



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0096105
(43) 공개일자 2021년08월04일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 47/12* (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01) *A61K 47/22* (2017.01)
A61K 47/26 (2017.01) *A61K 9/00* (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01) *C07K 16/40* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 39/39591 (2013.01)
A61K 47/12 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-7016186
- (22) 출원일자(국제) 2019년10월30일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2021년05월27일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2019/114233
- (87) 국제공개번호 WO 2020/088492
 국제공개일자 2020년05월07일
- (30) 우선권주장
 201811283440.7 2018년10월31일 중국(CN)

- (71) 출원인
상하이 준스 바이오사이언스 컴퍼니 리미티드
 중국, 상하이 201210, 파일럿 프리 트레이드 존,
 하이웨이 로드, 넘버 36 앤 58, 빌딩 2, 13층
쑤저우 준명 바이오사이언스 컴퍼니 리미티드
 중국, 장쑤 215002, 우장 이코노믹 앤드 테크놀로
 지컬 디벨롭먼트 존, 이스트 오브 장안 로드
- (72) 발명자
리우, 홍관
 중국, 장쑤 215002, 쑤저우, 우장 이코노믹 앤드
 테크놀로지컬 디벨롭먼트 존, 이스트 오브 장안
 로드
리우, 페이시양
 중국, 장쑤 215002, 쑤저우, 우장 이코노믹 앤드
 테크놀로지컬 디벨롭먼트 존, 이스트 오브 장안
 로드
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인씨엔에스

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **항PCSK9 항체를 함유한 안정화 제제**

(57) 요약

본 발명은 고농도의 항PCSK9(인간 전구단백질 전환효소 서브틸리신 캡신 9) 항체를 함유한 액체 제제를 제공하며, 상기 제제는 완충액, 안정화제 및 계면활성제를 더 포함한다. 본 발명이 제공하는 액체 제제는 점도가 낮으며, 제제를 수개월 동안 보관 후에도, 항체는 높은 안정성을 지닌다.

(52) CPC특허분류

A61K 47/183 (2013.01)

A61K 47/22 (2013.01)

A61K 47/26 (2013.01)

A61K 9/0019 (2013.01)

A61P 3/06 (2018.01)

C07K 16/40 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/565 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

(72) 발명자

장, 징

중국, 장쑤 215002, 쑤저우, 우장 이코노믹 앤드 테크놀로지컬 디벨롭먼트 존, 이스트 오브 장안 로드

딩, 셴하오

중국, 장쑤 215002, 쑤저우, 우장 이코노믹 앤드 테크놀로지컬 디벨롭먼트 존, 이스트 오브 장안 로드

장, 메이

중국, 장쑤 215002, 쑤저우, 우장 이코노믹 앤드 테크놀로지컬 디벨롭먼트 존, 이스트 오브 장안 로드

우, 춘

중국, 장쑤 215002, 쑤저우, 우장 이코노믹 앤드 테크놀로지컬 디벨롭먼트 존, 이스트 오브 장안 로드

펑, 후이

중국, 장쑤 215002, 쑤저우, 우장 이코노믹 앤드 테크놀로지컬 디벨롭먼트 존, 이스트 오브 장안 로드

우, 하이

중국, 상하이 201210, 파일럿 프리 트레이드 존, 하이웨이 로드, 넘버 36 앤 58, 빌딩 2, 13층

명세서

청구범위

청구항 1

- (1) 완충액;
- (2) 안정화제; 및
- (3) 인간 PCSK9에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 프래그먼트를 포함하는 일종의 안정화된 항체 제제로서,

상기 항체 또는 이의 항원 결합 프래그먼트는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2와 LCDR3을 포함하고, 여기서:

HCDR1의 아미노산 서열은 SEQ ID NO:1이고;

HCDR2의 아미노산 서열은 SEQ ID NO:2이며;

HCDR3의 아미노산 서열은 SEQ ID NO:3이고;

LCDR1의 아미노산 서열은 SEQ ID NO:4이며;

LCDR2의 아미노산 서열은 SEQ ID NO:5이고;

LCDR3의 아미노산 서열은 SEQ ID NO:6이며; 또한

상기 제제의 pH는 5.5~6.5이다.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 완충액은 아세트산염 완충액 또는 히스티딘 완충액인 것을 특징으로 하는 항체 제제.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 완충액은 L-히스티딘과 L-히스티딘 일염산염으로 제조되는 히스티딘 완충액인 것을 특징으로 하는 항체 제제.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 히스티딘 완충액은 1-10mM의 히스티딘과 10-20mM의 히스티딘염을 함유하고; 바람직하게는, 상기 히스티딘과 히스티딘염 몰비의 범위가 1:1 내지 1:4인 것을 특징으로 하는 항체 제제.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 완충액의 농도는 15-25mM인 것을 특징으로 하는 항체 제제.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 안정화제는 아르기닌 또는 이의 염, 솔비톨, 만니톨 또는 수크로오스이거나, 또는 아르기닌 또는 이의 염과 솔비톨, 만니톨 또는 수크로오스의 조합인 것을 특징으로 하는 항체 제제.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 안정화제는 아르기닌염으로서, 상기 제제 중에서 이의 농도는 50mM 내지 200mM이며; 또는 상기 안정화제는 아르기닌염과 만니톨 또는 솔비톨의 혼합물이며, 여기서, 상기 제제에서 아르기닌염의 농도는 50-150mM이고, 만니톨 또는 솔비톨의 농도는 50-200mM이며, 또한 두 가지 안정화제의 총 농도 범위는 50mM 내지 250mM인 것을 특징으로 하는 항체 제제.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원 결합 프래그먼트는 중쇄 가변영역(VH)과 경쇄 가변영역(VL)을 포함하되, 여기서 VH의 아미노산 서열은 SEQ ID NO:7이고, VL의 아미노산 서열은 SEQ ID NO:8인 것을 특징으로 하는 항체 제제.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원 결합 프래그먼트는 중쇄(HC)와 경쇄(LC)를 포함하되, 여기서 HC의 아미노산 서열은 SEQ ID NO:9이고, LC의 아미노산 서열은 SEQ ID NO:10인 것을 특징으로 하는 항체 제제.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 항체 제제는 농도가 약 0.01% 내지 약 0.05%인 폴리소르베이트 20 또는 폴리소르베이트 80을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 제제.

청구항 11

제1항에 있어서,

(a) 약 20mM의 히스티딘 완충액;

(b) 약 100mM 내지 200mM의 아르기닌염;

(c) 약 0.02%의 폴리소르베이트 20; 및

(d) 약 100mg/mL 내지 약 200mg/mL의 인간 PCSK9에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 프래그먼트를 포함하는 것을 특징으로 하는 항체 제제.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 항체 제제는

(1) 약 100mg/mL 내지 약 200mg/mL의 항PCSK9 항체 또는 이의 항원 결합 프래그먼트; (2) 약 10-50mM의 히스티딘 완충액, pH는 약 5.5-6.5; (3) 약 50mM 내지 약 200mM의 아르기닌염; 및 (4) 약 0% 내지 0.1%의 비이온 계면활성제; 또는

(1) 약 150±10mg/mL의 항PCSK9 항체 또는 이의 항원 결합 프래그먼트; (2) 약 20mM의 히스티딘 완충액, pH는 약 5.5-6.5; (3) 약 60mM±5mM, 130mM±5mM 또는 160mM±5mM의 아르기닌염; 및 (4) 약 0% 내지 0.1%의 비이온 계면활성제; 또는

(1) 약 150±10mg/mL의 항PCSK9 항체 또는 이의 항원 결합 프래그먼트, 여기서 상기 항체는 중쇄 가변영역(VH)과 경쇄 가변영역(VL)을 포함하되, 상기 VH의 아미노산 서열은 SEQ ID NO:7이고, VL의 아미노산 서열은 SEQ ID NO:8이며; (2) 약 20mM의 히스티딘 완충액, pH는 약 5.5-6.5; (3) 약 160mM±5mM의 아르기닌; 및 (4) 약 0.02%의 폴리소르베이트 20; 또는

(1) 약 150±10mg/mL의 항PCSK9 항체 또는 이의 항원 결합 프래그먼트, 여기서 상기 항체는 전장 항체로서, 여기서 중쇄의 아미노산 서열은 SEQ ID NO:9이고, 경쇄의 아미노산 서열은 SEQ ID NO:10이며; (2) 약 20mM의 히스

티딘 완충액, pH는 약 5.5-6.5; (3) 약 160mM±5mM의 아르기닌; 및 (4) 약 0.02%의 폴리소르베이트 20; 또는
 (1) 150mg/mL의 항PCSK9 항체 또는 이의 항원 결합 프래그먼트; (2) 20mM의 히스티딘 완충액; (3) 160mM의 아르기닌염산염; 및 (4) 0.02%의 폴리소르베이트 20; 또는
 (1) 150mg/mL의 항PCSK9 항체 또는 이의 항원 결합 프래그먼트; (2) 20mM의 히스티딘 완충액; (3) 120mM의 아르기닌염산염, 60mM의 만니톨; 및 (4) 0.02%의 폴리소르베이트 20; 또는
 (1) 150mg/mL의 항PCSK9 항체 또는 이의 항원 결합 프래그먼트; (2) 20mM의 히스티딘 완충액; (3) 60mM의 아르기닌염산염, 160mM의 만니톨; 및 (4) 0.02%의 폴리소르베이트 20;의 성분을 포함하는 항체 제제로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 항체 제제.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중의 어느 한 항에 따른 항체 제제를 함유한 전달장치.

청구항 14

제1항 내지 제12항 중의 어느 한 항에 따른 항체 제제를 함유한 프리필드 주사기(prefilled syringe).

청구항 15

제1항 내지 제12항 중의 어느 한 항에 따른 항체 제제 또는 제13항에 따른 전달장치, 또는 제14항에 따른 프리필드 주사기가 PCSK9 활성과 관련된 어떠한 질환을 치료, 예방 또는 개선하는 방법에 있어서의 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 치료성 항체 제제 분야에 관한 것으로서, 특히, 본 발명은 의약 제제 분야에 관한 것이며, 상기 제제는 인간 전구단백질 전환효소 서브틸리신 켄신 9(PCSK9)과 특이적으로 결합된 인간화 항체를 함유한다.

배경 기술

[0002] 전구단백질 전환효소 서브틸리신 켄신 9(PCSK9)은 일종의 전구단백질 전환효소(proprotein convertase)로서, 간 세포 표면의 저밀도 지질단백질(LDL) 수용체의 분해를 촉진시켜 혈장 중 LDL 콜레스테롤의 함량을 증가시키며, 그 발현의 상승은 인간 이상지질혈증 및 심혈관 관련 질환과 밀접한 관계가 있다. 공개번호가 W02017088782인 특허에서는 다양한 항PCSK9 항체가 PCSK9 생물활성에 대한 길항을 통해 혈액 중의 LDL 농도를 현저히 저하시킴으로써, 고콜레스테롤혈증 등의 관련 질환을 치료하는 분야에서 중요한 전망을 지닌다고 공개하였다. 어떠한 단백질 치료제와도 마찬가지로, 치료성 항PCSK9 항체는 제조 또는 보관 과정에서 응집, 변성, 가교, 탈아미드화(deamidation), 이성질체화, 산화 및 절단(cleave)과 같은 물리 및 화학적 불안정성의 영향을 받을 수 있다(Wang et al., J. Pharm. Sci. 96:1-26, 2007(Wang 등, 《제약과학잡지》, 제96권 제1-26페이지, 2007년)). 따라서, 항체의 물리화학적 성질을 안정적으로 유지할 수 있는 항체 제제의 개발은 매우 큰 도전이다.

[0003] 고콜레스테롤혈증 등 관련 질환은 일반적으로 만성 질환의 일종으로서, 환자에게 원외 또는 자가 투약이 가능한 편리성을 제공하는 것이 매우 중요하다. 단백질 치료제는 일반적으로 비경구 경로를 통해서만 투여할 수 있으며, 여기서 피하주사(SC) 또는 근육주사(IM) 투여 경로는 치료 비용을 절감할 수 있고, 투여 기간 동안 환자와 건강관리서비스 제공자(Healthcare Providers)의 편리성을 개선할 수 있다. 그러나 SC 또는 IM 주사제에 필요한 소용량(통상적으로 0.5 내지 2mL)은 제제에 또 다른 도전을 제기하였는데, 그 이유는 치료 수준을 구현하도록, 통상적으로 100mg 내지 1g의 단백질/제제 간의 고농도 항체 제제의 투여가 필요하기 때문이다. 그런데 고도로 농축된 단백질 제제는 통상적으로 단백질의 응집과 침전을 증가시키고 점도를 증가시킬 수 있어, 가공, 제조 및 보관 기간에 부정적인 결과를 초래하는데, 여기서 점도의 증가는 또한 제제의 사용에 대해 통증, 따가운 증상 및 약물전달장치의 옵션 측면의 제한과 같은 부정적인 영향이 있을 수 있다(Shire et al., J. Pharm. Sci. 93:1390-1402, 2004(Shire 등, 《제약과학잡지》, 제93권 제1390-1402페이지, 2004년)).

