



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년07월31일
 (11) 등록번호 10-1424624
 (24) 등록일자 2014년07월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/48 (2006.01) **A61K 39/395** (2006.01)
 (21) 출원번호 **10-2012-7015450(분할)**
 (22) 출원일자(국제) **2004년05월14일**
 심사청구일자 **2012년06월14일**
 (85) 번역문제출일자 **2012년06월14일**
 (65) 공개번호 **10-2012-0073369**
 (43) 공개일자 **2012년07월04일**
 (62) 원출원 **특허 10-2005-7021693**
 원출원일자(국제) **2004년05월14일**
 심사청구일자 **2009년05월14일**
 (86) 국제출원번호 **PCT/US2004/015376**
 (87) 국제공개번호 **WO 2004/110498**
 국제공개일자 **2004년12월23일**
 (30) 우선권주장
 60/470,550 2003년05월14일 미국(US)
 (56) 선행기술조사문헌
 US20020001587 A1*
 WO1997004801 A1*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
이뮤노젠 아이엔씨
 미국 02451-1477 메사추세츠주 월섬 윈터 스트리트 830
 (72) 발명자
애플렛 갓프레이
 미국, 메사추세츠 02138, 캠프릿지, 1/2 애쉬 스트리트 플레이스 8
장 웨이
 미국, 메사추세츠 02138, 캠프릿지, 넘버7비, 매사추세츠 애브뉴 1580
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
특허법인씨엔에스

전체 청구항 수 : 총 60 항

심사관 : 감유림

(54) 발명의 명칭 **약물 콘주게이트 조성물**

(57) 요약

본 발명은 마이탄시노이드에 화학적으로 결합된 항체를 포함하는 치료에 유효한 양의 콘주게이트를 포함하는 액체 조성물 및 동결 건조 조성물을 제공한다. 본 발명은 나아가 항체가 세포의 표면에 결합하고 마이탄시노이드의 세포독성을 활성화시키며, 이에 따라 세포가 사멸되도록 인간에게 상기 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 인간에서 세포 사멸방법을 제공한다.

(72) 발명자

플레밍 마이클

미국, 뉴햄프셔 03053, 런던데리, 벌치우드 드라이브 5

치흐 형-웨이

미국, 매사추세츠 02139, 캠프릿지, 넘버 63, 웨스턴 애브뉴 101

특허청구의 범위

청구항 1

(i) 마이탄시노이드에 화학적으로 결합된 항체를 포함하는 치료에 유효한 양의 콘쥬게이트, (ii) 상기 콘쥬게이트 mg당 시트레이트 버퍼, 아세테이트 버퍼, 숙시네이트 버퍼 및 히스티딘 버퍼로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 완충제 0.1-2mg, (iii) 상기 콘쥬게이트 mg당 수크로오즈 0.5-5mg, (iv) 상기 콘쥬게이트 mg당 글리신 2-20mg, 및 (v) 상기 콘쥬게이트 mg당 계면활성제 0.005-0.1mg을 포함하며, 물로 재구성되는 경우 pH가 5 내지 6인 것을 특징으로 하는 동결 건조 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 계면활성제는 폴리소르베이트 80 또는 폴리소르베이트 20인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 콘쥬게이트 mg 당 0.3mg의 소디움 숙시네이트를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 콘쥬게이트 mg 당 1mg의 수크로오즈를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 콘쥬게이트 mg 당 3.8mg의 글리신을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제1항의 동결 건조 조성물에 물을 첨가하여 재구성된 조성물을 제공함으로써 제조된 재구성된 동결 건조 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 재구성된 조성물에서 콘쥬게이트의 농도는 0.1 내지 5mg/mL인 것을 특징으로 하는 재구성된 동결 건조 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 재구성된 조성물에서 완충제의 농도는 2 내지 50mM인 것을 특징으로 하는 재구성된 동결 건조 조성물.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 재구성된 조성물에서 글리신의 농도는 50 내지 500mM인 것을 특징으로 하는 재구성된 동결 건조 조성물.

청구항 10

(i) 마이탄시노이드에 화학적으로 결합된 항체를 포함하는 콘쥬게이트, (ii) 시트레이트 버퍼, 아세테이트 버퍼, 숙시네이트 버퍼 및 히스티딘 버퍼로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 완충제 2-50mM, (iii) 수크로오즈 0.1 내지 3%wt/vol, (iv) 글리신 또는 만니톨 50-500mM, (v) 계면활성제 0.002 내지 0.1%wt/vol, 및 (vi) 물을 포

함하며, pH가 5 내지 6인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 조성물은 글리신을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

글리신의 농도는 250mM인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 13

제10항에 있어서,

상기 조성물은 만니톨을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 14

제10항에 있어서,

상기 계면활성제는 폴리소르베이트 80 또는 폴리소르베이트 20인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 15

제10항에 있어서,

상기 계면활성제의 농도는 전체 조성물 부피의 0.005 내지 0.02%wt/vol인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 계면활성제의 농도는 전체 조성물 부피의 0.01%wt/vol인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 17

제10항에 있어서,

상기 조성물은 숙시네이트 버퍼를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 18

제10항에 있어서,

상기 조성물은 히스티딘 버퍼를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 19

제10항에 있어서,

상기 완충제의 농도는 5-15mM인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 20

제10항에 있어서,

상기 완충제의 농도는 10mM인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 21

제10항에 있어서,

상기 콘쥬게이트의 농도는 1mg/mL인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 22

제10항에 있어서,

상기 콘쥬게이트의 농도는 5mg/mL인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 23

제10항에 있어서,

상기 조성물의 pH는 5.5인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체는 단클론성 항체인 것을 특징으로 하는 조성물 또는 재구성된 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서,

상기 항체는 인간화된 단클론성 항체인 것을 특징으로 하는 조성물 또는 재구성된 조성물.

청구항 26

제24항에 있어서,

상기 항체는 세포 표면에 존재하는 항원에 결합하는 것을 특징으로 하는 조성물 또는 재구성된 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서,

상기 항원은 NCAM/CD56, CD33, CD19, GD₃, CanAg, PSMA, 알파-엽산 수용체, Her2/neu, CD44v6, 페토아시나르 펜크리아틱(FAP) 항원, Cripto-1, CA6, CD20, CA55.1, MN/CA IX, 및 콘드로이틴 술페이트 프로테오글리칸으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물 또는 재구성된 조성물.

청구항 28

제24항에 있어서,

상기 항체는 huN901, huMy9-6, huB4, huC242, 트라스투주맵, 비타투주맵, 시브로투주맵 및 리투시맵으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물 또는 재구성된 조성물.

청구항 29

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 마이탄시노이드는 티올기를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물 또는 재구성된 조성물.

청구항 30

제29항에 있어서,

상기 마이탄시노이드는 N^{2'}-디아세틸-N^{2'}-(3-머캅토-1-옥소프로필)-마이탄신(DM1)인 것을 특징으로 하는 조성물 또는 재구성된 조성물.

청구항 31

제29항에 있어서,

상기 마이탄시노이드는 N^{2'}-디아세틸-N^{2'}-(4-머캅토-4-메틸-1-옥소펜필)-마이탄신(DM4)인 것을 특징으로 하는 조성물 또는 재구성된 조성물.

청구항 32

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체는 디술파이드 결합, 산 불안정 결합, 광불안정 결합, 펩티다제 불안정 결합, 티오에테르 결합 및 에스테리아제 불안정 결합으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 화학 결합에 의해 마이탄시노이드에 화학적으로 결합되는 것을 특징으로 하는 조성물 또는 재구성된 조성물.

청구항 33

제1항에 있어서,

상기 조성물은 (i) N^{2'}-디아세틸-N^{2'}-(3-머캅토-1-옥소프로필)-마이탄신(DM1)에 화학적으로 결합된 huN901을 포함하는 콘주게이트, (ii) 콘주게이트 mg 당 0.3mg의 소듐 숙시네이트 버퍼, (iii) 콘주게이트 mg 당 0.02mg의 폴리소르베이트 20, (iv) 콘주게이트 mg 당 1mg의 수크로오즈 및 (v) 콘주게이트 mg 당 3.8mg의 글리신을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 34

제10항에 있어서,

상기 조성물은 (i) N^{2'}-디아세틸-N^{2'}-(3-머캅토-1-옥소프로필)-마이탄신(DM1)에 화학적으로 결합된 huN901 1mg/ml, (ii) 10mM 소듐 시트레이트, (iii) 수크로오즈 0.5%wt/vol, (iv) 250mM 글리신, (v) 폴리소르베이트 20 0.01%wt/vol. 및 (vi) 물을 포함하며, 상기 조성물의 pH는 5.5인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 35

제10항에 있어서,

상기 조성물은 (i) N^{2'}-디아세틸-N^{2'}-(3-머캅토-1-옥소프로필)-마이탄신(DM1)에 화학적으로 결합된 huN901을 포함하는 콘주게이트, (ii) 10mM 소듐 시트레이트, (iii) 수크로오즈 0.5%wt/vol, (iv) 250mM 글리신, (v) 폴리소르베이트 20 0.01%wt/vol. 및 (vi) 물을 포함하며, 상기 조성물의 pH는 5.5인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 36

(i) 마이탄시노이드에 화학적으로 결합된 항체를 포함하는 콘주게이트, (ii) 시트레이트 버퍼, 아세테이트 버퍼, 숙시네이트 버퍼 및 히스티딘 버퍼로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 완충제 2-50mM, (iii) 수크로오즈 2 내지 5%wt/vol, (iv) 글리신 또는 만니톨 50-500mM, (v) 계면활성제 0.002 내지 0.1%wt/vol, 및 (vi) 물을 포함하며, pH가 5 내지 6인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 37

(i) 마이탄시노이드에 화학적으로 결합된 항체를 포함하는 콘주게이트, (ii) 시트레이트 버퍼, 아세테이트 버퍼, 숙시네이트 버퍼 및 히스티딘 버퍼로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 완충제 2-50mM, (iii) 수크로오즈 4 내지 6%wt/vol, (iv) 글리신 또는 만니톨 50-500mM, (v) 계면활성제 0.002 내지 0.1%wt/vol, 및 (vi) 물을 포함하며, pH가 5 내지 6인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 38

제36항 또는 제37항에 있어서,

상기 조성물은 글리신을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 39

제38항에 있어서,

글리신의 농도는 250mM인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 40

제36항 또는 제37항에 있어서,
상기 조성물은 만니톨을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 41

제36항 또는 제37항에 있어서,
상기 계면활성제는 폴리소르베이트 80 또는 폴리소르베이트 20인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 42

제36항 또는 제37항에 있어서,
상기 계면활성제의 농도는 전체 조성물 부피의 0.005 내지 0.02%wt/vol인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 43

제42항에 있어서,
상기 계면활성제의 농도는 전체 조성물 부피의 0.01%wt/vol인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 44

제36항 또는 제37항에 있어서,
상기 조성물은 숙시네이트 버퍼를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 45

제36항 또는 제37항에 있어서,
상기 조성물은 히스티딘 버퍼를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 46

제36항 또는 제37항에 있어서,
상기 완충제의 농도는 5-15mM인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 47

제36항 또는 제37항에 있어서,
상기 완충제의 농도는 10mM인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 48

제37항에 있어서,
수크로오즈의 농도는 전체 조성물 부피의 5%wt/vol인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 49

제36항 또는 제37항에 있어서,
상기 콘쥬게이트의 농도는 1mg/mL인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 50

제36항 또는 제37항에 있어서,

상기 콘주게이트의 농도는 5mg/mL인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 51

제36항 또는 제37항에 있어서,

상기 조성물의 pH는 5.5인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 52

제36항 또는 제37항에 있어서,

상기 항체는 단클론성 항체인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 53

제52항에 있어서,

상기 항체는 인간화된 단클론성 항체인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 54

제52항에 있어서,

상기 항체는 세포 표면에 존재하는 항원에 결합하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 55

