



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0029158
(43) 공개일자 2021년03월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/30 (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 10-2020-7037421
(22) 출원일자(국제) 2019년05월31일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2020년12월24일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2019/054559
(87) 국제공개번호 WO 2019/234576
국제공개일자 2019년12월12일
(30) 우선권주장
18175655.2 2018년06월03일
유럽특허청(EPO)(EP)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
람카프 바이오 베타 엘티디.
스위스 8808 슈비츠 페피콘 반호프스트라체 1
(72) 발명자
부아토이스 바네쎄
프랑스 74270 콩테민-사르장 헤민 데 라 클루나츠
32디
마조치 사라
스위스 1212 그랜드 랜시 헤민 데 소스-보아 3
스트레인 클라우스
독일 69469 바인하임 파노라마슈트라체 14
(74) 대리인
김진희, 김태홍

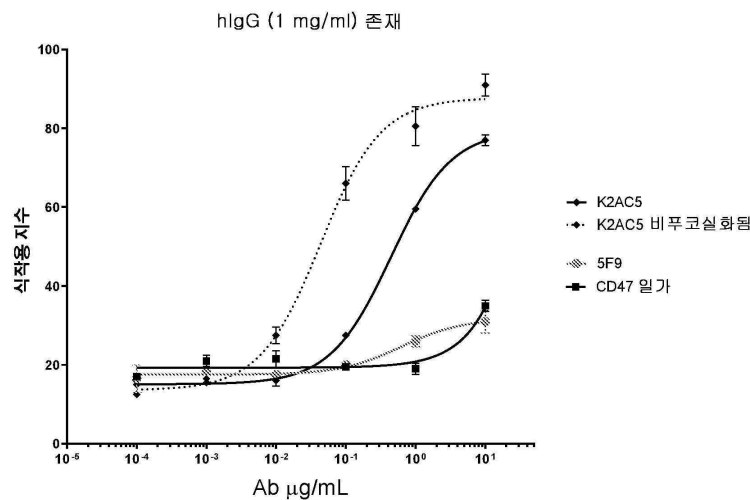
전체 청구항 수 : 총 199 항

(54) 발명의 명칭 CEACAM5 및 CD47에 대한 이중특이성 항체

(57) 요약

본 발명은 인간 암배아 항원 CEACAM5 및 인간 CD47에 결합하는 이중특이성 항체, 그러한 이중특이성 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 및 그러한 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터 및 숙주 세포를 제공한다. 본 발명은 그러한 항체를 선별 및 생성하기 위한 방법 및 질병 면역요법의 치료에 그러한 항체를 이용하는 방법도 아울러 추가로 제공한다.

대표도 - 도16a



(52) CPC특허분류

C07K 16/2803 (2013.01)
C07K 16/2809 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/41 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2317/732 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

(30) 우선권주장

18175656.0 2018년06월03일
유럽특허청(EPO)(EP)
18175657.8 2018년06월03일
유럽특허청(EPO)(EP)
18175658.6 2018년06월03일
유럽특허청(EPO)(EP)
18188788.6 2018년08월13일
유럽특허청(EPO)(EP)
18188790.2 2018년08월13일
유럽특허청(EPO)(EP)
18188792.8 2018년08월13일
유럽특허청(EPO)(EP)
18190983.9 2018년08월27일
유럽특허청(EPO)(EP)

명세서

청구범위

청구항 1

인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제1 결합부 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 제2 결합부를 포함하는 이중특이성 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체는, 당조작되지 않은 동일한 이중특이성 항체와 비교하여 감소된 수의 푸코오스 잔기를 보유하도록 당조작된(glycoengineered) Fc 영역을 포함하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제1 결합부는 인간 CEACAM5 및 CEACAM6에 특이적으로 결합하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 4

제3항에 있어서, 제1 결합부는 인간 CEACAM5 및 인간 CEACAM6에 균형을 이룬 방식으로 특이적으로 결합하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 5

제4항에 있어서, 인간 CEACAM5 및 인간 CEACAM6에 대한 결합의 EC50 값이 3배 미만으로 상이한 (균형을 이룬 결합) 것인 이중특이성 항체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

a) 제1 결합부는 CDR로서 서열 번호: 25의 CDRH1, 서열 번호: 26의 CDRH2 및 서열 번호: 27의 CDRH3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 CDR로서 서열 번호: 112의 CDRL1, 서열 번호: 113의 CDRL2, 및 서열 번호: 114의 CDRL3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,

b) 제2 결합부는 CDR로서 서열 번호: 25의 CDRH1, 서열 번호: 26의 CDRH2 및 서열 번호: 27의 CDRH3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 CDR로서 서열 번호: 28의 CDRL1, 서열 번호: 29의 CDRL2, 및 서열 번호: 30의 CDRL3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 결합부는 아미노산 35 - 144의 CEACAM5의 Ig 유사 V 타입 도메인에 결합하는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중특이성 항체는, CEACAM5에 대한 결합에 대해, VK 및 VH 도메인으로서 서열 번호: 100 및 101의 서열의 VK 및 VH를 포함하는 항CEACAM5 항체 SM3E와 경쟁하는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중특이성 항체는, CEACAM5에 대한 결합에 대해, 항CEACAM5 항체 SM3E, VL 및 VH 도메인으로서 서열 번호: 102 및 103의 서열의 VL 및 VH를 포함하는 MEDI, VK 및 VH 도메인으로서 서열 번호: 110 및 111의 서열의 VK 및 VH를 포함하는 라베투주맵(Lab), VK 및 VH 도메인으로서 서열 번호: 104 및 105의 서열의 VK 및 VH를 포함하는 SAR, VK 및 VH 도메인으로서 서열 번호: 108 및 109의 서열의

VK 및 VH를 포함하는 T86.66, VK 및 VH 도메인으로서 서열 번호: 106 및 107의 서열의 VK 및 VH를 포함하는 CH1A1A 중 어느 것과 경쟁하지 않는 것인 이중특이성 항체.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중특이성 항체의 식작용 지수 곡선의 EC50 값이, 동일한 실험 조건 하에서 그리고 1 mg/ml의 인간 IgG의 존재 하에서 참조 항체 K2AC22의 E50 값의 0.1 내지 3배의 범위에 있는 것인 이중특이성 항체.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중특이성 항체의 MKN45 세포의 식작용의 EC50 값이, 동일한 실험 조건 하에서 그리고 1 mg/ml의 인간 IgG의 존재 하에서 참조 항체 K2AC22의 E50 값의 0.1 내지 10배의 범위에 있는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 1 mg/ml의 인간 IgG의 존재 하에서 이미징 기반 어세이에서 측정된 식작용 지수의 최대값이, 인간 IgG가 존재하지 않는 동일한 실험 조건 하에서의 식작용과 비교하여 0.7배를 초과하여 감소되지 않는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.

청구항 13

제10항에 있어서, EC50 범위가 0.2 내지 3.0, 0.3 내지 3.0, 0.5 내지 2.5 또는 1.0 내지 2.5인 이중특이성 항체.

청구항 14

제10항 또는 제11항에 있어서, 식작용의 EC50 값이 식작용 지수 곡선의 EC50 값으로서 측정되는 것인 이중특이성 항체.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 1 mg/ml의 인간 IgG의 존재 하에서 상기 이중특이성 항체의 최대 식작용 지수가, 동일한 실험 조건 하에서 그리고 인간 IgG를 첨가하지 않고 측정된 최대 식작용 지수와 비교하여 7배 초과하여 감소되지 않는 것인 이중특이성 항체.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

- a) 제1 결합부는 서열 번호: 1의 CDRH1, 서열 번호: 2의 CDRH2 및 서열 번호: 3의 CDRH3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 인간 람다 타입 및 서열 번호: 13의 경쇄 불변 도메인을 포함하고, 제2 결합부는 서열 번호: 1의 CDRH1, 서열 번호: 2의 CDRH2 및 서열 번호: 3의 CDRH3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 7의 CDRL1, 서열 번호: 8 내에 포함된 Ala Ala Ser의 CDRL2, 및 서열 번호: 9의 CDRL3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하거나, 또는
- b) 제1 결합부는 CDR로서 서열 번호: 25의 CDRH1, 서열 번호: 26의 CDRH2 및 서열 번호: 27의 CDRH3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 인간 람다 타입 및 서열 번호: 13의 경쇄 불변 도메인을 포함하고, 제2 결합부는 CDR로서 서열 번호: 25의 CDRH1, 서열 번호: 26의 CDRH2 및 서열 번호: 27의 CDRH3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 28의 CDRL1, 서열 번호: 29의 CDRL2, 및 서열 번호: 30의 CDRL3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 17

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

- a) 제1 결합부는 CDR로서 서열 번호: 25의 CDRH1, 서열 번호: 26의 CDRH2 및 서열 번호: 27의 CDRH3를 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

서열 번호: 31, 32 및 33; 서열 번호: 34, 35, 및 36, 서열 번호: 37, 38, 및 39, 서열 번호: 40, 41, 및 42, 서열 번호: 43, 44, 및 45, 서열 번호: 46, 47, 및 48, 서열 번호: 49, 50, 및 51, 서열 번호: 52, 53, 및 54, 서열 번호: 55, 56, 및 57, 서열 번호: 58, 59, 및 60, 서열 번호: 61, 62, 및 63, 서열 번호: 112, 113, 및 114로 구성되는 군으로부터 선택된 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3의 조합을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,

b) 제2 결합부는 CDR로서 서열 번호: 25의 CDRH1, 서열 번호: 26의 CDRH2 및 서열 번호: 27의 CDRH3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 CDR로서 서열 번호: 28의 CDRL1, 서열 번호: 29의 CDRL2, 및 서열 번호: 30의 CDRL3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 18

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 결합부 내에 경쇄 불변 도메인으로서 서열 번호: 13의 인간 램다 타입 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.

청구항 19

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

a) 제1 결합부는 서열 번호: 4의 중쇄 가변 영역(VH), 및 서열 번호: 64, 서열 번호: 65, 서열 번호: 66, 서열 번호: 67, 서열 번호: 68, 서열 번호: 69, 서열 번호: 70, 서열 번호: 71, 서열 번호: 72, 서열 번호: 73, 서열 번호: 74, 및 서열 번호: 115로 구성되는 VLCL 영역 내에 포함되는 VL의 군으로부터 선택된 경쇄 가변 영역을 포함하고,

b) 제2 결합부는 서열 번호: 4의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 10의 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 20

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

a) 제1 결합부는 서열 번호: 5의 중쇄, 및 서열 번호: 64, 서열 번호: 65, 서열 번호: 66, 서열 번호: 67, 서열 번호: 68, 서열 번호: 69, 서열 번호: 70, 서열 번호: 71, 서열 번호: 72, 서열 번호: 73, 서열 번호: 74, 및 서열 번호: 115로 구성되는 군으로부터 선택된 경쇄를 포함하고,

b) 제2 결합부는 서열 번호: 5의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 11의 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 제1 결합부에 대해 일가이고, 제2 결합부에 대해 일가인 이중특이성 항체.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 불변 및 가변 프레임워크 영역 서열은 인간인 이중특이성 항체.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제2 결합부 각각은 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 포함하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 항체는 인간 IgG1 타입인 이중특이성 항체.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이성 항체는 전장 항체인 이중특이성 항체.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, CEACAM5에 특이적으로 결합하는 상기 제1 결합부는 카파 경쇄 가변 도메인 및 람다 경쇄 불변 도메인을 포함하고, CD47에 특이적으로 결합하는 상기 제2 결합부는 카파 경쇄 가변 도메인 및 카파 경쇄 불변 도메인을 포함하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 27

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, CEACAM5에 특이적인 상기 제1 결합부는 람다 경쇄 가변 도메인 및 람다 경쇄 불변 도메인을 포함하고, CD47에 특이적인 상기 제2 결합부는 카파 경쇄 가변 도메인 및 카파 경쇄 불변 도메인을 포함하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이성 항체는 완전 인간 이중특이성 IgG1 포맷인 이중특이성 항체.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중특이성 항체는 타입 1 또는 타입 2의 $\kappa\lambda$ 이중특이성 항체이고, 공통 중쇄(cHC)를 포함하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 100 nM 내지 600 nM의 결합 친화성으로 인간 CD47에 결합하는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중특이성 항체는 1 내지 200 nM의 EC50 값으로 MKN-45 세포에 결합하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 이중특이성 항체는 1 내지 50 nM의 EC50 값으로 MKN-45 세포에 결합하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 33

제31항에 있어서, 상기 이중특이성 항체는 50 내지 100 nM의 EC50 값으로 MKN-45 세포에 결합하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 34

제31항에 있어서, 상기 이중특이성 항체는 100 내지 200 nM의 EC50 값으로 MKN-45 세포에 결합하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 마크로파지의 존재 하에서 상기 이중특이성 항체에 의한 MKN-45 세포의 식작용 지수 곡선에 대한 EC50이, 가용성 CEACAM5의 부재 하에서 측정된 EC50과 비교하여 200 ng/ml의 가용성 CEACAM5의 존재 하에서 더 높은 농도를 향해 4배 초과하여 이동되지 않고/않거나, 식작용 지수 곡선의 최대값이 200 ng/mL의 CEACAM5의 첨가에 의해 10% 이상, 15% 이상, 또는 20% 이상 감소되지 않는 것인 이중특이성 항체.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중특이성 항체의 MKN-45 세포에 대한 결합 곡선에 대한 EC50이, 가용성 CEACAM5의 부재 하에서 측정된 EC50과 비교하여 200 ng/ml의 가용성 CEACAM5의 존재 하에서 더 높은 농도를 향해 2배 초과하여 이동되지 않는 것인 이중특이성 항체.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이성 항체는 인간 CEACAM1과 교차반응하지 않는 것인 이중특이성 항체.

청구항 38

제3항에 있어서, 상기 이중특이성 항체는 재조합 CHO 세포 CHO-K1(ATCC® CCL-61™) 상에서 발현되는 인간 CEACAM6에 1 내지 50 nM의 EC50 값으로 결합하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 39

제38항에 있어서, CEACAM6 음성 CHO 세포는 인간 CEACAM6의 cDNA를 함유하는 벡터로 형질감염되는 것인 이중특이성 항체.

청구항 40

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 300 nM의 농도에서, 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하고, 서열 번호: 20의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 21의 경쇄 가변 영역을 포함하는 모노클로날 항체가, MKN-45 세포에 대한 CEACAM5xCD47 이중특이성 항체의 결합 곡선의 EC50을 더 높은 농도를 향해 3배 초과하여 이동시키지 않는 것인 이중특이성 항체.

청구항 41

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 300 nM의 농도에서, 인간 CEACAM5 및 CD3ε에 특이적으로 결합하고, 중쇄로서 서열 번호: 97 및 98의 중쇄 및 경쇄로서 서열 번호: 96 및 99의 경쇄를 포함하는 이중특이성 항체가, MKN-45 세포에 대한 CEACAM5xCD47 이중특이성 항체의 결합 곡선의 EC50을 더 높은 농도를 향해 3배 초과하여 이동시키지 않는 것인 이중특이성 항체.

청구항 42

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 30 nM의 농도에서, 인간 CEACAM5 및 CD3ε에 특이적으로 결합하고, 중쇄 및 경쇄로서 서열 번호: 92 내지 95의 아미노산 서열을 포함하는 이중특이성 항체가, MKN-45 세포에 대한 CEACAM5xCD47 이중특이성 항체의 결합 곡선의 EC50을 더 높은 농도를 향해 3배 초과하여 이동시키지 않는 것인 이중특이성 항체.

청구항 43

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 30 nM의 농도에서, 인간 CEACAM5 및 CD3ε에 특이적으로 결합하고, 중쇄 및 경쇄로서 서열 번호: 92 내지 95의 아미노산 서열의 쇄를 포함하는 이중특이성 항체가, MKN-45 세포에 대한 CEAxCD47 이중특이성 항체의 식작용 지수 곡선의 EC50을 더 높은 농도를 향해 3배 초과하여 이동시키지 않는 것인 이중특이성 항체.

청구항 44

제1항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 300 nM의 농도에서, 인간 CEACAM5 및 CD3ε에 특이적으로 결합하고, 중쇄 및 경쇄로서 서열 번호: 96 내지 99의 아미노산 서열을 포함하는 이중특이성 항체가, MKN-45 세포에 대한 CEACAM5xCD47 이중특이성 항체의 식작용 지수 곡선의 EC50을 더 높은 농도를 향해 3배 초과하여 이동시키지 않는 것인 이중특이성 항체.

청구항 45

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 결합부의 중쇄로서 그리고 제2 결합부의 중쇄로서 공통 중쇄 (cHC)를 포함하는 이중특이성 항체.

청구항 46

제45항에 있어서, 각각의 결합부의 상기 공통 중쇄는 CDR로서 서열 번호: 1의 CDRH1, 서열 번호: 2의 CDRH2 및

서열 번호: 3의 CDRH3 또는 서열 번호: 25의 CDRH1, 서열 번호: 26의 CDRH2 및 서열 번호: 27의 CDRH3를 포함하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 47

제45항에 있어서, 각각의 결합부의 상기 공통 중쇄는 공통 가변 중쇄 도메인(cVH)으로서 서열 번호: 4를 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.

청구항 48

제45항에 있어서, 서열 번호: 5, 서열 번호: 23, 및 서열 번호: 24로 구성되는 군으로부터 선택된 공통 중쇄(cHC)를 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.

청구항 49

제48항에 있어서, 서열 번호: 5의 공통 중쇄는 서열 번호: 6에 나타난 핵산 서열에 의해 코딩되는 것인 이중특이성 항체.

청구항 50

제1항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 결합부는 CDR로서 서열 번호: 1의 CDRH1, 서열 번호: 2의 CDRH2 및 서열 번호: 3의 CDRH3를 포함하는 공통 중쇄 및 CDR로서 서열 번호: 7의 CDRL1, 서열 번호: 8 내에 포함된 Ala Ala Ser의 CDRL2, 및 서열 번호: 9의 CDRL3를 포함하는 경쇄(LC), 또는 CDR로서 서열 번호: 25의 CDRH1, 서열 번호: 26의 CDRH2 및 서열 번호: 27의 CDRH3를 포함하는 공통 중쇄 및 CDR로서 서열 번호: 28의 CDRL1, 서열 번호: 29의 CDRL2, 및 서열 번호: 30의 CDRL3를 포함하는 경쇄(LC)를 포함하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 51

제1항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 결합부는 가변 중쇄 도메인(cVH)으로서 서열 번호: 4를 포함하는 중쇄 및 서열 번호: 10의 가변 경쇄 도메인(VL)을 포함하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 52

제1항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 결합부는 서열 번호: 5의 중쇄(cHC) 및 서열 번호: 11의 경쇄(CL)를 포함하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 53

제1항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 결합부는 서열 번호: 23의 중쇄(cHC) 및 서열 번호: 11의 경쇄(CL)를 포함하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 54

제1항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 결합부는 서열 번호: 24의 중쇄(cHC) 및 서열 번호: 11의 경쇄(CL)를 포함하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 55

제52항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호: 11의 경쇄(CL)는 서열 번호: 12에 나타난 핵산 서열에 의해 코딩되는 것인 이중특이성 항체.

청구항 56

제1항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중특이성 항체는 CEACAM5에 특이적으로 결합하고, 서열 번호: 13의 경쇄 불변 도메인을 포함하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 57

제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중특이성 항체는 0.1 내지 10 nM의 IC50으로 MKN-45 세포

상에서 CD47(SIRP α , CD172a; UniProtKB P78324) 간의 상호작용을 억제하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 58

제1항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 마크로파지에 의한 CEACAM5 발현 종양 세포주 MKN-45의 식작용 지수 곡선(이미징 기반 어세이)의 10 nM 미만의 EC50 값을 특징으로 하는 이중특이성 항체.

청구항 59

제1항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중특이성 항체는 CEACAM5에 특이적으로 결합하지만, MKN-45 종양 세포 상에서 CEACAM5에 대한 결합에 대해 MAB CEA, CEA-TCB 또는 CEA-TCB1과 경쟁하지 않는 것인 이중특이성 항체.

청구항 60

제1항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, MKN-45 세포에 대한 결합에 대한 EC50 값(1 내지 200 nM의 EC50)은 300 nM 농도의 MAB CEA 또는 CEA-TCB의 존재 하에서 또는 30 nM 농도의 CEA-TCB1의 존재 하에서 3배 미만으로 증가되는 것인 이중특이성 항체.

청구항 61

제1항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이성 항체는 B6H12.2를 이용하는 동일한 어세이로 측정된 EC50과 비교하여 RBC 식작용에 대해 100배 이상 더 높은 EC50을 보유하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 62

제1항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이성 항체는 최대 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 유의미한 혈소판 활성화를 나타내지 않는 것인 이중특이성 항체.

청구항 63

제1항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이성 항체는 변형된 올리고당을 갖는 Fc 영역을 보유하도록 당조작된 것인 이중특이성 항체.

청구항 64

제63항에 있어서, 당조작된 이중특이성 항체는, 동일한 실험 조건 하에서 측정되는 경우 당조작되지 않은 동일한 이중특이성 항체와 비교하여 이미징 기반 어세이에 의해 측정된 식작용 지수 곡선에 대해 적어도 3배 더 낮은 EC50 값을 보유하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 65

제64항에 있어서, 식작용 지수에 대한 EC50은 5 내지 10배 더 낮거나 또는 10 내지 30배 더 낮은 것인 이중특이성 항체.

청구항 66

제1항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이성 항체는, 당조작되지 않은 이중특이성 항체와 비교하여 감소된 수의 푸코오스 잔기를 보유하도록 변형된 Fc 영역을 보유하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 67

제1항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이성 항체는, 당조작되지 않은 이중특이성 항체와 비교하여 증가된 비율의 양분된 올리고당을 보유하도록 당조작된 Fc 영역을 보유하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 68

제69항에 있어서, 양분된 올리고당은 주로 양분된 복합체인 이중특이성 항체.

청구항 69

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이성 항체는, 당조작되지 않은 이중특이성 항체와 비교하여 상기 이중특이성 항체의 Fc 영역 내에 증가된 비율의 양분된 비푸코실화된 올리고당을 보유하도록 당조작된 것인 이중특이성 항체.

청구항 70

제1항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이성 항체는, 당조작되지 않은 이중특이성 항체와 비교하여 Fc 영역 내에 GlcNAc 잔기 대 푸코오스 잔기의 증가된 비율을 보유하도록 당조작된 것인 이중특이성 항체.

청구항 71

제70항에 있어서, 상기 양분된 비푸코실화된 올리고당은 주로 하이브리드 형태인 이중특이성 항체.

청구항 72

제70항에 있어서, 상기 양분된 비푸코실화된 올리고당은 주로 복합체 타입인 이중특이성 항체.

청구항 73

제1항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중특이성 항체는, N-연결된 올리고당의 50% 내지 100%가 비푸코실화된 Fc 영역을 보유하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 74

제1항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중특이성 항체는, N-연결된 올리고당의 50% 내지 100%가 양분된 Fc 영역을 보유하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 75

제1항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중특이성 항체는, N-연결된 올리고당의 80% 내지 100%가 양분되고 비푸코실화된 Fc 영역을 보유하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 76

제1항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중특이성 항체는 당조작된 것이고, 상기 당조작된 항체에 의해 유도된 농도 ADCC 곡선(최대값 및/또는 EC50)은, 당조작되지 않은 동일한 이중특이성 항체에 의해 유도된 ADCC와 비교하여 적어도 1.2배 증가되는 것인 이중특이성 항체.

청구항 77

제76항에 있어서, ADCC 곡선의 EC50 값 및/또는 ADCC 최대값은 1.2 내지 2.0배 증가되는 것인 이중특이성 항체.

청구항 78

제2항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중특이성 항체는, 동일한 실험 조건 하에서 측정되는 경우, 당조작되지 않은 동일한 이중특이성 항체와 비교하여, 이미징 기반 어세이에 의해 측정된 식작용 지수 곡선에 대해 적어도 3배 더 낮은 EC50 값을 보유하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 79

제78항에 있어서, 식작용 지수에 대한 EC50은 5 내지 10배 더 낮은 것인 이중특이성 항체.

청구항 80

제78항에 있어서, 식작용 지수에 대한 EC50은 10 내지 30배 더 낮은 것인 이중특이성 항체.

청구항 81

제2항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 당조작된 항체에 의해 유도된 유세포분석으로 결정된 최대 ADCP 기능은, 당조작되지 않은 동일한 이중특이성 항체에 의해 유도된 ADCP와 비교하여 적어도 1.2배 증가되는 것인 이중특이성 항체.

청구항 82

제80항에 있어서, ADCP는 1.2 내지 2.0배 증가되는 것인 이중특이성 항체.

청구항 83

제1항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 단일 치환 S239D, I332E, G236A, 이중 치환 I332E 및 G236A, S239D 및 I332E, S239D 및 G236A, 및 삼중 치환 S329D 및 I332E 및 G236A로 구성되는 군으로부터 선택된, Fc 영역 내의 1개, 2개 또는 3개 아미노산 치환을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.

청구항 84

제83항에 있어서, 이중특이성 항체는, 당조작되지 않은 동일한 이중특이성 항체와 비교하여 감소된 수의 푸코오스 잔기를 보유하도록 당조작된 Fc 영역을 보유하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 85

제83항 또는 제84항에 있어서, 상기 아미노산 치환된 항체에 의해 유도된 ADCC 곡선의 EC50 값 및/또는 최대값은, Fc 영역 내에 상기 아미노산 치환 중 아무것도 포함하지 않는 이중특이성 항체에 의해 유도된 ADCC와 비교하여 적어도 1.2배 증가되는 것인 이중특이성 항체.

청구항 86

제85항에 있어서, ADCC는 1.2 내지 2.0배 증가되는 것인 이중특이성 항체.

청구항 87

제83항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 영역 내에 상기 치환을 포함하는 이중특이성 항체는, 동일한 실험 조건 하에서 측정되는 경우, Fc 영역 내에 상기 아미노산 치환을 아무것도 포함하지 않는 동일한 이중특이성 항체와 비교하여 이미징 기반 어세이에 의해 측정된 식작용 지수 곡선에 대해 적어도 3배 더 낮은 EC50 값을 보유하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 88

제87항에 있어서, 식작용 지수에 대한 EC50은 5 내지 10배 더 낮은 것인 이중특이성 항체.

청구항 89

제87항에 있어서, 식작용 지수에 대한 EC50은 10 내지 30배 더 낮은 것인 이중특이성 항체.

청구항 90

제83항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 영역 내에 상기 치환을 포함하는 이중특이성 항체는, 상기 아미노산 치환된 항체에 의해 유도된 유세포분석으로 결정된 최대 식작용이 Fc 영역 내에 상기 아미노산 치환을 아무것도 포함하지 않는 상기 항체에 의해 유도된 최대 식작용과 비교하여 적어도 1.2배 증가되는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.

청구항 91

제90항에 있어서, ADCP는 1.2 내지 2.0배 증가되는 것인 이중특이성 항체.

청구항 92

제83항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 영역 내에 상기 치환을 포함하는 이중특이성 항체는, 동일한 실험 조건 하에서 측정되는 경우, Fc 영역 내에 상기 아미노산 치환을 아무것도 포함하지 않는 동일한 이중특이성 항체와 비교하여 이미징 기반 어세이에 의해 측정된 식작용 지수 곡선에 대해 적어도 3배 더 낮은 EC50 값을 보유하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 93

제92항에 있어서, 식작용 지수에 대한 EC50 값은 5 내지 10배 더 낮은 것인 이중특이성 항체.

청구항 94

제2항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 영역 내의 N-연결된 올리고당의 50% 내지 100%, 60% 내지 100%, 70% 내지 100% 또는 80% 내지 100%가 비푸코실화된 것인 이중특이성 항체.

청구항 95

제2항 내지 제94항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 영역 내의 N-연결된 올리고당의 50% 내지 100%, 60% 내지 100%, 70% 내지 100% 또는 80% 내지 100%가 양분된 것인 이중특이성 항체.

청구항 96

제2항 내지 제95항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 영역 내의 N-연결된 올리고당의 50% 내지 100%, 60% 내지 100%, 70% 내지 100% 또는 80% 내지 100%가 양분되고, 비푸코실화된 것인 이중특이성 항체.

청구항 97

제2항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서, 당조작된 이중특이성 항체는, 공통 중쇄로서 서열 번호: 5를 포함하는 당조작되지 않은 이중특이성 항체와 비교하여 증가된 이펙터 기능을 포함하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 98

제97항에 있어서, 이중특이성 항체는 하기 이펙터 기능 중 하나 이상의 증가를 나타내는 것인 이중특이성 항체:

- a. Fc γ R에 대한 증가된 결합 친화성,
- b. 증가된 항체 의존성 세포성 식작용(ADCP)을 포함하는, 매크로파지의 증가된 결합,
- c. 증가된 항체 매개성 세포성 세포독성(ADCC)을 포함하는, NK 세포의 증가된 결합, 및
- d. 단핵구에 대한 증가된 결합.

청구항 99

제1항 내지 제98항 중 어느 한 항에 있어서, 이미징 기반 식작용 어세이에 대한 1 mg/mL의 hu IgG의 첨가는, 농도/식작용 지수 곡선의 최대값의 0.9배 미만의 감소 및/또는 더 높은 농도를 향해 EC50의 3배 미만의 이동을 야기하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 100

제1항 내지 제99항 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이성 항체는 시노물구스 원숭이 CEACAM5와 교차반응하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 101

제1항 내지 제100항 중 어느 한 항에 따른 이중특이성 항체를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 102

제101항의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 103

제102항의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 104

본 발명에 따른 이중특이성 항체의 제조 방법으로서,

- a) 상기 이중특이성 항체의 생성을 허용하는 조건 하에서 제103항의 숙주 세포를 배양하는 단계, 및

b) 상기 항체를 단리하는 단계
를 포함하는 방법.

청구항 105

제104항에 있어서, 상기 항체는 CEACAM5 및 CD47에 특이적으로 결합할 수 있는 것인 방법.

청구항 106

제2항 내지 제100항 중 어느 한 항의 당조작된 이중특이성 항체의 제조 방법으로서,

- a) 상기 이중특이성 항체의 생성을 허용하고, 상기 이중특이성 항체의 Fc 영역 상에 존재하는 올리고당의 변형을 허용하는 조건 하에서, $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코사미트르랜스퍼라아제 III 활성을 보유하는 폴리펩타이드를 코딩하는 적어도 하나의 핵산을 발현하도록 당조작된 숙주 세포를 배양하는 단계, 및
- b) 상기 당조작된 이중특이성 항체를 단리하는 단계로서, 상기 당조작된 이중특이성 항체가 CEACAM5 및 CD47에 특이적으로 결합할 수 있는 것인 단계
를 포함하는 방법.

청구항 107

숙주 세포에서 제2항 내지 제100항 중 어느 한 항의 당조작된 이중특이성 항체의 제조 방법으로서,

- a) 상기 이중특이성 항체의 생성을 허용하고, 상기 이중특이성 항체의 Fc 영역 상에 존재하는 올리고당의 변형을 허용하는 조건 하에서, FUT8 유전자의 타겟팅된 파괴에 의해 당조작된 숙주 세포를 배양하는 단계, 및
- b) 상기 당조작된 이중특이성 항체를 단리하는 단계로서, 상기 당조작된 이중특이성 항체가 CEACAM5 및 CD47에 특이적으로 결합할 수 있는 것인 단계
를 포함하는 방법.

청구항 108

숙주 세포에서 제83항 내지 제93항 중 어느 한 항의 Fc 치환된 이중특이성 항체의 제조 방법으로서,

- a) 상기 이중특이성 항체의 생성을 허용하는 조건 하에서 Fc 치환된 이중특이성 항체를 코딩하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계, 및
- b) 상기 Fc 치환된 이중특이성 항체를 단리하는 단계로서, 상기 이중특이성 항체가 CEACAM5 및 CD47에 특이적으로 결합할 수 있는 것인 단계
를 포함하는 방법.

청구항 109

종양 세포와 제1항 내지 제100항 중 어느 한 항의 이중특이성 항체를 접촉시키는 단계를 포함하는, 종양 세포의 세포 용해를 유도하는 방법.

청구항 110

제109항에 있어서, 종양 세포는 인간 종양 세포인 방법.

청구항 111

제109항 또는 제110항에 있어서, 종양 세포는 환자에 있는 것인 방법.

청구항 112

제109항 내지 제111항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 세포는 대장암 세포, NSCLC(비소세포 폐암) 세포, 위암 세포, 췌장암 세포, 유방암 세포, 또는 CEACAM5를 발현하는 다른 종양 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 113

CEACAM5를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료 방법으로서, 대상체에게 제1항 내지 제100항 중 어느 한 항의 이중특이성 항체의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 114

CEACAM5를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 생존 기간을 증가시키는 방법으로서, 상기 대상체에게 제1항 내지 제100항 중 어느 한 항의 이중특이성 항체의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 115

제113항 또는 제114항에 있어서, 암은 대장암, 비소세포 폐암(NSCLC), 위암, 췌장암 또는 유방암인 방법.

청구항 116

제109항 내지 제115항 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이성 항체는 화학요법 및/또는 방사선요법과 함께 인간 대상체에게 투여되는 것인 방법.

청구항 117

CEACAM5를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료 방법으로서, 대상체에게 제1항 내지 제100항 중 어느 한 항의 이중특이성 항체의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함하고, 상기 이중특이성 항체의 식작용의 EC50 값이, 동일한 실험 조건 하에서 그리고 1 mg/ml의 인간 IgG의 존재 하에서, 참조 항체 K2AC22의 E50 값의 0.1 내지 3배 범위에 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 118

제117항에 있어서, EC50 범위는 0.2 내지 3.0, 0.3 내지 3.0, 0.5 내지 2.5 또는 1.0 내지 2.5인 방법.

청구항 119

제109항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이성 항체는 100 nM 내지 600 nM의 결합 친화성으로 인간 CD47에 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 120

제1항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서, CEACAM5를 발현하는 암을 보유하는 대상체를 치료하는 방법에서의 용도를 위한 이중특이성 항체로서, 상기 방법은 대상체에게 본 발명에 따른 이중특이성 항체의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함하고, 상기 이중특이성 항체의 식작용의 EC50 값이, 동일한 실험 조건 하에서 그리고 1 mg/ml의 인간 IgG의 존재 하에서, 참조 항체 K2AC22의 EC50의 0.1 내지 3배 범위에 있는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.

청구항 121

제120항에 있어서, EC50 범위가 0.2 내지 3.0, 0.3 내지 3.0, 0.5 내지 2.5 또는 1.0 내지 2.5인 이중특이성 항체.

청구항 122

제120항 또는 제121항에 있어서, 이중특이성 항체가 100 nM 내지 600 nM의 결합 친화성으로 인간 CD47에 결합하는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.

청구항 123

CEACAM5를 발현하는 암을 보유하는 대상체를 치료하기 위한 약제의 제조에서 제1항 내지 제100항 중 어느 한 항의 이중특이성 항체의 용도.

청구항 124

제123항에 있어서, 암은 대장암, 비소세포 폐암(NSCLC), 위암, 췌장암 및 유방암으로 구성되는 군으로부터 선택

되는 것인 용도.

청구항 125

제1항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서, CEACAM5를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료에서, 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제3 결합부, 및 인간 CD3ε에 특이적으로 결합하는 제4 결합부를 포함하는 제2 이중특이성 항체와 동시, 별도, 또는 순차적 조합으로 사용하기 위한 이중특이성 항체.

청구항 126

제1항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서, CEACAM5를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료를 위해, 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제3 결합부, 및 인간 CD3ε의 에피토프에 특이적으로 결합하는 제4 결합부로서, 상기 에피토프가 서열 번호: 22의 아미노산 서열을 포함하는 제4 결합부를 포함하는 제2 이중특이성 항체와 동시, 별도, 또는 순차적 조합으로 사용하기 위한 이중특이성 항체.

청구항 127

제1항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서, CEACAM5를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료에서, CEA-TCB 및/또는 CEA-TCB1과 동시, 별도, 또는 순차적 조합으로 사용하기 위한 이중특이성 항체.

청구항 128

제1항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서, CEACAM5를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료를 위해, 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제3 결합부로서, 서열 번호: 20의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 21의 경쇄 가변 영역을 포함하는 제3 결합부, 및 인간 CD3ε의 에피토프에 특이적으로 결합하는 제4 결합부로서, 상기 에피토프가 서열 번호: 22의 아미노산 서열을 포함하는 제4 결합부를 포함하는 제2 이중특이성 항체와 동시, 별도, 또는 순차적 조합으로 사용하기 위한 이중특이성 항체.

청구항 129

제1항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서, CEACAM5를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료에서 제2 이중특이성 항체와 동시, 별도, 또는 순차적 조합으로 사용하기 위한 이중특이성 항체로서, 본 발명의 상기 이중특이성 항체는 상기 제2 이중특이성 항체와 경쟁하지 않는 것인 이중특이성 항체.

청구항 130

제1항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서, CEACAM5를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료에서 CEA-TCB 또는 CEA-TCB1과 동시, 별도, 또는 순차적 조합으로 사용하기 위한 이중특이성 항체로서, 이중특이성 항체는 CEA-TCB 또는 CEA-TCB1과 경쟁하지 않는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.

청구항 131

제1항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서, CEACAM5를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료에서 CEA-TCB 또는 CEA-TCB1과 동시, 별도, 또는 순차적 조합으로 사용하기 위한 이중특이성 항체로서, 이중특이성 항체는 CEA-TCB 또는 CEA-TCB1과 경쟁하는 것인 이중특이성 항체.

청구항 132

제1항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하고 서열 번호: 88의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 89의 경쇄 가변 영역을 포함하는 제3 결합부, 및 인간 CD3ε에 특이적으로 결합하고 서열 번호: 90의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 91의 경쇄 가변 영역을 포함하는 제4 결합부를 포함하는 제2 이중특이성 항체와 동시, 별도, 또는 순차적 조합으로 사용하기 위한 이중특이성 항체.

청구항 133

제125항 내지 제132항 중 어느 한 항에 있어서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체 및 제2 이중특이성 항체는 상기 대상체에게 6 내지 15일 간격으로 교대로 투여되는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.

청구항 134

제125항 내지 제132항 중 어느 한 항에 있어서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체 및 제2 이중특이성 항체는 상기 대상체에게 6 내지 15일 간격으로 동시에 투여되는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.

청구항 135

제1항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서, CEACAM5를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료에서 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하고 서열 번호: 20의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 21의 경쇄 가변 영역을 포함하는 제3 결합부 및 인간 CD3ε의 에피토프에 특이적으로 결합하고 서열 번호: 22의 아미노산 서열을 포함하는 제4 결합부를 포함하는 제2 이중특이성 항체와 동시, 별도, 또는 순차적 조합으로 사용하기 위한 이중특이성 항체로서, 300 nM 농도의 상기 제2 이중특이성 항체는 본 발명에 따른 이중특이성 항체의 MKN-45 세포에 대한 식작용 지수 곡선의 EC50의 EC50을 더 높은 농도를 향해 3배 초과하여 이동시키지 않는 것인 이중특이성 항체.

청구항 136

제1항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서, CEACAM5를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료에서 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하고 서열 번호: 88의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 89의 경쇄 가변 영역을 포함하는 제3 결합부 및 인간 CD3ε에 특이적으로 결합하고 서열 번호: 90의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 91의 경쇄 가변 영역을 포함하는 제4 결합부를 포함하는 제2 이중특이성 항체와 동시, 별도, 또는 순차적 조합으로 사용하기 위한 이중특이성 항체로서, 300 nM 농도의 상기 제2 이중특이성 항체는 본 발명에 따른 이중특이성 항체의 MKN-45 세포에 대한 결합 곡선의 EC50을 더 높은 농도를 향해 3배 초과하여 이동시키지 않는 것인 이중특이성 항체.

청구항 137

제1항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서, CEACAM5를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료에서 CEA-TCB 또는 CEA-TCB1과 동시, 별도, 또는 순차적 조합으로 사용하기 위한 이중특이성 항체로서, 300 nM 농도의 상기 CEA-TCB 또는 30 nM 농도의 CEA-TCB1은 본 발명에 따른 이중특이성 항체의 MKN-45 세포에 대한 결합 곡선의 EC50을 더 높은 농도를 향해 3배 초과하여 이동시키지 않는 것인 이중특이성 항체.

청구항 138

제125항 내지 제137항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 대장암, 비소세포 폐암(NSCLC), 위암, 췌장암 및 유방암인 이중특이성 항체.

청구항 139

제125항 내지 제138항 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이성 항체 및 제2 이중특이성 항체는, 예를 들어 MKN-45 종양 세포 및 동일한 인간 공여자로부터 유래한 인간 마크로파지 및 T 세포를 함유하는 어세이에서 종양 세포의 상가적인 사멸율%을 나타내는 것인 이중특이성 항체.

청구항 140

제125항 내지 제138항 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이성 항체 및 제2 이중특이성 항체는, 예를 들어 MKN-45 종양 세포 및 동일한 인간 공여자로부터 유래한 인간 마크로파지 및 T 세포를 함유하는 어세이에서 종양 세포의 상승적인 사멸율%를 나타내는 것인 이중특이성 항체.

청구항 141

CEACAM5를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료에 사용하기 위한 제1항 내지 제100항 중 어느 한 항의 이중특이성 항체를 포함하는 조성물로서, 이중특이성 항체는 제2 이중특이성 항체와 경쟁하지 않는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 142

제1항 내지 제100항 중 어느 한 항의 이중특이성 항체를 포함하는 조성물로서, 이중특이성 항체는 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하고 서열 번호: 20의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 21의 경쇄 가변 영역을 포함하는 제3 결합부, 및 인간 CD3ε의 에피토프에 특이적으로 결합하고 서열 번호: 22의 아미노산 서열을 포함하는 제4 결합부를 포함하는 제2 이중특이성 항체와 경쟁하지 않는 것을 특징으로 하고, 조성물은 CEACAM5를 발현하는 암을

보유하는 대상체의 치료에 사용하기 위한 것인 조성물.

청구항 143

제1항 내지 제100항 중 어느 한 항의 이중특이성 항체를 포함하는 조성물로서, 이중특이성 항체는 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하고 서열 번호: 88의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 89의 경쇄 가변 영역을 포함하는 제3 결합부, 및 인간 CD3ε에 특이적으로 결합하고 서열 번호: 90의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 91의 경쇄 가변 영역을 포함하는 제4 결합부를 포함하는 제2 이중특이성 항체와 경쟁하지 않는 것을 특징으로 하고, 조성물은 CEACAM5를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료에 사용하기 위한 것인 조성물.

청구항 144

제141항 내지 제143항 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이성 항체는 CEA-TCB 및/또는 CEA-TCB1과 경쟁하지 않는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 145

종양을 보유하는 인간 환자의 치료 방법으로서, 인간 환자에게 제1항 내지 제100항 중 어느 한 항의 CEACAM5xCD47 이중특이성 항체 및 CEACAM5 및 CD3에 대한 제2 이중특이성 항체의 유효량을 투여하는 단계를 포함하고, 후속적으로

- (i) 환자에게, 예를 들어 4 내지 12주에 걸쳐 매주, 상기 제2 항체CEACAM5xCD3 항체 0.1 내지 10 mg/kg, 추가의 실시양태에서 1.0 내지 20.0 mg/kg의 용량을 투여하는 단계,
 - (ii) 환자에게 상기 제2 항체를 q1, q2w, q3w 또는 경우에 따라 q4w로 투여하는 단계,
 - (iii) 이러한 4 내지 12주 후 및 상기 항체CEACAM5xCD3 항체의 추가적인 2 또는 3 또는 4 제거 반감기 후 환자에게 본 발명에 따른 항체 1 내지 20 mg/kg의 용량을 투여하는 단계,
 - (iv) 환자에게 본 발명에 따른 상기 항체를 q1, q2w, q3w 또는 경우에 따라 q4w로 투여하고, 상기 CEACAM5xCD47 이중특이성 항체의 2 또는 3 또는 4 제거 반감기를 기다리고, 그 후 경우에 따라 CEACAM5xCD3 이중특이성 항체의 상기 사이클을 반복하고, 그 후 CEACAM5xCD47 이중특이성 항체를 투여하고, 경우에 따라 그 사이클을 다시 반복하는 단계
- 를 포함하는 방법.

청구항 146

제145항에 있어서, 종양은 암인 방법.

청구항 147

제145항에 있어서, 종양은 고형 종양인 방법.

청구항 148

제146항에 있어서, 암은 CEACAM5를 발현하는 고형 암인 방법.

청구항 149

제146항 또는 제148항에 있어서, 암은 대장암, 비소세포 폐암(NSCLC), 위암, 췌장암 또는 유방암인 방법.

청구항 150

제145항 내지 제149항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 항체는 CEA-TCB인 방법.

청구항 151

제145항 내지 제149항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 항체는 CEA-TCB1인 방법.

청구항 152

제145항 내지 제151항 중 어느 한 항에 있어서, CEACAM5xCD47 이중특이성 항체 및 제2 이중특이성 항체는 경쟁적인 방법.

청구항 153

종양을 보유하는 인간 환자의 치료 방법으로서, 제1항 내지 제100항 중 어느 한 항의 CEACAM5xCD47 이중특이성 항체 및 CEACAM5 및 CD3에 대한 제2 이중특이성 항체의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 154

제153항에 있어서, CEACAM5xCD47 이중특이성 항체 및 CEACAM5 및 CD3 항체는 경쟁적이 아닌 것인 방법.

청구항 155

제153항 또는 제154항에 있어서, 항체는 동시에 투여되는 것인 방법.

청구항 156

제153항 내지 제155항 중 어느 한 항에 있어서, 환자는 0.01 내지 10 mg/kg의 CEACAM5xCD3 이중특이성 항체 및 1 내지 20 mg/kg의 CEACAM5xCD47 이중특이성 항체의 용량을 거의 동시에 투여받고, 그 후 q1w 또는 q2w 또는 q3w 또는 경우에 따라 q4w의 빈도로 이들 조합된 투여의 1회 이상을 실시받는 것인 방법.

청구항 157

제156항에 있어서, CEACAM5xCD3 이중특이성 항체는 0.5 내지 10 mg/kg으로 투여되는 것인 방법.

청구항 158

제153항 내지 제157항 중 어느 한 항에 있어서, 종양은 암인 방법.

청구항 159

제153항 내지 제158항 중 어느 한 항에 있어서, 종양은 고형 종양인 방법.

청구항 160

제158항에 있어서, 암은 CEACAM5를 발현하는 고형 암인 방법.

청구항 161

제158항 또는 제160항에 있어서, 암은 대장암, 비소세포 폐암(NSCLC), 위암, 췌장암 또는 유방암인 방법.

청구항 162

제153항 내지 제161항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 항체는 CEA-TCB인 방법.

청구항 163

제153항 내지 제161항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 항체는 CEA-TCB1인 방법.

청구항 164

제145항 내지 제163항 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이성 항체 및 제2 이중특이성 항체는 상가적인 효능을 나타내는 것인 방법.

청구항 165

제145항 내지 제163항 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이성 항체 및 제2 이중특이성 항체는 상승적인 효능을 나타내는 것인 방법.

청구항 166

제1항 내지 제100항 중 어느 한 항의 이중특이성 항체 및 약학적으로 허용 가능한 부형제 또는 담체를 포함하는

약학 조성물.

청구항 167

제166항에 있어서, 약제로서 사용하기 위한 약학 조성물.

청구항 168

제166항 또는 제167항에 있어서, 고형 종양 질환의 치료에서 약제로서 사용하기 위한 약학 조성물.

청구항 169

제166항 또는 제167항에 있어서, 대장암, NSCLC(비소세포 폐암), 위암, 췌장암 또는 유방암의 치료에서 약제로서 사용하기 위한 약학 조성물.

청구항 170

CEACAM5를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료에서 제2 이중특이성 항체와 동시, 별도, 또는 순차적 조합으로 사용하기 위한, 제1항 내지 제100항 중 어느 한 항의 제1 이중특이성 항체를 포함하는 약학 조성물로서, 상기 제2 이중특이성 항체는 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하고 서열 번호: 20의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 21의 경쇄 가변 영역을 포함하는 제3 결합부 및 인간 CD3 ϵ 의 에피토프에 특이적으로 결합하고 서열 번호: 22의 아미노산 서열을 포함하는 제4 결합부를 포함하고, 300 nM 농도의 상기 제2 이중특이성 항체는 제1 이중특이성 항체의 MKN-45 세포에 대한 결합 곡선의 EC50을 더 높은 농도를 향해 3배 초과하여 이동시키지 않는 것인 약학 조성물.

청구항 171

CEACAM5를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료에서 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하고 서열 번호: 88의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 89의 경쇄 가변 영역을 포함하는 제3 결합부 및 인간 CD3 ϵ 에 특이적으로 결합하고 서열 번호: 90의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 91의 경쇄 가변 영역을 포함하는 제4 결합부를 포함하는 제2 이중특이성 항체와 동시, 별도, 또는 순차적 조합으로 사용하기 위한 제1항 내지 제100항 중 어느 한 항의 제1 이중특이성 항체를 포함하는 약학 조성물로서, 30 nM 농도의 상기 제2 이중특이성 항체는 제1 이중특이성 항체의 MKN-45 세포에 대한 결합 곡선의 EC50을 더 높은 농도를 향해 3배 초과하여 이동시키지 않는 것인 약학 조성물.

청구항 172

제171항에 있어서, 제2 이중특이성 항체는 결합 곡선의 EC50을 더 높은 농도를 향해 3배 초과하여 이동시키지 않는 것인 약학 조성물.

청구항 173

제166항 내지 제172항 중 어느 한 항에 있어서, 암은 대장암, 비소세포 폐암(NSCLC), 위암, 췌장암, 또는 유방암인 약학 조성물.

청구항 174

약학 조성물의 제조를 위한 제1항 내지 제100항 중 어느 한 항의 항체의 용도.

청구항 175

약학 조성물의 제조를 위한 제1항 내지 제100항 중 어느 한 항의 항체 및 약학적으로 허용 가능한 부형제 또는 담체의 용도.

청구항 176

고형 종양 질환의 치료에서 약제의 제조를 위한 제1항 내지 제100항 중 어느 한 항의 항체의 용도.

청구항 177

대장암, NSCLC(비소세포 폐암), 위암, 췌장암 또는 유방암의 치료에서 제1항 내지 제100항 중 어느 한 항의 항

체의 용도.

청구항 178

종양 세포와 제1항 내지 제100항 중 어느 한 항의 이중특이성 항체를 접촉시키는 단계를 포함하는, 종양 세포의 세포 용해를 유도하는 방법.

청구항 179

제178항에 있어서, 종양 세포는 대장암 세포, NSCLC(비소세포 폐암), 위암 세포, 췌장암 세포 또는 유방암 세포 인 방법.

청구항 180

제178항 및 제179항에 있어서, 세포 용해는 이중특이성 항체의 항체 의존성 세포성 식작용 및/또는 항체 의존성 세포성 세포독성에 의해 유도되는 것인 방법.

청구항 181

CEACAM5를 비정상적으로 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료 방법으로서, 대상체에게 제1항 내지 제100항 중 어느 한 항의 이중특이성 항체의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법,

청구항 182

CEACAM5를 비정상적으로 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료 방법으로서, 대상체에게 인간 CEACAM5 및 인간 CD3에 결합하는 제2 이중특이성 항체와 함께 제1항 내지 제100항 중 어느 한 항의 이중특이성 항체의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 183

제182항에 있어서, 경쟁하는 CEACAM5xCD3 및 CEACAM5xCD47 이중특이성 항체는 순차적으로/교대로 투여되는 것인 방법.

청구항 184

제182항에 있어서, CEACAM5xCD3 및 CEACAM5xCD47 이중특이성 항체가 경쟁하지 않거나 또는 단지 최소 경쟁하는 경우, 상기 두 이중특이성 항체는 순차적으로 또는 병행하여/동시에 투여되는 것인 방법.

청구항 185

제182항 내지 제184항 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이성 항체 및 제2 이중특이성 항체는 상가적인 효능을 나타내는 것인 방법.

청구항 186

제182항 내지 제184항 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이성 항체 및 제2 이중특이성 항체는 상승적인 효능을 나타내는 것인 방법.

청구항 187

CEACAM5를 비정상적으로 발현하는 암을 보유하는 대상체에서 무진행 생존 및/또는 총 생존 시간을 증가시키는 방법으로서, 상기 대상체에게 제1항 내지 제100항 중 어느 한 항의 이중특이성 항체의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 188

제187항에 있어서, 암은 대장암, 비소세포 폐암(NSCLC), 위암, 췌장암 또는 유방암 또는 CEACAM5를 발현하는 다른 암인 방법.

청구항 189

제178항 내지 제188항 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이성 항체는 화학요법 및/또는 방사선요법과 함께 투여되는 것인 방법.

청구항 190

제178항 내지 제189항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 대장암 또는 폐암 또는 위암 또는 췌장암 또는 유방암 또는 CEACAM5를 발현하는 다른 암을 앓고 있는 환자인 방법.

청구항 191

CEACAM5를 비정상적으로 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료 방법으로서, 상기 대상체에게 인간 CEACAM5 및 인간 CD3엡실론에 대한 제2 이중특이성 항체와 함께 제1항 내지 제100항 중 어느 한 항의 이중특이성 항체의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 192

제191항에 있어서, 이중특이성 항체 및 제2 이중특이성 항체는 상가적인 효능을 나타내는 것인 방법.

청구항 193

제191항에 있어서, 이중특이성 항체 및 제2 이중특이성 항체는 상승적인 효능을 나타내는 것인 방법.

청구항 194

CEACAM5를 비정상적으로 발현하는 암을 보유하는 대상체에서 무진행 생존 기간 및/또는 총 생존 시간을 증가시키는 방법으로서, 상기 대상체에게 제1항 내지 제100항 중 어느 한 항의 이중특이성 항체의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 195

제191항 내지 제194항 중 어느 한 항에 있어서, 암은 대장암, 비소세포 폐암(NSCLC), 위암, 췌장암 또는 유방암인 방법.

청구항 196

제191항 내지 제195항 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이성 항체는 화학요법 또는 방사선요법과 함께 투여되는 것인 방법.

청구항 197

제191항 내지 제196항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 대장암 또는 폐암 또는 위암 또는 췌장암 또는 유방암 또는 CEACAM5를 발현하는 다른 암을 보유하는 암 환자인 방법.

청구항 198

제178항 내지 제197항 중 어느 한 항의 치료 방법에서 제1항 내지 제99항 중 어느 한 항에 따른 이중특이성 항체의 용도.

