(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0024245
(43) 공개일자 2021년03월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/68 (2017.01) *A61K 31/5517* (2006.01)
A61K 47/40 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/6803 (2017.08)
A61K 31/5517 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7005783(분할)
(22) 출원일자(국제) 2014년03월12일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2015-7023840
원출원일자(국제) 2014년03월12일
심사청구일자 2019년03월08일
(85) 번역문제출일자 2021년02월25일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/024466
(87) 국제공개번호 WO 2014/165119
국제공개일자 2014년10월09일
(30) 우선권주장
61/780,185 2013년03월13일 미국(US)
61/782,231 2013년03월14일 미국(US)

(71) 출원인
시애틀 지네틱스, 인크.
미국 98021 워싱턴주 보델 30번 드라이브 에스.이. 21823
(72) 발명자
리 휘
미국 워싱턴 98021 보델 30번 드라이브 에스이 21823
지앙 샨
미국 워싱턴 98021 보델 30번 드라이브 에스이 21823
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인와이에스장

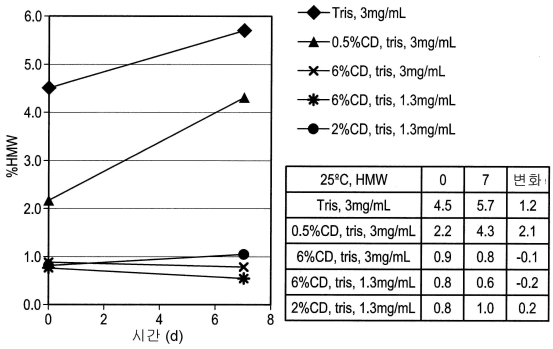
전체 청구항 수 : 총 64 항

(54) 발명의 명칭 **사이클로덱스트린 및 항체-약물 포합체 제형**

(57) 요 약

액체 및 동결건조된 제형 두 가지를 모두 포함하여, 벤조다이아제핀 항체-약물 포합체 (ADC) 및 사이클로덱스트린을 포함하는 제형들이 개시된다. 또한 벤조다이아제핀 항체-약물 포합체와 처리 약물-관련 불순물들을 포함하는 혼합물의 정제 방법들이 개시된다.

대 표 도



25°C, HMW	0	7	변화
Tris, 3mg/mL	4.5	5.7	1.2
0.5%CD, tris, 3mg/mL	2.2	4.3	2.1
6%CD, tris, 3mg/mL	0.9	0.8	-0.1
6%CD, tris, 1.3mg/mL	0.8	0.6	-0.2
2%CD, tris, 1.3mg/mL	0.8	1.0	0.2

(52) CPC특허분류
A61K 47/40 (2013.01)
C07K 16/2875 (2013.01)
C07K 16/2896 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
(72) 발명자
윌리스 메리
미국 워싱턴 98021 보델 30번 드라이브 에스이 21823
메이어 데이몬
미국 워싱턴 98021 보델 30번 드라이브 에스이 21823

명 세 서

청구범위

청구항 1

벤조다이아제핀 ADC 및 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들을 포함하는 혼합물로부터 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들을 제거하기 위한 방법으로서,

벤조다이아제핀 ADC 및 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들을 포함하는 혼합물에 접선 유동 여과를 수행하는 한편, 혼합물 중의 적어도 약 1% w/v 사이클로덱스트린의 농도를 유지하는 것을 포함하는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 사이클로덱스트린은 접선 유동 여과를 시작할 때 혼합물에 존재하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 사이클로덱스트린은 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들의 어떠한 실질적인 제거 전에 혼합물에 첨가되고, 그런 다음 사이클로덱스트린은 혼합물 중에서 적어도 약 1% w/v의 농도로 유지되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 약 2% 농도의 사이클로덱스트린이 혼합물 중에서 유지되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 약 3% 농도의 사이클로덱스트린이 혼합물 중에서 유지되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 접선 유동 여과는 일정 부피 투석여과인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 접선 유동 여과 장치는 펌프, 입구를 가지는 여과 홀더, 여과물 출구, 보유물 출구, 약 50 Kd 또는 더 작은 기공 크기를 가지고 여과 홀더를 상류 구획과 하류 구획으로 나누어 모든 여과물이 입구로 들어가 여과물 출구를 통해 여과 홀더를 빠져나가기 전에 그곳을 통과해야 하는 한외여과막, 포합 반응 혼합물을 보유하기 위한 샘플 저장소, 및 샘플 저장소와 유체 소통되는 완충액 저장소를 포함하고, 이때 완충액 저장소의 완충액은 적어도 약 1% w/v의 사이클로덱스트린, 적어도 약 2% w/v의 사이클로덱스트린 또는 적어도 약 3% w/v의 사이클로덱스트린을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 완충액은 접선 유동 여과 장치의 부피가 일정하게 유지되도록 여과물 유속과 동일한 속도로 여과 부피를 대체하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 여과는 불연속 투석여과인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 있어서, (i) 항체를 벤조다이아제핀 ADC를 포함하는 포합 반응 혼합물을

형성하기에 충분한 조건하에서 벤조다이아제핀 약물-링커와 접촉시키는 단계와 (ii) 그 반응 혼합물을 퀀칭제와 접촉시켜서 퀀칭된 포합 반응 혼합물을 형성시키는 단계를 더 포함하고, 이때 상기 접선 유동 여과가 수행되는 혼합물은 퀀칭된 포합 반응 혼합물인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 1항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 있어서, 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들은 퀀칭된 벤조다이아제핀 약물-링커인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 11항에 있어서, 퀀칭된 벤조다이아제핀 약물-링커는 7.50보다 크지 않거나 6.5보다 크지 않은 SlogP 값을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 1항 내지 제 12항 중 어느 한 항에 있어서, 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들은 약 1μM 이하, 0.5μM 이하, 0.1μM 이하 또는 0.05μM 이하의 수준으로 감소되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 1항 내지 제 13항 중 어느 한 항에 있어서, 사이클로덱스트린은 화학적으로 변형된 베타 사이클로덱스트린인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 14항에 있어서, 사이클로덱스트린은 하이드록시프로필 베타 사이클로덱스트린 또는 설포부틸에테르 베타 사이클로덱스트린인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

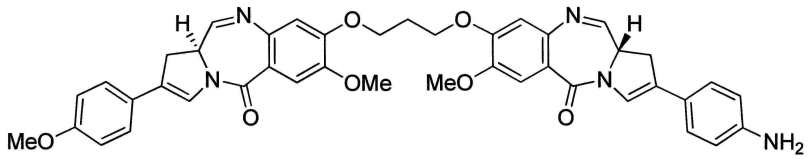
제 15항에 있어서, 사이클로덱스트린은 하이드록시프로필 베타 사이클로덱스트린인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 1항 내지 제 16항 중 어느 한 항에 있어서, 벤조다이아제핀 ADC는 피롤로벤조다이아제핀 이량체에 포합된 단클론성 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

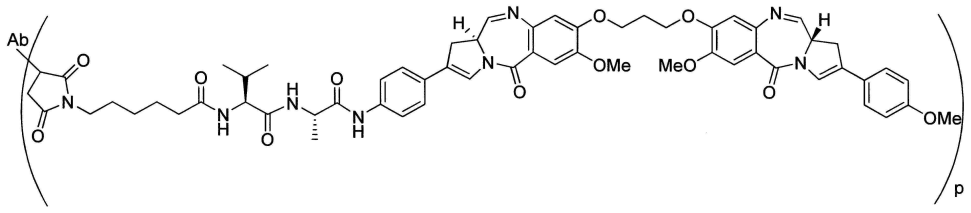
청구항 18

제 17항에 있어서, 피롤로벤조다이아제핀 이량체는 다음 식 또는 그것의 염인 것을 특징으로 하는 방법:



청구항 19

제 18항에 있어서, 벤조다이아제핀 ADC는 다음:

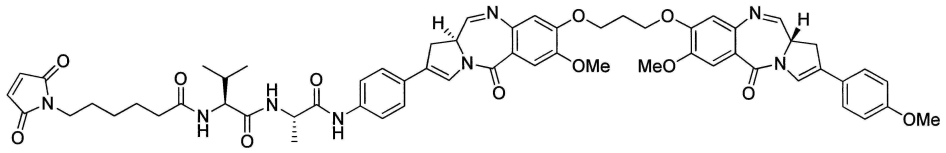


과 같거나 그것의 염이고, 이때 Ab는 단클론성 항체이며 p는 혼합물 중의 항체당 약물-링커 분자의 평균 수를

나타내고 약 2인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제 18항 또는 제 19항에 있어서, 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물은 퀀칭된 약물-링커이고, 퀀칭되기 전의 약물-링커는 다음 식:



을 가지는 것이거나 그것의 염인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제 1항 내지 제 16항 중 어느 한 항에 있어서, 벤조다이아제핀 ADC는 인돌리노벤조다이아제핀 이량체 또는 옥사졸리디노벤조다이아제핀 이량체에 포합된 단클론성 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제 1항 내지 제 21항 중 어느 한 항의 방법을 사용하여 정제된 혼합물.

청구항 23

제형 중에 0.1μM 이하의 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들을 포함하는 벤조다이아제핀 ADC 제형.

청구항 24

벤조다이아제핀 ADC; 및

약 3% w/v 내지 약 305 w/v의 농도의 사이클로덱스트린을 포함하는 약학 제형.

청구항 25

제 24항에 있어서, 제형은 적어도 하나의 완충제를 더 포함하고; 제형은 수용액으로 존재하며 적어도 하나의 완충제의 농도는 생리적으로 적당한 pH를 유지하기에 효과적인 것을 특징으로 하는 약학 제형.

청구항 26

제 24항 또는 제 25항에 있어서, 사이클로덱스트린은 약 5% w/v 또는 약 6% w/v 내지 약 30% w/v의 농도로 존재하는 것을 특징으로 하는 약학 제형.

청구항 27

제 26항에 있어서, 사이클로덱스트린은 약 6% w/v 내지 약 10% w/v의 농도로 존재하는 것을 특징으로 하는 약학 제형.

청구항 28

제 24항 내지 제 27항 중 어느 한 항에 있어서, 동결건조 보호제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 제형.

청구항 29

제 28항에 있어서, 적어도 하나의 동결건조 보호제는 당인 것을 특징으로 하는 약학 제형.

청구항 30

제 29항에 있어서, 당은 슈크로오스인 것을 특징으로 하는 약학 제형.

청구항 31

제 28항 내지 제 30항 중 어느 한 항에 있어서, 동결건조 보호제는 약 4% 내지 약 8% (w/v)의 농도로 존재하는

것을 특징으로 하는 약학 제형.

청구항 32

제 31항에 있어서, 동결건조 보호제는 약 6% (w/v)의 농도로 존재하는 것을 특징으로 하는 약학 제형.

청구항 33

제 24항 내지 제 32항 중 어느 한 항에 있어서, 제형은 약 6.0 내지 약 8.0의 pH를 가지는 것을 특징으로 하는 약학 제형.

청구항 34

제 33항에 있어서, 제형은 6.5 내지 7.5의 pH를 가지는 것을 특징으로 하는 제형.

청구항 35

제 34항에 있어서, 제형은 약 7.3의 pH를 가지는 것을 특징으로 하는 제형.

청구항 36

제 25항 내지 제 35항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 완충제는 트리스, 아세테이트, 히스티딘, 시트레이트, 포스페이트 및 석시네이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제형.

청구항 37

제 36항에 있어서, 적어도 하나의 완충제는 약 20mM 농도의 트리스인 것을 특징으로 하는 제형.

청구항 38

제 24항 내지 제 37항 중 어느 한 항에 있어서, 벤조다이아제핀 ADC는 약 0.5mg/ml 내지 약 30mg/ml의 농도로 존재하는 것을 특징으로 하는 제형.

청구항 39

제 38항에 있어서, 벤조다이아제핀 ADC는 약 0.5mg/ml, 1mg/ml 또는 2mg/ml 내지 약 10mg/ml의 농도로 존재하는 것을 특징으로 하는 제형.

청구항 40

제 39항에 있어서, 벤조다이아제핀 ADC 농도는 약 2mg/ml 내지 약 5mg/ml인 것을 특징으로 하는 제형.

청구항 41

제 40항에 있어서, 벤조다이아제핀 ADC 농도는 약 3mg/ml인 것을 특징으로 하는 제형.

청구항 42

제 23항 내지 제 41항 중 어느 한 항에 있어서, 사이클로덱스트린은 화학적으로 변형된 베타 사이클로덱스트린인 것을 특징으로 하는 제형.

청구항 43

제 42항에 있어서, 사이클로덱스트린은 하이드록시프로필 베타 사이클로덱스트린 또는 설포부틸에테르 베타 사이클로덱스트린인 것을 특징으로 하는 제형.

청구항 44

제 42항에 있어서, 사이클로덱스트린은 하이드록시프로필 베타 사이클로덱스트린인 것을 특징으로 하는 제형.

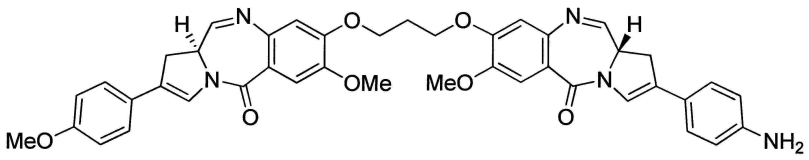
청구항 45

제 23항 내지 제 44항 중 어느 한 항에 있어서, 벤조다이아제핀 ADC는 피롤로벤조다이아제핀 이량체에 포합된

단클론성 항체인 것을 특징으로 하는 제형.

청구항 46

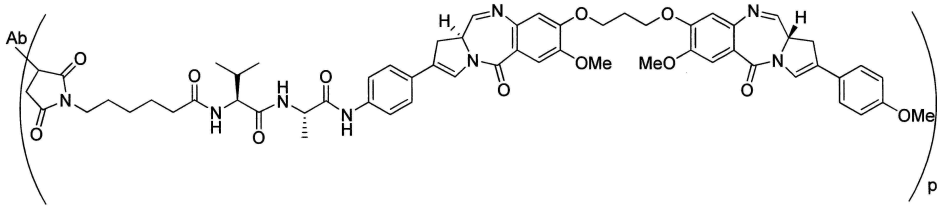
제 45항에 있어서, 피롤로벤조다이아제핀 이량체는 다음 식:



을 가지거나 그것의 약학적으로 허용되는 염인 것을 특징으로 하는 제형.

청구항 47

제 46항에 있어서, 벤조다이아제핀 ADC는 다음:



과 같거나 그것의 염이고, 이때 Ab는 단클론성 항체이며 p는 제형 중의 항체당 약물-링커 분자의 평균 수를 나타내고 약 2인 것을 특징으로 하는 제형.

청구항 48

제 23항 내지 제 44항 중 어느 한 항에 있어서, 벤조다이아제핀 ADC는 인돌리노벤조다이아제핀 이량체 또는 옥사졸리디노벤조다이아제핀 이량체에 포합된 단클론성 항체인 것을 특징으로 하는 제형.

청구항 49

제 23항 내지 제 48항 중 어느 한 항에 있어서, ADC의 항체 성분은 인간 CD33 또는 인간 CD70의 세포외재성 도메인에 특이적으로 결합하는 항체인 것을 특징으로 하는 제형.

청구항 50

제 49항에 있어서, 항체는 h2H12 또는 h1F6 항체인 것을 특징으로 하는 제형.

청구항 51

제 50항에 있어서, 인간화된 2H12 항체는 SEQ ID NO:3에 표시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 서열 및 SEQ ID NO:4에 표시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 서열을 가지고, 인간화된 1F6 항체는 SEQ ID NO:13에 표시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 서열 및 SEQ ID NO:14에 표시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 제형.

청구항 52

제 23항 내지 제 51항 중 어느 한 항에 있어서, ADC의 항체 성분은 IgG1 아이소타입의 중쇄 불변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 제형.

청구항 53

ADC의 농도가 약 2mg/ml 내지 약 5mg/ml인 PBD ADC;

약 5% w/v 내지 약 10% w/v의 농도의 하이드록시프로필 사이클로덱스트린;

약 4% 내지 약 8% 농도의 당; 및

적어도 하나의 완충제를 포함하는 약학 제형으로서,

제형은 수용액으로 존재하고 적어도 하나의 완충제의 농도는 생리적으로 적당한 pH를 유지하기에 효과적인 약학 제형.

청구항 54

제 53항에 있어서,

항체-약물 포합체의 농도는 약 3mg/ml이고;

HPβCD의 농도는 약 6%이며;

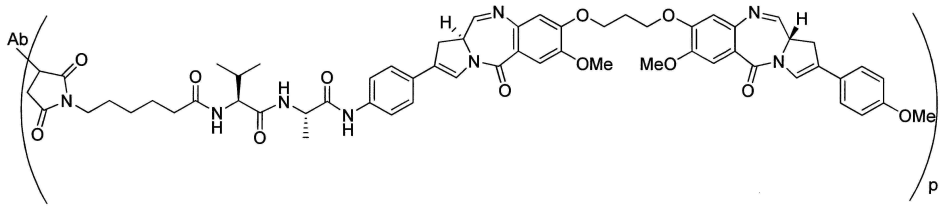
당은 약 6% 농도의 슈크로오스이고;

적어도 하나의 완충제는 약 20mM 농도의 트리스이고; 및

pH는 약 7.0 내지 약 7.5 (바람직하게는 7.2 또는 7.3)인 것을 특징으로 하는 제형.

청구항 55

제 53항 또는 제 54항에 있어서, ADC는 다음 식:



을 가지거나 그것의 약학적으로 허용되는 염이고; 이때 Ab는 단클론성 항체이며 p는 제형 중의 항체당 약물-링커 분자의 평균 수를 나타내고 약 2인 것을 특징으로 하는 제형.

청구항 56

제 23항 내지 제 55항 중 어느 한 항에 있어서, ADC의 벤조다이아제핀 약물 성분은 항체 상에 존재하는 공학적으로 도입된 시스테인 잔기를 통해 항체에 포합되고 항체의 사슬간 이황화 사슬들은 실질적으로 손상되지 않은 것을 특징으로 하는 제형.

청구항 57

제 56항에 있어서, 시스테인 잔기는 IgG1 항체의 위치 239에 있고, 이때 넘버링은 Kabat에서 표시된 것처럼 EU 색인에 따르는 것을 특징으로 하는 제형.

청구항 58

제 53항 내지 제 57항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 h2H12 또는 h1F6 항체인 것을 특징으로 하는 제형.

청구항 59

제 58항에 있어서, 인간화된 2H12 항체는 SEQ ID NO:3에 표시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 서열 및 SEQ ID NO:4에 표시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 서열을 가지고, 인간화된 1F6 항체는 SEQ ID NO:13에 표시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 서열 및 SEQ ID NO:14에 표시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 제형.

청구항 60

안정화되고, 동결건조된 항체-약물 포합체 제형의 제조 방법으로서,

상기 방법은

제 25항 내지 제 59항 중 어느 한 항에서와 같은 제형을 제공하는 단계; 및

동결건조된 항체-약물 포합체 제형을 형성하기 위해 그 수용액을 동결건조시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 61

제 60항의 방법에 의해 제조된 안정화되고, 동결건조된 항체-약물 포합체 제형.

청구항 62

제 25항 내지 제 59항 중 어느 한 항에서와 같은 수성 제형으로의 복원을 가능하게 하는 안정화되고, 동결건조된 항체-약물 포합체 제형.

청구항 63

항체에 부착된 벤조다이아제핀 약물-링커의 화학적 분해 및 단편화를 방지하기 위한 방법으로서, 적어도 6% w/v의 감마 사이클로덱스트린 또는 화학적으로 변형된 베타 사이클로덱스트린을 사용하여 항체에 부착된 벤조다이아제핀 약물-링커를 제형하는 것을 포함하는 방법.

청구항 64

2% w/v 이하의 사이클로덱스트린을 가지는 벤조다이아제핀 약물 링커에 비교하여 제형 중에 존재하는 벤조다이아제핀 약물 링커의 화학적 분해의 감소에 의해 측정되는 바 개선된 안정성을 가지는 제 23항 내지 제 59항 중 어느 한 항의 제형.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 2013년 3월 13일에 출원된 미국 가출원 번호 61/780,185호 및 2013년 3월 14일에 출원된 미국 가출원 번호 61/782,231호의 유익을 주장하며, 상기 출원들은 모든 목적에 대해 그것의 전체 내용이 참조로 포함된다.

[0002] 기술분야

[0003] 본 발명은 사이클로덱스트린 및 항체-약물 포합체 제형에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0004] 항체-약물 포합체 (ADC)는 조직 또는 기관의 표적화된 부위에 약물을 전달하는 효과적인 수단을 제공할 수 있다. 종양과 같은 표적의 항체에 의한 인식은 독성 화학요법제에 대한 비-표적 조직의 노출을 최소화하고 "유리(free)" 약물 (즉 항체와 같은 담체에 결합되지 않은)의 독성과 결부된 부작용을 한정한다. ADC는 많은 기법들에 의해 제조될 수 있다. 인간 또는 다른 대상에 투여되기 전에, 포합체는 유리 약물 및 다른 불순물들을 제거하기 위해 정제된다.

[0005] (특허문헌 1) US2012/0238731 A

[0006] (특허문헌 2) US2012/0028944 A

[0007] (특허문헌 3) US2005/0084536 A

[0008] (특허문헌 4) WO2011/130613 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 벤조다이아제핀 함유 약물의 매우 높은 잠재력으로 인해, 벤조다이아제핀 ADC와 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들을 포함하는 혼합물로부터 약물 관련 불순물들의 제거는 매우 효과적일 필요가 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 이런 요구 및 다른 요구들을 해결한다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 25℃에서 보관된 다양한 h2H12-1 제형에 존재하는 퍼센트 고분자량 (%HMW) 종을 보여주는 그래프를 도시한다. %HMW는 시점 0, 7 및 14일에 측정된다.

도 2는 25℃에서 보관된 다양한 h1F6-1 제형에 존재하는 퍼센트 고분자량 (%HMW) 종을 보여주는 그래프를 도시한다. %HMW는 시점 0, 7 및 14일에 측정된다.

도 3은 40℃에서 보관된 다양한 h2H12-3 제형에 존재하는 퍼센트 고분자량 (%HMW) 종을 보여주는 그래프를 도시한다. %HMW는 시점 0, 3 및 7일에 측정된다.

도 4는 40℃에서 보관된 다양한 h1F6-3 제형에 존재하는 퍼센트 고분자량 (%HMW) 종을 보여주는 그래프를 도시한다. %HMW는 시점 0, 3 및 7일에 측정된다.

도 5는 40℃에서 보관된 다양한 h2H12-2 제형에 존재하는 퍼센트 고분자량 (%HMW) 종을 보여주는 그래프를 도시한다. %HMW는 시점 0, 3 및 7일에 측정된다.

도 6은 40℃에서 보관된 다양한 h1F6-2 제형에 존재하는 퍼센트 고분자량 (%HMW) 종을 보여주는 그래프를 도시한다. %HMW는 시점 0, 3 및 7일에 측정된다.

도 7은 25℃에서 보관된 다양한 h2H12-1 제형에 존재하는 퍼센트 산성 종을 보여주는 그래프를 도시한다. 퍼센트 산성 종은 시점 0, 7 및 14일에 측정된다.

도 8은 25℃에서 보관된 다양한 h21F6-1 제형에 존재하는 퍼센트 산성 종을 보여주는 그래프를 도시한다. 퍼센트 산성 종은 시점 0, 7 및 14일에 측정된다.

도 9는 40℃에서 보관된 다양한 h2H12-3 제형에 존재하는 퍼센트 산성 종을 보여주는 그래프를 도시한다. 퍼센트 산성 종은 시점 0, 3 및 7일에 측정된다.

도 10은 40℃에서 보관된 다양한 h1F6-3 제형에 존재하는 퍼센트 산성 종을 보여주는 그래프를 도시한다. 퍼센트 산성 종은 시점 0, 3 및 7일에 측정된다.

도 11은 40℃에서 보관된 다양한 h2H12-2 제형에 존재하는 퍼센트 산성 종을 보여주는 그래프를 도시한다. 퍼센트 산성 종은 시점 0, 3 및 7일에 측정된다.

도 12는 40℃에서 보관된 다양한 h21F6-2 제형에 존재하는 퍼센트 산성 종을 보여주는 그래프를 도시한다. 퍼센트 산성 종은 시점 0, 3 및 7일에 측정된다.

도 13은 25℃에서 보관된 다양한 h1F6-1 제형에 존재하는 퍼센트 고분자량 (%HMW) 종을 보여주는 그래프를 도시한다. %HMW는 시점 0 및 7일에 측정된다.

도 14는 투석여과 과정 중에 하이드록시프로필 베타 사이클로덱스트린의 농도를 보여주는 그래프를 도시한다. 투석여과 완충액은 3% w/v 사이클로덱스트린을 함유하였다. 데이터는 막이 사이클로덱스트린에 대해 투과성임을 보여준다.

도 15는 10% w/v 사이클로덱스트린 (다이아몬드형) 또는 3% w/v 사이클로덱스트린 (정사각형)의 농도를 유지하는 한편 퀀칭된 포합체 반응 혼합물로부터 퀀칭된 약물-링커의 소멸(clearance)을 보여주는 그래프를 도시한다.

도 16은 3% w/v 사이클로덱스트린 (정사각형)의 농도를 유지하는 한편 퀀칭된 포합체 반응 혼합물로부터 퀀칭된 약물-링커의 소멸을 보여주는 그래프를 도시한다.

도 17은 3% w/v 사이클로덱스트린 (정사각형)의 농도를 유지하는 한편 퀀칭된 포합체 반응 혼합물로부터 퀀칭된 약물-링커의 소멸을 보여주는 그래프를 도시한다.

도 18은 3% w/v 사이클로덱스트린 (정사각형)의 농도를 유지하는 한편 퀀칭된 포합체 반응 혼합물로부터 퀀칭된 약물-링커의 소멸을 보여주는 그래프를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] **일반적 사항**

[0013] 본 발명은 부분적으로, 벤조다이아제핀 ADC 및 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들을 포함하고 있는 혼합물 (본

원에서는 ADC 혼합물로도 언급됨)로부터 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들을 제거하는 것은 벤조다이아제핀 약물의 본질로 인해 비효과적이라는 발견과, 그 혼합물에 사이클로덱스트린을 첨가하는 것이 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들의 효과적인 소멸을 가능하게 한다는 발견을 토대로 한다. 본 발명자들은 다른 무엇보다도, 벤조다이아제핀 ADC와 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들을 포함하는 혼합물에 접선 유동 여과 전에 사이클로덱스트린을 첨가하는 것이 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들의 효과적인 소멸을 가능하게 한다.

[0014] 본 발명은 또한 부분적으로, 벤조다이아제핀 ADC의 사이클로덱스트린-함유 제형이 사이클로덱스트린을 함유하지 않은 제형에 비교하여 월등한 안정성을 나타낸다는 발견을 토대로 한다. 개선된 안정성은 예를 들면 다음 중 하나 또는 그 이상에 의해 증명될 수 있다: (i) 응집 속도와 크기의 감소, (ii) 산성 종들 (acidic species)의 성장의 감소 및 (iii) 약물의 화학적 분해의 감소.

