

## 명세서

### 발명의 명칭: HGH 융합단백질의 고농도 투여 제형

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 hGH (human Growth Hormone) 융합단백질의 고농도 투여 제형에 관한 것으로, 더 상세하게는 폴록사머 188 (Poloxamer 188)과 폴리소르베이트 80 (Polysorbate 80)을 함유함으로써 면역글로불린 Fc 폴리펩타이드(이하, 'hyFc'와 혼용하여 표시됨)가 융합되어 있는 hGH의 고농도 제형에서도 응집 반응이 현저히 감소된 hGH 융합단백질의 고농도 투여 제형에 관한 것이다.

[2]

#### 배경기술

- [3] 성장호르몬은 191개의 아미노산으로 구성된 폴리펩타이드로서, 뇌하수체 전엽에서 분비되는 호르몬이다. 성장호르몬 수용체와 결합하여 IGF-1 (Insulin like Growth Factor-1)을 발현시킴으로써 세포의 성장 및 재생에 관여한다. 성장호르몬은 정상인의 몸에서는 뇌하수체에서 생산되며 사춘기까지 생산량이 늘어나고 나이가 들면서 차차 생산량이 감소하는 것으로 알려져 있다.
- [4] 대표적인 성장호르몬 결핍증상에는 성인 성장호르몬 결핍증 (adult growth hormone deficiency, AGHD)과 소아 성장호르몬 결핍증 (pediatric growth hormone deficiency, PGHD)이 있다. 성인 성장호르몬 결핍증의 경우 뇌종양, 뇌출혈 등의 치료과정에서 방사선이나 수술에 의하여 환자의 뇌하수체가 손상되는 경우 또는 특발성으로 발생한다. 성장호르몬의 분비가 제대로 되지 않으면 체중 감소, 뼈의 무기질 밀도 감소, 지방 증가, HDL의 감소, LDL의 증가, 근육장도 감소 등의 증상이 나타나 삶의 질이 저하된다. 성인 성장호르몬 결핍증 환자는 혈청 내 IGF-1의 농도가 동일 연령대 정상인 대비 표준편차 점수(standard deviation score, SDS)가 -2 이하 ( $\leq -2$  SDS) 또는 백분위 2.5 내 ( $\leq 2.5$  percentile)에 속한다. 혈중 성장호르몬의 반응치는 인슐린 내성검사(Insulin tolerance test, ITT), 아르기닌 부하(Growth hormone-releasing hormone + Arginine, GHRH+ARG) 검사, 글루카곤(Glucagon) 검사, L-DOPA 검사, 클로니딘(Clonidine) 검사 등 자극시험(stimulation test)을 통해 측정할 수 있다. 성장호르몬의 최대 수치(peak GH)가 신체질량지수(BMI) 25 kg/m<sup>2</sup> 미만인 환자에서 11.0 µg/L 이하, 신체질량지수 25~30 kg/m<sup>2</sup> 환자에서 8.0 µg/L 이하, 또는 신체질량지수 30 kg/m<sup>2</sup> 초과인 환자에서 4.0 µg/L 이하인 경우 결핍증으로 판정한다(Guidelines for Use of Growth Hormone in Clinical Practice, Endocr. Pract. 2009;15 (Suppl 2)). 소아 성장호르몬 결핍증은 뇌하수체의 손상 또는 발달 장애가 있는 경우 발생한다. 성장호르몬의 분비 장애가 있으면 저신장증이 나타나는데, 신장이 또래의 성장곡선에서 하위 3% 또는 한 해 5cm 이하의 성장을 보이며, 저혈당, 체력저하, 우울증 및 정신적 미성숙 등의 증상이 나타나기도 한다. 동일 연령대에서 키가

평균보다 3 SD (Standard deviation) 이상 낮은 경우, 부모의 키 평균보다 1.5 SD 이상 낮은 경우, 평균 키보다 2 SD 이상 낮으며 또래의 성장에 비하여 1년 이상 1 SD 이상 낮은 경우, 2세 이상이나 SD 값이 0.5 이상 낮은 경우, 또는 저신장 증상이 나타나지 않았으나 1년 이상 2 SD 미만이거나 2년 이상 1.5 를 유지하는 경우 소아 성장호르몬 결핍증으로 판정할 수 있다 (Consensus guideline for the diagnosis and treatment of GH deficiency in childhood and adolescence: summary statement of the GH Research Society. GH Research Society, J. Clin. Endocrinol. Metab., 2000 Nov; 85(11): 3990-3).

- [5] 성장호르몬 결핍증은 주로 성장호르몬을 이용한 치료가 이루어지는데, 1950년대 처음으로 성장호르몬 치료가 시작되었을 때 성장호르몬은 사람 사체(死體)의 뇌하수체로부터 추출하였으며, 1명의 사람에서 추출된 성장호르몬의 양이 무척 적었기 때문에 공급이 매우 제한적이었으며 고가였다. 유전자 재조합 기술이 발달함에 따라 대장균에서 합성한 성장호르몬이 출시되었다(Somatropin, 1981, 미국 Genentech사). 현재 미국에서 시판되는 재조합 성장호르몬(recombinant growth hormone) 치료제는 화이자(Pfizer)의 제노트로핀(Genotropin), 일라이 릴리(Eli Lilly)의 휴마트로프(Humatrope), 제넨텍(Genentech)의 뉴트로핀(Nutropin), 노보 노디스크(Novo Nordisk)의 노디트로핀(Norditropin) 등이 있다.
- [6] 현재 성장호르몬 제제는 1일 제형으로서 특히, 소아 환자의 경우 3-4년의 긴 치료기간 동안 매일 약을 주사해야 하는 불편함이 있으며 주사로 인한 정신적 스트레스가 환자의 삶의 질을 저하시키는 것으로 알려져 있다. 또한 환자가 의도치 않게 주사를 맞지 못하는 문제가 빈번히 발생하며 치료효과를 저해하는 가장 큰 요인이 되고 있다. 또한 치료 연수가 증가할수록 투여 불이행 횟수는 현저히 증가하는 것으로 알려져 있다 (Endocrine practice, 2008 Mar; 14(2): 143-54). 약 2/3 정도의 환자들이 불이행에 따라 순응도가 낮아지며, 실제 이로 인하여 키 성장 속도가 줄어듦이 알려져 있다(PloS one, 2011 Jan; 6(1): e16223).
- [7] 이러한 문제점 때문에 다양한 기술을 이용하여 지속형 성장호르몬을 개발하려는 시도가 꾸준히 이어져 왔다. Ascendis pharma사는 Transcon PEG 플랫폼을 이용하여, OPKO/Pfizer사는 hGH에 CTP를 융합하여, 그리고 Novo Nordisk사는 albumin을 융합하여 hGH의 반감기를 늘렸으며 이러한 기술은 성장호르몬 주사를 매일 투여하던 환자에게 주 1회 투여를 가능하게 하였다.
- [8] 이와 관련하여, 본 출원인은 hGH에 IgD 및 IgG4를 조합한 hyFc를 융합하여 보체의존성 및 항체의존성 독성이 낮고, hGH의 지속성이 향상된 GX-H9 물질에 대한 특허를 출원하여 등록받은 바 있다(미국등록특허 제8,529,899호). 이어서, GX-H9의 주 1회 또는 2주 1회 투여가 가능한 용량용법 특허를 출원하였다(미국공개특허 제2021-0177945호 및 미국공개특허 제2019-0224281호).
- [9] 한편, GX-H9의 임상시험 초기에는 농도를 30mg/ml로 제형화하여 공급하였다.

이후, GX-H9을 2주 1회 투여하는 과정에서 GX-H9 투여 양(volume)이 늘어났고 이에 고농도 제형에 대한 필요성이 대두되었다.

- [10] 이에, 본 발명자들은 GX-H9의 서열분석을 통하여 구조적 특징을 예측하고 hGH이 소수성 패치 (hydrophobic patch)를 많이 가지고 있어 단백질 자체가 소수성 상호작용에 의한 응집체를 형성할 수 있다는 점과 DP(Drug Product) 용기 내 기체/오일/고체 표면 등에 단백질이 흡착되어 일종의 단백질 필름을 형성하고 이들이 탈리되어 만들어진 패치들이 불용성 입자로 응집체를 형성할 수 있다는 점에 착안하여 이와 같은 응집체 형성을 방지할 수 있는 제형을 개발하고자 노력하였으며, 계면활성제로 폴리스르베이트 80과 폴록사머 188을 함께 첨가한 액상 제형에서 응집체 형성이 현저히 개선됨을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[11]

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [12] 본 발명은 hGH 융합단백질의 고농도 제형을 제조함에 있어, 단백질 응집 반응이 현저히 감소되어 보관 안정성이 유지되는 hGH-hyFc 융합단백질의 고농도 제형을 제공하는 것을 목적으로 한다.

### 과제 해결 수단

- [13] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 hGH(human Growth Hormone) 융합단백질, 폴록사머 188(Poloxamer 188) 및 폴리스르베이트 80(Polysorbate 80)을 포함하는, 액상 약학 제형을 제공한다.
- [14] 본 발명에 있어서, 상기 hGH 융합단백질은 hGH 및 면역글로불린 Fc 폴리펩타이드를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [15] 본 발명에 있어서, 상기 hGH는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [16] 본 발명에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 폴리펩타이드는 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [17] 본 발명에 있어서, 상기 hGH 융합단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [18] 본 발명에 있어서, 상기 제형은 30mg/mL 내지 150mg/mL의 hGH 융합단백질을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [19] 본 발명에 있어서, 상기 제형은 0.01% 내지 0.2% (w/v) 폴록사머 188을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [20] 본 발명에 있어서, 상기 제형은 0.01% 내지 0.2% (w/v) 폴리스르베이트 80을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [21] 본 발명에 있어서, 상기 제형은 히스티딘(Histidine), 아르기닌(Arginine), 글루탐산(Glutamic acid) 및 염화나트륨(NaCl)로 구성된 군에서 선택되는 하나

이상의 부형제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [22] 본 발명에 있어서, 상기 제형은 보존제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [23] 본 발명에 있어서, 상기 보존제는 m-크레솔(m-cresol), 페놀(phenol) 및 벤질 알코올(benzyl alcohol)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [24] 본 발명에 있어서, 상기 보존제는 1mg/mL 내지 2mg/mL의 페놀인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [25] 본 발명에 있어서, 상기 제형은 1mM 내지 20mM의 히스티딘을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [26] 본 발명에 있어서, 상기 제형은 40mM 내지 70mM 아르기닌을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [27] 본 발명에 있어서, 상기 제형은 40mM 내지 70mM 글루탐산을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [28] 본 발명에 있어서, 상기 제형은 80mM 내지 100mM의 염화나트륨을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [29] 본 발명에 있어서, 상기 제형은 pH 5.5 내지 pH 7.0인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [30] 본 발명에 있어서, 상기 제형은 바람직하게는 pH 6.0 내지 pH 6.9, 더욱 바람직하게는 pH 6.0 내지 6.2인 것을 특징으로 하는 할 수 있다.
- [31] 본 발명에 있어서, 상기 제형은 냉장에서 6개월 보관시 1.5% 미만의 응집체를 형성하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [32] 본 발명에 있어서, 상기 제형은 피하 또는 근육 투여용인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [33] 본 발명에 있어서, 상기 제형은 병(bottle), 마이크로튜브(microtube), 백(bag), 바이알(vial), 카트리지(cartridge), 주입기(injector) 및 주사기(syringe)로 구성된 군에서 선택된 용기에서 보관되는 것을 특징으로 할 수 있다.

