 1,3-디메틸우라실인, 액체 제형.

청구항 5

제1항에 있어서, 제형이 약학적 조성물이고, 단백질이 치료용 단백질이고, 부형제 화합물이 약학적으로 허용되는 부형제 화합물인, 액체 제형.

청구항 6

제1항에 있어서, 제형이 비-치료용 제형이고, 단백질이 비-치료용 단백질인, 액체 제형.

청구항 7

제5항에 있어서, 치료용 단백질이 폐길화 단백질(PEGylated protein)인, 액체 제형.

청구항 8

제5항에 있어서, 치료용 단백질이 치료용 항체인, 액체 제형.

청구항 9

제8항에 있어서, 치료용 항체가 베바시주맙, 트라스투주맙, 아달리무맙, 인플릭시맙, 에타너셉트, 세특시맙, 리특시맙, 이필리무맙, 및 오말리주맙으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 액체 제형.

청구항 10

제1항에 있어서, 부형제 화합물의 점도-감소량이 약 250 mg/mL 이하인, 액체 제형.

청구항 11

제1항에 있어서, 부형제 화합물의 점도-감소량이 약 10 mg/mL 내지 약 200 mg/mL인, 액체 제형.

청구항 12

제11항에 있어서, 부형제 화합물의 점도-감소량이 약 10 mg/mL 내지 약 120 mg/mL인, 액체 제형.

청구항 13

제12항에 있어서, 부형제 화합물의 점도-감소량이 약 20 mg/mL 내지 약 120 mg/mL인, 액체 제형.

청구항 14

제1항에 있어서, 부형제 화합물의 점도-감소량이 약 1 mg/mL 내지 약 100 mg/mL인, 액체 제형.

청구항 15

제14항에 있어서, 부형제 화합물의 점도-감소량이 약 2 mg/mL 내지 약 80 mg/mL인, 액체 제형.

청구항 16

제15항에 있어서, 부형제 화합물의 점도-감소량이 약 5 mg/mL 내지 약 50 mg/mL인, 액체 제형.

청구항 17

제16항에 있어서, 부형제 화합물의 점도-감소량이 약 10 mg/mL 내지 약 40 mg/mL인, 액체 제형.

청구항 18

제1항에 있어서, 부형제 화합물의 점도-감소량이 약 1 mM 내지 약 400 mM인, 액체 제형.

청구항 19

제18항에 있어서, 부형제 화합물의 점도-감소량이 약 2 mM 내지 약 150 mM인, 액체 제형.

청구항 20

제19항에 있어서, 부형제 화합물의 점도-감소량이 약 5 mM 내지 약 100 mM인, 액체 제형.

청구항 21

제20항에 있어서, 부형제 화합물의 점도-감소량이 약 10 mM 내지 약 75 mM인, 액체 제형.

청구항 22

제21항에 있어서, 부형제 화합물의 점도-감소량이 약 15 mM 내지 약 50 mM인, 액체 제형.

청구항 23

제1항에 있어서, 점도-감소량이 제형의 점도를 대조 제형의 점도보다 낮은 점도로 감소시키고, 상기 대조 제형이 부형제 화합물을 함유하지 않지만 달리 치료용 제형과 건조 중량 기준으로 동일한, 액체 제형.

청구항 24

제23항에 있어서, 액체 제형의 점도가 대조 제형의 점도보다 적어도 약 10% 낮은, 액체 제형.

청구항 25

제24항에 있어서, 액체 제형의 점도가 대조 제형의 점도보다 적어도 약 30% 낮은, 액체 제형.

청구항 26

제25항에 있어서, 액체 제형의 점도가 대조 제형의 점도보다 적어도 약 50% 낮은, 액체 제형.

청구항 27

제26항에 있어서, 액체 제형의 점도가 대조 제형의 점도보다 적어도 약 70% 낮은, 액체 제형.

청구항 28

제27항에 있어서, 액체 제형의 점도가 대조 제형의 점도보다 적어도 약 90% 낮은, 액체 제형.

청구항 29

제23항에 있어서, 액체 제형의 점도가 약 100 cP 미만인, 액체 제형.

청구항 30

제29항에 있어서, 액체 제형의 점도가 약 50 cP 미만인, 액체 제형.

청구항 31

제30항에 있어서, 액체 제형의 점도가 약 20 cP 미만인, 액체 제형.

청구항 32

제31항에 있어서, 액체 제형의 점도가 약 10 cP 미만인, 액체 제형.

청구항 33

제1항에 있어서, 보존제, 계면활성제, 당, 다당류, 아르기닌, 프롤린, 히알루로니다제, 안정화제, 가용화제, 공용매, 하이드로트로프, 및 완충제로 이루어진 군으로부터 선택된 추가 제제를 추가로 포함하는, 제형.

청구항 34

단백질, 및 3-아미노피리딘, 디사이클로민, 1-메틸-2-피롤리돈, 페닐세린, DL-3-페닐세린, 및 사이클로세린으로 이루어진 군으로부터 선택된 부형제 화합물을 포함하는 액체 제형으로서, 상기 부형제 화합물이 점도-감소량으로 첨가되는, 액체 제형.

청구항 35

질병 또는 장애의 치료를 필요로 하는 포유동물에서 질병 또는 장애를 치료하는 방법으로서,

상기 포유동물에게 액체 치료용 제형을 투여하는 것을 포함하고, 상기 액체 치료용 제형이 치료적 유효량의 치료용 단백질을 포함하고, 상기 액체 치료용 제형이 점도-감소량의 약학적으로 허용되는 부형제 화합물을 추가로 포함하고, 상기 약학적으로 허용되는 부형제 화합물이 피리미딘이고; 상기 치료용 제형이 상기 질병 또는 장애의 치료에 효과적인, 방법.

청구항 36

질병 또는 장애의 치료를 필요로 하는 포유동물에서 질병 또는 장애를 치료하는 방법으로서,

상기 포유동물에게 액체 치료용 제형을 투여하는 것을 포함하고, 상기 액체 치료용 제형이 치료적 유효량의 치료용 단백질을 포함하고, 상기 액체 치료용 제형이 점도-감소량의 3-아미노피리딘, 디사이클로민, 1-메틸-2-피롤리돈, 페닐세린, DL-3-페닐세린, 및 사이클로세린으로 이루어진 군으로부터 선택된 약학적으로 허용되는 부형제 화합물을 추가로 포함하고, 상기 치료용 제형이 상기 질병 또는 장애의 치료에 효과적인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2019년 11월 26일에 출원된 미국 가특허 출원 제62/940,683호의 이익을 주장한다. 상기 출원의 전체 내용은 인용에 의해 본원에 포함된다.

[0003] 출원 분야

[0004] [0001] 본 출원은 일반적으로 바이오폴리머를 전달하기 위한 제형에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] [0002] 바이오폴리머는 치료 또는 비-치료 목적으로 사용될 수 있다. 항체 또는 효소 제형과 같은 바이오폴리머-기반 치료제는 질병을 치료하는 데 널리 사용된다. 효소, 펩티드, 및 구조 단백질과 같은 비-치료용 바이오폴리머는 가정, 영양, 상업적 및 산업적 용도와 같은 비-치료적 적용에 유용하다.

- [0006] [0003] 치료적 적용에 사용되는 바이오폴리머는 질병 치료를 위해 체내로 도입될 수 있도록 제형화되어야 한다. 예를 들어, 정맥내(IV) 주사에 의해 이들 제형을 투여하는 대신, 특정 상황 하에 피하(SC) 또는 근육내(IM) 경로에 의해 항체 및 단백질/펩티드 바이오폴리머 제형을 전달하는 것이 유리하다. 그러나, SC 또는 IM 주사에 대한 더 나은 환자 순응도 및 편안함을 달성하기 위해, 주사기의 액체 부피는 전형적으로 2 내지 3 cc로 제한되고 제형의 점도는 제형이 통상적인 의료 장치 및 소구경 바늘을 사용하여 전달될 수 있도록 전형적으로 약 20 센티푸아즈(cP)보다 낮다. 이러한 전달 파라미터는 전달되는 제형에 대한 투여량 요건에 항상 잘 맞는 것은 아니다.
- [0007] [0004] 예를 들어, 항체는 이들의 의도된 치료 효과를 발휘하기 위해 고용량 수준으로 전달될 필요가 있을 수 있다. 고용량 수준의 항체 제형을 전달하기 위해 제한된 액체 부피를 사용하는 것은 전달 비히클에서 때때로 150 mg/mL의 수준을 초과하는 고농도의 항체를 필요로 할 수 있다. 이러한 투여량 수준에서, 제형의 점도-대-농도 플롯은 이들의 선형-비선형 전이를 넘어서서, 제형의 점도는 농도가 증가함에 따라 극적으로 상승한다. 그러나, 증가된 점도는 표준 SC 또는 IM 전달 시스템과 양립할 수 없다.
- [0008] [0005] 추가적인 우려로서, 바이오폴리머-기반 치료제의 용액은 또한 침전, 단편화, 산화, 탈아미드화, 헤이징, 유백광, 변성, 액체-액체 상 분리, 및 겔 형성, 가역적 또는 비가역적 응집과 같은 안정성 문제가 발생하기 쉽다. 안정성 문제는 용액의 저장 수명을 제한하거나 특별한 취급을 필요로 한다.
- [0009] [0006] 예로서, 주사용 단백질 제형을 생산하기 위한 한 가지 접근법은 치료용 단백질 용액을 분말로 변형시키는 것이고, 이러한 분말은 재구성되어 SC 또는 IM 전달에 적합한 현탁액을 형성할 수 있다. 동결건조는 단백질 분말을 생산하기 위한 표준 기술이다. 후속 재구성을 위한 단백질 분말을 생산하기 위해 동결-건조, 분무 건조, 및 심지어 침전에 이은 초임계-유체 추출이 사용되었다. 분말형 현탁액은 재용해 전 점도가 낮고(동일한 전체 용량의 용액과 비교하여), 따라서 입자가 바늘을 통해 맞기에 충분히 작으면 SC 또는 IM 주사에 적합할 수 있다. 그러나, 분말에 존재하는 단백질 결정은 면역 반응을 유발할 고유의 위험을 갖는다. 재용해 후 불확실한 단백질 안정성/활성은 추가 문제를 제기한다. 단백질 분말 현탁액에 의해 도입된 제한을 피하면서 치료 목적을 위한 저점도 단백질 제형을 생산하는 기술이 당 분야에 여전히 필요하다.
- [0010] [0007] 상기 기재된 단백질의 치료적 적용 이외에, 효소, 펩티드, 및 구조 단백질과 같은 바이오폴리머는 비-치료적 적용에 사용될 수 있다. 이러한 비-치료용 바이오폴리머는 다수의 상이한 경로로부터 생산되거나, 예를 들어, 식물 공급원, 동물 공급원으로부터 유래되거나, 세포 배양물로부터 생산될 수 있다.
- [0011] [0008] 비-치료용 단백질은 일반적으로 물에서 과립 또는 분말형 물질 또는 용액 또는 분산액으로 생산, 수송, 저장 및 취급될 수 있다. 비-치료적 적용을 위한 바이오폴리머는 구형 또는 섬유질 단백질일 수 있고, 이러한 물질의 특정 형태는 물에서 제한된 용해도를 갖거나 용해 시 높은 점도를 나타낼 수 있다. 이러한 용액 특성은 비-치료적 물질의 제형, 취급, 저장, 펌핑, 및 성능에 대한 문제를 제시할 수 있으므로, 비-치료용 단백질 용액의 점도를 감소시키고 용해도 및 안정성을 개선시키는 방법이 필요하다.
- [0012] [0009] 단백질은 각각 고유하게 폴딩된 3-D 구조 및 표면 에너지 맵(소수성/친수성 영역 및 전하)을 갖는 복잡한 바이오폴리머이다. 농축된 단백질 용액에서, 이러한 거대분자는 이들의 정확한 모양 및 표면 에너지 분포에 따라 강하게 상호작용하고 심지어 복잡한 방식으로 맞물릴 수 있다. 강한 특정 상호작용에 대한 "핫-스팟"은 단백질 클러스터링을 유발하여 용액 점도를 증가시킨다. 이러한 문제를 해결하기 위해, 국소화된 상호작용 및 클러스터링을 방해함으로써 용액 점도를 감소시키는 것을 목적으로 하는 다수의 부형제 화합물이 생물요법 제형에 사용된다. 이러한 노력은, 종종 경험적으로, 개별적으로 조정되고, 때로는 인 실리코(in silico) 시뮬레이션에 의해 안내된다. 부형제 화합물의 조합이 제공될 수 있지만, 이러한 조합을 다시 최적화하는 것은 경험적으로 그리고 사례별 기준으로 진행되어야 한다.
- [0013] [0010] 비선형 조건 하에 주어진 농도에서 단백질 제형의 점도를 감소시키기 위한 진정으로 보편적인 접근법이 당 분야에 여전히 필요하다. 단백질의 활성을 보존하고 안정성 문제를 피하면서 이러한 점도 감소를 달성하는 것이 당 분야에 추가로 필요하다. 점도-감소 시스템을 조정 가능한 및 지속 방출 프로파일을 갖는 제형과 함께 사용하고 데포 주사에 적합한 제형과 함께 사용하도록 조정하는 것이 추가로 바람직할 것이다. 또한, 단백질 및 다른 바이오폴리머를 생산하기 위한 공정을 개선하는 것이 바람직하다.

발명의 내용

[0014] 발명의 개요

[0015] [0011] 구현예에서, 단백질, 및 장애 아민, 방향족 또는 음이온성 방향족, 작용성화된 아미노산, 올리고펩티드,

단쇄 유기산, 저분자량 지방족 다중산, 디온 및 설펜, 쯔비터이온성 부형제, 및 수소 결합 요소를 갖는 크라우딩제(crowding agent)로 이루어진 군으로부터 선택된 부형제 화합물을 포함하는 액체 제형으로서, 상기 부형제 화합물이 점도-감소량으로 첨가되는, 액체 제형이 본원에 개시된다. 구현예에서, 단백질은 폐길화 단백질(PEGylated protein)이고, 부형제는 저분자량 지방족 다중산이다. 구현예에서, 부형제 화합물은 장애 아민 화합물이다.

[0016] [0012] 구현예에서, 장애 아민은 암모늄 클로라이드, 암모늄 브로마이드, 암모늄 플루오라이드, 암모늄 아세테이트, 암모늄 시트레이트, 모노에탄올아민 하이드로클로라이드, 모노에탄올아민 하이드로브로마이드, 모노에탄올아민 하이드로플루오라이드, 모노에탄올아민 아세테이트, 모노에탄올아민 시트레이트, 디에탄올아민 하이드로클로라이드, 디에탄올아민 하이드로브로마이드, 디에탄올아민 하이드로플루오라이드, 디에탄올아민 아세테이트, 디에탄올아민 시트레이트, 트리에탄올아민 하이드로클로라이드, 트리에탄올아민 하이드로브로마이드, 트리에탄올아민 하이드로플루오라이드, 트리에탄올아민 아세테이트, 트리에탄올아민 시트레이트, 우레아 하이드로클로라이드, 우레아 하이드로브로마이드, 우레아 하이드로플루오라이드, 우레아 아세테이트, 및 우레아 시트레이트로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 구현예에서, 변형 아민은 암모니아 또는 암모늄 하이드록사이드의 컨쥬게이트 산이다. 구현예에서, 장애 아민 화합물은 암모니아 또는 암모늄 하이드록사이드의 컨쥬게이트 산이다.

[0017] [0013] 구현예에서, 제형은 약학적 조성물이고, 약학적 조성물은 치료용 단백질을 포함하고, 여기서 부형제 화합물은 약학적으로 허용되는 부형제 화합물이다. 구현예에서, 제형은 비-치료용 제형이고, 비-치료용 제형은 비-치료용 단백질을 포함한다. 구현예에서, 치료용 단백질은 베바시주맵, 트라스투주맵, 아달리루맵, 인플릭시맵, 에타너셉트, 다베포에틴 알파, 에포에틴 알파, 세특시맵, 페그필그라스티뮵, 필그라스티뮵, 및 리툽시맵으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 구현예에서, 부형제 화합물은 농축된 부형제 용액으로 제형화된다. 구현예에서, 점도-감소량은 제형의 점도를 대조 제형의 점도보다 낮은 점도로 감소시킨다. 구현예에서, 제형의 점도는 대조 제형의 점도보다 적어도 약 10% 낮거나, 대조 제형의 점도보다 적어도 약 30% 낮거나, 대조 제형의 점도보다 적어도 약 50% 낮거나, 대조 제형의 점도보다 적어도 약 70% 낮거나, 대조 제형의 점도보다 적어도 약 90% 낮다. 구현예에서, 점도는 약 100 cP 미만, 또는 약 50 cP 미만, 또는 약 20 cP 미만, 또는 약 10 cP 미만이다. 구현예에서, 부형제 화합물은 <5000 Da, 또는 <1500 Da, 또는 <500 Da의 분자량을 갖는다. 구현예에서, 제형은 적어도 약 1 mg/mL의 단백질, 또는 적어도 약 25 mg/mL의 단백질, 또는 적어도 약 50 mg/mL의 단백질, 또는 적어도 약 100 mg/mL의 단백질, 또는 적어도 약 200 mg/mL의 단백질을 함유한다. 구현예에서, 제형은 약 0.001 mg/mL 내지 약 60 mg/mL의 부형제 화합물을 포함하거나, 약 0.1 mg/mL 내지 약 50 mg/mL의 부형제 화합물을 포함하거나, 약 1 mg/mL의 내지 약 40 mg/mL의 부형제 화합물을 포함하거나, 약 5 mg/mL 내지 약 30 mg/mL의 부형제 화합물을 포함한다. 구현예에서, 제형은 대조 제형과 비교할 때 개선된 안정성을 갖는다. 개선된 안정성은 눈에 보이는 입자, 눈에 보이지 않는 입자, 응집체, 탁도, 유백광, 또는 겔의 형성의 감소로서 나타날 수 있다. 구현예에서, 제형은 개선된 안정성을 가지며, 여기서 개선된 안정성은 대조 제형과의 비교에 의해 결정되고, 대조 제형은 부형제 화합물을 함유하지 않는다. 구현예에서, 개선된 안정성은 광산란에 의해 측정하는 경우 입도의 증가를 방지한다. 구현예에서, 개선된 안정성은 대조 제형에서의 모노머 퍼센트보다 더 높은 모노머 퍼센트에 의해 나타나며, 여기서 모노머 퍼센트는 크기 배제 크로마토그래피에 의해 측정된다. 구현예에서, 부형제 화합물은 카페인일 수 있는 장애 아민이다. 구현예에서, 부형제 화합물은 장애 아민이다. 구현예에서, 장애 아민은 카페인, 테오필린, 티라민, 이미다졸, 아스파탐, 사카린, 아세실팜 포타슘, 피리미딘, 1,3-디메틸우라실, 트리아미노피리미딘, 피리미딘, 및 테아크린으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 구현예에서, 장애 아민은 카페인, 프로카인, 리도카인, 이미다졸, 아스파탐, 사카린, 및 아세실팜 포타슘이다. 구현예에서, 장애 아민은 카페인이다. 구현예에서, 장애 아민은 국소 주사 가능한 마취제 화합물이다. 장애 아민은 독립적인 약리학적 특성을 가질 수 있고, 장애 아민은 독립적인 약리학적 효과를 갖는 양으로 제형에 존재할 수 있다. 구현예에서, 장애 아민은 치료적 유효량 미만의 양으로 제형에 존재할 수 있다. 독립적인 약리학적 활성은 국소 마취 활성일 수 있다. 구현예에서, 독립적인 약리학적 활성을 갖는 장애 아민은 제형의 점도를 추가로 감소시키는 제2 부형제 화합물과 조합된다. 제2 부형제 화합물은 카페인, 테오필린, 티라민, 프로카인, 리도카인, 이미다졸, 아스파탐, 사카린, 및 아세실팜 포타슘으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 구현예에서, 제형은 보존제, 계면활성제, 당, 다당류, 아르기닌, 프롤린, 히알루로니다제, 안정화제, 가용화제, 공용매, 하이드로트로프, 및 완충제로 이루어진 군으로부터 선택된 추가 제제를 포함할 수 있다.

[0018] [0014] 추가로, 질병 또는 장애의 치료를 필요로 하는 포유동물에서 질병 또는 장애를 치료하는 방법으로서, 상기 포유동물에게 액체 치료용 제형을 투여함을 포함하고, 치료용 제형이 치료적 유효량의 치료용 단백질을 포함하고, 제형이 장애 아민, 방향족 물질 및 음이온성 방향족 물질, 작용성화된 아미노산, 올리고펩티드, 단쇄 유기산, 저분자량 지방족 다중산, 디온 및 설펜, 쯔비터이온성 부형제, 및 수소 결합 요소를 갖는 크라우딩제로

이루어진 군으로부터 선택된 약학적으로 허용되는 허용되는 부형제 화합물을 추가로 포함하고; 치료용 제형이 질병 또는 장애의 치료에 효과적인, 방법이 본원에 개시된다. 구현예에서, 치료용 단백질은 폐길화 단백질이고, 부형제는 변형 아민이다. 구현예에서, 변형 아민은 암모늄 클로라이드, 암모늄 브로마이드, 암모늄 플루오라이드, 암모늄 아세테이트, 암모늄 시트레이트, 모노에탄올아민 하이드로클로라이드, 모노에탄올아민 하이드로브로마이드, 모노에탄올아민 하이드로플루오라이드, 모노에탄올아민 아세테이트, 모노에탄올아민 시트레이트, 디에탄올아민 하이드로클로라이드, 디에탄올아민 하이드로브로마이드, 디에탄올아민 하이드로플루오라이드, 디에탄올아민 아세테이트, 디에탄올아민 시트레이트, 트리에탄올아민 하이드로클로라이드, 트리에탄올아민 하이드로브로마이드, 트리에탄올아민 하이드로플루오라이드, 트리에탄올아민 아세테이트, 트리에탄올아민 시트레이트, 우레아 하이드로클로라이드, 우레아 하이드로브로마이드, 우레아 하이드로플루오라이드, 우레아 아세테이트, 및 우레아 시트레이트로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 구현예에서, 변형 아민은 암모니아 또는 암모늄 하이드록사이드의 컨주게이트 산이다. 구현예에서, 단백질은 폐길화 단백질이고, 부형제 화합물은 저분자량 지방족 다중산이다. 구현예에서, 치료용 단백질은 폐길화 단백질이고, 부형제 화합물은 페놀 또는 폴리페놀일 수 있는 방향족 화합물이고, 폴리페놀은 탄닌산일 수 있다. 구현예에서, 부형제는 장애 아민이다. 구현예에서, 제형은 피하 주사, 또는 근육내 주사, 또는 정맥내 주사에 의해 투여된다. 구현예에서, 부형제 화합물은 치료용 제형에 점도-감소량으로 존재하고, 점도-감소량은 치료용 제형의 점도를 대조 제형의 점도보다 낮은 점도로 감소시킨다. 구현예에서, 부형제 화합물은 농축된 부형제 용액으로 제조된다. 구현예에서, 치료용 제형은 대조 제형과 비교할 때 개선된 안정성을 갖는다. 구현예에서, 부형제 화합물은 본질적으로 순수하다.

[0019] [0015] 구현예에서, 액체 단백질 제형의 안정성을 개선시키는 방법으로서, 치료용 단백질, 및 장애 아민, 방향족 물질 및 음이온성 방향족 물질, 작용성화된 아미노산, 올리고펩티드, 단쇄 유기산, 저분자량 지방족 다중산, 디온 및 설펜, 쯔비터이온성 부형제, 및 수소 결합 요소를 갖는 크라우딩제로 이루어진 군으로부터 선택된 군으로부터 선택된 부형제 화합물을 포함하고, 액체 단백질 제형이 대조 액체 단백질 제형과 비교하여 개선된 안정성을 나타내고, 대조 액체 단백질 제형이 부형제 화합물을 함유하지 않으며, 달리 액체 단백질 제형과 실질적으로 유사한, 방법이 본원에 개시된다. 구현예에서, 부형제 화합물은 농축된 부형제 용액으로 제형화된다. 액체 제형의 안정성은 가수분해, 광분해, 산화, 환원, 탈아미드화, 디설파이드 스크램블링, 단편화, 및 해리로 이루어진 군으로부터 선택된 화학 반응에 대한 저항성에 의해 나타나는 화학적 안정성일 수 있다. 액체 제형의 안정성은 저온 저장 조건 안정성, 실온 안정성 또는 상승된 온도 안정성일 수 있다. 액체 단백질 제형의 개선된 안정성은 대조 제형에서의 모노머 퍼센트보다 더 높은 모노머 퍼센트에 의해 나타날 수 있으며, 여기서 모노머 퍼센트는 크기 배제 크로마토그래피에 의해 측정된다. 액체 제형의 안정성은 기계적 안정성일 수 있으며, 이는 교반, 펌핑, 여과, 충전, 및 가스 버블 접촉으로 이루어진 군으로부터 선택된 응력 조건에 대한 개선된 저항성에 의해 나타날 수 있다.

[0020] [0016] 또한, 구현예에서, 단백질, 및 장애 아민, 방향족 또는 음이온성 방향족, 작용성화된 아미노산, 올리고펩티드, 단쇄 유기산, 저분자량 지방족 다중산, 디온 및 설펜, 쯔비터이온성 부형제, 및 수소 결합 요소를 갖는 크라우딩제로 이루어진 군으로부터 선택된 부형제 화합물을 포함하는 액체 제형으로서, 제형 중 부형제 화합물의 존재가 단백질 확산 상호작용 파라미터 kD, 또는 제2 비리얼 계수 B22에 의해 측정될 수 있는 보다 안정한 단백질-단백질 상호작용 또는 개선된 단백질-단백질 상호작용 특성을 야기하는, 액체 제형이 본원에 개시된다. 구현예에서, 제형은 치료용 제형이고, 치료용 단백질을 포함한다. 구현예에서, 제형은 비-치료용 제형이고, 비-치료용 제형은 치료용 단백질을 포함한다.

[0021] [0017] 본 발명은 또한 단백질 및 부형제 화합물을 포함하는 액체 제형을 포함하며, 여기서 부형제 화합물은 피리미딘이고, 부형제 화합물은 점도-감소량으로 첨가된다. 특정 양태에서, 피리미딘은 메틸-치환된 피리미딘이다. 피리미딘의 비-제한적인 예로는 피리미딘, 피리미딘, 트리아미노피리미딘, 1,3-디메틸우라실, 1-메틸우라실, 3-메틸우라실, 1,3-디에틸우라실, 5-메틸우라실, 6-메틸우라실, 우라실, 1,3-디메틸-테트라하이드 피리미딘, 티민, 1-메틸티민, 0-4-메틸티민, 1,3-디메틸티민, 디메틸티민 이량체, 테아크린, 사이토신, 5-메틸사이토신, 및 3-메틸사이토신이 있다. 특정의 구체적인 양태에서, 피리미딘은 1,3-디메틸우라실이다. 추가의 양태에서, 본 발명은 단백질, 및 3-아미노피리딘, 디사이클로민, 1-메틸-2-피롤리돈, 페닐세린, DL-3-페닐세린, 및 사이클로세린으로 이루어진 군으로부터 선택된 부형제 화합물을 포함하는 액체 제형으로서, 부형제 화합물이 점도-감소량으로 첨가되는, 액체 제형에 관한 것이다. 액체 제형은 약학적 조성물일 수 있고, 여기서 단백질은 치료용 단백질이고 부형제는 약학적으로 허용되는 부형제이다. 치료용 단백질의 예는 치료용 항체(예를 들어, 베바시주맵, 트라스투주맵, 아달리우맵, 인플릭시맵, 에타너셉트, 세툽시맵, 리툽시맵, 이필리우맵, 및 오말리주맵) 및 폐길화 단백질을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 대안적으로, 액체 제형은 비-치료용 제형일 수 있고, 여기서 단백질은 비-치료용 단백질이다. 본원에 개시된 액체 제형에서 부형제의 점도-감소량은 약 250

mg/ml 이하; 약 10 mg/mL 내지 약 200 mg/mL; 약 10 mg/mL 내지 약 120 mg/mL; 약 20 mg/mL 내지 약 120 mg/mL; 약 1 mg/mL 내지 약 100 mg/mL; 약 2 mg/mL 내지 약 80 mg/mL; 약 5 mg/mL 내지 약 50 mg/mL; 약 10 mg/mL 내지 약 40 mg/mL; 약 1 mM 내지 약 400 mM; 약 2 mM 내지 약 150 mM; 약 5 mM 내지 약 100 mM; 또는 약 15 mM 내지 약 50 mM일 수 있다. 추가의 양태에서, 부형제 화합물의 점도-감소량은 제형의 점도를 대조 제형의 점도보다 낮은 점도로 감소시키고, 여기서 대조 제형은 부형제를 함유하지 않지만 달리 치료용 제형과 건조 중량 기준으로 동일하고; 예를 들어, 액체 제형의 점도는 대조 제형의 점도보다 적어도 약 10%, 적어도 약 30%, 적어도 약 50%, 적어도 약 70%, 또는 적어도 약 90% 낮을 수 있다. 추가 양태에서, 액체 제형은 약 100 cP 미만, 약 50 cP 미만, 약 20 cP 미만, 또는 약 10 cP 미만의 점도를 갖는다. 또 다른 추가 양태에서, 액체 제형은 보존제, 계면활성제, 당, 다당류, 아르기닌, 프롤린, 히알루로니다제, 안정화제, 가용화제, 공용매, 하이드로트로프, 및 완충제로 이루어진 군으로부터 선택된 추가 제제를 포함한다.

[0022] [0018] 본 발명은 추가로 단백질, 예를 들어, 치료용 단백질 또는 비-치료용 단백질을 포함하는 액체 제형의 점도를 감소시키는 방법으로서, 본원에 기재된 바와 같은 점도-감소량의 피리미딘을 액체 제형에 첨가하는 것을 포함하는, 방법을 추가로 포함한다.

[0023] [0019] 또 다른 추가의 양태에서, 본 발명은 단백질, 예를 들어, 치료용 단백질 또는 비-치료용 단백질을 포함하는 액체 제형의 점도를 감소시키는 방법으로서, 액체 제형에 점도-감소량의 3-아미노피리딘, 디사이클로민, 1-메틸-2-피롤리돈, 페닐세린, DL-3-페닐세린, 및 사이클로세린으로 이루어진 군으로부터 선택된 부형제를 첨가하는 것을 포함하는, 방법에 관한 것이다.

[0024] [0020] 본 발명은 추가로 질병 또는 장애의 치료를 필요로 하는 포유동물에서 질병 또는 장애를 치료하는 방법으로서, 상기 포유동물에게 액체 치료용 제형을 투여하는 것을 포함하고, 액체 치료용 제형이 치료적 유효량의 치료용 단백질을 포함하고, 액체 치료용 제형이 점도-감소량의 약학적으로 허용되는 부형제 화합물을 추가로 포함하고, 부형제 화합물이 피리미딘이고; 치료용 제형이 질병 또는 장애의 치료에 효과적인, 방법을 포함한다.

[0025] [0021] 추가의 양태에서, 본 발명은 질병 또는 장애의 치료를 필요로 하는 포유동물에서 질병 또는 장애를 치료하는 방법으로서, 상기 포유동물에게 액체 치료용 제형을 투여하는 것을 포함하고, 액체 치료용 제형이 치료적 유효량의 치료용 단백질을 포함하고, 액체 치료용 제형이 점도-감소량의 3-아미노피리딘, 디사이클로민, 1-메틸-2-피롤리돈, 페닐세린, DL-3-페닐세린, 및 사이클로세린으로 이루어진 군으로부터 선택된 약학적으로 허용되는 부형제 화합물을 추가로 포함하고, 치료용 제형이 질병 또는 장애의 치료에 효과적인, 방법을 포함한다.

[0026] [0022] 추가로, 구현예에서, 단백질-관련 과정을 개선하는 방법으로서, 본원에 기재된 바와 같은 액체 제형을 제공하고, 이를 가공 방법에 사용하는 것을 포함하는, 방법이 본원에 개시된다. 구현예에서, 가공 방법은 여과, 펄핑, 혼합, 원심분리, 정제, 막 분리, 동결건조, 또는 크로마토그래피를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0027] [0023] 도 1은 동적 광산란에 의해 평가하는 경우, 응력 및 비-응력 조건 하에 단클론성 항체의 용액에 대한 입도 분포의 그래프를 나타낸다. 도 1의 데이터 곡선은 비교를 가능하게 하는 기준선 오프셋을 갖는다: 샘플 1-A에 대한 곡선은 100 강도 단위만큼 오프셋되고 샘플 1-FT에 대한 곡선은 Y-축에서 200 강도 단위만큼 오프셋된다.

[0024] 도 2는 동적 광산란에 의해 평가하는 경우, 여러 분자 집단에 대한 샘플 직경 대 멀티모달 크기 분포를 측정하는 그래프를 보여준다. 도 2의 데이터 곡선은 비교를 가능하게 하는 기준선 오프셋을 갖는다: 샘플 2-A에 대한 곡선은 100 강도 단위만큼 오프셋되고 샘플 2-FT에 대한 곡선은 Y-축에서 200 강도 단위만큼 오프셋된다.

