(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.[6]
C07K 1/00

(11) 공개번호 특1999-0045460
(43) 공개일자 1999년06월25일

(21) 출원번호 10-1998-0049921
(22) 출원일자 1998년11월20일
(30) 우선권주장 97120528.1 1997년11월22일 EPO(EP)
98102846.7 1998년02월19일 EPO(EP)
(71) 출원인 베링거 만하임 게엠베하 포케어 헤르베르트
독일 데-68305 만하임 잔트호퍼 슈트라쎄 116베링거 만하임 게엠베하 베버 만프레트
독일 데-68305 만하임 잔트호퍼 슈트라쎄 116
(72) 발명자 헬러브란트 클라우스
독일 데-82269 겔텐도르프 존넨스트라세 5
파파디미트리오우 아폴론
독일 데-83673 비클 바하스트라세 38아
빈터 게르하르트
독일 데-69221 도센하임 얀스트라세 20에
(74) 대리인 김창세, 장성구

심사청구 : 있음

(54) 개선된 단백질 안정화 방법

요약

단백질의 완충된 수용액이 완충 물질로서 칼륨 포스페이트 완충액을 함유하고 용액 중의 칼륨 대 나트륨 이온의 비가 10:1 이상인 것을 특징으로 하는, 단백질의 완충된 수용액을 냉동시키고 해동시키고 주입량의 분획으로 분할시키는, 단백질의 약학 조성물의 재구성된 동결건조물에서 단백질 응집체의 형성을 방지하는 개선된 방법은 약학 조성물의 안정한 동결건조물을 제조하는데 유리하게 사용될수 있다.

대표도

도1

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 여러 완충액 및 염 용액의 공융점의 측정을 나타낸다.

도 2는 포스페이트 완충액을 냉동하는 동안 pH 값의 이동을 나타낸다.

도 3은 전단 또는 냉동/해동 응력후 여러 완충 용액(A, B, C) 중의 항체(L-셀렉틴에 대한)의 용액의 입자 형성을 나타낸다.

A: 10 mmol/l KP, 150 mmol/l NaCl, pH 7 중의 Ab, B: 100 mmol/l KP, pH 7.2 중의 Ab, C: 100 mmol/l KP, 0.01 중량%의 트윈(등록상표(Tween)) 80, pH 7.2 중의 Ab;

a: 원심분리된 (출발 물질); b: 전단 응력후(30초 볼텍스); c: 6회의 냉동/해동 사이클후(-20℃).

도 4는 전단 또는 냉동/해동 응력후 여러 완충 용액(A, B, C) 중의 HBV에 대한 항체의 용액의 입자 형성을 나타낸다.

A: 10 mmol/l KP, 30 mmol/l NaCl, pH 6.5 중의 Ab, B: 100 mmol/l KP, pH 7.2 중의 Ab, C: 100 mmol/l KP, 0.01 중량%의 트윈(등록상표) 80, pH 7.2 중의 Ab.

도 5는 0℃ 미만의 온도에서 저장후 단백질 용액(실시예 3에 따른 인간 IgG) 중의 가용성 응집체의 크기 배제 HPLC 분석을 나타낸다.

A: 10 mmol/l KP, 150 mmol/l NaCl, pH 7.0 중의 Ab, B: 100 mmol/l KP, pH 7.2 중의 Ab.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 냉동 또는 동결 건조 방법에서 또는 저온 저장동안 단백질을 안정화하는 개선된 방법에 관한 것이다.

효소 또는 항체뿐만 아니라 이의 단편과 같은 단백질은 저온(0℃ 미만)에서 저장시, 특히 반복된 냉동 및 해동 방법에서 불안정하고 활성을 잃고/거나 수용액에서 가용성 또는 불용성 응집체를 형성하기 쉽고, 이들 응집체는 혼탁물로서 입자 형성에 의해 분명해진다. 그러나, 이런 응집체 및/또는 입자 형성은 단백질의 약학 조성물의 경우 허용될수 없거나 또는 적어도 단지 미량만이 허용된다. 약학 조성물은 투명한 용액이어야 하고, 이것이 동결건조물로서 존재하면 이것은 또한 재구성시 가용성 단백질 응집체가 없는 투명한 입자-없는 용액을 생성해야만 한다.

수많은 방법 및 첨가제가 용액 중의 단백질의 안정화에 대해 공지되어 있다. 예를 들면 HSP25와 같은 열-충격 단백질의 첨가에 의한 단백질의 안정화는 예를 들면 유럽 특허 출원 제 0 599 344 호에 기술되어 있다. 폴리옥시 프로필렌 및 폴리옥시 에틸렌으로 구성된 블록 공중합체의 첨가 및 인지질에 의한 항체의 안정화는 유럽 특허 출원 제 0 318 081 호에 기술되어 있다. 유럽 특허 출원 제 0 025 275 호는 아르기닌, 구아니딘 또는 이미다졸과 같은 질소를 함유한 염기성 물질의 염의 첨가에 의한 면역 글로불린의 안정화를 기술한다. 안정화를 위한 다른 적합한 첨가제는 폴리에테르(유럽 특허 출원 제 0 018 609 호), 글리세린, 알부민 및 덱스트란 설페이트(미국 특허 제 4,808,705 호), 트윈(등록상표) 20과 같은 세제(독일 특허 제 26 52 636 호, 영국 특허 제 8514349 호), GroEL과 같은 샤프롱(Chaperone)(멘도자(Mendoza)의 문헌[J.A. Biotechnol. Tech. 10(1991) 535-540]), 시트레이트 완충액(제 WO 93/22335 호) 또는 킬레이트제(제 WO 91/15509 호)이다. 이들 첨가제가 단백질을 수용액에서 어느 정도 안정화시킬수 있지만, 종래 분야에서 공지된 어떠한 방법도 재해동하는 동안, 0℃ 미만의 온도에서 저장하는 동안 또는 용액이 동결 건조후 재구성될때 가용성 또는 불용성 응집체가 형성되지 않거나 또는 약학적인 목적을 위해 단지 무시할수 있는 양만이 형성되도록 반복된 냉동 및 해동 방법동안 단백질을 안정화하는데 적합하지 않다는 것이 밝혀졌다.

