



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0121772
(43) 공개일자 2023년08월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/30 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 16/3007 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2023-7021786
(22) 출원일자(국제) 2021년12월17일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년06월28일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2021/061983
(87) 국제공개번호 WO 2022/130348
국제공개일자 2022년06월23일

(30) 우선권주장
20215766.5 2020년12월18일
유럽특허청(EPO)(EP)
63/135,996 2021년01월11일 미국(US)

(71) 출원인
람카프 바이오 베타 엘티디.
스위스 8808 슈비츠 페피콘 반호프스트라체 1

(72) 발명자
부아토이스 바네사
프랑스 74270 콘타민-사르진 체민 데 라 클룬자 32데
세킨저 안자
스위스 8853 라헨 가르텐슈트라체 3
호세 디르크
스위스 8808 페피콘 반호프슈트라체 1

(74) 대리인
김진희, 김태홍

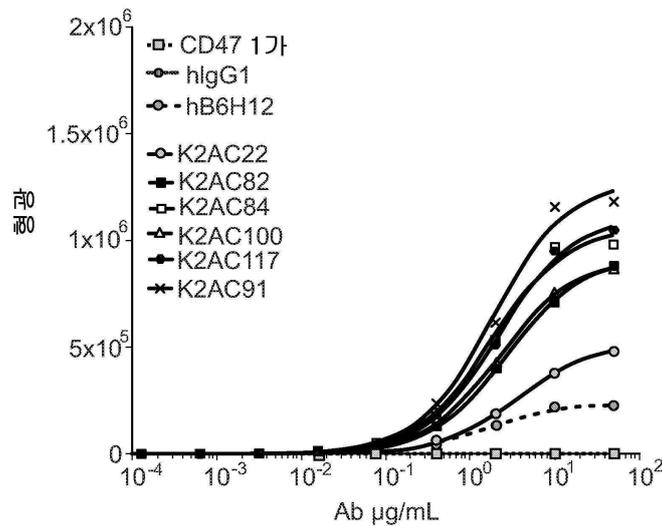
전체 청구항 수 : 총 55 항

(54) 발명의 명칭 **CEACAM5 및 CD47에 대한 이중특이적 항체**

(57) 요약

본 발명은 인간 암배아 항원 CEACAM5 및 인간 CD47에 결합하는 이중특이적 항체에 관한 것이다. 추가로, 본 발명은 상기 이중특이적 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 및 숙주 세포에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 상기 항체를 선별 및 제조하는 방법 및 질환 치료에서 상기 항체를 사용하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 단일요법에서 및 조합 요법에서의 이중특이적 항체의 치료적 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

C07K 16/2803 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/41 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제1 결합부, 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 제2 결합부를 포함하는 이중특이적 항체로서,

a) 제1 결합부는 중쇄 가변 영역으로서 서열 번호 1의 CDRH1, 서열 번호 2의 CDRH2 및 서열 번호 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고,

b) 제1 결합부는 경쇄 가변 영역으로서

b1) 서열 번호 14의 CDRL1, 서열 번호 15의 CDRL2, 및 서열 번호 16의 CDRL3, 또는

b2) 서열 번호 17의 CDRL1, 서열 번호 18의 CDRL2, 및 서열 번호 19의 CDRL3,

b3) 서열 번호 20의 CDRL1, 서열 번호 21의 CDRL2, 및 서열 번호 22의 CDRL3,

b4) 서열 번호 23의 CDRL1, 서열 번호 24의 CDRL2, 및 서열 번호 25의 CDRL3, 및

b5) 서열 번호 26의 CDRL1, 서열 번호 27의 CDRL2, 및 서열 번호 28의 CDRL3

으로 구성된 군으로부터 선택되는 CDRL 세트를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,

c) 제2 결합부는 중쇄 가변 영역으로서 서열 번호 1의 CDRH1, 서열 번호 2의 CDRH2 및 서열 번호 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 경쇄 가변 영역으로서 서열 번호 7의 CDRL1, 서열 번호 8의 CDRL2, 및 서열 번호 9의 CDRL3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것

을 특징으로 하는, 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제1 결합부, 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 제2 결합부를 포함하는 이중특이적 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 제1 결합부 중 가변 중쇄 영역으로서 서열 번호 4의 가변 중쇄 영역, 및 가변 경쇄 영역으로서 서열 번호 32, 서열 번호 33, 서열 번호 34, 서열 번호 35, 및 서열 번호 36으로 구성된 군으로부터 선택되는 가변 경쇄 영역을 포함하고, 제2 결합부 중 가변 중쇄 영역으로서 서열 번호 4의 가변 중쇄 영역 및 가변 경쇄 영역으로서 서열 번호 10의 가변 경쇄 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 3

제1항에 있어서, 제1 결합부 중 서열 번호 5를 포함하는 중쇄, 및 서열 번호 37, 서열 번호 38, 서열 번호 39, 서열 번호 40, 및 서열 번호 41로 구성된 군으로부터 선택되는 경쇄를 포함하고, 제2 결합부 중 서열 번호 5의 중쇄 영역 및 서열 번호 11을 갖는 경쇄를 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄로서 서열 번호 6의 공통 중쇄를 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 제1 결합부에 대해 1가이고, 제2 결합부에 대해 1가인 이중특이적 항체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 불변 및 가변 프레임워크 영역 서열이 인간의 것인 이중특이적 항체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 결합부의 경쇄가 람다 경쇄(VLCL)이고, 제2 결합부의 경쇄가 카파 경쇄(VKCK)인 이중특이적 항체.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 인간 IgG1 타입인 이중특이적 항체.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가, 당조작되지 않은 동일한 이중특이적 항체와 비교하여 푸코스 잔기 개수가 감소되도록 당조작된 Fc 영역을 포함하는 것인 이중특이적 항체.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중특이적 항체가 CEACAM5에의 결합에 대하여 서열 번호 43 및 44의 가변 경쇄 및 중쇄 영역을 포함하는 항CEACAM5 항체 SM3E와 경쟁하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 2 내지 10 nM의 결합 친화도(KD)로 재조합 인간 CEACAM5에 결합하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 100 nM 내지 600 nM의 결합 친화도로 인간 재조합 CD47에 결합하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 CEACAM3 및 재조합 CEACAM5에의 결합에 대한 KD 값의 비가 100배 이상인 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 14

제13항에 있어서, 재조합 CEACAM3 및 재조합 CEACAM5에의 결합에 대한 KD 값의 비가 100배 내지 200배인 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이적 항체 K2AC22의 식작용 지수와 비교하여 LoVo 종양 세포의 식작용 지수의 최대값이 적어도 8% 증가한 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 16

제15항에 있어서, LoVo 종양 세포의 식작용 지수의 최대값이 8% 내지 20% 증가한 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, K2AC22의 식작용 지수와 비교하여 Ls174T 종양 세포의 식작용 지수의 최대값이 적어도 8% 증가한 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 18

제17항에 있어서, Ls174T 종양 세포의 식작용 지수의 최대값이 8% 내지 25% 증가한 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 동일한 실험 조건하에 K2AC22에 대해 측정된 IC50보다 10배 이상 더 낮은 IC50으로 MKN-45 세포 상의 CD47과 SIRP α 사이의 상호작용을 억제시키는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 20

제19항에 있어서, MKN-45 세포 상의 CD47과 SIRP α 사이의 상호작용을 10배 내지 30배의 IC50 배수로 억제시키는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, MKN-45 세포 상의 CD47과 SIRP α 사이의 상호작용을 0.1 nM 이하의 IC50으로 억제시키는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 22

제21항에 있어서, MKN-45 세포 상의 CD47과 SIRP α 사이의 상호작용을 0.1 nM 내지 0.04 nM의 IC50으로 억제시키는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, CEACAM5에의 결합에 대하여 시비사타맵과 경쟁하지 않는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 이중특이적 항체는, 300 nM의 농도에서 인간 CEACAM5 및 CD3 ϵ 에 결합하는 제2 이중특이적 항체가 제1 이중특이적 항체의 MKN-45 세포에의, 또는 LS174T 세포에의 결합 곡선의 EC50을 3배 초과하는 더 높은 농도로 이동시키지 않는다는 것을 특징으로 하는 것인 이중특이적 항체.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 제2 이중특이적 항체가 TCB2014 또는 시비사타맵인 이중특이적 항체.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드들의 세트.

청구항 27

제26항의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드들을 포함하는 발현 벡터.

청구항 28

제27항의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 29

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 이중특이적 항체를 제조하는 방법으로서, a) 상기 이중특이적 항체의 생산을 허용하는 조건하에서 제28항의 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 b) 상기 항체를 단리시키는 단계를 포함하는 제조 방법.

청구항 30

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 암의 요법에서 사용하기 위한 이중특이적 항체.

청구항 31

제30항에 있어서, 암이 고형 암인 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 32

제30항에 있어서, 암이 결장직장암, NSCLC(비소세포 폐암), 위암, 췌장암, 유방암, 또는 또 다른 CEACAM5 발현 암인 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 33

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, CEACAM5를 발현하는 암을 앓는 피험체를 치료하기 위한 의약 제조에서 사용하기 위한 이중특이적 항체.

청구항 34

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, CEACAM5를 발현하는 암을 앓는 피험체의 치료에서 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제3 결합부, 및 인간 CD3 ϵ 에 특이적으로 결합하는 제4 결합부를 포함하는 제2 이중특이적 항체와의 동시, 개별, 또는 순차적인 조합으로 사용하기 위한 이중특이적 항체.

청구항 35

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 이중특이적 항체가 TCB2014 또는 시비사타맙인, 동시, 개별, 또는 순차적인 조합으로 사용하기 위한 이중특이적 항체.

청구항 36

제34항 또는 제35항에 있어서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체 및 제2 이중특이적 항체가 상기 피험체에게 6 내지 15일 간격으로 동시에 투여되는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.

청구항 37

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항의 이중특이적 항체 및 약학적으로 허용되는 부형제 또는 담체를 포함하는 약학 조성물.

청구항 38

제37항에 있어서, 의약으로서 사용하기 위한 약학 조성물.

청구항 39

제37항 또는 제38항에 있어서, 고형 암 치료에서 의약으로서 사용하기 위한 약학 조성물.

청구항 40

제37항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 결장직장암, NSCLC(비소세포 폐암), 위암, 췌장암, 또는 유방암 치료에서 의약으로서 사용하기 위한 약학 조성물.

청구항 41

CEACAM5를 발현하는 암을 앓는 피험체에게 치료 유효량의, 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항의 이중특이적 항체, 또는 제37항 내지 제40항 중 어느 한 항의 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, CEACAM5를 발현하는 암을 앓는 피험체를 치료하는 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 암이 인간 암인 방법.

청구항 43

제41항 또는 제42항에 있어서, 피험체가 환자인 방법.

청구항 44

제41항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 결장직장암 세포, NSCLC(비소세포 폐암) 세포, 위암 세포,

췌장암 세포, 유방암 세포, 또는 CEACAM5를 발현하는 또 다른 종양 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 45

제41항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이적 항체가 화학요법 또는 방사선 요법과 함께 조합하여 투여되는 것인 방법.

청구항 46

유효량의, 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항의 CEACAM5 x CD47 이중특이적 항체, 및 CEACAM5 및 CD3에 대한 제 2 이중특이적 항체를 투여하는 단계를 포함하는, 종양을 앓는 인간 환자를 치료하는 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, CEACAM5 x CD47 이중특이적 항체 및 CEACAM5 및 CD3 항체가 경쟁하지 않는 것인 방법.

청구항 48

제46항 또는 제47항에 있어서, 항체가 동시에 투여되는 것인 방법.

청구항 49

제41항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항의 이중특이적 항체를 0.01 내지 10 mg/kg의 1회 이상의 용량으로 투여받는 것인 방법.

청구항 50

제46항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 CEACAM5 x CD3 이중특이적 항체를 0.01 내지 10 mg/kg의 1회 이상의 용량으로, 및 CEACAM5 x CD47 이중특이적 항체를 1 내지 20 mg/kg의 1회 이상의 용량으로 투여받는 것인 방법.

청구항 51

제46항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 항체가 TCB2014 또는 시비사타맙인 방법.

청구항 52

CEACAM5를 발현하는 암을 앓는 피험체에게 치료 유효량의, 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항의 이중특이적 항체를 투여하는 단계를 포함하는, CEACAM5를 발현하는 암을 앓는 피험체에서 생존 기간을 연장시키는 방법.

청구항 53

제52항에 있어서, 암이 결장직장암, 비소세포 폐암(NSCLC), 위암, 췌장암, 또는 유방암인 것을 특징으로 하는 것인 방법.

청구항 54

제52항 또는 제53항에 있어서, 이중특이적 항체가 화학요법 및/또는 방사선 요법과 함께 조합하여 투여되는 것인 방법.

청구항 55

제52항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항의 이중특이적 항체를 0.01 내지 10 mg/kg의 1회 이상의 용량으로 투여받는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

서열 목록에 대한 참조

본 출원과 함께 출원된 전자적으로 제출된 서열 목록의 내용은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다.

[0001]

[0002]

[0003] 본 발명의 기술분야

[0004] 본 발명은 인간 암배아 항원 CEACAM5(CEA: carcinoembryonic antigen)에, 및 인간 CD47에 결합하는 이중특이적 항체(CEAxCD47 이중특이적 항체)에 관한 것이다. 추가로, 본 발명은 상기 이중특이적 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 및 숙주 세포에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 상기 항체를 선별 및 제조하는 방법 및 질환 치료에서 상기 항체를 사용하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 단일 요법에서의, 및 특히, CEAxCD3 T 세포 이중특이적 항체(TCB: T-cell bispecific antibody) 및 PD-1 또는 PD-L1의 억제제를 이용하는 조합 요법에서의 CEAxCD47 이중특이적 항체의 치료적 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 본 발명의 배경

[0006] CEA는 염색체 19q13 상의 CEA 관련 세포 부착 분자(CEACAM: CEA-related cell adhesion molecule)와 임신 특이적 당단백질(PSG: pregnancy-specific glycoprotein) 하위군 사이에서 나뉘어진 22개의 유전자에 의해 코딩된 인간에서 12개의 밀접하게 관련된 단백질을 포함하는 CEACAM 패밀리에 속한다(문헌 [Beauchemin N & Arabzadeh A, Cancer Metastasis Rev. 2013]). CEACAM은 예컨대, 세포-세포 인식과 같은 다양한 생리학적 프로세스에 관여하고, 조직 구조의 형성 및 혈관신생에서 인슐린 항상성 조절 및 T 세포 증식에 이르는 세포 프로세스를 조절하고; CEACAM은 또한 숙주 특이적 바이러스 및 박테리아에 대한 수용체로 확인되었다(문헌 [Kuespert K et al., Curr Opin Cell Biol. 2006]). CEA(CEACAM5 또는 CD66e; UniProtKB - P06731)는 배아 및 태아 발달 초기에 존재하며, 정상적인 성인 조직에서 그의 발현을 유지한다. 그의 주요 발현 부위는 결장의 원주형 상피 세포 및 배상 세포, 특히, 소장의 상부 1/3 및 빈 내강 표면에 있다.

[0007] CEA는 결장직장 암종, 위 암종, 폐 암종 및 췌장 암종을 포함하나, 이에 제한되지 않는 상피 기원의 종양에서 (과다) 발현되며(문헌 [Beauchemin N & Arabzadeh A, Cancer Metastasis Rev. 2013]에서 리뷰), 그의 진단 발현을 유지하지 못하게 됨에 따라 전체 세포 표면에 걸쳐 분포하게 된다(문헌 [Hammarstrom, Semin Cancer Biol 1999]).

[0008] 인간 PD-1 축 길항제 및 T 세포 재지향 및 활성화 항CEA/항CD3 이중특이적 항체의 조합에 의해 CEA 발현 암을 치료하는 방법은 US20140242079 및 W02017118657(이들은 각각 그 전문이 참조로 포함)에 언급되어 있고, 임상 결과는 ASCO 연례 회의 2017에서 발표되었다(문헌 [Taberero et al., J Clin Oncol 35, 2017 (suppl:abstr 3002)]).

[0009] 면역 체크포인트 경로의 2개 이상의 상이한 표적에 결합하는 면역 체크포인트 길항제, 및 CEA 및 T 세포 표면 항원에 결합하는 T 세포 재지향제를 투여함으로써 종양을 치료하는 방법이 W02015112534에 언급되어 있다. CEACAM5 및 과립구에 결합하는 클래스 I 항체는 US20110064653에 언급되어 있다.

[0010] 인간 CD47(UniProtKB - Q08722(CD47_HUMAN; IAP))은 리간드 트롬보스폰딘-1(TSP-1) 및 신호 조절 단백질 알파(SIRP α: signal-regulatory protein alpha; CD172a; UniProtKB P78324)에 결합하고, 특히, SIRP α를 발현하는 대식세포에 대해 면역계에 "돈트 잇 미(don't eat me)" 신호를 보내는 역할을 할 수 있는 막관통 단백질이다. 종양 세포 표면 상의 CD47에의 SIRP α의 결합을 강력하게 억제(낮은 IC50)시키는 것은 대식세포에 의한 종양 세포의 식작용을 증가시키는 조치이다. CD47은 아포토시스, 증식, 부착 및 이동을 비롯한 다양한 세포 프로세스에 관여한다. 추가로, 면역 및 혈관신생 반응에서 중요한 역할을 한다. CD47은 혈액 종양과 고형 종양 환자의 종양 세포에서 과다발현된다. CD47에 대한 항체는 최신 기술에 기술되어 있으며, 예컨대, 림프종과 같은 혈액 악성종양 및 고형 종양, 예를 들어, 위암을 비롯한, 상이한 종양 엔티티에서 유망한 임상전 및 초기 임상 활성을 보여주었다(문헌 [Weiskopf K., European Journal of Cancer 76 (2017) 100-109]; [Huang Y et al., J Thorac Dis 2017;9(2):E168-E174]; [Kaur et al., Antibody Therapeutics, 3 (2020) 179-192]). CD47에 결합하는 IgG1 서브클래스의 항체는 Fc에 의존하는 방식으로 혈소판 고갈 및 적혈구(RBC: red blood cell) 및 헤모글로빈 감소를 초래할 수 있다(예컨대, US20140140989 참조). 이러한 역효과를 피하기 위해, W02017196793에는 항CD47 항체의 IgG4 서브클래스의 돌연변이체 형태(IgG4PE, S228P 돌연변이 뿐만 아니라, FcγR 결합을 감소시키기 위한 L235E 돌연변이 포함)가 기술되어 있다. FcγR 결합 및 이펙터 기능이 크게 감소된 상기 항CD47 항체는 상기 혈소판 고갈을 초래하지 않는다. CD47 및 CD20에 대한 단일 도메인 이중특이적 항체는 (von Bommel PE et al.)(문헌 [Oncoimmunol. 7 (2018) e386361]) 및 (Piccione EC et al.)(문헌 [mAbs 7 (2015)946-956])에 의해 기술되었다. (Dheilily E. et al.)(문헌 [Mol. Thera. 25 (2017) 523-533]); W02014087248 또한 참조)은 CD19 및 CD47에 대한 이중특이적 항체를 기술한다.

- [0011] 서열 번호 5의 공통 중쇄(VH-CH1) 및 서열 번호 10의 CD47-상호작용 가변 경쇄 영역 VL을 포함하는 CEACAM5 및 CD47에 대한 이중특이적 항체는 W02019234576, EP19213002, 및 US62943726(그의 전문이 참조로 포함)에 기술되어 있다. 서열 번호 5의 공통 중쇄 및 서열 번호 10의 CD47-상호작용 가변 경쇄 영역 VL을 포함하는 CD19 및 CD47에 대한 이중특이적 항체는 W02014087248(그의 전문이 참조로 포함)에 기술되어 있다. W02018098384는 CD47 및 CEACAM5를 공동 표적화하는 이중특이적 항체에 관한 것이다. EP3623388은 CD47과 SIRP α 사이의 상호작용을 차단하기 위한 낮은 친화도를 갖는 융합 단백질 및 종양 표적화 아암을 포함하는 이중특이적 결합 분자에 관한 것이다. WO 2018/057955는 CD47과 메조텔린, 둘 모두에 결합하고, 공통 중쇄를 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것이다. W02019016411은 CD47 및 종양 항원을 표적화하는 이중특이적 항체 분자에 관한 것이다.
- [0012] 혈액 악성종양의 치료에서 상당한 진전이 이루어졌다. 이는 여러 타입의 진행성 고형 종양 치료에서 이루어진 진보와 대조된다. 국소 진행성 또는 특히, 전이성 고형암 타입의 치료에서의 특정 진전에도 불구하고, 결장직장암, 췌장암, 폐암 등과 같은 진행성 암을 앓는 환자의 무진행 생존(PFS: progression-free survival) 및 전체 생존(OS: overall survival)은 여전히 다소 제한적이고, 일반적으로 치유법이 없다. 암 면역요법에 많은 희망이 있었고, 확실하지만, 제한적인 성공이 있다. 종양은 T 이펙터 세포 및 대식세포와 같은 다른 면역 세포에 의한 파괴로부터 세포를 보호하기 위한 대책을 개발한다. 지난 10년(수십 년) 동안 암 면역요법 기반 전략법은 상기 종양 방어 대책에 대응하고, 암 세포에 대하여 T 세포를 재지향시키는 데 어느 정도 성공을 이루었다. 상기 전략법의 가장 두드러진 예는 특정 면역 체크포인트의 억제제/활성제이다. 예를 들어, PD-1 축 길항제와 같은 체크포인트 억제제는 특정 고형암과 싸우기 위해 T 이펙터 세포를 재활성화시키는 것으로 나타났다. 그러나, 모든 고형 종양 타입이 PD-1 축 길항제에 반응하는 것은 아니며, 이러한 반응 타입에서도 종종 50%보다도 훨씬 적은 환자가 예컨대, 항PD-1 또는 PD-L1 항체를 이용한 치료로부터 관련된 이익을 갖는다. 예를 들어, 진행성 결장직장암 환자 중 10% 미만의 진행성 결장직장암 환자 10% 미만이 PD-1 축 억제제를 사용한 치료에 적합하다(특히 암에서 현미부수체 불안정성 MSI(Microsatellite Instability)을 보이는 진행성 결장직장암 환자 중 대략 4%가 약간의 이익을 갖는다).
- [0013] 키메라 항원 수용체(CAR: chimeric antigen receptor) T 세포를 사용한 임상 T 세포 요법 및 T 세포 이중특이적 항체를 사용한 요법은 혈액 악성종양에서 유망한 임상 결과를 전달하였다. 그러나, 임상 T 세포 요법을 사용한 임상 연구, 예를 들어 다양한 고형 종양에서 CAR T 세포는 대부분 반응을 보이지 않거나, 또는 미미한 반응만을 보였다(예컨대, 문헌 [Xu et al., Expert Review of Anticancer Therapy 2017, 17, 1099-1106]; [Greenbaum et al., Biol Blood Marrow Transplant 2020 Oct;26(10):1759-1769]).
- [0014] US20140242079, W02017055389, US20140242080, 및 문헌 [Bacac et al. (Clin. Cancer Res., 22(13), 3286-97 (2016))](이들은 각각 그 전문이 참조로 포함)에는 CEAxCD3 T 세포 이중특이적 항체가 기술되어 있다. W02017055389로부터의 T 세포 이중특이적 항체는 임상전 연구에서 시비사타맘에 비해 강력하게 증가된 T 세포 활성화 효력/효능을 보이며, 이러한 더 높은 효력의 CEAxCD3 T 세포 이중특이적 항체 중 하나는 임상 개발 중에 있었다(NCT03539484에서 R07172508). 본원에서 사용되는 바, "TCB2014"는 CDR로서 US20140242080의 서열 번호 270-276 및 290-296에 제시된 바와 같은 CDR을 포함하는(또한, US20140242079(그 전문이 참조로 포함)의 서열 번호 4-10 및 24-30의 CDR 참조), US20140242080에 기술된 바와 같은 2+1 포맷으로 CEA 및 CD3에 결합하는 이중특이적 항체를 지칭한다. ASCO 연례 회의 2017에서의 (Taberner et al.) 발표(문헌 [J Clin Oncol 35, 2017 (suppl;abstr 3002)])는 CEAxCD3 이중특이적 항체 R0 6958688(시비사타맘)을 단일요법으로 및 항PD-L1 항체 아테졸리주맙과의 조합으로 사용한 진행성/전이성 결장직장암 환자에서의 1상 임상 데이터를 포함하였다. 시비사타맘 단일요법 및 PD-L1 억제제 아테졸리주맙과의 조합에서 안정적인 질환 및 부분 반응이 발견되었다. 2017년 이후 시비사타맘 CEAxCD3에 대한 새로운 임상 데이터가 발표되지 않았다. Q3W 100 mg 시비사타맘과 PD-L1 억제제 아테졸리주맙을 함께 사용하고, B세포 살해 항CD20 항체 오비누투주맙(시비사타맘에 대해 보고된 항약물 항체 ADA(anti drug antibody) 형성을 피하기 위해)을 이용한 전처리를 사용한 한 시험이 2019년 3월 게시되었다(ClinicalTrials gov. Identifier NCT038666339). 현재까지 공개된 데이터는 없다. 최근 현미부수체 안정성을 보이는 진행성 결장직장암 환자에서 Q3W 100mg 시비사타맘 + 아테졸리주맙 + R0712290을 사용한 새로운 임상 시험이 게시되었다(2021년 4월, NCT04826003). R0712290은 섬유아세포 활성화 단백질(FAP: Fibroblast activating Protein) 및 T 세포 공동자극성 인자 4-1BB에 결합하는 이중특이적 융합 단백질로, T 세포의 추가적인 활성화를 일으켜 CEAxCD3와 조합할 경우, 종양 세포의 효능/살해를 증가시키지만, 또한 독성도 증가, 예컨대, 사이토카인 방출도 증가시킨다. MEDI-565(AMG211), 추가의 이중특이적 CEAxCD3 항체, 단일쇄 항체가 임상 개발 중이며, 상기 항체를 사용한 임상 시험 결과가 발표되었다(예컨대, 안전한 질환 유도, 예컨대, 문헌 [M. Pishvaian et al., Clin Colorectal Cancer.2016 DEC; 15(4) 345-351] 참조).

- [0015] CEACD3 이중특이적 항체가 PD-L1 억제 항체와 조합되었을 때 증가된 효능이 보고되었다. 상기 데이터는 진행성 고형 종양에서 CEACD3 이중특이적 항체로 효능이 달성될 수 있다는 것을 보여준다. 그러나, 전반적으로, 단일 요법에서 및 PD-L1 억제제와의 조합에서, 임상 연구에서 대부분의 환자는 여전히 진행 중이었고, 반응을 보인 환자는 기껏해야 부분 관해 및 안정적인 질환을 보였으나, 완전 관해는 달성하지 못했다.
- [0016] CEACD3 시비사타맘과 같은 T 세포 이중특이적 항체로 효능을 증가시키는 한 가지 접근법은 4-1BB 또는 CD28 등과 같은 공동자극성 T 세포 수용체에 대한 효능작용 효과를 통해 추가적인 T 세포를 활성화시키는 제2 약물과의 조합이다. T 세포 이중특이적 항체의 널리 공지된 부작용은 예컨대, 3등급 또는 5등급(사망)과 같이, 더 높은 등급일 수 있는 사이토카인 방출 증후군 CRS(cytokine release syndrome)의 유도이다. T 세포 이중특이적 항체에의 T 세포 공동자극성 수용체를 표적화하는 이중특이적 항체의 추가는 사이토카인 방출의 상당한 증가를 야기할 수 있고, 따라서, 더 높은 등급의 CRS의 위험을 증가시킬 수 있다.
- [0017] 더 우수한 결과를 얻기 위한 또 다른 접근법은 예를 들어, T 세포 이중특이적 항체에 PD-1 체크포인트 축의 억제제를 추가하는 것 뿐만 아니라, 추가 체크포인트 억제제 또는 효능제를 추가하는 것일 수 있다. 그러나, 지금까지 결장직장암 등과 같은 진행성 고형암에서의 상기 조합 접근법에 대한 유망한 임상 데이터는 없다. 진행성 고형 종양 내에서 T 세포의 제한된 이용가능성은 확실히 T 세포 이중특이적 항체와 PD-1 축 억제제 및/또는 다른 체크포인트 억제제 또는 T 세포 공동자극성 수용체에서 이중특이적 효능제로 달성할 수 있는 효능을 제한하는 중요한 메커니즘이다.
- [0018] T 세포 이중특이적 항체 TAAxCD3(TAA=종양 연관 항원(Tumor associated antigen), 예컨대, CEA 및 그외 다수)은 혈액 악성종양, 예컨대, 다발성 골수종, B 세포 악성종양, 예컨대, 미만성 거대 B 세포 림프종, 여포성 림프종 등을 앓는 환자에서 고도로 효과적이다. 시비사타맘 CEACD3을 이용한 임상 결과는 진행성 고형 종양에서도 TAAxCD3의 효능이 있지만(상기 텍스트 참조), 혈액 악성종양에서 달성된 것보다 훨씬 적다는 것을 보여준다. PD-1 축 억제제를 추가하면 효능이 추가될 수 있지만, 제한적일 뿐이다. CD28 또는 4-1BB와 같은 공동자극성 T 세포 수용체에 이중특이적 항체 또는 융합 단백질 효능제를 추가하면, 임상전 시험에서 효능이 증가하지만 독성도 증가하며, 예컨대, 사이토카인 방출도 증가한다. T 세포의 추가 활성화를 목표로 하는 대신, 다른 면역 세포, 특히, 대식세포를 종양 세포로 재지향시키는 치료제를 추가하는 것이 더 성공적일 수 있다. 본 발명은 1. 단일요법으로 및/또는 2. 특히, CEACD3 이중특이적 항체의 종양 세포 사멸 효과를 증가시키기 위해 CEACD3 T 세포 이중특이적 항체와의 조합 요법으로서 CEACAM5 발현 고형 종양에 대해 대식세포를 재지향시키고, 활성화시키는 이중특이적 항체 CEACD47을 다룬다. a 및 회피는 T 세포 공동자극성 수용체에서 이중특이적 효능제와의 조합과 대조적으로 CRS의 위험을 증가시켰다.
- [0019] CEACAM5 및 CD47에 대한 이중특이적 항체는 WO2019234576에 기술되어 있다. WO2019234576에 기술된 한 예시적인 이중특이적 항체는 K2AC22이다(WO2019234576의 서열 번호 65는 K2AC22의 CEACAM5 결합부의 경쇄를 나타내고, WO2019234576의 서열 번호 6은 K2AC22의 공통 중쇄를 나타내고, 서열 번호 10은 K2AC22의 CD47 결합부의 경쇄를 나타낸다). 그러나, CEACAM5 및 CD47에 대한 개선된 이중특이적 항체, 예를 들어, 낮은 독성, 낮은 면역원성 및 바람직한 약동학적 특성과 높은 효능을 조합하는 개선된 항체가 여전히 요구되고 있다. 따라서, 본 발명의 목적은 선행 기술의 CEACAM5 및 CD47에 대한 이중특이적 항체보다 유리한 CEACAM5 및 CD47에 대한 새로운 이중특이적 항체를 제공하는 것이다.

발명의 내용

- [0020] 본 발명의 요약
- [0021] 본 발명은 인간 CEACAM5에 결합할 수 있는 제1 결합부, 및 인간 CD47에 결합할 수 있는 제2 결합부를 포함하는 신규 이중특이적 항체를 제공한다. 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 종양 세포에 대해, CEACAM5를 다량으로 발현하는 종양 세포 및 소량으로 CEACAM5를 발현하는 종양 세포, 둘 모두에 대해 높은 식작용 활성을 유도한다. 한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 면역 세포, 특히, 대식세포의 관여에 기인하여 주로 최적화된 식작용/항체 의존적 세포 식작용(ADCP: antibody-dependent cellular phagocytosis)을 통해 그의 항종양 세포 효과를 유도한다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 감소된 비의 CEACAM3 대 CEACAM5 결합 친화도, 각각 CEACAM5-CD47 항체 K2AC22 대비 증가된 비의 KD를 나타낸다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 종양 세포 상에서 발현된 CD47에의 SIRP α 의 결합을 억제하고, 종양 세포의 식작용을 증가시킨다. 인간 CEACAM5 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 개선된 이중특이적 항체는 또한 종양 치료, 특히, 고형 종양 치료에 사용하기에 적합하다.

