



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0131898
(43) 공개일자 2022년09월29일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/19 (2006.01) *A61K 47/22* (2017.01)
A61K 47/26 (2017.01) *A61K 47/64* (2017.01)
A61K 9/00 (2006.01) *A61K 9/08* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 9/19 (2013.01)
A61K 47/22 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7021780
- (22) 출원일자(국제) 2020년11월27일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년06월24일
- (86) 국제출원번호 PCT/GB2020/053026
- (87) 국제공개번호 WO 2021/105694
 국제공개일자 2021년06월03일
- (30) 우선권주장
 62/940,966 2019년11월27일 미국(US)

- (71) 출원인
바이사이클티엑스 리미티드
 영국, 씨비22 3에이티, 캠브리지, 바브라햄 리서치 캠퍼스, 빌딩 900
- (72) 발명자
베네트 가빈
 영국 씨비22 3에이티 캠브리지 바브라햄 리서치 캠퍼스 빌딩 900 바이사이클티엑스 리미티드 내
- 맵키 리사**
 영국 씨비22 3에이티 캠브리지 바브라햄 리서치 캠퍼스 빌딩 900 바이사이클티엑스 리미티드 내
- (74) 대리인
장훈

전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 **E p h A 2 에 특이적인 바이사이클릭 펩티드 리간드 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 바이사이클 독소 접합체 BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 이의 약제학적 조성물, 및 이의 용도에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 47/26 (2013.01)

A61K 47/6415 (2017.08)

A61K 9/0019 (2013.01)

A61K 9/08 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

명세서

청구범위

청구항 1

BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 및 완충제, 충전제 또는 증량제 또는 결합제, 및 계면활성제로부터 선택된 약제학적으로 허용되는 부형제 또는 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 완충제가 히스티딘 염산염인, 약제학적 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 충전제 또는 증량제 또는 결합제가 수크로스인, 약제학적 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 계면활성제가 폴리소르베이트-20인, 약제학적 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 있어서, 등장성 조절제를 추가로 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 등장성 조절제가 텍스트로스를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중의 어느 한 항에 있어서, 동결건조된 분말 형태의 고체 약제학적 조성물인, 약제학적 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중의 어느 한 항에 있어서, 물을 추가로 포함하는 액체 약제학적 조성물인, 약제학적 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중의 어느 한 항에 있어서,

BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염;

BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 1mg당 약 1.31 내지 2.62mg의 히스티딘 염산염;

BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 1mg당 약 15 내지 30mg의 수크로스; 및

BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 1mg당 약 0.05 내지 0.1mg의 폴리소르베이트 20을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

약 21.2mg의 BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염;

BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 1mg당 약 55.5mg의 히스티딘 염산염;

BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 1mg당 약 636mg의 수크로스; 및

BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 1mg당 약 1.06 내지 2.12mg의 폴리소르베이트 20을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 11

제8항에 있어서,
 약 2 내지 4mg/mL BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염;
 약 5.25mg/mL 히스티딘 염산염;
 약 60mg/mL 수크로스; 및
 약 0.1 내지 0.2mg/mL 폴리소르베이트 20을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 12

환자의 EphA2-발현과 관련된 진행성 고형 악성종양을 치료하는 방법으로서, 제1항 내지 제11항 중의 어느 한 항의 약제학적 조성물을 환자에게 정맥내 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 EphA2-발현과 관련된 진행성 고형 악성종양이 비소세포 폐암(NSCLC), 난소암, 삼중-음성 유방암(TNBC), 위/상부 위장관(GI), 췌장 및 요로상피 암으로부터 선택되는, 방법.

청구항 14

제12항 또는 제13항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 7일마다 한 번 투여되는, 방법.

청구항 15

제12항 내지 제14항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 약 2.2, 4.4, 7.3, 11, 14.6, 또는 19.4mg/m²의 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 16

제12항 내지 제15항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 약 60분의 IV 주입을 통해 투여되는, 방법.

청구항 17

제12항 내지 제15항 중의 어느 한 항에 있어서, 니블루맙을 투여함을 추가로 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 2019년 11월 27일에 출원된 미국 가특허 출원 일련 번호 제62/940,966호에 대한 우선권을 주장하며, 이의 전체는 본원에 참고로 포함된다.

[0003] **발명의 기술 분야**

[0004] 본 발명은 바이사이클 독소 접합체, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 이의 약제학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 병든 조직에서 EphA2의 과발현을 특징으로 하는 질환, 장애 또는 상태를 예방 또는 치료하기 위한 바이사이클 독소 접합체, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 이의 약제학적 조성물의 용도를 제공한다.

배경 기술

[0005] 사이클릭 펩티드는 단백질 표적에 높은 친화성 및 표적 특이성으로 결합할 수 있으며, 따라서 치료제의 개발에 매력적인 분자 부류이다. 실제로, 몇몇 사이클릭 펩티드가, 예를 들면, 항균성 펩티드 반코마이신, 면역억제 약물 사이클로스포린 또는 항암 약물 옥트레오티드로서 진료소에서 이미 성공적으로 사용되었다(Driggers *et al.* (2008), *Nat Rev Drug Discov* 7 (7), 608-24). 우수한 결합 특성은 펩티드와 표적 사이에 형성된 비교적

큰 상호작용 표면 뿐만 아니라 사이클릭 구조의 감소된 입체구조적 가요성으로부터 야기된다. 전형적으로, 마크로사이클은, 예를 들면, 사이클릭 펩티드 CXCR4 길항제 CVX15(400Å²; Wu *et al.* (2007), Science 330, 1066-71), 인테그린 αVβ3에 결합하는 Arg-Gly-Asp 모티프를 갖는 사이클릭 펩티드(355Å²)(Xiong *et al.* (2002), Science 296 (5565), 151-5) 또는 유로키나제-타입 플라스미노겐 활성화제에 결합하는 사이클릭 펩티드 억제제 유파인-1(603Å²; Zhao *et al.* (2007), J Struct Biol 160 (1), 1-10)로서 수백 평방 옹스트롬의 표면에 결합한다.

[0006] 이들의 사이클릭 배위로 인해, 펩티드 마크로사이클은 선형 펩티드보다 덜 유연하여, 표적에 결합시 엔트로피의 손실이 적어지고 더 높은 결합 친화도를 야기한다. 감소된 가요성은 또한 표적-특이 입체구조를 고정시켜 선형 펩티드에 비해 결합 특이성을 증가시킨다. 이러한 효과는 개환될 때 다른 MMP에 비해 선택성이 상실되는 매트릭스 메탈로프로테이나제 8, (MMP-8)의 강력하고 선택적인 억제제에 의해 예시되었다(Cherney *et al.* (1998), J Med Chem 41 (11), 1749-51). 마크로폐환(macrocyclization)을 통해 달성되는 유리한 결합 특성은 예를 들면 반코마이신, 니신 및 악티노마이신에서와 같이 하나 이상의 펩티드 환을 갖는 멀티사이클릭 펩티드에서 더욱 현저하다.

[0007] 다른 연구팀들은 이전에 시스테인 잔기를 갖는 폴리펩티드를 합성 분자 구조로 테더링하였다(Kemp and McNamara (1985), J. Org. Chem; Timmerman *et al.* (2005), ChemBioChem). Meloen 및 동료들은 단백질 표면의 구조적 모방을 위해 합성 스캐폴드에 다중 펩티드 루프를 신속하고 정량적으로 폐환시키기 위해 트리스(브로모메틸)벤젠 및 관련 분자를 사용하였다(Timmerman *et al.* (2005), ChemBioChem). 예를 들면 TATA (1,1',1''-(1,3,5-트리아지난-1,3,5-트리일)트리프로프-2-엔-1-온, Heinis *et al.* Angew Chem, Int Ed. 2014; 53:1602-1606)으로서 의분자 스캐폴드에 시스테인 함유 폴리펩티드를 연결함으로써 상기 화합물이 생성되는 후보 약물 화합물의 생성 방법을 들 수 있다.

[0008] 바이사이클릭 펩티드의 큰 라이브러리를 생성하고 관심 표적에 스크리닝하기 위해 파지 디스플레이-기반 조합 접근법이 개발되었다(Heinis *et al.* (2009), Nat Chem Biol 5 (7), 502-7 및 WO 2009/098450). 간략하게 말하면, 3개의 시스테인 잔기 및 6개의 랜덤 아미노산의 2개의 영역을 함유하는 선형 펩티드의 조합 라이브러리(Cys-(Xaa)₆-Cys-(Xaa)₆-Cys)를 파지 상에 표시하고 시스테인 측쇄를 소분자 스캐폴드에 공유 결합시킴으로써 폐환시켰다.

발명의 내용

[0009] 하나의 측면에 따르면, 본 발명은 BT5528 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 히스티딘 염산염, 수크로스 및 폴리소르베이트 20을 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 일부 양태에서, BT5528 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 히스티딘 염산염, 수크로스 및 폴리소르베이트 20을 포함하는 약제학적 조성물은 동결건조된 분말이다.

[0010] 또 다른 측면에서, 본 발명은 BT5528 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 히스티딘 염산염, 수크로스, 폴리소르베이트 20 및 텍스트로스를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 일부 양태에서, BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 히스티딘 염산염, 수크로스, 폴리소르베이트 20, 및 텍스트로스를 포함하는 약제학적 조성물은 물 중의 약제학적 제형이다.

[0011] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기술된 바와 같은 약제학적 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하여, 환자에서 EphA2 발현과 관련된 진행성 악성종양(advanced malignancy)을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은 환자에게 매주 IV 주입에 의해 물 중의 BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 히스티딘, 수크로스, 폴리소르베이트 20, 및 텍스트로스를 포함하는 약제학적 제형을 투여하는 것을 포함하여, 환자에서 EphA2 발현과 관련된 진행성 악성종양을 치료하는 방법을 제공한다.

특정 양태의 상세한 설명

[0013] 1. 본 발명의 특정 양태의 일반적인 설명:

[0014] 투여를 위해 재구성될 수 있는, BT5528에 대한 안정한 동결건조 제형이 개발되었다. 개발 과정 동안, BT5528이 바이알의 표면에 흡착되어 재구성이 어려운 것으로 관찰되었다. BT5528이 바이알의 표면에 흡착되는 원인이 별도의 동결건조 주기 동안 조사되었다.

[0015] 많은 가설이 잠재적인 원인으로, 최종 제품의 높은 염화나트륨 농도, 재구성된 제품의 보다 염기성인 pH, 실란 처리된 바이알 및 펩티드의 과도한 건조를 제시하였다. 이러한 각각의 가설을 대체 당, 계면활성제 및 더 낮은 BT5528 농도의 제형 스크린으로 함께 평가하여 이것이 재구성 특성을 개선하는지 조사하였다. 더 낮은 pH 사전-동결건조로 재구성 시간의 개선이 수득되었지만, 바이알 표면에 유성 점적이 남아 있었다. 염화나트륨 함량의 감소, 실란 처리된 바이알의 사용 및 낮은 2차 건조 온도(제품의 최종 수분 함량을 증가시키기 위해)는 재구성 특성을 개선하지 못했다. 대체 당 또는 계면활성제는 개선을 일으키지 않았다.

[0016] 놀랍게도, BT5528 농도를 4mg/mL에서 2mg/mL로 감소시키면 재구성 특성이 개선되는 것으로 밝혀진 것으로 밝혀졌다. 재구성 시간이 단축되었고 재구성 후 바이알의 표면에 유성 점적이 관찰되지 않았다. 회수율 대 이론치는 4mg/mL 제형에 대해서는 지속적으로 목표치 미만인 것과 비교하여 2mg/mL 제형에서는 목표치에 있었다.

[0017] 따라서, 하나의 측면에서, 본 발명은 BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염의 농도가 약 2 내지 4mg/mL 인 액체 제형으로부터, 예를 들면, 동결건조에 의해 용매(들)를 제거함으로써 제조된, BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 고체 약제학적 조성물을 제공한다.

[0018] 또 다른 측면에서, 본 발명은 EphA2-발현과 관련된 진행성 고형 악성종양을 치료하기 위해 본원에 기술된 약제학적 조성물을 사용하는 방법을 제공한다.

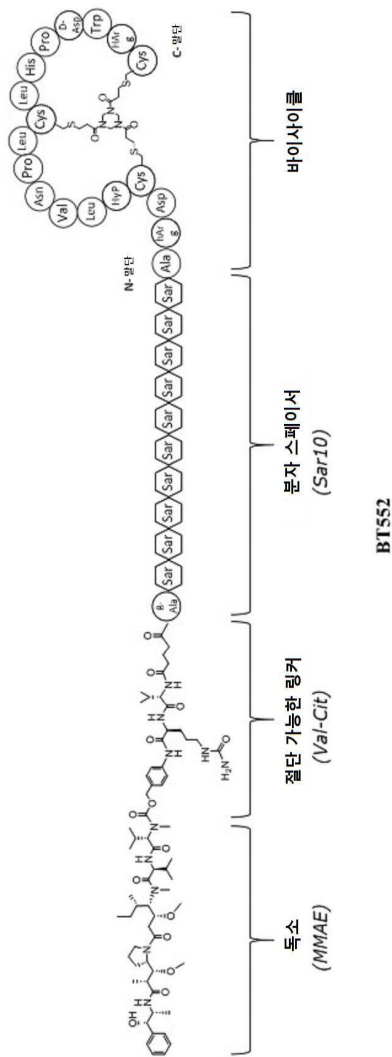
[0019] **2. 화합물 및 정의:**

[0020] 본원에 사용된 용어 "BT5528"은 아래 나타낸 바와 같은 구조를 갖는 바이사이클 독소 접합체이며, 여기서 분자 스캐폴드는 1,1',1''-(1,3,5-트리아지난-1,3,5)-트리일)트리프로프-2-엔-1-온(TATA)이고, 펩티드 리간드는 하기 아미노산 서열을 포함한다:

[0021] (β -Ala)-Sar₁₀-A(HArg)D-C_i(HyP)LVNPLC_{ii}LHP(D-Asp)W(HArg)C_{iii} (서열 번호 1)

[0022] 여기서 Sar은 사르코신이고, HArg는 호모아르기닌이고, HyP는 하이드록시프롤린이다.

[0023] 본원에 사용된 용어 "약제학적으로 허용되는 염"은 건전한 의학적 판단의 범위 내에서 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 등 없이 인간 및 하등 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합하고 합리적인 이익/위험 비율에 상응하는 염을 지칭한다. 약제학적으로 허용되는 염은 당업계에서 잘 알려져 있다. 예를 들면, S. M. Berge 등은 본원에 참고로 포함된 문헌[참조; J. Pharmaceutical Sciences, 1977, 66, 1-19]에 약제학적으로 허용되는 염을 상세히 설명하고 있다. 본 발명의 화합물의 약제학적으로 허용되는 염은 적합한 무기 및 유기 산 및 염기로부터 유도된 것을 포함한다. 약제학적으로 허용되는 무독성 산 부가염의 예는 염산, 브롬화수소산, 인산, 황산 및 과염소산과 같은 무기산 또는 아세트산, 옥살산, 말레산, 타르타르산, 시트르산, 숙신산 또는 말론산과 같은 유기산으로 또는 이온 교환과 같은 당업계에서 사용되는 다른 방법을 사용함으로써 형성된 아미노 그룹의 염이다. 다른 약제학적으로 허용되는 염은 아디페이트, 알기네이트, 아스코르베이트, 아스파르테이트, 벤젠설포네이트, 벤조에이트, 바이설포네이트, 보레이트, 부티레이트, 캄포레이트, 캄포르설포네이트, 시트레이트, 사이클로헥탄프로피오네이트, 디글루코네이트, 도데실설포네이트, 에탄설포네이트, 포르메이트, 푸마레이트, 글루코헵토네이트, 글리세로포스페이트, 글루코네이트, 헤미설포네이트, 헵타노에이트, 헥사노에이트, 하이드로요오다이드, 2-하이드록시-에탄설포네이트, 락토비오네이트, 락테이트, 라우레이트, 라우릴 설포네이트, 말레이트, 말레에이트, 말로네이트, 메탄설포네이트, 2-나프탈렌설포네이트, 니코티네이트, 니트레이트, 올레에이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모에이트, 펙티네이트, 퍼설포네이트, 3-페닐프로피오네이트, 포스페이트, 피발레이트, 프로피오네이트, 스테아레이트, 석시네이트, 설포네이트, 타르트레이트, 티오시아네이트, p-톨루엔설포네이트, 운데카노에이트, 발레레이트 염 등을 포함한다.



[0024]

[0025]

적절한 염기로부터 유도된 염은 알칼리 금속, 알칼리 토금속, 암모늄 및 $N^+(C_{1-4}\text{알킬})_4$ 염을 포함한다. 대표적인 알칼리 또는 알칼리 토금속 염은 나트륨, 리튬, 칼륨, 칼슘, 마그네슘 등을 포함한다. 추가의 약제학적으로 허용되는 염은, 적절한 경우, 할라이드, 하이드록사이드, 카복실레이트, 설페이트, 포스페이트, 니트레이트, 저급 알킬 설포네이트 및 아릴 설포네이트와 같은 짝이온을 사용하여 형성된 무독성 암모늄, 4급 암모늄, 및 아민 양이온을 포함한다. 염 형태는 본 발명의 범위 내에 있으며, 펩티드 리간드에 대한 언급은 상기 리간드의 염 형태를 포함하는 것으로 인지될 것이다.

[0026]

본 발명의 염은 문헌[*Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P. Heinrich Stahl (Editor), Camille G. Wermuth (Editor), ISBN: 3-90639-026-8, Hardcover, 388 pages, August 2002]에 기술된 방법과 같은 통상적인 화학적 방법에 의해 염기성 또는 산성 모이티어를 함유하는 모 화합물로부터 합성될 수 있다. 일반적으로, 이러한 염은 이러한 화합물의 유리 산 또는 염기 형태를 물 또는 유기 용매, 또는 둘의 혼합물에서 적절한 염기 또는 산과 반응시킴으로써 제조될 수 있다.

[0027]

본원에 사용된 용어 "약"은 주어진 값 또는 범위의 10% 이내의 의미를 가질 것이다. 일부 양태에서, 용어 "약"은 주어진 값의 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 또는 1% 이내를 지칭한다.

[0028]

달리 언급되지 않는 한, 본원에 도시된 구조는 또한 구조의 모든 이성체(예를 들어, 거울상 이성체, 부분 입체 이성체 및 기하(또는 형태)) 형태; 예를 들면, 각 비대칭 중심에 대한 R 및 S 배위, Z 및 E 이중 결합 이성체, 및 Z 및 E 형태 이성체를 포함하는 것을 의미한다. 따라서, 본 발명의 화합물의 단일 입체화학적 이성체 뿐만 아니라 거울상 이성체, 부분 입체 이성체 및 기하(또는 형태적) 혼합물은 본 발명의 범위 내에 있다. 달리 언급되지 않는 한, 본 발명의 화합물의 모든 호변이성체 형태는 본 발명의 범위 내에 있다. 추가로, 달리 언급되지 않는 한, 본원에 도시된 구조는 또한 하나 이상의 동위원소 농축 원자의 존재에서만 상이한 화합물을 포함하

는 것을 의미한다. 예를 들면, 중수소 또는 삼중수소에 의한 수소의 대체 또는 ¹³C- 또는 ¹⁴C-풍부 탄소에 의한 탄소의 대체를 포함하는 본 발명의 구조를 갖는 화합물은 본 발명의 범위 내에 있다. 이러한 화합물은, 예를 들면, 분석 도구로서, 생물학적 검정에서 프로브로서, 또는 본 발명에 따른 치료제로서 유용하다.

[0029] **3. 약제학적 조성물**

[0030] 하나의 측면에 따르면, 본 발명은 BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 및 약제학적으로 허용되는 부형제 또는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 약 21.2mg BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하였다.

[0031] 일부 양태에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 고체 약제학적 조성물이다. 일부 양태에서, 본 발명의 고체 약제학적 조성물은 분말이다. 일부 양태에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 동결건조 분말이다. 일부 양태에서, 본 발명의 고체 약제학적 조성물은 과립이다.

[0032] 일부 양태에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 액체 약제학적 조성물이다. 일부 양태에서, 본 발명의 액체 약제학적 조성물은 허용되는 비히클 또는 용매 중의 약제학적 제형이다. 일부 양태에서, 허용되는 비히클 또는 용매는 멸균수, 링거 용액, U.S.P. 및 등장성 염화나트륨 용액으로부터 선택된다. 일부 양태에서, 허용되는 비히클 또는 용매는 멸균수이다. 일부 양태에서, 허용되는 비히클 또는 용매는 멸균 주사가 가능한 매질이다. 일부 양태에서, 본 발명의 액체 약제학적 조성물은 약 2 내지 4mg/mL BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함한다.

