



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0036889
(43) 공개일자 2020년04월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 307/52 (2006.01) *A61K 31/341* (2006.01)
A61K 31/4375 (2006.01) *A61K 31/443* (2006.01)
A61K 31/4709 (2006.01) *A61P 1/16* (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01) *C07D 405/12* (2006.01)
C07D 405/14 (2006.01) *C07D 407/12* (2006.01)
C07D 471/04 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07D 307/52 (2013.01)
A61K 31/341 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7005246
- (22) 출원일자(국제) 2018년07월26일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2020년02월24일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2018/070289
- (87) 국제공개번호 WO 2019/020745
 국제공개일자 2019년01월31일
- (30) 우선권주장
 17183667.9 2017년07월28일
 유럽특허청(EPO)(EP)
- (71) 출원인
에프. 호프만-라 로슈 아게
 스위스 체하-4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124
- (72) 발명자
파스트 요나스
 스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호프만-라 로슈 아게
파울루스 안야 사라
 스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호프만-라 로슈 아게
- (74) 대리인
제일특허법인(유)

전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **이중특이성 항체 제형**

(57) 요약

본 발명은 중앙태아성 항원(CEA) 및 CD3에 결합하는 이중특이성 항체의 약학 제형, 상기 제형의 제조 방법 및 용도에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 31/4375 (2013.01)
A61K 31/443 (2013.01)
A61K 31/4709 (2013.01)
A61P 1/16 (2018.01)
A61P 3/10 (2018.01)
C07D 405/12 (2013.01)
C07D 405/14 (2013.01)
C07D 407/12 (2013.01)
C07D 471/04 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

4.0 내지 7.0의 pH로

1 내지 200 mg/mL의 CEA CD3 이중특이성 항체;

1 내지 100 mM의 완충제;

0.001 내지 1%(w/v)의 계면활성제; 및

1 내지 500 mM의 하나 이상의 안정화제

를 포함하는 약학 제형.

청구항 2

제1항에 있어서,

CEA CD3 이중특이성 항체의 농도가 1 내지 100 mg/mL인, 약학 제형.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

완충제가 히스티딘 완충제인, 약학 제형.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

완충제의 농도가 10 내지 50 mM인, 약학 제형.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

완충제가 5.0 내지 6.0의 pH를 제공하는, 약학 제형.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

계면활성제가 폴리솔베이트인, 약학 제형.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

계면활성제의 농도가 0.01 내지 0.1%(w/v)인, 약학 제형.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

하나 이상의 안정화제가 염, 사카라이드 및 아미노산의 군으로부터 선택되는, 약학 제형.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

하나 이상의 안정화제의 농도가 120 내지 300 mM인, 약학 제형.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,
 염, 사카라이드 및 아미노산의 군으로부터 선택되는 제1 안정화제; 및
 메티오닌인 제2 안정화제
 를 포함하는 약학 제형.

청구항 11

제10항에 있어서,
 제1 안정화제의 농도가 120 내지 300 mM이고;
 제2 안정화제의 농도가 5 내지 25 mM인, 약학 제형.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,
 5.5±0.5의 pH로
 5 내지 50 mg/mL의 CEA CD3 이중특이성 항체;
 15 내지 30 mM의 L-히스티딘;
 0.02 내지 0.05%(w/v)의 폴리솔베이트 20;
 120 내지 300 mM의 수크로스; 및
 임의적으로 5 내지 25 mM의 메티오닌
 을 포함하는 약학 제형.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,
 5.5의 pH로, 50 mg/mL의 CEA CD3 이중특이성 항체, 20 mM의 L-히스티딘, 0.05%(w/v)의 폴리솔베이트 20, 230 mM의 수크로스 및 10 mM의 메티오닌;
 5.5의 pH로, 20 mg/mL의 CEA CD3 이중특이성 항체, 20 mM의 L-히스티딘, 0.05%(w/v)의 폴리솔베이트 20, 240 mM의 수크로스 및 10 mM의 메티오닌; 또는
 5.5의 pH로, 5 mg/mL의 CEA CD3 이중특이성 항체, 20 mM의 L-히스티딘, 0.05%(w/v)의 폴리솔베이트 20, 240 mM의 수크로스 및 10 mM의 메티오닌
 을 포함하는 약학 제형.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,
 5.5±0.5의 pH로
 50 mg/mL의 CEA CD3 이중특이성 항체;
 20 mM의 L-히스티딘;
 0.05(w/v)의 폴리솔베이트 20;
 230 mM의 수크로스; 및
 10 mM의 메티오닌

을 포함하는 약학 제형.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

CEA CD3 이중특이성 항체가

(i) CD3에 특이적으로 결합하고, 서열번호 1의 중쇄 CDR(HCDR)1, 서열번호 2의 HCDR2 및 서열번호 3의 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변부, 및 서열번호 4의 경쇄 CDR(LCDR)1, 서열번호 5의 LCDR2 및 서열번호 6의 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변부를 포함하는 제1 항원 결합 잔기; 및

(ii) CEA에 특이적으로 결합하고, 서열번호 9의 중쇄 CDR(HCDR)1, 서열번호 10의 HCDR2 및 서열번호 11의 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변부, 및 서열번호 12의 경쇄 CDR(LCDR)1, 서열번호 13의 LCDR2 및 서열번호 14의 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변부를 포함하는 제2 항원 결합 잔기

를 포함하는, 약학 제형.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

CEA CD3 이중특이성 항체가 CEA 및/또는 제1 아단위 및 제2 아단위로 구성되는 Fc 도메인에 특이적으로 결합하는 제3 항원 결합 잔기를 포함하는, 약학 제형.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

CEA CD3 이중특이성 항체가

(i) CD3에 특이적으로 결합하고, 서열번호 1의 중쇄 CDR(HCDR)1, 서열번호 2의 HCDR2 및 서열번호 3의 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변부, 및 서열번호 4의 경쇄 CDR(LCDR)1, 서열번호 5의 LCDR2 및 서열번호 6의 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변부를 포함하는 제1 항원 결합 잔기로서, Fab 경쇄 및 Fab중쇄의 가변부 또는 불변부, 특히 불변부가 교환되는 교차 Fab 분자인 제1 항원 결합 잔기; 및

(ii) CEA에 특이적으로 결합하고, 서열번호 9의 중쇄 CDR(HCDR)1, 서열번호 10의 HCDR2 및 서열번호 11의 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변부, 및 서열번호 12의 경쇄 CDR(LCDR)1, 서열번호 13의 LCDR2 및 서열번호 14의 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변부를 포함하는 제2 항원 결합 잔기 및 제3 항원 결합 잔기로서, 각각이 Fab 분자, 특히 통상적인 Fab 분자인 제2 항원 결합 잔기 및 제3 항원 결합 잔기; 및

(iii) 제1 아단위 및 제2 아단위로 구성되는 Fc 도메인

을 포함하되, 상기 제2 항원 결합 잔기가 Fab 중쇄의 C-말단에서 상기 제1 항원 결합 잔기의 Fab 중쇄의 N-말단에 융합되고, 제1 항원 결합 잔기가 Fab 중쇄의 C-말단에서 상기 Fc 도메인의 제1 아단위의 N-말단에 융합되고, 상기 제3 항원 결합 잔기가 Fab 중쇄의 C-말단에서 상기 Fc 도메인의 제2 아단위의 N-말단에 융합된, 약학 제형.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

액체 형태, 동결건조 형태 또는 동결건조 형태로부터 재구성된 액체 형태인 약학 제형.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따른 제형의 암 치료에 유용한 약물의 제조를 위한 용도.

청구항 20

진술한 본 발명.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 종양태아성 항원(CEA) 및 CD3에 결합하는 이중특이성 항체(CEA CD3 이중특이성 항체의 약학 제형, 상기 제형의 제조 방법 및 용도에 관한 것이다.

발명의 내용

[0002] 하기 다르게 정의되지 않는 한, 용어는 당업계에서 일반적으로 사용되는 바와 같다.

[0003] 제1 양상에서, 본 발명은

[0004] 4.0 내지 7.0의 pH로

[0005] 1 내지 200 mg/mL의 CEA CD3 이중특이성 항체;

[0006] 1 내지 100 mM의 완충제;

[0007] 0.001 내지 1%(w/v)의 계면활성제; 및

[0008] 1 내지 500 mM의 하나 이상의 안정화제

[0009] 를 포함하는 약학 제형에 관한 것이다.

[0010] 본 발명에 따른 약학 제형은 액체 형태, 동결건조 형태 또는 동결건조 형태로부터 재구성된 액체 형태로 제공될 수 있다.

[0011] 본 발명에 따른 약학 제형에 유용한 CEA CD3 이중특이성 항체는 하기 상세히 기재된다.

[0012] 바람직한 양태에서, 본 발명에 따른 약학 제형에 포함되는 CEA CD3 이중특이성 항체의 농도는 1 내지 100 mg/mL, 바람직하게는 10 내지 75 mg/mL, 가장 바람직하게는 20 내지 50 mg/mL이다. 50 mg/mL 농도가 특히 바람직하다. 일부 양태에서, 상기 제형에 포함되는 CEA CD3 이중특이성 항체의 농도는 5 mg/mL이다.

[0013] 본원에 사용된 용어 "완충제"는 약학 제제의 pH를 안정화시키는 약학적으로 허용되는 염이다. 적합한 완충제는 당업계에 주지되어 있고 문헌에서 찾을 수 있다. 예를 들어 시트레이트 염, 아세테이트 염, 히스티딘 염, 숙시네이트 염, 말레이트 염, 포스페이트 염 또는 락테이트 염, 및/또는 이의 대표적인 유리산 또는 유리염기, 및 다양한 염 및/또는 이의 산 및 염기기의 혼합물이 사용될 수 있다. 바람직한 약학적으로 허용되는 완충제는 비한정적으로 히스티딘 완충제, 시트레이트 완충제, 숙시네이트 완충제, 아세테이트 완충제 및 포스페이트 완충제를 포함한다. 본 발명에 사용하기에 바람직한 완충제는 완충 제제로서 히스티딘 완충제, 즉 히스티딘, 일반적으로는 L-히스티딘을 갖는 완충제이다. L-히스티딘 또는 L-히스티딘과 L-히스티딘 하이드로클로라이드의 혼합물 및 염산에 의해 성취되는 pH 조정을 포함하는 L-히스티딘/HCl 완충제가 가장 바람직하다. 달리 지시되지 않는 한, 본원에 사용된 용어 "L-히스티딘"은 본원에서 완충제를 설명하는데 사용될 때, L-히스티딘/HCl 완충제를 지칭한다. L-히스티딘/HCl 완충제는 적합한 양의 L-히스티딘 및 L-히스티딘 하이드로클로라이드를 물에 용해시키거나 적합한 양의 L-히스티딘을 물에 용해시키고 염산의 첨가에 의해 pH를 목적하는 값으로 조정함으로써 제조될 수 있다. 전술한 완충제는 일반적으로 약 1 내지 약 100 mM, 바람직하게는 약 10 내지 약 50 mM, 보다 바람직하게는 약 15 내지 30 mM, 가장 바람직하게는 20 mM의 농도로 사용된다. 사용되는 완충제와 상관없이, pH는 당업계에 공지되어 있는 산 또는 염기, 예를 들어 염산, 아세트산, 인산, 황산 및 시트르산, 나트륨 하이드록사이드 및 칼륨 하이드록사이드에 의해 약 4.0 내지 약 7.0, 바람직하게는 약 5.0 내지 약 6.0, 가장 바람직하게는 약 5.5의 값으로 조정될 수 있다.

[0014] 본원에 사용된 용어 "계면활성제"는 약학적으로 허용되는 계면활성제이다. 바람직하게는, 비이온성 계면활성제가 사용된다. 약학적으로 허용되는 계면활성제의 예는 비한정적으로 폴리옥시에틸렌-솔비탄 지방산 에스터(트윈(Tween)), 폴리에틸렌 알킬 에터(브리즈(Brij)), 알킬페닐폴리옥시에틸렌 에터(트라이톤 엑스(Triton X)), 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체(폴록사머(Poloxamer) 및 플루로닉(Pluronic)) 및 나트륨 도데실 설페이트(SDS)를 포함한다. 바람직한 폴리옥시에틸렌-솔비탄 지방산 에스터는 폴리솔베이트 20(폴리옥시에틸렌 솔비탄 모노라우레이트, 트윈 20(상표명)으로 시판됨) 및 폴리솔베이트 20(폴리옥시에틸렌 솔비탄 모노올레이트, 트윈 80(상표명)으로 시판됨)이다. 바람직한 폴리에틸렌-폴리프로필렌 공중합체는 플루로닉(등록상표) F68 또는 폴록사머 188(상표명)으로 시판되는 것들이다. 바람직한 폴리옥시에틸렌 알킬 에터는 브

리즈(상표명)로 시판되는 것들이다. 바람직한 알킬페닐폴리옥시에틸렌 에터는 트라이톤 엑스로 시판되고, p-tert-옥틸페녹시 폴리에톡시에탄올(트라이톤 엑스 100(상표명)으로 시판됨)이 바람직하다. 본 발명에 사용하기에 바람직한 계면활성제는 폴리오옥시에틸렌-솔비탄 지방산 에스터, 바람직하게는 폴리솔베이트 20 또는 폴리솔베이트 80, 가장 바람직하게는 폴리솔베이트 20이다. 폴리솔베이트 20(트윈 20(상표명)) 및 폴리솔베이트 80(트윈 80(상표명))이 사용될 때, 이는 일반적으로 약 0.001 내지 약 1%, 바람직하게는 약 0.01 내지 약 0.1%, 보다 바람직하게는 약 0.02 내지 약 0.05%, 가장 바람직하게는 약 0.05%의 농도로 사용된다. 본 발명의 제형에서, 계면활성제 농도는 중량/부피(w/v)로 표현되는 백분율로서 기재된다.