[0015] **발명의 요약**

[0016] 본원에는 벤조다이아제핀 ADC와 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들을 포함하고 있는 혼합물로부터 사이클로덱스트린을 사용한 접선 유동 여과에 의해 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들을 제거하기 위한 방법이 제공된다. 그 방법은 벤조다이아제핀 ADC와 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들을 포함하고 있는 혼합물에 대해 접선 유동 여과를 수행하는 것을 포함한다. 여과 중에 사이클로덱스트린을 사용하는 것은 분리 공정을 보조한다. 따라서, 본원에는 벤조다이아제핀 ADC와 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들을 포함하고 있는 혼합물에 대해 접선 유동 여과를 수행하는 것을 포함하는, 벤조다이아제핀 ADC와 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들을 포함하고 있는 혼합물로부터 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들을 제거하기 위한 방법이 제공되고, 이때 사이클로덱스트린이 정제 공정을 보조하기 위해 사용된다. 바람직한 측면으로, 사이클로덱스트린은 ADC 혼합물 중의 성분들의 용해도를 실질적으로 유지하고 응집을 방지하기에 충분한 양으로 첨가된다. 사이클로덱스트린은 예를 들면 혼합물 중에 접선 유동 여과 공정이 시작될 때 존재하거나, 또는 다르게는, 접선 유동 여과가 개시된 후 첫 번째로 (바람직하게는 어떠한 불순물의 실질적인 제거 전에) 첨가될 수 있다. 일부 측면으로, 방법은 벤조다이아제핀 ADC와 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들을 포함하고 있는 혼합물에 대해 접선 유동 여과를 수행하는 한편, 혼합물 중에서 적어도 약 1% w/v 사이클로덱스트린, 적어도 약 2% w/v 사이클로덱스트린 또는 적어도 약 3% w/v 사이클로덱스트린의 농도를 유지하는 것을 포함한다. 본 발명은 또한 벤조다이아제핀 ADC, 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들 및 적어도 약 1% w/v의 농도로 존재하는 사이클로덱스트린을 포함하는 혼합물을 제공하고, 그 혼합물에 대해 접선 유동 여과를 수행하는 한편, 혼합물 중의 사이클로덱스트린을 적어도 약 1% w/v의 농도로 유지하는 것을 포함하며; 방법은 벤조다이아제핀 ADC, 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들 및 적어도 약 2% w/v의 농도로 존재하는 사이클로덱스트린을 포함하는 혼합물을 제공하고, 그 혼합물에 대해 접선 유동 여과를 수행하는 한편, 혼합물 중의 사이클로덱스트린을 적어도 약 2% w/v의 농도로 유지하는 것을 포함하고; 방법은 벤조다이아제핀 ADC, 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들 및 적어도 약 3% w/v의 농도로 존재하는 사이클로덱스트린을 포함하는 혼합물을 제공하고, 그 혼합물에 대해 접선 유동 여과를 수행하는 한편, 혼합물 중의 사이클로덱스트린을 적어도 약 3% w/v의 농도로 유지하는 것을 포함한다.

[0017] 접선 유동 여과는 예를 들면, 일정 부피 투석여과 또는 불연속 투석여과일 수 있다. 접선 유동 여과 장치는 예를 들면 펌프, 입구를 가지는 여과 홀더, 여과물 출구, 보유물 출구, 약 50 Kd 또는 더 작은 기공 크기를 가지고 여과 홀더를 상류 구획과 하류 구획으로 나누어 모든 여과물이 입구로 들어가 여과물 출구를 통해 여과 홀더를 빠져나가기 전에 그곳을 통과해야 하는 한외여과막, 포합 반응 혼합물을 보유하기 위한 샘플 저장소, 및 샘플 저장소와 유체 소통되는 완충액 저장소를 포함할 수 있다. 바람직한 측면으로, 완충액 저장소는 적어도 약 1% w/v의 사이클로덱스트린, 적어도 약 2% w/v의 사이클로덱스트린 또는 적어도 약 3% w/v의 사이클로덱스트린을 포함한다. 한외여과막은 예를 들면 약 30 Kd의 기공 크기를 포함하여, 다양한 기공 크기를 가질 수 있다. 한외여과막은 재생 셀룰로오스를 포함하여, 많은 물질로 만들어질 수 있다.

[0018] 접선 유동 여과에 의해 여과될 수 있는 혼합물은 본원에 기술된 포합 반응 혼합물 중 어떠한 것이든지 포함하는 포합 반응 혼합물일 수 있다. 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물은 본원에 기술된 불순물들 중 어떠한 것일 수 있다. 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물은 퀀칭되거나 퀀칭되지 않을 수 있다. 예를 들어, 방법은 벤조다이아제핀 ADC를 포함하는 포합 반응 혼합물을 형성하기에 충분한 조건하에서 항체 또는 항체-링커를 벤조다이아제핀 약물-링커와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 임의로, 포합 반응 혼합물은 퀀칭제와 접촉되어 퀀칭된 포합 반응 혼합물이 형성될 수 있다. 퀀칭되지 않았거나 퀀칭된 포합 혼합물에 대해서는 본원에 기술된 것과 같은 접선 유동 여과가 수행된다. 다르게는, 방법은 벤조다이아제핀 ADC를 포함하는 포합 반응 혼합물을 형성하기에 충분한 조건하에서 항체 또는 항체-링커를 유리 약물과 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 임의로, 포합 반응 혼합물은 퀀칭제와 접촉되어 퀀칭된 포합 반응 혼합물이 형성될 수 있다. 퀀칭되지 않았거나 퀀칭된 포합 혼합물

에 대해서는 본원에 기술된 것과 같은 접선 유동 여과가 수행된다. 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물은 예를 들면 퀀칭되었거나 퀀칭되지 않은 약물-링커이거나 퀀칭되었거나 퀀칭되지 않은 약물일 수 있다. 본 발명의 방법은 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들의 제거에 효과적이다. 바람직하게, 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들은 약 1μM 또는 그 미만, 0.5μM 또는 그 미만, 0.1μM 또는 그 미만 또는 0.05μM 또는 그 미만의 수준으로 감소된다.

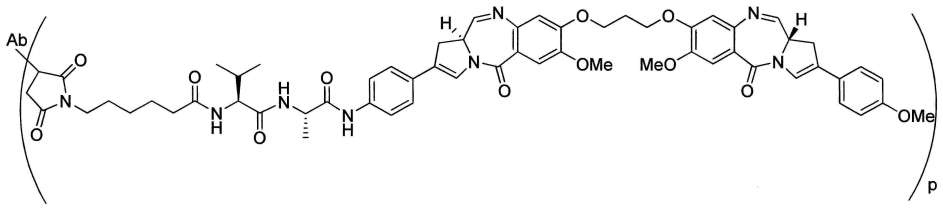
[0019] 화학적으로 변형된 베타 및 감마 사이클로덱스트린을 포함하여 베타 및 감마 사이클로덱스트린은 특히 본 발명에 사용하기에 효과적이다. 사이클로덱스트린은 예를 들면 하이드록시프로필 베타 사이클로덱스트린 또는 설포부틸에테르 베타 사이클로덱스트린일 수 있다. 일부 측면으로, 사이클로덱스트린이 감마 사이클로덱스트린인 경우, 사이클로덱스트린은 접선 유동 여과 중에 적어도 약 1% w/v의 농도에서 유지되고, 사이클로덱스트린이 베타 사이클로덱스트린인 경우, 사이클로덱스트린은 접선 유동 여과 중에 적어도 약 2% w/v 또는 적어도 약 3% w/v의 농도에서 유지된다.

[0020] 또한 본원에는 벤조다이아제핀 ADC 및 사이클로덱신을 적어도 약 3% w/v 내지 약 30% w/v, 바람직하게는 약 5% w/v 또는 6% w/v 내지 약 30% w/v 또는 약 6% w/v 내지 약 10% w/v의 농도로 포함하는 약학 조성물이 제공된다. 제형은 수성이거나 비-수성 형태일 수 있다. 제형은 동결건조보호제 (바람직하게 당, 예컨대 슈크로오스)와 같은 추가의 부형제를 포함할 수 있다. 그런 동결건조보호제는 그 자체로서 작용하기에 효과적인 어떠한 농도, 예를 들면 약 4% 내지 약 8% (w/v), 바람직하게는 약 6% (w/v)일 수 있다. 제형의 pH는 생리적으로 적당한 pH이다. 예시적인 pH 값은 약 6.0 내지 약 8.0 또는 약 6.5 내지 약 7.5, 또는 약 7 내지 7.5이다. 제형은 전형적으로 완충제를 포함한다. 완충제는 광범위한 완충제, 이를테면 트리스(Tris), 아세테이트, 히스티딘, 시트레이트, 포스페이트 및 석시네이트로부터 선택될 수 있다. 트리스는 예를 들면 약 20mM의 농도로 존재할 수 있다. 제형 중의 벤조다이아제핀 ADC의 농도는 광범위하게 달라질 수 있다. 바람직한 측면으로, ADC는 약 0.5 mg/ml 내지 약 30 mg/ml, 약 0.5 mg/ml 내지 약 10 mg/ml, 약 1 mg/ml 내지 약 10 mg/ml, 약 2 mg/ml 내지 약 10 mg/ml, 약 2 mg/ml 내지 약 5 mg/ml, 바람직하게 약 3mg/ml의 농도로 존재할 수 있다. 화학적으로 변형된 베타 및 감마 사이클로덱스트린을 포함하여, 베타 및 감마 사이클로덱스트린은 특히 제형에 사용하기에 효과적이다. 사이클로덱스트린은 예를 들면 하이드록시프로필 베타 사이클로덱스트린 또는 설포부틸에테르 베타 사이클로덱스트린일 수 있다.

[0021] 본원에는 ADC의 농도가 약 2 mg/ml 내지 약 5 mg/ml인 PBD ADC; 약 5% w/v 내지 약 10% w/v 농도의 하이드록시프로필 사이클로덱스트린; 약 4% 내지 약 8% 농도의 당; 및 적어도 하나의 완충제를 포함하는 약학 제형이 제공되고, 이때 제형은 수용액 상태이며 적어도 하나의 완충제의 농도는 생리적으로 적당한 pH (예컨대 약 6 내지 약 8, 보다 바람직하게는 약 7 내지 약 8 또는 약 7 내지 약 7.5)를 유지하기에 효과적이다.

[0022] 본원에는 ADC의 농도가 약 3 mg/ml인 PBD ADC; 약 6%의 농도의 하이드록시프로필 사이클로덱스트린; 약 6%의 농도의 슈크로오스 및 약 20 mM 농도의 트리스를 포함하는 약학 제형이 제공되고, 이때 제형의 pH는 약 7 내지 약 7.5 (예컨대 약 7.3)이다.

[0023] 본원에 제공된 방법 및 제형에서, ADC는 예를 들어 PBD ADC일 수 있다. 예를 들어 ADC는 다음 식:

[0024] 

[0025] 또는 그것의 약학적으로 허용되는 염을 가질 수 있고; 이때 Ab는 단클론성 항체이며 p는 항체당 약물-링커 분자의 평균 수를 나타내는 것으로 약 2이다. 다른 측면으로, ADC는 인돌리노벤조다이아제핀 이량체에 포합된 단클론성 항체 또는 옥사졸리디노벤조다이아제핀 이량체에 포합된 단클론성 항체를 포함할 수 있다. 본원에 기술된 방법 및 제형에서, 항체는 본원에 기술된 인간화된 2H12 또는 1F6 항체를 포함하여 어떠한 단클론성 항체를 포함한 어떠한 항체일 수 있다. 항체의 약물-링커에의 포합은 도입된 시스테인 잔기의 황 원자를 통한 포합을 포함하여, 해당 기술분야에 공지된 방법들 중 어느 것에 의한 것일 수 있다.

[0026] 또한 본원에는 안정화되고, 동결건조된 항체-약물 포합체 제형의 제조 방법이 제공된다. 그 방법은 본원에 기술된 것과 같은 수성 제형을 제공하고; 동결건조된 항체-약물 포합체 제형을 형성하기 위하여 그 수용액을 동결건

조시키는 것을 포함할 수 있다. 본원에는 또한 그렇게 제조된 안정화되고, 동결건조된 항체-약물 포합체 제형이 제공된다.

[0027] 본원에는 또한 항체에 부착된 벤조다이아제핀 약물-링커의 화학적 분해 및 단편화를 방지하기 위한 방법이 제공된다. 그 방법은 항체에 부착된 벤조다이아제핀 약물-링커를 본원에 제공된 구체예들 중 어느 하나에 기술된 것과 같이 적어도 약 6% w/v 감마 사이클로덱스트린 또는 화학적으로 변형된 베타 사이클로덱스트린으로 제형하는 것을 포함할 수 있다.

[0028] **정의**

[0029] 다르게 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술적이고 과학적인 용어들은 기술된 방법들과 조성물들이 속하는 기술분야에서 통상적인 기술을 가진 사람에 의해 통상적으로 이해되는 것과 같은 의미를 가진다. 본원에서 사용되는 것과 같이, 다음의 용어 및 구절들은 다르게 명시되지 않는 한 그것들에 대해 설명된 의미를 가진다.

[0030] 용어 "헤테로고리"는 본원에서 사용되는 것과 같이 3 내지 14개의 고리 원자 (고리 구성원으로도 언급됨)를 가지는 단일고리형, 이중고리형 또는 다중고리형 고리 시스템을 말하고, 이때 적어도 하나의 고리의 적어도 하나의 고리 원자는 N, O, P 또는 S로부터 선택된 헤테로원자 (및 탄소 원자들의 범위 및 특정 수의 모든 조합 및 하위조합 및 그 안의 헤테로원자)이다. 헤테로고리는 N, O, P 또는 S로부터 독립적으로 선택된 1 내지 4개의 고리 헤테로원자를 가질 수 있다. 헤테로고리의 하나 또는 그 이상의 N, C 또는 S 원자는 산화될 수 있다. 단일고리형 헤테로고리는 바람직하게 3 내지 7개의 고리 구성원 (예컨대 2 내지 6개의 탄소 원자와 N, O, P 또는 S로부터 독립적으로 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자)을 가지고, 이중고리형 헤테로고리는 바람직하게 5 내지 10개의 고리 구성원 (예컨대 4 내지 9개의 탄소 원자와 N, O, P 또는 S로부터 독립적으로 선택된 1 내지 3개의 헤테로원자)을 가진다. 헤테로원자를 포함하는 고리는 방향족 또는 비-방향족일 수 있다.

[0031] 용어 "탄소고리"는 본원에서 사용되는 것과 같이, 3 내지 14개의 고리 원자 (및 탄소 원자들의 범위 및 특정 수의 모든 조합 및 하위조합 및 그 안의 헤테로원자)를 가지는 포화되거나 불포화된 비-방향족 단일고리형, 이중고리형 또는 다중고리형 고리 시스템을 말하고, 이때 고리 원자는 모두 탄소 원자이다. 단일고리형 탄소고리는 바람직하게 3 내지 6개의 고리 원자, 보다 바람직하게 5 또는 6개의 고리 원자를 가진다. 탄소고리는 바람직하게 3 내지 8개의 탄소 고리 원자를 가진다.

[0032] 본원에서 사용되는 것과 같은 구절 "약학적으로 허용되는 염"은 화합물의 약학적으로 허용되는 유기 또는 무기 염을 말한다. 화합물은 적어도 하나의 아미노기를 함유할 수 있고, 따라서 산 부가 염은 아미노기로 형성될 수 있다. 예시적인 염으로는, 그것들에 한정되는 것은 아니지만 설페이트, 트라이플루오로아세테이트, 시트레이트, 아세테이트, 옥살레이트, 클로라이드, 브로마이드, 요오다이드, 니트레이트, 바이설페이트, 포스페이트, 산 포스페이트, 아이소니코티네이트, 락테이트, 살리실레이트, 산 시트레이트, 타타레이트, 올레에이트, 탄네이트, 판토쎄네이트, 바이타타레이트, 아스코베이트, 석시네이트, 말레에이트, 겐티시네이트, 푸마레이트, 글루코네이트, 글루쿠로네이트, 사카레이트, 포메이트, 벤조에이트, 글루타메이트, 메탄설포네이트, 에탄설포네이트, 벤젠설포네이트, p-톨루엔설포네이트 및 파모에이트 (즉 1,1'-메틸렌-비스-(2-하이드록시-3-나프토에이트))염을 포함한다. 약학적으로 허용되는 염은 아세테이트 이온, 석시네이트 이온 또는 다른 카운터이온과 같이 다른 분자의 포함을 포함할 수 있다. 카운터 이온은 원래의 화합물(parent compound) 상의 전하를 안정시키는 어떠한 유기 또는 무기 부분일 수 있다. 나아가 약학적으로 허용되는 염은 그것의 구조 안에 하나 이상의 전하를 띤 원자를 가질 수 있다. 다수의 전하를 띤 원자가 존재하는 경우, 약학적으로 허용되는 염의 일부는 다중 카운터 이온을 가질 수 있다. 그러므로 약학적으로 허용되는 염은 하나 또는 그 이상의 전하를 띤 원자 및/또는 하나 또는 그 이상의 카운터 이온을 가질 수 있다.

[0033] "폴리펩티드" 또는 "폴리펩티드 사슬"은 그것이 자연적으로 생성된 것이거나 합성 제조된 것이든지 펩티드 결합에 의해 결합된 아미노산 잔기들의 중합체이다. 약 10 미만의 아미노산 잔기의 폴리펩티드가 통상 "펩티드"로 언급된다.

[0034] "단백질"은 하나 또는 그 이상의 펩티드 사슬을 포함하는 거대분자이다. 단백질은 또한 비-펩티드 성분들, 예컨대 탄수화물 기를 포함할 수 있다. 탄수화물 및 다른 비-펩티드 치환체는 단백질이 생성되는 세포에 의해 단백질에 첨가될 수 있고, 세포 유형에 따라 다를 것이다. 단백질은 본원에서 그것의 아미노산 골격 구조의 관점에서 정의되고; 탄수화물 기와 같은 치환체는 일반적으로 명시되지 않지만, 그럼에도 불구하고 존재할 수 있다.

[0035] 용어 "아미노-말단" 및 "카르복시-말단"은 본원에서 폴리펩티드 내의 위치들을 표시하기 위하여 사용된다. 맥락

이 허용하는 경우 이들 용어는 근접한 또는 관련된 위치를 포시하기 위해 폴리펩티드의 특정 서열 또는 부분을 참조로 사용된다. 예를 들어 폴리펩티드 내의 참조 서열에 대해 카르복실-말단에 위치한 특정 서열은 참조 서열의 카르복실 말단에 가까이 위치하지만, 반드시 완전한 폴리펩티드의 카르복실 말단에 있는 것은 아니다.

[0036] 용어 "항체"는 본원에서 항원의 존재에 대한 반응으로 신체에 의해 생성되고 항원뿐 아니라, 항원-결합 단편 및 그것의 공학처리된 변이체에 결합하는 면역글로불린 단백질을 표시하기 위해 사용된다. 그러므로 용어 "항체"는 예를 들면 전-길이 면역글로불린 중쇄 및 경쇄를 포함하는 무상 단클론성 항체 (예컨대 하이브리도마 기술을 사용하여 생성된 항체) 및 항원-결합 항체 단편, 예컨대 $F(ab')_2$ 및 Fab 단편을 포함한다. 유전자 공학처리된 무상 항체 및 단편들, 예컨대 키메릭 항체, 인간화된 항체, 단일-사슬 Fv 단편, 단일-사슬 항체, 이중체, 미니바디, 선형 항체, 다가 또는 다중특이성 (예컨대 이중특이성) 하이브리드 항체 등이 또한 포함된다. 그러므로 용어 "항체"는 항체의 항원-결합 부위를 포함하는 어떠한 단백질을 포함하는 것으로 광범위하게 사용되고 그것의 항원에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0037] 용어 "유전자 공학처리된 항체"는 그것의 아미노산 서열이 천연 항체의 그것과 달라진 항체를 의미한다. 항체의 제조시 재조합 DNA 기법의 관련성 때문에, 당업자는 천연 항체에서 발견된 아미노산 서열로 국한될 필요는 없고; 항체는 바람직한 특성을 얻기 위해 재디자인될 수 있다. 가능한 변경은 많으며 단지 하나 또는 몇 개의 아미노산의 변경으로부터, 예를 들면 가변 또는 불변 영역의 완전한 재디자인에 이르기까지 다양하다. 불변 영역의 변화는 일반적으로 예컨대 상보물 고정, 세포와의 상호작용 및 다른 이펙터 기능과 같은 특성들을 개선하거나 변경하기 위하여 만들어질 것이다. 전형적으로 가변 영역의 변화는 항원-결합 특성을 개선하거나, 가변 영역 안정성을 개선하거나 또는 면역원성의 위험을 줄이기 위하여 만들어질 것이다.

[0038] "항체의 항원-결합 부위"는 그것의 항원에 결합하기에 충분한 항체의 부분이다. 최소한의 그런 영역은 전형적으로 가변 도메인이거나 그것의 유전자 공학처리된 변이체이다. 단일-도메인 결합 부위는 카멜리드 항체로부터 (Muyldermans and Lauwereys, *J. Mol. Recog.* 12:131-140, 1999; Nguyen et al., *EMBO J.* 19:921-930, 2000 참조) 또는 단일-사슬 항체 ("dAb"; Ward et al., *Nature* 341:544-546, 1989; 미국 특허 제 6,248,516호, Winter 등 참조)를 생성하기 위하여 다른 종의 VH 도메인으로부터 생성될 수 있다. 특정 변형에서, 항원-결합 부위는 자연적으로 또는 비-자연적으로 (예컨대 돌연변이된) 발생하는 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인, 또는 그것의 조합의 단지 2개의 상보성 결정 영역 (CDR)을 가지는 폴리펩티드 영역이다 (예컨대 Pessi et al., *Nature* 362:367-369, 1993; Qiu et al., *Nature Biotechnol.* 25:921-929, 2007 참조). 보다 통상적으로, 항체의 항원-결합 부위는 중쇄 가변 (VH) 도메인 및 공통 에피토프에 결합하는 경쇄 가변 (VL) 도메인을 둘 다 포함한다. 본 발명의 맥락 내에서, 항체는 항원-결합 부위 외에 하나 또는 그 이상의 성분들, 예를 들면 항체의 제 2 항원-결합 부위 (동일하거나 상이한 에피토프 또는 동일하거나 상이한 항원에 결합할 수 있음), 펩티드 링커, 면역글로불린 불변 영역, 면역글로불린 힌지, 양친매성 나선 (Pack and Pluckthun, *Biochem.* 31:1579-1584, 1992 참조), 비-펩티드 링커, 올리고뉴클레오티드 (Chaudri et al., *FEBS Letters* 450:23-26, 1999 참조), 세포분역 억제 또는 세포독성 약물 등을 포함할 수 있고, 단량체이거나 다량체 단백질일 수 있다. 항체의 항원-결합 부위를 포함하는 분자들의 실례는 해당 기술분야에 알려져 있고, 예를 들면 Fv, 단일-사슬 Fv(scFv), Fab, Fab', F(ab')2, F(ab)c, 이중체, dAb, 미니바디, 나노바디, Fab-scFv 융합물, 이중특이성 (scFv)4-IgG 및 이중특이성 (scFv)2-Fab를 포함한다. (예컨대 Hu et al., *Cancer Res.* 56:3055-3061, 1996; Atwell et al., *Molecular Immunology* 33:1301-1312, 1996; Carter and Merchant, *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:449-454, 1997; Zuo et al., *Protein Engineering* 13:361-367, 2000; and Lu et al., *J. Immunol. Methods* 267:213-226, 2002 참조.)

[0039] 본원에서 사용되는 것과 같이, 용어 "면역글로불린"은 실질적으로 면역글로불린 유전자(들)에 의해 코드화된 하나 또는 그 이상의 폴리펩티드로 이루어진 단백질을 말한다. 면역글로불린의 한 형태는 척추동물의 천연 (즉, 자연적인) 항체들의 기본적인 구조적 단위를 구성한다. 이 형태는 사량체이고 두 개의 동일한 쌍의 면역글로불린 사슬로 이루어지는데, 각 쌍은 하나의 경쇄 및 하나의 중쇄를 가진다. 각 쌍에서, 경쇄 및 중쇄 가변 영역들 (VL 및 VH)은 함께 주로 항원에 대한 결합에 기여하고, 불변 영역들은 주로 항체 이펙터 기능에 기여한다. 면역글로불린 단백질의 5가지 부류 (IgG, IgA, IgM, IgD 및 IgE)가 고등 척추동물에서 확인되었다. IgG는 주요 부류를 포함하고; 그것은 정상적으로 혈장에서 발견된 두 번째로 가장 풍부한 단백질로서 존재한다. 인간에서, IgG는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 표시된 4개의 하위부류로 이루어진다. IgG 부류의 중쇄 불변 영역은 그리스어 기호 γ로 표시된다. 예를 들어 IgG1 하위부류의 면역글로불린은 γ1 중쇄 불변 영역을 함유한다. 각각의 면역글로불린 중쇄는 종에서 주어진 하위부류에 대해 근본적으로 불변하는 불변 영역 단백질 도메인들 (CH1, 힌지, CH2 및 CH3; IgG3는 또한 CH4 도메인을 함유함)로 이루어진 불변 영역을 가진다. 인간 및 비-인간 면역글로불린

사슬을 코드화하는 DNA 서열들은 해당 기술분야에 알려져 있다. (예컨대 Ellison et al., *DNA* 1:11-18, 1981; Ellison et al.., *Nucleic Acids Res.* 10:4071-4079, 1982; Kenten et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6661-6665, 1982; Seno et al., *Nuc. Acids Res.* 11:719-726, 1983; Riechmann et al., *Nature* 332:323-327, 1988; Amster et al., *Nuc. Acids Res.* 8:2055-2065, 1980; Rusconi and Kohler, *Nature* 314:330-334, 1985; Boss et al., *Nuc. Acids Res.* 12:3791-3806, 1984; Bothwell et al., *Nature* 298:380-382, 1982; van der Loo et al., *Immuno genetics* 42:333-341, 1995; Karlin et al., *J. Mol. Evol.* 22:195-208, 1985; Kindsvogel et al., *DNA* 1:335-343, 1982; Breiner et al., *Gene* 18:165-174, 1982; Kondo et al., *Eur. J. Immunol.* 23:245-249, 1993; 및 GenBank Accession No. J00228 참조.) 면역글로불린 구조 및 기능의 개관을 위해서는 Putnam, *The Plasma Proteins*, Vol V, Academic Press, Inc., 49-140, 1987; and Padlan, *Mol. Immunol.* 31:169-217, 1994 참조함. 용어 "면역글로불린"은 맥락에 따라 무상 항체, 그것의 성분 사슬 또는 사슬들의 단편을 표시하는, 공통적인 의미에 대해 본원에서 사용된다.

[0040] 전-길이 면역글로불린 "경쇄" (약 25Kd 또는 214 아미노산)는 아미노-말단에서 가변 영역 유전자에 의해 (약 110 아미노산을 코드화함) 및 카르복실-말단에서 카파 또는 람다 불변 영역에 의해 코드화된다. 전-길이 면역글로불린 "중쇄" (약 50Kd 또는 446 아미노산)는 가변 영역 유전자에 의해 (약 116 아미노산을 코드화함) 및 감마, 뮤, 알파, 델타 또는 엡실론 불변 영역 유전자 (약 330 아미노산을 코드화함)에 의해 코드화되고, 후자는 항체의 아이소타입을 각각 IgG, IgM, IgA, IgD 또는 IgE로서 규정한다. 경쇄 및 중쇄 내에서, 가변 및 불변 영역들은 약 12 또는 그 이상의 아미노산의 "J" 영역에 의해 결합되고, 이때 중쇄는 또한 약 10 이상의 아미노산의 "D" 영역을 포함한다. (일반적인 것은 Fundamental Immunology (Paul, ed., Raven Press, N.Y., 2nd ed. 1989), Ch. 7 참조).