- [0022] 한 측면에서, 본 발명은
- [0023] a) 제1 결합부는 중쇄 가변 영역으로서 서열 번호 1의 CDRH1, 서열 번호 2의 CDRH2 및 서열 번호 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0024] b) 제1 결합부는 경쇄 가변 영역으로서
- [0025] b1) 서열 번호 14의 CDRL1, 서열 번호 15의 CDRL2, 및 서열 번호 16의 CDRL3, 또는
- [0026] b2) 서열 번호 17의 CDRL1, 서열 번호 18의 CDRL2, 및 서열 번호 19의 CDRL3,
- [0027] b3) 서열 번호 20의 CDRL1, 서열 번호 21의 CDRL2, 및 서열 번호 22의 CDRL3,
- [0028] b4) 서열 번호 23의 CDRL1, 서열 번호 24의 CDRL2, 및 서열 번호 25의 CDRL3, 및
- [0029] b5) 서열 번호 26의 CDRL1, 서열 번호 27의 CDRL2, 및 서열 번호 28의 CDRL3으로 구성된 군으로부터 선택되는 CDRL 세트를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0030] c) 제2 결합부는 중쇄 가변 영역으로서 서열 번호 1의 CDRH1, 서열 번호 2의 CDRH2 및 서열 번호 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및
- [0031] 경쇄 가변 영역으로서 서열 번호 7의 CDRL1, 서열 번호 8의 CDRL2, 및 서열 번호 9의 CDRL3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 인간 CEACAM5(추가로 "CEA"로도 또한 지칭)에 특이적으로 결합하는 제1 결합부, 및 인간 CD47(추가로 "CD47"로도 또한 지칭)에 특이적으로 결합하는 제2 결합부를 포함하는, 이중특이적 항체(추가로 "CEAxCD47 이중특이적 항체," 또는 "본 발명에 따른 이중특이적 항체"로도 또한 지칭)를 제공한다.
- [0032] 본 발명은 상기 측면의 추가 실시양태를 포함한다:
- [0033] 한 실시양태에서, 본 발명은
- [0034] a) 제1 및 제2 결합부는 각각 중쇄 가변 영역으로서 서열 번호 1의 CDRH1, 서열 번호 2의 CDRH2 및 서열 번호 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0035] b) 제1 결합부는 경쇄 가변 영역으로서 서열 번호 14의 CDRL1, 서열 번호 15의 CDRL2, 및 서열 번호 16의 CDRL3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0036] c) 제2 결합부는 경쇄 가변 영역으로서 서열 번호 7의 CDRL1, 서열 번호 8의 CDRL2, 및 서열 번호 9의 CDRL3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제1 결합부 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 제2 결합부를 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것이다.
- [0037] 한 실시양태에서, 본 발명은
- [0038] a) 제1 및 제2 결합부는 각각 중쇄 가변 영역으로서 서열 번호 1의 CDRH1, 서열 번호 2의 CDRH2 및 서열 번호 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0039] b) 제1 결합부는 경쇄 가변 영역으로서 서열 번호 17의 CDRL1, 서열 번호 18의 CDRL2, 및 서열 번호 19의 CDRL3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0040] c) 제2 결합부는 경쇄 가변 영역으로서 서열 번호 7의 CDRL1, 서열 번호 8의 CDRL2, 및 서열 번호 9의 CDRL3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제1 결합부 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 제2 결합부를 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것이다.
- [0041] 한 실시양태에서, 본 발명은
- [0042] a) 제1 및 제2 결합부는 각각 중쇄 가변 영역으로서 서열 번호 1의 CDRH1, 서열 번호 2의 CDRH2 및 서열 번호 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0043] b) 제1 결합부는 경쇄 가변 영역으로서 서열 번호 20의 CDRL1, 서열 번호 21의 CDRL2, 및 서열 번호 22의 CDRL3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0044] c) 제2 결합부는 경쇄 가변 영역으로서 서열 번호 7의 CDRL1, 서열 번호 8의 CDRL2, 및 서열 번호 9의 CDRL3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제1 결합부 및

인간 CD47에 특이적으로 결합하는 제2 결합부를 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것이다.

- [0045] 한 실시양태에서, 본 발명은
- [0046] a) 제1 및 제2 결합부는 각각 중쇄 가변 영역으로서 서열 번호 1의 CDRH1, 서열 번호 2의 CDRH2 및 서열 번호 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0047] b) 제1 결합부는 경쇄 가변 영역으로서 서열 번호 23의 CDRL1, 서열 번호 24의 CDRL2, 및 서열 번호 25의 CDRL3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0048] c) 제2 결합부는 경쇄 가변 영역으로서 서열 번호 7의 CDRL1, 서열 번호 8의 CDRL2, 및 서열 번호 9의 CDRL3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제1 결합부 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 제2 결합부를 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것이다.
- [0049] 한 실시양태에서, 본 발명은
- [0050] a) 제1 및 제2 결합부는 각각 중쇄 가변 영역으로서 서열 번호 1의 CDRH1, 서열 번호 2의 CDRH2 및 서열 번호 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0051] b) 제1 결합부는 경쇄 가변 영역으로서 서열 번호 26의 CDRL1, 서열 번호 27의 CDRL2, 및 서열 번호 28의 CDRL3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0052] c) 제2 결합부는 경쇄 가변 영역으로서 서열 번호 7의 CDRL1, 서열 번호 8의 CDRL2, 및 서열 번호 9의 CDRL3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제1 결합부 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 제2 결합부를 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것이다.
- [0053] 한 실시양태에서, 본 발명은 제1 결합부 중 가변 중쇄 영역으로서 서열 번호 4의 가변 중쇄 영역, 및 가변 경쇄 영역으로서 서열 번호 32, 서열 번호 33, 서열 번호 34, 서열 번호 35, 및 서열 번호 36으로 구성된 군으로부터 선택되는 가변 경쇄 영역을 포함하고, 제2 결합부 중 가변 중쇄 영역으로서 서열 번호 4의 중쇄 가변 쇠 영역 및 가변 경쇄 영역으로서 서열 번호 10의 가변 경쇄 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 이중특이적 항체에 관한 것이다.
- [0054] 한 실시양태에서, 본 발명은 제1 결합부 중 가변 중쇄 영역으로서 서열 번호 4의 가변 중쇄 영역, 및 가변 경쇄 영역으로서 서열 번호 32의 가변 경쇄 영역을 포함하고, 제2 결합부 중 가변 중쇄 영역으로서 서열 번호 4의 가변 쇠 영역 및 가변 경쇄 영역으로서 서열 번호 10을 갖는 가변 경쇄 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 이중특이적 항체에 관한 것이다.
- [0055] 한 실시양태에서, 본 발명은 제1 결합부 중 가변 중쇄 영역으로서 서열 번호 4의 가변 중쇄 영역, 및 가변 경쇄 영역으로서 서열 번호 33의 가변 경쇄 영역을 포함하고, 제2 결합부 중 가변 중쇄 영역으로서 서열 번호 4의 가변 쇠 영역 및 가변 경쇄 영역으로서 서열 번호 10을 갖는 가변 경쇄 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 이중특이적 항체에 관한 것이다.
- [0056] 한 실시양태에서, 본 발명은 제1 결합부 중 가변 중쇄 영역으로서 서열 번호 4의 가변 중쇄 영역, 및 가변 경쇄 영역으로서 서열 번호 34의 가변 경쇄 영역을 포함하고, 제2 결합부 중 가변 중쇄 영역으로서 서열 번호 4의 가변 쇠 영역 및 가변 경쇄 영역으로서 서열 번호 10을 갖는 가변 경쇄 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 이중특이적 항체에 관한 것이다.
- [0057] 한 실시양태에서, 본 발명은 제1 결합부 중 가변 중쇄 영역으로서 서열 번호 4의 가변 중쇄 영역, 및 가변 경쇄 영역으로서 서열 번호 35의 가변 경쇄 영역을 포함하고, 제2 결합부 중 가변 중쇄 영역으로서 서열 번호 4의 가변 쇠 영역 및 가변 경쇄 영역으로서 서열 번호 10을 갖는 가변 경쇄 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 이중특이적 항체에 관한 것이다.
- [0058] 한 실시양태에서, 본 발명은 제1 결합부 중 가변 중쇄 영역으로서 서열 번호 4의 가변 중쇄 영역, 및 가변 경쇄 영역으로서 서열 번호 36의 가변 경쇄 영역을 포함하고, 제2 결합부 중 가변 중쇄 영역으로서 서열 번호 4의 가변 쇠 영역 및 가변 경쇄 영역으로서 서열 번호 10을 갖는 가변 경쇄 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 이중특이적 항체에 관한 것이다.
- [0059] 한 실시양태에서, 본 발명은 제1 결합부 중 서열 번호 5의 중쇄, 및 서열 번호 37, 서열 번호 38, 서열 번호 39, 서열 번호 40, 및 서열 번호 41로 구성된 군으로부터 선택되는 경쇄를 포함하고, 제2 결합부 중 서열 번호

5의 중쇄 및 서열 번호 11을 갖는 경쇄를 포함하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 이중특이적 항체에 관한 것이다.

- [0060] 한 실시양태에서, 본 발명은 제1 결합부 중 서열 번호 5의 중쇄, 및 서열 번호 37의 경쇄를 포함하고, 제2 결합부 중 서열 번호 5의 중쇄 및 서열 번호 11을 갖는 경쇄를 포함하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 이중특이적 항체에 관한 것이다.
- [0061] 한 실시양태에서, 본 발명은 제1 결합부 중 서열 번호 5의 중쇄, 및 서열 번호 38의 경쇄를 포함하고, 제2 결합부 중 서열 번호 5의 중쇄 및 서열 번호 11을 갖는 경쇄를 포함하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 이중특이적 항체에 관한 것이다.
- [0062] 한 실시양태에서, 본 발명은 제1 결합부 중 서열 번호 5의 중쇄, 및 서열 번호 39의 경쇄를 포함하고, 제2 결합부 중 서열 번호 5의 중쇄 및 서열 번호 11을 갖는 경쇄를 포함하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 이중특이적 항체에 관한 것이다.
- [0063] 한 실시양태에서, 본 발명은 제1 결합부 중 서열 번호 5의 중쇄, 및 서열 번호 40의 경쇄를 포함하고, 제2 결합부 중 서열 번호 5의 중쇄 및 서열 번호 11을 갖는 경쇄를 포함하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 이중특이적 항체에 관한 것이다.
- [0064] 한 실시양태에서, 본 발명은 제1 결합부 중 서열 번호 5의 중쇄, 및 서열 번호 41의 경쇄를 포함하고, 제2 결합부 중 서열 번호 5의 중쇄 및 서열 번호 11을 갖는 경쇄를 포함하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 이중특이적 항체에 관한 것이다.
- [0065] 한 실시양태에서, 본 발명은 K2AC82, K2AC84, K2AC91, K2AC100, 또는 K2AC117 이중특이적 항체 중의 것과 동일한 CEACAM5 결합부를 포함하는 이중특이적 항체에 관한 것이다. 상기 실시양태에서, 이중특이적 항체는
 - [0066] · 서열 번호 14-16의 경쇄 CDR, 서열 번호 32의 VL, 및/또는 서열 번호 37의 VLCL(K2AC82),
 - [0067] · 서열 번호 17-19의 CDR, 서열 번호 33의 VL, 및/또는 서열 번호 38의 VLCL(K2AC84),
 - [0068] · 서열 번호 20-22의 CDR, 서열 번호 34의 VL, 및/또는 서열 번호 39의 VLCL(K2AC91),
 - [0069] · 서열 번호 23-25의 CDR, 서열 번호 35의 VL, 및/또는 서열 번호 40의 VLCL(K2AC100),
 - [0070] · 서열 번호 26-28의 CDR, 서열 번호 36의 VL, 및/또는 서열 번호 41의 VLCL(K2AC117), 또는
 - [0071] · 상기 기술된 바와 같은 상기 항체의 CDR 영역 및/또는 경쇄 및 중쇄를 포함하는 유도체를 포함한다.
- [0072] 한 실시양태에서, 불변 및 가변 프레임워크 영역 서열은 인간의 것이다.
- [0073] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 제1 및 제2 결합부가 각각 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 포함하는 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 전장 항체이다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 인간 IgG1 타입의 항체인 것을 특징으로 한다.
- [0074] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 람다 경쇄 가변 도메인(VL) 및 람다 경쇄 불변(CL) 도메인을 포함하는, CEA에 특이적인 제1 결합부, 및 카파 경쇄 가변 도메인(VK) 및 카파 경쇄 불변 도메인(CK)을 포함하는, CD47에 특이적인 제2 결합부를 포함하는 것을 특징으로 한다($\kappa\lambda$ 이중특이적 항체, $\kappa\lambda$ 바디). 상기 한 실시양태에서, 제2 결합부는 경쇄 LC(CD47 VKCK)로서 서열 번호 11의 경쇄를 포함한다. 서열 번호 11의 카파 경쇄는 가변 경쇄 도메인으로서 서열 번호 10의 가변 경쇄 도메인(Mab CD47 VK) 및 불변 경쇄 도메인으로서 서열 번호 13의 불변 경쇄 도메인(CD47 CK)을 포함한다.
- [0075] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 전체 인간 이중특이적 IgG(특히, IgG1) 포맷의 것이고, 추가로 $\kappa\lambda$ 이중특이적 항체의 것이다.
- [0076] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 $\kappa\lambda$ 이중특이적 항체이고, 공통 중쇄(cHC: common heavy chain)를 포함하는 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, 공통 중쇄는 가변 중쇄 도메인으로서 서열 번호 4의 VH 가변 중쇄 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 서열 번호 5의 공통 중쇄 VH-CH1을 포함하는 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 서열 번호 6의 공통 중쇄(VH-CH1-CH2-CH3)를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0077] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 제1 결합부에 대해 1가이고, 제2 결합부에 대해 1가인 것

을 특징으로 한다.

- [0078] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 CEACAM5에의 결합에 대하여 VK 및 VH 도메인으로서 서열 번호 43 및 44 서열의 VK 및 VH 도메인을 포함하는 항CEACAM5 항체 SM3E와 경쟁하는 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 CEACAM5에의 결합에 대하여 시비사타맘과 및/또는 MEDI-565(AMG211; (문헌 [MD Oberst et al., mAbs 6 (2014) 1571-1584]))와 경쟁하지 않는 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 CEACAM5 항체는 CEACAM5 이중특이적 항체 시비사타맘 및/또는 MEDI-565와 병용으로 투여될 수 있다.
- [0079] 또 다른 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 변형된 올리고당을 갖는 Fc 영역을 갖도록 당조작된 것을 특징으로 한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 당조작되지 않은 동일한 이중특이적 항체와 비교하여 푸코스 잔기 개수가 감소되도록 당조작된 Fc 영역을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0080] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 올리고당 쇄(들) 중 감소된 양의 푸코스를 포함한다.
- [0081] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 Fc 영역 중 50% 내지 100%의 N 연결된 올리고당이 비푸코실화된 것을 특징으로 한다.
- [0082] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 어떤 어푸코실화 방법도 적용되지 않았다면, 본 발명에 따른 이중특이적 항체의 올리고당 쇄(들) 중 푸코스 양은 각 항체의 푸코스 함량과 비교하여 80% 내지 100%만큼 감소되는 것을 특징으로 한다.
- [0083] 한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 Fc 영역 중 80% 내지 100%의 N 연결된 올리고당이 양분되고, 비푸코실화된 것을 특징으로 한다. 일반적으로 CEACAM5 및 CD47에 결합하는 어푸코실화된 이중특이적 항체 및 그의 제조 및 정제는 WO2019234576, US 62/943,726 및 EP19213002에 기술되어 있다.
- [0084] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 단일 치환 S239D, I332E, G236A, 이중 치환 I332E 및 G236A, S239D 및 I332E, S239D 및 G236A, 및 삼중 치환 S329D 및 I332E 및 G236A로 구성된 군으로부터 선택되는 Fc 영역 중 1개, 2개 또는 3개 아미노산 치환을 포함하고, 동일하되, 단, 당조작되지 않은 이중특이적 항체와 비교하여 푸코스 잔기 개수가 감소되도록 당조작된 Fc 영역을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0085] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 재조합 CEACAM3 및 재조합 CEACAM5에의 결합에 대한 KD 값의 비가 100배 이상인 것을 특징으로 한다(실시예 3, 표 2).
- [0086] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 재조합 CEACAM3 및 재조합 CEACAM5에의 결합에 대한 KD 값의 비가 100배 내지 200배인 것을 특징으로 한다.
- [0087] 한 실시양태에서, 본 발명의 이중특이적 항체는 CEACAM5 및 CEACAM3에의 결합의 상대적 언커플링을 보인다(차별적인 결합). 이중특이적 CEACAM5 항체 K2AC22와 비교하여 전장 재조합 인간 CEACAM5 단백질에의 결합 증가에도 불구하고, 전장 재조합 인간 CEACAM3에의 결합은 비례하여 증가하지 않는다. 전장 CEACAM3 대 CEACAM5에의 결합에 대한 KD의 몫/비는 83(K2AC22)에서 137(K2AC84), 146(K2AC100)으로 증가함을 보여준다. 이는 차별적 결합이 65% - 76% 증가한 것과 같다(실시예 3, 표 2).
- [0088] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 농도 의존적 식작용(인간 대식세포에 의한 CEACAM5 발현 종양 세포주의 ADCP)을 특징으로 한다. ADCP는 본 발명에 따라 이미징에 의해 식작용 지수(EC50 및/또는 최대값)로 측정되며, 일반적으로 E:T는 1:3이다(인간 대식세포:표적 세포(종양 세포); 예컨대, EC50 값, 및 식작용 Emax의 max. 지수에 대해 도 2 및 표 6 내지 9를 참조한다). 도 2의 결과는 E:T는 1:3인 것으로 수득되었다. 검정법에 관한 세부사항은 실시예 7에 기술되어 있고; 이미징 검정법은 셀인사이트 CX5(CellInsight CX5)에 기초한다. 달리 언급되지 않는 한, 식작용 지수 값은 상기 이미징 방법에 의해 측정된다.
- [0089] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 K2AC22의 식작용 지수와 비교하여 LoVo 종양 세포의 식작용 지수의 최대값(Emax)이 적어도 8% 증가한 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, LoVo 종양 세포에 대해 증가는 8% 내지 20%이다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 K2AC22의 식작용 지수와 비교하여 Ls174T 종양 세포의 식작용 지수의 최대값이 적어도 8% 증가한 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, Ls174T 종양 세포에 대해 증가는 8% 내지 25%이다. (실시예 7, 표 5). LoVo 및 LS174T는 CEACAM5의 발현이 다소 낮은 종양 세포이다(실시예 5의 표 3 참조).
- [0090] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 인간 CD47과 인간 SIRP α 사이의 상호작용을 억제시킨다.

한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 동일한 실험 조건하에 K2AC22에 대해 측정된 IC50보다 10배 이상 더 낮은 IC50으로 MKN-45 세포 상의 CD47과 SIRP α 사이의 상호작용을 억제시킨다. 한 실시양태에서, 상기 배수는 10 내지 30이다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 0.1 nM 이하의 IC50으로 MKN-45 세포 상의 CD47과 SIRP α 사이의 상호작용을 억제시킨다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 0.1 nM 내지 0.04 nM의 IC50으로 MKN-45 세포 상의 CD47과 SIRP α 사이의 상호작용을 억제시킨다(실시예 10 및 표 12 참조).

- [0091] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 하기 특성 중 2개 이상을 갖는 것을 특징으로 한다: 재조합 CEACAM3 및 재조합 CEACAM5에의 결합에 대한 KD 값의 비가 100배 이상인 것인 특성, CEACAM5 및 CEACAM3에의 결합의 상대적 언커플링을 보이는 특성, 농도 의존적 ADCP를 보이는 특성, K2AC22의 식작용 지수와 비교하여 LoVo 종양 세포의 식작용 지수의 최대값(E_{max})이 적어도 8% 증가한 것인 특성, 및 K2AC22와 비교하여 10배 초과로 더 낮은 IC50으로 CD47과 SIRP α 사이의 상호작용을 억제시킬 수 있는 능력을 보이는 것인 특성.
- [0092] 이중특이적 항체 K2AC22는 인간 CEACAM5 및 인간 CD47에 결합하는 이중특이적 항체이고, WO2019234576에 기술되어 있다. K2AC22는 서열 번호 6의 공통 중쇄, CEACAM5 결합부 중 서열 번호 42의 경쇄, 및 CD47 결합부 중 서열 번호 11의 경쇄를 포함하고; K2AC22의 CDR은 서열 번호 1-3, 7-9, 및 29-31에 제시되어 있다(표 1).
- [0093] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 (생물층 간섭법에 의해 측정된) 100 nM 내지 600 nM의 결합 친화도(KD), 및 한 실시양태에서, 100 nM 내지 500 nM의 결합 친화도로 재조합 인간 CD47에 결합하는 것을 특징으로 한다.
- [0094] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 2 nM 내지 10 nM의 KD로 재조합 인간 CEACAM5에 결합하는 것을 특징으로 한다(실시예 3, 표 2). 한 실시양태에서, 본 발명의 이중특이적 항체는 최신 기술의 이중특이적 항체 K2AC22와 비교하여 10배 내지 50배, 및 한 실시양태에서 20배 내지 50배 더 높은 결합 친화도(더 낮은 KD)를 갖는다.
- [0095] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 시비사타맵과 같은 CEAxCD3 T 세포 이중특이적 항체와의 조합 치료에 유용하다.
- [0096] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 CEACAM5에 특이적으로 결합하되, 종양 세포, 예컨대, MKN-45 및 LS174T 상의 CEACAM5에의 결합에 대해 TCB2014 및 시비사타맵과 경쟁하지 않는 것을 특징으로 한다(실시예 8).
- [0097] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 300 nM의 농도에서 인간 CEACAM5 및 CD3 ϵ (상기)에 결합하는 이중특이적 항체 TCB2014가 본 발명에 따른 이중특이적 항체의 MKN-45 세포에의, 또는 또 다른 실시양태에서, LS174T 세포에의 결합 곡선의 EC50을 3배 초과만큼 한 실시양태에서, 더 높은 농도로 이동시키지 않는다는 것을 특징으로 한다(실시예 8 및 도 5). 상기 경우에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체 및 TCB2014는 "비경쟁적"인 것으로 정의되고, 상기 CEA에의 그의 결합에의 유의적인 간섭 없이 CEA에 동시에 결합할 수 있는 것으로 간주된다. 상기 경우에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체 및 TCB2014는 "비경쟁적"인 것으로 정의되고, 상기 CEA에의 그의 결합에의 유의적인 간섭 없이 CEA에 동시에 결합할 수 있는 것으로 간주되는 바, 따라서, 두 약물의 치료 수준이 혈액 및/또는 종양 조직에 동시에 존재하더라도, 영향을 받지 않은 식작용(CEAxCD47)에 대한 그의 효과 및 또한 영향을 받지 않은 T 세포 활성화(TCB2014 및 시비사타맵)에 대한 그의 효과를 나타낼 수 있다. 이는 TCB2014 또는 시비사타맵과 본 발명의 CEAxCD47 이중특이적 항체의 병용 치료를 용이하게 한다.
- [0098] 한 실시양태에서, CEAxCD3 이중특이적 항체 TCB2014와 조합된 본 발명의 CEAxCD47 이중특이적 항체는 예컨대, 동일한 지원자 인간 공여자로부터 유래된 LoVo 또는 LS174T 종양 세포 및 인간 대식세포 및 T 세포를 함유하는 검정법에서 적어도 상가적이거나, 또는 심지어 시너지적인 종양 세포 사멸률(%)을 나타낸다.
- [0099] 한 실시양태에서, CEAxCD3 이중특이적 항체 TCB2014와 조합된 본 발명의 CEAxCD47 이중특이적 항체는 예컨대, 동일한 지원자 인간 공여자로부터 유래된 LoVo 또는 LS174T 종양 세포 및 인간 대식세포 및 T 세포를 함유하는 검정법에서 적어도 상가적이거나, 또는 심지어 시너지적인 종양 세포 사멸을 나타낸다.
- [0100] 본 발명은 추가로 본 발명에 따른 이중특이적 항체를 코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.
- [0101] 본 발명은 본 발명에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 추가로 제공한다.

- [0102] 본 발명은
- [0103] a) 본 발명에 따른 이중특이적 항체의 생산을 허용하는 조건하에서 상기 이중특이적 항체를 코딩하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계, 및
- [0104] b) 상기 항체가 CEACAM5 및 CD47에 특이적으로 결합할 수 있는 것인 상기 항체를 단리시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 이중특이적 항체를 제조하는 방법을 추가로 제공한다.
- [0105] 본 발명의 항체를 코딩하는 제2 폴리펩티드는 각각의 두 상이한 경쇄 및 공통 중쇄를 모두 코딩하는 한 폴리펩티드, 또는 각각의 경쇄 및 중쇄를 개별로 코딩되는 별도의 폴리펩티드일 수 있다. 또한, 발현 벡터는 각각의 두 상이한 경쇄 및 공통 중쇄를 발현하는 1, 2, 또는 3개의 벡터일 수 있다.
- [0106] 본 발명은 종양 세포를 본 발명에 따른 이중특이적 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는, 종양 세포의 세포 용해를 유도하는 방법을 추가로 제공한다. 종양 세포는 바람직하게, 환자에서의 인간 종양 세포이다. 종양 세포의 세포 용해를 유도하는 방법의 한 실시양태에서, 종양 세포는 결장직장암 세포, NSCLC(비소세포 폐암: non-small cell lung cancer) 세포, 위암 세포, 췌장암 세포, 유방암 세포, 또는 CEACAM5를 발현하는 또 다른 종양 세포이다.
- [0107] 본 발명은 CEACAM5를 발현하는 암을 앓는 피험체에게 치료 유효량의 본 발명에 따른 이중특이적 항체를 투여하는 단계를 포함하는, CEACAM5를 발현하는 암을 앓는 피험체를 치료하는 방법을 추가로 제공한다.
- [0108] 본 발명은 CEACAM5를 발현하는 암을 앓는 피험체에게 치료 유효량의 본 발명에 따른 이중특이적 항체를 투여하는 단계를 포함하는, CEACAM5를 발현하는 암을 앓는 피험체에서 생존 기간을 연장시키는 방법을 추가로 제공한다. 본 발명의 추가 실시양태는 암이 결장직장암, 비소세포 폐암(NSCLC), 위암, 췌장암, 또는 유방암인 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 방법인 것이다.
- [0109] 본 발명은 CEACAM5를 발현하는 암을 앓는 피험체에게 치료 유효량의 본 발명에 따른 이중특이적 항체를 투여하는 단계를 포함하는, CEACAM5를 발현하는 암을 앓는 피험체를 치료하는 방법을 추가로 제공한다. 본 발명의 추가 실시양태는 본 발명에 따른 이중특이적 항체를 인간 피험체에게 화학요법 또는 방사선 요법과 함께 조합하여 투여하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 방법인 것이다.
- [0110] 본 발명은 CEACAM5를 발현하는 암을 앓는 피험체 치료용 의약 제조에서 사용하기 위한 본 발명에 따른 이중특이적 항체를 추가로 제공한다. 본 발명의 추가 실시양태는 암이 결장직장암, 비소세포 폐암(NSCLC), 위암, 췌장암 및 유방암으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 상기의 본 발명에 따른 의약 제조에서 사용하기 위한 본 발명에 따른 이중특이적 항체인 것이다.
- [0111] 본 발명은 CEACAM5를 발현하는 암을 앓는 피험체의 치료에서 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제3 결합부, 및 인간 CD3ε에 특이적으로 결합하는 제4 결합부를 포함하는 제2 이중특이적 항체와의 동시, 개별, 또는 순차적인 조합으로 사용하기 위한, 본 발명에 따른 이중특이적 항체를 추가로 제공한다. 본 발명의 추가 실시양태는 CEACAM5를 발현하는 암을 앓는 피험체의 치료에서 TCB2014 또는 시비사타맙과의 동시, 개별, 또는 순차적인 조합으로 사용하기 위한, 본 발명에 따른 이중특이적 항체이다.
- [0112] 본 발명의 추가 실시양태는 CEACAM5를 발현하는 암을 앓는 피험체의 치료에서 상기 제2 이중특이적 항체와의 동시, 개별, 또는 순차적인 조합으로 사용하기 위한, 본 발명에 따른 이중특이적 항체이다.
- [0113] 본 발명의 추가 실시양태는 본 발명에 따른 이중특이적 항체 및 제2 이중특이적 항체를 상기 피험체에게 6 내지 15일 간격으로 교대로 투여하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따라 사용하기 위한 본 발명에 따른 이중특이적 항체이다.
- [0114] 본 발명의 추가 실시양태는 본 발명에 따른 이중특이적 항체 및 제2 이중특이적 항체를 상기 피험체에게 6 내지 15일 간격으로 동시에 투여하는 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따라 사용하기 위한 본 발명에 따른 이중특이적 항체이다.
- [0115] 본 발명의 추가 실시양태는 상기 암이 결장직장암, 비소세포 폐암(NSCLC), 위암, 췌장암 및 유방암인 것을 특징으로 하는, 본 발명에 따라 사용하기 위한, 본 발명에 따른, 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제1 결합부 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 제2 결합부를 포함하는 본 발명에 따른 제1 이중특이적 항체이다.
- [0116] 본 발명의 추가 실시양태는 종양(암), 특히, 고형 종양, 특히, CEACAM5를 발현하는 고형암, 특히, 결장직장암, 비소세포 폐암(NSCLC), 위암, 췌장암 및 유방암 진단을 받은 인간 환자에게 유효량의, 본 발명에 따른 이중특이

적 항체, 및 CEA 및 CD3에 대한 상기 기술된 바와 같은 제2 이중특이적 항체(한 실시양태에서, TCB2014, 한 실시양태에서, 시비사타맵)를 투여하는 단계를 포함하고, 후속적으로,

- [0117] 상기 환자에게 0.1 내지 10 mg/kg, 추가 실시양태에서, 0.5 내지 10 mg/kg, 추가 실시양태에서, 1 내지 2 mg/kg의 용량의 상기 제2 항 CEAxCD3 항체를 예컨대, 4 내지 12주간에 걸쳐 매주 또는 4 내지 12주간에 걸쳐 q2w로 투여하고, 상기 4 내지 12주 후 및 상기 항 CEAxCD3 항체의 추가의 2 또는 3 또는 4 제거 반감기 대기 후에 상기 환자에게 0.1 내지 20 mg/kg 용량의 본 발명에 따른 항체를 투여하는 단계,
- [0118] 상기 본 발명에 따른 항체의 2 또는 3 또는 4 제거 반감기 대기하에 환자에게 상기 본 발명에 따른 항체를 예컨대, 12주 초과 기간 동안 q1, q2w, q3w 또는 임의적으로, q4w로 투여한 후, 이어서, 임의적으로, CEA x CD3 이중특이적 항체 투여, 이어서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체 투여로 이루어지는 상기 사이클을 반복하고, 임의적으로, 상기 사이클 등을 다시 반복하는 단계를 포함하는, 종양(암), 특히, 고형 종양, 특히, CEACAM5를 발현하는 고형암, 특히, 결장직장암, 비소세포 폐암(NSCLC), 위암, 췌장암 및 유방암 진단을 받은 인간 환자를 치료하는 방법이다.
- [0119] 상기 CEA x CD3 이중특이적 항체 및 본 발명에 따른 CEA x CD47 이중특이적 항체가 비경쟁적인 바, 두 이중특이적 항체는 또한 예컨대, 환자에게 거의 동시에 0.1 내지 10 mg/kg, 추가 실시양태에서, 0.5 내지 10 mg/kg, 추가 실시양태에서, 1 내지 2 mg/kg 용량의 CEA x CD3 이중특이적 항체 및 3 내지 30 mg/kg, 추가 실시양태에서, 1 내지 10 mg/kg 용량의 본 발명에 따른 CEA x CD47 이중특이적 항체를 투여한 후, 이어서, q1w 또는 q2w 또는 q3w 또는 임의적으로, q4w의 빈도로 상기 조합 투여를 1회 이상 수행함으로써 환자가 병용으로 두 이중특이적 항체 모두 혈장 및 조직 농도로 경험하는 방식("동시 방식")으로 투여될 수 있다. 용어 "q1w"는 주 1회 투여를 의미하고; q2w는 2주마다 투여하는 것 등을 의미한다.
- [0120] 안전상의 이유로, 한 실시양태에서, 본 발명의 bsAb를 첨가하지 않고 상기 제2 항체 CEAxCD3으로 요법을 시작하고, CEAxCD3에 전형적인 사이토카인 방출 증후군(CRS: cytokine release syndrome)에서 회복된 후(보통 TAAxCD3 항체를 2 또는 3회 투여한 후)에만 두 bsAb의 동시 투여를 시작하는 것이 필요할 수 있다.
- [0121] 본 발명은 본 발명에 따른 항체 및 약학적으로 허용되는 부형제 또는 담체를 포함하는 약학 조성물을 추가로 제공한다.
- [0122] 본 발명은 의약으로서 사용하기 위한 본 발명에 따른 항체를 포함하는 약학 조성물을 추가로 제공한다. 상기 한 실시양태에서, 본 발명은 고형 종양 장애 치료에서 의약으로서 사용하기 위한 본 발명에 따른 항체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 한 실시양태에서, 약학 조성물은 결장직장암, NSCLC(비소세포 폐암), 위암, 췌장암 또는 유방암 치료에서 의약으로서 사용하기 위한 본 발명에 따른 항체를 포함한다.
- [0123] 본 발명은 CEACAM5를 발현하는 암을 앓는 피험체의 치료에서 상기 정의된 바와 같은 TCB2014 또는 시비사타맵과의 동시, 개별, 또는 순차적인 조합으로 사용하기 위한, 본 발명에 따른 이중특이적 항체를 포함하는 조성물로서, 여기서, 300 nM 농도의 상기 제2 이중특이적 항체는 본 발명에 따른 이중특이적 항체의 MKN-45 및/또는 LS174T 세포에의 결합 곡선의 EC50을 3배 초과만큼 한 실시양태에서, 더 높은 농도로 이동시키지 않는 것인 조성물을 추가로 제공한다. 본 발명의 추가 실시양태는 암이 결장직장암, 비소세포 폐암(NSCLC), 위암, 췌장암, 또는 유방암을 특징으로 하는 것인 본 발명에 따른 조성물인 것이다.
- [0124] 본 발명은 약학 조성물의 제조를 위한 본 발명에 따른 항체의 용도를 추가로 제공한다.
- [0125] 본 발명은 약학 조성물의 제조를 위한 본 발명에 따른 항체 및 약학적으로 허용되는 부형제 또는 담체의 용도를 추가로 제공한다.
- [0126] 본 발명은 고형 종양 장애 치료에서 의약 제조를 위한 본 발명에 따른 항체의 용도를 추가로 제공한다. 본 발명의 추가 실시양태는 결장직장암, NSCLC(비소세포 폐암), 위암, 췌장암 또는 유방암의 치료에서의 본 발명에 따른 항체의 용도인 것이다.
- [0127] 본 발명의 또 다른 측면은 종양 세포를 상기 기술된 실시양태 중 임의의 것의 이중특이적 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는, 종양 세포의 세포 용해를 유도하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 종양 세포는 결장직장암 세포, NSCLC(비소세포 폐암), 위암 세포, 췌장암 세포 또는 유방암 세포이다. 한 실시양태에서, 세포 용해는 본 발명에 따른 이중특이적 항체의 항체 의존적 세포 식작용 및/또는 항체 의존적 세포 매개 세포독성에 의해 유도된다.
- [0128] 본 발명의 또 다른 측면은 CEACAM5를 비정상적으로 발현하는 암을 앓는 피험체에게 치료 유효량의 상기 기술된

실시양태 중 임의의 것의 이중특이적 항체를 투여하는 단계를 포함하는, CEACAM5를 비정상적으로 발현하는 암을 앓는 피험체를 치료하는 방법을 제공한다.