청구항 199

제198항에 있어서, 암은 대장암, 비소세포 폐암(NSCLC), 위암, 췌장암 및 유방암으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 서열목록에 대한 참조

[0002] 본 출원과 함께 제출된 전자적으로 전송된 서열목록(2019년 5월 31일에 생성된 "4130_002PC08_SeqListing_ST25.txt", 122,709 바이트)의 내용은 그 전체 내용이 본 출원에 참고로 인용된다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 인간 암배아 항원 CEACAM5(CEA) 및 인간 CD47에 결합하는 이중특이성 항체(CEAxCD47 이중특이성 항체)에 관한 것이다. 추가적으로, 본 발명은 그러한 이중특이성 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 및 그러한 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터와 숙주 세포에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 그러한 항체를 선별하고 제조하기 위한 방법 및 질병의 치료에 그러한 항체를 이용하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 단일요법 및 조합요법, 특히 CEAxCD3 T 세포 이중특이성 항체(TCB) 및/또는 PD-1 또는 PD-L1의 억제제와의 조합요법에서 CEAxCD47 이중특이성 항체의 치료적 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 인간 CEA 패밀리는 29개의 유전자를 함유하는데, 이중 18개가 발현된다: 7개는 CEA 서브그룹에 속하고, 11개는 임신 특이적인 당단백질 서브그룹에 속한다. 몇몇 CEA 서브그룹 멤버는 세포 부착 특성을 보유하는 것으로 생각된다. CEA는 내재 면역에서 역할을 수행하는 것을 생각된다(Hammarström S., Semin Cancer Biol. 9(2):67-81 (1999)). 암배아 항원(CEA, CEACAM5 또는 CD66e; UniProtKB - P06731)은 암배아 항원 관련 세포 부착 분자(CEACAM) 패밀리의 멤버이고, 종양 관련 항원(Gold and Freedman, J Exp. Med., 121:439-462, 1965; Berinstein N. L., J Clin Oncol., 20:2197-2207, 2002)이다. 또한, CEACAM6(CD66c; UniProtKB - P40199)도 암배아 항원(CEA) 패밀리에 속한다. 다수의 모노클로날 항체는 진단 도구로서 연구 목적으로, 및 치료 목적으로 CEA에 대해 생성되었다(참조: 예를 들어, W02012117002(그 전체 내용이 참고로 인용됨), 또한 실시예 8f 참조)). 가용성 CEA - 본 출원에서 shed(shed) CEA 또는 sCEA로도 언급됨 - 는 확립된 종양 마커이다. 암 환자의 혈장 내 레벨은 몇몇 경우에 1000 ng/ml을 상회할 수 있지만, 건강한 대상체 내의 혈장 농도는 10 ng/ml 미만이다(예를 들어, Sandler B. et al Anticancer Res 1999, 19(5B), 4229-33). 문헌[참조: Hao C., Zhang G. 및 L. in Progress in Molecular Biology 및 Translational Science (2019)]은 100 내지 250 ng/mL의 CEA 혈장 농도가 췌장암, 결장- 및 직장암, 폐암 및 위암에서 환자의 유의율(significant %)로 확인될 수 있음을 보고한다. 그렇게 높은 레벨은 이들 암이 국소적으로 진행되고/되거나 전이성인 경우에 특이적으로 관찰된다. 문헌[참조: Wanebo et. al., New Eng. J. Med. (1978)]에 따르면, 재발성/전이성 결장암의 21%는 100 ng/ml를 초과하는 sCEA를 보유한다. 문헌[참조: Hohenberger et. al., Annals Surgery (1994)]은 대장암 환자, 단계 Duke 4 및 간 전이에서 환자의 26%가 50 ng/mL를 상회하는 sCEA를 보유하는 것으로 보고한다. 문헌[참조: Jurgensmerier et al Br. J. Cancer (2013)]은 전이성 대장암을 겪고 있는 수백명의 환자를 대상으로 한 다소 규모의 연구에서 이들 환자의 24% 각각 25%에서 225 ng/mL를 초과하는 sCEA를 보고한다. 가용성 CEA는 치료적 항CEA 항체의 감소된 효능을 잠재적으로 유발하는 종양 세포 상에서 CEA에 대한 결합을 대해 치료적 항 CEA 항체와 경쟁할 수 있다. 이는 대부분의 암 환자, 예를 들어 대장암 환자에서 최대 100 내지 250 ng/ml의 sCEA 혈장 농도까지 가용성 CEA에 대한 제한된 교차 반응성을 보유하는 항CEA 항체를 이용함으로써 회피될 수 있다.

[0006] 마우스 모노클로날 항체 PR1A3는 NS1(P3/NS 1/I-Ag-4-1) 골수종 세포와 정상 대장 상피세포로 면역화된 마우스 유래의 비장 세포와의 융합에 의해 생성되었다. 문헌(참조: Richman P. I. 및 Bodmer W. F., Int. J. Cancer, 39:317-328, 1987)은 마우스 모노클로날 항체 PR1A3를 기재한다. PR1A3의 에피토프 맵핑은 상기 항체가 CEA 분자의 B3 도메인 및 GPI 앵커를 타겟팅함을 나타낸다(Durbin H. et al., Proc. Natl. Scad. Sci. USA, 91:4313-4317, 1994). 결론적으로, PR1A3 항체는 주로 막 결합된 CEA에 결합하고, 암 환자의 혈류에서 발견될 수 있는 가용성 CEA에는 결합하지 않는다. PR1A3에 의해 결합된 에피토프는 형태적 에피토프이고, 선형 에피토프는 아니다(Stewart et al., Cancer Immunol Immunother, 47 (1999) 299-06). 인간화 PR1A3(hPR1A3) 항체는 예를 들어 문헌[참조: Conaghan P. J., et al., Br. J. Cancer, 98 (2008)1217-1225] 및 W02012117002(그 전체 내용이 참고로 인용됨)에 기재되어 있다.

[0007] 인간 PD-1 축 길항물질 및 항CEA/항CD3 이중특이성 항체의 조합에 의해 암을 치료하기 위한 방법은 US20140242079 및 W02017118657(각각은 그 전체 내용이 참고로 인용됨)에 기재되어 있고, 임상 결과는 ASCO 컨퍼런스 2017(Taberner et al, J Clin Oncol 35, 2017 (suppl; abstr 3002))에서 공개되었다. 면역 체크포인트 경로의 2개 이상의 상이한 타겟에 결합하는 면역 체크포인트 길항물질, 및 CEA 및 T 세포 표면 항원에 결합하는 T 세포 리디랙팅제를 투여함으로써 종양을 치료하는 방법은 W02015112534에 기재되어 있다. 단일 도메인 항 CEACAM6 항체 및 유래아제로 구성되는 컨주게이트는 현재 임상시험 중이다(NCT02309892; W02016116907). CEACAM5, CEACAM6 및 과립구에 결합하는 클래스 I 항체는 US20110064653에 기재되어 있다.

[0008] 당해 기술분야에 기재된 항CD3ε 항체는 SP34이다(Yang SJ, The Journal of Immunology (1986) 137; 1097-

1100). SP34는 영장류 및 인간 CD3 둘 다와 반응한다. SP34는 BD Biosciences에서 시판된다. 당해 기술분야에 기재된 추가의 항CD3 항체는 UCHT-1이다(참조: WO2000041474). 당해 기술분야에 기재된 추가의 항CD3 항체는 BC-3이다(Fred Hutchinson Cancer Research Institute; GvHD의 I/II 시험에 사용됨, Anasetti et al., Transplantation 54: 844 (1992)). SP34는 SP-34가 CD3의 ϵ 체 상에만 존재하는 에피토프를 인식하는 반면(참조: Salmeron et al., (1991) J. Immunol. 147: 3047), UCHT-1 및 BC-3는 ϵ 및 γ 체 둘 다에 의해 기여된 에피토프를 인식한다는 점에서 UCHT-1 및 BC-3와 상이하다. 또한, 항CD3 항체는 WO2007042261, WO2008119565, WO2008119566, WO2008119567, WO2010037836, WO2010037837, WO2010037838, 및 US8236308에 기재되어 있다(각각은 그 전체 내용이 참고로 인용됨). CEA에 특이적인 결합부 및 CD3 ϵ 에 특이적인 결합부를 포함하는 이중특이성 항체는 US20140242079A1(그 전체 내용이 참고로 인용됨)에 기재되어 있다.

[0009]

인간 CD47(UniProtKB - Q08722 (CD47_HUMAN; IAP))은 리간드 트롬보스폰딘-1(TSP-1) 및 신호 조절 단백질 알파(SIRP α ; CD172a; UniProtKB P78324)에 결합하는 경막 단백질이고, 면역 시스템, 구체적으로 마크로파지에 대해 "나를 먹지 마세요" 신호로서 작용할 수 있다. CD47은 아포토시스, 증식, 부착, 및 이동을 포함하는 일정 범위의 세포 과정에 연루된다. 또한, 이는 면역 및 혈관형성 반응에서 중요한 역할을 수행한다. CD47은 상이한 종양 세포에서 과발현된다. CD47에 대한 항체는 당해 기술분야에 기재되어 있고, 몇몇은 종양 치료용 치료제로서 임상시험 중이다(Weiskopf K. European Journal of Cancer 76 (2017) 100-109; Huang Y et al., J Thorac Dis 2017;9(2):E168-E174). CD47에 결합하는 IgG1 서브클래스의 항체는 Fc 의존성 방식으로 헤모글로빈의 적혈구 RBC의 감소 및 혈소판의 결손을 초래할 수 있다(참조: 예를 들어 US20140140989). 이러한 부작용을 회피하기 위해, WO2017196793에는 항CD47 항체의 IgG4 서브클래스의 돌연변이체 형태(Fc γ R 결합을 감소시키기 위해 L235E 돌연변이뿐만 아니라 S228P 돌연변이를 보유하는 IgG4PE)가 기재되어 있다. 심하게 감소된 Fc γ R 결합 및 이펙터 기능을 보유하는 그러한 항CD47 항체는 그러한 혈소판 결손을 초래하지 않는다. CD47 및 CD20에 대한 단일 도메인 이중특이성 항체는 문헌[참조: von Bommel PE et al., Oncoimmunol. 7 (2018) e386361 및 Piccione EC et al. mAbs 7 (2015)946-956]에 기재되어 있다. 문헌[참조: Dheilily E. et al., Mol. Thera. 25 (2017) 523-533 (참조: 또한 WO2014087248)]은 CD19 및 CD47에 대한 이중특이성 항체를 기재하고 있다. 서열 번호: 5의 공통 중쇄 및 서열 번호: 10의 가변 경쇄 도메인 VL을 포함하는, CD19 및 CD47에 대한 이중특이성 항체는 WO2014087248(그 전체 내용이 참고로 인용됨)에 기재되어 있다.

[0010]

인간 FcRI(CD64)은 단핵구/마크로파지 및 수지상 세포(DC)로 제한되고, 호중구 및 비만세포 상에서 유도성으로 발현되며; hFc RIIA(CD32A)는 모든 골수세포 상에서 발현되지만, 림프구 상에서는 발현되지 않으며; hFc RIIIB(CD32B)는 단지 순환하는 B 세포 및 호염기구 상에서만 고도로 발현되고(L. Cassard, F. Joensson, S. Arnaud, M. Daeron, J. Immunol.189 (2012) 2995-3006), 단핵구의 20% 및 호중구의 4% 상에서 저조하게 발현되고, 조직 마크로파지 및 DC 상에서 발현되지만, 비만세포 상에서는 발현되지 않으며; hFc RIIC(CD32C)는 NK 세포, 단핵구, 및 호중구 상에서 발현된다. hFc RIIIA(CD16A)는 NK 세포 및 단핵구/마크로파지 상에서 발현되고; hFc RIIIB(CD16B)는 호중구 상에서 발현되고, 최근에 입증된 바와 같이, 호염기구의 서브셋 상에서 발현된다. 이들 발현 패턴은 hFc RIIA가 단지 비만세포, 호염기구, 호중구 및 호산구에 의해 구성적으로 발현된 활성화 IgG 수용체임을 강조한다(Bruhns P., Blood 119 (2012) 5640). IgG의 각각의 서브클래스의 생물학적 활성은 잘 알려져 있지 않다. IgG 수용체(Fc γ R)는 인간에서 매우 많다. 그들은 고친화성 및 저친화성 수용체를 포함한다. 고친화성 및 저친화성 Fc γ R은 둘 다 IgG 면역복합체와 높은 친화성으로 결합하지만, 단지 고친화성 Fc γ R만 단량체성 IgG와 결합한다. 인간에는 하나의 고친화성 IgG 수용체, hFc γ RI(CD64), 및 2개의 패밀리의 저친화성 IgG 수용체, hFc γ RIIA, IIB, 및 IIC(CD32), 및 hFc γ RIIIA 및 IIB(CD16)가 존재한다. hFc γ RI 및 hFc γ RIIIA는 Fc γ R 연관 활성화 수용체이고, hFc γ RIIA 및 hFc γ RIIC는 단일 도메인 활성화 수용체이고, hFc γ RIIB는 단일 도메인 억제성 수용체이고, hFc γ RIIIB는 기능이 확인되지 않은 GPI 앵커링된 수용체이다(Bruhns P. Blood 113 (2009) 3716). 몇몇 연구 그룹은 그들의 중쇄 당쇄수식에서 1,6-푸코오스가 결합되는 항체는 Fc γ RIII 수용체에 대한 증강된 결합 친화성 및 증가된 ADCC 활성을 보유하는 것을 입증하였다(Shields, R. L., et al., (2002) J Biol. Chem. 277, 26733-26740.; (2002) J Biol. Chem. 8, 8). 추가적으로, Fc γ RIII 수용체에 대한 결합 친화성과 ADCC 활성 사이의 상관관계가 확립되었다(Okazaki, A., et al., (2004) J Mol. Biol. 336, 1239-1249; Dall'Ozzo, 2004). IgG 분자는 그의 Fc 영역 내에 2개의 N-연결된 올리고당을 각각의 중쇄에 하나씩 보유한다. 임의의 당단백질로서, 항체는 동일한 폴리펩타이드 백본을 공유하지만 당쇄수식 부위에 부착된 상이한 올리고당을 보유하는 당형태의 군집으로서 생성된다. 혈청 IgG의 Fc 영역에서 통상적으로 확인되는 올리고당은 복합 바이안테나리 타입(complex bi-antennary type)인데(Wormald et al., Biochemistry 36: 130-38 (1997), 낮은 레벨의 말단 시알산 및 양분된 N-아세틸글루코사민(GlcNAc), 및 가변적인 정도의 말단 갈락토실화 및 코어 푸코실화를 보유한다. 몇몇 연구는 Fc γ R 결합을 위해 요구되는 최소 탄수화물 구조가 올리고당 코어 내

에 존재함을 제안한다. Lund et al., J. Immunol. 157:4963-69 (1996). 글리칸 모이어티 내에 감소된 푸코오스 함량을 보유하는 항체는 정상적으로 푸코실화된 항체와 비교하여 더 높은 항체 의존성 세포독성 (ADCC) 활성을 나타낸다(Niwa R et al., Cancer Res, 64, 2127-33, 2004). 저/무 푸코오스 항체의 증강된 ADCC 이면의 메커니즘은 Fc γ RIIIa(CD16)에 대한 그의 증가된 친화성이다. 푸코오스 첨가를 담당하는 유전자 (α 1,6-푸코실트랜스퍼라아제; FUT8)에 대한 대립유전자 둘 다가 녹아웃된 세포주는 US6946292, US7425446, US8067232(각각은 그 전체 내용이 참고로 인용됨)에 기재되어 있고, <http://www.potelligent.com>에서 확인할 수 있다. 중국 햄스터 난소(CHO) 세포에서 β (1,4)-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라아제 III(GnTIII), 양분된 올리고당의 형성을 촉매하는 글리코실트랜스퍼라아제의 과발현은 조작된 CHO 세포에 의해 생성된 항체의 시험관내 ADCC 활성을 현저히 증가시킨다(Umana, P. et al., Nature Biotechnol. 17:176-180 (1999), WO199954342, US20030175884(각각은 그 전체 내용이 참고로 인용됨)). 또한, Fc 도메인 내의 돌연변이는 상이한 Fc 수용체에 대한 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(각각은 그 전체 내용이 참고로 인용됨)).

[0011] 혈액학적 악성종양의 치료에서 상당한 진전이 이루어졌다. 이는 몇몇 타입의 진행성 고형 종양의 치료에서 이루어진 진전과는 대조적이다. 이들 중 다수는 오히려 빈번한 이들 진행성 종양 타입의 무진행 생존(PFS) 및 전체적인 생존(OS)은 화학요법에 대한 조합 파트너로서 예를 들어 VEGFR 또는 ERGFR에 대한 모노클로날 항체의 존재 및 부재 하에서 신규한 화학요법 스킴에 의해 개선된 정도였다. 그러나 과거에 다수의 진행성/전이성 고형 종양을 위해, 약물 요법의 진보는 제한되었다. 많은 희망이 암 면역요법에 투입되었고, 확실한 성공도 있지만, 제한적이다. 종양은 T 이펙터 세포 및 마크로파지와 같은 다른 면역 세포에 의한 파괴로부터 그들의 세포를 보호하기 위한 방책을 개발한다. 지난 10년(들)의 암 면역요법은 확실히 T 세포를 다시 적당하게 만들고 암세포에 대해 이들을 다시 이동시키는 것에 일부 초점이 맞추어져 있었고, 성공을 거두었다. 가장 현저한 예는 특정 면역 체크포인트의 억제제/활성화제이다. 예를 들어, PD-1 축 길항물질과 같은 체크포인트 억제제는 T 이펙터 세포를 재활성화하여 특정 고형 종양과 싸우는 것으로 확인되었다. 그러나, 모든 고형 종양이 반응성인 것은 아니며, 반응성인 경우에도, 종종 50% 훨씬 미만의 환자가 항PD-1 또는 PD-L1 항체를 이용하는 치료로부터 관련된 이익을 향유한다.

[0012] CAR T 세포를 이용하는 임상 T 세포 요법 및 또한 T 세포 이중특이성 항체를 이용하는 요법은 혈액학적 악성종양에서 유망한 임상 결과를 나타낸다. 그러나, 다양한 고형 종양에서 임상 T 세포 요법, 예를 들어 CAR T 세포를 이용하는 임상 연구는 대부분 반응률을 나타내지 않거나, 단지 미미한 반응률만을 나타냈다(예를 들어, Xu et. al. Expert Review of Anticancer Therapy 2017, 17, 1099-1106).

[0013] US20140242079 및 WO2017055389(각각은 그 전체 내용이 참고로 인용됨)는 CEAxCD3 T 세포 이중특이성 항체를 기재한다. US20140242079로부터 하나의 항체 및 WO2017055389로부터 하나는 둘 다 임상 개발 중이다(참조: clinicaltrials.gov; NCT3866239에서 R06958688 및 NCT03539484에서 R07172508). 이들 T 세포 이중특이성 항체는 CEAxCD3의 상이한 에피토프에 결합하고, 상이한 종양 세포 사멸 효능을 보유한다. 인간 T 세포를 이용하는 시험관내 어세이에서 종양 세포 사멸과 관련하여, WO201705389에 기재된 대부분의 효능 있는 CEAxCD3 T 세포 이중특이성 항체는 R06958688/시비사타맵(CEA-TCB)보다 10 내지 100배 또는 더 강력하다.

[0014] 진행성 고형 종양을 보유하는 환자에서 T 세포 이중특이성 항체 TAAxCD3 (TAA = 종양 연관 항원)를 이용하는 임상시험 결과는 최근까지 실망적이었다. 그러나, 단일요법 부분 반응에서 진행성 대장암 환자 및 안정된 질병에서의 결과를 나타내는 예비 1상 결과(J.Taberner et.al., J. Clin. Oncol. 35, 2017 (suppl. Abstr. 3002))는 CEAxCD3 T 세포 이중특이성 항체 CEA-TCB(R06958688/시비사타맵, 참조 예를 들어 Bacac et al Clin. Cancer Res., 22(13), 3286-97 (2016); 및 US20140242079)에 대해 ASCO 2017에서 공개되었다. 임상적으로 활성인 용량에서, 예를 들어 300 nM의 혈장 농도는 시비사타맵의 경우 도달되었다. CEA-TCB가 PD-L1 억제 항체와 조합된 경우, 더 부분적인 반응 및 안정한 질병이 일어났다. 이들 데이터는 효능이 진행성 고형 종양에서 CEA-TCB를 사용하여 달성될 수 있음을 나타낸다. 그러나 단일요법에서 및 PD-L1 억제제와의 조합에서, 대부분의 환자는 여전히 진행하고 있었고, 그들 반응은 기껏해야 부분적인 반응 및 안정한 질병을 나타냈으나, 완전한 반응은 달성되지 않았다. 더 좋은 결과를 얻기 위한 한 접근법은 T 세포 이중특이성 항체에 PD-1 체크포인트 축의 억제제를 추가하는 것뿐만 아니라, 추가의 체크포인트 억제제 또는 작용물질을 추가하는 것이다. 그러나, 지금까지 우리가 아

는 한, 활용할 수 있는 그러한 조합 접근법에 대한 유망한 임상 데이터는 존재하지 않는다. 진행성 고형 종양 내에서 T 세포의 제한된 이용 가능성은 확실히 T 세포 이중특이성 항체 + PD-1 축 억제제 및/또는 T 세포에 대한 다른 체크포인트 억제제 또는 작용물질을 이용하여 달성할 수 있는 효능을 제한하는 중요한 메커니즘이다.

[0015] T 세포 이중특이성 항체 및 PD-1 축 억제제의 조합에 진행성 고형 종양의 종양 세포에 대해 T 세포를 리다이렉트하는 것을 목적으로 하는 다른 치료제를 첨가하는 것 대신에, 종양 세포에 면역 세포, 구체적으로 마크로파지 또는 마크로파지 및 자연 살해 NK 세포를 리다이렉트하는 치료제를 첨가하는 것이 더 성공적일 수 있다. 본 발명은 단일요법으로서 또는 예를 들어 T 세포 이중특이성 항체 및/또는 PD-1/PD-L1 억제 항체와 함께 CEA 발현 고형 종양에 대해 마크로파지 및 또한 NK 세포를 리다이렉트하는 이중특이성 항체를 다룬다.

[0016] 고형 종양에서 CAR T 세포를 이용한 실망스러운 결과는 간단히 설명할 수 있다 - 고형 종양을 투과하여 그 내내 분포되는 CAR T 세포의 수는 충분하지 않다는 것이다. 이는 대부분의 혈액학적 악성종양에서 확실히 다르고; CAR T 세포는 종양 세포에 잘 접근할 수 있는데, 이는 고형 종양에서의 실망스러운 효능과 비교하여 이들 악성 종양에서 높은 효능의 차이점을 설명한다. 추가적으로, CAR T 세포는 대부분 강력하게 면역 억제성인 종양 미세 환경(TME)에 의해 심하게 억제될 수 있다.

[0017] 요법에 사용된 모노클로날 항체 및 또한 이중특이성 항체는 다양한 부작용을 유발할 수 있다. 중요한 독성 문제는 사이토카인 방출 증후군(CRS)인데, 이는 예를 들어 알렘투주맙, 무로모넵-CD3, 리톡시맙, 및 CD19xCD3 이중 특이성 항체 블리나투모맙을 이용하는 요법에서 확인되었다. 또한, 항CD47 항체를 이용하는 치료는 항CD47 항체 매개 식작용 후 증가된 양의 전염증성 사이토카인을 유발하는 것이 확인되었다(참조: 예를 들어 US20160144009). wt IgG1 Fc를 보유하는 항CD47 모노클로날 항체의 공지된 부작용은 증가된 적혈구 RBC 식작용/용해 및 혈소판 활성화이다(참조: 예를 들어, 도 8 및 10에서 wt IgG1 Fc를 보유하는 항CD47 항체 B6H12.2에 의해 유도된 혈소판 활성화 및 RBC 식작용).

[0018] 본 발명은 고형 종양의 치료를 위해 지정된 인간 CEACAM5 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 이중특이성 항체를 제공한다. 이들 이중특이성 항체는 높은 활성, 낮은 독성, 낮은 면역원성 및 유리한 약물동태학적 특성을 함께 보유한다. 본 발명에 따른 이중특이성 항체는 주로 면역 세포, 구체적으로 마크로파지 및 NK 세포의 연루에 기인한 최적화된 ADCP(항체 의존성 세포성 식작용) 및 ADCC(항체 의존성 세포성 세포독성)에 의해 그들의 항종양 세포 효과를 유도한다. 또한, 본 발명은 R06958688, R07172508와 같은 CEAxCD3 T 세포 이중특이성 항체 및 예를 들어 후술하는 바와 같은, 인간 마크로파지의 존재 하에서 MKN-45와 같은 종양 세포의 강력한 식작용을 나타내는 다른 CEAxCD3 T 세포 이중특이성 항체와의 조합 치료를 위해 지정된 인간 CEACAM5 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 이중특이성 항체를 제공한다.

발명의 내용

[0019] 한 실시양태에서, 본 발명은 인간 CEACAM5(추가로 "CEA"로도 칭함)에 특이적으로 결합하는 제1 결합부 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 제2 결합부(추가로 "CD47"로도 칭함)를 포함하는 이중특이성 항체(추가로 "Mab CEAxCD47" 또는 "CEAxCD47 이중특이성 항체"로도 칭함)에 관한 것이다.

[0020] 한 실시양태에서, 본 발명은 인간 CEACAM5 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 이중특이성 항체에 관한 것으로, Fc 영역은, 동일하지만 당조작되지 않은 이중특이성 항체와 비교하여, 감소된 수의 푸코오스 잔기를 보유하도록 당조작된 것을 특징으로 한다.

[0021] 한 실시양태에서, 본 발명은 제1 결합부에서 인간 CEACAM5 및 CEACAM6에 및 제2 결합부에서 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체를 제공한다. 한 실시양태에서, 본 발명은 인간 CEACAM5 및 인간 CEACAM6에 균형잡힌 방식으로 특이적으로 결합하는 이중특이성 항체 CEAxCD47 에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 이중특이성 항체는 인간 재조합 CEACAM5 및 CEACAM6에 대해 결합하는 것을 특징으로 하고, CEACAM5 및 CEACAM6에 대한 결합의 EC50 값은 3배 미만(균형잡힌 결합, 균형잡힌 방식으로 결합, 표 5 참조) 상이한 것을 특징으로 한다. 결합은 스트렙타비딘/비오틴 기반 ELISA에서 측정된다(참조: 실시예 8f).

[0022] 한 실시양태에서, 본 발명은 제1 결합부에서 인간 CEACAM5 및 CEACAM6에 및 제2 결합부에서 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 이중특이성 항체를 제공하는데,

[0023] a) 제1 결합부가 CDR로서 서열 번호: 25의 CDRH1, 서열 번호: 26의 CDRH2 및 서열 번호: 27의 CDRH3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 CDR로서 서열 번호: 112의 CDRL1, 서열 번호: 113의 CDRL2, 및 서열 번호: 114의 CDRL3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,

- [0024] b) 제2 결합부가 CDR로서 서열 번호: 25의 CDRH1, 서열 번호: 26의 CDRH2 및 서열 번호: 27의 CDRH3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 CDR로서 서열 번호: 28의 CDRL1, 서열 번호: 29의 CDRL2, 및 서열 번호: 30의 CDRL3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0025] 한 실시양태에서, 본 발명은 인간 CEACAM5 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 이중특이성 항체에 관한 것으로, 이중특이성 항체는 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제1 결합부 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 제2 결합부를 포함하고, 제1 결합부는 아미노산 35 - 144의 CEACAM5의 Ig 유사 V 타입 도메인에 결합하는 것을 특징으로 한다.
- [0026] 한 실시양태에서, 본 발명은 인간 CEACAM5 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 이중특이성 항체에 관한 것으로, 이중특이성 항체는 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제1 결합부 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 제2 결합부를 포함하고, 상기 이중특이성 항체는 CEACAM5에 대한 결합에 대해 VK 및 VH 도메인으로서 서열 번호: 100 및 101의 서열의 VK 및 VH를 포함하는 항CEA 항체 SM3E와 경쟁하는 것을 특징으로 한다.
- [0027] 한 실시양태에서, 본 발명은 인간 CEACAM5 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 이중특이성 항체에 관한 것으로, 이중특이성 항체는 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제1 결합부 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 제2 결합부를 포함하고, 상기 이중특이성 항체는 CEACAM5에 대한 결합에 대해 항CEA 항체 SM3E, VL 및 VH 도메인으로서 서열 번호: 102 및 103의 VL 및 VH 서열을 포함하는 MEDI, VK 및 VH 도메인으로서 서열 번호: 110 및 111의 VK 및 VH 서열을 포함하는 라베투주맵(Lab), VK 및 VH 도메인으로서 서열 번호: 104 및 105의 VK 및 VH 서열을 포함하는 SAR, VK 및 VH 도메인으로서 서열 번호: 108 및 109의 VK 및 VH 서열을 포함하는 T86.66, VK 및 VH 도메인으로서 서열 번호: 106 및 107의 VK 및 VH 서열을 포함하는 CH1A1A와 경쟁하지 않는 것을 특징으로 한다.
- [0028] 한 실시양태에서, 본 발명은 인간 CEACAM5 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 이중특이성 항체에 관한 것으로, 이중특이성 항체는 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제1 결합부 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 제2 결합부를 포함하고, 상기 이중특이성 항체의 식작용 지수 곡선(phagocytosis index curve)의 EC50 값은 동일한 실험 조건 하에서 및 1 mg/ml의 인간 IgG의 존재 또는 부재 하에서 참조 항체 K2AC22의 EC50 값의 0.1 내지 3배의 범위에 있는 것을 특징으로 한다. 추가의 실시양태에서, 상기 범위는 0.2 내지 3.0, 0.3 내지 3.0, 0.5 내지 2.5 또는 1.0 내지 2.5이다. 식작용의 EC50 값은 식작용 지수 곡선의 EC50 값으로서 측정된다(이미징 기반 식작용 어세이, 실시예 9 및 도 12 및 표 3 참조).
- [0029] 한 실시양태에서, 본 발명은 인간 CEACAM5 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 이중특이성 항체에 관한 것으로, 이중특이성 항체는 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제1 결합부 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 제2 결합부를 포함하고, 1 mg/ml의 인간 IgG의 존재 하에서 상기 이중특이성 항체의 최대 식작용 지수(참조: 실시예 9.2; CellInsight™ 기반 어세이)는 동일한 실험 조건 하에서, 그러나 인간 IgG의 첨가 없이 측정된 최대 식작용 지수와 비교하여 30% 이상 감소되지 않는 것을 특징으로 한다(참조: 예를 들어 도 17).
- [0030] 한 실시양태에서, 이중특이성 항체는 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제1 결합부 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 제2 결합부를 포함하는 것을 특징으로 하고,
- [0031] a) 제1 결합부는 서열 번호: 1의 CDRH1, 서열 번호: 2의 CDRH2 및 서열 번호: 3의 CDRH3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 인간 람다 타입 및 서열 번호: 13의 경쇄 불변 도메인을 포함하고,
- [0032] 제2 결합부는 서열 번호: 1의 CDRH1, 서열 번호: 2의 CDRH2 및 서열 번호: 3의 CDRH3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 7의 CDRL1, 서열 번호: 8 내에 포함된 Ala Ala Ser의 CDRL2, 및 서열 번호: 9의 CDRL3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하거나, 또는
- [0033] b) CDR로서 서열 번호: 25의 CDRH1, 서열 번호: 26의 CDRH2 및 서열 번호: 27의 CDRH3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 인간 람다 타입 및 서열 번호: 13의 경쇄 불변 도메인을 포함하고, 제2 결합부는 CDR로서 서열 번호: 25의 CDRH1, 서열 번호: 26의 CDRH2 및 서열 번호: 27의 CDRH3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 28의 CDRL1, 서열 번호: 29의 CDRL2, 및 서열 번호: 30의 CDRL3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0034] 한 실시양태에서, 이중특이성 항체는 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제1 결합부 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 제2 결합부를 포함하는 것을 특징으로 하고,
- [0035] a) 제1 결합부는 CDR로서 서열 번호: 25의 CDRH1, 서열 번호: 26의 CDRH2 및 서열 번호: 27의 CDRH3를 포함하

는 중쇄 가변 영역 및

- [0036] 서열 번호: 31, 32 및 33; 서열 번호: 34, 35, 및 36, 서열 번호: 37, 38, 및 39, 서열 번호: 40, 41, 및 42, 서열 번호: 43, 44, 및 45, 서열 번호: 46, 47, 및 48, 서열 번호: 49, 50, 및 51, 서열 번호: 52, 53, 및 54, 서열 번호: 55, 56, 및 57, 서열 번호: 58, 59, 및 60, 서열 번호: 61, 62, 및 63, 서열 번호: 112, 113, 및 114로 구성되는 군으로부터 선택되는 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3의 조합을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0037] b) 제2 결합부는 CDR로서 서열 번호: 25의 CDRH1, 서열 번호: 26의 CDRH2 및 서열 번호: 27의 CDRH3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 CDR로서 서열 번호: 28의 CDRL1, 서열 번호: 29의 CDRL2, 및 서열 번호: 30의 CDRL3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0038] 한 실시양태에서, 이중특이성 항체는 제1 결합부 내에 경쇄 불변 도메인으로서 서열 번호: 13의 인간 람다 타입 도메인을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0039] 한 실시양태에서, 이중특이성 항체는 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제1 결합부 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 제2 결합부를 포함하는 것을 특징으로 하고,
- [0040] a) 제1 결합부는 서열 번호: 4의 중쇄 가변 영역(VH) 및 서열 번호: 64, 서열 번호: 65, 서열 번호: 66, 서열 번호: 67, 서열 번호: 68, 서열 번호: 69, 서열 번호: 70, 서열 번호: 71, 서열 번호: 72, 서열 번호: 73, 서열 번호: 74, 및 서열 번호: 115로 구성되는 VLCL 영역 내에 포함된 VL의 군으로부터 선택된 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0041] b) 제2 결합부는 서열 번호: 4의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 10의 경쇄 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0042] 한 실시양태에서, 이중특이성 항체는 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제1 결합부 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 제2 결합부를 포함하는 것을 특징으로 하고,
- [0043] a) 제1 결합부는 서열 번호: 5의 중쇄 및 서열 번호: 64, 서열 번호: 65, 서열 번호: 66, 서열 번호: 67, 서열 번호: 68, 서열 번호: 69, 서열 번호: 70, 서열 번호: 71, 서열 번호: 72, 서열 번호: 73, 서열 번호: 74, 및 서열 번호: 115로 구성되는 군으로부터 선택된 경쇄를 포함하고,
- [0044] b) 제2 결합부는 서열 번호: 5의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 11의 경쇄 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0045] 한 실시양태에서, 이중특이성 항체는 제1 결합부에 대해 일가 및 제2 결합부에 대해 일가인 것을 특징으로 한다.
- [0046] 한 실시양태에서, 불변 및 가변 프레임워크 영역 서열은 인간이다.
- [0047] 한 실시양태에서, 이중특이성 항체는 제1 및 제2 결합부 각각이 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 포함하는 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, 이중특이성 항체는 인간 IgG1 타입인 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, 이중특이성 항체는 전장 항체이다.
- [0048] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체는 CEA에 특이적으로 결합하고, 카파 경쇄 가변 도메인 및 람다 경쇄 불변 도메인을 포함하는 제1 결합부 및 CD47에 특이적으로 결합하고, 카파 경쇄 가변 도메인 및 카파 경쇄 불변 도메인 ($\kappa\lambda$ 이중특이성 항체, $\kappa\lambda$ 바디, 타입 1)을 포함하는 제2 결합부를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0049] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체는 CEA에 특이적이고, 람다 경쇄 가변 도메인 및 람다 경쇄 불변 도메인을 포함하는 제1 결합부 및 CD47에 특이적이고, 카파 경쇄 가변 도메인 및 카파 경쇄 불변 도메인 ($\kappa\lambda$ 이중특이성 항체, $\kappa\lambda$ 바디, 타입 2)을 포함하는 제2 결합부를 포함하는 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체는 인간 이중특이성 IgG(구체적으로 IgG1) 포맷의 것이고, 추가적으로 타입 1 또는 타입 2의 $\kappa\lambda$ 이중특이성 항체이다.
- [0050] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체는 타입 1 또는 타입 2의 $\kappa\lambda$ 이중특이성 항체이고, 공통 중쇄(cHC)를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0051] 한 실시양태에서, 이중특이성 항체는 100 nM 내지 600 nM의 결합 친화성으로, 한 실시양태에서, 100 nM 내지 500 nM의 결합 친화성으로 인간 CD47에 결합하는 것을 특징으로 한다.

- [0052] 한 실시양태에서, 이중특이성 항체는 1 내지 200 nM의 EC50 값으로 MKN-45 세포에 결합하는 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, 이중특이성 항체는 1 내지 50 nM의 EC50 값으로 MKN-45 세포에 결합하는 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, 이중특이성 항체는 1 내지 100 nM의 EC50 값으로 MKN-45 세포에 결합하는 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, 이중특이성 항체는 100 내지 200 nM의 EC50 값으로 MKN-45 세포에 결합하는 것을 특징으로 한다.
- [0053] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체는 상기 이중특이성 항체에 의해 인간 마크로파지의 존재 하에서 MKN-45 세포의 식작용에 대한 최대 달성 가능한 식작용 지수가 가용성 CEA 부재 하에서 측정된 식작용 지수와 비교하여 5000 ng/ml의 가용성 CEA의 존재 하에서 20%를 초과하여 감소되지 않는 것을 특징으로 한다.
- [0054] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체는 인간 마크로파지의 존재 하에서 상기 이중특이성 항체에 의한 MKN-45 세포의 식작용 지수 곡선에 대한 EC50이 가용성 CEA 부재 하에서 측정된 EC50과 비교하여 200 ng/ml의 가용성 CEA의 존재 하에서 더 높은 농도를 향해 4배 초과하여 이동되지 않고/않거나 식작용 지수 곡선의 최대값은 200 ng/mL의 sCEA의 첨가에 의해 10% 이상, 15% 이상, 또는 20% 이상 감소되지 않는 것을 특징으로 한다(참조: 예를 들어 도 20b).
- [0055] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체는 상기 이중특이성 항체의 MKN-45 세포에 대한 결합 곡선에 대한 EC50이 가용성 CEA의 부재 하에서 측정된 EC50과 비교하여 200 ng/ml의 가용성 CEA의 존재 하에서 더 높은 농도를 향해 2배 초과하여 이동되지 않는 것을 특징으로 한다(참조: 예를 들어 도 20a).
- [0056] 한 실시양태에서, 이중특이성 항체는 인간 CEACAM1과 교차반응하지 않는 것을 특징으로 한다.
- [0057] 한 실시양태에서, 이중특이성 항체는 재조합 CHO 세포 CHO-K1(ATCC® CCL-61™) 상에서 발현된 인간 CEACAM6에 1 내지 50 nM의 EC50 값으로 결합하는 것을 특징으로 한다(CEACAM6 음성 CHO 세포는 CEACAM6 단백질이 발현되도록 하기 위해 인간 CEACAM6의 cDNA를 함유하는 벡터를 이용하여 형질감염된다).
- [0058] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체는 300 nM의 농도에서 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하고, 서열 번호: 20의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 21의 경쇄 가변 영역을 포함하는 모노클로날 항체(추가로 MAB CEA로도 칭함)가 한 실시양태에서 MKN-45 세포에 대한 본 발명의 이중특이성 항체의 결합 곡선의 EC50을 더 높은 농도를 향해 3배 초과하여 이동시키지 않는 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체는 300 nM의 농도에서 인간 CEACAM5 및 CD3ε에 특이적으로 결합하고, 중쇄로서 서열 번호: 97 및 98의 중쇄 및 경쇄로서 서열 번호: 96 및 99의 경쇄를 포함하는 이중특이성 항체가 MKN-45 세포에 대한 본 발명의 이중특이성 항체의 결합 곡선의 EC50을 한 실시양태에서 더 높은 농도를 향해 3배 초과하여 이동시키지 않는 것을 특징으로 한다. 그러한 경우에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체 및 CEA-TCB는 "비경쟁적"으로 규정되고, 상기 CEA에 대한 결합에서 현저한 간섭 없이 CEA에 자연적으로 결합할 수 있는 것으로 간주된다.
- [0059] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체는 30 nM의 농도에서 인간 CEACAM5 및 CD3ε에 특이적으로 결합하고, 중쇄 및 경쇄로서 서열 번호: 92 내지 95의 아미노산 서열을 포함하는 이중특이성 항체(추가로 CEA-TCB1으로도 칭함)가 MKN-45 세포에 대한 본 발명의 이중특이성 항체의 결합 곡선의 EC50을 한 실시양태에서 더 높은 농도를 향해 3배 초과하여 이동시키지 않는 것을 특징으로 한다. 그러한 경우에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체 및 CEA-TCB1은 "비경쟁적"으로 규정되고, 상기 CEA에 대한 결합에서 현저한 간섭 없이 CEA에 자연적으로 결합할 수 있는 것으로 간주된다. 그러한 경우에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체 및 MAB CEA, CEA-TCB 및/또는 CEA-TCB1은 "비경쟁적"으로 규정되고, 상기 CEA에 대한 그들의 결합에서 현저한 간섭 없이 CEA에 자연적으로 결합할 수 있는 것으로 간주된다.
- [0060] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체는 30 nM의 농도에서 인간 CEACAM5 및 CD3ε(추가로 CEA-TCB1으로도 칭함)에 특이적으로 결합하고, 중쇄 및 경쇄로서 서열 번호: 92 내지 95의 아미노산 서열을 포함하는 이중특이성 항체가 MKN-45 세포에 대한 CEACAM5xCD47 이중특이성 항체의 식작용 지수 곡선의 EC50을 한 실시양태에서 더 높은 농도를 향해 3배 초과하여 이동시키지 않는 것을 특징으로 한다. 그러한 경우에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체 및 CEA-TCB1은 "비경쟁적"으로 규정되고, 상기 CEA에 대한 그들의 결합에서 현저한 간섭 없이 CEA에 자연적으로 결합할 수 있는 것으로 간주되고, 따라서 약물 둘 다의 치료적 레벨이 종양 조직 내에 동시에 존재하는 경우에도 파괴되지 않은 식작용(CEAxCD47)에 대한 그의 효과 및 또한 파괴되지 않은 T 세포 활성화(CEAxTCB1)에 대한 그의 효과를 나타낼 수 있다(참조: 도 18).
- [0061] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체는 300 nM의 농도에서 인간 CEACAM5 및 CD3ε에 특이적으로 결합하고, 중쇄 및 경쇄로서 서열 번호: 96 내지 99의 아미노산 서열을 포함하는 이중특이성 항체(추가로 CEA-

TCB로도 칭함)가 MKN-45 세포에 대한 CEACAM5xCD47 이중특이성 항체의 결합 곡선의 EC50을 한 실시양태에서 더 높은 농도를 향해 3배 초과하여 이동시키지 않는 것을 특징으로 한다. 그러한 경우에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체 및 CEA-TCB는 "비경쟁적"으로 규정되고, 상기 CEA에 대한 그들의 결합에서 현저한 간섭 없이 CEA에 자연적으로 결합할 수 있는 것으로 간주되고, 따라서 약물 둘 다의 치료적 레벨이 종양 조직 내에 동시에 존재하는 경우에도 파괴되지 않은 식작용에 대한 그의 효과(CEAxCD47) 및 또한 파괴되지 않은 T 세포 활성화에 대한 그의 효과(CEA-TCB)를 나타낼 수 있다(참조: 도 18). 이는 본 발명의 CEA-TCB/TCB1과 본 발명의 CEAxCD47의 조합 치료를 용이하게 한다(참조: 도 18).

- [0062] 서열 번호: 88 내지 99의 서열은 각각 US20140242079 W02017055389에 따른 것이다.
- [0063] 한 실시양태에서, CEA-TCB 및 CEA-TCB1과 같은 CEAxCD3 이중특이성 항체와 조합된 본 발명의 CEAxCD47 이중특이성 항체는 예를 들어 동일한 자원 인간 공여자로부터 유도된 T 세포 및 인간 마크로파지 및 MKN-45 종양 세포를 함유하는 어세이에서 적어도 상가적이거나, 또는 심지어 상승적인 종양 세포의 사멸율%을 나타낸다(참조: 도 19a 및 b).
- [0064] 한 실시양태에서, 이중특이성 항체는 제1 결합부의 중쇄로서 및 제2 결합부의 중쇄로서 공통 중쇄(cHC)를 포함하는 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, 이중특이성 항체는 각각의 결합부의 상기 공통 중쇄가 CDR로서 서열 번호: 1의 CDRH1, 서열 번호: 2의 CDRH2 및 서열 번호: 3의 CDRH3 또는 서열 번호: 25의 CDRH1, 서열 번호: 26의 CDRH2 및 서열 번호: 27의 CDRH3를 포함하는 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, 이중특이성 항체는 각각의 결합부의 상기 공통 중쇄가 공통 가변 중쇄 도메인(cVH)으로서 서열 번호: 4를 포함하는 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체는 서열 번호: 5, 서열 번호: 23, 및 서열 번호: 24로 구성되는 군으로부터 선택된 공통 중쇄(cHC)를 포함하는 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, 서열 번호: 5의 공통 중쇄는 서열 번호: 6에 나타난 핵산 서열에 의해 코딩된다.
- [0065] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체는 CD47에 특이적인 제2 결합부로서, CDR로서 서열 번호: 1의 CDRH1, 서열 번호: 2의 CDRH2 및 서열 번호: 3의 CDRH3를 포함하는 공통 중쇄 및 CDR로서 서열 번호: 7의 CDRL1, 서열 번호: 8 내에 포함된 Ala Ala Ser의 CDRL2, 및 서열 번호: 9의 CDRL3를 포함하는 경쇄(LC), 또는 CDR로서 서열 번호: 25의 CDRH1, 서열 번호: 26의 CDRH2 및 서열 번호: 27의 CDRH3를 포함하는 공통 중쇄 및 CDR로서 서열 번호: 28의 CDRL1, 서열 번호: 29의 CDRL2, 및 서열 번호: 30의 CDRL3를 포함하는 경쇄(LC)를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0066] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체는 제2 결합부로서 가변 중쇄 도메인(cVH)으로서 서열 번호: 4 및 서열 번호: 10의 가변 경쇄 도메인(VL)을 포함하는 중쇄를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0067] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체는 제2 결합부로서 서열 번호: 5를 포함하는 중쇄(cHC) 및 서열 번호: 11의 경쇄(CL)를 포함하는 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체는 제2 결합부로서 서열 번호: 23을 포함하는 중쇄(cHC) 및 서열 번호: 11의 경쇄(CL)를 포함하는 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체는 제2 결합부로서 서열 번호: 24를 포함하는 중쇄(cHC) 및 서열 번호: 11의 경쇄(CL)를 포함하는 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, 서열 번호: 11의 경쇄(LC)는 서열 번호: 12에 나타난 핵산 서열에 의해 코딩된다.
- [0068] 한 실시양태에서, 이중특이성 항체는 CEA에 특이적으로 결합하고, 서열 번호: 13의 경쇄 불변 도메인을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0069] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체는 0.1 내지 10 nM의 IC50으로 MKN-45 세포 상에서 CD47 간의 상호작용을 억제하는 것을 특징으로 한다. SIRP α (SIRP α , CD172a; UniProtKB P78324)는 200 ng/ml (His 태깅된 가용성 SIRP알파)의 농도로 사용된다. 어세이의 상세한 내용은 실시예 8(CD47 항체의 SIRP α 블로킹 활성화)에 기재되어 있고, 결과는 표 2에 기재되어 있다.
- [0070] 한 실시양태에서, 본 발명의 이중특이성 항체는 10 nM 미만의 이중특이성 항체의 EC50에서 인간 마크로파지에 의해 MKN-45 세포와 같은 CEA 발현 종양 세포주의 농도 의존성 식작용(ADCP)을 특징으로 한다. ADCP는 일반적으로 1:3 (인간 마크로파지:타겟 세포(종양 세포)); 예를 들어 도 12, 15, 및 16 참조의 E:T 비율을 이용하여 이미징에 의해 식작용 지수(EC50 또는 최대값)로서 본 발명에 따라 측정된다). 도 3b의 결과는 1:1의 E:T를 이용하여 얻었다. 어세이의 상세한 내용은 실시예 9.2에 기재되어 있다.
- [0071] 추가 정보를 위한, 10 nM 미만의 이중특이성 항체의 EC50에서 인간 마크로파지에 의한 MKN-45 세포와 같은 CEA 발현 종양 세포주의 식작용(ADCP). 또한, ADCP는 예를 들어 3:1 (인간 마크로파지:타겟 세포(종양 세포)); 예를

들어 도 3a 참조)의 E:T 비율을 이용하여 유세포분석에 의해 측정될 수도 있다. 어세이의 상세한 내용은 실시예 9(1. 유세포분석 기반 ADCP 어세이)에 기재되어 있다.

- [0072] 한 실시양태에서, 이중특이성 항체는 CEACAM5에 특이적으로 결합하지만, MKN-45 종양 세포 상에서 CEACAM5에 대한 결합에 대해 MAB CEA, CEA-TCB 및/또는 CEA-TCB1과 경쟁하지 않는 것을 특징으로 한다.
- [0073] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체는 MKN-45 세포에 대한 결합에 대한 EC50 값(1 내지 200 nM의 EC50)이 300 nM 농도의 MAB CEA 또는 CEA-TCB의 첨가에 의해 각각 30 nM 농도의 CEA-TCB1의 첨가에 의해 3배 미만 증가되는 것(경쟁 없음)을 특징으로 한다.
- [0074] 한 실시양태에서, 본 발명의 CEAxCD47 항체는 B6H12.2를 이용하는 동일한 어세이(실시예 15)에서 측정된 EC50과 비교하여 RBC 식작용에 대해 100배 이상 더 높은 EC50을 나타낸다.
- [0075] 한 실시양태에서, 본 발명의 CEAxCD47 항체(비푸코실화의 부재 또는 존재 하에서 wt IgG1 Fc를 보유함)는 최대 200 µg/mL의 농도에서 유의미한 혈소관 활성화를 나타내지 않는다(참조: 실시예 15 및 CEAxCD47 이중특이성 항체 K2AC5 및 K2AC22에 대해 실시예 15에 기재된 결과).
- [0076] 다른 실시양태에서, 본 발명은 변형된 올리고당을 갖는 Fc 영역을 보유하도록 당조작된 본 발명의 이중특이성 항체에 관한 것이다. 놀랍게도 그러한 당조작된 본 발명에 따른 이중특이성 항체가 동일한 실험 조건 하에서 측정되는 경우, 동일하지만 당조작되지 않은 (모) 이중특이성 항체와 비교하여 이미징 기반 어세이에 의해 측정된 식작용 지수 곡선에 대해 적어도 3배 더 낮은 EC50 값을 보유한다는 것이 확인되었다. 한 실시양태에서, 식작용 지수에 대한 EC50은 5 내지 10배 더 낮거나, 또는 10 내지 30배 더 낮다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 동일하지만 당조작되지 않은 이중특이성 항체와 비교하여 감소된 수의 푸코오스 잔기를 보유하도록 변형되었다. 다른 실시양태에서, Fc 영역은 당조작되지 않은 이중특이성 항체와 비교하여 증가된 비율의 양분된 올리고당을 보유한다. 아직 다른 실시양태에서, 양분된 올리고당은 주로 양분된 복합체이다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 당조작된 항원 결합 분자는 당조작되지 않은 이중특이성 항체와 비교하여 상기 이중특이성 항체의 Fc 영역 내에 증가된 비율의 양분되고 비푸코실화된 올리고당을 보유한다. 대안적으로, 본 발명의 이중특이성 항체는 당조작되지 않은 이중특이성 항체와 비교하여 Fc 영역 내에 증가된 비율의 GicNAc 잔기 대 푸코오스 잔기를 보유할 수 있다. 한 실시양태에서, 양분되고 비푸코실화된 올리고당은 주로 하이브리드 형태이다. 대안적으로, 양분되고 비푸코실화된 올리고당은 주로 복합체 타입이다.
- [0077] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체는 Fc 영역 내의 N-연결된 올리고당의 50% 내지 100%가 비푸코실화되는 것을 특징으로 한다.
- [0078] 한 실시양태에서, 이중특이성 항체는 Fc 영역 내의 N-연결된 올리고당의 50% 내지 100%가 양분되는 것을 특징으로 한다.
- [0079] 한 실시양태에서, 이중특이성 항체는 Fc 영역 내의 N-연결된 올리고당의 80% 내지 100%가 양분되고 비푸코실화되는 것을 특징으로 한다.
- [0080] 한 실시양태에서, 이중특이성 항체는 상기 당조작된 항체에 의해 유도된 농도/ADCC 곡선(EC50의 감소 또는 ADCC의 최대값의 증가)(참조: 도 13 및 14)이 동일하지만 당조작되지 않은 이중특이성 항체에 의해 유도된 ADCC와 비교하여 적어도 1.2배 증가되는 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, ADCC는 1.2 내지 2.0배 증가된다.
- [0081] 한 실시양태에서, 이중특이성 항체는 동일한 실험 조건 하에서 측정되는 경우, 동일하지만 당조작되지 않은 (모) 이중특이성 항체와 비교하여 이미징 기반 어세이에 의해 측정된 식작용 지수 곡선에 대한 적어도 3배 더 낮은 EC50 값을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, 식작용 지수에 대한 EC50은 5 내지 10배 더 낮거나, 또는 10 내지 30배 더 낮다.
- [0082] 한 실시양태에서, 이중특이성 항체는 상기 당조작된 항체에 의해 유도되고 유세포분석에 의해 측정된 최대 식작용 지수가 동일하지만 당조작되지 않은 이중특이성 항체에 의해 유도된 최대 식작용 지수와 비교하여 적어도 1.2배 증가되는 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, 최대 식작용 지수는 1.2 내지 2.0배 증가된다.
- [0083] 한 실시양태에서, 이중특이성 항체는 상기 당조작된 항체에 의해 유도되고 이미징에 의해 측정된 최대 식작용 지수가 동일하지만 당조작되지 않은 이중특이성 항체에 의해 유도된 최대 식작용 지수와 비교하여 적어도 1.2배 증가되는 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, 최대 식작용 지수는 1.2 내지 2.0배 증가된다.
- [0084] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 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 구성되는 군으로부터 선택된, Fc 영역 내의 1개, 2개 또는 3개 아미노산 치환("Fc 아미노산 치환")을 포함하는 것을 특징으로 한다.