[0004] 따라서, 본 분야에는 특히 저점도이면서 환자의 통증을 경감시킬 수 있는 고농도 단백질 제제에 대한 수요가 존

재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 인간 전구단백질 전환효소 서브틸리신 췌신 9(PCSK9)과 특이적으로 결합된 인간화 항체를 함유한 의약 제제를 제공한다.

과제의 해결 수단

[0006] 한편으로는, 본 발명은 (1) 완충액; (2) 안정화제; (3) 항PCSK9 항체 또는 항원 결합 프래그먼트(Fab)를 포함하는 안정화된 항체 제제를 제공한다.

[0007] 일종의 바람직한 방식으로서, 상기 안정화된 항체 제제는 비이온형 계면활성제를 더 포함할 수 있다.

[0008] 한 가지 실시방식에서, 여기서 상기 완충액은 히스티딘 완충액이다. 한 가지 실시방식에서, 상기 히스티딘 완충액은 L-히스티딘과 L-히스티딘 일염산염으로 제조된다. 한 가지 실시방식에서, 상기 히스티딘 완충액의 농도는 약 20mM이다.

[0009] 한 가지 실시방식에서, 여기서 상기 안정화제는 아르기닌 또는 그 염, 솔비톨, 만니톨 또는 수크로오스 중의 하나 또는 그 이상으로부터 선택된다. 한 가지 실시방식에서, 여기서 상기 안정화제는 아르기닌염이다. 한 가지 실시방식에서, 아르기닌 또는 그 염의 농도는 약 50mM 내지 약 200mM이다. 일부 구체적인 실시방식에서, 아르기닌 또는 그 염의 농도는 약 60mM, 130mM, 160mM 또는 165mM이다.

[0010] 한 가지 실시방식에서, 여기서 상기 항체 또는 항원 결합 프래그먼트는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2와 LCDR3을 포함하되, 여기서 HCDR1은 아미노산 서열 SEQ ID NO: 1을 가지고; HCDR2는 아미노산 서열 SEQ ID NO: 2를 가지며; HCDR3은 아미노산 서열 SEQ ID NO: 3을 가지고; LCDR1은 아미노산 서열 SEQ ID NO: 4를 가지며; LCDR2는 아미노산 서열 SEQ ID NO: 5를 가지고; 또한 LCDR3은 아미노산 서열 SEQ ID NO: 6을 가진다. 한 가지 구체적인 실시방식에서, 여기서 상기 항체 또는 항원 결합 프래그먼트는 중쇄 가변영역(VH)과 경쇄 가변영역(VL)을 포함하고, 여기서 VH는 아미노산 서열 SEQ ID NO: 7을 가지며, VL은 아미노산 서열 SEQ ID NO: 8을 가진다. 한 가지 구체적인 실시방식에서, 여기서 상기 항체 또는 항원 결합 프래그먼트는 중쇄(HC)와 경쇄(LC)를 포함하되, 여기서 HC는 아미노산 서열 SEQ ID NO: 9를 가지고, LC는 아미노산 서열 SEQ ID NO: 10을 가진다. 한 가지 실시방식에서, 여기서 상기 항체 또는 항원 결합 프래그먼트의 농도는 약 100mg/mL 내지 약 200mg/mL이다. 구체적인 한 가지 실시방식에서, 여기서 상기 항체 또는 항원 결합 프래그먼트의 농도는 약 150mg/mL이다.

[0011] 한 가지 실시방식에서, 본 발명이 제공하는 항체 제제는 농도가 약 0.01% 내지 약 0.05%인 폴리소르베이트 20 또는 폴리소르베이트 80을 포함한다. 구체적인 한 가지 실시방식에서, 본 발명이 제공하는 항체 제제는 농도가 약 0.02%인 폴리소르베이트 20을 포함한다.

[0012] 한 가지 실시방식에서, 본 발명이 제공하는 항체 제제는 (1) 약 20mM인 히스티딘 조제 완충액; (2) 약 50mM 내지 약 200mM의 아르기닌 또는 그 염의 안정화제; (3) 약 100mg/mL 내지 약 200mg/mL의 PCSK9 억제 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트; 및 (4) 약 0.02%의 폴리소르베이트 20을 포함하고; 여기서 상기 항체 또는 항원 결합 프래그먼트는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2와 LCDR3을 포함하되, 여기서 HCDR1은 아미노산 서열 SEQ ID NO: 1을 가지고; HCDR2는 아미노산 서열 SEQ ID NO: 2를 가지며; HCDR3은 아미노산 서열 SEQ ID NO: 3을 가지고; LCDR1은 아미노산 서열 SEQ ID NO: 4를 가지며; LCDR2는 아미노산 서열 SEQ ID NO: 5를 가지고; 또한 LCDR3은 아미노산 서열 SEQ ID NO: 6을 가진다.

[0013] 한 가지 실시방식에서, 본 발명이 제공하는 항체 제제는 40℃에서 28일 동안 보관 후 적어도 94%의 항체를 갖는 천연 입체구조(native conformation)를 구비한다.

[0014] 한 가지 실시방식에서, 본 발명이 제공하는 항체 제제는 40℃에서 28일 동안 보관 후 적어도 45%의 항체를 갖는 주요 전하변이체(charged variant)를 구비한다.

[0015] 한 가지 실시방식에서, 본 발명이 제공하는 항체 제제는 2-8℃에서 12개월 동안 보관 후 적어도 98%의 항체를 갖는 천연 입체구조(native conformation)를 구비한다.

[0016] 한 가지 실시방식에서, 본 발명이 제공하는 항체 제제는 2-8℃에서 12개월 동안 보관 후 적어도 87%의 항체를

갖는 주요 전하변이체(charged variant)를 구비한다.

- [0017] 일 측면으로, 본 발명은 전달장치를 제공하며, 이는 본 발명이 제공하는 어느 하나의 항체 제제를 포함한다.
- [0018] 일 측면으로, 본 발명은 프리필드 주사기를 제공하며, 이는 본 발명이 제공하는 어느 하나의 항체 제제를 포함한다.
- [0019] 일 측면으로, 본 발명은 본 발명이 제공하는 어느 하나의 항체 제제를 포함하는 전달장치, 또는 프리필드 주사기가 PCSK9 활성과 관련된 어떠한 질환 또는 불균형을 치료, 예방 또는 개선하는 방법에 적용됨에 있어서의 용을 제공한다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명은 항PCSK9 항체 또는 그 항원 결합 부분을 포함하는 안정화된 수성 액체 약물 제제로서, 본 기술분야에서 공인된 제제에 비하여 개선된 성질을 가지는 것을 특징으로 한다. 본 발명이 제공하는 고농도 제제는 높은 안정성과 낮은 점도라는 의외의 특징을 지닌다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 JS002를 함유한 제제가 세포의 LDL에 대한 결합과 섭취를 억제하는 도면이다.
 도 2는 JS002를 여러 번 피하주사로 투여 후 78일 동안 고지혈증 레서스 원숭이의 LDL-C에 미치는 영향을 관찰한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 본 발명은 항PCSK9 항체 또는 그 항원 결합 부분을 포함하는 안정화된 수성 액체 약물 제제로서, 본 기술분야에서 공인된 제제에 비하여 개선된 성질을 가지는 것을 특징으로 한다. 본 발명이 제공하는 고농도 제제는 높은 안정성과 낮은 점도라는 의외의 특징을 지닌다.
- [0023] 본 발명은 구체적인 방법, 시약, 화합물, 조성물 또는 생물학적 시스템에 한정되지 않으며, 당연히 이상 내용에 대해 변화를 실시할 수 있음을 이해해야 한다. 또한 본 출원에서 사용되는 용어는 단지 구체적인 실시방식을 기술하기 위한 것이지 한정하고자 하는 데 목적이 있지 않음을 이해해야 한다. 상기 내용에 별도의 명확한 설명이 없는 한, 본 명세서 및 첨부된 청구항 중에 사용된 단수 형식 “하나”, “일종” 및 “상기”는 복수의 지시대명사를 포함한다. 따라서, 예를 들어, “일종의 폴리펩타이드” 라 언급한 경우, 2종 또는 그 이상의 폴리펩타이드 등의 조합을 포함한다.
- [0024] 본 출원에서 사용하는 “약” 이 측정 가능한 수치(예를 들어 양, 지속시간 등)를 지칭하는 경우, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$ 와 $\pm 0.1\%$ 를 포함하되, 구체적인 수치 $\pm 20\%$ 또는 $\pm 10\%$ 에 대한 변화를 포함하는 것을 의미하는데, 이러한 변화들이 공개된 방법을 수행하기에 적합하기 때문이다.
- [0025] 별도로 정의하지 않는 한, 본 출원에 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자가 통상적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 비록 본 출원의 공개와 유사하거나 또는 동일한 어떠한 방법 및 재료든지 모두 본 발명의 시험에 사용될 수 있으나, 본 출원은 바람직한 재료와 방법을 기술하였다. 본 발명의 권리에 대한 기술 및 수요 시, 아래의 용어를 사용한다.
- [0026] “치료 활성 항체” 또는 “치료성 항체” 는 치료 목적, 즉 피험자의 장애를 치료하기 위한 항체를 말한다. 언급해야 할 점으로, 비록 치료성 단백질은 치료 목적에 사용될 수 있으나, 상기 단백질은 체외 연구에도 사용될 수 있기 때문에, 본 발명은 이러한 용도에 국한되지 않는다.
- [0027] 용어 “약물 제제” 또는 “제제” 는 일종의 제품으로서, 활성성분의 생물 활성을 유효하게 하는 형식을 취하며, 또한 상기 제제가 투여되는 피험자에게 허용할 수 없는 독성을 지닌 기타 성분을 함유하지 않는다. 상기 제제는 무균성이다.
- [0028] 용어 “액체 제제” 란 액체 상태에 있는 제제를 말하며, 또한 재현탁 동결건조 제제를 지칭하는 것은 아니다. 본 발명의 액체 제제는 보관 시 안정적이고, 또한 그 안정성이 동결건조(또는 기타 상태 변경 방법, 예를 들어 분무 건조)에 의존적이지 않다.
- [0029] 용어 “수성 액체 제제” 란 물을 용매로 사용하는 액체 제제를 말한다. 한 가지 실시방식에서, 수성 액체 제제는 동결건조, 분무건조 및/또는 냉동으로 안정성(예를 들어 화학 및/또는 물리적 안정성 및/또는 생물 활성)을

유지할 필요가 없는 제제이다.