[0033] 일부 양태에서, 약제학적으로 허용되는 부형제 또는 담체는 완충제를 포함한다. 일부 양태에서, 완충제는 인산염, 글리신, 소르브산, 소르브산칼륨, 포화 식물성 지방산의 부분 글리세라이드 혼합물, 물, 염 또는 전해질, 예를 들어 황산프로타민, 인산수소이나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨, 아연염, 콜로이드성 실리카, 삼규산마그네슘, 폴리비닐 피롤리돈, 셀룰로스-기반 물질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카복시메틸셀룰로스, 폴리아크릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌-폴리옥시프로필렌-블록 중합체, 폴리에틸렌 글리콜 및 양모지로부터 선택된다. 일부 양태에서, 완충제는 히스티딘 염산염이다. 일부 양태에서, 완충제는 수산화나트륨이다. 일부 양태에서, 완충제는 염산이다.

[0034] 일부 양태에서, 완충제는 본 발명의 약제학적 조성물의 pH를 약 6 내지 8로 조절하는 양으로 존재한다. 일부 양태에서, 완충제는 BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 1mg당 약 1 내지 3mg의 양의 히스티딘 염산염이다. 일부 양태에서, 히스티딘 염산염은 BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 1mg당 약 1.31 또는 2.62mg의 양이다. 일부 양태에서, 본 발명의 액체 약제학적 조성물은 히스티딘 염산염을 약 5.24mg/mL의 농도로 포함한다.

[0035] 일부 양태에서, 본 발명의 액체 약제학적 조성물은 약 6 내지 8의 pH이다. 일부 양태에서, 본 발명의 액체 약제학적 조성물은 약 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 또는 8.0의 pH이다. 일부 양태에서, 본 발명의 액체 약제학적 조성물은 약 6.5 또는 7.0의 pH이다.

[0036] 일부 양태에서, 약제학적으로 허용되는 부형제 또는 담체는 불활성 약제학적으로 허용되는 부형제 또는 담체를 포함한다. 일부 양태에서, 약제학적으로 허용되는 불활성 부형제 또는 담체는 시트르산나트륨 또는 인산이칼슘이다. 일부 양태에서, 약제학적으로 허용되는 불활성 부형제 또는 담체는 충전제 또는 증량제이다. 일부 양태에서, 충전제 또는 증량제는 전분, 락토스, 수크로스, 글루코스, 만니톨 또는 규산이다. 일부 양태에서, 약제학적으로 허용되는 불활성 부형제 또는 담체는 결합제이다. 일부 양태에서, 결합제는 카복시메틸셀룰로스, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈, 수크로스, 또는 아카시아이다. 일부 양태에서, 약제학적으로 허용되는 불활성 부형제 또는 담체는 수크로스, 트레할로스, 텍스트로스, 또는 이들의 조합으로부터 선택된다. 일부 양태에서, 약제학적으로 허용되는 불활성 부형제 또는 담체는 수크로스이다.

[0037] 일부 양태에서, 약제학적으로 허용되는 불활성 부형제 또는 담체(예를 들어, 수크로스)는 BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 1mg당 약 10 내지 35mg의 양이다. 일부 양태에서, 약제학적으로 허용되는 불활성 부형제 또는 담체(예를 들어, 수크로스)는 BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 1mg당 약 15 또는 30mg의 양이다. 일부 양태에서, 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 불활성 부형제 또는 담체(예를 들어, 수크로스)를 약 60mg/mL의 농도로 포함한다.

[0038] 일부 양태에서, 약제학적으로 허용되는 부형제 또는 담체는 계면활성제를 포함한다. 일부 양태에서, 계면활성

제는 폴리소르베이트(예를 들어, 폴리소르베이트-20, 폴리소르베이트-40, 폴리소르베이트-60, 폴리소르베이트-65, 폴리소르베이트-80, 폴리소르베이트-85, 또는 이들의 조합)이다. 일부 양태에서, 계면활성제는 폴록사머(예를 들어, 폴록사머 188); Triton™; 나트륨 도데실 설페이트(SDS); 나트륨 라우렐 설페이트; 나트륨 옥틸 글리코사이드; 라우릴-설포베타인, 미리스틸-설포베타인, 리놀레일-설포베타인, 스테아릴-설포베타인, 라우릴-사르코신, 미리스틸-사르코신, 리놀레일-사르코신, 스테아릴-사르코신, 리놀레일-베타인, 미리스틸-베타인, 세틸-베타인, 라우로아미도프로필-베타인, 코카미도프로필-베타인, 리놀레아미도프로필-베타인, 미리스타미도프로필-베타인, 팔미도프로필-베타인, 이소스테아라아미도프로필-베타인(예를 들어, 라우로아미도프로필), 미리스타아미도프로필-, 팔미도프로필-, 또는 이소스테아라아미도프로필-디메틸아민; 나트륨 메틸 코코일-, 또는 이나트륨 메틸 오페일-타우레이트; 및 Monaquat™ 시리즈(Mona Industries, Inc., Paterson, NJ), 폴리 에틸 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 및 에틸렌과 프로필렌 글리콜의 공중합체(예를 들어, 플루로닉스, PF68)로부터 선택된다. 일부 양태에서, 계면활성제는 폴리소르베이트 20이다.

- [0039] 일부 양태에서, 계면활성제(예를 들어, 폴리소르베이트 20)는 BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 1mg 당 약 0.01 내지 0.15mg의 양이다. 일부 양태에서, 계면활성제(예를 들어, 폴리소르베이트 20)는 BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 1mg당 약 0.025, 0.05, 또는 0.1mg의 양이다. 일부 양태에서, 액체 약제학적 조성물은 계면활성제(예를 들어, 폴리소르베이트 20)를 약 0.1 또는 0.2mg/mL의 농도로 포함한다.
- [0040] 일부 양태에서, 약제학적으로 허용되는 부형제 또는 담체는 등장성 조절제를 포함한다. 일부 양태에서, 등장성 조절제는 염화나트륨, 텍스트로스, 염화칼슘, 또는 이들의 조합이다. 일부 양태에서, 등장성 조절제는 텍스트로스이다. 일부 양태에서, 등장성 조절제는 염화나트륨이다. 일부 양태에서, 등장성 조절제는 염화나트륨과 텍스트로스의 조합이다.
- [0041] 일부 양태에서, 본 발명은 BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 히스티딘 염산염, 수크로스, 및 폴리소르베이트 20을 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 다음을 포함한다:
- [0042] BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염;
- [0043] BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 1mg당 약 1.31 내지 2.62mg 히스티딘 염산염;
- [0044] BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 1mg당 약 15 내지 30mg 수크로스; 및
- [0045] BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 1mg당 약 0.05 내지 0.1mg 폴리소르베이트 20.
- [0046] 일부 양태에서, 본 발명은 다음을 포함하는 동결건조 분말인 고체 약제학적 조성물을 제공한다:
- [0047] 약 21.2mg BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염;
- [0048] BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 1mg당 약 55.5mg 히스티딘 염산염;
- [0049] BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 1mg당 약 636mg 수크로스; 및
- [0050] BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 1mg당 약 1.06 내지 2.12mg 폴리소르베이트 20.
- [0051] 일부 양태에서, 본 발명은 다음을 포함하는 동결건조 분말인 고체 약제학적 조성물을 제공한다:
- [0052] 약 21.2mg BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염;
- [0053] BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 1mg당 약 27.8mg 히스티딘 염산염;
- [0054] BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 1mg당 약 318mg 수크로스; 및
- [0055] BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 1mg당 약 1.06mg 폴리소르베이트 20.
- [0056] 일부 양태에서, 본 발명은 다음을 포함하는 액체 약제학적 조성물을 제공한다:
- [0057] 약 2 내지 4mg/mL BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염;
- [0058] 약 5.25mg/mL 히스티딘 염산염;
- [0059] 약 60mg/mL 수크로스; 및
- [0060] 약 0.1 내지 0.2mg/mL 폴리소르베이트 20.

- [0061] 일부 양태에서, 본 발명은 본 발명의 고체 약제학적 조성물을 물에 용해시킴으로써 제조된 액체 약제학적 조성물을 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은 본 발명의 고체 약제학적 조성물을 주사 가능한 매질(예를 들어, 염수 또는 5% 텍스트로스)에 용해시킴으로써 제조된 액체 약제학적 조성물을 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은 본 발명의 고체 약제학적 조성물을 물에 재구성한 다음 5% 텍스트로스 희석시켜 제조된 액체 약제학적 조성물을 제공한다. 일부 양태에서, 액체 약제학적 조성물은 IV 투여를 위해 5% 텍스트로스 IV 백에 희석된다. 일부 양태에서, 5% 텍스트로스 IV 백 중의 액체 약제학적 조성물은 IV 투여 전 최대 약 4시간 동안 실온(약 20 내지 25℃)하에 저장된다. 일부 양태에서, 5% 텍스트로스 IV 백 중의 액체 약제학적 조성물은 IV 투여 전 최대 약 20시간 동안 냉장(약 2 내지 8℃) 조건하에서 저장된다. 일부 양태에서, 5% 텍스트로스 IV 백 중의 액체 약제학적 조성물은 IV 투여 전 최대 약 20시간 동안 냉장(약 2 내지 8℃) 조건하에서 저장된 다음 최대 약 4시간 동안 실온(약 20 내지 25℃)하에 저장된다.
- [0062] 일부 양태에서, 본 발명은 BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 히스티딘 염산염, 수크로스, 폴리소르베이트 20, 및 텍스트로스를 포함하는 고체 약제학적 조성물을 제공한다. 일부 양태에서, 본 발명은 BT5528, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 히스티딘 염산염, 수크로스, 폴리소르베이트 20, 텍스트로스, 및 물을 포함하는 액체 약제학적 조성물을 제공한다. 일부 양태에서, 약제학적 조성물의 성분은 상기 기술된 바와 같은 양, 농도 및 비율로 존재한다.
- [0063] **4. 약제학적 조성물의 용도**
- [0064] 하나의 측면에서, 본 발명은 본원에 기술된 바와 같은 약제학적 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하여, 환자에서 EphA2-발현과 관련된 진행성 고형 악성종양을 치료하기 위한 방법 또는 용도를 제공한다. 일부 양태에서, EphA2-발현과 관련된 진행성 고형 악성종양은 비소세포 폐암(NSCLC), 난소암, 삼중-음성 유방암(TNBC), 위/상부 위장관(GI), 췌장 및 요로상피 암으로부터 선택된다. 일부 양태에서, EphA2-발현과 관련된 진행성 고형 악성종양은 NSCLC의 선암종 하위유형(아테노-NSCLC)이다.
- [0065] 일부 양태에서, 본 발명의 방법은 본원에 기술된 바와 같은 약제학적 조성물을 환자에게 정맥내 투여하는 것을 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 IV 주사에 의해 투여된다. 일부 양태에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 IV 주입에 의해 투여된다. 일부 양태에서, 본 발명의 약제학적 조성물의 IV 주입은 약 5 내지 30분간 지속된다. 일부 양태에서, 본 발명의 약제학적 조성물의 IV 주입은 약 30 내지 90분간 지속된다. 일부 양태에서, 본 발명의 약제학적 조성물의 IV 주입은 약 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 또는 90분간 지속된다. 일부 양태에서, 본 발명의 약제학적 조성물의 IV 주입은 약 60분간 지속된다. 일부 양태에서, 본 발명의 약제학적 조성물의 IV 주입은 약 2, 2.5, 3, 3.5, 또는 4시간 지속된다.
- [0066] 일부 양태에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7일마다 한 번 환자에게 투여된다. 일부 양태에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 매주 환자에게 투여된다. 일부 양태에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 2주마다 한 번 환자에게 투여된다.
- [0067] 일부 양태에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 약 1 내지 27mg/m²의 용량으로 투여된다. 일부 양태에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 약 2 내지 20mg/m²의 용량으로 투여된다. 일부 양태에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 약 2 내지 20mg/m²의 용량으로 투여된다. 일부 양태에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 약 2.2, 4.4, 7.3, 11, 14.6, 또는 19.4mg/m²의 용량으로 투여된다. 일부 양태에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 약 1.5 내지 3.5, 3.5 내지 5.5, 6.5 내지 8.5, 10 내지 12, 13.5 내지 15.5, 또는 18.5 내지 20.5mg/m²의 용량으로 투여된다. 일부 양태에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 약 1 내지 10 또는 10 내지 20mg/m²의 용량으로 투여된다. 일부 양태에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 약 21, 22, 23, 24, 25, 26, 또는 27mg/m²의 용량으로 투여된다.
- [0068] 일부 양태에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 적어도 18세의 환자에게 투여된다.
- [0069] 일부 양태에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 ECOG(Eastern Cooperative Oncology Group) 수행 상태 점수가 0 또는 1인 환자에게 투여된다. ECOG 수행 상태 점수 0 및 1은 실시예 1에 설명되어 있다.
- [0070] 일부 양태에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 RECIST(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) v1.1에 따라 측정 가능한 질환이 있는 환자에게 투여된다.
- [0071] 일부 양태에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 허용 가능한 장기 기능을 가진 환자에게 투여된다. 일부 양태에

서, 허용 가능한 장기 기능을 가진 환자는 다음으로부터 선택된 실험실 데이터를 갖는다:

- [0072] 신장 기능: Cockcroft-Gault 방정식에 의해 또는 24시간 뇨 수집으로 측정된 바와 같은 $\geq 50\text{mL/min}$ 의 크레아티닌 청소율;
- [0073] 총 빌리루빈 $\leq 1.5 \times \text{ULN}$ (정상치의 상한);
- [0074] 혈청 알부민 $\geq 2.5 \text{ g/dL}$;
- [0075] 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제(AST) $\leq 2.5 \times \text{ULN}$ 또는 간 전이효소의 존재하에 $\leq 5 \times \text{ULN}$;
- [0076] 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT) $\leq 2.5 \times \text{ULN}$ 또는 간 전이효소의 존재하에 $\leq 5 \times \text{ULN}$; 및
- [0077] INR(International normal ratio) < 1.3 또는 \leq 규격 ULN (항응고제 허용되지 않음).
- [0078] 일부 양태에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 허용 가능한 혈액학적 기능을 가진 환자에게 투여된다. 일부 양태에서, 허용 가능한 혈액학적 기능을 가진 환자는 다음으로부터 선택된 실험실 데이터를 갖는다:
- [0079] 헤모글로빈 $\geq 9\text{g/dL}$;
- [0080] 절대 호중구 수 (ANC) ≥ 1500 개 세포/ mm^3 ; 및
- [0081] 혈소판 수 $\geq 75,000$ 개 세포/ mm^3 .
- [0082] 일부 양태에서, 환자는 본 발명의 약제학적 조성물의 1차 용량 4주 이내에 적혈구 또는 혈소판 수혈 또는 성장 인자를 갖지 않는다.
- [0083] 일부 양태에서, 환자는 백금-기반 화학요법 중 또는 이후의 진행을 포함하여 모든 표준 치료 옵션을 소진하고/하거나 가장 최근의 치료법에서 방사선학적 진행의 증거로 적어도 하나의 이전 치료법에 실패한, NSCLC의 선암 종 하위유형(아데노-NSCLC)을 갖는다. 일부 양태에서, 환자는 EGFR, ALK, NTRK, ROS1 또는 기타 게놈 종양 이상을 갖는다. 일부 양태에서, 환자는 드라이버 돌연변이 질환에 대한 적절한 치료를 받지 않았다. 일부 양태에서, 환자는 본 발명의 약제학적 조성물의 1차 용량 전 적어도 28일에 면역 요법을 받지 않았다.
- [0084] 일부 양태에서, 환자는 본 발명의 약제학적 조성물의 1차 용량 전 14일 이내에 화학요법 치료를 받지 않았다. 일부 양태에서, 환자는 본 발명의 약제학적 조성물의 1차 용량 전 28일 또는 5회 반감기 중 짧은 기간 이내에 항암 치료를 받지 않았다. 일부 양태에서, 환자는 CTCAE(Common Terminology Criteria for Adverse Events) v 5.0(등급 2 이하이어야 하는 탈모증 제외)에 따라 등급 1로 결정된 이전 독성을 갖는다.
- [0085] 일부 양태에서, 환자는 본 발명의 약제학적 조성물의 1차 용량의 4주 이내에 실험 치료를 받지 않았다.
- [0086] 일부 양태에서, 환자는 CYP3A4의 강력한 억제제 또는 유도제 또는 허브- 또는 식품-기반을 포함한 P-gp의 강력한 억제제로 현재 치료를 받고 있지 않다.
- [0087] 일부 양태에서, 환자는 본 발명의 약제학적 조성물의 어느 하나의 성분 또는 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE)에 대한 감수성을 갖지 않는다.
- [0088] 일부 양태에서, 환자는 심각한 의학적 상태, 생명을 위협하는 질환, 조절되지 않는 활동성 감염 또는 기관계 기능 장애(예를 들어 복수, 응고병증, 뇌병증)를 갖지 않는다.
- [0089] 일부 양태에서, 환자는 본 발명의 약제학적 조성물의 1차 용량의 4주 이내에 주요 수술(혈관 통로의 배치 제외)을 받은 적이 없다.
- [0090] 일부 양태에서, 환자는 본 발명의 약제학적 조성물의 1차 용량의 30일 이내에 생백신을 제공받지 않았다.
- [0091] 일부 양태에서, 환자는 조절되지 않는 증후성 뇌 전이를 갖지 않는다. 일부 양태에서, 환자는 스테로이드를 사용하지 않고 적어도 4주 동안 국소 요법 후 또는 1일 10mg 이하의 프레드니손 또는 등가물의 안정 용량 또는 감소 용량으로 안정적인 신경학적 상태를 갖는다.
- [0092] 일부 양태에서, 환자는 본 발명의 약제학적 조성물의 1차 용량 전에 조절되지 않는 고혈압(수축기 혈압[BP] $\geq 139\text{mmHg}$; 이완기 혈압 $\geq 89\text{mmHg}$)을 갖지 않는다. 일부 양태에서, 환자는 본 발명의 약제학적 조성물의 1차 용량 전 적어도 3개월 동안 안정적으로 조절된 고혈압을 갖는다.
- [0093] 일부 양태에서, 환자는 본 발명의 약제학적 조성물의 1차 용량 전 6개월 이내에 기록된 뇌혈관 사건(뇌졸중 또

는 일과성 허혈 발작), 불안정 협심증, 심근경색증, 울혈성 심부전 또는 뉴욕 심장 학회 클래스 III-IV의 증상의 병력을 갖지 않는다.

[0094] 일부 양태에서, 환자는 본 발명의 약제학적 조성물의 1차 용량 전 6개월 이내에 평균 휴식시 보정된 QT 간격 (QTcF) >470msec을 갖지 않는다.

[0095] 일부 양태에서, 환자는, 본 발명의 약제학적 조성물의 1차 용량 전 6개월 이내에, QTc 연장 위험 또는 심부전, 저칼륨혈증, 선천성 긴 QT 증후군, 긴 QT 증후군의 가족력 또는 40세 미만의 원인 불명의 급사와 같은 부정맥 사건의 위험을 증가시키는 요인 또는 QT 간격을 연장하는 것으로 알려진 임의의 수반되는 약물을 갖지 않는다.

[0096] 일부 양태에서, 환자는, 본 발명의 약제학적 조성물의 1차 용량 전 6개월 이내에, 안정기 심전도(ECG)의 리듬, 전도 또는 형태에 있어서의 임상적으로 중요한 이상, 예를 들어, 완전 좌각 블록(complete left bundle branch block), 제3도 심블록(third degree heart block)을 갖지 않는다.

[0097] 일부 양태에서, 환자는 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 또는 후천성 면역 결핍 증후군(AIDS)을 갖지 않는다.

[0098] 일부 양태에서, 환자는 양성 B형 간염 표면 항원 및/또는 항-B형 간염 코어 항체를 갖지 않는다.

[0099] 일부 양태에서, 환자는 중합효소 연쇄 반응(PCR) 검사에서 음성을 받았고 적절한 항바이러스 요법을 받았다.

[0100] 일부 양태에서, C형 간염 바이러스(HCV) 항체가 양성인 경우 환자는 양성 바이러스 부하를 갖는 활동성 C형 간염 감염을 갖는다.

[0101] 일부 양태에서, 환자는 C형 간염 감염을 치료받았으며 ≥12주의 지속된 바이러스 반응을 나타내었다.

[0102] 일부 양태에서, 환자는 본 발명의 약제학적 조성물의 1차 용량 전 3개월 이내에 혈전색전성 사건 및/또는 출혈 장애(예를 들어, 심부정맥 혈전증[DVT] 또는 폐색전증[PE])를 갖지 않는다.

[0103] 일부 양태에서, 환자는 본 발명의 약제학적 조성물의 1차 용량 전 3년 이내에 다른 악성 종양을 갖지 않는다. 일부 양태에서, 환자는 이전에 진단된 악성 종양으로부터의 임의의 잔류 질환(치료 의도로 적절히 치료된 기저 세포 암종, 피부 편평 세포, 자궁경부 상피내 종양/자궁경부 체자리 암종 또는 체자리 흑색종 또는 유방 관상피 내 암종 제외)을 갖지 않는다.