[0015] 본원에 사용된 용어 "안정화제"는 활성 약학 성분 및/또는 제형을 제조, 저장 및 적용 동안 화학적 및/또는 물리적 분해로부터 보호하는 약학적으로 허용되는 부형제이다. 안정화제는 비한정적으로 사카라이드, 아미노산, 폴리올(예를 들어 만니톨, 솔비톨, 자일리톨, 텍스트란, 글리세롤, 아라비톨, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜), 사이클로덱스트린(예를 들어 하이드록시프로필-β-사이클로덱스트린, 설포부틸에틸-β-사이클로덱스트린, β-사이클로덱스트린), 폴리에틸렌글리콜(예를 들어 PEG 3000, PEG 3350, PEG 4000, PEG 6000), 알부민(예를 들어 인간 혈청 알부민(HSA), 소 혈청 알부민(BSA)), 염(예를 들어 나트륨 클로라이드, 마그네슘 클로라이드, 칼슘 클로라이드) 및 이후로 본원에 정의되는 킬레이트제(예를 들어 EDTA)를 포함한다. 전술한 바와 같이, 안정화제는 상기 제형에 약 1 내지 약 500 mM, 바람직하게는 약 10 내지 약 300 mM, 보다 바람직하게는 약 120 내지 약 300 mM의 양으로 존재할 수 있다. 동일하거나 상이한 균으로부터 선택되는 하나 초과 안정화제가 상기 제형에 존재할 수 있다.

[0016] 본원에 사용된 용어 "사카라이드"는 모노사카라이드 및 올리고사카라이드를 포함한다. 모노사카라이드는 산에 의해 가수분해가 불가능한 단량체성 탄수화물, 예컨대 단당류 및 이의 유도체, 예를 들어 아미노당이다. 사카라이드는 통상적으로 이의 D 형태이다. 모노사카라이드의 예는 글루코스, 프럭토스, 갈락토스, 만노스, 솔보스, 테옥시리보스 및 뉴리민산을 포함한다. 올리고사카라이드는 글리코시드 결합을 통해 연결된 하나 초과 단량체성 사카라이드 단위로 이루어진 분자 또는 직쇄 탄수화물이다. 올리고사카라이드 내의 단량체성 사카라이드 단위는 동일하거나 상이할 수 있다. 단량체성 사카라이드 단위의 개수에 따라, 올리고사카라이드는 다이-, 트라이-, 테트라- 및 펜타- 등의 사카라이드일 수 있다. 폴리사카라이드와는 대조적으로, 모노사카라이드 및 올리고사카라이드는 수용성이다. 올리고사카라이드의 예는 수크로스, 트레할로스, 락토스, 말토스 및 라피노스를 포함한다. 본 발명에 사용하기에 바람직한 사카라이드는 수크로스 및 트레할로스(즉 α, α-D-트레할로스)이고, 수크로스가 가장 바람직하다. 트레할로스는 트레할로스 2수화물로서 이용가능하다. 사카라이드는 상기 제형에 약 100 내지 약 500 mM, 바람직하게는 약 200 내지 약 300 mM, 보다 바람직하게는 약 220 내지 약 250 mM, 가장 바람직하게는 230 mM의 양으로 존재할 수 있다.

[0017] 본원에 사용된 용어 "아미노산"은 카복시기에 대해 α-위치에 존재하는 아미노 잔기를 보유하는 약학적으로 허용되는 유기 분자이다. 아미노산의 예는 비한정적으로 아르기닌, 글리신, 오르니틴, 리신, 히스티딘, 글루탐산, 아스파라긴산, 이소류신, 류신, 알라닌, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 메티오닌, 세린 및 프롤린을 포함한다. 사용되는 아미노산은 바람직하게는 각각의 경우 L-형이다. 염기성 아미노산, 예컨대 아르기닌, 히스티딘 또는 리신은 바람직하게는 이의 무기 염 형태(유리하게는 염산 염 형태, 특 아미노산 하이드로클로라이드)로 사용된다. 본 발명에 사용하기에 바람직한 아미노산은 메티오닌이다. 메티오닌은 바람직하게는 약 5 내지 약 25 mM, 가장 바람직하게는 약 10 mM의 농도로 사용된다.

[0018] 안정화제의 하위 군 중 하나는 동결건조 보호제이다. 용어 "동결건조 보호제"는 가변성의 활성 성분(예를 들어 단백질)을 동결건조 과정, 후속의 저장 및 재구성 동안 불안정화 조건으로부터 보호하는 약학적으로 허용되는 부형제이다. 동결건조 보호제는 비한정적으로 사카라이드, 폴리올(예컨대 당 알코올) 및 아미노산으로 이루어진 군을 포함한다. 바람직한 동결건조 보호제는 사카라이드, 예컨대 수크로스, 트레할로스, 락토스, 글루코스, 만노스, 말토스, 갈락토스, 프럭토스, 솔보스, 라피노스, 뉴라민산, 아미노당, 예컨대 글루코사민, 갈락토사민, N-메틸글루코사민(메글루민(Meglumine)), 폴리올, 예컨대 만니톨 및 솔비톨, 및 아미노산, 예컨대 아르기닌 및 글리신 또는 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 동결건조 보호제는 일반적으로 약 10 내지 500 mM, 바람직하게는 약 10 내지 약 300 mM, 보다 바람직하게는 약 100 내지 300 mM의 양으로 사용된다.

[0019] 안정화제의 하위 군 중 하나는 항산화제이다. 용어 "항산화제"는 활성 약학 성분의 산화를 방지하는 약학적으로 허용되는 부형제이다. 항산화제는 비한정적으로 아스코르브산, 글루타티온, 시스테인, 메티오닌, 시트르산 및 EDTA를 포함한다. 항산화제는 약 0.01 내지 약 100 mM, 바람직하게는 약 5 내지 약 50 mM, 보다 바람직하게는 약 5 내지 약 25 mM의 양으로 사용될 수 있다.

- [0020] 본 발명에 따른 제형은 하나 이상의 긴장성제도 포함할 수 있다. 용어 "긴장성제"는 제형의 긴장성을 조절하는데 사용되는 약학적으로 허용되는 부형제이다. 제형은 저장성, 등장성 또는 고장성일 수 있다. 일반적으로, 등장성은 통상적으로는 인간 혈청에 대한 용액의 삼투압에 관한 것이다(약 250 내지 350 mOsmol/kg). 본 발명에 따른 제형은 저장성, 등장성 또는 고장성일 수 있되, 바람직하게는 등장성이다. 등장성 제형은 액체이거나, 고체 형태, 예를 들어 동결건조 형태로부터 재구성된 액체일 수 있고, 비교되는 일부 다른 용액, 예컨대 생리 식염수 및 혈청과 동일한 긴장성을 갖는 용액이다. 적합한 긴장성제는 비한정적으로 나트륨 클로라이드, 칼륨 클로라이드, 글리세린, 및 아미노산 또는 당류의 균으로부터의 임의의 성분, 특히 글루코스를 포함한다. 긴장성제는 일반적으로 약 5 내지 약 500 mM의 양으로 사용된다.
- [0021] 안정화제 및 긴장성제 중, 둘 다의 기능을 할 수 있는, 즉 안정화제이면서 긴장성제일 수 있는 화합물의 군이 존재한다. 이의 예는 당류, 이미노산, 폴리올, 사이클로덱스트린, 폴리에틸렌글리콜 및 염의 균으로부터 찾을 수 있다. 안정화제이면서 긴장성제일 수 있는 당류의 예는 트레할로스이다.
- [0022] 상기 제형은 보조제, 예컨대 방부제, 습윤제, 유화제 및 분산제도 포함할 수 있다. 미생물의 존재를 방지하는 것은 멸균 절차, 및 다양한 항박테리아제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 및 소르브산 등의 포함 둘다에 의해 확보될 수 있다. 방부제는 일반적으로 약 0.001 내지 약 2%(w/v)의 양으로 존재한다. 방부제는 비한정적으로 벤질 알코올, 페놀, m-크레졸, p-클로르-m-크레졸, 메틸 또는 프로필 파라벤 및 벤잘코늄 클로라이드를 포함한다.
- [0023] 본 발명에 따른 제형에 포함되는 CEA CD3 이중특이성 항체는 CD3 및 CEA에 특이적으로 결합하는 이중특이성 항체이다. 특히 유용한 CEA CD3 이중특이성 항체는, 예를 들어 PCT 공보 WO 2014/131712(이의 전체는 본원에 참조로 혼입됨)에 기재되어 있다.
- [0024] 용어 "이중특이성"은 항체가 적어도 2개의 구별되는 항원 결정인자에 특이적으로 결합할 수 있음을 의미한다. 전형적으로, 이중특이성 항체는 각각이 상이한 항원 결정인자에 특이적인 2개의 항원 결합 부위를 포함한다. 특정 양태에서, 이중특이성 항체는 2개의 항원 결정인자, 특히 2개의 구별되는 세포에 발현된 2개의 항원 결정인자에 동시에 결합할 수 있다.
- [0025] 본원에 사용된 용어 "항원 결정인자"는 "항원" 및 "에피토프"와 동의어이고, 항원 결합 잔기가 결합하여 항원 결합 잔기-항원 복합체를 형성하는 폴리펩티드 거대분자 상의 위치(예를 들어 아미노산의 인접 스트레치(stretch) 또는 비인접 아미노산의 상이한 영역으로 구성된 일치 형태)를 지칭한다. 유용한 항원 결정인자는, 예를 들어 종양 세포의 표면, 바이러스-감염 세포의 표면, 기타 질환 세포의 표면, 면역 세포의 표면, 혈청 중 유리형(free), 및/또는 세포의 기질(ECM)에서 찾을 수 있다.
- [0026] 본원에 사용된 용어 "항원 결합 잔기"는 항원 결정인자에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드 분자이다. 하나의 양태에서, 항원 결합 잔기는 표적 부위, 예를 들어 항원 결정인자를 보유하는 특정 유형의 종양 세포에 부착되는 실체(예를 들어 제2 항원 결합 잔기)와 관련될 수 있다. 또 다른 양태에서, 항원 결합 잔기는 이의 표적 항원, 예를 들어 T 세포 수용체 복합체 항원을 통해 신호전달을 활성화시킬 수 있다. 항원 결합 잔기는 본원에 추가로 정의되는 항체 및 이의 단편을 포함한다. 특정한 항원 결합 잔기는 항체 중쇄 가변부 및 항체 경쇄 가변부를 포함하는 항체의 항원 결합 도메인을 포함한다. 특정 양태에서, 항원 결합 잔기는 본원에 추가로 정의되고 당업계에 공지되어 있는 항체 불변부를 포함할 수 있다. 유용한 중쇄 불변부는 5개의 이소형(isotype), 즉 α , δ , ϵ , γ 또는 μ 중 임의의 것을 포함한다. 유용한 경쇄 불변부는 2개의 이소형, 즉 κ 및 λ 중 임의의 것을 포함한다.
- [0027] "특이적 결합"은 상기 결합이 항원 선택성이고 원치않거나 비특이적인 상호작용과는 차별화될 수 있음을 의미한다. 항원 결합 잔기가 특정한 항원 결정인자에 결합하는 능력은 효소-결합 면역흡착 분석(ELISA) 또는 당업자에게 친숙한 기타 기법, 예를 들어 표면 플라즈몬 공명(SPR) 기법(비아코어(BIAcore) 기기에서 분석됨)(문헌 [Liljeblad et al., Glyco J 17, 323-329 (2000)]) 및 종래의 결합 분석(문헌[Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)])을 통해 측정된다. 하나의 양태에서, 항원 결합 잔기의 비관련 단백질에 대한 결합 정도는, 예를 들어 SPR로 측정시 상기 항원 결합 잔기의 항원에 대한 결합의 약 10% 미만이다. 특정 양태에서, 항원에 결합하는 항원 결합 잔기, 또는 상기 항원 결합 잔기를 포함하는 항체는 1 μ M 이하, 100 nM 이하, 10 nM 이하, 1 nM 이하, 0.1 nM 이하, 0.01 nM 이하 또는 0.001 nM 이하(예를 들어 10^{-8} M이하, 10^{-8} 내지 10^{-13} M, 예를 들어 10^{-9} 내지 10^{-13} M)의 해리 상수(K_D)를 갖는다.

