



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년08월30일
 (11) 등록번호 10-1301011
 (24) 등록일자 2013년08월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/48 (2006.01) **A61K 38/20** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2008-7004084
 (22) 출원일자(국제) 2006년08월14일
 심사청구일자 2011년08월10일
 (85) 번역문제출일자 2008년02월20일
 (65) 공개번호 10-2008-0034476
 (43) 공개일자 2008년04월21일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2006/031653
 (87) 국제공개번호 WO 2007/024536
 국제공개일자 2007년03월01일
 (30) 우선권주장
 60/710,858 2005년08월24일 미국(US)
 60/797,713 2006년05월04일 미국(US)
 (56) 선행기술조사문헌
 JP2004532639 A
 전체 청구항 수 : 총 35 항

(73) 특허권자
이뮤노젠 아이엔씨
 미국 02451-1477 메사추세츠주 월섬 윈터 스트리트 830
 (72) 발명자
다이 용
 미국, 메사추세츠 01532, 노스버로우, 비치우드
 서클 15
왕 용
 미국, 메사추세츠 01778, 웨이랜드, 피쿼트 로드
 27
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
특허법인씨엔에스

심사관 : 송건형

(54) 발명의 명칭 **마이탄시노이드 항체 접합체 제조 방법**

(57) 요약

본 발명은 약물에 화학적으로 결합된 세포바인딩제를 제조하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 세포바인딩체에 링커를 공유결합시키는 단계, 정제 단계, 약물을 상기 세포바인딩체에 접합시키는 단계 및 후속적인 정제 단계를 포함한다.

(72) 발명자

진 성진

미국, 메사츄세츠 01720, 액튼, 알링턴 스트리트
415

메슈람 데보라 에이치.

미국, 메사츄세츠 02446, 브록라인, 제임스 스트리
트6번가 32

애플레트 갓프레이 더블유.

미국, 메사츄세츠 02138, 캠브리지, 아쉬 스트리트
플레이스 1/2 8

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 항체에 링커를 공유결합시키기 위해 항체와 이작용성 가교제를 접촉시키고 이에 따라 이에 결합된 링커를 갖는 항체를 포함하는 제 1 혼합물을 제조하는 단계,

(b) 상기 제 1 혼합물을 접선 흐름 여과, 선택적 침전, 흡착 여과, 또는 흡착 크로마토그래피에 적용하여 이에 결합된 링커를 갖는 정제된 제 1 항체 혼합물을 제조하는 단계,

(c) pH 4-9를 갖는 용액에서 이에 결합된 링커를 갖는 항체를 마이탄시노이드와 반응시켜 상기 정제된 제 1 혼합물에서 이에 결합된 링커를 갖는 항체에 마이탄시노이드를 접합시켜 (i) 상기 링커를 통해 상기 마이탄시노이드에 화학적으로 결합된 항체, (ii) 유리 마이탄시노이드(free maytansinoid), 및 (iii) 단계 (c) 중에 생성되는 반응 부산물을 포함하는 제 2 혼합물을 제조하는 단계, 및

(d) 상기 제 2 혼합물을 접선 흐름 여과, 선택적 침전, 흡착 여과, 또는 흡착 크로마토그래피에 적용하여 상기 링커를 통해 상기 제 2 혼합물의 다른 성분으로부터 상기 마이탄시노이드에 화학적으로 결합된 항체를 정제하고, 이에 따라 상기 링커를 통해 상기 마이탄시노이드에 화학적으로 결합된 항체의 정제된 제 2 혼합물을 제조하는 단계

를 포함하는 항체-마이탄시노이드 접합체 제조 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 흡착 크로마토그래피는 히드록시아파타이트 크로마토그래피, 소수성 전하 유도 크로마토그래피(HCIC), 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC), 이온 교환 크로마토그래피, 혼합 방식 이온 교환 크로마토그래피, 고정화 금속 친화성 크로마토그래피(IMAC), 염료 리간드 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 역상 크로마토그래피, 및 이의 조합으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 접선 흐름 여과는 단계 (b) 및 (d)에서 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 흡착 크로마토그래피는 단계 (b) 및 (d)에서 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 접선 흐름 여과는 단계 (b)에서 사용되며, 단계 (c)는 pH 6-6.5에서 수행되는 경우, 단계 (d)에서 사용되는 흡착 크로마토그래피는 이온 교환 크로마토그래피가 아닌 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 흡착 크로마토그래피는 단계 (b)에서 사용되며, 접선 흐름 여과는 단계 (d)에서 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 단계 (c)에서 상기 용액은 4-6의 pH를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1항에 있어서, 단계 (c)에서 상기 용액은 6.5-9의 pH를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 1항에 있어서, 단계 (c)에서 상기 용액은 수크로스를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 1항에 있어서, 단계 (c)에서 상기 용액은 시트레이트 버퍼, 아세테이트 버퍼, 숙시네이트 버퍼, 및 포스페이트 버퍼로 구성되는 그룹으로부터 선택된 완충제를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

(a) 항체에 링커를 공유결합시키기 위해 항체와 이작용성 가교제를 접촉시키고 이에 따라 이에 결합된 링커를 갖는 항체를 포함하는 제 1 혼합물을 제조하는 단계,

(b) pH 4-9를 갖는 용액에서 이에 결합된 링커를 갖는 항체를 마이탄시노이드와 반응시켜 상기 제 1 혼합물에서 이에 결합된 링커를 갖는 항체에 마이탄시노이드를 접합시켜 (i) 상기 링커를 통해 상기 마이탄시노이드에 화학적으로 결합된 항체, (ii) 유리 마이탄시노이드(free maytansinoid), 및 (iii) 단계 (b) 중에 생성된 반응 부산물을 포함하는 제 2 혼합물을 제조하는 단계, 및

(c) 상기 제 2 혼합물을 접선 흐름 여과, 선택적 침전, 흡착 여과, 흡착 크로마토그래피, 또는 이의 조합에 적용하여 상기 링커를 통해 상기 제 2 혼합물의 다른 성분으로부터 상기 마이탄시노이드에 화학적으로 결합된 항체를 정제하고, 이에 따라 상기 링커를 통해 상기 세포독성제에 화학적으로 결합된 항체들의 정제된 제 2 혼합물을 제조하는 단계

를 포함하며, 여기서 상기 제 1 혼합물은 접선 흐름 여과, 선택적 침전, 흡착 여과 또는 흡착 크로마토그래피에 적용되지 않는 항체-마이탄시노이드 접합체 제조 방법.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 제 1 혼합물은 정제되지 않는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 11항에 있어서, 상기 흡착 크로마토그래피는 히드록시아파타이트 크로마토그래피, 소수성 전하 유도 크로마토그래피(HCIC), 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC), 이온 교환 크로마토그래피, 혼합 방식 이온 교환 크로마토그래피, 고정화 금속 친화성 크로마토그래피(IMAC), 염료 리간드 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 역상 크로마토그래피, 및 이의 조합으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 11항에 있어서, 단계 (b)에서 상기 용액은 4-6의 pH를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 11항에 있어서, 단계 (b)에서 상기 용액은 6.5-9의 pH를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 11항에 있어서, 단계 (b)에서 상기 용액은 pH 6이하 또는 pH 6.5이상을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 11항에 있어서, 단계 (b)에서 상기 용액은 수크로스를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제 11항에 있어서, 단계 (b)에서 상기 용액은 시트레이트 버퍼, 아세테이트 버퍼, 숙시네이트 버퍼, 및 포스페이트 버퍼로 구성되는 그룹으로부터 선택된 완충제를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제 1항 내지 제 18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 모노클로날 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제 19항에 있어서, 상기 항체는 인간화 모노클로날 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제 1항 내지 제 18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 huN901, huMy9-6, huB4, huC242, 트라스투주맵(trastuzumab), 비바투주맵(bivatuzumab), 시브로투주맵(sibrotuzumab), CNT095, huDS6, 및 리투시맵(rituximab)으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제 1항 내지 제 18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 마이탄시노이드는 티올기를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제 22항에 있어서, 상기 마이탄시노이드는 N^{2'}-데아세틸-N^{2'}-(3-머캅토-1-옥소프로필)-마이탄신(DM1)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

제 22항에 있어서, 상기 마이탄시노이드는 N^{2'}-데아세틸-N^{2'}-(4-메틸-4-머캅토-1-옥소펜틸)-마이탄신(DM4)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

제 1항 내지 제 18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 디설피드 결합, 산 분해성 결합, 광 분해성 결합, 펩티다아제 분해성 결합, 및 티오에테르 결합, 및 에스테라아제 분해성 결합으로 구성되는 그룹으로부터 선택된 화학적 결합을 통해 상기 마이탄시노이드에 화학적으로 커플링되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

제 1항 내지 제 18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 혼합물을 흘딩하여 상기 항체로부터 불안정하게 결합된 링 커들을 방출시키는 것을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

제 1항 내지 제 18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 트라스투주맵(trastuzumab)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28

제 1항 내지 제 18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 키메릭 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29

제 1항 내지 제 18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 인간화 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30

제 1항 내지 제 18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 인간 모노클로날 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 31

제 1항 내지 제 18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 마우스 모노클로날 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 32

제 1항 내지 제 18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이작용성 가교제는 N-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(SPDP), N-숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)-시클로헥산-1-카르복시-(6-아미도카프로에이트)(LC-SMCC),

κ -말레이미도운데카노익산 N-숙신이미딜 에스테르(KMUA), γ -말레이미도부티르산 N-숙신이미딜 에스테르(GMBS), ϵ -말레이미도카프로익산 N-히드록시숙신이미딜 에스테르(EMCS), m-말레이미도벤조일-N-히드록시숙신이미딜 에스테르(MBS), N-(α -말레이미도아세톡시)-숙신이미딜 에스테르(AMAS), 숙신이미딜-6-(β -말레이미도프로피온아미도)헥사노에이트(SMPH), N-숙신이미딜 4-(p-말레이미도페닐)-부티레이트(SMPB), N-(p-말레이미도페닐)이소시아네이트(PMPI), N-숙신이미딜-4-(이오도아세틸)-아미노벤조에이트(SIAB), N-숙신이미딜 이오도아세테이트(SIA), N-숙신이미딜 브로모아세테이트(SBA), 및 N-숙신이미딜 3-(브로모아세틸아미도)프로피오네이트(SBAP)로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 33

제 1항 내지 제 18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이작용성 가교제는 N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)부타노에이트(SPDB), N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)펜타노에이트(SPP), 및 N-숙신이미딜 4-(말레이미도메틸)시클로헥산카르복실레이트(SMCC)로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 34

제 1항 내지 제 18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이작용성 가교제는 N-숙신이미딜 4-(말레이미도메틸)시클로헥산카르복실레이트(SMCC)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 35

제 1항 내지 제 18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 트라스투주맵(trastuzumab)이고, 상기 이작용성 가교제는 N-숙신이미딜 4-(말레이미도메틸)시클로헥산카르복실레이트(SMCC)이고, 그리고 상기 마이탄시노이드는 N^{2'}-데아세틸-N^{2'}-(3-머캅토-1-옥소프로필)-마이탄신(DM1)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 접합체가 약물에 화학적으로 결합된 세포바인딩제를 포함하는, 실질적으로 고순도 및 안정성을 갖는 접합체를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 암치료는 보다 효과적으로 표적하고 암세포를 사멸하는 약학의 발달로 현저히 진보되었다. 이 때문에, 연구자들은 종양-특이 또는 종양-관련 항원에 결합하는 항체에 기초한 약물을 개발하기 위해 암세포에 의해 선택적으로 발현되는 세포-표면 리셉터 및 항원의 이점을 취하였다. 이와 관련하여, 박테리아 및 식물 독소와 같은 세포독성 분자, 방사성 핵종, 및 특정 화학치료 약물은 종양-특이 또는 종양-관련 세포 표면 항원에 결합하는 모노클로날 항체에 화학적으로 연결된다(참조 예, 국제특허출원 WO 00/02587, WO 02/060955, 및 WO 02/092127, 미국 특허 5,475,092, 6,340,701, 및 6,171,586, 특허출원공개 제 2003/0004210A1, 및 Ghetie et al., J. Immunol. Methods, 112: 267-277(1988)). 이러한 화합물들은 전형적으로 각각 독소, 방사성 핵종, 및 약물 "접합체"를 칭한다. 이들은 종종 면역접합체, 방사성면역접합체, 및 면역독소로 간주된다. 종양 세포 사멸은 종양 세포에 대한 약물 접합체의 결합 및 상기 약물의 세포독성 활성의 분비 또는/및 활성화시에 일어난다. 약물 접합체에 의해 제공되는 선택성은 정상 세포에 대한 독성을 최소화시켜 환자에서 약물의 인내도를 증가시킨다.
- [0003] 마이탄시노이드와 같은 설피드릴-함유 세포독성제에 대해 항체를 접합시키는 방법은 이전에 기술되어 있다(참조 예, 미국 특허 5,208,020, 5,416,064 및 6,441,163). 예를 들어, 미국 특허 5,208,020 및 5,416,064에는 항체가 미국 특허 4,149,003, 4,563,304 및 미국 특허 출원 공개 제 2004/0241174 A1에 기재된 바와 같은 헤테로이작용성 제제로 일차 변형된 항체-마이탄시노이드 접합체를 제조하는 방법이 기재되어 있다. 미국 특허 5,208,020 및 5,416,064에는 또한 변형된 항체를 pH 7에서 과량의 설피드릴-함유 세포독성제와 접합시키고, Sephadex™ G25 크로마토그래피 컬럼상에서 정제하는 것이 기재되어 있다. 크기 배제 크로마토그래피(SEC)에 의한 항체-약물 접합체의 정제가 또한 기재된다(참조 예, Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci.(USA), 93: 8618-8623(1996), 및 Chari et al, Cancer Research, 52: 127-131(1992)).
- [0004] 상기 항체-약물 접합체의 제조에 대해 앞서 기재된 방법들은 복잡하다. 왜냐하면, 이들은 최적으로 원하여지는 것보다 덜 순수하거나 덜 안정적인 면역접합체를 성취하거나 생성하는데 성가신 단계들로 방해받기 때문이다. 예를 들어, pH 6.0 내지 6.5에서의 접합은 순수하고 안정한 접합체를 생성하는데 최적은 아니다. 또한, 이러한 조건하에서의 접합 반응은 일반적으로 느리며 비효율적이며, 이는 과도한 시간 및 재료 사용을 요구한다.
- [0005] 순도 및/또는 안정성과 같은 생성물 질을 손상시키지 않고 하나 이상의 제조 단계를 변형 또는 없애는 것이 원하여진다. 일부 옵션이 다른 것들보다 세포바인딩제, 링커, 및 약물의 특정 조합으로 보다 효율적이게 될 정도로 지금까지 기재된 것들보다 추가의 정제 옵션을 갖는 것이 또한 원하여진다.
- [0006] 앞서 살펴본 바와 같이, 실질적으로 고순도이면서 동시에 보다 우수한 안정성을 갖는 세포바인딩제-약물 접합체 조성물을 제조하는 향상된 방법을 개발하는 것이 당 기술분야에 요구된다. 본 발명은 이러한 방법을 제공한다. 본 발명의 이러한 잇점 및 다른 잇점 뿐만 아니라 추가적인 발명적 특징들이 본 명세서에 제공된 본 발명의 상세한 설명으로부터 명확해질 것이다.

