

명세서

발명의 명칭: 항-FcRn 항체에 대한 제형

기술분야

- [1] 본 발명은 항-FcRn 항체인 HL161BKN에 최적화된 제형에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 자가면역 질환의 원인은 유전적, 환경적 및 면역학적인 관점에서 오랜 기간 연구가 진행되어 왔으나, 여전히 명확한 질병의 발생 원인은 밝혀지지 않고 있다. 최근 많은 연구를 통해 다수의 자가면역 질환들이 IgG 형태의 자가항체(autoantibody)에 의해 발생하는 것으로 밝혀지고 있다. 실제로 자가면역 질환 진단 및 치료연구에서 질환 특이적인 자가항체들의 존재 유무와 감소에 따른 치료효과와의 연관성이 널리 규명되고 있다.
- [3] 이와 같은 자가면역 질환 치료제로서 1차 선택제는 전신 고용량 스테로이드 주사이며, 증상이 심각하거나 스테로이드로 조절이 어려운 경우 고용량의 IVIG(Intravenous immunoglobulin) 투여 또는 혈장 분리 반출술을 적용하였다. 고용량 스테로이드는 효과가 미약하거나 반복 사용시 심각한 부작용이 나타날 수 있으며, IVIG와 혈장 분리 반출술의 경우는 치료비용이 비싸고 다양한 부작용과 감염의 위험이 있어 이 치료 분야에서의 치료제 개발이 절실한 상태이다.
- [4] 한편, 최근 FcRn 항체를 이용한 자가면역질환 치료제가 연구되고 있다(대한민국 특허공개번호 제10-2014-0147606호). 상기 항체는 IgG의 리사이클링(Recycling) 작용에 관여하는 FcRn(Neonatal Fc Receptor)을 블로킹하여 체내 IgG의 소실속도(Catabolism)를 증가시킴으로써 자가항체를 낮추어 질환을 치료하고자 하는 새로운 기전의 약물이다. 이러한 항-FcRn 항체는 기존 치료제들의 문제점을 해결할 수 있는 제품으로 기대된다.
- [5] 그러나, 이러한 항체를 체내 자가항원(Autoantigen)에 대한 자가항체(Autoantibody)가 발생하여 질환이 나타나는 천포창(Pemphigus bulgaris)이나 신경성 척수염(Neuromyelitis optica), 중증 근무력증(Myasthenia gravis)과 같은 중증 자가면역 질환에 적용하기 위해서는 이러한 항체에 최적화된 제형 및 투여 방법에 따라 최적화된 제형이 필요한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명자들은 중증 자가면역 질환을 치료하기 위한 항-FcRn 항체에 최적화된 제형을 개발하기 위해서 연구한 결과, 항-FcRn 항체인 HL161BKN에 최적화된 버퍼 및 제형을 개발하였다.

과제 해결 수단

- [7] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명의 일 측면은, (a) 항-FcRn 항체 또는 이의

단편, (b) 만니톨, 솔비톨, 아르기닌, 히스티딘, 글리신 및 이들의 염으로부터 선택되는 1종 이상의 첨가제, (c) 시트레이트 또는 히스티딘으로부터 선택된 완충 시스템, 및 (d) 계면활성제를 포함하는 약제학적 제제를 제공한다.

발명의 효과

- [8] 본 발명에 따른 (a) 항-FcRn 항체 또는 이의 단편, (b) 만니톨, 솔비톨, 아르기닌, 히스티딘, 글리신 및 이들의 염으로부터 선택되는 1종 이상의 첨가제, (c) 시트레이트 또는 히스티딘으로부터 선택된 완충 시스템, 및 (d) 계면활성제를 포함하는 pH 4.0 내지 8.0의 약제학적 제제는 HL161BKN에 최적화된 약학 조성물으로서, 상기 제형에서 HL161BKN의 안정성이 향상됨을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

- [9] 도 1은 DSC(Differential Scanning Calorimetry)를 이용하여 HL161BKN의 열안정성을 분석한 것이다.
- [10] 도 2는 시트르산 나트륨-포스페이트 버퍼 pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 조건에서 HL161BKN의 4주 가속 안정성을 확인한 것이다.
- [11] 도 3은 HL161BKN의 제형을 연구하기 위한 과정을 도식화한 것이다.
- [12] 도 4는 부형제 테스트 결과, 부형제에 따라 생성된 HL161BKN(210 mg/mL)의 응집체(aggregates) 및 단편(fragments)의 변화량을 확인한 것이다.
- [13] 도 5는 각 부형제 조건에 따른 HL161BKN(210 mg/mL)의 전하 변이체(charge variants) 양상을 CEX-HPLC를 이용하여 분석한 것이다.
- [14] 도 6은 부형제 조합에 따른 HL161BKN의 응집체 변화량의 분산분석(Analysis of variance, ANOVA) 결과를 나타낸 것이다.
- [15] 도 7은 부형제 조합에 따라 생성된 HL161BKN(210 mg/mL)의 응집체 및 단편의 변화량을 확인한 것이다.
- [16] 도 8은 부형제 조합에 따른 HL161BKN의 응집체 및 단편의 변화량의 실험계획법(Design of Experiment, DOE) 분석 결과를 나타낸 것이다.
- [17] 도 9는 부형제 조합에 따른 HL161BKN의 전하 변이체(charge variants) 양상을 CEX-HPLC를 이용하여 분석한 것이다.
- [18] 도 10은 추가 부형제 테스트에서 HL161BKN(210 mg/mL)의 응집체 및 단편의 변화량을 확인한 것이다.
- [19] 도 11은 추가 부형제 테스트에서 부형제 조건에 따른 HL161BKN의 전하 변이체(charge variants) 양상을 CEX-HPLC를 이용하여 분석한 것이다.
- [20] 도 12는 HL161BKN(210 mg/mL)의 교반 스트레스에 대한 PSB20 유무에 따른 영향을 확인한 것이다.
- [21] 도 13은 교반 테스트에서 PSB20 유무에 따른 HL161BKN의 단량체(monomer) 변화를 확인한 것이다.
- [22] 도 14는 점성 감소 부형제 테스트에서 HL161BKN(210 mg/mL)의 응집체 및 단편의 변화량을 확인한 것이다.

- [23] 도 15는 1차 부형제 스크리닝에서 HL161BKN(210 mg/mL)의 응집체 및 단편의 변화를 확인한 것이다.
- [24] 도 16은 1차 부형제 스크리닝 조건에 따른 HL161BKN의 전하 변이체(charge variants) 양상을 CEX-HPLC를 이용하여 분석한 것이다.
- [25] 도 17은 2차 부형제 스크리닝에서 HL161BKN(210 mg/mL)의 응집체 및 단편의 변화를 확인한 것이다.
- [26] 도 18은 2차 부형제 조건에 따른 HL161BKN의 전하 변이체(charge variants) 양상을 CEX-HPLC를 이용하여 분석한 것이다.
- [27] 도 19는 HL161BKN의 불용성 미립자(sub-visible particle) 수의 변화를 확인한 것이다.
- [28] 도 20은 HL161BKN 제형에서 HL161BKN의 농도에 따른 점성을 확인한 결과이다. 이때, HL161BKN이 170 mg/mL 일때, 10 cP로 확인되었다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [29] 본 발명의 일 측면은, (a) 항-FcRn 항체 또는 이의 단편, (b) 만니톨, 솔비톨, 아르기닌, 히스티딘, 글리신 및 이들의 염으로부터 선택되는 1종 이상의 첨가제, (c) 시트레이트 또는 히스티딘으로부터 선택된 완충 시스템, 및 (d) 계면활성제를 포함하는 pH 4.0 내지 8.0의 약제학적 제제를 제공한다.
- [30] 또한, 상기 약제학적 제제는 추가적으로 메티오닌을 포함할 수 있다. 또한, 상기 약제학적 제제는 추가적으로 수크로스, 트레할로스와 같은 당류를 포함할 수 있다.
- [31] 상기 완충 시스템은 그 짝 산-염기 성분으로 인해 pH에서의 변화에 저항성인 버퍼를 의미한다.
- [32] 본 명세서에서 사용된 용어 "히스티딘 버퍼"는 히스티딘 이온을 포함하는 버퍼를 의미한다. 이때, 히스티딘 버퍼의 구체예는 히스티딘 클로라이드 버퍼, 히스티딘 아세테이트 버퍼, 히스티딘 포스페이트 버퍼, 및 히스티딘 설페이트 버퍼로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [33] 본 명세서에서 사용된 용어 "시트레이트 버퍼"는 시트레이트 이온을 포함하는 버퍼를 의미한다. 이때, 시트레이트 버퍼의 구체예는 시트르산-나트륨 버퍼, 시트르산-칼륨 버퍼, 시트르산-칼슘 버퍼, 및 시트르산-마그네슘 버퍼로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [34] 본 명세서에서 사용된 용어 "계면활성제"는 교반(agitation) 및 전단(shearing)과 같은 기계적 스트레스에 대해 단백질 제형을 보호하기 위해 사용되는 약학적으로 허용가능한 부형제를 나타낸다. 계면활성제의 구체예는 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 40, 폴리소르베이트 60, 폴리소르베이트 80, 폴록사머, 트리톤, 나트륨 도데실 설페이트, 나트륨 라우릴 설포네이트, 나트륨

옥틸 글리코시드, 라우릴-설포베타인, 미리스틸-설포베타인,
 리놀레일-설포베타인, 스테아릴-설포베타인, 라우릴-사르코신,
 미리스틸-사르코신, 리놀레일-사르코신, 스테아릴-사르코신, 리놀레일-베타인,
 미리스틸-베타인, 세틸-베타인, 라우릴 아미도프로필-베타인,
 코카르아미도프로필-베타인, 리놀레아미도프로필-베타인,
 미리스트아미도프로필-베타인, 팔미토일아미도프로필-베타인,
 이소스테아르아미도프로필-베타인, 미리스트아미도프로필-디메틸아민,
 팔미토일아미도프로필-디메틸아민, 이소스테아르아미도프로필-디메틸아민,
 나트륨 메틸 코카아실, 나트륨 메틸 올레일-타우레이트, 폴리에틸렌 글리콜,
 폴리프로필렌 글리콜, 및 에틸렌 및 프로필렌 글리콜의 코폴리머으로 이루어진
 군으로부터 선택되는 어느 하나의 계면활성제일 수 있다. 이때, 상기
 계면활성제는 바람직하게 폴리소르베이트 20 일 수 있다.

- [35] 또한, 상기 억제학적 제제는 수성 제제일 수 있으며, 바람직하게는 주사형 액상 제제일 수 있다.
- [36] 이때, 상기 항-FcRn 항체는 HL161BKN 일 수 있다.
- [37] 상기 HL161BKN은 서열번호 5의 아미노산을 가지는 H-CDR1, 서열번호 6의 아미노산을 가지는 H-CDR2, 및 서열번호 7의 아미노산을 가지는 H-CDR3을 포함하는 중쇄가변영역을 포함하며, 서열번호 8의 아미노산을 가지는 L-CDR1, 서열번호 9의 아미노산을 가지는 L-CDR2, 및 서열번호 10의 아미노산을 가지는 L-CDR3을 포함하는 경쇄가변영역을 포함한다.
- [38] 또한, 상기 HL161BKN은 하기 표 1에 기재된 중쇄 및 경쇄 영역을 포함할 수 있다. 또한, 상기 중쇄 및 경쇄는 표 2에 기재된 핵산에 의해 코딩될 수 있다.

[39] [표1]

구분	아미노산 서열	서열번호
Heavy chain	QLLLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSLS SSFSYWVWIR QPPGKGLEWI	1
	GTIIYSGNTY YNPSLKSRIT ISVDTSKNHF SLKLSSVTAA DTAVYYCARR	
	AGILTGYLDS WQQGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV	
	KDYFPEPVTW SNWSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVW TVPSSSLGTQ	
	TYICNVNHKP SNTKVDKRVK PKSCDKTHTC PPCPAPEAAG GPSVFLFPPK	
	PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY	
	NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKARGQPREP	
	QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFIYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP	
	VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG	
Light chain	SYVLTSQSPV SVAPGQTARI TCGGNNIGSK SVHWYQQKPG QAPVLVYDD	2
	SDRPSGIPER FSASNSGNTA TLTISRVEAG DEADYYCQVW DSSSDHVVFG	
	GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW	
	KADSSPVKAG VETTTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE	
	GSTVEKTVAP TECS	

[40] 상기 항체의 당화 위치는 다음과 같다: Asn301, N-glycan(G0F, G1F, G0-GlcNac, Man5).