유럽 특허 출원 제 0 314 095 호에서 완충 물질로서 히스티딘 완충액 및 첨가제로서 염화 칼슘을 함유하고 높은 이온 강도(0.35 내지 1.2 몰/l의 NaCl)로 존재하는, VIII 인자와 같은 혈장 단백질의 동결건조물이 기술되어 있다.

0.5 내지 15 mmol/l의 염화 나트륨 또는 염화 칼륨, 및 완충 이온으로서 0.01 내지 10 mmol/l의 라이신 하이드로클로라이드 및 0.2 내지 5 mmol/l의 히스티딘을 함유한, VIII 인자와 같은 혈장 단백질의 동결건조물은 유럽 특허 출원 제 0 315 968 호에 기술되어 있다. 그러나, 히스티딘 완충액은 단백질을 안정화하고 단백질의 동결건조물이 재구성될때 응집체 및 입자 형성을 방지하는데 적합하지 않다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 단백질의 약학 조성물의 동결건조물이 재구성될때 응집체 및 입자 형성을 실질적으로 방지할수 있는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

따라서, 본 발명의 목적은 단백질의 약학 조성물의 동결건조물이 재구성될때 응집체 및 입자 형성을 실질적으로 방지할수 있는 방법을 제공하는 것이다.

따라서, 본 발명은 단백질의 완충된 수용액을 냉동하고, 해동하고, 주입량의 분획으로 나누고 이들 분획을 동결 건조하고, 단백질의 완충된 수용액이 완충 물질로서 칼륨 포스페이트 완충액을 함유하고, 용액 중의 칼륨 대 나트륨 이온의 비가 10:1 이상인 것을 특징으로 하는, 단백질, 바람직하게는 항체의 약학 조성물의 용액에서 단백질 응집체의 형성을 방지하는 개선된 방법에 관한 것이다. 완충 수용액은 바람직하게는 필수적으로 나트륨 이온을 함유하지 않는다.

본 발명은 단백질, 특히 항체와 같은 것을 이량화 또는 다량화하는 경향을 갖는 단백질의 약학 조성물을 중성 pH 범위(pH 6 내지 8, 바람직하게는 pH 6.5 내지 7.5)에서 안정한 약학 조성물로 배합될수 있게 한다. 특히 용액이 한번 또는 여러번 냉동(선택적으로 동결 건조)되고 다시 해동되면 항체와 같은 단백질은 중성 pH 범위에서 응집하는 경향이 있다.

약학 조성물은 나트륨 이온의 최소로 가능한 수가 약학 조성물에 존재하고, 10 내지 300 mmol/l, 바람직하게는 50 내지 250 mmol/l의 완충액 농도의 6 내지 8의 pH 범위의 칼륨 포스페이트 완충액에서 특히 유리하다. 용액 중의 칼륨 대 나트륨 이온의 적합한 비는 10:1 이상이다. 칼륨 포스페이트 완충액이 약학 조성물에서 완충 물질로서 단독으로 사용되고 나트륨 염(예를 들면 염화 나트륨과 같은 것)이 첨가되지 않는 것이 특히 바람직하다. 이런 경우에서 대개 나트륨 이온은 약학 조성물에 존재하지 않거나, 또는 반복된 냉동 또는 해동동안 단백질의 응집체를 형성하지 않는 낮은 양으로만 약학 조성물에 함유된다.

제조 방법동안 한번 이상 냉동된 단백질 용액의 동결건조물은 이어서 칼륨 포스페이트 완충액이 완충 물질로서 사용되면 혼탁물을 형성하지 않고 실질적으로 재구성될수 있다는 것이 증명되었다. 나트륨 포스페이트 완충액, 히스티딘 완충액 또는 시트레이트 완충액과 같은 일반적인 완충액은 이런 방법에서 주로 단백질로 구성된 응집체를 형성시키고 따라서 또한 상당한 정도로 혼탁물을 생성한다. 냉동된 단백질 용액은 약 -15℃ 미만으로 이미 완전하게 냉동되었고, 약 -15℃ 이상의 공융점을 갖고, 따라서 상기 온도 또는 더 낮은 온도, 바람직하게는 예를 들면 -20℃에서 이미 저장될수 있다. 용액이 공융 온도 미만에만 완전하게 냉동되기 때문에, 이것은 나트륨 이온을 함유한 포스페이트 완충액 중의 단백질에 나트륨 이온이 없는 완충액 또는 나트륨 이온 농도가 매우 낮은 완충액에서보다 냉동 저장동안(일반적으로

-20℃에서) 및 냉동/해빙 방법동안 더 높은 응력이 가해진다는 것을 의미한다. 본 발명에 따르면, 이 응력은 응집체 및 입자 형성을 억제시키는 상기 언급된 배합물에서 피해진다. 이 배합물은 비용을 절약할 수 있는 -20℃에서 단백질 용액의 안정한 저장을 가능하게 한다. 나트륨 포스페이트 완충액과는 달리 칼륨 포스페이트 완충액은 냉동 방법동안 단지 약간의 pH 이동(바람직하게는 ± 1 pH 단위 이하, 특히 바람직하게는 ± 0.5 pH 단위 이하)을 갖는다.