발명의 상세한 설명

- [0007] 본 발명은 약물에 화학적으로 결합된 세포바인딩제를 포함하는 실질적으로 고순도 및 안정성을 갖는 접합체를 제조하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 (a) 상기 세포바인딩제에 링커를 공유결합시키기 위해 세포바인딩제와 이작용성 가교제를 접촉시키고 이에 따라 이에 결합된 링커를 갖는 세포바인딩제를 포함하는 제 1 혼합물을 제조하는 단계, (b) 상기 제 1 혼합물을 접선 흐름 여과, 흡착 크로마토그래피, 흡착 여과, 선택적 침전 또는 이의 조합으로 적용하여 이에 결합된 링커를 갖는 정제된 제 1 세포바인딩제 혼합물을 제조하는 단계, (c) 약 pH 4-9를 갖는 용액에서 이에 결합된 링커를 갖는 세포바인딩제를 약물과 반응시켜 상기 정제된 제 1 혼합물에서 이에 결합된 링커를 갖는 세포바인딩제에 약물을 접합시켜 (i) 상기 링커를 통해 상기 약물에 화학적으로 결합된 세포바인딩제, (ii) 유리 약물(free drug), 및 (iii) 반응 부산물을 포함하는 제 2 혼합물을 제조하는 단계, 및 (d) 상기 제 2 혼합물을 접선 흐름 여과, 흡착 크로마토그래피, 흡착 여과, 선택적 침전 또는 이의 조합으로 적용하여 상기 링커를 통해 상기 제 2 혼합물의 다른 성분으로부터 상기 약물에 화학적으로 결합된 세포바인딩제를 정제하고, 이에 따라 정제된 제 2 혼합물을 제조하는 단계를 포함한다.
- [0008] 본 발명은 실질적으로 고순도 및 안정성을 갖는 세포바인딩제-약물 접합체를 제조하는 방법을 제공한다. 이러한 조성물은 상기 접합체의 고순도 및 안정성 때문에 질병 치료에 사용될 수 있다. 마이탄시노이드와 같은 약물에

화학적으로 결합되는 항체와 같은 세포바인딩제를 포함하는 조성물은 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제 2004/0241174 A1에 기재되어 있다. 이러한 상황에서, 실질적으로 고순도는 (a) 접합체 종의 90% 이상, 바람직하게 95% 이상이 모노머성이며, 그리고/또는 (b) 접합체 제조물내 유리 약물 수준이 (총 약물에 대하여) 2% 미만인 것으로 간주된다.

[0009] 이와 관련하여, 본 발명의 방법은 (a) 상기 세포바인딩제에 링커를 공유결합시키기 위해 세포바인딩제와 이작용성 가교제를 접촉시키고 이에 따라 이에 결합된 링커를 갖는 세포바인딩제를 포함하는 제 1 혼합물을 제조하는 단계, (b) 상기 제 1 혼합물을 접선 흐름 여과, 흡착 크로마토그래피, 흡착 여과, 선택적 침전 또는 이의 조합으로 적용하여 상기 제 1 혼합물의 다른 성분으로부터 이에 결합된 링커를 갖는 세포바인딩제를 정제하고, 이에 따라 이에 결합된 링커를 갖는 정제된 제 1 세포바인딩제 혼합물을 제조하는 단계, (c) 약 pH 4-9를 갖는 용액에서 이에 결합된 링커를 갖는 세포바인딩제를 약물과 반응시켜 상기 정제된 제 1 혼합물에서 이에 결합된 링커를 갖는 세포바인딩제에 약물을 접합시켜 (i) 상기 링커를 통해 상기 약물에 화학적으로 결합된 세포바인딩제, (ii) 유리 약물(free drug), 및 (iii) 반응 부산물을 포함하는 제 2 혼합물을 제조하는 단계, 및 (d) 상기 제 2 혼합물을 접선 흐름 여과, 흡착 크로마토그래피, 흡착 여과, 선택적 침전 또는 이의 조합으로 적용하여 비-접합 약물, 반응물 및 부산물을 제거할 뿐만 아니라 실질적으로 정제된 세포바인딩제-약물 접합체를 획득하는 단계를 포함한다. 임의로, 본 발명의 방법은 적어도 하나의 단계 a-b, 단계 b-c, 및/또는 단계 c-d 사이에 상기 혼합물을 홀딩하여 상기 세포바인딩제로부터 불안정하게 결합된 링커를 방출시키는 것을 더 포함한다.

[0010] 바람직하게, 접선 흐름 여과(TFF, 교차 흐름 여과, 한외여과 및 정용여과로도 알려짐) 및/또는 흡착 크로마토그래피 수지가 정제 단계에 이용된다. 그러나, TFF가 제 1 정제 단계(단계 b)에 사용되는 경우, (단계 c)에서 pH 6.0-6.5에서의 접합이 이용되며, 흡착 크로마토그래피 수지가 제 2 정제 단계(단계 d)에 이용되며, 상기 흡착 크로마토그래피 수지는 비이온 교환 수지인 것이 바람직하다. 다른 바람직한 구현으로, TFF는 두 정제 단계 모두에 이용되거나, 흡착 크로마토그래피 수지는 두 정제 단계 모두에 이용된다. 택일적으로, 흡착 크로마토그래피 수지가 제 1 정제 단계에 사용되며, TFF는 제 2 정제 단계에 이용된다. TFF와 흡착 크로마토그래피 수지의 조합이 또한 제 1 및/또는 제 2 정제 단계에 이용될 수 있다.

[0011] Pellicon 타입 시스템(Millipore, Billerica, MA), Sartocoon Cassette 시스템(Sartorius AG, Edgewood, NY) 및 Centrasette 타입 시스템(Pall Corp., East Hills, NY)을 포함하는 어느 적절한 TFF 시스템이 이용될 수 있다.

[0012] 어느 적절한 흡착 크로마토그래피 수지가 이용될 수 있다. 바람직한 흡착 크로마토그래피 수지는 히드록시아파타이트 크로마토그래피, 소수성 전하 유도 크로마토그래피(HCIC), 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC), 이온 교환 크로마토그래피, 혼합 방식 이온 교환 크로마토그래피, 고정화 금속 친화성 크로마토그래피(IMAC), 염료 리간드 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 역상 크로마토그래피, 및 이의 조합에 대한 수지들을 포함한다. 적절한 히드록시아파타이트 수지의 예는 세라믹 히드록시아파타이트(ChT Type I 및 Type II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), HA Ultrogel 히드록시아파타이트(Pall Corp., East Hills, NY), 및 세라믹 불화 인회석(CFT Type I 및 Type II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)를 포함한다. 적절한 HCIC 수지의 예는 MEP Hypercel 수지(Pall Corp., East Hills, NY)이다. 적절한 HIC 수지의 예는 Butyl-Sepharose, Hexyl-Sepharose, Phenyl-Sepharose, 및 Octyl Sepharose 수지(모두 GE Healthcare, Piscataway, NJ), 뿐만 아니라 Macro-prep Methyl 및 Macro-Prep t-Butyl 수지(Biorad Laboratories, Hercules, CA)를 포함한다. 적절한 이온 교환 수지의 예는 SP-Sepharose, CM-Sepharose, 및 Q-Sepharose 수지(모두 GE Healthcare, Piscataway, NJ), 및 Unosphere S 수지(Biorad Laboratories, Hercules, CA)를 포함한다. 적절한 혼합 방식 이온 교환기의 예는 Bakerbond ABx 수지(JT Baker, Phillipsburg NJ)를 포함한다. 적절한 IMAC 수지의 예는 Chelating Sepharose 수지(GE Healthcare, Piscataway, NJ) 및 Profinity IMAC 수지(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)를 포함한다. 적절한 염료 리간드 수지의 예는 Blue Sepharose 수지(GE Healthcare, Piscataway, NJ) 및 Affi-gel Blue 수지(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)를 포함한다. 적절한 친화성 수지의 예는 세포바인딩제가 항체인 Protein A Sepharose 수지(예, MabSelect, GE Healthcare, Piscataway, NJ), 및 예를 들어, Lentil Lectin Sepharose 수지(GE Healthcare, Piscataway, NJ)와 같이 세포 바인딩제가 적절한 렉틴 결합부를 갖는 렉틴 친화성 수지를 포함한다. 택일적으로 상기 세포바인딩제에 특이적인 항체가 사용될 수 있다. 이러한 항체는 예를 들어, Sepharose 4 Fast Flow 수지(GE Healthcare, Piscataway, NJ)에 고정될 수 있다. 적절한 역상 수지의 예는 C4, C8 및 C18 수지(Grace Vydac, Hesperia, CA)를 포함한다.

[0013] 본 발명의 방법에 따라, 이에 결합된 링커를 갖는 세포바인딩제 뿐만 아니라 반응물 및 다른 부산물을 포함하는 제 1 혼합물이 제조된다. 반응물 및 부산물로부터 변형 세포바인딩제의 정제는 상기 제 1 혼합물을 정제 공정에

적용하여 수행된다. 이와 관련하여, 상기 제 1 혼합물은 예를 들어, 멤브레인-기초 접선 흐름 여과 공정과 같은 접선 흐름 여과(TFF), 흡착 크로마토그래피, 흡착 여과, 또는 선택적 침전, 또는 어느 다른 적절한 정제 공정 뿐만 아니라 이의 조합을 이용하여 정제될 수 있다. 이러한 제 1 정제 단계는 정제된 제 1 혼합물을 제공한다. 즉, 본 발명에 따른 정제 전의 상기 제 1 혼합물에 비하여 증가된 농도의 결합된 링커를 갖는 세포바인딩제 및 감소된 양의 결합되지 않은 이작용성 가교제를 제공한다.

[0014] 결합된 링커를 갖는 세포바인딩제의 정제된 제 1 혼합물을 얻기 위해 상기 제 1 혼합물의 정제 후, 약 pH 4-9를 갖는 용액에서 상기 결합된 링커를 갖는 세포바인딩제와 약물을 반응시킴으로써 상기 제 1 정제 혼합물에서 결합된 링커를 갖는 세포바인딩제에 약물이 접합되며, 그 결과, (i) 상기 링커를 통해 상기 약물에 화학적으로 결합된 세포바인딩제, (ii) 유리 약물, 및 (iii) 부산물을 포함하는 제 2 혼합물이 생성된다. 접합 반응은 약 pH 4-9에서 수행되며, 상기 반응은 바람직하게 약 pH 6 또는 그 이하에서, 또는 약 pH 6.5 또는 그 이상에서 수행되며, 가장 바람직하게는 약 pH 4-6에서, 또는 약 pH 6.5-9에서, 특히 4 내지 6 미만의 pH 또는 6.5이상 내지 9의 pH에서 수행된다. 접합 단계가 약 6.5 또는 그 이상의 pH에서 수행되는 경우에 일부 설피드-함유 약물은 디설피드-결합 형성에 의해 다imer화되는 경향이 있다. 반응 혼합물로부터 미량 금속 및/또는 산소의 제거 뿐만 아니라 산화방지제의 임의의 첨가 또는 보다 반응적인 이탈기를 갖는 링커의 사용, 또는 1 분취액이상의 약물 첨가가 이러한 상황에서 효율적인 반응을 위해 필요할 수 있다.

[0015] 임의로, 변형된 세포바인딩제의 정제는 생략될 수 있다. 이러한 경우에, 상기 약물은 가교제와 함께 동시에 첨가되거나, 또는 상기 세포바인딩제에 가교제를 첨가한 후 1, 2, 3 또는 그 이상의 시간 후와 같이 다소 늦은 시점에 첨가될 수 있다.

[0016] 본 발명의 방법은 임의로 상기 세포바인딩제-약물 접합체의 용해도 및 회수를 증가시키기 위해 본 발명의 방법에 사용된 접합 단계에 수크로즈의 첨가를 포함한다. 바람직하게, 수크로즈는 약 0.1-20%(w/v)(예, 약 0.1%(w/v), 1%(w/v), 5%(w/v), 10%(w/v), 15%(w/v), 또는 20%(w/v))의 농도로 첨가된다. 바람직하게, 수크로즈는 약 1-10%(w/v)(예, 약 2%(w/v), 약 4%(w/v), 약 6%(w/v), 또는 약 8%(w/v))의 농도로 첨가된다. 또한, 접합 반응은 완충제의 첨가를 포함할 수 있다. 당해 기술분야에 알려진 어느 적절한 완충제가 사용될 수 있다. 적절한 완충제는 예를 들어, 시트레이트 버퍼, 아세테이트 버퍼, 숙시네이트 버퍼, 및 포스페이트 버퍼를 포함한다.

[0017] 접합 단계 이후에, 상기 제 2 혼합물은 정제 단계가 이루어진다. 이와 관련하여, 상기 제 2 혼합물은 상기 언급한 바와 같이, 예를 들어, 멤브레인-기초 접선 흐름 여과 공정과 같은 접선 흐름 여과(TFF), 흡착 크로마토그래피, 흡착 여과, 또는 선택적 침전, 또는 어느 다른 적절한 정제 공정 뿐만 아니라 이의 조합을 이용하여 정제될 수 있다. 이러한 제 2 정제 단계는 정제된 제 2 혼합물을 제공한다. 즉, 본 발명에 따른 정제 전의 상기 제 2 혼합물에 비하여 상기 링커를 통해 화학적으로 결합된 세포바인딩제의 증가된 농도 및 상기 제 2 혼합물의 하나 이상의 다른 성분의 감소된 양을 제공한다.