#### **발명의 효과**

- [34] 본 발명에 따른 폴록사머 188과 폴리소르베이트 80을 함유할 경우, 응집 반응이 현저히 감소되고 보관 안정성이 향상된 고농도의 hGH 용합단백질 제형을 제조할 수 있다.

[35]

#### **도면의 간단한 설명**

- [36] 도 1은 GX-H9의 다양한 제형에서 폴리소르베이트 80 유무에 따른 제형 안정성을 평가하고자 외관 분석(불용성 이물 육안 검사)한 결과이다.
- [37] 도 2는 GX-H9의 다양한 제형에서 폴리소르베이트 80 유무에 따른 제형 안정성을 평가하고자 미세입자(불용성 미립자) 분석한 결과이다.
- [38] 도 3은 GX-H9의 다양한 제형에서 폴리소르베이트 80 유무에 따른 제형

- 안정성을 평가하고자 SE-UPLC 분석한 결과이다.
- [39] 도 4는 GX-H9의 다양한 제형에서 폴리소르베이트 80 유무에 따른 제형 안정성을 평가하고자 RP-HPLC 분석한 결과이다.
- [40] 도 5는 GX-H9 제형에서 폴리소르베이트 80 농도에 따른 제형 안정성을 평가하고자 외관 분석 (불용성 이물 육안 검사)한 결과이다.
- [41] 도 6은 GX-H9 제형에서 폴리소르베이트 80 농도에 따른 제형 안정성을 평가하고자 미세입자 분석한 결과이다.
- [42] 도 7은 GX-H9 제형에서 폴리소르베이트 80 농도에 따른 제형 안정성을 평가하고자 순도 (SE-UPLC, RP-HPLC) 분석한 결과이다.
- [43] 도 8은 다양한 GX-H9 농도, 폴리소르베이트 80 농도, 보존제 조건에서 제형 안정성을 평가하고자 외관 분석 (불용성 이물 육안 검사)한 결과이다.
- [44] 도 9a는 다양한 GX-H9 농도 조건에서 제형 안정성을 평가하고자 순도 (SE-UPLC, RP-HPLC) 분석한 결과이다.
- [45] 도 9b는 다양한 폴리소르베이트 80 농도 조건에서 GX-H9 제형 안정성을 평가하고자 순도 (SE-UPLC, RP-HPLC) 분석한 결과이다.
- [46] 도 9c는 다양한 보존제 처리에 따른 GX-H9 제형 안정성을 평가하고자 순도 (SE-UPLC, RP-HPLC) 분석한 결과이다.

[47]

#### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [48] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[49]

- [50] 본 발명에서는 GX-H9의 고농도 제형을 제조함에 있어서 계면활성제로 폴리소르베이트 80과 폴록사머 188을 함께 함유할 경우, 응집체 형성이 현저히 감소되는 것을 확인하였다.

[51]

- [52] 따라서, 본 발명은 일 관점에서 hGH 융합단백질, 폴록사머 188(Poloxamer 188) 및 폴리소르베이트 80 (Polysorbate 80)을 포함하는 액상 약학 제형에 관한 것이다.

[53]

본 발명에 있어서, 상기 hGH 융합단백질은 hGH 및 면역글로불린 Fc 폴리펩타이드를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[54]

본 발명에서 사용한 hGH 융합단백질 "GX-H9"는 인간 성장호르몬(hGH)에 하이브리드 Fc를 융합시켜 제조한 인간 성장호르몬 융합 단백질인 hGH-hyFc를 지칭한다. hGH 융합단백질인 GX-H9는 미국특허 제8,529,899호에 개시된 방법에 따라 제조할 수 있다.

- [55] 본 발명에 있어서, 상기 hGH는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [56] 본 발명에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 폴리펩타이드는 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [57] 본 발명에 있어서, 상기 hGH 융합단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [58] 본 발명에 있어서, 상기 제형은 30mg/mL 내지 150mg/mL의 hGH 융합단백질을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 60mg/mL 내지 120mg/mL의 GX-H9을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 상기 제형은, 예컨대, 30mg/mL, 40mg/mL, 50mg/mL, 60mg/mL, 70mg/mL, 80mg/mL, 90mg/mL, 100mg/mL, 110mg/mL, 120mg/mL, 130mg/mL, 140mg/mL 또는 150mg/mL의 GX-H9을 포함할 수 있다.
- [59] 본 발명에 있어서, 상기 제형은 0.01% (w/v) 내지 0.2% (w/v) 폴록사머 188을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 0.05% (w/v) 내지 0.15% (w/v), 또는 0.08% (w/v) 내지 0.12% (w/v), 더욱 바람직하게는 0.10% (w/v)의 폴록사머 188을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [60] 본 발명에 있어서, 상기 제형은 0.01% (w/v) 내지 0.2% (w/v) 폴리소르베이트 80을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 0.05% (w/v) 내지 0.15% (w/v), 또는 0.05% (w/v) 내지 0.10% (w/v), 더욱 바람직하게는 0.07% (w/v)의 폴리소르베이트 80을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [61] 본 발명에 있어서, 상기 제형은 상기 제형은 히스티딘(Histidine), 아르기닌(Arginine), 글루탐산(Glutamic acid) 및 염화나트륨(NaCl)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 부형제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [62] 본 발명에 있어서, 상기 제형은 보존제(preservative)를 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [63] 본 발명에 있어서, 상기 보존제는 m-크레솔(m-cresol), 페놀(phenol) 및 벤질 알코올(benzyl alcohol)로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [64] 본 발명에 있어서, 상기 보존제는 1mg/mL 내지 2mg/mL의 페놀인 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 1mg/mL의 페놀인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [65] 본 발명에 있어서, 상기 제형은 1mM 내지 20mM의 히스티딘을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 5mM 내지 15 mM, 더욱 바람직하게는 10mM의 히스티딘을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [66] 본 발명에 있어서, 상기 제형은 40mM 내지 70mM 아르기닌을 포함하는 것을

특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 50mM 내지 60mM, 더욱 바람직하게는 55mM의 아르기닌을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

- [67] 본 발명에 있어서, 상기 제형은 40mM 내지 70mM 글루탐산을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 50mM 내지 60mM, 더욱 바람직하게는 55mM의 글루탐산을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [68] 본 발명에 있어서, 상기 제형은 80mM 내지 100mM의 염화나트륨을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 85mM 내지 95mM, 더욱 바람직하게는 90mM의 염화나트륨을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [69] 본 발명에 있어서, 상기 제형은 pH 5.5 내지 pH 7.0인 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 pH 5.9 내지 pH 6.9, 더 바람직하게는 pH 6.0 내지 pH 6.5, 더욱 바람직하게는 pH 6.0 내지 pH 6.2, 가장 바람직하게는 pH 6.1인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [70] 본 발명에 있어서, 상기 제형은 냉장, 예컨대 2°C 내지 8°C, 바람직하게는 4°C 내지 6°C에서 약 6개월 보관시, 3.0% 미만, 바람직하게는 2.0% 미만, 더욱 바람직하게는 1.5% 미만, 예컨대 0 내지 1.5%의 응집체를 형성하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [71] 본 발명에 있어서, 상기 제형은 피하 또는 근육 투여용인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [72] 본 발명에 있어서, 상기 제형은 주사용 제형인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [73] 본 발명에 있어서, 상기 제형은 병(bottle), 마이크로튜브(microtube), 백(bag), 바이알(vial), 카트리지(cartridge), 주입기(injector) 및 주사기(syringe)로 구성된 군에서 선택된 용기에서 보관되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [74] 예컨대, 제형은 유리 바이알, 유리 카트리지, 플라스틱 카트리지, 프리필드 주사기(prefilled syringe), 펜 주입기(pen injector) 및 자동 주입기(autoinjector)로 구성된 군에서 선택된 용기에서 보관되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [75]
- [76] 본 발명에 따른 고농도 GX-H9 약학 제형은 성장호르몬이 결핍된 성인 또는 소아에게 투여될 수 있다. 본 발명에 따른 고농도 GX-H9 약학 제형은 다양한 방법으로 대상체에게 투여될 수 있다.
- [77] 본 발명에서 상기 대상체는 포유동물일 수 있으나, 이에 한정되지는 않으며, 바람직하게는 상기 대상체는 인간일 수 있다.
- [78] 예를 들면, 상기 제형은 비경구적으로 투여될 수 있는데, 그 예는 피하 또는 근육 내이다.

- [79] 본 발명에서 용어 "약학 제형"은 GX-H9의 생물학적 활성이 효과적이 되게 하는 형태로 GX-H9을 함유하고, 제형이 투여되는 피험자에게 독성을 나타내는 성분이 허용 가능한 용량 이상으로 함유하지 않는 제제를 지칭한다.
- [80] "안정한" 제형은 저장, 보관 및 유통시, GX-H9의 생리적 안정성 및/또는 화학적 안정성 및/또는 생물학적 활성을 실질적으로 보유하는 것이다. 일 양태에서, 제형은 저장시 생리적 및 화학적 안정성뿐만 아니라 그것의 생물학적 활성을 실질적으로 보유한다. 저장 기간은 제형의 의도된 보관 수명에 기반하여 일반적으로 선택된다. 안정성은 선택된 시간 기간 동안 선택된 온도에서 측정될 수 있다. 예를 들어, 일 양태로서 액상 제형은 약 25°C에서 약 2주 내지 4주, 적어도 약 3개월, 적어도 약 6개월, 적어도 약 9개월, 적어도 약 12개월 또는 적어도 약 18개월 동안 안정하다. 또 다른 예로써, 액상 제형은 약 5°C에서 약 2 내지 4주, 적어도 약 3개월, 적어도 약 6개월, 적어도 약 9개월, 적어도 약 12개월, 적어도 약 18개월, 적어도 약 24개월, 적어도 약 30개월 또는 적어도 약 36개월 동안 안정하다.
- [81] 단백질 안정성을 측정하기 위한 분석 기법은 매우 다양하며 선행문헌[Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) 및 Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993)] 등을 참고하였다.
- [82] 액상 제형의 안정성은 다이머, 멀티머 및/또는 응집물 형성의 평가(예를 들어, 크기 배제 초고성능 액체 크로마토그래피 (size exclusion ultra-high performance liquid chromatography, SE-UPLC), 크기 배제 고성능 액체 크로마토그래피 (size exclusion high performance liquid chromatography, SE-HPLC), 역상 초고성능 액체 크로마토그래피 (reversed-phase ultra-high performance liquid chromatography, RP-UPLC), 역상 고성능 액체 크로마토그래피 (reversed-phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC) 등과 같은 액체 크로마토그래피), 기질-보조 레이저 탈착-이온화 시간 비행 질량 분석법(matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry: MALDI-TOF MS), 분석 초원심분리, 광 산란 (광자 상관 분광법, 동적 광 산란(dynamic light scattering: DLS), 정적 광 산란, 다각 레이저 광 산란 (multi-angle laser light scattering: MALLS), 유동-기반 현미경 영상화, 전자 임피던스(쿨터(coulter)) 카운터, 광 차단 또는 다른 액체 입자 계측 시스템을 사용하여, 탁도 측정에 의해 및/또는 시각적 검사에 의해); 양이온 교환 크로마토그래피(cation exchange chromatography: CEX), 정전위점 초점화(isoelectric focusing: IEF), 예를 들어 모세관 기법(capillary technique: cIEF), 또는 모세관 전기영동(capillary zone electrophoresis)을 사용하여 전하 이질성을 평가함으로써; 아미노-말단 또는 카복시-말단 서열 분석; 질량 스펙 펩타이드 맵핑(예를 들어 트립신/LYS-C 이용) 분석; 항체의 생물학적 활성 또는 항원 결합 기능 등을 평가를 포함하는, 다양한 상이한 방법에서 정성적으로 및/또는 정량적으로 평가될 수 있다.