- [0085] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 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 구성되는 군으로부터 선택된, Fc 영역 내의 1개, 2개 또는 3개 아미노산 치환 및 동일하지만 당조작되지 않은 이중특이성 항체와 비교하여 감소된 수의 푸코오스 잔기를 보유하도록 당조작된 Fc 영역을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0086] 한 실시양태에서, Fc 영역 내에 상기 치환을 포함하는 이중특이성 항체는 상기 아미노산 치환된 항체에 의해 유도된 농도/ADCC 곡선(EC50의 감소 또는 ADCC의 최대값의 증가)이 Fc 영역 내에 상기 아미노산 치환을 아무것도 포함하지 않는 상기 항체에 의해 유도된 ADCC와 비교하여 적어도 1.2배 증가되는 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, ADCC는 1.2 내지 2.0배 증가된다.
- [0087] 한 실시양태에서, Fc 영역 내에 상기 치환을 포함하는 이중특이성 항체는 동일한 실험 조건 하에서 측정되는 경우, Fc 영역 내에 상기 아미노산 치환을 아무것도 포함하지 않는 동일한 (모) 이중특이성 항체와 비교하여 이미징 기반 어세이에 의해 측정된 식작용 지수 곡선에 대한 적어도 3배 더 낮은 EC50 값을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, 식작용 지수에 대한 EC50은 5 내지 10배 더 낮거나, 또는 10 내지 30배 더 낮다.
- [0088] 한 실시양태에서, Fc 영역 내에 상기 치환을 포함하는 이중특이성 항체는 상기 아미노산 치환된 항체에 의해 유도된 유세포분석에 의해 결정된 최대 식작용(ADCP)이 Fc 영역 내에 상기 아미노산 치환을 아무것도 포함하지 않는 상기 항체에 의해 유도된 ADCP와 비교하여 적어도 1.2배 증가되는 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, ADCP는 1.2 내지 2.0배 증가된다. 한 실시양태에서, Fc 영역 내에 상기 치환을 포함하는 이중특이성 항체는 상기 아미노산 치환된 항체에 의해 유도된 이미징에 의해 결정된 최대 식작용(ADCP)이 Fc 영역 내에 상기 아미노산 치환을 아무것도 포함하지 않는 상기 항체에 의해 유도된 ADCP와 비교하여 적어도 1.2배 증가되는 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, ADCP는 1.2 내지 2.0배 증가된다.
- [0089] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체는 Fc 영역 내의 N-연결된 올리고당의 50% 내지 100%, 60% 내지 100%, 70% 내지 100% 또는 80% 내지 100%가 비푸코실화되는 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체는 Fc 영역 내의 N-연결된 올리고당의 50% 내지 100%, 60% 내지 100%, 70% 내지 100% 또는 80% 내지 100%가 양분되는 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체는 Fc 영역 내의 N-연결된 올리고당의 50% 내지 100%, 60% 내지 100%, 70% 내지 100% 또는 80% 내지 100%가 양분되고, 비푸코실화되지 않는 것을 특징으로 한다.
- [0090] 한 실시양태에서, 당조작된 이중특이성 항체는 공통 중쇄로서 서열 번호: 5를 포함하는 당조작되지 않은 이중특이성 항체(모 이중특이성 항체, 하기 규정되는 바와 같은 표준 조건에서 CHO K1 세포주 CHO-K1(ATCC®CCL-61™)에서 생성됨)와 비교하여 증가된 이펙터 기능을 포함한다.
- [0091] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체는 상기 당조작된 이중특이성 항체가 하나 이상의 증가된 이펙터 기능, 예를 들어 FcγR에 대한 증가된 결합 친화성, 마크로파지의 증가된 결합(증가된 항체 의존성 세포성 식작용; ADCP), NK 세포의 증가된 결합(증가된 항체 매개 세포성 세포독성; ADCC), 및 단핵구에 대한 증가된 결합으로 구성되는 군 유래의 것을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0092] 항CD47 모노클로날 항체 hu5F9-G4(2014년 이래 임상시험에서 테스트됨, 예를 들어 clinicaltrials.gov 참조)에 대해 측정된 농도/식작용 지수 곡선은 어세이에 1 mg/mL의 생리학적 농도로 첨가된 huIgG의 첨가에 의해 현저히 감소된다(이미징 기반 어세이에서 측정된 EC50의 증가 및 식작용 곡선의 최대값의 감소, 예를 들어 도 17 참조).
- [0093] 놀랍게도, 본 발명의 CEAxCD47 항체는 인간 IgG가 첨가되는 경우 단지 EC50의 3배 미만의 적은 이동만을 나타내고, 농도/식작용 지수 곡선의 최대값의 현저한 감소는 나타내지 않는다(참조: 표 4).
- [0094] 한 실시양태에서, 본 발명의 CEAxCD47 항체는 이미징 기반 식작용 어세이에 대한 1 mg /mL의 hu IgG의 첨가가 농도/식작용 지수 곡선의 최대값의 0.9배 미만의 감소 및/또는 더 높은 농도를 향한 EC50의 3배 미만의 이동을 야기하는 것을 특징으로 한다(참조: 표 4).
- [0095] 본 발명의 추가의 실시양태는 본 발명에 따른 이중특이성 항체를 코딩하는 것을 특징으로 하는 단리된 폴리뉴클레오타이드이다.
- [0096] 본 발명의 추가의 실시양태는 본 발명에 따른 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터이다.

- [0097] 본 발명의 추가의 실시양태는 본 발명에 따른 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포이다.
- [0098] 본 발명의 추가의 실시양태는 본 발명에 따른 이중특이성 항체의 제조 방법인데, 상기 방법은
- [0099] a) 본 발명의 상기 이중특이성 항체의 생성을 허용하는 조건 하에서 상기 이중특이성 항체를 코딩하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계, 및
- [0100] b) 상기 항체를 단리하는 단계로서, 상기 항체는 CEA 및 CD47에 특이적으로 결합할 수 있는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0101] 한 실시양태에서, 본 발명은 숙주 세포 내에서 본 발명에 따른 당조작된 이중특이성 항체를 제조하는 방법을 포함하는 것을 특징으로 하는데, 상기 방법은
- [0102] a) 본 발명의 상기 이중특이성 항체의 생성을 허용하고, 상기 이중특이성 항체의 Fc 영역 상에 존재하는 올리고당의 변형을 허용하는 조건 하에서 $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코사미드트랜스퍼라아제 III 활성을 보유하는 폴리펩타이드를 코딩하는 적어도 하나의 핵산을 발현하도록 당조작된 숙주 세포를 배양하는 단계, 및
- [0103] b) 상기 당조작된 이중특이성 항체를 단리하는 단계로서, 상기 당조작된 이중특이성 항체는 CEACAM5 및 CD47에 특이적으로 결합할 수 있는 단계를 포함한다.
- [0104] 한 실시양태에서, 본 발명은 숙주 세포 내에서 당조작된 이중특이성 항체를 제조하는 방법을 포함하는 것을 특징으로 하는데, 상기 방법은
- [0105] a) 본 발명의 상기 이중특이성 항체의 생성을 허용하고, 상기 이중특이성 항체의 Fc 영역 상에 존재하는 올리고당의 변형을 허용하는 조건 하에서 FUT8 유전자의 타겟팅된 파괴에 의해 당조작된 숙주 세포를 배양하는 단계, 및
- [0106] b) 상기 당조작된 이중특이성 항체를 단리하는 단계로서, 상기 당조작된 이중특이성 항체는 CEACAM5 및 CD47에 특이적으로 결합할 수 있는 단계를 포함한다.
- [0107] 한 실시양태에서, 본 발명은 숙주 세포 내에서 당조작된 이중특이성 항체를 제조하는 방법을 포함하는 것을 특징으로 하는데, 상기 방법은
- [0108] a) 본 발명의 상기 이중특이성 항체의 생성을 허용하는 조건 하에서 본 발명의 Fc 치환된 이중특이성 항체를 코딩하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계, 및
- [0109] b) 상기 Fc 치환된 이중특이성 항체를 단리하는 단계로서, 상기 이중특이성 항체는 CEA 및 CD47에 특이적으로 결합할 수 있는 단계를 포함한다.
- [0110] 본 발명의 추가의 실시양태는 종양 세포와 본 발명에 따른 이중특이성 항체를 접촉시키는 단계를 포함하는, 종양 세포의 세포 용해를 유도하는 방법이다. 종양 세포는 인간 종양 세포이고, 바람직하게는 환자 내의 종양 세포이다.
- [0111] 본 발명의 추가의 실시양태는 본 발명에 따른 방법인데, 종양 세포는 대장암 세포, NSCLC(비소세포 폐암) 세포, 위암 세포, 췌장암 세포, 유방암 세포, 또는 CEA를 발현하는 다른 종양 세포인 것을 특징으로 한다.
- [0112] 본 발명의 추가의 실시양태는 CEA를 발현하는 암을 보유하는 대상체를 치료하는 방법인데, 상기 방법은 대상체에게 본 발명에 따른 이중특이성 항체의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0113] 본 발명의 추가의 실시양태는 CEA를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 생존 시간을 증가시키는 방법인데, 상기 본 발명에 따른 이중특이성 항체의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0114] 본 발명의 추가의 실시양태는 본 발명에 따른 방법인데, 암은 대장암, 비소세포 폐암(NSCLC), 위암, 췌장암 또는 유방암인 것을 특징으로 한다.
- [0115] 본 발명의 추가의 실시양태는 본 발명에 따른 방법인데, 본 발명에 따른 이중특이성 항체는 인간 대상체에게 화학요법 또는 방사선요법과 함께 투여된다.
- [0116] 본 발명의 추가의 실시양태는 CEA를 발현하는 암을 보유하는 대상체를 치료하는 방법인데, 상기 방법은 대상체에게 본 발명에 따른 이중특이성 항체의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함하고, 상기 이중특이성 항체의 식작용의 EC50 값이 동일한 실험 조건 하에서 및 1 mg/ml의 인간 IgG의 존재 및/또는 부재 하에서 참조 항체 K2AC22의 E50 값의 0.1 내지 3배 범위에 있는 것을 특징으로 한다. 추가의 실시양태에서, 상기 범위는 0.2 내지

3.0, 0.3 내지 3.0, 0.5 내지 2.5 또는 1.0 내지 2.5이다. 한 실시양태에서, 이중특이성 항체는 100 nM 내지 600 nM의 결합 친화성으로, 한 실시양태에서 100 nM 내지 500 nM의 결합 친화성으로 인간 CD47에 결합하는 것을 특징으로 한다.

- [0117] 본 발명의 추가의 실시양태는 CEA를 발현하는 암을 보유하는 대상체를 치료하는 방법에서 본 발명에 따른 이중특이성 항체의 용도인데, 상기 방법은 대상체에게 본 발명에 따른 이중특이성 항체의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함하고, 상기 이중특이성 항체의 식작용의 EC50 값이 동일한 실험 조건 하에서 및 1 mg/ml의 인간 IgG의 존재 및/또는 부재 하에서 참조 항체 K2AC22의 E50 값의 0.1 내지 3배 범위에 있는 것을 특징으로 한다. 추가의 실시양태에서, 상기 범위는 0.2 내지 3.0, 0.3 내지 3.0, 0.5 내지 2.5 또는 1.0 내지 2.5이다. 한 실시양태에서, 이중특이성 항체는 100 nM 내지 600 nM의 결합 친화성으로, 한 실시양태에서 100 nM 내지 500 nM의 결합 친화성으로 인간 CD47에 결합하는 것을 특징으로 한다.
- [0118] 도 13 내지 17로부터 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따른 항체의 ADCC 및 ADCCP/식작용 지수 값은 1 mg/ml의 농도의 인간 IgG(1 mg/ml 또는 훨씬 더 높은 인간 IgG는 대부분의 환자에 존재함)에 의해 영향받지 않거나, 또는 단지 낮은 정도로 영향을 받는 반면, 당해 기술분야의 항CD47 항체(hu5F9-G4)의 경우, ADCC 및 ADCCP 값은 1 mg/ml의 인간 IgG의 존재 하에서 현저히 감소된다.
- [0119] 본 발명의 추가의 실시양태는 CEA를 발현하는 암을 보유하는 대상체를 치료하기 위한 약제의 제조에서 본 발명에 따른 이중특이성 항체의 용도이다.
- [0120] 본 발명의 추가의 실시양태는 본 발명에 따른 약제의 제조에서 본 발명에 따른 이중특이성 항체의 용도인데, 암은 대장암, 비소세포 폐암(NSCLC), 위암, 췌장암 및 유방암으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [0121] 본 발명의 추가의 실시양태는 CEA를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료에서 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제3 결합부, 및 인간 CD3ε에 특이적으로 결합하는 제4 결합부를 포함하는 제2 이중특이성 항체와 동시, 별도, 또는 순차적 조합으로 사용하기 위한 본 발명에 따른 이중특이성 항체이다. 본 발명의 추가의 실시양태는 CEA를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료에서 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제3 결합부, 및 인간 CD3ε의 에피토프에 특이적으로 결합하는 제4 결합부로서, 상기 에피토프는 서열 번호: 22의 아미노산 서열을 포함하는 제4 결합부를 포함하는 제2 이중특이성 항체와 동시, 별도, 또는 순차적 조합으로 사용하기 위한 본 발명에 따른 이중특이성 항체이다.
- [0122] 본 발명의 추가의 실시양태는 CEA를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료에서 CEA-TCB 및/또는 CEA/TCB1과 동시, 별도, 또는 순차적 조합으로 사용하기 위한 본 발명에 따른 이중특이성 항체이다.
- [0123] 본 발명의 추가의 실시양태는 CEA를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료에서 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하고 서열 번호: 20의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 21의 경쇄 가변 영역을 포함하는 제3 결합부 및 인간 CD3ε의 에피토프에 특이적으로 결합하는 제4 결합부로서, 상기 에피토프는 서열 번호: 22의 아미노산 서열을 포함하는 제4 결합부를 포함하는 제2 이중특이성 항체와 동시, 별도, 또는 순차적 조합으로 사용하기 위한 본 발명에 따른 이중특이성 항체이다. 본 발명의 추가의 실시양태는 본 발명에 따른 이중특이성 항체인데, CEA를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료에서 상기 제2 이중특이성 항체와 동시, 별도, 또는 순차적 조합으로 사용하기 위한 상기 제2 이중특이성 항체와 경쟁하지 않는 것을 특징으로 한다.
- [0124] 본 발명의 추가의 실시양태는 본 발명에 따른 이중특이성 항체인데, CEA를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료에서 상기 CEA-TCB 또는 CEA-TCB1과 동시, 별도, 또는 순차적 조합으로 사용하기 위한 CEA-TCB 또는 CEA-TCB1과 경쟁하지 않는 것을 특징으로 한다.
- [0125] 본 발명의 추가의 실시양태는 본 발명에 따른 이중특이성 항체인데, CEA를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료에서 상기 CEA-TCB 또는 CEA-TCB1과 동시, 별도, 또는 순차적 조합으로 사용하기 위한 CEA-TCB 또는 CEA-TCB1과 경쟁하는 것을 특징으로 한다.
- [0126] 본 발명의 추가의 실시양태는 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하고 서열 번호: 88의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 89의 경쇄 가변 영역을 포함하는 제3 결합부 및 인간 CD3ε에 특이적으로 결합하고 서열 번호: 90의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 91의 경쇄 가변 영역을 포함하는 제4 결합부를 포함하는 제2 이중특이성 항체와 동시, 별도, 또는 순차적 조합으로 사용하기 위한 본 발명에 따른 이중특이성 항체이다.
- [0127] 본 발명의 추가의 실시양태는 본 발명에 따른 용도를 위한 본 발명에 따른 이중특이성 항체인데, 본 발명에 따

른 이중특이성 항체 및 제2 이중특이성 항체가 6 내지 15일 간격으로 교대로 상기 대상체에게 투여되는 것을 특징으로 한다.

- [0128] 본 발명의 추가의 실시양태는 본 발명에 따른 용도를 위한 본 발명에 따른 이중특이성 항체인데, 본 발명에 따른 이중특이성 항체 및 제2 이중특이성 항체가 6 내지 15일 간격으로 동시에 상기 대상체에게 투여되는 것을 특징으로 한다.
- [0129] 본 발명의 추가의 실시양태는 CEA를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료에서 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하고 서열 번호: 20의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 21의 경쇄 가변 영역을 포함하는 제3 결합부 및 인간 CD3ε의 에피토프에 특이적으로 결합하고 서열 번호: 22의 아미노산 서열을 포함하는 제4 결합부를 포함하는 제2 이중특이성 항체와 동시, 별도, 또는 순차적 조합으로 사용하기 위한 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제1 결합부 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 제2 결합부를 포함하는 본 발명에 따른 제1 이중특이성 항체인데, 300 nM 농도의 상기 제2 이중특이성 항체는 본 발명에 따른 이중특이성 항체의 MKN-45 세포에 대한 식작용 지수 곡선의 EC50 값을 한 실시양태에서 더 높은 농도를 향해 3배 초과하여 이동시키지 않는다.
- [0130] 본 발명의 추가의 실시양태는 CEA를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료에서 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하고 서열 번호: 88의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 89의 경쇄 가변 영역을 포함하는 제3 결합부 및 인간 CD3ε의 에피토프에 특이적으로 결합하고 서열 번호: 90의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 91의 경쇄 가변 영역을 포함하는 제4 결합부를 포함하는 제2 이중특이성 항체와 동시, 별도, 또는 순차적 조합으로 사용하기 위한 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제1 결합부 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 제2 결합부를 포함하는 본 발명에 따른 제1 이중특이성 항체인데, 30 nM 농도의 상기 제2 이중특이성 항체는 본 발명에 따른 이중특이성 항체의 MKN-45 세포에 대한 결합 곡선의 EC50 값을 한 실시양태에서 더 높은 농도를 향해 3배 초과하여 이동시키지 않는다.
- [0131] 본 발명의 추가의 실시양태는 CEA를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료에서 CEA-TCB 또는 CEA-TCB1과 동시, 별도, 또는 순차적 조합으로 사용하기 위한 본 발명에 따른 제1 이중특이성 항체인데, 300 nM 농도의 상기 CEA-TCB 또는 30 nM 농도의 상기 CEA-TCB1은 본 발명에 따른 이중특이성 항체의 MKN-45 세포에 대한 결합 곡선의 EC50 값을 한 실시양태에서 더 높은 농도를 향해 3배 초과하여 이동시키지 않는다.
- [0132] 본 발명의 추가의 실시양태는 본 발명에 따른 용도를 위한, 본 발명에 따른 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제1 결합부 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 제2 결합부를 포함하는 본 발명에 따른 제1 이중특이성 항체인데, 상기 암은 대장암, 비소세포 폐암(NSCLC), 위암, 췌장암 및 유방암인 것을 특징으로 한다.
- [0133] 본 발명의 추가의 실시양태는 본 발명에 따른 이중특이성 항체를 포함하는 조성물인데, CEA를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료에서 사용하기 위한 상기 규정된 바와 같은 상기 제2 이중특이성 항체와 경쟁하지 않는 것을 특징으로 한다.
- [0134] 본 발명의 추가의 실시양태는 본 발명에 따른 이중특이성 항체를 포함하는 조성물인데, CEA를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료에서 사용하기 위해 CEACAM5에 특이적으로 결합하고 서열 번호: 20의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 21의 경쇄 가변 영역을 포함하는 제3 결합부 및 인간 CD3ε에 특이적으로 결합하고 서열 번호: 22의 아미노산 서열을 포함하는 제4 결합부를 포함하는 제2 이중특이성 항체와 경쟁하지 않는 것을 특징으로 한다.
- [0135] 본 발명의 추가의 실시양태는 본 발명에 따른 이중특이성 항체를 포함하는 조성물인데, CEA를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료에서 사용하기 위해 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하고 서열 번호: 88의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 89의 경쇄 가변 영역을 포함하는 제3 결합부 및 인간 CD3ε의 에피토프에 특이적으로 결합하고 서열 번호: 90의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 91의 경쇄 가변 영역을 포함하는 제4 결합부를 포함하는 제2 이중특이성 항체와 경쟁하지 않는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 추가의 실시양태는 본 발명에 따른 이중특이성 항체를 포함하는 조성물인데, CEA-TCB 및/또는 CEA-TCB1과 경쟁하지 않는 것을 특징으로 한다.
- [0136] 본 발명의 추가의 실시양태는 종양(암), 구체적으로 고형 종양, 구체적으로 CEA를 발현하는 고형 종양, 구체적으로 대장암, 비소세포 폐암(NSCLC), 위암, 췌장암 및 유방암으로 진단된 인간 환자의 치료를 위한 방법인데, 상기 방법은 인간 환자에게 본 발명에 따른 이중특이성 항체 및 CEA 및 CD3에 대한 상기한 바와 같은 제2 이중특이성 항체(한 실시양태에서, CEA-TCB 또는 CEA-TCB1)의 유효량을 투여하는 단계를 포함하고, 상기 방법은 후속적으로
- [0137] 환자에게, 예를 들어 4 내지 12주에 걸쳐 매주, 상기 제2 항CEACAM5xCD3 항체 0.1 내지 10 mg/kg, 추가의 실시

양태에서 0.5 내지 10 mg/kg, 추가의 실시양태에서 1 내지 2 mg/kg의 용량을 투여하는 단계,

- [0138] 환자에게 상기 제2 항체 q1, q2w, q3w 또는 경우에 따라 q4w를 투여하는 단계,
- [0139] 이들 4 내지 12주 후 및 상기 항CEAxCD3 항체의 추가적인 2 또는 3 또는 4 제거 반감기 후 환자에게 본 발명에 따른 항체 1 내지 20 mg/kg의 용량을 투여하는 단계,
- [0140] 환자에게 상기 본 발명에 따른 항체 q1, q2w, q3w 또는 경우에 따라 q4w를 투여하는 단계,
- [0141] 본 발명에 따른 상기 항체의 2 또는 3 또는 4 제거 반감기를 기다리는 단계, 및 그 후에
- [0142] 경우에 따라 상기 CEAxCD3 이중특이성 항체 투여 후 CEAxCD47 이중특이성 항체 투여의 사이클을 반복하고, 경우에 따라 그 사이클을 다시 반복하는 단계를 포함한다.
- [0143] 이러한 "교대" 방법은 본 발명의 항체 및 제2 이중특이성 항체가 경쟁적인 경우 적용된다.
- [0144] 본 발명에 따른 상기 CEAxCD3 이중특이성 항체 및 CEAxCD47 이중특이성 항체가 경쟁적이 아닌 경우, 2가지 이중특이성 항체는 또한, 예를 들어 환자에게 0.1 내지 10 mg/kg, 추가의 실시양태에서 0.5 내지 10 mg/kg, 추가의 실시양태에서 1 내지 2 mg/kg의 본 발명의 CEAxCD3 이중특이성 항체 및 1 내지 20 mg/kg의 CEAxCD47 이중특이성 항체의 용량을 거의 동시에 투여하고, 그 후에 q1w 또는 q2w 또는 q3w 또는 경우에 따라 q4w의 빈도로 이들 조합 투여의 1회 이상을 실시함으로써 환자가 이중특이성 항체 둘 다의 치료적으로 유효한 혈장 및 조직 농도를 병행하여 경험하는 방식("동시 방식")으로 투여될 수 있다.
- [0145] 용어 "Q1w"는 1주 1회 투여를 의미하고; q2w는 2주마다 투여를 의미한다.
- [0146] 본 발명의 추가의 실시양태는 본 발명에 따른 항체 및 약학적으로 허용 가능한 부형제 또는 담체를 포함하는 약학 조성물이다.
- [0147] 본 발명의 추가의 바람직한 실시양태는 의약으로서 사용하기 위한 본 발명에 따른 항체를 포함하는 약학 조성물이다.
- [0148] 본 발명의 추가의 바람직한 실시양태는 고형 종양 질환의 치료에서 의약으로서 사용하기 위한 본 발명에 따른 항체를 포함하는 약학 조성물이다.
- [0149] 본 발명의 추가의 바람직한 실시양태는 대장암, NSCLC (비소세포 폐암), 위암, 췌장암 또는 유방암의 치료에서 의약으로서 사용하기 위한 본 발명에 따른 항체를 포함하는 약학 조성물이다.
- [0150] 본 발명의 추가의 실시양태는 CEA를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료에서 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하고 서열 번호: 20의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 21의 경쇄 가변 영역을 포함하는 제3 결합부 및 인간 CD3ε의 에피토프에 특이적으로 결합하고 서열 번호: 22의 아미노산 서열을 포함하는 제4 결합부를 포함하는 제2 이중특이성 항체와 동시, 별도, 또는 순차적 조합으로 사용하기 위한 본 발명에 따른 이중특이성 항체를 포함하는 조성물인데, 300 nM 농도의 상기 제2 이중특이성 항체는 본 발명에 따른 이중특이성 항체의 MKN-45 세포에 대한 결합 곡선의 EC50 값을 한 실시양태에서 더 높은 농도를 향해 3배 초과하여 이동시키지 않는다.
- [0151] 본 발명의 추가의 실시양태는 CEA를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료에서 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하고 서열 번호: 88의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 89의 경쇄 가변 영역을 포함하는 제3 결합부 및 인간 CD3ε의 에피토프에 특이적으로 결합하고 서열 번호: 90의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 91의 경쇄 가변 영역을 포함하는 제4 결합부를 포함하는 제2 이중특이성 항체와 동시, 별도, 또는 순차적 조합으로 사용하기 위한 본 발명에 따른 이중특이성 항체를 포함하는 조성물인데, 30 nM 농도의 상기 제2 이중특이성 항체는 본 발명에 따른 이중특이성 항체의 MKN-45 세포에 대한 결합 곡선의 EC50을 더 높은 농도를 향해 3배 초과하여 이동시키지 않는다.
- [0152] 본 발명의 추가의 실시양태는 본 발명에 따른 조성물인데 암은 대장암, 비소세포 폐암(NSCLC), 위암, 췌장암, 또는 유방암인 것을 특징으로 한다.
- [0153] 본 발명의 추가의 실시양태는 약학 조성물의 제조에 사용하기 위한 본 발명에 따른 항체의 용도이다.
- [0154] 본 발명의 추가의 실시양태는 약학 조성물의 제조를 위한 본 발명에 따른 항체 및 약학적으로 허용 가능한 부형제 또는 담체의 용도이다.
- [0155] 본 발명의 추가의 실시양태는 고형 종양 질환의 치료에서 약제의 제조를 위한 본 발명에 따른 항체의 용도이다.

- [0156] 본 발명의 추가의 실시양태는 대장암, NSCLC (비소세포 폐암), 위암, 췌장암 또는 유방암의 치료에서 본 발명에 따른 항체의 용도이다.
- [0157] 본 발명의 다른 관점은 중앙 세포와 상기한 실시양태 중 임의의 실시양태의 이중특이성 항체를 접촉시키는 단계를 포함하는 중앙 세포의 세포 용해를 유도하는 방법을 제공한다. 몇몇 실시양태에서, 중앙 세포는 대장암 세포, NSCLC(비소세포 폐암), 위암 세포, 췌장암 세포 또는 유방암 세포이다.
- [0158] 한 실시양태에서, 세포 용해는 이중특이성 항체의 항체 의존성 세포성 식작용 및/또는 항체 의존성 세포성 세포 독성에 의해 유도된다.
- [0159] 본 발명의 다른 관점은 CEA를 비정상적으로 발현하는 암을 보유하는 대상체를 치료하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 대상체에게 상기한 실시양태 중 임의의 실시양태의 이중특이성 항체의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0160] 본 발명의 다른 관점은 CEA를 비정상적으로 발현하는 암을 보유하는 대상체를 치료하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 대상체에게 인간 CEA 및 인간 CD3에 결합하는 이중특이성 항체와 함께 상기한 실시양태 중 임의의 실시양태의 이중특이성 항체의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. CEAXCD47 항체 및 CEAXCD3 항체가 경쟁하는 경우, 그들은 중앙 세포의 표면 상에서 CEA 수용체에 대해 경쟁할 것이며, 각각의 조합 파트너에 대한 수용체 점유 및 효능은 그들의 반응 친화성 및 그들의 혈장 농도에 따라 달라지고, 따라서 예측이 어려우며, 두 약물의 농도가 상이한 제거 반감기 각각 신체로부터의 클리어런스를 보유하는 경우 시간 경과에 따라 가변적이다. 따라서 경쟁하는 CEAXCD3 및 CEAXCD47 이중특이성 항체는 순차적으로(교대) 제공되어야 한다. CEAXCD3 및 CEAXCD47 이중특이성 항체가 경쟁하지 않거나, 또는 단지 최소한으로 경쟁하는 경우, 그들은 순차적으로뿐만 아니라 병행하여(동시에) 제공될 수 있으며, 이는 유리할 수 있는데, 그 이유는 CEAXCD3 이중특이성 항체에 의한 T 세포의 연관을 통한 및 동시에 CEAXCD47 이중특이성 항체에 의한 마크로파지의 연관을 통한 중앙 세포 사멸은 상가적이거나 상승적일 수 있기 때문이며, 이는 두 약물이 병행하여 제공되는 경우 효능이 증가됨을 의미한다.
- [0161] 본 발명의 다른 관점은 CEA를 비정상적으로 발현하는 암을 보유하는 대상체에서 무진행 생존 및/또는 총 생존 시간을 증가시키는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 대상체에게 상기한 실시양태 중 임의의 실시양태의 이중특이성 항체의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 한 실시양태에서, 암은 대장암, 비소세포 폐암(NSCLC), 위암, 췌장암 또는 유방암 또는 CEA를 발현하는 다른 암이다.
- [0162] 이들 방법의 특정 실시양태에서, 이중특이성 항체는 화학요법 또는 방사선요법과 함께 투여된다. 한 실시양태에서, 대상체는 대장암 또는 폐암 또는 위암 또는 췌장암 또는 유방암 또는 CEA를 발현하는 다른 암을 겪고 있는 환자이다.
- [0163] 본 발명의 다른 관점은 CEA를 비정상적으로 발현하는 암을 보유하는 대상체를 치료하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 대상체에게 인간 CEA 및 인간 CD3에 결합하는 이중특이성 항체와 함께 상기한 실시양태 중 임의의 실시양태의 이중특이성 항체의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0164] 본 발명의 다른 관점은 CEA를 비정상적으로 발현하는 암을 보유하는 대상체에서 무진행 생존 및/또는 총 생존 시간을 증가시키는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 대상체에게 상기한 실시양태 중 임의의 실시양태의 이중특이성 항체의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 한 실시양태에서, 암은 대장암, 비소세포 폐암(NSCLC), 위암, 췌장암 또는 유방암이다.
- [0165] 이들 방법의 특정 실시양태에서, 이중특이성 항체는 화학요법 또는 방사선요법과 함께 투여된다. 한 실시양태에서, 대상체는 대장암 또는 폐암 또는 위암 또는 췌장암 또는 유방암 또는 다른 CEA 발현 암을 보유하는 암 환자이다.
- [0166] 본 발명의 다른 실시양태는 상기한 치료 방법 중 임의의 치료 방법을 위한 본 발명에 따른 이중특이성 항체의 용도를 제공한다. 한 실시양태에서, 암은 대장암, 비소세포 폐암(NSCLC), 위암, 췌장암 및 유방암으로 구성되는 군으로부터 선택된다.

도면의 간단한 설명

- [0167] 도 1은 본 발명의 CEAXCD47 이중특이성 항체의 일반적인 분자 포맷; 면역원성 및 항약물 항체 ADA 형성을 최소화하기 위한 aa 브리지를 보유하지 않고 IgG 모노클로날 항체와 구별할 수 없는 완전 인간 IgG1 구조; 공통 중쇄(서열목록 참조); CD47 결합부 내의 카파 경쇄(CL 및 VL)(서열목록 참조); CEA 결합부 내의 람다 CL(서열목록

참조) 및 CEA 결합부 내의 램다 또는 카파 VL(a); ADCP 및 ADCC를 증가시키기 위한 Fc의 당조작(낮은 푸코오스) 또는 aa 돌연변이(들) 또는 둘 다(b)를 나타낸다.

도 2는 표면 상에 TAA뿐만 아니라 CD47을 보유하는 종양 세포에 대한 TAAxCD47 이중특이성 항체의 결합을 나타낸다. 1 내지 50 nM의 EC50으로 TAAxCD47의 결합(실선, 또한 본 발명의 다양한 CEAxCD47 항체의 결합 곡선에 대해 도 11 참조); 점선은 예를 들어 가용성 CEA에 의한 결합 곡선의 예시적인 및 모식적인 잠재 이동을 나타내는데, 구체적인 데이터에 대해서는 예를 들어 K2AC5 및 22와 같은 본 발명의 CEAxCD47 이중특이성 항체의 MKN-45 세포에 대한 결합 곡선에 대한 200 ng/ml의 가용성 CEA의 영향을 나타내는 도 20a 참조.

도 3a는 본 발명의 CD47 결합 암(arm)을 보유하는 TAAxCD47 이중특이성 항체, CD47 및 TAA 일가 항체뿐만 아니라 고친화성 항TAA(MSLN) 모노클로날 항체, 아마톡시맵을 이용하는 인간 채장암 세포주 HPAC(CEA 및 메소텔린 MSLN과 같은 다른 TAA를 발현함)의 식작용(유세포분석에 의해 평가되고 식작용의 %로서 표현됨)의 농도 의존성 증가를 나타낸다. 모든 항체는 야생형 IgG1 Fc 부분을 보유한다. 이중특이성 항체는 가장 높은 식작용을 나타낸다.

도 3b는 다양한 항체에 의해 유도된 식작용(CellInsight 어세이를 이용하여 평가되고 식작용 지수로서 표현됨)의 농도 의존성 증가를 나타낸다; 곡선 1: TAA 또는 CD47에 결합하지 않는 대조군 hIgG1; 곡선 2: 야생형 hIgG1 Fc를 보유하는 TAAxCD47 이중특이성 항체; 곡선 3: 야생형 hIgG1을 보유하는 항CD47 항체 B6H12.2; 곡선 4: hIgG1 Fc 부분 내에 DEA aa 치환(S329D, I332E 및 G236A)을 보유하는 TAAxCD47 이중특이성 항체. 가장 강력한 식작용은 DEA 돌연변이된 Fc를 보유하는 TAAxCD47을 이용하여 달성되었다.

도 4는 타겟 세포(인간 자연 PBMC 대 종양 세포 50:1)로서 폐암 NCI-H226 암 세포를 이용하는, 모두 동일한 본 발명의 CD47 결합 암을 보유하는 다양한 TAAxCD47 이중특이성 항체(TAA는 메소텔린 MSLN임)에 대한 ADCC 용량 반응 곡선(Cr51⁺ 어세이를 이용하여 평가되고, 특이적인 사멸률%로 표현됨)의 예를 나타낸다. 모든 이중특이성 항체는 고친화성 항TAA 모노클로날 항체, 아마톡시맵, 항MSLN mAb보다 더 강한 ADCC를 나타낸다.

도 5는 타겟 세포(이펙터 대 종양 세포 50:1)로서 폐암 NCI-H226 암 세포를 이용하는, 야생형 Fc를 보유하는 TAAxCD47 이중특이성 항체, DEA 돌연변이를 보유하는 Fc를 보유하는 상응하는 TAAxCD47 이중특이성 항체, 고친화성 항TAA 모노클로날 항체(본 도면에서 TAA는 CEA가 아님), 및 인간 IgG1 대조군 항체의 ADCC 용량 반응 곡선(Cr51⁺ 어세이를 이용하여 평가되고, 특이적인 사멸률%로 표현됨)을 나타낸다. 가장 강력한 ADCC는 DEA 돌연변이를 보유한 이중특이성 항체에서 관찰되었다.

도 6은 TAAxCD47 이중특이성 항체(실선) 및 상응하는 항CD47 일가 항체(점선)에 의한 CEA(TAA)를 동시발현하는 MKN-45 세포 상에서 발현된 CD47에 대한 가용성 SIRP α 의 농도 의존성 블로킹을 나타낸다. 이중특이성 항체의 더 높은 블로킹 능력은 CD47의 TAA 동시 연관 의존성 블로킹 및 타겟 세포에 대한 더 강력한 결합에 기인한다.

도 7a는 200 μ g/mL의 하기 항체와 함께 인큐베이션된 인간 전혈 내의 사이토카인 IFN γ 및 TNF α 의 방출을 나타낸다: 음성 대조군으로서 에르비투스, 양성 대조군으로서 항CD52 항체 캄파스, 및 동일한 항원 결합 영역을 보유하지만 상이한 Fc 영역(좌로부터 우로)을 보유하는 3개의 이중특이성 항체: 야생형 IgG1 Fc, DEA 돌연변이(S329D 및 I332E)를 보유하는 IgG1 Fc, DE 돌연변이를 보유하는 IgG1 Fc. biAb CD47lo 및 CD47lo는 동일한 CD47xTAA 이중특이성 항체를 의미한다. DEA 돌연변이를 보유하는 이중특이성 항체를 이용하여 관찰된 IFN γ 및 TNF α 방출은 야생형 Fc를 보유하는 이중특이성 항체를 이용하는 경우보다 더 높지 않다.

도 7b는 200 μ g/mL의 하기 항체와 함께 인큐베이션된 인간 전혈 내의 사이토카인 IL-6 및 IL-8의 방출을 나타낸다: 음성 대조군으로서 에르비투스, 양성 대조군으로서 항CD52 항체 캄파스, 및 동일한 항원 결합 영역을 보유하지만 상이한 Fc 영역(좌로부터 우로)을 보유하는 3개의 이중특이성 항체: 야생형 IgG1 Fc, DEA 돌연변이(S329D 및 I332E)를 보유하는 IgG1 Fc, DE 돌연변이를 보유하는 IgG1 Fc. biAb CD47lo 및 CD47lo는 동일한 CD47xTAA 이중특이성 항체를 의미한다. DE 또는 DEA 돌연변이를 보유하는 이중특이성 항체를 이용하여 관찰된 IL-6 및 IL-8 방출은 야생형 Fc를 보유하는 이중특이성 항체를 이용하는 경우보다 더 높지 않다.

도 8은 다양한 항체에 의해 유도된 모노클로날 항CD47 항체(모든 RBC는 세포 표면 상에서 20,000 내지 25,000개의 CD47 분자를 발현함)에 대한 주요 "항원 싱크(antigen sink)"인 적혈구(RBC)의 농도 의존성 식작용을 나타낸다: 야생형 Fc를 보유하는 항CD47 huIgG1 항체 B6H12.12, 야생형 Fc를 보유하는 CD47xTAA 이중특이성 항체 및 DEA 돌연변이를 보유하는 동일한 CD47xTAA 이중특이성 항체. B6H12는 10 내지 100 ng/ml(대략 0.07 내지 0.7 nM)의 농도에서 RBC 식작용을 나타내는 한편, 야생형 huIgG1 Fc를 보유하는 TAAxCD47 이중특이성 항체는 최대

200,000 ng/ml(대략 1350 nM)의 농도에서 RBC 식작용을 나타내지 않는다; 동일하지만 DEA 돌연변이를 보유하는 Fc 부분을 보유하는 이중특이성 항체는 항CD47 huIgG1 항체 B6H12를 이용하는 경우보다 여전히 2-2.5 로그 더 높은, 1000 ng/ml(대략 7 nM) 초과 농도에서 야생형 Fc와 비교하여 RBC의 증가된 식작용을 나타낸다.

도 9는 대조군 hIgG1 항체 또는 TAAxCD47 이중특이성 항체(초기 2주 동안 30 mg/kg 및 최종 2주 동안 100 mg/kg)가 4주에 한번 정맥내 주입된 비인간 영장류(NHP; 시노몰구스 원숭이) 내에서의 적혈구 계수 및 혈소판 계수를 나타낸다. 높은 노출(30 mg/kg으로 제2 투여의 말미에 TAAxCD47 이중특이성 항체 혈장 농도는 대략 500 nM이었음)에도 불구하고 TAAxCD47 이중특이성 항체를 이용하여 관찰된 혈액학 계수의 유의미한 감소는 없었다.

도 10은 상이한 농도(0 내지 200 µg/mL)에서 나타낸 바와 같이 항체와 함께 인간 전혈의 인큐베이션에 의해 유도된 시험관내 혈소판 활성화(유세포분석에 의해 평가되고 %CD62P 발현으로서 표현됨)를 나타낸다. 2 µg/ml 및 그 초과에서 혈소판 활성화를 유도하는 B6H12-hIgG1과는 대조적으로, 야생형 IgG1 Fc를 보유하는 TAAxCD47 이중특이성 항체는 테스트된 가장 높은 농도(200 µg/mL)에서도 혈소판 활성화를 유도하지 않는다. 또한, CEAxCD47 이중특이성 항체 K2AC5 및 K2AC22도 테스트되었고, wtIgG1 Fc를 보유하는 버전뿐만 아니라 비푸코실화된 버전은 최대 20 µg/mL까지 유의미한 혈소판 활성화를 나타내지 않았다(참조: 실시예 15).

도 11a 및 **11b**는 상응하는 항CD47 일가 항체와 비교하여 본 발명의 CD47xCEA 이중특이성 항체의 농도 의존성 결합을 나타낸다. CD47 및 CEA를 발현하는 타겟 세포(MKN-45)에 대한 결합은 FACS에 의해 평가되었다. 도 11a는 80% 초과하여 SM3E 항체에 의해 억제된 MKN-45 세포에 결합하는, 빈(bin) 1에 분류된 항체를 나타내고; 도 11b는 항CEA 항체 SM3E, MEDI, T84.66, SAR, Lab, 및 CH1A1A에 의해 억제되지 않는(20% 미만) MKN-45 세포에 결합하는, 빈 2에 분류된 항체를 나타낸다.

도 12는 상응하는 항CD47 일가 항체와 비교하여 상이한 농도에서 상이한 CD47xCEA 이중특이성 항체(K2AC5, K2AC22, K2AC23, K2AC25, K2AC26, K2AC27, K2AC28 및 K2AC29)에 의해 유도된 MKN-45 세포의 식작용(CellInsight 어세이에 의해 평가되고, 식작용 지수로 표현됨)의 농도 의존성 증가를 나타낸다. 1 mg/mL의 hIgG(인간 면역글로불린)는 본 실험에서 각각의 테스트된 항체에 대해 첨가된다. 본 실험에서 확립된 EC50 값은 0.2 내지 20 µg/ml에 포함되고, 최대 식작용 지수(10 µg/ml에서)는 32.5% 내지 69% 범위이다(참조: 테스트된 각각의 개별적인 CD47xCEA 이중특이성 항체에 대한 데이터의 요약을 위한 실시예 챕터의 표 3).

도 13 및 **도 14**는 2개의 선별된 본 발명의 CD47xCEA 이중특이성 항체(K2AC5 및 K2AC22), 및 야생형 인간 IgG1 Fc 부분 또는 비푸코실화된 Fc 부분을 보유하는 상응하는 CD47 일가 항체에 의해 유도된 ADCC(LDH 방출 어세이를 이용하여 평가되고, MKN45 암 세포의 특이적인 세포 용해 %로 표현됨)의 농도 의존성 증가를 나타낸다. 항CD47 항체 Hu5F9-G4의 서열 동일 유사체(인간 IgG4 Fc를 보유하는 5F9, US20160333093에 기재됨)는 비교를 위해 평가되었다. 실험은 1 mg/ml의 인간 IgG의 부재(도 13) 또는 존재(도 14) 하에서 수행되었다. 실험 조건 둘 다에서, 비푸코실화된 Fc를 보유하는 항체 버전이 야생형 Fc 보유 버전과 비교하여 더 높은 용해/사멸 활성을 유도한다(wt 버전과 비교하여 비푸코실화된 K2AC5 및 K2AC22 이중특이성 항체에 대한 EC50이 5-9배 더 낮음).

도 15 및 **도 16**은 야생형 인간 IgG1 Fc 부분 또는 비푸코실화된 Fc 부분을 보유하는 K2AC5 및 K2AC22 CD47xCEA 이중특이성 항체에 의해 유도된 식작용(이미징 기반 어세이 CellInsight에 의해 평가되고, 식작용 지수로서 표현됨)의 농도 의존성 증가를 나타낸다. 상응하는 CD47 일가 항체(야생형 hIgG1 Fc를 보유함) 및 항CD47 항체 Hu5F9-G4의 서열 동일 유사체(5F9)는 비교를 위해 평가되었다. 실험은 1 mg/ml의 인간 IgG의 부재(도 15) 또는 존재(도 16) 하에서 수행되었다. 실험 조건 둘 다에서, 비푸코실화된 Fc를 보유하는 이중특이성 항체 버전이 상응하는 야생형 Fc 보유 버전과 비교하여 더 높은 식작용 능력을 나타낸다(wt 버전과 비교하여 비푸코실화된 K2AC5 및 K2AC22 이중특이성 항체에 대한 EC50이 3-10배 더 낮음).

도 17은 1 mg/ml의 인간 IgG의 존재 또는 부재 하에서 2개의 선별된 CD47xCEA 이중특이성 항체, 즉 K2AC5 및 K2AC22에 의해 유도된 식작용(이미징 기반 어세이 CellInsight에 의해 평가되고, 식작용 지수로서 표현됨)의 농도 의존성 증가를 나타낸다. 항CD47 항체 Hu5F9-G4의 서열 동일 유사체(인간 IgG4 Fc를 보유하는 5F9, US20160333093에 기재됨)는 비교를 위해 평가되었다. 1 mg/ml의 인간 IgG의 첨가(이는 인간에서 IgG의 생리학적 혈장 농도 훨씬 미만임)는 CD47xCEA 이중특이성 항체의 효능(즉, EC50)에 약간 영향을 미치는 한편, mAb 5F9에 의해 구동된 활성은 현저하게 방해된다(EC50 및 최대 식작용).

도 18은 K2AC22 CEAxCD47 이중특이성 항체에 의해 유도된 식작용(이미징 기반 어세이 CellInsight에 의해 평가되고, 식작용 지수로서 표현됨)에 대한 T 세포 재타겱팅 CEA-TCB1(30 nM) 및 CEA-TCB(300 nM) 이중특이성 항체(CEAxCD3 이중특이성 항체 CEA-TCB: R06958688/시비사타맘, 예를 들어 Bacac et al Clin. Cancer Res.,

22(13), 3286-97 (2016) 및 US20140242079 참조; CEA-TCB1: W02017055389 유래)의 효과를 나타낸다. T 세포 재타겟팅 이중특이성 항체, CD47xCEA 이중특이성 항체 및 상응하는 CD47 일가 항체는 비교를 위해 단독으로 테스트되었다. CEA-TCB 및 CEA-TCB1 둘 다 K2AC22의 식작용에서 농도 의존성 활성을 손상시키지 않는다.

도 19는 2개의 선별된 본 발명의 CD47xCEA 이중특이성 항체(2가지 용량(즉, 0.37 µg/mL 또는 1.1 µg/mL)에서 K2AC5(도 19a) 및 K2AC22(도 19b) 단독 또는 0.16 nM 또는 0.8 nM의 CEA-TCB와 함께)에 의한 혼합 어세이(동일한 인간 자원 공여자로부터 얻은 PBMC 및 마크로파지 첨가)에서 CEA-TCB 단독 또는 무관한 hIgG1 대조군과 비교한 MKN45 암 세포의 사멸(발광에 의해 평가되고, 사멸률 %로 표현함)을 나타낸다. (a) CEAxCD3 이중특이성 항체 CEA-TCB(서열 번호: 96 내지 99) 및 CEAxCD47 이중특이성 항체 K2AC5의 조합의 적어도 상가 효과; (b) 또한, CEA-TCB + K2AC22에 대해 적어도 상가 효과.

도 20은 200 ng/mL의 세트 CEA의 존재 또는 부재 하에서 결합(20a) 및 식작용(20b)(이미징 기반 어세이(CellInsight)를 이용하여 평가되고, 식작용 지수로 표현됨)에 대한 CEAxCD47 항체 K2AC5 및 22의 농도 의존성 효과를 나타낸다. CEAxCD47 항체 둘 다의 결합 곡선에 대한 200 ng/ml의 가용성 CEA의 유의미한 영향은 없다. 최대 식작용에 대한 가용성 CEA의 유의미한 영향은 없다. EC50은 4배 미만 이동된다.

도 21a는 상응하는 항CD47 일가 항체 및 무관한 hIgG1 대조군과 비교하여 MKN-45 세포에 대한 본 발명의 CD47xCEA 이중특이성 항체의 농도 의존성 결합을 나타낸다. K2AC39는 인간 CEACAM5 및 인간 CEACAM6에 교차반응하는 CD47xCEA 이중특이성 항체 후보이고; 반면에 K2AC22는 CEACAM6에 교차반응하지 않는다. CD47, CEACAM5 및 CEACAM6를 발현하는 타겟 세포(MKN-45)에 대한 결합은 FACS에 의해 평가되었다.

도 21b는 상응하는 항CD47 일가 항체 및 무관한 hIgG1 대조군과 비교하여 2개의 상이한 CD47xCEA 이중특이성 항체(K2AC22 및 K2AC39)에 의해 유도된 MKN-45 세포의 식작용(이미징 기반 어세이(CellInsight)를 이용하여 평가되고, 식작용 지수로 표현됨)의 농도 의존성 증가를 나타낸다. K2AC39는 인간 CEACAM5 및 인간 CEACAM6에 교차반응하는 CD47xCEA 이중특이성 항체 후보이고; 반면에 K2AC22는 CEACAM6에 교차반응하지 않는다. 본 실험에서 1 mg/mL의 인간 IgG가 첨가된다. K2AC39는 K2AC22와 비교하여 MKN45 세포의 더 높은 식작용을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0168] 발명의 상세한 설명
- [0169] 용어는 후술하는 바와 같이 달리 규정되지 않으면 당해 기술분야에서 일반적으로 사용되는 바와 같이 사용된다.
- [0170] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "항원 결합부, 결합부"는 그의 가장 넓은 의미로 CEA, CD47 및 CD3와 같은 항원 결정기에 특이적으로 결합하는 항체의 부분을 의미한다.
- [0171] 구체적으로, 본 출원에서 사용된 바와 같이, 막 결합된 인간 암배아 항원(CEA, CEACAM5와 동일) 또는 CD47에 결합하는 결합부는 CEA 또는 CD47, 더 구체적으로 세포 표면 또는 막 결합된 CEA 또는 CD47에 특이적으로 결합한다. 따라서, 각각의 결합부는 CEA 또는 CD47에 결합한다. "특이적으로 결합하는, 특이적인, ~에 결합하는"은 결합이 항원 특이적이고, 원하지 않거나 또는 비특이적인 상호작용과 구별될 수 있음을 의미한다. 몇몇 실시양태에서, 관련이 없는, 비타겟 단백질에 대한 항타겟 항체의 결합의 정도는 예를 들어 표면 플라즈몬 공명(SPR) 예를 들어 Biacore®, 효소 결합 면역흡착(ELISA) 또는 유세포분석(FACS)에 의해 측정된 바와 같이 상기 타겟에 대한 항체의 결합보다 약 10배, 바람직하게는 >100배 미만이다. 타겟은 본 출원에서 논의된 단백질, 예를 들어 CEA, CD47, 및 CD3ε이다. 한 실시양태에서, CEA 결합부는 추가적으로 CEACAM6에 결합한다.
- [0172] "CEA, CD47에 특이적으로 결합하는, CEA, CD47에 결합하는, CEA, CD47에 특이적인"은 한 실시양태에서, 타겟 CEA 및 CD47에 충분한 친화성으로 결합할 수 있는 항체, 예를 들어 이중특이성 항체를 의미하는데, 그 결과 상기 항체는 CEA 및 CD47을 발현하는 종양 세포를 타겟팅함에 있어서 치료제로서 유용하게 된다. 용어 "~의 EC50 값으로 MKN-45 세포에 결합하는"은 어세이 조건을 의미하는데, 테스트된 이중특이성 항체 농도는 300 nM 농도의 항CD47 항체 B6H12.2(ATCC®HB-9771™ 또한 본 출원에서 B6H12로도 언급됨)의 존재 하에서 0.1 내지 1000 nM이다.
- [0173] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체는 시노물구스 CEACAM5뿐만 아니라 인간 CEACAM5에 결합한다.
- [0174] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "항체"는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 항체를 의미한다. 한 실시양태에서, 항체는 전장 항체이다. 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "항체 중쇄"는 전장 항체에 대해 규정된 바와 같은 가변 영역 및 불변 영역으로 구성된 항체 중쇄를 의미한다. 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "항

체 경쇄"는 전장 항체에 대해 규정된 바와 같은 가변 영역 및 불변 영역으로 구성된 항체 경쇄를 의미한다.

[0175] 용어 "전장 항체"는 2개의 "전장 항체 중쇄" 및 2개의 "전장 항체 경쇄"로 구성되는 항체를 의미한다. "전장 항체 중쇄"는 VH-CH1-HR-CH2-CH3로서 단축된, 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)로 구성되는 폴리펩타이드이다. "전장 항체 경쇄"는 VL-CL로서 단축된, N-말단에서 C-말단 방향으로 항체 경쇄 가변 도메인(VL), 및 항체 경쇄 불변 도메인(CL)으로 구성되는 폴리펩타이드이다. 항체 경쇄 불변 도메인(CL)은 κ (카파) 또는 λ (람다)일 수 있다. 2개의 전장 항체 도메인은 CL 도메인과 CH1 도메인 사이에 및 전장 항체 중쇄의 힌지 영역 사이에 폴리펩타이드간 이황화 결합에 의해 서로 연결된다. 전형적인 전장 항체의 예는 IgG(예를 들어, IgG 1 및 IgG2), IgM, IgA, IgD, 및 IgE와 같은 천연 항체이다. 본 발명에 따른 전장 항체는 한 실시양태에서 인간 IgG1 타입의 것, 하나의 추가 실시양태에서, 하기 규정된 바와 같이 Fc 부분 내에 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하고/하거나 Asn297에서 당조작된 것이다. 본 발명에 따른 전장 항체는 각각 한 쌍의 VH 및 VL에 의해 형성된 2개의 결합부를 포함하는데, 이 중 하나는 CEA에 결합하고, 다른 하나는 CD47에 결합한다.