본 발명의 방법은 임의로 이작용성 가교제를 이용한 세포바인딩제의 변형 후 홀딩 단계를 더 포함한다. 상기 홀딩 단계는 적절한 온도에서 적절한 시간동안 상기 용액을 유지하여 세포바인딩제로부터 불안정하게 결합된 링커들을 방출시키고, 한편으로는 세포바인딩제로부터 안정하게 결합된 링커들은 실질적으로 방출되지 않도록 하는 것을 포함한다. 바람직하게, 상기 홀딩 단계는 약 2-8°C의 온도에서 적어도 약 12시간동안 내지 최대 30일 이상의 기간동안 상기 용액을 유지하는 것을 포함한다. 택일적으로, 홀딩 단계의 기간은 상승된 온도에서 상기 홀딩 단계를 수행함으로써 실질적으로 감소될 수 있으며, 최대 온도는 세포바인딩제-약물 접합체의 안정성에 의해 제한된다. 예를 들어, 항체-약물 접합체에 대해 상기 홀딩 단계는 최대 약 37°C에서 최대 약 4주간, 바람직하게 2-4주간, 보다 바람직하게 1-2주간, 보다 바람직하게 약 1주이하(예, 2시간 내지 약 6일)동안 수행될 수 있다. 홀딩 단계를 위한 바람직한 pH 값은 약 6-10 범위이다. 가장 바람직한 pH 값은 약 6.5-8.5이다. 바람직하게, 상기 홀딩 단계는 변형된 세포바인딩제를 포함하는 혼합물을 적어도 약 12시간 내지 4주간 pH 6.5, 4°C에서 인큐베이팅하는 것을 포함한다. 보다 바람직하게, 상기 홀딩 단계는 약 12시간 내지 약 1주간 pH 6.5에서 20-30°C에서 변형된 세포바인딩제를 포함하는 혼합물을 인큐베이팅하는 것을 포함한다. 상기 홀딩 단계는 세포바인딩제가 약물에 접합되기 전 또는 후에 수행된다. 바람직하게, 상기 홀딩 단계는 세포바인딩제를 이작용성 가교제로 변형한 직후에 수행된다.

일 구현으로, 본 발명의 방법은 이작용성 가교제로 세포바인딩제를 변형한 후 및 접합 전에 홀딩 단계를 포함한다. 상기 홀딩 단계는 세포바인딩제로부터 불안정하게 결합된 링커들을 방출시키며, 한편으로는 세포바인딩제로부터 안정하게 결합된 링커들을 실질적으로 방출시키지 않는 적절한 시간동안 적절한 온도에서 상기 용액을 유지하는 것을 포함한다. 바람직하게, 상기 홀딩 단계는 예를 들어, 30일과 같이 적어도 약 5시간 내지 최대 5일

이상동안 약 2-8℃의 온도에서 상기 용액을 유지하는 것을 포함한다. 택일적으로, 홀딩 단계의 기간은 상승된 온도에서 홀딩 단계를 수행함으로써 실질적으로 감소될 수 있으며, 최대 온도는 세포바인딩제-약물 접합체의 안정성에 의해 제한된다. 예를 들어, 항체-약물 접합체에 대한 홀딩 단계는 최대 약 37℃에서 최대 약 4주간, 바람직하게 2-4주간, 보다 바람직하게 1-2주간, 보다 바람직하게 약 1주이하(예, 2시간 내지 약 6일)동안 수행될 수 있다. 홀딩 단계를 위한 바람직한 pH 값은 약 4이상 내지 약 6이하(예, 4-5.9)이다. 홀딩 단계를 위한 pH 값은 바람직하게 약 5이상 내지 약 6이하(예, 5-5.9)이다. 바람직하게, 상기 홀딩 단계는 변형된 세포바인딩제를 포함하는 혼합물을 적어도 약 5시간 내지 5일이상(예, 10일) pH 5에서 4℃에서 인큐베이팅하는 것을 포함한다. 보다 바람직하게, 상기 홀딩 단계는 약 5시간 내지 약 1-3일간 pH 5에서 20-30℃에서 변형된 세포바인딩제를 포함하는 혼합물을 인큐베이팅하는 것을 포함한다. 세포바인딩제의 변형 후, 정제 단계는 홀딩 단계 전 및/또는 후에 수행될 수 있다. 비흡착 또는 흡착 크로마토그래피와 같은 이러한 정제 단계는 당 기술분야의 숙련자에게 잘 알려져 있다.

일 구현으로, 상기 홀딩 단계의 기간은 뉴클레오피드의 첨가에 의해 감소될 수 있다. 상기 뉴클레오피드는 접합 단계 도중에 첨가될 수 있으며, 홀딩 단계는 접합과 동시에 수행될 수 있다. 본 발명의 정황상, 뉴클레오피드는 수용액에서 변형된 세포바인딩제상의 에스테르기 및 이미다졸 아미드와 반응할 수 있는 화학부이다. 적절한 뉴클레오피드는 당 기술분야에 알려져 있으며, 예를 들어, 일차 아민, 즉, RNH₂(여기서 R은 알킬 또는 방향족 기임); 또는 이차 아민, 즉, RR'NH(여기서 R 및 R'는 알킬 또는 방향족 기임)을 포함한다. 아민은 또한 아미노산, 리신 아미노산을 함유하는 펩타이드, 알파-아미노산 또는 비-천연 이차 아미노기를 함유하는 펩타이드, 또는 수용성 아민일 수 있다. 뉴클레오피드는 용액으로, 중합 상태로, 또는 고형상 제제로서 고정화 형태로 존재할 수 있다. 용액으로 적절한 뉴클레오피드의 예는 이에 한정하는 것은 아니나, 글리실글리신, 글리신, 타우린(소듐 2-아미노노에탄설포네이트), 에탄올아민, 디에탄올아민, 리신, 히드록실아민, 히드라진, 이미다졸, 히스티딘, 에틸아민, 2-아미노-2-(히드록시메틸)-1,3-프로판-디올 및 4-아미노-1-부탄올을 포함한다. 적절한 뉴클레오피드의 적절한 농도는 약 0.1mM 내지 특정 뉴클레오피드에 대한 용해도 허용치 범위이다. 중합 상태로 뉴클레오피드의 예는 이에 한정하는 것은 아니나, 폴리(에틸렌아민), 폴리-리신, 및 리신 아미노산을 함유하는 펩타이드 및 알파-아미노 또는 비-천연 이차 아미노기를 함유하는 펩타이드를 포함한다. 고형상 제제로서 고정화 형태로 뉴클레오피드의 예는 이에 한정하는 것은 아니나, EAH Sepharose 4B 및 아미노메틸 폴리스티렌 비드와 같은 고형상 결합 아민을 포함한다. 고형상 뉴클레오피드에 대해, 고형상 아민의 분자량은 세포바인딩제에 결합된 가교제의 양을 초과하여야 한다.

[0018] 상기 세포바인딩제는 세포, 전형적으로 그리고 바람직하게 동물 세포(예, 사람 세포)에 바인딩하는 어느 적절한 제제일 수 있다. 상기 세포바인딩제는 바람직하게 펩타이드 또는 폴리펩타이드이다. 적절한 세포바인딩제는 예를 들어, 항체(예, 모노클로날 항체 및 이의 프래그먼트), 림포카인, 호르몬, 성장인자, 영양분-수송 분자(예, 트랜스페린) 및 세포 표면상의 표적 분자를 특이적으로 바인딩하는 어느 다른 제제 또는 분자를 포함한다.

[0019] 본 명세서에 사용된 용어 "항체"는 Fab, F(ab')₂, dsFv, sFv, 다이어바디(diabodies)와 같은 어느 면역글로블린, 어느 면역글로블린 프래그먼트, 또는 세포 표면상의 (예를 들어, 상보성결정지역(complementarity determining region, CDR)을 함유하는) 항원에 결합할 수 있는 면역글로블린 키메라를 칭한다. 어느 적절한 항체가 세포바인딩제로 사용될 수 있다. 당업자는 적절한 항체의 선택이 표적하고자 하는 세포집단에 따라 달라질 것임을 인식할 것이다. 이와 관련하여, 특정 세포 집단(전형적으로 그리고 바람직하게 병에 걸린 세포 집단)에서 선택적으로 발현되는 세포 표면 분자(즉, 항원)의 타입 및 수는 본 발명의 조성물에 사용되는 적절한 항체의 선택을 결정할 것이다. 세포 표면 발현 프로파일은 중앙 세포 타입을 포함하는 광범위하게 다양한 세포 타입에 대해 알려져 있으며, 또는 알려지지 않은 경우에 통상적인 분자생물학 및 조직 화학 기술을 이용하여 검출될 수 있다.

[0020] 상기 항체는 폴리클로날이거나 모노클로날일 수 있으나, 가장 바람직하게 모노클로날 항체이다. 본 명세서에 사용된 "폴리클로날" 항체는 전형적으로 면역화 동물의 혈청에 함유된 항체 분자의 이종성 집단을 칭한다. "모노클로날" 항체는 특정 항원에 특이적인 항체 분자의 동종성 집단을 칭한다. 모노클로날 항체는 전형적으로 B 림프구("B 세포")의 단일 클론에 의해 생성된다. 모노클로날 항체는 표준 하이브리도마 기술을 포함하는 당업자에게 알려진 다양한 기술을 이용하여 획득될 수 있다(참조 예, Kohler 및 Milstein, Eur. J. Immunol., 5:511-519(1976), Harlow 및 Lane(eds.), Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press(1988), 및 C.A. Janeway et al.(eds.), Immunobiology, 5th Ed., Garland Publishing, New York, NY(2001)). 간략히, 모노클로날 항체를 생성하는 하이브리도마 방법은 전형적으로 어느 적절한 동물, 전형적으로 그리고 바람직하게 마우스에 항원(즉, "면역원")을 주입하는 것을 포함한다. 동물은 후속적으로 희생되며, 이의 비장으로부터 분리된 B 세포는 사람

골수종 세포와 융합된다. 하이브리드 세포가 생성되며(즉, "하이브리도마"), 이는 무기한으로 증식하며 시험관 내에서 원하는 특이성을 갖는 고 역가의 항체를 연속적으로 분비한다. 당해 기술분야에 알려진 어느 적절한 방법이 원하는 특이성을 갖는 항체를 생성하는 하이브리도마 세포를 확인하는데 사용될 수 있다. 이러한 방법은 예를 들어, 효소-결합 면역 흡착 어세이(ELISA), 웨스턴 블롯 분석, 및 방사성면역어세이를 포함한다. 하이브리도마 집단은 각 클론을 분리하기 위해 스크리닝되며, 이들 각각은 항원에 대한 단일 항체종을 분비한다. 각 하이브리도마는 단일 B 세포와의 융합으로부터 유도된 클론이기 때문에, 이를 생성하는 모든 항체 분자들은 이들의 항원 바인딩 사이트 및 아이소타입을 포함하는 구조면에서 동일하다. 모노클로날 항체는 또한 EBV-하이브리도마 기술(참조 예, Haskard 및 Archer, J. Immunol. Methods, 74(2): 361-67(1984), 및 Roder et al., Methods Enzymol., 121: 140-67(1986)), 벡테리오파지 벡터 발현 시스템(참조 예, Huse et al., Science, 246: 1275-81(1989)), 또는 Fab 및 scFv(단일 사슬 가변 영역)과 같은 항체 프래그먼트를 포함하는 파지 디스플레이 라이브러리(참조 예, 미국 특허 5,885,793 및 5,969,108, 및 국제 특허 출원 WO 92/01047 및 WO 99/06587)를 포함하는 다른 적절한 기술을 이용하여 생성될 수 있다.

[0021] 상기 모노클로날 항체는 어느 적절한 동물로부터 분리되거나 생성될 수 있으나, 바람직하게 포유류에서, 보다 바람직하게 마우스 또는 사람에서, 가장 바람직하게는 사람에서 생성된다. 마우스에서 항체를 생성하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있으며 본 명세서에 설명된다. 사람 항체와 관련하여, 당업자는 폴리클로날 항체가 적절한 항원으로 백신접종되거나 면역화된 사람 대상자의 혈청으로부터 분리될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 택일적으로, 사람 항체는 마우스와 같은 사람이 아닌 동물에서 사람 항체를 생성하는 공지 기술을 적용하여 생성될 수 있다(참조 예, 미국 특허 5,545,806, 5,569,825, 및 5,714,352, 및 미국 특허 출원 공개 제 2002/0197266 A1).

[0022] 사람에서 치료학적 적용을 위한 이상적인 선택이지만 사람 항체, 특히 사람 모노클로날 항체는 전형적으로 마우스 모노클로날 항체보다 생성하기 어렵다. 그러나, 마우스 모노클로날 항체는 사람에게 투여되는 경우에 신속한 숙주 항체 반응을 유도하며, 이는 항체-약물 접합체의 치료학적 또는 진단학적 잠재력을 감소시킬 수 있다. 이러한 문제를 회피하기 위해, 모노클로날 항체는 바람직하게 사람 면역 시스템에 의해 "외래"로 인지되지 않는다.

[0023] 이 때문에, 파지 디스플레이가 상기 항체를 생성하는데 사용될 수 있다. 이와 관련하여, 항체의 항원-바인딩 가변(V) 도메인을 암호화하는 파지 라이브러리는 표준 분자 생물 및 재조합 DNA 기술을 이용하여 생성될 수 있다(참조 예, Sambrook et al.(eds.), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York(2001)). 원하는 특이성을 갖는 가변 영역을 암호화하는 파지는 원하는 항원에 대한 특이적 바인딩을 위해 선택되며, 완전한 사람 항체는 선택된 가변 도메인을 포함하여 재구성된다. 재구성된 항체를 암호화하는 핵산 서열은 하이브리도마 생성에 사용되는 골수종 세포와 같은 적절한 세포주내로 도입되어, 모노클로날 항체의 특성을 갖는 사람 항체가 상기 세포에 의해 분비된다(참조 예, Janeway et al., 상기 참조, House et al., 상기 참조, 및 미국 특허 6,265,150). 택일적으로, 모노클로날 항체는 특정 사람 헤비 사슬 및 라이트 사슬 면역글로블린 유전자에 대해 유전자도입된 마우스로부터 생성될 수 있다. 이러한 방법은 당해 기술 분야에 알려져 있으며, 예를 들어, 미국 특허 5,545,806 및 5,569,825, 및 Janeway et al.(상기 참조)에 기술되어 있다.

[0024] 가장 바람직하게 상기 항체는 인간화 항체이다. 본 명세서에 사용된, "인간화" 항체는 항체의 항원 바인딩 루프를 형성하는 마우스 모노클로날 항체의 상보성결정지역(complementarity determining region, CDR)이 사람 항체 분자의 프레임워크상에 이식된 것이다. 마우스 및 사람 항체 프레임워크의 유사성에 기인하여, 이러한 방법이 사람 항체와 항원적으로 동일하나 이로부터 CDR 서열이 유도되는 마우스 모노클로날 항체와 동일한 항원에 결합하는 항체를 생성한다는 것이 일반적으로 당해 기술분야에 받아들여진다. 인간화 항체를 생성하는 방법은 당해 기술분야에 잘 알려져 있으며 예를 들어, Janeway et al., 상기 참조, 미국 특허 5,225,539, 5,585,089 및 5,693,761, 유럽 특허 제 0239400 B1, 및 영국 특허 제 2188638에 상세히 설명되어 있다. 인간화 항체는 또한 미국 특허 5,639,641 및 Pedersen et al., J. Mol. Biol., 235:959-973(1994)에 기재된 항체 표면화 기술을 이용하여 생성될 수 있다. 본 발명의 조성물의 접합체에 이용되는 항체는 가장 바람직하게 인간화 모노클로날 항체이나, 상기한 바와 같이 사람 모노클로날 항체 및 마우스 모노클로날 항체가 또한 본 발명의 범위내에 포함된다.