- [0030] 용어 “부형제”란 필요한 특성(예를 들어 농도(consistence), 향상된 안정성)을 제공 및/또는 삼투압을 조절하도록, 제제에 첨가될 수 있는 시약을 말한다. 자주 사용되는 부형제의 구현예로는 당류, 폴리올, 아미노산, 계면활성제와 폴리머를 포함하되, 이에 한정되지 않는다.
- [0031] 본문에서, 용어 “약 5.5 내지 약 6.5의 pH를 제공하는 완충제”란, 이의 산/알칼리 공액 성분의 작용을 통해 상기 시약을 포함하는 용액이 pH의 변화에 저항할 수 있도록 하는 시약을 말한다. 본 발명의 제제에 사용되는 완충액은 약 5.5 내지 약 6.5 범위 내의 pH, 또는 약 5.5 내지 약 6.0 범위 내의 pH를 가질 수 있다. 한 가지 실시방식에서, pH는 약 6.0이다.
- [0032] 본문에서, pH를 상기 범위 내로 제어하는 “완충제”의 구현예는 아세트산염(예를 들어 아세트산나트륨), 석신산염(예를 들어 석신산나트륨), 글루콘산, 히스티딘 및/또는 그 염, 메티오닌, 시트르산염, 인산염, 시트르산염/인산염, 이미다졸, 이들의 조합 및 기타 유기산 완충제를 포함한다. 한 가지 실시방식에서, 완충제는 단백질이 아니다. 한 가지 실시방식에서, 상기 완충제는 히스티딘 및/또는 그 염이고, 바람직하게는 L-히스티딘 및/또는 그 염이다. 통상적으로, 제제 중 완충제의 농도는 5-100mM의 범위 내이거나, 또는 약 5mM, 10mM, 15mM, 20mM, 25mM, 30mM, 35mM, 40mM, 45mM, 50mM, 55mM, 60mM, 65mM, 70mM, 75mM, 80mM, 85mM, 90mM, 95mM 또는 100mM 또는 상기 어느 2개의 수치를 엔드포인트로 하여 구성되는 범위 내, 예를 들어 10-30mM 또는 15-25mM일 수 있다. 한 가지 실시방식에서, 완충제의 농도는 약 20mM이다.
- [0033] “히스티딘 완충제”는 히스티딘 및/또는 그 염을 포함하는 완충제이다. 히스티딘의 염은 히스티딘 염산염, 히스티딘 아세트산염, 히스티딘 인산염 및 히스티딘 황산염 중의 하나 또는 그 이상을 포함한다. 본 발명의 한 가지 실시방식에서, 히스티딘 완충제는 1-10mM의 L-히스티딘과 10-20mM의 L-히스티딘 일염산염으로 제조된 히스티딘 완충제이다. 한 가지 실시방식에서, 히스티딘 제제는 4.5mM의 L-히스티딘과 15.5mM의 L-히스티딘 일염산염으로 제조된 pH가 6.0인 히스티딘 완충제이다. 한 가지 실시방식에서, 히스티딘 제제는 9.5mM의 L-히스티딘과 10.5mM의 L-히스티딘 일염산염으로 제조된 pH가 5.5인 히스티딘 완충제이다. 일부 실시방안에서, 히스티딘 완충액은 물비가 1:1 내지 1:4인 히스티딘과 히스티딘 염산염으로 조성된다.
- [0034] 본문에서 사용 시, 용어 “계면활성제”는 일반적으로 예컨대 항체와 같은 단백질이 공기/용액의 계면이 유도하는 응력, 용액/계면이 유도하는 응력의 영향을 받지 않도록 보호함으로써 항체의 응집을 감소시키거나 또는 제제 중 과립물의 형성을 최소화하는 시약을 포함한다. 예시적인 계면활성제는 비이온형 계면활성제, 예를 들어 폴리옥시에틸렌 솔비탄 지방산 에스테르(예를 들어 폴리소르베이트 20과 폴리소르베이트 80), 폴리에틸렌-폴리프로필렌 공중합체, 폴리에틸렌-폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시에틸렌-스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 알킬에테르, 예를 들어 폴리옥시에틸렌 모노라우릴에테르, 알킬페닐 폴리옥시에틸렌 에테르(Triton-X), 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체(폴록사머(Poloxamer), 플루로닉(Pluronic)), 도데실황산나트륨(SDS)을 포함하되, 이에 한정되지 않는다. 한 가지 실시방식에서, 상기 비이온형 계면활성제는 폴리소르베이트 20이다. 한 가지 실시방식에서, 폴리소르베이트 20의 농도는 약 0 내지 0.1%(w/v)이다. 한 가지 실시방식에서, 폴리소르베이트 20의 농도는 약 0.02%(w/v)이다. 한 가지 실시방식에서, 상기 비이온형 계면활성제는 폴리소르베이트 80이다. 한 가지 실시방식에서, 폴리소르베이트 80의 농도는 약 0 내지 0.1%(w/v)이다. 한 가지 실시방식에서, 폴리소르베이트 80의 농도는 약 0.02%(w/v)이다.
- [0035] 본문 중에서 사용 시, 용어 “안정화제”는 항체 및 기타 단백질의 응집을 저하시킬 수 있다. 예시적인 안정화제는: 인간 혈청 알부민(hsa), 소 혈청 알부민(bsa), α-카제인, 글로불린, α-락트알부민, LDH, 리소자임, 미오글로빈, 오브알부민과 Rnase A를 포함하되 이에 한정되지 않는다. 안정화제는 아미노산과 이들의 대사산물 및 이들의 염, 예를 들어 염산염, 예컨대: 아르기닌, 글리신, 알라닌(α-알라닌, β-알라닌), 베타인, 류신, 라이신, 글루탐산, 아스파르트산, 프롤린, 4-하이드록시프롤린, 사르코신, γ-아미노뷰티르산(GABA), 오파인류(opines)(알란오파인(alanopine), 옥토파인(octopine), 스트롬바인(strombine)) 및 트리메틸아민의 N-산화물(TMAO)을 더 포함한다. 안정화제는 당, 폴리올 및 이들의 대사 산물 등, 예를 들어 NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, 수크로오스, 만니톨, 솔비톨 등을 더 포함한다. 한 가지 실시방식에서, 상기 안정화제는 만니톨이다. 한 가지 실시방식에서, 상기 안정화제는 만니톨이다. 한 가지 실시방식에서, 상기 안정화제는 수크로오스이다. 한 가지 실시방식에서, 상기 안정화제는 솔비톨이다. 한 가지 실시방식에서, 상기 안정화제는 아미노산 또는 그 염이다. 한 가지 실시방식에서, 상기 아미노산은 아르기닌 또는 아르기닌 하이드로클로라이드이다. 한 가지 실시방식에서, 아르기닌 또는 아르기닌 하이드로클로라이드의 농도는 약 20 내지 200mM이다. 한 가지 실시방식에서, 아르기닌 또는 아르기닌 하이드로클로라이드의 농도는 약 50 내지 200mM이다. 한 가지 실시방식에서, 아르기닌 또는

아르기닌 하이드로클로라이드의 농도는 약 60mM, 130mM, 160mM 또는 165mM이다.

- [0036] 본문에서 사용되는 용어인 “점도”는 “운동점도” 또는 “절대점도”일 수 있다. “운동점도”는 중력의 영향 하에 발생하는 유체의 저항성 유동에 대한 일종 측정 지표이다. “절대점도”는 역학점도 또는 단순점도라고 칭하기도 하며, 이는 운동점도와 유체밀도의 곱이다(절대점도=운동점도×밀도). 운동점도의 차원은 L²/T이며, 여기서 L은 길이이고, T는 시간이다. 통상적으로, 운동점도는 센티스톡스(cSt)로 표시한다. 운동점도의 국제단위계 단위는 mm²/s, 즉 1cSt이다. 절대점도는 센티푸아즈(cP) 단위로 표시한다. 절대점도의 국제단위계 단위는 밀리파스칼-초(mPa-s)이며, 여기서 1cP=1mPa-s이다.
- [0037] 본 발명의 액체형 제제에 대하여, 본문에서 사용되는 용어 “저수준 점도”는 약 15센티푸아즈(cP) 미만의 절대점도를 나타낸다. 예를 들어 표준점도 측정 기술을 사용하여 측정 시, 상기 제제가 나타내는 절대점도가 약 15cP, 약 14cP, 약 13cP, 약 12cP, 약 11cP, 약 10cP, 약 9cP, 약 8cP 또는 그보다 더 낮으면, 본 발명의 액체형 제제는 “저점도”를 지니는 것으로 간주된다. 본 발명의 액체형 제제에 있어서, 본문에서 사용되는 용어인 “중간 수준 점도”는 약 35cP와 약 15cP 사이에 개재되는 절대점도를 나타낸다. 예를 들어, 표준점도 측정 기술을 사용하여 측정 시, 상기 제제가 나타내는 절대점도가 약 34cP, 약 33cP, 약 32cP, 약 31cP, 약 30cP, 약 29cP, 약 28cP, 약 27cP, 약 26cP, 약 25cP, 약 24cP, 약 23cP, 약 22cP, 약 21cP, 약 20cP, 약 19cP, 약 18cP, 약 17cP, 약 16cP, 또는 약 15cP이면, 본 발명의 액체형 제제는 “중등 점도”를 지니는 것으로 간주된다. 본 발명의 액체형 의약 제제는 일부 실시방식에서 저수준 내지 중등 수준의 점도를 나타낼 수 있다. 한 가지 실시방식에서, 본 발명은 놀랍게도 농도가 약 100-200mM인 항체와 60-165mM인 아르기닌 또는 그 염을 함께 조제함으로써, 저점도로 함유한 액체형 제제를 획득할 수 있다는 것을 발견하였다. 한 가지 실시방식에서, 또한 아르기닌 또는 그 염이 수크로오스, 솔비톨, 만니톨 등과 같은 등장화제(tonicity agent)를 함유한 제제의 점도를 현저하게 저하시킬 수 있다.
- [0038] “등장”이란 상기 제제가 인간 혈액과 대체로 동일한 삼투압을 갖는 것을 말한다. 등장 제제는 일반적으로 약 250 내지 350mOsm의 삼투압을 갖는다. 증기압 또는 빙점 하강식 삼투압계를 사용하여 등장성을 측정할 수 있다.
- [0039] “안정적” 제제는 여기서의 항체가 제조 과정 기간 및/또는 보관 시 기본적으로 그 물리적 안정성 및/또는 화학적 안정성 및/또는 생물 활성을 유지하는 제제이다. 함유된 항체가 일정 시간 동안 보관 후 100%의 화학구조 또는 생물학적 기능을 유지할 수 없다 하더라도, 의약 제제로서는 안정적일 수도 있다. 일부 상황에서, 일정 시간 동안 보관 후, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98% 또는 약 99%의 항체 구조 또는 기능을 유지할 수 있어도 “안정적”이라고 간주할 수 있다. 단백질 안정성을 측정하기 위한 각종 분석 기술은 본 기술분야에서 획득 가능하며, 또한 《펩타이드와 단백질 약물 전달》(Peptide and Protein Drug Delivery) 247-301, Vincent Lee 편집, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991), 및 Jones, A.(1993) Adv.Drug Delivery Rev.10:29-90에 종합적으로 기술되어 있다(양자의 인용은 참고로 함).
- [0040] 제제는 일정 온도 하에 일정 시간 동안 보관을 거친 후, 이 중 남은 천연 항체의 백분율 측정(및 기타 방법)을 통해, 그 안정성을 측정할 수 있다. 기타 방법 이외에, 천연 항체의 백분율은 크기 배제 크로마토그래피법(Size Exclusion Chromatography)(예를 들어 크기 배제 고성능액체 크로마토그래피법[SE-HPLC])으로 측정할 수 있으며, “천연”이란 응집되지 않고 분해되지 않은 것을 말한다. 일부 실시방식에서, 단백질의 안정성은 낮은 백분율로 분해(예를 들어 프래그먼트화) 및/또는 응집된 단백질을 구비한 용액 중 모노머 단백질의 백분율에 따라 확정된다. 일부 실시방식에서, 제제는 실온, 약 25-30°C 또는 40°C 하에서 최소 2주, 최소 28일, 최소 1개월, 최소 2개월, 최소 3개월, 최소 4개월, 최소 5개월, 최소 6개월, 최소 7개월, 최소 8개월, 최소 9개월, 최소 10개월, 최소 11개월, 최소 12개월, 최소 18개월, 최소 24개월, 또는 그 이상 동안 안정적으로 보관할 수 있으며, 최대 약 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 또는 0.1%의 응집형식을 초과하지 않는 항체이다.
- [0041] 이온교환 기간 동안 항체의 주 분획물(“주요 하전 형식(charged form)”)에 비해 산성인 분획물에서 천이되는 항체(“산성 형식”)의 백분율 측정(및 기타 방법)을 통해 안정성을 측정할 수 있으며, 여기서, 안정성은 산성 형식의 항체의 백분율과 반비례를 이룬다. 다른 방법 이외에, “산성화” 항체의 백분율은 이온교환 크로마토그래피법(예를 들어 양이온교환 고성능액체 크로마토그래피법[CEX-HPLC])을 통해 측정할 수 있다. 한 가지 실시방식에서, 허용 가능한 정도의 안정성이란 제제를 일정 온도 하에 일정 시간 동안 보관 후, 여기서 검출될 수 있는 산성 형식의 항체가 최대 약 49%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5% 또는 0.1%를 초과하지 않는 것을 말한다. 안정성을 측정하기 전 보관하는 일정 시간은 최소 2주, 최소 28일, 최소 1개월, 최소 2개월, 최소 3개월, 최소 4개월, 최소 5개월, 최소 6개월, 최소 7개월, 최소 8개월, 최소 9개월, 최소 10개월, 최소 11개월, 최소 12개월, 최소 18개월, 최소 24개월, 또는 그 이상일 수 있다. 안정성을 평가

시, 의약 제제의 보관이 허용되는 일정 온도는 약 -80℃ 내지 약 45℃ 범위 내의 임의의 온도일 수 있으며, 예를 들어 약 -80℃, 약 -30℃, 약 -20℃, 약 0℃, 약 2-8℃, 약 5℃, 약 25℃, 또는 약 40℃이다.