제54항에 있어서,

상기 항원은 NCAM/CD56, CD33, CD19, GD₃, CanAg, PSMA, 알파-엽산 수용체, Her2/neu, CD44v6, 페토아시나르 팬크리아틱(FAP) 항원, Cripto-1, CA6, CD20, CA55.1, MN/CA IX, 및 콘드로이틴 술페이트 프로테오글리칸으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 56

제52항에 있어서,

상기 항체는 huN901, huMy9-6, huB4, huC242, 트라스투주맵, 비타투주맵, 시브로투주맵 및 리톡시맵으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 57

제36항 또는 제37항에 있어서,

상기 마이탄시노이드는 티올기를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 58

제57항에 있어서,

상기 마이탄시노이드는 N^{2'}-디아세틸-N^{2'}-(3-머캅토-1-옥소프로필)-마이탄신(DM1)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 59

제57항에 있어서,

상기 마이탄시노이드는 N^{2'}-디아세틸-N^{2'}-(4-머캅토-4-메틸-1-옥소펜틸)-마이탄신(DM4)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 60

제36항 또는 제37항에 있어서,

상기 항체는 디술과이드 결합, 산 불안정 결합, 광불안정 결합, 펩티다제 불안정 결합, 티오에테르 결합 및 에스테라아제 불안정 결합으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 화학 결합에 의해 마이탄시노이드에 화학적으로 결합되는 것을 특징으로 하는 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 마이탄시노이드에 화학적으로 결합된 항체를 포함하는 콘쥬게이트 및 그 사용방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 약학의 발전과 함께 암 세포를 보다 효율적으로 목표로 하고 사멸시키는 암의 치료법은 상당히 진전되었다. 이러한 목적을 위하여, 연구자들은 암세포에 의해 선택적으로 발현되는 세포-표면 수용체 및 항원을 이용하여 특이적 종양 또는 종양 연결 항원을 결합하는 항체를 기초로 약물을 발전시켰다. 이와 관련하여, 박테리아 및 식물 독소와 같은 세포독성 분자, 방사성 핵종, 및 특정한 화학적 치료 약물이 종양-특이성 또는 종양-관련 세포 표면 항원을 결합하는 단클론성 항체에 화학적으로 연결되었다(예를 들어, 국제특허출원 제 WO 00/02587, WO 02/060955 및 WO 02/092127, 미국특허 제 5,475,092, 6,340,701, 6,171,586, 미국 특허출원 공개 제 2003/0004210 A1, 및 Ghetie et al., J. Immunol. Methods, 112, 267~277(1988)을 참고바람). 이러한 화합물은 일반적으로 각각 독소, 방사성 핵종, 및 약물 "콘쥬게이트"라 칭한다. 이들은 때때로 면역콘쥬게이트, 방사성 면역콘쥬게이트 및 항독소라한다. 종양세포에 약물 콘쥬게이트가 결합되고 마이탄시노이드에 세포독성활성이 활성화되어 종양 세포가 사멸된다.

[0003] 약물 콘쥬게이트에 의해 종양 선택성이 공급됨에도 불구하고, 임상환경에서 약물 콘쥬게이트의 사용은 여러가지 요인에 의해 제한된다. 이와 관련하여, 약물 콘쥬게이트 배합물은 일반적으로 알려진 배합물의 항체를 기초로 하며, 콘쥬게이트된 세포독성 분자가 항체의 안정성을 갖는지에 대해 고려하지 않고 약물 콘쥬게이트를 제조한다. 이와 같은, 현재의 약물 콘쥬게이트 조성물은 종양-특이성 항체를 단독으로 함유하는 조성물 보다 덜 안정하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 이에 따라, 상기와 같은 견지에 있어서, 현재 사용되고 있는 약물 콘쥬게이트 조성물보다 안정한 고도의 세포독성 약물을 함유하는 약물 콘쥬게이트 조성물이 요구된다. 또한, 암과 같은 세포 증식과 관련된 인간 질병의 치료를 위해 이러한 약물 콘쥬게이트 조성물의 사용방법이 요구된다.

[0005] 본 발명은 이러한 조성물 및 방법을 제공한다. 본 발명의 이러한 그리고 다른 잇점 뿐만 아니라 추가의 특징을 이하 본 발명의 상세한 설명을 통하여 보다 상세히 설명하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 (i) 마이탄시노이드에 화학적으로 결합된 항체를 포함하는 치료 유효량의 콘쥬게이트, (ii) 완충제, (iii) 토닉화량(tonicifying amount)의 소듐 클로라이드, (iv) 물 및 (v) 임의의 계면활성제를 포함하며, pH가 약 5 내지 6인 것을 특징으로 하는 조성물이 제공된다. 또한, 본 발명은 (i) 마이탄시노이드에 화학적으로 결합된 항체를 포함하는 치료 유효량의 콘쥬게이트, (ii) 완충제, (iii) 항동결제, (iv) 별킹제 및 (v) 임의의 계면활성제를 포함하며, 물에 용해시키는 경우, pH가 약 5 내지 6인 것을 특징으로 하는 조성물이 제공된다. 본 발명은 나아가 항체가 세포 표면에 결합하고 마이탄시노이드의 세포독성을 활성화시키고, 이에 따라 세포를 사멸시키기 위해 상기된 조성물을 인간에게 투여하는 단계를 포함하는 인간에서 세포 사멸 방법을 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0007] 이하 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다.
- [0008] 본 발명은 (i) 마이탄시노이드에 화학적으로 결합된 항체를 포함하는 치료 유효량의 콘주게이트, (ii) 완충제, (iii) 임의의 계면활성제, (iv) 톤화량의 소듐 클로라이드, 및 (v) 물을 포함하며, pH가 약 5 내지 6인 것을 특징으로 하는 조성물이 제공된다.
- [0009] 본 발명의 조성물은 마이탄시노이드에 화학적으로 결합된 항체를 포함하는 콘주게이트를 포함한다. 본 발명에서 사용되는 용어 "항체"는 세포 표면상의 항원에 결합할 수 있는, Fab, F(ab')₂, dsFv, sFv, 디아바디(diabodies), 및 트리아바디(triabodies) 또는 면역글로불린 키메라와 같은 어떠한 면역 글로불린, 어떠한 면역 글로불린 프래그먼트를 칭한다(예를 들어, 상보성 결정 부위(CDR)을 포함한다.). 이 기술분야의 당업자는 적합한 항체의 선택이 목표로 하는 세포군집에 따라 결정되는 것으로 판단한다. 이와 관련하여, 특정한 세포군집(일반적으로 바람직하게는 질병에 걸린 세포 군집)에서 선택적으로 발현되는 세포 표면 분자(즉, 항원)의 형태 및 수는 본 발명의 조성물에서 사용하기 위한 적합한 항체의 선택을 결정한다. 세포 표면 발현 프로파일은 종양 세포 형태를 포함하는 광범위한 형태의 세포 종류로 알려져 있거나, 알려지지 않은 경우에는, 일반적인 분자 생물학 및 조직화학 기술을 사용하여 결정할 수 있다.
- [0010] 항체는 다클론성 또는 단클론성일 수 있으나, 단클론성 항체가 가장 바람직하다. 본 발명에서 사용되는, '다클론성' 항체는 일반적으로는, 면역화된 동물의 세럼에 함유된, 혼성 항체 군집을 칭한다. "단클론성" 항체는 특정한 항원에 효과가 있는 항체 분자의 단일 군집을 칭한다. 일반적으로 단클론성 항체는 B 림프구("B 세포")의 단일 클론에 의해 생성된다. 단클론성 항체는 표준 하이브리도마 기술을 포함하는 이 기술분야에 알려진 다양한 기술을 사용하여 얻어질 수 있다(예를 들어, Kohler and Milstein, Eur. J. Immunol., 5, 511-519 (1976), Harlow and Lane(eds.), Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press(1988), 및 C.A. Janeway et al.(eds.) Immunobiology, 5th Ed., Garland Publishing, New York (2001)를 참고바람) 간단히 말해서, 단클론성 항체를 생성하는 하이브리도마 방법은 항원을 갖는(즉, "면역원") 어떠한 적합한 동물, 일반적으로 바람직하게는 마우스에 주입하는 단계를 포함한다. 후속적으로 상기 동물을 죽이고 그 비장에서 분리된 B세포를 인간 골수종 세포와 융해시킨다(fused). 혼성 세포(즉, '하이브리도마')가 생성되며, 이는 체내에서 원하는 특이성을 갖는 항체를 높은 타이터(titer)로 불명확하고 연속적으로 증식시킨다. 이 기술분야에 알려진 어떠한 적합한 방법은 원하는 특이성을 갖는 항체를 생성하는 하이브리도마 세포를 일치시키는데 사용될 수 있다. 이러한 방법으로는 예를 들어, 효소-결합된 면역 흡착제 어세이(ELISA), 특수 단백질 검출 검사 분석 및 방사면역검정법을 포함한다. 하이브리도마의 군집은 독립적인 클론을 분리하여 스크린하고, 항원에 단일 항체 종을 각각 시크릿한다(secret). 각각의 하이브리도마는 단일 B세포와의 융해로부터 유도되는 클론이며, 모든 항체 분자는 항원 결합 부위 및 이소타입을 포함하는 구조에서 동일하다. 단클론성 항체는 또한 EBV-하이브리도마 기술(예를 들어, Haskard and Archer, J. Immunol. Methods, 74(2), 361-67(1984) 및 Roder et al., Methods Enzymol., 121, 140-67(1986)를 참고바람) 또는 살균 바이러스 벡터 발현 시스템(예를 들어, Huse et al., Science, 246, 1275-81(1981)을 참고바람)을 포함하는 다른 적합한 기술을 사용하여 발생될 수 있다. 단클론성 항체 프래그먼트를 제조하기 위하여, 제조합형 방법이 일반적으로 사용된다.
- [0011] 단클론성 항체는 어떠한 적합한 동물에서 분리 또는 생성될 수 있으나, 바람직하게는 포유류에서 생성되며, 보다 바람직하게는 마우스, 가장 바람직하게는 인간이다. 마우스에서 항체를 생성하는 방법은 이 기술분야에 잘 알려져 있으며, 본 발명에 개시된다. 인간 항체와 관련하여, 이 기술 분야의 당업자는 다클론성 항체가 적합한 항원으로 백신 또는 면역화된 인간 개체의 세럼으로부터 분리될 수 있는 것으로 판단한다. 선택적으로, 인간 항체는 마우스와 같은 비-인간 동물에서 인간 항체를 생성하는 알려진 기술을 적용하여 발생될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 5,545,806, 5,569,825, 및 5,714,352 및 미국 특허 출원 공개번호 제 2002/0197266 A1을 참고바람). 인간의 치료 적용을 위한 이상적인 선택이지만, 일반적으로 인간 항체, 특히 인간 단클론성 항체는 마우

