



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0063305  
(43) 공개일자 2015년06월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 9/08 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)  
A61K 47/30 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2014-0169009  
(22) 출원일자 2014년11월28일  
심사청구일자 2014년11월28일  
(30) 우선권주장  
1020130148028 2013년11월29일 대한민국(KR)

(71) 출원인  
한화케미칼 주식회사  
서울특별시 중구 청계천로 86 (장교동)  
(72) 발명자  
이정태  
대전 서구 둔산로 201, 602동 501호 (둔산동, 국  
화아파트)  
김인혁  
대전광역시 유성구 신성로68번길 47(신성동) 성현  
택원도 202호  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
손민

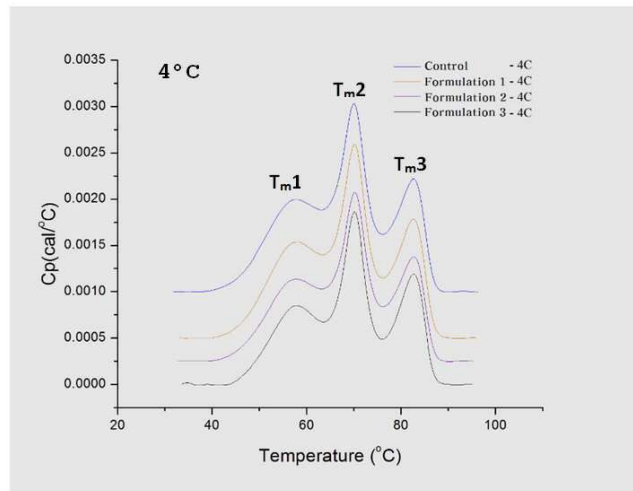
전체 청구항 수 : 총 29 항

(54) 발명의 명칭 TNFR 및 면역글로블린 Fc 영역을 포함하는 융합 단백질을 포함하는 액상 제제

**(57) 요약**

본 발명은 TNFR(tumor necrosis factor receptor) 및 면역글로블린 Fc 영역을 포함하는 융합 단백질 및 안정화제를 포함하며, 상기 안정화제는 프롤린 및 히스티딘으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산, 완충용액, 및 염화나트륨(NaCl) 및 수크로즈(Sucrose)를 포함하는 등장화제를 함유하는 것인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 지속형 액상 제제 및 상기 액상 제제의 제조 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 액상 제제는 TNFR-Fc 융합 단백질(에타너셉트)에 대해 장기간 보관이 가능하고 보관 조건을 까다롭게 유지하지 않아도 됨에 따라 우수한 저장 안정성을 제공한다. 이와 같은 본 발명의 액상 제제는 간단한 제제로 우수한 저장 안정성을 나타내어 다른 안정화제나 동결 건조 제제에 비해 경제적인 제공이 가능하여, 향후 TNFR-Fc 융합 단백질(에타너셉트)을 이용한 치료 분야에 효과적으로 응용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도2a



(72) 발명자

**유재근**

인천 남구 경원대로 689, 111동 901호 (관교동, 신비마을아파트)

**임정임**

대전 서구 남선로9번길 47-10, 2층 (탄방동)

**정명현**

대전 유성구 송강로42번길 61, 206동 703호 (송강동, 송강청솔아파트)

**안용호**

대전 유성구 대덕대로 596, 902호 (도룡동, 로얄밸리)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

TNFR(tumor necrosis factor receptor) 또는 이의 단편 및 면역글로블린 Fc 영역을 포함하는 융합 단백질인 TNFR-Fc 융합 단백질, 프롤린, 히스티딘 및 글루탐산으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산, 완충 용액, 및 등장화제를 함유하는 것인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 TNFR-Fc 융합 단백질은 에타너셉트(Etanercept)인 것인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 TNFR-Fc 융합 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 것인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 융합 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 아미노산 치환, 제거 또는 삽입 등에 의해 변이된 융합 단백질 또는 에타너셉트와 유사한 활성을 나타내는 펩타이드 유사체인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 등장화제는 액상 제제의 삼투압을 280 내지 350 mOsm으로 유지하는 것인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 상기 등장화제는 염화나트륨(NaCl)과 수크로스를 포함하는 것인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 상기 등장화제는 염화나트륨(NaCl)을 1 내지 1000 mM의 농도로 포함되고, 수크로스를 0.01 내지 3 중량%로 포함되는 것인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제.

#### 청구항 8

제7항에 있어서, 상기 등장화제는 염화나트륨(NaCl)을 105 내지 150 mM 농도로 포함하고, 수크로스를 0.01 내지 1.5 중량%로 포함하는 것인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제.

**청구항 9**

제1항에 있어서, 상기 액상 제제에 포함된 용합 단백질의 농도의 범위가 20 내지 55 mg/mL인 것인, TNFR-Fc 용합 단백질을 포함하는 액상 제제.

**청구항 10**

제1항에 있어서, 상기 완충 용액은 구연산-인산(Citrate-phosphate) 또는 인산 완충 용액인, TNFR-Fc 용합 단백질을 포함하는 액상 제제.

**청구항 11**

제1항에 있어서, 상기 완충 용액은 농도의 범위가 10 내지 35 mM인 것인, TNFR-Fc 용합 단백질을 포함하는 액상 제제.

**청구항 12**

제1항에 있어서, 상기 액상 제제의 pH 범위가 6.0 내지 6.6인 것인, TNFR-Fc 용합 단백질을 포함하는 액상 제제.

**청구항 13**

제1항에 있어서, 상기 액상 제제는 프롤린을 10 mM 이하의 농도로 포함하거나 히스티딘을 5 mM 이하의 농도로 포함하는 것인, TNFR-Fc 용합 단백질을 포함하는 액상 제제.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 상기 액상 제제는 프롤린을 9 mM 이하의 농도로 포함하거나 히스티딘을 0.1 mM 이하의 농도로 포함하는 것인, TNFR-Fc 용합 단백질을 포함하는 액상 제제.

**청구항 15**

제1항에 있어서, 상기 제제는 프롤린과 히스티딘의 혼합 아미노산을 포함하는 것인, TNFR-Fc 용합 단백질을 포함하는 지속형 액상 제제.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 상기 액상 제제는 프롤린을 1 mM 내지 9 mM의 농도로 포함하고, 히스티딘을 0.1 mM 이하의 농도로 포함하는 것인, TNFR-Fc 용합 단백질을 포함하는 액상 제제.

**청구항 17**

제16항에 있어서, 상기 액상 제제는 프롤린을 1 mM 내지 9 mM의 농도로 포함하고, 히스티딘을 0.01 mM 내지 0.09 mM의 농도로 포함하는 것인, TNFR-Fc 용합 단백질을 포함하는 액상 제제.

**청구항 18**

제17항에 있어서, 상기 액상 제제는 프롤린을 6 mM의 농도로 포함하고, 히스티딘을 0.09 mM의 농도로 포함하는 것인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제.

**청구항 19**

제1항에 있어서, 상기 액상 제제는 글루탐산을 1 mM 내지 20 mM의 농도로 추가로 포함하는 것인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제.

**청구항 20**

제19항에 있어서, 상기 액상 제제는 글루탐산을 10 mM 내지 15 mM의 농도로 포함하는 것인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제.

**청구항 21**

p75 sTNFR-Fc 융합 단백질인 약리학적 유효량의 TNFR-Fc 융합 단백질, 구연산-인산 완충 용액, 염화나트륨, 수크로즈, 및 프롤린과 히스티딘을 포함하는 혼합 아미노산을 포함하는, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제.

**청구항 22**

제21항에 있어서, 상기 액상 제제는 30 내지 55 mg/mL의 TNFR-Fc 융합 단백질과 10 내지 35 mM 구연산-인산 완충 용액, 105 내지 120 mM NaCl, 0.5 내지 1.5 % 수크로즈, 1 내지 9 mM 프롤린 및 0.01 내지 0.1 mM 히스티딘을 포함하며, pH가 6.3인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제.

**청구항 23**

제22항에 있어서, 상기 액상 제제는 50 mg/mL의 TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하고, 25 mM 구연산-인산 완충 용액, 115 mM NaCl, 1 % 수크로즈, 6 mM 프롤린 및 0.09 mM 히스티딘을 포함하며, pH가 6.3인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제.

**청구항 24**

제21항에 있어서, 상기 액상 제제는 30 내지 55 mg/mL의 TNFR-Fc 융합 단백질과 10 내지 35 mM 구연산-인산 완충 용액, 120 내지 150 mM NaCl, 0.01 내지 0.5 % 수크로즈, 1 내지 9 mM 프롤린 및 0.01 내지 0.1 mM 히스티딘을 포함하며, pH가 6.3인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제.

**청구항 25**

제24항에 있어서, 상기 액상 제제는 50 mg/mL의 TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하고, 25 mM 구연산-인산 완충 용액, 130 mM NaCl, 0.1 % 수크로즈, 6 mM 프롤린 및 0.09 mM 히스티딘을 포함하며, pH가 6.3인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제.

**청구항 26**

제21항에 있어서, 추가로 글루탐산을 포함하는 것으로, 상기 액상 제제는 30 내지 55 mg/mL의 TNFR-Fc 용합 단백질과 10 내지 35 mM 구연산-인산 완충 용액, 100 내지 150 mM NaCl, 0.1 내지 1.5 % 수크로즈, 5 내지 15 mM 글루탐산, 1 내지 10 mM 프롤린 및 1 내지 10 mM 히스티딘을 포함하며, pH가 6.3인, TNFR-Fc 용합 단백질을 포함하는 액상 제제.

**청구항 27**

제26항에 있어서, 상기 액상 제제는 50 mg/mL의 TNFR-Fc 용합 단백질과 25 mM 구연산-인산 완충 용액, 100 mM NaCl, 1 % 수크로즈, 10 mM 글루탐산, 10 mM 프롤린 및 5 mM 히스티딘을 포함하며, pH가 6.3인, TNFR-Fc 용합 단백질을 포함하는 액상 제제.

**청구항 28**

- a) 에타너셉트를 제조하는 단계; 및
- b) a) 단계에서 제조된 에타너셉트를 프롤린 및 히스티딘으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산, 완충 용액, 및 염화나트륨(NaCl)과 수크로즈(Sucrose)를 포함하는 등장화제를 함유하는 안정화제와 혼합하는 단계를 포함하는, 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 TNFR-Fc 용합 단백질을 포함하는 액상 제제의 제조 방법.