- [0042] 항체가 색상 및/또는 투명도(clarity) 육안 검사 시 또는 UV광 산란 또는 포어 크기 배제 크로마토그래피를 통해 측정 시 기본적으로 응집, 침전 및/또는 변성과 같은 징후가 나타나지 않으면, 즉 상기 항체는 상기 약물 제제 중 “그 물리적 안정성을 유지” 하는 것이다. 응집(Aggregation)은 단일한 분자 또는 복합물의 공유(covalent) 또는 비공유 결합으로 응집체를 형성하는 과정이다. 응집은 가시적인 침전물이 형성되는 정도까지 진행될 수 있다.
- [0043] 제제의 안정성, 예를 들어 물리적 안정성은 본 기술분야 중 공지된 방법을 통해 평가할 수 있으며, 샘플의 외관 광소멸도(흡광도 또는 광밀도) 측정을 포함한다. 이러한 광소멸 측정은 제제의 탁도와 관련이 있다. 제제의 탁도는 부분적으로는 용액 중에 용해된 단백질의 고유 성질이며, 또한 통상적으로 비탁법을 통해 측정하고, 비탁법 탁도 단위(NTU)로 측정된다.
- [0044] 예를 들어 용액 중 하나 또는 복수 성분의 농도(예를 들어 단백질 및/또는 염 농도)에 따라 변화되는 탁도 수준은 제제의 “유탁” 또는 “유탁 외관” 이라고도 칭한다. 탁도 수준은 기지의 탁도 현탁액을 사용하여 발생하는 표준 곡선을 참조하여 계산할 수 있다. 약물 조성물의 탁도 수준을 측정하기 위한 참조 표준 제품은 《유럽약전》 표준을 기준으로 한다(《유럽약전》(European Pharmacopoeia), 제4판, “유럽 약품 품질 위원회 지령”(Directorate for the Quality of Medicine of the Council of Europe)(EDQM), Strasbourg, France). 《유럽약전》 표준에 따르면, 투명한 용액은 탁도가 《유럽약전》 표준에 따라 약 3인 탁도를 갖는 기준 현탁액보다 낮거나 또는 같은 용액으로 정의된다. 비탁법의 탁도 측정은 결합(association) 또는 비이상적인 효과(non-ideal effect)가 존재하지 않는 상황에서의 레일리 산란을 검출할 수 있으며, 이는 통상적으로 농도에 따라 선형 변화를 나타낸다. 물리적인 안정성을 평가하기 위한 기타 방법은 본 기술 분야에서 공지된 것이다.
- [0045] 만약 정해진 시점에서 항체의 화학적 안정성이 아래에 정의된 생물 활성을 여전히 유지할 수 있게 하는 것으로 간주될 경우, 즉 상기 항체는 약물 제제 중 “그 화학 안정성을 유지” 하는 것이다. 예를 들어 항체의 화학적 변화를 검출 또는 정량하는 형식을 통해 화학 안정성을 평가할 수 있다. 화학적 변화는 크기의 변화(예를 들어 짧게 자름)를 포함할 수 있으며, 이는 예를 들어 포어 크기 배제 크로마토그래피, SDS-PAGE 및/또는 매트릭스 보조 레이저 탈착/이온화 비행시간 질량분석기(MALDI/TOF MS)를 통해 평가할 수 있다. 기타 유형의 화학적 변화는 전하 변화(예를 들어 탈아미드화 또는 산화의 결과로서 발생)를 포함하며, 이는 예를 들어 이온교환 크로마토그래피를 통해 평가할 수 있다.
- [0046] 만약 약물 제제 중의 항체의 예상 목적이 생물 활성이라면, 상기 항체는 약물 제제 중 “그 생물 활성을 유지” 하는 것이다. 예를 들어, 제제를 예를 들어 5℃, 25℃, 45℃ 등 온도에서 일정 시간(예를 들어 1 내지 12개월) 동안 보관한 후, 상기 제제에 함유된 항PCSK9 항체가 PCSK9과 결합되는 친화력이 상기 보존 전의 항체 결합 친화력의 적어도 90%, 95% 이상이면, 본 발명의 제제가 안정적인 것으로 간주할 수 있다. 결합 친화력은 예를 들어 ELISA 또는 플라즈마 공명 기술로 측정할 수도 있다.
- [0047] 본 발명의 상황에서, 약리학적 의미상, 항체의 “치료 유효량” 또는 “유효량” 이란 항체가 효과적으로 치료할 수 있는 장애 증상의 예방 또는 치료 또는 경감 측면에서 유효한 양을 말한다.
- [0048] 용어 “피험자” 또는 “환자” 는 포유동물 생물체를 포함하도록 의도되었다. 피험자/환자의 구현에는 인간 및 비인간 포유동물, 예를 들어 비인간 영장동물, 개, 쥐, 돼지, 말, 돼지, 면양, 산양, 고양이, 마우스, 토끼, 래트와 유전자변형 비인간 동물을 포함한다. 본 발명의 특정 실시방식에서, 피험자는 인간이다.
- [0049] 항PCSK9 항체
- [0050] 본 발명에 따른 제제는 인간 PCSK9과 특이적으로 결합되는 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트를 포함한다. 본문에서 사용되는 용어 “PCSK9” 은 인간 전구단백질 전환효소의 하나로서, 서브틸라아제(subtilase) 패밀리에 속하는 프로테아제 K 서브패밀리아이다. 종래 문헌에서 저밀도 지방 단백질 입자의 수용체와 결합하여 그 분해를 촉진시킴으로써, PCSK9이 혈장의 LDL 수준을 향상시킬 수 있다는 것이 이미 증명되었다.
- [0051] 본문에서 사용되는 용어인 “항체” 는 완전한 항체 분자 및 그 항원 결합 프래그먼트를 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본문에서 사용되는 용어인 항체의 “항원 결합 부분” 또는 “항원 결합 프래그먼트” (또는 “항체 부분” 또는 “항체 프래그먼트” 로 약칭)는 항체 중 인간 PCSK9 또는 그 에피토프(epitope)와의 특이적 결합 능력을 유지하는 하나 또는 다수의 프래그먼트를 말한다.

- [0052] 본문에서 사용되는 용어 “전장 항체”란, 4가닥의 펩타이드 사슬을 포함하는 면역글로불린 분자를 말하며, 2가닥의 중(H)쇄(전장일 때 약 50-70kDa)와 2가닥의 경(L)쇄(전장일 때 약 25kDa)가 이황화 결합(disulfide bond)을 통해 서로 연결된다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변영역(heavy chain variable region)(본문에서는 VH로 약칭함)과 중쇄 불변영역(heavy chain constant region)(본문에서는 CH로 약칭함)으로 구성된다. 중쇄 불변영역은 3개의 구조 도메인 CH1, CH2와 CH3로 구성된다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변영역(본문에서는 VL로 약칭함)과 경쇄 불변영역으로 구성된다. 경쇄 불변영역은 1개의 구조 도메인 CL로 구성된다. VH와 VL 영역은 높은 가변성을 지닌 상보성 결정영역(complementarity determining region)(CDR)과 그 간격이 더욱 보수적인 프레임워크 영역(FR)으로 칭하는 영역으로 더 세분화될 수 있다. 각각의 VH 또는 VL 영역은 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4의 순서에 따라 아미노기 말단으로부터 카르복실기 말단까지 배열되는 3개의 CDR과 4개의 FR로 구성된다. 중쇄와 경쇄의 가변영역에는 항원과 상호 작용하는 결합 구조 도메인이 함유되어 있다. 항체의 불변영역은 면역글로불린 단백질의 숙주 조직 또는 인자(면역시스템의 각종 세포(예를 들어 효과기 세포(effector cell))와 고전적 보체 시스템(classical complement system)의 제1 성분(C1q) 포함)에 대한 결합을 매개할 수 있다.
- [0053] 본문에서 사용 시, 용어 “CDR”은 항체 가변 서열 내의 상보 결정영역을 말한다. 중쇄와 경쇄의 각 가변영역에는 3개의 CDR이 존재하며, 이는 각 중쇄 및 경쇄 가변영역에 대해 HCDR1, HCDR2와 HCDR3 또는 LCDR1, LCDR2와 LCDR3로 명명된다. 이러한 CDR의 정확한 경계는 상이한 시스템에 따라 다른 정의가 있다. Kabat(위와 같이)에 의해 기술되는 시스템은 항체의 어떤 가변영역에도 적용될 수 있는 명확한 잔기 번호 시스템을 제공하였을 뿐만 아니라, 3개의 CDR을 정의하는 정확한 잔기 경계를 제공하였다. 이러한 CDR은 Kabat CDR이라고 칭한다. Chothia 등은, KabatCDR 내의 어떤 하위 부분이 비록 아미노산 서열 수준에서 큰 다양성을 지니에도 불구하고, 거의 일치하는 펩타이드 뼈대 구조(peptide backbone structure)를 사용하였음을 발견하였다(Chothia 등, (1987) Mol. Biol. 196:901-917; Chothia 등, (1989) Nature 342:877-883). Kabat CDR과 중첩되는 CDR의 기타 경계에 대한 정의는 이미 Padlan(1995) FASEB J. 9:133-139 및 MacCallum(1996) J. Mol. Biol. 262 (5):732-45에 기술되어 있다. 다른 CDR 경계의 정의는 본문 중에 기술되는 시스템 중의 하나를 엄격하게 따르지 않을 가능성이 있으나, 여전히 Kabat CDR과 중첩되며, 비록 이들이 단축되거나 연장되더라도, 이는 예측 또는 실험에 따라 특정 잔기 또는 잔기군 또는 심지어 전체적인 CDR이 항원의 결합에 현저한 영향을 미치지 않는 것으로 나타났기 때문이다. 본문에서 사용된 방법은 일부 실시방식에서 Kabat 또는 Chothia가 정의한 CDR을 사용하였더라도, 이러한 시스템에 따라 정의된 어떠한 CDR도 이용 가능하다.
- [0054] 본 발명에 따른 항PCSK9 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 국제 공개번호 WO2017088782에 기술된 어느 하나의 항PCSK9 항체를 포함한다. 한 가지 실시방식에서, 본 발명의 방법과 조성물 중에 사용된 항체는 항체 JS002로부터 유래되는 6개의 CDR을 포함한다.
- [0055] 본문에 따른 “항원 결합 프래그먼트”는 항체의 프래그먼트 또는 유도체를 포함하며, 통상적으로 패런탈 항체(parental antibody)의 항원 결합영역 또는 가변영역(예를 들어 하나 또는 다수의 CDR)의 적어도 하나의 프래그먼트를 포함하며, 이는 패런탈 항체의 적어도 일부 결합 특이성을 유지한다. 항원 결합 프래그먼트의 구현에는 Fab, Fab', F(ab')₂와 Fv 프래그먼트; 이중항체; 선형 항체; sc-Fv와 같은 단쇄 항체 분자; 항체 프래그먼트로부터 형성되는 나노항체(nanobody) 및 다중특이성 항체를 포함하되, 이에 한정되지 않는다. 항원의 결합 활성이 몰 농도의 기초 상에 표시될 때, 결합 프래그먼트 또는 유도체는 통상적으로 그 항원 결합 활성의 적어도 10%를 유지한다. 바람직하게는 결합 프래그먼트 또는 유도체는 패런탈 항체의 항원 결합 친화력의 적어도 20%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100% 또는 그 이상을 유지한다. 또한 항체의 항원 결합 프래그먼트에는 그 생물 활성을 뚜렷하게 변화시키지 않는 보수적이거나 또는 비보수적인 아미노산 대체물(항체의 “보수 변이체” 또는 “기능적 보수 변이체”라고 칭함)을 포함할 수 있는 것으로 더 예측된다.
- [0056] 한 가지 실시방식에서, 본 발명에 따른 항PCSK9 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2와 LCDR3을 포함하되, 여기서 HCDR1은 아미노산 서열 SEQ ID NO: 1을 가지고; HCDR2는 아미노산 서열 SEQ ID NO: 2를 가지며; HCDR3은 아미노산 서열 SEQ ID NO: 3을 가지고; LCDR1은 아미노산 서열 SEQ ID NO: 4를 가지며; LCDR2는 아미노산 서열 SEQ ID NO: 5를 가지고; 또한 LCDR3은 아미노산 서열 SEQ ID NO: 6을 가진다.
- [0057] 한 가지 실시방식에서, 본 발명에 따른 항PCSK9 항체 또는 항원 결합 프래그먼트는 중쇄 가변영역(VH)과 경쇄 가변영역(VL)을 포함하되, 여기서 VH는 아미노산 서열 SEQ ID NO: 7을 가지고; VL은 아미노산 서열 SEQ ID NO: 8을 가진다.
- [0058] 본문의 실시예에서 사용되는 비제한적이고 시범적인 항체는 “JS002”라고 칭하며, 이는 인간 PCSK9과 특이적으

로 결합되는 인간화 완전 항체로서, 중쇄와 경쇄를 포함하되, 여기서 중쇄의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 9이고, 경쇄의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 10이다.