포스페이트 완충액의 농도는 효과적으로 입자 형성을 방지하기 위해 10 mol/l 이상, 바람직하게는 약 50 mmol/l 이상이어야 한다고 밝혀졌다. 삼투 몰농도가 너무 높지 않아야 하기 때문에(이것은 약학 조성물에서(즉, 바람직하게는 재구성된 용액에서) 재구성후 유리하게는 생리학적인 범위, 바람직하게는 약 300mOsm(± 20 mOsm, 100 내지 500 mOsm의 범위가 또한 적합하다)), 완충 물질의 농도 또는 선택적으로 완충 물질 및 염의 합은 250 내지 300 mmol/l 이하이어야 한다. 완충액 농도는 바람직하게는 분획에서 50 내지 250 mmol/l이다. 그러나, 더 높은 농도의 완충 물질 및/또는 염도 분획을 제조하기 위해 사용되는 용액(벌크웨어(bulkware))의 제조에서 허용된다.

염 첨가제가 특히 이온 강도를 조절하기 위해 약학 조성물에서 바람직하다면, 본 발명에 따르면 또한 나트륨 염을 사용하지 않거나 또는 칼륨 이온의 농도보다 실질적으로 더 낮은 나트륨 이온의 농도를 선택하는 것이 유리하다. 따라서, 다르게는 일반적인 염화 나트륨 대신 염화 칼륨과 같은 칼륨 염을 첨가하는 것이 적당하다. 그러나, 소량의 나트륨 염(예를 들면, 약 10 mmol/l 이하)은 칼륨 이온 대 나트륨 이온의 비가 10:1 이상이라면 방해하지 않는다고 밝혀졌다. 칼슘 포스페이트는 이런 첨가에 의해 침전되기 때문에 예를 들면 염화 칼슘과 같은 칼슘 염을 첨가하는 것이 가능하지 않고, 따라서 목적하지 않는 혼탁물의 형성 외에, 본 발명에 따른 칼륨 포스페이트의 완충 효과가 없어진다.

이의 형성이 본 발명에 따른 방법에서 방지되어야 하는 불용성 응집체는 이의 크기가 일반적으로 1 ㎛ 이상이나 또한 10 ㎛ 이상의 범위일수 있는 단백질 응집체로서 필수적으로 이해된다. 입자는 예를 들면 PSS의 입자 계수 장치 아큐사이저(AccuSizer)(입자 분류 시스템, 미국)와 같은 상업적인 입자 계수 장치를 사용하는 적합한 입자 계수 방법에 의해 측정될수 있다. 본 발명에 따라 2 내지 400 ㎛/ml의 입자 수가 3000개 미만이거나 또는 10 내지 400 ㎛/ml의 입자가 2000개 이하일때 방법의 개선이 이루어진다. USP(미국 약전)에 따르면 10 ㎛ 이상의 범위의 최대 6000개의 입자 및 25 ㎛ 이상의 범위의 최대 600개의 입자가 약학적인 제제의 주입 도스에 따라 허용된다. 이것은 단백질의 치료학적인 조성물에 대한 단순한 기법으로 본 발명에 따라 이루어질수 있다.

단백질(폴리펩티드)은 화학적으로 개질된 단백질뿐만 아니라 단백질 또는 단백질 단편으로서 본 발명의 의미 내에서 이해된다. 약학 조성물을 위해 바람직하게 안정화된 단백질은 바람직하게는 항체, 면역독과 같은 항체 융합 단백질, 효소, 및 에리트로포이에틴, 소마토스타틴, 인슐린, 사이토킨, 인터페론 또는 플라즈미노겐 활성화제와 같은 단백질 호르몬이다.

본 발명의 의미 내의 분획은 선택적으로 추가의 가공후(추가의 약학적으로 허용된 물질의 첨가) 바람직하게는 환자에게 주사하기 위해 약학 조성물로서 적합한 단백질 용액의 분취량으로서 이해된다.

약학 조성물이 칼륨 포스페이트 완충액에 의해 안정화되는 pH 범위는 바람직하게는 약산성, 중성 또는 약알칼리성 범위(약 6 내지 8의 pH, 바람직하게는 약 7 pH)이다.

본 발명에 따르면 바람직하게는 0.01 내지 0.1 중량%의 농도에서 폴리소르베이트와 같은 비이온성 세제(예를 들면, 트윈(등록상표) 80)를 첨가하는 것이 바람직하다.

또한, 유리하게는 10 mg/ml 이상, 바람직하게는 약 30 내지 100 mg/ml의 농도에서 비환원당(바람직하게는 수크로스 또는 트레할로스)와 같은 저온보호제 또는 유리 형성제를 첨가하는 것이 바람직하다.

따라서, 본 발명의 추가의 주제는 필수적으로 무정형이고, 단백질과 용액 중의 칼륨 이온 대 나트륨 이온의 비가 10:1 이상인 주완충 물질로서 칼륨 포스페이트 완충액의 냉동된 용액으로 구성된, 단백질의 응집체가 적은 용융성 고체 저장 형태이다.