[0025] 도 3은 8 내지 10 분 체류 시간에 주요 단량체 피크를 갖는 단클론성 항체 용액의 크기 배제 크로마토그램을 보여준다. 도 3의 데이터 곡선은 비교를 가능하게 하는 기준선 오프셋을 갖는다: 샘플 2-C, 2-A, 및 2-FT에 대한 곡선은 Y-축 방향으로 오프셋되어 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 상세한 설명

[0029] [0026] 농축된 단백질 용액의 전달을 가능하게 하는 이들의 생산 및 사용을 위한 제형 및 방법이 본원에 개시된다. 구현예에서, 본원에 개시된 접근법은 전형적인 단백질 용액과 비교하여 액체 제형에서 더 낮은 점도의 액체 제형 또는 더 높은 농도의 치료용 또는 비-치료용 단백질을 생성할 수 있다. 구현예에서, 본원에 개시된 접근법

은 전형적인 단백질 용액과 비교할 때 개선된 안정성을 갖는 액체 제형을 생성할 수 있다. 안정한 제형은 그 안에 함유된 단백질이 저온 저장 조건, 실온 조건, 또는 승온 저장 조건과 상관없이 저장 조건 하에 저장 시 이의 물리적 및 화학적 안정성 및 이의 치료적 또는 비-치료적 효능을 실질적으로 유지하는 제형이다. 유리하게는, 안정한 제형은 또한 그 안에 용해된 단백질의 응집 또는 침전에 대한 보호를 제공할 수 있다. 예를 들어, 저온 저장 조건은 냉장고 또는 냉동고에서의 저장을 수반할 수 있다. 일부 예에서, 저온 저장 조건은 10℃ 이하의 온도에서의 저장을 수반할 수 있다. 추가의 예에서, 저온 저장 조건은 약 2℃ 내지 약 10℃의 온도에서의 저장을 수반한다. 다른 예에서, 저온 저장 조건은 약 4℃의 온도에서의 저장을 수반한다. 추가의 예에서, 저온 저장 조건은 약 -20℃ 이하와 같은 동결 온도에서의 저장을 수반한다. 또 다른 예에서, 저온 저장 조건은 약 -20℃ 내지 약 0℃의 온도에서의 저장을 수반한다. 실온 저장 조건은 주위 온도, 예를 들어, 약 10℃ 내지 약 30℃에서의 저장을 수반할 수 있다. 상승된 저장 조건은 약 30℃ 초과 온도에서의 저장을 수반할 수 있다. 예를 들어, 약 30℃ 내지 약 50℃의 온도에서의 상승된 온도 안정성은 가속 노화 연구의 일부로서 전형적인 주변(10-30℃) 조건에서의 장기 저장을 예측하는 데 사용될 수 있다.

[0030] [0027] 용액 중의 단백질은 얽힌 사슬의 번역 이동성을 제한하고 단백질의 치료적 또는 비-치료적 효능을 방해할 수 있는 얽힘을 형성하는 경향이 있다는 것이 폴리머 과학 및 공학의 당업자에게 잘 알려져 있다. 구현예에서, 본원에 개시된 바와 같은 부형제 화합물은 용액에서 부형제 화합물과 표적 단백질 사이의 특이적 상호작용으로 인해 단백질 클러스터링을 억제할 수 있다. 본원에 개시된 바와 같은 부형제 화합물은 천연 또는 합성일 수 있고, 바람직하게는 FDA가 일반적으로 안전한 것으로 인정한 물질("GRAS")이다.

[0031] 1. 정의

[0032] [0028] 본 개시의 목적 상, 용어 "단백질"은 별개의 3차 구조를 생성하기에 충분히 긴 사슬 길이를 갖는, 전형적으로 1-3000 kDa의 분자량을 갖는 아미노산의 서열을 지칭한다. 일부 구현예에서, 단백질의 분자량은 약 50-200 kDa이고; 다른 구현예에서, 단백질의 분자량은 약 20-1000 kDa 또는 약 20-2000 kDa이다. 용어 "단백질"과 대조적으로, 용어 "펩티드"는 별개의 3차 구조를 갖지 않는 아미노산의 서열을 지칭한다. 매우 다양한 바이오폴리머가 용어 "단백질"의 범위 내에 포함된다. 예를 들어, 용어 "단백질"은 항체, 압타머, 융합 단백질, 폐길화 단백질, 합성 폴리펩티드, 단백질 단편, 지단백질, 효소, 구조 펩티드 등을 포함하는 치료용 또는 비-치료용 단백질을 지칭할 수 있다.

[0033] a. 치료용 바이오폴리머 정의

[0034] [0029] 치료 효과를 갖는 이러한 바이오폴리머는 "치료용 바이오폴리머"로 지칭될 수 있다. 치료 효과를 갖는 이러한 단백질은 "치료용 단백질"로 지칭될 수 있다. 치료용 제형에 함유된 치료용 단백질은 또한 이의 "단백질 활성 성분"으로 지칭될 수 있다.

[0035] [0030] 비-제한적 예로서, 치료용 단백질은 포유동물 단백질, 예컨대, 호르몬 및 프로호르몬(예를 들어, 인슐린 및 프로인슐린, 글루카곤, 칼시토닌, 티로이드 호르몬(T3 또는 T4 또는 티로이드-자극 호르몬), 파라티로이드 호르몬, 난포-자극 호르몬, 황체형성 호르몬, 성장 호르몬, 성장 호르몬 방출 인자 등); 응고 및 항응고 인자(예를 들어, 조직 인자, 폰 빌레브란트 인자, 인자 VIIIC, 인자 IX, 단백질 C, 플라스미노겐 활성화제(우로키나제, 조직형 플라스미노겐 활성화제), 트롬빈); 사이토카인, 케모카인 및 염증 매개체; 인터페론; 집락-자극 인자; 인터류킨(예를 들어, IL-1 내지 IL-10); 성장 인자(예를 들어, 혈관 내피 성장 인자, 섬유아세포 성장 인자, 혈소판-유래 성장 인자, 형질전환 성장 인자, 신경영양 성장 인자, 인슐린-유사 성장 인자 등); 알부민; 콜라겐 및 엘라스킨; 피브린 실란트; 조혈 인자(예를 들어, 에리트로포이에틴, 트롬보포이에틴 등); 골유도 인자(예를 들어, 골형성 단백질); 수용체(예를 들어, 인테그린, 카드헤린 등); 표면 막 단백질; 수송 단백질; 조절 단백질; 항원성 단백질(예를 들어, 항원으로 작용하는 바이러스 성분); 및 항체를 포함할 수 있다. 용어 "항체"는, 이의 가장 넓은 의미에서, 비제한적인 예로서 단클론성 항체(예를 들어, 면역글로불린 Fc 영역을 갖는 전장 항체 포함), 단쇄 분자, 이중-특이적 및 다중-특이적 항체, 디아바디, 항체-약물 컨쥬게이트, 폴리에피토프 특이성을 갖는 항체 조성물, 다클론성 항체(예컨대, 면역-손상된 환자에 대한 요법으로 사용되는 다클론성 면역글로불린), 및 항체의 단편(예를 들어, Fc, Fab, Fv 및 F(ab')₂ 포함)을 포함하는 것으로 본원에 사용된다. 항체는 또한 "면역글로불린"으로 지칭될 수 있다. 항체는 생물학적으로 중요한 물질인 특정 단백질 또는 비-단백질 "항원"에 대한 것으로 이해되며; 환자에게 치료적 유효량의 항체를 투여하는 것은 항원과 복합체를 형성함으로써, 환자가 치료 효과를 경험하도록 이의 생물학적 특성을 변경시킬 수 있다.

[0036] [0031] 구현예에서, 단백질은 폐길화되는데, 이는 이들이 폴리(에틸렌 글리콜)("PEG") 및/또는 폴리(프로필렌 글리콜)("PPG") 단위를 포함함을 의미한다. 폐길화 단백질, 또는 PEG-단백질 컨쥬게이트는 용해도, 약독학, 약

력학, 면역원성, 신장 청소율, 및 안정성과 같은 이의 유익한 특성으로 인해 치료 적용에서 유용성을 발견하였다. 폐길화 단백질의 비제한적인 예는 사이토카인, 호르몬, 호르몬 수용체, 세포 신호전달 인자, 응고 인자, 항체, 항체 단편, 펩티드, 압타머, 및 효소의 폐길화 버전이다. 구현예에서, 폐길화 단백질은 인터페론(PEG-IFN), 폐길화 항-혈관 내피 성장 인자(VEGF), 폐길화 인간 성장 호르몬(HGH), 폐길화 뮤테인 길항제, PEG 단백질 컨주게이트 약물, 아다젠, PEG-아데노신 데아미나제, PEG-우리카제, 페가스파가제, 폐길화 과립구 콜로니-자극 인자(GCSF), 페그필그라스티모, 페글로티카제, 페그비소멘트, 페갑타닙, 페기네사티드, 폐길화 적혈구생성-자극제, 폐길화 에포에틴- α , 폐길화 에포에틴- β , 메톡시 폴리에틸렌 글리콜-에포에틴 베타, 폐길화 항혈우병 인자 VIII, 폐길화 항혈우병 인자 IX, 및 세르톨리주맙 페글(Certolizumab pegol)일 수 있다.

[0037] [0032] 폐길화 단백질은 단백질과 하나 이상의 반응성 작용기를 갖는 PEG 시약의 반응과 같은 다양한 방법에 의해 합성될 수 있다. PEG 시약 상의 반응성 작용기는 리신, 히스티딘, 시스테인, 및 N-말단과 같은 표적화된 단백질 부위에서 단백질과의 연결을 형성할 수 있다. 전형적인 폐길화 시약은 단백질 상의 표적화된 아미노산 잔기와 특이적 반응성을 갖는 알데히드, 말레이미드, 또는 석신이미드기와 같은 반응성 작용기를 갖는다. 폐길화 시약은 약 1 내지 약 1000 개의 PEG 및/또는 PPG 반복 단위의 PEG 사슬 길이를 가질 수 있다. 폐길화의 다른 방법은 글리코-폐길화를 포함하며, 여기서 단백질은 먼저 글리코실화되고 이후 글리코실화된 잔기는 제2 단계에서 폐길화된다. 특정 폐길화 과정은 시알릴트랜스페라제 및 트랜스글루타미나제와 같은 효소에 의해 보조된다.

[0038] [0033] 폐길화 단백질은 천연의 비-폐길화 단백질에 비해 치료적 이점을 제공할 수 있지만, 이러한 물질은 이들을 정제, 용해, 여과, 농축 및 투여하기 어렵게 만드는 물리적 또는 화학적 특성을 가질 수 있다. 단백질의 폐길화는 천연 단백질과 비교하여 더 높은 용액 점도를 야기할 수 있고, 이는 일반적으로 더 낮은 농도의 폐길화 단백질 용액의 제형을 필요로 한다.

[0039] [0034] 단백질 치료제를 안정한 저점도 용액으로 제형화하여 이들이 최소 주사 부피로 환자에게 투여될 수 있도록 하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 약물의 피하(SC) 또는 근육내(IM) 주사는 일반적으로 작은 주사 부피, 바람직하게는 2 mL 미만을 필요로 한다. SC 및 IM 주사 경로는 자가-투여 치료에 매우 적합하며, 이는 직접적인 의학적 감독 하에서만 수행되는 정맥내(IV) 주사에 비해 비용이 덜 들고 접근 가능한 형태의 치료이다. SC 또는 IM 주사용 제형은 최소의 주사력으로 혈-게이지 바늘을 통한 치료 용액의 용이한 흐름을 허용하기 위해 일반적으로 30 cP 미만, 및 바람직하게는 20 cP 미만의 낮은 용액 점도를 필요로 한다. 작은 주사 부피와 낮은 점도 요건의 이러한 조합은 SC 또는 IM 주사 경로에서 폐길화 단백질 치료제의 사용에 대한 난제를 제기한다.

[0040] [0035] "치료"는 증상의 발병을 예방 또는 지연시키고/시키거나 장애의 증상을 경감시키거나 개선시키는 것을 포함하여, 장애를 치료, 치유, 경감, 개선, 구제하거나 달리 이에 유리하게 영향을 미치기 위해 의도된 임의의 조치를 포함한다. 치료를 필요로 하는 그러한 환자는 이미 특정 장애가 있는 환자와 장애의 예방이 바람직한 환자 둘 모두를 포함한다. 장애는 급성 또는 만성 질병, 또는 포유동물을 급성 또는 만성 질병에 걸리게 하는 병리학적 상태를 포함하는 포유동물의 항상성 웰빙을 변화시키는 임의의 상태이다. 장애의 비-제한적인 예는 암, 대사 장애(예를 들어, 당뇨병), 알레르기 장애(예를 들어, 천식), 피부 장애, 심혈관 장애, 호흡기 장애, 혈액 장애, 근골격 장애, 염증성 또는 류마티스 장애, 자가면역 장애, 위장 장애, 비뇨기과 장애, 성 및 생식 장애, 신경계 장애 등을 포함한다. 치료 목적을 위한 "포유동물"은 인간, 가축, 애완용 동물, 농장 동물, 스포츠 동물, 일하는 동물 등을 포함하는 포유동물로 분류되는 임의의 동물을 지칭할 수 있다. 따라서, "치료"는 수의학적 및 인간 치료 둘 모두를 포함할 수 있다. 편의상, 이러한 "치료"를 받는 포유동물은 "환자"로 지칭될 수 있다. 특정 구현예에서, 환자는 자궁 내 태아 동물을 포함하는 임의의 연령일 수 있다.

[0041] [0036] 치료적 유효량의 치료용 단백질을 함유하는 제형은 "치료용 제형"으로 지칭될 수 있다. 구현예에서, 치료는 치료적 유효량의 치료용 제형을 이를 필요로 하는 포유동물에게 제공하는 것을 포함한다. "치료적 유효량"은 기존 장애의 치료 또는 예상되는 장애의 예방을 달성하기 위해 이를 필요로 하는 포유동물에게 투여되는 치료용 단백질의 적어도 최소 농도이다(이러한 치료 또는 이러한 예방은 "치료적 개입"임). 치료용 제형에 활성 성분으로서 포함될 수 있는 다양한 치료용 단백질의 치료적 유효량은 당 분야에 익숙할 수 있거나; 이하에서 발견되거나 치료적 개입에 적용되는 치료용 단백질의 경우, 치료적 유효량은 단지 통상적인 실험을 이용하여 당업자에 의해 수행되는 표준 기술에 의해 결정될 수 있다. 구현예에서, 치료용 제형은 다른 선택적 성분과 함께 또는 없이 치료적 유효량의 단백질 활성 성분 및 부형제를 포함한다.

[0042] b. 비-치료용 바이오폴리머 정의

[0043] [0037] 비-치료적 목적(즉, 치료를 포함하지 않는 목적), 예컨대, 가정용, 영양, 상업적 및 산업적 적용을 위해 사용되는 이러한 바이오폴리머는 "비-치료용 바이오폴리머"로 지칭될 수 있다. 비-치료용 목적으로 사용되는 이

러한 단백질은 "비-치료용 단백질"로 지칭될 수 있다. 비-치료용 단백질을 함유하는 제형은 "비-치료용 제형"으로 지칭될 수 있다. 비-치료용 단백질은 식물 공급원, 동물 공급원으로부터 유래되거나 세포 배양물로부터 생산될 수 있고; 이들은 또한 효소 또는 구조 단백질일 수 있다. 비-치료용 단백질은 촉매, 인간 및 동물 영양, 가공 보조제, 세정제, 및 폐기물 처리와 같은 가정, 영양, 상업적 및 산업적 적용에 사용될 수 있다.

[0044] [0038] 비-치료용 단백질의 중요한 카테고리는 효소의 카테고리이다. 효소는, 예를 들어, 촉매, 인간 및 동물 영양 성분, 가공 보조제, 세정제, 및 폐기물 처리제로서 다수의 비-치료적 용도를 갖는다. 효소 촉매는 다양한 화학 반응을 촉진시키는 데 사용된다. 비-치료적 용도를 위한 효소 촉매의 예는 카탈라제, 옥시도리덕타제, 트랜스페라제, 하이드롤라제, 리아제, 이소머라제, 및 리가제를 포함한다. 효소의 인간 및 동물 영양 용도는 뉴트라수티컬, 단백질의 영양 공급원, 미량영양소의 킬레이트화 또는 제어 전달, 소화 보조제, 및 보충물을 포함하고; 이들은 아밀라제, 프로테아제, 트립신, 락타제 등으로부터 유래될 수 있다. 효소 가공 보조제는 베이킹, 양조, 발효, 주스 가공, 및 포도주 양조와 같은 작업에서 식품 및 음료 제품의 생산을 개선하기 위해 사용된다. 이러한 식품 및 음료 가공 보조제의 예는 아밀라제, 셀룰라제, 펙티나제, 글루카나제, 리파제, 및 락타제를 포함한다. 효소는 또한 바이오연료의 생산에 사용될 수 있다. 예를 들어, 바이오연료용 에탄올은, 예를 들어, 셀룰로스 및 리그노셀룰로스 물질과 같은 바이오매스 공급원료의 효소적 분해에 의해 보조될 수 있다. 이러한 공급원료 물질을 셀룰라제 및 리그니나제로 처리하면 바이오매스가 연료로 발효될 수 있는 기질로 변형된다. 다른 상업적 적용에서, 효소는 세제, 세정제, 및 세탁, 접시 세척, 표면 세척, 및 장비 세척 적용을 위한 얼룩 제거 보조제로서 사용된다. 이러한 목적을 위한 전형적인 효소는 프로테아제, 셀룰라제, 아밀라제, 및 리파제를 포함한다. 또한, 비-치료용 효소는 셀룰라제에 의한 텍스타일 연화, 가죽 가공, 폐기물 처리, 오염된 침전물 처리, 수처리, 펄프 표백, 및 펄프 연화 및 탈갈합과 같은 다양한 상업적 및 산업적 공정에 사용된다. 이러한 목적을 위한 전형적인 효소는 아밀라제, 자일라나제, 셀룰라제, 및 리그니나제이다.

[0045] [0039] 비-치료용 바이오폴리머의 다른 예는 섬유질 또는 구조 단백질, 예컨대, 케라틴, 콜라겐, 젤라틴, 엘라스틴, 피브로인, 액틴, 튜불린, 또는 이들의 가수분해, 분해, 또는 유도체화된 형태를 포함한다. 이러한 물질은 젤라틴, 아이스크림, 요구르트, 및 과자와 같은 식품 성분의 제조 및 제형화에 사용되며; 이들은 또한 증점제, 레올로지 개질제, 식감 개선제, 및 영양 단백질의 공급원으로서 식품에 첨가된다. 화장품 및 퍼스널 케어 산업에서, 콜라겐, 엘라스틴, 케라틴, 및 가수분해된 케라틴은 피부 케어 및 헤어 케어 제형의 성분으로 널리 사용된다. 비-치료용 바이오폴리머의 또 다른 예는 베타-락토글로불린, 알파-락트알부민, 및 혈청 알부민과 같은 유청 단백질이다. 이러한 유청 단백질은 낙농 작업으로부터 부산물로서 대량 생산되며 다양한 비-치료적 적용에 사용되어 왔다.

[0046] 2. 측정

[0047] [0040] 구현예에서, 본원에 기재된 단백질-함유 제형은 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 분석에 의해 측정 시 단량체 손실에 저항성이다. 본원에서 사용되는 SEC 분석에서, 주요 분석물 피크는 일반적으로 제형에 함유된 표적 단백질과 연관되며, 단백질의 이러한 주요 피크는 단량체 피크로 지칭된다. 단량체 피크는 응집된(이량체, 삼량체, 올리고머 등) 또는 단편화된 상태와 대조적으로, 단량체 상태의 표적 단백질, 예를 들어, 단백질 활성 성분의 양을 나타낸다. 단량체 피크 면적은 표적 단백질과 관련된 단량체, 응집체, 및 단편 피크의 총 면적과 비교될 수 있다. 따라서, 단백질-함유 제형의 안정성은 경과된 시간 후 단량체의 상대량에 의해 관찰될 수 있고; 따라서, 본 발명의 단백질-함유 제형의 안정성 개선은 부형제를 함유하지 않는 대조 제형에서의 모노머 퍼센트와 비교하여, 특정 경과 시간 후 더 높은 모노머 퍼센트로서 측정될 수 있다.

[0048] [0041] 구현예에서, 이상적인 안정성 결과는 SEC 분석에 의해 결정하는 경우 98 내지 100%의 단량체 피크를 갖는 것이다. 구현예에서, 본 발명의 단백질-함유 제형의 안정성의 개선은 응력 조건에 노출된 후 부형제를 함유하지 않는 대조 제형에서의 단량체 퍼센트와 비교하여 그러한 대조 제형이 동일한 응력 조건에 노출되는 경우 더 높은 퍼센트의 단량체로서 측정될 수 있다. 구현예에서, 응력 조건은 저온 저장, 고온 저장, 공기에 대한 노출, 가스 버블에 대한 노출, 전단 조건에 대한 노출, 또는 동결/해동 사이클에 대한 노출일 수 있다.

[0049] [0042] 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 단백질-함유 제형은 동적 광 산란(DLS) 분석에 의해 측정하는 경우 단백질 입도의 증가에 저항성이 있다. DLS 분석에서, 본원에서 사용되는 바와 같이, 단백질-함유 제형에서 단백질의 입도는 중간 입경으로서 관찰될 수 있다. 이상적으로, 표적 단백질의 중간 입경은 DLS 분석에 적용될 때 비교적 변하지 않아야 하는데, 이는 입자 직경이 응집된(이량체, 삼량체, 올리고머 등) 또는 단편화된 상태와 대조적으로 단량체 상태의 활성 성분을 나타내기 때문이다. 중간 입경의 증가는 응집된 단백질을 나타낼 수 있다. 따라서, 단백질-함유 제형의 안정성은 경과 시간 후 중간 입경의 상대적 변화에 의해 관찰될 수 있다.

[0050] [0043] 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 단백질-함유 제형은 동적 광 산란(DLS) 분석에 의해 측정하는 경우 다분산 입도 분포를 형성하는 데 저항성이다. 구현예에서, 단백질-함유 제형은 콜로이드성 단백질 입자의 다분산 입도 분포를 함유할 수 있다. 구현예에서, 이상적인 안정성 결과는 제형의 초기 중간 입경과 비교하여 중간 입경에서 10% 미만의 변화를 갖는 것이다. 구현예에서, 본 발명의 단백질-함유 제형의 안정성의 개선은 부형제를 함유하지 않는 대조 제형에서의 중간 입경과 비교하여 소정의 경과 시간 후 중간 입경의 하위 변화 퍼센트로서 측정될 수 있다. 구현예에서, 본 발명의 단백질-함유 제형의 안정성의 개선은 응력 조건에 노출된 후 부형제를 함유하지 않는 대조 제형에서의 중간 입경의 변화 퍼센트와 비교하여 그러한 대조 제형이 동일한 응력 조건에 노출되는 경우 중간 입경의 더 낮은 변화 퍼센트로서 측정될 수 있다. 구현예에서, 응력 조건은 저온 저장, 고온 저장, 공기에 대한 노출, 가스 버블에 대한 노출, 진단 조건에 대한 노출, 또는 동결/해동 사이클에 대한 노출일 수 있다. 구현예에서, 본 발명의 단백질-함유 제형 치료용 제형의 안정성의 개선은 대조 제형이 동일한 응력 조건에 노출될 때 부형제를 함유하지 않는 대조 제형에서의 입도 분포의 다분산성과 비교하여 DLS에 의해 측정하는 경우 덜 다분산성 입도 분포로서 측정될 수 있다.

[0051] [0044] 구현예에서, 본 발명의 단백질-함유 제형은 탁도, 광산란, 및/또는 입자 계수 분석에 의해 측정하는 경우 침전에 저항성이다. 탁도, 광산란, 또는 입자 계수 분석에서, 더 낮은 값은 일반적으로 제형에서 더 적은 수의 현탁 입자를 나타낸다. 탁도, 광산란, 또는 입자 계수의 증가는 표적 단백질의 용액이 안정하지 않다는 것을 나타낼 수 있다. 따라서, 단백질-함유 제형의 안정성은 경과 시간 후 탁도, 광산란, 또는 입자 계수의 상대량에 의해 관찰될 수 있다. 구현예에서, 이상적인 안정성 결과는 낮고 비교적 일정한 탁도, 광산란, 또는 입자 계수 값을 갖는 것이다. 구현예에서, 본 발명의 단백질-함유 제형의 안정성 개선은 부형제를 함유하지 않는 대조 제형의 탁도, 광산란, 또는 입자 수 값과 비교하여, 특정 경과 시간 후 더 낮은 탁도, 더 낮은 광산란, 또는 더 적은 입자 수로서 측정될 수 있다. 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 단백질-함유 제형의 안정성 개선은 대조 제형이 동일한 응력 조건에 노출될 때 부형제를 함유하지 않는 대조 제형의 탁도, 광산란 또는 입자와 비교하여 응력 조건에 노출 후 더 낮은 탁도, 더 낮은 광산란, 또는 더 적은 입자 수로서 측정될 수 있다. 구현예에서, 응력 조건은 저온 저장, 고온 저장, 공기에 대한 노출, 가스 버블에 대한 노출, 진단 조건에 대한 노출, 또는 동결/해동 사이클에 대한 노출일 수 있다.

[0052] 3. 치료용 제형

[0053] [0045] 일 양태에서, 본원에 개시된 제형 및 방법은 치료적 유효량의 치료용 단백질 및 부형제 화합물을 포함하는 개선된 또는 감소된 점도의 안정한 액체 제형을 제공한다. 구현예에서, 제형은 허용되는 농도의 활성 성분 및 허용되는 점도를 제공하면서 안정성을 개선할 수 있다. 구현예에서, 제형은 대조 제형과 비교할 때 안정성의 개선을 제공하고; 본 개시의 목적 상, 대조 제형은 부형제 화합물이 없는 것을 제외하고는 모든 면에서 치료용 제형과 건조 중량 기준으로 실질적으로 유사하거나 동일한 단백질 활성 성분을 함유하는 제형이다. 구현예에서, 제형은 장기 저장, 25-45℃와 같은 상승된 온도, 동결/해동 조건, 진단 또는 혼합, 주사, 희석, 가스 버블 노출, 산소 노출, 광 노출, 및 동결건조의 응력 조건 하에 안정성의 개선을 제공한다. 구현예에서, 단백질-함유 제형의 개선된 안정성은 대조 제형과 비교하여 더 낮은 백분율의 가용성 응집체, 미립자, 눈에 보이지 않는 입자, 또는 겔 형성의 형태이다. 구현예에서, 단백질-함유 제형의 개선된 안정성은 대조 제형과 비교하여 더 높은 생물학적 활성의 형태이다. 구현예에서, 단백질-함유 제형의 개선된 안정성은 화학적 반응, 예컨대, 가수분해, 광분해, 산화, 환원, 탈아미드화, 디설파이드 스캐램블링, 단편화, 또는 해리에 대한 저항성과 같은 개선된 화학적 안정성의 형태이다. 구현예에서, 단백질-함유 제형의 개선된 안정성은 눈에 보이는 입자, 눈에 보이지 않는 입자, 응집체, 탁도, 유백광, 또는 겔의 형성의 감소에 의해 나타난다.

[0054] [0046] 액체 단백질 제형의 점도는 단백질 자체(예를 들어, 효소, 항체, 수용체, 융합 단백질 등)의 성질; 이의 크기, 3차원 구조, 화학적 조성, 및 분자량; 제형 중 이의 농도; 단백질 이외의 제형의 성분; 원하는 pH 범위; 제형을 위한 저장 조건; 및 제형을 환자에게 투여하는 방법을 포함하지만, 이로 제한되지 않는 다양한 요인들에 의해 영향을 받을 수 있는 것으로 이해된다. 본원에 기재된 부형제 화합물과 함께 사용하기에 가장 적합한 치료용 단백질은 바람직하게는 본질적으로 순수하며, 즉, 오염 단백질이 없다. 구현예에서, "본질적으로 순수한" 치료용 단백질은, 모두 조성물 중 치료용 단백질 및 오염 단백질의 총 중량을 기준으로, 적어도 90 중량%의 치료용 단백질, 또는 바람직하게는 적어도 95 중량%의 치료용 단백질, 또는 더욱 바람직하게는 적어도 99 중량%의 치료용 단백질을 포함하는 단백질 조성물이다. 명확성의 목적 상, 부형제로서 첨가된 단백질은 이러한 정의에 포함되는 것으로 의도되지 않는다. 본원에 기재된 치료용 제형은 약학적-등급 제형, 즉, 제형이 투여되는 포유동물에 독성이 있는 성분을 함유하지 않으면서 단백질 활성 성분의 요망되는 치료 효능이 달성될 수 있는 형태로 포유동물을 치료하는 데 사용하도록 의도된 제형으로서 사용하기 위해 의도된 제형이다.

- [0055] [0047] 구현예에서, 치료용 제형은 적어도 1 mg/mL의 단백질 활성 성분을 함유한다. 다른 구현예에서, 치료용 제형은 적어도 10 mg/mL의 단백질 활성 성분을 함유한다. 다른 구현예에서, 치료용 제형은 적어도 25 mg/mL의 단백질 활성 성분을 함유한다. 다른 구현예에서, 치료용 제형은 적어도 100 mg/mL의 단백질 활성 성분을 함유한다. 다른 구현예에서, 치료용 제형은 적어도 200 mg/mL의 단백질 활성 성분을 함유한다. 추가의 다른 구현예에서, 치료용 제형 용액은 적어도 300 mg/mL의 단백질 활성 성분을 함유한다. 일반적으로, 본원에 개시된 부형제 화합물은 약 0.001 내지 약 60 mg/mL의 양으로 치료용 제형에 첨가된다. 구현예에서, 부형제 화합물은 약 0.1 내지 약 50 mg/mL의 양으로 첨가될 수 있다. 구현예에서, 부형제 화합물은 약 1 내지 약 40 mg/mL의 양으로 첨가될 수 있다. 구현예에서, 부형제는 약 5 내지 약 30 mg/mL의 양으로 첨가될 수 있다.
- [0056] [0048] 특정 구현예에서, 치료용 제형 용액은 적어도 300 mg/mL의 단백질 활성 성분을 함유한다. 특정 양태에서, 본원에 개시된 부형제 화합물은 약 1 내지 약 300 mg/mL의 양, 또는 약 5 내지 약 300 mg/mL의 양으로 치료용 제형에 첨가된다. 구현예에서, 부형제 화합물은 약 10 내지 약 200 mg/mL의 양으로 첨가될 수 있다. 구현예에서, 부형제 화합물은 약 5 내지 약 100 mg/mL, 또는 약 20 내지 약 100 mg/mL의 양으로 첨가될 수 있다. 구현예에서, 부형제 화합물은 약 10 내지 약 75 mg/mL, 또는 약 20 내지 약 75 mg/mL의 양으로 첨가될 수 있다. 구현예에서, 부형제는 약 15 내지 약 50 mg/mL의 양으로 첨가될 수 있다.
- [0057] [0049] 다양한 분자량의 부형제 화합물은 제형에서 단백질 활성 성분과 조합될 때 특정 유리한 특성을 위해 선택된다. 부형제 화합물을 포함하는 치료용 제형의 예는 하기에 제공된다. 구현예에서, 부형제 화합물은 <5000 Da의 분자량을 갖는다. 구현예에서, 부형제 화합물은 <1000 Da의 분자량을 갖는다. 구현예에서, 부형제 화합물은 <500 Da의 분자량을 갖는다.
- [0058] [0050] 구현예에서, 본원에 개시된 부형제 화합물은 점도-감소량으로 치료용 제형에 첨가된다. 구현예에서, 점도-감소량은 대조 제형과 비교할 때 제형의 점도를 적어도 10% 감소시키는 부형제 화합물의 양이고; 본 개시의 목적 상, 대조 제형은 부형제 화합물이 없는 것을 제외하고는 모든 면에서 치료용 제형과 건조 중량 기준으로 실질적으로 유사하거나 동일한 단백질 활성 성분을 함유하는 제형이다. 구현예에서, 점도-감소량은 대조 제형과 비교할 때 제형의 점도를 적어도 30% 감소시키는 부형제 화합물의 양이다. 구현예에서, 점도-감소량은 대조 제형과 비교할 때 제형의 점도를 적어도 50% 감소시키는 부형제 화합물의 양이다. 구현예에서, 점도-감소량은 대조 제형과 비교할 때 제형의 점도를 적어도 70% 감소시키는 부형제 화합물의 양이다. 구현예에서, 점도-감소량은 대조 제형과 비교할 때 제형의 점도를 적어도 90% 감소시키는 부형제 화합물의 양이다.
- [0059] [0051] 구현예에서, 점도-감소량은 100 cP 미만의 점도를 갖는 치료용 제형을 생성한다. 다른 구현예에서, 치료용 제형은 50 cP 미만의 점도를 갖는다. 다른 구현예에서, 치료용 제형은 20 cP 미만의 점도를 갖는다. 다른 구현예에서, 치료용 제형은 10 cP 미만의 점도를 갖는다. 본원에서 사용되는 용어 "점도"는 본원에 개시된 방법에 의해 측정하는 경우의 동적 점도 값을 지칭한다.
- [0060] [0052] 구현예에서, 치료용 제형은 고농도의 치료용 단백질로 환자에게 투여된다. 본원에 기재된 부형제 화합물로 제형화된 치료용 단백질의 고농도 용액은 주사기 또는 사전-충전 주사기를 사용하여 환자에게 투여될 수 있다. 구현예에서, 치료용 제형은 치료용 부형제가 없는 유사한 제형으로 경험될 것보다 더 적은 주사 부피로 및/또는 덜 불편하게 환자에게 투여된다. 구현예에서, 치료용 제형은 더 좁은 게이지 바늘, 또는 치료용 부형제가 없는 유사한 제형으로 요구될 더 적은 주사기 힘을 사용하여 환자에게 투여된다. 구현예에서, 치료용 제형은 데포 주사로 투여된다. 구현예에서, 치료용 제형은 체내에서 치료용 단백질의 반감기를 연장시킨다. 본원에 개시된 바와 같은 치료용 제형의 이러한 특징은 임상 상황, 즉, 근육내 주사의 환자 허용도가 IM/SC 용도 및 허용 가능한(예를 들어, 2-3 cc) 주사 부피의 사용에 전형적인 소구경 바늘의 사용을 포함하는 상황, 및 이러한 조건이 단일 주사 부위에서 단일 주사로 유효량의 제형의 투여를 야기하는 상황에서 근육내 또는 피하 주사에 의한 이러한 제형의 투여를 가능하게 할 것이다. 대조적으로, 통상적인 제형 기술을 사용한 필적 가능한 투여량의 치료용 단백질의 주사는 통상적인 제형의 더 높은 점도에 의해 제한될 것이고, 따라서 통상적인 제형의 SC/IM 주사는 임상 상황에 적합하지 않을 것이다.
- [0061] [0053] 본 개시에 따른 치료용 제형은 개선된 안정성과 일치하는 특정 유리한 특성을 가질 수 있다. 구현예에서, 치료용 제형은 전단 분해, 상 분리, 클라우딩 아웃, 침전, 산화, 탈아미드화, 응집, 및/또는 변성에 대해 저항성이다. 구현예에서, 치료용 제형은 대조 제형과 비교하여 더 효과적으로 가공, 정제, 저장, 주사, 투여, 여과, 및/또는 원심분리된다.
- [0062] [0054] 구현예에서, 본원에 개시된 치료용 제형은 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 분석에 의해 측정 시 단량체

손실에 저항성이다. SEC 분석에서, 주요 분석물 피크는 일반적으로 치료용 단백질과 같은 제형의 활성 성분과 연관되며, 활성 성분의 이러한 주요 피크는 단량체 피크로 지칭된다. 단량체 피크는 응집된(이량체, 삼량체, 올리고머 등) 단백질과 대조적으로, 단량체 상태의 활성 성분의 양을 나타낸다. 따라서, 치료용 제형의 안정성은 경과 시간 후 단량체의 상대량에 의해 관찰될 수 있다. 구현예에서, 본원에 개시된 바와 같은 치료용 제형의 안정성의 개선은 부형제를 함유하지 않는 대조 제형에서의 단량체 퍼센트와 비교하여 소정의 경과 시간 후 상위 단량체 퍼센트로서 측정될 수 있다. 구현예에서, 본원에 개시된 바와 같은 치료용 제형의 안정성의 개선은 응력 조건에 대한 노출 후 부형제를 함유하지 않는 대조 제형에서의 단량체 퍼센트와 비교하여 응력 조건에 대한 노출 후 상위 단량체 퍼센트로서 측정될 수 있다. 구현예에서, 본 발명의 치료용 제형은 동적 광 산란(DLS) 분석에 의해 측정하는 경우 단백질 입도의 증가에 저항성이 있다. DLS 분석에서, 치료용 단백질의 입도는 중간 입경으로서 관찰될 수 있다. 이상적으로, 치료용 단백질의 중간 입경은 비교적 변하지 않아야 한다. 따라서, 중간 입경의 증가는 응집된 단백질을 나타낼 수 있다. 따라서, 치료용 제형의 안정성은 경과 시간 후 중간 입경의 상대적 변화에 의해 관찰될 수 있다. 구현예에서, 본원에 개시된 바와 같은 치료용 제형은 동적 광 산란(DLS) 분석에 의해 측정하는 경우 다분산 입도 분포를 형성하는 데 저항성이다. 구현예에서, 본 발명의 치료용 제형의 안정성의 개선은 부형제를 함유하지 않는 대조 제형에서의 중간 입경과 비교하여 소정의 경과 시간 후 중간 입경의 하위 변화 퍼센트로서 측정될 수 있다. 구현예에서, 본원에 개시된 바와 같은 치료용 제형의 안정성의 개선은 부형제를 함유하지 않는 대조 제형에서의 중간 입경의 변화 퍼센트와 비교하여 응력 조건에 대한 노출 후 중간 입경의 더 낮은 변화 퍼센트로서 측정될 수 있다. 다시 말해서, 구현예에서, 개선된 안정성은 광산란에 의해 측정하는 경우 입도의 증가를 방지한다. 구현예에서, 응력 조건은 저온 저장, 고온 저장, 공기에 대한 노출, 가스 버블에 대한 노출, 진단 조건에 대한 노출, 또는 동결/해동 사이클에 대한 노출일 수 있다. 구현예에서, 본원에 개시된 바와 같은 치료용 제형의 안정성의 개선은 부형제를 함유하지 않는 대조 제형에서의 입도 분포의 다분산성과 비교하여 DLS에 의해 측정하는 경우 더 적은 다분산성 입도 분포로서 측정될 수 있다.