[0129] 본 발명의 또 다른 측면은 CEACAM5를 비정상적으로 발현하는 암을 앓는 피험체에게 치료 유효량의 상기 기술된 실시양태 중 임의의 것의 이중특이적 항체를 인간 CEA 및 인간 CD3에 결합하는 이중특이적 항체와 함께 조합하여 투여하는 단계를 포함하는, CEACAM5를 비정상적으로 발현하는 암을 앓는 피험체를 치료하는 방법을 제공한다. CEACAM5 이중특이적 항체 및 본 발명에 따른 CEACAM5 이중특이적 항체는 경쟁하지 않거나, 또는 단지 최소한으로 경쟁하는 바, 이는 순차적으로 뿐만 아니라, 병용으로(동시에) 제공될 수 있고, 이는 매우 유리할 수 있는데, 그 이유는 CEACAM5 이중특이적 항체에 의한 T 세포의 결합을 통한 및 동시에 본 발명에 따른 CEACAM5 이중특이적 항체에 의한 대식세포의 결합을 통한 종양 세포 사멸이 상승적이거나, 또는 심지어 시너지적일 수 있으며, 이는 두 약물을 병용으로 제공되면, 효능이 증가한다는 것을 의미한다.

[0130] 본 발명의 또 다른 측면은 CEACAM5를 비정상적으로 발현하는 암을 앓는 피험체에게 치료 유효량의 상기 기술된 실시양태 중 임의의 것의 이중특이적 항체를 투여하는 단계를 포함하는, CEACAM5를 비정상적으로 발현하는 암을 앓는 피험체에서 무진행 생존 및/또는 전체 생존 기간을 연장시키는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 암은 결장직장암, 비소세포 폐암(NSCLC), 위암, 췌장암 또는 유방암 또는 CEACAM5를 발현하는 또 다른 암이다.

[0131] 상기 방법의 특정 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 화학요법 또는 방사선 요법과 함께 조합하여 투여된다. 한 실시양태에서, 피험체는 결장직장암 또는 폐암 또는 위암 또는 췌장암 또는 유방암 또는 CEACAM5를 발현하는 또 다른 암을 앓는 환자이다.

[0132] 본 발명의 또 다른 측면은 CEACAM5를 비정상적으로 발현하는 암을 앓는 피험체에게 치료 유효량의 상기 기술된 실시양태 중 임의의 것의 이중특이적 항체를 인간 CEA 및 인간 CD3에 결합하는 이중특이적 항체와 함께 조합하여 투여하는 단계를 포함하는, CEACAM5를 비정상적으로 발현하는 암을 앓는 피험체를 치료하는 방법을 제공한다.

[0133] 본 발명의 또 다른 측면은 CEACAM5를 비정상적으로 발현하는 암을 앓는 피험체에게 치료 유효량의 상기 기술된 실시양태 중 임의의 것의 이중특이적 항체를 투여하는 단계를 포함하는, CEACAM5를 비정상적으로 발현하는 암을 앓는 피험체에서 무진행 생존 기간 및/또는 전체 생존 기간을 연장시키는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 암은 결장직장암, 비소세포 폐암(NSCLC), 위암, 췌장암, 또는 유방암이다.

[0134] 상기 방법의 특정 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 화학요법 또는 방사선 요법과 함께 조합하여 투여된다. 한 실시양태에서, 피험체는 결장직장암 또는 폐암 또는 위암 또는 췌장암 또는 유방암 또는 또 다른 CEACAM5 발현 암을 앓는 암 환자이다.

[0135] 본 발명의 또 다른 실시양태는 상기 기술된 치료 방법 중 임의의 것을 위한 본 발명에 따른 이중특이적 항체의 용도를 제공한다. 한 실시양태에서, 암은 결장직장암, 비소세포 폐암(NSCLC), 위암, 췌장암, 및 유방암으로 구성된 군으로부터 선택된다.

도면의 간단한 설명

[0136] 도면의 간단한 설명

도 1a-1f. 최신 기술의 이중특이적 CEACAM5 항체 K2AC22 대비 5개의 본 발명에 따른 CD47xCEACAM5 이중특이적 항체(K2AC82, K2AC84, K2AC91, K2AC100, 및 K2AC117)의 농도 의존적 결합. 본 도면은 또한 6개의 CEACAM5 발현 암 세포주: (도 1a) SK-CO-1 세포, (도 1b) MKN-45 세포, (도 1c) HPAF-II 세포, (도 1d) SNU-C1 세포, (도 1e) Ls174T 세포 및 (도 1f) LoVo 세포 상에서의 상응하는 항CD47 1가 항체의, 비관련 hIgG1 대조군(hIgG1, CD47 1가에 대한 선 아래 있는 선)의, 및 2가 항CD47 mAb(hB6H12, 점선)의 결합을 보여준다. 본 발명에 따른 이중특이적 항체의 EC50은 K2AC22의 EC50보다 더 낮고, 본 발명에 따른 이중특이적 항체의 최대 결합(MFI)은 K2AC22의 최대 결합보다 더 높다.

도 2a-2f. 최신 기술의 CEACAM5xCD47 이중특이적 항체 K2AC22 대비 2개의 본 발명에 따른 CEACAM5xCD47 이중특이적 항체(K2AC84 및 K2AC100)에 의해 유도된 LoVo 암 세포의 농도 의존적 식작용. 본 도면은 또한 상응하는 항 CD47 1가 항체 및 이소타입 대조군 hIgG1에 의해 유도된 식작용을 보여준다. 도 2a-2f는 6명의 상이한 인간 공여자((도 2a) 공여자 862; (도 2b) 공여자 872; (도 2c) 공여자 873; (도 2d) 공여자 863; (도 2e) 공여자 874 및 (도 2f) 공여자 866)의 PBMC(말초 혈액 단핵 세포: Peripheral Blood Mononuclear Cell)로부터 유래된 대식세포를 이용하여 획득된 데이터를 보여준다. 대부분의 공여자에서, 2개의 본 발명에 따른 항체에 의해 유도된

식작용은 K2AC22보다 우수하다.

도 3a-3b. 최신 기술의 어푸코실화된 CEACAM5xCD47 이중특이적 항체 K2AC22 대비 4 내지 5개의 어푸코실화된 본 발명에 따른 CEACAM5xCD47 이중특이적 항체(K2AC82 afuco, K2AC84 afuco, K2AC91 afuco, K2AC100 afuco 및 K2AC177 afuco)에 의해 유도된 CEACAM5 발현 암 세포의 농도 의존적 식작용. 본 도면은 또한 상응하는 항CD47 1가 항체 및 hIgG1 이소타입 대조군(hIgG1)에 의해 유도된 식작용을 보여준다. 도 3a는 표적 세포로서 MKN-45를 이용하고, 2명의 인간 공여자(공여자(D) 830; 공여자(D) 831)의 PBMC(말초 혈액 단핵 세포)로부터 유래된 대식세포를 이용하여 획득된 데이터를 보여주고, 도 3b는 표적 세포로서 SNU-C1을 이용하고, 2명의 인간 공여자(공여자(D) 831; 공여자(D) 833)로부터 유래된 대식세포를 이용하여 획득된 데이터를 보여준다. 공여자에서, 본 발명에 따른 항체에 의해 유도된 식작용은 K2AC22보다 우수하다.

도 4. 최신 기술의 CEACAM5xCD47 이중특이적 항체 K2AC22 대비 5개의 본 발명에 따른 CEACAM5xCD47 이중특이적 항체(K2AC82, K2AC84, K2AC91, K2AC100 및 K2AC177)에 의한 CD47/SIRP α 차단 활성. 본 도면은 상응하는 항 CD47 1가 항체에 의한 CD47/SIRPα 차단 활성도 보여준다. 비교를 위해 hIgG1 이소타입 대조군(hIgG1) 추가 또는 Ab 부재인 2개의 음성 대조군을 추가하였다. 2가 mAb hB6H12를 양성 대조군으로서 추가하였다. 5개의 본 발명에 따른 CEACAM5xCD47 이중특이적 항체(K2AC82, K2AC84, K2AC91, K2AC100 및 K2AC177) 모두 최신 기술의 CEACAM5xCD47 이중특이적 항체 K2AC22와 비교하여 개선된 차단 활성을 보였다.

도 5. CEACAM5 발현 세포, MKN-45의 세포 표면에서의 항CEACAM5 mAb, TCB2014 및 TCB 2017의 존재하의 CD47xCEACAM5 이중특이적 항체 K2AC100의 농도 의존적 결합. K2AC100을 300 nM의 TCB2014(진한 선, 진한 삼각형) 또는 30 nM의 TCB2017(진한 선, 진한 다이아몬드)의 존재하에 형광색소로 직접 표지하여 MKN-45 세포 단독(진한 선, 진한 원)에 대한 그의 결합을 추적하였다. 음성 대조군(Ctr1)이 사용되었다(TCB2014 또는 TCB2017의 존재하에 IgG1).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0137] **본 발명의 상세한 설명**
- [0138] 용어는 하기와 달리 정의되지 않는 한, 관련 기술 분야에서 일반적으로 사용되는 바와 같이 본원에서 사용된다.
- [0139] 본 발명에 따른 항체는 하기 특성 중 하나 이상의 유익한 특성을 갖는다:
- [0140] - CEACAM3 대 CEACAM5에의 결합에 대한 KD 값의 비,
- [0141] - 저 CEA 발현 종양 세포에서의 식작용 지수의 최대값(Emax), 및/또는
- [0142] - 종양 세포의 표면 상의 CD47에의 SIRP α의 결합의 억제(낮은 IC50).
- [0143] 본 발명에 따른 항체는 놀랍게도 실시예 3 및 표 2에 제시된 바와 같이 CEACAM3 대 CEACAM5에 대한 유익한 결합 비를 나타낸다. 예를 들어, K2AC100은 K2AC22의 결합 친화도(KD: binding affinity)와 비교하여 CEACAM5에 대해서는 25배 더 높은 결합 친화도(더 낮은 KD)를 나타내지만, 놀랍게도 CEACAM3에 대해서는 단지 14배 더 높은 결합 친화도(더 낮은 KD)를 나타낸다. 유사하게, K2AC84는 K2AC22의 결합 친화도(KD)와 비교하여 CEACAM5에 대해 46배 더 높은 결합 친화도(KD)를 나타내지만, 놀랍게도 CEACAM3에 대해서는 단지 28배 더 높은 결합 친화도(KD)를 나타낸다. 따라서, CEACAM5에의 결합에 대한 KD 값 대비 CEACAM3에의 결합에 대한 KD 값의 비는 K2AC22의 경우, 83이지만, K2AC100의 경우에는 146이고, K2AC84의 경우에는 137이다.
- [0144] CEACAM5 또는 CEACAM6과 같은 여러 패밀리 구성원이 상피 세포에 의해 발현되는 반면, 예컨대, CEACAM3(CGM1 또는 CD66d; UniProtKB - P40198)과 같은 다른 패밀리 구성원은 전적으로 인간 과립구, 예컨대, 박테리아 감염 제거에 관여하는 세포 타입에서 발현된다(문헌 [Kuespert K et al., Curr Opin Cell Biol. 2006]; [Pils S et al., Int J Med Microbiol.2008]). CEACAM5와 CEACAM3 사이의 높은 서열 상동성에도 불구하고, CEACAM3은 CEACAM 패밀리의 다른 구성원과 달리 세포-세포 부착을 지원하지 않고, 오히려 옹소닌 비의존적 인식 및 네이세리아 고노르호에아에(*Neisseria gonorrhoeae*), 헤모필루스 인플루엔자에(*Hemophilus influenzae*), 및 모락셀라 카타랄리스(*Moraxella catarrhalis*)를 비롯한, 제한된 그람 음성 박테리아 세트의 제거를 매개한다(문헌 [Kuroki et al., J. Biol. Chem.1991]; [Pils S et al., Int J Med Microbiol.2008]). CEACAM3은 선천성 면역계의 식세포 수용체로 논의된다(문헌 [Schmitter et al., J Exp Med.2004]). 본 발명자들의 지식에 따르면, CEACAM5 및 CD47에 대한 이중특이적 항체는 CEACAM3에도 상당히 결합하는 경우, 호중구 과립구에 악영향을 미치고, 호중구의 개수를 감소시킬 수 있으며, 즉, 증가된 식작용에 의해 호중구 감소증을 유발할 수 있다. 이로 인

해 즉각적인 의료 개입 없이는 생명을 위협할 수 있는 박테리아 감염이 발생할 위험이 높아질 수 있다. 높은 결합 친화도는 낮은 KD를 특징으로 한다. CEACAM 5와 CEACAM3 사이의 CEA 표적화 이중특이적 항체의 분포는 상기 두 CEACAM 패밀리 구성원에 대한 결합 친화도의 비에 의해 결정된다. CEACAM5에의 결합에 대한 KD 대비 CEACAM3에의 결합에 대한 KD의 비가 높다는 것은 CEACAM5에의 결합과 비교하여 이중특이적 항체의 CEACAM3에의 결합이 더 적다는 것을 의미하며, 이는 유익할 것이다.

[0145] 본 발명에 따른 항체는 놀랍게도 각각의 세포주에서 K2AC22의 식작용 지수와 비교하여 한 실시양태에서, 낮은 CEA 발현 종양 세포(예컨대, LoVo 세포주)에서 유익한 최대 식작용 지수 값(E_{max})을 나타낸다. 표 5에 따르면, 본 발명의 이중특이적 항체는 최신 기술의 K2AC22의 이중특이적 항체와 비교하여 LoVo 세포(세포 표면에서 4000 CEACAM5)의 식작용 지수 곡선의 8.5 내지 17% 더 높은 최대값을 나타낸다. LS174T 세포(세포 표면에서 26000 CEACAM5)의 경우, 식작용 지수의 최대값은 K2AC22와 비교하여 본 발명의 항체의 경우, 8.7 내지 20.6% 더 높다(표 5). SNU-C1 또는 MKN-45와 같은 더 높은 CEACAM5 발현 세포에서 E_{max} 의 증가는 더 낮다.

[0146] 따라서, 더 높은 비율(%)의 환자가 본 발명에 따른 이중특이적 항체로 성공적으로 치료될 수 있다.

[0147] 실시예 5 및 11에 개시된 바와 같이, 악성 세포에서의 CEA 발현은 RNA 발현 또는 세포 표면 CEA 분자의 계수 면에서 상당히 다양할 수 있다. 본 발명의 이중특이적 항체의 식작용 활성을 연구하는 데 사용되는 CEA 발현 암 세포주는 세포 표면에서 평균 108,000개의 CEA 표적을 발현한다(실시예 5, 표 3). 암 환자(결장직장 및 폐)의 새 종양 조직으로부터 유래된 오가노이드는 실시예 11에 기술된 방법에 의해 조사되었다. 이들 1차 오가노이드의 CEACAM5의 평균 발현은 세포당 28,000개의 CEACAM5 표적, 즉, 표 3에 제시된 바와 같이 세포주에서의 평균 발현보다 대략 4배 낮은 것으로 밝혀졌다. 따라서, CEACAM5 발현이 더 낮은 악성 세포의 식작용에 대해 개선된 이중특이적 항체는 종양 요법에 사용하는 데 유리할 수 있다. 따라서, 예컨대, 폐 선암종에서, 결장직장암 및 다른 CEACAM5 발현 종양에서 발현이 이중성이고/거나, 다소 낮다고 가정하면, 상기 환자는 본 발명의 CEAxCD47 이중특이적 항체로 성공적으로 치료될 수 있다.

[0148] 본 발명에 따른 항체는 놀랍게도 실시예 10 및 도 4에 제시된 바와 같이 항체 K2AC22와 비교하여 종양 세포 표면 상의 CD47에의 SIRP α 의 결합의 유익한 억제(낮은 IC50)를 나타낸다. 종양 세포 상의 CD47과 대식세포 상의 SIRP α 의 상호작용이 종양 세포의 식작용을 억제시키며, 이는 상기 상호작용의 효과적인 억제가 식작용을 증가시킨다는 것을 의미한다.

[0149] 본원에서 사용되는 바, 용어 " E_{max} "는 화합물의 최대 활성을 기술한다. 예를 들어, 세포 사멸 검정법에서, E_{max} 는 주어진 시간 프레임 내에서 대식세포에 의한 암 세포(예컨대, 칼세인 AM으로 표지, 실시예 7 참조)의 제거/사멸을 기술한다. 이는 종양 침윤 대식세포의 총 개수가 제한되어 있기 때문에, 임상적으로 매우 중요한 것으로 추정되고: 예를 들어, 시간 간격당 종양 세포 개수의 2배로 제거된다면, 이는 시간당 동일한 개수의 종양 세포를 제거하기 위해 존재해야 하는 대식세포 개수의 절반과 같다.

[0150] 본원에서 사용되는 바, 용어 " EC_{50} "은 은 최대 활성의 절반($E_{max}/2$)에 도달하는 화합물 농도를 기술한다. 낮은 EC_{50} 은 더 적은 양의 화합물을 주입해야 하고, 따라서, 예컨대, 더 높은 EC_{50} 에 비해 더 낮은 생산 비용 및/또는 잠재적으로 더 낮은 비율의 부작용을 달성하기 때문에 유용하다. 따라서, E_{max} 와 EC_{50} 은 화합물 활성의 다른 측면을 설명한다. 비교가능한 E_{max} 의 두 화합물의 경우, EC_{50} 은 더 낮은 농도에서 동일한 치료 효과를 얻을 수 있으므로 투여할 약물의 양이 적고 잠재적으로 부작용 발생률이 낮기 때문에 중요하다.

[0151] 본원에서 사용되는 바, 용어 "항원 결합부" 및 "결합부"는 가장 넓은 의미에서 예컨대, CEA, CD47 및 CD3과 같은 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 항체의 일부분을 지칭한다.

[0152] 더욱 구체적으로, 본원에서 사용되는 바, 막 결합 인간 암배아 항원(CEA, CEACAM5와 동일) 또는 CD47에 결합하는 결합부는 CEA 또는 CD47에, 더욱 특히, 세포 표면 또는 막 결합 CEA 또는 CD47에 특이적으로 결합한다. 따라서, 각 결합부는 CEA 또는 CD47에 결합한다. "특이적으로 결합하는, ~에 특이적인, ~에 결합하는"이란, 결합이 항원에 대해 선택적이고, 원치 않거나, 또는 비특이적인 상호작용과 구별될 수 있다는 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, 비관련된, 비표적 단백질에의 항표적 항체의 결합 정도는 예컨대, 생물층 간섭법, 예컨대, 옥테트(Octet)®, 표면 플라즈몬 공명(SPR: surface plasmon resonance), 예컨대, 비아코어(Biacore)®, 효소 결합 면역흡착(ELISA: enzyme-linked immunosorbent) 또는 유세포 분석법(FACS)에 의해 측정된 바, 상기 표적에의 항체의 결합보다 약 10배, 바람직하게는 >100배 더 적다. 표적은 본원에서 논의된 단백질, 예컨대, CEA, CD47, 및 CD3 ϵ 이다.

[0153] 한 실시양태에서, CEA 및 CD47에 특이적으로 결합하는, CEA 및 CD47에 결합하는, 및 CEA 및 CD47에 특이적인이

라는 어구는 항체, 예컨대, 이중특이적 항체가 CEACAM5 및 CD47을 발현하는 종양 세포를 표적화하는 데 치료제로서 유용하도록 하는 데 충분한 친화도로 표적 CEA 및 CD47에 결합할 수 있다는 것을 지칭한다. 특정 EC50 값으로 MKN-45, SNU-C1, LS174T, SK-CO-1, HPAF-II 및/또는 LoVo 세포에 결합한다고 언급하는 것은 유세포 분석법에 의해 측정된 EC50 값을 지칭한다(실시예 6 참조).

[0154] 본원에서 사용되는 바, 용어 "항체"는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 항체를 지칭한다. 한 실시양태에서, 항체는 전장 항체이다. 본원에 사용되는 바, 용어 "항체 중쇄"는 전장 항체에 대해 정의된 가변 영역 및 불변 영역으로 구성된 항체 중쇄를 지칭한다. 본원에서 사용되는 바, 용어 "항체 경쇄"는 전장 항체에 대해 정의된 가변 영역 및 불변 영역으로 구성된 항체 경쇄를 지칭한다.

[0155] "전장 항체"라는 용어는 2개의 "전장 항체 중쇄" 및 2개의 "전장 항체 경쇄"로 구성된 항체를 나타낸다. "전장 항체 중쇄"는 N 말단에서 C 말단 방향으로 항체 중쇄 가변 도메인(VH), 항체 불변 중쇄 도메인 1(CH1), 항체 힌지 영역(HR), 항체 중쇄 불변 도메인 2(CH2), 및 항체 중쇄 불변 도메인 3(CH3)으로 구성된 폴리펩티드이며, 이는 VH-CH1-HR-CH2-CH3로 약칭된다. "전장 항체 경쇄"는 N 말단에서 C 말단 방향으로 항체 경쇄 가변 도메인(VL) 및 항체 경쇄 불변 도메인(CL)으로 구성된 폴리펩티드이며, 이는 VL-CL로 약칭된다. 항체 경쇄 불변 도메인(CL)은 κ (카파) 또는 λ (람다)일 수 있다. 2개의 전장 항체 도메인은 CL 도메인과 CH1 도메인 사이 및 전장 항체 중쇄의 힌지 영역 사이에서 폴리펩티드간 디설피드 결합을 통해 함께 연결된다. 전형적인 전장 항체의 예는 IgG(예컨대, IgG1 및 IgG2), IgM, IgA, IgD 및 IgE와 같은 천연 항체이다. 본 발명에 따른 전장 항체는 한 실시양태에서, 인간 IgG1 타입의 것이고, 추가의 한 실시양태에서, 하기에서 정의된 바와 같은 Fc 부분에 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하고/거나, Asn297에 부착된 다당류 쇄에서 당조작된 것이다. 본 발명에 따른 전장 항체는 각각 하나는 CEA에 결합하고, 다른 하나는 CD47에 결합하는 것인 한 쌍의 VH 및 VL에 의해 형성된 2개의 결합부를 포함한다.

[0156] 본원에서 사용되고, 상기에서 언급된 바와 같이, "상보성 결정 영역(들)"(CDR(들): Complementarity determining region(s))은 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드, 둘 모두의 가변 영역 내에서 발견되는 비연속 항원 결합 부위(이는 또한 항원 결합 영역으로도 공지)를 기술한다. CDR은 또한 "초가변 영역"(HVR: hypervariable region)으로도 지칭되며, 상기 용어는 항원 결합 영역을 형성하는 가변 영역의 부분과 관련하여 본원에서 "CDR"이라는 용어와 상호교환적으로 사용된다. 상기 특정 영역은 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)](상기 문헌은 본원에서 참조로 포함)에 기술되어 있다. 카바트(Kabat)에 의해 정의된 CDR을 포함하는 적절한 아미노산 잔기는 하기 서열 목록 표에 제시되어 있다. 특정 CDR을 포함하는 정확한 잔기 번호는 CDR의 서열 및 크기에 따라 달라질 것이다. 당업자는 항체의 가변 영역 아미노산 서열을 고려하여 어떤 잔기가 특정 CDR을 구성하는지를 통상적으로 결정할 수 있다. 본원에서 사용되는 바, "서열 번호 x의 CDRL1을 포함하는"이라는 용어는 언급된 가변 경쇄의 CDRL1 영역이 (CDRL1로서 서열 번호 x의 CDRL1을 포함하는) 서열 번호 x의 것이라는 것을 지칭한다. 다른 CDR도 마찬가지이다. 달리 명시되지 않는 한, HVR 잔기는 본원에서 문헌 [Kabat et al. 상기 문헌 동일]에 따라 넘버링되고, "CDR"로 명명되며, 본 발명에 따른 이중특이적 항체에서 다른 특정 아미노산 잔기 위치의 넘버링에 대한 언급은 또한 카바트 넘버링 체계에 따른다.

[0157] 본원에서 사용되는 바, 용어 "Fc 영역" 및 "Fc 도메인"은 IgG 중쇄의 C 말단 영역을 지칭하고; IgG1 항체의 경우, C 말단 영역은 -CH2-CH3를 포함한다(상기 참조). IgG 중쇄의 Fc 영역 경계는 약간 다를 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 일반적으로 위치 Cys226의 아미노산 잔기에서 카복실 말단까지 뻗어 있는 것으로 정의된다. 불변 영역은 당업계 최신 기술에 널리 공지되어 있으며, 예컨대, (Kabat, E.A.)에 의해 기술되어 있다(예컨대, 문헌 [Johnson, G., and Wu, T.T., Nucleic Acids Res.28 (2000) 214-218]; [Kabat, E.A., et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 (1975) 2785-2788] 참조).

[0158] IgG 분자는 각 중쇄에 하나씩 그의 Fc 영역에 2개의 N 연결 올리고당을 보유한다. 임의의 당단백질로서, 항체는 동일한 폴리펩티드 백본을 공유하지만, 글리코실화 부위에 부착된 상이한 올리고당을 갖는 당형태 집단으로 제조된다. 글리칸 모이어티에서 푸코스 함량이 감소된 항체는 일반적으로 푸코실화된 항체와 비교하여 더 높은 항체 의존적 세포 세포독성(ADCC) 활성을 나타낸다(문헌 [Niwa R et al., Cancer Res, 64, 2127-33, 2004]). 푸코스 첨가를 담당하는 유전자(α 1,6-푸코실트랜스퍼라제; FUT8)에 대한 두 대립형질이 녹아웃된 세포주는 US6946292, US7425446, US8067232(각각 그 전문이 참조로 포함)에 기술되어 있다. 상기 세포주를 사용하여, 푸코스 함량이 감소되고, ADCC 및 항체 의존적 세포 식작용(ADCP)이 증가된, 글리칸 모이어티를 포함하는, 본 발명에 따른 이중특이적 항체를 생성할 수 있다. 푸코스 함량이 감소된 항체를 제조하는 데 사용할 수 있는 또 다른 기술은 US8642292(본원에 참조로 포함)에 기술되어 있다. 이 기술은 CHO 세포주 등과 같은 항체 생산자 세포

주 내로 이중성 박테리아 효소를 안정적으로 통합시키도록 디자인된 것이다. 이러한 조치에 의해 D-만노스로부터의 푸코스의 드 노보 합성은 차단된다. 또한 생산 세포가 푸코스가 없는 배지에서 배양되는 경우, 결과적으로 안정적인 수준으로 어푸코실화된 항체가 생성된다. 본 발명의 어푸코실화된 이중특이적 항체를 제조 및 정제하는 예시적인 방법은 실시예 9(1. 및 2.)에 기술되어 있다.

[0159] Fc 도메인 내의 돌연변이는 또한 상이한 Fc 수용체에의 Fc 도메인의 결합 특성을 변경시킬 수 있다 (WO2004063351, WO2004099249; WO2005018669, WO2005063815, WO2005110474, WO2005056759, WO2005092925, WO2005018572, WO2006019447, WO2006116260, WO2006023420, WO2006047350, WO2006085967, WO2006105338, WO2007021841, WO2007008943, WO2007024249, WO2007041635, WO2007048077, WO2007044616, WO2007106707, WO2008022152, WO2008140603, WO2008036688, WO2008091798, WO2008091954, WO2008092117, WO2008098115, WO2008121160, WO2008150494, WO2010033736, WO2014113510(이들은 각각 그 전문이 참조로 포함)).