- [0028] "친화도"는 분자의 단일 결합 부위(예를 들어 수용체)와 이의 결합짝(예를 들어 리간드)간의 비공유결합성 상호작용의 총합의 강도이다. 달리 지시되지 않는 한, 본원에서 사용된 "결합 친화도"는 결합짝 구성원들(예를 들어 항원 결합 잔기 및 항원, 또는 수용체 및 이의 리간드)간의 1:1 상호작용을 반영하는 고유 결합 친화도이다. 분자 X의 이의 짝 Y에 대한 친화도는 일반적으로, 해리 속도 상수(k_{off})와 회합 속도 상수(k_{on})의 비인 해리 상수(K_D)로 표시된다. 따라서, 등가의 친화도는 속도 상수의 비가 동일하게 유지되는 한, 상이한 속도 상수를 포함할 수 있다. 친화도는 본원에 기재된 것을 비롯한 당업계에 공지되어 있는 잘 확립된 방법에 측정될 수 있다. 친화도를 측정하는 특정 방법은 표면 플라즈몬 공명(SPR)이다.
- [0029] "CD3"은 달리 지시되지 않는 한 임의의 척추동물, 예컨대 포유동물, 예컨대 영장류(예를 들어 인간), 비인간 영장류(예를 들어 사이노몰구스 원숭이(*cynomolgus monkey*)) 및 설치류(예를 들어 마우스(mouse) 및 래트(rat)) 유래의 고유한 CD3 형태를 지칭한다. 상기 용어는 미처리된 CD3 및 세포에서 처리로부터 야기되는 임의의 형태의 전장(full-length) CD3을 포괄한다. 또한, 상기 용어는 CD3의 자연 발생 변형, 예를 들어 스플라이스 변형 또는 대립유전자 변형을 포괄한다. 하나의 양태에서, CD3은 인간 CD3, 특히 인간 CD3의 입실론 아단위(CD3 ϵ)이다. 인간 CD3의 아미노산 서열은 유니프롯(UniProt, www.uniprot.org) 접근 번호 P07766(버전 144) 또는 NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov/) RefSeq NP_000724.1에 제시되어 있다. 또한, 서열번호 22를 참고한다. 사이노몰구스[마카카 파시쿨라리스(*Macaca fascicularis*)] CD3 ϵ 은 NCBI 진뱅크(GenBank) 번호 BAB71849.1에 제시되어 있다. 또한, 서열번호 23을 참고한다.
- [0030] "종양태아성 항원" 또는 "CEA"(종양태아성 항원-관련 세포 부착 분자 5(CEACAM5)로서 공지되어 있음)는 달리 지시되지 않는 한 임의의 척추동물, 예컨대 포유동물, 예컨대 영장류(예를 들어 인간), 비인간 영장류(예를 들어 사이노몰구스 원숭이) 및 설치류(예를 들어 마우스 및 래트) 유래의 임의의 고유한 CEA를 지칭한다. 상기 용어는 미처리된 CEA 및 세포에서 처리로부터 야기되는 임의의 형태의 전장 CEA를 포괄한다. 또한, 상기 용어는 CEA의 자연 발생 변형, 예를 들어 스플라이스 변형 또는 대립유전자 변형을 포괄한다. 인간 CEA의 아미노산 서열은 유니프롯(www.uniprot.org) 접근 번호 P06731 또는 NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov/) RefSeq NP_004354.2에 제시되어 있다.
- [0031] Fab 분자 등에 대해 본원에 사용된 용어 "제1", "제2" 또는 "제3"은 하나 초과와 각각의 유형의 잔기가 존재할 때 구별의 편의를 위해 사용된다. 상기 용어의 사용은 달리 언급되지 않는 한 이중특이성 항체의 특정 순서 또는 배향을 부여하도록 의도되지 않는다.
- [0032] 본원에 사용된 용어 "가"는 항체에서 항원 결합 부위의 특정된 개수의 존재를 나타낸다. 따라서, 용어 "항원에 대한 1가 결합"은 항체에서 항원 특이성인 하나(하나 초과가 아님)의 항원 결합 부위의 존재를 나타낸다.
- [0033] 본원에 사용된 용어 "가"는 넓은 의미로 사용되고 다양한 항체, 예컨대 비한정적으로 단클론 항체, 다클론 항체, 다중특이성 항체(예를 들어 이중특이성 항체), 및 목적하는 항원 결합 활성을 나타내는 항원 단편을 포함한다.
- [0034] 용어 "전장 항체", "온전 항체" 및 "완전 항체"는 본원에서 상호대체가능하게 사용되어 고유한 항체 구조와 실질적으로 유사한 구조를 갖는 항체를 지칭한다.
- [0035] "항체 단편"은 온전 항체가 결합하는 항원에 결합하는 온전 항체의 부분을 포함하는 온전 항체 이외의 분자를 지칭한다. 항체 단편의 예는 비한정적으로 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ 및 다이항체(diabody), 선형 항체, 단일쇄 항체 분자(예를 들어 scFv) 및 단일 도메인 항체를 포함한다. 특정 항체 단편의 검토를 위해, 문헌[Hudson et al., *Nat Med* 9, 129-134 (2003)]을 참고한다. scFv 항체의 검토를 위해, 예를 들어 문헌[Pluckthun, in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참고하고 WO 93/16185, US 5,571,894 및 US 5,587,458도 참고한다. 회수(salvage) 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하고 증가된 생체내 반감기를 갖는 Fab 및 F(ab')₂의 논의를 위해, US 5,869,046을 참고한다. 다이항체는 2가 또는 이중특이성일 수 있는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 항체 단편이다. 예를 들어 EP 404,097; WO 1993/01161; 문헌[Hudson et al., *Nat Med* 9, 129-134 (2003)]; 및 문헌[Hollinger et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 6444-6448 (1993)]을 참고한다. 트라이항체 및 테트라항체도 문헌[Hudson et al., *Nat Med* 9, 129-134 (2003)]에 기재되어 있다. 단일 도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부 또는 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부를 포함하는 항체 단편이다. 특정 양태에서, 단일 도메인 항체는 인간 단일 도메인 항체이다(미국 메사추세츠주 윌탐 소재의 도만티스 인코포레이티드(Domantis, Inc.), 예를 들어 US 6,248,516 B1 참고). 항체 단편은 본원에 기재된 다양한 기법, 예

컨대 비한정적으로 온전 항체의 단백질해성 소화 및 재조합 숙주 세포(예를 들어 *E. coli* 또는 파지)의 제조에 의해 제조될 수 있다.

- [0036] 용어 "가변부" 또는 "가변 도메인"은 항원에 대한 항체의 결합에 연루되는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 지칭한다. 고유 항체의 중쇄(VH) 및 경쇄(VL)의 가변 도메인은 일반적으로 유사한 구조를 갖되, 각각의 도메인은 4개의 보존된 프레임워크부(FR) 및 3개의 초가변부(HVR)을 포함한다. 예를 들어 문헌[Kindt et al., *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)]을 참고한다. 단일 VH 또는 VL 도메인이 항원 결합 특이성을 부여하기에 충분할 수 있다. 가변부 서열과 관련하여 본원에 사용되는 "카밧(Kabat) 번호부여"는 문헌[Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]에 제시되어 있는 번호부여 체계를 지칭한다.
- [0037] 본원에 사용된 중쇄 및 경쇄의 모든 불변부 및 불변 도메인의 아미노산 위치는 문헌[Kabat, et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]에 따라 번호부여되고, 본원에서 "카밧에 따른 번호부여" 또는 "카밧 번호부여"로서 지칭된다. 구체적으로는, 카밧 번호부여 체계(문헌[Kabat, et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]의 647 내지 660 쪽 참고)는 카파(κ) 및 람다(λ) 아이소형의 경쇄 불변 도메인 CL에 사용되고, 카밧 EU 번호부여 체계(상기 문헌의 661 내지 723 쪽 참고)는 중쇄 불변 도메인(CH1, 힌지(Hinge), CH2 및 CH3)에 사용되고, 이는 본원에서 이러한 경우 "카밧 EU 색인에 따른 번호부여"로 지칭함으로써 추가로 명시된다.
- [0038] 본원에 사용된 용어 "초가변부" 또는 "HVR"은 서열의 초가변부("상보성 결정부" 또는 "CDR")이고/거나 구조적으로 정의된 루프(loop)("초가변 루프")를 형성하고/거나 항원 접촉 잔기("항원 접촉부")를 함유하는 항체 가변 도메인의 각각의 부를 지칭한다. 일반적으로, 항체는 6개의 HVR, 즉 VH에서 3개(H1, H2 및 H3), VL에서 3개(L1, L2 및 L3)를 포함한다. 본원에서 예시적인 HVR은 하기를 포함한다:
- [0039] (a) 아미노산 잔기 26-32(L1), 50-52(L2), 91-96(L3), 26-32(H1), 53-55 (H2) 및 96-101(H3)에서 나타나는 초가변 루프(문헌[Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)] 참고);
- [0040] (b) 아미노산 잔기 24-34(L1), 50-56(L2), 89-97(L3), 31-35b(H1), 50-65(H2) 및 95-102(H3)에서 나타나는 CDR(문헌[Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)] 참고);
- [0041] (c) 아미노산 잔기 27c-36(L1), 46-55(L2), 89-96(L3), 30-35b(H1), 47-58(H2) 및 93-101(H3)에서 나타나는 항원 접촉부(문헌[MacCallum et al. *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)]); 및
- [0042] (d) HVR 아미노산 잔기 46-56(L2), 47-56(L2), 48-56(L2), 49-56(L2), 26-35(H1), 26-35b(H1), 49-65(H2), 93-102(H3) 및 94-102(H3)을 비롯한 상기 (a), (b) 및/또는 (c)의 조합.
- [0043] 달리 지시되지 않는 한, 가변 도메인에서 HVR 잔기 또는 기타 잔기(예를 들어 FR 잔기)는 본원에서 상기 카밧 등의 문헌에 따라 번호부여된다.
- [0044] "프레임워크" 또는 "FR"은 초가변부(HVR) 잔기 이외의 가변 도메인 잔기를 지칭한다. 가변 도메인의 FR은 일반적으로 4개의 도메인, 즉 FR1, FR2, FR3 및 FR4로 이루어진다. 따라서, HVR 및 FR 서열은 일반적으로 VH(또는 VL)에서 FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4 순으로 나타난다.
- [0045] 항체 또는 면역글로불린의 "강(class)"은 이의 중쇄에 의해 보유되는 불변 도메인 또는 불변부의 유형을 지칭한다. 5개의 주요 강, 즉 IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM이 존재하고, 이들 중 몇몇은 아강(subclass)(아이소형), 예를 들어 IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ 및 IgA₂로 추가로 구분될 수 있다. 면역글로불린의 상이한 강에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α , δ , ϵ , γ 및 μ 로 지칭된다.
- [0046] "Fab 분자는 면역글로불린의 중쇄("Fab 중쇄")의 VH 및 CH1 도메인 및 경쇄("Fab 경쇄")의 VL 및 CL로 이루어진 단백질을 지칭한다.
- [0047] "교차 Fab 분자("크로스페브(Crossfab)"로도 지칭됨)"는 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인 또는 불변 도메인이 교환되는(즉 서로 대체되는) Fab 분자를 의미하는데, 즉 교차 Fab 분자는 경쇄 가변 도메인 VL 및 중쇄 불변 도메인 1 CH1로 구성된 펩티드 쇠(N-말단에서 C-말단 방향으로 VL-CH1), 및 중쇄 가변 도메인 VH 및 경쇄 불변 도메인 CL로 구성된 펩티드 쇠(N-말단에서 C-말단 방향으로 VH-CL)를 포함한다. 명확히 하면, Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의

가변 도메인이 서로 교환되는 교차 Fab 분자에서, 중쇄 불변 도메인 1 CH1을 포함하는 펩티드 쇠는 본원에서 (교차) Fab 분자의 "중쇄"로서 지칭된다. 반대로, Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 불변 도메인이 교환되는 교차 Fab 분자에서, 중쇄 가변 도메인 VH를 포함하는 펩티드 쇠는 본원에서 (교차) Fab 분자의 "중쇄"로서 지칭된다.

[0048] 이와는 대조적으로, "통상적인 Fab 분자"는 이의 자연 형식, 즉 중쇄 가변 도메인 및 불변 도메인으로 구성된 중쇄(N-말단에서 C-말단 방향으로 VH-CH1), 및 경쇄 가변 도메인 및 불변 도메인으로 구성된 경쇄(N-말단에서 C-말단 방향으로 VL-CL)을 포함하는 Fab 분자를 의미한다.

[0049] 용어 "면역글로불린 분자"는 천연 발생 항체의 구조를 갖는 단백질을 지칭한다. 예를 들어 IgG 항의 면역글로불린은 다이설파이드 결합된 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄로 구성된 약 150,000 Da의 헤테로사합체 당단백질이다. N-말단에서 C-말단에, 각각의 중쇄는 가변 도메인(VH)(가변 중 도메인 또는 중쇄 가변부로도 지칭됨)에 이어서 3개의 불변 도메인(CH1, CH2 및 CH3)(중쇄 불변부로도 지칭됨)을 갖는다. 유사하게, N-말단에서 C-말단에, 각각의 경쇄는 가변 도메인(VL)(가변 경 도메인 또는 경쇄 가변부로도 지칭됨)에 이어서 불변 경(CL) 도메인(경쇄 불변부로도 지칭됨)을 갖는다. 면역글로불린의 중쇄는 α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG) 또는 μ (IgM)로 지칭되는 5개의 유형(이 중 일부는 아형, 예를 들어 γ_1 (IgG₁), γ_2 (IgG₂), γ_3 (IgG₃), γ_4 (IgG₄), α_1 (IgA₁) 및 α_2 (IgA₂)로 추가로 구분될 수 있음) 중 하나에 속할 수 있다. 면역글로불린의 경쇄는 이의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기준으로 카파 및 람다로 지칭되는 2개의 유형 중 하나에 속할 수 있다. 면역글로불린은 면역글로불린 힌지부를 통해 연결된 2개의 Fab 분자 및 Fc 도메인으로 필수적으로 이루어진다.

[0050] 본원에서 "Fc 도메인" 또는 "Fc부"는 불변부의 적어도 일부를 함유하는 면역글로불린의 C-말단부를 정의하는데 사용된다. 상기 용어는 고유 서열 Fc부 및 가변 Fc부를 포함한다. IgG 중쇄의 Fc부의 경계는 약간 변경될 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc부는 통상적으로 Cys226 또는 Pro230에서 중쇄의 카복시-말단에 이어지는 것으로 정의된다. 그러나, 숙주 세포에서 생성된 항체는 중쇄의 C-말단으로부터의 하나 이상, 특히 1 또는 2개의 아미노산의 번역후 절단을 겪을 수 있다. 따라서, 숙주 세포에 의해 전장 중쇄를 암호화하는 특정 핵산 분자의 발현으로써 생성되는 항체는 전장 중쇄를 포함할 수 있거나, 전장 중쇄의 절단된 변형을 포함할 수 있다. 이는 중쇄의 마지막 2개의 C-말단 아미노산이 글리세린(G446) 및 리신(K447, 카바트 EU 색인에 따른 번호부여)인 경우일 수 있다. 따라서, Fc부의 C-말단 리신(Lys447), 또는 C-말단 글리신(G1446) 및 리신(K447)은 존재하거나 존재하지 않을 수 있다. 본원에서 달리 특정되지 않는 한, Fc부 또는 불변부에서 아미노산 잔기의 번호부여는 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991](상기 또한 참고)에 기재된 EU 색인으로도 지칭되는 EU 번호부여 체계에 따른다. 본원에 사용되는 Fc 도메인의 "아단위"는 이합체 Fc 도메인을 형성하는 2개의 폴리펩티드, 즉 면역글로불린 중쇄의 C-말단부를 포함하고 안정한 자체-회합이 가능한 폴리펩티드 중 하나를 지칭한다. 예를 들어 IgG Fc 도메인의 아단위는 IgG CH2 및 IgG3 불변 도메인을 포함한다.