[0063] [0055] 구현예에서, 본원에 개시된 바와 같은 치료용 제형은 탁도, 광산란, 또는 입자 계수 분석에 의해 측정하는 경우 침전에 저항성이다. 구현예에서, 본원에 개시된 바와 같은 치료용 제형의 안정성 개선은 부형제를 함유하지 않는 대조 제형의 탁도, 광산란, 또는 입자 수 값과 비교하여, 특정 경과 시간 후 더 낮은 탁도, 더 낮은 광산란, 또는 더 적은 입자 수로서 측정될 수 있다. 구현예에서, 본원에 개시된 바와 같은 치료용 제형의 안정성 개선은 부형제를 함유하지 않는 대조 제형의 탁도, 광산란, 또는 입자 수 값과 비교하여, 응력 조건에 대한 노출 후 더 낮은 탁도, 더 낮은 광산란, 또는 더 적은 입자 수로서 측정될 수 있다. 구현예에서, 응력 조건은 저온 저장, 고온 저장, 공기에 대한 노출, 가스 버블에 대한 노출, 진단 조건에 대한 노출, 또는 동결/해동 사이클에 대한 노출일 수 있다.

[0064] [0056] 구현예에서, 치료용 부형제는 산화적 손상에 대해 치료용 단백질을 안정화시키는 항산화제 특성을 갖는다. 구현예에서, 치료용 제형은 치료용 단백질에 대한 역가의 상당한 손실 없이 주위 온도에서, 또는 냉장고 조건에서 연장된 시간 동안 저장된다. 구현예에서, 치료용 제형은 필요할 때까지 저장을 위해 건조되고; 이후 적절한 용매, 예를 들어, 물로 재구성된다. 유리하게는, 본원에 기재된 바와 같이 제조된 제형은 수개월 내지 수년의 장기간에 걸쳐 안정할 수 있다. 예외적으로 긴 저장 기간이 요망되는 경우, 제형은 단백질 변성에 대한 우려 없이 냉동고에서 보존될 수 있다(그리고 나중에 재활성화될 수 있다). 구현예에서, 제형은 냉장을 필요로 하지 않는 장기 저장을 위해 제조될 수 있다.

[0065] [0057] 구현예에서, 본원에 개시된 부형제 화합물은 안정성-개선량으로 치료용 제형에 첨가된다. 구현예에서, 안정성-개선량은 대조 제형과 비교할 때 제형의 변성을 적어도 10% 감소시키는 부형제 화합물의 양이고; 본 개시의 목적 상, 대조 제형은 부형제 화합물이 없는 것을 제외하고는 치료용 제형과 건조 중량 기준으로 실질적으로 유사한 단백질 활성 성분을 함유하는 제형이다. 구현예에서, 안정성-개선량은 대조 제형과 비교할 때 제형의 변성을 적어도 30% 감소시키는 부형제 화합물의 양이다. 구현예에서, 안정성-개선량은 대조 제형과 비교할 때 제형의 변성을 적어도 50% 감소시키는 부형제 화합물의 양이다. 구현예에서, 안정성-개선량은 대조 제형과 비교할 때 제형의 변성을 적어도 70% 감소시키는 부형제 화합물의 양이다. 구현예에서, 안정성-개선량은 대조 제형과 비교할 때 제형의 변성을 적어도 90% 감소시키는 부형제 화합물의 양이다.

[0066] [0058] 치료용 제형을 제조하기 위한 방법은 당업자에게 익숙할 수 있다. 본 발명의 치료용 제형은, 예를 들어, 치료용 단백질이 용액에 첨가되기 전 또는 후에 부형제 화합물을 제형에 첨가함으로써 제조될 수 있다. 치료용 제형은, 예를 들어, 치료용 단백질 및 부형제를 제1(더 낮은) 농도로 조합한 후 여과 또는 원심분리에 의해 처리되어 제2(더 높은) 농도의 치료용 단백질을 생산함으로써 생산될 수 있다. 치료용 제형은 카오토트로프, 코스모트로프, 하이드로트로프, 및 염을 갖는 하나 이상의 부형제 화합물로 제조될 수 있다. 치료용 제형은 캡슐화,

분산, 리포솜, 소포 형성 등과 같은 기술을 사용하여 하나 이상의 부형제 화합물로 제조될 수 있다. 본원에 개시된 부형제 화합물을 포함하는 치료용 제형을 제조하기 위한 방법은 부형제 화합물의 조합을 포함할 수 있다. 구현예에서, 부형제의 조합은 더 낮은 점도, 개선된 안정성, 또는 감소된 주사 부위 통증에서 이점을 야기할 수 있다. 보존제, 계면활성제, 당, 수크로스, 트레할로스, 다당류, 아르기닌, 프롤린, 히알루로니다제, 안정화제, 완충제 등을 포함하는 다른 첨가제가 이들의 제조 동안 치료용 제형에 도입될 수 있다. 본원에서 사용되는 약학적으로 허용되는 부형제 화합물은 비독성이고 동물 및/또는 인간 투여에 적합한 것이다.

[0067] 3. 비-치료용 제형

[0068] [0059] 일 양태에서, 본원에 개시된 제형 및 방법은 유효량의 비-치료용 단백질 및 부형제 화합물을 포함하는 개선된 또는 감소된 점도의 안정한 액체 제형을 제공한다. 구현예에서, 제형은 허용되는 농도의 활성 성분 및 허용되는 점도를 제공하면서 안정성을 개선한다. 구현예에서, 제형은 대조 제형과 비교할 때 안정성의 개선을 제공하고; 본 개시의 목적 상, 대조 제형은 부형제 화합물이 없는 것을 제외하고는 모든 면에서 비-치료용 제형과 건조 중량 기준으로 실질적으로 유사하거나 동일한 단백질 활성 성분을 함유하는 제형이다.

[0069] [0060] 액체 단백질 제형의 점도는 단백질 자체(예를 들어, 효소, 구조 단백질, 가수분해 정도 등)의 성질; 이의 크기, 3차원 구조, 화학적 조성, 및 분자량; 제형 중 이의 농도; 단백질 이외의 제형의 성분; 원하는 pH 범위; 제형을 위한 저장 조건; 및 제형에 대한 저장 조건을 포함하지만, 이로 제한되지 않는 다양한 요인들에 의해 영향을 받을 수 있는 것으로 이해된다.

[0070] [0061] 구현예에서, 비-치료용 제형은 적어도 25 mg/mL의 단백질 활성 성분을 함유한다. 다른 구현예에서, 비-치료용 제형은 적어도 100 mg/mL의 단백질 활성 성분을 함유한다. 다른 구현예에서, 비-치료용 제형은 적어도 200 mg/mL의 단백질 활성 성분을 함유한다. 추가의 다른 구현예에서, 비-치료용 제형 용액은 적어도 300 mg/mL의 단백질 활성 성분을 함유한다. 일반적으로, 본원에 개시된 부형제 화합물은 약 0.001 내지 약 60 mg/mL의 양으로 비-치료용 제형에 첨가된다. 구현예에서, 부형제 화합물은 약 0.1 내지 약 50 mg/mL의 양으로 첨가될 수 있다. 구현예에서, 부형제 화합물은 약 1 내지 약 40 mg/mL의 양으로 첨가될 수 있다. 구현예에서, 부형제는 약 5 내지 약 30 mg/mL의 양으로 첨가될 수 있다.

[0071] [0062] 특정 구현예에서, 비-치료용 제형 용액은 적어도 300 mg/mL의 단백질 활성 성분을 함유한다. 특정 양태에서, 본원에 개시된 부형제 화합물은 약 1 내지 약 300 mg/mL의 양, 또는 약 5 내지 약 300 mg/mL의 양으로 치료용 제형에 첨가된다. 구현예에서, 부형제 화합물은 약 10 내지 약 200 mg/mL의 양으로 첨가될 수 있다. 구현예에서, 부형제 화합물은 약 5 내지 약 100 mg/mL, 또는 약 20 내지 약 100 mg/mL의 양으로 첨가될 수 있다. 구현예에서, 부형제 화합물은 약 10 내지 약 75 mg/mL, 또는 약 20 내지 약 75 mg/mL의 양으로 첨가될 수 있다. 구현예에서, 부형제는 약 15 내지 약 50 mg/mL의 양으로 첨가될 수 있다.

[0072] [0063] 다양한 분자량의 부형제 화합물은 제형에서 단백질 활성 성분과 조합될 때 특정 유리한 특성을 위해 선택된다. 부형제 화합물을 포함하는 비-치료용 제형의 예는 하기에 제공된다. 구현예에서, 부형제 화합물은 <5000 Da의 분자량을 갖는다. 구현예에서, 부형제 화합물은 <1000 Da의 분자량을 갖는다. 구현예에서, 부형제 화합물은 <500 Da의 분자량을 갖는다.

[0073] [0064] 구현예에서, 본원에 개시된 부형제 화합물은 점도-감소량으로 비-치료용 제형에 첨가된다. 구현예에서, 점도-감소량은 대조 제형과 비교할 때 제형의 점도를 적어도 10% 감소시키는 부형제 화합물의 양이고; 본 개시의 목적 상, 대조 제형은 부형제 화합물이 없는 것을 제외하고는 모든 면에서 치료용 제형과 건조 중량 기준으로 실질적으로 유사하거나 동일한 단백질 활성 성분을 함유하는 제형이다. 구현예에서, 점도-감소량은 대조 제형과 비교할 때 제형의 점도를 적어도 30% 감소시키는 부형제 화합물의 양이다. 구현예에서, 점도-감소량은 대조 제형과 비교할 때 제형의 점도를 적어도 50% 감소시키는 부형제 화합물의 양이다. 구현예에서, 점도-감소량은 대조 제형과 비교할 때 제형의 점도를 적어도 70% 감소시키는 부형제 화합물의 양이다. 구현예에서, 점도-감소량은 대조 제형과 비교할 때 제형의 점도를 적어도 90% 감소시키는 부형제 화합물의 양이다.

[0074] [0065] 구현예에서, 점도-감소량은 100 cP 미만의 점도를 갖는 비-치료용 제형을 생성한다. 다른 구현예에서, 비-치료용 제형은 50 cP 미만의 점도를 갖는다. 다른 구현예에서, 비-치료용 제형은 20 cP 미만의 점도를 갖는다. 다른 구현예에서, 비-치료용 제형은 10 cP 미만의 점도를 갖는다. 본원에서 사용되는 용어 "점도"는 동적 점도 값을 지칭한다.

[0075] [0066] 본 개시에 따른 비-치료용 제형은 특정 유리한 특성을 가질 수 있다. 구현예에서, 비-치료용 제형은 전단 분해, 상 분리, 클라우딩 아웃, 산화, 탈아미드화, 응집, 침전, 및 변성에 대해 저항성이다. 구현예에서, 치

료용 제형은 대조 제형과 비교하여 더 효과적으로 가공, 정제, 저장, 펄핑, 여과, 및 원심분리될 수 있다.

[0076] [0067] 구현예에서, 비-치료용 부형제는 산화적 손상에 대해 비-치료용 단백질을 안정화시키는 항산화제 특성을 갖는다. 구현예에서, 비-치료용 제형은 비-치료용 단백질에 대한 역가의 상당한 손실 없이 주위 온도에서, 또는 냉장고 조건에서 연장된 시간 동안 저장된다. 구현예에서, 비-치료용 제형은 필요할 때까지 저장을 위해 건조되고; 이후 적절한 용매, 예를 들어, 물로 재구성될 수 있다. 유리하게는, 본원에 기재된 바와 같이 제조된 제형은 수개월 내지 수년의 장기간에 걸쳐 안정하다. 예외적으로 긴 저장 기간이 요망되는 경우, 제형은 단백질 변성에 대한 우려 없이 냉동고에서 보존된다(그리고 나중에 재활성화된다). 구현예에서, 제형은 냉장을 필요로 하지 않는 장기 저장을 위해 제조된다.

[0077] [0068] 구현예에서, 본원에 개시된 부형제 화합물은 안정성-개선량으로 비-치료용 제형에 첨가된다. 구현예에서, 안정성-개선량은 대조 제형과 비교할 때 제형의 변성을 적어도 10% 감소시키는 부형제 화합물의 양이고; 본 개시의 목적 상, 대조 제형은 부형제 화합물이 없는 것을 제외하고는 치료용 제형과 건조 중량 기준으로 실질적으로 유사하거나 동일한 단백질 활성 성분을 함유하는 제형이다. 구현예에서, 안정성-개선량은 대조 제형과 비교할 때 제형의 변성을 적어도 30% 감소시키는 부형제 화합물의 양이다. 구현예에서, 안정성-개선량은 대조 제형과 비교할 때 제형의 변성을 적어도 50% 감소시키는 부형제 화합물의 양이다. 구현예에서, 안정성-개선량은 대조 제형과 비교할 때 제형의 변성을 적어도 70% 감소시키는 부형제 화합물의 양이다. 구현예에서, 안정성-개선량은 대조 제형과 비교할 때 제형의 변성을 적어도 90% 감소시키는 부형제 화합물의 양이다.

[0078] [0069] 본원에 개시된 부형제 화합물을 포함하는 비-치료용 제형을 제조하기 위한 방법은 당업자에게 익숙할 수 있다. 예를 들어, 비-치료용 단백질이 용액에 첨가되기 전 또는 후에 부형제 화합물을 제형에 첨가할 수 있다. 비-치료용 제형은 제1(더 낮은) 농도로 생성시킨 후 여과 또는 원심분리에 의해 처리되어 제2(더 높은) 농도를 생성시킬 수 있다. 비-치료용 제형은 카오토로프, 코스모트로프, 하이드로트로프, 및 염을 갖는 하나 이상의 부형제 화합물로 제조될 수 있다. 비-치료용 제형은 캡슐화, 분산, 리포솜, 소포 형성 등과 같은 기술을 사용하여 하나 이상의 부형제 화합물로 제조될 수 있다. 보존제, 계면활성제, 안정화제 등을 포함하는 다른 첨가제가 이들의 제조 동안 비-치료용 제형에 도입될 수 있다.

[0079] 4. 부형제 화합물

[0080] [0070] 각각 하나 이상의 치료용 또는 비-치료용 단백질과 함께 사용하기에 적합하고 각각 제형이 고농도의 단백질(들)을 함유하도록 구성될 수 있게 하는 여러 부형제 화합물이 본원에 기재되어 있다. 후술되는 부형제 화합물의 일부 카테고리는 다음과 같다: (1) 장애 또는 변형 아민; (2) 방향족 및 음이온성 방향족; (3) 작용성화된 아미노산; (4) 올리고펩티드; (5) 단쇄 유기산; (6) 저분자량 지방족 다중산; 및 (7) 디온 및 설폰.

[0081] [0071] 구현예에서, 하나 이상의 점도-감소 부형제 화합물은 제형에 동시에 또는 순차적으로 첨가될 수 있다. 구현예에서, 점도-감소 화합물 중 적어도 하나는 장애 아민이다. 구현예에서, 적어도 하나의 부형제 화합물은 피리미딘, 메틸-치환된 피리미딘, 또는 페네틸아민이다. 피리미딘은 적어도 하나의 피리미딘 고리를 포함하는 화합물이고; 피리미딘 고리는 임의로 치환될 수 있고/거나 융합된 고리 시스템의 일부, 예를 들어, 융합된 바이사이클릭 또는 트리사이클릭 고리 시스템의 일부일 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 예시적인 피리미딘은, 예를 들어, 피리미딘, 피리미디논, 트리아미노피리미딘, 퓨린, 아데닌, 및 구아닌을 포함한다. 메틸-치환된 피리미딘은 적어도 하나의 메틸-치환된 피리미딘 고리를 포함하는 화합물이다. 예시적인 메틸-치환된 피리미딘은 1,3-디메틸우라실, 1-메틸우라실, 3-메틸우라실, 5-메틸우라실, 및 6-메틸우라실이다. 추가의 예시적인 피리미딘은 하기에 더욱 상세히 기재된다. 특정 양태에서, 피리미딘 또는 메틸-치환된 피리미딘은 카페인 또는 잔틴이 아니다. 또 다른 추가 양태에서, 피리미딘은 적어도 하나의 피리미딘 고리를 포함하는 화합물이고, 여기서 피리미딘 고리는 융합된 고리 시스템의 일부가 아니다. 구현예에서, 적어도 하나의 부형제 화합물은 카페인, 사카린, 아세살팜 포타슘, 아스파탐, 테오필린, 타우린, 1-메틸-2-피롤리돈, 2-피롤리디논, 나이아신아미드, 및 이미다졸로 이루어진 군으로부터 선택된다. 구현예에서, 적어도 하나의 부형제 화합물은 카페인, 타우린, 나이아신아미드, 및 이미다졸로 이루어진 군으로부터 선택된다. 구현예에서, 적어도 하나의 부형제 화합물은 우라실, 1-메틸우라실, 6-메틸우라실, 5-메틸우라실, 1,3-디메틸우라실, 사이토신, 5-메틸사이토신, 3-메틸사이토신, 티민, 메틸티민, 0-4-메틸티민, 1,3-디메틸티민, 및 디메틸티민 이량체를 포함한다. 구현예에서, 적어도 하나의 부형제 화합물은 디펜하이드라민, 페네틸아민, N-메틸페네틸아민, N,N-디메틸펜에틸아민, 베타-3-디하이드록시펜에틸아민, 베타-3-디하이드록시-N-메틸페네틸아민, 3-하이드록시펜에틸아민, 4-하이드록시펜에틸아민, 티로시놀, 티라민, N-메틸티라민, 및 호르데닌으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 구현예에서, 적어도 하나의 부형제 화합물은 음이온성 방향족 부형제이고, 일부 구현예에서, 음이온성 방향족 부형제는 4-하이드록시벤젠

존산일 수 있다. 구현예에서, 점도-감소량은 약 1 mg/mL 내지 약 100 mg/mL의 적어도 하나의 부형제 화합물이거나, 점도-감소량은 약 1 mM 내지 약 400 mM의 적어도 하나의 부형제 화합물이거나, 점도-감소량은 약 2 mM 내지 약 150 mM의 양이거나, 점도-감소량은 약 2 mg/mL 내지 약 80 mg/mL의 양이거나, 점도-감소량은 약 5 mg/mL 내지 약 50 mg/mL의 양이거나, 점도-감소량은 약 10 mg/mL 내지 약 40 mg/mL의 양이다. 구현예에서, 점도-감소량은 약 2 mM 내지 약 150 mM의 양, 또는 약 5 mM 내지 약 100 mM의 양, 또는 약 10 mM 내지 약 75 mM의 양, 또는 약 15 mM 내지 약 50 mM의 양이다. 구현예에서, 담체 용액은 보존제, 당, 폴리올, 다당류, 아르기닌, 프롤린, 계면활성제, 안정화제, 및 완충제로 이루어진 군으로부터 선택된 추가 제제를 포함한다.

[0082] [0072] 이론에 국한되지 않고, 본원에 기재된 부형제 화합물은 달리 입자간(즉, 단백질-단백질) 상호작용에 포함될 치료용 단백질의 특정 단편, 서열, 구조, 또는 섹션과 회합하는 것으로 사료된다. 이러한 부형제 화합물과 치료용 또는 비-치료용 단백질의 회합은 단백질이 과도한 용액 점도를 유발하지 않으면서 고농도로 제형화될 수 있도록 단백질간 상호작용을 차폐할 수 있다. 구현예에서, 부형제 화합물은 보다 안정한 단백질-단백질 상호작용을 야기할 수 있고; 단백질-단백질 상호작용은 단백질 확산 파라미터 kD, 또는 삼투성 제2 비리얼 계수 B22에 의해, 또는 당업자에게 친숙한 다른 기술에 의해 측정될 수 있다.

[0083] [0073] 부형제 화합물은 유리하게는 수용성일 수 있으므로, 수성 비히클과 함께 사용하기에 적합하다. 구현예에서, 부형제 화합물은 >1 mg/mL의 수용해도를 갖는다. 구현예에서, 부형제 화합물은 >10 mg/mL의 수용해도를 갖는다. 구현예에서, 부형제 화합물은 >100 mg/mL의 수용해도를 갖는다. 구현예에서, 부형제 화합물은 >500 mg/mL의 수용해도를 갖는다.

[0084] [0074] 유리하게는, 치료용 단백질 제형에 대해, 부형제 화합물은 생물학적으로 허용되고 비-면역원성인 물질로부터 유래될 수 있고, 따라서 약학적 용도에 적합하다. 치료적 구현예에서, 부형제 화합물은 체내에서 대사되어 생물학적으로 상용 가능한 비-면역원성 부산물을 생성할 수 있다.

[0085] a. 부형제 화합물 카테고리 1: 장애 또는 변형 아민

[0086] [0075] 치료용 또는 비-치료용 단백질의 고농도 용액은 부형제 화합물로서 장애 또는 변형 아민 소분자와 함께 제형화될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "장애 아민"은 하기 실시예와 일치하는, 적어도 하나의 별키한 또는 입체 장애된 기를 함유하는 소분자를 지칭한다. 본원에서 사용되는 용어 "변형 아민"은 하기에 보다 상세히 기재된 바와 같이, 아민 작용기를 함유하지만 별키한 또는 입체 장애된 기를 갖지 않는 소분자를 지칭한다. 장애 또는 변형 아민은 유리 염기 형태, 양성자화된 형태, 또는 이 둘의 조합으로 사용될 수 있다. 양성자화된 형태에서, 장애 또는 변형 아민은 음이온성 상대이온, 예컨대, 클로라이드, 하이드록사이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 포르메이트, 포스페이트, 설페이트, 또는 카르복실레이트와 회합될 수 있다.

[0087] [0076] 부형제 화합물로서 유용한 장애 아민 화합물은 부형제 화합물이 중성 pH의 수용액에서 양이온 전하를 갖도록 2차 아민, 3차 아민, 4차 암모늄, 피리디늄, 피롤리돈, 피롤리딘, 피페리딘, 모르폴린, 또는 구아니디늄 기를 함유할 수 있다. 장애 아민 화합물은 또한 사이클릭 방향족, 지환족, 사이클로헥실, 또는 알킬 기와 같은 적어도 하나의 별키 또는 입체 장애 기를 함유한다. 구현예에서, 입체 장애 기는 그 자체로 아민 기, 예컨대, 디알킬아민, 트리알킬아민, 구아니디늄, 피리디늄, 또는 4차 암모늄 기일 수 있다. 이론으로 국한되지 않으면서, 장애 아민 화합물은 양이온 pi 상호작용에 의해 페닐알라닌, 트립토판, 및 티로신과 같은 단백질의 방향족 섹션과 회합하는 것으로 사료된다. 구현예에서, 입체 장애 아민의 양이온성 기는 단백질에서 방향족 아미노산 잔기의 전자 풍부 pi 구조에 대한 친화성을 가질 수 있어, 이들이 단백질의 이러한 섹션을 차폐할 수 있고, 이에 의해 이러한 차폐된 단백질이 회합하고 응집하는 경향을 감소시킬 수 있다.

[0088] [0077] 구현예에서, 장애 아민 부형제 화합물은 이미다졸, 이미다졸린, 또는 이미다졸리딘 기, 또는 이의 염, 예컨대, 이미다졸, 1-메틸이미다졸, 4-메틸이미다졸, 1-헥실-3-메틸이미다졸륨 클로라이드, 1-에틸이미다졸, 4-에틸이미다졸, 1-헥실-3-에틸이미다졸륨 클로라이드, 이미다졸린, 2-이미다졸린, 이미다졸리돈, 2-이미다졸리돈, 히스타민, 4-메틸히스타민, 알파-메틸히스타민, 베타히스틴, 베타-알라닌, 2-메틸-2-이미다졸린, 1-부틸-3-메틸이미다졸륨 클로라이드, 부틸 이미다졸, 요산, 포타슘 우레이트, 베타졸, 카르노신, 스페르민, 스페르미딘, 아스파탐, 사카린, 아세실팜 포타슘, 잔틴, 테오필린, 테오브로민, 카페인, 및 안세린을 포함하는 화학적 구조를 갖는다. 구현예에서, 장애 아민 부형제 화합물은 피리미딘, 피리미디논, 트리아미노피리미딘, 1,3-디메틸우라실, 1-메틸우라실, 3-메틸우라실, 1,3-디에틸우라실, 6-메틸우라실, 우라실, 1,3-디메틸-테트라하이드로 피리미디논, 티민, 1-메틸티민, 0-4-메틸티민, 1,3-디메틸티민, 디메틸티민 이량체, 테아크린, 시토신, 5-메틸시토신, 3-메틸시토신, 퓨린, 구아닌, 및 아데닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 피리미딘이다. 다른 양태에서, 장애 아민 부형제 화합물은 1-메틸-2-피롤리돈, 페닐세린, DL-3-페닐세린, 사이클로세린, 디사

이클로민, 및 시스테아민으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 구현예에서, 장애 아민 부형제 화합물은 구아니디노아세테이트, 디메틸에탄올아민, 에탄올아민, 디메틸아미노에탄올, 디메틸아미노프로필아민, 트리에탄올아민, 1,3-디아미노프로판, 1,2-디아미노프로판, 폴리에테르아민, Jeffamine® 브랜드 폴리에테르아민, 폴리에테르-모노아민, 폴리에테르-디아민, 폴리에테르-트리아민, 1-(1-아다만틸)에틸아민, 호르데닌, 벤질아민, 디메틸벤질아민, 디메틸사이클로헥실아민, 디에틸사이클로헥실아민, 디사이클로헥실메틸아민, 헥사메틸렌 비구아나이드, 폴리(헥사메틸렌 비구아나이드), 이미다졸, 디메틸글리신, 메글루민, 아그마틴, 아그마틴 설페이트, 디아자비스아클로[2.2.2]옥탄, 테트라메틸에틸렌디아민, N,N-디메틸에탄올아민, 에탄올아민 포스페이트, 글루코사민, 콜린 클로라이드, 포스포콜린, 나리아신아미드, 이소니코틴아미드, N,N-디에틸 니코틴아미드, 니코틴산, 니코틴산 소듐 염, 이소니코틴산, 티라민, N-메틸티라민, 3-아미노피리딘, 4-아미노피리딘, 2,4,6-트리메틸피리딘, 3-피리딘 메탄올, 디피리다몰, 니코틴아미드 아데노신 디뉴클레오타이드, 비오틴, 폴산, 폴린산, 폴린산 칼슘 염, 모르폴린, N-메틸피롤리돈, 2-피롤리디논, 프로카인, 리도카인, 디시안디아미드-타우린 부가물, 2-피리딜에틸아민, 디시안디아미드-벤질 아민 부가물, 디시안디아미드-알킬아민 부가물, 디시안디아미드-사이클로알킬아민 부가물, 및 디시안디아미드-아미노메탄포스포산 부가물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 구현예에서, 본 개시내용과 일치하는 장애 아민 화합물은 양성자화된 암모늄 염으로서 제형화된다. 구현예에서, 본 개시내용과 일치하는 장애 아민 화합물은 상대이온으로서 무기 음이온 또는 유기 음이온을 갖는 염으로서 제형화된다. 구현예에서, 치료용 또는 비-치료용 단백질의 고농도 용액은 부형제 화합물로서 카페인과 벤조산, 하이드록시벤조산, 또는 벤젠설포산의 조합물로 제형화된다. 구현예에서, 장애 아민 부형제 화합물은 체내에서 대사되어 생물학적으로 적합한 부산물을 생성한다. 일부 구현예에서, 장애 아민 부형제 화합물은 제형에 약 250 mg/ml 이하의 농도로 존재한다. 추가 구현예에서, 장애 아민 부형제 화합물은 제형에 약 10 mg/ml 내지 약 200 mg/ml의 농도, 또는 약 10 mg/ml 내지 약 120 mg/ml의 농도로 존재한다. 또 다른 추가의 양태에서, 장애 아민 부형제 화합물은 제형에 약 20 mg/ml 내지 약 120 mg/ml의 농도로 존재한다.

[0078] 구현예에서, 이러한 장애 아민 카테고리의 점도-감소 부형제는 메틸잔틴, 예컨대, 카페인 및 테오필린을 포함할 수 있지만, 이들의 사용은 전형적으로 이들의 낮은 수용해도로 인해 제한되었다. 일부 적용에서, 이들의 낮은 수용해도에도 불구하고 이러한 점도-감소 부형제의 더 높은 농축된 용액을 갖는 것이 유리할 수 있다. 예를 들어, 가공에서, 농축된 단백질 용액에 첨가될 수 있는 농축된 부형제 용액을 갖는 것이 유리할 수 있어서, 부형제의 첨가로 인해 단백질이 원하는 최종 농도 미만으로 희석되지 않을 수 있다. 다른 경우에, 이의 낮은 수용해도에도 불구하고, 최종 단백질 제형의 원하는 점도 감소, 안정성, 등장성 등을 달성하기 위해 추가적인 점도-감소 부형제가 필요할 수 있다. 구현예에서, 고농축된 부형제 용액은 (i) 유효 점도-감소량보다 1.5 내지 50 배 더 높은 농도의 점도-감소 부형제로서, 또는 (ii) 298 K에서 순수한 물 중 이의 문헌에 보고된 용해도보다 1.5 내지 50 배 더 높은 농도의 점도-감소 부형제로서(예를 들어, 문헌[The Merck Index; Royal Society of Chemistry; Fifteenth Edition, (April 30, 2013)]에 보고된 바와 같은), 또는 둘 모두로서 제형화될 수 있다.

[0079] 특정 공-용질은 이러한 저 용해도 점도-감소 부형제의 용해도 한계를 실질적으로 증가시켜서, 문헌에 보고된 용해도 값보다 몇 배 더 높은 농도의 부형제 용액을 가능하게 하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 공-용질은 하이드로트로프의 일반적인 категорией로 분류될 수 있다. 이러한 적용을 위한 용해도의 가장 큰 개선을 제공하는 것으로 밝혀진 공-용질은 일반적으로 주위 온도 및 생리학적 pH에서 물에 매우 용해성이고(> 0.25 M), 피리딘 또는 벤젠 고리를 함유하였다. 공-용질로서 유용할 수 있는 화합물의 예는 아닐린 HCl, 이소니아신아미드, 나리아신아미드, n-메틸티라민 HCl, 페놀, 프로카인 HCl, 레조르시놀, 사카린 칼슘 염, 사카린 소듐 염, 소듐 아미노벤조산, 소듐 벤조에이트, 소듐 파라하이드록시벤조에이트, 소듐 메타하이드록시벤조에이트, 소듐 2,5-디하이드록시벤조에이트, 소듐 살리실레이트, 소듐 설파닐레이트, 소듐 파라하이드록시벤젠 설포네이트, 시네프린, 및 티라민 HCl을 포함한다.