[0041] 면역글로불린 경쇄 또는 중쇄 가변 영역 (또한 본원에서 각각 "경쇄 가변 도메인" ("VL 도메인") 또는 "중쇄 가변 도메인" ("VH 도메인")으로 언급됨)은 또한 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로도 언급되는 3개의 초가변 영역이 사이에 있는 "프레임워크" 영역으로 이루어진다. 프레임워크 영역은 항원의 에피토프에 특이적으로 결합하기 위해 CDR을 배열하는 작용을 한다. 그러므로 용어 "초가변 영역" 또는 "CDR"은 항원 결합에 주로 기여하는 항체의 아미노산 잔기들을 말한다. 아미노-말단으로부터 카르복실-말단 쪽으로, VL 및 VH 도메인은 다음의 프레임워크 (RF) 및 CDR 영역을 포함한다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 각 도메인에 대한 아미노산의 배열은 Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991), 또는 Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917, 1987; Chothia et al., *Nature* 342:878-883, 1989의 정의들을 따른다. Kabat은 또한 광범위하게 사용되는 넘버링 관례 (Kabat 관례)를 제공하는데, 그 관례에서 상이한 중쇄들 사이의 또는 상이한 경쇄들 사이의 해당하는 잔기들은 동일한 번호로 배정된다. VL 도메인의 CDR 1, 2 및 3은 또한 본원에서 각각 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3로 언급되고; VH 도메인의 CDR 1, 2 및 3은 또한 본원에서 각각 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3로 언급된다.

[0042] 맥락이 다른 것을 표시하지 않는 한, 본원에서 사용된 것과 같은 용어 "단클론성 항체"는 하이브리도마 기술을 통해 제조된 항체들에 한정되는 것은 아니다. 용어 "단클론성 항체"는 어떠한 진핵생물, 원핵생물 또는 파지 클론을 포함하여, 단일 클론으로부터 유도된 항체를 말하며, 그것이 제조된 방법을 말하지 않는다.

[0043] 용어 "키메릭 항체"는 첫 번째 종으로부터 유도된 가변 도메인 및 두 번째 종으로부터 유도된 불변 영역을 가지는 항체를 말한다. 키메릭 면역글로불린 또는 항체는 예를 들면 유전자 공학처리에 의해, 상이한 종에 속하는 면역글로불린 유전자 절편들로부터 구성될 수 있다. 아래에서 정의되는 것과 같이, 용어 "인간화된 항체"는 키메릭 항체를 포함하는 것으로 의도되지 않는다. 인간화된 항체는 그것의 구성에서는 키메릭이긴 하지만 (즉 단백질의 한 종 이상으로부터의 영역들을 포함하지만), 그것은 본원에서 정의된 것과 같이, 키메릭 면역글로불린 또는 항체에서 발견되지 않는 추가의 특징을 포함한다 (즉 가변 영역은 공여체 CDR 잔기와 수용체 프레임워크 잔기들을 포함한다).

[0044] 용어 "인간화된 VH 도메인" 또는 "인간화된 VL 도메인"은 전체적으로 또는 실질적으로 비-인간 공여체 면역글로불린 (예컨대 마우스 또는 쥐)로부터의 일부 또는 모든 CDR 및 전체적으로 또는 실질적으로 인간 면역글로불린 서열로부터 유래하는 가변 영역 프레임워크 서열을 포함하는 면역글로불린 VH 또는 VL 도메인을 말한다. CDR을 제공하는 비-인간 면역글로불린은 "공여체"로 불리고 프레임워크를 제공하는 인간 면역글로불린은 "수용체"로 불린다. 일부 경우에, 인간화된 항체는 적절한 결합 특성을 증강시키기 위해 인간 가변 도메인 프레임워크 영역 내에 비-인간 잔기를 보유할 수 있다 (예컨대 프레임워크의 돌연변이는 항체가 인간화될 때 결합 친화성을 보존하기 위해 필요할 수 있다).

[0045] "인간화된 항체"는 인간화된 VH 도메인 및 인간화된 VL 도메인 중 하나 또는 둘 다를 포함하는 항체이다. 면역글로불린 불변 영역(들)은 존재할 필요는 없지만, 존재하는 경우 그것들은 전체적으로 또는 실질적으로 인간 면역글로불린 불변 영역들로부터 유래된다.

[0046] 인간화된 항체의 CDR은 해당 잔기들의 적어도 60%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 100% (Kabat에 의해 정의되는 것과 같이)가 각각의 CDR 사이에서 동일할 때 비-인간 항체의 해당하는 CDR"로부터 실질적으로 유래"한다. CDR이 실질적으로 비-인간 면역글로불린으로부터 유래되는 인간화된 VH 또는 VL 도메인의 특별한 변형에서, 인간화된 VH 또는 VL 도메인의 CDR은 해당하는 비-인간 VH 또는 VL CDR에 관련하여 세 개의 모든 CDR을 가로질러 6개 이하 (예컨대 5 이하, 4 이하, 3 이하, 2 이하 또는 1 이하)의 아미노산 치환을 가진다. 항체 VH 또는 VL 도메인의 가변 영역 프레임워크 서열 또는 존재하는 경우 면역글로불린 불변 영역의 서열은 Kabat에 의해 정의된 해당 잔기들의 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 100%가 동일할 때 각각 인간 VH 또는 VL 프레임워크 서열 또는 인간 불변 영역"으로부터 실질적으로 유래"한다. 그러므로, 인간화된 항체의 모든 부분은, 아마도 CDR을 제외하고, 전체적으로 또는 실질적으로 자연 인간 면역글로불린 서열로부터 유래된다.

[0047] 항체의 그것의 표적 항원에 대한 특이적 결합은 적어도 10^6, 10^7, 10^8, 10^9 또는 $10^{10} M^{-1}$의 친화성을 의미한다. 특이한 결합은 크기에서 검출가능할 정도로 더 높고 적어도 하나의 비관련 표적에서 일어나는 비-특이적 결합과 구별가능하다. 특이한 결합은 특정 기능성 기들 사이의 결합의 형성 또는 특별한 공간 맞춤(spatial fit)(예컨대 열쇠와 자물쇠 유형)의 결과일 수 있는 한편, 비특이적 결합은 통상적으로 반 데르 발스 힘의 결과이다. 그러나 특이적 결합은 필수적으로 단클론성 항체가 하나 및 단지 하나의 표적에만 결합하는 것을 의미하는 것은 아니다.

[0048] 본원에서 기술된 것과 같은 단백질과 관련하여, SEQ ID NO에 의해 명시되는 것들에 해당하는 아미노산 잔기들에 대한 언급은 그런 잔기들의 번역-후 변형을 포함한다.

[0049] 본원에서 기술된 것과 같은 항체-약물 포합체 제형의 맥락에서 용어 "안정화된"은 항체-약물 포합체가 본질적으로 보관시에 그것의 물리적 및 화학적 동일성 및 통합성을 보유하는 제형을 말한다. 단백질 안정성을 측정하기 위한 다양한 분석적 기법은 해당 기술분야에서 활용가능하다 (예컨대 *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301 (Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. 1991 and *Jones, Adv. Drug Delivery Rev.* 10:29-90, 1993 참조). 단백질 안정성을 측정하기 위한 예시적인 기법들 또한 본원에 기술되어 있다 (아래의 실시예 참조). 안정성은 선택된 시간 기간 동안 선택된 온도에서 측정될 수 있다. 신속한 시험을 위해, 제형은 더 높은 또는 "가속화된" 온도, 예를 들면 40℃에서 1주 내지 1개월 또는 시간 안정성이 측정되는 그 이상의 기간 동안 유지될 수 있다. 예시적인 구체예에서, 제형은 성분 항체 단백질의 부산물, 예를 들면 고분자량 응집 생성물, 저분자량 분해 또는 단편화 생성물, 산성 종들, 화학적 분해물 또는 그것들의 혼합물의 형성에 대해 허용적이지 않다. 용어 "안정성"은 항체와 같은 분자 종이 그것의 원래의 화학적 동일성, 예를 들면 일차, 이차 및/또는 삼차 구조를 보유하는 시간보다 긴 시간의 길이를 말한다.

[0050] 용어 "부산물"은 주어진 제형의 치료적 항체-약물 포합체의 비율을 손상시키거나 감소시키는 바람직하지 못한 생성물을 포함한다. 전형적인 부산물은 항체-약물 포합체의 응집체, 항체-약물 포합체의 단편들 (예를 들면 약물-링커의 탈아민화 또는 가수분해 또는 화학적 분해 및 단편화에 의한 항체의 분해에 의해 생성됨), 항체-약물 포합체의 산성 변이체 또는 그것들의 혼합물을 포함한다.

[0051] 항체-약물 포합체 (ADC)는 전형적으로 링커를 통해 세포독성 약물에 포합된 항체이다. 링커는 절단가능한 단위를 포함하거나 비-절단성일 수도 있다. 절단가능한 단위는 예를 들면 이황화 교환을 통해 절단가능한 이황화 함유 링커, 산성 pH에서 절단가능한 산-가변성 링커 및 가수분해 효소 (예컨대 글리코실 가수분해효소, 예컨대 글루쿠로니다제), 에스테라제 및 펩티다제 (예컨대 펩티드 링커 및 글루쿠로니드 링커)에 의해 절단가능한 링커를 포함한다. 비-절단성 링커는 단백질 가수분해성 항체 분해 메커니즘을 통해 약물을 방출하는 것으로 여겨진다.

[0052] 용어 "고분자량 응집체"는 항체-약물 포합체 (ADC)의 응집체와, 뿐만 아니라 ADC의 단편들 (예를 들면 가수분해에 의한 폴리펩티드의 분해에 의해 생성된)을 포함하는 응집체 및 ADC와 그런 단편들의 혼합물을 포함하는 응집체를 포함한다. 고분자량 응집체의 존재는 예컨대 크기-축출 크로마토그래피 (SEC)에 의해 측정될 수 있다. 전형적으로, 고분자량 응집체는 치료 단량체 ADC보다 큰 분자량을 가지는 복합체이다. 항체 성분이 두 개의 동일한 쌍의 면역글로불린 사슬로 이루어진 사량체인 ADC의 경우에, 각각의 쌍은 하나의 경쇄와 하나의 중쇄 (예컨대 IgG 아이소타입의)를 가지고, 그런 응집체는 약 150 kD보다 크다. 그러나 항체 성분이 두 개의 면역글로불린 경쇄 및 두 개의 면역글로불린 중쇄로 이루어진, 전형적인 단일특이성의 사량체 항체 단백질의 그것보다 크거나

작은 분자량을 가지는 경우에 (예컨대 단일-사슬 항체 또는 이중특이성 항체), 그런 응집체의 크기는 그에 따라 달라질 수 있다.

[0053] 용어 "저분자량 분해 생성물"은 예를 들면 항체-약물 포합체 (ADC)의 단편들, 예를 들어 탈아민화 또는 가수분해에 의해 생성된 단편들을 포함한다. 저분자량 분해 생성물의 존재는 예컨대 크기-축출 크로마토그래피 (SEC)에 의해 측정될 수 있다. 전형적으로, 저분자량 분해 생성물은 치료 단량체 ADC보다 적은 분자량을 가진다. 항체 성분이 두 개의 동일한 쌍의 면역글로불린 사슬로 이루어진 사량체인 ADC의 경우에, 각각의 쌍은 하나의 경쇄와 하나의 중쇄 (예컨대 IgG 아이소타입의)를 가지고, 그런 분해 생성물은 약 150 kD보다 적다. 그러나 항체 성분이 두 개의 면역글로불린 경쇄 및 두 개의 면역글로불린 중쇄로 이루어진, 전형적인 단일특이성의 사량체 항체 단백질의 그것보다 크거나 작은 분자량을 가지는 경우에 (예컨대 단일-사슬 항체 또는 이중특이성 항체), 그런 분해 생성물의 크기는 그에 따라 달라질 수 있다.

[0054] 관심의 항체-약물 포합체 (ADC)의 "산성 변이체"는 ADC의 실험적 PI보다 더 산성인 ADC 변이체이다. 산 변이체의 존재는 예컨대 양이온 교환 크로마토그래피 또는 영상 모세관 IEF (icIEF)에 의해 측정될 수 있다. 산성 변이체의 예시는 탈아민화된 변이체이다. 단백질 분자의 탈아민화된 변이체는 하나 또는 그 이상의 중성 아미드 측쇄(들)이 전체 산성 특성을 가지는 잔기로 전환되어 있는 것들이다. (예컨대 원래의 폴리펩티드의 하나 또는 그 이상의 아스파라긴 잔기(들)이 아스파테이트로 전환되었다).

[0055] 본원에서 사용되는 것과 같은 용어 "희석제"는 본원에서 기술된 것과 같이 예시적인 또는 적절한 농도 또는 농도들을 변경시키거나 이루는데 적당한 용액을 말한다.

[0056] 용어 "용기"는 물체 또는 액체가 배치되거나 담길 수 있는, 예컨대 보관을 위한 어떤 것 (예를 들면 홀더, 용기, 선박 등)을 말한다.

[0057] 용어 "투여 경로"는 치료 단백질을 전달하기 위한, 예를 들면 비경구적으로, 정맥 내로, 근육 내로 또는 피하로 전달하기 위한, 기술 분야에서 인정된 투여 경로를 포함한다. 암의 치료를 위해 ADC를 투여하기 위해서는, 정맥 내 또는 피하 투여에 의해 전신적인 순환계 안으로 투여하는 것이 바람직할 수 있다. 고체 종양을 특징으로 하는 암의 치료를 위해서는, 투여는, 그렇게 하는 것이 바람직하다면 종양 안으로 직접 국한될 수 있다.

[0058] 용어 "치료"는 질병을 가지는 환자에게, 그 질병을 낫게 하거나, 치유하거나, 경감시키거나, 지연시키거나, 완화시키거나, 변경시키거나, 해결하거나, 좋아지게 하거나, 개선시키거나 또는 영향을 미치게 할 목적으로 치료제를 투여하는 것을 말한다.

[0059] 용어 "환자"는 예방적 또는 치료적 치료를 받아들이는 인간 및 다른 포유류 대상을 포함한다.

[0060] 용어 "유효량", "유효 용량" 또는 "유효한 단위용량"은 바람직한 효과를 이루거나 적어도 부분적으로 이루기에 충분한, 예컨대 질병 또는 장애의 하나 또는 그 이상의 증상들의 발생을 억제하거나 개선시키기에 충분한 양을 말한다. 약학 조성물의 유효량은 "유효한 처방"으로 투여된다. 용어 "유효 처방"은 질병 또는 장애의 예방적 또는 치료적 치료를 이루기에 적당한 투여되는 조성물의 양과 단위용량 빈도의 조합을 말한다.

[0061] 본원에서 사용되는 것과 같은 용어 "단위용량 유닛 형태" (또는 "유닛 단위용량 형태")는 치료하고자 하는 환자에 대해 일원화된 단위용량으로서 적당한 물리적으로 별개의 유닛을 말하고, 각각의 유닛은 필요한 약학적 담체, 희석제 또는 부형제와 결합하여 바람직한 치료 효과를 나타내기 위해 계산된 활성 화합물 (본 발명에 따르는 ADC)의 예정된 양을 함유한다. 발명의 단위용량 유닛 형태에 대한 명세는 활성 화합물의 독특한 특성 및 이루고자 하는 특별한 치료 효과, 및 그런 화합물을 환자들의 치료를 위해 합성하는 기술분야에 고유한 한계점들에 의해 영향을 받고 직접적으로 좌우된다.

[0062] 본 발명의 제형에서 ADC의 실제 단위용량 수준은 환자에게 독성을 나타내지 않으면서 그 특별한 환자, 조성물 및 투여 방식에 대한 바람직한 치료 반응을 이루기에 효과적인 ADC의 양을 얻기 위해 달라질 수 있다. 선택된 단위용량 수준은 사용된 본 발명의 특정 조성물의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용되는 특정 화합물의 배설 속도, 치료 기간, 사용되는 그 특정 조성물과 조합하여 사용되는 다른 약물들, 화합물들 및/또는 물질들, 치료되고 있는 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 일반적인 건강상태 및 이전의 병력을 포함한 다양한 약물동력학적 인자들, 및 의학 기술분야에 잘 알려져 있는 유사한 인자들에 따라 좌우될 것이다.

[0063] "세포 독성 효과"는 표적 세포를 고갈, 제거 및/또는 사멸시키는 것을 말한다. "세포 독성제"는 세포에 대해 세포독성 효과를 나타내는 제제를 말한다.

[0064] "세포 정지 효과"는 세포 증식의 억제를 말한다. "세포 정지제"는 세포에 대해 세포 정지 효과를 나타내고, 그

로써 세포의 구체적인 하위세트의 성장 및/또는 팽창을 억제하는 제제를 말한다.

[0065] 만약 두 개의 아미노산 서열의 아미노산 잔기들이 최대의 일치성을 위해 배열될 때 동일하다면 두 아미노산 서열은 "100% 아미노산 서열 동일성"을 가진다. 서열 비교는 DNASTAR (Madison, Wisconsin)에 의해 제작된 LASERGENE 생물정보학 컴퓨팅 슈트에 포함된 것들과 같은 표준 소프트웨어 프로그램을 사용하여 수행될 수 있다. 최적 배열을 측정함으로써 두 개의 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열들을 비교하기 위한 다른 방법들은 해당 기술분야에 숙련된 기술을 가진 사람들에게 잘 알려져 있다 (예컨대 Peruski and Peruski, *The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research* (ASM Press, Inc. 1997); Wu et al. (eds.), "Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins," in *Methods in Gene Biotechnology* 123-151 (CRC Press, Inc. 1997); Bishop (ed.), *Guide to Human Genome Computing* (2nd ed., Academic Press, Inc. 1998) 참조.) 만약 두 개의 서열이 상호 관련하여 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 가진다면 두 아미노산 서열은 "실질적인 서열 동일성"을 가지는 것으로 고려된다.

[0066] 백분율 서열 동일성은 Kabat 넘버링 관례에 의해 최대로 배열된 항체 서열로 측정된다. 배열 후에, 만약 대상 항체 영역 (예컨대 중쇄 또는 경쇄의 전체 가변 도메인)이 참조 항체의 동일한 영역과 비교된다면, 대상 및 참조 항체 영역들 사이의 백분율 서열 동일성은 대상 및 참조 항체 영역 둘 다에서 동일한 아미노산에 의해 차지된 위치들의 수를 두 영역의 배열된 위치의 총 수로 나눈 후 100을 곱하여 백분율로 전환시킨 것이며, 이때 갭은 계산되지 않는다.

[0067] 용어 "약학 제형"은 그런 형태로 (대상에게 투여될 때) 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적인 것을 허용하고, 그 제형이 투여될 대상에 대해 허용될 수 없을 정도로 독성인 추가 성분들을 함유하지 않는 제제를 말한다. 그런 제형은 멸균성이다.

[0068] 하나 또는 그 이상의 인용된 요소들을 "포함하는" 조성물 또는 방법들은 구체적으로 인용되지 않은 다른 요소들을 포함할 수 있다.

[0069] 본원의 숫자 범위에 대한 언급 (예컨대 "X 내지 Y" 또는 "X로부터 Y까지")은 그 범위를 정의하는 종점들과 그 범위 내에 속하는 모든 값을 포함한다.

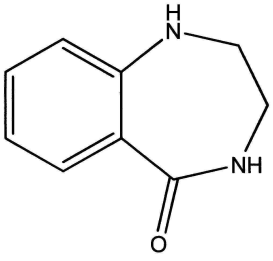
[0070] 맥락으로부터 다르게 드러나지 않는 한, 값이 "약" X 또는 "대략적으로" X로 표현될 때, X의 진술된 값은 ±10% 까지 정확한 것으로 인지될 것이다.

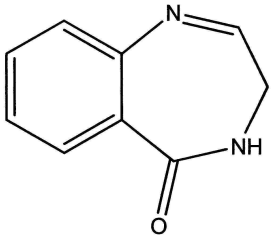
[0071] 예시적인 구체예들의 설명

[0072] **벤조다이아제핀 항체-약물 포합체**

[0073] 벤조다이아제핀 항체-약물 포합체는 반드시 필요한 것은 아니지만, 전형적으로 링커를 통해 벤조다이아제핀 이량체에 포합된 항체를 말한다. 벤조다이아제핀 약물-링커는 링커에 부착된 벤조다이아제핀 이량체를 말한다. 벤조다이아제핀 약물-링커의 링커 성분은 전형적으로 항체에의 부착을 위한 반응성 기를 가질 것이다. 벤조다이아제핀 화합물은 그것의 코어에 다이아제핀 고리에 융합된 벤젠 고리를 가진다. 다이아제핀 고리에 융합된 벤젠 고리에 대한 예시적인 고리 구조는 다음과 같다:

3,4-다이하이드로-1*H*-벤조[*e*][1,4]다이아제핀-5(2*H*)-온





3*H*-벤조[*e*][1,4]다이아제핀-5(4*H*)-온

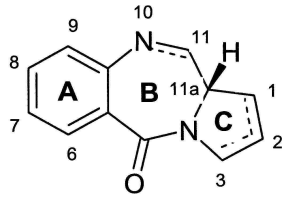
[0074]

[0075] 벤조다이아제핀 화합물들은 두 고리에 있는 치환체의 수, 유형 및 위치 및 다이아제핀 고리의 포화 정도가 다르다. 그것들은 또한 벤젠 및/또는 다이아제핀 고리에 융합된 추가 고리들의 수가 다르다. 벤조다이아제핀 화합물의 정의에 포함되는 것은 벤젠 또는 다이아제핀 고리가 하나 또는 그 이상의 방향족 또는 비-방향족 탄소고리형

또는 헤테로고리형 고리에 융합된 것들이다. 벤조다이아제핀 이량체는 두 개의 벤조다이아제핀 유닛이 사슬(tether)을 통해 함께 결합됨으로써 형성된 화합물이다.

[0076] 벤조다이아제핀 항체-약물 포합체의 항체 성분은 하나 또는 그 이상의 벤조다이아제핀 약물-링커, 예컨대 1 내지 20개의 약물-링커에 포합될 수 있다. 일부 측면으로, 벤조다이아제핀 항체-약물 포합체의 항체 성분은 1, 2, 3 또는 4개의 약물-링커에 포합될 것이다. 포합은 항체 상의 상이한 위치들을 통해 이루어질 수 있다. 일부 측면으로 포합은 시스테인 잔기의 황 원자를 통한 것일 수 있다. 일부 측면에서 시스테인 잔기는 항체의 사슬간 이황화물의 시스테인 잔기이다. 다른 측면에서 시스테인 잔기는 항체 안으로 공학처리된다. 일부 측면에서, 시스테인 잔기는 EU 색인 (Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991))에 의해 측정된 바 위치 239 (인간 IgG1)에서 항체 안으로 공학처리된다. 일부 측면에서, 벤조다이아제핀 ADC 혼합물 또는 제형에서 항체당 평균 2개의 약물-링커가 있을 것이고, 그 약물-링커는 EU 색인 (Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991))에 의해 측정된 바 위치 239 (인간 IgG1)에서 항체 안으로 도입된 시스테인 잔기에 포합될 것이다.

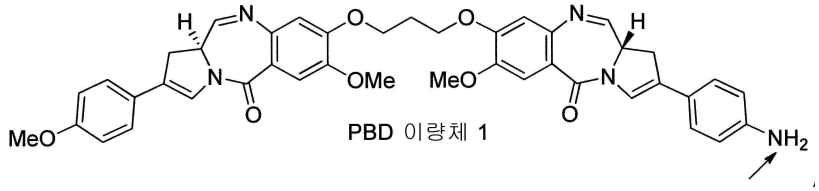
[0077] 한 측면으로, 벤조다이아제핀 이량체는 피롤로벤조다이아제핀 (PBD) 이량체이다. PBD는 다음 일반 구조식을 가진다:



[0078]

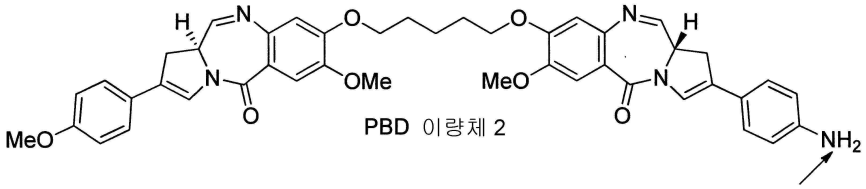
[0079] PBD들은 방향족 A 고리와 피롤로 C 고리 둘 다에서 치환체의 수, 유형 및 위치, 및 C 고리의 포화 정도가 다르다. B-고리에서, N10-C11 위치에는 이민 (N=C), 카비놀아민 (NH-CH(OH)) 또는 카비놀아민 에테르 (NH-CH(OR))이 있는데, 그것은 DNA를 알킬화하는 데 기여하는 친전자성 중심이다. 알려진 자연 생성물은 모두 키랄 C11a 위치에서 (S)-형태를 가지며, 그것은 C 고리에서 A 고리를 향해 보았을 때 생성물에 우측 꼬임을 제공한다. 이것은 생성물에 B-형태 DNA의 마이너 그루브를 가지는, 아이소헬리시티(isohelicity)에 대한 적절한 3-차원 형상을 제공하고, 그것은 결합 부위에서 꼭 맞는 결합을 유발한다. PBD의 마이너 그루브에서 부가물을 형성하는 능력은 PBD가 DNA 프로세싱을 간섭하고, 그로써 항종양제로서의 사용을 가능하게 한다. 이들 분자의 생물학적 활성은 예를 들면 두 개의 PBD 유닛을 함께 결합시킴으로써 (예컨대 가요성 알킬렌 링커를 경유한 C8/C'-하이드록실 기능성을 통해) 강화될 수 있다. PBD 이량체는 그것의 생물학적 활성에 대해 주로 원인이 되는 것으로 여겨지는 앞뒤 역순상 동서열의 5'-Pu-GATC-Py-3' 가닥간 교차결합과 같은 서열-선택적 DNA 병변을 형성하는 것으로 여겨진다.