**청구항 29**

제28항에 있어서, 상기 b)의 혼합하는 단계는 i) 안정화제, 완충 용액 및 등장화제를 포함하는 용액을 제조하는 단계; 및 ii) 상기 a) 단계에서 제조된 에타너셉트 단백질이 포함된 용액을 상기 i) 단계에서 제조한 용액으로 교환하는 단계를 포함하는 것인, 제조 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 TNFR(tumor necrosis factor receptor) 또는 이의 단편 및 면역글로블린 Fc 영역을 포함하는 용합 단백질인 TNFR-Fc 용합 단백질 및 안정화제를 포함하며, 상기 안정화제는 프롤린 및 히스티딘으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산, 완충 용액, 및 염화나트륨(NaCl)과 수크로즈(Sucrose)를 포함하는 등장화제를 함유하는 것인, TNFR-Fc 용합 단백질을 포함하는 액상 제제 및 상기 액상 제제의 제조 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 일반적으로, 단백질 의약품은 적당하지 않은 온도, 전단 응력(Shear stress), 진동, 냉해동(Freeze-thawing), UV 노출, 과도한 pH 변화, 유기용매 및 미생물에 의한 오염 등에 의해 화학적 및 물리적으로 변성이 쉽게 일어난다. 화학적 변성으로는 이합체의 해리, 산화, 탈아미드화(Deamidation), 이성화(Isomerization) 및 다량체화(Polymerization) 등이 포함되고, 이들은 단백질의 아미노산 조성과 단백질을 포함하는 용매의 상태(염, pH 및 온도)에 영향을 받는다. 물리적 변성으로는 3차 구조의 손실, 단량체의 공유/비공유적 응집, 흡착 등이 포함되고, 이들은 용매 등과 같은 단백질을 포함하고 있는 주변환경에 의해 변하게 되는 단백질 표면에 있는 소수성 부분(Hydrophobic patches), 전하 분포(Charge distribution)와 같은 단백질의 복잡한 구조와 열안정성에 영향을 받는다.

[0003] 항체를 비롯한 단백질의 물리적 또는 화학적 변성은 생리활성 효과를 상실시키며, 이러한 변성은 비가역적이기 때문에, 일단 변성된 단백질은 원래의 특성을 거의 회복할 수 없어 치료학적 효능이 떨어지게 된다. 또한 단량체의 응집과 같은 현상은 면역반응을 일으킨다는 보고가 꾸준히 제기되고 있어 이러한 응집을 발생시키지 않고,

생리학적 유효량을 가지는 제제에 관한 연구가 많이 진행되고 있다(Ishikawa et al., Biol. Pharm. Bull., 33(8): 1413-1417, 2010).

[0004] 이와 같은, 용액 중의 단백질 변성을 막기 위하여 여러 가지 방법들이 연구되어 왔고, 일부 단백질 약품은 동결 건조방법으로 안정성 문제를 해결하고 있다. 그러나, 동결건조 과정 중 얼음 결정의 형성, pH의 변화 및 용질의 농축 등과 같은 동결 및 건조 스트레스가 발생하기 때문에 단백질의 변성을 초래할 수 있고, 생산공정에 동결 건조가 포함되어 있어 대용량의 동결 건조기를 사용해야만 하는 등 대규모의 투자가 필요한 단점이 있다. 또한, 동결 건조 제품은 사용 시에 다시 주사용수에 녹여야 하는 불편이 있다.

[0005] 이와 같은 한계를 해결하는 대안으로서, 용액 상태인 단백질에 안정화제를 첨가하여 안정성을 향상시키기도 한다. 단백질 의약품에 사용될 수 있는 안정화제로는 계면활성제, 혈청 알부민, 다당류, 아미노산, 고분자, 염류 등이 알려져 있다 (Wang, Int. J. Pharm., 185: 129-188, 1999; Wang et al., J. Pharm. Sci., 96(1): 1-26, 2007).

[0006] 그러나, 이러한 약물의 안정화 제제를 제조하기 위해서는 유효 성분 각각의 물리화학적 특성에 따라 적절한 안정화제를 사용해야만 하며, 안정화제들을 병용할 경우 상호 간의 경쟁작용 및 부작용으로 인하여 목적인 바와는 다른 역효과를 가져올 수 있다. 또한, 단백질을 안정화하는 데는 적합한 범위의 농도가 존재하고, 특히 고농도의 단백질 의약품을 제조하기 위해서는 용액 중의 단백질을 안정화하기 위해서는 많은 노력과 주의가 필요하다 (Shire et al., J. Pharm. Sci., 93(6): 1390-1402, 2004).

[0007] 한편, 에타너셉트는 체내에서 TNF- $\alpha$  리셉터(TNF- $\alpha$  receptor)의 세포 표면과 TNF- $\alpha$ 가 결합하는 것을 경쟁적으로 저해하여, TNF- $\alpha$ 와 관계된 면역반응을 억제하는 역할을 하는 생물학적 조절제(biological modulator)이다. 에타너셉트는 수용성의 인간 p75 TNF(tumor necrosis factor) 리셉터와 인간 면역글로불린 G 서브클래스(subclass) 1의 Fc 부위가 결합된, 융합 단백질 2개가 이황화 결합(Disulfide bond)으로 연결된 동형이량체(Homodimer)의 형태를 갖으며, 분자량이 150 kDa에 이르는 거대분자이다(Goldenberg, *Clinical Therapeutics*, 21(1): 75-87, 1999; Moreland et al., *Ann. Intern. Med.*, 130(6): 478-486, 1999).

[0008] 이는 2002년에 암젠(Amgen) 사에 의해 엔브렐(Enbrel)이라는 상품명으로 출시되었다. 에타너셉트는 TNF- $\alpha$  저해제로 류마티스 관절염, 건선, 강직성 척추염 등에 사용되고 있으며, 혈관염, 알츠하이머병 및 크론병에 적용하기 위한 임상 연구가 진행 중에 있다.

[0009] 에타너셉트와 같은 TNFR-Fc 융합 단백질의 안정화 제형 기술들은 종래에는 기존 단백질 의약품들과 마찬가지로 생산 보관, 저장 및 운송 중간에 발생할 수 있는 단백질의 변성을 최소화하고 장기간 활성을 유지하는 액상 제형 개발을 목적으로 하고 있었으나, 여전히 만족할만한 액상 제제의 개발이 어려웠다. 따라서, TNFR-Fc 융합 단백질(에타너셉트)의 활성을 안정하게 장기간 유지할 수 있는 새로운 액상 제제 및 미국 등록특허 제7,648,702호에 개시된 아르기닌(arginine)이 포함된 액상 제제보다 TNFR-Fc 융합 단백질(에타너셉트)의 안정화 효과가 우수한 액상 제제의 개발에 대한 필요성이 대두되고 있다.

[0010] 이에 본 발명자들은 에타너셉트의 활성을 안정하게 유지할 수 있는 액상 제제의 제조 방법에 대해 연구하였다. 본 발명은 기존 공지되어 있던 단일 또는 혼합 아미노산 안정화제 농도보다 낮은 농도의 프롤린 및 히스티딘으로 이루어진 그룹에서 선택된 일종 이상의 아미노산을 포함하는 안정화제가 용액 상에서 에타너셉트의 안정화에 현저히 효과가 있음을 제공하고 있으며, 이를 통해 본 발명을 완성하였다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0011] 본 발명의 하나의 목적은 TNFR(tumor necrosis factor receptor) 또는 이의 단편 및 면역글로불린 Fc 영역을 포함하는 융합 단백질인 TNFR-Fc 융합 단백질 및 안정화제를 포함하며, 상기 안정화제는 프롤린 및 히스티딘으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산, 완충 용액, 및 바람직하게는 염화나트륨(NaCl)과 슈크로스(Sucrose)를 함유하는 등장화제를 포함하는 것인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 안정화 액상 제제를 제공하

는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 액상 제제를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

[0013] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 TNFR(tumor necrosis factor receptor) 또는 이의 단편 및 면역글로블린 Fc 영역을 포함하는 융합 단백질인 TNFR-Fc 융합 단백질 및 안정화제를 포함하며, 상기 안정화제는 프롤린 및 히스티딘으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산, 완충 용액, 및 염화나트륨(NaCl)과 수크로즈(Sucrose)를 포함하는 등장화제를 함유하는 것인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제를 제공한다.

[0014] 상기 TNFR 또는 이의 단편 및 면역글로블린 Fc 영역을 포함하는 융합 단백질은 에타너셉트(Etanercept, recombinant p75 sTNFR-Fc fusion protein)일 수 있으며, 특히 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 것일 수 있다. 또한, 상기 융합 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 아미노산 치환, 제거 또는 삽입 등에 의해 변이된 융합 단백질 또는 에타너셉트와 유사한 활성을 나타내는 펩타이드 유사체일 수 있다. 본 발명의 액상 제제는 프롤린 및 히스티딘으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산 또는 이들의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하여 TNFR-Fc 융합 단백질(에타너셉트)의 부산물 형성을 감소시켜 이의 활성을 안정하게 장기간 유지하는 안정화한 액상 제제 또는 안정한 액상 제제이다.

[0015] 본 발명에서 용어, "TNFR 또는 이의 단편 및 면역글로블린 Fc 영역을 포함하는 융합 단백질"은 종양괴사인자 수용체(tumor necrosis factor receptor, TNFR) 또는 이의 단편과 면역글로블린 Fc 영역이 융합된 재조합 단백질을 의미하며, 특히 상기 면역글로블린 Fc 영역은 IgG1의 면역글로블린 Fc 영역에서 유래한 것일 수 있다. 바람직하게는 상기 융합 단백질은 에타너셉트일 수 있으며, 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 것일 수 있다.

[0016] 본 발명에서 용어 "에타너셉트(Etanercept, recombinant p75 sTNFR:Fc fusion protein)"는, 수용성의 인간 75 킬로달톤(p75) TNF 리셉터와 인간 면역글로블린 G(IgG) 서브클래스 1의 Fc 부위가 결합된, 융합 단백질 2개가 이황화 결합으로 연결된 동형이량체의 형태를 갖는 단백질을 의미한다.

[0017] 보다 구체적으로, 수용성의 인간 p75 TNF 리셉터의 세포외 리간드-결합 부위와 인간 IgG1의 Fc 부위가 결합된 융합 단백질 2개가 3개의 이황화결합으로 연결된 동량 이형체의 형태를 갖는다. 상기 에타너셉트의 Fc 부위는 CH2 도메인, CH3 도메인 및 힌지 영역으로 구성되고, IgG1의 CH1 도메인은 포함하지 않는다. 상기 에타너셉트는 약 150kD의 분자량을 가질 수 있다. 또한, 에타너셉트는 현재 상표명 ENBREL<sup>®</sup> (Amgen Inc., Thousand Oaks, CA)하에 시판되는 것으로서, CAS number 185243-69-0인 것일 수 있다.