칼륨 이온, 및 나트륨 이온의 잔여 함량의 농도에 따라, 칼륨 대 나트륨 이온의 비는 10:1 이상, 바람직하게는 50:1 이상이어야 한다. 필수적으로 나트륨 이온없는 칼륨 완충액을 사용하는 것이 특히 바람직하다.

본 발명의 추가의 바람직한 양태에서, 약학 조성물은 생체외 세포 배양(예를 들면 단클론 항체를 제조하기 위한 재조합 제조 또는 하이브리도마 세포 주의 배양)에 의해 제조된 단백질을 함유한다. 상기 경우에서 염 및/또는 완충액의 제 1 첨가를 갖는 칼륨 염 및/또는 칼륨 포스페이트 완충액을 첨가하거나 또는 분리 및 정제 방법에서 이후 재완충시키는 것이 적합하다. 이것은 0℃ 미만에서의 폴리펩티드 제제의 중간 안정성 저장을 가능하게 한다. 재완충은 예를 들면 염석에 의해 이온의 교환으로서 이해된다. 단백질의 정제 및 분리 방법에서 완충액 또는 염 농도는 또한 이들 조성물이 치료학적으로 사용되지 않기 때문에 분획화 전에 50 내지 100 mmol/l 이상일수 있다. 그러나, 주사용 조성물에 적합한 삼투 몰농도는 분획화 전에 조절되는 것은 필수적이다.

다음의 실시예, 문헌 및 도면은 또한 본 발명을 설명하고, 이의 보호 범위는 청구항으로부터 이루어진다. 기술된 방법은 변형후에도 본 발명의 주제를 여전히 기술하는 실시예로서 이해된다.

<u>실시예 1</u>

여러 완충액 및 염 용액의 공융점

NaCl-함유 완충액의 공융점은 NaCl-없는 완충액 또는 NaCl 대신 KCl을 함유한 용액보다 약 10℃ 낮다는 것이 도 1로부터 분명하다. 용액은 공융점 미만에서만 완전하게 냉동되기 때문에, 이것은 NaCl-함유 포스페이트 완충액 중의 단백질이 냉동 저장(일반적으로 -20℃에서)동안 및 냉동/해동 방법동안 NaCl-없는 완충액에서보다 더 높은 응력을 받는다는 것을 의미한다. 본 발명에 따라 이 응력은 응집체 및 입자의 형성을 억제하는 상기 언급된 배합물에서 피해진다. 이 형성은 비용을 절약할수 있는 -20℃에서 단백질

용액의 안정한 저장을 가능하게 한다.

실시예 2

포스페이트 완충액을 냉동하는 동안 pH 값의 이동

NaCl-함유 포스페이트 완충액에서 이나트륨 수소 포스페이트의 침전으로 인해 냉동 방법동안 pH 값이 크게 감소한다는 것은 도 2로부터 명백하다. pH 값은 NaCl-없는 칼륨 포스페이트 완충액에서는 대개 일정하게 유지된다.

실시예 3

전단 또는 냉동/해동 응력후 단백질 용액 중의 입자 형성

여러 완충액(A, B, C) 중의 인간 IgG(L-셀렉톤에 대한 항체)의 용액을 입자 함량에 대해 분석했다(아큐사이저, 입자 분류 시스템, 미국).

A) 10 mmol/l KP, 150 mmol/l NaCl, pH 7 중의 Ab,

B) 100 mmol/l KP, pH 7.2 중의 Ab,

C) 100 mmol/l KP, 0.01 중량%의 트윈(등록상표) 80, pH 7.2 중의 Ab,

a) 원심분리된 (출발 물질),

b) 전단 응력후(30초 볼텍스),

c) 6회의 냉동/해동 사이클후(-20℃).

도 3의 자료는 각각 0.7 ml의 샘플을 지칭한다.

도 3에 따르면 입자 형성이 나트륨-없는 칼륨 포스페이트 완충액을 사용함으로써 본 발명에 따라 억제된다는 것을 알수 있다. 이 효과는 비이온성 세제(트윈(등록상표) 80, 0.01 중량%)의 첨가에 의해 증가될 수 있다.

실시예 4

전단 또는 냉동/해동 응력후 단백질 용액 중의 입자 형성

여러 완충액(A, B, C) 중의 HBV에 대한 항체의 용액을 입자 함량에 대해 분석했다(아큐사이저, 입자 분류 시스템).

A) 10 mmol/l KP, 30 mmol/l NaCl, pH 6.5 중의 Ab,

B) 100 mmol/l KP, pH 7.2 중의 Ab,

C) 100 mmol/l KP, 0.01 중량%의 트윈(등록상표) 80, pH 7.2 중의 Ab,

a) 원심분리된 (출발 물질),

b) 전단 응력후(30초 볼텍스),

c) 6회의 냉동/해동 사이클후(-20℃).

도 3의 자료는 각각 0.7 ml의 샘플을 지칭한다.

도 4에 따르면 본 발명에 따라 나트륨-없는 칼륨 포스페이트 완충액을 사용함으로써 입자 형성이 억제된다는 것을 알수 있다. 이 효과는 비이온성 세제의 첨가에 의해 증가될수 있다.