[0051] "Fc 도메인의 제1 및 제2 아단위의 회합 촉진 변형"은 Fc 도메인 아단위의 펩티드 골격의 조작 또는 번역후 변형이고, 이는 Fc 도메인 아단위를 포함하는 폴리펩티드와 동일한 펩티드의 회합되어 동중이합체(homodimer)가 형성됨을 감소시키거나 방지한다. 본원에 사용된 회합 촉진 변형은, 특히 회합이 목적되는 2개의 Fc 도메인 아단위(즉 Fc 도메인의 제1 및 제2 아단위) 각각에 수행되는 개별 변형을 포함하되, 상기 변형은 상기 2개의 Fc 도메인 아단위의 회합을 촉진하도록 서로 상보적이다. 예를 들어 회합 촉진 변형은 회합이 입체적 또는 정전기적으로 바람직하도록 Fc 도메인 아단위 중 하나 또는 둘다의 구조 또는 전하를 변경할 수 있다. 따라서, (이중)이합체화는 제1 Fc 도메인 아단위를 포함하는 폴리펩티드와 제2 Fc 도메인 아단위를 포함하는 폴리펩티드 간에 나타나고, 이들은 상기 아단위 각각에 융합되는 추가의 구성요소(예를 들어 항원 결합 잔기)가 동일하지 않다는 점에서 동일하지 않은 것일 수 있다. 일부 양태에서, 회합 촉진 변형은 Fc 도메인에서의 아미노산 돌연변이, 구체적으로는 아미노산 치환을 포함한다. 특정 양태에서, 회합 촉진 변형은 Fc 도메인의 2개의 아단위 각각에서 개별 아미노산 돌연변이, 구체적으로는 아미노산 치환을 포함한다.

[0052] 용어 "효과기 기능"은 항체에 대한 언급에 사용될 때 항체의 Fc부에 기인할 수 있는 생물 활성들을 지칭하고, 상기 활성들은 상기 항체 이형에 따라 변한다. 항체 효과기 기능의 예는 C1q 결합 및 보체 의존성 세포독성(CDC), Fc 수용체 결합, 항체-의존성 세포-매개된 세포독성(ADCC), 항체-의존성 세포 식균작용(ADCP), 시토카인 분비, 항원 제공 세포에 의한 면역 복합체-매개된 항원 흡수, 세포 표면 수용체(예를 들어 B 세포 수용체)의 방향 조절, 및 B 세포 활성화를 포함한다.

[0053] 참조 폴리펩티드 서열에 관한 "아미노산 서열 일치성 퍼센트(%)"는, 필요한 경우 최대의 서열 일치성 퍼센트를 성취하기 위해서, 및 상기 서열 일치성의 부분으로서 어떠한 보존적인 치환도 고려함 없이, 서열과 도입 틸을

정렬시킨 후, 참조 폴리펩티드 서열 중의 아미노산 잔기들과 일치하는 후보 서열 중의 아미노산 잔기들의 백분율로서 정의된다. 아미노산 서열 일치성 퍼센트를 측정하기 위한 정렬은 당업계의 기술 내에 있는 다양한 방식들로, 예를 들어 공개적으로 입수할 수 있는 컴퓨터 소프트웨어, 예를 들어 BLAST, BLAST-2, 클러스탈(Clustal) W, 메그얼라인(Megalign)(DNASTAR) 소프트웨어 또는 FASTA 프로그램 패키지를 사용하여 성취될 수 있다. 당업자는 서열들을 정렬시키기에 적합한 매개변수들, 예를 들어 비교하는 서열들의 전체길이에 대해 최대의 정렬을 성취하기 위해 필요한 임의의 연산을 결정할 수 있다. 그러나, 본 발명의 목적을 위해서, 아미노산 서열 일치성%를 상기 FASTA 패키지 버전 36.3.8cdml ggsearch 프로그램을 사용하거나 또는 나중에 BLOSUM50 비교 행렬과 함께 생성시킨다. 상기 FASTA 프로그램 패키지는 문헌[W. R. Pearson and D. J. Lipman (1988), "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85:2444-2448]; 문헌[W. R. Pearson (1996) "Effective protein sequence comparison" Meth. Enzymol. 266:227- 258]; 및 문헌[Pearson et. al. (1997) Genomics 46:24-36]에 저술되었으며 http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_down.shtml로부터 공개적으로 입수할 수 있다. 한편으로, http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/index.cgi에서 접근가능한 공개 서버를 사용하여 서열들을 비교할 수 있고, 국소적이기보다는 전체적인 정렬을 보장하기 위해서 ggsearch(전체적인 단백질:단백질) 프로그램 및 디폴트 옵션(BLOSUM50; open: -10; ext: -2; Ktup = 2)을 사용하여 정렬을 수행한다. 아미노산 일치성 퍼센트는 출력 정렬 헤더에 제공된다.

- [0054] "활성화 Fc 수용체"는 항체의 Fc 도메인에 의한 후속적인 맞물림이 수용체-보유 세포를 자극하여 효과기 기능을 수행하도록 하는 신호 전달 사건을 인식하는 Fc 수용체이다. 활성화 Fc 수용체는 Fc γ RIIIa(CD16a), Fc γ RI(CD64), Fc γ RIIa(CD32), 및 Fc α RI(CD89)를 포함한다.
- [0055] "감소된 결합", 예를 들어 Fc 수용체에 대한 감소된 결합은 각각의 상호작용에 대한 친화도의 감소이고, 이는, 예를 들어 SPR에 의해 측정된다. 명확하게는, 상기 용어는 0(또는 분삭 방법의 검출 한계치 미만)으로의 친화도 감소, 즉 상호작용의 완전한 중단도 포함한다. 반대로, "증가된 결합"은 각각의 상호작용에 대한 결합 친화도의 증가를 지칭한다.
- [0056] "융합"은 구성요소(예를 들어 Fab 분자 및 Fc 도메인 아단위)가 펩티드 결합에 의해 직접 또는 하나 이상의 펩티드 링커(peptide linker)를 통해 연결됨을 의미한다.
- [0057] CEA CD3 이중특이성 항체는 CD3에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 잔기, 및 CEA에 특이적으로 결합하는 제2 항원 결합 잔기를 포함한다.
- [0058] 하나의 양태에서, 제1 항원 결합 잔기는 서열번호 1의 중쇄 CDR(HCDR)1, 서열번호 2의 HCDR2 및 서열번호 3의 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변부; 및 서열번호 4의 경쇄 CDR(LCDR)1, 서열번호 5의 LCDR2 및 서열번호 6의 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변부를 포함한다.
- [0059] 하나의 양태에서, 제2 항원 결합 잔기는 서열번호 9의 중쇄 CDR(HCDR)1, 서열번호 10의 HCDR2 및 서열번호 11의 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변부; 및 서열번호 12의 경쇄 CDR(LCDR)1, 서열번호 13의 LCDR2 및 서열번호 14의 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변부를 포함한다.
- [0060] 특정한 양태에서, CEA CD3 이중특이성 항체는
- [0061] (i) CD3에 특이적으로 결합하고, 서열번호 1의 중쇄 CDR(HCDR)1, 서열번호 2의 HCDR2 및 서열번호 3의 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변부; 및 서열번호 4의 경쇄 CDR(LCDR)1, 서열번호 5의 LCDR2 및 서열번호 6의 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변부를 포함하는 제1 항원 결합 잔기; 및
- [0062] (ii) CEA에 특이적으로 결합하고, 서열번호 9의 중쇄 CDR(HCDR)1, 서열번호 10의 HCDR2 및 서열번호 11의 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변부; 및 서열번호 12의 경쇄 CDR(LCDR)1, 서열번호 13의 LCDR2 및 서열번호 14의 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변부를 포함하는 제2 항원 결합 잔기
- [0063] 를 포함한다.
- [0064] 하나의 양태에서, 제1 항원 결합 잔기는 서열번호 7의 아미노산 서열에 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 중쇄 가변부 서열 및 서열번호 8의 아미노산 서열에 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 경쇄 가변부 서열을 포함한다.
- [0065] 하나의 양태에서, 제1 항원 결합 잔기는 서열번호 7의 중쇄 가변부 서열 및 서열번호 8의 경쇄 가변부 서열을 포함한다.

- [0066] 하나의 양태에서, 제2 항원 결합 잔기는 서열번호 15의 아미노산 서열에 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 중쇄 가변부 서열 및 서열번호 16의 아미노산 서열에 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 경쇄 가변부 서열을 포함한다.
- [0067] 하나의 양태에서, 제2 항원 결합 잔기는 서열번호 15의 중쇄 가변부 서열 및 서열번호 16의 경쇄 가변부 서열을 포함한다.
- [0068] 일부 양태에서, 제1 및/또는 제2 항원 결합 잔기는 Fab 분자이다. 일부 양태에서, 제1 항원 결합 잔기는 Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변부 또는 불변부가 교환된 교차 Fab 분자이다. 이러한 양태에서, 제2 항원 결합 잔기는 바람직하게는 통상적인 Fab 분자이다.
- [0069] 일부 양태에서, 제1 및 제2 항원 결합 잔기는, 임의적으로는 펩티드 링커에 의해, 서로 융합된다.
- [0070] 일부 양태에서, 제1 및 제2 항원 결합 잔기는 각각 Fab 분자이고, (i) 제2 항원 결합 잔기는 Fab 중쇄의 C-말단에서 제1 항원 결합 잔기의 Fab 중쇄의 N-말단에 융합되거나; (ii) 제1 항원 결합 잔기는 Fab 중쇄의 C-말단에서 제2 항원 결합 잔기의 Fab 중쇄 N-말단에 융합된다.
- [0071] 일부 양태에서, CEA CD3 이중특이성 항체는 CD3에 결합하는 1가로 제공된다.
- [0072] 특정한 양태에서, CEA CD3 이중특이성 항체는 CD3에 특이적으로 결합하는 단일 항원 결합 잔기, 및 CEA에 특이적으로 결합하는 2개의 항원 결합 잔기를 포함한다. 따라서, 일부 양태에서, CEA CD3 이중특이성 항체는 CEA에 특이적으로 결합하는 제3 항원 결합 잔기를 포함한다. 일부 양태에서, 제3 항원 잔기는 제1 항원 결합 잔기와 동일하다(예를 들어 마찬가지로 Fab 분자이고 동일한 아미노산 서열을 포함함).
- [0073] 특정한 양태에서, CEA CD3 이중특이성 항체는 제1 및 제2 아단위로 구성된 Fc 도메인을 추가로 포함한다. 하나의 양태에서, Fc 도메인은 IgG Fc 도메인이다. 특정한 양태에서, Fc 도메인은 IgG₁ Fc 도메인이다. 또 다른 양태에서, Fc 도메인은 IgG₄ Fc 도메인이다. 보다 구체적인 양태에서, Fc 도메인은 위치 S228(카밧 EU 색인 번호호부여)의 아미노산 치환, 바람직하게는 아미노산치환 S228P를 포함하는 IgG₄ Fc 도메인이다(문헌[Stubenrauch et al., Drug Metabolism and Disposition 38, 84-91 (2010)] 참고). 추가의 특정한 양태에서, Fc 도메인은 인간 Fc 도메인이다. 특히 바람직한 양태에서, Fc 도메인은 인간 IgG₁ Fc 도메인이다. 인간 IgG₁ Fc부의 예시적인 서열은 서열번호 21에 제시된다.
- [0074] 제1, 제2 및 존재하는 경우, 제3 결합 잔기가 Fab 분자인 일부 양태에서, (a) (i) 제2 항원 결합 잔기가 Fab 중쇄의 C-말단에서 제1 항원 결합 잔기의 Fab 중쇄의 N-말단에 융합되고, 제1 항원 결합 잔기가 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제1 아단위의 N-말단에 융합되거나, (ii) 제2 항원 결합 잔기가 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제1 아단위의 N-말단에 융합되고, 제2 항원 결합 잔기가 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제1 아단위의 N-말단에 융합되고; (b) 제3 항원 결합 잔기가 존재하는 경우, 이는 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제2 아단위의 N-말단에 융합된다.
- [0075] 특정한 양태에서, Fc 도메인은 Fc 도메인의 제1 및 제2 아단위의 회합 촉진 변형을 포함한다. 인간 IgG Fc 도메인의 2개의 아단위간의 가장 방대한 단백질-단백질 상호작용의 부위는 CH3 도메인이다. 따라서, 하나의 양태에서, 상기 변형은 Fc 도메인의 CH3 도메인에 존재한다.
- [0076] 구체적인 양태에서, 전술된 Fc 도메인의 제1 및 제2 아단위의 회합 촉진 변형은 이른바 "뿔-인투-홀(knob-into-hole)" 변형이고, 상기 Fc 도메인의 2개의 아단위 중 하나에 "뿔(knob)" 변형을 포함하고 상기 Fc 도메인의 2개의 아단위의 다른 하나에 "홀(hole)" 변형을 포함한다. 상기 뿔-인투-홀 기술은 예를 들어 US 5,731,168; US 7,695,936; 문헌[Ridgway et al., Prot Eng 9, 617-621 (1996)] 및 문헌[Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001)]에 기재되어 있다. 일반적으로, 상기 방법은 돌기가 이중이량체 형성을 촉진하고 동중이량체 형성을 방해하도록 공동 중에 위치할 수 있게 제1 폴리펩타이드의 접촉면에 상기 돌기("뿔")를 도입시키고 제2 폴리펩타이드의 접촉면에 상응하는 공동("홀")을 도입시킴을 수반한다. 돌기는 상기 제1 폴리펩타이드의 접촉면으로부터 작은 아미노산 측쇄를 보다 큰 측쇄(예를 들어 티로신 또는 트립토판)로 대체시킴으로써 구성된다. 상기 돌기와 동일하거나 유사한 크기의 보상의 공동, 큰 아미노산 측쇄를 보다 작은 것(예를 들어 알라닌 또는 트레오닌)으로 대체시킴으로써 상기 제2 폴리펩타이드의 접촉면에 생성시킨다.
- [0077] 따라서, 특정한 양태에서, 상기 면역접합체에 포함된 항체의 Fc 도메인의 제1 아단위의 CH3 도메인에서 아미노산 잔기를 보다 큰 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 대체하고, 이에 의해 제2 아단위의 CH3 도메인내의 공동

에 위치할 수 있는 상기 제1 아단위의 CH3 도메인내의 돌기를 생성시키고 상기 Fc 도메인의 제2 아단위의 CH3 도메인에서 아미노산 잔기를 보다 작은 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 대체하고, 이에 의해 상기 제1 아단위의 CH3 도메인내의 돌기가 위치할 수 있는 상기 제2 아단위의 CH3 도메인내의 공동을 생성시킨다. 바람직하게 상기 보다 큰 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기는 아르기닌(R), 페닐알라닌(F), 티로신(Y) 및 트립토판(W)으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 바람직하게 상기 보다 작은 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기는 알라닌(A), 세린(S), 트레오닌(T) 및 발린(V)으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 상기 돌기 및 공동, 예를 들어 부위-특이적인 돌연변이유발에 의해서 또는 펩타이드 합성에 의해서 상기 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산을 변경시킴으로써 만들 수 있다.

