



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111110841 A

(43)申请公布日 2020.05.08

(21)申请号 201811283440.7

(22)申请日 2018.10.31

(71)申请人 上海君实生物医药科技股份有限公司

地址 201203 上海市浦东新区中国(上海)
自由贸易试验区蔡伦路781号6楼602
室

申请人 苏州君盟生物医药科技有限公司

(72)发明人 刘洪川 刘沛想 丁申皓 吴纯
冯辉 武海

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

A61P 3/06(2006.01)

权利要求书2页 说明书18页
序列表5页 附图1页

(54)发明名称

含有抗PCSK9抗体的稳定制剂

(57)摘要

本发明提供一种含高浓度的抗PCSK9(人类前蛋白转化酶枯草溶菌素9)抗体的液体制剂,该制剂还包含一种缓冲液、一种稳定剂和一种表面活性剂。本发明提供的液体配制剂具有低粘度,并且配制剂在储存数月之后,抗体具有高稳定性。

1. 一种稳定的抗体制剂, 包含:
 - (a) 一种缓冲液;
 - (b) 一种稳定剂; 和
 - (c) 一种特异性结合人PCSK9的抗体或抗原结合片段, 其中所述的抗体或抗原结合片段包含HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3, 其中:
 - HCDR1具有氨基酸序列SEQ ID NO:1;
 - HCDR2具有氨基酸序列SEQ ID NO:2;
 - HCDR3具有氨基酸序列SEQ ID NO:3;
 - LCDR1具有氨基酸序列SEQ ID NO:4;
 - LCDR2具有氨基酸序列SEQ ID NO:5; 和
 - LCDR3具有氨基酸序列SEQ ID NO:6; 并且该制剂的pH为5.5~6.5。
2. 如权利要求1所述的抗体制剂, 其特征为所述的配制缓冲液为组氨酸缓冲液。
3. 如权利要求1所述的抗体制剂, 其特征为所述的配制缓冲液是由L-组氨酸和L-组氨酸单盐酸盐制成的组氨酸缓冲液。
4. 如权利要求1所述的抗体制剂, 其特征为所述的配制缓冲液是浓度约20mM组氨酸缓冲液。
5. 如权利要求1所述的抗体制剂, 其特征为所述的稳定剂为精氨酸、山梨醇、甘露醇或蔗糖。
6. 如权利要求1所述的抗体制剂, 其特征为所述的稳定剂是浓度约50mM至约200mM的精氨酸。
7. 如权利要求1所述的抗体制剂, 其特征为还可包含浓度约0.01%至约0.05%聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80。
8. 如权利要求1所述的抗体制剂, 其特征为包含:
 - (a) 约20nM的组氨酸缓冲液;
 - (b) 约100mM至200mM的精氨酸;
 - (c) 约0.02%聚山梨醇酯20; 和
 - (d) 约100mg/mL至约200mg/mL的特异性结合人PCSK9的抗体或抗原结合片段, 所述的抗体或其抗原结合片段包含HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3, 其中:
 - HCDR1具有氨基酸序列SEQ ID NO:1;
 - HCDR2具有氨基酸序列SEQ ID NO:2;
 - HCDR3具有氨基酸序列SEQ ID NO:3;
 - LCDR1具有氨基酸序列SEQ ID NO:4;
 - LCDR2具有氨基酸序列SEQ ID NO:5; 和
 - LCDR3具有氨基酸序列SEQ ID NO:6。
9. 如权利要求1所述的抗体制剂, 其特征为所述的抗体或抗原结合片段包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL), 其中VH的具有氨基酸序列为SEQ ID NO:7; 和VL具有氨基酸序列SEQ ID NO:8。
10. 如权利要求1所述的抗体制剂, 其特征为其中所述的抗体或抗原结合片段包含重链(HC)和轻链(LC), 其中HC的具有氨基酸序列为SEQ ID NO:9; 和LC具有氨基酸序列SEQ ID

NO:10。

11. 一种递送装置,其包含根据权利要求1-10中任一项的抗体制剂。

12. 一种预填装注射器,其包含根据权利要求1-10中任一项的抗体制剂。

13. 权利要求1-10中任一项所述的抗体制剂或权利要求11所述的递送装置,或权利要求12所述的预填装注射器用于治疗、预防或改善任何与PCSK9活性相关的疾病的方法。

含有抗PCSK9抗体的稳定制剂

技术领域

[0001] 本发明涉及治疗性抗体制剂领域。尤其是,本发明涉及医药制剂领域,该制剂含有一种与人类前蛋白转化酶枯草溶菌素9 (PCSK9) 特异性结合的人源化抗体。

背景技术

[0002] 前蛋白转化酶枯草溶菌素9 (PCSK9) 是一种前蛋白转化酶,具有促进肝脏细胞表面低密度脂蛋白 (LDL) 受体的降解从而增加血浆中LDL胆固醇含量,其表达升高与人类血脂异常及心血管相关疾病密切相关。公开号为W02017088782 的专利中公开了多种抗PCSK9抗体能通过拮抗PCSK9生物活性而显著降低血液中LDL浓度,在治疗高胆固醇血症等相关疾病领域中具有重要的前景。与任何蛋白质治疗剂一样,治疗性的抗PCSK9抗体在制造或储存过程中会受到物理和化学不稳定性诸如聚集、变性、交联、脱酰胺化、异构化、氧化和剪切的影响 (Wang et al., J.Pharm.Sci. 96:1-26, 2007 (Wang等人,《制药科学杂志》,第96卷第1-26页,2007年))。因此,开发一种能保持抗体理化性质稳定的抗体制剂具有非常大的挑战。

[0003] 高胆固醇血症等相关疾病一般是一种慢性疾病,提供患者院外或可自我施用给药的便利非常重要。蛋白治疗剂一般只能通过胃肠外途径给药,其中皮下注射 (SC) 或肌内注射 (IM) 给药途径可降低治疗成本并改善给药期间患者和医疗保健提供者的便利性。而SC或IM注射剂所需的小体积 (通常为0.5至2mL) 提出了另外的制剂挑战,因为给药需要通常在100mg至1g蛋白质/剂之间的高浓度抗体制剂,以实现治疗水平。而高度浓缩的蛋白质制剂通常会增加蛋白质聚集、沉淀并增加粘度,从而造成加工、制造和储存期间产生负面后果,其中粘度增加还可能对制剂的施用具有负面影响,例如感觉疼痛和灼热症状和药物递送装置选项方面的限制 (Shire et al., J.Pharm.Sci. 93:1390-1402, 2004 (Shire等人,《制药科学杂志》,第93卷第1390-1402页,2004年))。

[0004] 因此,本领域存在着对于在特别是提供低粘度并且减轻患者疼痛的高浓度蛋白质制剂的需求。

发明内容

[0005] 本发明通过提供含有与人类前蛋白转化酶枯草溶菌素9 (PCSK9) 特异性结合的人源抗体的医药制剂。

[0006] 一方面,本发明提供了一种稳定的抗体制剂,包含:(1) 一种缓冲液;(2) 一种稳定调节剂;(3) 一种抗PCSK9抗体或抗原结合片段。作为一种优选方式,所述的稳定的抗体制剂还可以包含一种非离子型表面活性剂。

