



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년03월17일
(11) 등록번호 10-2375269
(24) 등록일자 2022년03월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/08 (2006.01) A61K 38/19 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01) A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/26 (2017.01) A61K 47/68 (2017.01)
A61K 9/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/08 (2013.01)
A61K 38/193 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0011802
(22) 출원일자 2021년01월27일
심사청구일자 2021년01월27일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020200112881 A
KR1020200116477 A
KR1020110085917 A
KR1020150080038 A

(73) 특허권자
한미약품 주식회사
경기도 화성시 팔탄면 무하로 214
(72) 발명자
임형규
경기도 화성시 동탄기흥로 550
김상윤
경기도 화성시 동탄기흥로 550
홍성희
경기도 화성시 동탄기흥로 550
(74) 대리인
리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 7 항

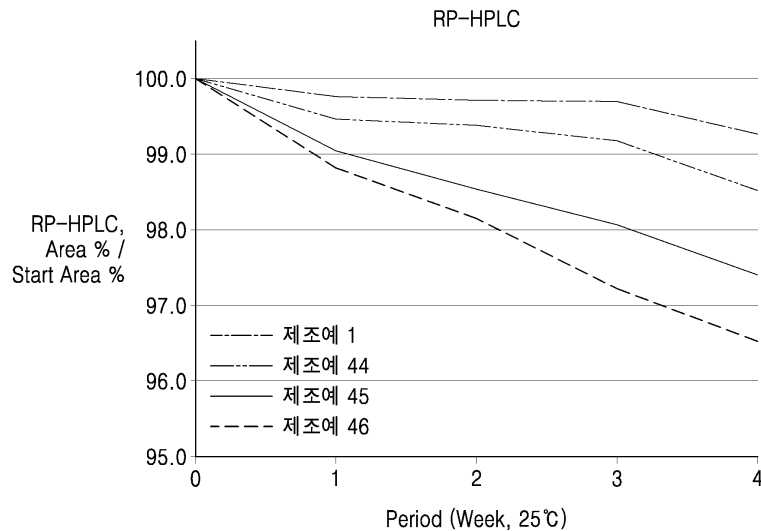
심사관 : 최원철

(54) 발명의 명칭 단백질 액상 제제 및 이의 제조방법

(57) 요약

단백질 액상 제제 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 일 양상에 따른 고농도의 에플라페그라스티를 함유하는 액상 제제 및 이의 제조 방법에 의하면, 고농도의 단백질을 함유할 수 있으면서, 용해도 및 안정성이 우수하고, 투여 부위의 자극/고통 또는 환자의 불편감을 감소시켜 환자 친화적인 주입이 가능한 액상 제제를 제공할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/02 (2013.01)

A61K 47/12 (2013.01)

A61K 47/26 (2013.01)

A61K 47/6813 (2017.08)

A61K 9/0019 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

에플라페그라스티움(eflapegrastim) 및 완충물질을 포함하는 액상 제제로서,

11 내지 66 mg/mL 농도의 에플라페그라스티움; 5 내지 100 mM 농도의 구연산 나트륨; 0.001 내지 0.5%(w/v) 농도의 폴리소르베이트 80; 1 내지 20 %(w/v) 농도의 만니톨; 및 5 내지 200 mM 농도의 염화나트륨을 포함하고;

하기 수학적 식 1로 정의된 환자 친화(Patient Friendly: PF) 지수가 10 이하이며,

[수학적 식 1]

$$PF(\text{Patient friendly}) \text{ 지수} = \text{Osm}(\text{mOsm/kg})/100 + \text{MGF}(\text{N})$$

수학적 식 1에서 Osm은 액상 제제의 삼투압(Osmolarity)의 수치이고, MGF는 29 게이지의 주사기로 액상 제제를 2.835 mm/s 속도로 투여 시 최대활주력(Maximum Gliding Force)의 수치이다;

삼투압이 100 mOsm/kg 내지 800 mOsm/kg이고;

상기 액상 제제를 29 게이지의 주사기로 2.835 mm/s 속도로 투여 시 최대활주력이 5N 이하이거나, 또는 4.725 mm/s 속도로 투여 시 최대활주력(Maximum Gliding Force)이 7N 이하이며;

23 내지 27 °C 및 55 내지 65% 상대 습도에서 4주간 보존한 후에 측정된 에플라페그라스티움의 잔존율이 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC) 및 크기 배제 크로마토그래피(SE-HPLC) 기준으로 95% 이상이고, 상기 폴리소르베이트 80의 최종 농도가 상기 액상 제제 대비 0.001 내지 5%(w/v) 인 것을 특징으로 하는 에플라페그라스티움 액상 제제.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 액상 제제의 전도도(conductivity)가 15 mS/cm 이하인 것인 에플라페그라스티움 액상 제제.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 잔존율이 98% 이상인 것인 에플라페그라스티움 액상 제제.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 액상 제제는 20 °C 내지 25 °C의 상온에서 점도(viscosity)가 4 cP 이하인 것인 에플라페그라스티움 액상 제제.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

청구항 1에 있어서, 상기 액상 제제의 pH가 4 내지 8인 것인 에플라페그라스티드 액상 제제.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

청구항 1에 있어서, 상기 액상 제제는 정제 컬럼을 이용하여 전처리된 것인 에플라페그라스티드 액상 제제.

청구항 19

청구항 18에 있어서, 상기 전처리된 액상 제제를 상기 폴리소르베이트 80을 포함하지 않는 버퍼에서 버퍼 교환한 후, 농축된 것인 에플라페그라스티드 액상 제제.

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 단백질 액상 제제 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 과립구 콜로니 자극인자(Granulocyte-Colony Stimulating Factor, G-CSF)는 골수간세포와 백혈구의 분열과 분화를 지시하는 사이토카인으로 골수 밖에서 세포들의 분열 및 분화를 촉진하는 역할을 한다. 분자량은 18,000 내지 19,000 달톤이고, 등전점(pI)이 6.1(당쇄화 정도에 따라 pI 값이 5.5-6.1)인 당단백질이다.

[0003] 재조합 DNA 기술은 G-CSF의 분자적 및 유전적 성질을 규명하였으며, CHU-2 세포와 인간 방광암 세포 5637에서 mRNA를 분리하여 조제된 cDNA 라이브러리에서 인간 G-CSF 유전자가 클로닝된 이후, 포유동물 세포와 원핵세포에서 G-CSF를 생산할 수 있게 되었다.

[0004] 한편, 상기한 바와 같은 G-CSF와 같은 단백질을 포함하는 약제학적 단백질 제형의 상업적 실행가능성 및 효율에 있어서, 제형의 안정성은 당해 제형에 추가의 분자를 포함시킴으로써 극복될 수 있다. 단백질 안정성은 용액 속에서 당해 단백질과 상호작용하여 당해 단백질을 안정하고 용해성이며 비응집 상태로 유지시키는 부형제를 포함시킴으로써 개선시킬 수 있다. 예를 들면, 염 화합물 및 기타 이온성 종(ionic species)이 단백질 제형에 대한 첨가제이다. 이들은 비특이적 방식으로 단백질에 결합하여 열적 안정성을 증가시킴으로써 단백질의 변성을 방지하는 것을 돕는다. 염 화합물(예: NaCl, KCl)은 응집 및 침전을 방지하기 위해 상업적 인슐린 제제에서 성공적으로 사용되어 왔다. 아미노산(예: 히스티딘, 아르기닌)은 제형 첨가제로서 사용되는 경우에 단백질의 2차 구조의 변형을 감소시키는 것으로 밝혀졌다. 통상 사용되는 첨가제의 기타 예에는 글리세롤 및 당 등의 폴리알콜 물질, 및 비이온성(예: Tween, Pluronic) 계면활성제 등이 포함된다.

[0005] 약제학적 첨가제는 가용성, 무독성이어야 하고 특정한 치료학적 단백질에 대한 안정화 효과를 제공하는 특정한 농도에서 사용되어야 한다. 첨가제의 안정화 효과는 단백질-의존성 및 농도-의존성이기 때문에, 약제학적 제형에서 사용될 각 첨가제는 불안정성을 유발하거나 당해 제형의 화학적 또는 물리적 구성에 대한 기타 부작용을 유발하지 않도록 주의깊게 시험되어야 한다. 단백질의 안정화에 사용된 성분들은 시간 경과에 따른 단백질 안정성과 관련하여 또는 저장 동안 환경 변화에 따라 단백질 안정성과 관련된 문제를 유발할 수 있다.

[0006] 또한, 단백질의 약제학적 제제는 치료 효과를 향상시키기 위해 고농도로 제형화되어야 한다. 고농도 단백질 제형은 보다 작은 용적의 용량이 가능하고 포장 및 저장이 보다 경제적이기 때문에 치료학적 사용에 유리하다. 그러나, 고농도 단백질 제형의 개발은 제조, 안정성, 환자의 통증 등 다수의 과제가 존재한다. 예를 들면, 단백질의 응집 또는 불용성은 제형 중의 단백질 농도가 상승함에 따라 일반적으로 증가한다(Shire, S.J. et al., J. Pharm. Sci., 93, 1390(2004)). 이 때문에 고농도 단백질 제형에서는 저농도 제형에서 나타나지 않은 부작용, 예를 들어, 비천연 형태의 단백질 응집 및 미립자 형성 등이, 저농도 단백질 제형에서는 유리한 효과를 제공하였던 첨가제를 쓴 경우에도 나타날 수 있다. 또한, 고농도 단백질의 높은 점도는 여과 방식의 제조 공정을 방해할 수도 있으면서, 주사 시 환자에게 고통 및 추가적인 부작용을 겪어 환자 친화성이 낮아질 가능성이 존재한다. 따라서, 약제학적 단백질 제형은 통상 주의깊게, 임의의 부작용을 제한하면서, 단백질 안정성, 환자 친화성 및 치료학적 요건을 향상시키기 위해 성분과 농도의 균형이 요구된다.

[0007] 이에, 응집 가능성이 높은 비천연의 단백질을 고농도로 함유하는 단백질 제제에 있어서, 치료학적 사용에 유용할 뿐만 아니라, 용해도 및 안정성의 측면에서 유리하고, 환자 친화적인 제제의 개발이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 일 양상은 고농도의 에플라페그라스티움(eflapegrastim) 및 완충물질을 포함하는 액상 제제를 제공하는 것이다.

- [0009] 다른 양상은 상기 액상 제제를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 또 다른 양상은 상기 액상 제제를 포함하는 제조 물품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 일 양상은 에플라페그라스티움(eflapegrastim) 및 완충물질을 포함하는 액상 제제로서,
- [0012] 6 mg/mL 내지 150mg/mL 농도의 에플라페그라스티움을 포함하거나;
- [0013] 하기 수학적 1로 정의된 환자 친화(Patient Friendly: PF) 지수가 10 이하이거나,
- [0014] [수학적 1]
- [0015] $PF(\text{Patient friendly}) \text{ 지수} = \text{Osm}(\text{mOsm/kg})/100 + \text{MGF}(\text{N})$
- [0016] 수학적 1에서 Osm은 액상 제제의 삼투압(Osmolarity)의 수치이고, MGF는 29 게이지의 주사기로 액상 제제를 2.835 mm/s 속도로 투여 시 최대활주력(Maximum Gliding Force)의 수치이다;
- [0017] 삼투압이 100 mOsm/kg 내지 1000 mOsm/kg이거나;
- [0018] 상기 액상 제제를 29 게이지의 주사기로 2.835 mm/s 속도로 투여 시 최대활주력이 7N 이하이거나, 또는 4.725 mm/s 속도로 투여 시 최대활주력(Maximum Gliding Force)이 10N 이하이거나;
- [0019] 23 내지 27 °C 및 55 내지 65% 상대 습도에서 4주간 보존한 후에 측정된 에플라페그라스티움의 잔존율이 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC) 또는 크기 배제 크로마토그래피(SE-HPLC) 기준으로 95% 이상인 에플라페그라스티움 액상 제제를 제공한다.
- [0020] 다른 양상은 상기 액상 제제를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0021] 또 다른 양상은 상기 액상 제제를 포함하는 제조 물품을 제공한다.

