



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0153668
(43) 공개일자 2022년11월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/08 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01) A61K 47/20 (2017.01)
A61K 47/22 (2017.01) A61K 47/24 (2017.01)
A61K 9/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 9/08 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7038231(분할)
(22) 출원일자(국제) 2015년06월22일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2017-7001786
원출원일자(국제) 2015년06월22일
심사청구일자 2020년06월10일
- (85) 번역문제출일자 2022년11월01일
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/036899
(87) 국제공개번호 WO 2015/196187
국제공개일자 2015년12월23일
- (30) 우선권주장
62/014,784 2014년06월20일 미국(US)
(뒷면에 계속)
- (71) 출원인
코메라 라이프 사이언시스, 인코포레이티드
미국 01801 매사추세츠주 워번 스위트 4650 길 스트리트 12
- (72) 발명자
손 데이빗 에스.
미국 매사추세츠주 02467 체스트넛 힐 로렌스 로드 9
워트릭 필립
미국 매사추세츠주 02470 벨몬트 유닛 2 렉싱턴 스트리트 147
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인아주김장리

전체 청구항 수 : 총 58 항

(54) 발명의 명칭 단백질 제형에 대한 점성도-감소 부형제 화합물

(57) 요약

본 발명은 농축된 단백질 용액의 전달을 허용하는 제형 및 이의 생산방법을 포함한다. 본 발명의 방법은 전통적인 단백질 용액에 비해 더 낮은 점성도 액체 제형 또는 액체 제형 중의 더 고농도의 치료적 또는 비치료적 단백질을 수득할 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61K 39/39591 (2013.01)
A61K 47/12 (2013.01)
A61K 47/18 (2013.01)
A61K 47/183 (2013.01)
A61K 47/20 (2013.01)
A61K 47/22 (2013.01)
A61K 47/24 (2013.01)
A61K 9/0019 (2013.01)

(72) 발명자

포르틸라 로사 카사도

미국 매사추세츠주 01960 피바디 아발론 드라이브
4231

마호니 로버트 피.

미국 매사추세츠주 01922 뉴베리 오스틴 레인 2

무디 마크

미국 매사추세츠주 01742 콩코드 레볼루셔너리 로
드 51

(30) 우선권주장

62/083,623 2014년11월24일 미국(US)

62/136,763 2015년03월23일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

액체 제형으로서, 입체장애 아민, 음이온성 방향족, 기능화된 아미노산, 올리고펩타이드, 단쇄 유기산 및 저분자량 지방족 폴리산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 부형제 화합물 및 단백질을 포함하되, 상기 부형제 화합물은 점성도-감소량으로 첨가되는, 액체 제형.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단백질은 폐길화된(PEGylated) 단백질이고, 상기 부형제 화합물은 저분자량 지방족 폴리산인, 액체 제형.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제형은 약제학적 조성물이되, 상기 약제학적 조성물은 치료적 단백질을 포함하고, 상기 부형제 화합물은 약제학적으로 허용 가능한 부형제 화합물인, 액체 제형.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 제형은 비치료적 제형이되, 상기 비치료적 제형은 비치료적 단백질을 포함하는, 액체 제형.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 점성도-감소량은 상기 제형의 점성도를 대조군 제형의 점성도 미만의 점성도로 감소시키는, 액체 제형.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 제형의 상기 점성도는 상기 대조군 제형의 상기 점성도의 적어도 약 10% 미만인, 액체 제형.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 제형의 상기 점성도는 상기 대조군 제형의 상기 점성도의 적어도 약 30% 미만인, 액체 제형.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 제형의 상기 점성도는 상기 대조군 제형의 상기 점성도의 적어도 약 50% 미만인, 액체 제형.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 제형의 상기 점성도는 상기 대조군 제형의 상기 점성도의 적어도 약 70% 미만인, 액체 제형.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 제형의 상기 점성도는 상기 대조군 제형의 상기 점성도의 적어도 약 90% 미만인, 액체 제형.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 점성도는 약 100cP 미만인, 액체 제형.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 점성도는 약 50cP 미만인, 액체 제형.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 점성도는 약 20cP 미만인, 액체 제형.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 점성도는 약 10cP 미만인, 액체 제형.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 부형제 화합물은 분자량이 5000Da 미만인, 액체 제형.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 부형제 화합물은 분자량이 1500Da 미만인, 액체 제형.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 부형제 화합물은 분자량이 500Da 미만인, 액체 제형.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 적어도 약 25mg/ml의 단백질을 함유하는, 액체 제형.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 제형은 적어도 약 100mg/ml의 단백질을 함유하는, 액체 제형.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 제형은 적어도 약 200mg/ml의 단백질을 함유하는, 액체 제형.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 제형은 적어도 약 300mg/ml의 단백질을 함유하는, 액체 제형.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 약 5mg/ml 내지 약 300mg/ml의 부형제 화합물을 포함하는, 액체 제형.

청구항 23

제22항에 있어서, 약 10mg/ml 내지 약 200mg/ml의 부형제 화합물을 포함하는, 액체 제형.

청구항 24

제23항에 있어서, 약 20mg/ml 내지 약 100mg/ml을 포함하는, 액체 제형.

청구항 25

제24항에 있어서, 약 25mg/ml 내지 약 75mg/ml의 부형제 화합물을 포함하는, 액체 제형.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 상기 대조군 제형에 비교할 때 개선된 안정성을 갖는, 액체 제형.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 부형제 화합물은 입체장애 아민인, 액체 제형.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 입체장애 아민은 카페인, 테오필린, 티라민, 프로카인, 리도카인, 이미다졸, 아스팔탐, 사카린 및 아세살팜 칼륨으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 액체 제형.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 입체장애 아민은 카페인인, 액체 제형.

청구항 30

제27항에 있어서, 상기 입체장애 아민은 국소 주사용 마취제 화합물인, 액체 제형.

청구항 31

제27항에 있어서, 상기 입체장애 아민은 독립적인 약학적 특성을 갖는, 액체 제형.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 입체장애 아민은 독립적인 약학적 효과를 갖는 양으로 상기 제형 중에 존재하는, 액체 제형.

청구항 33

제31항에 있어서, 상기 독립적인 약학적 활성은 국소 마취 활성인, 액체 제형.

청구항 34

제31항에 있어서, 상기 입체장애 아민은 치료적 유효량 미만의 양으로 상기 제형 중에 존재하는, 액체 제형.

청구항 35

제31항에 있어서, 상기 독립적인 약학적 활성을 갖는 상기 입체장애 아민은 상기 제형의 점성도를 추가로 감소시키는 제2 부형제 화합물과 조합되는, 액체 제형.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 제2 부형제 화합물은 카페인, 테오필린, 티라민, 프로카인, 리도카인, 이미다졸, 아스팔탐, 사카린 및 아세살팜 칼륨으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 액체 제형.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 보존제, 계면활성제, 당, 다당류, 아르기닌, 프롤린, 하이알루로닉 다제, 안정제 및 완충제로 이루어진 군으로부터 선택되는 추가적인 제제를 더 포함하는, 액체 제형.

청구항 38

질환 또는 장애의 치료가 필요한 포유류에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법으로서,

상기 포유류에게 액체 치료적 제형을 투여하는 단계를 포함하되, 상기 액체 치료적 제형은 치료적 유효량의 치료적 단백질을 포함하고, 상기 액체 치료적 제형은 입체장애 아민, 음이온성 방향족, 기능화된 아미노산, 올리고펩타이드, 단쇄 유기산 및 저분자량 지방족 폴리산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 약제학적으로 허용 가능한 부형제 화합물을 더 포함하며; 그리고

상기 치료적 제형은 상기 장애의 상기 치료에 효과적인, 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 치료적 단백질은 폐길화된 단백질이고, 상기 부형제 화합물은 저분자량 지방족 폴리산인, 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 40

제38항 또는 제39항에 있어서, 상기 부형제 화합물은 입체장애 아민인, 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 입체장애 아민은 국소 주사용 마취제 화합물인, 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 42

제38항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료적 제형은 피하 주사에 의해 투여되는, 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 43

제38항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료적 제형은 근육내 주사에 의해 투여되는, 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 44

제38항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료적 제형은 정맥내 주사에 의해 투여되는, 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 45

제38항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 부형제 화합물은 점성도-감소량으로 상기 치료적 제형 중에 존재하고, 상기 점성도-감소량은 상기 치료적 제형의 점성도를 대조군 제형의 점성도 미만의 점성도로 감소시키는, 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 46

제38항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료적 제형은 상기 대조군 제형에 비교할 때, 개선된 안정성을 갖는, 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 47

제38항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 부형제 화합물은 본질적으로 순수한, 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 48

주사 부위에서의 통증을 감소시키는 것이 필요한 포유류에서 치료적 단백질의 주사 부위에서의 통증을 감소시키는 방법으로서,

주사에 의해 액체 치료적 제형을 투여하는 단계를 포함하되, 상기 치료적 제형은 치료적 유효량의 상기 치료적 단백질을 포함하고,

상기 제형은 국소 주사용 마취제 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 약제학적으로 허용 가능한 부형제 화합물을 더 포함하며,

상기 약제학적으로 허용 가능한 부형제 화합물은 점성도-감소량으로 상기 제형에 첨가되고; 그리고

상기 포유류는 대조군 치료적 제형의 투여에 의할 때보다 상기 부형제 화합물을 포함하는 상기 치료적 제형의 투여에 의해 더 적은 통증을 경험하고, 상기 대조군 치료적 제형은 상기 부형제 화합물을 함유하지 않으며, 다르게는 상기 치료적 제형과 동일한, 주사 부위에서의 통증을 감소시키는 방법.

청구항 49

액체 단백질 제형의 안정성을 개선시키는 방법으로서,

입체장애 아민, 음이온성 방향족, 기능화된 아미노산, 올리고펩타이드, 및 단쇄 유기산 및 저분자량 지방족 폴리산으로 이루어진 군으로부터 선택된 군으로부터 선택된 부형제 화합물 및 치료적 단백질을 포함하는 액체 단백질 제형을 제조하는 단계를 포함하되,

상기 액체 단백질 제형은 대조군 액체 단백질 제형에 비해 개선된 안정성을 입증하고, 상기 대조군 액체 단백질 제형은 상기 부형제 화합물을 함유하지 않으며, 다르게는 상기 액체 단백질 제형과 동일한, 액체 단백질 제형의 안정성을 개선시키는 방법.

청구항 50

제49항에 있어서, 상기 액체 단백질 제형의 상기 안정성은 저온 저장 조건 안정성인, 액체 단백질 제형의 안정성을 개선시키는 방법.

청구항 51

제49항에 있어서, 상기 액체 단백질 제형의 상기 안정성은 실온 안정성 또는 승온 안정성인, 액체 단백질 제형의 안정성을 개선시키는 방법.

청구항 52

액체 제형으로서, 입체장애 아민, 음이온성 방향족, 기능화된 아미노산, 올리고펩타이드 및 단쇄 유기산, 및 저분자량 지방족 폴리산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 부형제 화합물 및 단백질을 포함하되, 상기 부형제 화합물은 상기 단백질 확산 상호작용 매개변수 kD , 또는 상기 제2 비리얼 계수 $B22$ 에 의해 측정되는 바와 같은 개선된 단백질-단백질 상호작용을 초래하는, 액체 제형.

청구항 53

제52항에 있어서, 상기 액체 제형은 치료적 제형이되, 상기 치료적 제형은 치료적 단백질을 포함하는, 액체 제형.

청구항 54

제52항에 있어서, 상기 제형은 비치료적 제형이되, 상기 비치료적 제형은 비치료적 단백질을 포함하는, 액체 제형.

청구항 55

단백질-관련 공정을 개선시키는 방법으로서,

제1항 내지 제37항 및 제50항 내지 제54항 중 어느 한 항의 액체 제형을 제공하는 단계, 및

가공 방법에서 상기 액체 제형을 사용하는 단계를 포함하는, 단백질-관련 공정을 개선시키는 방법.

청구항 56

제55항에 있어서, 상기 액체 제형은 치료적 제형이되, 상기 치료적 제형은 치료적 단백질을 포함하는, 단백질-관련 공정을 개선시키는 방법.

청구항 57

제55항에 있어서, 상기 액체 제형은 비치료적 제형이고, 상기 비치료적 제형은 비치료적 단백질을 포함하는, 단백질-관련 공정을 개선시키는 방법.

청구항 58

제55항에 있어서, 상기 가공 방법은 여과, 펌핑, 혼합, 원심분리, 막 분리, 동결건조 및 크로마토그래피로 이루어진 군으로부터 선택되는, 단백질-관련 공정을 개선시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

관련출원

본 출원은 2014년 6월 20일자로 출원된 미국 가출원 특허 제62/014,784호, 2014년 11월 24일자로 출원된 미국

[0001]

[0002]

가출원 특허 제62/083,623호 및 2015년 3월 23일자로 출원된 미국 가출원 특허 제62/136,763호의 유익을 주장한다. 각각의 상기 출원의 전문은 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0003] **기술분야**

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

배경 기술

[0005] 생체중합체는 치료적 또는 비치료적 목적을 위해 사용될 수 있다. 생체중합체-기반 치료, 예컨대 항체 또는 효소 제형은 질환을 치료하는데 널리 사용된다. 비치료적 생체중합체, 예컨대 효소, 펩타이드 및 구조적 단백질은 비치료적 적용분야, 예컨대 가정, 영양, 상업적 및 산업 용도에서의 효용을 가진다.

[0006] 치료적 적용분야에서 사용되는 생체중합체는 질환의 치료를 위해 신체 내로의 그들의 도입을 허용하도록 제형화되어야 한다. 예를 들어, 정맥내(IV) 주사에 의해 제형을 투여하는 것 대신 특정 환경 하에서 피하(SC) 또는 근육내(IM) 경로에 의해 항체 및 단백질/펩타이드 생체중합체 제형을 전달하는 것이 유리하다. SC 또는 IM 주사에 의한 환자 순응도 및 편안함을 더 양호하게 향상시키기 위해, 주사기 내 액체 용적은 전형적으로 2 내지 3cc로 제한되고, 제형의 점성도는 전형적으로 약 20 센티포아즈(cP)보다 더 낮지만, 따라서 제형은 통상적인 의료 기기 및 소구경 바늘을 이용하여 전달될 수 있다. 이들 전달 매개변수는 전달 중인 제형에 대한 투약량 조건과 항상 잘 맞지는 않는다.

[0007] 예를 들어, 항체는 그들의 의도된 치료 효과를 발휘하기 위해 고용량 수준으로 전달될 것이 필요할 수 있다. 고용량 수준의 항체 제형을 전달하기 위해 제한된 액체 용적을 이용하는 것은 때때로 150mg/ml 수준을 초과하는, 전달 비히클 내 고농도의 항체를 필요로 할 수 있다. 이 투약량 수준에서, 단백질 용액의 점성도 대 농도 플롯은 제형의 점성도가 증가됨에 따라 극적으로 상승하도록, 그들의 선형-비선형 전환 범위 밖에 있다. 그러나, 증가된 점성도는 표준 SC 또는 IM 전달 시스템과 양립가능하지 않다. 생체중합체-기반 치료제 용액은 또한 안정성 문제, 예컨대 침전, 헤이징(hazing), 유백광, 변성 및 겔 형성, 가역적 또는 비가역적 응집의 경향이 있다. 안정성 문제는 용액의 저장 수명을 제한하거나, 또는 특별한 조절을 필요로 한다.

[0008] 주사용 단백질 제형을 생성하기 위한 일 접근은 SC 또는 IM 전달에 적합한 현탁액을 형성하기 위해 재구성될 수 있는 분말로 치료적 단백질 용액을 전환시키는 것이다. 동결건조는 단백질 분말을 생성하기 위한 표준 기법이다. 냉동건조, 분무건조 및 심지어 침전 후 초임계 유체 추출은 후속적 재구성을 위한 단백질 분말을 생성하기 위해 사용되었다. 분말 현탁액은 재용해 전에 점성도가 낮으며(동일한 전체 용량에서의 용액에 비해), 따라서 SC 또는 IM 주사에 적합할 수 있고, 단, 입자는 바늘을 통과하기에 충분히 작다. 그러나, 분말 중에 존재하는 단백질 결정은 면역 반응을 촉발시키는 것의 타고난 위험을 가진다. 재용해 후 불특정 단백질 안정성/활성은 추가적인 문제를 가진다. 치료적 목적을 위해 저점성도 단백질 제형을 생성하는 한편, 단백질 분말 현탁액에 의해 도입된 제한을 피하는 기법에 대한 당업계의 필요가 남아있다.