[0018] 본 발명의 TNFR 또는 이의 단편 및 면역글로블린 Fc 영역을 포함하는 융합 단백질, 특히 에타너셉트는 세포 발현 시스템에서 재조합 DNA 기술에 의해 제조될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0019] 본 발명의 에타너셉트는 체내에서 TNF-α 리셉터의 세포 표면과 TNF-α가 결합하는 것을 경쟁적으로 저해하여, TNF-α와 관계된 면역반응을 억제하는 역할을 하는 생물학적 조절체로서, 류마티스 관절염, 건선, 강직성 척추염 등에 사용되고 있으며, 혈관염, 알츠하이머병 및 크론병에 적용하기 위한 임상 연구가 현재 진행 중에 있다.

[0020] 본 발명의 액상 제제에서 TNFR 또는 이의 단편 및 면역글로블린 Fc 영역을 포함하는 융합 단백질, 특히 에타너셉트는 약학적 유효량으로 포함될 수 있으며, 1 내지 100 mg/mL의 양으로 포함될 수 있고, 바람직하게는 20 내지 55 mg/mL로 포함될 수 있고, 더 바람직하게는 30 내지 55 mg/mL의 농도로 포함될 수 있다.

[0021] 본 발명에서 용어 "안정화한 액상 제제" 및 "안정한 액상 제제"은 제형 중의 치료학적 유효성분인 본 발명의 융합 단백질, 특히 에타너셉트를 용액 상태로 저장시에 본질적으로 이의 물리적 및 화학적 동일성, 및 완전성을 보유하는 제형을 지칭한다. 본 발명의 융합 단백질, 특히 에타너셉트의 안정성을 측정하기 위한 각종 분석 기술은 당해 분야에서 널리 알려진 단백질 안정성 분석법이 이용될 수 있다. 안정성은 선택된 시간 동안에 선택된 온도에서 측정할 수 있다. 신속한 시험을 위해, 제형은 보다 높은 또는 "가속화된" 온도, 예를 들면, 2주 내지 1개월 이상 동안 40°C에서 보관할 수 있으며, 이 시점에서 시간 안정성을 측정한다.

[0022] 본 발명에서 용어 "안정화제"는 제형 중의 생물학적 분자 및/또는 일반적인 약학적 부형제와 상호작용하여 안정



화시키는 특이적 화학적 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 안정화제는 일반적으로 단백질 응집을 초래하는 공기/용액 계면 유도된 스트레스 및 용액/표면 유도된 스트레스로부터 단백질을 보호한다. 본 발명에서 안정화제는 용액상태로 본 발명의 융합 단백질, 특히 에타너셉트를 저장하는 동안에 이의 부산물 형성을 감소시켜 이의 활성을 장기간 유지하게 만드는 성분이다. 바람직하게는, 상기 안정화제는 프롤린 및 히스티딘으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 사용할 수 있다.

- [0023] 본 발명의 아미노산은 L-아미노산 및 D-아미노산을 모두 포함한다.
- [0024] 본 발명의 안정화제에는 상기 프롤린, 히스티딘과 같은 아미노산 뿐만 아니라, 실질적으로 동일한 효능을 나타내는 이들의 유사체, 용매화물, 수화물, 입체 이성질체, 및 이들의 약학적으로 허용가능한 염이 모두 본 발명의 범주 내로 포함할 수 있다.
- [0025] 본 발명에서 용어 "부산물"은 제형 중의 치료학적 유효성분인 TNFR-Fc 융합 단백질(에타너셉트)의 비율을 저하시키거나 감소시키는 목적하지 않는 산물을 의미한다. 전형적 부산물은 TNFR-Fc 융합 단백질(에타너셉트)가 탈아미드화 또는 가수분해 등에 의해 변성되어 생성된 "저분자 생성물", 올리고머, 응집체 등의 "고분자 생성물" 또는 이들의 혼합물을 포함한다.
- [0026] 본 발명에서 용어 "고분자 생성물"은 변성 등에 의해 후속적으로 응집되는 TNFR-Fc 융합 단백질(에타너셉트)의 단편(예를 들면, 탈아미드화 또는 가수분해에 의한 폴리펩타이드의 분해에 의해 생산됨) 또는 이들의 혼합물을 포함한다. 전형적으로, 고분자 생성물은 치료학적 단량체 형태의 TNFR-Fc 융합 단백질(에타너셉트)보다 큰 분자량을 갖는 복합체로, 이들은 약 150 kDa을 초과하는 분자량을 가질 것이다.
- [0027] 본 발명에서 용어 "저분자 생성물"은 예를 들면, 탈아미드화 또는 가수분해에 의해 생성된 치료학적 폴리펩타이드, 즉 TNFR-Fc 융합 단백질(에타너셉트)의 단편을 포함한다. 전형적으로, 저분자 생성물은 치료학적 단량체 형태의 TNFR-Fc 융합 단백질(에타너셉트)보다 적은 분자량을 갖는 복합체로, 이들은 약 150 kDa 미만의 분자량을 가질 것이다.
- [0028] 본 발명의 액상 제제는 안정화제로서 프롤린 및 히스티딘으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산을 포함한다. 추가적으로 다른 아미노산, 예를 들어 글루탐산이 제제를 안정화하기 위하여 추가될 수 있다. 바람직하게는, 상기 액상 제제는 안정화제로서 프롤린 또는 히스티딘이 포함되거나, 프롤린 및 히스티딘과 같이 2종의 혼합 아미노산이 모두 포함된 것이다. 상기 조합에는 각각의 프롤린, 히스티딘의 약학적으로 허용가능한 염이 추가로 포함되거나, 프롤린, 히스티딘 각각이 그의 약학적으로 허용가능한 염으로 변경된 형태가 포함될 수 있다. 바람직하게는 안정화제로서 프롤린 및 히스티딘과 같이 혼합 아미노산이 포함된 것이다.
- [0029] 본 발명에서 안정화제에 포함되는 프롤린은 1 내지 10 mM, 바람직하게는 1 내지 9 mM, 더욱 바람직하게는 3 내지 9 mM, 더욱더 바람직하게는 3 내지 6 mM의 농도 범위로 포함될 수 있으며, 히스티딘은 0.01 내지 5 mM, 바람직하게는 0.01 내지 0.1 mM, 더 바람직하게는 0.03 내지 0.1 mM, 더욱 바람직하게는 0.03 내지 0.09 mM, 더욱더 바람직하게는 0.06 내지 0.09 mM의 농도 범위, 또는 가장 바람직하게는 0.09 mM의 농도로 포함될 수 있다. 특히, 안정화제로서 프롤린 및 히스티딘과 같이 혼합 아미노산이 포함될 경우, 프롤린은 1 내지 10 mM, 바람직하게는 1 내지 9 mM, 더욱 바람직하게는 3 내지 9 mM, 더욱더 바람직하게는 3 내지 6 mM의 농도 범위로 포함되고, 히스티딘은 0.01 내지 5 mM, 바람직하게는 0.01 내지 0.1 mM, 더 바람직하게는 0.03 내지 0.1 mM, 더욱 바람직하게는 0.03 내지 0.09 mM, 더욱더 바람직하게는 0.06 내지 0.09 mM의 농도 범위, 또는 가장 바람직하게는 0.09 mM의 농도로 포함되는 것일 수 있다. 글루탐산과 같은 추가적인 아미노산을 1 내지 20 mM, 바람직하게는 5 내지 15 mM, 더욱 바람직하게는 10 내지 15 mM 농도 범위로 추가될 수 있다. 한편 프롤린 및 히스티딘의 혼합물과 포함시킬 경우, 글루탐산은 1 내지 20 mM, 바람직하게는 5 내지 15 mM, 더욱 바람직하게는 10 내지 15 mM 농도 범위로 포함되는 것일 수 있다.
- [0030] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 TNFR-Fc 융합 단백질(에타너셉트) 안정화 액상 제제의 제조에 있어, 기존 에타너셉트의 안정화 제형으로 공지된 아르기닌이 포함된 액상 제제(미국 등록특허 제7,648,702호)보다 우수한 액상 제제 조성을 개발하기 위하여, 아미노산 조합과 등장화제의 조건을 변화시켜 액상 제제를 제조하였고 그들의 안정화 효과를 측정하였다.