[42] 이때, 상기 억제학적 제제는 20 cP 이하의 점도를 갖는 것을 특징으로 할 수

구분	역산 서열	서열번호
polynucleotides coding Heavy chain	CAG CTG CTG CTG CAA GAA TCC GGC CCT GGC CTG GTG AAA CCC	3
	TCC GAG ACA CTG TCC CTG ACC TGC ACC GTG TCC GGC GGC TCC	
	CTG TCC TCC AGC TTC TCC TAC TGG GTC TGG ATC CGG CAG CCC	
	CCT GGC AAG GGC CTG GAA TGG ATC GGC ACC ATC TAC TAC TCC	
	GGC AAC ACC TAC TAC AAC CCC AGC CTG AAG TCC CGG CTG ACC	
	ATC TCC GTG GAC ACC TCC AAG AAC CAC TTC AGC CTG AAG CTG	
	TCC TCC GTG ACC GCC GCT GAC ACC GCC CTG TAC TAC TGT GCC	
	AGA AGG GCC GGC ATC CTG ACC GGC TAC CTG GAC TCT TGG GGC	
	CAG GGC ACC CTG GTG ACA GTG TCC TCC GCC TCC ACC AAG GGC	
	CCC TCC GTG TTC CCT CTG GCC CCC TCC AGC AAG TCC ACC TCT	
	GGC GGC ACC GCT GCC CTG GGC TGT CTG GTG AAA GAC TAC TTC	
	CCC GAG CCC GTG ACC GTG TCC TGG AAC TCT GGC GCC CTG ACC	
	TCC GGC GTG CAC ACC TTC CCT GCC GTG CTG CAG TCC TCC GGC	
	GTG TAC TCC CTG TCC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC TGT	
	CTG GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAC CAC AAG CCC	
	TCC AAC ACC AAG GTG GAC AAG CGG GTG GAA CCC AAG TCC TGC	
	GAC AAG ACC CAC ACC TGT CCC CCC TGT CCT GCC CCT GAA GCT	
	GCT GGC GGC CCT AGC GTG TTC CTG TTC CCA CCA AAG CCC AAG	
	GAC ACC CTG ATG ATC TCC CGG ACC CCC GAA GTG ACC TGC GTG	
	GTG GTG GAC GTG TCC CAC GAG GAC CCT GAA GTG AAG TTC AAT	
	TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAA GTG CAC AAC GCC AAG ACC AAG	
	CCC AGA GAG GAA CAG TAC AAC TCC ACC TAC CGG GTG GTG TCC	
	GTG CTG ACC GTG CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAC GGC AAA GAG	
	TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAG GCC CTG CCT GCC CCC ATC	
	GAA AAG ACC ATC TCC AAG GCC AAG GGC CAG CCC CGC GAG CCC	
	CAG GTG TAC ACA CTG CCC CCT AGC CGG GAA GAG ATG ACC AAG	
	AAC CAG GTG TCC CTG ACA TGC CTG GTG AAG GGC TTC TAC CCC	
	TCC GAC ATT GCC CTG GAA TGG GAG TCC AAC GGC CAG CCC GAG	
	AAC AAC TAC AAG ACC ACC CCC CCT GTG CTG GAC TCC GAC GGC	
	TCA TTC TTC CTG TAC TCC AAG CTG ACC GTG GAC AAG TCC CGG	
	TGG CAG CAG GGC AAC GTG TTC TCC TGC TCC GTG ATG CAC GAG	
	GCC CTG CAC AAC CAC TAC ACC CAG AAG TCC CTG TCC CTG AGC	
	CCC GGC	
polynucleotides coding light chain	TGT TAC GTG CTG ACC CAG TCC CCC TCC GTG TCC GTG GCT	4
	CCT GGC CAG ACC GCC AGA ATC ACC TGT GGC GGC AAC AAC	
	ATC GGC TCC AAG TCC GTG CAC TGG TAT CAG CAG AAG CCC	
	GGC CAG GCC CCC GTG CTG GTG GTG TAC GAC GAC TCC GAC	
	CGG CCC TCT GGC ATC CCT GAG CGG TTC TCC GCC TCC AAC	
	TCC GGC AAC ACC GCC ACC CTG ACC ATC TCC AGA GTG GAA	
	GCC GGC GAC GAG GCC GAC TAC TAC TGC CAA GTG TGG GAC	
	TCC TCC TCC GAC CAC GTG GTG TTC GGC GGA GGC ACC AAG	
	CTG ACC GTG CTG GGC CAG CCT AAG GCC GCT CCC TCC GTG	
	ACC CTG TTC CCC CCA TCC TCC GAG GAA CTG CAG GCC AAC	
	AAG GCC ACC CTG GTC TGC CTG ATC TCC GAC TTC TAC CCT	
	GGC GCC GTG ACC GTG GCC TGG AAG GCC GAC AGC TCT CCT	
	GTG AAG GCC GGC GTG GAA ACC ACC ACC CCC TCC AAG CAG	
	TCC AAC AAC AAA TAC GCC GCC TCC TCC TAC CTG TCC CTG	
	ACC CCC GAG CAG TGG AAG TCC CAC CGG TCC TAC AGC TGC	
	CAA GTG ACA CAC GAG GCC TCC ACC GTG GAA AAG ACC GTG	
	GCC CCT ACC GAG TGC TCC	

있다. 구체적으로 상기 약제학적 제제는 1 cP 내지 20 cP의 점도를 가질 수 있다. 또한, 상기 약제학적 제제는 10 cP 내지 20 cP의 점도를 가질 수 있으며, 약 10 cP, 약 11 cP, 약 12 cP, 약 13 cP, 약 14 cP, 약 15 cP, 약 16 cP, 약 17 cP, 약 18 cP, 약 19 cP, 약 20 cP의 점도를 가질 수 있다.

- [43] 또한, 상기 약제학적 제제는 250 mOs/kg 내지 500 mOs/kg의 삼투압을 갖는 것을 특징으로 할 수 있다. 구체적으로, 상기 약제학적 제제는 300 mOs/kg ~ 450 mOs/kg 또는 350 mOs/kg ~ 400 mOs/kg의 삼투압을 가질 수 있다. 또한, 상기 약제학적 제제는 약 250 mOs/kg, 약 260 mOs/kg, 약 270 mOs/kg, 약 280 mOs/kg, 약 290 mOs/kg, 약 300 mOs/kg, 약 310 mOs/kg, 약 320 mOs/kg, 약 330 mOs/kg, 약 340 mOs/kg, 약 350 mOs/kg, 약 360 mOs/kg, 약 370 mOs/kg, 약 380 mOs/kg, 약 390 mOs/kg, 약 400 mOs/kg, 약 410 mOs/kg, 약 420 mOs/kg, 약 430 mOs/kg, 약 440 mOs/kg, 약 450 mOs/kg, 약 460 mOs/kg, 약 470 mOs/kg, 약 480 mOs/kg, 약 490 mOs/kg, 또는 약 500 mOs/kg의 삼투압을 가질 수 있다.
- [44] 또한, 상기 약제학적 제제는 HL161BKN을 50 mg/mL 내지 250 mg/mL의 농도로 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 약제학적 제제는 60 mg/mL 내지 250 mg/mL, 70 mg/mL 내지 250 mg/mL, 80 mg/mL 내지 250 mg/mL, 90 mg/mL 내지 250 mg/mL 또는 100 mg/mL 내지 250 mg/mL로 포함할 수 있다. 또한, 상기 약제학적 제제는 HL161BKN을 120 mg/mL 내지 230 mg/mL, 150 mg/mL 내지 220 mg/mL 또는 180 mg/mL 내지 210 mg/mL로 포함할 수 있다. 또한, 상기 약제학적 제제는 HL161BKN을 약 50 mg/mL, 약 60 mg/mL, 약 70 mg/mL, 약 80 mg/mL, 약 90 mg/mL, 약 100 mg/mL, 약 110 mg/mL, 약 120 mg/mL, 약 130 mg/mL, 약 140 mg/mL, 약 150 mg/mL, 약 160 mg/mL, 약 170 mg/mL, 약 180 mg/mL, 약 190 mg/mL, 약 200 mg/mL, 약 210 mg/mL, 약 220 mg/mL, 약 230 mg/mL, 약 240 mg/mL, 또는 약 250 mg/mL로 포함할 수 있다.
- [45] 또한, 상기 약제학적 제제는 pH 4.0 내지 8.0 일 수 있다. 구체적으로, 상기 약제학적 제제는 pH 4.0 내지 7.0 일 수 있다. 바람직하게는 상기 약제학적 제제는 pH 5.0 내지 6.0 일 수 있다. 또한, 상기 약제학적 제제는 약 pH 5.0, 약 pH 5.1, 약 pH 5.2, 약 pH 5.3, 약 pH 5.4, 약 pH 5.5, 약 pH 5.6, 약 pH 5.7, 약 pH 5.8, 약 pH 5.9, 약 pH 6.0, 약 pH 6.1, 약 pH 6.2, 약 pH 6.3, 약 pH 6.4, 약 pH 6.5, 약 pH 6.6, 약 pH 6.7, 약 pH 6.8, 약 pH 6.9 또는 약 pH 7.0 일 수 있다.
- [46] 또한, 상기 첨가제는 10 mM 내지 400 mM로 포함될 수 있다. 이때, 상기 첨가제는 만니톨, 솔비톨, 아르기닌, 히스티딘 또는 글리신 단독으로 사용될 수 있으며, 2개 이상이 혼합하여 사용될 수 있다. 구체적으로, 상기 첨가제는 각각 10 mM 내지 400 mM, 20 mM 내지 300 mM, 50 mM 내지 250 mM 또는 100 mM 내지 150 mM로 포함될 수 있다. 구체적으로, 상기 첨가제는 각각 약 10 mM, 약 20 mM, 약 30 mM, 약 40 mM, 약 50 mM, 약 60 mM, 약 70 mM, 약 80 mM, 약 90 mM, 약 100 mM, 약 110 mM, 약 120 mM, 약 130 mM, 약 140 mM, 약 150 mM, 약 160 mM, 약 170 mM, 약 180 mM, 약 190 mM, 약 200 mM, 약 210 mM, 약 220 mM,

약 230 mM, 약 240 mM, 약 250 mM, 약 260 mM, 약 270 mM, 약 280 mM, 약 290 mM, 약 300 mM로 포함될 수 있다.

- [47] 또한, 상기 첨가제는 2개가 혼합되어 사용될 수 있다. 일 구체예로 상기 첨가제는 만니톨 및 솔비톨을 포함할 수 있다. 일 구체예로 상기 첨가제는 만니톨 및 아르기닌을 포함할 수 있다. 일 구체예로 상기 첨가제는 만니톨 및 히스티딘을 포함할 수 있다. 일 구체예로 상기 첨가제는 만니톨 및 글리신을 포함할 수 있다. 일 구체예로 상기 첨가제는 솔비톨 및 아르기닌을 포함할 수 있다. 일 구체예로 상기 첨가제는 솔비톨 및 히스티딘을 포함할 수 있다. 일 구체예로 상기 첨가제는 솔비톨 및 글리신을 포함할 수 있다. 일 구체예로 상기 첨가제는 아르기닌 및 히스티딘을 포함할 수 있다. 일 구체예로 상기 첨가제는 아르기닌 및 글리신을 포함할 수 있다. 일 구체예로 상기 첨가제는 히스티딘 및 글리신을 포함할 수 있다. 이때, 각각의 첨가제는 상술한 농도로 약제학적 제제에 포함될 수 있다.
- [48] 상기 약제학적 제제의 일 구체예는 (a) 100 mg/mL 내지 250 mg/mL의 항-FcRn 항체, (b) 50 내지 250 mM의 L-아르기닌 또는 이의 염산염, (c) 50 내지 250 mM의 L-히스티딘 및 (d) 0.01 내지 0.05%의 폴리소르베이트 20을 포함하는, pH 5.0 내지 6.0의 약제학적 제제 일 수 있다.
- [49] 이때, 상기 항-FcRn 항체는 상술한 바와 같다. 또한, 상기 약제학적 제제는 수성 제제일 수 있으며, 주사형 액상 제제일 수 있다. 또한, 상술한 약제학적 제제는 피하로 투여되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [50] 또한, 상기 약제학적 제제는 가속 조건에서 매우 안정함을 확인하였다. 구체적으로 가속 조건(25°C, 상대습도 60%)에서 6개월 테스트 결과 응집체 및 단편의 함유량이 약 10% 이하일 수 있다. 또한, 상기 조건에서 응집체 및 단편의 함유량은 약 9% 이하, 약 8% 이하, 약 7% 이하, 약 6% 이하, 약 5.5% 이하 또는 약 5.0% 이하 일 수 있다.
- [51] 뿐만 아니라, 상기 약제학적 제제는 장기 보존 조건에서도 매우 안정적임을 확인하였다. 구체적으로, 5°C, 36개월 조건에서 응집체 및 단편의 함유량이 약 10% 이하일 수 있다. 또한, 상기 조건에서 응집체 및 단편의 함유량은 약 9% 이하, 약 8% 이하, 약 7% 이하, 약 6% 이하, 약 5% 이하, 약 4% 이하, 약 3% 이하, 약 2% 이하, 약 1.8% 이하, 약 1.5% 이하 또는 약 1.2% 이하 일 수 있다.
- [52] 또한, 상기 약제학적 제제는 자가면역 질환의 치료에 사용될 수 있다. 이때, 자가면역 질환은 중증 근무력증(Myasthenia Gravis, MG), 갑상선눈병증(Thyroid Eye Disease, TED), 온 자가면역 용혈성 빈혈(Warm Autoimmune Hemolytic Anemia, WAIHA), 시신경척수염(Neuromyelitis Optica, NMO), 특발성 혈소판 감소성 자반증(Immune Thrombocytopenic Purpura, ITP), 보통 천포창(Pemphigus Vulgaris, PV), 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증(Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy, CIDP), 루프스 신염(Lupus Nephritis, LN), 및 막성신증(Membranous Nephropathy, MN)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느

하나 일 수 있다.