실시예 5

0℃ 미만의 온도에서 단백질 용액(실시예 3에 따른 인간 IgG)을 저장하는 동안 가용성 응집체의 형성의 방지

단백질 용액을 A) 10 mM의 칼륨 포스페이트, 150 mM의 NaCl, pH 7.0, 및 B) 100 mM의 칼륨 포스페이트, pH 7.2에서 -20℃에서 여러 주동안 저장했다. 가용성 응집체 및 천연 단백질을 크기 배제 HPLC에 의해 분석했다(도 5). 본 발명에 따르면 NaCl-함유 완충액에서보다 NaCl-없는 완충액에서 응집체 형성이 상당히 더 적다. 이것은 무엇보다도 pH 값의 이동이 NaCl-없는 완충액에서 실질적으로 방지되고 저장 온도는 공융점보다 상당히 낮다는 사실 때문이다(또한 실시예 1 및 2를 참조할수 있다).

실시예 6

냉동/해동 응력후 단백질 용액 중의 입자 형성

여러 완충액 중의 항체 MAB L-셀렉틴, MAB HBV; MAB PDGF-R 및 MAB LNGF-R을 냉동/해동 응력 전후(6회 냉동/해동)에 입자의 함량에 대해 분석했다(아큐사이저, 입자 분류 시스템)(결과는 표 1에 비교, C_{prot}: 단백질 농도). 2 내지 400 ㎛/ml의 크기를 갖는 입자가 나타난다.

본 발명에 따라 나트륨-없는 칼륨 포스페이트 완충액(KP)을 사용함으로써 입자 형성이 억제된다는 것을 알수 있다. 이 효과는 비이온성 세제의 첨가에 의해 증가될수 있다.

[표 1]

완충액 중의 MAB L-셀렉틴	C_{prot} [mg/ml]	응력 없이 ml당 2 내지 400 ㎛의 입자	6회 냉동/해동후 ml당 2 내지 400 ㎛의 입자
10 mM KP, 150 mM NaCl, pH 7.2	21.40	875	6245
100 mM KP, 0.01 중량% 트윈 80, pH 7.2	18.50	276	332

[표 2]

완충액 중의 MAB HBV	C_{prot} [mg/ml]	응력 없이 ml당 2 내지 400 ㎛의 입자	6회 냉동/해동후 ml당 2 내지 400 ㎛의 입자
10 mM KP, 30 mM NaCl, pH 6.6	17.85	544	19085
100 mM KP, 0.01 중량% 트윈 80, pH 7.2	18.30	740	695

[표 3]

완충액 중의 MAB PDGF-R	C_{prot} [mg/ml]	응력 없이 ml당 2 내지 400 ㎛의 입자	6회 냉동/해동후 ml당 2 내지 400 ㎛의 입자
10 mM KP, 150 mM NaCl, pH 7.2	1.70	130	33795
50 mM KP, 0.01 중량% 트윈 80, pH 7.2	1.70	691	677

[표 4]

완충액 중의 MAB LNGF-R	C_{prot} [mg/ml]	응력 없이 ml당 2 내지 400 ㎛의 입자	6회 냉동/해동후 ml당 2 내지 400 ㎛의 입자
10 mM KP, 150 mM NaCl, pH 7.2	1.70	690	28915
50 mM KP, 0.01 중량% 트윈 80, pH 7.2	1.70	1164	1257

참고 문헌

독일 특허 제 26 52 636 호, 유럽 특허 출원 제 0 018 609 호, 제 0 025 275 호, 제 0 314 095 호, 제 0 315 968 호, 제 0 318 081 호, 제 0 599 344 호, 영국 특허 제 8514349 호, 멘조다의 문헌[J. A. Biotechnol. Tech. 10 (1991) 535-540], 미국 특허 제 4,808,705 호, 제 WO 91/15509 호 및 제 WO 93/22335 호.

발명의 효과

본 발명에 의하면, 완충 물질로서 칼륨 포스페이트 완충액을 함유하고 용액 중의 칼륨 대 나트륨 이온의 비가 10:1 이상인 단백질의 완충된 수용액을 냉동시키고 해동시키고 주입량의 분획으로 분할시키는, 단백질의 약학 조성물의 재구성된 동결건조물을 이용함으로써 단백질 응집체의 형성이 방지된다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

완충 물질로서 칼륨 포스페이트 완충액을 함유하고, 용액 중의 칼륨 대 나트륨 이온의 비가 10:1 이상인 단백질의 완충된 수용액을 냉동시키고 해동시키고 주입량의 분획으로 분할하고, 이들 분획을 동결건조시키는, 단백질의 약학 조성물의 재구성된 동결건조물에서

단백질 응집체의 형성을 방지하는 개선된 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

분획의 완충액 농도가 10 mmol/ml 내지 300 mmol/ml인 방법.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

분획의 재구성된 용액의 삼투 몰농도가 바람직하게는 100 내지 500 mOsm, 더욱 바람직하게는 300 ± 50 mOsm인 방법.

청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

완충된 수용액이 6 내지 8의 pH 범위에서 완충되는 방법.

청구항 5

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

완충된 수 용액이 비이온성 세제를 함유하는 방법.

청구항 6

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

완충된 수용액이 10 내지 100 mg/ml 농도의 당을 함유하는 방법.

청구항 7

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

단백질이 항체인 방법.

청구항 8

필수적으로 무정형이고, 완충 물질로서 칼륨 포스페이트 완충액을 갖는 단백질의 냉동된 용액을 함유하고, 칼륨 이온 대 나트륨 이온의 비가 10:1 이상인, 응집체가 적은 단백질의

용융성 고체 저장 형태.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

저장 형태가 동결 건조에 의해 제조되는 고체 저장 형태.