스 단클론성 항체 보다 발생시키기 어렵다. 그러나, 마우스 단클론성 항체는 인간에 투여되는 경우 신속한 호스트 항체 반응을 유도하며, 이는 항체-약물 콘주게이트의 치료 또는 진단 포텐셜을 감소시킬 수 있다. 이러한 복잡함을 우회하기 위해, 바람직하게 단클론성 항체는 인간 면역 시스템에 의해 "포린(foreign)"으로 인지되지 않는다. 이러한 목적을 위하여, 파즈(phage) 디스플레이는 항체를 발생시키는데 사용된다. 이와 관련하여 항체의 파즈 라이브러리 엔코딩 항원-결합 변이성(V) 도메인은 표준 분자 생물학 및 재조합 DNA 기술을 사용하여 발생될 수 있다(예를 들어, Sambrook et al.(des.), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York(2001)을 참고바람). 원하는 항원에 특이성 결합을 위해 원하는 특이성을 갖는 변이성 영역의 파즈 인코딩을 선택하고, 완전한 인간 항체를 선택된 변이성 도메인을 포함하여 재구성한다. 재구성된 항체를 엔코딩한 핵산 시퀀스는 단클론성 항체 특성을 갖는 인간 항체가 세포에 의해 시트릿되도록, 하이브리도마 제조를 위해 사용되는 골수암 세포와 같은 적합한 세포 라인에 도입된다(예를 들어, 상기 Janeway et al., 상기 Huse et al., 및 미국특허 제 6,265,150호를 참고 바람). 선택적으로 단클론성 항체는 특정한 인간의 중저(heavy and light) 사슬 면역 글로블린 유전자가 유전자 도입된 마우스로부터 발생될 수 있다. 이러한 방법은 이 기술 분야 및 예를 들어, 미국 특허 제 5,545,806호, 및 5,569,825호 및 상기 Janeway et al.,에 개시되어 있다. 가장 바람직하게, 항체는 인간화된 항체이다. 본 발명에서 사용되는 "인간화된(humanized)" 항체는 항체의 항원 결합 루프를 형성하는, 마우스 단클론성 항체의 상보성 결정 부위가 인간 항체 분자의 골격에 이식되는 것이다. 마우스 및 인간 항체의 골격 유사성으로 인해, 이 기술분야에서 이러한 시도는 인간의 항체와 항원적으로 동일한 단클론성 항체를 생성하며, CDR 시퀀스가 유도되는 마우스 단클론성 항체와 동일한 항원을 결합하는 것이 일반적으로 수용된다. 인간화된 항체의 발생방법은 기술분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 상기 Janeway et al., 미국특허 제 5,225,539호, 제 5,585,089호 및 5,693,761호, 유럽 특허 제 0239400 B1 및 영국특허 제 2188638호에 상세히 개시된다. 인간화된 항체는 또한 미국 특허 제 5,639,641호 및 Pedersen et al., J. Mol. Biol., 235, 959-973(1994)에 개시된 항체 재표면화(resurfacing) 방법을 사용하여 발생될 수 있다. 본 발명의 조성물 중 콘주게이트에 사용되는 항체는 인간화된 단클론성 항체가 가장 바람직하며, 상기된 바와 같이, 인간 단클론성 항체 또는 마우스 단클론성 항체가 본 발명의 범주내에 있다.

[0012] 최소 하나의 항원 결합 부위를 가지며, 이에 따라 목표 세포의 표면에 존재하는 최소 하나의 항원 또는 수용체를 인지하고 결합하는 항체 프래그먼트는 본 발명의 범주내에 있다. 이와 관련하여, 원래(intact) 항체 분자의 단백질 가수분해로 항원을 인지하고 결합하는 능력을 보유하는 다양한 항체 프래그먼트가 생성될 수 있다. 예를 들어, 프로테아제 파괴인을 갖는 항체 분자의 제한된 소화작용으로 3개의 프래그먼트가 생성되며, 이중 두개는 동일하며, 이를 Fab 프래그먼트라 하며, 이들은 어미 항체 분자의 항원 결합 활성을 보유한다. 효소 썪신을 갖는 항체 분자의 분해는 일반적으로 두개의 항체 프래그먼트를 생성하며, 이중 하나는 항체 분자의 항원-결합 팔을 모두 보유하며, 이에 따라 F(ab')₂ 프래그먼트라 한다. 합성 펩타이드에 의해 항체 저사슬의 V 도메인에 결합된 항체 중사슬의 변이성(V) 도메인을 포함하는 절단된 Fab 프래그먼트로 구성되는, 단일-사슬 변이성 영역 프래그먼트(sFv)는 일반적인 재조합 DNA 공학 기술을 사용하여 제조될 수 있다(예를 들어, Janeway et al.,을 참고바람). 유사하게, 디슬파이드-안정화된 변이성 영역 프래그먼트(dsFv)가 재조합 DNA 기술에 의해 제조될 수 있다(예를 들어, Reiter et al., Protein Engineering 7, 697-704(1994)를 참고바람). 그러나, 본 발명의 항체 프래그먼트는 이러한 항체 프래그먼트의 예시적인 종류에 제한되지 않는다. 원하는 세포 표면 수용체 또는 항원을 인지하고 결합하는 어떠한 적합한 항체 프래그먼트가 사용될 수 있다. 항체-항원 결합은 예를 들어, 방사 면역 측정법(RIA), ELISA, 특수 단백질 검출 검사, 면역 침강, 및 경쟁적 억제 어세이와 같은 이 기술분야에 알려진 어떠한 적합한 방법을 사용하여 분석될 수 있다(예를 들어, 상기 Janeway et al., 및 미국특허 출원 공개 제 2002/0197266A1을 참고바람).

[0013] 또한, 항체는 키메라 항체일 수 있다. "키메라"이란, 항체가 적어도 두개의 상이한 종류로부터 얻어지거나 또는 유도되는, 최소 두개의 상이한 면역 글로블린, 또는 이들의 프래그먼트를 포함하는 것을 의미한다(예를 들어, 두개의 상이한 면역 글로블린, 쥐과의 면역 글로블린 변이성 영역과 결합된 일정한 인간 면역글로블린 영역).

[0014] 어떠한 적합한 항체가 본 발명의 조성물에 사용될 수 있다. 특히, 바람직한 항체는 인간화된 단클론성 항체이며, 이들의 예로는 huN901, huMy9-6, huB4, huC242, 투라스투주맵(trastuzumab), 비바투주맵(bivatuzumab), 시브로투주맵(sibrotuzumab), 및 리투시맵(rituximab)을 포함한다(예를 들어, 미국특허 제

5,639,641호, 미국 가출원 제 60/424,332, 국제특허출원 제 W002/16401호, Pedersen et al., J. Mol. Biol., 235, 959-973, Roguska et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 969-73(1994), Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 8618-8623(1996), Nadler et al., J. Immunol., 131, 244-250(1983), Colometer et al., Cancer Invest., 19, 49-56(2001), Heider et al., Eur. J. Cancer, 31A, 2385-2391(1995), Welt et al., J. Clin. Oncol., 12, 1193-1203(1994), Maloney et al., Blood, 90, 2188-2195(1995) 및 미국특허 제 5,665,357호를 참고바람). 가장 바람직하게, 항체는 huN901 인간화된 단클론성 항체 또는 huMy9-6 인간화된 단클론성 항체이다. 다른 인간화된 단클론성 항체가 이 기술분야에 알려져 있으며 이는 본 발명의 조성물과 관련하여 사용될 수 있다.

[0015] 본 발명에 따라서, 상기 개시된 항체는 어떠한 적합한 세포독성제, 특히 종양 세포의 세포독성을 유도하는 세포독성제에 화학적으로 결합되어 상기된 바와 같은 콘주게이트를 형성한다. 일반적인 약리학 메카니즘의 결과, 약물 콘주게이트에 사용되는 항체는 제한된 양으로만 목적하는 세포와 접촉하고 결합한다. 따라서, 콘주게이트에 사용되는 세포독성제는 치료효과를 도출하는 충분한 세포 사멸이 일어나도록 매우 세포 독성이 있어야 한다. 이러한 세포독성제의 예는 신규한 탁산(예를 들어, 국제특허출원 제 W001/38318호 및 PCT/US03/02675호를 참고바람), DNA-알킬화제(예를 들어, CC-1065 아날로그), 안트라사이클린, 터불리신(tubulysin) 아날로그, 듀오카마이신(duocarmycin) 아날로그, 아우리스타틴(auristatin) E 및 반응성 폴리에틸렌글리콜 부분을 포함하는 세포독성제를 포함한다(예를 들어, Sasse et al., J. Antibiot. (Tokyo), 53, 879-85(2000), Suzawa et al., Bioorg. Med. Chem, 8, 2175-84(2000), Ichimura et al., J. Antibiot. (Tokyo), 44, 1045-53(1991), Francisco et al., Blood(2003)(인쇄 공개 전에 전자 공개), 미국특허 제 5,475,092호, 6,340,701호, 6,327,738호 및 6,436,931호, 미국특허출원 공개 제 2001/0036923A1, 계류중인 미국특허 출원 제 10/024,290호 및 10/116.053 및 국제특허출원 제 W001/49698호를 참고바람). 선택적으로, 가장 바람직하게, 항체는 본 발명의 조성물의 콘주게이트를 형성하기 위해 마이탄시노이드에 화학적으로 결합된다.

[0016] 마이탄시노이드는 원래 *메이테누스(Maytenus)*과에 속하는 동아프리카 관목으로부터 분리되었으나, 이후에 *악티노신네마 프리티오숨(Actinosynnema pretiosum)*과 같은 토양 박테리아의 대사산물인 것으로 발견되었다(예를 들어, 미국특허 제 3,896,111호를 참고바람). 마이탄시노이드는 유사분열 억제를 통한 세포독성을 유도한다. 실험적 자료는 미세소관 단백질 튜불린의 중합을 억제하고 이에 따라 미세소관의 형성을 방지하여 유사분열을 억제함을 제시하고 있다(예를 들어, 미국특허 제 6,441,163호 및 Remillard et al., Science, 189, 1002-1005(1975)를 참고바람). 마이탄시노이드는 시험관에서 세포배양 모델을 사용하여 체외에서 종양 세포 성장을 억제하고, 실험용 동물 시스템을 사용하여 체내에서 종양 세포 성장을 억제함을 보여준다. 또한, 마이탄시노이드의 세포독성은 예를 들어, 메토타렉사트, 다우노루비신 및 빈크리스틴과 같은 통상적인 화학치료제의 1000-배 이상이다(예를 들어, 미국특허 5,208,020호를 참고바람). 마이탄시노이드는 마이탄신, 마이탄시놀, 마이탄시놀의 C-3 에스테르 및 다른 마이탄시놀 아날로그 및 유도체를 포함하는 것으로 이 기술분야에 알려져 있다(예를 들어, 미국특허 제 5,208,202호 및 제 6,441,163호를 참고바람). 마이탄시놀의 C-3 에스테르는 천연 또는 합성 유도될 수 있다. 또한, 천연 및 합성 C-3 마이탄시놀 에스테르는 모두 단순한 카르복시산을 갖는 C-3 에스테르 또는 N-메틸-L-알라닌의 유도체를 갖는 C-3 에스테르로 분류될 수 있으며, 후자가 전자보다 세포독성이 있다. 합성 마이탄시노이드 아날로그는 또한 이 기술분야에 알려져 있으며, 예를 들어, Kupchan et al., J. Med. Chem., 21 31-37(1978)에 개시되어 있다. 마이탄시놀 및 이들의 아날로그 및 유도체의 발생방법은 예를 들어 미국특허 제 4,151,042호에 개시되어 있다.

[0017] 본 발명의 조성물에 사용하기 적합한 마이탄시노이드는 천연 공급원으로부터 분리되거나, 이 기술분야에 알려진 방법을 사용하여 합성 또는 반합성될 수 있다. 또한, 상기 마이탄시노이드는 충분한 세포 독성이 최종 콘주게이트 분자에서 유지되는 한 적합한 방법으로 개질될 수 있다. 이와 관련하여, 마이탄시노이드는 항체가 결합될 수 있는 적합한 작용기가 결합된다. 결합 부분은 콘주게이트를 형성하기 위해 항체에 마이탄시노이드를 결합하도록 바람직하게 사용된다. 결합 부분은 특정한 위치에서 마이탄시노이드 세포독성을 활성화시키는 화학적 결합을 포함한다. 적합한 화학 결합은 이 기술분야에 알려져 있으며, 디설파이드 결합, 산불안정(labile) 결합, 광불안정 결합, 펩티다아제 불안정 결합, 설프하이드릴 및 말레이미드기 사이에 형성된 티오에테르 결합, 및 에스테라아제 불안정 결합을 포함한다. 가장 바람직하게, 결합 부분은 디설파이드 결합 또는 티오에테르 결합을 포함한다.

