



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년03월08일

(11) 등록번호 10-2372245

(24) 등록일자 2022년03월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/19 (2006.01) A61K 31/401 (2006.01)

A61K 47/18 (2017.01) A61K 47/26 (2017.01)

A61K 47/48 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/19 (2013.01)

A61K 31/401 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-7016066

(22) 출원일자(국제) 2014년11월21일

심사청구일자 2019년11월21일

(85) 번역문제출일자 2016년06월16일

(65) 공개번호 10-2016-0079890

(43) 공개일자 2016년07월06일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2014/075326

(87) 국제공개번호 WO 2015/075201

국제공개일자 2015년05월28일

(30) 우선권주장

61/907,001 2013년11월21일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020130117751 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

젠덱 에이/에스

덴마크 1560 코펜하겐 브이 칼베보드 브뤼게 43

(72) 발명자

발비외른, 에스페르

덴마크 데코-3670 베크쇠 브뤼스테드 335

징, 샤오나

덴마크 데코-2860 쇠부르그 킬데바케고르츠 알레 162베

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 37 항

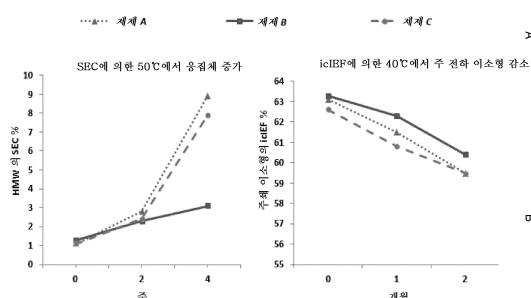
심사관 : 신영신

(54) 발명의 명칭 항체-약물 접합체 동결건조 제제

(57) 요약

항체-약물 접합체 (ADC), 예컨대 항-조직 인자 ADC의 계면활성제 미함유 동결건조 제제, 및 그의 재구성된 제제, 방법 및 용도가 본원에 개시된다. 제제는 오리스타틴 유도체 또는 다른 유사한 소수성 약물을 기초로 한 항-TF ADC에 특히 적합하다. 일반적으로, 제제의 부형제는 히스티딘, 수크로스, 트레할로스, 만니톨 및 글라이신을 포함하거나 이로 이루어진다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 47/183 (2013.01)

A61K 47/26 (2013.01)

A61K 47/6803 (2017.08)

A61K 47/6843 (2017.08)

A61K 47/6889 (2017.08)

C07K 16/2896 (2013.01)

C07K 2317/56 (2013.01)

C07K 2317/565 (2013.01)

(72) 발명자

로비, 켈리 앤

미국 47403 인디애나주 블루밍턴 더블유 맥해피 우
즈 드라이브 4356

폴, 티모시 워렌

미국 47404 인디애나주 블루밍턴 더블유. 포티지
트라이얼 4102

사샤, 그레고리 앨런

미국 46106 인디애나주 바저스빌 화이트테일 우즈
드라이브 4271

피즈, 네이션 앨런

미국 47403 인디애나주 블루밍턴 아파트먼트 디 에
스 그린리프 코트 701

빌름센, 보덜

스위스 체하-4058 바젤 보네크 5.4 에를렌마트베크
9

명세서

청구범위

청구항 1

항-조직 인자 (TF) 항체-약물 접합체 (ADC) 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 수성 제제의 동결건조에 의해 얻어지며,

a) 제제에 계면활성제가 존재하지 않고,

b) ADC의 항-TF 항체 부분이 서열 6에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR1 영역, 서열 7에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR2 영역, 및 서열 8에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR3 영역을 포함하는 가변 중쇄 (VH) 영역, 및 서열 46에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR1 영역, 서열 47에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR2 영역, 및 서열 48에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR3 영역을 포함하는 가변 경쇄 (VL) 영역을 포함하고,

c) ADC의 약물 부분이 발린 시트룰린 모노메틸 오리스타틴 E(vcMMAE)를 포함하는,

항-TF ADC의 동결건조 제제.

청구항 2

제1항에 있어서, 제약상 허용되는 부형제가

a) pH가 5 내지 7로 유지되도록 동결건조 단계 동안 pH 변화를 제한하는 완충제,

b) 항-TF ADC와 함께 비정질 상을 형성하는 적어도 하나의 비-환원당; 및

c) 적어도 하나의 증량제

를 포함하는 것인 동결건조 제제.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 수성 제제가 히스티딘, 시트레이트, 포스페이트, 탄산, 숙시네이트, 글리콜레이트 및 이들 중 어느 조합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 완충제를 포함하는 것인 동결건조 제제.

청구항 4

제2항에 있어서, 완충제가 히스티딘인 동결건조 제제.

청구항 5

제2항 또는 제4항에 있어서 있어서, 수성 제제가 20 내지 50 mM, 25 mM 내지 40 mM, 28 mM 내지 34 mM, 29 mM 내지 31 mM, 또는 30 mM의 농도로 완충제를 포함하는 것인 동결건조 제제.

청구항 6

제2항 또는 제4항에 있어서, 비-환원당이 수크로스, 트레할로스 및 이들의 조합물로부터 선택되는 것인 동결건조 제제.

청구항 7

제6항에 있어서, 비-환원당이 수크로스인 동결건조 제제.

청구항 8

제2항 또는 제4항에 있어서, 수성 제제가 10 내지 250 mM, 50 내지 225 mM, 84 내지 165 mM, 84 내지 146 mM, 84 내지 92 mM, 또는 88 mM의 농도의 수크로스로서 비-환원당을 포함하는 것인 동결건조 제제.

청구항 9

제2항 또는 제4항에 있어서, 증량제가 만니톨 및 글라이신으로부터 선택되는 것인 동결건조 제제.

청구항 10

제9항에 있어서, 증량제가 만니톨인 동결건조 제제.

청구항 11

제2항 또는 제4항에 있어서, 수성 제제가 50 mM 내지 300 mM, 100 mM 내지 274 mM, 158 내지 172 mM, 또는 165 mM의 농도에서 증량제를 포함하는 것인 동결건조 제제.

청구항 12

제1항, 제2항 및 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 수성 제제가 5 g/L 내지 30 g/L 항-TF ADC, 7 내지 20 g/L 항-TF ADC, 또는 8 내지 15 g/L 항-TF ADC를 포함하는 것인 동결건조 제제.

청구항 13

제1항, 제2항 및 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 수성 제제가 9 내지 11 g/L 항-TF ADC, 또는 10 g/L 항-TF ADC를 포함하는 것인 동결건조 제제.

청구항 14

제1항, 제2항 및 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 수성 제제의 pH가 5.5 내지 6.5의 범위, 또는 6인 동결건조 제제.

청구항 15

제2항 또는 제4항에 있어서, 증량제로서 만니톨 및 비-환원당으로서 수크로스를 포함하고, 만니톨 대 수크로스의 중량비가 적어도 1:1인 동결건조 제제.

청구항 16

제2항 또는 제4항에 있어서, 증량제로서 만니톨 및 비-환원당으로서 수크로스를 포함하고, 만니톨 대 수크로스의 중량비가 1:1 내지 30:1, 1:1 내지 10:1, 또는 1:1 내지 2:1인 동결건조 제제.

청구항 17

제2항 또는 제4항에 있어서, 증량제로서 만니톨 및 비-환원당으로서 수크로스를 포함하고, 만니톨 대 수크로스의 중량비가 1:1인 동결건조 제제.

청구항 18

제2항 또는 제4항에 있어서, 증량제로서 만니톨을 포함하고, 만니톨 대 항-TF ADC의 중량비가 적어도 약 3:1인 동결건조 제제.

청구항 19

제2항 또는 제4항에 있어서, 증량제로서 만니톨 및 비-환원당으로서 수크로스를 포함하고, 만니톨 대 항-TF ADC의 중량비가 3:1이고, 만니톨 대 수크로스의 중량비가 1:1인 동결건조 제제.

청구항 20

제1항, 제2항 및 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 5 g/L 내지 30 g/L 항-TF ADC 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 수성 제제의 동결건조에 의해 얻어지며, 상기 제약상 허용되는 부형제가

- a. pH가 5 내지 7인 20 내지 50 mM 히스티딘 또는 시트레이트 완충제;
- b. 10 내지 250 mM 수크로스 또는 트레할로스; 및
- c. 50 mM 내지 300 mM 만니톨 또는 글라이신

을 포함하는 것인 동결건조 제제.

청구항 21

제1항, 제2항 및 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 수성 제제가 9 내지 11 g/L 항-TF ADC 또는 10 mg/mL 항-TF ADC, 30 mM 히스티딘, 88 mM 수크로스 및 165 mM 만니톨을 포함하는 것인 동결건조 제제.

청구항 22

제1항, 제2항 및 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 45의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역을 포함하는 것인 동결건조 제제.

청구항 23

제1항, 제2항 및 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 분자당 약물 모이어티의 평균 절대 수가 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8인 동결건조 제제.

청구항 24

제1항, 제2항 및 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 항-TF 항체가 전장 항체인 동결건조 제제.

청구항 25

제1항, 제2항 및 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 항-TF 항체가 전장 완전 인간 모노클로날 IgG1 항체, 또는 인간 IgG1 κ 인 동결건조 제제.

청구항 26

제1항, 제2항 및 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 9 g/L 내지 11 g/L 항-TF ADC 및 pH가 5 내지 7인 30 mM 히스티딘 완충제; 88 mM 수크로스; 및 165 mM 만니톨을 포함하는 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 수성 제제의 동결건조에 의해 얻어지며; 항체가 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 45의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역을 포함하는 동결건조 제제.

청구항 27

제1항, 제2항 및 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 항-TF ADC가 적어도 6개월, 적어도 9개월, 적어도 15개월, 적어도 18개월, 적어도 24개월, 또는 적어도 36개월 동안 제약 용도를 위해 2-8°C, 또는 5°C에서 안정한 것인 동결건조 제제.

청구항 28

제27항에 있어서, 제제가 적어도 6개월, 적어도 9개월, 적어도 15개월, 적어도 18개월, 적어도 24개월, 또는 적어도 36개월 동안 5°C에서 보관할 때 3.0% 미만의 응집체, 또는 2.0% 미만의 응집체를 가질 때 안정한 것인 동결건조 제제.

청구항 29

제27항에 있어서, 안정성이 실시예 10에 따라 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 분석에 의해 결정되는 것인 동결건조 제제.

청구항 30

제1항, 제2항 및 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 동결건조 제제가 3.0 wt.% 미만의 수분, 2.0 wt.% 미만의 수분, 1 wt.% 미만의 수분, 또는 0.5 wt.% 미만의 수분을 함유하는 것인 동결건조 제제.

청구항 31

- 7 내지 20 g/L의 항체 부분이 제22항의 VH 및 VL 서열을 포함하는 것인 항-TF ADC, 및 하기 b, c 또는 d 중 어느 2종, 또는 b, c 또는 d 전부:
- 28 내지 34 mM 히스티딘;

c. 84 내지 146 mM 수크로스;

d. 158 내지 274 만니톨

을 포함하는, 항-TF ADC의 동결건조 제제를 제조하기 위한 수성 용액.

청구항 32

제1항, 제2항 및 제4항 중 어느 한 항에 따른 동결건조 제제를 멸균 수성 희석제 내에 재구성함으로써 얻은 제약상 허용되는 액체 제제.

청구항 33

제32항에 있어서, 5 g/L 내지 30 g/L 항-TF ADC, pH가 5 내지 7인 20 내지 50 mM 히스티딘; 10 내지 250 mM 수크로스 또는 트레할로스; 및 50 mM 내지 300 mM 만니톨 또는 글라이신을 포함하는 액체 제제.

청구항 34

제33항에 있어서, 9 내지 11 mg/mL 항-TF ADC, 28 내지 34 mM 히스티딘, 84 내지 92 mM 수크로스 및 158 내지 274 mM 만니톨을 포함하는 액체 제제.

청구항 35

- 수성 용액을 0.5°C/min 내지 1°C/min의 속도로 -40°C 이하의 온도로 냉각하는 단계;
- 적어도 120 min 동안 등온으로 유지하는 단계;
- 0.5°C/min 내지 3°C/min의 속도로 -20°C 내지 -15°C로 가온하는 단계;
- 적어도 180 min 동안 등온으로 유지하는 단계;
- 30°C 내지 -10°C의 온도에서 50 mTorr 내지 200 mTorr의 압력을 사용하여 진공을 인가하는 단계;
- 온도를 0.5°C/min 내지 1°C/min의 속도로 35°C 내지 50°C로 상승시키는 단계, 및
- 적어도 10시간 동안 등온으로 유지하는 단계

를 포함하는, 제1항, 제2항 및 제4항 중 어느 한 항에 따른 동결건조 제제의 제조 방법.

청구항 36

제1항, 제2항 및 제4항 중 어느 한 항에 따른 동결건조 제제를 멸균 수성 희석제 내에 재구성하는 단계를 포함하는, 항-TF ADC의 주사가능 용액의 제조 방법.

청구항 37

항-조직 인자 (TF) 항체-약물 접합체 (ADC) 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 수성 제제의 동결건조에 의해 얻어지며,

- 제제에 계면활성제가 존재하지 않고, 10 g/L 항-TF ADC, pH가 6인 30 mM 히스티딘 완충제, 88 mM 수크로스, 및 165 mM 만니톨을 포함하고,
- ADC의 항-TF 항체 부분이 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄 (VH) 영역 및 서열 45의 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄 (VL) 영역을 포함하고,
- ADC의 약물 부분이 발린 시트룰린 모노메틸 오리스타틴 E(vcMMAE)를 포함하는,

항-TF ADC의 동결건조 제제.

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항체-약물 접합체 (ADC)에 특히 적합한 동결건조 제제, 그의 재구성된 제제, 및 상기 동결건조 및 재구성된 제제의 제조 및 예를 들어 암 치료에서의 사용 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] ADC는 약물이 표적 세포에 대한 그의 세포독성 또는 다른 치료 효과를, 임의로 내재화 후에 발휘할 수 있도록 항체 부분이 표적 세포 상의 그의 항원에 특이적으로 결합하는 것인, 암 및 다른 병태의 치료를 위한 특이적 고 효능 작용제이다. 몇몇의 ADC, 특히 항-조직 인자 (항-TF) 항체를 기초로 한 ADC가 문헌에 기재되어 있다 (예를 들어, 그 전부가 본원에 참조로 포함된 WO 2011157741 A2 참조).

[0003] 그러나, 다른 단백질 약품처럼, 항체는 분해, 예컨대 산화, 탈아미드화 및 단편화, 및 입자 및 응집체 형성을 겪기 쉽다. 따라서, 이송 및 보관 동안 안정한 ADC 약물을 제공하기 위해, 제약 제제 내의 담체, 부형제, 및/또는 안정화제는 신중하게 선택되어야 한다. 또한, 항체 또는 ADC의 장기 안정성은 이 목적을 위해 최적화된 부형제를 사용하여 동결건조된 또는 냉동-건조된 제제를 제조함으로써 개선될 수 있다. 항체 또는 ADC 제제를 위한 많은 상기 제제가 특허 문헌에 기재되어 있고, 예를 들어 WO9704801, WO9856418, WO02011753, WO02096457, WO03009817, WO03039485, US8372396, WO2004004639, WO2004016286, WO2004055164, WO2004071439, WO2006014965, WO2006044908 및 WO2007019232를 참고한다.

[0004] ADC에 대해, 약물 접합 자체가 항체의 안정성을 감소시키고 생리화학적 특성을 변경할 수 있다는 점에서 추가의 문제가 존재한다. 예를 들어, 약물 모이어티 (moiety) DM1의 항-HER2 항체 트라스투주맙에 대한 접합이 항체의 CH2 도메인의 탈안정화를 야기한다고 보고되었다 (Wakankar et al., 2010). 또한, 세포독성 약물은 종종 소수성이기 때문에, ADC 접합체는 전체로서 비접합된 항체보다 덜 가용성이고, 따라서 응집, 입자 형성 및 표면 흡착을 더 쉽게 겪을 수 있다. 일반적으로, 항체 및 ADC 제제는 응집 및 흡착을 감소시키기 위해 계면활성제, 흔히 폴리소르베이트 20 또는 80을 포함한다 (예를 들어, 상기 언급된 특허 문헌 참고). 예를 들어, 브렌독시맙 베도틴 (상표명 아드세트리스(ADCETRIS)®)은 물 내에 재구성될 때 약 6.6의 pH에서 5 mg/mL ADC, 70 mg/mL 트레할로스 이수화물, 5.6 mg/mL 시트르산나트륨 이수화물, 0.21 mg/mL 시트르산 일수화물, 및 0.20 mg/mL 폴리소르베이트 80을 함유하는 동결건조된 분말로서 제공되는 오리스타틴 (auristatin) 유도체 MMAE에 연결된 항-CD30 항체에 기반한 ADC이다.

[0005] 따라서, 계면활성제는 제약 제제에 통상적으로 사용되고, 일반적으로 허용되는 제약 성분으로 인식되고 있다. 상기 언급한 바와 같이, 계면활성제는 항체 제조 및 제제화 동안 응집체 형성을 감소시키기 위해 통상적으로 사용된다 (예를 들어 문헌 [Vasquez-Rey and Lang, 2011, Biotech, Bioeng. 108:7 p 1494] 참조). 그러나, 가능한 한 많은 비활성 화합물의 사용을 감소시키는 것이 제약 제제의 일반적인 관심사항이다. 이러한 관심사항은 생성되는 약물의 비용을 감소시키는 것뿐만 아니라, 부형제의 잠재적인 원치 않는 효과를 감소시키는 것이다. 예를 들어, 생물학적 막과 반응하는 양친매성 (amphiphilic) 특성 때문에 많은 계면활성제는 독성이 더 크거나 더 작다. 수생 유기체에서 10 mg/L만큼 낮은 계면활성제의 LC50을 관찰하는 것은 드물지 않다. 또한, 자가산화 또는 폴리소르베이트의 광에 대한 노출은 과산화수소의 형성을 유발할 수 있고, 이것은 다시 항체 분자를 산화시켜 불안정한 생성물을 생성할 수 있다 ([Kerwin, 2008]; [Singh et al., 2012]). 이것은 ADC의 효능을 감소시킬 뿐만 아니라, 그의 잠재적으로 유해한 분해 생성물의 형성을 유발할 수 있다.

[0006] 실제로, 예를 들어 동결건조에 적합한 것으로 W02004004639에 처음 기재된 50 mM 숙신산, pH 6.0 및 5.0% 수크로스를 함유하는 huC242-DM1 ADC의 계면활성제 미함유 제제는 나중에 입자 및 응집체 형성을 적절하게 해결하지 못하는 것으로 W02007019232A2에서 보고되었다.

[0007] 따라서, 이송 및 보관 동안 안정하고 입자, 응집체 및 분해 생성물을 실질적으로 함유하지 않는, ADC용 계면활성제 미함유 제약 제제에 대한 필요성이 계속 존재한다.

발명의 내용

[0008] 발명의 개요

[0009] 본 발명자들은 재구성될 때 항-TF ADC가 안정한 상태로 유지되고 응집체 또는 입자를 형성하지 않는 항-TF ADC의 동결건조 제제를 발견하였다. 아주 놀랍게도, 이 제제는 계면활성제, 예컨대 폴리소르베이트 20 또는 80을 포함하지 않으면서, 및/또는 무기 염이 없는 상태에서 제조될 수 있다. 본 발명은 따라서 동결건조 단계 동안 pH 변화를 제한하는 완충제 성분, 적어도 하나의 안정화제, 일반적으로 고체 상태에서 항-TF ADC와 비정질 상을 형성하는 비-환원당, 및 적어도 하나의 증량제(bulking agent)를 포함하는 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 항-TF ADC의 안정한 계면활성제 미함유 동결건조 제제를 제공하고, 임의로 동결건조 제제에는 본질적으로 임의의 염이 존재하지 않을 수 있다. 예시적인 부형제는 다음을 포함하고, 이로 제한되지 않는다:

[0010] - 일반적으로 동결건조 전에 및/또는 재구성 후에 수성 제제에 약 5 내지 약 7의 pH를 제공하는 완충제 성분, 예컨대, 히스티딘, 시트레이트, 숙시네이트, 글리콜레이트, 탄산 및/또는 포스페이트;

[0011] - 하나 이상의 비-환원당, 예컨대 수크로스 및/또는 트레할로스;

[0012] - 하나 이상의 증량제, 예컨대 만니톨 및/또는 글라이신.

[0013] 이들 및 다른 측면 및 실시양태를 다음 섹션에서 보다 상세히 설명한다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 4주 동안 보관된 HuMax-TF DOE 샘플에 대해 SEC 분석을 사용하여 얻은 HMW (A), 주(main) (B) 및 LMW (C) 물질종의 백분율을 보여준다. 상기 막대 그래프에 대해, 제제는 각각의 완충제 + 부형제 하위군에 대해 좌측에서 우측으로 pH가 증가하는 순서로 배치되었다. 각각의 막대 쌍에서, 좌측 막대는 2-8℃를 나타내고, 우측 막대 45℃를 나타낸다. 상세한 내용에 대해서는 실시예 2를 참고한다.

도 2는 1주 동안 보관된 HuMax-TF DOE 샘플에 대해 cIEF를 사용하여 관찰된 산성 (A), 주 (B) 및 염기성 (C) 물질종의 피크 영역의 백분율에 대한 다양한 제제의 효과를 보여준다. 상기 막대 그래프에서, 제제는 각각의 완충제 + 부형제 하위군에 대해 좌측에서 우측으로 pH가 증가하는 순서로 배치된다. 각각의 막대 쌍에서, 좌측 막대는 2-8℃를 나타내고, 우측 막대 45℃를 나타낸다. 상세한 내용에 대해서는 실시예 4를 참고한다.

도 3은 2주 동안 40℃에서 보관될 때 SEC에 의해 결정된 HuMax TF ADC의 % HMW에 대한 pH의 효과를 보여준다. 상세한 내용에 대해서는 실시예 5를 참고한다.

도 4는 2주 동안 40℃에서 보관된 HuMax TF ADC에 대해 iCE에 의해 결정된 % 산성 물질종에 대한 pH 효과를 보여준다. 상세한 내용에 대해서는 실시예 5를 참고한다.

도 5a는 pH 6.0에서 제조되고 2주 동안 40℃에서 보관된 HuMax TF ADC 용액의 % 전하 주 피크 (iCE에 의한)에 대한 소르비톨 및 PS80 (폴리소르베이트 80)의 효과를 보여준다. 상세한 내용에 대해서는 실시예 5를

참고한다.

도 5b는 pH 6.0에서 제조되고 2주 동안 40℃에서 보관된 HuMax TF ADC 용액의 주 피크 (SEC에 의한)에 대한 소르비톨 및 PS80 (폴리소르베이트 80)의 효과를 보여준다. 상세한 내용에 대해서는 실시예 5를 참고한다.

도 6은 2주 동안 40℃에서 보관된 HuMax-TF-ADC의 주 전하 이소형 백분율에 대한 액체 제제와 동결건조 제제 사이의 비교를 보여준다. 상세한 내용에 대해서는 실시예 6을 참고한다.

도 7은 HuMax-TF-ADC의 상이한 동결건조 제제에 대한 가속 (accelerated) 안정성 데이터로부터의 예시적인 결과를 보여준다. (a) 응집체는 SEC에 의해 50℃에서 증가한다. (b) 주 전하 이소형은 icIEF에 의해 40℃에서 감소한다. 상세한 내용에 대해서는 실시예 8을 참고한다.

도 8은 2개월 동안 40℃에서 보관한 후 동결건조 제제 A, B 및 C의 DLS 입자 크기 분포를 보여준다. 상세한 내용에 대해서는 실시예 8을 참고한다.

도 9는 2주 동안 50℃에서 보관한 후 제제 A, B, 및 C의 제2 유도체 FTIR 스펙트럼을 보여준다. 수 분포는 상이한 크기 빈 (bin) 내의 입자의 수를 보여준다. 상세한 내용에 대해서는 실시예 8을 참고한다.

도 10은 제제 B에 대한 DSC 열 유동 온도기록도를 보여준다. 상세한 내용에 대해서는 실시예 11을 참고한다.

도 11은 본 발명의 ADC 제제에 사용하기 위한 예시적인 항-TF 항체의 VH 및 VL 서열을 보여준다. 카바트 (Kabat)에 따른 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열은 강조된다: 이텔릭체 서열은 CDR1 영역을 나타내고, 밑줄친 서열은 CDR2 영역을 나타내고, 굵게 표시한 서열은 CDR3 영역을 나타낸다.

도 12는 2개월 이하 동안 40℃에서 보관한 후 5 mg/mL 및 30 mg/mL 제제에 대한 SEC 평균 % 주 피크를 보여준다. 실시예 12를 참고한다.

도 13은 2개월 이하 동안 40℃에서 보관한 후 5 mg/mL 및 30 mg/mL 제제에 대한 SEC 평균 % 고분자량 물질종을 보여준다. 실시예 12를 참고한다.

도 14는 2개월 동안 40℃에서 보관한 후 5 mg/mL 및 30 mg/mL HuMax-TF-ADC 제제에 대한 iCE % 주 피크를 보여준다. 실시예 12를 참고한다.

도 15은 2개월 동안 40℃에서 보관한 후 5 mg/mL 및 30 mg/mL HuMax-TF-ADC 제제에 대한 iCE % 산성 물질종을 보여준다. 실시예 12를 참고한다.

도 16은 2개월 동안 40℃에서 보관한 후 5 mg/ml 및 30 mg/ml HuMax-TF-ADC 제제에 대한 iCE % 염기성 물질종을 보여준다. 실시예 12를 참고한다.

도 17은 48시간 이하 동안 25℃에서 보관된 용액 샘플에 대한 HuMax-TF-ADC에 대한 SEC 평균 % 주 피크를 보여준다.

도 18은 48시간 이하 동안 25℃에서 보관된 용액 샘플에 대한 SEC 평균 % 고분자량 물질종을 보여준다.

도 19는 48시간 이하 동안 25℃에서 보관된 용액 샘플에 대한 iCE 평균 % 주 피크를 보여준다.

도 20은 48시간 이하 동안 25℃에서 보관된 용액 샘플에 대한 iCE 평균 % 산성 물질종을 보여준다.

도 21은 48시간 이하 동안 25℃에서 보관된 용액 샘플에 대한 iCE 평균 % 염기성 물질종을 보여준다.

도 22는 2개월 이하 동안 40℃에서 보관된 동결건조된 글라이신 및 시트레이트 제제에 대한 SEC 평균 % 주 피크를 보여준다.

도 23은 2개월 이하 동안 40℃에서 보관된 동결건조된 글라이신 및 시트레이트 제제에 대한 SEC 평균 % 고분자량 물질종을 보여준다.

도 24는 2개월 동안 40℃에서 보관한 후 글라이신 또는 시트레이트로 제조된 HuMax-TF-ADC 제제에 대한 iCE % 주 피크를 보여준다.

도 25는 2개월 동안 40℃에서 보관한 후 글라이신 또는 시트레이트로 제조된 HuMax-TF-ADC 제제에 대한 iCE % 산성 물질종을 보여준다.

도 26은 2개월 동안 40℃에서 보관한 후 글라이신 또는 시트레이트로 제조된 HuMax-TF-ADC 제제에 대한 iCE %

염기성 물질종을 보여준다.

도 27은 pH 5, 또는 6, 또는 7에서 20 mM 또는 50 mM 히스티딘을 사용하여 제조되고 2개월 동안 40℃에서 보관된 10 mg/mL HuMax-TF-ADC 동결건조 제제에 대한 iCE % 주 피크를 보여준다.

도 28은 pH 5, 또는 6, 또는 7에서 20 mM 또는 50 mM 히스티딘을 사용하여 제조되고 2개월 동안 40℃에서 보관된 10 mg/mL HuMax-TF-ADC 제제에 대한 iCE % 산성 물질종을 보여준다.

도 29는 pH 5, 또는 6, 또는 7에서 20 mM 또는 50 mM 히스티딘을 사용하여 제조되고 2개월 동안 40℃에서 보관된 10 mg/mL HuMax-TF-ADC 제제에 대한 iCE % 염기성 물질종을 보여준다.

도 30은 pH 5, 또는 6, 또는 7에서 20 mM 또는 50 mM 히스티딘을 사용하여 제조되고 2개월 동안 40℃에서 보관된 10 mg/mL HuMax-TF-ADC 제제에 대한 SEC % 주 피크를 보여준다.

도 31은 pH 5, 또는 6, 또는 7에서 20 mM 또는 50 mM 히스티딘을 사용하여 제조되고 2개월 동안 40℃에서 보관된 10 mg/mL HuMax-TF-ADC 제제에 대한 SEC 평균 % 고분자량 물질종을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 발명의 상세한 설명
- [0016] 정의
- [0017] 용어 "동결건조된" 및 "냉동-건조된"은 본원에서 교환가능하게 사용되고, 먼저 동결한 후, 물질 내의 동결수가 승화되도록 하기 위해 주위 압력을 감소시킴으로써 탈수된 물질을 의미한다.
- [0018] 용어 "완충제"는 본원에서 사용되는 바와 같이, 제약상 허용되는 완충제를 의미한다. 용어 "완충제"는 용액의 pH 값을 예를 들어 허용되는 범위 내로 유지하는 작용제를 포함하고, 본원에서 설명되는 바와 같은 히스티딘, 트리스(TRIS)® (트리스(히드록시메틸)아미노메탄), 시트레이트, 숙시네이트, 글리콜레이트 등을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 일반적으로, "완충제"는 본원에서 사용되는 바와 같이, 약 5 내지 약 7, 바람직하게는 약 5.5 내지 6.5의 pH, 예컨대 약 pH 6 또는 약 pH 6.0에 적합한 pKa 및 완충 능력을 갖는다.
- [0019] 용어 "증량제(bulking agent)"는 냉동-건조된 생성물에 추가의 구조를 제공할 수 있는 작용제를 포함한다 (예를 들어, 제약상 허용되는 케이크 (cake)를 제공하기 위해). 통상적으로 사용되는 증량제는 만니톨, 글라이신, 수크로스 등을 포함한다. 제약상 허용되는 케이크의 제공 이외에, 증량제는 또한 일반적으로 동결건조된 조성물에 유용한 특질, 예컨대 붕괴 (collapse) 온도의 변경, 냉동-해동 보호의 제공, 장기간 보관에 걸친 단백질 안정성의 추가의 향상 등을 부여한다. 이들은 또한 장성 변형체로서 기능할 수 있다.
- [0020] 용어 "안정화제"는 본원에서 사용되는 바와 같이, 단백질에 안정성을 제공하는, 예를 들어 냉동 동안 동결보호제 및/또는 (냉동-) 건조 또는 '탈수' 동안 동결건조보호체로서 기능하는 작용제를 포함한다. 적합한 안정화제는 비-환원당 또는 당류 및 당 알콜, 예컨대 수크로스, 트레할로스, 만니톨, 자일리톨 등, 및 아미노산, 예컨대 글라이신, 알라닌 및 라이신을 포함한다. 안정화제는 또한 증량제, 장성-변형제 및/또는 점도 증가제로서 기능할 수 있다. 약어 "cIEF", "icIEF" 및 "iCE"는 본원에서 교환가능하게 사용되고, 모두 "모세관 등전 포커싱 (capillary isoelectric focusing)"을 의미한다.
- [0021] "계면활성제"는 본원에서 사용되는 바와 같이, 일반적으로 표면에 대한 약물 흡착 및/또는 응집을 방지하기 위해 제약 제제에 사용되는 화합물이다. 또한, 계면활성제는 두 액체 사이의 또는 액체와 고체 사이의 표면 장력 (또는 계면 장력)을 낮춘다. 예를 들어, 예시적인 계면활성제는 매우 낮은 농도 (예를 들어, 5% w/w 이하, 예컨대 3% w/w 이하, 예컨대 1% w/w 이하)로 존재할 때 표면 장력을 유의하게 낮출 수 있다. 계면활성제는 양친매성이고, 이것은 이들이 대체로 친수성 및 소수성 또는 친지질성 기 둘 모두로 이루어지고, 따라서 수성 용액에서 미셀 (micelle) 또는 유사한 자가회합 구조를 형성할 수 있음을 의미한다. 제약 용도를 위해 알려진 계면활성제는 글리세롤 모노올레에이트, 벤제토포름 클로라이드, 나트륨 도큐세이트, 인지질, 폴리에틸렌 알킬 에테르, 소듐 라우릴 술페이트 및 트리카프틸린 (음이온성 계면활성제); 벤즈알코늄 클로라이드, 시트림이드, 세틸피리디늄 클로라이드 및 인지질 (양이온성 계면활성제); 및 알파 토크페롤, 글리세롤 모노올레에이트, 미리스틸 알콜, 인지질, 폴록사머, 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르, 폴리옥시에틸렌 피마자유 유도체, 폴리옥시에틸렌 소르빈탄 지방산 에스테르, 폴리옥시에틸렌 스테아레이트, 폴리옥실 15 히드록시스테아레이트, 폴리옥실글리세리드, 폴리소르베이트, 프로필렌 글리콜 디라우레이트, 프로필렌 글리콜 모노라우레이트, 소르비탄 에스테르 수크로스 팔미테이트, 수크로스 스테아레이트, 트리카프틸린 및 TPGS (비이온성 및 양성이온성 (zwitterionic) 계

면활성제)를 포함한다.

[0022] 본원에서 관심 "회석제"는 제약상 허용되고 (인간 투여를 위해 안전하고 비-독성이고) 재구성되는 제제의 제조에 유용한 것이다. 예시적인 회석제는 멸균수, 정균 주사수 (BWF), pH 완충 용액 (예를 들어 포스페이트-완충 염수), 멸균 염수 용액, 링거 (Ringer) 용액 또는 텍스트로스 용액을 포함한다.