[0009] 상기 기재한 단백질의 치료적 용도에 추가로, 생체중합체, 예컨대 효소, 펩타이드 및 구조적 단백질이 비치료 용도로 사용될 수 있다. 이들 비치료적 생체중합체는 다수의 상이한 경로로부터 생성될 수 있으며, 예를 들어, 식물 공급원, 동물 공급원으로부터 유래되거나, 또는 세포 배양물로부터 생성된다.

[0010] 비치료적 단백질은 보통 수 중에서 과립 또는 분말 물질로서 또는 용액 또는 분산물로서 생성, 수송, 저장 및 조절될 수 있다. 비치료적 용도를 위한 생체중합체는 과립 또는 섬유 단백질일 수 있고, 이들 물질의 특정 형태는 수 중에서 제한된 가용성을 가질 수 있거나 또는 용해 시 고점성도를 나타낼 수 있다. 이들 용액 특성은 비치료적 물질의 제형, 조절, 저장, 펌핑 및 성능에 대한 도전을 제공할 수 있으며, 따라서, 비치료적 단백질 용액의 점성도를 감소시키고, 용해도 및 안정성을 개선시키기 위한 필요가 있다.

[0011] 단백질은 복잡한 생체중합체이며, 각각은 독특하게 폴딩된 3-D 구조 및 표면 에너지 맵(소수성/친수성 영역 및 전하)을 지닌다. 농축 단백질 용액에서, 이들 거대분자는 그들의 정확한 형상 및 표면 에너지 분포에 따라서 복잡한 방법으로 강하게 상호작용하고 심지어 서로 맞물릴 수 있다. 강한 특정 상호작용을 위한 "핫스팟(Hot-spot)"은 단백질 클러스터링을 야기하여 용액 점성도를 증가시킨다. 이들 문제를 처리하기 위해, 다수의 부형제 화합물이 국소 상호작용을 지연시킴으로써 그리고 클러스터링에 의해 용액 점성도를 감소시키는 것으로 목적으로 하는 생체치료 제형에서 사용된다. 이들 노력은 개개로 맞춤되며, 종종 경험적으로, 때때로 인실리코 시뮬레이션에 의해 가이드된다. 부형제 화합물의 조합물이 제공될 수 있지만, 이러한 조합물을 최적화하는 것은 또한 경험적으로 그리고 사례에 따른 기준으로 진행되어야 한다.

[0012] 비선형 조건 하에서 주어진 농도로 단백질 제형의 감소된 점성도에 대한 사실상 보편적인 접근을 위한 당업계의 필요가 남아있다. 이런 점성도 감소를 달성하는 한편 단백질의 활성을 보존하기 위한 당업계의 추가적인 필요가 있다. 추가로 조율가능하고 지속적인 방출 프로파일을 갖는 제형과 함께 사용하기 위한 그리고 데포 주사에 적합한 제형과 함께 사용하기 위한 점성도-감소 시스템을 적합하게 하는 것이 바람직할 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명은 농축된 단백질 용액의 전달을 허용하는 제형 및 이의 생산방법을 포함한다.

과제의 해결 수단

[0014] 실시형태에서, 입체장애 아민, 음이온성 방향족, 기능화된 아미노산, 올리고펩타이드, 단쇄 유기산 및 저분자량 지방족 폴리산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 부형제 화합물 및 단백질을 포함하는 액체 제형이 본 명세서에서 개시되되, 부형제 화합물은 점성도-감소량으로 첨가된다. 실시형태에서, 단백질은 폐길화된(PEGylated) 단백질이고, 부형제는 저분자량 지방족 폴리산이다. 실시형태에서, 제형은 약제학적 조성물이고, 치료적 제형은 치료적 단백질을 포함하되, 부형제 화합물은 약제학적으로 허용 가능한 부형제 화합물이다. 실시형태에서, 제형은 비치료적 제형이고, 비치료적 제형은 비치료적 단백질을 포함한다. 실시형태에서, 점성도-감소량은 제형의 점성도를 대조군 제형의 점성도 미만의 점성도로 감소시킨다. 실시형태에서, 제형의 점성도는 대조군 제형 점성도의 적어도 약 10% 미만이거나, 또는 대조군 제형 점성도의 적어도 약 30% 미만이거나, 또는 대조군 제형 점성도의 적어도 약 50% 미만이거나, 또는 대조군 제형 점성도의 적어도 약 70% 미만이거나, 또는 대조군 제형 점성도의 적어도 약 90% 미만이다. 실시형태에서, 점성도는 약 100cP 미만이거나, 또는 약 50cP 미만이거나, 또는 약 20cP 미만이거나, 또는 약 10cP 미만이다. 실시형태에서, 부형제 화합물은 분자량이 5000Da 미만, 또는 1500Da 미만, 또는 500Da 미만이다. 실시형태에서, 상기 제형은 적어도 약 25mg/ml의 단백질, 또는 적어도 약 100mg/ml의 단백질, 또는 적어도 약 200mg/ml의 단백질, 또는 적어도 약 300mg/ml의 단백질을 함유한다. 실시형태에서, 상기 제형은 약 5mg/ml 내지 약 300mg/ml의 부형제 화합물을 포함하거나, 또는 약 10mg/ml 내지 약 200mg/ml의 부형제 화합물을 포함하거나, 또는 약 20mg/ml 내지 약 100mg/ml를 포함하거나, 또는 약 25mg/ml 내지 약 75mg/ml의 부형제 화합물을 포함한다. 실시형태에서, 상기 제형은 대조군 제형에 비교할 때, 개선된 안정성을 가진다. 실시형태에서, 부형제 화합물은 입체장애 아민이다. 실시형태에서, 입체장애 아민은 카페인, 테오필린, 티라민, 프로카인, 리도카인, 이미다졸, 아스팔탐, 사카린, 및 아세실팜 칼륨으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 실시형태에서, 입체장애 아민은 카페인이다. 실시형태에서, 입체장애 아민은 국소 주사용 마취제 화합물이다. 입체장애 아민은 독립적인 약학적 특성을 가질 수 있고, 입체장애 아민은 독립적인 약학적 효과를 갖는 양으로 제형 중에 존재할 수 있다. 실시형태에서, 입체장애 아민은 치료적 유효량 미만의 양으로 제형 중에 존재할 수 있다. 독립적인 약학적 활성은 국소 마취 활성일 수 있다. 실시형태에서, 독립적인 약학적 활성을 갖는 입체장애 아민은 제형의 점성도를 추가로 감소시키는 제2 부형제 화합물과 조합된다. 제2 부형제 화합물은 카페인, 테오필린, 티라민, 프로카인, 리도카인, 이미다졸, 아스팔탐, 사카린 및 아세실팜 칼륨으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 실시형태에서, 제형은 보존제, 계면활성제, 당, 다당류, 아르기닌, 프롤린, 하이알루로니다제, 안정제, 및 완충제로 이루어진 군으로부터 선택되는 추가적인 제제를 포함할 수 있다.

[0015] 본 명세서에서 포유류에게 액체 치료적 제형을 투여하는 단계를 포함하는, 포유류에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 개시되되, 치료적 제형은 치료적 유효량의 치료적 단백질을 포함하고, 상기 제형은 입체장애 아민, 음이온성 방향족, 기능화된 아미노산, 올리고펩타이드, 단쇄 유기산, 및 저분자량 지방족 폴리산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 약제학적으로 허용 가능한 부형제 화합물을 추가로 포함하며; 치료적 제형은 질환 또는 장애의 치료에 효과적이다. 실시형태에서, 치료적 단백질은 폐길화된 단백질이고, 부형제 화합물은 저분자량 지방족 폴리산이다. 실시형태에서, 부형제는 입체장애 아민이다. 실시형태에서, 입체장애 아민은 국소 마취제 화합물이다. 실시형태에서, 제형은 피하 주사, 또는 근육내 주사, 또는 정맥내 주사에 의해 투여된다. 실시형태에서, 부형제 화합물은 점성도-감소량으로 치료적 제형에 존재하고, 점성도-감소량은 치료적 제형의 점성도를 대조군 제형의 점성도 미만의 점성도로 감소시킨다. 실시형태에서, 치료적 제형은 대조군 제형에 비교할 때 개선된 안정성을 가진다. 실시형태에서, 부형제 화합물은 본질적으로 순수하다.

[0016] 추가로 본 명세서에서 주사에 의해 액체 치료적 제형을 투여하는 단계를 포함하는, 주사 부위에서의 통증을 감소시키는 것이 필요한 포유류에서 치료적 단백질의 주사 부위에서의 통증을 감소시키는 방법이 개시되되, 치료적 제형은 치료적 유효량의 치료적 단백질을 포함하고, 제형은 국소 주사용 마취제 화합물로 이루어진 군으로부터

터 선택된 약제학적으로 허용 가능한 부형제 화합물을 추가로 포함하고, 약제학적으로 허용 가능한 부형제 화합물은 점성도-감소량으로 제형에 첨가되며; 포유류는 대조군 치료적 제형의 투여에 의한 때보다 부형제 화합물을 포함하는 치료적 제형의 투여에 의해 더 적은 통증을 경험하고, 대조군 치료적 제형은 부형제 화합물을 함유하지 않으며, 다르게는 치료적 제형과 동일하다.

[0017] 본 명세서에서, 실시형태에서, 입체장애 아민, 음이온성 방향족, 기능화된 아미노산, 올리고펩타이드 및 단쇄 유기산 및 저분자량 지방족 폴리산으로 이루어진 군으로부터 선택된 부형제 화합물 및 치료적 단백질을 포함하는 액체 단백질 제형을 제조하는 단계를 포함하는, 액체 단백질 제형의 안정성을 개선시키는 방법이 개시되며, 액체 단백질 제형은 대조군 액체 단백질 제형에 비해 개선된 안정성을 입증하고, 대조군 액체 단백질 제형은 부형제 화합물을 함유하지 않으며, 다르게는 액체 단백질 제형과 동일하다. 액체 제형의 안정성은 저온 저장 조건 안정성, 실온 안정성 또는 승온 안정성일 수 있다.

[0018] 또한 실시형태에서, 입체장애 아민, 음이온성 방향족, 기능화된 아미노산, 올리고펩타이드, 단쇄 유기산, 및 저분자량 지방족 폴리산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 부형제 및 단백질을 포함하는 액체 제형이 본 명세서에서 개시되며, 제형 중의 부형제 화합물의 존재는 단백질 확산 상호작용 매개변수 kD , 또는 제2 비리얼 계수 B_{22} 에 의해 측정되는 바와 같은 개선된 단백질-단백질 상호작용 특징을 초래한다. 실시형태에서, 제형은 치료적 제형이고, 치료적 단백질을 포함한다. 실시형태에서, 제형은 비치료적 제형이고, 비치료적 단백질을 포함한다.

[0019] 추가로, 실시형태에서, 상기 기재된 액체 제형을 제공하는 단계 및 가공 방법에서 그것을 사용하는 단계를 포함하는, 단백질-관련 공정을 개선시키는 방법이 본 명세서에서 개시된다. 실시형태에서, 가공 방법은 여과, 펄핑, 혼합, 원심분리, 막 분리, 동결건조 또는 크로마토그래피를 포함한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명의 방법은 전통적인 단백질 용액에 비해 더 낮은 점성도 액체 제형 또는 액체 제형 중의 더 고농도의 치료적 또는 비치료적 단백질을 수득할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 명세서에서 농축 단백질 용액의 전달을 허용하는 제형 및 제형 생산방법이 개시된다. 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 접근은 전통적인 단백질 용액에 비해, 액체 제형에서 더 낮은 점성도의 액체 제형 또는 더 고농도의 치료적 또는 비치료적 단백질을 수득할 수 있다. 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 접근은 전통적인 단백질 용액에 비교할 때, 개선된 안정성을 갖는 액체 제형을 수득할 수 있다. 안정한 제형은 그에 함유된 단백질이 그의 물리적 및 화학적 안정성을 보유하고, 저온 저장 조건이든, 실온 조건이든 또는 승온 저장 조건이든, 저장 조건 하에서 저장 시 그의 치료적 또는 비치료적 효능을 보유한다. 유리하게는, 안정한 제형은 또한 그에 용해된 단백질의 응집 또는 침전에 대해 보호를 제공할 수 있다. 예를 들어, 저온 저장 조건은 냉장고 또는 냉동고에서의 저장을 수반할 수 있다. 일부 예에서, 저온 저장 조건은 $10^{\circ}C$ 이하의 온도에서 통상적인 냉장고 또는 냉동고 저장을 수반할 수 있다. 추가적인 예에서, 저온 저장 조건은 약 $2^{\circ}C$ 내지 약 $10^{\circ}C$ 의 온도에서 저장을 수반한다. 다른 예에서, 저온 저장 조건은 약 $4^{\circ}C$ 의 온도에서 저장을 수반한다. 추가적인 예에서, 저온 저장 조건은 냉동 온도, 예컨대 약 $0^{\circ}C$ 이하에서의 저장을 수반한다. 다른 예에서, 저온 저장 조건은 약 $-30^{\circ}C$ 내지 약 $0^{\circ}C$ 의 온도에서 저장을 수반한다. 실온 저장 조건은 주위 온도에서, 예를 들어, 약 $10^{\circ}C$ 내지 약 $30^{\circ}C$ 에서 저장을 수반할 수 있다. 예를 들어, 약 $30^{\circ}C$ 내지 약 $50^{\circ}C$ 온도에서의 승온 안정성은 전형적인 주위(10 내지 $30^{\circ}C$) 조건에서 장기간 저장을 예측하기 위해 가속 노화 연구의 부분으로서 사용될 수 있다.

[0022] 용액 중의 단백질이 엉킴을 형성하는 경향이 있다는 것은 중합체 과학 및 공학의 당업자에게 잘 공지되어 있는데, 단백질 엉킴은 엉킨 사슬의 번역 이동성을 제한하고 단백질의 치료적 또는 비치료적 효능을 방해할 수 있다. 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 부형제 화합물은 용액 중에서 부형제 화합물과 표적 단백질 사이의 특이적 상호작용에 기인하여 단백질 클러스터링을 억제할 수 있다. 본 명세서에 개시된 바와 같은 부형제 화합물은 천연 또는 합성일 수 있고, 바람직하게는 FDA가 일반적으로 안전한 것으로 인식하는 물질이다 ("GRAS").

[0023] 1. 정의

[0024] 본 개시내용의 목적을 위해 용어 "단백질"은 전형적으로 분자량이 1 내지 $3000kD$ 인 별도의 3차 구조를 생성하기에 충분히 긴 쇠를 갖는 아미노산 서열을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 단백질의 분자량은 약 50 내지 $200kD$ 이고; 다른 실시형태에서, 단백질의 분자량은 약 20 내지 $1000kD$ 또는 약 20 내지 $2000kD$ 이다. 용어 "단백질"과

대조적으로, 용어 "펩타이드"는 별도의 3차 구조를 갖지 않는 아미노산 서열을 지칭한다. 매우 다양한 생체중합체가 용어 "단백질"의 범주 내에 포함된다. 예를 들어, 용어 "단백질"은 항체, 앵타머, 융합 단백질, 폐결화된 단백질, 합성 폴리펩타이드, 단백질 단편, 리포단백질, 효소, 구조적 펩타이드 등을 포함하는 치료적 또는 비치료적 단백질을 지칭할 수 있다.

[0025] 비제한적 예로서, 치료적 단백질은 포유류 단백질, 예컨대 호르몬 및 프로호르몬(예를 들어, 인슐린 및 프로인슐린, 글루카곤, 칼시토닌, 갑상선 호르몬(T3 또는 T4 또는 갑상선 자극 호르몬), 부갑상선 호르몬, 난포 자극 호르몬, 황체형성 호르몬, 성장 호르몬, 성장 호르몬 방출 인자 등); 응고 및 항응고 인자(예를 들어, 조직 인자, 폰빌레브란트 인자, 인자 VIIIC, 인자 IX, 단백질 C, 플라스미노겐 활성화제(유로키나제, 조직 유형 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, 신경 영양 성장 인자, 인슐린 유사 성장 인자 등); 알부민; 콜라겐 및 엘라스틴; 조혈 인자(예를 들어, 에리스로포이에틴, 트롬보포이에틴 등); 골유도성 인자(예를 들어, 뼈형성 단백질); 수용체(예를 들어, 인테그린, 카테린 등); 표면 막 단백질; 수송단백질; 조절 단백질(예를 들어, 항원 단백질(예를 들어, 항원으로서 작용하는 바이러스성 성분); 및 항체를 포함할 수 있다. 용어 "항체"는 본 명세서에서 그의 가장 넓은 범위에서 비제한적 예로서 단클론성 항체(예를 들어, 면역글로불린 Fc 영역을 지니는 전장 항체를 포함함), 단일쇄 분자, 이중특이성 및 다중특이성 항체, 다이머, 폴리머, 폴리머화 특이성을 갖는 항체 조성물, 및 항체 단편(예를 들어, Fab, Fv 및 F(ab')₂를 포함함)을 포함하기 위해 사용된다. 항체는 또한 "면역글로불린"으로 지칭될 수 있다. 항체는 생물학적으로 중요한 물질인 특이적 단백질 또는 비단백질 "항원"과 관련되는 것으로 이해되며; 환자에게 치료적 유효량의 항체의 투여는 항원과 복합체화됨으로써 그의 생물학적 특성을 변경시킬 수 있고, 따라서 환자는 치료적 효과를 경험한다.