- [0059] 의약 제제
- [0060] 본문에 따른 제제는 고농도 활성 항체를 포함하며 고안정성, 저점도를 갖는 액체성 제제이다. 특히, 본 발명은 아르기닌염을 함유한 제제의 점도가 등장화제(tonicity agent)를 함유한 조제액보다 현저히 낮다는 것을 발견하였다. 이밖에, 조제액에 함유된 아르기닌염은 등장화제를 함유한 조제액의 점도를 현저히 저하시킬 수 있다.
- [0061] 본 발명의 제제는 인간 PCSK9에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트, 완충액과 안정화제를 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 제제의 pH는 5.5-6.5 범위 이내이다.
- [0062] 본 발명의 제제 중, 항PCSK9의 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 통상적으로 100mg/mL 내지 약 200mg/mL의 범위에 있다. 일부 실시방안에서, 본 발명의 제제 중 150±10mg/mL의 항PCSK9의 항체 또는 항원 결합 프래그먼트가 함유된다. 바람직한 실시방안에서, 본 발명의 제제에 함유되는 항PCSK9의 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2와 LCDR3을 포함하되, 여기서 HCDR1은 아미노산 서열 SEQ ID NO: 1을 가지고; HCDR2는 아미노산 서열 SEQ ID NO: 2를 가지며; HCDR3은 아미노산 서열 SEQ ID NO: 3을 가지고; LCDR1은 아미노산 서열 SEQ ID NO: 4를 가지며; LCDR2는 아미노산 서열 SEQ ID NO: 5를 가지고; 또한 LCDR3은 아미노산 서열 SEQ ID NO: 6을 가진다. 더욱 바람직하게는, 상기 항체 또는 항원 결합 프래그먼트는 중쇄 가변영역(VH)과 경쇄 가변영역(VL)을 포함하되, 여기서 VH는 아미노산 서열 SEQ ID NO: 7을 가지고; VL은 아미노산 서열 SEQ ID NO: 8을 가진다. 더욱 바람직하게는, 상기 항체 또는 항원 결합 프래그먼트는 중쇄(HC)와 경쇄(LC)를 포함하되, 여기서 HC는 아미노산 서열 SEQ ID NO: 9을 가지고, LC는 아미노산 서열 SEQ ID NO: 10을 가진다.
- [0063] 본 발명의 제제 중, 완충액은 아세트산염 완충액 또는 히스티딘 완충액일 수 있으며, 바람직하게는 히스티딘 완충액이다. 바람직하게는, 완충액의 pH는 5.5-6.0의 범위이다. 바람직하게는, 본 발명의 히스티딘 완충액은 히스티딘과 본문 중의 상기 히스티딘의 염을 함유한다. 통상적으로, 본 발명에 사용되는 히스티딘 완충액은 1-10mM의 히스티딘과 10-20mM의 히스티딘염(예를 들어 일염산염)을 함유한다. 바람직하게는, 히스티딘 완충액 중, 히스티딘과 히스티딘의 염의 몰비는 1:1 내지 1:4의 범위 이내이다. 본 발명의 제제 중, 완충액의 농도는 10-50mM일 수 있고, 바람직하게는 15-25mM, 예를 들어 20mM이다.
- [0064] 본 발명의 제제 중, 안정화제는 아르기닌 또는 그 염, 솔비톨, 만니톨과 수크로오스 중의 하나 또는 그 이상으로부터 선택될 수 있으며, 아르기닌염인 것이 바람직하다. 예시적인 아르기닌염은 아르기닌 하이드로클로라이드를 포함한다. 약제학에서 안정화제로 사용되는 기타 아르기닌염 역시 본 발명에 사용될 수 있다. 통상적으로, 본 발명의 제제 중 안정화제의 농도는 50mM 내지 300mM 범위 이내, 예를 들어 50-200mM, 130-200mM 또는 160-250mM이다. 아르기닌염을 단독으로 사용 시, 제제 중 이의 농도는 50-200mM, 예를 들어 130-200mM의 범위 이내일 수 있다. 일부 실시방안에서, 안정화제는 아르기닌염과 만니톨 또는 솔비톨의 혼합물이다. 아르기닌염과 만니톨 또는 솔비톨의 조합을 사용할 경우, 제제 중 아르기닌염의 농도는 50-150mM의 범위 이내이고, 만니톨 또는 솔비톨의 농도는 50-200mM의 범위 이내일 수 있으며, 2가지 안정화제의 총 농도는 50mM 내지 300mM, 예를 들어 50mM 내지 250mM의 범위 이내일 수 있다.
- [0065] 일부 실시방식에서, 본 발명에 따른 제제는 (1) 항PCSK9의 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트; (2) 히스티딘 완충액, pH는 약 5.5-6.5; 및 (3) 아르기닌염을 포함한다.
- [0066] 본 발명의 일부 실시방식에서, 본 발명에 따른 제제는 본문에 따른 비이온형 계면활성제를 더 포함한다. 통상적으로, 함유 시, 제제 중 비이온형 계면활성제의 농도는 예를 들어 0.01-0.05%(w/v)와 같이 0.1%(w/v)를 초과하지 않는다. 바람직한 비이온형 계면활성제는 폴리소르베이트 20 및/또는 폴리소르베이트 80을 포함하며, 특히 바람직한 농도는 약 0.02%이다.
- [0067] 한 가지 실시방식에서, 본 발명에 따른 제제는: (1) 약 100mg/mL 내지 약 200mg/mL의 항PCSK9 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트; (2) 약 10-50mM의 히스티딘 완충액, pH는 약 5.5-6.5; (3) 약 50mM 내지 약 200mM의 아르기닌염; 및 (4) 약 0% 내지 약 0.1%의 비이온 계면활성제를 포함한다.
- [0068] 한 가지 실시방식에서, 본 발명에 따른 제제는: (1) 약 150±10mg/mL의 항PCSK9 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트; (2) 약 20mM의 히스티딘 완충액, pH는 약 5.5-6.5; (3) 약 60±5mM, 130±5mM 또는 160±5mM의 아르기닌염; 및 (4) 약 0% 내지 약 0.1%의 비이온 계면활성제를 포함한다.

- [0069] 한 가지 실시방식에서, 본 발명에 따른 제제는: (1) 약 $150 \pm 10 \text{mg/mL}$ 의 항PCSK9 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트; (2) 약 20mM의 히스티딘 완충액, pH는 약 5.5-6.5; (3) 약 $160 \pm 5 \text{mM}$ 의 아르기닌염; 및 (4) 약 0.02%의 폴리소르베이트 20을 포함한다.
- [0070] 한 가지 실시방식에서, 본 발명에 따른 제제는: (1) 약 $150 \pm 10 \text{mg/mL}$ 의 항PCSK9 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트, 여기서 상기 항체는 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2와 LCDR3을 포함하되, 여기서 HCDR1은 아미노산 서열 SEQ ID NO: 1을 가지고; HCDR2는 아미노산 서열 SEQ ID NO: 2를 가지며; HCDR3은 아미노산 서열 SEQ ID NO: 3을 가지고; LCDR1은 아미노산 서열 SEQ ID NO: 4를 가지며; LCDR2는 아미노산 서열 SEQ ID NO: 5를 가지고; 또한 LCDR3은 아미노산 서열 SEQ ID NO: 6을 가지며; (2) 약 20mM의 히스티딘 완충액, pH는 약 5.5-6.5; (3) 약 $160 \pm 5 \text{mM}$ 의 아르기닌염; 및 (4) 약 0.02%의 폴리소르베이트 20을 포함한다.
- [0071] 한 가지 실시방식에서, 본 발명에 따른 제제는 5.5-6.5의 pH를 가지고, 또한 (1) 약 $150 \pm 10 \text{mg/mL}$ 의 항PCSK9 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트, 여기서 상기 항체는 중쇄 가변영역(VH)과 경쇄 가변영역(VL)을 포함하되, 여기서 VH는 아미노산 서열 SEQ ID NO: 7을 가지고; VL은 아미노산 서열 SEQ ID NO: 8을 가지며; (2) 약 20mM의 히스티딘 완충액, pH는 약 5.5-6.5; (3) 약 $160 \pm 5 \text{mM}$ 의 아르기닌염; 및 (4) 약 0.02%의 폴리소르베이트 20을 포함한다.
- [0072] 한 가지 실시방식에서, 본 발명에 따른 제제는 (1) 약 $150 \pm 10 \text{mg/mL}$ 의 항PCSK9 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트, 여기서 상기 항체는 전장 항체로서, 여기서 중쇄의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 9이고, 경쇄의 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 10이며; (2) 약 20mM의 히스티딘 완충액, pH는 약 5.5-6.5; (3) 약 $160 \pm 5 \text{mM}$ 의 아르기닌염; 및 (4) 약 0.02%의 폴리소르베이트 20을 포함한다.
- [0073] 약물 제제의 용기 및 투여 방법
- [0074] 본 발명의 약물 제제는 약물 및 기타 약물 조성물을 보관하기에 적합한 어떤 용기에든 포함될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약물 제제는 일정 부피를 지닌 밀봉 및 멸균된 플라스틱 또는 유리 용기, 예를 들어 바이알(vial), 앰플(Ampule), 주사기(syringe), 약통 또는 병에 포함될 수 있다. 상이한 유형의 바이알은 본 발명의 제제를 담는 데에 사용될 수 있으며, 예를 들어 투명 및 불투명(예를 들어 호박색) 유리 또는 플라스틱 바이알을 포함한다. 마찬가지로, 상이한 유형의 주사기를 응용하여 본 발명의 약물 제제를 수납 및/또는 투여할 수 있다.
- [0075] 약물 제제는 비경구적 경로를 통해 환자에게 투여될 수 있으며, 이를테면 주사(예를 들어, 피하, 정맥 내, 근육 내, 복막 내 등), 또는 경피, 점막, 비강, 호흡기도 및/또는 경구 투여될 수 있다. 다양한 반복 사용 가능한 펜 주 및/또는 자동 주사기 전달장치를 응용하여 본 발명의 약물 제제를 피하 전달할 수 있다. 본 발명의 약물 조성물을 피하 전달하기 위한 일회용 펜주(pen) 및/또는 자동 주사기 전달장치의 구현에는 SOLOSTAR™ 펜주 (sanofi-aventis), FLEXPEN™(Novo Nordisk), 및 KWIKPEN™(Eli Lilly), SURECLICK™자동주사기(Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™(Haselmeier, Stuttgart, 독일), EPIPEN(Dey, L. P.) 및 HUMIRA™펜주(Abbott Labs, Abbott Park, IL)를 포함하되, 단 이에 한정되지 않으며, 여기서는 단지 몇 가지 예를 든 것일 뿐이다.
- [0076] 마이크로 주입 세트(micro infusion set)는 본 발명의 제제를 전달하기 위한 용도로서 역시 본문 내에 포함된다. 본문에서 사용되는 용어인 “마이크로 주입 세트”는 비교적 장시간(예를 들어, 약 10, 15, 20, 25, 30분 또는 그 이상) 내에 대용량(예를 들어, 약 2.5mL 또는 그 이상)의 치료 제제를 완만히 투여하기 위해 설계된 피하 전달장치를 나타낸다. 예를 들어 U.S. 6,629,949, US 6,659,982와 Meehan 등, J.Controlled Release 46:107-116(1996)을 참조한다. 마이크로 주입 세트는 특히 고농도(예를 들어, 약 100, 125, 150, 175, 200mg/ML 또는 그 이상) 및/또는 점성 용액에 포함된 대용량 치료 단백질질을 전달하는 데 사용될 수 있다.
- [0077] 의약 제제의 치료 용도
- [0078] 기타 용도 이외에, 본 발명의 의약 제제는 PCSK9이 매개하는 질환 또는 불균형을 포함하는 PCSK9 활성과 관련된 모든 질환 또는 불균형을 치료, 예방 또는 개선하는 데 사용될 수 있다. 본 발명의 의약 제제로 치료 또는 예방하는 시범적, 비제한적 질환과 실조는 각종 이상지질혈증, 예를 들어 고콜레스테롤혈증, 가족성 고콜레스테롤혈증, 1¼지방혈증, 가족성 1¼지방혈증, 제3형 이상 지단백혈증, 가족성 제3형 이상 지단백혈증, 1¼ 중성지방혈증과 가족성 고중성지방혈증을 포함한다.
- [0079] 본 발명은 본 발명인 항체 제제가 PCSK9 활성과 관련된 어떠한 질환 또는 불균형을 치료, 예방 또는 개선하는 약제를 제조함에 있어서의 응용도 포함한다. 또한 본문에 따른 PCSK9 활성과 관련된 어떠한 질환 또는 불균형을

치료, 예방 또는 개선하는 본문에 따른 항체 제제를 더 포함한다.

[0080] 이하 실시예를 통해 본 발명에 대해 상세히 기술하였으나, 본 발명에 대해 어떠한 불리한 제한을 두고자 하는 것을 의미하는 것은 아니다. 본문은 이미 본 발명을 상세히 기술하였으며, 구체적인 실시예도 함께 공개하였다. 본 분야의 당업자에게 있어서, 본 발명의 정신과 범위를 벗어나지 않는 상황에서 본 발명의 구체적인 실시방식에 대해 각종 변화와 개선을 실시할 수 있음은 자명한 것이다.

[0081] 실시예 1: 완충액 체계와 pH 선별 실험

[0082] 액체형 항체 제제 중, 완충액 체계와 pH는 항체의 안정성에 밀접한 영향을 미치며, 각종 독특한 물리화학 성질을 지닌 항체는 모두 가장 적합한 완충액의 종류와 pH를 갖는다. 최적의 완충액 체계와 pH의 선별은 본 발명이 공개하는 항PCSK9 항체가 적합하게 임상에 응용될 수 있도록 최적의 안정성을 갖도록 해준다.