[0023] 본원에서 사용되는 바와 같이, "치료 모이어티"는 대상체에게 투여될 때, 특히 본원에서 설명되는 ADC로서 전달될 때 치료 또는 예방 효과를 발휘하는 화합물을 의미한다. "세포독성" 또는 "세포증식 억제성" 모이어티는 세포에 유해한 (예를 들어, 사멸시키는) 화합물이다. ADC에 사용하기 위한 일부의 세포독성 또는 세포증식 억제성 모이어티는 소수성이고, 이것은 이들이 물 내에 용해도를 보이지 않거나 단지 제한된 용해도, 예를 들어, 1 g/L 이하 (매우 약한 가용성), 예컨대 0.8 g/L 이하, 예컨대 0.6 g/L 이하, 예컨대 0.4 g/L 이하, 예컨대 0.3 g/L 이하, 예컨대 0.2 g/L 이하, 예컨대 0.1 g/L 이하 (사실상 불용성)만을 갖는다는 것을 의미한다. 예시적인 소수성 세포독성 또는 세포증식 억제성 모이어티는 특정 미세튜불린 (microtubulin) 억제제, 예컨대 오리스타틴 및 그의 유도체, 예를 들어, MMAF 및 MMAE를 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0024] 용어 "이뮤노글로불린"은 4개 모두가 디설피드 결합에 의해 상호연결된 한 쌍의 경쇄 (L) 및 한 쌍의 중쇄 (H)의 2쌍의 폴리펩티드 사슬로 이루어지는, 구조상 관련된 당단백질의 클래스를 나타낸다. 이뮤노글로불린의 구조는 특징이 잘 결정되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N. Y. (1989)) 참조]. 간단히 설명하면, 각각의 중쇄는 일반적으로 중쇄 가변 영역 (본원에서 VH 또는 V_H 로 약칭함) 및 중쇄 불변 영역 (CH 또는 C_H)으로 이루어진다. 중쇄 불변 영역은 일반적으로 3개의 도메인, 즉 CH1, CH2, 및 CH3으로 이루어진다. 각각의 경쇄는 일반적으로 경쇄 가변 영역 (본원에서 VL 또는 V_L 로 약칭함) 및 경쇄 불변 영역 (CL 또는 C_L)으로 이루어진다. 경쇄 불변 영역은 일반적으로 1개의 도메인 CL로 이루어진다. VH 및 VL 영역은 상보성 결정 영역 (CDR)으로도 불리는 추가변 영역 (또는 서열이 추가변성이고/이거나 구조적으로 규정된 루프를 형성할 수 있는 추가변 영역)으로 추가로 세분될 수 있고, 이들 영역에는 프레임워크 영역 (FR)으로 불리는 보다 보존된 영역이 산재되어 있다. 각각의 VH 및 VL은 일반적으로 3개의 CDR 및 4개의 FR로 이루어지고, 이들은 아미노-말단에서 카르복시-말단으로 다음 순서로 배열되어 있다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (또한, 문헌 [Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987)] 참조). 일반적으로, 상기 불변 영역 내에서 아미노산 잔기의 넘버링은 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]에 기재된 방법에 따라 수행된다 (본원에서 카바트에서와 같은 또는 카바트에 따른 가변 도메인 잔기 넘버링과 같은 문구는 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 대한 상기 넘버링 시스템을 의미한다). 상기 넘버링 시스템을 사용하여, 펩티드의 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 CDR의 단축, 또는 그 내부로의 삽입에 대응하는 보다 적은 아미노산 또는 추가의 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 VH CDR2의 잔기 52 다음의 단일 아미노산 삽입체 (카바트에 따른 잔기 52a) 및 중쇄 FR 잔기 82 다음의 삽입 잔기 (예컨대, 카바트에 따른 잔기 82a, 82b, 및 82c 등)를 포함할 수 있다. 잔기의 카바트 넘버링은 항체 서열을 "표준" 카바트 넘버링된 서열과 상동성 영역에서 정렬함으로써 제시된 항체에 대해 결정될 수 있다.

[0025] 본 발명의 문맥에서 용어 "항체" (Ab)는 이뮤노글로불린 분자, 이뮤노글로불린 분자의 단편, 또는 이들의 유도체를 지칭하고, 이는 전형적인 생리학적 조건 하에서 적어도 약 30분, 적어도 약 45분, 적어도 약 1시간, 적어도 약 2시간, 적어도 약 4시간, 적어도 약 8시간, 적어도 약 12시간, 약 24시간 또는 그 초과, 약 48시간 또는 그 초과, 약 3, 4, 5, 6, 7일 또는 그 초과 등과 같은 유의한 기간의 시간, 또는 임의의 기타 관련된 기능적으로 정의된 기간 (예컨대, 항원에 대한 항체 결합과 관련된 생리학적 응답을 유도하고/하거나, 촉진하고/하거나, 증강시키고/시키거나 조정하는데 충분한 시간 및/또는 항체가 이펙터 활성을 동원하는데 충분한 시간)의 반감기로 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 갖는다. 이뮤노글로불린 분자의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 항체 (Ab)의 불변 영역은 면역계의 다양한 세포 (예컨대 이펙터 세포) 및 보체계의 성분, 예를 들어 고전적인 보체 활성화 경로의 제1 성분인 C1q가 포함되는 숙주 조직 또는 인자에 대한 이뮤노글로불린의 결합을 매개할 수 있다. 상기 나타난 바와 같이, 본원에서 용어 항체는 달리 언급되거나 문맥적으로 명백하게 모순되지 않는 한, 항원에 특이적으로 결합하는 능력이 유지된 항체의 단편을 포함한다. 항체의 항원-결합 기능이 전장 항체의 단편에 의해 수행될 수 있는 것으로 나타났다. 용어 "항체" 내에 포함되는 결합 단편의 예로는 다음이 포함된다: (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 1가 단편인 Fab' 또는 Fab 단편, 또는 W02007059782 (젠맵 (Genmab A/S))에 기재된 바와 같은 1가 항체; (ii) 힌지 영역에서 디설피

드 다리에 의해 연결된 두 개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')₂ 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 본질적으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 아암의 VL 및 VH 도메인으로 본질적으로 이루어진 Fv 단편; (v) VH 도메인으로 본질적으로 이루어지고 도메인 항체 (Holt et al., Trends Biotechnol. 2003 Nov;21(11):484-90)로도 불리는 dAb 단편 (Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)); (vi) 낙타류 (camelid) 또는 나노바디 (nanobody) (Revs et al., Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan;5(1):111-24) 및 (vii) 단리된 상보성 결정 영역 (CDR). 또한, Fv 단편의 두 도메인인 VL 및 VH가 별개의 유전자에 의해 코딩되더라도, 재조합 방법을 사용하여, VL 및 VH 영역이 쌍을 이루어 1가 분자 (단일쇄 항체 또는 단일쇄 Fv (scFv)로 공지됨)를 형성하는 단일 단백질 사슬로 만들어지도록 할 수 있는 합성 링커에 의해 두 도메인을 연결할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Bird et al., Science 242, 423-426 (1988)] 및 [Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)] 참조). 이와 같은 단일쇄 항체는 달리 언급되거나 문맥적으로 명백하게 지시되지 않는 한, 용어 항체 내에 포함된다. 상기 단편이 항체의 의미 내에 일반적으로 포함되지만, 이는 총괄적으로, 그리고 각각 독립적으로, 상이한 생물학적 특성 및 용도를 나타내는 본 발명의 특유한 특징이다. 본 발명의 문맥 내의 상기 및 기타 유용한 항체 단편이 본원에서 추가로 논의된다. 달리 나타내지 않으면, 용어 항체에는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 (mAb), 이중특이적 항체, 항체-유사 폴리펩티드, 예컨대 키메라 (chimera) 항체 및 인간화 항체, 및 임의의 공지의 기술, 예를 들어 효소 절단, 펩티드 합성, 및 재조합 기술에 의해 제공되는, 항원에 특이적으로 결합하는 능력이 유지된 항체 단편 (항원-결합 단편)이 일반적으로 포함된다는 것을 또한 이해하여야 한다. 생성된 항체는 임의의 이소형을 가질 수 있다.

[0026] 본 발명의 문맥에서, 용어 "ADC"는 항체-약물 접합체를 의미하고, 본 발명의 문맥에서 본원에서 설명되는 바와 같이 또 다른 모이어티에 커플링된 항-TF 항체를 의미한다. 이것은 예를 들어 링커를 사용하여, 예를 들어 시스테인에 또는 다른 접합 방법을 사용하여 다른 아미노산에 커플링될 수 있다. 모이어티는 예를 들어 약물 또는 독소 등일 수 있다.

[0027] "항-TF 항체"는 항원 조직 인자 또는 조직 인자 항원에 특이적으로 결합하는, 상기 설명한 항체이다. 용어 "조직 인자", "TF", "CD142", "조직 인자 항원", "TF 항원" 및 "CD142 항원"은 본원에서 교환가능하게 사용되고, 달리 특정되지 않으면, 세포에 의해 천연적으로 발현되거나 또는 조직 인자 유전자로 형질감염된 세포서 발현되는 인간 조직 인자의 임의의 변이체, 이소형 및 중 상동체를 포함한다. 한 실시양태에서, 조직 인자 아미노산 서열은 Genbank 기탁 NP_001984.1 서열의 성숙 형태를 포함한다. 항-TF 항체, 특히 인간 항-TF 항체는 W02011/157741에 설명된 방법에 따라 생산되고 특성화될 수 있다.

[0028] 본원에서 사용되는 용어 "인간 항체"는 인간 생식계열 (germline) 이뮤노글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함하도록 의도된다. 본 발명의 인간 항체는 인간 생식계열 이뮤노글로불린 서열에 의해 코딩되지 않는 아미노산 잔기 (예를 들어, 시험관 내에서 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이 유발에 의해 또는 생체 내에서 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다.

[0029] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 ADC의 항체 또는 ADC는 단리된다. "단리된 항체" 또는 "단리된 ADC"는 본원에서 사용되는 바와 같이, 상이한 항원 특이성을 갖는 다른 항체가 실질적으로 없는 항체 또는 ADC를 지칭하도록 의도된다 (예를 들어, TF에 특이적으로 결합하는 단리된 항체에는 TF 이외의 다른 항원에 특이적으로 결합하는 항체가 실질적으로 없다). 단리된 항체-약물 접합체는 본원에서 사용되는 바와 같이, "자유 독소"가 또한 실질적으로 없는 항체-약물 접합체를 지칭하도록 의도되고, 여기서 "자유 독소"는 항체에 접합되지 않은 독소를 의미하고자 의도된다. 독소와 관련하여 사용되는 용어 "실질적으로 없는"은 특히 W02011157741의 실시예 16에서 설명되는 바와 같이 결정될 때 5% 미만, 예컨대 4% 미만, 또는 3% 미만, 또는 2% 미만, 또는 1.5% 미만, 또는 1% 미만, 또는 0.5% 미만의 비접합된 약물이 존재함을 의미할 수 있다. 그러나, 인간 TF의 에피토프, 이소형 또는 변이체에 특이적으로 결합하는 단리된 항체 또는 단리된 항체-약물 접합체는 다른 관련 항원, 예를 들어, 다른 종으로부터의 항원 (예컨대 조직 인자 중 상동체)에 대해 교차 반응성을 가질 수 있다. 또한, 단리된 항체 또는 ADC에는 다른 세포 물질 및/또는 화합물이 실질적으로 없을 수 있다. 본 발명의 한 실시양태에서, 상이한 항원-결합 특이성을 갖는 2종 이상의 "단리된" 모노클로날 항체 또는 ADC가 잘 규정된 조성으로 조합된다. 한 실시양태에서, 2종 이상의 단리된 모노클로날 항체 또는 ADC는 2종 이상의 상이한 에피토프에서 TF에 결합한다. 또 다른 실시양태에서, TF에 대한 결합 특이성을 갖는 mAb 또는 ADC와, TF가 아닌 제2 결합 특이성을 갖는 하나 이상의 mAb 또는 ADC의 혼합물일 수 있다.

[0030] 2종 이상의 항체의 문맥에서 본원에서 사용될 때, 용어 "와 경쟁하다" 또는 "와 교차 경쟁하다"는 항체가 항원에 결합할 때 또 다른 항체, 예를 들어 "참조" 항체와 경쟁함을 나타낸다. 예를 들어, TF 결합을 위한 2종 이상의 항체의 경쟁은 W010066803의 실시예 12에서 설명되는 바와 같은 검정을 사용하여 분석될 수 있고, 여기서

항체 교차-경쟁 연구는 샌드위치 ELISA를 사용하여 수행된다. 간단히 설명하면, PBS 완충제 내의 0.5 또는 2 $\mu\text{g/ml}$ 항체를 100 μl /웰로 사용하여 플레이트 웰을 시험되는 항-TF 항체로, 예를 들어 +4°C에서 밤새 코팅한다. ELISA 웰을 PBS로 세척하고, 1시간 동안 실온에서 PBS 중의 2% (v/v) 혈청 (예를 들어, 닭 혈청)으로 차단하고, PBS로 다시 세척한다. 후속적으로, 50 μl 항-TF 참조 항체 (10 $\mu\text{g/mL}$)에 이어 50 μl His-태그부착된 세포외 도메인 TF (TFECDHis) (0.5 또는 1 $\mu\text{g/ml}$)을 첨가하고, 1시간 동안 RT에서 (진탕하면서) 인큐베이팅한다. 플레이트를 PBST (PBS + 0.05% 트윈)로 3회 세척하고, 1:2000 희석시킨 항-his 비오틴화 항체 (예를 들어, 항-his 비오틴 BAM050)와 함께 1시간 동안 RT에서 (진탕하면서) 인큐베이팅한다. 플레이트를 세척하고, 직접 또는 간접적으로 검출가능한 화합물에 접합된 스트렙타비딘 (예를 들어, 스트렙타비딘-폴리-HRP (상킨 (Sanquin, 네덜란드 암스테르담))과 함께 20분 동안 RT에서 인큐베이팅하고, 다시 세척한다. 이어서, 결합된 스트렙타비딘의 양을 검출 및/또는 정량한다. 예를 들어, 간접적으로 검출가능한 화합물이 HRP이면, 반응액을 암소에서 RT에서 ABTS (로슈 다이아그노스틱스 (Roche Diagnostics))로 더욱 발색시키고, 2% (w/v) 옥살산을 첨가하여 15분 후에 중지시키고, 405 nm에서 흡광도를 측정한다. 검정은 또한 플레이트 웰을 참조 항체로 코팅한 후, 여기에 시험 항체를 TF와 함께 첨가될 수 있다는 점에서 반전될 수 있다. 몇몇 쌍의 항체에서, W010066803의 실시예 12의 검정에서의 경쟁은 하나의 항체가 플레이트에 코팅되고 다른 항체는 경쟁을 위해 사용되거나 또는 그 반대로 적용될 경우에만 관찰된다. 또한, 본원에서 사용될 때, 용어 "와 경쟁하다"는 상기 항체의 조합을 포함하는 것으로 의도된다.

[0031] 본원에서 사용될 때, 용어 "모노클로날 항체" 또는 "모노클로날 항체 조성물"은 단일 분자 조성의 항체 분자의 제제를 지칭한다. 모노클로날 항체 또는 그의 조성물은 본 발명에 따른 약물 접합된 항체일 수 있다. 모노클로날 항체 조성물은 특정 에피토프에 대한 단일 결합 특이성 및 친화도를 보인다. 따라서, 용어 "인간 모노클로날 항체"는 인간 생식계열 이뮤노글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는, 단일 결합 특이성을 나타내는 항체를 말한다. 인간 모노클로날 항체는 불멸화 세포에 융합된, 인간 중쇄 트랜스젠 (transgene) 및 경쇄 트랜스젠을 포함하는 게놈을 갖는 트랜스제닉 (transgenic) 또는 트랜스크로모솜 (transchromosomal) 비-인간 동물, 예컨대 트랜스제닉 마우스로부터 수득된 B 세포를 포함하는 하이브리도마에 의해 생성될 수 있다. 관련 기술 분야에 공지된 분자 생물학을 사용하여, 임의로 또 다른 이소형과 함께 항체를 재조합 방식으로 생산할 수 있도록 인간 모노클로날 항체의 cDNA 및/또는 아미노산 서열을 이어서 결정할 수 있다.

[0032] 본원에서 사용되는 바와 같이, 미리 결정된 항원에 대한 항체의 결합이라는 맥락에서 용어 "결합" 또는 "특이적으로 결합하다"는 일반적으로 예를 들어 항원을 리간드로, 항체를 분석물로 사용하여 BIAcore 3000 기기에서 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 기술에 의해 결정하는 경우, 약 10^{-7} M 이하, 예컨대 약 10^{-8} M 이하, 예컨대 약 10^{-9} M 이하, 약 10^{-10} M 이하, 또는 약 10^{-11} M 이하의 KD (해리 평형 상수)에 상응하는 친화도의 결합이고, 미리 결정된 항원 또는 밀접하게 관련된 항원 이외의 비-특이적 항원 (예컨대, BSA, 카제인)에 대한 결합을 위한 그의 결합 친화도보다 10배 이상 낮은, 예컨대 100배 이상 낮은, 예를 들어 1,000배 이상 낮은, 예컨대 10,000배 이상 낮은, 예를 들어 100,000배 이상 낮은 KD에 상응하는 친화도로 미리 결정된 항원에 결합한다. 친화도가 더 낮은 양은 항체의 KD에 의존적이기 때문에, 항체의 KD가 매우 낮으면 (즉, 항체가 고도로 특이적이면), 항원에 대한 친화도가 비-특이적 항원에 대한 친화도보다 더 낮은 양은 10,000배 이상일 수 있다.

[0033] 또한, 본 발명은 한 실시양태에서 본원에서 설명되는 항체의 VL 영역, VH 영역, 또는 하나 이상의 CDR의 기능적 변이체를 포함하는 항체의 제제를 제공한다. 항-TF 항체의 문맥에서 사용되는 VL, VH, 또는 CDR의 기능적 변이체는 모 항체의 친화도/결합력 (avidity) 및/또는 특이성/선택성의 적어도 실질적인 비율 (적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 초과)을 계속 보유할 수 있도록 하고, 일부 경우에 상기 항-TF 항체는 모 항체보다 더 큰 친화도, 선택성 및/또는 특이성과 연관될 수 있다.

[0034] 상기 기능적 변이체는 일반적으로 모 항체에 대한 유의한 서열 동일성을 보유한다. 두 서열 간의 동일성 %는 두 서열의 최적 정렬을 위해 도입될 필요가 있는 갭 (gap)의 수 및 각각의 갭의 길이를 고려하여 서열에 의해 공유되는 동일한 위치의 수의 함수이다 (즉, 동일성 % = [동일한 위치의 #/위치의 총 #] x 100). 서열의 비교 및 두 서열 사이의 동일성 %의 결정은 아래에서 설명되는 바와 같은 수학 알고리즘을 사용함 수행할 수 있다.

[0035] 본 발명의 목적을 위해, 두 아미노산 서열 사이의 서열 동일성은 EMBOSS 패키지 (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, [Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277]), 바람직하게는 버전 5.0.0 이후의 버전의 니들 (Needle) 프로그램에서 실행되는 니들만-분취 (Needleman-Wunsch) 알고리즘을 사용하여 결정할 수 있다 (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453). 사용되는 파라미터는

갭 개방 페널티 (open penalty) 10, 갭 연장 페널티 0.5, 및 EBLOSUM62 (BLOSUM62의 EMBOSS 버전) 치환 매트릭스이다. "가장 긴 동일성" (-nobrief 옵션을 사용하여 얻음)으로 표시된 니들의 결과는 동일성 비율로서 사용하고, 다음과 같이 계산한다: (동일한 잔기 x 100)/(정렬 길이 - 정렬 내의 갭의 총수).

[0036] 본 발명의 목적을 위해, 두 데옥시리보뉴클레오타이드 서열 사이의 서열 동일성은 EMBOSS 패키지 (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, [Rice et al., 2000, 상기 문헌]), 바람직하게는 버전 5.0.0 이후의 버전의 니들 프로그램에서 실행되는 니들만-분취 알고리즘을 사용하여 결정된다 (Needleman and Wunsch, 1970, 상기 문헌). 사용되는 파라미터는 갭 개방 페널티 10, 갭 연장 페널티 0.5, 및 EDNAFULL (NCBI NUC4.4의 EMBOSS 버전) 치환 매트릭스이다. "가장 긴 동일성" (-nobrief 옵션을 사용하여 얻음)으로 표시된 니들의 결과는 동일성 비율로서 사용하고, 다음과 같이 계산한다: (동일한 데옥시리보뉴클레오타이드 x 100)/(정렬 길이 - 정렬 내의 갭의 총수).

[0037] CDR 변이체의 서열은 대부분 보존적 치환을 통해 모 항체 서열의 CDR 서열과 상이할 수 있고; 예를 들어 변이체 내의 적어도 약 35%, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 75% 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상, 예컨대 약 96%, 97% 또는 98% 또는 99%의 치환은 보존적 아미노산 잔기 교체이다.

[0038] CDR 변이체의 서열은 대부분 보존적 치환을 통해 모 항체 서열의 CDR 서열과 상이할 수 있고; 예를 들어 변이체 내의 적어도 10, 예컨대 적어도 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개의 치환이 보존적 아미노산 잔기 교체이다.

[0039] 본 발명의 측면에서, 보존적 치환은 다음 3개의 표 중 하나 이상에 반영되는 아미노산의 클래스 내에서의 치환에 의해 규정될 수 있다:

[0040] 보존적 치환을 위한 아미노산 잔기 클래스

산성 잔기	Asp (D) 및 Glu (E)
염기성 잔기	Lys (K), Arg (R), 및 His (H)
친수성 비하전 잔기	Ser (S), Thr (T), Asn (N), 및 Gln (Q)
지방족 비하전 잔기	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L), 및 Ile (I)
비-극성 비하전 잔기	Cys (C), Met (M), 및 Pro (P)
방향족 잔기	Phe (F), Tyr (Y), 및 Trp (W)

[0041]

[0042] 다른 보존적 아미노산 잔기 치환 클래스

1	A	S	T
2	D	E	
3	N	Q	
4	R	K	
5	I	L	M
6	F	Y	W

[0043]

[0044] 아미노산 잔기의 다른 물리적 및 기능적 분류

알콜 기-함유 잔기	S 및 T
지방족 잔기	I, L, V, 및 M
시클로알케닐-회합 잔기	F, H, W, 및 Y
소수성 잔기	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W, 및 Y
음으로 하전된 잔기	D 및 E
극성 잔기	C, D, E, H, K, N, Q, R, S, 및 T
양으로 하전된 잔기	H, K, 및 R
작은 잔기	A, C, D, G, N, P, S, T, 및 V
매우 작은 잔기	A, G, 및 S
턴(turn) 형성 관여 잔기	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P, 및 T
가요성 잔기	Q, T, K, S, G, P, D, E, 및 R

[0045]

[0046] 보다 보존적 치환기 분류는 다음을 포함한다: 발린-류신-이소류신, 페닐알라닌- 티로신, 라이신-아르기닌, 알라닌-발린, 및 아스파라긴-글루타민. 추가의 아미노산의 군이 또한 예를 들어 문헌 [Creighton (1984) Proteins: Structure and Molecular 특성 (2d Ed. 1993), W.H. Freeman and Company]에서 설명된 원칙을 사용하여 설계될 수 있다.

[0047] 본 발명의 한 실시양태에서, 친수도/친수성 특성 및 잔기 중량/크기의 측면에서의 보존 역시 예시된 항체의 CDR 에 비해 변이체 CDR에 실질적으로 보유된다 (예를 들어, 중량 클래스, 친수도 점수, 또는 두 서열은 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 그 초과 (예를 들어, 약 99%)로 보유된다). 예를 들어, 보존적 잔기 치환은 또한 또는 별법으로 관련 기술 분야에 알려진 강 또는 약 중량 (strong or weak based weight)에 기초한 보존기의 대체를 기초로 할 수 있다.

[0048] 유사한 잔기의 보유는 또한 또는 별법으로 BLAST 프로그램 (예컨대, 표준 설정 BLOSUM62, 개방 갭 = 11 및 연장된 갭 = 1을 사용하여 NCBI를 통해 입수가능한 BLAST 2.2.8)의 사용에 의해 결정되는 유사성 스코어에 의해 측정될 수 있다. 적합한 변이체는 일반적으로 모 펩티드에 대해 적어도 약 45%, 예컨대 적어도 약 55%, 적어도 약 65%, 적어도 약 75%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 그 초과 (예컨대, 약 99%)의 유사성을 보인다.

[0049] 본원에서 사용되는 바와 같이, "이소형"은 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 코딩되는 이뮤노글로불린 클래스 (예컨대 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, 또는 IgM)를 의미한다.

[0050] 용어 "에피토프"는 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 결정인자를 의미한다. 에피토프는 대체로 아미노산 또는 당 측쇄와 같은 분자의 표면기로 이루어지고, 일반적으로 특이적인 3차원 구조 특성 및 특이적 전하 특성을 갖는다. 입체형태적 및 비-입체형태적 에피토프는 변성 용매의 존재 하에서 입체형태적 에피토프에 대한 결합은 손실되지만 비-입체형태적 에피토프에 대해서는 손실되지 않는다는 점에서 구별된다. 에피토프는 결합에 직접 관련되는 아미노산 잔기 (에피토프의 면역우성 성분으로도 칭해짐) 및 결합에 직접 관련되지 않는 기타 아미노산 잔기, 예컨대 특이적 항원 결합 펩티드에 의해 효과적으로 차단되는 아미노산 잔기 (즉, 아미노산 잔기가 특이적 항원 결합 펩티드의 풋프린트 (footprint) 내에 존재함)를 포함할 수 있다.

[0051] "치료"는 증상 또는 질환 상태의 진정, 개선, 정지 또는 근절 (치유)을 목적으로 유효량의 본 발명의 치료 활성 화합물을 투여하는 것을 의미한다.

[0052] "유효량" 또는 "치료 유효량"은 목적하는 치료 결과의 달성에 필요한 투여량에서 및 필요한 시간 동안 효과적인 양을 의미한다. 항-TF 항체 약물 접합체의 치료 유효량은 개체의 질환 상태, 연령, 성별, 및 체중, 및 개체에서 목적하는 반응을 유도하는 항-TF 항체 약물 접합체의 능력과 같은 인자에 따라 상이할 수 있다. 또한, 치료

유효량은 항체 또는 항체 일부의 임의의 독성 또는 유해한 효과가 치료상 유익한 효과보다 크지 않은 양이다.

[0053] 본 발명의 구체적인 실시양태

[0054] 본 발명은 적어도 부분적으로는, 동결건조될 때 항-TF ADC의 제약 목적 및 치료 용도에 적합한 안정한 동결건조 제제를 제공하는 항-TF ADC의 특정 수성 조성물에 대한 발견을 기초로 한다. 본원에서 개시되는 제제는 또한 계면활성제, 예를 들어 폴리소르베이트 20 및 80, 무기 염, 예를 들어 NaCl을 배제하는 옵션을 제공한다. 제약 조성물의 유효 기간 동안 효능 및 안전성을 보장하기 위해, 조성물은 안정성이 시험된다. 일반적으로, 안정성 시험은 조성물의 성분 조성, 순도 및 효력에 대한 시험을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 안정성은 의도되는 보관 온도 및 상승한 온도(들)에서 시험된다. 순도 시험은 SDS-PAGE, CE-SDS, 등전포커싱 (isoelectrofocusing), 면역전기영동, 웨스턴 블롯 (Western blot), 역상 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토 그래피 (SEC), 이온 교환 및 친화도 크로마토그래피를 포함할 수 있고 이로 제한되지 않는다. 다른 시험은 시각적 외형, 예컨대 색상 및 투명도, 미립자, pH, 수분 및 재구성 시간을 포함할 수 있고 이로 제한되지 않는다.

[0055] 안정성 시간 경로 동안 특히 순도 및 효력에 대한 분해 프로파일은 제약 생성물의 조성물 및/또는 제제와 긴밀하게 연결된다. 특히, 적절한 제제의 선택은 분해 프로파일을 유의하게 변경할 수 있다. 계면활성제, 예컨대 폴리소르베이트 20은 종종 유효 기간을 제한하는 분해 생성물의 형성을 감소시키기 위해 제약 조성물에 첨가된다. 모노클로날 항체 및 모노클로날 항체로부터 유래된 접합된 약물 생성물의 일반적인 분해 프로파일은 공유 및 비-공유 고분자량 응집체, 단편, 탈아미드화 및 산화 생성물의 형성을 포함한다. 특히, 탈아미드화 및 산화 생성물 및 다른 산성 물질종은 대체로 안정성 시험의 시간 경로 동안 발생한다. 일부 경우에, 산성 물질종은 제약 조성물의 허용되는 유효 기간을 제한한다. 예를 들어, 탈아미드화에 의한 산성 물질종의 형성은 예를 들어, 영상화 모세관 등전포커싱 (icIEF)에 의해 시험될 수 있다. 다른 경우에, 고분자량 응집체의 형성은 제약 조성물의 허용되는 유효 기간을 제한한다. 응집체의 형성은 예를 들어 SEC (크기 배제 크로마토그래피), DLS, MFI, SDS-PAGE 또는 CE-SDS에 의해 시험될 수 있다.

[0056] 예를 들어, 제약상 허용되는 안정성의 본 발명의 항-TF ADC 제제는 적어도 약 3개월, 바람직하게는 약 6개월, 및 보다 바람직하게는 약 12개월 이상, 예컨대 18개월 이상, 예컨대 적어도 24개월 또는 심지어 36개월 동안 약 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 또는 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 의 온도에서 보관될 때, 응집체의 비율이 예를 들어 실시예 10에 따라 SEC 분석을 사용하여 결정할 때 약 10% 미만, 바람직하게는 약 5% 미만, 보다 바람직하게는 약 2% 미만인 것이다. 추가로 또는 별법으로, 본 발명의 안정한 항-TF ADC 제제는 적어도 약 3개월, 바람직하게는 약 6개월, 및 보다 바람직하게는 약 12개월 또는 그 초과 기간 동안 약 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 또는 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 의 온도에서 보관될 때, 주 이소형의 변화가 예를 들어 실시예 10에 따라 icIEF 분석을 사용하여 결정할 때 15% 미만, 바람직하게는 10% 미만, 보다 바람직하게는 8% 미만, 가장 바람직하게는 5% 미만인 것이다.

[0057] 본 발명은 따라서 각각 구체적인 실시양태를 제시하는, 다음과 같은 예시적이고 비-제한적인 항-TF ADC의 동결건조 제제를 제공한다:

[0058] 항-조직 인자 (TF) 항체-약물 접합체 (ADC) 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 수성 제제의 동결건조에 의해 얻을 수 있거나 또는 얻어지며, 계면활성제가 존재하지 않는 것인 상기 항-TF ADC의 동결건조 제제.

[0059] 한 실시양태에서, 제약상 허용되는 부형제는 다음을 포함한다:

[0060] a) pH가 5 내지 7로 유지되도록 동결건조 단계 동안 pH 변화를 제한하는 완충제,

[0061] b) 고체 상태에서 항-TF ADC와 함께 비정질 상을 형성하는 적어도 하나의 비-환원당; 및

[0062] c) 적어도 하나의 증량제.

[0063] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 약 5 g/L 내지 약 30 g/L 항-TF ADC 및 pH가 약 5 내지 약 7, 임의로 약 5.5 내지 약 6.5인 약 20 내지 약 50 mM 히스티딘 완충제; 약 10 내지 약 250 mM 수크로스 또는 트레할로스; 및 약 50 mM 내지 약 300 mM 만니톨 또는 글라이신을 포함하는 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 수성 제제의 동결건조에 의해 제조되는 동결건조 제제에 관한 것이다.

[0064] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 약 7 g/L 내지 약 20 g/L 항-TF ADC 및 pH가 약 5 내지 약 7, 임의로 약 5.5 내지 약 6.5인 약 20 내지 약 50 mM 히스티딘 완충제; 약 10 내지 약 250 mM 수크로스 또는 트레할로스; 및 약 50 mM 내지 약 300 mM 만니톨 또는 글라이신을 포함하는 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 수성 제제의 동결건조에 의해 제조되는 동결건조 제제에 관한 것이다.

- [0065] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 약 5 g/L 내지 약 30 g/L 항-TF ADC 및 pH가 약 5 내지 약 7, 임의로 약 5.5 내지 약 6.5인 약 25 내지 약 40 mM, 예컨대 약 29 내지 약 31 mM 히스티딘 완충제; 약 10 내지 약 250 mM 수크로스 또는 트레할로스; 및 약 50 mM 내지 약 300 mM 만니톨 또는 글라이신을 포함하는 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 수성 제제의 동결건조에 의해 제조되는 동결건조 제제에 관한 것이다.
- [0066] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 약 5 g/L 내지 약 30 g/L 항-TF ADC 및 pH가 약 5 내지 약 7, 임의로 약 5.5 내지 약 6.5인 약 20 내지 약 50 mM 히스티딘 완충제; 약 50 내지 225 mM 수크로스 또는 트레할로스, 예컨대 약 84 내지 약 165 mM 수크로스 또는 트레할로스; 및 약 50 mM 내지 약 300 mM 만니톨 또는 글라이신을 포함하는 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 수성 제제의 동결건조에 의해 제조되는 동결건조 제제에 관한 것이다.
- [0067] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 약 5 g/L 내지 약 30 g/L 항-TF ADC 및 pH가 약 5 내지 약 7, 임의로 약 5.5 내지 약 6.5인 약 20 내지 약 50 mM 히스티딘 완충제; 약 10 내지 약 250 mM 수크로스 또는 트레할로스; 및 약 100 mM 내지 약 274 mM, 예컨대 약 158 내지 약 274, 예컨대 약 158 내지 약 172 mM 만니톨 또는 글라이신을 포함하는 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 수성 제제의 동결건조에 의해 제조되는 동결건조 제제에 관한 것이다.
- [0068] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 약 5 g/L 내지 약 30 g/L 항-TF ADC 및 pH가 약 5.5 내지 약 6.5인 약 20 내지 약 50 mM 히스티딘 완충제; 약 50 내지 약 225 mM 수크로스 또는 트레할로스; 및 약 100 mM 내지 약 274 mM 만니톨 또는 글라이신을 포함하는 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 수성 제제의 동결건조에 의해 제조되는 동결건조 제제에 관한 것이다.
- [0069] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 약 5 g/L 내지 약 30 g/L 항-TF ADC 및 pH가 약 5 내지 약 7, 임의로 약 5.5 내지 약 6.5인 약 20 내지 약 50 mM 히스티딘 완충제; 약 84 내지 약 165 mM 수크로스 또는 트레할로스; 및 약 100 내지 약 274 mM 만니톨 또는 글라이신을 포함하는 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 수성 제제의 동결건조에 의해 제조되는 동결건조 제제에 관한 것이다.
- [0070] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 약 5 g/L 내지 약 30 g/L 항-TF ADC 및 pH가 약 5.5 내지 약 6.5인 약 20 내지 약 50 mM 히스티딘 완충제; 약 84 내지 약 146 mM 수크로스; 및 약 158 mM 내지 약 274 mM 만니톨을 포함하는 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 수성 제제의 동결건조에 의해 제조되는 동결건조 제제에 관한 것이다.
- [0071] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 약 5 g/L 내지 약 30 g/L 항-TF ADC 및 pH가 약 5.5 내지 약 6.5인 약 25 내지 약 40 mM 히스티딘 완충제; 약 84 내지 약 92 mM 수크로스; 및 약 158 내지 약 274 mM 만니톨을 포함하는 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 수성 제제의 동결건조에 의해 제조되는 동결건조 제제에 관한 것이다.
- [0072] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 약 7 g/L 내지 약 20 g/L 항-TF ADC 및 pH가 약 5.5 내지 약 6.5인 약 25 내지 약 40 mM 히스티딘 완충제; 약 84 내지 약 92 mM 수크로스; 및 약 100 mM 내지 약 274 mM 만니톨 또는 글라이신을 포함하는 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 수성 제제의 동결건조에 의해 제조되는 동결건조 제제에 관한 것이다.
- [0073] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 약 7 g/L 내지 약 20 g/L, 예컨대 약 9 내지 약 11 g/L 항-TF ADC 및 pH가 약 5.5 내지 약 6.5인 약 25 내지 약 40 mM 히스티딘 완충제; 약 84 내지 약 92 mM 수크로스 또는 트레할로스; 및 약 158 내지 약 172 mM 만니톨 또는 글라이신을 포함하는 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 수성 제제의 동결건조에 의해 제조되는 동결건조 제제에 관한 것이다.
- [0074] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 약 9 내지 약 11 g/L 항-TF ADC 및 pH가 약 5.5 내지 약 6.5인 약 29 내지 약 31 mM 히스티딘 완충제; 약 84 내지 약 92 mM 수크로스; 및 약 158 내지 약 172 mM 만니톨 또는 글라이신을 포함하는 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 수성 제제의 동결건조에 의해 제조되는 동결건조 제제에 관한 것이다.
- [0075] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 약 9 내지 약 11 g/L 항-TF ADC, 예컨대 약 10 mg/mL 항-TF ADC, 및 pH가 약 6인 약 30 mM 히스티딘 완충제; 약 88 mM 수크로스; 및 약 165 mM 만니톨 또는 글라이신을 포함하는 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 수성 제제의 동결건조에 의해 제조되는 동결건조 제제에 관한 것이다.
- [0076] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 약 10 mg/mL 항-TF ADC, 및 pH가 약 6인 약 25 내지 약 40 mM 히스티딘 완충제, 예컨대 30-35 mM 히스티딘 완충제, 예컨대 약 30 mM 히스티딘 완충제; 약 88 mM 수크로스; 및 약 165 mM 만니톨을 포함하는 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 수성 제제의 동결건조에 의해 제조되는 동결건조 제제에 관한 것이다.