[0026] 실시형태에서, 단백질은 폐결화되는데, 이는 그들이 폴리(에틸렌 글리콜)("PEG") 및/또는 폴리(프로필렌 글리콜)("PPG") 단위를 포함한다는 것을 의미한다. 폐결화된 단백질 또는 PEG-단백질 컨쥬게이트는 그들의 유리한 특성, 예컨대 용해도, 약동학, 약리학, 면역원성, 신장 클리어런스 및 안정성에 기인하여 치료 용도에서의 효용이 발견되었다. 폐결화된 단백질의 비제한적 예는 폐결화된 인터페론(PEG-IFN), 폐결화된 항-VEGF, PEG 단백질 컨쥬게이트 약물, 아다겐, 페가스파라가제, 페그필그라스티, 페글로티카제, 페그비소만트, 폐결화된 에포에틴-β, 및 세르토리주막 폐골이다.

[0027] 폐결화된 단백질은 하나 이상의 반응성 작용기를 갖는 PEG 시약과 단백질의 반응과 같은 다양한 방법에 의해 합성될 수 있다. PEG 시약에 대한 반응성 작용기는 표적화된 단백질 부위, 예컨대 라이신, 히스티딘, 시스테인 및 N-말단에서 단백질과 결합을 형성할 수 있다. 전형적인 폐결화 시약은 단백질에 대해 표적화된 아미노산 잔기와 특이적 반응성을 갖는 알데하이드, 말레이미드, 또는 숙신이미드기와 같은 반응성 작용기를 가진다. 폐결화된 시약은 약 1 내지 약 1000 PEG 및/또는 PPG 반복 단위의 PEG 쇄를 가질 수 있다. 폐결화의 다른 방법은 글리코 폐결화를 포함하며, 여기서 단백질은 처음 글리코실화되고, 이어서, 글리코실화된 잔기는 제2 단계에서 폐결화된다. 특정 폐결화 과정은 시알릴트랜스퍼라제 및 트랜스글루타미나제와 같은 효소에 의해 보조된다.

[0028] 폐결화된 단백질이 천연, 비폐결화된 단백질 이상으로 치료적 이점을 제공할 수 있지만, 이들 물질은 그들이 정제, 용해, 여과, 농축 및 투여되는 것을 어렵게 하는 물리적 또는 화학적 특성을 가질 수 있다. 단백질의 폐결화는 천연 단백질에 비해 더 높은 용액 점성도를 야기할 수 있으며, 이는 일반적으로 더 저농도에서 폐결화된 단백질 용액의 제형을 필요로 한다.

[0029] 안정한, 저 점성도 용액 중에서 단백질 치료제를 제형화하는 것이 바람직할 수 있으며, 따라서 그들은 최소 주사 용액 중에서 환자에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 약물의 피하(SC) 또는 근육내(IM) 주사는 일반적으로 적은 주사 용적, 바람직하게는 2ml 미만을 필요로 한다. SC 및 IM 주사 경로는 자가 투여 치료에 적합하며, 이는 직접 의학적 감독 하에서만 수행되는 정맥내(IV) 주사에 비해 더 적은 비용이 들고 더 접근하기 쉬운 형태이다. SC 또는 IM 주사에 대한 제형은 좁은 게이지 바늘을 통해 치료 용액의 용이한 유동을 허용하기 위해 저용액 점성도, 일반적으로 30cP 미만, 및 바람직하게는 20cP 미만을 필요로 한다. 작은 주사 용적 및 저 점성도 요건의 이런 조합은 SC 또는 IM 주사 경로에서 폐결화된 단백질 치료의 용도에 대한 도전으로 존재한다.

[0030] 치료적 효과를 갖는 해당 단백질은 "치료적 단백질"로 지칭될 수 있고; 치료적 유효량으로 치료적 단백질을 함유하는 제형은 "치료적 제형"으로 지칭될 수 있다. 치료적 제형에 함유된 치료적 단백질은 또한 그의 "단백질 활성 성분"으로 지칭될 수 있다. 전형적으로, 치료적 제형은 치료적 유효량 단백질 활성 성분 및 부형제를 다른 선택적 구성성분과 함께 또는 다른 선택적 구성성분 없이 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "치료적"은

존재하는 장애의 치료와 장애의 예방을 둘 다 포함한다.

[0031] "치료"는 증상 개시의 예방 또는 지연 및/또는 장애 증상의 경감 또는 개선을 포함하는, 장애를 관리, 치유, 경감, 개선, 치료 또는 달리 유리하게 영향을 미치는 것으로 의도되는 임의의 측정을 포함한다. 치료가 필요한 해당 환자는 이미 특정 장애를 갖는 환자와 장애의 예방이 바람직한 환자를 둘 다 포함한다. 장애는 급성 또는 만성 질환, 또는 포유류가 급성 또는 만성 질환이 되게 쉽게 하는 병리학적 병태를 포함하는 포유류의 항상성 웰빙을 변경시키는 임의의 병태이다. 장애의 비제한적 예는 암, 대사 장애(예를 들어, 당뇨병), 알레르기 장애(예를 들어, 천식), 피부 장애, 심혈관 장애, 호흡 장애, 혈액학적 장애, 근골격 장애, 염증 또는 류마티즘 장애, 자가면역 장애, 위장 장애, 비뇨기 장애, 생식 장애, 신경 장애 등을 포함한다. 치료 목적을 위해 용어 "포유류"는 인간, 가축 동물, 애완동물, 농장 동물, 스포츠 동물, 작업 동물 등을 포함하는 포유류로서 분류되는 임의의 동물을 지칭할 수 있다. 따라서 "치료"는 수의학적 치료와 인간 치료 둘 다를 포함할 수 있다. 편리함을 위해, 이러한 "치료"를 받는 포유류는 "환자"로서 지칭될 수 있다. 특정 실시형태에서, 환자는 자궁내 태아 동물을 포함하는 임의의 연령일 수 있다.

[0032] 실시형태에서, 치료는 치료가 필요한 포유류에게 치료적 유효량의 치료적 제형을 제공하는 단계를 수반한다. "치료적 유효량"은 존재하는 장애의 치료 또는 예견되는 장애의 예방을 달성하기 위해 치료가 필요한 포유류에게 투여되는 적어도 최소 농도의 치료적 단백질이다(이러한 치료 또는 이러한 예방은 "치료적 개입"이다). 치료적 제형에서 활성 성분으로서 포함될 수 있는 치료적 유효량의 다양한 치료적 단백질은 당업계에서 익숙할 수 있거나; 또는 본 명세서에서 이후에 치료적 개입에 대해 발견 또는 적용되는 치료적 단백질에 대해, 치료적 유효량은 단지 일상적인 실험을 이용하여 당업자에 의해 수행되는 표준 기법에 의해 결정될 수 있다.

[0033] 비치료적 목적(즉, 치료를 수반하지 않는 목적), 예컨대 가정, 영양, 상업적 및 산업적 용도를 위해 사용되는 해당 단백질은 "비치료적 단백질"로 지칭될 수 있다. 비치료적 단백질을 함유하는 제형은 "비치료적 제형"으로 지칭될 수 있다. 비치료적 단백질은 식물 공급원, 동물 공급원으로부터 유래될 수 있거나, 또는 세포 배양물로부터 생성되고; 그들은 또한 효소 또는 구조적 단백질일 수 있다. 비치료적 단백질은 촉매, 인간 및 동물 영양, 가공 보조제, 세정제 및 폐기물 처리와 같은 가정, 영양, 상업적 및 산업적 용도에서 사용될 수 있다.

[0034] 비치료적 생체중합체의 중요한 범주는 효소이다. 효소는 다수의 비치료적 용도, 예를 들어, 촉매, 인간 및 동물 영양 성분, 가공 보조제, 세정제 및 폐기물 처리제를 가진다. 효소 촉매는 다양한 화학 반응을 가속화하기 위해 사용된다. 비치료적 용도를 위한 효소 촉매의 예는 카탈라제, 산화환원효소, 트랜스퍼라제, 가수분해효소, 리아제, 이성질화효소 및 리가제를 포함한다. 효소의 인간 및 동물 영양 용도는 기능식품, 단백질의 영양 공급원, 미량영양소의 킬레이션 또는 제어된 전달, 소화 보조제 및 보충물을 포함하고; 이들은 아밀라제, 프로테아제, 트립신, 락타제 등으로부터 유래될 수 있다. 베이킹, 양조, 발효, 주스 가공 및 포도주 제조와 같은 작업에서 식품 및 음료 제품의 생성을 개선시키기 위한 효소 가공 보조제가 유용하다. 이들 식품 및 음료 가공 보조제의 예는 아밀라제, 셀룰라제, 펙티나제, 글루카나제, 리파제 및 락타제를 포함한다. 효소는 또한 바이오연료의 생성에서 사용될 수 있다. 바이오연료용 에탄올은, 예를 들어, 바이오매스 공급 원료, 예컨대 셀룰로스 및 목질계 물질의 효소 분해에 의해 보조될 수 있다. 이러한 공급원료의 셀룰로스 및 리그닌나제에 의한 처리는 바이오매스를, 연료로 발효될 수 있는 기질로 전환시킨다. 상업적 적용분야에서, 효소는 세탁, 식기 세척, 표면 세정 및 도구 세정 용도를 위한 세제, 세정제 및 염색 리프팅 보조제로서 사용된다. 이 목적을 위한 전형적인 효소는 프로테아제, 셀룰로스, 아밀라제 및 리파제를 포함한다. 추가로, 비치료적 효소는 다양한 상업적 및 산업적 공정, 예컨대 셀룰라제를 이용한 텍스타일 연화, 가죽 가공, 폐기물 처리, 오염 침전물 처리, 물 처리, 펄프 표백 및 펄프 연화 및 탈결합에서 사용된다. 이들 목적을 위한 전형적인 효소는 아밀라제, 자일라나제, 셀룰라제 및 리그닌나제이다.

[0035] 비치료적 생체중합체의 다른 예는 섬유성 또는 구조적 단백질, 예컨대 케라틴, 콜라겐, 젤라틴, 엘라스틴, 피브로인, 액틴, 튜불린 또는 이들의 가수분해, 분해 또는 유도체화된 형태를 포함한다. 이들 물질은 젤라틴, 아이스크림, 요구르트 및 당과제품과 같은 식품 성분의 제조 및 제형화에 사용되며; 그들은 또한 증점제, 유동 개질제, 구강촉감 개선제로서 그리고 영양 단백질의 공급원으로서 식품에 첨가된다. 미용 및 퍼스널 케어 산업에서, 콜라겐, 엘라스틴, 케라틴 및 가수분해된 케라틴은 피부 관리 및 헤어 케어 제형의 성분으로서 널리 사용된다. 비치료적 생체중합체의 또 다른 예는 유청 단백질, 예컨대 베타-락토글로불린, 알파-락타부민, 및 혈청 알부민이다. 이들 유청 단백질은 낙농 작업으로부터의 부산물로서 대규모로 생성되고, 다양한 비치료적 용도를 위해 사용되었다.

[0036] 2. 치료적 제형

- [0037] 일 양상에서, 본 명세서에 개시된 제형 및 방법은 치료적 유효량으로 치료적 단백질 및 부형제 화합물을 포함하는, 개선된 또는 감소된 점성도의 안정한 액체 제형을 제공한다. 실시형태에서, 제형은 안정성을 개선시키는 한편, 허용 가능한 농도의 활성 성분 및 허용 가능한 점성도를 제공할 수 있다. 실시형태에서, 제형은 대조군 제형에 비교할 때 안정성의 개선을 제공하며; 본 개시내용의 목적을 위해, 대조군 제형은 부형제 화합물이 없다는 것을 제외하고 치료적 제형에 대한 모든 방법에서 건조 중량이 동일한 단백질 활성 성분을 함유하는 제형이다. 실시형태에서, 단백질 함유 제형의 개선된 안정성은 대조군 제형에 비해 더 낮은 백분율의 가용성 응집물, 미립자, 현미경으로 보이는 입자 또는 겔 형성 형태이다.
- [0038] 액체 단백질 제형의 점성도는 단백질 그 자체(예를 들어, 효소, 항체, 수용체, 융합 단백질 등)의 특성; 그 크기, 3차원 구조, 화학적 조성 및 분자량; 제형 중의 그의 농도; 단백질 이외의 제형의 성분; 목적으로 하는 pH 범위; 제형에 대한 저장 조건; 및 환자에게 제형을 투여하는 방법을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 다양한 인자에 의해 영향받을 수 있다는 것이 이해된다. 본 명세서에 기재된 부형제 화합물과 함께 사용하는데 가장 적합한 치료 단백질은 바람직하게는 본질적으로 순수하며, 즉, 오염 단백질이 없다. 실시형태에서, "본질적으로 순수한" 치료적 단백질은 치료적 단백질의 적어도 90중량%, 또는 바람직하게는 적어도 95중량%, 또는 더 바람직하게는, 적어도 99중량%를 포함하는 단백질 조성물이며, 모두 조성물 중의 치료적 단백질과 오염 단백질의 총 중량을 기준으로 한다. 명확화의 목적을 위해, 부형제로서 첨가되는 단백질은 이 정의에 포함되는 것으로 의도되지 않는다. 본 명세서에 기재된 치료적 제형은 단백질 활성 성분의 목적으로 하는 치료적 효능이 달성될 수 있는 그러한 형태로 그리고 제형이 투여되는 포유류에 대해 독성인 성분을 함유하는 일 없이 약제학적 등급 제형, 즉, 포유류를 치료하는 데 사용하는 것으로 의도되는 제형으로서의 용도에 대해 의도된다.
- [0039] 실시형태에서, 치료적 제형은 적어도 25mg/ml의 단백질 활성 성분을 함유한다. 다른 실시형태에서, 치료적 제형은 적어도 100mg/ml의 단백질 활성 성분을 함유한다. 다른 실시형태에서, 치료적 제형은 적어도 200mg/ml의 단백질 활성 성분을 함유한다. 또 다른 실시형태에서, 치료적 제형 용액은 적어도 300mg/ml의 단백질 활성 성분을 함유한다. 일반적으로, 본 명세서에 개시된 부형제 화합물은 약 5 내지 약 300mg/ml의 양으로 치료적 제형에 첨가된다. 실시형태에서, 부형제 화합물은 약 10 내지 약 200mg/ml의 양으로 첨가될 수 있다. 실시형태에서, 부형제 화합물은 약 20 내지 약 100mg/ml의 양으로 첨가될 수 있다. 실시형태에서, 부형제는 약 25 내지 약 75mg/ml의 양으로 첨가될 수 있다.
- [0040] 다양한 분자량의 부형제 화합물은 제형 중의 단백질 활성 성분과 조합될 때 특정 유리한 특성을 위해 선택된다. 부형제 화합물을 포함하는 치료적 제형의 예를 이하에 제공한다. 실시형태에서, 부형제 화합물은 분자량이 5000Da 미만이다. 실시형태에서, 부형제 화합물은 분자량이 1000Da 미만이다. 실시형태에서, 부형제 화합물은 분자량이 500Da 미만이다.
- [0041] 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 부형제 화합물은 점성도-감소량으로 치료적 제형에 첨가된다. 실시형태에서, 점성도-감소량은 대조군 제형에 비교할 때 적어도 10%로 제형의 점성도를 감소시키는 부형제 화합물의 양이며; 본 개시내용의 목적을 위해, 대조군 제형은 부형제 화합물이 없다는 것을 제외하고 치료적 제형에 대한 모든 방법에서 건조 중량이 동일한 단백질 활성 성분을 함유하는 제형이다. 실시형태에서, 점성도-감소량은 대조군 제형과 비교할 때 적어도 30%로 제형의 점성도를 감소시키는 부형제 화합물의 양이다. 실시형태에서, 점성도-감소량은 대조군 제형과 비교할 때 적어도 50%로 제형의 점성도를 감소시키는 부형제 화합물의 양이다. 실시형태에서, 점성도-감소량은 대조군 제형과 비교할 때 적어도 70%로 제형의 점성도를 감소시키는 부형제 화합물의 양이다. 실시형태에서, 점성도-감소량은 대조군 제형과 비교할 때 적어도 90%로 제형의 점성도를 감소시키는 부형제 화합물의 양이다.
- [0042] 실시형태에서, 점성도-감소량은 점성도가 100cP 미만인 치료적 제형을 수득한다. 다른 실시형태에서, 치료적 제형은 점성도가 50cP 미만이다. 다른 실시형태에서, 치료적 제형은 점성도가 20cP 미만이다. 또 다른 실시형태에서, 치료적 제형은 점성도가 10cP 미만이다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "점성도"는 본 명세서에 개시된 방법에 의해 측정될 때 역학적 점성도값을 지칭한다.
- [0043] 본 개시내용에 따른 치료적 제형은 특정 유리한 특성을 가진다. 실시형태에서, 치료적 제형은 전단 저하, 상 분리, 혼탁, 침전 및 변성에 대해 저항성이 있다. 실시형태에서, 치료적 제형은 대조군 제형에 비해 더 효과적으로 가공, 정제, 저장, 주입, 투여, 여과 및 원심분리된다. 실시형태에서, 치료적 제형은 고농도의 치료 단백질에서 환자에게 투여된다. 실시형태에서, 치료적 제형은 치료 부형제가 없는 유사한 제형이 의해 경험되는 것보다 덜 불편하게 환자에게 투여된다. 실시형태에서, 치료적 제형은 데포 주사로서 투여된다. 실시형태에서, 치료적 제형은 신체에서 치료적 단백질의 반감기를 연장시킨다. 본 명세서에 개시된 바와 같은 치료적 제형의 이들

특징은 임상 상황, 즉, 근육내 주사의 환자 수용이 IM/SC 목적 및 견딜 수 있는(예를 들어, 2 내지 3cc) 주사 용적에 대해 전형적인 소구경 바늘의 사용을 포함하는 경우, 및 이들 조건이 단일 주사 부위에서 단일 주사 내 유효량의 제형의 투여를 초래하는 경우에서 근육내 또는 피하 주사에 의해 이러한 제형의 투여를 허용한다. 대조적으로, 통상적인 제형화 기법을 이용하는 비슷한 투약량의 치료적 단백질 주사는 통상적인 제형의 더 높은 점성도에 의해 제한되며, 따라서 통상적인 제형의 SC/IM 주사는 임상 상황에 적합하지 않다.