[0007] 在一个实施方式中,其中所述的缓冲液为组氨酸缓冲液。在一个实施方式中,该组氨酸缓冲液是由L-组氨酸和L-组氨酸单盐酸盐制成。在一个实施方式中,该组氨酸缓冲液的浓度约20nM。

[0008] 在一个实施方式中,其中所述的稳定调节剂包含选自精氨酸、山梨醇、甘露醇或蔗糖中的一种或以上。在一个实施方式中,其中所述的稳定调节剂仅为精氨酸。在一个实施方

式中,精氨酸的浓度约50mM至约200mM。在一些具体的实施方式中,精氨酸的浓度约60mM、130mM、160mM或165mM。

[0009] 在一个实施方式中,其中所述的抗体或抗原结合片段包含HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中:HCDR1具有氨基酸序列SEQ ID NO: 1;HCDR2具有氨基酸序列SEQ ID NO:2;HCDR3具有氨基酸序列SEQ ID NO: 3;LCDR1具有氨基酸序列SEQ ID NO:4;LCDR2具有氨基酸序列SEQ ID NO: 5;并且LCDR3具有氨基酸序列SEQ ID NO:6。在一个具体的实施方式中,其中所述的抗体或抗原结合片段包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH的具有氨基酸序列为SEQ ID NO:7;和VL具有氨基酸序列SEQ ID NO:8。在一个具体的实施方式中,其中所述的抗体或抗原结合片段包含重链(HC)和轻链(LC),其中HC的具有氨基酸序列为SEQ ID NO:9;和LC具有氨基酸序列SEQ ID NO:10。在一个实施方式中,其中所述的抗体或抗原结合片段浓度约100mg/mL至约200mg/mL。在一个具体的实施方式中,其中所述的抗体或抗原结合片段浓度约150mg/mL。

[0010] 在一个实施方式中,本发明提供的抗体制剂包含浓度约0.01%至约0.05%聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80。在一个具体的实施方式中,本发明提供的抗体制剂包含浓度约0.02%聚山梨醇酯20。

[0011] 在一个实施方式中,本发明提供的抗体制剂包含:(1)约20nM的组氨酸缓冲液;(2)约50mM至约200mM的精氨酸稳定调节剂;(3)约100mg/mL至约200mg/mL的抗PCSK9抗体或抗原结合片段;以及(4)约0.02%聚山梨醇酯20;其中所述的抗体或抗原结合片段包含HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中:HCDR1具有氨基酸序列SEQ ID NO:1;HCDR2具有氨基酸序列SEQ ID NO:2;HCDR3具有氨基酸序列SEQ ID NO:3;LCDR1具有氨基酸序列SEQ ID NO:4;LCDR2具有氨基酸序列SEQ ID NO:5;并且LCDR3具有氨基酸序列SEQ ID NO:6。

[0012] 在一个实施方式中,本发明提供的抗体制剂于40℃储存28天后具有至少94%抗体的具有天然构象。

[0013] 在一个实施方式中,本发明提供的抗体制剂于40℃储存28天后具有至少45%抗体的具有主要带电变体。

[0014] 在一个实施方式中,本发明提供的抗体制剂于2-8℃储存12个月后具有至少98%抗体的具有天然构象。

[0015] 在一个实施方式中,本发明提供的抗体制剂于2-8℃储存12个月后具有至少87%抗体的具有主要带电变体。

[0016] 在一方面,本发明提供一种递送装置,其包含本发明提供的任何一种抗体制剂。

[0017] 在一方面,本发明提供一种预填充注射器,其包含本发明提供的任何一种抗体制剂。

[0018] 在一方面,本发明提供一种包含本发明提供的任何一种抗体制剂的递送装置,或预填充注射器用于治疗、预防或改善任何与PCSK9活性相关的疾病或失调的方法。

附图说明

[0019] 图1含有JS002的制剂抑制细胞对LDL的结合与摄取。

[0020] 发明详述

[0021] 本发明的特点在于包含抗PCSK9抗体或其抗原结合部分的稳定的水性液体药物制

剂,其与本技术领域公认的制剂相比具有改进的性质。本发明提供的高浓度制剂具有出人意料的特征,即具有高稳定性和低粘度。

[0022] 应理解本发明不限于具体的方法、试剂、化合物、组合物或生物系统,当然可以对以上进行变化。还应理解本申请所用术语仅为了描述具体的实施方式,并不旨在进行限制。除非该内容被另外明确说明,否则本说明书以及所附权利要求中所用的单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数指代。因此,例如,提及“一种多肽”包括了两种或更多种多肽等的组合。

[0023] 本申请所用的“约”在指代可测量数值(如量、持续时间等)时意在涵盖相对于具体数值 $\pm 20\%$ 或 $\pm 10\%$ 的变化,包括 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 和 $\pm 0.1\%$,因为这些变化适于进行所公开的方法。

[0024] 除非另外定义,本申请所用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。尽管与本申请公开相似或相同的任何方法和材料都可用于测试本发明的实践中,但本申请描述了优选的材料和方法。在描述并要求本发明的权利时,将使用以下术语。

[0025] “治疗活性抗体”或“治疗性抗体”是指可用于治疗目的,即用于治疗受试者中的障碍的抗体。应该指出,尽管治疗性蛋白质可用于治疗目的,但本发明不限于这样的用途,因为所述蛋白质也可以用于体外研究。

[0026] 术语“药物制剂”或“制剂”是一种制品,其采用的形式使得活性成分的生物活性有效,并且不含对该制剂所施用的受试者具有不可接受的毒性的其它成分。该制剂为无菌的。

[0027] 术语“液体制剂”是指处于液体状态下的制剂,且不意图指称重悬浮的冻干制剂。本发明的液体制剂在储存时稳定,并且其稳定性不依赖于冻干(或其他状态改变方法,例如喷雾干燥)。

[0028] 术语“水性液体制剂”是指使用水作为溶剂的液体制剂。在一种实施方式中,水性液体制剂是不需冻干、喷雾干燥和/或冷冻来维持稳定性(例如化学和/或物理稳定性和/或生物活性)的制剂。

[0029] 术语“赋形剂”是指可以向制剂添加以提供所需特性(例如稠度、提高的稳定性)和/或调节渗透压的试剂。常用赋形剂的实例包括但不限于糖类、多元醇、氨基酸、表面活性剂和聚合物。

[0030] 本文中,术语“提供约5.5至约6.5的pH的缓冲剂”是指这样的试剂,通过其酸/碱共轭组分的作用使得包含该试剂的溶液能抵抗pH变化。本发明的制剂中使用的缓冲液可具有约5.5至约6.5范围内的pH、或约5.5至约6.0范围内的pH。在一个实施方式中,pH为约6.0。