[0176] 본 출원에서 사용된 바와 같이 "상보성 결정 영역(들)"("CDR")은 중쇄 및 경쇄 폴리펩타이드 둘 다의 가변 영역 내에서 확인된 비인접 항원 조합 부위(또한, 항원 결합 영역으로도 공지됨)를 나타낸다. 또한, CDR은 "초가변 영역"으로도 언급되고, 그 용어는 항원 결합 영역을 형성하는 가변 영역의 부분에 대해 본 출원에서 용어 "CDR"과 상호 교환 가능하게 사용된다. 이 특별한 영역은 본 출원에 참고로 인용된 문헌[참조: Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) 및 Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)]에 기재되어 있는데, 정의는 서로에 대해 비교하는 경우 아미노산 잔기의 중첩 또는 서브셋을 포함한다. IG 및 TR의 FR-IMGT 및 CDR-IMGT 영역의 정의는 모든 종의 모든 IG 및 TR V-REGION을 위한 IMGT 독특한 넘버링: 구조 및 진화에 대한 관심에 기초한다(Lefranc, M.-P. et al., Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003) 및, 재배열된 CDR3-IMGT의 경우 및 FR4-IMGT의 경우, "V-DOMAIN 및 V-LIKE-DOMAIN의 경우 IMGT 독특한 넘버링"(Lefranc, M.-P. et al., Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)). 그럼에도 불구하고, 항체 또는 이의 변이체의 CDR을 언급하는 정의의 적용은 본 출원에서 규정되고 사용된 바와 같은 용어의 범위에 있는 것으로 의도된다. IMGT 및 카바트에 의해 규정된 바와 같은 CDR을 포함하는 적합한 아미노산 잔기는 서열 목록 표에 후술된다. 구체적인 CDR을 포함하는 정확한 잔기 번호는 CDR의 서열 및 크기에 따라 달라질 것이다. 당해 기술분야의 통상의 기술자는 어떤 잔기가 해당 항체의 가변 영역 아미노산 서열에 구체적인 CDR을 포함하는지 일상적으로 결정할 수 있다. 본 출원에서 사용된 바와 같이 용어 "서열 번호: x의 CDRL1을 포함하는"은 언급된 가변 경쇄의 CDRL1 부분이 서열 번호: x(CDRL1으로서 서열 번호: x의 CDRL1을 포함함) 것임을 의미한다. 또한, 이는 다른 CDR의 경우에도 동일하다.

[0177] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "Fc 영역; Fc 도메인"은 IgG 중쇄의 C 말단 영역을 의미하고; IgG1 항체의 경우, C 말단 영역은 -CH2-CH3를 포함한다(상기 참조). IgG 중쇄의 Fc 영역의 경계는 미세하게 변화될 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 일반적으로 위치 Cys226의 아미노산 잔기로부터 카르복실 말단까지 신장되도록 규정된다.

[0178] 불변 영역은 당해 기술분야에 널리 알려져 있고, 예를 들어 카바트, E.A.에 의해 기재된다(참조: 예를 들어 Johnson, G., 및 Wu, T.T., Nucleic acids Res.28 (2000) 214-218; Kabat, E.A., et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 (1975) 2785- 2788).

[0179] 용어 "에피토프"는 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 임의의 폴리펩타이드 결정기를 포함한다. 특정 실시양태에서, "에피토프"는 분자, 예를 들어 아미노산, 당 측쇄, 포스포릴, 또는 설포닐의 화학적으로 활성인 표면 그룹화를 포함하고, 특정 실시양태에서, 특이적인 3개의 3차원 구조 특성 및/또는 특이적인 전하 특성을 보유할 수 있다. 에피토프는 항체의 의해 결합된 타겟의 영역이다. 한 실시양태에서, 본 발명의 이중특이성 항체는 CEACAM5의 N 말단 도메인(아미노산 35 - 144의 Ig 유사 V 타입 도메인, UniProtKB - P06731)에 결합한다. CEACAM5에 대한 CEAxCD47 이중특이성 항체의 결합 위치는 에피토프 비닝(epitope binning)에 의해 달성된다. 에피토프 비닝에서, 항체는 쌍별 조합 방식으로 테스트되고, 동일한 결합 영역에 경쟁하는 항체는 빈(bin)으로 함께 그룹화된다. 본 출원에서 경쟁 테스트는 당해 기술분야에 따른 항CEA 항체를 이용하여 수행된다. 한 실시양태에서, 본 발명의 이중특이성 항체는 CEACAM5에 대한 결합에 대해 참조 항체 SM3E(빈 1)과 경쟁한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 이중특이성 항체는 CEACAM5에 대한 결합에 대해 참조 항체 SM3E, MEDI, T84.66, SAR, Lab, 및 CH1A1A(빈 2)와 경쟁하지 않는다. 경쟁은 어세이에 의해 측정되는데, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도의 비오틴화된 인간 CEACAM5는 고정화되고, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 참조와 함께 인큐베이션된다. 본 발명의 CEAxCD47 이중특이성 항체의 CEACAM5 결합부를 포함하는 CEACAM5 항체는 실온에서 1 시간 동안 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 로 첨가된다. 플레이트는 세척

되고, 결합된 CEACAM5 mAb가 검출된다.

- [0180] 한 실시양태에서, 본 발명의 이중특이성 항체는 CEACAM5의 B3 도메인 및 GPI 앵커에 결합한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 항CEA 항체(MAB CEA)와 동일한 에피토프에 결합하는데, 이는 서열 번호: 20의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 21의 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0181] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "공동 중쇄(cHC)"는 VH-CH1-HR-CH2-CH3로서 단축된, 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)인 폴리펩타이드를 의미한다. 본 발명에 따른 이중특이성 항체에 적합한 공동 중쇄는 W02012023053, W02013088259, W02014087248, 및 W02016156537(각각은 그 전체 내용이 참고로 인용됨)에 기재된 바와 같은 항CD47 항체의 중쇄이다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체의 cHC는 경쇄 CDR로서 서열 번호: 1의, 서열 번호: 2의 CDRL2, 및 서열 번호: 3의 CDRL3, 및 중쇄 CDR로서 서열 번호: 25의 CDRH1, 서열 번호: 26의 CDRH2 및 서열 번호: 27의 CDRH3를 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체의 cHC는 중쇄 가변 영역 VH로서 서열 번호: 4의 VH 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체의 cHC는 서열 번호: 5의 것이다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체는 cHC를 포함하는 $\kappa\lambda$ 이중특이성 항체($\kappa\lambda$ 바디)이다.
- [0182] $\kappa\lambda$ 바디 포맷은 표준 IgG 분자와 구분할 수 없고 표준 모노클로날 항체(참조: 예를 들어 W02013088259, W02012023053)와 구분할 수 없는 특성을 보유하여 환자에서 면역원성이 없거나 낮은 이중특이성 항체의 정제를 가능하게 한다.
- [0183] 공동 중쇄를 포함하는 본 발명의 이중특이성 항체는 예를 들어 W02012023053(그 전체 내용이 참고로 인용됨)에 따라 제조될 수 있다. W02012023053에 기재된 방법은 인간 면역글로불린과 구조가 동일한 이중특이성 항체를 생성한다. 이러한 타입의 분자는 2 개의 독특한 중쇄 폴리펩타이드, 불변 카파 도메인에 융합된 제1 경쇄 가변 영역 및 불변 람다 도메인에 융합된 제2 경쇄 가변 영역으로 구성된다. 하나의 결합 부위는 CEA에 대한 특이성을 나타내고, 다른 부위는 CD47에 대한 특이성을 나타내는데, 이때 각각의 중쇄 및 각각의 경쇄가 기여한다. 경쇄 가변 영역은 람다 또는 카파 패밀리의 것일 수 있고, 바람직하게는 각각 람다 및 카파 불변 도메인에 융합된다. 이는 비천연 폴리펩타이드 접합의 생성을 회피하기 위해 바람직하다. 그러나, 또한 제1 특이성을 위해 불변 람다 도메인에 카파 경쇄 가변 도메인을 융합시키거나, 또는 제2 특이성을 위해 불변 카파 도메인에 람다 경쇄 가변 도메인을 융합시킴으로써 본 발명의 이중특이성 항체를 얻을 수 있다. 다른 경쇄는 항상 완전 카파(VL 및 CL) 또는 완전 람다이다. W02012023053에 기재된 이중특이성 항체는 " $\kappa\lambda$ 바디"이다. 이러한 $\kappa\lambda$ 바디 포맷은 표준 IgG와 구분할 수 없고 표준 모노클로날 항체와 구분할 수 없는 특성을 보유하는 이중특이성 항체의 정제를 가능하게 하며, 따라서 예를 들어 아미노산 브리지 또는 다른 비천연 요소를 포함하는 이전 포맷과 비교하여 바람직하다.
- [0184] 상기 방법의 필수적인 단계는 동일한 중쇄 가변 도메인을 공유하는 상이한 항원 특이성을 보유하는 2개의 항체 Fv 영역(각각 가변 경쇄 도메인 및 가변 중쇄 도메인으로 구성됨)의 확인이다. 모노클로날 항체 또는 이의 단편의 생성을 위한 다수의 방법이 기재되어 왔다(참조: 예를 들어, Antibody: A Laboratory Manual, Harlow E, 및 Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). 완전 인간 항체는 CDR 1 및 2를 포함하는 경쇄 및 중쇄 둘 다의 서열이 인간 유전자로부터 유래한 항체 분자이다. CDR3 영역은 인간 유래의 것이거나, 또는 합성 수단에 의해 디자인될 수 있다. 그러한 항체는 "인간 항체", 또는 "완전 인간 항체"라 언급된다. 인간 모노클로날 항체는 트리오마 기법; 인간 B 세포 하이브리도마 기법(참조: Kozbor, et al., 1983 Immunol Today 4: 72); 및 인간 모노클로날 항체를 생성하기 위한 EBV 하이브리도마 기법(참조: Cole, et al., 1985 In: 모노클로날 항체 및 Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)을 이용함으로써 제조될 수 있다. 인간 모노클로날 항체가 이용될 수 있고, 인간 하이브리도마를 이용함으로써(참조: Cote, et al., 1983. Proc Natl Acad Sci USA 80: 2026-2030) 또는 시험관 내에서 엡스타인 바르 바이러스를 이용하여 인간 B 세포를 형질전환함으로써(참조: Cole, et al., 상기 참조) 제조될 수 있다.
- [0185] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "CEA, CEACAM5"는 세포 표면 당단백질 및 종양 관련 항원인 인간 암배아 항원(CEA, CEACAM-5 또는 CD66e; UniProtKB - P06731)을 의미한다(Gold 및 Freedman, J Exp. Med., 121:439-462, 1965; Berinstein NL, J Clin Oncol., 20:2197-2207, 2002). 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "CEACAM6"는 인간 CEACAM6(CD66c; UniProtKB - P40199)를 의미하는데, 이는 또한 암배아 항원 관련 세포 부착 분자(CEACAM) 패밀리의 멤버이다. 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "CEACAM1"은 암배아 항원 관련 세포 부착 분자(CEACAM) 패밀리의 멤버이기도 한 인간 CEACAM1(UniProtKB - P13688 (CEAM1_HUMAN)을 의미한다. 추가

정보 및 CEA 패밀리의 다른 멤버에 대한 정보는 <http://www.uniprot.org>에서 확인할 수 있다.

- [0186] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "MAB CEA"는 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하고, 서열 번호: 20의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 21의 경쇄 가변 영역을 포함하는 모노클로날 항체를 의미한다. 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "MAB CEA1"은 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하고, 서열 번호: 88의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 89의 경쇄 가변 영역을 포함하는 모노클로날 항체를 의미한다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체는 MAB CEA, MAB CEA1, CEA-TCB, 또는 CEA-TCB1과 경쟁하고; 추가의 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체는 MAB CEA, MAB CEA1, CEA-TCB, 또는 CEA-TCB1과 경쟁하지 않는다. MAB CEA 및 상기 가변쇄는 US20140242079에 기재되어 있다(US20140242079(그 전체 내용이 참고로 인용됨)의 서열 번호: 21 및 27). MAB CEA의 VH 및 VL을 포함하는 이중특이성 항CEAx항CD3ε 항체(CEA-TCB)는 문헌[참조: Bacac et al Clin. Cancer Res., 22(13), 3286-97 (2016)]에 기재되어 있다. MAB CEA1의 VH 및 VL을 포함하는 추가의 이중특이성 CEAxCD3 Mab(CEA-TCB1)는 전하 변형을 보유하는 분자 B "2+1 IgG 크로스Fab, 역전"으로서 WO2017055389에 기재되어 있다(CD3 결합제에서 VH/VL 교환, CEA 결합제에서 전하 변형, 인간화 CEA 결합제)(참조: WO2017055389(그 전체 내용이 참고로 인용됨)의 도 3b 및 서열 번호: 34, 36-38). 본 출원에서 사용된 바와 같이, 한 실시양태에서, "이중 특이성 CEAxCD3 항체"는 항체 CEA-TCB 또는 항체 CEA-TCB1을 의미한다.
- [0187] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "CD47에 특이적으로 결합하는, CD47에 결합하는, CD47 결합부"는 본 발명에 따른 이중특이성 항체의 맥락에서 CD47에 대한 특이성을 의미한다. CD47은 다관통 막 단백질이고, 3개의 세포외 도메인(아미노산 19-141, 198-207, 및 257-268; UniProtKB - Q08722 참조)을 포함한다. 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "CD47에 대한 결합 친화성"은 SPR에 의해 측정된다.
- [0188] 한 실시양태에서, CD47에 대한 본 발명에 따른 이중특이성 항체의 결합은 하나 이상의 상기 세포외 도메인에 의해 발생한다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체는 인간 CD47과 인간 SIRP α 간의 상호작용을 억제한다.
- [0189] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "CEA에 특이적으로 결합하는, CEA에 결합하는, CEA 결합부"는 본 발명에 따른 이중특이성 항체의 맥락에서 세포의 표면 상에서 CEACAM5에 대한 특이성을 의미한다. 세포 상에서 CEA(CEACAM5)에 대한 결합은 바람직하게는 세포당 200,000 내지 600,000개의 CEA 카피를 포함하는 위 아데노암 종 MKN-45 세포를 이용하여 측정된다. 본 발명에 따른 항체의 농도는 상기 규정된 바와 같이 MKN-45 세포에 대한 결합에 대해 결과적인 EC50과 관련하여 적합한 범위에서 가변적이다. 본 발명에 따른 이중특이성 항체는 환자의 혈액/혈장에서 확인된 바와 같은 농도로, 즉 그러한 농도에서 가용성 CEA가 본 발명의 이중특이성 항체의 효능에 영향을 미치지 않거나, 또는 단지 최소한으로 영향을 미치는 농도에서 그러한 세포 막 결합된 CEACAM5에 특이적으로 결합하고, 추가의 실시양태에서 가용성 CEACAM5에 결합하지 않거나, 또는 단지 최소로 결합한다. 이는 기재된 바와 같이 본 발명의 이중특이성 항체에 의해 MKN-45 세포의 식작용에 대한 가용성 CEA의 영향에 의해 측정된다.
- [0190] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "막 결합된 인간 CEA"는 세포, 구체적으로 종양 세포의 표면의 막 부분에 결합되는 인간 암배아 항원(CEA)을 의미한다. 특정 상황에서, 용어 "막 결합된 인간 CEA"는 세포의 막에 결합되지 않지만, 본 발명에 따른 항체가 결합하는 막 결합된 CEA 에피토프를 보존하기 위해 구축된 CEA를 의미한다.
- [0191] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "가용성 CEACAM5에 대한 실질적인 교차 반응성이 없는, 가용성 CEACAM5에 비결합하는"은 본 발명에 따른 이중특이성 항체의 맥락에서, 특히 막 결합된 CEACAM5와 비교하는 경우, 그러한 항체가 가용성 CEACAM5에 대한 관련된 결합을 나타내지 않는다는 것을 의미한다. 그러한 비결합은 후술하는 바와 같이, 바람직하게는 식작용 지수의 이미징 기반 측정에서, MKN-45 세포를 이용하는 식작용 어세이에서 이중특이성 항체의 식작용 활성화에 대한 가용성 CEA의 낮은 영향에 의해 간접적으로 결정될 수 있다(실시예 9 참조). 따라서, 가용성 CEACAM5에 대한 실질적인 교차 반응성이 없다는 것은 인간 마크로파지의 존재 하에서 상기 이중특이성 항체에 의한 MKN-45 세포의 식작용에 대한 최대 달성 가능한 식작용 지수(이중특이성 항체 CEAxCD47의 전형적인 농도-식작용 지수 곡선 및 최대 달성 가능한 식작용 지수는 예를 들어 도 12, 15, 16, 17, 20a에 도시되어 있고, 상기 어세이는 실시예 9.2에 설명되어 있다)가, 200 ng/ml의 가용성 CEA가 식작용 어세이에 첨가되는 경우, 20% 초과하여 감소되지 않는다는 것을 의미한다. 대안적으로, 농도-식작용 지수 곡선에 대한 EC50의 이동이 결정될 수 있다. 200 ng/ml의 가용성 CEA의 첨가는 한 실시양태에서 더 높은 농도를 향해 3배 초과하여 이러한 EC50을 이동시키지 않을 것이다. 대안적으로, 세포 상에서 CEA에 대한 본 발명의 이중특이성 항체에 대한 가용성 CEA의 영향이 없거나, 또는 최소의 영향은 유세포분석에 의해 측정된 결합 곡선(그러한 결합 곡선은 도 20b에 도시되어 있다)에 대한 가용성 CEA의 영향에 의해 예측된다. 유세포분석 어세이에 대한 200 ng/ml의

가용성 CEA의 첨가는 한 실시양태에서 더 높은 농도를 향해 3배 초과하여 결합 곡선 각각 EC50을 이동시키지 않을 것이다.

- [0192] 용어 "가용성 CEA, 세드 CEA, sCEA"는 세포 막 또는 세포 표면(예를 들어, 종양 세포 표면)에 결합하지 않거나, 또는 이로부터 절단되는 CEACAM5를 의미한다. 가용성 CEA는 예를 들어 암을 보유하는 환자의 혈류 내에서 확인될 수 있다. CEA가 세포 막으로부터 세딩되는 경우, GPI 앵커는 파괴되고, CEACAM5는 본 발명에 따른 항체에 대한 가용성 CEA의 결합을 방지하거나, 또는 적어도 약화시킬 수 있는 형태 변화를 겪는 것으로 추정된다.
- [0193] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "CEACAM6에 대한 교차 반응성, CEACAM6에 특이적으로 결합하는, CEACAM6에 결합하는, CEACAM6 결합부"는 본 발명에 따른 이중특이성 항체의 맥락에서 본 발명에 따른 이중특이성 항체가 세포의 표면(막) 상에서 CEACAM5 및 CEACAM6를 특이적으로 인식하는 것을 의미한다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체는 막 결합된 CEA에 대한 결합과 비교하는 경우, 막 결합된 CEACAM6에 특이적으로 결합한다. 세포 표면 상에서 본 발명의 해당 이중특이성 항체에 의한 CEACAM6 수용체에 대한 CEACAM5의 점유 비율은 CEACAM5 각각 CEACAM6에 대한 결합 친화성에 의존하고, 이들 결합 친화성이 예를 들어 SPR에 의해 측정되는 경우 용이하게 계산될 수 있다.
- [0194] 특정 실시양태에서, CEACAM5에 특이적으로 결합하는 항체는 암배아 항원 관련 세포 부착 단백질, 예를 들어 CEACAM1, CEACAM3, CEACAM4, CEACAM6, CEACAM7 및 CEACAM8에 결합하지 않는다. 특정 실시양태에서, CEACAM5에 특이적으로 결합하는 항체는 또한 유사한 EC50으로 CEACAM6에 결합한다.
- [0195] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "CEACAM1 및/또는 CEACAM3, CEACAM4, CEACAM6, CEACAM7 및 CEACAM8에 대한 교차 반응성이 실질적으로 없는, 상기 CEACAM에 대한 비결합"은 본 발명에 따른 이중특이성 항체의 맥락에서, 그러한 항체가 막 결합된 CEACAM5와 비교하는 경우 치료적 혈장 농도(1 내지 1000 nM)에서 상기 막 결합된 CEACAM에 대한 임의의 관련된 결합을 나타내지 않은 것을 의미한다. CEACAM1 및/또는 CEACAM5, CEACAM6 및 CEACAM8에 대한 비결합은 상기 CEACAM을 발현하는 제조항 CHO 세포에 대한 및 상기 CEACAM을 발현하는 제조항 PEAK 세포에 대한 결합 곡선의 측정에 의한 또는 제조항 CEACAM 단백질에 대한 결합을 측정하는 ELISA 어세이에 의한 CEACAM3 및/또는 CEACAM4, 및 CEACAM7에 대한 결합 곡선의 유세포분석 기반 측정에 의해 결정될 수 있다. 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 본 출원에 언급된 화합물(예를 들어, 인간 IgG)에 "결합하지 않는, 대한 비결합"은 또한 그러한 관련 없는 결합 또는 비교차 반응성을 의미한다. 예를 들어, ELISA에서, 그러한 관련 없는 화합물에 대한 OD 값은 검출 한계의 OD와 대략 동일할 것이다.
- [0196] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "인간 CEA 및 인간 CD3에 결합하는 이중특이성 항체, CEAxCD3 Mab"는 인간 CEACAM5 및 CD3ε에 결합하는 이중특이성 항체를 의미한다. 그러한 항체는 예를 들어 "CEA-TCB" 및 "CEA-TCB1"이다. 본 출원에서 사용된 바와 같이, "CEA-TCB"는 서열 번호: 1, 2, 21, 및 22로서 US20140242079(그 전체 내용이 참고로 인용됨)에 기재된 바와 같은 CEA 및 CD3에 결합하는 이중특이성 항체를 의미한다. 또한, CEA-TCB의 아미노산 서열은 본 발명의 서열 번호: 96 내지 99로서 기재된다. 본 출원에서 사용된 바와 같이 "CEA-TCB1"은 전하 변형(CD3 결합체에서 VH/VL 교환, CEA 결합체에서 전하 변형, 인간화 CEA 결합체)을 보유하는 "2+1 IgG 크로스Fab, 역전" 포맷에서 분자 B를 의미한다; 도 3b, WO2017055389(그 전체 내용이 참고로 인용됨)의 서열 번호: 34, 36-38). CEA-TCB1의 아미노산 서열은 본 발명의 서열 번호: 92 내지 95로서 기재된다. 추가의 CEAxCD3 Mab는 WO2007071426, WO2013012414, WO2015112534, WO2017118675, US20140242079 및 WO2017055389(각각은 그 전체 내용이 참고로 인용됨)에 기재되어 있다. 추가의 CEAxCD3 Mab는 R06958688이다 (참조: 예를 들어, Bacac et al Clin. Cancer Res., 22(13), 3286-97 (2016)). 한 실시양태에서, 상기 CEAxCD3 Mab는 MAB CEA로서 인간 CEACAM5의 동일한 에피토프에 결합하고/하거나 경쟁적이다. 한 실시양태에서, 상기 CEAxCD3 Mab는 MAB CEA1으로서 인간 CEACAM5의 동일한 에피토프에 결합하고/하거나 경쟁적이다.
- [0197] 본 출원에서 사용된 바와 같이 "CD3 Mab, CD3에 대한 항체"는 인간 CD3ε(UniProtKB - P07766 (CD3E_HUMAN)을 의미한다. 용어 "CD3ε에 대한 항체, 항CD3ε 항체"는 구체적으로 CD3ε에 결합한다. 한 실시양태에서, CD3ε에 대한 항체는 구체적으로 항CD3 항체 SP34(BD Biosciences 카탈로그 번호 565983)와 동일한 에피토프에 특이적으로 결합한다. 한 실시양태에서, CD3ε에 대한 항체는 인간 CD3ε의 에피토프에 특이적으로 결합하고, 서열 번호: 22의 아미노산 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, CD3ε에 대한 항체는 인간 CD3ε에 특이적으로 결합하고, 서열 번호: 90의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 91의 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0198] 한 실시양태에서, 본 발명의 이중특이성 항체는 MKN-45 세포 상에 제시된 바와 같은 CEA에 대한 결합에 대해 CEA-TCB 및/또는 CEA-TCB1과 경쟁하지 않는다. 따라서, 300 nM(CEA-TCB) 또는 30 nM(CEA-TCB1) 농도의 CEA-TCB는 MKN-45 세포에 대한 상기 본 발명의 이중특이성 항체의 식작용 지수 곡선의 EC50을 한 실시양태에서 더 높은

농도를 향해 3배 초과하여 이동시키지 않는다.

- [0199] 300 nM은 CEA-TCB의 치료적으로 유효한 용량으로 환자 혈장에서 측정된 농도이다((J.Tabernero et.al., J. Clin. Oncol. 35, 2017 (suppl. Abstr. 3002)). CEA-TCB1은 전임상 연구에서 CEA-TCB보다 대략 10 내지 100배 더 강력하고(결합 친화성, 중앙 세포 용해, W02017055389), 따라서 EC50의 이동은 30 nM에서 테스트된다.
- [0200] 결합에서의 경쟁은 MKN-45 세포에 대한 결합 곡선의 유세포분석 기반 측정 및 이러한 결합 곡선의 EC50의 결정에 의해 결정될 수 있다(참조: 예를 들어, 그러한 결합 곡선에 대한 도 2 및 도 11). 비경쟁은 한 실시양태에서 300 nM의 MAB CEA 또는 CEA-TCB가 어세이에 첨가되는 경우 EC50이 더 높은 농도를 향해 3배 미만 이동되는 것을 의미한다. 300 nM은 CEAxCD3 이중특이성 항체(CEA-TCB)의 치료적으로 활성인 용량/혈장 농도 범위의 농도이다(J.Tabernero et.al., J. Clin. Oncol. 35, 2017 (suppl. Abstr. 3002)). MAB CEA1 또는 CEA-TCB1에 의한 비경쟁은 30 nM의 MAB CEA1 각각 CEA-TCB1이 어세이에 첨가되는 경우 EC50이 3배 미만 이동되는 것을 의미한다.
- [0201] 결합에서의 경쟁은 MKN-45 세포에 대한 결합 곡선의 유세포분석 기반 측정 및 이러한 결합 곡선의 EC50의 결정에 의해 결정될 수 있다(참조: 그러한 결합 곡선에 대한 도 2 및 도 11). 비경쟁은 한 실시양태에서 300 nM의 MAB CEA 또는 CEA-TCB가 어세이에 첨가되는 경우 EC50이 더 높은 농도를 향해 3배 미만 변화되는 것을 의미한다. 300 nM은 CEAxCD3 이중특이성 항체(CEA-TCB)의 치료적으로 활성인 용량/혈장 농도 범위의 농도이다(J.Tabernero et.al., J. Clin. Oncol. 35, 2017 (suppl. Abstr. 3002)).
- [0202] MAB CEA1 또는 CEA-TCB1에 의한 비경쟁은 30 nM의 MAB CEA1 각각 CEA-TCB1이 어세이에 첨가되는 경우 EC50이 3배 미만 이동되는 것을 의미한다.
- [0203] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "비경쟁적"은 300 nM(MAB-CEA, CEA-TCB) 또는 30 nM(MAB CEA1, CEA-TCB1)의 농도에서 제2 항체(MAB CEA, MAB CEA1 또는 CEA-TCB 또는 CEA-TCB1과 같은 CEAxCD3 ϵ 에 대한 이중특이성 항체)가 MKN-45 세포에 대한 본 발명의 이중특이성 항체의 결합 곡선의 EC50을 한 실시양태에서 더 높은 농도를 향해 3배 초과하여 이동시키지 않는다는 것을 의미한다. 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "경쟁적"은 300 nM 각각 30 nM(MAB CEA1 또는 CEA-TCB1)의 농도에서 제2 항체(MAB CEA, MAB CEA1 또는 CEA-TCB 또는 CEA-TCB1과 같은 CEAxCD3 ϵ 에 대한 이중특이성 항체)가 MKN-45 세포에 대한 본 발명의 이중특이성 항체의 결합 곡선의 EC50을 한 실시양태에서 더 높은 농도를 향해 3배 초과하여, 바람직하게는 5배 초과하여 이동시키는 것을 의미한다.
- [0204] 본 출원에서 사용된 바와 같이 용어 "상보성 결정 영역"("CDR")은 중쇄 및 경쇄 폴리펩타이드의 가변 영역 내에서 확인된 비인접 항원 조합 부위(항원 결합 영역으로도 공지되어 있음)를 나타낸다. 또한, CDR은 "초가변 영역"으로도 언급되고, 그 용어는 항원 결합 영역을 형성하는 가변 영역의 부분에 대해 본 출원에서 용어 "CDR"과 상호 교환 가능하게 사용된다. 이 특별한 영역은 문헌[참조: Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) 및 Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)]에 기재되어 있다. 또한, Kabat 등은 임의의 항체에 적용할 수 있는 가변 도메인 서열에 대한 넘버링 시스템을 규정하였다. 당해 기술분야의 통상의 기술자는 서열 자체 이상의 임의의 실험적인 데이터에 대한 의존 없이, 임의의 가변 도메인 서열에 대해 이러한 "카바트 넘버링" 시스템을 명확하게 할당할 수 있다. 본 출원에서 사용된 바와 같이, "카바트 넘버링"은 문헌[참조: Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983)]에 기재된 넘버링 시스템을 의미한다. 달리 특별히 언급하지 않으면, 본 발명에 따른 이중특이성 항체에서 특이적인 아미노산 잔기 위치의 넘버링에 대한 참조는 카바트 넘버링 시스템에 따른다.
- [0205] 본 출원에서 사용된 바와 같이 용어 "ADCP"는 항체 의존성 세포 매개 식작용을 의미한다.
- [0206] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 본 발명에 따른 "식작용, 식작용의 EC50 값, 식작용의 최대값, 식작용 지수"는 "이미징"에 의해 MKN-45 세포를 이용하여 측정된 식작용을 의미한다. 예를 들어 1:1 또는 1:3의 이펙터(마크로파지):타겟(중앙) 세포 비율에서의 인큐베이션 및 판독치("이미징 결정된 ADCP")로서 "식작용 지수"를 이용하는 적합한 이미징 방법은 실시예 9에 기재되어 있다. 도 3b는 0.1 또는 훨씬 더 적은 대략 500 nM의 이중특이성 TAAxCD47 항체의 테스트된 농도 범위에서 결정된 바와 같은 최대 달성 가능한 식작용 지수를 나타낸다. 도 12, 15 및 16은 본 발명에 따른 이중특이성 항체 K2AC5 및 K2AC22에 대한 ADCP 결과를 나타낸다. 본 출원에서 사용된 바와 같이, "상기 이중특이성 항체의 식작용"은 상기 항체에 의해 야기된/유도된 식작용을 의미한다. 항체 K2AC22는 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제1 결합부 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 제2 결합부를 포함하고, 제1 결합부는 서열 번호: 5의 중쇄 및 서열 번호: 65의 경쇄를 포함하고, 제2 결합부는 서열 번호: 5

의 중쇄 및 서열 번호: 11의 경쇄를 포함한다. 항체 K2AC5는 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제1 결합부 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 제2 결합부를 포함하고, 제1 결합부는 서열 번호: 5의 중쇄 및 서열 번호: 64의 경쇄를 포함하고, 제2 결합부는 서열 번호: 5의 중쇄 및 서열 번호: 11의 경쇄를 포함한다. 항체 K2AC10, K2AC13 K2AC18, K2AC23, K2AC25, K2AC26, K2AC27, K2AC28, K2AC29는 동일한 중쇄 및 제2 결합부 경쇄를 포함하지만, 제1 결합부 경쇄가 상이하다(참조: 표 1, 서열 목록).

- [0207] 당해 기술분야에서 식작용에 대한 추가의 정보를 위해, 또한 식작용은 식작용 %(참조: 일가 TAA 및 CD47 항체 및 TAAxCD47 이중특이성 항체의 농도로부터 식작용 %의 의존성에 대한 실시예 9 및 도 3a)로서 및 예를 들어 3 인간 마크로파지 대 1 타겟/중양 세포의 비율("유세포분석으로 결정된 ADCP")에서 유세포분석 기반 방법에 의해 측정될 수 있다.
- [0208] 용어 "인간 IgG, hIgG"는 CD47 및 CEACAM5에 특이적으로 결합하지 않는 인간 면역글로블린 IgG의 시판되는 임상 등급의 균질한 제조물(Bio-rad.com)을 의미한다.
- [0209] CHO 세포에서 생성된 항체는 전형적으로 양분되는 N-아세틸글루코사민(양분되는 GlcNAc)가 매우 낮거나 없고, 높은 레벨의 코어 푸코실화를 보유하는 복합 바이안테너리 구조를 보유한다. N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라아제 III의 과발현은 항체 의존성 세포성 세포독성(ADCC)을 개선하기 위해 항체 상에 존재하는 양분되는 GlcNAc의 분율을 증가시키기 위해 사용되었다. 또한, RNAi 및 유전자 결실 기술은 ADCC 활성을 극적으로 증가시키기 위해 항체 상의 푸코오스를 감소 또는 제거하기 위해 사용되었다(Davis J. et al.; Biotechnol. Bioeng. 2001;74:288-294; Saba JA, et al.; Anal. Biochem. 2002;305:16-31; Kanda Y, et al.; J. Biotechnol. 2007;130:300-310; Mori K, et al.; Biotechnol. Bioeng. 2004;88:901-908).
- [0210] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체는 당조작된다. 한 실시양태에서, 당조작된 본 발명에 따른 이중특이성 항체는 표준 조건(1000 ml 용기, 온도 37°C, pH 7.0, 임펠러 속도 80 rpm, 최소 용존 산소 30%; 배양 시간 14일)에서 CHO K1 세포주(ATCC®CCL-61™)에서의 생성에 따른 당쇄수식을 포함하는, 서열 번호: 5(모 항체)에 포함된 Fc 부분을 포함하는 이중특이성 항체와 비교하여 증가된 ADCC 및/또는 ADCP 활성(감소된 EC50 및/또는 더 높은 식작용 지수의 최대값)을 보유한다.
- [0211] 더 구체적인 실시양태에서, ADCC의 증가(EC50의 감소 및/또는 최대값의 증가)는 상기 모 항체와 비교하여 1.2 내지 2.0배 또는 심지어 적어도 2.0배이다(예를 들어, 도 13 및 14 참조).
- [0212] 더 구체적인 실시양태에서, ADCP의 증가(식작용 지수 곡선의 EC50의 감소)는 상기 모 항체와 비교하여 적어도 3 배 또는 심지어 적어도 5배 이상이다(예를 들어, 도 15 및 16 참조).
- [0213] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "GnTIII 활성을 보유하는 폴리펩타이드, GnTIII"는 N-연결된 올리고당의 트리만노실 코어의 β 연결된 만노사이드에 β-1-4 연결로 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)의 첨가를 촉매할 수 있는 폴리펩타이드, 예를 들어 β-1,4-만노실-당단백질4-β-N-아세틸글루코사미닐-트랜스퍼라아제(EC 2.4.1.144)를 의미한다.
- [0214] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "FUT8"는 α1,6-푸코실트랜스퍼라아제(EC:2.4.1.68)를 의미한다.
- [0215] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "이펙터 기능, Fc 매개 세포성 세포독성"은 항체의 Fc 영역(천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기인할 수 있는 그들의 생물학적 활성을 의미한다. 항체 이펙터 기능의 예는 Fc 수용체 결합 친화성, 항체 의존성 세포성 세포독성(ADCC), 항체 의존성 세포성 식작용(ADCP), 사이토카인 분비, 항원 제시 세포에 의한 면역 복합체 매개 항원 흡수, 세포 표면 수용체의 하향 조절 등을 포함하나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 그러한 면역 메커니즘은 "인간 면역 이펙터 세포"에 의한 "타겟팅된 세포"의 용해를 유도한다.
- [0216] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "당조작된 항체"는 일반적으로 모 항체와 비교하여 아미노산 Asn297에서 상기 항체의 Fc 영역에 부착된 푸코실화된 및/또는 양분되는 올리고당의 감소된 양을 포함하는 본 발명에 따른 이중특이성 항체를 의미한다.
- [0217] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 당조작의 맥락에서 용어 "모 항체, 모 이중특이성 항체"는 당조작된 항체와 동일한 아미노산 조성을 포함하지만 당조작되지 않은 본 발명에 따른 이중특이성 항체를 의미한다. 그러한 비교를 위해, 표준 조건 하에서 모 항체 및 당조작된 항체는 동일한 숙주 세포이지만, 제1 경우에는 당조작이 없는 숙주 세포에서, 동일한 숙주 세포이지만, 제2 경우에는 FUT8 유전자의 타겟팅된 파괴에 의해 조작된 또는 GnTIII 활성을 보유하는 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 발현함으로써 조작된 숙주 세포 내에서 생성된

다(상기 참조).

- [0218] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "인간 면역 이펙터 세포"는 그들이 항원 결합 분자의 Fc 영역 또는 Fc 융합 단백질의 Fc 영역에 결합하여 이펙터 기능을 수행함으로써 그들의 표면 상에 Fc 수용체를 나타내는 백혈구의 집단을 의미한다. 그러한 집단은 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 및/또는 자연 살해(NK) 세포 및/또는 마크로파지를 포함할 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.
- [0219] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "증가된 Fc 매개 세포성 세포독성"은 상기 규정된 Fc 매개 세포성 세포독성의 메커니즘에 의해 타겟 세포를 둘러싸는 배지 중에서 본 발명의 이중특이성 항체의 주어진 농도에서 주어진 시간에 용해된 "타겟팅된 세포"의 수의 증가, 및/또는 Fc 매개 세포성 세포독성의 메커니즘에 의해 주어진 시간에 "타겟팅된 세포"의 주어진 수의 용해를 달성하기 위해 요구되는 타겟 세포를 둘러싸는 배지 중에서 본 발명의 이중특이성 항체의 농도의 감소로서 규정된다. Fc 매개 세포성 세포독성의 증가는 동일한 표준 조건을 이용하지만 본 출원에 기재된 방법에 의해 변경된 당쇄수식 패턴을 보유하도록(예를 들어, 글리코실트랜스퍼라아제, GnTIII, 또는 다른 글리코실트랜스퍼라아제 또는 FUT8 파괴를 발현하기 위해) 조작된 숙주 세포에 의해 생성되지 않는 동일한 타입의 숙주 세포에 의해 생성된 본 발명의 동일한 이중특이성 항체에 의해 매개성 세포성 세포독성과 관계가 있다.
- [0220] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "발현 벡터"는 당해 기술분야에 공지된 바와 같은 적합한 방식으로 본 발명에 따른 항체의 증쇄 및 경쇄를 포함하는 하나 이상의 벡터를 의미한다.
- [0221] 본 출원에서 사용된 바와 같이 "FUT8 유전자의 타겟팅된 파괴에 의해 조작된 숙주 세포"는 본 발명에 따른 항체를 발현할 수 있고, 추가적으로 US8067232, US7425446, US6946292(각각은 그 전체 내용이 참고로 인용됨), 및 문헌[참조: Yamane-Ohnuki N. et al., Biotech. Bioeng.; 87 (2004) 614-622]에 기재된 바와 같이 FUT8 유전자의 타겟팅된 파괴에 의해 당조작된 숙주 세포를 의미한다. 그러한 숙주 세포에서 발현된 본 발명에 따른 항체는 Fc 영역에 결합된 복합체 N-글리코사이드-연결된 당 쇄를 포함하는 Fc 영역을 포함하는데, 이는 N-아세틸글루코사민을 함유하는 환원 말단을 포함하고, 당 쇄는 당 쇄의 환원 말단에 N-아세틸글루코사민의 6 위치에 결합된 푸코오스를 함유하지 않는다.
- [0222] 본 발명은 추가로 숙주 세포에 의해 생성된 본 발명의 이중특이성 항체를 제조하기 위한 방법에 관한 것인데, 50% 내지 100%, 60% 내지 100%, 70% 내지 100%, 80% 내지 100%, 또는 90% 내지 100%의 비푸코실화를 포함하는 것을 특징으로 하고, 상기 방법은 상기 숙주 세포 내에서 본 발명의 이중특이성 항체를 코딩하는 핵산 및 글리코실트랜스퍼라아제 활성을 보유하는 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산, 또는 그러한 핵산을 포함하는 벡터를 발현시키는 단계를 포함한다. 글리코실트랜스퍼라아제 활성을 보유하는 유전자는 (1,4)-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라아제 III(GnTIII), α -만노시다아제 II(ManII), (1,4)-갈락토실트랜스퍼라아제(GalT), (1,2)-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라아제 I(GnTI), 및 β (1,2)-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라아제 II(GnTII)를 포함한다. 한 실시양태에서, 글리코실트랜스퍼라아제 활성을 보유하는 유전자의 조합은 숙주 세포 내에서 발현된다(예를 들어, GnTIII 및 Man II). 유사하게, 상기 방법은 또한 글리코실트랜스퍼라아제 유전자가 파괴되었거나, 그렇지 않으면 불활성화된 숙주 세포(예를 들어, α 1-6-코어 푸코실트랜스퍼라아제를 코딩하는 유전자의 활성이 녹아오된 숙주세포) 내에서 상기 이중특이성 항체를 코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드(들)의 발현을 포함한다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 이중특이성 항체는 당쇄수식 패턴을 변형하기 위해 GnTIII 활성을 보유하는 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 추가로 발현하는 숙주 세포 내에서 생성될 수 있다. 특이적인 실시양태에서, GnTIII 활성을 보유하는 폴리펩타이드는 골지 상주 폴리펩타이드의 골지 국부화 도메인을 포함하는 융합 폴리펩타이드이다. 다른 바람직한 실시양태에서, GnTIII 활성을 보유하는 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 발현하는 숙주 세포 내에서 본 발명의 이중특이성 항체의 발현은 증가된 Fc 수용체 결합 친화성 및 증가된 이펙터 기능을 보유하는 이중특이성 항체로 귀결된다.
- [0223] 본 발명은 본 발명의 이중특이성 항체를 제조하기 위한 방법에 관한 것인데, 상기 항체는 50% 내지 100%, 60% 내지 100%, 70% 내지 100%, 80% 내지 100%, 또는 90% 내지 100%의 비푸코실화를 포함하는 것을 특징으로 하고, 숙주 세포에 의해 생성되고, 상기 방법은 상기 숙주 세포 내에서 본 발명의 이중특이성 항체를 코딩하는 핵산 및 파괴된 FUT8 유전자를 발현시키는 단계를 포함한다.
- [0224] 한 실시양태에서, 본 발명의 숙주 세포에 의해 생성된 변경된 당쇄수식을 보유하는 이중특이성 항체는 숙주 세포의 변형의 결과로서(예를 들어, 글리코실트랜스퍼라아제 유전자의 발현에 의해) 증가된 Fc 수용체 결합 친화성 및/또는 증가된 이펙터 기능을 나타낸다. 바람직하게는, 증가된 Fc 수용체 결합 친화성은 Fc γ 활성화 수용체, 예를 들어 Fc γ RIIIa 수용체에 대한 증가된 결합이다.

- [0225] 한 실시양태에서, 비푸코실화된 올리고당의 백분율은 50% 내지 100%, 구체적으로 60% 내지 100%, 70% 내지 100%, 및 더 구체적으로 80% 내지 100%이다. 비푸코실화된 올리고당은 하이브리드 타입 또는 복합체 타입일 수 있다. 아직 다른 실시양태에서, 본 발명의 방법에 의해 제조된 이중특이성 항체는 본 발명의 방법에 의한 그의 올리고당의 변형의 결과로서 Fc 영역 내에 증가된 비율의 양분된 올리고당을 보유한다. 한 실시양태에서, 양분된 올리고당의 백분율은, 구체적으로 50%, 60% 내지 70%, 및 더 구체적으로, 80%이다. 특히 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 숙주 세포 및 방법에 의해 생성된 이중특이성 항체는 Fc 영역 내에 증가된 비율의 양분되고, 비푸코실화된 올리고당을 보유한다. 양분되고, 비푸코실화된 올리고당은 하이브리드 또는 복합체일 수 있다.
- [0226] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "숙주 세포"는 본 발명의 이중특이성 항체를 생성하도록 조작될 수 있는 임의의 종류의 세포 시스템을 포괄한다. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 변형된 당형태를 보유하는 항원 결합 분자의 생성이 가능하도록 조작된다. 특정 실시양태에서, 숙주 세포는 GnTIII 활성을 보유하는 하나 이상의 폴리펩타이드의 증가된 레벨을 발현하도록 추가로 조작되었다. 숙주 세포는 단지 몇몇 예를 들어 세포, 예를 들어 배양된 포유동물 세포, 예를 들어 CHO 세포(상기 참조), BHK 세포, NSO 세포, SP2/0 세포, YO 골수종 세포, P3X63 마우스 골수종 세포, PER 세포, PER.C6 세포 또는 하이브리도마 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 및 식물 세포를 포함하고, 트랜스제닉 동물, 트랜스제닉 식물 또는 배양된 식물 또는 동물 조직 내에 포함된 세포도 포함한다. 본 발명의 당조작된 이중특이성 항체의 생성을 위한 숙주 세포는 예를 들어 US6602684, US20040241817, US20030175884; 및 WO 2004065540에 기재되어 있다. 본 발명의 이중특이성 항체는 대안적으로 US2003/0157108, EP1176195, WO2003084570, WO2003085119 및 US2003/0115614, US2004/093621, US2004/110282, US2004/110704, US2004/132140(각각은 그 전체 내용이 참고로 인용됨)에 개시된 기법에 따라 Fc 영역 내에 감소된 푸코오스 잔기를 보유하도록 당조작될 수 있다. 또한, 당조작된 본 발명의 이중특이성 항체는 변형된 당단백질을 생성하는 발현 시스템, 예를 들어 WO2003/056914, WO2004/057002, 및 WO2004/024927(각각은 그 전체 내용이 참고로 인용됨)에 기재된 것에서 생성될 수 있다.
- [0227] 본 발명의 추가의 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체는 단일 치환 S239D, I332E, G236A, 이중 치환 I332E 및 G236A, S239D 및 I332E ("DE 치환"), S239D 및 G236A, 및 삼중 치환 S329D 및 I332E 및 G236A("DEA 치환")로 구성되는 군으로부터 선택되는 Fc 영역 내의 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산 치환("Fc 아미노산 치환")을 포함한다. (Richards JO, et al., Mol. Cancer Ther. 7 (2008) 2517-2527). 중쇄의 상이한 카운팅으로 인해, 이들 아미노산 번호는 +/- 1개, 2개 또는 3개의 아미노산의 차이가 있을 수 있지만, 모두 3개에 대해 동일한 이동을 보유한다. 서열 번호: 5의 중쇄의 경우, 1개의 아미노산 이동이 존재하고, 따라서 S329D 및 I332E 및 G236A는 S328D 및 I331E 및 G235A를 나타낸다. DE 치환을 보유하는 서열 번호: 5는 서열 번호: 23에 기재되어 있고, DEA 치환을 보유하는 서열 번호: 5는 서열 번호: 24에 기재되어 있다. 이중특이성 항체의 ADCC 및/또는 ADCP 활성은 Fc 부분의 그러한 아미노산 변형에 의해 증가될 수 있다.
- [0228] 본 출원에서 사용된 바와 같이, Fc 치환의 맥락에서 용어 "모 항체, 모 이중특이성 항체"는 Fc 치환된 항체와 동일한 아미노산 조성을 포함하지만, 상기 치환(들)이 없는 본 발명에 따른 이중특이성 항체를 의미한다. 그러한 비교를 위해, 모 항체 및 Fc 치환된 항체는 - 당조작된 항체의 경우에서와 같이 - 동일한 조건 하의 동일한 숙주 세포에서 생성되지만, 제1 경우에는 Fc 치환이 없는 숙주 세포에서 생성되고, 제2 경우에는 동일한 항체만 그러한 Fc 치환(들)을 보유하는 동일한 숙주 세포에서 생성된다. 유용한 숙주 세포주는 예를 들어 CHO-K1이다.
- [0229] 본 출원에서 사용된 바와 같이, Fc 치환을 포함하고, 당조작되는 본 발명에 따른 이중특이성 항체의 맥락에서 용어 "모 항체, 모 이중특이성 항체", 따라서 그러한 모 항체는 Fc 치환된 항체와 동일한 아미노산 조성을 포함하지만, 상기 치환(들)이 없고 당조작되지 않은 각각의 이중특이성 항체이다.
- [0230] 본 발명의 추가의 실시양태에서, 이중특이성 항체의 ADCC 및/또는 ADCP 활성은 각각의 모 항체의 ADCC 및/또는 ADCP 활성과 비교하여 Fc 부분의 당조작과 함께 Fc 부분의 아미노산 치환에 의해 증가된다.
- [0231] 따라서, 본 발명은 한 실시양태에서, 인간 CEACAM5 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 이중특이성 항체를 포함하는데, Fc 영역 내의 단일 치환 S239D, I332E, G236A, 이중 치환 I332E 및 G236A, S239D 및 I332E, 삼중 치환 S329D 및 I332E 및 G236A로 구성되는 군으로부터 선택된 1개 또는 2개 또는 3개의 아미노산 치환("Fc 아미노산 치환")을 포함하고, 50% 내지 100%, 60% 내지 100%, 70% 내지 100%, 80% 내지 100%, 또는 90% 내지 100%의 Fc 부분의 비푸코실화를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0232] 실시예 9는 ADCC 활성 및 또한 ADCP 활성의 결정을 위해 사용된 어세이를 기재한다.

- [0233] ADCC는 후술하는 바와 같은 시험관내 ADCC 어세이에 의해 측정될 수 있다:
- [0234] 1) 상기 어세이는 이중특이성 항체의 CEA 결합 영역에 의해 인식된 CEA를 발현하는 것으로 공지된 타겟 세포를 이용한다;
- [0235] 2) 상기 어세이는 이펙터 세포로서 무작위 선택된 건강한 공여자의 혈액으로부터 단리된 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 사용한다;
- [0236] 3) 상기 어세이는 하기 프로토콜에 따라 수행된다:
- [0237] i) PBMC는 표준 밀도 원심분리 절차를 이용하여 단리되고, RPMI 세포 배양 배지 중에 6.25×10^6 세포/ml로 현탁된다;
- [0238] ii) 타겟 세포는 표준 조직 배양 방법에 의해 성장되고, 90%보다 더 높은 생존율을 보유하는 지수 성장기에서 수확되고, RPMI 세포 배양 배지 중에서 세척되고, 1×10^6 세포에 대해 100 마이크로큐리의 ^{51}Cr 으로 표지되고, 세포 배양 배지로 2회 세척되고, 0.25×10^6 세포/ml의 밀도로 세포 배양 배지 중에 재현탁된다;
- [0239] iii) 20 마이크로리터의 상기 최종 타겟 세포 현탁액은 96웰 미량역가 플레이트의 각각의 웰에 이전된다;
- [0240] iv) 이중특이성 항체는 세포 배양 배지 중에서 4000 ng/ml 내지 0.12 ng/ml로 연속적으로 희석되고, 20 마이크로리터의 생성된 항체 용액은 96웰 미량역가 플레이트 내의 타겟 세포에 첨가되고, 상기 전체 농도 범위를 커버하는 다양한 항체 농도에서 3회 반복 테스트된다;
- [0241] v) 최대 방출(MR) 대조군의 경우, 표지된 타겟 세포를 함유하는 플레이트 내의 3개의 추가적인 웰은 이중특이성 항체 용액 대신에, 50 마이크로리터의 비이온성 세정제(트리톤, Sigma, St. Louis)의 5%(V/V) 수용액을 수용한다(상기 iv 참조);
- [0242] vi) 자연 방출(SR) 대조군의 경우, 표지된 타겟 세포를 함유하는 플레이트 내의 3개의 추가적인 웰은 이중특이성 항체 용액 대신에, 20 마이크로리터의 RPMI 세포 배양 배지를 수용한다(상기 iv 참조);
- [0243] vii) 그 후, 상기 96웰 미량역가 플레이트는 $50 \times g$ 에서 1분 동안 원심분리되고, 4°C에서 1 시간 동안 인큐베이션된다;
- [0244] viii) 40 마이크로리터의 PBMC 현탁액(상기 i 참조)은 50:1의 이펙터:타겟(E:T) 세포 비율을 얻기 위해 각각의 웰에 첨가되고, 플레이트는 37°C에서 4 시간 동안 5% CO_2 분위기 하의 인큐베이터 내에 위치된다;
- [0245] ix) 각각의 웰 유래의 무세포 상등액이 수확되고, 실험적으로 방출된 방사능(R)은 감마 계수기를 이용하여 정량된다;
- [0246] x) 특이적인 용해의 백분율은 식 $(ER-MR)/(MR-SR) \times 100$ 에 따라 각각의 이중특이성 항체에 대해 계산되는데, 이때 ER은 그 항체 농도에 대해 정량된 평균 방사능이고(참조: 상기 ix), MR은 MR 대조군(참조: 상기 v)에 대해 정량된 평균 방사능이고(참조: 상기 ix), SR은 SR 대조군(참조: 상기 vi)에 대해 정량된 평균 방사능이다(참조: 상기 ix).
- [0247] 본 출원에서 사용된 바와 같이 "증가된 ADCC"는 상기 테스트된 이중특이성 항체 농도 범위에서 관찰된 특이적인 용해의 최대 백분율, 및/또는 상기 테스트된 이중특이성 항체 농도 범위에서 관찰된 특이적인 용해의 최대 백분율의 1/2을 달성하기 위해 필요한 이중특이성 항체의 농도(EC50)의 감소로서 규정된다. ADCC의 증가는 동일한 표준 생성, 정제, 제형화 및 저장 방법을 이용하여 동일한 타입의 숙주 세포에 의해 생성된, 동일한 이중특이성 항체의 의해 매개된 상기 어세이를 이용하여 측정된 ADCC에 대한 것이지만, GnTIII를 과발현하도록 조작된 숙주 세포 또는 FUT8 유전자의 타겟팅된 파괴에 의해 조작된 숙주 세포("모 항체")에 의해 생성되지 않는다. Fc에서 아미노산 치환의 경우, ADCC의 증가는 치환(들)을 보유하지 않는 모 이중특이성 항체를 이용하여 측정된 ADCC에 대한 것이다. Fc 부분 내에 아미노산 치환을 포함하고 당조작된 이중특이성 항체의 경우, ADCC의 증가는 치환(들)을 보유하지 않는 모 당조작되지 않은 이중특이성 항체를 이용하여 측정된 ADCC에 대한 것이다.
- [0248] 항CEA 항원 결합 분자의 치료적 용도 및 이를 이용하는 방법
- [0249] 본 발명에 따른 이중특이성 항체 CEACAMxCD47은 단일 요법으로 또는 특히 CEA-TCB 또는 CEA-TCB1 및/또는 PD-1 축 길항물질과 같은 CEAxCD3 T 세포 이중특이성 항체와 함께 조합 요법으로 주로 종양 세포의 마크로파지 매개 식작용에 의한 고형 종양의 치료를 위해 최적화된다. 본 발명에 따른 항체 및 CEAxCD3 T 세포 이중특이성 항체

는 후술하는 바와 같이 투여될 수 있다.