[0044] 실시형태에서, 치료적 부형제는 산화적 손상에 대해 치료적 단백질을 안정화시키는 항산화제 특성을 가진다. 실시형태에서, 치료적 제형은 주위 온도에서 또는 치료적 단백질의 효능의 상당한 손실이 없는 냉장 조건에서 장기간의 시간 동안 저장된다. 실시형태에서, 치료적 제형은 그것이 필요할 때까지 저장을 위해 건조되고; 이어서, 적절한 용매, 예를 들어 물을 이용하여 재구성된다. 유리하게는, 본 명세서에 기재된 바와 같은 제형은 수개월 내지 수년의 장기간의 시간에 걸쳐 안정할 수 있다. 예외적으로 장기간의 저장이 요망될 때, 제형은 단백질 변성의 두려움 없이 냉동고에서 보존될 수 있다(그리고 이후에 재활성화된다). 실시형태에서, 제형은 냉장을 필요로 하지 않는 장기간 저장을 위해 제조될 수 있다.

[0045] 치료적 제형을 제조하기 위한 방법은 당업자에게 익숙할 수 있다. 본 발명의 치료적 제형은, 예를 들어, 치료적 단백질이 용액에 첨가되지 전에 또는 후에 제형에 부형제 화합물을 첨가함으로써 제조될 수 있다. 치료적 제형은, 예를 들어 제1(더 낮은) 농도에서 치료적 단백질을 부형제와 혼합함으로써 생성될 수 있고, 이어서, 제2(더 높은) 치료적 단백질을 생성하기 위해 여과 또는 원심분리에 의해 처리될 수 있다. 치료적 제형은 카오트로프, 코스모트로프, 하이드로트로프 및 염과 하나 이상의 부형제 화합물로 이루어질 수 있다. 치료적 제형은 캡슐화, 분산, 리포솜, 소수포 제형 등과 같은 기법을 이용하여 하나 이상의 부형제 화합물로 이루어질 수 있다. 본 명세서에 개시된 부형제 화합물을 포함하는 치료적 제형을 제조하기 위한 방법은 부형제 화합물의 조합물을 포함할 수 있다. 실시형태에서, 부형제의 조합물은 더 낮은 점성도, 개선된 안정성, 또는 감소된 주사 부위 통증에서 이점을 생성할 수 있다. 다른 첨가제는 보존제, 계면활성제, 당, 수크로스, 트레할로스, 다당류, 아르기닌, 프롤린, 하이알루로니다제, 안정제, 완충제 등을 포함하는 그들의 제조 동안 치료적 제형에 도입될 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은, 약제학적으로 허용 가능한 부형제 화합물은 비독성이고 동물 및/또는 인간 투여에 적합한 것이다.

[0046] 3. 비치료적 제형

[0047] 일 양상에서, 본 명세서에 개시된 제형 및 방법은 유효량으로 비치료적 단백질 및 부형제 화합물을 포함하는, 개선된 또는 감소된 점성도의 안정한 액체 제형을 제공한다. 실시형태에서, 제형은 안정성을 개선시키는 한편, 허용 가능한 농도의 활성 성분 및 허용 가능한 점성도를 제공한다. 실시형태에서, 제형은 대조군 제형에 비교할 때 안정성의 개선을 제공하며; 본 개시내용의 목적을 위해, 대조군 제형은 부형제 화합물이 없다는 것을 제외하고 비치료적 제형에 대해 모든 방법에서 건조 중량이 동일한 단백질 활성 성분을 함유하는 제형이다.

[0048] 액체 단백질 제형의 점성도는 단백질 그 자체의 특성(예를 들어, 효소, 구조적 단백질, 가수분해 정도 등); 그 크기, 3차원 구조, 화학적 조성 및 분자량; 제형 중의 그의 농도; 단백질 이외의 제형 성분; 목적으로 하는 pH 범위; 및 제형에 대한 저장 조건을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 다양한 인자에 의해 영향받을 수 있다는 것이 이해된다.

[0049] 실시형태에서, 비치료적 제형은 적어도 25mg/ml의 단백질 활성 성분을 함유한다. 다른 실시형태에서, 비치료적 제형은 적어도 100mg/ml의 단백질 활성 성분을 함유한다. 다른 실시형태에서, 비치료적 제형은 적어도 200mg/ml의 단백질 활성 성분을 함유한다. 또 다른 실시형태에서, 비치료적 제형 용액은 적어도 300mg/ml의 단백질 활성 성분을 함유한다. 일반적으로, 본 명세서에 개시된 부형제 화합물은 약 5 내지 약 300mg/ml의 양으로 비치료적 제형에 첨가된다. 실시형태에서, 부형제 화합물은 약 10 내지 약 200mg/ml의 양으로 첨가된다. 실시형태에서, 부형제 화합물은 약 20 내지 약 100mg/ml의 양으로 첨가된다. 실시형태에서, 부형제는 약 25 내지 약 75mg/ml의 양으로 첨가된다.

[0050] 다양한 분자량의 부형제 화합물은 제형 중의 단백질 활성 성분과 조합될 때 특정 유리한 특성을 위해 선택된다. 부형제 화합물을 포함하는 비치료적 제형의 예를 이하에 제공한다. 실시형태에서, 부형제 화합물은 분자량이 5000Da 미만이다. 실시형태에서, 부형제 화합물은 분자량이 1000Da 미만이다. 실시형태에서, 부형제 화합물은 분자량이 500Da 미만이다.

[0051] 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 부형제 화합물은 점성도-감소량으로 비치료적 제형에 첨가된다. 실시형태에서, 점성도-감소량은 대조군 제형에 비교할 때 적어도 10%로 제형의 점성도를 감소시키는 부형제 화합물의 양이

며; 본 개시내용의 목적을 위해, 대조군 제형은 부형제 화합물이 없다는 것을 제외하고 치료적 제형에 대한 모든 방법에서 건조 중량이 동일한 단백질 활성 성분을 함유하는 제형이다. 실시형태에서, 점성도-감소량은 대조군 제형과 비교할 때 적어도 30%로 제형의 점성도를 감소시키는 부형제 화합물의 양이다. 실시형태에서, 점성도-감소량은 대조군 제형과 비교할 때 적어도 50%로 제형의 점성도를 감소시키는 부형제 화합물의 양이다. 실시형태에서, 점성도-감소량은 대조군 제형과 비교할 때 적어도 70%로 제형의 점성도를 감소시키는 부형제 화합물의 양이다. 실시형태에서, 점성도-감소량은 대조군 제형과 비교할 때 적어도 90%로 제형의 점성도를 감소시키는 부형제 화합물의 양이다.

[0052] 실시형태에서, 점성도-감소량은 점성도가 100cP 미만인 비치료적 제형을 수득한다. 다른 실시형태에서, 비치료적 제형은 점성도가 50cP 미만이다. 다른 실시형태에서, 비치료적 제형은 점성도가 20cP 미만이다. 또 다른 실시형태에서, 비치료적 제형은 점성도가 10cP 미만이다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "점성도"는 역학적 점성도 값을 지칭한다.

[0053] 본 개시내용에 따른 비치료적 제형은 특정 유리한 특성을 가질 수 있다. 실시형태에서, 비치료적 제형은 전단 저하, 상 분리, 혼탁, 침전 및 변성에 대해 저항성이 있다. 실시형태에서, 치료적 제형은 대조군 제형에 비해 더 효과적으로 가공, 정제, 저장, 펌핑, 여과 및 원심분리될 수 있다.

[0054] 실시형태에서, 비치료적 부형제는 산화적 손상에 대해 비치료적 단백질을 안정화시키는 항산화제 특성을 가진다. 실시형태에서, 비치료적 제형은 주위 온도에서 또는 비치료적 단백질의 효능의 상당한 손실이 없는 냉장 조건에서 장기간의 시간 동안 저장된다. 실시형태에서, 비치료적 제형은 그것이 필요할 때까지 저장을 위해 건조되고; 이어서, 적절한 용매, 예를 들어 물을 이용하여 재구성될 수 있다. 유리하게는, 본 명세서에 기재된 바와 같은 제형은 수개월 내지 수년의 장기간의 시간에 걸쳐 안정하다. 예외적으로 장기간의 저장이 요망될 때, 제형은 단백질 변성의 두려움 없이 냉동고에서 보존된다(그리고 이후에 재활성화된다). 실시형태에서, 제형은 냉장을 필요로 하지 않는 장기간 저장을 위해 제조된다.

[0055] 본 명세서에 개시된 부형제 화합물을 포함하는 비치료적 제형의 제조방법은 당업자에게 익숙할 수 있다. 예를 들어, 부형제 화합물은 비치료적 단백질이 용액에 첨가되기 전에 또는 후에 제형에 첨가될 수 있다. 비치료적 제형은 제1(더 낮은) 농도에서 생성될 수 있고, 이어서, 제2(더 높은) 농도를 생성하기 위해 여과 또는 원심분리에 의해 처리될 수 있다. 비치료적 제형은 카오토로프, 코스모트로프, 하이드로트로프 및 염과 하나 이상의 부형제 화합물로 이루어질 수 있다. 비치료적 제형은 캡슐화, 분산, 리포솜, 소수포 제형 등과 같은 기법을 이용하여 하나 이상의 부형제 화합물로 이루어질 수 있다. 다른 첨가제는 보존제, 계면활성제, 안정제 등을 포함하는 비치료적 제형 내로 그들의 제조 동안 도입될 수 있다.

[0056] 4. 부형제 화합물

[0057] 각각 하나 이상의 치료적 또는 비치료적 단백질과 함께 사용하는데 적합하고, 각각 고농도로 단백질(들)을 함유하도록 제형이 구성되게 하는 몇몇 부형제 화합물이 기재된다. 이하에 기재된 부형제 화합물의 일부 범주는: (1) 입체장애 아민; (2) 음이온성 방향족; (3) 기능화된 아미노산; 및 (4) 올리고펩타이드이다. 이론에 의해 구속되는 일 없이, 본 명세서에 기재된 부형제 화합물은 입자간(즉, 단백질-단백질) 상호작용에 달리 수반되는 치료적 단백질의 특정 단편, 서열, 구조 또는 부분과 관련되는 것으로 생각된다. 이들 부형제 화합물의 치료적 또는 비치료적 단백질과의 결합은 단백질이 과량의 용액 점성도를 야기하는 일 없이 고농도로 제형화될 수 있도록 단백질간 상호작용을 가리움할 수 있다. 부형제 화합물은 유리하게는 수용성일 수 있으며, 따라서 수성 비히킬과 함께 사용하기에 적합하다. 실시형태에서, 부형제 화합물은 수용해도가 10mg/ml 초과이다. 실시형태에서, 부형제 화합물은 수용해도가 100mg/ml 초과이다. 실시형태에서, 부형제 화합물은 수용해도가 500mg/ml 초과이다. 유리하게는 치료적 단백질에 대해, 부형제 화합물은 생물학적으로 허용 가능하고 비면역원성인 물질로부터 유래될 수 있으며, 따라서 약제학적 용도에 적합하다. 치료적 실시형태에서, 부형제 화합물은 생물학적으로 양립 가능한 그리고 비면역원성 부산물을 수득하기 위해 신체 내에서 대사될 수 있다.

[0058] a. 부형제 화합물 범주 1: 입체장애 아민

[0059] 치료적 또는 비치료적 단백질의 고농도 용액은 부형제 화합물로서 입체장애 아민 소분자와 함께 제형화될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "입체장애 아민"은 이하의 실시예와 일치되는 적어도 하나의 부피가 큰 또는 입체장애된 기를 함유하는 소분자를 지칭한다. 입체장애 아민은 유리 염기 형태로, 양성자화된 형태로, 또는 이들 둘의 조합물로 사용될 수 있다. 양성자화된 형태에서, 입체장애 아민은 음이온성 반대이온, 예컨대 염화물, 수산화물, 브롬화물, 요오드화물, 플루오린화물, 아세트산염, 폼산염, 인산염, 황산염 또는 카복실산염과 결합

될 수 있다. 부형제 화합물이 중성 pH에서 수용액에서 양이온성 전하를 갖도록, 부형제 화합물로서 유용한 입체장애 아민 화합물은 2차 아민, 3차 아민, 4차 암모늄, 피리디늄, 피롤리돈, 피롤리딘, 피페리딘, 몰폴린 또는 구아니디늄 기를 함유할 수 있다. 입체장애 아민 화합물은 또한 적어도 하나의 부피가 큰 또는 입체장애기, 예컨대 환식 방향족, 지환족, 사이클로헥실 또는 알킬기를 함유한다. 실시형태에서, 입체장애기는 그 자체가 아민기, 예컨대 다이알킬아민, 트라이알킬아민, 구아니디늄, 피리디늄 또는 4차 암모늄기일 수 있다. 이론에 의해 구속되는 일 없이, 입체장애 아민 화합물은 양이온 파이 상호작용에 의해 페닐알라닌, 트립토판 및 타이로신과 같은 단백질의 방향족 부분과 결합되는 것으로 생각된다. 실시형태에서, 입체장애 아민의 양이온성 기는 단백질에서 방향족 아미노산 잔기의 전자 풍부 파이 구조에 대한 친화도를 가질 수 있고, 따라서 그들은 단백질의 이들 부분을 설딩함으로써, 결합 및 응집되는 이러한 설딩된 단백질의 경향을 감소시킬 수 있다.