[0031] 在本文中,将pH控制在范围内的“缓冲剂”实例包括乙酸盐(例如乙酸钠)、琥珀酸盐(例如琥珀酸钠)、葡萄糖酸、组氨酸、甲硫氨酸、柠檬酸盐、磷酸盐、柠檬酸盐/磷酸盐、咪唑、其组合和其他有机酸缓冲剂。在一种实施方式中,缓冲剂不是蛋白质。在一个实施方式中,该缓冲剂为组氨酸。在实施方式中,缓冲剂的浓度为约5mM、10mM、15mM、20mM、25mM、30mM、35mM、40mM、45mM、50mM、55mM、60mM、65mM、70mM、75mM、80mM、85mM、90mM、95mM或100mM。在一个实施方式中,缓冲剂浓度为约20mM。

[0032] “组氨酸缓冲剂”为包含组氨酸氨基酸的缓冲剂。组氨酸缓冲剂的实例包括组氨酸盐酸盐、组氨酸乙酸盐、组氨酸磷酸盐、组氨酸硫酸盐。在一个实施方式中,组氨酸制剂为:

由1-10mM的L-组氨酸、10-20mM的L-组氨酸单盐酸盐制成的组氨酸缓冲剂。在一个实施方式中,组氨酸制剂为:由4.5mM的L-组氨酸、15.5mM的L-组氨酸单盐酸盐制成的pH为6.0的组氨酸缓冲剂。在一个实施方式中,组氨酸制剂为:由9.5mM的L-组氨酸、10.5mM的L-组氨酸单盐酸盐制成的pH为5.5的组氨酸缓冲剂。

[0033] 当在本文中使用时,术语“表面活性剂”一般包括保护蛋白质例如抗体免受空气/溶液界面诱导的应力、溶液/表面诱导的应力的影响以减少抗体的聚集或使制剂中颗粒物的形成最小化的试剂。示例性的表面活性剂包括但不限于非离子型表面活性剂例如聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯(如聚山梨醇酯20和聚山梨醇酯80)、聚乙烯-聚丙烯共聚物、聚乙烯-聚丙烯二醇、聚氧乙烯-硬脂酸酯、聚氧乙烯烷基醚、例如聚氧乙烯单月桂基醚、烷基苯基聚氧乙烯醚(Triton-X)、聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物(泊洛沙姆,Pluronic)、十二烷基硫酸钠(SDS)。在一个实施方式中,该非离子型表面活性剂为聚山梨醇酯20。在一个实施方式中,聚山梨醇酯20的浓度为约0至0.1% (w/v)。在一个实施方式中,聚山梨醇酯20的浓度为约0.02% (w/v)。

[0034] 当在本文中使用时,术语“稳定剂”可降低抗体及其他蛋白质聚集。示例性的稳定剂包括但不限于:人血清白蛋白(hsa)、牛血清白蛋白(bsa)、 α -酪蛋白、球蛋白、 α -乳白蛋白、LDH、溶菌酶、肌红蛋白、卵清蛋白和RNAaseA。稳定剂还包括氨基酸和它们的代谢产物,如:精氨酸、甘氨酸、丙氨酸(α -丙氨酸、 β -丙氨酸)、甜菜碱、亮氨酸、赖氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、脯氨酸、4-羟基脯氨酸、肌氨酸、 γ -氨基丁酸(GABA)、奥品类(opines)(丙氨奥品、章鱼碱、甘氨奥品(strombine))和三甲胺的N-氧化物(TMAO)。在一个实施方式中,该稳定剂为氨基酸。在一个实施方式中,该氨基酸为精氨酸。在一个实施方式中,精氨酸浓度为约20至200mM。在一个实施方式中,精氨酸浓度为约50至200mM。在一个实施方式中,精氨酸的浓度约60mM、130mM、160mM或165mM。

[0035] 当在本文中使用时,术语“张度剂”包括盐(NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂等)可作为张度调节剂来控制渗透压,诸如蔗糖、甘露醇、山梨醇等可以充当张度调节剂。在一个实施方式中,该张度剂为甘露醇。在一个实施方式中,该张度剂为蔗糖。在另一个实施方式中,山梨醇。在一个实施方式中,制剂中不含任何一种张度剂。

[0036] 本文所用的术语“粘度”可以是“运动粘度”或“绝对粘度”。“运动粘度”是对流体在重力影响下所产生的抵抗性流动的一种测量指标。“绝对粘度”,有时称为动态粘度或简单粘度,是运动粘度与流体密度的乘积(绝对粘度=运动粘度 \times 密度)。运动粘度的量纲是L²/T,其中L是长度,T是时间。通常,运动粘度以厘沱(cSt)表示。运动粘度的国际单位制单位是mm²/s,即1cSt。绝对粘度以厘泊(cP)单位表示。绝对粘度的国际单位制单位是毫帕斯卡-秒(mPa-s),其中1cP= 1mPa-s。

[0037] 对于本发明之液体型制剂,本文所用的术语“低水平粘度”将表示低于约15 厘泊(cP)的绝对粘度。例如,如果当使用标准粘度测量技术测量时,该制剂展示的绝对粘度为约15cP、约14cP、约13cP、约12cP、约11cP、约10cP、约9cP、约8cP,或更低,则本发明之液体型制剂将被认为是具有“低粘度”。对于本发明之液体型制剂,本文所用的术语“中等水平粘度”将表示介于约35cP和约15cP 之间的绝对粘度。例如,如果当使用标准粘度测量技术测量时,该制剂展示的绝对粘度为约34cP、约33cP、约32cP、约31cP、约30cP、约29cP、约28cP、约27cP、约26cP、约25cP、约24cP、约23cP、约22cP、约21cP、约20cP、约19cP、18cP、约17cP、约

16cP,或约15.1cP,则本发明之液体型制剂将被认为是具有“中等粘度”。本发明之液体型医药制剂在某些实施方式中可展示低水平至中等水平的粘度。在一个实施方式中,本发明作出了惊人的发现,通过将浓度为约 100-200mM的抗体与60-165mM的精氨酸一起配制,可以获得含低粘度的液体型制剂。在一个实施方式中,还进一步发现,精氨酸可明显地降低含有其它张度剂如蔗糖、山梨醇、甘露醇等的制剂粘度。

[0038] “等渗”是指该制剂具有与人血液基本相同的渗透压。等渗制剂一般具有约 250至350mOsm的渗透压。可使用蒸汽压或冰点下降式的渗透压计测量等渗性。

[0039] “稳定的”制剂是其中的抗体在制造过程期间和/或储存时基本上保持其物理稳定性和/或化学稳定性和/或生物活性的制剂。即使所含的抗体在经过一定时间储存之后未能保持其100%的化学结构或生物功能,医药制剂也可以是稳定的。在某些情况下,在经过一定时间储存之后,能维持约90%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%的抗体结构或功能,也可被认为是“稳定的”。用于测量蛋白质稳定性的各种分析技术在本技术领域是可得的,并综述在《肽和蛋白质药物递送》(Peptide and Protein Drug Delivery) 247-301, Vincent Lee主编,Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991)), 和Jones, A. (1993) Adv. Drug Delivery Rev. 10:29-90中(二者引入作为参考)。