[0025] 적어도 하나의 항원 바인딩 사이트를 가지며, 이에 따라 표적 세포의 표면에 존재하는 적어도 하나의 항원 또는 리셉터를 인지하고 바인딩하는 항체 프래그먼트가 또한 본 발명의 범위내에 포함된다. 이와 관련하여, 본래의 항체 분자의 단백질 가수분해성 분할은 항원을 인지하고 바인딩하는 능력을 보유하는 다양한 항체 프래그먼트

트를 생성할 수 있다. 예를 들어, 프로테아제 파괴인을 이용한 항체 분자의 제한된 분해는 전형적으로 세 개의 프레그먼트를 생성하며, 이 중에서 둘은 동일하며, 이들은 모 항체 분자의 항원 바인딩 활성을 보유함에 따라 Fab 프레그먼트로 칭하여진다. 효소 썬을 이용한 항체 분자의 분할은 일반적으로 두 개의 항체 프레그먼트를 생성하며, 이 중에서 하나는 항체 분자의 항원-바인딩 팔 모두를 보유하며, 이에 따라 F(ab')₂ 프레그먼트로 칭하여진다. 디티오트레이톨 또는 머캅토에틸아민을 이용한 F(ab')₂ 프레그먼트의 감소는 Fab' 프레그먼트로 칭하여지는 프레그먼트를 생성한다. 합성 펩타이드를 통해 라이트 항체 사슬의 V 도메인에 연결된 항체 헤비 사슬의 가변(V) 도메인을 포함하는 트렁케이티드 Fab 프레그먼트로 구성된 단일 사슬 가변 영역 프레그먼트(sFv) 항체 프레그먼트는 통상적인 재조합 DNA 기술을 이용하여 생성될 수 있다(참조 예, Janeway et al., 상기 참조). 마찬가지로, 디설피드-안정화 가변 영역 프레그먼트(dsFv)가 재조합 DNA 기술에 의해 제조될 수 있다(참조 예, Reiter et al., Protein Engineering, 7: 697-704(1997)). 그러나, 본 발명의 정황에서 항체 프레그먼트는 이러한 예시적인 타입의 항체 프레그먼트들로 한정되는 것은 아니다. 원하는 세포 표면 리셉터 또는 항원을 인지 및 바인딩하는 어느 적절한 항체 프레그먼트가 사용될 수 있다. 항체 프레그먼트는 또한 예를 들어, Parham, J. Immunol., 131: 2895-2902(1983), Spring et al., J. Immunol., 113: 470-478(1974), 및 Nisonoff et al., Arch. Biochem. Biophys., 89: 230-244(1960)에 기술되어 있다. 항체-항원 바인딩은 예를 들어, 방사성면역어세이(RIA), ELISA, 웨스턴 블롯, 면역침전, 및 경쟁 저해 어세이(참조 예, Janeway et al., 상기 참조, 및 미국 특허 출원 공개 제 2002/0197266 A1)와 같이 당해 기술분야에 알려진 어느 적절한 방법을 이용하여 어세이될 수 있다.

[0026] 또한, 상기 항체는 키메라 항체이거나 이의 항원 바인딩 프레그먼트일 수 있다. "키메라"이란 항체가 적어도 두 개의 다른 종으로부터 획득되거나 유도된 적어도 두 면역글로블린, 또는 이의 프레그먼트를 포함하는 것을 의미한다(예, 무린 면역글로블린 가변 영역과 조합된 사람 면역글로블린 불변 영역과 같은 두 개의 다른 면역글로블린). 상기 항체는 또한 예를 들어, 카멜리드 항체(참조 예, Desmyter et al., Nature Struct. Biol., 3: 752, (1996)), 또는 예를 들어, 새로운 항원 리셉터(IgNAR)와 같은 상어 항체(참조 예, Greenberg et al., Nature, 374: 168(1995), 및 Stanfiel et al., Science, 305: 1770-1773(2004))와 같이 도메인 항체(dAb) 또는 이의 항원 바인딩 프레그먼트일 수 있다.

[0027] 어느 적절한 항체가 본 발명의 정황에 사용될 수 있다. 예를 들어, 모노클로날 항체 J5는 CALLA에 특이적인 무린 IgG2a 항체이며(Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen)(Ritz et al., Nature, 283: 583-585(1980)), CALLA를 발현하는 세포(예, 급성 림포블라스틱 백혈병 세포)를 표적하는데 사용될 수 있다. 상기 모노클로날 항체 MY9는 CD33 항원에 특이적으로 바인딩하는 무린 IgG1 항체이며(Griffin et al., Leukemia Res., 8: 521(1984)), CD33을 발현하는 세포(예, 급성 골수성 백혈병(AML) 세포)를 표적하는데 사용될 수 있다.

[0028] 마찬가지로, 상기 모노클로날 항체 항-B4(B4로도 칭하여짐)는 B 세포상의 CD19 항원에 바인딩하는 무린 IgG1 항체이며(Nadler et al., J. Immunol., 131: 244-250(1983)), B 세포 또는 CD19를 발현하는 병에 걸린 세포(예, 비-호즈킨 림프종 세포 및 만성 림포블라스틱 백혈병 세포)를 표적하는데 사용될 수 있다. N901은 소 세포 폐종양을 포함하는 신경 내분비 기원의 세포에서 발견되는 CD56(신경 세포 부착 분자) 항원에 바인딩하는 무린 모노클로날 항체이며, 이는 신경 내분비 기원의 세포에 약물을 표적하기 위해 상기 접합체에 사용될 수 있다. 상기 J5, MY9, 및 B4 항체는 바람직하게 상기 접합체의 일부로서 이의 사용 전에 표면화되거나 인간화된다.

[0029] 항체의 표면화 또는 인간화는 예를 들어, Roguska et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 969-73(1994)에 기재되어 있다.

[0030] 또한, 상기 모노클로날 항체 C242는 CanAg 항원에 바인딩하며(참조 예, 미국 특허 5,552,293), 결장암, 췌장암, 비-소세포 폐암 및 위암과 같은 CanAg를 발현하는 종양에 상기 접합체를 표적하는데 사용될 수 있다. HuC242는 모노클로날 항체 C242의 인간화 형태이다(참조 예, 미국 특허 5,552,293). 이로부터 HuC242가 생성되는 하이브리도마는 ECACC 식별번호 90012601로 기탁된다. HuC242는 CDR-그래프팅 방법(참조 예, 미국 특허 5,585,089, 5,693,761, 및 5,693,762) 또는 표면화 방법(참조 예, 미국 특허 5,639,641)을 이용하여 제조될 수 있다. HuC242는 예를 들어, 결장암, 췌장암, 비-소세포 폐암 및 위암 세포와 같이 CanAg 항원을 발현하는 종양 세포에 상기 접합체를 표적하는데 사용될 수 있다.

[0031] 난소암 및 전립선암 세포를 표적하기 위해, 항-MUC1 항체가 상기 접합체에 세포바인딩제로 사용될 수 있다. 항-MUC1 항체는 예를 들어, 항-HMFG-2(참조 예, Taylor-Papadimitriou et al., Int. J. Cancer, 28: 17-21(1981)), hCTM01(참조 예, van Hof et al., Cancer Res., 56: 5179-5185(1996)), 및 DS6를 포함한다. 전립선암 세포는 또한 J591(참조 예, Liu et al., Cancer Res., 57: 3629-3634(1997))과 같이 세포바인딩제로 항-전

립선-특이 멤브레인 항원(PSMA)을 이용하여 상기 접합체로 표적될 수 있다. 더욱이, 유방암, 전립선암 및 난소암과 같이 Her2 항원을 발현하는 암세포는 항체 허셉틴(trastuzumab)을 이용하여 표적될 수 있다. 인슐린성 성장인자 리셉터에 바인딩하는 항-IGF-IR 항체가 또한 상기 접합체에 사용될 수 있다.

[0032] 특히 바람직한 항체는 인간화 모노클로날 항체이며, 이의 예는 huN901, huMy9-6, huB4, huC242, trastuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, 및 rituximab(참조 예, 미국 특허 5,639,641 및 5,665,357, 미국 가 특허출원 제 60/424,332(미국 특허 출원 공개 제 2005/0118183 A1), 국제 특허 출원 WO 02/16401, Pedersen et al., 상기 참조, Roguska et al., 상기 참조, Liu et al., 상기 참조, Nadler et al., 상기 참조, Colomer 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), 및 Maloney et al., Blood, 90: 2188-2195(1997))를 포함한다. 가장 바람직하게, 상기 항체는 huN901 인간화 모노클로날 항체 또는 huMy9-6 인간화 모노클로날 항체이다. 다른 바람직한 항체는 CNT095, huDS6, huB4, 및 huC242를 포함한다. 다른 인간화 모노클로날 항체들이 당해 기술분야에 알려져 있으며 본 발명에 관련되어 사용될 수 있다.

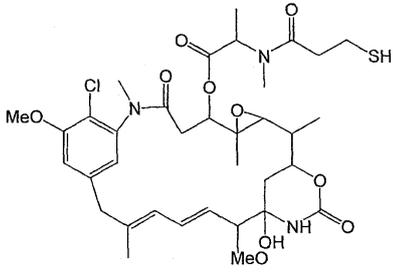
[0033] 상기 세포바인딩제는 바람직하게 항체이나, 상기 세포바인딩제는 또한 비-항체 분자일 수 있다. 적절한 비-항체 분자는 예를 들어, 인터페론(예, 알파, 베타, 또는 감마 인터페론), 림포카인(예, 인터루킨 2(IL-2), IL-3, IL-4 또는 IL-6), 호르몬(예, 인슐린), 성장인자(예, EGF, TGF-알파, FGF, 및 VEGF), 콜로니-자극 인자(예, G-CSF, M-CSF, 및 GM-CSF(참조 예, Burgess, Immunology Today, 5: 155-158(1984)), 소마토스타틴, 및 트랜스페린(참조 예, O'Keefe et al., J. Biol. Chem., 260: 932-937(1985))을 포함한다. 예를 들어, 골수 세포에 바인딩하는 GM-CSF가 급성 골수성 백혈병 세포를 표적하기 위해 세포바인딩제로 사용될 수 있다. 또한, 활성화 T-세포에 바인딩하는 IL-2가 이식 그래프트 거부 예방, 그래프트 대 숙주 질병의 치료 및 예방, 및 급성 T-세포 백혈병 치료를 위해 사용될 수 있다. 상피세포 성장인자(EGF)가 폐암 및 두경부암과 같은 편평상피 암을 표적하는데 사용될 수 있다. 소마토스타틴은 신경아세포종 세포 및 다른 종양 세포 타입을 표적하는데 사용될 수 있다.

[0034] 상기 접합체는 어느 적절한 약물, 전형적으로 세포독성제를 포함할 수 있다. 본 명세서에 사용된 "세포독성제"는 세포의 사멸을 일으키거나, 세포 사멸을 유도하거나, 또는 세포 생존능을 감소시키는 어느 화합물을 칭한다. 적절한 세포독성제는 예를 들어, 마이탄시노이드 및 마이탄시노이드 유사체, 텍소이드, CC-1065 및 CC-1065 유사체, 및 돌래스타틴 및 돌래스타틴 유사체를 포함한다. 본 발명의 바람직한 구현으로, 상기 세포독성제는 마이탄시놀 및 마이탄시놀 유사체를 포함하는 마이탄시노이드이다. 마이탄시노이드는 미소관 형성을 저해하며 포유류 세포에 고 독성적인 화합물이다. 적절한 마이탄시노이드 유사체의 예는 변형된 방향족 고리를 갖는 것들 및 다른 포지션에 변형을 갖는 것들 포함한다. 이러한 마이탄시노이드는 예를 들어, 미국 특허 4,256,746, 4,294,757, 4,307,016, 4,313,946, 4,315,929, 4,322,348, 4,331,598, 4,361,650, 4,362,663, 4,364,866, 4,424,219, 4,371,533, 4,450,254, 5,475,092, 5,585,499, 5,846,545 및 6,333,410에 기술되어 있다.

[0035] 변형된 방향족 고리를 갖는 마이탄시노이드 유사체의 예는 (1) C-19-데클로로(미국 특허 4,256,746)(안사미토신 P2의 LAH에 의해 제조됨), (2) C-20-히드록시(또는 C-20-데메틸) +/-C-19-데클로로(미국 특허 4,361,650 및 4,307,016)(스트렙토마이세스 또는 악티노마이세스를 이용한 탈메틸화 또는 LAH를 이용한 탈염소화에 의해 제조됨), 및 (3) C-20-데메톡시, C-20-아실옥시(-OCOR), +/-데클로로(미국 특허 4,294,757)(아실 클로라이드를 이용한 아실화에 의해 제조됨)를 포함한다.

[0036] 방향족 고리 이외의 다른 포지션의 변형을 갖는 마이탄시놀 유사체의 예는 (1) C-9-SH(미국 특허 4,424,219)(마이탄시놀과 H₂S 또는 P₂S₅의 반응에 의해 제조됨), (2) C-14-알콕시메틸(데메톡시/CH₂OR)(미국 특허 4,331,598), (3) C-14-히드록시메틸 또는 아실옥시메틸(CH₂OH 또는 CH₂OAc)(미국 특허 4,450,254)(노카디아로부터 제조됨), (4) C-15-히드록시/아실옥시(미국 특허 4,364,866)(스트렙토마이세스에 의한 마이탄시놀의 전환에 의해 제조됨), (5) C-15-메톡시(미국 특허 4,313,946 및 4,315,929)(트레위아 머디폴로라로부터 분리됨), (6) C-18-N-데메틸(미국 특허 4,362,663 및 4,322,348)(스트렙토마이세스에 의한 마이탄시놀의 탈메틸화에 의해 제조됨), 및 (7) 4,5-데옥시(미국 특허 4,371,533)(마이탄시놀의 티타늄 트리클로라이드/LAH 환원에 의해 제조됨)를 포함한다.