[0104] 일부 양태에서, 환자는 본 발명의 약제학적 조성물의 1차 용량 전 마지막 14일 이내에 전신 항감염 치료 또는 발열을 갖지 않는다.

[0105] 일부 양태에서, 본 발명은 EphA2-발현과 관련된 진행성 고형 악성종양을 치료하기 위한, 본 발명의 약제학적 조성물 및 니볼루맙의 조합 용도를 제공한다. 니볼루맙은 라벨에 기술된 바와 같이 투여될 수 있으며, 이것은 <https://www.opdivohcp.com/dosing/dosing-schedules>에서 찾을 수 있으며, 이의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함된다. 일부 양태에서, 니볼루맙은 2주마다 240mg 투여된다. 일부 양태에서, 니볼루맙은 4주마다 480mg 투여된다. 일부 양태에서, 니볼루맙은 30분 IV 주입으로서 투여된다.

[0106] 조합 용도의 일부 양태에서, 환자는 면역 체크포인트 억제제에 대한 불내성인 것으로 이전에 알려져 있지 않다. 조합 용도의 일부 양태에서, 환자는 체크포인트 억제제 요법에 과민증이 있는 것으로 알려져 있지 않다. 조합 용도의 일부 양태에서, 환자는 이전에 장기 이식을 받은 적이 없다. 조합 용도의 일부 양태에서, 환자는 이전에 임상적으로 관련된 면역결핍으로 진단되지 않는다. 조합 용도의 일부 양태에서, 환자는 치료가 필요한 활동성 전신 감염을 갖지 않는다. 조합 용도의 일부 양태에서, 환자는 1일 10mg 이상의 프레드니손 등가물 또는 기타 강력한 면역억제제를 복용하지 않는다. 조합 용도의 일부 양태에서, 환자는 탈모증 또는 백반증을 제외하고 자가면역 질환의 병력을 갖지 않는다. 조합 용도의 일부 양태에서, 환자는 간질성 폐질환의 병력을 갖지 않는다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0107] 실시예

[0108] 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것이며 이에 대한 제한으로 해석되어서는 안 된다. 달리 명시되지 않는 한, 모든 아미노산은 L-배위로 사용되었다.

[0109] 실시예 1. BT5528 동결건조 의약품의 제조

[0110] 공정 평가를 먼저 수행한 다음 후보 제형에 대한 열 평가를 수행하였다. 관련 안정성과 동결건조 시험에 착수한 다음 동결건조 주기 최적화, 추가 제형 스크리닝 및 여과 평가를 수행하였다.

[0111] 1. BT5528 공정 평가 및 동결/해동 안정성

[0112] 벌크 용액 외관, pH, 밀도 및 BT5528 분석/관련 물질을 기록하였다. 추가 샘플은 3회의 동결(-20℃)/해동 주기를 거쳐 각 주기 후에 외관, pH, UPLC 및 육안으로 보이지 않는 미립자(MFI)를 평가하였다.

[0113] 1.1. 용액 제조

[0114] 14g의 WFI(70% w/v)를 작은 유리 비이커에 칭량 부가하고, 이에 104mg의 히스티딘 HCl을 칭량하고 행구면서 첨가한 다음 용해될 때까지 교반하였다. 일단 용해되면, 수크로스 1.2g을 칭량하여 첨가한 다음 용해될 때까지 자기적으로 교반하였다. 용액의 pH를 측정하고 목표(pH 7.7 내지 8.1)로 조정하였다. 초기 pH는 3.42 pH였고 0.1M NaOH 용액을 사용하여 pH 8.07로 조정하였다.

[0115] 1% (w/v) 폴리소르베이트 20 용액은 50mL의 WFI에 0.5g의 폴리소르베이트 20을 용해시켜 제조하였다. 400 µL의 1% (w/v) 폴리소르베이트 20 용액을 교반하면서 히스티딘/수크로스 용액에 첨가하였다. 86.8mg의 BT5528을 칭량하고 연속 교반하면서 용액에 천천히 첨가하였다. API의 완전한 용해에는 약 90분이 소요되었다.

[0116] 용액의 pH를 측정하고 목표(pH 6.8 내지 7.2)로 조정하였다. API 첨가 후 pH는 7.79 pH였고 0.1 M HCl 용액을 사용하여 pH 7.19로 조정하였다. 용액을 20mL 부피측정 플라스크로 옮기고 WFI로 최종 용적으로 되게 만들었다. 용액을 단일 0.22 µm, PES 막 주사기 필터를 통해 여과하였다. 최종 용액은 눈에 보이는 미립자가 없는 투명한 무색 용액이었다. 최종 용액의 밀도는 1.025g/cm³로 측정되었다. 여과전 및 여과후 샘플을 HPLC 분석을 위해 분석에 통과시켰다. 나머지 벌크 용액을 2mL 용적으로 2mL 유리 바이알에 채우고 3회의 동결/해동 주기를 거쳤다.

[0117] 1.2. 결과

[0118] 1.2.1. 외관 및 pH

[0119] 3회의 동결/해동 주기 동안 외관 또는 pH에는 유의한 변화가 없었다.

[0120] 표 1-1. 용액 외관 및 pH

시점/보관	외관	pH
여과전	눈에 보이는 미립자가 없는 투명한 무색 용액	7.2
여과후	눈에 보이는 미립자가 없는 투명한 무색 용액	N/A
동결 해동 주기 1	눈에 보이는 미립자가 없는 투명한 무색 용액	7.3
동결 해동 주기 2	눈에 보이는 미립자가 없는 투명한 무색 용액	7.3
동결 해동 주기 3	눈에 보이는 미립자가 없는 투명한 무색 용액	7.3

[0121]

[0122] 1.2.2. 분석 및 관련 물질

[0123] 결과는 여과전 및 여과후 동안 분석 또는 관련 물질에 변화가 없음을 보여준다. 또한 동결/해동 평가 동안 분석 또는 관련 물질의 변화가 없었다.

[0124] 표 1-2. 분석

시점/보관	바이알 1 함량 (mg/mL)	바이알 2 함량 (mg/mL)	평균 함량 (mg/mL)	재구성/이론치 ¹ (%)	재구성/전 ² (%)
여과전	3.8259	3.8287	3.83	95.68	-
여과후	3.8249	3.8305	3.83	95.69	100.01
동결 해동 주기 1	3.8189	3.8102	3.81	95.36	99.67
동결 해동 주기 2	3.8021	3.8316	3.82	95.42	99.73
동결 해동 주기 3	3.8297	3.8241	3.83	95.67	99.99

¹ 이론치 4mg/ml의 백분율로서

² 여과전 결과의 백분율로서

[0125]

[0126] 표 1-3. 관련 물질

RRT	샘플 및 양 (면적%)				
	여과전	여과후	동결 해동 주기 1	동결 해동 주기 2	동결 해동 주기 3
0.97	0.12	0.13	0.11	0.11	0.11
0.99	2.20	2.18	2.18	2.19	2.16
1.03	0.98	0.97	0.97	0.94	1.00
1.05	0.21	0.22	0.17	0.16	0.20
1.12	0.10	<LOQ	<LOQ	0.10	<LOQ
1.15	0.12	0.12	0.14	0.13	0.13
총합 ¹	3.73	3.62	3.57	3.63	3.60

¹ 관련 물질의 합 ≥0.10%

[0127]

[0128] 1.3. 논의 및 결론

[0129] 여과 동안 분석 손실이 없었으며, 이는 API가 PES 막에 흡착되지 않음을 나타낸다. 분석 및 관련 물질 데이터는 바이알을 3회의 동결/해동 주기에 적용한 후에 변하지 않았으며, 이는 API가 동결/해동 주기 동안 안정함을 입증한다.

[0130] 2. 단계 3 - 열적 평가

[0131] BT5528 제형의 열적 특성은 동결건조 주기의 설계에 영향을 미치는 붕괴 온도 또는 열적 현상을 식별하기 위해 동결 건조 현미경법(FDM) 및 시차 주사 열량법(DSC)으로 평가하였다.

[0132] 제형 세부 사항은 표 1-4에 나타내어져 있다. 활성 및 위약 제형의 열적 특성을 평가함으로써, 동결 건조 주기에 대한 매개변수를 결정할 수 있었다.

[0133] 표 1-4. 제형 조성

성분	농도 (mg/mL)
BT5528	4.0
히스티딘 HCl	5.24
수크로스	60.0
폴리소르베이트 20	0.2
수산화나트륨	목표 pH가 되도록 q.s.
WFI	1mL가 되도록 q.s.

[0134]

[0135] 2.1. 동결 건조 현미경(FDM)

[0136] FDM을 사용하여 제형의 붕괴 온도를 결정하였다. FDM 주기 설정점 매개변수를 개선하기 위해 여러 샘플을 분석하였다. 각 분석은 명시야 투과광을 갖는 10x 대물 렌즈를 사용하여 수행하였다. 수행된 각 분석으로부터의 주요 관찰 결과는 표 1-5에 나타내어져 있다.

[0137] 표 1-5. FDM에 의한 열적 관찰

실행	동결 (°C)	붕괴 개시 (°C)	붕괴 (°C)
1	-29.5	-32.7	-30.2
2	-28.2	-32.5	-29.3
3	-28.2	-31.7	-30.2
4	-28.2	-31.9	-30.4

[0138]

[0139] 샘플 구조의 미묘한 변화, 예를 들어 불명확한 건조 전면은 샘플 붕괴의 첫 징후로 언급되었으며 그 다음에는 명점이 나타난다. 이러한 시각적 관찰은 붕괴의 시작으로 해석되었다. 샘플 전체에 퍼져 있는 더 큰 밝은 영역이 발달함에 따라 구조의 추가 손실이 명백하였다. 이 영역은 후속적으로 갈라진 틈을 형성하여 심각한 붕괴를 초래하였다. 이러한 상호-연결된 밝은 영역/갈라진 틈의 발생은 제품의 붕괴로 간주되었다.

[0140] 2.2. 시차 주사 열량법(DSC)

[0141] FDM에 추가하여, 제형을 표 1-6에 표시된 매개변수를 사용하여 DSC에 의해 분석하였다. 주요 관찰 사항의 요약은 표 1-7에 나타내어져 있다.

[0142] 표 1-6. 어닐링 처리를 하지 않은 경우에 대한 DSC 설정값 매개변수

매개변수	설정
주기	1°C/분으로 25°C에서 -50°C로, -50°C에서 10분 유지, 1°C/분으로 -50°C에서 25°C로
도가니	100µL 알루미늄 밀봉
참조 샘플	비어있는 도가니
퍼지 가스	60mL/분 N ₂
건설성 가스	170 mL/분 N ₂

[0143]

[0144] 표 1-7. DSC 써모그램의 주요 관찰

관찰사항	온도 (°C)	
	동결 개시	-9.69
유리 전이/공용 용융	검출되지 않음	검출되지 않음
용융 개시	-13.21	-10.72

[0145]

[0146] DSC는 크고 잘 정의된 동결 발열과 용융 흡열을 보여주었다. 다른 주목할만한 열적 현상은 관찰되지 않았다.

[0147] **2.2.1. 논의 및 결론**

[0148] FDM 및 DSC에 의해 생성된 데이터는 동결건조 주기의 설계를 지원하는데 사용되었다. 이 온도는 1차 건조 동안 동결 온도 및 최고 허용 제품 온도(highest permissible product temperature)의 조짐을 보인다. 제형의 붕괴 온도는 대략 -30°C였으며, 이 온도는 동결건조 주기의 1차 건조 온도를 결정할 것이다.

[0149] 열 평가의 결과에 기초하여, 동결건조 주기는 1차 건조 동안 붕괴 온도보다 5-10°C 낮은 제품 온도를 유지하는 것을 목표로 하며, 이 경우 대략 -30°C이다.

[0150] **3. 단계 5 - 동결건조 시험**

[0151] BT5528 제형의 열적 특성은 단계 4 - 열 평가에서 결정되었다. 단계 4에서 생성된 열 데이터는 대략 -30°C의 붕괴 온도를 나타내었다.

[0152] 이러한 데이터에 기반하여, 표 1-8에 자세히 설명된 동결건조 주기 시험은 제품 온도를 붕괴 온도보다 5-10°C 낮게 유지하도록 설계되었다. 표 1-9 및 재구성 안정성 평가에 자세히 설명된 바와 같이 동결건조된 제품의 안정성 연구를 지원하기에 충분한 바이알을 준비하였다. 4mg/mL의 용액을 1mL의 용적으로 2mL의 투명한 유형 I 유리 바이알에 채웠다. 동결건조된 제품은 1mL의 WFI로 재구성되어 4mg/mL의 목표 농도를 달성하였다. 활성 바이알 바로 주변 영역은 전체 챔버의 조건을 보다 가깝게 모방하기 위해 1mL의 완충 용액을 함유하는 바이알로 채워졌다.

[0153] **3.1. 용액 제조**

[0154] ~80mL의 WFI(~70% w/v 최종 용적)를 628.8mg의 히스티딘 HCl이 첨가된 유리 비이커에 첨가하고 용해될 때까지 자기적으로 교반하였다. 일단 용해되면, 7.2g의 수크로스를 칭량하고 WFI/히스티딘 용액에 첨가한 다음 용해될 때까지 교반하였다. 용액의 pH를 측정하고 0.1M 수산화나트륨으로 목표(pH 7.7-8.1)로 조정하였다. 초기 pH는 3.93 pH였으며 pH 7.74로 조정되었다.

[0155] 1% (w/v) 폴리소르베이트 20 용액은 0.5g의 폴리소르베이트 20을 50mL의 WFI에 용해시켜 제조하였다. 2.4mL의 1% (w/v) 폴리소르베이트 20 용액을 교반하면서 히스티딘/수크로스 용액에 첨가하였다. 615mg의 BT5528을 칭량하고 연속 교반하면서 용액에 천천히 첨가하였다. BT5528의 완전한 용해에는 약 120분이 소요되었다. 90분 교반 후 API는 비이커의 바닥 측면 모두에 부착된 것으로 보였다. 추가로 30분의 교반 시간으로 눈에 보이는 미립자가 없는 무색 용액이 생성되었다.

[0156] 용액의 pH를 측정하고 0.1M 염산으로 목표(pH 6.8-7.2)로 조정하였다. API 첨가 후 pH는 pH 7.83이었고 0.1M HCl 용액을 사용하여 pH 7.10으로 조정하였다. 용액을 완전히는 아니지만 100mL 및 20mL 부피측정 플라스크에 옮기고 WFI로 최종 용적으로 만든 다음 원래 비이커에 다시 넣고 혼합되도록 교반하였다.

[0157] 용액의 샘플을 여과전 수집하고 나머지는 단일 0.22 µm PES 주사기 필터를 통해 여과하였으며, 분석을 위해 여과후 샘플을 수집하였다. 여액은 눈에 보이는 미립자가 없이 무색 투명하였다.

[0158] **3.2. 동결건조**

[0159] 용액을 1mL의 용적으로 2mL 바이알에 채우고 13mm 동결 건조 마개를 사용하여 부분적으로 마개를 막았다. 중앙

과 전면에 위치한 단일 바이알을 주기 전반에 걸쳐 제품 온도를 모니터링하기 위해 조사하였다. 바이알 주변 영역은 1mL의 위약 용액을 함유하는 2mL 바이알로 채워졌다. 바이알을 표 1-8의 주기를 사용하여 동결건조시켰다.

[0160] 주기의 진행은 선반 및 제품 온도(열전대 프로브)와 Pirani 게이지 및 정전용량 압력계로 측정된 챔버 압력을 기반으로 하여 모니터링하였다.

[0161] 표 1-8. 동결건조 주기

단계	주기 단계	온도 (°C)	압력 (mTorr)	시간(분)	램프 속도(°C/분)
1	부하	5	N/A	N/A	N/A
2	유지	5	N/A	30	N/A
3	램프	-40	N/A	180	0.25
4	동결	-40	N/A	180	N/A
5	추가 동결	-40	100	30	N/A
6	램프	-25	100	75	0.20
7	1차 건조	-25	100	3701	N/A
8	램프	25	20	250	0.20
9	2차 건조	25	20	866	N/A
10	종료	바이알을 (순수) 질소로 722,000 mTorr가 되도록 마개를 막음			
총 주기 지속시간 ~89시간(-3.7일)					

[0162]

[0163] 동결건조된 플러그는 백색이었고, 붕괴 징후 없이 잘 형성되었다. 충전 높이에서 수축이 관찰되었지만, 이것이 동결건조된 플러그의 구조에 영향을 미쳤다는 징후는 없었다.

[0164] 동결건조된 제품을 안정 상태에 놓고 25°C/60% RH의 가속 저장에서 1개월(표 1-9에 따름) 동안 시험하였다. 동결건조된 제품을 외관, 수분 함량, 및 UPLC에 의한 분석 및 관련 물질에 의해 평가하였다. 재구성된 제품을 재구성 시간, 용액 외관, pH 및 육안으로 보이지 않는 미립자(T = 0 단독)에 기반하여 평가하였다.

[0165] 표. 1-9. 건조된 제품의 평가

시험	T = 0 (wks)	T = 1 (wks)	T = 2 (wks)	T = 4 (wks)
UPLC 동결건조-전	✓	n.a.	n.a.	n.a.
칼 피서 적정	✓	-	✓	✓
UPLC	✓	✓	✓	✓
재구성 시간 ¹	✓	-	✓	✓
재구성된 pH ¹	✓	-	✓	✓
육안으로 보이지 않는 미립자	✓	-	-	-

¹ 1mL WFI로 재구성됨

[0166]

3.3. 결과

[0167]

3.3.1. 동결건조물의 외관

[0168]

[0169] 안정성 연구 동안 동결건조물의 외관은 표 1-10에 기록되어 있다.

[0170]

[0171] 표 1-10. 동결건조물의 외관, 001/BCL/18

시점/보관	외관
초기 (T = 0)	약간의 수축의 징후가 있는 백색 동결건조된 케이크
25°C/60%RH	
T = 1 wk	
T = 2 wk	수축의 징후가 있는 백색 동결건조된 케이크
T = 4 wk	수축의 징후가 있는 백색 동결건조된 케이크

[0172]

[0173] 표 1-11. 외관, 재구성 시간 및 pH, 001/BCL/18

시점/보관	재구성 시간 (secs.)	외관	pH
초기 (T = 0)	108 ¹	눈에 보이는 미립자가 없는 투명한 무색 용액	7.1
25°C/60%RH			
T = 1 wk	-		-
T = 2 wk	529 ²	눈에 보이는 미립자가 없는 투명한 무색 용액	7.1
T = 4 wk ³	386		
	409	투명한 무색 용액, 바이알 바닥에 얼룩이 눈에 뵈	7.1

¹ 재구성시 바이알 바닥에 두꺼운 백색 거품이 분명하였다. 이것은 향후 시점에서 모니터링되어야 한다.

² 재구성시 바이알을 몇 분 동안 휘저은 다음 남은 시간 동안 벤치에 정치시켰다. 작은 유성 반점이 바이알 바닥에 나타났으며, 백색 고체는 보이지 않았다.

³ 재구성시 바이알을 몇 분 동안 휘저은 다음 남은 시간 동안 벤치에 정치시켰다. 잠재적 제품의 반점이 여전히 바이알 바닥에 붙어 있는 것이 나타났다. 그후 추가 바이알을 재구성 실험을 수행하기 위해 사용하였다. 바이알을 30 분 동안 정치시켰지만 반점은 여전히 존재하였다. 재구성 분석 동안 휘저음 및 침강의 각 단계에서 사진을 찍었으나, 작은 증점 응적으로 인해 반점의 존재를 표시하기 어려웠다.

[0174]

3.3.3. 수분 함량

[0175]

[0175] 표 1-12. 수분 함량, 001/BCL/18

시점/보관		수분 (%)
초기 (T=0)		1.94 ¹
25°C/60%RH	T = 1 wk	-
	T = 2 wk	1.44
	T = 4 wk	2.11 ¹

¹T=0 및 T=4 주 시점에서 수분 함량에 대해 큰 변화가 주지되었다. 이에 관해 클라이언트가 T=0 에서 연락하였다. 변화는 동결 건조 내 바이알 위치의 차이 및 수동 충전 용적의 차이로 인한 것일 수 있다.