- [83] 본 발명에서, 상기 약학 제형은 등장성 제형일 수 있으며, "등장성" 제형은 실질적으로 인간 혈액과 동일한 삼투압을 가진다. 등장성 제형은 일반적으로 약 250 내지 350 mOsm/kg의 삼투압을 가질 것이다. 등장성은, 예를 들어 수증기압 또는 빙냉형 삼투압계를 사용하여 측정될 수 있다.
- [84] 본 발명에서, "완충제"는 그것의 산-염기 컨쥬게이트 성분의 작용에 의해 pH의 변화에 저항하는 완충제를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 완충제는 약 5.0 내지 약 7.5, 약 5.8 내지 약 7.0, 약 6.0 내지 약 6.5로 또는 약 6.0 내지 약 6.3의 pH로 제형의 pH를 조절한다. 일 양태에서, 단독으로 또는 조합으로 pH를 제어하는 완충제의 예는, 아세테이트(acetate), 숙시네이트(succinate), 글루코네이트(gluconate), 히스티딘(histidine), 시트레이트(citrate), 포스페이트(phosphate), 말리에이트(maleate), 카코다일레이트(cacodylate), 2-[N-모폴리노]에탄설폰산(2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid, MES), 비스(2-하이드록시에틸)이미노트리스[하이드록시메틸]메탄(비스-트리스)(bis(2-hydroxyethyl)iminotris [Hydroxymethyl]methane (bis-tris)), N-[2-아세트아미도]-2-이미노다이아세트산(N-[2-acetamido]-2-iminodiacetic acid, ADA), 글라이실글라이신(glycylglycine) 또는 다른 유기산 완충제를 포함할 수 있다.
- [85] 한편, 본 발명에서 완충제는 생물학적 완충제, 즉, 생물학적 시스템 또는 이의 맥락에서 사용되는 종래 기술로부터 공지된 완충제가 사용될 수 있는데, 예컨대, 본 발명에서 사용되는 완충액은 무기 염 및 유기 염을 함유하는 혼합 완충액일 수 있다.
- [86] 또한, 본 발명에서 사용될 수 있는 바람직한 혼합 완충액은 생물학적 완충액으로, 아미노산을 포함하는 것일 수 있다. 본 발명에서 사용될 수 있는 바람직한 아미노산은 히스티딘, 아르기닌 및 글루탐산으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 히스티딘, 아르기닌 및 글루탐산을 모두 포함하는 것이 바람직하다.
- [87] 본 발명에서, "계면활성제"는 액체의 표면 장력을 낮추는 작용제를 지칭한다. 일 양태에서, 계면활성제는 비이온성 계면활성제일 수 있다. 바람직한 양태로서, 본 발명은 계면활성제로 폴리소르베이트 80과 폴록사머 188를 모두 포함할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 본 발명에서 추가로 포함될 수 있는 계면활성제의 예는 폴리소르베이트(폴리옥시에틸렌 솔비탄 모노라우레이트, 예를 들어, 폴리소르베이트 20); 트리톤(TRITON)(t-옥틸페녹시폴리에톡시에탄올, 비이온성 세정제, 미시간주 미들랜드에 소재한 다우 케미컬 컴퍼니의 유니온 카바이드(Union Carbide) 자회사); 도데실 황산 나트륨(sodium dodecyl sulfate: SDS); 라우릴 황산 나트륨; 소듐 옥틸 글라이코사이드; 라우릴-, 미리스틸-, 리놀레일- 또는 스테아릴-설포베타인; 라우릴-, 미리스틸-, 리놀레일- 또는 스테아릴-사코신; 리놀레일-, 미리스틸- 또는 세틸-베타인; 라우로아미도프로필-, 코카미도프로필-,

리놀레아미도프로필-, 미리스트아미도프로필-, 팔미도프로필-, 또는 아이소스테아르아미도프로필-베타인(예를 들어, 라우로아미도프로필); 미리스트아미도프로필-, 팔미도프로필-, 또는 아이소스테아르아미도프로필-다이메틸아민; 소듐 메틸 코코일-, 또는 다이소듐 메틸 올레일-타우레이트; 솔비탄 모노팔미테이트; 및 MONAQUAT 시리즈(뉴저지주 패터슨에 소재한 모나 인더스트리즈 인코포레이티드(Mona Industries, Inc.)); 폴리에틸 글라이콜(polyethyl glycol: PEG), 폴리프로필렌 글라이콜(PPG) 및 폴리옥시에틸렌 및 폴록시프로필렌 글라이콜의 공중합체(예를 들어, 플루로닉스/폴록사머(Pluronic/Poloxamer), PF68 등); 로 구성된 군에서 선택되는 것을 포함한다.

[88] 본 발명에 따른 제형은 일 실시양태로서 멸균되고 보존제를 포함하지 않는다. 다른 실시양태에서, 본 발명에 따른 제형은 임의의 보존제를 포함할 수 있으며, 상기 보존제는 파라벤-무함유 보존제일 수 있다. 파라벤은 일련의 파라히드록시벤조에이트 또는 파라히드록시벤조산의 에스테르이며, 이는 시토카인 방출 및 자극을 야기하고 여러 유형의 암과 관계된 것으로 공지되어 있다. 파라벤의 예는 메틸 파라벤, 에틸 파라벤, 프로필 파라벤, 부틸 파라벤, 헵틸 파라벤, 이소부틸 파라벤, 이소프로필 파라벤, 벤질 파라벤, 및 이들의 나트륨 염을 포함한다.

[89] 예시적인 파라벤-무함유 보존제는 메틸페놀 (크레솔), 예컨대 3-메틸페놀 (메타-크레솔 또는 m-크레솔), 페놀, 페네틸 알코올, 카프릴릴 글리콜, 페녹시에탄올, 소르베이트, 소르브산칼륨, 소르브산나트륨, 소르브산, 벤조산나트륨, 벤조산, 아세만난, 올레우로페인, 카르바크롤, 크랜베리 추출물, 글로코노락톤, 녹차 추출물, 헬리안투스 안누우스(Helianthus annuus) 종자 오일, 락토바실러스(Lactobacillus) 발효물, 우스네아 바르바타(Usnea barbata) 추출물, 폴리아미노프로필 비구아니드, 폴리글리세릴-3 팔미테이트, 폴리글리세릴-6 카프릴레이트, 석류 추출물, 포플러스 트레몰로이드스(Populus tremuloides) 껍질 추출물, 레스페라트롤, 로스마리누스 오피시날리스(Rosmarinus officinalis) 잎 추출물, 벤질 알코올, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다.

[90] 본 발명에 따른 제형은 항산화제를 추가로 포함할 수 있다. "항산화제"는 다른 분자의 산화를 억제하는 작용제를 지칭하며, 본 발명에서 항산화제의 예는 시트레이트, 리포산, 요산, 글루타티온, 토코페롤, 카로텐, 라이코펜, 시스테인, 포스포네이트 화합물, 예를 들어, 에티드론산, 데스페록사민 및 말레이트를 포함한다.

[91]

[92] 본 발명에서 사용되는 GX-H9은 실질적으로 순수할 수 있고 (즉, 오염 단백질 등이 없음), 실질적으로 동종일 수 있다. "실질적으로 순수한" GX-H9은 약학 제형 내 단백질의 전체 중량을 기준으로 적어도 약 90중량%, 대안적으로 적어도 약 95중량% 또는 97 중량%로 포함된다는 것을 의미한다.

- [93] GX-H9은 “실질적으로 동종인” GX-H9를 포함할 수 있고, 상기 “실질적으로 동종인” GX-H9은 본 발명에서 사용되는 GX-H9와 균등 활성을 갖는 변이를 갖는다는 것을 의미한다. 상기의 실질적으로 동종인 것은 일 양태로서 GX-H9 아미노산 서열과 실질적으로 동일한 것을 의미할 수 있고, 실질적으로 동일한 서열은 본 발명의 GX-H9 아미노산 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 열라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 열라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다.
- [94]
- [95] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [96]
- [97] **실시예 1. hGH-hyFc의 고농도 제형 12주 안정성 평가**
- [98]
- [99] 1-1. 예비 실험 결과 요약
- [100] hGH-hyFc (이하, 'GX-H9'와 혼용하여 표시됨)의 고용량 제형에 대한 예비 실험에서는 pH 6.0 내지 6.5 범위에 걸쳐 온도 스트레스에 대한 응집 저항성이 다른 pH 범위에 비해 더 크게 나타났다. 또한, 인산염 완충제에 비해 히스티딘 완충제제를 사용하는 경우 더 높은 수준의 안정성을 확인할 수 있었다. 한편, 동결/해동, 교반 조건에서 폴록사머 188 및 폴리소르베이트 80을 사용하면 높은 안정성을 얻을 수 있었다.
- [101] 전반적으로, SE-HPLC 결과는 pH 6.1에서 더 높은 안정성을 나타내는 반면, RP-UPLC 결과는 염화나트륨을 함유하는 pH 6.5 제형에서 더 높은 안정성을 나타내는 것으로 확인되었다 (데이터 미도시).
- [102]
- [103] 1-2. 실험 설계
- [104] 이하에서는 인산염 완충액 pH 6.9 제형을 추가로 포함하여, 총 5개의 서로 다른 제형에 대해 온도 (-70°C, 2 내지 8°C, 25°C, 45°C) 스트레스, 동결/해동 스트레스, 가벼운 진탕 스트레스에 따른 안정성을 평가하였다. 표 1은 GX-H9 및 부형제 농도 및 종류의 제형조건을 나타낸 것이다.
- [105]
- [106] **[표 1]**

[107]

| pH  | 농도(mg/mL) | 10 mM<br>히스티딘 | 15 mM<br>인산나트륨 | 아르기닌<br>(mM) | 글루탐산(mM) | 염화나트륨(mM) | 수크로오스<br>% (w/v) | 0.1% (w/v)<br>폴록사머<br>188 |
|-----|-----------|---------------|----------------|--------------|----------|-----------|------------------|---------------------------|
| 6.1 | 150       | +             |                | 55           | 55       | 90        |                  | +                         |
| 6.1 | 100       | +             |                | 55           | 55       | 90        |                  | +                         |
| 6.5 | 150       | +             |                |              |          | 80        | 4                | +                         |
| 6.9 | 150       |               | +              |              |          |           | 200 mM           | +                         |
| 6.9 | 30        |               | +              |              |          | 50        | 5                | +                         |

[108]

[109] GX-H9을 포함한 용액을 표 1에서 언급된 제형조건(Poloxamer 188를 제외)의 각각의 버퍼로 한외여과(ultrafiltration, UF)/정용여과(diafiltration, DF)를 실시하였다. pH와 conductivity를 측정하여 버퍼가 충분히 평형이 도달하였음을 확인한 후, 원하는 농도까지 농축한 다음 폴록사머 188을 첨가하여 목표 농도를 맞추었다.