본 발명에 따라, 결합 부분은 반응성 화학기를 바람직하게 포함한다. 특히 바람직한 반응성 화학기는 N-숙신이미딜 에스테르 및 N-술포숙신이미딜 에스테르이다. 바람직한 구현에 있어서, 반응성 화학기는 티올기 사이에 디설파이드 결합에 의해 마이탄시노이드에 공유적으로 결합될 수 있다. 이에 따라, 본 발명에 개시된 바와 같이, 개질된 마이탄시노이드는 바람직하게 티올기를 포함한다. 이 기술분야의 당업자는 티올기가 수소원자에 결합된 황원자를 포함하며, 이는 이 기술분야에서 일반적으로 설프하이드릴기라 하며, "-SH" 또는 "RSH"로 표시될 수 있다.

[0018] 반응성 화학기를 포함하는 연결기를 포함하는 특히 바람직한 마이탄시노이드는 마이탄시놀의 C-3 에스테르 및 그 아날로그이며, 이 때, 결합 부분은 디설파이드 결합을 포함하며, 화학적 반응기는 N-숙신이미딜 또는 N-술포숙신이미딜 에스테르를 포함한다. 마이탄시노이드 상의 다양한 위치는 결합 부분을 화학적으로 결합하는 위치로 제공될 수 있다. 예를 들어, 하이드록시를 갖는 C-3 위치, 하이드록시메틸로 개질된 C-14 위치, 하이드록시로 개질된 C-15 위치, 하이드록시기를 갖는 C-20 위치가 모두 유용하다. 마이탄시놀의 C-3 위치에 결합 부분이 결합되는 것이 가장 바람직하다. 가장 바람직하게, 본 발명의 조성물과 관련하여 사용되는 마이탄시노이드는 N^{2'}-디아세틸-N^{2'}-(3-메르캅토-1-옥소프로필)-마이탄신(DM1) 또는 N^{2'}-디아세틸-N^{2'}-(4-메르캅토-4-메틸-1-옥소펜틸)마이탄신(DM4)이다.

[0019] 또한, 다른 화학 결합을 갖는 결합 부분이 다른 마이탄시노이드와 같이, 본 발명에서 사용될 수 있다. 다른 화학적 결합의 특정한 예로는 산 불안정 결합, 티오에테르 결합, 광불안정 결합, 펩티다아제 불안정 결합 및 에스테라아제 불안정 결합을 포함한다. 결합 부분을 갖는 마이탄시노이드의 제조방법은 예를 들어, 미국특허 제 5,208,020, 5,416,064 및 6,333,410호에 개시된다.

[0020] 마이탄시노이드의 결합 부분은 일반적으로 바람직하게 마이탄시노이드에 항체를 결합시키는데 사용되는 보다 큰 링커 분자의 일부이다. 링커 분자가 세포독성의 유지 및 마이탄시노이드 및 항체 각각의 목표 특성을 제공하는 한, 어떠한 적합한 링커 분자가 본 발명과 관련하여 사용될 수 있다. 링커(linker) 분자는 상기 마이탄시노이드 및 항체가 서로 화학적으로 결합(예, 공유결합)하도록 화학 결합(상기 개시됨)을 통해 마이탄시노이드와 항체를 결합시킨다. 필요에 따라, 상기 링커 분자는 디설파이드 결합 또는 티오에테르 결합을 통해 마이탄시노이드와 항체를 화학적으로 결합시킨다. 가장 바람직하게, 상기 항체는 디설파이드 결합에 의해 마이탄시노이드에 화학적으로 결합된다.

[0021] 특히 바람직한 링커 분자로는 예를 들어, N-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(SPDP)(예, Carlsson et al., Biochem. J., 173, 723-737(1978)을 참고바람), N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)부타노에이트(SPDB)(예, 미국특허 제 4,563,304호를 참고바람), N-숙신이미딜-4-(2-피리딜디티오)펜타노에이트(SPP)(예, CAS 등록 번호 341498-08-6을 참고바람), N-숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산 1-카르복실레이트(SMCC)(예, Yoshitake et al.,의 Eur. J. Biochem., 101 395-399(1979)를 참고바람) 및 N-숙신이미딜 4-메틸-4-[2-(5-니트로-피리딜)-디티오]펜타노에이트(SMNP)(예, 미국특허 제 4,563,304호를 참고바람)를 포함한다. 본 발명에서 사용하기에 가장 바람직한 링커 분자는 SPP, SMCC 및 SPDB이다.

[0022] 본 발명의 조성물은 마이탄시노이드에 화학적으로 결합된 항체를 포함하는 치료에 유효한 양의 콘주게이트를 포함한다. "치료에 유효한 양"이란, 개체에서 의미있는 이로운, 예를 들어, 종양 세포 세포독성의 최소 하나의 양상을 촉진, 또는 특정 암과 관련한 다른 상응하는 의료 조건의 처리, 치료, 방지 또는 개선을 나타내기 위해 충분한 양을 의미한다. 치료에 효과적인 양은 개체에서 바람직한 생물학적 효과, 처리하고자 하는 조건 및/또는 콘주게이트의 특정한 성질 및 개체에 따라서 변화될 수 있다. 이에 따라, 본 발명에 개시된 방법에 따라서, 일반적으로 주치의(또는 조성물 투여를 책임지는 다른 의료 전문가)가 각 독립적인 환자를 치료하는 조성물의 양을 정할 수 있다. 본 발명의 조성물에서 콘주게이트 농도는 약 0.1 내지 5mg/mL(예, 약 0.5mg/mL, 약 2mg/mL, 또는 약 5mg/mL)이다. 바람직한 구현에 있어서, 본 발명의 조성물에서 콘주게이트의 농도는 약 1mg/mL 이상(예, 약 2mg/mL 이상, 약 3mg/mL 이상, 또는 약 4mg/mL 이상)이다. 가장 바람직하게, 본 발명의 조성물에서 콘주게이트

의 농도는 약 5mg/mL이다. 콘주게이트를 최소 1mg/mL 포함하는 조성물이 특히 바람직하지만, 1mg/mL미만(예, 약 0.1mg/mL 내지 0.9mg/mL의 농도)의 콘주게이트 농도가 본 발명의 조성물에서 안정하게 유지될 수 있으며, 이에 따라 이는 본 발명의 범주 내에 있다. 콘주게이트 분자를 1mg/mL 이상으로 포함하는 조성물은 치료 및 상업용으로 이로우며, 이러한 농도는 투여를 위한 보다 사용하기 편리한 부피(즉, 보다 적은)로 제조되도록 조성물의 단일 투여량일 수 있다.

[0023] 바람직하게, 본 발명의 조성물은 예를 들어, 그 필요시에 인간 호스트에 투여와 같은, 약학적 사용에 적합하도록 배합된다. 이러한 목적을 위하여, 콘주게이트 분자는 바람직하게 생리학적으로 수용가능한 캐리어(예, 첨가물 또는 희석제)를 포함하는 조성물로 배합된다. 생리학적으로 수용가능한 캐리어는 잘 알려져 있으며 쉽게 이용가능하며, 완충제, 항산화제, 세균 발육 저지제, 염, 환자의 혈액 또는 다른 신체의 유체로 등장(isotonic)의 배합물이 되도록 하는 용질, 및 서스펜딩제, 가용화제, 농화제, 안정화제(예, 계면활성제) 및 방부제를 포함할 수 있는 수성 및 비-수성 무균 서스펜션을 포함한다. 캐리어의 선택은, 적어도 부분적으로는 목표 조직 및/또는 세포의 위치, 및 조성물의 투여에 사용되는 특정한 방법에 의해 결정될 것이다. 약물 콘주게이트 배합물에 사용하기 위한 적합한 캐리어 및 첨가물의 예가 예를 들어, 국제특허출원 제 W000/02587, W002/060955 및 W002/092127 및 Ghetie et al., J. Immunol. Methods, 112, 267-277(1988)에 개시되어 있다. 가장 바람직하게, 본 발명의 조성물은 완충제, 계면활성제, 토닉화(tonicifying)량의 소듐 클로라이드 및 물을 포함한다.

[0024] 어떠한 적합한 약학적으로 수용가능한 완충제가 본 발명의 조성물과 함께 사용될 수 있다. 특히 바람직한 완충제의 예로는 시트레이트, 아세테이트, 숙시네이트, 포스페이트 및 히스티딘을 포함한다. 그러나, 본 발명의 조성물은 이러한 예시적인 완충제로 제한되지 않는다. 완충제는 원하는 조건하에서 조성물의 충분한 안정성이 달성되는 한, 어떠한 적합한 농도로 존재할 수 있다. 이와 관련하여, 조성물에서 완충제의 농도는 약 2 내지 50mM(예, 약 2~10mM, 약 10~20mM, 약 20~30mM, 약 30~40mM 또는 약 40~50mM)이다. 가장 바람직하게, 조성물에서 완충제의 농도는 약 5~15mM(예, 약 10mM)이다. 바람직하게 완충제는 소듐 숙시네이트 또는 소듐 아세테이트이나, 가장 바람직하게는 소듐 시트레이트이다. 일반적으로 완충제는 pH가 바람직한 범위로 유지되도록 본 발명의 조성물에서 존재한다. 이와 관련하여, 본 발명의 조성물은 바람직하게 약 5~6의 pH(예, 약 5, 5.5, 또는 6)를 갖는다. 보다 높은 pH(예, 약 pH 6 이상)를 갖는 조성물은 보다 낮은 pH(예, 약 pH 6이하)를 갖는 조성물 보다 덜 안정한 것으로 여겨진다. 이에 따라, 본 발명의 조성물은 가장 바람직하게 약 5.5의 pH를 갖는다.

[0025] 상기된 완충제 뿐만 아니라, 본 발명의 조성물은 임의로 계면활성제를 함유한다. 어떠한 적합한 계면활성제가 본 발명과 관련하여 사용될 수 있다. 적합한 계면활성제는 이 기술분야에 잘 알려져 있다. 본 발명의 조성물에 따르면, 바람직하게 계면활성제는 폴리소르베이트이며, 바람직하게는, 폴리소르베이트 20 또는 폴리소르베이트 80이다. 가장 바람직하게, 상기 계면활성제는 폴리소르베이트 20이다. 계면활성제는 조성물의 충분한 안정성이 원하는 조건하에서 달성되는 한, 어떠한 적합한 농도로 본 발명의 조성물에 존재할 수 있다. 이와 관련하여, 조성물에서 계면활성제의 농도는 조성물 전체 부피의 약 0.002 내지 0.1%wt/vol(예, 0.002~0.01%, 약 0.005~0.02%, 또는 약 0.01~0.1%wt/vol)이다. 가장 바람직하게, 조성물에서 계면활성제의 농도는 전체 조성물 부피의 약 0.005~0.02%wt/vol(예, 약 0.01%wt/vol)이다. 계면활성제와 배합되는 조성물이 바람직하지만, 계면활성제 없이 배합된 조성물 또한 본 발명의 범주내에 있다.