[0080] 포합체로서 사용될 수 있는 예시적인 PBD 이량체 또는 그것들의 염 (예컨대 약학적으로 허용되는 염)은 다음과 같다:

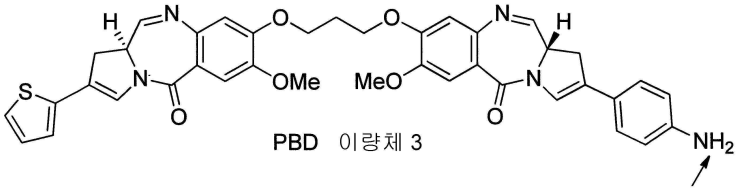


PBD 이량체 1

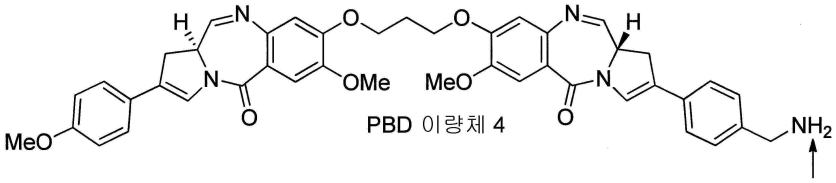
[0081]



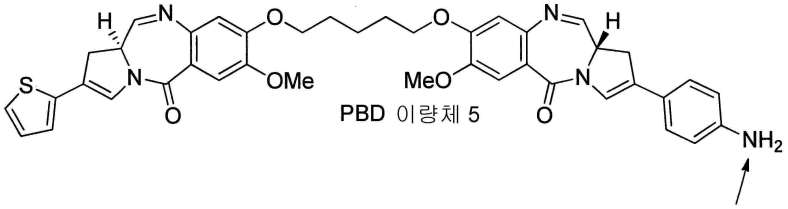
PBD 이량체 2,



PBD 이량체 3

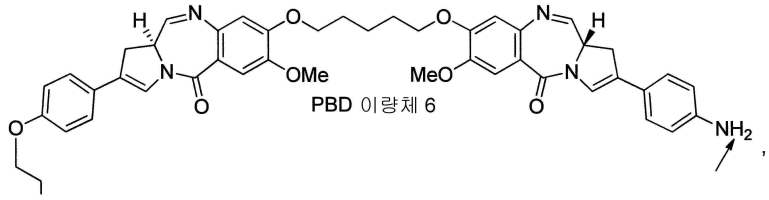


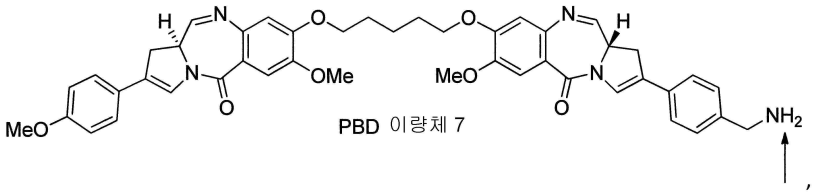
PBD 이량체 4,

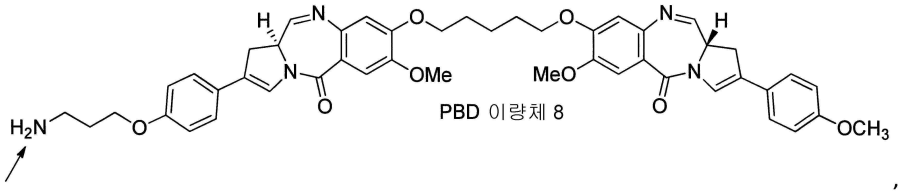


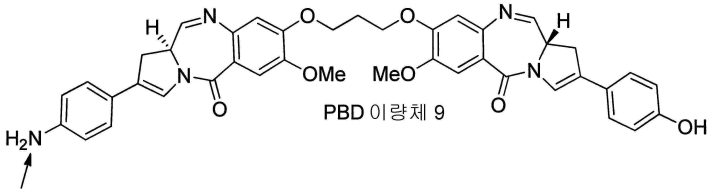
PBD 이량체 5,

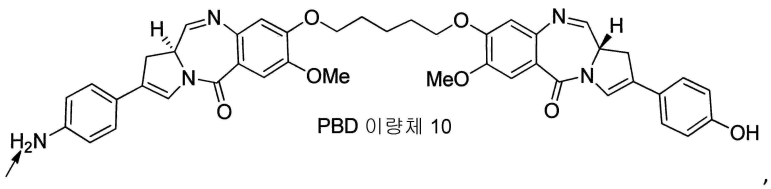
[0082]



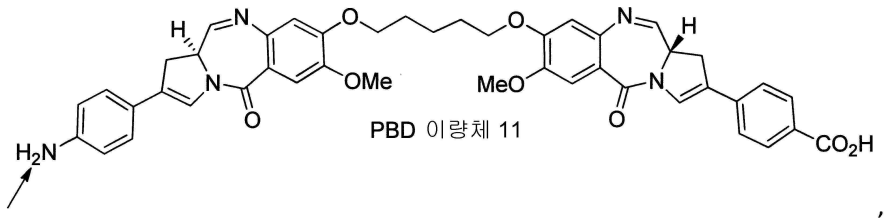






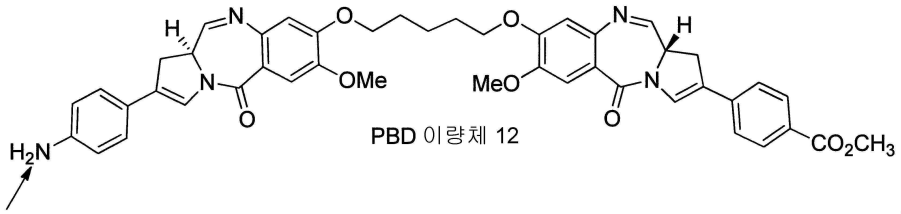


[0083]



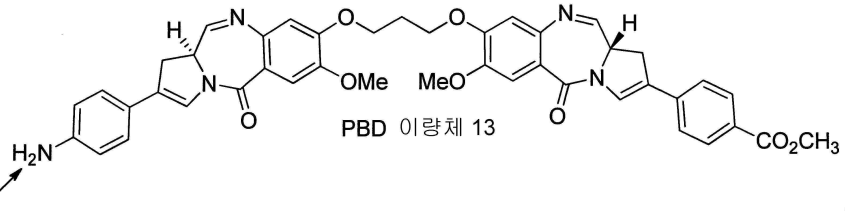
PBD 이량체 11

,



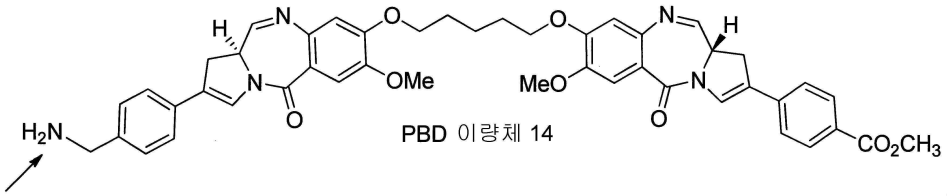
PBD 이량체 12

,



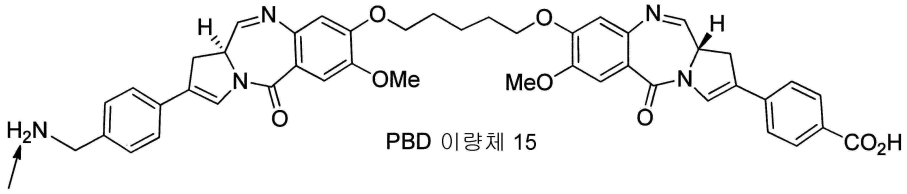
PBD 이량체 13

,



PBD 이량체 14

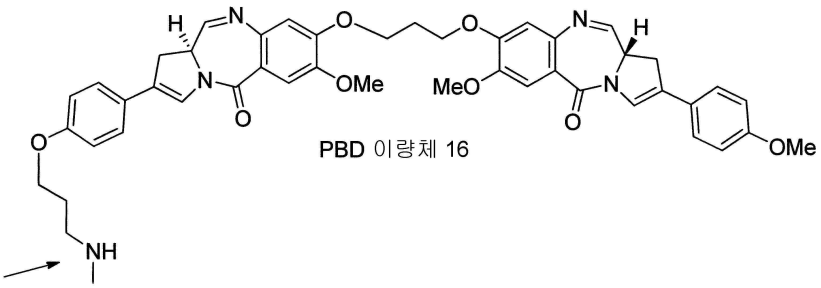
,



PBD 이량체 15

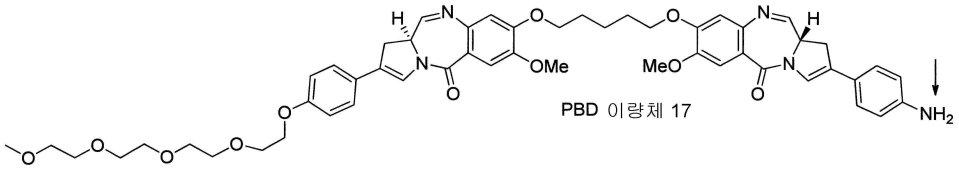
,

[0084]



PBD 이량체 16

[0085] 또는



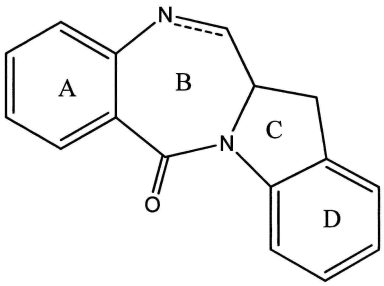
PBD 이량체 17

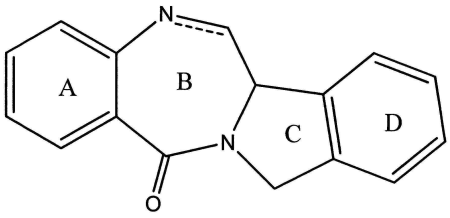
[0086]

[0087] PBD 이량체는 링커에 대한 포합에 적당한 어떠한 위치에서든지 항체에 결합될 수 있다. 예를 들어 어떤 구체예

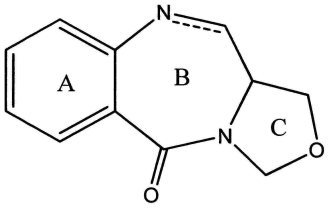
에서, PBD 이량체는 항체에 화합물을 결합시키기 위한 앵커(anchor)를 제공하는 C2 위치에 치환체 (예컨대 일차 또는 이차 아민)를 가질 것이다. C2 위치는 상기 제시된 예시적인 구조들에서 화살표로 표시된다. 대체 구체예에서, PBD 이량체의 N10 위치는 항체에 화합물을 결합시키기 위한 앵커를 제공할 것이다.

[0088] 다른 측면으로, 벤조다이아제핀 이량체는 인돌리노벤조다이아제핀 이량체 또는 옥사졸리디노벤조다이아제핀 이량체이다. 인돌리노벤조다이아제핀 (IBD) 및 옥사졸리디노벤조다이아제핀 (OBD)의 일반적 구조는 다음과 같다:





[0089] ,

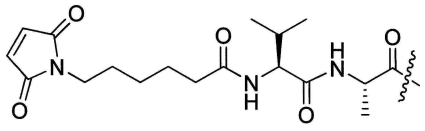


[0090] 및 .

[0091] 인돌리노벤조다이아제핀 및 옥사졸리디노벤조다이아제핀은 그것들의 고리에 있는 치환체의 수, 유형 및 위치가 다르다. PBD와 같이, 두 개의 인돌리노벤조다이아제핀 또는 두 개의 옥사졸리디노벤조다이아제핀 유닛은, 예컨대 두 개의 단량체 유닛의 A 고리들 사이의 에테르 기능성을 통해 함께 결합되어 이량체를 형성할 수 있다. PBD를 사용할 때와 같이, 인돌리노벤조다이아제핀 이량체 또는 옥사졸리디노벤조다이아제핀 이량체는 링커에의 포합에 적당한 어떠한 위치에서든지 항체에 결합될 수 있다.

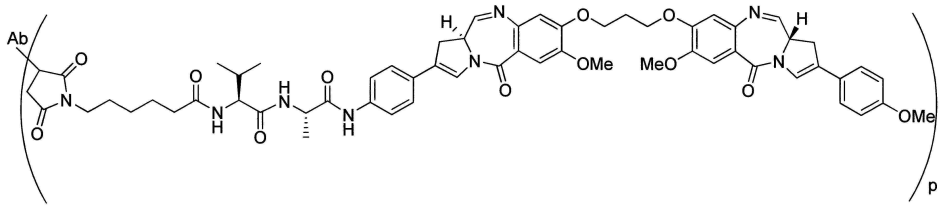
[0092] 약물 성분으로서 PBD 이량체를 포함하는 벤조다이아제핀 ADC는 또한 PBD ADC로서 언급될 수 있다. 유사하게, 약물 성분으로서 인돌리노벤조다이아제핀 이량체를 포함하는 벤조다이아제핀 ADC는 IBD ADC로서 언급될 수 있고, 약물 성분으로서 옥사졸리노벤조다이아제핀 이량체를 포함하는 ADC는 OBD ADC로서 언급될 수 있다. 전형적으로 PBD ADC, IBD ADC 및 OBD ADC를 포함하여, 벤조다이아제핀 ADC는 벤조다이아제핀 약물과 항체 사이에 링커를 포함한다. 링커는 절단가능한 유닛 (예컨대 효소에 대한 표적 기질인 아미노산 또는 아미노산들의 연속적인 서열) 또는 비-절단성 링커 (예컨대 항체의 분해에 의해 방출된 링커)를 포함할 수 있다. 링커는 추가로 항체에의 결합을 위한 말레이미드 기, 예컨대 말레이미도카프로일을 포함할 수 있다. 링커는 항체에의 결합을 위한 대체 기, 이를테면 예를 들어 N-하이드록시석신이미딜 에스테르 또는 불안정한 이황화물, 이를테면 예를 들어 이황화 싸이오피리딜을 포함할 수 있다. PBD 이량체, IBD 이량체, OBD 이량체, 링커 및 그것들의 포합체는 해당 기술분야에 알려져 있다. 예를 들어 WO 2010/091150, WO 2012/112708 , WO 2012/128868, WO 2011/023883 및 WO 2009/016516 참조.

[0093] 본원에 기술된 것들 중 어느 것을 포함하여, 벤조다이아제핀 이량체에의 항체의 결합을 위한 예시적인 링커는 다음과 같고, 식에서 파선은 약물에 대한 부착 부위를 나타내며 항체는 말레이미드 기를 통해 결합된다:



[0094]

[0095] 예시적인 PBD-기초 항체-약물 포합체는 아래에 나타낸 것과 같이 항체-약물 포합체 또는 그것의 염 (예컨대 약학적으로 허용되는 염):

[0096] 

[0097] 을 포함하고, 이때 Ab는 항체 (예컨대 단클론성 항체)이며, 약물-부하는 항체당 약물-링커 분자의 수인 p로 표시된다. 맥락에 따라, p는 항체당 약물-링커 분자의 평균 수를 나타낼 수 있고, 또한 평균 약물 부하로 언급된다. P의 범위는 1 내지 20이고, 바람직하게는 1 내지 8이다. 일부 측면에서, p가 평균 약물 부하를 나타낼 때, p의 범위는 약 2 내지 약 5이다. 일부 측면에서, p는 약 2, 약 3, 약 4 또는 약 5이다. 일부 측면에서 항체는 시스테인 잔기의 황 원자를 통해 약물 링커에 포합된다. 일부 측면에서 시스테인 잔기는 항체의 사슬간 이황화물의 시스테인 잔기이다. 다른 측면에서 시스테인 잔기는 항체 안으로 공학처리된다. 어떤 측면에서, 시스테인 잔기는 EU 색인 (Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991))에 의해 측정된 바 위치 239 (인간 IgG1)에서 항체 안으로 공학처리된다. 그런 일부 측면에서, p는 약 2이다. 그런 ADC의 제조 방법은 해당 기술분야에 알려져 있다 (예를 들어 국제 공보 WO2011/130613호 참조).

[0098] **포합 반응**

[0099] 본 발명은 무엇보다도, 벤조다이아제핀 ADC 및 벤조다이아제핀-관련 불순물들을 포함하는 혼합물로부터 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들을 제거하기 위한 방법에 관련된다. 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물은 항체의 벤조다이아제핀 이량체 또는 벤조다이아제핀 약물-링커에의 포합 반응으로부터 발생하는 어떠한 약물-관련 불순물이다. 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들은 예를 들면 벤조다이아제핀 이량체 유리 약물, 벤조다이아제핀 약물-링커, 퀀칭된 벤조다이아제핀 약물-링커 또는 벤조다이아제핀 약물-링커 분해 생성물을 포함할 수 있다. 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들은 항체에 포합된 벤조다이아제핀 약물 또는 항체에 포합된 약물-링커가 아니다.

[0100] 본 발명의 일부 측면으로, 항체는 벤조다이아제핀 ADC 및 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들을 포함하는 혼합물 (또한 본원에서 포합 반응 혼합물로서도 언급됨)을 형성하기에 충분한 조건하에서 벤조다이아제핀 약물-링커와 접촉된다. 다른 측면으로, 항체-링커 (링커에 포합된 항체)는 벤조다이아제핀 ADC 및 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들을 포함하는 혼합물 (또한 본원에서 포합 반응 혼합물로서도 언급됨)을 형성하기에 충분한 조건하에서 벤조다이아제핀 유리 약물과 접촉된다. 다른 측면으로, 항체-링커는 벤조다이아제핀 ADC 및 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들을 포함하는 혼합물 (또한 본원에서 포합 반응 혼합물로서도 언급됨)을 형성하기에 충분한 조건하에서 벤조다이아제핀 약물-링커와 접촉된다. 항체를 링커 또는 약물-링커에 포합시키는 일반적인 방법은 해당 기술분야에 알려져 있고 본원에서는 상세하게 기술되지 않는다. 일부 측면에서, 포합은 항체의 라이신 잔기에 대해 일어날 것이다. 다른 측면에서, 포합은 항체 상에 존재하는 천연 또는 공학처리된 시스테인 (예컨대 사슬간 이황화물의 시스테인 또는 항체의 중쇄 또는 경쇄에 도입된 시스테인 잔기)에 대해 일어날 것이다. 일부 측면에서, 포합은 항체 상에 존재하는 공학처리된 시스테인에 대해 일어날 것이고, 그 항체는 벤조다이아제핀 약물-링커와 접촉하기 전에 환원될 것이며, 항체는 부분적으로 재산화될 것이고 (즉 도입된 시스테인에 대해서가 아니라 사슬간 이황화물에 대해서 재산화됨) 벤조다이아제핀 약물-링커는 부분적으로 재산화된 항체 상의 공학처리된 시스테인에 포합될 것이다. 그런 일부 측면에서, 공학처리된 시스테인은 위치 239 (IgG1, Kabat에서 설명된 것과 같은 EU 색인 넘버링)에 있을 것이다.

[0101] 해당 기술분야의 숙련자는 항체 또는 항체-링커를 약물 또는 약물-링커에 포합시키기 위해 사용된 조건들이 부분적으로 약물 및 링커의 정체성에 좌우될 것임을 인지할 것이다. 일반적으로, 포합 반응은 약 0℃ 내지 약 40℃의 온도에서 수행된다. 일부 구체예에서, 포합 반응은 약 4℃에서 수행된다. 일부 구체예에서, 포합 반응은 약 25℃에서 수행된다. 일부 구체예에서, 포합 반응은 약 37℃에서 수행된다. 포합 반응은 어떠한 적당한 길이의 시간 동안 수행될 수 있다. 일반적으로 포합 반응 혼합물은 수분 내지 수 시간 사이의 어떠한 시간 동안 적당한 조건하에서 인큐베이션된다. 반응은 예를 들면 약 1분, 또는 약 5분, 또는 약 30분, 또는 약 1시간 30분, 또는 약 4시간, 또는 약 12시간 또는 약 24시간 동안 수행될 수 있다. 일반적으로 포합 반응 혼합물은 약 6 내지 약 9 또는 약 7 내지 약 8의 pH 범위에서 형성된다. 다양한 완충제가 특정 pH를 유지하기 위해 사용될 수 있다. 적당한 완충제의 실례로는, 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 2-(N-모르폴리노)에탄설폰산 (MES), 2-[4-(2-하이드록시에틸)피페라진-1-일]에탄설폰산 (HEPES), 3-모르폴리노프로판-1-설폰산 (MOPS), 2-아미노-2-하이

드록시메틸-프로판-1,3-다이올 (TRIS), 시트르산 나트륨, 아세트산 나트륨 및 붕산 나트륨을 포함한다. 공용매 (예컨대 다이메틸 아세트아미드, 프로필렌 글리콜, 다이메틸설폭시드, 다이메틸포름아미드, 에탄올, 메탄올, 테트라하이드로퓨란, 아세톤 및 아세트산), 염 (예컨대 NaCl, KCl, $CaCl_2$ 및 Mn^{2+}와 MG^{2+}의 염), 킬레이터 (예컨대 에틸렌 글리콜-비스(2-아미노에틸에테르)-*N*,*N*,*N*′,*N*′-테트라아세트산 (EGTA), 2-({2-[비스(카르복시메틸)아미노]에틸}(카르복시메틸)아미노)아세트산 (EDTA) 및 1,2-비스(o-아미노페녹시)에탄-*N*,*N*,*N*′,*N*′-테트라아세트산 (BAPTA))가 또한 필요에 따라 포함될 수 있다. 완충액, 공용매, 염 및 킬레이터 들은 어떠한 적당한 농도에서 사용될 수 있고, 그것은 해당 기술분야의 숙련자에 의해 쉽게 결정될 수 있다. 일반적으로, 완충액, 공용매, 염 및 킬레이터 들은 약 1μM 내지 약 1M 또는 심지어 더 높은 (예컨대 공용매에 따라 0 내지 50% v/v) 농도에서 반응 혼합물에 포함된다. 벤조다이아제핀 약물 또는 약물-링커의 어떠한 적당한 양이 포합에 대해 사용될 수 있다.

[0102] 일부 측면으로, 포합 반응 (예컨대 항체의 약물-링커에의 포합) 후에, 및 접선 유동 여과 전에, 과잉량의 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들은 퀀칭제를 사용함으로써 비반응성으로 만들어질 것이다. 퀀칭제는 반응성 부분에 공유 결합됨으로써 반응성 부분의 반응성을 없앨 수 있는, 항체 이외의 시약이다. 해당 기술분야의 숙련자는 퀀칭제가 약물 또는 링커의 성질을 토대로 선택될 것임을 인지할 것이다. 예를 들어 싸이올-함유 제제, 예컨대 B-머캡토 에탄올 또는 N-아세틸시스테인이 말레이미도 기 또는 다른 싸이올 반응성 기를 함유하는 과잉량의 약물-링커 화합물을 퀀칭하기 위해 사용될 수 있다. 글리신과 같은 아민은 N-하이드록시석신이미딜 에스테르를 함유하는 과잉량의 링커-약물 화합물을 퀀칭하기 위해 사용될 수 있다. 전형적으로, 퀀칭제는 항체 및 약물-링커와 관련하여 과잉량으로 사용된다.

[0103] 일부 측면에서, 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물은 퀀칭된 벤조다이아제핀 약물-링커일 것이다. 퀀칭된 포합 반응 혼합물은 포합 반응 (예컨대 항체의 약물-링커에의 포합, 항체-링커의 약물-링커에의 포합 또는 항체-링커의 약물에의 포합), 퀀칭제의 도입 및 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들의 퀀칭 후의 반응 혼합물을 말한다. 전형적으로 용어 퀀칭된 포합 반응 혼합물은 어떠한 정제 단계들 전의 혼합물을 말한다.

[0104] 본 발명의 벤조다이아제핀 이량체는 성질상 소수성이다. 본 발명자들은 놀랍게도 고도로 소수성인 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들이 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물과 ADC가 ADC 혼합물에 용해되어 있는 경우에도 ADC 혼합물로부터 제거하는 것이 어려울 수 있다는 것을 발견하였다. 본 발명자들은 7.50 미만의 SlogP 값을 가지는 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들이 7.50보다 큰 SlogP 값을 가지는 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들보다 본 발명의 방법을 사용하여 ADC 혼합물로부터 제거하는 것이 더 쉽다는 것을 발견하였다. 따라서, 바람직한 구체예에서, 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물은 7.50보다 크지 않은 SlogP 값, 보다 바람직하게는 7.0보다 크지 않은 SlogP 값, 보다 더 바람직하게는 6.5 또는 6.0보다 크지 않은 SlogP 값, 또는 심지어 5.8의 SlogP 값을 가질 것이다.

[0105] 본 발명자들은 퀀칭제가 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들의 소수성을 낮추기 위하여, 그로써 정제과정에 들이는 노력을 보조하기 위하여 사용될 수 있다는 것을 추가로 발견하였다. 퀀칭제가 결합하는 화합물의 소수성을 감소시키는 작용을 하는 퀀칭제를 선택함으로써, ADC 혼합물로부터 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물의 소멸은 개선될 수 있다. 따라서, 특히 바람직한 퀀칭제는, 퀀칭하고자 하는 화합물에 결합되었을 때, 그 결과의 화합물의 소수성을 감소시키는 작용을 하는 것들이다. 예를 들어 특히 바람직한 퀀칭제는 그것이 부착되는 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물 (예컨대 약물 또는 약물-링커)의 소수성을 감소시킬 것이다. 바람직한 일부 측면에서, 퀀칭된 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물은 7.50보다 크지 않은 SlogP 값, 보다 바람직하게는 7.0보다 크지 않은 SlogP 값, 보다 더 바람직하게는 6.5 또는 6.0보다 크지 않은 SlogP 값, 또는 심지어 5.8의 SlogP 값을 가질 것이다. 그런 일부 측면에서, 퀀칭되지 않은 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물은 퀀칭된 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물보다 높은 SlogP 값을 가졌다.

[0106] SlogP는 소수성의 척도이다. SlogP는 옥탄올/물 분배 계수의 로그 (내포된 수소를 포함함)이고 Chemical Computing 그룹으로부터의 프로그램 MOE를 사용하여 계산될 수 있다 (Wildman, S.A., Crippen, G.M.을 사용하여 계산된 SlogP 값; Prediction of Physiochemical Parameters by Atomic Contributions; *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 39 No. 5 (**1999**) 868-873).

[0107] 퀀칭제가 결합하여 화합물의 소수성을 감소시키는 작용을 하는 퀀칭제는 하전된 퀀칭제뿐 아니라 친수성임에도 불구하고 하전되지 않은 퀀칭제를 포함한다. 친수성 퀀칭제는 싸이올-당, 예컨대 싸이올-글루코오스와 페길화된 퀀칭제, 예컨대 페길화된 싸이올을 포함한다.

[0108] PBD 약물-링커 합성의 예시로서, WO 2011/130613호는 PBD 약물-링커를 합성하고, 이어서 그 PBD 약물-링커를 항체에 포합시키는 방법을 설명한다. 간단히 설명하자면, 50mM의 붕산 나트륨을 함유하고 있는 pH 7.4의 PBS 중의 항체들이 트리스(카르복시에틸)포스핀 염산염 (TCEP)으로 37℃에서 환원된다. 항체 사슬간 이황화물은 약물 링커를 사용한 알킬화에 활용될 수 있는 싸이올 형태에 공학처리된 시스테인을 남기는, 데하이드로아스코브산을 사용한 산화에 의해 재형성된다. 환원된 항체는 그런 다음 항체 싸이올당 ~1.5 당량의 말레이미드 약물-링커로, 약물-링커를 가용화하기에 충분한 공용매의 존재하에 알킬화된다. 약 90분 후에, 반응은 약물-링커에 관련하여 약 3 당량의 N-아세틸 시스테인의 첨가에 의해 퀀칭된다.

[0109] 사용된 포합 방법에 관계 없이, 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들은 혼합물에 존재할 것이다. 언제나 그런 것은 아니지만, 일반적으로, 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들은 혼합물에 약 10 내지 100 μM의 수준으로 존재할 것이다. 일부 측면에서, 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물은 퀀칭되거나 퀀칭되지 않은 약물-링커, 예컨대 N-아세틸 시스테인 퀀칭된 약물-링커일 것이다. 다른 측면으로, 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물은 퀀칭되거나 퀀칭되지 않은 유리 벤조다이아제핀 약물 (즉 링커 또는 항체에 부착되지 않은 약물)이다. 다른 측면으로, 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물은 벤조다이아제핀 약물-링커 분해 생성물, 예컨대 예를 들면 약물-링커의 산화 또는 가수분해된 유도체이다.

[0110] **접선 유동 여과 (TFF)**

[0111] 전형적으로 포합 반응과 임의의 퀀칭에 이어서, 벤조다이아제핀 ADC 및 벤조당아제핀 약물-관련 불순물들을 포함하는 혼합물에 대해 접선 유동 여과 (TFF)가 수행된다. 본 발명자들은 혼합물로부터 약물-관련 불순물들을 효율적으로 제거하기 위하여, 여과의 전 과정을 통해 사이클로덱스트린을 사용하고 최소 수준의 사이클로덱스트린을 유지하는 것이 바람직한 것을 발견하였다. 벤조다이아제핀 관련 불순물의 소멸을 최적화하기 위하여, 사이클로덱스트린은 실질적으로 ADC 혼합물의 성분들 (예컨대 ADC)의 용해도를 유지하는 수준에서 유지된다. 사이클로덱스트린은 바람직하게 여과 공정을 시작하기 전에 (예컨대 포합 및 임의의 퀀칭 후, 그러나 접선 유동 여과를 시작하기 전) 또는 여과 공정을 시작할 때 (또는 개시할 때) 혼합물에 첨가된다. 일부 측면에서, 사이클로덱스트린은 여과 공정이 시작된 후에, 그러나 실질적으로 어떠한 불순물이든 제거되기 전에 ADC 혼합물에 첨가될 것이다. 가용화제 (예컨대 사이클로덱스트린)는 바람직하게 혼합물에 대해 접선 유동 여과가 수행되기 전에 혼합물에 첨가된다. 사이클로덱스트린의 수준은 바람직하게 여과의 전 과정을 통해 최소 수준에서 유지된다.

[0112] 본 발명자들은 사이클로덱스트린이 그것의 첨가가 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들의 제거를 개선시킬뿐 아니라 그것의 제형된 약물-제품 안으로의 통합이 제형된 제품의 안정성을 개선시키기 때문에 특히 유익한 가용화제라는 것을 발견하였다. 사이클로덱스트린은 포합 반응 및 임의의 퀀칭 후의 벤조다이아제핀 ADC 및 벤조당아제핀 약물-관련 불순물들을 포함하는 혼합물에 첨가될 수 있다. 일부 측면으로, 적어도 약 1%w/v의 사이클로덱스트린 (즉 10g/리터)이 포합 반응 혼합물에 첨가된다. 일부 측면에서, 적어도 약 2%w/v의 사이클로덱스트린 (즉 20g/리터)이 포합 반응 혼합물에 첨가된다. 일부 측면에서, 적어도 약 3%w/v의 사이클로덱스트린 (즉 30g/리터)이 포합 반응 혼합물에 첨가된다. 일부 측면에서, 약 1%w/v의 사이클로덱스트린 내지 약 10%w/v의 사이클로덱스트린, 약 2%w/v의 사이클로덱스트린 내지 약 10%w/v의 사이클로덱스트린, 또는 약 3%w/v의 사이클로덱스트린 내지 약 10%w/v의 사이클로덱스트린, 또는 약 3%w/v의 사이클로덱스트린 내지 약 6%w/v의 사이클로덱스트린 또는 약 3%w/v의 사이클로덱스트린 내지 약 4%w/v의 사이클로덱스트린이 사이클로덱스트린 혼합물에 첨가된다.

[0113] 접선 유동 여과는 정제하고자 하는 샘플이 반-투과성 막의 표면을 접선으로 지나 재순환되는 여과 공정을 말한다. 막 기공을 통과하기에 너무 큰 거대부자들은 막의 상류측 (보유물 측)에 보유되고 기공을 통해 지나가기에 충분히 작은 분자들은 여과측으로 통과한다. 일반적으로, 어떤 분자들이 여과물에서 제거되고 보유물 중에 보유되는 분자들이 어떤 것인지의 측정은 주로 분자량, 용해도 및 필터 기공 크기에 따라 좌우된다. 공급물 유속, 막간 차압(trans-membrane pressure), 막 유형 또는 조성, 유체 혼합물 중의 성분들의 농도, 유체 혼합물의 온도 및 점도와 같은 다른 인자들이 소멸의 속도 및 정도에 영향을 미칠 수 있다. 포합 반응 혼합물로부터 약물-관련 불순물들을 소멸하기 위하여 접선 유동 여과 장치를 사용하고 접선 유동 여과를 수행하기 위한 일반적인 방법들은 해당 기술분야에 알려져 있고, 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들의 소멸에 사용하기 위한 해당 기술분야의 지식과 함께 본 발명의 교시를 사용하여 최적화될 수 있다.

[0114] 일부 측면에서, 접선 유동 여과의 방식은 투석여과일 것이다. 투석여과 중에, 완충액이 도입되는 한편 여과물이 제거된다. 투석여과는, 예를 들면 일정 부피 투석여과 또는 불연속식 투석여과일 수 있다. 바람직한 구체예에서, 일정 수준의 사이클로덱스트린이 투석여과 전 과정을 통해 유지된다. 바람직한 구체예에서, 사이클

로덱스트린은 여과 공정 전에 또는 공정이 시작될 때 벤조다이아제핀 ADC 및 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들을 포함하는 혼합물에 첨가된다. 일부 측면으로, 적어도 약 1% w/v의 사이클로덱스트린이 여과의 전 과정을 통해 유지된다. 그런 일부 측면에서, ADC 혼합물에는 혼합물이 적어도 약 1% w/v의 사이클로덱스트린의 농도를 가지고 투석여과 완충액이 적어도 약 1% w/v의 사이클로덱스트린을 포함하도록 여과 공정 전에 또는 공정이 시작될 때 사이클로덱스트린이 첨가된다. 일부 측면으로, 적어도 약 2% w/v의 사이클로덱스트린이 여과의 전 과정을 통해 유지된다. 그런 일부 측면에서, ADC 혼합물에는 혼합물이 적어도 약 2% w/v의 사이클로덱스트린의 농도를 가지고 투석여과 완충액이 적어도 약 2% w/v의 사이클로덱스트린을 포함하도록 여과 공정 전에 또는 공정이 시작될 때 사이클로덱스트린이 첨가된다. 일부 측면으로, 적어도 약 3% w/v의 사이클로덱스트린이 여과의 전 과정을 통해 유지된다. 그런 일부 측면에서, ADC 혼합물에는 혼합물이 적어도 약 3% w/v의 사이클로덱스트린의 농도를 가지고 투석여과 완충액이 적어도 약 3% w/v의 사이클로덱스트린을 포함하도록 여과 공정 전에 또는 공정이 시작될 때 사이클로덱스트린이 첨가된다. 일부 측면으로, 적어도 약 1%, 적어도 약 2%, 적어도 약 3% w/v의 사이클로덱스트린이 여과의 전 과정을 통해 유지된다. 그런 일부 측면에서, ADC 혼합물에는 혼합물이 적어도 약 1%, 2% 또는 3% w/v의 사이클로덱스트린의 농도를 가지고 투석여과 완충액이 적어도 약 1%, 2% 또는 3% w/v의 사이클로덱스트린을 포함하도록 여과 공정 전에 또는 공정이 시작될 때 사이클로덱스트린이 첨가된다. 다른 측면으로, 약 1% w/v 사이클로덱스트린 내지 약 10% w/v 사이클로덱스트린, 약 2% w/v 사이클로덱스트린 내지 약 10% w/v 사이클로덱스트린, 또는 약 3% w/v 사이클로덱스트린 내지 약 10% w/v 사이클로덱스트린, 또는 약 3% w/v 사이클로덱스트린 내지 약 6% w/v 사이클로덱스트린 또는 약 3% w/v 사이클로덱스트린 내지 약 4% w/v 사이클로덱스트린의 수준이 여과의 전 과정을 통해 유지된다. 바람직하게, 사이클로덱스트린은 여과 공정 전에 또는 공정이 시작할 때 첨가되긴 하지만, 사이클로덱스트린이 여과 공정이 시작된 후, 그러나 바람직하게는 불순물들의 어떠한 실질적인 제거가 이루어지기 전에 ADC 혼합물에 먼저 도입되는 것도 고려된다. 사이클로덱스트린의 첨가는 예를 들면 투석여과 완충액을 통해서일 수 있다. 구절 "여과의 전 과정을 통해 유지되는"은 표시된 농도의 사이클로덱스트린이 여과 공정 중에 존재하는 것을 의미한다. 일부 측면으로, 예컨대 사이클로덱스트린이 여과 공정이 시작된 후에 (바람직하게 불순물들의 어떠한 실질적인 제거 전에) 첨가되는 그런 경우에, 사이클로덱스트린은 여과 공정이 시작할 때에는 존재하지 않겠지만, 사이클로덱스트린이 도입된 후에는 표시된 농도에서 유지될 것이다.

[0115] 상기에서 주지된 것과 같이, 투석여과 완충액은 적어도 약 1%, 적어도 약 2%, 적어도 약 3% w/v의 사이클로덱스트린 또는 적어도 약 4% w/v의 사이클로덱스트린을 포함할 수 있다. 일부 측면으로, 투석여과 완충액은 약 1% w/v 사이클로덱스트린 내지 약 10% w/v 사이클로덱스트린, 약 2% w/v 사이클로덱스트린 내지 약 10% w/v 사이클로덱스트린, 또는 약 3% w/v 사이클로덱스트린 내지 약 10% w/v 사이클로덱스트린, 또는 약 3% w/v 사이클로덱스트린 내지 약 6% w/v 사이클로덱스트린 또는 약 3% w/v 사이클로덱스트린 내지 약 4% w/v 사이클로덱스트린을 함유할 것이다. 전형적으로, 투석여과 완충액은 추가로 완충제를 포함할 것이다. 적당한 완충액은 아세테이트 완충액, 포스페이트 완충액, 석시네이트 완충액, 히스티딘 완충액, HEPES 및 MOPS를 포함하며, 그것들에 한정되지 않는다. 한 측면으로, 완충제는 트리스 (2-아미노-2-(하이드록시메틸)-1,3-프로판다이올)일 것이다. 투석여과 완충액에 대한 완충액의 예시적인 농도는 약 5mM 내지 약 100mM, 약 50mM, 약 10mM 내지 약 40mM 또는 약 20mM이다. 특정 구체예에서, 트리스는 약 5mM 내지 약 50mM, 약 10mM 내지 약 40mM 또는 약 20mM로 포함된다. 투석여과 완충액에 대한 적당한pH는 일반적으로 약 6.0 내지 약 8.0의 범위에 있지만, 더 높거나 더 낮을 수 있다. 일부 측면에서, pH는 약 6.5 내지 약 7.5 또는 약 7 내지 7.4의 범위에 있다. 일부 측면에서 pH는 약 7.3 또는 약 7.2이다.

[0116] 일부 측면에서, 베타사이클로덱스트린을 사용할 때 적어도 약 2%, 적어도 약 3% 또는 적어도 약 4%의 사이클로덱스트린의 농도가 여과의 전 과정을 통해 유지된다. 일부 측면에서, 감마 사이클로덱스트린이 사용될 때 적어도 약 1%의 농도가 여과의 전 과정을 통해 유지된다.

[0117] 본 발명은 ADC 혼합물로부터 접선 유동 여과를 사용하여 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들을 제거하기 위한 방법들을 제공한다. 일부 측면에서, 접선 유동 여과 장치는 입구를 가진 여과 홀더, 여과물 출구 (또한 투과물 출구로도 언급됨), 보유물 출구, 반-투과성 한외여과막 및 펌프를 포함한다. 여과막은 홀더를 상류 구획과 하류 구획으로 분리하여 모든 여과물이 입구로 들어와 막을 통과한 후 여과물 출구를 통해 홀더를 빠져나가도록 한다. 사용될 여과막은 ADC 혼합물과 사용하기에 적당한 어떠한 물질 또는 물질들의 조합으로 만들어질 수 있다. 예시적인 막은 재생 셀룰로오스 또는 폴리에테르설폰으로 만들어진 한외여과막을 포함한다 (예컨대 Millipore ULTRACEL® or BIOMAX® Membranes). 막의 기공 크기는 필터의 기공들의 평균 크기를 말한다. 본 발명에 사용하기 위하여 막은 전형적으로 100kD보다 적은, 보다 전형적으로 약 50kD 또는 약 30kD보다 적은 기공 크기를 가질 것이다. 따라서 일부 측면에서, 여과막은 100kD보다 적은, 보다 전형적으로 약 50kD 또는 약 30kD

보다 적은 기공 크기를 가지는 재생 셀룰로오스 또는 폴리에테르설폰 한외여과막일 것이다.

[0118] 일부 측면에서, 접선 유동 여과 시스템은 추가로 포합 반응 혼합물을 보유하기 위한 샘플 저장소와 그 샘플 저장소와 유체 소통하는 완충액 저장소를 포함할 것이다. 일부 측면에서, 완충액의 목적은 여과물 부피를 여과물이 흐르는 것과 동일한 속도에서 교체하여 시스템 내에서 부피가 일정하게 유지되게 하는 것이다. 정제될 혼합물은 샘플 저장소로부터 펌핑되어 여과막을 지나고, 샘플 저장소로 되돌아올 것이다. 일부 측면에서, 흐름 경로는 혼합물의 샘플 저장소로의 복귀를 제한하기 위해 사용될 수 있는 밸브를 함유할 것이다. 부분적으로 밸브를 닫는 것은 흐름의 일부가 막을 통해 폐기되는 (여과물) 한편 대부분의 흐름은 샘플 저장소로 복귀되도록 (보유물) 힘을 가하는 것이다. 폐기물로 진행되는 여과물은 완충액 및 막의 기공을 통과하기에 충분히 작은 그런 용질 분자들을 함유한다. 투석여과 완충액은 여과물로서의 완충액 손실을 교체하기 위해 시스템에 첨가됨으로써 시스템의 총 부피는 일정하게 유지된다. 투석여과 완충액이 제거되고 있는 용질을 함유하지 않기 때문에, 용질의 농도는 점차로 감소된다.

[0119] 기술된 것과 같이, 본 발명의 일부 측면에서, 일정 부피 투석여과는 ADC 혼합물을 정제하고 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들을 소멸하기 위해 사용되는 접선 유동 여과 방식이다. 일정-부피 투석여과에서, 투석부피(diavolume)는 어떠한 시점에서든 총 용액 부피, 특히 출발 총 혼합물 부피를 말한다. 일부 측면에서, 샘플은 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들의 농도를 측정하기 위하여 하나 또는 그 이상의 투석부피 후에 제거될 것이다. 투석여과는 전형적으로 바람직한 표적 수준으로의 소멸을 제공하기 위해 이전의 실험에 의해 측정된 바 있는 많은 투석부피에 대해 실시될 것이다. 전형적으로, 투석여과는 일단 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들의 농도가 표적 수준에 도달하면 종료될 것이다. 일부 측면에서, 표적 소멸 수준은 약 1μM 또는 그 이하, 바람직하게는 약 0.5μM 또는 그 이하, 또는 0.2μM 또는 심지어 0.1μM 또는 그 이하이다.

[0120] 일부 측면에서, 보유물은 약 3mg/ml 내지 약 10mg/ml의 벤조다이아제핀 ADC, 약 10mM 내지 약 30mM의 트리스, 약 3% 내지 약 10% w/v의 사이클로덱스트린을 약 6.5 내지 약 7.5의 pH에서 포함할 것이다. 일부 측면에서, 보유물은 약 3mg/ml의 벤조다이아제핀 ADC, 약 20mM의 트리스, 약 3%의 사이클로덱스트린 또는 약 4%의 사이클로덱스트린을 약 7.3의 pH에서 포함할 것이다.

[0121] **사이클로덱스트린**

[0122] 사이클로덱스트린은 전분으로부터 생성된 비-환원 고리형 글루코오스 올리고당이다. 1,4-글리코시드 결합에 의해 결합된 6, 7 또는 8개의 글루코오스 유닛 (각각 α-, β- 및 γ-사이클로덱스트린)을 가지는 세 개의 공통 사이클로덱스트린이 있다. 사이클로덱스트린은 그것의 내부 구멍에 게스트 분자(guest molecules)를 포획함으로써 봉입 복합체를 형성하는 분자 보유기로서 작용할 수 있다. α-사이클로덱스트린은 보다 작은 구멍을 가지는 한편, β- 및 γ-사이클로덱스트린은 보다 큰 구멍을 가진다.

[0123] 본 발명에 사용하기에 적당한 사이클로덱스트린은 알파, 베타 및 감마 사이클로덱스트린을 포함하지만, 베타 및 감마 사이클로덱스트린이 더 큰 내부 구멍을 제공하는 점에서 바람직하다. 사이클로덱스트린에 대해 화학적 변형이 이루어졌는데, 특히 β-사이클로덱스트린은 원래의 사이클로덱스트린의 용해도를 개선시킨다. 하이드록시에틸 β-사이클로덱스트린, 하이드록시프로필 β-사이클로덱스트린 (예컨대 2-하이드록시프로필-β-사이클로덱스트린), 메틸화된 β-사이클로덱스트린, 글루코실 β-사이클로덱스트린 및 설포부틸 에테르 β-사이클로덱스트린이 용해도를 개선시키기 위해 화학적으로 변형된 사이클로덱스트린의 실례들이다. 본 발명의 일부 측면에서, 화학적으로 변형된 β-사이클로덱스트린을 포함하여 β-사이클로덱스트린이 사용될 것이다. 일부 측면에서, 화학적으로 변형된 β-사이클로덱스트린은 하이드록시프로필 β-사이클로덱스트린 또는 설포부틸에테르 β-사이클로덱스트린일 것이다. 일부 측면에서, 사이클로덱스트린은 화학적으로 변형된 감마 사이클로덱스트린을 포함하여 감마 사이클로덱스트린일 것이다. 일부 측면에서, 사이클로덱스트린은 하이드록시프로필 사이클로덱스트린 (예컨대 HP4.3-β-사이클로덱스트린, HP5.5-β-사이클로덱스트린, HP7.6-β-사이클로덱스트린 및 HP4.5-γ-사이클로덱스트린)일 것이다. 다른 측면으로, 사이클로덱스트린은 설포부틸에테르 β-사이클로덱스트린 (예컨대 SBE6.6-β-사이클로덱스트린, SBE6.7-β-사이클로덱스트린, SBE6.8-β-사이클로덱스트린, SBE4.1-β-사이클로덱스트린 및 SBE4.6Et3.5-β-사이클로덱스트린)일 것이다. 또 다른 측면으로, 사이클로덱스트린은 설포부틸에테르 γ-사이클로덱스트린 (예컨대 SBE4.3-γ-사이클로덱스트린, SBE.6-γ-사이클로덱스트린, SBE.2-γ-사이클로덱스트린 및 SBE5.6Et6.3-γ-사이클로덱스트린)일 것이다. 본원에서 사용된 것과 같이, "화학적으로 변형된 베타 사이클로덱스트린"은 그것의 원래의 사이클로덱스트린 (즉 변형되지 않은 사이클로덱스트린)과 비교하여 적어도 개선된 용해도를 가지도록 화학적으로 변형된 베타 사이클로덱스트린이다.

[0124] **제형**

[0125] 본 발명은 벤조다이아제핀 ADC 및 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들을 포함하는 혼합물 (포합 반응 혼합물과 퀀칭된 포합 반응 혼합물을 포함함), TFF 보유물 제형 및 벤조다이아제핀 ADC와 사이클로덱스트린을 포함하는 약학 제형을 제공한다. TFF 보유물 제형은 정제되었지만 최종적으로 제형되지 않은 ADC 혼합물을 말한다.

[0126] 사이클로덱스트린은 전형적으로 적어도 약 1% w/v, 적어도 약 2% w/v 사이클로덱스트린, 적어도 약 3% w/v 사이클로덱스트린 또는 적어도 약 4% w/v 사이클로덱스트린 (예컨대 1% w/v, 2% w/v, 3% w/v 또는 4% w/v)의 수준으로 ADC 혼합물에 첨가된다. 일부 측면에서, 본 발명은 적어도 약 1%, 적어도 약 2% w/v 사이클로덱스트린, 적어도 약 3% w/v 사이클로덱스트린을 포함하는 포합 반응 혼합물, 적어도 약 1%, 적어도 약 2% w/v 사이클로덱스트린 또는 적어도 약 3% w/v 사이클로덱스트린을 포함하는 퀀칭된 포합 반응 혼합물 및/또는 적어도 약 1%, 적어도 약 2% w/v 사이클로덱스트린 또는 적어도 약 3% w/v 사이클로덱스트린을 포함하는 TFF 보유물 제형을 제공한다. 일부 측면에서, 사이클로덱스트린은 ADC 혼합물 (포합 반응 혼합물과 퀀칭된 포합 반응 혼합물을 포함함) 및 TFF 보유물 제형에 약 2% 또는 약 3% w/v 사이클로덱스트린 내지 약 30% w/v 사이클로덱스트린, 약 2% 또는 약 3% w/v 사이클로덱스트린 내지 약 15% w/v 사이클로덱스트린, 약 2% 또는 약 3% w/v 사이클로덱스트린 내지 약 10% w/v 사이클로덱스트린의 수준으로 존재한다. 일부 측면에서, 사이클로덱스트린이 베타사이클로덱스트린인 경우, ADC 혼합물 또는 TFF 보유물 제형에는 적어도 약 2% 또는 약 3% 사이클로덱스트린이 존재한다. 일부 측면에서, 사이클로덱스트린이 감마 사이클로덱스트린인 경우, ADC 혼합물 또는 TFF 보유물 제형에는 적어도 약 1% 또는 약 2% 사이클로덱스트린 또는 약 3% 사이클로덱스트린이 존재한다.

[0127] 사이클로덱스트린은 전형적으로 약 3% w/v 사이클로덱스트린 또는 그 이상의 수준으로 약학 제형에 존재한다. 일부 측면에서, 사이클로덱스트린은 약 5% w/v 또는 그 이상, 또는 약 6% w/v 또는 그 이상의 수준으로 약학 제형에 존재한다. 일부 측면에서, 사이클로덱스트린은 3% w/v 사이클로덱스트린, 약 5% w/v 사이클로덱스트린 또는 약 6% w/v 사이클로덱스트린 내지 약 30% w/v 사이클로덱스트린, 또는 약 3% w/v 사이클로덱스트린, 약 5% w/v 사이클로덱스트린 또는 약 6% w/v 사이클로덱스트린 내지 약 15% w/v 사이클로덱스트린, 또는 약 3% w/v 사이클로덱스트린, 약 5% w/v 사이클로덱스트린 또는 약 6% w/v 사이클로덱스트린 내지 약 10% w/v 사이클로덱스트린 또는 약 3% w/v 사이클로덱스트린, 약 5% w/v 사이클로덱스트린 또는 약 6% w/v 사이클로덱스트린 내지 약 8% w/v 사이클로덱스트린의 수준으로 약학 제형에 존재한다. 일부 구체예에서, 사이클로덱스트린은 약 3% w/v의 농도로 존재한다. 다른 구체예에서, 사이클로덱스트린은 약 4% w/v의 농도로 존재한다. 또 다른 구체예에서, 사이클로덱스트린은 약 5% w/v, 약 6% w/v, 약 7% w/v 또는 약 8% w/v의 농도로 존재한다. 일부 측면으로, 본원에서 기술된 약학 제형은 1μM 또는 그 이하, 0.5μM 또는 그 이하, 0.1μM 또는 그 이하 또는 0.05μM 또는 그 이하의 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들을 포함한다.

[0128] 일부 측면으로, 본 발명은 1μM 또는 그 이하, 0.5μM 또는 그 이하, 0.1μM 또는 그 이하 또는 0.05μM 또는 그 이하의 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들을 포함하는 벤조다이아제핀 ADC 약학 제형 및 TFF 보유물 제형을 제공한다. 사이클로덱스트린은 그런 벤조다이아제핀 ADC 제형에서, 약 1%, 약 2% 또는 약 3% w/v 사이클로덱스트린 내지 약 30% w/v 사이클로덱스트린, 약 1%, 약 2% 또는 약 3% w/v 사이클로덱스트린 내지 약 15% w/v 사이클로덱스트린, 약 1%, 약 2% 또는 약 3% w/v 사이클로덱스트린 내지 약 10% w/v 사이클로덱스트린의 수준으로 존재할 수 있다. 일부 측면에서, 사이클로덱스트린은 1μM 또는 그 이하, 0.5μM 또는 그 이하, 0.1μM 또는 그 이하 또는 0.05μM 또는 그 이하의 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물들을 포함하는 벤조다이아제핀 ADC 약학 제형 및 TFF 보유물 제형에 약 5% 또는 그 이상 또는 약 6% 또는 그 이상의 수준으로 존재한다. 일부 측면에서, 사이클로덱스트린은 그러한 제형에 약 1%, 약 2%, 약 3% w/v 사이클로덱스트린, 약 5% w/v 사이클로덱스트린 또는 약 6% w/v 사이클로덱스트린 내지 약 30% w/v 사이클로덱스트린, 또는 약 3% w/v 사이클로덱스트린, 약 5% w/v 사이클로덱스트린 또는 약 6% w/v 사이클로덱스트린 내지 약 15% w/v 사이클로덱스트린, 또는 약 3% w/v 사이클로덱스트린, 약 5% w/v 사이클로덱스트린 또는 약 6% w/v 사이클로덱스트린 내지 약 10% w/v 사이클로덱스트린 또는 약 3% w/v 사이클로덱스트린, 약 5% w/v 사이클로덱스트린 또는 약 6% w/v 사이클로덱스트린 내지 약 8% w/v 사이클로덱스트린의 수준으로 존재한다. 일부 구체예에서, 사이클로덱스트린은 약 1% w/v의 농도로 존재한다. 일부 구체예에서, 사이클로덱스트린은 약 2% w/v의 농도로 존재한다. 일부 구체예에서, 사이클로덱스트린은 약 3% w/v의 농도로 존재한다. 다른 구체예에서, 사이클로덱스트린은 약 4% w/v의 농도로 존재한다. 또 다른 구체예에서, 사이클로덱스트린은 약 5% w/v, 약 6% w/v, 약 7% w/v 또는 약 8% w/v의 농도로 존재한다.

[0129] **약학 제형**

[0130] 본 발명은 벤조다이아제핀 ADC 및 사이클로덱스트린을 포함하는 약학 제형을 제공한다. 본 발명자들은 약 2% w/v 또는 그 이상의 사이클로덱스트린을 함유하는 사이클로덱스트린-함유 제형이 제형에 0.5% w/v 또는 그 미만의 사이클로덱스트린을 함유하는 제형에 비교하여 응집의 속도 및 정도에서 감소를 나타내고, 사이클로덱스트린

을 함유하지 않은 제형에 비교하여 산성 종들의 성장의 감소를 나타낸 것을 발견하였다. 본 발명자들은 또한 약 6% 또는 그이상의 w/v 사이클로덱스트린을 함유하는 제형이 제형에 2% w/v 또는 그 미만의 사이클로덱스트린을 함유한 제형에 비교하여 벤조다이아제핀 약물-링커의 화학적 분해의 감소를 나타낸 것을 발견하였다. 따라서 본 발명은 부분적으로, 약 6% w/v의 사이클로덱스트린을 포함하는 벤조다이아제핀 ADC가 더 적은 양의 사이클로덱스트린을 함유하거나 사이클로덱스트린을 전혀 함유하지 않은 제형들에 비교하여 개선된 안정성을 나타냈다는 발견을 토대로 한다. 개선된 안정성은 예를 들면 다음 중 하나 또는 그 이상의 것에 의해 증명될 수 있다: (i) 응집의 속도와 정도의 감소, (ii) 산성 종들의 성장의 감소 및 (iii) 약물의 화학적 분해의 감소. 특정 측면으로, 본 발명은 치료적 용도에 대해 안정화된 액체 또는 동결건조된 벤조다이아제핀 ADC 제형을 제공한다. 특히, 치료용 벤조다이아제핀 ADC가 연장된 시간 기간에 걸쳐 안정하고 다양한 투여 경로를 통해 투여될 수 있도록 안정화된 제형들이 제공된다. 그런 제형은 특히 예를 들면, ADC의 항체 성분에 의해 인지되는 항원을 발현하는 표적 세포에 대해 세포독성 또는 세포 정지 효과를 발휘함으로써 질병 또는 장애의 치료 (예컨대 암의 치료)에 사용하도록 정해진 벤조다이아제핀 ADC에 대해 유용하다.

[0131] 한 측면으로, 본 발명은 벤조다이아제핀 ADC, 사이클로덱스트린 및 임의로 적어도 하나의 완충제를 포함하는 벤조다이아제핀 ADC 제형을 제공하며, 이때 완충제는 생리적으로 적당한 pH를 유지하기 위한 양으로 존재한다. 사이클로덱스트린은 본원에서 기술된 사이클로덱스트린들 중 어느 것일 수 있지만, 바람직하게는 베타 또는 감마 사이클로덱스트린이고, 보다 바람직하게는 원래의 분자에 비교하여 그것의 용해도를 개선시키기 위해 화학적으로 변형된 베타 사이클로덱스트린이다. 일부 측면에서, 사이클로덱스트린은 감마 사이클로덱스트린이다. 일부 측면에서, 감마 사이클로덱스트린은 원래의 분자에 비교하여 그것의 용해도를 개선시키기 위해 화학적으로 변형되었다. 특히 바람직한 사이클로덱스트린은 하이드록시프로필 베타 사이클로덱스트린 또는 설포부틸에테르 베타 사이클로덱스트린이다. 사이클로덱스트린은 본원에 기술된 농도들 중 어느 농도에서든지 제형에 존재할 수 있다. 일부 측면에서, 사이클로덱스트린은 약 3% w/v, 약 4% w/v, 약 5% w/v 또는 약 6% w/v 또는 그 이상으로 제형에 존재하는 감마 사이클로덱스트린 (미변형 또는 화학적으로 변형된 분자) 또는 화학적으로 변형된 베타 사이클로덱스트린 (예컨대 메틸화된 베타 사이클로덱스트린, 글루코실 베타 사이크로덱스트린, 하이드록시프로필 베타 사이클로덱스트린 또는 설포부틸 베타 사이클로덱스트린)일 것이다. 일부 측면에서, 사이클로덱스트린은 3% w/v 사이클로덱스트린, 약 5% w/v 사이클로덱스트린 또는 약 6% w/v 사이클로덱스트린 내지 약 30% w/v 사이클로덱스트린, 또는 약 3% w/v 사이클로덱스트린, 약 5% w/v 사이클로덱스트린 또는 약 6% w/v 사이클로덱스트린 내지 약 15% w/v 사이클로덱스트린, 또는 3% w/v 사이클로덱스트린, 약 5% w/v 사이클로덱스트린 또는 약 6% w/v 사이클로덱스트린 내지 약 10% w/v 사이클로덱스트린 또는 3% w/v 사이클로덱스트린, 약 5% w/v 사이클로덱스트린 또는 약 6% w/v 사이클로덱스트린 내지 약 8% w/v 사이클로덱스트린의 수준으로 제형에 존재하는 감마 사이클로덱스트린 (미변형 또는 화학적으로 변형된 분자) 또는 화학적으로 변형된 베타 사이클로덱스트린 (예컨대 메틸화된 베타 사이클로덱스트린, 글루코실 베타 사이크로덱스트린, 하이드록시프로필 베타 사이클로덱스트린 또는 설포부틸 베타 사이클로덱스트린)일 것이다.

[0132] 상기에서 주지된 것과 같이, 본 발명의 수성 벤조다이아제핀 ADC 제형은 수용액에서 생리적으로 적당한 pH를 유지하기 위하여 임의로 완충제를 포함한다. 본원에 기술된 것과 같이 안정화된 수성 제형에 적당한 pH는 예컨대 약 6.0 내지 약 8.0의 범위 또는 약 6.5 내지 약 7.5의 범위의 pH를 포함한다. 특정 구체예에서, ADC를 약 6.8 내지 약 7.5; 보다 전형적으로는 약 7.0 내지 약 7.5, 약 7.1 내지 약 7.5, 약 7.2 내지 약 7.5 또는 약 7.3 내지 약 7.5의 pH에서 제형하는 것이 바람직할 것이다. 특별한 변형에서, pH는 약 7.2이다. 적당한 완충액은 트리스 (2-아미노-2-(하이드록시메틸)-1,3-프로판다이올) 및 시트레이트뿐 아니라, 주지된 pH 범위 내에서 효과적이고, 본원에 기술된 것과 같은 수용액을 형성하기 위하여 동결건조된 제형의 복원시를 포함하여, 용액이 제형 중에 대략 생리적 pH에 도달하는 것을 허용할 생리적으로 허용되는 다른 완충액들을 포함한다. 그런 완충액의 예시로는 아세테이트, 포스페이트, 석시네이트 및 히스티딘을 포함한다. 본 발명에 따르는 제형에 대한 예시적인 완충액의 농도는 약 5mM 내지 약 100mM, 약 50mM, 약 10mM 내지 약 40mM 또는 약 20mM이다. 특정 구체예에서, 트리스가 약 5mM 내지 약 50mM, 약 10mM 내지 약 40mM 또는 약 20mM로 포함된다. 본 발명에 따르는 제형들에 대한 완충액들의 다른 적당한 농도는 해당 기술분야에 통상적인 지식을 가진 사람에 의해 쉽게 결정될 수 있다.

[0133] 특별한 변형에서, 제형 -예컨대 동결건조된 형태로부터 복원된 동결건조, 또는 본원에서 기술된 것과 같인 수성 제형으로 복원하기 위한 동결건조된 제형에 적당한 것들-은 항체-약물 포합체를 보호하기 위하여 하나 또는 그 이상의 안정화제를 함유할 수 있다. 안정화제는 또한 본원에서 동결건조 보호제로서 언급되기도 한다. 전형적으로 적당한 안정화제는 당 또는 아미노산이다. 예시적인 안정화제로는 슈크로오스, 트레할로오스, 만니톨, 솔비톨, 덱스트로오스, 말토오스, 덱스트란, 아르기닌, 글리신 및 히스티딘을 포함한다. 전형적으로 제형 중의 안정

화제 (예컨대 동결건조 보호제)의 양은 복원시에 결과의 제형이 실질적으로 등장성이 되도록 하는 양이다. 또한, 동결건조 보호제의 양은 동결건조 시에 ADC의 분해/응집이 일어나는 것을 허용하지 않을 정도로 너무 낮아서는 안된다. 동결건조 보호제가 당 (예컨대 슈크로오스 또는 트레할로오스)인 경우에, 수성 제형 중의 예시적인 동결건조 보호제 농도는 약 1% 내지 약 10% (w/v), 보다 전형적으로는 약 2% 내지 약 8% (w/v) 및 보다 더 전형적으로는 약 4% 내지 약 8% (w/v)의 범위일 수 있다. 구체적인 변형에서, 동결건조 보호제는 약 6% (w/v) 농도의 슈크로오스이다.

[0134] 일부 측면에서, 제형 중의 아르기닌은 0.5M 또는 그 미만으로 존재한다. 일부 측면에서, 제형 중의 아르기닌은 0.2M 또는 0.1M 또는 그 미만으로 존재한다. 일부 측면에서, 제형에는 아르기닌이 존재하지 않는다. 일부 측면에서, 제형에는 아미노산이 존재하지 않는다.

[0135] 제형에 사용하기 위한 추가의 부형제는 예를 들면 염 (예컨대 염화 나트륨), 계면활성제 (예컨대 폴리솔베이트 80, 폴리솔베이트 20, 폴록사머), 항산화제 (예컨대 아스코르브산, 메티오닌, 말산) 및 다른 부형제들, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 카르복시메틸셀룰로오스 및 피롤리돈을 포함한다.

[0136] 본 발명의 약학 제형 중의 ADC 농도는 전형적으로 약 0.1mg/ml 또는 0.5mg/ml 내지 약 50mg/ml 또는 약 1mg/ml 내지 약 30mg/ml의 범위이다. 보다 전형적으로, ADC는 약 1mg/ml 내지 약 5mg/ml, 약 10mg/ml 또는 약 15mg/ml의 농도로; 또는 약 2mg/ml 내지 약 5mg/ml 또는 약 10mg/ml의 농도로 존재한다. 일부 측면에서, ADC는 약 0.6mg/ml 내지 약 3mg/ml의 농도로 존재한다. 특별한 변형에서, ADC는 약 1mg/ml, 약 2mg/ml, 약 3mg/ml, 약 4mg/ml, 약 5mg/ml, 약 6mg/ml, 약 7mg/ml, 약 8mg/ml, 약 9mg/ml 또는 약 10mg/ml의 농도로 존재한다.

[0137] 일부 구체예에서, 본원에 기술된 벤조다이아제핀 ADC와 사이클로덱스트린을 포함하는 ADC 혼합물, 포합 반응 혼합물, 퀀칭된 포합 반응 혼합물, TFF 보유물 제형 및 약학 제형 중의 ADC의 항체 성분은 다음으로부터 선택된 단클론성 항체이다: 각각의 쌍이 하나의 경쇄와 하나의 중쇄를 가지는, 두 개의 동일한 쌍의 면역글로불린 사슬로 이루어진 사량체; 항체 Fv 단편; 항체 Fab 단편; 항체 Fab'(2) 단편, 항체 Fd 단편, 단일-사슬 항체 (예컨대 scFv 또는 scFv-Fc 융합물); 또는 단일 도메인 항체 단편 (Dab). 특별한 변형에서, 항체는 첫 번째와 두 번째 폴리펩티드 사슬을 포함하는데, 이때 첫 번째 폴리펩티드 사슬은 그것의 카르복실 말단에서 경쇄 불변 영역에 융합된 경쇄 가변 (VL) 도메인을 포함하고, 두 번째 폴리펩티드 사슬은 그것의 카르복실 말단에서 중쇄 불변 영역에 융합된 중쇄 가변 (VH) 도메인을 포함한다. 그런 변형에서, 단클론성 항체는 전형적으로 각각의 쌍이 하나의 경쇄와 하나의 중쇄를 가지는, 두 개의 동일한 쌍의 면역글로불린 사슬로 이루어진 사량체이다. 중쇄 불변 영역은 자연적인 인간 불변 영역에 관련하여 Fey 수용체에 대해 감소된 결합을 가지는 자연적 인간 불변 영역의 자연적으로 발생한 또는 돌연변이 형태일 수 있다. 일부 구체예에서, 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로부터 선택된 아이소타입의 것이다. 구체적인 변형에서, 중쇄 불변 영역은 IgG1 아이소타입의 것이다.

[0138] 단클론성 항체를 포함하여, 항체들을 생성하기 위한 다양한 방법들이 해당 기술분야에 잘 알려져 있고, 본원에서는 상세하게 기술되지 않는다. 본 발명에 사용하기 위한 항체들은 무상 항체들이거나 그것들의 항원 결합 단편들일 수 있다. 바람직한 항체는 인간 또는 인간화된 항체, 특히 인간 또는 인간화된 단클론성 항체들이다. 일부 측면에서, 항체는 암세포의 표면에서 발현되는 암세포 항원에 특이적으로 결합할 것이다. 다른 측면에서, 항체는 자가면역 질병 상태와 관련된 활성화된 림프구에 결합할 것이다. 일부 측면에서, 항체는 CD19, CD20, CD30, CD33, CD70, 글리피칸-3, Liv-1 또는 루이스 Y 항원에 특이적으로 결합할 것이다.

[0139] 특별한 구체예에서, 항체는 인간 CD33의 세포외 도메인에 특이하게 결합하는 항-CD33 항체이다. 예시적인 인간 CD33 서열은 Swiss Prot 승인 번호 P20138로 배정된다. 특정 구체예에서, 항-CD33 항체는 2H12로 표시된 쥐 항-CD33 단클론성 항체의 경쇄 및/또는 중쇄 가변 도메인 상보성 결정 영역들 (각각 SEQ ID NO:1 및 2에 표시된 VL 및 VH 도메인 아미노산 서열들)을 포함한다. 따라서, 일부 변형에서, 항-CD33 항체는 SEQ ID NO:5에 표시된 것과 같은 CDR-L1 아미노산 서열, SEQ ID NO:6에 표시된 것과 같은 CDR-L2 아미노산 서열 및 SEQ ID NO:7에 표시된 것과 같은 CDR-L3 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 (VL) 도메인; 및/또는 SEQ ID NO:8에 표시된 것과 같은 CDR-H1 아미노산 서열, SEQ ID NO:9에 표시된 것과 같은 CDR-H2 아미노산 서열 및 SEQ ID NO:10에 표시된 것과 같은 CDR-H3 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 (VH) 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 항-CD33 항체는 인간화된 항체이다. 예를 들어 상기와 같이 VL 및/또는 VH 도메인을 포함하는 항-CD33 항체의 특정 변형에서, VL 도메인은 SEQ ID NO:1에 표시된 것과 같은 아미노산 서열을 가지는 쥐과의 2H12 VL 도메인으로부터 유도된 인간화된 VL 도메인이고, 및/또는 VH 도메인은 SEQ ID NO:2에 표시된 것과 같은 아미노산 서열을 가지는 쥐과의 2H12 VH 도메인으로부터 유도된 인간화된 VH 도메인이다. 특히 적당한 VL 및 VH 도메인은 각각 SEQ ID NO:3 및 4에 대해 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적

어도 98%, 적어도 99% 또는 적어도 100% 동일한 아미노산 서열들을 가진다. 특정 구체예에서, 항-CD33 항체는 첫 번째 및 두 번째 폴리펩티드 사슬을 포함하며, 이때 첫 번째 폴리펩티드 사슬은 그것의 카르복실 말단에서 경쇄 불변 영역 (예컨대 SEQ ID NO:21의 아미노산 서열을 가지는 경쇄 불변 영역)에 융합된 VL 도메인을 포함하고, 두 번째 폴리펩티드 사슬은 그것의 카르복실 말단에서 중쇄 불변 영역 (예컨대 SEQ ID NO:22 또는 SEQ ID NO:23의 아미노산 서열을 가지는 중쇄 불변 영역)에 융합된 VH 도메인을 포함한다. 그런 변형에서, 항-CD33 항체는 전형적으로, 각각의 쌍이 하나의 경쇄와 하나의 중쇄를 가지는, 두 개의 동일한 쌍의 면역글로불린 사슬로 이루어지는 사량체이다. 본 발명에 따라 사용하기에 적당한 예시적인 항-CD33 항체들은 또한 2012년 5월 18일에 출원된 미국 가출원 번호 61/649,110에 기술되어 있고, 상기 출원의 내용은 모든 목적에 대해 전체적으로 본원에 참조로 포함된다.

[0140] 다른 구체예에서, 항체는 인간 CD70의 세포외 도메인에 특이적으로 결합하는 항-CD70 항체이다. 예시적인 인간 CD70 서열은 Swiss Prot 승인 번호 P32970.2로 배정된다. 특정 구체예에서, 항-CD70 항체는 1F6로 표시된 쥐과 항-CD70 단클론성 항체의 경쇄 및/또는 중쇄 가변 도메인 상보성 결정 영역들 (각각 SEQ ID NO:11 및 12에 표시된 VL 및 VH 도메인 아미노산 서열들)을 포함한다. 일부 그런 변형에서, 항-CD70 항체는 SEQ ID NO:15에 표시된 것과 같은 CDR-L1 아미노산 서열, SEQ ID NO:16에 표시된 것과 같은 CDR-L2 아미노산 서열 및 SEQ ID NO:17에 표시된 것과 같은 CDR-L3 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 (VL) 도메인; 및 SEQ ID NO:18에 표시된 것과 같은 CDR-H1 아미노산 서열, SEQ ID NO:19에 표시된 것과 같은 CDR-H2 아미노산 서열 및 SEQ ID NO:20에 표시된 것과 같은 CDR-H3 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 (VH) 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 항-CD70 항체는 인간화된 항체이다. 예를 들어 상기와 같이 VL 및 VH 도메인을 포함하는 항-CD70 항체의 특정 변형에서, VL 도메인은 SEQ ID NO:11에 표시된 것과 같은 아미노산 서열을 가지는 쥐과의 1F6 VL 도메인으로부터 유도된 인간화된 VL 도메인이고, 및/또는 VH 도메인은 SEQ ID NO:12에 표시된 것과 같은 아미노산 서열을 가지는 쥐과의 1F6 VH 도메인으로부터 유도된 인간화된 VH 도메인이다. 특히 적당한 VL 및 VH 도메인은 각각 SEQ ID NO:13 및 14에 대해 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 적어도 100% 동일한 아미노산 서열들을 가진다. 특정 구체예에서, 항-CD70 항체는 첫 번째 및 두 번째 폴리펩티드 사슬을 포함하며, 이때 첫 번째 폴리펩티드 사슬은 그것의 카르복실 말단에서 경쇄 불변 영역 (예컨대 SEQ ID NO:21의 아미노산 서열을 가지는 경쇄 불변 영역)에 융합된 VL 도메인을 포함하고, 두 번째 폴리펩티드 사슬은 그것의 카르복실 말단에서 중쇄 불변 영역 (예컨대 SEQ ID NO:22의 아미노산 서열을 가지는 중쇄 불변 영역)에 융합된 VH 도메인을 포함한다. 그런 변형에서, 항-CD70 항체는 전형적으로, 각각의 쌍이 하나의 경쇄와 하나의 중쇄를 가지는, 두 개의 동일한 쌍의 면역글로불린 사슬로 이루어지는 사량체이다. 본 발명에 따라 사용하기에 적당한 예시적인 항-CD70 항체들은 또한 미국 특허 제 8,067,546호에 기술되어 있고, 그것의 내용은 모든 목적에 대해 전체적으로 본원에 참조로 포함된다.

[0141] 예시적인 항-CD33 및 항-CD70 가변 도메인 및 CDR 서열들뿐 아니라 예시적인 면역글로불린 경쇄 및 중쇄 불변 영역들을 아래의 표 1에 나타낸다.

표 1

[0142]

설명	아미노산 서열	SEQ ID NO:
쥐과 2H12 VL	DIKMTQSPSSMYASLGERVIINCKASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSG QDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK	1
쥐과 2H12 VH	QVQLQQSGPELVRPGTFVKISCKASGYTFTNYDINWVNQRPGQGLEWIGWIYPGDGSTKYNEKFKAKA TLTADKSSSTAYLQLNNLTSENSAVYFCASGYEDAMDYWGQGTSVTVSS	2
인간화된 2H12 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTINCKASQDINSYLSWFQQKPGKAPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSG QDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYDEFPLTFGGGTKVEIK	3
인간화된 2H12 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYDINWVRQAPGQGLEWIGWIYPGDGSTKYNEKFKAKA TLTADTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCASGYEDAMDYWGQGTTVTVSS	4
2H12 CDR-L1	KASQDINSYLS	5
2H12 CDR-L2	RANRLVD	6
2H12 CDR-L3	LQYDEFPLT	7
2H12 CDR-H1	NYDIN	8

2H12 CDR-H2	WIYPGDGSTKYNEKFKA	9
2H12 CDR-H3	GYEDAMDY	10
쥐과 1F6 VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSREVPWTFGGGTKLEIKR	11
쥐과 1F6 VH	QIQLVQSGPEVKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTYADAFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNEDTATYFCARDYGDYGMDYWGQGTSVTVSS	12
인간화된 1F6 VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSREVPWTFGQGTKVEIKR	13
인간화된 1F6 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYADAFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARDYGDYGMDYWGQGTTVTVSS	14
1F6 CDR-L1	RASKSVSTSGYSFMH	15
1F6 CDR-L2	LASNLES	16
1F6 CDR-L3	QHSREVPWT	17
1F6 CDR-H1	NYGMN	18
1F6 CDR-H2	WINTYTGEPTYADAFKG	19
1F6 CDR-H3	DYGDYGMDY	20
인간 경쇄 불변 영역	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	21
인간 중쇄 불변 영역 (C-말단 K 없음)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	22
인간 중쇄 불변 영역, S239C (C-말단 K 없음)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	23

[0143] 앞에서 주지된 것과 같이, 본 발명의 예시적인 약학 제형은 (i) 제형 중에 0.5% w/v 이하의 사이클로덱스트린을 함유하는 제형에 비교하여 응집의 속도 및 정도의 감소, (ii) 사이클로덱스트린을 함유하지 않는 제형에 비교하여 산성 종들의 성장의 감소 및/또는 (iii) 제형 중에 2% w/v 이하의 사이클로덱스트린을 함유하는 제형에 비교하여 약물-링커 (예컨대 벤조다이아제핀 약물)의 화학적 분해의 감소를 나타낸다. 따라서, 본 발명은 (i) 제형 중에 2% w/v 이하의 사이클로덱스트린을 함유하는 제형에 비교하여 벤조다이아제핀 약물의 화학적 분해에 대한 개선된 내성, (ii) 제형 중에 0.5% w/v 이하의 사이클로덱스트린을 함유하는 제형에 비교하여 응집에 대한 개선된 내성 및 (iii) 사이클로덱스트린을 함유하지 않은 제형에 비교하여 산성 종들의 성장에 대한 개선된 내성 중 적어도 한 가지를 가지는 제형의 제조 방법을 제공한다. 따라서, 일부 측면으로, 약 5% 또는 약 6% w/v 또는 그 이상의 사이클로덱스트린을 포함하는 본 발명의 약학 제형은 (i) 2% 이하의 사이클로덱스트린을 함유하는 제형에 비교하여 벤조다이아제핀 약물의 화학적 분해에 대한 개선된 내성, (ii) 0.5% 이하의 사이클로덱스트린을 함유하는 제형에 비교하여 응집에 대한 개선된 내성 및 (iii) 0.5% 이하의 사이클로덱스트린을 함유하는 제형에 비교하여 산성 종들의 성장에 대한 개선된 내성 중 적어도 한 가지를 나타낸다. 따라서, 일부 측면으로, 약 5% 또는 약 6% w/v 또는 그 이상의 사이클로덱스트린을 포함하는 본 발명의 약학 제형은 (i) 2% 이하의 사이클로덱스트린을 함유하는 제형에 비교하여 벤조다이아제핀 약물의 화학적 분해에 대한 개선된 내성 및 (ii) 0.5% 이하의 사이클로덱스트린을 함유하는 제형에 비교하여 응집에 대한 개선된 내성을 나타낸다. 다른 측면으로, 약 5% 또는 약 6% w/v 또는 그 이상의 사이클로덱스트린을 포함하는 본 발명의 약학 제형은 (i) 2% 이하의 사이클로덱스트린을 함유하는 제형에 비교하여 벤조다이아제핀 약물의 화학적 분해에 대한 개선된 내성, (ii) 0.5% 이하의 사이클로덱스트린을 함유하는 제형에 비교하여 응집에 대한 개선된 내성 및 (iii) 0.5% 이하의 사이클로덱스트

린을 함유하는 제형에 비교하여 산성 종들의 성장에 대한 개선된 내성을 나타낸다.

[0144] 본원에 기술된 혼합물들 또는 제형들 (약학 제형을 포함함) 중 어느 것에서, 벤조다이아제핀 ADC는 본원에 기술된 것과 같이 PBD 이량체 1, PBD 이량체 2, PBD 이량체 3, PBD 이량체 4, PBD 이량체 5, PBD 이량체 6, PBD 이량체 7, PBD 이량체 8, PBD 이량체 9, PBD 이량체 10, PBD 이량체 11, PBD 이량체 12, PBD 이량체 13, PBD 이량체 14, PBD 이량체 15, PBD 이량체 16 또는 PBD 이량체 17에 포합된 인간화된 2H12 또는 인간화된 1F6를 포함할 수 있다. 일부 측면으로, 항체에 대한 PBD 이량체의 포합은 항체 안에 공학적으로 도입된 시스테인 잔기를 통해서 이루어질 것이다. 일부 측면에서, 시스테인 잔기는 EU 색인 (Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991))에 의해 측정되는 바 위치 239 (인간 IgG1)에서 항체 안에 공학적으로 도입된다. 일부 측면에서, 제형에는 항체당 평균 2개의 약물-링커가 있을 것이다.

[0145] 일부 측면으로, 본 발명의 약학 제형은 보통 벌크 약물 제품으로서 유용한, ADC (예를 들면 항-CD33 또는 항-CD70 ADC)의 농축된 제제를 제공한다. 나아가 특정 구체예에서, 본 발명의 약학 제형은 냉동, 동결건조 및/또는 복원에 대해 안정하다.

[0146] 일부 측면으로, 본원에 기술된 약학 제형은 약 -80℃ 내지 약 8℃의 온도에서 보관된다. 일반적으로, 약학 제형은 이들 범위에서 안정하고 생물학적 활성을 보유한다. 특정 측면으로, 본원에 기술된 제형은 사이클로덱스트린을 함유하지 않은 제형에 비교하여, 스트레스 조건 (예컨대 25℃ 또는 40℃에서 7일 및 14일과 같은 연장된 시간 기간 동안 보관)에 노출될 때 개선된 안정성을 나타낸다.

[0147] 본 발명의 약학 제형은 다양한 투여 경로에 의해 전달하기에 적당하다. 특정 구체예에서, 약학 제형은 비경구로, 예컨대 정맥 내로, 근육 내로 또는 피하로 투여된다. 암 치료를 위한 ADC의 투여를 위해, 약학 제형은 정맥 내 또는 피하 투여에 의해 전신성 순환계 안으로 전달될 수 있다. 특별한 구체예에서, 약학 제형은 정맥 내 전달을 위해 제형된다. 정맥 내 투여는 예를 들면 30 내지 90분과 같은 기간에 걸친 주입에 의해 또는 1회의 볼루스 주사에 의해 이루어질 수 있다. 일부 측면에서, 투여는 말단 삽입된 중심 카테테르에서 느린 (즉 30 내지 60초에 걸친) IV 푸쉬를 통해 이루어질 것이다.

[0148] 본 발명의 약학 제형의 유효량은 투여 수단, 표적 부위, 환자의 생리적 상태, 환자가 인간 또는 동물인지, 투여된 다른 약물 및 치료가 예방적인 것인지 치료적인 것인지를 포함하여 상이한 많은 인자들에 따라 다르다. 통상적으로, 환자는 인간이지만 비-인간 동물도 치료될 수 있다. 치료 단위용량은 안전성과 효능을 최적화하기 위해 적정될 필요가 있다.

[0149] 본 발명의 ADC 투여에 대한 예시적인 단위용량은 약 1.0㎍/kg 내지 약 5mg/kg, 약 10㎍/kg 내지 약 3mg/kg, 약 10㎍/kg 내지 약 2mg/kg, 약 1.0㎍/kg 내지 약 1.0mg/kg 또는 약 1.0㎍/kg 내지 500.0㎍/kg의 대상 체중을 포함한다.

[0150] 투여의 빈도는 다른 인자들 중에서도 순환계의 항체-약물 포합체의 반감기ㅡ 환자의 상태 및 투여 경로에 좌우된다. 빈도는 환자의 상태 변화 또는 치료되고 있는 질환 (예컨대 암)의 진행정도에 대한 반응으로 매일, 격주, 격월, 분기당 1회이거나 또는 비규칙적인 간격을 가질 수 있다. 정맥 내 투여에 대한 예시적인 빈도는 연속적인 치료 과정에 걸쳐 일주일에 2회 내지 분기당 1회이지만, 더 많거나 적은 빈도의 투약 또한 가능하다. 정맥 내 투여를 위한 다른 예시적인 빈도는 연속적인 치료 과정에 걸쳐 일주일에 1회 또는 1개월에 1회지만, 더 많거나 적은 빈도의 투약 또한 가능하다. 피하 투여에 대해서는, 예시적인 투약 빈도는 매일에서 월에 1회지만, 더 많거나 적은 빈도의 투약 또한 가능하다.

[0151] 단위용량의 투여의 용이함 및 균일성을 위해 유닛 단위용량 형태로 발명의 제형을 제공하는 것이 특히 유익하다. 발명의 제형은 액체 또는 동결건조된 형태 중 어느 하나로, 예컨대 캡슐, 유리 바이알, 앰플, 다중-용량 용기 등으로 제시될 수 있다. 유닛 단위용량 형태는 본원에 기술된 어떠한 제형을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, ADC는 IV 투여를 위해 복원하기 위한 동결건조된 케이크 또는 단일-사용 앰버 유리에 보관된 분말로서 존재할 수 있다. 복원은 적당한 희석제 (예컨대 주사용 물)를 사용하여 바람직한 농도로 이루어진다. 전형적으로 복원은 복원된 용액이 동결건조 전의 제형과 동일한 농도의 성분들을 가질 정도로 충분한 희석제를 사용하여 복원된다. 복원된 제품은 환자에게 투여되어야 할 용량 수준에 따라 추가로 희석될 수 있다. 추가 희석은 예를 들면 주사용 염화 나트륨을 사용하여 이루어질 수 있다. 발명의 일부 측면에서, 복원 또는 임의의 추가 희석 직후에 ADC는 IV (예컨대 느린 IV 푸쉬)에 의해 중심 정맥 접근 장치의 적절한 주사 부분 안으로 투여된다. 주입선은 전형적으로 식염수로 플러싱될 것이다.

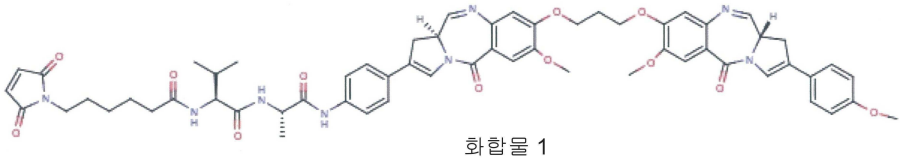
[0152] 일부 측면으로, 본 발명은 본 발명의 안정화된 ADC 제형을 포함하는 약학적 단위용량 유닛 형태 (예컨대 본원에 기술된 것과 같이, 액체 또는 동결건조된 형태 중 어느 하나로, ADC 제형을 함유하는 밀봉된 용기)를 포함하는 치료 제품을 제공한다. 치료 제품은 추가로 사용을 위한 라벨링을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 치료 제품은 예를 들면 환자에서 치료 용량을 이루기 위해 필요한 적절한 부피를 사용하기 위한 지시사항을 추가로 포함하는 키트로서 제공된다. 유닛 단위용량 형태, 용기 또는 키트는 다중 사용을 위해 충분한 제형을 제공하기 위해 디자인되거나 1회 사용을 위한 것일 수 있다. 일부 구체예에서, 키트는 희석제를 추가로 포함한다.

[0153] 만약 서열의 상이한 버전이 다른 시간에 승인 번호와 결부된다면, 본 출원의 유효한 출원일에 승인 번호와 결부된 버전을 의미한다. 유효한 출원일은 실제 출원일 또는 가능하다면 승인 번호를 언급하는 선행 출원의 출원일 중 앞선 날짜를 의미한다. 마찬가지로 만약 다른 버전의 공보가 다른 시간에 공개된다면, 그 버전은 다른 표시가 없는 한 출원의 유효한 출원일에서 가장 최근에 공개된 것을 의미한다. 발명의 어떠한 특징, 단계, 요소, 구체예 또는 측면은 구체적으로 다르게 표시되지 않는 한 어떠한 다른 것과 조합하여 사용될 수 있다. 비록 본 발명이 명료성과 이해를 목적으로 예시 및 실례에 의하여 어느 정도 상세하게 기술되었지만, 어떤 변화들과 변형들은 첨부된 청구범위의 범주 내에서 실시될 수 있다는 것이 명백해질 것이다. 상기 또는 아래에서 인용된 모든 특허 파일링, 웹사이트, 다른 공보, 승인 번호 등은 그것의 전체가 모든 목적에 대해 각각의 개별적인 항목이 구체적으로 및 개별적으로 참조로 포함된 것으로 표시되는 것과 동일한 정도로 참조로 포함된다.

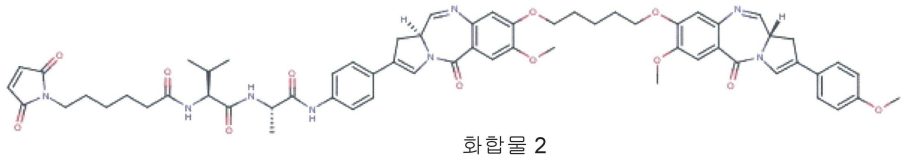
[0154] **실시예**

[0155] PBD 이량체 **1** 내지 **4**와 그것의 합성은 WO2011/130613에 기술되어 있다. PBD 이량체 **5** 내지 **10**과 **16**은 WO2011/130613 A1에 기술되어 있는 방법들을 사용하여 합성될 수 있다. 간단히 설명하면, PBD 이량체 **9**와 **16**은 WO2011/130613 A1의 C3-결합된 비스-트라이플레이트 중간체 **8a**를 통해 접근할 수 있다. 붕산 또는 피나콜 보로네이트로서 바람직한 C2 아릴기는 순차적인 Suzuki 커플링으로 도입되고, 이어서 SEM 다이락탐 환원으로 이민 기능성 기가 드러난다. PBD 이량체 **5** 내지 **8**과 **10**은 WO2011/130613 A1의 C5-결합된 비스-트라이플레이트 중간체 **8b**로부터 동일한 방식으로 제조된다. C2 아릴기에 에스테르 또는 카르복실산을 함유하는 PBD 이량체 **11** 내지 **15**는 WO2011/130613 A1에 기술된 방법들을 사용하여 적은 변형을 사용하여 접근될 수 있다. PBD 이량체 **13**은 WO2011/130613 A1의 C3-결합된 비스-트라이플레이트 중간체 **8a**로부터 제조될 수 있다. 비스 트라이플레이트는 적절하게 기능화된 붕산 또는 피나콜 보로네이트와의 Suzuki 커플링을 통해 비대칭화되어 아미노 기능성 기를 내포하는 C2 아릴기가 세워진다. 그 결과 생성된 모노트라이플레이트는 그런 다음 리튬 트라이에틸보로하이드라이드로 환원되어 SEM 카비놀이 생성되고, 그것은 두 번째 Suzuki 커플링이 수행되어 메틸 에스테르를 함유한 C2 아릴기가 세워진다. 마지막으로, SEM 카비놀은 WO2011/130613 A1에서 기술된 것과 같이, 실리카겔 상에서 3일 동안 교반을 통해 이민으로 전환된다. PBD 이량체 **12** 및 **14**는 WO2011/130613 A1에서 C5-결합된 비스 트라이플레이트 **8b**를 사용하여 출발하여 동일한 방식으로 제조될 수 있다. PBD 에스테르의 유리 카르복실산 (**11** 및 **15**)으로의 전환은 사포닌화를 통해 이루어질 수 있다. IgG1 mAb의 시스테인 돌연변이의 제조는 일반적으로 US20100158909에 기술되어 있다.

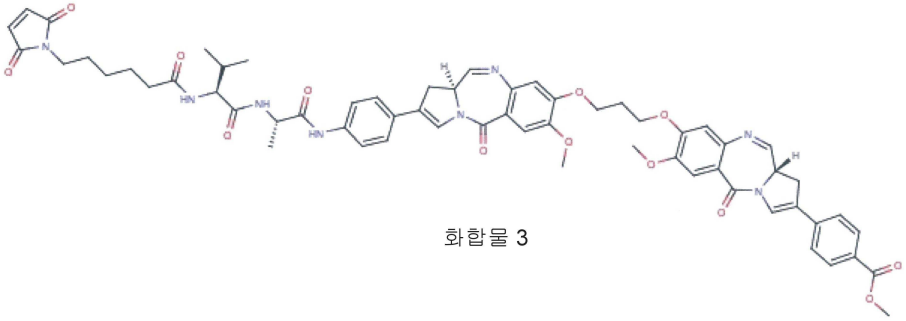
[0156] 다음의 실시예들에서 사용된 PBD 약물-링커는 다음과 같다. 약물-링커의 항체에의 포합은 WO2011/130613 A1에서 기술된 것과 같다.



화합물 1



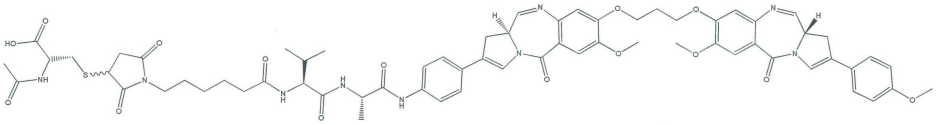
화합물 2



화합물 3

[0157]

[0158] 다음의 실시예들에서 언급된 퀀칭된 약물-링커는 다음 구조를 가진다:



[0159]

[0160] PBD 약물 링커들은 h2H12ec 항체 또는 h1F6ec에 중쇄의 위치 239를 통해 포합되었다 (항체 이름 다음의 표시 "ec"는 위치 239에서 공학적으로 도입된 시스테인을 가지는 항체를 나타낸다). 간단히 설명하면, 위치 239 (EU 색인 넘버링)에 도입된 시스테인을 가지는 h2H12 및 h1F6은 환원되었고, 부분적으로 재산화되었으며 (즉 사슬간 이황화물에 대해 재산화됨), WO 2011/130613에 기술된 방법들을 사용하여 PBD 약물-링커에 포합되어 ADC가 형성되었다. PBD 약물-링커는 도입된 시스테인 잔기를 통해 부분적으로 재산화된 항체에 포합되었다 (항체당 평균 2개의 약물-링커). h2H12-1은 화합물 1에 포합된 인간화된 2H12ec 항체를 말하는 한편, h1F6-1은 화합물 1에 포합된 인간화된 1F6ec 항체를 말한다. h2H12-2는 화합물 2에 포합된 인간화된 2H12ec 항체를 말하는 한편, h1F6-2는 화합물 2에 포합된 인간화된 1F6ec 항체를 말한다. h2H12-3은 화합물 3에 포합된 인간화된 2H12ec 항체를 말하는 한편, h1F6-3은 화합물 3에 포합된 인간화된 1F6ec 항체를 말한다. 실시예 4 내지 7은 위치 239에서 도입된 시스테인을 통해 화합물 1에 포합된 h2H12ec 또는 h1F6ec 항체 중 하나를 사용하여 수행하였다.

[0161] **실시예 1**: 사이클로덱스트린 기초 제형은 6개의 모든 PBD ADC에 대한 응집의 속도와 정도를 감소시켰다

[0162] 투석, 완충액 교환 칼럼 또는 원심분리 여과를 사용하여 출발 물질의 시험된 제형 완충액으로의 완충액 교환에 의해 제형들을 제조하였다. 제형들은 도면들에 표시된 것과 같다. 아르기닌의 농도는 제공된 대로 표시될 때 0.5M이다. 최종 ADC 농도는 UV 분광계에 의해 측정되는 바 1.3mg/mL 내지 3.1 mg/mL의 범위에 있었다. 제형된 ADC를 사전-멸균된 튜브에 채워 다음의 ICH 조건에서 보관하였다: 2 내지 8℃, 25℃/65% RH 및/또는 40℃/75% RH. %HMW는 크기 축출 크로마토그래피를 사용하여 모니터링하였다. 도 1의 제형은 h2H12-1을 함유하고, 25℃에서 보관한다; 도 2의 제형은 h1F6-1을 함유하고 25℃에서 보관한다; 도 3의 제형은 h2H12-3을 함유하고, 40℃에서 보관한다; 도 4의 제형은 h1F6-3을 함유하고 40℃에서 보관한다; 도 1의 제형은 h2H12-2를 함유하고, 40℃에서 보관한다; 도 6의 제형은 h1F6-2를 함유하고 40℃에서 보관한다; 도 13의 제형은 h1F6-1을 함유하고 25℃에서 보관한다.

[0163] **실시예 2**: HPBCD-기초 제형은 6개의 PBD ADC 중 5개에 대해 산성 종들의 성장을 감소시켰다

[0164] 투석, 완충액 교환 칼럼 또는 원심분리 여과를 사용하여 출발 물질의 시험된 제형 완충액으로의 완충액 교환에 의해 제형들을 제조하였다. 제형들은 도면들에 표시된 것과 같다. 아르기닌의 농도는 제공된 대로 표시될 때 0.5M이다. 최종 ADC 농도는 UV 분광계에 의해 측정되는 바 1.3mg/mL 내지 3.1 mg/mL의 범위에 있었다. 제형들을 사전-멸균된 튜브에 채워 다음의 ICH 조건에서 보관하였다: 2 내지 8℃, 25℃/65% RH 및/또는 40℃/75% RH. 샘플을 영상 모세관 등전점 전기영동에 의해 전하 분포 (% 산성, % 메인, % 염기성)에 대해 분석하였다. 도 7의 제형은 h2H12-1을 함유하고, 25℃에서 보관한다; 도 8의 제형은 h1F6-1을 함유하고 25℃에서 보관한다; 도 9의 제형은 h2H12-3을 함유하고, 40℃에서 보관한다; 도 10의 제형은 h1F6-3을 함유하고 40℃에서 보관한다; 도 11의 제형은 h2H12-2를 함유하고, 40℃에서 보관한다; 도 12의 제형은 h1F6-2를 함유하고 40℃에서 보관한다.

[0165] **실시예 3**: HPBCD-기초 제형은 약물-링커의 화학적 분해를 감소시켰다

[0166] 투석, 완충액 교환 칼럼 또는 원심분리 여과를 사용하여 출발 물질의 시험된 제형 완충액으로의 완충액 교환에 의해 제형들을 제조하였다. 일반적으로 제형들은 대조표준 (대부분 아르기닌)으로서 초기 제형, 완충액, 3% 사이클로덱스트린 및 6% 사이클로덱스트린을 포함하였다. 최종 ADC 농도는 UV 분광계에 의해 측정되는 바 1.3mg/mL 내지 3.1 mg/mL의 범위에 있었다. 제형을 사전-멸균된 튜브에 채워 다음의 ICH 조건에서 보관하였다: 2 내지 8℃, 25℃/65% RH 및/또는 40℃/75% RH. 약물-링커 안정성을 환원된 PLRP/MS를 사용하여 % 분해산물에 의해 또는 펩신 소화 지도를 사용하여 % 무상 약물 링커에 의해 측정하였다. 그 결과는 다음과 같고, 제형들은 좌측 칼럼에 열거한다. 표 2는 6% 사이클로덱스트린을 함유한 제형이 40℃에서 1주일 후 2% 사이클로덱스트린을 사용한 것보다 약물 링커가 덜 분해된 것을 증명한 것을 나타낸다. 표 3은 6% 사이클로덱스트린을 함유한 h2H12-1의 제형들이 25℃에서 1주일 후에 약물 링커를 덜 분해한 것을 증명한 것을 나타내고, 표 4는 6% hpb사이클로덱스트린을 함유한 h1F6-1의 제형들이 40℃에서 1주일 동안 인큐베이션된 후에 더 높은 수준의 무상 약물 링커를 유지하였음을 나타낸다.

표 2

[0167]

h1F6-1 샘플 (40℃에서 1주일 보관한 후)	펩신 소화에 의한 무상 약물-링커의 %
출발 물질 (T0 대조표준)	82
20mM Tris, 2%CD	63
20mM Tris, 6%CD	70

표 3

[0168]

h2H12-1 샘플 (25℃에서 1주일 보관한 후)	약물 링커 분해산물의 % (-168 달톤 종)
0.5M Arg [t=0, 대조표준]	0.2
0.5 M Arg [25℃, t=1w]	4.7
0.5 M Arg, 6% hpβCD [25℃, t=1w]	3.0
6% hpβCD, 20 mM KPhos [t=0, 대조표준]	0.6
6% hpβCD, 20 mM KPhos [25℃, t=1w]	1.4

표 4

[0169]

h1F6ec-1 샘플 (40℃에서 1주일 보관한 후)	펩신 소화에 의한 무상 약물-링커의 %
출발 물질 (T0 대조표준)	85
0.5 M Arg [pH 7.2, 40℃, t=1w]	63
20 mM Tris [pH 7.2, 40℃, t=1w]	66
20 mM Tris, 6% hpβCD, [pH 7.2, 40℃, t=1w]	69

[0170] **실시예 4**: 사이클로덱스트린 농도 프로필

[0171] 이 실험은 투석여과 중에 h2H12-1을 포함하는 퀀칭된 포합 반응 혼합물 (QCR)의 응집을 방지하기 위해 사용되는, 투석여과 완충액의 한 성분으로서 3% w/v 하이드록시프로필-사이클로덱스트린 (hpb-CD)의 활용성을 시험하였다. 이 실험의 일차 목표는 투석여과를 위해 사용될 막이 hpb-CD에 대해 투과성인지 아닌지를 측정하는

것이었다. 만약 막이 hpb-CD를 거의 투과시키지 못한다면 그것의 배치 중의 농도는 투석여과 완충액 중의 농도 이상으로 증가하는 한편, 신속하게 투과시킬 수 있다면, 배치 중의 hpb-CD 농도는 투석여과 완충액의 농도에 도달하여 그 수준에서 유지될 것이다.

[0172] 투석여과 (DF) 과정은 30kD의 분자량 기공 크기를 가지는, Millipore로부터의 88cm^2 Ultracel Pellicon 3 카세트를 사용하였다. DF에 대한 배치 부피는 250mL였고, 공급물 유속은 전 과정을 통해 40ml/분이었으며, 보유물 밸브는 ~20psi의 막간-차압을 유지하기 위해 조정하였다. 일정함 배치 부피를 유지하기 위한 투석여과 완충액 첨가 속도는 9mL/분에서 시작하였지만, 대부분의 과정을 통해 13 내지 14 ml/분에서 유지하였다. 샘플을 각 투석부피의 완료 후에 제거하였다. 각 샘플의 hpb-CD의 농도를 증기화 광산란 검출이 포함된 RP HPLC 분석을 사용하여 측정하였다.

[0173] 그 결과는 hpb-CD의 농도가 투석여과를 시작할 때 0으로부터 5 투석부피에 걸쳐 2.8 내지 2.9 wt%로 증가한 후, 추가의 5 투석부피 동안 일정하게 유지된 것을 나타냈다 (도 14). hpb-CD의 농도 프로필은 사용된 한외여과막을 쉽게 투과할 수 있는 시약과 일치한다.

[0174] **실시예 5**: 3% 및 10% w/v/ 사이클로덱스트린을 사용한 접선 유동 여과

[0175] 이 실험에서, h2H12-1, 50 w/w% 프로필렌 글리콜, 퀀칭된 약물-링커 (화합물 4) 및 NAC를 50mM의 트리스/5mM의 EDTA, pH 8.0 중에 함유하고 있는 QCR을 활용하였다. 이 혼합물을 50mM 트리스/5mM EDTA, pH 8.0 중의 hpb-CD의 50 w/v 용액의 25% 부피를 첨가함으로서 10 w/v% hpb-CD로 만들었다. 그런 다음 혼합물을 실시예 4와 유사한 조건하에서, 그러나 대략적인 규모로 투석여과하였다. 각각의 투석부피 후에 샘플을 제거하고, 분석할 때까지 냉동시켰다. 퀀칭된 약물-링커의 농도를 각 샘플에서 측정하였다. 퀀칭된 약물-링커의 농도는 투석여과의 전 과정을 통해, $\ln(C/C_0)$와 투석부피 # 사이의 선형 관계: $C/C_0 = \exp(-SN)$에 의해 나타나는 것과 같이, 일정 부피 투석여과를 통한 소멸에 대한 수립된 모델을 허용하는 방식으로 감소되었다. C와 C_0는 측정된 분석물의 농도이고, N은 투석부피의 횟수이며, S는 막의 보유물 측의 분석물 농도에 의해 나누어진 막의 투과물 측의 분석물 농도로서 정의된 체거름 인자(sieving factor)이다. 출발 농도는 16.3㎛M였고, 최종 농도는 0,14㎛M였다.

[0176] 10 w/v% hpb-CD의 존재하에, 퀀칭된 PBD 약물-링커는 이 투석여과 과정 중에 효과적으로 소멸된다 (도 15). hpb-CD의 부재시에 특정 횟수의 투석부피 후에 소멸이 중단된 이전의 실험들과 달리, 이 실험에서 소멸은 매우 낮은 수준가지 효과적이었다. 실험은 효과적이고 완전한 소멸이 시험된 조건하에서 이루어질 수 있었음을 증명한다.

[0177] 실험을 더 낮은 농도의 hpb-CD를 사용하여 반복하였다 (도 15). 본질적으로 동일한 소멸이 3 w/v% hpb-CD를 10%로 대체하였을 때 관찰되었다.

[0178] **실시예 6**: QCR 혼합물로부터 약물-관련 불순물들의 소멸

[0179] 실시예 4 및 5에 기술된 실험들은 퀀칭된 PBD 약물-링커가 사이클로덱스트린을 사용하여 투석여과 과정에 의해 혼합물로부터 제거될 수 있었음을 보여주었다. 이 실험의 목적은 이 방법이 퀀칭된 PBD 약물-링커의 더 높은 출발 농도를 가지는 QCR로부터 퀀칭된 약물-링커를 성공적으로 소멸시킬 수 있는지를 측정하는 것이었다.

[0180] 보관하고 있던 냉동된 환원 항체 (사슬간 이황화물에 대해서가 아니라 239 위치에 대해 환원된 h2H12)를 해동시켰다. 프로필렌 글리콜(PG)와, 이어서 약물-링커-PG/DMA (화합물 1)를 첨가하여 포합 반응 혼합물을 형성하였다. 그 혼합물은 50% (v/v) PG 및 과잉량의 약물-링커 (화합물 4)를 함유하였다. 반응을 약 90분 동안 진행시킨 후, 3.0 당량 (약물-링커와 관련하여)의 NAC를 첨가하고, 퀀칭 반응을약 30분 동안 진행시켰다.

[0181] 충분한 50 w/w% hpb-CD 스톡 용액을 첨가하여 퀀칭된 포합 반응 hpb-CD 농도를 3%로 만들었다. TFF 과정을, 88cm^2의 재생 셀룰로오스 막을 사용하여, TFF 공급물 펌프 상에서 회전시킴으로써 시작하였다. 고농도의 PG를 함유한 용액들의 이전의 TFF 과정에서처럼, 초기 유속은 막간-차압으로 인해 제한되었지만, 첫 번째 투석부피 중에 공급물 유속은 막에 대해 권장된 작동 범위로 점차적으로 증가될 수 있었다. 그런 다음 보유물 밸브를 20psi의 TMP를 유지하도록 조정하였다. 투석여과 완충액을 첨가하여 일정한 부피를 유지하였다. 과정을 20 투석부피에 대해 허용하였고, 샘플을 각각의 투석부피 후에 취하여 계속되는 분석을 위해 냉동하였다.

[0182] 전체 정제 과정 중에 취한 샘플의 용액 중의 퀀칭된 PBD 약물-링커 (화합물 4)의 농도의 측정은 물질이 TFF 과정에 의해 소멸되었음을 나타냈다. 농도는 27.47㎛M에서 출발하여 20 투석부피 후에 0.03㎛M로 강하되었는데, 그것은 퀀칭된 PBD 약물-링커가 QCR 용액으로부터 TFF에 의해 소멸될 수 있었음을 보여준다 (도 16). 최종 생성

물 샘플의 분석은 평균 약물 부하 및 분포, 이황화 결합 세기, 전하 분포 및 UV 스펙트럼이 이 과정에 의해 불리하게 영향을 받지 않았음을 나타냈다 (데이터는 제시하지 않음).

[0183] **실시예 7**: 2H12 ADC 또는 h1F6 ADC를 포함하는 QCR 혼합물로부터 약물-관련 불순물들의 소멸

[0184] 30kD MW 컷오프 0.1m2 Ultracel Pellicon 3 멤브레인 (Millipore)을 사용하여 퀀칭된 포합 반응 혼합물에 대해 TFF 과정을 수행하였다. TMP를 초기에는 유속에 의해, 나중에는 보유물 밸브에 의해 20psi에서 유지하였다. TFF 과정을 20 투석부피에 대해 작동시켰고, 이때 매 2번째 투석부피마다 샘플을 수집하였다. 퀀칭된 PBD 약물-링커의 농도를 각 샘플에서 측정하였다.

[0185] 2H12 ADC를 포함한 QCR 혼합물을 사용하는 한 실험에서, 퀀칭된 PBD 약물-링커 (화합물 4)의 농도는 TFF 과정 중에 29.56mM로부터 0.02mM로 떨어졌다. 소멸 도표는 선형이었고, 이때 체거름 인자는 ~0.4였다. TFF 단계 중에 회수에 대한 데이터는 활용할 수 없지만, ADC에 대한 전체 수율은 >95%였고, 그래서 TFF 과정 중에 손실은 <5%였다 (도 7).

[0186] TFF는 3% hpb-CD의 존재하에 퀀칭된 PBD 약물-링커의 소멸에 대해 탄소-여과만큼 효과적이다. TFF 과정 중에 약물-관련 불순물들에 대한 조사를 토대로, 충분히 낮은 불순물 수준을 이루는 것을 보장하기 위해 14 투석부피가 충분한 것으로 추정된다.

[0187] h1F6 ADC를 포함하는 QCR 혼합물을 사용한 한 실험에서, 퀀칭된 PBD 약물-링커 (화합물 4)의 농도는 TFF 과정 중에 21.2mM로부터 0.1μM로 떨어졌다. 소멸 도표는 선형이었고, 체거름 인자는 ~0.6이었다 (도 18).

[0188] **실시예 8**: 사이클로덱스트린 없이 접선 유동 여과를 사용한 벤조다이아제핀 ADC의 정제

[0189] 퀀칭된 약물-링커 (화합물 4)를 일정 부피 투석여과를 사용하여 QCR로부터 정제하였다. 퀀칭된 포합 반응 혼합물을 접선 유동 여과 장치 안에 넣었다. 퀀칭된 포합 반응 혼합물은 트리스, NaCl 및 50%의 프로필렌 글리콜을 포함한다. 접선 유동 여과 완충액 또한 트리스, NaCl 및 50%의 프로필렌 글리콜을 포함한다. 한외여과/투석여과 순서 후에, 4 투석부피 후 소멸 스톨링(stalling)을 사용하여 1.1μM의 벤조다이아제핀 약물-관련 불순물이 혼합물에 남아있었다 (데이터는 제시하지 않음).

[0190] **실시예 9 - 세포독성**

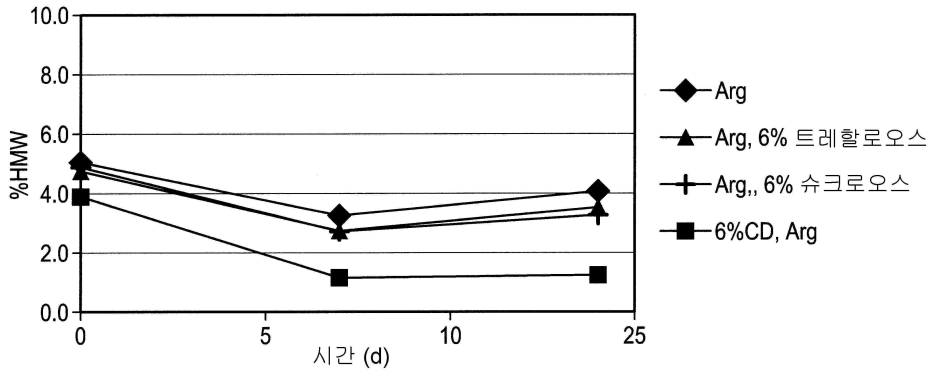
[0191] 세포독성 연구를 수행하여 6% 사이클로덱스트린을 함유한 ADC 제형이 세포독성 활성을 보유하였는지의 여부를 측정하였다. 그 결과는 ADC 제형이 세포독성 활성을 보유하였음을 증명하였다 (데이터는 제시하지 않음).