- [0077] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 약 9 내지 약 11 g/L 항-TF ADC, 예컨대 약 10 mg/mL 항-TF ADC (여기서, 항-TF-ADC는 프로테아제 절단가능 발린 시트룰린 링커를 통해 약물 모노메틸 오리스타틴 E (vcMMAE)에 접합된 TF에 대한 인간 모노클로날 IgG1, κ 항체 011로 이루어진 ADC인 HuMax TF ADC (IgG1, vcMMAE)임), 및 pH가 약 6인 약 30 mM 히스티딘 완충제; 약 88 mM 수크로스; 및 약 165 mM 만니톨 또는 글라이신을 포함하는 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 수성 제제의 동결건조에 의해 제조되는 동결건조 제제에 관한 것이다.
- [0078] 별개의 구체적인 실시양태에서, 제제에는 본질적으로 계면활성제가 존재하지 않는다.
- [0079] 본 발명의 또 다른 측면에서, 제제에는 계면활성제가 존재하지 않는다.
- [0080] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 동결건조 단계 동안 pH 변화를 제한하는 완충제, 고체 상태에서 항-TF ADC와 비정질 상을 형성하는 적어도 하나의 비-환원당 및 적어도 하나의 증량제를 포함하는 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 수성 제제의 동결건조에 의해 제조되는 항-TF ADC의 동결건조 제제에 관한 것이고, 여기서 항-TF ADC는 mcMMAF, mcMMAE, vcMMAF 및 vcMMAE로부터 선택되는 약물-링커, 및 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 45의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역; 서열 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 73의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역; 서열 37의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 77의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역; 또는 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 41의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 VH 및 VL 영역을 포함하는 항-TF 항체를 포함하고; 임의로 동결건조 제제에는 본질적으로 임의의 계면활성제가 존재하지 않는다.
- [0081] 별개의 구체적인 실시양태에서, 상기 실시양태 중 임의의 하나의 ADC의 항체-모이어티는 인간 항-TF 항체 011의 VH 및 VL CDR, 임의로 VH (서열 5) 및 VL (서열 45), 및 mcMMAE, vcMMAE, vcMMAF 또는 mcMMAF인 약물-링커를 포함한다.
- [0082] 별개의 구체적인 실시양태에서, 상기 실시양태 중 임의의 하나의 ADC의 항체-모이어티는 인간 항-TF 항체 098의 VH 및 VL CDR, 임의로 VH (서열 33) 및 VL (서열 73), 및 mcMMAE, vcMMAE, vcMMAF 또는 mcMMAF인 약물-링커를 포함한다.
- [0083] 별개의 구체적인 실시양태에서, 상기 실시양태 중 임의의 하나의 ADC의 항체-모이어티는 인간 항-TF 항체 111의 VH 및 VL CDR, 임의로 VH (서열 37) 및 VL (서열 77), 및 mcMMAE, vcMMAE, vcMMAF 또는 mcMMAF인 약물-링커를 포함한다.
- [0084] 다른 별개의 구체적인 실시양태에서, 본 발명은 본질적으로 임의의 폴리소르베이트, 임의로 임의의 계면활성제가 존재하지 않는, 상기 실시양태 중 임의의 하나의 동결건조 제제를 제공한다.
- [0085] 본 발명은 또한 본질적으로 항-TF 항체-약물 접합체; 히스티딘, 시트레이트 및 트리스로부터 선택되는 완충제; 수크로스, 트레할로스 및 이들의 조합물로부터 선택되는 비-환원당, 및 만니톨 및 글라이신으로부터 선택되는 증량제로 이루어지는 동결건조 제제를 제공한다. 한 실시양태에서, 항-TF 항체는 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 45의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역; 서열 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 73의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역; 서열 37의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 77의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역; 및 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 41의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 VH 및 VL 서열의 VH 및 VL CDR 영역, 임의로 VH 및 VL 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-TF ADC는 각각 서열 5 및 45의 VH 및 VL CDR을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-TF ADC는 각각 서열 33 및 73의 VH 및 VL CDR을 포함한다. 한 실시양태에서, 항-TF ADC는 각각 서열 37 및 77의 VH 및 VL CDR을 포함한다.
- [0086] 상기 실시양태 중 임의의 하나의 구체적인 실시양태에서, 상기 실시양태 중 임의의 하나의 동결건조 제제는 만니톨 및 수크로스를 포함하고, 여기서 만니톨 대 수크로스의 중량비는 적어도 약 1, 예컨대 약 1 내지 약 30, 예컨대 1 내지 약 10, 예컨대 약 1 내지 약 2, 예컨대 약 1이다.
- [0087] 상기 실시양태 중 임의의 하나의 구체적인 실시양태에서, 상기 실시양태 중 임의의 하나의 동결건조 제제는 만니톨 및 트레할로스를 포함하고, 여기서 만니톨 대 트레할로스의 중량비는 적어도 약 1, 예컨대 약 1 내지 약 30, 예컨대 1 내지 약 10, 예컨대 약 1 내지 약 2, 예컨대 약 1이다.
- [0088] 상기 실시양태 중 임의의 하나의 구체적인 실시양태에서, 상기 실시양태 중 임의의 하나의 동결건조 제제는 만니톨 및 수크로스를 포함하고, 여기서 만니톨 대 수크로스의 중량비는 약 1 내지 약 10이고, 만니톨 대 ADC의 중량비는 적어도 약 3, 예컨대 3 내지 30이다.

- [0089] 본 발명은 또한 약 9 내지 약 11 g/L 항-TF ADC 및 약 30 mM 히스티딘; 약 88 mM 수크로스; 및 약 165 mM 만니톨을 포함하는, 임의로 이로 이루어지는 수성 제제의 동결건조에 의해 얻을 수 있는 동결건조 제제를 제공한다.
- [0090] 본 발명은 또한
- [0091] a. 임의로 항-TF 항체 011의 VH 및 VL CDR 또는 VH 및 VL 서열을 포함하는 약 7 내지 약 20 g/L 항-TF ADC,
- [0092] b. 약 28 내지 34 mM 히스티딘;
- [0093] c. 약 84 내지 약 146 mM 수크로스;
- [0094] d. 약 158 내지 약 274 mM 만니톨; 또는
- [0095] e. a)와, (b) 내지 (d) 중 어느 2종, 3종 또는 전부의 조합물
- [0096] 을 포함하는 항-TF ADC의 동결건조 제제의 제조에 적합한 수성 용액을 제공한다.
- [0097] 본 발명은 또한 계면활성제를 함유하지 않는, 항-TF ADC의 동결건조 제제의 제조에 적합한 수성 용액을 제공하고, 상기 용액은
- [0098] a. 임의로 항-TF 항체 011의 VH 및 VL CDR 또는 VH 및 VL 서열을 포함하는 약 7 내지 약 20 g/L 항-TF ADC,
- [0099] b. 약 28 내지 34 mM 히스티딘;
- [0100] c. 약 84 내지 약 146 mM 수크로스;
- [0101] d. 약 158 내지 약 274 mM 만니톨; 또는
- [0102] e. a)와, (b) 내지 (d) 중 어느 2종, 3종 또는 전부의 조합물
- [0103] 을 포함한다.
- [0104] 본 발명은 또한
- [0105] a. 임의로 항-TF 항체 011의 VH 및 VL CDR 또는 VH 및 VL 서열을 포함하는 약 7 내지 약 20 g/L 항-TF ADC,
- [0106] b. 약 28 내지 34 mM 히스티딘;
- [0107] c. 약 84 내지 약 146 mM 수크로스;
- [0108] d. 약 158 내지 약 274 mM 만니톨; 또는
- [0109] e. a)와, (b) 내지 (d) 중 어느 2종, 3종 또는 전부의 조합물
- [0110] 로 이루어지는 항-TF ADC의 동결건조 제제의 제조에 적합한 수성 용액을 제공한다.
- [0111] 본 발명은 또한 상기 측면 또는 실시양태 중 임의의 하나의 동결건조 제제를 멸균 수성 희석제 내에 재구성함으로써 얻은 제약상 허용되는 액체 제제를 제공한다. 예를 들어, 상기 액체 제제는 약 5 g/L 내지 약 30 g/L 항-TF ADC, pH가 약 5 내지 약 7인 약 20 내지 약 50 mM 히스티딘; 약 10 내지 약 250 mM 수크로스 또는 트레할로스; 및 약 50 mM 내지 약 300 mM 만니톨 또는 글라이신을 포함하거나 또는 이로 본질적으로 이루어질 수 있다. 한 실시양태에서, 액체 제제는 약 9 내지 약 11 mg/mL 항-TF ADC, 약 28 내지 약 34 mM 히스티딘, 약 84 내지 약 92 mM 수크로스 및 약 158 내지 약 274 mM 만니톨을 포함하거나 또는 이로 본질적으로 이루어진다.
- [0112] 항-TF ADC의 동결건조 제제는 약 9 g/L 내지 약 11 g/L 항-TF ADC 및 pH가 약 5.5 내지 약 6.5인 약 30 mM 히스티딘 완충제; 약 88 mM 수크로스; 및 약 165 mM 만니톨을 포함하는 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 수성 제제의 동결건조에 의해 제조될 수 있고, 여기서 항체는 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 45의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역; 서열 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 73의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역; 서열 37의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 77의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역; 또는 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 41의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역을 포함하고, 약물은 MMAF 또는 MMAE, 예를 들어 vcMMAE인 링커-약물이다.
- [0113] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 동결건조 제제는 3.0 wt.% 미만의 수분을 함유한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 동결건조 제제는 2.0 wt.% 미만의 수분을 함유한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 동결건조 제제는 1.0 wt.% 미만의 수분을 함유한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 동결건조 제제는 0.5 wt.% 미만의

수분을 함유한다.

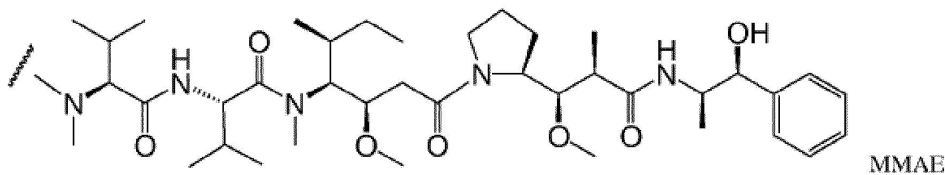
- [0114] 또 다른 바람직한 측면에서, 상기 바람직한 제제 중의 임의의 하나는 그 내에 포함되는 하나 이상의 성분의 정확한 양(들) 및/또는 정확한 pH 값을 포함한다. 즉, 하나 이상의 용어 "약"이 상기 본 발명의 다른 바람직한 측면에서 삭제된다.
- [0115] 항체 약물-접합체
- [0116] 본원에서 설명되는 바와 같이, 본 발명의 제제는 예를 들어 항-TF ADC에 적합하다.
- [0117] 한 실시양태에서, 본 발명의 동결건조 제제는 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 치료 모이어티에 접합된 항-TF ADC를 포함한다: 탁솔; 시토칼라신 B; 그라미시딘 D; 에티뮴 브로마이드; 에메틴; 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다우노루비신, 디히드록시 안트라신 디온, 튜불린-억제제, 예컨대 메이탄신 또는 그의 유사체 또는 유도체, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-데히드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 퓨로마이신, 칼리케아미신 또는 그의 유사체 또는 유도체, 항대사물질, 예컨대, 메토크렉세이트, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 플루다라빈, 5-플루오로우라실, 데카르바진, 히드록시우레아, 아스파라기나제, 겐시타빈 또는 클라르리빈, 알킬화제, 예컨대, 메클로레타민, 티오에파, 클로람부실, 멜팔란, 카르무스틴 (BSNU), 로무스틴 (CCNU), 시클로포스파미드, 부술판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 다카르바진 (DTIC), 프로카르바진, 미토마이신 C, 시스플라틴, 카르보플라틴, 듀오카르마이신 A, 듀오카르마이신 SA, 라첼마이신 (CC-1065), 또는 그의 유사체 또는 유도체; 피롤로[2,1-c][1,4] 벤조디아제핀 (PDB) 또는 그의 유사체, 항생제, 예컨대, 닥티노마이신, 블레오마이신, 다우노루비신, 독소루비신, 이다루비신, 미트라마이신, 미토마이신, 미톡산트론, 폴리카마이신, 안트라마이신 (AMC)), 디프테리아 독소 및 관련 분자, 예컨대, 디프테리아 A 사슬 및 그의 활성 단편 및 혼성체 (hybrid) 분자, 리신 독소, 예컨대, 리신 A 또는 탈글리코실화 리신 A 사슬 독소, 콜레라 독소, 시가 (Shiga)-유사 독소, 예컨대 SLT I, SLT II, SLT IIV, LT 독소, C3 독소, 시가 독소, 백일해 독소, 파상풍 독소, 대두보우만-버크 (Bowman-Birk) 프로테아제 억제제, 슈도모나스 (*Pseudomonas*) 외독소, 알로린, 사포린, 모데신, 겔라닌, 아브린 A 사슬, 모데신 A 사슬, 알파-사르신, 알류리테스 포르디이 (*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피톨라카 아메리카나 (*Phytolacca americana*) 단백질, 예컨대 PAPI, PAPII 및 PAP S, 모모르디카 카란티아 (*Momordica charantia*) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사포나리아 오피시날리스 (*saponaria officinalis*) 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신 및 에노마이신 독소, 리보뉴클레아제 (RNase), DNase I, 스탕필로코커스 (*Staphylococcal*) 장독소-A, 엑세포 항바이러스 단백질, 디프테린 독소, 및 슈도모나스 내독소.
- [0118] 한 실시양태에서, 항체는 돌라스타틴, 메이탄신, 칼리케아미신, 듀오카르마이신, 라첼마이신 (CC-1065), 또는 이들의 유사체, 유도체, 또는 전구약물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 약물인 세포독성 또는 세포증식 억제성 모이어티에 접합된다.
- [0119] 한 실시양태에서, 항체는 튜블린 억제제, DNA 상호작용 화합물 및/또는 키나제 억제제인 치료 활성의 세포증식 억제성, 및/또는 세포독성 모이어티에 접합된다. 한 실시양태에서, 항체는 소수성 화합물, 예컨대 소수성 튜블린 억제제, 바람직하게는 오리스타틴, 보다 바람직하게는 MMAE 또는 MMAF, 및 가장 바람직하게는 MMAE에 접합된다.
- [0120] 약물-로딩 (또는 항체 분자당 세포증식 억제성 또는 세포독성 약물의 평균 수)은 일반적으로 1 내지 약 8이고, 예를 들어 p는 3-6, 예컨대 4-6 또는 3-5일 수 있거나, 또는 p는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8, 예컨대 3, 4 또는 5, 예컨대 4일 수 있다.
- [0121] 본 발명의 제제에 사용하기 위한 ADC는 일반적으로 세포증식 억제성 또는 세포독성 약물 단위와 항체 단위 사이의 링커 단위를 포함한다.
- [0122] 일부의 실시양태에서, 링커의 절단이 세포내 환경에서 항체로부터 약물 단위를 방출하도록 링커는 세포내 조건 하에서 절단가능하다. 또 다른 실시양태에서, 링커 단위는 절단가능하지 않고, 약물은 예를 들어 항체 분해에 의해 방출된다. 일부의 실시양태에서, 링커는 세포내 환경에 (예를 들어 리소좀 또는 엔도솜 또는 소포 (caveola) 내에) 존재하는 절단가능제에 의해 절단가능하다. 링커는 예를 들어 리소솜 또는 엔도솜 프로테아제를 포함하고 이로 제한되지 않는 세포내 펩티다제 또는 프로테아제 효소에 의해 절단되는 펩티딜 링커일 수 있다. 일부의 실시양태에서, 펩티딜 링커의 길이는 적어도 2개의 아미노산 또는 적어도 3개의 아미노산이다. 절단체는 카텝신 B 및 D 및 플라스민을 포함할 수 있고, 이들은 모두 디펩티드 약물 유도체를 가수분해하여 표적 세포 내에 활성 약물을 방출하는 것으로 알려져 있다 (예를 들어, 문헌 [Dubowchik and Walker, 1999, Pharm.

Therapeutics 83: 67-123] 참조). 구체적인 실시양태에서, 세포내 프로테아제에 의해 절단가능한 펩티딜 링커는 Val-Cit (발린-시트룰린) 링커 또는 Phe-Lys (페닐알라닌-라이신) 링커이다 (예를 들어, Val-Cit 링커를 사용한 독소루비신의 합성 및 Phe-Lys 링커의 상이한 예를 설명하고 있는 US6214345 참조). Val-Cit 및 Phe-Lys 링커의 구조의 예는 아래에서 설명되는 MC-vc-PAB, MC-vc-GABA, MC-Phe-Lys-PAB 또는 MC-Phe-Lys-GABA를 포함하고 이로 제한되지 않고, 여기서 MC는 말레이미도 카프로일의 약어이고, vc는 Val-Cit의 약어이고, PAB는 p-아미노벤질카르바메이트의 약어이고, GABA는 γ -아미노부티르산의 약어이다. 치료제의 세포내 단백질 분해 방출을 이용할 때의 이점은 치료제가 접합될 때 일반적으로 약화되고 접합체의 혈청 안정성이 일반적으로 높다는 것이다.

[0123] 일부의 실시양태에서, 링커 단위는 절단가능하지 않고, 약물은 항체 분해에 의해 방출된다 (US 2005/0238649 참조). 일반적으로, 상기 링커는 실질적으로 세포외 환경에 감수성이 아니다.

[0124] 바람직한 실시양태에서, 항체는 돌라스타틴 유도체, 예컨대 오리스타틴에 접합된다. 오리스타틴 또는 오리스타틴 펩티드 유사체 및 유도체는 예를 들어, US5635483; US5780588; US5663149 (모두 그 전부가 본원에 참고로 포함됨)에 기재된 바와 같이 미세소관 (microtubule) 동역학, GTP 가수분해 및 핵 및 세포 분열을 저해하고, 항암 및 항진균 활성을 갖는 것으로 밝혀졌다. 오리스타틴 약물 모이어티는 일반적으로 펩티드 약물 모이어티의 N (아미노) 말단 또는 C (말단)을 통해 링커를 통해 항체에 부착된다. 예시적인 오리스타틴 실시양태는 문헌 [Senter et al., Proceedings of the American Association for Cancer Research. Volume 45, abstract number 623, presented March 28, 2004]에 개시되고 US 2005/0238649에 기재된 N-말단-연결된 모노메틸 오리스타틴 약물 모이어티 DE 및 DF를 포함한다.

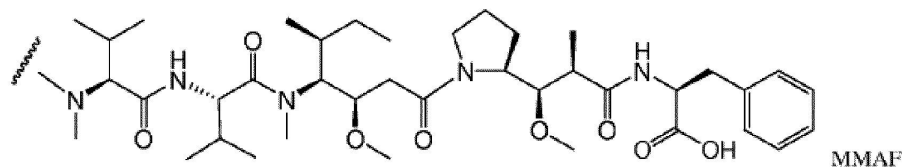
[0125] 한 실시양태에서, 오리스타틴은 모노메틸 오리스타틴 E (MMAE)이다:



[0126]

[0127] 여기서, 물결선은 링커에 대한 부착 부위를 나타낸다.

[0128] 한 실시양태에서, 오리스타틴은 모노메틸 오리스타틴 F (MMAF)이다:

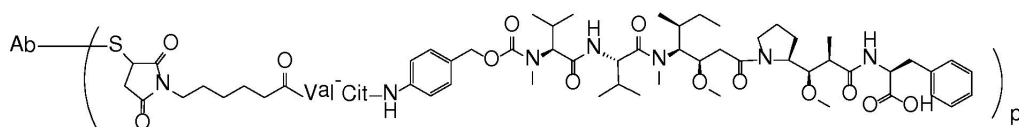


[0129]

[0130] 여기서, 물결선은 링커에 대한 부착 부위를 나타낸다.

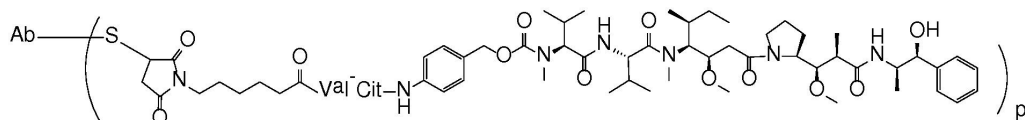
[0131] 한 실시양태에서, 링커는 항체의 (부분) 환원에 의해 얻은 항체, 예를 들어, 항-TF 항체의 술프히드릴 잔기에 부착된다.

[0132] 한 실시양태에서, 링커-오리스타틴은 MC-vc-PAB-MMAF (vcMMAF로도 지정됨) 또는 MC-vc-PAB-MMAE (vcMMAE로도 지정됨)이다:



[0133]

[0134] Ab-MC-vc-PAB-MMAF (Ab-vcMMAF)

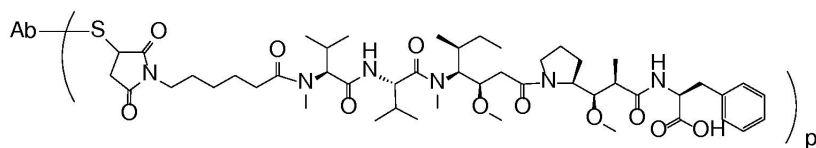


[0135]

[0136] Ab-MC-vc-PAB-MMAE (Ab-vcMMAE)

[0137] 여기서, p는 1 내지 8의 수이고, 예를 들어 p는 3-5일 수 있고, S는 항체의 술프히드릴 잔기를 나타내고, Ab는 항체를 나타낸다. 한 실시양태에서 링커-올리스타틴은 vcMMAE이다.

[0138] 한 실시양태에서, 링커-접합체는 mcMMAF (여기서, mc/MC는 말레이미도 카프로일임)이다:



[0139]

[0140] Ab-MC-MMAF (Ab-mcMMAF)

[0141] 여기서, p는 1 내지 8의 수이고, 예를 들어 p는 3-5일 수 있고, S는 항-TF 항체의 술프히드릴 잔기를 나타내고, Ab는 항체를 나타낸다.

[0142] 일반적으로 임의의 항-TF 항체에 적용될 수 있지만, 본 발명의 ADC 제제에 특히 적합한 항체는 그에 대한 VH 및 VL 서열이 본원에서 제공되는 임의의 하나 이상의 항-TF 항체 (표 1 및 도 11 참조), 예를 들어, 항체 011, 098, 114, 017-D12, 042, 092-A09, 101, 025, 109 또는 111, 예컨대 항체 011, 098 또는 111, 예컨대 011과 하나 이상의 물리화학적 및/또는 항원-결합 특성을 공유하는 것이다. 따라서, 한 실시양태에서, 관심 약물에 접합될 때, 생성되는 ADC의 pI는 약 5 내지 약 12, 예컨대 약 7 내지 약 10, 예컨대 약 8.5 내지 약 9.5, 예컨대 약 8.5 내지 약 9.0일 수 있다.

[0143] 한 실시양태에서, ADC는 임의로 IgG1, κ 형식의 인간 항체 011와 동일한 에피토프에 결합하고/하거나 상기 항체의 하나 이상의 CDR 서열을 포함할 수 있다.

[0144] 한 실시양태에서, ADC는 임의로 IgG1, κ 형식의 인간 항체 098과 동일한 에피토프에 결합하고/하거나 상기 항체의 하나 이상의 CDR 서열을 포함할 수 있다.

[0145] 한 실시양태에서, ADC는 임의로 IgG1, κ 형식의 인간 항체 114와 동일한 에피토프에 결합하고/하거나 상기 항체의 하나 이상의 CDR 서열을 포함할 수 있다.

[0146] 한 실시양태에서, ADC는 임의로 IgG1, κ 형식의 인간 항체 017-D12와 동일한 에피토프에 결합하고/하거나 상기 항체의 하나 이상의 CDR 서열을 포함할 수 있다.

[0147] 한 실시양태에서, ADC는 임의로 IgG1, κ 형식의 인간 항체 042와 동일한 에피토프에 결합하고/하거나 상기 항체의 하나 이상의 CDR 서열을 포함할 수 있다.

[0148] 한 실시양태에서, ADC는 임의로 IgG1, κ 형식의 인간 항체 092-A09와 동일한 에피토프에 결합하고/하거나 상기 항체의 하나 이상의 CDR 서열을 포함할 수 있다.

[0149] 한 실시양태에서, ADC는 임의로 IgG1, κ 형식의 인간 항체 101과 동일한 에피토프에 결합하고/하거나 상기 항체의 하나 이상의 CDR 서열을 포함할 수 있다.

[0150] 한 실시양태에서, ADC는 임의로 IgG1, κ 형식의 인간 항체 025와 동일한 에피토프에 결합하고/하거나 상기 항체의 하나 이상의 CDR 서열을 포함할 수 있다.

[0151] 한 실시양태에서, ADC는 임의로 IgG1, κ 형식의 인간 항체 109와 동일한 에피토프에 결합하고/하거나 상기 항체의 하나 이상의 CDR 서열을 포함할 수 있다.

[0152] 한 실시양태에서, ADC는 임의로 IgG1, κ 형식의 인간 항체 111과 동일한 에피토프에 결합하고/하거나 상기 항체

의 하나 이상의 CDR 서열을 포함할 수 있다.

- [0153] 한 실시양태에서, 항체는 조직 인자 결합을 위해 서열 33의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 73의 서열을 포함하는 VL 영역을 포함하는 참조 항체와, 또는 서열 1의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 41의 서열을 포함하는 VL 영역을 포함하는 항체와, 또는 서열 5의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 45의 서열을 포함하는 VL 영역을 포함하는 항체와, 또는 서열 9의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 49의 서열을 포함하는 VL 영역을 포함하는 항체와, 또는 서열 13의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 53의 서열을 포함하는 VL 영역을 포함하는 항체와, 또는 서열 17의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 57의 서열을 포함하는 VL 영역을 포함하는 항체와, 또는 서열 21의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 61의 서열을 포함하는 VL 영역을 포함하는 항체와, 또는 서열 25의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 65의 서열을 포함하는 VL 영역을 포함하는 항체와, 또는 서열 29의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 69의 서열을 포함하는 VL 영역을 포함하는 항체와, 또는 서열 37의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 77의 서열을 포함하는 VL 영역을 포함하는 항체와 경쟁하는 항-TF 항체이다. 한 실시양태에서, 항체는 조직 인자 결합을 위해 서열 5의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 45의 서열을 포함하는 VL 영역을 포함하는 참조 항체와 경쟁하는 항-TF 항체이다.
- [0154] 한 실시양태에서, 항-TF 항체는 서열 34, 35 및 36의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 74, 75 및 76의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VL 영역; 또는 서열 2, 3 및 4의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 42, 43 및 44의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VL 영역; 또는 서열 6, 7 및 8의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 46, 47 및 48의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VL 영역; 또는 서열 10, 11 및 12의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 50, 51 및 52의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VL 영역; 또는 서열 14, 15 및 16의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 54, 55 및 56의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VL 영역; 또는 서열 18, 19 및 20의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 58, 59 및 60의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VL 영역; 또는 서열 22, 23 및 24의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 62, 63 및 64의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VL 영역; 또는 서열 26, 27 및 28의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 66, 67 및 68의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VL 영역; 또는 서열 30, 31 및 32의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 70, 71 및 72의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VL 영역; 또는 서열 38, 39 및 40의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 78, 79 및 80의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VL 영역; 또는 임의의 상기 항체의 변이체를 포함하고, 상기 변이체는 바람직하게는 상기 서열 내에 최대 1, 2 또는 3개의 아미노산 변형, 보다 바람직하게는 아미노산 치환, 예컨대 보존적 아미노산 치환을 갖는다. 한 실시양태에서, 항-TF 항체는 서열 6, 7 및 8의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 46, 47 및 48의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VL 영역, 또는 상기 서열 내에 최대 1, 2 또는 3개의 아미노산 변형, 보다 바람직하게는 아미노산 치환, 예컨대 보존적 아미노산 치환을 갖는 변이체를 포함한다.
- [0155] 한 실시양태에서, 항-TF 항체는 서열 33, 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 37 및 29로 이루어지는 군으로부터 선택되는 VH 영역 서열에 적어도 80% 동일성, 예컨대 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98% 또는 100% 동일성; 또는 서열 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 33, 37 및 29로 이루어지는 군으로부터 선택되는 VH 영역 서열에 비해 최대 20, 예컨대 15, 또는 10, 또는 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산 변형, 보다 바람직하게는 아미노산 치환, 예컨대 보존적 아미노산 치환을 갖는 VH를 포함한다.
- [0156] 한 실시양태에서, 항-TF 항체는 서열 41, 45, 49, 53, 57, 61, 65, 73, 77 및 69로 이루어지는 군으로부터 선택되는 VL 영역 서열에 적어도 80% 동일성, 예컨대 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98% 또는 100% 동일성; 또는 서열 41, 45, 49, 53, 57, 61, 65, 73, 77 및 69로 이루어지는 군으로부터 선택되는 VH 영역 서열에 비해 최대 20, 예컨대 15, 또는 10, 또는 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산 변형, 보다 바람직하게는 아미노산 치환, 예컨대 보존적 아미노산 치환을 갖는 VL을 포함한다.
- [0157] 별개의 구체적인 실시양태에서, 항-TF 항체는 전장, 완전 인간 모노클로날 IgG1, κ 항체 항-TF HuMab 092-A09, 항-TF HuMab 101, 항-TF HuMab 025, 항-TF HuMab 109, 항-TF HuMab 017-D12, 항-TF HuMab 114, 항-TF HuMab 042, 항-TF HuMab 011, 항-TF HuMab 098 또는 항-TF HuMab 111 또는 이들의 임의의 VH 및 VL CDR을 포함하는 항체, 또는 이들의 임의의 VH 및 VL 서열을 포함하는 항체이다. 한 특정 실시양태에서, 항-TF 항체는 항-TF HuMab 011, 또는 그의 VH CDR1, 2, 3 및 VL CDR 1, 2, 3 서열을 포함하는 항체, 또는 그의 VH 및 VL 서열을 포함하는 항체이다. 한 특정 실시양태에서, 항-TF 항체는 항-TF HuMab 098, 또는 그의 VH CDR1, 2, 3 및 VL CDR 1, 2, 3 서열을 포함하는 항체, 또는 그의 VH 및 VL 서열을 포함하는 항체이다. 한 특정 실시양태에서, 항-TF 항체는 항-TF HuMab 111, 또는 그의 VH CDR1, 2, 3 및 VL CDR 1, 2, 3 서열을 포함하는 항체, 또는 그의 VH 및

VL 서열을 포함하는 항체이다.

표 1은 이들 항체의 VH (1a) 및 VL (1b) 서열에 관한 구체적인 서열 식별자 (서열, SEQ ID No)를 제시한다.

<표 1a>

VH-영역	
서열 1	VH 114
서열 2	VH 114, CDR1
서열 3	VH 114, CDR2
서열 4	VH 114, CDR3
서열 5	VH 011
서열 6	VH 011, CDR1
서열 7	VH 011, CDR2
서열 8	VH 011, CDR3
서열 9	VH 017-D12
서열 10	VH 017-D12, CDR1
서열 11	VH 017-D12, CDR2
서열 12	VH 017-D12, CDR3
서열 13	VH 042
서열 14	VH 042, CDR1
서열 15	VH 042, CDR2
서열 16	VH 042, CDR3
서열 17	VH 092-A09
서열 18	VH 092-A09, CDR1
서열 19	VH 092-A09, CDR2
서열 20	VH 092-A09, CDR3
서열 21	VH 101
서열 22	VH 101, CDR1
서열 23	VH 101, CDR2

서열 24	VH 101, CDR3
서열 25	VH 025
서열 26	VH 025, CDR1
서열 27	VH 025, CDR2
서열 28	VH 025, CDR3
서열 29	VH 109
서열 30	VH 109, CDR1
서열 31	VH 109, CDR2
서열 32	VH 109, CDR3
서열 33	VH 098
서열 34	VH 098, CDR1
서열 35	VH 098, CDR2
서열 36	VH 098, CDR3
서열 37	VH 111
서열 38	VH 111, CDR1
서열 39	VH 111, CDR2
서열 40	VH 111, CDR3

[0161]

[0162] <표 1b>

VL-영역	
서열 41	VL 114
서열 42	VL 114, CDR1
서열 43	VL 114, CDR2
서열 44	VL 114, CDR3
서열 45	VL 011
서열 46	VL 011, CDR1
서열 47	VL 011, CDR2
서열 48	VL 011, CDR3
서열 49	VL 017-D12
서열 50	VL 017-D12, CDR1
서열 51	VL 017-D12, CDR2
서열 52	VL 017-D12, CDR3
서열 53	VL 042
서열 54	VL 042, CDR1
서열 55	VL 042, CDR2
서열 56	VL 042, CDR3
서열 57	VL 092-A09
서열 58	VL 092-A09, CDR1
서열 59	VL 092-A09, CDR2
서열 60	VL 092-A09, CDR3
서열 61	VL 101
서열 62	VL 101, CDR1
서열 63	VL 101, CDR2
서열 64	VL 101, CDR3
서열 65	VL 025
서열 66	VL 025, CDR1

[0163]

서열 67	VL 025, CDR2
서열 68	VL 025, CDR3
서열 69	VL 109
서열 70	VL 109, CDR1
서열 71	VL 109, CDR2
서열 72	VL 109, CDR3
서열 73	VL 098
서열 74	VL 098, CDR1
서열 75	VL 098, CDR2
서열 76	VL 098, CDR3
서열 77	VL 111
서열 78	VL 111, CDR1
서열 79	VL 111, CDR2
서열 80	VL 111, CDR3

[0164]

[0165]

특히 바람직한 실시양태에서, ADC는 프로테아제 절단가능 발린 시트롤린 링커를 통해 약물 모노메틸 오리스타틴 E (vcMMAE)에 접합된 TF에 대한 인간 모노클로날 IgG1, κ 항체 011로 이루어진 ADC인 HuMax TF ADC (IgG1, vcMMAE)이다. 상기 항체의 확인 및 생산은 WO 2011157741에 기재되어 있다. 각각의 모노클로날 항체 (mAb) 분자는 평균적으로 4개의 약물 분자를 보유한다. 항체 부분은 분자량은 대략 147 kDa이다. 평균적으로, 4개의 vcMMAE 분자 (분자량 1.3 kDa)가 각각의 mAb 분자에 부착되고, 따라서 HuMax TF ADC의 총 평균 분자량은 152 kDa이다. HuMax-TF-ADC의 등전점은 약 8.7이다.

[0166]

제제

[0167]

본 발명에 따라 사용되는 항체의 치료 제제는 요구되는 순도를 갖는 ADC를 임의의 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))와 함께 혼합함으로써 동결건조된 제제 또는 수성 용액의 형태로 제조된다. 허용되는 담체, 부형제, 또는 안정화제는 사용되는 투여량 및 농도에서 수여자에게 비독성이다.

[0168]

일반적으로, 본 발명에 따라 동결건조 및 재구성된 제제는 항-TF ADC, 완충제, 안정화제 (일반적으로 비-환원당 또는 당 알콜 또는 아미노산), 및 증량제를 포함한다. 바람직한 안정화제는 수크로스, 트레할로스 및 이들의 조합물이다. 바람직한 증량제는 만니톨, 글라이신 및 이들의 조합물이다.