[0078] 이러한 구체적인 양태에서, Fc 도메인의 제1 아단위의 CH3 도메인에서 366번 위치의 트레오닌 잔기를 트립토판 잔기로 대체하고(T366W), 상기 Fc 도메인의 제2 아단위의 CH3 도메인에서 407번 위치의 티로신 잔기를 발린 잔기로 대체시킨다(Y407V). 하나의 양태에서, 상기 Fc 도메인의 제2 아단위에서 추가로 366번 위치의 트레오닌 잔기를 세린 잔기로 대체하고(T366S), 368번 위치의 류신 잔기를 알라닌 잔기로 대체시킨다(L368A)(카밧 EU 색인에 따른 번호 부여). 추가의 양태에서, 상기 Fc 도메인의 제1 아단위에서 추가로 354번 위치의 세린 잔기를 시스테인 잔기로 대체하거나(S354C), 또는 356번 위치의 글루탐산 잔기를 시스테인 잔기로 대체하고(E356C)(특히 354번 위치의 세린 잔기를 시스테인 잔기로 대체시킨다), 상기 Fc 도메인의 제2 아단위에서 추가로 349번 위치의 티로신 잔기를 시스테인 잔기로 대체시킨다(Y349C)(카밧 EU 색인에 따른 번호 부여). 바람직한 양태에서, 상기 Fc 도메인의 제1 아단위는 아미노산 치환 S354C 및 T366W를 포함하고, 상기 Fc 도메인의 제2 아단위는 아미노산 치환 Y349C, T366S, L368A 및 Y407V(카밧 EU 색인에 따른 번호 부여)를 포함한다.

[0079] 일부 양태에서, Fc 도메인은 Fc 수용체에 대한 결합 및/또는 효과기 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다.

[0080] 특정한 양태에서, Fc 수용체는 Fc γ 수용체이다. 하나의 양태에서, Fc 수용체는 인간 Fc 수용체이다. 하나의 양태에서, Fc 수용체는 활성 Fc 수용체이다. 구체적인 양태에서, Fc 수용체는 활성 인간 Fc γ 수용체, 보다 구체적으로는 Fc γ R1IIa, Fc γ R1 또는 Fc γ R1Ia, 가장 구체적으로는 Fc γ R1IIa이다. 하나의 양태에서, 효과기 기능은 보체 의존 세포독성(CDC), 항체 의존 세포-매개 세포독성(ADCC), 항체 의존 세포 식균작용(ADCP) 및 시토퀴인 분비의 군으로부터 선택되는 것 중 하나 이상이다. 특정 양태에서, 효과기 기능은 ADCC이다.

[0081] 전형적으로, 동일한 하나 이상의 아미노산 치환은 Fc 도메인의 2개의 아단위 각각에 존재한다. 하나의 양태에서, 하나 이상의 아미노산 치환은 Fc 도메인의 Fc 수용체에 대한 결합 친화도를 감소시킨다. 하나의 양태에서, 하나 이상의 아미노산 치환은 Fc 도메인의 Fc 수용체에 대한 결합 친화도를 2배 이상, 5배 이상 또는 10배 이상 감소시킨다.

[0082] 하나의 양태에서, Fc 도메인은 E233, L234, L235, N297, P331 및 P329(카밧 EU 색인에 따른 번호부여)의 군으로부터 선택되는 위치의 아미노산 치환을 포함한다. 보다 구체적인 양태에서, Fc 도메인은 L234, L235 및 P329(카밧 EU 색인에 따른 번호부여)의 군으로부터 선택되는 위치의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 양태에서, Fc 도메인은 아미노산 치환 L234A 및 L235A(카밧 EU 색인에 따른 번호부여)를 포함한다. 일부 양태에서, Fc 도메인은 IgG₁ Fc 도메인, 특히 인간 IgG₁ Fc 도메인이다. 하나의 양태에서, Fc 도메인은 P329 위치의 아미노산 치환을 포함한다. 보다 구체적인 양태에서, 아미노산 치환은 P329A 또는 P329G, 특히 P329G(카밧 EU 색인에 따른 번호부여)이다. 하나의 양태에서, Fc 도메인은 P329 위치의 아미노산 치환 및 E233, L234, L235, N297 및 P331(카밧 EU 색인에 따른 번호부여)로부터 선택되는 위치의 추가의 아미노산 치환을 포함한다. 보다 구체적인 양태에서, 추가의 아미노산 치환은 E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D 또는 P331S이다. 특정한 양태에서, Fc 도메인은 위치 P329, L234 및 L235(카밧 EU 색인에 따른 번호부여)의 아미노산 치환을 포함한다. 보다 특정한 양태에서, Fc 도메인은 아미노산 돌연변이 L234A, L235A 및 P329G("P329G LALA", "PGLALA" 또는 "LALAPG")를 포함한다. 구체적으로, 바람직한 양태에서, Fc 도메인의 각각의 아단위는 아미노산 치환 L234A, L235A 및 P329G(카밧 EU 색인 번호부여)를 포함하는데, 즉 즉 상기 Fc 도메인의 각각의 제1 및 제2 아단위에서 234 위치의 류신 잔기는 알라닌 잔기로 대체되고(L234A), 235 위치의 류신 잔기는 알라닌 잔기로 대체되고(L235A), 329 위치의 프롤린 잔기는 글리신 잔기로 대체된다(P329G)(카밧 EU 색인에 따른 번호 부여). 하나의 이러한 양태에서, 상기 Fc 도메인은 IgG₁ Fc 도메인, 특히 인간 IgG₁ Fc 도메인이다.

[0083] 바람직한 양태에서, CEA CD3 이중특이성 항체는

[0084] (i) 서열번호 1의 중쇄 CDR(HCDR)1, 서열번호 2의 HCDR2 및 서열번호 3의 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변부; 및 서

열번호 4의 경쇄 CDR(LCDR)1, 서열번호 5의 LCDR2 및 서열번호 6의 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변부를 포함하고, CD3에 특이적으로 결합하는 제1 항원 결합 잔기로서, Fab 경쇄 및 Fab 중쇄의 가변부 또는 불변부, 특히 불변부가 교환되는 교차 Fab 분자인 제1 항원 결합 잔기;

- [0085] (ii) 서열번호 9의 중쇄 CDR(HCDR)1, 서열번호 10의 HCDR2 및 서열번호 11의 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변부; 및 서열번호 12의 경쇄 CDR(LCDR)1, 서열번호 13의 LCDR2 및 서열번호 14의 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변부를 포함하고, CEA에 특이적으로 결합하는 제2 및 제3 항원 결합 잔기로서, 각각의 Fab 분자, 특히 통상적인 Fab 분자인 제2 및 제3 항원 결합 잔기; 및
- [0086] (iii) 제1 및 제2 아단위로 구성된 Fc 도메인
- [0087] 을 포함하는 이중특이성 항체이되, 여기서 제2 항원 결합 잔기는 Fab 중쇄의 C-말단에서 제1 항원 결합 잔기의 Fab 중쇄의 N-말단에 융합하고, 제1 항원 결합 잔기는 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제1 아단위의 N-말단에 융합하고, 제3 항원 결합 잔기는 Fab 중쇄의 C-말단에서 Fc 도메인의 제2 아단위의 N-말단에 융합된다.
- [0088] 하나의 양태에서, 제1 항원 결합 잔기는 서열번호 7의 아미노산 서열에 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 중쇄 가변부 서열 및 서열번호 8의 아미노산 서열에 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 경쇄 가변부 서열을 포함한다.
- [0089] 하나의 양태에서, 제1 항원 결합 잔기는 서열번호 7의 중쇄 가변부 서열 및 서열번호 8의 경쇄 가변부 서열을 포함한다.
- [0090] 하나의 양태에서, 제2 및 제3 항원 결합 잔기는 서열번호 15의 아미노산 서열에 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 중쇄 가변부 서열 및 서열번호 16의 아미노산 서열에 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 경쇄 가변부 서열을 포함한다.
- [0091] 하나의 양태에서, 제2 및 제3 항원 결합 잔기는 서열번호 15의 중쇄 가변부 및 서열번호 16의 경쇄 가변부를 포함한다.
- [0092] 상기 양태에 따른 Fc 도메인은 Fc 도메인과 관련하여 상기 기재된 모든 특질을 단독 또는 조합으로 혼입할 수 있다.
- [0093] 하나의 양태에서, 항원 결합 잔기 및 Fc부는 펩티드 링커, 특히 서열번호 19 및 서열번호 20의 펩티드 링커에 의해 서로 융합된다. 하나의 양태에서, CEA CD3 이중특이성 항체는 서열번호 17의 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하는 폴리펩티드(특히 2개의 폴리펩티드), 서열번호 18의 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하는 폴리펩티드, 서열번호 19의 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하는 폴리펩티드, 및 서열번호 20의 서열에 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.
- [0094] 특히 바람직한 양태에서, CEA CD3 이중특이성 항체는 서열번호 17의 서열을 포함하는 폴리펩티드(특히 2개의 폴리펩티드), 서열번호 18의 서열을 포함하는 폴리펩티드, 서열번호 19의 서열을 포함하는 폴리펩티드, 및 서열번호 20의 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다(CEA TCB).
- [0095] 특히 바람직한 양태에서, CEA CD3 이중특이성 항체는 CEA TCB이다.
- [0096] 본 발명에 따른 제형을 위해, CEA CD3 이중특이성 항체는 약 1 내지 약 200 mg/mL, 바람직하게는 약 1 내지 약 100 mg/mL, 보다 바람직하게는 약 10 내지 약 75 mg/mL, 가장 바람직하게는 약 20 내지 약 50 mg/mL의 농도로 사용된다. 바람직한 양태에서, 상기 제형은 약 20 내지 약 50 mg/mL, 특히 약 50 mg/mL의 CEA CD3 이중특이성 항체를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 제형은 약 5 mg/mL의 CEA CD3 이중특이성 항체를 포함한다.
- [0097] 제1 양상에서, 본 발명은
- [0098] 4.0 내지 7.0의 pH로
- [0099] 1 내지 200 mg/mL의 CEA CD3 이중특이성 항체;
- [0100] 1 내지 100 mM의 완충제;
- [0101] 0.001 내지 1%(w/v)의 계면활성제; 및

- [0102] 1 내지 500 mM의 하나 이상의 안정화제
- [0103] 를 포함하는 약학 제형에 관한 것이다.
- [0104] 본 발명에 따른 제형에 포함될 수 있는 CEA CD3 이중특이성 항체는 본원에 상세히 기재되어 있다. CEA TCB가 특히 바람직하다.
- [0105] 바람직한 양태에서, 본 발명에 따른 제형에 포함된 CEA CD3 이중특이성 항체의 농도는 1 내지 100 mg/mL, 바람직하게는 10 내지 75 mg/mL, 가장 바람직하게는 20 내지 50 mg/mL이다. 20 mg/mL 또는 50 mg/mL, 가장 바람직하게는 50 mg/mL의 농도가 특히 바람직하다. 추가로 바람직한 양태에서, CEA CD3 이중특이성 항체의 농도는 5 내지 50 mg/mL이다. 5 mg/mL, 20 mg/mL 또는 50 mg/mL의 농도가 이러한 양태에 따라 특히 바람직하다. 추가로 바람직한 양태에서, CEA CD3 이중특이성 항체의 농도는 1 내지 10 mg/mL이다. 5 mg/mL의 농도가 이러한 양태에 따라 특히 바람직하다.
- [0106] 또 다른 바람직한 양태에서, 본 발명에 따른 제형에 포함되는 완충제는 히스티딘 완충제, 바람직하게는 L-히스티딘/HCl 완충제이다. L-히스티딘/HCl 완충제(즉 완충 제제로서 L-히스티딘)가 특히 바람직하다.
- [0107] 바람직하게는, 완충제의 농도는 10 내지 50 mM, 보다 바람직하게는 15 내지 30 mM, 가장 바람직하게는 20 mM이다.
- [0108] 바람직하게는, 완충제는 5.0 내지 6.0, 보다 바람직하게는 5.5 ± 0.5 , 가장 바람직하게는 5.5 ± 0.3 의 pH를 제공한다.
- [0109] 바람직한 양태에서, 본 발명에 따른 제형에 포함되는 계면활성제는 폴리솔베이트, 바람직하게는 폴리솔베이트 20 또는 폴리솔베이트 80, 가장 바람직하게는 폴리솔베이트 20이다.
- [0110] 바람직하게는, 계면활성제는 0.01 내지 0.1%(w/v), 보다 바람직하게는 0.02 내지 0.05%, 가장 바람직하게는 0.05% 농도이다.
- [0111] 또 다른 바람직한 양태에서, 본 발명에 따른 제형에 포함되는 하나 이상의 안정화제는 염, 바람직하게는 나트륨 클로라이드, 사카라이드, 바람직하게는 트레할로스 이수화물 또는 수크로스, 및 아미노산, 바람직하게는 아르기닌 하이드로클로라이드로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직하게는, 하나 이상의 안정화제는 수크로스이다.
- [0112] 바람직하게는, 하나 이상의 안정화제의 농도는 120 내지 300 mM, 보다 바람직하게는 220 내지 250 mM, 가장 바람직하게는 230 내지 240 mM이다.
- [0113] 바람직한 양태에서, 본 발명에 따른 제형은 염, 사카라이드 및 아미노산의 군으로부터 선택되는 제1 안정화제, 및 메티오닌인 제2 안정화제를 포함한다.
- [0114] 바람직한 양태에서, 제1 안정화제의 농도는 120 내지 300 mM, 바람직하게는 220 내지 250 mM, 보다 바람직하게는 230 내지 240 mM이고, 제2 안정화제 메티오닌은 5 내지 25 mM, 바람직하게는 5 내지 15 mM, 보다 바람직하게는 10 mM의 농도로 존재한다.
- [0115] 특히 바람직한 양태에서, 본 발명에 따른 제형은 제1 안정화제로서 사카라이드, 바람직하게는 수크로스, 및 제2 안정화제로서 메티오닌을 포함한다. 사카라이드의 농도는 (특히 CEA CD3 이중특이성 항체의 농도가 50 mg/mL 이상인 양태에서) 바람직하게는 약 230 mM이고, 메티오닌은 약 10 mM이다. 일부 양태에서, 특히 CEA CD3 이중특이성 항체가 50 mg/mL 이하(예를 들어 5 mg/mL 또는 20 mg/mL)인 양태에서, 사카라이드의 농도는 약 240 mM이고, 메티오닌의 농도는 약 10 mM이다.
- [0116] 하나의 양태에서, 본 발명에 따른 제형은
- [0117] 5.5 ± 0.5 의 pH로
- [0118] 5 내지 50 mg/mL의 CEA CD3 이중특이성 항체;
- [0119] 15 내지 30 mM의 L-히스티딘;
- [0120] 0.02 내지 0.05%(w/v)의 폴리솔베이트 20;
- [0121] 120 내지 300 mM의 수크로스; 및