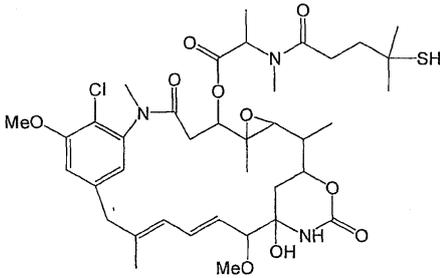
[0037] 본 발명의 바람직한 구현으로, 상기 접합체는 세포독성제로서 N^{2'}-데아세틸-N^{2'}-(3-머캅토-1-옥소프로필)-마이탄신으로도 알려진 티올-함유 마이탄시노이드 DM1을 이용한다. DM1의 구조는 화학식 (I)으로 표현된다.



(I)

[0038]

[0039] 본 발명의 다른 바람직한 구현으로, 상기 접합체는 세포독성제로서 N^{2'}-테아세틸-N^{2'}-(4-메틸-4-머캅토-1-옥소펜틸)-마이탄신으로도 알려진 티올-함유 마이탄시노이드 DM4를 이용한다. DM4의 구조는 화학식 (II)로 표현된다.



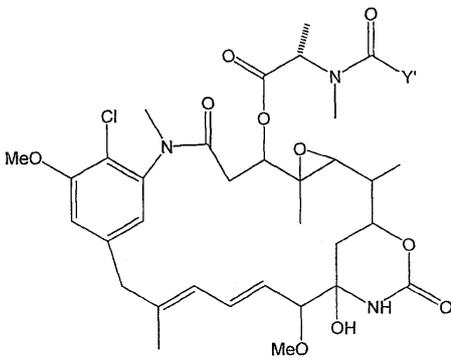
(II)

[0040]

[0041] 예를 들어, 황원자를 갖는 탄소원자상에 모노 또는 디-알킬 치환을 갖는 티올 및 디설피드-함유 마이탄시노이드를 포함하는 다른 마이탄신이 본 발명의 정황에 사용될 수 있다. 특히 바람직한 것은 C-3 포지션에 (a) C-14 히드록시메틸, C-15 히드록시, 또는 C-20 테메틸 작용기, 및 (b) 힌더드 설피드릴기를 갖는 아실화 아미노산 측쇄를 가지며, 여기서 상기 티올 작용기를 갖는 아실기의 탄소원자는 하나 또는 두 개의 치환체를 가지며, 상기 치환체는 CH₃, C₂H₅, 1-10 탄소원자를 갖는 선형 또는 분지형 알킬 또는 알케닐, 3-10 탄소원자를 갖는 시클릭 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐, 또는 헤테로시클릭 방향족 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이며, 또한 상기 치환체들 중 하나는 H일 수 있으며, 상기 아실기는 카보닐 작용기와 황 원자간에 적어도 3 탄소 원자의 선형 사슬 길이를 갖는 마이탄시노이드이다.

[0041]

[0042] 본 발명의 정황에 사용되는 부가적인 마이탄신은 화학식 (III)로 표현되는 화합물을 포함한다.



(III),

[0043]

[0044] 상기 식에서,

[0045] Y'는 (CR₇R₈)₁(CR₉=CR₁₀)_pC≡C_qA₀(CR₅R₆)_mD_u(CR₁₁=CR₁₂)_r(C≡C)_sB_t(CR₃R₄)_n-CR₁R₂SZ이며, 여기서 R₁ 및 R₂는 각각 독립적

으로 CH₃, C₂H₅, 1-10 탄소원자를 갖는 선형 알킬 또는 알케닐, 3-10 탄소원자를 갖는 분지형 또는 시클릭 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐, 또는 헤테로시클릭 방향족 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이며, 그리고 여기서 R₂는 또한 H일 수 있으며,

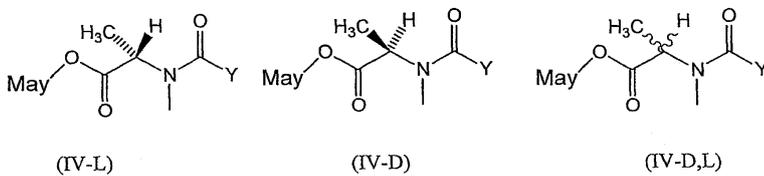
[0046] A, B, D는 3-10 탄소원자를 갖는 시클로알킬 또는 시클로알케닐, 단순 또는 치환된 아릴, 또는 헤테로시클릭 방향족, 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이며,

[0047] 여기서 R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁, 및 R₁₂는 각각 독립적으로 H, CH₃, C₂H₅, 1-10 탄소원자를 갖는 선형 알킬 또는 알케닐, 3-10 탄소원자를 갖는 분지형 또는 시클릭 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐, 또는 헤테로시클릭 방향족 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이며,

[0048] 여기서 l, m, n, o, p, q, r, s, 및 t는 각각 0 또는 1-5의 정수이며, 단 l, m, n, o, p, q, r, s 및 t 중에서 적어도 둘은 어느 때나 0이 아니며, 여기서 Z는 H, SR 또는 COR이며, 여기서 R은 1-10 탄소원자를 갖는 선형 알킬 또는 알케닐, 3-10 탄소원자를 갖는 분지형 또는 시클릭 알킬 또는 알케닐, 또는 단순 또는 치환된 아릴 또는 헤테로시클릭 방향족, 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이다.

[0049] 화학식 (III)의 바람직한 구현은 (a) R₁이 H이며, R₂가 메틸이며, 그리고 Z가 H인 경우, (b) R₁ 및 R₂가 메틸이며, 그리고 Z가 H인 경우, (c) R₁이 H이며, R₂가 메틸이며, 그리고 Z가 -SCH₃인 경우, 그리고 (d) R₁ 및 R₂가 메틸이며, 그리고 Z가 -SCH₃인 경우의 화학식 (III)의 화합물을 포함한다.

[0050] 이러한 부가적인 마이탄신들은 또한 화학식 (IV-L), (IV-D), 또는 (IV-D,L)로 표현된다.



[0051]

상기 식에서,

[0053] Y는 (CR₇R₈)_l(CR₅R₆)_m(CR₃R₄)_nCR₁R₂SZ이며,

[0054] 여기서 R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 CH₃, C₂H₅, 1-10 탄소원자를 갖는 선형 알킬, 또는 알케닐, 3-10 탄소원자를 갖는 분지형 또는 시클릭 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐, 또는 헤테로시클릭 방향족 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이며, 여기서 R₂는 또한 H일 수 있으며,

[0055] 여기서 R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, 및 R₈은 각각 독립적으로 H, CH₃, C₂H₅, 1-10 탄소원자를 갖는 선형 알킬 또는 알케닐, 3-10 탄소원자를 갖는 분지형 또는 시클릭 알킬 또는 알케닐, 치환된 페닐, 또는 헤테로시클릭 방향족 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이며,

[0056] 여기서 l, m, 및 n은 각각 독립적으로 1-5의 정수이며, 또한 n은 0일 수 있으며,

[0057] 여기서 Z는 H, SR, 또는 COR이며, 여기서 R은 1-10 탄소원자를 갖는 선형 또는 분지형 알킬 또는 알케닐, 3-10 탄소원자를 갖는 시클릭 알킬 또는 알케닐, 또는 단순 또는 치환된 아릴 또는 헤테로시클릭 방향족 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이며, 그리고

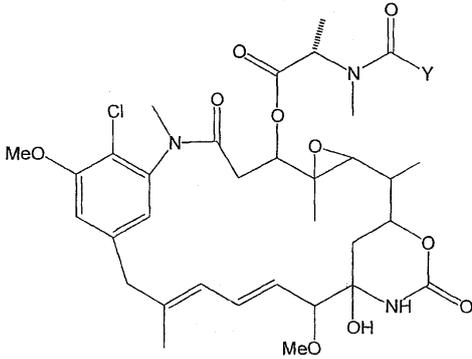
[0058] 여기서 May는 C-3, C-14 히드록시메틸, C-15 히드록시, 또는 C-20 메스메틸에 측쇄를 갖는 마이탄시노이드를 나타낸다.

[0059] 화학식 (IV-L), (IV-D) 및 (IV-D,L)의 바람직한 구현은 (a) R₁이 H이며, R₂가 메틸이며, R₅, R₆, R₇, 및 R₈은 각각 H이며, l 및 m은 각각 1이며, n은 0이며, 그리고 Z는 H인 경우, (b) R₁ 및 R₂는 메틸이며, R₅, R₆, R₇, R₈은 각각 H이며, l 및 m은 1이며, n은 0이며, 그리고 Z는 H인 경우, (c) R₁은 H이며, R₂는 메틸이며, R₅, R₆, R₇, 및 R₈은 각각 H이며, l 및 m은 각각 1이며, n은 0이며, 그리고 Z는 -SCH₃인 경우, 또는 (d) R₁ 및 R₂는 메틸이며, R₅, R₆, R₇, R₈은 각각 H이며, l 및 m은 1이며, n은 0이며, 그리고 Z는 -SCH₃인 경우의 화학식 (IV-L), (IV-D)

및 (IV-D,L)의 화합물들을 포함한다.

[0060] 바람직하게 상기 세포독성제는 화학식 (IV-L)로 표현된다.

[0061] 추가적인 바람직한 마이탄신은 또한 화학식 (V)로 표현되는 화합물을 포함한다.



(V)

[0062]

상기 식에서,

[0063]

[0064] Y는 $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$ 를 나타내며,

[0065]

여기서 R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 CH_3 , C_2H_5 , 1-10 탄소원자를 갖는 선형 알킬, 또는 알케닐, 3-10 탄소원자를 갖는 분지형 또는 시클릭 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐 또는 헤테로시클릭 방향족 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이며, 그리고 여기서 R_2 는 또한 H일 수 있으며,

[0066]

여기서 R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , 및 R_8 은 각각 독립적으로 H, CH_3 , C_2H_5 , 1-10 탄소원자를 갖는 선형 알킬 또는 알케닐, 3-10 탄소원자를 갖는 분지형 또는 시클릭 알킬 또는 알케닐, 치환된 페닐, 또는 헤테로시클릭 방향족 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이며,

[0067]

여기서 l, m, 및 n은 각각 독립적으로 1-5의 정수이며, 또한 n은 0일 수 있으며,

[0068]

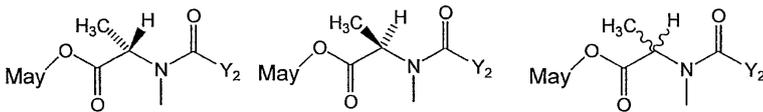
여기서 Z는 H, SR, 또는 COR이며, 여기서 R은 1-10 탄소원자를 갖는 선형 또는 분지형 알킬 또는 알케닐, 3-10 탄소원자를 갖는 시클릭 알킬 또는 알케닐, 또는 단순 또는 치환된 아릴 또는 헤테로시클릭 방향족 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이다.

[0069]

화학식 (V)의 바람직한 구현은 (a) R_1 이 H이며, R_2 가 메틸이며, R_5 , R_6 , R_7 , 및 R_8 은 각각 H이며, l 및 m은 각각 1이며, n은 0이며, 그리고 Z가 H인 경우, (b) R_1 및 R_2 는 메틸이며, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 은 각각 H이며, l 및 m은 1이며, n은 0이며, 그리고 Z는 H인 경우, (c) R_1 은 H이며, R_2 는 메틸이며, R_5 , R_6 , R_7 , 및 R_8 은 각각 H이며, l 및 m은 각각 1이며, n은 0이며, 그리고 Z는 $-SCH_3$ 인 경우, 또는 (d) R_1 및 R_2 는 메틸이며, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 은 각각 H이며, l 및 m은 1이며, n은 0이며, 그리고 Z는 $-SCH_3$ 인 경우의 화학식 (V)의 화합물들을 포함한다.

[0070]

보다 바람직한 마이탄신은 화학식 (VI-L), (VI-D) 또는 (VI-D,L)로 표현되는 화합물을 포함한다.



(VI-L)

(VI-D)

(VI-D, L),

[0071]

상기 식에서,

[0072]

[0073] Y_2 는 $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$ 이며,

[0074]

여기서 R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 CH_3 , C_2H_5 , 1-10 탄소원자를 갖는 선형 알킬, 또는 알케닐, 3-10 탄소원자를

갖는 분지형 또는 시클릭 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐, 또는 헤테로시클릭 방향족 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이며, 여기서 R₂는 또한 H일 수 있으며,

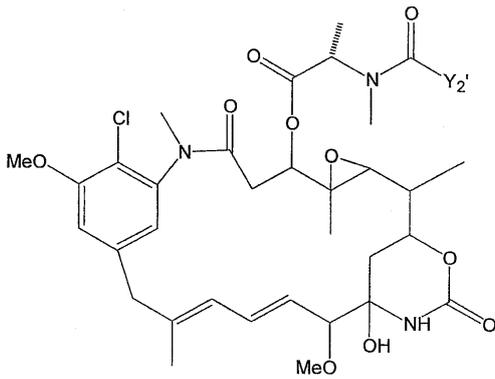
[0075] 여기서 R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, 및 R₈은 각각 독립적으로 H, CH₃, C₂H₅, 1-10 탄소원자를 갖는 선형 알킬 또는 알케닐, 3-10 탄소원자를 갖는 분지형 또는 시클릭 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐, 또는 헤테로시클릭 방향족 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이며,

[0076] 여기서 l, m, 및 n은 각각 독립적으로 1-5의 정수이며, 또한 n은 0일 수 있으며,

[0077] 여기서 Z는 H, SR, 또는 COR이며, 여기서 R은 1-10 탄소원자를 갖는 선형 알킬 또는 알케닐, 3-10 탄소원자를 갖는 분지형 또는 시클릭 알킬 또는 알케닐, 또는 단순 또는 치환된 아릴 또는 헤테로시클릭 방향족 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이며, 그리고

[0078] 여기서 May는 마이탄시노이드를 나타낸다.

[0079] 부가적인 바람직한 마이탄신은 화학식 (VII)로 표현되는 화합물을 포함한다.