발명의 효과

- [0022] 일 양상에 따른 고농도의 에플라페그라스티움을 함유하는 액상 제제 및 이의 제조 방법에 의하면, 고농도의 단백질을 함유할 수 있으면서, 용해도 및 안정성이 우수하고, 투여 부위의 자극/고통 또는 환자의 불편감을 감소시켜 환자 친화적인 주입이 가능한 액상 제제를 제공할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 일 실시예에 따른 액상 제제에서, 폴리소르베이트계 비이온성 계면활성제의 농도에 의한 에플라페그라스티움의 잔존율 변화를 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC)를 통해 확인한 결과이다.
- 도 2는 일 실시예에 따른 액상 제제에서, 폴리소르베이트계 비이온성 계면활성제의 농도에 의한 에플라페그라스티움의 잔존율 변화를 크기 배제 크로마토그래피(SE-HPLC)를 통해 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 일 양상은 고농도의 에플라페그라스티움(eflapegrastim) 및 완충물질을 포함하는 액상 제제를 제공한다.
- [0026] 에플라페그라스티움(eflapegrastim)
- [0027] 본 명세서에서 용어 "에플라페그라스티움(eflapegrastim)"은 재조합 인간 과립구 콜로니 자극인자(Human Granulocyte-Colony Stimulating Factor, hG-CSF) 변이체를 포함하는 지속형 G-CSF 결합체의 국제일반명(INN)이다(WHO Drug Information Volume 29, 2015). 상기 에플라페그라스티움은 생리활성 펩타이드인 과립구 콜로니 자극인자와 생분해성 고분자, 면역글로불린 Fc 영역이 연결된 형태의 결합체일 수 있다.
- [0028] 또한, 본 명세서에서 유용한 면역글로불린 Fc는 인간 면역글로불린 Fc, 그의 밀접하게 관련된 유사체의 서열을 갖는 것으로, 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트 또는 기니아 피그 등의 동물기원일 수 있다. 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE 또는 IgM 유래 또는 이들의 조합(combination) 또는 이들의 하이브리드(hybrid)에 의한 Fc 영역일 수 있다. 구체적으로, 면역글로불린 Fc 영역은 인간 혈액에 가장 풍부한 IgG 또는 IgM 유래이며, 더욱 구체적으로, 리간드 결합 단백질의 반감기를 향상시키는 것으로 공지된 IgG 유래이다.

면역글로불린 Fc는 천연 IgG를 특정 단백질 분해 효소로 처리하여 제조할 수 있으며, 재조합 기술을 이용하여 형질 전환된 세포로부터도 제조할 수 있다. 구체적으로 면역글로불린 Fc는 대장균(*E. coli*) 형질전환체로부터 제조한 재조합 인간 면역글로불린 Fc이다.

[0029] 한편, IgG 역시 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 서브클래스로 나눌 수 있고, 본 발명에서는 이들의 조합 또는 이들의 하이브리드도 가능하다. 구체적으로 IgG2 및 IgG4 서브클래스이며, 더욱 구체적으로, 보체 의존적 독성(CDC, Complement-dependent cytotoxicity)과 같은 이펙터 기능(effector function)이 거의 없는 IgG4의 Fc 영역이다. 즉, 본 명세서의 약물의 캐리어용 면역글로불린 Fc 영역은, 인간 IgG4 유래의 비-당쇄화된 Fc 영역이다. 인간 유래의 Fc 영역은 인간 생체에서 항원으로 작용하여 이에 대한 새로운 항체를 생성하는 등의 바람직하지 않은 면역 반응을 일으킬 수 있는 비-인간 유래의 Fc 영역에 비하여 바람직하다.

[0030] 본 명세서에서 사용되는 에플라페그라스티움은 상기 hG-CSF 변이체와 면역글로불린 Fc 영역을 결합시켜 제조한다. 이때 이용되는 결합 방법으로, 상기 hG-CSF 변이체와 면역글로불린 Fc 영역을 비펩타이드성 중합체를 이용하여 교차 결합시키거나, 재조합 기술을 이용하여 상기 hG-CSF 변이체와 면역글로불린 Fc 영역이 연결된 형태의 융합 단백질로 제조할 수 있다. 교차 결합 시 사용되는 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올, 폴리비닐 알콜, 폴리사카라이드, 텍스트란, 폴리비닐 에틸 에테르, PLA(폴리락트산, polylactic acid) 및 PLGA(폴리락틱-글리콜산, polylactic-glycolic acid)와 같은 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 당해 분야에 이미 알려진 이들의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 명세서의 범위에 포함된다.

[0031] 본 명세서에 상기 hG-CSF 변이체는 포유동물로부터 추출되거나, 화학적으로 합성될 수 있다. 또한, 유전자 재조합 기법을 이용하여 hG-CSF 변이체를 코딩하는 DNA로 형질전환된 원핵 또는 진핵생물로부터 수득할 수도 있는데, 숙주로서 대장균(예를 들어, *E. coli*) 또는 효모(예를 들어, *S. cerevisiae*) 및 포유동물 세포(예를 들어, 중국 햄스터 난소세포, 원숭이 세포)를 사용할 수 있다. 사용한 숙주에 따라, hG-CSF 변이체 발현산물은 포유동물 또는 다른 진핵 탄수화물과 당쇄화될 수 있거나, 비-당쇄화될 수 있다. 또한, 원핵생물에서 발현시킬 경우에는 상기 hG-CSF 변이체 발현산물은 초기 메티오닌 잔기를 포함(위치 -1) 할 수 있다. 본 발명에 적합한 hG-CSF 변이체는 대장균을 숙주세포로 이용하여 제조한 hG-CSF 변이체일 수 있다.

[0032] 일 구체예에 있어서, 상기 에플라페그라스티움은 천연형 G-CSF의 17번째 시스테인 및 65번째 프롤린 잔기가 세린으로 치환되고 1번째 트레오닌이 삭제된 재조합 인간 과립구 콜로니 자극인자 유도체^{17, 65} Ser-G-CSF를 포함한다. 상기에서 언급한 바와 같이, 상기 에플라페그라스티움의 비천연의 단백질은 천연 단백질 또는¹⁷ Ser-G-CSF와 비교하여 추가적인 단백질의 응집의 가능성 및 임의의 부작용을 제공할 수 있다. 단백질 응집은 단백질 용액에서 통상적인 문제이며, 단백질의 농도 또는 점도 증가를 일으킨다. 본 명세서는 고농도의 저응집 단백질 제제를 달성하는 수단을 제공한다. 본 명세서의 제제는, 용액 중 단백질의 안정한 고농도를 달성할 수 있어, 치료학적 목적에 유리할 수 있다.

[0033] 한편, 폴리펩타이드와 같은 단백질의 기능 및 생리활성은 단백질의 입체구조에 의해 결정되고, 단백질의 입체구조 중 기능과 관련된 부분이 달라지면 본래의 특정 기능을 발휘할 수 없게 된다. 예를 들면, 아미노산 서열이 하나만 달라져도 그 아미노산이 단백질 입체구조 중 기능부위에 해당하여 그 부위의 입체구조를 변화시키게 되면 그 단백질의 기능에 영향을 주게 되는 것은 공지된 사실이다. 또한, 약학 제제분야에 있어, 단백질 및 펩타이드 제형의 가장 공통적인 논의는 약물의 물리화학적 안정성에 대한 것이며, 실제로 약물의 특성은 성공적인 전달 및 안정성을 위한 적절한 제제를 결정하는데 중요하다. 단백질 약물 제제의 개발에서의 첫 단계는 약물 특성 및 상이한 제제 내에서의 안정성에 대한 완전한 특성화를 포함하며, 당해 기술분야의 통상의 기술자는 등전점, 분자량 및 총체적 아미노산 구성과 같은 단백질의 물리화학적 특성을 고려함으로써 시작된다(Jeffrey L. et al., 1994). 즉, 상이한 단백질 약물(예컨대, IL-1 β)은 물론 천연형 단백질에서 아미노산 서열 1개만 달라져도 천연형 단백질과는 다른 물리화학적 특성을 나타냄에 따라 단백질 안정화 제제에 있어 안정성 접근에 대한 고유한 해법을 필요하게 된다.

[0034] 본 발명의 액상 제제는 천연형 hG-CSF 또는¹⁷ Ser-G-CSF와 비교하여, 추가적인 아미노산 변형을 지닌^{17, 65} Ser-G-CSF를 포함하는 에플라페그라스티움에 대하여, 고농도 조건 하에서도 높은 안정성을 나타낼 수 있다는 점에 기술적 특징이 있다.

[0036] 본 명세서에서 용어 "고농도"는 치료학적 사용에 유리한 효과를 증대시킬 수 있는 정도의 용량을 의미한다. 예

컨대, 고농도의 에플라페그라스티움은 6 mg/mL, 7 mg/mL, 8 mg/mL, 9 mg/mL, 10 mg/mL, 11 mg/mL, 12 mg/mL, 13 mg/mL, 14 mg/mL, 15 mg/mL, 16 mg/mL, 17 mg/mL, 18 mg/mL, 19 mg/mL 또는 20 mg/mL 이상의 농도로 제제 내에 포함될 수 있다. 구체적으로, 고농도의 에플라페그라스티움은 6 mg/mL 내지 150mg/mL, 10 mg/mL 내지 150mg/mL, 11 mg/mL 내지 150mg/mL, 10 mg/mL 내지 100mg/mL, 11 mg/mL 내지 100mg/mL, 10 mg/mL 내지 80mg/mL, 11 mg/mL 내지 70mg/mL, 12 mg/mL 내지 70mg/mL, 14 mg/mL 내지 70mg/mL, 11 mg/mL 내지 66mg/mL, 12 mg/mL 내지 66mg/mL, 13 mg/mL 내지 66mg/mL, 14 mg/mL 내지 66mg/mL, 15 mg/mL 내지 66mg/mL, 16 mg/mL 내지 66mg/mL, 17 mg/mL 내지 66mg/mL, 18 mg/mL 내지 66mg/mL, 19 mg/mL 내지 66mg/mL, 또는 20 mg/mL 내지 66mg/mL의 농도로 제제 내에 포함될 수 있다.

[0037] 본 명세서에서 용어 "안정한"은 단백질 저장시이의 물리적 안정성 및/또는 화학적 안정성 및/또는 생물학적 안정성을 실질적으로 보유하는 것을 의미할 수 있다. 전형적으로 일정한 시간 동안 특정 저장 조건 하에서 활성 성분의 손실이 특정량 미만, 예를 들면, 10% 미만, 7% 미만, 5% 미만, 4% 미만, 또는 3% 미만인 경우 이러한 제제는 안정한 것으로 이해된다.

[0039] 에플라페그라스티움의 농도 및 잔존율

[0040] 상기한 바와 같이 에플라페그라스티움의 농도의 증가는 잔존율에 부정적인 영향을 미칠 수 있다. 또한, 에플라페그라스티움은 천연형 hG-CSF 대비 추가적인 돌연변이체라는 측면에서 잔존율에 비예측성의 영향을 미칠 수 있다. 이에, 상기 액상 제제의 안정성은 단백질 약물의 응집체(aggregate) 형성을 주요 인자로 하여 평가될 수 있다. 단백질 약물은 전단응력이 주어지거나 다른 물리적 또는 화학적 환경이 주어지면, 응집체를 형성하게 되며, 이와 같은 응집체 형성은 효능 감소 등의 생체 이용률 감소에 영향을 주는 인자이기 때문에 액상 제제의 개발에 고려되는 주요 구성 요소이다.

[0041] 일 구체예에 따른 액상 제제는 23 내지 27 °C 및 55 내지 65% RH(Relative Humidity)에서 RP-HPLC(Reversed phase-High Performance Liquid Chromatography) 또는 SE-HPLC(Size Exclusion-High Performance Liquid Chromatography) 측정 시 4주간 보존 시험 후의 단백질(예를 들면, 에플라페그라스티움)의 잔존율이 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 또는 98% 이상인 것일 수 있다. 이때, 상기 잔존율은 초기의 단백질 순도 대비 특정 시점의 순도의 상대적 비율을 지칭하는 것으로서, 액상 제제 내 단백질(예를 들면, 에플라페그라스티움)의 n 주차 잔존율은 수학적 식 2에 의해 정의될 수 있다.

[0042] [수학적 식 2]

[0043] n 주차 잔존율(%) = n 주차 순도 값 / 초기 순도 값 x 100

[0045] 일 구체예에 있어서, 상기 RP-HPLC 측정은 액상 제제 시료에 대해 적절한 컬럼(예를 들면, C4 컬럼(입자 크기 5 μ m, Inerior Diameter X Length: 4.6 mm X 250 mm))으로 40 내지 80 °C 조건에서 측정된 것일 수 있다. HPLC 조건을 요약하면, 0.5 내지 2.0 mL/min 유속(바람직하게는 1.0 ml/min)을 갖는 eluent linear gradient 시스템을 사용할 수 있고, 이동상 A 는 0.05 내지 1.0 % 트리플루오로아세트산(바람직하게는 0.1%) 및 10 내지 40 % 아세트나이트릴(바람직하게는 20%)을 포함하고, 이동상 B 는 0.05 내지 1.0 % 트리플루오로아세트산(바람직하게는 0.1%) 및 60 내지 95 % 아세트나이트릴(바람직하게는 80%)을 포함하는 것일 수 있다. 또한, 탐지기는 214 nm 으로 설정된 것일 수 있다.

[0046] 일 구체예에 있어서, 상기 SE-HPLC 측정은 액상 제제 시료에 대해 적절한 컬럼(예를 들면, Protein LW-803 컬럼(입자 크기 5 μ m, Inerior Diameter X Length: 8.0 mm X 300 mm))으로 측정된 것일 수 있다. HPLC 조건을 요약하면, 0.3 내지 1.2 ml/min 유속(바람직하게는 0.6 ml/min)을 갖는 isocratic gradient 시스템이 사용할 수 있고, 이동상은 10 내지 10 mM 나트륨 포스페이트, 50 내지 300 mM 염화나트륨, 또는 1 내지 15% 이소프로필 알코올을 포함하는 것일 수 있다. 또한, 탐지기는 214 nm으로 설정된 것일 수 있다.