[0080] 구현예에서, 특정 장애 아민 부형제 화합물은 다른 약리학적 특성을 가질 수 있다. 예로서, 잔틴은 전신 흡수될 때 자극제 특성 및 기관지확장제 특성을 포함하는 독립적인 약리학적 특성을 갖는 장애 아민의 카테고리이다. 대표적인 잔틴은 카페인, 아미노필린, 3-이소부틸-1-메틸잔틴, 파라잔틴, 펜톡시필린, 테오브로민, 테오필린 등을 포함한다. 메틸화된 잔틴은 심장 수축력, 심박수, 및 기관지확장에 영향을 미치는 것으로 이해된다. 일부 구현예에서, 잔틴 부형제 화합물은 제형에 약 30 mg/ml 이하의 농도로 존재한다.

[0081] 독립적인 약리학적 특성을 갖는 장애 아민의 또 다른 카테고리는 국소 주사 가능한 마취제 화합물이다. 국소 주사 가능한 마취제 화합물은 (a) 친유성 방향족 고리, (b) 중간체 에스테르 또는 아마이드 결합, 및 (c) 2차 또는 3차 아민의 3-성분 분자 구조를 갖는 장애 아민이다. 이러한 카테고리의 장애 아민은 나트륨 이온의 유입을 억제하여 국소 마취를 유도함으로써 신경 전도를 방해하는 것으로 이해된다. 국소 마취제 화합물에 대한

친유성 방향족 고리는 탄소 원자(예를 들어, 벤젠 고리)로 형성될 수 있거나 헤테로원자를 포함할 수 있다(예를 들어, 티오펜 고리). 대표적인 국소 주사용 마취제 화합물은 아밀로카인, 아르티카인, 부피비카인, 부타카인, 부타닐리카인, 클로르프로카인, 코카인, 사이클로메티카인, 디메토카인, 에디토카인, 헥실카인, 이소부카인, 레보부피바카인, 리도카인, 메타부테타민, 메타부톡시카인, 메피바카인, 메프틸카인, 프로폭시카인, 프틸로카인, 프로카인, 피페로카인, 테트라카인, 트리메카인 등을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 국소 주사 가능한 마취제 화합물은 단백질 치료용 제형에서 감소된 점도, 개선된 안정성, 및 주사 시 감소된 통증과 같은 다수의 이점을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 국소 마취제 화합물은 약 50 mg/ml 이하의 농도로 제형에 존재한다.

[0093] [0082] 구현예에서, 독립적인 약리학적 특성을 갖는 장애 아민은 본원에 기재된 제형 및 방법에 따라 부형제 화합물로서 사용된다. 일부 구현예에서, 독립적인 약리학적 특성을 갖는 부형제 화합물은 약리학적 효과를 갖지 않고/거나 치료적으로 효과적이지 않은 양으로 존재한다. 다른 구현예에서, 독립적인 약리학적 특성을 갖는 부형제 화합물은 약리학적 효과를 갖고/거나 치료적으로 효과적인 양으로 존재한다. 특정 구현예에서, 독립적인 약리학적 특성을 갖는 장애 아민은 제형 점도를 감소시키기 위해 선택된 또 다른 부형제 화합물과 조합하여 사용되며, 여기서 독립적인 약리학적 특성을 갖는 장애 아민은 이의 약리학적 활성의 이점을 부여하기 위해 사용된다. 예를 들어, 국소 주사 가능한 마취제 화합물은 제형 점도를 감소시키고 또한 제형의 주사 시 통증을 감소시키기 위해 사용될 수 있다. 주사 통증의 감소는 마취 특성에 의해 야기될 수 있으며; 또한, 점도가 부형제에 의해 감소될 때 더 낮은 주사력이 필요할 수 있다. 대안적으로, 국소 주사 가능한 마취제 화합물은 제형의 점도를 감소시키는 또 다른 부형제 화합물과 조합되면서 제형 주사 동안 감소된 국소 감각의 바람직한 약리학적 이점을 부여하는 데 사용될 수 있다.

[0094] [0083] 다른 구현예에서, 점도-감소 부형제는 잠재적인 환자에 대한 이의 생리학적 영향 또는 이의 결핍에 기초하여 선택된다. 예를 들어, 특정 치환된 페네틸아민은 모노아민 신경전달물질 시스템과 같은 다양한 신경전달물질을 조절하는 것으로 이해되고, 이들은 중추 신경계에 대한 이들의 영향으로 인해 다양한 항정신성 효과(예를 들어, 각성제, 환각제 또는 환각제 효과)를 가질 수 있지만, 항정신성 효과를 생성하지 않거나, 임상적으로 문제가 있는 항정신성 효과를 생성하지 않거나, 용량-관련 방식으로 항정신성 효과를 야기하되 특정 제형에서 발견되는 투여량에서 항정신성 효과를 야기할 수 있는 점도-감소량의 점도-감소 페네틸아민 부형제를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 유사하게, 다른 생리학적 효과(예를 들어, 심혈관, 호흡기, 위장, 비뇨생식기 등)를 생성하지 않거나, 임상적으로 문제가 있는 생리학적 효과를 생성하지 않거나, 용량-관련 방식으로 생리학적 효과를 야기하되 특정 제형에서 발견되는 투여량에서 생리학적 효과를 나타내지 않는 다른 점도-감소 부형제를 사용하는 것이 바람직할 수 있다.

[0095] [0084] 구현예에서, 변형 아민 부형제는 약염기의 컨쥬게이트 산일 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "컨쥬게이트 산"은 약간의 산도를 갖는 염기의 양성자화된 형태를 지칭하고; 따라서, 이러한 분자는 염기의 컨쥬게이트 산으로 알려져 있다. 컨쥬게이트 산이 변형 아민 부형제로서 포함되는 약 염기는, 예를 들어, 암모니아(NH_3), 암모늄 하이드록사이드(NH_4OH), 알칸올아민, 및 아민을 포함한다. 변형 아민 부형제는 이러한 약염기를 산과 반응시켜 이의 컨쥬게이트 산을 생성시킴으로써 생성될 수 있다. 예시적인 변형 아민 부형제는 이러한 약염기의 컨쥬게이트 산, 예컨대, 암모늄 클로라이드, 암모늄 브로마이드, 암모늄 플루오라이드, 암모늄 아세테이트, 암모늄 시트레이트, 모노에탄올아민 하이드로클로라이드, 모노에탄올아민 하이드로브로마이드, 모노에탄올아민 하이드로플루오라이드, 모노에탄올아민 아세테이트, 모노에탄올아민 시트레이트, 디에탄올아민 하이드로클로라이드, 디에탄올아민 하이드로브로마이드, 디에탄올아민 하이드로플루오라이드, 디에탄올아민 아세테이트, 디에탄올아민 시트레이트, 트리에탄올아민 하이드로클로라이드, 트리에탄올아민 하이드로브로마이드, 트리에탄올아민 하이드로플루오라이드, 트리에탄올아민 아세테이트, 트리에탄올아민 시트레이트, 우레아 하이드로클로라이드, 우레아 하이드로브로마이드, 우레아 하이드로플루오라이드, 우레아 아세테이트, 우레아 시트레이트를 포함한다. 구현예에서, 약염기는 암모니아 또는 암모늄 하이드록사이드이고, 변형 아민은 이의 컨쥬게이트 산이다. 특정 구현예에서, 약염기는 에톡실화된 아민, 예를 들어, 모노에탄올아민, 디에탄올아민, 및 트리에탄올아민이고, 변형 아민은 이의 컨쥬게이트 산이다.

[0096] [0085] 구현예에서, 모노에탄올아민 약염기는 암모니아를 에틸렌 옥사이드와 반응시키는 합성 경로에 의해 생성될 수 있거나, 이는 임의로 테카르복실라제 효소의 도움으로 세린 또는 포스포티딜세린의 탈카르복실화에 의해 생성될 수 있다. 다른 구현예에서, 약염기는 우레아이다. 약염기는 단백질을 함유하는 용액에 도입되기 전에 컨쥬게이트 산 부형제를 생성시키기 위해 산(예컨대, HF , HCl , HBr , H_3PO_4 , H_2SO_4 , 아세트산, 시트르산 등)으로 변형될 수 있다. 다른 구현예에서, 약염기는 용액에서 단백질의 존재 하에 변형 아민 부형제를 형성하기 위해 산

으로 변형될 수 있다.

- [0097] [0086] 상기 개시된 것들과 같은 변형 아민은 폐길화 단백질을 포함하는 제형의 점도를 감소시키는데 특히 유용하다. 이론으로 국한되지 않으면서, 양성자화된 아민 기는 폐길화 단백질의 PEG 세그먼트의 수소 결합 및 용매화를 변화시켜, PEG 사슬의 백본에서 입체형태적 변화를 야기하고, 용액 점도가 감소하도록 PEG 용액 구조를 근본적으로 변형시키는 것으로 사료된다.
- [0098] b. 부형제 화합물 카테고리 2: 방향족 및 음이온성 방향족
- [0099] [0087] 치료용 또는 비-치료용 단백질의 고농도 용액은 부형제 화합물로서 방향족 소분자 화합물로 제형화될 수 있다. 방향족 부형제 화합물은 페닐, 벤질, 아릴, 알킬벤질, 하이드록시벤질, 페놀, 하이드록시아릴, 헤테로방향족 기, 또는 융합된 방향족 기와 같은 방향족 작용기를 함유할 수 있다. 방향족 부형제 화합물은 또한 카르복실레이트, 옥사이드, 페녹사이드, 설포네이트, 설페이트, 포스포네이트, 포스페이트, 또는 설파이드와 같은 작용기를 함유할 수 있다. 방향족 부형제는 음이온성, 양이온성, 또는 비하전일 수 있다.
- [0100] [0088] 하전된 방향족 부형제는 산, 염기 또는 염(적용 가능한 경우)으로서 기술될 수 있고, 이는 다양한 염 형태로 존재할 수 있다. 이론으로 국한되지 않으면서, 하전된 방향족 부형제 화합물은 단백질의 반대로 하전된 세그먼트와 회합할 수 있는 별키한 입체 장애 분자로 사료되고, 이로써 이들은 단백질의 이러한 섹션을 차폐하여, 단백질-함유 제형을 점성으로 만드는 단백질 분자 사이의 상호작용을 감소시킬 수 있다. 예를 들어, 음이온성 방향족 부형제는 단백질의 양이온성 세그먼트와 회합하고, 이로써 이들이 단백질의 이러한 섹션을 차폐하여, 단백질-함유 제형을 점성으로 만드는 단백질 분자 사이의 상호작용을 감소시킬 수 있다.
- [0101] [0089] 구현예에서, 방향족 부형제 화합물의 예는 음이온성 방향족 화합물, 예컨대, 살리실산, 아미노살리실산, 하이드록시벤조산, 아미노벤조산, 파라-아미노벤조산, 벤젠설포산, 하이드록시벤젠설포산, 나프탈렌설포산, 나프탈렌디설포산, 하이드로퀴논 설포산, 설파닐산, 바닐산, 바닐린, 바닐린-타우린 부가물, 아미노페놀, 안트라닐산, 신남산, 쿠마르산, 카페인, 이소니코틴산, 엽산, 폴린산, 폴린산 칼슘 염, 페닐세린, DL-3-페닐세린, 아데노신 모노포스페이트, 데옥시아데노신, 구아노신, 데옥시구아노신, 인돌 아세트산, 포타슘 우레이트, 푸란 디카복실산, 푸란-2-아크릴산, 2-푸란프로피온산, 소듐 페닐피루베이트, 소듐 하이드록시페닐피루베이트, 디하이드록시벤조산, 트리하이드록시벤조산, 피로갈롤, 벤조산, 및 상기 산의 염을 포함한다. 구현예에서, 음이온성 방향족 부형제 화합물은 이온화된 염 형태로 제형화된다. 구현예에서, 음이온성 방향족 화합물은 디메틸사이클로헥실암모늄 하이드록시벤조에이트와 같은 장애 아민의 염으로서 제형화된다. 구현예에서, 음이온성 방향족 부형제 화합물은 유기 양이온과 같은 다양한 상대이온과 제형화된다. 구현예에서, 치료용 또는 비-치료용 단백질의 고농도 용액은 음이온성 방향족 부형제 화합물 및 카페인과 제형화된다. 구현예에서, 음이온성 방향족 부형제 화합물은 체내에서 대사되어 생물학적으로 적합한 부산물을 생성한다.
- [0102] [0090] 구현예에서, 방향족 부형제 화합물의 예는 페놀 및 폴리페놀을 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "페놀"은 적어도 하나의 하이드록실 기에 결합된 적어도 하나의 방향족 기 또는 융합된 방향족 기로 이루어진 유기 분자를 지칭하고, 용어 "폴리페놀"은 하나 초과인 페놀 기로 이루어진 유기 분자를 지칭한다. 이러한 부형제는 특정 상황에서, 예를 들어, 치료용 또는 비-치료용 폐길화 단백질의 고농도 용액을 갖는 제형에 사용되어 용액 점도를 낮추는 데 유리할 수 있다. 페놀의 비-제한적인 예는 벤젠디올 레조르시놀(1,3-벤젠디올), 카테콜(1,2-벤젠디올) 및 하이드로퀴논(1,4-벤젠디올), 벤젠트리올 하이드록시퀴논(1,2,4-벤젠트리올), 피로갈롤(1,2,3-벤젠트리올), 및 플로로글루시놀(1,3,5-벤젠트리올), 벤젠테트라올 1,2,3,4-벤젠테트라올 및 1,2,3,5-벤젠테트라올, 및 벤젠펜톨 및 벤젠헥솔을 포함한다. 폴리페놀의 비-제한적인 예는 탄닌산, 엘라그산, 에피갈로카테킨 갈레이트, 카테킨, 탄닌, 엘라지탄닌, 및 갈로탄닌을 포함한다. 보다 일반적으로, 페놀계 및 폴리페놀계 화합물은 플라보노이드, 리그난, 페놀산, 및 스틸벤을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 플라보노이드 화합물은 안토시아닌, 칼콘, 디하이드로칼콘, 디하이드로플라바놀, 플라바놀, 플라바논, 플라본, 플라보놀, 및 이소플라보노이드를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 페놀산은 하이드록시벤조산, 하이드록시신남산, 하이드록시페닐아세트산, 하이드록시페닐프로판산, 및 하이드록시페닐펜탄산을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 다른 폴리페놀계 화합물은 알킬메톡시페놀, 알킬페놀, 쿠르쿠미노이드, 하이드록시벤즈알데하이드, 하이드록시벤조케톤, 하이드록시신남알데하이드, 하이드록시쿠마린, 하이드록시페닐프로펜, 메톡시페놀, 나프토퀴논, 하이드로퀴논, 페놀 테르펜, 레스베라트롤, 및 티로솔을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 구현예에서, 폴리페놀은 탄닌산이다. 구현예에서, 페놀은 갈산이다. 구현예에서, 페놀은 피로갈롤이다. 구현예에서, 페놀은 레조르시놀이다. 이론으로 국한되지 않으면서, 페놀계 화합물, 예를 들어, 갈산, 피로갈롤, 및 레조르시놀의 하이드록실 기는 PEG 사슬의 골격에서 에테르 산소 원자와 수소 결합을 형성하고, 이에 따라 용액 점도가 감소되도록 PEG

용액 구조를 근본적으로 변경시키는 페놀/PEG 착물을 형성시킨다.

[0103] 탄닌산과 같은 폴리페놀계 화합물은 갈산, 피로갈롤, 및 레조르시놀과 같은 이들의 각각의 페놀 기 빌딩 블록으로부터 이들의 점도-감소 특성을 유도한다. 폴리페놀계 화합물 내의 페놀 기의 특정 조직화는 페놀의 첨가에 의해 달성되는 점도 감소가 더 적은 양의 각각의 폴리페놀의 첨가에 의해 향상되는 복잡한 거동을 야기할 수 있다.

[0104] c. 부형제 화합물 카테고리 3: 작용성화된 아미노산

[0091] 치료용 또는 비-치료용 단백질의 고농도 용액은 하나 이상의 작용성화된 아미노산으로 제형화될 수 있고, 여기서 단일 작용성화된 아미노산 또는 하나 이상의 작용성화된 아미노산을 포함하는 올리고펩티드가 부형제 화합물로서 사용될 수 있다. 구현예에서, 작용성화된 아미노산 화합물은 가수분해되거나 대사되어 아미노산을 생성할 수 있는 분자("아미노산 전구체")를 포함한다. 구현예에서, 작용성화된 아미노산은 페닐, 벤질, 아릴, 알킬벤질, 하이드록시벤질, 하이드록시아릴, 헤테로방향족 기, 또는 융합된 방향족 기와 같은 방향족 작용기를 함유할 수 있다. 구현예에서, 작용성화된 아미노산 화합물은 에스테르화된 아미노산, 예컨대, 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 벤질, 사이클로알킬, 글리세릴, 하이드록시에틸, 하이드록시프로필, PEG, 및 PPG 에스테르를 함유할 수 있다. 구현예에서, 작용성화된 아미노산 화합물은 아르기닌 에틸 에스테르, 아르기닌 메틸 에스테르, 아르기닌 하이드록시에틸 에스테르, 및 아르기닌 하이드록시프로필 에스테르로 이루어진 군으로부터 선택된다. 구현예에서, 작용성화된 아미노산 화합물은 중성 pH의 수용액 중 하전된 이온성 화합물이다. 예를 들어, 단일 아미노산은 아세테이트 또는 벤조에이트와 같은 에스테르를 형성함으로써 유도체화될 수 있고, 가수분해 생성물은 둘 모두의 천연 물질인 아세트산 또는 벤조산, 및 아미노산일 것이다. 구현예에서, 작용성화된 아미노산 부형제 화합물은 체내에서 대사되어 생물학적으로 적합한 부산물을 생성한다.

[0106] d. 부형제 화합물 카테고리 4: 올리고펩티드

[0092] 치료용 또는 비-치료용 단백질의 고농도 용액은 부형제 화합물로서 올리고펩티드로 제형화될 수 있다. 구현예에서, 올리고펩티드는 구조가 하전된 섹션 및 벌기한 섹션을 갖도록 설계된다. 구현예에서, 올리고펩티드는 2 내지 10 개의 펩티드 서브유닛으로 이루어진다. 올리고펩티드는 이작용성, 예를 들어, 비극성 아미노산에 커플링된 양이온성 아미노산, 또는 비극성 아미노산에 커플링된 음이온성 아미노산일 수 있다. 구현예에서, 올리고펩티드는 2 내지 5 개의 펩티드 서브유닛으로 이루어진다. 구현예에서, 올리고펩티드는 호모펩티드, 예컨대, 폴리글루탐산, 폴리아스파르트산, 폴리-리신, 폴리-아르기닌, 및 폴리-히스티딘이다. 구현예에서, 올리고펩티드는 순 양이온 전하를 갖는다. 다른 구현예에서, 올리고펩티드는 Trp2Lys3과 같은 헤테로펩티드이다. 구현예에서, 올리고펩티드는 ABA 반복 패턴과 같은 교대 구조를 가질 수 있다. 구현예에서, 올리고펩티드는 음이온성 및 양이온성 아미노산 둘 모두, 예를 들어, Arg-Glu를 함유할 수 있다. 이론으로 국한되지 않으면서, 올리고펩티드는 고점도 용액을 초래하는 분자간 상호작용을 감소시키는 방식으로 단백질과 회합할 수 있는 구조를 포함하고; 예를 들어, 올리고펩티드-단백질 회합은 전하-전하 상호작용일 수 있으며, 이는 다소 비극성인 아미노산을 남겨 단백질 주위의 수화 층의 수소 결합을 방해하여 점도를 낮출 수 있다. 일부 구현예에서, 올리고펩티드 부형제는 약 50 mg/ml 이하의 농도로 조성물에 존재한다.

[0108] e. 부형제 화합물 카테고리 5: 단쇄 유기산

[0093] 본원에서 사용되는 용어 "단쇄 유기산"은 C2-C6 유기산 화합물 및 이의 염, 에스테르, 또는 락톤을 지칭한다. 이러한 카테고리는 포화 및 불포화 카르복실산, 하이드록시 작용성화된 카르복실산, 및 선형, 분지형, 또는 환형 카르복실산을 포함한다. 구현예에서, 단쇄 유기산에서 산 기는 카르복실산, 설펡산, 포스폰산, 또는 이들의 염이다.

[0110] [0094] 상기 4 개의 부형제 카테고리 이외에, 치료용 또는 비-치료용 단백질의 고농도 용액은 부형제 화합물로서 단쇄 유기산, 예를 들어, 소르브산, 발레르산, 프로피온산, 글루쿠론산, 카프로산, 및 아스코르브산의 산 또는 염 형태와 제형화될 수 있다. 이러한 카테고리의 부형제 화합물의 예는 포타슘 소르베이트, 타우린, 소듐 프로피오네이트, 칼슘 프로피오네이트, 마그네슘 프로피오네이트, 및 소듐 아스코르베이트를 포함한다.

[0111] f. 부형제 화합물 카테고리 6: 저분자량 지방족 다중산

[0095] 치료용 또는 비-치료용 폐길화 단백질의 고농도 용액은 더 낮은 용액 점도를 가능하게 하는 특정 부형제 화합물과 제형화될 수 있으며, 여기서 이러한 부형제 화합물은 저분자량 지방족 다중산이다. 본원에서 사용되는 용어 "저분자량 지방족 다중산"은 분자량이 약 1500 미만이고 적어도 2 개의 산성 기를 갖는 유기 지방족 다중산을 지칭하며, 여기서 산성 기는 양성자-공여 모이어티인 것으로 이해된다. 산성 기는 양성자화된 산 형태, 염

형태, 또는 이들의 조합일 수 있다. 산성 기의 비-제한적인 예는 카르복실레이트, 포스포네이트, 포스페이트, 설포네이트, 설페이트, 니트레이트, 및 니트라이트 기를 포함한다. 저분자량 지방족 다중산 상의 산성 기는 음이온성 염 형태, 예컨대, 카르복실레이트, 포스포네이트, 포스페이트, 설포네이트, 설페이트, 니트레이트, 및 니트라이트일 수 있고; 이들의 상대이온은 나트륨, 칼륨, 리튬, 및 암모늄일 수 있다. 본원에 기재된 바와 같은 폐길화 단백질과 상호작용하는 데 유용한 저분자량 지방족 다중산의 특정 예는 말레산, 타르타르산, 글루타르산, 말론산, 이타콘산, 시트르산, 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), 아스파르트산, 글루탐산, 알렌드론산, 에티드론산 및 이의 염을 포함한다. 이들의 음이온성 염 형태의 저분자량 지방족 다중산의 추가의 예는 포스페이트(PO_4^{3-}), 하이드로젠 포스페이트(HPO_4^{3-}), 디하이드로젠 포스페이트(H_2PO_4^-), 설페이트(SO_4^{2-}), 바이설페이트(HSO_4^-), 피로포스페이트($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$), 핵사메타포스페이트, 카보네이트(CO_3^{2-}), 및 바이카보네이트(HCO_3^-)를 포함한다. 음이온성 염에 대한 상대이온은 Na, Li, K, 또는 암모늄 이온일 수 있다. 이러한 부형제는 또한 부형제와 조합하여 사용될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 저분자량 지방족 다중산은 또한 알파 하이드록시산일 수 있고, 여기서 제1 산성 기에 인접한 하이드록실 기, 예를 들어, 글리콜산, 락트산, 및 글루콘산 및 이들의 염이 있다. 구현예에서, 저분자량 지방족 다중산은 2 개 초과와 산성 기를 보유하는 올리고머 형태, 예를 들어, 폴리아크릴산, 폴리포스페이트, 폴리펩타이드 및 이들의 염이다. 일부 구현예에서, 저분자량 지방족 다중산 부형제는 약 50 mg/ml 이하의 농도로 조성물에 존재한다.

[0113] g. 부형제 화합물 카테고리 7: 디온 및 설펜

[0096] 효과적인 점도-감소 부형제는 298K에서 적어도 1 g/L로 순수한 물에 가용성이고 pH 7에서 순 중성 전하를 갖는 설펜, 설펜아미드, 또는 디온 작용기를 함유하는 분자일 수 있다. 바람직하게는, 분자는 1000 g/mol 미만 및 더욱 바람직하게는 500 g/mol 미만의 분자량을 갖는다. 점도를 감소시키는 데 효과적인 디온 및 설펜은 다중 이중 결합을 갖고, 수용성이고, pH 7에서 순전하를 갖지 않으며, 강한 수소 결합 공여체가 아니다. 이론으로 국한되지 않으면서, 이중 결합 특성은 단백질과 약한 파이-스태킹 상호작용을 가능하게 할 수 있다. 구현예에서, 고 단백질 농도 및 고농도에서만 고점도를 발생시키는 단백질에서, 하전된 부형제는 정전기적 상호작용이 더 긴 범위의 상호작용이기 때문에 효과적이지 않다. 용매화된 단백질 표면은 주로 친수성이어서 이들을 수용성으로 만든다. 단백질의 소수성 영역은 일반적으로 3차원 구조 내에서 차폐되지만, 구조는 끊임없이 진화하고, 언폴딩되고, 재폴딩되며(때때로 "호흡"으로 지칭됨), 인접한 단백질의 소수성 영역은 서로 접촉하여 소수성 상호작용에 의해 응집을 초래할 수 있다. 디온 및 설펜 부형제의 파이-스태킹 특징은 이러한 "호흡" 동안 노출될 수 있는 소수성 패치를 차폐할 수 있다. 부형제의 또 다른 중요한 역할은 매우 근접한 단백질 사이의 소수성 상호작용 및 수소 결합을 붕괴시키는 것이며, 이는 용액 점도를 효과적으로 감소시킬 것이다. 본 설명에 적합한 디온 및 설펜 화합물은 디메틸설펜, 에틸 메틸 설펜, 에틸 메틸 설펜, 에틸 이소프로필 설펜, 비스(메틸설펜)메탄, 메탄 설펜아미드, 메티오닌 설펜, 소듐 바이설펜, 메나디온 소듐 바이설펜, 1,2-사이클로펜탄디온, 1,3-사이클로펜탄디온, 1,4-사이클로펜탄디온, 및 부탄-2,3-디온을 포함한다.

[0115] h. 부형제 화합물 카테고리 8: 쯔비터이온성 부형제

[0097] 치료용 또는 비-치료용 단백질의 용액은 안정성을 개선시키거나 점도를 감소시키기 위해 부형제로서 특정 쯔비터이온성 화합물과 제형화될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "쯔비터이온성"은 양이온성 하전 섹션 및 음이온성 하전 섹션을 갖는 화합물을 지칭한다. 구현예에서, 쯔비터이온성 부형제 화합물은 아민 옥사이드이다. 구현예에서, 반대 전하는 2 내지 8 개의 화학 결합에 의해 서로 분리된다. 구현예에서, 쯔비터이온성 부형제 화합물은 약 50 내지 약 500 g/mol의 분자량을 갖는 것과 같은 소분자일 수 있거나, 약 500 내지 약 2000 g/mol의 분자량을 갖는 것과 같은 중간 분자량 분자일 수 있거나, 약 2000 내지 약 100,000 g/mol의 분자량을 갖는 폴리머와 같은 고분자량 분자일 수 있다.

[0117] 쯔비터이온성 부형제 화합물의 예는 (3-카복시프로필) 트리메틸암모늄 클로라이드, 1-아미노사이클로헥산 카복실산, 호모사이클로류신, 1-메틸-4-이미다졸아세트산, 3-(1-피리디니오)-1-프로판설포네이트, 4-아미노벤조산, 알렌드론네이트, 아미노에틸 설펜산, 아미노히푸르산, 아스파탐, 아미노트리스 (메틸렌포스폰산) (ATMP), 칼코부트롤, 칼테리돌, 코카미도프로필 부테인, 코카미도프로필 하이드록시설펜, 크레아틴, 시티딘, 시티딘 모노포스페이트, 디아미노피멜산, 디에틸렌트리아민펜타아세트산, 디메틸 페닐알라닌, 메틸글리신, 사르코신, 디메틸글리신, 쯔비터이온성 디펩티드(예를 들어, Arg-Glu, Lys-Glu, His-Glu, Arg-Asp, Lys-Asp, His-Asp, Glu-Arg, Glu-Lys, Glu-His, Asp-Arg, Asp-Lys, Asp-His), 디에틸렌트리아민 펜타(메틸렌 포스폰산) (DTPMP), 디팔미토일 포스파티딜콜린, 액토인, 에틸렌디아민 테트라(메틸렌포스폰산) (EDTMP), 플레이트 벤조에이트 혼합물,

폴레이트 니아신아미드 혼합물, 젤라틴, 하이드록시프롤린, 이미노디아세트산, 이소구바신, 레시틴, 미리스타민 옥사이드, 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 (NAD), 아스파르트산, N-메틸 아스파르트산, N-메틸프롤린, 리신, N-트리메틸 리신, 오르니틴, 옥솔린산, 리센드로네이트, 알릴 시스테인, S-알릴-L-시스테인, 소마파시탄, 타우린, 테아닌, 트리고넨린, 비가바트린, 엑토인, 4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진에탄설포네이트, o-옥틸포스포릴 콜린, 니코틴아미드 모노뉴클레오티드, 트리글리신, 테트라글리신, β -구아니디노프로피온산, 5-아미노레볼린산 하이드로클로라이드, 피콜린산, 리도페닌, 포스포콜린, 1-(5-카복시헨틸)-4-메틸피리딘-1-이움브로마이드, L-안세린 니트레이트, L-글루타티온 환원형, N-에틸-L-글루타민, N-메틸 프롤린, (Z)-1-[N-(2-아미노에틸)-N-(2-아미노에틸) 아미노]디아젠-1-이움-1,2-디올레이트 (DETA-NONate), (Z)-1-[N-(3-아미노프로필)-N-(3-아미노프로필)아미노]디아젠-1-이움-1,2-디올레이트 (DPTA-NONate), 및 졸레드론산을 포함한다.

[0118] [0099] 이론으로 국한되지 않으면서, 쯔비터이온성 부형제 화합물은, 단백질과의 상호작용에 의해, 예를 들어, 전하 상호작용, 소수성 상호작용, 및 입체 상호작용에 의해 단백질과 상호작용하여 단백질이 응집에 대해 보다 저항성을 갖도록 함으로써, 또는 단백질 제형에서 물의 벌크 특성, 예컨대, 전해질 기여, 표면 장력 감소, 이용 가능한 비결합된 물의 양의 변화, 또는 유전 상수의 변화에 의해 영향을 미침으로써 점도 감소 또는 안정화 효과를 가할 수 있다.

[0119] i. 부형제 화합물 카테고리 9: 수소 결합 요소를 갖는 크라우딩제

[0120] [00100] 치료용 또는 비-치료용 단백질의 용액은 안정성을 개선시키거나 점도를 감소시키기 위해 부형제로서 수소 결합 요소를 갖는 크라우딩제와 제형화될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "크라우딩제"는 용액에 단백질을 용해시키는 데 이용 가능한 물의 양을 감소시켜 효과적인 단백질 농도를 증가시키는 제형 첨가제를 지칭한다. 구현예에서, 크라우딩제는 단백질 입도를 감소시키거나 용액에서 단백질 언폴딩의 양을 감소시킬 수 있다. 구현예에서, 크라우딩제는 수소 결합 및 수화 효과에 의해 물의 구조화를 야기하는 용매 개질제로서 작용할 수 있다. 구현예에서, 크라우딩제는 용액에서 단백질 사이의 분자간 상호작용의 양을 감소시킬 수 있다. 구현예에서, 크라우딩제는 산소, 황, 또는 질소 원자에 부착된 수소와 같은 적어도 하나의 수소 결합 공여체 요소를 함유하는 구조를 갖는다. 구현예에서, 크라우딩제는 약 6 내지 약 11의 pKa를 갖는 적어도 하나의 약산성 수소 결합 공여체 요소를 함유하는 구조를 갖는다. 구현예에서, 크라우딩제는 약 2 내지 약 50 개의 수소 결합 공여체 요소를 함유하는 구조를 갖는다. 구현예에서, 크라우딩제는 루이스 염기와 같은 적어도 하나의 수소 결합 수용체 요소를 함유하는 구조를 갖는다. 구현예에서, 크라우딩제는 약 2 내지 약 50 개의 수소 결합 수용체 요소를 함유하는 구조를 갖는다. 구현예에서, 크라우딩제는 약 50 내지 500 g/mol의 분자량을 갖는다. 구현예에서, 크라우딩제는 약 100 내지 350 g/mol의 분자량을 갖는다. 다른 구현예에서, 크라우딩제는 500 g/mol 초과 분자량, 예를 들어, 라피노스, 이눌린, 풀루란, 또는 시니스트린을 가질 수 있다.