[0176]

[0177] 3.3.4. 육안으로 보이지 않는 미립자

[0178] 표 1-13. 육안으로 보이지 않는 미립자, 001/BCL/18

시점/보관		수/바이알 ¹		통과/실패 ²
		≥10 μm	≥25 μm	
초기 (T=0)		45	1	통과
25°C/60%RH	T = 1 wk	-	-	-
	T = 2 wk	-	-	-
	T = 4 wk	-	-	-

¹충전 용적이 1mL 인 경우

²바이알당 직경 ≥10μm의 입자 수 < 6000 = 통과, 바이알당 직경 ≥25μm의 입자 수 < 600 = 통과

[0179]

[0180] 3.3.5. 동결건조 전 분석

[0181] 표 1-14. 여과 전 및 후 벌크 용액 분석, 001/BCL/18

시점/보관	함량 (mg/mL)	재구성/이론치 ¹ (%)	재구성/전 ² (%)
여과전	3.79	94.8	-
여과후	3.65	91.3	96.3

¹이론치 4mg/ml의 백분율로서

²여과전 결과의 백분율로서

[0182]

[0183] 3.3.6. 동결건조 전 관련 물질

[0184] 표 1-15. 동결건조 전 및 후 관련 물질

RRT	샘플 및 양 (면적%)	
	여과전	여과후
0.96	0.36	0.26
0.96	1.65	1.61
1.07	0.58	0.51
1.08	0.38	0.36
1.20	0.11	0.14
1.27	0.16	0.11
1.29	0.13	0.11
Total ¹	3.37	3.10

¹관련 물질의 합 ≥0.10%

[0185]

[0186] 3.3.7. 분석(바이알 함량)

[0187] 표 1-16. 분석, 001/BCL/18

시점/보관		바이알 1 (mg/vial)	바이알 2 (mg/vial)	평균 함량 (mg/vial)	재구성/이론치 ¹ (%)	재구성/T=0 ² (%)
초기 (T=0)		3.7302	3.7607	3.75	93.6	-
25°C/60%RH	T = 1 wk	3.7816	3.7132	3.75	93.7	99.9
	T = 2 wk	3.8873	3.7879	3.84	95.9	102.3
	T = 4 wk	3.8077	3.8044	3.81	95.2	101.5

¹이론치 5mg/바이알의 백분율로서

²초기(T=0) 결과의 백분율로서

[0188]

[0189] 3.3.8. 관련 물질

[0190] 표 1-17. 순도/관련 물질 (면적%), 25°C/60%RH

RRT	시점 및 양 (면적%)			
	처음 (T = 0)	1 wk	2 wk	4 wk
0.96	0.31	0.10	<LOQ	0.28
0.98	1.65	1.30	1.46	1.59
1.07	0.58	0.69	ND	0.49
1.08	0.39	0.53	0.66	0.75
1.14	ND	ND	0.14	ND
1.27	0.14	ND	ND	0.13
1.28	0.12	0.21	0.21	0.16
1.43	ND	ND	ND	0.11
합계 ¹	3.19	2.83	2.47	3.51

¹ 관련 물질의 합 ≥ 0.10%

[0191]

[0192]

3.3.9. 논의 및 결론

[0193]

시험 동결건조를 위한 주기 매개변수는 리드 제형에 적합한 것으로 밝혀졌다; 동결건조된 플러그는 백색이었고 약간의 수축이 있었다. 25°C/60% RH에서 4주간 안정한 동결건조된 플러그의 외관에는 변화가 없었다. 재구성된 용액의 pH는 연구 과정 동안 pH 7.1로 유지되었지만, 재구성 시간에 변동이 있었고 바이알 표면에 유성 점착이 주지되었다. 재구성 절차 및 재구성된 제품의 외관은 동결건조 주기 최적화 동안 추가로 조사될 것이다.

[0194]

분석 값은 4주 안정성 연구에 걸쳐 일관되게 유지되었지만, 농도는 이론치의 93-95%였음을 유지해야 한다. 결과로서 여과전에도 낮았으며, 이는 여과 손실과 대조적으로 배합 동안 유리 제품에 API의 흡착을 시사한다.

[0195]

관련 물질 데이터는 T = 0 및 T = 4주에서 각각 3.19% 및 3.51%로 필적했지만, 관련 물질 데이터에는 2.47에서 3.51%로 변동성의 정도가 있었다.

[0196]

리드 제형은 25°C/60% RH에서 저장할 때 안정한 것으로 나타났으므로 동결건조 주기 최적화로 진행되었다.

[0197]

4. 단계 6 - 동결건조 주기 최적화

[0198]

시험 동결건조 주기로부터 생성된 동결건조 제품에 대한 안정성 데이터는 25°C/60% RH에서 저장하는 동안 제품이 안정하다는 것을 보여주었다. 1차 최적화 주기 실행은 1차 건조 기간을 줄이는 것을 목표로 하여 -20°C의 1차 건조 선반 온도를 사용하였다.

[0199]

소수의 바이알을 채워서(18), 동결건조된 제품의 시험 및 재구성 안정성 평가를 위한 충분한 바이알 수를 제공하였다.

[0200]

4mg/mL의 용액을 5.3mL의 용적으로 10mL의 투명한 유형 I 유리 바이알에 채웠다. 동결건조된 제품을 5.3mL의 WFI로 재구성하여 4mg/mL의 목표 농도를 달성하였다.

[0201]

테스트 동결건조 안정성 동안 관찰된 바와 같이 소수성 코팅의 사용이 바이알 표면에 대한 제품의 흡착을 방지하는지 평가하기 위해, 2mL TopLyo™ 바이알을 또한 사용하였다. 소수의 바이알(5)을 0.5mL 용적으로 채우고 동일한 주기로 동결건조하였다.

[0202]

4.1. 동결건조 최적화 주기 1

[0203]

4.1.1. 용액 제조

[0204]

150mL 벌크 용액을 다음과 같이 제조하였다:

[0205]

대략 100mL의 WFI를 자기 교반 막대를 포함하는 200mL 비이커에 첨가하고, 이에 786.3mg의 히스티딘 HCl을 행구면서 첨가하고 5분이 소요되는 용해될 때까지 교반하였다.

[0206]

일단 용해되면, 9.0004g의 수크로스를 칭량하고 행구면서 비이커에 첨가한 다음 용해될 때까지 자기적으로 교반하였다. 용액을 수크로스가 완전히 용해될 때까지 5분 동안 교반하였다.

[0207]

용액의 pH를 측정하고 3mL의 1%(w/v) 폴리소르베이트 20을 첨가하기 전에 1M 수산화나트륨으로 pH 7.7-8.1의 목표 pH로 조정하였다. 용액을 균질해질 때까지 5분 동안 교반하였다.

[0208]

651mg의 BT5528을 칭량하고 행구면서 배합 용기에 천천히 첨가하였다. 용액을 90분 동안 자기적으로 교반하였으며, 소량의 API가 비이커의 표면에 흡착된 것으로 보였다. API는 완전히 용해되기 전에 초기에 용해 과정 동안 응집되는 것으로 보인다는 것을 주지해야 한다.

[0209]

용액의 pH를 측정하고 0.1M HCl을 사용하여 pH 7.03으로 조정하였다(목표 pH는 pH 6.8-7.2임). 그후 용액을 완

전히는 아니지만 100mL 및 50mL 부피측정 플라스크로 옮기고, WFI로 용적으로 되게 만들었다. 용액을 원래의 바이커로 되돌리고 혼합되도록 교반하였다.

[0210] 용액을 분석을 위해 수집된 여과전 및 여과후 샘플과 함께 단일 0.22 μm PES 주사기 필터를 통해 여과하였다. 생성된 여액은 눈에 보이는 미립자가 없는 투명한 무색 용액이었다.

[0211] **4.1.2. 동결건조**

[0212] 용액을 5.3mL의 용적으로 10mL 유형 I 투명 유리 바이알에 채우고 0.5mL의 용적으로 표준 및 TopLyo™(실란 처리된 바이알) 둘 다에 채워 소수성 표면의 사용이 표면에 대한 BT5528의 흡착을 감소시켰는지를 알아보았다.

[0213] 트레이 중앙에 위치한 단일 바이알을 주기 전반에 걸쳐 제품 온도를 모니터링하기 위해 조사하였다. 1차 및 2차 건조의 중점을 결정하기 위해 온도(선반/제품 프로브) 및 챔버 압력(정전용량 압력계/Pirani 게이지)에 기반하여 주기의 진행을 모니터링하였다.

[0214] 바이알을 표 1-18의 주기를 사용하여 선반에서 직접 동결건조시켰다.

[0215] 표 1-18. 동결건조 주기

단계	주기 단계	온도 (°C)	압력 (mTorr)	시간(분)	램프 속도 (°C/분)
1	부하	5	N/A	N/A	N/A
2	유지	5	N/A	30	N/A
3	램프	-40	N/A	180	0.25
4	동결	-40	N/A	180	N/A
5	추가 동결	-40	100	30	N/A
6	램프	-20	100	100	0.20
7	1차 건조	-20	100	4658	N/A
8	램프	25	20	225	0.20
9	2차 건조	25	20	368	N/A
10	종료	바이알을 (순수) 질소로 722,000 mTorr가 되도록 마개를 막음			
총 주기 지속시간 ~96.2시간(~4일)					

[0216]

[0217] 동결건조된 플러그는 백색이었고 잘 형성되었으며 약간의 수축이 있었다. 수축은 1차 건조 온도가 -25°C인 시험 동결건조 주기에서도 관찰되었기 때문에 제형의 고유 특징인 것으로 보인다. TopLyo™ 바이알의 동결건조된 플러그는 전체적인 붕괴를 보였으며, 따라서 제품을 시험하는 것은 불가능하였다. 붕괴는 2mL 바이알의 0.5mL 충전에 비해 10mL 바이알의 5.3mL 충전 용적의 연장된 건조 시간으로 인해 제품 온도가 붕괴 온도 이상으로 증가하기 때문일 것 같다.

[0218] **4.1.3. 결과**

[0219] 배치 세부 사항은 표 1-19에 나타내어져 있다. 배치 002/BCL/18은 최적화 주기 1에서 동결건조되었다.

[0220] 표 1-19. 의약품 조성 (배치 번호 및 제형 세부정보)

002/BCL/18	4mg/mL BT5528, 5.24 mg/mL 허스티딘 HCl, 60 mg/mL 슈크로스, 0.2 mg/mL 폴리소르베이트 20 (5.3mL 충전 - 21.2mg 바이알)
------------	---

[0221]

[0222] **4.1.3.1. 용액의 외관, pH 및 재구성 시간**

[0223] 표 1-20. 용액의 외관, pH 및 재구성 시간

샘플	외관	pH	재구성 시간(분)
002/BCL/18	눈에 보이는 입자가 없는 투명한 무색 용액	7.1	12.03 ¹

[0224] ¹ 재구성하기 위해서는 격렬한 진탕이 필요하였다. 기록된 시간이 지난 후 큰 덩어리는 남아 있지 않았지만 물질의 유성 침전물을 여전히 볼 수 있었으며, 이는 제품이 바이알에 붙어 있음을 시사한다. 도 1. 완전한 용해를 얻기 위해서는 와류 혼합이 필요하였다.

[0225] 표 1-21. 동결건조된 플러그의 외관

샘플	외관
002/BCL/18	분명한 수축을 갖는 균질한 백색 동결건조된 케이크

[0226]

[0227] **4.1.3.2. 육안으로 보이지 않는 미립자**

[0228] 표 1-22. 육안으로 보이지 않는 미립자

샘플	10 μm (수/바이알) ¹	25 μm (수/바이알) ¹	통과/실패 ²
002/BCL/18	173	4	Pass

¹ 충전 용적이 5.3mL 인 경우

² 바이알당 직경 ≥10μm의 입자 수 ≤ 6000 = 통과, 바이알당 직경 ≥25μm의 입자 수 ≤ 600 = 통과

[0229]

[0230] 4.1.3.3. 수분 함량

[0231] 표 1-23. 물 함량

샘플	평균 물 (%w/w)
002/BCL/18	2.50

[0232]

[0233] 4.1.3.4. 분석(바이알 함량)

[0234] 표 1-24. 분석

샘플	여과전 분석 (mg/mL)	여과후 분석 (mg/mL)	재구성후 /이른치 ¹ (%)	분석 (mg/mL)	재구성/이른치 ¹ (%)	재구성/후 ² (%)
002/BCL/18	바이알 1	4.2092	4.0521	96.27	4.2369	105.92
	바이알 2				4.1854	104.63
						104.56
						103.29

¹ 이른치 4mg/mL의 백분율로서

² 여과후 결과의 백분율로서

[0235]

[0236] 4.1.3.5. 순도/관련 물질

[0237] 표 1-25. 순도/관련 물질

RRT	양(면적/면적 %)		
	여과전	여과후	002/BCL/18
0.97	0.92	0.90	0.86
0.98	1.78	1.40	1.75
BT5528	96.07	96.40	96.17
1.09	0.76	0.85	0.78
1.16	0.13	0.14	0.11
1.27	0.11	0.10	0.12
1.30	0.16	0.15	0.15
총합 ¹	3.86	3.54	3.77

¹ 관련 물질의 합 ≥0.10%

[0238]

[0239] 4.1.4. 논의 및 결론

[0240] 동결건조된 플러그의 외관은 1차 건조 온도가 -20℃로 리드 제형에 적합하였으며 1차 건조의 초기 단계 동안 제품 온도를 붕괴 온도 미만으로 유지한다는 것을 보여주었다. 온도는 건조가 거의 완료됨에 따라 1차 건조가 끝날 무렵 붕괴 온도를 초과하였다. 2차 최적화 주기의 경우 제품 붕괴의 징후가 없었으므로 1차 건조 온도를 -15℃로 추가로 높이는 것이 권장된다.

[0241] 동결건조된 제품의 재구성은 재구성에 필요한 유성 점적 형성 와류 혼합이 있는 시험 동결건조 제품과 유사하였다. 와류의 사용은 제형 중의 폴리소르베이트 20의 존재로 인해 제품의 과도한 거품을 야기하였다. 재구성 시간은 대략 12분으로 목표 시간인 10분을 초과하였다.

[0242] 분석 값은 목표치에 있었으며, 이는 배합 동안 또는 여과 동안 유리 제품에 대한 흡착으로 인한 API 손실이 없음을 나타낸다. 순도/관련 물질 데이터는 여과전 및 여과후에 대해 동결건조후와 유사하였다.

[0243] 4.2. 동결건조 최적화 주기 2

[0244] 1차 최적화 주기 실행은 -20℃의 1차 건조 선반 온도를 사용하여 1차 건조 기간을 줄였다. 동결건조된 제품은 백색이었고, 붕괴의 징후 없이 잘 형성되었다. 따라서 2차 동결건조 주기에서는 1차 건조 기간을 더욱 줄이기 위해 선반 온도를 -15℃로 증가시키는 것이 권장되었다.

[0245] 소수의 바이알을 채워서(18), 동결건조된 제품의 시험을 위한 충분한 바이알 수를 제공하였다.

[0246] 4mg/mL의 용액을 5.3mL의 용적으로 10mL의 투명한 유형 I 유리 바이알에 채웠다. 동결건조된 제품을 5.3mL의 WFI로 재구성하여 4mg/mL의 목표 농도를 달성하였다.

[0247] 시험 동결건조 안정성 동안 관찰된 바와 같이 소수성 코팅의 사용이 바이알 표면에 대한 제품의 흡착을 방지하는지를 평가하기 위해, 2mL TopLyto™ 바이알을 사용하였다. 소수의 바이알(5)을 0.5mL 용적의 용액으로 채우고 동일한 주기로 동결건조시켰다. 사이클 최적화 1 동안 붕괴가 관찰되었고 실란 처리된 코팅의 영향을 평가할 수 없었기 때문에, 코팅이 없는 소수의 2mL 바이알을 또한 TopLyto™ 바이알과 비교하여 채웠다.

[0248] **4.2.1. 용액 제조**

[0249] 120mL 벌크 용액을 다음과 같이 제조하였다.

[0250] 대략 80mL의 WFI를 자기 교반기 막대를 포함하는 200mL 비이커에 첨가하고, 이에 628.8mg의 히스티딘 HCl을 행구면서 첨가하고 5분이 소요되는 용해될 때까지 교반하였다.

[0251] 일단 용해되면, 7.2g의 수크로스를 칭량하고 비이커에 행구면서 첨가한 다음 용해될 때까지 자기적으로 교반하였다. 용액을 수크로스가 완전히 용해될 때까지 5분 동안 교반하였다.

[0252] 용액의 pH를 측정하고 2.4mL의 1%(w/v) 폴리소르베이트 20을 첨가하기 전에 1M 수산화나트륨으로 pH 7.7-8.1의 목표 pH로 조정하였다. 용액을 균질해질 때까지 5분 동안 교반하였다.

[0253] 615mg의 BT5528을 칭량하고 배합 용기에 행구면서 천천히 첨가하였다. 용액을 120분 동안 자기적으로 교반하고, 90분 후에 API가 비이커의 바닥 및 또한 자기 교반기 막대의 표면에 흡착된 것으로 나타났다. 추가 교반 시간으로 미립자가 없는 무색 용액이 생성되었다.

[0254] 용액의 pH를 측정하고 pH 7.1로 조정하였다(목표 pH는 pH 6.8-7.2임). 그후 용액을 완전히는 아니지만 100mL 및 20mL 부피측정 플라스크로 옮기고, WFI로 용적으로 되게 만들었다. 용액을 원래의 비이커로 되돌리고 혼합 되도록 교반하였다.

[0255] 용액을 분석을 위해 수집된 여과전 및 여과후 샘플과 함께 단일 0.22µm PES 주사기 필터를 통해 여과하였다. 생성된 여액은 눈에 보이는 미립자가 없는 투명한 무색 용액이었다.

[0256] **4.2.2. 동결건조**

[0257] 트레이 중앙에 위치한 단일 바이알을 주기 전반에 걸쳐 제품 온도를 모니터링하기 위해 조사하였다. 1차 및 2차 건조의 중점을 결정하기 위해 온도(선반/제품 프로브) 및 압력(정전용량 압력계/Pirani 게이지) 차이에 기반하여 주기의 진행을 모니터링하였다.

[0258] 바이알을 표 1-26의 주기를 사용하여 선반에서 직접 동결건조하였다. 제품 프로브 결함으로 인해, 동결건조 주기 동안 온도 데이터를 얻지 못했다. 1차 및 2차 건조의 완료를 나타내기 위해 Pirani 게이지 및 정전용량 압력계의 수렴을 사용하였다.

[0259] **표 1-26. 동결건조 주기**

단계	주기 단계	온도 (°C)	압력 (mTorr)	시간(분)	램프 속도 (°C/분)	
1	부하	5	N/A	N/A	N/A	
2	유지	5	N/A	30	N/A	
3	램프	-40	N/A	180	0.25	
4	동결	-40	N/A	180	N/A	
5	추가 동결 ¹	-40	100	30	N/A	
6	램프	-15	100	125	0.20	
7	1차 건조	-15	100	300	N/A	
8	램프	25	20	250	0.20	
9	2차 건조	25	20	866	N/A	
10	종료					바이알을 (순수) 질소로 722,000 mTorr가 되도록 마개를 막음
총 주기 지속시간 ~89시간(~3.7일)						

[0260]

[0261] **4.2.3. 결과**

[0262] 배치 세부 사항은 표 1-28에 나타내어져 있다.

[0263] 표 1-27. 의약품 조성(배치 번호 및 제형 세부사항)

003/BCL/18	4mg/mL BT5528, 5.24 mg/mL 히스티딘 HCl, 60 mg/mL 수크로스, 0.2 mg/mL 폴리소르베이트 20 (5.3mL 충전 - 21.2mg 바이알)
------------	---

[0264]

[0265] **4.2.3.1. 용액의 외관, pH 및 재구성 시간**

[0266] 표 1-28. 용액의 외관, pH 재구성 시간

샘플	외관	pH	재구성 시간(분)
003/BCL/18	A clear colourless solution free from visible particles	6.7	11.14

¹ 재구성하기 위해서는 격렬한 진탕이 필요하였다. 기록된 시간이 지난 후 큰 덩어리는 남아 있지 않았지만 물질의 유성 침전물을 여전히 볼 수 있었으며, 이는 제품이 바이알에 붙어 있음을 시사한다. 완전한 용해를 얻기 위해서는 와류 혼합이 필요하였다.