청구항 10

제 8 항 또는 제 9 항에 있어서,

단백질이 항체인 고체 저장 형태.

청구항 11

완충 물질로서 칼륨 포스페이트 완충액을 함유하고,

a) 용액 중의 칼륨 대 나트륨 이온의 비가 10:1 이상이고,

b) 완충액 농도가 10 내지 300 mmol/ml인, 6 내지 8의 pH 범위의 완충된 수용액 중의 단백질의 약학 조성물.

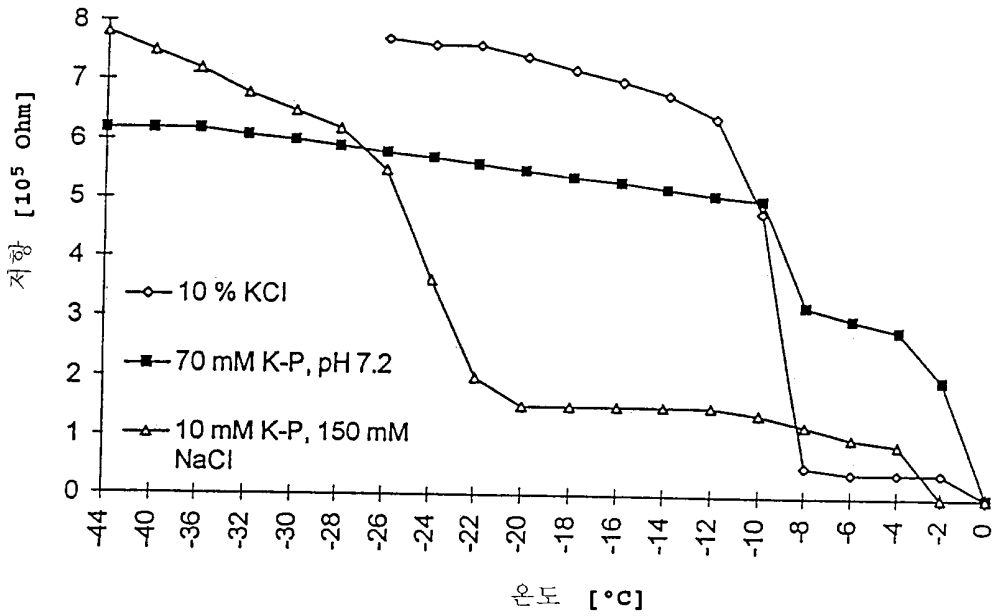
청구항 12

제 11 항에 있어서,

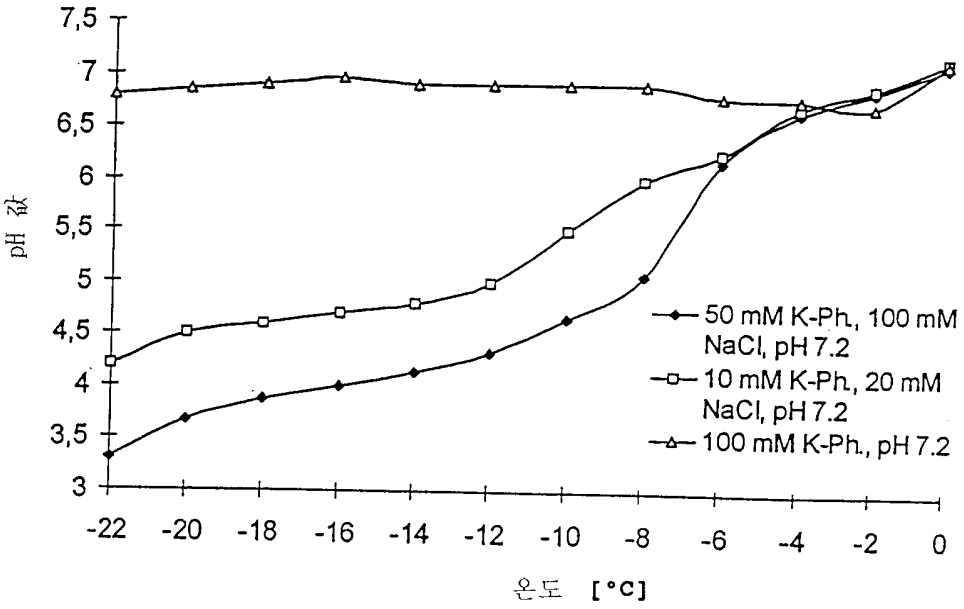
단백질이 항체인 약학 조성물.