[0160] 용어 "에피토프"는 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 임의의 폴리펩티드 결정기를 포함한다. 특정 실시양태에서, "에피토프"는 예컨대, 아미노산, 당 측쇄, 포스포릴 또는 술폰닐과 같은 분자의 화학적 활성 표면 그룹을 포함하고, 특정 실시양태에서, 특정 3차원 구조적 특징 및/또는 특정 전하 특징을 가질 수 있다. 에피토프는 항체에 의한 결합이 이루어지는 표적의 영역이다. 한 실시양태에서, 본 발명의 이중특이적 항체는 CEACAM5의 N 말단 도메인에 결합한다(아미노산 35-144의 Ig 유사 V 타입 도메인, UniProtKB - P06731). CEACAM5에의 CEACD47 이중특이적 항체의 결합 위치는 에피토프 비닝을 통해 달성된다. 에피토프 비닝에서, 항체는 쌍별 조합 방식으로 시험되며, 동일한 결합 영역에 대해 경쟁하는 항체는 빈으로 함께 그룹화된다. 최신 기술에 따라 및 본원에 기술된 바와 같이, 본원에서는 항CEA 항체를 사용하여 경쟁 시험이 수행된다. 한 실시양태에서, 본 발명의 이중특이적 항체는 참조 항체 SM3E와 CEACAM5에의 결합에 대해 경쟁한다. 경쟁은 0.5 µg/ml 농도의 비오틴화된 인간 CEACAM5를 고정화하고, 참조의 연속 희석액(67 nM 내지 0.09 nM)과 함께 인큐베이션시키는 검정법에 의해 측정된다. 본 발명의 CEACD47 이중특이적 항체를 실온에서 1시간 동안 0.1 µg/ml로 첨가한다. 플레이트를 세척하고, 결합된 CEACD47 이중특이적 항체를 검출한다.

[0161] 본원에서 사용되는 바, 용어 "공통 중쇄"(cHC)는 N 말단에서 C 말단 방향으로 항체 중쇄 가변 도메인(VH), 항체 불변 중쇄 도메인 1(CH1), 항체 힌지 영역(HR), 항체 중쇄 불변 도메인 2(CH2) 및 항체 중쇄 불변 도메인 3(CH3)으로 구성된 폴리펩티드를 지칭하며, VH-CH1-HR-CH2-CH3으로 약칭된다. 본 발명에 따른 이중특이적 항체에 적합한 공통 중쇄는 WO2012023053, WO2013088259, WO2014087248, 및 WO2016156537(이들은 각각 그 전문이 참조로 포함)에 기술된 바와 같은 항CD47 항체의 중쇄이다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체의 공통 중쇄는 중쇄 CDR로서 서열 번호 1의 CDRH1, 서열 번호 2의 CDRH2, 및 서열 번호 3의 CDRH3을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체의 cHC는 중쇄 가변 영역 VH로서 서열 번호 4의 VH 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체의 공통 중쇄 cHC의 Fab 부분은 서열 번호 5의 것(VH-CH1)이다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체의 공통 중쇄 cHC는 서열 번호 6의 것(VH-CH1-CH2-CH3)이다. 서열 번호 6은 추가로 IgG1 Fc 부분을 포함하는 중쇄이다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체는 cHC를 포함하는 κ λ 이중특이적 항체(κ λ 바디)이다.

[0162] κ λ 바디 포맷은 표준 IgG 분자와 구별할 수 없고, 표준 단일클론 항체와 구별할 수 없는 특징을 갖는, 환자에서 잠재적인 면역원성이 없거나, 낮을 가능성이 있는 이중특이적 항체의 친화성 정제를 허용한다(예컨대, WO2013088259, WO2012023053 참조).

[0163] 공통 중쇄를 포함하는 본 발명의 이중특이적 항체는 예를 들어 WO2012023053(그의 전문이 참조로 포함)에 따라 제조될 수 있다. WO2012023053에 기술된 방법을 통해 인간 면역글로불린과 구조가 동일한 이중특이적 항체를 생성한다. 상기 타입의 분자는 고유한 중쇄 폴리펩티드의 두 카파, 불변 카파 도메인에 융합된 제1 경쇄 가변 영역 및 불변 람다 도메인에 융합된 제2 경쇄 가변 영역으로 이루어진다. 한 결합 부위는 CEA에 대한 특이성을 나타내고, 다른 부위는 CD47에 대한 특이성을 나타내며, 여기서, 각각의 중쇄 및 각각의 경쇄에 기여한다. 경쇄 가변 영역은 람다 또는 카파 패밀리에 속하고, 바람직하게는 각각 람다 및 카파 불변 도메인에 융합된다. 이는 비천연 폴리펩티드 접합부의 생성을 피하기 위해 선호되는 것이다. 그러나, 제1 특이성을 위해 카파 경쇄 가변 도메인을 불변 람다 도메인에 융합시키거나, 또는 제2 특이성을 위해 람다 경쇄 가변 도메인을 불변 카파 도메인에 융합시킴으로써 본 발명의 이중특이적 항체를 획득할 수 있다. 이어서, 다른 경쇄는 항상 완전 카파(VL 및 CL) 또는 완전 람다(소위 카파 람다 이중특이적 항체의 하이브리드 포맷으로 불림)이다. WO 2012023053에 기술된 이중특이적 항체는 "κ λ 바디"이다. 상기 κ λ 바디 포맷은 표준 단일클론 항체와 구별할 수 없는 특성을 가진 표준 IgG 분자와 구별할 수 없는 이중특이적 항체의 친화성 정제를 허용하는 바, 따라서, 예컨대, 아미노

산 브릿지 또는 다른 비천연 요소를 포함하는 이전 포맷과 비교하여 바람직하다.

- [0164] 본원에서 사용되는 바, 용어 "CEA" 및 "CEACAM5"는 세포 표면 당단백질 및 종양 연관 항원(문헌 [Gold and Freedman, J Exp. Med., 121:439-462, 1965]; [Berinstein NL, J Clin Oncol., 20:2197-2207, 2002])인, 인간 암배아 항원(CEA, CEACAM-5 또는 CD66e; UniProtKB - P06731)을 지칭한다. 본원에서 사용되는 바, 용어 "CEACAM3"은 이 또한 암배아 항원 관련 세포 부착 분자(CEACAM) 패밀리의 구성원인 인간 CEACAM3(UniProtKB - P40198 (CEAM3_HUMAN))을 지칭한다. 추가 정보 및 CEA 패밀리의 다른 구성원에 대한 정보는 <http://www.uniprot>에서 살펴볼 수 있다.
- [0165] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 TCB2014와 경쟁적이지 않다. 이중특이적 항CEACAM5 x 항 CD3ε 항체인 시비사타맵은 문헌 [Bacac et al. (Clin. Cancer Res., 22(13), 3286-97 (2016))]에 기술되어 있다. TCB2014의 항체쇄는 US20140242079(US20140242079의 서열 번호 1, 2, 21, 22, 23, 및 27)(그의 전문이 참조로 포함)에 기술되어 있다. 추가의 이중특이적 CEACAM3 Mab(TCB2017)는 전하 변형(CD3 결합제에서 VH/VL 교환, CEA 결합제에서 전하 변형, 인간화 CEA 결합제)이 있는 "2+1 IgG 크로스Fab(2+1 IgG CrossFab), 역전"인 분자 B로서 WO2017055389(WO2017055389의 서열 번호 34, 36-38 참조(그의 전문이 참조로 포함))에 기술되어 있다.
- [0166] 본원에서 사용되는 바, 한 실시양태에서, "이중특이적 CEA x CD3 항체"는 항체 TCB2014, 시비사타맵 또는 항체 TCB2017을 지칭한다. 시비사타맵, TCB2014 및 TCB2017은 세포막에 근접하게 위치하는 CEACAM5의 에피토프에 결합한다. 대조적으로, 본 발명의 CEACAM3 이중특이적 항체는 CEACAM5의 N 말단에 가까운 세포막의 원위 에피토프에 결합하고, CEACAM5에의 결합에 대해 시비사타맵, TCB2014 및 TCB2017과 경쟁하지 않는다.
- [0167] 본원에서 사용되는 바, 본 발명에 따른 이중특이적 항체의 맥락에서 "CD47에 특이적으로 결합하는," "CD47에 결합하는" 및 "CD47 결합부"라는 용어는 인간 CD47에 대한 특이성을 지칭한다. 인간 CD47은 다중 통과 막 단백질이며, 3개의 세포외 도메인(아미노산 19-141, 198-207 및 257-268; UniProtKB - Q08722 참조)을 포함한다. 본원에서 사용되는 바, "CD47에의 결합 친화도"는 생물층 간섭법(Octet Technology) 및/또는 표면 플라즈몬 공명(Biacore Technology)에 의해 정량적으로(KD) 측정된다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체의 CD47에의 결합은 상기 세포외 도메인 중 하나 이상의 것을 통해 이루어진다.
- [0168] 한 실시양태에서, (인간 CD47에 특이적으로 결합하는) 본 발명에 따른 항체의 제2 결합부는 경쇄 CDR로서 서열 번호 7의 CDRL1, 서열 번호 8의 CDRL2, 및 서열 번호 9의 CDRL3을 포함하는 경쇄, 및 중쇄 CDR로서 서열 번호 1의 CDRL1, 서열 번호 2의 CDRL2, 및 서열 번호 3의 CDRL3을 포함하는 중쇄를 특징으로 한다. 한 실시양태에서, (인간 CD47에 특이적으로 결합하는) 본 발명에 따른 항체의 제2 결합부는 서열 번호 10의 카파 경쇄 가변 영역을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, (인간 CD47에 특이적으로 결합하는) 본 발명에 따른 항체의 제2 결합부는 서열 번호 11의 카파 경쇄를 특징으로 한다. 한 실시양태에서, (인간 CD47에 특이적으로 결합하는) 본 발명에 따른 항체의 제2 결합부는 서열 번호 4의 중쇄 가변 영역을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, (인간 CD47에 특이적으로 결합하는) 본 발명에 따른 항체의 제2 결합부는 서열 번호 5의 중쇄를 특징으로 한다. 한 실시양태에서, (인간 CD47에 특이적으로 결합하는) 본 발명에 따른 항체의 제2 결합부는 서열 번호 6의 중쇄를 특징으로 한다.
- [0169] 본원에서 사용되는 바, "서열 번호 5의 중쇄를 특징으로 하는"이라는 용어는 표 1에 제시된 바와 같은, 본 발명에 따른 항체의 Fab 부분인 중쇄의 VH-CH1 부분을 지칭한다. 상기 중쇄는 추가로, 및 일반 지식에 따라, 힌지 영역, CH2, CH3으로서 추가 부분을 포함할 수 있고, 예컨대, F(ab')₂ 포맷과 같은 임의의 항체 포맷일 수 있다. 바람직한 포맷은 상기 기술된 바와 같은 공통 중쇄 포맷이다.
- [0170] 본원에서 사용되는 바, "CEA에 특이적으로 결합하는," "CEA에 결합하는" 및 "CEA 결합부"라는 용어는 본 발명에 따른 이중특이적 항체의 재조합 인간 CEACAM5에의 결합을 지칭하는 것으로, 여기서, 상기 항체는 재조합 인간 CEACAM5에의 결합의 KD 값과 비교하여 100배 이상의 KD 값으로 재조합 인간 CEACAM3에 결합하는 것이다. 본원에서 사용되는 바, 용어 "KD"는 본 발명에 따른 이중특이적 항체와 그의 항원 CEACAM5 또는 CEACAM3 사이의 평형 해리 상수를 지칭하고, nM으로 명기되고, 예컨대, 표면 플라즈몬 공명 및/또는 생물층 간섭법(실시예 3)에 의해 측정될 수 있다.
- [0171] 세포 상의 CEA(CEACAM5)에의 결합은 상이한 종양 세포주, 예컨대, LoVo, LS174T, MKN-45, SNU-C1, SK-CO-1, HPAF-II를 사용하여 측정된다. 본 발명에 따른 항체의 농도는 상기 정의된 바와 같은, 세포에의 결합에 대하여 생성된 EC50 값 및 Emax 값과 관련하여 적절한 범위에서 달라진다. 본 발명의 이중특이적 항체의 결합 곡선은

도 1a-1f에 제시되어 있으며, EC50 및 Emax는 표 4에 열거되어 있다.

- [0172] 본원에서 사용되는 바, 용어 "막 결합 인간 CEA"는 세포의 막 부분 또는 세포의 표면, 특히, 종양 세포의 표면에 결합된 인간 암배아 항원(CEA)을 지칭한다.
- [0173] 본원에서 사용되는 바, 용어 "인간 CEA 및 인간 CD3에 결합하는 이중특이적 항체" 및 "CEAxCD3 Mab"는 인간 CEACAM5 및 CD3 ϵ 에 결합하는 이중특이적 항체를 의미한다. 상기 항체는 예를 들어, 시비사타맵, "TCB2014" 및 "TCB2017"이다. 본원에서 사용되는 바, "TCB2014"는 서열 번호 1, 2, 21, 및 22로서 US20140242079(그의 전문이 참조로 포함)에 기술된 바와 같은, CEA 및 CD3에 결합하는 이중특이적 항체를 지칭한다. 본원에서 사용되는 바, "TCB2017"은 전하 변형(CD3 결합제에서 VH/VL 교환, CEA 결합제에서 전하 변형, 인간화 CEA 결합제)이 있는 "2+1 IgG 크로스Fab, 역전" 포맷의 분자 B를 지칭한다; WO2017055389의 서열 번호 34, 36-38 (그의 전문이 참조로 포함). 추가 CEAxCD3 Mab는 WO2007071426, WO2013012414, WO2015112534, WO2017118675, US20140242079 및 WO2017055389(이들은 각각 그 전문이 참조로 포함)에 기술되어 있다. 추가 CEAxCD3 Mab는 시비사타맵(이전 R06958688)이다(예컨대, 문헌 [Bacac et al., Clin. Cancer Res., 22(13), 3286-97 (2016)] 참조). 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 상기 CEAxCD47 Mab는 TCB2014 또는 TCB2017과 경쟁적이지 않고/거나, 동일한 인간 CEACAM5의 에피토프에 결합하지 않는다.
- [0174] 본원에서 사용되는 바, "CD3 ϵ " 및 "CD3"은 인간 CD3 ϵ (UniProtKB - P07766 (CD3E_HUMAN))을 지칭한다. 용어 "CD3 ϵ (CD3)에 대한 항체" 및 "항CD3 ϵ (CD3) 항체"는 CD3 ϵ 에 특이적으로 결합하는 항체에 관한 것이다. 한 실시양태에서, CD3 ϵ 에 대한 항체는 항CD3 항체 SP34(BD Biosciences 카탈로그 번호 565983)와 동일한 에피토프에 특이적으로 결합한다.
- [0175] 한 실시양태에서, 본 발명의 이중특이적 항체는 MKN-45 및/또는 LS174T 세포 상에 제시된 바와 같은 CEA에의 결합에 대해 TCB2014 및/또는 TCB2017과 경쟁하지 않는다. 따라서, 300 nM(TCB2014) 또는 30 nM(TCB2017) 농도의 TCB2014는 MKN-45 및/또는 LS174T 세포에 대한 상기 본 발명의 이중특이적 항체의 식작용 지수 곡선의 EC50을 3배 초과만큼 한 실시양태에서, 더 높은 농도로 이동시키지 않는다.
- [0176] 300 nM TCB2014 농도가 선택되었는데, 그 이유는 상기 규모의 농도가 예컨대, 100 mg와 같은 치료 유효 용량의 시비사타맵을 이용하여 iv로 치료받은 환자의 혈장에서 측정되었기 때문이다(시비사타맵에 대한 PK 데이터에 대해서 문헌 [Melero et al., ASCO 2017, Abstract 2549 and Poster No.41, Abstract in Journal of Clinical Oncology 35, no.15_suppl (May 20, 2017) 2549-2549] 참조, 각각의 임상 결과에 대해서는 문헌 [Tabernero et al., J. Clin. Oncol.35, 2017 (suppl. Abstr. 3002)] 참조). PD-L1 억제제와 함께 조합한 시비사타맵에 대한 현재 활발히 모집 중인 연구에서 시비사타맵 100 mg이 투여된다(ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03866239). TCB2017은 임상전 연구에서 TCB2014보다 대략 10 내지 100배 더 강력하다(T 세포 의존적 세포 세포독성 TDCS 검정법에서 결합 친화도 또는 종양 세포 용해로 측정; WO2017055389 참조). 따라서, TCB2017에 의한 본 발명의 이중특이적 항체의 식작용 곡선의 EC50의 이동은 30 nM의 TCB2017에서 시험되었다.
- [0177] 결합 경쟁은 MKN-45 세포에의 결합 곡선의 유세포 분석 기반 측정 및 상기 결합 곡선의 EC50 측정에 의해 결정될 수 있다. 비경쟁이란, 300 nM의 TCB2014가 검정에 추가되는 경우, EC50이 3배 미만만큼, 한 실시양태에서, 더 높은 농도로 이동하는 것을 의미한다. 300 nM은 CEA x CD3 이중특이적 항체(TCB2014)의 치료 활성 용량/혈장 농도 범위의 농도이다(문헌 [Tabernero et al., J. Clin. Oncol.35, 2017 (suppl. Abstr.3002)]). TCB2017에 의한 비경쟁이란, 30 nM의 TCB2017이 검정에 추가되는 경우, EC50이 3배 미만만큼 이동하는 것을 의미한다.
- [0178] 본원에서 사용되는 바, "경쟁하지 않는다"라는 용어는 300 nM(TCB2014) 또는 30 nM(TCB2017) 농도의 제2 항체(CEAxCD3 ϵ 에 대한 이중특이적 항체, 예컨대, TCB2014 또는 TCB2017)가 MKN-45 세포에의 본 발명의 이중특이적 항체의 결합 곡선의 EC50을 3배 초과만큼, 한 실시양태에서, 더 높은 농도로 이동시키지 않는다는 것을 의미한다.
- [0179] 본원에서 사용되는 바, 용어 "ADCP"는 항체 의존적 세포 식작용을 지칭한다. 본원에서 사용되는 바, 본 발명에 따른 식작용, 식작용의 EC50 값, 식작용의 최대값, 및 식작용 지수는 종양 세포주, 예컨대, LoVo, LS174T, SNU-C1 및/또는 MKN-45를 이용하여 "이미징"에 의해 측정된 식작용을 지칭한다. 예컨대, 1:1 또는 1:3의 이펙터(대 식세포):표적(종양) 세포 비로 인큐베이션시키고, 판독값으로서 "식작용 지수"(이미징으로 측정된 ADCP)를 갖는 적절한 이미징 방법이 실시예 7에 기술되어 있다. 본원에서 사용되는 바, "상기 이중특이적 항체의 식작용"이란, 상기 항체에 의해 유발/유도된 식작용을 의미한다.
- [0180] 용어 "인간 IgG" 및 "hIgG"는 인간 항체 이소타입을 지칭한다. 실험 설정에서 사용되는 바, 상기 용어는 CD47

및 CEACAM5에 특이적으로 결합하지 않는 인간 면역글로불린 IgG의 상업적으로 이용가능한 임상 등급의 균질 제제(예컨대, Bio-Rad로부터 이용가능)를 지칭한다.

- [0181] 항CEA 항원 결합 분자의 치료적 적용 및 사용 방법
- [0182] 본 발명에 따른 CEACAM x CD47 이중특이적 항체는 단일요법으로, 또는 CEACD3 T 세포 이중특이적 항체, 예컨대, 시비사타맘, TCB2014 또는 TCB2017 및/또는 PD-1 축 길항제와 함께 하는 조합 요법으로 주로 종양 세포의 대식세포 매개 식작용에 의해 뿐만 아니라, ADCC에 의해 이루어지는 고�형 종양의 치료를 위해 최적화된다. 본 발명에 따른 항체 및 CEACD3 T-세포 이중특이적 항체는 하기 기술된 바와 같이 투여될 수 있다.
- [0183] 특정 실시양태에서, 질환 resp. 고�형 종양은 결장직장 종양, 비소세포 폐 종양, 위 종양, 췌장 종양 및 유방 종양으로 구성된 군을 포함하나, 이에 제한되지 않는, CEACAM5를 발현하거나, 또는 심지어 과다발현하는 암이다. 특정 실시양태에서, 종양은 결장직장 종양이다. 특정 실시양태에서 종양은 위 종양 또는 위식도 연결부 종양이다. 특정 실시양태에서 종양은 CEACAM5 및 HER-2를 발현하는 위 종양/위식도 연결부 종양이다. 특정 실시양태에서 종양은 폐 종양이다. 본원에 기술된 모든 치료 적용 사용 방법, 용도, 조합 등은 특히 상기 종양/질환의 치료를 위한 실시양태이다.
- [0184] 본 발명자들은 본 발명에 따른 항체가 각각 중화 항약물 항체(ADA)에 기인하는 약물 노출 상실로 각각 효능이 상실됨에 따라 ADA 형성 가능성이 낮거나, 또는 없다는 것을 인식한다.
- [0185] 한 실시양태에서, 본 발명은 암종(암, 종양, 예를 들어, 인간 암종), 특히, CEACAM5 발현 종양을 생체내에서 치료하는 방법을 제공한다. 본 방법은 본 발명의 이중특이적 항체를 함유하는 조성물을 약학적 유효량으로 피험체에게 투여하는 단계를 포함한다. "피험체"는 인간 피험체, 한 실시양태에서, 암/종양/암종을 앓는 환자를 의미한다.
- [0186] CEACAM5 발현은 다양한 종양 엔티티에서, 특히 다른 것들 중에서도 결장직장 암종, 췌장 선암종, 위암, 비소세포 폐암, 유방암에서 발견될 수 있다. 위장관의 건강하고 정상적인 선 상피에서 CEACAM5는 주로 세포의 정단 표면에서 분극화된 패턴으로 발현된다. 이러한 분극화된 발현 패턴은 전신으로 투여되는 항CEA 단일 또는 이중특이적 항체에 의한 접근을 제한하고, 이로써, 건강한 조직에 대한 잠재적인 독성을 제한한다. 본 발명의 항체의 낮은 친화도의 CD47 결합과 함께, 이는 본 발명의 항체에 의한 상기 정상 세포의 식작용을 유도하지 않거나, 또는 제한한다. 이러한 분극화된 발현 패턴은 위장 및 다른 악성 종양의 세포에서 상실된다. CEACAM5는 암 세포의 전체 세포 표면에 걸쳐 동등하게 발현되는데, 이는 암 세포가 정상적인 건강한 세포보다 본 발명의 항체에 훨씬 더 잘 접근할 수 있고, 상기 언급된 조합에 의해 각각 본 발명의 CEACD47 이중특이적 항체에 의해 선택적으로 사멸될 수 있다는 것을 의미한다. 암 세포에서 CEACAM5의 발현은 대부분 비악성 세포에서의 발현보다 높다.
- [0187] 한 실시양태에서, 본 발명의 이중특이적 항체는 진행성 고�형 종양, 한 실시양태에서, CEACAM5 발현 종양의 치료를 위한 단일요법에 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 CEACD3 Mab와 함께 조합하여 동시에, 개별로 또는 순차적 조합으로 사용된다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 CEACD3 Mab 및/또는 PD-1 축 길항제와 함께 조합하여 동시에, 개별로 또는 순차적 조합으로 사용된다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 PD-1 축 길항제와 함께 조합하여 동시에, 개별로 또는 순차적 조합으로 사용된다. 상기 PD-1 축 길항제는 예컨대, WO2017118675에 기술되어 있다. 상기 조합은 대식세포와 T 세포에 의해 고�형암을 공격한다. 한 CEACD3 Mab가 임상 개발 중에 있다(시비사타맘; ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03866239 참조). MEDI-565는 임상 개발 중이었지만, 진행 중인 임상 시험을 clinicaltrials.gov에서 확인할 수는 없었다. 한 실시양태에서, CEA 및 CD3에 대한 이중특이적 항체로서 TCB2014 또는 시비사타맘이 사용된다.
- [0188] TCB2014 및 시비사타맘에 사용된 CEA에의 결합체는 항CEA 항체 PR1A3으로부터 유래된 것이다(예컨대, EP2681244B1 참조). 상기 항체는 세포막에 근접하게 위치하는 소위 CEA의 B3 도메인이라는 것에 결합한다. TCB2014는 낮은 nM의 결합 친화도로 CEA에 결합하고, 고용량(환자 및 용량당 40 내지 600 mg; 예컨대, 문헌 [Taberner et al., J. Clin. Oncol.35, 2017 (suppl. Abstr.3002)] 참조)에서 효능을 보인다. 고용량에서 세포 표면의 거의 모든 CEA 표적은 TCB2014에 의해 점유된다. 본 발명자들의 지식에 따르면, CEACD47과 시비사타맘, TCB2014 또는 TCB2017의 조합은, 두 약물이 모두 모두 중첩되지 않는 상이한 에피토프에 각각 결합하여 CEA 항원에 대해 경쟁하지 않는다면, 동시에 두 약물 모두의 치료 혈장 수준을 생성할 수 있으며, 최상의 결과를 달성할 수 있다(상가적 또는 심지어는 시너지적).
- [0189] 본원에서 사용되는 바, 본 발명에 따른 항체 및 인간 CEA 및 인간 CD3 ε에 결합하는 제2 항체의 "조합, 동시,

개별 또는 순차적 조합"이라는 용어는 2개의 항체(또는 본 발명의 항체, CEACAM5 Mab 및 PD-1 축 길항제의 조합인 경우, 3개의 항체)를 개별로 또는 함께 투여하는 것을 지칭하고, 여기서, 2개 또는 3개의 항체는 조합 요법의 이점을 얻도록 디자인된 적절한 투여 요법, 예를 들어, 개별, 순차적, 동시, 공동, 시차를 둔 또는 교대 투여의 일부로 투여된다. 따라서, 2개 또는 3개의 항체는 동일한 약학 조성물의 일부로서 또는 별개의 약학 조성물로 투여될 수 있다. 본 발명에 따른 항체는 제2 이중특이적 항체의 투여 전에, 그와 동시에 또는 그 후에, 또는 그의 일부 조합으로 투여될 수 있다. 본 발명에 따른 항체가 반복된 간격으로 환자에게 투여되는 경우, 제2 이중특이적 항체는 본 발명의 항체의 각각의 투여 전에, 그와 동시에, 또는 그 후에, 또는 그의 일부 조합으로, 또는 본 발명의 항체를 사용한 치료와 관련하여 상이한 간격으로, 또는 본 발명의 항체를 사용한 치료 과정 전에, 그 동안 또는 그 후의 임의의 시간에 단일 용량으로 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체 및 제2 이중특이적 항체는 교대 투여로, 한 실시양태에서, 본 발명의 항체와 제2 항체의 투여 사이에 6 내지 15일의 간격을 두고 투여된다. 상기 교대 투여에서, 제1 투여는 본 발명의 항체 또는 제2 항체일 수 있다.

- [0190] 용어 "PD-1 축 길항제"는 항PD-1 항체 또는 항PD-L1 항체를 지칭한다. 항PD-1 항체는 예컨대, 켈트루디주맙(Keytruda®, MK-3475), 니볼루맙, 피달리리주맙, 람브롤리주맙, MEDI-0680, PDR001 및 REGN2810이다. 항PD-1 항체는 예컨대, WO200815671, WO2013173223, WO2015026634, US7521051, US8008449, US8354509, WO2009114335, WO2015026634, WO2008156712, WO2015026634, WO2003099196, WO2009101611, WO2010/027423, WO2010/027827, WO2010/027828, WO2008/156712, 및 WO2008/156712(이들은 각각 그 전문이 참조로 포함)에 기술되어 있다.
- [0191] 항PD-L1 항체는 예컨대, 아테졸리주맙, MDX-1 105, 두르발루맙 및 아벨루맙이다. 항PD-L1 항체는 예컨대, WO2015026634, WO2013/019906, WO2010077634, US8383796, WO2010077634, WO2007005874, 및 WO2016007235(이들은 각각 그 전문이 참조로 포함)에 기술되어 있다.
- [0192] 본 발명에 따른 항체 및 제2 이중특이적 항체의 조합 투여와 관련하여, 두 화합물 모두 하나의 단일 투여 형태로 또는 별도의 투여 형태로, 예컨대, 2개의 상이한 또는 동일한 투여 형태로 존재할 수 있다.
- [0193] 본 발명의 항체 및 제2 항체가 CEACAM5와 관련하여 경쟁하지 않는 경우, 한 실시양태에서, 의사가 원하는 경우, 두 항체 모두 동시에 투여될 수 있다. 본 발명의 항체 및 제2 항체가 CEACAM5와 관련하여 경쟁하는 경우, 한 실시양태에서, 두 항체 모두 교대 투여로 투여된다.
- [0194] 본 발명의 항체는 전형적으로 당업계에서 공지된 바와 같이 환자가 치료되고 있는 암의 가장 효과적인 치료(효능 및 안전성 관점 모두에서)를 제공하는 투여 요법으로 환자에게 투여될 것이다. 바람직하게, 종양 세포는 상기 접근법의 완전한 치료 잠재력을 달성하기 위해 T 세포 및 대식세포에 의해 동시에 공격되며, 본 발명에 따른 CEACAM5 및 CEACAM5 이중특이적 항체는 세포 표면의 CEA에의 결합과 관련하여 비경쟁적이어야 한다.
- [0195] 상기 논의된 바와 같이, 본 발명의 항체의 투여되는 항체의 양 및 투여 시기는 치료되는 환자의 타입(예컨대, 성별, 연령, 체중) 및 상태, 치료되는 질환 또는 병태의 중증도, 및 투여 경로에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체 및 제2 항체는 1일 또는 1주일에 체중 1 kg당 0.1 내지 100 mg의 용량으로 단일 또는 분할 용량으로 또는 연속 주입에 의해 환자에게 투여된다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항체 및 제2 항체는 각각 0.1 내지 30 mg/kg 범위의 용량으로 환자에게 투여된다. 일부 경우에는 상기에서 언급된 범위의 하한보다 낮은 투여량 수준이 적절할 수 있는 반면, 다른 경우에는 훨씬 더 많은 용량이 임의의 유해한 부작용을 유발하지 않으면서 사용될 수 있다.
- [0196] 본원에서 사용되는 바, 용어 "항체의 반감기"는 통상적인 약동학적 검정법에서 측정된 상기 항체의 제거 반감기를 지칭한다. 본 발명에 따른 항체 및 CEA 및 CD3에 대한 제2 이중특이적 항체는 3-14일의 제거 반감기를 갖는다.
- [0197] 또 다른 측면에서, 본 발명은 또한 질환, 특히, CEACAM5가 발현되는, 특히, CEA가 동일한 세포 타입의 정상 조직과 비교하여 비정상적으로 발현되는(예컨대, 세포 표면 상에 과다발현되거나, 또는 상이한 패턴으로 발현되는) 세포 증식 장애의 치료에서의 본 발명에 따른 이중특이적 항체의 용도에 관한 것이다. 상기 장애로는 결장직장암, NSCLC(비소세포 폐암), 위암, 위식도암, 췌장암 및 유방암을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. CEACAM5 발현 수준은 공지된 상이한 최신 방법(예컨대, 면역조직화학 검정법, 면역형광 검정법, 면역효소 검정법, ELISA, 유세포 분석법, 방사선면역검정법 등을 통해)에 의해 측정될 수 있다.
- [0198] 한 측면에서, 본 발명의 이중특이적 항체는 CEACAM5를 발현하는 세포를 생체 내에서 또는 시험관내에서 표적화하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 이중특이적 항체는 특히 종양 세포의 ADCP 및 ADCC 유도를 통한 종양 형

성 예방, 종양 근절 및 종양 성장 또는 전이의 억제에 특히 유용하다. 본 발명의 이중특이적 항체는 CEACAM5를 발현하는 임의의 종양을 치료하는 데 사용될 수 있다. 본 발명의 이중특이적 항체로 치료될 수 있는 특정 악성 종양으로는 결장직장암, 비소세포 폐암, 위암, 위식도 연결부 암, 췌장암, 및 유방암을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