[0026] 추가의 안정화제로서, 소듐 클로라이드가 본 발명의 조성물에 첨가된다. 이와 관련하여, 본 발명의 조성물은 적합한 양, 바람직하게는, 토닉화량의 소듐 클로라이드(NaCl)을 포함한다. "토닉화량의 소듐 클로라이드"란, 조성물내의 NaCl 농도가 조성물의 토닉시티(tonicity)가 인간 혈액의 토닉시티와 동일한 것(즉, 등장(isotonic)을 의미한다. 이와 관련하여, NaCl은 충분한 토닉시티 및 안정성이 본 발명의 조성물에서 달성되는 한, 어떠한 적합한 농도로 본 발명의 조성물에 존재할 수 있다. 바람직하게, 조성물내의 소듐 클로라이드 농도는 약 50mM 내지 500mM(예, 약 50~100mM, 약 100~150mM, 약 150~250mM, 약 250~350mM 또는 약 350~450mM)이다. 보다 높은 소듐 클로라이드의 농도(예, 약 150mM 이상)가 본 발명의 조성물을 등장 보다 하이퍼 토닉하게 만들 수 있으며, 인간에게 투여하기 전에, 바람직하게 물에 텍스트로스 5%("D5W") 또는 노르말 살린("NS")와 같은 어떠한 적합한 등장 용매를 이용하여 이러한 조성물을 희석하는 것은 이러한 조성물을 약간 하이퍼토닉

(hypertonic)하게 할 것이며, 본 발명에 사용하기 적합하게 한다. 바람직하게, 조성물에서 소듐 클로라이드의 농도는 약 100 내지 200mM(예, 100 내지 140mM, 약 130~170mM, 또는 약 160~200mM)이다. 가장 바람직하게, 조성물에서 소듐 클로라이드의 농도는 약 110~150mM(예, 약 110~130mM 또는 약 120mM)이다.

[0027] 본 발명의 특히 바람직한 구현에 있어서, 상기 조성물은 (i) DM1에 화학적으로 결합된 huN901을 포함하는 콘주게이트 약 5mg/mL, (ii) 약 10mM의 소듐 시트레이트 버퍼, (iii) 약 0.01%의 폴리소르베이트 20, (iv) 약 120mM의 소듐 클로라이드, 및 (v) 물(바람직하게는 주입하기에 적합한 물(WFI))을 포함하며, pH가 약 5.5이다. 다른 바람직한 구현에 있어서, 조성물은 (i) DM1에 화학적으로 결합된 huMy9-6을 포함하는 콘주게이트 약 1mg/mL 이상(예, 약 1mg/mL, 약 2mg/mL, 약 3mg/mL, 약 5mg/mL, 또는 그 사이의 범위), (ii) 약 10mM의 소듐 시트레이트 버퍼, (iii) 임의로 약 0.01%의 폴리소르베이트 20, (iv) 약 135mM의 소듐 클로라이드, 및 (v) 물을 포함하며, pH가 약 5.5이다. 또 다른 바람직한 구현에 있어서, 조성물은 (i) DM4에 화학적으로 결합된 huMy9-6을 포함하는 콘주게이트 약 1mg/mL 이상(예, 약 1mg/mL, 약 2mg/mL, 약 3mg/mL, 약 5mg/mL, 또는 그 사이의 범위), (ii) 약 10mM의 소듐 시트레이트 버퍼, (iii) 임의로 약 0.01%의 폴리소르베이트 20, (iv) 약 135mM의 소듐 클로라이드, 및 (v) 물을 포함하며, pH가 약 5.5이다. 추가의 바람직한 구현에 있어서, 조성물은 (i) SMCC 링커에 의해 DM1에 화학적으로 결합된 huN901을 포함하는 콘주게이트 약 1mg/mL 이상(예, 약 1mg/mL, 약 2mg/mL, 약 3mg/mL, 약 5mg/mL, 또는 그 사이의 범위), (ii) 약 10mM의 소듐 시트레이트 버퍼, (iii) 임의로 약 0.01%의 폴리소르베이트 20, (iv) 약 130mM의 소듐 클로라이드, 및 (v) 물을 포함하며, pH가 약 5.5이다.

[0028] 항체(또는 일반적으로 단백질)를 함유하는 조성물은 산화에 의해 불안정해진다. 이에 따라, 본 발명의 다른 구현에 있어서, 조성물은 항산화제를 추가로 포함한다. 어떠한 적합한 항산화제가 본 발명의 조성물에 사용될 수 있다. 적합한 항산화제가 이 기술분야에 알려져 있으며, 예를 들어, 수퍼옥사이드 디스무타아제, 글루타티온, 퍼옥시다아제, 토코트리엔올, 폴리페놀, 아연, 망간, 셀레늄, 비타민 C, 비타민 E, 베타 카로틴, 시스테인 및 메티오닌을 포함한다. 본 발명의 조성물에 사용되는 항산화제는 메티오닌이 가장 바람직하다. 항산화제는 어떠한 적합한 농도로 조성물에 존재할 수 있다. 바람직하게, 조성물에서 항산화제의 농도는 약 100um 내지 100mM(예, 약 0.25~1mM, 약 0.5~2mM, 약 5~15mM, 약 20~70mM, 또는 약 60~90mM)이다. 가장 바람직하게, 조성물에서 항산화제의 농도는 약 5~15mM(예, 약 10mM)이다.

[0029] 항산화제 뿐만 아니라, 본 발명의 조성물은 수크로오즈의 첨가에 의해 보다 안정화될 수 있다. 항체 배합물을 안정화시키기 위해 수크로오즈를 사용하는 것은 이 기술분야에 알려져 있다. 어떠한 적합한 양의 수크로오즈가 본 발명의 조성물에 사용될 수 있으나, 바람직하게 조성물에서 수크로오즈의 농도는 전체 조성물 부피의 약 0.1~10%wt/vol(예, 0.1~1%, 약 2~5%, 또는 약 7~10% wt/vol)이다. 가장 바람직하게, 조성물에서 수크로오즈의 농도는 전체 조성물 부피의 약 4~6% wt/vol(예, 약 5%wt/vol)이다.

[0030] 본 발명은 나아가 그 내부에 분산된 본 발명의 조성물을 갖는 밀봉 용기 및 비활성 가스 오버레이를 포함하는 패키징된 조성물을 제공한다. 패키징된 조성물은 본 발명의 조성물이 패키징된 조성물내에 안정하게 유지되는 한, 어떠한 적합한 비활성 가스와 오버레이될 수 있다. 패키징된 조성물은 앰플이나 바이알과 같은 유니트-دوز 또는 멀티-دوز으로 존재할 수 있다.

[0031] 본 발명에 개시된 물-함유 조성물(또한, 본 발명에서는 "액체" 또는 "수성" 조성물이라 함) 뿐만 아니라, 본 발명은 또한, (i) 마이탄시노이드에 화학적으로 결합된 항체를 포함하는 치료에 유효한 양의 콘주게이트, (ii) 완충제, (iii) 계면활성제, (iv) 항동결제, 및 (v) 벌킹제를 포함하며, 물에 녹이는 경우 pH가 약 5 내지 6인 동결 건조된 조성물을 제공한다. "동결 건조된"이란, 조성물이 진공 하에서 냉동-건조되는 것을 의미한다. 동결 건조는 일반적으로 용질이 용매로부터 분리되도록 특정한 배합물을 냉동시켜 수행된다. 그 다음 용매는 부차 한도(예, 1차 건조)에 의해 그 다음 침전(예, 2차 건조)에 의해 제거된다. 콘주게이트(즉, 마이탄시노이드에 화학적으로 결합된 항체), 완충제, 계면활성제 및 이들의 성분에 대한 설명은 상기된 바와 같으며, 이는 상기된 동결 건조된 조성물에도 동일하게 적용가능하다. 동결건조된 조성물의 재구성 전에, 본 발명의 동결 건조된 조성

물을 포함하는 각 성분의 상대적인 양은 콘쥬게이트 mg 당 첨가물(예, 버퍼, 계면활성제, 벌킹제, 항동결제) mg 으로 표시될 수 있다.

[0032] 본 발명에 개시된 어떠한 적합한 완충제는 본 발명의 동결 건조된 조성물과 함께 사용될 수 있으며, 본 발명의 동결 건조된 조성물은 바람직하게 소듐 숙시네이트 버퍼를 포함한다. 완충제는 어떠한 적합한 양으로 본 발명의 동결 건조된 조성물에 존재할 수 있다. 특히, 동결 건조된 조성물은 바람직하게 콘쥬게이트 mg 당 완충제 약 0.1 내지 0.2mg(예, 콘쥬게이트 mg 당 약 0.1~0.5mg의 완충제, 콘쥬게이트 mg 당 약 0.5 내지 1mg의 완충제, 콘쥬게이트 mg 당 약 1 내지 2mg의 완충제)를 포함한다. 가장 바람직하게, 상기 동결 건조된 조성물은 콘쥬게이트 mg 당 소듐 숙시네이트 버퍼를 약 0.3mg 포함한다.

[0033] 본 발명에 개시된 어떠한 적합한 계면활성제가 본 발명의 동결 건조된 조성물과 함께 사용될 수 있으며, 바람직하게 계면활성제는 폴리소르베이트이며, 바람직하게는 폴리소르베이트 20 또는 폴리소르베이트 80이다. 가장 바람직하게, 계면활성제는 폴리소르베이트 20이다. 계면활성제는 동결 건조된 조성물의 충분한 안정성이 원하는 조건하에서 이루어지는 한 어떠한 적합한 양으로 본 발명의 동결 건조 조성물에 존재할 수 있다. 이와 관련하여, 동결건조된 조성물은 바람직하게 콘쥬게이트 mg 당 약 0.005 내지 0.1mg(예, 콘쥬게이트 mg 당 약 0.005 내지 0.01mg의 계면활성제, 콘쥬게이트 mg 당 약 0.01~0.05mg의 계면활성제, 콘쥬게이트 mg 당 약 0.05 내지 0.1mg의 계면활성제)를 포함한다. 상기 계면활성제가 폴리소르베이트 20인 경우에, 동결 건조된 조성물은 바람직하게 콘쥬게이트 mg 당 약 0.02mg의 폴리소르베이트 20을 포함한다.

[0034] 냉동 및 건조 도중에 조성물의 활성 성분의 분해를 방지하기 위하여, 본 발명의 동결 건조된 조성물은 항동결제, 바람직하게는 무정형 항동결제를 추가로 포함한다. 본 발명에서 사용되는 용어 "항동결제"는 냉동 도중에 불안정한 분자를 보호하는 첨가물을 의미한다. 본 발명의 조성물에 사용하는 적합한 항동결제는 이 기술분야에 알려져 있으며, 예를 들어, 글리세롤, 디메틸설폭사이드(DMSO), 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 텍스트란, 글루코오스, 트레할로오스 및 수크로오스를 포함한다. 가장 바람직하게, 상기 항동결제는 수크로오스이다. 상기 항동결제는 본 발명의 동결 건조 조성물에 어떠한 적합한 양으로 존재할 수 있다. 상기 동결 건조된 조성물은 바람직하게 콘쥬게이트 mg 당 항동결제를 약 0.5 내지 5mg(예, 0.5 내지 2mg)(예, 콘쥬게이트 mg 당 약 0.8mg의 항동결제, 콘쥬게이트 mg 당 약 2mg의 항동결제, 또는 콘쥬게이트 mg 당 약 4mg의 항동결제)를 포함한다. 항동결제가 수크로오스인 경우에, 동결 건조된 조성물은 바람직하게 콘쥬게이트 mg 당 약 0.5 내지 2mg(예, 약 1mg)을 포함한다.