- [0031] 그 결과, 프롤린 및 히스티딘으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산을 포함시킨 제제에서 에타너셉트를 고온에서 용액 상태로 저장하는 기간 동안 에타너셉트의 변성을 방지하여 안정화하는 효과가 뛰어난 것을 확인하였다(표 1의 제제 4 및 제제 5, 제제 7 및 제제 8, 표 4의 제제 2 및 제제 3, 표 7의 제제 2 내지 제제 4 및 제제 6 내지 제제 7). 특히, 프롤린과 히스티딘을 포함하는 혼합 아미노산을 포함시킨 제제(표 1의 제제 5 및 제제 8, 표 4의 제제 2 및 제제 3, 표 7의 제제 2 내지 제제 4 및 제제 6 내지 제제 7)에서 대조 제제보다 우월한 안정화 효과를 확인하였다.
- [0032] 즉, 본 발명은 기존 공지되어 있던 단일 또는 혼합 아미노산 안정화제 농도(10 mM 이상)보다 낮은 농도(6.1 mM) 프롤린 및 히스티딘으로 이루어진 그룹에서 선택된 일종 이상의 아미노산을 포함하는 안정화제가 용액 상에서 에타너셉트의 안정화에 현저히 효과가 있음을 최초로 밝혔다.
- [0033] 본 발명에 따른 액상 제제는 프롤린 및 히스티딘으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산을 포함하는 안정화제를 첨가함에 따라 TNFR-Fc 융합 단백질(에타너셉트)의 안정성을 증진시키는 기능을 방해하지 않는 한 항체, 단백질 의약품의 액상 제제에 일반적으로 포함되는 임의의 물질이 추가로 포함될 수 있다.
- [0034] 본 발명에서 용어 "완충 용액"은 제형의 등장성 및 화학적 안정성을 증진시키는 성분으로, 생리학적으로 적합한 pH를 유지하는 작용을 한다. 상기 완충 용액은 TNFR-Fc 융합 단백질(에타너셉트)의 안정화를 위해 액상 제제의 pH가 급격히 변화하는 것을 방지하며, 용액의 pH를 유지시키는 역할을 하고, 그러한 완충제의 바람직한 예로는 시트레이트, 포스페이트, 숙시네이트, 타르트레이트, 푸마레이트, 글루코네이트, 옥살레이트, 락테이트, 아세테이트, 히스티딘, 또는 트리스(Tris) 등의 수용액을 포함하나 이들로 제한되지 않는다. 특정한 양태에서, 완충 용액은 구연산-인산(Citrate-phosphate) 완충 수용액이다. 이러한 완충 용액은 1종 단독으로 사용하거나 2종 이상을 임의로 조합하여 사용할 수도 있다. 상기 완충 용액은
- [0035] 본 발명의 액상 제제는 약 5 내지 약 7.5의 pH 또는 약 5.8 내지 약 6.8의 pH를 가질 수 있다. 특히, 제제는 약 6.0 내지 6.6의 pH를 가질 수 있다. pH는 필요에 따라 당해 분야에 공지된 기술에 의해 조절할 수 있다. 완충 용액은 0.1 내지 100 mM, 바람직하게는 1 내지 50 mM, 더욱 바람직하게는 10 내지 35 mM로 존재한다. 바람직하게는, 본 발명의 완충 수용액은 주사용수를 사용될 수 있다.
- [0036] 본 발명에서 용어 "등장화제"는 부분적으로, 제제의 등장성을 유지하고 단백질 수준을 유지시키는데 기여하고, 부분적으로, 제제 중에 존재하는 치료학적 활성 폴리펩타이드의 수준, 비 또는 비율을 보존하는데 기여하는 성분을 지칭한다. 등장화제 용액은 혈중 혈장과 동일한 삼투압을 유지하고, 따라서 피험체의 혈중 혈장의 삼투압을 변화시키지 않으면서 피험체에게 정맥 내 주입될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 하나의 양태에서, 삼투압은 본 발명의 제제가 정맥 내 주입에 적합하도록 제조된다. 흔히, 등장화제는 벌킹제(bulking agent)로서도 작용한다. 이와 같이, 등장화는 단백질이 동결 및 전단력과 같은 다양한 스트레스를 극복할 수 있게 한다.
- [0037] 상기 등장화제는 TNFR-Fc 융합 단백질(에타너셉트)을 수용액상으로 체내에 투여할 때 체내에서 적절하게 삼투압을 유지하는 역할을 한다. 그러한 등장화제의 예로는 통상적으로 사용되는, 염화나트륨, 염화칼륨, 붕산, 붕산 나트륨, 만니톨, 글리세린, 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 말토스, 수크로스, 에리스리톨, 아라비톨, 자일리톨, 소르비톨, 포도당 등을 사용할 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들 등장화제는 1종 단독으로 사용하거나 2종 이상을 임의로 조합하여 사용할 수도 있다. 본 발명에서 등장화제는 특히 염화나트륨과 수크로스를 포함하는 것일 수 있다. 본 발명의 등장화제는 용액의 삼투압을 250 내지 350 mOsm으로 유지하는 것일 수 있으며, 바람직하게는 1 내지 1000 mM의 염화나트륨 및/또는 0.01 내지 3%의 수크로스를 포함하는 것일 수 있고, 더 바람직하게는 50 내지 250 mM의 염화나트륨 및/또는 0.01 내지 1.5%의 수크로스를 포함하는 것일 수 있으며, 보다 더 바람직하게는 105 내지 150 mM의 염화나트륨 및/또는 0.01 내지 1.5%의 수크로스를 포함하는 것일 수 있다. 본 발명의 제제에 염화나트륨 및 수크로스를 사용할 경우, 염화나트륨 농도는 1 내지 1000 mM, 바람직하게는 50 내지 250 mM, 더 바람직하게는 100 내지 150 mM, 더욱 바람직하게는 105 내지 150 mM, 더욱더 115 내지 140 mM, 가장 바람직하게는 115 내지 130 mM일 수 있으며, 본 발명 제제의 수크로스의 양은 총 제제의 0.01 내지 3 중량%, 바람직하게는 0.01 내지 1.5 중량%, 더욱 바람직하게는 0.1 내지 1.0 중량% 범위일 수 있으며, 더욱더 바람직하게는 본 발명 제제의 수크로스의 양은 0.1 중량%, 0.5 중량% 및 1.0 중량% 중에서 선택될 수 있다.

- [0038] 본 발명의 구체적인 일 양태에서, 본 발명의 액상 제제에 등장화제로 염화나트륨과 수크로스를 사용하였으며, 115 mM 염화나트륨과 1.0 % 수크로스를 포함하는 제제(표 1의 제제 1 내지 제제 5) 또는 115mM 염화 나트륨과 0.5 수크로스를 포함하는 제제(표 7의 제제 1 내지 와 제제 4)와 140 mM 염화나트륨과 0.1 % 수크로스를 포함하는 제제(표 1의 제제 6 내지 제제 8) 또는 130mM 염화 나트륨과 0.1% 수크로즈 포함하는 제제(표 7의 제제 5 내지 제제 7)를 제조하여, 이들의 안정화 효과를 대조 제제 (100 mM의 염화나트륨, 1.0 % 수크로즈)와 비교 측정하였다
- [0039] 그 결과, 기존 에타너셉트의 제제 조성과 비교하여 그 조성 농도가 변경된 수크로즈와 염화나트륨의 등장화제를 사용하고 있는 본 발명 제제에 있어 조성 농도가 변경된 등장화제로 인하여 염화 나트륨이 증가되고 수크로즈가 감소된 제제들에서 에타너셉트의 안정성이 개선되어짐을 확인할 수 있었다.
- [0040] 본 발명에 따른 액상 제제는 추가로 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함할 수 있으며, 부형제로서 당알콜류 (Sugars and Polyols), 계면활성제(Surfactants), 고분자(Polymes) 등을 포함할 수 있다. 당알콜류는 수크로스, 트레알로스, 락토스, 말토스, 갈락토스, 만니톨, 솔비톨, 글리세롤 등이 사용될 수 있으며, 계면활성제로는 폴리솔베이트 20, 폴리솔베이트 80, 폴록사머 등의 비이온 계면활성제가 사용될 수 있고, 고분자로는 텍스트란, 폴리에틸렌글리콜, 카르복실메틸셀룰로스, 히아루론산, 사이클로덱스트린 등이 사용될 수 있다.
- [0041] 본 발명에 따른 액상 제제는 추가로 보존제를 포함할 수 있다. 상기 보존제는 항균제로서 작용하기 위해 제약 제제에 첨가되는 화합물을 의미하는데, 이러한 보존제로 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄, 클로로헥시딘, 페놀, m-크레졸, 벤질 알코올, 메틸파라벤, 프로필파라벤, 클로로부탄올, o-크레졸, p-크레졸, 클로로크레졸, 페닐수은산 질산염, 티메로살, 벤조산 등을 사용할 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들 보존제는 1종 단독으로 사용하거나 2종 이상을 임의로 조합하여 사용할 수도 있다.
- [0042] 본 발명에서 액상 제제는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 약리학적 유효량의 TNFR-Fc 융합 단백질("에타너셉트", "etanercept") 및 안정화제를 포함하며, 상기 안정화제는 구연산-인산 완충 용액, 염화나트륨, 수크로즈, 및 프롤린과 히스티딘으로 이루어진 혼합 아미노산을 포함하는 것인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 안정화 액상 제제일 수 있으며, 특히 본 발명의 액상 제제는 30 내지 55 mg/mL의 TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하고, 10 내지 35 mM 구연산-인산 완충 용액, 105 내지 125 mM NaCl, 0.5 내지 1.5 % 수크로즈, 1 내지 9 mM 프롤린 및 0.01 내지 0.1 mM 히스티딘을 포함하며, pH가 6.3이거나; 30 내지 55 mg/mL의 TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하고, 10 내지 35 mM 구연산-인산 완충 용액, 120 내지 150 mM NaCl, 0.01 내지 0.5 % 수크로즈, 1 내지 9 mM 프롤린 및 0.01 내지 0.1 mM 히스티딘을 포함하며, pH가 6.3인 액상 제제일 수 있다.
- [0043] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 대표적인 조성으로 하기 액상 제제가 제공되었다.
- [0044] - 50 mg/mL의 TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하고, 25 mM 구연산-인산 완충 용액, 115 mM NaCl, 0.5 % 수크로즈, 6 mM 프롤린 및 0.09 mM 히스티딘을 포함하며, pH가 6.3인, 액상 제제(표 7의 제제 3).
- [0045] - 50 mg/mL의 TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하고, 25 mM 구연산-인산 완충 용액, 130 mM NaCl, 0.1 % 수크로즈, 6 mM 프롤린 및 0.09 mM 히스티딘을 포함하며, pH가 6.3인, 액상 제제(표 7의 제제 7).
- [0046] - 50 mg/mL의 TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하고, 25 mM 구연산-인산 완충 용액, 100 mM NaCl, 1.0 % 수크로즈, 10 mM 프롤린, 5 mM 히스티딘 및 10 mM 글루탐산을 포함하며, pH가 6.3인, 액상 제제(표 1의 제제 10).
- [0047] 본 발명의 제제는 에타너셉트가 치료할 수 있는 질병의 치료제로 사용될 수 있다. 에타너셉트는 체내에서 TNF- $\alpha$ 와 관계된 면역반응을 억제하는 역할을 하는 생물학적 조절제로 작용할 수 있으므로, 본 발명의 제제는 류마티스 관절염, 건선, 강직성 척추염, 혈관염, 알츠하이머병 또는 크론병 등에 사용될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0048] 본 발명에 따른 제제는 경구 투여, 또는 피하, 근육내, 복강내, 흉골내, 경피, 및 정맥내 주사 및 주입을 포함

하는 비경구 투여에 의해 체내에 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0049] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 액상 제제의 제조방법을 제공한다.
- [0050] 본 발명의 액상 제제는 에타너셉트를 제조하는 단계; 및 상기 단계에서 제조된 에타너셉트를 프롤린 및 히스티딘으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산, 완충 용액, 및 바람직하게는 염화나트륨(NaCl)과 수크로스(Sucrose)를 포함하는 등장화제를 함유하는 안정화제와 혼합하는 단계를 통하여 제조할 수 있다. 상기 설명한 제조 방법에서, 혼합하는 단계는 상기 제조된 에타너셉트 용액을 안정화제 포함 용액으로 교환하는 것을 포함하는 것일 수 있다.
- [0051] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 액상 제제를 포함하는 TNF- $\alpha$  활성이 유해한 장애의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0052] 상기 액상 제제는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0053] 본 발명에서 용어, "TNF- $\alpha$  활성이 유해한 장애"는 장애를 앓는 환자내 TNF  $\alpha$ 의 존재가 장애의 병리학에 관여하는 것으로 밝혀지거나 의심되거나 장애의 악화에 기여하는 인자인 것으로 밝혀지거나 의심되는 질환 및 장애를 포함한다. 본 발명에서 TNF- $\alpha$  활성이 유해한 장애는 패혈증, 자가면역 질환, 특히, 류마티스 관절염, 류마티스 척추염, 골관절염, 통풍관절염, 알레르기, 다발성 경화증, 자가면역 당뇨병, 자가면역 포도막염 및 신장 증후군을 포함하는 염증과 관련된 질환, 감염성 질환, 동종이식 거부 및 이식 대 숙주 질환(GVHD), 악성 암, 폐 장애, 장 장애, 심장 장애 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0054] 본 발명의 조성물을 개체에 투여함으로써, TNF- $\alpha$  활성이 유해한 장애를 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0055] 본 발명에서 용어, "치료"란 본 발명의 조성물의 투여로 TNF- $\alpha$  활성이 유해한 장애의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미하며, "예방"은 상기 조성물의 투여로 TNF- $\alpha$  활성이 유해한 장애의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 상기 예방 또는 치료는 TNF- $\alpha$  활성이 유해한 장애가 발생할 수 있는 임의의 포유동물에 적용이 가능하며, 그 예로 인간 및 영장류 뿐만 아니라, 소, 돼지, 양, 말, 개 및 고양이 등 가축을 제한 없이 포함하나, 바람직하게는 인간일 수 있다.
- [0056] 본 발명에서 "투여"는 어떤 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 조성물들의 투여 경로는 약물이 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비강 내 투여, 폐내 투여, 직장 내 투여 등이 될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 그러나 경구 투여 시, 캡타이드는 소화되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제제화 하는 것이 바람직하다. 바람직하게는 주사제 형태로 투여될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0057] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자와 함께, 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.
- [0058] 또한 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용 가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않고 투여 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 말한다. 경구투여 시에는 결합제, 활택제, 분해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소 및 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장화제 및 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제 및 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 제제는 상술한 바와 같은 약학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여 시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서, 서스펜션, 시럽 및 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 환약, 캡슐 및 서방형 제제 등으로 제제화 할 수 있다.
- [0059] 본 발명의 액상 제제는 치료학적 유효량의 TNFR-Fc 융합 단백질(에타너셉트)을 포함한다. 일반적으로, 그 예로 엔브렐(Enbrel), 에타너셉트의 치료학적 유효량은 1 주당 25 내지 100 mg 정도가 허용 범위이다.