- [0199] 본 발명의 이중특이적 항체는 인간에게 볼루스로서 정맥내로 투여되거나, 일정 기간 동안 연속 주입에 의해, 근육내, 복강내, 뇌척수내, 피하, 관절내, 활막내, 척추강내, 경구, 국소 또는 흡입 경로에 의해 투여될 수 있는 것을 비롯하여, 하기에서 논의되는 것과 같은 약학적으로 허용되는 투여 형태로 포유동물, 바람직하게, 인간에게 투여된다. 본 발명의 이중특이적 항체는 또한 국소 및 전신 치료 효과를 발휘하기 위해 종양내, 종양 주위, 병변내 또는 병변 주위 경로에 의해 적합하게 투여된다.
- [0200] 질환의 치료를 위해, 본 발명의 이중특이적 항체의 적절한 투여량은 치료하고자 하는 질환의 타입, 질환의 중증도 및 경과, 이전 요법, 환자의 임상 병력 및 항체에 대한 반응 및 주치의의 재량에 따라 좌우될 것이다. 본 발명의 이중특이적 항체는 한 번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 환자에게 적합하게 투여된다. 본 발명은 CEACAM5를 발현하는 종양 세포(본원에서는 또한 암 세포로도 명명)를 선택적으로 사멸시키는 방법을 제공한다.
- [0201] 상기 방법은 본 발명의 이중특이적 항체와 상기 종양 세포의 상호작용을 포함한다. 이들 종양 세포는 결장직장암종, 비소세포 폐암종(NSCLC), 위암종, 위식도 연결부 암, 췌장 암종 및 유방 암종을 포함하는 인간 암종으로부터 유래할 수 있다.
- [0202] 또 다른 측면에서, 본 발명은 비정상적인 CEACAM5 발현과 관련된 질환 치료용 의약의 제조를 위한 본 발명의 이중특이적 항체의 용도에 관한 것이다. 특정 실시양태에서, 질환은 결장직장 종양, 비소세포 폐 종양, 위 종양, 위식도 연결부 종양, 췌장 종양, 및 유방 종양을 포함하나, 이에 제한되지 않는, CEACAM5를 발현하거나, 또는 심지어는 과다발현하는 암이다.
- [0203] *조성물, 제제, 투여량 및 투여 경로*
- [0204] 한 측면에서, 본 발명은 본 발명의 이중특이적 항체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 예컨대, 암과 같은 질환의 치료 방법에서 또는 예컨대, 암과 같은 질환의 치료용 의약 제조에서의 상기 약학 조성물의 용도에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 치료 유효량의 본 발명의 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 질환 치료, 더욱 특히, 암 치료 방법에 관한 것이다.
- [0205] 한 측면에서, 본 발명은 상기 정의된 바와 같은 인간 암종, 종양을 치료하기 위한 약학 조성물, 조합물 및 방법을 포함한다. 예를 들어, 본 발명은 약학적 유효량의 본 발명의 항체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 인간 암종의 치료에 사용하기 위한 약학 조성물을 포함한다.
- [0206] 본 발명의 이중특이적 항체 조성물은 정맥내, 복강내, 경구, 림프내 또는 직접적인 종양내 투여를 포함하나, 이에 제한되지 않는 통상적인 투여 모드를 사용하여 투여될 수 있다. 정맥내 투여 또는 피하 투여가 바람직하다.
- [0207] 본 발명의 한 측면에서, 본 발명의 이중특이적 항체를 함유하는 치료 제제는 동결건조 제제 또는 액체 제제의 형태로 원하는 정도의 순도를 갖는 항체를 임의적인 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제와 혼합함으로써 보관용으로 제조된다(문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]). 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 무독성이다. 생체내 투여에 사용되는 제제는 멸균 상태여야 한다. 이는 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 쉽게 달성된다. 본 발명의 약학 조성물에 대한 가장 효과적인 투여 모드 및 투여량 요법은 질환의 중증도 및 경과, 환자의 상태 및 치료에 대한 반응 및 담당 의사의 판단에 따라 결정된다. 따라서, 조성물의 투여량은 균일 투여량일 수 있거나, 또는 개별 환자, 예컨대, 체중에 맞게 적합화될 수 있다. 그럼에도 불구하고, 본 발명의 조성물의 유효 용량은 일반적으로 0.1 내지 30 mg/kg의 범위가 될 것이다.
- [0208] 본 발명의 이중특이적 항체는 Mol당 150 kD 규모의 분자량을 갖는다. 한 실시양태에서, 이는 Fc 부분을 보유한다. 환자에서 제거 반감기는 3 내지 14일 범위이다. 이 반감기는 하루에 한 번, 일주일에 한 번 또는 2주에 한 번 투여를 허용하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0209] 본 발명의 이중특이적 항체 및 그의 각 조성물은 액체 액제 또는 현탁제, 정제, 환제, 산제, 좌제, 중합체성 마이크로캡슐 또는 마이크로소포체, 리포솜 및 주사용 액제 또는 주입용 액제를 포함하나, 이에 제한되지 않는, 다양한 투여 형태일 수 있다. 바람직한 형태는 투여 모드 및 치료 적용에 따라 달라진다.
- [0210] 본 발명의 이중특이적 항체를 포함하는 조성물은 우수한 의료 실무와 일치하는 방식으로 제제화, 투약 및 투여

될 것이다. 이러한 맥락에서 고려해야 할 인자로는 치료 중인 특정 질환 또는 장애, 치료 중인 특정 포유동물, 개별 환자의 임상 상태, 질환 또는 장애의 원인, 작용제의 전달 부위, 투여 방법, 투여 일정, 및 의료 종사자에게 알려진 다른 인자를 포함한다.

- [0211] 제조 물품
- [0212] 본 발명의 또 다른 측면에서, 상기 기술된 장애의 치료, 예방 및/또는 진단에 유용한 물질을 함유하는 제조 물품을 제공한다. 제조 물품은 용기, 및 용기 위의 또는 용기와 결합된 라벨 또는 패키지 인서트를 포함한다. 적합한 용기로는 예를 들어, 병, 바이알, 시린지, IV 용액 백 등을 포함한다. 용기는 예컨대, 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 물질로 형성될 수 있다. 용기는 그 자체로 또는 병태의 치료, 예방 및/또는 진단에 효과적인 또 다른 조성물과 조합된 조성물을 수용하고, 멸균 접근 포트를 가질 수 있다(예를 들어, 용기는 정맥내 용액 백 또는 피하 주사 니들에 의해 관통가능한 마개가 있는 바이알일 수 있다). 조성물 중 적어도 하나의 활성제는 본 발명의 이중특이적 항체이다. 라벨 또는 패키지 인서트는 본 조성물이 선택된 병태를 치료하는 데 사용된다는 것을 나타낸다. 더욱이, 제조 물품은 (a) 본 발명의 이중특이적 항체를 포함하는 조성물이 내부에 함유된 제1 용기; 및 (b) 추가의 세포독성제 또는 다른 치료제를 포함하는 조성물이 내부에 함유된 제2 용기를 포함할 수 있다. 본 발명의 상기 실시양태에서, 제조 물품은 조성물이 특정 병태를 치료하는 데 사용될 수 있다는 것을 나타내는 패키지 인서트를 추가로 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 제조 물품은 약학적으로 허용되는 완충제, 예컨대, 주사용 정균수(BWFI: bacteriostatic water for injection), 포스페이트 완충처리된 염수, 링거 용액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2(또는 제3) 용기를 추가로 포함할 수 있다. 이는 다른 완충제, 희석제, 필터, 니들 및 시린지를 비롯하여, 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질을 추가로 포함할 수 있다.
- [0213] 본 발명의 추가 실시양태
- [0214] 1. a) 제1 결합부는 중쇄 가변 영역으로서 서열 번호 1의 CDRH1, 서열 번호 2의 CDRH2 및 서열 번호 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0215] b) 제1 결합부는 경쇄 가변 영역으로서
- [0216] b1) 서열 번호 14의 CDRL1, 서열 번호 15의 CDRL2, 및 서열 번호 16의 CDRL3, 또는
- [0217] b2) 서열 번호 17의 CDRL1, 서열 번호 18의 CDRL2, 및 서열 번호 19의 CDRL3,
- [0218] b3) 서열 번호 20의 CDRL1, 서열 번호 21의 CDRL2, 및 서열 번호 22의 CDRL3,
- [0219] b4) 서열 번호 23의 CDRL1, 서열 번호 24의 CDRL2, 및 서열 번호 25의 CDRL3, 및
- [0220] b5) 서열 번호 26의 CDRL1, 서열 번호 27의 CDRL2, 및 서열 번호 28의 CDRL3으로 구성된 군으로부터 선택되는 CDRL 세트를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0221] c) 제2 결합부는 중쇄 가변 영역으로서 서열 번호 1의 CDRH1, 서열 번호 2의 CDRH2 및 서열 번호 3의 CDRH3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및
- [0222] 경쇄 가변 영역으로서 서열 번호 7의 CDRL1, 서열 번호 8의 CDRL2, 및 서열 번호 9의 CDRL3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는,
- [0223] 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제1 결합부, 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 제2 결합부를 포함하는 이중특이적 항체.
- [0224] 2. 실시양태 1에 있어서, 제1 결합부 중 가변 중쇄 영역으로서 서열 번호 4의 가변 중쇄 영역, 및 가변 경쇄 영역으로서 서열 번호 32, 서열 번호 33, 서열 번호 34, 서열 번호 35, 및 서열 번호 36으로 구성된 군으로부터 선택되는 가변 경쇄 영역을 포함하고, 제2 결합부 중 가변 중쇄 영역으로서 서열 번호 4의 가변 중쇄 영역 및 가변 경쇄 영역으로서 서열 번호 10의 가변 경쇄 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.
- [0225] 3. 실시양태 1에 있어서, 제1 결합부 중 서열 번호 5를 포함하는 중쇄, 및 서열 번호 37, 서열 번호 38, 서열 번호 39, 서열 번호 40, 및 서열 번호 41로 구성된 군으로부터 선택되는 경쇄를 포함하고, 제2 결합부 중 서열 번호 5의 중쇄 및 서열 번호 11을 갖는 경쇄를 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.
- [0226] 4. 상기 실시양태들 중 어느 한 실시양태에 있어서, 중쇄로서 서열 번호 6의 공통 중쇄를 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.
- [0227] 5. 상기 실시양태들 중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 항체가 제1 결합부에 대해 1가이고, 제2 결합부에 대

해 1가인 이중특이적 항체.

- [0228] 6. 상기 실시양태들 중 어느 한 실시양태에 있어서, 불변 및 가변 프레임워크 영역 서열이 인간의 것인 이중특이적 항체.
- [0229] 7. 상기 실시양태들 중 어느 한 실시양태에 있어서, 제1 결합부의 경쇄가 람다 경쇄(VLCL)이고, 제2 결합부의 경쇄가 카파 경쇄(VKCK)인 이중특이적 항체.
- [0230] 8. 상기 실시양태들 중 어느 한 실시양태에 있어서, 항체가 인간 IgG1 타입인 이중특이적 항체.
- [0231] 9. 상기 실시양태들 중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 항체가, 당조작되지 않은 동일한 이중특이적 항체와 비교하여 푸코스 잔기 개수가 감소되도록 당조작된 Fc 영역을 포함하는 것인 이중특이적 항체.
- [0232] 10. 상기 실시양태들 중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 이중특이적 항체가 CEACAM5에의 결합에 대하여 서열 번호 43 및 44의 가변 경쇄 및 중쇄 영역을 포함하는 항CEACAM5 항체 SM3E와 경쟁하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.
- [0233] 11. 상기 실시양태들 중 어느 한 실시양태에 있어서, 2 내지 10 nM의 결합 친화도(KD)로 재조합 인간 CEACAM5에 결합하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.
- [0234] 12. 상기 실시양태들 중 어느 한 실시양태에 있어서, 100 nM 내지 600 nM의 결합 친화도로 인간 재조합 CD47에 결합하는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.
- [0235] 13. 상기 실시양태들 중 어느 한 실시양태에 있어서, 재조합 CEACAM3 및 재조합 CEACAM5에의 결합에 대한 KD 값의 비가 100배 이상인 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.
- [0236] 14. 실시양태 13에 있어서, 재조합 CEACAM3 및 재조합 CEACAM5에의 결합에 대한 KD 값의 비가 100배 내지 200배인 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.
- [0237] 15. 상기 실시양태들 중 어느 한 실시양태에 있어서, 이중특이적 항체 K2AC22의 식작용 지수와 비교하여 LoVo 종양 세포의 식작용 지수의 최대값이 적어도 8% 증가한 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.
- [0238] 16. 실시양태 15에 있어서, LoVo 종양 세포의 식작용 지수의 최대값이 8% 내지 20% 증가한 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.
- [0239] 17. 상기 실시양태들 중 어느 한 실시양태에 있어서, K2AC22의 식작용 지수와 비교하여 Ls174T 종양 세포의 식작용 지수의 최대값이 적어도 8% 증가한 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.
- [0240] 18. 실시양태 17에 있어서, Ls174T 종양 세포의 식작용 지수의 최대값이 8% 내지 25% 증가한 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.
- [0241] 19. 상기 실시양태들 중 어느 한 실시양태에 있어서, 동일한 실험 조건하에 K2AC22에 대해 측정된 IC50보다 10배 이상 더 낮은 IC50으로 MKN-45 세포 상의 CD47과 SIRP α 사이의 상호작용을 억제시키는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.
- [0242] 20. 실시양태 19에 있어서, MKN-45 세포 상의 CD47과 SIRP α 사이의 상호작용을 10배 내지 30배의 IC50 배수로 억제시키는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.
- [0243] 21. 상기 실시양태들 중 어느 한 실시양태에 있어서, MKN-45 세포 상의 CD47과 SIRP α 사이의 상호작용을 0.1 nM 이하의 IC50으로 억제시키는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.
- [0244] 22. 실시양태 21에 있어서, MKN-45 세포 상의 CD47과 SIRP α 사이의 상호작용을 0.1 nM 내지 0.04 nM의 IC50으로 억제시키는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.
- [0245] 23. 상기 실시양태들 중 어느 한 실시양태에 있어서, CEACAM5에의 결합에 대하여 시비사타맘과 경쟁하지 않는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.
- [0246] 24. 상기 실시양태들 중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 제1 이중특이적 항체는, 300 nM의 농도에서 인간 CEACAM5 및 CD3 ϵ 에 결합하는 제2 이중특이적 항체가 제1 이중특이적 항체의 MKN-45 세포에의, 또는 LS174T 세포에의 결합 곡선의 EC50을 3배 초과하는 더 높은 농도로 이동시키지 않는다는 것을 특징으로 하는 것인 이중특이적 항체.

- [0247] 25. 실시양태 24에 있어서, 상기 제2 이중특이적 항체가 TCB2014 또는 시비사타맙인 이중특이적 항체.
- [0248] 26. 상기 실시양태들 중 어느 한 실시양태에 따른 이중특이적 항체를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드들의 세트.
- [0249] 27. 실시양태 26의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드들을 포함하는 발현 벡터.
- [0250] 28. 실시양태 27의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.
- [0251] 29. a) 실시양태 1-25 중 어느 한 실시양태에 따른 이중특이적 항체의 생산을 허용하는 조건하에서 실시양태 28의 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 b) 상기 항체를 단리시키는 단계를 포함하는, 실시양태 1-25 중 어느 한 실시양태에 따른 이중특이적 항체를 제조하는 방법.
- [0252] 30. 실시양태 1-25 중 어느 한 실시양태에 있어서, 인간 암의 요법에서 사용하기 위한 용도의 이중특이적 항체.
- [0253] 31. 실시양태 30에 있어서, 암이 고형 암인 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.
- [0254] 32. 실시양태 30에 있어서, 암이 결장직장암, NSCLC(비소세포 폐암), 위암, 췌장암, 유방암, 또는 또 다른 CEACAM5 발현 암인 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.
- [0255] 33. 실시양태 1-25 중 어느 한 실시양태에 있어서, CEACAM5를 발현하는 암을 앓는 피험체를 치료하기 위한 의약 제조에서 사용하기 위한 용도의 이중특이적 항체.
- [0256] 34. 실시양태 1-25 중 어느 한 실시양태에 있어서, CEACAM5를 발현하는 암을 앓는 피험체의 치료에서 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제3 결합부, 및 인간 CD3 ϵ 에 특이적으로 결합하는 제4 결합부를 포함하는 제2 이중특이적 항체와의 동시, 개별, 또는 순차적인 조합으로 사용하기 위한 용도의 이중특이적 항체.
- [0257] 35. 실시양태 1-25 중 어느 한 실시양태에 있어서, 제2 이중특이적 항체가 TCB2014 또는 시비사타맙인, 동시, 개별, 또는 순차적인 조합으로 사용하기 위한 용도의 이중특이적 항체.
- [0258] 36. 실시양태 34 또는 35에 있어서, 본 발명에 따른 이중특이적 항체 및 제2 이중특이적 항체가 상기 피험체에 게 6 내지 15일 간격으로 동시에 투여되는 것을 특징으로 하는 이중특이적 항체.
- [0259] 37. 실시양태 1-25 중 어느 한 실시양태의 이중특이적 항체 및 약학적으로 허용되는 부형제 또는 담체를 포함하는 약학 조성물.
- [0260] 38. 실시양태 37에 있어서, 의약으로서 사용하기 위한 약학 조성물.
- [0261] 39. 실시양태 37 또는 실시양태 38에 있어서, 고형 암 치료에서 의약으로서 사용하기 위한 약학 조성물.
- [0262] 40. 실시양태 37-39 중 어느 한 실시양태에 있어서, 결장직장암, NSCLC(비소세포 폐암), 위암, 췌장암, 또는 유방암 치료에서 의약으로서 사용하기 위한 약학 조성물.
- [0263] 41. CEACAM5를 발현하는 암을 앓는 피험체에게 치료 유효량의, 실시양태 1-25 중 어느 한 실시양태의 이중특이적 항체, 또는 제37항 내지 제40항 중 어느 한 항의 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, CEACAM5를 발현하는 암을 앓는 피험체를 치료하는 방법.
- [0264] 42. 실시양태 41에 있어서, 암이 인간 암인 방법.
- [0265] 43. 실시양태 41 또는 42에 있어서, 피험체가 환자인 방법.
- [0266] 44. 실시양태 41-43 중 어느 한 실시양태에 있어서, 암이 결장직장암 세포, NSCLC(비소세포 폐암) 세포, 위암 세포, 췌장암 세포, 유방암 세포, 또는 CEACAM5를 발현하는 또 다른 종양 세포인 것을 특징으로 하는 방법.
- [0267] 45. 실시양태 41-44 중 어느 한 실시양태에 있어서, 이중특이적 항체가 화학요법 또는 방사선 요법과 함께 조합하여 투여되는 것인 방법.
- [0268] 46. 유효량의, 실시양태 1-25 중 어느 한 실시양태의 CEACAM5 x CD47 이중특이적 항체, 및 CEACAM5 및 CD3에 대한 제2 이중특이적 항체를 투여하는 단계를 포함하는, 종양을 앓는 인간 환자를 치료하는 방법.
- [0269] 47. 실시양태 46에 있어서, CEACAM5 x CD47 이중특이적 항체 및 CEACAM5 및 CD3 항체가 경쟁하지 않는 것인 방법.
- [0270] 48. 실시양태 46 또는 47에 있어서, 항체가 동시에 투여되는 것인 방법.

- [0271] 49. 실시양태 41 내지 48 중 어느 한 실시양태에 있어서, 환자가 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항의 이중특이적 항체를 0.01 내지 10 mg/kg의 1회 이상의 용량으로 투여받는 것인 방법.
- [0272] 50. 실시양태 46 내지 48 중 어느 한 실시양태에 있어서, 환자가 CEACAM5 x CD3 이중특이적 항체를 0.01 내지 10 mg/kg의 1회 이상의 용량으로, 및 CEACAM5 x CD47 이중특이적 항체를 1 내지 20 mg/kg의 1회 이상의 용량으로 투여받는 것인 방법.
- [0273] 51. 실시양태 46-50 중 어느 한 실시양태에 있어서, 제2 항체가 TCB2014 또는 시비사타맙인 방법.
- [0274] 52. CEACAM5를 발현하는 암을 앓는 피험체에게 치료 유효량의, 실시양태 1-25 중 어느 한 실시양태의 이중특이적 항체를 투여하는 단계를 포함하는, CEACAM5를 발현하는 암을 앓는 피험체에서 생존 기간을 연장시키는 방법.
- [0275] 53. 실시양태 52에 있어서, 암이 결장직장암, 비소세포 폐암(NSCLC), 위암, 췌장암, 또는 유방암인 것을 특징으로 하는 것인 방법.
- [0276] 54. 실시양태 52 또는 53에 있어서, 이중특이적 항체가 화학요법 및/또는 방사선 요법과 함께 조합하여 투여되는 것인 방법.
- [0277] 55. 실시양태 52 내지 54 중 어느 한 실시양태에 있어서, 환자가 실시양태 1-25 중 어느 한 실시양태의 이중특이적 항체를 0.01 내지 10 mg/kg의 1회 이상의 용량으로 투여받는 것인 방법.

표 1

표 1: 서열 목록

서열 번호	관련 영역
서열 번호 1	공통 중쇄 CDRH1
서열 번호 2	공통 중쇄 CDRH2
서열 번호 3	공통 중쇄 CDRH3
서열 번호 4	공통 중쇄 가변 영역 VH
서열 번호 5	공통 중쇄 (VH-CH1)
서열 번호 6	공통 중쇄 (VH-CH1-CH2-CH3)
서열 번호 7	CD47 결합부 CDRL1
서열 번호 8	CD47 결합부 CDRL2
서열 번호 9	CD47 결합부 CDRL3
서열 번호 10	CD47 결합부 경쇄 가변 영역 VK
서열 번호 11	CD47 결합부 경쇄 (VKCK; K2)
서열 번호 12	CD47 결합부 경쇄 (VKCK; 핵산); (K2)
서열 번호 13	CD47 결합부 불변 경쇄 카파 (CK)
서열 번호 14	CEACAM5 결합부 AC82 CDRL1;
서열 번호 15	CEACAM5 결합부 AC82 CDRL2
서열 번호 16	CEACAM5 결합부 AC82 CDRL3
서열 번호 17	CEACAM5 결합부 AC84 CDRL1
서열 번호 18	CEACAM5 결합부 AC84 CDRL2
서열 번호 19	CEACAM5 결합부 g part AC84 CDRL3
서열 번호 20	CEACAM5 결합부 AC91 CDRL1
서열 번호 21	CEACAM5 결합부 AC91 CDRL2
서열 번호 22	CEACAM5 결합부 AC91 CDRL3
서열 번호 23	CEACAM5 결합부 AC100 CDRL1
서열 번호 24	CEACAM5 결합부 AC100 CDRL2
서열 번호 25	CEACAM5 결합부 AC100 CDRL3
서열 번호 26	CEACAM5 결합부 AC117 CDRL1
서열 번호 27	CEACAM5 결합부 AC117 CDRL2
서열 번호 28	CEACAM5 결합부 AC117 CDRL3

[0278]

서열 번호	29	CEACAM5 결합부 AC22 CDRL1
서열 번호	30	CEACAM5 결합부 AC22 CDRL2
서열 번호	31	CEACAM5 결합부 AC22 CDRL3
서열 번호	32	CEACAM5 결합부 경쇄 가변 영역 AC82 VL
서열 번호	33	CEACAM5 결합부 경쇄 가변 영역 AC84 VL
서열 번호	34	CEACAM5 결합부 경쇄 가변 영역 AC91 VL
서열 번호	35	CEACAM5 결합부 경쇄 가변 영역 AC100 VL
서열 번호	36	CEACAM5 결합부 경쇄 가변 영역 AC117 VL
서열 번호	37	CEACAM5 결합부 경쇄 AC82 VLCL
서열 번호	38	CEACAM5 결합부 경쇄 AC84 VLCL
서열 번호	39	CEACAM5 결합부 AC91 경쇄 VLCL
서열 번호	40	CEACAM5 결합부 AC100 경쇄 VLCL
서열 번호	41	CEACAM5 결합부 AC117 경쇄 VLCL
서열 번호	42	CEACAM5 결합부 AC22 경쇄 VLCL
서열 번호	43	VK_SM3E
서열 번호	44	VH_SM3E
서열 번호	45	프라이머
서열 번호	46	프라이머
서열 번호	47	프라이머
서열 번호	48	프라이머
서열 번호	49	프라이머
서열 번호	50	프라이머

[0279]

[0280]

실시에

[0281]

실시에 1: 인간 CEACAM5의 클로닝, 발현, 및 정제; huCEACAM3 및 huCD47의 공급원.

[0282]

완전 세포외 도메인(ECD: extracellular domain) CEACAM5에 상응하는 서열을 pEAK8 포유동물 발현 벡터(Edge Biosystems: 미국 메릴랜드주 게이더스버그 소재)로 서브클로닝하였다. 벡터를 변형시켜 C 말단에 아비태그(Avitag)TM(Avidity, 미국 콜로라도주 덴버 소재) 및 헥사-히스티딘 태그, 인간 Fc 영역 또는 마우스 Fc 영역을 도입하였다. DNA 시퀀싱에 의해 구성물을 확인하였다. IMAC(고정화된 금속 이온 친화성 크로마토그래피: Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography), FcXL 또는 캡처셀렉트TM IgG-Fc(ms) 친화성 매트릭스(CaptureSelectTM IgG-Fc(ms) Affinity Matrix)에 의해 재조합 가용성 단백질의 정제를 수행하였고; 인간 CEACAM3 및 비오틴화된 CEACAM3은 ACRO바이오시스템즈(ACROBiosystems: 미국 뉴욕 소재)로부터 이용가능하다. 인간 CD47 및 비오틴화된 CD47은 WO2019234576에 기술된 바와 같이 제조될 수 있거나, 또는 ACRO바이오시스템즈(미국 뉴욕 소재)로부터 이용가능하다.

[0283]

실시에 2: 램다 및 카파 경쇄를 보유하는 이중특이적 항체의 발현 및 정제

[0284]

동시 발현은 예컨대, 각각이 공동 발현시키고자 하는쇄 중 하나를 발현하는 것인 다중 벡터의 형질감염과 같은 상이한 방식으로, 또는 다중 유전자의 발현을 구동하는 벡터를 사용함으로써 달성될 수 있다. 벡터 pNovi kHλ는 US 2012/0184716 및 WO 2012/023053(이는 각각 그 전문이 본원에서 참조로 포함)에 기술된 바와 같이 1개의 중쇄, 1개의 카파 경쇄 및 1개의 램다 경쇄의 공동 발현을 허용하도록 이전에 생성되었다. 3개 유전자의 발현은 인간 사이토메갈로바이러스 프로모터(hCMV)에 의해 구동되고, 벡터는 안정적인 세포주의 선별 및 확립을 가능하게 하는 글루타민 합성 효소 유전자(GS: glutamine synthetase gene) 또한 함유한다. 항hCEACAM5 IgGλ 또는 항hCD47 IgGκ를 포유동물 세포에서 일시적인 발현을 위해 벡터 pNovi kHλ에 클로닝하였다. 피크(peak) 세포 또는 CHO 세포를 적합한 세포 개수 및 배양 배지 부피(우태아 혈청 함유)가 있는 적절한 플라스크에서 배양한다. 제조사의 설명서에 따라 리포펙타민 2000(Lipofectamine 2000)을 사용하여 플라스미드 DNA를 세포에

형질감염시킨다. 형질감염된 세포의 상청액 중 항체 농도는 옥테트RED96(OctetRED96)을 사용하여 생산하는 동안 측정한다. 항체 농도에 따라, 형질감염 5 내지 7일 후에 상청액을 수확하고, 1300 g로 10 min 동안 원심분리하여 정화시킨다. 정제 프로세스는 3개의 친화도 단계로 구성된다. 먼저, FcXL 친화성 매트릭스(Thermo Fisher Scientific)를 PBS로 세척한 후, 이어서, 정화된 상청액에 첨가한다. +4℃에서 밤새도록 인큐베이션시킨 후, 상청액을 2000 g로 10 min 동안 원심분리하고, 통과액을 보관하고, 수지를 PBS로 2회 세척한다. 이어서, 수지를 아미콘 프로(Amicon Pro) 칼럼으로 옮기고, pH 3.0의 50 mM 글리신을 함유하는 용액을 용출에 사용한다. 수개의 용출 분획이 생성되고, 이를 풀링시키고, 50 kDa 아미콘™ 울트라 센트리퓨갈(Amicon™ Ultra Centrifugal) 필터 장치(Merck KGaA: 독일 다름슈타트 소재)를 사용하여 PBS에 대해 탈염시킨다. 상청액으로부터의 총 인간 IgG를 함유하는 용출된 생성물을 나노드롭(Nanodrop) 분광광도계(NanoDrop Technologies: 미국 델라웨어주 월밍턴 소재)를 사용하여 정량화하고, 적절한 부피의 카파 선택 친화성 매트릭스(GE Healthcare)와 함께 20 rpm으로 RT에서 15 min 동안 인큐베이션시킨다. 인큐베이션, 수지 회수, 용출 및 탈염 단계는 앞서 기술된 바와 같이 수행된다. 마지막 친화성 정제 단계는 람다 Fab 선택 친화성 매트릭스(GE Healthcare)를 사용하여 이전 두 정제와 동일한 프로세스를 적용하여 수행된다. 최종 생성물을 나노드롭을 사용하여 정량화한다. 정제된 이중특이적 항체를 변성 및 환원 조건하에 전기영동에 의해 분석한다. 애질런트 2100 바이오애널리저(Agilent 2100 Bioanalyzer)를 프로테인 80(Protein 80)과 함께 제조사(Agilent Technologies: 미국 캘리포니아주 산타 클라라 소재)에 의해 기술된 바와 같이 사용한다. 4 μ l의 정제된 샘플을 디티오프레이톨(DTT; Sigma Aldrich: 미국 미주리주 세인트루이스)로 보충된 샘플 완충제와 함께 혼합한다. 샘플을 95℃에서 5 min 동안 가열한 후, 이어서, 칩 상에 로딩한다. 모든 샘플을 리몰루스 아메보사이트 라이세이트 시험(LAL: Limulus Amebocyte Lysate; Charles River Laboratories: 미국 매사추세츠주 월밍턴 소재)을 사용하여 내독소 오염에 대해 시험한다.

[0285] **실시예 3: KD 측정.**

[0286] a) 재조합 인간 CEACAM5에의 Ab의 KD를 측정하기 위한 실험 절차(Octet)

[0287] 생물층 간섭법(BLI: Bio-Layer Interferometry) 기술을 사용하여 재조합 가용성 인간 CEACAM5에 대한 본 발명의 CD47xCEACAM5 이중특이적 항체의 항인간 CEACAM5 아암의 친화도를 측정하였다. 옥테트RED96 기기 및 프로테인 A(Protein A) 바이오센서를 사용하였다(Sartorius). 30℃에서 측정을 수행하였다. 키네틱(Kinetic) 완충제(PBS, 0.002% 트윈 20, 0.01% BSA, Kathon; Sartorius)에서의 수화, 사전 컨디셔닝 및 기준선 단계 후, 키네틱 완충제 중 0.5 μ g/mL의 $\kappa\lambda$ 바디를 바이오센서에 5 min 동안 로딩하였다. 이어서, 50 nM로 시작하여 2x의 희석률로 재조합 인간 CEACAM5 세포의 도메인(ECD: Extra Cellular Domain) 가용성 단백질의 일련의 희석액(사내 제조)에 바이오센서를 침지시켰다. 회합 및 해리 단계를 각각 600초 동안 모니터링하였다. 10 mM 글리신(pH 1.7)을 이용하여 바이오센서를 재생시켰다. 표준 획득물을 적용하였다(5.0 Hz, 평균 20). 곡선은 단계간 보정 없이, 참조 웰 감소, 기준선 상의 Y 정렬을 이용하여 프로세싱하였다. 전체 회합 및 해리 단계에 대해 1:1 글로벌 피팅 모델을 적용하여 친화도를 측정하였다. 동일한 실험 절차에 의해 본 발명의 이중특이적 항체의 재조합 인간 CD47에의 결합 친화도(KD)를 측정하였다. 상기 절차에 의해 측정된, CEACAM5에의 예시적인 본 발명의 이중특이적 항체의 KD는 하기 표 2에 제시되어 있다.