[0040] 制剂在一定温度下经过一定时间的储存之后,通过测定其中剩余的天然抗体的百分比(及其它方法),可以测量其稳定性。除其它方法外,天然抗体的百分比可以通过尺寸排阻色谱法(例如尺寸排阻高效液相色谱法[SE-HPLC])来测量,“天然的”指未聚集的和未降解的。在一些实施方式中,蛋白质的稳定性按照具有低百分比的降解(例如片段化)和/或聚集蛋白质的溶液中单体蛋白质的百分数来确定。在一种实施方式中,制剂可以在室温、约25-30℃或40℃下稳定储存至少 2周、至少28天、至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少4个月、至少 5个月、至少6个月、至少7个月、至少8个月、至少9个月、至少10个月、至少11个月、至少12个月、至少18个月、至少24个月,或更长,最多不超过约6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%,或0.1%聚集形式的抗体。

[0041] 通过测定在离子交换期间在比抗体主馏分(“主要荷电形式”)较为酸性的馏分中迁移的抗体(“酸性形式”)的百分比(及其它方法),可以测量稳定性,其中稳定性与酸性形式抗体的百分比成反比。除其它方法外,“酸化”抗体的百分比可以通过离子交换色谱法(例如阳离子交换高效液相色谱法[CEX-HPLC])来测量。在一个实施方式中,可接受程度的稳定性意为当制剂在一定温度下经过一定时间的储存之后,其中可检测出的酸性形式的抗体最多不超过约49%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或0.1%。在测量稳定性之前储存的一定时间可以是至少2周、至少28天、至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少4个月、至少5个月、至少6个月、至少7个月、至少8个月、至少9个月、至少10个月、至少11个月、至少12个月、至少18个月、至少24个月,或更长。当评估稳定性时,容许储存医药制剂的一定温度可以是约-80℃至约45℃范围内的任何温度,例如储存于约-80℃、约-30℃、约-20℃、约0℃、约2-8℃、约5℃、约25℃,或约40℃。

[0042] 如果抗体在颜色和/或澄清度目测检查时或通过UV光散射或通过孔径排阻层析测量时基本上不显示出例如聚集、沉淀和/或变性的迹象,则所述抗体在该药物制剂中“保持其物理稳定性”。聚集是单个分子或复合物共价或非共价缔合以形成聚集体的过程。聚集可以进行到形成可见沉淀物的程度。

[0043] 制剂的稳定性例如物理稳定性可以通过本技术领域中公知的方法来评估,包括测量样品的表观消光度(吸光度或光密度)。这样的消光测量与制剂的浊度相关。制剂的浊度部分是溶解在溶液中的蛋白质的固有性质,并且通常通过比浊法来测量,并用比浊法浊度单位(NTU)来量度。

[0044] 随着例如溶液中一种或多种组分的浓度(例如蛋白质和/或盐浓度)而变化的浊度水平也被称为制剂的“乳浊”或“乳浊外观”。浊度水平可以参照使用已知浊度的悬液产生的标准曲线来计算。用于测定药物组合物的浊度水平的参比标准品可以基于《欧洲药典》标准(《欧洲药典》(European Pharmacopoeia),第四版,“欧洲药品质量委员会指令”(Directorate for the Quality of Medicine of the Council of Europe)(EDQM),Strasbourg,France)。根据《欧洲药典》标准,澄清溶液被定义为浊度低于或等于按照《欧洲药典》标准具有约3的参比悬液的浊度的溶液。比浊法的浊度测量可以检测在不存在缔合或非理想效应的情况下的瑞利散射,其通常随浓度线性变化。用于评估物理稳定性的其他方法在本技术领域中公知。

[0045] 如果抗体在给定时间点的化学稳定性使得抗体被认为仍保持如下文中所定义的生物活性,则所述抗体在药物制剂中“保持其化学稳定性”。可以通过例如检测或定量抗体的化学改变的形式来评估化学稳定性。化学改变可以包括尺寸改变(例如剪短),其可以使用例如孔径排阻层析、SDS-PAGE和/或基质辅助的激光解吸电离/飞行时间质谱(MALDI/TOF MS)来评估。其他类型的化学改变包括电荷改变(例如作为脱酰胺或氧化的结果而发生),其可以通过例如离子交换层析来评估。

[0046] 如果药物制剂中的抗体对于其预期目的来说是生物活性的,则所述抗体在药物制剂中“保持其生物活性”。例如,如果制剂于例如5°C、25°C、45°C等温度下储存一定时间(例如1至12个月)之后,该制剂所含抗PCSK9抗体与PCSK9结合的亲和力为所述储存之前抗体结合亲和力的至少90%、95%或以上,则可认为本发明之制剂是稳定的。结合亲和力也可用例如ELISA或等离子共振技术测定。

[0047] 在本发明的情形中,在药理学意义上,抗体的“治疗有效量”或“有效量”是指在抗体可以有效治疗的障碍的症状的预防或治疗或减轻方面有效的量。

[0048] 术语“受试者”或“患者”意图包括哺乳动物生物体。受试者/患者的实例包括人类和非人类哺乳动物,例如非人类灵长动物、狗、奶牛、马、猪、绵羊、山羊、猫、小鼠、兔、大鼠和转基因非人类动物。在本发明的特定实施方式中,受试者是人类。

[0049] 抗PCSK9抗体

[0050] 本发明的医药制剂包含一种与人PCSK9特异性结合的抗体或抗原结合片段。本文所用的术语“PCSK9”意为一种人类前蛋白转化酶,属于分泌枯草杆菌酶家族的蛋白酶K亚族。现有文献已证明,通过与低密度脂蛋白颗粒受体结合和促进其降解,PCSK9可提高血浆LDL水平。

[0051] 本文所用的术语“抗体”应被理解为包括完整抗体分子及其抗原结合片段。本文所用的术语抗体的“抗原结合部分”或“抗原结合片段”(或简称为“抗体部分”或“抗体片段”)是指抗体中保持了与人PCSK9或其表位特异性结合能力的一个或多个片段。

[0052] 本文所用的术语“全长抗体”,指包含四条肽链的免疫球蛋白分子,两条重(H)链(全长时约50-70kDa)和两条轻(L)链(全长时约25kDa)通过二硫键互相连接。每一条重链由

重链可变区(在本文中缩写为VH)和重链恒定区(在本文中缩写为CH)组成。重链恒定区由3个结构域CH1、CH2和CH3组成。每一条轻链由轻链可变区(在本文中缩写为VL)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域CL组成。VH和VL区可被进一步细分为具有高可变性的互补决定区(CDR)和其间隔以更保守的称为框架区(FR)的区域。每一个VH或VL区由按下列顺序:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4从氨基末端至羧基末端排列的3个CDR和4个FR组成。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白对宿主组织或因子(包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q))的结合。