- [0250] 구체적 실시양태에서, 질병 각각 고형 종양은 CEA를 발현하거나, 또는 심지어 과발현하는 암이며, 대장 종양, 비소세포 폐 종양, 위 종양, 췌장 종양 및 유방 종양의 균을 포함하나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 구체적 실시양태에서, 종양은 대장 종양이다. 본 출원에 기재된 모든 치료적 적용 방법, 용도, 조합 등은 구체적으로 이들 종양/질병의 치료를 위한 실시양태이다.
- [0251] 본 발명자들은 본 발명에 따른 항체가 중화 ADA 각각 효능의 상실에 기인하여 ADA 형성 가능성 각각 노출의 상실이 낮거나 없다는 것을 인식한다.
- [0252] 한 실시양태에서, 본 발명은 생체 내에서 암종(암, 종양, 예를 들어 인간 암종), 구체적으로 CEA 발현 종양의 치료 방법을 제공한다. 이 방법은 대상체에게 본 발명의 이중특이성 항체를 함유하는 조성물의 약학적 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. "대상체"는 인간 대상체, 한 실시양태에서 암/종양/암종을 겪는 환자를 의미한다.
- [0253] 다양한 종양 엔티티에서 CEA 발현은 일반적으로 매우 높는데, 구체적으로 그 중에서도 대장 암종, 췌장 아데노암종, 위암, 비소세포 폐암, 유방암, 두경부 암종, 자궁 및 방광에서 매우 높다. 위장관 내의 건강한 정상 선상 상피세포에서, CEA는 상피 세포의 선단 표면 상에 극성 패턴으로 발현된다. 이러한 극성 발현 패턴은 전신 투여되어 잠재 독성인 항CEA 모노 또는 이중특이성 항체에 의한 접근 가능성을 제한한다. 본 발명의 항체의 저 친화성 CD47 결합과 함께, 이는 본 발명의 항체에 의해 그러한 정상 세포의 식작용을 유도하지 않거나, 또는 제한된 식작용을 유도한다. 이러한 극성 발현은 위장관 및 다른 악성 종양의 세포 내에서 상실된다. CEA는 암 세포의 전체 표면 상에서 균등하게 발현되는데, 이는 암 세포가 정상의 건강한 세포보다 본 발명의 항체에 훨씬 더 접근할 수 있고, 상기한 조합에 의해 각각 본 발명의 CEAxCD47 이중특이성 항체에 의해 선별적으로 사멸될 수 있음을 의미한다.
- [0254] 한 실시양태에서, 본 발명의 이중특이성 항체는 진행성 고형 종양, 한 실시양태에서, CEA 발현 종양의 치료를 위한 단일요법에 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체는 CEAxCD3 Mab와 함께 동시, 별도, 또는 순차적 조합으로 사용된다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체는 CEAxCD3 Mab 및/또는 a PD-1 축 길항물질과 함께 동시, 별도, 또는 순차적 조합으로 사용된다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 이중특이성 항체는 PD-1 축 길항물질과 함께 동시, 별도, 또는 순차적 조합으로 사용된다. 그러한 PD-1 축 길항물질은 예를 들어 WO2017118675에 기재되어 있다. 그러한 조합은 마크로파지 및 T 세포에 의해 고형 종양을 공격한다. 2개의 CEAxCD3 Mab는 임상 개발 중이다(CEA-TCB 및 CEA-TCB1; 참조 clinicaltrials.gov; NCT3866239에서 R06958688 및 NCT03539484에서 R07172508). MEDI-565는 임상 개발 중이지만, clinicaltrials.gov에서 확인될 수 있는 적극적인 임상시험은 존재하지 않는다. 한 실시양태에서, CEA 및 CD3에 대한 이중특이성 항체로서, 항체 CEA-TCB 또는 CEA-TCB1이 사용된다.
- [0255] CEA-TCB에서 사용된 CEA에 대한 결합체는 항CEA 항체 PRIA3로부터 유래한다(참조: 예를 들어 EP2681244B1). 이러한 항체는 CEA의 소위 B3 도메인에 결합한다. CEA-TCB는 CEA에 대해 낮은 nM 결합 친화성을 보유하고, 고 용량에서 효능을 나타낸다(투약 및 환자당 40 내지 600 mg; (참조: 예를 들어 J.Taberner et.al., J. Clin. Oncol. 35, 2017 (suppl. Abstr. 3002)). 이들 용량에서 세포 표면 상의 거의 모든 CEA 타겟은 CEA-TCB에 의해 점유된다. CEA-TCB 또는 CEA-TCB1 및 CEAxCD47의 조합은, 약물 둘 다가 CEA 항원에 대해 비경쟁적인 경우, 동시에 약물 둘 다의 치료적 혈장 레벨을 생성하고, 최상의 결과(상가적 또는 심지어 상승적)를 달성한다.
- [0256] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 인간 CEA 및 인간 CD3ε에 결합하는 본 발명에 따른 항체 및 제2 이중특이성 항체의 "조합, 동시, 별도, 또는 순차적 조합"은 2개의 항체(또는 본 발명의 항체, CEAxCD3 Mab 및 PD-1 축 길항물질의 조합의 경우에는 3개의 항체)를 별도로 또는 함께 임의 투여하는 것을 의미하는데, 이때 2개 또는 3개의 항체는 조합 요법의 이점을 얻기 위해 디자인된 적합한 투약 레지먼의 일부로서, 예를 들어 별도, 순차, 동시(simultaneous 또는 concurrent), 시간적으로 시차를 둔 투여로 투여된다. 따라서, 2개 또는 3개의 항체는 동일한 약학 조성물의 일부로서 또는 별도의 약학 조성물로 투여될 수 있다. 본 발명에 따른 항체는 제2 이중특이성 항체의 투여 이전에, 동시에, 또는 후속적으로, 또는 이의 몇몇 조합으로 투여될 수 있다. 본 발명에 따른 항체가 예를 들어, 치료의 표준 과정 중에, 대상체에게 반복된 기간으로 투여되는 경우, 제2 이중특이성 항체는 본 발명의 항체의 각각 투여 이전에, 동시에, 또는 후속적으로, 또는 이의 몇몇 조합으로, 또는 본 발명의 항체를 이용하는 치료와 관련하여 상이한 간격으로, 또는 본 발명의 항체를 이용하는 치료 과정 이전에, 도중의 임의의 시간에, 또는 후속적으로 단일 용량으로 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체 및 제2 이중특이성 항체는 교대 투여, 한 실시양태에서 본 발명의 항체와 제2 항체의 투여 사이에 6 내지 15일의 간격으로 투여된다. 그러한 교대 투여에서, 제1 투약은 본 발명의 항체 또는 제2 항체일 수 있다.

- [0257] 용어 "PD-1 축 길항물질"은 항PD-1 항체 또는 항PD-L1 항체를 의미한다. 항PD-1 항체는 예를 들어 캄브롤리주맵(Keytruda®, MK-3475), 니볼루맵, 피딜리주맵, 람브롤리주맵, MEDI-0680, PDR001, 및 REGN2810이다. 항PD-1 항체는 예를 들어 WO200815671, WO2013173223, WO2015026634, US7521051, US8008449, US8354509, WO2009114335, WO2015026634, WO2008156712, WO2015026634, WO2003099196, WO2009101611, WO2010/027423, WO2010/027827, WO2010/027828, WO2008/156712, 및 WO2008/156712(각각은 그 전체 내용이 참고로 인용됨)에 기재되어 있다.
- [0258] 항PD-L1 항체는 예를 들어 아테졸리주맵, MDX-1 105, 두르발루맵 및 아벨루맵이다. 항PD-L1 항체는 예를 들어 WO2015026634, WO2013/019906, WO2010077634, US8383796, WO2010077634, WO2007005874, 및 WO2016007235(각각은 그 전체 내용이 참고로 인용됨)에 기재되어 있다.
- [0259] 본 발명에 따른 항체 및 제2 이중특이성 항체의 조합 투여와 관련하여, 화합물 둘 다는 하나의 단일 투여 형태 또는 별도의 투여 형태, 예를 들어 2개의 상이하거나 동일한 투여 형태일 수 있다.
- [0260] 본 발명의 항체 및 제2 항체는 CEACAM5에 대해 경쟁하지 않으며, 한 실시양태에서, 의사에 의해 요구되는 경우 항체 둘 다는 동시에 투여될 수 있다. 본 발명의 항체 및 제2 항체가 CEACAM5에 대해 경쟁하는 경우, 한 실시양태에서, 항체 둘 다는 교대 투여로 투여된다.
- [0261] 본 발명의 항체는 전형적으로 당해 기술분야에 공지된 바와 같이 치료되는 환자에게 암의 가장 효과적인 치료(효능 및 안전성 둘 다의 관점에서)를 제공하는 투여 레지던으로 환자에게 투여될 것이다. 바람직하게는 종양 세포는 이 접근법의 완전한 치료적 가능성을 달성하기 위해 T 세포 및 마크로파지에 의해 동시에 공격받고, CEA-CD3 및 CEAxCD47 이중특이성 항체는 세포 표면 상의 CEA에 대한 결합에 관해 비경쟁적이어야 한다.
- [0262] 상기 논의한 바와 같이, 투여된 항체의 양 및 본 발명의 항체의 투여 시기는 치료되는 환자의 타입(예를 들어, 성별, 연령, 체중) 및 상태, 질병 또는 병태의 중증도, 및 투여 경로에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체 및 제2 항체는 단일 또는 분할 투약으로 또는 연속 주입에 의해 1일 또는 1주당 0.1 내지 100 mg/kg 체중 범위의 용량으로 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항체 및 제2 항체 각각은 0.1 내지 20 mg/kg 범위의 용량으로 환자에게 투여된다. 몇몇 경우에서, 상기 범위의 하한치 미만의 투여량 레벨이 적합할 수 있는 한편, 다른 경우에서 임의의 해로운 부작용을 유발하지 않으면서 더 많은 용량이 사용될 수 있다.
- [0263] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "항체의 반감기"는 통상적인 약물동태학 어세이, 예를 들어 실시예 17에 기재된 바와 같이 측정된 바와 같은, 상기 항체의 반감기를 의미한다. 본 발명에 따른 항체 및 CEA 및 CD3에 대한 제2 이중특이성 항체는 3-14일의 제거 반감기를 보유한다.
- [0264] 다른 관점에서, 또한 본 발명은 질병, 구체적으로 CEA가 발현되는, 구체적으로 동일한 세포 타입의 정상 조직과 비교하여 CEA가 비정상적으로 발현되는(예를 들어, 세포 표면 상에서 상이한 패턴으로 발현되거나, 또는 과발현됨) 세포 증식 질환의 치료에서 본 발명에 따른 이중특이성 항체의 용도에 관한 것이다. 그러한 질환은 대장암, NSCLC(비소세포 폐암), 위암, 췌장암 및 유방암을 포함하나, 이들로 제한되는 것은 아니다. CEA 발현 레벨은 당해 기술분야의 공지된 방법(예를 들어, 면역조직화학 어세이, 면역형광 어세이, 면역효소 어세이, ELISA, 유세포분석, 방사성면역 어세이 등에 의함)에 의해 결정될 수 있다.
- [0265] 한 관점에서, 본 발명의 이중특이성 항체는 생체내 또는 시험관 내에서 CEA를 발현하는 세포를 타겟팅하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 이중특이성 항체는 종양 세포의 ADCP 및 ADCC의 유도에 의한 종양 형성의 예방, 종양의 근절 및 종양 성장 또는 전이의 억제에 특히 유용하다. 본 발명의 이중특이성 항체는 CEA를 발현하는 임의의 종양을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 이중특이성 항체를 사용하여 치료될 수 있는 구체적인 악성종양은 대장암, 비소세포 폐암, 위암, 췌장암 및 유방암을 포함하나, 이들로 제한되는 것은 아니다.
- [0266] 본 발명의 이중특이성 항체는 후술하는 바와 같이, 예를 들어 볼루스로서 또는 일정 기간에 걸쳐 연속 주입에 의해 정맥 내, 근육 내, 복강 내, 뇌척수 내, 피하, 동맥 내, 활막 내, 척추강 내, 경구, 국소, 또는 흡입 경로로 투여될 수 있는 것과 같은 약학적으로 허용 가능한 투여 형태로 포유동물, 바람직하게는 인간에게 투여된다. 또한, 본 발명의 이중특이성 항체는 국소뿐만 아니라 전신 치료 효과를 나타내기 위해 종양 내, 종양 주변, 병변 내, 또는 병변 주변 경로에 의해 적절히 투여된다.
- [0267] 질병의 치료를 위해, 본 발명의 이중특이성 항체의 적합한 투여량은 치료하려는 질병의 타입, 질병의 중증도 및 경과, 이전 요법, 환자의 임상 이력 및 항체에 대한 반응, 및 주치의의 재량에 따라 달라질 것이다. 본 발명의 이중특이성 항체는 일회성 치료 또는 일련의 치료로 환자에게 적절히 투여된다. 본 발명은 CEA를 발현하는 종양

세포를 선별적으로 사멸시키기 위한 방법을 제공한다.

- [0268] 이러한 방법은 본 발명의 이중특이성 항체와 상기 종양 세포의 상호작용을 포함한다. 이들 종양 세포는 대장 암 종, 비소세포 폐 암종(NSCLC), 위 암종, 췌장 암종 및 유방 암종을 포함하는 인간 암종으로부터 유래할 수 있다.
- [0269] 다른 관점에서, 본 발명은 비정상적인 CEA 발현과 관련된 질병을 치료하기 위한 약제의 제조를 위한 본 발명의 이중특이성 항체의 용도에 관한 것이다. 구체적인 실시양태에서, 상기 질병은 CEA를 발현 또는 심지어 과발현하는 암이고, 대장 종양, 비소세포 폐 종양, 위 종양, 췌장 종양 및 유방 종양을 포함하나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 구체적인 실시양태에서, 종양은 대장 종양이다.
- [0270] 조성물, 제형, 투여 용량, 및 투여 경로
- [0271] 한 관점에서, 본 발명은 본 발명의 이중특이성 항체 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 질병, 예를 들어 암의 치료 방법에서, 또는 질병, 예를 들어 암의 치료를 위한 약제의 제조에서 그러한 약학 조성물의 용도에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 질병의 치료를 위한 방법, 더 구체적으로 암의 치료를 위한 방법에 관한 것인데, 상기 방법은 본 발명의 약학 조성물의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0272] 한 관점에서, 본 발명은 상기한 바와 같은 인간 암종, 종양을 치료하기 위한 조성물, 조합물 및 방법을 포함한다. 예를 들어, 본 발명은 본 발명의 항체의 약학적 유효량 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 인간 암종의 치료에서 사용하기 위한 약학 조성물을 포함한다.
- [0273] 본 발명의 이중특이성 항체 조성물은 정맥내, 복강내, 경구, 림프내 또는 직접 종양내 투여를 포함하나, 이들로 제한되는 것은 아닌 전통적인 투여 모드를 이용하여 투여될 수 있다. 정맥내 투여 또는 피하 투여가 바람직하다.
- [0274] 본 발명의 한 관점에서, 본 발명의 이중특이성 항체를 함유하는 치료적 제형은 요구되는 순도를 보유하는 항체와 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 안정화제(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))를 혼합함으로써 동결건조 제형 또는 액상 제형의 형태로 저장을 위해 제조된다. 허용 가능한 담체, 부형제, 또는 안정화제는 사용된 투여형태 및 농도에서 수혜자에게 비독성이다. 시험관내 투여를 위해 사용되는 제제는 멸균되어야 한다. 이는 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 용이하게 수행된다. 본 발명의 약학 조성물을 위해 가장 효과적인 투여 모드 및 투여 레지먼은 질병의 중증도 및 경과, 환자의 병태 및 치료에 대한 반응 및 치료 의사의 판단에 따라 달라진다. 따라서, 조성물의 투여 용량은 고정 용량일 수 있거나, 또는 개별 환자에, 예를 들어 체중에 적응될 수 있다. 그럼에도 불구하고, 본 발명의 조성물의 유효 용량은 일반적으로 0.1 내지 20 mg/kg 범위일 것이다.
- [0275] 본 발명의 이중특이성 항체는 분자당 150 kD 크기의 분자량을 보유한다. 한 실시양태에서 그들은 Fc 부분을 보유한다. 환자에서 제거 반감기는 3 내지 14일의 범위이다. 이 반감기는 1일 1회, 1주 1회, 또는 2주마다 1회의 투여를 가능하게 하나, 이들로 제한되는 것은 아니다.
- [0276] 본 발명의 이중특이성 항체 및 그들 각각의 조성물은 액체 용액 또는 현탁액, 정제, 필, 분말, 좌약, 중합체 마이크로캡슐 또는 마이크로베지클, 리포솜, 및 주사 가능한 또는 주입 가능한 용액을 포함하나 이들로 제한되는 것은 아닌 다양한 투여 형태일 수 있다. 바람직한 투여 형태는 투여 모드 및 치료적 적용에 따라 달라진다.
- [0277] 본 발명의 이중특이성 항체를 포함하는 조성물은 모범 의료 행위에 부합되는 방식으로 제형화될 것이고, 용량화될 것이고(dosed), 투여될 것이다. 이 맥락에서 고려할 요인은 치료하려는 특정 질병 또는 질환, 치료하려는 특정 포유동물, 개별적인 환자의 임상적인 상태, 질병 또는 질환의 원인, 제제의 전달 부위, 투여 방법, 투여 스케줄, 및 의료인에게 공지된 다른 요인을 포함한다.
- [0278] 제조 물품
- [0279] 본 발명의 다른 관점에서, 상기한 질환의 치료, 예방 및/또는 진단을 위해 유용한 물질을 함유하는 제조 물품이 제공된다. 상기 제조 물품은 용기, 및 용기 상에 또는 용기와 관련하여 라벨 또는 포장 삽입물을 포함한다. 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알, 주사기, IV 용액 백 등을 포함한다. 용기는 다양한 재료, 예를 들어 유리 또는 플라스틱으로 형성될 수 있다. 용기는 조성물만을 보유하거나, 또는 조성물과 병태를 치료, 예방 및/또는 진단하기에 효과적인 다른 조성물과 함께 보유하며, 멸균 액세스 포트를 보유할 수 있다(예를 들어, 용기는 피하 주사 바늘에 의해 천공 가능한 스톱퍼를 보유하는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있다). 조성물 내의 적

어도 하나의 활성제는 본 발명의 이중특이성 항체이다. 라벨 또는 포장 삽입물은 조성물이 선택되는 병태를 치료하기 위해 사용될 수 있음을 나타낸다. 게다가, 제조 물품은 (a) 그 내부에 함유된 조성물을 보유하는 제1 용기로서, 조성물이 본 발명의 이중특이성 항체를 포함하는 제1 용기; 및 (b) 그 내부에 함유된 조성물을 보유하는 제2 용기로서, 조성물은 추가로 세포독성제 또는 그렇지 않으면 치료제를 추가로 포함하는 제2 용기를 포함할 수 있다. 본 발명의 이 실시양태의 제조 물품은 조성물이 특정 병태를 치료하기 위해 사용될 수 있음을 나타내는 포장 삽입물을 추가로 포함할 수 있다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 제조 물품은 약학적으로 허용 가능한 버퍼, 예를 들어 정균적 주사용 멸균수(BWFI), 인산염 완충처리된 염수, 링거 용액 및 텍스트로오스 용액을 포함하는 제2(또는 제3) 용기를 추가로 포함할 수 있다. 추가로 이는 다른 버퍼, 희석제, 필터, 니들, 및 주사기를 포함하는, 상업적인 및 사용자 견지로부터 바람직한 다른 재료를 포함할 수 있다.

- [0280] 본 발명의 추가 실시양태
- [0281] 하기 실시양태에서, 인간 CEACAM5 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 이중특이성 항체가 기재된다.
- [0282] 1. 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제1 결합부 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 제2 결합부를 포함하는 이중특이성 항체.
- [0283] 2. 실시양태 1에 있어서, Fc 영역은, 동일하지만 당조작되지 않은 이중특이성 항체와 비교하여 감소된 수의 푸코오스 잔기를 보유하도록 당조작된 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.
- [0284] 3. 실시양태 1 또는 2에 있어서, 제1 결합부는 아미노산 35 - 144의 CEACAM5의 Ig 유사 V 타입 도메인에 결합하는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.
- [0285] 4. 실시양태 1 내지 3 중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 이중특이성 항체는 CEACAM5에 대한 결합에 대해 항체 SM3E와 경쟁하는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.
- [0286] 5. 실시양태 1 내지 3 중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 이중특이성 항체는 항체 SM3E, MEDI, LAB, SAR, T86.66, CH1A1A와 경쟁하지 않는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.
- [0287] 6. 실시양태 1 내지 5 중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 이중특이성 항체의 식작용의 EC50 값은 동일한 실험 조건 하에서 및 1 mg/ml의 인간 IgG의 존재 또는 부재 하에서 참조 항체 K2AC22의 E50 값의 0.1 내지 10배 범위에 있는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.
- [0288] 7. 실시양태 1 내지 6 중 어느 한 실시양태에 있어서, 1 mg/ml의 인간 IgG의 존재 하에서 이미징 기반 어세이에서 측정된 식작용 지수의 최대값은 인간 IgG 부재하의 동일한 실험 조건 하에서의 식작용과 비교하여 30% 초과하여 감소되지 않는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.
- [0289] 8. 실시양태 1 내지 7 중 어느 한 실시양태에 있어서, 제1 결합부에 대해 일가이고, 제2 결합부에 대해 일가인 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.
- [0290] 9. 실시양태 1 내지 8 중 어느 한 실시양태에 있어서, 제1 및 제2 결합부 각각은 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄를 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.
- [0291] 10. 실시양태 1 내지 9 중 어느 한 실시양태에 있어서, 인간 IgG1 타입인 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.
- [0292] 11. 실시양태 1 내지 10 중 어느 한 실시양태에 있어서, 불변 및 가변 프레임워크 영역 서열은 인간 또는 인간 기원인 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.
- [0293] 12. 실시양태 1 내지 11 중 어느 한 실시양태에 있어서, 이중특이성 항체는 전장 항체인 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.
- [0294] 13. 실시양태 1 내지 12 중 어느 한 실시양태에 있어서, 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하고 카과 경쇄 가변 도메인 및 람다 경쇄 불변 도메인을 포함하는 제1 결합부 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하고 카과 경쇄 가변 도메인 및 카과 경쇄 불변 도메인을 포함하는 제2 결합부를 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.
- [0295] 14. 실시양태 1 내지 12 중 어느 한 실시양태에 있어서, 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하고 람다 경쇄 가변 도메인 및 람다 경쇄 불변 도메인을 포함하는 제1 결합부 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하고 카과 경쇄 가변 도메인 및 카과 경쇄 불변 도메인을 포함하는 제2 결합부를 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.
- [0296] 15. 실시양태 13 또는 14 중 어느 한 실시양태에 있어서, 공통 중쇄를 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이성

항체.

- [0297] 16. 실시양태 1 내지 15 중 어느 한 실시양태에 있어서,
- [0298] a) 제1 결합부는 서열 번호: 1의 CDRH1, 서열 번호: 2의 CDRH2 및 서열 번호: 3의 CDRH3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 인간 램다 타입 및 서열 번호: 13의 경쇄 불변 도메인을 포함하고, 제2 결합부는 서열 번호: 1의 CDRH1, 서열 번호: 2의 CDRH2 및 서열 번호: 3의 CDRH3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 7의 CDRL1, 서열 번호: 8 내에 포함된 Ala Ala Ser의 CDRL2, 및 서열 번호: 9의 CDRL3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하거나, 또는
- [0299] b) 제1 결합부는 CDR로서 서열 번호: 25의 CDRH1, 서열 번호: 26의 CDRH2 및 서열 번호: 27의 CDRH3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 인간 램다 타입 및 서열 번호: 13의 경쇄 불변 도메인을 포함하고, 제2 결합부는 CDR로서 서열 번호: 25의 CDRH1, 서열 번호: 26의 CDRH2 및 서열 번호: 27의 CDRH3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 CDR로서 서열 번호: 28의 CDRL1, 서열 번호: 29의 CDRL2, 및 서열 번호: 30의 CDRL3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.
- [0300] 17. 실시양태 1 내지 16 중 어느 한 실시양태에 있어서, 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제1 결합부 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 제2 결합부를 포함하는 것을 특징으로 하고,
- [0301] a) 제1 결합부는 CDR로서 서열 번호: 25의 CDRH1, 서열 번호: 26의 CDRH2 및 서열 번호: 27의 CDRH3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 31, 32 및 33; 서열 번호: 34, 35 및 36, 서열 번호: 37, 38 및 39, 서열 번호: 40, 41 및 42, 서열 번호: 43, 44 및 45, 서열 번호: 46, 47 및 48, 서열 번호: 49, 50 및 51, 서열 번호: 52, 53 및 54, 서열 번호: 55, 56 및 57, 서열 번호: 58, 59 및 60, 서열 번호: 61, 62 및 63, 및 서열 번호: 112, 113, 및 114로 구성되는 군으로부터 선택된 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3의 조합을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0302] b) 제2 결합부는 CDR로서 서열 번호: 1의 CDRH1, 서열 번호: 2의 CDRH2 및 서열 번호: 3의 CDRH3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 CDR로서 서열 번호: 7의 CDRL1, 서열 번호: 8 내에 포함된 Ala Ala Ser의 CDRL2, 및 서열 번호: 9의 CDRL3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하거나, 또는
- [0303] 제2 결합부는 CDR로서 서열 번호: 25의 CDRH1, 서열 번호: 26의 CDRH2 및 서열 번호: 27의 CDRH3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 CDR로서 서열 번호: 28의 CDRL1, 서열 번호: 29의 CDRL2, 및 서열 번호: 30의 CDRL3를 포함하는 경쇄 가변 영역 및 경우에 따라 인간 램다 타입 및 서열 번호: 13의 경쇄 불변 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.
- [0304] 18. 실시양태 1 내지 17 중 어느 한 실시양태에 있어서, 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제1 결합부 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 제2 결합부를 포함하는 것을 특징으로 하고,
- [0305] a) 제1 결합부는 서열 번호: 4의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 64, 서열 번호: 65, 서열 번호: 66, 서열 번호: 67, 서열 번호: 68, 서열 번호: 69, 서열 번호: 70, 서열 번호: 71, 서열 번호: 72, 서열 번호: 73, 서열 번호: 74, 및 서열 번호: 115로 구성되는 VLCL 영역 내에 포함된 VL의 군으로부터 선택된 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0306] b) 제1 결합부는 서열 번호: 4의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 10의 경쇄 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.
- [0307] 19. 실시양태 1 내지 18 중 어느 한 실시양태에 있어서, 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제1 결합부 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 제2 결합부를 포함하는 것을 특징으로 하고,
- [0308] a) 제1 결합부는 서열 번호: 5의 중쇄 및 서열 번호: 64, 서열 번호: 65, 서열 번호: 66, 서열 번호: 67, 서열 번호: 68, 서열 번호: 69, 서열 번호: 70, 서열 번호: 71, 서열 번호: 72, 서열 번호: 73, 서열 번호: 74, 및 서열 번호: 115로 구성되는 군으로부터 선택된 경쇄를 포함하고,
- [0309] b) 제2 결합부는 서열 번호: 5의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 11의 경쇄 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.
- [0310] 20. 실시양태 1 내지 19 중 어느 한 실시양태에 있어서, 인간 IgG1 타입의 전장 이중특이성 항체이고, 제1 결합부에 대해 일가이고 제2 결합부에 대해 일가이며, 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하고 카파 경쇄 가변 도메인 및 램다 경쇄 불변 도메인을 포함하는 제1 결합부 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하고 카파 경쇄 가변 도메인

및 카파 경쇄 불변 도메인을 포함하는 제2 결합부를 포함하거나, 또는 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하고 람다 경쇄 가변 도메인 및 람다 경쇄 불변 도메인을 포함하는 제1 결합부 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하고 카파 경쇄 가변 도메인 및 카파 경쇄 불변 도메인을 포함하는 제2 결합부를 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.

- [0311] 21. 실시양태 1 내지 20 중 어느 한 실시양태에 있어서, 100 nM 내지 600 nM, 바람직하게는 100 내지 500 nM의 결합 친화성으로 인간 CD47에 결합하는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.
- [0312] 22. 실시양태 1 내지 21 중 어느 한 실시양태에 있어서, 1 내지 200 nM의 EC50 값으로 MKN-45 세포에 결합하는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.
- [0313] 23. 실시양태 1 내지 22 중 어느 한 실시양태에 있어서, 100 nM 내지 500 nM의 결합 친화성으로 인간 CD47에 결합하고, 1 내지 200 nM의 EC50 값으로 MKN-45 세포에 결합하는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.
- [0314] 24. 실시양태 1 내지 23 중 어느 한 실시양태에 있어서,
- [0315] a) 인간 매크로파지의 존재 하에서, 상기 이중특이성 항체에 의한 MKN-45 세포의 식작용 지수 곡선에 대한 EC50은 가용성 CEA의 부재 하에서 측정된 EC50과 비교하여 200 ng/ml의 가용성 CEA의 존재 하에서 더 높은 농도를 향해 4배 초과하여 이동되지 않고/않거나 식작용 지수 곡선의 최대값은 200 ng/mL의 가용성 CEA의 첨가에 의해 10% 이상, 15% 이상, 또는 20% 이상 감소되지 않고/않거나
- [0316] b) 상기 이중특이성 항체의 MKN-45 세포에 대한 결합 곡선에 대한 EC50은 가용성 CEA 부재 하에서 측정된 EC50과 비교하여 200 ng/ml의 가용성 CEA의 존재 하에서 더 높은 농도를 향해 2배 초과하여 이동되지 않는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.
- [0317] 25. 실시양태 1 내지 24 중 어느 한 실시양태에 있어서, 인간 재조합 CEACAM5 및 CEACAM6에 결합하고, 그에 따라 재조합 CEACAM5 및 CEACAM6에 대한 결합의 EC50 값은 3배 미만 상이한 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.
- [0318] 26. 실시양태 25에 있어서,
- [0319] a) 제1 결합부는 CDR로서 서열 번호: 25의 CDRH1, 서열 번호: 26의 CDRH2 및 서열 번호: 27의 CDRH3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 CDR로서 서열 번호: 112의 CDRL1, 서열 번호: 113의 CDRL2, 및 서열 번호: 114의 CDRL3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0320] b) 제2 결합부는 CDR로서 서열 번호: 25의 CDRH1, 서열 번호: 26의 CDRH2 및 서열 번호: 27의 CDRH3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 CDR로서 서열 번호: 28의 CDRL1, 서열 번호: 29의 CDRL2, 및 서열 번호: 30의 CDRL3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.
- [0321] 27. 실시양태 1 내지 26 중 어느 한 실시양태에 있어서, 인간 CEACAM5 및 CD3 ϵ 에 특이적으로 결합하고 중쇄로서 서열 번호: 97 및 98의 중쇄 및 경쇄로서 서열 번호: 96 및 99의 경쇄를 포함하는 300 nM 농도의 이중특이성 항체는 한 실시양태에서 MKN-45 세포에 대한 본 발명의 이중특이성 항체의 결합 곡선의 EC50을 더 높은 농도를 향해 3배 초과하여 이동시키지 않는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.
- [0322] 28. 실시양태 1 내지 27 중 어느 한 실시양태에 있어서, 인간 CEACAM5 및 CD3 ϵ 에 특이적으로 결합하고 중쇄 및 경쇄로서 서열 번호: 92 내지 95의 아미노산 서열의 쇄를 포함하는 30 nM 농도의 이중특이성 항체(또한, CEA-TCB1으로 추가로 지칭됨)은 한 실시양태에서 MKN-45 세포에 대한 본 발명의 이중특이성 항체의 결합 곡선의 EC50을 더 높은 농도를 향해 3배 초과하여 이동시키지 않는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.
- [0323] 29. 실시양태 1 내지 28 중 어느 한 실시양태에 있어서, Fc 영역은 각각의 모 이중특이성 항체와 비교하여 감소된 수의 푸코오스 잔기를 보유하도록 당조작된 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.
- [0324] 30. 실시양태 29에 있어서, Fc 영역 내의 N-연결된 올리고당의 50% 내지 100%는 비푸코실화된 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.
- [0325] 31. 실시양태 29 또는 30 중 어느 한 실시양태에 있어서, Fc 영역 내의 N-연결된 올리고당의 50% 내지 100%는 양분된 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.
- [0326] 32. 실시양태 29 내지 31 중 어느 한 실시양태에 있어서, Fc 영역 내의 N-연결된 올리고당의 80% 내지 100%는 양분되고 비푸코실화된 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.
- [0327] 33. 실시양태 29 내지 32 중 어느 한 실시양태에 있어서, 각각의 모 이중특이성 항체에 의해 유도된 EC50 값 및

/또는 ADCC의 최대값과 비교하여 상기 항체에 의해 유도된 ADCC 최대값 및/또는 ADCC의 EC50 값은 1.2 내지 2.0 배 또는 적어도 2.0배 증가되고/되거나, 식작용 지수 곡선의 EC50 값은 적어도 1.2 내지 2.0배 또는 적어도 2.0 배 감소되는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.

- [0328] 34. 실시양태 29 내지 33 중 어느 한 실시양태에 있어서, 각각의 모 이중특이성 항체에 의해 유도된 식작용 지수의 최대값 각각 EC50 값과 비교하여 상기 항체에 의해 유도된 식작용 지수의 이미징 측정된 최대값은 적어도 3배 증가되고/되거나, 식작용 지수 곡선의 EC50 값은 적어도 3배 또는 적어도 5배 감소되는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.
- [0329] 35. 실시양태 29 내지 34 및 30 중 어느 한 실시양태에 따른 이중특이성 항체의 제조 방법으로서,
- [0330] a) $\beta(1,4)$ -N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라아제 III 활성을 보유하는 폴리펩타이드를 코딩하는 적어도 하나의 핵산을 발현하도록 조작된 숙주 세포를 상기 이중특이성 항체의 생성을 허용하고 상기 이중특이성 항체의 Fc 영역 상에 존재하는 올리고당의 상기 당조작된 변형을 허용하는 조건 하에서 배양하는 단계; 및
- [0331] b) 상기 당조작된 이중특이성 항체를 단리하는 단계로서, 상기 항체는 인간 CEACAM5 및 인간 CD47에 특이적으로 결합할 수 있는 단계
- [0332] 를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0333] 36. 실시양태 29 내지 30 및 33 내지 34 중 어느 한 실시양태에 따른 이중특이성 항체의 제조 방법으로서,
- [0334] a) FUT8 유전자의 타겟팅된 파괴에 의해 당조작된 숙주 세포를 본 발명의 상기 당조작된 이중특이성 항체의 생성을 허용하고 상기 이중특이성 항체의 Fc 영역 상에 존재하는 올리고당의 상기 당조작된 변형을 허용하는 조건 하에서 배양하는 단계, 및
- [0335] b) 상기 당조작된 이중특이성 항체를 단리하는 단계로서, 상기 항체는 인간 CEACAM5 및 인간 CD47에 특이적으로 결합할 수 있는 단계
- [0336] 를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0337] 37. 실시양태 1 내지 34 중 어느 한 실시양태에 따른 이중특이성 항체를 코딩하는 것을 특징으로 하는 단리된 폴리뉴클레오타이드.
- [0338] 38. 실시양태 37에 따른 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터.
- [0339] 39. 실시양태 38에 따른 벡터를 포함하는 숙주 세포.
- [0340] 40. 실시양태 1 내지 34 중 어느 한 실시양태에 따른 이중특이성 항체 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물.
- [0341] 41. 실시양태 1 내지 34 중 어느 한 실시양태에 따른 이중특이성 항체와 종양 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는, 종양 세포의 세포 용해를 유도하는 방법.
- [0342] 42. 실시양태 41에 있어서, 종양 세포는 대장암 세포, NSCLC (비소세포 폐암), 위암 세포, 췌장암 세포, 유방암 세포, 또는 인간 CEACAM5를 발현하는 다른 종양 세포인 것을 특징으로 하는 방법.
- [0343] 43. CEA를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료 방법으로서, 상기 방법은 대상체에게 실시양태 1 내지 34 중 어느 한 실시양태에 따른 이중특이성 항체의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0344] 44. CEA를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 생존 기간을 증가시키는 방법으로서, 상기 방법은 대상체에게 실시양태 1 내지 34 중 어느 한 실시양태에 따른 이중특이성 항체의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0345] 45. 실시양태 43 또는 44에 있어서, 암은 대장암, 비소세포 폐암(NSCLC), 위암, 췌장암 또는 유방암인 방법.
- [0346] 46. 실시양태 43 내지 45 중 어느 한 실시양태에 있어서, 실시양태 1 내지 34 중 어느 한 실시양태에 따른 이중특이성 항체는 화학요법 또는 방사선요법과 함께 인간 대상체에게 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0347] 47. 실시양태 1 내지 34 중 어느 한 실시양태에 있어서, CEA를 발현하는 암을 보유하는 대상체를 치료하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한 이중특이성 항체.
- [0348] 48. 실시양태 47에 따른 사용에 있어서, 암은 대장암, 비소세포 폐암(NSCLC), 위암, 췌장암 및 유방암으로 구성되는 군으로부터 선택되는 이중특이성 항체.

- [0349] 49. 실시양태 1 내지 34 중 어느 한 실시양태에 있어서, CEA를 발현하는 암을 보유하는 대상체를 치료하는 방법에서 사용하기 위한 이중특이성 항체로서, 상기 방법은 대상체에게 상기 이중특이성 항체의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함하고, 상기 이중특이성 항체의 식작용의 EC50 값은 동일한 실험 조건 하에서 및 1 mg/ml의 인간 IgG의 존재 및/또는 부재 하에서 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제1 결합부 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 제2 결합부를 포함하고, 제1 결합부는 서열 번호: 5의 중쇄 및 서열 번호: 65의 경쇄를 포함하고, 제2 결합부는 서열 번호: 5의 중쇄 및 서열 번호: 11의 경쇄를 포함하는 참조 항체 K2AC22의 EC50 값의 0.1 내지 10배의 범위에 있는, 이중특이성 항체.
- [0350] 50. CEA를 발현하는 암을 보유하는 인간 대상체의 치료에서 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제3 결합부 및 인간 CD3 ϵ 에 특이적으로 결합하는 제4 결합부를 포함하는 제2 이중특이성 항체와 동시, 별도, 또는 순차적인 조합에서의 용도를 위한, 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하는 제1 결합부 및 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 제2 결합부를 포함하는 제1 이중특이성 항체.
- [0351] 51. 실시양태 50에 따른 용도에 있어서, 제2 이중특이성 항체의 상기 제4 결합부는 서열 번호: 22의 아미노산 서열을 포함하는 인간 CD3 ϵ 의 에피토프에 결합하는 것을 특징으로 하는 제1 이중특이성 항체.
- [0352] 52. 실시양태 50 또는 51에 따른 용도에 있어서, 상기 제2 항체는 중쇄 및 경쇄로서 서열 번호: 96 내지 99의 쇄를 포함하거나, 또는 중쇄 또는 경쇄로서 서열 번호: 92 내지 95의 아미노산 서열의 쇄를 포함하고, 상기 300 nM 또는 30 nM 농도의 제2 항체는 한 실시양태에서 MKN-45 세포에 대한 상기 제1 이중특이성 항체의 결합 곡선의 EC50을 더 높은 농도를 향해 3배 초과하여 이동시키지 않는 것을 특징으로 하는 제1 이중특이성 항체.
- [0353] 53. CEA를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료에서 중쇄 및 경쇄로서 서열 번호: 96 내지 99의 쇄를 포함하거나 또는 중쇄 및 경쇄로서 서열 번호: 92 내지 95의 아미노산 서열의 쇄를 포함하는 제2 이중특이성 항체와 동시, 별도, 또는 순차적 조합으로 사용하기 위한 실시양태 1 내지 34 중 어느 한 실시양태에 따른 이중특이성 항체.
- [0354] 54. 실시양태 1 내지 34 및 50 내지 53 중 어느 한 실시양태에 있어서, 인간 CEACAM5를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료에서 중쇄 및 경쇄로서 서열 번호: 96 내지 99의 쇄를 포함하거나 또는 중쇄 및 경쇄로서 서열 번호: 92 내지 95의 아미노산 서열을 포함하는 제2 이중특이성 항체와 경쟁하지 않고, 상기 제2 이중특이성 항체와 동시, 별도, 또는 순차적 조합으로 사용하기 위한 이중특이성 항체.
- [0355] 55. 실시양태 1 내지 34 및 50 내지 53 중 어느 한 실시양태에 있어서, 인간 CEACAM5를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료에서 a) 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하고 서열 번호: 20의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 21의 경쇄 가변 영역을 포함하는 제3 결합부 및 인간 CD3 ϵ 의 에피토프에 특이적으로 결합하는 제4 결합부로서, 상기 에피토프는 서열 번호: 22의 아미노산 서열을 포함하는 제4 결합부 또는 b) 중쇄 및 경쇄로서 서열 번호: 96 내지 99의 쇄 또는 중쇄 및 경쇄로서 서열 번호: 92 내지 95의 아미노산 서열의 쇄를 각각 포함하는 제2 이중특이성 항체와 인간 CEACAM5를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료에서 동시, 별도, 또는 순차적인 조합에서의 용도를 위한 것이고, 그에 따라 300 nM(서열 번호: 96 내지 99) 또는 30 nM(서열 번호 92 내지 95) 농도의 상기 제2 이중특이성 항체는 실시양태 1 내지 34 중 어느 한 실시양태에 따른 이중특이성 항체의 MKN-45 세포의 식작용 지수 곡선의 EC50을 더 높은 농도로 3배 초과하여 이동시키지 않는 이중특이성 항체.
- [0356] 56. 실시양태 50 내지 55 중 어느 한 실시양태에 따른 용도에 있어서, 상기 암은 대장암, 비소세포 폐암(NSCLC), 위암, 췌장암 및 유방암인 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.
- [0357] 57. 실시양태 50 내지 56 중 어느 한 실시양태에 따른 용도에 있어서, 실시양태 1 내지 34 중 어느 한 실시양태에 따른 이중특이성 항체 및 제2 이중특이성 항체는 상기 대상체에게 6 내지 15일 간격으로 교대 또는 동시 투여되는 이중특이성 항체.
- [0358] 58. 실시양태 1 내지 34 중 어느 한 실시양태에 따른 이중특이성 항체를 포함하는 조성물로서, 인간 CEACAM5를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료에서의 용도를 위한 것이고, a) 인간 CEACAM5에 특이적으로 결합하고 서열 번호: 20의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 21의 경쇄 가변 영역을 포함하는 제3 결합부 및 인간 CD3 ϵ 의 에피토프에 특이적으로 결합하는 제4 결합부로서, 상기 에피토프는 서열 번호: 22의 아미노산 서열을 포함하는 제4 결합부 또는 b) 중쇄 및 경쇄로서 서열 번호: 96 내지 99의 쇄 또는 중쇄 및 경쇄로서 서열 번호: 92 내지 95의 아미노산 서열의 쇄를 각각 포함하는 제2 이중특이성 항체와 교차반응하지 않는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [0359] 59. 실시양태 1 내지 34 중 어느 한 실시양태에 따른 이중특이성 항체를 포함하는 조성물로서, a) 인간 CEACAM5

에 특이적으로 결합하고 서열 번호: 20의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호: 21의 경쇄 가변 영역을 포함하는 제3 결합부 및 인간 CD3 ϵ 의 에피토프에 특이적으로 결합하는 제4 결합부로서, 상기 에피토프는 서열 번호: 22의 아미노산 서열을 포함하는 제4 결합부 또는 b) 중쇄 및 경쇄로서 서열 번호: 96 내지 99의 쇠 또는 중쇄 및 경쇄로서 서열 번호: 92 내지 95의 아미노산 서열의 쇠를 각각 포함하는 제2 이중특이성 항체와 인간 CEACAM5를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료에서 동시, 별도, 또는 순차적인 조합에서이 용도를 위한 것이고, 300 nM(서열 번호: 96 내지 99) 또는 30 nM(서열 번호 92 내지 95) 농도의 상기 제2 이중특이성 항체는 한 실시양태에서 실시양태 1 내지 34 중 어느 한 실시양태에 따른 이중특이성 항체의 MKN-45 세포의 식작용 지수 곡선의 EC50을 더 높은 농도로 3배 초과하여 이동시키지 않는 조성물.

- [0360] 60. 실시양태 58 또는 59에 있어서, 암은 대장암, 비소세포 폐암(NSCLC), 위암, 췌장암 및 유방암인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [0361] 61. 실시양태 1 내지 34 중 어느 한 실시양태에 있어서, CEA를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 치료 방법에서의 용도를 위한 것이고, 상기 방법은 대상체에게 상기 이중특이성 항체의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 이중특이성 항체.
- [0362] 62. 실시양태 1 내지 34 중 어느 한 실시양태에 있어서, CEA를 발현하는 암을 보유하는 대상체의 생존 기간을 증가시키는 방법에서의 용도를 위한 것이고, 상기 방법은 대상체에게 상기 이중특이성 항체의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 이중특이성 항체.
- [0363] 63. 실시양태 61 또는 62 중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 이중특이성 항체는 인간 대상체에게 화학요법 또는 방사선요법과 함께 투여되는 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.
- [0364] 64. 실시양태 60 또는 62 중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 암은 대장암, 비소세포 폐암(NSCLC), 위암, 췌장암 또는 유방암인 것을 특징으로 하는 이중특이성 항체.

표 1

서열 목록

서열 번호	대상
서열 번호: 1	Mab CD47 CDRH1 (IMGT)
서열 번호: 2	Mab CD47 CDRH2 (IMGT)
서열 번호: 3	Mab CD47 CDRH3 (IMGT)
서열 번호: 4	Mab CD47 VH
서열 번호: 5	Mab CD47 중쇄
서열 번호: 6	Mab CD47 중쇄 (핵산)
서열 번호: 7	Mab CD47 CDRL1 (IMGT)
서열 번호: 8	Mab CD47 CDRL2 (단지 Ala Ala Ser; IMGT))
서열 번호: 9	Mab CD47 CDRL3 (IMGT)
서열 번호: 10	Mab CD47 VL
서열 번호: 11	Mab CD47 경쇄; KA3 (K2)
서열 번호: 12	Mab CD47 경쇄 (핵산); KA3 (K2)
서열 번호: 13	제 1 결합부 CL
서열 번호: 14	프라이머 실시예 12
서열 번호: 15	프라이머 실시예 12
서열 번호: 16	프라이머 실시예 12
서열 번호: 17	프라이머 실시예 12
서열 번호: 18	프라이머 실시예 12
서열 번호: 19	프라이머 실시예 12
서열 번호: 20	MAB CEA 가변 중쇄
서열 번호: 21	MAB CEA 가변 경쇄
서열 번호: 22	CD3 엡실론의 에피토프
서열 번호: 23	Mab CD47 중쇄, DE 치환
서열 번호: 24	Mab CD47 중쇄, DEA 치환
서열 번호: 25	Mab CD47 CDRH1 (카바트)

[0365]

서열 번호: 26	Mab CD47 CDRH2 (카바트)
서열 번호: 27	Mab CD47 CDRH3 (카바트)
서열 번호: 28	Mab CD47 CDRL1 (카바트); KA3
서열 번호: 29	Mab CD47 CDRL2 (카바트); KA3
서열 번호: 30	Mab CD47 CDRL3 (카바트); KA3
서열 번호: 31	Mab CECDRL1; 1D9 (AC5)
서열 번호: 32	Mab CECDRL2; 1D9 (AC5)
서열 번호: 33	Mab CECDRL3; 1D9 (AC5)
서열 번호: 34	Mab CECDRL1; 1G6 (AC22)
서열 번호: 35	Mab CECDRL2; 1G6 (AC22)
서열 번호: 36	Mab CECDRL3; 1G6 (AC22)
서열 번호: 37	Mab CECDRL1; 1D5 (AC10)
서열 번호: 38	Mab CECDRL2; 1D5 (AC10)
서열 번호: 39	Mab CECDRL3; 1D5 (AC10)
서열 번호: 40	Mab CECDRL1; 2B8 (AC13)
서열 번호: 41	Mab CECDRL2; 2B8 (AC13)
서열 번호: 42	Mab CECDRL3; 2B8 (AC13)
서열 번호: 43	Mab CECDRL1; 1A2 (AC18)
서열 번호: 44	Mab CECDRL2; 1A2 (AC18)
서열 번호: 45	Mab CECDRL3; 1A2 (AC18)
서열 번호: 46	Mab CECDRL1; 1A8 (AC23)
서열 번호: 47	Mab CECDRL2; 1A8 (AC23)
서열 번호: 48	Mab CECDRL3; 1A8 (AC23)
서열 번호: 49	Mab CECDRL1; 2F4 (AC25)
서열 번호: 50	Mab CECDRL2; 2F4 (AC25)
서열 번호: 51	Mab CECDRL3; 2F4 (AC25)
서열 번호: 52	Mab CECDRL1; 2F7 (AC26)
서열 번호: 53	Mab CECDRL2; 2F7 (AC26)
서열 번호: 54	Mab CECDRL3; 2F7 (AC26)
서열 번호: 55	Mab CECDRL1; 2C11 (AC27)
서열 번호: 56	Mab CECDRL2; 2C11 (AC27)

[0366]

서열 번호: 57	Mab CECDRL3; 2C11 (AC27)
서열 번호: 58	Mab CECDRL1; C11 (AC28)
서열 번호: 59	Mab CECDRL2; C11 (AC28)
서열 번호: 60	Mab CECDRL3; C11 (AC28)
서열 번호: 61	Mab CECDRL1; 2B5 (AC29)
서열 번호: 62	Mab CECDRL2; 2B5 (AC29)
서열 번호: 63	Mab CECDRL3; 2B5 (AC29)
서열 번호: 64	Mab CEA 1D9 VLCL2 CEA (AC5)
서열 번호: 65	Mab CEA 1G6 VLCL2 CEA (AC22)
서열 번호: 66	Mab CEA 1D5 VLCL2 CEA (AC10)
서열 번호: 67	Mab CEA 2B8 VLCL2 CEA (AC13)
서열 번호: 68	Mab CEA 1A2 VLCL2 CEA (AC18)
서열 번호: 69	Mab CEA 1A8 VLCL2 CEA (AC23)
서열 번호: 70	Mab CEA 2F4 VLCL2 CEA (AC25)
서열 번호: 71	Mab CEA 2F7 VLCL2 CEA (AC26)
서열 번호: 72	Mab CEA 2C11 VLCL2 CEA (AC27)
서열 번호: 73	Mab CEA C11 VLCL2 CEA (AC28)
서열 번호: 74	Mab CEA 2B5 VLCL2 CEA (AC29)
서열 번호: 75	핵산 1D9 VLCL2 CEA (AC5)
서열 번호: 76	핵산 1G6 VLCL2 CEA (AC22)
서열 번호: 77	핵산 1D5 VLCL2 CEA (AC10)
서열 번호: 78	핵산 2B8 VLCL2 CEA (AC13)
서열 번호: 79	핵산 1A2 VLCL2 CEA (AC18)
서열 번호: 80	핵산 1A8 VLCL2 CEA (AC23)
서열 번호: 81	핵산 2F4 VLCL2 CEA (AC25)
서열 번호: 82	핵산 2F7 VLCL2 CEA (AC26)
서열 번호: 83	핵산 2C11 VLCL2 CEA (AC27)
서열 번호: 84	핵산 C11 VLCL2 CEA (AC28)
서열 번호: 85	핵산 2B5 VLCL2 CEA (AC29)
서열 번호: 86	인간 CEA (CEACAM5); 전장 DNA
서열 번호: 87	인간 CEA (CEACAM5); 전장 단백질

[0367]

서열 번호: 88	MAB CEA1 VH (서열 번호: 31) 및 부분의 CEA VH-CH1(EE)-Fc (홀, P329G LALA) [서열 번호: 36] aa TCB WO2017055389) 및 서열 번호: 37
서열 번호: 89	MAB CEA1 VL (서열 번호: 32) 및 부분의 Hum. CEA VL-CL(RK) [서열 번호: 38] aa TCB WO201705538
서열 번호: 90	MAB CD3 VH (서열 번호: 33) 및 부분의 CD3 VH-CL(CK) aa TCB WO2017055389 [서열 번호: 34])
서열 번호: 91	MAB CD3 VL, (서열 번호: 34) 및 부분의 CEA VH-CH1(EE)-CD3 VL-CH1-Fc (노브, P329G LALA) [서열 번호: 37] aa TCB WO2017055389)
서열 번호: 92	CD3 VH-CL(CK)
서열 번호: 93	CEA VH-CH1(EE)-Fc (홀, P329G LALA)
서열 번호: 94	CEAVH-CH1(EE)-CD VL-CH1-Fc (노브, P329G) LALA)
서열 번호: 95	CEA VL-CL(RK)
서열 번호: 96	CD3 CH2527 크로스 Fab VL-CH1
서열 번호: 97	CH1A10 VH CH1 FC 홀 P329G LALA
서열 번호: 98	CH1A1A CD3 CH2527 크로스 Fab VH-CK FC 노브 P329G LALA
서열 번호: 99	LC CEA
서열 번호: 100	VK_SM3E
서열 번호: 101	VH_SM3E
서열 번호: 102	VL_MEDI
서열 번호: 103	VH_MEDI
서열 번호: 104	VK_SAR
서열 번호: 105	VH_SAR
서열 번호: 106	VK_CH1A1A
서열 번호: 107	VH_CH1A1A

[0368]

서열 번호: 108	VK_T84.66
서열 번호: 109	VH_T84.66
서열 번호: 110	VK_LABETUZUMAB
서열 번호: 111	VH_LABETUZUMAB
서열 번호: 112	Mab CEA 1B2 (AC39) CDRL1
서열 번호: 113	Mab CEA 1B2 (AC39) CDRL2
서열 번호: 114	Mab CEA 1B2 (AC39) CDRL3
서열 번호: 115	Mab CEA 1B2 (AC39) VLCL2
서열 번호: 116	Mab CEA 1B2 (AC39) VLCL2, 핵산

[0369]

[0370]

서열 번호: 92 내지 95는 CEA-TCB1를 의미하고, 서열 번호: 96 내지 99는 CEA-TCB를 의미한다.