[0083] 본 연구는 약 150mg/mL 농도의 JS002와, 보조재 130mM의 아르기닌 하이드로클로라이드로 진행하였다. 투석용 백을 사용하여 JS002 단백질이 상용하는 배합에 있도록 투석액을 교환하고, 샘플을 밀폐된 원심분리관에 담아 완충액 선별을 실시하였다. 아세트산나트륨 완충액과 히스티딘 완충액(히스티딘과 히스티딘 하이드로클로라이드의 몰비는 1:1) 두 가지 유형을 선별하였으며, pH는 5.0에서 6.0 수준이다(표 1과 같음). 샘플을 40°C/ambient RH에 두고, 각각 2주째 및 4주째에 인출하여 분석 검출을 실시하였다. 단백질 분해의 주요 경로는 응집물, 분해산물과 전하변이체의 형성이다. 크기 배제 크로마토그래피법(SEC-HPLC)을 이용하여 천연 형식(단백질 모노머)과 응집 형식의 JS002가 차지하는 백분율을 측정하고, 양이온 교환 크로마토그래피법(CEX-HPLC)으로 산성과 알칼리성 형식의 mAb가 차지하는 백분율을 측정하였다. 시험 시작(0W), 2주간(2W) 및 4주간(4W) 경과 후의 SEC-HPLC 모노머의 함량과 CEX-HPLC의 메인 피크(main peak) 함량으로 직선을 피팅하고 하강 기울기(%/주)를 계산하여 상이한 완충액 체계와 pH가 JS002 항체의 안정성에 미치는 영향을 고찰한 결과의 총정리는 표 2에 나타난 바와 같다.

표 1

완충액 체계와 pH 선별 실험 중의 배합 정보

[0084]

배합번호	pH	완충 체계	보조재
1	5.0	20mM의 아세트산나트륨 완충액	130mM의 아르기닌 하이드로클로라이드
2	5.5	20mM의 아세트산나트륨 완충액	130mM의 아르기닌 하이드로클로라이드
3	6.0	20mM의 히스티딘 완충액	130mM의 아르기닌 하이드로클로라이드

표 2

완충액 체계와 pH 선별 실험 중 안정성 결과 총정리

[0085]

배합번호	온도 시간	SEC-HPLC 모노머(%)	SEC-HPLC 모노머 하강 기울기(% /주)	CEX-HPLC 메인피크(%)	CEX-HPLC 메인피크 하강속도(%/ 주)
1	0주	99.4	1.20	86.4	5.90
	40°C, 2주	98.5		75.8	
	40°C, 4주	94.6		62.8	
2	0주	99.3	0.82	86.2	8.48
	40°C, 2주	98.8		75.4	
	40°C, 4주	96.0		52.3	
3	0주	99.5	0.57	86.5	9.75
	40°C, 2주	99.0		77.9	
	40°C, 4주	97.2		47.5	

[0086] 표 2에 표시된 바와 같이, SEC-HPLC 실험 검출에서, 항체는 제제의 pH가 5.5~6.0인 범위 내에서 모두 상대적인 안정을 유지할 수 있으며, 40°C 고온에서 4주 동안 놓아둔 후, 샘플의 모노머 함량은 94% 이상이고, 모노머의 순도 하강 속도 역시 1.5%/주 이하이며; 샘플의 주요 전하는 45% 이상을 차지하고, 주요 전하의 하강 속도는 10%/주 이하였다. 완충 체계가 히스티딘 완충액이고 pH가 6.0(배합 번호 3)일 때, 40°C 고온에서 4주 동안 방치한 후, 샘플의 모노머의 순도가 가장 높고(약 97%), 모노머 순도의 하강 속도는 0.57%/주에 불과하였다. 이러한

결과를 바탕으로, pH값이 5.5-6.0인 20mM 히스티딘 완충제를 선택하여 액체형 JS002 제제의 개발에 사용한다.

[0087] 실시예 2: 안정화제 선별 실험

[0088] 상이한 부형제가 항체 안정성과 점도에 미치는 영향을 좀 더 탐구하기 위하여, 수크로오스, 아르기닌 하이드로클로라이드, 솔비톨 또는 만니톨 중 하나 또는 이들을 조합한 제제를 선택하여 비교 시험을 실시하였다. 즉 상기 상이한 부형제 또는 그 조합을 약 150mg/mL의 JS002가 함유된 20mM의 히스티딘 완충액(pH는 5.5 또는 6.0)에 각각 투입하였으며, 구체적인 배합 정보는 표 3과 같다. 각 배합 제제를 나누어 담은 후 40℃ 조건 하에 두고, 각각 2주째, 4주째에 인출하여 항체의 안정성과 조제액의 점도를 분석 검출하였다. 분자 배제 고성능액체 크로마토그래피법(SEC-HPLC)을 통해 JS002 모노머 함량의 변화를 검출하고, 약한 양이온 고성능액체 크로마토그래피법(CEX-HPLC)을 통하여 JS002 전하의 메인 피크 함량을 검출하였으며, 및 4주째 표준 방법에 따라 제제의 점도를 검출하였다. 표 4에 표시된 바와 같이, 배합 중 수크로오스, 아르기닌 하이드로클로라이드, 솔비톨 또는 만니톨 중 하나 또는 이들의 조합이 함유된 경우, 항체는 모두 비교적 강한 열 안정성을 가졌으며, 즉 제제를 40℃의 고온에 4주간 놓아둔 후, 샘플의 모노머 함량은 98% 이상이었고, 주요 전하는 51% 이상을 차지하였다.

[0089] 특히, 각 항의 데이터 분석을 종합해보면, 아르기닌염만 함유한 제제는 항체의 안정성이 가장 강하고 점도가 가장 낮았다. 구체적으로, 40℃의 고온에 4주간 놓아둔 후, 아르기닌염만 함유한 제제군은: (1) 항체 구조에 대한 안정성에 있어서, 항체 모노머 순도의 하강 속도가 뚜렷하게 가장 낮았으며, 0.1%/주로 낮아, 가장 높은 수크로오스 군의 약 25-30%이며, 항체의 모노머 순도는 98.8%에 달하여, 수크로오스, 솔비톨 또는 만니톨의 항체 안정성에 대한 영향을 어느 정도로 개선할 수 있고; (2) 항체 전하에 대한 안정성의 경우, 항체의 주요 전하의 하강 속도가 가장 낮아, 6.25%/주로 낮으며, 주요 전하는 61.2%에 달하였으며; (3) 제제의 점도에 대하여, 아르기닌만 함유한 제제의 점도는 5cP 미만(표 5)으로, 다른 각 군의 배합보다 현저히 낮았으며, 특히 수크로오스만 함유한 제제 군의 약 20-25%이다. 또한, 아르기닌염은 수크로오스, 솔비톨 또는 만니톨을 함유한 제제의 점도를 현저하게 개선하여, 약 50% 감소시켰다.

[0090] 고농도의 항체 용액은 일반적으로 항체의 응집과 침전 등을 더욱 쉽게 야기하여, 항체의 안정성이 저하되며, 또한 용액 점도의 증가는 주사(특히 피하 또는 근육 주사)의 투여를 어렵게 만든다. 이상의 실험을 종합해보면, 제제가 액체 제제인 경우, 아르기닌염은 항체 JS002의 안정성을 보장할 수 있을 뿐만 아니라, 액체의 점도를 현저하게 낮출 수 있음을 발견하였다. 특히, 완충액이 히스티딘 완충액(pH는 5.5 또는 6.0)이고, 아르기닌염의 일종의 안정화제만 함유한 경우, 항체의 안정성과 용액의 점도 효과가 가장 우수하다.

표 3

안정화제 선별 실험 중의 배합 정보

[0091]

배합번호	pH	보조제
4	5.5	240mM의 수크로오스
5	6.0	240mM의 수크로오스
6	5.5	165mM의 아르기닌하이드로클로라이드
7	6.0	165mM의 아르기닌 하이드로클로라이드
8	5.5	270mM의 솔비톨
9	6.0	270mM의 솔비톨
10	5.5	260mM의 만니톨
11	6.0	260mM의 만니톨
12	5.5	60mM의 아르기닌 하이드로클로라이드155mM의 수크로오스
13	6.0	60mM의 아르기닌 하이드로클로라이드155mM의 수크로오스
14	5.5	60mM의 아르기닌 하이드로클로라이드165mM의 솔비톨
15	6.0	60mM의 아르기닌 하이드로클로라이드165mM의 솔비톨
16	5.5	60mM의 아르기닌 하이드로클로라이드160mM의 만니톨
17	6.0	60mM의 아르기닌 하이드로클로라이드160mM의 만니톨

표 4

안정화제 선별 실험 결과 총정리

배합번호	SEC-HPLC 모노머(%)			SEC-HPLC 모노머 하강속도 (%/주)	CEX-HPLC 메인피크(%)			CEX-HPLC 메인피크 하강속도(%/주)
	0주	2주	4주		0주	2주	4주	
4	99.5	98.7	98.1	0.38	88.4	68.9	53.2	8.80
5	99.3	98.5	98.3	0.30	87.6	67.7	55.5	8.03
6	99.4	99.0	98.5	0.25	86.2	70.4	61.2	6.25
7	99.4	99.1	98.8	0.10	86.3	69.5	59.8	6.63
8	99.4	99.0	98.4	0.28	87.7	68.1	56.6	7.78
9	99.3	98.6	98.2	0.30	87.9	70.7	54.6	8.33
10	99.4	98.9	98.0	0.28	87.6	67.8	56.3	7.83
11	99.3	99.0	98.3	0.30	87.7	66.8	55.1	8.15
12	99.4	98.8	98.6	0.20	88.6	72.3	51.1	9.38
13	99.4	98.8	98.5	0.23	88.8	71.3	52.7	9.03
14	99.4	98.9	98.5	0.23	87.9	72.2	51.6	9.08
15	99.7	99	98.5	0.30	88.6	70	54	8.65
16	99.6	98.9	98.6	0.25	87.9	72.3	52.4	8.88
17	99.5	99	98.5	0.25	87.6	72	53.2	8.60

표 5

각 배합 제제의 점도

배합번호	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
점도(cP)	25.3	22.5	4.8	4.3	16.0	18.4	14.1	17.9	12.2	11.9	7.8	8.1	8.0	8.0

실시예 3: 계면활성제 선별 실험

액체 제제에 첨가되는 계면활성제는 항체와 같은 단백질이 보관 과정에서 공기/용액의 계면이 유도하는 응력, 용액/계면이 유도하는 응력의 영향을 받지 않도록 함으로써 항체의 응집 또는 사용 제제 중 과립물의 형성을 최소화하기 위한 시약에 자주 사용되며, 이는 항체의 물리 화학 성질을 안정화하기에 유리하다. 20mM의 히스티딘 완충액(pH 6.0), 130mM의 아르기닌 하이드로클로라이드와 150mg/ml의 JS002가 함유된 제제에 각각 상이한 농도(0-0.5%)의 폴리소르베이트 20 또는 폴리소르베이트 80을 투입하고, 40℃에서 2주 동안 놓아둔 후 분석 검출하였다. 표 6과 같이, SEC-HPLC 모노머 함량과 CEX-HPLC 메인 피크 함량의 측정 결과는, 상이한 농도(0-0.5%)의 폴리소르베이트 20 또는 폴리소르베이트 80을 함유한 제제 중 항체 JS002의 열 안정성은 뚜렷한 차이가 없었으나, 단 모두 높은 안정성을 유지하는 것으로 나타났다.

표 6

계면활성제 선별

배합번호	계면활성제	SEC-HPLC(%) 모노머(%)	CEX-HPLC(%) 주 전하(%)
18	0.0% 폴리소르베이트 20	98.9	68.4
19	0.01% 폴리소르베이트 20	98.8	68.3
20	0.02% 폴리소르베이트 20	98.8	68.4
21	0.05% 폴리소르베이트 20	98.9	68.7
22	0.1% 폴리소르베이트 20	98.8	68.9
23	0.0% 폴리소르베이트80	98.8	68.6
24	0.01% 폴리소르베이트 80	98.8	68.4
25	0.02% 폴리소르베이트 80	98.6	67.8
26	0.05% 폴리소르베이트80	98.6	67.1

27	0.1% 폴리소르베이트80	98.9	68.4
----	----------------	------	------

[0097] 실시예 4: 제제의 장기 안정성 연구

[0098] 치료성 항체를 함유한 액체 약물 제품은 통상적으로 2-8℃의 조건에서 보관해야 하기 때문에, 제제를 장기간 보관하는 과정에서 높은 안정성을 유지할 수 있는 것이 매우 중요하다. 상기 선별 결과에 따라, 4가지 배합을 설계하여 제제의 장기 안정성 연구를 진행하였다.