- [53] **HL161BKN에 최적화된 제형 스크리닝**
- [54] HL161BKN을 각 조건별로 약 210 mg/mL 농도로 제조하여 40°C 가속조건에서 4주간 보관하며, 농도(A280), 탁도(A340), 순도(SEC-HPLC, CEX-HPLC), 점도, 삼투압, 불용성미립자(MFI) 분석 등을 수행하여 시료의 안정성 및 피하투여 적합성을 평가하였다.
- [55] 우선, 기존 항체 제품에서 사용 빈도가 높은 부형제 11종을 대상으로 스크리닝 시험을 수행하였다. 그 결과, L-히스티딘, L-아르기닌 염산염, L-글리신, D-소르비톨, D-만니톨이 응집체 생성 감소 효과가 있음을 확인하였다.
- [56] 이에 선정된 부형제 5종의 조합을 통한 시너지 효과를 시험하였다. 그 결과, L-아르기닌 염산염이 통계적으로 유의한 수준($p < 0.01$)으로 응집체 생성을 감소시키는 것을 확인하였다.
- [57] 응집체 및 단편화에 대한 효과값(effect value) 비교 결과를 종합하여, L-히스티딘, D-만니톨을 부형제로 선택하였다. 또한, 추가 부형제 스크리닝 결과, 응집 생성 감소 효과를 나타낸 L-메티오닌을 추가로 선정하였다. 또한, 히스티딘을 기본 버퍼로 사용할 수 있음을 확인하였다. 또한, 제품의 보관 및 이송 중 발생할 수 있는 교반 스트레스에 의한 응집체 생성 억제 효과를 나타낸 고순도의 0.02% 폴리소르베이트 20을 선택하였다.
- [58] 다음으로 선정된 히스티딘 기본 버퍼와 L-아르기닌 염산염, D-만니톨, L-메티오닌 부형제의 1차 농도 스크리닝 시험을 수행하였다. 이때, PBS20 농도를 0.02%로 고정하고 수행하였다. 그 결과, 부형제 없이 50 mM 히스티딘 기본 버퍼 조건에서의 높은 안정성을 확인할 수 있었다. 또한, 부형제 조건에 따른 응집체 및 단편 증가량은 유의적 차이를 보이지 않았으나, L-아르기닌 염산염 첨가 농도가 높을수록 응집체 생성이 감소되었다.
- [59] 반면 D-만니톨 유무 및 L-메티오닌 농도에 따른 차이는 거의 없는 것으로 확인되었다. 따라서, HL161BKN 제형으로 L-히스티딘 기본 버퍼에 L-아르기닌 염산염, 0.02% PSB20을 선정하였다.
- [60] 마지막으로, L-히스티딘 및 L-아르기닌 염산염의 최적 농도를 선정하기 위해 HL161BKN 2배치를 가지고, 2차 농도 스크리닝을 수행하였다. 그 결과, 부형제 농도 조건에 따른 응집체 및 단편 증가량은 유의적 차이를 보이지 않았으며, 모든 조건에서의 점도 및 삼투압 측정값이 피하투여에 적합한 20 cP 이하, 250 ~ 500 mOsmol/kg로 확인되었다.
- [61] 또한 각 조건 시료에 대하여 미세 유체 이미징(Micro flow imaging, MFI)을 이용한 불용성 미립자 분석을 수행한 결과, 불용성 미립자(sub-visible particles) 수 증가가 가장 적었던 조건을 확인하였으며, 순도(aggregates 및 fragments), 점도, 삼투압 시험을 통한 안정성 및 피하주사(SC) 투여 적합도를 평가하여 최종 제형을 선정하였다.
- [62] 결론적으로, HL161BKN의 비임상 및 임상 1상 시험을 위한 제형을 약 100 mM

L-히스티딘, 약 100 mM L-아르기닌 염산염, 약 0.02% 폴리소르베이트 20(pH 6.0)으로 선정하였다.

발명의 실시를 위한 형태

- [63] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [64] **I. HL161BKN의 제조**
- [65] **제조예 1. HL161 항체를 제조하기 위한 유전자 컨스트럭트 및 벡터 준비**
- [66] HL161BKN을 제조하기 위하여 서열번호 1의 아미노산을 포함하는 중쇄를 코딩하는 서열번호 3의 핵산 서열을 가지는 폴리뉴클레오티드를 pCHO 1.0 벡터(Life Technologies)에 적재하였다. 또한, 서열번호 2의 아미노산을 포함하는 경쇄를 코딩하는 서열번호 4의 핵산 서열을 가지는 폴리뉴클레오티드를 pCHO 1.0 벡터에 적재하였다.
- [67] **제조예 2. HL161BKN 세포주 제작 및 생산**
- [68] 제조예 1에서 제작한 발현 벡터를 이용하여 CHO-S 세포에 형질전환하고 methotrexate와 puromycin의 선별 과정을 거친 후, 최종 생산 세포주를 제작하였다. 제작한 세포주는 cell bank로 제작하여 보관함으로써 HL161BKN 생산에 이용하였다. 항체 생산은 배양 배지(Dynamis medium + 8 mM L-glutamine)가 들어 있는 바이오리액터에서 2일 간격으로 첨가 배지(EFB+)를 첨가함으로써 약 15일동안 배양한 후 상등액을 회수하였다. 그 후, Protein A 컬럼을 수행하고, low pH에서 viral inactivation 시킨 후, Anion exchange chromatography(AEX) 및 Cation exchange chromatography(CEX)를 수행하였다. 그 후, 농축 및 buffer 교환(Ultrafiltration/Diafiltration) 후, 제균 여과하는 단계로 정제하였다. SEC-HPLC, CE-SDS, cIEF, ELISA, Potency, Concentration 등의 분석을 통해 생산한 항체 시료의 품질을 확인하였다.
- [69] **제조예 3. HL161BKN의 기본 특성 분석**
- [70] HL161BKN의 열 안정성과 pH에 따른 가속 조건에서의 안정성 시험, 용해도 시험을 진행하였다. 열 안정성은 DSC(differential scanning calorimetry)로 Tm 값을 분석하였으며, pH 별 가속조건 실험은 37°C에서 1개월간 보관하면서 응집체 및 단편 생성 정도를 모니터링 하였다.
- [71] Tm 값 분석을 위한 DSC는 오송 첨단의료산업진흥재단 장비를 이용하였다. 25°C ~ 100°C 범위에서 실험하였으며 그 결과는 도 1과 같이 확인되었다. IgG1 type의 전형적인 DSC histogram을 나타냈으며, CH 도메인과 Fv 도메인에 따른 커브를 확인할 수 있었다. HL161BKN은 79.9°C의 높은 Tm을 나타내 열역학적으로 매우 안정한 것으로 분석되었다.
- [72] 또한, pH 5.0, 6.0, 7.0, 및 8.0의 시트르산 나트륨-포스페이트 버퍼를 이용하여,

HL161BKN 농도를 10 mg/mL로 제조하였다. 그 후, 37°C에 4주 보관하면서 SEC-HPLC를 이용한 응집체(aggregates) 또는 단편(fragments) 생성 정도를 확인하였다. 그 결과, pH가 높을수록 응집체 또는 단편 발생이 증가하였다(도 2).

[73] 이 결과를 토대로 낮은 pH인 5.0과 6.0의 저농도 또는 고농도의 버퍼들을 이용하여 HL161BKN을 100 mg/mL로 제조 후, 40°C 가속 조건에서 4주간 보관하며 안정성 시험을 수행하였다. 그 결과, HL161BKN은 낮은 pH 조건인 pH 5.0 ~ 6.0에서 안정한 경향을 나타냈으며, 모든 조건에서 전체적으로 단량체(monomer)가 높은 수준을 유지하였다.

[74] 또한, HL161BKN의 용해도를 확인하고자 10 ~ 300 mg/mL 농도까지 6단계로 농축하면서, 단계별로 시료를 채취하여 육안 관찰, A280 nm(농도), A340 nm(탁도, turbidity), SEC-HPLC 순도 분석을 실시하였다. 그 결과 HL161BKN은 농도가 증가함에 따라 탁도가 점차 증가되나, 268 mg/mL 농도까지 단량체 순도 변화는 거의 없음을 확인하였다.

[75] **II. HL161BKN에 최적화된 제형 선별**

[76] **준비예 1. HL161BKN에 최적화된 제형 스크리닝**

[77] 본 실험목적은 HL161BKN의 고농도 피하투여 제품 개발을 위한 원액(drug substance) 및 제품(drug product)의 제형을 선정하기 위함이다. 본 실험에는 HL161BKN-B005, HL161BKN-B018, HL161BKN-B021 3개의 생산 배치를 이용하였으며 사용한 시약 및 기구는 하기와 같다(표 3).

[78] [표3]

Components	Manufacturer
D-(+)-Trehalose dihydrate	Sigma
D-Mannitol	Sigma
D-Mannitol	Avantor
D-Sorbitol	Sigma
L-Arginine monohydrochloride	Merck
L-Histidine monohydrochloride monohydrate	Merck
L-Histidine	Sigma
L-Histidine	Avantor
Polysorbate 20 (PSB20)	Sigma
Polysorbate 20 (PSB20)	Avantor
Polysorbate 80 (PSB80)	Merck
Sodium chloride	Merck
Sucrose	Bioshop
Sucrose	Avantor
L-Glycine	Merck
L-Methionine	Avantor
L-Lysine-monohydrochloride	Tianjin Tianyao pharmaceuticals
L-Valine	Evonik
Sodium sulfate anhydrous	Deajung
Ammonium chloride	Sigma
Citric acid, anhydrous	Avantor
Citric acid, anhydrous	Merck
Acetonitrile	B&J
Tri-sodium citrate, dihydrate	Merck
Tri-sodium citrate, dihydrate	Avantor
1.5 mL microcentrifuge tube	Axygen
Amicon [®] ultra centricon, 15 mL	Millipore
Amicon [®] ultra centricon, 4 mL	Millipore

[79] 본 제형 테스트를 위해 사용한 기기는 다음과 같다(표 4).

[80] [표4]

Instruments	Manufacturer	Catalog number
Centrifuge	Gyrogen	1580-MGR
mv-ROC Viscometer	Rheosense	mv-ROC
Osmometer	Gonotec	Osmomat 3000
Temperature & Humidity Chamber	Jeio tech	TH-TG-300
Nanodrop	Thermoscientific	Nanodrop2000
Propac WCX-10	Dionex	054993
TSK gel G3000SWXL	TOSOH	5788
TSK SWXL guard column	TOSOH	8543
Water bath	Daihan	DH.WB000111
Waters alliance HPLC	Waters	E2695 / 2489
MyLab intelli mixer	MyLab	SLRM-3
MFI 5200 particle analyzer	ProteinSimple	4000-015-001
Stat-ease Design-Expert® software	Stat-Ease	Version 7.0

[81] 준비예 2. 시험 방법

[82] HL161BKN의 제형 선정 시험은 크게 부형제 스크리닝과 부형제 농도 스크리닝 시험으로 나누어 수행하였다. 구체적으로, 도 3과 같은 방법으로 실험을 수행하였다.

[83] 실시예 1. 부형제 스크리닝

[84] 실시예 1.1. 부형제 테스트

[85] 현재 시판중인 항체 제품에서 사용 빈도가 높은 11종의 부형제로 수크로오스(Sucrose), D-트레할로스(D-Trehalose), D-만니톨(D-Mannitol), D-소르비톨(D-Sorbitol), L-아르기닌 염산염(L-Arginine HCl), L-히스티딘 염산염(L-Histidine HCl), L-히스티딘(L-Histidine), L-글리신(L-Glycine), 폴리소르베이트 20(Polysorbate 20), 폴리소르베이트80(Polysorbate 80), 염화나트륨(NaCl)을 선정하였다. 구체적으로, 5 mM 시트르산 나트륨(sodium citrate)(pH 6.0)을 기본 버퍼로 하여 12가지 buffer 조건에서 excipients test를 수행하였다(표 5).

[86] HL161BKN을 Amicon®(Cut off MW. 30,000)을 이용하여 1 mL 이하로 농축 후, 해당 buffer 조건으로 버퍼교환 하여 최종 농도가 210 mg/mL이 되도록 제조하였다. 각 조건별 시료는 0.3 ~ 0.5 mL씩 제조하였으며, 1.5 mL 마이크로원심분리기 튜브에 담아 40°C, 4주간 보관하였다. 0, 2, 4주차에 시료를 샘플링하여 농도(A280), 탁도(A340), 순도(SEC-HPLC, CEX-HPLC)의 변화를 평가하였다.

[87] [표5]

Buffer	Target concentration (mg/mL)	11 Excipients										
		Sucrose (mM)	D-Trehalose (mM)	D-Mannitol (mM)	D-Sorbitol (mM)	L-Arg-HCl (mM)	L-His-HCl (mM)	L-His (mM)	L-Gly (mM)	PSB 20 (%)	PSB 80 (%)	NaCl (mM)
5 mM Na citrate (pH 6.0)	210	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	200	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	250	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	50	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	50	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	20	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	150

[88] 실시예 1.2. 부형제 조합 테스트

[89] 실시예 1.1에서 선정된 5종의 부형제(L-히스티딘, L-아르기닌 염산염, L-글리신, D-소르비톨, D-만니톨)를 조합할 경우 시너지 효과가 있는지 확인하였다. 구체적으로 DOE(design of experiments) software(Stat-ease Design-Expert®, version 7.0)를 사용하여 2 level factorial(2^{n-1}) design으로 17가지 조건 시험을 계획하였다(표 6). 구체적으로, 5 mM 시트르산 나트륨(pH 6.0) 기본 버퍼 조건과 11가지 부형제 조합 조건의 총 12가지 조건 시험을 수행하였다. 또한, 5가지 excipient 단독 조건 시험은 실시예 1.1의 시험 결과를 사용하였다.

[90] 시험 방법은 실시예 1.1과 동일하게 수행하였으며 추가로 각 조건별 버퍼 및 시료에 대한 삼투압을 측정하였고, 상기 DOE Software를 사용하여 ANOVA 분석 및 효과값(effects value)를 계산하였다.

[91] [표6]

Basal Buffer	HL161BKN concentration (mg/mL)	Sample No.	Excipients (mM)				
			His	Arg-HCl	Gly	Sorbitol	Mannitol
5 mM Na citrate (pH 6.0)	210	Control	-	-	-	-	-
		1	50	-	-	-	-
		2	-	50	-	-	-
		3	-	-	100	-	-
		4	-	-	-	250	-
		5	-	-	-	-	200
		6	50	-	100	250	-
		7	50	50	-	250	-
		8	50	50	100	-	-
		9	50	50	-	-	200
		10	50	-	100	-	200
		11	-	50	100	250	-
		12	50	-	-	250	200
		13	-	50	100	-	200
		14	-	-	100	250	200
		15	-	50	-	250	200
		16	50	50	100	250	200

[92] 실시예 1.3. 추가 부형제 테스트

[93] HL161BKN 제형 시험에 대한 부형제 추가 분석을 진행하였다.