[0121] 수소 결합 요소를 갖는 크라우딩제 부형제의 예는 1,3-디메틸-3,4,5,6-테트라하이드로-2(1H)-피리미디온, 15-크라운-5, 18-크라운-6, 2-부탄올, 2-부타논, 2-페녹시에탄올, 아세타미노펜, 알라토인, 아라비노스, 메글루민, 아라비톨, 벤질 아세톤아세테이트, 벤질 알코올, 클로로부탄올, 콜레스타놀테트라아세틸-b-글루코시드, 신남알데하이드, 사이클로헥산온, 데옥시리보스, 디에틸 카보네이트, 디메틸 카보네이트, 디메틸 이소소르바이드, 디메틸아세타미드, 디메틸포름아미드, 디메틸을 에틸렌 우레아, 디메틸우라실, 에필락토스, 에리트리톨, 에리트로스, 에틸 락테이트, 에틸 말톨, 에틸렌 카보네이트, 포름아미드, 푸코스, 갈락토스, 제니스테인, 젠티스산 에탄올아미드, 글루코노락톤, 글리세르알데하이드, 글리세롤, 글리세롤 카보네이트, 글리세롤 포르말, 글리세롤 우레탄, 글리시리드산, 고시핀, 하르파고시드, 헤데라코시드 C, 이코텍스트린, 이디톨, 이미다졸리딘, 이노시톨, 이눌린, 이소말티톨, 코직산, 락티톨, 락토비온산, 락토스, 락툴로스, 릭소스, 마데카소시드, 말토트리오스, 만기페린, 만노스, 멜지토스, 메틸 락테이트, 메틸피롤리돈, 모그로시드 V, N-아세틸갈락토사민, N-아세틸글루코사민, N-아세틸뉴라민산, N-메틸 아세타미드, N-메틸 포름아미드, N-메틸 프로피온아미드, 펜타에리트리톨, 피노레시놀 디글루코시드, 글루쿠론산, 피라세탐, 프로필 갈레이트, 프로필렌 카보네이트, 프시코스, 풀루란, 피로갈룰, 퀘산, 라피노스, 레바우디오시드 A, 램노스, 리비톨, 리보스, 리불로스, 사카린, 세도헵톨로스, 시니스트린, 솔케탈, 스타키오스, 수크랄로스, 타가토스, t-부탄올, 테트라글리콜, 트리아세틴, N-아세틸-d-만노사민, 니스토스, 케스토스, 투라노스, 아카르보스, D-사카라산 1,4-락톤, 티오디갈락토시드, 푸코이단, 하이드록시사플로르 옐로우 A, 시킵산, 디오스민, 프라바스타틴 소듐 염, D-알트로스, L-굴론산 감마-락톤, 네오마이신, 루부로스이드 디하이드로아르테미시닌, 플로로글루신올, 나린긴, 바이칼레인, 헤스페리딘, 아피제닌, 피로갈룰, 모린, 살살레이트, 캠프페롤, 미리세틴, 3',4',7-트리하이드록시이소플라본, (±)-탁시폴린, 실리빈, 페르세이톨 디포르말, 4-하이드록시페닐피루브산, 설펜세타미드, 이소프로필 β -D-1-티오갈락토피라노시드, 에틸 2,5-디하이드로벤조에이트, 스펙티노마이신, 레베라트룰, 퀘르세틴, 카나마이신 설펜세이트, 1-(2-피리미디닐)피페라진,

2-(2-피리딜)에틸아민, 2-이미다졸리돈, DL-1,2-이소프로필리텐글리세롤, 메트포르민, m-자일릴렌디아민, x-자일릴렌디아민, 데메클로사이클린, 트리프로필렌 글리콜, 투베이모시드 I, 베르베날로시드, 자일리톨, 및 자일로스를 포함한다.

[0122] 6. 단백질/부형제 용액: 특성 및 공정

[00102] 특정 구현예에서, 치료용 또는 비-치료용 단백질의 용액은 단백질 확산 상호작용 파라미터, kD에 의해, 생물층 간섭계에 의해, 표면 플라즈몬 공명에 의해, 또는 제2 비리얼 계수, B22, 또는 유사한 방법에 의해 측정하는 경우 개선된 단백질-단백질 상호작용 특징 또는 단백질 자가-상호작용을 야기하기 위해 상기-확인된 부형제 화합물, 또는 이들의 조합("부형제 첨가제"), 예컨대, 장애 또는 변형 아민, 방향족, 작용성화된 아미노산, 올리고펩티드, 단쇄 유기산, 저분자량 지방족 다중산, 디온 및 설펜, 쯔비터이온성 부형제, 및 크라우딩제와 제형화된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 상기 확인된 부형제 화합물 또는 이들의 조합을 사용하는 시험 제형에 의해 달성된 하나 이상의 단백질-단백질 상호작용 파라미터에서의 "개선"은 시험 제형을 부형제 화합물 또는 부형제 첨가제를 함유하지 않는 비슷한 제형으로의 조건 하에 비교하는 경우 매력적인 단백질-단백질 상호작용의 감소를 지칭할 수 있다. KD 및 B22의 측정은 업계의 표준 기술을 사용하여 이루어질 수 있고, 개선된 용액 특성 또는 용액 중 단백질의 안정성의 지표일 수 있다. 예를 들어, 높은 음의 kD 값은 단백질이 강한 매력적인 상호작용을 갖는다는 것을 나타낼 수 있고, 이는 응집, 불안정성, 및 레올로지 문제를 유발할 수 있다. 상기 확인된 특정 부형제 화합물 또는 이의 조합물의 존재 하에 제형화될 때, 동일한 단백질은 더 낮은 음의 kD 값, 또는 0에 가깝거나 초과하는 kD 값의 개선된 프록시 파라미터를 가질 수 있으며, 이러한 개선된 프록시 파라미터는 제형-관련 파라미터의 개선과 관련이 있다.

[00103] 구현예에서, 특성의 상기 기재된 부형제 화합물 또는 이들의 조합, 예컨대, 장애 또는 변형 아민, 방향족, 작용성화된 아미노산, 올리고펩티드, 단쇄 유기산, 저분자량 지방족 다중산, 디온 및 설펜, 쯔비터이온성 부형제, 및/또는 크라우딩제는 여과, 주사, 전달, 펌핑, 혼합, 열 전달기에 의한 가열 또는 냉각, 가스 전달, 원심분리, 크로마토그래피, 막 분리, 원심분리 농축, 접선 유동 여과, 방사형 유동 여과, 측류 여과, 동결건조, 및 겔 전기영동 같은 가공 방법을 사용하여 단백질-함유 용액의 제조, 가공, 멸균 충전, 정제, 및 분석과 같은 단백질-관련 공정을 개선시키기 위해 사용된다. 이러한 공정 및 가공 방법은 제조, 가공, 정제, 및 분석 단계 동안 용액에서 단백질의 더 낮은 점도로 인한 개선된 효율, 개선된 용해도, 또는 개선된 안정성을 가질 수 있다. 또한, 단백질 가공 장비의 세척, 멸균, 및 유지와 같은 장비-관련 공정은 단백질의 오염 감소, 변성 감소, 점도 감소, 및 개선된 용해도 때문에 상기 확인된 부형제의 사용에 의해 촉진될 수 있고, 이러한 공정의 개선과 관련된 파라미터는 유사하게 개선된다.

[0125] 실시예

[0126] [00104] 재료:

[0127] ● 소 감마 글로불린(BGG), >99% 순도, Sigma Aldrich

[0128] ● 히스티딘, Sigma Aldrich

[0129] ● 하기 실시예에 기재된 다른 물질은 달리 명시되지 않는 한 Sigma Aldrich로부터의 것들이었다.

[0130] 실시예 1: 부형제 화합물 및 시험 단백질을 함유하는 제형의 제조

[00105] 부형제 화합물 및 시험 단백질을 사용하여 제형을 제조하였고, 여기서 시험 단백질은 치료용 제형에 사용될 치료용 단백질, 또는 비-치료용 제형에 사용될 비-치료용 단백질을 시뮬레이션하기 위한 것이었다. 이러한 제형을 다음 방식으로 점도 측정을 위해 상이한 부형제 화합물과 함께 50 mM 히스티딘에서 제조하였다. 히스티딘 하이드로클로라이드를 먼저 1.94 g의 히스티딘(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 증류수에 용해시키고 1 M 염산(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 사용하여 pH를 약 6.0으로 조정한 후, 부피 플라스크에서 증류수로 250 mL의 최종 부피로 희석함으로써 제조하였다. 이어서, 부형제 화합물을 50 mM 히스티딘 HCl에 용해시켰다. 부형제의 목록은 하기 실시예 4, 5, 6, 및 7에 제공된다. 일부 경우에, 부형제 화합물을 50 mM 히스티딘 HCl에 용해시키기 전에 pH 6으로 조정하였다. 이러한 경우에, 부형제 화합물을 먼저 탈이온수에 약 5 wt%로 용해시키고, pH를 염산 또는 소듐 하이드록사이드에 의해 약 6.0으로 조정하였다. 이어서, 제조된 염 용액을 화씨 약 150 도 (약 65°C)의 대류 실험실 오븐에 넣어 물을 증발시키고 고체 부형제를 분리하였다. 50 mM 히스티딘 HCl 중 부형제 용액이 제조되면, 시험 단백질(소 감마 글로불린("BGG")(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO))을 1 mL 부형제 용액 당 약 0.336 g BGG의 비율로 용해시켰다. 이는 약 280 mg/mL의 최종 단백질 농도를 야기하였다. 부형제와 함께 50 mM 히스티딘 HCl 중 BGG의 용액을 20 mL 바이알에서 제형화하고 오비탈 진탕기 테이블에서 100 rpm으로

밤새 진탕시켰다. 이어서, 용액을 2 mL 미세원심분리기 튜브로 옮기고, IEC MicroMax 미세원심분리기에 2300 rpm으로 10 분 동안 원심분리하여 점도 측정 전에 혼입 공기를 제거하였다.

[0132] 실시예 2: 점도 측정

[00106] 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조된 제형의 점도 측정을 DV-IIT LV 콘 및 플레이트 점도계(Brookfield Engineering, Middleboro, MA)로 수행하였다. 점도계에 CP-40 콘을 장착하고 3 rpm 및 25℃에서 작동시켰다. 제형을 0.5 mL의 부피로 점도계에 로딩하고, 주어진 전단 속도 및 온도에서 3 분 동안 인큐베이션한 후, 20 초의 측정 수집 시간을 두었다. 이어서, 1 분의 전단 인큐베이션 및 후속 20 초 측정 수집 시간으로 이루어진 2 개의 추가 단계를 수행하였다. 수집된 3 개의 데이터 포인트를 이후 평균내고 샘플에 대한 점도로서 기록하였다.

[0134] 실시예 3: 단백질 농도 측정

[00107] UV/VIS 분광계(Perkin Elmer Lambda 35)에서 280 nm의 파장에서 단백질 용액의 흡광도를 측정함으로써 실험 용액 중 단백질의 농도를 결정하였다. 먼저, 기기를 pH 6의 50 mM 히스티딘 완충액으로 흡광도가 0이 되도록 보정하였다. 다음으로, 단백질 용액을 동일한 히스티딘 완충액으로 300 배 희석하고, 280 nm에서의 흡광도를 기록하였다. 용액 중 단백질의 최종 농도는 1.264 mL/(mg x cm)의 흡광 계수 값을 사용함으로써 계산하였다.

[0136] 실시예 4: 장애 아민 부형제 화합물을 갖는 제형

[00108] 280 mg/mL의 BGG를 함유하는 제형을 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조하였고, 일부 샘플은 첨가된 부형제 화합물을 함유하였다. 이러한 시험에서, 디메틸사이클로헥실아민(DMCHA), 디사이클로헥실메틸아민(DMACHMA), 디메틸프로필아민(TEA), 디메틸에탄올아민(DMEA), 및 나이아신아미드의 하이드로클로라이드 염을 장애 아민 부형제 화합물의 예로서 시험하였다. 또한, DMCHA의 하이드록시벤조산 염 및 타우린-디시안디아미드 부가물을 장애 아민 부형제 화합물의 예로서 시험하였다. 각 단백질 용액의 점도를 실시예 2에 기재된 바와 같이 측정하였고, 결과는 하기 표 1에 제시되어 있으며, 이는 점도를 감소시키는 데 있어서 첨가된 부형제 화합물의 이점을 나타낸다.

[0138] 표 1

시험 번호	첨가된 부형제	부형제 농도 (mg/mL)	점도 (cP)	점도 감소
4.1	없음	0	79	0%
4.2	DMCHA-HCl	28	50	37%
4.3	DMCHA-HCl	41	43	46%
4.4	DMCHA-HCl	50	45	43%
4.5	DMCHA-HCl	82	36	54%
4.6	DMCHA-HCl	123	35	56%
4.7	DMCHA-HCl	164	40	49%
4.8	DMAHA-HCl	87	57	28%
4.9	DMAHA-HCl	40	54	32%
4.10	DCHMA-HCl	29	51	35%
4.11	DCHMA-HCl	50	51	35%
4.14	TEA-HCl	97	51	35%
4.15	TEA-HCl	38	57	28%
4.16	DMEA-HCl	51	51	35%
4.17	DMEA-HCl	98	47	41%
4.20	DMCHA- 하이드록시벤조에이트	67	46	42%

[0139]

시험 번호	첨가된 부형제	부형제 농도 (mg/mL)	점도 (cP)	점도 감소
4.21	DMCHA- 하이드록시벤조에이트	92	42	47%
4.22	실시예 8의 생성물	26	58	27%
4.23	실시예 8의 생성물	58	50	37%
4.24	실시예 8의 생성물	76	49	38%
4.25	실시예 8의 생성물	103	46	42%
4.26	실시예 8의 생성물	129	47	41%
4.27	실시예 8의 생성물	159	42	47%
4.28	실시예 8의 생성물	163	42	47%
4.29	나이아신아미드	48	39	51%
4.30	N-메틸-2-피롤리돈	30	45	43%
4.31	N-메틸-2-피롤리돈	52	52	34%

[0140]

[0141]

실시예 5: 음이온성 방향족 부형제 화합물을 갖는 제형

[0142]

[00109] 280 mg/mL의 BGG의 제형을 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조하였고, 일부 샘플은 첨가된 부형제 화합물을 함유하였다. 각 용액의 점도를 실시예 2에 기재된 바와 같이 측정하였고, 결과는 하기 표 2에 제시되어 있으며, 이는 점도를 감소시키는 데 있어서 첨가된 부형제 화합물의 이점을 나타낸다.

[0143] 표 2

시험 번호	첨가된 부형제	부형제 농도 (mg/mL)	점도 (cP)	점도 감소
5.1	없음	0	79	0%
5.2	소듐 아미노벤조에이트	43	48	39%
5.3	소듐 하이드록시벤조에이트	26	50	37%
5.4	소듐 설파닐레이트	44	49	38%
5.5	소듐 설파닐레이트	96	42	47%
5.6	소듐 인돌 아세테이트	52	58	27%
5.7	소듐 인돌 아세테이트	27	78	1%
5.8	바닐산, 나트륨 염	25	56	29%
5.9	바닐산, 나트륨 염	50	50	37%
5.10	소듐 살리실레이트	25	57	28%
5.11	소듐 살리실레이트	50	52	34%
5.12	아테노신 모노포스페이트	26	47	41%
5.13	아테노신 모노포스페이트	50	66	16%
5.14	소듐 벤조에이트	31	61	23%
5.15	소듐 벤조에이트	56	62	22%

[0144]

[0145] 실시예 6: 올리고펩티드 부형제 화합물을 갖는 제형

[0146] [00110] 올리고펩티드(n=5)를 N 말단이 유리 아민이고 C 말단이 유리 산인 >95% 순도로 NeoBioLab Inc.(Woburn, MA)에 의해 합성하였다. 디펩티드(n=2)를 LifeTein LLC에 의해 95% 순도로 합성하였다. 280 mg/mL의 BGG의 제형을 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조하였고, 일부 샘플은 첨가된 부형제 화합물로서 합성 올리고펩티드를 함유하였다. 각 용액의 점도를 실시예 2에 기재된 바와 같이 측정하였고, 결과는 하기 표 3에 제시되어 있으며, 이는 점도를 감소시키는 데 있어서 첨가된 부형제 화합물의 이점을 나타낸다.

[0147] 표 3

시험 번호	첨가된 부형제	부형제 농도 (mg/mL)	점도 (cP)	점도 감소
6.1	없음	0	79	0%
6.2	ArgX5	100	55	30%
6.3	ArgX5	50	54	32%
6.4	HisX5	100	62	22%
6.5	HisX5	50	51	35%
6.6	HisX5	25	60	24%
6.7	Trp2Lys3	100	59	25%
6.8	Trp2Lys3	50	60	24%
6.9	AspX5	100	102	-29%
6.10	AspX5	50	82	-4%
6.11	디펩티드 LE (Leu-Glu)	50	72	9%
6.12	디펩티드 YE (Tyr-Glu)	50	55	30%
6.13	디펩티드 RP (Arg-Pro)	50	51	35%
6.14	디펩티드 RK (Arg-Lys)	50	53	33%
6.15	디펩티드 RH (Arg-His)	50	52	34%
6.16	디펩티드 RR (Arg-Arg)	50	57	28%
6.17	디펩티드 RE (Arg-Glu)	50	50	37%

[0148]

시험 번호	첨가된 부형제	부형제 농도 (mg/mL)	점도 (cP)	점도 감소
6.18	디펩티드 LE (Leu-Glu)	100	87	-10%
6.19	디펩티드 YE (Tyr-Glu)	100	68	14%
6.20	디펩티드 RP (Arg-Pro)	100	53	33%
6.21	디펩티드 RK (Arg-Lys)	100	64	19%
6.22	디펩티드 RH (Arg-His)	100	72	9%
6.23	디펩티드 RR (Arg-Arg)	100	62	22%
6.24	디펩티드 RE (Arg-Glu)	100	66	16%

[0149]

[0150]

실시예 8: 구아닐 타우린 부형제의 합성

[0151]

[00111] 구아닐 타우린을 미국 특허 제2,230,965호에 기재된 다음 방법에 따라 제조하였다. 타우린(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 3.53 부를 1.42 부의 디시안디아미드(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)와 혼합하고, 균질한 혼합물이 수득될 때까지 모르타르 및 막자에서 그라인딩하였다. 다음으로, 혼합물을 플라스크에 넣고 200 °C에서 4시간 동안 가열하였다. 생성물을 추가 정제 없이 사용하였다.

[0152]

실시예 9: 부형제 화합물을 함유하는 단백질 제형

[0153]

[00112] 부형제 화합물 및 시험 단백질을 사용하여 제형을 제조하였고, 여기서 시험 단백질은 치료용 제형에 사용될 치료용 단백질, 또는 비-치료용 제형에 사용될 비-치료용 단백질을 시뮬레이션하기 위한 것이었다. 이러한 제형을 다음 방식으로 점도 측정을 위해 상이한 부형제 화합물과 함께 50 mM 수성 히스티딘 완충 용액에서 제조하였다. 히스티딘 하이드로클로라이드 완충 용액을 먼저 1.94 g의 히스티딘(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 증류수에 용해시키고 1 M 염산(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 사용하여 pH를 약 6.0으로 조정 한 후, 부피 플라스크에서 증류수로 250 mL의 최종 부피로 희석함으로써 제조하였다. 이어서, 부형제 화합물을 50 mM 히스티딘 HCl 완충 용액에 용해시켰다. 부형제 화합물의 목록은 표 4에 제공된다. 일부 경우에, 부형제 화합물을 50 mM 히스티딘 HCl에 용해시키고, 생성된 용액의 pH를 소량의 진한 소듐 하이드록사이드 또는 염산으로 조정하여 모델 단백질의 용해 전에 pH 6을 달성하였다. 일부 경우에, 부형제 화합물을 50 mM 히스티딘 HCl에 용해시키기 전에 pH 6으로 조정하였다. 이러한 경우에, 부형제 화합물을 먼저 탈이온수에 약 5 wt%로 용해시키고, pH를 염산 또는 소듐 하이드록사이드에 의해 약 6.0으로 조정하였다. 이어서, 제조된 염 용액을 화씨 약 150 도(65°C)의 대류 실험실 오븐에 넣어 물을 증발시키고 고체 부형제를 분리하였다. 50 mM 히스티딘 HCl 중 부형제 용액이 제조되면, 시험 단백질인 소 감마 글로불린(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 약 280 mg/mL의 최종 단백질 농도를 달성하기 위한 비율로 용해시켰다. 부형제가 있는 50 mM 히스티딘 HCl 중 BGG의 용액을 20 mL 바이알에서 제형화하고 오비탈 진탕기 테이블에서 100 rpm으로 밤새 진탕시켰다. 이어서, 용액을 2 mL 미세원심분리기 튜브로 옮기고, IEC MicroMax 미세원심분리기에서 2300 rpm으로 10 분 동안 원심분리하여 점도 측정 전에 혼입 공기를 제거하였다.

[0154]

[00113] 상기 기재된 바와 같이 제조된 제형의 점도 측정을 DV-IIT LV 콘 및 플레이트 점도계(Brookfield Engineering, Middleboro, MA)로 수행하였다. 점도계에 CP-40 콘을 장착하고 3 rpm 및 25°C에서 작동시켰다. 제형을 0.5 mL의 부피로 점도계에 로딩하고, 주어진 전단 속도 및 온도에서 3 분 동안 인큐베이션한 후, 20 초의 측정 수집 기간을 두었다. 이어서, 1 분의 전단 인큐베이션 및 후속 20 초 측정 수집 기간으로 이루어진 2 개의 추가 단계를 수행하였다. 수집된 3 개의 데이터 포인트를 이후 평균내고 샘플에 대한 점도로서 기록하였다. 부형제가 있는 용액의 점도를 부형제가 없는 모델 단백질 용액의 점도로 표준화시켰다. 표준화된 점도는 부형제가 없는 모델 단백질 용액의 점도에 대한 부형제가 있는 모델 단백질 용액의 점도의 비율이다.

[0155] 표 4

시험 번호	첨가된 부형제	부형제 농도 (mg/mL)	표준화된 점도 (cP)	점도 감소
9.1	DMCHA-HCl	120	0.44	56%
9.2	나이아신아미드	50	0.51	49%
9.3	이소니코틴아미드	50	0.48	52%
9.4	티라민 HCl	70	0.41	59%
9.5	히스타민 HCl	50	0.41	59%
9.6	이미다졸 HCl	100	0.43	57%
9.7	2-메틸-2-이미다졸린 HCl	60	0.43	57%
9.8	1-부틸-3-메틸이미다졸륨 클로라이드	100	0.48	52%
9.9	프로카인 HCl	50	0.53	47%
9.10	3-아미노피리딘	50	0.51	49%
9.11	2,4,6-트리메틸피리딘	50	0.49	51%
9.12	3-피리딘 메탄올	50	0.53	47%
9.13	니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오타이드	20	0.56	44%
9.15	소듐 페닐피루베이트	55	0.57	43%
9.16	2-피롤리디논	60	0.68	32%

[0156]

시험 번호	첨가된 부형제	부형제 농도 (mg/mL)	표준화된 점도 (cP)	점도 감소
9.17	모르폴린 HCl	50	0.60	40%
9.18	아그마틴 설페이트	55	0.77	23%
9.19	1-부틸-3-메틸이미다졸륨 아이오다이드	60	0.66	34%
9.21	L-안세린 니트레이트	50	0.79	21%
9.22	1-헥실-3-메틸이미다졸륨 클로라이드	65	0.89	11%
9.23	N,N-디에틸 니코틴아미드	50	0.67	33%
9.24	니코틴산, 나트륨 염	100	0.54	46%
9.25	비오틴	20	0.69	31%

[0157]

[0158] 실시예 10: 부형제 조합물 및 시험 단백질을 함유하는 제형의 제조

[0159]

[00114] 일차 부형제 화합물, 이차 부형제 화합물 및 시험 단백질을 사용하여 제형을 제조하였고, 여기서 시험 단백질은 치료용 제형에 사용될 치료용 단백질, 또는 비-치료용 제형에 사용될 비-치료용 단백질을 시뮬레이션 하기 위한 것이었다. 일차 부형제 화합물은 하기 표 5에 열거된 바와 같이 음이온성 및 방향족 작용기 둘 모두를 갖는 화합물로부터 선택되었다. 이차 부형제 화합물은 하기 표 5에 열거된 바와 같이 pH 6에서 비이온성 또는 양이온성 전하 및 이미다졸린 또는 벤젠 고리를 갖는 화합물로부터 선택되었다. 이러한 부형제의 제형을 다음 방식으로 점도 측정을 위해 부형제 용액과 함께 50 mM 히스티딘에서 제조하였다. 히스티딘 하이드로클로라이드를 먼저 1.94 g의 히스티딘(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 증류수에 용해시키고 1 M 염산(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 사용하여 pH를 약 6.0으로 조정한 후, 부피 플라스크에서 증류수로 250 mL의 최종 부피로 희석함으로써 제조하였다. 이후, 개별 일차 또는 이차 부형제 화합물을 50 mM 히스티딘 HCl에 용해시켰다. 일차 부형제와 이차 부형제의 조합물을 50 mM 히스티딘 HCl에 용해시키고, 생성된 용액의 pH를 소량의 진한 소듐 하이드록사이드 또는 염산으로 조정하여 모델 단백질의 용해 전에 pH 6을 달성하였다. 일단 부형제 용액이 상기 기재된 바와 같이 제조되면, 시험 단백질(소 감마 글로불린(BGG)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO))을 약 280 mg/mL의 최종 단백질 농도를 달성하기 위한 비율로 각 시험 용액에 용해시켰다. 부형제가 있는 50 mM 히스티딘 HCl 중 BGG의 용액을 20 mL 바이알에서 제형화하고 오비탈 진탕기 테이블에서 100 rpm으로 밤새 진탕시켰다. 이어서, 용액을 2 mL 미세원심분리기 튜브로 옮기고, IEC MicroMax 미세원심분리기에서 2300 rpm으로 10 분 동안 원심분리하여 점도 측정 전에 혼입 공기를 제거하였다.

[0160]

[00115] 상기 기재된 바와 같이 제조된 제형의 점도 측정을 DV-IIT LV 콘 및 플레이트 점도계(Brookfield Engineering, Middleboro, MA)로 수행하였다. 점도계에 CP-40 콘을 장착하고 3 rpm 및 25°C에서 작동시켰다. 제형을 0.5 mL의 부피로 점도계에 로딩하고, 주어진 전단 속도 및 온도에서 3 분 동안 인큐베이션한 후, 20 초의 측정 수집 기간을 두었다. 이어서, 1 분의 전단 인큐베이션 및 후속 20 초 측정 수집 기간으로 이루어진 2 개의 추가 단계를 수행하였다. 수집된 3 개의 데이터 포인트를 이후 평균내고 샘플에 대한 점도로서 기록하였다. 부형제가 있는 용액의 점도를 부형제가 없는 모델 단백질 용액의 점도로 표준화시켰고, 하기 표 5에 요약하였다. 표준화된 점도는 부형제가 없는 모델 단백질 용액의 점도에 대한 부형제가 있는 모델 단백질 용액의 점도의 비율이다. 실시예는 일차 부형제와 이차 부형제의 조합이 단일 부형제보다 더 나은 결과를 제공할 수 있음을 보여준다.

[0161] 표 5

시험 번호	일차 부형제		이차 부형제		표준화된 점도
	명칭	농도 (mg/mL)	명칭	농도 (mg/mL)	
10.1	살리실산	30	없음	0	0.79
10.2	살리실산	25	이미다졸	4	0.59
10.3	4-하이드록시벤조산	30	없음	0	0.61
10.4	4-하이드록시벤조산	25	이미다졸	5	0.57
10.5	4-하이드록시벤젠 설펜산	31	없음	0	0.59
일차 부형제		이차 부형제			
10.6	4-하이드록시벤젠 설펜산	26	이미다졸	5	0.70
10.7	4-하이드록시벤젠 설펜산	25	카페인	5	0.69
10.8	없음	0	카페인	10	0.73
10.9	없음	0	이미다졸	5	0.75

[0162]

[0163] 실시예 11: 부형제 조합물 및 시험 단백질을 함유하는 제형의 제조

[0164] [00116] 일차 부형제 화합물, 이차 부형제 화합물 및 시험 단백질을 사용하여 제형을 제조하였고, 여기서 시험 단백질은 치료용 제형에 사용될 치료용 단백질, 또는 비-치료용 제형에 사용될 비-치료용 단백질을 시뮬레이션하기 위한 것이었다. 일차 부형제 화합물은 하기 표 6에 열거된 바와 같이 음이온성 및 방향족 작용기 둘 모두를 갖는 화합물로부터 선택되었다. 이차 부형제 화합물은 하기 표 6에 열거된 바와 같이 pH 6에서 비이온성 또는 양이온성 전하 및 이미다졸린 또는 벤젠 고리를 갖는 화합물로부터 선택되었다. 이러한 부형제의 제형을 다음 방식으로 점도 측정을 위해 증류수에서 제조하였다. 일차 부형제와 이차 부형제의 조합물을 증류수에 용해시키고, 생성된 용액의 pH를 소량의 진한 소듐 하이드록사이드 또는 염산으로 조정하여 모델 단백질의 용해 전에 pH 6을 달성하였다. 일단 증류수 중 부형제 용액이 제조되면, 시험 단백질(소 감마 글로불린(BGG)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO))을 약 280 mg/mL의 최종 단백질 농도를 달성하기 위한 비율로 용해시켰다. 부형제가 있는 증류수 중 BGG의 용액을 20 mL 바이알에서 제형화하고 오비탈 진탕기 테이블에서 100 rpm으로 밤새 진탕시켰다. 이어서, 용액을 2 mL 미세원심분리기 튜브로 옮기고, IEC MicroMax 미세원심분리기에서 2300 rpm으로 10 분 동안 원심분리하여 점도 측정 전에 혼입 공기를 제거하였다.

[0165] [00117] 상기 기재된 바와 같이 제조된 제형의 점도 측정을 DV-IIT LV 콘 및 플레이트 점도계(Brookfield Engineering, Middleboro, MA)로 수행하였다. 점도계에 CP-40 콘을 장착하고 3 rpm 및 25°C에서 작동시켰다. 제형을 0.5 mL의 부피로 점도계에 로딩하고, 주어진 전단 속도 및 온도에서 3 분 동안 인큐베이션한 후, 20 초의 측정 수집 기간을 두었다. 이어서, 1 분의 전단 인큐베이션 및 후속 20 초 측정 수집 기간으로 이루어진 2 개의 추가 단계를 수행하였다. 수집된 3 개의 데이터 포인트를 이후 평균내고 샘플에 대한 점도로서 기록하였다. 부형제가 있는 용액의 점도를 부형제가 없는 모델 단백질 용액의 점도로 표준화시켰고, 하기 표 6에 요약하였다. 표준화된 점도는 부형제가 없는 모델 단백질 용액의 점도에 대한 부형제가 있는 모델 단백질 용액의 점도의 비율이다. 실시예는 일차 부형제와 이차 부형제의 조합이 단일 부형제보다 더 나은 결과를 제공할 수 있음을 보여준다.

[0166] 표 6

시험 번호	일차 부형제		이차 부형제		표준화된 점도
	명칭	농도 (mg/mL)	명칭	농도 (mg/mL)	
11.1	살리실산	20	없음	0	0.96
11.2	살리실산	20	카페인	5	0.71
11.3	살리실산	20	나이아신아미드	5	0.76
11.4	살리실산	20	이미다졸	5	0.73

[0167]

[0168] 실시예 12: 부형제 화합물 및 PEG를 함유하는 제형의 제조

[00118] 재료: 모든 재료는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)에서 구입하였다. 제형을 부형제 화합물 및 PEG를 사용하여 제조하였고, 여기서 PEG는 치료용 제형에 사용될 치료용 폐길화 단백질을 시뮬레이션하기 위한 것이었다. 이러한 제형을 동일한 부피의 PEG 용액을 부형제의 용액과 혼합함으로써 제조하였다. 둘 모두의 용액을 7.3의 pH에서 10 mM Tris, 135 mM NaCl, 및 1 mM 트랜스-신남산으로 이루어진 Tris 완충액에서 제조하였다.

[00119] 3 g의 폴리(에틸렌 옥사이드) 평균 Mw ~1,000,000(Aldrich 카탈로그 # 372781)를 97 g의 Tris 완충 용액과 혼합함으로써 PEG 용액을 제조하였다. 혼합물을 완전한 용해를 위해 밤새 교반하였다.

[00120] 부형제 용액 제조의 예는 다음과 같다: 0.4 g의 시트르산(Aldrich cat. # 251275)을 5 mL의 Tris 완충 용액에 용해시킴으로써 Tris 완충액 중 대략 80 mg/mL의 시트르산 용액을 제조하고 최소량의 10 M NaOH 용액에 의해 pH를 7.3으로 조정하였다.

[00121] 0.5 mL의 PEG 용액을 0.5 mL의 부형제 용액과 혼합하여 PEG 부형제 용액을 제조하고, 몇 초 동안 볼텍스를 사용하여 혼합하였다. 0.5 mL의 PEG 용액을 0.5 mL의 Tris 완충 용액과 혼합하여 대조 샘플을 제조하였다.

[0173] 실시예 13: 부형제 화합물 및 PEG를 함유하는 제형의 점도 측정

[00122] 제조된 제형의 점도 측정을 DV-IIT LV 콘 및 플레이트 점도계(Brookfield Engineering, Middleboro, MA)로 수행하였다. 점도계에 CP-40 콘을 장착하고 3 rpm 및 25°C에서 작동시켰다. 제형을 0.5 mL의 부피로 점도계에 로딩하고, 주어진 전단 속도 및 온도에서 3 분 동안 인큐베이션한 후, 20 초의 측정 수집 기간을 두었다. 이어서, 1 분의 전단 인큐베이션 및 후속 20 초 측정 수집 기간으로 이루어진 2 개의 추가 단계를 수행하였다. 수집된 3 개의 데이터 포인트를 이후 평균내고 샘플에 대한 점도로서 기록하였다.

[00123] 표 7에 제시된 결과는 점도 감소에서 첨가된 부형제 화합물의 효과를 보여준다.