[0169]

용어 "완충제"는 본원에서 사용되는 바와 같이, 제약상 허용되는 완충제를 의미한다. 일반적으로, 완충제는 약 5 내지 약 7, 바람직하게는 약 5.5 내지 6.5의 pH, 예컨대 약 pH 6 또는 약 pH 6.0에 적합한 pKa 및 완충 능력을 갖는다. 동결건조 제제를 위해, 완충제 성분은 사용된 농도에서 실온 미만의 온도에서 결정화하지 않아야 한다. 보다 빠르고 보다 강력한 동결건조 사이클의 실행이 가능하기 때문에, 붕괴 온도가 보다 높은 완충제가 바람직하다. 적합한 제약상 허용되는 완충제는 히스티딘-완충제, 시트레이트-완충제, 숙시네이트-완충제, 탄산-완충제, 포스페이트 완충제, 글리콜레이트-완충제, 트리스® (트리스 (히드록시메틸)아미노메탄) 완충제 및 이들의 혼합물을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 바람직한 완충제는 L-히스티딘, 시트레이트, 포스페이트, 탄산, 숙시네이트 및/또는 글리콜레이트, 예컨대 히스티딘 및/또는 시트레이트를 기초로 하고, 또한 예를 들어 L-히스티딘과 L-히스티딘 히드로클로라이드 또는 트리스® (트리스 (히드록시메틸)아미노메탄)의 혼합물을 포함한다. 잠재적으로, 관련 기술 분야에 알려진 산 또는 염기를 사용한 pH 조절이 필요할 수 있다. 상기 언급된 L-히스티딘, 시트레이트, 포스페이트, 탄산, 숙시네이트 및/또는 글리콜레이트 완충제는 일반적으로 약 1 mM 내지 약 100 mM, 예컨대 약 5 내지 약 80 mM, 바람직하게는 약 20 mM 내지 약 50 mM, 보다 바람직하게는 약 10 내지 약 30 mM, 훨씬 더 바람직하게는 약 30 mM의 양으로 사용된다. 포스페이트 완충제의 농도는 바람직하게는

약 1 내지 약 30 mM이다. 사용되는 완충제와 무관하게, pH는 관련 기술 분야에 알려진 산 또는 염기를 사용한 조정에 의해 또는 완충제 성분의 적절한 혼합물의 사용에 의해 또는 둘 모두에 의해 약 5 내지 약 7, 바람직하게는 약 5.5 내지 약 6.5, 가장 바람직하게는 약 6.0의 값으로 조정될 수 있다. 바람직하게는, 완충제는 약 10 내지 약 30 mM의 농도의 히스티딘 및/또는 시트레이트 완충제, 예컨대 약 30 mM의 농도의 히스티딘 완충제를 포함한다.

[0170] 본 발명의 제제는 상기 규정된 하나 이상의 제약상 허용되는 안정화제 및 관련 기술 분야에 "동결건조보호제"로 알려진 성분, 예컨대 관련 기술 분야에 알려진 당, 당 알콜, 아미노 당, 아미노산 및 텍스트란을 추가로 포함할 수 있다. 일반적으로, 제약상 허용되는 안정화제는 약 1 mM 내지 약 500 mM의 양으로 사용될 수 있다. 적합한 당은 일당류 및 이당류를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 본 발명에 따라 사용하기 위한 당 및 당 알콜의 비-제한적인 예는 트레할로스, 수크로스, 만니톨, 소르비톨, 만노스, 말토스, 갈락토스, 프럭토스, 소르보스, 라피노스, 글루코사민, N-메틸글루코사민 ("메글루민"으로도 언급됨), 갈락토사민 및 뉴라민산 및 이들의 조합물을 포함한다. 비-환원당 및 당 알콜, 예컨대 약 10 내지 약 250 mM, 예컨대 약 50 내지 225 mM, 예컨대 약 84 내지 146, 예컨대 약 84 내지 92 mM 농도의 수크로스 또는 트레할로스가 바람직하다. 수크로스가 가장 바람직하다.

[0171] 한 실시양태에서, 제제는 84 내지 92 mM 수크로스, 예컨대 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91 또는 92 mM 수크로스를 포함한다. 가장 바람직한 제제는 88 mM 수크로스를 포함한다.

[0172] 특히, 당 알콜, 예컨대 만니톨이 또한 허용되는 시간 내에, 보다 구체적으로 0 - 600초 내에 재구성될 수 있는 균일한 및 안정한 동결건조 케이크를 생성하기 위해 증량제로서 사용될 수 있다. 일반적으로, "증량제"는 API의 총량이 케이크에 적절한 구조를 제공하기에는 너무 적을 때 사용된다. 증량제는 제약상 우수한 (pharmaceutically elegant) 케이크를 제공하는 불활성 매트릭스를 제공하여야 한다. 증량제는 또한 제제의 열 특성을 변형한다. 활성 약물의 농도는 종종 시스템의 냉동-건조 특징이 오직 증량제에 의해 결정되도록 매우 낮다. 통상적인 증량제는 결정질 증량제로서 만니톨, 글라이신; 비정질 증량제로서 수크로스, 트레할로스, 젤라틴, 텍스트란을 포함한다. 바람직한 증량제는 만니톨 및 글라이신이다.

[0173] 한 실시양태에서, 제제는 약 158 내지 약 274 mM 만니톨, 예컨대 160 mM, 또는 162 mM, 또는 165 mM, 또는 170 mM, 또는 180 mM, 또는 200 mM 만니톨을 포함한다. 가장 바람직하게는, 제제는 약 165 mM 만니톨, 또는 165 mM 만니톨을 포함한다.

[0174] 본 발명에 따른 특정 동결건조 제제는 계면활성제를 배제할 수 있도록 설계된다. 그러나, 관련 기술 분야의 통상의 기술자가 이해할 수 있는 바와 같이, 일부 목적을 위해서라면 계면활성제를 포함하는 것이 바람직할 수도 있다. 적합한 제약상 허용되는 계면활성제는 폴리에틸렌-소르비탄-지방산 에스테르, 폴리에틸렌-폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시에틸렌-스테아레이트 및 소듐 도데실 술페이트를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 폴리에틸렌-소르비탄-지방산 에스테르는 폴리에틸렌(20)-소르비탄-에스테르 (폴리소르베이트 20으로 약칭, 상표명 (TM) 트윈(Tween) 20(TM) 하에 시판됨) 및 폴리옥시에틸렌(20)소르비탄모노올레레이트 (폴리소르베이트 80으로 약칭, 상표명 트윈 80(TM) 하에 시판됨)를 포함한다. 폴리에틸렌-폴리프로필렌 글리콜은 상표명 플루로닉(Pluronic)(R) F68 또는 폴록사머(Poloxamer) 188(TM) 하에 시판되는 것이다. 폴리옥시에틸렌-스테아레이트는 상표명 미르지(Myrij)(TM) 하에 시판되고 있다. 폴리옥시에틸렌 모노라우릴 에테르는 상표명 브리즈(Brij)(TM) 하에 시판되는 것이다. 바람직할 때, 폴리에틸렌-소르비탄-폴리에틸렌(20)-소르비탄-에스테르 (트윈 20(TM)) 및 폴리옥시에틸렌(20)소르비탄모노올레레이트 (트윈 80(TM))는 예를 들어, 약 0.01% 내지 약 0.06%, 예컨대 약 0.02% 내지 약 0.04%의 양으로 사용될 수 있다.

[0175] 본 발명에 따른 특정 동결건조 제제는 동결건조 전 액체 및 동결건조 제제로부터 종종 등장제로서 사용되는 무기염, 예컨대 염화나트륨 (NaCl)을 배제하는 것이 가능하도록 설계된다. 염의 다른 예는 양이온 나트륨, 칼륨, 칼슘 또는 마그네슘과 음이온 클로라이드, 포스페이트, 시트레이트, 숙시네이트, 술페이트 또는 이들의 혼합물의 임의의 조합물의 염을 포함한다. 그러나, 관련 기술 분야의 통상의 기술자가 이해할 수 있는 바와 같이, 일부 목적을 위해서라면, 예를 들어 동결건조 제제의 재구성을 위해, 즉, 아래에서 설명되는 바와 같이 희석제로서 무기염을 포함하는 것이 바람직할 수도 있다.

[0176] 본 발명의 제제는 하나 이상의 다음 성분을 추가로 포함할 수 있다: 항산화제, 아스코르브산, 글루타티온, 방부제 (예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 시클로텍스트린, 예를 들어 히드록시프로필- β -시클로텍스트린, 술포부

틸에틸- α -시클로텍스트린, [베타]-시클로텍스트린, 폴리에틸렌글리콜, 예를 들어 PEG 3000, 3350, 4000, 또는 6000; 저분자량 (약 10개 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 이뮤노글로불린; 킬레이팅제, 예컨대 EDTA; 염-형성 반대-이온, 예컨대 나트륨; 및 금속 복합체 (예를 들어 Zn-단백질 복합체).

[0177] 공정

[0178] 냉동 건조는 일반적으로 3개의 주요 단계를 포함한다: 냉동, 1차 건조, 및 2차 건조. 제1 단계는 생성물의 공융 (eutectic) 또는 유리 전이 온도보다 낮은 온도에서 생성물을 동결하는 것이다. 냉동 속도는 물 결정의 크기 및 후속 건조 속도에 영향을 준다. 제2 단계는 용매 (얼음) 물을 제거하는 1차 건조이다. 생성물 온도는 붕괴 온도 미만으로 유지되고, 모든 얼음/물이 승화하는 것이 중요하다. 제3 단계는 용질로부터 "결합된" 물 또는 물을 제거하는 2차 건조이고, 그동안 탈착 과정을 가속화하기 위해 유통 온도가 종종 40°C보다 높은 온도로 상승한다. 항체- 및 다른 단백질 또는 단백질 집합체 제제에 적합한 동결건조 방법은 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 잘 알려져 있고, 예를 들어 문헌 ["Lyophilization of Biopharmaceuticals" by Henry R. Costantino and Michael J. Pikal; "Freeze Drying/Lyophilization of Pharmaceuticals and Biological Products" by Louis Rey and Joan C. May]에 기재되어 있다.

[0179] 본 발명의 한 측면에서, 수성 용액의 동결건조는

[0180] a. 수성 용액을 0.3°C/min 내지 3°C/min로 -40°C 내지 -60°C로 냉각하고;

[0181] b. 적어도 120 min 동안 등온으로 유지하고;

[0182] c. 0.3°C/min 내지 6°C/min의 속도로 -20°C 내지 -15°C로 가온하고;

[0183] d. 적어도 180 min 동안 등온으로 유지하고;

[0184] e. -40°C 내지 -10°C의 온도에서 30 mTorr 내지 300 mTorr의 압력을 사용하여 진공을 인가하고;

[0185] f. 온도를 0.3°C/min 내지 3°C/min로 35°C 내지 50°C로 상승시키고,

[0186] g. 적어도 10시간 동안 또는 잔류 수분이 2% 이하일 때까지 등온으로 유지하는 단계

[0187] 를 포함한다.

[0188] 또 다른 실시양태에서, 수성 용액의 동결건조는

[0189] a. 수성 용액을 0.5°C/min 내지 1°C/min의 속도로 -40°C 이하로 냉각하고;

[0190] b. 적어도 120 min 동안 등온으로 유지하고;

[0191] c. 0.5°C/min 내지 3°C/min의 속도로 -20°C 내지 -15°C로 가온하고;

[0192] d. 적어도 180 min 동안 등온으로 유지하고;

[0193] e. -30°C 내지 -10°C의 온도에서 50 mTorr 내지 200 mTorr의 압력을 사용하여 진공을 인가하고;

[0194] f. 온도를 0.5°C/min 내지 1°C/min의 속도로 35°C 내지 50°C로 증가시키고;

[0195] g. 적어도 10시간 동안 등온으로 유지하는 단계

[0196] 를 포함한다.

[0197] 한 실시양태에서, 냉각 단계 a)는 수성 용액을 적어도 0.3°C/min, 예컨대 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9 또는 3.0 °C/min으로 -40°C의 온도로 냉각함으로써 수행한다.

[0198] 또 다른 실시양태에서, 냉각 단계 a)는 수성 용액을 적어도 0.3°C/min, 예컨대 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9 또는 3.0°C/min로 -50°C의 온도로 냉각함으로써 수행한다.

[0199] 또 다른 실시양태에서, 냉각 단계 a)는 수성 용액을 적어도 0.3°C/min, 예컨대 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9 또는 3.0°C/min로 -60°C의 온도로 냉각함으로써 수행한다.

[0200] 또 다른 실시양태에서, 가온 단계 c)는 물질을 적어도 0.3°C/min, 예컨대 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0,

1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.5, 3.8, 3.9, 4.0, 4.5, 5.0 또는 6.0°C/min로 -15°C의 온도로 가온함으로써 수행한다.

[0201] 또 다른 실시양태에서, 가온 단계 c)는 물질을 적어도 0.3°C/min, 예컨대 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.5, 3.8, 3.9, 4.0, 4.5, 5.0 또는 6.0°C/min로 -20°C의 온도로 가온함으로써 수행한다.

[0202] 또 다른 실시양태에서, 단계 f)의 온도 증가는 적어도 0.3°C/min, 예컨대 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9 또는 3.0 °C/min을 사용하여 35°C의 온도로 증가시킴으로써 수행된다.

[0203] 또 다른 실시양태에서, 단계 f)의 온도 증가는 적어도 0.3°C/min, 예컨대 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9 또는 3.0 °C/min을 사용하여 40°C의 온도로 증가시킴으로써 수행된다.

[0204] 또 다른 실시양태에서, 단계 f)의 온도 증가는 적어도 0.3°C/min, 예컨대 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9 또는 3.0 °C/min을 사용하여 50°C의 온도로 증가시킴으로써 수행된다.

[0205] 용도

[0206] 또 다른 측면에서, 본 발명은 암 치료에 사용하기 위한, 본원의 임의의 측면 또는 실시양태에서 규정되는 ADC 제제를 제공한다. 예시적인 암은 중추신경계의 종양에 의해 야기되는 것, 두경부암, 폐암, 예컨대 NSCLC, 유방암, 구체적으로 삼중 음성 유방암, 식도암, 위장 또는 위암, 간 및 담도암, 췌장암, 결직장암, 방광암, 신장암, 전립선암, 자궁내막암, 난소암, 악성 흑색종, 육종, 원발 부위 미상의 종양, 골수암, 급성 림프아구성 백혈병, 만성 림프아구성 백혈병 및 비-호지킨 (Hodgkin) 림프종, 피부암, 신경아교종, 뇌암, 자궁, 급성 골수성 백혈병 및 직장암을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 한 실시양태에서, ADC의 항체 부분은 항-TF 항체이고, 본 발명의 제제는 췌장암, 결직장암, 유방암, 방광암, 전립선암 또는 난소암을 앓고 있는 대상체에게 투여된다.

[0207] 대상체에게 투여하기 전에, 치료 유효량의 ADC를 포함하는 본 발명의 동결건조 제제는 제약상 허용되는 희석제 내로 용해, 즉, 재구성된다. 예시적인, 비-제한적인 희석제는 제약 등급 멸균수 (주사용수, WFI) 또는 염수, 정균 주사수 (BWFI), pH 완충 용액 (예를 들어 포스페이트-완충 염수), 링거 용액 및 텍스트로스 용액을 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 동결건조 제제는 물, pH 완충 용액 (예를 들어 포스페이트-완충 염수), 링거 용액 및 텍스트로스 용액 내에 재구성될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 동결건조 제제는 약 5 내지 약 30 mg/mL ADC, 예컨대 약 7 내지 약 20 mg/mL ADC, 예컨대 약 8 내지 15 mg/mL ADC, 예컨대 약 9 내지 약 11 mg/mL ADC, 예컨대 약 10 mg/mL ADC의 농도로 주사용 멸균수 (WFI) 내에 재구성될 수 있다. 농도는 예를 들어 pH 완충 용액 (예를 들어 포스페이트-완충 염수, 링거 용액 및/또는 텍스트로스 용액) 내로의 주입을 위해 약 0.05 mg/mL 내지 30 mg/mL ADC, 예를 들어, 0.12 mg/mL 내지 2.40 mg/mL ADC의 농도로 임의로 추가로 희석할 수 있다.

[0208] 일반적으로, 본 발명의 재구성된 제제는 비경구 투여에 적합하다. 문구 "비경구 투여" 및 "비경구로 투여되는"은 본원에서 사용되는 바와 같이, 경구 및 국소 투여 이외의 다른 투여, 대체로 주사 또는 주입에 의한 투여 방식을 의미하고, 표피, 정맥내, 근내, 동맥내, 경막내, 관절낭내, 안와내, 심내, 피내, 복강내, 건내, 경기관, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내, 두개내, 흉강내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 포함한다. 한 실시양태에서, 제약 조성물은 예를 들어 멸균수 또는 염수 내에 동결건조 제제를 재구성하고 대상체에게 투여하기 전에 IV 백 또는 시린지 내에 유지함으로써 정맥내 또는 피하 주사 또는 주입에 의해 투여된다.

[0209] 본 발명은 또한 일반적으로 활성 작용제의 양이 표시된 완전 밀폐 용기, 예컨대 바이알, 앰플 또는 향낭 (sachet) 내의 본 발명에 따른 항-TF ADC의 동결건조 제제를 포함하는 키트를 제공한다. 제약 물질이 주사에 의해 투여되는 경우, 주사용 멸균수 또는 염수의 앰플은 예를 들어 임의로 키트의 일부로서 제공될 수 있어서, 성분들은 투여 전에 혼합될 수 있다. 상기 키트는 원하는 경우에, 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 쉽게 명백해질 하나 이상의 다양한 통상의 제약 키트 성분, 예를 들어, 하나 이상의 제약상 허용되는 담체를 갖는 용기, 추가의 용기 등을 추가로 포함할 수 있다. 투여할 성분의 양, 투여를 위한 지침, 및/또는 성분 혼합을 위한 지침을 나타내는 삽입물 또는 표지로서 인쇄된 설명서가 또한 키트 내에 포함될 수 있다.

[0210] 본 발명의 실시양태:

- [0211] 1. 약 5 g/L 내지 약 30 g/L 항-조직 인자 (TF) 항체-약물 접합체 (ADC) 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 수성 제제의 동결건조에 의해 얻을 수 있거나 또는 얻은 항-TF ADC의 동결건조 제제로서, 상기 제약상 허용되는 부형제가
- [0212] a. pH가 약 5 내지 약 7인 약 20 내지 약 50 mM 히스티딘 또는 시트레이트 완충제;
- [0213] b. 약 10 내지 약 250 mM 수크로스 또는 트레할로스; 및
- [0214] c. 약 50 mM 내지 약 300 mM 만니톨 또는 글라이신
- [0215] 을 포함하는 것인 동결건조 제제.
- [0216] 2. a. MMAE 및 MMAF로부터 선택되는 치료 모이어티 및 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 45의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역; 서열 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 73의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역; 서열 37의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 77의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역; 또는 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 41의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 VH 및 VL 영역을 포함하는 항-TF 항체를 포함하는 항-TF ADC; 및
- [0217] b. 동결건조 단계 동안 pH 변화를 제한하는 완충제, 고체 상태에서 항-TF ADC와 비정질 상을 형성하는 적어도 하나의 비-환원당 및 적어도 하나의 증량제를 포함하는 제약상 허용되는 부형제
- [0218] 를 포함하는 수성 제제의 동결건조에 의해 얻을 수 있거나 얻은, 임의의 계면활성제가 본질적으로 없는 항-TF ADC의 동결건조 제제.
- [0219] 3. 실시양태 2에 있어서, 수성 제제가 히스티딘, 시트레이트, 포스페이트, 탄산, 숙시네이트, 글리콜레이트 및 이들의 임의의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 완충제를 포함하는 것인 동결건조 제제.
- [0220] 4. 실시양태 1 또는 3에 있어서, 완충제가 히스티딘인 동결건조 제제.
- [0221] 5. 상기 실시양태 중 임의의 하나에 있어서, 수성 제제가 약 7 내지 약 20 g/L 항-TF ADC, 예컨대 약 8 내지 약 15 g/L 항-TF ADC를 포함하는 것인 동결건조 제제.
- [0222] 6. 상기 실시양태 중 임의의 하나에 있어서, 수성 제제가 약 9 내지 약 11 g/L 항-TF ADC를 포함하는 것인 동결건조 제제.
- [0223] 7. 상기 실시양태 중 임의의 하나에 있어서, 수성 제제의 pH가 약 5.5 및 6.5, 예컨대 약 6인 동결건조 제제.
- [0224] 8. 상기 실시양태 중 임의의 하나에 있어서, 수성 제제가 약 25 내지 약 40 mM 히스티딘, 예컨대 약 28 내지 약 34 mM 히스티딘을 포함하는 것인 동결건조 제제.
- [0225] 9. 상기 실시양태 중 임의의 하나에 있어서, 수성 제제가 약 29 내지 약 31 mM 히스티딘을 포함하는 것인 동결건조 제제.
- [0226] 10. 상기 실시양태 중 임의의 하나에 있어서, 수성 제제가 약 50 내지 약 225 mM 수크로스 또는 트레할로스, 예컨대 84 내지 약 165 mM 수크로스 또는 트레할로스를 포함하는 것인 동결건조 제제.
- [0227] 11. 상기 실시양태 중 임의의 하나에 있어서, 수성 제제가 약 84 내지 약 146 mM 수크로스, 예컨대 약 84 내지 약 92 mM 수크로스를 포함하는 것인 동결건조 제제.
- [0228] 12. 상기 실시양태 중 임의의 하나에 있어서, 수성 제제가 약 100 내지 약 274 mM 만니톨 또는 글라이신을 포함하는 것인 동결건조 제제.
- [0229] 13. 상기 실시양태 중 임의의 하나에 있어서, 수성 제제가 약 158 내지 약 172 mM 만니톨을 포함하는 것인 동결건조 제제.
- [0230] 14. 상기 실시양태 중 임의의 하나에 있어서, 수성 제제가 약 9 내지 약 11 g/L 항-TF ADC, 예컨대 약 10 mg/mL 항-TF ADC, 및 약 30 mM 히스티딘, 약 88 mM 수크로스 및 약 165 mM 만니톨을 포함하는 것인 동결건조 제제.
- [0231] 15. a. 항-TF 항체-약물 접합체,
- [0232] b. 히스티딘, 시트레이트, 숙시네이트, 글리콜레이트, 탄산 및 포스페이트로부터 선택되는 완충제;
- [0233] c. 수크로스, 트레할로스 및 이들의 조합물로부터 선택되는 비-환원당, 및

- [0234] d. 만니톨 및 글라이신으로부터 선택되는 증량제
- [0235] 를 포함하는 동결건조 제제.
- [0236] 16. 상기 실시양태 중 임의의 하나에 있어서, 임의의 폴리소르베이트가 본질적으로 없는 것인 동결건조 제제.
- [0237] 17. 상기 실시양태 중 임의의 하나에 있어서, 임의의 계면활성제가 본질적으로 없는 것인 동결건조 제제.
- [0238] 18. 상기 실시양태 중 임의의 하나에 있어서, 임의의 계면활성제가 없는 것인 동결건조 제제.
- [0239] 19. a. 항-TF 항체-약물 접합체,
- [0240] b. 히스티딘 및 시트레이트로부터 선택되는 완충제;
- [0241] c. 수크로스, 트레할로스 및 이들의 조합물로부터 선택되는 비-환원당, 및
- [0242] d. 만니톨 및 글라이신으로부터 선택되는 증량제
- [0243] 로 본질적으로 이루어진 동결건조 제제.
- [0244] 20. 상기 실시양태 중 임의의 하나에 있어서, 만니톨 및 수크로스를 포함하고, 만니톨 대 수크로스의 중량비가 적어도 약 1인 동결건조 제제.
- [0245] 21. 상기 실시양태 중 임의의 하나에 있어서, 만니톨 및 수크로스를 포함하고, 만니톨 대 수크로스의 중량비가 약 1 내지 약 30, 예컨대 1 내지 약 10, 예컨대 약 1 내지 약 2인 동결건조 제제.
- [0246] 22. 상기 실시양태 중 임의의 하나에 있어서, 만니톨 및 수크로스를 포함하고, 만니톨 대 수크로스의 중량비가 약 1인 동결건조 제제.
- [0247] 23. 상기 실시양태 중 임의의 하나에 있어서, 만니톨을 포함하고, 만니톨 대 항-TF ADC의 중량비가 적어도 약 3인 동결건조 제제.
- [0248] 24. 상기 실시양태 중 임의의 하나에 있어서, 만니톨 및 수크로스를 포함하고, 만니톨 대 항-TF ADC의 중량비가 약 3이고, 만니톨 대 수크로스의 중량비가 약 1인 동결건조 제제.
- [0249] 25. 상기 실시양태 중 임의의 하나에 있어서, 약 250 mM 미만의 수크로스 및 약 300 mM 미만의 만니톨을 포함하는 수성 제제의 동결건조에 의해 얻을 수 있거나 얻은 동결건조 제제.
- [0250] 26. 상기 실시양태 중 임의의 하나에 있어서, 약 160 mM 미만의 수크로스 및 약 274 mM 미만의 만니톨을 포함하는 수성 제제의 동결건조에 의해 얻을 수 있거나 얻은 동결건조 제제.
- [0251] 27. 상기 실시양태 중 임의의 하나에 있어서, 약 7 내지 약 20 g/L 항-TF ADC 및
- [0252] a. 약 28 내지 34 mM 히스티딘;
- [0253] b. 약 84 내지 약 146 mM 수크로스;
- [0254] c. 약 158 내지 약 274 mM 만니톨; 또는
- [0255] d. (a) 내지 (c) 중 어느 2종 또는 전부의 조합물
- [0256] 을 포함하는 수성 제제의 동결건조에 의해 얻을 수 있거나 얻은 동결건조 제제.
- [0257] 28. 상기 실시양태 중 임의의 하나에 있어서, 약 9 내지 약 11 g/L 항-TF ADC, 예컨대 약 10 mg/mL 항-TF ADC, 및
- [0258] a. 약 30 mM 히스티딘;
- [0259] b. 약 88 mM 수크로스;
- [0260] c. 약 165 mM 만니톨; 또는
- [0261] d. (a) 내지 (c) 중 어느 2종 또는 전부의 조합물
- [0262] 을 포함하는 수성 제제의 동결건조에 의해 얻을 수 있거나 얻은 동결건조 제제.
- [0263] 29. 상기 실시양태 중 임의의 하나에 있어서, 항체 분자당 약물 모이어티의 평균 절대 수가 1, 2, 3, 4, 5, 6,

7, 또는 8, 예컨대 3, 4 또는 5인 동결건조 제제.

- [0264] 30. 상기 실시양태 중 임의의 하나에 있어서, 항체가 소수성 약물에 접합된 것인 동결건조 제제.
- [0265] 31. 상기 실시양태 중 임의의 하나에 있어서, 약물이 오리스타틴 또는 그의 기능적 펩티드 유사체 또는 유도체인 동결건조 제제.
- [0266] 32. 상기 실시양태 중 임의의 하나에 있어서, 약물이 항-TF 항체의 술프히드릴 잔기에 부착된 링커를 통해 항-TF 항체에 연결되고, 상기 술프히드릴 잔기가 항-TF 항체의 부분적인 환원, 또는 환원에 의해 얻은 것인 동결건조 제제.
- [0267] 33. 상기 실시양태 중 임의의 하나에 있어서, 약물이 MMAE 또는 MMAF인 동결건조 제제.
- [0268] 34. 상기 실시양태 중 임의의 하나에 있어서, 약물이 vcMMAE, vcMMAF 또는 mcMMAF로부터 선택되는 링커-약물을 통해 항-TF 항체에 연결되는 것인 동결건조 제제.
- [0269] 35. 상기 실시양태 중 임의의 하나에 있어서, 항체가 전장 항체인 동결건조 제제.
- [0270] 36. 상기 실시양태 중 임의의 하나에 있어서, 항체가 인간 IgG1 κ 항체인 동결건조 제제.
- [0271] 37. 상기 실시양태 중 임의의 하나에 있어서, 항체가 인간 TF에 결합하기 위해
 - [0272] a. 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 45의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;
 - [0273] b. 서열 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 73의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;
 - [0274] c. 서열 37의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 77의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역; 또는
 - [0275] d. 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 41의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역
- [0276] 으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 VH 및 VL 영역을 포함하는 하나 이상의 참조 항체와 경쟁하는 것인 동결건조 제제.
- [0277] 38. 상기 실시양태 중 임의의 하나에 있어서, 항-TF 항체가
 - [0278] a. 서열 6에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR1 영역, 서열 7에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR2 영역, 및 서열 8에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR3 영역을 포함하는 가변 중쇄 (VH) 영역, 및 서열 46에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR1 영역, 서열 47에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR2 영역, 및 서열 48에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR3 영역을 포함하는 가변 경쇄 (VL) 영역,
 - [0279] b. 서열 34에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR1 영역, 서열 35에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR2 영역, 및 서열 36에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR3 영역을 포함하는 VH 영역, 및 서열 74에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR1 영역, 서열 75에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR2 영역, 및 서열 76에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR3 영역을 포함하는 VL 영역, 또는
 - [0280] c. 서열 38에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR1 영역, 서열 39에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR2 영역, 및 서열 40에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR3 영역을 포함하는 VH 영역, 및 서열 78에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR1 영역, 서열 79에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR2 영역, 및 서열 80에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR3 영역을 포함하는 VL 영역, 또는
 - [0281] d. 서열 2에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR1 영역, 서열 3에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR2 영역, 및 서열 4에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR3 영역을 포함하는 VH 영역, 및 서열 42에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR1 영역, 서열 43에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR2 영역, 및 서열 44에 제시된 아미노산 서열을 갖는 CDR3 영역을 포함하는 VL 영역, 또는
 - [0282] e. 상기 서열에, 바람직하게는 최대 1, 2 또는 3개의 아미노산 변형, 보다 바람직하게는 아미노산 치환, 예컨대 보존적 아미노산 치환을 갖는 임의의 상기 항체의 변이체를 포함하는 것인 동결건조 제제.
- [0284] 39. 상기 실시양태 중 임의의 하나에 있어서, 항체가
 - [0285] a. 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 45의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;

- [0286] b. 서열 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 73의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역;
- [0287] c. 서열 37의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 77의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역; 또는
- [0288] d. 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 41의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역
- [0289] 을 포함하는 것인 동결건조 제제.
- [0290] 40. 상기 실시양태 중 임의의 하나에 있어서, 항체가 전장 완전 인간 모노클로날 IgG1 항체, 임의로 IgG1 κ 인 동결건조 제제.
- [0291] 41. a. 임의로 항체 부분이 실시양태 37 내지 39 중 임의의 하나의 실시양태의 VH 및 VL 서열을 포함하는 것인 약 7 내지 약 20 g/L의 항-TF ADC;
- [0292] b. 약 28 내지 34 mM 히스티딘;
- [0293] c. 약 84 내지 약 146 mM 수크로스;
- [0294] d. 약 158 내지 약 274 만니톨; 또는
- [0295] e. (b) 내지 (d) 중 어느 2종 또는 전부의 조합물
- [0296] 을 포함하는, 항-TF ADC의 동결건조 제제의 제조에 적합한 적절한 수성 용액.
- [0297] 42. 실시양태 1-40 중 임의의 하나의 실시양태의 동결건조 제제를 멸균 수성 희석제 내에 재구성함으로써 얻은 제약상 허용되는 액체 제제.
- [0298] 43. 실시양태 42에 있어서, 약 5 g/L 내지 약 30 g/L 항-TF ADC, pH가 약 5 내지 약 7인 약 20 내지 약 50 mM 히스티딘; 약 10 내지 약 250 mM 수크로스 또는 트레할로스; 및 약 50 mM 내지 약 300 mM 만니톨 또는 글라이신 을 포함하는 액체 제제.
- [0299] 44. 실시양태 43에 있어서, 약 9 내지 약 11 mg/mL 항-TF ADC, 약 28 내지 약 34 mM 히스티딘, 약 84 내지 약 92 mM 수크로스 및 약 158 내지 약 274 mM 만니톨을 포함하는 액체 제제.
- [0300] 45. 실시양태 1-40 중 임의의 하나의 실시양태의 동결건조 제제를 멸균 수성 희석제 내에 재구성하는 단계를 포함하는, 항-TF ADC의 주사가능 용액의 제조 방법.
- [0301] 46. 약 9 g/L 내지 약 11 g/L 항-TF ADC 및 pH가 약 5 내지 약 7인 약 30 mM 히스티딘 완충제; 약 88 mM 수크로스; 및 약 165 mM 만니톨을 포함하는 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 수성 제제의 동결건조에 의해 제조되고; 항체가 서열 5의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 45의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역; 서열 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 73의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역; 서열 37의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 77의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역; 또는 서열 1의 아미노산 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 41의 아미노산 서열을 포함하는 VL 영역을 포함하고, 링커-약물이 vcMMAE, vcMMAF 또는 mcMMAF인 항-TF ADC의 동결건조 제제.
- [0302] 실시예 1
- [0303] 본 실시예는 본원에서 HuMax-TF로서 칭하는 항-TF HuMab 098의 열 안정성에 대한 특정 완충제 및 pH 값의 효과를 보여준다 (WO2011157741 A2 참조). pH 4.5-6.5에서 히스티딘 및 아세트산 완충제 시스템을 이용하여 선택된 부형제, 완충제 및 pH 조건에 대한 가속 안정성 연구를 설계하였다.
- [0304] 사용된 DOE (실험 디자인 (Design of Experiments))는 하나의 수치 (pH) 및 2개의 카테고리 인자 (완충제 및 부형제 종류)를 갖는 반응 표면, 선형 디자인이었다. 다양한 생물물리학적 및 분석적 방법과 연관된 실험 변동성을 평가하기 위해 DOE는 각각의 제제 조성물에 대해 이중 샘플을 포함하였다. 중심점 제제에서 50 mg/mL에서 및 조합한 소르비톨 및 염화나트륨 부형제를 사용한 20 mg/mL에서 추가의 off-DOE 샘플을 연구에 포함시켰다. 표 2는 HuMax-TF에 대한 예비제제 실험의 디자인 (DOE) 샘플을 보여준다.

[0305] <표 2>

	pH	완충제	부형제	단백질 농도 (mg/ml)
A	4.5	30mM 아세트레이트	140mM NaCl	20
B	4.5	30mM 아세트레이트	140mM NaCl	20
C	5.0	30mM 아세트레이트	140mM NaCl	20
D	6.0	30mM 히스티딘	140mM NaCl	20
E	6.5	30mM 히스티딘	140mM NaCl	20
F	5.5	30mM 히스티딘	140mM NaCl	20
G	5.5	30mM 아세트레이트	140mM NaCl	20
H	4.5	30mM 아세트레이트	225mM 소르비톨	20
I	5.5	30mM 히스티딘	225mM 소르비톨	20
J	5.5	30mM 아세트레이트	140mM NaCl	20
K	6.0	30mM 히스티딘	225mM 소르비톨	20
L	6.5	30mM 히스티딘	140mM NaCl	20
M	6.0	30mM 히스티딘	140mM NaCl	20
N	6.5	30mM 히스티딘	225mM 소르비톨	20
O	5.0	30mM 아세트레이트	225mM 소르비톨	20
P	5.5	30mM 아세트레이트	225mM 소르비톨	20
Q	5.5	30mM 히스티딘	225mM 소르비톨	20
R	5.0	30mM 아세트레이트	140mM NaCl	20
S	5.5	30mM 아세트레이트	225mM 소르비톨	20
T	6.5	30mM 히스티딘	225mM 소르비톨	20
U	5.0	30mM 아세트레이트	225mM 소르비톨	20
V	4.5	30mM 아세트레이트	225mM 소르비톨	20
W	5.5	30mM 히스티딘	140mM NaCl	20
X	6.0	30mM 히스티딘	225mM 소르비톨	20
보다 높은 단백질 농도에 대한 Off-DOE 조성물				

[0306]

Y	5.0	30mM 아세트레이트	225mM 소르비톨	50
Z	5.0	30mM 아세트레이트	140mM NaCl	50
AA	6.0	30mM 히스티딘	225mM 소르비톨	50
BB	6.0	30mM 히스티딘	140mM NaCl	50
부형제 혼합물에 대한 Off-DOE 조성물				
CC	5.0	30mM 아세트레이트	110mM 소르비톨 + 70mM NaCl	20
DD	6.0	30mM 히스티딘	110mM 소르비톨 + 70mM NaCl	20

[0307]

[0308] 가속 안정성 샘플을 다양한 분석 방법에 의해 시험하였다. 선택된 결과를 실시예 2, 3 및 4에서 논의한다.