[94] 공유 결합 응집(Covalent aggregates) 감소 효과가 알려진 L-메티오닌의 추가 시험과 주사(injection)시 통증을 유발할 수 있는 시트르산 나트륨(pH 6.0) 기본 버퍼를 히스티딘(pH 6.0)으로 변경 시험을 수행하였다. 또한, peroxide가 많이 함유된 저품질의 PSB20(Polysorbate 20) 사용 시 산화에 의해 항체 안정성이 감소하므로, 제형용 고품질의 PSB20으로 변경하였다. 그 후, 상기 제형을 일반적으로 많이 사용되는 0.02% 농도에서 교반 스트레스(agitation stress)에 대한 영향을 확인하였다. 그리고, 고농도 항체 제품의 점도를 감소시킬 수 있는 부형제를 스크리닝하였다.

- [95] 실시예 1.3.1. L-메티오닌 및 히스티딘 기본 버퍼(Histidine basal buffer) 테스트
- [96] L-메티오닌 효과와 기본 버퍼인 5 mM 시트르산 나트륨(pH 6.0)을 히스티딘(pH 6.0)으로 변경 가능한지 확인하고자 표 7의 6가지 조건으로 시험을 수행하였다. 히스티딘 기본 버퍼의 경우, L-히스티딘과 L-히스티딘 염산염을 혼합하여 pH 6.0이 되도록 제조하여 사용하였다. 시험 방법은 실시예 1.1과 동일하게 수행하였다.

[97] [표7]

HL161BKN concentration (mg/mL)	Conditions	Buffer
210	1	5 mM Na Citrate (pH 6.0)
	2	5 mM Na Citrate, 50 mM Methionine (pH 6.0)
	3	5 mM Na Citrate, 50 mM Histidine (pH 6.0)
	4	5 mM Na Citrate, 0.02% PSB20 (pH 6.0)
	5	10 mM Histidine (pH 6.0)
	6	50 mM Histidine (pH 6.0)

- [98] 실시예 1.3.2. 폴리소르베이트 20(PSB20) 테스트
- [99] 교반 스트레스(Agitation stress)에 대한 PSB20의 보호 효과를 확인하고자 표 8의 4가지 조건으로 시험을 수행하였다. 실시예 1.1과 동일하게 제조된 시료를 1.5 mL 마이크로원심분리기 튜브에 0.5 mL씩 담고 MyLab intelli mixer에 장착하여 실온에서 1주일 동안 10 rpm으로 회전시킨 후, 농도, 탁도, 순도(SEC-HPLC) 분석을 수행하였다.

[100] [표8]

Target concentration (mg/mL)	Buffer	PSB20	Agitation
210	5 mM Na citrate (pH6.0)	-	-
		-	+
		0.02%	-
		0.02%	+

- [101] 실시예 1.3.3. 점도 감소를 위한 부형제 스크리닝
- [102] HL161BKN 고농도 제품을 피하투여 경로로 개발하기 위해 일반적으로 점도를 감소시킨다고 알려져 있는 8종의 부형제를 테스트하였다. 50 mM 히스티딘(pH 6.0)을 기본 버퍼로 하여 총 9가지 부형제 스크리닝 시험을 수행하였다(표 9).
- [103] 시료를 실시예 1.1과 동일한 방법으로 각 조건별 1 mL씩 제조하여 25°C에서

점도를 측정하였다. 또한, 4주 가속 안정성시험을 수행하면서 각 조건 별 농도(A280), 순도(SEC-HPLC) 변화를 평가하였다.

[104] [표9]

Basal Buffer	HL161BKN concentration (mg/mL)	Condition	8 Excipients							
			L-His-HCl (mM)	L-Lys-HCl (mM)	L-Arg-HCl (mM)	Gly (mM)	L-Val (mM)	NaCl (mM)	Na ₂ SO ₄ (mM)	NH ₄ Cl (mM)
50 mM Histidine (pH6.0)	210	1	-	-	-	-	-	-	-	-
		2	100	-	-	-	-	-	-	-
		3	-	100	-	-	-	-	-	-
		4	-	-	100	-	-	-	-	-
		5	-	-	-	100	-	-	-	-
		6	-	-	-	-	100	-	-	-
		7	-	-	-	-	-	100	-	-
		8	-	-	-	-	-	-	100	-
		9	-	-	-	-	-	-	-	100

[105] 실시예 1.4. 부형제 농도 스크리닝

[106] 실시예 1.4.1. 1차 부형제 농도 스크리닝

[107] 실시예 1.1, 1.2 및 1.3을 통해서 선정된 50 mM 히스티딘(pH 6.0) 기본 버퍼와 부형제 4종(L-메티오닌, L-아르기닌 염산염, D-만니톨, PSB20) 중 3종(L-메티오닌, L-아르기닌 염산염, D-만니톨)에 대하여 2 level factorial(2ⁿ) design의 DOE 시험을 계획하여 총 9가지 조건으로 부형제 농도 스크리닝을 수행하였다(표 10).

[108] 실험은 실시예 1.1과 동일하게 수행하였으며, 농도(A280), 탁도(A340), 순도(SEC-HPLC, CEX-HPLC), 점도, 삼투압 변화를 분석하였다.

[109] [표10]

Conditions	L-Met (mM)	L-Arg-HCl (mM)	D-Mannitol (mM)	PSB20 (%)
1	-	-	-	-
2	50	50	0	0.02
3	10	100	0	0.02
4	10	50	100	0.02
5	10	100	100	0.02
6	50	100	100	0.02
7	50	50	100	0.02
8	50	100	0	0.02
9	10	50	0	0.02

[110] 실시예 1.4.2. 2차 부형제 농도 스크리닝

[111] 최종 선정된 히스티딘 기본 버퍼와 부형제 2종(L-아르기닌 염산염, PSB20) 중, L-아르기닌 염산염의 최적 농도 탐색을 위하여 4가지 조건에서 4주 40℃ 가속 안정성 시험을 HL161BKN B018 및 B021의 2배치를 사용하여 수행하였다(표 11). 시험은 실시예 1.1과 동일하게 수행하였으며, 농도(A280), 탁도(A340), 순도(SEC-HPLC, CEX-HPLC), 점도, 삼투압, 불용성 미립자(Micro flow imaging; MFI)를 분석하였다.

[112] [표11]

Conditions	L-Histidine (Basal buffer) (mM)	L-Arg-HCl (mM)	PSB20 (%)	HL161BKN Batch#
1	50	100	0.02	B018
2	50	150	0.02	
3	100	100	0.02	
4	150	50	0.02	
1	50	100	0.02	B021
2	50	150	0.02	
3	100	100	0.02	
4	150	50	0.02	

[113] 실시예 2. 부형제 스크리닝 시험결과

[114] 실시예 2.1. 부형제 테스트 수행 결과

[115] 부형제 스크리닝을 위해 선정된 11종 부형제의 HL161BKN 시료 안정성에 대한 영향을 평가하기 위해 40°C 가속조건의 0, 2, 4주차에 농도, 탁도, 순도, 응집체(aggregates), 단편(fragments) 및 전하 변이체(charge variants) 분석을 수행하였다. 이러한 분석을 통해, 응집체 및 단편의 생성을 억제하는 효과가 좋은 5 종(L-아르기닌 염산염, L-히스티딘, D-만니톨, L-글리신, D-소르비톨)의 부형제를 선정하였다.

[116] 실시예 2.1.1. 농도(A280) 및 탁도(A340) 분석 결과

[117] HL161BKN 농도가 4주 동안 증가하였으며(표 12), 이는 40°C 가속조건에서 버퍼 증발에 의한 것으로 추정되었다.

[118] [표 12]

Excipient	0 Week				2 Week				4 Week			
	측정 OD340	평균	회색배수	농도	측정 OD340	평균	회색배수	농도	측정 OD340	평균	회색배수	농도
-	37.090	37.338	10	231.9	41.560	41.567	10	258.2	41.000	40.830	10	253.6
	37.435				41.547				40.747			
	37.489				41.594				40.744			
Histidine	34.625	34.887	10	216.7	38.327	38.761	10	240.7	37.347	37.508	10	233.0
	34.901				38.999				37.580			
	35.136				38.956				37.596			
Histidine HCl	35.391	35.220	10	218.8	35.938	35.735	10	222.0	38.122	38.222	10	237.4
	35.050				35.559				38.241			
	35.220				35.709				38.304			
Arginine HCl	33.643	33.813	10	210.0	36.255	36.215	10	224.9	38.682	39.004	10	242.3
	33.697				36.278				39.231			
	34.098				36.113				39.100			
Trehalose	33.000	32.923	10	204.5	33.704	33.671	10	209.1	34.474	34.704	10	215.6
	33.038				33.627				34.809			
	32.752				33.682				34.829			
Sorbitol	34.590	34.938	10	217.0	36.956	37.086	10	230.3	38.396	38.591	10	239.7
	34.961				37.169				38.726			
	35.262				37.133				38.652			
Sucrose	33.079	33.120	10	205.7	39.543	39.359	10	244.5	39.865	40.004	10	248.5
	33.104				39.384				39.955			
	33.177				39.151				40.193			
Mannitol	34.599	34.561	10	214.7	38.971	38.988	10	242.2	37.017	37.131	10	230.6
	34.613				38.879				37.034			
	34.471				39.114				37.341			
Glycine	33.782	33.608	10	208.7	30.015	30.159	10	187.3	36.080	36.265	10	225.2
	33.296				30.141				36.338			
	33.745				30.320				36.377			
PSB20	36.778	36.623	10	227.5	38.696	39.312	10	244.2	41.305	40.944	10	254.3
	36.524				39.574				40.330			
	36.567				39.666				41.196			
PSB80	32.287	32.284	10	200.5	36.254	36.183	10	224.7	45.823	45.692	10	283.8
	32.445				36.103				45.721			
	32.119				36.193				45.533			
NaCl	30.704	30.708	10	190.7	32.621	32.658	10	202.8	34.538	34.592	10	214.9
	30.679				32.757				34.708			
	30.741				32.597				34.530			

[119] 반면, 대부분의 조건에서 탁도는 증가하지 않거나, 0.020 이하의 변화량을 보였다. 단, PSB20 조건에서 육안으로 뿌옇게 변한 것이 관찰되었으며 탁도(A340) 역시 크게 증가한 것으로 확인되었다(표 13).

[120] [표 13]

Condition No.	Excipients	Turbidity (A340)			
		Week 0	Week 2	Week 4	ΔA_{340} (W4-W0)
1	-	0.125	0.122	0.145	0.020
2	Sucrose	0.211	0.166	0.167	-0.044
3	D-Trehalose	0.127	0.099	0.098	-0.029
4	D-Mannitol	0.184	0.111	0.113	-0.071
5	D-Sorbitol	0.129	0.106	0.115	-0.014
6	L-Arginine-HCl	0.142	0.095	0.101	-0.041
7	L-Histidine-HCl	0.149	0.108	0.130	-0.019
8	L-Histidine	0.118	0.112	0.124	0.006
9	L-Glycine	0.142	0.100	0.113	-0.029
10	PSB20	0.166	1.159	1.260	1.094
11	PSB80	0.266	0.324	0.275	0.009
12	NaCl	0.162	0.119	0.142	-0.020

[121] 실시예 2.1.2. 응집체 및 단편 분석 결과

[122] SEC-HPLC를 이용하여 각 부형제 조건 별 응집체 및 단편 증가량을 비교 평가하였다(표 14). 기본 버퍼 조건과 비교하여 L-아르기닌 염산염, L-히스티딘, L-히스티딘 염산염, D-만니톨, L-글리신, D-소르비톨은 응집체 생성을 효과적으로 억제하였다. 또한, 0.2% PSB20, 0.2% PSB80, NaCl은 오히려 응집체 생성을 증가시켰다. 그리고, 단편 생성을 억제하는 부형제는 L-히스티딘, L-히스티딘 염산염, L-아르기닌 염산염, L-글리신이었으며, NaCl은 단편 생성을 증가시켰다(표 14 및 도 4).

[123] [표 14]

Condition No.	Excipients	Relative purity (monomer)			Changes at week 2 (W2-W0)		Changes at week 4 (W4-W0)	
		Week 0	Week 2	Week 4	Δ Aggre	Δ Frag	Δ Aggre	Δ Frag
1	-	100.0	92.1	84.4	4.3	2.9	10.0	4.3
2	Sucrose	100.0	93.6	87.3	3.3	2.5	7.6	3.9
3	D-Trehalose	100.0	94.9	90.6	2.2	2.5	4.5	4.1
4	D-Mannitol	100.0	95.1	91.5	1.9	2.6	3.6	4.2
5	D-Sorbitol	100.0	94.9	91.4	2.0	2.7	3.8	4.0
6	L-Arginine-HCl	100.0	97.5	96.7	0.2	2.1	0.1	3.0
7	L-Histidine-HCl	100.0	96.1	94.7	2.0	1.7	2.3	2.7
8	L-Histidine	100.0	95.8	94.7	2.0	1.8	2.0	2.5
9	L-Glycine	100.0	96.2	93.2	1.6	1.9	3.6	2.7
10	PSB20	100.0	95.9	84.0	0.9	2.8	10.5	4.0
11	PSB80	100.0	83.5	81.5	12.5	2.4	13.0	3.7
12	NaCl	100.0	86.6	70.7	8.2	4.0	20.1	6.5

[124] 실시예 2.1.3. 전하 변이체 분석 결과

[125] CEX-HPLC를 이용하여 각 부형제 조건에 따른 HL161BKN의 전하 변이체(charge variants) 변화 양상을 확인하였다. 그 결과, 뚜렷한 전하 변이체 변화를 관찰할 수 없었다. 다만, PSB20과 NaCl 조건에서 주요 피크(main peak)가 많이 감소하였다(도 5). 이는 응집체 증가로 인한 결과로 예상되었다.