[0176] 표 7

시험 번호	부형제	부형제 농도 (mg/mL)	점도 (cP)	점도 감소
13.1	없음	0	104.8	0%
13.2	시트르산 Na 염	40	56.8	44%
13.3	시트르산 Na 염	20	73.3	28%
13.4	글리세롤 포스페이트	40	71.7	30%
13.5	글리세롤 포스페이트	20	83.9	18%
13.6	에틸렌 디아민	40	84.7	17%
13.7	에틸렌 디아민	20	83.9	15%
13.8	EDTA/K 염	40	67.1	36%
13.9	EDTA/K 염	20	76.9	27%
13.10	EDTA/Na 염	40	68.1	35%
13.11	EDTA/Na 염	20	77.4	26%
13.12	D-글루콘산/K 염	40	80.32	23%
13.13	D-글루콘산/K 염	20	88.4	16%
13.14	D-글루콘산/Na 염	40	81.24	23%
13.15	D-글루콘산/Na 염	20	86.6	17%
13.16	락트산/K 염	40	80.42	23%
13.17	락트산/K 염		85.1	19%

[0177]

시험 번호	부형제	부형제 농도 (mg/mL)	점도 (cP)	점도 감소
13.18	락트산/Na 염	40	86.55	17%
13.19	락트산/Na 염	20	87.2	17%
13.20	에티드론산/K 염	24	71.91	31%
13.21	에티드론산/K 염	12	80.5	23%
13.22	에티드론산/Na 염	24	71.6	32%
13.23	에티드론산/Na 염	12	79.4	24%

[0178]

[0179] 실시예 14: BSA 분자 당 1 개의 PEG 사슬을 갖는 폐길화 BSA의 제조

[0180] [00124] 비이커에 200 mL의 인산염 완충 식염수(Aldrich Cat. # P4417) 및 4 g의 BSA(Aldrich Cat. # A7906)를 첨가하고 자성 막대로 혼합하였다. 다음으로 400 mg의 메톡시 폴리에틸렌 글리콜 말레이미드, MW = 5,000(Aldrich Cat. # 63187)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 반응시켰다. 다음 날, 20 방울의 HCl 0.1 M을 첨가하여 반응을 중단시켰다. 반응 생성물을 SDS-Page 및 SEC에 의해 특성화하였고, 이는 폐길화 BSA를 분명히 나타냈다. 반응 혼합물을 분자량 컷오프(MWCO)가 30,000인 Amicon 원심분리기 튜브에 넣고 수 밀리리터로 농축시켰다. 다음으로, 샘플을 대략 6의 pH에서 50 mM의 히스티딘 완충액으로 20 배 희석한 다음, 고 점도 유체가 수득될 때까지 농축시켰다. 280 nm에서 흡광도를 측정하고 0.6678의 BSA에 대한 흡광 계수를 사용하여 단백질 용액의 최종 농도를 수득하였다. 결과는 용액 중 BSA의 최종 농도가 342 mg/mL였음을 지시하였다.

[0181] 실시예 15: BSA 분자 당 다중 PEG 사슬을 갖는 폐길화 BSA의 제조

[0182] [00125] 7.2의 pH에서 25 mM의 인산염 완충액 중 BSA(Aldrich A7906)의 5 mg/mL 용액을 0.5 g의 BSA를 100 mL의 완충액과 혼합함으로써 제조하였다. 다음으로, 1 g의 메톡시 PEG 프로피온알데하이드 Mw=20,000(JenKem Technology, Plano, TX 75024) 및 이어서 0.12 g의 소듐 시아노보로하이드라이드(Aldrich 156159)를 첨가하였다. 반응이 실온에서 밤새 진행되게 하였다. 다음 날, 반응 혼합물을 Tris 완충액(pH=7.3에서 10 mM Tris, 135 mM NaCl)으로 13 회 희석하고, 대략 150 mg/mL의 농도에 도달할 때까지 30,000의 Amicon 원심분리기 튜브 MWCO를 사용하여 농축시켰다.

[0183] 실시예 16: 리소자임 분자 당 다중 PEG 사슬을 갖는 폐길화 리소자임의 제조

[0184] [00126] 7.2의 pH에서 25 mM의 인산염 완충액 중 리소자임(Aldrich L6876)의 5 mg/mL 용액을 0.5 g의 리소자임을 100 mL의 완충액과 혼합함으로써 제조하였다. 다음으로, 1 g의 메톡시 PEG 프로피온알데하이드 Mw=5,000(JenKem Technology, Plano, TX 75024) 및 이어서 0.12 g의 소듐 시아노보로하이드라이드(Aldrich 156159)를 첨가하였다. 반응이 실온에서 밤새 진행되게 하였다. 다음 날, 반응 혼합물을 인산염 완충액, 25 mM, pH 7.2로 49 배 희석하고, 30,000의 Amicon 원심분리기 튜브 MWCO를 사용하여 농축시켰다. 280 nm에서 흡광도를 측정하고 2.63의 리소자임에 대한 흡광 계수를 사용하여 단백질 용액의 최종 농도를 수득하였다. 용액 중 리소자임의 최종 농도는 140 mg/mL였다.

[0185] 실시예 17: BSA 분자 당 1 개의 PEG 사슬을 갖는 폐길화 BSA의 점도에 대한 부형제의 효과

[0186] [00127] 6 또는 12 mg의 부형제 염을 0.3 mL의 폐길화 BSA 용액에 첨가함으로써 부형제를 갖는 폐길화 BSA(상기 실시예 14로부터)의 제형을 제조하였다. 용액을 부드럽게 진탕시켜 혼합하고, 500 sec⁻¹의 전단 속도에서 A10 채널(100 마이크로 깊이)이 장착된 RheoSense microVisc에 의해 점도를 측정하였다. 점도계 측정을 주위 온도에서 완료하였다.

[0187] [00128] 표 8에 제시된 결과는 점도 감소에서 첨가된 부형제 화합물의 효과를 보여준다.

표 8

시험 번호	부형제	부형제 농도 (mg/mL)	점도 (cP)	점도 감소
17.1	없음	0	228.6	0%
17.2	알파- 사이클로덱스트린 설페이트 Na 염	20	151.5	34%
17.3	K 아세테이트	40	89.5	60%

실시예 18: BSA 분자 당 다중 PEG 사슬을 갖는 폐길화 BSA의 점도에 대한 부형제의 효과

[00129] 8 밀리그램의 부형제 염을 0.2 mL의 폐길화 BSA 용액에 첨가함으로써 부형제로서 시트르산 Na 염을 갖는 폐길화 BSA(상기 실시예 15로부터)의 제형을 제조하였다. 용액을 부드럽게 진탕시켜 혼합하고, 500 sec^{-1} 의 전단 속도에서 A10 채널(100 미크론 깊이)이 장착된 RheoSense microVisc에 의해 점도를 측정하였다. 점도계 측정을 주위 온도에서 완료하였다. 표 9에 제시된 결과는 점도 감소에서 첨가된 부형제 화합물의 효과를 보여준다.

표 9

시험 번호	첨가된 부형제	부형제 농도 (mg/mL)	점도 (cP)	점도 감소
18.1	없음	0	56.8	0%
18.2	시트르산 Na 염	40	43.5	23%

실시예 19: 리소자임 분자 당 다중 PEG 사슬을 갖는 폐길화 리소자임의 점도에 대한 부형제의 효과

[00130] 6 밀리그램의 부형제 염을 0.3 mL의 폐길화 리소자임 용액에 첨가함으로써 부형제로서 포타슘 아세테이트를 갖는 폐길화 리소자임(상기 실시예 16로부터)의 제형을 제조하였다. 용액을 부드럽게 진탕시켜 혼합하고, 500 sec^{-1} 의 전단 속도에서 A10 채널(100 미크론 깊이)이 장착된 RheoSense microVisc에 의해 점도를 측정하였다. 점도계 측정을 주위 온도에서 완료하였다. 다음 표에 제시된 결과는 점도 감소에서 첨가된 부형제 화합물의 이점을 보여준다.

표 10

시험 번호	부형제	부형제 농도 (mg/mL)	점도 (cP)	점도 감소
19.1	없음	0	24.6	0%
19.2	K 아세테이트	20	22.6	8%

실시예 20: 부형제 화합물을 함유하는 단백질 제형

[00131] 부형제 화합물 또는 2 개의 부형제 화합물과 시험 단백질의 조합을 사용하여 제형을 제조하였고, 여기서 시험 단백질은 치료용 제형에 사용될 치료용 단백질을 시뮬레이션하기 위한 것이었다. 이러한 제형을 다음

방식으로 점도 측정을 위해 상이한 부형제 화합물과 함께 20 mM 히스티딘 완충액에서 제조하였다. 부형제 조합을 20 mM 히스티딘(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)에 용해시키고, 생성된 용액의 pH를 소량의 진한 소듐 하이드록사이드 또는 염산으로 조정하여 모델 단백질의 용해 전에 pH 6을 달성하였다. 이 실시예에 대한 부형제 화합물은 하기 표 11에 열거되어 있다. 일단 부형제 용액이 제조되면, 시험 단백질(소 감마 글로불린(BGG)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO))을 약 280 mg/mL의 최종 단백질 농도를 달성하기 위한 비율로 용해시켰다. 부형제 용액 중 BGG의 용액을 5 mL 멸균 폴리프로필렌 튜브에서 제형화하고 오비탈 진탕기 테이블에서 80 내지 100 rpm으로 밤새 진탕시켰다. 이어서, 용액을 2 mL 미세원심분리기 튜브로 옮기고, IEC MicroMax 미세원심분리기에서 2300 rpm으로 약 10 분 동안 원심분리하여 점도 측정 전에 혼입 공기를 제거하였다.

[0200] [00132] 상기 기재된 바와 같이 제조된 제형의 점도 측정을 DV-IIT LV 콘 및 플레이트 점도계(Brookfield Engineering, Middleboro, MA)로 수행하였다. 점도계에 CP-40 콘을 장착하고 3 rpm 및 섭씨 25도에서 작동시켰다. 제형을 0.5 mL의 부피로 점도계에 로딩하고, 주어진 전단 속도 및 온도에서 3 분 동안 인큐베이션한 후, 20 초의 측정 수집 시간을 두었다. 이어서, 1 분의 전단 인큐베이션 및 후속 20 초 측정 수집 시간으로 이루어진 2 개의 추가 단계를 수행하였다. 수집된 3 개의 데이터 포인트를 이후 평균내고 샘플에 대한 점도로서 기록하였다. 부형제가 있는 용액의 점도를 부형제가 없는 모델 단백질 용액의 점도로 표준화시켰고, 결과는 하기 표 11에 나타나 있다. 표준화된 점도는 부형제가 없는 모델 단백질 용액의 점도에 대한 부형제가 있는 모델 단백질 용액의 점도의 비율이다.

[0201] 표 11

시험 #	부형제 A		부형제 B		표준화된 점도
	명칭	농도 (mg/mL)	명칭	농도 (mg/mL)	
20.1	없음	0	없음	0	1.00
20.2	아스파탐	10	없음	0	0.83
20.3	사카린	60	없음	0	0.51
20.4	아세실팜 K	80	없음	0	0.44
20.5	테오필린	10	없음	0	0.84
20.6	사카린	30	없음	0	0.58
20.7	아세실팜 K	40	없음	0	0.61
20.8	카페인	15	다우린	15	0.82
20.9	카페인	15	티라민	15	0.67

[0202] 실시예 21: 점도 및 주사 통증을 감소시키기 위한 부형제를 함유하는 단백질 제형

[0204] [00133] 부형제 화합물, 제2 부형제 화합물, 및 시험 단백질의 조합을 사용하여 제형을 제조하였고, 여기서 시험 단백질은 치료용 제형에 사용될 치료용 단백질을 시뮬레이션하기 위한 것이었다. 제1 부형제 화합물, 부형제 A를 국소 마취 특성을 갖는 화합물의 군으로부터 선택하였다. 제1 부형제인 부형제 A 및 제2 부형제인 부형제 B는 표 12에 열거되어 있다. 이들 제형을 이들의 점도가 측정될 수 있도록 하기 방식으로 부형제 A 및 부형제 B를 사용하여 20 mM 히스티딘 완충액에서 제조하였다. 표 12에 개시된 양의 부형제를 20 mM 히스티딘(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)에 용해시키고, 생성된 용액의 pH를 소량의 진한 소듐 하이드록사이드 또는 염산으로 조정하여 모델 단백질의 용해 전에 pH 6을 달성하였다. 일단 부형제 용액이 제조되면, 시험 단백질(소 감마 글로불린(BGG)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO))을 약 280 mg/mL의 최종 단백질 농도를 달성하기 위한 비율로 부형제 용액에 용해시켰다. 부형제 용액 중 BGG의 용액을 5 mL 멸균 폴리프로필렌 튜브에서 제형화하고 오비탈 진탕기 테이블에서 80 내지 100 rpm으로 밤새 진탕시켰다. 이어서, BGG-부형제 용액을 2 mL 미세원심분리기 튜브로 옮기고, IEC MicroMax 미세원심분리기에서 2300 rpm으로 약 10 분 동안 원심분리하여 점도 측정 전에 혼입 공기를 제거하였다.

[0205] [00134] 상기 기재된 바와 같이 제조된 제형의 점도 측정을 DV-IIT LV 콘 및 플레이트 점도계(Brookfield Engineering, Middleboro, MA)로 수행하였다. 점도계에 CP-40 콘을 장착하고 3 rpm 및 섭씨 25도에서 작동시켰다. 제형을 0.5 mL의 부피로 점도계에 로딩하고, 주어진 전단 속도 및 온도에서 3 분 동안 인큐베이션한 후, 20 초의 측정 수집 시간을 두었다. 이어서, 1 분의 전단 인큐베이션 및 후속 20 초 측정 수집 시간으로 이루어진 2

개의 추가 단계를 수행하였다. 수집된 3 개의 데이터 포인트를 이후 평균내고 샘플에 대한 점도로서 기록하였다. 부형제가 있는 용액의 점도를 부형제가 없는 모델 단백질 용액의 점도로 표준화시켰고, 결과는 하기 표 12에 나타나 있다. 표준화된 점도는 부형제가 없는 모델 단백질 용액의 점도에 대한 부형제가 있는 모델 단백질 용액의 점도의 비율이다.

표 12

시험 #	부형제 A		부형제 B		표준화된 점도
	명칭	농도 (mg/mL)	명칭	농도 (mg/mL)	
21.1	없음	0	없음	0	1.00
21.2	리도카인	45	없음	0	0.73
21.3	리도카인	23	없음	0	0.74
21.4	리도카인	10	카페인	15	0.71
21.5	프로카인 HCl	40	없음	0	0.64
21.6	프로카인 HCl	20	카페인	15	0.69

실시예 22: 부형제 화합물 및 PEG를 함유하는 제형

[00135] 제형을 부형제 화합물 및 PEG를 사용하여 제조하였고, 여기서 PEG는 치료용 제형에 사용될 치료용 폐길화 단백질을 시뮬레이션하기 위한 것이었고, 표 13에 열거된 바와 같은 양으로 부형제 화합물을 제공하였다. 이들 제형을 동일한 부피의 PEG 용액을 부형제의 용액과 혼합함으로써 제조하였다. 둘 모두의 용액을 DI-수에서 제조하였다.

[00136] 16.5 g의 폴리(에틸렌 옥사이드) 평균 Mw ~100,000(Aldrich 카탈로그 # 181986)를 83.5 g의 DI 수와 혼합하여 PEG 용액을 제조하였다. 혼합물을 완전한 용해를 위해 밤새 교반하였다.

[00137] 부형제 용액을 이러한 일반적인 방법에 의해 및 하기 표 13에 상세히 기재된 바와 같이 제조하였다: DI-수 중 제3염기성 포타슘 포스페이트(Aldrich 카탈로그 # P5629)의 대략 20 mg/mL 용액을 0.05 g의 포타슘 포스페이트를 5 mL에 용해시킴으로써 제조하였다. 0.5 mL의 PEG 용액을 0.5 mL의 부형제 용액과 혼합하여 PEG 부형제 용액을 제조하고, 몇 초 동안 볼텍스를 사용하여 혼합하였다. 0.5 mL의 PEG 용액을 0.5 mL의 DI-수와 혼합하여 대조 샘플을 제조하였다. 점도를 측정하고 결과를 하기 표 13에 기록하였다.

[0212] 표 13

시험 번호	부형제	부형제 농도 (mg/mL)	점도 (cP)	점도 감소 (%)
22.1	없음	0	79.7	0
22.2	시트르산 Na 염	10	74.9	6.0
22.3	포타슘 포스페이트	10	72.3	9.3
22.4	시트르산 Na 염/포타슘 포스페이트	10/10	69.1	13.3
22.5	소듐 설페이트	10	75.1	5.8
22.6	시트르산 Na 염/소듐 설페이트	10/10	70.4	11.7

[0213]

[0214] 실시예 23: 부형제를 갖는 단백질 용액의 개선된 가공

[0215]

[00138] 0.25 g의 고체 BGG(Aldrich 카탈로그 번호 G5009)를 4 ml의 완충 용액과 혼합하여 2 개의 BGG 용액을 제조하였다. 샘플 A의 경우: 완충 용액은 20 mM 히스티딘 완충액(pH=6.0)이었다. 샘플 B의 경우: 완충 용액은 15 mg/ml의 카페인을 함유하는 20 mM 히스티딘 완충액(pH=6)이었다. 샘플을 100 rpm으로 설정된 오비탈 진탕기에 배치함으로써 고체 BGG의 용해를 수행하였다. 카페인 부형제를 함유하는 완충액 샘플은 단백질을 더 빨리 용해시키는 것으로 관찰되었다. 카페인 부형제를 갖는 샘플(샘플 B)의 경우, BGG의 완전한 용해가 15 분 내에 달성되었다. 카페인이 없는 샘플(샘플 A)의 경우, 용해에 35 분이 필요했다.

[0216]

[00139] 다음으로, 샘플을 30,000 분자량 컷오프를 갖는 2 개의 개별 Amicon Ultra 4 원심분리 필터 유닛에 넣고, 샘플을 10 분 간격으로 2,500 rpm에서 원심분리하였다. 각각의 10 분 원심분리 실행 후 회수된 여과액 부피를 기록하였다. 표 14의 결과는 샘플 B에 대한 여과액의 더 빠른 회수를 보여준다. 또한, 샘플 B는 모든 추가 실행으로 농축을 유지했지만, 샘플 A는 최대 농축점에 도달하였고 추가 원심분리는 추가 샘플 농도를 발생시키지 않았다.

표 14

원심분리 시간 (min)	수집된 샘플 A 여과액 (mL)	수집된 샘플 B 여과액 (mL)
10	0.28	0.28
20	0.56	0.61
30	0.78	0.88
40	0.99	1.09
50	1.27	1.42
60	1.51	1.71
70	1.64	1.99
80	1.79	2.29
90	1.79	2.39
100	1.79	2.49

실시예 24: 다중 부형제를 함유하는 단백질 제형

[00140] 이 실시예는 부형제로서 카페인과 아르기닌의 조합이 어떻게 BGG 용액의 점도를 감소시키는 데 유리한 효과를 갖는지를 보여준다. 0.18 g의 고체 BGG(Aldrich 카탈로그 번호 G5009)를 pH 6에서 0.5 mL의 20 mM 히스티딘 완충액과 혼합함으로써 4 개의 BGG 용액을 제조하였다. 각각의 완충 용액은 하기 표에 기재된 바와 같이 상이한 부형제 또는 부형제의 조합을 함유하였다. 용액의 점도를 이전 실시예에 기재된 바와 같이 측정하였다. 결과는 장애 아민 부형제인 카페인과 아르기닌과 같은 공지된 부형제와 조합될 수 있고, 조합이 개별 부형제 자체보다 우수한 점도 감소 특성을 갖는다는 것을 보여준다.

표 15

샘플	첨가된 부형제(들)	점도 (cP)	점도 감소 (%)
A	없음	130.6	0
B	카페인 (10 mg/ml)	87.9	33
C	카페인 (10 mg/ml) / 아르기닌 (25 mg/ml)	66.1	49
D	아르기닌 (25 mg/ml)	76.7	41

[00141] 아르기닌을 pH 6의 히스티딘 완충액 중 BGG의 280 mg/mL 용액에 첨가하였다. 50 mg/mL 초과 수준에서, 더 많은 아르기닌을 첨가하는 것은 표 16에 제시된 바와 같이 점도를 추가로 감소시키지 않았다.

[0224] 표 16

첨가된 아르기닌 (mg/mL)	점도 (cP)	점도 감소 (%)
0	79.0	0%
53	40.9	48%
79	46.1	42%
105	47.8	40%
132	49.0	38%
158	48.0	39%
174	50.3	36%
211	51.4	35%

[0225]

[0226]

[00142] 카페인을 pH 6의 히스티딘 완충액 중 BGG의 280 mg/mL 용액에 첨가하였다. 10 mg/mL 초과 수준에서, 더 많은 카페인을 첨가하는 것은 표 17에 제시된 바와 같이 점도를 추가로 감소시키지 않았다.

[0227]

표 17

첨가된 카페인 (mg/mL)	점도 (cP)	점도 감소 (%)
0	79	0%
10	60	31%
15	62	23%
22	50	45%

[0228]

[0229]

실시예 25: 탈이온수 중 공-용질의 용액의 제조

[0230]

[00143] 수중 카페인 용해도를 증가시키기 위해 공-용질로서 사용된 화합물은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)로부터 입수되었고, 나이아신아미드, 프롤린, 프로카인 HCl, 아스코르브산, 2,5-디하이드록시벤조산, 리도카인, 사카린, 아세살팜 K, 티라민, 및 아미노벤조산을 포함하였다. 탈이온수에 건조 고체를 용해시키고, 일부 경우에, 필요에 따라 5 M 염산 또는 5 M 소듐 하이드록사이드를 사용하여 pH를 약 6의 pH 내지 약 8의 pH 값으로 조정함으로써 각각의 공-용질의 용액을 제조하였다. 이어서, 용액을 클래스 A 부피 플라스크를 사용하여 25 mL 또는 50 mL의 최종 부피로 희석하고, 용해된 화합물의 질량 및 용액의 최종 부피를 기준으로 농도를 기록하였다. 제조된 용액을 순수하게 또는 탈이온수로 희석하여 사용하였다.

[0231]

실시예 26: 카페인 용해도 시험

[0232]

[00144] 주위 온도(약 23°C)에서 카페인 용해도에 대한 상이한 공-용질의 영향을 다음 방식으로 평가하였다. 건조 카페인 분말(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 20 mL 유리 신틸레이션 바이알에 첨가하고 카페인의 질량을 기록하였다. 실시예 25에 따라 제조된 10 mL의 공-용질 용액을 특정 경우에 카페인 분말에 첨가하였고(표 18에 기록됨); 다른 경우에(표 18에 기록됨), 공-용질 용액과 탈이온수의 블렌드를 10 mL의 최종 첨가 부피를 유지하면서 카페인 분말에 첨가하였다. 건조 카페인 분말의 부피 기여는 임의의 이러한 혼합물에서 무시할 수 있는 것으로 가정되었다. 작은 자성 교반 막대를 바이알에 첨가하고, 용액을 교반 플레이트에서 약 10 분 동안 격렬하게 혼합하였다. 약 10 분 후, 건조 카페인 분말의 용해에 대해 바이알을 관찰하였고, 결과는 하기 표 18에 제공

된다. 이러한 관찰은 나이아신아미드, 프로카인 HCl, 2,5-디하이드록시벤조산 소듐 염, 사카린 소듐 염, 및 티라민 클로라이드 염 모두가 보고된 카페인 용해도 한계(Sigma-Aldrich에 따라 실온에서 약 16 mg/mL)의 적어도 약 4 배까지 카페인의 용해를 가능하게 했다는 것을 시사하였다.

표 18

시험 No.	공-용질		카페인	관찰
	명칭	농도 (mg/mL)	(mg/mL)	
26.1	프롤린	100	50	DND
26.2	나이아신아미드	100	50	CD
26.3	나이아신아미드	100	60	CD
26.4	나이아신아미드	100	75	CD
26.5	나이아신아미드	100	85	CD
26.6	나이아신아미드	100	100	CD
26.7	나이아신아미드	80	85	CD
26.8	나이아신아미드	50	80	CD
26.9	프로카인 HCl	100	85	CD
26.10	프로카인 HCl	50	80	CD
26.11	나이아신아미드	30	80	DND
26.12	프로카인 HCl	30	80	DND
26.13	나이아신아미드	40	80	MD
26.14	프로카인 HCl	40	80	DND
26.15	아스코르브산, Na	50	80	DND
26.16	아스코르브산, Na	100	80	DND
26.17	2,5 DHBA, Na	40	80	CD
26.18	2,5 DHBA, Na	20	80	MD
26.19	리도카인 HCl	40	80	DND

시험 No.	공-용질		카페인	관찰
	명칭	농도 (mg/mL)	(mg/mL)	
26.20	사카린, Na	90	80	CD
26.21	아세실팜 K	80	80	DND
26.22	티라민 HCl	60	80	CD
26.23	Na 아미노벤조에이트	46	80	DND
26.24	사카린, Na	45	80	DND
26.25	티라민 HCl	30	80	DND

CD = 완전히 용해됨; MD = 대부분 용해됨; DND = 용해되지 않음

[0235]

[0236]

실시예 27: 단백질 제형에 대한 더 높은 카페인 농도의 영향

[0237]

[00145] 일차 부형제 화합물, 이차 부형제 화합물 및 시험 단백질을 사용하여 제형을 제조하였고, 여기서 시험 단백질은 치료용 제형에 사용될 치료용 단백질을 시뮬레이션하기 위한 것이었다. 일차 부형제 화합물은 둘 모두 저용해도를 갖는 화합물로부터 선택되었고, 점도 감소를 입증하였다. 이차 부형제 화합물은 더 높은 용해도 및 피리딘 또는 벤젠 고리를 갖는 화합물로부터 선택되었다. 이러한 제형을 점도 측정을 위해 상이한 부형제 화합물과 함께 20 mM 히스티딘 완충액에서 하기 방식으로 제조하였다: 부형제 조합물을 20 mM 히스티딘 완충 용액에 용해시키고, 생성된 용액의 pH를 소량의 진한 소듐 하이드록사이드 또는 염산으로 조정하여 모델 단백질의 용해 전에 pH 6을 달성하였다. 특정 실험에서, 일차 부형제를 문헌에 보고된 바와 같은 이의 실온 용해도 한계를 크게 초과하는 양으로 첨가하였다. 일단 부형제 용액이 제조되면, 시험 단백질(소 감마 글로불린(BGG, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO))을 약 280 mg/mL의 최종 단백질 농도를 달성하기 위한 비율로 용해시켰다. 부형제 용액 중 BGG의 용액을 20 mL 바이알에서 제형화하고 오비탈 진탕기 테이블에서 100 rpm으로 밤새 진탕시켰다. 이어서, 용액을 2 mL 미세원심분리기 튜브로 옮기고, IEC MicroMax 미세원심분리기에서 2300 rpm으로 10 분 동안 원심분리하여 점도 측정 전에 혼입 공기를 제거하였다.

[0238]

[00146] 상기 기재된 바와 같이 제조된 제형의 점도 측정을 DV-IIT LV 콘 및 플레이트 점도계(Brookfield Engineering, Middleboro, MA)로 수행하였다. 점도계에 CP-40 콘을 장착하고 3 rpm 및 섭씨 25도에서 작동시켰다. 제형을 0.5 mL의 부피로 점도계에 로딩하고, 주어진 전단 속도 및 온도에서 3 분 동안 인큐베이션한 후, 20 초의 측정 수집 기간을 두었다. 이어서, 1 분의 전단 인큐베이션 및 후속 20 초 측정 수집 기간으로 이루어진 2 개의 추가 단계를 수행하였다. 수집된 3 개의 데이터 포인트를 이후 하기 표 19에 나타낸 바와 같이 평균내고 샘플에 대한 점도로서 기록하였다. 부형제가 있는 용액의 점도를 부형제가 없는 모델 단백질 용액의 점도로 표준화시켰다. 표준화된 점도는 부형제가 없는 모델 단백질 용액의 점도에 대한 부형제가 있는 모델 단백질 용액의 점도의 비율이다.

[0239] 표 19

시험 No.	일차 부형제		이차 부형제		표준화된 점도
	명칭	농도 (mg/mL)	명칭	(mg/mL)	
27.1	카페인	15	없음	0	0.75
시험 No.	일차 부형제		이차 부형제		표준화된 점도
	명칭	농도 (mg/mL)	명칭	(mg/mL)	
27.2	카페인	15	사카린	14	0.62
27.3	카페인	15	프로카인 HCl	20	0.61
27.4	카페인	60	나이아신아미드	50	0.61
27.5	카페인	60	프로카인 HCl	50	0.60
27.6	카페인	60	사카린	50	0.66

[0240]

[0241] 실시예 28: 부형제로서 카페인을 갖는 아달리무맙 용액의 개선된 안정성

[0242] [00147] 카페인 부형제의 존재 및 부재에서 아달리무맙 용액의 안정성은 샘플을 2 개의 상이한 응력 조건: 교반 및 동결-해동에 노출시킨 후 평가하였다. 실시예 32에 더욱 상세히 기재된 특성을 갖는 아달리무맙 약물 제형 HUMIRA®를 사용하였다. HUMIRA® 샘플을 실시예 32에 기재된 바와 같이 원래의 완충 용액 중 200 mg/ml 아달리무맙 농도로 농축시켰고; 이러한 농축된 샘플을 "샘플 1"로 지정하였다. 실시예 33에 기재된 바와 같이 ~200 mg/mL의 아달리무맙 및 15 mg/mL의 첨가된 카페인으로 제2 샘플을 제조하였고; 카페인이 첨가된 이러한 농축된 샘플을 "샘플 2"로 지정하였다. 둘 모두의 샘플을 다음과 같이 희석제를 사용하여 1 mg/ml 아달리무맙의 최종 농도로 희석하였다: 샘플 1 희석제는 원래의 완충 용액이고, 샘플 2 희석제는 20 mM 히스티딘, 15 mg/ml 카페인, pH = 5였다. 둘 모두의 HUMIRA® 희석액을 0.22 μ 주사기 필터를 통해 여과하였다. 모든 희석된 샘플에 대해, 층류 후드에서 2 ml 에펜도르프 튜브 중에 각각 300 μ l의 3 개의 배치를 제조하였다. 샘플에 다음 응력 조건을 가하였다: 교반의 경우, 샘플을 91 시간 동안 300 rpm으로 오비탈 진탕기에 넣었고; 동결-해동의 경우, 샘플을 조건 당 평균 6 시간 동안 -17°C에서 30°C로 7 회 순환시켰다. 표 20은 제조된 샘플을 설명한다.

[0243] 표 20

샘플 #	첨가된 부형제	응력 조건
1-C	없음	없음
1-A	없음	교반
1-FT	없음	동결-해동
2-C	15 mg/mL 카페인	없음
2-A	15 mg/mL 카페인	교반
2-FT	15 mg/mL 카페인	동결-해동

[0244]

[0245] [00148] 동적 광산란(DLS)에 의한 안정성 평가

[0246] [00149] Brookhaven Zeta Plus 동적 광 산란 기기를 사용하여 샘플에서 아달리무맙 분자의 유체역학적 반경을 측정하고 응집체 집단의 형성의 증거를 찾았다. 표 21은 표 20에 기재된 6 개의 샘플에 대한 DLS 결과를 보여주는 것이고; 이들 중 일부(1-A, 1-FT, 2-A, 및 2-FT)는 응력 조건에 노출되었고(응력된 샘플), 다른 것들(1-C 및

2-C)은 응력을 받지 않았다. 부형제로서 카페인에 부재 하에서, 응력을 받은 샘플 1-A 및 1-FT는 응력을 받지 않은 샘플 1-C보다 더 높은 유효 직경을 나타냈고, 또한 이들은 유의하게 더 큰 직경의 입자의 제2 집단을 나타냈고; 더 큰 직경을 갖는 이러한 새로운 입자 그룹화는 눈에 보이지 않는 입자로의 응집의 증거였다. 카페인을 함유하는 응력을 받은 샘플(샘플 2-A 및 2-FT)은 응력을 받지 않은 샘플 2-C와 유사한 입경으로 단지 하나의 집단을 나타냈다. 이러한 결과는 응집체 또는 눈에 보이지 않는 입자의 형성을 감소시키거나 최소화하기 위해 카페인을 첨가하는 효과를 입증한다. 표 21 및 도 1, 2, 및 3은 DLS 데이터를 나타내며, 여기서 단클론성 항체의 멀티모달 입도 분포는 카페인을 함유하지 않는 응력을 받은 샘플에서 명백하다.

표 21

샘플 #	유효 직경 (nm)	집단 #1의 직경 (nm)	집단 #1의 강도 기준 %	집단 #2의 직경 (nm)	집단 #2의 강도 기준 %
1-C	10.9	10.8	100	-	-
1-A	11.5	10.8	87	28.9	13
1-FT	20.4	11.5	66	112.2	44
2-C	10.5	10.5	100	-	-
2-A	10.8	10.8	100	-	-
2-FT	11.4	11.4	100	-	-

[00150] 표 22A 및 표 22B는 입도 분포를 나타내는 아달리무맙 샘플의 DLS 원시 데이터를 나타낸다. G(d)는 강도-가중 차등 크기 분포이다. C(d)는 누적 강도-가중 차등 크기 분포이다.

[0250] 표 22A

샘플 1-C			샘플 1-A			샘플 1-FT		
직경 (nm)	G (d)	C(d)	직경 (nm)	G (d)	C(d)	직경 (nm)	G (d)	C(d)
10.6	14	4	9.3	13	3	8.2	12	2
10.6	53	20	9.8	47	15	9.2	55	13
10.7	92	46	10.3	87	37	10.3	98	32
10.8	100	76	10.8	100	63	11.5	100	52
10.9	61	93	11.4	67	80	12.9	57	63
10.9	22	100	12	27	87	14.5	14	66
			26.1	4	88	89.3	5	67
			27.5	10	91	100.1	27	72
			28.9	13	94	112.2	52	83
			30.5	13	97	125.7	52	93
			32.1	7	99	140.8	30	99
			33.8	4	100	157.8	7	100

[0251]

[0252] 표 22B

샘플 2-C			샘플 2-A			샘플 2-FT		
직경 (nm)	G (d)	C(d)	직경 (nm)	G (d)	C(d)	직경 (nm)	G (d)	C(d)
10.3	14	4	10.6	7	2	11.3	28	9
10.4	52	19	10.6	43	16	11.3	64	29
10.5	91	46	10.7	79	40	11.4	100	60
10.5	100	75	10.8	100	71	11.5	79	85
10.6	62	93	10.8	64	91	11.5	43	98
10.7	23	100	10.9	29	100	11.6	7	100

[0253]

[0254] 실시예 29: 크기-배제 크로마토그래피(SEC)에 의한 안정성 평가

[0255] [00151] SEC를 사용하여 상기 기재된 응력을 받은 및 응력을 받지 않은 아달리무맙 샘플로부터 크기가 약 0.1 미크론 미만인 임의의 보이지 않는 미립자를 검출하였다. 가드 컬럼을 갖는 TSKgel SuperSW3000 컬럼(Tosoh Biosciences, Montgomeryville, PA)을 사용하고, 용리를 280 nm에서 모니터링하였다. 총 10 μ l의 각각의 응력을 받은 및 응력 받지 않은 샘플을 0.35 ml/분의 유량으로 pH 6.2 완충액(100 mM 포스페이트, 325 mM NaCl)에 의해 등용매로 용리시켰다. 아달리무맙 단량체의 체류 시간은 대략 9 분이였다. 데이터는 부형제로서 카페인을 함유하는 샘플이 임의의 검출 가능한 응집체를 나타내지 않았음을 보여주었다. 또한, 3 개의 샘플 모두에서 단

량체의 양은 일정하게 유지되었다.