[110] 무균 조건에서 각각의 제형으로 만든 GX-H9 시료들을 0.2 $\mu$ m 폴리비닐리덴 디플루오라이드(polyvinylidene difluoride, PVDF) 멤브레인을 통해 여과한 다음 사전 멸균된 발열성 소실 붕규산 바이알(depyrogenated borosilicate vials)에 분배하고 마개를 닫은 후 알루미늄 쉘로 크림핑(crimping)하였다. 이후, 각 바이알을 안정성 시험을 위한 스트레스 조건에 두고, 원하는 시점에 샘플을 추출하여 안정성 평가를 수행하였다 (표 2). 샘플의 분취량은 적절한 분석을 위해 필요에 따라 희석하여 사용하였으며, 나머지 샘플은 백업 테스트를 위해 -70°C에서 유지되었다. 표 2는 스트레스 조건 및 분석항목의 실험조건을 나타낸 것이다.

[111]

[112] [표 2]

[113]

| 조건                                | 샘플링 시기 | A280 nm,<br>큐벳(cuvette) | A330 nm,<br>희석 | 육안 외관<br>(visible<br>appearance)(<br>액상) | RP-UPLC | SE-U/HPLC | pH |
|-----------------------------------|--------|-------------------------|----------------|------------------------------------------|---------|-----------|----|
| -70 °C                            | T=0    | 1                       | 1              | 1                                        | 1       | 1         | 1  |
| 3-일 진탕 스트레스<br>(2-8 °C)           | 3 일    | 1                       | 1              | 1                                        | 1       | 1         | 1  |
| 5 주기 동결 (-70°C) /<br>해동 (ambient) | 1 주    | 1                       | 1              | 1                                        | 1       | 1         | 1  |
| 2-8 °C                            | 1 주    | 1                       | 1              | 1                                        | 1       | 1         | 1  |
| 25 °C                             | 1 주    | 1                       | 1              | 1                                        | 1       | 1         | 1  |
| 45 °C                             | 1 주    | 1                       | 1              | 1                                        | 1       | 1         | 1  |
| 2-8 °C                            | 3 주    | 1                       | 1              | 1                                        | 1       | 1         | 1  |
| 25 °C                             | 3 주    | 1                       | 1              | 1                                        | 1       | 1         | 1  |
| 45°C                              | 3 주    | 1                       | 1              | 1                                        | 1       | 1         | 1  |
| -70 °C                            | 6 주    | 1                       | 1              | 1                                        | 1       | 1         | 1  |
| 2-8 °C                            | 6 주    | 1                       | 1              | 1                                        | 1       | 1         | 1  |
| 25 °C                             | 6 주    | 1                       | 1              | 1                                        | 1       | 1         | 1  |
| -70 °C                            | 12 주   | 1                       | 1              | 1                                        | 1       | 1         | 1  |
| 2-8 °C                            | 12 주   | 1                       | 1              | 1                                        | 1       | 1         | 1  |
| 25 °C                             | 12 주   | 1                       | 1              | 1                                        | 1       | 1         | 1  |

[114]

[115] 1-3. 농도 (A280), 탁도(A330), 외관 및 pH 변화

[116] 스트레스 조건에서 각 제형의 농도, 탁도, 육안을 통한 외관 및 pH 변화를 확인하였다.

[117] 샘플의 농도는  $1.0 \text{ mg/mL} = 1.04 \text{ AU}$ 의 흡광 계수를 사용하여 280 nm에서 흡광도 측정에 의해 결정되었다. 확인된 최종 단백질 농도는 산란에 대해 수정되었다 ( $(A280-A330)/\epsilon_{280}$  = 수정된 단백질 농도).

[118] 다양한 스트레스 조건 후 샘플의 단백질 농도, 탁도, 외관 및 pH를 확인한 결과는 표 3과 표 4에 도시된 바와 같다. 다양한 스트레스 조건에 따른 단백질 농도, 탁도 및 pH와 관련하여 명확한 차이가 관찰되지 않았다. 다양한 스트레스 조건 하에서 모든 제형에서는 눈에 보이는 미립자가 관찰되지 않았다. 5 X 동결/해동 또는 2-8°C에서 3일 진탕 스트레스 결과, 어떠한 제형에서도 식별 가능한 분석적 변화가 확인되지 않았다.

[119] 표 3은 온도 스트레스 후 농도, 탁도, 외관 및 pH 변화를 나타낸 것이다.

[120]

[121] **[표 3]**

[122]

| 샘플 조성<br>(Sample Composition) |                                               | GX-H9 농도 (mg/mL)<br>혼탁도(Turbidity) (A330)-회색<br>육안 외관(Visual appearance)*<br>측정된 pH |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|-------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                               |                                               | -70 °C                                                                              |           |           | -2-8 °C   |           |           |           | 25 °C     |           |           |           | 45°C      |           |
|                               |                                               | t=0                                                                                 | t=6 주     | t=12 주    | t=1 주     | t=3 주     | t=6 주     | t=12 주    | t=1 주     | t=3 주     | t=6 주     | t=12 주    | t=1 주     | t=3 주     |
|                               |                                               |                                                                                     |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
| 10 mM 히스티딘,<br>0.1% 폴록사머 188  | 55 mM 아르기닌,<br>55 mM 글루탐산, 90 mM NaCl, pH 6.1 | 149.9                                                                               | 152.3     | 152       | 152       | 154.8     | 151.6     | 154.7     | 151.4     | 155.7     | 146.4     | 150.3     | 150.9     | 157       |
|                               |                                               | 0.004                                                                               | 0.004     | 0.005     | 0.005     | 0.004     | 0.005     | 0.005     | 0.007     | 0.004     | 0.003     | 0.005     | 0.007     | 0.011     |
|                               |                                               | O, LY, NP                                                                           | O, LY, NP | O, LY, NP | O, LY, NP | O, LY, NP | O, LY, NP | O, LY, NP | O, LY, NP | O, LY, NP | O, LY, NP | O, LY, NP | O, LY, NP | O, LY, NP |
|                               |                                               | 6.1                                                                                 | 6.1       | 6         | 6.1       | 6         | 6.1       | 6         | 6.1       | 6.1       | 6.1       | 6         | 6.1       | 6.1       |
|                               | 55 mM 아르기닌,<br>55 mM 글루탐산, 90 mM NaCl, pH 6.1 | 105.3                                                                               | 103.6     | 104.9     | 106.2     | 107.1     | 103.4     | 104.1     | 105.3     | 107.6     | 102.1     | 104.4     | 106.5     | 101.9     |
|                               |                                               | 0.003                                                                               | 0.003     | 0.003     | 0.004     | 0.003     | 0.003     | 0.003     | 0.005     | 0.003     | 0.003     | 0.004     | 0.006     | 0.006     |
|                               |                                               | O, LY, NP                                                                           | O, LY, NP | O, LY, NP | O, LY, NP | O, LY, NP | O, LY, NP | O, LY, NP | O, LY, NP | O, LY, NP | O, LY, NP | O, LY, NP | O, LY, NP | O, LY, NP |
|                               |                                               | 6.1                                                                                 | 6.1       | 6         | 6.1       | 6.1       | 6.1       | 6         | 6.1       | 6.1       | 6.1       | 6         | 6.1       | 6.1       |
|                               | 80 mM NaCl,<br>4% 수크로오스, pH 6.5               | 144.2                                                                               | 141.7     | 145.4     | 140.6     | 146.2     | 142.7     | 133.4     | 146.2     | 147.5     | 141.6     | 137.7     | 145.2     | 146.1     |
|                               |                                               | 0.001                                                                               | 0.009     | 0.003     | 0.005     | 0.003     | 0.005     | 0.005     | 0.006     | 0.008     | 0.003     | 0.004     | 0.006     | 0.004     |
|                               |                                               | C, LY, NP                                                                           | C, LY, NP | C, LY, NP | C, LY, NP | C, LY, NP | C, LY, NP | C, LY, NP | C, LY, NP | C, LY, NP | C, LY, NP | C, LY, NP | C, LY, NP | C, LY, NP |
|                               |                                               | 6.5                                                                                 | 6.5       | 6.5       | 6.5       | 6.5       | 6.5       | 6.5       | 6.5       | 6.5       | 6.5       | 6.5       | 6.5       | 6.5       |
| 15 mM 인산나트륨,<br>0.1% 폴록사머 188 | 200 mM (6.8%) 수크로오스, pH 6.9                   | 156.4                                                                               | 154.3     | 157.6     | 157.7     | 161.8     | 154.6     | 157.6     | 158.5     | 160.9     | 154.9     | 151.1     | 155.5     | 153       |
|                               |                                               | 0.003                                                                               | 0.005     | 0.006     | 0.008     | 0.004     | 0.005     | 0.006     | 0.007     | 0.007     | 0.004     | 0.006     | 0.008     | 0.006     |
|                               |                                               | C, LY, NP                                                                           | C, LY, NP | C, LY, NP | C, LY, NP | C, LY, NP | C, LY, NP | C, LY, NP | C, LY, NP | C, LY, NP | C, LY, NP | C, LY, NP | C, LY, NP | C, LY, NP |
|                               |                                               | 6.8                                                                                 | 6.9       | 6.8       | 6.9       | 6.9       | 6.9       | 6.8       | 6.9       | 6.8       | 6.9       | 6.8       | 6.9       | 6.9       |
|                               | 50 mM NaCl,<br>5% 수크로오스, pH 6.9               | 30.7                                                                                | 30.4      | 31.1      | 30.5      | 32.5      | 30.4      | 30.6      | 30.5      | 31.3      | 30.8      | 31.1      | 30.3      | 31.9      |
|                               |                                               | 0.005                                                                               | 0.005     | 0.005     | 0.007     | 0.003     | 0.003     | 0.005     | 0.006     | 0.004     | 0.004     | 0.006     | 0.005     | 0.006     |
|                               |                                               | C, NC, NP                                                                           | C, NC, NP | C, NC, NP | C, NC, NP | C, NC, NP | C, NC, NP | C, NC, NP | C, NC, NP | C, NC, NP | C, NC, NP | C, NC, NP | C, NC, NP | C, NC, NP |
|                               |                                               | 6.8                                                                                 | 6.8       | 6.8       | 6.8       | 6.8       | 6.8       | 6.8       | 6.8       | 6.8       | 6.8       | 6.8       | 6.9       | 6.8       |

[123] \*C= Clear; T=Turbid; O= Opalescent (translucent); LY=Light Yellow; NC=No Color; NP=No Particles

[124]

[125] 표 4는 동결/해동 및 진탕 스트레스 후 농도, 탁도, 외관 및 pH 변화를 나타낸 것이다.