도면

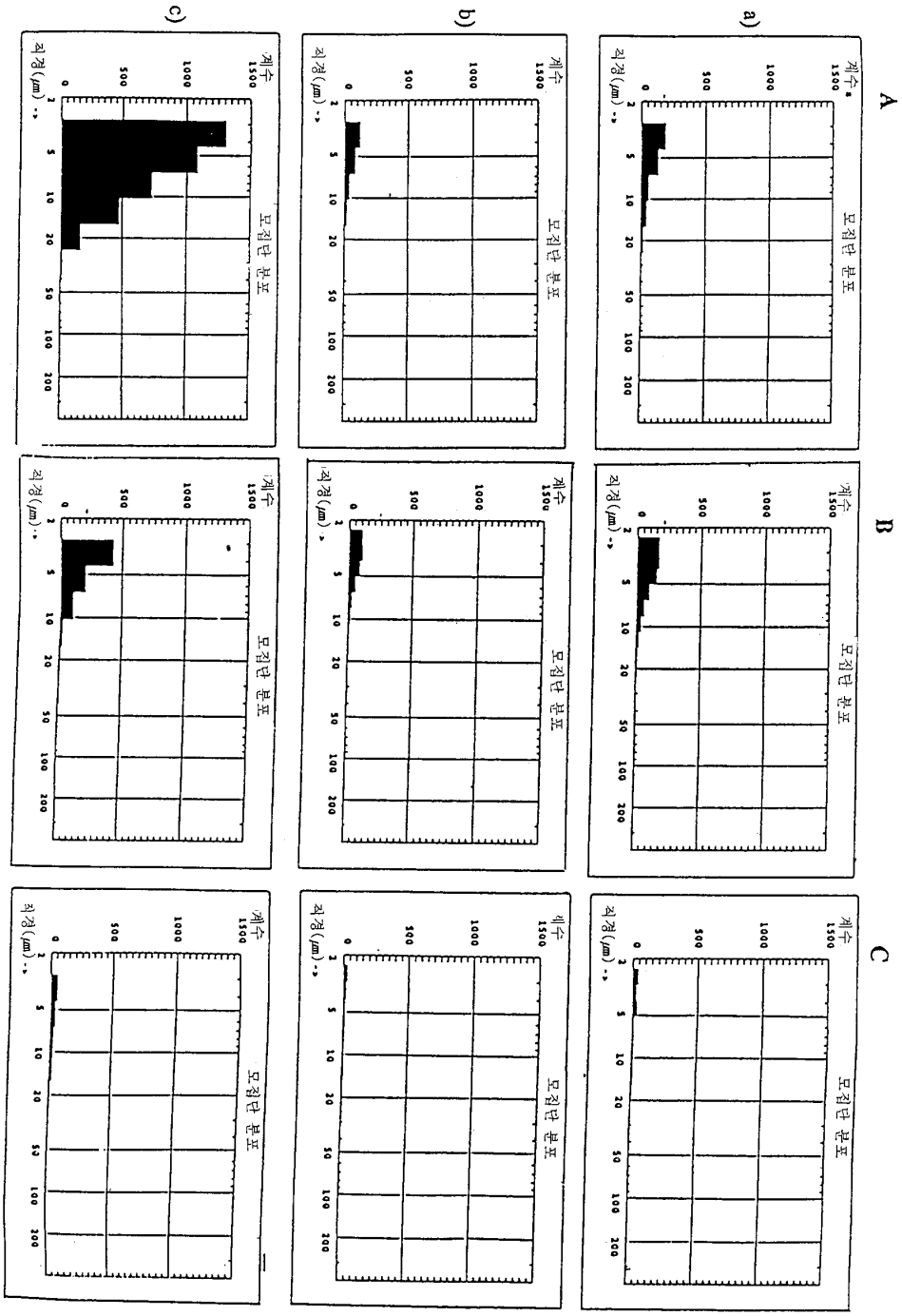
도면1


저항 [10⁵ Ohm]
8
7
6
5
4
3
2
1
0
10 % KCl
70 mM K-P, pH 7.2
10 mM K-P, 150 mM NaCl
-44
-40
-36
-32
-30
-28
-26
-24
-22
-20
-18
-16
-14
-12
-10
-8
-6
-4
-2
0
온도 [°C]