[0267]

[0268] 표 1-29. 동결건조된 플러그의 외관

샘플	외관
003/BCL/18	분명한 수축을 갖는 균질한 백색 동결건조된 케이크

[0269]

[0270] 4.2.3.2. 육안으로 보이지 않는 미립자

[0271] 표 1-30. 육안으로 보이지 않는 미립자

샘플	10 µm (수/바이알) ¹	25 µm (수/바이알) ¹	통과/실패 ²
003/BCL/18	209	4	통과

¹ 충전 용적이 5.3mL 인 경우

² 바이알당 직경 ≥10µm의 입자 수 ≤ 6000 = 통과, 바이알당 직경 ≥25µm의 입자 수 ≤ 600 = 통과

[0272]

[0273] 4.2.3.3. 수분 함량

[0274] 표 1-31. 물 함량

샘플	평균 물 (%w/w)
003/BCL/18	2.13

[0275]

[0276] 4.2.3.4. 분석(바이알 함량)

[0277] 표 1-32. 분석

샘플		여과전 분석 (mg/mL)	여과후 분석 (mg/mL)	재구성후 /이론치 ¹ (%)	분석 (mg/mL)	재구성 /이론치 ¹ (%)	재구성/후 ² (%)
		003/BCL/18	바이알 1	3.9008	3.9849	98.57	102.16
바이알 2	22.6418	4.2720					

¹ 이론치 4mg/mL의 백분율로서

² 여과후 결과의 백분율로서

[0278]

[0279] 4.2.3.5. 순도/관련 물질

[0280] 표 1-33. 순도/관련 물질 배치 003/BCL/18

RRT	양(면적/면적 %)		
	여과전	여과후	003/BCL/18
0.96	0.19	0.19	0.18
BT5528	98.89	98.85	98.83
1.12	0.72	0.81	0.77
총합 ¹	0.91	1.00	1.05

¹ 관련 물질의 합 ≥0.10%

[0281]

[0282] 3.2.4. 논의 및 결론

[0283] 동결건조된 플러그의 외관은 1차 건조 온도가 -15℃로 리드 제형에 적합하였으며 1차 건조의 초기 단계 동안 제품 온도를 붕괴 온도 미만으로 유지한다는 것을 보여주었다. 온도는 건조가 거의 완료됨에 따라 1차 건조가 끝날 무렵 붕괴 온도를 초과하였다.

[0284] 동결건조된 제품의 재구성은 재구성에 필요한 유성 점적 형성 와류 혼합이 있는 시험 동결건조 제품과 유사하였다. 와류의 사용은 제형 중의 폴리소르베이트 20의 존재로 인해 제품의 과도한 거품을 야기하였다. 재구성 시간은 대략 11분으로 목표 시간인 10분을 초과하였다.

[0285] TopLyو™ 바이알에서 동결건조된 플러그의 재구성은 표준 유형 I 투명 유리 2mL 바이알보다 더 길었고 표면에

대한 API의 더 큰 흡착이 관찰되었다. 이것은 실란 처리된 바이알의 사용이 동결건조된 제품에 대한 재구성 또는 분석 회수 값을 개선시키지 않는다는 것을 보여주었다.

[0286] 분석 값은 목표치에 있었으며, 이것은 배합 동안 또는 여과 동안 유리 제품에 대한 흡착으로 인한 API 손실이 없었음을 나타낸다. 순도/관련 물질 데이터는 여과전 및 여과후에 대해 동결 건조 후 유사하였지만, 총 관련 물질은 최적화 주기 1보다 상당히 적었다는 것을 주지해야 한다.

[0287] 수분 함량 값은 동결건조 최적화 주기 1(2.50%(w/w))과 비교할 때 이 주기에서 2.13%(w/w)로 유사하였다.

[0288] 10mL 바이알(21.2mg/바이알 BT5528)에서 동결건조된 제품의 재구성의 평가를 산성 용액을 사용하여 수행하였다. BT5528은 염기성 단백질이기 때문에, pH를 조정하면 재구성이 개선될 가능성이 있다. 더 낮은 완충액 pH를 달성하기 위해 WFI보다 묽은 산을 사용한 재구성이 재구성 후 가용화 속도를 증가시키는 것으로 가정되었다. 산성 용액을 사용한 개선된 재구성은 더 낮은 값(예를 들어, 현재 pH 7.1과 비교하여 pH 6 또는 6.5)으로의 동결 건조 전 제형의 목표 pH의 변화가 WFI 단독으로의 동결건조된 제품의 재구성을 개선한다는 것을 나타낼 것이다.

[0289] 동결건조된 BT5528 제품의 단일 바이알을 5.3mL의 0.01M HCl 또는 0.02M HCl로 재구성하고 15분의 기간에 걸쳐 외관을 주지하였다. 0.02M HCl 용액으로 유성 점적 형성과 관련하여 재구성 시간 및 재구성된 제품의 외관이 개선되었다. 이것은 동결건조된 제품의 보다 산성인 pH가 재구성 특성을 개선할 수 있음을 시사하였다.

[0290] 직면한 재구성 문제에 대한 두 번째 가설은 배합 과정의 결과로서의 제형의 높은 염 농도였다. API 용해 전에 수산화나트륨을 사용하여 pH를 ~pH 3.5에서 pH 7.7-8.1로 조정한 다음 목표 pH 6.8-7.2로 pH 조정을 위해 염산을 사용하였다.

[0291] **5. 히스티딘/pH 평가**

[0292] 재구성을 위한 산성 용액의 사용은 재구성 시간 및 외관을 개선하였다. 더 낮은 pH 사전-동결건조가 재구성 시간 및 분석 결과를 개선하는지를 조사하기 위해, pH 6, pH 6.5 및 pH 7.0에서 3가지 용액을 제조하고, 표 36의 주기를 사용하여 동결건조한 다음 동결건조후를 평가하였다.

[0293] 또한, pH 조정을 위한 수산화나트륨의 사용 및 최종 제품의 염화나트륨 함량을 줄이도록 배합 공정을 수정하였다. BT5528을 첨가하기 전에 제조된 용액의 pH는 조정하지 않았고, API 용해 후에만 조정하였다.

[0294] 제형은 표 1-34에 나타내어져 있다.

[0295] 표 1-34. 히스티딘/pH 제형 조성(배치 번호 및 제형 세부사항)

제형 1	4mg/mL BT5528, 5.24 mg/mL 히스티딘 HCl, 60 mg/mL 수크로스, 0.2 mg/mL 폴리소르베이트 20, pH 6
제형 2	2mg/mL BT5528, 5.24 mg/mL 히스티딘 HCl, 60 mg/mL 수크로스, 0.2 mg/mL 폴리소르베이트 20, pH 6.5
제형 3	2mg/mL BT5528, 5.24 mg/mL 히스티딘 HCl, 60 mg/mL 수크로스, 0.1 mg/mL 폴리소르베이트 20, pH 7

[0296]

[0297] **5.1. 용액 제조**

[0298] 제조된 3가지 제형 각각에 대한 용액 제조 세부사항은 다음과 같았다.

[0299] 제형 1 - 히스티딘 HCl - pH 6

[0300] 대략 35mL의 WFI를 자기 교반기 막대를 함유하는 비이커에 첨가하였다. 이에 262.1mg의 히스티딘 HCl을 행구면서 첨가하고 용해될 때까지 자기적으로 교반하였다. 일단 용해되면, 3.0322g의 수크로스를 칭량하고 행구면서 첨가한 다음 용해될 때까지 교반하였다. 1mL의 1% (w/v) 폴리소르베이트 20 용액을 히스티딘/수크로스 용액에 피펫팅하고 완전한 용해가 달성될 때까지 교반하였다. 용액의 pH는 pH 4.01로 측정되었다.

[0301] 258mg의 BT5528를 칭량하고 천천히 첨가한 다음 완전히 용해될 때까지 90분 동안 교반하였다. 용액의 pH를 측정하고 1M 수산화나트륨을 사용하여 pH 6.02로 조정한 다음 50mL 부피측정 플라스크로 옮기고 WFI로 용적으로 되게 만들었다. 용액을 원래의 비이커로 되돌리고 혼합되도록 교반하였다.

[0302] 용액을 단일 0.22 μm PES 주사기 필터를 통해 여과하였으며, 여액은 눈에 보이는 미립자가 없는 투명한 무색 용액이었다.

[0303] 제형 2 - 히스티딘 HCl - pH 6.5

[0304] 대략 35mL의 WFI를 자기 교반기 막대를 함유하는 비이커에 첨가하였다. 이에 262.2mg의 히스티딘 HCl을 행구면서 첨가하고 용해될 때까지 자기적으로 교반하였다. 일단 용해되면, 3.0360g의 수크로스를 칭량하고 행구면서 첨가한 다음 용해될 때까지 교반하였다. 1mL의 1% (w/v) 폴리소르베이트 20 용액을 히스티딘/수크로스 용액에 피펫팅하고 완전한 용해가 달성될 때까지 교반하였다. 용액의 pH는 pH 4.01로 측정되었다.

[0305] 257mg의 BT5528를 칭량하고 천천히 첨가한 다음 완전히 용해될 때까지 90분 동안 교반하였다. 용액의 pH를 측정하고 1M 수산화나트륨을 사용하여 pH 6.49로 조정한 다음 50mL 부피측정 플라스크로 옮기고 WFI로 용적으로 되게 만들었다. 용액을 원래의 비이커로 되돌리고 혼합되도록 교반하였다. 용액을 단일 0.22 μm PES 주사기 필터를 통해 여과했으며, 여액은 눈에 보이는 미립자가 없는 투명한 무색 용액이었다.

[0306] 제형 3 - 히스티딘 - pH 7

[0307] 대략 35mL의 WFI를 자기 교반기 막대를 함유하는 비이커에 첨가하였다. 이에 262.0mg의 히스티딘을 행구면서 첨가하고 용해될 때까지 자기적으로 교반하였다. 일단 용해되면, 3.0439g의 수크로스를 칭량하고 행구면서 첨가한 다음 용해될 때까지 교반하였다. 1mL의 1% (w/v) 폴리소르베이트 20 용액을 히스티딘/수크로스 용액에 피펫팅하고 완전한 용해가 달성될 때까지 교반하였다. 용액의 pH는 pH 7.73으로 측정되었다.

[0308] 257mg의 BT5528를 칭량하고 천천히 첨가한 다음 완전히 용해될 때까지 90분 동안 교반하였다. 용액의 pH를 측정하고 1M 수산화나트륨을 사용하여 pH 6.97로 조정한 다음 50mL 부피측정 플라스크로 옮기고 WFI로 용적으로 되게 만들었다. 용액을 원래의 비이커로 되돌리고 혼합되도록 교반하였다.

[0309] 용액을 단일 0.22 μm PES 주사기 필터를 통해 여과했으며, 여액은 눈에 보이는 미립자가 없는 투명한 무색 용액이었다.

[0310] **5.2. 동결건조**

[0311] 제조된 3개의 제형 각각을 5.3mL의 용적으로 10mL 유형 I 투명 유리 바이알에 채웠다.

[0312] 바이알을 동결 건조 트레이의 중앙에 적재하고 표 1-35의 주기를 사용하여 선반에서 직접 동결건조시켰다. 1차 및 2차 건조의 종점을 결정하기 위해 온도(선반/제품 프로브) 및 압력(정전용량 압력계/Pirani 게이지) 차이에 기반하여 주기의 진행을 모니터링하였다.

[0313] 표 1-35. 동결건조 주기

단계	주기 단계	온도 (°C)	압력 (mTorr)	시간(분)	랩프 속도 (°C/분)
1	부하	5	N/A	N/A	N/A
2	유지	5	N/A	30	N/A
3	랩프	-40	N/A	180	0.25
4	동결	-40	N/A	180	N/A
5	추가 동결 ¹	-40	100	30	N/A
6	랩프	-15	100	125	0.20
7	1차 건조	-15	100	3739	N/A
8	랩프	25	20	200	0.20
9	2차 건조	25	20	904	N/A
10	종료		바이알을 (순수) 질소로 722,000 mTorr가 되도록 마개를 막음		
총 주기 지속시간 ~90시간(~3.7일)					

[0314]

[0315] **5.3. 결과**

[0316] **5.3.1. 용액의 외관, pH 및 재구성 시간**

[0317] 재구성하기 위해서는, 격렬한 진탕이 필요하였다. 기록된 시간 후, 큰 덩어리가 남아 있지 않았지만 바이알 벽에 물질이 달라붙는 것을 여전히 볼 수 있으며, 이는 제품이 바이알에 부착되었음을 시사한다. 완전한 용해를 얻기 위해서는 와류 혼합이 필요하였다.

[0318] 표 1-36. 용액의 외관, pH 재구성 시간

샘플	외관	pH	재구성 시간(분)
히스티딘 HCl pH 6.0	눈에 보이는 입자가 없는 투명한 무색 용액	6.0	3분 04초
히스티딘 HCl pH 6.5	눈에 보이는 입자가 없는 투명한 무색 용액	6.5	6분 04초
히스티딘 pH 7.0	눈에 보이는 입자가 없는 투명한 무색 용액	7.0	8분 38초

[0319]

[0320] 표 1-37. 동결건조된 플러그의 외관

샘플	외관
히스티딘 HCl pH 6.0	분명한 수축을 갖는 백색 동결건조된 케이크
히스티딘 HCl pH 6.5	분명한 수축을 갖는 백색 동결건조된 케이크
히스티딘 pH 7.0	분명한 수축을 갖는 백색 동결건조된 케이크

[0321]

[0322] 5.3.2. 분석(바이알 함량)

[0323] 표 1-38. 분석

샘플		여과전 분석 (mg/mL)	여과후 분석 (mg/mL)	재구성후/이론치 ¹ (%)	재구성후/전 (%)	분석 (mg/바이알)	재구성/이론치 (%)	재구성/후 ² (%)
	바이알2	3.9510	98.78	91.78				
pH 6.5	바이알1	4.2583	4.2805	107.01	100.52	3.8813	97.03	90.67
						바이알2	3.9095	97.74
pH 7.0	바이알1	4.0259	4.0095	100.24	99.59	3.5649	89.12	88.91
						바이알2	3.6056	90.14

[0324] ¹이론치 4mg/mL의 백분율로서

[0325] ²여과후 결과의 백분율로서

[0325] 5.3.3. 순도/관련 물질

[0326] 표 1-39. 순도/관련 물질 히스티딘 HCl pH 6.0

RRT	양(면적/면적 %)		
	여과전	여과후	히스티딘 HCl pH 6.0
0.96	0.29	0.25	0.33
BT5528	98.50	98.57	98.47
1.12	0.75	0.80	0.69
1.16	0.12	<LOQ	0.12
1.33	0.11	0.13	0.10
총합 ¹	1.27	1.18	1.24

[0327] ¹관련 물질의 합 ≥0.10%

[0328] 표 1-40. 순도/관련 물질. 히스티딘 HCl pH 6.5

RRT	양(면적/면적 %)		
	여과전	여과후	히스티딘 HCl pH 6.5
0.96	0.22	0.17	0.28
BT5528	99.66	98.80	98.24
1.10	ND	0.44	0.48
1.12	0.76	0.44	0.58
1.29	0.10	<LOQ	0.12
1.33	<LOQ	<LOQ	0.10
총합 ¹	1.08	1.05	1.56

[0329] ¹관련 물질의 합 ≥0.10%

[0330] 표 1-41. 순도/관련 물질. 히스티딘 HCl pH 7.0

RRT	양(면적/면적 %)		
	여과전	여과후	히스티딘 HCl pH 7.0
0.94	<LOQ	ND	0.11
0.96	0.30	0.29	0.34
BT5528	98.37	98.41	98.62
1.10	0.45	0.52	ND
1.12	0.65	0.56	0.69
1.33	<LOQ	0.15	0.12
총합 ¹	1.40	1.52	1.26

[0331] ¹관련 물질의 합 ≥0.10%

[0332] 5.3.4. 논의 및 결론

[0333] 3가지 제형에 대한 동결건조된 플러그의 외관은 유사하였으며, 이는 제품 외관에 대한 pH 또는 배합의 영향이 없음을 나타낸다. 동결건조된 플러그의 외관은 시험 동결건조 및 최적화 주기 1 및 2에서와 동일하였다.

[0334] 플러그의 재구성 시간은 pH 6의 경우 3분 4초에서 pH 7.0의 경우 8분 38초로 pH에 따라 증가하였다. 이것은 재구성된 용액의 pH가 재구성 시간에 영향을 미친다는 것을 보여주었다. 또한, 수정된 배합 공정(수산화나트륨 사용 감소)은 이전의 >11분과 비교하여 세 가지 제형에 대해 <9분의 시간으로 재구성 시간을 개선한 것으로 나

타났다. 그러나, 재구성을 달성하기 위해 와류 혼합이 여전히 필요하였으며 바이알 표면에서 유성 점적을 볼 수 있었다. 따라서 pH 및 염의 존재가 바이알 표면에 대한 API의 흡착에 관여하는 유일한 요인은 아니다.

[0335] 3가지 제형에 대한 순도/관련 물질은 유사하였다(표 1-39 내지 표 1-41). 분석 데이터는 여과 동안 BT5528의 흡착 손실이 없음을 보여주었다(표 1-38). pH 7과 비교하여 pH 6에서 더 높은 분석(바이알 함량)이 관찰되었으며, 이는 더 낮은 pH 사전-동결건조가 BT5528 회수를 개선시켰음을 나타낸다.

[0336] pH 7에 비해 pH 6에서 더 짧은 재구성 시간 및 개선된 회수에도 불구하고 유성 점적이 여전히 보였으며, 결과적으로 최종 제품의 수분 함량을 증가시키기 위해 대체 당 및 더 낮은 2차 건조 온도를 평가하는 추가 작업을 수행하였다. BT5528은 수증 양호한 용해도를 갖는 것으로 보고되었으며, 긴 재구성 시간 및 유성 점적 형성은 동결건조 공정 동안 펩티드가 과도하게 건조되었기 때문일 수 있다는 가설을 세웠다. 이것은 수화 겹층(hydration shell)의 손실을 초래하고 동결건조된 제품에서 펩티드 배좌를 변화시켰을 수 있다.

[0337] **6. 당 제형 스크린**

[0338] 동결건조전 제형의 pH 변화는 재구성 동안 바이알 표면에 유성 점적의 형성을 방지하지 않았지만 재구성 시간을 개선하였다(pH 6이 pH 7보다 짧음).

[0339] 최적화 주기 3 동안 동결건조된 제형의 흡착 특성으로 인해, 다양한 당 및 대체 계면활성제를 갖는 5개의 제형을 평가하였다. 제형의 조성은 표 1-42에 나타내어져 있다.

[0340] 섹션 5.3.4에 논의된 바와 같이 제품이 과도하게 건조되어 펩티드 수화 겹층이 제거되었을 수 있다는 가설을 세웠으며, 따라서 당/계면활성제 스크린 외에 더 낮은(0°C) 2차 건조 시간을 또한 조사하였다.

[0341] 표 1-42. 의약품 조성(배치 번호 및 제형 세부사항)

제형 1	4mg/mL BT5528, 5.24 mg/mL 히스티딘 HCl, 60 mg/mL 수크로스, 0.2 mg/mL 폴리소르베이트 20 (5.3mL 충전 — 21.2mg/바이알) 20mL 바이알
제형 2	4mg/mL BT5528, 5.24 mg/mL 히스티딘 HCl, 60 mg/mL 수크로스, 0.2 mg/mL 폴리소르베이트 80 (5.3mL 충전 — 21.2mg/바이알) 10mL 바이알
제형 3	4mg/mL BT5528, 5.24 mg/mL 히스티딘 HCl, 60 mg/mL 수크로스, 0.2 mg/mL 폴리소르베이트 20 (5.3mL 충전 — 21.2mg/바이알) 10mL 바이알
제형 4	4mg/mL BT5528, 5.24 mg/mL 히스티딘 HCl, 60 mg/mL 수크로스, 0.2 mg/mL 폴리소르베이트 20 (5.3mL 충전 — 21.2mg/바이알) 10mL 바이알
제형 5	4mg/mL BT5528, 5.24 mg/mL 히스티딘 HCl, 60 mg/mL 수크로스, 0.2 mg/mL 폴리소르베이트 20 (5.3mL 충전 — 21.2mg/바이알) 20mL 바이알

[0342]

[0343] **6.1. 용액 제조**

[0344] 각각의 제형은 별도로 자세히 설명된 제형 5를 제외하고는 동일한 방식으로 제조하였다. 대략 35mL의 WFI를 자기 교반기 막대를 함유하는 비이커에 첨가하였다. 이에 ~262mg의 히스티딘을 행구면서 첨가하고 용해될 때까지 자기적으로 교반하였다. 일단 용해되면, ~3g의 수크로스/트레할로스/텍스트로스(각각 제형 1-2, 3 및 4)를 칭량하고 행구면서 첨가한 다음 용해될 때까지 교반하였다. 제형 1, 3 및 4의 경우 1mL의 1% (w/v) 폴리소르베이트 20 용액을 히스티딘/수크로스 용액에 피펫팅하고 제형 2의 경우 1mL의 1% (w/v) 폴리소르베이트 80 용액을 피펫팅하였다. 용액을 완전한 용해가 달성될 때까지 교반하였다. 각 용액의 pH를 측정하였다.

[0345] 제형 5는 다음과 같이 제조하였다: 대략 70mL의 WFI를 자기 교반기 막대를 함유하는 비이커에 첨가하였다. 이에 524.9mg의 히스티딘을 행구면서 첨가하고 용해될 때까지 자기적으로 교반하였다. 일단 용해되면, 6.0031g의 수크로스를 칭량하고 행구면서 첨가한 다음 용해될 때까지 교반하였다. 2mL의 1%(w/v) 폴리소르베이트 20 용액을 히스티딘/수크로스 용액에 피펫팅하고 완전한 용해가 달성될 때까지 교반하였다. 용액의 pH를 측정하였다.