- [0060] 또 하나의 양태로서 본 발명은 상기 액상 제제를 포함하는 조성물을 TNF- $\alpha$  활성이 유해한 장애를 가진 개체에 투여하는 단계를 포함하는, TNF- $\alpha$  활성이 유해한 장애의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0061] 본 발명의 액상 제제를 포함하는 조성물은 고농도의 TNFR-Fc 융합 단백질(에타너셉트)을 장기간 안정적으로 유지할 수 있기 때문에, 장기간 보관이 가능하고 보관 조건을 까다롭게 유지하지 않아도 됨에 따라, TNF- $\alpha$  활성이 유해한 장애의 예방 또는 치료에 널리 사용될 수 있다.
- [0062] 구체적인 제1양태로서, 본 발명은 TNFR(tumor necrosis factor receptor) 또는 이의 단편 및 면역글로블린 Fc 영역을 포함하는 융합 단백질인 TNFR-Fc 융합 단백질, 프롤린, 히스티딘 및 글루탐산으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산, 완충 용액, 및 등장화제를 함유하는 것인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제일 수 있다.
- [0063] 제2양태로서, 본 발명은 상기 제1양태에 있어서 상기 TNFR-Fc 융합 단백질이 에타너셉트(Etanercept)인 것인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제일 수 있다.
- [0064] 제3양태로서, 본 발명은 상기 제1양태에 있어서 상기 TNFR-Fc 융합 단백질이 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 것인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제일 수 있다.
- [0065] 제4양태로서, 본 발명은 상기 제1양태에 있어서 상기 융합 단백질이 서열번호 1의 아미노산 서열에서 아미노산 치환, 제거 또는 삽입 등에 의해 변이된 융합 단백질 또는 에타너셉트와 유사한 활성을 나타내는 펩타이드 유사체인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제일 수 있다.
- [0066] 제5양태로서, 본 발명은 상기 제1양태에 있어서 상기 등장화제가 액상 제제의 삼투압을 280 내지 350 mOsm으로 유지하는 것인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제일 수 있다.
- [0067] 제6양태로서, 본 발명은 상기 제1양태에 있어서 상기 등장화제가 염화나트륨(NaCl)과 수크로스를 포함하는 것인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제일 수 있다.
- [0068] 제7양태로서, 본 발명은 상기 제6양태에 있어서 상기 등장화제는 염화나트륨(NaCl)을 1 내지 1000 mM의 농도로 포함되고, 수크로스를 0.01 내지 3 중량%으로 포함되는 것인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제일 수 있다.
- [0069] 제8양태로서, 본 발명은 상기 제7양태에 있어서 상기 등장화제는 염화나트륨(NaCl)을 105 내지 150 mM 농도로 포함하고, 수크로스를 0.01 내지 1.5 중량%로 포함하는 것인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제일 수 있다.
- [0070] 제9양태로서, 본 발명은 상기 제1양태에 있어서 상기 액상 제제에 포함된 융합 단백질의 농도의 범위가 20 내지 55 mg/mL인 것인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제일 수 있다.
- [0071] 제10양태로서, 본 발명은 상기 제1양태에 있어서 상기 완충 용액은 구연산-인산(Citrate-phosphate) 또는 인산 완충 용액인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제일 수 있다.

- [0072] 제11양태로서, 본 발명은 상기 제1양태에 있어서 상기 완충 용액은 농도의 범위가 10 내지 35 mM인 것인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제일 수 있다.
- [0073] 제12양태로서, 본 발명은 상기 제1양태에 있어서 상기 액상 제제의 pH 범위가 6.0 내지 6.6인 것인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제일 수 있다.
- [0074] 제13양태로서, 본 발명은 상기 제1양태에 있어서 상기 액상 제제는 프롤린을 10 mM 이하의 농도로 포함하거나 히스티딘을 5 mM 이하의 농도로 포함하는 것인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제일 수 있다.
- [0075] 제14양태로서, 본 발명은 상기 제13양태에 있어서 상기 액상 제제는 프롤린을 9 mM 이하의 농도로 포함하거나 히스티딘을 0.1 mM 이하의 농도로 포함하는 것인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제일 수 있다.
- [0076] 제15양태로서, 본 발명은 상기 제1양태에 있어서 상기 제제는 프롤린과 히스티딘의 혼합 아미노산을 포함하는 것인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 지속형 액상 제제일 수 있다.
- [0077] 제16양태로서, 본 발명은 상기 제15양태에 있어서 상기 액상 제제는 프롤린을 1 mM 내지 9 mM의 농도로 포함하고, 히스티딘을 0.1 mM 이하의 농도로 포함하는 것인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제일 수 있다.
- [0078] 제17양태로서, 본 발명은 제16양태에 있어서 상기 액상 제제는 프롤린을 1 mM 내지 9 mM의 농도로 포함하고, 히스티딘을 0.01 mM 내지 0.09 mM의 농도로 포함하는 것인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제일 수 있다.
- [0079] 제18양태로서, 본 발명은 상기 제17양태에 있어서 상기 액상 제제는 프롤린을 6 mM의 농도로 포함하고, 히스티딘을 0.09 mM의 농도로 포함하는 것인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제일 수 있다.
- [0080] 제19양태로서, 본 발명은 상기 제1양태에 있어서 상기 액상 제제는 글루탐산을 1 mM 내지 20 mM의 농도로 추가로 포함하는 것인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제일 수 있다.
- [0081] 제20양태로서, 본 발명은 상기 제19양태에 있어서 상기 액상 제제는 글루탐산을 10 mM 내지 15 mM의 농도로 포함하는 것인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제일 수 있다.
- [0082] 제21양태로서, 본 발명은 p75 sTNFR-Fc 융합 단백질인 약리학적 유효량의 TNFR-Fc 융합 단백질, 구연산-인산 완충 용액, 염화나트륨, 수크로즈, 및 프롤린과 히스티딘을 포함하는 혼합 아미노산을 포함하는, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제일 수 있다.
- [0083] 제22양태로서, 본 발명은 상기 제21양태에 있어서 상기 액상 제제는 30 내지 55 mg/mL의 TNFR-Fc 융합 단백질과 10 내지 35 mM 구연산-인산 완충 용액, 105 내지 120 mM NaCl, 0.5 내지 1.5 % 수크로즈, 1 내지 9 mM 프롤린 및 0.01 내지 0.1 mM 히스티딘을 포함하며, pH가 6.3인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제일 수 있다.

- [0084] 제23양태로서, 본 발명은 상기 제22양태에 있어서 상기 액상 제제는 50 mg/mL의 TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하고, 25 mM 구연산-인산 완충 용액, 115 mM NaCl, 1 % 수크로즈, 6 mM 프롤린 및 0.09 mM 히스티딘을 포함하며, pH가 6.3인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제일 수 있다.
- [0085] 제24양태로서, 본 발명은 상기 제21양태에 있어서 상기 액상 제제는 30 내지 55 mg/mL의 TNFR-Fc 융합 단백질과 10 내지 35 mM 구연산-인산 완충 용액, 120 내지 150 mM NaCl, 0.01 내지 0.5 % 수크로즈, 1 내지 9 mM 프롤린 및 0.01 내지 0.1 mM 히스티딘을 포함하며, pH가 6.3인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제일 수 있다.
- [0086] 제25양태로서, 본 발명은 상기 제24양태에 있어서 상기 액상 제제는 50 mg/mL의 TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하고, 25 mM 구연산-인산 완충 용액, 130 mM NaCl, 0.1 % 수크로즈, 6 mM 프롤린 및 0.09 mM 히스티딘을 포함하며, pH가 6.3인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제일 수 있다.
- [0087] 제26양태로서, 본 발명은 상기 제21양태에 있어서 추가로 글루탐산을 포함하는 것으로, 상기 액상 제제는 30 내지 55 mg/mL의 TNFR-Fc 융합 단백질과 10 내지 35 mM 구연산-인산 완충 용액, 100 내지 150 mM NaCl, 0.1 내지 1.5 % 수크로즈, 5 내지 15 mM 글루탐산, 1 내지 10 mM 프롤린 및 1 내지 10 mM 히스티딘을 포함하며, pH가 6.3인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제일 수 있다.
- [0088] 제27양태로서, 본 발명은 상기 제26양태에 있어서 상기 액상 제제는 50 mg/mL의 TNFR-Fc 융합 단백질과 25 mM 구연산-인산 완충 용액, 100 mM NaCl, 1 % 수크로즈, 10 mM 글루탐산, 10 mM 프롤린 및 5 mM 히스티딘을 포함하며, pH가 6.3인, TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제일 수 있다.
- [0089] 제28양태로서, 본 발명은 a) 에타너셉트를 제조하는 단계; 및 b) a) 단계에서 제조된 에타너셉트를 프롤린 및 히스티딘으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산, 완충 용액, 및 염화나트륨(NaCl)과 수크로즈(Sucrose)를 포함하는 등장화제를 함유하는 안정화제와 혼합하는 단계를 포함하는, 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 TNFR-Fc 융합 단백질을 포함하는 액상 제제의 제조 방법을 제공한다.
- [0090] 제29양태로서, 본 발명은 상기 제28양태에 있어서 상기 b)의 혼합하는 단계는 i) 안정화제, 완충 용액 및 등장화제를 포함하는 용액을 제조하는 단계; 및 ii) 상기 a) 단계에서 제조된 에타너셉트 단백질이 포함된 용액을 상기 i) 단계에서 제조한 용액으로 교환하는 단계를 포함하는 것인, 제조 방법일 수 있다.