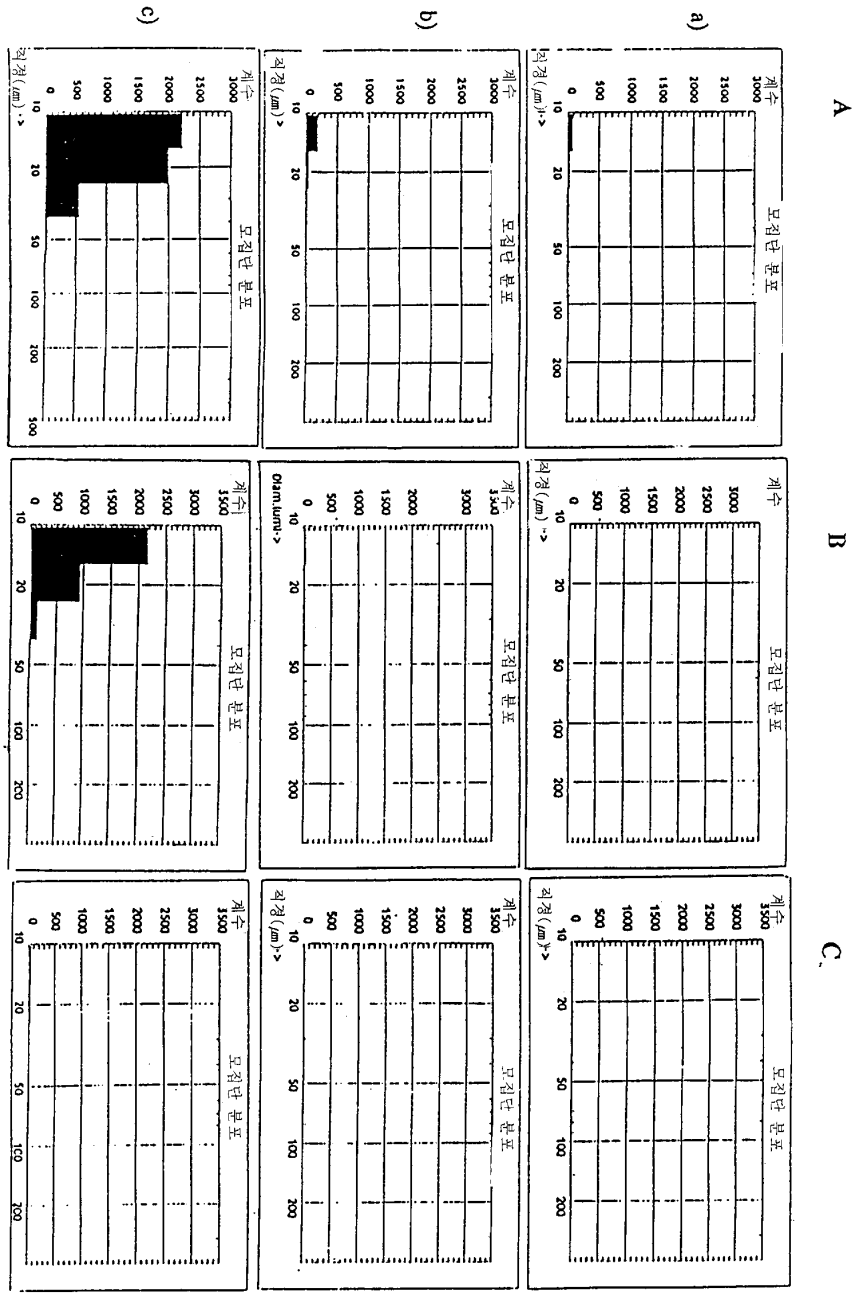
도면2


pH 값
7,5
7
6,5
6
5,5
5
4,5
4
3,5
3
50 mM K-Ph., 100 mM NaCl, pH 7.2
10 mM K-Ph., 20 mM NaCl, pH 7.2
100 mM K-Ph., pH 7.2
-22
-20
-18
-16
-14
-12
-10
-8
-6
-4
-2
0
온도 [°C]

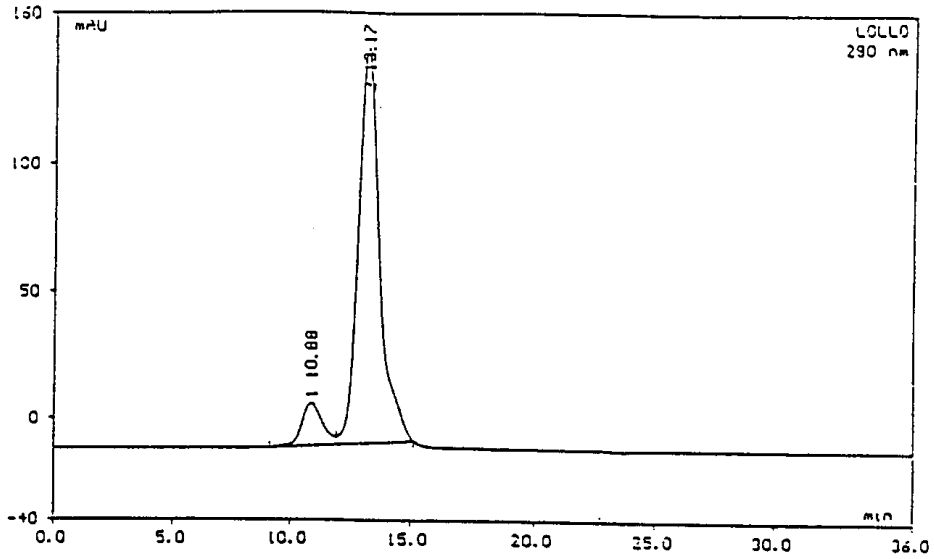
도면3



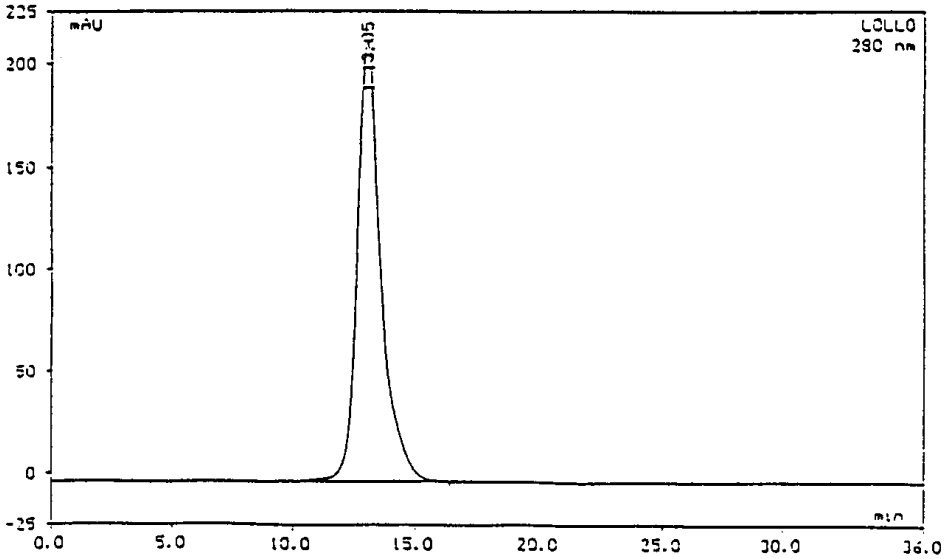
도면4



도면5a


mAU
LOLLO
290 nm
13.17
10.88
150
100
50
0
-40
0.0
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
36.0
min

도면5b


mAU
LOLLO
290 nm
13.05
225
200
150
100
50
0
-25
0.0
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
36.0
min