[0288] b) 재조합 인간 CEACAM3에의 Ab의 KD를 측정하기 위한 실험 절차(Octet)

[0289] 생물층 간섭법(BLI) 기술 및 옥테트RED96 기기를 사용하여 재조합 가용성 인간 CEACAM3에 대한 본 발명의 CD47xCEACAM5 이중특이적 항체의 항인간 CEACAM5 아암의 친화도를 측정하였다. 항His 태그 항체가 로딩된 HIS1K 바이오센서(Sartorius)를 사용하여 his 태그부착된 재조합 huCEACAM3(R&D Systems, # 9868-CM)을 포획하였다. 30℃에서 측정을 수행하였다. 키네틱 완충제(PBS, 0.002% 트윈 20, 0.01% BSA, Kathon; Sartorius)에서의 수화, 사전 컨디셔닝 및 기준선 단계 후, 키네틱 완충제 중 0.5 μ g/mL의 재조합 huCEACAM3을 바이오센서에 5 min 동안 로딩하였다. 이어서, 667 nM로 시작하여 2x의 희석률로 $\kappa\lambda$ 바디의 일련의 희석액에 바이오센서를 침지시켰다. 회합 및 해리 단계를 각각 60초 및 120초 동안 모니터링하였다. 10 mM 글리신(pH 1.7)을 이용하여 바이오센서를 재생시켰다. 표준 획득물을 적용하였다(5.0 Hz, 평균 20). 곡선은 이중 참조 감소, 기준선 상의 Y 정렬 및 단계간 보정을 이용하여 프로세싱하였다. 전체 회합 단계 및 해리 단계 처음 5초 동안 그에 대해 1:1 글로벌 피팅 모델을 적용하여 친화도를 측정하였다. 상기 절차에 의해 측정된, CEACAM3에의 예시적인 본 발명의 이중특이적 항체의 KD는 하기 표 2에 제시되어 있다.

표 2

표 2. 옥테트라에 의해 측정된, 3개의(세가지) CD47xCEACAM5 이중특이적 항체, K2AC84, K2AC100, 및 K2AC22(비교)에 대한 항CEACAM5 아암의 결합 친화도(KD; nM).

	rec. hCEACAM5에의 친화도 (KD; nM)	rec. hCEACAM3에의 친화도 (KD; nM)	차이 배수 hCEACAM3/hCEACAM5
K2AC22	120 (+/-13)	10'000 (+/-3000)	83
K2AC84	2.63 (+/-0.12)	360 (+/-42)	137
K2AC100	4.8 (+/-1)	700 (+/-270)	146

[0290]

[0291] 실시예 4: 참조 항체 SM3E와의 경쟁에 의한 CD47xCEACAM5 이중특이적 항체의 에피토프 비닝

[0292]

에피토프 비닝은 본 발명에 따른 항체의 결합, 또는 예컨대, 대안적으로, 본 발명의 이중특이적 항체의 제1 결합부의 관련된 2가 항CEA(표적 단백질) 항체의 결합을 특장화하기 위해 사용되는 경쟁적 면역검정법이다. 표적 단백질에 결합하는 신규 항체의 경쟁적 차단 프로파일은 상기 표적 단백질에 또한 결합하고, 그에 대한 결합 에피토프가 이미 확립/공개된 항체에 대해 생성된다. 이러한 참조 항체에 대한 경쟁은 항체가 동일하거나, 근접하게 위치하는 에피토프를 가지며, 이들이 함께 "비닝된다"는 것을 나타낸다. CEACAM5 참조 항체와 경쟁할 수 있는 본 발명의 CD47xCEACAM5 이중특이적 항체의 능력은 ELISA에 의해 마우스 Fc 영역을 보유하는 SM3E로부터 유래된 참조 항체(US20050147614)(표준 방법을 사용하여 제조된 mAb)를 이용하여 제조된 인간 CEACAM5에 대해 시험된다. SM3E는 CEA의 N 말단, 세포막 원위부에 더 많이 결합한다.

[0293]

비오틴화된 인간 CEACAM5를 스트렙타비딘 코팅된 96 웰 플레이트에 0.5 µg/ml로 코팅하고, 참조 mAb(0.09 nM 내지 67 nM), 또는 마우스 Fc 영역을 보유하는 비관련 mAb의 일련의 희석액과 함께 1시간 동안 인큐베이션시킨다. 본 발명의 CD47xCEACAM5 이중특이적 항체를 0.1 µg/ml로 실온에서 1시간 동안 첨가한다. 플레이트를 세척하고, 결합된 CD47xCEACAM5 이중특이적 항체를 항인간 IgG(Fc)-HRP(Jackson ImmunoResearch)를 이용하여 검출한다. 세척 후, 플레이트를 암플렉스 레드(Amplex Red) 시약으로 현시한다. 형광 신호를 시너지 HT(Synergy HT) 플레이트 판독기(Biotek) 상에서 측정한다.

[0294]

본 발명의 CD47 x CEACAM5 이중특이적 항체를 이용하여 경쟁 실험을 수행하였다. K2AC82, K2AC84, K2AC91, K2AC100, 및 K2AC117의 결합은 각 경쟁(즉, 도구) 항체에 의해 80% 이상만큼 감소되었다. 최고 농도의 참고 도구 항체하에서 이중특이적 항체의 결합이 80% 이상만큼 감소되었을 때, CD47xCEACAM5 이중특이적 항체는 본원에서 SM3E 항체와 경쟁하는 것으로 확인된다. 도구 항체의 첨가 및 비첨가하의 결과를 비교하는 경우, CEACAM5에의 결합이 20%미만만큼 감소되는 경우, CD47xCEACAM5 이중특이적 항체는 도구 항체와 비경쟁적인 것으로 확인된다.

[0295]

실시예 5: 6개의 상이한 암 세포주의 세포 표면에서의 CEACAM5 및 CD47의 표적 밀도(즉, 개수)의 정량화.

[0296]

6개의 상이한 암 세포주의 세포 표면에서의 CEACAM5 및 CD47의 표적 밀도(즉, 개수)를 측정하였다. 상기 세포주는 인간 위 선암종 세포(MKN-45, DSMZ ACC 409), 인간 결장직장암 세포(SK-CO-1(ATCC; HTB-39); SNU-C1(ATCC; CRL-5972); Ls174T(ATCC; CL-188) 및 LoVo(ATCC; CCL-229)), 또는 췌장 선암종 세포(HPAF-II, ATCC, CRL-1997)였다.

[0297]

간접 면역형광 검정법을 이용하여 유세포 분석법에 의해 세포 표면 항원을 정량적으로 측정하기 위해 QIFIKIT® (Agilent Dako)를 사용하였다. QIFIKIT®는 상이하되, 잘 정의된 정량의 마우스 단일클론 항체(Mab)로 코팅된 일련의 6개의 비드 집단으로 구성된다. 비드는 특정 1차 마우스 단일 클론 항체로 표지된 세포를 모방한다. 상이한 세포 표본을 상이한 1차 항체로 표지한 후, 동일한 보정 비드 세트를 사용하여 정량화할 수 있다.

[0298]

세포를 그의 적합화된 배지에서 배양하고, 트립신-EDTA(Sigma Aldrich)로 분리하고, 원심분리(3 min, 350 g)한 후, 냉 FACS 완충제(PBS, 2% BSA - Sigma Aldrich로부터 입수) 중에 재현탁시키고, 0.22 µm (Stericup, Millipore)를 통해 여과하여 3.106개의 세포/mL를 수득하였다. 각 샘플의 3.10⁵개의 세포를 V-바닥 플레이트에 플레이팅하였다. 1 µl의 FcγR 차단 시약을 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 4°C에서 10 min 동안 인큐베이션시켰

다. 인간 CEACAM5(#sc-23928; mIgG1(Santa Cruz)) 및 인간 CD47(내부 생산; B6H12; 마우스 백본)에 대한 1차 항체 10 μl 를 최종 농도 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 세포에 첨가하고, 4°C에서 30 min 동안 인큐베이션시켰다. 200 μl 의 PBS BSA 2%로 세포를 2회 세척하고, 3 min 동안 400 g로 원심분리하였다. (QIFIKIT®로부터 입수한 셋업 또는 보정) 비드 100 μl 를 세포와 함께 세척하고, 동일하게 처리하였다. 키트로부터의 2차 항체 100 μl (PBS BSA 2% 중 1/50)를 각 웰에 첨가하고, 4°C에서 30 내지 45 min 동안 인큐베이션시켰다. 세포를 원심분리(4°C에서 3 min, 400 g)하여 상청액을 폐기하고, 2회 세척하였다. 마지막 원심분리 후, 세포를 130 μl 의 셀픽스(CellFix) 중에 재현탁시키고, 사이토플렉스(CytoFlex) 세포분석기(Beckman Coulter)에서 획득하였다. 플로우조(FlowJo) 소프트웨어 및 Excel 파일로 익스포트된 기하 평균을 이용하여 분석을 수행하였다. 보정 비드로부터의 MFI 값을 이용하여 선형 회귀를 수행하였다. 상기 회귀선으로부터 세포의 항체 결합능(ABC: Antibody Binding Capacity)을 외삽하였다. 특이적 염색 중 하나에 대하여 이소타입 대조군으로부터 ABC를 감산하여 특이적 항체 결합능(sABC: Specific Antibody Binding Capacity)을 얻었다. 상기 분석으로부터의 데이터는 하기 표 3에 제시되어 있다.

표 3

표 3. 6개의 암 세포주의 표면에서의 CEACAM5 및 CD47의 표적 밀도

	기원	CEACAM5 (x10 ³)	CD47 (x10 ³)
SK-CO-1	결장직장	257	105
MKN-45	위	155	135
HPAF-II	췌장	120	114
SNU-C1	결장직장	85	68
Ls174T	결장직장	26	57
LoVo	결장직장	4	25

[0299]

[0300]

실시예 6: CEAxCD47 이중특이적 항체의 CEACAM5 발현 암 세포주에의 결합 측정(EC50 및 최대 결합 Emax).

[0301]

CD47xCEACAM5 이중특이적 항체의 결합을 CEACAM5 발현 인간 위 선암종 세포(예컨대, MKN-45), CEACAM5 발현 인간 결장직장암 세포(SK-CO-1, SNU-C1, Ls174T, 및 LoVo), 및 CEACAM5 발현 췌장 선암종 세포(HPAF-II)에서 시험하였다.

[0302]

세포를 수확하고, 계수하고, 생존능에 대해 체크하고, FACS 완충제(PBS 2% BSA, 0.1% NaN₃) 중에 3x10⁶개의 세포/ml로 재현탁시켰다. 100 μl 의 세포 현탁액을 V 바닥 96 웰 플레이트에 분배하였다(3x10⁵개의 세포/웰). 4°C에서 1300 rpm으로 3분 동안 원심분리하여 상청액을 제거하였다. 이어서, 본 발명에 따른 항체를 농도를 증가시켜 가면서 웰에 첨가하고, 4°C에서 15분 동안 인큐베이션시켰다. 세포를 냉 FACS 완충제로 2회 세척하고, PE(R-피코에리트린) 접합된 마우스 항인간 IgG Fc 2차 항체(SouthernBiotech, FACS 완충제 중에 1:100으로 미리 희석)와 함께 4°C에서 추가로 15분 동안 다시 인큐베이션시켰다. 세포를 냉 FACS 완충제로 2회 세척하고, 1:15000으로 희석된 사이토스블루(SytoxBBlue)(Life Technologies)와 함께 300 μl FACS 완충제 중에 재현탁시켰다. 형광, 구체적으로, 평균 형광 활성(MFI)을 사이토플렉스(Cytoflex)(Millipore)를 유세포 분석기를 이용하여 측정하였다. 그래프패드 프리즘7(GraphPad Prism7) 소프트웨어를 이용하여 결합 곡선 및 EC50 및 Emax 값을 측정하고, 계산하였다. 상기 분석으로부터의 데이터는 하기 표 4에 제시되어 있다.

표 4

표 4. CEACAM5 및 CD47을 발현하는 인간 암 세포주에서의 6개의 CD47xCEACAM5 이중특이적 항체의 EC50(nM) 및 Emax(MFI) 결합(K2AC22 비교).

세포주		CD47xCEACAM5 이중특이적 항체					
		K2AC22	K2AC82	K2AC84	K2AC91	K2AC100	K2AC117
SK-CO-1	EC50 (nM)	24	17.3	12	12.7	14.7	14.7
	Emax (MFI*,x10 ⁶)	0.52	0.9	1	1.3	0.9	1.1
MKN-45	EC50 (nM)	21.3	10	7.3	8	8.7	8
	Emax (MFI*,x10 ⁶)	1.16	1.18	1.52	1.64	1.3	1.35
HPAF-II	EC50 (nM)	19.3	11.3	8.7	N/A	8	7.3
	Emax (MFI*,x10 ⁶)	0.67	0.94	1.27	N/A	1.1	1.2
SNU-C1	EC50 (nM)	10.7	4.4	2.47	2.53	3.27	3.13
	Emax (MFI*,x10 ⁶)	0.24	0.28	0.37	0.4	0.3	0.37
Ls174T	EC50 (nM)	28	11.3	5.6	6	4.5	6.7
	Emax (MFI*,x10 ⁶)	0.073	0.077	0.089	0.1	0.07	0.07
LoVo	EC50 (nM)	44	22	16	16	18.7	20
	Emax (MFI*,x10 ⁶)	0.23	0.26	0.36	0.38	0.28	0.32

*MFI - 평균 형광 강도(Mean Fluorescence Intensity)

N/A - 적용불가 - 해당 세포주에서 해당 Ab에 대해 이용가능한 데이터 없음.

[0303]

[0304]

표 4의 데이터는 본 발명에 따른 이중특이적 항체 모두 K2AC22와 비교하여 상당히 더 낮은 EC50 및 더 높은 Emax를 나타낸다는 것을 보여주고 있다.

[0305]

표 4에 제시된 바와 같이, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 SK-CO1 세포에는 10 내지 30 nM의 EC50 값으로, MKN-45 세포에는 5 내지 15 nM의 EC50 값으로, HPAF-II 세포에는 5 내지 15 nM의 EC50 값으로, SNU-C1 세포에는 1 내지 10의 EC50 값으로, LS174T 세포에는 3 내지 15 nM의 EC50 값으로, 및/또는 LoVo 세포에는 15 내지 25 nM의 EC50 값으로 결합한다.

[0306]

또한 표 4에 제시된 바와 같이, 본 발명에 따른 이중특이적 항체는 SK-CO1 세포에는 0.5 내지 1.5(MFI x 10⁶)의 Emax 값으로, MKN-45 세포에는 1 내지 2(MFI x 10⁶)의 Emax 값으로, HPAF-II 세포에는 0.5 내지 1.5(MFI x 10⁶)의 Emax 값으로, SNU-C1 세포에는 0.2 내지 0.6(MFI x 10⁶)의 Emax 값으로, LS174T 세포에는 0.05 내지 0.2(MFI x 10⁶)의 Emax 값으로, 및/또는 LoVo 세포에는 0.2 내지 0.5(MFI x 10⁶)의 Emax 값으로 결합한다.

[0307]

실시예 7: 항체 의존적 세포 식작용(ADCP) 각각의 식작용(식작용 지수) 측정

[0308]

6개의 CEACAM5 발현 암 세포주(MKN-45, SK-CO-1, SNU-C1, Ls174T, LoVo 및 HPAF-II)를 이용하여 본 발명의 CEACAM5xCD47 이중특이적 항체의 시험관내 식작용 활성을 평가하였다. K2AC22는 비교를 위해 동일한 세포주 및 실험 절차를 이용하여 평가하였다.

[0309]

본 검정법은 셀인사이트 CX5 고함량 스크리닝 플랫폼(CellInsight CX5 High Content Screening Platform)을 이용하는 이미징 기반 방법에 의존한다. 평가되는 관독값은 100개의 대식세포에 의해 포식되는 표적 세포의 평균 개수로 정의되는 식작용 지수이다.

[0310] 1. 대식세포 제조:

[0311] 피콜(Ficoll) 구배에 의해 다른 건강한 공여자(세포주에 따라 5 내지 7명의 상이한 공여자)로부터의 버피 코트로부터 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 단리시켰다. 20 ng/mL의 인간 대식세포 콜로니 자극 인자(M-CSF: macrophage colony-stimulating factor)(PeproTech)의 존재하에서 7 내지 9일 동안 완전 배지(RPMI 1640, 10% 열 불활성화된 우태아 혈청[Invitrogen]), 2 mM L-글루타민, 1 mM 피루브산나트륨, 10 mM HEPES 완충제, 25 mg/mL 겐타마이신 (모두 Sigma-Aldrich로부터 입수), 및 50 mM 2-메르캅토에탄올(Thermo Fisher Scientific)) 중에서 PBMC를 배양함으로써 대식세포를 생성하였다. 이어서, 세포 배양 배지를 교환하여 분화 단계+1일째)에서 비부착성 세포를 제거하고, 대식세포를 나타내는 부착성 세포는 세포 해리 완충제(Sigma-Aldrich)를 사용하여 분리하고, 세포분석법에 기반한 ADCP 실험을 위해 사용 당일(7일, 8일, 또는 9일째) 완전 배지 중에서 세척하였다. 세포 이미징에 기반한 ADCP를 위해, 6일째 세포 해리 완충제를 이용하여 대식세포를 분리하고, 96 광학 플레이트(Costar) 중에 웰당 30'000개로 시딩하였다.

[0312] 2. 식작용 활성 평가(CellInsight™ 기반 검정법)

[0313] 마이크로플레이트 웰에 부착된 대식세포(칼세인 레드 오렌지로 염색된)를 칼세인(칼세인) AM 표지된 표적 종양 세포와 1:3의 이펙터:표적 세포 비로 상이한 농도의 시험되는 항체의 존재하에 37°C에서 30 min(MKN45 및 SNU-C1) 또는 2.5시간(LoVo 및 Ls174T) 동안 공동 인큐베이션시켰다. 인큐베이션 기간 종료시, 상청액을 완전 배양 배지로 교체하고, 셀인사이트™ CX5 고품량 스크리닝 플랫폼을 이용하여 마이크로플레이트를 이미징하였다. 웰당 1500개의 대식세포를 획득하고, 분석하였다. 식작용은 이중 양성 이벤트 (대식세포 + 표적 종양 세포)인 것으로 입증되었고, 셀인사이트™ 제조사의 소프트웨어에 의해 식작용 지수를 계산하였다.

[0314] 도 2, 및 표 5, 6, 7, 8, 9에 제시된 결과는 모두 4개의 CEACAM5 발현 암 세포주(MKN-45, SNU-C1, Ls174T, LoVo)를 이용하여 수득된 것이고; 여기서, 이펙터 세포 대 표적/종양 세포 비는 1:3이었다.

표 5

표 5. 이중특이적 Ab K2AC22 대비 5개의 CEACAM5xCD47 이중특이적 항체에 대해 평가된 식작용 지수 최대값의 증가율(%)

	CEACAM5 수준	K2AC82	K2AC84	K2AC91	K2AC100	K2AC117
MKN-45	155'000	6.1	1.8	4.6	1.8	0
SNU-C1	85'000	0	0	0	0	0
Ls174T	26'000	8.7	14.4	20.6	14.4	11.2
LoVo	4'000	13.2	17	9.3	18.6	8.5

[0315]

[0316] 5개의 본 발명에 따른 이중특이적 항체 모두 K2AC22와 비교하여 더 우수한 결합을 보였다(더 낮은 EC50 및 더 높은 Emax, 실시예 6, 표 4 참조). 놀랍게도, K2AC22 대비 본 발명의 항체의 달성된 최대 식작용 지수 Emax ADCP의 증가율(%)은 저 CEACAM5 발현 세포주 LoVo 및 Ls174T에서 가장 강력하였다.

[0317] 본 결과는 실험에서 상이한 인간 공여자로부터 수득한 대식세포를 이용한 실험에서 수득하였다. 상기 실험으로부터 수득된 데이터는 표 6(MKN-45 세포에 대한 결과), 표 7(SNU-C1 세포에 대한 결과), 표 8(Ls174T 세포에 대한 결과) 및 표 9(LoVo 세포세포에 대한 결과)에 제시되어 있다.

표 6

표 6. 7명의 상이한 공여자(D)의 대식세포하에 표적으로서 MKN-45 인간 암 세포주를 이용한 6개의 CEACAM5xCD47 이중특이적 항체(K2AC82, K2AC84, K2AC91, K2AC100, K2AC117, 및 K2AC22(비교))의 식작용 활성으로부터의 EC50($\mu\text{g}/\text{mL}$) 및 E_{max}의 시험관내 평가.

공여자(D)		CD47xCEACAM5 이중특이적 항체					
		K2AC22	K2AC82	K2AC84	K2AC91	K2AC100	K2AC117
D854	EC50 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.2	0.14	0.1	0.04	0.3	0.1
	최대 식작용 지수	57	61	47	45	53	48
D860	EC50 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.2	0.13	0.25	0.23	0.25	0.36
	최대 식작용 지수	41	47	40	50	47	41
D864	EC50 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.82	0.42	0.28	0.25	0.53	0.34
	최대 식작용 지수	54	71	67	66	67	67
D867	EC50 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.5	0.15	0.21	0.13	0.21	0.2
	최대 식작용 지수	62	60	64	65	60	62
D868	EC50 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.65	0.19	0.64	0.3	0.16	0.26
	최대 식작용 지수	31	30	38	36	33	31
D870	EC50 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.35	0.17	0.14	0.35	0.1	0.12
	최대 식작용 지수	40	37	36	38	32	34
D871	EC50 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.4	0.15	0.14	0.2	0.2	0.2
	최대 식작용 지수	41	40	40	41	40	40
평균 (+/- SD)	EC50	0.45 (+/- 0.2)	0.19 (+/- 0.1)	0.25 (+/- 0.2)	0.21 (+/- 0.1)	0.25 (+/- 0.1)	0.23 (+/- 0.1)
	최대 식작용 지수	46.6 (+/- 11)	49.4 (+/- 15)	47.4 (+/- 15)	48.7 (+/- 12)	47.4 (+/- 13)	46.1(+/- 14)

[0318]

표 7

표 7. 5명의 상이한 공여자(D)의 대식세포하에 표적으로서 SNU-C1 인간 암 세포주를 이용한 6개의 CEACAM5xCD47 이중특이적 항체(K2AC82, K2AC84, K2AC91, K2AC100 & K2AC117, 및 K2AC22)의 식작용 활성으로부터의 EC50 및 Emax의 시험관내 평가.

공여자(D)		CD47xCEACAM5 이중특이적 항체					
		K2AC22	K2AC82	K2AC84	K2AC91	K2AC100	K2AC117
D860	EC50 (µg/mL)	0.02	0.05	0.02	0.003	0.02	0.02
	최대 식작용 지수	26	22	22	17	22	20
D868	EC50 (µg/mL)	0.6	0.08	0.35	0.09	0.3	0.2
	최대 식작용 지수	20	17	22	19	21	19
D870	EC50 (µg/mL)	0.07	0.13	0.06	0.05	0.07	0.06
	최대 식작용 지수	14	15	13	13	14	14
D871	EC50 (µg/mL)	0.96	0.2	0.18	0.27	1.28	0.38
	최대 식작용 지수	17	15	15	17	17	17
D875	EC50 (µg/mL)	0.18	0.12	0.15	0.06	0.08	0.08
	최대 식작용 지수	22	16	16	15	16	14
평균 (+/- SD)	EC50	0.37 (+/- 0.4)	0.12 (+/- 0.06)	0.15 (+/- 0.13)	0.09 (+/- 0.1)	0.35 (+/- 0.53)	0.15 (+/- 0.15)
	최대 식작용 지수	19.8 (+/- 4.6)	17 (+/- 2.9)	17.6 (+/- 4.2)	16.2 (+/- 2.3)	18 (+/- 3.4)	16.8 (+/- 2.8)

[0319]

표 8

표 8. 5명의 상이한 공여자의 대식세포하의 Ls174T 인간 암 세포주에 대한 6개의 CD47xCEACAM5 이중특이적 항체의 EC50 및 E_{max} 식작용 활성.

공여자(D)		CD47xCEACAM5 이중특이적 항체					
		K2AC22	K2AC82	K2AC84	K2AC91	K2AC100	K2AC117
D862	EC50 ($\mu\text{g/mL}$)	0.25	0.17	0.29	0.84	0.56	0.22
	최대 식작용 지수	37	44	47	45	46	41
D863	EC50 ($\mu\text{g/mL}$)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	최대 식작용 지수	32	40	40	37	40	41
D866	EC50 ($\mu\text{g/mL}$)	1.57	0.15	N/A	N/A	0.07	0.48
	최대 식작용 지수	15	14	19	29	14	16
D874	EC50 ($\mu\text{g/mL}$)	0.33	0.04	0.03	0.03	0.05	0.09
	최대 식작용 지수	51	44	47	47	48	50
D875	EC50 ($\mu\text{g/mL}$)	0.25	0.19	0.098	0.45	0.35	0.15
	최대 식작용 지수	25	32	30	35	35	30
평균 (+/- SD)	EC50	0.6 (+/- 0.65)	0.14 (+/- 0.07)	0.14 (+/- 0.13)	0.44 (+/- 0.41)	0.26 (+/- 0.24)	0.24 (+/- 0.17)
	최대 식작용 지수	32 (+/- 13.5)	34.8 (+/- 12.6)	36.6 (+/- 12.1)	36.8 (+/- 7.4)	36.6 (+/- 13.6)	35.6 (+/- 13)

[0320]

표 9

표 9. 6명의 상이한 공여자의 대식세포하의 LoVo 인간 암 세포주에 대한 6개의 CD47xCEACAM5 이중특이적 항체의 EC50 및 E_{max} 식작용 활성.

공여자(D)		CD47xCEACAM5 이중특이적 항체					
		K2AC22	K2AC82	K2AC84	K2AC91	K2AC100	K2AC117
D862	EC50 (µg/mL)	0.14	0.05	0.05	0.045	0.054	0.31
	최대 식작용 지수	30	27	27	26	27	28
D863	EC50 (µg/mL)	0.28	0.12	0.3	0.09	0.37	0.19
	최대 식작용 지수	19	28	31	30	30	27
D866	EC50 (µg/mL)	0.24	0.054	0.042	0.044	0.08	0.07
	최대 식작용 지수	29	31	31	34	34	34
D872	EC50 (µg/mL)	1.14	5.6	3	0.65	2.34	2.43
	최대 식작용 지수	10	17	17	10	13	13
D873	EC50 (µg/mL)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	최대 식작용 지수	11	12	13	10	17	8
D874	EC50 (µg/mL)	0.14	0.05	0.036	0.054	0.052	0.038
	최대 식작용 지수	30	31	32	31	32	30
평균 (+/- SD)	EC50	0.39 (+/- 0.42)	1.17 (+/- 2.47)	0.69 (+/- 1.3)	0.18 (+/- 0.27)	0.58 (+/- 1)	0.61 (+/- 1)
	최대 식작용 지수	21.5 (+/- 9.5)	24.3 (+/- 7.9)	25.2 (+/- 8.2)	23.5 (+/- 10.8)	25.5 (+/- 8.5)	23.3 (+/- 10.3)

[0321]

[0322]

실시예 8: 본 발명의 이중특이적 항체와 CEACAM5에 결합하는 다른 치료 항체 사이의 CEACAM5에의 결합에 대한 경쟁 측정

[0323]

실시예 6에 기술된 바와 같이 CEACAM5를 발현하는 세포에의 결합 검정법을 수행하였다. CEACAM3 이중특이적 항체, 예컨대, 시비사타맵 또는 TCB2014를 결합 검정법에 첨가할 경우, 본 검정법을 이용하여 본 발명의 이중특이적 항체의 MKN-45 및 LS174T 암 세포주에의 결합 곡선의 이동을 측정할 수 있다. 300 nM의 항체가 본 발명의 이중특이적 항체의 결합 곡선을 3배 미만만큼 이동시킬 경우, 항체는 비경쟁적인 것으로 간주되었다.

[0324]

본 실험에서, CD47xCEACAM5 이중특이적 항체 K2AC100의 농도 의존적 결합은 항CEACAM5 mAb인 TCB2014 또는 TCB2017의 존재하에 측정하였다. 이 결합은 CEACAM5 발현 MKN-45 세포의 세포 표면에서 측정하였다. K2AC100을 300 nM의 TCB2014(진한 선, 진한 삼각형) 또는 30 nM의 TCB2017(진한 선, 진한 다이아몬드)의 존재하에 형광색소로 직접 표지하여 MKN-45 세포 단독(진한 선, 진한 원)에 대한 그의 결합을 추적하였다. 음성 대조군(Ctrl)이 사용되었다(TCB2014 또는 TCB2017의 존재하에 IgG1). 본 실험의 결과는 도 5에 제시되어 있다. 본 데이터는 300 nM

의 TCB2014가 첨가된 경우, MKN-45 중앙 세포에의 본 발명의 CEAxCD47 이중특이적 항체 K2AC100의 결합 곡선의 이동은 없거나, 또는 최소의 이동이 이루어졌다는 것을 보여준다. 따라서 K2AC100 항체는 CEACAM5 결합과 관련 하여 TCB2014 및 TCB2017 항체와 비경쟁적이다.

[0325] **실시예 9: 본 발명의 어푸코실화된 이중특이적 항체 제조**

[0326] 표 10 및 11은 본 발명의 이중특이적 항체의 어푸코실화된 버전에 의한 2개의 세포주(MKN-45 및 SNU-C1)의 식작용에 대한 결과(EC50 및 Emax)를 보여주는 것이다. 본 발명의 이중특이적 항체의 어푸코실화된 버전을 하기 방법에 의해 제조하고, 정제하였다:

[0327] 1. 제조

[0328] 각각 푸코실화된 항체 및 어푸코실화된 항체 제조를 위해 작업 부피가 700 mL 또는 100 mL인 토마슨 에를렌(Thomson erlen) 장치에 0.3×10^6 개의 세포/mL의 생존가능한 세포 농도로 각각의 본 발명의 이중특이적 항체에 대한 플라스미드로 형질감염된 CHO 풀(각각 벡터 플라스미드에 대해 실시예 2 참조)을 접종하였다. 모든 풀을 CDACF 배지 CDCHO를 사용하는 15일 기간의 유가식 모드 및 적합화된 공급 방식으로 작동시켰다. 어푸코실화된 항체 제조를 위해, 문헌 [Rillahan et al. Nature Chem. Biol. 2012Jul;8(7):661-8]에 기술된 어푸코실화에 기초하여, 및 EP2282773에 기초하여 200 μ M 푸코스 억제제(1,3,4-트리-O-아세틸-2-데옥시-2-플루오로-L-푸코스) 볼루스를 유가식 프로세스 동안 0, 5, 8 및 11일째에 첨가하였다. 유가식 배양 15일 후에 푸코실화된 또는 어푸코실화된 항체를 함유하는 본 발명의 이중특이적 항체의 풀 상청액을 수확하였다. 사토클리어 다이내믹스® 랩 V 세포 수확 사토리우스 시스템(Sartoclear Dynamics® Lab V Cell Harvesting Sartorius system)을 사용하여 CHO 풀 상청액 수확물을 정화시켰다(공급업체의 설명서 참조).