[0060] 실시형태에서, 입체장애 아민 부형제 화합물은 이미다졸, 이미다졸린, 또는 이미다졸리딘기 또는 이들의 염, 예컨대 이미다졸, 1-메틸이미다졸, 4-메틸이미다졸, 1-헥실-3-메틸이미다졸륨 클로라이드, 히스타민, 4-메틸히스타민, 알파-메틸히스타민, 베타히스틴, 베타-알라닌, 2-메틸-2-이미다졸린, 1-뷰틸-3-메틸이미다졸륨 클로라이드, 요산, 요산칼륨, 베타졸, 카르노신, 아스팔탐, 사카린, 아세살팜 칼륨, 잔틴, 테오필린, 테오브로민, 카페인 및 안세린을 포함하는 화학 구조를 가진다. 실시형태에서, 입체장애 아민 부형제 화합물은 다이메틸에탄올아민, 다이메틸아미노프로필아민, 트라이에탄올아민, 다이메틸벤질아민, 다이메틸사이클로헥실아민, 다이에틸사이클로헥실아민, 다이사이클로헥실메틸아민, 헥사메틸렌 비구아나이드, 폴리(헥사메틸렌 비구아나이드), 이미다졸, 다이메틸글리신, 아그만틴, 다이아자바이사이클로[2.2.2]옥탄, 테트라메틸에틸렌디아민, N,N-다이메틸에탄올아민, 에탄올아민 포스페이트, 글루코사민, 콜린 클로라이드, 포스포콜린, 니아신아마이드, 아이소니코틴아마이드, N,N-다이에틸 니코틴아마이드, 니코틴산 나트륨염, 티라민, 3-아미노피리딘, 2,4,6-트라이메틸피리딘, 3-피리딘 메탄올, 니코틴아마이드 아데노신 다이뉴클레오타이드, 바이오틴, 몰폴린, N-메틸피롤리돈, 2-피롤리돈, 프로카인, 리도카인, 다이사이안다디아마이드-타우린 부가물, 2-피리딜에틸아민, 다이사이안다디아마이드-벤질 아민 부가물, 다이사이안다디아마이드-알킬아민 부가물, 다이사이안다디아마이드-사이클로알킬아민 부가물 및 다이사이안다디아마이드-아미노메탄포스폰산 부가물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 실시형태에서, 본 개시내용과 일치되는 입체장애 아민 화합물은 양성자화된 암모늄염으로서 제형화된다. 실시형태에서, 본 개시내용과 일치되는 입체장애 아민 화합물은 반대이온으로서 무기 음이온 또는 유기 음이온과의 염으로서 제형화된다. 실시형태에서, 치료적 또는 비치료적 단백질의 고농도 용액은 부형제 화합물로서 벤조산, 하이드록시벤조산 또는 벤젠설폰산과 카페인의 조합물과 함께 제형화된다. 실시형태에서, 입체장애 아민 부형제 화합물은 신체에서 대사되어 생물학적으로 양립 가능한 부산물을 수득한다. 일부 실시형태에서, 입체장애 아민 부형제 화합물은 약 250mg/ml 이하의 농도로 제형 중에 존재한다. 추가 실시형태에서, 입체장애 아민 부형제 화합물은 제형 중에서 약 10mg/ml 내지 약 200mg/ml의 농도로 존재한다. 또한 추가적인 양상에서, 입체장애 아민 부형제 화합물은 제형 중에서 약 20 내지 약 120mg/ml의 농도로 존재한다.

[0061] 실시형태에서, 특정 입체장애 아민 부형제 화합물은 다른 약학적 특성을 가질 수 있다. 예로서, 잔틴은 전신 흡수될 때 자극제 특성 및 기관지확장제 특성을 포함하는, 독립적인 약학적 특성을 갖는 입체장애 아민의 범주이다. 대표적인 잔틴은 카페인, 아미노필린, 3-아이소뷰틸-1-메틸잔틴, 파라잔틴, 펜톡시필린, 테오브로민, 테오필린 등을 포함한다. 메틸화된 잔틴은 심장수축력, 심박수 및 기관지확장에 영향을 미치는 것으로 이해된다. 일부 실시형태에서, 잔틴 부형제 화합물은 약 30mg/ml 이하의 농도로 제형 중에 존재한다.

[0062] 독립적인 약학적 특성을 갖는 입체장애 아민의 다른 범주는 국소 주사용 마취제 화합물이다. 국소 주사용 마취제 화합물은 (a) 친유성 방향족 고리, (b) 중간체 에스터 또는 아마이드 결합, 및 (c) 2차 또는 3차 아민의 3-성분 분자 구조를 갖는 입체장애 아민이다. 입체장애 아민의 이런 범주는 나트륨 이온의 유입을 저해하고, 이에 의해 국소 마취를 유도함으로써 신경 전도를 방해하는 것으로 이해된다. 국소 마취제 화합물에 대한 친유성 방향족 고리는 탄소 원자(예를 들어, 벤젠 고리)로 이루어질 수 있거나 또는 헤테로원자(예를 들어, 티오펜 고리)를 포함할 수 있다. 대표적인 국소 주사용 마취제 화합물은 아밀로카인, 아티카인, 부피비카인, 부타카인, 부타닐카인, 클로르프로카인, 코카인, 사이클로메티카인, 다이메토카인, 에디토카인, 헥실카인, 아이소부카인, 레보부피바카인, 리도카인, 메타부테타민, 메타부톡시카인, 메피바카인, 메프릴카인, 프로폭시카인, 프릴로카인, 프로카인, 피페로카인, 테트라카인, 트라이메카인 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 국소 주사용 마취제 화합물은 단백질 치료적 제형에서 다수의 이점, 예컨대 감소된 점성도, 개선된 안정성, 및 주사시 감소된 통증을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 국소 마취제 화합물은 약 50mg/ml 이하의 농도로 제형 중에 존재한다.

[0063] 실시형태에서, 독립적인 약학적 특성을 갖는 입체장애 아민은 본 명세서에 기재된 제형 및 방법에 따라 부형제

화합물로서 사용된다. 일부 실시형태에서, 독립적인 약학적 특성을 갖는 부형제 화합물은 약학적 효과를 갖지 않고/않거나 치료적으로 효과적이지 않은 양으로 존재한다. 다른 실시형태에서, 독립적인 약학적 특성을 갖는 부형제 화합물은 약학적 효과를 갖고/갖거나 치료적으로 효과적인 양으로 존재한다. 특정 실시형태에서, 독립적인 약학적 특성을 갖는 입체장애 아민은 제형 점성도를 감소시키기 위해 선택된 다른 부형제 화합물과 조합하여 사용되며, 여기서 독립적인 약학적 특성을 갖는 입체장애 아민은 그의 약학적 활성의 이점을 부여하기 위해 사용된다. 예를 들어, 국소 주사용 마취제 화합물은 제형 점성도를 감소시키기 위해 그리고 또한 제형의 주사 시 통증을 감소시키기 위해 사용될 수 있다. 주사 통증의 감소는 마취 특성에 의해 야기될 수 있고; 또한 점성도가 부형제에 의해 감소될 때 더 낮은 주입력이 필요할 수 있다. 대안적으로, 국소 주사용 마취제 화합물은 제형 주사 동안 감소된 국소 감각의 바람직한 약학적 이점을 부여하는 한편, 제형의 점성도를 감소시키는 다른 부형제 화합물과 조합될 수 있다.

[0064] b. 부형제 화합물 범주 2: 음이온성 방향족

[0065] 치료적 또는 비치료적 단백질의 고농도 용액은 부형제 화합물로서 음이온성 방향족 소분자 화합물과 함께 제형화될 수 있다. 음이온성 방향족 부형제 화합물은 방향족 작용기, 예컨대 페닐, 벤질, 아릴, 알킬벤질, 하이드록시벤질, 페놀, 하이드록시아릴, 헤테로방향족기, 또는 축합된 방향족기를 함유할 수 있다. 음이온성 방향족 부형제 화합물은 또한 음이온성 작용기, 예컨대 카복실산염, 옥사이드, 펜옥사이드, 설펜산염, 황산염, 포스폰산염, 인산염 또는 설파이드를 함유할 수 있다. 음이온성 방향족 부형제가 산, 나트륨염 또는 기타로서 기재될 수 있지만, 부형제는 다양한 염 형태로 사용될 수 있다는 것이 이해된다. 이론에 의해 구속되는 일 없이, 음이온성 방향족 부형제 화합물은 단백질의 양이온성 세그먼트와 결합할 수 있는 부피가 큰, 입체장애 분자인 것으로 생각되며, 따라서 그들은 단백질의 이들 부분을 설당함으로써 단백질-함유 제형 점성을 제공하는 단백질 분자 사이의 상호작용을 감소시킬 수 있다.

[0066] 실시형태에서, 음이온성 방향족 부형제 화합물의 예는 살리실산, 아미노살리실산, 하이드록시벤조산, 아미노벤조산, 파라-아미노벤조산, 벤젠설펜산, 하이드록시벤젠설펜산, 나프탈렌설펜산, 나프탈렌다이설펜산, 하이드로퀴논 설펜산, 설파닐산, 바닐린산, 바닐린, 바닐린-타우린 부가물, 아미노페놀, 안트라닐산, 신남산, 쿠마르산, 아데노신 일인산염, 인돌 아세트산, 요산칼륨, 푸란 다이카복실산, 푸란-2-아크릴산, 2-푸란프로피온산, 페틸피루브산나트륨, 하이드록시페닐피루브산나트륨, 다이하이드록시벤조산, 트라이하이드록시벤조산, 피로갈롤, 벤조산, 및 앞서 언급한 산의 염과 같은 화합물을 포함한다. 실시형태에서, 음이온성 방향족 부형제 화합물은 이온화된 염 형태로 제형화된다. 실시형태에서, 음이온성 방향족 화합물은 입체장애 아민의 염, 예컨대 다이메틸사이클로헥실암모늄 하이드록시벤조산염으로서 제형화된다. 실시형태에서, 음이온성 방향족 부형제 화합물은 유기 양이온과 같은 다양한 반대이온과 함께 제형화된다. 실시형태에서, 치료적 또는 비치료적 단백질의 고농도 용액은 음이온성 방향족 부형제 화합물 및 카페인과 함께 제형화된다. 실시형태에서, 음이온성 방향족 부형제 화합물은 신체에서 대사되어 생물학적으로 양립 가능한 부산물을 수득한다.

[0067] c. 부형제 화합물 범주 3: 기능화된 아미노산

[0068] 치료적 또는 비치료적 단백질의 고농도 용액은 하나 이상의 기능화된 아미노산과 함께 제형화될 수 있으며, 여기서, 단일 기능화된 아미노산 또는 하나 이상의 기능화된 아미노산을 포함하는 올리고펩타이드가 부형제 화합물로서 사용될 수 있다. 실시형태에서, 기능화된 아미노산 화합물은 아미노산을 수득하기 위해 가수분해 또는 대사될 수 있는 분자("아미노산 전구체")를 포함한다. 실시형태에서, 기능화된 아미노산은 방향족 작용기, 예컨대 페닐, 벤질, 아릴, 알킬벤질, 하이드록시벤질, 하이드록시아릴, 헤테로방향족기 또는 축합된 방향족기를 함유할 수 있다. 실시형태에서, 기능화된 아미노산 화합물은 에스터화된 아미노산, 예컨대 메틸, 에틸, 프로필, 뷰틸, 벤질, 사이클로알킬, 글리세릴, 하이드록시에틸, 하이드록시프로필, PEG 및 PPG 에스테르를 함유할 수 있다. 실시형태에서, 기능화된 아미노산 화합물은 아르기닌 에틸 에스테르, 아르기닌 메틸 에스테르, 아르기닌 하이드록시에틸 에스테르, 및 아르기닌 하이드록시프로필 에스테르로 이루어진 군으로부터 선택된다. 실시형태에서, 기능화된 아미노산 화합물은 중성 pH에서 수용액 중에서 하전된 이온 화합물이다. 예를 들어, 단일 아미노산은 아세트산염 또는 벤조산염과 같은 에스테르를 형성함으로써 유도체화될 수 있고, 가수분해 생성물은 아세트산 또는 벤조산, 천연 물질 + 아미노산일 것이다. 실시형태에서, 기능화된 아미노산 부형제 화합물은 신체에서 대사되어 생물학적으로 양립 가능한 부산물을 수득한다.

[0069] d. 부형제 화합물 범주 4: 올리고펩타이드

[0070] 치료적 또는 비치료적 단백질의 고농도 용액은 부형제 화합물로서 올리고펩타이드와 함께 제형화될 수 있다. 실시형태에서, 올리고펩타이드는 구조가 하전된 부분 및 부피가 큰 부분을 갖도록 설계된다. 실시형태에서, 올리

고펩타이드는 2 내지 10개 펩타이드 서브유닛으로 이루어진다. 올리고펩타이드는 2작용성, 예를 들어 비극성의 아미노산에 결합된 양이온성 아미노산 또는 비극성의 아미노산에 결합된 음이온성 아미노산일 수 있다. 실시형태에서, 올리고펩타이드는 2 내지 5개 펩타이드 서브유닛으로 이루어진다. 실시형태에서, 올리고펩타이드는 호모펩타이드, 예컨대 폴리글루탐산, 폴리아스파르트산, 폴리-라이신, 폴리-아르기닌 및 폴리-히스티딘이다. 실시형태에서, 올리고펩타이드는 순 양이온성 전하를 가진다. 다른 실시형태에서, 올리고펩타이드는 헤테로펩타이드, 예컨대 Trp2Lys3이다. 실시형태에서, 올리고펩타이드는 ABA 반복 패턴과 같은 교번의 구조를 가질 수 있다. 실시형태에서, 올리고펩타이드는 음이온성 아미노산과 양이온성 아미노산을 둘 다 함유할 수 있다(예를 들어, Arg-Glu). 이론에 의해 구속되는 일 없이, 올리고펩타이드는 고점성 용액을 야기하는 분자간 상호작용을 감소시키는 방식으로 단백질과 결합될 수 있는 구조를 포함하고; 예를 들어, 올리고펩타이드-단백질 결합은, 단백질 주위의 수화층의 수소 결합을 붕괴시키기 위해 다소 비극성 아미노산을 남기고, 이에 의해 점성도를 낮추는, 전하-전하 상호작용일 수 있다. 일부 실시형태에서, 올리고펩타이드 부형제는 약 50mg/ml 이하의 농도로 조성물 중에 존재한다.

[0071] e. 부형제 화합물 범주 5: 단쇄 유기산

[0072] 본 명세서에서 사용되는 용어 "단쇄 유기산"은 C2-C6 유기산 화합물 및 이의 염, 에스터 또는 락톤을 지칭한다. 이 범주는 포화 및 불포화 카복실산, 하이드록시 기능화된 카복실산, 및 선형, 분지형 또는 환식 카복실산을 포함한다. 실시형태에서, 단쇄 유기산에서 산기는 카복실산, 설폰산, 포스폰산, 또는 이들의 염이다.

[0073] 상기 4가지 부형제 범주에 추가적으로, 치료적 또는 비치료적 단백질의 고농도 용액은 단쇄 유기산, 예를 들어, 부형제 화합물로서 솔브산, 발레르산, 프로피온산, 카프론산 및 아스코브산의 산 및 염 형태와 함께 제형화될 수 있다. 이 범주에서 부형제 화합물의 예는 솔브산칼륨, 타우린, 프로피온산칼륨, 프로피온산마그네슘 및 아스코브산나트륨을 포함한다.

[0074] f. 부형제 화합물 범주 6: 저분자량 지방족 폴리산

[0075] 치료적 또는 비치료적 폐길화된 단백질의 고농도 용액은 용액 점성도를 더 낮출 수 있는 특정 부형제 화합물과 함께 제형화될 수 있으며, 여기서 이러한 부형제 화합물은 저분자량 지방족 폴리산이다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "저분자량 지방족 폴리산"은 분자량이 약 1500 미만이고, 적어도 2개의 산성기를 갖는 유기 지방족 폴리산을 지칭하며, 여기서 산성기는 양성자-공여 모이어티인 것으로 이해된다. 산성기의 비제한적 예는 카복실산 염, 포스폰산염, 인산염, 설폰산염, 황산염, 질산염 및 아질산염기를 포함한다. 저분자량 지방족 폴리산에 대한 산성기는 음이온성 염 형태, 예컨대 카복실산염, 포스폰산염, 인산염, 설폰산염, 황산염, 질산염 및 아질산염일 수 있고; 그들의 반대이온은 나트륨, 칼륨, 리튬 및 암모늄일 수 있다. 본 명세서에서 기재된 바와 같은 폐길화된 단백질과 상호작용하는데 유용한 저분자량 지방족 폴리산의 구체적 예는 말레산, 타르타르산, 글루타르산, 말론산, 시트르산, 에틸렌다이아민테트라아세트산(EDTA), 아스파르트산, 글루탐산, 알렌드론산, 에티드론산 및 이들의 염을 포함한다. 음이온성 염 형태로 저분자량 지방족 폴리산의 추가적인 예는 인산염(PO_4^{3-}), 인산수소(HPO_4^{3-}), 인산2수소(H_2PO_4^-), 황산염(SO_4^{2-}), 중황산염(HSO_4^-), 파이로인산염($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$), 탄산염(CO_3^{2-}) 및 중탄산염(HCO_3^-)을 포함한다. 음이온성 염에 대한 반대이온은 Na, Li, K 또는 암모늄 이온일 수 있다. 이들 부형제는 또한 부형제와 조합하여 사용될 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은, 저분자량 지방족 폴리산은 또한 알파 하이드록시산일 수 있으며, 여기서 제1 산성기, 예를 들어 글리콜산, 락트산 및 글루콘산 및 이들의 염에 인접한 하이드록실기가 있다. 실시형태에서, 저분자량 지방족 폴리산은 2개 초과 산성기를 보유하는 올리고머 형태, 예를 들어 폴리아크릴산, 폴리포스페이트, 폴리펩타이드 및 이들의 염이다. 일부 실시형태에서, 저분자량 지방족 폴리산 부형제는 조성물 중에서 약 50mg/ml 이하의 농도로 존재한다.