- [0122] 임의적으로 5 내지 25 mM의 메티오닌
- [0123] 을 포함하는 약학 제형을 포함한다.
- [0124] 추가의 양태에서, 본 발명에 따른 제형은
- [0125] 5.5±0.5의 pH로
- [0126] 5 내지 50 mg/mL의 CEA CD3 이중특이성 항체;
- [0127] 15 내지 25 mM의 L-히스티딘;
- [0128] 0.03 내지 0.05%(w/v)의 폴리솔베이트 20;
- [0129] 220 내지 250 mM의 수크로스; 및
- [0130] 5 내지 15 mM의 메티오닌
- [0131] 을 포함하는 약학 제형을 포함한다.
- [0132] 추가의 양태에서, 본 발명에 따른 제형은
- [0133] 5.5±0.3의 pH로
- [0134] 5 내지 50 mg/mL의 CEA CD3 이중특이성 항체;
- [0135] 15 내지 25 mM의 L-히스티딘;
- [0136] 0.03 내지 0.05%(w/v)의 폴리솔베이트 20;
- [0137] 220 내지 250 mM의 수크로스; 및
- [0138] 5 내지 15 mM의 메티오닌
- [0139] 을 포함하는 약학 제형을 포함한다.
- [0140] 추가의 양태에서, 본 발명에 따른 제형은
- [0141] 5.5±0.5의 pH로
- [0142] 20 내지 50 mg/mL의 CEA CD3 이중특이성 항체;
- [0143] 15 내지 30 mM의 L-히스티딘;
- [0144] 0.02 내지 0.05%(w/v)의 폴리솔베이트 20;
- [0145] 120 내지 300 mM의 수크로스; 및
- [0146] 임의적으로 5 내지 25 mM의 메티오닌
- [0147] 을 포함하는 약학 제형을 포함한다.
- [0148] 추가의 양태에서, 본 발명에 따른 제형은
- [0149] 5.5±0.5의 pH로
- [0150] 20 내지 50 mg/mL의 CEA CD3 이중특이성 항체;
- [0151] 15 내지 25 mM의 L-히스티딘;
- [0152] 0.03 내지 0.05%(w/v)의 폴리솔베이트 20;
- [0153] 220 내지 250 mM의 수크로스; 및
- [0154] 5 내지 15 mM의 메티오닌
- [0155] 을 포함하는 약학 제형을 포함한다.
- [0156] 추가의 양태에서, 본 발명에 따른 제형은
- [0157] 5.5±0.3의 pH로

- [0158] 20 내지 50 mg/mL의 CEA CD3 이중특이성 항체;
- [0159] 15 내지 25 mM의 L-히스티딘;
- [0160] 0.03 내지 0.05%(w/v)의 폴리솔베이트 20;
- [0161] 220 내지 250 mM의 수크로스; 및
- [0162] 5 내지 15 mM의 메티오닌
- [0163] 을 포함하는 약학 제형을 포함한다.
- [0164] 추가의 양태에서, 본 발명에 따른 제형은
- [0165] 5.5±0.5의 pH로
- [0166] 1 내지 10 mg/mL의 CEA CD3 이중특이성 항체;
- [0167] 15 내지 30 mM의 L-히스티딘;
- [0168] 0.02 내지 0.05%(w/v)의 폴리솔베이트 20;
- [0169] 120 내지 300 mM의 수크로스; 및
- [0170] 임의적으로 5 내지 25 mM의 메티오닌
- [0171] 을 포함하는 약학 제형을 포함한다.
- [0172] 추가의 양태에서, 본 발명에 따른 제형은
- [0173] 5.5±0.5의 pH로
- [0174] 1 내지 10 mg/mL의 CEA CD3 이중특이성 항체;
- [0175] 15 내지 25 mM의 L-히스티딘;
- [0176] 0.03 내지 0.05%(w/v)의 폴리솔베이트 20;
- [0177] 220 내지 250 mM의 수크로스; 및
- [0178] 5 내지 15 mM의 메티오닌
- [0179] 을 포함하는 약학 제형을 포함한다.
- [0180] 추가의 양태에서, 본 발명에 따른 제형은
- [0181] 5.5±0.3의 pH로
- [0182] 1 내지 10 mg/mL의 CEA CD3 이중특이성 항체;
- [0183] 15 내지 25 mM의 L-히스티딘;
- [0184] 0.03 내지 0.05%(w/v)의 폴리솔베이트 20;
- [0185] 220 내지 250 mM의 수크로스; 및
- [0186] 5 내지 15 mM의 메티오닌
- [0187] 을 포함하는 약학 제형을 포함한다.
- [0188] 특히 바람직한 양태에서, 본 발명에 따른 제형은
- [0189] 5.5±0.5의 pH로
- [0190] 50 mg/mL의 CEA CD3 이중특이성 항체, 바람직하게는 CEA TCB;
- [0191] 20 mM의 L-히스티딘;
- [0192] 0.05%(w/v)의 폴리솔베이트 20;
- [0193] 230 mM의 수크로스; 및

- [0194] 10 mM의 메티오닌
- [0195] 을 포함하는 약학 제형을 포함한다.
- [0196] 추가로 바람직한 양태에서, 본 발명에 따른 제형은
- [0197] 5.5±0.3의 pH로
- [0198] 50 mg/mL의 CEA CD3 이중특이성 항체, 바람직하게는 CEA TCB;
- [0199] 20 mM의 L-히스티딘;
- [0200] 0.05%(w/v)의 폴리솔베이트 20;
- [0201] 230 mM의 수크로스; 및
- [0202] 10 mM의 메티오닌
- [0203] 을 포함하는 약학 제형을 포함한다.
- [0204] 추가로 바람직한 양태에서, 본 발명에 따른 제형은
- [0205] 5.5±0.5의 pH로
- [0206] 20 mg/mL의 CEA CD3 이중특이성 항체, 바람직하게는 CEA TCB;
- [0207] 20 mM의 L-히스티딘;
- [0208] 0.05%(w/v)의 폴리솔베이트 20;
- [0209] 240 mM의 수크로스; 및
- [0210] 10 mM의 메티오닌
- [0211] 을 포함하는 약학 제형을 포함한다.
- [0212] 추가로 바람직한 양태에서, 본 발명에 따른 제형은
- [0213] 5.5±0.3의 pH로
- [0214] 20 mg/mL의 CEA CD3 이중특이성 항체, 바람직하게는 CEA TCB;
- [0215] 20 mM의 L-히스티딘;
- [0216] 0.05%(w/v)의 폴리솔베이트 20;
- [0217] 240 mM의 수크로스; 및
- [0218] 10 mM의 메티오닌
- [0219] 을 포함하는 약학 제형을 포함한다.
- [0220] 추가로 바람직한 양태에서, 본 발명에 따른 제형은
- [0221] 5.5±0.5의 pH로
- [0222] 5 mg/mL의 CEA CD3 이중특이성 항체, 바람직하게는 CEA TCB;
- [0223] 20 mM의 L-히스티딘;
- [0224] 0.05%(w/v)의 폴리솔베이트 20;
- [0225] 240 mM의 수크로스; 및
- [0226] 10 mM의 메티오닌
- [0227] 을 포함하는 약학 제형을 포함한다.
- [0228] 추가로 바람직한 양태에서, 본 발명에 따른 제형은
- [0229] 5.5±0.3의 pH로

- [0230] 5 mg/mL의 CEA CD3 이중특이성 항체, 바람직하게는 CEA TCB;
- [0231] 20 mM의 L-히스티딘;
- [0232] 0.05%(w/v)의 폴리솔베이트 20;
- [0233] 240 mM의 수크로스; 및
- [0234] 10 mM의 메티오닌
- [0235] 을 포함하는 약학 제형을 포함한다.
- [0236] 특정 양태에서, 본 발명에 따른 제형은 나트륨 클로라이드를 포함하지 않는다. 특정 양태에서, 상기 제형은 2가 양이온을 포함하지 않는다. 특정 양태에서, 상기 제형은 시트레이트를 포함하지 않는다. 특정 양태에서, 상기 제형은 폴리올을 포함하지 않는다. 특정 양태에서, 상기 제형은 텍스트란을 포함하지 않는다. 특정 양태에서, 상기 제형은 리신을 포함하지 않는다.
- [0237] 본 발명에 따른 제형은 액체 형태, 동결건조 형태, 또는 동결건조 형태로부터 재구성된 액체 형태일 수 있다. 특정 양태에서, 상기 제형은 액체 형태이다.
- [0238] 본원에 사용된 "액체"는 본 발명에 따른 제형과 관련하여 대기압하에 적어도 약 2 내지 약 8°C의 온도에서 액체인 제형을 나타낸다.
- [0239] 본원에 사용된 용어 "동결건조"는 본 발명에 따른 제형과 관련하여 당업계에 자체적으로 공지되어 있는 동결건조법에 제조된 제형을 나타낸다. 용매(예를 들어 물)은 동결에 이어서 진공하에 얼음의 승화에 및 고온에서 잔류하는 물의 탈착에 의해 제거된다. 동결건조물은 약 0.1 내지 5%(w/w)의 잔류 습도를 갖고 분말 또는 물리적으로 안정한 케이크로서 존재한다. 동결건조물은 재구성 매질의 첨가 후 신속한 용해에 의해 특징지어진다.
- [0240] 본원에 사용된 용어 "재구성 형태"는 본 발명에 따른 제형과 관련하여 동결건조되고 재구성 매질의 첨가에 의해 재용해된 제형을 나타낸다. 적합한 재구성 매질은 비한정적으로 주사용 물(WFI), 주사용 정균수(BWFI), 나트륨 클로라이드 용액(예를 들어 0.9%(w/v) NaCl), 글루코스 용액(예를 들어 5% 글루코스), 계면활성제-함유 용액(예를 들어 0.01% 폴리솔베이트 20), pH-완충된 용액(예를 들어 포스페이트-완충된 용액)을 포함한다.
- [0241] 본 발명에 따른 제형은 생리적으로 잘 관용될 수 있고 용이하게 제조될 수 있고 정밀하게 조제될 수 있고 저장 기간, 반복 냉동 및 해동 사이클 및 역학적 응력에 따른 제품 및 응집물의 분해에 대해 안정하다.
- [0242] 본 발명은 본 발명에 따른 제형의 제조 방법을 추가로 포함한다. 상기 제조 방법은 CEA CD3 이중특이성 항체를 예상 완충 조성물을 함유하는 정용여과(diafiltration) 완충제에 대해 완충-교환하는 단계, 및 필요에 따라, 항체를 정용여과에 의해 농축하는 단계, 이어서, 스탁(stock) 용액으로서 부형제(예를 들어 트레할로스 다이하이드레이트, 수크로스, 아르기닌, 나트륨 클로라이드 또는 메티오닌)를 항체 용액에 첨가하는 단계, 이어서, 스탁 용액으로서 계면활성제는 항체/부형제 용액에 첨가하는 단계, 및 최종적으로, 완충 용액을 사용하여 항체의 농도를 목적하는 최종 농도로 조정하는 단계(이에 의해 최종 부형제 및 계면활성제 농도에 도달함)를 포함한다.
- [0243] 다르게는, 부형제는 CEA CD3 이중특이성 항체를 포함하는 출발 용액에 고체로서 첨가될 수도 있다. CEA CD3 이중특이성 항체가 고체 형태, 예를 들어 동결건조물인 경우, 본 발명에 따른 제형은 먼저 이중특이성 항체를, 임의적으로 하나 이상의 부형제를 포함하는, 물 또는 완충 용액에 용해시킨 후, 추가의 부형제를 스탁 용액 또는 고체로서 첨가함에 의해 제조될 수 있다. CEA CD3 이중특이성 항체는 유리하게는 모든 추가의 부형제를 포함하는 용액에 직접 용해될 수 있다. 본 발명에 따른 제형에 존재하는 부형제 중 하나 이상은, 예를 들어 이중특이성 항체의 제조 후에 수행되는 정제의 최종 단계에서 제형의 부형제 중 하나 또는 하나 초과, 바람직하게는 모두를 포함하는 용액에 CEA CD3 이중특이성 항체를 직접 용해시킴으로써 CEA CD3 이중특이성 항체의 제조 방법 동안 또는 종결시에 이미 첨가된 것일 수 있다. 이중특이성 항체 및 부형제를 포함하는 용액이 목적하는 pH를 아직 갖지 않는 경우, 이는 바람직하게는 완충제에 이미 존재하는 산 또는 염기를 사용하여 산 또는 염기를 첨가함으로써 조정된다. 이는 멸균 여과에 후속으로 수행된다.
- [0244] 본 발명은 질병 치료에 사용하기 위한 본 발명에 따른 제형, 또는 질병, 특히 세포 증식 질환(여기서 CEA가 발현되고, 특히 CEA가 동일한 세포 유형의 정상 조직에 비해 비정상적으로 발현(예를 들어 과발현)됨) 치료에 유용한 약제의 제조를 위한 본 발명에 따른 제형의 용도를 추가로 포함한다. 상기 질환은 상이한 유형의 암, 예컨대 대장암, 폐암, 췌장암, 유방암 및 위암을 포함한다. CEA 발현 수준은 당업계에 공지되어 있는 방법(예를 들어 면역 조직화학 분석, 면역 형광 분석, 면역 효소 분석, ELISA, 유세포 분석, 방사성 면역 분석, 웨스턴 블

롯, 리간드 결합 또는 키나제 활성화 등)에 의해 측정될 수 있다. 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 제형을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 전술한 질환의 치료 방법을 포함한다.