[126]

[127] [표 4]

[128]

| 샘플 조성<br>(Sample Composition) |                                               | GX-H9 농도 (mg/mL)<br>혼탁도(Turbidity) (A330)<br>육안 외관(Visual appearance)*<br>측정된 pH |                                    |                                    |
|-------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
|                               |                                               | t=0                                                                              | F/T, 5x                            | 진탕(Shake) 3 일                      |
|                               |                                               |                                                                                  |                                    |                                    |
| 10 mM 히스티딘,<br>0.1% 폴록사머 188  | 55 mM 아르기닌,<br>55 mM 글루탐산, 90 mM NaCl, pH 6.1 | 149.9<br>0.004<br>O, LY, NP<br>6.1                                               | 149.8<br>0.004<br>O, LY, NP<br>6.1 | 152.0<br>0.004<br>O, LY, NP<br>6.1 |
|                               | 55 mM 아르기닌,<br>55 mM 글루탐산, 90 mM NaCl, pH 6.1 | 105.3<br>0.003<br>O, LY, NP<br>6.1                                               | 103.2<br>0.002<br>O, LY, NP<br>6.1 | 104.3<br>0.003<br>O, LY, NP<br>6.1 |
|                               | 80 mM NaCl, 4% 수크로오스, pH 6.5                  | 144.2<br>0.001<br>C, LY, NP<br>6.5                                               | 145.4<br>0.006<br>C, LY, NP<br>6.5 | 141.1<br>0.004<br>C, LY, NP<br>6.5 |
| 15 mM 인산나트륨,<br>0.1% 폴록사머 188 | 200 mM (6.8%) 수크로오스, pH 6.9                   | 156.4<br>0.003<br>C, LY, NP<br>6.8                                               | 162.6<br>0.005<br>C, LY, NP<br>6.8 | 156.7<br>0.008<br>C, LY, NP<br>6.8 |
|                               | 50 mM NaCl, 5% 수크로오스, pH 6.9                  | 30.7<br>0.005<br>C, NC, NP<br>6.8                                                | 31.1<br>0.003<br>C, NC, NP<br>6.8  | 30.6<br>0.005<br>C, NC, NP<br>6.8  |

[129] \*C= Clear; T=Turbid; O= Opalescent (translucent); LY=Light Yellow; NC=No Color; NP=No Particles

[130]

[131] GX-H9의 목표 농도는 모든 테스트 제형에서 달성되었으며, 이는 준비 후 대부분의 제형에 대해 <1%의 산란 수준을 나타내었다. 스트레스 반응 후, 샘플의 단백질 농도, 탁도, 외관 및 pH를 확인한 결과, 모든 테스트 제형에서 다양한 스트레스 조건에 따른 단백질 농도, 탁도 및 pH와 관련하여 명확한 차이가 관찰되지 않았다.

[132]

[133] 1-4. SE-UPLC

[134] SE-UPLC(겔 여과 크로마토그래피라고도 함)는 크기에 따라 단백질의 분자 형태를 분리한다. 이 방법에서는 고분자종 (예컨대, 응집체, IgG 이량체 및 올리고머)이 원하는 (단량체) IgG 종보다 먼저 pre-peaks로 용리된다. 저분자종 (예컨대, 분해 산물 및 단편)은 이후 post-peaks로 용리된다.

[135] SE-UPLC는 Waters Acquity UPLC BEH SEC, 200A (4.6 x 300mm, 1.7 $\mu$ m) 및 100mM 인산나트륨, 200mM 아르기닌-HCl, pH 7.0, 이동상을 사용하여 수행되었다

[136]

[137] 표 5는 온도 스트레스에 따른 SE-UPLC 결과를 나타낸 것이다.

[138]

[139] **[표 5]**

[140]

| 샘플 조성<br>(Sample Composition) |                      | SE-UPLC (% 순도)   |        |       |        |        |       |       |       |        |       |       |      |      |
|-------------------------------|----------------------|------------------|--------|-------|--------|--------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|------|------|
|                               |                      | HMW              |        |       |        |        |       |       |       |        |       |       |      |      |
|                               |                      | 메인 피크(Main Peak) |        |       |        |        |       |       |       |        |       |       |      |      |
|                               |                      | LMW              |        |       |        |        |       |       |       |        |       |       |      |      |
|                               |                      | t=0              | -70 °C |       | 2-8 °C |        |       |       | 25 °C |        |       |       | 45°C |      |
| t=6 주                         | t=12 주               |                  | t=1 주  | t=3 주 | t=6 주  | t=12 주 | t=1 주 | t=3 주 | t=6 주 | t=12 주 | t=1 주 | t=3 주 |      |      |
| 10 mM 히스티딘,<br>0.1% 폴록사머 188  | 55 mM 아르기닌,          | 0.9              | 0.8    | 0.9   | 1.1    | 1.0    | 1.4   | 1.8   | 1.7   | 2.1    | 2.9   | 4.1   | 7.9  | 13.1 |
|                               | 55 mM 글루탐산,          | 93.7             | 91.8   | 91.6  | 93.2   | 91.6   | 90.6  | 89.6  | 92.2  | 89.5   | 86.5  | 83.4  | 85.8 | 77.8 |
|                               | 90 mM NaCl, pH 6.1   | 5.4              | 7.4    | 7.5   | 5.7    | 7.4    | 8.0   | 8.6   | 6.1   | 8.4    | 10.5  | 12.5  | 6.3  | 9.1  |
|                               | 55 mM 아르기닌,          | 0.9              | 0.7    | 0.8   | 0.9    | 0.9    | 1.2   | 1.6   | 1.4   | 1.8    | 2.4   | 3.4   | 6.7  | 10.9 |
|                               | 55 mM 글루탐산,          | 93.8             | 91.9   | 91.7  | 93.7   | 91.7   | 90.8  | 90.0  | 92.3  | 90.0   | 87.3  | 84.8  | 86.9 | 79.8 |
|                               | 90 mM NaCl, pH 6.1   | 5.3              | 7.4    | 7.6   | 5.4    | 7.4    | 7.9   | 8.4   | 6.3   | 8.2    | 10.3  | 11.8  | 6.4  | 9.2  |
| 15 mM 인산나트륨,<br>0.1% 폴록사머 188 | 80 mM NaCl,          | 0.8              | 0.8    | 0.8   | 1.1    | 1.3    | 1.6   | 1.8   | 2.0   | 2.7    | 3.5   | 4.6   | 8.1  | 13.1 |
|                               | 4% 수크로오즈,            | 93.9             | 91.9   | 91.7  | 93.5   | 91.2   | 90.3  | 89.2  | 92.2  | 88.6   | 86.0  | 82.1  | 85.1 | 76.7 |
|                               | pH 6.5               | 5.3              | 7.3    | 7.6   | 5.3    | 7.5    | 8.2   | 9.1   | 5.9   | 8.7    | 10.5  | 13.3  | 6.8  | 10.2 |
|                               | 200 mM (6.8%) 수크로오즈, | 1.1              | 1.0    | 1.0   | 1.5    | 1.6    | 2.0   | 2.2   | 2.5   | 3.4    | 4.4   | 5.5   | 8.7  | 13.7 |
|                               | pH 6.9               | 93.4             | 91.8   | 91.4  | 92.9   | 90.4   | 89.2  | 87.5  | 90.7  | 85.8   | 80.8  | 74.5  | 82.8 | 72.8 |
|                               | 50 mM NaCl,          | 5.4              | 7.3    | 7.6   | 5.6    | 7.9    | 8.8   | 10.2  | 6.8   | 10.8   | 14.8  | 20.0  | 8.5  | 13.5 |
|                               | 5% 수크로오즈,            | 0.7              | 0.7    | 0.6   | 0.9    | 1.0    | 1.2   | 1.3   | 1.2   | 1.7    | 2.1   | 2.6   | 3.5  | 5.9  |
|                               | pH 6.9               | 93.9             | 92.1   | 91.8  | 93.7   | 91.2   | 90.3  | 89.2  | 93.1  | 88.2   | 83.6  | 78.6  | 87.8 | 79.2 |
|                               |                      | 5.3              | 7.2    | 7.6   | 5.4    | 7.8    | 8.5   | 9.5   | 5.7   | 10.1   | 14.2  | 18.7  | 8.6  | 14.8 |

[141]

[142] 표 6은 동결/해동 및 진탕 스트레스에 따른 SE-UPLC 결과를 나타낸 것이다.