[126] 실시예 2.2. 부형제 조합 테스트 결과

[127] 실시예 1.1의 부형제 테스트에서 선정된 5종의 부형제 조합에 의한 HL161BKN 시료 안정성 효과를 평가하였다. 구체적으로 40°C, 4주 가속 시험을 실시하였으며, 응집체 및 단편의 생성을 효과적으로 억제하는 L-아르기닌 염산염, L-히스티딘, 및 D-만니톨을 선정하였다.

[128] 부형제 스크리닝 시험을 통해 선정된 부형제에 대하여 조합(combination)을 통한 시너지 효과가 있는지 확인하고자 design of experiments(DOE) software를 사용하여 조건시험을 계획하였다. 기본 buffer 조건과 11가지 excipients combination조건의 총 12가지 조건 시험을 수행하였다. 5가지 excipients 단독 조건 시험은 실시예 1.1의 시험 결과를 사용하였다(표 15).

[129] 응집체 변화량 비교 결과를 ANOVA로 분석하였을 때 통계적으로 유의한

수준($p < 0.01$)으로 aggregates 생성을 감소시키는 부형제를 찾았다. 그러나 단편 생성을 통계적 유의 수준으로 감소시키는 부형제는 없었다.

- [130] 반면, HL161BKN의 경우 부형제 조합에 따라 응집체 생성 양상이 달랐으나, 부형제 조합에 의한 시너지 효과는 없었다. ANOVA 분석 및 effect value 비교 순위를 참고하여 부형제 종류를 선정하였다.

- [131] [표 15]

Condition No.	L-Histidine	L-Arg HCl	L-Glycine	D-Sorbitol	D-Mannitol	Test
	50 mM	50 mM	100 mM	250 mM	200 mM	
1	-1	-1	-1	-1	1	X
2	1	-1	1	1	-1	O
3	1	1	-1	1	-1	O
4	1	-1	-1	-1	-1	X
5	1	1	1	-1	-1	O
6	-1	1	-1	-1	-1	X
7	-1	-1	-1	1	-1	X
8	1	1	-1	-1	1	O
9	1	-1	1	-1	1	O
10	1	1	1	1	1	O
11	1	-1	-1	1	1	O
12	-1	1	1	-1	1	O
13	-1	-1	1	1	1	O
14	-1	1	1	1	-1	O
15	-1	1	-1	1	1	O
16	-1	-1	1	-1	-1	X
17	-1	-1	-1	-1	-1	O

- [132] 실시예 2.2.1. 농도(A280) 및 탁도(A340) 분석 결과

- [133] HL161BKN 농도가 4주 동안 증가하였으며, 이는 40°C 가속조건에서 버퍼 증발에 의한 것으로 추정되었다(표 16). 반면 탁도는 증가하지 않거나 0.054 이하로 미미한 증가를 보였다(표 17).

[134] [표16]

Conditions	0 Week				2 Week				4 Week			
	측정 OD280	평균	회색배수	농도	측정 OD280	평균	회색배수	농도	측정 OD280	평균	회색배수	농도
2	36559	36.471	10	226.5	36.286	36.333	10	225.7	38.797	39.513	10	245.4
	36505				36.411				39.767			
	36349				36.301				39.976			
3	34230	34.367	10	213.5	37.192	37.215	10	231.2	37.316	37.342	10	231.9
	34393				37.254				37.534			
	34477				37.200				37.177			
5	35852	35.860	10	222.7	38.200	38.062	10	236.4	37.938	37.988	10	236.0
	35768				38.003				37.875			
	35961				37.984				38.151			
8	33291	33.364	10	207.2	36.967	37.044	10	230.1	38.593	38.709	10	240.4
	33395				37.064				38.919			
	33406				37.102				38.616			
9	34744	34.872	10	216.6	36.676	36.908	10	229.2	37.359	37.306	10	231.7
	34994				37.078				37.507			
	34877				36.971				37.053			
10	35955	35.986	10	223.5	36.084	36.158	10	224.6	37.998	38.015	10	236.1
	36051				36.124				37.981			
	35952				36.265				38.067			
11	34664	34.419	10	213.8	36.009	36.020	10	223.7	36.216	36.293	10	225.4
	34410				35.972				36.272			
	34182				36.080				36.291			
12	35834	35.976	10	223.5	36.878	36.956	10	229.5	39.354	39.027	10	242.4
	36063				37.016				38.856			
	36031				36.973				38.872			
13	34637	34.713	10	215.6	39.294	39.173	10	243.3	38.173	38.248	10	237.6
	34706				38.945				38.372			
	34797				39.280				38.199			
14	34242	34.259	10	212.8	38.398	38.458	10	238.9	35.047	35.016	10	217.5
	34401				38.349				35.041			
	34134				38.628				34.959			
15	34681	34.769	10	216.0	34.802	34.916	10	216.9	37.212	37.332	10	231.9
	34761				34.819				37.388			
	34865				35.128				37.397			
17	36082	36.074	10	224.1	38.488	38.520	10	239.3	41.257	41.353	10	256.8
	36121				38.548				41.370			
	36019				38.525				41.431			

[135] [표17]

Condition	0 Week		2 Week		4 Week	
	측정 OD340	평균	측정 OD340	평균	측정 OD340	평균
2	0.120	0.119	0.105	0.105	0.140	0.141
	0.117		0.104		0.143	
	0.121		0.106		0.141	
3	0.102	0.101	0.104	0.106	0.126	0.121
	0.101		0.108		0.118	
	0.099		0.106		0.119	
5	0.113	0.106	0.133	0.131	0.161	0.160
	0.102		0.129		0.158	
	0.103		0.131		0.160	
8	0.090	0.090	0.105	0.107	0.120	0.121
	0.093		0.107		0.121	
	0.086		0.108		0.122	
9	0.103	0.103	0.111	0.112	0.140	0.141
	0.103		0.110		0.141	
	0.104		0.114		0.143	
10	0.099	0.098	0.114	0.112	0.132	0.133
	0.097		0.109		0.134	
	0.099		0.112		0.133	
11	0.104	0.102	0.117	0.116	0.136	0.136
	0.101		0.117		0.137	
	0.101		0.114		0.135	
12	0.110	0.104	0.096	0.096	0.099	0.101
	0.102		0.097		0.102	
	0.100		0.095		0.101	
13	0.112	0.110	0.100	0.099	0.098	0.099
	0.110		0.099		0.101	
	0.107		0.097		0.097	
14	0.101	0.098	0.108	0.106	0.143	0.142
	0.098		0.107		0.141	
	0.096		0.104		0.142	
15	0.107	0.105	0.099	0.099	0.117	0.117
	0.105		0.102		0.117	
	0.102		0.097		0.117	
17	0.122	0.119	0.106	0.104	0.114	0.115
	0.118		0.104		0.116	
	0.116		0.103		0.114	

[136] 실시예 2.2.2. 응집체 및 단편 분석 결과

[137] SEC-HPLC를 이용하여 각 부형제 조합 조건 별 응집체 및 단편 증가량을 비교 평가하였다(표 18 및 도 7). 또한, 실시예 1.1의 부형제 단독 조건시험을 포함하여 총 17가지 조건에 대한 SEC-HPLC 데이터를 ANOVA 분석하였다. 그 결과,

L-아르기닌 염산염이 통계적으로 유의한 수준($p < 0.01$)으로 응집체 생성을 감소시키는 것으로 확인되었으며(도 6), 단편 생성을 통계적으로 유의한 수준까지 감소시키는 부형제는 없었다.

- [138] 또한, 응집 및 단편화에 대한 effect value를 비교한 결과, L-히스티딘, D-만니톨, D-소르비톨을 부형제로 사용하였을 경우, HL161BKN의 응집체 및 단편 생성이 감소함을 확인할 수 있었다. 그러나, 부형제간의 시너지 효과는 없었다. D-만니톨과 D-소르비톨은 이성질체로써 둘 중 사용 빈도가 높은 D-만니톨을 선택하였다(도 8).

- [139] [표18]

Condition No.	Excipients	Relative purity (monomer)			Changes at week 2 (W2-W0)		Changes at week 4 (W4-W0)	
		Week 0	Week 2	Week 4	Δ Aggre	Δ Frag	Δ Aggre	Δ Frag
2	H+S+G	100.0	95.7	95.7	2.3	1.8	1.8	2.2
3	H+A+S	100.0	95.9	96.5	2.1	1.8	1.1	2.2
5	H+A+G	100.0	95.2	95.1	2.3	2.2	2.1	2.5
8	H+A+M	100.0	96.5	97.2	1.4	1.8	0.4	2.3
9	H+M+G	100.0	95.4	95.8	2.5	1.9	1.8	2.2
10	H+A+S+M+G	100.0	95.9	96.2	2.1	1.7	1.3	2.3
11	H+S+M	100.0	95.7	95.7	2.2	1.8	1.9	2.1
12	A+M+G	100.0	96.7	96.3	1.1	2.0	0.9	2.5
13	S+M+G	100.0	96.6	96.6	1.1	2.0	0.7	2.4
14	A+S+G	100.0	97.5	94.7	0.0	2.3	0.6	4.3
15	A+S+M	100.0	96.9	97.2	0.6	2.2	-0.4	3.0
17	(-) Control	100.0	92.6	88.9	4.1	2.7	6.6	3.6

- [140] * A: 50 mM L-아르기닌 염산염, H: 50 mM L-히스티딘, G: 100 mM L-글리신, M: 200 mM D-만니톨, S: 250 mM D-소르비톨

- [141] 실시예 2.2.3. 전하 변이체 분석 결과

- [142] CEX-HPLC를 이용하여 부형제 조합 조건에 따른 HL161BKN의 전하 변이체 변화 양상을 확인하였다. 그 결과, 뚜렷한 전하 변이체(basic 및 acidic variants) 변화를 관찰할 수 없었다(도 9).

- [143] 실시예 2.2.4. 점도 및 삼투압 분석 결과

- [144] 각 부형제 조합 조건별 점도를 측정한 결과, L-아르기닌 염산염 첨가 시 점도가

감소되는 경향이 확인되었다. 삼투압은 첨가된 부형제의 개수와 농도가 증가할수록 높아졌다. 구체적으로, 50 mM L-아르기닌 염산염, 50 mM L-히스티딘, 100 mM L-글리신 첨가 시에 각각 약 100 mOsmol/kg, 200 mM D-만니톨 첨가 시에 약 200 mOsmol/kg, 250 mM D-소르비톨 첨가 시에 약 250 mOsmol/kg의 삼투압이 증가되는 것으로 확인되었다(표 19).

[145] 일반적으로 피하 주사제들의 삼투압은 체내 삼투압(약 290 mOsmol/kg)과 유사하며 약 250 ~ 500 mOsmol/kg 범위로 조절된다(PCT/EP2009/066675). 따라서 HL161BKN 농도를 감안하여 제형 버퍼의 삼투압은 약 220 ~ 450 mOsmol/kg 범위로 조절되어야 한다고 판단되었다. 이에 삼투압 범위를 고려하여 추후 부형제 농도 스크리닝 시험을 진행하기로 하였다.

[146] [표19]

Condition No.	Excipients	Viscosity (cP, 25°C)		Osmolality (mOsmol/kg)	
		Buffer	Sample	Buffer	Sample
2	H+S+G	1.066	N/A	498	683
3	H+A+S	1.052	16.700	485	617
5	H+A+G	0.925	19.641	320	395
8	H+A+M	1.002	15.941	434	549
9	H+M+G	1.021	14.807	451	593
10	H+A+S+M+G	1.198	27.865	831	1103
11	H+S+M	1.465	23.680	631	850
12	A+M+G	1.250	39.732	425	560
13	S+M+G	1.055	22.291	471	613
14	A+S+G	1.358	32.547	606	814
15	A+S+M	1.199	19.176	607	788
17	(-) Control	1.115	57.890	23	37

[147] * A: 50 mM L-아르기닌 염산염, H: 50 mM L-히스티딘, G: 100 mM L-글리신, M: 200 mM D-만니톨, S: 250 mM D-소르비톨

[148] 실시예 2.3. 추가 부형제 테스트 수행 결과

[149] 추가 부형제 시험을 수행하였다. 그 결과, 50 mM 히스티딘(pH 6.0)을 기본 버퍼로 사용하며, 응집 생성을 억제하는 효과가 있는 L-메티오닌과 교반

스트레스 조건하에서 응집체 생성을 억제하는 0.02% PSB20을 추가 부형제로 선택하였다.

[150] 실시예 2.3.1. L-메티오닌 및 히스티딘 기본 버퍼 테스트 수행 결과

[151] 1) 농도(A280) 및 탁도(A340) 분석 결과

[152] HL161BKN 농도가 4주 동안 증가하였으며, 이는 40°C 가속조건에서 버퍼 증발에 의한 것으로 추정되었다(표 20). 탁도는 증가되지 않거나 0.1 이하로 미미한 증가를 보였다(표 21).