### **발명의 효과**

- [0091] 본 발명에 따른 액상 제제는 TNFR-Fc 융합 단백질(에타너셉트)에 대해 장기간 보관이 가능하고 보관 조건을 까다롭게 유지하지 않아도 됨에 따라 우수한 저장 안정성을 제공한다. 이와 같은 본 발명의 액상 제제는 간단한 제제로 우수한 저장 안정성을 나타내어 다른 안정화되거나 동결 건조된 제제에 비해 경제적인 제공이 가능하여, 향후 TNFR-Fc 융합 단백질(에타너셉트)을 이용한 치료에 효과적으로 이용될 수 있을 것이다.

### **도면의 간단한 설명**

- [0092] 도 1은 p75 sTNFR-Fc 융합 단백질(에타너셉트)에 대한 아미노산 서열(서열번호 1)을 나타낸 도이다.  
 도 2는 실시예 3에서 개시하고 있는 바와 같이 4 ℃ (도 2a) 및 25 ℃ (도 2b)에서 제제 1, 2, 3 및 대조군을 시차주차 열량법을 통해 측정된 그래프를 나타낸 도이다.

### **발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0093] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위

한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0094] **실시예 1: 에타너셉트(Etanercept) 액상 제제의 제조**

[0095] TNFR-Fc 융합 단백질인 에타너셉트(Etanercept, recombinant p75 sTNFR:Fc fusion protein)의 액상 제제의 안정화를 위하여, 아미노산 또는 혼합 아미노산을 안정화제로 이용하거나 등장화제를 조절하여 안정화 효과를 확인하였다. 즉, 프롤린(proline) 또는 프롤린과 히스티딘(histidine)을 혼합하여 안정화제로 사용하거나 등장화제인 NaCl과 Sucrose의 농도를 조절한 액상 제제를 제조하였다.

[0096] 본 발명의 액상제제는 구체적으로, 25 mM 구연산-인산 완충 수용액(Citrate-phosphate)에 안정화제로 아르기닌, 글루탐산, 프롤린, 히스티딘으로 이루어진 그룹에서 선택된 아미노산을 첨가하고, 등장화제로 수크로즈(Sucrose)와 염화 나트륨(NaCl)을 첨가하여 제제 1 내지 제제 10을 제조하였다. 그리고 나서, pH 6.3으로 각각의 pH를 조절한 뒤 TNFR-fc 융합 단백질(에타너셉트)의 농도가 50 mg/mL이 되도록 투석 과정을 거쳐 제제 1 내지 제제 10을 제조하였다. 또한, 대조 액상 제제로 기존 에타너셉트의 제제인 25 mM phosphate 완충액에 등장화제로 25 mM 아르기닌, 100 mM 염화나트륨 및 1.0 % 수크로즈를 첨가한 후 pH를 6.3으로 조절하였다. 그 뒤 에타너셉트의 농도가 50 mg/mL이 되도록 대조 제제를 제조하였다.

[0097] 상기 제조한 액상 제제의 조성은 하기 표 1과 같다.

**표 1**  
액상 제제 조성

[0098]

제제	제제 조성					
	에타너셉트 농도	완충 용액	NaCl 농도	Sucrose 농도	pH	아미노산
제제 1	50 mg/ml	25 mM, Citrate-phosphate	115 mM	1.0 %	6.3	-
제제 2	50 mg/ml	25 mM, Citrate-phosphate	115 mM	1.0 %	6.3	아르기닌 3 mM
제제 3	50 mg/ml	25 mM, Citrate-phosphate	115 mM	1.0 %	6.3	아르기닌 3 mM 히스티딘 0.09 mM
제제 4	50 mg/ml	25 mM, Citrate-phosphate	115 mM	1.0 %	6.3	프롤린 3 mM
제제 5	50 mg/ml	25 mM, Citrate-phosphate	115 mM	1.0 %	6.3	프롤린 3 mM 히스티딘 0.09 mM
제제 6	50 mg/ml	25 mM, Citrate-phosphate	140 mM	0.1 %	6.3	-
제제 7	50 mg/ml	25 mM, Citrate-phosphate	140 mM	0.1 %	6.3	프롤린 3 mM
제제 8	50 mg/ml	25 mM, Citrate-phosphate	140 mM	0.1 %	6.3	프롤린 3 mM 히스티딘 0.09 mM
제제 9	50 mg/ml	25 mM, Citrate-phosphate	100 mM	1.0 %	6.3	글루탐산 15 mM 프롤린 5 mM 히스티딘 5 mM
제제 10	50 mg/ml	25 mM, Citrate-phosphate	100 mM	1.0 %	6.3	글루탐산 10 mM 프롤린 10 mM 히스티딘 5 mM
대조 제제	50 mg/ml	25 mM, phosphate	100 mM	1.0 %	6.3	아르기닌 25 mM



[0099] 실시예 2: 에타너셉트(Etanercept) 액상의 안정성 평가

[0100] 상기 실시예 1에서 제조한 각각의 액상 제제의 안정성을 확인하기 위해, 각각의 제제를 25 °C와 40 °C의 조건에서 1, 2, 4 및 8 주간 보관한 후 크기배제-고성능 액체 크로마토그래피(Size-exclusion High-Performance Liquid Chromatography, SE-HPLC) 및 소수성-고성능 액체 크로마토그래피(Hydrophobic interaction high-performance liquid chromatography, HIC-HPLC)로 에타너셉트의 잔존량을 측정하였다.

[0101] 측정된 결과는 하기 표 2 및 표 3과 같다.

표 2

[0102] SE-HPLC를 이용한 시간에 따른 에타너셉트 순도 측정

	제제	25 °C					40 °C				
		0주	1주	2주	4주	8주	0주	1주	2주	4주	8주
에타너셉트 순도(%) 감소 의 량	1	0.0	-0.3	-0.6	-1.4	-2.3	0.0	-4.1	-7.1	-14.8	-25.4
	2	0.0	-0.2	-0.5	-1.3	-2.1	0.0	-4.0	-6.8	-13.6	-24.2
	3	0.0	-0.2	-0.5	-0.8	-1.6	0.0	-2.5	-5.8	-12.4	-21.2
	4	0.0	-0.3	-0.6	-1.4	-2.4	0.0	-4.1	-7.1	-14.4	-24.8
	5	0.0	-0.2	-0.5	-0.9	-1.9	0.0	-3.5	-5.9	-12.0	-23.4
	6	0.0	-0.2	-0.6	-1.4	-2.3	0.0	-4.1	-6.9	-13.5	-22.4
	7	0.0	-0.2	-0.5	-1.4	-2.0	0.0	-3.8	-6.5	-12.3	-21.0
	8	0.0	-0.1	-0.4	-0.8	-1.6	0.0	-3.3	-5.7	-11.4	-20.3
	9	0.0	-0.1	-0.4	-0.6	-1.5	0.0	-1.7	-4.9	-11.1	-24.0
	10	0.0	-0.1	-0.4	-0.7	-1.3	0.0	-1.9	-5.2	-11.2	-24.6
	대조	0.0	-0.2	-0.5	-1.1	-2.2	0.0	-3.8	-6.6	-13.9	-25.7

표 3

[0103] HIC-HPLC를 이용한 시간에 따른 에타너셉트 순도 측정

	제제	25 °C					40 °C				
		0주	1주	2주	4주	8주	0주	1주	2주	4주	8주
에타너셉트 순도(%) 감소 의 량	1	0.0	-0.2	-0.4	-3.3	-4.3	0.0	-4.8	-7.3	-15.9	-26.5
	2	0.0	-0.2	-0.4	-3.2	-4.2	0.0	-4.7	-7.1	-14.7	-25.6
	3	0.0	-0.4	-0.5	-3.1	-3.9	0.0	-4.6	-6.8	-14.6	-23.8
	4	0.0	-0.2	-0.4	-3.2	-4.3	0.0	-4.8	-7.3	-15.4	-25.8
	5	0.0	-0.3	-0.5	-3.2	-4.0	0.0	-4.6	-6.8	-13.6	-25.7
	6	0.0	-0.2	-0.5	-3.4	-4.4	0.0	-4.7	-7.1	-14.6	-23.4
	7	0.0	-0.1	-0.3	-3.1	-4.3	0.0	-4.7	-6.8	-13.6	-22.5
	8	0.0	-0.2	-0.5	-3.1	-4.1	0.0	-4.7	-6.6	-13.4	-22.5
	9	0.0	-0.2	-0.4	NA	-3.7	0.0	-4.5	-8.4	-14.6	-28.6
	10	0.0	-0.1	-0.4	-3.1	-3.4	0.0	-4.6	-7.3	-15.2	-29.6
	대조	0.0	-0.1	-0.3	-3.4	-4.7	0.0	-5.0	-8.0	-16.4	-29.5

[0104] NA : Not available..

[0105] 상기 표 2와 표 3의 25 °C와 40 °C SE-HPLC와 HIC-HPLC 분석 결과에서 확인할 수 있듯이, 기존 에타너셉트의 제제 조성에서 안정화제로 사용한 아르기닌 단독 조성제제(대조 제제)에 비하여 프롤린과 히스티딘 혼합 아미노산을 사용하는 제제(제제 5, 제제 8)들에서 에타너셉트의 용액 안정성이 개선되는 효과가 있음을 확인하였다.

[0106] 상기 결과를 통하여 프롤린과 히스티딘 혼합 아미노산을 안정화제로 포함한 에타너셉트 액상 제제가 에타너셉트의 변성을 방지하여 장기적으로 활성을 유지할 수 있음을 확인하였으며, 프롤린과 히스티딘 혼합 아미노산을 안

정화제로 사용시 에타너셉트의 용액 안정성이 개선되는 효과가 있음을 확인하였다.

[0107] 또한, 기존 에타너셉트 제제 구성과 비교하여 수크로스와 염화나트륨으로 구성된 등장화제의 구성을 변경하여 제조한 본 발명의 제제들에 있어서 에타너셉트 안정성을 비교해보았을 때, 대조 제제에 비하여 염화나트륨의 농도를 증가시키고 수크로스 농도를 감소시킨 제제에서 에타너셉트의 용액 안정성이 개선되는 효과가 있음을 확인하였다.

[0108] 아울러, 아미노산 안정화제를 넣지 않는 액상 제제(제제 1 및 제제 6)에 비하여 프롤린과 히스티딘의 혼합 아미노산을 안정화제로 사용하는 액상 제제(제제 5 및 제제 8)들에서 에타너셉트의 용액 안정성이 개선되는 효과가 있음을 확인하였다.