[143]

[144] [표 6]

[145]

| 샘플 조성<br>(Sample Composition) |                             | SE-UPLC (% Purity) |         |               |
|-------------------------------|-----------------------------|--------------------|---------|---------------|
|                               |                             | HMW                |         |               |
|                               |                             | 메인 피크(Main Peak)   |         |               |
|                               |                             | LMW                |         |               |
|                               |                             | t=0                | F/T, 5x | 진탕(Shake) 3 일 |
| 10 mM 히스티딘,<br>0.1% 폴리사머 188  | 55 mM 아르기닌,                 |                    |         |               |
|                               | 55 mM 글루탐산,                 | 0.9                | 0.7     | 1.2           |
|                               |                             | 93.7               | 92.1    | 93.5          |
|                               |                             | 5.4                | 7.2     | 5.4           |
|                               | 90 mM NaCl, pH 6.1          |                    |         |               |
|                               | 55 mM 아르기닌,                 | 0.9                | 0.7     | 1.0           |
|                               | 55 mM 글루탐산,                 | 93.8               | 92.1    | 93.6          |
| 15 mM 인산나트륨,<br>0.1% 폴리사머 188 |                             | 5.3                | 7.2     | 5.4           |
|                               | 90 mM NaCl, pH 6.1          |                    |         |               |
|                               | 80 mM NaCl,                 | 0.8                | 0.8     | 1.0           |
|                               |                             | 93.9               | 91.9    | 93.6          |
|                               | 4% 수크로오즈, pH 6.5            | 5.3                | 7.3     | 5.4           |
|                               |                             |                    |         |               |
|                               |                             |                    |         |               |
| 15 mM 인산나트륨,<br>0.1% 폴리사머 188 | 200 mM (6.8%) 수크로오즈, pH 6.9 | 1.1                | 1.1     | 1.1           |
|                               |                             | 93.4               | 91.6    | 93.5          |
|                               |                             | 5.4                | 7.3     | 5.4           |
| 15 mM 인산나트륨,<br>0.1% 폴리사머 188 | 50 mM NaCl,                 | 0.7                | 0.7     | 0.8           |
|                               |                             | 93.9               | 92.0    | 93.8          |
|                               | 5% 수크로오즈, pH 6.9            | 5.3                | 7.3     | 5.4           |

[146]

[147] -70°C, 2-8°C, 25°C 및 45°C에서 12주간 보관한 샘플의 SE-UPLC 결과, 표 5 및 표 6에 나타난 바와 같이, 고분자중(HMW) 및 저분자중(LMW) 모두 증가되었다. 안정성 종말점 비교 결과, 더 높은 pH에 비해 pH 6.1에서 GX-H9 안정성이 더 높게 나타났다. 한편, 동일한 pH 6.1 제형 중 100 mg/mL 제형이 150 mg/mL 보다 더 안정적이었다. 동결/해동 및 2-8°C 진탕 스트레스에 노출되었을 때 모든 테스트 제형 사이에 식별 가능한 경향이 관찰되지 않았는데, 그 이유는 결과 데이터가 t=0 결과 및 검정 변동성 내에서 유사했기 때문이다 (표 5 및 표 6).

[148]

[149] 1-5. RP-UPLC

[150] RP-UPLC는 소수성의 차이에 따라 분자를 분리한다. 분리는 고정상의 고정된 소수성 리간드에 대한 이동상의 용질 결합에 따라 달라진다. 용출은 일반적으로 분자 소수성이 증가하는 순서로 유기 용매를 통한 이동상의 소수성 변화로 수행된다. 용매 구배 분리는 Waters Acquity UPLC Protein BEH300 C4 컬럼(2.1 x 150mm)와 함께 220 nm에서 모니터링하는 UV 검출기(A220) 및 통합

소프트웨어(Chromeleon 7.2)가 장착된 초고성능 액체 크로마토그래피 시스템(Waters Acquity H-Class UPLC)을 사용하여 수행되었다.

[151]

[152] 표 7은 온도 스트레스에 따른 RP-UPLC 결과를 나타낸 것이다.

[153]

[154] [표 7]

[155]

| 샘플 조성<br>(Sample Composition)  |                                 | RP-UPLC (% 순도)                      |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |
|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|                                |                                 | 친수성(Hydrophilic) 1                  |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |
|                                |                                 | 친수성(Hydrophilic) 2                  |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |
|                                |                                 | 친수성(Hydrophilic) 3                  |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |
|                                |                                 | 메인 피크(Main Peak)                    |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |
|                                |                                 | 메인 피크 어깨(Shoulder of the main peak) |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |
|                                |                                 | 소수성(Hydrophobic) 1                  |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |
|                                |                                 | t=0                                 | -70 °C        |               |               | 2-8 °C        |               |               | 25 °C         |               |               | 45°C          |               |               |               |
|                                |                                 | t=6 주                               | t=12 주        | t=1 주         | t=3 주         | t=6 주         | t=12 주        | t=1 주         | t=3 주         | t=6 주         | t=12 주        | t=1 주         | t=3 주         |               |               |
| 10 mM 히스티딘,<br>0.1% 플루오르사마 188 | 55 mM 아르기닌,                     | 1.81<br>0.85                        | 1.86<br>0.89  | 1.89<br>0.67  | 1.89<br>0.86  | 2.09<br>0.80  | 2.29<br>0.88  | 2.76<br>0.67  | 2.21<br>0.84  | 3.06<br>0.87  | 4.14<br>1.08  | 6.05<br>1.29  | 2.72<br>0.81  | 4.29<br>1.71  |               |
|                                | 55 mM 글루탐산,                     | 2.33<br>94.10                       | 2.88<br>93.45 | 2.61<br>93.68 | 2.35<br>93.99 | 2.43<br>93.77 | 2.84<br>93.06 | 2.54<br>91.64 | 2.30<br>93.75 | 2.32<br>90.28 | 2.22<br>87.53 | 2.26<br>86.19 | 3.07<br>92.40 | 4.50<br>82.84 |               |
|                                | 90 mM NaCl, pH 6.1              | n.a.<br>0.91                        | n.a.<br>0.91  | n.a.<br>1.15  | n.a.<br>0.91  | n.a.<br>0.91  | n.a.<br>0.93  | 1.23<br>1.17  | n.a.<br>0.91  | 2.56<br>0.90  | 4.16<br>0.87  | 3.15<br>1.06  | n.a.<br>0.99  | 5.55<br>1.12  |               |
|                                | 55 mM 아르기닌,                     | 1.81<br>0.86                        | 1.84<br>0.90  | 1.89<br>0.67  | 1.86<br>0.84  | 2.04<br>0.8   | 2.22<br>0.89  | 2.62<br>0.67  | 2.14<br>0.84  | 2.89<br>0.87  | 3.83<br>1.06  | 5.55<br>1.26  | 2.64<br>0.77  | 4.17<br>1.63  |               |
|                                | 55 mM 글루탐산,                     | 2.35<br>94.07                       | 2.89<br>93.45 | 2.62<br>93.65 | 2.35<br>94.02 | 2.43<br>93.80 | 2.85<br>93.11 | 2.54<br>91.71 | 2.30<br>93.80 | 2.32<br>90.71 | 2.24<br>87.97 | 2.29<br>86.92 | 3.06<br>92.57 | 4.39<br>83.67 |               |
|                                | 90 mM NaCl, pH 6.1              | n.a.<br>0.91                        | n.a.<br>0.92  | n.a.<br>1.16  | n.a.<br>0.92  | n.a.<br>0.92  | n.a.<br>0.94  | 1.28<br>1.17  | n.a.<br>0.91  | 2.29<br>0.91  | 4.03<br>0.88  | 2.94<br>1.04  | n.a.<br>0.97  | 5.04<br>1.10  |               |
|                                | 80 mM NaCl,                     | 1.87<br>0.88                        | 1.91<br>0.90  | 1.93<br>0.66  | 1.99<br>0.87  | 2.31<br>0.81  | 2.65<br>0.89  | 3.35<br>0.66  | 2.37<br>0.84  | 3.32<br>0.83  | 4.57<br>0.95  | 6.60<br>1.06  | 2.95<br>0.78  | 4.83<br>1.53  |               |
|                                | 4% 수크로오즈,                       | 2.30<br>94.04                       | 2.86<br>93.40 | 2.59<br>93.62 | 2.31<br>93.91 | 2.40<br>93.56 | 2.83<br>90.17 | 2.51<br>90.75 | 2.29<br>93.59 | 2.31<br>89.83 | 2.25<br>86.84 | 2.24<br>85.88 | 3.18<br>88.49 | 4.42<br>82.52 |               |
|                                | pH 6.5                          | n.a.<br>0.91                        | n.a.<br>0.93  | n.a.<br>1.19  | n.a.<br>0.92  | n.a.<br>0.93  | n.a.<br>0.92  | 2.54<br>1.19  | 1.53<br>0.92  | n.a.<br>0.89  | 2.82<br>0.87  | 4.52<br>0.87  | 3.16<br>1.08  | 3.67<br>0.94  | 5.71<br>0.99  |
|                                | 15 mM 인산나트륨,<br>0.1% 플루오르사마 188 | 200 mM (6.8%) 수크로<br>오즈,            | 1.90<br>0.86  | 1.94<br>0.89  | 1.99<br>0.70  | 2.10<br>0.87  | 2.57<br>0.81  | 3.13<br>0.89  | 4.27<br>0.70  | 3.00<br>0.85  | 5.00<br>0.83  | 7.40<br>0.96  | 11.37<br>1.10 | 3.97<br>0.76  | 6.61<br>1.55  |
|                                |                                 | pH 6.9                              | 2.30<br>94.02 | 2.86<br>93.37 | 2.60<br>93.47 | 2.31<br>93.80 | 2.38<br>91.45 | 2.88<br>89.12 | 2.52<br>89.31 | 2.25<br>90.20 | 2.28<br>87.06 | 2.26<br>81.20 | 2.95<br>79.30 | 6.66<br>86.07 | 5.00<br>78.57 |
|                                |                                 |                                     | n.a.<br>0.92  | n.a.<br>0.94  | n.a.<br>1.25  | n.a.<br>0.93  | n.a.<br>0.93  | 1.87<br>0.92  | 3.06<br>1.26  | 1.94<br>0.91  | 2.80<br>0.87  | 3.95<br>0.83  | 6.66<br>1.08  | 5.02<br>0.87  | 7.43<br>0.89  |
| 50 mM NaCl,                    |                                 | 1.87<br>0.88                        | 1.91<br>0.90  | 1.96<br>0.69  | 2.02<br>0.88  | 2.42<br>0.85  | 2.89<br>0.89  | 3.89<br>0.70  | 3.01<br>0.84  | 4.54<br>0.83  | 6.70<br>0.94  | 10.20<br>1.05 | 3.73<br>0.71  | 6.81<br>1.51  |               |
| 5% 수크로오즈,                      |                                 | 2.31<br>94.02                       | 2.87<br>93.38 | 2.62<br>93.48 | 2.30<br>93.88 | 2.36<br>91.69 | 2.84<br>89.70 | 2.54<br>89.75 | 2.26<br>90.48 | 2.31<br>87.94 | 3.03<br>82.76 | 2.19<br>80.61 | 3.68<br>87.38 | 5.54<br>74.99 |               |
| pH 6.9                         |                                 | n.a.<br>0.93                        | n.a.<br>0.94  | n.a.<br>1.24  | n.a.<br>0.92  | n.a.<br>0.93  | n.a.<br>0.92  | 1.76<br>1.23  | 1.76<br>0.89  | 2.51<br>0.88  | 3.51<br>0.84  | 5.72<br>1.04  | 4.91<br>1.05  | 3.65<br>0.84  | 10.35<br>0.81 |

[156]

[157] 표 8은 동결/해동 및 진탕 스트레스에 따른 RP-UPLC 결과를 나타낸 것이다.