[0371]

Ala: 알라닌; Ser: 세린

- [0372] 실시예
- [0373] **실시예 1: 인간 CD47의 클로닝, 발현 및 정제**
- [0374] 클로닝
- [0375] 인간 CD47(hCD47)의 세포외 도메인에 상응하는 서열은 특이적인 올리고뉴클레오타이드를 이용하는 폴리머라아제 연쇄 반응(PCR)에 의해 인간 cDNA로부터 증폭된다. 증폭 생성물은 젤 정제되고, pEAK8 포유동물 발현 벡터(Edge Biosystems, Gaithersburg, Md.) 내로 클로닝된다. 벡터는 각각 단백질의 단일 부위 비오틴화 및 IMAC(고정화된 금속 이온 친화성 크로마토그래피)에 의한 정제가 가능하도록 C 말단에 Avitag™(Avidity, Denver Colo.) 및 헥사 히스티딘 태그를 도입하기 위해 추가로 변형된다. 컨스트럭트는 DNA 서열결정에 의해 확인된다.
- [0376] 발현
- [0377] 그 후, 플라스미드는 리포솜 기반 형질감염 시약, 예를 들어 리포펙타민2000(Thermofisher Scientific)을 이용하여 포유동물 세포 내로 형질감염된다. 형질감염 단계는 단지 소량의 DNA 및 세포, 전형적으로 웰당 2×10^5 세포 및 2 µg의 플라스미드 DNA만이 필요하고, 형질감염은 6웰 플레이트에서 수행된다. 상이한 포유동물 세포주가 사용될 수 있지만, 후술하는 실시예에서 형질전환된 인간 배 신장 단층 상피 세포(PEAK 세포)가 형질감염된다. 이들 세포는 에피솜 복제 과정을 추가로 지원하는 EBNA-1 유전자를 안정적으로 발현하고, 반부착성이고, 표준 세포 배양 조건(5% CO₂; 10% 태아 송아지 혈청으로 보충된 DMEM 배지 중에서 37°C) 하에서 성장될 수 있다. 24 h 후, 세포는 0.5-2 µg/mL의 퓨로마이신을 함유하는 배지를 첨가함으로써 선별 배지 하에 위치된다: 에피솜 벡터를 보유하는 세포는 이 항생제에 저항성이다.
- [0378] 형질감염하고 2 내지 3주 후, 증폭 및 선별된 세포는 정제 단계를 위해 일회용 CELLline™ 생물반응기 내에 주입되었다. CELLline™은 표준 세포 배양 인큐베이터 내에서 사용될 수 있는 2 구획 생물반응기이다. 더 작은 구획(15 ml)은 세포를 함유하고, 컷오프 크기가 10 kDa인 반투과성 막에 의해 더 큰(1 리터) 배지 함유 구획과 분리된다(Bruce et al. 2002, McDonald et al. 2005). 이러한 시스템은 더 작은 구획 내에 세포 및 분리된 단백질을 유지하면서 영양소, 게이즈(gaze) 및 대사 폐기물의 확산을 가능하게 한다. 배양은 상등액의 수확 이전에 7-10일 동안 유지된다. 배지는 혈청을 함유하기 때문에, 세포는 양호한 생존율을 유지하며, 수회의 생산적 운전은 동일한 세포 및 용기를 이용하여 수행될 수 있다.
- [0379] 정제
- [0380] 수확 후, 세포 배양 상등액은 원심분리에 의해 투명화된다. 그 후, 상등액은 100 mM 이미다졸로 보충되고, Ni-NTA 친화성 크로마토그래피 수지(Qiagen)에 로딩된다. 상대적으로 높은 농도의 이미다졸은 수지에 대한 오염물질의 결합을 최소화한다. 컬럼의 세척 후, 단백질은 AKTA 프라임 크로마토그래피 시스템(Amersham Pharmacia Biotech) 상에서 30 mL 이미다졸 구배(20-400 mM 이미다졸)를 이용하여 2 mL/분의 유속으로 용출된다. 추가로 용출 구배는 재조합 단백질의 순도를 개선시키지만, 크로마토그래피 시스템을 이용할 수 없는 경우 단계 용출법으로 대체될 수 있다. 용출된 분획은 재조합 단백질 내에서 그들의 함량을 결정하기 위해 SDS-PAGE 또는 ELISA에 의해 분석될 수 있다. 관심 분획은 모으고, 인산염 완충 염수 또는 다른 적합한 버퍼로 평형화된 Amicon 10 KD 컬럼(Millipore) 상에서 탈염된다. 그 후, 탈염된 단백질은 다양한 기법을 이용하여 정량될 수 있고, 그들의 순도는 SDS-PAGE에 의해 분석될 수 있다. 재조합 CD47은 제조사의 지침에 따라 비오틴 리가아제(Avidity, Denver Colo.)를 이용하여 시험관 내에서 비오틴화된다. 탈염 후, 비오틴화 레벨은 스트렙타비딘 자기 비드 및 SDS-PAGE 분석을 이용하는 풀다운 어세이에 의해 평가된다.
- [0381] **실시예 2: 인간 CEACAM 패밀리 멤버의 클로닝, 발현 및 정제**
- [0382] 클로닝
- [0383] CEACAM5의 완전한 세포외 도메인(ECD) 및 A3-B3 도메인에 상응하는 서열은 Eurofins and Twist Bioscience에 의해 합성되었다. 이들 합성 유전자는 pEAK8 포유동물 발현 벡터(Edge Biosystems, Gaithersburg, Md.) 내로 서브클로닝되었다. 벡터는 C 말단에 Avitag™(Avidity, Denver Colo.) 및 헥사 히스티딘 태그, 인간 FC 영역 또는 마우스 FC 영역을 도입하기 위해 변형되었다. 컨스트럭트는 DNA 서열결정에 의해 확인되었다. 재조합 가용성 단백질의 정제는 IMAC(고정화된 금속 이온 친화성 크로마토그래피), FcXL 또는 CaptureSelect™ IgG-Fc(ms) 친

화성 매트릭스(Thermofisher Scientific)에 의해 수행되었다.

- [0384] 또한, 인간 CEACAM 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 18, 19, 20, 21 및 시노물구스 CEACAM5의 전장 버전을 코딩하는 벡터는 PEAK 및/또는 CHO 세포의 세포 표면에서 발현을 위해 생성되었다. 또한, 가용성의 전장 인간 CEACAM16도 유사하게 클로닝되었다.
- [0385] 발현 및 정제
- [0386] 상기 재조합 단백질의 발현, 정제 및 비오틴화는 실시예 1에 상세히 기술된 바와 같이 수행되었다.
- [0387] **실시예 3: 고정된 가변 중쇄 도메인을 함유하는 인간 scFv 라이브러리를 이용하는 CEACAM5 Fvs의 파지 디스플레이 선별**
- [0388] M13 박테리오파지 상에 디스플레이된 인간 scFv 라이브러리의 구축 및 취급을 위한 일반 절차는 그 전체 내용이 본 출원에 참고로 인용된 Vaughan et al., (Nat. Biotech. 1996, 14:309-314)에 기재되어 있다. 선별 및 스크리닝을 위한 라이브러리는 모두가 동일한 VH 도메인을 공유하고 단지 VL 도메인에서 다변화된 scFv를 코딩한다. 고정된 VH 라이브러리의 생성을 위한 방법 및 이중특이성 항체의 확인 및 어셈블리를 위한 그들의 용도는 각각 그 전체 내용이 본 출원에 참고로 인용된 US 2012/0184716 및 WO 2012/023053에 기재되어 있다. 인간 CEACAM5에 대한 scFv 결합을 확인하기 위한 절차는 후술된다.
- [0389] 단백질 선별
- [0390] scFv 파지 라이브러리의 액적(10^{12} Pfu)은 회전 믹서 상의 실온에서 1 시간 동안 3%(w/v) 탈지유를 함유하는 PBS로 블로킹된다. 블로킹된 파지는 회전 믹서 상의 실온에서 1 시간 동안 스트렙타비딘 자기 비드(Dynabeads™ M-280) 상에서 해제(deselected)된다. 해제된 파지는 로터리 믹서 상의 실온에서 2 시간 동안 스트렙타비딘 자기 비드 상에 포획된 100 nM의 A3-B3 도메인 또는 비오틴화된 인간 CEACAM5와 함께 인큐베이션된다. 비드는 자기 스탠드를 이용하여 포획되고, 그 후 PBS/0.1% Tween 20으로 5회 세척되고, PBS로 2회 세척된다. 파지는 로터리 믹서 상의 실온에서 30분 동안 100 nM TEA로 용출된다. 용출된 파지 및 비드는 Tris-HCl 1 M pH 7.4로 중화되고, 10 ml의 지수적으로 성장하는 TG1 세포에 직접 첨가되고, 천천히 진탕하면서(90 rpm) 37°C에서 1 시간 동안 인큐베이션된다. 감염된 TG1의 액적은 선별 산물을 적정하기 위해 계열 희석된다. 남아있는 감염된 TG1은 3800 rpm으로 10분 동안 스펀되고, 2 ml의 2xTY 내에 재현탁되고, 10 ml의 2xTYAG(100 µg/ml 앰피실린 및 2% 글루코오스를 함유하는 2xTY 배지) 아가 바이오어세이 플레이트 상에 스프레딩된다. 30°C에서 하룻밤 인큐베이션 후, 10 ml의 2xTY가 플레이트에 첨가되고, 세포는 표면으로부터 스크래핑되고, 50 ml의 폴리프로필렌 튜브에 이전된다. 50% 글리세롤 용액은 17% 글리세롤의 최종 농도를 얻기 위해 세포 현탁액에 첨가된다. 선별 라운드의 액적은 -80°C에서 보관된다.
- [0391] 파지 리스큐
- [0392] 이전의 선별 라운드에서 얻은 50 µl의 세포 현탁액은 50 ml의 2xTYAG에 첨가되고, 0.3 내지 0.5의 OD₆₀₀에 도달할 때까지 교반하면서(240 rpm) 37°C에서 성장된다. 그 후, 배양액은 1.2×10^{11} 의 M13K07 헬퍼 파지로 초감염되고, 37°C(90 rpm)에서 1 시간 동안 인큐베이션된다. 배지는 3800 rpm에서 10분 동안 세포를 원심분리하고, 배지를 제거하고, 50 ml의 2xTYAG(100 µg/ml 앰피실린; 50 µg/ml 카나마이신을 함유하는 2xTY 배지) 중에 펠렛을 재현탁함으로써 교환된다. 그 후, 배양액은 30°C(240 rpm)에서 하룻밤 성장된다. 다음 날, 상등액을 함유하는 파지는 다음 라운드의 선별을 위해 사용된다.
- [0393] 세포 표면 선별
- [0394] 상등액을 함유하는 파지는 회전 믹서 상의 실온에서 1 시간 동안 3%(w/v) 탈지유를 함유하는 PBS를 이용하여 블로킹된다. 그 후, 블로킹된 파지는 인간 CEACAM5를 발현하지 않는 MKN45 CEACAM5^{KO} 상에서 1 시간 동안 해제된다. 해제된 파지는 부드럽게 진탕하면서 실온에서 2 시간 동안 CEACAM5를 발현하는 2×10^7 의 MKN45 세포와 함께 인큐베이션된다. 세포는 펠렛화되고, PBS로 6회 세척된다. 결합된 파지는 76 mM 시트르산으로 용출되고, 10분 동안 진탕된다. Tris-HCl 1 M pH 8을 이용하는 중화 후, 세포는 10 ml의 지수적으로 성장하는 TG1에 직접 첨가되고, 서서히 진탕하면서 37°C에서 1 시간 동안 인큐베이션된다. 감염된 TG1의 액적은 선별 산물을 적정하기 위해 계열 희석된다. 감염된 TG1은 3800 rpm으로 10분 동안 스펀되고, 2 ml의 2xTY 내에 재현탁되고, 2xTYAG 아가 바이오어세이 플레이트 상에 스프레딩된다. 30°C에서 하룻밤 인큐베이션 후, 10 ml의 2xTY가 플레이트에

첨가되고, 세포는 표면으로부터 스크래핑되고, 50 ml의 폴리프로필렌 튜브에 이전된다. 50% 글리세롤 용액은 17% 글리세롤의 최종 농도를 얻기 위해 세포 현탁액에 첨가된다. 선별 라운드의 액적은 -80°C에서 보관된다.

[0395] **실시예 4: 가용성 CEACAM5, CEACAM6, 및 CEACAM1에 대한 scFv 결합/비결합에 대한 스크리닝**

[0396] 결합 및 기능 테스트를 위한 scFv 주변세포질 제조

[0397] 개별 클론은 웰당 0.9 ml의 2xTYAG 배지(100 µg/ml 암피실린, 0.1% 글루코오스를 함유하는 2xTY 배지)를 함유하는 딥웰 미량역가 플레이트 내에 접종되고, 37°C에서 5-6 시간(240 rpm) 동안 성장된다. 그 후, 웰당 100 µl의 2xTY 배지 중의 0.2 mM IPTG는 0.02 mM IPTG의 최종 농도가 되도록 첨가된다. 플레이트는 240 rpm으로 진탕하면서 30°C에서 하룻밤 인큐베이션된다. 딥웰 플레이트는 4°C에서 3200 rpm으로 10분 동안 원심분리되고, 상등액은 조심스럽게 제거된다. 펠렛은 150 µl의 TES 버퍼(50 mM Tris-HCl(pH 8), 1 mM EDTA(pH 8), 20% 수크로오스, 완전 프로테아제 억제제로 보충됨, Roche) 중에 재현탁된다. 저장성 쇼크는, 150 µl의 희석된 TES 버퍼(1:5 TES:물 희석)를 첨가하고 얼음 위에서 30분 동안 인큐베이션함으로써 생성된다. 플레이트는 세포 및 데브리스를 펠렛화하기 위해 4°C에서 4000 rpm으로 10분 동안 원심분리된다. 상등액은 조심스럽게 다른 미량역가 플레이트로 이전되고, 기능 어세이 또는 결합 어세이에서 즉시 테스트하기 위해 얼음 위에 보관된다.

[0398] 결합

[0399] CEACAM5에 대한 결합에 대한 scFv의 스크리닝은 CellInsight™ 기술을 이용하는 균일 어세이에서 테스트된다. 하기 시약들은 384 투명 바닥 웰 플레이트(Corning)의 각각의 웰 내에서 혼합된다: 대조군 단백질을 위해 비오틴화된 CEACAM5, 비오틴화된 도메인 A3-B3 또는 비오틴화된 NusA로 코팅된 30 µl의 스트랩타비딘 폴리스티렌 비드 현탁액(Polysciences; 3000 비드/웰); 60 µl의 블로킹된 scFv 주변세포질 제제; 10 µl의 검출 버퍼(5 µg/ml의 마우스 항c-myc 항체를 함유하는 PBS; 1:200으로 희석된 항마우스 Fc AlexaFluor® 647). 600 rpm으로 5분 동안 혼합 후, 384 웰 플레이트는 실온에서 인큐베이션되고, 2 시간 후에 CellInsight™ CX5 고 함량 스크리닝 플랫폼(ThermoFisher Scientific)에서 판독된다. CEACAM5에 대해서는 특정 신호를 나타내나 NusA에 대해서는 나타내지 않는 scFv를 발현하는 클론은 추가의 분석 또는 서열결정을 위해 선별된다.

[0400] CEACAM1, CEACAM6 및 다른 CEACAM에 대한 결합은 동일한 방식으로 측정될 수 있다.

[0401] 과지 클론 서열결정

[0402] 단일 클론은 웰당 1 ml의 LBAG 배지(100 µg/ml 암피실린 및 2% 글루코오스를 함유하는 LB 배지)를 함유하는 96 딥웰 미량역가 플레이트 내로 접종되고 37°C, 240 rpm에서 하룻밤 성장된다. DNA는 Zyppy-96 플라미스 미니프랩 키트(Zymo Research)를 이용하여 추출되고, 서열결정된다.

[0403] **실시예 5: IgG 내로의 고정된 VH 후보자 리포매팅 및 포유동물 세포에서의 일시적인 발현**

[0404] 스크리닝 및 서열결정 후, 원하는 결합 특성을 보유하는 scFv 후보는 IgG 내로 리포매팅되고, PEAK 세포 내로 일시적인 형질감염에 의해 발현된다. 선별된 scFv의 VH 및 VL 서열은 특이적인 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 증폭되고, 중쇄 및 경쇄 불변 영역을 함유하는 발현 벡터 내로 클로닝되고, 구축물은 서열결정에 의해 확인된다. 발현 벡터는 제조사의 지침에 따라 리포팩타민 2000(Thermofisher Scientific)을 이용하여 포유동물 세포 내로 형질감염된다. 개략적으로, 3.5×10^6 의 PEAK 세포는 T75 플라스크 내의 태아 소 혈청을 함유하는 25 ml의 배양 배지 중에서 배양된다. 형질감염된 세포는 37°C에서 5-6일 동안 배양되고, IgG 생성은 OctetRED96 기기에 의해 정량된다. 상등액은 제조사의 지침에 따라 FcXL 친화성 수지(Thermofisher Scientific) 상에서 IgG 정제를 위해 수확된다. 개략적으로, 형질감염된 세포 유래의 상등액은 적절한 양의 FcXL 수지와 함께 4°C에서 하룻밤 인큐베이션된다. PBS에 의한 수지 세척 후, 샘플은 Amicon Pro 컬럼 상에 로딩되고, 결과적으로 IgG는 50 mM 글라이신 pH 3.5 중에 용출된다. 그 후, 용출된 IgG 분획은 히스티딘 NaCl pH 6.0 버퍼에 대해 Amicon 50 kDa에 의해 투석되고, IgG 함량은 280 nm에서 흡수에 의해 정량된다. 순도 및 IgG 완전성은 Agilent Bioanalyzer 제조사(Agilent Technologies, Santa Clara, Calif., USA)에 의해 확인된다.

[0405] **실시예 6: CEACAM5 항체의 특성규명**

[0406] a) CEACAM 패밀리의 상이한 멤버를 이용하여 형질감염된 세포에 대한 CEACAM5 항체의 결합

[0407] 본 발명자들의 지식에 따라, CEACAM5 모노클로날 항체(mAb)의 특이성은 상이한 수의 CEACAM 패밀리를 이용하여 형질감염된 PEAK 및/또는 CHO 세포를 이용하는 유세포분석에 의해 확인될 수 있다. 인간 CEACAM 1, 3, 4, 5, 6,

7, 8, 18, 19, 20 및 21 및 20의 전장 버전을 코딩하는 벡터는 실시예 2에 기재된 바와 같이 PEAK 및/또는 CHO 세포의 표면에서 이들 단백질을 발현하기 위해 사용된다. 비형질감염된 PEAK 및/또는 CHO 세포는 음성 대조군으로서 사용된다. 세포는 수확되고, 카운트되고, 생존률에 대해 검사되고, FACS 버퍼(PBS 2% BSA, 0.1% Na₂S₂O₈) 중에 3x10⁶ 세포/ml로 재현탁된다. 100 μl의 세포 현탁액은 V 바닥 96웰 플레이트(3x10⁵ 세포/웰)에 분배된다. 상등액은 4°C에서 1300 rpm으로 3분 동안 원심분리에 의해 제거되고, 세포는 본 발명에 따른 항체의 농도를 증가시키면서 4°C에서 15분 동안 인큐베이션된다. 항체는 FACS 버퍼 중에 희석되고, 농도 범위는 30 pM-500 nM이다. 세포는 냉 FACS 버퍼로 2회 세척되고, PE(R-피코에리트린) 컨주게이션된 마우스 항인간 IgG Fc 2차 항체(SouthernBiotech, FACS 버퍼 중에 1:100으로 예비 희석됨)와 함께 4°C에서 추가로 15분 동안 재인큐베이션된다. 세포는 냉 FACS 버퍼로 2회 세척되고, 1:1500으로 희석된 TOPRO-3(Invitrogen)과 함께 300 μl의 FACS 버퍼 중에 재현탁된다. 형광은 FACSCalibur™(BD Biosciences)을 이용하여 측정된다. 용량 반응 결합 곡선은 GraphPad Prism7 소프트웨어를 이용하여 피팅된다. 동일한 방식으로, CEACAM1, CEACAM6 및 다른 CEACAM은 특성규명될 수 있다. 개략적으로, 정제된 Mab는 10 μg/ml의 최종 농도에서 30분 동안 CEACAM 패밀리 단백질을 중 하나를 발현하는 세포와 함께 인큐베이션된다. 2회 세척 후, 결합된 항체는 Cy-5 컨주게이션된 항인간 Fc 2차 항체(BD biosciences)를 이용하여 검출된다.

[0408] PE 컨주게이션된 항인간 IgG Fc 2차 항체에 의해 검출되는 결합된 항체가 없는 경우, 본 발명에 따른 항체는 상기 CEACAM에 대해 비결합으로서 확인된다.

[0409] b) CEACAM5 항체의 시노물구스 CEACAM5와의 교차 반응성

[0410] 본 발명자들이 지식에 따라, 시노물구스 원숭이 CEACAM5와 교차반응할 수 있는 본 발명의 CEACAM5 모노클로날 항체의 능력은 전장 시노물구스 CEACAM5를 발현하는 벡터로 형질감염된 PEAK CHO 세포를 이용하는 유세포분석에 의해 테스트될 수 있다. 유세포분석은 상기 항체가 cynoCEACAM5를 발현하는 PEAK CHO 세포에 결합하는지 여부 또는 상기 항체가 상기 CEACAM에 각각 비결합하는 PEAK CHO 세포에 결합하지 않는지 여부의 검출을 가능하게 한다.

[0411] **실시예 7: 람다 및 카파 경쇄를 보유하는 이중특이성 항체의 발현 및 정제**

[0412] 동일한 세포 내에서 1개의 중쇄 및 2개의 경쇄의 동시 발현은 3개의 상이한 항체의 어셈블리를 유도할 수 있다. 동시 발현은 상이한 방법, 예를 들어 동시발현되는 쇠 중 하나를 발현하는 다수의 벡터의 형질감염 또는 다중 유전자 발현을 구동하는 벡터를 이용함으로써 달성될 수 있다. 상이한 항CEACAM5 항체를 코딩하는 벡터는 항 CD47 항체 Ka3의 중쇄 및 경쇄(서열 번호: 5 및 11), 동일한 공통 중쇄를 보유하고 US 2014/0303354에 기재되어 있는 항CD47 항체를 발현하는 다른 벡터와 함께 동시형질감염된다. 대안적으로, 2개의 경쇄는 각각 그 전체 내용이 본 출원에 참고로 인용된 US 2012/0184716 및 WO 2012/023053에 기재된 바와 같은 하나의 중쇄, 하나의 카파 경쇄 및 하나의 람다 경쇄의 동시 발현을 가능하게 하도록 이전에 생성된 벡터 pNovi κHL 내로 클로닝된다. 3개의 유전자의 발현은 인간 사이토메갈로바이러스 프로모터(hCMV)에 의해 구동되고, 또한 상기 벡터는 안정적인 세포주의 선별 및 확립을 가능하게 하는 글루타민 신테타아제 유전자(GS)를 함유한다. 항 CEACAM5 IgG 및 항CD47 IgG의 공통 VH 및 VL 유전자는 포유동물 세포에서 일시적인 발현을 위해 벡터 pNovi κHL 내에 클로닝된다. Peak 세포는 적절한 세포 수 및 배양 배지 부피(태아 소 혈청 포함)를 이용하여 적합한 플라스크 내에서 배양된다. 플라스미드 DNA는 제조사의 지침에 따라 리포펙타민 2000을 이용하여 세포 내로 형질감염된다. 형질감염된 세포의 상등액 내의 항체 농도는 OctetRED96을 이용하여 생성 중에 측정된다. 항체 농도에 따라, 상등액은 형질감염하고 5 내지 7일 후에 수확되고, 1300 g에서 10분 동안 원심분리에 의해 투명화된다. 정제 과정은 3개의 친화성 단계로 구성된다. 첫째, FcXL 친화성 매트릭스(ThermoFisher Scientific)는 PBS로 세척되고, 그 후 투명화된 상등액 내에 첨가된다. +4°C에서 하룻밤 인큐베이션 후, 상등액은 2000 g에서 10분 동안 원심분리되고, 통과액은 저장되고, 수지는 PBS로 2회 세척된다. 그 후, 수지는 Amicon Pro 컬럼에 이전되고, pH 3에서 50 mM 글라이신을 함유하는 용액은 용출을 위해 사용된다. 몇몇 용출 분획이 생성되고, 수집되고, 50 kDa Amicon™ 초원심분리 필터 유닛(Merck KGaA, Darmstadt, Germany)을 이용하여 PBS에 대해 탈염된다. 상등액 유래의 총 인간 IgG를 함유하는 용출된 생성물은 나노드롭 분광계(NanoDrop Technologies, Wilmington, Del.)를 이용하여 정량되고, RT 및 20 rpm에서 15분 동안 적합한 부피의 카파 셀렉트 친화성 매트릭스(GE Healthcare)와 함께 인큐베이션된다. 인큐베이션, 수지 회수, 용출 및 탈염 단계는 이전에 기술된 바와 같이 수행된다. 최종 친화성 정제 단계는 2개의 이전 정제를 위한 것과 동일한 과정을 적용하는 람다 Fab 셀렉트 친화성 매트릭스(GE Healthcare)를 이용하여 수행된다. 최종 생성물은 나노드롭을 이용하여 정량된다. 정제

된 이중특이성 항체는 변성 및 환원 조건에서 전기영동에 의해 분석된다. Agilent 2100 Bioanalyzer는 제조사 (Agilent Technologies, Santa Clara, Calif., USA)에 의해 기재된 바와 같이 단백질 80 키트와 함께 사용된다. 4 μ L의 정제된 샘플은 디티오프레이톨(DTT; Sigma Aldrich, St. Louis, Mo.)로 보충된 샘플 버퍼와 혼합된다. 샘플은 95°C에서 5분 동안 가열되고, 그 후 칩 상에 로딩된다. 모든 샘플은 리몰루스 아메보사이트 라이세이트 테스트(LAL; Charles River Laboratories, Wilmington, Mass.)를 이용하여 내독소 오염에 대해 테스트된다.

[0413] 실시예 8: 일가 및 이중특이성 항체의 특성규명

[0414] a) 이중 타겟팅 이중특이성 항체는 동일한 세포의 표면 상에서 2개의 상이한 항원에 결합한다.

[0415] 본 발명자들의 지식에 따라, 세포의 표면 상에서 2개의 항원에 대한 2개의 항체 암(arm)의 동시 결합은 어비디티 메커니즘(avidity mechanism)에 기인하는 친화성의 상가적인 또는 상승적인 증가를 초래할 수 있다. 결과적으로, 동시 연관(co-engagement)은 단지 하나의 단일 항원을 발현하는 세포와 비교하여 항원 둘 다를 발현하는 세포에 대한 높은 선택성을 부여한다. 추가적으로, 그들의 각각의 타겟에 대한 이중특이성 항체의 2개의 암의 친화성은 타겟 세포에 대한 결합이 항체 암 중 하나에 의해 주로 구동되는 방식으로 설정될 수 있다. 예를 들어, CEACAM5에 대해 또는 CEACAM5 및 CEACAM6에 대해 높은 친화성으로 결합하는 하나의 암, 및 CD47에 대해 더 낮은 친화성으로 결합하지만 CD47과의 CEACAM5 또는 CEACAM5 및 CEACAM6 동시 연관에 대한 CD47/SIRP α 를 억제하기에 충분한 제2 암으로 구성된 이중 타겟팅 $\kappa\lambda$ 항체는 암 대 정상 세포에서 CD47의 우선적인 억제를 가능하게 하여야 한다.

[0416] b) 인간 CD47에 대한 친화성 측정

[0417] 본 발명자들의 지식에 따라, 인간 CD47에 대한 본 발명에 따른 항체의 결합 친화성은 Biacore T200 기기를 이용하는 표면 플라즈몬 공명 기술에 의해 평가될 수 있다. 비오티닐화된 인간 CD47 가용성 제조합 단백질은 스트랩 타비딘 코팅된 센서 칩(Series S Sensor Chip SA) 상에서 포획될 수 있다. 그 후, 테스트 항체의 농도 시리즈는 표면 상에 주입될 수 있는데, 이때 각각의 주입 사이에 표면의 재생이 이루어진다.

[0418] 이러한 측정은 CD19xCD47 $\kappa\lambda$ 이중특이성 항체를 이용하여 수행되었다. 반복된 결정에서 측정된 결합 친화성은 400 내지 500 nM였다. 이러한 항체의 CD47 결합 암은 본 발명의 CEAxCD47 이중특이성 항체의 CD47 결합 암과 동일하다. 본 발명자들의 지식에 따라, 본 발명의 CEAxCD47 이중특이성 항체를 이용하여 수행된 동일한 실험은 그러한 실험의 표준 편차 내에서 유사한 결과를 제공할 것이다.

[0419] c) 타겟 종양 세포의 표면 상에서 CEACAM5와 CD47의 동시 연관을 입증하기 위한 일가 및 이중특이성 항체의 SIRP α 블로킹 활성

[0420] 본 발명자들의 지식에 따라, 다른 시리즈의 실험이 수행될 수 있는데, 이는 타겟 세포의 표면 상에서 TAA(CEACAM5와 같은) 및 CD47의 동시 연관의 증거를 제공할 수 있고, CD47xCEACAM5 $\kappa\lambda$ 항체에 의한 CD47-SIRP α 상호작용의 중화가 CEACAM5 의존성임을 나타내는 실험이다. 그러한 실험에서, CD47xCEACAM5 $\kappa\lambda$ 바디 및 상응하는 일가 항체의 활성은 CD47-SIRP α 억제 어세이에서 테스트될 수 있다. 도 6은 상응하는 일가 항CD47 항체와 비교하여 본 발명의 이중특이성 항체보다 동일한 CD47 결합 암을 함유하는 TAAxCD47 이중특이성 항체(TAA는 CEA가 아님)를 이용하는 결과를 나타낸다.

[0421] d) CD47 항체의 SIRP α 블로킹 활성

[0422] 본 발명의 이중특이성 항체에 대해 나타낸 SIRP α 억제 효능 데이터의 측정을 위한 실험 설정(결과는 표 2 참조):

[0423] MKN45의 표면에서 발현된 인간 CD47과 가용성 SIRP α 의 상호작용을 모니터링하는 결합된 SIRP α 세포 기반 어세이의 검출은 블로킹 활성의 검출을 위해 사용된다. 본 발명에 따른 이중특이성 항체를 이용하는 용량 반응 실험은 IC50 값의 결정을 가능하게 한다.

[0424] CD47 및 CEACAM5 둘 다를 발현하는 MKN45 암 세포는 이미징 시스템(CX5)이 세포를 검출할 수 있도록 하기 위해 CFSE 바이올렛으로 염색된다. 개략적으로, 웰당 3,000개의 염색된 MKN45 세포는 384 광학 웰 플레이트(Costar)에 시딩되고, 증가된 농도(1.9 pM 내지 333 nM, 4중)의 본 발명의 이중특이성 항체와 함께 50분 동안 인큐베이션된다. 그 후, 항마우스 IgG-Fc AF647 커플링된 항체(Jackson ImmunoResearch, 1:2000으로 희석됨)와 예비혼합된 고정 농도의 SIRP α -마우스Fc는 최종 50 ng/mL로 첨가된다. 3H30의 인큐베이션 후, 플레이트는 이미징 시스템(CX5, Thermofisher)을 이용하여 획득되고, 검출된 결합된 SIRP α 에 의해 방출된 형광 신호는 이미징 시스

템에 설치된 소프트웨어에 의해 기록된다. 형광 신호는 테스트된 용량 범위에 따라 플롯되고, IC50은 소프트웨어(Prism, Graphpad)에 의해 계산된다.

[0425] 표 2는 0.22 nM 내지 7 nM의 IC50 범위를 나타내는 CD47/SIRP α 결합 억제에서 몇몇 CEAxCD47 이중특이성 항체의 효능을 나타낸다.

[0426] e) 참조 항체와의 경쟁에 의한 CEACAM5 항체의 에피토프 비닝

[0427] 에피토프 비닝은 본 발명에 따른 항체의 결합 또는 예를 들어 제1 결합부의 관련된 항CEA(타겟 단백질) 항체의 결합을 특성규명하기 위해 사용된 경쟁적 면역어세이다. 타겟 단백질에 대한 항체 결합의 경쟁적 블로킹 프로파일은 이러한 타겟 단백질에 대한 항체 결합에 대해 생성되는데, 결합 에피토프는 이미 확립되고/공개되었다. 이들 참조 항체 중 하나에 대한 경쟁은 항체가 동일하거나 또는 근접하게 위치한 에피토프를 보유하고, 이들은 서로 "비닝되었음(binned)"을 나타낸다. CEACAM5 참조 항체와 경쟁할 수 있는 본 발명의 이중특이성 항체의 일부분인 CEACAM5 mAb의 능력은 마우스 Fc 영역을 보유하는 하기 참조 항체를 이용하는 재조합 인간 CEACAM5에 대한 ELISA에 의해 테스트된다: SM3E, 특허 US20050147614A1에 기재된 SM3E 유래의 mAb의 서열, 표준 방법을 이용하여 생성된 mAb; MEDI, 특허 WO2016036678A1에 기재된 MEDI-565 유래의 mAb; SAR, 특허 EP3199552A1에 기재된 Mab2_VLg5VHg2 유래의 mAb; CH1A1A, 특허 US20120251529에 기재되고 Klein *et al* in *Oncoimmunology*, 2017 Jan 11;6(3)에 의한 CH1A1A-2F1 유래의 mAb; 특허 WO2017055389에 기재된 변종 1 유래의 인간화된 T84.66 mAb; 특허 US 2002/0165360 A1에 기재된 hMN14 유래의 LAB mAb. SM3E는 예를 들어 CEA의 N-말단, 세포막 원위부에 더 결합하고, MEDI는 중간부에, CH1A1A는 막에 근접하여 결합한다.

[0428] 비오틴화된 인간 CEACAM5는 스트렙타비딘 코팅된 96웰 플레이트 내에 0.5 μ g/ml로 코팅되고, 10 μ g/ml의 마우스 Fc 영역을 보유하는 관련 없는 mAb 또는 참조 mAb와 함께 1 시간 동안 인큐베이션된다. CEACAM5 mAb(2가의 모노클로날 항CEA 항체로서 및 각각의 CEAxCD47 이중특이성 항체로서는 아님)는 실온에서 1 시간 동안 0.2 μ g/ml로 첨가된다. 플레이트는 세척되고, 결합된 CEACAM5 mAb는 항인간 IgG(Fc)-HRP(Jackson ImmunoResearch)를 이용하여 검출된다. 세척 후, 플레이트는 Amplex Red 시약으로 현시된다. 형광 신호는 Synergy HT 플레이트 판독기(Biotek) 상에서 측정된다.

[0429] 결과는 표 2에 나타낸다. 빈 1은 각각의 항체가 CEACAM5에 대한 결합에 대해 SM3E와 경쟁함을 의미한다. 빈 2는 각각의 항체가 상기 언급된 도구 항체 중 임의의 항체와 경쟁하지 않음을 의미한다. 경쟁 실험은 각각의 항CEA 2가 모노클로날 항체를 이용하여 수행된 표 2에 목록화된 모든 CEAxCD47 이중특이성 항체에 대한 것이었다. CEACAM5에 대한 그러한 모노클로날 항체의 결합이 각각의 도구 항체에 의해 80% 이상 감소되는 경우, CEAxCD47 이중특이성 항체는 도구 항체와 경쟁적으로 결합하는 것으로 분류되는 것으로 결론 내려졌다. CEACAM5에 대한 각각의 항CEA 2가 mAb의 결합이, 도구 항체의 존재 및 부재 하의 결과가 비교되는 경우, 20% 또는 그 미만으로 감소되는 경우, CEAxCD47 항체는 도구 항체와 비경쟁적인 것으로 확인된다.

[0430] 빈 1: K2AC13, K2AC18, K2AC23, K2AC27, K2AC29

[0431] 빈 2: K2AC10, K2AC25, K2AC28 K2AC26

[0432] 본 발명에 따른 이중특이성 항체에 대한 빈 특성규명, CEA에 대한 결합의 EC50 값, SIRP α 억제 효능, 및 EC50 뿐만 아니라 식작용의 최대 계수에 대한 결과는 표 2, 3 및 4에 기재되어 있다.

표 2

CEAxCD47 이중특이성 항체의 시험관내 특성규명

항체 명칭	빈 특성규명	EC50 결합 (nM) [#]	SIRP α 억제 효능 (nM) [#]
K2AC5	빈 1	11.3	0.4
K2AC10	빈 2	1.15	0.22
K2AC13	빈 1	190	4
K2AC18	빈 1	131.8	7
K2AC22	빈 1	16.5	0.37
K2AC23	빈 1	76.8	1.6
K2AC25	빈 2	13	0.22
K2AC26	빈 1	12.7	0.32
K2AC27	빈 1	12.5	0.86
K2AC28	빈 2	52.5	0.95
K2AC29	빈 1	14.5	0.72

MKN45 CEA⁺ 암 세포를 이용함

[0433]

표 3

CEAxCD47 이중특이성 항체의 시험관내 기능 활성*

항체 명칭	EC50 (μ g/mL)	최대 식작용 지수
K2AC5	0.44	59 (\pm 4.2)
K2AC22	0.19	69
K2AC23	0.68	67.5 (\pm 2.1)
K2AC25	1.54	48 (\pm 1.4)
K2AC26	> 9.9	46 (\pm 9.9)
K2AC27	>11.7	47 (\pm 1.4)
K2AC28	>19.8	32.5 (\pm 0.7)
K2AC29	>4.4	42 (\pm 5.6)

[0434]

표 4

MKN45 세포를 이용하는 1 mg/mL의 hIgG1의 존재 또는 부재 하에서 2개의 CD47xCEA 이중특이성 항체에 대한 최대 식작용 지수 및 EC50

항체 명칭	EC50 식작용 (μ g/mL) – hIgG1 부재	EC50 식작용 (μ g/mL) – hIgG1 존재	최대 식작용 지수 – hIgG1 부재	최대 식작용 지수 – hIgG1 존재
K2AC5	0.16	0.44	67 (\pm 5.7)	77 (\pm 1.4)
K2AC22	0.25	0.45	85 (\pm 4.2)	92.5 (\pm 3.5)
5F9 hIgG4	0.15	0.62	54 (\pm 1.4)	31 (\pm 2.8)

최대 = 최대값; 10 μ g/ml에서 평가된 최대 식작용 지수; # MKN45 CEA⁺ 암 세포를 이용함

[0435]

표 5

ELISA 에 의한 재조합 단백질을 이용하는 ELISA 에 의한 인간 CEACAM5 또는 인간 CEACAM6 에 대한 EC50 결합

항체 명칭	CEACAM5 에 대한 EC50 결합	CEACAM6 에 대한 EC50 결합
AC22	0.015	결합 없음
AC39	0.22	0.17

[0436]

[0437]

f) 인간 CEACAM5 및 인간 CEACAM6에 대한 항CEA 항체의 결합

[0438]

비오틴닐화된 재조합 인간 CEACAM5 또는 CEACAM6 단백질은 스트렙타비딘 코팅된 96웰 마이크로플레이트 내에서 0.5 µg/mL로 포획된다. 플레이트는 세척되고, 본 발명의 모노클로날 항CEA 2가 항체는 넓은 농도 범위(예를 들어 5×10^{-4} 내지 1 µg/mL)로 첨가되고, 1 hr 동안 인큐베이션된다. 플레이트는 세척되고, 결합된 항체는 항인간 IgG(Fc)-HRP(Jackson ImmunoResearch)를 이용하여 검출된다. 세척 후, 플레이트는 Amplex Red 시약(Molecular Probes)을 이용하여 현시된다. 형광 신호는 Synergy HT plate reader(Biotek) 상에서 측정된다.

[0439]

모노클로날 항체 AC39에 대해 얻은 결과는 표 5에 포함된다; 이러한 항체는 균형을 이룬 CEACAM5 및 CEACAM6 결합을 나타내는데, 이는 CEACAM5 및 CEACAM6에 대한 결합에 대한 EC50이 유사함을 의미한다(균형을 이룬 항체의 CEACAM5 결합 대 CEACAM6 결합에 대한 EC50의 비율 범위는 0.33 내지 3임). 이러한 범위 외의 비율을 보유하는 항체는 균형을 이루지 않은 것으로 간주된다.

[0440]

실시예 9: 이중특이성 항체에 의해 매개된 ADCC 및 ADCP

[0441]

a) TAAxCD47 이중특이성 항체에 의해 매개된 ADCC 및 ADCP는 TAA 의존성이다.

[0442]

CD47 및 TAA를 동시 연관시킬 수 있는 이중 타겟팅 TAAxCD47 κ λ 항체의 능력은 TAA 음성 세포와 비교하여 및 CD47-SIRPa 상호작용의 TAA 의존성 중화에서 TAA 양성 세포에 대한 결합의 친화성을 상당히 증가시킨다. 결과적으로, 이는 CEAxCD47 κ λ 항체에 의해 매개된 효율적이고 선별적인 암 세포 사멸을 나타낼 수 있다.

[0443]

도 3a에 나타낸 ADCP 실험(유세포분석 기반 어세이)으로부터 입증된 바와 같은 결과는 상응하는 일가 TAA뿐만 아니라 일가 CD47 항체와 비교하여 이중특이성 TAAxCD47 항체의 더 높은 ADCP를 나타낸다. 도 4는 고 친화성 항 TAA 모노클로날 항체 아마톡시맵(TAA는 MSLN임)과 비교하여 4개의 이중특이성 TAAxCD47 항체(TAA는 메소텔린 MSLN임)의 더 높은 ADCC(Cr51 기반 어세이)를 나타낸다(MSLN을 보유하는 폐암 NCI-H226 종양 세포가 사용된다).

[0444]

b) TAAxCD47 항체를 이용하여 측정된 Cr51⁺ 방출 어세이

[0445]

건강한 PBMC는 RPMI/10 ng/mL의 재조합 hIL-2로 보충된 10% 열 불활성화된 FCS와 함께 37°C에서 하룻밤 활성화되었다. 다음 날, 타겟 세포(즉, TAA를 발현하는 암 세포)는 100 µCi의 Cr51(Perkin Elmer, 37°C, 1 h)와 함께 인큐베이션되었다. 세척 후, 세포는 테스트 항체를 이용하여 흡소닌화되었다(30분, 37°C). 그 후, Cr51 로딩된 암 세포는 이펙터(PBMC) 및 타겟 세포(TAA 발현 세포) 사이의 최종 80:1 또는 50:1 비율을 얻기 위해 PBMC 세포와 혼합되었다. 세포 혼합물은 37°C에서 4 h 동안 인큐베이션된 후 10분 동안 1500 rpm으로 원심분리되었다. 상등액은 LumaPlate(섬광제로 코팅됨) 내로 이전되었고, γ-계수기에서 계수되었다. 음성 대조군(자연 Cr51 방출)은 이펙터 세포 부재 하에서 배지와 함께 인큐베이션된 Cr51 로딩된 타겟 세포로 구성되었다. 총 용해 대조군은 5 µL의 세포 용해 용액(트리톤 X-100)과 함께 인큐베이션된 Cr51 로딩된 타겟 세포로 구성되었다. 비특이적인 용해 대조군(베이스라인)은 이펙터 세포의 존재 및 Ab의 부재 하에서 인큐베이션된 Cr51 로딩된 타겟 세포로 구성되었다. ADCC 백분율은 하기 식을 이용하여 계산되었다: % 특이적인 ADCC = ((분당 샘플 계수(cpm) - 비특이적인 용해 대조군 cpm)/(총 용해 대조군 cpm - 음성 대조군 cpm)) x 100%.

[0446]

도 5는 wt IgG1 Fc 버전 대 본 발명의 CEAxCD47 항체와 동일한 CD47 암을 보유하는 CD47xTAA 이중특이성 항체(TAA CEA가 아님)의 추가적으로 DEA 돌연변이된 Fc 버전의 비교 실험의 ADCC(Cr 51 기반 어세이)에 대한 결과를 나타낸다. 또한, 고 친화성 항TAA 2가 mAb에 대한 결과도 나타낸다. DEA 돌연변이를 보유하는 IgG1 Fc를 보유하는 TAAxCD47 이중특이성 항체의 ADCC가 가장 높고, 그 다음이 IgG1 Fc를 가진 CEAxCD47 biAb 및 wt IgG1 Fc를

가진 2가 mAb 순이다.

[0447]

c) LDH 방출 어세이에 의해 측정된 ADCC

[0448]

CEAxCD47 이중특이성 항체의 ADCC는 하기 어세이에서 테스트된다:

[0449]

건강한 PBMC는 RPMI/10 ng/mL의 재조합 hIL-2로 보충된 10% 열 불활성화된 FCS와 함께 37°C에서 하룻밤 활성화되었다. 다음 날, 타겟 세포(예를 들어, MKN45 암 세포)는 상이한 농도의 테스트된 항체를 이용하여 옹소닌화된 다. PBMC 및 옹소닌화된 타겟 세포는 세포 배양 인큐베이터 내의 37°C에서 6 시간 동안 둥근 바닥 플라스크 내에서 이펙터/타겟 50/1의 비율로 동시 인큐베이션된다. 이 인큐베이션 후, 상등액은 광학 평저 플레이트 내로 이전되고, LDH 방출은 마이크로플레이트 판독기를 이용하여 OD를 측정함으로써 Roche로부터 시판되는 키트로 정량된다. 특이적인 용해 %는 하기 식을 이용하여 계산된다:

$$\text{특이적인 용해} = \left(\frac{\text{LDH 샘플} - (\text{LDH 이펙터} + \text{타겟 세포})}{\text{최대 LDH} - \text{LDH 타겟 세포 단독}} \right) \times 100$$

[0450]

도 13은 본 발명의 이중특이성 항체와 그들의 당조작된 형태 및 항체 5F9 사이의 비교 실험의 결과를 나타낸다. 도 14는 1 mg/ml의 인간 면역글로불린(IgG)의 존재 하에서 본 발명의 이중특이성 항체와 그들의 당조작된 형태 및 항체 5F9 사이의 비교 실험의 결과를 나타낸다.

[0452]

d) ADCP 어세이

[0453]

2가지 방법이 사용된다. FACS 기반 방법에서, 식작용의 백분율(적어도 하나의 종양 세포를 포식한 마크로파지의 백분율을 나타냄)이 결정된다. 도 3a는 CEAxCD47 항체에서도 사용된 CD47 결합 암을 보유하는 TAAxCD47 항체에 대한 이 FACS 기반 어세이를 사용하여 얻은 결과를 나타낸다. CellInsight CX5 고 함량 스크리닝 플랫폼을 이용하는 이미징 기반 방법으로, 100개의 마크로파지에 의해 포식된 타겟 세포의 평균 수로 정의된 식작용 지수가 결정된다. 도 3b는 CEAxCD47 항체의 CD47 결합 암을 보유하는 TAAxCD47 이중특이성 항체(TAA, CEA가 아님)를 이용하여 얻은 결과를 나타낸다. 도 12, 15, 16, 17, 18, 20b, 및 21b는 본 발명의 CEAxCD47 이중특이성 항체를 이용하여 얻은 결과를 나타낸다. 도 15는 본 발명의 이중특이성 항체와 그들의 당조작된 형태 및 항CD47 항체 5F9 사이의 비교 실험의 결과를 나타낸다. 도 16은 환자에 통상적으로 존재하는 바와 같은 1 mg/ml의 인간 면역글로불린(IgG)의 존재 하에서 본 발명의 이중특이성 항체와 그들의 당조작된 형태 및 항체 5F9 사이의 비교 실험의 결과를 나타낸다. 도 17은 1 mg/ml의 인간 면역글로불린(huIgG, 1 mg/mL 또는 훨씬 더 높은 농도로 환자에 존재함)의 존재 또는 부재 하에서 본 발명의 이중특이성 항체 사이의 비교 실험의 결과를 나타낸다. 도 18은 30 nM의 CEA-TCB1 또는 300 nM의 CEA-TCB의 존재 또는 부재 하에서 K2AC22의 농도/식작용 지수 곡선을 나타낸다.

[0454]

e) 식작용 어세이: 1. CellInsight CX5 고 함량 스크리닝 플랫폼 기반 이미징 어세이 및 2. 유세포분석 기반 어세이

[0455]

마크로파지의 제조: 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)는 피콜 구배에 의해 버피 코트로부터 분리된다. 마크로파지는 20 ng/mL의 인간 마크로파지 콜로니 자극 인자(M-CSF)(PeproTech)의 존재 하의 완전 배지(RPMI 1640, 10% 열 불활성화된 태아 송아지 혈청 [Invitrogen]), 2 mM L-글루타민, 1 mM 나트륨 피루베이트, 10 mM HEPES 버퍼, 25 mg/mL 젠타마이신(모두 Sigma-Aldrich), 및 50 mM 2-머캅토에탄올(Thermo Fisher Scientific) 중에서 7일 동안 PBMC를 배양함으로써 생성된다. 후속적으로 비부착성 세포는 세포 배양 배지를 교환함으로써 분화 상(+1일째)에서 제거되고, 마크로파지를 나타내는 부착성 세포는 세포 해리 버퍼(cell dissociation buffer, Sigma-Aldrich)를 이용하여 탈착되고, 세포분석(cytometry) 기반 ADCP 실험을 위한 사용일(8일째 또는 9일째)에 완전 배지 중에서 세척된다. 세포 이미징 기반 ADCP의 경우, 마크로파지는 세포 해리 버퍼를 이용하여 6일째에 탈착되고, 96 광학 플레이트(costar) 내에 웰당 30,000으로 시딩된다.

[0456]

1. CellInsight™ 기반 어세이

[0457]

마이크로플레이트 웰에 부착하는 마크로파지(칼세인 레드 오렌지로 염색됨)는 상이한 농도의 테스트하려는 항체의 존재 하에서 37°C에서 2.5 시간 동안 1:3의 이펙터:타겟 세포 비율로 칼세인 AM 표지된 타겟 종양 세포와 함께 동시 인큐베이션된다. 인큐베이션 기간의 말미에, 상등액은 완전 배양 배지로 대체되고, 마이크로플레이트는 CellInsight™CX5 고 함량 스크리닝 플랫폼을 이용하여 이미징된다. 웰당 1500개의 마크로파지가 획득되고, 본

석된다. 식작용은 이중 양성 이벤트(마크로파지 + 타겟 종양 세포)로서 입증되고, 식작용 지수는 CellInsight™ 제조사의 소프트웨어에 의해 계산된다.

[0458] 도 12, 15, 16, 17, 18, 20b, 및 21b의 모든 결과뿐만 아니라 표 3 및 4에 나타낸 EC50 및 최대 식작용 지수 값은 CEA를 발현하는 MKN-45 세포 및 1:3의 이펙터 세포 대 타겟/종양 세포 비율을 이용하여 얻는다. 도 3b의 데이터는 TAA(CEA가 아님)를 보유하는 NCI-N87 세포 및 1:1의 이펙터 대 타겟/종양 세포 비율을 이용하여 얻는다. 마크로파지당 더 많은 종양 세포가 제공될수록 더 높은 식작용 지수가 예측되는데, 이는 아미도 본 발명에 따른 이중특이성 항체에 대한 결과를 나타내는 다른 도면과 비교하여 TAAxCD47 이중특이성 항체(TAA, CEA가 아님)에 대한 도 3b에 나타낸 백그라운드 신호 및 전체적으로 더 낮은 식작용 지수가 주요 원인이다.

[0459] 본 발명의 모든 ADCP(식작용) 값, 범위 등은 달리 명시적으로 언급하지 않으면 이미징 기반 어세이에 기초한 것이다(도 3a의 데이터는 유동 기반 어세이를 이용하여 얻는다).

[0460] 2. 유세포분석 기반 ADCP 어세이

[0461] 본 발명자들의 지식에 따라, ADCP는 또한 후술하는 바와 같은 방법에 의해 측정될 수 있다: 마크로파지는 상이한 농도의 테스트하려는 항체의 존재 하에서 예를 들어 3:1의 이펙터:타겟 세포 비율로 37°C에서 2.5 시간 동안 CSFE 표지된 타겟 종양 세포(예를 들어 MKN-45, LS174T 또는 HPAC 종양 세포)와 동시 인큐베이션된다. 인큐베이션 기간의 말미에, 비오틴화된 항인간 CD14 항체 및 스트랩-Cy5는 마크로파지를 표지하기 위해 첨가된다. 그 후, 세포는 세척되고, 유세포분석이 수행된다. 식작용은 이중 양성 이벤트 CD14+ 및 CFSE+에 의해 입증된다. 식작용의 백분율은 CD14+/CFSE+ 이중 양성 이벤트와 전체 타겟 세포의 비율에 100을 곱한 값으로 제시된다. 도 3a의 데이터는 TAA(CEA가 아님)를 보유하는 HPAC 세포 및 1:1의 이펙터 대 타겟/종양 세포 비율을 이용하여 얻는다. 유세포분석 기반 어세이가 사용되었다. 도 3b의 데이터는 TAA(CEA가 아님)를 보유하는 NCI-N87 세포 및 1:1의 이펙터 대 타겟/종양 세포 비율을 이용하여 얻는다. 이미징 기반 어세이가 사용되었다.

[0462] **실시예 10: MNK-45 세포에 대한 CEAxCD47 및 CEAxCD3의 결합; CEAxCD3과의 결합의 경쟁**

[0463] a) CD47xCEACAM5 이중특이성 항체의 결합은 예를 들어 CEA 발현 인간 위 아데노암종 세포(MKN-45, DSMZ ACC 409)에 대해 테스트된다.

[0464] 세포는 수확되고, 카운트되고, 생존률에 대해 검사되고, FACS 버퍼(PBS 2% BSA, 0.1% NaN₃) 중에 3x10⁶ 세포/ml로 재현탁된다. 100 μl의 세포 현탁액은 V 바닥 96웰 플레이트(3x10⁵ 세포/웰)에 분배된다. 상등액은 4°C에서 1300 rpm으로 3분 동안 원심분리에 의해 제거된다. 그 후, 증가하는 농도의 본 발명에 따른 항체가 웰 내에 첨가되고, 4°C에서 15분 동안 인큐베이션된다. 세포는 냉 FACS 버퍼로 2회 세척되고, PE(R-피코에리트린) 컨주게이션된 마우스 항인간 IgG Fc 2차 항체(SouthernBiotech, FACS 버퍼 중에 1:100으로 예비희석됨)와 함께 4°C에서 추가로 15분 동안 재인큐베이션된다. 세포는 냉 FACS 버퍼로 2회 세척되고, 1:15000으로 희석된 SytoxBlue(Life Technologies)와 함께 300 μl의 FACS 버퍼 중에 재현탁된다. 형광은 Cytotflex(Millipore)를 이용하여 측정된다. 결합 곡선 및 EC50 값이 얻어지고 GraphPad Prism7 소프트웨어를 이용하여 계산된다. 동일한 방식으로, MKN-45 세포에 대한 MAB CEA 또는 MAB CEA1의 결합이 테스트될 수 있다. 도 11은 MKN-45 세포에 대한 몇몇 CEAxCD47 이중특이성 항체의 결합 곡선을 나타낸다.

[0465] b) CEAxCD3 T 세포 이중특이성 항체의 첨가에 의한 CEA 양성 종양 세포주(MKN-45)에 대한 CEAxCD47 항체의 결합 곡선의 이동

[0466] 본 발명자들의 지식에 따라, 본 발명에 따른 CD47xCEACAM5 이중특이성 항체와 CEA-TCB 또는 CEA-TCB1과 같은 CEAxCD3 T 세포 이중특이성 항체의 경쟁 실험의 경우, MKN-45 세포에 대한 CEACAM5xCD47의 결합은 상기한 바와 같이 결정될 수 있지만, 본 발명의 CEAxCD47 이중특이성 항체를 위한 조합 파트너로서 CEAxCD3 T 세포 이중특이성 항체가 CEA에 대한 결합에 대해 경쟁하는지 경쟁하지 않는지 여부를 연구하기 위해, CEAxCD3 T 세포 이중특이성 항체의 존재 및 부재 하에서 수행된다.