[0047] 예컨대, 본 명세서의 액상 제제는 상기한 바와 같은 조건에서 단백질 약물의 초기 순도의 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 또는 98% 이상이 응집체(aggregate) 또는 분해물을 생성하지 않고 모노머 형태로 유지된다. 다르게 표현하면, 본 명세서의 액상 제제는 상기한 바와 같은 조건에서 단백질 약물의 초기 함량의 5% 이하, 예컨대 4% 이하 또는 3% 이하가 응집체(aggregate) 또는 분해물 형태로 변환된다.

[0049] 일반적으로, 4주간 보존 시험 후의 가속 조건(25±2 °C / 60±5 % RH)에서 단백질(예를 들면, 에플라페그라스티움)의 잔존율이 95% 정도 유지하는 경우 이러한 제제는 안정한 것으로 이해된다. 4주간 보존 시험 후의 가속 조건(25±2 °C / 60±5 % RH)에서 단백질의 잔존율이 97% 이상 유지하는 경우 이러한 제제는 우수한 안정성을 가진다고 이해된다. 4주간 보존 시험 후의 가속 조건(25±2 °C / 60±5 % RH)에서 단백질의 잔존율

이 98% 이상 유지하는 경우 이러한 제제는 매우 우수한 안정성을 가진다고 이해된다.

[0050] 특정 이론에 구속되는 것은 아니지만, 본 명세서의 액상 제제가 고농도의 에플라페그라스티를 포함함에 따라 단백질간의 상호작용으로 인하여 장기 보존 후의 에플라페그라스티의 잔존율이 증가할 수 있다. 또한, hG-CSF 변이체의 구체적인 아미노산 서열 또한 잔존율 증가에 영향을 줄 수 있으며, 이는 전하를 가진 아미노산들의 정전기적 결합이나 화학구조에 기인하는 아미노산들간의 상호작용으로 인한 것으로 보인다.

[0051] 상기 제제의 안정성을 위하여, 상기 에플라페그라스티 및 완충물질 이외에, 본 발명의 액상 제제의 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 당업계에서 공지되어 있는 기타의 성분 내지 물질들이 액상 제제에 선택적으로 더 포함될 수 있다.

[0053] 안정화제

[0054] 일 구체예에 있어서, 상기 액상 제제는 안정화제를 포함할 수 있다.

[0055] 용어 "안정화제"는 안정성을 개선시키거나 향상시키는 부형제를 의미할 수 있다. 상기 안정화제의 예는 만니톨, 소르비톨, 텍스트로즈, 트레할로즈, 슈크로즈, 라피노즈, 말토즈, 벤질 알콜, 비오틴, 비셀파이트 화합물, 보론 화합물, 부틸화 하이드록시아니솔(BHA), 부틸화 하이드록시톨루엔(BHT), 아스코르브산 및 이의 에스테르, 카로테노이드, 칼슘 시트레이트, 아세트-L-카미틴, 킬레이트화제, 콘드로이틴, 크로뎀, 시트르산, 조효소 Q-10, 시스테인, 시스테인 하이드로클로라이드, 3-데하이드로쉬키믹산(DHS), EDTA(에틸렌디아민테트라아세트산; 에테데이트 이나트륨), 비타민 A 및 이의 에스테르, 비타민 B 및 이의 에스테르, 비타민 C 및 이의 에스테르, 비타민 D 및 이의 에스테르, 비타민 E 및 이의 에스테르, 예를 들면, 비타민 E 아세테이트, 아연 및 이들의 임의의 배합물이 포함된다. 상기 안정화제는 상기 액상 제제에 대하여 0.2 내지 30%(w/v), 0.5 내지 30%(w/v), 0.5 내지 20%(w/v), 0.5 내지 10%(w/v), 1 내지 30%(w/v), 1 내지 25%(w/v), 1 내지 20%(w/v), 1 내지 15%(w/v), 2 내지 20%(w/v), 2 내지 15%(w/v), 또는 2 내지 10%(w/v) 로 포함될 수 있다.

[0056] 일 구체예에서, 상기 안정화제는 알부민이 실질적으로 함유되지 않은 안정화제이다. 단백질의 안정화제로 이용될 수 있는 인간 혈청 알부민은 인체의 혈액으로부터 제조되므로, 인간 유래의 병원성 바이러스에 의한 오염 가능성이 존재하며, 젤라틴이나 소 혈청 알부민은 질환을 야기하거나, 일부 환자의 경우에는 알러지 반응을 유발할 가능성이 있다. 본 명세서의 알부민-비함유 안정화제는 인간 또는 동물 유래의 혈청 알부민 또는 정제된 젤라틴 등의 이종 단백질을 함유하지 않아 바이러스 감염의 우려가 없을 수 있다.

[0057] 본 명세서에서 "실질적으로 포함하지 않다(substantially does not comprise)"는 언급된 물질이 조성물의 제제 또는 활성 또는 제제의 특성, 또는 활성에 기여하지 않을 정도로 포함되거나 전혀 포함되지 않는 것을 의미한다.

[0058] 특정 이론에 구속되는 것은 아니지만, 상기에서 언급된 바와 같은 제제의 안정성을 개선시키는 역할을 할 수 있다. 따라서, 특정 함량의 이들 물질의 사용으로 변화된 물리적 또는 화학적 환경에 의해 에플라페그라스티의 잔존율은 변화하게 된다.

[0060] 계면활성제

[0061] 일 구체예에 있어서, 상기 액상 제제는 계면활성제를 포함할 수 있다.

[0062] 본 명세서에서 용어 "계면활성제"는 일반적으로 공기/용액 계면 유도된 변형력 및 용액/표면 유도된 변형력으로 부터 단백질을 보호하는 제제를 포함하는 의미일 수 있다. 예를 들면, 계면활성제는 단백질을 응집으로부터 보호할 수 있다. 적합한 계면활성제에는, 폴리소르베이트계 비이온성 계면활성제의 예로는 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 40, 폴리소르베이트 60 또는 폴리소르베이트 80를 포함할 수 있다. 또한, 계면활성제의 예로는 폴록사머, 예를 들면, 폴록사머 188, 및 트윈, 예를 들면, 트윈 20 및 트윈 80, 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르, 트리톤 X-100, Brij 30, 또는 Brij 35를 포함할 수 있다.

[0063] 폴리소르베이트계 비이온성 계면활성제가 전체 용액 또는 전체 액상 제제 대비 최종 농도 5%(w/v)를 기준으로, 그 이상일 경우 에플라페그라스티를 포함하는 액상 제제의 안정성에 상당한 영향을 줄 수 있으며, 상기 안정성 평가 척도로서 잔존율이 적용될 수 있다. 예를 들어, 4주간 보존 시험 후의 가속 조건(25±2 °C / 60±5 % RH)에서 단백질의 잔존율이 97% 이상 유지하는 경우 이러한 제제는 우수한 안정성을 가진다고 이해된다.

[0064] 한편, 유럽에서 처음으로 허용된 이후로 폴리소르베이트계 비이온성 계면활성제는 약학/화장품 분야에 있어 첨가제로 널리 사용되나 최근 인체에 부정적인 영향을 나타낸다는 일부 보고가 있다. 예컨대, 폴리소르베이트 80

을 인체에 주입하였을 때 아나필락시스(anaphylaxis)를 유발한다는 보고가 있다(Palacios Castano MI et al., Anaphylaxis Due to the Excipient Polysorbate 80, 2016). 따라서, 단백질 약물의 안정성 및 주입 시 환자 불편감을 유발하지 않는 범위 내에서 폴리소르베이트계 비이온성 계면활성제의 농도를 조절할 필요가 있으며, 액상 제제 제조 공정과정 중에 불가피하게 폴리소르베이트계 비이온성 계면활성제의 농도가 높아지는 것을 기술적으로 방지할 필요가 있다.

[0065] 일 구체예에 있어서, 상기 폴리소르베이트계 비이온성 계면활성제는 전체 용액 또는 전체 액상 제제 대비 최종 농도로 0.0001 내지 5%(w/v), 0.0001 내지 0.5%(w/v), 0.0001 내지 0.05%(w/v), 0.0001 내지 0.005%(w/v), 0.0001 내지 0.0005%(w/v), 0.001 내지 5%(w/v), 0.001 내지 0.5%(w/v), 0.001 내지 0.05%(w/v), 0.001 내지 0.005%(w/v), 0.01 내지 5%(w/v), 0.01 내지 0.5%(w/v), 0.01 내지 0.05%(w/v), 0.1 내지 5%(w/v), 또는 0.1 내지 0.5%(w/v)로 포함될 수 있고, 예를 들어, 0.0001 내지 4.5%(w/v), 0.0001 내지 0.45%(w/v), 0.0001 내지 0.045%(w/v), 0.0001 내지 0.0045%(w/v), 0.0001 내지 0.00045%(w/v), 0.001 내지 4.5%(w/v), 0.001 내지 0.45%(w/v), 0.001 내지 0.045%(w/v), 0.001 내지 0.0045%(w/v), 0.01 내지 4.5%(w/v), 0.01 내지 0.45%(w/v), 0.01 내지 0.045%(w/v), 0.1 내지 4.5%(w/v), 또는 0.1 내지 0.45%(w/v)로 포함될 수 있다.

[0067] 본 명세서에서 용어 "최종 농도(final concentration)"는 기술된 농도(stated concentration)와 구분되는 개념으로 실질적으로 액상 제제 내에 포함되는 실제 농도(actual concentration)를 의미한다. 예를 들면, 액상 제제의 제조에 있어서, 완충물질의 교환 후 목표하는 농도까지 에플라페그라스티를 농축하는 과정에서, 상기 용액 내 계면활성제의 최종 농도는 기술된 농도보다 더 높아질 수 있다. 예컨대, 계면활성제로 폴리소르베이트계 비이온성 계면활성제를 사용하는 실시 형태에서는, 기술된 농도가 0.005%(w/v)인 경우에는 폴리소르베이트계 계면활성제가 에플라페그라스티와 함께 농축되어 제제 내 이의 실제 농도 또는 최종 농도는 0.005%(w/v)의 최소 1000 배를 초과할 수 있다. 예를 들어, 에플라페그라스티가 아닌 과립구 콜로니 자극인자 결합체를 포함하는 액상 제제를 기재한 대한민국 등록특허공보 제10-1340710호 (공개일자 2013.12.12.)의 실시예에 기재된 0.005%(w/v) 또는 0.01%(w/v)의 폴리소르베이트 80의 최종 농도 (즉, 실제 농도)는 최소 5%(w/v) 또는 10%(w/v)를 초과할 수 있다. 이에 반해, 본 명세서에서 폴리소르베이트계 비이온성 계면활성제의 최종 농도를 0.005%(w/v)라고 표시하는 경우는 폴리소르베이트계 비이온성 계면활성제를 실질적으로 포함하지 않는 완충물질로 교환, 예를 들어 투석 여과를 사용하여 교환한 후, 목표 에플라페그라스티 농도까지 완충물질의 농축을 마친 다음에 0.005%(w/v)농도가 될 때까지 폴리소르베이트계 비이온성 계면활성제를 0.005%(w/v)로 스파이킹(spiking)하여 얻은 제제라는 것을 의미한다. 따라서, 일 구체예에 따른 상기 액상 제제는 정제 컬럼을 이용하여 전처리된 것이나, 상기 전처리된 액상 제제를 상기 폴리소르베이트계 비이온성 계면활성제를 실질적으로 포함하는 않는 완충물질로 교환한 후, 농축한 것일 수 있다. 이로 인해, 특정 이론에 제한됨이 없이, 본 명세서의 액상 제제는 종래 액상 제제에 비해, 고농도이면서 응집 가능성이 높은 비천연 단백질을 함유하는 액상 제제의 현저한 제제의 안정성 및 개선된 임의의 특성을 제공할 수 있다.

[0069] 긴장성 개질제

[0070] 일 구체예에 있어서, 상기 액상 제제는 긴장성 개질제를 포함할 수 있다.

[0071] 본 명세서에서 사용된 용어 "긴장성(tonicity) 개질제"는 액체 제제의 긴장성을 조정하기 위해 사용될 수 있는 화합물 또는 화합물들을 의미할 수 있다.

[0072] 긴장성 개질제는 약학적으로 허용 가능한 염, 당류, 및 아미노산으로 이루어진 군에서 1종 이상 선택된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 긴장성 개질제는 염화나트륨, 인산 나트륨, 숙신산나트륨, 황산나트륨, 염화칼륨, 염화마그네슘, 황산마그네슘, 염화마그네슘 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 보다 구체적으로 염화나트륨 등일 수 있다. 또한, 상기 긴장성 개질제는 단당류, 이당류, 올리고당류 및 다당류로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 예컨대, 트레할로오스, 슈크로오스, 만니톨, 소르비톨, 프럭토오스, 말토오스, 락토오스, 텍스트란 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 또한, 상기 긴장성 개질제는 프롤린, 알라닌, 아르기닌(예컨대, L-아르기닌), 아스파라진, 아스파르트산(예컨대, L-아스파르트산), 글리신, 세린, 라이신, 히스티딘 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0073] 본 명세서의 제제의 안정화를 위한 상기 긴장성 개질제의 농도는 상기 삼투압 범위를 유지 또는 조절할 수 있는 양일 수 있으며, 예컨대, 1 내지 600 mM, 5 내지 600 mM, 5 내지 400 mM, 5 내지 300 mM, 10 내지 400 mM, 10 내지 300 mM, 10 내지 200 mM, 20 내지 400 mM, 20 내지 200 mM, 30 내지 400 mM, 30 내지 200 mM, 50 내지 600 mM, 50 내지 400 mM, 80 내지 400 mM, 80 내지 200 mM, 100 내지 400 mM, 100 내지 300 mM, 또는 100 내지 200 mM 일 수 있다.