[0309] 실시예 2

- [0310] 응집 및 분해의 정도에 대한 다양한 제제의 효과를 결정하기 위해, 4주 동안 5 및 45℃ (각각 비-스트레스 (stressed) 및 스트레스)에서 인큐베이팅한 HuMax-TF 샘플을 SEC (크기 배제 크로마토그래피)를 이용하여 분석하였다. 비-스트레스 HuMax-TF 샘플의 SEC 크로마토그램은 총 피크 영역의 98% 이상을 차지하는 단량체 항체에 대응하는 하나의 주요 피크를 보여주었다. 상기 하나의 주요 SEC 피크는 각각의 제제 내에서 항체의 크기 균질성을 반영하였다. 다양한 제제 사이에서 SEC 데이터의 비교를 위해, 주 피크 이전에 용리된 물질종에 대한 피크 영역 값을 합하고, % HMW로서 기록하였다. 유사하게, 주 피크 이후에 용리된 물질종에 대한 피크 영역 값을 합하고, % 분해로서 기록하였다. 도 1에 제시된 막대 그래프는 비-스트레스 조건 하에 임의의 제제에 대한 임의의 물질종에 대한 유의한 경향을 보여주지 않았다. 그러나, 스트레스 조건에 대해, 응집 및 분해로 인한 증가된 %HMW 및 %LMW, 및 감소된 % 주 값이 관찰되었다. 히스티딘 제제보다 아세테이트 제제에 대해 보다 높은 %HMW 및 %LMW 값이 관찰되었다. 두 완충제 종류 모두에 대해, 보다 특히 아세테이트 제제에서, %HMW 및 %LMW 물질종은 pH 증가에 따라 및 염화나트륨에 비해 소르비톨을 사용할 때 감소하였다.
- [0311] 실시예 3
- [0312] 선택된 4-주 DOE 샘플에 대해 환원 및 비-환원 조건 하에 SDS-PAGE 분석을 수행하였다. 환원 조건 하에, 중쇄 밴드는 약 54 kDa에서 나타나고, 경쇄 밴드는 약 26 kDa에서 나타났다. 비-환원 조건 하에, 주 HuMax-TF 밴드는 약 145 kDa에서 이동하였다. 샘플을 환원 및 비-환원 SDS-PAGE를 이용하여 분석하였다. 비-스트레스 샘플에 비해, 열 스트레스 제제는 비-환원 겔에서 무손상 IgG 미반에서 LMW 밴드의 강도의 증가를 보여주었다. 유사하게, 비-스트레스 샘플에 비해 스트레스 샘플에 대해 중쇄 및 경쇄 밴드 사이에서 새로운 밴드의 증가된 강도가 관찰되었다. 환원 및 비-환원 샘플 모두에 대해, 아세테이트 제제는 히스티딘 제제에 비해 이들 분해된 물질종의 강도의 보다 큰 증가를 보여주었다.
- [0313] 실시예 4
- [0314] 관찰된 피크 영역에 대한 다양한 제제 성분의 효과를 평가하기 위해, 1-주 스트레스 및 비-스트레스 HuMax-TF DOE 샘플을 cIEF (영상화 모세관 등전 포커싱)을 이용하여 분석하였다. 결과를 도 2에 제시한다. 주 피크보다 더 낮은 pI 값을 갖는 물질종에 대한 % 피크 영역 값을 합하고 % 산성으로서 기록하고, 주 피크보다 더 높은 pI 값을 갖는 물질종에 대한 % 피크 영역 값을 합하고 % 염기성으로서 기록하였다.
- [0315] 도 2에 제시된 비-스트레스 HuMax-TF DOE 샘플의 cIEF 분석은 비-스트레스 샘플에 대해 pH, 완충제 종류 또는 부형제 종류에 대한 cIEF 결과의 의존성에 대한 임의의 명백한 경향을 보여주지 않았다. 스트레스 DOE 샘플의 cIEF 분석은 주 피크 % 영역의 5-13% 감소를 보여주었다. 주 피크 영역의 감소는 산성 물질종에 대한 피크 영역의 증가, 및 대부분의 제제에 대해 % 염기성 피크 영역의 증가와 또한 동시에 발생하였다. 막대 그래프로 도시된 % 산성 물질종의 변화는 명백한 pH 의존성을 보여주지 않았지만, 아세테이트 제제는 일반적으로 히스티딘 제제보다 근소하게 더 낮은 % 산성 피크 영역을 보여주었다. 그러나, % 염기성 물질종은 % 염기성 피크 영역이 pH 증가에 따라 감소하면서 강한 pH 의존성을 보여주었다. 추가로, 히스티딘 제제는 아세테이트 제제보다 더 낮은 % 염기성 물질종을 보여주었다.
- [0316] 실시예 5
- [0317] 용액 내에서 HuMax-TF-ADC의 안정성에 대한 pH, 폴리소르베이트의 존재, 및 소르비톨의 존재의 효과를 시험하기 위해 스크리닝 연구를 설계하였다. HuMax-TF-ADC는 프로테아제 절단가능 발린 시트룰린 (vc) 링커를 통해 미세 소관-파괴제 모노메틸 오리스타틴 E (MMAE)에 화학적으로 접합된 인간 모노클로날 IgG1 항체 HuMax-TF 011로 구성된 항체-약물 접합체이다.
- [0318] 3가이 상이한 pH 값을 이용하여 12가지 상이한 제제를 제조하였다. 용액 제제 연구 설계를 표 3에 제시한다. 모든 제제는 30 mM 히스티딘과 함께 HuMax-TF-ADC를 10 mg/mL로 함유하였다. 트윈 = 폴리소르베이트 80 (PS80).

[0319] <표 3>

제제	pH	트윈 농도 (%)	소르비톨 (mM)
1	5.5	0	0
2	5.5	0	225
3	5.5	0.02	0
4	5.5	0.02	225
5	6.0	0	0
6	6.0	0	225
7	6.0	0.02	0
8	6.0	0.02	225
9	6.5	0	0
10	6.5	0	225
11	6.5	0.02	0
12	6.5	0.02	225

[0320]

[0321] 스크리닝 연구를 위해 제조한 12가지 제제를 UV/Vis (자외선-가시광선 분광법 (UltraViolet-Visible Spectroscopy)), icIEF, SEC, 및 DAR-HIC (소수성 상호작용 크로마토그래피를 이용한 약물-대-항체 몰비)을 이용하여 분석하였다. 제제 스크리닝 연구에서는 HuMax-TF-ADC에 대한 주요 안정성 표시 파라미터가 SEC에 의해 측정된 응집체 및 icIEF에 의해 측정된 산성 이소형 (아마도 탈아미드화 때문에)임을 보여주었다.

[0322]

2주 동안 40℃에서 보관된 용액 샘플 내에서 HMW 형성 백분율에 대한 pH의 효과를 SEC에 의해 측정하였다 (도 3은 표 3의 제제 1, 5, 및 9에 대한 SEC % HMW를 보여준다). 6.0의 pH가 히스티딘 완충제 내에서 HuMax-TF-ADC의 응집을 제한하는데 가장 효율적인 것으로 나타났다.

[0323]

2주 동안 40℃에서 보관된 용액 샘플 내에서 HuMax-TF-ADC의 탈아미드화에 대한 pH의 효과를 icIEF에서 산성 물질 증가에 의해 측정하였다 (도 4는 표 3의 제제 1, 5, 및 9에 대한 결과를 보여준다). 5.5의 pH가 탈아미드화를 제한하기 위해 가장 효율적이고, pH 6.0 및 pH 6.5의 순인 것으로 밝혀졌다.

[0324]

소르비톨 또는 PS80의 사용은 2주 동안 40℃에서 보관된 HuMax-TF-ADC 제제 내에서 icIEF에 의한 % 주 전하 피크, 및 SEC에 의한 주 피크에 대한 임의의 현저한 효과를 갖지 않았다 (도 5a 및 5b). 이것은 제제에 계면활성제가 존재하지 않을 수 있음을 보여준다.

[0325]

실시예 6

[0326]

제제 스크리닝에서는 주요 안정성 표시 파라미터가 SEC에 의해 측정된 응집체 및 icIEF에 의해 측정된 산성 이소형 (아마도 탈아미드화)임을 보여주었다. 가속 조건 하에 측정된 모든 시험된 액체 제제에서 탈아미드화 속도는 빠르고, 따라서 HuMax-TF-ADC의 시험된 액체 제제는 명백하게 불안정하였다. 일부 액체 제제 및 예비 동결건조 제제 사이의 비교를 도 6에 제시한다.

[0327]

실시예 7

[0328]

동결건조된 케이크에 대한 충전 부피 (fill volume) 및 바이알 부피/형상의 가능한 영향을 조사하기 위해, 상이한 농도의 수크로스 (150 mM 및 250 mM), 10 mg/mL HuMax-TF-ADC를 30 mM 히스티딘 완충제 (pH 6.0) 내에 함유하는 2가지 제제를 사용하여 파일럿 (pilot) 동결건조 연구를 수행하였다. HuMax-TF-ADC의 히스티딘, 수크로스 제제에 대해, 동결건조된 케이크 외관은 상이한 충전 부피 및 바이알 크기에 의해 상이하였다:

[0329]

A: 제제의 제1군의 샘플을 2 mL 유리 바이알 당 0.25 mL로 충전하고 동결건조하였다. 샘플은 붕괴의 명백한 징후 없이 제약상 우수한 것으로 보였다.

[0330]

B: 동일한 제제의 제2군의 샘플을 동일한 동결건조 사이클을 사용하여, 10 mL 바이알 내에 4 mL 충전 부피를 이

용하여 동시에 동결건조하였다. 샘플은 심한 수축이 있는 것으로 보였다.

[0331] 따라서, 제제는 2 mL 유리 바이알 내에 적은 충전 부피 0.25 mL에 대해 제약상 우수한 케이크를 지지할 수 있었지만, 10 mL 바이알 내에 4 mL의 보다 큰 충전 부피에 대해 덜 적합하다.

[0332] 실시예 8

[0333] 본 실시예의 목적은 HuMax-TF-ADC에 대한 동결건조 제제의 안정성에 대한 수크로스 및 만니톨 농도의 효과를 시험하기 위한 것이다.

[0334] 초기 시험에서는 수크로스가 제제의 주요 특성을 유지하면서 트레할로스로 쉽게 대체될 수 있음을 보여주었다. 단지 수크로스를 사용하여 시험을 계속하였다.

[0335] 10 mg/mL HuMax-TF-ADC, 30 mM 히스티딘 (pH 6.0)을 함유하는 3가지 상이한 동결건조 제제를 상이한 농도의 수크로스 및 만니톨을 갖도록 제조하였다. 상세한 내용을 표 4에 제시한다.

[0336] <표 4>

제제	HuMax-TF-ADC	히스티딘	수크로스	만니톨
A	10 mg/mL	30 mM	225 mM (7.7% w/v)	274 mM (5% w/v)
B	10 mg/mL	30 mM	88 mM (3% w/v)	165 mM (3% w/v)
C	10 mg/mL	30 mM	160 mM (5.5% w/v)	274 mM (5% w/v)

[0337]

[0338] 상이한 농도의 수크로스 및 만니톨을 갖는 동결건조 제제를 25℃, 40℃, 및 50℃에서 가속 안정성 시험에 배치하였다. 스트레스 샘플을 SEC (크기 배제 크로마토그래피), icIEF (영상화 모세관 등전 포커싱), FTIR (푸리에 변환 적외선 분광법 (Fourier transform infrared spectroscopy)), DLS (동적 광 산란)와 같은 방법에 의해 분석하였다. 3가지 제제에 대한 가속 안정성 데이터는 제제 B가 특히 50℃ 및 40℃에서 안정성 데이터를 비교할 때, 응집체 및 주 전하 이소형에 관하여 다른 제제들보다 잇점을 가짐을 보여주었다. 예시적인 결과를 도 7에 제시한다.

[0339] 또한, 제제 B는 제제 A 및 C에 비교할 때 2개월 동안 40℃에서 보관한 후 보다 많은 입자에서 최소의 성장을 보였다 (도 8).

[0340] 50℃에서 2주 동안 보관 후에 제제 A, B, 및 C에 대한 제2 유도체 FTIR 스펙트럼의 아마이드 I 영역에서는 겉보기 변화가 관찰되지 않았다 (도 9). 데이터는 분자에 대한 2차 구조가 스트레스 온도 조건 하에 보관할 때 각각의 제제 내에서 동일하게 유지됨을 제안하였다.

[0341] 실시예 11

[0342] 본 실시예는 HuMax-TF-ADC 제제에서 결정질 증량제로서 만니톨의 적합성, 특히, HuMax-TF-ADC에 대한 동결건조 제제에서 만니톨의 결정화를 위한 어닐링 (annealing) 온도 및 시간을 입증하였다. 시차 주사 열량계 (DSC)는 에너지를 직접 측정하고 샘플의 열 용적의 정확한 측정을 허용하는 열 분석 기술이다. 샘플이 물리적 전환, 예컨대 상 전이를 겪을 때, 샘플 및 참조물 사이의 열 유동의 차이를 DSC에 의해 검출할 수 있다.

[0343] 본 실시예에서, 제제 내에서 만니톨의 결정화의 개시를 위해 요구되는 시간을 결정하기 위해 DSC를 사용하였다. 2가지 상이한 어닐링 온도 (-15℃ 및 -20℃)를 시험하였다. 용액을 1℃/min으로 -40℃로 냉각시킨 후, 온도를 1℃/min으로 -15℃ 또는 -20℃로 상승시키고, 120분 동안 등온으로 유지하였다. 제제 B에 대한 만니톨의 결정화에 대한 개시 시간은 도 10에 도시된 바와 같이 -15℃ 또는 -20℃에서 어닐링할 때 약 10분이었다. 데이터는 만니톨이 어닐링 동안 쉽게 결정화되고, 따라서 제제 내에서 결정질 증량제로서 잘 작용함을 입증하였다.

[0344] 실시예 10

[0345] 동결건조된 HuMax TF-ADC 제제 샘플을 장기간 및 가속 안정성 프로그램 상에서 평가하였다. 재구성 후에 HuMax-TF-ADC 제제의 조성물을 30 mM 히스티딘 (4.65 mg/mL에 상응함), 88 mM 수크로스 (약 30 mg/mL에

상응함), 165 mM 만니톨 (약 30 mg/mL에 상응함) (pH 6.0) 내에 10 mg/mL로 제제화하였다. 장기간 안정성 샘플을 0점 시간 (time zero), 1개월, 2개월, 3개월, 6개월, 9개월, 12개월 및 18개월 등에서 분석하였다. 동결 건조 제제를 상이한 시점에서 주사용수 (WFI)로 재구성하고, SEC, HIC, CE-SDS 및 icIEF를 포함한 분석 방법에 의해 시험하였다.

[0346] 5±3℃ 및 25±2℃에서 적어도 6개월 보관 후에, 모든 샘플은 모든 시험 방법에 따라 안정하게 유지되었다. 5±3℃ 및 25±2℃에서 보관된 샘플은 연구 시작에 비해 적어도 6개월 시점에서 임의의 시험 방법에 따라 유의한 변화를 보이지 않았다. 25℃에서 가속 안정성 시험 동안 온도 프로파일에서 예상된 근소한 변화가 icIEF, 환원 CE-SDS, 및 SEC 시험에서 관찰되었다.

[0347] 특히, 응집에 관하여, SEC 분석은 응집체의 비율이 적어도 6개월에 걸쳐 5±3℃ 및 25±2℃ 모두에서 샘플에 대해 약 2.2%로 유지됨을 보여주었다. IcIEF를 이용하여 HuMax-TF-ADC의 전하 프로파일에 대한 변화를 결정하였다. 5±3℃에서 보관된 샘플에 대해 주 전하 이소형의 변화는 0.4% 이내에 있고, 25℃에서 보관된 샘플에 대해, 0점 시간에 비해 적어도 6개월에 걸쳐 변화는 단지 1.7%이었다.

[0348] 또한, 평균 DAR (몰 오리스타틴/몰 mAb), 약물 부하 (load) 및 유리 약물은 5℃ 및 25℃에서 적어도 6개월에 걸쳐 거의 일정하게 유지된다. 5℃ 및 25℃ 모두에서 적어도 6개월에 걸쳐 CE-SDS (비-환원) 및 CE-SDS (환원)에 의한 분해 및 SEC에 의한 LMW의 징후는 없었다. 마지막으로 중요하게는, 세포독성에 의한 생물검정에서는 HuMaxTF-ADC의 생물학적 기능성이 5℃ 및 25℃ 모두에서 적어도 6개월 동안 보존될 수 있음을 입증하였다. 따라서, 상기 제제 내의 HuMax-TF-ADC는 제약 용도를 위해 허용가능하게 안정하다.

[0349] <표 5a>

[0350] 5±3℃에서 HuMax-TF-ADC 약물 생성물의 안정성 프로그램으로부터 실시예 데이터

검정	시점 (개월)				
	0	1	2	3	6
SEC % 주요	97.6	97.7	97.8	97.7	97.6
SEC % HMW	2.3	2.2	2.1	2.2	2.2
SEC % LMW	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2
HIC에 의한 평균 DAR (몰 오리스타틴/몰 mAb)	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1
HIC에 의한 약물 로드 또는 비결합된 항체 (면적 %)	1.9	1.8	1.9	1.8	1.8
CE-SDS (비-환원)	CR	CR	CR	CR	CR
CE-SDS (환원)	CR	CR	CR	CR	CR
CE-SDS (환원) % LC0 + LC1	31.8	31.9	32.8	32.0	30.5
CE-SDS (환원) % HC	66.2	65.9	65.3	65.9	67.2
CE-SDS (환원) LC0 + LC1 + HC	98.0	97.8	98.1	97.9	97.7
유리 약물 (w/w % 유리 약물/mAb)	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
icIEF % 주요	70.3	70.7	NA	69.6	69.9
icIEF % 산성	25.2	24.2	NA	24.7	25.2
icIEF % 염기성	4.5	5.2	NA	5.7	4.9
세포 독성 (참조 표준물에 기반)	106	102	111	122	100
가시 입자	가시 입자가 실질적으로 없는	가시 입자가 실질적으로 없는	가시 입자가 실질적으로 없는	가시 입자가 실질적으로 없는	가시 입자가 실질적으로 없는

[0351] CR= 참조 표준물
에 비해 ; HC= 중쇄; LC= 경쇄; TQI= 총 정량가능한 불순물; NT= 시험되지 않음 ; NA= 분석되지 않음

[0352] <표 5b>

[0353] 25±3℃에서 HuMax-TF-ADC 약물 생성물의 안정성 프로그램으로부터 실시예 데이터

검정	시점 (개월)				
	0	1	2	3	6
SEC % 주요	97.6	97.6	97.7	97.7	97.6
SEC % HMW	2.3	2.3	2.2	2.2	2.2
SEC % LMW	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2
HIC에 의한 평균 DAR (몰 오리스타틴/몰 mAb)	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1
HIC에 의한 약물 로드 (면적 %)	1.9	1.8	1.9	1.8	1.8
CE-SDS (비-환원)	CR	CR	CR	CR	CR
CE-SDS (환원)	CR	CR	CR	CR	CR
CE-SDS (환원) % LC0 + LC1	31.8	32.0	32.8	32.0	30.8
CE-SDS (환원) % HC	66.2	66.1	65.3	65.8	66.8
CE-SDS (환원) LC0 + LC1 + HC	98.0	98.1	98.1	97.8	97.6
유리 약물(w/w % 유리 약물/mAb)	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
iCEIF % 주요	70.3	69.8	NA	68.6	68.6
iCEIF % 산성	25.2	24.7	NA	25.1	25.6
iCEIF % 염기성	4.5	5.4	NA	6.3	5.9
세포 독성 (참조 표준물에 기반)	106	109	104	111	98
가시 입자	가시 입자가 실질적으로 없는	가시 입자가 실질적으로 없는	가시 입자가 실질적으로 없는	가시 입자가 실질적으로 없는	가시 입자가 실질적으로 없는

[0354]

[0355] CR= 참조 표준물에 비해 ; HC= 중쇄; LC= 경쇄; TQI= 총 정량가능한 불순물; NT= 시험되지 않음 ; NA= 분석되지 않음

[0356] 실시예 11

[0357] 본 연구는 부형제 농도에 대한 허용되는 범위를 확인하기 위해 HuMax-TF-ADC의 안정성에 대한 보다 높은 또는 보다 낮은 부형제 농도의 효과를 검사하기 위한 것이었다. 표 6에 따라 HuMax-TF-ADC의 3가지 제제를 제조하였다. 용액을 10 mL 유리 바이알 내에 4 mL/바이알로 충전하고, 동결건조하였다. 각각의 제제의 샘플을 4주 동안 50℃에서 가속 안정성에 배치하고, 2, 3, 및 4주 후에 샘플링하였다. HuMax-TF-ADC의 안정성에 대한 보다 높은 또는 보다 낮은 농도의 부형제의 영향을 평가하기 위한 데이터를 얻기 위해, 샘플을 농도, pH, 재구성 시간, 외관, iCE, CE-SDS, SEC, DAR-HIC, 유리 약물 DLS, 및 MFI에 대해 시험하였다. 데이터는 제제들이 스트레스 안정성 시험에서 유사하게 거동함을 보여주었다.

[0358] <표 6>

설명	부형제의 농도		
	히스티딘	수크로스	만니톨
보다 낮은 부형제 농도	29.5 mM / 4.58 g/L	84 mM / 28.75 g/L	158mM / 28.78 g/L
표적 제제	30 mM / 4.65 g/L	88 mM / 30.12 g/L	165 mM/ 30.06 g/L
보다 높은 부형제 농도	30.5 mM / 4.73 g/L	92 mM/ 31.49 g/L	172 mM/ 31.33 g/L

[0359]

[0360] 실시예 12

[0361] 제제 내의 HuMax-TF-ADC 농도에 대한 허용되는 범위를 확인하기 위해, 동결건조된 HuMax-TF-ADC 제제의 안정성에 대한 HuMax-TF-ADC 농도의 효과를 검사하였다.

[0362] 30 mM 히스티딘, 88 mM 수크로스, 165 mM 만니톨, 및 5 mg/mL 또는 30 mg/mL HuMax-TF-ADC에 의해 제조된 제제를 동결건조하고 2개월 동안 40℃에서 또는 50℃에서 2주 동안 보관하였다. 40℃에서 2개월 보관 후에 SEC에

의한 주 피크는 97% 초과로 유지되었고 (도 12), 40℃에서 보관 후에 두 농도 모두에 대해 평균 % 고분자량 물질종의 단지 약간의 증가가 관찰되었다 (도 13). ICE 데이터에 의해 나타난 바와 같이, 스트레스 조건 하에 전하 프로파일 변화의 경향은 두 농도 모두에 대해 유사하였다 (도 14, 15 및 16).

[0363] 이것은 HuMax-TF-ADC가 적어도 5 mg/mL 내지 30 mg/mL 범위의 농도로 제제화될 수 있음을 보여준다.

[0364] 실시예 13

[0365] HuMax-TF-ADC의 사용중 (in-use) 안정성을 적어도 48시간 동안 실온에서 상이한 농도 (48 mg/ml까지)로 및 상이한 희석제, 즉, 주사용수 (WFI), 0.9% NaCl(염수) 및 텍스트로스 5% (D5W) 용액 내에서 시험하였다.

[0366] SEC 데이터는 평균 % 주 피크가 48시간 동안 25℃에서 보관된 샘플에 대해 97% 초과로 유지되었음을 보여준다 (도 17). 48 mg/mL 샘플은 다른 샘플보다 약 0.5% 더 많은 고분자량 물질종을 함유하였다 (도 18). 상이한 희석제는 응집 성향에 영향을 미치지 않았다.

[0367] 25℃에서 보관된 사용중 용액 샘플을 iCE를 이용하여 검사하였다. 5% 텍스트로스를 사용하여 재구성된 샘플은 다른 샘플에 비해 48시간 후에 최저 % 주 피크 (도 19) 및 최고 % 산성 물질종 (도 20)을 가졌다. 이는 WFI 및 염수가 HuMax-TF-ADC의 전하 프로파일을 보존하기 위해 잠재적으로 더 우수한 희석제임을 나타낸다.

[0368] 실시예 14

[0369] HuMax-TF-ADC 제제의 안정성에 대한 완충제 종류 및 결정화 부형제 종류의 효과를 본 실시예에서 입증한다.

[0370] 동결건조 제제 내에서 완충제로서 히스티딘을 시트레이트로 교체할 때, 또는 결정화 부형제로서 만니톨을 글라이신으로 교체할 때, 40℃에서 2개월 동안 보관한 후 안정성을 SEC 및 iCE에 의해 분석하였다.

[0371] 도 22 내지 도 26에서, 범례 "글라이신"은 10 mg/mL HuMax-TF-ADC, 30 mM 히스티딘, 88 mM 수크로스, 165 mM 글라이신 (pH 6.0)을 함유하는 제제를 나타내는 반면; 범례 "시트레이트"는 10 mg/mL HuMax-TF-ADC, 30 mM 시트레이트, 88 mM 수크로스, 165 mM 만니톨 (pH 6.0)을 함유하는 제제를 나타낸다.

[0372] 40℃에서 2개월 동안 보관한 후 시트레이트 또는 글라이신 제제에서 SEC 평균 % 주 피크 (도 22) 또는 고분자량 피크 (도 23)의 현저한 변화가 관찰되지 않았다. 임의의 샘플에서 저분자량 피크는 관찰되지 않았다.

[0373] 글라이신 및 시트레이트를 함유하는 제제 내에서 40℃에서 2개월 동안 iCE % 주 피크의 감소 속도 (도 24)는 30 mM 히스티딘, 88 mM (3%) 수크로스 및 165 mM (3%) 만니톨을 함유하는 제제와 대등하였다 (도 7). 열 스트레스 조건 하에, 시트레이트 제제는 히스티딘을 갖는 제제에 비해 보다 많은 산성 물질종과 연관되고 (도 25), 글라이신 제제는 만니톨을 갖는 제제에 비해 보다 많은 염기성 물질종과 연관되는 것으로 관찰되었다 (도 26).

[0374] 실시예 15

[0375] HuMax-TF-ADC의 안정성에 대한 pH 및 완충제 농도의 효과를 본 실시예에서 입증하였다. 3% 만니톨 및 3% 수크로스를 사용하지만 샘플의 pH를 5, 6, 또는 7로 조정하면서 20 mM 또는 50 mM 히스티딘을 사용하여 HuMax-TF-ADC를 10 mg/mL 농도로 제조하였다. 동결건조된 샘플을 40℃에서 2개월까지 보관하였다. pH 5, 6 또는 7에서 20 mM 히스티딘 또는 50 mM 히스티딘을 사용하여 제조된 제제는 완충제 농도 및 pH에 무관하게 40℃에서 유사한 SEC 결과를 보여주었지만, 단, pH 5에서 50 mM 히스티딘의 제제가 응집에서 약간의 증가를 보여주었다 (도 30 및 31).

[0376] iCE에 의한 도 27-29에 도시된 바와 같이, pH는 스트레스 시험 하에 전하 프로파일 변화에 관하여 완충제 농도보다 중요한 역할을 하는 것으로 관찰된다. pH 6에서 제조된 제제는 40℃ 보관에서 2개월 동안 주 피크의 최소 감소를 보여주었다. 주 피크의 겉보기 감소가 관찰되고, 이것은 분석 방법 변동보다 잠재적으로 더 크다. pH 5에서 제조된 제제는 % 주 피크의 최대 감소를 보여주었다 (도 27). pH 7에서 제조된 제제는 산성 물질종의 최고 백분율을 가졌고 (도 28), pH 5에서 제조된 제제는 염기성 물질종의 최고 백분율을 가졌다 (도 29).

[0377] 실시예 16

[0378] 본 발명의 HuMax-TF-ADC의 동결건조 제제에 대한 동결건조 사이클을 아래에 설명된 바와 같이 수행하였다.

[0379] 먼저, 바이알을 0.5℃/min 내지 1℃/min로 -40℃ 이하로 냉각하고, 적어도 120 min 동안 등온으로 유지할 수 있다 (냉각 단계). 후속적으로, 바이알을 0.5℃/min 내지 3℃/min의 속도로 -20℃ 내지 -15℃로 가온하고, 적어도 180 min 동안 등온으로 유지한다 (어닐링 단계). 그 후, -30℃ 내지 -10℃의 온도에서 50 mTorr 내지 200 mTorr의 압력을 이용하여 진공을 개시한다 (1차 건조). 마지막으로, 온도를 0.5℃/min 내지 1℃/min로 35℃ 내

지 50℃로 증가시키고, 적어도 10시간 동안 등온으로 유지한다 (2차 건조). 잔류 수분은 2 중량% 초과이어서는 안 된다.

[0380] 참고문헌의 목록

[0381] WO2011157741, WO9704801, WO9856418, WO02011753, WO02096457, WO03009817, WO03039485, US8372396, WO2004004639, WO2004016286, WO2004055164, WO 2004071439, WO2006014965, WO2006044908 and WO2007019232.

[0382] Physicochemical Stability of the Antibody-Drug Conjugate Trastuzumab-DM1: Changes due to Modification and Conjugation Processes. Aditya A. Wakankar, et al., Bioconjugate Chemistry 2010: 21 (9), 1588-1595

[0383] Challenges in developing bioanalytical assays for characterization of antibody-drug conjugates. Stephan JP, etc, Bioanalysis. 2011 Mar;3(6):677-700

[0384] Analytical methods for physicochemical characterization of antibody drug conjugates. Wakankar A, et al., MAbs. 2011 Mar-Apr;3(2):161-72.

[0385] Analytical and bioanalytical technologies for characterizing antibody-drug conjugates, Stephen C Alley, Kevin E Anderson, Current Opinion in Chemical Biology, June 2013, 17 (3), 406-411

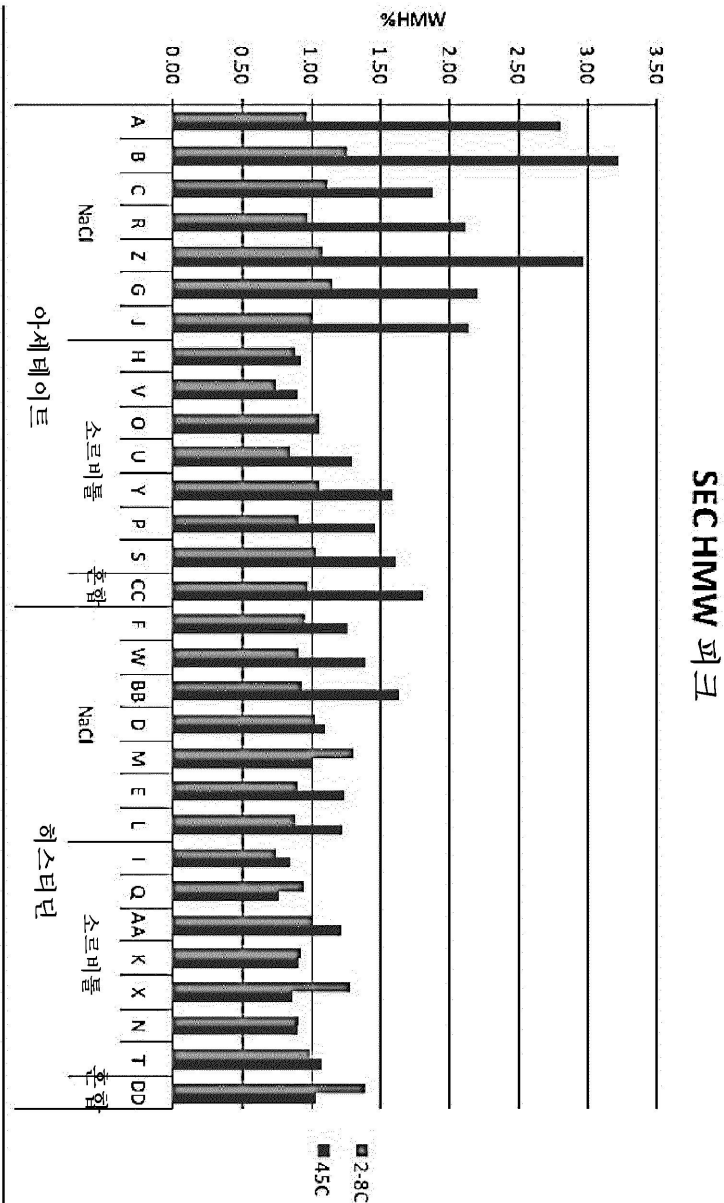
[0386] Effect of Polysorbate 80 Quality on Photostability of a Monoclonal Antibody, Singh et al., AAPS PharmSciTech, Vol. 13, No. 2, 2012.

[0387] Polysorbates 20 and 80 Used in the Formulation of Protein Biotherapeutics: Structure and Degradation Pathways. BRUCE A. KERWIN, JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, VOL. 97, NO. 8, AUGUST 2008, 2924-2935.

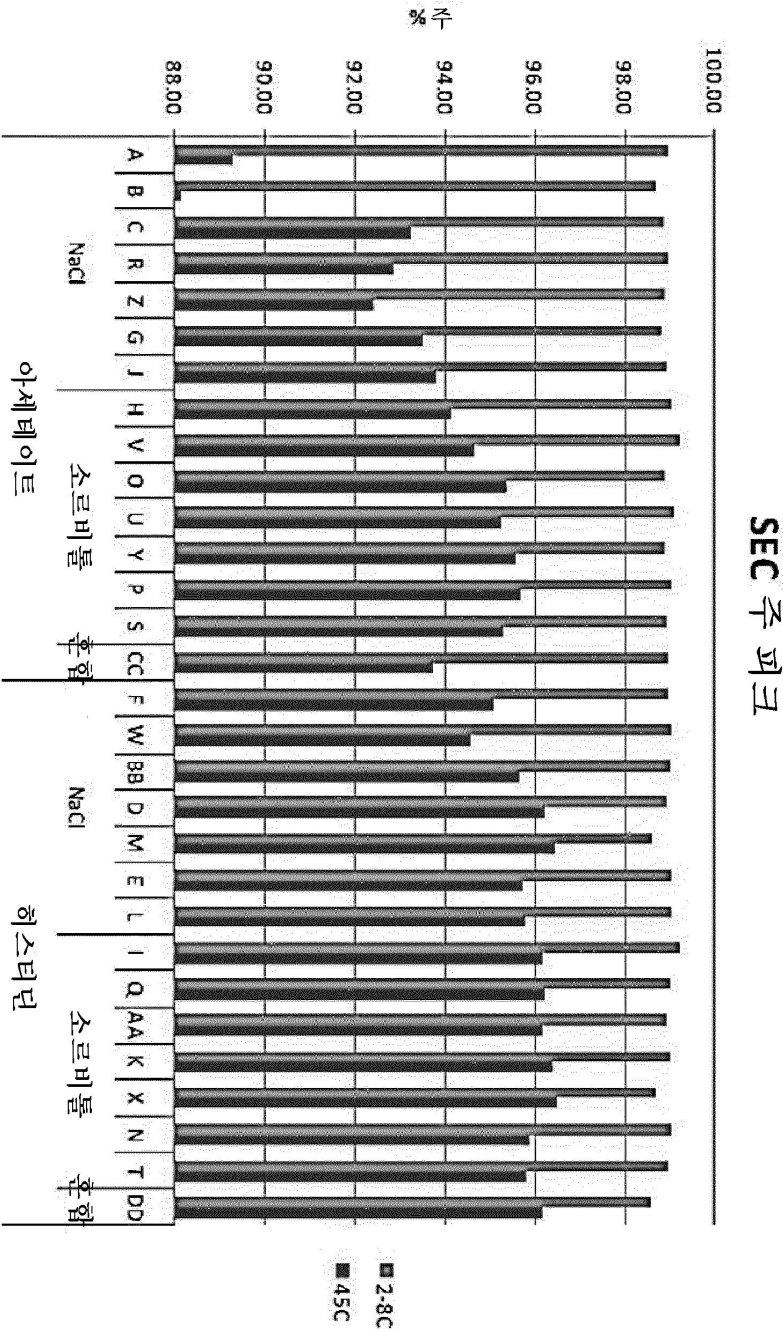
[0388] Aggregates in monoclonal antibody manufacturing processes, Vasquez-Rey and Lang, 2011, Biotech, Bioeng. 108(7) p. 1494-1508.

도면

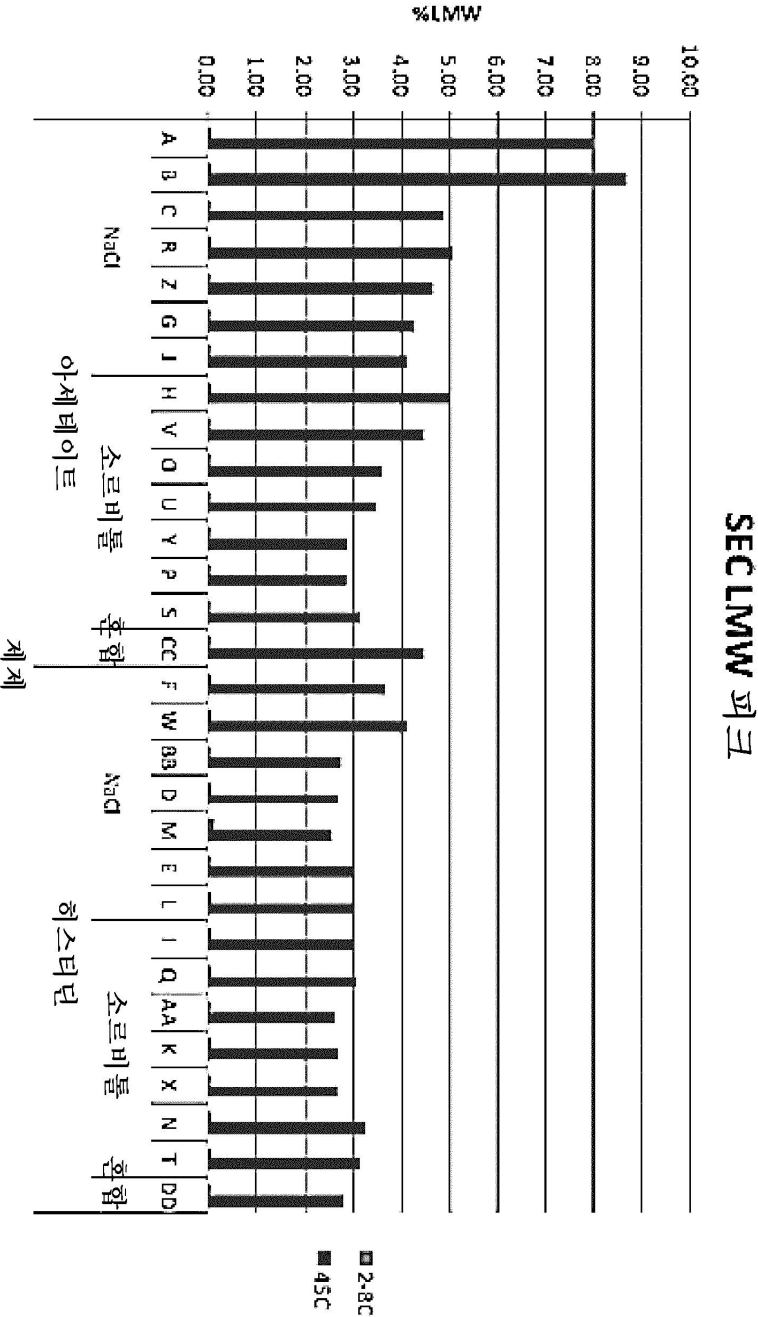
도면1a



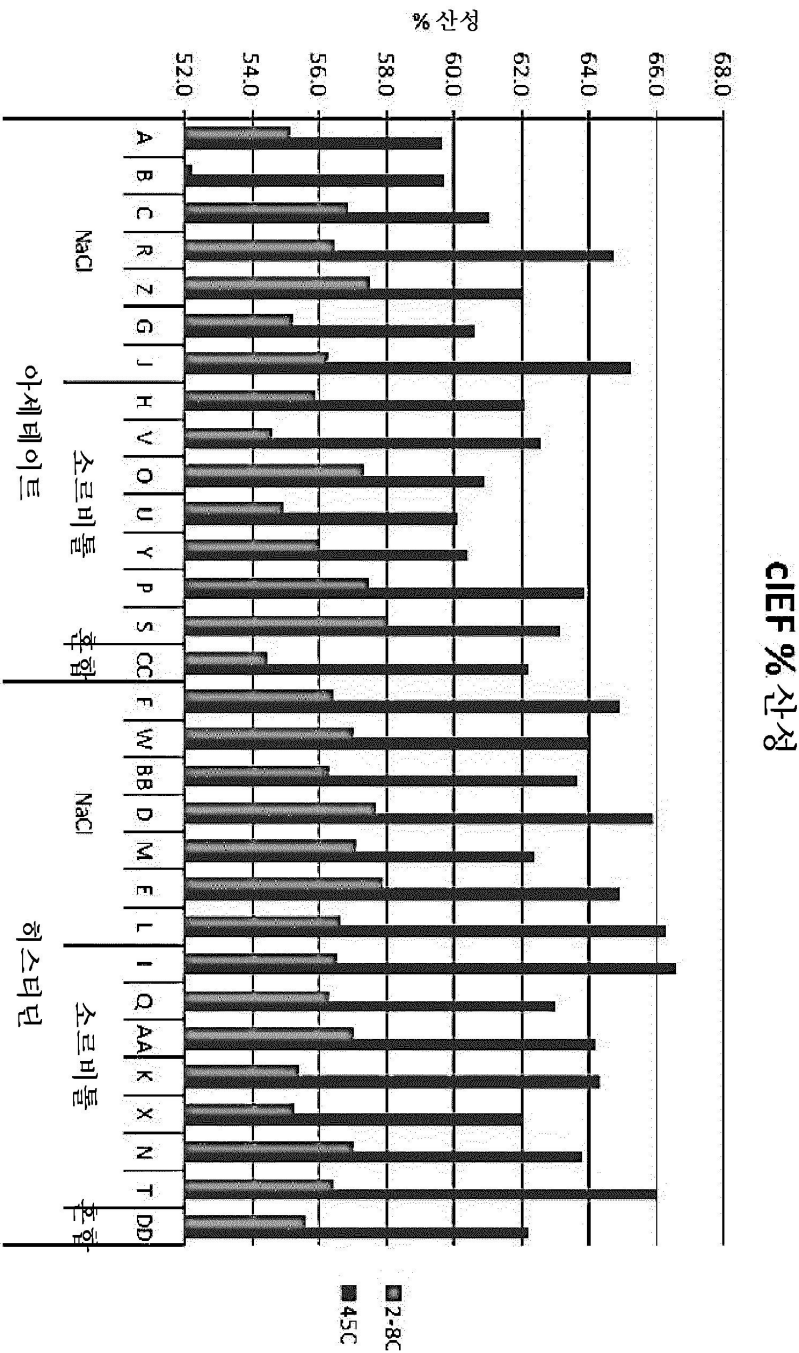
도면1b



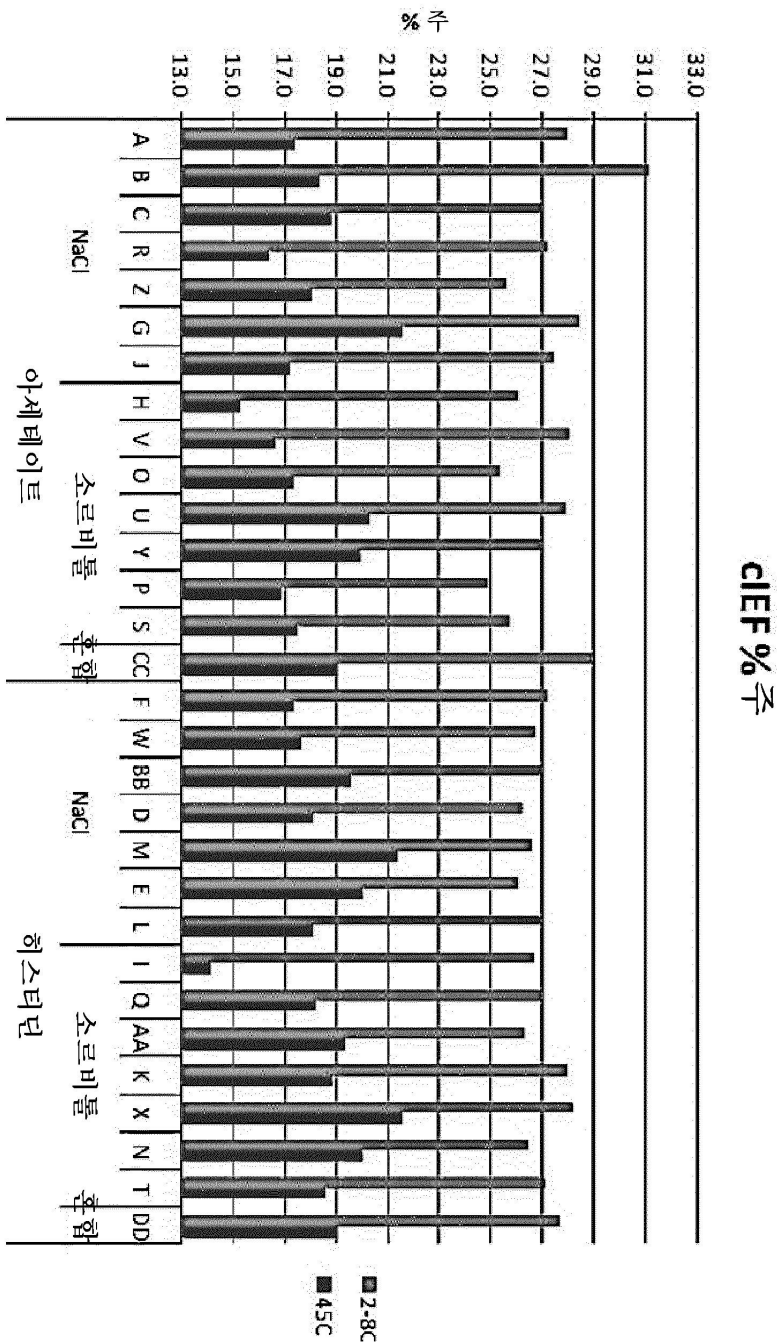
도면1c



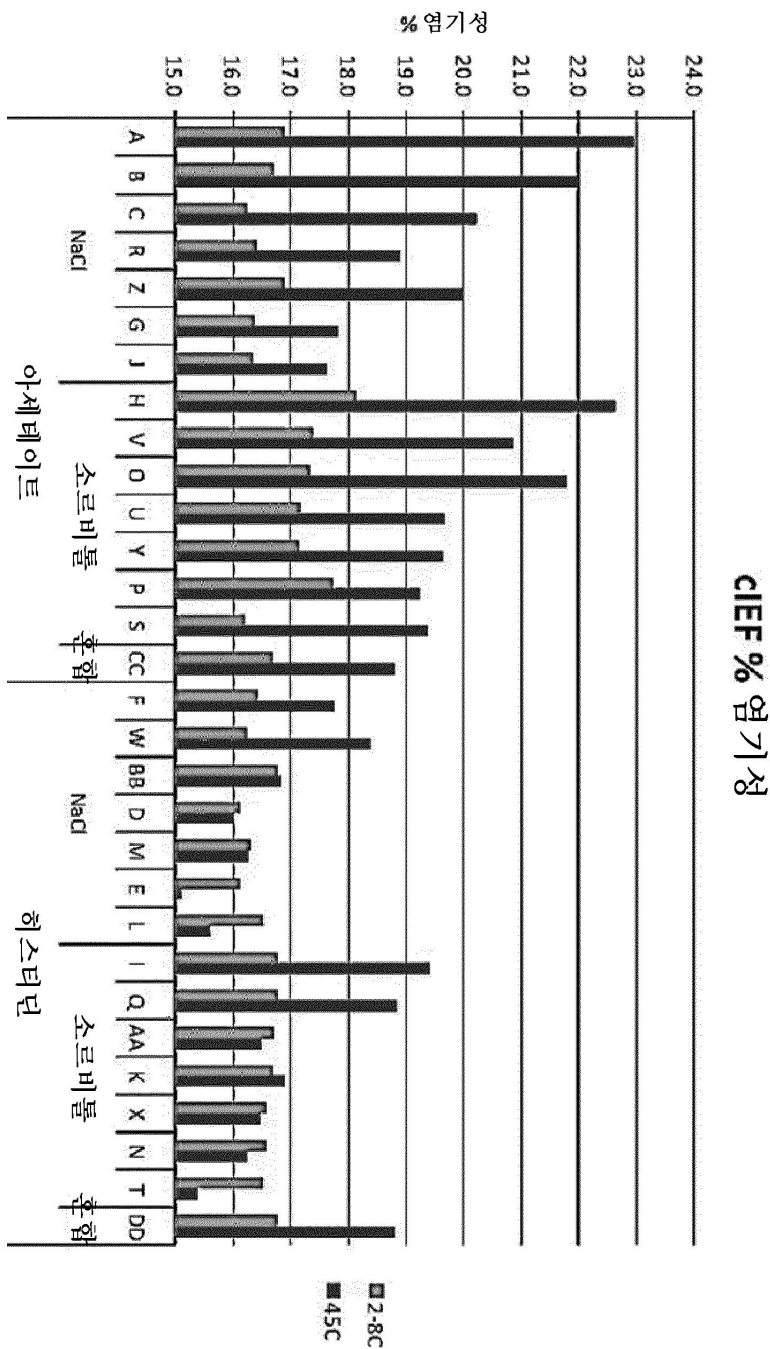
도면2a



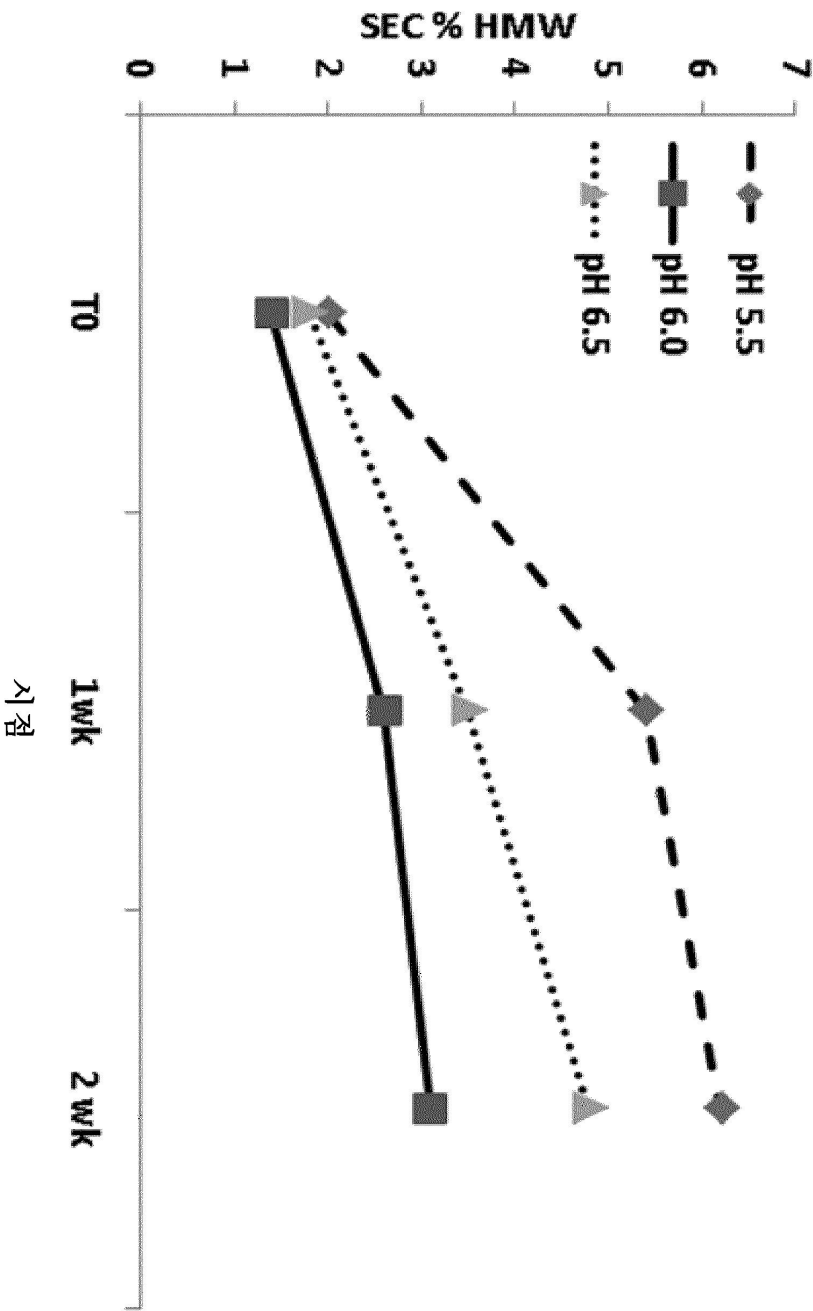
도면2b



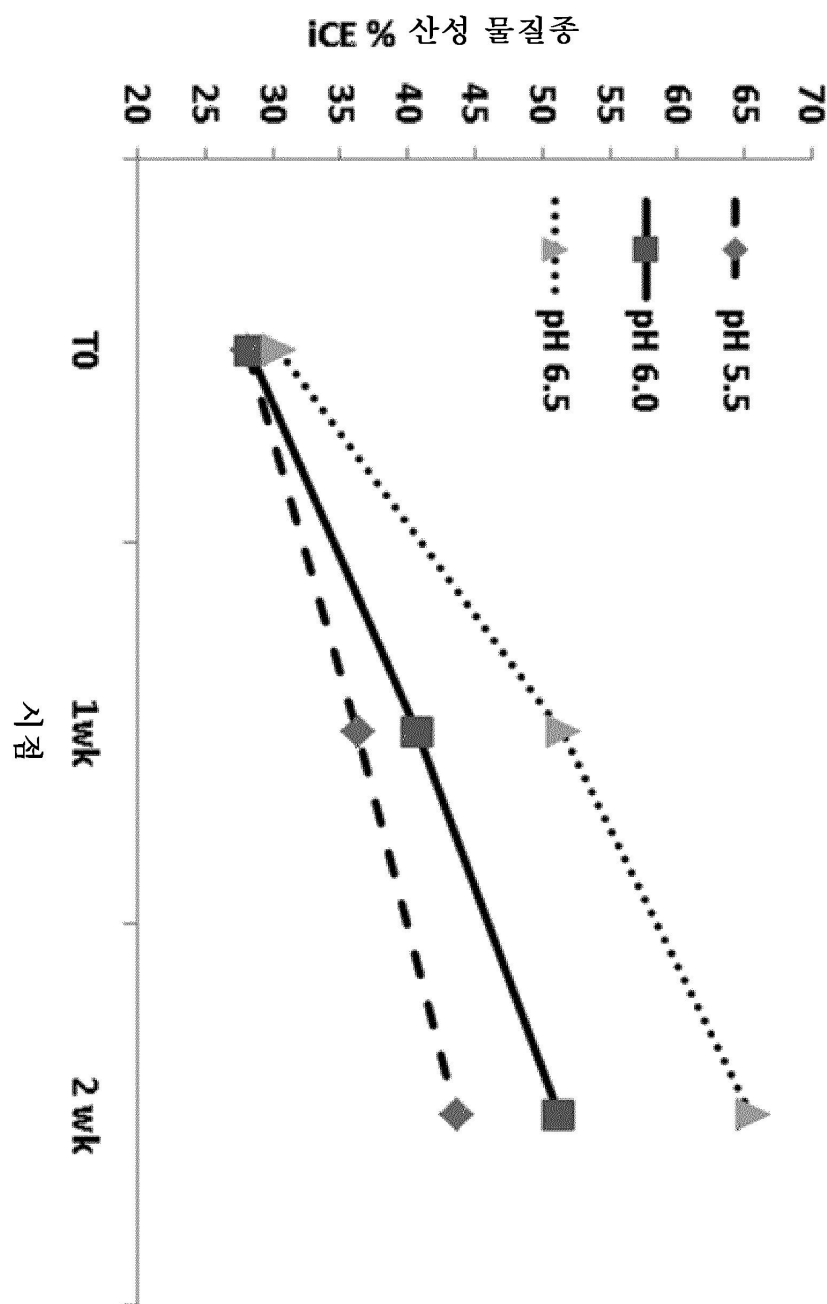
도면2c



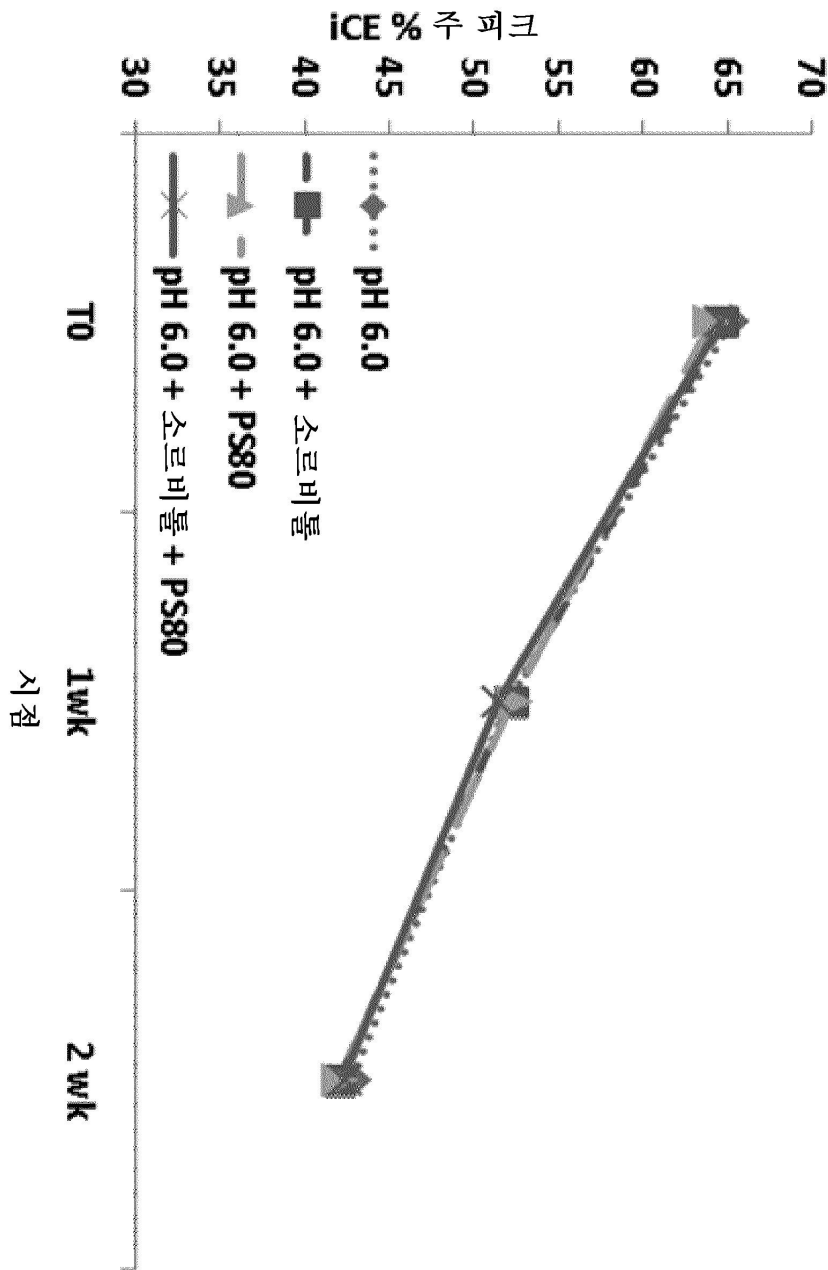
도면3



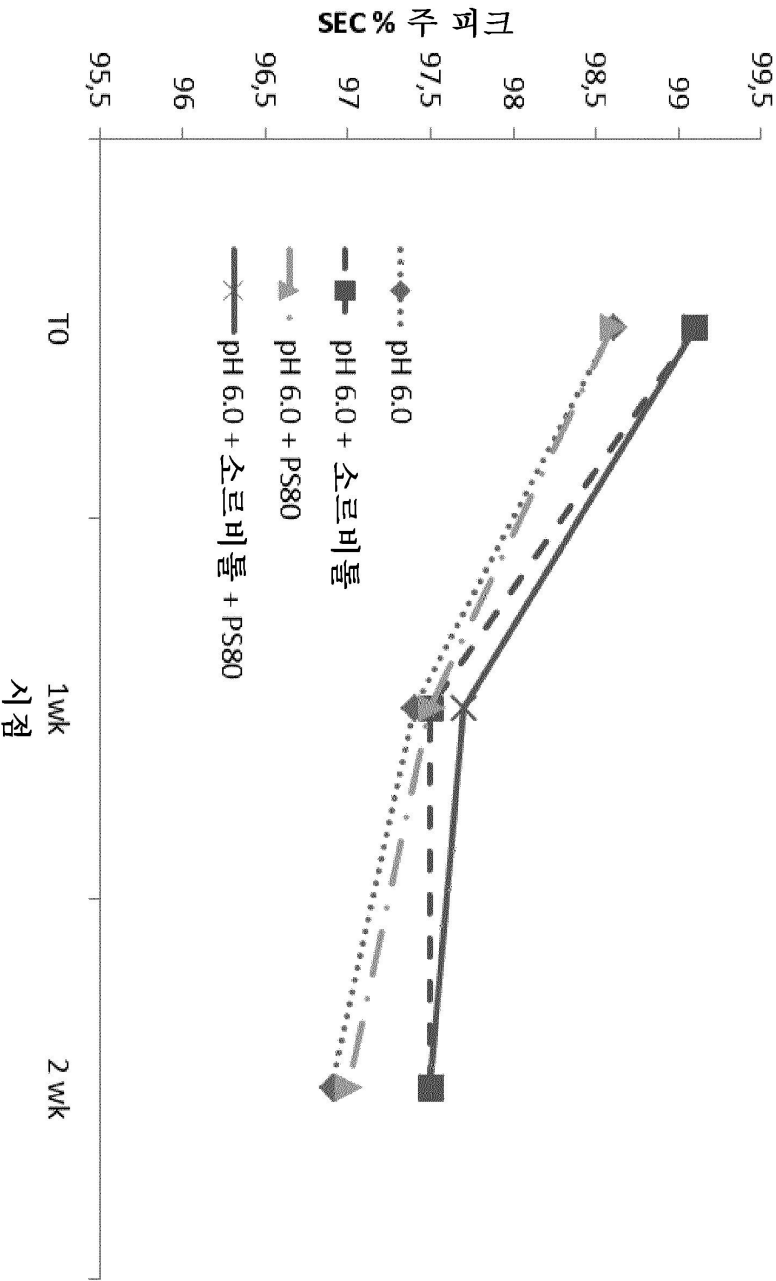
도면4



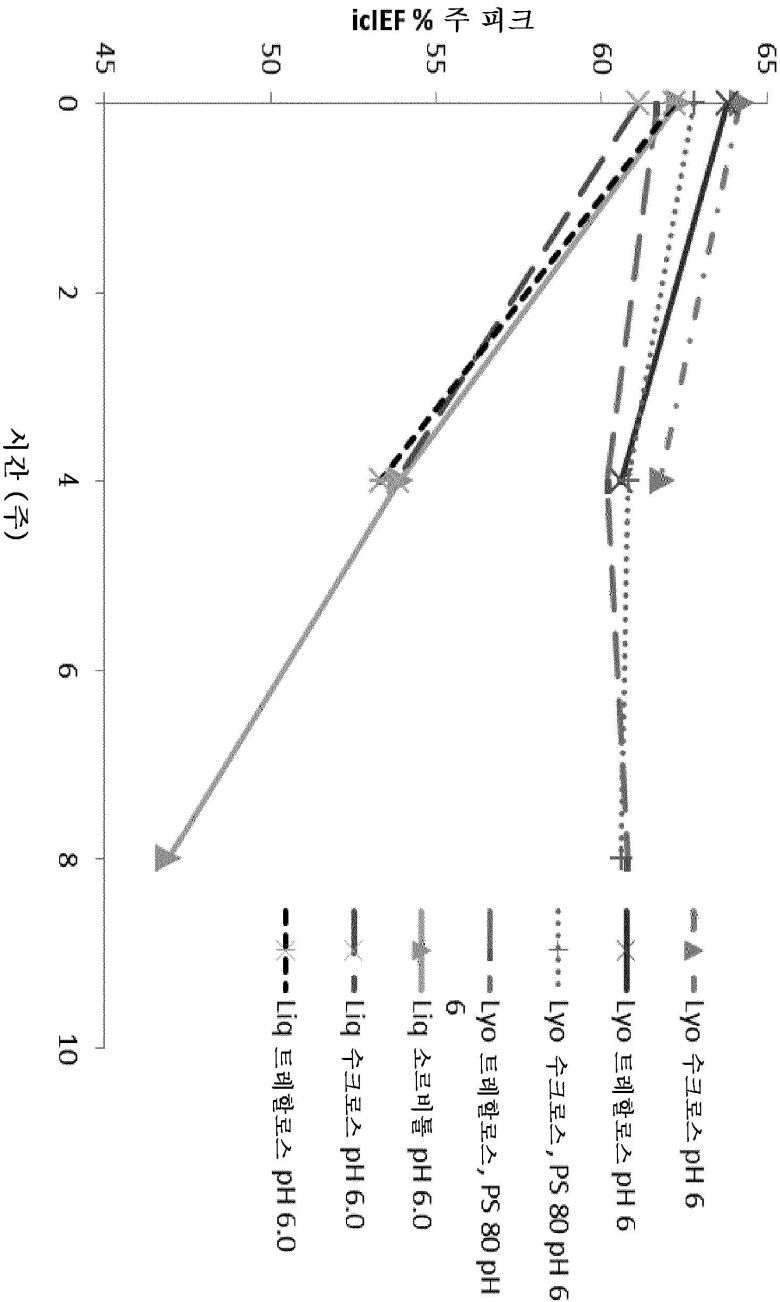
도면5a



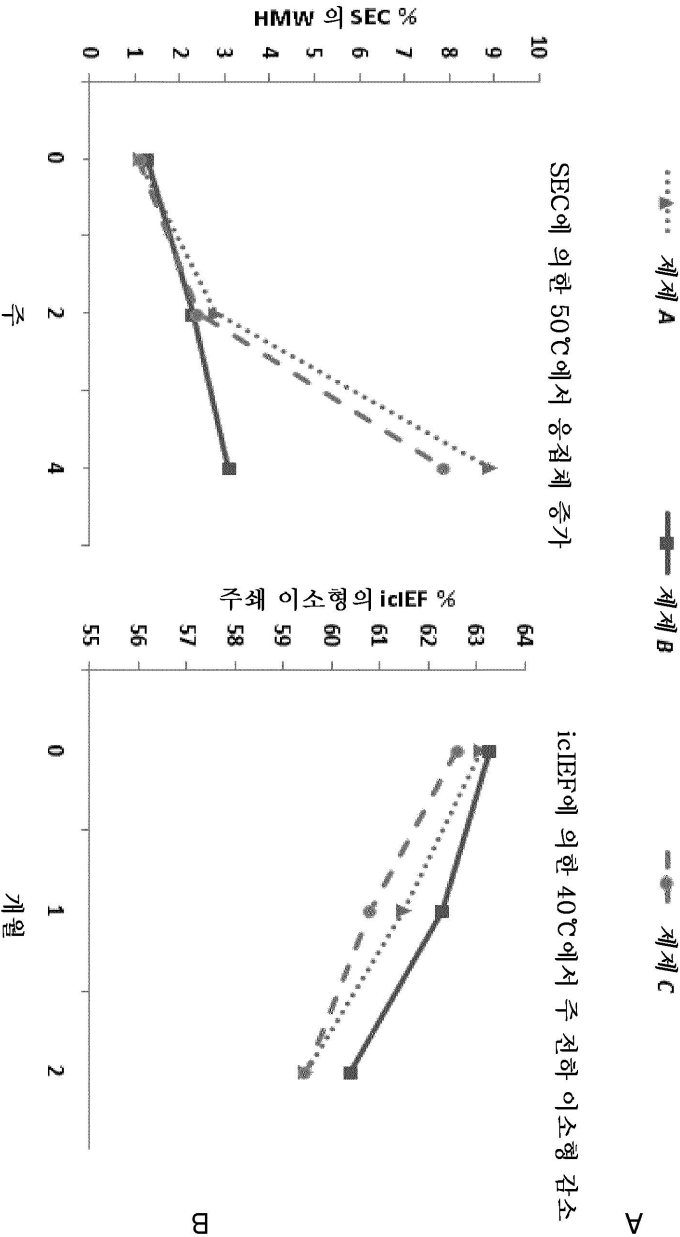
도면5b



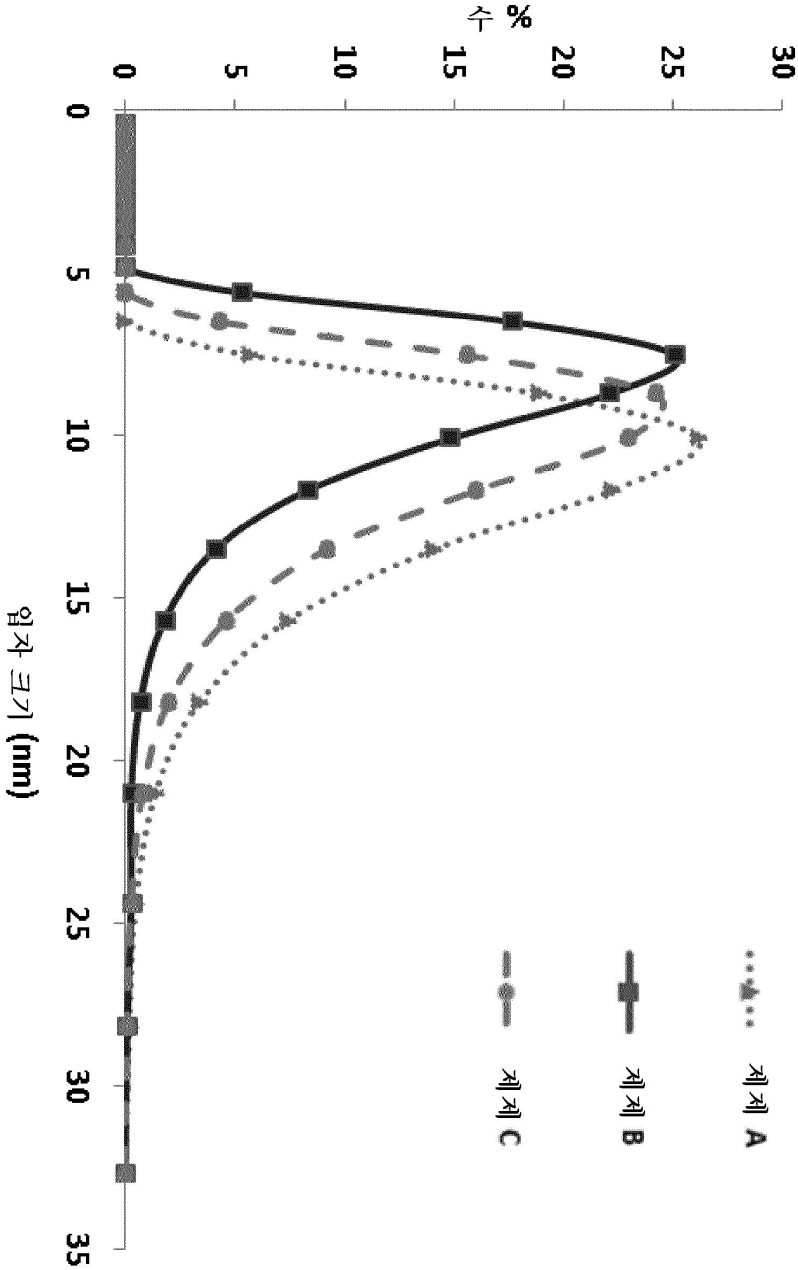
도면6



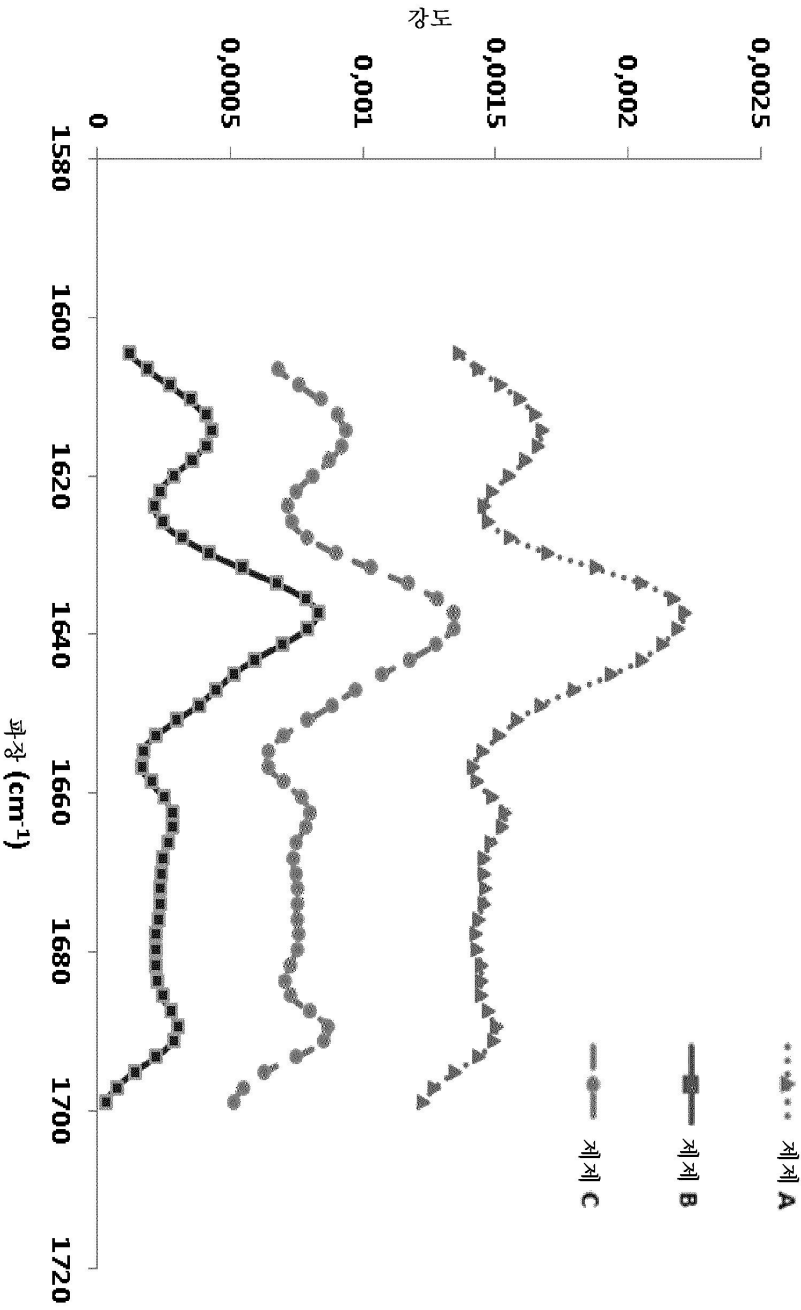
도면7



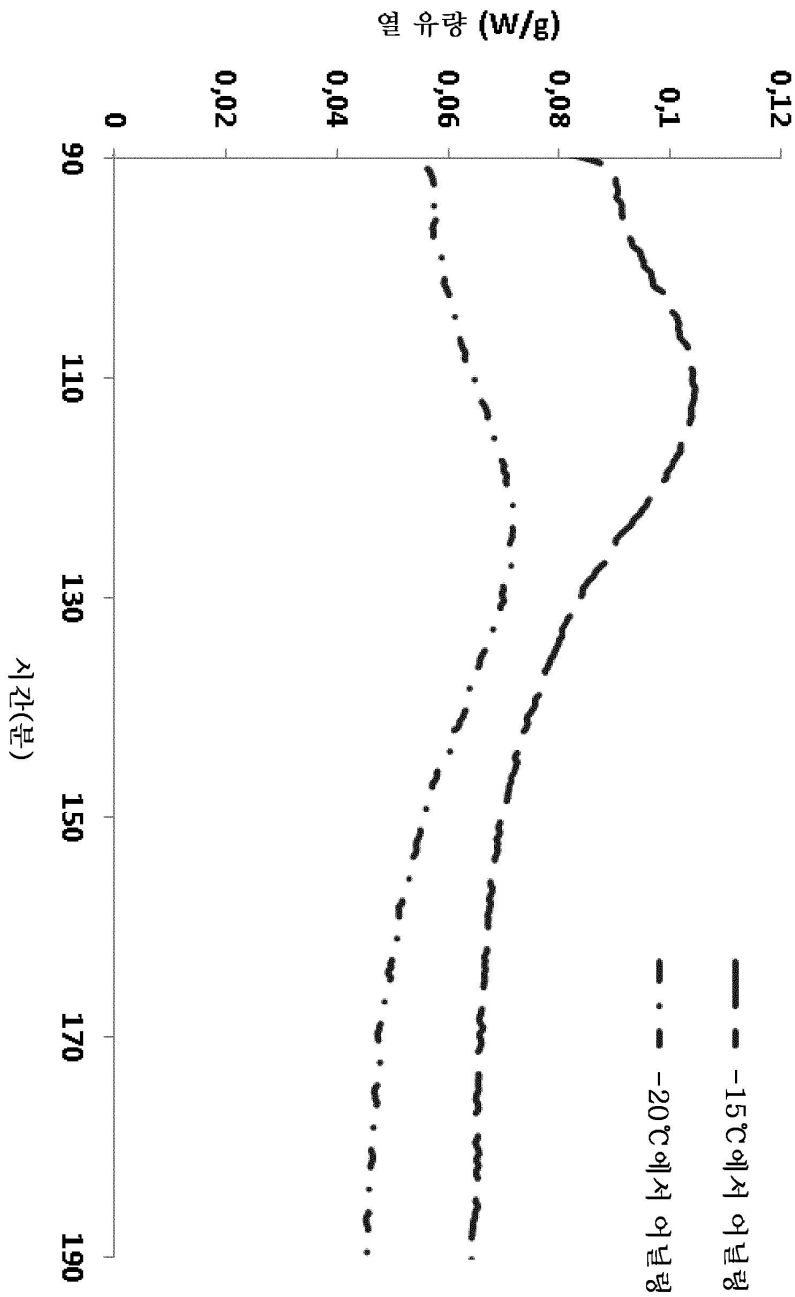
도면8



도면9



도면10

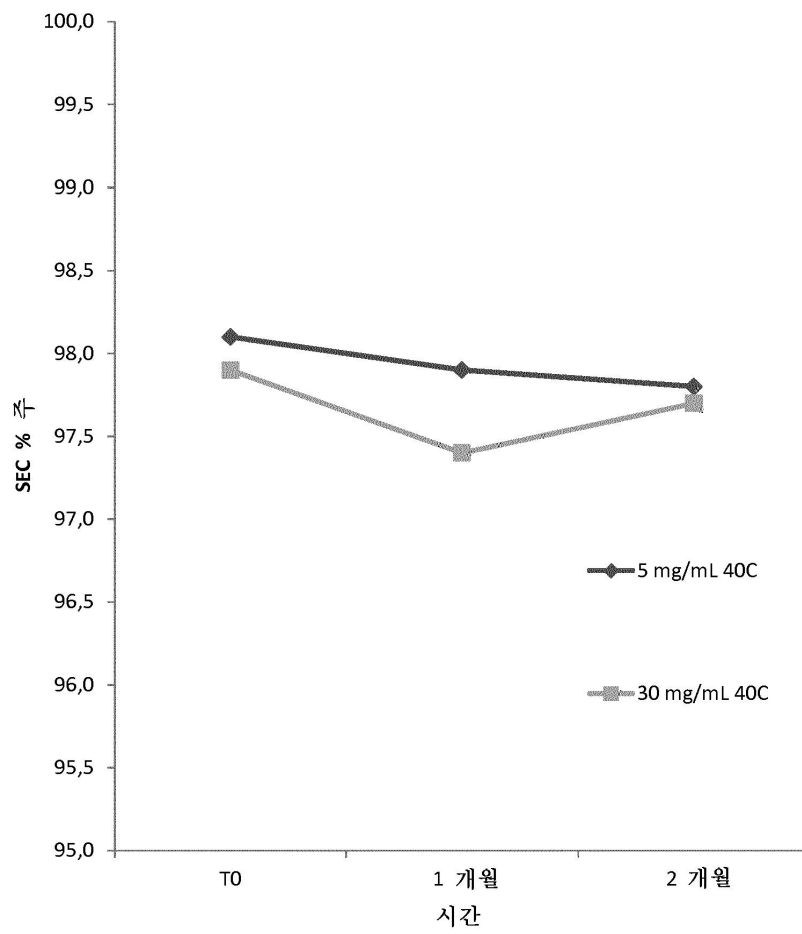


도면11

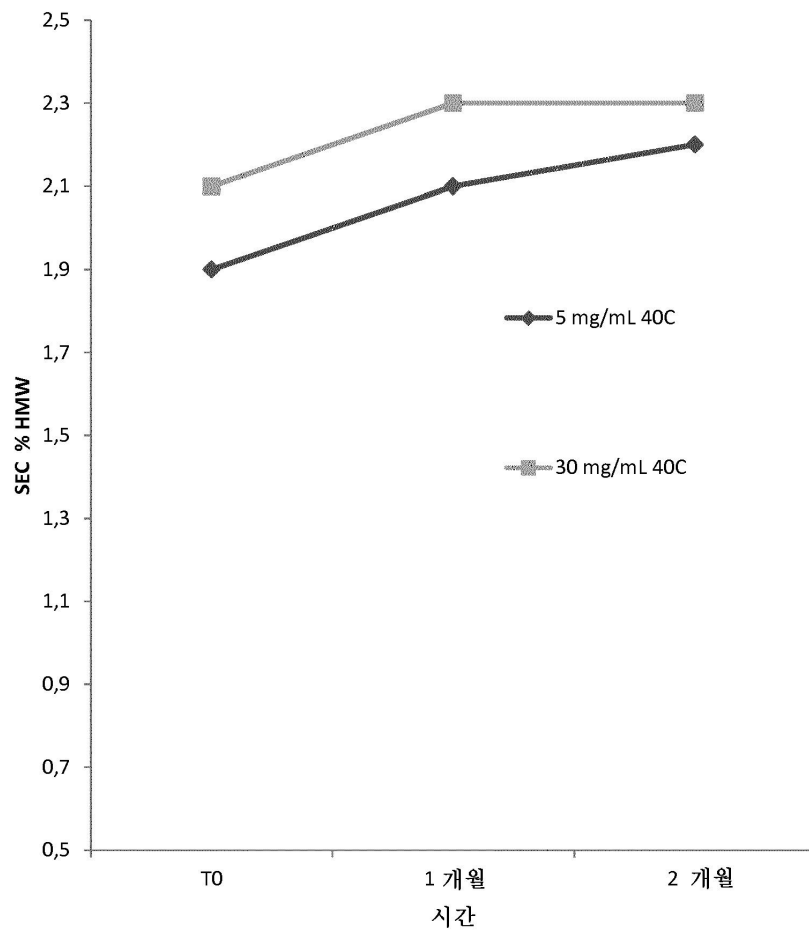
VH: |---CDR1---| |---CDR2---| |-----CDR3-----|
QVQLVDSGGGVVOPGRSIRLSCVASGPTVSNDAHEWHPQAFGKLEWVALIMWDGYNKINADSVKGRFTISRDKSKNTLYLQMSLRPADDAVYYARRPQT-----PYGLDWGQGTIVTVSSVH1015-114 (1)
EVQLLESGGGIVOPGGSLRLSCMASGPTFSNVAISWHPQAFGKLEWVSLTSGSDYTYTDSVKGRFTISRDKSKNTLYLQMSLRPADDAVYYARSPMG-----YILDWGQGTIVTVSSVH1015-011 (5)
EVQLLESGGGIVOPGGSLRLSCMASGPTTSSVVAISWHPQAFGKLEWVSLTSGSDYTYTDSVKGRFTISRDKSKNTLYLQMSLRPADDAVYYAKDGYFL-----LWFEDLMGRGLIVTVSSVH1015-017 (9)
EVQLLESGGGIVOPGGSLRLSCMASGPTTSSVGVSWHPQAFGKLEWVSLTSGSGDTYYADSVKGRFTISRDKSKNTLYLQMSLRPADDAVYYAKAPWT-----YFEDYWGQGTIVTVSSVH1015-042 (13)
EVQLLESGGGIVOPGGSLRLSCMASGPTTNNAISWHPQAFGKLEWVSLTSGSGDTYYADSVKGRFTISRDKSKNTLYLQMSLRPADDAVYYAKTPMG-----YFEDYWGQGTIVTVSSVH1015-092 (17)
EVQLLESGGGIVOPGGSLRLSCMASGPTTSHVAISWHPQAFGIDWVSCLTSGSGDTYYADSVKGRFTISRDKSKNTLYLQMSLRPADDAVYFAKTPMG-----YFEDYWGQGTIVTVSSVH1015-101 (21)
QVQLVDSGGGVVOPGRSIRLSCVASGPTTSTRVAHEWHPQAFGKLEWVALTNDGINDYYADSVKGRFTISRDKSKNTLYLQMSLRPADDAVYYARDGQLG-----RGYFDYWGQGTIVTVSSVH1015-025 (25)