[153] [표20]

Condition	T0				T2				T4			
	측정 OD280	평균	희석배수	농도	측정 OD280	평균	희석배수	농도	측정 OD280	평균	희석배수	농도
10 mM Na Citrate, pH 6	33.102	33.179	10	206.1	37.997	38.120	10	236.8	34.364	34.382	10	213.6
	33.293				37.689				34.337			
	33.143				38.374				34.446			
10 mM Na Citrate, 50 mM Methionine, pH 6	32.352	32.289	10	200.6	34.964	34.778	10	216.0	33.135	33.026	10	205.1
	32.215				34.658				33.137			
	32.301				34.712				32.805			
10 mM Na Citrate, 50 mM Histidine-HCl, pH 6	35.852	35.817	10	222.5	40.067	40.309	10	250.4	38.534	38.685	10	240.3
	35.773				40.413				38.776			
	35.826				40.447				38.746			
10 mM Na Citrate, 0.02% PSB20, pH 6	33.336	33.529	10	208.3	37.538	37.818	10	234.9	33.856	33.795	10	209.9
	33.572				37.903				33.662			
	33.678				38.012				33.857			
10 mM Histidine, pH 6	32.976	32.987	10	204.9	37.096	37.358	10	232.0	37.282	37.254	10	231.4
	33.024				37.358				37.246			
	32.960				37.619				37.234			
50 mM Histidine, pH 6	33.019	32.937	10	204.6	37.23	37.071	10	230.3	39.888	39.889	10	247.8
	32.837				37.024				40.019			
	32.954				36.959				39.761			

[154] [표21]

Condition	T0		T2		T4	
	측정 OD340	평균	측정 OD340	평균	측정 OD340	평균
10 mM Na Citrate, pH 6	0.110	0.111	0.116	0.116	0.127	0.125
	0.115		0.117		0.124	
	0.109		0.114		0.124	
10 mM Na Citrate, 50 mM Methionine, pH 6	0.112	0.112	0.100	0.101	0.103	0.103
	0.115		0.106		0.104	
	0.108		0.098		0.103	
10 mM Na Citrate, 50 mM Histidine, pH 6	0.111	0.108	0.118	0.119	0.135	0.135
	0.107		0.122		0.136	
	0.105		0.117		0.134	
10 mM Na Citrate, 0.02% PSB20, pH 6	0.114	0.115	0.123	0.120	0.123	0.123
	0.115		0.119		0.123	
	0.116		0.117		0.122	
10 mM Histidine, pH 6	0.102	0.103	0.116	0.116	0.149	0.146
	0.108		0.118		0.143	
	0.100		0.115		0.146	
50 mM Histidine, pH 6	0.097	0.095	0.125	0.123	0.153	0.152
	0.096		0.122		0.152	
	0.092		0.123		0.150	

[155] 2) 응집체 및 단편 분석 결과

[156] 기본 버퍼 조건과 비교하여 L-메티오닌이 응집체 생성을 억제하는데 우수한 효과를 나타내었다. 또한, 0.02% PSB20에 의한 응집체 생성 증가는 없었다. 또한 L-히스티딘을 부형제로 첨가한 조건과 기본 버퍼로 사용한 조건의 결과는 유사하였으며, 10 mM 히스티딘보다 50 mM 히스티딘 조건에서 응집체 생성이 감소하였다(표 22 및 도 10).

[157] [표22]

Condition No.	Relative purity (monomer)			Changes at week 2 (W2-W0)		Changes at week 4 (W4-W0)	
	Week 0	Week 2	Week 4	ΔAggre	ΔFrag	ΔAggre	ΔFrag
1	100.0	90.1	82.5	5.1	3.9	9.9	6.0
2	100.0	95.7	92.4	2.2	1.8	4.3	2.7
3	100.0	95.1	93.9	2.7	1.9	3.0	2.7
4	100.0	88.8	83.5	5.8	4.4	7.7	7.2
5	100.0	94.4	91.9	3.3	1.9	4.4	3.1
6	100.0	96.2	95.1	1.8	1.7	1.8	2.8

[158] 3) 전하 변이체 분석 결과

[159] CEX-HPLC 분석 결과, 뚜렷한 전하 변이체(basic 및 acidic variants)의 변화는 관찰할 수 없었다(도 11).

[160] 실시예 2.3.2. 폴리소르베이트 20 테스트 수행 결과

[161] 1) 농도(A280) 및 탁도(A340) 분석 결과

[162] 실온에서의 교반 시험 결과, 농도 변화는 거의 없었다. PSB20 없이 교반한 시료는 육안상 하얗게 변하여 탁도를 측정할 수 없었다(도 12). 반면, PSB20이 있는 시료는 교반조건시에 육안상 약간 뿌옇게 변하였으며, 탁도가 0.227 정도 증가하였다(표 23).

[163] 이를 통해 고농도 HL161BKN의 교반에 의한 스트레스를 PSB20이 보호하는 효과가 있음을 확인하였다.

[164] [표23]

PSB20	Agitation	Relative purity (monomer)			Turbidity (A340)		
		Week 0	Week 1	Δconc. (W1-W0)	Week 0	Week 1	ΔA340 (W1-W0)
-	-	206.1	206.6	0.5	0.111	0.115	0.004
-	+	206.1	NA*	NA	0.111	NA	NA
0.02%	-	208.3	197.4	-10.9	0.115	0.126	0.011
0.02%	+	208.3	212.3	4.0	0.115	0.342	0.227

*NA: Not applicable

[165] 2) 응집체 및 단편 분석 결과

[166] 교반 스트레스에 의해 응집체 생성이 증가되었으며, PSB20에 의한 응집체 생성 억제 효과를 확인할 수 있었다. 반면 교반 스트레스에 의한 단편 증가는 나타나지 않았다(표 24 및 도 13).

[167] [표24]

PSB20	Agitation	Relative purity (monomer)		Week 1 (W1-W0)	
		Week 0	Week 1	Δ Aggre	Δ Frag
-	-	100.0	94.7	4.6	0.2
-	+	100.0	NA	NA	NA-
0.02%	-	100.0	94.3	5.0	0.2
0.02%	+	100.0	90.6	8.3	0.2

*NA: Not applicable

[168] 실시예 2.3.3. 점도 감소를 위한 부형제 스크리닝 수행 결과

[169] 1) 농도(A280) 및 점도 분석 결과

[170] HL161BKN 농도가 4주 동안 증가하였으며(표 25), 이는 40°C 가속조건에서 buffer 증발에 의한 것으로 추정되었다. L-히스티딘 염산염, L-아르기닌 염산염, L-글리신 첨가 시, 조건 1 대비 점도가 감소되었으나 그 효과는 미미한 수준이었다. 반면, L-라이신 염산염, NaCl, Na₂SO₄, NH₄Cl의 경우는 오히려 점도가 크게 증가하는 결과를 보였다(표 26).

[171] [표25]

Condition			0 Week				2 Week				4 Week			
			측정 OD280	평균	회색배수	농도	측정 OD280	평균	회색배수	농도	측정 OD280	평균	회색배수	농도
200 mg/ml	1	50 mM Histidine, pH 6	33.850	33.934	10	210.8	38.622	36.502	10	239.1	41.038	41.277	10	256.4
			33.922				38.514				41.264			
			34.031				38.389				41.539			
	2	50 mM Histidine, 100 mM HEPES, pH 6	32.763	32.539	10	202.1	35.180	35.132	10	218.2	38.754	38.979	10	242.1
			32.306				35.054				39.112			
			32.469				35.161				39.051			
	3	50 mM Histidine, 100 mM Glycine, pH 6	32.403	32.500	10	201.9	36.711	36.544	10	227.0	36.376	36.440	10	226.3
			32.556				36.893				36.527			
			32.541				36.028				36.418			
	4	50 mM Histidine, 100 mM Arg-HCl, pH 6	32.554	32.619	10	202.6	37.297	37.092	10	230.4	36.304	36.403	10	226.1
			32.649				36.930				36.488			
			32.655				37.028				36.418			
	5	50 mM Histidine, 100 mM Lysine-HCl, pH 6	33.940	34.026	10	211.3	37.432	37.491	10	232.9	40.240	40.630	10	252.4
			34.269				37.589				40.916			
			33.670				37.471				40.733			
	6	50 mM Histidine, 100 mM Valine, pH 6	35.426	35.637	10	221.3	38.475	38.518	10	239.2	37.653	37.850	10	235.1
			35.763				38.581				38.070			
			35.722				38.499				37.828			
	7	50 mM Histidine, 100 mM HEPES, pH 6	35.017	34.997	10	217.4	37.585	37.575	10	233.4	39.127	39.392	10	244.7
			35.230				37.434				39.621			
			34.743				37.707				39.428			
	8	50 mM Histidine, 100 mM NaCl, pH 6	35.734	35.647	10	221.4	37.912	37.844	10	235.1	38.064	38.115	10	236.7
			35.597				37.807				38.364			
			35.611				37.812				37.917			
	9	50 mM Histidine, 100 mM Na ₂ SO ₄ , pH 6	35.553	35.655	10	221.5	35.367	35.383	10	219.8	36.852	37.118	10	230.5
			35.792				35.440				37.310			
			35.620				35.343				37.191			

[172] [표26]

Condition No.	Excipients	Viscosity (cP, 25°C)	
		Buffer	Sample
1	-	1.047	19.723
2	L-His HCl	1.240	18.487
3	L-Lys HCl	1.101	26.472
4	L-Arg HCl	1.105	17.768
5	L-Glycine	1.070	17.716
6	L-Valine	1.086	20.753
7	NaCl	0.980	25.620
8	Na ₂ SO ₄	1.088	24.135
9	NH ₄ Cl	1.049	30.414

[173] 2) 응집체 및 단편 분석 결과

[174] SEC-HPLC 분석을 통해 응집체 및 단편을 분석하였다. 그 결과, 조건 1 대비 L-히스티딘 염산염, L-아르기닌 염산염을 첨가했을 때 응집체가 상대적으로 적게 발생하였으며, 단편 생성을 감소시키는 부형제는 없었다(표 27 및 도 14).

[175] [표27]

Condition No.	Excipients	Relative purity (monomer%)			Changes at week 2 (W2-W0)		Changes at week 4 (W4-W0)	
		Week 0	Week 2	Week 4	ΔAggre	ΔFrag	ΔAggre	ΔFrag
1	-	100.0	92.4	89.4	5.2	2.2	6.9	3.3
2	L-His HCl	100.0	94.4	92.4	3.0	2.4	3.9	3.5
3	L-Lys HCl	100.0	93.7	92.1	3.8	2.3	4.5	3.1
4	L-Arg HCl	100.0	94.6	92.8	3.0	2.2	3.8	3.2
5	L-Glycine	100.0	93.7	91.7	3.9	2.2	4.9	3.2
6	L-Valine	100.0	93.6	92.2	3.9	2.3	4.4	3.1
7	NaCl	100.0	93.2	91.4	4.2	2.4	5.3	3.1
8	Na ₂ SO ₄	100.0	94.1	92.3	3.6	2.2	4.4	3.0
9	NH ₄ Cl	100.0	93.4	91.6	4.1	2.3	4.8	3.3

[176] 실시예 2.4. 부형제 농도 스크리닝 수행 결과

[177] 실시예 2.4.1. 1차 부형제 농도 스크리닝 수행 결과

[178] 상기 실시예 1.3에서 선정된 히스티딘 기본 버퍼(pH 6.0)와 0.02% PSB20에서의 부형제 3종(L-메티오닌, L-아르기닌 염산염, D-만니톨)의 농도를 스크리닝하고자 총 9가지 조건에서 시험을 수행하였다(표 28). 그 결과, 히스티딘 기본 버퍼에 L-아르기닌 염산염과 PSB20을 부형제로 선정하였다.

[179] [표28]

Condition No.	L-Met (mM)	L-Arg HCl (mM)	D-Mannitol (mM)	PSB20 (%)
1	-	-	-	-
2	50	50	0	0.02
3	10	100	0	0.02
4	10	50	100	0.02
5	10	100	100	0.02
6	50	100	100	0.02
7	50	50	100	0.02
8	50	100	0	0.02
9	10	50	0	0.02

[180] 1) 농도(A280) 및 탁도(A340) 분석 결과

[181] HL161BKN 농도가 4주간 약 15% 내외로 증가하였으며, 이는 40°C 가속조건에서 버퍼 증발에 의한 것으로 추정되었다(표 29). 각 조건에서의 탁도는 평균 0.048 정도의 미미한 증가만을 나타내었다(표 30).