[0346] 5가지 제형 각각에, ~257mg의 BT5528을 칭량하고 천천히 첨가한 다음 완전히 용해될 때까지 90분 동안 교반하였다. 첨가/용해 동안 BT5528이 비이커의 측면에 부착되고 외관이 겔과 유사하다는 것을 주지해야 한다. BT5528을 피펫을 사용하여 비이커의 측면으로부터 제거하여 API가 용액에 완전히 용해되도록 하였다. 용액의 pH를 측정하고 1M 수산나트륨으로 pH 6.5로 조정한 다음 50mL(제형 1-4) 또는 100mL(제형 5) 부피측정 플라스크로 옮기고 WFI로 용적으로 되게 만들었다. 용액을 원래의 비이커로 되돌리고 혼합되도록 교반하였다.

[0347] 각 용액을 단일 0.22 μm PES 주사기 필터를 통해 여과하였으며, 여액은 눈에 보이는 미립자가 없는 투명한 무색 용액이었다.

[0348] 표 1-43. 용액 pH (배치 번호, 완충액 pH, 및 최종 pH)

제형 1	7.74	6.51
제형 2	7.75	6.52
제형 3	7.65	6.52
제형 4	7.76	6.51
제형 5	7.75	6.52

[0349]

[0350] 6.2. 동결건조

[0351] 충전된 용액의 용적 및 바이알 유형은 표 1-44에 나타내어져 있다.

[0352] 표 1-44. 바이알 유형 및 충전 용적(배치 번호, 바이알(mL) 및 충전 용적(mL))

제형 1	20	5.3
제형 2	10	5.3
제형 3	10	5.3
제형 4	10	5.3
제형 5	20	10.6

[0353]

[0354] 표 1-45. 동결건조 주기 매개변수

단계	주기 단계	온도 (°C)	압력 (mTorr)	시간 (분)	램프 속도 (°C/분)
1	부하	5	N/A	N/A	N/A
2	유지	5	N/A	30	N/A
3	램프	-40	N/A	180	0.25
4	동결	-40	N/A	180	N/A
5	추가 동결	-40	100	30	N/A
6	램프	-25	100	75	0.20
7	1차 건조	-25	100	6450	N/A
8	램프	0	20	125	0.20
9	2차 건조	0	20	1009	N/A
10	종료		바이알을 (순수) 질소로 722,000 mTorr가 되도록 마개를 막음		
총 주기 지속시간 ~135시간(-5.6일)					

[0355]

[0356] 제형 1로부터의 동결건조된 플러그는 백색이었고, 수축 또는 붕괴의 징후 없이 잘 형성되었으며 균질하였다. 제형 2, 4 및 5에 대한 동결건조된 플러그는 백색이었고 균질했지만 수축의 징후가 있었다.

[0357] 제형 3(트레할로스)은 플러그의 심각한 붕괴 및 멜트백(melt back)을 보였다.

[0358] 트레할로스 및 텍스트로스 제형의 열적 특성은 용액을 동결 건조하기 전에 결정되지 않았으나, 보존적 주기 매개변수가 사용되었다. 문헌에 보고된 트레할로스의 붕괴 온도는 대략 -28°C이며, 이것은 수크로스(-31°C) 및 텍스트로스(-41°C) 둘 다에 대해 보고된 것보다 높으므로 -25°C의 1차 건조 선반 온도가 적합한 것으로 예상되었다. 제품 프로브 데이터는 1차 건조의 초기 단계 동안 제품의 온도가 대략 -38°C임을 보여주었으며 따라서 붕괴될 것으로 예상되지 않았다.

[0359] 텍스트로스를 함유하는 제형 4는 붕괴되지 않아 관찰된 붕괴 원인을 규명할 수 없었다.

[0360] 6.3. 결과

[0361] 6.3.1. 용액의 외관, pH 및 재구성 시간

[0362] 표 1-46. 용액의 외관, pH 재구성 시간

샘플	외관 ¹	pH	재구성 시간 (분)
제형 1 4 mg/mL	투명한 무색 용액, 측벽에 흡착이 나타남.	6.4	1 분 35 초
제형 1 2 mg/mL	투명한 무색 용액, 측벽에 흡착이 나타남.	6.5	3 분 17 초
제형 1 1.3 mg/mL	투명한 무색 용액, 측벽에 흡착이 나타남.	6.5	7 분 27 초
제형 2	투명한 무색 용액, 측벽에 흡착이 나타남.	6.5	5 분 40 초
제형 3	투명한 무색 용액, 케이크가 용해되지 않았음	6.5	16 분 00 초
제형 4	투명한 무색 용액, 측벽에 흡착이 나타남.	6.5	6 분 40 초
제형 5	투명한 무색 용액, 측벽에 흡착이 덜 나타남. ²	6.5	4 분 03 초

[0363]

[0364] 최적화 주기 분석 동안, 모든 제형에 대해 흡착이 주지되었다. 제형 1 내지 4는 의약품이 재구성된 용액 위에 또는 안에서 유리 바이알에 흡착되는 상당한 흡착 특성을 가졌다. 제형 5(2mg/mL BT5528)는 의약품이 용액 약

간 위에서만 흡착되고 용액 내에서 어떠한 흡착도 주지되지 않는 최상의 결과를 생성하였다. 재구성 시간의 변동성은 제형 1의 시험 전반에 걸쳐 편차가 있는 분석 절차에서 파생된다. 이것은 제형 1의 심각한 흡착 특성으로 인해 발생하였다. 4mg/mL 용액의 경우, 재구성 매질을 첨가한 직후에 교반이 일어나 용액 위에 심각한 흡착 확산을 야기하였다. 2mg/mL에 대해 교반 전 침강 기간을 수행하여 흡착이 여전히 관찰되었지만 더 양호한 재구성 성능을 생성하였다. 1.3mg/mL 용액의 경우 필요한 교반을 최소화하기 위해 5분의 침강 기간을 수행하였다. 이러한 과장된 침강 기간으로 흡착이 개선되지 않았다. 제형 2의 경우 줄곧 2분의 침강 기간, 1분 교반 및 교반 전 최종 1분 침강 기간을 용해될 때까지 수행하였다. 제형 5는 제형 중에서 가장 잘 수행되었으며 주기 4 최적화를 위해 이 제형에 대해 전형적인 재구성 방법이 수행될 것이다(재구성 매질 첨가 직후 교반).

[0365] 표 1-47. 동결건조된 플러그의 외관

샘플	외관 ¹
제형 1	균질한 백색 동결건조된 케이크
제형 2	분명한 수축을 갖는 균질한 백색 동결건조된 케이크
제형 3	분명한 전반적 붕괴를 갖는 바이알 중앙의 백색 디스크
제형 4	분명한 수축을 갖는 균질한 백색 동결건조된 케이크
제형 5	분명한 수축을 갖는 균질한 백색 동결건조된 케이크

[0366] ¹동결건조된 케이크의 사진에 대해서는 부록 참조

[0367] 6.3.2. 육안으로 보이지 않는 미립자

[0368] 표 1-48. 육안으로 보이지 않는 미립자

샘플	10 μm (수/ 바이알)	25 μm (수/ 바이알)	통과/실패
제형 1 ¹	855	71	Pass
제형 2 ¹	3127	473	Pass
제형 3 ¹	1866	46	Pass
제형 4 ¹	5752	1304	Fail
제형 5 ²	3074	21	Pass

[0369] ¹충진 용적이 5.3mL인 경우

²충진 용적이 10.6mL인 경우

바이알은 오토클레이빙/탈피로게네이션되지 않았으므로 미립자 물질의 판독값이 부풀려질 수 있음을 주의해야 함.

[0370] 10 μm에 대한 결과는 모든 제형에 대해 부풀려졌으며 제형 2 및 4는 재구성시 발생하는 흡착으로 인한 것이다. 이것은 기술 배치 바이알과 동일한 세척 절차를 거치지 않는 동결건조 최적화 바이알과 결합되어 결과가 부풀려졌다. 모든 결과는 25 μm 수준에서 실패한 제형 4를 제외하고는 약전 사양(pharmacopoeial specification)(용기당 <6000개 입자, 10 μm 및 용기당 <600개 입자)을 통과한다. 이것은 불량한 재구성 성능 및 관찰된 흡착 특성 때문일 것이다.

[0371] 6.3.3. 수분 함량

[0372] 표 1-49. 수분 함량

샘플	평균 물 (%w/w)
제형 1	2.60
제형 2	2.87
제형 3	11.08
제형 4	1.69
제형 5	3.84

[0373] 부풀려진 제형 3을 제외하고 모든 제형은 <5%의 최적 수위(optimal water level)를 생성하였다. 제형 3은 무수 메탄올에서의 불량한 용해로 인해 격렬한 혼합 및 초음파 처리가 필요하였다. 불량한 용해 및 이러한 배치에 필요한 증가된 혼합 및 초음파 처리는 이 제형이 수분 함량에 대해 성능이 좋지 않았으며 다른 제형과 비교하여 추세를 벗어난 부풀려진 결과가 강조된다는 것을 시사한다.

[0375] 6.3.4. 분석 및 순도 결과

[0376] 6.3.4.1. 여과전 및 여과후

[0377] 샘플을 0.22 μm PES 막 주사기 필터를 사용하여 여과하였다. VWD 검출을 통해 분석 전에 여과 공정 동안 문제가 관찰되지 않았다.

[0378] 표 1-50. 여과전 및 여과후

샘플	여과전 [BT5528] (mg/mL)	여과후 [BT5528] (mg/mL)	회수율 ¹
제형 1	3.92	3.94	100.5
제형 2	3.71	3.76	101.5
제형 3	3.70	3.54	95.8
제형 4	3.66	3.82	104.4
제형 5	1.96	2.02	103.5

[0379] ¹회수율% vs 여과전 결과.

[0380] 표 1-51. 순도/관련 물질 여과전

RRT	제형 및 양(면적%)				
	1	2	3	4	5
BT5528	98.41	99.01	99.25	99.25	99.20
1.10	1.51	0.98	0.26	0.75	0.72
1.11	N.D	N.D	0.49	N.D	N.D
총합 ¹	1.5	1.0	0.8	0.8	0.7

[0381] ¹관련 물질의 합 $\geq 0.10\%$

[0382] 표 1-52. 순도/관련 물질 여과후

RRT	제형 및 양(면적%)				
	1	2	3	4	5
BT5528	99.24	99.38	99.11	99.13	99.30
1.10	0.76	0.52	0.89	0.87	0.63
총합 ¹	0.8	0.5	0.9	0.9	0.6

[0383] ¹관련 물질의 합 $\geq 0.10\%$

[0384] 제형 3의 경우 회수율이 더 낮았고 추세를 벗어났으며, 이는 수분 및 재구성 세부사항으로부터 제형이 다른 제형과 비교하여 성능이 좋지 않다는 것을 재강조한다. 트레할로스는 이 제형에서만 존재하며, 이것은 이러한 당이 낮은 회수율 및 추세를 벗어난 데이터의 근본 원인임을 설명한다.

[0385] 6.3.4.2. 바이알 함량

[0386] 표 1-53. 동결건조된 바이알 함량

샘플	바이알 1 [BT5528] (mg/vial)	바이알 2 [BT5528] (mg/vial)	평균 [BT5528] (mg/vial)	회수율 ¹
제형 1	21.30	21.38	21.34	100.7
제형 2	20.16	20.19	20.17	95.1
제형 3	19.71	19.68	19.70	92.9
제형 4	20.31	20.34	20.33	95.9
제형 5	21.07	21.39	21.23	100.1

[0387] ¹회수율% vs 이론치 21.2mg/바이알 BT5528.

[0388] 평균 관련 물질이 표 1-54에 보고되어 있다.

[0389] 표 1-54. 순도/관련 물질

RRT	제형 및 양(면적%)				
	1	2	3	4	5
BT5528	99.30	99.13	99.24	99.30	99.22
1.10	0.70	0.87	0.76	0.70	0.79
총합 ¹	0.7	0.9	0.8	0.7	0.8

[0390] ¹관련 물질의 합 $\geq 0.10\%$

[0391] 6.3.4.3. 순도/관련 물질

[0392] 제형 1을 3개의 개별 용적의 WFI(5.3mL, 10.6mL 및 15.9mL)로 재구성하여 각각 4mg/mL, 2mg/mL 및 1.3mg/mL의 농도를 제공하였다. 제형 2, 3 및 4는 5.3mL WFI에서 재구성되어 4mg/mL의 농도를 제공하고 제형 5는 10.6mL WFI에서 재구성되어 2mg/mL의 농도를 제공하였다. 분석 및 순도를 평가하고 이론값과 비교하였다.

[0393] 표 1-55. 재구성된 바이알 함량

샘플	분석 (mg/mL)	재구성/이론치 (%)
제형 1 (5.3 mL 재구성)	3.52	88.1
제형 1 (10.6 mL 재구성)	1.02	50.9
제형 1 (15.9mL 재구성)	1.32	99.2
제형 2	3.55	88.8
제형 3	2.51	62.8
제형 4	3.42	85.5
제형 5	2.06	103.0

[0394] 회수율% vs 이론치 4mg/mL, 2mg/mL 및 1.33mg/mL BT5528.

[0395] 표 1-56. 제형 1에 대한 순도/관련 물질 - 3가지 재구성 용적

RRT	재구성 용적 및 양(면적%)		
	5.3 mL	10.6 mL	15.9 mL
0.98	0.12	<LOQ	<LOQ
BT5528	99.08	98.69	98.95
1.10	0.32	0.54	0.25
1.11	0.44	0.21	0.26
1.12	<LOQ	0.53	0.58
총합 ¹	0.9	1.3	1.1

[0396]

[0397] 표 1-57. 제형 2 - 5에 대한 순도/관련 물질

RRT	제형 및 양(면적%)			
	2	3	4	5
0.98	N.D	<LOQ	<LOQ	0.24
BT5528	98.74	98.80	98.38	98.69
1.10	0.46	0.50	0.52	0.26
1.11	0.58	0.59	0.66	0.33
1.12	0.41	<LOQ	0.41	0.53
총합 ¹	1.5	1.1	1.6	1.4

[0398]

[0399] 제형 1 내지 5에 대해 얻은 분석 값은 가변적이었으며, 이는 초기 재구성 데이터로부터 예상할 수 있는 것이어서, BT5528이 유리 바이알에 대한 흡착 특성을 갖는다고 결론내릴 수 있다. 제형 1(1.3mg/mL) 및 제형 5는 각각 가장 최적의 회수율 %(99.2% 및 103.0%)을 야기하였다. 다른 회수율 %은 재구성 공정으로부터의 의약품(API)의 손실에 기인한다. 입자는 유리 바이알에 흡착되었으며 추가의 혼합 및 대략 1시간의 방치 기간에도 완전히 용해될 수 없었다. 1시간의 방치 기간은 비현실적인 절차이며 주기 최적화 4의 경우 재구성을 돕기 위해 장치 기간이 더 짧은 시간프레임(~5분)으로 단축될 것이다.

[0400] **6.4. 논의 및 결론**

[0401] 모든 제형은 흡착 특성을 갖는 것으로 나타났으며 따라서 최적화 주기 3에 대한 분석 시험 전반에 걸쳐 제품의 변동성 및 손실이 나타났다. 제형 5는 평가된 나머지 4개 제형보다 성능이 더 양호하였다. 제형 5는 다른 제형(4mg/mL)과 비교하여 더 낮은 API 농도(2mg/mL)를 가졌다. 최적화 주기 4에서 더 낮은 농도의 API를 평가하는 것이 권장되었다. 이것은 재구성 성능을 추가로 평가하고 기술 배치를 진행하기 위한 일관된 공정을 달성할 수 있게 한다. 또한 기술 배치가 제조되기 전에 분석 회수율이 일관되게 목표치에 있는 것도 중요하였다.

[0402] **7. 동결건조 주기 4**

[0403] 제형의 흡착 특성으로 인해, 동결건조 동안 추가 제형을 평가하였다. 당 제형 스크린 동안 수득된 데이터로부터, 제형 1 및 5를 표 1-58의 추가 제형과 함께 재평가하였다. 더 낮은(0°C) 2차 건조 온도를 펩티드의 과도한 건조 및 수화 겔층의 손실 가능성을 조사하기 위해 당 제형 스크린 동안 평가하였다. 동결건조 최적화 주기 4는, 0°C는 재구성 특성을 개선시키지 못했기 때문에, 이전에 사용된 2차 건조 온도인 25°C로 되돌아갔다.

[0404] 당 제형 스크린으로부터의 데이터는 2mg/mL의 더 낮은 BT5528 농도에서 개선된 재구성 프로파일을 생성하였다. 이러한 제시를 위한 흡착 감소로 인해, 제형 5는 최적화 주기 4를 위해 남겨두고, 제형 6에는 원래의 리드 제형(제형 1)과 일치하는 폴리소르베이트 대 BT5528 API의 비율을 유지하기 위해 더 낮은 농도의 폴리소르베이트 20을 도입하였다. 제형의 조성은 표 1-58에 나타내어져 있다.

[0405] 표 1-58. 의약품 조성(배치 번호 및 제형 세부사항)

제형 1	4mg/mL BT5528, 5.25 mg/mL 히스티딘 HCl, 60 mg/mL 수크로스, 0.2 mg/mL 폴리소르베이트 20 (5.3mL 충전 - 21.2mg 바이알) 20mL 바이알
제형 5	2mg/mL BT5528, 5.25 mg/mL 히스티딘 HCl, 60 mg/mL 수크로스, 0.2 mg/mL 폴리소르베이트 20 (10.6mL 충전 - 21.2mg 바이알) 20mL 바이알
제형 6	2mg/mL BT5528, 5.24 mg/mL 히스티딘 HCl, 60 mg/mL 수크로스, 0.1 mg/mL 폴리소르베이트 20 (10.6mL 충전 - 21.2mg 바이알) 20mL 바이알

[0406]

[0407] 7.1. 용액 제조

[0408] 각각의 제형은 동일한 방식으로 제조하였다. 대략 35mL 또는 70mL의 WFI를 자기 교반기 막대를 함유하는 비이커에 첨가하였다. 이에 261.9mg의 히스티딘을 행구면서 제형 1(50mL)에 첨가하고, 524.9mg을 제형 5에 첨가하고 524.7mg을 제형 6(100mL)에 첨가하고 용해될 때까지 자기적으로 교반하였다. 일단 용해되면, 3.0011의 수크로스를 제형 1에 첨가하고, 6.0010g을 제형 5에 첨가하고 6.0064g을 제형 6에 첨가한 다음 용해될 때까지 교반하였다. 1mL의 1% (w/v) 폴리소르베이트 20 용액을 제형 1 및 제형 6의 경우 히스티딘/수크로스 용액에 피펫팅하고 2mL를 제형 5에 피펫팅하였다. 용액을 완전한 용해가 달성될 때까지 교반하였다. 각 용액의 pH를 측정하였다.

[0409] 3가지 제형 각각에, ~257mg의 BT5528을 칭량하고 천천히 첨가한 다음 완전히 용해될 때까지 90분 동안 교반하였다. 첨가/용해 동안 API가 제형 1에 대한 비이커의 측면에 부착되며, 이는 제형 5 및 6(2mg/mL에 비해 4mg/mL)에 대해 덜 두드러졌다는 것을 주지해야 한다. API를 피펫을 사용하여 비이커 측면에서 제거하여 API가 용액에 완전히 용해되도록 하였다. 용액의 pH를 측정하고 1M 수산화나트륨으로 pH 6.5로 조정된 다음 50mL(제형 1) 또는 100mL(제형 5 및 6) 부피 측정 플라스크로 옮기고 WFI로 용적으로 되게 만들었다. 용액을 원래의 비이커로 되돌리고 혼합되도록 교반하였다.

[0410] 각 용액을 단일 0.22 µm PES 주사기 필터를 통해 여과하였으며, 여액은 눈에 보이는 미립자가 없는 투명한 무색 용액이었다.

[0411] 7.2. 동결건조

[0412] 제조된 용액을 5.3mL(제형 1) 또는 10.6mL(제형 5 및 제형 6)의 용적으로 20mL 유형 I 투명 유리 바이알에 채우고, 20mm 동결 건조 마개로 부분적으로 마개를 막고 표 1-59의 주기를 사용하여 선반에서 직접 동결건조하였다.

[0413] 트레이 중앙에 위치한 각 제형의 단일 바이알을 주기 전반에 걸쳐 제품 온도를 모니터링하기 위해 조사하였다. 1차 및 2차 건조의 중점을 결정하기 위해 온도(제품 프로브/선반) 및 압력(정전용량 압력계/Pirani 게이지) 차이에 기반하여 주기를 모니터링하였다.