- [0074] 긴장성 개질제는 하기에서 후술될 바와 같이 적절한 삼투압을 제공하는데 충분한 양으로 첨가될 수 있다.
- [0076] 완충물질 및 pH
- [0077] 본 명세서에서 용어 "완충물질"은 수용액에 첨가시 산 또는 알칼리를 첨가하는 경우, 또는 용매로 희석하는 경우 pH의 변화에 대해 용액을 보호할 수 있는 1종 이상의 성분을 의미할 수 있다. 상기 완충물질은 제제의 안정화를 위한 조성물의 pH가 특정 범위가 되도록 할 수 있는 모든 물질, 예컨대 유기산 버퍼 또는 무기산 버퍼, 예를 들면, 유기산, 무기산, 또는 유기산 또는 무기산의 염일 수 있다. 더욱 상세하게는 상기 완충제는, 숙신산, 아세트산, 시트르산, 히스티딘, 인산, 글라이신, 락트산, 트리스, 비스트리스 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 유기산 또는 무기산, 또는 상기 유기산 또는 무기산의 나트륨염, 숙시네이트, 아세테이트, 시트레이트, 포스페이트, 락테이트 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 더욱 상세하게는 상기 완충물질의 예는 알칼리 염(나트륨 또는 칼륨 포스페이트 또는 이들의 수소 또는 이수소 염), 구연산나트륨/시트르산, 나트륨 아세테이트/아세트산을 비롯하여 당업계에서 공지된 임의의 다른 제약상 허용 가능한 pH 완충물질을 포함할 수 있으며, 이들의 혼합물도 사용될 수 있다.
- [0078] 일 구체예에 있어서, 상기 완충물질의 농도는 5 내지 100 mM, 5 내지 80 mM, 10 내지 80 mM, 10 내지 60 mM, 10 내지 50 mM, 또는 15 내지 25 mM일 수 있다.
- [0079] 일 구체예에 있어서, 상기 액상 제제의 특정 pH 범위는 4 내지 8, 5 내지 8, 5 내지 7, 또는 5 내지 6, 구체적인 실시예에 있어서, 5.5 일 수 있다.
- [0080] 상기 완충물질은 물과 같은 액상 매질에 용해되어 pH는 4 내지 8, 5 내지 8, 5 내지 7, 또는 5 내지 6인 용액 상태로 사용될 수 있다.
- [0082] 삼투압
- [0083] 여러가지 문헌을 종합하여, 약물의 삼투압은 300 ± 30 mOsm/kg으로 조절될 수 있으나, 다양한 부형제가 사용되어야 하기에, 기술산업상 고장성 용액으로 제조되기도 한다. 정맥 내 또는 혈관 내 투여에 있어서, 삼투압의 상한은 일반적으로 1000 mOsm/kg을 넘지 않는 것이 제안되고, 혈청의 삼투압은 약 285 mOsm/L이기 때문에, 삼투압의 하한은 일반적으로 100 mOsm/L 또는 200 mOsm/L을 넘는 것이 제안된다. 따라서, 일반적으로 환자는 100 내지 1000 mOsm/kg, 200 내지 1000 mOsm/kg, 100 내지 800 mOsm/kg, 또는 200 내지 800 mOsm/kg을 견딜 수 있을 것으로 예상된다. 일 구체예에서, 우수한 안정화 효과를 나타내기 위한 액상 제제의 삼투압은 400 내지 800 mOsm/kg일 수 있다.
- [0084] 한편, 삼투압은 당해 기술분야에 알려진 측정방법 및 측정기기를 이용하여 측정할 수 있다.
- [0085] 특정 이론에 구속되는 것은 아니지만, 본 명세서의 액상 제제의 삼투압은 에플라페그라스티의 농도에 영향을 받거나 추가적으로 포함될 수 있는 안정화제나 긴장성 개질제의 농도에 영향을 받는 것으로 추측하였다. 본 명세서의 액상 제제가 일정 범위의 에플라페그라스티의 농도 및/또는 특정 아미노산 서열을 갖는 hG-CSF 변이체로 인하여 안정성이 증가됨에 따라 종래 액상 제제의 조성과 비교하여 안정성에 영향을 줄 수 있는 액상 제제의 조성을 보다 유연하게 조절할 수 있다. 이에 따라 발명의 효과를 달성하기 위한 액상 제제의 삼투압을 갖기 위한 조성을 보다 유연하게 조절할 수 있다. 예컨대, 액상 제제의 안정성을 위하여 추가적으로 포함될 수 있는 안정화제 또는 긴장성 개질제의 농도를 상대적으로 낮추어 삼투압을 조절할 수 있다.
- [0087] 전도도
- [0088] 다른 구체예에 있어서, 본 명세서의 제제는 전도도(conductivity)가 20 mS/cm, 19 mS/cm, 18 mS/cm, 17 mS/cm, 16 mS/cm, 또는 15 mS/cm 이하인 것일 수 있다. 상기 인용된 수치의 중간 범위, 예를 들면, 1 내지 20 mS/cm은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다. 예를 들면, 상한치 및/또는 하한치로서 상기 인용된 수치의 조합을 사용하는 수치 범위는 포함되는 것으로 의도된다. 또한, 인용된 수치에 포함되는 수치, 예를 들면, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 mS/cm 등도 본 명세서에 포함된다.
- [0089] 본 명세서에 사용된 용어 "전도도"는 수용액이 2개 전극 사이에서 전류를 전도하는 능력을 의미한다. 일반적으로, 전기 전도도 및 비(specific)-전도도는 전류를 전도하는 물질 능력의 척도이다. 용액에서, 전류는 이온 수송에 의해 흐른다. 따라서, 수용액 중에 존재하는 이온의 양이 증가함에 따라, 용액은 보다 높은 전도도를 가질 것이다. 전도도의 측정 단위는 mmhos (mS/cm)이고, 시중에 판매되는 전도도 측정기를 사용하여 측정할 수 있다.
- [0091] 최대활주력 및 점도

[0092] 본 명세서에서 용어 "최대활주력(Maximum Gliding Force: MGF)"은 주사기를 이용하여 약물을 투여시 가해지는 최대 힘을 의미하며, 제제의 점도, 주사 속도, 및 주사기 특성에 영향을 받는다. 또한, 단백질 제제의 유동학적 특성은 단백질의 농도에 의해 영향을 받게 된다. 또한, 29 G 이상의 얇은 니들은 실질적으로 최대 활주력을 증가시킨다. 결국, 높은 농도의 단백질로 인한 응집 현상, 및 이로 인한 점도 증가는 최대 활주력의 증가를 일으키고, 최대 활주력의 감소를 위해 29 G 미만의 니들로 투여해야하는 경우가 발생하며, 이는 환자의 불편감을 일으키게 된다. 일반적으로, 환자는 15 N 내지 20N 정도의 최대 활주력을 견딜 수 있다고 보고된 바 있다 (Development of Syringeability Guide for Subcutaneous Protein Formulations, L. Joseph et al., Pfizer Global Research & Development, 2010).

[0093] 일 구체예에서, 치료적 효과를 위해 충분한 고농도의 에필라페그라스티를 함유하면서도 액상 제제를 29 게이지의 주사기로 2.835 mm/s 속도로 투여 시 최대활주력이 7N, 6N, 5N, 4N, 또는 3N 이하일 수 있다. 또한, 액상 제제를 29 게이지의 주사기로 4.725 mm/s 속도로 투여 시 최대활주력이 10N, 9N, 8N, 7N, 6N, 5N, 4N, 3.5 N 또는 3N 이하일 수 있다. 최대활주력은 당해 기술분야에 공지된 활주력(Gliding force) 측정장치를 이용하여 측정할 수 있으며, 예컨대 대고무역에서 판매하고 있는 레오미터(rheometer)를 이용하여 측정할 수 있다. 일 구체예에 있어서, 본 명세서의 액상 제제는 20 °C 내지 25 °C의 상온에서 점도(viscosity)가 10 cP, 9 cP, 8 cP, 7 cP, 6 cP, 5 cP, 4 cP, 3 cP, 3.5 cP, 3 cP, 2.5 cP 또는 2 cP 이하일 수 있다. 점도는 당해 기술분야에 알려진 측정방법 및 측정기기를 이용하여 측정할 수 있다.

[0094] 상기에서 언급된 바와 같이 최대 활주력은 제제의 점도에 의해 영향을 받고, 점도, 즉, 단백질 제제의 유동학적 특성은 농도에 의해 영향을 받게 된다. 따라서, 상기 최대 활주력은 단백질 약물(에플라페그라스티)의 잔존율, 농도, 또는 완충물질에 의해서 영향을 받을 수 있으며, 또한 추가적으로 포함될 수 있는 계면활성제, 안정화제 또는 긴장성 개질제에 의해서도 영향을 받을 수 있다.

[0096] 환자 친화 제제

[0097] 단백질 약물의 경우 치료 효과를 위해 고농도로 제형화되는 것이 요구되는데, 일반적으로 응집, 불용성, 열화 등의 문제는 단백질 농도가 상승함에 따라 증가되는 문제가 있다. 따라서, 약제학적 단백질 제제에 있어 임의의 부작용을 제한하면서, 안정성 및 치료적 요건을 향상시키기 위해 성분과 농도의 균형을 맞추는 것이 당업계에서 해결해야 할 기술적 과제 중 하나이다. 이에, 본 명세서는 고농도의 활성 성분을 함유하면서도 제제의 안정성 및 용해도가 높은 제제를 제조할 수 있었다. 이러한 치료학적 사용을 위한 단백질 제제의 본 명세서의 놀라운 진보 이외에도, 이러한 단백질 약물의 액상 제제를 개체에 투여할 시에, 투여 부위에서의 자극(irritation)/통증(pain), 및 불편감(uncomfortableness)은 여전히 해결해야할 과제로 남아있다.

[0099] 삼투압과 투여부위 자극(irritation)/통증(pain)

[0100] 조직과 세포에서의 삼투압 변화는 인체에서 위험한 신호로 감지되어, 수지상 세포를 활성화 시키고, 면역반응과 염증반응을 자극한다 (Gallo and Gallucci, 2013). 인간 영유아의 소화관에서의 고장성은 괴사성 장결장염을 일으킬 수 있다고 보고된 바 있다(Atakent et al., 1984). 통증 수용체들의 존재가, 주사를 포함한 다양한 이벤트에 의해 유발되는 통증을 느끼는 것의 원인이라는 것은 이미 잘 알려져 있다. 말초의 고통에 대한 감각은 통각 수용기라 불리는 구심성 섬유들(감각신경섬유)을 통해 매개된다(Brazeau et al., 1998). 기능적으로, 통각수용기는 2개의 주요타입으로 분류되어 있는데, 화학물질에 반응하는 다류자극수용기(polymodal nociceptor)와 기계적, 열적 자극들에 반응하는 기계적열적자극수용기(mechanothermal nociceptor)가 있다. 그렇기 때문에, 통각수용기의 통증에 대한 감도는 화학물질의 종류뿐만 아니라 주입위치, 주입속도, 주입부피에도 의존한다. 고장성 용액(또는 저장성 용액)은 세포로부터 물을 밖으로 끌어낼 수 있고(또는 세포로의 물의 흡수를 일으킬 수 있고), compression(또는 stretch)-sensitive channel을 활성화시켜 고통을 일으킨다.

[0102] 최대활주력 및 점도와 환자 불편감(uncomfortableness)

[0103] 주입부피(주사시 약물의 주입부피, injection volume)을 줄이는 것과 저장공간을 확보하는 것에 관련하여, 더 높은 농도의 단백질 제제가 관심을 받고 있다. 높은 농도의 단백질 제제에 대한 개발은 안정성, 제조, 전달에 관하여 몇 가지 현실적인 문제점들이 존재하고, 이는 단백질이 높은 농도에서 응집하는 경향이 있는 것에 기인한다. 높은 농도의 단백질 제제의 물리적인 물성들은 그들을 쉽게 전달하기 위한 능력에 영향을 주고, 이런 고농도의 용액들은 흔히 높은 점도를 나타내어, 주사기 바늘을 용액이 통과할 수 없게 막을 수 있다. 그렇기 때문에 물질의 점도와 단백질 농도는 상관관계를 가지며, 높은 농도의 단백질 제제일 수록 점도가 높아 환자에 불편감을 야기한다. 따라서, 단백질 제제의 농도의 증가 및 점도 감소를 통해 치료적 효과를 높이면서 환자의 수용

성을 더 높게 할 수 있는 제제의 개발은 단백질 제제의 설계에 있어 진보된 발전을 제시한다.