[0035] 본 발명의 동결건조된 조성물은 추가로 벌킹제, 바람직하게는 결정성 벌킹제를 추가로 포함할 수 있다. 일반적으로 벌킹제는 동결건조의 결과로서 생성되는 "케이크"의 구조 및 중량을 제공하기 위해 이 기술분야에서 사용된다. 이 기술분야에 알려진 어떠한 적합한 벌킹제가 본 발명의 동결 건조된 조성물과 함께 사용될 수 있다. 적합한 벌킹제로는 예를 들어, 매니톨, 텍스트란, 및 글리신을 포함한다. 본 발명의 조성물에 사용되는 가장 바람직한 벌킹제는 글리신이다. 본 발명의 동결 건조된 조성물은 콘쥬게이트 mg 당 벌킹제를 약 2 내지 20mg(예, 콘쥬게이트 mg 당 약 2 내지 10mg의 벌킹제, 콘쥬게이트 mg 당 약 5 내지 10mg의 벌킹제, 콘쥬게이트 mg 당 약 10 내지 15mg의 벌킹제, 또는 콘쥬게이트 mg 당 약 15 내지 20mg의 벌킹제)를 포함한다. 벌킹제가 글리신인 경우, 동결건조된 조성물은 콘쥬게이트 mg 당 약 3.8mg의 글리신을 포함한다.

[0036] 이에 따라, 본 발명에 따라서, 5mg/mL의 콘쥬게이트(예, 바람직하게, DM1에 화학적으로 결합된 huN901을 포함하는 콘쥬게이트)를 포함하도록 재구성되어진 동결 건조된 조성물의 함량은 바람직하게, (i) 콘쥬게이트 mg 당 소듐 숙시네이트 버퍼 약 0.3mg, (ii) 콘쥬게이트 mg 당 약 0.02mg의 폴리소르베이트 20, (iii) 콘쥬게이트 mg 당 약 1mg의 수크로오스, 및 (iv) 콘쥬게이트 mg 당 약 3.8mg의 글리신을 포함한다. 일단 물로 재구성되면, 이러한 동결 건조된 조성물은 약 5.5의 pH를 갖는다. 또한, 동결 건조된 조성물을 물로 재구성하는 경우, 콘쥬게이트, 완충제, 및 계면활성제는 상기된 바와 같이 동결건조된 조성물에도 적용가능한 것이다.

- [0037] 동결건조화 방법은 이 기술 분야에 잘알려져 있으며, 예를 들어, Wang, W., Int. J. Pharm., 203, 1-60(2000)에 개시되어 있다. 예를 들어, 본 발명의 동결 건조된 조성물은: (1) 2.5시간동안 4℃의 쉘프 온도 및 대기 챔버 압력으로 예비-냉각하는 단계, (2) 14시간 동안 -50℃의 쉘프 온도 및 대기 챔버 압력으로 냉각하는 단계, (3) 6시간동안 -20℃의 쉘프 온도 및 대기 챔버 압력에서 글리신 재결정화 단계, (4) 16시간동안 -50℃의 쉘프 온도 및 대기 챔버 압력에서 재-냉각하는 단계, (5) 24시간동안 -13℃의 쉘프 온도 및 100mTorr 압력에서 1차 건조하는 단계, (6) 10시간동안 24℃의 쉘프 온도 및 100mTorr 압력에서 2차 건조하는 단계, 및 (7) 24℃의 쉘프 온도 및 상온 챔버 압력에서 스톱퍼 페이즈(stopper phase)하는 단계를 포함하는 동결건조화 사이클을 사용하여 제조될 수 있다.
- [0038] 그러나, 본 발명의 조성물은 상기된 방법에 의해 제조되는 조성물에 제한되지 않는다. 실제로, 어떠한 적합한 동결 건조화 방법이 본 발명의 동결 건조된 조성물을 제조하기 위해 사용될 수 있으며, 선택된 동결 건조 변수(예, 건조 시간)가 동결 건조되는 용액의 부피를 포함하는 다양한 인자에 따라 결정된다는 것은 이 기술분야의 당업자에게 명확할 것이다.
- [0039] 본 발명의 바람직한 구현 뿐만 아니라, 본 발명의 조성물(액체 또는 동결건조 형태로)은 추가의 치료 또는 생물학적 활성제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 특정한 증상(예, 암)의 치료에 유용한 치료 인자가 존재할 수 있다. 이부프로펜 또는 스테로이드와 같은 염증을 조절하는 인자는 조성물의 체내 투여와 관련한 부종 및 염증 및 육체적 고통을 감소시키는 조성물의 일부일 수 있다. 면역 증가제는 질병에 대한 육체의 자연적인 방어력을 조절하기 위해 조성물에 포함될 수 있다. 비타민 및 미네랄, 항산화제 및 미량 영양분이 조성물과 함께 공동 투여될 수 있다. 항생제 즉, 살균제 및 곰팡이 방지제가 조성물의 투여와 관련한 절차를 포함하는 감염 위험 및 다른 질병을 감소시킬 수 있다.
- [0040] 본 발명은 나아가 (i) 마이탄시노이드에 화학적으로 결합된 항체를 포함하는 치료에 유효한 양의 콘주게이트, (ii) 완충제, (iii) 계면활성제, (iv) 토닉화량의 소듐 클로라이드, 및 (v) 물을 포함하며, pH가 약 5 내지 6 인 조성물을 인간에 투여하는 단계를 포함하며, 항체가 세포의 표면에 결합되고 마이탄시노이드의 세포독성이 활성화되고, 이에 따라 세포가 사멸되도록 하는 인간에서 세포 사멸 방법을 제공한다. 콘주게이트(즉, 마이탄시노이드에 화학적으로 결합된 항체), 첨가물(예, 완충제, 계면활성제, 소듐 클로라이드 등) 및 이들의 성분에 대한 설명은 상기된 바와 같으며, 본 발명의 방법에도 적용가능한 것이다.
- [0041] 본 발명의 방법은 인간에게 본 발명의 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 실제, 본 발명의 방법은 질병, 특히 암과 같은 상승된 수준의 세포 증식성을 갖는 질병에 감염된 세포를 목표로 하고 사멸시키는데 사용된다. 이에 따라, 이와 관련하여, 본 발명의 방법은 바람직하게 인간의 종양 세포를 사멸시키며, 이에 따라, 암의 예방, 개선 및/또는 치료하는데 사용된다.
- [0042] 인간에게 조성물을 투여하는 어떠한 적합한 수단이 본 발명에서 사용될 수 있으며, 일반적으로 바람직하게 본 발명의 조성물은 주입에 의해, 가장 바람직하게는 정맥 주입에 의해 인간에게 투여된다. 용어 "주입"이란, 조성물이 인간의 목표 조직에 효과적으로 도입되는 것을 의미한다. 용어 "정맥 주입"이란, 조직에, 일반적으로 바람직하게는 인간의 정맥으로 조성물이 도입되는 것을 의미한다. 조성물은 어떠한 적합한 경로에 의해 인간에게 투여될 수 있으나, 바람직하게는 인간의 정맥내 또는 복강내로 투여된다. 본 발명의 방법은 종양 세포를 사멸시키는데 사용되지만, 본 발명의 조성물의 종양 내 투여가 특히 바람직하다. 본 발명의 조성물을 주입에 의해 투여하는 경우, 어떠한 적합한 주입 장치가 조성물을 종양에 바로 투여하도록 사용될 수 있다. 예를 들어, 일반적인 의료 주사기가 피하 종양에 조성물을 바로 주입하는데 사용될 수 있다. 선택적으로, 조성물은 본 발명의 액상 조성물에 종양을 베이싱(bathing)하여 종양에 적용될 수 있다. 또한, 종양은 어떠한 적합한 전달 장치, 예, 카테터를 사용하여 시간 범위 동안 본 발명의 조성물과 함께 살포될 수 있다. 덜 바람직하지만, 다른 경로의 투여가 인간에게 조성물을 전달하는데 사용될 수 있다. 실제, 하나 이상의 경로가 본 발명의 조성물의 투여에 사용될 수 있으나, 특정한 경로가 다른 경로 보다 직접적이며 보다 효과적인 반응을 제공할 수 있다. 예를 들어, 특

별히 바람직하지는 않으나, 본 발명의 조성물은 피부, 흡입 또는 예를 들어, 근육내 또는 동맥내 투여에 의해 비경구적으로 투여에 의해 흡수된, 인체 캐비티에 적용 또는 설치될 수 있다. 바람직하게, 인간에게 비경구적으로 투여되는 본 발명의 조성물은 특정한 세포, 예를 들어, 암세포를 목표로 한다.

[0043] 본 발명에 개시된 바와 같이, 콘주게이트는 항체를 포함하며, 이는 바람직하게, huN901, huMy9-6, huB4 또는 huC242와 같은 인간화된 단클론성 항체이다. 다른 적합한 항체로는 예를 들어, 트라스투주맵, 비바투주맵, 시프로투주맵 및 리톡시맵을 포함한다. 이러한 콘주게이트를 포함하는 조성물이 본 발명의 조성물에 사용되는 경우, 항체는 세포(예, 종양 세포)의 표면에서 발현되는 항원(예, 종양-특이성 항원)과 함께 상호 작용을 통해 원하는 세포(예, 종양 세포)에 콘주게이트를 목표로 한다. 종양-특이성 항원은 이 기술분야에 알려져 있으며, 예를 들어, 상피 조직암(예, MUC1) 및 유방 및 난소암(예, HER2/neu)를 포함한다(예를 들어, Bartnes, Tidsskr. Nor. Laegeforen., 121, 2941-5(2001) 및 Von Mensdorff-Pouilly et al., Int. J. Biol. Markers, 15, 343-356(2000)을 참고바람).

[0044] 본 발명의 바람직한 구현에 있어서, 항체(예, huMy9-6)은 CD33 항원에 결합하며, 이는 예를 들어, 골수 백혈병 세포에 의해 발현된다. 다른 바람직한 구현에 있어서, 항체(예, huB4)는 CD19 항원에 결합하며, 이는 인간 B-세포 림프종 세포에 의해 발현된다. 선택적으로 항체(예, huC242)는 CanAg 항원에 결합하며, 이는 예를 들어, 대장, 췌장, 위장, 및 다른 위장암 및 대부분의 비-소형 세포 폐 암을 포함하는 다수의 암세포 형태에 의해 발현된다. 가장 바람직하게, 항체(예, huN901)은 NCAM/CD56 항원을 결합하며, 이는 예를 들어, 소형 세포 폐악성 종양(SCLC) 세포 및 신경내분비 가지점에 의해 발현된다. 항체가 결합할 수 있는 다른 바람직한 항원은 GD₃ 항원, PSMA, 알파-엽산 수용체, Her2/neu, CD44v6, 페토아시나르 팬크리아틱(fetoacinar pancreatic)(FAP) 항원, Cripto-1 항원, CA6 항원, CD20, CA 55.1, MN/CA IX 및 콘드로이틴 술페이트 프로테오글리칸을 포함한다(예를 들어, Chang et al., Cancer Res., 59, 3192-98(1999), Miotti et al., Int. J. Cancer, 39, 297-303(1987), Colomer et al., Heider et al., Welt et al., LePage et al., American Assn. For Cancer Research(AACR), 2003 Annual Meeting, Poster Abstract No. 749, Kearse et al., Int. J. Cancer, 88, 866-72(2000), Maloney et al., Opavsky et al., Genomics, 33, 480-87(1996), Behm et al., Blood, 87, 1134-39(1996) 및 미국특허 제 5,665,357호를 참고바람). 본 발명에 개시된 어떠한 종양 특이성 항원 또는 수용체에 의해 목표 세포(즉, 종양)에 콘주게이트를 결합시킬 때, 마이탄시노이드의 세포 독성이 활성화된다. 마이탄시노이드 세포독성이 활성화될 수 있는 메카니즘의 예는 항체와 마이탄시노이드 사이의 디술파이드 결합의 분해에 의해 세포 내부에 유리 마이탄시노이드의 방출, 세포내의 항체 분해, 및 세포 표면에서 마이탄시노이드 세포독성의 활성화를 포함한다. 그러나, 본 발명의 조성물은 이러한 예시적인 마이탄시노이드 활성화 모드로 제한되지 않는다. 실제, 마이탄시노이드의 세포독성을 활성화시키는 어떠한 메카니즘이 본 발명의 범주내에 있다.