[0414] 표 1-59. 동결건조 최적화 주기 4

단계	주기 단계	온도 (°C)	압력 (mTorr)	시간 (분)	랩프 속도 (°C/분)
1	부하	5	N/A	N/A	N/A
2	유지	5	N/A	30	N/A
3	랩프	-40	N/A	180	0.25
4	동결	-40	N/A	180	N/A
5	추가 동결	-40	100	30	N/A
6	랩프	-25	100	75	0.20
7	1차 건조	-25	100	6386	N/A
8	랩프	25	20	250	0.20
9	2차 건조	25	20	1102	N/A
10	종료	바이알을 (순수) 질소로 722,000 mTorr가 되도록 마개를 막음			
총 주기 지속시간 ~135시간(-5.7일)					

[0415]

[0416] 7.3. 결과

[0417] 7.3.1. 용액의 외관, pH 및 재구성 시간

[0418] 표 1-60. 용액의 외관, pH 및 재구성 시간

샘플	외관 ¹	pH	재구성 시간 (분)
제형1	투명한 무색 용액, 측벽에 보통의 흡착이 나타남.	6.6	1 분 52 초
제형5	투명한 무색 용액, 측벽에 흡착이 덜 나타남 ²	6.6	39 초
제형6	투명한 무색 용액, 측벽에 흡착이 덜 나타남 ²	6.6	40 초

[0419] ¹ 제형은 눈에 보이는 입자를 가졌다. 재구성된 용액의 사진에 대해서는 도 32 참조.

[0420] 이전과 같이, 4mg/mL BT5528을 갖는 제형 1을 완전히 재구성하는 것이 더 어려웠다. 제형 5 및 6은 더 낮은 BT5528 농도로 인해 재구성하기가 더 쉬웠다. 제형 1은 제형 5 및 6보다 더 높은 정도의 흡착을 생성하였으며, 이는 감소된 2mg/mL BT5528 농도가 더 나은 재구성을 생성하고 후속적으로 흡착이 덜 발생하고 단지 매우 작은 입자만이 흡착된다는 것을 강조한다.

[0421] 표 1-61. 동결건조된 플러그의 외관

샘플	외관
제형1	분명한 수축을 갖는 균질한 백색 동결건조된 케이크
제형5	분명한 수축을 갖는 균질한 백색 동결건조된 케이크
제형6	분명한 수축을 갖는 균질한 백색 동결건조된 케이크

[0422]

[0423] 7.3.2. 육안으로 보이지 않는 미립자

[0424] 표 1-62. 육안으로 보이지 않는 미립자

샘플	10 μm (수/바이알)	25 μm (수/바이알)	통과/실패 ³
제형 ¹	191	18	통과
제형5 ²	445	92	통과
제형6 ²	247	35	통과

[0425] ¹충전 용적이 5.3mL인 경우
²충전 용적이 10.6mL인 경우
³바이알당 직경 ≥10μm의 입자 수 ≤ 6000 = 통과, 바이알당 직경 ≥25μm의 입자 수 ≤ 600= 통과

[0426] 10 μm에 대한 결과는 모든 제형에 대해 약간 부풀려져 있다. 동결건조 최적화 바이알은 기술 배치 바이알과 동일한 세척 절차를 거치지 않으며 부풀려진 결과를 생성할 수 있다.

[0427] 모든 결과는 약전 사양을 통과한다 - 바이알당 직경 ≥10 μm의 입자 수 ≤6000 및 바이알당 직경 ≥25 μm의 입자 수 ≤600.

[0428] 7.3.3. 수분 함량

[0429] 동결건조된 플러그의 수분 함량은 메탄올을 용매로 사용하여 Karl Fisher 분석에 의해 결정하였다. 이중 바이알로부터의 단일 샘플을 배치당 분석하였다, 표 1-63. 무수 메탄올을 첨가하는 동안 재구성 문제는 주지되지 않았다.

[0430] 표 1-63. 수분 함량

샘플	평균 들 (%w/w)
제형1	0.71
제형5	1.51
제형6	1.47

[0431] 모든 제형은 <5%의 최적 수위를 야기하였다. 무수 메탄올을 첨가하는 동안 재구성 문제는 주지되지 않았다.

[0432] 7.3.4. 분석 및 순도 결과

[0433] 7.3.4.1. 여과전

[0434] 샘플은 0.22 μm PES 막 주사기 필터를 사용하여 여과하였다. 여과 공정 동안 문제가 관찰되지 않았다. 실수로 여과후 샘플을 동결건조 전에 수집하지 않아 결과는 이론상 농도에 대해 보고된다.

[0436] 표 1-64. 여과전 및 여과후

샘플	여과전 [BT5528] (mg/mL)	회수율 ¹
제형 1	3.64	91.0
제형 5	1.97	98.5
제형 6	1.91	95.5

[0437] ¹회수율% vs 제형 1의 경우 4mg/mL 및 제형 5 및 6의 경우 2mg/mL 이른값

[0438] 표 1-65. 순도/관련 물질 여과전

RRT	제형 및 양(면적%)		
	1	5	6
0.51	0.22	0.18	0.22
0.53	0.22	0.21	0.27
0.97	0.13	0.13	0.11
BT5528	98.35	98.63	98.61
1.10	0.55	0.61	0.51
1.30	0.11	0.11	0.14
총합 ¹	1.5	1.2	1.3

[0439] ¹관련 물질의 합 $\geq 0.10\%$

[0440] 제형 5 및 6은 이론상 2mg/mL 농도에 비해 95% 초과회수율을 갖는다. 제형 1에 대한 회수율 값은 91%로 상당히 더 낮으며, 이는 2mg/mL 제제가 더 강력할 가능성이 있음을 시사한다.

[0441] 관련 물질 데이터는 세 가지 제형 모두에 대해 일관적이다.

[0442] 7.3.5. 바이알 함량

[0443] 표 1-66. 동결건조된 바이알 함량

샘플	바이알 1 [BT5528] (mg/바이알)	바이알 2 [BT5528] (mg/바이알)	평균 [BT5528] (mg/바이알)	회수율 ¹
제형 1	19.75	19.65	19.70	92.9
제형 5	21.53	21.74	21.63	102.0
제형 6	21.11	20.92	21.01	99.1

[0444] ¹회수율% vs 이론치 21.2mg/바이알 BT5528.

[0445] 평균 관련 물질이 표 1-67에 보고되어 있다.

[0446] 표 1-67. 순도/관련 물질

RRT	제형 및 양(면적%)		
	1	5	6
0.51	0.19	0.18	0.17
0.53	0.26	0.24	0.23
0.97	0.15	0.15	0.14
BT5528	98.34	98.26	98.44
1.10	0.70	0.79	0.65
1.30	0.10	0.11	0.12
총합 ¹	1.4	1.5	1.3

[0447] ¹관련 물질의 합 $\geq 0.10\%$

[0448] 7.3.6. 재구성된 용액

[0449] 제형 1을 5.3mL WFI로 재구성하여 4mg/mL의 농도를 제공하였다. 제형 5 및 6을 10.6mL WFI에서 재구성하여 2mg/mL의 농도를 제공하였다. 분석 및 순도를 평가하고 이론값과 비교하였다.

[0450] 표 1-68. 재구성된 바이알 함량

샘플	평균 [BT5528] (mg/mL)	평균 [BT5528] (mg/mL)	평균 [BT5528] (mg/mL)	회수율 ¹
바이알 1	2.98	3.25	3.11	77.8
바이알 2	1.84	1.88	1.86	93.0
바이알 3	1.79	1.84	1.81	90.5

[0451] ¹회수율% vs 이론치 4mg/mL 및 2 mg/mL BT5528.

[0452] 평균 관련 물질 결과가 표 1-69에 보고되어 있다.

[0453] 표 1-69. 순도/관련 물질 제형 1, 5 및 6.

RRT	제형 및 양(면적%)		
	1	5	6
0.51	0.28	0.23	0.20
0.53	0.31	0.29	0.27
0.97	0.15	0.14	0.12
BT5528	98.42	98.58	98.53
1.10	0.58	0.53	0.48
1.30	0.12	0.11	0.15
총합 ¹	1.4	1.3	1.2

[0454] 관련 물질 데이터는 세 가지 제형 모두에 대해 일관적이다.
 [0455]

[0456] 표 1-69의 분석 데이터는 세 가지 제형 모두에 대한 목표보다 낮다. 대략 78%의 회수율을 갖는 제형 1의 경우 특히 더 좋지 않다. 제형 1은 4mg/mL에서 가장 높은 BT5528 농도를 가지며 따라서 BT5528 API의 특성으로 인해 완전히 재구성하기가 가장 어려웠다. 결과는 더 낮은 2mg/mL BT5528 농도가 더 유리한 제시이며 비-GMP 기술 배치를 위해 고려되어야 함을 나타낸다.

[0457] **7.4. 결론**

[0458] 동결건조물의 외관은 평가된 3가지 제형 모두에 대해 유사하였으며, 백색이고, 균질하며, 약간의 수축이 있었다. BT5528 농도의 변화 및 더 높은 충전 용적은 제품의 외관에 영향을 미치지 않았다.

[0459] 2mg/mL 용액(제형 5 및 6)의 재구성 시간은 4mg/mL 용액(제형 1)보다 1분 이상 빨랐다. 2개의 폴리소르베이트 20 농도, 0.1 및 0.2mg/mL(각각 제형 5 및 6)의 재구성 시간에는 차이가 없었으며, 이는 폴리소르베이트 20이 재구성 시간에 영향을 미치지 않음을 나타낸다.

[0460] 제형 1의 수분 함량은 제형 5 및 6보다 낮았으며, 이것은 충전 용적이 절반이기 때문으로 예상되었다.

[0461] 순도/관련 물질은 동결건조 전 및 후 또는 평가된 세 가지 제형 간에 차이가 없었다. 그러나 회수율에 있어서는 이론치와 차이가 있었다. 제형 1에 대한 분석 값은 제형 5 및 6(1.86 및 1.18mg/mL)의 경우 91-93%에 비해 이론치(3.11mg/mL)의 77.8%였으며, 이는 더 낮은 BT5528 농도를 갖는 동결건조된 제품의 개선된 재구성을 보여 준다.

[0462] **8. 여과 평가**

[0463] GMP 제조 동안 벌크 용액을 필터 멸균시킨다(0.22 μm 기공 크기). 필터와의 상용성 및 필터 막 및 하우징에 대한 흡착으로 인한 가능한 재료 손실을 조사해야 한다. 관련 물질도 모니터링한다.

[0464] 알려진 용적의 제형(표 1-71)을, 연동 펌프 및 백금-경화 실리콘 배관에 의해, 알려진 표면적의 독점 "P"(약제) 등급 필터 캡슐을 통해 통과시켜 단일 유형의 막 상의 필터 표면적 cm²당 흡착 손실을 평가하였다; PES(폴리에테르 설펜)(Mini Kleenpak 캡슐 필터, KA02EKVP2S, 표면적 220cm²).

[0465] 필터 상류의 배압으로서 측정된 여과 용이성을 평가하였다. 사전-필터 용액 및 5개의 연속적인 초기 여액 샘플 및 최종 벌크 여액에서의 활성 농도 및 관련 물질을 UPLC에 의해 결정하였다. 사전-필터 및 여액 샘플의 pH를 또한 결정하였다.

[0466] 필터 막 또는 캡슐 표면에서의 활성 물질의 흡착은, 발생하는 경우, 통상적으로 가포화 현상(saturable phenomenon)이다. 특정 유형의 필터 캡슐의 포화를 제공하는 용액의 용적을 확인했다면, 이것이 해당 특정 캡슐의 초기 폐기 용적이 된다. 유용한 내부 합의는 전체 필터 표면(cm²)에 대한 여과된 용적(mL)의 비율이 ≥5가 되도록 하는 것이다.

[0467] 표 1-70. 여과 평가 제형 조성(배치 번호 및 제형 세부사항)

여과 평가	2mg/mL BT5528, 5.24 mg/mL 히스티딘 HCl, 60 mg/mL 수크로스, 0.1 mg/mL 폴리소르베이트 20 (10.6mL 충전 - 21.2mg/바이알) 20mL 바이알
-------	---

[0469] **8.1. 용액 제조**

[0470] 표 1-70에 자세히 설명된 제형은 200mL 규모로 제조하였다. 대략 140mL의 WFI를 자기 교반기 막대를 함유하는 비이커에 첨가하였다. 이에 ~1.05g의 히스티딘을 행구면서 첨가하고 용해될 때까지 자기적으로 교반하였다. 일단 용해되면, 12g의 수크로스를 칭량하고 행구면서 첨가한 다음 용해될 때까지 교반하였다. 2mL의 1%(w/v)

폴리소르베이트 20 용액을 히스티딘/수크로스 용액에 피펫팅하고 완전한 용해가 달성될 때까지 교반하였다.

[0471] 용액에 ~514mg의 BT5528을 칭량하고 천천히 첨가한 다음 완전히 용해될 때까지 90분 동안 교반하였다. 용액의 pH를 측정하고 1M 수산화나트륨으로 pH 6.5로 조정한 다음 200mL 부피측정 플라스크로 옮기고 WFI로 용적으로 되게 만들었다. 용액을 원래의 비이커로 되돌리고 혼합되도록 교반하였다.

[0472] **8.2. 여과**

[0473] 용액의 샘플을 UPLC 분석을 위해 여과전 상태로 유지시키고 나머지는 백금-경화 실리콘 배관 및 연동 펌프를 사용하여 단일 0.22 μm PES 캡슐 필터를 통해 여과하였다.

[0474] 분취량은 다음과 같이 여과 공정 전반에 걸쳐 수집하였다:

- [0475] · 여과전
- [0476] · 0-10mL
- [0477] · 10-20mL
- [0478] · 20-30mL
- [0479] · 30-40mL
- [0480] · 40-50mL
- [0481] · 대량 여액

[0482] 용액은 쉽게 여과되었고 배압은 낮았으며, 생성된 여액은 눈에 보이는 미립자가 없는 투명한 무색 용액이었다.

[0483] 분취량을 UPLC에 의해 분석 및 관련 물질에 대해 분석하여 필터 막에서의 분석 손실 또는 막과의 비상용성을 나타내는 추출물/침출물이 있는지를 알아보았다.

[0484] **8.3. 결과**

[0485] 표 1-71. 여과 샘플 바이알 함량

샘플	분석 (mg/mL)	재구성/이론치 ¹ (%)	재구성/여과전 ² (%)
Pre-Filtration	2.03	101.5	-
First few mL	1.77	88.5	87.2
10 - 20 mL	1.97	98.5	97.0
20 - 30 mL	1.98	99.0	97.5
30 - 40 mL	2.02	101.0	99.5
40 - 50 mL	2.06	103.0	101.5
Bulk Solution	2.04	102.0	100.5

¹ 회수율% vs 이론치 2mg/mL BT55238

² 회수율% vs 여과전 결과

[0486]

[0487] 표 1-72. 순도/관련 물질 여과 평가

RRT	용적 및 양 (면적%)						벌크
	Pre	처음 몇 mL	10 - 20 mL	20 - 30 mL	30 - 40 mL	40 - 50 mL	
0.51	0.18	0.21	0.19	0.18	0.18	0.19	0.18
0.53	0.22	0.26	0.21	0.23	0.20	0.21	0.21
0.96	0.14	0.11	0.12	0.13	0.13	0.15	0.14
0.97	0.56	0.65	0.60	0.59	0.61	0.59	0.55
BT5528	97.94	98.18	98.28	98.17	98.16	98.11	98.27
1.10	0.61	0.47	0.57	0.64	0.65	0.67	0.46
총합 ¹	1.8	1.7	1.7	1.8	1.8	1.8	1.5

[0488]

[0489] PES 필터를 통과한 샘플의 처음 0-10mL 동안 분석 저하가 주지되었다. 이것은 예상치 못한 것이 아니며 이 필터 유형에 대해 소량의 폐기량이 필요함을 나타낸다. 0-10mL를 여과한 후 허용 가능한 회수율이 달성되었으며 총 불순물에는 유의한 변화가 없었다.

[0490] 따라서 PES 필터는 BT5528 의약품의 제조에 적합하다.

[0491] **8.4. 논의 및 결론**

[0492] 낮은 배압으로 PES 캡슐 필터를 통해 여과된 용액은 막이 이 용액의 여과에 적합했음을 나타낸다.

- [0493] 수집된 분취량 또는 벌크 용액에서 순도/관련 물질 데이터에는 변화가 없었으며, 이는 추출물/침출물이 존재하지 않음을 나타낸다.
- [0494] 분석 데이터는 이론치 대비 88.5% 회수율의 수집된 첫 번째 분취량(0-10mL)에서의 BT5528 농도의 초기 감소를 나타냈지만, 분석은 10-20mL를 초과한 후 목표치로 되돌아갔다. 이는 비-GMP 기술 배치 동안 필터당 10mL의 폐기 용적이 사용되어야 함을 나타낸다.
- [0495] **9. 결론**
- [0496] 이 보고서는 비-GMP 기술 배치로 진행하기 위한 안정한 동결건조 제형의 성공적인 개발을 입증하였다.
- [0497] 동결건조 주기 최적화가 수행되었지만 바이알 표면에 대한 BT5528 흡착 문제 및 재구성에 대한 문제로 인해 보다 보존적인 주기가 비-GMP 기술 배치로 진행되었다.
- [0498] 여과 평가에 착수하였으며, 이것은 여과 동안 BT5528 농도의 초기 감소를 보였고 10mL 후에는 목표치로 되돌아갔다. 비-GMP 기술 배치 동안 필터당 10mL의 폐기 용량이 사용될 것이다.
- [0499] 바이알 표면에 대한 BT5528의 흡착의 원인을 별도의 동결건조 주기 동안 조사하였다. 잠재적인 원인, 최종 제품의 높은 염화나트륨 농도, 재구성된 제품의 보다 염기성인 pH, 실란 처리된 바이알 및 펩티드의 과도한 건조로 많은 가설이 제시되었다. 이러한 각각의 가설을 대체 당, 계면활성제 및 더 낮은 BT5528 농도의 제형 스크린과 함께 평가하여 이것이 재구성 특성을 개선하는지를 조사하였다. 보다 낮은 pH 사전-동결건조로 재구성 시간의 개선이 수득되었지만 바이알 표면에 유성 점적이 남아 있었다.
- [0500] 염화나트륨 함량의 감소, 실란 처리된 바이알의 사용 및 보다 낮은 2차 건조 온도(제품의 최종 수분 함량을 증가시키기 위해)는 재구성 특성을 개선하지 못했다. 대체 당 또는 계면활성제는 개선을 야기하지 않았지만 BT5528 농도를 4mg/mL에서 2mg/mL로 감소시키면 재구성 특성이 개선되는 것으로 밝혀졌다. 재구성 시간이 단축되었고 재구성 후 바이알 표면에서 유성 점적이 관찰되지 않았다. 이론치 대비 회수율은 4mg/mL 제형에 대해 일관되게 목표치 미만인 것과 비교하여 2mg/mL 제형에서는 목표치에 있었다.
- [0501] BT5528 표면 흡착에 대한 조사 결과에 기반하여, 고객과의 논의 후에, 비-GMP 기술 배치로 진행하기 위해 2mg/mL의 BT5528 농도를 갖는 리드 제형을 선택하였다.
- [0502] **실시예 2. EphA2 발현과 관련된 진행성 악성종양 환자에서 BT5528의 안전성, 약동학 및 예비 임상 활성화에 대한 I/II상 연구**
- [0503] **2.1 목적**
- [0504] **1차 목적**
- [0505] 증량(escalation)의 1차 목적(파트 A-1 및 A-2)은 다음과 같다:
- [0506] · 단독요법으로서(파트 A-1) 및 니블루맙과의 조합하여(파트 A-2) EphA2-발현과 관련된 진행성 고형 악성종양 환자에서 BT5528의 안전성 및 내약성을 평가하기 위해
- [0507] · 관찰된 경우 BT5528의 최대 허용 용량(MTD)을 정의하고 단일 요법으로서(파트 A-1) 및 니블루맙과 조합하여(파트 A-2) 권장되는 2상 용량(RP2D)을 결정하기 위해.
- [0508] 확장(expansion)의 1차 목적(파트 B-1 및 B-2)은 다음과 같다:
- [0509] · RECIST 1.1을 사용하여 단독 요법으로서(파트 B-1) 및 니블루맙과 조합하여(파트 B-2) 선택된 고형 종양 징후가 있는 환자에서 BT5528의 임상 활성을 평가하기 위해
- [0510] **2차 목적**
- [0511] 이 연구의 에스컬레이션(파트 A-1 및 A-2)의 2차 목적은 다음과 같다:
- [0512] · 단독요법으로서(파트 A-1) 및 니블루맙과 조합하여(파트 A-2) EphA2-발현과 관련된 진행성 고형 악성종양 환자에서 BT5528 투여로 달성된 항종양 활성의 예비 신호를 평가하기 위해
- [0513] · BT5528의 약동학(PK) 매개변수를 결정하기 위해
- [0514] · 항-약물 항체(ADA) 발달의 발생률을 결정하기 위해

[0515] 확장(파트 B-1 및 B-2) 연구의 2차 목표는 다음과 같다:

[0516] · 단독요법으로서(파트 B-1) 및 니볼루맵과 조합하여(파트 B-2) 선택된 고형 종양 징후가 있는 환자에서 BT5528의 안전성 및 내약성을 평가하기 위해

[0517] · BT5528의 약동학(PK) 매개변수를 결정하기 위해

[0518] · 항-약물 항체(ADA) 발달의 발생률을 결정하기 위해

[0519] **2.2. 연구 설계**

[0520] 이 연구는 단일 제제로서(파트 A-1 및 B-1) 및 니볼루맵과 조합하여(파트 A-2 및 B-2) 제공된 BT5528의 인간을 대상으로 하는 I/II상, 개방 표지 용량-증량 연구이다. 이 연구에는 두 파트가 있다: 파트 A, 용량 증량 및 파트 B, 용량 확장.