[0076] 5. 단백질/부형제 용액: 특성 및 과정

[0077] 특정 실시형태에서, 치료적 또는 비치료적 단백질의 용액은 상기 동정한 부형제 화합물, 예컨대 입체장애 아민, 음이온성 방향족, 기능화된 아미노산, 올리고펩타이드, 단쇄 유기산과 함께 제형화되어, 단백질 확산 상호작용 매개변수(kD), 또는 제2 비리얼 계수(B22)에 의해 측정되는 바와 같은 개선된 단백질-단백질 상호작용 특징을 초래한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은, 상기 동정한 부형제 화합물을 이용하는 제형에 의해 달성된 단백질-단백질 상호작용 특징의 "개선"은 단백질-단백질 상호작용의 감소를 의미한다. kD 및 B22의 이들 측정은 산업에서 표준 기법을 이용하여 이루어질 수 있고, 개선된 용액 특성 또는 용액 중의 단백질의 안정성의 지표가 될 수 있다. 예를 들어, 고도로 음성인 kD 값은 단백질이 강한 인력을 가지고, 이는 응집, 불안정성 및 유동 문제

를 야기할 수 있다는 것을 나타낼 수 있다. 특정의 상기 동정한 부형제 화합물의 존재에서 제형화될 때, 동일한 단백질은 덜 음성인 kD 값 또는 0 근처이거나 초과인 kD 값을 가질 수 있다.

[0078] 실시형태에서, 특정의 상기 기재한 부형제 화합물, 예컨대 입체장애 아민, 음이온성 방향족, 기능화된 아미노산, 올리고펩타이드, 단쇄 유기산 및/또는 저분자량 지방족 폴리산은 열전달, 기체 전달, 원심분리, 크로마토그래피, 막 분리, 원심분리 농축, 접선 유동 여과, 반경류(radial flow) 여과, 측류 여과, 동결건조 및 겔 전기영동에 의한 여과, 주입, 전달, 펌핑, 혼합, 가열 또는 냉각을 이용하는 단백질-관련 과정, 예컨대 단백질-함유 용액의 제조, 가공, 멸균여과, 정제 및 분석을 개선시키기 위해 사용된다. 이들 공정 및 가공 방법은 제조, 가공, 정제 및 분석 단계 동안 용액 중의 단백질의 더 낮은 점성도, 개선된 용해도, 또는 개선된 안정성에 기인하여 개선된 효율을 가질 수 있다. 추가적으로, 장비-관련 공정, 예컨대 단백질 가공 장비의 세정, 멸균 및 유지에 단백질의 감소된 파울링, 감소된 변성, 더 낮은 점성도 및 개선된 안정성에 기인하여 상기 동정한 부형제의 사용에 의해 용이하게 될 수 있다.

[0079] 상기 기재한 부형제 화합물과 함께 제형화한 치료적 단백질의 고농도 용액은 사전 충전한 주사기를 이용하여 환자에게 투여될 수 있다.

[0080] 실시예

[0081] 물질:

[0082] • 소 감마 글로불린(BGG), 99% 초과 순도, 시그마 알드리치(Sigma Aldrich)

[0083] • 히스티딘, 시그마 알드리치

[0084] • 이하의 실시예에 기재하는 다른 물질은 달리 구체화되지 않는 한 시그마 알드리치사로부터의 것이었다.

[0085] 실시예 1: 부형제 화합물 및 시험 단백질을 함유하는 제형의 제조

[0086] 부형제 화합물 및 시험 단백질을 이용하여 제형을 제조하였고, 여기서, 시험 단백질은 치료적 제형에 사용되는 치료적 단백질 또는 비치료적 제형에서 사용되는 비치료적 단백질 중 하나를 시뮬레이션하기 위한 것으로 의도된다. 이러한 제형을 다음의 방법으로 점성도 측정을 위해 상이한 부형제 화합물과 함께 50mM 히스티딘 염산염 중에서 제조하였다. 증류수 중에 1.94g 히스티딘(미조리주 세인트루이스에 소재한 시그마 알드리치)을 용해시킴으로써, 그리고 1M 염산(미조리주 세인트루이스에 소재한 시그마 알드리치)을 이용하여 pH를 약 6.0으로 조절함으로써 처음 히스티딘 염산염을 제조하고, 이어서, 용적측정 플라스크에서 증류수를 이용하여 최종 용적 250mL로 희석시켰다. 이어서, 부형제 화합물을 50mM 히스티딘 HCl 중에 용해시켰다. 부형제의 목록을 이하의 실시예 4, 5, 6 및 7에 제공한다. 일부 경우에, 50mM 히스티딘 HCl 중에서 용해시키기 전에 부형제 화합물을 pH 6으로 조절하였다. 이 경우에, 부형제 화합물을 약 5중량%로 탈이온수 중에서 처음 용해시키고 나서, 염산 또는 수산화나트륨 중 하나를 이용하여 pH를 약 6.0으로 조절하였다. 이어서, 제조한 염 용액을 약 150°F(약 65°C)에서 실험실 오븐에 배치시켜 물을 증발시키고 고체 부형제를 단리시켰다. 일단 50mM 히스티딘 HCl 중의 부형제 용액이 제조되면, 시험 단백질(소 감마 글로불린(BGG)(미조리주 세인트 루이스에 소재한 시그마-알드리치))을 1mL 부형제 용액 당 약 0.336g BGG의 비로 용해시켰다. 이는 약 280mg/mL의 최종 단백질 농도를 야기하였다. 부형제와 함께 50mM 히스티딘 HCl 중의 BGG 용액을 20mL 바이알에서 제형화하고 나서, 오비탈 진탕기 테이블 상에서 밤새 100rpm으로 진탕시켰다. 이어서, BGG 용액을 2mL 원심분리관에 옮기고 나서, IEC MicroMax 마이크로원심분리기에서 2300rpm으로 10분 동안 원심분리시켜 점성도 측정 전에 연행공기를 제거하였다.

[0087] 실시예 2: 점성도 측정

[0088] 실시예 1에서 기재되는 바와 같이 제조한 제형의 점성도 측정을 DV-IIT LV 원뿔 평판 점성도계(매사추세츠주 미들버로에 소재한 브룩필드 엔지니어링(Brookfield Engineering))를 이용하였다. 점성도계는 CP-40 원뿔을 구비하였고, 3rpm 및 25°C에서 작동시켰다. 제형을 0.5mL의 용적으로 점성도계에 장입하고 나서, 주어진 전단 속도 및 온도에서 3분 동안 인큐베이션 다음에, 20초의 측정 수집 기간이 이어졌다. 이어서, 1분의 전단 인큐베이션 및 후속적 20초 측정 수집 기간으로 이루어진 2개의 추가 단계가 이어졌다. 수집한 3개 데이터 지점을 평균 내고, 샘플에 대한 점성도로서 기록하였다.

[0089] 실시예 3: 단백질 농도 측정

[0090] UV/VIS 분광계(퍼킨 엘머 람다 35(Perkin Elmer Lambda 35))에서 280nm의 파장으로 단백질 용액의 흡광도를 측

정함으로써 실험 용액 중의 단백질 농도를 결정하였다. 처음에 기기를 pH 6에서 50mM 히스티딘 완충제를 이용하여 흡광도를 0으로 교정하였다. 다음에, 단백질 용액을 동일한 히스티딘 완충제로 300배만큼 희석시키고 나서, 280nm에서 흡광도를 기록하였다. 흡광계수 값 $1.264\text{ml}/(\text{mg} \times \text{cm})$ 을 이용함으로써 용액 중의 단백질의 최종 농도를 계산하였다.

[0091] 실시예 4: 입체장애 아민 부형제 화합물을 지니는 제형

[0092] 280mg/ml BGG를 함유하는 제형을 실시예 1에 기재한 바와 같이 제조하였고, 일부 샘플은 첨가된 부형제 화합물을 함유하였다. 이들 시험에서, 다이메틸사이클로헥실아민(DMCHA), 다이사이클로헥실메틸아민(DCHMA), 다이메틸아미노프로필아민(DMAPA), 트라이에탄올아민(TEA), 다이메틸에탄올아민(DMEA) 및 니아신아마이드의 염산염을 입체장애 아민 부형제 화합물의 예로서 시험하였다. 또한 DMCHA 및 타우린-다이사이안다이하마이드 부가물의 하이드록시벤조산염은 입체장애 아민 부형제 화합물의 예로서 시험하였다. 각각의 단백질 용액의 점성도를 실시예 2에 기재한 바와 같이 측정하였고, 결과는 점성도를 감소시킴에 있어서 첨가된 부형제 화합물의 이점을 나타내는 이하의 표 1에 제시한다.

표 1

[0093]

시험 번호	첨가한 부형제	부형제 농도 (mg/ml)	점성도 (cP)	점성도 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	DMAPA-HCl	87	57	28%
4.9	DMAPA-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-하이드록시벤조산염	67	46	42%
4.21	DMCHA-하이드록시벤조산염	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	니아신아마이드	48	39	51%
4.30	N-메틸-2-피롤리돈	30	45	43%
4.31	N-메틸-2-피롤리돈	52	52	34%

[0094] 실시예 5: 음이온성 방향족 부형제 화합물을 지니는 제형

[0095] 280mg/ml BGG의 제형을 실시예 1에 기재한 바와 같이 제조하였고, 일부 샘플은 첨가된 부형제 화합물을 함유하였다. 각각의 용액의 점성도를 실시예 2에 기재한 바와 같이 측정하였고, 결과는 점성도를 감소시킴에 있어서 첨가된 부형제 화합물의 이점을 나타내는 이하의 표 2에 제시한다.

표 2

[0096]

시험 번호	첨가한 부형제	부형제 농도(mg/ml)	점성도(cP)	점성도 감소
5.1	없음	0	79	0%
5.2	아미노벤조산나트륨	43	48	39%

5.3	하이드록시벤조산나트륨	26	50	37%
5.4	살리실산나트륨	44	49	38%
5.5	살리실산나트륨	96	42	47%
5.6	인돌 아세트산나트륨	52	58	27%
5.7	인돌 아세트산나트륨	27	78	1%
5.8	바닐린산, 나트륨염	25	56	29%
5.9	바닐린산, 나트륨염	50	50	37%
5.10	살리실산나트륨	25	57	28%
5.11	살리실산나트륨	50	52	34%
5.12	아데노신 일인산염	26	47	41%
5.13	아데노신 일인산염	50	66	16%
5.14	벤조산나트륨	31	61	23%
5.15	벤조산나트륨	56	62	22%

[0097] 실시예 6: 올리고펩타이드 부형제 화합물을 지니는 제형

[0098] 유리 아민으로서 N 말단 그리고 유리산으로서 C 말단을 지니는 올리고펩타이드(n=5)를 네오바이오랩 인코포레이티드(NeoBioLab Inc.)에 의해 95% 초과 순도로 합성하였다. 다이펩타이드(n=2)를 95% 순도로 라이프테인 엘엘씨사(LifeTein LLC)에 의해 합성하였다. 280mg/ml BGG의 제형을 실시예 1에 기재한 바와 같이 제조하였고, 일부 샘플은 첨가된 부형제 화합물로서 합성 올리고펩타이드를 함유하였다. 각각의 용액의 점성도를 실시예 2에 기재한 바와 같이 측정하였고, 결과는 점성도를 감소시킴에 있어서 첨가된 부형제 화합물의 이점을 나타내는 이하의 표 3에 제시한다.

표 3

[0099]

시험 번호	첨가한 부형제	부형제 농도 (mg/ml)	점성도 (cP)	점성도 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	다이펩타이드 LE (Leu-Glu)	50	72	9%
6.12	다이펩타이드 YE (Tyr-Glu)	50	55	30%
6.13	다이펩타이드 RP (Arg-Pro)	50	51	35%
6.14	다이펩타이드 RK (Arg-Lys)	50	53	33%
6.15	다이펩타이드 RH (Arg-His)	50	52	34%
6.16	다이펩타이드 RR (Arg-Arg)	50	57	28%
6.17	다이펩타이드 RE (Arg-Glu)	50	50	37%
6.18	다이펩타이드 LE (Leu-Glu)	100	87	-10%
6.19	다이펩타이드 YE (Tyr-Glu)	100	68	14%
6.20	다이펩타이드 RP (Arg-Pro)	100	53	33%
6.21	다이펩타이드 RK (Arg-Lys)	100	64	19%
6.22	다이펩타이드 RH (Arg-His)	100	72	9%
6.23	다이펩타이드 RR (Arg-Arg)	100	62	22%
6.24	다이펩타이드 RE (Arg-Glu)	100	66	16%

[0100] 실시예 8: 구아닐 타우린 부형제의 합성

[0101] 구아닐 타우린을 미국 특허 제2,230,965호에 기재된 방법에 따라 제조하였다. 타우린(미조리주 세인트 루이스에 소재한 시그마-알드리치) 3.53부를 다이사이안다이아마이드(미조리주 세인트 루이스에 소재한 시그마-알드리치)

1.42부와 혼합하고 나서, 균질한 혼합물이 얻어질 때까지 막자사발에서 분쇄하였다. 다음에, 혼합물을 플라스크에 넣고, 200℃에서 4시간 동안 가열하였다. 생성물을 추가 정제 없이 사용하였다.

[0102] 실시예 9: 부형제 화합물을 함유하는 단백질 제형

[0103] 부형제 화합물 및 시험 단백질을 이용하여 제형을 제조하였고, 여기서, 시험 단백질은 치료적 제형에 사용되는 치료적 단백질 또는 비치료적 제형에서 사용되는 비치료적 단백질 중 하나를 시뮬레이션하기 위한 것으로 의도된다. 이러한 제형을 다음의 방법으로 점성도 측정을 위해 상이한 부형제 화합물과 함께 50mM 수성 히스티딘 염산염 완충제 용액 중에서 제조하였다. 증류수 중에 1.94g 히스티딘(미조리주 세인트루이스에 소재한 시그마 알드리치)을 용해시킴으로써, 그리고 1M 염산(미조리주 세인트루이스에 소재한 시그마 알드리치)을 이용하여 pH를 약 6.0으로 조절함으로써 히스티딘 염산염 완충제 용액을 처음 제조하고, 이어서, 용적측정 플라스크에서 증류수를 이용하여 최종 용적 250mL로 희석시켰다. 이어서, 부형제 화합물을 50mM 히스티딘 HCl 완충제 용액 중에 용해시켰다. 부형제 화합물의 목록을 표 4에서 제공한다. 일부 경우에, 부형제 화합물을 50mM 히스티딘 HCl 중에 용해시키고 나서, 얻어진 용액 pH를 소량의 진한 수산화나트륨 또는 염산으로 조절하여 모델 단백질의 용해 전에 pH 6을 달성하였다. 일부 경우에, 50mM 히스티딘 HCl 중에서 용해시키기 전에 부형제 화합물을 pH 6으로 조절하였다. 이 경우에, 부형제 화합물을 약 5중량%로 탈이온수 중에서 처음 용해시키고 나서, 염산 또는 수산화나트륨 중 하나를 이용하여 pH를 약 6.0으로 조절하였다. 이어서, 제조한 염 용액을 약 150°F(65℃)에서 실험실 오븐에 배치시켜 물을 증발시키고 고체 부형제를 단리시켰다. 일단 50mM 히스티딘 HCl 중의 부형제 용액이 제조되면, 시험 단백질, 소 감마 글로불린(미조리주 세인트 루이스에 소재한 시그마-알드리치)을 약 280mg/mL의 최종 단백질 농도를 달성하기 위한 비로 용해시켰다. 부형제와 함께 50mM 히스티딘 HCl 중의 BGG 용액을 20mL 바이알에서 제형화하고 나서, 오비탈 진탕기 테이블 상에서 밤새 100rpm으로 진탕시켰다. 이어서, BGG 용액을 2 mL 원심분리관에 옮기고 나서, IEC MicroMax 마이크로원심분리기에서 2300rpm으로 10분 동안 원심분리시켜 점성도 측정 전에 연행공기를 제거하였다.