(VII),

[0080]

상기 식에서,

[0082] Y₂는 (CR₇R₈)₁(CR₉=CR₁₀)_pC≡C_qA₀(CR₅R₆)_mD_u(CR₁₁=CR₁₂)_r(C≡C)_sB_t(CR₃R₄)_nCR₁R₂SZ₂이며,

[0083] 여기서 R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 CH₃, C₂H₅, 1-10 탄소원자를 갖는 선형 분지형 또는 알킬 또는 알케닐, 3-10 탄소원자를 갖는 시클릭 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐, 또는 헤테로시클릭 방향족 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이며, 여기서 R₂는 또한 H일 수 있으며,

[0084] 여기서 A, B, 및 D는 각각 독립적으로 3-10 탄소원자를 갖는 시클로알킬 또는 시클로알케닐, 단순 또는 치환된 아릴, 또는 헤테로시클릭 방향족 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이며,

[0085] 여기서 R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ 및 R₁₂는 각각 독립적으로 H, CH₃, C₂H₅, 1-10 탄소원자를 갖는 선형 알킬 또는 알케닐, 3-10 탄소원자를 갖는 분지형 또는 시클릭 알킬 또는 알케닐, 페닐, 치환된 페닐, 또는 헤테로시클릭 방향족 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이며,

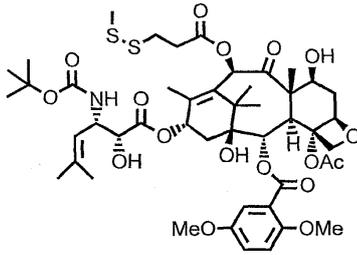
[0086] 여기서 l, m, n, o, p, q, r, s, 및 t는 각각 독립적으로 0 또는 1-5의 정수이며, 단, l, m, n, o, p, q, r, s 및 t 중에서 적어도 둘은 어느 때나 0이 아니며, 여기서 Z₂는 SR 또는 -COR이며, 여기서 R은 1-10 탄소원자를 갖는 선형 알킬 또는 알케닐, 3-10 탄소원자를 갖는 분지형 또는 시클릭 알킬 또는 알케닐, 또는 단순 또는 치환된 아릴 또는 헤테로시클릭 방향족, 또는 헤테로시클로알킬 라디칼이다.

[0087] 화학식 (VII)의 바람직한 구현은 R₁이 H이고 R₂가 메틸인 화학식 (VII)의 화합물을 포함한다.

[0088] 마이탄시노이드에 부가적으로, 상기 접합체에 사용되는 세포독성제는 탁산 또는 이의 유도체일 수 있다. 탁산은 파클리탁셀(Taxol®), 세포독성 천연 산물, 및 도세탁셀(Taxotere®), 반-합성 유도체를 포함하는 화합물류이며, 이들은 모두 암치료에 널리 사용된다. 탁산은 튜블린의 디폴리머화를 저해하여 세포 사멸을 일으키는 유사분열 스피indle 활성 억제제이다. 도세탁셀 및 파클리탁셀은 암 치료에 유용한 제제이나, 이들의 항종양

활성은 정상 세포에 대한 이들의 비-특이적 독성 때문에 제한된다. 또한, 파클리탁셀 및 도세탁셀과 같은 화합물 자체는 세포바인딩제의 접합체에 사용되기에 충분히 강력하지 못하다.

[0089] 세포독성 접합체의 제조에 사용되기에 바람직한 탁산은 화학식 (VIII)의 탁산이다.



(VIII)

[0090]

[0091] 항체와 같은 세포바인딩제에 탁산을 접합시키는 방법과 함께 본 발명의 정황에 사용될 수 있는 탁산 합성 방법은 미국 특허 5,416,064, 5,475,092, 6,340,701, 6,372,738, 6,436,931, 6,596,757, 6,706,708, 및 6,716,821, 및 미국 특허 출원 공개 제 2004/0024049 A1에 상세히 기재되어 있다.

[0092] 세포독성제는 또한 CC-1065 또는 이의 유도체일 수 있다. CC-1065는 스트렙토마이세스 젤렌시스(*Streptomyces zelensis*)의 배양액으로부터 분리된 강력한 항종양 항생물질이다. CC-1065는 독소루비신, 메소트렉세이트, 및 빈크리스틴과 같은 일반적으로 사용되는 항암 약물에 비해 시험관내에서 약 1000배 강하다(Bhuyan et al., *Cancer Res.*, 42: 3532-3537(1982)). CC-1065 및 그 유사체는 미국 특허 5,585,499, 5,846,545, 6,340,701 및 6,372,738에 기재되어 있다. CC-1065의 세포독성 효력은 이의 알킬화 활성 및 이의 DNA-바인딩 또는 DNA-상호작용 활성과 관련된다. 이러한 두 활성은 상기 분자의 별도 부분으로 존재한다. 이에 대해, 상기 알킬화 활성은 시클로프로파피롤로인돌(CPI) 서브유닛내에 함유되며, 상기 DNA-바인딩 활성은 CC-1065의 두 피롤로인돌 서브유닛내에 존재한다.

[0093] 여러 CC-1065 유사체가 당해 기술분야에 알려져 있으며, 접합체에 세포독성제로 사용될 수 있다(참조 예, Warpehoski et al., *J. Med. Chem.*, 31: 590-603(1988)). CPI 부가 시클로프로파벤즈인돌(CBI) 부로 대체된 일련의 CC-1065 유사체가 개발되었다(Boger et al., *J. Org. Chem.*, 55: 5823-5833(1990), 및 Boger et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1: 115-120(1991)). 이러한 CC-1065 유사체는 마우스에서 지연된 독성을 일으키지 않고 시험관내에서 모 약물의 고 효능을 유지한다. CC-1065와 같이, 이러한 화합물들은 DNA의 마이너 그루브에 공유적으로 바인딩하여 세포 사멸을 일으킨다.

[0094] CC-1065 유사체의 치료학적 효능은 종양 사이트로의 표적 운반을 통해 생체내 분포를 변화시킴으로써 크게 향상될 수 있으며, 이는 비-표적 조직에 대해 보다 낮은 독성을 일으켜 이에 따라 보다 낮은 전신성 독성을 일으킨다. 이에 따라, 종양 세포를 특이적으로 표적하는 세포바인딩제와 CC-1065의 유사체 및 유도체의 접합체가 생성되었다(참조 예, 미국 특허 5,475,092, 5,585,499, 및 5,846,545). 이러한 접합체는 전형적으로 시험관내에서 고 표적-특이 세포독성을 나타내며, 마우스에서 사람 종양 이종이식 모델에서 항종양 활성을 나타낸다(참조 예, Chari et al, *Cancer Res.*, 55: 4079-4084(1995)).

[0095] CC-1065 유사체를 합성하는 방법은 미국 특허 5,475,092, 5,585,499, 5,846,545, 6,534,660, 6,586,618, 및 6,756,397 및 미국 특허 출원 공개 제 2003/0195365 A1에 상세히 기재되어 있다.

[0096] 메소트렉세이트, 다우노루비신, 독소루비신, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 멜팔란, 미토마이신 C, 클로람부실, 칼리키아미신, 튜블리신 및 튜블리신 유사체, 듀오카마이신 및 듀오카마이신 유사체, 돌래스타틴 및 돌래스타틴 유사체와 같은 약물이 또한 본 발명의 정황에 사용될 수 있다. 독소루비신 및 다우노루비신 화합물(참조 예, 미국 특허 6,630,579)이 또한 약물로 사용될 수 있다.

[0097] 상기 약물 접합체는 시험관내 방법에 의해 제조될 수 있다. 약물 또는 프로드럭을 항체에 연결하기 위해, 연결기가 사용된다. 적절한 연결기가 당해 기술분야에 잘 알려져 있으며, 디설피드기, 산 분해성 기, 광 분해성 기, 펩티다아제 분해성 기, 및 에스테라아제 분해성 기를 포함한다. 바람직한 연결기는 디설피드기이다. 예를 들어, 접합체는 항체와 약물 또는 프로드럭 사이의 디설피드 교환 반응을 이용하여 제작될 수 있다. 약물 분자는 또한

혈청 알부민과 같은 매개 캐리어 분자를 통해 세포바인딩제에 연결될 수 있다.

[0098] 본 발명에 따라, 상기 세포바인딩제는 이작용성 가교제와 상기 세포바인딩제를 반응시킴으로써, 이에 따라 상기 세포바인딩제에 링커 분자의 공유 결합이 일어나 변형된다. 본 명세서에 사용된, "이작용성 가교제"는 본 명세서에 기재된 약물과 같은 약물에 세포바인딩제를 공유 결합시키는 어느 화학부이다. 본 발명의 바람직한 구현으로, 연결부 부분은 상기 약물에 의해 제공된다. 이와 관련하여, 상기 약물은 상기 약물에 세포바인딩제를 접합시키는데 사용되는 보다 큰 링커 분자의 일부인 연결부를 포함한다. 예를 들어, 마이탄시노이드 DM1을 형성하기 위해, 마이탄신의 C-3 히드록실기에서의 측쇄는 유리 설피드릴기(SH)를 갖도록 변형된다. 이러한 티오레이티드 형태의 마이탄신은 변형된 세포바인딩제와 반응하여 접합체를 형성할 수 있다. 따라서, 최종 링커는 두 성분으로부터 조립되며, 이 중 하나는 가교제에 의해 제공되며 다른 하나는 DM1의 측쇄에 의해 제공된다.

[0099] 링커 제제가 예를 들어, 각각 상기 약물과 세포바인딩제의 세포독성 및 표적 특성과 같이 상기 치료적 보유력을 제공하는 한 어느 적절한 이작용성 가교제가 본 발명과 관련하여 사용될 수 있다. 바람직하게, 상기 링커 분자는 약물과 세포바인딩제가 서로 화학적으로 결합되는 것과 같이(예, 공유 결합), 화학적 결합(상기한 바와 같이)을 통해 약물과 세포바인딩제를 접합시킨다. 바람직하게, 상기 연결 제제는 분할성 링커이다. 보다 바람직하게, 상기 링커는 온화한 조건하에서, 즉, 약물의 활성이 영향받지 않는 세포내 조건하에서 분할된다. 적절한 분할성 링커의 예는 디설피드 링커, 산분해성 링커, 광분해성 링커, 펩티다아제 분해성 링커, 및 에스테라제 분해성 링커를 포함한다. 디설피드 함유 링커는 디설피드 교환을 통해 분할가능한 링커이며, 이는 생리적 조건하에서 일어날 수 있다. 산분해성 링커는 산성 pH에서 분할가능한 링커이다. 예를 들어, 엔도솜 및 리소솜과 같은 특정 세포내 구획은 산성 pH(pH 4-5)를 가지며, 산분해성 링커를 분할하기에 적절한 조건을 제공한다. 광분해성 링커는 바디 표면에 그리고 광 접근가능한 다수의 바디 캐비티에서 유용하다. 또한, 적외선 광이 조직을 침투할 수 있다. 펩티다아제 분해성 링커가 특정 펩타이드 내부 또는 외부 세포를 분할하는데 사용될 수 있다(참조 예, Trouet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 626-629(1982), 및 Umemoto et al., Int. J. Cancer, 43: 677-684(1989)).

[0100] 바람직하게 상기 약물은 디설피드 결합을 통해 세포바인딩제에 연결된다. 상기 링커 분자는 상기 세포바인딩제와 반응할 수 있는 반응성 화학 기를 포함한다. 상기 세포바인딩제와의 반응에 바람직한 반응성 화학 기는 N-숙신이미딜 에스테르 및 N-설포숙신이미딜 에스테르이다. 또한 상기 링커 분자는 반응성 화학 기, 바람직하게 상기 약물과 반응하여 디설피드 결합을 형성할 수 있는 디티오피리딜 기를 포함한다. 특히 바람직한 링커 분자는 예를 들어, N-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(SPDP)(참조 예, Carlsson et al., Biochem. J., 173: 723-737(1978)), N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)부타노에이트(SPDB)(참조 예., 미국 특허 4,563,304), N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)펜타노에이트(SPP)(참조 예, CAS Registry number 341498-08-6), 및 본 명세서에 참고문헌으로 편입된 미국 특허 6,913,748에 기재된 다른 반응성 가교-링커를 포함한다.

[0101] 분할성 링커가 본 발명의 방법에 사용되나, 비-분할성 링커가 또한 상기한 접합체를 생성하는데 사용될 수 있다. 비-분할성 링커는 마이탄시노이드, 탁산, 또는 CC-1065 유사체와 같은 약물을 안정한 공유 방식으로 세포바인딩제에 연결할 수 있는 어느 화학 부이다. 따라서, 비-분할성 링커는 상기 약물 또는 세포바인딩제가 활성을 보유하는 조건에서 산-유도 분할, 광-유도 분할, 펩티다아제-유도 분할, 에스테라아제-유도 분할, 및 디설피드 결합 분할에 실질적으로 저항적이다.

[0102] 약물과 세포바인딩제간의 비-분할성 링커를 형성하는 적절한 가교제들은 당해 기술분야에 잘 알려져 있다. 비-분할성 링커의 예는 세포바인딩제와의 반응을 위한 N-숙신이미딜 에스테르 또는 N-설포숙신이미딜 에스테르 뿐만 아니라 상기 약물과의 반응을 위한 말레이미도- 또는 할로아세틸-계 부를 갖는 링커를 포함한다. 말레이미도계 부를 포함하는 가교제는 N-숙신이미딜 4-(말레이미도메틸)시클로헥산카르복실레이트(SMCC), SMCC의 "긴 사슬" 유사체(LC-SMCC)인 N-숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)-시클로헥산-1-카르복시-(6-아미도카프로에이트), κ -말레이미도운데카노익산 N-숙신이미딜 에스테르(KMUA), γ -말레이미도부티르산 N-숙신이미딜 에스테르(GMBS), ϵ -말레이미도카프로익산 N-히드록시숙신이미드 에스테르(EMCS), m-말레이미도벤조일-N-히드록시숙신이미드 에스테르(MBS), N-(α -말레이미도아세톡시)-숙신이미드 에스테르(AMAS), 숙신이미딜-6-(β -말레이미도프로피온아미도)헥사노에이트(SMPH), N-숙신이미딜 4-(p-말레이미도페닐)-부티레이트(SMPB), 및 N-(p-말레이미도페닐)이소시아네이트(PMPI)를 포함한다. 할로아세틸계 부를 포함하는 가교제는 N-숙신이미딜-4-(이오도아세틸)-아미노벤조에이트(SIAB), N-숙신이미딜 이오도아세테이트(SIA), N-숙신이미딜 브로모아세테이트(SBA), 및 N-숙신이미딜 3-(브로모아세트아미도)프로피오네이트(SBAP)를 포함한다.

[0103] 비-분할성 링커를 형성하는 황원자가 결여된 다른 가교제가 또한 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 이러한 링

커는 디카르복실산계 부로부터 유도될 수 있다. 적절한 디카르복실산계 부는 이에 한정하는 것은 아니나 일반 화학식 (IX)의 α, ω -디카르복실산을 포함한다.



[0105] (IX)

[0106] 상기 식에서, X는 2-20 탄소원자를 갖는 선형 또는 분지형 알킬, 알케닐 또는 알키닐기이며, Y는 3-10 탄소원자를 갖는 시클로알킬 또는 시클로알케닐기이며, Z는 6-10 탄소원자를 함유한 치환 또는 비치환 방향족기, 또는 헤테로 원자가 N, O 또는 S로부터 선택된 치환 또는 비치환 헤테로시클릭기이며, 그리고 여기서 1, m, 및 n은 각각 0 또는 1이며, 단, 1, m, 및 n은 동시에 모두 0은 아니다.