[0053] 当在本文中使用时,术语“CDR”是指抗体可变序列内的互补决定区。在重链和轻链的各个可变区中存在3个CDR,其对于各个重链和轻链可变区被命名为HCDR1、HCDR2和HCDR3或LCDR1、LCDR2和LCDR3。这些CDR的准确边界按照不同的系统有不同的定义。由Kabat(同上)描述的系统不仅提供了可适用于抗体的任何可变区的明确的残基编号系统,而且提供了定义3个CDR的准确残基边界。这些CDR可以被称为KabatCDR。Chothia等发现,KabatCDR内的某些子部分采取几乎一致的肽骨架构型,尽管在氨基酸序列水平上具有大的多样性(Chothia等,(1987)Mol.Biol.196:901-917;Chothia等,(1989)Nature 342:877-883)。定义与KabatCDR交叠的CDR的其他边界已由Padlan(1995)FASEB J.9:133-139和MacCallum(1996)J.Mol.Biol.262(5):732-45描述。再其他的CDR边界定义可能不严格遵从本文中描述的系统之一,但仍然与KabatCDR交叠,尽管它们可能被缩短或加长,这是由于根据预测或实验发现特定残基或残基组或甚至整个CDR不显著影响抗原结合。本文中使用的可以利用按照任何这些系统所定义的CDR,尽管某些实施方式使用了Kabat或Chothia定义的CDR。本发明所述的抗PCSK9抗体或其抗原结合片段包括国际公开号为W02017088782中描述的任意一个抗PCSK9抗体或抗原结合片段。在一种实施方式中,在本发明的方法和组合物中使用的抗体包括来自于抗体JS002的6个CDR。

[0054] 本文所实用的属于“抗原结合片段”包括抗体的片段或衍生物,通常包括亲代抗体的抗原结合区或可变区(例如一个或多个CDR)的至少一个片段,其保持亲代抗体的至少一些结合特异性。抗体结合片段的实例包括但不限于Fab,Fab',F(ab')₂和Fv片段;双抗体;线性抗体;单链抗体分子,例如sc-Fv;由抗体片段形成的纳米抗体(nanobody)和多特异性抗体。当抗原的结合活性在摩尔浓度基础上表示时,结合片段或衍生物通常保持其抗原结合活性的至少10%。优选结合片段或衍生物保持亲代抗体的抗原结合亲和力的至少20%、50%、70%、80%、90%、95%或100%或更高。还预期抗体的抗原结合片段可包括不明显改变其生物活性的保守或非保守氨基酸取代(称为抗体的“保守变体”或“功能保守变体”)。

[0055] 在一个实施方式中,本发明所述的抗PCSK9抗体或抗原结合片段包含HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中:HCDR1具有氨基酸序列SEQ ID NO:1;HCDR2具有氨基酸序列SEQ ID NO:2;HCDR3具有氨基酸序列SEQ ID NO:3;LCDR1具有氨基酸序列SEQ ID NO:4;LCDR2具有氨基酸序列SEQ ID NO:5;并且LCDR3具有氨基酸序列SEQ ID NO:6。

[0056] 在一个实施方式中,本发明所述的抗PCSK9抗体或抗原结合片段包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH的具有氨基酸序列为SEQ ID NO:7;和VL具有氨基酸序列SEQ ID NO:8。

[0057] 在本文实施例中所用的非限制性、示范性抗体被称为“JS002”,其是与人PCSK9特

异性结合的人源化完全抗体,其包含重链和轻链,其中重链的氨基酸序列为SEQ ID NO:9和轻链的氨基酸序列SEQ ID NO:10。

[0058] 医药制剂

[0059] 本发明所述的制剂是一种包含高浓度活性抗体且具有高稳定性、低粘度的液体性制剂。特别地,本发明发现含有精氨酸盐的制剂粘度明显低于含有张力剂的配制液。另外,在配制液中含有的精氨酸盐能明显降低含有张力剂的配制液。

[0060] 在一个实施方式中,本发明所述的制剂包含:(1)抗PCSK9的抗体或抗原结合片段;(2)组氨酸缓冲液,pH约为5.5-6.5;和(3)精氨酸盐。在一个具体的实施方式中,本发明所述的制剂包含非离子型表面活性剂。在另一个具体实施方式中,本发明所述的制剂还可包含一种张力剂,例如甘露醇、山梨醇或蔗糖。

[0061] 在一个实施方式中,本发明所述的制剂包含:(1)约100mg/mL至约200mg/mL的抗PCSK9的抗体或抗原结合片段;(2)约10-50mM组氨酸缓冲液,pH约为5.5-6.5;(3)约50mM至约200mM的精氨酸盐;以及(4)约0%至约0.1%的非离子表面活性剂。

[0062] 在一个实施方式中,本发明所述的制剂包含:(1)约150±10mg/mL的抗PCSK9的抗体或抗原结合片段;(2)约20mM组氨酸缓冲液,pH约为5.5-6.5;(3)约60±5mM、130±5mM或160±5mM的精氨酸盐;以及(4)约0%至约0.1%的非离子表面活性剂。

[0063] 在一个实施方式中,本发明所述的制剂包含:(1)约150±10mg/mL的抗PCSK9的抗体或抗原结合片段;(2)约20mM组氨酸缓冲液,pH约为5.5-6.5;(3)约160±5mM的精氨酸盐;以及(4)约0.02%的聚山梨酯20。

[0064] 在一个实施方式中,本发明所述的制剂包含:(1)约150±10mg/mL的抗PCSK9的抗体或抗原结合片段,其中所述的抗体包含HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中:HCDR1具有氨基酸序列SEQ ID NO:1;HCDR2具有氨基酸序列SEQ ID NO:2;HCDR3具有氨基酸序列SEQ ID NO:3;LCDR1具有氨基酸序列SEQ ID NO:4;LCDR2具有氨基酸序列SEQ ID NO:5;并且LCDR3具有氨基酸序列SEQ ID NO:6;(2)约20mM组氨酸缓冲液,pH约为5.5-6.5;(3)约160±5mM的精氨酸;以及(4)约0.02%的聚山梨酯20。

[0065] 在一个实施方式中,本发明所述的制剂具有5.5-6.5的pH并且包含:(1)约150±10mg/mL的抗PCSK9的抗体或抗原结合片段,其中所述的抗体包含包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH的具有氨基酸序列为SEQ ID NO:7;和VL氨基酸序列SEQ ID NO:8;(2)约20mM组氨酸缓冲液,pH约为5.5-6.5;(3)约160±5mM的精氨酸;以及(4)约0.02%的聚山梨酯20。

[0066] 在一个实施方式中,本发明所述的制剂包含:(1)约150±10mg/mL的抗PCSK9的抗体或抗原结合片段,其中所述的抗体为全长抗体,其中重链的氨基酸序列为SEQ ID NO:9和轻链的氨基酸序列SEQ ID NO:10;(2)约20mM组氨酸缓冲液,pH约为5.5-6.5;(3)约160±5mM的精氨酸;以及(4)约0.02%的聚山梨酯20。

[0067] 药物制剂的容器及施用方法

[0068] 本发明的药物制剂可包含在任何适于储存药物以及其他药物组合物的容器中。例如,本发明的药物制剂可包含在具有一定体积的密封及灭菌的塑料或玻璃容器中,诸如小瓶、安瓿、注射器、药筒或瓶子。不同类型的小瓶可用于包含本发明的制剂,例如包括透明和不透明(例如,琥珀色)玻璃或塑料小瓶。同样地,可应用不同类型的注射器来容纳和/或施