[0045] 인간 투여를 위한 목적으로, 본 발명에 개시된 액체 조성물은 인간에게 직접 (예, 정맥 주입) 또는 투여 전에 바로 적합한 희석제로 희석하여 투여될 수 있다. 적합한 희석제가 이 기술분야에 알려져 있으며, D5W 및 노르말 살린(NS)을 포함한다. 적합한 희석제로 1:1, 1:2, 1:3 또는 그 이상(예, 1:5, 1:10, 또는 1:50)으로 희석하는 것이 가능하다. 본 발명의 조성물의 희석은 바람직하게 조성물 내의 콘주게이트 분자의 농도를 약 0.1mg/mL 이하로 감소되지 않는다. 본 발명의 액체 조성물을 희석할 때, 상기된 각 조성물의 성분(예, 완충제, 계면활성제 및 소듐 클로라이드)의 농도가 상응하여 감소된다.

[0046] 본 발명의 동결 건조된 조성물이 인간에 투여되는 경우, 조성물은 먼저 살균 액상 첨가물, 예를 들어, 주입을 위해 적합한 물, 사용전에 바로 D5W 또는 NS를 첨가하여 재구성하여야 한다. 이에 따라, 본 발명은 나아가, (a) 본 발명에 개시된 동결 건조된 조성물을 제공하는 단계, (b) 물을 상기 동결 건조된 조성물에 첨가하여 재구성된 조성물을 제공하는 단계, 및 (c) 상기 재구성된 조성물을 인간에게 투여하여 항체가 세포 표면에 결합하고 마이탄시노이드가 세포에 의해 억압되어 세포를 사멸시키는 단계를 포함하는 인간내 세포 사멸방법을 제공한다. 동결건조된 조성물, 투여 경로, 종양 특이성 항원, 및 이들의 성분은 상기 개시된 바와 같이, 본 발명의 방법에 적용가능한 것이다. 또한, 본 발명에서 논의된 바와 같이, 본 발명의 동결 건조된 조성물을 물로 재구성한 후에, 상기 개시된 본 발명의 액체 조성물과 함께 사용되는 콘주게이트 및 첨가물(예, 완충제, 계면활성제, 항

동결제 및 별킹제의 상대적인 농도에 대한 설명은 상기 본 발명의 방법에도 적용가능한 것이다.

[0047] 본 발명에서 논의된 바와 같이, 본 발명의 방법은 액체 조성물 또는 동결 건조된 조성물의 사용에 관계없이, 암의 치료에 바람직하게 사용된다. 본 발명의 방법은 예를 들어, 폐, 유방, 대장, 전립선, 신장, 췌장, 난소, 혈액 및 림프장기를 포함하는 어떠한 종류의 암 치료에 사용될 수 있다. 덜 바람직하지만, 본 발명의 조성물은 자기면역 질병(예, 조직 루푸스, 류마티스성 관절염 및 다중 경화증), 이식 거부반응(예, 신장 이식 거부반응, 간 이식 거부반응, 폐이식 거부반응, 심장 이식 거부반응 및 골수 이식 거부반응), 호스트 질병에 대한 이식, 바이러스 감염(예, CMV 감염, HIV 감염, AIDS 등) 및 기생충 감염(예, 편모충증, 아메바증, 주열흡충병)을 포함하는 세포 증식과 관련된 다른 질병의 치료에 사용될 수 있다.

[0048] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 설명하고자 하며, 이로써 본 발명을 제한하는 것은 아니다.

[0049] 실시예 1

[0050] 이 실시예는 마이탄시노이드에 화학적으로 결합된 항체를 포함하는 콘주게이트, 완충제, 계면활성제, 토닉화량의 소듐 클로라이드 및 물을 포함하는 조성물의 제조를 설명하는 것이다.

[0051] 디술파이드 결합에 의해 마이탄시노이드 DM1에 화학적으로 결합된 huN901 단클론성 항체를 포함하는 콘주게이트("huN901:DM1")의 발생은 상기 개시한 바와 같다(예를 들어, 미국특허 제 6,441,163호를 참고바람). 상기 개시된 첨가물 각각의 존재하에서 huN901:DM1을 1mg/mL 내지 5mg/mL로 함유하는 배합물을 제조하였다. 각 배합물의 안정성을 다음 어세이: 입자를 검출하는 육안 검사, 유리 약물-관련 중을 측정하는 크로마토그래피 방법, 및 고 및 저 분자량의 콘주게이트-관련 중을 검출하기 위한 HPLC 크기 배제 크로마토그래피(SEC-HPLC)로 평가하였다. 육안 검사와 관련하여, 입자의 존재는 불안정성을 나타내는 것이며, 이에 따라 바람직하지 않은 것으로 여겨지며, 투명한 용액은 안정한 배합물을 나타내는 것이다. 크로마토그래피 어세이를 사용하여 4°C 및 25°C에서 유리 약물의 양을 측정하였다. 이러한 각각의 어세이 결과는 약 5.5의 pH에서 약 5mg/mL의 huN901:DM1 콘주게이트, 약 10mM 소듐 시트레이트, 약 0.01%의 폴리소르베이트 및 소듐 클로라이드를 함유하는 배합물이 우수한 안정성을 가짐을 나타내었다.

[0052] 또한 불안정성 지표인 이량체 배합물과 관련하여 상기된 배합물의 안정성을 확인하기 위하여, huN901:DM1 콘주게이트를 농축하고 포스페이트 버퍼된 살린(PBS), pH 6.5(배합물 1A-1C) 또는 10mM 소듐 시트레이트, 0.01% 폴리소르베이트 20, 60mM NaCl, pH 5.5(배합물 1D)로 배합하였다. 4°C 및 25°C에서 6개월 후에, 샘플을 SEC-HPLC로 어세이하였다. 결과를 다음 표 1에 나타낸다.

표 1

[0053]

배합물	콘주게이트 농도 (mg/mL)	완충제	계면활성제	NaCl	6개월 후 콘주게이트 이량체 %	
					4°C	25°C
1A(비교예)	5.0	PBS, pH 6.5	무	무	5.5	9.3
1B(비교예)	3.8	PBS, pH 6.5	무	무	5.5	8.4
1C(비교예)	1.2	PBS, pH 6.5	무	무	4.9	6.0
1D(발명예)	5.0	소듐 시트레이트, pH 5.5	0.01% 폴리소르베 이트 20	60mM	5.1	6.0

[0054] 이러한 결과는 본 발명의 조성물(배합물 1D로 표시)이 콘주게이트 이량체의 형성에 대하여 보호되는 것을 나타낸다. 이에 따라, 육안 검사 어세이, 크로마토그래피 어세이 및 SEC-HPLC 어세이를 합한 결과는 본 발명의 조성물이 시험된 배합물 중 가장 안정하다는 것을 나타내었다.

[0055] 실시예 2

[0056] 이 실시예는 마이탄시노이드에 화학적으로 결합된 항체를 포함하는 콘쥬게이트, 완충제, 계면활성제 또는 수크로오즈, 토닉화량의 소듐 클로라이드 및 물을 포함하는 조성물의 제조를 설명하는 것이다.

[0057] N-숙시이미딜 4-(2-피리딜디티오)펜타노에이트(SPP) 링커에 의해 마이탄시노이드 DM1에 화학적으로 결합된 huN901 단클론성 항체를 포함하는 콘쥬게이트("huN901-SPP-DM1")는 본 발명에 개시된 이 기술분야에 알려진 방법을 이용하여 제조하였다(예, 미국특허 6,441,163호를 참고바람). huN901-SPP-DM1 콘쥬게이트는 다양한 농도로, (a) PBS, pH 6.5(배합물 2A 및 2B) 또는 (b) 10mM 소듐 시트레이트, 0.01% 폴리소르베이트 20, 135mM NaCl, pH 5.5(배합물 2C)로 배합하였다. 각 배합물 샘플을 4°C 및 25°C에서 6개월 동안 배양하고, 그 후, 크로마토그래피에 의해 유리 약물 및 콘쥬게이트 이량체의 존재를 평가하였다. 이러한 분석 결과를 표 2에 나타내었다.

표 2

배합물	콘쥬게이트 농도 (mg/mL)	완충제	계면활성제	이량체 %			유리 약물 %		
				시간	6개월		시간	6개월	
					0	4°C		25°C	0
2A(비교예)	1.0	PBS, pH 6.5	무	4.8	5.8	6.1	1.1	1.6	4.6
2B(비교예)	5.0	PBS, pH 6.5	무	5.2	8.5	10.1	1.1	1.6	4.9
2C(발명예)	5.0	소듐 시트레이트, pH 5.5	0.01% 폴리소르베이트	4.4	5.5	6.4	0.4	1.2	2.9

[0059] 표 2의 결과 뿐만 아니라, 배합물의 입자상을 육안으로 검사하였다. 본 발명의 배합물(배합물 2C)는 4°C에서 6개월 저장한 후에 투명하였으나, 비교예(배합물 2A 및 2B)에서는 입자 및 침전이 관찰되었다.

[0060] 이러한 결과는 본 발명의 조성물의 증가된 안정성을 설명하는 것이다.

[0061] 실시예 3

[0062] 이 실시예는 마이탄시노이드에 화학적으로 결합된 항체를 포함하는 콘쥬게이트, 완충제, 계면활성제, 토닉화량의 소듐 클로라이드, 항산화제 및 물을 포함하는 조성물의 제조를 설명하는 것이다.

[0063] N-숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트(SMCC) 링커에 의해 마이탄시노이드 DM1에 화학적으로 결합된 huN901 단클론성 항체를 포함하는 콘쥬게이트("huN901-SMCC-DM1")를 본 발명에 개시된, 이 기술분야에 알려진 방

[0064] 법을 이용하여 제조하였다(예, 미국특허 제 6,441,163호를 참고바람). 1mg/mL의 huN901-SMCC-DM1 콘쥬게이트를 (a) 포스페이트 버퍼된 살린(PBS), pH 6.5(배합물 3A), (b) 10mM 소듐 시트레이트, 0.01% 폴리소르베이트 20, 130mM NaCl, pH 5.5(배합물 3B), 또는 (c) 10mM 소듐 시트레이트, 0.01% 폴리소르베이트 20, 130mM NaCl, 10mM 메티오닌, pH 5.5(배합물 3C)로 배합하였다. 25°C 및 37°C에서 3.5개월 배양시킨 후에, 각 배합물의 샘플을 크로마토그래피 어세이에 의해 콘쥬게이트 이량체의 존재를 시험하였다. 분석 결과를 표 3에 나타내었다.

표 3

배합물	완충제	계면활성제	항산화제	이량체 %		
				시간 0	3.5 개월	
					25℃	37℃
3A(비교예)	PBS, pH 6.5	무	무	4.0	5.8	11.2
3B(발명예)	소듐 시트레이트, pH 5.5	0.01% 폴리소르베이트 20	무	4.0	4.7	6.3
3C(발명예)	소듐 시트레이트, pH 5.5	0.01% 폴리소르베이트 20	10mM 메티오닌	4.0	4.4	4.8

[0066] 이러한 결과는 본 발명의 조성물(배합물 3B 및 3C)이 증가된 안정성을 제공함을 보여준다.