[0245] 본 발명의 제형은 당업계에 공지되어 있는 다양한 방법에 의해 투여될 수 있다. 당업자에 의해 이해될 것인 바, 투여의 경로 및/또는 방식은 목적하는 결과에 따라 달라질 것이다.

[0246] 본 발명의 제형을 특정 투여 경로에 의해 투여하기 위해, 상기 제형을 희석액에 희석하는 것이 필요할 수 있다. 약학적으로 허용되는 희석제는 염수, 글루코스, 링거액 및 완충제 수용액을 포함한다.

[0247] 바람직하게는, 본 발명에 따른 제형은 정맥내(i.v.), 피하(s.c.) 또는 약학 분야에 주지되어 있는 임의의 기타 비경구 투여 방법에 의해 투여될 수 있다.

[0248] 본원에 사용된 어구 "비경구 투여" 및 "비경구적 투여"는 소화관 및 국소 투여 이외의, 통상적으로는 주사에 의한 투여 방식을 의미하고, 비한정적으로 정맥내, 근육내, 동맥내, 경막내, 피막내, 안와내, 심장내, 피내, 복강내, 경기관, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 뇌척수막내, 척수내, 경막외 및 흉골하 주사 및 주입을 포함한다.

[0249] 제형은 상기 제형은 주사 또는 주입 시스템에 의해 전달가능한 정도로 멸균성이고 유체여야 한다. 물 이외에도, 담체는 등장성 완충된 염수 용액, 에탄올, 폴리올(예를 들어 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 프로필렌 글리콜 등), 및 이의 적합한 혼합물일 수 있다.

[0250] 본 발명에 따른 제형은 당업계에 공지되어 있는 방법, 예를 들어 한외여과-정용여과, 투석, 첨가 및 혼합, 동결 건조, 재구성 및 이의 조합에 의해 제조될 수 있다. 본 발명에 따른 제형의 제조의 예는 하기 기재된 것에서 찾을 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0251] 하기 실시예는 본 발명을 더욱 상세히 설명하지만, 본 발명의 범주를 한정하는 것으로서 간주되어서는 안된다. 본원에 인용된 모든 특허 및 과학 문헌의 개시는 그 전체가 참조로 명백히 혼입된다.

[0252] 실시예

[0253] 본 발명에 따른 CEA CD3 이중특이성 항체 제형을 일반적인 준비 및 분석 방법을 사용한 하기 제공되는 실험적 결과 및 하기 정리한 분석을 기반으로 개발하였다.

[0254] 실시예 1: 제형을 위한 성분의 제조

[0255] CEA CD3 이중특이성 항체 CEA TCB를 재조합 단백질의 제조로부터 일반적으로 공지되어 있는 기법에 의해 제조하였다. 실시예에 따른 제형을 제조하기 위해, CEA TCB 항체를 약 5.5의 pH에서 20 mM 히스티딘 완충제(L-히스티딘/HCl 완충제) 중 표적 농도를 약 20 내지 30% 상회하는 농도로 제공하였다.

[0256] 본 발명에 따른 제형의 부형제는 실제로 널리 사용되고 당업자에게 공지되어 있다. 따라서, 이에 대해 더 상세한 설명은 불필요하다.

[0257] 본 발명에 따른 액상 약물 제품을 하기와 같이 개발하였다.

[0258] 실시예 2: 액상 제형의 제조

[0259] 액상 제형의 제조를 위해, CEA TCB를 예상 완충 조성물을 함유하는 정용여과 완충제에 대해 완충-교환하고, 필요에 따라, 정용여과에 의해 표적 농도를 약 20 내지 30% 상회하는 항체의 농도로 농축하였다. 정용여과 과정의 완료 후, 부형제(예를 들어 수크로스, 나트륨 클로라이드 및 메티오닌)을 상기 항체 용액에 스타크 용액으로서 첨가하였다. 이어서, 계면활성제는 50 내지 200배 스타크 용액으로서 첨가하였다. 최종적으로, 단백질 농도를 완충제에 의해 약 5 mg/mL, 약 20 mg/mL 또는 약 50 mg/mL의 최종 CEA TCB 농도가 되도록 조정하였다.

[0260] 모든 제형을 0.22 μm 저단백질 결합 필터를 통해 여과하고 ETFT(에틸렌과 테트라플루오로에틸렌의 공중합체)-코팅된 고무 마개 및 알루미늄 주름형 뚜껑으로 밀폐되는 6 mL 유리 멸균 바이알에 무균 충전하였다. 충전 부피는 약 2.7 mL였다. 상기 제형을 상이한 시간 간격 동안 ICH 기후 조건(5°C, 25°C 및 40°C)에서 저장하고 진탕(5°C 및 25°C에서 200분⁻¹의 진동수로 1주간 진탕) 및 냉동-해동 응력법에 의해 응력을 가했다. 응력 시험을 적용하기 전후에 샘플을 하기 분석법에 의해 분석하였다.

[0261] 1) 자외선 분광 광도법;

[0262] 2) 크기 배제 크로마토그래피(SEC);

[0263] 3) 이온 교환 크로마토그래피(IEC);

[0264] 4) 용액의 탁도 측정; 및

[0265] 5) 보이는 입자에 대한 육안 관찰.

[0266] 단백질 함량의 측정에 사용하는 자외선 분광 광도법을 퍼킨 엘머(Perkin Elmer) λ35 자외선 자외선 분광 광도계에서 240 내지 400 nm의 파장에서 수행하였다. 순수한 단백질 샘플을 상용하는 제형 완충제에 의해 약 0.5/mL로 희석하였다. 단백질 농도를 하기 수학적 식 1에 따라 계산하였다.

[0267] [수학적 식 1]

$$\text{단백질 함량} = \frac{(A_{280nm} - A_{320nm}) \times \text{희석 배율}}{\epsilon \left[\frac{cm^2}{mg} \right] \times d_{cm}}$$

[0268]

[0269] 280 nm에서 자외선 흡광을 320 nm에서의 광 산란에 대해 보정하고 희석 배율(이는 순수한 샘플 및 희석 완충제의 칭량된 질량 및 밀도로부터 측정됨)를 곱하였다. 피제수(numerator)를 큐벳(cuvette) 경로 길이 d와 흡광 계수 ε의 곱으로 나누었다.

[0270] 크기 배제 크로마토그래피(SEC)를 사용하여 상기 제형 중 가용성 고분자량 중(응집물) 및 저분자량 가수분해 생성물(LMW)을 검출하였다. 상기 방법을 자외선 검출기를 갖고 토소 바이오사이언스(Tosoh Bioscience) TSK-Gel G3000SWXL 컬럼이 장착된 워터스 얼라이언스(Waters Alliance) HPLC 기기상에서 수행하였다. 온전 단량체, 응집물 및 가수분해 생성물을 0.2 M 칼륨 포스페이트, 0.25 M 칼륨 클로라이드, pH 7.0를 이동상으로서 사용하여 등용매 용리 프로파일에 의해 분리하고 280 nm의 파장에서 검출하였다.

[0271] 이온 교환 크로마토그래피(IEC)를 사용하여 상기 제형 중 CEA TCB의 순전하를 변하게 하는 화학적 분해 생성물을 검출하였다. 자외선 검출기(280 nm의 검출 파장) 및 써모사이언티픽 맵팩(ThermoScientific) MabPac SCX-10 BioLC 컬럼(4 mm x 250 mm)이 장착된 적합한 HPLC 기기를 사용하였다. 물 중 10 mM HEPES, pH 7.7 및 10 mM HEPES, 1 M NaCl, pH 7.7을 이동상 A 및 B로서 1.0 mL/분의 유동 속도로 사용하였다.

[0272] 탁도의 측정을 위해, HACH 2100AN 탁도계를 실온에서 사용하여 유색광을 FTU(탁도 단위)로 측정하였다.

[0273] 제형 A, B, C, H, I 및 J의 샘플을 세이데너더(Seidenader) V90-T 육안 관찰 계기를 사용하여 보이는 입자에 대해 분석하였다. 제형 D, E, F 및 G의 샘플을 심플렉스 앰플 테스트링 아파라투스(Simplex Ampoule Testing Apparatus) OPTIMA I를 사용하여 보이는 입자에 대해 분석하였다.

[0274] 제형 A 내지 J에 대한 안정성 시험의 결과를 하기 첨부한 표 1에 제시한다.

[0275] 결과는 최대의 항체 안정성 및 입자가 없는 항체 제형을 획득하기 위해서는, L-히스티딘/HCl 완충제가 가장 바람직한 완충제이고, 메티오닌과 조합된 수크로스가 가장 바람직한 안정화제이고, 폴리솔베이트 20이 가장 바람직한 계면활성제임을 나타낸다.

[표 1]

본 발명에 따른 액상 CEA CD3 이중특이성 항체 제형의 조성 및 안정성 데이터										
제형 A(50 mg/ml CEA TCB, 20 mM L-히스티딘 pH 5.5, 230 mM 수크로스, 0.05% 폴리솔베이트 20 및 10 mM 메티오닌의 조성을 갖는 액상 제형)										
저장 조건	저장 시간	단백질 농도 (mg/ml)	크기 배제-HPLC			이온 교환-HPLC			탁도 (FTU)	보이는 입자 (용기당)
			HMW(%)	주요 피크 (%)	LMW(%)	산성 피크 (%)	주요 피크 (%)	염기성 피크 (%)		
-	초기	49.5	1.6	98.2	0.1	25.5	71.9	2.6	7.0	0
진명 5°C	1 주	n/a	1.6	98.2	0.2	25.2	71.8	3	7.0	0
진명 25°C	1 주	n/a	1.6	98.2	0.2	25.4	71.8	2.8	7.1	0
냉동/해동	(5 사이클)	n/a	1.6	98.2	0.2	25.5	72.1	2.4	7.0	0
2 내지 8°C	5 주	n/a	1.6	98.2	0.2	25.3	71.9	2.8	7.6	0

[0276]

[0277]

저장 조건	저장 시간	단백질 농도 (mg/ml)	크기 배제-HPLC			이온 교환-HPLC			탁도 (FTU)	보이는 입자 (용기당)
			HMW(%)	주요 피크 (%)	LMW(%)	산성 피크 (%)	주요 피크 (%)	염기성 피크(%)		
25℃	8 주	49.4	1.6	98.2	0.2	25.0	72.3	2.7	7.3	0
	12 주	49.2	1.7	98.1	0.2	25.2	72.3	2.5	7.7	0
	24 주	49.7	1.7	98.0	0.3	25.0	71.6	3.5	7.5	0
	36 주	n/a	1.7	98.0	0.4	26.3	71.0	2.6	7.2	0
	5 주	n/a	1.6	97.9	0.5	26.3	70.8	2.9	7.5	0
	8 주	50	1.6	97.7	0.6	26.9	70.4	2.8	7.8	0
	12 주	50.2	1.7	97.5	0.8	28.7	68.4	2.9	7.8	0
	24 주	49.9	1.7	97.0	1.3	31.4	64.7	3.9	7.5	0
	5 주	n/a	2.0	95.7	2.3	37.3	59	3.7	9.7	0
	8 주	50	1.6	94.6	3.8	44.9	51.2	3.9	10.1	0
	12 주	50	3	92.1	5.0	52.6	43.3	4.1	11.0	0
	40℃									
제형 B(50 mg/ml CEA TCB, 20 mM L-히스티딘 pH 5.5, 130 mM 나트륨 클로라이드 및 0.05% 폴리솔베이트 20 의 조성물 갖는 액상 제형)										
-	초기	49.6	1.8	98.1	0.1	25.4	71.8	2.8	28.3	0

저장 조건	저장 시간	단백질 농도 (mg/mL)	크기 배제-HPLC			이온 교환-HPLC			탁도 (FTU)	보이는 입자 (용기당)
			HMW(%)	주요 피크 (%)	LMW(%)	산성 피크 (%)	주요 피크 (%)	염기성 피크(%)		
진탕 5°C	1 주	n/a	1.8	98	0.2	25.3	71.8	3	28.6	0
	1 주	n/a	1.9	97.9	0.2	25.1	71.8	3.1	28.5	0
진탕 25°C	n/a		1.7	98.1	0.2	25.4	72	2.6	28.6	0
	(5 사이클)		n/a							
냉동/ 해동	5 주	n/a	1.9	97.9	0.2	25	72	3	30.4	0
	8 주	50	1.9	97.9	0.2	24.7	72.4	2.9	29.4	0
2 내지 8°C	12 주	49.3	2.1	97.7	0.2	25.1	72.2	2.7	30.0	0
	5 주	n/a	2.1	97.4	0.5	25.7	70.7	3.6	29.5	0
25°C	8 주	49.7	2.2	97.1	0.7	25.8	70.8	3.4	30.2	0
	12 주	49.7	2.4	96.7	0.9	27.5	69.2	3.3	30.1	>10
40°C	5 주	n/a	3.3	94.0	2.7	34.4	60.8	4.8	44.8	>10
	8 주	48.8	2.4	93.4	4.2	39.8	55.6	4.7	56.4	>10
	12 주	48.9	4.7	89.3	5.9	47.1	47.9	5.0	59.4	>10