QVQLVDSGGGVVOPGRSIRLSCPASGPTTSIYAHEWHPQAFGKLEWVALTNDGYNKYYADSVKGRFTISRDKSKNTLYLQMSLRPADDAVYYARDGQLG-----RGYFDYWGQGTIVTVSSVH1015-109 (29)
QVQLVDSGAEVRKPGSSVKVSCKASGGSFNNYFVWHPQAFGQGFEMWGRIPITIGITVAQKQGRVTIIDKSTAYMELNSLRSDDAVYYAGGDD-----LD--AFDIMGQGTIVTVSSVH1015-098 (33)
QVQLVDSGGGVVOPGRSIRLSCAGSGPTNNRAVAVHPQAFGKLDWVAVLTNDGINKYYADSVKGRFTISRDKSKNTLYLQMSLRPADDAVYYARDDTMV-----RGAFDYWGQGTIVTVSSVH1015-111 (37)

VL: |---CDR1---| |---CDR2---| |---CDR3-----|
EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSYSSSTLAWYQQRKGAAPRLLIYGASNRATGIPDRFSGSGSDTFTLTISLRLEPEDFAVYYQXGSS--LTFPGGTKVEIKVLI015-114 (41)
DIQWTQSPPLISASAGRVITICTRASQGIS--RLAWYQQRKEAPKSLIYASLSLQSGVPSRPSGSGSDTFTLTISLQPEDFATYQQXNSYP-YTFPGGTKLEIKVLI015-011 (45)
EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSYSSSTLAWYQQRKGAAPRLLIYGASNRATGIPDRFSGSGSDTFTLTISLRLEPEDFAVYYQXGSSP-RTFPGGTKVEIKVLI015-017 (49)
EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQGIS--RLAWYQQRKEAPKSLIYASLSLQSGVPSRPSGSGSDTFTLTISLRLEPEDFAVYYQXGSSP-YTFPGGTKLEIKVLI015-042 (53)
DIQWTQSPPLISASAGRVITICTRASQGIS--RLAWYQQRKEAPKSLIYASLSLQSGVPSRPSGSGSDTFTLTISLQPEDFATYQQXNSYP-YTFPGGTKLEIKVLI015-092 (57)
DIQWTQSPPLISASAGRVITICTRASQGIS--RLAWYQQRKEAPKSLIYASLSLQSGVPSRPSGSGSDTFTLTISLQPEDFATYQQXNSYPIYTFPGGTKLEIKVLI015-101 (61)
EIVLTQSPATLISLSPGERATLSCRASQSYSS--YLAWYQQRKGAAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSDTFTLTISLRLEPEDFAVYYQQRSNMP-LTFPGGTKVEIKVLI015-025 (65)
EIVLTQSPATLISLSPGERATLSCRASQGIS--YLAWYQQRKGAAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSDTFTLTISLRLEPEDFAVYYQQRSNMP-LTFPGGTKVEIKVLI015-109 (69)
DIQWTQSPPLISASAGRVITICTRASQGIS--RLAWYQQRKEAPKSLIYASLSLQSGVPSRPSGSGSDTFTLTISLQPEDFATYQQXNSYP-YTFPGGTKLEIKVLI015-098 (73)
EIVLTQSPATLISLSPGERATLSCRASQSYSS--YLAWYQQRKGAAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSDTFTLTISLRLEPEDFAVYYQQRSNMP-LTFPGGTKVEIKVLI015-111 (77)