[0107] 본 명세서에 기재된 다수의 비-분할성 링커들은 미국 특허 출원 10/960,602(미국 특허 출원 공개 2005/0169933 A1)에 상세히 기재되어 있다. 택일적으로, 미국 특허 6,441,163 B1에 기재된 바와 같이 상기 약물은 세포바인딩제와 반응하기에 적절한 반응성 에스테르를 도입하기 위해 일차 변형될 수 있다. 세포바인딩제와 활성화 링커부를 함유하는 이러한 마이탄시노이드의 반응은 분할성 또는 비-분할성 세포바인딩제 마이탄시노이드 접합체를 생성하는 다른 방법을 제공한다. 마이탄시노이드, 이를 포함하는 세포독성제, 약물 접합체 및 관련 제조 방법에 관한 추가적인 정보는 미국 특허 출원 11/352,121 및 미국 특허 출원 10/849,136(미국 특허 출원 공개 2004/0235840 A1)에 기재되어 있다.

[0108] 하기 실시예는 본 발명을 보다 설명하나 이의 범위를 어느 방식으로 한정하려는 것은 아니다.

실시예

[0109] 실시예 1

[0110] 본 실시예는 TFF를 이용한 헤테로이작용성 변형제로 변형된 항체의 정제를 나타낸다.

[0111] huN901 모노클로날 항체(최종 농도 8mg/ml)를 N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)펜타노에이트(SPP, 5.6배 물 초과)로 약 189분간 20°C에서 50mM NaCl, 2mM EDTA, 및 5% 에탄올을 함유하는 50mM 포타슘 포스페이트 버퍼(pH 7.5)에서 배양하였다. 제 1 그룹으로, 반응 혼합물은 평형된 Sephadex™ G25F 수지 컬럼을 이용하여 정제되고, 50mM NaCl 및 2mM EDTA를 함유하는 50mM 포타슘 포스페이트 버퍼(pH 6.5)에서 용출되었다. 제 2 그룹으로, 반응 혼합물은 Pellicon XL TFF 시스템(Millipore, Billerica, MA)를 이용하여 정제되고, 항체는 10,000 분자량 컷 오프 멤브레인(Ultracel™ 재생 셀룰로오스 멤브레인, Millipore, Billerica, MA)을 이용하여 50mM 포타슘 포스페이트, 50mM NaCl(pH 6.5) 및 2mM EDTA내로 초여과되었다(5 볼륨). 두 시료는 모두 50mM NaCl 및 최종 농도 3% DMA를 함유하는 포타슘 포스페이트 버퍼에서 pH 6.5에서 18시간동안 DM1(바인딩되지 않은 링커보다 1.7배 물 초과)과 접합되었다.

[0112] 두 그룹 모두에서, 수율은 조합된 변형 및 정제 단계에 있어서 분광광도계로(280nm 파장) 측정되었다. 343nm에서 $8,080\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 의 흡광계수를 갖는 피리딘-2-티온을 방출시키는 디티오프레이틀 처리로 링커/항체 비율이 또한 측정되었다. 약물/항체 비율은 접합 단계에 있어서 분광광도계로(280nm 및 252nm 파장) 측정되었다. 또한, SPP-관련 소분자종의 제거는 Hisep HPLC에 의해 측정되었다.

[0113] 그 결과를 표 1에 나타내었다.

[0114] 표 1: G-25F 대 TFF를 이용한 변형 huN901 정제 방법

[0115]

		Sephadex™ G25F 수지	TFF
변형 단계	단계 수율	94%	98%
	링커/항체 비율	4.9	4.9
	SPP-관련 소분자	0.2%	0.2%
접합 단계	약물/항체 비율	3.7	3.7

[0116] 표 1에 나타낸 바와 같이, TFF의 사용은 비흡착성 크로마토그래피(G25) 공정과 적어도 동일한 질이면서도 보다

편리하고 계량가능한 약물 집합체 산물을 생성하였다.

[0117] 실시예 2

[0118] 본 실시예는 흡착 크로마토그래피를 이용한 헤테로이작용성 변형제로 변형된 항체의 정제를 나타낸다.

[0119] huB4 항체는 50mM NaCl, 2mM EDTA, 및 5% 에탄올을 함유하는 50mM 포타슘 포스페이트 버퍼(pH 6.5)에서 실온에서 120분간 N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)부타노에이트(SPDB, 5.4배 물 초과)로 변형되었다. 제 1 그룹으로, 반응 혼합물은 실시예 1에 기재된 Sephadex™ G25F 수지를 이용하여 정제되었다. 제 2 그룹으로, 반응 혼합물은 세라믹 히드록시아파타이트 컬럼(CHT, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)에 로딩되었으며, 이는 12.5mM 포타슘 포스페이트 버퍼(pH 6.5)로 평형되고 80mM 포타슘 포스페이트 버퍼(pH 6.5)로 용출되었다.

[0120] 두 그룹 모두에서 수율 및 링커/항체 비율은 실시예 1에 기재된 바와 같이 측정되었다. 제 1 그룹은 91% 수율 및 4.2 링커/항체 비율을 가졌다. 제 2 그룹은 89% 수율 및 4.2 링커/항체 비율을 가졌다.

[0121] CNT095 항체(최종 농도 10mg/ml)는 2.7% 수크로즈 및 5% 에탄올을 함유하는 10mM 소듐 포스페이트 버퍼(pH 7.5)에서 20°C에서 120분간 N-숙신이미딜 4-(2-피리딜디티오)부타노에이트(SPDB, 4.5배 물 초과)로 변형되었다. 제 1 그룹으로, 반응 혼합물은 12.5mM NaCl 및 0.5mM EDTA를 함유하는 12.5mM 포타슘 포스페이트 버퍼(pH 6.6)에서 Sephadex™ G25F 수지를 이용하여 정제되었다. 제 2 그룹으로, 반응 혼합물은 SP Sepharose Fast Flow 컬럼(GE Healthcare, Piscataway, NJ)에 로딩되었으며, 이는 10mM 소듐 포스페이트 버퍼(pH 7.5)로 평형되고 50mM NaCl을 함유하는 50mM 포타슘 포스페이트 버퍼(pH 7.5)로 용출되었다.

[0122] 두 그룹 모두에서, 수율 및 링커/항체 비율은 실시예 1에 기재된 바와 같이 검출되었다. 제 1 그룹은 96% 수율 및 4.0 링커/항체 비율을 가졌다. 제 2 그룹은 97% 수율 및 4.1 링커/항체 비율을 가졌다.

[0123] 본 실시예에서 얻어진 데이터는 흡착 크로마토그래피가 헤테로이작용성 변형제로 변형된 항체를 정제하는데 사용될 수 있음을 입증한다.

[0124] 실시예 3

[0125] 본 실시예는 pH 6.5 이상에서 약물과 변형 항체를 접합시키는 유익한 효과를 나타낸다.

[0126] 제 1 실험으로, CNT095 항체를 실시예 2에 기재된 바와 같이 변형하고 정제하였다. 변형된 항체는 그 다음 두 그룹으로 나뉘었다. 제 1 그룹에서 접합은 12.5mM NaCl, 0.5mM EDTA, 3% DMA, 및 링커당 1.7 배 물 초과 약물을 함유하는 12.5mM 포타슘 포스페이트(pH 6.5)에서 20°C에서 수행되었다. 제 2 그룹에서, 접합 반응은 pH 7.5에서 수행되었다. 접합된 항체는 NAP-10 컬럼에 걸쳐 정제되었다.

[0127] 약물/항체 비율은 두 그룹 모두에 대해 측정되었다. 그 결과 데이터를 표 2에 나타내었다.

[0128] 표 2: pH 6.5 대 7.5의 접합 반응시 약물/항체 비율

[0129]

반응 시간(hours)	접합 반응 pH 6.5에서의 약물/항체 비율	접합 반응 pH 7.5에서의 약물/항체 비율
0.5	-	3.0
1	2.3	3.4
1.5	--	3.5
2	2.8	3.5
2.75	-	3.6
3.5	3.2	3.6
5	3.4	3.7

[0130] 표 2에 데이터로 나타낸 바와 같이, 접합은 pH 6.5에서보다 pH 7.5에서 보다 신속히 진행된다.

[0131] 제 2 실험으로, huB4 인간화 모노클로날 항체는 (a) 항체에 비해 4.9배 물 초과 SPDB 또는 (b) 항체에 비해 4.8배 물 초과 SPDB로 변형되었다. 양 상황에서, 반응은 5% 에탄올에 담긴 50mM 포타슘 포스페이트, 50mM 포타슘 클로라이드, 및 2mM EDTA(pH 6.5)에서 실온에서 총 120분간 수행되었다. 시료 (a)는 pH 6.5에서 50mM 포타슘 포스페이트, 50mM 소듐 클로라이드, 및 2mM EDTA에서 평형된 Sephadex™ G25F 수지 컬럼에 걸쳐 정제되었다. 시료 (b)는 크로마토그래피 버퍼가 pH 7.5로 적정된 것을 제외하고 동등하게 정제되었다. 양 시료는 최종 농도 디메틸아세트아미드(DMA) 3%에서 실온에서 18시간동안 DM4(바인딩된 링커에 비해 1.7배 물 초과)로 접합되었다.

[0132] 따라서, 시료 (a)는 pH 6.5에서 접합되었고, 시료 (b)는 pH 7.5에서 접합되었다. 그 다음 상기 시료들은 pH 6.5에서 9.6mM 포타슘 포스페이트 및 4.2mM 소듐 클로라이드로 평형된 Sephadex™ G25F 수지 컬럼으로 정제되었다. 두 시료는 모두 4℃에서 7개월까지 배양되었고, 간격을 두고 방출 유리 약물을 분석하였다. 그 결과 데이터를 표 3에 나타내었다.

[0133] 표 3 - pH 6.5 및 7.5에서 접합된 시료로부터 시간에 걸친 유리 약물의 방출

시간(개월)	pH 6.5 접합	pH 7.5 접합
0	1.0	0.8
1.5	1.8	1.0
2.5	3.2	1.9
7	4.0	2.8

[0135] 표 3에 데이터로 나타낸 바와 같이, 유리 약물의 방출은 pH 6.5에서 접합된 시료 (a)에 비해 pH 7.5에서 접합된 시료 (b)에서 실질적으로 보다 느렸다. 따라서, pH 7.5에서 제조된 약물 접합체 산물은 pH 6.5에서 제조된 약물 접합체 산물에 비해 시간에 걸친 방출과 관련하여 보다 안정한 것으로 나타났다. pH 7.5에서의 접합은 또한 pH 6.5에서보다 보다 나은 약물 편입을 보여, 이에 따라 사용되는 약물이 보다 적게 요구된다.

[0136] 실시예 4

[0137] 본 실시예는 pH 6.0이하에서 변형 항체와 약물을 접합시키는 유익한 효과를 나타낸다.

[0138] huN901 모노클로날 항체(최종 농도 8mg/ml)를 50mM NaCl, 2mM EDTA, 및 5% 에탄올을 함유하는 50mM 포타슘 포스페이트 버퍼(pH 7.5)에서 N-숙신이미딜 4-(2-피리디닐디티오)헨타노에이트(SPP, 5.6배 물 초과)와 함께 약 180분간 20℃에서 배양하였다. 제 1 그룹으로, 반응 혼합물은 50mM NaCl 및 2mM EDTA를 함유하는 50mM 소듐 시트레이트 버퍼(pH 5.0)에서 평형되고 용출된 Sephadex™ G25F 수지 컬럼을 이용하여 정제되었다. 제 2 그룹으로, 반응 혼합물은 50mM NaCl 및 2mM EDTA를 함유하는 50mM 포타슘 포스페이트 버퍼(pH 6.5)에서 평형되고 용출된 Sephadex™ G25F 수지 컬럼을 이용하여 정제되었다. 두 시료는 모두 최종 농도 디메틸아세트아미드(DMA) 3%에서 실온에서 3, 19, 25, 48, 및 120시간동안 DM4(바인딩된 링커에 비해 1.7배 물 초과)와 접합되었다.

[0139] 따라서, 제 1 그룹의 시료는 50mM NaCl 및 2mM EDTA를 함유하는 50mM 소듐 시트레이트 버퍼(pH 5.0)에서 접합되었으며, 제 2 그룹의 시료는 50mM NaCl 및 2mM EDTA를 함유하는 50mM 소듐 포스페이트 버퍼(pH 6.5)에서 접합되었다. 그 다음 시료들은 50mM NaCl을 함유하는 50mM 포타슘 포스페이트 버퍼(pH 6.5)에서 평형 및 용출된 Sephadex™ G25F 수지 컬럼을 이용하여 정제되었다.

[0140] 두 그룹 모두에서, 링커/항체 비율은 343nm에서 $8,080\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 의 흡광계수를 갖는 피리딘-2-티온을 방출시키는 디티오프레이트 처리에 의해 측정되었다. 약물/항체 비율은 접합 단계에 있어서 분광광도계로(280nm 및 252nm 파장) 측정되었다.

[0141] 제 1 그룹은 4.3 링커/항체 비율을 가졌다. 제 2 그룹은 4.2 링커/항체 비율을 가졌다.

[0142] 두 그룹에 대한 시간에 걸친 약물/항체 비율을 표 4에 나타내었다.

[0143] 표 4: 접합 pH의 상관 관계로서 SPP-변형 huN901내로의 DM1 편입율

[0144]

반응 시간(시간)	약물/항체 비율(mol/mol)	
	pH 5.0 접합	pH 6.5 접합
3	2.43	2.97
19	3.38	3.28
25	3.41	NT
48	3.46	3.17
120	3.44	2.85

[0145] 표 4에 나타낸 데이터로부터 알 수 있는 바와 같이, pH 5.0에서 변형 항체와 약물을 접합하여 제조된 접합체는 pH 6.5에서 접합이 이루어진 접합체보다 접합 반응 코스 도중에 보다 높고 보다 안정한 결합 약물 수준을 달성한다. 증가된 안정성에 부가적으로, 상기 결과는 보다 높은 약물/항체 수준은 pH 6.5의 접합에서 동일한 양의 약물을 이용하는 경우에 비해 pH 5.0에서 접합되는 경우에 달성됨을 보여주며, 이에 따라 pH 5.0에서 약물이 보다 효율적으로 사용됨을 보여준다.

[0146] 두 그룹 모두에서, 접합체 모노머 양은 시간에 걸쳐 검출되었다. 그 결과 데이터를 표 5에 나타내었다.