用本发明的药物制剂。

[0069] 药物制剂可通过肠胃外途径施用于患者,诸如注射(例如,皮下、静脉内、肌内、腹膜内等)、或经皮、粘膜、鼻、呼吸道和/或口腔施用。可应用多种可重复使用的笔和/或自动注射器递送装置来皮下递送本发明的药物制剂。可用于皮下递送本发明药物组合物的一次性笔和/或自动注射器递送装置的实例包括但不限于SOLOSTAR™笔(sanofi-aventis)、FLEXPEN™(Novo Nordisk)、以及 KWIKPEN™(Eli Lilly)、SURECLICK™自动注射器(Amgen, Thousand Oaks, CA)、PENLETTM(Haselmeier, Stuttgart, 德国)、EPIPEN(Dey, L.P.)和 HUMIRA™笔(Abbott Labs, Abbott Park, IL),此处仅是几个例子。

[0070] 微量输液器用于递送本发明制剂的用途也包含在本文之内。本文使用的术语“微量输液器”表示设计用于在较长时间(例如,约10、15、20、25、30分钟或更长)内缓慢施用大体积(例如,约2.5mL或更多)治疗制剂的皮下递送装置。例如参见U.S. 6,629,949、US 6,659,982和Meehan等,J.Controlled Release 46:107-116(1996)。微量输液器尤其可用于递送包含在高浓度(例如,约100、125、150、175、200mg/ML或更高)和/或粘稠溶液中的大剂量治疗蛋白。

[0071] 医药制剂的治疗用途

[0072] 除其它用途外,本发明之医药制剂可用于治疗、预防或改善任何与PCSK9 活性相关的疾病或失调,包括PCSK9介导的疾病或失调。可以本发明之医药制剂治疗或预防的示范性、非限制性疾病和失调包括各种血脂异常症,例如高胆固醇血症、家族性高胆固醇血症、1/3脂血症、家族性1/3脂血症、异常3脂蛋白血症、家族性异常3脂蛋白血症、1/3甘油三酯血症和家族性高甘油三酯血症。

具体实施方式

[0073] 实施例1缓冲液体系和pH筛选实验

[0074] 液体型抗体制剂中,缓冲液体系和pH密切影响抗体的稳定性,每种具有独特理化性质的抗体都具有最适宜的缓冲液的种类和pH。筛选一种最佳缓冲液体系和pH,使本发明公开的抗PCSK9抗体具有最佳的稳定性以适宜临床应用。

[0075] 该研究是以约150mg/mL的浓度JS002,辅料为130mM盐酸精氨酸进行的。使用透析袋进行透析换液使JS002蛋白处于相应的处方中,样品放置在密闭的离心管中进行缓冲液筛选。我们筛选了乙酸钠缓冲液和组氨酸缓冲液两种类型,pH 从5.0到6.0水平(如表1-1所示)。将样品在40°C/环境RH下放置,分别在第2周第4周取出进行分析检测。蛋白降解的主要途径是聚集物、裂解产品和带电变体的形成。采用尺寸排阻色谱法(SEC-HPLC)测定天然形式(蛋白单体)与聚集形式JS002所占的百分比,采用阳离子交换色谱法(CEX-HPLC)测定酸性与碱性形式mAb所占的百分比。以试验起始(0W)、放置两周(2W)和放置四周(4W)的SEC-HPLC单体含量和CEX-HPLC主峰含量,拟合直线并计算下降斜率(%/周)考察不同缓冲液体系和pH对JS002抗体稳定性的影响,结果汇总见表1-2所示。

[0076] 表1缓冲液体系和pH筛选实验中的处方信息

处方编号	pH	缓冲体系	辅料
[0077] 1	5.0	20 mM 乙酸钠缓冲液	130 mM 盐酸精氨酸
2	5.5	20 mM 乙酸钠缓冲液	130 mM 盐酸精氨酸
3	6.0	20mM 组氨酸缓冲液	130 mM 盐酸精氨酸

[0078] 表2缓冲液体系和pH筛选实验中稳定性结果汇总

处方编号	温度 时间	SEC-HPLC 单体(%)	SEC-HPLC 单体下降速 率(%/周)	CEX-HPL C 主峰(%)	CEX-HPLC 主峰下降速 率(%/周)
[0079] 1	0 周	99.4	1.20	86.4	5.90
	40℃, 2 周	98.5		75.8	
	40℃, 4 周	94.6		62.8	
2	0 周	99.3	0.82	86.2	8.48
	40℃, 2 周	98.8		75.4	
	40℃, 4 周	96.0		52.3	
3	0 周	99.5	0.57	86.5	9.75
	40℃, 2 周	99.0		77.9	
	40℃, 4 周	97.2		47.5	

[0080] 由表2所示, SEC-HPLC实验检测中, 抗体在制剂pH 5.5~6.0范围内均可保持相对稳定, 高温40℃放置4周后, 样品单体含量在94%以上、单体纯度下降速率也在1.5%/周以下; 样品主要电荷占45%以上、主要电荷的下降速率在10%/周以下。当缓冲体系为组氨酸缓冲液并且pH为6.0(处方编号3)时, 高温40℃放置4周后样品的单体纯度最高(约达97%), 单体纯度的下降速率仅为0.57%/周。基于这些结果, 选择pH值为5.5-6.0的20mM组氨酸缓冲剂用于液体型JS002 制剂的开发。

[0081] 实施例2稳定剂筛选实验

[0082] 为了进一步探究不同赋形剂对抗体稳定性和粘度的影响, 我们选取蔗糖、盐酸精氨酸、山梨醇或甘露醇之一或其组合的制剂进行了比较测试。即将上述不同的赋形剂或其组合分别加入含约150mg/mL JS002的20mM组氨酸缓冲液(pH 为5.5或/和6.0), 具体处方信息如表3所示。各处方制剂分装后放置于40℃条件下, 分别在第2周、第4周取出进行分析检测抗体稳定性和配制液粘度。通过分子排阻高效液相色谱法(SEC-HPLC)检测JS002单体含量变化、弱阳离子高效液相色谱法(CEX-HPLC)检测JS002电荷主峰含量, 以及在第四周按标准方法检测制剂粘度。如表4所示, 当处方中含有蔗糖、盐酸精氨酸、山梨醇或甘露醇一种或其组合时, 抗体均有较强的热稳定性, 即制剂高温40℃放置4周后, 样品单体含量在98%以上, 带主要电荷占51%以上。

[0083] 特别地, 综合各项数据分析, 当只含精氨酸盐的制剂, 抗体的稳定性最强且粘度最低。具体地, 高温40℃放置4周后, 仅含精氨酸盐的制剂组: (1) 对于抗体结构的稳定性, 抗体单体纯度的下降速率明显最低, 低至0.1%/周, 约为最高的蔗糖组的25-30%, 抗体的单体