[0109] 상기 실험 결과를 종합하면, 에타너셉트 액상 제제에 있어서, 1) 등장화제로 사용하고 있는 염화 나트륨의 농도를 증가시키면서, 수크로스의 농도를 낮추는 것과 2) 프롤린과 히스티딘으로 구성된 혼합 아미노산을 안정화제로 사용하는 것을 통하여 에타너셉트의 용액 안정성이 증가하는 것을 확인하였다. 즉, 상기 1) 또는 2)의 조건을 통해서 기존 에타너셉트 액상 제제보다 에타너셉트의 부산물 생성을 효과적으로 방지하여 에타너셉트의 약리 효능을 장기간 안정하게 보존할 수 있는 지속적인 안정성 개선 효과가 있음을 확인하였다.

[0110] **실시예 3: 혼합 아미노산 조성물 포함 에타너셉트 액상 제제의 장기 보관시 안정성 평가**

[0111] 상기 실시예 1과 실시예 2의 실험을 통하여 안정성 개선이 확인된 프롤린과 히스티딘 및 이들의 혼합 아미노산으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산을 포함하는 조성들에 대하여 6개월 보관 조건 하에서 에타너셉트 액상 제제의 안정성을 측정하였다..

[0112] 구체적으로 25 mM 구연산-인산 완충액에 0.09 mM 히스티딘, 3mM 프롤린 또는 0.09 mM 히스티딘과 3mM 프롤린의 혼합 아미노산을 첨가하고, 등장화제로 1.0% 또는 0.1% 수크로스와 115 mM 또는 130mM 염화 나트륨을 첨가하였다. 그리고 나서, pH 6.3으로 각각의 pH를 조절한 뒤 TNFR-fc 용합 단백질(에타너셉트)의 농도가 50 mg/mL이 되도록 투석 과정을 거쳐 제제 1 내지 제제 3을 제조하였다. 또한, 대조 액상 제제로 25 mM phosphate 완충액에 등장화제로 25 mM 아르기닌, 100 mM 염화나트륨 및 1.0 % 수크로스를 첨가하고, 에타너셉트 또한 포함시킨 후 pH를 6.3으로 조절하였다. 그 뒤 에타너셉트의 농도가 50 mg/mL가 되도록 대조 제제를 제조하였다.

[0113] 상기 제조한 액상 제제의 조성은 하기 표 4와 같다.

**표 4**

장기 보관 액상 제제 조성

[0114]

제제	제제 조성					
	에타너셉트 농도	완충 용액	NaCl 농도	Sucrose 농도	pH	아미노산
제제1	50 mg/ml	25 mM, Citrate-phosphate	115 mM	1.0 %	6.3	아르기닌 3 mM 히스티딘 0.09 mM
제제2	50 mg/ml	25 mM, Citrate-phosphate	115 mM	1.0 %	6.3	프롤린 3 mM 히스티딘 0.09 mM
제제3	50 mg/ml	25 mM, Citrate-phosphate	130 mM	0.1 %	6.3	프롤린 3 mM 히스티딘 0.09 mM
대조제제	50 mg/ml	25 mM, phosphate	100 mM	1.0 %	6.3	아르기닌 25 mM

[0115] 상기 실시 표 4와 같이 제조한 각각의 액상 제제의 안정성을 확인하기 위해 각각의 제제를 4 °C, 25 °C와 40 °C의 조건에서 1, 3 및 6 개월간 보관한 후 (40 °C 조건은 3개월) 크기배제-고성능 액체 크로마토그래피(Size-exclusion High-Performance Liquid Chromatography, SE-HPLC) 및 소수성-고성능 액체 크로마토그래피(Hydrophobic interaction high-performance liquid chromatography, HIC-HPLC)로 에타너셉트의 잔존량을 측정하였다.

[0116] 측정된 결과는 하기 표 5와 표 6과 같다.

표 5

[0117] 안정성 개선 혼합 아미노산 액상 제제들에 대한 SE-HPLC를 이용한 시간에 따른 에타너셉트 순도 측정

에타너셉트 순도 (%)의 감소량	제제	4 °C				25 °C				40 °C		
		0개월	1개월	3개월	6개월	0개월	1개월	3개월	6개월	0개월	1개월	3개월
1		0.0	-0.3	-0.6	-1.4	0.0	-2.1	-5.2	-8.9	0.0	-10.4	-25.2
2		0.0	-0.4	-0.7	-1.4	0.0	-2.2	-6.1	-9.5	0.0	-10.0	-25.3
3		0.0	-0.3	-0.6	-1.4	0.0	-2.2	-5.4	-9.3	0.0	-10.2	-27.9
대조		0.0	-0.4	-0.7	-1.4	0.0	-2.2	-5.6	-9.9	0.0	-12.5	-27.4

표 6

[0118] 안정성 개선 혼합 아미노산 액상 제제들에 대한 HIC-HPLC를 이용한 시간에 따른 에타너셉트 순도 측정

에타너셉트 순도 (%)의 감소량	제제	4 °C				25 °C				40 °C		
		0개월	1개월	3개월	6개월	0개월	1개월	3개월	6개월	0개월	1개월	3개월
1		0.0	-0.2	-0.2	-0.7	0.0	-1.7	-3.8	-8.8	0.0	-9.5	-26.5
2		0.0	-0.2	-0.3	-0.8	0.0	-1.8	-4.3	-8.7	0.0	-8.9	-25.9
3		0.0	-0.3	-0.3	-0.7	0.0	-1.7	-4.3	-9.1	0.0	-9.2	-29.9
대조		0.0	-0.2	-0.2	-0.8	0.0	-1.7	-4.5	-9.9	0.0	-11.8	-28.6

[0119] 또한, 표 4에 설명된 제제들에서 에타너셉트의 열안정성을 측정하고 에타너셉트 단백질이 변성되는 온도를 확인하기 위하여, 시차주차 열량법(Differential scanning calorimetry, DSC)을 통해 에타너셉트의 열분석도(thermogram)를 측정하였다. 도 2에서는 4 °C(도 2a) 또는 25 °C(도 2b) 조건에서 6 개월마다 측정된 각 제제들의 DSC 열분석도를 나타낸다.

[0120] 전이 온도 Tm1, Tm2 및 Tm3와 함께 3개의 열 변성 상태가 분명하게 나타났다. 이는 CH2(Tm2), CH3(Tm3)의 도메인을 포함하고 있는 에타너셉트의 Fc 구성과 세포의 리간드 결합 단백질인 TNFR(tumore necrosis factor receptor; Tm1)에 의한 두 도메인의 존재를 나타낸다 (N. A. Kim et al., Int. J. Pharm., 460(1-2), 108-118, 2014).

[0121] 도 2에서 확인할 수 있듯이, 25 °C에서 아르기닌과 히스티딘 혼합 아미노산을 이용한 제제 1에서는 대조제제나 다른 프롤린과 히스티딘 혼합 아미노산을 사용한 제제들과 비교하여 4 °C(도 2a)에 존재하던 Tm1 및 Tm2의 피크 사이에 존재하던 익곡(valley)이 25 °C(도 2b)에서 사라지는 것을 확인할 수 있다. 이러한 결과는 제제1에서는 에타너셉트의 Fc 구성의 CH2 도메인과 세포의 리간드 결합 도메인(TNFR)의 안정성이 감소하였음을 나타낸다.

[0122] 또한, 상기 표 5와 표 6의 25 °C 와 40 °C SE-HPLC와 HIC-HPLC 분석 결과에서 확인할 수 있듯이, 기존 에타너셉트의 제제 조성에서 안정화제로 사용한 아르기닌 단독 조성제제(대조 제제)에 비하여 프롤린과 히스티딘 혼합 아미노산을 사용하는 제제(제제 2 및 제제 3)에서 에타너셉트의 용액 안정성이 개선되는 효과가 있음을 확인하였다.

[0123] 상기 결과를 통하여 프롤린과 히스티딘 혼합 아미노산을 안정화제로 포함한 에타너셉트 액상 제제가 에타너셉트의 변성을 방지하면서 장기적으로 활성을 유지하고 있음을 확인하였다.

[0124] **실시예 4: 혼합 아미노산 조성 비율에 따른 에타너셉트 액상 제제의 안정성 평가**

[0125] 상기 실시예 1 내지 3에서 기존 에타너셉트의 제제 조성 (아르기닌 단독 조성제제)에 비해 안정성의 개선이 확인된 프롤린과 히스티딘 혼합을 사용하는 제제에 있어 혼합 아미노산 조성 비율에 따른 에타너셉트 액상 제제의 안정성을 확인하기 위해, 혼합 아미노산 조성 비율에 따른 안정성 효과를 확인하였다. 즉, 다양한 농도의 프롤린을 히스티딘을 혼합하여 안정화제로 사용하고, 등장화제인 수크로즈와 염화나트륨의 농도를 조절한 액상 제제를 제조하였다.

[0126] 구체적으로 25 mM 구연산-인산 완충액에 안정화제로 히스티딘의 농도를 0.09mM로 고정하고, 3 mM 내지 9 mM 프롤린을 포함하는 혼합 아미노산을 첨가하고, 등장화제로 0.5% 또는 0.1% 수크로즈와 115 mM 또는 130mM 염화 나트륨을 첨가하였다. 그리고 나서, 그리고 나서, pH 6.3으로 각각의 pH를 조절한 뒤 TNFR-fc 용합 단백질(에타너셉트)의 농도가 50 mg/mL이 되도록 투석 과정을 거쳐 제제 1 내지 제제 5을 제조하였다. 또한, 대조 액상 제제로 25 mM phosphate 완충액에 등장화제로 25 mM 아르기닌, 100 mM 염화나트륨 및 1.0 % 수크로즈를 첨가하고, 50 mg/mL 에타너셉트를 포함시킨 후 pH를 6.3으로 조절하였다. 그 뒤 에타너셉트의 농도가 50 mg/mL가 되도록 대조 제제를 제조하였다.

[0127] 상기 제조한 액상 제제의 조성은 하기 표 7과 같다.