[158]

[159] [표 8]

[160]

| 샘플 조성<br>(Sample Composition) |                    | RP-UPLC (% Purity)                  |         |               |
|-------------------------------|--------------------|-------------------------------------|---------|---------------|
|                               |                    | 친수성(Hydrophilic) 1                  |         |               |
|                               |                    | 친수성(Hydrophilic) 2                  |         |               |
|                               |                    | 친수성(Hydrophilic) 3                  |         |               |
|                               |                    | 메인 피크(Main Peak)                    |         |               |
|                               |                    | 메인 피크 어깨(Shoulder of the main peak) |         |               |
|                               |                    | 소수성(Hydrophobic) 1                  |         |               |
|                               |                    | t=0                                 | F/T, 5x | 진탕(Shake) 3 일 |
| 10 mM 히스티딘,<br>0.1% 폴록사머 188  | 55 mM 아르기닌,        | 1.81                                | 1.87    | 1.86          |
|                               |                    | 0.85                                | 0.81    | 0.85          |
|                               | 55 mM 글루탐산,        | 2.33                                | 2.44    | 2.35          |
|                               |                    | 94.10                               | 93.97   | 94.02         |
|                               | 90 mM NaCl, pH 6.1 | n.a.                                | n.a.    | n.a.          |
|                               |                    | 0.91                                | 0.92    | 0.92          |
|                               | 55 mM 아르기닌,        | 1.81                                | 1.87    | 1.83          |
|                               |                    | 0.86                                | 0.80    | 0.87          |
|                               | 55 mM 글루탐산,        | 2.35                                | 2.45    | 2.33          |
|                               |                    | 94.07                               | 93.96   | 94.04         |
|                               | 90 mM NaCl, pH 6.1 | n.a.                                | n.a.    | n.a.          |
|                               |                    | 0.91                                | 0.92    | 0.93          |
| 15 mM 인산나트륨,<br>0.1% 폴록사머 188 | 80 mM NaCl,        | 1.87                                | 1.94    | 1.92          |
|                               |                    | 0.88                                | 0.81    | 0.88          |
|                               | 4% 수크로오즈, pH 6.5   | 2.30                                | 2.42    | 2.31          |
|                               |                    | 94.04                               | 93.91   | 93.98         |
|                               |                    | n.a.                                | n.a.    | n.a.          |
|                               |                    | 0.91                                | 0.92    | 0.91          |
|                               | 200 mM (6.8%) 수크로  | 1.90                                | 1.98    | 2.00          |
|                               | 오즈,                | 0.86                                | 0.80    | 0.88          |
|                               |                    | 2.30                                | 2.40    | 2.31          |
|                               | pH 6.9             | 94.02                               | 93.88   | 93.88         |
|                               |                    | n.a.                                | n.a.    | n.a.          |
|                               |                    | 0.92                                | 0.93    | 0.93          |
|                               | 50 mM NaCl,        | 1.87                                | 1.95    | 1.95          |
|                               |                    | 0.88                                | 0.81    | 0.88          |
|                               | 5% 수크로오즈, pH 6.9   | 2.31                                | 2.42    | 2.32          |
|                               |                    | 94.02                               | 93.90   | 93.93         |
|                               |                    | n.a.                                | n.a.    | n.a.          |
|                               |                    | 0.93                                | 0.93    | 0.93          |

[161]

[162] -70°C, 2-8°C, 25°C에서 12주간 또는 45°C에서 3주간 보관한 샘플의 RP-UPLC 결과, 아르기닌 및 글루탐산을 함유하는 pH 6.1 제형이 다른 높은 pH 제형과 비교하여 더 우수한 안정성을 나타내었다. 동결/해동 및 2-8°C 진탕 스트레스에 노출되었을 때 모든 테스트 제형 사이에 식별 가능한 경향이 관찰되지 않았는데, 그 이유는 결과 데이터가 t=0 결과 및 검정 변동성 내에서 유사했기 때문이다 (표 7 및 표 8).

[163]

[164] 실시예 2. 폴리소르베이트 80 유무에 따른 hGH-hyFc 제형 안정성 평가

[165] 실시예 1을 통하여 가장 우수한 제형으로 선정된 10mM Histidine, 0.1% (w/v) Poloxamer 188, 55mM Arginine, 55mM Glutamic acid, 90mM NaCl, pH 6.1

조건에서도 불용성 이물 생성과 미세입자 증가 경향을 나타내어 GX-H9의 hGH이 소수성 패치 (hydrophobic patch)를 많이 가지고 있어 단백질 자체가 소수성 상호작용에 의한 응집체를 형성할 수 있다는 점과 DP 용기 내 기체/오일/고체 표면 등에 단백질이 흡착되어 일종의 단백질 필름을 형성하고 이들이 탈리되어 만들어진 패치들이 불용성 입자로 응집체를 형성할 수 있다는 점에 착안하여 이와 같은 응집체 형성을 방지할 수 있는 제형을 개발하고자 계면활성제로 폴록사머 188 뿐 아니라, 폴리소르베이트 80과 함께 첨가한 액상 제형에서 응집체 형성이 현저히 개선됨을 확인하고자 하였다.

[166]

[167] 폴록사머 188만을 사용하는 경우에 비하여, 폴록사머 188과 폴리소르베이트 80을 함께 사용하는 경우 불용성 이물 및 미세입자의 생성을 더 잘 저해하는 결과에 기반하여, 60 mg/mL의 hGH-hyFc를 포함하는 제형 조성물 4 종에서 폴록사머 188의 농도를 0.10% (w/v)로 고정하고, 0.03% (w/v) 폴리소르베이트 80의 첨가하여 총 8종 제형에 대해 외관, 미세입자 분석, SE-UPLC, RP-HPLC(reversed-phase high performance liquid chromatography) 분석을 진행하였다.

[168]

[169] 2-1. 외관 분석 (불용성 이물 육안 검사)

[170] hGH-hyFc 원액(Drug Substance, DS)을 이용하여 다양한 제형 조성물을 조제하고 Biosafety cabinet에서 0.22 $\mu$ m PES 필터로 필터링 후 외부 유래 먼지 등이 포함되지 않도록 유리 바이알에 약 0.8mL씩 분주하였다. 냉장 (5°C) 및 상온 (25°C)에서 보관중이던 샘플 용기를 꺼내어 약 30분간 상온화 시킨 뒤 이물 검사대에서 용기 외부를 알코올 등으로 표면을 깨끗하게 닦은 후 용기에 들어 있는 그대로 육안으로 직접 관찰하여 6개월 동안 불용성 이물 여부를 확인하였다.

[171]

그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, 냉장 (5°C) 보관시, 폴리소르베이트 80이 포함된 조건에서는 6개월 동안 불용성 이물이 생성되지 않았으나, 폴리소르베이트 80이 포함되지 않은 조건에서는 냉장 6개월 간 10개 중 상당수의 샘플에서 불용성 이물의 생성이 확인되었다. 한편, 상온(25°C) 보관시, 폴리소르베이트 80이 포함된 조건에서는 이를 포함하지 않는 조건에 비하여 대체로 불용성 이물 생성이 저해되는 것으로 나타났다. 특히, Candidate #1 및 Candidate #4는 3개월 동안 불용성 이물이 생성되지 않았다. 그러나, 폴리소르베이트 80이 포함되지 않은 제형 조건에서는 상온에서 보관 6개월에 모든 바이알에서 불용성 이물 생성이 확인되었다.

[172]

[173] 2-2. 미세입자 (Sub-visible particle) 분석

[174] 각 조건 별 샘플을 유리 바이알에 1mL씩 취하여 준비하고, 외부업체에 의뢰하여 (KBIO, 제형 기술 지원팀) Microflow Imaging 장비 (MFI 5200,

Proteinsimple)와 MFI View System Software (MVSS) Version 2-R4.1.0.40.4816, MFI View Analysis Suite (MVAS) Version 1.4.0를 이용하여 미세입자 분석을 진행하였다.

[175] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 냉장 (5°C) 보관 6 개월에서 폴리소르베이트 80을 포함하는 Candidate #1, #2, #4 및 #6이 미세입자의 생성을 잘 저해하는 것으로 관찰되었다. 미세입자 생성과 관련하여, 냉장 및 상온 모두에서 폴리소르베이트 80을 함께 포함하지 않는 제형에서는 현저히 높은 미세입자가 생성되는 것을 알 수 있었다.

[176]

[177] 2-3. SE-UPLC 분석

[178] ACQUITY UPLC Protein BEH200 (4.6\*300 mm) (Waters, 186005226) 컬럼을 사용하여 100mM sodium phosphate (pH7.0), 200mM Arginine-HCl, 이동상 용액을 0.25mL/min의 속도로 흘려주고, 각 조건 별 샘플을 10µg 주입하여 흡광도 280nm에서 GX-H9 단백질의 피크를 확인하였다.

[179] 그 결과, 도 3에서와 같이 냉장 (5°C) 보관 및 상온 (25°C) 보관 6 개월에서 Candidate #2, #3 및 #5의 순도는 우수한 것으로 확인되었다. 특히, 폴리소르베이트 80을 포함한 제형에서는 Candidate #2의 순도가 가장 우수하였다. 폴리소르베이트 80을 포함하지 않는 제형인 Candidate #3, #5의 경우, Candidate #2와 비교하여 냉장 보관 6개월에서의 순도는 유사하였지만, 상온 보관 6개월에서는 순도가 상대적으로 낮은 것으로 확인되었다.

[180]

[181] 2-4. RP-HPLC

[182] Proteonavi C4 300Å5µm (Shiseido, 80205) column을 사용하여 0.05% Trifluoroacetic acid (TFA) in Water (MPA), 0.05% Trifluoroacetic acid (TFA) in Acetonitrile (MPB) 이동상 용액을 0.5mL/min의 속도로 표 9의 구배 조건으로 흘려주고, 20µg의 시료를 주입하여 흡광도 220nm에서 GX-H9 단백질의 피크를 확인하였다.

[183]

[184] **[표 9]**

[185]

| 구배(Gradient) |           |       |       |
|--------------|-----------|-------|-------|
| 시간(Time)     | 플로우(Flow) | % MPA | % MPB |
| 초기(Initial)  | 0.5       | 49.0  | 51.0  |
| 30.0         | 0.5       | 30.0  | 70.0  |
| 30.5         | 0.5       | 0.0   | 100.0 |
| 31.0         | 0.5       | 49.0  | 51.0  |
| 40.0         | 0.5       | 49.0  | 51.0  |

[186]

[187] 그 결과, 도 4에서와 같이, 냉장 (5°C) 보관 6 개월에서는 모든 제형 간 순도가 유사하였으나, 상온 (25°C) 보관 6 개월에서는 Candidate #4가 상대적으로 가장 우수한 순도를 나타내었다.

[188]

[189] 실시예 3. 폴리소르베이트 80 함량에 따른 hGH-hyFc 제형 안정성 평가

[190] 실시예 2를 종합하여 가장 적합한 제형이라고 판단되는 Candidate #2에서 폴리소르베이트 80의 농도를 달리하여 hGH-hyFc의 제형 안정성 (외관 분석, 미세입자 분석, SE-UPLC 분석, RP-HPLC 분석)을 실시예 2와 동일한 실험 방법으로 진행하였다.