纯度高达98.8%，并且能一定程度改善蔗糖、山梨醇或甘露醇对抗体稳定性的影响；(2) 对如抗体电荷的稳定性，抗体主要电荷的下降速率最低，低至6.25%/周，主要电荷高达61.2%；(3) 对于制剂的粘度，仅含精氨酸的制剂粘度低于5cP，明显低于其它各组处方，特别是仅为含蔗糖制剂组的约20-25%。另外，精氨酸盐明显改善含蔗糖、山梨醇或甘露醇制剂的粘度，约降低50%。

[0084] 高浓度的抗体溶液一般更容易引起抗体聚集、沉淀等，使抗体稳定性降低，并且溶液粘度增加注射（特别是皮下或肌内注射）施用难度。综合以上实验，我们发现，当液体制剂中，精氨酸盐不仅能保证抗体JS002的稳定性，还能显著降低液体粘度。特别是，当缓冲液为组氨酸缓冲液（pH为5.5或6.0），仅含精氨酸盐的一种稳定剂时，抗体稳定性和溶液的粘度效果最优。

[0085] 表3赋形剂筛选实验中的处方信息

处方编号	pH	辅料
4	5.5	240mM 蔗糖
5	6.0	240mM 蔗糖
6	5.5	165mM 盐酸精氨酸

[0087]

7	6.0	165mM 盐酸精氨酸
8	5.5	270mM 山梨醇
9	6.0	270mM 山梨醇
10	5.5	260mM 甘露醇
11	6.0	260mM 甘露醇
12	5.5	60mM 盐酸精氨酸 155mM 蔗糖
13	6.0	60mM 盐酸精氨酸 155mM 蔗糖
14	5.5	60mM 盐酸精氨酸 165mM 山梨醇
15	6.0	60mM 盐酸精氨酸 165mM 山梨醇
16	5.5	60mM 盐酸精氨酸 160mM 甘露醇
17	6.0	60mM 盐酸精氨酸 160mM 甘露醇

[0088] 表4辅料筛选实验结果汇总

[0089]

处方 编号	SEC-HPLC 单体(%)			SEC-HPLC C 单体下 降速率 (%/周)	CEX-HPLC 主峰(%)			CEX-HPLC 主峰下降速 率(%/周)
	0 周	2 周	4 周		0 周	2 周	4 周	
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

[0090]	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

[0091] 表5各处方制剂的粘度

[0092]

处方编号	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
粘度(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

[0093] 实施例3表面活性剂筛选实验

[0094] 液体制剂中添加表面活性剂常用于保护蛋白质例如抗体在储存过程中免受空气/溶液界面诱导的应力、溶液/表面诱导的应力的影响以减少抗体的聚集或使制剂中颗粒物的形成最小化的试剂,其利于抗体理化性质的稳定。在含有20mM 组氨酸缓冲液(pH为6.0)、130mM盐酸精氨酸和150mg/ml的JS002的制剂中分别加入不同浓度的(0-0.5%)的聚山梨酯20或聚山梨酯80,40℃放置2周后分析检测。如表7所示,SEC-HPLC单体含量和CEX-HPLC主峰含量测定结果显示,含有不同浓度的(0-0.5%)的聚山梨酯20或聚山梨酯80制剂中抗体JS002 的热稳定性无明显区别,但都保持高稳定性。

[0095] 表6表面活性剂筛选

处方编号	表面活性剂	SEC-HPLC(%) 单体(%)	CEX-HPLC(%) 主电荷(%)
[0096] 18	0.0%聚山梨酯 20	98.9	68.4
19	0.01%聚山梨酯 20	98.8	68.3

[0097]	20	0.02%聚山梨酯 20	98.8	68.4
	21	0.05%聚山梨酯 20	98.9	68.7
	22	0.1%聚山梨酯 20	98.8	68.9
	23	0.0%聚山梨酯 80	98.8	68.6
	24	0.01%聚山梨酯 80	98.8	68.4
	25	0.02%聚山梨酯 80	98.6	67.8
	26	0.05%聚山梨酯 80	98.6	67.1
	27	0.1%聚山梨酯 80	98.9	68.4

[0098] 实施例4制剂长期稳定性研究

[0099] 含有治疗性抗体的液体药物制品通常需要储存在2-8℃条件下,所以制剂能在长期储存中保持高稳定性非常重要。根据上述的筛选结果,我们设计4个处方进行制剂的长期稳定性研究。

[0100] 配制如表6所示的4种处方制剂分别储存于透明小瓶中,放置2~8℃条件下若干个月,对各样品进行分析测试。通过以下参数评估稳定性:(a)目视外观;(b)光阻法检测不溶性微粒(OD405nm);(c)pH;(d)CE-SDS法检测抗体的分子量;(d)SEC-HPLC测量抗体单体(质量标准:≥97.0%)、聚体(质量标准:≤3.0%)或片段的含量(质量标准:≤1.0%);(e)CEX-HPLC测量抗体主要电荷(质量标准:≥70.0%)、酸性电荷(质量标准:≤30.0%)或碱性电荷含量(质量标准:≤15.0%);(f)ELISA法检测抗体结合活性(质量标准:参比品的70%-130%);以及(g)抗体的生物学活性(HepG2细胞摄取LDL实验,质量标准:参比品的70%-130%)。如表7所示,4种制剂处方在2-8℃条件下,1-12月储存过程具有非常好的稳定性。

[0101] 表6用于制剂长期稳定性研究的制剂处方

处方编号	pH	处方组成
28	5.5	20mM 组氨酸缓冲液, 160mM 盐酸精氨酸, 0.02%聚山梨酯 20; 150mg/ml JS002
29	6.0	20mM 组氨酸缓冲液, 160mM 盐酸精氨酸, 0.02%聚山梨酯 20; 150mg/ml JS002
30	6.0	20mM 组氨酸缓冲液, 120mM 盐酸精氨酸, 60mM 甘露醇, 0.02%聚山梨酯 20; 150mg/ml JS002
31	6.0	20mM 组氨酸缓冲液, 60mM 盐酸精氨酸, 160mM 甘露醇, 0.02%聚山梨酯 20; 150mg/ml JS002

[0103] 表7制剂处方的长期稳定性数据

[0104]

检项	时间(月)	制剂处方			
		28	29	30	31
分子排阻高效液相色谱法-单体(%)	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
分子排阻高效液相色谱法-聚体(%)	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
分子排阻高效液相色谱法-片段(%)	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
弱阳离子高效液相色谱法-主峰(%)	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
弱阳离子高效液相色谱法-酸性峰(%)	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
弱阳离子高效液相色谱法-碱性峰(%)	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

检项	时间 (月)	制剂处方			
		28	29	30	31
	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
[0105] 结合 ELISA 法(%)	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
生物学活性 (HepG2 细胞 LDL 摄取实验法)	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

[0106] 实施例5高浓度抗PCSK9抗体的室温储存稳定性

[0107] 含有治疗性抗体的液体药物制品通常需要储存在2-8℃下直至储存期结束。因此在购买药品至使用的时间内,还需要由患者进行冷藏。取决于所提出的用药方案,在自我施用药物的情况下这可能导致由患者负责的储存时间长达几周。因此,不需在冷藏条件下储存的药物显示出对于家庭护理产品来说患者方便性的显著提高和不正确储存情况下药物品质影响的降低,从而减少了投诉率和温度偏离的监测。

[0108] 如表8所示,本发明公开的制剂对抗蛋白质降解具有更高稳定性,在25℃下测量的所得降解动力学参数满足环境储存长达6个月的要求。

[0109] 表8制剂加速稳定性数据汇总 (25±2℃)

检测项目	检测方法	质量标准	时间点 (月)	检测结果
[0110] 纯度	分子排阻高效液相色谱法 (SEC-HPLC 法)	单体含量≥97.0%	0	99.7%
			1	99.6%
			3	99.3%
			6	99.4%
		聚体含量≤3.0%	0	0.3%
			1	0.4%
			3	0.4%

[0111]

检测项目	检测方法	质量标准	时间点 (月)	检测结果
[0111]		片段含量 \leq 1.0%	6	0.6%
			0	0.0%
			1	0.0%
			3	0.3%
			6	0.1%
	弱阳离子高效液相色谱法 (CEX-HPLC)法	主峰含量 \geq 70.0%	0	90.1%
			1	83.9%
			3	74.7%
			6	64.6%
		酸性峰含量 \leq 30.0%	0	7.4%
			1	12.2%
			3	22.4%
			6	32.8%
		碱性峰含量 \leq 15.0%	0	2.5%
			1	3.9%
			3	2.9%
			6	2.6%
	还原 CE-SDS 电泳法	重链、非糖基化重链和轻链含量之和 \geq 95.0%	0	99.9%
			1	99.8%
			3	99.5%
6			98.9%	
非还原 CE-SDS 电泳法	主峰含量 \geq 90.0%	0	97.9%	
		1	96.9%	
		3	97.9%	
		6	97.3%	
效价	结合活性 (结合 ELISA 法)	应为参比品的 70%~130%	0	111.0%
			1	95.0%
			3	88.6%
			6	80.2%
	生物学活性 (HepG2 细胞 LDL 摄取实验法)	应为参比品的 70%~130%	0	104.0%
			1	94.2%
			3	92.6%
			6	81.1%

[0112] 实施例6 ForteBio亲和力测定(生物光干涉法)

[0113] ForteBio亲和力测定按照现有的方法进行。简言之,取4mg JS002(处方编号:29)和Evolocumab(140mg/ml/支,购自AMGEN,批号:1063135),分别在10KD超滤管中用磷酸盐缓冲液进行100倍换液,换液后以280nm的吸收值测定蛋白含量,调整浓度为2mg/mL。取出生物素,平衡至室温,称取2mg Sulfo-NHS-Biotin加入300 μ L超纯水中,即为10mM的生物素母液。

取2mg/mL JS002和Evolocumab各1mL置于新的EP管中,按照蛋白:生物素=1:6,加入 8 μ L的生物素母液。混匀,室温反应1-2h。生物素反应结束后,于10KD超滤管中用磷酸盐缓冲液进行100倍换液,换液后以280nm的吸收值测定蛋白含量,调整浓度在1-2mg/mL范围内。生物素化的蛋白分装为每管0.1mL,-80 $^{\circ}$ C保存,冻融不超过1次。分别将生物素化后的JS002和Evolocumab抗体(5 μ g/mL)偶联到链霉亲和素(SA)生物探针上,实验缓冲液(0.1%BSA,0.02%Tween-20及 1xPBS)平衡300s,然后,分别向JS002板和Evolocumab板中依次注入不同浓度稀释的PCSK9,结合300s,解离时间为1800s。根据公式 $KD=koff/kon$ 计算亲和力常数。

[0114] 试验结果:Fortebio结果显示,与PCSK9的结合亲和力,JS002明显优于同靶点药物Evolocumab。

[0115] 表9 Fortebio比较JS002和Repatha对人PCSK9亲和力

		KD (M)	kon (1/Ms)	kdis (1/s)
[0116]	JS002	2.15-11	6.02E+04	1.30E-06
	Evolocumab	6.51-10	4.92E+04	3.21E-05

[0117] 实施例7 JS002细胞生物学活性研究(HepG2细胞LDL摄取法)

[0118] 本实验从细胞水平评价JS002(处方编号:29)对暴露在人PCSK9-D347Y的HepG2细胞LDL的摄取的情况,并且与已上市的同靶点药物Evolocumab(140mg/ml/支,购自AMGEN,批号:1063135)比较。简言之,将人肝癌细胞系(HepG2)细胞(ATCC,批号:62591368)以 2.0×10^4 个/孔的密度进行铺板(80 μ L每孔),37 $^{\circ}$ C,7%CO₂培养过夜。将JS002抗体及Evolocumab分别进行浓度梯度稀释(起始浓度为20 μ g/mL,2倍浓度梯度稀释),取10 μ L抗体稀释液加入HepG2细胞中,孵育半小时,同时稀释抗原至1 μ g/mL,取10 μ L抗原稀释液加入HepG2细胞中,抗原抗体及细胞共孵育4-6h。加入荧光标记的LDL(3 μ g/mL),与细胞共孵育16-18h,然后通过酶标仪检测细胞内摄取的荧光量。

[0119] 如图1所示,实验结果表明JS002能够与细胞表面人PCSK9-D347Y结合,从而抑制其与LDLR的结合,增加LDLR对LDL的结合与摄取。并且,JS002($EC_{50}=92.68$ ng/mL)的促LDL内吞效果明显优于Evolocumab($EC_{50}=151.1$ ng/mL)。

Tyr Ala Ser Thr Leu Gln Pro

1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 8

Leu Gln Tyr Asp Asp Leu Trp Thr

1 5

<210> 7

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<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> 人工序列 (Artificial Sequence)

<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> 人工序列(Artificial Sequence)
 <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

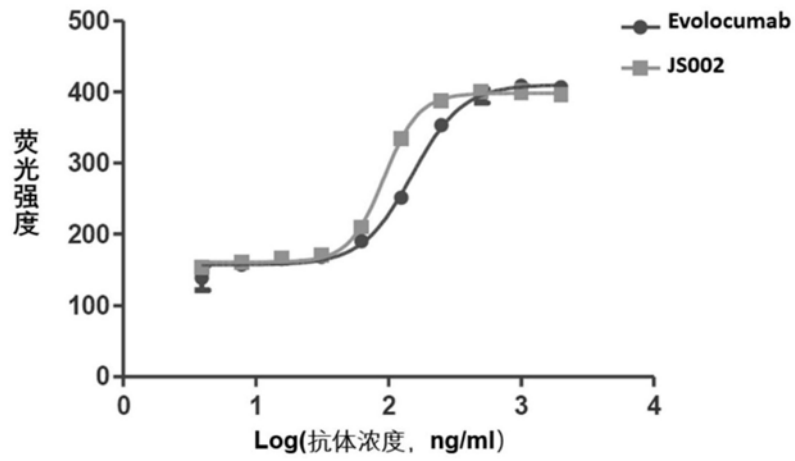
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<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



	Evolocumab	JS002
EC50	151.10	92.68

图1