[0329] 2. 정제

[0330] 본 발명의 푸코실화된 및 어푸코실화된 이중특이적 항체의 정제는 3 단계 친화성 정제 프로세스에 의해 달성하였다. 정제를 시작하기 전, 적절한 부피의 친화성 매트릭스가 있는 칼럼을 사용하기 위해 옥테트RED96을 사용하여 이중특이적 항체 풀의 상청액 중 항체 농도를 측정하였다. 푸코실화된 또는 어푸코실화된 이중특이적 항체를 함유하는 각각의 정화된 CHO 풀 상청액을 사전 조정 없이 MabSelect SuRe(MSS) 칼럼(GE Healthcare)에 로딩하여 세포 배양 오염물질 대부분을 제거하였다. 이어서, MSS 용출액을 낮은 pH 유지로 처리하여 바이러스를 불활성화시키고, 트리스 1 M pH 9로 pH 6에서 중화시켰다. 이어서, MSS 용출액을 LambdaFabSelect(LFS) 칼럼(GE Healthcare)에 로딩하여 단일특이적 κ (모노 κ)를 제거하였다. 이어서, LFS 용출액의 pH를 pH 6으로 조정하였다. LFS를 Capto L(CL) 칼럼(GE Healthcare)에 로딩하여 단일특이적 λ (모노 λ)를 제거하였다. CL 용출액을 보관 전에 pH를 조정하였다. 이어서, 최종 물질을 농축시키고, 최종 제제 완충제로 정용여과하였고, 그의 농도는 나노드롭을 사용하여 조정하였다. 푸코실화된 및 어푸코실화된 이중특이적 항체를 분취하고, 전달될 때까지 -80°C 에서 보관하였다. 제조자(Agilent Technologies: 미국 캘리포니아주 산타클라라 소재)에 의해 기술된 바와 같이 단백질 80(Protein 80) 키트를 사용하여 애질런트 2100 바이오분석기(Agilent 2100 Bioanalyzer)를 이용하여 변성 및 환원 조건하에서 전기영동으로 사이징에 대해 정제된 이중특이적 항체를 분석하였다. ACQUITY UPLC H-클래스 바이오 시스템(ACQUITY UPLC H-Class Bio System)(Waters)을 사용하여 크기 배제 크로마토그래피(SEC-UPLC)로 응집 수준을 평가하였다. 정제된 이중특이적 항체의 전하 변이체 분석은 멀티포르 II 전기영동 시스템(Multiphor II Electrophoresis System)(GE Healthcare)을 사용하여 등전점 포커싱 기술(IEF: isoelectric focusing)에 의해 달성하였다. 푸코실화된 및 어푸코실화된 K2AC5 및 K2AC22 항체의 N 연결 복합체 바이안테너리 당형태의 상대적 분포는 랩칩 GXIT터치(LabChip GXITouch)(Perkin Elmer)에서 처리량 마이크로칩-CE 방법을 사용하여 측정하였다. 리물루스 아메보사이트 라이세이트 시험(LAL; Charles River Laboratories: 미국 매사추세츠주 윌밍턴 소재)을 사용하여 내독소 오염에 대해 모든 항체를 시험하였다. 본 발명의 afuc 이중특이적 항체는 > 70%의 어푸코실화를 보였다.

[0331] 상기 어푸코실화된 CEAxCD47 이중특이적 항체를 사용하여 표 10 및 11에, 및 도 3a 및 3b에 제시된 결과를 수득하였다.

[0332] 3. 본 발명의 어푸코실화된 이중특이적 항체를 제조하는 다른 방법

[0333] 3.1 FUT 8 음성 생산 세포주를 이용한 방법

[0334] 대안적으로, 및 본 발명자들의 지식에 따르면, 본 발명에 따른 어푸코실화된 이중특이적 항체 또한 하기와 같은 방법에 따라 제조할 수 있다:

- [0335] 물질 및 방법은 문헌 [Naoko Yamane-Ohnuki et al., Biotech. Bioeng.; 87 (2004) 614-622]에 따른다.
- [0336] *차이니스 햄스터 FUT8 cDNA 단리*
- [0337] 본 발명자들의 지식에 따르면, RN이지® 미니 키트(RNeasy® Mini Kit)(Qiagen: 독일 힐덴 소재)를 이용하여 CHO/DG44 세포로부터 전체 RNA를 단리시키고, 역전사 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR: reverse transcript-polymerase chain reaction)(Invitrogen: 미국 캘리포니아주 칼즈배드)을 위해 슈퍼스크립트(Superscript) 제1 가닥 합성 시스템을 이용하여 올리고-dT로 역전사시킨다. 무린 FUT8 cDNA(문헌 [Hayashi, 2000; DNA Seq 11:91-96])로부터 디자인된 프라이머
- [0338] 5V-GTCTGAAGCATTATGTGTGAAGC-3V(서열 번호 45) 및
- [0339] 5V-GTGAGTACATTCATTGTACTGTG-3V(서열 번호 46)를 이용하여 PCR에 의해 차이니스 햄스터 FUT8 cDNA를 단일 가닥 CHO/DG44 세포 cDNA로부터 증폭시킨다.
- [0340] *FUT8 유전자좌의 표적화 구성물*
- [0341] 본 발명자들의 지식에 따르면, 2개의 대체 벡터, pKOFUT8Neo 및 pKOFUT8Puro를 이용하여 CHO/DG44 세포에서 FUT8 유전자의 표적화된 파괴를 수행한다. 프로브로서 차이니스 햄스터 FUT8 cDNA를 사용하여 CHO-K1 세포 E-게놈 라이브러리(Stratagene: 미국 캘리포니아주 라호야 소재)를 스크리닝하여 제1 코딩 엑손을 포함하는 FUT8 유전자의 9.0 kb 단편을 단리시켜 표적화 구성물을 확립한다. 번역 개시 부위를 포함하는 234 bp 세그먼트를 loxP 부위 측면에 위치하는, 각각 플라스미드 pKOSelectNeo 또는 pKOSelectPuro(Lexicon: 미국 텍사스 소재)의 네오마이신 내성 유전자(Neor) 카세트 또는 퓨로마이신 내성 유전자(Puror) 카세트로 대체한다. 플라스미드 pKOSelectDT(Lexicon)로부터의 디프테리아 독소 유전자(DT) 카세트를 5V 상동성 영역에 삽입한다. 생성된 표적화 구성물, pKOFUT8Neo 및 pKOFUT8Puro는 1.5 kb 5V 상동성 서열 및 5.3 kb 3V 상동성 서열을 포함하였다. 형질감염 전, 표적화 구성물을 고유한 SalI 부위에서 선형화한다.
- [0342] *상동성 재조합체에 대한 형질감염 및 스크리닝*
- [0343] 본 발명자들의 지식에 따르면, 서브컨플루언트 CHO/DG44 세포(1.6 × 10⁶)를 바이오-래드 진펄서® II(Bio-Rad GenePulser® II)를 사용하여 350 V 및 250 AF에서 4 Ag의 선형화된 pKOFUT8Neo로 전기천공하였다. 전기천공 후, 600 Ag/mL G418(Nacalai Tesque: 일본 교토 소재)을 이용하여 형질감염체를 선별한다. 앞서 보고된 변형된 미세추출 방법(문헌 [Ramirez-Solis et al., 1992; Anal Biochem 201:331-335.])에 의해 하기 프라이머를 사용하여 96 웰 플레이트에서 게놈 PCR을 수행한다:
- [0344] 5V-TTGTGTGACTCTTAAGTCTCAGAG-3V(서열 번호 47) 및
- [0345] 5V-GAGGCCACTTGTGTAGCGCAAGTG-3V(서열 번호 48).
- [0346] 게놈 PCR을 사용하여 수득된 1.7 kb 단편에 의해 상동성 재조합체를 확인하고, 하기 프라이머로 증폭된 221 bp 단편을 사용하여 서던 블롯 분석에 의해 확인한다:
- [0347] 5V-GTGAGTCCATGGCTGCTACTG-3V(서열 번호 49) 및
- [0348] 5V-CCTGACTGGCTATTCTCAG-3V(서열 번호 50).
- [0349] 앞서 기술된 바와 같이 반접합성 클론에 대해 선형화된 pKOFUT8Puro를 이용하여 제2 라운드의 상동성 재조합을 수행하고, 15 Ag/mL 퓨로마이신(Sigma-Aldrich: 미국 미주리주 세인트루이스 소재)으로 약물 선별을 수행한다. 확인된 형접합성 파괴체를 Cre-레코미니나제 발현 벡터 pBS185(Invitrogen)로 전기천공하여 두 FUT8 대립유전자, 둘 모두로부터 약물 내성 유전자 카세트를 제거한다.
- [0350] *FUT8(-) 세포에 의한 단일클론 항체 제조*
- [0351] 본 발명자들의 지식에 따르면, 본 발명에 따른 이종특이적 항체를 코딩하는 발현 벡터로 FUT8(-) 세포주를 전기천공하고, 크산틴 및 티미딘이 결여된 배지에서 선별한다. 컨플루언트 형질감염체를 Ex 세포® 301 배지(Ex-Cell® 301 Medium)(JRH Biosciences: 미국 캔자스주 르넥사 소재) 중에서 1주 동안 배양한다. MabSelect™ (Amersham Biosciences: 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재)를 이용하여 배양물 상청액으로부터 항체를 정제한다. 추가 정제 단계는 음이온/양이온 교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피 및 특히 상기 기술된 바와 같은 각각 카파 램다 선택 수지를 사용하는 정제일 수 있다.

- [0352] 3.2. 생산 세포 배지로부터의 세포의 푸코스 회수 및 세포내 푸코스 생합성에 대한 효소적 개입
- [0353] 바람직하게, 및 본 발명자들의 지식에 따르면, 본 발명의 어푸코실화된 이중특이적 항체는 또한 하기와 같은 US8642292에 기술된 방법/기술에 따라 제조할 수 있다. 이 기술은 CHO 세포주 등과 같은 항체 생산자 세포주 내로 이중성 박테리아 효소를 안정적으로 통합시키도록 디자인된 것이다. 이로써, D-만노스로부터의 푸코스의 드 노보 합성은 차단된다. 또한 생산 세포가 푸코스가 없는 배지에서 배양되는 경우, 결과적으로 안정적인 수준으로 어푸코실화된 항체가 생성된다.
- [0354] 진행 세포에서, 푸코스는
- [0355] a) 셀비지 경로를 통해 세포의 공간 또는 리소솜으로부터, 및
- [0356] b) 푸코스의 드 노보 합성 경로에서 D-만노스로부터 푸코스의 드 노보 합성에 의해 이루어지는 2개 경로를 통해 생성된다.
- [0357] 셀비지 경로는 배양 배지로부터 푸코스를 생략함으로써 완전히 차단될 수 있다. 드 노보 생합성 경로는 상기 경로의 중간체 GDP-4-케토-6-데옥시-D-만노스를 GDP-4-케토-6-데옥시-D-갈락토스 대신 GDP-D-람노스로 전환함으로써 차단될 수 있다. 이는 각각 박테리아 효소 GDP-6-데옥시-D-리코스-4-헥솔로스 리덕타제(RMD)를 코딩하는 유전자를 생산 세포주 내로 안정적으로 통합시킴으로써 RMD를 생산 세포주로 이동시킴으로써 달성된다. 생산 세포주에서 발현되는 RMD는 심지어 소량도 생산 세포의 드 노보 합성 경로를 완전히 차단시킨다.
- [0358] 생산 세포주, 예컨대, 본 발명의 어푸코실화된 항체 제조를 위해 디자인된 CHO 기반 세포주 뿐만 아니라, 본 발명의 항체를 이미 생산하고 있고, 푸코스 함량이 80% 내지 100%만큼 감소된 항체를 생산하도록 조작된 기존의 생산 세포주를 구성하는 데 상기 기술이 사용될 것이다.
- [0359] 도 3a 및 3b, 및 표 10 및 11에 제시된 모든 결과는 2개 CEACAM5 발현 암 세포주(MKN-45 및 SNU-C1)를 사용하여 수득된 것이고; 여기서, 이펙터 세포 대 표적/종양 세포 비는 1:3이었다. 본 결과는 3명의 상이한 인간 공여자로부터 수득한 대식세포를 이용한 실험에서 수득하였다. 상기 실험으로부터 수득된 데이터는 표 10(MKN-45 세포에 대한 결과), 및 표 11(SNU-C1 세포에 대한 결과)에 제시되어 있다.

표 10

표 10. 2명의 상이한 공여자(D)의 대식세포하에 표적으로서 MKN45 인간 암 세포주를 이용한 6개의 어푸코실화된 CEACAM5xCD47 이중특이적 항체(K2AC82 afuco, K2AC84 afuco, K2AC91 afuco, K2AC100 afuco, K2AC117 afuco, 및 K2AC22 afuco(비교))의 식작용 활성으로부터의 EC50($\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 E_{max}(최대 식작용 지수)의 시험관내 평가.

		CD47xCEACAM5 이중특이적 항체					
		K2AC22 afuco	K2AC82 afuco	K2AC84 afuco	K2AC91 afuco	K2AC100 afuco	K2AC117 afuco
D830	EC50 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.11	0.077	0.13	0.15	0.14	0.11
	최대 식작용 지수	62	72	84	82	84	72
D831	EC50 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.26	0.12	0.14	0.16	0.08	0.15
	최대 식작용 지수	34	40	40	44	37	38
평균 (+/- SD)	EC50	0.2 (+/- 0.11)	0.1 (+/- 0.03)	0.1 (+/- 0.01)	0.2 (+/- 0.01)	0.1 (+/- 0.04)	0.1 (+/- 0.03)
	최대 식작용 지수	48 (+/- 19.8)	56 (+/- 22.6)	62 (+/- 31.1)	63 (+/- 26.9)	60.5 (+/- 33)	55 (+/- 24)

[0360]

표 11

표 11. 2명의 상이한 공여자(D)의 대식세포하에 표적으로서 SNU-C1 인간 암 세포주를 이용한 6개의 어푸코실화된 CEACAM5xCD47 이중특이적 항체(K2AC82 afuco, K2AC84 afuco, K2AC91 afuco, K2AC100 afuco, K2AC117 afuco, 및 K2AC22 afuco(비교))의 식작용 활성으로부터의 EC50($\mu\text{g}/\text{mL}$) 및 E_{max}(최대 식작용 지수)의 시험관내 평가.

공여자(D)		CD47xCEACAM5 이중특이적 항체					
		K2AC22 afuco	K2AC82 afuco	K2AC84 afuco	K2AC91 afuco	K2AC100 afuco	K2AC117 afuco
D831	EC50 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.2	0.07	0.14	0.04	0.08	0.09
	최대 식작용 지수	31	34	31	31	32	35
D833	EC50 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.09	0.03	0.03	0.034	0.027	N/A
	최대 식작용 지수	32	36	33	33	38	N/A
평균 (+/- SD)	EC50	0.15 (+/- 0.08)	0.05 (+/- 0.03)	0.09 (+/- 0.08)	0.04 (+/- 0.004)	0.05 (+/- 0.04)	0.09
	최대 식작용 지수	31.5 (+/- 0.7)	35 (+/- 1.4)	32 (+/- 1.4)	32 (+/- 1.4)	35 (+/- 4.2)	35

[0361]

[0362] 실시예 10

[0363] 중양 세포 상의 CD47과 SIRP α 의 상호작용 차단

[0364] 본 발명의 이중특이적 항체의 SIRP α 억제 효능(IC50)의 측정을 위한 실험 설정:

[0365] 차단 활성을 검출하기 위해 하기 기술되는 바와 같이 MKN-45 세포의 표면에서 발현된 인간 CD47과 가용성 SIRP α 의 상호작용을 모니터링하는 세포 기반 검정법을 이용하였다. 본 발명에 따른 이중특이적 항체를 사용한 농도-반응 실험을 통해 억제 곡선(도 4 참조) 및 IC50 값(표 12 참조)을 결정할 수 있었다.

[0366] CD47 및 CEACAM5, 둘 모두를 발현하는 MKN-45 암 세포를 바이올렛으로 염색하여 이미징 시스템(CX5)이 세포를 검출할 수 있도록 하였다. 간략하면, 웰당 3'000개의 염색된 MKN-45 세포를 384 광학 웰 플레이트(Costar)에 시딩하고, 본 발명의 이중특이적 항체의 농도를 증가시켜 가면서(1.9 pM 내지 333 nM, 사중으로) 50분 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 항마우스 IgG-Fc AF647 커플링된 항체(Jackson ImmunoResearch, 1:2000으로 희석)와 함께 미리 혼합된, 고정 농도의 SIRP α 마우스Fc를 최종 50 ng/mL로 첨가하였다. 3시간 30분의 인큐베이션 후, 플레이트에서 검출된 결합된 SIRP α 에 의해 방출된 형광 신호의 이미지를 이미징 시스템(CX5, Thermo Fisher)으로 획득하였다. 형광 신호(평균 형광 강도 MFI)를 시험된 용량 범위에 따라 플롯팅하였고, 소프트웨어(Prism, GraphPad)에 의해 IC50을 계산하였다. 결과는 표 12에 제시되어 있다:

표 12

표 12. (hCD47 발현 세포로서 MKN-45를 이용하여) 최근 기술의 이중특이적 CEAxCD47 항체 K2AC22와 비교하여 5개의 본 발명의 CEACAM5xCD47 이중특이적 항체(K2AC82, K2AC84, K2AC91, K2AC100 및 K2AC117)에 대해 CD47/SIRP α 차단 검정법으로 측정된 IC50(nM).

항체 명칭	SIRPα 억제 효능 (nM) [#]
K2AC22	1.2
K2AC82	0.07
K2AC84	0.04
K2AC91	0.05
K2AC100	0.09
K2AC117	0.08

[0367]

[0368]

실시예 11: a. 암 환자의 신선한 샘플로부터의 암 세포에서의 CEACAM5 발현을 수득하고(Qifikit 데이터), b. 식작용 데이터를 수득하기 위한 오가노이드 절차

[0369]

환자의 1차 샘플로부터 유래된 오가노이드를 표준 방법(효소 소화 및/또는 기계적 해리)에 의해 단일 세포 현탁액으로 제조하였다. 10 μl의 항인간 CEACAM5 1차 항체(#sc-23928; mIgG1(Santa Cruz); 최종 농도 20 μg/mL)를 세포에 첨가하고, 4°C에서 30 min 동안 인큐베이션시켰다. 세포를 세척하고 원심분리하였다. (QIFIKIT®로부터 입수한 셋업 또는 보정) 비드 100 μl를 세포와 함께 세척하고, 동일하게 처리하였다. 키트로부터의 2차 항체 100 μl(PBS BSA 2% 중 1/50)를 각 웰에 첨가하고, 4°C에서 30 내지 45 min 동안 인큐베이션시켰다. 세포를 원심분리하여 상층액을 폐기하고, 2회 세척하였다. 마지막 원심분리 후, 세포를 재현탁시키고, 세포분석기에서 획득하였다. 특정 소프트웨어 및 Excel 파일로 익스포트된 기하 평균을 이용하여 분석을 수행하였다. 보정 비드로부터의 MFI 값을 이용하여 선형 회귀를 수행하였다. 상기 회귀선으로부터 세포의 항체 결합능(ABC)을 외삽하였다. 특이적 염색 중 하나에 대하여 이소타입 대조군으로부터 ABC를 감산하여 특이적 항체 결합능(sABC)을 얻었다.

[0370]

상기 1차 오가노이드의 CEACAM5의 평균 발현은 세포당 28,000개의 CEACAM5 표적인 것으로 밝혀졌는데, 이는 표 5의 세포주에서의 평균 발현보다 대략 4배 낮은 값이다.

[0371]

암 환자의 1차 샘플로부터 유래된 오가노이드는 본 발명의 이중특이적 항체 및 인간 공여자로부터의 대식세포가 첨가되는 경우, 농도 의존적 식작용/식작용 지수를 연구하는 데에도 또한 사용될 수 있다(실시예 7 참조). 동일한 방법을 사용함으로써, 본 발명자들의 지식에 따르면, 또한 인간 공여자로부터의 T 세포가 첨가되는 경우, CEACD3 이중특이적 항체와 본 발명의 이중특이적 항체의 조합 또한 연구될 수 있다.

[0372]

실시예 12: 항종양 활성: 조직 슬라이스 배양.

[0373]

본 발명자들의 지식에 따르면, 본 발명에 따른 이중특이적 항체의 항종양 활성을 CEA 발현 종양 진단을 받은 환자로부터의 종양 조직 슬라이스 배양물 중에서 각각 단일 작용제로서 뿐만 아니라, 조합 치료에서 평가할 수 있다(문헌 [Soennichsen et al., Clinical Colorectal Cancer 2018]).

[0374]

1. 조직 슬라이스 배양 및 처리

[0375]

신선한 종양 조직 샘플을 절단하고, 이전에 공개된 바와 같이 처리한다(문헌 [Soennichsen et al., Clinical Colorectal Cancer 2018]). 간략하면, 외과적 절제 및 1차 육안상의 병리학적 평가 직후, 종양 샘플을 조직 초퍼를 사용하여 350 μm 슬라이스로 절단한다. 이어서, 3 mm 코어링 도구를 사용하여 조직 슬라이스 직경을 표준화한다. 3개의 조직 슬라이스를 무작위로 폴링하고, 막 인서트에 배치하고, 6 웰 플레이트에서 배양한다. 37°C 및 5% CO2의 표준화된 조건하에서 슬라이스를 인큐베이션시킨다. 표준 세포 배양 배지에서 사전 배양 후, 슬라이스 삼중체를 본 발명에 따른 이중특이적 항체에 단독으로 또는 (예컨대, PD-L1 억제제와 함께) 조합하여 각각 최대 120시간 동안 노출시킨다. 화합물 노출 후, 종양 슬라이스를 4% 파라포름알데히드를 사용하여 밤새도록

고정시킨다.

2. 염색

파라포름알데히드로 고정된 슬라이스를 파라핀 중에 포매시키고, 5 μm 절편으로 프로세싱한다. 헤마톡실린 & 에오신(HE) 염색을 수행하여 조직병리학적 측면 및 종양 세포 비율을 평가한다. 전체 세포 계수, 종양 세포 계수 및 증식을 면역형광 염색으로 분석한다. 간략하면, 파라핀 절편을 탈파라핀화한다. 항원 회수 후, 절편을 0.3% PBS/트리톤X(TritonX)로 세척하고, 5% 정상 염소 혈청으로 30분 동안 차단한다. 사이토케라틴(AE1+3), Ki67 및 절단된 PARP에 대한 1차 항체를 각각 0.5% 소 혈청 알부민 중에 희석하고, 4°C에서 밤새도록 인큐베이션시킨다. 절편을 0.3% 포스페이트 완충처리된 염수/트리톤X로 세척하고, 2차 항체로 표지한다. 핵을 핵스트(Hoechst) 33342로 염색한다. (예컨대, CEA 발현에 대한) 추가 염색을 포함할 수 있다.

3. 데이터 분석

형광 현미경을 사용하여 형광 염색된 절편으로부터 조직 슬라이스당 5개의 사진(20x)을 촬영한다. 염색별 분할 알고리즘을 이용하여 핵스트 33342, 사이토케라틴, Ki67 및 절단된 PARP 염색에 대해 양성 픽셀 계수를 측정한다. 사이토케라틴 양성 픽셀로 둘러싸인 Ki67/절단된 PARP 양성 핵의 픽셀을 분석하여 증식/아포토시스성 종양 면적을 계산한다. 모든 사진에 대해 총 세포 계수(핵스트 양성), 종양 세포 계수(핵스트 및 사이토케라틴 양성) 및 증식성 종양 세포 계수(핵스트, 사이토케라틴 및 Ki67 양성/절단 PARP)를 계산한다. 종양 세포 계수를 전체 세포 계수로 정규화하여 사진마다 상이한 종양 세포 분율을 고려한다. 이어서, 단일 이미지 값으로부터 평균 슬라이스 값을 계산한다. 평균 슬라이스 값을 이용하여 조건에 대한 평균값을 계산한다.

실시예 13: 생체내 항종양 활성.

본 발명자들의 지식에 따르면, 본 발명에 따른 이중특이적 항체의 항종양 활성을 트랜스제닉 마우스에서 각각 단일 작용제로서 뿐만 아니라, 조합 치료에서 평가하였다.

1. 세포주 생성 및 성장 시험

예컨대, 뮤린 결장암 세포주 CT26 또는 MC38에 기초한 hCEACAM5(Tg)hCD47(Tg)mCD47(ko) 세포주를 생성할 것이다. CRISPR/Cas9를 이용한 후, 이어서, 세포 분류에 의해 KO 클론을 단리시켜 내인성 마우스 CD47 유전자의 녹아웃(KO: Knock-out)을 수행한다. 내부 리보솜 진입 부위(IRES: internal ribosome entry site)를 이용하여 hCD47 및 hCEACAM5, 둘 모두의 발현을 구동시키는 카세트로 KO 클론을 형질감염시킨 후, 예컨대, 전체 발현 수준 및 비에 기초하여 조작된 클론을 단리시킨다. 검증된 클론 3개를 선택하여 3개의 검증된 클론이 선택되어 최종 클론의 선택을 위해 생체내 생착/종양형성에 대해 후속적으로 시험할 것이다.

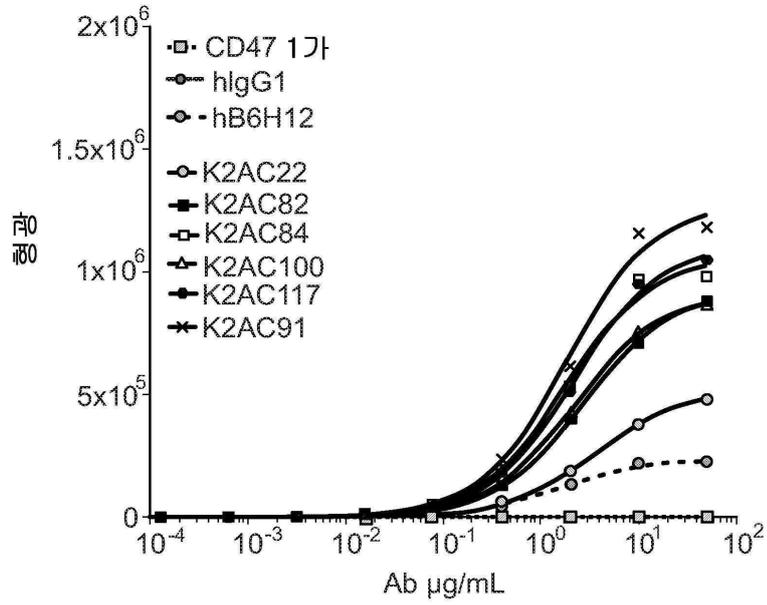
2. 생체내 항종양 활성

인간 CD3e를 발현하는 BALB/cJGpt 배경의 마우스 계통(T001550 이형접합성 BALB/c-hCD3ET/Wt 마우스) 및 인간 CD47/인간 SIRP α를 발현하는 것(T037264 동형접합성 BALB/c-hCD47/hSIRP α 마우스)은 겐파마테크(GemPharmatech)에서 이용가능하다. 대안적으로, 인간 CD3e를 발현하는 C57BL/6/Bcgen 배경의 마우스 계통(동형접합성 B-hCD3E 마우스) 및 인간 CD47/인간 SIRP α를 발현하는 것(동형접합성 B-hSIRP α/hCD47 마우스)은 바이오사이토젠(Biocytozen)에서 이용가능하다. 두 마우스 계통을 교배하여 삼중 인간화 hCD3e/hSIRPα/hCD47 마우스를 수득하고, 본 발명에 따른 이중특이적 항체를 단일 작용제로서 또는 조합 치료로 시험하는 후속 실험을 위해 자손을 사용할 것이다.

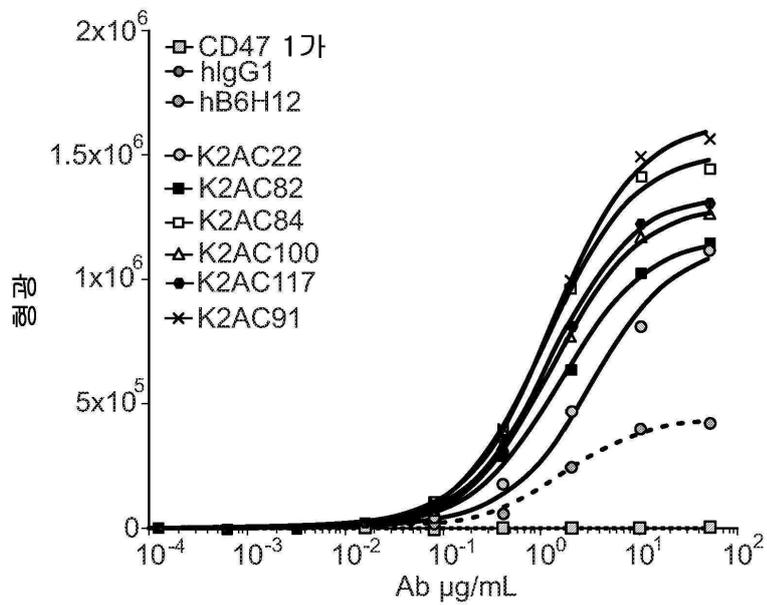
0일째 삼중 인간화 hCD3e/hSIRPα/hCD47 마우스에 CT26-hCEACAM5(Tg)hCD47(Tg)mCD47(ko) 세포주(BALB/c 배경) 또는 MC38-hCEACAM5(Tg)hCD47(Tg)mCD47(ko) 세포주(C57BL/6 배경)를 접종한다. 일단 코호트에서 중간 종양 크기가 예컨대, 200 mm³에 도달하고 나면, 마우스 1마리의 종양 부피가 예컨대, 3000 mm³를 초과하거나, 또는 미리 지정된 동물 보호 및 관리 종점 중 어느 하나 이상의 것이 발생할 때까지, 단일 작용제로서 뿐만 아니라, 조합으로 본 발명에 따른 이중특이적 항체를 이용하는 치료를 예컨대, 2회 치료/주의 간격으로 i.v. 볼루스로서 개시한다. 주 3회로 종양 부피 및 체중을 측정한다. 하기 공식: TV = 0.5 a x b²(여기서, a 및 b는 각각 종양의 긴 직경 및 짧은 직경이다).