[0467] **실시예 11: 푸코실화된 및 비푸코실화된 K2AC5 및 K2AC22 이중특이성 항체의 생성 및 정제**

[0468] 푸코실화된 및 비푸코실화된 K2AC5 및 K2AC22 이중특이성 항체의 생성:

[0469] CHO 풀(K2AC5를 위해 하나 및 K2AC22를 위해 하나)은 각각 푸코실화된 및 비푸코실화된 항체의 생성을 위해 700 mL 또는 100 mL의 작동 부피로 톱숨 에틀렌 디바이스 내에서 0.3 x 10⁶ 세포/mL의 생존 세포 농도로 접종된다.

모든 풀은 CDACF 배지 CDCHO 및 적응 공급 레짐을 이용하는 유가식 모드로 15일의 지속 기간 동안 운용된다. 비푸코실화된 항체의 생성을 위해, 200 μM 푸코스 억제제(1,3,4-트리-0-아세틸-2-데옥시-2-플루오로-L-푸코스)의 불루스는 문헌[참조: Rillahan et al. Nature Chem. Biol. 2012 Jul;8(7):661-8]에 기재된 비푸코실화 전략 및 EP2282773에 기초한 유가식 공정 중의 0, 5, 8 및 11일째에 첨가된다. 푸코실화된 또는 비푸코실화된 항체를 함유하는 K2AC5 및 K2AC22 풀 상등액의 수확은 유가식 배양 15일 후에 수행된다. CHO 풀 상등액의 수확물은 Sartoclear Dynamics® 랩 V 세포 수확 사토리우스 시스템을 이용하여(참조: 공급자 지침) 투명화된다.

[0470] 푸코실화된 및 비푸코실화된 K2AC5 및 K2AC22 이중특이성 항체의 정제

[0471] 푸코실화된 및 비푸코실화된 K2AC5 및 K2AC22 이중특이성 항체의 정제는 3가지의 친화성 단계 정제 공정이다. 정제를 개시하기 이전에, K2AC5 및 K2AC22 풀의 상등액 내 항체 농도는 친화성 매트릭스의 적합한 부피로 컬럼을 이용하기 위해 OctetRED96을 이용하여 측정된다. 푸코실화된 또는 비푸코실화된 이중특이성 항체를 함유하는 각각의 투명화된 CHO 풀 상등액은 세포 배양 오염물의 대부분을 제거하기 위해 사전 조정 없이 MabSelect SuRe(MSS) 컬럼(GE Healthcare) 상에 로딩된다. 그 후, MSS 용출물은 바이러스를 불활성화시키기 위해 낮은 pH 유지에 의해 처리되고, Tris 1 M pH 9를 이용하여 pH 6으로 중화된다. 그 후, MSS 용출물은 단일특이성 κ(모노 κ)를 제거하기 위해 LambdaFabSelect(LFS) 컬럼(GE Healthcare) 상에 로딩된다. 그 후, LFS 용출물은 pH 6으로 pH 조정된다. LFS는 단일특이성 λ(모노 λ)를 제거하기 위해 Capto L(CL) 컬럼(GE Healthcare) 상에 로딩된다. CL 용출물은 저장 이전에 pH 조정된다. 그 후, 최종 물질은 농축되고, 최종 제형화 버퍼 내로 환외여과되고, 그의 농도는 나노드롭을 이용하여 조정된다. 푸코실화된 및 비푸코실화된 K2AC5 및 K2AC22 이중특이성 항체는 나누어 담고 배달까지 -80°C에서 저장된다. 정제된 이중특이성 항체는 제조사(Agilent Technologies, Santa Clara, Calif., USA)에 의해 기재된 바와 같이 단백질 80 키트를 이용하는 Agilent 2100 Bioanalyzer로 변성 및 환원 조건에서 전기영동에 의해 크기에 대해 분석된다. 응집 레벨은 ACQUITY UPLC H-클래스 바이오 시스템(Waters)을 이용하는 크기 배제 크로마토그래피(SEC-UPLC)에 의해 평가된다. 정제된 이중특이성 항체의 전하 변이체 분석은 Multiphor II 전기영동 시스템(GE Healthcare)을 이용하는 등전 집초 기법(IEF)에 의해 달성된다. 푸코실화된 및 비푸코실화된 K2AC5 및 K2AC22 항체의 N-연결된 복합 바이안테너리 당형태의 상대 분포는 LabChip GXII Touch(Perkin Elmer) 상에서 스루풋 마이크로칩-CE 방법을 이용하여 결정된다. 모든 항체는 리몰루스 아메보사이트 라이세이트 테스트(LAL; Charles River Laboratories, Wilmington, Mass)를 이용하여 내독소 오염에 대해 테스트된다. 당조작된 K2AC5는 79.68%의 비푸코실화를 나타내고, 당조작된 K2AC22는 89.13%의 비푸코실화를 나타낸다.

[0472] 이들 비푸코실화된 CEaxCD47 이중특이성 항체는 도 13, 14, 15 및 16에 나타낸 결과를 얻기 위해 사용되었다.

[0473] 실시예 12: FUT8(-) 세포주에서의 발현 및 정제

[0474] 대안적으로, 및 본 발명자들의 지식에 따라, 본 발명에 따른 비푸코실화된 이중특이성 항체는 또한 후술하는 바와 같은 방법에 따라 제조될 수 있다:

[0475] 문헌[참조: Naoko Yamane-Ohnuki et al., Biotech. Bioeng.; 87 (2004) 614-622]에 따른 재료 및 방법.

[0476] 중국 햄스터 FUT8 cDNA의 단리

[0477] 총 RNA는 RNeasy® 미니 키트(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 CHO/DG44 세포로부터 단리되고, 역전사 폴리머라아제 연쇄 반응(RT-PCR)을 위한 슈퍼스크립트 제1 스트랜드 합성 시스템(Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 올리고-dT로 역전사된다. 중국 햄스터 FUT8 cDNA는 뮤린 FUT8 cDNA(Hayashi, 2000; DNA Seq 11:91-96)로부터 디자인된 프라이머

5V-GTCTGAAGCATTATGTGTTGAAGC-3V (서열 번호: 14) 및

5V-GTGAGTACATTCATTGTAAGTGTG-3V (서열 번호: 15)

[0478] 를 이용하는 PCR에 의해 단일 스트랜드 CHO/DG44 세포 cDNA로부터 증폭된다.

[0480] FUT8 유전자좌의 타겟팅 컨스트럭트

[0481] CHO/DG44 세포 내에서 FUT8 유전자의 타겟팅된 파괴는 2개의 대체 벡터, pKOFUT8Neo 및 pKOFUT8Puro를 이용하여 수행된다. 제1 코딩 엑손을 포함하는 FUT8 유전자의 9.0 kb 단편은 타겟팅 컨스트럭트를 확립하기 위해 프로브로서 중국 햄스터 FUT8 cDNA를 이용하여 CHO-K1 세포 E-게놈 라이브러리(Stratagene, La Jolla, CA)를 스크리닝함으로써 단리된다. 번역 개시 부위를 함유하는 234 bp 절편은 각각 loxP 부위에 인접한, 플라스미드

pKOSelectNeo 또는 pKOSelectPuro(Lexicon, TX) 유래의 네오마이신 저항성 유전자(Neor) 카세트 또는 퓨로마이신 저항성 유전자(Puror) 카세트에 대체된다. 플라스미드 pKOSelectDT(Lexicon) 유래의 디프테리아 독소 유전자(DT) 카세트는 5V 상동 영역에 삽입된다. 생성된 타겟팅 컨스트럭트, pKOFUT8Neo 및 pKOFUT8Puro는 1.5 kb 5 V 상동 서열 및 5.3 kb 3 V 상동 서열을 포함하였다. 형질감염 이전에, 타겟팅 컨스트럭트는 독특한 SalI 부위에서 선형화된다.

[0482] 형질감염 및 상동 재조합체에 대한 스크리닝

[0483] 하위융합 CHO/DG44 세포(1.6 10⁶)는 Bio-Rad GenePulser®II를 이용하여 350 V 및 250 AF에서 4 Ag의 선형화된 pKOFUT8Neo로 전기천공된다. 전기천공 후, 형질감염체는 600 Ag/mL G418(Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)를 이용하여 선별된다. 게놈 PCR은 하기 프라이머를 사용하여 이전에 보고된 변형된 마이크로추출법(Ramirez-Solis et al., 1992; Anal Biochem 201:331- 335.)에 의해 96웰 플레이트에서 수행된다:

5V-TTGTGTGACTCTTAACTCTCAGAG-3V (서열 번호: 16) 및

5V-GAGGCCACTTGTGTAGCGCCAAGTG-3V (서열 번호: 17).

[0484]

[0485] 상동 재조합체는 게놈 PCR을 이용하여 얻은 1.7 kb 단편에 의해 확인되고, 하기 프라이머로 증폭된 221 bp 단편을 이용하는 서던 블롯 분석에 의해 검증된다:

5V-GTGAGTCCATGGCTGCTACTG-3V (서열 번호: 218) 및

5V-CCTGACTTGGCTATTCTCAG-3V (서열 번호: 19).

[0486]

[0487] 반접합자 클론은 선형화된 pKOFUT8Puro를 이용하는 제2 라운드의 상동 재조합 및 이전에 기재된 바와 같이 15 Ag/mL의 퓨로마이신(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 이용하는 약물 선별이 수행된다. 확인된 동종접합자 파괴체는 FUT8 대립유전자 둘 다 유래의 약물 내성 유전자 카세트를 제거하기 위해 Cre-리컴비나아제 발현 벡터 pBS185(Invitrogen)를 이용하여 전기천공된다.

[0488] FUT(-) 세포에 의한 모노클로날 항체 생성

[0489] FUT8(-) 세포주는 본 발명에 따른 이중특이성 항체를 코딩하는 발현 벡터로 전기천공되고, 하이포잔틴 및 티미딘이 결여된 배지에서 선별된다. 융합 형질감염체는 Ex-Cell®301 배지(JRH Biosciences, Lenexa, KS) 중에서 1주일 동안 배양된다. 항체는 MabSelect™(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)을 이용하여 배양 상등액으로부터 정제된다. 추가의 정제 단계는 음이온/양이온 교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피 및 구체적으로 상기한 바와 같은 카파 램다 선별 수지를 각각 이용하는 정제일 수 있다.

[0490] 실시예 13: 이중특이성 항체의 생체내 항종양 활성

[0491] 본 발명자들의 지식에 따라, 본 발명에 따른 이중특이성 항체의 항종양 활성은 제노그래프트 모델, 예를 들어 하기 모델에 의해 계산될 수 있다: MKN-45 또는 LS174T 세포와 같은 1 또는 2x10⁶ CEA 양성 종양 세포는 NOD/SCID 마우스 내에 피하 이식된다. 종양 부피는 주당 3회 측정된다. 종양 이식물이 대략 0.1 cm³에 도달하는 경우, 마우스는 그룹(예를 들어 그룹당 4 내지 6 마리의 마우스)으로 무작위화되고, 항체 치료가 개시된다. 이러한 실험은 예를 들어 본 발명에 따른 이중특이성 항체의 효과를 비교할 수 있고, 양성 대조군 Mab, 예를 들어 CD47 Mab B6H12.2 항체는, 예를 들어 실험의 말미(d25)까지 매주 정맥내 주사된다. 항체는 예를 들어 마우스당 주사당 50 내지 1200 µg으로 투여된다.

[0492] 본 발명의 이중특이성 항체와 CEAxCD3 이중특이성 항체의 조합은 적합한 모델에서 테스트될 수 있다. 본 발명에 따른 항체와 MAB CEA, MAB CEA1 또는 CEA-TCB CEA-TCB1의 조합이 테스트될 수 있는 모델은 예를 들어 Bacac et al(Clin. Cancer Res., 22(13); 3286-97;2016)에 의해 기재되고, 또한 구체적으로 CEACAM5xCD47과 CEA-TCB 또는 CEA-TCB1의 조합 연구를 위해 사용된다.

[0493] 실시예 14: 건강한 인간 공여자 인간 혈액 유래의 전혈 및 PBMC에서 테스트된 사이토카인 방출

[0494] 본 발명자들의 지식에 따라, 시험관내 사이토카인 방출 어세이는 수성 프리젠테이션(aqueous presentation) 내의 테스트 항체(95% v/v 혈액)에 의한 최소 희석으로 전혈(WB CRA)을 이용하여 수행될 수 있다. 이러한 어세이 포맷은 사이토카인 방출의 메커니즘에 영향을 미칠 수 있는 생리학적 농도에서 인자를 함유하는 시험관내 환경을 더 가깝게 모방하기 위해 고려된다. 그러나, 이러한 포맷은 T 세포 매개된 사이토카인 방출(예를 들어,

CD28)을 불량하게 예측하는 것으로 생각된다.

- [0495] 또한, 상기 어세이는 T 세포 매개된 사이토카인 방출(PBMC SP CRA)을 평가하기 위해 건강한 인간 공여자 유래의 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 및 고정화된 mAb(고형 상, SP) 프리젠테이션을 이용하여 수행될 수 있다. 이러한 어세이 포맷은 생체 내에서 일어날 수 있는 mAb의 가교 및 고밀도 프리젠테이션(예를 들어, 다른 면역 세포 상에서 항체의 Fc 부분과 Fc γ 수용체의 상호작용 또는 항약물 항체에 의한 mAb의 가교)을 모의한다. 이러한 포맷은 T 세포 매개된 사이토카인 방출을 예측한다.
- [0496] 각각의 어세이 포맷을 위한 음성 대조군뿐만 아니라 특이적인 양성 대조군은 CD47xCEA 이중특이성 항체와 같은 TAAxCD47 항체와 병행하여 테스트될 수 있다. 도 7a 및 7b 참조.
- [0497] **실시예 15: 적혈구에 대한 항체 결합, 적혈구의 식작용, 및 혈소판 활성화와 응집**
- [0498] 전혈 결합
- [0499] 본 발명자들의 지식에 따라, 시트레이트 중의 건강한 공여자로부터 수집된 인간 전혈 샘플은 3 μ g/mL의 본 발명의 AF488 커플링된 CEAxCD47 이중특이성 항체, B6H12.2 또는 아이소타입 대조군 및 표면 염색 항체(PE-Cy7 항 hCD45 및 PE 항hCD41a, 혈소판에 대해서만)와 함께 4°C에서 30분 동안 혼합될 수 있다. 인큐베이션 후, 전혈은 2개의 샘플로 나뉜다: 5 μ L는 적혈구 분석을 위해 PBS 중에서 희석 및 세척되는 한편, 150 μ L는 혈소판 분석을 위해 적혈구 용해 용액과 함께 인큐베이션되고 세척된다. 샘플은 CytoFLEX 기기 상에서 획득되고, MFI 값을 결정하기 위해 FlowJo 소프트웨어를 이용하여 분석된다.
- [0500] 적혈구식작용
- [0501] 본 발명자들의 지식에 따라, 인간 적혈구(RBC)는 300xg에서의 원심분리에 의해 인간 전혈로부터 분리될 수 있고, PBS 중에서 2회 세척되고, CFSE-(카복시플루오레세인 석신이미딜 에스테르)로 표지되고, 마크로파지의 첨가 이전에 테스트 항체와 함께 37°C에서 1 시간 동안 예비인큐베이션된다. 표지된 RBC는 본 발명에 따른 항체 또는 대조군(비결합 IgG1 항체)의 존재 하에서 200:1의 타겟 대 이펙터 비율로 1 시간 동안 인간 마크로파지와 함께 배양될 수 있다. 배양 후, 세포는 항CD14-APC로 염색되고, 유세포분석에 의해 분석된다. 식작용은 CFSE+이고 따라서 적어도 하나의 RBC를 포식한 CD14+ 이벤트(마크로파지)의 퍼센트로서 정량되었다(이벤트는 싱글렛으로 게이팅된다). 식작용 및 FACS 분석은 실시예 9에 기재된 바와 같이 수행되나, 적혈구는 마크로파지 염색 후 FACS 용해 용액으로 용해되었다.
- [0502] 도 8은 IgG1 항CD47 모노클로날 항체 B6H12.2에 대한 RBC 식작용이 본 발명의 CEAxCD47 이중특이성 항체의 CD47 결합 암을 함유하는 IgG1 TAAxCD47(CEAxCD47이 아님) $\kappa\lambda$ 이중특이성 항체에 대해서보다 훨씬 더 강력함을 나타낸다. 야생형 Fc를 보유하는 TAAxCD47 이중특이성 항체는 테스트된 농도 범위에서 식작용을 나타내지 않고, Fc가 aa 돌연변이 DEA(S329D 및 I332E 및 G236A)를 보유하는 경우, 식작용은 검출되지만, B6H12.2 항체에 관해 더 높은 농도에서 검출된다.
- [0503] 시험관내 혈소판 활성화 및 응집
- [0504] 표준 유세포분석 실험에서, 7명의 건강한 인간 공여자의 전혈에서 인간 혈소판 활성화를 유도할 수 있는 TAAxCD47 및 CEAxCD47 이중특이성 항체의 능력은 표면 마커 CD62P의 상향조절에 의해 측정되었다. 개략적으로, 5 μ L의 전혈은 10 μ L의 각각의 샘플(2X로 제조됨)과 함께 실온에서 15분 동안 인큐베이션된다. 각각의 테스트된 항체는 상이한 농도(0, 0.02, 0.2, 2, 20 및 200 μ g/mL)로 첨가된다. 혈소판 활성화를 유도하는 것으로 공지된 양성 대조군 시약으로서 포함된 아데노신 다이포스페이트(ADP) 및 항CD9(ALB6)는 각각 10 μ M 및 10 μ g/mL의 농도로 첨가된다. 그 후, 10 μ L의 항CD41a-PE 및 10 μ L의 항CD62P-APC가 첨가되었고, 실온의 암실에서 15분 동안 인큐베이션되었다. 최종적으로, 500 μ L의 CellFix(BD Biosciences, 물 중에서 1/10로 희석됨)가 첨가되었고, 200 μ L의 각각의 샘플은 CytoFLEX 획득에 적합한 U 바닥 96웰 플레이트 내에 이전된다. 혈소판은 CD41a-PE 포지티브 염색에 의해 확인된다. 혈소판 활성화는 CD62P마커의 발현에 의해 평가된다.
- [0505] 도 10은 7명의 자원 공여자 유래의 혈액에서 얻은 결과를 나타낸다. 항TAA 모노클로날 항체 및 TAAxCD47 이중특이성 항체 둘 다 관련 혈소판 활성화를 유도하지 않았음이 확인되었다(둘 다 wt IgG1 Fc를 보유함). 대조적으로, wt IgG1 Fc를 보유하는 항CD47 항체 B6H12.2는 혈소판 활성화를 유도하였고, 또한 DEA 돌연변이를 보유하는 Fc를 보유하는 TAAxCD47 biAb도 혈소판 활성화를 나타냈다.
- [0506] 또한, CEAxCD47 항체 K2AC5 및 K2AC22(비푸코실화 보유 및 비보유)는 전혈에서 혈소판 활성화에 대해 도 10에 나타낸 바와 같은 농도 범위에서 연구되었다. 7명의 공여자 중 6명의 혈액에서, 유의적인 혈소판 활성화는 관찰

되지 않았는데, 도 10에서 TAAxCD47에 대해 나타낸 바와 같다. 이미 한 명의 공여자는 양성 대조군 제제를 이용하여 통상적이지 않은 혈소판 활성화 및 그 후 K2AC5 및 22에 의한 몇몇 혈소판 활성화를 나타냈다. 이러한 한 명의 공여자의 결과는 통상적이지 않은 혈소판 활성화로 인해 무시되었다.

[0507] 본 발명자들의 지식에 따라, CD47/CEA 이중특이성 항체의 존재 하에서 응집에 대한 가능성은 혈소판 농후 혈장 (PRP)에 대해 평가될 수 있다. PRP는 10 μ M 및 5 μ M의 ADP로 켈린지되거나, 또는 200, 100, 20, 25, 및 12.5 μ g/mL의 테스트 제품뿐만 아니라 염수 또는 아이소타입 대조군으로 켈린지된다. 혈소판 응집은 일정한 교반 하에서 트롬보-응집측정기 TA 4 V를 이용하여 전체적인 혈소판 자극(즉, 10분)에 의해 평가될 수 있다. Thrombosoft 1.6 소프트웨어(SD Innovation, Frouard, France)가 데이터 분석을 위해 사용될 수 있다.

[0508] **실시예 16: 시노물구스.예에서 혈액학 평가**

[0509] 본 발명자들의 지식에 따라, 시노물구스 원숭이 교차 반응성 항체는 혈액학 파라미터(RBC 및 혈소판을 포함함)에 대한 임의의 영향에 대해 시노물구스 원숭이의 생체 내에서 테스트될 수 있다. 본 발명에 따른 항체는 예를 들어 정맥내 경로당 주간 베이스로 최대 100 mg/kg의 용량으로 정맥내 경로당 시노물구스 원숭이에게 제공된다. 적혈구 및 혈소판 계수를 포함하는 혈액학적 파라미터는 경시적으로 모니터링되고, 원숭이(프리-용량 값) 내의 대조군 값과 비교된다.

[0510] 도 9의 결과는 본 발명에 따른 CEAxCD47 이중특이성 항체의 CD47 결합 암을 함유하는 IgG1 TAAxCD47(CEAxCD47 이 아님) κ λ 이중특이성 항체를 이용하여 얻었다. 고용량 반복 투여에도 불구하고, RBC 계수 및 혈소판 계수와 관련하여 대조군 동물과 처리된 동물 사이에 유의적인 차이는 없다. 이는 대략 1 mg/kg의 단일 용량에서 이미 시작되는 헤모글로빈의 용량 의존성 감소를 나타내는 IgG4 항CD47 항체 hu5F9-G4를 이용하여 얻은 공개된 결과(Jie Liu et al (Open access article, PLOS ONE 10(9) September 2015))와는 대조적이다. IgG4 포맷은 IgG1 포맷과 비교하여 적혈구 및 혈소판에 대한 영향을 최소화하기 위해 사용되었다. 이미 1 mg/kg 및 그 미만의 다소 낮은 용량에서조차 이러한 측정치에도 불구하고, 예를 들어 헤모글로빈의 용량 의존성 감소는 시노물구스 원숭이에서 관찰된다.

[0511] **실시예 17: 시노물구스 원숭이에서 약물동태학적 특성의 결정**

[0512] 단일 용량 약물동태학 연구에서 발명자들의 지식에 따라, 동물들은 그룹(수컷 및 암컷 포함)당 n=2 내지 4 마리의 원숭이의 2 내지 5개의 처리 그룹으로 무작위화될 수 있다. 동물들은 본 발명의 이중특이성 항체의 단일 IV 용량으로 투여된다(15 내지 30분에 걸쳐 주입). 처리 그룹에서 용량은 0.01 mg/kg 내지 100 mg/kg 범위이다. 투여 부피는 최대 5 mL/kg이다. 채혈은 다수의 시점, 예를 들어 이중특이성 항체의 정맥내 투여 후 0.25, 1, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 240, 336, 504(22일째), 672(29일째), 840(36일째), 1008(43일째), 1176(50일째) 및 1344h (57일째)에 실험 프로토콜에 따라 진행된다. 동물 및 시점당 대략 2 mL의 혈액 샘플이 수집된다. 항체의 농도는 혈청 또는 혈장에서 측정되었다. ELISA 테스트는 농도를 측정하기 위해 수행되고 확인된다. 각각의 샘플은 이중 측정된다.

[0513] 농도 시간 곡선으로부터, Cmax, 클리어런스, 제거 반감기, 곡선하 면적 등과 같은 PK 파라미터는 산업 표준 소프트웨어(Phoenix WinNonlin; 비구획 분석)를 이용하여 결정될 수 있다.

[0514] CEAxCD47 카파-람다 이중특이성 항체의 제거 반감기는 3 내지 14일의 범위에 있는 것으로 예상되는데, 이는 환자에 대한 q1w 또는 q2w 또는 q3w 또는 q4w 투여를 시사한다.

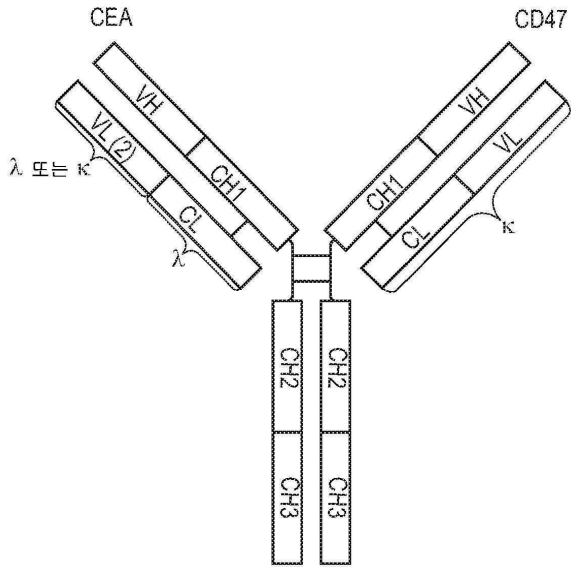
[0515] **실시예 18: 세드 CEA의 존재 하에서 이중특이성 항체에 의해 매개된 ADCP**

[0516] 타겟 세포로서 사용된 MKN45 세포는 칼세인 AM으로 염색된다. 병행하여, 농도의 테스트된 항체는 고정 용량(200 ng/mL)의 시판되는 세드 CEA(BioRad)의 존재 또는 부재 하에서 인큐베이션된다. 이러한 인큐베이션 후, 염색된 MKN-45는 세드 CEA와 미리 혼합된 항체를 이용하여 실온에서 20분 동안 흡소닌화된다. 그 후, 마이크로플레이트 웰에 부착하는 마크로파지(칼세인 레드 오렌지로 염색됨)는 1:3의 이펙터:타겟 세포 비율로 흡소닌화된 표지된 타겟 종양 세포와 함께 37°C에서 2.5 시간 동안 동시 인큐베이션된다. ADCP는 1 mg/mL의 인간 hIgG의 존재 하에서 수행된다. 인큐베이션 기간의 말미에, 상등액은 완전 배양 배지로 대체되고, 마이크로플레이트는 CellInsight™ CX5 고 함량 스크리닝 플랫폼을 이용하여 이미징된다. 웰당 1500개의 마크로파지가 획득되고, 분석된다. 식작용은 이중 양성 이벤트(마크로파지 + 포식된 타겟 종양 세포)로서 입증되고, 식작용 지수는 CellInsight™ 제조사의 소프트웨어에 의해 계산된다. 결과는 도 20b에 도시되어 있다.

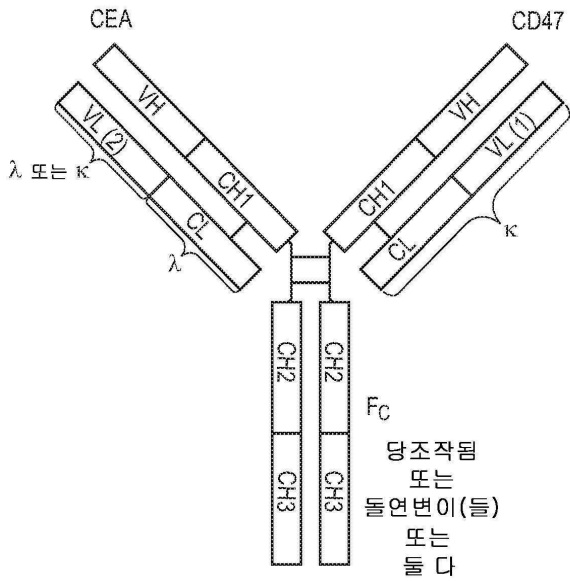
- [0517] **실시예 19: CEA-TCB 및 CEA-TCB1의 존재 하에서 이중특이성 항체에 의해 매개된 ADCP**
- [0518] 타겟 세포로서 사용된 칼세인 AM-표지된 MKN45 세포는 고정 용량의 CEA-TCB(300 nM) 또는 CEA-TCB1(30 nM)의 존재 또는 부재 하의 RT에서 20분 동안 미리 인큐베이션되었다. 이러한 인큐베이션 후, 상이한 농도의 테스트된 항체가 적절한 웰 내에 20분 동안 첨가되었다. 그 후, 마이크로플레이트 웰에 부착하는 마크로파지(칼세인 레드 오렌지로 염색됨)는 1:3의 이펙터:타겟 세포 비율로 옅소닌화된 표지된 타겟 종양 세포와 함께 37°C에서 2.5 시간 동안 동시 인큐베이션된다. ADCP는 1 mg/mL의 인간 hIgG의 존재 하에서 수행된다. 인큐베이션 기간의 말미에, 상등액은 완전 배양 배지로 대체되고, 마이크로플레이트는 CellInsight™ CX5 고 함량 스크리닝 플랫폼을 이용하여 이미징된다. 웰당 1500개의 마크로파지가 획득되고, 분석된다. 식작용은 이중 양성 이벤트(마크로파지+포식된 타겟 종양 세포)로서 입증되고, 식작용 지수는 CellInsight™ 제조사의 소프트웨어에 의해 계산된다.
- [0519] 도 18은 첨가된 CEA-TCB 및 CEA-TCB1 둘 다 K2AC22에 유도된 식작용을 감소시키지 않음을 나타낸다. 놀랍게도, K2AC22의 식작용은 30 nM의 CEA-TCB1의 첨가에 의해 약간이지만 증가되었다.
- [0520] **실시예 20: CD47xCEA 및 CEAxCD3의 조합에 의한 사멸 어세이**
- [0521] 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)는 버피 코트로부터 단리되었다. 이들 PBMC의 일부는 (T 세포의 소스로서 사용되기 위해) 동결 매체(90% FCS 10% DMSO) 중에서 동결되었고, 일부는 (식작용 섹션에서 설명된 바와 같이) 마크로파지를 제조하기 위해 사용되었다. 마크로파지 분화의 6일 후, 세포는 96웰 플레이트에 플레이팅되었고, 37°C에서 인큐베이션되었다. 어세이 당일(마크로파지 플레이팅하고 2일 후), 상응하는 마크로파지 공여자 유래의 동결된 PBMC는 해동되었고, 마크로파지 플레이트에 첨가되었다. 타겟 세포(루시퍼라아제를 발현하도록 조작된 MKN45)는 특정 농도의 CEAxCD47 이중특이성 항체와 함께 특정 농도에서 항체, 즉 CEAxCD3 T 세포 이중특이성 항체의 조합으로 옅소닌화되었다. 옅소닌화된 타겟은 마크로파지 및 자가 PBMC를 함유하는 플레이트에 첨가되었고; 플레이트는 37°C에서 48h 동안 인큐베이션되었다. 48 h 후, 웰 배지의 1/2은 제거되었고, 150 µg/mL의 최종 농도를 얻기 위해 2X 루시페린 용액이 플레이트에 첨가되었다. RT에서 5분 동안 인큐베이션한 후, 플레이트는 Synergy NEO를 이용하여 판독되었다. 생존율은 발광값(- 백그라운드)을 단지 타겟 세포만을 함유하는 대조군으로 나누고 100을 곱함으로써 계산되었다. 그 후, 사멸율은 생존율을 100까지 감하여 외삽되었다.
- [0522] 도 19a 및 b는 다양한 농도에서 CEA-TCB 및 K2AC5 및 K2AC22의 조합을 이용하여 얻은 결과를 나타낸다.
- [0523] 본 출원에 인용된 폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩타이드 서열 둘 다를 포함하는 모든 간행물, 특허, 특허출원, 인터넷 사이트, 및 수탁번호/테이터베이스 서열은 각각의 간행물, 특허, 특허출원, 인터넷 사이트, 및 수탁번호/테이터베이스 서열이 구체적으로 및 개별적으로 참고 인용되는 것으로 나타내는 바와 같이 동일한 정도로 모든 목적을 위해 그 전체 내용이 본 출원에 참고 인용된다.

도면

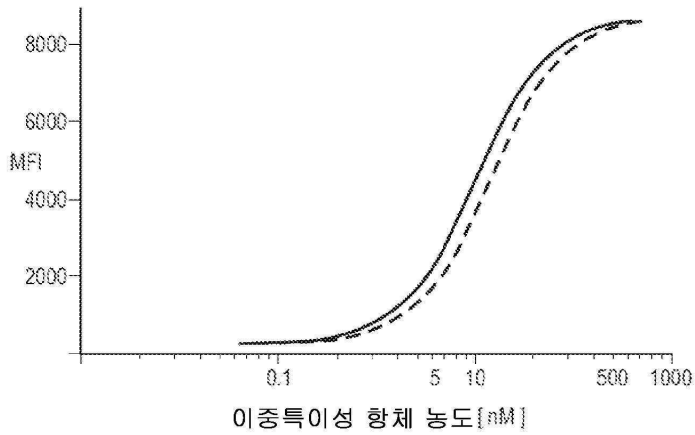
도면1a



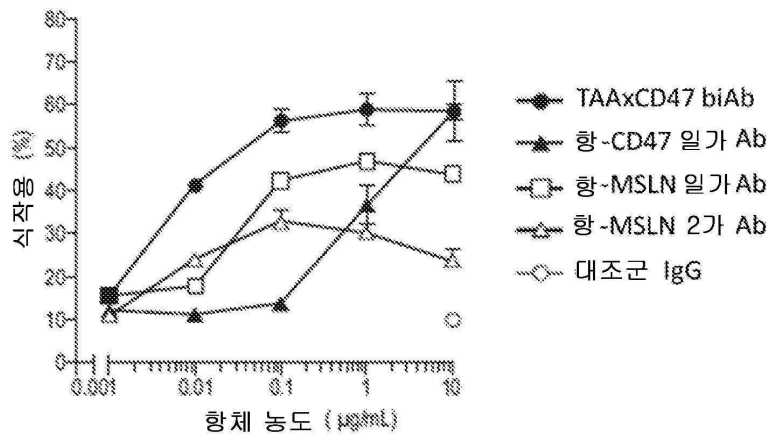
도면1b



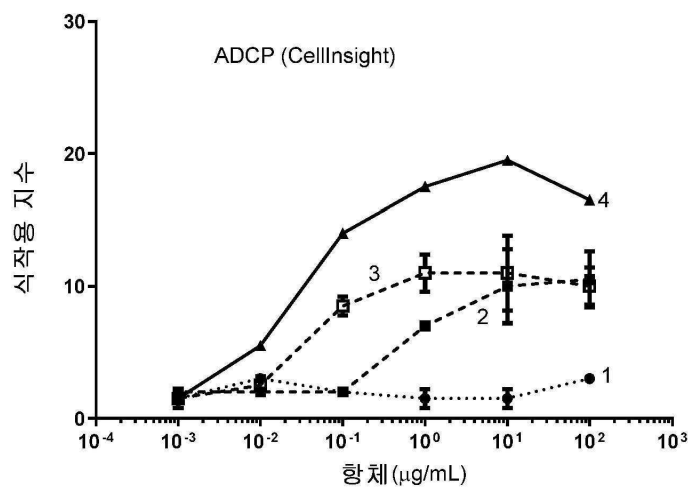
도면2



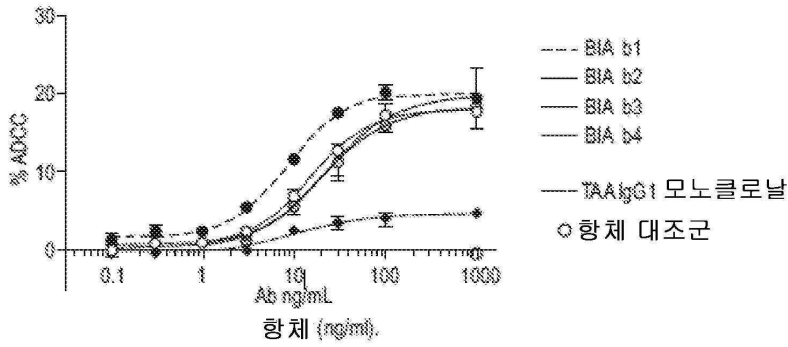
도면3a



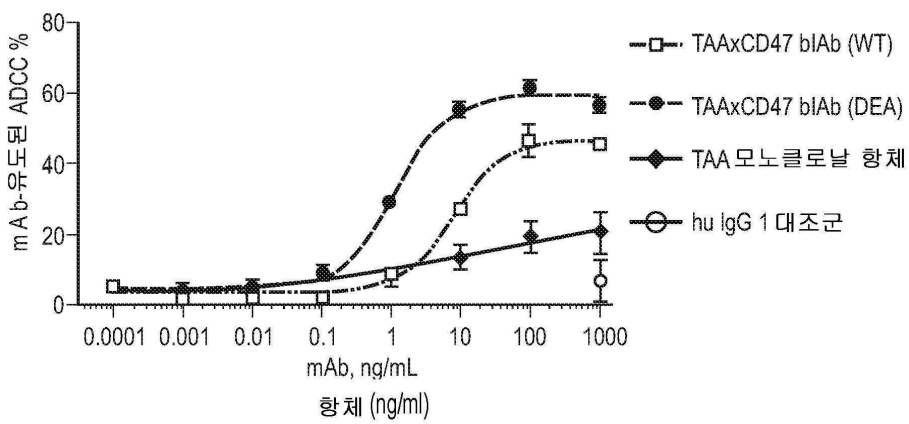
도면3b



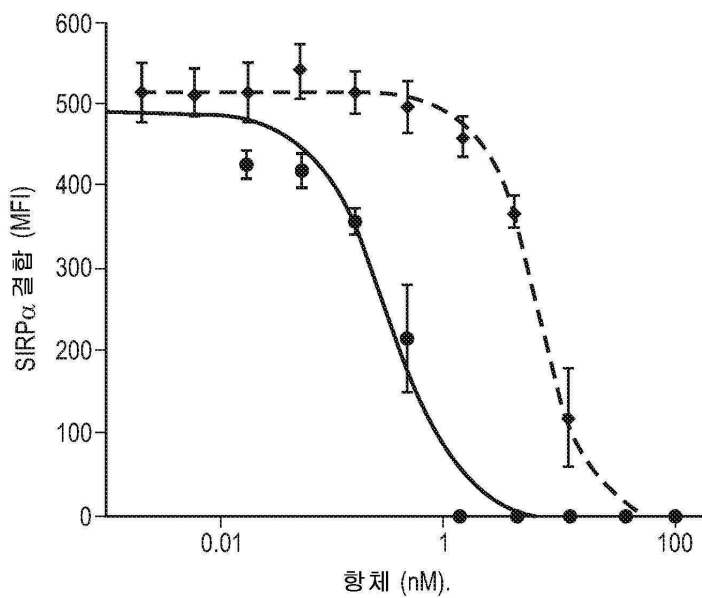
도면4



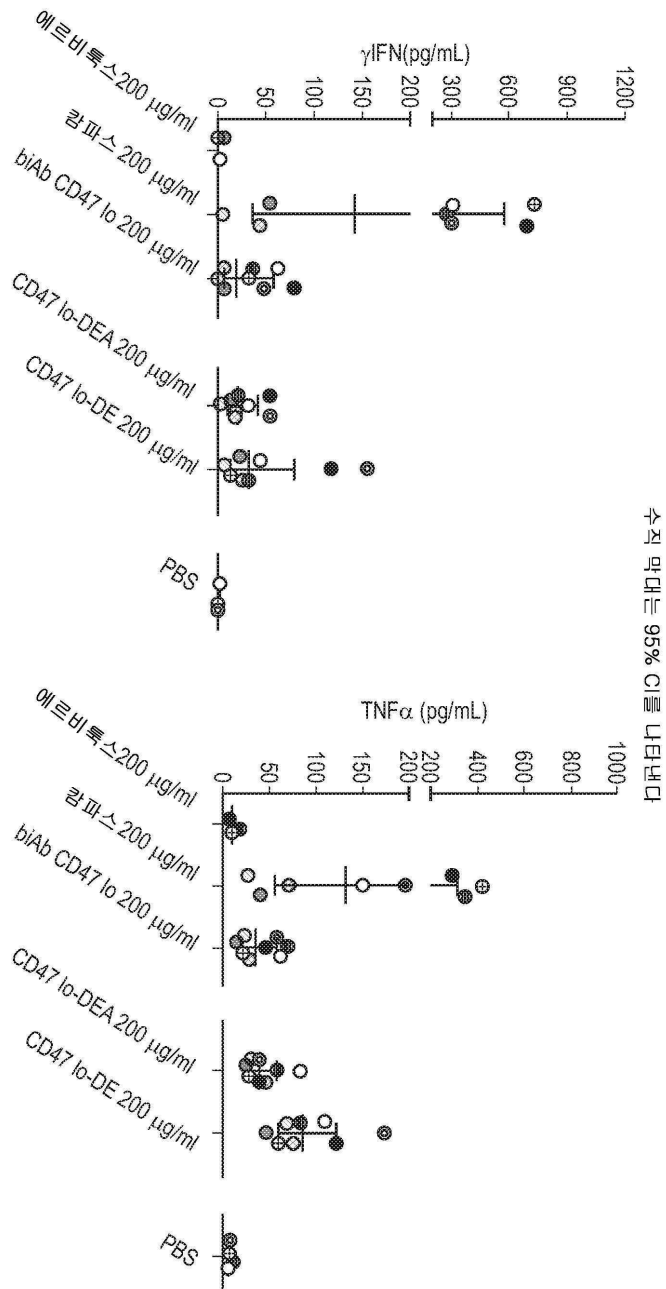
도면5



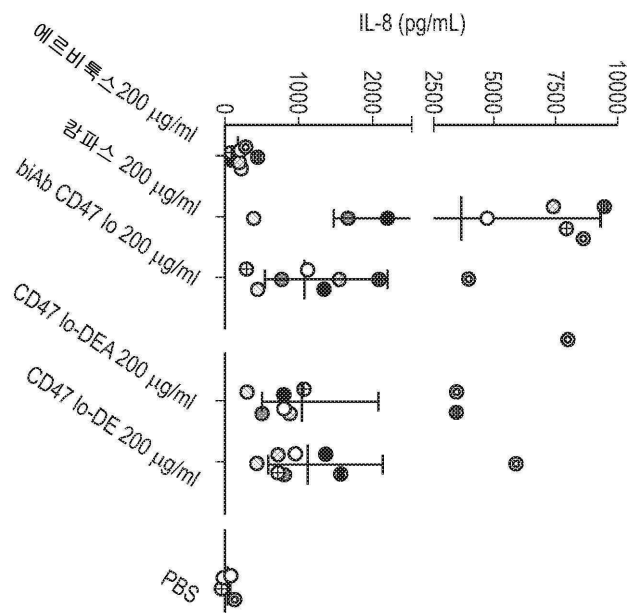
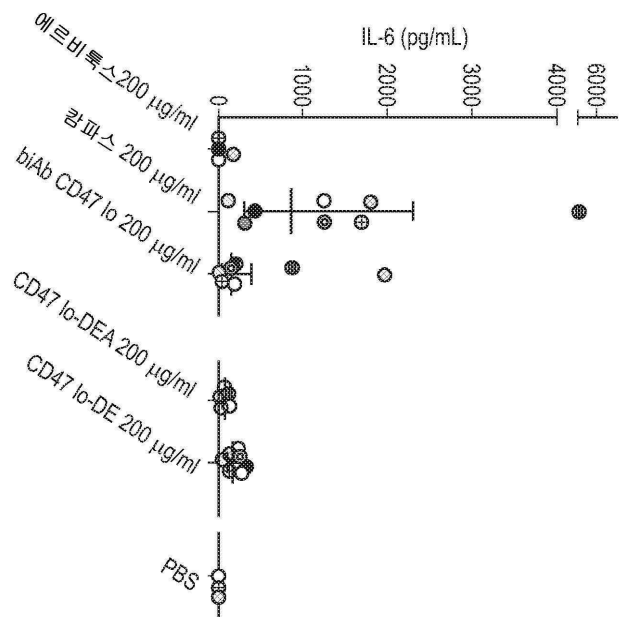
도면6