**표 7**

[0128] 프롤린과 히스티딘의 혼합 아미노산 조성 비율에 따른 액상 제제 조성

제제	제제 조성					
	에타너셉트 농도	완충 용액	NaCl 농도	Sucrose 농도	pH	아미노산
제제 1	50 mg/ml	25 mM, Citrate-phosphate	115 mM	0.5 %	6.3	
제제 2	50 mg/ml	25 mM, Citrate-phosphate	115 mM	0.5 %	6.3	프롤린 3 mM 히스티딘 0.09 mM
제제 3	50 mg/ml	25 mM, Citrate-phosphate	115 mM	0.5 %	6.3	프롤린 6 mM 히스티딘 0.09 mM
제제 4	50 mg/ml	25 mM, Citrate-phosphate	115 mM	0.5 %	6.3	프롤린 9 mM 히스티딘 0.09 mM
제제 5	50 mg/ml	25 mM, Citrate-phosphate	130 mM	0.1 %	6.3	
제제 6	50 mg/ml	25 mM, Citrate-phosphate	130 mM	0.1 %	6.3	프롤린 3 mM 히스티딘 0.09 mM
제제 7	50 mg/ml	25 mM, Citrate-phosphate	130 mM	0.1 %	6.3	프롤린 6 mM 히스티딘 0.09 mM
대조제제	50 mg/ml	25 mM, phosphate	100 mM	1.0 %	6.3	아르기닌 25 mM

[0129] 상기 표 7과 같이 제조한 각각의 액상 제제의 안정성을 확인하기 위해, 각각의 제제를 25 °C와 40 °C의 조건에서 2, 4 및 8 주간 보관한 후 크기배제-고성능 액체 크로마토그래피(Size-exclusion High-Performance Liquid Chromatography, SE-HPLC) 및 소수성-고성능 액체 크로마토그래피(Hydrophobic interaction high-performance liquid chromatography, HIC-HPLC)로 에타너셉트의 잔존량을 측정하였다.

[0130] 측정된 결과는 하기 표 8 및 표 9와 같다.

**표 8**

[0131] 프롤린과 히스티딘의 혼합 아미노산 조성 비율 변화에 따른 액상 제제들의 SE-HPLC를 이용한 시간에 따른 에타너셉트 순도 측정

에타너셉트 순도(%) 의 감소 량	제제	25 °C				40 °C			
		0주	2주	4주	8주	0주	2주	4주	8주
1		0.0	-1.3	-2.3	-3.9	0.0	-6.1	-10.9	-19.0
2		0.0	-1.1	-2.0	-3.4	0.0	-5.3	-10.0	-18.0
3		0.0	-1.2	-2.0	-3.4	0.0	-5.2	-10.0	-18.0
4		0.0	-1.3	-2.2	-3.7	0.0	-5.5	-9.9	-18.1
5		0.0	-1.3	-2.4	-4.0	0.0	-5.5	-10.2	-18.0
6		0.0	-1.2	-2.1	-3.6	0.0	-5.5	-10.2	-18.0
7		0.0	-1.2	-2.1	-3.6	0.0	-5.2	-9.7	-17.7
대조		0.0	-1.3	-2.4	-4.0	0.0	-6.3	-11.4	-19.8

표 9

[0132] 프롤린과 히스티딘의 혼합 아미노산 조성 비율 변화에 따른 액상 제제들의 HIC-HPLC를 이용한 시간에 따른 에타너셉트 순도 측정

에타너셉트 순도(%) 의 감소 량	제제	25 °C				40 °C			
		0주	2주	4주	8주	0주	2주	4주	8주
1		0.0	-0.9	-1.6	-3.0	0.0	-5.7	-10.6	-19.0
2		0.0	-0.9	-1.5	-3.1	0.0	-5.3	-10.2	-19.0
3		0.0	-0.8	-1.4	-3.0	0.0	-5.1	-10.0	-17.8
4		0.0	-1.0	-1.6	-2.8	0.0	-5.1	-9.5	-18.2
5		0.0	-0.9	-1.6	-2.9	0.0	-5.6	-10.4	-18.7
6		0.0	-0.8	-1.5	-3.0	0.0	-5.3	-10.1	-18.4
7		0.0	-0.8	-1.5	-3.1	0.0	-5.4	-9.6	-18.0
대조		0.0	-1.1	-1.8	-3.1	0.0	-6.4	-11.4	-20.3

[0133] 상기 표 8과 표 9의 25 °C 와 40 °C SE-HPLC와 HIC-HPLC 분석 결과에서 확인할 수 있듯이, 기존 에타너셉트의 제제 조성에서 안정화제로 사용된 아르기닌 단독 조성제제(대조 제제)에 비하여 프롤린과 히스티딘 혼합 아미노산을 사용하는 제제들에서 에타너셉트의 용액 안정성이 개선되는 효과가 있음을 확인하였다.

[0134] 안정화제로 사용된 혼합 아미노산의 농도 비율에 따른 안정성 개선 효과를 살펴 보았을 때, 115 mM의 염화 나트륨과 0.5% 수크로스를 사용하면서 프롤린의 농도 변화 (3 mM 내지 9 mM)를 주었던 프롤린과 히스티딘 혼합 아미노산 사용 제제들 (제제 2 내지 제제 4)있어서 6 mM 프롤린과 0.09 mM 히스티딘을 혼합한 제제 (제제 3)가 가장 개선된 안정성을 보이고 있음을 확인하였다.

[0135] 상기 결과를 통하여 프롤린과 히스티딘 혼합 아미노산 비율 조성에 있어 6 mM 프롤린과 0.09 mM 히스티딘 혼합 아미노산을 안정화제로 포함한 에타너셉트 액상 제제가 에타너셉트의 변성을 방지하여 장기적으로 활성을 유지할 수 있음을 확인하였다.

[0136] 상기 결과를 종합한 결과, 본 발명은 프롤린과 히스티딘 혼합 아미노산을 안정화제로 포함한 에타너셉트 액상 제제가 변성을 방지하여 장기적으로 활성을 유지할 수 있음을 발견하였으며, 높은 염화나트륨과 낮은 수크로스로 이루어진 등장화제 사용시 에타너셉트의 용액 안정성이 개선되는 효과가 있음을 확인하였다.

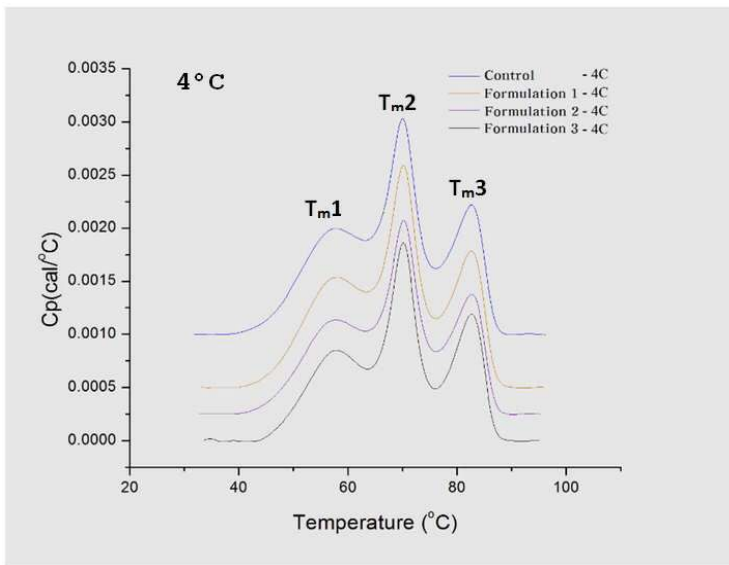
[0137] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있음을 이해할 수 있다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 제한적인 것이 아닌 것으로 이해하여야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 상세한 설명보다는 후술되는 특허 청구범위의 의미 및 범위, 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

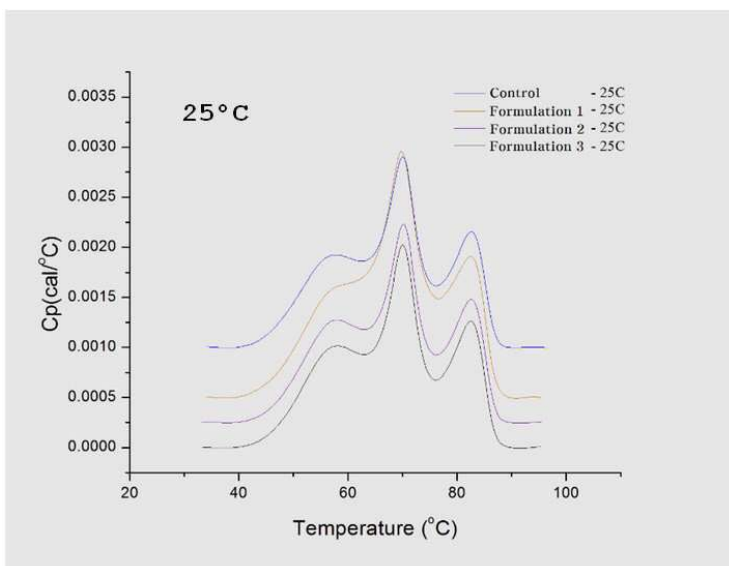
도면1

LPAQVAFPTY	APEPGSTCRL	REYDQTAQM	CCSKCSPGQH	AKVFCTKTS	TVCDSCEDST	60
YTQLWNWVPE	CLSCGSRCS	DQVETQACTR	EQNRICTRCP	GWYCALSKE	GCRLCAPLRK	120
CRPGFVARP	GTETSDVVCK	PCAPGTFSDT	TSSTDICRPH	QICNVVAIPG	DASMDAVCTS	180
TSPTRSMAPG	AVHLPQPVST	RSQHTQPTPE	PSTAPSTSFL	LPMPGSPPAE	GSTGDEPKSC	240
DKTHTCPPCP	APELLGGPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSHED	PEVKFNWYVD	300
GVEVHNAKTK	PREEQYDSTY	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	CKVSNKALPA	PIEKTISKAK	360
GQPREPQVYV	LPPSREEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPVLDS	420
DGSFFLYSKL	TVDKSRWQGG	NVFSCSVMHE	ALHNHYTKS	LSLSPG		

도면2a



도면2b



서열목록

- <110> HANWHA CHEMICAL CORPORATION
- <120> A liquid formulation of a fusion protein comprising TNFR  
and Fc region
- <130> PA131139KR-P1
- <150> KR10-2013-0148028
- <151> 2013-11-29
- <160> 1
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 466
- <212> PRT
- <213> Etanercept aa
- <400> 1

Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser  
 1                    5                    10                    15  
 Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys  
                          20                    25                    30  
 Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr  
                          35                    40                    45  
 Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu  
                          50                    55                    60  
 Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser  
                          65                    70                    75                    80  
 Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys  
                          85                    90                    95  
  
 Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys  
                          100                    105                    110  
 Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala  
                          115                    120                    125  
 Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro  
                          130                    135                    140  
 Gly Thr Phe Ser Asp Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His  
                          145                    150                    155                    160

Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asp Ala Ser Met Asp Ala

165 170 175

Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val

180 185 190

His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr

195 200 205

Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly

210 215 220

Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp Glu Pro Lys Ser Cys

225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asp Ser Thr Tyr

305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser

370 375 380

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

385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro



405 410 415  
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
420 425 430  
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
435 440 445  
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
  
450 455 460  
Pro Gly  
465