[0099] 표 7과 같은 4종의 배합 제제를 조제하여 각각 투명한 바이알에 담고, 2-8℃의 조건하에 수개월 동안 보존 후, 각 샘플에 대해 분석 시험을 실시하였다. 이하 파라미터를 통해 안정성을 평가하였다: (a) 외관 육안검출; (b) 포토레지스트법으로 불용성 미립자(OD405nm) 검출; (c) pH; (d) CE-SDS법으로 항체의 분자량 검출; (d) SEC-HPLC로 항체 모노머(품질표준: ≥97.0%), 응집체(품질 표준: ≤3.0%) 또는 프래그먼트의 함량(품질표준: ≤1.0%) 측정; (e) CEX-HPLC로 항체의 주요 전하(품질표준: ≥70.0%), 산성 전하(품질표준: ≤30.0%) 또는 알칼리성 전하 함량(품질표준: ≤15.0%) 측정; (f) ELISA법으로 항체 결합 활성(품질 표준: 참고 제품(reference product)의 70%-130%) 검출; 및 (g) 항체의 생물학적 활성(HepG2 세포의 LDL 섭취 실험, 품질표준: 참고 제품의 70%-130%). 표 8과 같이, 4종 제제의 배합은 2-8℃의 조건 하에, 1-12개월 동안 보존하는 과정에서 매우 양호한 안정성을 지닌다.

표 7

[0100] 제제의 장기 안정성 연구를 위한 제제 배합

배합번호	pH	배합 조성성분
28	5.5	20mM의 히스티딘 완충액, 160mM의 아르기닌 하이드로클로라이드, 0.02%의 폴리소르베이트 20; 150mg/ml의 JS002
29	6.0	20mM의 히스티딘 완충액, 160mM의 아르기닌 하이드로클로라이드, 0.02%의 폴리소르베이트 20; 150mg/ml의 JS002
30	6.0	20mM의 히스티딘 완충액, 120mM의 아르기닌 하이드로클로라이드, 60mM의 만니톨, 0.02%의 폴리소르베이트 20; 150mg/ml의 JS002
31	6.0	20mM의 히스티딘 완충액, 60mM의 아르기닌 하이드로클로라이드, 160mM의 만니톨, 0.02%의 폴리소르베이트 20; 150mg/ml JS002

표 8

[0101] 제제 배합의 장기 안정성 데이터

검사 항목	시간(개월)	제제 배합			
		28	29	30	31
분자 배제 고성능 액체크로마토그래피법-모노머(%)	0	99.7	99.7	99.7	99.7
	1	99.7	99.7	99.7	99.7
	2	99.8	99.8	99.7	99.7
	3	99.6	99.6	99.5	99.5
	6	99.5	99.5	99.5	99.5
	9	99.6	99.5	99.5	99.5
	12	99.6	99.6	99.6	99.6
분자 배제 고성능 액체크로마토그래피법-중합체(%)	0	0.3	0.3	0.3	0.3
	1	0.3	0.3	0.3	0.3
	2	0.2	0.2	0.3	0.3
	3	0.4	0.4	0.5	0.5
	6	0.5	0.5	0.5	0.5
	9	0.4	0.5	0.5	0.5
	12	0.4	0.4	0.4	0.4

분자 배제 고성능 액체크로마토그래피법-프래그먼트(%)	0	0.0	0.0	0.0	0.0
	1	0.0	0.0	0.0	0.0
	2	0.0	0.0	0.0	0.0
	3	0.0	0.0	0.0	0.0
	6	0.0	0.0	0.0	0.0
	9	0.0	0.0	0.0	0.0
	12	0.0	0.0	0.0	0.0
약한 양이온고성능액체크로마토그래피법-메인 피크(%)	0	88.4	84.9	87.1	85.2
	1	90.3	89.9	90.6	88.5
	2	84.5	85.3	84.4	86.7
	3	88.1	88.2	88.3	88.1
	6	88.5	88.6	88.7	88.2
	9	87.8	84.3	87.7	88.4
	12	89.0	88.3	87.6	87.6
약한 양이온고성능액체크로마토그래피법-산성 피크(%)	0	7.8	9.0	8.0	8.7
	1	6.5	6.9	6.4	8.0
	2	8.4	8.8	10.1	8.1
	3	7.8	8.2	8.0	8.2
	6	7.9	8.2	8.2	8.5
	9	9.2	9.9	9.8	8.3
	12	8.0	9.1	9.6	9.5
약한 양이온고성능액체크로마토그래피법-알칼리성 피크(%)	0	3.9	6.1	4.9	6.1
	1	3.2	3.2	3.1	3.5
	2	7.1	5.8	5.6	5.2
	3	4.1	3.6	3.7	3.7
	6	3.5	3.2	3.1	3.3
	9	3.0	5.8	2.5	3.3
	12	3.0	2.6	2.8	2.9
결합ELISA법(%)	0	99.0	104.3	108.8	101.7
	1	104.3	95.6	103.8	100.7
	2	130.2	88.2	108.0	105.1
	3	75.5	84.7	95.8	78.9
	6	99.6	98.8	102.0	94.4
	9	99.6	98.8	102.0	94.4
	12	98.6	94.4	106.8	83.4
생물학적 활성(HepG2세포의 LDL섭취 실험법)	0	119.6	101.7	114.1	122.4
	1	105.7	102.9	94.6	97.9
	2	110.9	97.3	96.8	83.5
	3	108.7	90.3	98.7	107.3
	6	105.6	84.9	92.3	108.0
	9	104.1	103.3	106.1	87.8
	12	108.7	97.7	97.2	102.4

[0102] 실시예 5: 고농도 항PCSK9 항체의 실온 보관 안정성

[0103] 치료성 항체를 함유한 액체 약물 제품은 통상적으로 보관 기한이 종료될 때까지 2-8℃에서 보관해야 한다. 따라서 환자는 약품 구매일로부터 사용 기간 내에 이를 냉장해야 할 필요가 있다. 제시되는 투약 방안에 따라, 약물을 자가 투여하는 경우 환자가 책임을 져야 하는 보관 기간이 길게는 몇 주에 이를 수 있다. 따라서, 냉장이 필요없는 조건하에 보관하는 약물은 가정용 위생제품에 있어서 환자의 편리성이 현저히 높아지고 부정확한 보관 상태에서 약물의 품질에 미치는 영향이 감소함으로써, 불만 제기 비율과 온도 편차의 감시가 감소한다는 것을 나타낸다.

[0104] 표 9와 같이, 본 발명이 공개하는 제제(배합 번호: 20)는 항단백질 분해에 대하여 더욱 높은 안정성을 지니며, 25℃에서 측정된 분해 동력학적 파라미터는 길게는 6개월에 이르는 상온 보관(ambient storage) 요구를 충족시킨다.

표 9

[0105] 제제의 가속 안정성 데이터 총정리(25±2℃)

검출 항목	검출 방법	품질표준	시간점(개월)	검출결과
순도	분자 배제 고성능액체크로마토그래피법 (SEC-HPLC 법)	모노머 함량 ≥97.0%	0	99.7%
			1	99.6%
			3	99.3%
			6	99.4%
		폴리머 함량 ≤3.0%	0	0.3%
			1	0.4%
			3	0.4%
			6	0.6%
		프래그먼트 함량 ≤1.0%	0	0.0%
			1	0.0%
			3	0.3%
			6	0.1%
	약한 양이온고성능액체크로마토그래피 법(CEX-HPLC법)	메인 피크 함량 ≥70.0%	0	90.1%
			1	83.9%
			3	74.7%
			6	64.6%
		산성 피크 함량 ≤30.0%	0	7.4%
			1	12.2%
			3	22.4%
			6	32.8%
		알칼리성 피크 함 량 ≤15.0%	0	2.5%
			1	3.9%
			3	2.9%
			6	2.6%
환원CE-SDS전기영동법	중쇄, 비당화 중쇄 와 경쇄 함량의 합 ≥95.0%	0	99.9%	
		1	99.8%	
		3	99.5%	
		6	98.9%	
비환원CE-SDS전기영동법	메인 피크 함량 ≥90.0%	0	97.9%	
		1	96.9%	
		3	97.9%	
		6	97.3%	
항체가 (titer)	종합활성(결합ELISA법)	참고 제품의 70% ~130%이어야 한다	0	111.0%
			1	95.0%
			3	88.6%
			6	80.2%
	생물학적 활성(HepG2세포의 LDL섭취 실험법)	참고 제품의 70% ~130%이어야 한다	0	104.0%
			1	94.2%
			3	92.6 %
			6	81.1%

[0106] 실시예 6: ForteBio 친화력 측정(생물학적 공간섭법)

[0107] ForteBio 친화력 측정은 종래의 방법에 따라 실시하였다. 간단히 말하면, 4mg의 JS002(배합번호: 29)와 Evolocumab(140mg/ml/펜, AMGEN으로부터 구입, 로트번호: 1063135)을 취하여, 각각 10KD의 초여과관 (ultrafiltration tube)에서 인산염 완충액으로 100배의 액체 교환을 실시하고, 액체 교환 후 280nm의 흡수값으로 단백질 함량을 측정하여, 농도를 2mg/mL로 조정하였다. 비오틴을 취하고, 실온으로 평형을 맞추어, 2mg의 Sulfo-NHS-Biotin을 취하여 300 µL의 초순수에 투입한 것이 즉 10mM의 비오틴 모액이다. 2mg/mL의 JS002와 Evolocumab 각 1mL를 취하여 새로운 EP관에 담고, 단백질:비오틴=1:6의 비율로 8 µL의 비오틴 모액을 투입하였다. 고르게 혼합하고, 실온에서 1-2h 동안 반응시켰다. 비오틴 반응이 종료된 후, 10KD 초여과관에서 인산염 완충액으로 100배의 액체 교환을 실시하고, 액체 교환 후 280nm의 흡수값으로 단백질 함량을 측정하여, 농도를 1-2mg/mL 범위 내로 조정하였다. 비오틴화된 단백질을 각 시험관마다 0.1mL씩 나누어 담고, -80℃에서 보관하되, 동결 및 해동은 1회를 넘지 않는다. 각각 비오틴화된 후의 JS002와 Evolocumab 항체(5µg/mL)를 스트랩타비딘

(SA) 바이오프로브에 연결하고, 실험 완충액(0.1% BSA, 0.02% Tween-20 및 1xPBS)으로 300s 동안 평형을 맞춘 다음, 각각 JS002 플레이트와 Evolocumab 플레이트에 순차적으로 상이한 농도로 희석된 PCSK9를 주입하고, 300s 동안 결합하였으며, 해리 시간은 1800s이다. 공식 $=k_{off}/k_{on}$ 에 따라 친화력 상수를 계산하였다.

[0108] 실험 결과는 표 10에 나타난 바와 같다. Fortebio 결과에 따르면, JS002의 PCSK9과의 결합 친화력은 동일 표적 약물인 Evolocumab보다 현저히 우수한 것으로 나타났다.

표 10

[0109] Fortebio를 통한 JS002와 Repatha의 인간 PCSK9에 대한 친화력 비교

	KD (M)	kon (1/Ms)	kdis (1/s)
JS002	2.15^{-11}	6.02E+04	1.30E-06
Evolocumab	6.51^{-10}	4.92E+04	3.21E-05

[0110] 실시예 7: JS002 세포의 생물학적 활성 연구(HepG2 세포의 LDL 섭취법)

[0111] 본 실험은 세포 수준으로부터 JS002(배합 번호: 29)의 인간 PCSK9-D347Y에 노출된 HepG2 세포의 LDL 섭취 상황을 평가하고, 이미 출시된 동일 표적 약물 Evolocumab(140mg/ml/펜, AMGEN으로부터 구입, 로트번호: 1063135)과 비교하였다. 간단히 말해, 인간 간암세포계(HepG2) 세포(ATCC, 로트번호: 62591368)는 2.0×10^4 개/웰(well)의 밀도로 플레이팅(각 웰당 80 μ L)하고, 37°C에서 7%의 CO2로 하룻밤 동안 배양하였다. JS002 항체 및 Evolocumab을 각각 농도 기울기 희석을 실시하여(시작 농도는 20 μ g/mL, 2배 농도의 기울기로 희석), 10 μ L의 항체 희석액을 HepG2 세포에 투입하고, 30분 동안 배양(incubation)과 동시에, 항원을 1 μ g/mL로 희석하고, 10 μ L의 항체 희석액을 HepG2 세포에 투입하여, 항원 항체 및 세포를 4-6h 동안 공동 배양하였다. 형광 표기된 LDL(3 μ g/mL)을 투입하고, 세포와 함께 16-18h 동안 배양한 후, 마이크로플레이트 리더를 통해 세포 내 섭취된 형광량을 검출하였다.

[0112] 실험 결과는 도 1과 같으며, 결과는 JS002가 세포 표면의 인간 PCSK9-D347Y와 결합하여, 이와 LDLR의 결합을 억제하고, LDLR의 LDL에 대한 결합과 섭취를 증가시킬 수 있는 것으로 나타났다. 또한, JS002(EC50=92.68ng/mL)는 LDL가 세포내에 도입되는 내포작용(endocytosis)을 촉진시키는 효과가 Evolocumab(EC50=151.1ng/mL)보다 뚜렷하게 우수하였다.