[0104] 상기에 기재된 바와 같이 제조한 제형의 점성도 측정을 DV-IIT LV 원뿔 평판 점성도계(매사추세츠주 미들버로에 소재한 브룩필드 엔지니어링)를 이용하였다. 점성도계는 CP-40 원뿔을 구비하였고, 3rpm 및 25℃에서 작동시켰다. 제형을 0.5mL의 용적으로 점성도계에 장입하고 나서, 주어진 전단 속도 및 온도에서 3분 동안 인큐베이션 다음에, 20초의 측정 수집 기간이 이어졌다. 이어서, 1분의 전단 인큐베이션 및 후속적 20초 측정 수집 기간으로 이루어진 2개의 추가 단계가 이어졌다. 수집한 3개 데이터 지점을 평균 내고, 샘플에 대한 점성도로서 기록하였다. 부형제를 지니는 용액의 점성도를 부형제가 없는 모델 단백질 용액의 점성도에 대해 정규화시켰다. 정규화된 점성도는 부형제가 있는 모델 단백질 용액의 점성도 대 부형제가 없는 모델 단백질의 점성도의 비이다.

표 4

[0105]

시험 번호	첨가한 부형제	부형제 농도 (mg/mL)	정규화된 점성도(cP)	점성도 감소
9.1	DMCHA-HCl	120	0.44	56%
9.2	니아신아마이드	50	0.51	49%
9.3	아이소니코틴아마이드	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-트라이메틸피리딘	50	0.49	51%
9.12	3-피리딘 메탄올	50	0.53	47%
9.13	니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드	20	0.56	44%
9.15	페닐피루브산나트륨	55	0.57	43%
9.16	2-피롤리딘온	60	0.68	32%
9.17	몰폴린 HCl	50	0.60	40%
9.18	아그마틴 황산염	55	0.77	23%
9.19	1-부틸-3-메틸이미다졸륨 아이오다이드	60	0.66	34%
9.21	L-안세린 질산염	50	0.79	21%

9.22	1-헥실-3-메틸이미다졸륨 클로라이드	65	0.89	11%
9.23	N,N-다이에틸 니코틴아마이드	50	0.67	33%
9.24	니코틴산, 나트륨염	100	0.54	46%
9.25	바이오틴	20	0.69	31%

[0106] 실시예 10: 부형제 조합물 및 시험 단백질을 함유하는 제형의 제조

[0107] 1차 부형제 화합물, 2차 부형제 화합물 및 시험 단백질을 이용하여 제형을 제조하였고, 여기서, 시험 단백질은 치료적 제형에 사용되는 치료적 단백질 또는 비치료적 제형에서 사용되는 비치료적 단백질 중 하나를 시뮬레이션하기 위한 것으로 의도된다. 1차 부형제 화합물을 이하의 표 5에 열거하는 바와 같이 음이온성 작용기와 방향족 작용기를 둘 다 갖는 화합물로부터 선택하였다. 2차 부형제 화합물을 이하의 표 5에 열거하는 바와 같이 pH 6에서 비이온성 또는 양이온성 전하 중 하나 및 이미다졸린 또는 벤젠 고리 중 하나를 갖는 화합물로부터 선택하였다. 이들 부형제의 제형을 다음의 방법에서 점성도 측정을 위해 50mM 히스티딘 염산염 완충제 용액에서 제조하였다. 증류수 중에 1.94g 히스티딘(미조리주 세인트루이스에 소재한 시그마 알드리치)을 용해시킴으로써, 그리고 1M 염산(미조리주 세인트루이스에 소재한 시그마 알드리치)을 이용하여 pH를 약 6.0으로 조절함으로써 처음 히스티딘 염산염을 제조하고, 이어서, 용적측정 플라스크에서 증류수를 이용하여 최종 용적 250mL로 희석시켰다. 이어서 개개 1차 또는 2차 부형제 화합물을 50mM 히스티딘 HCl 중에 용해시켰다. 1차 부형제와 2차 부형제의 조합물을 50mM 히스티딘 HCl 중에 용해시키고 나서, 얻어진 용액 pH를 소량의 진한 수산화나트륨 또는 염산으로 조절하여 모델 단백질의 용해 전에 pH 6을 달성하였다. 일단 부형제 용액이 상기 기재한 바와 같이 제조되면, 시험 단백질(소 감마 글로불린(BGG)(미조리주 세인트 루이스에 소재한 시그마-알드리치)을 약 280mg/mL의 최종 단백질 농도를 달성하기 위한 비로 각각의 시험 용액에 용해시켰다. 부형제와 함께 50mM 히스티딘 HCl 중의 BGG 용액을 20mL 바이알에서 제형화하고 나서, 오비탈 진탕기 테이블 상에서 밤새 100rpm으로 진탕시켰다. 이어서, BGG 용액을 2mL 원심분리관에 옮기고 나서, IEC MicroMax 마이크로원심분리기에서 2300rpm으로 10분 동안 원심분리시켜 점성도 측정 전에 연행공기를 제거하였다.

[0108] 상기에 기재된 바와 같이 제조한 제형의 점성도 측정을 DV-IIT LV 원뿔 평판 점성도계(매사추세츠주 미들버로에 소재한 브룩필드 엔지니어링)를 이용하였다. 점성도계는 CP-40 원뿔을 구비하였고, 3rpm 및 25°C에서 작동시켰다. 제형을 0.5mL의 용적으로 점성도계에 장입하고 나서, 주어진 전단 속도 및 온도에서 3분 동안 인큐베이션 다음에, 20초의 측정 수집 기간이 이어졌다. 이어서, 1분의 전단 인큐베이션 및 후속적 20초 측정 수집 기간으로 이루어진 2개의 추가 단계가 이어졌다. 수집한 3개 데이터 지점을 평균 내고, 샘플에 대한 점성도로서 기록하였다. 부형제를 지니는 용액의 점성도를 부형제가 없는 모델 단백질 용액의 점성도에 대해 정규화시켰고, 이하의 표 5에 요약하였다. 정규화된 점성도는 부형제가 있는 모델 단백질 용액의 점성도 대 부형제가 없는 모델 단백질의 점성도의 비이다. 본 실시예는 1차 부형제와 2차 부형제의 조합물이 단일 부형제보다 더 양호한 결과를 제공할 수 있다는 것을 나타낸다.

표 5

시험 번호	1차 부형제		2차 부형제		정규화된 점성도
	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 설폰산	31	없음	0	0.59
10.6	4-하이드록시벤젠 설폰산	26	이미다졸	5	0.70
10.7	4-하이드록시벤젠 설폰산	25	카페인	5	0.69
10.8	없음	0	카페인	10	0.73
10.9	없음	0	이미다졸	5	0.75

[0109]

[0110] 실시예 11: 부형제 조합물 및 시험 단백질을 함유하는 제형의 제조

[0111] 1차 부형제 화합물, 2차 부형제 화합물 및 시험 단백질을 이용하여 제형을 제조하였고, 여기서, 시험 단백질은 치료적 제형에 사용되는 치료적 단백질 또는 비치료적 제형에서 사용되는 비치료적 단백질을 시뮬레이션하기 위한 것으로 의도된다. 1차 부형제 화합물을 이하의 표 6에 열거하는 바와 같이 음이온성 작용기와 방향족 작용기를 둘 다 갖는 화합물로부터 선택하였다. 2차 부형제 화합물을 이하의 표 6에 열거한 바와 같이 pH 6에서 비이온성 또는 양이온성 전하 중 하나 및 이미다졸린 또는 벤젠 고리 중 하나를 갖는 화합물로부터 선택하였다. 이들 부형제의 제형을 다음의 방법에서 점성도 측정을 위해 증류수 중에서 제조하였다. 1차 부형제와 2차 부형제의 조합물을 증류수 중에 용해시키고 나서, 얻어진 용액 pH를 소량의 진한 수산화나트륨 또는 염산으로 조절하여 모델 단백질의 용해 전에 pH 6을 달성하였다. 일단 증류수 중의 부형제 용액이 제조되면, 시험 단백질, (소감마 글로불린(BGG)(미조리주 세인트 루이스에 소재한 시그마-알드리치))을 약 280mg/ml의 최종 단백질 농도를 달성하기 위한 비로 용해시켰다. 부형제와 함께 증류수 중의 BGG 용액을 20ml 바이알에서 제형화하고 나서, 오비탈 진탕기 테이블 상에서 밤새 100rpm으로 진탕시켰다. 이어서, BGG 용액을 2ml 원심분리관에 옮기고 나서, IEC MicroMax 마이크로원심분리기에서 2300rpm으로 10분 동안 원심분리시켜 점성도 측정 전에 연행공기를 제거하였다.

[0112] 상기에 기재된 바와 같이 제조한 제형의 점성도 측정을 DV-IIT LV 원뿔 평판 점성도계(매사추세츠주 미들버로에 소재한 브룩필드 엔지니어링)를 이용하였다. 점성도계는 CP-40 원뿔을 구비하였고, 3rpm 및 25℃에서 작동시켰다. 제형을 0.5ml의 용적으로 점성도계에 장입하고 나서, 주어진 전단 속도 및 온도에서 3분 동안 인큐베이션 다음에, 20초의 측정 수집 기간이 이어졌다. 이어서, 1분의 전단 인큐베이션 및 후속적 20초 측정 수집 기간으로 이루어진 2개의 추가 단계가 이어졌다. 수집한 3개 데이터 지점을 평균 내고, 샘플에 대한 점성도로서 기록하였다. 부형제를 지니는 용액의 점성도를 부형제가 없는 모델 단백질 용액의 점성도에 대해 정규화시켰고, 이하의 표 6에 요약하였다. 정규화된 점성도는 부형제가 있는 모델 단백질 용액의 점성도 대 부형제가 없는 모델 단백질의 점성도의 비이다. 본 실시예는 1차 부형제와 2차 부형제의 조합물이 단일 부형제보다 더 양호한 결과를 제공할 수 있다는 것을 나타낸다.

표 6

시험 번호	1차 부형제		2차 부형제		정규화된 점성도
	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	니아신아마이 드	5	0.76
11.4	살리실산	20	이미다졸	5	0.73

[0113]

[0114]

실시예 12: 부형제 화합물 및 PEG를 함유하는 제형의 제조

[0115]

물질: 모든 물질을 미조리주 세인트 루이스에 소재한 시그마-알드리치사로부터 구입하였다. 부형제 화합물 및 PEG를 이용하여 제조하였고, 여기서 PEG는 치료적 제형에서 사용되는 치료적 폐길화된 단백질을 시뮬레이션하기 위한 것으로 의도된다. 동일 용적의 PEG 용액을 부형제 용액과 혼합함으로써 이러한 제형을 제조하였다. 용액을 둘 다 10mM 트리스, 135mM NaCl, 1mM 트랜스-신남산으로 이루어진 트리스 완충제 중에서 pH 7.3에서 제조하였다.

[0116]

3g의 폴리(에틸렌 옥사이드) 평균 Mw 대략 1,000,000(알드리치 카탈로그 번호 372781)을 97g의 트리스 완충제 용액과 혼합함으로써 PEG 용액을 제조하였다. 혼합물을 완전한 용해를 위해 밤새 교반시켰다.

[0117]

부형제 용액 제조의 예는 다음과 같다: 트리스 완충제 중의 시트르산의 대략 80mg/ml 용액을 5ml의 트리스 완충제 용액 중에 0.4g의 시트르산(알드리치 카탈로그 번호 251275)을 용해시킴으로써 제조하고 나서, 최소량의 10M NaOH 용액을 이용하여 pH 7.3으로 조절하였다.

[0118]

0.5ml의 PEG 용액을 0.5ml의 부형제 용액과 혼합함으로써 PEG 부형제 용액을 제조하고, 몇 초 동안 교반을 이용하여 혼합하였다. 0.5ml의 PEG 용액을 0.5ml의 트리스 완충제 용액과 혼합함으로써 대조군 샘플을 제조하였다.

[0119]

실시예 13: 부형제 화합물 및 PEG를 함유하는 제형의 점성도 측정

[0120]

제조한 제형에 대한 점성도 측정을 DV-IIT LV 원뿔 평판 점성도계(매사추세츠주 미들버로에 소재한 브룩필드 엔지니어링)를 이용하였다. 점성도계는 CP-40 원뿔을 구비하였고, 3rpm 및 25°C에서 작동시켰다. 제형을 0.5ml의 용적으로 점성도계에 장입하고 나서, 주어진 전단 속도 및 온도에서 3분 동안 인큐베이션 다음에, 20초의 측정 수집 기간이 이어졌다. 이어서, 1분의 전단 인큐베이션 및 후속적 20초 측정 수집 기간으로 이루어진 2개의 추가 단계가 이어졌다. 수집한 3개 데이터 지점을 평균 내고, 샘플에 대한 점성도로서 기록하였다.

[0121]

표 7에 제공하는 결과는 점성도를 감소시킴에 있어서 첨가된 부형제 화합물의 효과를 나타낸다.

표 7

[0122]

시험 번호	부형제	부형제 농도(mg/ml)	점성도(cP)	점성도 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 인산염	40	71.7	30%
13.5	글리세롤 인산염	20	83.9	18%
13.6	에틸렌 다이아민	40	84.7	17%
13.7	에틸렌 다이아민	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%
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%

[0123] 실시예 14: BSA 분자 당 1개의 PEG 쇄를 지니는 폐길화된 BSA의 제조

[0124] 비커에 200mL의 인산염 완충 식염수(알드리치 카탈로그 번호 P4417) 및 4g의 BSA(알드리치 카탈로그 번호 A7906)를 첨가하고 나서, 자기 막대와 혼합하였다. 다음에, 400mg의 메톡시 폴리에틸렌 글리콜 말레이미드, MW=5,000(알드리치 카탈로그 번호 63187)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새 실온에서 교반시켰다. 다음날, 20 점적의 HCl 0.1M을 첨가하여 반응을 중단시켰다. 반응 생성물은 폐길화된 BSA를 분명하게 보여주는 SDS-Page 및 SEC에 의해 특성구명하였다. 반응 혼합물을 분자량 컷오프(MWCO) 30,000으로 아미콘(Amicon) 원심분리관에 넣고, 몇 밀리리터로 농축시켰다. 다음에, 샘플을 히스티딘 완충제(50mM, pH 대략 6)를 이용하여 20배 희석시키고 나서, 고정성도 유체가 얻어질 때까지 농축시켰다. 280nm에서 흡광도를 측정함으로써 그리고 BSA에 대한 흡광 계수 0.6678을 이용함으로써 단백질 용액의 최종 농도를 얻었다. 결과는 용액 중의 BSA의 최종 농도가 342mg/mL였다는 것을 나타내었다.

[0125] 실시예 15: BSA 분자 당 다중 PEG 쇄를 지니는 폐길화된 BSA의 제조

[0126] 0.5g의 BSA를 100mL의 완충제와 혼합함으로써 인산염 완충제(25mM pH 7.2) 중의 BSA(알드리치 A7906)의 5mg/mL 용액을 제조하였다. 다음에, 1g의 메톡시 PEG 프로피온알데하이드 Mw=20,000(텍사스주 75024 플라이노에 소재한 젠캠 테크놀로지(JenKem Technology))를 첨가한 다음, 0.12g의 시안화 수소화 붕산나트륨(알드리치 156159)을 첨가하였다. 반응을 밤새 실온에서 진행시켰다. 다음날 반응 혼합물을 트리스 완충제(10mM 트리스, 135mM NaCl, pH=7.3)를 이용하여 13배 희석시키고 나서, 대략 150mg/mL가 도달될 때까지 아미콘 원심분리관 MWCO 30,000을 이용하여 농축시켰다.

[0127] 실시예 16: 라이소자임 분자 당 다중 PEG 쇄를 지니는 폐길화된 라이소자임의 제조

[0128] 0.5g의 라이소자임을 100mL의 완충제와 혼합함으로써 인산염 완충제(25mM pH 7.2) 중의 라이소자임(알드리치 L6876)의 5mg/mL 용액을 제조하였다. 다음에, 1g의 메톡시 PEG 프로피온알데하이드 Mw=5,000(텍사스주 75024 플라이노에 소재한 젠캠 테크놀로지(JenKem Technology))를 첨가한 다음, 0.12g의 시안화 수소화 붕산나트륨(알드리치 156159)을 첨가하였다. 반응을 밤새 실온에서 진행시켰다. 다음날, 반응 혼합물을 인산염 완충제(25 mM, pH7.2)를 이용하여 49배 희석시키고 나서, 아미콘 원심분리관 MWCO 30,000을 이용하여 농축시켰다. 280nm에서 흡광도를 측정함으로써 그리고 라이소자임에 대한 흡광 계수 2.63을 이용함으로써 단백질 용액의 최종 농도를 얻었다. 용액 중의 최종 농도는 140mg/mL였다.