[0192] **실시예 10 - 퀀칭된 포합 반응 혼합물로부터 약물-관련 불순물들의 소멸**

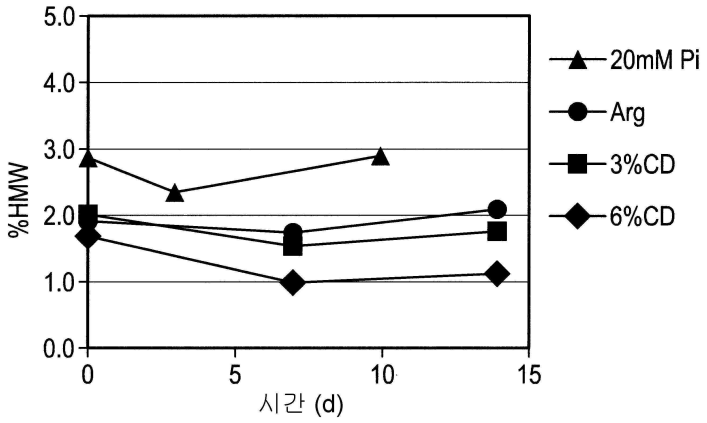
[0193] 7.57의 SlogP 값을 가지는 퀀칭되지 않은 PBD 약물-링커 (화합물 1)를 퀀칭되지 않은 포합 반응 혼합물로부터 일정 부피 투석여과를 사용하여 정제하였다. 사이클로덱스트린을 3%로 유지하였다. 놀랍게도, 퀀칭되지 않은 PBD 링커의 소멸 (데이터는 제시하지 않음)은 앞의 실시예들에서 나타난 것과 같이 퀀칭된 PBD 약물-링커의 소멸만큼 효과적이지 않았다. 이 실험은 PBD 약물-링커의 소수성을 낮추는 것 (화합물 4는 5.76의 SlogP 값을 가짐)이 소멸을 개선시켰음을 증명하였다.

도면

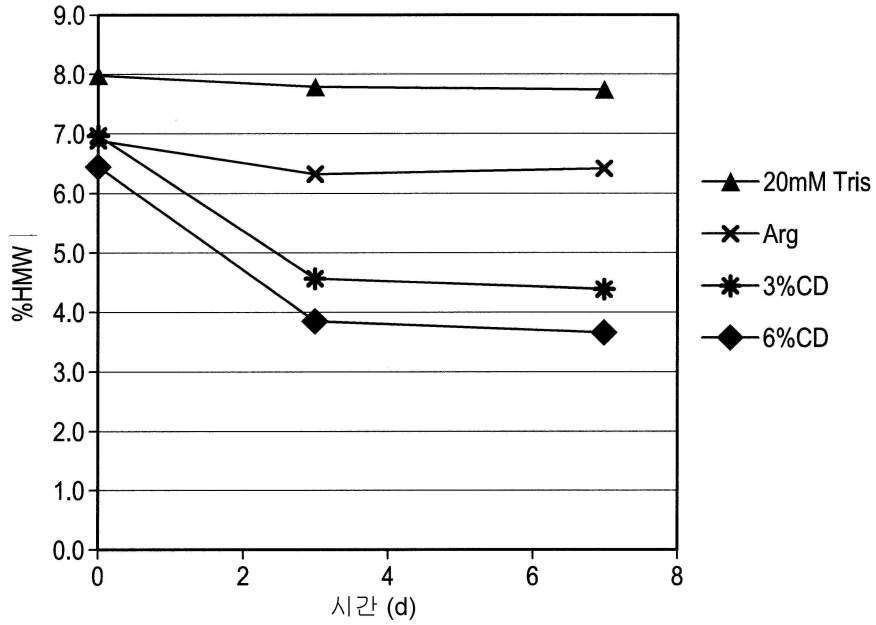
도면1



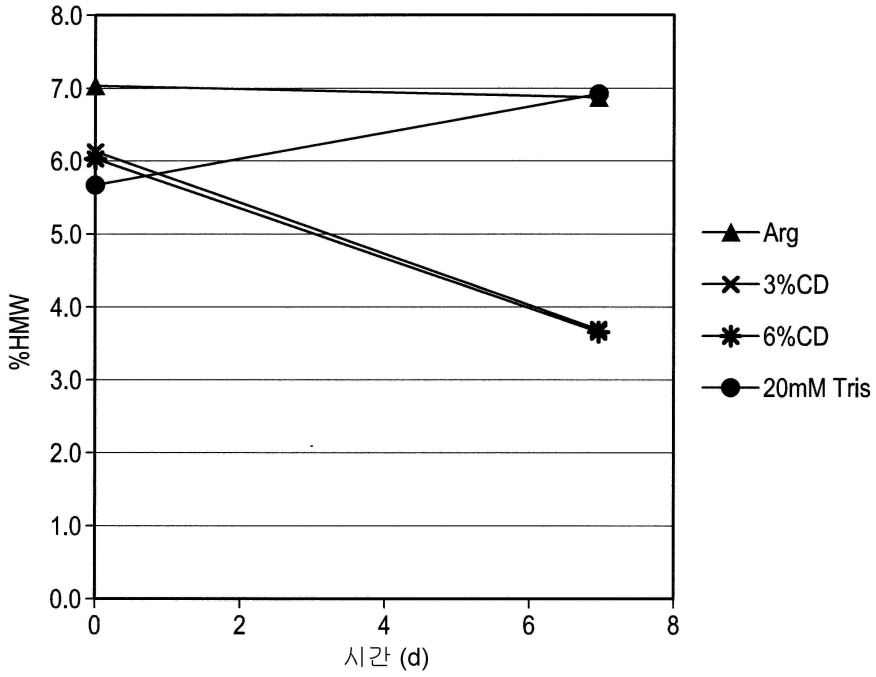
도면2


5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
%HMW
0
5
10
15
시간 (d)
20mM Pi
Arg
3%CD
6%CD

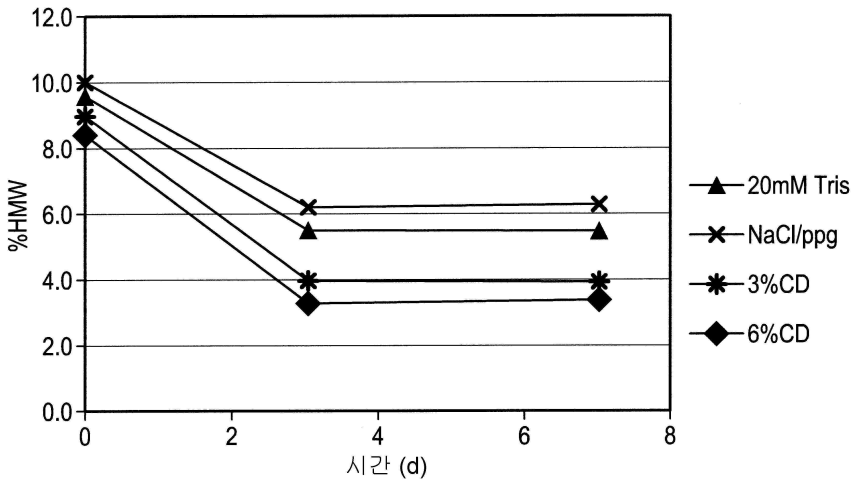
도면3


9.0
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
%HMW
0
2
4
6
8
시간 (d)
20mM Tris
Arg
3%CD
6%CD

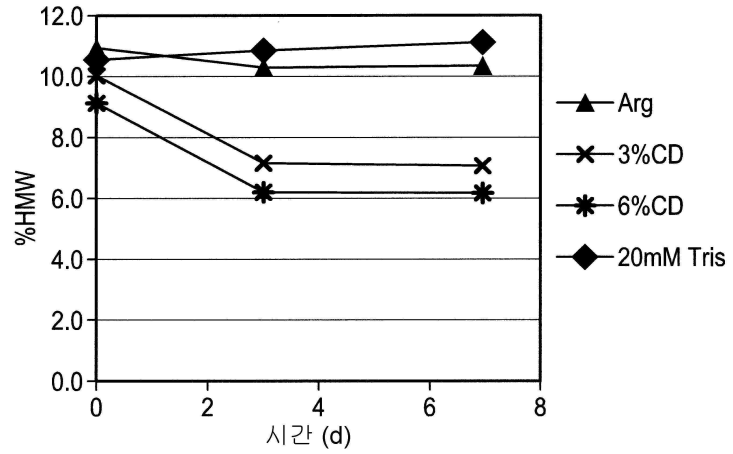
도면4


8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
%HMW
0
2
4
6
8
시간 (d)
Arg
3%CD
6%CD
20mM Tris

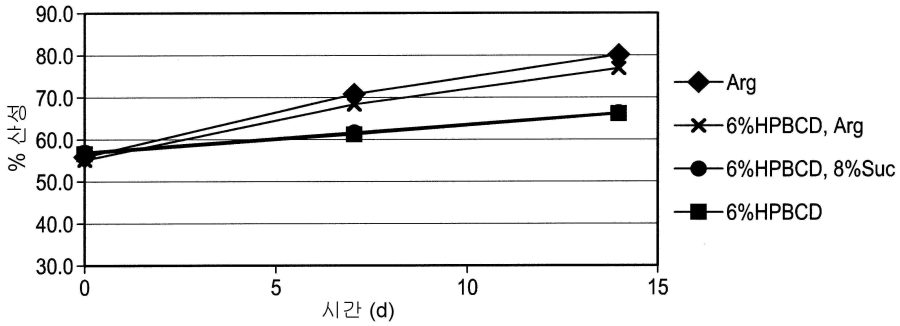
도면5


12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
%HMW
0
2
4
6
8
시간 (d)
20mM Tris
NaCl/ppg
3%CD
6%CD

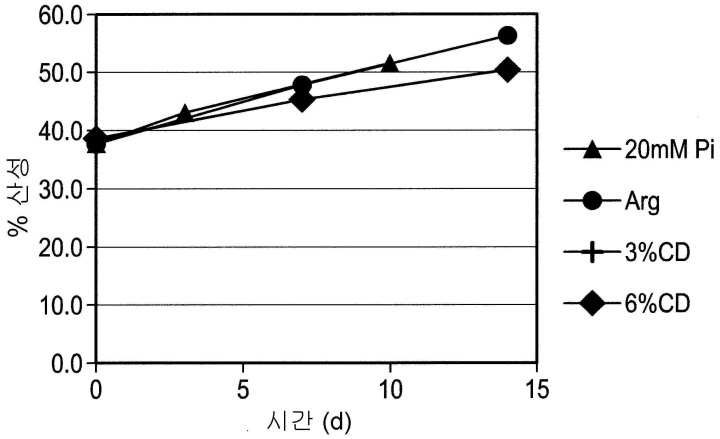
도면6


12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
%HMW
0
2
4
6
8
시간 (d)
Arg
3%CD
6%CD
20mM Tris

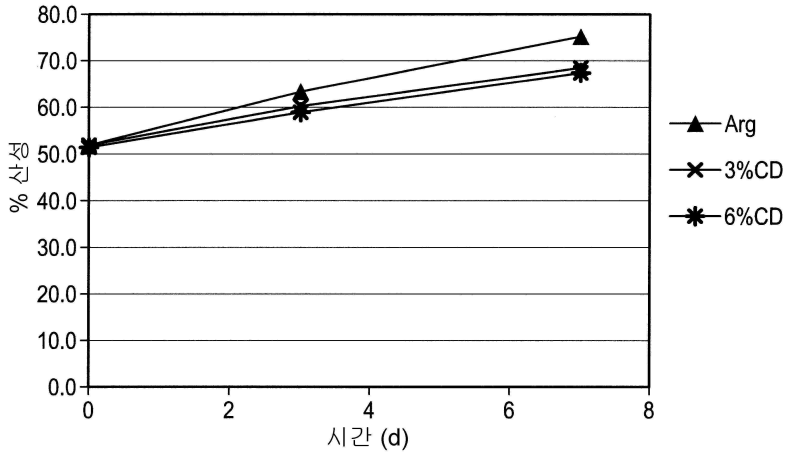
도면7


90.0
80.0
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
% 산정
0
5
10
15
시간 (d)
Arg
6%HPBCD, Arg
6%HPBCD, 8%Suc
6%HPBCD

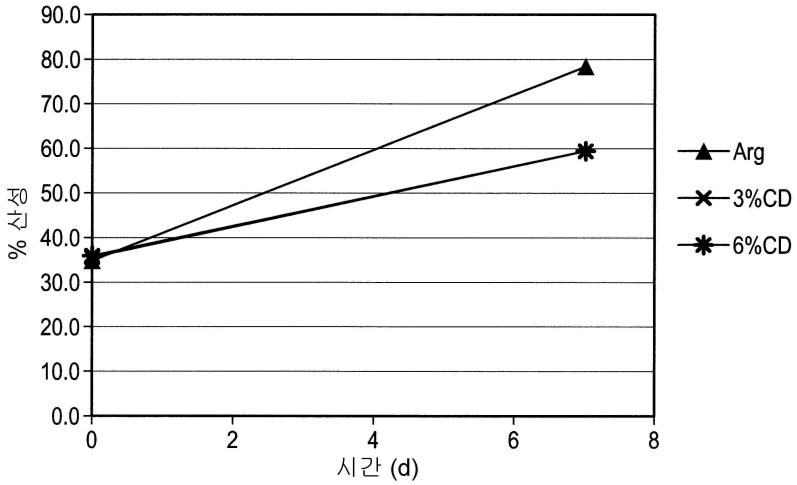
도면8


60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
% 산정
0
5
10
15
시간 (d)
20mM Pi
Arg
3%CD
6%CD

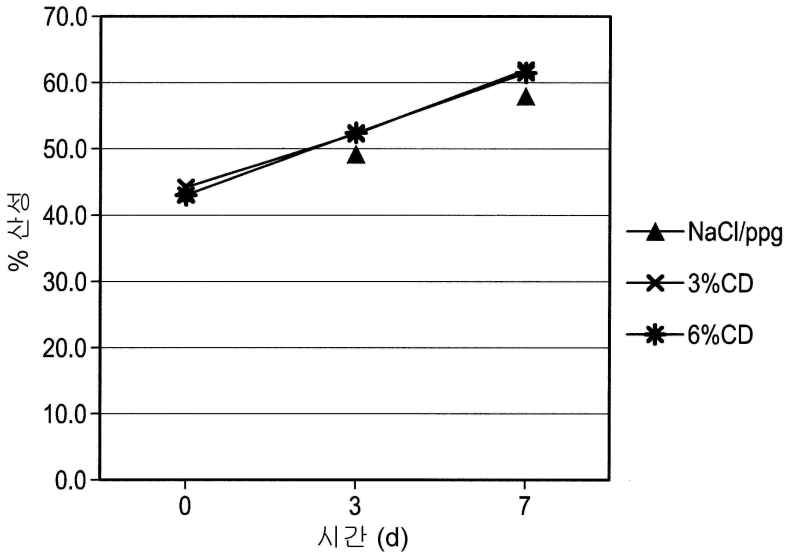
도면9



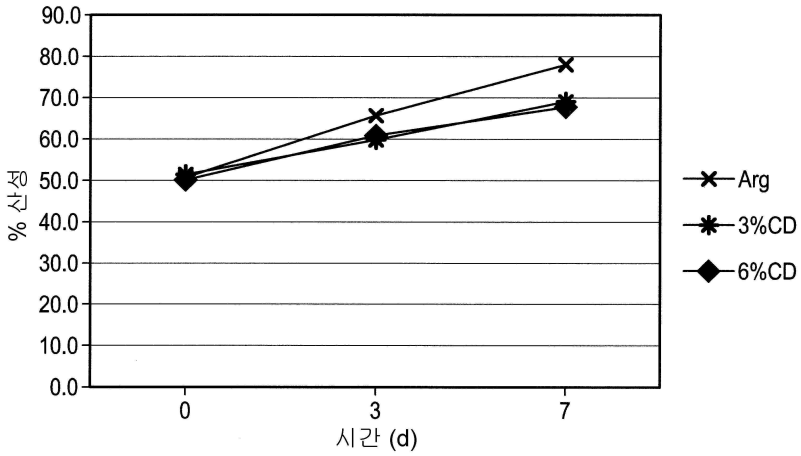
도면10



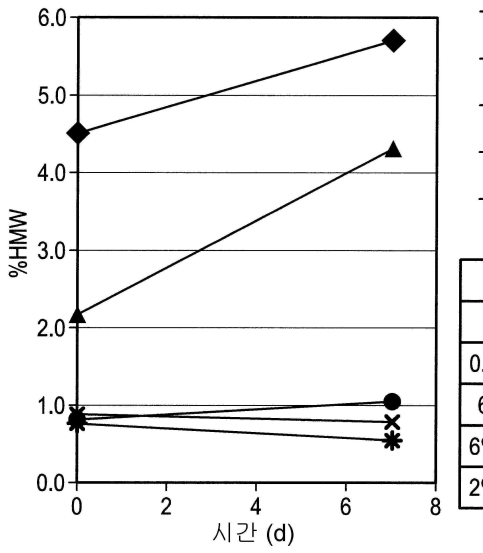
도면11



도면12

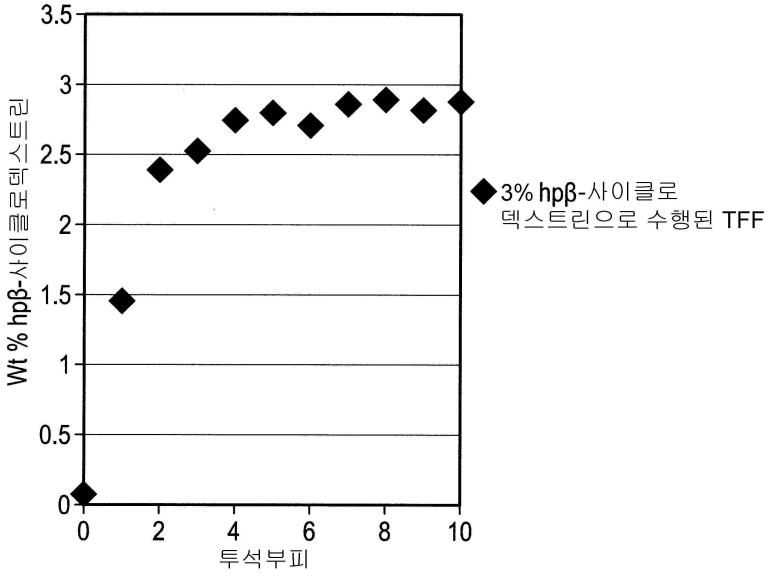


도면13

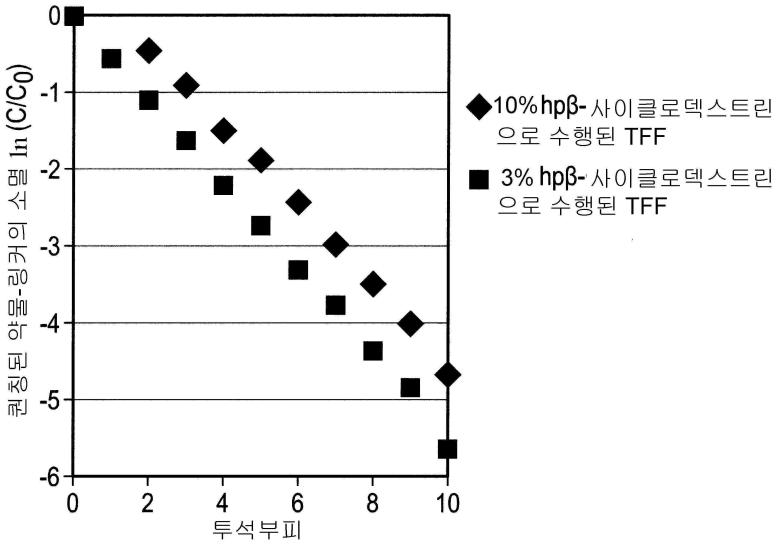


25°C, HMW	0	7	변화
Tris, 3mg/mL	4.5	5.7	1.2
0.5%CD, tris, 3mg/mL	2.2	4.3	2.1
6%CD, tris, 3mg/mL	0.9	0.8	-0.1
6%CD, tris, 1.3mg/mL	0.8	0.6	-0.2
2%CD, tris, 1.3mg/mL	0.8	1.0	0.2

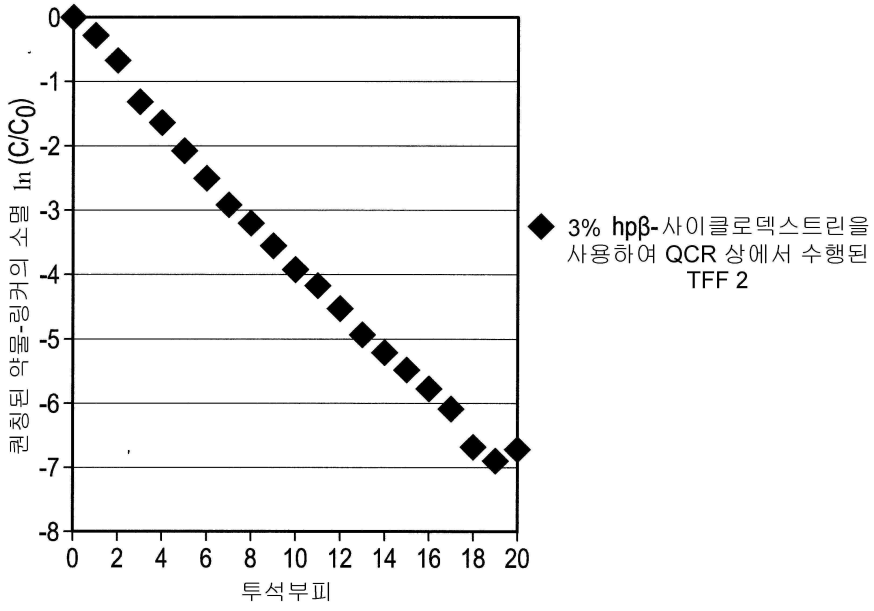
도면14



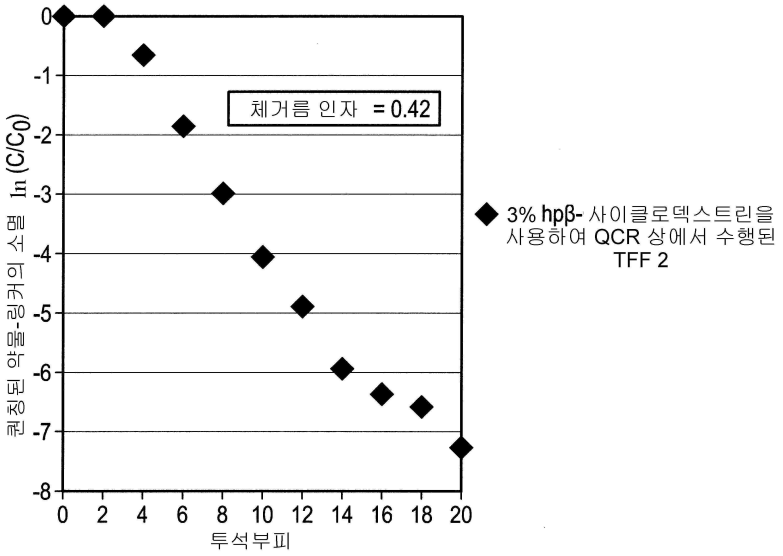
도면15


0
-1
-2
-3
-4
-5
-6
0
2
4
6
8
10
투석부피
퀀칭된 약물-링커의 소멸 ln (C/C0)
10% hpβ-사이클로덱스트린으로 수행된 TFF
3% hpβ-사이클로덱스트린으로 수행된 TFF

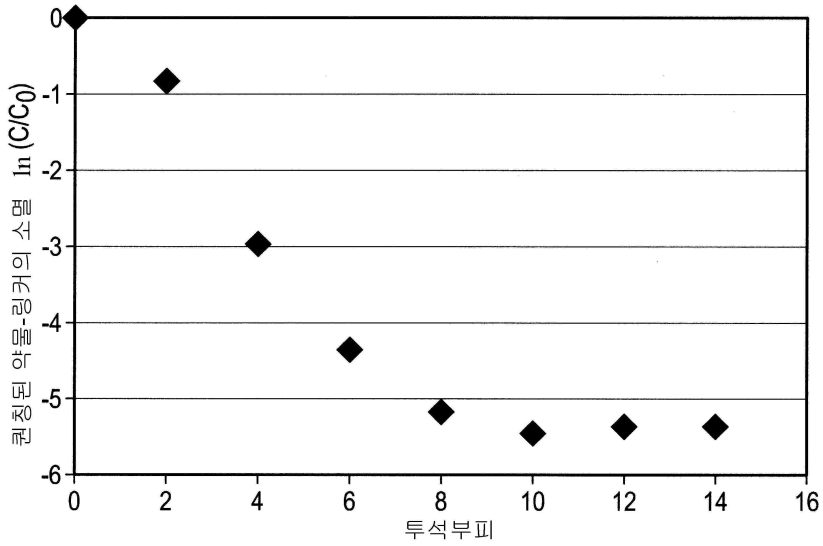
도면16


0
-1
-2
-3
-4
-5
-6
-7
-8
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
투석부피
퀀칭된 약물-링커의 소멸 ln (C/C0)
3% hpβ-사이클로덱스트린을 사용하여 QCR 상에서 수행된 TFF 2

도면17



도면18



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Seattle Genetics, Inc.

<120> CYCLODEXTRIN AND ANTIBODY-DRUG CONJUGATE FORMULATIONS

<130> PBD-00812PC

<150> 61/780,185

<151> 2013-03-13

<150> 61/782,231

<151> 2013-03-14

<160> 23

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Murine 2H12 VL

<400> 1

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Val Ile Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr

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

85 90 95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 2

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Murine 2H12 VH

<400> 2

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
1 5 10 15
Phe Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Asp Ile Asn Trp Val Asn Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Asn Leu Thr Ser Glu Asn Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Ser Gly Tyr Glu Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 3

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Humanized 2H12 VL

<400> 3

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 Asn Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr

20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile

35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 4

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYDINWVRQAPGQGLEWIGWIYPGDGSTKYNEKFK
AKATLTADTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCASGYEDAMDYWGQGTTVTVSS

<400> 4

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Gly Tyr Glu Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 2H12 CDR-L1

<400> 5

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Ser
1 5 10

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 2H12 CDR-L2

<400> 6

Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 2H12 CDR-L3

<400> 7

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 2H12 CDR-H1

<400> 8

Asn Tyr Asp Ile Asn

1 5

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 2H12 CDR-H2

<400> 9

Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Ala

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 2H12 CDR-H3

<400> 10

Gly Tyr Glu Asp Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 11

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Murine 1F6 VH

<400> 11

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

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser

20 25 30

Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg

85 90 95

Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105 110

<210> 12

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Murine 1F6 VH

<400> 12

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Ala Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Gly Asp Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 13

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Humanized 1F6 VL

<400> 13

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser

20 25 30

Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg

85 90 95

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

100 105 110

<210> 14

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Humanized 1F6 VH

<400> 14

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Ala Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Gly Asp Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 1F6 CDR-L1

<400> 15

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Met His

1 5 10 15

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 1F6 CDR-L2

<400> 16

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 1F6 CDR-L3

<400> 17

Gln His Ser Arg Glu Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 1F6 CDR-H1

<400> 18

Asn Tyr Gly Met Asn

1 5

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> 1F6 CDR-H2

<400> 19

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Ala Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220

><223> 1F6 CDR-H3

<400> 20

Asp Tyr Gly Asp Tyr Gly Met Asp Tyr

1 5

<210> 21

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Human light chain constant region

<400> 21

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys

65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 22

<211> 329

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Human heavy chain constant region (no C-term K)

<400> 22

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu

225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 23
<211> 329
<212> PRT
<213> Artificial
<220><223> Human heavy chain constant region, S239C (no C-term K)
<400> 23
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

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

85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Cys Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325