[0147] 표 5: SPP-변형 huN901과 DM1의 접합 도중 접합 pH가 접합체 모노머 수준에 미치는 영향

[0148]

반응 시간(시간)	접합체 단량체(%)	
	pH 5.0 접합	pH 6.5 접합
3	98.5	98.0
19	98.8	98.2
25	99.1	NT
48	99.2	98.3
120	99.2	97.3

[0149] 표 5에 나타낸 데이터로부터 알 수 있는 바와 같이, pH 5.0에서 변형 항체와 약물의 접합에 의해 제조된 접합체는 pH 6.5의 접합 pH에서 이루어진 접합체보다 보다 높은 수준의 접합체 모노머를 갖는다.

[0150] 실시예 5

[0151] 본 실시예는 pH 6미만에서 변형 항체에 약물을 접합시키는 잇점을 더욱 나타낸다.

[0152] BIWA 4 항체는 50mM 포타슘 포스페이트 버퍼(pH 6.5), 50mM NaCl, 2mM EDTA, 및 5% 에탄올에서 실온에서 120-140분간 SPP(표 6에 나타낸 바와 같이 물 초과 SPP)로 변형되었다. 변형 항체 분액을 다양한 pH 값(pH 4.6-6.5)을 갖는 버퍼에서 평형된 각 NAP 25 컬럼에서 정제되었다. pH 4.6-5.9 버퍼는 35mM 소듐 시트레이트, 150mM 소듐 클로라이드, 및 2mM EDTA로 구성되었다. pH 6.5 버퍼는 2mM EDTA를 함유한 PBS이었다.

[0153] 각 pH에서 변형된 항체는 디메틸아세트아미드(DMA, 최종 농도 3%)에서 DM1(링커에 비해 1.7배 물 초과)과 접합되었다. 실온에서 17-18시간동안 배양 후, 접합된 항체 시료를 PBS(pH 6.5)에서 평형된 NAP 25 컬럼에서 크로마토그래피로 정제하였다. 링커/항체 비율(표 6에서 L/A)은 343nM에서 $8,080M^{-1}cm^{-1}$ 의 흡광계수를 갖는 피리딘-2-티온을 방출시키는 디티오프레이트 처리에 의해 측정되었다. 약물/항체 비율은 접합 단계에 있어서 분광광도계로(280nm 및 252nm 파장) 측정되었다. 접합체 모노머, 고분자량종, 및 저분자량종은 0.2M 포타슘 클로라이드 및 20% 이소프로판올을 함유하는 0.2M 포타슘 포스페이트 버퍼(pH 7.0)에서 평형 및 디벨로핑된 TSKG3000SWXL 컬럼을 이용한 SEC-HPLC에 의해 검출되었다.

[0154] 그 분석 결과를 표 6에 나타내었다.

[0155] 표 6: pH와 관련된 약물 접합체 산물 특성

버퍼	SPP 몰 초과	L/A	D/A	모노머(%)	고 MW(%)	저 MW(%)	접합 단계 수율(%)
pH 4.6	4.7	3.8	3.6	97.5	2.2	0.4	74
pH 5.1	4.4	4.7	3.6	97.6	1.9	0.6	75
pH 5.6	5.0	4.9	3.6	97.7	1.5	0.8	85
pH 5.9	5.5	5.3	3.7	96.4	2.3	1.4	76
pH 6.5	6.6	6.4	3.7	95.1	2.8	1.9	71

[0157] 표 6에 나타난 데이터는 SPP-변형 BIWA 4와 DM1의 접합이 pH 6.5에서의 접합에 비해 pH 6.0이하에서 효율적임을 나타낸다. 특정 최종 약물/항체에 이르는 링커와 약물의 양, 특히 SPP 링커와 DM1의 양은 보다 낮은 pH에서 감소하였다. 또한, 보다 낮은 pH에서 접합체 모노머, 고분자량종, 및 저분자량종의 수준이 보다 최적이었으며, 수율이 향상되었다.

[0158] 실시예 6

[0159] 본 실시예는 변형 항체 정제 단계가 임의로 생략될 수 있음을 나타낸다. 상기 약물은 이작용성 변형체와 동시에 첨가되거나 다소 늦은 시기에 첨가될 수 있다.

[0160] 변형체 다음에 약물을 첨가하는 예로, 인산화 모노클로날 항체 CNT095는 20°C에서 120분간 항체에 걸쳐 4.6 몰 초과와 SPDB에서 이작용성 변형체 SPDB와 20mg/mL의 농도로 변형되었다. 변형 버퍼는 5.3% 수크로즈 및 5% 에탄올을 함유하는 44mM 포스페이트 버퍼(pH 7.5)이었다. 변형 항체의 한 분액은 12.5mM NaCl을 함유하는 12.5mM 포타슘 포스페이트 버퍼(pH 7.5)에서 평형 및 용출된 Sephadex™ G25F 수지(표준 4-단계 공정)에 걸쳐 정제되었으며, 후속적으로 실온에서 20시간동안 12.5mM NaCl 및 10% DMA를 함유하는 12.5mM 포타슘 포스페이트 버퍼(pH 7.5)에서 최종 변형 항체 농도 10mg/mL에서 DM4(바인딩된 링커에 비해 1.7배 몰 초과 약물)와 접합되었다. 변형 항체의 제 2 분액은 추가 정제없이 120분 변형 반응의 마지막에 즉시 접합되었다(3단계 공정).

[0161] 변형 반응 혼합물의 단백질 및 버퍼 농도는 10mg/mL의 변형 단백질 농도 및 5.9mM NaCl 및 2.7% 수크로즈를 함유하는 28mM 포타슘 포스페이트(pH 7.5)의 버퍼 조성을 수득하도록 조절되었다. 그 다음 DM4를 첨가하고(출발 SPDB에 비해 1.7배 몰 초과), DMA를 최종 농도 10%로 조절하였다. 실온에서 20시간 배양 후, 접합 항체의 두 분액을 pH 5.5에서 10mM 히스티딘 및 10% 수크로즈에서 평형된 Sephadex™ G25F 수지에서 정제되었다.

[0162] 링커/항체 비율(L/A)은 343nM에서 8,080M⁻¹cm⁻¹의 흡광계수를 갖는 피리딘-2-티온을 방출시키는 디티오프레이틀 처리에 의해 측정되었다. 약물/항체(D/A) 비율 및 수율은 접합 단계에 있어서 분광광도계로(280nm 및 252nm 파장) 측정되었다. 모노머의 퍼센트는 SEC-HPLC에 의해 검사되었다. 유리 약물의 퍼센트는 Hisep 컬럼에서 HPLC에 의해 검사되었다. 이러한 분석 결과를 표 7에 나타내었다.

[0163] 표 7: 변형 항체에 대한 정제 단계의 임의적 생략

파라미터	4-단계 공정	3-단계 공정
출발 SPDB	4.6 x	4.6 x
L/A	4.1	무검출
D/A	3.9	4.0
수율	79%	91%
% 모노머	95.8%	96.1%
% 유리 약물	2.4%	1.1%

[0165] 표 7에 나타난 결과에 의해 입증된 바와 같이, 변형 항체를 정제하는 단계는 본 발명의 정황에서 생략될 수 있다.

[0166] 실시예 7

[0167] 본 실시예는 헤테로이작용성 변형제로 변형된 다음 마이탄시노이드로 접합된 항체를 정제하는 향상된 수단을 나타낸다.

[0168] 실시예 1에 기재한 바와 같이, SPP(7배 물 초과)로 변형되고 Sephadex™ G25F 수지에서 정제된 huN901 항체를 마이탄시노이드 DM1(3% 최종 농도 디메틸아세트아미드(DMA)에 용해된, 링커에 비해 1.7배 물 초과)과 접합하였다.

[0169] 제 1 접합체 시료를 포스페이트 완충 염수(PBS, pH 6.5)에서 Sephadex™ G25F 수지상의 표준 크로마토그래피에 의해 정제하였다.

[0170] 제 2 접합체 시료는 실시예 1에 기재된 바와 같이 Pellicon XL TFF 시스템(Millipore, Billerica, MA)에 의해 정제하였다.

[0171] 제 3 접합체 시료는 50mM Tris(pH 8.0)에서 평형되고, 50mM 소듐 아세테이트(pH 4.0)으로 용출된 MEP Hypercell 수지 컬럼을 이용하여 정제하였다.

[0172] 제 4 접합체 시료는 50mM 소듐 포스페이트(pH 6.5)에서 평형되고, 0.2M NaCl 및 50mM 소듐 포스페이트(pH 6.5)로 용출된 UNOsphere S 수지 컬럼을 이용하여 정제하였다.

[0173] 제 5 접합체 시료는 50mM 소듐 포스페이트(pH 6.5)에서 평형되고, 0.3M NaCl 및 50mM 소듐 포스페이트(pH 6.5)로 용출된 CHT 수지(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 컬럼을 이용하여 정제하였다.

[0174] 제 6 접합체 시료는 35mM 소듐 시트레이트, 10mM 소듐 클로라이드(pH 5.0)에서 평형되고 0.25M NaCl, 35mM 소듐 시트레이트(pH 5.0)로 용출된 SP Sepharose 수지 컬럼을 이용하여 정제되었다.

[0175] 접합체 모노머는 0.2M 포타슘 클로라이드 및 20% 이소프로판올을 함유하는 pH 7.0의 0.2M 포타슘 포스페이트 버퍼에서 평형 및 디벨로핑된 TSKG3000SW_{XL} 수지 컬럼을 이용하여 SEC-HPCL에 의해 검출되었다. 접합 단계 수율은 접합된 항체의 수율을 (280nm 파장에서 분광 광도계로 측정된) 접합된 변형 항체의 양으로 나누어 검출되었다.

[0176] 이러한 분석 결과를 표 8에 나타내었다.

[0177] 표 8: 접합 정제 단계 비교

접합체 시료	접합 정제 단계	접합체 모노머 %	단계 수율 %
1(대조군)	G25F 수지	93.2	86
2(발명예)	TFF	92.8	85
3(발명예)	MEP Hypercell 수지	94.5	74
4(발명예)	UNOsphere 수지	96.3	81
5(발명예)	CHT 수지	97.9	72
6(발명예)	SP Sepharose 수지	95.1	81

[0179] 표 8의 결과는 본 발명의 정제 방법 모두(그룹 2-6)는 대조군(그룹 1)으로 획득된 수율과 유사한 수율을 제공하였다. 각 본 발명의 크로마토그래프 방법은 접합체 모노머의 수준 향상을 생성하였으며 정률증가하는 경향이 있다.

[0180] CHT(세라믹 히드록시아파타이트)에 부가적으로, CFT(세라믹 플루오로아파타이트)가 유사한 크로마토그래프 조건

하에서 사용될 수 있다. 택일적으로 원하는 산물(실질적으로 모노머성 접합체)은 상기 수지에 의해 보유되지 않으나, 고분자량종이 보유되어 이에 따라 원하는 산물로부터 분리되도록 CHT 및 CFT 수지 모두 비-흡착 방식으로 사용될 수 있다.

[0181] 접합을 위한 표준 버퍼/용매 조성물은 (실시에 1에서 사용된 것과 같이) pH 6.5의 3% DMA, 50mM 포타슘 포스페이트, 50mM NaCl, 및 2mM EDTA를 포함하나, 다른 조성물이 본 명세서에 기술한 일부 크로마토그래프 단계에 더욱 호환될 수 있으며, 표준 방법에 비해 다른 잇점을 제공한다. 예를 들어, 접합은 pH 6.5에서 3% DMA, 12.5mM 포타슘 포스페이트, 12.5mM NaCl, 및 0.5mM EDTA에서 수행될 수 있다. 이러한 조건하에서, huB4 항체에 편입된 링커의 양에 비해 편입된 DM4의 양은 표준 조건에 비해 약 10% 높았다. 또한, 이러한 조건은 양이온 교환 및 CHT 수지와 같이 수지상의 로딩과 호환될 수 있다.

[0182] 본 명세서에 인용된 간행물, 특허출원, 및 특허를 포함하는 모든 참고문헌은 각 참고문헌이 참고문헌에 의해 편입되는 것으로 각각 그리고 명확히 표시되고 본 명세서에 그 전체를 나타낸 정도로 참고문헌으로 편입된다.

[0183] 본 발명을 설명하는 정황에 있어서, 용어 "a" 및 "an" 및 "the"의 사용은 본 명세서에 달리 표기하지 않는 한 또는 정황상 명확히 반대되는 것을 나타내지 않는한 단수 및 복수 모두를 포함하는 것으로 간주된다. 용어 "포함하는(comprising)", "갖는(having)", 및 "포함하는(including)"은 달리 표기하지 않는한 개방된 용어(즉, "한정하는 것은 아니나, .. 포함하는")로 간주된다. 본 명세서에서 수치 범위의 열거는 달리 표기하지 않는 한, 단지 그 범위내에 있는 각 개별적 수치에 대해 각각 언급하는 속기법으로 제공하는 것으로 의도되며, 각 개별적 수치는 마치 본 명세서에 각각 언급된 것과 같이 명세서에 포함되는 것으로 의도된다. 본 명세서에 언급된 모든 방법은 본 명세서에 달리 표기하지 않는 한 또는 그렇지 않으면 명확히 정황상 상반되지 않는 한 어느 적절한 순서로 수행될 수 있다. 본 명세서에 제공된 어느 그리고 모든 예, 또는 예시적인 언어(예, "와 같은")의 사용은 본 발명을 보다 명백히 하기 위한 것일 뿐 달리 청구하지 않는 한 본 발명의 범위에 제한을 두려는 것은 아니다. 본 명세서에서 어느 비-청구된 요소가 본 발명의 수행에 필수적인 것으로 나타내는 언어는 없는 것으로 간주된다.

[0184] 본 발명을 수행하기 위해 본 발명자에게 알려진 최적 모드를 포함하는 본 발명의 바람직한 구현이 본 명세서에 기재된다. 이러한 바람직한 구현의 변형은 앞선 설명을 읽을 경우 당해 기술분야의 통상의 기술을 가진 자에게 자명해질 수 있다. 본 발명자들은 숙련자는 이러한 변형을 적절히 이용할 것으로 기대하며, 본 발명자들은 본 명세서에 특정적으로 기재된 것과 달리 실행되는 것을 의도한다. 따라서, 본 발명은 적용가능한 법에 의해 인정되는 것으로 여기에 첨부된 청구범위에 언급된 대상의 모든 변형 및 등가물을 포함한다. 더욱이, 이들의 모든 가능한 변형에서 상기 요소들의 어느 조합이 본 명세서에 달리 표기하지 않는 한 또는 그렇지 않으면 정황상 명확히 상반되지 않는 한 본 발명에 의해 포함된다.