[191] 그 결과, 외관 분석에서는 상온 (25°C) 에서 3개월 이상 보관하기 위해 0.07%(w/v)이상의 폴리소르베이트 80을 추가로 함유하는 제형이 적합함을 확인할 수 있었다 (도 5). 또한, 미세입자 분석에서는 폴리소르베이트 80의 농도 0.03 내지 0.15% (w/v)범위에서 대체로 유사한 미세입자가 확인되었다 (도 6). SE-UPLC, RP-HPLC 결과에서는 냉장 (5°C) 보관시 폴리소르베이트 80의 농도에 의한 유의적인 차이가 없었으며, SE-UPLC 결과에서 상온 보관시 폴리소르베이트 80의 농도가 0.10% (w/v) 이상일 때 순도가 감소하였으며, RP-HPLC 결과에서는 상온 보관시 폴리소르베이트 80의 농도에 의한 순도 차이가 크지 않았다 (도 7).

[192]

[193] 실시예 4. 고용량 hGH-hyFc 제형 안정성 평가

[194] 상기 실시예들을 종합하여, (i) 폴리소르베이트 80을 0.07% (w/v)로 고정하고 hGH-hyFc를 각각 60, 80, 100, 120 mg/ml 처리하여 유리 카트리지에 보관하는 경우, (ii) hGH-hyFc를 120mg/ml로 고정하고 폴리소르베이트 80을 각각 0.03, 0.05, 0.07, 0.10, 0.15% (w/v) 처리하여 유리 카트리지에 보관하는 경우, (iii) hGH-hyFc를 60mg/ml 및 폴리소르베이트 80의 0.07% (w/v)로 고정하고 각각 m-cresol, phenol 또는 benzyl alcohol의 보존제를 처리하여 유리 바이알에 보관하는 경우에 대해, 냉장 (5°C) 및 상온 (25°C) 보관에 따른 외관 분석을 통해

불용성 이물이 관찰되는지 확인하고, 순도 변화를 확인하여 제형 안정성을 평가하고자 하였다.

[195]

[196] 4-1. 외관 분석 (불용성 이물 육안 검사)

[197] hGH-hyFc 원액(DS)을 이용하여 다양한 제형 조성물을 조제하고 Biosafety cabinet에서 0.22 $\mu$ m PES 필터로 필터링 후 외부 유래 먼지 등이 포함되지 않도록 유리 바이알에 약 1.0mL씩 분주하였다. 냉장 (5°C) 및 상온 (25°C) 에서 보관중이던 샘플 용기를 꺼내어 약 30분간 상온화 시킨 뒤 이물 검사대에서 용기 외부를 알코올 등으로 표면을 깨끗하게 닦은 후 용기에 들어 있는 그대로 눈으로 직접 관찰하여 6개월 동안 불용성 이물 여부를 확인하였다.

[198] 그 결과, (i) 폴리소르베이트 80의 0.07% (w/v)로 고정하고 hGH-hyFc를 60 - 100 mg/ml 처리하여 유리 카트리지에 보관하는 경우 냉장 및 상온 6개월 간 불용성 이물이 생성되지 않는 것으로 확인되었고, (ii) hGH-hyFc를 120mg/ml로 고정하고 폴리소르베이트 80을 각각 0.05 - 0.15% (w/v)처리하여 유리 카트리지에 보관하는 경우 냉장 및 상온 6개월 간 불용성 이물이 생성되지 않는 것으로 확인되었으며, (iii) hGH-hyFc를 60mg/ml 및 폴리소르베이트 80을 0.07% (w/v)로 고정하고 1mg/mL 페놀을 보존제로 처리하여 유리 바이알에 보관하는 경우 냉장 및 상온 6개월 간 불용성 이물이 생성되지 않는 것으로 확인되었다 (도 8).

[199]

[200] 4-2. SE-UPLC 및 RP-HPLC 분석

[201] 각 조건에 따른 샘플을 유리 카트리지 또는 유리 바이알에서 취하고 이동상 버퍼 및 제형버퍼를 이용해 2mg/mL로 희석한 후, 0.22 $\mu$ m 셀룰로오스 아세테이트 원심분리용 튜브 필터로 여과 후 LC 바이알에 넣어 SE-UPLC 또는 RP-HPLC 분석하였다.

[202] SE-UPLC는, ACQUITY UPLC Protein BEH200 (4.6\*300 mm) (Waters, 186005226) column을 사용하여 100mM sodium phosphate (pH7.0), 200mM Arginine-HCl, 이동상 용액을 0.25mL/min의 속도로 흘려주고, 10 $\mu$ g 주입하여 흡광도 280nm에서 GX-H9 단백질의 피크를 확인하였다.

[203] RP-HPLC는, Proteonavi C4 300Å 5 $\mu$ m (Shiseido, 80205) column을 사용하여 0.05% Trifluoroacetic acid (TFA) in Water (MPA), 0.05% Trifluoroacetic acid (TFA) in Acetonitrile (MPB) 이동상 용액을 0.5mL/min의 속도로 표 9의 구배 조건으로 흘려주고, 20 $\mu$ g의 시료를 주입하여 흡광도 220nm에서 GX-H9 단백질의 피크를 확인하였다.

[204] 그 결과, (i) 폴리소르베이트 80의 0.07% (w/v)로 고정하고 hGH-hyFc를 60 - 120mg/ml 처리하여 유리 카트리지에 보관하는 경우, SE-UPLC에서 냉장 (5°C) 보관시 hGH-hyFc 용량 60mg/mL과 120mg/mL 간 순도 차이 0.5%로 미미하나, 상온 (25°C) 보관시에는 hGH-hyFc 용량 60mg/mL과 120mg/mL 간 순도 차이가 3.6%로 확인되었다. 한편, 상온 보관시 hGH-hyFc 용량 60mg/mL과 120mg/mL 간

RP-HPLC에 의한 순도 차이는 0.8%로 미미하였다 (도 9a).

[205] (ii) hGH-hyFc를 120mg/ml로 고정하고 폴리소르베이트 80을 각각 0.03 - 0.15% (w/v)처리하여 유리 카트리지에 보관하는 경우에는 냉장 보관시 폴리소르베이트 80 농도 0.03% (w/v)와 0.15% (w/v)간 순도 차이가 없었으며, 상온 보관시 폴리소르베이트 80 농도 0.03% (w/v)와 0.15% (w/v)간 차이도 미미하였다 (도 9b).

[206] (iii) hGH-hyFc를 60mg/ml 및 폴리소르베이트 80의 0.07% (w/v)로 고정하고 각각 m-cresol, phenol 또는 benzyl alcohol의 보존제를 처리하여 유리 바이알에 보관하는 경우에 있어서는, SE-UPLC결과 1mg/ml 페놀을 함유하는 조건에서 순도가 가장 적게 감소하였으며, RP-HPLC 결과에서는 모든 보존제에서 순도에 유의적 차이가 없었다 (도 9c).

[207]

[208] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[209]

#### 서열목록 Free Text

[210] **1. GX-H9 (hGH-hyFc5)**

[211] Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg  
 [212] Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu  
 [213] Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro  
 [214] Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg  
 [215] Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu  
 [216] Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val  
 [217] Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp  
 [218] Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu  
 [219] Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser  
 [220] Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr  
 [221] Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe  
 [222] Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe Arg  
 [223] Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys Glu Lys Glu  
 [224] Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His Thr  
 [225] Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
 [226] Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
 [227] Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
 [228] Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr

[229] Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
 [230] Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser  
 [231] Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
 [232] Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val  
 [233] Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
 [234] Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
 [235] Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr  
 [236] Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
 [237] Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
 [238] Ser Leu Gly Lys

[239]

[240] **2. hGH (GenBank: AAA98618.1) (signal sequence 제외)**

[241] Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg  
 [242] Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu  
 [243] Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro  
 [244] Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg  
 [245] Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu  
 [246] Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val  
 [247] Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp  
 [248] Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu  
 [249] Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser  
 [250] Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr  
 [251] Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe  
 [252] Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe

[253]

[254] **3. hyFc5**

[255] Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys Glu Lys  
 [256] Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro Ser His  
 [257] Thr Gln Pro Leu Gly Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 [258] Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 [259] Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 [260] Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser  
 [261] Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 [262] Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser  
 [263] Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 [264] Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
 [265] Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 [266] Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr

[267] Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu  
[268] Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
[269] Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
[270] Leu Ser Leu Gly Lys

## 청구범위

- [청구항 1] hGH(human Growth Hormone) 융합단백질, 폴록사머 188(Poloxamer 188) 및 폴리소르베이트 80(Polysorbate 80)을 포함하는, 액상 약학 제형.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 hGH 융합단백질은 hGH 및 면역글로불린 Fc 폴리펩타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는, 제형.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 hGH는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는, 제형.
- [청구항 4] 제2항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 폴리펩타이드는 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는, 제형.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 hGH 융합단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는, 제형.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 제형은 30mg/mL 내지 150mg/mL의 hGH 융합단백질을 포함하는 것을 특징으로 하는, 제형.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 제형은 0.01% 내지 0.2% (w/v) 폴록사머 188을 포함하는 것을 특징으로 하는, 제형.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 제형은 0.01% 내지 0.2% (w/v) 폴리소르베이트 80을 포함하는 것을 특징으로 하는, 제형.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 제형은 히스티딘(Histidine), 아르기닌(Arginine), 글루탐산(Glutamic acid) 및 염화나트륨(NaCl)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 부형제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 제형.
- [청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 제형은 보존제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 제형.
- [청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 보존제는 m-크레솔(m-cresol), 페놀(phenol) 및 벤질 알코올(benzyl alcohol)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 제형.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 보존제는 1mg/mL 내지 2mg/mL의 페놀인 것을 특징으로 하는, 제형.
- [청구항 13] 제9항에 있어서, 상기 제형은 1mM 내지 20mM의 히스티딘을 포함하는 것을 특징으로 하는, 제형.
- [청구항 14] 제9항에 있어서, 상기 제형은 40mM 내지 70mM 아르기닌을 포함하는 것을 특징으로 하는, 제형.
- [청구항 15] 제9항에 있어서, 상기 제형은 40mM 내지 70mM 글루탐산을 포함하는 것을 특징으로 하는, 제형.
- [청구항 16] 제9항에 있어서, 상기 제형은 80mM 내지 100mM의 염화나트륨을 포함하는 것을 특징으로 하는, 제형.
- [청구항 17] 제1항에 있어서, 상기 제형은 pH 5.5 내지 pH 7.0인 것을 특징으로 하는, 제형.

- [청구항 18] 제17항에 있어서, 상기 제형은 pH 6.0 내지 pH 6.2인 것을 특징으로 하는 제형.
- [청구항 19] 제1항에 있어서, 상기 제형은 냉장에서 6개월 보관시 1.5% 미만의 응집체를 형성하는 것을 특징으로 하는, 제형.
- [청구항 20] 제1항에 있어서, 상기 제형은 피하 또는 근육 투여용인 것을 특징으로 하는, 제형.
- [청구항 21] 제1항에 있어서, 상기 제형은 병(bottle), 마이크로튜브(microtube), 백(bag), 바이알(vial), 카트리지(cartridge), 주입기(injector) 및 주사기(syringe)로 구성된 군에서 선택된 용기에서 보관되는 것을 특징으로 하는, 제형.