[0521] **2.3. 연구 약물, 용량 및 투여 방식:**

[0522] BT5528은 증량 용량으로 1시간에 걸쳐 정맥내 주입으로 투여하였다. 니볼루맵은 라벨에 따라 투여하였다.

[0523] **2.4. 포함 기준 - 모든 환자:**

[0524] 환자는 조사 연구에 포함되기 위해 다음 기준을 충족해야 한다:

[0525] 1. 연구별 절차, 샘플링 또는 분석을 수행하기 전에 환자 또는 법적 보호자가 서명하고 날짜를 기입한 현지 지침에 따른 서면 동의서.

[0526] 환자가 연구(예를 들어, 종양 생검)의 자발적 요소에 참여하기를 거부하는 경우, 환자에게 불이익이 있거나 혜택이 손실되지 않으며 그/그녀는 연구의 다른 측면으로부터 배제되지 않을 것이다.

[0527] 2. 동의서 서명 당시 적어도 18세

[0528] 3. ECOG(Eastern Cooperative Oncology Group) 수행 상태 점수 0 또는 1

[0529]

ECOG 수행 상태 척도		카르노프스키(Karnofsky) 수행 척도	
등급	설명	퍼센트	설명
0	정상적인 활동. 완전히 활동적이며 제한 없이 질병 전의 모든 수행을 수행할 수 있다.	100	정상, 불만 없음, 질병의 증거 없음
		90	정상적인 활동을 할 수 있음; 질병의 경미한 징후 또는 증상
1	증상이 있지만 걸을 수 있다. 육체적으로 격렬한 활동에 제한이 있지만 걸을 수 있고 가벼운 작업이나 앉아서 하는 작업(예를 들어, 가벼운 집안일, 사무)을 수행할 수 있다.	80	노력으로 정상적인 활동; 질병의 일부 징후 또는 증상
		70	자신을 돌보고, 정상적인 활동을 할 수 없거나 활동적인 일을 할 수 없음

[0530] 4. 환자는 고형 종양 반응 평가 기준(RECIST) v1.1에 따라 측정 가능한 질환을 가져야 한다.

[0531] 5. 다음 실험실 데이터에 의해 입증된 바와 같은 허용 가능한 장기 기능:

[0532] - 다음과 같은 신장 기능: Cockcroft-Gault 방정식에 의해 또는 24시간 뇨 수집에 의해 측정된 바와 같은 $\geq 50\text{mL/min}$ 의 크레아티닌 청소율.

[0533] - 총 빌리루빈 $\leq 1.5 \times \text{ULN}$ (정상치의 상한);

[0534] - 혈청 알부민 $\geq 2.5 \text{ g/dL}$;

[0535] - 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제(AST) $\leq 2.5 \times \text{ULN}$ 또는 간 전이효소의 존재하에 $\leq 5 \times \text{ULN}$;

[0536] - 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT) $\leq 2.5 \times \text{ULN}$ 또는 간 전이효소의 존재하에 $\leq 5 \times \text{ULN}$; 및

[0537] - INR(International normal ratio) < 1.3 또는 \leq 규격 ULN (항응고제 허용되지 않음).

[0538] 6. 허용되는 혈액학적 기능(적혈구 또는 혈소판 수혈 또는 성장 인자는 BT5528의 1차 용량의 4주 이내에 허용되지 않음):

[0539] - 헤모글로빈 $\geq 9\text{g/dL}$

- [0540] - 절대 호중구 수 (ANC) ≥ 1500 개 세포/mm³; 및
- [0541] - 혈소판 수 $\geq 75,000$ 개 세포/mm³.
- [0542] 7. 가임 여성(WOCBP)에 대한 임신 테스트 음성(BT5528의 1차 용량 전 3일 이내에 검진시 혈청 검사 음성 및 소변 또는 혈청 검사 음성. 가임 여성 파트너가 있는 남성 환자 및 가임 여성 환자는 연구에 참여하는 동안 및 연구 약물의 마지막 투여 후 6개월 동안 1% 미만의 실패율을 위해 적어도 CTFG(Clinical Trial Facilitation Group) 권장 사항만큼 보수적인 매우 효과적인 피임법(경구 및 호르몬 피임약 허용)을 따라야 한다 (https://www.hma.eu/fileadmin/dateien/Human_Medicines/01-About_HMA/Working_Groups/CTFG/2014_09_HMA_CTFG_Contraception.pdf). 남성 환자는 또한 연구 약물의 마지막 투여 후 6개월 동안 연구에 참여하는 동안 정자 기증을 삼가야 하고 여성은 그 시간 동안 모유 수유를 하거나 난자를 기증해서는 안된다.
- [0543] 가임기가 아닌 여성은 다음과 같이 정의된다:
- [0544] · 적절한 임상 프로파일(예를 들어, 적절한 연령, 혈관 운동 증상의 병력)과 함께 12개월의 자연적인(자발적) 무월경이 있었다면, 여성은 폐경기이며 가임기가 아닌 것으로 간주된다.
- [0545] · 영구적으로 불임수술을 받은 여성(예를 들어, 난관폐쇄술, 자궁적출술, 양측 난관절제술, 양측 난소절제술).
- [0546] · >45세이고, 호르몬 대체 요법을 사용하지 않으며 적어도 12개월 동안 월경이 완전히 중단된 경험이 있는 여성 또는 난포 자극 호르몬(FSH) 값이 >40 mIU/mL 및 에스트라디올 값 <40pg/mL(140pmol/L)를 갖는 여성.
- [0547] · >45세이고, 호르몬 대체 요법을 사용하고 적어도 1년 동안 월경이 완전히 중단된 경험이 있는 여성 또는 호르몬 대체 요법 시작 전 FSH >40 mIU/mL 및 에스트라디올 <40 pg/mL에 근거한 폐경의 증거가 기록된 여성.
- [0548] 8. BT5528의 첫 번째 투여 날짜 이전 9개월 이내의 보관된 중앙 샘플의 가용성 또는 검진 동안 새로운 중앙 생검을 제공할 의향.
- [0549] 9. 연구자의 판단에 따르면 BT5528 치료 시작 후 평균 수명 ≥ 12 주.
- [0550] 10. 프로토콜 및 연구 절차를 준수할 의지와 능력이 있어야 한다.
- [0551] **추가 포함 기준 - 파크 A 단독**
- [0552] 1. 이전 요법 후에 재발하였고 치료에 대한 승인된 또는 표준 옵션의 부족으로 인해 I상 연구의 후보인, EphA2의 높은 발현으로 역사적으로 알려진 진행성의 조직학적으로 확인된 악성 고형 종양(비소세포성 폐암(NSCLC), 난소암, 삼중-음성 유방암(TNBC), 위/상부 위장관(GI), 췌장 및 요로상피 암)을 가진 환자. 다른 종양이 있는 환자는 BT5528의 첫 번째 투여 날짜 이전 9개월 이내에 수집된 종양 조직에서 EphA2의 높은 발현 증거를 제공한다면 등록할 수 있다. SRC는 특정 종양 유형에서 바이오마커, 안전성 또는 약동학 평가를 강화할 필요가 있다고 느낀다면 증량 동안의 어느 시점에서든 포함 3.1.1에 나열된 종양 유형 중 특정 종양 유형의 등록을 요구하기로 결정할 수 있다.
- [0553] **추가 포함 기준 - 파트 B-1 및 B-2 NSCLC 단독요법 및 조합 코호트**
- [0554] 1. NSCLC의 선암종 아형(adeno-NSCLC)으로 조직학적으로 확인된 전이성 재발성 질환이 있는 환자는 자격이 있으며 백금-기반 화학요법 중 또는 이후의 진행을 포함하여 모든 표준 치료 옵션을 소진해야 하고, 가장 최근의 치료 라인에서 방사선학적 진행의 증거와 함께 적어도 하나의 이전 치료 라인에 실패했어야 한다. EGFR, ALK, NTRK, ROS1 또는 기타 게놈 종양 이상이 해당한다면, 드라이버 돌연변이 질환에 대한 후보가 아니거나 적절한 치료를 받았어야 한다. 이전 면역요법의 경우, 마지막 투여는 BT5528의 첫 번째 투여보다 적어도 28일 이전이어야 한다.
- [0555] 2. 코호트당 적어도 6명의 환자는 생검이 가능한 적어도 1개의 종양 병변을 가져야 하고 BT5528의 첫 번째 투여 이전 및 주기 1에서의 임의의 투여 후에 생검을 기꺼이 받아야 한다.
- [0556] **2.5. 제외 기준 - 모든 환자:**
- [0557] 다음 기준 중 어느 것을 충족하는 환자는 연구 참가에서 제외될 것이다:
- [0558] 1. 연구 치료의 첫 번째 투여 전 14일 이내의 화학 요법 치료, 기타 항암 치료, 28일 이내 또는 5 반감기 중 더

짧은 기간 내의 치료. 이전 독성은 CTCAE(Common Terminology Criteria for Adverse Events) v 5.0에 따라 등급 1로 해결되어야 한다(등급 2 이하이어야 하는 탈모증은 제외).

- [0559] 2. BT5528의 첫 번째 투여의 4주 이내에 실험적 치료.
- [0560] 3. CYP3A4의 강력한 억제제 또는 유도제 또는 허브- 또는 식품-기반을 포함한 P-gp의 강력한 억제제를 사용한 현재 치료.
- [0561] 4. 연구용 제품 또는 모노메틸 아우리스타틴 E(MMAE)의 성분 중 어느 것에 대한 알려진 감수성.
- [0562] 5. 심각한 의학적 상태, 생명을 위협하는 질환, 조절되지 않는 활동성 감염 또는 기관계 기능 장애(예를 들어 복수, 응고병증, 뇌병증), 또는 연구자의 의견으로 위장, 피부 및 폐 동반-질환에 대한 고려를 포함하고 임상적으로 유의한 동반-질환이 없는지 확인하기 위한 선별 흉부 CT 검사를 포함하여 환자의 안전을 손상시키거나 연구 결과의 완전성을 방해하거나 손상시킬 수 있는 기타 이유.
- [0563] 6. BT5528의 첫 번째 투여의 4주 이내에 주요 수술(혈관 통로의 배치 제외) 및 연구 요법 시작 전에 적절하게 회복되어야 함.
- [0564] 7. 연구 치료 30일 이내에 생백신 수령.
- [0565] 8. 조절되지 않는 증후성 뇌 전이(스테로이드를 사용하지 않고 적어도 4주 동안 국소 요법 후 또는 1일 10mg 이하의 프레드니손 또는 등가물의 안정 용량 또는 감소 용량으로 안정적인 신경학적 상태를 가져야 하고 신경학적 및 기타 AE의 평가를 혼란스럽게 할 신경학적 기능 장애가 없어야 한다.)
- [0566] 9. BT5528의 첫 번째 투여 전 조절되지 않는 고혈압(수축기 혈압[BP] ≥ 139 mmHg, 이완기 혈압 ≥ 89 mmHg)이 있는 환자(적어도 3개월 동안 안정적으로 조절되어야 함).
- [0567] 10. 연구 결과를 혼란스럽게 하거나, 환자의 참여를 방해할 수 있거나, 또는 다음을 포함하지만 이에 제한되지 않는 연구자의 의견에서 참여하는 것이 환자에게 최선의 이익이 아닌 임의의 상태, 요법 또는 실험실 이상의 이력 또는 현재 증거:
 - [0568] - 뇌혈관 사건(뇌졸중 또는 일과성 허혈 발작), 불안정 협심증, 심근경색, 울혈성 심부전 또는 뉴욕 심장 학회 클래스 III-IV의 증상의 병력 또는:
 - [0569] i. 평균 휴식시 보정된 QT 간격(QTcF) >470 msec
 - [0570] ii. QTc 연장 위험 또는 심부전, 저칼륨혈증, 선천성 긴 QT 증후군, 긴 QT 증후군의 가족력 또는 40세 미만의 설명할 수 없는 돌연사와 같은 또는 부정맥 사건의 위험을 증가시키는 임의의 요인, 또는 QT 간격을 연장하는 것으로 알려진 임의의 병용 약물
 - [0571] iii. 안정기 심전도(ECG)의 리듬, 전도 또는 형태에 있어서의 (연구자에 의해 평가된 바와 같은) 임상적으로 중요한 이상, 예를 들어, 완전 좌각 블록, 제3도 심블록이 있는 환자.
- [0572] 11. 알려진 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 또는 후천성 면역결핍 증후군(AIDS).
- [0573] 12. 양성 B형 간염 표면 항원 및/또는 항-B형 간염 코어 항체를 갖는 환자. 중합효소 연쇄 반응(PCR) 검사에서 음성을 받은 환자는 적절한 항바이러스 요법이 허용된다.
- [0574] 13. C형 간염 바이러스(HCV) 항체가 양성인 경우 양성 바이러스 부하를 갖는 활동성 C형 간염 감염(항체가 음성이면 바이러스 부하가 적용되지 않음). C형 간염 감염에 대해 치료를 받은 환자는 ≥ 12 주의 지속적인 바이러스 반응을 기록한 경우 포함될 수 있다.
- [0575] 14. BT5528의 첫 번째 투여 전 3개월 이내에 혈전색전성 사건 및/또는 출혈 장애(예를 들어, 심부정맥 혈전증 [DVT] 또는 폐색전증[PE]).
- [0576] 15. BT5528의 첫 번째 투여 전 3년 이내에 다른 악성 종양의 병력, 또는 이전에 진단된 악성 종양으로부터의 임의의 잔류 질환의 임의의 증거(치료 의도로 적절히 치료된 기저 세포 암종, 피부 편평 세포, 자궁경부 상피내 종양/자궁경부 제자리 암종 또는 제자리 흑색종 또는 유방 관상피내 암종 제외).
- [0577] 16. BT5528의 첫 번째 투여 전 지난 14일 이내에 전신 항감염 치료 또는 발열.
- [0578] 17. 프로토콜 및/또는 프로토콜에 설명된 후속 절차의 준수를 허용하지 않는 심리적, 가족적, 사회학적 또는 지

리적 조건.

[0579] **추가 제외 기준 파트 A-2 및 B-2 니블루맙 조합 코호트**

- [0580] 1. 면역 체크포인트 억제제에 대한 이전의 불내성
- [0581] 2. 체크포인트 억제제 요법에 대한 알려진 과민증
- [0582] 3. 이전의 장기 이식(동종 포함)
- [0583] 4. 임상적으로 관련된 면역결핍의 진단
- [0584] 5. 치료가 필요한 활동성 전신 감염
- [0585] 6. 1일 10mg 이상의 프레드니손 등가물 또는 기타 강력한 면역억제제
- [0586] 7. 탈모증 또는 백반증을 제외한 자가면역 질환의 병력
- [0587] 8. 간질성 폐질환의 병력

[0588] **2.6 상관 검정:**

[0589] 모든 환자는 EphA2의 발현 수준 평가 및 추가 분자 유전적 특성화(즉, 특정 체세포 돌연변이 평가 등)를 위해 보관 종양 재료 또는 새로운 종양 생검을 제공해야 한다. 이 재료는 조직 블록 또는 10-15 파라핀-침지된 비염색 슬라이드로 제공되어야 한다.

[0590] BT5528의 종양내 PK/약력학적 효과를 조사하기 위해 투여전 및 투여후 종양 생검을 수집할 것이다. 투여전 및 투여후 종양 생검은 모든 환자에 대해 선택 사항이지만 파트 B의 환자 하위집합(코호트당 6명)에 대해서는 의무적이다. 투여후 생검은 BT5528 투여 후 4 내지 36시간 이내인 한 투여후 주기 1에서 필요할 것이다. 추가의 세부사항에 대해서는 평가 일정(SOA)을 참조한다.

[0591] 투여전 및 투여후 혈액 샘플을 또한 순환 종양 DNA(ctDNA)의 체세포 돌연변이, ADA 및 약물유전체학적 분석과 같은 약리학, 반응 및 치료 내성 바이오마커를 평가하기 위해 수집할 것이다.

[0592] **2.7. 통계 방법론:**

[0593] 용량-증량(A-1 및 A-2에 별도로 적용): 이 연구에서 조사할 용량 수준의 실제 수는 용량 제한 독성(DLT)을 기반으로 하는 허용되지 않는 용량의 결정에 따라 좌우될 것이다. MTD는 DLT를 기반으로 정의될 것이다(섹션 5 참조). 연구 수행 동안 관찰된 PK 프로파일 뿐만 아니라 다른 안전성 데이터 및 항종양 활성에 대한 임의의 추세를 사용하여 RP2D를 결정할 것이며, 이는 MTD보다 크지 않을 것이다.

[0594] 3+3 설계는 처음 두 용량 수준에 사용될 것이다. 적어도 3명의 평가 가능한 환자가 각 용량 수준에 등록되고 다음 용량 수준으로 증량이 일어나기 전에 28일 동안 평가될 것이다. 용량 수준 1에서 내약성을 확인한 후, 용량 수준 2로 100% 이하의 용량 증량이 허용될 것이다. 치료 주기는 SOA에 따라 연속적으로 일어날 것이다. 1명의 환자가 DLT를 경험하는 경우 추가 3명의 환자가 동일한 용량으로 치료될 것이다. 다음 용량 수준으로 진행하기 전에 1주기의 치료(28일)를 완료한 적어도 3명의 환자의 코호트에 대한 평가가 필요하다. 추가 세부사항은 섹션 5에서 찾을 수 있다.

[0595] 처음 두 용량 수준에서의 내약성의 증거에 따라, 모든 후속 용량 간격 증량은 2-매개변수 Bayesian 로지스틱 회귀 모델(BLRM)을 사용하는 일종의 연속 재평가 방법(CRM) 및 다음으로 더 높은 증량된 용량 수준이, 용량 수준이 안전하지 않은 것으로 밝혀질 가능성(DLT 비율 $\geq 33\%$)이 $\leq 25\%$ 로 존재하는 과잉용량 기준을 충족하는 용량 증 목표 간격(20%, 33%)에서 DLT가 발생할 가장 높은 사후 확률을 포함한다는 EWOC(escalation with overdose control) 원리를 기반으로 할 것이다. BLRM은 누적 DLT/안전성 데이터에 적용되고 결과는 SRC에 이용 가능해질 것이며, 이러한 데이터의 검토시, SRC는 정확한 용량 증량에 관한 권장 사항을 만들 것이다. 추정 증량 계획은 부록 F: 용량 증량 설계의 세부사항 및 작동 특성에 자세한 내용과 함께 섹션 5에 제공된다.

[0596] 파트 B의 각 코호트는 $p_0 = 0.175$ 및 $p_1 = 0.35$ 이고 단측 알파가 0.05이고 검정력이 80%인 Simon 2단계 설계를 사용할 것이며, 여기서 p_0 및 p_1 은 전체 응답률(ORR)에 대한 귀무 및 대립 가설이다. 3명 이상의 환자가 모집된 처음 14명의 환자 중에서 객관적인 반응을 갖는다면($\geq 21\%$ ORR) 추가 26명의 환자가 투여받을 것이다; 그렇지 않으면, 코호트는 중지될 것이다.

[0597] 따라서, 연구에 모집된 최대 환자 수는 152명이다; 파트 A-1에서 48명, 파트 A-2에서 24명, 두 파트 B 코호트

각각에서 40명.

서열 목록

<110> BicycleTx Limited

<120> BICYCLIC PEPTIDE LIGANDS SPECIFIC FOR EphA2 AND USES THEREOF

<130> BIC-C-P2930PCT

<150> 62/940,966

<151> 2019-11-27

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Synthetic Peptide

<220><221> Xaa

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is B-Ala

<220><221> Xaa

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Sar10

<220><221> Xaa

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is HArg

<220><221> Xaa

<222> (7)..(7)

<223>

Xaa is HyP

<220><221> Xaa

<222> (19)..(19)

<223> Xaa is HArg

<400> 1

Xaa Xaa Ala Xaa Asp Cys Xaa Leu Val Asn Pro Leu Cys Leu His Pro

1 5 10 15

Asp Trp Xaa Cys