[0256] 실시예 30: HERCEPTIN[®]의 점도 감소

[00152] 단클론성 항체 트라스투주맙(Genentech의 HERCEPTIN[®])을 동결건조된 분말로서 입수하고 DI 수에서 21 mg/mL로 재구성하였다. 생성된 용액을 3500 rpm에서 1.5 시간 동안 원심분리함으로써 Amicon Ultra 4 원심분리 농축기 튜브(분자량 컷-오프, 30 KDa)에서 그대로 농축시켰다. 적절한 완충액에서 샘플을 200 배 희석하고 1.48 mL/mg의 흡광 계수를 사용하여 280 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 농도를 측정하였다. RheoSense microVisc 점도계를 사용하여 점도를 측정하였다.

[00153] 히스티딘 및 부형제를 증류수에 용해시킨 다음, pH를 적절한 수준으로 조정함으로써, 살리실산 및 카페인을 단독으로 또는 조합하여 함유하는 부형제 완충액을 제조하였다. 완충 시스템 1 및 2의 조건은 표 23에 요약되어 있다.

표 23

완충 시스템 #	살리실산 농도	카페인 농도	삼투압농도 (mOsm/kg)	pH
1	10 mg/mL	10 mg/mL	145	6
2	-	15 mg/mL	86	6

[00154] HERCEPTIN[®] 용액을 ~1:10의 비율로 부형제 완충액에서 희석하고, Amicon Ultra 15(MWCO 30 KDa) 농축기 튜브에서 농축시켰다. Bradford 검정을 사용하여 농도를 결정하고, 스톡 HERCEPTIN[®] 샘플로부터 만들어진 표준 보정 곡선과 비교하였다. RheoSense microVisc를 사용하여 점도를 측정하였다. 다양한 HERCEPTIN[®] 용액의 농도 및 점도 측정은 하기 표 24에 제시되어 있고, 여기서 완충 시스템 1 및 2는 표 23에서 확인된 완충액을 지칭한다.

표 24

부형제가 첨가되지 않은 대조 용액		10 mg/mL 카페인 + 10 mg/ml 살리실산이 첨가된 용액(완충 시스템 1)		15 mg/mL 카페인에 첨가된 용액(완충 시스템 2)	
점도 (cP)	항체 농도 (mg/mL)	점도 (cP)	항체 농도 (mg/mL)	점도 (cP)	항체 농도 (mg/mL)
37.2	215	9.7	244	23.4	236
9.3	161	7.7	167	12.2	200
3.1	108	2.9	122	5.1	134
1.6	54	2.4	77	2.1	101

[00155] 살리실산과 카페인 둘 모두를 함유하는 완충 시스템 1은 대조 샘플과 비교하여 215 mg/mL에서 76%의 최대 점도 감소를 가졌다. 카페인만을 함유하는 완충 시스템 2는 200 mg/mL에서 최대 59%의 점도 감소를 가졌다.

[0265] 실시예 31: AVASTIN[®]의 점도 감소

[00156] AVASTIN[®](Genentech에 의해 시판되는 베바시주맙 제형)은 히스티딘 완충액 중 25 mg/ml 용액으로 수용되었다. 샘플을 Amicon Ultra 4 원심분리 농축기 튜브(MWCO 30 KDa)에서 3500 rpm으로 농축시켰다. 점도를

RheoSense microVisc에 의해 측정하고, 농도를 280 nm에서의 흡광도에 의해 결정하였다(소광 계수, 1.605 mL/mg). 25 mM 히스티딘 HCl과 함께 10 mg/mL 카페인을 첨가함으로써 부형제 완충액을 제조하였다. AVASTIN[®] 스톱 용액을 부형제 완충액으로 희석한 다음, Amicon Ultra 15 원심분리 농축기 튜브(MWCO 30 KDa)에서 농축시켰다. 부형제 샘플의 농도를 Bradford 검정에 의해 결정하고 점도를 RheoSense microVisc를 사용하여 측정하였다. 결과는 하기 표 25에 제시되어 있다.

표 25

농도 (mg/mL)	부형제가 첨가되지 않은 점도 (cP)	10 mg/mL의 카페인 부형제가 첨가된 점도 (cP)	부형제로부터의 점도 감소 %
266	297	113	62%
213	80	22	73%
190	21	13	36%

[00157] AVASTIN[®]은 대조 AVASTIN 샘플과 비교할 때 10 mg/mL의 카페인에 213 mg/mL로 농축될 때 73%의 최대 점도 감소를 나타냈다.

실시예 32: HUMIRA[®]의 프로파일

[00158] HUMIRA[®] (AbbVie Inc., Chicago, IL)는 류마티스 관절염, 건선 관절염, 강직성 척추염, 크론병, 궤양성 대장염, 중등도 내지 중증 만성 건선 및 청소년 특발성 관절염과 같은 자가면역 질환의 염증 반응을 감소시키기 위해 전형적으로 처방되는 TNF-알파 차단제인 치료용 단클론성 항체 아달리무맙의 상업적으로 입수 가능한 제형이다. HUMIRA[®]는 40 mg의 아달리무맙, 4.93 mg의 소듐 클로라이드, 0.69 mg의 소듐 포스페이트 일염기성 이수화물, 1.22 mg의 소듐 포스페이트 이염기성 이수화물, 0.24 mg의 소듐 시트레이트, 1.04 mg의 시트르산 일수화물, 9.6 mg의 만니톨 및 0.8 mg의 폴리소르베이트-80을 함유하는 0.8 mL 단일 사용 용량으로 판매된다. 이러한 제형의 점도 대 농도 프로파일을 하기 방식으로 생성하였다. 30 kDa 분자량 컷-오프를 갖는 Amicon Ultra 15 원심분리 농축기(EMD-Millipore, Billerica, MA)에 약 15 mL의 탈이온수를 채우고, 10 분 동안 4000 rpm으로 Sorvall Legend RT(Kendro Laboratory Products, Newtown, CT)에서 원심분리하여 막을 세정하였다. 그 후에, 잔류하는 물을 제거하고, 2.4 mL의 HUMIRA[®] 액체 제형을 농축기 튜브에 첨가하고, 4000 rpm에서 25°C에서 60 분 동안 원심분리하였다. 10 마이크로리터의 잔류물을 1990 마이크로리터의 탈이온수로 희석하고, 280 nm에서 희석된 샘플의 흡광도를 측정하고, 1.39 mL/mg-cm의 희석 계수 및 흡광 계수를 사용하여 농도를 계산함으로써 잔류물의 농도를 결정하였다. 농축된 샘플의 점도를 23°C에서 250 sec⁻¹의 전단 속도로 A05 칩(RheoSense, San Ramon, CA)이 장착된 microVisc 점도계에 의해 측정하였다. 점도 측정 후, 샘플을 소량의 여과액으로 희석하고, 농도 및 점도 측정을 반복하였다. 이 공정을 사용하여 하기 표 26에 기재된 바와 같이 다양한 아달리무맙 농도에서 점도 값을 생성하였다.

표 26

아달리무맙 농도 (mg/mL)	점도 (cP)
277	125
253	63
223	34
202	20
182	13

실시예 33: 점도-감소 부형제를 사용한 HUMIRA®의 재제형화

[00159] 하기 실시예는 HUMIRA®가 점도-감소 부형제를 갖는 완충액에서 재제형화하는 일반적인 공정을 기술한다. 탈이온수에 약 0.15 g의 히스티딘(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 및 0.75 g의 카페인(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 용해시킴으로써 점도-감소 부형제의 용액을 20 mM 히스티딘에 제조하였다. 생성된 용액의 pH를 5 M 염산에 의해 약 5로 조정하였다. 이어서, 용액을 탈이온수에 의해 부피 플라스크에서 50 mL의 최종 부피로 희석하였다. 그 후에, 생성된 완충된 점도-감소 부형제 용액을 사용하여 HUMIRA®를 높은 mAb 농도로 재제형화하였다. 다음으로, 약 0.8 mL의 HUMIRA®를 30 kDa 분자량 컷오프를 갖는 세정된 Amicon Ultra 15 원심분리 농축기 튜브에 첨가하고, Sorvall Legend RT에서 4000 rpm 및 25°C에서 8 내지 10 분 동안 원심분리하였다. 그 후, 상기 기재된 바와 같이 제조된 약 14 mL의 완충된 점도-감소 부형제 용액을 원심분리 농축기에서 농축된 HUMIRA®에 첨가하였다. 부드럽게 혼합한 후, 샘플을 4000 rpm 및 25°C에서 약 40 내지 60 분 동안 원심분리하였다. 잔류물을 점도-감소 부형제를 갖는 완충액에서 재제형화된 HUMIRA®의 농축된 샘플이었다. 샘플의 점도 및 농도를 측정하고, 일부 경우에 소량의 여과액으로 희석하여 더 낮은 농도에서 점도를 측정하였다. 이전 실시예에서 농축된 HUMIRA® 제형과 동일한 방식으로 microVisc 점도계로 점도 측정을 완료하였다. 탈이온수에 희석된 HUMIRA® 스톡 용액으로부터 생성된 표준 곡선을 사용하여 Bradford 검정으로 농도를 결정하였다. 점도-감소 부형제에 의한 HUMIRA®의 재제형화는 하기 표 27에 기재된 바와 같이, 재제형화 없이 상업적 완충액에 농축된 HUMIRA®의 점도 값과 비교하여 30% 내지 60%의 점도 감소를 제공하였다.

표 27

아달리무맙 농도 (mg/mL)	점도 (cP)
290	61
273	48
244	20
205	14

실시예 34: 카페인, 이차 부형제 및 시험 단백질을 함유하는 제형의 제조

[00160] 부형제 화합물로서 카페인 또는 카페인과 제2 부형제 화합물의 조합물, 및 시험 단백질을 사용하여 제형을 제조하였고, 여기서 시험 단백질은 치료용 제형에 사용될 치료용 단백질을 시뮬레이션하기 위한 것이었다. 이러한 제형을 다음 방식으로 점도 측정을 위해 상이한 부형제 화합물과 함께 20 mM 히스티딘 완충액에서 제조

하였다. 부형제 조합(하기 표 28에 기재된 바와 같은 부형제 A 및 B)을 20 mM 히스티딘(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)에 용해시키고, 생성된 용액의 pH를 소량의 진한 소듐 하이드록사이드 또는 염산으로 조정하여 모델 단백질의 용해 전에 pH 6을 달성하였다. 일단 부형제 용액이 제조되면, 시험 단백질(소 감마 글로불린(BGG)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO))을 약 280 mg/mL의 최종 단백질 농도를 달성하기 위한 비율로 용해시켰다. 부형제 용액 중 BGG의 용액을 20 mL 유리 신틸레이션 바이알에서 제형화하고 오비탈 진탕기 테이블에서 80-100 rpm으로 밤새 진탕시켰다. 이어서, 용액을 2 mL 미세원심분리기 튜브로 옮기고, IEC MicroMax 미세원심분리기에서 2300 rpm으로 약 10 분 동안 원심분리하여 점도 측정 전에 혼입 공기를 제거하였다.

[0280] [00161] 상기 기재된 바와 같이 제조된 제형의 점도 측정을 DV-IIT LV 콘 및 플레이트 점도계(Brookfield Engineering, Middleboro, MA)로 수행하였다. 점도계에 CP-40 콘을 장착하고 3 rpm 및 섭씨 25도에서 작동시켰다. 제형을 0.5 mL의 부피로 점도계에 로딩하고, 주어진 전단 속도 및 온도에서 3 분 동안 인큐베이션한 후, 20 초의 측정 수집 기간을 두었다. 이어서, 1 분의 전단 인큐베이션 및 후속 20 초 측정 수집 기간으로 이루어진 2 개의 추가 단계를 수행하였다. 수집된 3 개의 데이터 포인트를 이후 평균내고 샘플에 대한 점도로서 기록하였다. 부형제가 있는 용액의 점도를 부형제가 없는 모델 단백질 용액의 점도로 표준화시켰다. 표준화된 점도는 부형제가 없는 모델 단백질 용액의 점도에 대한 부형제가 있는 모델 단백질 용액의 점도의 비율이다.

[0281] 표 28

부형제 A		부형제 B		표준화된 점도
명칭	농도 (mg/mL)	명칭	농도 (mg/mL)	
-	0	-	0	1.00
카페인	15	-	0	0.77
카페인	15	소듐 아세테이트	12	0.77
카페인	15	소듐 설페이트	14	0.78
카페인	15	아스파르트산	20	0.73
카페인	15	CaCl ₂ 2수화물	15	0.65
카페인	15	디메틸 설펜	25	0.65
카페인	15	아르기닌	20	0.63
카페인	15	류신	20	0.69
카페인	15	페닐알라닌	20	0.60
카페인	15	나이아신아미드	15	0.63
카페인	15	에탄올	22	0.65

[0282] 실시예 35: 디메틸 설펜 및 시험 단백질을 함유하는 제형의 제조

[0283] [00162] 부형제 화합물로서 디메틸 설펜(Jarrow Formulas, Los Angeles, CA) 및 시험 단백질을 사용하여 제형을 제조하였고, 여기서 시험 단백질은 치료용 제형에 사용될 치료용 단백질을 시뮬레이션하기 위한 것이었다. 이러한 제형을 다음 방식으로 점도 측정을 위해 20 mM 히스티딘 완충액에서 제조하였다. 디메틸 설펜을 20 mM 히스티딘(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)에 용해시키고, 생성된 용액의 pH를 소량의 진한 소듐 하이드록사이드 또는 염산으로 조정하여 모델 단백질의 용해 전에 pH 6을 달성한 후, 0.22 마이크론 필터를 통해 여과하였다. 부형제 용액이 제조되면, 시험 단백질(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)로부터의 소 감마 글로불린(BGG))을 약 280 mg/mL의 농도로 용해시켰다. 부형제 용액 중 BGG의 용액을 20 mL 유리 신틸레이션 바이알에서 제형화하고 오비탈 진탕기 테이블에서 80-100 rpm으로 밤새 진탕시켰다. 이어서, 용액을 2 mL 미세원심분리기 튜브로 옮기고, IEC MicroMax 미세원심분리기에서 2300 rpm으로 약 10 분 동안 원심분리하여 점도 측정 전에 혼입 공기를 제거하였다.

[0285] [00163] 상기 기재된 바와 같이 제조된 제형의 점도 측정을 DV-IIT LV 콘 및 플레이트 점도계(Brookfield Engineering, Middleboro, MA)로 수행하였다. 점도계에 CP-40 콘을 장착하고 3 rpm 및 섭씨 25도에서 작동시켰다. 제형을 0.5 mL의 부피로 점도계에 로딩하고, 주어진 전단 속도 및 온도에서 3 분 동안 인큐베이션한 후, 20 초의 측정 수집 기간을 두었다. 이어서, 1 분의 전단 인큐베이션 및 후속 20 초 측정 수집 기간으로 이루어진 2

개의 추가 단계를 수행하였다. 수집된 3 개의 데이터 포인트를 이후 평균내고 샘플에 대한 점도로서 기록하였다. 부형제가 있는 용액의 점도를 부형제가 없는 모델 단백질 용액의 점도로 표준화시켰다. 표준화된 점도는 부형제가 없는 모델 단백질 용액의 점도에 대한 부형제가 있는 모델 단백질 용액의 점도의 비율이다.

표 29

디메틸 설펜 농도 (mg/mL)	표준화된 점도
0	1.00
15	0.92
30	0.71
50	0.71
30	0.72

실시예 36: 탄닌산을 함유하는 제형의 제조

[00164] 본 실시예에서, 고분자량 폴리(에틸렌 옥사이드)(PEG) 분자를 폐길화 단백질의 점도 거동을 모방하기 위한 모델 화합물로서 사용하였다. 1,000,000의 점도 평균 분자량(MV)을 갖는 PEG(Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO)를 멸균된 5 mL 폴리프로필렌 원심분리기 튜브에서 탈이온수(DI)와 혼합하여 대략 1.8 중량%의 PEG 용액을 제조함으로써 대조 샘플(표 30의 #36.1)을 제조하였다. 탄닌산(TA, Spectrum Chemicals, New Brunswick, NJ)을 갖는 2 개의 샘플 #36.2 및 36.3을 적절한 양의 PEG, TA, 및 DI 수에서 제조된 1 mM KCl을 혼합함으로써 각각 대략 1:100 및 1:1000의 TA:PEG 질량비로 제조하였다. 모든 샘플을 200 rpm에서 밤새 Daigger Scientific(Vernon Hills, IL) Labgenius 오비탈 진탕기에 놓았다. 20℃ 및 250 s⁻¹의 벽 전단 속도로 microVISC 레오미터(RheoSense, San Ramon, CA)에서 점도 측정을 수행하였다. 측정 후, 점도의 농도 의존성을 설명하기 위해 각각의 PEG 농도로 점도를 표준화하였다. 샘플 36.1, 36.2, 및 36.3에 대한 PEG 농도, TA 농도, 점도, 표준화된 점도, 및 점도 감소는 하기 표 30에 열거되어 있다. 농축된 PEG 용액에 TA를 첨가하면 용액 점도가 대략 40%까지 실질적으로 감소한다.

표 30

샘플	PEG 농도 (wt. %)	TA 농도 (wt. %)	점도 (cP)	표준화된 점도 (점도/ wt. % PEG)	대조로부터 표준화된 점도의 감소 %
36.1	1.79	0	128	71.4	N/A
36.2	1.79	1.78 x 10 ⁻²	75.0	41.9	41.3
36.3	1.80	1.71 x 10 ⁻³	84.5	46.9	34.3

실시예 37: 부형제 용량 프로파일을 갖는 제형

[00165] 상이한 물 농도의 부형제 및 시험 단백질을 사용하여 제형을 제조하였고, 여기서 시험 단백질은 치료용 제형에 사용될 치료용 단백질을 시뮬레이션하기 위한 것이었다. 이러한 제형을 다음 방식으로 점도 측정을 위해 20 mM 히스티딘 완충액에서 제조하였다. 0 및 80 mM 카페인 부형제의 스톱 용액을 20 mM 히스티딘(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)에서 제조하고, 생성된 용액의 pH를 소량의 진한 소듐 하이드록사이드 또는 염산으로 조정하여 모델 단백질의 용해 전에 pH 6을 달성하였다. 2 개의 스톱 용액을 다양한 부피비로 블렌딩함으로써 다양한 카페인 농도의 추가 용액을 제조하였다. 일단 부형제 용액이 제조되면, 시험 단백질(소 감마 글로불린(BGG, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO))을 0.7 mL 용액을 0.25 g 동결 건조된 단백질 분말에 첨가함으로써 약 280 mg/mL의 최종 단백질 농도를 달성하기 위한 비율로 용해시켰다. 부형제 용액 중 BGG의 용액을 5 mL 멸균 폴리프로필렌 튜브에서 제형화하고 오비탈 진탕기 테이블에서 100 rpm으로 밤새 진탕시켜 용해시켰다. 이어서, 용액을 2 mL 미세원심분리기 튜브로 옮기고, IEC MicroMax 미세원심분리기에서 2400 rpm으로 5 분 동안 원심분리하여 점도 측정 전에 혼입 공기를 제거하였다.

[00166] 상기 기재된 바와 같이 제조된 제형의 점도 측정을 microVISC 점도계(RheoSense, San Ramon, CA)로 수

행하였다. 점도계에는 100 마이크론의 채널 깊이를 갖는 A-10 칩이 장착되었고, 250 s^{-1} 의 전단 속도 및 섭씨 25도에서 작동되었다. 점도를 측정하기 위해, 피펫으로부터 모든 기포를 제거하도록 주의하면서 제형을 점도계에 로딩하였다. 로딩된 샘플 제형을 갖는 피펫을 기기에 넣고 5 분 동안 측정 온도에서 인큐베이션되게 하였다. 이후, 안정한 점도 판독으로 지시되는 시험 유체로 채널이 완전히 평형화될 때까지 기기를 작동시킨 다음, 점도를 센티푸아즈로 기록하였다. 이러한 측정의 결과는 표 31에 열거되어 있다.

표 31

시험 #	부형제 농도 (mM)	부형제 농도 (mg/mL)	점도 (cP)	표준화된 점도
37.1	20	3.9	77	0.92
37.2	50	9.7	65	0.78
37.3	10	1.9	70	0.84
37.4	5	1.0	67	0.81
37.5	30	5.8	63	0.76
37.6	40	7.8	65	0.78
37.7	0	0.0	83	1.00
37.8	70	13.6	50	0.60
37.9	80	15.5	50	0.60
37.10	60	11.7	57	0.69

실시예 38: 페놀계 화합물을 함유하는 제형의 제조

[00167] 본 실시예에서, 고분자량 폴리(에틸렌 옥사이드)(PEG) 분자를 페길화 단백질의 점도 거동을 모방하기 위한 모델 화합물로서 사용하였다. 1,000,000의 점도 평균 분자량(MV)을 갖는 PEG(Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO)를 멸균된 5 mL 폴리프로필렌 원심분리기 튜브에서 대략 1.8 중량%의 PEG로 탈이온수(DI)와 혼합함으로써 대조 샘플을 제조하였다. 페놀계 화합물 갈산(GA, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO), 피로갈롤(PG, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) 및 레조르시놀(R, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO)을 다음과 같이 부형제로서 시험하였다. 적절한 양의 PEG, 부형제, 및 DI 수를 혼합함으로써 각각 대략 3:50, 1:2, 및 1:2의 부형제:PEG 질량비로 첨가된 GA, PG 및 R로 3 개의 PEG 함유 샘플을 제조하였다. 샘플을 200 rpm에서 밤새 Daigger Scientific(Vernon Hills, IL) Labgenius 오비탈 진탕기에 놓았다. 20°C 및 250 s^{-1} 의 벽 전단 속도로 microVISC 레오미터(RheoSense, San Ramon, CA)에서 점도 측정을 수행하였다. 측정 후, 점도의 농도 의존성을 설명하기 위해 각각의 PEG 농도로 점도를 표준화하였다. 대조 및 부형제-함유 샘플에 대한 PEG 농도, 부형제 농도, 점도, 표준화된 점도, 및 점도 감소는 하기 표 32에 열거되어 있다.

[0299] 표 32

샘플 #	PEG 농도 (wt. %)	첨가된 부형제	부형제 농도 (wt. %)	점도 (cP)	표준화된 점도 (점도/ wt. % PEG)	대조로부터 표준화된 점도의 감소 %
38.1	1.80	없음	0.000	134	74.5	N/A
38.2	1.80	GA	0.206	120	67.0	10.1
38.3	1.80	PG	0.870	106	59.2	19.6
38.4	1.80	R	1.00	113	63.1	15.3

[0300]

[0301] 실시예 39: 피리미딘 고리를 갖는 부형제 및 시험 단백질을 함유하는 제형의 제조

[0302]

[00168] 하나의 피리미딘 고리를 포함한 구조를 갖는 부형제 화합물 및 시험 단백질을 사용하여 제형을 제조하였고, 여기서 시험 단백질은 치료용 제형에 사용될 치료용 단백질을 시뮬레이션하기 위한 것이었다. 이러한 제형을 하기 방식으로 상이한 부형제 화합물과 함께 20 mM 히스티딘 완충액에서 제조하였다. 표 33에 열거된 바와 같은 부형제 화합물을 20 mM 히스티딘(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 수용액에 용해시키고, 생성된 용액의 pH를 소량의 진한 소듐 하이드록사이드 또는 염산으로 조정하여 모델 단백질의 용해 전에 pH 6을 달성하였다. 일단 부형제 용액이 제조되면, 시험 단백질(소 감마 글로불린(BGG, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO))을 각각 280 mg/mL의 최종 단백질 농도를 달성하기 위한 비율로 용해시켰다. 부형제 용액 중 BGG의 용액을 20 mL 유리 신틸레이션 바이알에서 제형화하고 오비탈 진탕기 테이블에서 100 rpm으로 밤새 교반하였다. 이어서, 용액을 2 mL 미세원심분리기 튜브로 옮기고, IEC MicroMax 미세원심분리기에서 2300 rpm으로 10 분 동안 원심분리하여 점도 측정 전에 혼입 공기를 제거하였다.

[0303]

[00169] 상기 기재된 바와 같이 제조된 제형의 점도 측정을 DV-IIT LV 콘 및 플레이트 점도계(Brookfield Engineering, Middleboro, MA)로 수행하였다. 점도계에 CP-40 콘을 장착하고 3 rpm 및 섭씨 25도에서 작동시켰다. 제형을 0.5 mL의 부피로 점도계에 로딩하고, 주어진 전단 속도 및 온도에서 3 분 동안 인큐베이션한 후, 20 초의 측정 수집 기간을 두었다. 이어서, 1 분의 전단 인큐베이션 및 후속 20 초 측정 수집 기간으로 이루어진 2 개의 추가 단계를 수행하였다. 수집된 3 개의 데이터 포인트를 이후 평균내고 샘플에 대한 점도로서 기록하였다. 부형제가 있는 용액의 점도를 부형제가 없는 모델 단백질 용액의 점도로 표준화시켰다. 표준화된 점도는 부형제가 없는 모델 단백질 용액의 점도에 대한 부형제가 있는 모델 단백질 용액의 점도의 비율이다. 이러한 측정의 결과는 표 33에 나타나 있다.

[0304] 표 33

샘플 #	첨가된 부형제	부형제 MW (g/mol)	부형제 농도 (mg/mL)	표준화된 점도
39.1	피리미디논	96.1	14	0.73
39.2	1,3-디메틸우라실	140.1	22	0.67
39.3	트리아미노피리미 딘	125.1	20	0.87
39.4	카페인	194	15	0.77
39.5	피리미디논	96.1	7	0.82
39.6	1,3-디메틸우라실	140.1	11	0.76
39.7	피리미딘	80.1	13	0.78
39.8	피리미딘	80.1	6.5	0.87
39.9	없음	n/a	0	0.97
39.10	없음	n/a	0	1.00
39.11	없음	n/a	0	0.95
39.12	테아크린	224	15	0.73
39.13	테아크린	224	15	0.77

[0305]

[0306] 실시예 40: 부형제 및 PEG 모델 화합물을 함유하는 제형의 제조

[0307] [00170] 본 실시예를 위한 물질은 PEG-20K로 약칭되는 20,000 분자량을 갖는 선형 PEG 분자를 포함하였다. 약염기의 컨쥬게이트 산을 포함하는 구조를 갖는 부형제 화합물, 및 PEG-20K 모델 화합물을 사용하여 제형을 제조하였고, 여기서 PEG-20K 모델 화합물은 폐경화 단백질을 시뮬레이션하기 위한 것이었다.

[0308] [00171] 먼저, 조건 당 n=3 반복 측정으로 하기 표 34에 제시된 바와 같이, 물 및 20 mM 시트레이트 완충액 중 상이한 농도에서의 PEG-20K의 점도 프로파일을 기준선 조건으로서 결정하였다.

[0309] 표 34

PEG-20K (mg/mL) 농도	수용액		20 mM 시트레이트 완충 용액	
	점도 (cP)	SD	점도 (cP)	SD
240	80.64	0.67	83.99	1.08
180	35.20	0.49	35.64	0.66
210	54.81	0.61	58.25	1.08
150	23.78	0.43	24.37	0.54
120	14.98	0.12	15.23	0.29
90	7.86	0.08	7.96	0.20

[0310]

[0311]

[00172] 다음으로, 부형제 스톱 용액을 20 mM 시트레이트 완충액에서 1 M 농도로 제조하였다. 스톱 용액의 pH를 약 5로 조정하였다. 140 mL의 300 mg/mL PEG-20K 스톱을 20 내지 60 μ L의 부형제 스톱과 혼합함으로써 PEG-20K 용액을 제조하였다. 스파이킹된 부형제의 양에 따라, 40-0 μ L의 시트레이트 완충액을 첨가함으로써 최종 샘플 부피를 200 μ L로 조정하였다. PEG-20K 및 부형제를 함유하는 블렌딩된 용액을 모두 pH 4.9-5.0으로 조정된 시트레이트 완충액으로 제조하였으므로, 임의의 약염기 부형제는 완충 용액에서 이들의 컨쥬게이트 산으로 전환되었다. 상이한 부형제와 210 mg/mL의 PEG-20K를 함유하는 각각의 PEG-20K 샘플의 점도를 MicroVISC에서 적어도 3 회 측정하였고, 결과는 하기 표 35에 요약되어 있다.

[0312] 표 35

210 mg/mL PEG 20K 용액에 첨가된 부형제	점도 (cP)	SD
없음 (대조)	59.3	0.1
NH ₄ OH (0.3 M)	52.6	0.8
NH ₄ OH (0.1 M)	54.4	0.5
프롤린	55.6	1.7
트리글리세린 (0.1M)	56.2	3.5
이미다졸 (0.1 M)	56.5	0.9
NaF (0.1M)	56.9	1.2
NH ₄ F (0.6M)	57.5	2.9
α-사이클로덱스트린 설페이트 K (2%)	57.6	0.2
글리세롤 포스페이트	57.9	1.2
디사이클로민 (0.05 M)	58.3	0.3
암모늄 설페이트 (0.1 M)	58.4	0.5
L-이소류신	58.6	0.5
붕산 (0.1 M)	58.8	0.5
스페르민	58.8	3.6
알라닌 (0.3 M)	59.0	2.8
포타슘 아세테이트	59.1	0.2
우레아 (0.1 M)	59.4	2.0
암모늄 아세테이트	59.5	0.5
Tris (0.1M)	59.8	1.3
NH ₄ F (0.1M)	60.3	1.8

[0313]

210 mg/mL PEG 20K 용액에 첨가된 부형제	점도 (cP)	SD
ZnCl ₂ (0.1M)	60.6	0.3
글리신 (0.3 M)	60.9	1.3
소르비톨 (5%)	66.0	0.1

[0314]

[0315] 실시예 41: 카페인을 사용한 점선 유동 여과의 개선

[0316]

[00173] 35 mg/mL 농도의 400 mL의 인간 감마 글로불린(Octagam, Octapharma, USA)을 100 mg/mL의 스톱을 포스페이트 완충된 염수(PBS)에 희석함으로써 제조하였다. 1 L의 Milli-Q 수에 1.8 mM KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl을 용해시켜 완충액을 제조하였다. 1 L의 Milli-Q 수에 50 mM 카페인, 1.8 mM KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl을 용해시켜 카페인 PBS 용액을 제조하였다. 수돗물을 EMD Millipore(Billerica, MA)로부터의 Direct-Q 3 UV 정제 시스템으로 정제하여 DI 수를 생산하였다. 인간 감마

글로불린(HGG) 용액을 30 KDa MWCO Pellicon XL TFF 카세트(Millipore, Billerica, MA)가 장착된 Labscale 접선 유동 여과(TFF) 시스템(Millipore, Billerica, MA)의 저장소로 옮겼다. 사용 전, 카세트를 Milli-Q 수 및 이어서 PBS로 플러싱하고, 막 온전성 및 효율을 보장하기 위해 물 투과성 시험을 수행하였다. HGG 용액을 Quattroflow 펌프(Cole-Parmer, IL)를 사용하여 카세트를 통해 펌핑하였고, 잔류물 라인에 샘플 저장소로 회송되고 투과물은 눈금이 매겨진 측정 실린더에 수집되었다. 교반기 막대는 공급물과 잔류물의 적절한 혼합을 보장하였다. 공급 펌프는 120 mL/분 공급물을 카세트에 전달하도록 설정되었다. 잔류물 제한기를 사용하여 대략 20 내지 30 psi 범위의 막횡단 압력(TMP)을 얻었고, 공급 펌프 및 잔류물 제한기를 조정함으로써 실험 전체에 걸쳐 TMP가 일정하게 유지되도록 보장하였다. 압력 및 유량의 데이터 로깅을 수행하고 30 분마다 샘플을 취하였다. 공급물 농도를 계산하기 위해, 샘플을 SE-HPLC에 의해 분석하였고, 여기서 50 mg을 TSKgel SuperSW3000 컬럼(30 cm × 4.6 mm ID, Tosoh Bioscience, King of Prussia, PA) 및 Agilent G1351B Diode 어레이 검출기가 장착된 Agilent 1100 HPLC 시스템에 로딩하였다. PBS를 0.35 mL/분의 유량으로 이동상으로 사용하였다. 피크 하면적을 적분하여 단백질 농도를 계산하였다. 시간의 함수로서 플롯팅된 공급물 농도를 사용하여 카페인의 존재 하의 TFF 효율을 대조 시스템을 사용하여 TFF와 비교하였다. 하기 표 36에 제시된 바와 같이, 초기 공급물 농도로부터 더 높은 농도 변화 퍼센트가 대조와 비교하여 카페인의 경우 더 짧은 시간에 관찰되었는데, 이는 증가된 TFF 효율을 입증하는 것이다.