[182] [표 29]

Condition			0 Week				2 Week				4 Week			
			측정 OD280	평균	회색배수	농도	측정 OD280	평균	회색배수	농도	측정 OD280	평균	회색배수	농도
210 mg/mL	1	50 mM Histidine, pH 6	34.818	34.673	10	215.4	40.515	40.787	10	253.3	39.391	39.579	10	245.8
			34.770				40.963				39.619			
			34.832				40.883				39.726			
	2	50 mM Histidine, 50 mM Methionine, 50 mM Arg-HCl, pH 6	35.636	35.605	10	221.1	41.353	41.430	10	257.3	40.936	41.245	10	256.2
			35.538				41.565				41.451			
			35.641				41.372				41.349			
	3	50 mM Histidine, 10 mM Methionine, 100 mM Arg-HCl, pH 6	33.558	33.430	10	207.6	36.078	36.064	10	224.0	34.138	34.161	10	212.2
			33.443				36.145				34.256			
			33.289				35.968				34.088			
	4	50 mM Histidine, 10 mM Methionine, 50 mM Arg-HCl, 100 mM Mannitol, pH 6	36.486	36.523	10	226.9	40.730	40.791	10	253.4	40.325	40.219	10	249.8
			36.690				40.785				40.367			
			36.393				40.857				39.965			
	5	50 mM Histidine, 10 mM Methionine, 100 mM Arg-HCl, 100 mM Mannitol, pH 6	36.410	36.336	10	225.7	36.240	36.254	10	225.2	37.971	38.208	10	237.3
			36.131				36.256				38.410			
			36.467				36.266				38.243			
	6	50 mM Histidine, 50 mM Methionine, 100 mM Arg-HCl, 100 mM Mannitol, pH 6	35.108	35.125	10	218.2	39.423	39.641	10	246.2	41.750	41.923	10	260.4
			35.132				39.749				41.992			
			35.136				39.752				42.027			
	7	50 mM Histidine, 50 mM Methionine, 50 mM Arg-HCl, 100 mM Mannitol, pH 6	36.423	36.579	10	227.2	39.168	39.110	10	242.9	43.308	43.031	10	267.3
			36.555				39.018				42.800			
			36.759				39.144				42.985			
	8	50 mM Histidine, 50 mM Methionine, 100 mM Arg-HCl, pH 6	34.828	35.081	10	217.9	35.673	35.929	10	223.2	37.477	37.722	10	234.3
			35.124				35.967				37.909			
			35.292				36.146				37.779			
	9	50 mM Histidine, 10 mM Methionine, 50 mM Arg-HCl, pH 6	31.656	31.625	10	196.4	35.713	35.849	10	222.7	34.000	34.103	10	211.8
			31.604				35.884				34.226			
			31.615				35.951				34.084			

[183] [표30]

Condition	T0		T2		T4	
	측정 OD340	평균	측정 OD340	평균	측정 OD340	평균
50 mM Histidine, pH 6	0.148	0.147	0.170	0.170	0.189	0.191
	0.146		0.169		0.191	
	0.147		0.170		0.192	
50 mM Histidine, 50 mM Methionine, 50 mM Arg-HCl, pH 6	0.145	0.143	0.186	0.182	0.194	0.193
	0.143		0.183		0.191	
	0.141		0.178		0.193	
50 mM Histidine, 10 mM Methionine, 100 mM Arg-HCl, pH 6	0.124	0.123	0.167	0.164	0.180	0.178
	0.122		0.161		0.178	
	0.123		0.165		0.175	
50 mM Histidine, 10 mM Methionine, 50 mM Arg-HCl, 100 mM Mannitol, pH 6	0.149	0.147	0.183	0.181	0.202	0.199
	0.148		0.179		0.198	
	0.145		0.182		0.197	
50 mM Histidine, 10 mM Methionine, 100 mM Arg-HCl, 100 mM Mannitol, pH 6	0.134	0.134	0.173	0.172	0.185	0.184
	0.132		0.172		0.184	
	0.135		0.172		0.184	
50 mM Histidine, 50 mM Methionine, 100 mM Arg-HCl, 100 mM Mannitol, pH 6	0.132	0.133	0.172	0.172	0.191	0.190
	0.133		0.170		0.191	
	0.134		0.174		0.188	
50 mM Histidine, 50 mM Methionine, 50 mM Arg-HCl, 100 mM Mannitol, pH 6	0.159	0.160	0.180	0.178	0.192	0.194
	0.160		0.175		0.196	
	0.162		0.180		0.193	
50 mM Histidine, 50 mM Methionine, 100 mM Arg-HCl, pH 6	0.139	0.138	0.175	0.174	0.191	0.189
	0.139		0.173		0.188	
	0.137		0.174		0.189	
50 mM Histidine, 10 mM Methionine, 50 mM Arg-HCl, pH 6	0.141	0.142	0.164	0.163	0.186	0.184
	0.143		0.160		0.184	
	0.141		0.164		0.182	

[184] 2) 응집체 및 단편 분석 결과

[185] SEC-HPLC 분석 결과, 각 부형제 농도 조건에 따른 응집체 및 단편 증가량은 유의적 차이를 보이지 않았다. 다만, 50 mM 히스티딘의 기본 버퍼 조건(조건 1)에서의 안정성이 높게 나타났으며, 50 mM 보다 100 mM L-아르기닌 염산염 첨가시 응집체 생성이 감소되었다. 그리고, L-메티오닌의 농도 및 D-만니톨 첨가

유무에 따른 응집체 및 단편 증가량은 기본 버퍼 조건과 거의 차이가 없거나 약간 증가된 것으로 확인되었다(표 31 및 도 15).

[186] [표31]

Condition No.	Relative purity (monomer%)			Changes at week 2 (W2-W0)		Changes at week 4 (W4-W0)	
	Week 0	Week 2	Week 4	Δ Aggre	Δ Frag	Δ Aggre	Δ Frag
1	100.0	96.5	94.8	1.7	1.6	2.6	2.4
2	100.0	95.8	94.2	2.3	1.7	2.9	2.6
3	100.0	96.5	94.6	1.7	1.6	2.6	2.6
4	100.0	95.6	94.1	2.6	1.6	3.3	2.3
5	100.0	96.1	94.7	2.0	1.8	2.6	2.5
6	100.0	95.9	94.3	2.2	1.7	2.8	2.6
7	100.0	95.9	94.1	2.2	1.7	3.2	2.5
8	100.0	95.9	94.5	2.2	1.7	2.8	2.5
9	100.0	94.9	93.0	2.6	2.4	3.4	3.3

[187] 3) 전하 변이체 분석 결과

[188] CEX-HPLC 분석 결과, 각 부형제 조건에 따른 뚜렷한 전하 변이체(charge variants) 변화는 관찰되지 않았다(도 16).

[189] 4) 점도 및 삼투압 분석 결과

[190] 각 부형제 농도 조건에 따른 점도와 삼투압 측정 결과, 50 mM 보다 100 mM 농도의 L-아르기닌 염산염 첨가 조건에서 점도 감소효과가 큰 것을 확인하였으며, 112 ~ 588 mOsmol/kg로 대부분 삼투압 기준을 만족하였다(표 32).

[191] [표32]

Condition No.	Viscosity(cP, 25°C)				Osmolality (mOsmol/kg)	
	Week 0		Week 4		Week 0	
	Buffer	Sample	Sample	Δ viscosity (W4-W0)	Buffer	Sample
1	1.062	18.682	25.033	6.321	80	112
2	1.081	16.426	28.315	11.889	232	297
3	1.120	12.148	15.029	2.881	283	331
4	1.126	19.706	30.707	11.001	305	408
5	1.176	17.528	18.147	0.619	401	500
6	1.185	17.800	29.186	11.386	446	588
7	1.168	25.624	28.682	3.058	349	474
8	1.133	18.321	18.282	-0.039	335	432
9	1.081	13.958	14.756	0.798	192	238

[192] 실시예 2.4.2. 2차 부형제 농도 스크리닝

[193] 실시예 1.4.1의 1차 부형제 농도 스크리닝에서 선정된 히스티딘 기본 버퍼와 2종의 부형제 중, L-아르기닌 염산염의 최적 농도 선정을 위해 4가지 조건에서 HL161BKN 2 배치 시료(HL161BKN B018, HL161BKN B021)로 농도, 탁도, 순도(aggregate 및 fragments), 점도, 삼투압 시험을 통한 안정성 및 피하주사(SC) 투여 적합도를 평가한 결과, 100 mM L-히스티딘, 100 mM L-아르기닌 염산염, 0.02% PSB20, pH 6.0을 HL161BKN의 최종 제형으로 결정하였다(표 33).

[194] [표33]

Conditions	L-Histidine (Basal buffer) (mM)	L-Arg-HCl (mM)	PSB20 (%)	HL161BKN Batch#
1	50	100	0.02	B018
2	50	150	0.02	
3	100	100	0.02	
4	150	50	0.02	
1	50	100	0.02	B021
2	50	150	0.02	
3	100	100	0.02	
4	150	50	0.02	

[195] 1) 농도(A280) 및 탁도(A340) 분석

[196] HL161BKN 농도가 4주간 변화가 거의 없었으며, 이는 1.5 mL 마이크로원심분리기를 파라필름(parafilm)으로 밀봉한 후, 항온항습기에 보관함으로써 버퍼의 증발을 방지한 효과로 예상되었다(표 34). 그리고, 탁도는 모든 조건에서 0.102 이하로 미미한 증가를 보였다(표 35).

[197] [표34]

Condition			0 Week				2 Week				4 Week			
			측정 OD280	평균	회색배수	농도	측정 OD280	평균	회색배수	농도	측정 OD280	평균	회색배수	농도
B018 (pool)	1	50 mM Histidine, 100 mM Arg-HCl, pH 6	35.485	35.547	10	220.8	34.738	34.727	10	215.7	34.493	34.474	10	214.1
			35.354				34.556				34.600			
			35.801				34.887				34.329			
	2	50 mM Histidine, 150 mM Arg-HCl, pH 6	36.112	36.128	10	224.4	36.017	36.022	10	223.7	34.073	34.095	10	211.8
			36.154				36.057				34.010			
			36.117				35.992				34.201			
	3	100 mM Histidine, 100 mM Arg-HCl, pH 6	37.151	37.273	10	231.5	35.054	35.005	10	217.4	33.163	33.265	10	206.6
			37.272				35.016				33.197			
			37.386				34.946				33.494			
	4	150 mM Histidine, 50 mM Arg-HCl, pH 6	35.793	35.843	10	222.6	33.970	33.994	10	211.1	33.989	34.049	10	211.5
			35.722				34.009				34.146			
			36.015				34.003				34.003			
B021 (13D7)	1	50 mM Histidine, 100 mM Arg-HCl, pH 6	34.958	35.085	10	217.9	36.516	36.453	10	226.4	35.538	35.633	10	221.3
			35.292				36.348				35.522			
			35.004				36.494				35.838			
	2	50 mM Histidine, 150 mM Arg-HCl, pH 6	35.187	35.346	10	219.5	32.950	32.886	10	204.3	35.910	35.973	10	223.4
			35.504				32.955				35.990			
			35.346				32.753				36.019			
	3	100 mM Histidine, 100 mM Arg-HCl, pH 6	33.123	33.218	10	206.3	36.664	36.632	10	227.5	34.242	34.278	10	212.9
			33.329				36.712				34.408			
			33.203				36.520				34.184			
	4	150 mM Histidine, 50 mM Arg-HCl, pH 6	35.554	35.584	10	221.0	38.367	38.305	10	237.9	36.008	36.052	10	223.9
			35.600				38.500				36.075			
			35.597				38.048				36.072			

[198] [표35]

Condition			T0		T2		T4		Δ OD340 (T4-T0)
			측정 OD340	평균	측정 OD340	평균	측정 OD340	평균	
8018 (pool)	1	50 mM Histidine, 100 mM Arg-HCl, pH 6	0.068	0.066	0.084	0.082	0.094	0.092	0.026
			0.068		0.080		0.092		
			0.063		0.083		0.091		
	2	50 mM Histidine, 150 mM Arg-HCl, pH 6	0.060	0.060	0.084	0.082	0.092	0.091	0.031
			0.063		0.080		0.092		
			0.057		0.083		0.090		
	3	100 mM Histidine, 100 mM Arg-HCl, pH 6	0.065	0.064	0.084	0.082	0.100	0.099	0.034
			0.065		0.082		0.100		
			0.063		0.080		0.096		
	4	150 mM Histidine, 50 mM Arg-HCl, pH 6	0.064	0.061	0.084	0.083	0.107	0.107	0.046
			0.060		0.082		0.109		
			0.060		0.082		0.105		
Life tech (13D7)	1	50 mM Histidine, 100 mM Arg-HCl, pH 6	0.140	0.142	0.214	0.216	0.244	0.244	0.102
			0.143		0.218		0.245		
			0.142		0.216		0.242		
	2	50 mM Histidine, 150 mM Arg-HCl, pH 6	0.139	0.140	0.187	0.186	0.202	0.201	0.061
			0.139		0.186		0.200		
			0.142		0.186		0.202		
	3	100 mM Histidine, 100 mM Arg-HCl, pH 6	0.135	0.138	0.195	0.193	0.213	0.214	0.076
			0.142		0.193		0.215		
			0.136		0.192		0.213		
	4	150 mM Histidine, 50 mM Arg-HCl, pH 6	0.144	0.140	0.203	0.203	0.230	0.230	0.090
			0.137		0.205		0.229		
			0.139		0.201		0.231		

[199] 2) 응집체 및 단편 분석

[200] SEC-HPLC 분석을 통하여, 각 부형제 조건에 따른 응집체 및 단편 증가량은 유의적 차이를 보이지 않았으나, 조건 3(100 mM L-Histidine, 100 mM L-Arginine HCl, 0.02% PSB20, pH 6.0)과 조건 4(50 mM L-Histidine, 100 mM L-Arginine HCl, 0.02% PSB20, pH 6.0)에서의 응집체 생성이 가장 적은 것으로 확인되었다(표 36 및 도 17).

[201] [표36]

Batch No.	Condition No.	Relative purity (monomer)			Changes at week 2 (W2-W0)		Changes at week 4 (W4-W0)	
		Week 0	Week 2	Week 4	Δ Aggre	Δ Frag	Δ Aggre	Δ Frag
B018	1	100.0	96.6	94.9	1.5	1.9	2.3	2.7
	2	100.0	96.3	95.2	1.7	2.0	2.2	2.6
	3	100.0	96.7	95.3	1.3	2.0	1.8	2.8
	4	100.0	96.7	95.5	1.1	2.1	1.6	2.9
B021	1	100.0	96.1	94.1	1.5	2.3	2.1	3.7
	2	100.0	96.0	94.3	1.7	2.2	2.2	3.4
	3	100.0	96.4	94.6	1.3	2.2	1.6	3.7
	4	100.0	96.3	94.7	1.3	2.4	1.6	3.7

[202] 3) 전하 변이체 분석

[203] CEX-HPLC 분석 결과, 각 부형제 조건에 따른 뚜렷한 전하 변이체(basic 및 acidic variants) 변화는 관찰되지 않았다(도 18).

[204] 4) 점도 및 삼투압 분석

[205] 각 부형제 농도 조건에 따른 점도 및 삼투압 측정 결과, 점도는 11 ~ 16 cP로 피하투여 제품의 점도 한계인 20 cP 이하로 조절이 되었으며, 삼투압은 350 ~ 465 mOsmol/kg으로 기준인 250 ~ 500 mOsmol/kg에 적합하였다(표 37).

[206] [표37]

Batch No.	Condition No.	Viscosity (cP, 25°C)			Osmolality (mOsmol/kg)			
		Week 0		Week 4	Week 0		Week 4	
		Buffer	Sample	Sample	Buffer	Sample	Sample	Δ mOsm (W4-W0)
B018	1	1.146	10.956	14.067	271	350	360	10
	2	1.160	13.126	12.117	360	429	436	7
	3	1.162	13.548	12.024	367	443	446	3
	4	1.153	11.848	11.777	373	465	475	10
B021	1	1.146	13.466	13.834	271	355	434	79
	2	1.160	14.030	11.871	360	453	458	5
	3	1.162	13.132	11.881	367	448	453	5
	4	1.153	15.875	13.351	373	465	471	6

[207] 5) 불용성 미립자 분석

[208] HL161BKN의 각 부형제 조건 시료에 대하여 미세 유체 이미징(Micro flow imaging, MFI)을 이용한 불용성 미립자 분석을 오송 첨단의료산업진흥재단

신약개발 지원센터에서 진행하였다.

[209] 각 조건의 시료를 10 mg/mL로 희석하여 5 μm ~ 100 μm 범위의 미립자(sub-visible particles) 수 증가량을 비교하였다. 그 결과, 조건 3에서 미립자 수 증가가 가장 적었다(표 38 및 도 19).

[210] [표38]

Condition No.	Δ Sub-visible particle number (W4-W1)					Total Sub-visible particle number (5 ~ 100 μm)		
	$5 \leq x < 10 \mu\text{m}$	$10 \leq x < 25 \mu\text{m}$	$25 \leq x < 50 \mu\text{m}$	$50 \leq x < 75 \mu\text{m}$	$75 \leq x < 100 \mu\text{m}$	Week 1	Week 4	Δ Particle (W4-W1)
1	30768	8779	402	26	5	2296	42131	39835
2	14463	3059	240	15	4	949	18920	17971
3	5680	1787	163	16	3	966	8516	7550
4	5940	1658	134	7	1	703	8586	7883

[211] 실시예 3.안정성 시험

[212] HL161BKN에 대해 최종 선정된 제제 조건에서 36개월 장기보존 및 가속 안정성 시험을 Catalent(USA)사에서 수행하였다. 안정성 평가를 위하여 완제의약품(Drug product, DP)는 Borosilicate glass vial과 테플론(teflon)이 코팅된 고무 마개(rubber stopper)를 사용하여 보관하였다. 선정된 제제 조건으로 안정성을 확인한 결과, 36개월 동안 DP의 안정성이 확인되어 주사제로서의 개발 가능성을 확보하였다(표 39 및 표 40).

[213] [39]

Drug product, long term stability at 5 ± 3°C										
Test item	Specification	Test Timepoints (Month)								
		0	1	3	6	9	12	18	24	36
Appearance	Clear, colorless to slightly yellow liquid in a clear, colorless glass vial; essentially free of particles	Clear slightly yellow liquid in a clear, colorless glass vial. Essentially free of particles	Clear slight yellow liquid in a clear, colorless glass vial, free of particles	Clear slightly yellow liquid in a clear, colorless glass vial; essentially free from particles	Clear slightly yellow liquid in a clear, colorless glass vial; essentially free of particles	Clear slightly yellow liquid in a clear, colorless glass vial; essentially free of particles	Clear slightly yellow liquid in a clear, colorless glass vial; essentially free of particles	Clear slightly yellow liquid in a clear, colorless glass vial; essentially free of particles	Clear slightly yellow liquid in a clear, colorless glass vial; essentially free of particles	Clear slightly yellow liquid in a clear, colorless glass vial; essentially free of particles
pH	5.5 - 6.5	5.9	5.9	5.9	5.9	5.9	5.9	5.9	5.9	5.9
A280	153 - 187 mg/mL	176 mg/mL	169 mg/mL	174 mg/mL	175 mg/mL	177 mg/mL	174 mg/mL	174 mg/mL	179 mg/mL	176 mg/mL
CE-SDS, Reduced	Sum of Heavy Chain and Light Chain > 95.0%	98.6%	98.4%	98.4%	98.5%	98.1%	97.9%	97.8%	98.0%	97.7%
CE-SDS, Non-Reduced ¹⁾	Report Intact Antibody (XX.X%)	89.9%	96.0%	95.8%	96.0%	95.4%	96.0%	95.8%	94.5%	95.1%
SEC-HPLC	≥ 90.0% Main Peak Aggregates and fragment ≤ 10.0%	99.4% <LLOQ	99.6% <LLOQ	98.4% 1.6%	98.8% 1.2%	99.4% <LLOQ	98.8% 1.2%	96.4% 3.6%	98.5% 1.5%	98.5% 1.5%
cIEF	Report Main peak pI value Report % Area of Basic group Report % Area of Main group Report % Area of Acidic group	pI=7.75 B: 1.25% M: 75.61% A: 23.14%	pI=7.78 B: 2.01% M: 77.17% A: 20.81%	pI=7.82 B: 2.01% M: 76.78% A: 21.21%	pI=7.80 B: 2.27% M: 75.29% A: 22.44%	pI=7.87 B: 2.12% M: 75.18% A: 22.70%	pI=7.74 B: 0.91% M: 78.55% A: 20.55%	pI=7.85 B: 2.66% M: 72.64% A: 24.70%	pI=7.82 B: 2.67% M: 72.06% A: 25.27%	pI=7.79 B: 2.21% M: 67.72% A: 30.06%
Potency	70 ~ 130% to reference standard	82%	108%	92%	107%	118%	118%	110%	96%	106%
Particulate Matter	≥10 µm: ≤ 6000 particles/container ≥25 µm: ≤ 600 particles/container	≥10 µm: 105 ≥25 µm: 0	Not Tested	≥10 µm: 4356 ≥25 µm: 73	≥10 µm: 14 ≥25 µm: 0	≥10 µm: 17 ≥25 µm: 2	≥10 µm: 42 ≥25 µm: 1	≥10 µm: 55 ≥25 µm: 1	≥10 µm: 143 ≥25 µm: 5	≥10 µm: 373 ≥25 µm: 10
Volume in Container	NLT the labeled volume	1 mL	Not Tested	Not Tested	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Endotoxin	≤ 0.5 EU/mg of protein	<0.1 EU/mg	Not Tested	Not Tested	Not Tested	Not Tested	<0.1 EU/mg	Not Tested	<0.1 EU/mg	<0.1 EU/mg
Sterility	No growth	No growth	Not Tested	Not Tested	Not Tested	Not Tested	No growth	Not Tested	No growth	No growth

[214] [표 40]

Drug Product, Accelerated stability at 25 ± 2°C / 60 ± 5%RH					
Test Item	Specification	Test Timepoints (Month)			
		0	1	3	6
Appearance	Clear, colorless to slightly yellow liquid in a clear, colorless glass vial, essentially free of particles	Clear slightly yellow liquid in a clear colorless glass vial, essentially free of particles	Clear light yellow liquid in a clear colorless glass vial, essentially free of particles	Clear slightly yellow liquid in a clear, colorless glass vial, essentially free from particles	Clear slightly yellow liquid in a clear, colorless glass vial, essentially free of particles
pH	5.5 - 6.5	5.9	5.9	5.9	5.9
A ₂₈₀	153 - 167 mg/mL	176 mg/mL	169 mg/mL	171 mg/mL	177 mg/mL
CE-SDS, Reduced	Sum of Heavy Chain and Light Chain ≥ 95.0%	98.6%	98.3%	97.9%	97.3%
CE-SDS, Non-Reduced ⁽¹⁾	Report Intact Antibody (XX.X%)	89.9%	95.7%	95.6%	93.7%
SEC-HPLC	≥ 90.0% Main Peak Aggregates and fragment ≤ 10.0%	99.4% <LLOQ ⁽²⁾	99.1% 0.9%	97.5% 2.6%	94.8% 5.2%
cIEF	Report Main peak pI value Report % Area of Basic group Report % Area of Main group Report % Area of Acidic group	pI=7.75 B: 1.25% M: 75.61% A: 23.14%	pI=7.81 B: 2.54% M: 73.72% A: 23.74%	pI=7.82 B: 3.28% M: 67.30% A: 29.42%	pI=7.77 B: 3.98% M: 60.60% A: 35.42%
Potency	70 ~ 130% to reference standard	82%	104%	79%	72%
Particulate Matter	≥10 µm: ≤ 6000 particles/container ≥25 µm: ≤ 600 particles/container	≥10 µm: 105 ≥25 µm: 0	Not Tested	≥10 µm: 4478 ≥25 µm: 14	≥10 µm: 12 ≥25 µm: 0

[215] 실시예 4. 최종 개발 후보 항체 제형 선정

[216] HL161BKN은 상기 제형에서 고농도에서 매우 안정한 경향을 나타내기 때문에 피하 투여 주사제 형태로의 개발 가능성을 확인하고자 하였다. 주사제를 개발하는 경우 투여 부위의 통증 및 부작용을 줄이기 위해 피하 투여가 가능한 점도는 20 cP 이하가 적합한 것으로 알려져 있다. 이에 따라 HL161BKN을 9단계 농도 조건으로 농축하여 5°C, 25°C 조건에서 viscosity를 측정하였다. 170 mg/mL의 고농도 HL161BKN 시료의 점도를 확인한 결과, 25°C에서 10 cP로 확인되어 피하 투여가 가능함을 확인하였다(도 20).

[217] HL161BKN은 상기 제형 연구에서 200 mg/mL 이상의 고농도에서도 매우 안정한 성질을 가짐이 확인되었다. 이로서 향후 자가 투여가 가능한 SC 주사제 제품 형태로 개발이 가능할 것으로 예상되며 타사 경쟁 제품들이 모두 infusion 형태의 제품인 것을 감안할 때 환자 편의성 증대라는 차별화가 가능하다.

[218] 뿐만 아니라, 상기 제형에서 고농도의 HL161BKN가 안정함을 확인하였으므로, 저농도의 HL161BKN도 상기 제형에서 안정할 것으로 예상된다. 따라서, 다양한 농도의 HL161BKN에 상기 제형은 적용될 수 있다.

청구범위

- [청구항 1] (a) 항-FcRn 항체 또는 이의 단편,
(b) 만니톨, 솔비톨, 아르기닌, 히스티딘, 글리신 및 이들의 염으로부터 선택되는 1종 이상의 첨가제,
(c) 시트레이트 또는 히스티딘으로부터 선택된 완충 시스템, 및
(d) 계면활성제
를 포함하는 pH 4.0 내지 8.0의 약제학적 제제.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 첨가제가 아르기닌 또는 이의 염이고,
상기 완충 시스템이 히스티딘인, 약제학적 제제.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 계면활성제는 폴리소르베이트인 것인, 약제학적 제제.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
추가적으로 메티오닌을 포함하는, 약제학적 제제.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 약제학적 제제는 주사제형인 것을 특징으로 하는 것인, 약제학적 제제.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 약제학적 제제는 20 cP 이하의 점도를 갖는 것을 특징으로 하는 것인, 약제학적 제제.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 약제학적 제제는 250 mOs/kg 내지 500 mOs/kg의 삼투압을 갖는 것을 특징으로 하는 것인, 약제학적 제제.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 항-FcRn 항체 또는 이의 단편의 농도가 50 mg/mL 내지 250 mg/mL인 것인, 약제학적 제제.
- [청구항 9] 제8항에 있어서,
상기 항-FcRn 항체 또는 이의 단편의 농도가 80 mg/mL 내지 250 mg/mL인 것인, 약제학적 제제.
- [청구항 10] 제1항에 있어서,
상기 약제학적 제제의 pH는 4.0 내지 7.0인 것인, 약제학적 제제.
- [청구항 11] 제1항에 있어서,
상기 항-FcRn 항체는
서열번호 5의 아미노산을 가지는 H-CDR1, 서열번호 6의 아미노산을 가지는 H-CDR2, 및 서열번호 7의 아미노산을 가지는 H-CDR3을 포함하는 중쇄가변영역을 포함하며;
서열번호 8의 아미노산을 가지는 L-CDR1, 서열번호 9의 아미노산을

가지는 L-CDR2, 및 서열번호 10의 아미노산을 가지는 L-CDR3을 포함하는 경쇄가변영역을 포함하는 것인, 약제학적 제제.

- [청구항 12] 제1항에 있어서,
상기 약제학적 제제는 피하로 투여되는 것을 특징으로 하는, 약제학적 제제.
- [청구항 13] 제1항에 있어서,
상기 약제학적 제제는
(a) 50 mg/mL 내지 250 mg/mL의 항-FcRn 항체,
(b) 50 내지 250 mM의 L-아르기닌 또는 이의 염산염,
(c) 50 내지 250 mM의 L-히스티딘 버퍼 및
(d) 0.01 내지 0.05%의 폴리소르베이트 20을 포함하며,
pH 4.0 내지 7.0인 것을 특징으로 하는, 약제학적 제제.
- [청구항 14] 제1항에 있어서,
상기 약제학적 제제는 가속 조건 하(25°C 상대습도 60%) 6개월 보관 시 HL161BKN의 응집체 및 단편의 양이 10% 이하인, 안정성이 증가된, 약제학적 제제.
- [청구항 15] 제1항에 있어서,
상기 약제학적 제제는 장기보존 조건(5°C) 하 36개월 보관 시 HL161BKN의 응집체 및 단편의 양이 10% 이하인, 안정성이 증가된, 약제학적 제제.
- [청구항 16] 제1항에 있어서,
상기 약제학적 제제는 장기보존 조건(5°C) 하 36개월 보관 시 HL161BKN의 응집체 및 단편의 양이 5.0% 이하인, 안정성이 증가된, 약제학적 제제.
- [청구항 17] 제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 약제학적 제제는 중증 근무력증, 갑상선눈병증, 온 자가면역 용혈성 빈혈, 시신경척수염, 특발성 혈소판 감소성 자반증, 보통 천포창, 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증, 루프스 신염, 및 막성신증으로 이루어진 군으로부터 선택된 자가면역 질환의 치료를 위한 것인, 약제학적 제제.