[0113] 실시예 8: 고지혈증 레서스 원숭이(rhesus monkey)에 대한 JS002 지질 강하(lipid-lowering) 효과에 관한 연구

[0114] 이번 실험에서는 19마리의 고지혈증 레서스 원숭이(LDL ≥ 1.3 mmol/L)를 선별하여, 아토르바스타틴 칼슘군(atorvastatin calcium)(1-4주째에 1.2mg/kg을 투여하고, 5-8주째에 2.4mg/kg을 투여, 4마리), JS002 고용량군(12mg/kg, 5마리), JS002 저용량군(4mg/kg, 5마리) 및 플라시보군(5마리), 이렇게 총 4군으로 나누었다. 아토르바스타틴 칼슘군은 경구 투여로 56일 동안 연속 투여하고, 휴약기(washout period)는 21일이며; JS002 고용량군과 JS002 저용량군은 4주에 1대씩 주사로 2회 투여하고, 78일 동안 연속 관찰하였고; 투여기와 휴약기에 주요 치료효과 분석지표(LDL-C, TC, HDL-C, ApoA1, ApoB와 TG), 부차적 치료효과 지표(체중), 및 안전성 지표(혈액의 생화학, 혈액 일반검사 지표와 임상적 관찰)의 변화를 관찰하고, 상기 지표를 종합하여 JS002(배합 번호: 20)의 고지혈증 레서스 원숭이에 대한 지질 강하 효과를 분석 평가하였다.

[0115] 실험 결과는 도 2와 같다. 이번 실험 중 플라시보군의 혈액지질 수준은 안정적이고, 양성 대조군인 아토르바스타틴 칼슘군의 약효 결과는 임상 문헌 보고와 유사하였으며, 실험 체계가 안정적이고 신뢰할 수 있다는 것이 증명되었다.

[0116] 본 실험 체계하에, 테스트 샘플인 JS002 고용량군 12mg/kg(임상적으로 계획된 사용 용량 420mg/70kg사람에 해당하며, 4주마다 1대씩 주사, 2회 피하주사 함)은 고지혈증 레서스 원숭이의 LDL-C에 대해 매우 현저한 강하 작용이 있으며, 기준선과 비교하여 LDL-C는 투약 후 D2-D71 강하 수준을 40%-70%로 유지할 수 있고; JS002 저용량군인 4mg/kg(임상적으로 계획된 사용 용량 140mg/70kg사람에 해당하며, 4주마다 1대씩 주사, 2회 피하주사 함)는 기준선과 비교하여 LDL-C는 투약 후 D2-D57 강하 수준을 20%-70%로 유지할 수 있으며, D57-D78은 약효 작용이 현저히 약해지고 반등하였다. JS002 고용량군의 작용 강도와 지속 시간은 모두 JS002 저용량군보다 우수하였다(도 2). 전체적인 투여 기간에 TG, FPG, ApoA1과 HDL-C는 뚜렷한 변화가 보이지 않았으며; 각 항의 안전성 지표는 투여와 관련된 변화가 보이지 않았다.

[0117] 실시예 9: 사이노몰거스 원숭이(cynomolgus monkey)에 대한 약물동역학 연구

[0118] 건강한 사이노몰거스 원숭이에게 1회 또는 다수회 상이한 용량의 JS002(배합 번호: 20)를 투여한 후의 약물동역학 성질을 시험 관찰하였다. 사이노몰거스 원숭이 실험군 구분과 투여 상황은 표 11과 같다. 여기서, A, B, C, D군은 1회 투여군으로, 투여 용량은 각각 2mg/kg, 10mg/kg, 50mg/kg과 10mg/kg이며, 여기서 A, B와 C군의 투여 방식은 피하주사이고, D군의 투여 방식은 정맥주사이다. E군은 연속 투여군으로, 투여 용량은 10mg/kg이며, 매주 1회씩 투여하여 연속으로 4회 투여하였다.

표 11

동물 군과 투약 상황

군별	피시험제품	투여방식 (빈도)	용량(mg/kg)	실험개체수
A	JS002	sc (1)	2	총 8마리, 암수 반반
B	JS002	sc (1)	10	총 8마리, 암수 반반
C	JS002	sc (1)	50	총 8마리, 암수 반반
D	JS002	iv (1)	10	총 8마리, 암수 반반
E	JS002	sc (QW X 4W)	10	총 8마리, 암수 반반

[0120] 주석:

[0121] 1. sc: 피하주사

[0122] 2. iv: 정맥주사.

[0123] 3. QW: 매주 1회.

[0124] 샘플링 후 혈청 샘플을 제조하여, 방법론으로 검증된 효소 결합 면역 흡착측정(enzyme-linked immunosorbent assay)을 실시하였으며, 결과는 표 12와 같다.

표 12

사이노몰거스 원숭이의 약물동역학 파라미터(평균값±표준편차)

파라미터(단위)	A	B	C	D	E
C ₀ (μg/mL)	NA	NA	NA	267.95±87.77	NA
t _{1/2} (hr)	56.15±19.00	74.36±14.28	69.31±26.07	65.86±20.75	85.89±16.01
T _{max} (hr)	24.00±15.71	31.50±22.16	27.75±13.96	0.427±0.663	540.75±39.34
C _{max} (μg/mL)	15.44±1.99	107.84±31.41	436.50±196.90	266.43±75.02	203.11±84.48
AUC _(0-t) (hr · μg/mL)	1897.13 ±452.31	19087.95 ±7429.11	91249.59 ±26754.11	21411.41 ±4595.14	43699.30 ±20948.48
Vd (mL/kg)	86.08±24.49	62.61±23.99	54.97±18.13	44.44±12.06	77.89±76.91
CL (mL/hr/kg)	1.11±0.269	0.603±0.243	0.592±0.186	0.486±0.103	0.732±0.962
F	NA	NA	NA	89.15%	NA

[0126] 주석: NA는 미검출을 나타낸다.

[0127] 결과에 따르면, 사이노몰거스 원숭이에게 상이한 용량(2, 10, 50mg/kg)의 피시험 약물 JS002를 1회 피하주사한 후, 혈청 약물 노출 수준이 용량이 증가함에 따라 증가하였고, 비선형성 약물동역학 특징을 나타내었다. JS002의 소실상(elimination phase) 반감기 t_{1/2}는 56-74h이며, 336h 내의 유효 반감기는 50-139h이다.

[0128] 사이노몰거스 원숭이에게 10mg/kg의 피시험 약물 JS002를 1회 피하주사한 후의 생체이용도(bioavailability)는 89.15%이다.

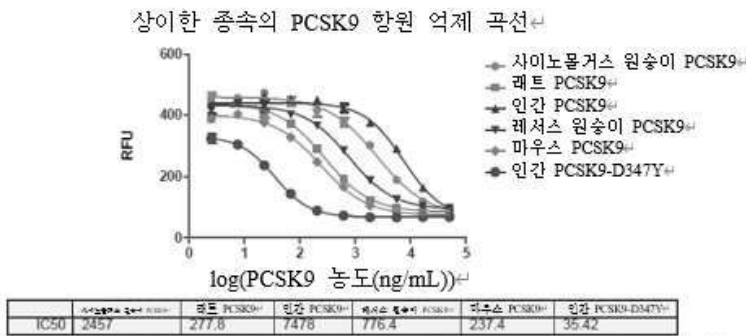
[0129] 사이노몰거스 원숭이에게 10mg/kg(매주 1회, 연속 4회)의 JS002를 피하주사한 후, 약물의 체내 노출량이 동일한 용량의 1회 투여군보다 현저히 높았으며, 약물이 체내에 뚜렷하게 축적되었다.

[0130] 실시예 10: 사이노몰거스 원숭이의 면역 독성과 면역 원성 연구

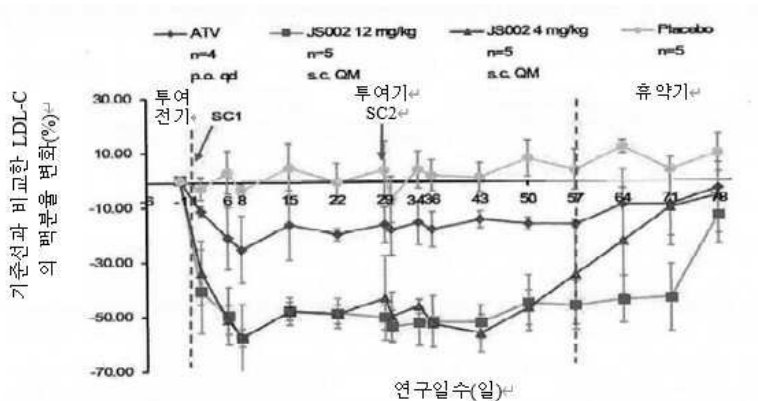
[0131] 본 시험은 사이노몰거스 원숭이에게 피시험 약물 JS002(배합번호: 20)를 피하주사로 4주간 반복 투여한 후 수반되는 약물 독성 시험에 대해 고찰하였다. CFDA의 GLP 규범 요구에 따라, 재조합 인간화 항PCSK9 단일클론 항체 주사액에 발생할 수 있는 면역 독성과 면역 원성을 평가하였다. 본 실험은 각각 부형제 대조군(0mg/kg), 저용량군(30mg/kg), 중간 용량군(100mg/kg)과 고용량군(300mg/kg)인 4개의 용량군을 설정하였으며, 각 군당 10마리로, 암수 반반씩이다. 매주 1회 투여하여, 4주간 연속 투여하였으며, 회복기는 4주이다. 연구 용량 범위 내에서, 사이노몰거스 원숭이에게 부형제와 상이한 용량(30, 100, 300mg/kg)의 피시험 약물 JS002를 피하주사로 투여한 후, 모든 개체의 각기 다른 시점의 혈액 샘플에서 모두 항약물 항체가 검출되지 않았고, 각 군의 샘플의 양성률과 개체 양성률은 모두 0.0%이었다. 결과는 상이한 용량(30, 100, 300mg/kg)의 피시험 약물 JS002를 여러 차례 피하주사로 투여한 후, 사이노몰거스 원숭이 체내의 면역 원성이 낮은 것으로 나타났다. 각 군의 동물의 신장 조직에 대해 면역 복합물 검출을 실시한 결과, 모두 면역 복합물의 침강(immunoprecipitation) 현상이 발견되지 않았다. 기타 면역 관련 지표는 각 군의 동물의 백혈구 세포의 절대계수(Absolute count) 및 감별계수(differential count), 면역글로불린 수준 및 AIG 비교값, 림프기관/조직의 거시 해부 관찰(gross anatomical observation), 흉선, 비장 장기 중량/계수 등에서 모두 투여와 관련된 비정상적인 변화가 발견되지 않았고, 림프 세포 아형(subset) 분포에서도 투여와 관련된 규칙적인 변화가 발견되지 않았다. 아울러, 병리조직학 검사에서도 정상으로 나타났다.

도면

도면1



도면2



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> SHANGHAI JUNSHI BIOSCIENCES CO., LTD.

SUZHOU JUNMENG BIOSCIENCES CO., LTD.

<120> STABLE FORMULATION CONTAINING ANTI-PCSK9 ANTIBODY

<130> 198719PCWO

<150> CN 201811283440.7

<151> 2019-10-31

<160> 10

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR1

<400> 1

Ser Tyr Gly Ile His

1 5

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR2

<400>

2

Val Ile Trp Arg Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Asn Ala Pro Phe Met Ser

1 5 10 15

<210> 3

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HCDR3

<400> 3

His Arg Asp

1

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR1

<400> 4

Gln Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr Ile Asp

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR2

<400> 5

Tyr Ala Ser Thr Leu Gln Pro

1 5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR3

<400> 6

Leu Gln Tyr Asp Asp Leu Trp Thr

1 5

<210> 7

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain variable region

<400> 7

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Ile His Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Asn Ala Pro Phe Met
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Phe
 65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Asn His Arg Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 8

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain variable region

<400> 8

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr
 20 25 30

Ile Asp Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

His Tyr Ala Ser Thr Leu Gln Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Leu Trp Thr
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 9

<211> 438

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy Chain

<400> 9

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Ile His Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Ile Thr Asp Tyr Asn Ala Pro Phe Met
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Phe
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Asn His Arg Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 100 105 110
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser
 115 120 125
 Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 130 135 140
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 145 150 155 160
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 165 170 175
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr
 180 185 190
 Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg
 195 200 205
 Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 210 215 220
 Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

225 230 235 240
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 245 250 255
 Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 260 265 270
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 275 280 285
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp

 290 295 300
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 305 310 315 320
 Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 325 330 335
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
 340 345 350
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

 355 360 365
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 370 375 380
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
 385 390 395 400
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
 405 410 415
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu

 420 425 430
 Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435
 <210> 10
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Light chain

<400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr
 20 25 30
 Ile Asp Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 His Tyr Ala Ser Thr Leu Gln Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Leu Trp Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210