표 36

시간 (min)	대조 시스템, 단백질 농도 (mg/mL)	대조 시스템, 변화 %	카페인 시스템, 단백질 농도 (mg/mL)	카페인 시스템, 변화 %
0	38.62	0	37.07	0
30	67.42	74.6	82.11	121.5
60	78.14	102.3	120.63	225.4
90	101.94	163.9	141.88	282.7
120	140.81	264.6	198.96	436.7
150	162.39	320.4	222.50	500.2
180	226.06	485.3	286.68	673.3
210	254.76	559.6	305.39	723.8
240	281.58	629.0		
270	291.99	656.0		

실시예 42: 카페인을 사용하여 단백질 A 수지로부터 정제 수용 개선

[00174] 20 mM 소듐 포스페이트, pH 7 완충액 중 15 mg/mL로 Bioceros(Utrecht, The Netherlands)로부터 구입한 연구-등급 오말리주마를 시험 샘플로서 사용하였다. 이러한 단백질 용액을 0.2 μm 폴리에테르설폰(PES) 필터를 통해 여과하였다. 여과된 물질을 DI 수 중 pH 7의 20 mM 소듐 포스페이트로 구성된 결합 완충액과 1:1 비율로 혼합하였다. 수돗물을 EMD Millipore(Billerica, MA)로부터의 Direct-Q 3 UV 정제 시스템으로 정제하여 DI 수를 생산하였다. GE Healthcare(Chicago, IL)로부터의 HiTrap Protein-A HP 1 mL 컬럼을 사용하여 단백질-A 정제를 수행하였다. 10 mL의 결합 완충액을 컬럼 평형화에 사용한 후, 30 mg의 단백질을 로딩하였다. 이어서, 컬럼을 5 mL의 결합 완충액으로 세척하여 결합되지 않은 단백질을 제거하였다. 결합된 오말리주마를 대조 완충액으로서 pH 3.5의 0.1 M 글리신 완충액을 사용하거나 pH 3.5의 0.1 M 글리신, 50 mM 카페인 완충액을 사용하여 1 mL 분획으로 컬럼으로부터 용리시켰다. 7.5 g의 글리신을 DI 수에 용해시키고, 6M HCl을 사용하여 pH를 3.5로 조정하고, 부피를 1 L로 조정함으로써 대조 완충액을 제조하였다. 7.5 g의 글리신 및 10 g의 카페인을 DI 수에 용해시키고, 6 M HCl을 사용하여 pH를 3.5로 조정하고 부피를 1 L로 조정함으로써 카페인 완충액을 제조하였다. 5 개의 1 mL 분획을 수집하고; 이러한 용리된 분획을 E1, E2, E3, E4, 및 E5로 표지하였다. 마지막으로, 컬럼을

5 mL의 0.1 M 글리신 pH 3.0 완충액으로 세척함으로써 단백질을 재생시켰다. 각 단계에 대한 유량은 1 mL/분이었고, 이를 Fusion 100 주입 펌프(Chemyx, Stafford, TX)에 의해 유지시켰다. 10 mL NormJect Luer Lok 주사기를 사용하였다(Henke Sass Wolf, Tuttlingen, Germany, 참조 번호 4100-000V0).

[00175] 5 개의 용리된 분획, E1, E2, E3, E4, 및 E5를 고성능 크기-배제 크로마토그래피(SEC) 분석에 의해 총 단백질 함량에 대해 검정하였다. Agilent HP 1100 HPLC 시스템에 연결된 TSKgel SuperSW3000 컬럼(30 cm × 4.6 mm ID, Tosoh Bioscience, King of Prussia, PA)을 사용하여 SEC 분석을 수행하였다. PBS를 실온에서 0.35 mL/분의 유량으로 이동상으로 사용하였다. 단백질을 G1315B 다이오드 어레이 검출기를 사용하여 280 nm에서의 흡광도로 모니터링하였다. 단백질을-A 수치로부터 용리된 단백질의 총량을 크로마토그램을 적분함으로써 결정하였고, 하기 표 37에 제시된 바와 같이 카페인 존재 하에서 약 8%의 수율 증가가 관찰되었다.

표 37

샘플 분획	카페인 함유 완충액 없이 용리된 분획의 단백질 농도 (mg/mL)	카페인 함유 완충액으로 용리된 분획의 단백질 농도 (mg/mL)
E1	0.277	1.13
E2	2.14	6.72
E3	6.58	4.67
E4	2.24	1.40
E5	1.06	0.708
총 수율	12.29	14.63
회수율 %	44.38	52.83

실시예 43: 저 pH 유지 동안 안정화를 위한 부형제

[00176] 20 mM 소듐 포스페이트, pH 7 완충액 중 15 mg/mL로 Bioceros(Utrecht, The Netherlands)로부터 구입한 연구-등급 리필리루마를 시험 샘플로서 사용하였다. 단백질 용액을 0.2 μm 폴리에테르설폰(PES) 필터를 통해 여과하였다. 라피노스 5수화물을 Sigma(St Louis, MO)로부터 입수하였다. 부형제 스톱을 0.15 M 글리신 완충액, pH 2.75에 1 M의 농도로 라피노스 5수화물을 용해시킴으로써 제조하였다. 7.5 g의 글리신을 0.9 L Milli-Q 수에 용해시키고, 1 M HCl을 사용하여 pH를 2.75로 조정하고, 부피를 0.1 L로 만들어 완충액을 제조하였다. 0 mM, 100 mM, 200 mM 및 400 mM의 최종 부형제 농도 및 2 mg/mL의 최종 이필리루마 농도로 이필리루마 용액에 부형제를 첨가함으로써 1 개의 대조 제형 및 3 개의 부형제-함유 제형을 제조하였다. 샘플을 산성 pH(2.75)에서 24h 동안 밤새 인큐베이션하고, 샘플을 SE-HPLC에 의해 분석하였고, 여기서 50 mg을 TSKgel SuperSW3000 컬럼(30 cm × 4.6 mm ID, Tosoh Bioscience, King of Prussia, PA) 및 Agilent G1315B Diode 어레이 검출기가 장착된 Agilent 1100 HPLC 시스템에 로딩하였다. PBS를 0.35 mL/분의 유량으로 이동상으로 사용하였다. 단량체 단백질(이필리루마) 농도를 단량체 피크 하 면적을 적분함으로써 계산하였다. 저 pH에 노출되지 않은 비처리된 샘플로부터의 단량체 분획을 100%로 표준화하고, 처리된 샘플의 단량체 분획을 이러한 비처리된 샘플의 백분율 변화로 표현하였다. 하기 표 38의 결과는 샘플에서 라피노스의 존재가 저 pH 유지 후 더 높은 백분율의 단량체 형태의 이필리루마를 초래하였음을 보여준다.

표 38

샘플	단량체 형태의 이필리무맙 %
0 mM 라피노스	38.69
100 mM 라피노스	52.68
200 mM 라피노스	63.07
400 mM 라피노스	78.88
비처리	100

실시예 44: 완충액 및 부형제 제조

[00177] 부형제 제형화 및 단백질 완충액 교환에 사용하기 위해 스톡 20 mM 히스티딘 하이드로클로라이드 (His HCl) 완충액을 제조하였다. 유형 1 초순수에 6.206 그램의 히스티딘(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 용해시킴으로써 2 리터의 His HCl을 제조하였다. 용해된 히스티딘의 용액을 진한 염산을 사용하여 pH 6.0으로 적정하였다. 이어서, His HCl 용액을 부피 플라스크를 사용하여 최대 2 리터로 만들고, 0.2 μ m 막 병-담 필터 장치(Sigma Aldrich, St. Louis, MO)를 통해 여과하였다. 실시예 46에서 시험될 부형제(표 39에 열거됨)를 다음과 같이 후속 시험을 위한 부형제 용액으로서 제조하였다. 각 부형제를 상기 기재된 His HCl 완충액에 용해시키고 진한 수산화나트륨 또는 진한 염산으로 pH를 조정함으로써 10X(1 M)으로 각 부형제를 제조하였다. 이후, 각각의 부형제 용액을 0.2 μ m 막 필터를 사용하여 여과하였다.

실시예 45: 단백질 용액 제조

[00178] 2 개의 시험 단백질인 Bioceros(The Netherlands)로부터 구입한 정제된 오말리주맙 및 인간 혈청 유래 다클론성 IgG(Octagam 10%)를 20 kDa 분자량 컷-오프 투석 카세트(Fisher Scientific)를 사용하여 His HCl(실시예 44에서 제조된 바와 같음)로 완충액 교환하였다. 각 단백질 용액을 부표에 부착된 투석 카세트로 옮기고 완충액 교환을 위해 플라스크에 넣었다. 총 3 회의 완충액 교환을 > 50x 출발 단백질 부피로 수행하였다. 최종 완충액 교환 단계에서, 단백질 용액을 투석 카세트로부터 제거하고 0.2 μ m 막 필터를 통해 여과하고, His HCl 완충액으로 100 배 희석함으로써 A280을 통해 단백질 농도를 측정하였다. 이어서, 100 μ L을 UV 투명 96 하프-웰 마이크로플레이트(Greiner Bio-One, Austria)로 옮기고, Synergy HT 플레이트 리더(BioTek, Winooski, VT)로 280 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 이어서, 블랭킹된 경로길이 보정된 A280 측정치를 각각의 흡광 계수로 나누고 희석 인자를 곱하여 단백질 농도를 결정하였다. 실시예 46에서 동적 광 산란(DLS) 점도 측정을 위한 제조에서 단백질을 농축시키기 위해 후속 농축 단계가 필요하였다. 30 kDa 분자량 컷-오프가 있는 Amicon-15 원심분리기 장치(EMD Millipore, Billerica, MA)를 사용하여 농축을 수행하고, 벤치탑 원심분리기(Sorvall Legend RT)에서 4000 xg로 원심분리함으로써 원심분리기 장치의 잔류물 질량을 기준으로 175 mg/mL로 농축시켰다.

실시예 46: 확산 상호작용 파라미터의 DLS 측정

[00179] 본 실시예에서, 희석된 단백질 용액의 확산 상호작용 파라미터(kD)를 0.1 M 부형제 용액의 존재 하에 DLS에 의해 측정하였다. 시험되는 부형제는 표 39에 열거되어 있다. 각 부형제에 대해, 0.2 M 부형제 용액을 이전에 제조된 1 M 부형제 스톡과 별도로 제조하였다. 0.1 M 부형제의 존재 하에 10 mg/mL 내지 0.6 mg/mL 범위의 5 개의 상이한 농도의 오말리주맙(실시예 45에 기재된 바와 같이 제조됨)을 사용하여 DLS에 의해 kD를 측정하였다. 임의의 부형제의 부재 하에 동일한 농도의 오말리주맙을 함유하는 동일한 세트의 대조 샘플을 제조하였다. 각각의 시험 샘플에 대해, 20 μ L의 단백질 용액을 384-웰 플레이트(Aurora Microplates, Whitefish, MT) 상에서 20 μ L의 0.2 M 부형제 용액(1:1 혼합물)과 혼합하였다. 샘플을 로딩한 후, 웰 플레이트를 플레이트 진탕기에 서 진탕시켜 내용물을 5분 동안 혼합하였다. 혼합 시, 웰 플레이트를 Sorvall Legend RT에서 1 분 동안 400 xg로 원심분리하여 임의의 공기 포켓을 강제로 제거하였다. 이후, 웰 플레이트를 DynaPro II DLS 플레이트 리더(Wyatt Technologies Corp., Goleta, CA)에 로딩하고, 각 샘플의 확산 계수를 25°C에서 측정하였다. 각각의 부형제에 대해, 측정된 확산 계수를 단백질 농도의 함수로 플롯팅하고, 데이터의 선형 피트의 기울기를 kD로서 기록하였다. 본 실시예에서, 각각의 측정을 대조 평균으로 표준화하고 대조에 대한 백분율로 보고하였다. 이들 결과는 하기 표 39에 나타나 있다.

[0334] 표 39

부형제	단백질	대조로부터의 kD 값의 변화 %
3-(1-피리디니오)-1- 프로판설폰네이트	오말리주맵	22%
아스파르트산	오말리주맵	72%
오르니틴	오말리주맵	49%
베타-알라닌	오말리주맵	25%
리신	오말리주맵	47%
트리코벨린	오말리주맵	28%
(3-카복시프로필) 트리메틸암모늄 클로라이드	오말리주맵	59%
아미노히푸르산	오말리주맵	20%
아르기닌	오말리주맵	81%
1-헥실-3-메틸이미다졸륨 클로라이드	오말리주맵	25%
NaCl (200 mM)	오말리주맵	70%
에탄올아민 HCL	오말리주맵	25%
스페르미딘	오말리주맵	54%
4-아미노피리딘	오말리주맵	25%
리신	오말리주맵	66%
시스테인 HCl	오말리주맵	38%
x-자일릴렌디아민	오말리주맵	56%
니코틴산	오말리주맵	18%

[0335]

부형제	단백질	대조로부터의 kD 값의 변화 %
퀸산	오말리주맵	19%
1,3-디아미노프로판	오말리주맵	62%
락토비온산	오말리주맵	47%
글루탐산	오말리주맵	35%
소듐 아스코르베이트	오말리주맵	35%
소듐 프로피오네이트	오말리주맵	33%
퀸산	오말리주맵	27%
소듐 벤조에이트	오말리주맵	33%
글루쿠론산	오말리주맵	32%
하이드록시벤조산	오말리주맵	50%
소듐 바이설파이트	오말리주맵	57%
살리실산	오말리주맵	43%
에티드로네이트	오말리주맵	56%
아세실팜 K+ 염	오말리주맵	49%
칼슘 프로피오네이트	오말리주맵	83%
시트르산	오말리주맵	47%
하이드로퀴논 설펜산	오말리주맵	36%
메나디온 소듐 바이설파이트	오말리주맵	25%
2-디메틸아미노에탄올	오말리주맵	31%
2-메틸-2-이미다졸린	오말리주맵	17%
사이클로세린	오말리주맵	9%

[0336]

부형제	단백질	대조로부터의 kD 값의 변화 %
3-아미노피리딘	오말리주맵	6%
4-아미노피리딘	오말리주맵	23%
아그마틴 설페이트	오말리주맵	69%
시티딘	오말리주맵	29%
에탄올아민	오말리주맵	29%
메글루민	오말리주맵	171%
모르폴린	오말리주맵	17%
트리에탄올아민	오말리주맵	40%

[0337]

[0338]

실시예 47: DLS에 의한 점도 측정

[0339]

[00180] Bioceros(The Netherlands)로부터 구입한 정제된 오말리주맵 및 인간 혈청 유래된 다클론성 IgG(Octagam 10%, Pfizer)를 모델 단백질 시스템으로 사용하여 부형제의 점도 효과를 조사하였다. 농축된 부형제 스톡 용액(표 40 및 41에 열거됨)을 실시예 44에 기재된 프로토콜에 따라 His HCl 완충액에서 10X(1M)로 제조하였다. 오말리주맵을 Amicon-15 원심분리기(30 kDa MWCO) 장치를 사용하여 His HCl 완충액으로 완충액 교환하고, 원심분리기 장치에서 잔류물 질량을 기준으로 175 mg/mL로 농축시켰다. 부형제 및 농축된 단백질을 200 μ L PCR 튜브에서 합하고, 1 부의 10X 부형제 및 9 부의 단백질을 첨가하였다. 폴리에틸렌 글리콜 표면 개질된 금 나노입자(nanoComposix, San Diego, CA)의 추가 2 μ L의 5배 희석된 용액을 각 PCR 튜브에 첨가하고 뒤집어서 철저히 혼합하였다. 임의의 부형제를 첨가하지 않은 것을 제외하고는 대조 샘플을 동일하게 제조하였다. 각 샘플(시험 샘플 및 대조)을 384-웰 마이크로플레이트(Aurora Microplates, Whitefish, MT)로 이중으로 옮기고(웰 당 25 μ L), 분석 전에 1분 동안 400 xg에서 원심분리하였다. DynaPro II DLS 플레이트 리더(Wyatt Technology Corp., Goleta, CA)를 사용하여 25℃에서 금 나노입자의 겔보기 입도를 측정하였다. 물에서의 금 나노입자의 알려진 입도에 대한 금 나노입자의 겔보기 입도의 비율을 사용하여 Stokes-Einstein 방정식에 따라 단백질 제형의 점도를 결정하였다. 본 실시예에서, 각각의 측정을 대조 평균으로 표준화시키고, 대조와 비교하여 감소율(%)로서 보고하였고, 표준 편차가 나타나 있으며, 결과는 하기 표 40 및 41에 나타나 있다.

[0340] 표 40

부형제 (100 mM)	단백질	감소 %	Std. dev.
디메틸우라실	hIgG	36.5%	1.5%
호르데닌	hIgG	33.7%	0.7%
아세살팜 K	hIgG	32.6%	2.5%
니코틴아미드	hIgG	26.8%	2.1%
아르기닌	hIgG	21.8%	3.0%
아스파탐	hIgG	20.0%	2.4%
사카린	hIgG	17.5%	3.7%
3-(1-피리디니오)-1-프로판설포네이트	hIgG	15.0%	1.9%
카페인	hIgG	19.8%	7.8%
이미다졸	hIgG	8.7%	3.3%
티라민	hIgG	3.6%	4.4%
대조	hIgG	0.0%	2.8%
디메틸글리신	hIgG	2.5%	10.0%
4-아미노피리딘	hIgG	29.7%	2.9%
니코틴아미드/카페인	hIgG	30.0%	1.0%
니코틴아미드/카페인	hIgG	33.4%	3.5%
호르데닌 HCl	hIgG	32.9%	5.5%
디메틸우라실/아르기닌	hIgG	22.2%	0.6%
Jeffamine M600	hIgG	16.5%	2.1%
디메틸우라실	hIgG	18.1%	9.4%

[0341]

부형제 (100 mM)	단백질	감소 %	Std. dev.
디에틸니코틴아미드	hIgG	11.1%	2.8%
아르기닌 HCl	hIgG	14.6%	6.9%
아르기닌/글루탐산	hIgG	17.5%	11.2%
니코틴아미드	hIgG	12.1%	5.8%
세린/테오닌	hIgG	5.8%	5.1%
이소니코틴아미드	hIgG	8.8%	8.5%
(3-카복실프로필) 트리메틸 암모늄 클로라이드	hIgG	5.2%	12.1%

[0342]

[0343] 표 41

부형제 (100 mM)	단백질	감소 %	Std. dev.
4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진에탄설향산	오말리주맙	71%	1.3%
O-(옥틸포스포릴)콜린	오말리주맙	38%	0.1%
니코틴아미드 모노뉴클레오티드	오말리주맙	61%	8%
이타콘산	오말리주맙	54%	1%
3-(1-피리디니오)-1-프로판설향네이트	오말리주맙	4%	0.2%
N-메틸 아스파르트산	오말리주맙	73%	0.6%
L-오르니틴	오말리주맙	82%	0.0%
베타-알라닌	오말리주맙	25%	5.4%
에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA)	오말리주맙	64%	3.1%
트리코넨	오말리주맙	63%	1.1%
(3-카복시프로필)트리메틸암모늄 클로라이드	오말리주맙	64%	3.6%
이미노디아세트산	오말리주맙	51%	0.6%
아미노히푸르산	오말리주맙	66%	2.4%
카페산	오말리주맙	35%	8.0%
아스파탐 (50 mM)	오말리주맙	32%	2.0%
1-(1-아다만틸)에틸아민 하이드로클로라이드 (100 mg/mL)	오말리주맙	32%	4.0%
나프탈렌디설향산 (100 mg/mL)	오말리주맙	9%	8.0%
x-자일렌디아민	오말리주맙	78%	2.4%
1,3-디아미노프로판	오말리주맙	78%	1.5%

[0344]

부형제 (100 mM)	단백질	감소 %	Std. dev.
이소니코틴산	오말리주맙	45%	17.2%
리신	오말리주맙	54%	3.4%
4-아미노피리딘	오말리주맙	41%	2.8%
이미다졸	오말리주맙	62%	1.8%
아데노신 모노포스페이트	오말리주맙	73%	2.7%
디사이클로민 (100 mg/mL)	오말리주맙	43%	2.4%
2-이미다졸리돈	오말리주맙	10%	3.0%
피리독신 HCl	오말리주맙	63%	11.0%
2-에틸이미다졸	오말리주맙	51%	1.7%
트리에탄올아민	오말리주맙	69%	2.9%
에탄올아민	오말리주맙	49%	5.1%
벤질아민	오말리주맙	81%	0.6%
1-부틸이미다졸	오말리주맙	60%	4.6%
디펜하이드라민 HCl	오말리주맙	77%	0.2%
프로카인 HCl	오말리주맙	71%	8.1%
2-디메틸아미노에탄올	오말리주맙	72%	6.7%
아세실팜 K	오말리주맙	74%	3.3%
소듐 아스코르베이트	오말리주맙	55%	0.6%
글루탐산	오말리주맙	49%	5.0%
에티드로네이트	오말리주맙	72%	0.0%
살리실산	오말리주맙	72%	1.1%

[0345]

부형제 (100 mM)	단백질	감소 %	Std. dev.
퀸산	오말리주맵	58%	7.8%
하이드록시벤조산	오말리주맵	68%	5.1%
글루쿠론산	오말리주맵	60%	6.0%
락토비온산	오말리주맵	46%	0.1%
소듐 헥사메타포스페이트	오말리주맵	75%	0.5%
소듐 바이실라이트	오말리주맵	71%	6.5%
소듐 벤조에이트	오말리주맵	60%	12.8%
칼슘 프로피오네이트	오말리주맵	75%	3.5%
소듐 프로피오네이트	오말리주맵	56%	-
2-디메틸아미노에탄올	오말리주맵	65%	10.6%
2-메틸-2-이미다졸린	오말리주맵	49%	12.6%
사이클로세린	오말리주맵	33%	1.2%
3-아미노피리딘	오말리주맵	59%	4.0%
4-아미노피리딘	오말리주맵	73%	2.3%
아그마틴 설페이트	오말리주맵	85%	1.8%
시티딘	오말리주맵	68%	1.6%
디펜하이드라민	오말리주맵	81%	0.1%
에탄올아민	오말리주맵	93%	1.6%
메글루민	오말리주맵	91%	0.2%
모르폴린	오말리주맵	78%	2.7%

[0346]

[0347]

실시예 48: 점도계에 의한 점도 측정

[0348]

[00181] 표 42 및 43에 열거된 부형제에 대한 부형제 용액을 His HCl 완충액에서 0.1 M 또는 0.075 M으로 제조하고, 진한 수산화나트륨 또는 진한 염산을 사용하여 pH를 조정하였다. Amicon-15 원심분리기 장치(30 kDa MWCO)를 사용하여 오말리주맵 및 인간 IgG를 각각의 부형제 제형으로 완충액 교환하였다. 완충액 교환 후, 단백질 용액을 원심분리기 장치에서 잔류물 질량을 기준으로 하여 오말리주맵의 경우 150 mg/mL 및 인간 IgG의 경우 250 mg/mL로 농축시켰다. 부형제의 부재를 제외하고는 동일한 방식으로 대조 제형을 제조하였다. 25°C로 설정된 온도-제어된 엔클로저에 봉입된 A05 칩을 사용하여 RheoSense 마이크로-점도계에서 점도 측정을 수행하였다. 전단 속도를 250 s^{-1} 로 설정하였다. 각 제형의 점도를 3 회 측정된 후, 각각의 완충액 20 μL 를 첨가하여 희석하고, 점도를 다시 측정하였다. 이를 각각 5 내지 6 회 반복하여 5 내지 6 개의 상이한 단백질 농도에 대한 점도 데이터를 생성하였다. 단백질 농도를 크기 배제 컬럼(TOSOH TSKgel SuperSW3000)과 쌍을 이룬 Agilent 1100 시리즈 고압 액체 크로마토그래피 기기를 사용하여 280 nm에서의 흡광도에 의해 측정하였다. 각 부형제 제형에 대한 농도의 함수로서 점도를 플롯팅함으로써 산점도를 생성하였다. 지수 추세선을 각 제형에 피팅하고, 방정식 $y = a \cdot e^{(b \cdot x)}$ 로 지수 피팅에 기초하여 농도에서의 점도를 계산하였고, 방정식에서, y는 cP 단위의 점도이고, x는 mg/mL의 단백질 농도이고, a 및 b는 방정식에 대한 피팅 파라미터이고, R^2 는 통계적 결정 계수이다. 본 실시예의 경우, 점도는 고정 농도의 함수로서 보고되고, 결과는 하기 표 42 및 43에 제공된다.

[0349] 표 42

부형제	단백질	완충액	지수 방정식 계산			
			a	b	R ²	250 mg/mL에서의 점도 계산치
카페인	인간 IgG	His HCl pH 5.5	0.469	0.0187	0.9194	50.3
니코틴아미드	인간 IgG	His HCl pH 5.5	0.6136	0.0198	0.9329	86.6
호르데닌 HCl	인간 IgG	His HCl pH 5.5	0.4116	0.0197	0.9535	56.7
1,3-디메틸우라실	인간 IgG	His HCl pH 5.5	0.0586	0.0282	0.9929	67.6
대조	인간 IgG	His HCl pH 5.5	0.2059	0.0248	0.9995	101.5

[0350]

[0351] 표 43

부형제	단백질	완충액	지수 방정식			
			a	b	R ²	120 mg/mL에서의 점도 계산치
설패닐산	오말리주맵	His HCl pH 6.0	1.2194	0.0185	0.8218	11.2
니코틴산	오말리주맵	His HCl pH 6.0	1.0171	0.0244	0.8041	19.0
오르니틴	오말리주맵	His HCl pH 6.0	0.1068	0.0419	0.6874	16.3
대조	오말리주맵	His HCl pH 6.0	0.8156	0.0319	0.9763	37.5
1,3-디아미노프로판	오말리주맵	His HCl pH 6.0	0.1498	0.0274	0.9835	4.0

[0352]

[0353] 실시예 49: 자가-상호작용의 BLI 측정

[0354]

[00182] 본 실시예에서, 생물층 간섭계(BLI) 시험을 ForteBio Octet Red-96 기기로 수행하였다. 아민 반응성 2 세대(AR2G) 바이오센서(Molecular Devices, CA)를 오말리주맵과 컨주게이션하여 부형제의 존재 하에 단백질 자가-상호작용을 검출하였다. 표 44에 열거된 부형제에 대한 부형제 용액을 His HCl 완충액에서 0.1 M로 제조하였다. 1.679 g의 이염기성 소듐 포스페이트, 7수화물(Sigma, St. Louis) 및 1.895 g의 일염기성 소듐 포스페이트, 일수화물(Sigma, St. Louis)을 DI 수에 용해시키고 부피를 조정함으로써 20 mM 소듐 포스페이트, pH 6.4 완충액을 제조하였다. Bioceros(Utrecht, The Netherlands)로부터 구입된 연구-등급 오말리주맵을 Amicon-15 원심분리기(30 kDa MWCO) 장치를 사용하여 pH 6.4의 포스페이트 완충액으로 완충액 교환하였다. 20 mM 소듐 포스페이트, pH 6.4 완충액 중 15 mg/mL의 이러한 오말리주맵 스톡 용액을 Sephadex G-25 PD-10 탈염 컬럼(GE Healthcare Life Sciences)을 사용하여 추가로 완충액 교환하고, 0.1 M에서 제조된 부형제를 함유하는 20 mM 소듐 포스페이트, pH 6.4 완충액으로 용리시켰다. Sephadex G-25 PD-10 탈염 컬럼(GE Healthcare Life Sciences)을 사용하여 유사하게 대조를 제조하였고, 20 mM 소듐 포스페이트, pH 6.4 완충액으로 용리시켰다. UV 투명 96 하프-웰 마이크로플레이트(Greiner Bio-One, Austria)를 사용하여 단백질 농도를 측정하고, Synergy HT 플레이트 리더(BioTek, Winooski, VT)로 280 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 단백질 농도를 제조된 부형제 완충액에 희석함으로써 5 mg/mL로 조정하였다. 흑색 바닥 96-웰 마이크로플레이트(Greiner Bio-One, Austria)에서, 20 mM 소듐 포스페이트, pH 6.4 완충액 중 0.1 M의 각 부형제 용액 250 μ L를 컬럼 B로 옮기고, 0.1 M 부형제를 함유하는 5 mg/ml 오말리주맵 용액 250 μ L를 컬럼 C로 옮겼다. 열이 개별 제형을 나타내고 행

이 단백질-함유 제형을 구별하도록 96-웰 플레이트를 설정하였다. 이어서, 트레이를 분석을 위해 ForteBio Octet Red-96으로 옮겼다. 오말리주맙 컨쥬게이션된 바이오센서를 120 초 동안 단백질을 함유하지 않는 제형에 침지시켜 기준선을 생성하였다. 이어서, 바이오센서를 제거하고 단백질을 함유하는 제형에 300 초 동안 침지시켰다. 본 실시예에서, 본 발명자들은 대조의 결합 신호와 비교하여 300 초에 결합 신호의 퍼센트로 델타를 보고하였고, 결과는 하기 표 44에 요약되어 있다.

표 44

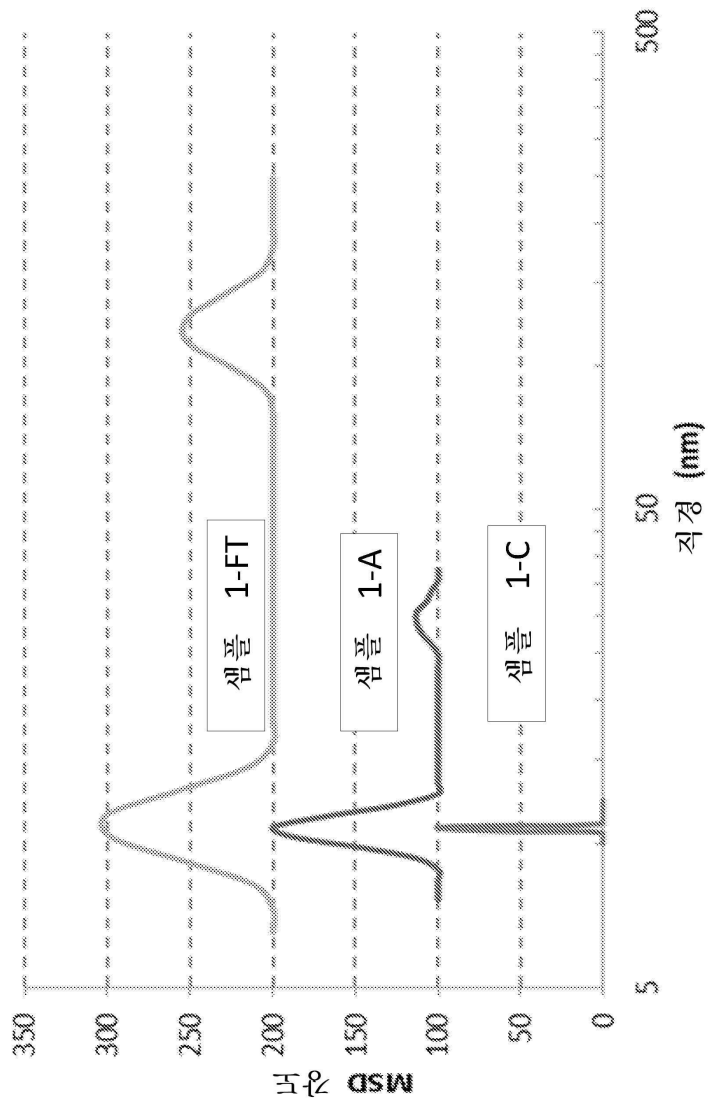
부형제	300 s에서의 결합 (nm)	변화 %
대조	7	0%
오르니틴	2.5	64%
이미노디아세트산	1.25	82%
니코틴산	0.5	93%
설패닐산	0.3	96%

균등론

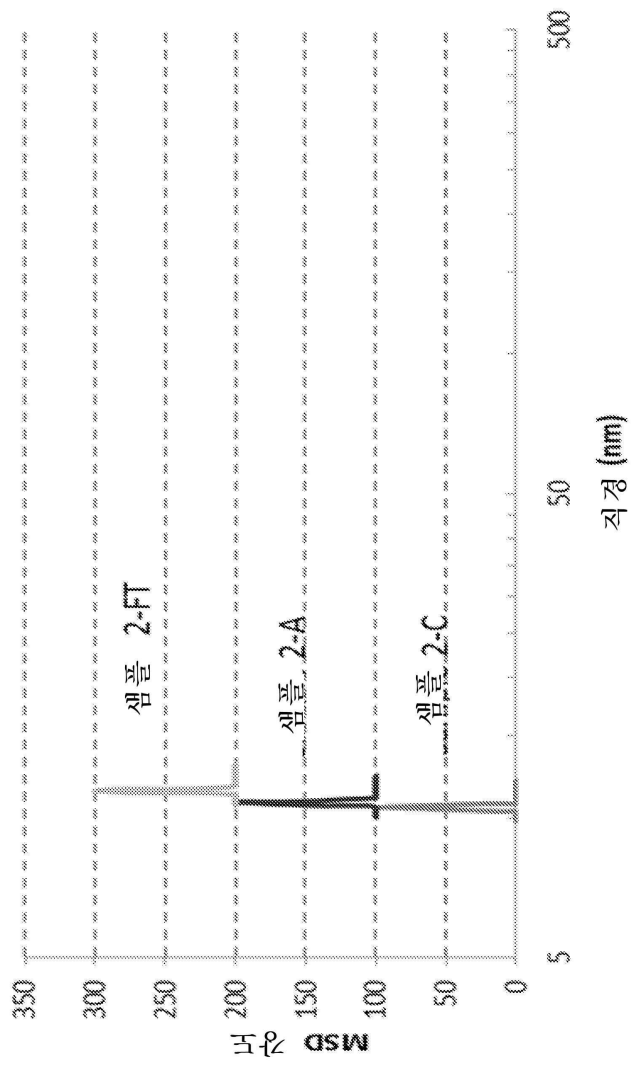
[00183] 본 발명의 특정 구현예가 본원에 개시되었지만, 상기 명세서는 예시적인 것이며 제한적인 것이 아니다. 본 발명은 특히 바람직한 구현예를 참조하여 나타내고 설명되었지만, 당업자는 첨부된 청구항에 의해 포함되는 본 발명의 범위를 벗어나지 않으면서 그 안에서 형태 및 세부사항의 다양한 변경이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다. 본 명세서를 검토하면 본 발명의 많은 변형이 당업자에게 명백해질 것이다. 달리 지시되지 않는 한, 본 명세서 및 청구항에서 사용되는 반응 조건, 성분의 양 등을 나타내는 모든 수는 모든 경우에 용어 "약"에 의해 변형되는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 달리 반대로 지시되지 않는 한, 본원에 기재된 수치 파라미터는 본 발명에 의해 수득하고자 하는 요망되는 특성에 따라 달라질 수 있는 근사치이다.

도면

도면1



도면2



도면3