[0067] 실시예 4

[0068] 이 실시예는 마이탄시노이드 DM1에 화학적으로 결합된 단클론성 항체 huMy9-6, 완충제, 토닉화량의 소듐 클로라이드, 및 물을 포함하며, 계면활성제 및 수크로오스가 포함되거나 또는 포함되지 않는 조성물의 제조를 설명하는 것이다.

[0069] N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)펜타노에이트(SPP) 링커에 의해 마이탄시노이드 DM1에 화학적으로 결합된 huMy9-6 단클론성 항체를 포함하는 콘주게이트("huMy9-6-SPP-DM1")를 본 발명에 개시된, 이 기술분야에 알려진 방법으로 제조하였다(예, 미국특허 6,441,163호를 참고바람). 1mg/mL의 huMy9-6-SPP-DM1 콘주게이트를 (a) 포스페이트 버퍼된 살린(PBS), pH 6.5(배합물 4A), (b) 10mM의 소듐 시트레이트, 135mM NaCl, pH 5.5(배합물 4B), (c) 10mM 소듐 시트레이트, 0.01% 폴리소르베이트 20, 135mM NaCl, pH 5.5(배합물 4C) 또는 (d) 10mM 소듐 시트레이트, 5% 수크로오스, 60mM NaCl, pH 5.5(배합물 4D)로 배합되었다. 4℃ 및 25℃에서 3개월 배양시킨 후에, 각 배합물 샘플을 SEC-HPLC로 어세이하여 고분자량(HMW) 종을 측정하고, 크로마토그래피 어세이에 의해 유리 약물 종을 측정하였다. 이 분석 결과를 표 4에 나타내었다.

표 4

배합물	완충제	NaCl (mM)	계면활성제	안정화제	유리 약물 %			HMW 종%		
					시간 0	3개월		시간 0	3개월	
						4℃	25℃		4℃	25℃
4A(비교예)	PBS, pH 6.5	무	무	무	0.2	1.3	3.2	0.5	1.4	2.0
4B(발명예)	소듐시트레이트, pH 5.5	135	무	무	0.1	1.0	1.8	0.4	0.7	1.4
4C(발명예)	소듐시트레이트, pH 5.5	135	0.01% 폴리소르베이트 20	무	0.1	1.0	1.8	0.5	0.8	1.8
4D(발명예)	소듐시트레이트, pH 5.5	60	무	5% 수크로오스	0.1	1.1	1.9	0.4	0.5	0.8

[0071] 또한, 배합물 4A 및 4B의 샘플을 4℃ 및 25℃에서 3개월동안 배양시킨 다음, 상기된 바와 같이 콘주게이트 이량체 형성을 시험하였다. 그 결과를 다음 표 3에 나타낸다.

표 5

[0072]

배합물	완충제	이량체 %		
		시간 0	3개월	
			4℃	25℃
4A(비교예)	PBS, pH 6.5	6.3	10.8	12.3
4B(발명예)	소듐 시트레이트, pH5.5	5.7	7.0	7.7

[0073]

이러한 결과는 본 발명의 조성물(배합물 4B, 4C, 4D)이 증가된 안정성을 제공하며, 수크로오스가 추가적인 안정성을 제공함을 알 수 있다.

[0074]

실시예 5

[0075]

이 실시예는 마이탄시노이드 DM4에 화학적으로 결합된 단클론성 항체 huMy9-6을 포함하는 콘주게이트, 완충제, 토닉화량의 소듐 클로라이드 및 물을 포함하며, 계면활성제를 포함하거나 또는 포함하지 않는 조성물의 제조를 설명하는 것이다.

[0076]

N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)부타노에이트(SPDB) 링커에 의해 마이탄시노이드 DM4에 화학적으로 결합된 huMy9-6 단클론성 항체를 포함하는 콘주게이트("huMy9-6-SPDB-DM4")를 본 발명에 개시된, 이 기술분야의 방법을 이용하여 제조하였다(미국특허 6,441,163호를 참고바람). 1mg/mL의 huMy9-6-SPDB-DM4 콘주게이트를 (a)포스페이 트 버퍼된 살린(PBS), pH 6.5, (b) 10mM의 소듐 시트레이트, 135mM NaCl, pH 5.5 또는 (c) 10mM 소듐 시트레이트, 0.01% 폴리소르베이트 20, 135mM NaCl, pH 5.5로 배합하였다. 상기된 배합물의 안정성을 확인하기 위하여, 각 배합물 샘플을 -80℃에서 6개월 배양시킨 후에 HIAC 입자 카운터를 사용하여 입자의 존재를 시험하였다. 각 배합물 샘플을 4℃ 및 25℃에서 6개월 동안 배양시킨 후에 상기된 바와 같이 유리 약물 중의 존재를 시험하였다. 이러한 분석 결과를 표 6에 나타낸다.

표 6

[0077]

배합물	완충제	계면활성제	NaCl mM	-80℃에서 6개월 후 > 5 μ m 입자	6개월 후 유리 약물%	
					4℃	25℃
5A(비교예)	PBS, pH 5.5	무	무	21218	1.6	5.0
5B(발명예)	소듐시트레이트, pH 5.5	무	135	8778	1.2	2.5
5C(발명예)	소듐시트레이트, pH 5.5	0.01% 폴리소르베이트 20	135	776	1.1	2.8

[0078]

이러한 결과는 본 발명의 조성물(배합물 5B 및 5C)이 유리 약물종 및 입자상 물질의 형성에 대하여 보호되며, 폴리 소르베이트의 존재가 입자 형성에 대하여 추가적인 안정성 보호를 제공함을 알 수 있다.

[0079]

실시예 6

[0080]

이 실시예는 마이탄시노이드 DM1에 화학적으로 결합된 단클론성 항체 huN901을 포함하는 콘주게이트를 포함하는 동결 건조된 조성물의 제조를 설명하는 것이다.

[0081]

디술파이드 결합에 의해 마이탄시노이드 DM1에 화학적으로 결합되는 huN901 인간 단클론성 항체를 포함하는 콘주게이트("huN901:DM1")를 상기 개시된 바와 같이 발생시켰다(예, 미국특허 제 6,441,163호 참고바람). 배합물 6A-6D로 지정된 4개의 배합물을 제조하였다. 각 배합물은 표 7에 나타낸 바와 같이, pH 5.5에서 (a) 1mg/mL의

huN901-DM1, (b) 10mM의 소듐 시트레이트 또는 10mM의 소듐 숙시네이트, (c) 0.5% wt/vol 수크로오즈, (d) 250mM 글리신 및 (e) 물을 함유하며, 0.01%wt/vol 폴리소르베이트 20을 함유하거나 함유하지 않았다.

표 7

[0082]

배합물	완충제	계면활성제	항동결제	벌킹제
6A(비교예)	소듐시트레이트	무	수크로오즈	글리신
6B(비교예)	소듐시트레이트	폴리소르베이트 20	수크로오즈	글리신
6C(비교예)	소듐숙시네이트	무	수크로오즈	글리신
6D(발명예)	소듐숙시네이트	폴리소르베이트 20	수크로오즈	글리신

[0083]

각 배합물 6A~6D의 1ml 샘플을 표 8에 개시된 동결건조화 스킴에 따라 1mL 바이알에서 동결건조하였다.

표 8

[0084]

동결화 단계	셀프 온도(°C)	챔버 압력(mTorr)	단계지속(시간)
예비냉각	4	대기압	2.5
냉각	-50	대기압	14
글리신 재결정화	-20	대기압	6
재-동결	-50	대기압	16
1차 건조	-13	100	24
2차 건조	24	100	10
스토퍼	24	대기압	-

[0085]

동결건조 후에, 각 배합물 6A-6D의 샘플은 고체의 균일한 백색 케이크를 나타내며, 모든 배합물 샘플은 증류수로 재구성되는 경우 빠르게 다시 서스펜드되었다(즉, 완전한 용해까지 20초 미만). 재구성된 샘플은 육안 외형 및 HPLC 크기 배제 크로마토그래피(SEC-HPLC)에 의한 고분자량 종으로 분석되었다. 입자상 물질 및/또는 고분자량 종의 존재는 불안정성을 나타내는 것이며, 이에 따라, 불안정한 것으로 여겨지며, 투명한 용액은 안정한 배합물이다. 이러한 분석 결과를 표 9에 나타낸다.

표 9

[0086]

배합물	후-재구성	
	외관	고분자량(%)
6A(비교예)	유백광, 입자	0.3
6B(비교예)	입자	0
6C(비교예)	투명, 입자없음	0.39
6D(발명예)	투명, 입자없음	0.05

[0087]

이러한 결과를 기초로 하여, 본 발명의 동결 건조된 조성물(즉, 배합물 6D)은 동결 건조시에 입자 및 고분자량 종의 형성을 효과적으로 방지하는 조성물이었다. 본 발명의 동결 건조된 조성물은 시험된 배합물 중 가장 안정하였다.

[0088]

실시예 7

[0089]

이 실시예는 마이탄시노이드 DM1에 화학적으로 결합된 단클론성 항체 huN901을 포함하는 콘주게이트를 포함하는 동결건조된 조성물의 안정성을 설명하는 것이다.

[0090] N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)펜타노에이트(SPP) 링커에 의해 마이탄시노이드 DM1에 화학적으로 결합된 huN901 단클론성 항체를 포함하는 콘쥬게이트("huN901-SPP-DM1")을 상기 개시된 바와 같이 제조하였다. 5mg/mL의 huN901-SPP-DM1 콘쥬게이트를 (a)PBS, pH 6.5 및 액체로 저장 또는 (b) 10mM 소듐 숙시네이트, 0.5% 수크로오즈, 0.01% 폴리소르베이트 20, 250mM 글리신, pH 5.5로 제조하고 실시예 6에 개시된 바와 같이 동결 건조하였다. 샘플을 6시간 동안 4℃ 및 25℃에서 배양하고, 그 다음, 본 발명에 개시된 바와 같이, 입자, 콘쥬게이트 이량체 및 유리 약물의 존재를 시험하였다. 이러한 분석 결과를 표 10에 나타내었다.

표 10

[0091]

배합물	외형			입자 (<5µm)	이량체 %			유리약물%			
	시간 0	6개월			시간 0	6개월		시간 0	6개월		
		4℃	25℃			25℃	4℃		25℃	4℃	25℃
7A 액상 (비교예)	투명	입자 및 침전	투명	1122	5.2	8.5	10.1	1.1	1.6	4.9	
7B 동결 건조 (발명예)	백색 고휘분 케이크; 20초 재구성 시간, 투명용액, 입자없음	백색 고휘분 케이크; 19초 재구성 시간, 투명용액, 입자없음	백색 고휘분 케이크; 15초 재구성 시간, 투명용액, 입자없음	24	3.8	4.1	4.6	0.6	0.6	0.9	

[0092] 이러한 결과는 본 발명의 동결 건조된 조성물의 안정성이 PBS에서 배합된 액체 조성물과 비교하여 입자, 콘쥬게이트 이량체 및 유리 약물이 감소함을 보여주는 것이다.

[0093] 본 발명에서 인용된 간행물, 특허출원 및 특허를 포함하는 모든 참고문헌은 본 발명에 참고문헌으로 편입되었다.

[0094] 본 발명의 특정한 구현에 대하여 기술한 상기한 바로부터, 다양한 변형, 조절 및 개선은 이 기술분야의 기술자에게 쉽게 이해될 수 있을 것이다. 이러한 변형, 조절 및 개선 모두는 본 발명의 범주에 속하는 것으로 이해된다. 따라서, 상기한 사항은 단지 본 발명을 예시하는 것으로 이로써 본 발명을 제한하는 것은 아니다.