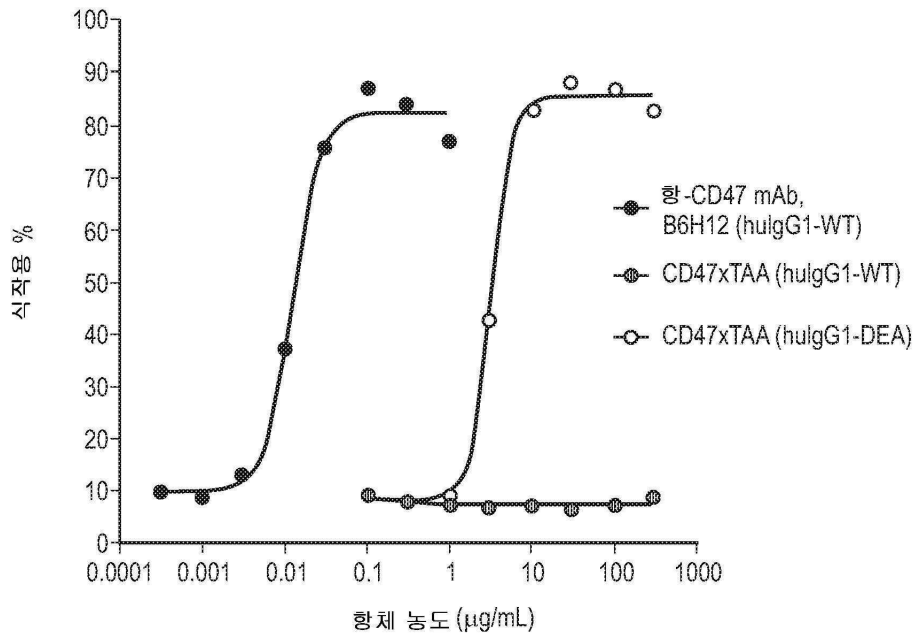
도면7a



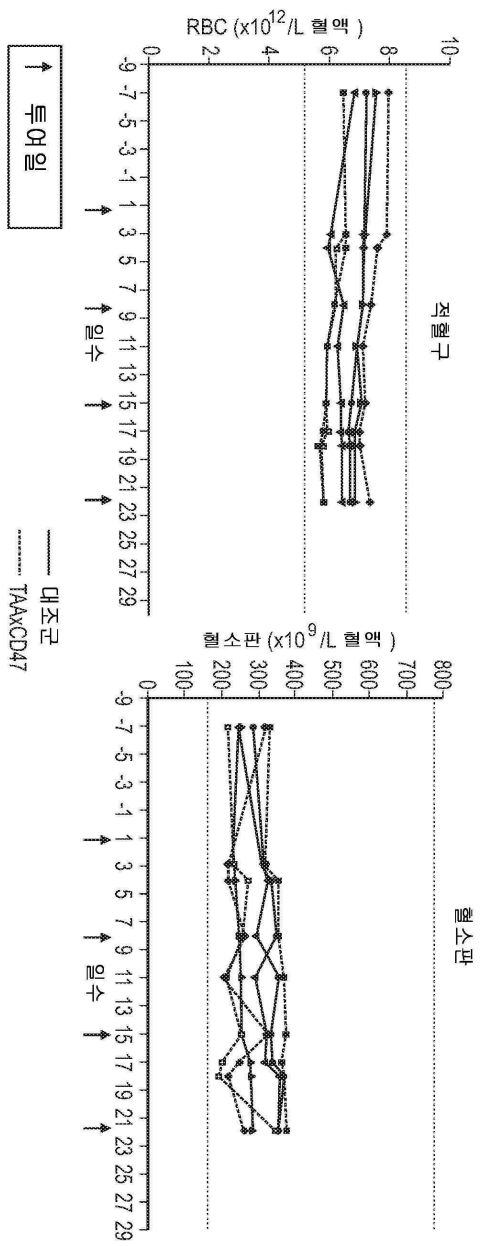
도면7b



도면8



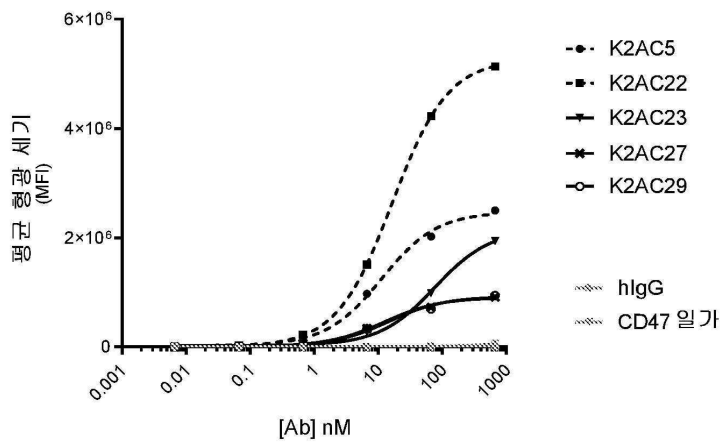
도면9



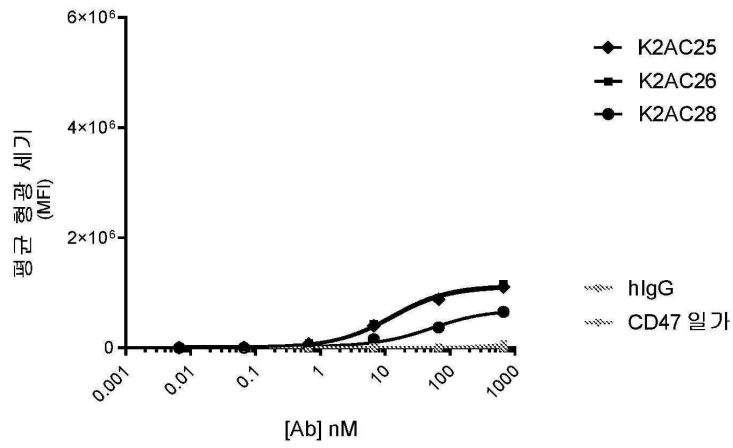
도면10



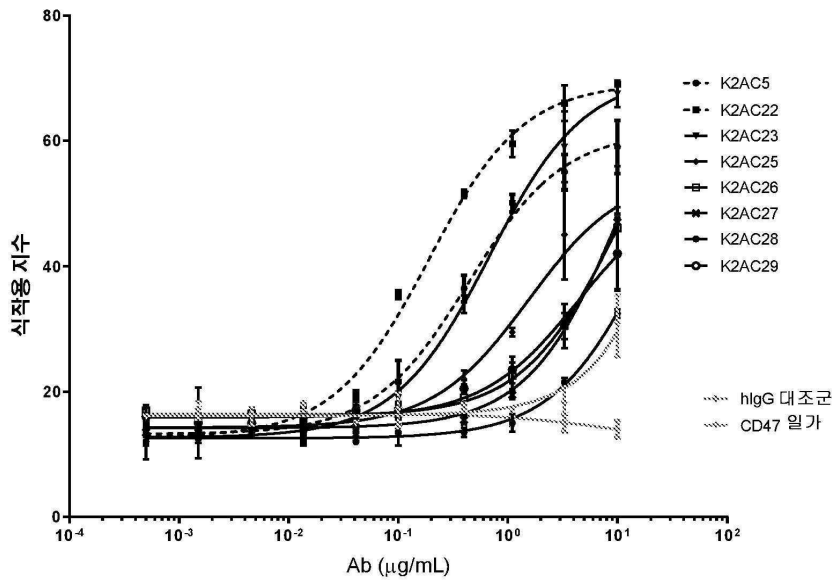
도면11a



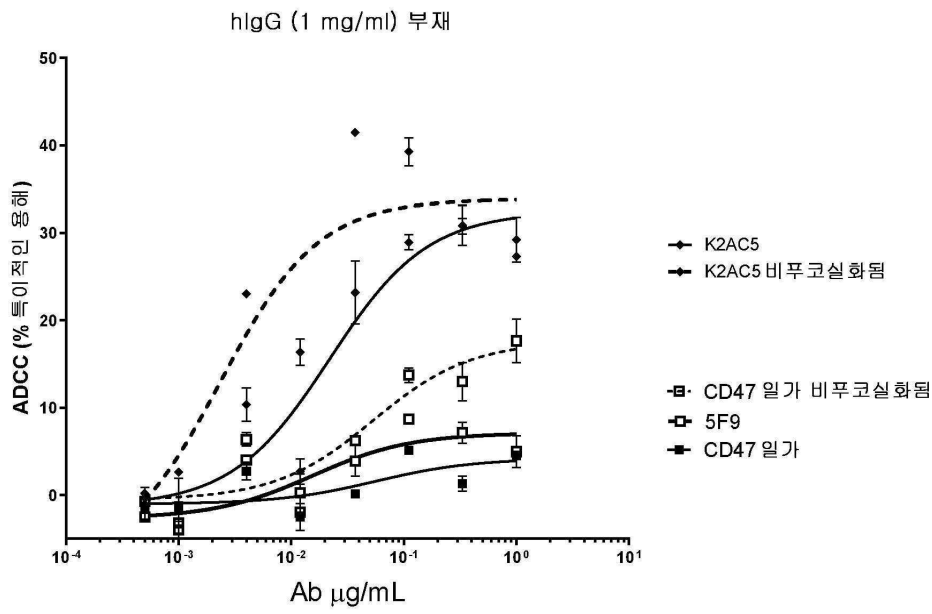
도면11b



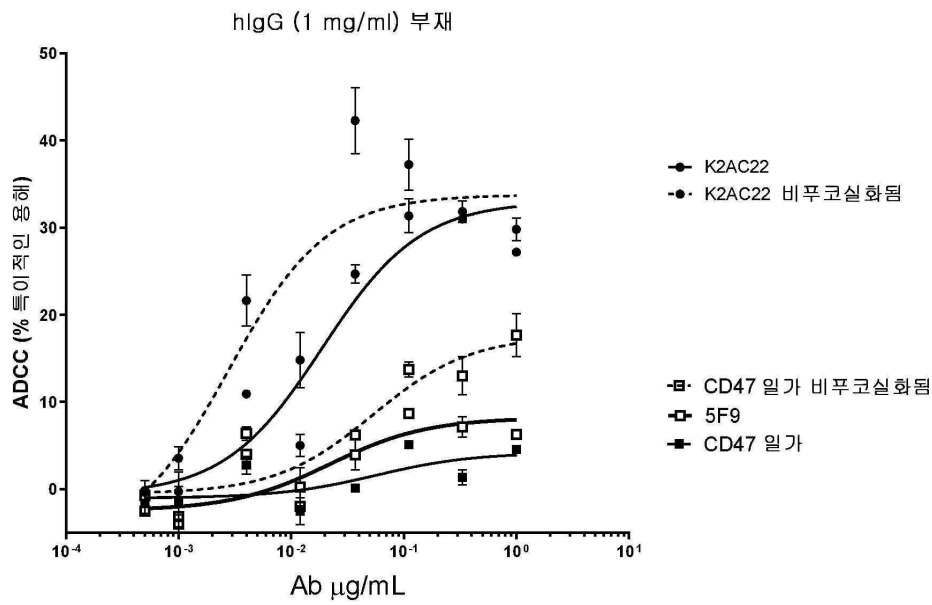
도면12



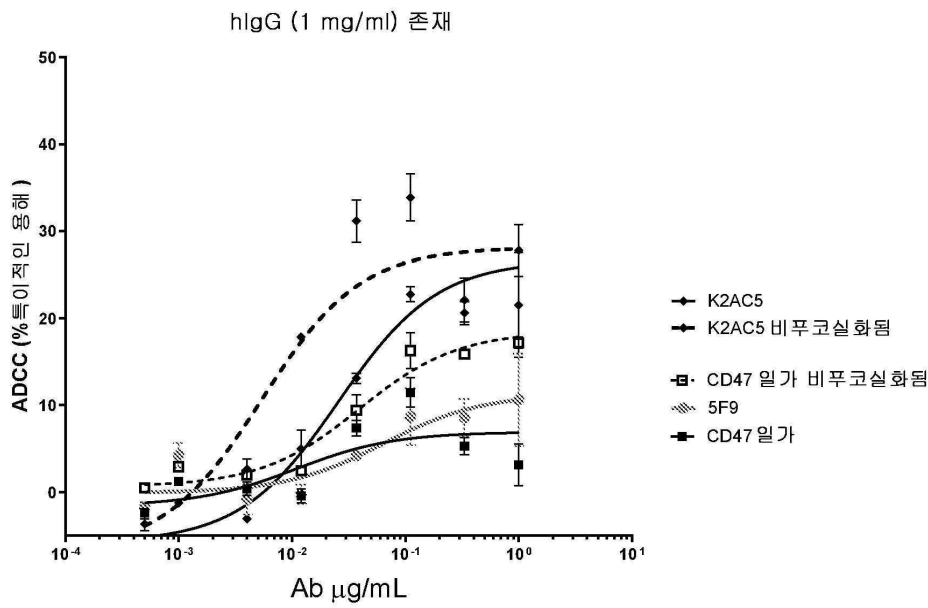
도면13a



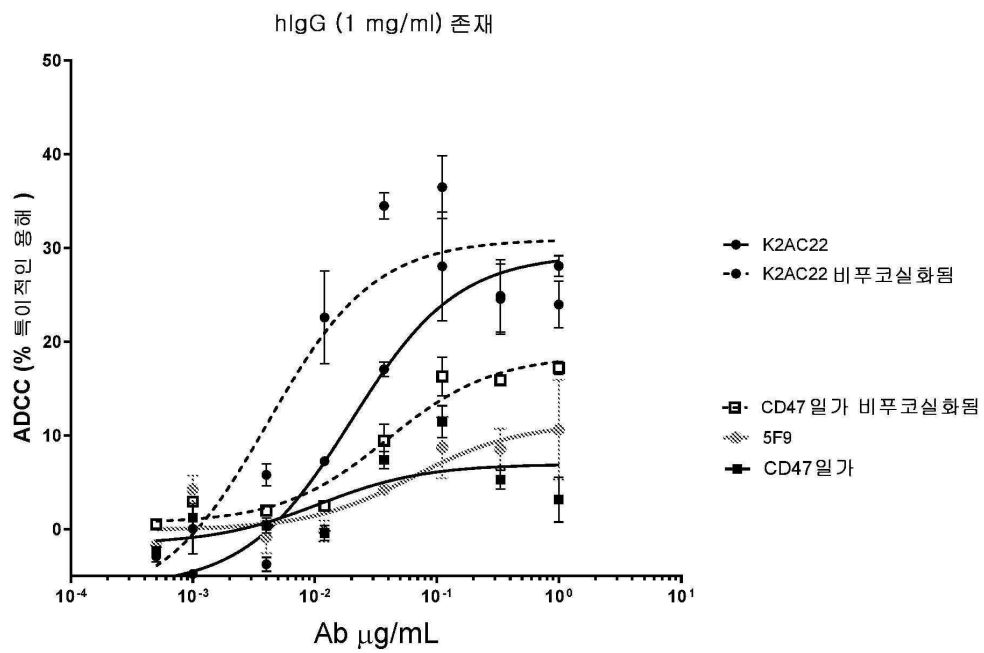
도면13b



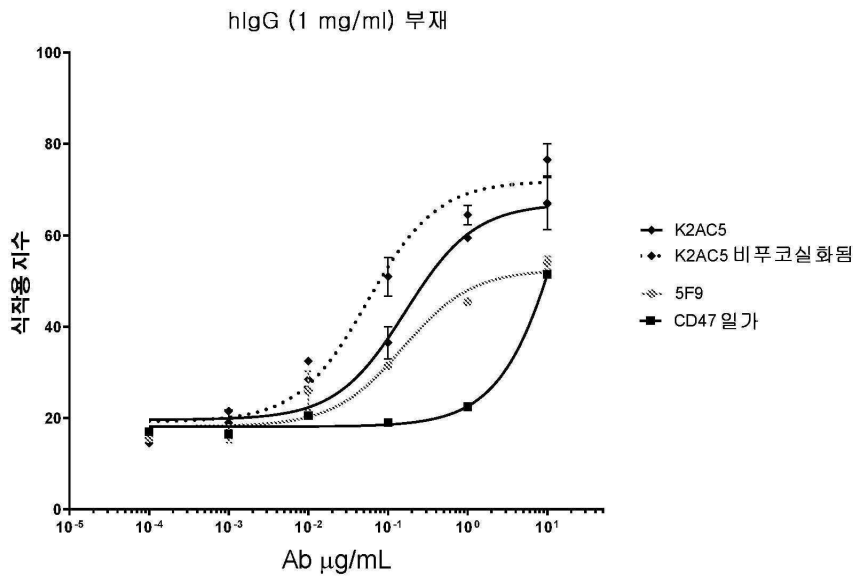
도면14a



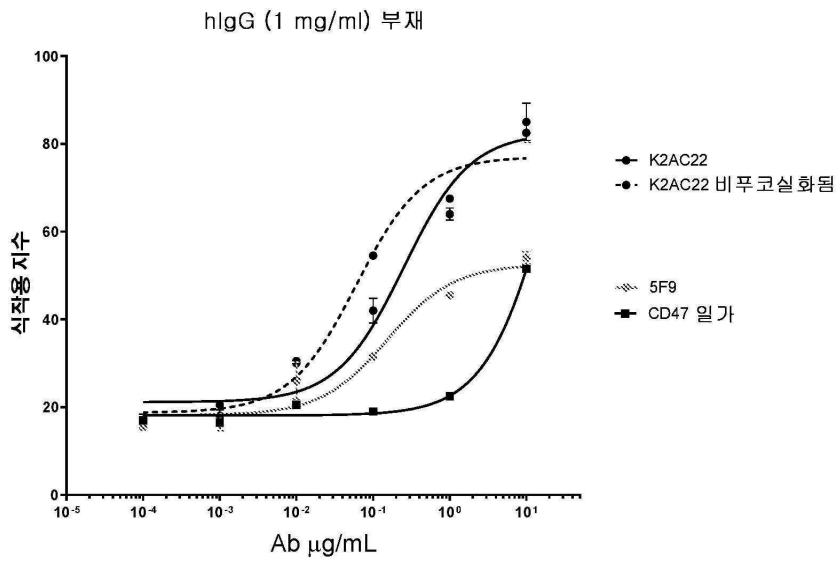
도면14b



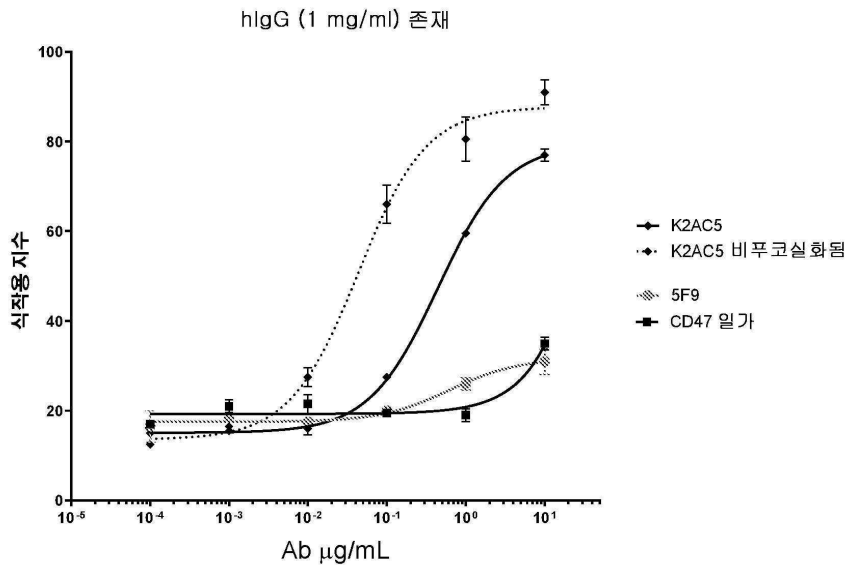
도면15a



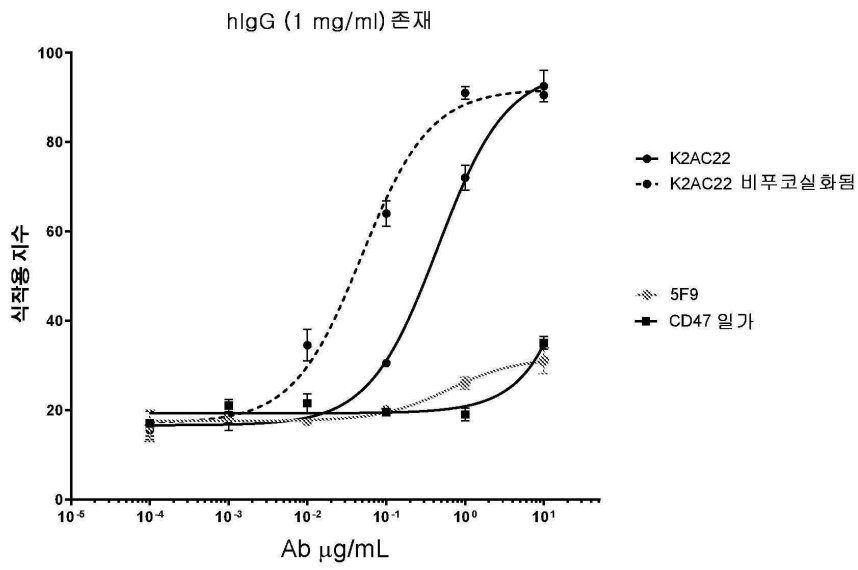
도면15b



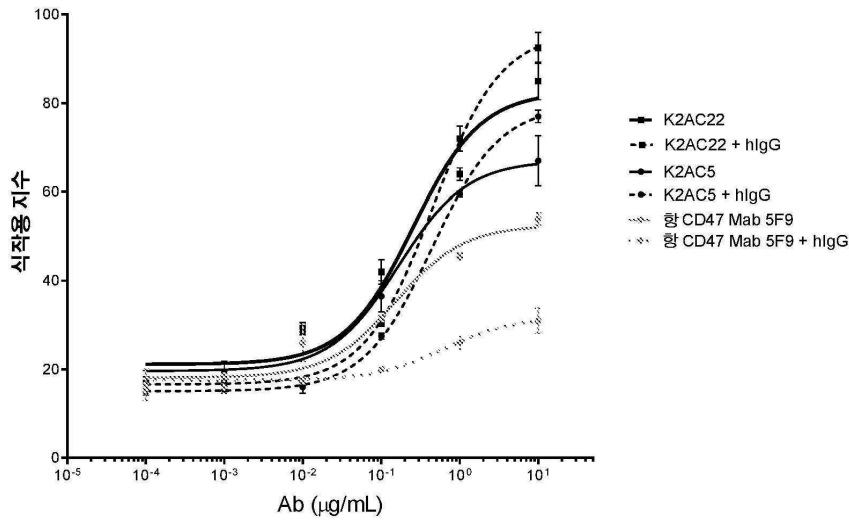
도면16a



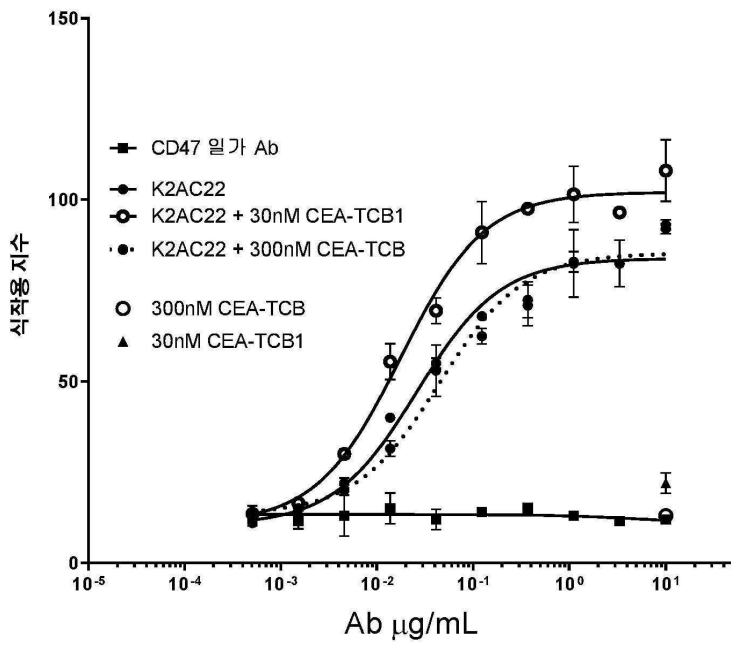
도면16b



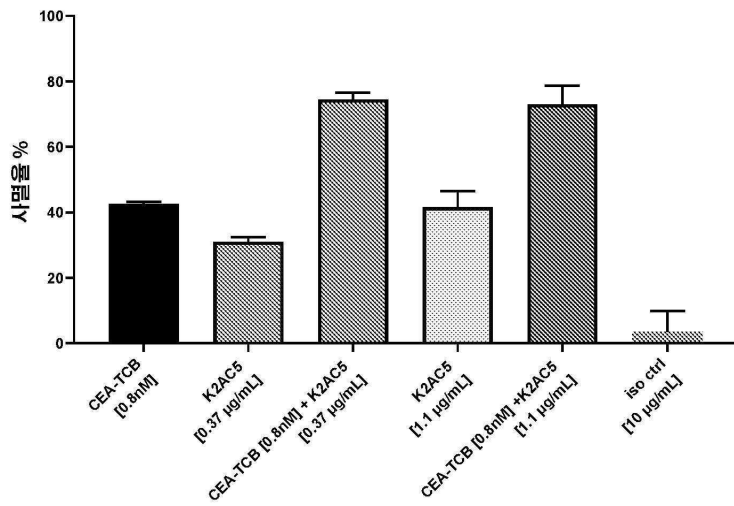
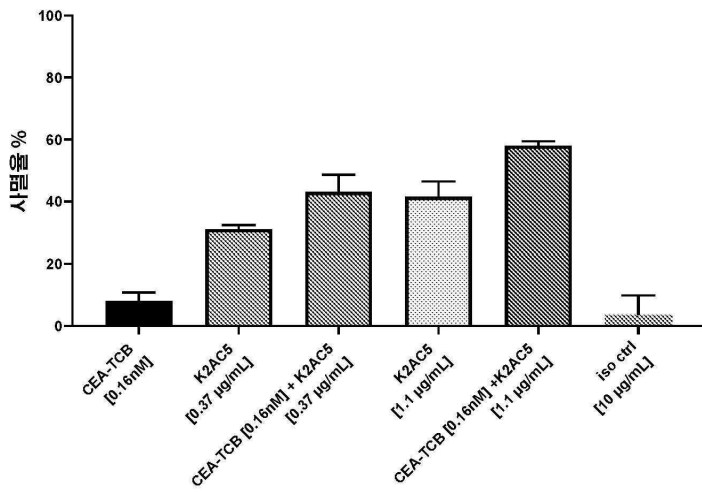
도면17



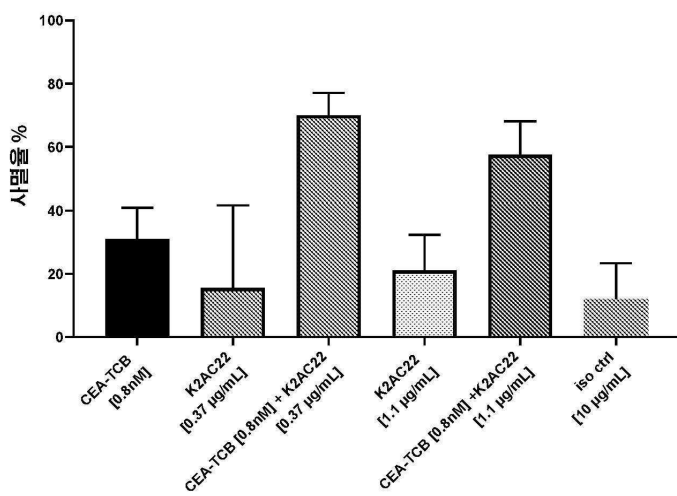
도면18



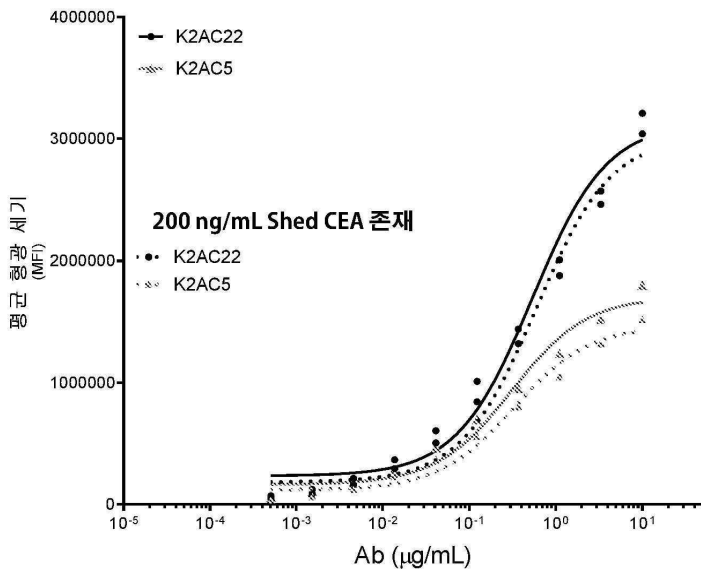
도면19a



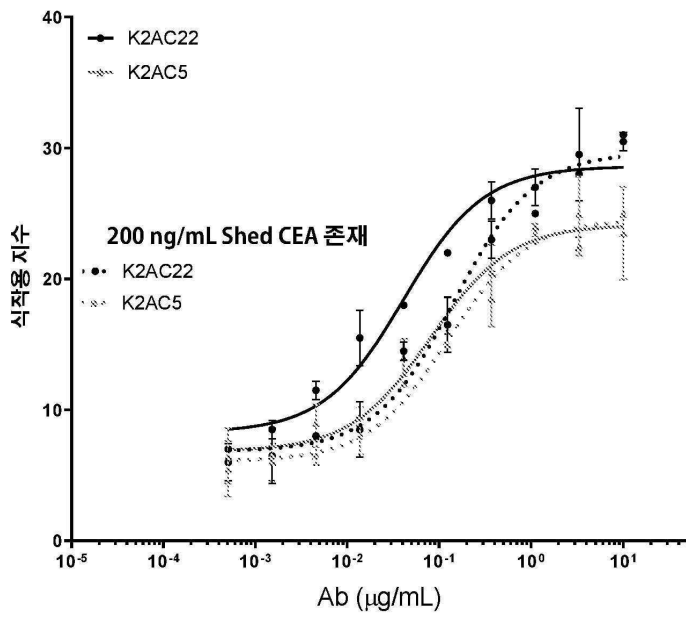
도면19b



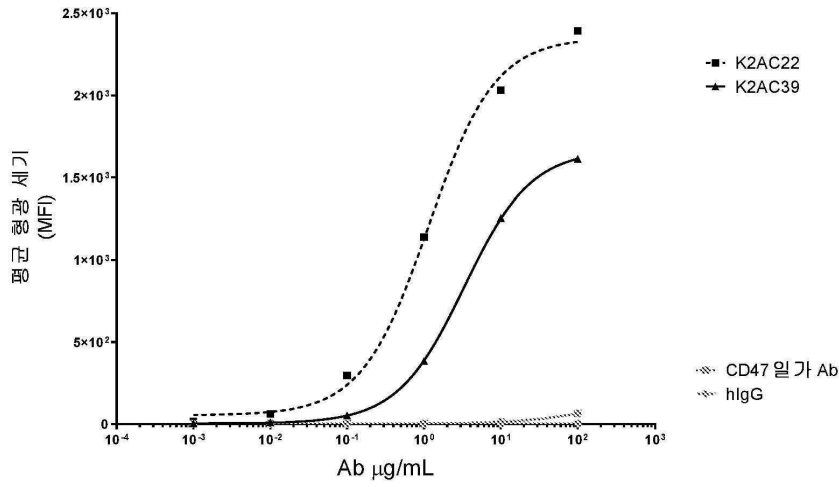
도면20a



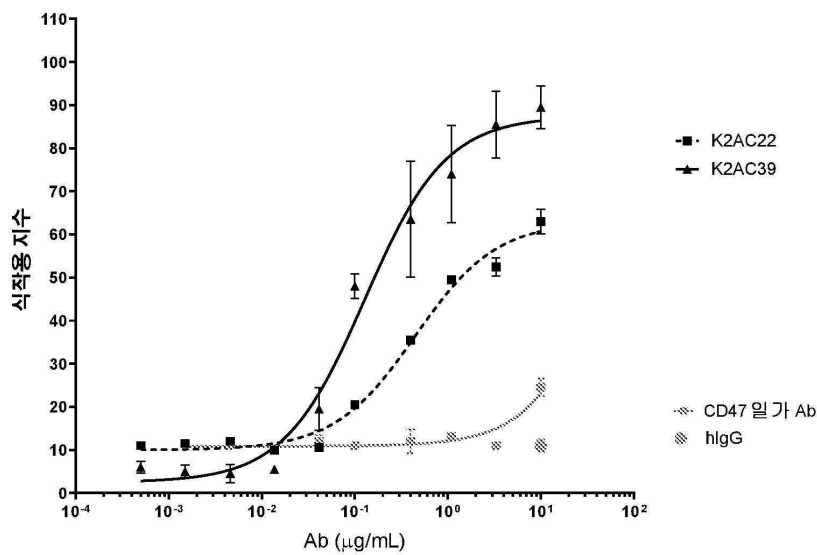
도면20b



도면21a



도면21b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> LamKap Bio beta Ltd.

<120> BISPECIFIC ANTIBODIES AGAINST CEACAM5 AND CD47

<130> 4130.002PC08

<150> EP18175655.2

<151> 2018-06-03

<150> EP18175656.0

<151> 2018-06-03

<150> EP18175657.8
<151> 2018-06-03
<150> EP18175658.6
<151> 2018-06-03
<150> EP18188788.6
<151> 2018-08-13
<150> EP18188790.2
<151> 2018-08-13
<150> EP18188792.8
<151> 2018-08-13
<150> EP18190983.9
<151> 2018-08-27
<160> 116
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1

<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Mab CD47 CDRH1
<400> 1
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Mab CD47 CDRH2
<400> 2
Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr
1 5

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Mab CD47 CDRH3

<400> 3

Ala Lys Ser Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr

1 5

<210> 4

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CD47 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> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CD47 HC

<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 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> 6

<211> 1338

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CD47 HC

<400> 6

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt cgccaggct 120

ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtgtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaagtat 300

gtgcttttg actactgggg ccaggaacc ctggtcacag tctcagcgc ctccaccaag 360
 ggcccatcgg tcttcccctt ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 420
 ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccggtga cagtctctg gaactcagga 480
 gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 540
 ctcagcagcg tggtagctgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac 600
 gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagagag ttgagcccaa atcttgtgac 660
 aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc 720

ctcttcccc caaaaccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 780
 gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 840
 gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 900
 gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag gactggetga atggcaagga gtacaagtgc 960
 aaggtctcca acaaagcctt cccagcccc atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg 1020
 cagccccgag aaccacaggt gtataacctg ccccatctc gggaggagat gaccaagaac 1080
 caggtcagcc tgacttgctt ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1140

gagagcaacg ggcagccgga gaacaactac aagaccagc ctcccgtgct ggactccgac 1200
 ggctccttct tctctatag caagctcacc gtggacaagt ccaggtggca gcaggggaac 1260
 gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacagca gaagagcctc 1320
 tcctgtctc cgggttaa 1338

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CD47 CDRL1

<400> 7

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

1 5

<210> 8

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MabCd47 CDRL2

<400> 8

Ala Ala Ser Ser

1

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CD47 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> Mab CD47 VL

<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> Mab CD47 LC

<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

Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu
 50 55 60

Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser
 65 70 75 80

Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser
 85 90 95

Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro
 100 105 110

Thr Glu Cys Ser
 115

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 14

gctggaagca ttatgtgtg aagc 24

<210> 15

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 15

gtgagtacat tcattgtact gtg 23

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 16

ttgtgtgact cttactctc agag 24

<210> 17

<211> 25

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 17
 gaggccactt gtgtagcgcc aagtg 25
 <210> 18
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 18
 gtgagtccat ggctgtcact g 21
 <210> 19
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 19
 cctgacttgg ctattctcag 20
 <210> 20
 <211> 121

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mab CEA variable heavy chain
 <400> 20
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe			
	20	25	30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
	35	40	45
Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe			
50	55	60	

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 21

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA variable light chain

<400> 21

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Epitope of CD3 epsilon

<400> 22

Gln Asp Gly Asn Glu

1 5

<210> 23

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CD47 HC-DE

<400> 23

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 Asp 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 Glu 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

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 Ala Gly Pro Asp 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 Glu 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> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CD47 CDRH1

<400> 25

Ser Tyr Ala Met Ser

1

5

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CD47 CHRH2

<400> 26

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

1

5

10

15

Gly

<

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CD47 CDRH3

<400> 27

Ser Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr

1

5

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CD47 CDRL1; KA3

<400> 28

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CD47 CDRL2; KA3

<400> 29

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CD47 CDRL3; KA3

<400> 30

Gln Gln Met His Pro Arg Ala Pro Lys Thr

1 5 10

<210> 31

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA CDRL1; 1D9 (AC5)

<400> 31

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

1 5 10

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA CDRL2; 1D9 (AC5)

<400> 32

Ala Gly Asn Leu Arg Pro Ser

1 5

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA CDRL3; 1D9 (AC5)

<400> 33

Gly Thr Trp Asp Phe Asn Tyr Gly Val Val

1 5 10

<210> 34

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA CDRL1; 1G6 (AC22)

<400> 34

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

1 5 10

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA CDRL2; 1G6 (AC22)

<400> 35

Phe Asp Asn Leu Arg Pro Ser

1 5

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA CDRL3; 1G6 (AC22)

<400> 36

Gly Thr Trp Asp Phe Ser Tyr Gly Ile Val

1 5 10
 <210> 37
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mab CEA CDRL1; 1D5 (AC10)
 <400> 37
 Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Tyr Ala Asn Ser Asn Val His

1 5 10
 <210> 38
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mab CEA CDRL2; 1D5 (AC10)
 <400> 38
 Ser Gly Ser Asn Arg Pro Ser

1 5
 <210> 39
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mab CEA CDRL3; 1D5 (AC10)
 <400> 39
 Gln Ser Tyr Asp Pro Ala His Asn Leu Leu Thr Ala Val

1 5 10
 <210> 40
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mab CEA CDRL1, 2B8 (AC13)
 <400> 40
 Thr Gly Thr Ser Ser Asn Val Arg Tyr Ala Ala Gly Val Ser

1 5 10

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA CDRL2; 2B8 (AC13)

<400> 41

Glu Val Ser Asn Arg Pro Ser

1 5

<210> 42

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA CDRL3; 2B8 (AC13)

<400> 42

Ser Ser Trp Asp Phe Glu His Gly Pro Ala Ala Lys Val

1 5 10

<210> 43

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA CDRL1; 1A2 (AC18)

<400> 43

Gly Gly Asn Gly Ile Gly Asp Ala Ser Val His

1 5 10

<210> 44

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA CDRL2; 1A2 (AC18)

<400> 44

Ser Thr Thr Thr Arg Pro Ser

1 5

<210> 45

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Mab CEA CDRL3; 1A2 (AC18)

<400> 45

Gln Val Trp Asp Gly Phe Gly Pro Arg His Arg Ala Val

1 5 10

<210> 46

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA CDRL1; 1A8 (AC23)

<400> 46

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

1 5 10

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA CDRL2; 1A8 (AC23)

<400> 47

Ala Thr Asn Thr Arg Pro Ser

1 5

<210> 48

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA CDRL3; 1A8 (AC23)

<400> 48

Ala Ala Trp Asp Phe Ser Tyr Lys Val Val

1 5 10

<210> 49

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA CDRL1; 2F4 (AC25)

<400> 49

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ile Thr Pro Val Ser

1 5 10

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA CDRL2; 2F4 (AC25)

<400> 50

Ser Asn Asn Phe Arg Pro Ser

1 5

<210> 51

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA CDRL3; 2F4 (AC25)

<400> 51

Gly Thr Trp Asp Arg Thr Gly His Glu Ile Arg Pro Val

1 5 10

<210> 52

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA CDRL1; 2F7 (AC26)

<400> 52

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

1 5 10

<210> 53

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA CDRL2; 2F7 (AC26)

<400> 53

Ser Asn Ser Ile Arg Pro Ser

1 5

<210> 54

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA CDRL3; 2F7 (AC26)

<400> 54

Ser Ser Tyr Asp Pro Arg Gly Asn Leu Leu Ile Arg Val

1 5 10

<210> 55

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA CDRL1; 2C11 (AC27)

<400> 55

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

1 5 10

<210> 56

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA CDRL2; 2C11 (AC27)

<400> 56

Asn Asn Ser Asp Arg Pro Ser

1 5

<210> 57

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA CDRL3; 2C11 (AC27)

<400> 57

Gln Ser Tyr Asp Gly Tyr Asn Met Leu Thr Ala Val

1 5 10

<210> 58

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA CDRL1; C11 (AC28)

<400> 58

Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Asn Asp Ile Thr Val His

1 5 10

<210> 59

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA CDRL2; C11 (AC28)

<400> 59

Gly Tyr Asn Ala Arg Pro Ser

1 5

<210> 60

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA CDRL3; C11 (AC28)

<400> 60

Gln Ser Trp Asp Gly His Gly Ser Ala Tyr Val

1 5 10

<210> 61

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA CDRL1; 2B5 (AC29)

<400> 61

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Glu Phe Thr Asn Gly Val Ser

1 5 10

<210> 62

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA CDRL2; 2B5 (AC29)

<400> 62

Gly Phe Ser Ser Arg Pro Ser

1 5

<210> 63

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA CDRL3; 2B5 (AC29)

<400> 63

Ser Ser Tyr Asp Pro Pro Trp His Leu Leu Ala Arg Val

1 5 10

<210> 64

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA 1D9 VLCL2 CEA (AC5)

<400> 64

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 Ala Gly Asn Leu 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 Asn Tyr

85 90 95

Gly Val 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> 65

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA 1G6 VLCL2 CEA (AC22)

<400> 65

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 Ala Asn Gly

20 25 30

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

35 40 45

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

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

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

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

 180 185 190
 Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
 195 200 205
 Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215
 <210> 69
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA 1A8 VLCL2 CEA (AC23)

<400> 69

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Tyr Gly
 20 25 30

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

Ile Tyr Ala Thr Asn Thr Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Phe Ser Tyr
 85 90 95

Lys Val 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> 70

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA 2F4 VLCL2 CEA (AC25)

<400> 70

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 Thr
 20 25 30
 Pro Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Ser Asn Asn Phe 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 Arg Thr Gly
 85 90 95
 His Glu Ile Arg Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110
 Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
 115 120 125
 Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
 130 135 140
 Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
 145 150 155 160
 Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
 165 170 175
 Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
 180 185 190
 Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
 195 200 205
 Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr
 195 200 205
 Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215
 <210> 72
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mab CEA 2C11 VLCL2 CEA
 <400> 72
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Tyr Ala
 20 25 30
 Asp Lys Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Asn Asn Ser Asp Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Gly Tyr
 85 90 95
 Asn Met Leu Thr Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110
 Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
 115 120 125
 Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
 130 135 140
 Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
 145 150 155 160
 Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
 165 170 175

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

<210> 73

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA C11 VLCL2 CEA (AC28)

<400> 73

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

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

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

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
 165 170 175

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
 180 185 190

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
 195 200 205

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 74

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA 2B5 VLCL2 CEA (AC29)

<400> 74

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

1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Glu Phe Thr
 20 25 30

Asn Gly Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Gly Phe Ser Ser Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu

65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Asp Pro Pro
 85 90 95

Trp His Leu Leu Ala Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val
 100 105 110

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

Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser

<220><223> Nucleic acid 1G6 VLCL2 CEA (AC22)

<400> 76

cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcgcccc caggacagaa ggtcaccatc 60
 tcctgctctg gaagcagctc caacattgct aatgggattg tatcctggta ccagcagctc 120
 ccaggaacag cccccaaact cctcatttat ttgataatc ttcgaccctc agggattcct 180
 gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccacce tgggcatcac cggactccag 240
 actggggacg aggccgatta ttactgcgga acatgggatt ttagttatgg tattgtgttc 300

ggcggaggga ccaagctgac cgtcctaggt cagcccaagg ctgccccctc ggtcactctg 360
 ttccccctt cctctgagga gcttcaagcc aacaaggcca cactgggtgtg tctcataagt 420
 gacttctacc cgggagccgt gacagtggct tggaaagcag atagcagccc ggtcaaggcg 480
 ggagtggaga ccaccacacc ctccaacaa agcaacaaca agtacgcggc cagcagctat 540
 ctgagcctga cgctgagca gtggaagtcc cacagaagct acagctgcca ggtcacgcat 600
 gaaggagca ccgtggagaa gacagtggcc cctacagaat gttcataa 648

<210> 77

<211> 660

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid 1D5 VLCL2 CEA (AC10)

<400> 77

cagtctgtgc tgacgcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
 tcctgcactg ggagcagctc caacatctat gcgaatagta atgtacctg gtaccagcag 120
 cttccaggaa cagcccccaa actcctcctc tattctggta gcaatcggcc ctccagggctc 180
 cctgaccgat tccttggtc caagctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
 caggtcagag atgaggtcga ttattactgc cagtctatg atcccgcga caacttgctc 300
 actgctgtgt tcggcggagg gaccaagctg accgtctag gtcagcccaa ggctgcccc 360

tcggtcactc tgttcccc ctcctctgag gagcttcaag ccaacaaggc cacactgggtg 420
 tgtctcataa gtgacttcta cccgggagcc gtgacagtgg cttggaaaagc agatagcagc 480
 cccgtcaagg cgggagtgga gaccaccaca cctccaac aaagcaaca caagtacgcg 540
 gccagcagct atctgagcct gacgcctgag cagtggaaagt cccacagaag ctacagctgc 600
 caggtcacgc atgaaggag caccgtggag aagacagtgg ccctacaga atgttcataa 660

<210> 78

<211> 660

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid 2B8 VLCL2 CEA (AC13)

<400> 78

cagtctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60

tcttgactg gaaccagcag taatgttagg tatgctgctg gtgtctcctg gtaccaacag 120

caccaggca aagccccaa actcatgatt tatgaggtca gtaatcggcc ctgaggggtt 180

tctaactgct tctctggctc caagtctggc aacacggcct ccctgacat ctctgggctc 240

caggctgagg acgaggctga ttattactgc agctcatggg attttgagca tggctcctgct 300

gctaaggtgt tcggcggagg gaccaagctg accgtcctag gtcagcccaa ggctgcccc 360

tcggtcactc tgttcccgc ctcctctgag gagcttcaag ccaacaaggc cacactggtg 420

tgtctcataa gtgacttcta cccgggagcc gtgacagtgg cttggaaagc agatagcagc 480

cccgtaagg cgggagtgga gaccaccaca cctccaac aaagcaaca caagtacgcg 540

gccagcagct atctgagcct gacgcctgag cagtggaagt cccacagaag ctacagctgc 600

caggtcacgc atgaaggag caccgtggag aagacagtgg ccctacaga atgttcataa 660

<210> 79

<211> 651

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid 1A2 VLCL2 CEA

<400> 79

tcctatgtgc tgactcagcc accctcagtg tcagtggccc caggaaagac ggccaggatt 60

acctgtgggg gaaacggat tggagatgcg tctgtgact ggtaccagca gaagccaggc 120

caggcccctg tgctggtcat ctattctact actacgggc cctcaggat tctgagcga 180

ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaagccggg 240

gatgaggccg actattactg tcaggtgtgg gatgggttg gtcctaggca tagggctgtg 300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtcta ggtcagccca aggctgcccc ctcggtcact 360

ctgttcccgc ctcctctga ggagcttcaa gccaacaagg ccacactggt gtgttcata 420

agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg gcttggaaag cagatagcag ccccgtaag 480

gctggagtgg agaccaccac accctccaaa caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc 540

tatctgagcc tgacgcctga gcagtggaag tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg 600

catgaagga gcaccgtgga gaagacagtg gccctacag aatgttcata a 651

<210> 80

<211> 648

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid 1A8 VLCL2 CEA (AC23)

<400> 80

cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggacct cgggcagag ggtcaccatc 60

tcttgttctg gaagcagctc caacatcggg tatgggcttg taaactggta ccagcagctc 120

ccaggaacgg ccccaaaact cctcatctat gctactaata cgcggccctc aggggtcctt 180

gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggtccag 240

tctgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatt ttagttataa ggttgtgttc 300

ggcggaggga ccaagctgac cgtcctaggt cagcccaagg ctgccccctc ggtcactctg 360

ttcccgcctt cctctgagga gttcaagcc aacaaggcca cactggtgtg tctcataagt 420

gacttctacc cgggagccgt gacagtggct tggaaagcag atagcagccc cgtcaaggcg 480

ggagtggaga ccaccacacc ctccaacaa agcaacaaca agtacgcggc cagcagctat 540

ctgagcctga cgctgagca gtggaagtcc cacagaagct acagctgcca ggtcacgcat 600

gaaggagca ccgtggagaa gacagtggcc cctacagaat gttcataa 648

<210> 81

<211> 657

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid 2F4 VLCL2 CEA (AC25)

<400> 81

cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcgccc caggacagaa ggtcaccatc 60

tctgtctctg gaagcagctc caacattggt attacgctg tatcctggta ccagcagctc 120

ccaggaacag ccccaaaact cctcatttat tctaataatt ttcgacctc agggattcct 180

gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccacce tgggcatcac cggactccag 240

actggggacg aggccgatta ttactgcgga acatgggata ggactggtca tgagattagg 300

cctgtgttcg gcggaggac caagctgacc gtcttaggtc agccaaggc tgccccctcg 360

gtcactctgt tcccgcctc ctctgaggag cttcaagcca acaaggccac actggtgtgt 420

ctcataagtg acttctacc gggagccgtg acagtggctt ggaaagcaga tagcagcccc 480

gtcaaggcgg gaggaggagac caccacaccc tccaaacaaa gcaacaacaa gtacgcggcc 540
 agcagctatc tgagcctgac gcctgagcag tggaaagccc acagaagcta cagctgccag 600
 gtcacgcatg aaggggagcac cgtggagaag acagtggccc ctacagaatg ttcataa 657
 <210> 82
 <211> 660
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Nucleic acid 2F7 VLCL2 CEA
 <400> 82
 cagctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60

 tctgactg gaaccagcag tgacgttaag tatgcgaatg cggctcctg gtaccaacag 120
 caccaggca aagccccaa actcatgatt tattctaata gtattcggcc ctccagggtt 180
 tctaactcgt tctctggctc caagtctggc aacacggcct ccctgacat ctctgggctc 240
 caggctgagg acgaggctga ttattactgc agctcatatg atccccgggg caacctctg 300
 atcagggtgt tcggcggagg gaccaagctg accgtcctag gtcagcccaa ggctgcccc 360
 tcggtcactc tgttcccc ctctctgag gagcttcaag ccaacaagc cacactggtg 420
 tgttcataa gtgacttcta cccgggagcc gtgacagtgg cttggaaagc agatagcagc 480

 cccgtcaagg cgggagtgga gaccaccaca ccctcaaac aaagcaacaa caagtacgcg 540
 gccagcagct atctgagcct gacgcctgag cagtggaagt cccacagaag ctacagctgc 600
 caggtcacgc atgaaggag caccgtggag aagacagtgg cccctacaga atgttcataa 660
 <210> 83
 <211> 657
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Nucleic acid 2C11 VLCL2 CEA (AC27)
 <400> 83
 cagctgtgac tgacgcagcc gccctcagtg tctggggccc caggcagag ggtcaccatc 60
 tctgactg ggagcagctc caacatcggg tatgctgata aggtacactg gtaccagcag 120

 cttccaggaa cagccccaa actcctcatc tataataata gcatcggcc ctccagggtc 180
 cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
 caggctgagg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg atggctaaa catgctgact 300
 gctgtgttcg gcggagggac caagctgacc gtcttagtgc agcccaagc tgccccctcg 360

gtcactctgt tccgcctc ctctgaggag cttcaagcca acaaggccac actggtgtgt 420
 ctcataagtg acttctaccc gggagccgtg acagtggctt ggaaagcaga tagcagcccc 480
 gtcaaggcgg gagtggagac caccacacc tccaacaaa gcaacaaca gtacgcggcc 540

agcagctatc tgagcctgac gcctgagcag tggaagtccc acagaagcta cagctgccag 600
 gtcacgatg aaggagcac cgtggagaag acagtggccc ctacagaatg ttcataa 657

<210> 84

<211> 657

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid C11 VLCL2 CEA (AC28)

<400> 84

aattttatgc tgactcagcc ccactctgtg tcggagtctc cggggaagac ggtaaccatc 60
 tcctgcacc gcagcagtg cagcatcaat gatattacgg tgcatgtgta ccagcagcgc 120
 ccgggcagtt cccccacc tgtgatctat gggataaac cgagaccctc tggggtcct 180
 gatcggttct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctcctcac catctctgga 240

ctgaagactg aggacgagc tgactactac tgtcagtcct gggatgggca tggttctgcg 300
 tatgtgttcg gggagggac caagetgacc gtcttaggtc agcccaagc tgccccctcg 360
 gtcactctgt tccgcctc ctctgaggag cttcaagcca acaaggccac actggtgtgt 420
 ctcataagtg acttctaccc gggagccgtg acagtggctt ggaaagcaga tagcagcccc 480
 gtcaaggcgg gagtggagac caccacacc tccaacaaa gcaacaaca gtacgcggcc 540
 agcagctatc tgagcctgac gcctgagcag tggaagtccc acagaagcta cagctgccag 600
 gtcacgatg aaggagcac cgtggagaag acagtggccc ctacagaatg ttcataa 657

<210> 85

<211> 660

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid 2B5 VLCL2 CEA (AC29)

<400> 85

cagtctgcc tgactcagc tcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60
 tcctgcactg gaaccagcag tgacgttgag ttacgaatg gtgtctctg gtaccaacag 120
 caccaggca aagccccaa actcatgatt tatggtttta gtagtcggcc ctcaggggtt 180
 tctaatcgt tctctggctc caagtctggc aacacggcct ccctgacat ctctggctc 240

caggctgagg acgaggctga ttattactgc agctcatatg atccccctg gcacctgctg 300
gctaggggtg tggcgagg gaccaagctg accgtcctag gtcagcccaa ggctgcccc 360

tcggtcactc tgttcccgcc ctctctgag gagcttcaag ccaacaaggc cacactggtg 420
tgtctcataa gtgacttcta cccgggagcc gtgacagtgg cttggaaagc agatagcagc 480
cccgtaagg cgggagtgga gaccaccaca ccctccaaac aaagcaaca caagtacgcg 540
gccagcagct atctgagcct gacgcctgag cagtggaagt cccacagaag ctacagctgc 600
caggtcacgc atgaaggagg caccgtggag aagacagtgg ccctacaga atgttcataa 660

<210> 86
<211> 2109
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 86

atggagtctc cctcggcccc tccccacaga tggatcatcc cctggcagag gctcctgctc 60

acagctcac tttaacctt ctggaacecg cccaccactg ccaagctcac tattgaatec 120
acgccgttca atgtcgaga ggggaaggag gtgcttctac ttgtccaaa tctgccccag 180
catctttttg gctacagctg gtacaaaggt gaaagagtgg atggcaaccg tcaaattata 240
ggataigtat taggaactca acaagctacc ccagggcccc catacagtgg tcgagagata 300
atatacccca atgcatcctt gctgatccag aacatcatcc agaatgacac aggattctac 360
accctacag tcataaagtc agatcttgat aatgaagaag caactggcca gttccgggta 420
taccgggagc tgccaagcc ctccatctcc agcaacaact ccaaacccgt ggaggacaag 480

gatgctgtgg cttcacctg tgaacctgag actcaggacg caacctacct gtggtgggta 540
aacaatcaga gctccccgt cagteccagg ctgcagctgt ccaatggcaa caggaccctc 600
actctattca atgtcacaag aatgacaca gcaagctaca aatgtgaaac ccagaacca 660
gtgagtcca ggcgcagtga ttcagtcac ctgaatgtcc tctatggccc ggatgcccc 720
accatttccc ctctaaacac atcttacaga tcaggggaaa atctgaacct ctctgccac 780
gcagcctcta acccacctgc acagtactct tggtttgtca atgggacttt ccagcaatcc 840
accgaagagc tctttatccc caacatcact gtgaataata gtggatccta tacgtgcca 900

gccataact cagacactgg cctcaatagg accacagtca cgacatcac agtctatgca 960
gagccacca aacccttcat caccagcaac aactccaacc ccgtggagga tgaggatgct 1020
gtagccttaa cctgtgaacc tgagattcag aacacaacct acctgtggtg ggtaaataat 1080
cagagcctcc cggtcagtcc caggctgcag ctgtccaatg acaacaggac cctcactcta 1140

ctcagtgta caaggaatga tgtaggaccc tatgagtggt gaatccagaa caaattaagt 1200
 gttgaccaca ggcaccagc catcctgaat gtctctatg gccagacga cccaccatt 1260
 tccccctcat acacctatta ccgtccagggt gtagaacctca gcctctcctg ccattgcagcc 1320

tctaaccac ctgcacagta ttcttggctg attgatggga acatccagca acacacaaa 1380
 gagctcttta tctccaacat cactgagaag aacagcggac tctatactg ccaggccaat 1440
 aactcagcca gtggccacag caggactaca gtcaagacaa tcacagtctc tgcggagctg 1500
 cccaagccct ccattctcag caacaactcc aaaccctggg aggacaagga tgctgtggcc 1560
 ttacactgtg aactcagcgc tcagaacaca acctacctgt ggtgggtaaa tggtcagagc 1620
 ctcccagta gtcaccagct gcagctgtcc aatggcaaca ggaccctcac tctattcaat 1680
 gtcacaagaa atgacgcaag agcctatgta tgtggaatcc agaactcagt gtagtcaaac 1740

cgcagtgacc cagtcaccct ggatgtctc tatgggcccgg acaccccat catttcccc 1800
 ccagactcgt cttacccttc gggagcgaac ctcaacctct cctgccactc gcctctaac 1860
 ccattccccg agtattcttg gcgtatcaat gggataccgc agcaacacac acaagttctc 1920
 tttatcgcca aaatcacgcc aaataataac gggacctatg cctgttttgt ctctaacttg 1980
 gctactggcc gcaataattc catagtcaag agcatcacag tctctgcac tggaaactct 2040
 cctggctctc cagctggggc cactgtcggc atcatgattg gtagtctggt tggggttct 2100
 ctgatataa 2109

<210> 87

<211> 702

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

Met Glu Ser Pro Ser Ala Pro Pro His Arg Trp Cys Ile Pro Trp Gln

1 5 10 15

Arg Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr

20 25 30

Thr Ala Lys Leu Thr Ile Glu Ser Thr Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly

35 40 45

Lys Glu Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln His Leu Phe Gly

50 55 60

Tyr Ser Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Ile

Glu Pro Pro Lys Pro Phe Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu
 325 330 335
 Asp Glu Asp Ala Val Ala Leu Thr Cys Glu Pro Glu Ile Gln Asn Thr
 340 345 350
 Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg
 355 360 365
 Leu Gln Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr
 370 375 380
 Arg Asn Asp Val Gly Pro Tyr Glu Cys Gly Ile Gln Asn Lys Leu Ser
 385 390 395 400
 Val Asp His Ser Asp Pro Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp
 405 410 415
 Asp Pro Thr Ile Ser Pro Ser Tyr Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Val Asn
 420 425 430
 Leu Ser Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser
 435 440 445
 Trp Leu Ile Asp Gly Asn Ile Gln Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Ile
 450 455 460
 Ser Asn Ile Thr Glu Lys Asn Ser Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala Asn
 465 470 475 480
 Asn Ser Ala Ser Gly His Ser Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Thr Val
 485 490 495
 Ser Ala Glu Leu Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro
 500 505 510
 Val Glu Asp Lys Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Ala Gln
 515 520 525
 Asn Thr Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser
 530 535 540
 Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn
 545 550 555 560
 Val Thr Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Cys Gly Ile Gln Asn Ser

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 89

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MAB CEA1 VL

<400> 89

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

 35 40 45
 Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn
 85 90 95
 Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

 100 105 110

<210> 90

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MAB CD3 VH

<400> 90

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 91

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MAB CD3 VL

<400> 91

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

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

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

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

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

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

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

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

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

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

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

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285

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

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

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

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

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 370 375 380
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 385 390 395 400
 Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 405 410 415
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 420 425 430
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 435 440 445
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 450 455 460
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 465 470 475 480
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 485 490 495
 Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 500 505 510
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr
 515 520 525
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 530 535 540
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 545 550 555 560
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 565 570 575
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 580 585 590
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 595 600 605
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro

610

<210> 95

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA VL-CL(RK)

<400> 95

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Gly Glu Ser Val Asp Ile Phe

 20 25 30

Gly Val Gly Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

 100 105 110

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

 115 120 125

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

 130 135 140

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

145 150 155 160

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

 165 170 175

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

 180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 96
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LC CD3 CH2527 Cross Fab VL-CH1
 <400> 96
 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 145 150 155 160
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 165 170 175

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

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

Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210

<210> 97

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEA CH1A10 VH CH1 FC Hole P329G LALA

<400> 97

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

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

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

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

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val

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

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

 275 280 285
 Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 290 295 300
 Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met
 305 310 315 320
 Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His
 325 330 335
 Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln

 340 345 350
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val
 355 360 365
 Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 370 375 380
 Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln

385 390 395 400
 Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val

 405 410 415
 Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
 420 425 430
 Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 435 440 445
 Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 450 455 460
 Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu

 465 470 475 480
 Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 485 490 495
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 500 505 510
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 515 520 525
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn

 530 535 540
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 545 550 555 560
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly
 565 570 575
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 580 585 590
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn

 595 600 605
 Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 610 615 620
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 625 630 635 640

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 645 650 655
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 660 665 670
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 675 680 685
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 690
 <210> 99
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LC CEA 2F1 84
 <400> 99
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95
 Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser

145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 100

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VK_SM3E

<400> 100

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> 101

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH_SM3E

<400>

101

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> 102

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL_MEDI

<400> 102

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

1 5 10 15

Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Arg Gly Ile Asn Val Gly Ala

 20 25 30

Tyr Ser Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr

 35 40 45

Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser Gly Val
 50 55 60

Ser Ser Arg Phe Ser Ala Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile
 65 70 75 80

Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Met Ile Trp His Ser Gly Ala Ser Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 100 105 110

Leu Thr Val Leu
 115

<210> 103

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> VH_MEDI

<400> 103

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Gly Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 104

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VK_SAR

<400> 104

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 Glu Asn Ile Phe Ser Tyr

 20 25 30

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

 35 40 45

Tyr Asn Thr Arg Thr 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 His His Tyr Gly Thr Pro Phe

 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

 100 105

<210> 105

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH_SAR

<400> 105

Glu Val Gln Leu Val 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 Val Phe Ser Ser Tyr

 20 25 30

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

 35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ile 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 Ala His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 106

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VK_CH1A1A

<400> 106

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

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

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

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

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

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

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 107

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH_CH1A1A

<400> 107

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 108

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VK_T84.66

<400> 108

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Gly Glu Ser Val Asp Ile Phe

20 25 30

Gly Val Gly Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

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

<210> 109

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH_T84.66

<400> 109

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

1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Val Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 110

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VK_LABETUZUMAB

<400> 110

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

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

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

Tyr Trp Thr Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Leu Tyr Arg Ser
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 111

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH_LABETUZUMAB

<400> 111

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Asp Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ile His Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe

65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Ser Leu Tyr Phe Gly Phe Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 112

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA 1B2 (AC39) CDRL1

<400> 112

Ser Gly Ser Ser Ser Glu Ile Thr Ala Ser Gly Val Ser

1 5 10

<210> 113

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA 1B2 (AC39) CDRL2

<400> 113

Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 114

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA 1B2 (AC39) CDRL3

<400> 114

Gly Thr Trp Asp Phe Pro Pro Ser Arg Phe Val

1 5 10

<210> 115

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mab CEA 1B2 (AC39) VLCL2

<400> 115

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 Glu Ile Thr Ala Ser

 20 25 30

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

 35 40 45

Ile Tyr Asp Asn 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 Pro Pro

 85 90 95

Ser Arg Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln

 100 105 110

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

 115 120 125

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

 130 135 140

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

145 150 155 160

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

 165 170 175

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

 180 185 190

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

195	200	205	
Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser			
210	215		
<210> 116			
<211> 651			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Mab CEA 1B2 (AC39) VLCL2, nucleic acid			
<400> 116			
cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc			60
tcctgctctg gaagcagctc cgagattact gcgtctggtg tatcctggta ccagcagctc			120
ccaggaacag cccccaaact cctcatttat gacaataata agcgaccctc agggattcct			180
gaccgattct ctggctccaa gtctggcagc tcagccacc tgggcatcac cggactccag			240
actggggagc aggccgatta ttactgcgga acatgggatt tcccgcgctc caggttcgtg			300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggtcagccca aggctgcccc ctcggtcact			360
ctgttcccgc cctcctctga ggagcttcaa gccacaagg ccacactggt gtgtctcata			420
agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg gcttggaaag cagatagcag ccccgtcaag			480
gcgggagtgg agaccaccac accctccaaa caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc			540
tatctgagcc tgacgcctga gcagtggaag tcccacagaa gctacagctg ccaggtcagc			600
catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg gccctacag aatgttcata a			651