도면

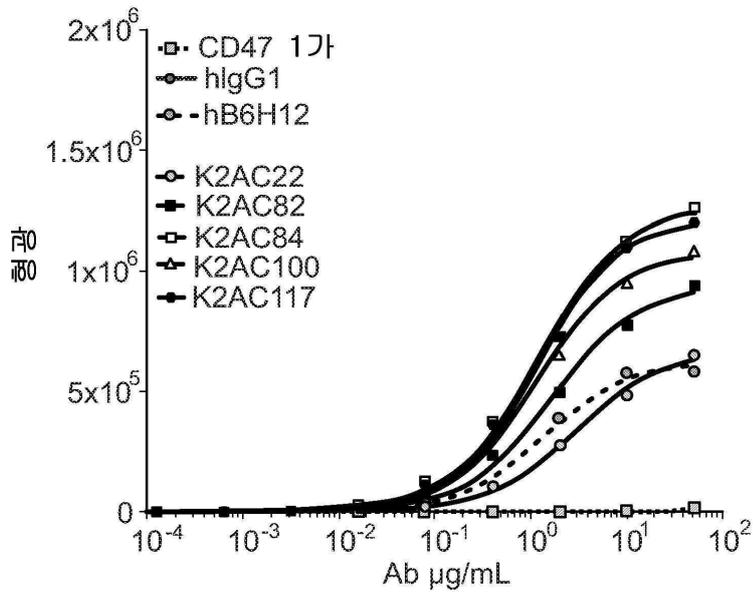
도면1a



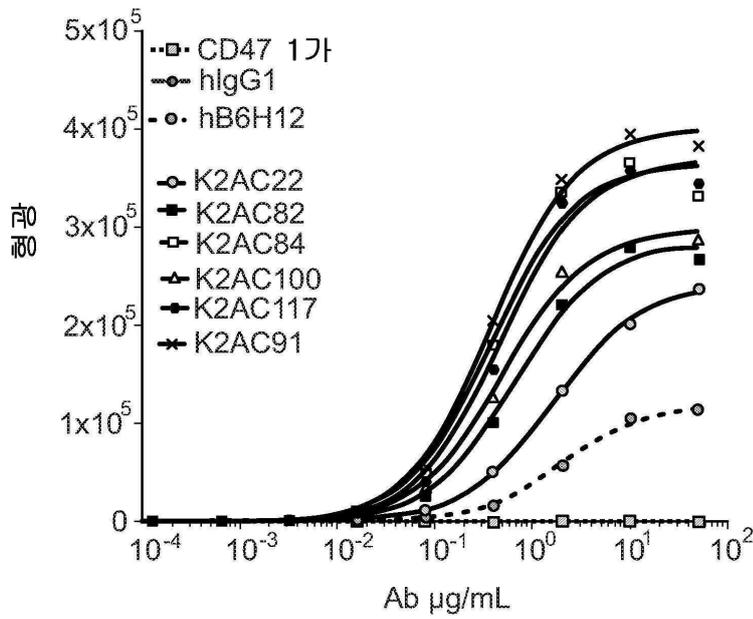
도면1b



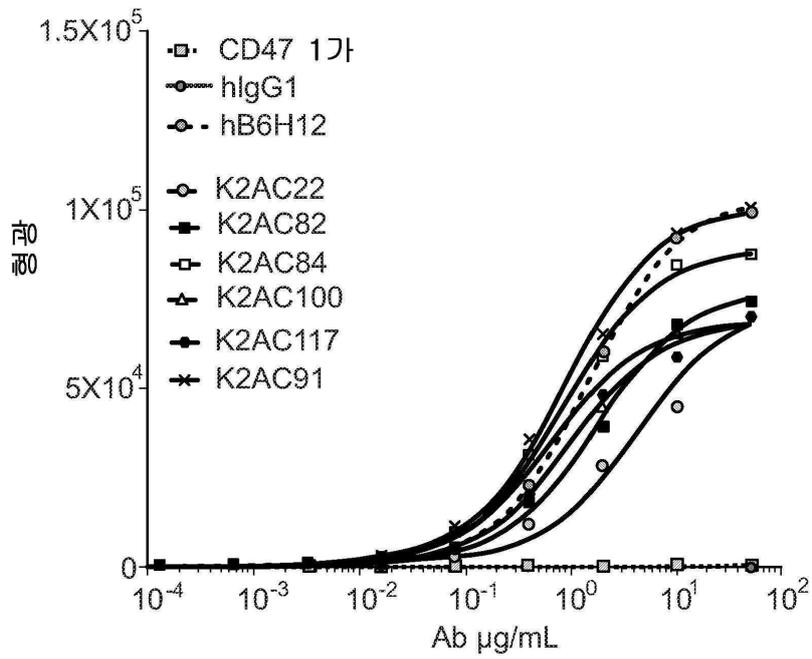
도면1c



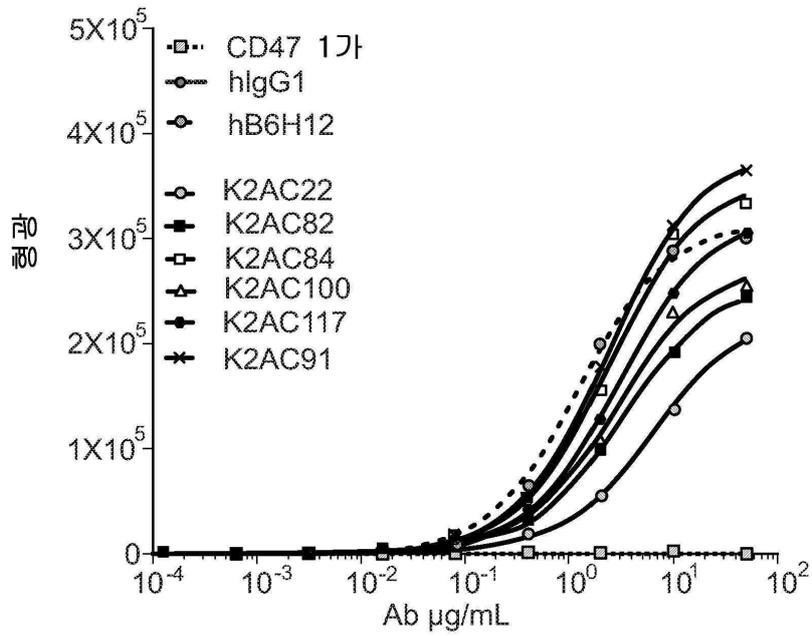
도면1d



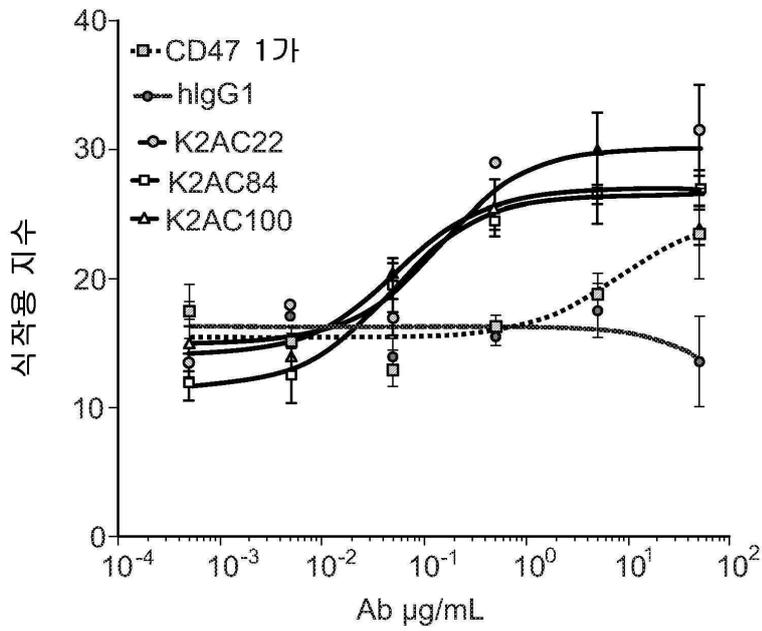
도면1e



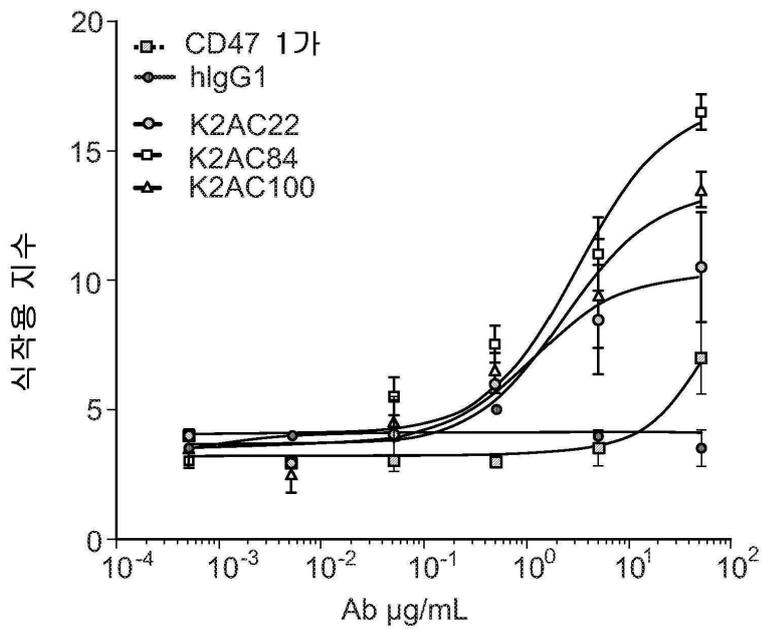
도면1f



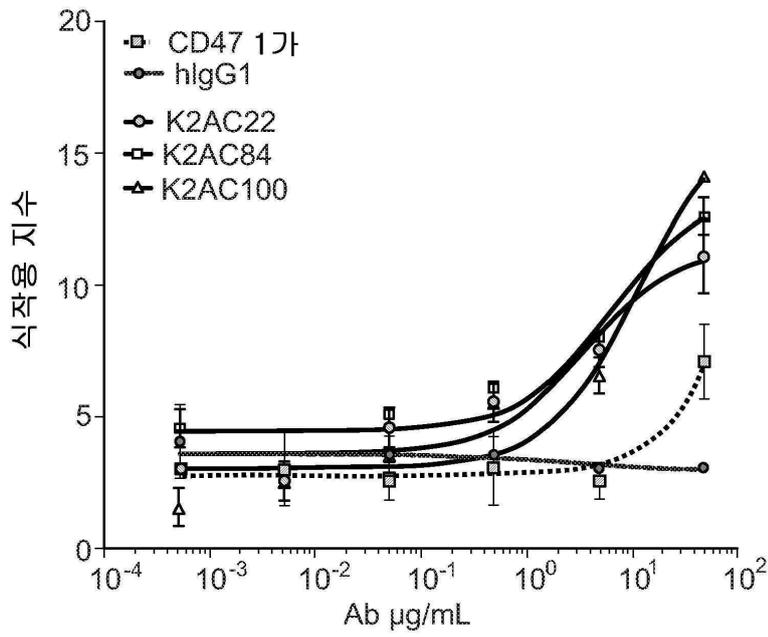
도면2a



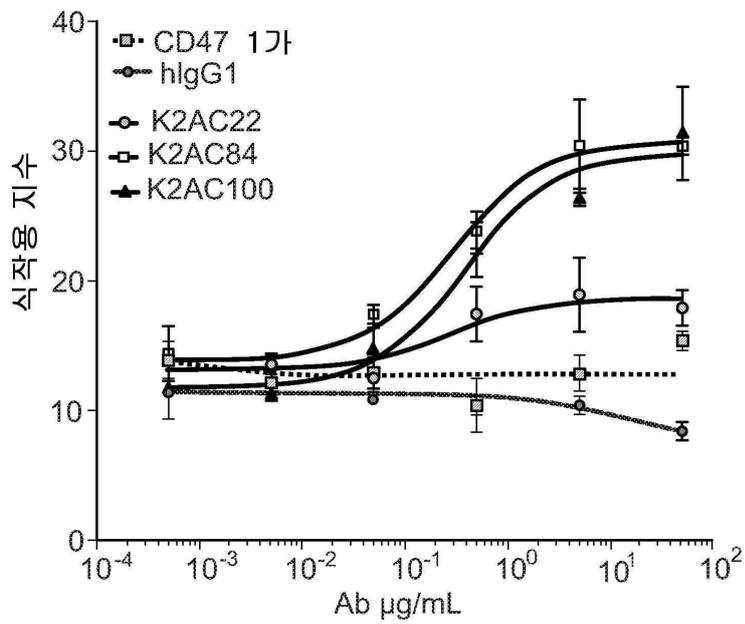
도면2b



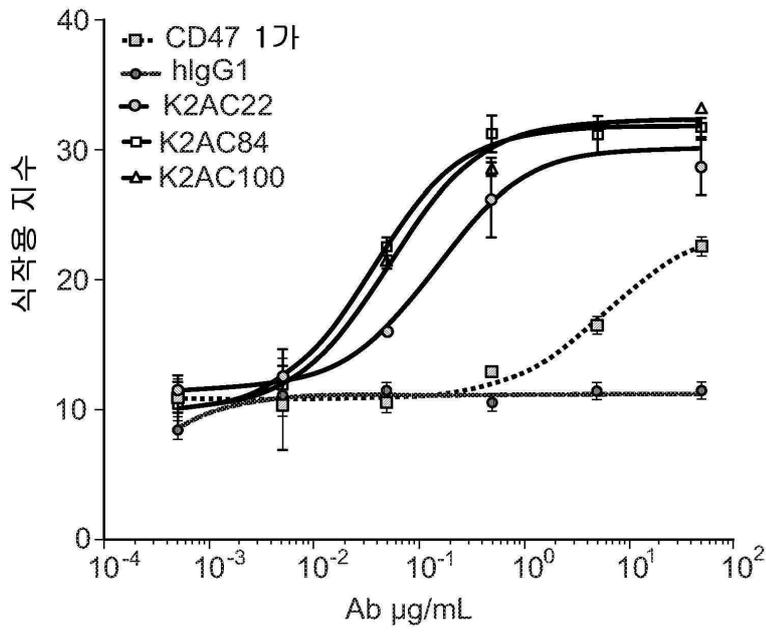
도면2c



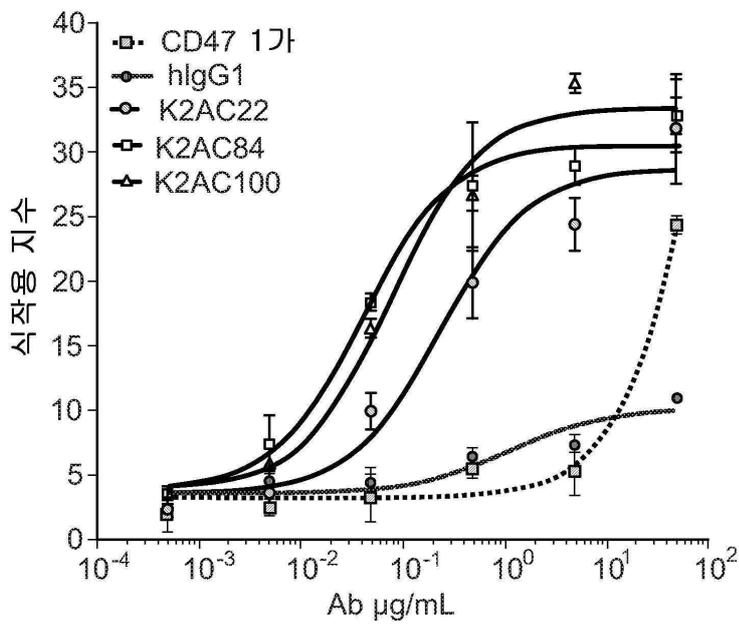
도면2d



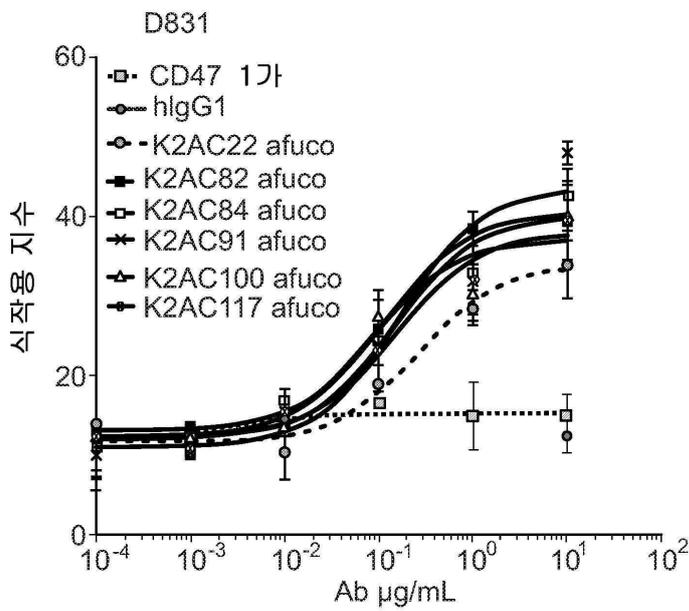
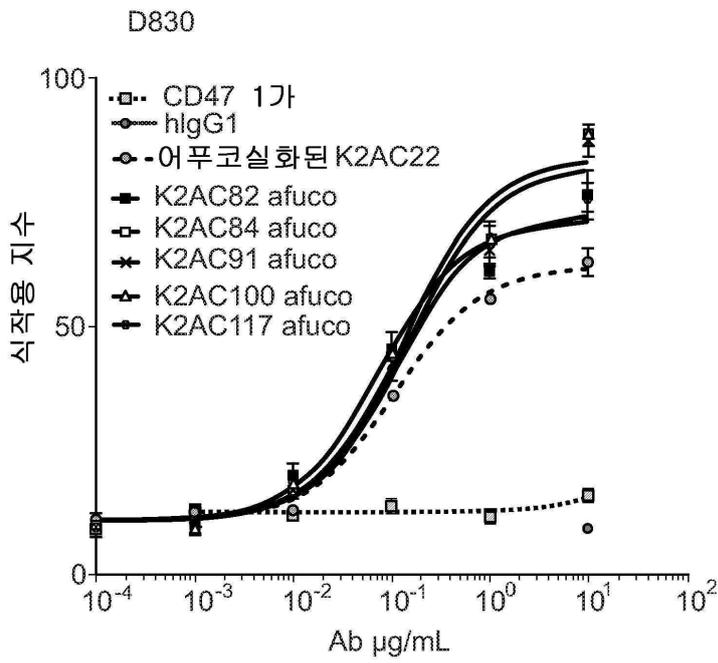
도면2e



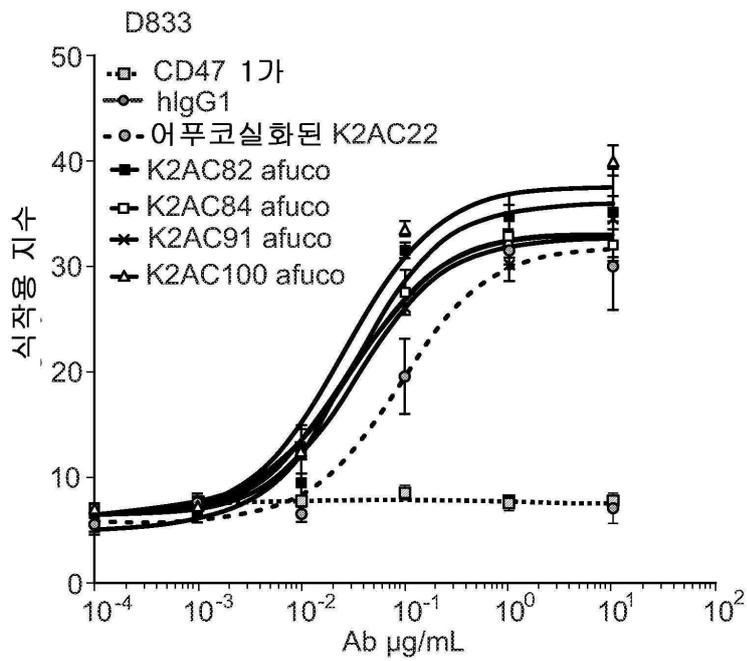
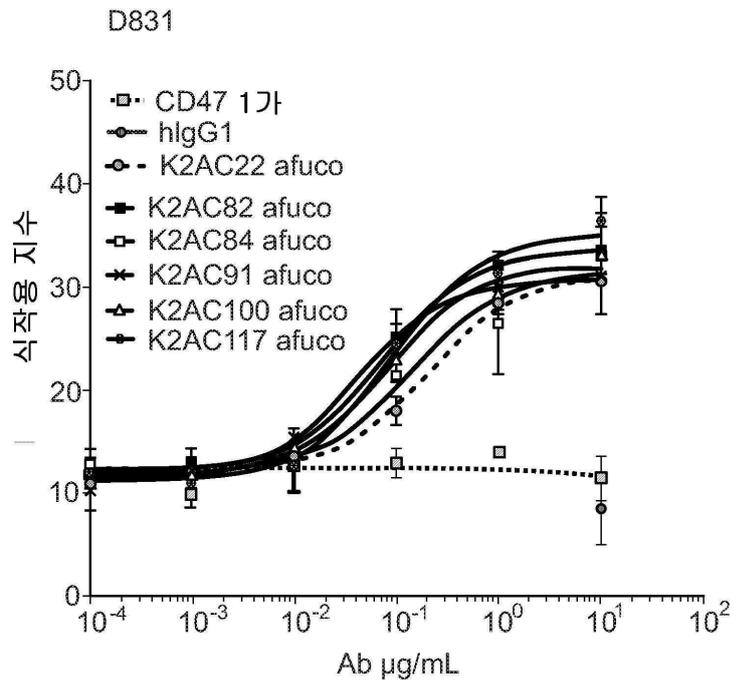
도면2f



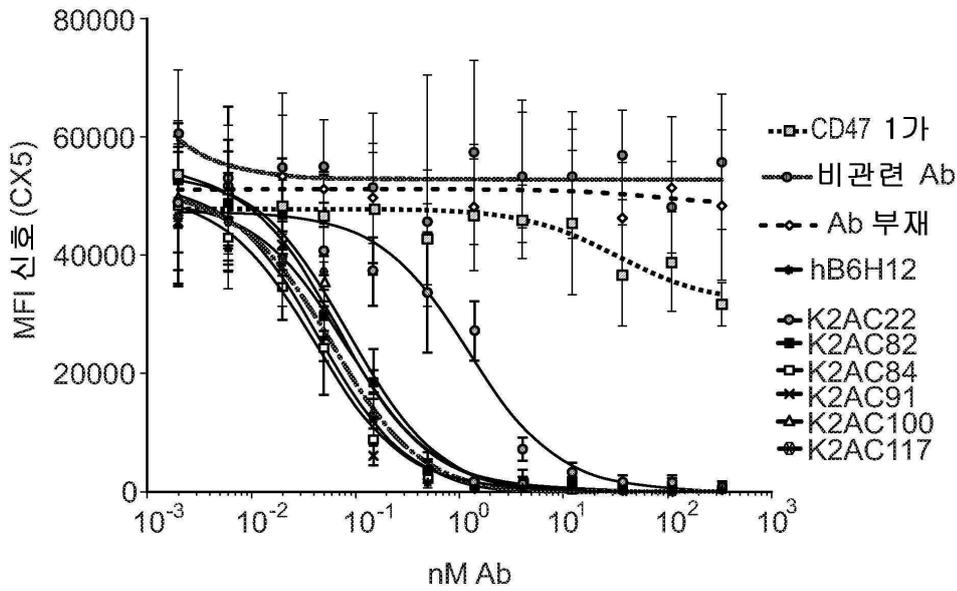
도면3a



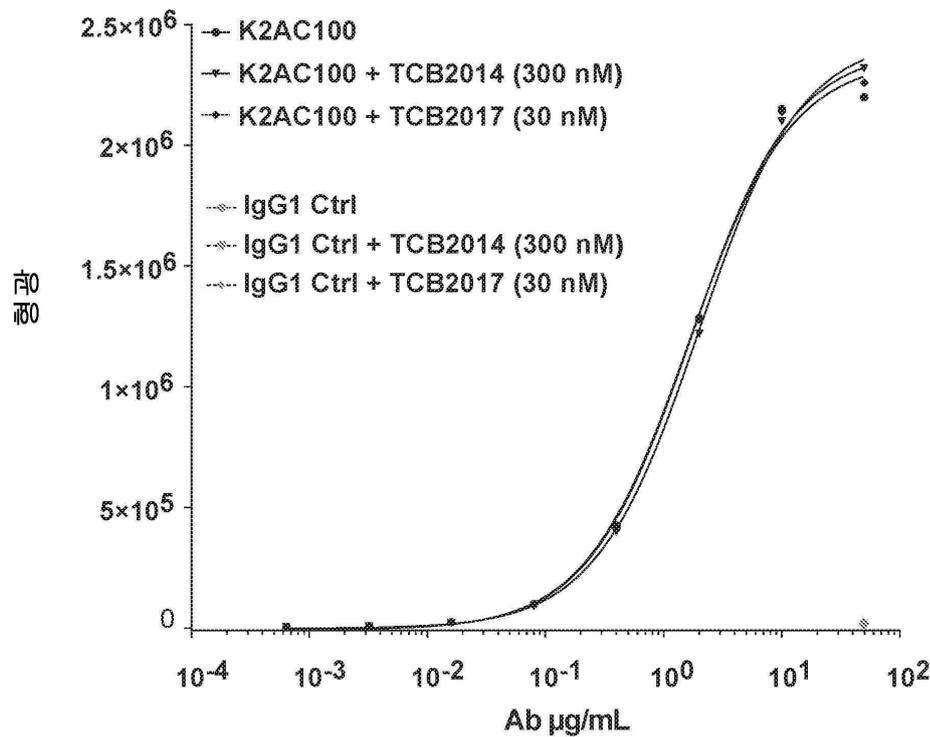
도면3b



도면4



도면5



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> LAMKAP BIO BETA AG

BUATOIS, VANESSA

HOSE, DIRK

SECKINGER, ANJA

<120> BISPECIFIC ANTIBODIES AGAINST CEACAM5 AND CD47

<130> 4130.005PC03

<150> US 63/135,996

<151> 2021-01-11

<150> EP 20215766

<151> 2020-12-18

<160> 50

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Common heavy chain CDRH1

<400> 1

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 2

<211> 17

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Common heavy chain CDRH2

<400> 2

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

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Common heavy chain CDRH3

<400> 3

Ser Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr

1 5

<210> 4

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Common heavy chain VH

<400> 4

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 Ser Tyr

 20 25 30

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

 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

 85 90 95

Ala Lys Ser Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

 100 105 110

Thr Val Ser Ser

 115

<210> 5

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Common heavy chain (VH-CH1)

<400> 5

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 Ser Tyr

 20 25 30

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

35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

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

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160

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

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

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro

225

<210> 6

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> common heavy chain (VH-CH1-CH2-CH3)

<400> 6

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

 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Ser Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

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

 Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD47 binding part CDRL1

<400> 7

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD47 binding part CDRL2

<400> 8

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD47 binding part CDRL3

<400> 9

Gln Gln Met His Pro Arg Ala Pro Lys Thr

1 5 10

<210> 10

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD47 binding part VK

<400> 10

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 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser 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 Gln Gln Met His Pro Arg Ala Pro
 85 90 95
 Lys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 11
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CD47 binding part light chain (VKCK; K2)
 <400> 11
 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 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser 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 Gln Gln Met His Pro Arg Ala Pro
 85 90 95
 Lys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 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> 12

<211> 648

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD47 binding part light chain (VKCK; nucleic acid); (K2)

<400> 12

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcaactgcc gggcaagtc gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcagcag atgcacccgc ggcceccgaa gaccttcggc 300

caagggacca aggtggaaat caaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtactcc 480

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctcg 540

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgttaa 648

<210> 13

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD47 binding part constant light chain kappa (CK)

<400> 13

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

1 5 10 15

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

20 25 30
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 14

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEACAM5 binding part AC82 CDRL1;

<400> 14

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Tyr Gly Leu Val Ser
 1 5 10

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEACAM5 binding part AC82 CDRL2

<400> 15

Gly Ile Asn Lys Arg Pro Ser
 1 5

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEACAM5 binding part AC82 CDRL3

<400> 16

Gly Thr Trp Asp Phe Ser Tyr Arg Val Asp

1 5 10

<210> 17

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEACAM5 binding part AC84 CDRL1

<400> 17

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ile Gly Leu Val Ser

1 5 10

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEACAM5 binding part AC84 CDRL2

<400> 18

Asn Val Asn Thr Arg Pro Ser

1 5

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEACAM5 binding part AC84 CDRL3

<400> 19

Gly Thr Trp Asp Phe Ser Tyr Arg Val Asp

1 5 10

<210> 20

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEACAM5 binding part AC91 CDRL1

<400> 20

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ile Gly Leu Val Ser

1 5 10

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEACAM5 binding part AC91 CDRL2

<400> 21

Thr Val Asn Asn Arg Pro Ser

1 5

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEACAM5 binding part AC91 CDRL3

<400> 22

Gly Thr Phe Asp Phe Ser Tyr Gly Ile Val

1 5 10

<210> 23

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEACAM5 binding part AC100 CDRL1

<400> 23

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Tyr Gly Leu Val Ser

1 5 10

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEACAM5 binding part AC100 CDRL2

<400> 24

Asn Gly Asn Ile Arg Pro Ser

1 5
<210> 25
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CEACAM5 binding part AC100 CDRL3
<400> 25

Gly Thr Trp Asp Phe Ser Tyr Arg Val Asp

1 5 10
<210> 26
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CEACAM5 binding part AC117 CDRL1
<400>

26

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ile Gly Leu Val Ser

1 5 10
<210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CEACAM5 binding part AC117 CDRL2
<400> 27

Asn Gly Asn Val Arg Pro Ser

1 5
<210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CEACAM5 binding part AC117 CDRL3
<400> 28

Gly Thr Trp Asp Phe Ser Tyr Arg Val Asp

1 5 10
<210>

> 29

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEACAM5 binding part AC22 CDRL1

<400> 29

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Ala Asn Gly Ile Val Ser

1 5 10

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEACAM5 binding part AC22 CDRL2

<400> 30

Phe Asp Asn Leu Arg Pro Ser

1 5

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEACAM5 binding part AC22 CDRL3

<400> 31

Gly Thr Trp Asp Phe Ser Tyr Gly Ile Val

1 5 10

<210> 32

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEACAM5 binding part AC82 VL

<400> 32

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ile Tyr Gly Ile Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln

65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Phe Ser Tyr

85 90 95

Arg Val Asp Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 33

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEACAM5 binding part AC84 VL

<400> 33

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

1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ile Gly

20 25 30

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

35 40 45

Ile Tyr Asn Val Asn Thr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln

65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Phe Ser Tyr

85 90 95

Arg Val Asp Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210>

34

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEACAM5 binding part AC91 VL

<400> 34

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

1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ile Gly

 20 25 30

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

 35 40 45

Ile Tyr Thr Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln

65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Phe Asp Phe Ser Tyr

 85 90 95

Gly Ile Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

 100 105

<210>

35

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEACAM5 binding part AC100 VL

<400> 35

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

Ile Tyr Asn Gly Asn Ile Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

<400> 37

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

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

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

 Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
 180 185 190
 Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr
 195 200 205
 Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 38

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEACAM5 binding part AC84 VLCL

<400> 38

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

1 5 10 15
Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ile Gly

 20 25 30
Leu Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

 35 40 45
Ile Tyr Asn Val Asn Thr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

 50 55 60
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln

65 70 75 80
Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Phe Ser Tyr

 85 90 95
Arg Val Asp Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro

 100 105 110
Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu

 115 120 125
Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro

 130 135 140
Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala

145 150 155 160
Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala

 165 170 175
Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg

 180 185 190
Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr

 195 200 205
Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

 210 215

<210> 39

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEACAM5 binding part AC91 VLCL

<400> 39

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

1 5 10 15

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ile Gly

 20 25 30

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

 35 40 45

Ile Tyr Thr Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln

65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Phe Asp Phe Ser Tyr

 85 90 95

Gly Ile Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro

 100 105 110

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

 115 120 125

Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro

 130 135 140

Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala

145 150 155 160

Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala

 165 170 175

Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg

 180 185 190

Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr

 195 200 205

Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210 215

<210> 40

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEACAM5 binding part AC100 VLCL

<400> 40

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ile Tyr Asn Gly Asn Ile Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln

65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Phe Ser Tyr

85 90 95

Arg Val Asp Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro

100 105 110

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

115 120 125

Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro

130 135 140

Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala

145 150 155 160

Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala

165 170 175

Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg

145 150 155 160
 Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala

 165 170 175
 Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg

 180 185 190
 Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr

 195 200 205
 Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

 210 215

<210> 43

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VK_SM3E

<400> 43

Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Val Gly

1 5 10 15
 Asp Arg Val Asn Ile Ala Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met

 20 25 30
 His Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

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

 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro Glu

65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Leu Thr

 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

 100 105

<210> 44

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH_SM3E

<400> 44

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Ser
 20 25 30

Tyr Met His Trp Leu Arg Gln Gly Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

Gln Gly Lys Ala Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Asn Glu Gly Thr Pro Thr Gly Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 45

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 45

gtctgaagca ttatgtgttg aagc

24

<210

> 46

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 46

gtgagtacat tcattgtact gtg	23
<210> 47	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 47	
ttgtgtgact cttactctc agag	24
<210> 48	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 48	
gaggccactt gtgtagcgc aagtg	25
<210> 49	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 49	
gtgagtccat ggctgtcact g	21
<210> 50	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 50	
cctgacttgg ctattctcag	20