[0104] 최대 활주력을 감소시키기 위해서, 치료적 효과를 높이기 위해서, 그리고 더 얇은 니들로 단백질 제제를 투여하기 위해서는 고농도의 단백질을 함유하면서 응집 현상이 적어야 하고, 점도가 낮아야 하는데, 서로 상반되는 수치(고농도 단백질 제제 및 낮은 점도)를 해결해야 한다.

[0106] 환자친화도 지수(PF, Patient friendly 지수)

[0107] 상기에서 언급된 바와 같이, 고농도 단백질 제제의 생성은 유백광, 응집 및 침전과 관련하여 상당한 문제를 유도할 수도 있다. 비천연 단백질 응집 및 미입자 형성의 가능성 이외에, 가역적 자가-결합이 발생할 수도 있으며, 이는 주입에 의한 전달을 복잡하게 하는 점도 증가 및 기타 특성을 생성할 수도 있다. 고점도는 또한 여과 방식에 의한 고농도 단백질의 제조를 복잡하게 할 수도 있다. 이에, 제제의 안정성이 높으면서, 환자 친화적인 제제의 개발은, 다양한 인자들이 주의깊게 복합적으로 고려되어야 한다. 즉, 제제의 안정성과 관련된 인자인 잔존율은 안정화제, 계면활성제에 의해 영향을 받고 이는 다시 물질의 점도에 영향을 미쳐 최대활주력에 영향을 미친다. 또한, 삼투압은 긴장성 개질제와 완충물질에 의해 영향을 받고, 이는 전도도에 영향을 미칠 수 있다.

[0109] 일 구체예에서, 본 명세서는 특정 범위의 하기 수학적 1의 환자 친화 지수를 만족하는 액상 제제를 제공한다;

[0110] [수학적 1]

[0111] PF(Patient friendly) 지수 = $Osm(mOsm/kg)/100 + MGF(N)$

[0112] 수학적 1에서 Osm은 액상 제제의 삼투압(Osmolarity)의 수치이고, MGF는 29 게이지의 주사기로 액상 제제를 2.835 mm/s 속도로 투여 시 최대활주력(Maximum Gliding Force)의 수치이다.

[0114] 상기 환자 친화 지수는 적정 삼투압 및 적정 최대 활주력의 수치를 고려했을 때, 10 이하일 수 있다. 만일 상기 환자 친화 지수가 10을 초과하는 경우, 체액과의 삼투압 차이 및/또는 높은 최대 활주력으로 인해 환자의 불편감이 급격하게 증가할 수 있다. 또한, 상기 환자 친화 지수는 적정 삼투압 및 적정 최대 활주력의 수치를 고려했을 때, 3 이상일 수 있다. 만일 상기 환자 친화 지수가 3 미만인 경우, 이 역시 체액과의 삼투압 차이 및/또는 낮은 최대 활주력으로 인해 환자의 불편감이 급격하게 증가할 수 있다.

[0115] 구체적으로, 액상 제제의 환자 친화 지수는 3 내지 10, 5 내지 10, 6 내지 10, 또는 6 내지 9일 수 있다. 점도에 의해 영향을 받는 최대 활주력이 적어도 1N 이상일 경우가 대부분인 것을 고려했을 때, 삼투압이 1000 mOsm/kg일 경우, 환자 친화 지수가 10을 초과하기 때문에 환자 친화 주입이 어려울 수 있다. 또한, 최대 활주력이 대부분 1N 이상일 경우가 대부분인 것을 고려했을 때, 삼투압이 200 mOsm/kg 미만일 경우, 환자 친화 지수가 3을 넘지 않기 때문에 환자 친화 주입이 어려울 수 있다.

[0116] 따라서, 상기 환자 친화 지수의 범위 내에 들어오는 액상 제제는 고농도의 단백질 제제가 고려된 낮은 점도, 낮은 활주력, 및 적정 삼투압의 범위를 갖기 때문에 상기에서 언급한 바와 같은 기술적 과제를 해결함으로써 높은 제형 안정성 가지면서 환자 친화 주입이 가능하다.

[0118] 본 발명의 액상 제제는 11 내지 66 mg/mL 농도의 에플라페그라스티 및 5 내지 100 mM 농도의 완충물질을 포함할 수 있거나, 11 내지 66 mg/mL 농도의 에플라페그라스티, 5 내지 100 mM 농도의 완충물질 및 0.001 내지 5%(w/v) 농도의 폴리소르베이트계 비이온성 계면활성제를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 액상 제제는 11 내지 66 mg/mL 농도의 에플라페그라스티, 5 내지 100 mM 농도의 완충물질, 1 내지 20 %(w/v) 농도의 안정화제, 0.001 내지 5%(w/v) 농도의 계면활성제 및 5 내지 200 mM 농도의 긴장성 개질제를 포함할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 액상 제제는 11 내지 66 mg/mL 농도의 에플라페그라스티 및 5 내지 100 mM 농도의 구연산 나트륨을 포함할 수 있거나, 11 내지 66 mg/mL 농도의 에플라페그라스티, 5 내지 100 mM 농도의 구연산 나트륨, 및 0.001 내지 5%(w/v) 농도의 폴리소르베이트 80을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 액상 제제는 11 내지 66 mg/mL 농도의 에플라페그라스티, 5 내지 100 mM 농도의 구연산 나트륨, 1 내지 20 %(w/v) 농도의 만니톨, 0.001 내지 5%(w/v) 농도의 폴리소르베이트 80 및 5 내지 200 mM 농도의 염화나트륨을 포함할 수 있거나, 11 내지 66 mg/mL 농도의 에플라페그라스티, 5 내지 100 mM 농도의 구연산 나트륨, 0.001 내지 0.5%(w/v) 농도의 폴리소르베이트 80, 1 내지 20 %(w/v) 농도의 만니톨, 및 5 내지 200 mM 농도의 염화나트륨을 포함할 수 있다.

[0120] 본 발명의 액상 제제의 주입볼륨은 투여 부위의 자극/고통 또는 환자 불편감의 최소화를 고려하여 적절히 조절될 수 있다. 예컨대, 액상 제제는 0.2 내지 1.2 mL의 주입볼륨을 가질 수 있다.

- [0122] 또 다른 양상은 상기 액상 제제를 함유하는 제조 물품을 제공한다.
- [0123] 본 명세서의 다른 실시양태에서, 약물 제품을 함유하고 그의 사용에 대한 지시사항을 제공하는 제조 물품이 제공된다. 제조 물품은 용기를 포함한다. 적합한 용기로는 예를 들어 병, 바이알, 주사기 및 시험 튜브를 들 수 있다. 용기는 유리, 플라스틱 또는 금속과 같은 여러 물질로부터 형성될 수 있다.
- [0125] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0127] **실시예 1. 환자 친화 주입 가능(Patient Friendly Injectable) 액상 제제의 분석**
- [0128] 본 실시예에서는 제제의 투여 시에 환자에 영향을 미치는 상기 제조된 제제의 여러 가지 변수를 활용하여 최종 액상 제제의 환자 친화 주사 제제를 도출하고자 하였다. 이를 위해, 상기한 바와 같이, 삼투압의 적정 수치는 "Tolerability of hypertonic injectables, Wei Wang, International Journal of Pharmaceutics 490 (2015) 308-315", 및 "Tonicity Agents Clarity - American Pharmacists Association"의 기재를 근거로 본 발명의 제제에 적용하여 100 내지 1000 mOsm/kg, 또는 바람직하게 200 내지 1000 mOsm/kg으로 결정하였다. 최대활주력의 적정 수치는 "Development of Syringeability Guide for Subcutaneous Protein Formulations, L. Joseph et al., Pfizer Global Research & Development, 2010"의 기재를 참고하여 5N 이하로 산정하였다.
- [0129] 이들 수치 간에 상호 보완성을 고려하여 매개 변수를 도입하였고, 이를 하기 수학적 1에 나타내었다. 하기 수학적 1을 만족하는 경우 환자 친화도가 높은 액상 제제를 제조할 수 있음을 알 수 있었고, 수학적 1의 결과값을 환자 친화(Patient Friendly) 지수라 명명하였다.
- [0131] [수학적 1]
- [0132] 환자 친화(Patient Friendly) 지수 = $Osm(mOsm/kg)/100 + MGF(N)$
- [0134] Osm: 액상 제제의 삼투압
- [0135] MGF: 29 게이지의 주사기로 액상 제제를 2.835 mm/s 속도로 투여 시 최대활주력
- [0137] 상기 환자 친화 지수는 적정 삼투압 및 적정 최대 활주력의 수치를 고려했을 때, 3 내지 10으로 결정하였다. 적어도 최대 활주력이 1N 이상일 경우가 대부분인 것을 고려했을 때, 액상 제제의 삼투압이 1000 mOsm/kg을 초과하는 경우, 환자 친화 지수가 10을 초과하기 때문에 환자 친화 주입이 어려울 수 있다. 또한, 적어도 최대 활주력이 1N 이상일 경우가 대부분인 것을 고려했을 때, 삼투압이 200 mOsm/kg 미만일 경우, 환자 친화 지수가 3을 넘지 않기 때문에 환자 친화 주입이 어려울 수 있다. 즉, 상기 환자 친화 지수가 3 내지 10일 경우 우수한 환자 친화 주사 제제인 것으로 간주된다.
- [0138] 따라서, 상기 환자 친화 지수의 범위 내에 들어오는 액상 제제는 고농도의 단백질 제제가 고려된 낮은 점도, 낮은 활주력, 및 적정 삼투압의 범위를 갖기 때문에 상기에서 언급한 바와 같은 기술적 과제를 해결함으로써 높은 제제 안정성을 가지면서 환자 친화 주입이 가능한 것으로 보았다.
- [0140] **실시예 2. 액상 제제의 안정성 분석**
- [0141] 고농도 단백질 제형에서의 안정성은 4주간 보존 시험 후의 잔존율을 통해 측정하였다. 구체적으로, 액상 제제의 잔존율을 측정하기 위하여, 가속 조건(25±2 °C/ 60±5 % RH)에서 4주간 보존 시험 후 에플라페그라스팀의 잔존율을 RP-HPLC 및 SE-HPLC로 측정하였다. 상기 액상 제제 내 에플라페그라스팀의 n 주차 잔존율은 수학적 2에 의해 산출되었다.
- [0142] [수학적 2]
- [0143] n 주차 잔존율(%) = n 주차 순도 값 / 초기 순도 값 x 100
- [0145] 순도는 HPLC에 따른 main peak의 상대적인 비율이다.
- [0147] HPLC는 Agilent 1200 시리즈를 사용하였으며, RP-HPLC는 Phenomenex Jupiter C4 컬럼으로 60°C 조건에서 측정하였다. 1.0 mL/min 유속을 갖는 2-eluent linear gradient 시스템이 사용되었으며, 이동상 A는 0.1% 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic acid)을 포함한 20% 아세토나이트릴(acetonitrile)이, 이동상 B는 0.1% 트리플루오로아세트산을 포함한 80% 아세토나이트릴이 각각 사용되었다. 초기 76% 이동상 A와 24% 이동상 B로 최소 1시간 안정화 후, 0 내지 15분 사이 24 내지 60% 이동상 B, 15 내지 48분 사이 60 내지 73% 이동상 B, 48 내지

75분 사이 73 내지 100% 이동상 B로 선형 구배 시스템으로 측정하였다. 그리고 75 내지 85분 사이 24% 이동상 B로 재평형시켰다. 시료 주입량은 20 ug, 탐지기는 214 nm 파장으로 설정되었고, Agilent Chemstation software로 모든 과정을 조정하였다.

[0148] SE-HPLC는 Shodex Protein KW-803 컬럼으로 상온 조건에서 측정하였다. 0.6 mL/min 유속을 갖는 isocratic gradient 시스템이 사용되었으며, 이동상은 50 mM 나트륨 포스페이트, 150 mM 염화나트륨, 5% 이소프로필 알코올(isopropyl alcohol)이 사용되었다. 최소 1시간 안정화 후, 60분간 측정하였으며, 시료 주입량은 20 ug, 탐지기는 214 nm 파장으로 설정되었고, Agilent Chemstation software로 모든 과정을 조정하였다.

[0150] 한편, 에플라페그라스티의 물리화학적 특성 및 단백질 제제분야의 일반적인 상식을 고려하여, 4주간 보존 시험 후의 가속 조건(25±2 °C/ 60±5 % RH)에서 에플라페그라스티의 잔존율이 아래와 같이 유지되는 경우 안정성을 가진다고 이해하였다:

[0151] - 95% 이상 유지: 안정성을 가짐

[0152] - 97% 이상 유지: 우수한 안정성을 가짐

[0153] - 98% 이상 유지: 매우 우수한 안정성을 가짐

[0155] **제조예 1-46. 에플라페그라스티 함유 액상 제제의 제조**

[0156] 고농도 에플라페그라스티를 함유하면서, 실시예 1 및 2에서 제시하는 환자친화적이고 제형 안정성을 보이는 액상 제제를 설계하였다.

[0157] 시뮬레이션 예측에 따라 제형 안정성과 환자 친화 주입이 가능할 것으로 보이는 제조예 1 내지 36의 액상 제제를 제조하였다. 한편, 종래의 제조법에 따라 고농도의 폴리소르베이트계 비이온성 계면활성제가 함유될 경우의 제형 안정성을 알아보기 위하여 제조예 37 내지 39의 액상 제제를 제조하였다. 추가적으로, 환자의 불편감 야기 또는 제형 안정성면에서 문제가 있을 것으로 예상되는 제조예 40 내지 43의 액상 제제를 제조하였으며, 제형 안정성의 주요한 인자인 에플라페그라스티의 잔존율에 영향을 미치는 인자로서, 계면활성제의 농도에 따른 변화를 확인하기 위하여 제조예 44 내지 46의 액상 제제를 제조하였다.

[0159] **1. 제조예 1 내지 36**

[0160] 에플라페그라스티를 함유하는 액상 제제는 다음과 같이 제조하였다.

[0161] 먼저, 22 mg/mL의 에플라페그라스티, 20 mM의 구연산 나트륨(pH 5.5), 5% 만니톨, 150 mM의 염화나트륨, 및 0.005%(w/v, 최종 농도)의 폴리소르베이트 80 조성으로 제조된 액상 제제를 준비하였다. 이후에, 시료 전처리를 위하여 S.Q 정제 컬럼(Source 15Q, GE Healthcare)을 이용하여 상기 제조된 액상 제제의 폴리소르베이트 80을 제거하였다. 이후에, 정제 프로파일 중 가장 주요한 분획만을 회수하였다. 다음으로 상기 전처리된 액상 제제에 대해 버퍼 교환을 여과법을 사용하여 수행하였다. 구체적으로, 폴리소르베이트 80을 포함하지 않는 버퍼에서 VivaSpin 20(Sartorius)을 사용하여 3,700 rpm으로 1시간 동안 총 5회 버퍼 교환을 수행하였다. 이후에 버퍼 교환된 액상 제제를 타겟 농도의 2 내지 3배 정도가 되도록 농축하였다. 최종 부피 및 타겟 농도를 고려하여 폴리소르베이트 80을 포함하지 않는 버퍼를 상기 농축된 액상 제제에 첨가하였다. 타겟 농도보다 100배 농축된 폴리소르베이트 80 스탁을 이용해 액상 제제의 폴리소르베이트 최종 농도(실제 농도)가 0.005%(w/v)가 되도록 스파이킹 하여, 최종 농도 0.005%(w/v) 폴리소르베이트 80을 함유하는 액상 제제를 제조하였다. 또한, 제조예 2 내지 37은 제조예 1과 동일한 방법으로 제조예 1의 제제와는 다른 조성으로 액상 제제를 제조하였다.

[0163] 즉, 제조예 1 내지 36의 액상 제제의 조성은 다음과 같다.

[0164] [제조예 1]

[0165] 22 mg/mL의 에플라페그라스티, 20 mM의 구연산 나트륨(pH 5.5), 5%(w/v) 만니톨, 150 mM의 염화나트륨, 및 0.005%(w/v, 최종 농도)의 폴리소르베이트 80.

[0166] [제조예 2]

[0167] 11 mg/mL의 에플라페그라스티, 20 mM의 구연산 나트륨(pH 5.5), 5%(w/v) 만니톨, 150 mM의 염화나트륨, 및 0.005%(w/v, 최종 농도)의 폴리소르베이트 80.

[0168] [제조예 3]

- [0169] 44 mg/mL의 에플라페그라스탐, 20 mM의 구연산 나트륨(pH 5.5), 5%(w/v) 만니톨, 150 mM의 염화나트륨, 및 0.005%(w/v, 최종 농도)의 폴리소르베이트 80.
- [0170] [제조예 4]
- [0171] 66 mg/mL의 에플라페그라스탐, 20 mM의 구연산 나트륨(pH 5.5), 5%(w/v) 만니톨, 150 mM의 염화나트륨, 및 0.005%(w/v, 최종 농도)의 폴리소르베이트 80.
- [0172] [제조예 5]
- [0173] 22 mg/mL의 에플라페그라스탐, 20 mM의 구연산 나트륨(pH 5.5), 1%(w/v) 만니톨, 10 mM의 염화나트륨, 및 0.005%(w/v, 최종 농도)의 폴리소르베이트 80.
- [0174] [제조예 6]
- [0175] 22 mg/mL의 에플라페그라스탐, 20 mM의 구연산 나트륨(pH 5.5), 3%(w/v) 만니톨, 50 mM의 염화나트륨, 및 0.005%(w/v, 최종 농도)의 폴리소르베이트 80.
- [0176] [제조예 7]
- [0177] 22 mg/mL의 에플라페그라스탐, 20 mM의 아세트산 나트륨(pH 5.5), 5%(w/v)의 소르비톨, 150 mM의 염화나트륨, 및 0.005%(w/v, 최종 농도)의 폴리소르베이트 80.
- [0178] [제조예 8]
- [0179] 44 mg/mL의 에플라페그라스탐, 20 mM의 아세트산 나트륨(pH 5.5), 5%(w/v)의 소르비톨, 150 mM의 염화나트륨, 및 0.005%(w/v, 최종 농도)의 폴리소르베이트 80.
- [0180] [제조예 9]
- [0181] 66 mg/mL의 에플라페그라스탐, 20 mM의 아세트산 나트륨(pH 5.5), 5%(w/v)의 소르비톨, 150 mM의 염화나트륨, 및 0.005%(w/v, 최종 농도)의 폴리소르베이트 80.
- [0182] [제조예 10]
- [0183] 22 mg/mL의 에플라페그라스탐, 20 mM의 아세트산 나트륨(pH 5.5), 5%(w/v)의 슈크로오스, 150 mM의 염화나트륨, 및 0.005%(w/v, 최종 농도)의 폴리소르베이트 80.
- [0184] [제조예 11]
- [0185] 44 mg/mL의 에플라페그라스탐, 20 mM의 아세트산 나트륨(pH 5.5), 5%(w/v)의 슈크로오스, 150 mM의 염화나트륨, 및 0.005%(w/v, 최종 농도)의 폴리소르베이트 80.
- [0186] [제조예 12]
- [0187] 66 mg/mL의 에플라페그라스탐, 20 mM의 아세트산 나트륨(pH 5.5), 5%(w/v)의 슈크로오스, 150 mM의 염화나트륨, 및 0.005%(w/v, 최종 농도)의 폴리소르베이트 80.
- [0188] [제조예 13]
- [0189] 22 mg/mL의 에플라페그라스탐, 20 mM의 아세트산 나트륨(pH 5.5), 3%(w/v)의 프롤린, 150 mM의 염화나트륨, 및 0.005%(w/v, 최종 농도)의 폴리소르베이트 80.
- [0190] [제조예 14]
- [0191] 44 mg/mL의 에플라페그라스탐, 20 mM의 아세트산 나트륨(pH 5.5), 3%(w/v)의 프롤린, 150 mM의 염화나트륨, 및 0.005%(w/v, 최종 농도)의 폴리소르베이트 80.
- [0192] [제조예 15]
- [0193] 66 mg/mL의 에플라페그라스탐, 20 mM의 아세트산 나트륨(pH 5.5), 3%(w/v)의 프롤린, 150 mM의 염화나트륨, 및 0.005%(w/v, 최종 농도)의 폴리소르베이트 80.
- [0194] [제조예 16]
- [0195] 22 mg/mL의 에플라페그라스탐, 20 mM의 히스티딘(pH 5.5), 5%(w/v)의 소르비톨, 150 mM의 염화나트륨, 및

0.005%(w/v, 최종 농도)의 폴리소르베이트 80.

- [0196] [제조예 17]
- [0197] 44 mg/mL의 에플라페그라스티미, 20 mM의 히스티딘(pH 5.5), 5%(w/v)의 소르비톨, 150 mM의 염화나트륨, 및 0.005%(w/v, 최종 농도)의 폴리소르베이트 80.
- [0198] [제조예 18]
- [0199] 66 mg/mL의 에플라페그라스티미, 20 mM의 히스티딘(pH 5.5), 5%(w/v)의 소르비톨, 150 mM의 염화나트륨, 및 0.005%(w/v, 최종 농도)의 폴리소르베이트 80.
- [0200] [제조예 19]
- [0201] 22 mg/mL의 에플라페그라스티미, 20 mM의 히스티딘(pH 5.5), 5%(w/v)의 슈크로오스, 150 mM의 염화나트륨, 및 0.005%(w/v, 최종 농도)의 폴리소르베이트 80.
- [0202] [제조예 20]
- [0203] 44 mg/mL의 에플라페그라스티미, 20 mM의 히스티딘(pH 5.5), 5%(w/v)의 슈크로오스, 150 mM의 염화나트륨, 및 0.005%(w/v, 최종 농도)의 폴리소르베이트 80.
- [0204] [제조예 21]
- [0205] 66 mg/mL의 에플라페그라스티미, 20 mM의 히스티딘(pH 5.5), 5%(w/v)의 슈크로오스, 150 mM의 염화나트륨, 및 0.005%(w/v, 최종 농도)의 폴리소르베이트 80.
- [0206] [제조예 22]
- [0207] 22 mg/mL의 에플라페그라스티미, 20 mM의 히스티딘(pH 5.5), 3%(w/v)의 프롤린, 150 mM의 염화나트륨, 및 0.005%(w/v, 최종 농도)의 폴리소르베이트 80.
- [0208] [제조예 23]
- [0209] 44 mg/mL의 에플라페그라스티미, 20 mM의 히스티딘(pH 5.5), 3%(w/v)의 프롤린, 150 mM의 염화나트륨, 및 0.005%(w/v, 최종 농도)의 폴리소르베이트 80.
- [0210] [제조예 24]
- [0211] 66 mg/mL의 에플라페그라스티미, 20 mM의 히스티딘(pH 5.5), 3%(w/v)의 프롤린, 150 mM의 염화나트륨, 및 0.005%(w/v, 최종 농도)의 폴리소르베이트 80.
- [0212] [제조예 25]
- [0213] 22 mg/mL의 에플라페그라스티미, 20 mM의 구연산나트륨(pH 5.5), 5%(w/v)의 만니톨, 20 mM의 인산나트륨, 및 0.01%(w/v, 최종 농도)의 폴리소르베이트 80.
- [0214] [제조예 26]
- [0215] 44 mg/mL의 에플라페그라스티미, 20 mM의 구연산나트륨(pH 5.5), 5%(w/v)의 만니톨, 20 mM의 인산나트륨, 및 0.01%(w/v, 최종 농도)의 폴리소르베이트 80.
- [0216] [제조예 27]
- [0217] 66 mg/mL의 에플라페그라스티미, 20 mM의 구연산나트륨(pH 5.5), 5%(w/v)의 만니톨, 20 mM의 인산나트륨, 및 0.01%(w/v, 최종 농도)의 폴리소르베이트 80.
- [0218] [제조예 28]
- [0219] 22 mg/mL의 에플라페그라스티미, 20 mM의 구연산나트륨(pH 5.5), 5%(w/v)의 만니톨, 25 mM의 아르기닌, 20 mM의 히스티딘, 및 0.2%(w/v, 최종 농도)의 폴리소르베이트 80.
- [0220] [제조예 29]
- [0221] 44 mg/mL의 에플라페그라스티미, 20 mM의 구연산나트륨(pH 5.5), 5%(w/v)의 만니톨, 25 mM의 아르기닌, 20 mM의 히스티딘, 및 0.2%(w/v, 최종 농도)의 폴리소르베이트 80.