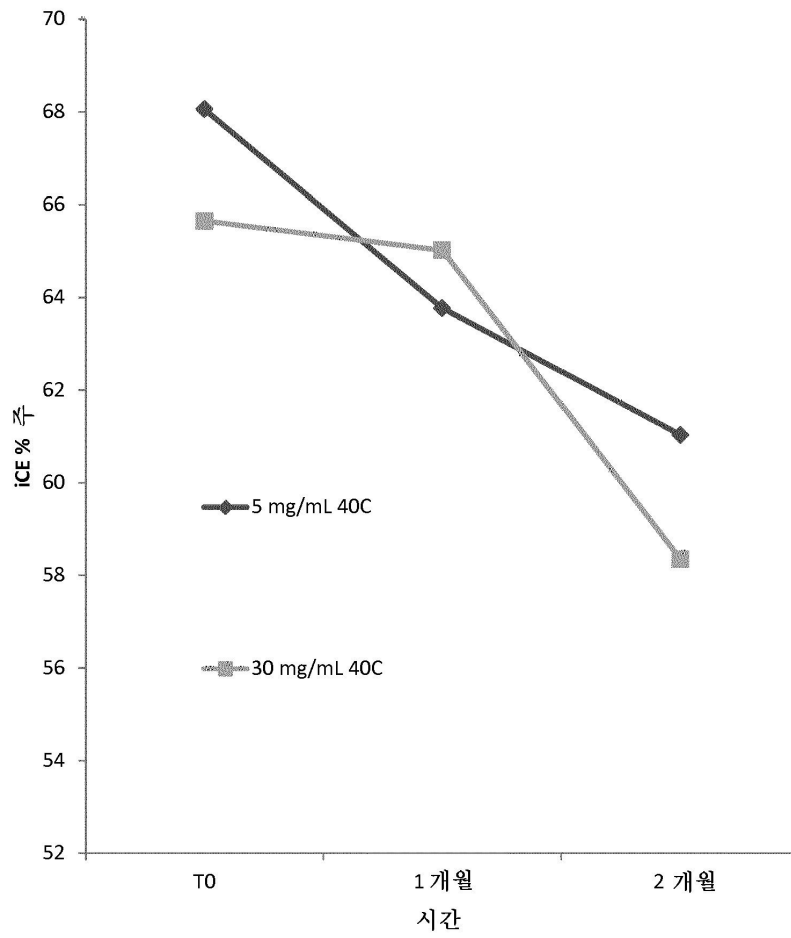
도면12



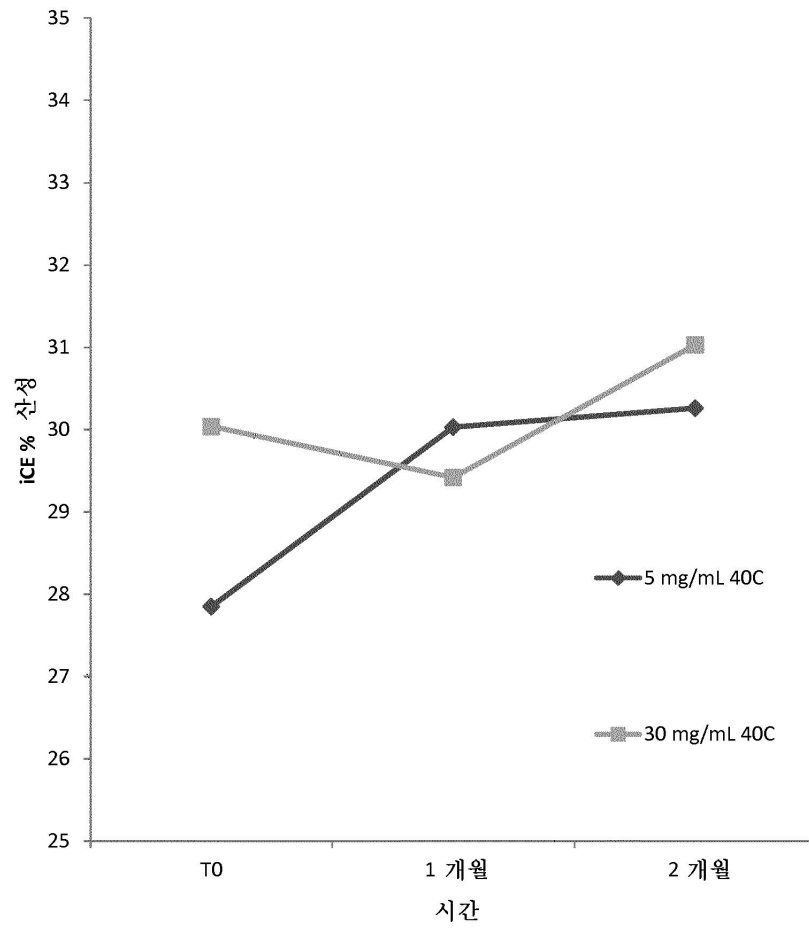
도면13



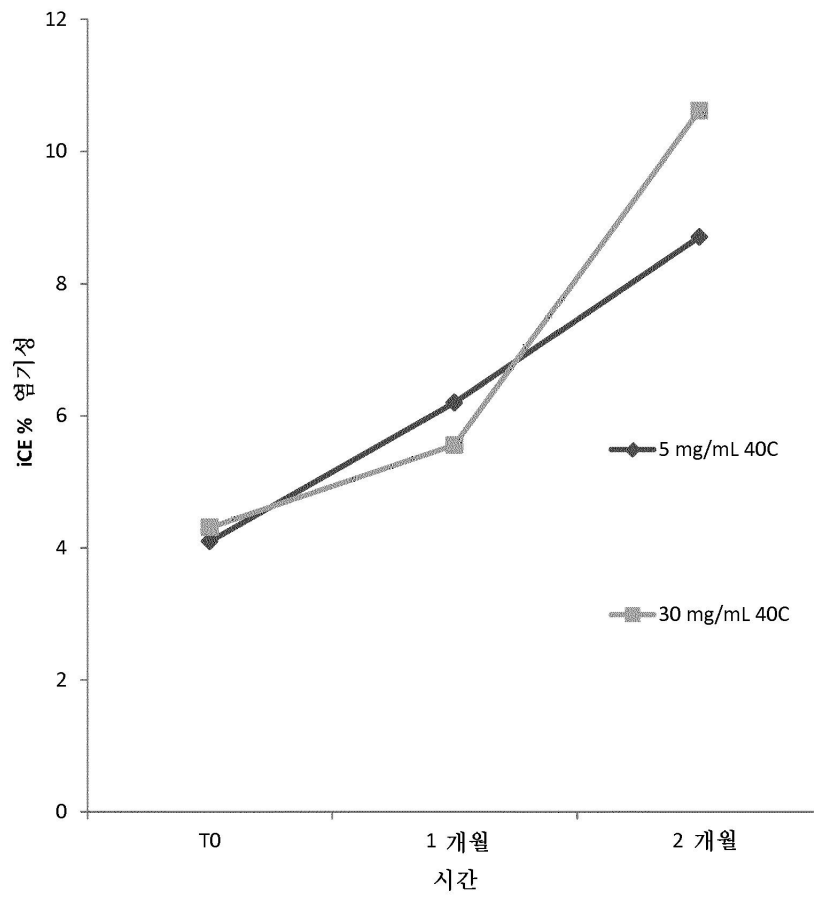
도면14



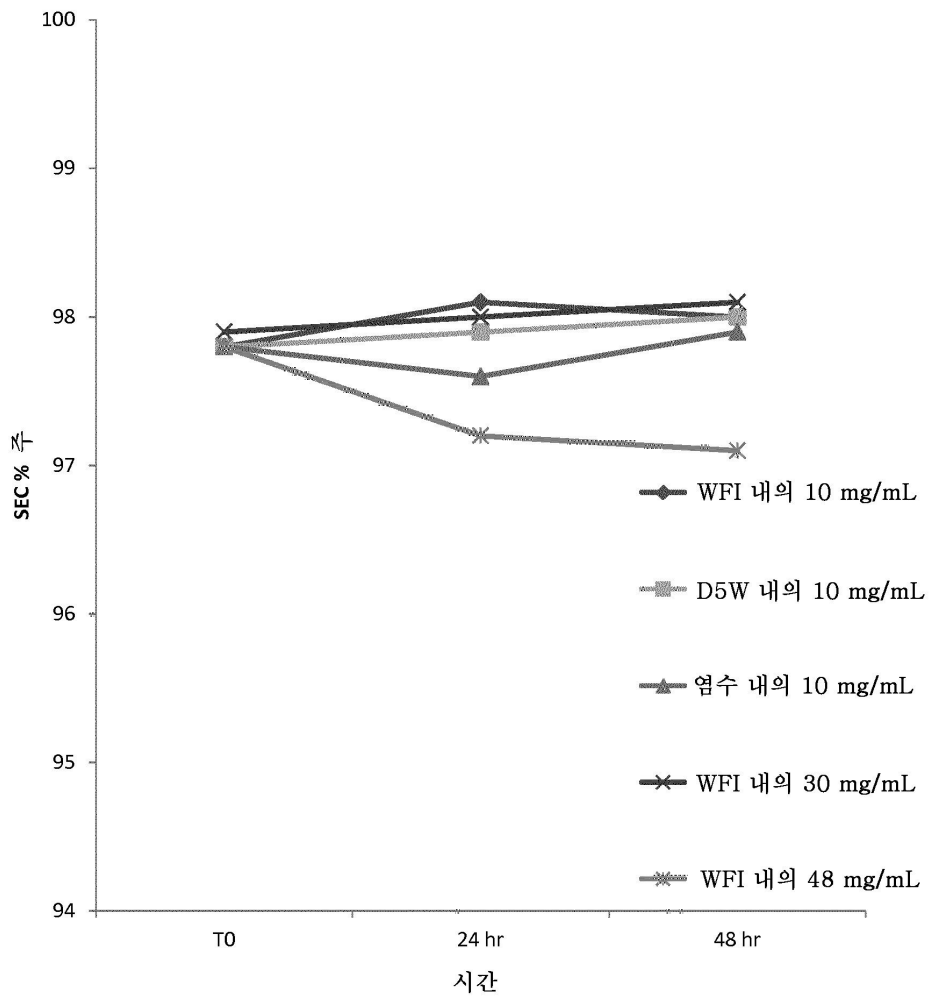
도면15



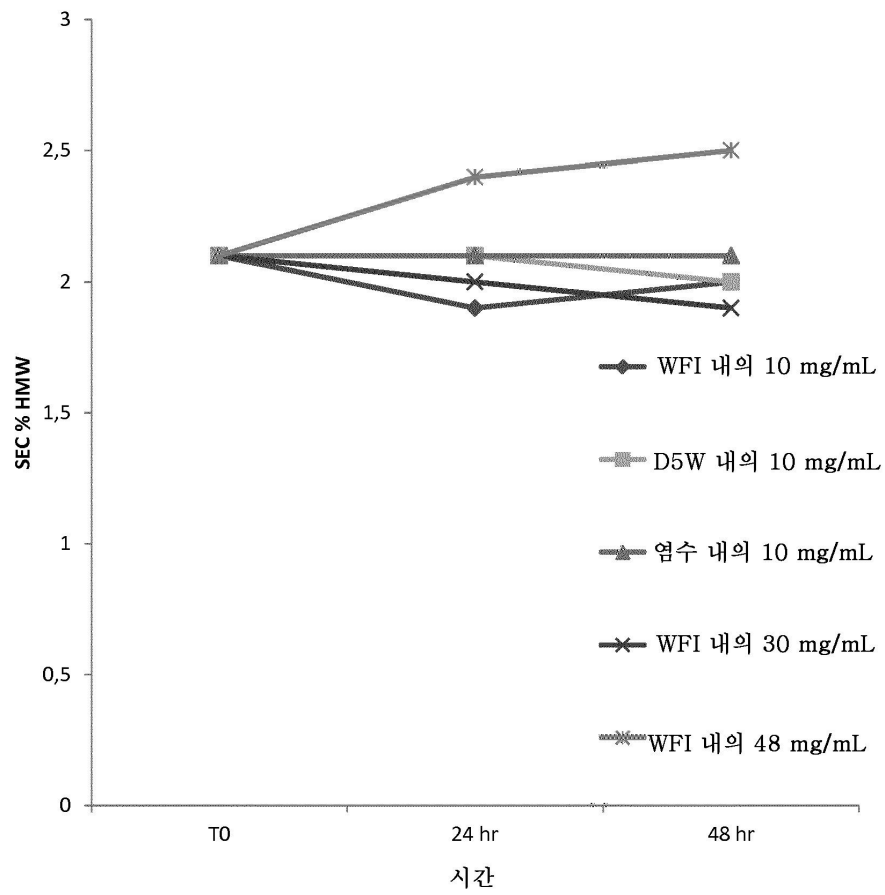
도면16



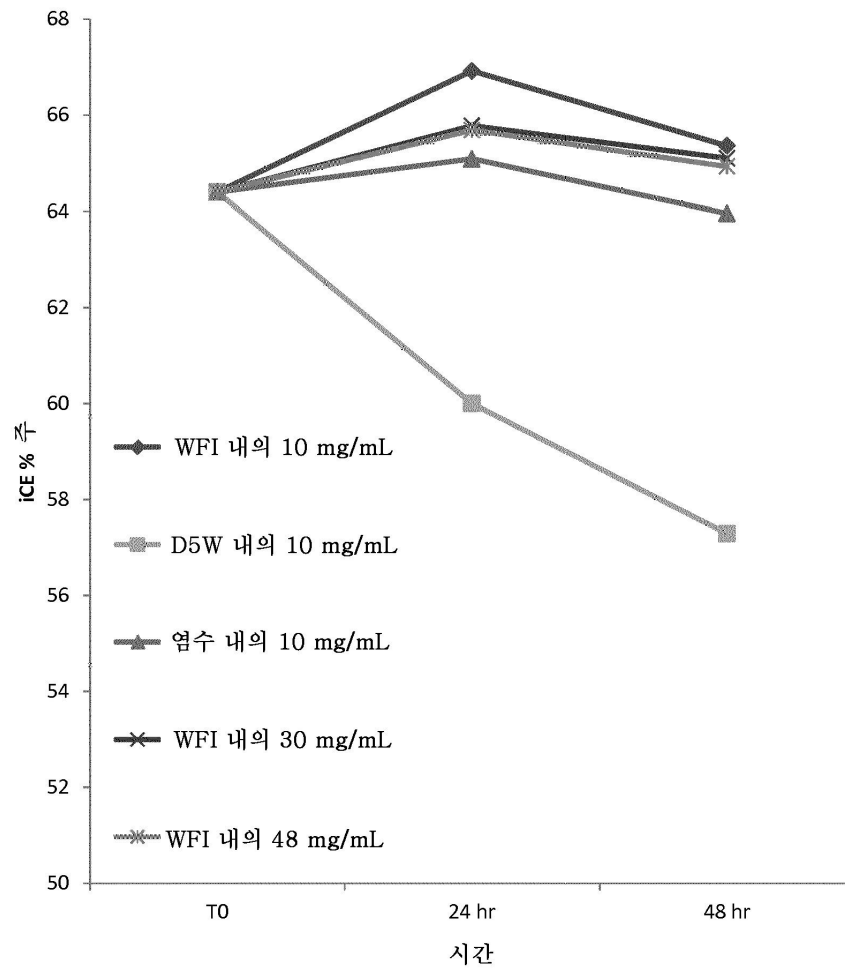
도면17



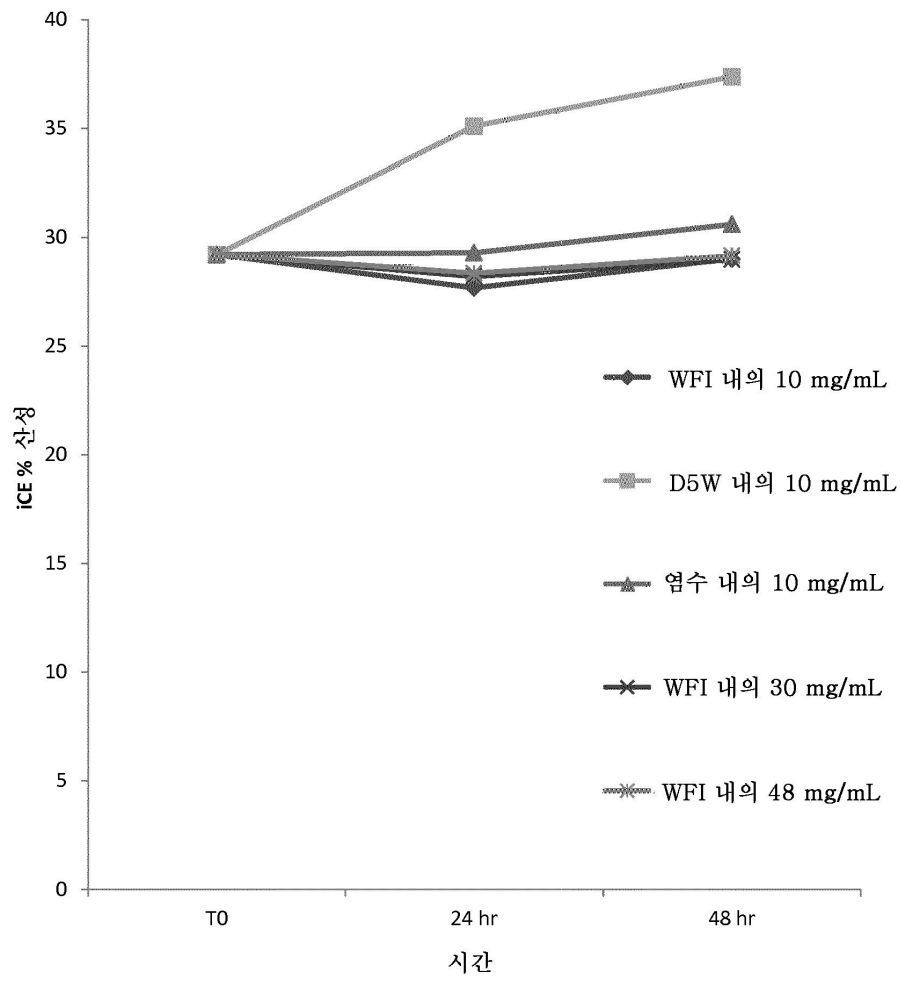
도면18



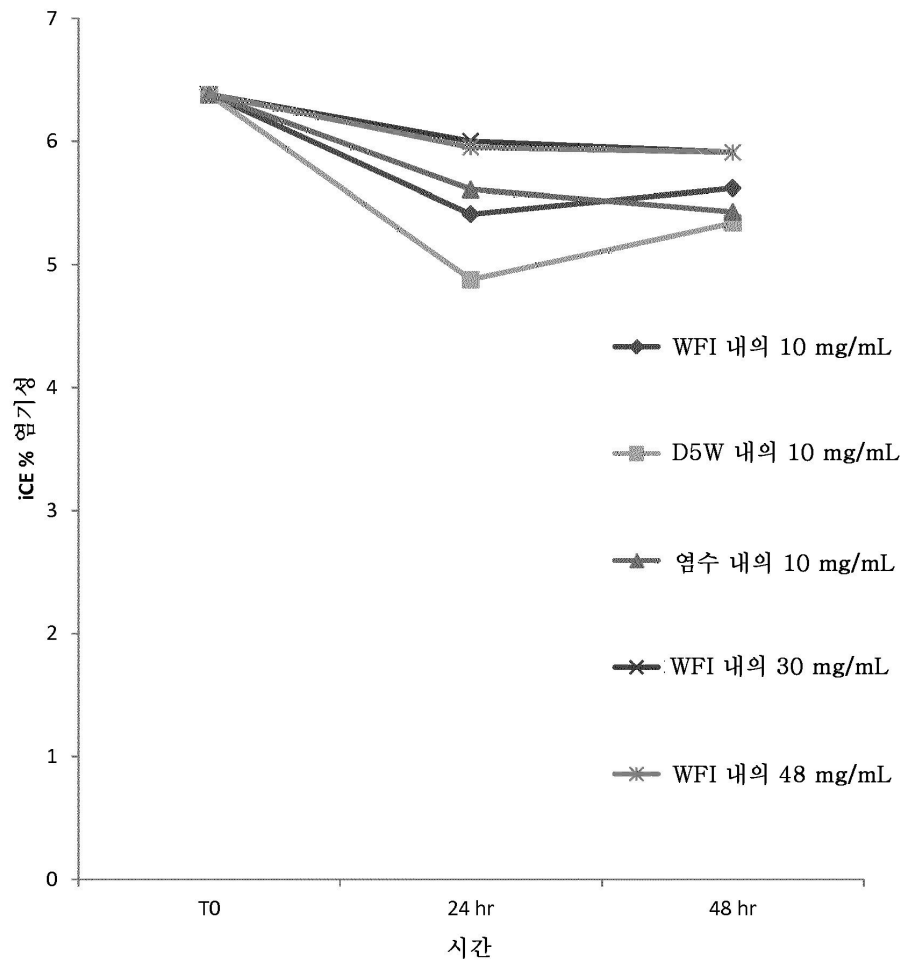
도면19



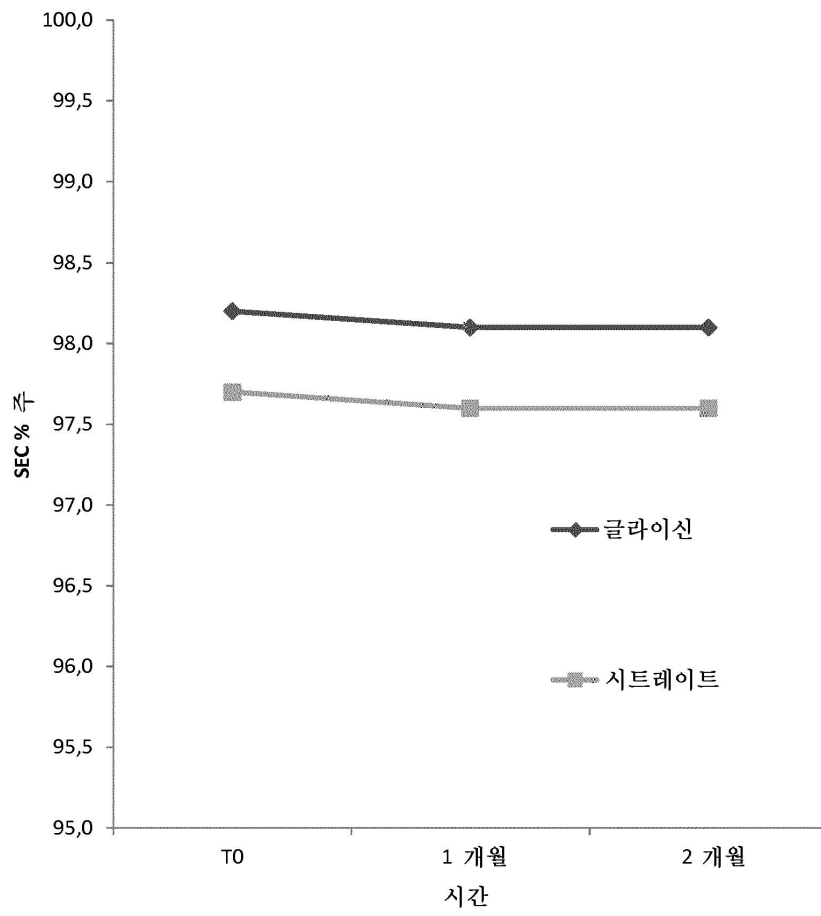
도면20



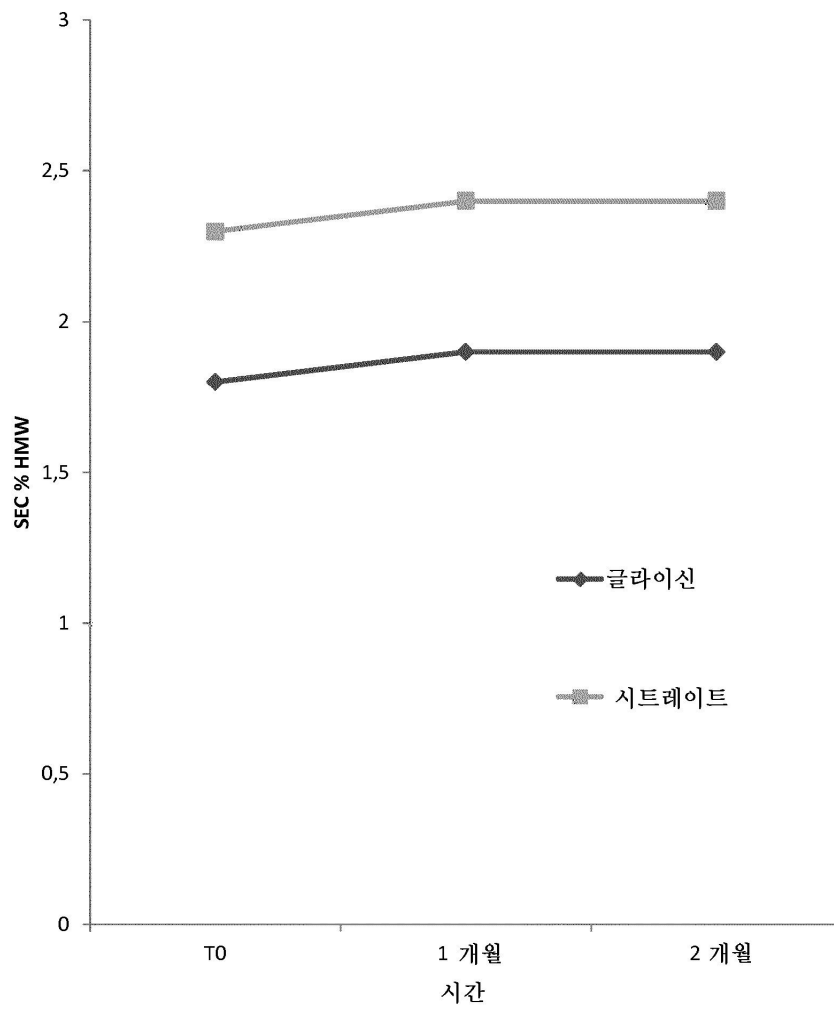
도면21



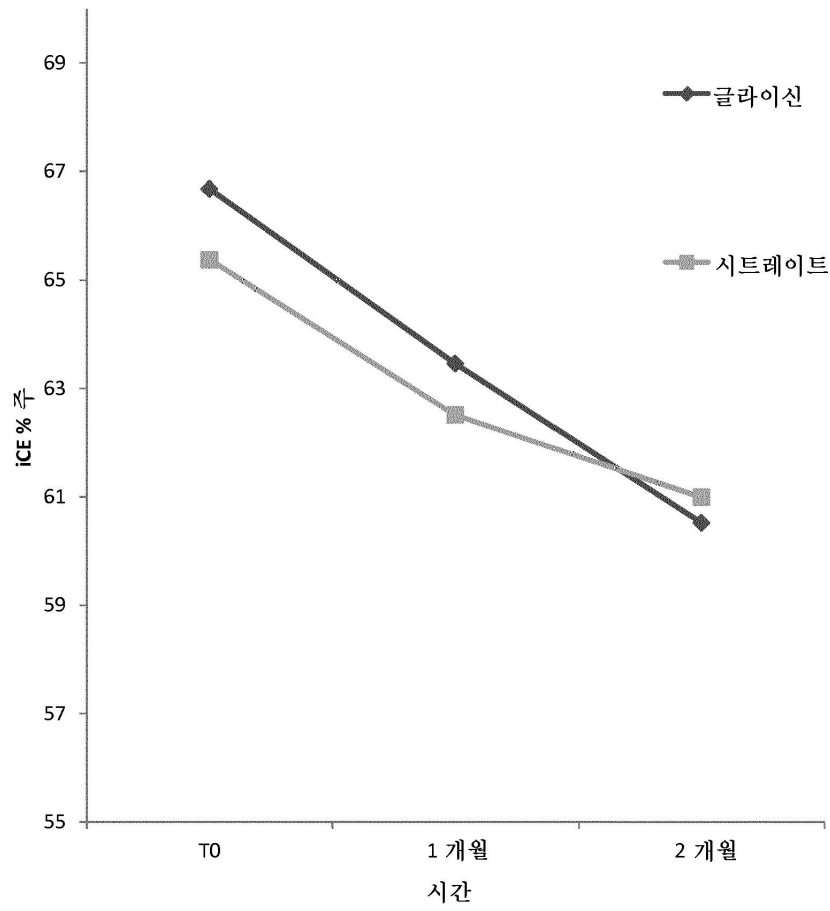
도면22



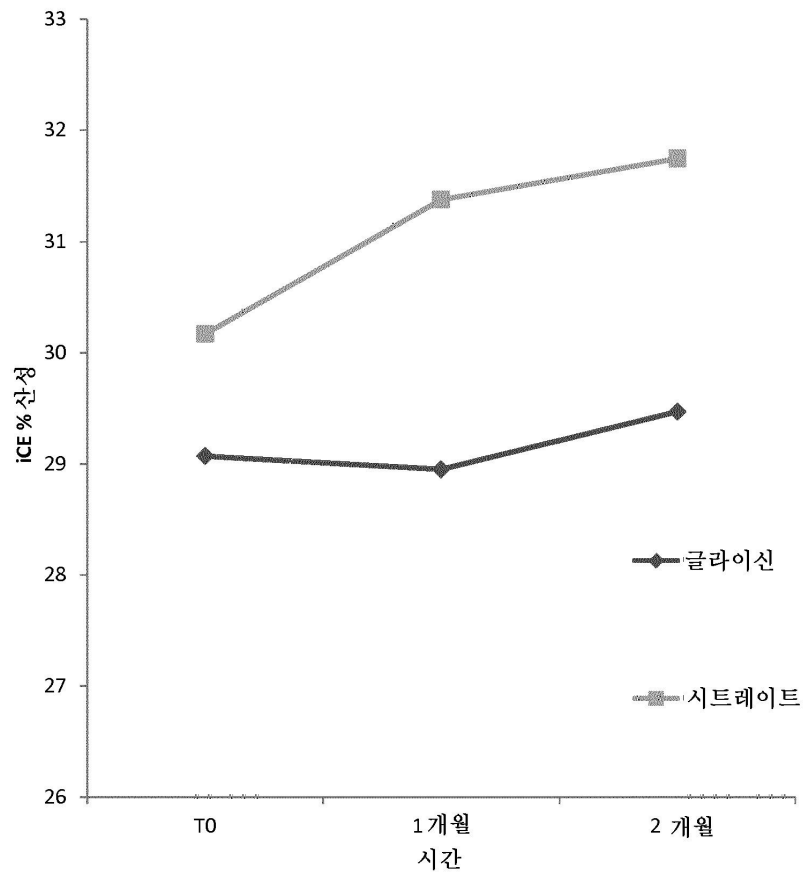
도면23



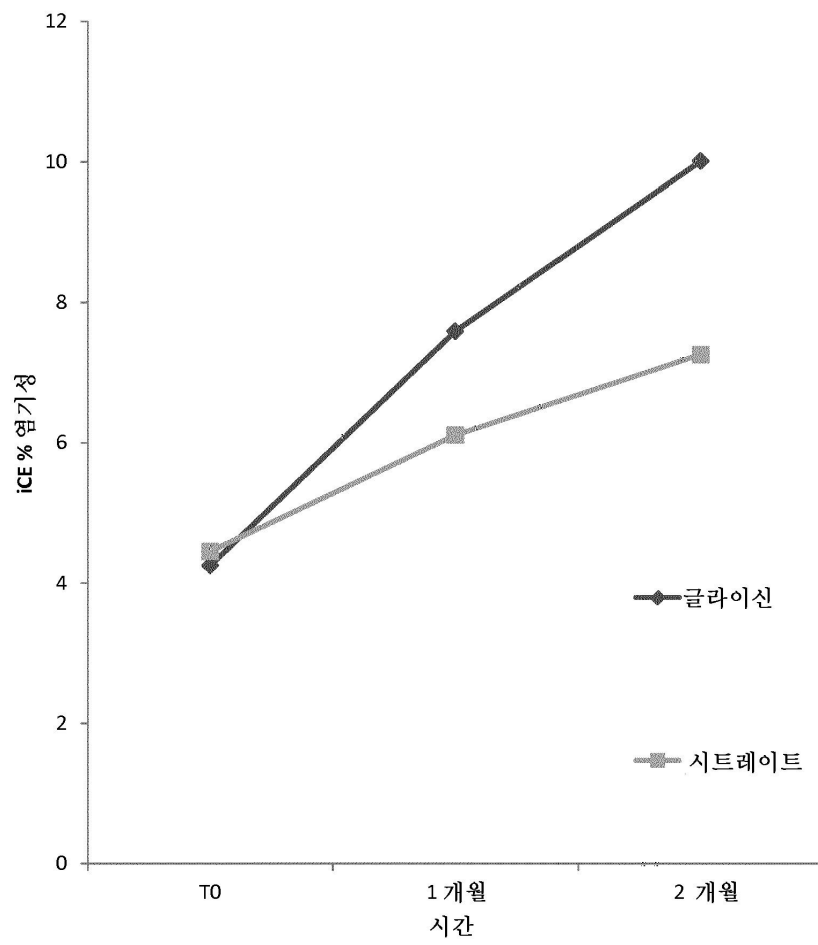
도면24



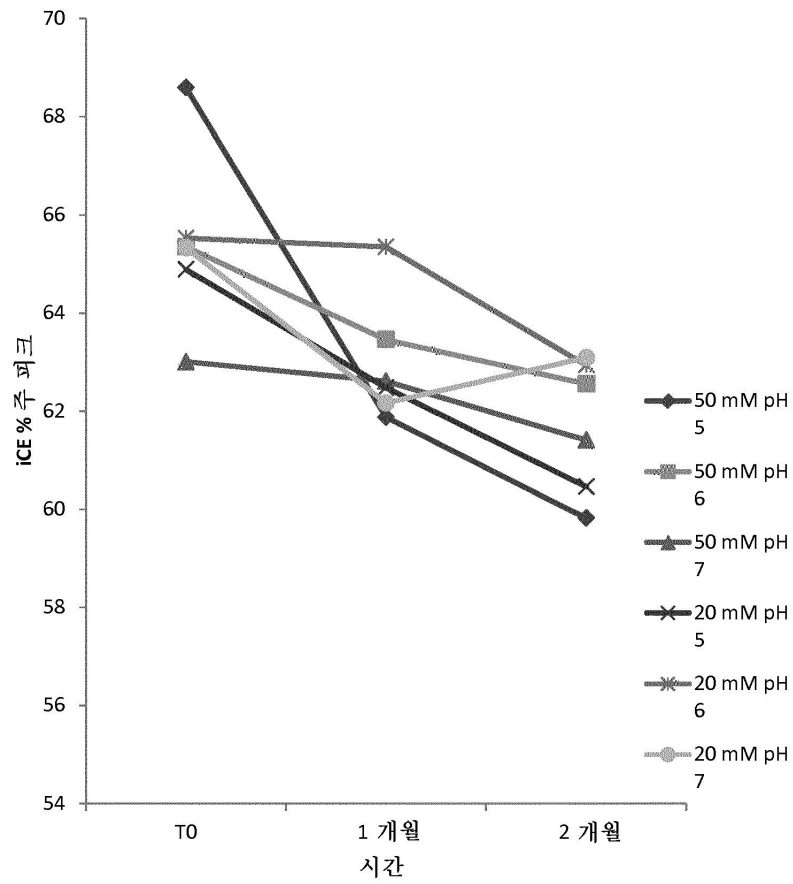
도면25



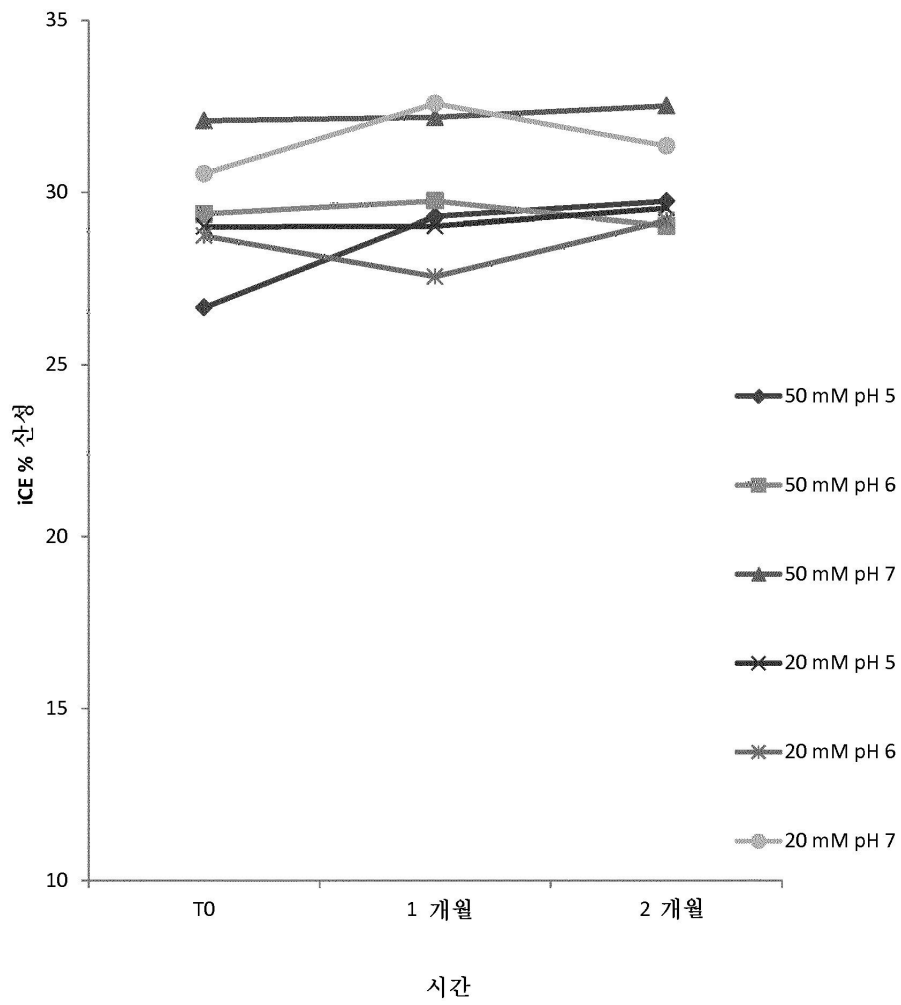
도면26



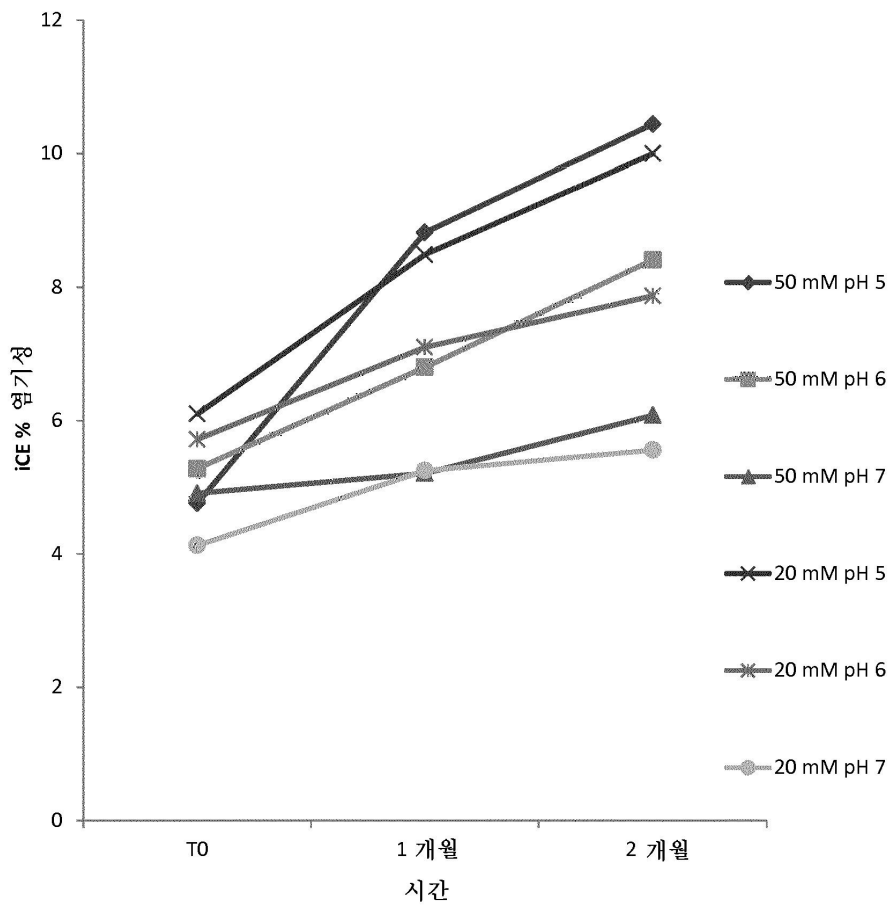
도면27



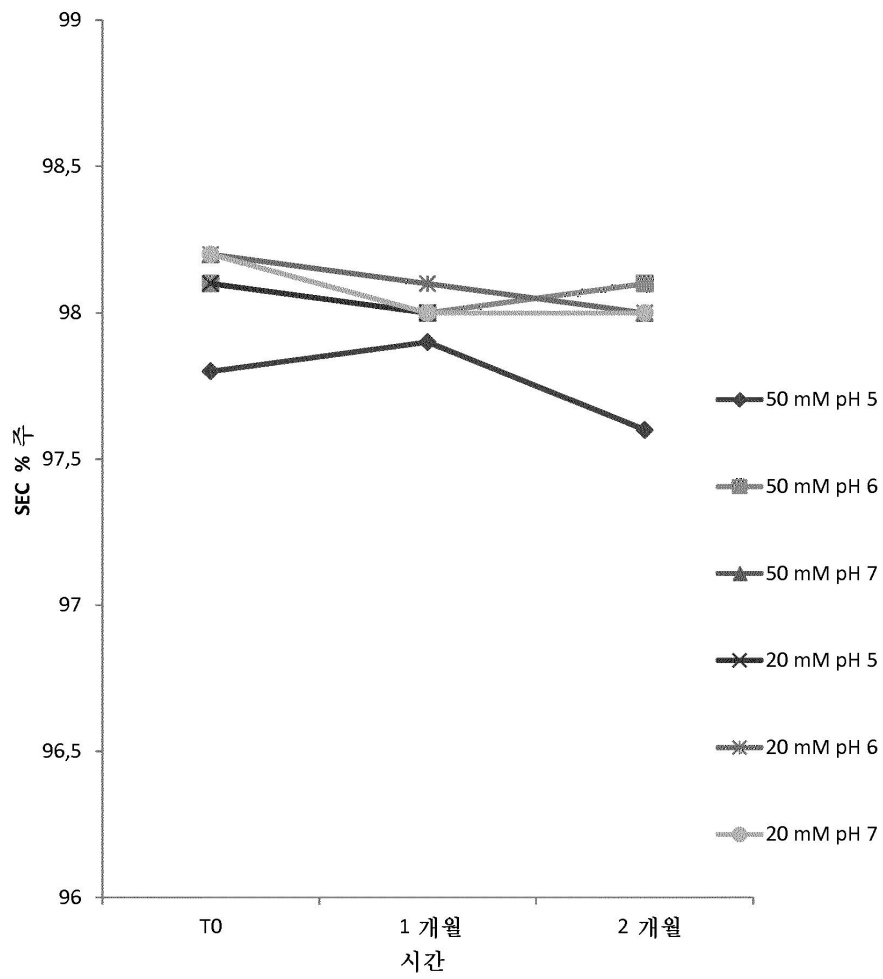
도면28



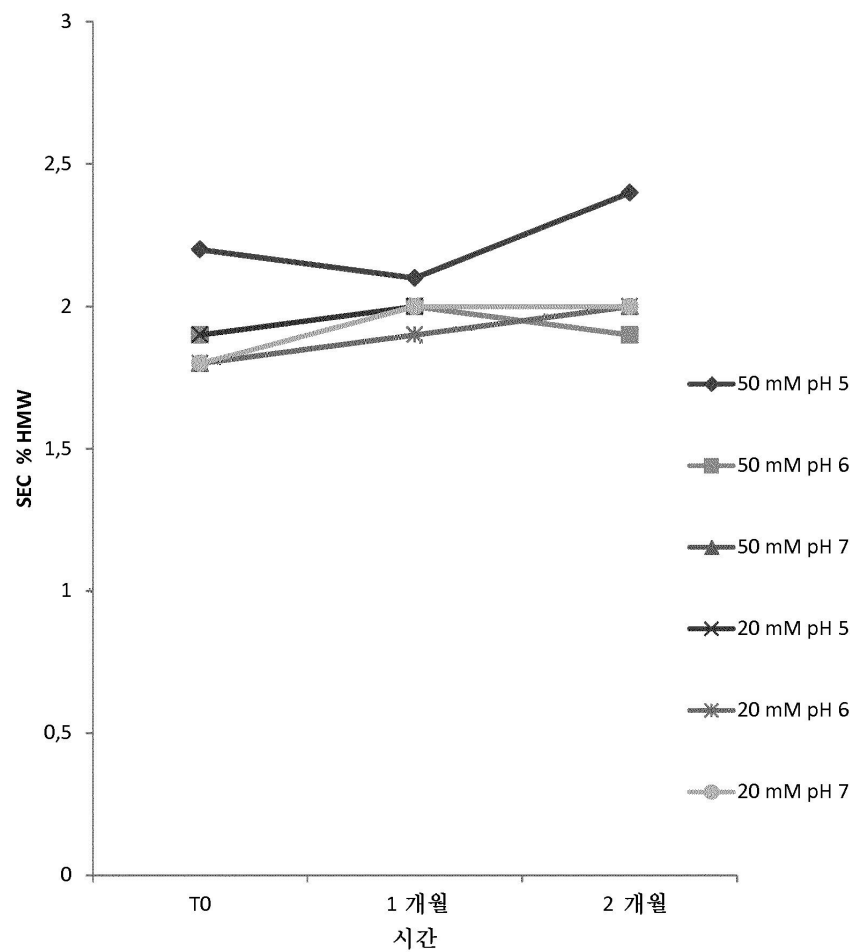
도면29



도면30



도면31



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Genmab A/S

<120> Antibody-drug conjugate formulations

<130> P/0081-W0

<160> 80

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 119

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 1

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Asn Asp

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Leu Ile Trp Tyr Asp Gly Val Asn Lys Asn Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Arg Pro Gly Thr Phe Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 2

Gly Phe Thr Val Ser Asn Asp Gly

1 5

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 3

Ile Trp Tyr Asp Gly Val Asn Lys

1 5

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 4

Ala Arg Arg Pro Gly Thr Phe Tyr Gly Leu Asp Val

1 5 10

<210> 5

<211> 118

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 5

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Asp Tyr Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Pro Trp Gly Tyr Tyr Leu Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 6

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala

1 5

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 7

Ile Ser Gly Ser Gly Asp Tyr Thr

1 5

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 8

Ala Arg Ser Pro Trp Gly Tyr Tyr Leu Asp Ser

1 5 10

<210> 9

<211> 120

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 9

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Asp Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Asp Gly Tyr Phe Leu Leu Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 10

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala

1 5

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 11

Ile Ser Gly Ser Gly Asp Ser Thr

1 5

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 12

Ala Lys Asp Gly Tyr Phe Leu Leu Trp Tyr Phe Asp Leu

1 5 10

<210> 13

<211> 118

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 13

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Val Ile Ser Gly Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
Ala Lys Ala Pro Trp Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser

115
<210> 14
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 14

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
1 5

<210> 15
<211> 8
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 15

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Thr Thr
1 5

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 16

Ala Lys Ala Pro Trp Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 17
<211> 118
<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 17

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Thr Pro Trp Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 18

Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr Ala

1 5

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 19

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr

1 5

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 20

Ala Lys Thr Pro Trp Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 21

<211> 118

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 21

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Ala Lys Gly Leu Asp Trp Val

35 40 45

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Val Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asp Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Lys Thr Pro Trp Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ile

100 105 110

Leu Val Ala Val Ser Ser

115

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 22

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala

1 5

<210> 23

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 23

Ile Ser Gly Ser Gly Val Thr Thr

1 5

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 24

Ala Lys Thr Pro Trp Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 25

<211> 120

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 25

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr

20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Ser Asn Asp Gly Tyr Asn Asp Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 26

Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Ala
 1 5

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 27

Ile Ser Asn Asp Gly Tyr Asn Asp
 1 5

<210> 28

<211> 13

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 28

Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 29

<211> 120

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 29

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Pro Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ile Tyr

20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Val Ser Asn Asp Gly Tyr Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asp Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 30

Gly Phe Thr Phe Ser Ile Tyr Ala

1 5

<210> 31

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 31

Val Ser Asn Asp Gly Tyr Asn Lys

1 5

<210> 32

<211> 13

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 32

Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 33

<211> 118

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 33

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Ser Phe Asn Asn Tyr

20 25 30

Pro Ile Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Phe Glu Trp Met

35 40 45

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Gly Gly Asp Asp Leu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Met Val Ser Val Ser Ser

115

<210> 34

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400>

> 34

Gly Gly Ser Phe Asn Asn Tyr Pro

1 5

<210> 35

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 35

Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Thr

1 5

<210> 36

<211> 11

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 36

Ala Gly Gly Asp Asp Leu Asp Ala Phe Asp Ile

1 5 10

<210> 37

<211> 120

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 37

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Asn Arg Tyr

20 25 30

Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Ser Asn Asp Gly Ile Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp His Thr Met Val Arg Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 38

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 38

Gly Phe Thr Phe Asn Arg Tyr Ala

1 5

<210> 39

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 39

Ile Ser Asn Asp Gly Ile Asn Lys

1 5

<210> 40

<211> 13

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 40

Ala Arg Asp His Thr Met Val Arg Gly Ala Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 41

<211> 107

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 41

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu
85 90 95

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

<210> 42

<211> 7

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 42

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr

1 5

<210> 43

<211> 3

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 43

Gly Ala Ser

1

<210> 44

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 44

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu Thr

1 5

<210> 45

<211> 107

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 45

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu Ser Ala Ser Ala Gly

1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Arg
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 46

<211> 6

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 46

Gln Gly Ile Ser Ser Arg

1 5

<210> 47

<211> 3

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 47

Ala Ala Ser

1

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 48

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5
 <210> 49
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 49
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 50
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 50

Gln Ser Val Arg Ser Ser Tyr

1 5
 <210> 51
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 51

Gly Ala Ser

1

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 52

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Arg Thr

1 5

<210> 53

<211> 108

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 53

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Ser

20 25 30

Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro

85 90 95

Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 54

<

211> 7

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 54

Gln Ser Val Gly Ser Ser Ser

1 5

<210> 55

<211> 3

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 55

Gly Ala Ser

1

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 56

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Arg Thr

1 5

<210> 57

<211> 107

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 57

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 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Arg

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 58

<211> 6

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 58

Gln Gly Ile Ser Ser Arg

1

5

<210> 59

<211> 3

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 59

Ala Ala Ser

1

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 60

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr

1

5

<210> 61

<211> 108

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 61

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 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu

85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 62

 $\angle$

211> 6

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 62

Gln Gly Ile Ser Ser Trp

1 5

<210> 63

<211> 3

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 63

Ala Ala Ser

1

<210> 64

<211> 10

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 64

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Tyr Thr

1 5 10

<210> 65

<211> 107

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 65

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 66

<211> 6

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 66

Gln Ser Val Ser Ser Tyr

1 5

<210> 67

<211> 3

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 67

Asp Ala Ser

1

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 68

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr

1 5

<210> 69

<211> 107

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 69

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Ile Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 70

<211> 6

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 70

Gln Ser Val Ser Ser Tyr

1 5

<210> 71

<211> 3

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 71

Asp Ala Ser

1

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 72

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr

1 5

<210> 73

<211> 107

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 73

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 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 74

<211> 6

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 74

Gln Gly Ile Ser Ser Trp

1 5

<210> 75

<211> 3

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 75

Ala Ala Ser

1

<210> 76

<211> 9

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 76

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 77

<211> 107

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 77

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65					70					75					80
Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Ser	Asn	Trp	Pro	Leu
					85					90					95
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys					
					100					105					

<210> 78

<211> 6

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 78

Gln Ser Val Ser Ser Tyr

1 5

<210> 79

<211> 3

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 79

Asp Ala Ser

1

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 80

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr

1 5