[0129] 실시예 17: BSA 분자 당 1개의 PEG 쇄를 지니는 폐길화된 BSA의 점성도에 대한 부형제의 효과

[0130] 6 또는 12 밀리그램의 부형제 염을 0.3mL의 폐길화된 BSA 용액에 첨가함으로써 부형제를 지니는 (상기 실시예 14로부터의) 폐길화된 BSA 제형을 제조하였다. 부드럽게 진탕시킴으로써 용액을 혼합하고 나서, 전단속도 500 초-1에서 A10 채널(100 마이크론 깊이)을 구비한 리오센스 마이크로비스크(RheoSense microVisc)에 의해 점성도를 측정하였다. 점성도 측정을 주위 온도에서 완료하였다.

[0131] 표 8에 제공하는 결과는 점성도를 감소시킴에 있어서 첨가된 부형제 화합물의 효과를 나타낸다.

표 8

[0132]

시험 번호	부형제	부형제 농도(mg/mL)	점성도(cP)	점성도 감소
17.1	없음	0	228.6	0%

17.2	알파-사이클로텍스트린 황산 Na 염	20	151.5	34%
17.3	아세트산K	40	89.5	60%

[0133] 실시예 18: BSA 분자 당 다중 PEG 쇄를 지니는 폐길화된 BSA의 점성도에 대한 부형제의 효과

[0134] 8 밀리그램의 부형제염을 0.2ml의 폐길화된 BSA 용액에 첨가함으로써 부형제로서 시트르산 Na 염을 지니는 (상기 실시예 15로부터의) 폐길화된 BSA의 제형을 제조하였다. 부드럽게 진탕시킴으로써 용액을 혼합하고 나서, 전단속도 500 초-1에서 A10 채널(100 마이크로 깊이)을 구비한 리오센스 마이크로비스크(RheoSense microVisc)에 의해 점성도를 측정하였다. 점성도 측정을 주위 온도에서 완료하였다. 표 9에 제공하는 결과는 점성도를 감소시킴에 있어서 첨가된 부형제 화합물의 효과를 나타낸다.

표 9

[0135]

시험 번호	첨가한 부형제	부형제 농도(mg/ml)	점성도(cP)	점성도 감소
18.1	없음	0	56.8	0%
18.2	시트르산 Na 염	40	43.5	23%

[0136] 실시예 19: 라이소자임 분자 당 다중 PEG 쇄를 지니는 폐길화된 라이소자임의 점성도에 대한 부형제의 효과

[0137] 6 밀리그램의 부형제 염을 0.3ml의 폐길화된 라이소자임 용액에 첨가함으로써 부형제로서 아세트산칼륨을 지니는 (상기 실시예 16으로부터의) 폐길화된 라이소자임의 제형을 제조하였다. 부드럽게 진탕시킴으로써 용액을 혼합하고 나서, 전단속도 500초-1에서 A10 채널(100 마이크로 깊이)을 구비한 리오센스 마이크로비스크(RheoSense microVisc)에 의해 점성도를 측정하였다. 점성도 측정을 주위 온도에서 완료하였다. 다음의 표에 제공하는 결과는 점성도를 감소시킴에 있어서 첨가된 부형제 화합물의 이점을 나타낸다.

표 10

[0138]

시험 번호	부형제	부형제 농도(mg/ml)	점성도(cP)	점성도 감소
19.1	없음	0	24.6	0%
19.2	아세트산K	20	22.6	8%

[0139] 실시예 20: 부형제 조합물을 함유하는 단백질 제형

[0140] 부형제 화합물, 또는 두 부형제 화합물과 시험 단백질의 조합물을 이용하여 제형을 제조하였고, 여기서 시험 단백질은 치료적 제형에서 사용되는 치료적 단백질을 시뮬레이션하기 위한 것으로 의도된다. 이들 제형을 다음의 방법으로 점성도 측정을 위해 상이한 부형제 화합물과 함께 20mM 히스티딘 완충제 중에서 제조하였다. 부형제 조합물을 20mM 히스티딘(미조리주 세인트 루이스에 소재한 시그마-알드리치) 중에 용해시키고 나서, 얻어진 용액 pH를 소량의 진한 수산화나트륨 또는 염산으로 조절하여 모델 단백질의 용해 전에 pH 6을 달성하였다. 이 실시예에 대한 부형제 화합물을 이하의 표 11에 열거한다. 일단 부형제 용액이 제조되면, 시험 단백질, (소 감마글로불린 또는 "BGG"(미조리주 세인트 루이스에 소재한 시그마-알드리치))을 약 280mg/ml의 최종 단백질 농도를 달성하기 위한 비로 용해시켰다. 부형제 용액 중의 BGG 용액을 5ml 멸균 폴리프로필렌관에서 제형화하고 나서, 오비탈 진탕기 테이블 상에서 밤새 80 내지 100rpm으로 진탕시켰다. 이어서, BGG 용액을 2ml 원심분리관에 옮기고 나서, IEC MicroMax 마이크로원심분리기에서 2300rpm으로 약 10분 동안 원심분리시켜 점성도 측정 전에 연행 공기를 제거하였다.

[0141] 상기에 기재된 바와 같이 제조한 제형의 점성도 측정을 DV-IIT LV 원뿔 평판 점성도계(매사추세츠주 미들버로에 소재한 브룩필드 엔지니어링)를 이용하였다. 점성도계는 CP-40 원뿔을 구비하였고, 3rpm 및 25℃에서 작동시켰다. 제형을 0.5ml의 용적으로 점성도계에 장입하고 나서, 주어진 전단 속도 및 온도에서 3분 동안 인큐베이션 다음에, 20초의 측정 수집 기간이 이어졌다. 이어서, 1분의 전단 인큐베이션 및 후속적 20초 측정 수집 기간으로 이루어진 2개의 추가 단계가 이어졌다. 수집한 3개 데이터 지점을 평균 내고, 샘플에 대한 점성도로서 기록하였다. 부형제를 지니는 용액의 점성도를 부형제가 없는 모델 단백질 용액의 점성도에 대해 정규화시켰고, 결과를 이하의 표 11에 나타낸다. 정규화된 점성도는 부형제가 있는 모델 단백질 용액의 점성도 대 부형제가 없는 모델 단백질의 점성도의 비이다.

표 11

시험 번호	부형제 A		부형제 B		정규화된 점성도
	명칭	농도 (mg/ml)	명칭	농도 (mg/ml)	
20.1	없음	0	없음	0	1.00
20.2	아스팔탐	10	없음	0	0.83
	사카린	60	없음	0	0.51
20.4	아세살팜 K	80	없음	0	0.44
20.5	테오피린	10	없음	0	0.84
20.6	사카린	30	없음	0	0.58
20.7	아세살팜 K	40	없음	0	0.61
20.8	카페인	15	타우린	15	0.82
20.9	카페인	15	티라민	15	0.67

[0142]

[0143] 실시예 21: 점성도 및 주사 통증을 감소시키기 위해 부형제를 함유하는 단백질 제형

[0144]

부형제 화합물, 제2 부형제 화합물 및 시험 단백질을 이용하여 제형을 제조하였고, 여기서 시험 단백질은 치료적 제형에서 사용되는 치료적 단백질을 시뮬레이션하기 위한 것으로 의도된다. 제1 부형제 화합물인 부형제 A를 국소 마취 특성을 갖는 화합물의 군으로부터 선택하였다. 제1 부형제인 부형제 A 및 제2 부형제인 부형제 B를 표 12에 열거한다. 이들 제형을 다음의 방법으로 부형제 A 및 부형제 B를 이용하여 20mM 히스티딘 완충제에서 제조하여, 그들의 점성도를 측정할 수 있었다. 표 12에 개시된 양의 부형제를 20mM 히스티딘(미조리주 세인트 루이스에 소재한 시그마-알드리치) 중에 용해시키고 나서, 얻어진 용액 pH를 소량의 진한 수산화나트륨 또는 염산으로 조절하여 모델 단백질의 용해 전에 pH 6을 달성하였다. 일단 부형제 용액이 제조되면, 시험 단백질(소감마 글로불린("BGG")(미조리주 세인트 루이스에 소재한 시그마-알드리치))을 약 280mg/ml의 최종 단백질 농도를 달성하기 위한 비로 부형제 용액 중에 용해시켰다. 부형제 용액 중의 BGG 용액을 5ml 멸균 폴리프로필렌관에 제형화하고 나서, 오비탈 진탕기 테이블 상에서 밤새 80 내지 100rpm으로 진탕시켰다. 이어서, BGG-부형제 용액을 2ml 원심분리관에 옮기고 나서, IEC MicroMax 마이크로원심분리기에서 2300rpm으로 약 10분 동안 원심분리시켜 점성도 측정 전에 연행공기를 제거하였다.

[0145]

상기에 기재된 바와 같이 제조한 제형의 점성도 측정을 DV-IIT LV 원뿔 평판 점성도계(매사추세츠주 미들버로에 소재한 브룩필드 엔지니어링)를 이용하였다. 점성도계는 CP-40 원뿔을 구비하였고, 3rpm 및 25℃에서 작동시켰다. 제형을 0.5ml의 용적으로 점성도계에 장입하고 나서, 주어진 전단 속도 및 온도에서 3분 동안 인큐베이션 다음에, 20초의 측정 수집 기간이 이어졌다. 이어서, 1분의 전단 인큐베이션 및 후속적 20초 측정 수집 기간으로 이루어진 2개의 추가 단계가 이어졌다. 수집한 3개 데이터 지점을 평균 내고, 샘플에 대한 점성도로서 기록하였다. 부형제를 지니는 용액의 점성도를 부형제가 없는 모델 단백질 용액의 점성도에 대해 정규화시켰고, 결과를 이하의 표 12에 나타낸다. 정규화된 점성도는 부형제가 있는 모델 단백질 용액의 점성도 대 부형제가 없는 모델 단백질의 점성도의 비이다.

표 12

시험 번호	부형제 A		부형제 B		정규화된 점성도
	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

[0146]

[0147]

실시예 22: 부형제 화합물 및 PEG를 함유하는 제형

[0148]

부형제 화합물 및 PEG를 이용하여 제조하였고, 여기서 PEG는 치료적 제형에서 사용되는 치료적 폐길화된 단백질을 시뮬레이션하기 위한 것으로 의도되며, 부형제 화합물은 표 13에 열거된 바와 같은 양으로 제공된다. 동일한 용적의 PEG 용액을 부형제 용액과 혼합함으로써 이들 제형을 제조하였다. 용액을 둘 다 탈이온수 중에서 제조하였다.

[0149]

16.5g의 폴리(에틸렌 옥사이드) 평균 Mw 대략 100,000(알드리치 카탈로그 번호 181986)을 83.5g의 탈이온수와 혼합함으로써 PEG 용액을 제조하였다. 혼합물을 완전한 용해를 위해 밤새 교반시켰다.

[0150]

부형제 용액을 이런 일반적 방법에 의해 그리고 이하의 표 13에서 상세하게 설명하는 바와 같이 제조하였다: 탈이온수 중의 계삼인산칼륨(알드리치 카탈로그 번호 P5629)의 대략 20mg/ml 용액을 5ml의 탈이온수 중에서 0.05g의 인산칼륨을 용해시킴으로써 제조하였다. 0.5ml의 PEG 용액을 0.5ml의 부형제 용액과 혼합함으로써 PEG 부형제 용액을 제조하고, 몇 초 동안 교반을 이용하여 혼합하였다. 0.5ml의 PEG 용액을 0.5ml의 탈이온수와 혼합함으로써 대조군 샘플을 제조하였다. 점성도를 측정하고 나서, 결과를 이하의 표 13에 기록한다.

표 13

[0151]

시험 번호	부형제	부형제 농도 (mg/ml)	점성도 (cP)	점성도 감소(%)
22.1	없음	0	79.7	0
22.2	시트르산 Na 염	10	74.9	6.0
22.3	인산칼륨	10	72.3	9.3
22.4	시트르산 Na 염/인산칼륨	10/10	69.1	13.3
22.5	황산나트륨	10	75.1	5.8
22.6	시트르산 Na 염/황산나트륨	10/10	70.4	11.7

[0152]

실시예 23: 부형제를 지니는 단백질 용액의 개선된 가공

[0153]

0.25g의 고체 BGG(알드리치 카탈로그 번호 G5009)를 4ml의 완충제 용액과 혼합함으로써 두 BGG 용액을 제조하였다. 샘플 A에 대해: 완충제 용액은 20mM 히스티딘 완충제(pH=6.0)였다. 샘플 B에 대해: 완충제 용액은 15mg/ml의 카페인을 함유하는 20mM 히스티딘 완충제(pH=6)였다. 100rpm으로 설정한 오비탈 진탕기에서 샘플을 배치시킴으로써 고체 BGG의 용해를 수행하였다. 단백질을 더 빠르게 용해시키기 위해 카페인 부형제를 함유하는 완충제 샘플을 관찰하였다. 카페인 부형제(샘플 B)를 지니는 샘플에 대해 BGG의 완전 용해를 15분 내에 달성하였다. 카페인이 없는 샘플(샘플 A)에 대해, 용해는 35분이 필요하였다.

[0154]

다음에, 샘플을 30,000 분자량 컷오프로 2개의 별도의 아미콘 울트라 4 원심분리 필터 단위에 넣고 나서, 샘플을 2,500rpm에서 10분 간격으로 원심분리시켰다. 각각의 10분 원심분리 실행 후에 회수한 여과액 용적을 보고하였다. 표 14의 결과는 샘플 B에 대한 여과액의 더 빠른 회수를 나타낸다. 추가로, 샘플 B는 모든 추가 실행에 의해 농축을 유지하였지만, 샘플 A는 최대 농축점에 도달되었고, 추가 원심분리는 추가 샘플 농축을 초래하지

않았다.

표 14

[0155]

원심분리 시간(분)	수집한 샘플 A 여과액(ml)	수집한 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

이 실시예는 부형제로서 카페인과 아르기닌의 조합물이 BGG 용액의 점성도를 감소시키는데 유리한 효과를 갖는 방법을 나타낸다. 0.18g의 고체 BGG(알드리치 카탈로그 번호 G5009)를 0.5ml의 20mM 히스티딘 완충제와 pH 6에서 혼합함으로써 4종의 BGG 용액을 제조하였다. 각각의 완충제 용액은 이하의 표에 기재한 바와 같은 상이한 부형제 또는 부형제의 조합물을 함유하였다. 용액의 점성도는 앞의 실시예에 기재한 바와 같이 측정하였다. 결과는 입체장애 아민 부형제, 카페인, 아르기닌과 같은 공지된 부형제와 조합될 수 있고, 조합물이 개개 부형제 단독보다 더 양호한 점성도 감소를 가진다는 것을 나타낸다.

표 15

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

아르기닌을 pH 6에서 히스티딘 완충제 중의 BGG의 280mg/ml 용액에 첨가하였다. 50mg/ml 초과 수준에서, 더 많은 아르기닌을 첨가하는 것은 추가로 표 16에 나타내는 바와 같이 점성도를 감소시키지 않았다.

표 16

[0160]

첨가한 아르기닌(mg/ml)	점성도(cP)	점성도 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%

카페인을 pH 6에서 히스티딘 완충제 중의 BGG의 280mg/ml 용액에 첨가하였다. 10mg/ml 초과 수준에서, 더 많은 카페인을 첨가하는 것은 추가로 표 17에 나타내는 바와 같이 점성도를 감소시키지 않았다.

표 17

첨가한 카페인(mg/ml)	점성도(cP)	점성도 감소(%)
0	79	0%
10	60	31%
15	62	23%
22	50	45%

[0162]

[0163]

균등론

[0164]

본 발명의 구체적 실시형태를 본 명세서에 개시하였지만, 상기 명세서는 예시적이며, 제한적이지 않다. 본 발명은 이의 바람직한 실시형태와 관련하여 구체적으로 나타내고 기재하였지만, 당업자는 형태 및 상세한 설명의 다양한 변화가 첨부하는 청구범위에 의해 포함되는 본 발명의 범주로부터 벗어나는 일 없이 그 안에서 이루어질 수 있다는 것을 이해할 것이다. 본 발명의 다수 변형은 본 명세서를 검토할 때 당업자에게 명백하게 될 것이다. 달리 표시되지 않는 한, 본 명세서 및 청구범위에서 반응 조건, 성분의 양 등을 표현하는 모든 수는 용어 "약"에 의해 모든 예에서 변형될 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 반대로 표시되지 않는 한, 본 명세서에 제시된 수치적 매개변수는 본 발명에 의해 얻어질 것으로 추구되는 목적으로 하는 특성에 따라 다를 수 있는 근삿값이다.