- [0222] [제조예 30]
- [0223] 66 mg/mL의 에플라페그라스티미, 20 mM의 구연산나트륨(pH 5.5), 5%(w/v)의 만니톨, 25 mM의 아르기닌, 20 mM의 히스티딘 및 0.2%(w/v, 최종 농도)의 폴리소르베이트 80.
- [0224] [제조예 31]
- [0225] 22 mg/mL의 에플라페그라스티미, 20 mM의 구연산나트륨(pH 5.5), 3%(w/v)의 프롤린, 150 mM의 염화나트륨, 및 0.01%(w/v, 최종 농도)의 폴리소르베이트 20.
- [0226] [제조예 32]
- [0227] 44 mg/mL의 에플라페그라스티미, 20 mM의 구연산나트륨(pH 5.5), 3%(w/v)의 프롤린, 150 mM의 염화나트륨, 및 0.01%(w/v, 최종 농도)의 폴리소르베이트 20.
- [0228] [제조예 33]
- [0229] 66 mg/mL의 에플라페그라스티미, 20 mM의 구연산나트륨(pH 5.5), 3%(w/v)의 프롤린, 150 mM의 염화나트륨, 및 0.01%(w/v, 최종 농도)의 폴리소르베이트 20.
- [0230] [제조예 34]
- [0231] 22 mg/mL의 에플라페그라스티미, 20 mM의 구연산나트륨(pH 5.5), 및 125 mM의 염화나트륨.
- [0232] [제조예 35]
- [0233] 44 mg/mL의 에플라페그라스티미, 20 mM의 구연산나트륨(pH 5.5), 및 125 mM의 염화나트륨.
- [0234] [제조예 36]
- [0235] 66 mg/mL의 에플라페그라스티미, 20 mM의 구연산나트륨(pH 5.5), 및 125 mM의 염화나트륨.
- [0237] **2. 제조예 37 내지 39**
- [0238] 제조예 37의 액상 제제는 대한민국 등록특허 제10-1340710호를 참조하여 제조하였으며, 다만, 대한민국 등록특허 제10-1340710호에 기재된 hG-CSF 변이체 아미노산 서열과는 다른 아미노산 서열을 갖는 hG-CSF 변이체를 포함하는 에플라페그라스티미를 활성 성분으로 사용하였고 이의 농도도 달리하여 제조하였다.
- [0239] 구체적으로, 22 mg/mL의 에플라페그라스티미, 20 mM의 구연산 나트륨(pH 5.5), 5%(w/v) 만니톨, 150 mM의 염화나트륨, 및 0.005%(w/v) (농축 과정 전 농도)의 폴리소르베이트 80을 사용하여 액상 제제를 준비하였다. 이후에, 시료의 전처리 없이 바로 버퍼 교환을 여과법을 사용하여 수행하였다. 구체적으로, 폴리소르베이트 80을 포함하는 버퍼에서 VivaSpin 20(Sartorius)을 사용하여 3,700 rpm으로 1시간 동안 총 5회 버퍼 교환을 수행하였다. 이후에 버퍼 교환된 액상 제제를 타겟 농도의 2배 정도가 되도록 농축하였다. 최종 부피 및 타겟 농도를 고려하여 모든 부형제가 포함된 버퍼로 희석하여 최종 액상 제제를 제조하였다. 상기 제조예 37의 액상 제제에서, 상기 언급된 폴리소르베이트 80의 농도는 농축 과정 전의 농도로서, 하기 시험예에서는 농축 과정에 따라, 최소 5%(w/v, 최종 농도)를 초과하는 폴리소르베이트 80이 적용되었다.
- [0241] 즉, 제조예 37의 액상 제제의 조성은 다음과 같다.
- [0242] [제조예 37]
- [0243] 22 mg/mL의 에플라페그라스티미, 20 mM의 구연산 나트륨(pH 5.5), 5%(w/v) 만니톨, 150 mM의 염화나트륨, 및 5%(w/v, 최종 농도) 초과 폴리소르베이트 80.
- [0245] 또한, 제조예 38 및 39는 제조예 37과 동일한 방법으로 제조예 37의 제제와는 다른 조성으로 하기와 같이 액상 제제를 제조하였다.
- [0246] [제조예 38]
- [0247] 31.5 mg/mL의 에플라페그라스티미, 20 mM의 구연산 나트륨(pH 5.5), 5%(w/v) 만니톨, 150 mM의 염화나트륨, 및 5%(w/v, 최종 농도) 초과 폴리소르베이트 80.
- [0248] [제조예 39]
- [0249] 40 mg/mL의 에플라페그라스티미, 20 mM의 구연산 나트륨(pH 5.5), 5%(w/v) 만니톨, 150 mM의 염화나트륨, 및

5%(w/v, 최종 농도) 초과와 폴리스르베이트 80.

[0251] **3. 제조예 40 내지 43**

[0252] 상기 제조예 1의 제제와는 조성을 달리하여 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 에플라페그라스티를 함유하는 액상 제제를 제조하였다.

[0253] 즉, 제조예 40 내지 43의 액상 제제의 조성은 다음과 같다.

[0254] [제조예 40]

[0255] 22 mg/mL의 에플라페그라스티, 20 mM의 구연산 나트륨(pH 5.5), 및 0.005%(w/v, 최종 농도)의 폴리스르베이트 80.

[0256] [제조예 41]

[0257] 22 mg/mL의 에플라페그라스티, 20 mM의 구연산 나트륨(pH 5.5), 10%(w/v) 만니톨, 500 mM의 염화나트륨 및 0.005%(w/v, 최종 농도)의 폴리스르베이트 80.

[0258] [제조예 42]

[0259] 22 mg/mL의 에플라페그라스티, 20 mM의 구연산 나트륨(pH 5.5), 20%(w/v) 글루코오스, 150 mM의 염화나트륨, 및 0.005%(w/v, 최종 농도)의 폴리스르베이트 80.

[0260] [제조예 43]

[0261] 22 mg/mL의 에플라페그라스티, 20 mM의 구연산 나트륨(pH 5.5), 5%(w/v) 젤라틴, 150 mM의 염화나트륨, 및 0.005%(w/v, 최종 농도)의 폴리스르베이트 80.

[0263] **4. 제조예 44 내지 46**

[0264] 상기 제조예 1의 제제와는 조성을 달리하여 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 에플라페그라스티를 함유하는 액상 제제를 제조하였다.

[0266] 즉, 제조예 44 내지 46의 액상 제제의 조성은 다음과 같다.

[0267] [제조예 44]

[0268] 22 mg/mL의 에플라페그라스티, 20 mM의 구연산 나트륨(pH 5.5), 5%(w/v) 만니톨, 150 mM의 염화나트륨, 및 0.5%(w/v, 최종 농도)의 폴리스르베이트 80.

[0269] [제조예 45]

[0270] 22 mg/mL의 에플라페그라스티, 20 mM의 구연산 나트륨(pH 5.5), 5%(w/v) 만니톨, 150 mM의 염화나트륨, 및 2.5%(w/v, 최종 농도)의 폴리스르베이트 80.

[0271] [제조예 46]

[0272] 22 mg/mL의 에플라페그라스티, 20 mM의 구연산 나트륨(pH 5.5), 5%(w/v) 만니톨, 150 mM의 염화나트륨, 및 5%(w/v, 최종 농도)의 폴리스르베이트 80.

[0274] **시험예 1. 액상 제제의 잔존율 및 환자 친화 지수 평가**

[0275] 제조예 1 내지 6 및 제조예 37 내지 43의 액상 제제를 대상으로, 삼투압 측정, 전도도 측정, 점도 측정 및 최대 활주력 측정을 실시하였으며, 이후, 가속 조건(25±2 °C 60±5 % RH)에서의 4주간 보존 시험 후 에플라페그라스티의 잔존율을 측정하였다.

[0277] **1. 제조예 1의 액상 제제 시험**

[0278] 제조예 1의 액상 제제의 삼투압은 자동 삼투압계(Gonotec, OSMOMAT auto)를 사용하여 측정하였고, 645 mOsm/kg 이었다.

[0279] 또한, 제조예 1의 액상 제제의 전도도(conductivity)는 상온에서 전도도 측정기(Compact Conductivity Meter EC33, LAQUAtwin, Horiba)를 사용하여 제조사의 설명에 따라 수행하였다. 그 결과 제조예 1의 액상 제제의 전도도는 14.37 mS/cm 이었다.

[0280] 또한, 제조예 1의 액상 제제의 점도는 실온(20 내지 25 °C에서 Vibration viscometer (A&D, SV-1A)를 사용하여 측정하였고, 점도 값은 1.86 cP이었다.

[0281] 또한, 제조예 1의 액상 제제의 최대활주력은 Rheo Meter(Sun scientific, Compac-100)를 사용하여 29게이지의 주사기(400 μL을 기준으로 길이 22.68 mm)로 액상 제제를 4.725 mm/s 속도(500 μL/6 sec), 및 2.835 mm/s 속도(500 μL/10 sec)로 투여 시의 수치를 측정 및 Reology Data System Ver 3.0을 사용하여 그 값을 확인하였고, 그 값은 각각 3.099 N, 및 2.099 N이었다.

[0282] 또한, 제조예 1의 액상 제제의 잔존율을 측정하기 위하여, 가속 조건(25±2°C/ 60±5 % RH)에서 4주간 보존 시험 후 에플라페그라스팀의 잔존율을 RP-HPLC 및 SE-HPLC로 측정하였다.

[0283] RP-HPLC 및 SE-HPLC로 측정된 에플라페그라스팀의 잔존율을 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0284]	RP-HPLC(Remaining rate, %)					SE-HPLC(Remaining rate, %)				
	0 W	1 W	2 W	3 W	4 W	0 W	1 W	2 W	3 W	4 W
제조예 1	100	99.9	99.8	99.4	99.2	100	100	99.7	99.6	99.5

[0285] **2. 제조예 2의 액상 제제 시험**

[0286] 상기 시험예 1과 동일하게, 제제의 삼투압, 전도도, 점도, 최대활주력, 및 잔존율을 측정하였다.

[0287] 제조예 2의 제제의 삼투압은 643.3 mOsm/kg이었고, 전도도는 14.80 mS/cm 이었으며, 실온(20 내지 25 °C에서의 점도 값은 1.39 cP이었다. 또한, 제조예 2의 제제의 최대활주력은 2.648 N(4.725 mm/s 속도, 및 29 G 주사기), 및 2.285 N(2.835 mm/s 속도, 및 29 G 주사기)이었다.

[0288] 또한, 상기 제조예 2의 제제의 가속 조건(25±2 °C/ 60±5 % RH)에서의 잔존율은 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0289]	RP-HPLC(Remaining rate, %)					SE-HPLC(Remaining rate, %)				
	0 W	1 W	2 W	3 W	4 W	0 W	1 W	2 W	3 W	4 W
제조예 2	100	99.9	99.7	99.2	99.1	100	100	99.6	99.4	99.0

[0290] **3. 제조예 3의 액상 제제 시험**

[0291] 상기 시험예 1과 동일하게, 제제의 삼투압, 전도도, 점도, 최대활주력, 및 잔존율을 측정하였다.

[0292] 제조예 3의 제제의 삼투압은 657.7 mOsm/kg이었고, 전도도는 13.45 mS/cm 이었으며, 실온(20 내지 25 °C에서의 점도 값은 2.32 cP이었다. 또한, 제조예 3의 제제의 최대활주력은 3.177 N(4.725 mm/s 속도, 및 29 G 주사기), 및 2.775 N(2.835 mm/s 속도, 및 29 G 주사기)이었다.

[0293] 또한, 상기 제조예 3의 제제의 가속 조건(25±2 °C/ 60±5 % RH)에서의 잔존율은 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

[0294]	RP-HPLC(Remaining rate, %)					SE-HPLC(Remaining rate, %)				
	0 W	1 W	2 W	3 W	4 W	0 W	1 W	2 W	3 W	4 W
제조예 3	100	99.8	99.5	99.0	98.9	100	100	99.5	99.2	98.8

[0295] **4. 제조예 4의 액상 제제 시험**

[0296] 상기 시험예 1과 동일하게, 제제의 삼투압, 전도도, 점도, 최대활주력, 및 잔존율을 측정하였다.

[0297] 제조예 4의 제제의 삼투압은 679 mOsm/kg이었고, 전도도는 12.67 mS/cm 이었으며, 실온(20 내지 25 °C에서의 점도 값은 3.54 cP이었다. 또한, 제조예 4의 제제의 최대활주력은 3.815 N(4.725 mm/s 속도, 및 29 G 주사기),

및 2.716 N(2.835 mm/s 속도, 및 29 G 주사기)이었다.

[0298] 또한, 상기 제조예 4의 제제의 가속 조건(25±2 °C/ 60±5 % RH)에서의 잔존율은 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

[0299]

	RP-HPLC(Remaining rate, %)					SE-HPLC(Remaining rate, %)				
	0 W	1 W	2 W	3 W	4 W	0 W	1 W	2 W	3 W	4 W
제조예 4	100	99.8	99.5	99.1	98.9	100	99.9	99.2	99.0	98.6

[0300] 5. 제조예 5의 액상 제제 시험

[0301] 상기 시험예 1과 동일하게, 제제의 삼투압, 전도도, 점도, 최대활주력, 및 잔존율을 측정하였다.

[0302] 제조예 5의 제제의 삼투압은 135.3 mOsm/kg이었고, 전도도는 4.27 mS/cm 이었으며, 실온(20 내지 25 °C에서의 점도 값은 1.40 cP이었다. 또한, 제조예 5의 제제의 최대활주력은 2.442 N(4.725 mm/s 속도, 및 29 G 주사기), 및 1.657 N(2.835 mm/s 속도, 및 29 G 주사기)이었다.

[0303] 또한, 상기 제조예 5의 제제의 가속 조건(25±2 °C/ 60±5 % RH)에서의 잔존율은 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

[0304]

	RP-HPLC(Remaining rate, %)					SE-HPLC(Remaining rate, %)				
	0 W	1 W	2 W	3 W	4 W	0 W	1 W	2 W	3 W	4 W
제조예 5	100	99.8	99.5	98.9	98.8	100	99.9	99.5	99.3	99.1

[0305] 6. 제조예 6의 액상 제제 시험

[0306] 상기 시험예 1과 동일하게, 제제의 삼투압, 전도도, 점도, 최대활주력, 및 잔존율을 측정하였다.

[0307] 제조예 6의 제제의 삼투압은 334.7 mOsm/kg이었고, 전도도는 7.49 mS/cm 이었으며, 실온(20 내지 25 °C에서의 점도 값은 1.50 cP이었다. 또한, 제조예 6의 제제의 최대활주력은 2.746 N(4.725 mm/s 속도, 및 29 G 주사기), 및 1.285 N(2.835 mm/s 속도, 및 29 G 주사기)이었다.

[0308] 또한, 상기 제조예 6의 제제의 가속 조건(25±2 °C/ 60±5 % RH)에서의 잔존율은 하기 표 6에 나타내었다.

표 6

[0309]

	RP-HPLC(Remaining rate, %)					SE-HPLC(Remaining rate, %)				
	0 W	1 W	2 W	3 W	4 W	0 W	1 W	2 W	3 W	4 W
제조예 6	100	99.7	99.4	99.0	98.9	100	100	99.1	98.9	98.7

[0310] 7. 제조예 37의 액상 제제 시험

[0311] 상기 시험예 1과 동일하게 제조예 37의 제제의 가속 조건(25±2 °C/ 60±5 % RH)에서의 잔존율은 하기 표 7에 나타내었다.

표 7

[0312]

	RP-HPLC(Remaining rate, %)					SE-HPLC(Remaining rate, %)				
	0 W	1 W	2 W	3 W	4 W	0 W	1 W	2 W	3 W	4 W
제조예 37	100	100	98.5	96.9	94.3	100	99.7	99.0	98.0	97.0

[0313] 8. 제조예 38의 액상 제제 시험

[0314] 상기 시험예 1과 동일하게 제조예 38의 제제의 가속 조건(25±2 °C/ 60±5 % RH)에서의 잔존율은 하기 표 8에

나타내었다.

표 8

[0315]

	RP-HPLC(Remaining rate, %)					SE-HPLC(Remaining rate, %)				
	0 W	1 W	2 W	3 W	4 W	0 W	1 W	2 W	3 W	4 W
제조예 38	100	99.9	98.4	96.8	94.0	100	99.7	99.1	98.0	97.0

9. 제조예 39의 액상 제제 시험

상기 시험예 1과 동일하게 제조예 39의 제제의 가속 조건(25±2 °C / 60±5 % RH)에서의 잔존율은 하기 표 9에 나타내었다.

표 9

[0318]

	RP-HPLC(Remaining rate, %)					SE-HPLC(Remaining rate, %)				
	0 W	1 W	2 W	3 W	4 W	0 W	1 W	2 W	3 W	4 W
제조예 39	100	100	98.5	97.0	94.0	100	99.7	99.0	98.0	97.0

10. 제조예 40의 액상 제제 시험

상기 시험예 1과 동일하게, 제제의 삼투압, 전도도, 점도, 최대활주력, 및 잔존율을 측정하였다.

제조예 40의 제제의 삼투압은 59.3 mOsm/kg이었고, 전도도는 3.45 mS/cm 이었으며, 실온(20 내지 25 °C에서의 점도 값은 1.26 cP이었다. 또한, 제조예 40의 제제의 최대활주력은 2.471 N(4.725 mm/s 속도, 및 29 G 주사기), 및 1.834 N(2.835 mm/s 속도, 및 29 G 주사기)이었다.

또한, 상기 제조예 40의 제제의 가속 조건(25±2 °C / 60±5 % RH)에서의 잔존율은 하기 표 10에 나타내었다.

표 10

[0323]

	RP-HPLC(Remaining rate, %)					SE-HPLC(Remaining rate, %)				
	0 W	1 W	2 W	3 W	4 W	0 W	1 W	2 W	3 W	4 W
제조예 40	100	99.8	99.4	98.8	98.6	100	100	99.7	99.5	99.4

11. 제조예 41의 액상 제제 시험

상기 시험예 1과 동일하게, 제제의 삼투압, 전도도, 점도, 최대활주력, 및 잔존율을 측정하였다.

제조예 41의 제제의 삼투압은 1721.7 mOsm/kg이었고, 전도도는 31.20 mS/cm 이었으며, 실온(20 내지 25 °C에서의 점도 값은 2.02 cP이었다. 또한, 제조예 41의 제제의 최대활주력은 2.952 N(4.725 mm/s 속도, 및 29 G 주사기), 및 1.922 N(2.835 mm/s 속도, 및 29 G 주사기)이었다.

또한, 상기 제조예 41의 제제의 가속 조건(25±2 °C / 60±5 % RH)에서의 잔존율은 하기 표 11에 나타내었다.

표 11

[0328]

	RP-HPLC(Remaining rate, %)					SE-HPLC(Remaining rate, %)				
	0 W	1 W	2 W	3 W	4 W	0 W	1 W	2 W	3 W	4 W
제조예 41	100	99.7	99.4	98.8	98.9	100	100	99.2	99.1	99.0

12. 제조예 42의 액상 제제 시험

상기 시험예 1과 동일하게, 제제의 삼투압, 전도도, 점도, 최대활주력, 및 잔존율을 측정하였다.

제조예 42의 제제의 삼투압은 1964.3 mOsm/kg이었고, 전도도는 10.56 mS/cm 이었으며, 실온(20 내지 25 °C에서

의 점도 값은 2.66 cP이었다. 또한, 제조예 42 의 제제의 최대활주력은 7.482 N(4.725 mm/s 속도, 및 29 G 주사기), 및 5.688 N(2.835 mm/s 속도, 및 29 G 주사기)이었다.

[0332] 또한, 상기 제조예 42의 제제의 가속 조건(25±2 °C / 60±5 % RH)에서의 잔존율은 하기 표 12에 나타내었다.

표 12

	RP-HPLC(Remaining rate, %)					SE-HPLC(Remaining rate, %)				
	0 W	1 W	2 W	3 W	4 W	0 W	1 W	2 W	3 W	4 W
제조예 42	100	99.7	99.4	99.0	98.9	100	100	99.3	99.1	98.7

[0334] 13. 제조예 43의 액상 제제 시험

[0335] 상기 시험예 1과 동일하게, 제제의 삼투압, 전도도, 점도, 최대활주력, 및 잔존율을 측정하였다.

[0336] 제조예 43의 제제의 삼투압은 316.3 mOsm/kg이었고, 전도도는 13.38 mS/cm 이었으며, 실온(20 내지 25 °C에서의 점도 값은 64.9 cP이었다. 또한, 제조예 43의 제제의 최대활주력은 7.482 N(4.725 mm/s 속도, 및 29 G 주사기), 및 5.688 N(2.835 mm/s 속도, 및 29 G 주사기)이었다.

[0337] 또한, 상기 제조예 43의 제제의 가속 조건(25±2 °C / 60±5 % RH)에서의 잔존율은 하기 표 13에 나타내었다.

표 13

	RP-HPLC(Remaining rate, %)					SE-HPLC(Remaining rate, %)				
	0 W	1 W	2 W	3 W	4 W	0 W	1 W	2 W	3 W	4 W
제조예 43	100	99.3	96.5	92.9	87.8	100	98.5	94.3	87.0	69.1

[0339] 14. 환자 친화 지수의 평가

[0340] 상기 제조된 액상 제제가 상기 식에 부합하는지 확인하기 위해 각각의 제제의 환자 친화 지수를 계산하였고, 그 결과를 하기 표 14에 나타내었다.

표 14

구분	환자 친화 지수
제조예 1	8.549
제조예 2	8.718
제조예 3	9.352
제조예 4	9.506
제조예 5	3.010
제조예 6	4.632
제조예 40	2.427
제조예 41	19.139
제조예 42	22.085
제조예 43	8.851

[0342] 상기 표 1 내지 13에 나타난 바와 같이, 고농도의 폴리소르베이트계 비이온성 계면활성제를 포함하는 제조예 37 내지 39의 경우, 일부 데이터에서 잔존율에 문제가 발생하였다. 또한, 제조예 43의 액상 제제에서는 심각한 잔존율 문제를 보였다.

[0343] 또한, 상기 표 14에 나타난 바와 같이, 제조예 43의 경우, 적정 삼투압의 범위 내이나 최대 활주력이 높아 여전히 환자의 고통을 유발할 수 있고, 제조예 41 의 경우, 적정 최대 활주력 범위 내이나 높은 삼투압으로 인해 여전히 환자의 고통을 유발할 수 있었다. 이에 반해, 일 구체예에 따른 액상 제제는 적정 삼투압의 범위에 들어오고, 최대 활주력의 범위가 5 N 이하이며, 환자 친화 지수가 적정 범위인 3 내지 10 이내인 것을 알 수 있었다. 따라서, 삼투압과 최대 활주력을 주요 인자로 하는 환자 친화 값이 3 내지 10인 일 구체예에 따른 액상 제제의

경우 환자에 고통을 유발함이 없이 바람직한 액상 제제의 투여가 가능함을 알 수 있었다.

[0345] **시험예 2. 계면활성제의 농도에 따른 액상 제제의 잔존율 평가**

[0346] 제조예 1 및 제조예 44 내지 46의 액상 제제를 대상으로, 상기 시험예 1과 동일한 방법으로, 가속 조건(25±2 °C/ 60±5 % RH)에서의 4주간 보존 시험 후 에플라페그라스티움의 잔존율을 측정하였다.

[0348] **1. 제조예 1의 액상 제제 시험**

[0349] 상기 제조예 1의 제제에 대한 가속 조건에서의 잔존율은 하기 표 15에 나타내었다.

표 15

[0350]

	RP-HPLC(Remaining rate, %)					SE-HPLC(Remaining rate, %)				
	0 W	1 W	2 W	3 W	4 W	0 W	1 W	2 W	3 W	4 W
제조예 1	100	99.7	99.7	99.7	99.3	100	100	99.9	99.7	99.6

[0351] **2. 제조예 44의 액상 제제 시험**

[0352] 상기 제조예 44의 제제에 대한 가속 조건에서의 잔존율은 하기 표 16에 나타내었다.

표 16

[0353]

	RP-HPLC(Remaining rate, %)					SE-HPLC(Remaining rate, %)				
	0 W	1 W	2 W	3 W	4 W	0 W	1 W	2 W	3 W	4 W
제조예 44	100	99.4	99.4	99.2	98.5	100	99.9	99.3	98.9	98.5

[0354] **3. 제조예 45의 액상 제제 시험**

[0355] 상기 제조예 45의 제제에 대한 가속 조건에서의 잔존율은 하기 표 17에 나타내었다.

표 17

[0356]

	RP-HPLC(Remaining rate, %)					SE-HPLC(Remaining rate, %)				
	0 W	1 W	2 W	3 W	4 W	0 W	1 W	2 W	3 W	4 W
제조예 45	100	99.0	98.5	98.1	97.4	100	99.8	99.0	98.3	97.5

[0357] **4. 제조예 46의 액상 제제 시험**

[0358] 상기 제조예 46의 제제에 대한 가속 조건에서의 잔존율은 하기 표 18에 나타내었다.

표 18

[0359]

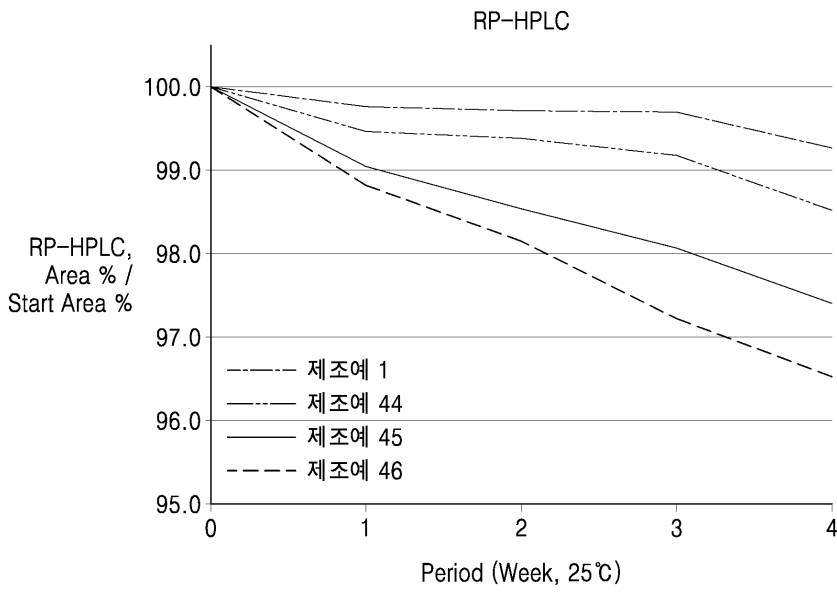
	RP-HPLC(Remaining rate, %)					SE-HPLC(Remaining rate, %)				
	0 W	1 W	2 W	3 W	4 W	0 W	1 W	2 W	3 W	4 W
제조예 46	100	98.8	98.1	97.2	96.5	100	99.6	98.5	97.5	96.7

[0360] 도 1 및 도 2는 일 실시예에 따른 액상 제제에서, 계면활성제의 농도에 의한 에플라페그라스티움의 잔존율 변화를 확인한 결과이다. 상기 도 1 및 도 2에 나타난 바와 같이, 계면활성제의 농도는 일 실시예에 따른 액상 제제의 잔존율과 높은 상관 관계를 보여주었으며, 이러한 실험 결과는 상기 계면활성제의 농도가 고농도의 에플라페그라스티움을 포함하는 액상 제제의 잔존율에 영향을 미치는 주요한 인자임을 나타내는 것이다.

[0362] 이상의 결과로부터, 일 구체예에 따른 액상 제제는, 기존의 액상 제제와 성분의 함량과 제조 방법이 상이하고, 그로 인해 고농도의 활성 성분을 포함하면서도, 제형의 안정성(예를 들면, 잔존율)이 높을 뿐만 아니라, 환자 친화 수치가 높아 환자에 고통을 유발함이 없이 투여가 가능함을 알 수 있다.

도면

도면1



도면2