제형 C(50 mg/mL CEA TCB, 20 mM L-히스티딘 pH 5.5, 230 mM 수크로스 및 0.05% 폴리솔베이트 20
의 조성을 갖는 액상 제형)

-	준기	49.4	1.7	98.2	0.1	25.5	72.0	2.6	7.2	0
진탕 5℃	1 주	n/a	1.7	98.2	0.2	25.1	71.9	3	7.0	0
진탕 25℃	1 주	n/a	1.6	98.1	0.2	25.4	71.7	2.9	7.1	0
냉동/ 해동	(5 사이클)	n/a	1.6	98.2	0.2	25.4	72.2	2.4	7.1	0
2 배지 8℃	5 주	n/a	1.7	98.1	0.2	25.3	71.9	2.8	7.8	0
	8 주	49.2	1.6	98.1	0.2	25.0	72.3	2.7	7.4	0
	12 주	49.1	1.8	98.0	0.3	25.3	72.2	2.5	7.9	0
25℃	5 주	n/a	1.7	97.8	0.5	26.3	70.7	3	7.7	0
	8 주	50.1	1.7	97.6	0.7	26.7	70.4	2.9	7.8	0
	12 주	49.6	1.9	97.3	0.8	28.5	68.6	2.9	8.0	0
40℃	5 주	n/a	2.2	95.4	2.4	37.6	58.5	3.8	9.4	0
	8 주	50	2	94.1	3.9	45.6	50.5	3.9	10.6	0
	12 주	49.9	4	91.0	5.0	53.2	42.5	4.3	11.2	0
제형 D(5 mg/ml, CFA TCB, 20 mM L-히스티딘 pH 5.5, 240 mM 수크로스, 10 mM 메티오닌 및 0.05% 폴리솔베이트 20 의 조성을 갖는 액상 제형)										
저장 조건	저장 시간	단백질 농도	크기 배계-HPLC	이온 교환-HPLC	투도	보이는 입자				

		(mg/ml)	HMW(%)	주요 피크 (%)	LMM(%)	산성 피크 (%)	주요 피크 (%)	염기성 피크(%)	(FTU)	(용기당)
-	초기	4.9	1.0	98.9	0.0	30.3	66.6	3.1	2.1	2
진탕 5℃	1 주	4.9	1.0	98.9	0.1	30.6	66.2	3.2	2.2	0
진탕 25℃	1 주	4.9	1.0	98.8	0.2	30.4	66.1	3.5	2.2	0
냉동/해동 (5 사이클)		4.9	1.0	98.9	0.1	30.5	66.5	3.0	2.3	0
	4 주	4.9	1.0	98.8	0.2	30.6	66.3	3.1	2.2	0
	8 주	5.0	1.0	98.8	0.1	30.5	66.3	3.1	2.2	0
2 배지 8℃	13 주	4.8	0.9	98.8	0.3	30.8	66.3	2.9	2.2	0
	4 주	4.9	1.0	98.7	0.3	30.5	65.7	3.9	2.2	0
	8 주	4.8	1.0	98.6	0.4	31.4	64.9	3.8	2.3	0
	13 주	4.8	0.9	98.5	0.7	32.8	63.7	3.5	2.1	0
25℃	4 주	4.9	1.0	97.4	1.6	37.8	57.1	5.1	2.2	0
	8 주	4.9	1.2	95.8	3.0	39.0	56.2	4.8	2.2	0
	13 주	4.9	1.2	94.1	4.7	68.5	27.2	4.3	2.4	0
계정 E(5 mg/ml CFA TCB, 20 ml L-히스터딘 pH 5.5, 240 ml 수크로스 및 0.05% 폴리솔베이트 20										

의 조성을 갖는 액상 제형)										
저장 조건	저장 시간	단백질 농도 (mg/ml)	크기 배제-HPLC			이온 교환-HPLC			탁도 (FTU)	보이는 입자 (용기당)
			HMW(%)	주요 피크 (%)	LMW(%)	산성 피크 (%)	주요 피크 (%)	염기성 피크(%)		
-	초기	5.1	1.0	98.9	0.0	30.2	66.8	3.0	2.2	0
진탕 5℃	1 주	5.1	1.1	98.9	0.0	30.6	66.4	3.0	2.4	0
진탕 25℃	1 주	5.1	1.0	98.8	0.2	30.4	66.0	3.6	2.3	0
냉동/ 해동 (5 사이클)		5.1	1.0	98.8	0.1	30.6	66.3	3.1	2.3	0
2 내지 8℃	4 주	5.1	1.1	98.8	0.2	30.6	66.4	3.0	2.2	0
	8 주	5.1	1.1	98.8	0.2	30.5	66.4	3.1	2.4	0
	4 주	5.1	1.0	98.7	0.3	30.7	98.7	3.9	2.4	0
25℃	8 주	5.0	1.0	98.5	0.5	31.9	98.5	3.9	2.3	0
	4 주	5.1	2.0	95.7	2.2	34.8	59.5	5.7	2.3	0
	8 주	5.1	6.0	89.7	4.3	49.5	43.8	6.7	2.8	0
40℃										

제형 F(5 mg/ml CEA TCB 및 L-히스티딘 pH 5.5
의 조성을 갖는 액상 제형)

저장 조건	저장 시간	단백질 농도	크기 배제-HPLC	이온 교환-HPLC	탁도	보이는 입자
-------	-------	--------	------------	------------	----	--------

시험 조건	시험 시간	단백질 농도 (mg/mL)	크기 배제-HPLC				이온 교환-HPLC			탁도 (FTU)	포이는 업차 (용기량)
			HMW(%)	주요 피크 (%)	LMW(%)	산성 피크 (%)	주요 피크 (%)	염기성 피크(%)			
-	초기	4.6	1.6	98.2	0.1	18.4	81.6	0	2.5	0	
진탕 5℃	1 주	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	
진탕 25℃	1 주	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	
병동/ 해동 (5 사이클)		n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	
2 내지 8℃	4 주	4.4	1.6	98.3	0.1	19.2	80.8	0	2.4	0	
25℃	4 주	4.5	1.6	98.1	0.3	19.7	80.3	0	2.5	0	
40℃	4 주	4.5	1.7	96.7	1.7	29.3	70.7	0	2.4	0	

제형 G(5 mg/mL CEA TCS 및 20 mM Na-P03 pH 7.0
의 조성을 갖는 액상 제형)

냉동/ 해동	(5 사이클)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
2 내지 8℃	4 주	5.0	2.2	97.7	0.2	21.0	79.0	0	3.5	0
25℃	4 주	5.0	2.5	97.1	0.3	37.6	62.4	0	3.9	0
40℃	4 주	5.0	4.2	93.0	2.8	89.5	10.5	0	3.7	>7

제형 H(50 mg/mL CEA TCB, 20 mM L-히스티딘 pH 5.5, 240 mM 수크로스 및 0.05% 폴리솔베이트 20 의 조성을 갖는 액상 제형)

저장 조건	저장 시간	단백질 농도 (mg/mL)	크기 배제-HPLC			이온 교환-HPLC			탁도 (FTU)	보이는 입자 (용기당)
			HMW(%)	주요 피크 (%)	LMW(%)	산성 피크 (%)	주요 피크 (%)	염기성 피크(%)		
-	초기	50.0	1.0	98.8	0.2	20.3	77.7	2.0	7.2	0
건담 5℃	1 주	n/a	1.0	98.7	0.3	20.00	77.8	2.1	7.1	0
건담 25℃	1 주	n/a	1.1	98.6	0.3	20.20	77.7	2	7.9	0
냉동/ 해동 (5 사이클)		n/a	1.0	98.7	0.2	20.2	77.6	2.1	7.2	1-5
2 내지 8℃	4 주	n/a	0.9	98.8	0.3	20.1	77.8	2.1	7.3	0
	7 주	n/a	1.1	98.8	0.2	20.3	77.3	2.3	7.1	1-5
25℃	4 주	n/a	1.1	98.4	0.5	21.7	76.2	2.1	8.4	0

40℃	7 주	50.1	1.3	98.1	0.6	26.3	70.9	2.7	7.8	0
	4 주	n/a	1.6	95.9	2.5	35.4	61.5	3.1	8.9	0
	7 주	50.5	4.5	91.8	3.7	45.8	49.9	4.4	10.8	0

제형 1(50 mg/mL CEA TCB, 20 mM 1-히스티딘 pH 5.5, 240 mM 수크로스 및 0.05% 폴우사며 188을 갖는 액상 제형)

직장 조건	직장 시간	단백질 농도 (mg/mL)	크기 배제-HPLC			이온 교환-HPLC			탁도 (FTU)	보이는 입자 (용기당)
			HMW(%)	주요 피크 (%)	LMW(%)	산성 피크 (%)	주요 피크 (%)	염기성 피크(%)		
-	초기	50.4	1.0	98.8	0.2	20.4	77.8	1.8	7.5	0
진탕 5℃	1 주	n/a	1.0	98.7	0.2	20.20	78	1.8	7.8	>10
진탕 25℃	1 주	n/a	1.1	98.6	0.3	20.40	77.7	1.9	9.6	>10
냉동/해동 (5 사이클)		n/a	1.0	98.7	0.2	20.4	77.4	2.3	7.6	0
2 내지 8℃	4 주	n/a	0.9	98.8	0.3	20.2	77.8	2.0	7.6	0
	7 주	n/a	1.1	98.8	0.2	20.3	77.6	2.2	7.5	0
	4 주	n/a	1.1	98.4	0.5	24.0	73.9	2.1	9.1	0
25℃	7 주	50.3	1.3	98.1	0.6	28.0	69.3	2.6	8.9	>10
	4 주	n/a	1.6	95.9	2.5	35.4	61.4	3.2	9.1	0

저장 조건	저장 시간	단백질 농도 (mg/ml)	크기 배제-HPLC			이온 교환-HPLC			타도 (FTU)	보이는 입자 (용기당)
			HMW(%)	주요 피크 (%)	LMW(%)	산성 피크 (%)	주요 피크 (%)	열기성 피크(%)		
-	준기	49.7	1.0	98.8	0.2	20.3	77.6	2.0	7.0	0
진탕 5℃	1 주	n/a	1.1	98.7	0.2	19.90	77.9	2.2	7.6	>10
진탕 25℃	1 주	n/a	3.0	96.7	0.3	19.80	77.6	2.6	95.5	>10
냉동/ 해동	(5 사이클)	n/a	1.0	98.7	0.2	20.2	77.9	1.9	7.3	>10
2 내지 8℃	4 주	n/a	0.9	98.8	0.3	20.0	77.9	2.1	6.9	0
	7 주	n/a	1.0	98.8	0.2	20.3	77.3	2.4	7.2	>10
	4 주	n/a	1.0	98.5	0.5	21.3	76.6	2.1	7.0	0
25℃	7 주	50.1	1.2	98.2	0.6	22.4	74.7	2.9	7.3	0
	4 주	n/a	1.5	96.0	2.5	35.2	61.6	3.2	8.5	0
	7 주	50.2	3.5	92.8	3.7	45.9	49.8	4.4	9.5	>10

제형 J(50 mg/mL, CEA TCB, 20 mM L-히스티딘 pH 5.5 및 240 mM 수크로스)
의 조성을 갖는 액상 제형)

서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> F. Hoffmann-La Roche AG
- <120> Bispecific antibody formulation
- <130> P34356
- <140> PCT/EP2018/070289
- <141> 2018-07-26
- <150> EP 17183667.9
- <151> 2017-07-28

<160> 23

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3 HCDR1

<400> 1

Thr Tyr Ala Met Asn

1 5

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3 HCDR2

<400> 2

Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser

1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3 HCDR3

<400> 3

His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3 LCDR1

<400> 4

Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3 LCDR2

<400> 5

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3 LCDR3

<400> 6

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val

1 5

<210> 7

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3 VH

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 8

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><

223> CD3 VL

<400> 8

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

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala

65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA HCDR1

<400> 9

Glu Phe Gly Met Asn

1 5

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA HCDR2

<400> 10

Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA HCDR3

<400> 11

Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA LCDR1

<400> 12

Lys Ala Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr Val Ala

1 5 10

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA LCDR2

<400> 13

Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg

1 5

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA LCDR3

<400> 14

His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu Phe Thr

1 5 10

<210> 15

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA VH

<400> 15

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 16

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA VL

<400> 16

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

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

100 105

<210> 17

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA CD3 bsAb LC(CEA)

<400> 17

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 18

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA CD3 bsAb LC(CD3)

<400> 18

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
 35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
 65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala
 100 105 110

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 115 120 125

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 130 135 140

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 145 150 155 160

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 165 170 175

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 180 185 190

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 195 200 205

Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210

<210> 19

<211> 694

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA CD3 bsAB HC(CEA-CD3-Fc)

<400> 19

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

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

 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu
 225 230 235 240

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
 245 250 255
 Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val
 260 265 270
 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Ile Arg Ser
 275 280 285
 Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 290 295 300
 Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met
 305 310 315 320
 Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His
 325 330 335
 Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 340 345 350
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val
 355 360 365
 Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 370 375 380
 Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
 385 390 395 400
 Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
 405 410 415
 Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
 420 425 430
 Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 435 440 445
 Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 450 455 460
 Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 465 470 475 480
 Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

485 490 495
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

500 505 510
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

515 520 525
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn

530 535 540
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp

545 550 555 560
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly

565 570 575
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu

580 585 590
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn

595 600 605
 Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

610 615 620
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr

625 630 635 640
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys

645 650 655
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

660 665 670
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu

675 680 685
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys

690

<210> 20

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA CD3 bsAB HC(CEA-Fc)

<400> 20

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala

130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His

195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

 85 90 95

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

 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

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

130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

 165 170 175

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

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210 215 220

Pro

225

<210> 22

<211> 207

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser

1 5 10 15

Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr

 20 25 30

Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr

 35 40 45

Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys

50 55 60

Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp

65 70 75 80

His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr

 85 90 95

Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu

 100 105 110

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

 115 120 125

Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu

 130 135 140

Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys

145 150 155 160

Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn

 165 170 175

Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg

 180 185 190

Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile

